

117078
-03

보안 과제 (), 일반 과제 (O) / 공개(O), 비공개(), 발간등록번호(O)

고부가가치식품기술개발사업 2019년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-002976-01

신규 식품원료 개발 및 안전성 평가
강황잎의 소재화 및 안전성 평가를 통한
소재화 및 안전성 평가를 통한

강황잎의 소재화 및 안전성 평가를 통한 신규 식품원료 개발 및 산업화 최종보고서

2020. 01. 31.

2019

주관연구기관 / (주)한불화농
협동연구기관 / 한국식품연구원
협동연구기관 / 진도울금 주식회사

농 립 축 산 식 품 부
(전문기관) 농림식품기술기획평가원

농림식품기술기획평가원
농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “강황잎의 소재화 및 안전성 평가를 통한 신규 식품원료 개발 및 산업화”
(개발기간 : 2017. 11. 01. ~ 2019. 10. 31.) 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2020. 01. 31.

주관연구기관명	: (주)한불화농	최유흥	(인)
협동연구기관명	: 한국식품연구원	박동준	(인)
협동연구기관명	: 진도올금 주식회사	하주형	(인)

주관연구책임자 : 이 석

협동연구책임자 : 이상훈

협동연구책임자 : 하주형

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의
합니다.

〈 보고서 요약서 〉

과제고유번호	117078-03	해 당 단 계 연 구 기 간	2017. 11. 01 ~ 2019. 10. 31	단 계 구 분	(2차년도) / (2차년도)
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	고부가가치식품기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세 부 과 제 명	강황잎의 소재화 및 안전성 평가를 통한 신규 식품원료 개발 및 산업화			
연구책임자	이 석	해당단계 참여연구원 수	총: 11명 내부: 4명 외부: 7명	해당단계 연구개발비	정부: 320,000 천원 민간: 110,000 천원 계: 430,000 천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 11명 내부: 4명 외부: 7명	총 연구개발비	정부: 560,000 천원 민간: 190,000 천원 계: 750,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	(주)한불화농 한국식품연구원 진도올금 주식회사			참여기업명	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	
-------------------------	--

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호	4	4	1								1

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

보고서 면수

요약 (연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)

1. 원물 확보부터 수확, 세척, 건조, 추출 공정까지의 모든 공정을 확립하고, 사업성을 검토하였으며, 반응표면분석법(RSM, Response Surface Methodology)을 이용한 원물의 최적 추출조건을 확립하고, 추출물의 안전성을 확보하였다.
2. 10 Brix 강황잎 열수 추출물을 등재 소재로 결정 후, 한시적 식품소재 등재 요건에 필요한 모든 기초자료 및 독성시험 결과를 확보하였다.
3. 강황잎 추출물을 다양한 가공 식품에 적용한 다음, 품질 특성분석을 통하여 제품화 가능성을 확인하였고, 식품소재로서의 활용성 증대를 위한 액상 등의 제형 제조방법을 확립하였다.
4. GC-MS 및 E-nose 분석을 통해 강황잎 추출물의 이화학적 특성을 확인하였고, 강황잎 추출물을 이용한 가공 제품의 기호도 평가, FGI(Focus Group Interview)를 통해 관능적 특성 및 마케팅 전략 수립에 필요한 기초 자료를 확보하였다.
5. 강황잎 추출물의 항산화, 항염증 및 장 건강 효능 평가를 위한 연구를 수행하여 학술논문 게재 및 학술발표 실적을 달성하였다.
6. 강황잎 추출물의 대량생산(1톤) 과정을 통해 대량생산 공정을 확립하였고, 지표성분 설정 및 품질관리를 위한 분석조건을 확립하였다.
7. 제조원가 계산 및 경제성 분석을 통하여 제품의 가격을 책정하였고, 2회의 홍보전시를 수행하였다. 또한 산업화를 위한 유통망, 비즈니스 모델, 마케팅 전략을 수립하였다.

114

< 요약 문 >

연구의 목적 및 내용	<p>1. 연구의 목표</p> <p>미활용 부산물인 강황잎을 식품원료로서 안전성을 인정받고, 강황잎의 소재화를 통한 새로운 고부가가치 천연식품소재의 개발 및 산업화</p> <p>2. 연구의 내용</p> <p>1) 주관연구기관 : (주)한불화농</p> <p>(1) 강황잎의 유효성분 추출방법 확립 및 잔류농약 분석, 독성시험</p> <ul style="list-style-type: none">- 강황잎 세척 및 건조 방법 설정 실험- HPLC를 이용한 강황잎의 잔류농약 분석 실험 및 기준 항목 설정- 건조된 강황잎을 이용한 추출공정 확립- 강황잎의 독성 및 안전성 시험 (공인인증기관 의뢰) <p>(2) 독성시험 및 유효성분이 함유된 강황잎을 이용한 제형 실험</p> <ul style="list-style-type: none">- 각종 향신료 및 식품으로의 건조된 강황잎 적용 실험- 강황잎 추출물을 이용한 식품 제형 개발- 기존의 강황잎 추출방법과 개발된 강황잎 추출방법의 특성 비교 및 표준화- 강황잎의 독성 및 안전성 시험 및 식품의약품안전처의 “식품 등의 한시적 기준 및 규격 인정 기준”에 따른 신청서 작성 <p>(3) 강황잎 추출물 대량생산 공정 및 제품 개발</p> <ul style="list-style-type: none">- 공장 규모의 대량생산을 위한 scale-up 연구- pilot plant 생산을 통한 음료, 푸딩 등의 시제품 개발- 산업화를 위한 홍보 실시 및 마케팅 전략 수립 <p>2) 협동연구기관 1 : 한국식품연구원</p> <p>(1) 강황잎 소재 표준화 및 품질관리를 위한 분석조건 확립</p> <ul style="list-style-type: none">- 강황잎 추출물의 일반성분 분석 및 지표성분 설정- 강황잎 추출물의 품질지표 및 규격 설정- LC-MS/MS 또는 GC-MS/MS를 활용한 지표성분 분석조건 및 전처리 방법 확립- LC-QTOF를 이용한 강황잎 소재의 기능성 성분 분석 및 항산화능 평가- 잔류농약 및 중금속 분석, 세포 실험을 통한 강황잎 추출물의 독성 평가
----------------	---

	<p>(2) 강황잎 소재의 특성 분석 및 저장 안정성 평가</p> <ul style="list-style-type: none"> - 강황잎 소재의 이화학적 특성 및 향미성분 분석 - PCA 분석법을 통한 강황잎 소재의 향미특성 및 기호도 평가 - 강황잎 소재의 제형에 따른 저장 안정성 평가 <p>(3) 강황잎 소재 기호도 평가 및 품질 개선</p> <ul style="list-style-type: none"> - 강황잎 소재의 기호도 결정인자 도출을 위한 전문가 대상 심층면접 - 소비자 조사를 위한 설문 조사표 설계 - 강황잎 소재를 이용한 시제품(음료, 푸딩 등)의 관능적 특성 및 기호도 분석 - 강황잎 소재를 이용한 시제품(음료, 푸딩 등)의 객관적 품질지표를 기반으로 한 제품 개선방안 도출 <p>3) 협동연구기관 2 : 농업법인 진도올금 주식회사</p> <p>(1) 강황잎 수확 및 전처리 가공기술 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> - 세척 방법(기계식, 침지식)에 따른 세척 공정 확립 - 강황잎 활용을 위한 수확 후 보관 및 유통 방안 확보 <p>(2) 강황잎 수확 및 전처리 가공기술 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> - 강황잎 건조공정 확립 - 강황잎 식품 소재화를 위한 건조 및 분말 제형 개발 <p>(3) 강황잎 소재 시제품 개발 및 대량가공 기술 확립</p> <ul style="list-style-type: none"> - 강황잎 분말화 가공기술 적용을 통한 식품소재 시제품 개발 - 대량생산 공정 확립 및 표준화
<p>연구개발성과</p>	<p>1. 핵심 성과</p> <p>1) 사업화 지표 : 특허출원 4건 (특허등록 진행 중), 제품화 2건, 품종등록 1건</p> <p>2) 연구기반 지표 : 학술논문 SCI급 2편, KCI급 2편 게재, 학술발표 2건, 홍보전시 2건</p> <p>2. 전략 성과</p> <p>1) 국내 미활용 농업 부산물의 고부가가치 활용 기술 개발 완료</p> <p>2) 강황잎 추출물의 한시적 식품소재 등재를 위한 독성시험 완료</p> <p>3) 잔류농약, 중금속, 미생물 검사 및 독성시험을 통한 강황잎 추출물의</p>

	식품원료 인정 진행 중 4) 강황잎의 산업화를 위한 가공기술 및 유효성분 추출기술 개발 완료 5) 강황잎 식품소재 개발을 위한 소재의 표준화 및 공정 확립 완료 6) 강황잎 추출물의 우수성 확보를 위한 생리기능성 자료 확보 완료				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	1. 기술적 측면 1) 현재 부산물로 폐기되고 있는 강황잎의 안전성 확보 및 이를 활용하기 위한 소재의 표준화 및 생산기술 확보 가능 2) 강황잎의 잔류농약, 중금속, 미생물 검사 등 식품공전에 따른 시험법의 기준 마련 가능 3) 강황잎 추출물이 첨가된 새로운 식품첨가물 및 제품개발 기술 확보 가능 4) 강황잎 추출방법에 관한 공정, 강황잎 추출물이 첨가된 새로운 제품들에 대한 기술 선점 및 특허권 취득 가능 5) 향후 기능성 효과에 대한 검증 연구를 통해 기능성 식품으로서 활용 가능 2. 경제적·산업적 측면 1) 강황잎 추출물을 첨가한 새로운 식품첨가물을 개발하여 국내시장 뿐만 아니라 해외 시장으로의 수출 경쟁력 확보 가능 2) 강황잎 추출물이 첨가된 다양한 품목을 개발함으로써 기존에 강황작물만 취급하던 농가에 강황잎을 이용한 2차 소득창출 방안 제시 가능				
국문핵심어 (5개 이내)	강황잎	식품첨가물	식품원료등재	농업부산물	독성시험
영문핵심어 (5개 이내)	Curcuma longa L. leaf	Food additive	Food ingredient recognition	Agriculture byproduct	Animal toxicity test

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	8
2. 연구수행 내용 및 결과	26
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	109
4. 연구결과의 활용 계획 등	112
붙임. 참고 문헌	113

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발의 목적

1) 최종 목표

(1) 미활용 부산물인 강황잎을 식품원료로서 안전성을 인정받고, 강황잎의 소재화를 통한 새로운 고부가가치 천연식품소재의 개발 및 산업화

- ① 강황잎 추출방법의 최적 추출조건 확립
- ② 강황잎 소재 표준화 및 제품 생산기술 개발
- ③ 강황잎 추출물을 이용한 시제품 개발
- ④ 잔류농약, 중금속, 미생물 검사 및 독성시험을 통한 강황잎 추출물의 식품원료 규격 인정

2) 세부 목표

(1) 주요 기능

- ① 식품원료 인정, 식품첨가물, 향미특성 등 우수성 확보

(2) 주요 기술

- ① 잔류농약, 중금속, 미생물 검사 및 독성시험을 통한 기준을 마련하여 식품소재로서의 안전성 확보
- ② 강황잎의 산업화를 위한 가공기술 및 유효성분 추출기술 (수증기 증류, 열수, 용제 추출)
- ③ 강황잎 식품소재 개발

(3) 적용 분야

- ① 숙취해소 음료, 푸딩, 카레 분말용 첨가물, 천연 향미제, 식품첨가물



그림 1. 미활용 부산물인 강황잎의 신규 식품소재 개발 및 등재

1-2. 연구개발의 필요성

- 1) 강황(*Turmeric, Curcuma longa* L.)은 생강목(Zingiberales), 생강과(Zingiberaceae)에 속하는 다년생 식물로서, 인도를 중심으로 한 아열대 지역에서 주로 재배되며, 한방에서는 뿌리줄기를 삶거나 찌서 말린 것을 강황(薑黃)으로, 덩이뿌리를 찌서 말린 것을 울금(鬱金)으로 사용하고 있다. (그림 2).



그림 2. 강황 및 강황잎

- 2) 강황은 우수한 해독작용이 있어 예로부터 염증치료용 약용식물로서 사용되어 왔으며, 강황의 주요성분인 커큐민(curcumin)은 폴리페놀 성분의 노란색 향신료로서, 항산화, 항염증, 항암, 치매 예방, 간 보호 효과 등 여러 가지 우수한 효능이 알려져 있어 식품원료로서의 관심이 지속적으로 증가하고 있다.
- 3) 통계청 자료(표 1)에 따르면, 강황의 국내 생산량은 전국적으로 2014년도에 약 487 톤, 2015년도에 1,804 톤으로, 약 3.8배 증가하였으며, 강황잎은 재배면적 300 평당 30~40 톤 정도 발생되는 것으로 보고되고 있다.

표 1. 지역별 강황 생산량 (2014~2015년도)

지 역	2014년				2015년			
	재배면적 (ha)	수확면적 (ha)	단수 (kg/10a)	생산량 (톤)	재배면적 (ha)	수확면적 (ha)	단수 (kg/10a)	생산량 (톤)
부산광역시	0.23	0.23	900.43	2.08	0.23	0.23	898.29	2.08
인천광역시	1.4	1.4	1,000	14	-	-	-	-
광주광역시	3	3	43.3	1.3	-	-	-	-
대전광역시	0.1	0.1	2,100	2.1	-	-	-	-
경기도	1.8	1.8	786.08	14.15	2.21	2.02	790.42	15.97
충청북도	-	-	-	-	0.4	0.4	600	2.4
전라북도	5.62	2.71	1,268.6	34.43	4.8	1.87	1,364.54	25.52
전라남도	62.3	49.61	786.79	390.33	207.25	158.4	1,089.03	1,725.01
경상북도	0.36	0.36	391.42	1.41	0.06	0.06	1,666.67	1
경상남도	1.9	1.9	1,257.52	23.84	1.94	1.94	1,371.45	26.65
제주도	1.3	1.3	268.31	3.49	2	2	267.6	5.35
총 생산량 (톤)				487.13				1,803.98

- 4) 전라북도 농업기술원의 보고에 따르면, 현재 강황 재배 시에 부산물로 버려지는 강황잎은 원물

무게 기준으로 200~300 톤이며, 이는 강황 작물 생산량과 거의 비슷한 양에 달하는 수준이다. 즉, 전국적인 강황 생산량을 고려했을 때, 2015년도에 강황잎도 약 1,800 톤 정도 발생한 것으로 산출되고 있다.

- 5) 강황의 주 재배지역은 전라북도, 전라남도, 광주광역시로, 2013년 전국 재배면적은 51 ha이며, 지속적으로 생산량이 증가하고 있는 추세이다. 강황의 뿌리줄기와 덩이뿌리는 일반적으로 약용으로 사용하고 있으나, 약용부위를 채취한 후 150 cm 이상 자라는 잎과 지하부 부산물은 이용되지 못하고 버려지고 있는 실정이다.
- 6) 강황의 부산물인 강황잎, 줄기 등을 활용하기 위한 다양한 연구가 진행되었고, 최근 강황잎 추출물로부터 기능성 향장소재를 개발하거나 모기퇴치제 원료로 사용하기 위한 연구가 진행되었다. 하지만, 강황잎이 식품원료로 등재되어 있지 않아 향산화, 항 당뇨, 간 보호 등 다양한 생리기능성이 알려져 있음에도 식품소재로서 활용이 불가능한 상태이다.
- 7) 국내 농업부산물의 연간 발생량은 약 891만 톤으로 추정되고 있으며, 볏짚, 보리짚, 왕겨, 과수 부산물 등이 주를 이루고 있다. (농림축산식품부, 2014). 이들 대부분 활용되지 못하고 있으나, 최근 바이오매스, 신소재 등 새로운 고부가가치 자원으로 활용하기 위한 다양한 연구가 활발히 진행되고 있다.
- 8) 주요 농산물 중 하나인 옥수수의 경우, 현재 식품과 에너지, 산업소재, 제약원료 등에 이용되고 있다. 옥수수를 재배한 후 옥수수잎, 옥수수수염 등이 부산물로 발생되는데, 2004년에 엔들핀 F&B에서는 옥수수수염에 함유된 약리성분을 이용하여 음료 및 티백을 개발하였다.
- 9) 현재 광동제약은 음료 부문에서 옥수수수염차를 주요 품목으로 판매하고 있다. 2016년도 3분기 기준으로 음료 부문의 매출액이 2,567억 원에 달하였고, 이는 전체 매출의 32.4%에 해당하는 수치이다. 이처럼 상당히 높은 수준의 매출은 옥수수의 부산물인 옥수수수염의 효능을 검증하고, 이를 식품원료로 사용한 결과이다.
- 10) 2011년도에 농촌진흥청에서는 옥수수수염으로부터 높은 함량의 메이신을 얻을 수 있는 최적의 추출방법을 밝혀냈다. 이처럼 옥수수의 부산물인 옥수수수염에 대한 끊임없는 연구개발을 통해 기능성 성분의 함량을 높일 수 있는 새로운 추출방법을 개발하였고, 이러한 움직임은 유효성분이 고농도로 함유된 옥수수수염 추출물을 이용한 제품 개발의 기초자료가 될 것이다.
- 11) 본 연구개발 과제를 통해 강황 재배 후에 발생하는 부산물인 강황잎을 옥수수수염과 같이 고부가가치를 지닌 새로운 식품원료 및 식품첨가물 소재로 개발하고자 한다.
- 12) 강황잎의 경우, 일본에서는 분말형태의 향신료로 제조하여 카레의 풍미를 증진시키는 목적으로 사용하고 있으며, 필리핀과 말레이시아에서는 오일 등을 추출하여 식용으로 사용하고 있다. 그러나 우리나라의 경우, 강황잎의 섭취 안전성에 대한 연구보고가 없고, 식용근거자료도 없어서 식품원료로서 사용이 불가능한 상태이다.

- 13) 현재 식품의약품안전처에서는 「식품의 기준 및 규격」에 의거하여 식품원료로서의 판단기준을 제시하고 있으며, 독성이나 부작용이 없고, 식욕억제, 약리효과 등을 목적으로 섭취한 것 이외에 국내에서 식품으로서 섭취한 근거를 기준으로 안전성과 건전성이 확인된 것에 한하여 인정하고 있다.
- 14) 강황잎을 「식품 등의 한시적 기준 및 규격인정 기준」(식품의약품안전처 고시 제2016-27호)에 따라 해당 원료의 안전성을 입증할 수 있는 자료를 제시하여 식품원료로서 사용가능하다고 인정받게 된다면, 현재 부산물로 버려지는 강황잎을 식품원료 또는 향후 기능성 식품 소재로도 활용할 수 있게 된다. 이는 곧 농가의 소득 증대와 농산물 유래 기능성 식품 시장의 활성화에 크게 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

1-3. 연구개발의 중요성

1) 기술적 중요성

- (1) 최근 우리나라는 전반적인 생활수준의 향상으로, 식생활에서 건강기능성과 새로운 식품소재에 대한 관심이 점차 높아지고 있다. 이에 따라 천연재료에 대한 관심이 증대되고 있으며, 천연 추출물이 첨가된 건강기능성 제품이 활발히 개발되어 출시되고 있다.
- (2) 최근 식품의약품안전처에서도 새로운 식품소재에 대한 사회적 요구를 반영하여 미래 대체 식량으로 벼메뚜기, 백강잠누에, 누에번데기, 갈색거저리유충, 쌍별귀뚜라미, 흰점박이꽃무지유충, 장수풍뎅이유충 등 총 7종의 곤충을 식품소재로 인정하였다.
- (3) 2015년 건강기능성 식품 개별인정형 원료 매출액 현황에 따르면, 전체 총 매출액은 3,149억 원이고, 그 중 당귀추출물(714억 원), 백수오 등의 복합추출물(380억 원), 황기추출물(266억 원), 헛개나무과병추출분말(255억 원)이 상위 4개 원료로서 활용되고 있다. 이러한 현황을 통해 건강기능성 식품에 천연 추출물이 많이 사용되고 있음을 알 수 있으며, 이들을 첨가한 제품이 지속적으로 출시되고 있기 때문에 새로운 천연 추출물에 대한 필요성이 대두되고 있다.
- (4) 미국 사우스캐롤라이나대학 연구팀의 보고에 따르면, 염증유발 지수가 가장 낮으면서 항염증 효과가 큰 식품은 강황인 것으로 나타났다. (표 2). 또한, 대학통합기능의학연구회에서는 커큐민 중 PPAR 성분은 염증을 일으키는 매개인자를 차단하기 때문에 강황 중 커큐민 성분이 염증을 억제하는 약의 주성분으로 쓰이고 있다고 보고하였다. 위 연구내용 외에도 강황의 주성분인 커큐민에 대해서는 지난 20여 년 동안 7,000 편에 달하는 연구논문을 통해 항산화, 항염, 항미생물 등의 효과가 있다고 밝혀졌다. 이처럼 강황에 대한 관심으로 강황의 열매부분뿐만 아니라 뿌리줄기에 있는 생리활성물질에 대한 연구도 활발히 진행되고 있다.

표 2. 항염증 효과가 높은 식품과 영양성분

식품 및 영양성분	항염증 효과 지표
강황	-0.785
식이섬유	-0.663
녹차/홍차	-0.536
생강	-0.453
비타민C	-0.424
마늘	-0.412
양파	-0.301

* 마이너스 점수가 높을수록 항염증 효과가 큼

- (5) 다른 식물들의 부위별 추출물에 대한 연구보고(Lee et al., 2016)에 따르면, 모링가의 뿌리, 잎, 줄기를 각각 추출한 추출물에서 총 플라보노이드 함량이 잎(14.78 mg/g)에서 가장 높았으며, 줄기(1.36 mg/g)와 뿌리(1.14 mg/g) 순으로 높게 나타났다. 또한, 인삼의 주요 식용부위인 뿌리보다 인삼 잎이나 열매 등 인삼 지상부에서 더 많은 사포닌이 함유되어 있어(Choi et al., 2009; Kim et al., 2013a, 2014a), 이에 관한 연구가 많이 진행되고 있다. 이처럼 모링가와 인삼 잎에서 유효성분이 가장 높은 농도로 검출된 것으로 보아, 강황 또한 열매, 줄기, 뿌리에서 검출되는 생리활성물질이 잎에서도 다량 함유되어 있을 것으로 기대된다.
- (6) 현재까지 강황의 줄기나 뿌리는 제한적으로 식용하고 있으나, 강황잎의 경우에는 강황잎을 이용한 염료, 향장소재, 아토피 치료제에 대한 연구까지만 진행되어 있고, 식용가능 여부를 검증하거나 식품소재로서의 가치를 연구한 보고는 없다. 따라서 강황잎은 대부분 활용되지 못해 폐기되고 있고, (주)한불화농은 진도군청과의 MOU 체결을 통해 강황 재배 시 부산물로 버려지는 강황잎을 공급받고, 한국식품연구원과의 협동연구를 통해 고부가가치 천연식품소재를 개발함으로써 농가의 소득창출에 기여하고자 한다.



그림 3. (주)한불화농과 진도군청과의 MOU 체결

2) 경제적·산업적 중요성

- (1) 트랜스페어런시 마켓 리서치社(Transparency Market Research)의 ‘글로벌 감초 추출물 마켓: 2017~2025년 글로벌 업계 분석, 규모, 시장점유율, 성장, 트렌트 및 전망’ 보고서에 따르면, 2016년 17억 달러의 규모를 형성한 감초 추출물 시장이 오는 2025년이면 23억 9,390만 달러로

확대될 것으로 전망했다.

- (2) 감초 추출물은 다양한 산업분야에서 감미료 용도로 사용되고 있을 뿐만 아니라 항염증, 항균, 항바이러스, 간 보호 등 여러 가지 건강기능성을 내포해 빈도 높게 사용되고 있다.
- (3) 대표적인 천연 추출물 중 하나인 감초 추출물의 시장 확대 및 영향력을 통해 강황잎 추출물의 성장가능성을 기대할 수 있다.
- (4) 본 연구개발 과제를 통해 개발할 강황잎 추출물도 유효성분 분석과 독성시험을 통해 안전성을 검증함으로써 천연식품소재로서의 가능성을 인정받아 식품뿐만이 아닌 다양한 산업분야에서 사용될 수 있도록 한다면, 국내를 넘어 세계시장에서도 천연식품소재로서 감초 추출물과 같이 높은 가치를 받을 가능성이 있다고 기대된다.
- (5) IMS 헬스 보고에 따르면, 2013년 기준 세계 천연물의약품 시장 규모는 약 25조 원으로 연 평균 약 10%씩 성장하고 있으며, 국내 시장 규모도 약 5,000억 원에 달한다고 한다. 강황잎의 독성시험을 통해 안전성을 검증하고, 유효성분이 고농도로 함유될 수 있도록 하는 추출기술을 개발한다면, 천연식품소재뿐만 아니라 천연물의약품소재로서도 적용이 가능할 것으로 기대된다.

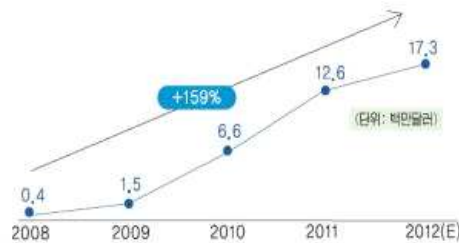


그림 4. 미국에서의 천연물의약품 판매 현황

- (6) 서귀포 소방서가 발표한 ‘최근 5년간 화재발생 현황’자료에 따르면, 2016년에 발생한 전체 화재 97건 중 농업관련 화재가 24건(24.7%)이었고, 이 중 17건이 과수원에서 농업부산물 소각 부주의로 인한 것으로 나타났다. 이처럼 전국적으로 농업지역에서의 화재 원인으로 농업부산물 소각이 주요 원인으로 꼽혔으며, 막대한 재산피해를 일으키고 있다. (그림 5). 또한 이러한 화재는 농가뿐만 아니라 산불로 이어질 수 있으므로 지역경제에도 큰 영향을 줄 수 있다.

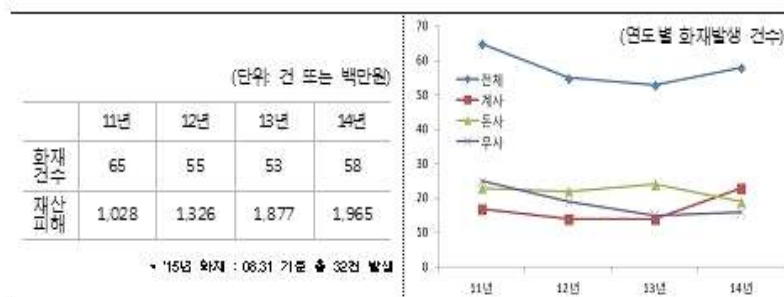


그림 5. 최근 4년(2011~2014년)동안의 축사시설 화재 통계

- (7) 부산물로 소각되어 폐기되는 강황잎을 소재화하고, 이를 이용하여 고부가가치 창출을 이루고자 하며, 강황잎을 소각하는 과정에서 발생할 수 있는 화재 또는 농가 피해를 줄여 경제적으로 이익을 줄 수 있다. 또한 강황잎 추출물이 새로운 식품소재, 고부가가치 소재로 발돋움하여 농가에 2차적인 소득창출이 가능하도록 기여할 수 있다.
- (8) 강황잎 분말 또는 추출물을 이용하여 다양한 식품군으로 개발이 가능함. 옥수수수염과 같이 차 형태로서 우려먹을 수 있고, 카레에 첨가하는 향신료, 음료 및 디저트에 식품향료로서도 사용이 가능하다.
- (9) 옥수수수염 차의 경우, 2014년도 3분기에 매출 1위를 달성하였으며, 매출액은 약 484억에 달하였다. (그림 6). 옥수수수염 차를 판매하고 있는 광동제약의 2016년 3분기 음료 매출액에 2,567억 원이었던 것을 고려한다면, 강황잎 차 또한 큰 성장가능성을 가지고 있다고 보인다.

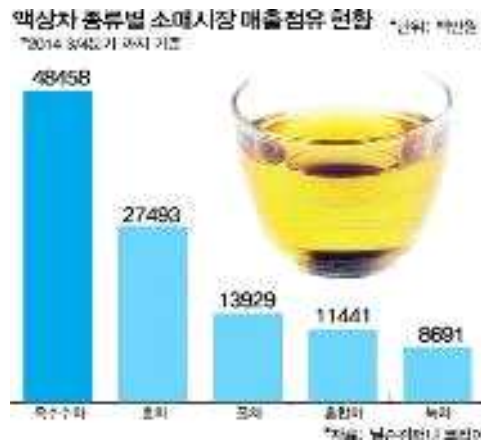


그림 6. 액상차 종류별 소매시장 매출점유 현황

- (10) 외식업체 '파파이스'에서도 허브가 함유된 닭 가슴살 요리 '러브 미 텐더' 메뉴가 전체 매출의 8%를 차지한다. 허브는 비타민과 미네랄이 풍부하게 함유되어 있고, 육류나 생선의 냄새를 없애주며, 독특한 향기로 식욕을 자극해 소화, 흡수를 돕는다고 한다. 강황잎 분말 또는 추출물에서도 육류의 누린내를 없애줄 수 있는 향이 존재하며, 이를 이취 제거와 향신료로서 사용한다면, 기존의 허브 분말 또는 추출물 제품 시장에서 새로운 제품으로서 가능성이 있다고 기대된다.



그림 7. 허브 분말 또는 추출물이 첨가된 시중 제품

1.4. 연구개발 대상의 국내·국외 현황

1) 국내 기술 수준 및 시장 현황

(1) 기술 현황

- ① 현재 시중에 사용되고 있는 천연물 분말 또는 추출물은 각각 분무건조(spray drying) 또는 동결건조(freeze drying), 열수 추출 또는 용제 추출 방법을 통하여 제조되고 있다. (표 3).

표 3. 천연물 분말 및 추출물 제조 방법

천연물	
분말 제품	추출물
분무 건조, 동결 건조	열수 추출, 용제 추출

- ② 강황 분말 또는 추출물도 다른 천연물을 이용한 공정과 동일하게 제조되고 있으며, 생리활성이 우수한 강황 유래 천연물 소재를 활용하기 위해서는 천연물 소재에 대한 활성 탐색과 생물자원의 특징을 고려한 제조 공정 검토가 필요하다.
- ③ 강황잎의 경우, 향장소재 및 방향제 원료로 사용하기 위한 다양한 추출방법 및 활용방안에 대한 연구는 이루어졌지만, 우수한 생리활성에 비하여 식품원료로서 활용이 불가하여 이와 관련된 응용사례 및 제품개발은 이루어지지 않고 있는 실정이다.
- ④ 강황잎에 적용할 수 있는 추출법에는 초고압, 열수, 용제(에탄올 등), 초음파 추출 등이 보고된 적이 있다. 강황잎 추출물은 연고 치료제 또는 화장품 조성물로서 연구된 적이 있으나, 식품에 적용 가능한 제형 및 제조기술에 대한 연구 보고는 없다.
- ⑤ 다양한 제품군에 사용하기 위해서 강황잎 추출물 중의 유효성분이 고농도로 함유될 수 있도록 하는 추출기술 확립과 액상이나 분말 등 강황잎 추출물의 제제·제형기술 확립이 요구된다.

(2) 시장 현황

- ① (주)인스팜에서 2013년 발효 울금을 이용하여 간 건강 개별인정형을 획득하여 건강기능식품을 개발해 제품을 출시하였다.
- ② 강황(울금)의 주성분인 커큐민에 대한 관심이 증가하면서 이를 주원료로 하는 제품들의 매출이 급증하는 등 각종 건강기능식품의 원료로서 각광받기 시작했다. 강황 분말 또는 추출물은 화장품과 식품에 첨가되고 있으며, 특히 건강기능식품인 숙취해소용 음료나 캔디, 차 음료에 사용되고 있다. (그림 8, 그림 9).



그림 8. 강황을 이용한 기능성 식품 및 화장품



그림 9. 강황 분말 또는 추출물이 첨가된 식품

- ③ 한독약품에서 출시한 숙취해소제 ‘레디큐’는 강황의 주성분인 커큐민과 테라큐민이라는 새로운 성분을 이용하여 망고 및 열대과일의 맛으로 차별화한 제품이다. 이는 2016년 누적판매 800만 병을 돌파하였고, 국내 시장뿐만 아니라 해외 시장까지 수출되며 매출 상승 중이다.
- ④ (주)글로벌인베스트는 ‘강황 플러스’라는 제품을 출시하였는데, 이 제품은 음식이나 음료의 맛과 향에 영향을 주지 않아 부담 없이 첨가하여 함께 섭취 가능하며, 육류나 어류 요리 시에 물과 희석하여 숙성시키면 비린내 제거용으로도 사용할 수 있다. 이는 강황의 주요 성분인 커큐민의 초미세가공기술과 고도의 코팅기술을 접목시켜 기존 강황 성분의 체내 흡수율을 증대시키고 맛과 향을 제거하여 부담 없이 섭취할 수 있도록 제조하였다.
- ⑤ 현재 강황의 주요한 유효성분이 체내에 쉽게 흡수될 수 있도록 가공하고, 특유의 쓴맛과 향을 제거하여 섭취할 수 있도록 한 다양한 제품들이 출시되고 있으나, 강황잎을 이용한 제품은 아직 출시된 적이 없다. 따라서 본 연구개발 과제를 통해 강황잎의 유효성분 검증과 독성시험을 수행하여 안전성을 확보한다면, 국내 및 국외 시장에서의 강황 관련 제품군이 더욱 다양해져 매출 상승으로 이어질 것으로 보인다.
- ⑥ 선행연구를 통해 강황잎 추출물에서도 약리성분이 검출되었고, 따라서 강황잎 추출물이 건강기능성 식품 소재로서 적용이 가능할 것으로 보인다. 국내 건강기능식품 시장 규모는 2014년 약 2조 52억 원이었으며, 2015년에는 약 2조 3,291억 원으로 16.2%가 증가하였으며, 2011년 이후 지속적인 성장세를 나타내고 있다. (그림 10). 최근 5년간 건강기능식품 생산액의 평균 성장률(7.4%)은 국내 제조업의 국내총생산 성장률(2.3%)보다 약 3.2배 높은 수준이다.



그림 10. 국내 건강기능식품 생산 실적 및 시장 규모 (2011~2015년)
(출처: 건강기능식품 생산 실적 보도자료, 식품의약품안전처, 2016)

표 4. 2015년도 개별인정형 품목별 매출 현황

구 분	매출액 (억원)		
	총 매출액	내수용	수출용
당귀혼합 추출물	714.0	662.5	51.5
강황 추출물	31.7	31.7	-

- ⑦ 국내 강황잎에서 얻은 추출물은 현재 향장소재, 여드름 개선용 화장품, 아토피 연고제에 적용되고 있을 뿐 식품으로 활용하기 위한 연구는 전무하다.
- ⑧ 예비실험을 통해 강황잎에서도 여러 가지 생리활성물질이 분석되었고, 연구개발 과제를 진행하면서 독성시험을 수행하여 안전성을 확인함으로써 식용이 가능하다는 것을 입증한다면, 새로운 건강기능식품 소재로서 활용할 수 있을 것으로 보인다.

(3) 경쟁기관 현황

- ① 강황잎 추출물을 사용하는 경쟁기관은 없는 것으로 조사되었고, 현재 시중에 판매되고 있는 강황 추출물은 상위 4개의 업체가 아래와 같이 조사되었다. (표 5).
- ② 강황잎 추출물을 이용한 연구보고로는 강원대학교에서 추출공정에 대한 것이 3건 발표되었고, 특허는 세바바이오텍에서 2건, 전라북도 농업기술원에서 3건 발표하였다. 그러나 연구 보고내용은 초고압 추출공정에 따른 피부면역 및 항산화 활성 증진 효과 비교, 추출법에 따른 향장 활성 비교에 대한 것으로, 기존 연구 보고들은 기능성 효과 검증이나 피부면역 효과에 대한 내용으로 그쳤다. 또한, 특허도 식품소재가 아닌 화장품과 치료제에 국한되어 있는 실정이다.

(4) 지식재산권 현황

- ① 국내에서 강황(울금)을 이용한 특허 건수는 800~900건이며, 논문 건수는 100~200건이었다. 그러나 강황잎에 대한 특허와 논문 건수는 각각 5건, 3건으로 나타났다. 이처럼 강황에 대한 연구는 잎과 꽃 부분보다는 대부분 뿌리줄기에 국한되어 있는 것으로 보인다. (그림 11, 그림 12).

- 1 [한국특허] **강황잎 함유 항균생리작용 제조회법**

한국특허 (등록) 출원인 : 한국특허출원기관 (출원번호 : 10-2014-0116641) (2014-11-20) 공개번호 : 10-2014-08340
 575-0019-04-151 IPC : C11D-003/48.A61K-006/91
강황 잎 추출물 함유 피부용 조성물 및 그 제조방법은 상처나 또는 입체적인 건을 형성하고 **강황 잎 추출물** 함유 피부용
 조성물이다.
 초록 : [원문](#) [대표도면](#)
- 2 [한국특허] **강황 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 아토피 피부염 개선용 화장료 조성물**

한국특허 (공개) 출원인 : 주식회사 세라미도케어 (세라미도케어) (출원번호 : 10-2014-0094375) (2014-07-25) (공
 개번호 : 10-2014-0112670) (2014-02-19) IPC : A61K-006/91.A61Q-07/30
 본 발명은 **강황 잎 추출물**을 함유하는 화장료 조성물이다. 본 발명에 따른 **강황 잎 추출물**의 제조방법은 **강황**의 분말을 300-800 RPM의 ... 3-10Hz
 동안 교반 건조하는 단계 및 교반 건조는 **강황 잎 추출물**의 순유율을 증가시켜 달성한다. 40-45°C...
 초록 : [원문](#)
- 3 [한국특허] **강황 잎 추출물을 함유하는 여드름 개선용 화장료 조성물**

한국특허 (공개) 출원인 : 주식회사 세라미도케어 (세라미도케어) (출원번호 : 10-2014-0123785) (2014-11-10) (공
 개번호 : 10-2015-0057914) (2015-09-24) IPC : A61K-006/91.A61Q-07/30
 본 발명은 **강황 잎 추출물**을 함유하는 여드름 개선용 화장료 조성물이다. 본 발명의 **강황 잎 추출물**은 여드름을 개선하
 는 단계 (1)인 단계가 이루어지고, 화장료 조성물 (2)은 여드름을 개선한다.
 초록 : [원문](#)
- 4 [한국특허] **강황 잎 추출물을 함유하는 화장품 조성물 및 그 제조방법**

한국특허 (등록) 출원인 : 한국특허출원기관 (출원번호 : 10-2014-0020100) (2014-02-18) (등록번호 : 10-1425874-0000)
 014-00-251 IPC : A61K-006/91.A61Q-01/90
 본 발명은 **강황 잎 추출물**을 함유하는 화장료 조성물 및 그 제조방법에 관한 ... 순상사기 건조시켜
 여드름을 효과적으로 제거하기 **강황**를 함유한 유분용질의 추출물과 GABA를 유추하고 **강황**
 초록 : [원문](#) [대표도면](#)
- 5 [한국특허] **강황 잎을 함유한 기능성 액체제를 제조방법**

한국특허 (등록) 출원인 : 한국특허출원기관 (출원번호 : 10-2011-0090713) (2011-09-01) (등록번호 : 10-1220430)
 000 (2013-01-29) IPC : D06F-001/34
강황 잎 추출물을 함유한 액체제의 제조방법은 본 발명의 액체제에 **강황 잎 추출물**을 함유한 액체 ... 유성으로 되어, 본
 발명에 의하면, 당분말 (MS)는 **강황 잎**으로부터 액체를 추출한다. 본 발명의 특징은...
 초록 : [원문](#)

그림 11. 강황잎에 대한 특허 검색결과



그림 12. 강황잎에 대한 특허 검색결과

② 강황잎에 대한 특허와 논문 검색결과, 피부면역 활성이나 추출공정에 의한 생리활성 물질의 효능을 검증하는 것 외에 강황잎을 식품소재로서 제제화하거나 그 효능을 검증하는 등의 연구가 거의 이루어지지 않았으며, 식품으로서의 활용도 불가능한 상황이다. 따라서 본 연구개발 과제를 통해 강황잎의 식용 가능성을 검증하고, 새로운 천연식품소재로 개발하여 제품화하는 연구개발은 충분히 타당성과 차별성이 있다고 판단되며, 농가 소득 증대에도 기여할 수 있을 것으로 생각된다.

(5) 표준화 현황

① 강황잎의 국외 섭취근거는 다수 있으나, 국내 섭취근거는 없는 상황이며, 식품의약품안전처의 '식품의 기준 및 규격'상 안전성이 입증되어 있지 않기 때문에 향후 식품원료 가능여부를 검토 받을 수 있다.

2) 국외 기술 수준 및 시장 현황

(1) 기술 현황

- ① 국외에서는 강황잎 추출물에 대한 연구 보고가 1997년도부터 있었으며, 최근까지도 강황잎을 이용한 연구 보고가 발표되고 있다. (그림 13). 그러나 강황잎 추출물의 각 성분이 나타내는 특정 효능에 대해서는 보고된 적이 있지만, 실제 식품에 첨가했을 때 나타나는 효능에 대한 연구는 많이 이루어지지 않았다.

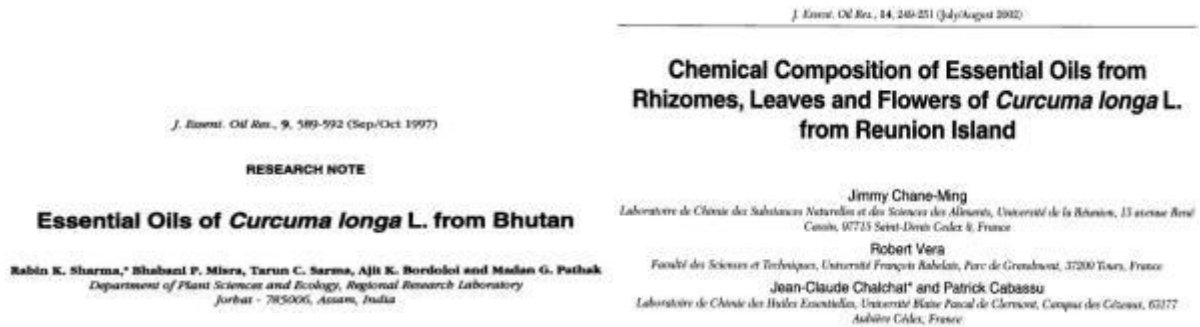


그림 13. 강황잎 관련 해외논문

- ② 강황잎 추출물 제조 시 이용되는 주요 추출방법에는 초임계유체 추출법, Pressurized Liquid Extraction (PLE), Steam Distillation (SD) 방법이 있다. 그러나 산업화하는 데 있어 높은 경제적 비용이 필요하다는 단점이 있으며, 해외 연구에서도 추출기술 및 추출물의 유효성분 검증에만 그치고 있다. 따라서 산업화를 위한 효율적인 추출공정 확립이 필요할 것으로 보인다.

(2) 시장 현황

- ① 국내에서는 강황잎을 섭취할 수 있는 식품으로 허가하지 않았지만, 말레이시아, 필리핀, 인도 등의 동아시아 지역에서는 강황잎이나 그 추출물을 식품의 풍미증진 및 건강기능성을 목적으로 첨가하여 제품으로 판매하고 있다. (그림 14).



그림 14. 인도에서 판매하고 있는 강황잎 추출물 제품

- ② 필리핀 식품의약품안전처에서는 강황잎을 식품소재로 허가하였고, Palaya Corporation에서 식품첨가용 강황잎 오일을 판매하고 있다. (그림 15).



그림 15. 필리핀 식품의약품안전처에서 인정한 강황잎 추출물 제품

- ③ 일본에서는 국내 시장의 2.5배, 일본 숙취해소 시장에서는 80%에 달하는 제품에 강황이 사용되고 있으며 (그림 16), 강황잎 차에 대한 특허가 있다. (그림 17). 강황잎을 건조하여 분쇄한 후, 티백에 넣어 우려먹는 방식으로 섭취한다. 또한, 민간에서는 계란말이의 풍미를 높이기 위해 강황잎을 첨가하기도 한다.



그림 16. 숙취해소용 일본 우콘 제품

【상품명】	우콘분말
【발명자】	【氏名】内藤 忠彦
【발명】	【課題】ウコン葉の採収時期を見極め、ウコンを育成しながら一番良い状態を、見計らってウコン葉を採取し、ウコン葉茶として可能になり、これは一時的でなく、ウコンを植えつけ、育成の時期で採集し、加工したウコン葉茶に關したものである。 【解決手段】ウコン葉をタイミング良く採取し、速やかに葉と茎の部分を切り離してまきみ、天日干しや乾燥による完全乾燥をして完成する。
【出願人】	【書類番号】5992055036 【氏名又は名称】内藤 忠彦
【出願日】	平成11年06月22日(1999. 6. 2)
【代理人】	
【公開番号】	特開2000-342230(P2000-342230A)
【公開日】	平成12年12月12日(2000. 12. 12)
【出願番号】	特願平11-190514

그림 17. 강황잎 차 관련 특허

- ④ 일본에서는 강황잎을 입욕제로 사용하기도 한다. (그림 18). 최근 아로마 테라피에 대한 관심이 높아지면서 특유의 향을 지닌 강황잎을 이용하는 사례가 증가하고 있다.

葉の利用法

ウコンの葉は一般的に、入浴時に利用するのがよいとされています。ウコンの葉を使った薬浴です。体が温まり湯冷めもしにくく、疲労回復やリラックスに効きます。

収穫した葉を洗って乾かし、手ぬぐいなどの布を半分に折って袋にして、10センチほどの長さに切ったウコンの葉を、その中に半分くらいまで入れて、お湯の中に入れます。色が出たらお湯からお湯から出して入浴します。

葉の量によっても違いますが、これで3回くらいは使えます。

粉砕した葉で作られた入浴用の商品もありますので、ウコンが手に入らない人はこういったものを利用するとよいでしょう。

그림 18. 강황잎 이용사례

- ⑤ 2015년에 보고한 그랜드 뷰 리서치(Grand View Research)의 ‘글로벌 커큐민 산업적 응용·지역별 전망’에 따르면, 글로벌 커큐민 마켓이 오는 2022년에 이르면 9,430만 달러 (한화기준 약 1,100억 원) 규모에 도달할 것으로 전망했다.
- ⑥ 글로벌 커큐민 시장에서 최대의 시장점유율을 차지하고 있는 업계는 제약업계로, 전체의 50% 이상을 차지하고 있는 것으로 분석되었으며, 식품분야에서도 천연염료 및 향신료를 찾는 수요가 늘어나면서 커큐민에 대한 관심이 증가하고 있다. (그림 19).

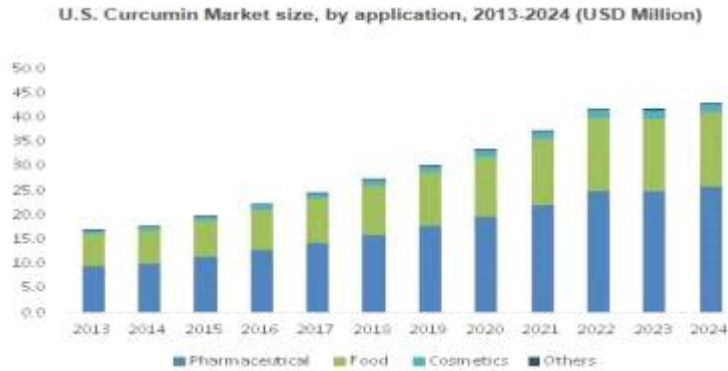


그림 19. 미국 내 커큐민 시장 규모

- ⑦ 본 연구개발 과제를 통해 강황잎 추출물의 식품소재로서의 안전성이 검증되고, 유효성분이 고농도로 추출될 수 있도록 하는 추출기술에 대한 특허권을 취득한다면, 국내 시장뿐만 아니라 해외 시장에서도 가시적인 성과를 기대해볼 수 있다.

1-5. 연구개발의 범위

1) 1차 연도

(1) 개발 목표

- ① 주관연구기관 [(주)한불화농] : 강황잎 중 유효성분의 최적 추출방법 확립 및 식품원료 등재를 위한 독성시험, 강황잎 추출물을 이용한 시제품 개발
- ② 협동연구기관 (한국식품연구원) : 강황잎 소재 표준화 및 품질관리 조건 확립
- ③ 협동연구기관 (농업법인 진도올금 주식회사) : 강황잎 전처리 및 가공 기술 확립

(2) 개발 내용 및 범위

① 주관연구기관 [(주)한불화농]

ㄱ. 강황잎 건조방법 설정 실험

- 수분함량에 따른 GC-MS 또는 HPLC를 이용한 유효성분의 농도 분석
- 유효성분이 고농도로 검출되는 적정 수분함량 값 설정
- 실험을 통해 얻은 수분함량 값에 도달하기까지의 자연건조 또는 열풍건조 공정의 효율적인 조건 확립 (온도, 습도 조건을 변수로 설정)

ㄴ. 건조된 강황잎을 이용한 추출공정 설정

- 물을 이용한 추출방법(상온, 중온, 스팀 증류 추출)의 유효성분 함량 분석 (시간, 온도 변수)
- 용제를 이용한 추출방법(에탄올 단독 사용)의 최적조건 확립 (시간, 온도 변수)
- 물 및 용제의 혼합용제를 이용한 추출방법에서 물과 에탄올의 비율(3:7, 5:5, 7:3)에 따른 유효성분의 농도 확인 (시간, 온도 변수)
- 병합처리(고압-초음파, 중온-초음파 추출 등)에 따른 유효성분의 농도 확인
- 단독 추출 및 병합 추출 처리 간의 유효성분의 농도 비교 검증
- 각 추출법에서 유효성분이 높게 함유될 수 있고, 가장 효율적이면서 산업화가 가능한 최적 추출 공정 확립
- 식품원료로서 등재시킬 최종제형(액상 또는 분말) 선정

ㄷ. 강황잎 추출물의 독성시험을 통한 안전성 확인 (공인인증기관 ChemOn, 1~2차년도)

- 설치류 단회 투여 독성시험 (암수 각 5마리, 7주)
- 설치류 2주 투여 DRF 시험 (암수 각 5마리, 6주)
- 비설치류 단회 투여 독성시험 (암수 각 2마리, 12주)
- 유전독성시험 : 복귀 돌연변이 (대장균 1군, 살모넬라균 4군)
- 유전독성시험 : 염색체 이상 시험 (햄스터 폐 세포, 9주)
- 유전독성시험 : 소핵시험 (암수 각 6마리, 9주)

ㄹ. 강황잎 추출물을 이용한 식품용 제제화 (액상 또는 분말 제제)

- 식품첨가용 강황잎 추출물의 액상제제와 분말제제 개발

- 액상제제에 덱스트린 등을 첨가한 후, 분무건조를 통한 분말제제 제조방법 개발
- 분무건조기의 온도, 회전속도 등을 변수로 한 분말제제 개발 및 유효성분 분석
- 개발된 제제에 대한 품질분석 및 기준 검증 : 납, 비소, 미생물 기준 등
- 대량생산 규모로 생산되는 액상제제와 분말제제의 품질비교 및 검증

ㄱ. 강황잎 추출물을 이용한 식품군 적용 실험

- 개발된 제제를 식품에 첨가하여 화학적, 물리적, 기능적, 관능적 특성의 변화를 관찰하여 적정 첨가 농도 결정 (범위 : 0.1~0.5%)
- 저장온도(4℃, 25℃)에 따른 식품분석(미생물 안전성 검사, 조직감 분석)을 통해 품질변화 관찰 (기존 유통기한 및 품질유지기한 비교)
- 시제품을 개발하여 소비자 패널을 대상으로 한 선호도 및 9점척도법을 이용한 관능평가 진행

② 협동연구기관 (한국식품연구원)

ㄱ. 강황잎 소재 표준화

- 강황잎 추출물의 일반성분 및 폴리페놀, 플라보노이드 등의 기능성 성분의 함량 분석
- GC-MS를 이용한 지표성분(Turmerone 등) 설정 및 추출공정별 함량 분석
- 강황잎 추출물의 품질지표 설정 및 제형별 규격 설정
- LC-MS/MS 또는 GC-MS/MS를 활용한 지표성분 분석조건 및 전처리 방법 확립
- 강황잎 소재의 잔류농약, 중금속 분석 및 세포독성시험
- 강황잎 소재의 항산화 효과(DPPH radical, ABTS radical 등)
- LC-QTOF 분석을 통한 강황잎 소재 기능성 성분 분석

③ 협동연구기관 (농업법인 진도울금 주식회사)

ㄱ. 강황잎 수확 및 전처리 가공기술 개발

- 지역 농가의 협조를 통한 강황잎 수확 작업
- 세척 방법(기계식, 침지식)에 따른 세척공정 확립
- 세척된 원물을 주관연구기관에 공급하는 데 있어 전처리 가공방법 및 품질기준 모색 : 유통 중 발생할 수 있는 품질 문제를 최소화할 수 있는 방안

2) 2차 연도

(1) 개발 목표

- ① 주관연구기관 [(주)한불화농] : 강황잎 추출물 대량생산 공정 및 기술 확립을 통한 제품개발
- ② 협동연구기관 (한국식품연구원) : 강황잎 소재의 특성 분석 및 안정성 평가와 강황잎 소재의 기호도 평가 및 품질개선
- ③ 협동연구기관 (농업법인 진도울금 주식회사) : 강황잎 대량가공기술 및 제품판매

(2) 개발 내용 및 범위

① 주관연구기관 [(주)한불화농]

ㄱ. 공장 규모의 생산을 위한 scale-up 연구

- 불밀을 활용한 홀분말화 조건(시간, 속도 변수)을 설정하여 건조된 강황잎을 이용한 식품소재 생산공정 확립
- 공장 규모의 강황잎 세척공정 조건(물의 온도, 물 사용량, 세척횟수 변수) 설정, 강황잎 건조 공정 조건(건조물의 양, 온도, 시간, 통풍량 변수) 설정
- 공장용 분쇄기의 sieve 크기(40 mesh, 10 mesh)에 따라 분말을 제조하고, 입도 크기 균질화 및 위생적인 품질관리를 위한 관리방법 모색
- 생산된 분말 제품의 살균방법(고압멸균처리, 열처리, 중온 열처리, 비열처리) 확립 및 살균처리에 따른 품질변화 관찰
- 강황잎 추출물을 실제 식품이나 음료 공정 중에 첨가하여 품질 안정성 (저장 중 미생물 실험 등) 및 관능(색, 맛, 향) 평가

ㄴ. pilot plant 생산을 통한 시제품 개발

- 회사 내 식향팀 및 AP(Application) Lab과의 협업을 통해 강황잎 추출물이 제제화된 음료, 푸딩 등의 시제품 개발
- 전문 패널들을 대상으로 한 시식을 통해 관능평가 진행
- 생산 표준화에 따른 제조원가 및 경제성 분석

ㄷ. pilot plant 생산으로 생산된 시제품의 저장 중 품질변화 분석

- 강황잎 추출물을 첨가한 시제품의 품질지표 설정을 위한 온도(4°C, 25°C), pH에 따른 저장실험 진행
- 저장실험 중 관능평가(맛, 향), 색도(CIE Lab) 측정, 산도 측정, 미생물(식중독 미생물) 검사 진행

ㄹ. 산업화를 위한 홍보 및 마케팅 전략 수립

- (주)한불화농의 식품향료를 취급하는 주거래 업체에 강황잎 오일 또는 추출물이 첨가된 식품을 제안함으로써 홍보 가능
- 진도올금 주식회사와 진도올금 사업단의 협조를 통해 지역특화제품 개발 및 사업홍보 가능
- 생리활성물질이 함유된 기능성 향미소재 개발을 통한 국내 및 국외 시장에 판로 개척 가능

ㅁ. 강황잎 추출물 독성시험을 통한 안전성 확인 (공인인증기거나 ChemOn, 1~2차년도)

- 설치류 13주 반복 투여 독성시험 (암수 각각 10마리, 27주)
- 통계처리 및 보고서 작성
- 식품의약품안전처 기준(식품 등의 한시적 기준 및 규격인정 기준)에 따른 신청서 작성

② 협동연구기관 (한국식품연구원)

ㄱ. 강황잎 소재의 특성 분석 및 안정성 평가

- 강황잎 소재의 이화학적 특성 분석 및 추출조건별 특성 분석
- SPME GC-MS 분석을 통한 강황잎 소재의 향미성분 분석
- PCA 분석을 통한 강황잎 소재의 향미특성 분석 및 기호도 평가

- 강황잎 소재의 제형에 따른 저장 안정성(제형별 온도, 기간 등) 평가

ㄴ. 강황잎 소재의 기호도 평가 및 품질개선

- 강황잎 소재의 결정인자 도출을 위한 전문가 대상 심층면접
- 소비자 조사를 위한 설문조사표 설계
- 강황잎 소재의 시제품 관능적 특성 및 기호도 분석
- 강황잎 소재의 시제품 객관적 품질지표를 기반으로 한 제품 개선방안 도출

③ 협동연구기관 (농업법인 진도올금 주식회사)

ㄱ. 강황잎 전처리 공정 확립

- 주관연구기관에 원료공급을 위한 pilot 규모의 세척공정 및 건조공정 확립
- 주관연구기관 및 협동연구기관과의 협업을 통한 원료 품질기준 검증

ㄴ. 강황잎 추출물 제제를 이용한 제품기획 및 판매전략 모색

- 주관연구기관과의 협업을 통해 식품향료를 취급하는 주거래 업체에 강황잎 추출물이 첨가된 식품을 제안하는 판매전략 수립
- 주관연구기관과의 협업을 통해 강황잎 추출물을 이용한 음료, 푸딩 등의 신제품 개발기획

ㄷ. 강황잎 소재 제품개발 및 대량가공기술 확립

- 강황잎 분말화 가공기술 적용을 통한 식품소재 시제품 개발
- 대량생산공정 확립 및 표준화

ㄹ. 강황잎 추출물 제제를 이용한 제품판매 및 홍보

- 진도올금 사업단의 협조를 통해 지역특화제품을 판매 및 사업홍보 전략 모색 (지역특화제품 판매장, 언론 홍보 등)

2. 연구수행 내용 및 결과

2-1. 연구개발의 추진 전략 및 방법

1) 강황잎 소재 확보 및 가공공정 확립

- ① 진도올금 주식회사는 강황잎의 산업화를 위해 필수적이 소재 확보, 전처리, 유통에 필요한 기반기술 및 인프라를 마련하고, (주)한불화농과의 협업을 통해 식품소재로 활용할 수 있는 분말화 공정 기술 등을 확보한다.

2) 강황잎 추출물을 이용한 식품소재 생산기술 확립

- ① (주)한불화농은 강황잎을 이용한 건조 및 추출공정을 Lab scale로 개발하고, 본 회사에 있는 생산라인을 이용하여 scale-up 조건 및 공정을 확립한다.
- ② (주)한불화농은 Lab scale로 얻어낸 강황잎 추출물을 액상제제와 분말제제로 개발하여 첨가 농도의 기준(범위 0.1~0.5%)을 마련한다. 이 제제들을 이용하여 실제로 식품에 적용하여 그 효능과 관능적 특성을 연구하고, 동시에 외부기관에 독성시험을 의뢰하여 실제 강황잎 추출물의 독성 및 안전성 평가를 진행한다.

3) 강황잎 추출물의 표준화 및 기호도 평가

- ① 한국식품연구원은 강황잎 성분 분석을 통하여 지표성분 설정 및 품질관리를 위한 지표성분 분석법을 확립하고, 소재를 표준화하여 효능 검증 및 제품개발을 수행한다.
- ② 한국식품연구원은 식품원료 등재를 위한 식품공전 시험법에 근거한 시험법을 마련하고, 잔류농약, 중금속 분석을 통한 기준을 마련한다.
- ③ 강황잎 추출물의 향미성분 분석, 이화학적 특성 및 기호도 평가를 통하여 식품소재로서의 우수성을 입증하여 강황잎 추출물의 산업화 기반을 마련한다.

4) 강황잎 추출물이 첨가된 시제품 개발 및 시장 현황 조사

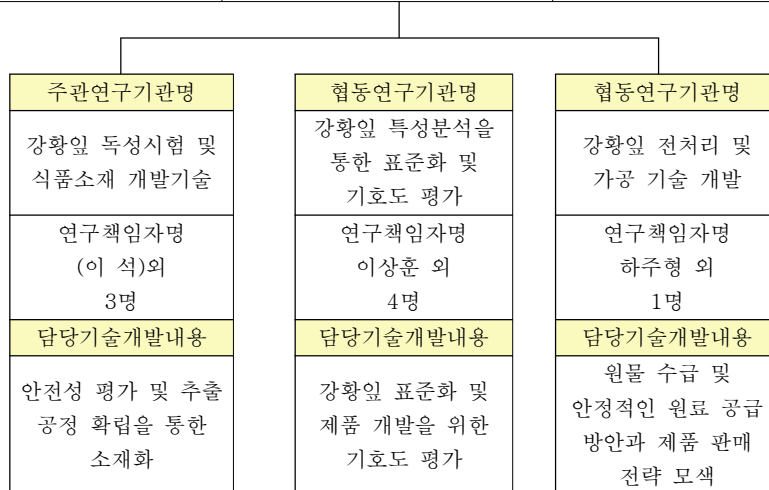
- ① (주)한불화농은 식품과 향장품에 대한 향료를 취급하는 회사로서의 장점을 살려 기존 주요 거래처를 방문함으로써 시장의 동향 및 판매경로를 파악한다.
- ② (주)한불화농은 시제품을 Lab scale로 제조하는 시설 및 기기를 보유하고 있으므로, 강황잎 분말 또는 추출물을 적용한 음료, 푸딩 등의 제품을 쉽게 제조하여 거래처에 제안 가능하다.
- ③ (주)한불화농은 강황잎의 천연 건강기능성 식품소재로서의 성장 가능성을 판단하고, 국내 및 국외 시장 동향을 파악하기 위해 관련 세미나, 학회, 박람회에 참석하여 자료를 확보한다.

2-2. 연구개발의 추진체계

1) 연구기관별 업무 및 추진체계

연구개발과제		총 참여 연구원
과제명	강황잎의 소재화 및 안전성 평가를 통한 신규 식품원료 개발 및 산업화	주관연구책임자 (이 석)외 총 11명

기관별 참여 현황		
구 분	연구기관수	참여연구원수
대 기 업		
중견기업		
중소기업	2	6
대 학		
국공립(연)		
출 연 (연)	1	5
기 타		



2-3. 연구개발의 추진일정

1차 연도																
일련 번호	연구내용	월별 추진 일정												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)	
		9	10	11	12	2018 1월	2	3	4	5	6	7	8			
1	강황잎 수확 및 세척, 가공 전처리 기술 개발														55,000	하주형 (진도올금)
2	강황잎 건조 방법 설정 실험														32,500	이 석 (한불화농)
3	건조된 강황잎을 이용한 추출 공정 설정														50,000	이 석 (한불화농)
4	강황잎 독성 및 안정성 실험														70,000	이 석 (한불화농)
5	강황잎 추출물의 지표성분 분석 및 표준화														47,500	이상훈 (한국식품연구원)
6	강황잎 추출물의 QC 분석 조건 확립														70,000	이상훈 (한국식품연구원)
2차 연도																
1	공장 규모 scale-up 적용 추출실험														65,000	이 석 (한불화농), 하주형 (진도올금)
2	강황잎 추출물 이용 식품 및 생리기능성 식품 제형 개발														30,000	이 석 (한불화농)
3	Pilot plant 생산을 통한 강황잎 추출물 조건별 강황잎 추출법 특성 비교 및 표준화														30,000	이 석 (한불화농),
4	Pilot plant 생산을 통한 강황잎 소재 시제품 개발 및 대량가공기술 확립														55,000	하주형 (진도올금)
5	강황잎 독성시험 및 보고서 작성														110,000	이 석 (한불화농)
6	강황잎 추출물 기호도 평가와 관능적 특성 분석 및 제품 개선														67,500	이상훈 (한국식품연구원)
7	산업화를 위한 홍보 및 마케팅 전략 수립														22,500	하주형 (진도올금)

2.4. 선행연구 내용 및 결과

1) 강황잎 추출물의 성분 분석

- ① 건조된 강황잎을 40% 에탄올을 이용하여 추출하고, 감압 농축하여 45 Brix의 추출물을 제조하였다.
- ② 얻어진 추출물(45 Brix)에 대해 간이 항산화능 실험(정성 실험)을 진행하였다. 실험방법은 0.2 mM DPPH 시약을 이용하였고, 적정량의 DPPH 시약에 추출물을 첨가하여 색의 변화(보라색 → 노란색)를 관찰하였다. 색의 변화가 소량(0.02~0.03 g) 첨가 시에도 관찰되어 추출물에 항산화 물질이 있을 것으로 판단하고, 사내 기기분석팀에 분석을 요청하였다.

2) 강황잎 오일의 성분 분석

- ① 강황잎에서 오일을 추출하여 GC-MS로 분석한 결과, 아래와 같은 여러 가지 종류의 생리활성 물질이 있었다. (표 6). 각 성분들을 조사한 결과, FEMA No. 또는 식품성분이었다. FEMA란 Flavor & Extract Manufacturer's Association의 약자로서 미국향료협회를 말하며, 각 분야의 전문가들이 과학적 기법 등을 통해 안정성을 평가하였다. FEMA No.를 부여받은 원료는 식품향료 제조에 사용될 수 있음을 나타낸다.

표 6. 강황잎 추출물의 성분 분석 결과

No.	Substance	FEMA No.	비고
1	alpha-Terpinolene	3046	
2	trans-Caryophyllene	2252	
3	trans-beta-Farnesene	2478	
4	alpha-Zingiberene	3124	
5	beta-Bisabolene	3331	
6	beta-Sesquiphellandrene		녹차 성분
7	Zingiberenol	3124	4번과 유사
8	Hexahydrofarnesyl acetone	1084	
9	Turmerone		Tumeric 주요 성분
10	ar-Turmerone		Tumeric 주요 성분
11	Phytol	4196	
12	Hexadecanoic acid	2832	palmitic acid

- ② 강황잎 추출물에서 분석된 여러 가지 물질들이 FEMA No.를 갖고 있음을 통해 강황잎 추출물이 식품향료로서 사용 가능함을 알 수 있었다. 또한, 식품향료에 사용가능하다는 점으로 미루어 보아 식품에 첨가도 가능할 것으로 기대된다.
- ③ 강황은 이미 숙취해소, 간 보호 등의 효능이 널리 알려져 있는데, 발효 울금의 경우에는 2013

년 개별인정형을 획득하였다. 강황잎의 경우에도 강황 추출물의 주요성분인 turmerone 이외에 다양한 생리활성성분들이 함유되어 있어 우수한 생리기능성을 가질 수 있을 것으로 기대된다.

- ④ 강황잎 추출물 성분들 중 α -Terpinolene는 모기퇴치 효과가 있는 산초나무의 향기성분 중 하나이고, trans-Caryophyllene은 정향(clove)의 증류추출액에서 추출되는 성분으로, 기존 모기기피제의 주요성분 중 하나이다. (Lim et al.)
- ⑤ Phytol은 항암 및 면역력 증강 효과 (Lee et al.), turmerone에는 항암 및 해독 효과 (Ferreira et al.), hexadecanoic acid에서는 항암 효과 (Aparna, Vasu davan et al.)가 있어 강황잎 추출물의 건강기능성 식품소재로서의 개발 가능성을 기대할 수 있다.

2-5. 연구 내용 및 결과

1) 강황잎 수확 및 전처리 가공기술 개발

- (1) 지역 농가의 협조를 통해 강황잎 수확 작업을 하고자 하였으나, 과제 시작시기(11월)가 이미 수확시기가 지난 후였기 때문에 기존에 수확해 두었던 원물을 건조하여 (주)한불화농에 제공하였다. (그림 20).



그림 20. 진도올금 주식회사에서 재배하는 강황잎(주)과 제공받은 원물(우)

- (2) 세척 방법(기계식, 침지식)에 따른 세척공정 확립을 위해 (주)한불화농과의 협동연구를 진행하였다. 진도올금 주식회사에서 갖추고 있는 설비와 (주)한불화농이 갖추고 있는 생산설비를 참고하여 실제로 산업화 가능한 방법을 최우선으로 고려하였다. (그림 21).



그림 21. 진도올금 주식회사에 있는 분쇄기(좌)와 농축기(우)

- (3) 진도올금 주식회사에서 생산하는 경우에는 건조된 강황잎을 세절한 후, 세척을 하는 공정을 거친다. 이 때 세척 후에 추출이 진행되므로, 추출탱크에 원물 무게 대비 20배의 물을 넣어 침지시킨 후에 배수하는 방법을 3회 반복하였다. 그 결과, 침지되는 흙먼지가 감소되는 것을 육안으로 확인할 수 있었다. (그림 22).

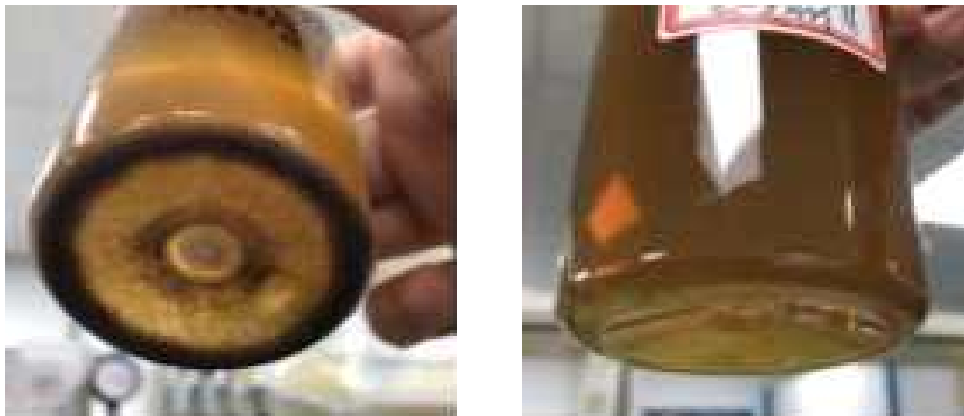


그림 22. 강황잎 1회 세척물(좌)와 3회 세척물(우)

- (4) 세척된 원물을 주관연구기관에 공급하는 데 있어 유통 중 발생할 수 있는 품질문제는 건조가 충분히 되지 않은 상태의 원물을 공급할 경우 주변환경(온도, 습도)에 따라 강황잎에 곰팡이가 발생할 수 있다는 것이다. 따라서 진도올금 주식회사에서 (주)한불화농으로 원물을 공급할 시에 수분함량이 3.0% 이내로 되도록 하고, 분말 형태로 제공하는 방법으로 하였다. 여름에는 품질문제의 발생률이 더욱 높을 수 있으므로, 필요에 따라 진도올금 주식회사에서 추출물까지 제조를 완료한 후에 반제품을 (주)한불화농에 제공하는 방안도 고려하였다.

2) 강황잎 소재의 일반성분, 중금속, 잔류농약 분석 및 병원성 미생물 검사

(1) 일반성분 분석

- ① 강황잎 분말의 일반성분은 AOAC 방법에 따라 분석하였다. 수분은 105℃ 건조법, 조단백은 micro-Kjeldahl법, 조지방은 soxhlet 추출법, 조회분은 550℃ 직접화법, 탄수화물은 100%에서 조단백, 조지방, 조회분을 뺀 값으로 나타내었다.

표 7. 강황잎 분말의 일반성분 분석 결과

시험 항목	기준 규격	분석 결과	판정
탄수화물 (g/100g)	-	77.8	-
조단백 (g/100g)	-	6.0	-
조지방 (g/100g)	-	0.5	-
회분 (g/100g)	-	9.4	-
수분 (g/100g)	-	6.3	-

(2) 중금속 분석

- ① 강황잎 분말 중 중금속 분석은 ICP-MS를 이용하여 측정하였다. 분석을 위해 측정하고자 하는 원소의 질량을 입력하고, 검량곡선을 작성한 후에 전처리를 한 시료용액을 주입하여 농도 값을 산출하였다. 중금속 중 납, 카드뮴, 비소, 수은, 구리, 크롬, 아연, 망간, 주석을 분석하여 아래와 같은 결과를 확인하였다. (표 7). 검사 결과, 카드뮴, 비소, 수은 등의 항목은 강황잎에서 검출되지 않았으나, 납이 0.44 mg/kg으로 기준치(0.2 mg/kg)를 2배 정도 초과 검출되어 향후 추출물 제조 시에 전처리 세척과정을 추가하여 보완하였다.

표 7. 강황잎 분말의 중금속 분석 결과

시험항목	분석 결과	단위	정량한계	시험방법
납 (Pb)	0.44	mg/kg	0.05	ICP-MS
카드뮴 (Cd)	불검출	mg/kg	0.05	ICP-MS
비소 (As)	불검출	mg/kg	0.05	ICP-MS
수은 (Hg)	불검출	mg/kg	0.05	ICP-MS
구리 (Cu)	4.79	mg/kg	0.05	ICP-MS
크롬 (Cr)	0.85	mg/kg	0.05	ICP-MS
주석 (Sn)	불검출	mg/kg	0.05	ICP-MS
망간 (Mn)	280	mg/kg	2.00	ICP-AES
아연 (Zn)	33.8	mg/kg	2.00	ICP-AES

(3) 잔류농약 분석

- ① 강황잎 분말 중 잔류농약 함량 분석은 ICP-MS를 이용하여 측정하였으며, 잔류농약 246종에

대하여 분석한 결과, 246종 전 항목 검출되지 않았다.



그림 23. 강황잎 분말의 잔류농약 분석 결과

(4) 병원성 미생물 검사

- ① 강황잎 분말 중 병원성 미생물 검사는 총세균, 대장균, 대장균군, 리스테리아 모노사이토제네스, 바실러스 세레우스, 살모넬라, 클로스트리디움 퍼프린젠스, 황색포도상구균을 대상으로 검사하였으며, 대장균과 대장균군은 음성으로 판정되었다.

표 8. 강황잎 분말의 병원성 미생물 검사 결과

시험 항목	기준 규격	검사 결과	판정
대장균	-	음성	-
대장균군	-	음성	-
총세균수 (g당)	-	320000	-
리스테리아 모노사이토제네스	-	음성	-
바실러스 세레우스	-	음성	-
살모넬라	-	음성	-
클로스트리디움 퍼프린젠스	-	음성	-
황색포도상구균	-	음성	-

3) 강황잎 건조방법 설정 및 추출공정 설정을 위한 예비실험

- (1) 진도울금 주식회사로부터 공급받은 강황잎 원물을 5~10 cm 크기로 세절한 후, 건조기를 이용하여 0.5%, 3.0%의 수분함량이 되도록 건조하였다. 건조된 원물을 mixer를 이용하여 60~80 mesh의 입자 크기로 분쇄하였다.



그림 24. 강황잎의 세절된 형태(좌)와 분쇄된 형태(우)

- (2) 각 수분함량을 갖춘 강황잎을 열수 추출(80℃, 3 h) 또는 30% 에탄올 추출(80℃, 3 h)을 통해 추출물을 얻었다. 이 추출물을 0.45 μm syringe filter를 이용하여 여과한 후, 이를 0.1%, 0.3%, 0.5%의 농도로 희석하여 DPPH 소거능을 관찰하였고, 이 결과를 통해 유효성분이 높게 검출되는 수분함량 값을 정하였다.
- (3) 50, 60, 80℃의 온도와 2, 4, 6, 12시간의 시간으로 변수를 잡고, 수분함량이 5.0%에 도달하는데 걸리는 열풍건조의 최적조건을 설정하였다.
- (4) 초음파 추출기를 이용하여 45, 50, 60℃에서 1, 1.5, 3시간 동안 물 추출을 진행하여 추출수율(%), 고형분 기준)을 관찰하였다.



그림 25. 초음파 추출 과정

- (5) 건조된 원물을 0, 10, 30, 50, 70, 100% 주정을 이용하여 30~50℃에서 5시간 동안 추출한 후, 여과하여 추출물을 얻었다. 이 때 원물 대 용제의 비율을 1:10, 1:15으로 진행하여 용제 비율

에 따른 추출수율 비교를 진행하였다.

- (6) 위의 방법으로 추출한 추출물의 추출수율을 비교하여 초음파 추출과 침지 추출 중 적절한 추출방법을 선정하였다.

4) 강황잎 추출물의 제조 및 특성 분석

- (1) 강황잎 추출물의 제조는 전처리가 끝난 강황잎 분말을 0, 10, 30, 50, 70, 100%의 주정으로 추출한 후, 여과하여 강황잎 추출물을 얻었다. 그리고 추출물을 진공 농축하여 고형분 대비 추출수율(%)을 측정하였다.



그림 26. 주정 농도에 따른 강황잎 추출물 (농도 100 → 0%)

- (2) 강황잎 추출물의 용제 농도별 추출수율

표 9. 강황잎의 용제 농도별 추출수율

시료	수율 (% , 고형분 기준)	온도
열수 추출물	5.470.83	40~43℃
10% 에탄올 추출물	4.240.40	
30% 에탄올 추출물	2.400.79	
50% 에탄올 추출물	1.070.29	
70% 에탄올 추출물	1.070.66	
100% 에탄올 추출물	1.0 미만	

- (3) 강황잎 추출물의 용제 농도별 수분함량 및 건조중량

- ① 강황잎 추출물의 용제 농도별 수분함량과 건조중량은 Satorius 사의 수분 측정기를 이용하여 측정하였다. 수분함량은 dish 위에 측정용 종이를 올려놓은 후에 calibration하고 시료를 1 mL 씩 분주하여 측정하였고, 건조중량은 추출물의 수분대비 함량으로 계산하여 나타내었다. (표 10). 측정한 수분함량(%)과 건조중량(%)을 바탕으로 추출물의 최종농도를 10 mg/mL로 제조

하기 위한 희석배수를 구하였으며, 이를 기준으로 희석하여 실험에 사용하였다.

표 10. 강황잎의 용제 농도별 수분함량과 건조중량 분석 결과

시료	수분함량 (%)	건조중량 (%)
열수 추출물	96.97	3.03
10% 에탄올 추출물	96.85	3.15
30% 에탄올 추출물	96.33	3.67
50% 에탄올 추출물	96.42	3.58

(4) 강황잎 열수 추출물 추출조건별 수분함량과 DPPH 소거능

① 용제별로 추출을 진행한 후, 항산화 성분의 함량을 측정하였으며, 측정한 결과를 토대로 강황잎 추출용매를 물로 선정하였다. 강황잎 건조시료를 고르게 균질화한 후에 물로 추출하여 추출물을 얻은 다음, Sartorius 사의 수분 측정기를 이용하여 수분함량을 측정하였다. 액상 시료의 수분함량은 dish와 측정용 pad를 올려놓은 후에 calibration하고 시료를 1 mL씩 분주하여 측정하였다.



그림 27. 강황잎 열수 추출물의 수분함량 측정 과정

표 11. 강황잎 열수 추출물의 추출조건별 수분함량 분석 결과

시료	수분함량 (%)
강황잎 건조시료	9.24
강황잎 열수 추출물 1/9, 3 h, 60-80℃	97.13
강황잎 열수 추출물 1/9, 5 h, 60-80℃	96.41
강황잎 열수 추출물 1/10, 3 h, 90-100℃	96.33
강황잎 열수 추출물 1/10, 5 h, 90-100℃	95.77

② 강황잎 열수 추출물의 추출조건별 DPPH의 소거능을 비교한 결과, 건조 원물의 수분함량이 0.5%인 경우보다 3.0%일 때, 유효성분의 함량이 더욱 높게 검출되는 것으로 나타났다.

③ 수분함량이 0.5%인 원물의 추출물을 0.1, 0.3, 0.5%로 희석한 경우에 DPPH 소거능이 각각 45,

63, 80%로 나타났다. 수분함량이 3.0%인 원물의 추출물을 0.1, 0.3, 0.5%로 희석한 경우에는 DPPH 소거능이 각각 55, 76, 88%로 나타났다. 이러한 결과는 열풍건조를 이용하여 원물의 수분함량을 조절하는 동안에 항산화 물질이 열에 의해 산화되거나 파괴되었을 가능성이 있기 때문으로 사료되었으며, 따라서 비교적 적은 시간으로 건조되는 수분함량이 3.0%인 원물의 추출물에서 더 많은 유효성분이 검출되었다고 사료되었다.

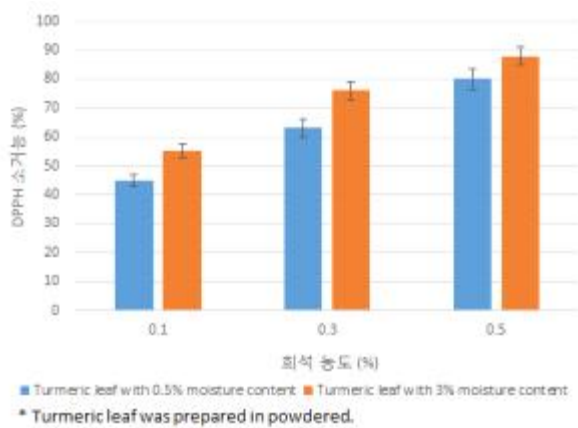


그림 28. 강황잎 열수 추출물의 수분함량에 따른 DPPH 소거능 분석 결과

- ④ 세절한 원물과 분쇄한 원물의 유효성분의 분석 결과, 세절한 원물보다 분쇄한 원물에서 DPPH 소거능이 10±2.8% 높게 나타남으로써 차이가 나타났다. 이는 입자 크기에 따른 표면적 차이에 의한 것으로 사료되었다.

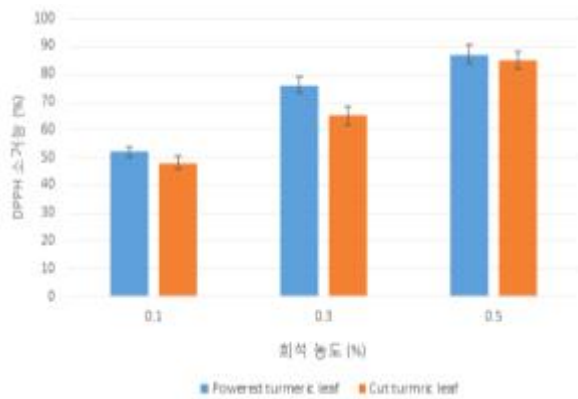


그림 29. 강황잎의 입자 크기(세절 정도)에 따른 DPPH 소거능 분석 결과

- ⑤ 수분함량이 5.0%인 경우, 강황잎에 존재하는 것으로 추측되는 다량의 섬유질 성분과 수분 때문에 분쇄가 잘 되지 않았다. 추후에 공장에서 생산을 할 경우, 기계에 무리가 생겨 원활한 생산이 어려울 것으로 판단되어 건조된 원물을 세절한 형태로 준비하기로 하였다.
- ⑥ 원물을 건조는 열풍건조기와 진공건조기를 이용하였으며, 진공건조의 경우에 낮은 온도에서 원물의 건조가 진행되기 때문에 원물의 외관 상태가 열풍건조에 비해 좋았다. 또한, 열풍건조와 진공건조의 경우, 원물의 수분함량이 3.0%까지 도달하는 데 각각 50~60℃와 40~45℃에서 5

시간, 12시간이 소요되었다. 이를 통해 진공건조의 경우가 비교적 긴 처리시간이 요구되는 것을 알 수 있었고, 전력비 및 시설규모 한계 등 산업적 문제를 갖고 있었다. 따라서 강황잎 원물을 건조하는 데 열풍건조를 이용하기로 하였고, 수분함량은 3.0%가 되도록 하였으며, 원물을 세절하여 준비하기로 하였다.

- ⑦ 초음파 추출을 진행해본 결과, 강황잎 초음파 처리를 통해 얻은 추출물은 열수 추출물과 다르게 투명도가 높게 나타났다. 이는 추출수율과 연관이 있었는데, 초음파 추출물의 추출수율은 $10\pm 2.0\%$ 였으며, 열수 추출물의 추출수율은 $15.0\pm 1.3\%$ 였다. 열에너지가 직접적으로 원물 조직에 가해져 유효성분이 용출되는 열수 추출물과는 다르게, 초음파 추출물은 비교적 낮은 온도에서 초음파(진동)가 원물 조직에 간접적으로 가해지기 때문에 추출과정 중 용출되는 성분이 적었을 것으로 사료되었다. 또한, 이러한 현상은 초음파 처리하여 얻은 추출물과 열수 처리하여 얻은 추출물의 항산화능을 비교한 결과로 설명이 되었다.
- ⑧ 실제 대량생산에 있어 초음파 추출기를 이용하는 것은 낮은 추출수율과 낮은 유효성분 용출이 한계점이 될 것으로 판단되며, 따라서 초음파 추출보다는 침지 추출(열수 또는 에탄올 추출)의 방법이 더욱 효과적일 것으로 사료되었다.

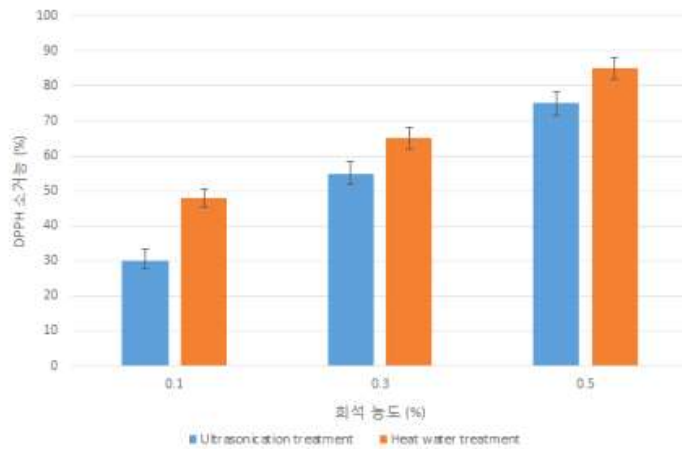


그림 30. 강황잎의 추출방법에 따른 DPPH 소거능 분석 결과

- ⑨ 건조된 원물을 침지 추출법으로 추출하는 과정은 다음과 같이 진행하였다. 건조된 원물을 0, 10, 30, 50, 70, 100% 주정에 30~50℃에서 5시간 추출한 후, 여과하여 추출물을 얻은 다음, 추출수율을 확인하였다. 그 결과, 열수 추출(0% 에탄올)에서 가장 높은 추출수율(5%)이 관찰되었다. (그림 31).



용제	수율 (고형분 기준, %)	온도	비고
0% EOH	5.4	40-43 °C	
10% EOH	4.2		
30% EOH	2.4		
50% EOH	1.1		
70% EOH	1.0		
100% EOH	1% 미만		

그림 31. 강황잎의 추출조건별 추출물(위)과 추출수율(아래)

5) 반응표면분석법(RSM, Response Surface Methodology)을 이용한 강황잎 최적 추출조건 확립

(1) 강황잎 소재의 최적 추출조건 확립을 위하여 반응표면분석법(RSM, Response Surface Methodology)을 통해 온도(°C), 시간(min), 용매 비율을 정한 후, 환류냉각 추출법으로 실험을 진행하였다. 추출용매의 양을 5 mL로 고정하고, 강황잎 분말을 각 비율로 더하여 조건에 따른 환류냉각 추출을 시행하였지만 (표 12), 강황잎이 수분을 흡수하며 멍쳐 정상적인 용매 회수가 어려웠다. 따라서 추출을 위한 최적 용매 비율을 정한 후에 다시 반응표면분석을 진행하기로 하였다. (표 13).

표 12. 강황잎 최적 추출조건 설정을 위한 반응표면분석 조건 (1차)

표준 순서	런 순서	점 유형	블럭	시간 (min)	온도 (°C)	용매비 (ratio)
1.0	1.0	1.0	1.0	1.8	44.2	9.1
2.0	2.0	1.0	1.0	4.2	44.2	9.1
3.0	3.0	1.0	1.0	1.8	85.8	9.1
4.0	4.0	1.0	1.0	4.2	85.8	9.1
5.0	5.0	1.0	1.0	1.8	44.2	20.9
6.0	6.0	1.0	1.0	4.2	44.2	20.9
7.0	7.0	1.0	1.0	1.8	85.8	20.9
8.0	8.0	1.0	1.0	4.2	85.8	20.9
9.0	9.0	-1.0	1.0	1.0	65.0	15.0
10.0	10.0	-1.0	1.0	5.0	65.0	15.0
11.0	11.0	-1.0	1.0	3.0	30.0	15.0
12.0	12.0	-1.0	1.0	3.0	100.0	15.0
13.0	13.0	-1.0	1.0	3.0	65.0	5.0
14.0	14.0	-1.0	1.0	3.0	65.0	25.0
15.0	15.0	0.0	1.0	3.0	65.0	15.0
16.0	16.0	0.0	1.0	3.0	65.0	15.0
17.0	17.0	0.0	1.0	3.0	65.0	15.0

- (2) 용매 비율을 확립하기 위하여 1:10에서 1:30까지 5배 단위로 나누어 용매 비율을 설정하였고, 최종적으로 1:25의 최적 용매 비율 조건을 확립하였다. 이후 고정된 용매 비율을 기준으로 하여 온도와 시간을 구하고, 추출 용매의 양을 20 mL로 고정하고 환류냉각 추출을 진행하였다.

표 13. 강황잎 최적 추출조건 설정을 위한 반응표면분석 조건 (2차)

표준 순서	런 순서	점 유형	블럭	시간 (min)	온도 (°C)	용매비 (ratio)
1.0	1.0	1.0	1.0	48.8	86.4	12.4
2.0	2.0	1.0	1.0	91.2	86.4	15.6
3.0	3.0	1.0	1.0	48.8	213.6	15.0
4.0	4.0	1.0	1.0	91.2	213.6	15.2
5.0	5.0	-1.0	1.0	40.0	150.0	14.3
6.0	6.0	-1.0	1.0	100.0	150.0	16.1
7.0	7.0	-1.0	1.0	70.0	60.0	14.0
8.0	8.0	-1.0	1.0	70.0	240.0	15.4
9.0	9.0	0.0	1.0	70.0	150.0	15.0
10.0	10.0	0.0	1.0	70.0	150.0	15.2
11.0	11.0	0.0	1.0	70.0	150.0	15.0

표 14. 강황잎 물 추출물의 추출수율 분석 결과

용매비 (ratio)	용매의 양 (mL)	강황잎 분말 (g)	수분함량 (%)	추출수율 (%)
1:10	20	2.00	98.41	7.15
1:15	20	1.33	99.05	10.25
1:20	20	1.00	99.3	10.93
1:25	20	0.80	99.38	12.08
1:30	20	0.67	99.55	12.09

- (3) 강황잎 추출 결과를 바탕으로 반응표면분석을 실시한 결과, 다음과 같은 결과를 얻었으며, 회귀 모델이 반응을 설명하는 데 적합함을 확인하였다.
- (4) 반응표면분석 결과에 따라 회귀 방정식을 산출하였고, 이를 통해 3차원 입체 그래프를 확보하였다. 그리고 이를 통해 최적 추출조건(온도 85°C, 시간 150분, 용매 비율 1:25)을 확립하였고, 15.58%의 추출수율을 확보할 수 있었다.

표 15. 강황잎 추출 유효성 검증

항목	DF	Adj SS	Adj MS	F-값	P-값
모형	5	9.46208	1.89242	22.34	0.002
선형	2	6.74472	3.37236	39.81	0.001
temp	1	4.50567	4.50567	53.19	0.001
time (m)	1	2.23905	2.23905	26.43	0.004

제공	2	0.45096	0.22548	2.66	0.163
temp * temp	1	0.00782	0.00782	0.09	0.774
time (m) * time (m)	1	0.43857	0.43857	5.18	0.072
2차 교호작용	1	2.26640	2.26640	26.76	0.004
temp*time (m)	1	2.26640	2.26640	26.76	0.004
오차	5	0.42353	0.08471		
적합성 결여	3	0.40401	0.13467	13.80	0.068
순수 오차	2	0.01952	0.00976		
총계	10	9.88561			

S	R-제공	R-제공(수정)	R-제공(예측)
0.291042	95.72%	91.43%	70.49%

표 16. 강황잎 추출물의 추출수율에 따른 반응표면분석 결과 다항방정식

Response	Second order polynomials	R ²	Significance
Yield (y)	$y=6.48962+2.50639*x_1-0.72924*x_2-1.72163*x_1^2-2.73276*x_2^2-1.68447*x_1*x_2$	0.9572	0.002
X1 : temperature (°C), X2 : time (h)			

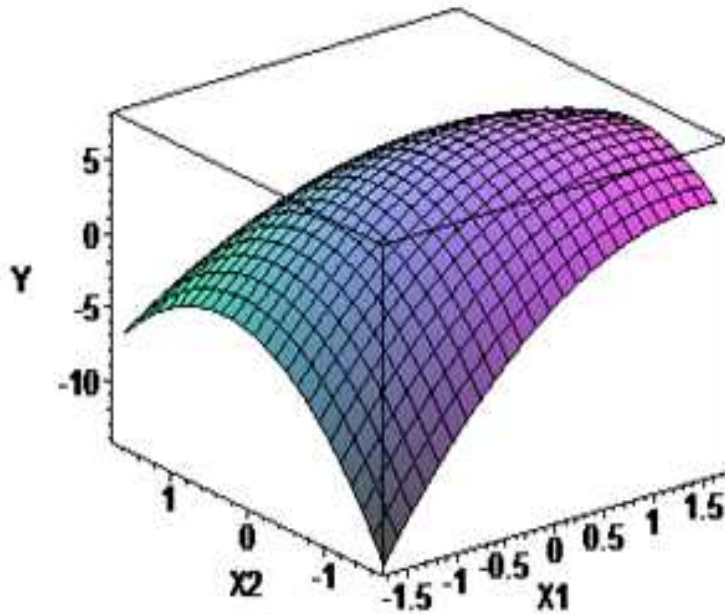


그림 32. 강황잎 추출물의 추출수율에 따른 반응표면 그래프

6) 강황잎 추출물 농축 및 소재 표준화

- (1) 반응표면분석법을 통해 확보한 최적 추출조건으로 강황잎을 추출한 후, 이를 농축하여 높은 당도(Brix)를 가진 추출물을 얻고자 하였다. 농축은 각각 당도가 10, 20, 50 Brix가 될 때까지 진행하였으며, 해당 농축액의 수분함량을 각각 측정하였다.

(2) Lab scale에서는 강황잎 추출물을 10, 30, 50 Brix까지 농축할 수 있었으나, 대량생산 규모로 생산하는 경우에는 30 Brix 이상에서 강황잎 추출물이 열에 의해 고형분이 타버리거나 겔화되는 현상이 발생하였다. 따라서 30 Brix 이상으로 농축하는 것은 어려움이 있으며, 농축 후 여과단계에서 겔화가 되어 여과가 되지 않는다는 한계점이 있어 10 Brix가 최적의 추출물이라고 판단하였다.

표 17. 강황잎 물 추출물 농축액의 당도별 수분함량 분석 결과

추출물의 당도 (Brix)	수분함량 (%)
10	92.32±0.10
20	73.94±0.02
50	51.65±0.52



그림 33. 강황잎 물 추출물의 당도별 농축액



그림 34. 강황잎 추출물 농축과정(좌)과 생산시설(우)

- (3) 10 Brix의 강황잎 추출물의 경우, 0.1%만 첨가하여도 식품의 풍미에 큰 영향을 주는 것으로 나타났으며, 실제 산업화하였을 경우에 식품 풍미개선제로 사용가능할 것으로 사료되었다. 또한 이와 관련한 특허출원이 완료되었다.
- (4) 식품의약품안전처 신소재식품과 담당자들과의 회의를 통해 10 Brix 강황잎 추출물에 대한 한시적 식품원료 인정을 위한 협조를 요청하였다.



그림 35. 강황잎 추출물(10 Brix)의 모습

7) 강황잎 추출물의 일반성분, 중금속, 잔류농약 분석

(1) 일반성분 분석

- ① 강황잎 추출물의 일반성분은 AOAC 방법에 따라 분석하였다. 수분은 105℃ 건조법, 조단백은 micro-Kjeldahl법, 조지방은 soxhlet 추출법, 조회분은 550℃ 직접화법, 탄수화물은 100%에서 조단백, 조지방, 조회분을 뺀 값으로 나타내었다.

표 18. 강황잎 추출물의 일반성분 분석 결과

시험 항목	기준 규격	분석 결과	판정
탄수화물 (g/100g)	-	3.8	-
조단백 (g/100g)	-	1.2	-
조지방 (g/100g)	-	0.3	-
회분 (g/100g)	-	1.21	-
수분 (g/100g)	-	3.7	-

(2) 중금속 분석

- ① 강황잎 추출물 중 중금속 분석은 ICP-MS를 이용하여 측정하였다. 분석을 위해 측정하고자 하는 원소의 질량을 입력하고, 검량곡선을 작성한 후에 전처리를 한 시료용액을 주입하여 농도 값을 산출하였다. 중금속 중 납, 카드뮴, 비소, 수은, 구리, 크롬, 아연, 망간, 주석을 분석하여 아래와 같은 결과를 확인하였다. (표 19). 검사 결과, 식품분야에서 중요한 중금속 항목인 납, 카드뮴, 비소, 수은은 검출되지 않았다.

표 19. 강황잎 추출물의 중금속 분석 결과

시험항목	분석 결과	단위	정량한계	시험방법
납 (Pb)	불검출	mg/kg	0.05	ICP-MS
카드뮴 (Cd)	불검출	mg/kg	0.05	ICP-MS
비소 (As)	불검출	mg/kg	0.05	ICP-MS
수은 (Hg)	불검출	mg/kg	0.05	ICP-MS
구리 (Cu)	0.55	mg/kg	0.05	ICP-MS
크롬 (Cr)	0.24	mg/kg	0.05	ICP-MS
주석 (Sn)	불검출	mg/kg	0.05	ICP-MS
망간 (Mn)	160	mg/kg	2.00	ICP-AES
아연 (Zn)	4.28	mg/kg	2.00	ICP-AES

(2) 잔류농약 분석

- ① 강황잎 분말 중 잔류농약 함량 분석은 ICP-MS를 이용하여 측정하였으며, 잔류농약 246종에 대하여 분석한 결과, 246종 전 항목 검출되지 않았다.



그림 36. 강황잎 추출물의 잔류농약 분석 결과

8) 강황잎 추출물의 기능성 성분 분석 및 항산화 효능 평가

(1) 강황잎 추출물 중 커큐민 함량 분석

① 강황잎 추출물 중의 지표성분 확인을 위하여 강황의 주요 생리활성성분인 커큐민의 함량을 HPLC로 분석하였다. 표준물질인 커큐민(C7277, Sigma-Aldrich Co.)은 10 µg/mL 농도로 제조하고, 2-fold dilution하여 0.078 µg/mL 농도까지 제조한 뒤, 0.45 µm PVDF syringe filter로 여과하여 분석에 사용하였다. HPLC 분석은 식품의약품안전처 식품첨가물 분석법에 제시되어 있는 심황색소 분석법을 참고 및 변형하여 진행하였다. Column은 YMC-C18 column을 사용하였으며, mobile phase는 A: 2% acetic acid in water, B: 2% acetic acid in acetonitrile(ACN)을 사용하였다. mobile phase gradient는 0~25분은 A: 55%, B: 45%, 25~32분은 A: 0%, B: 100%, 32~35분은 A: 55%, B: 45%로 하였다. retention time은 35분이었고, 분석 결과, 강황잎 열수 추출물에서는 커큐민이 검출되지 않았다. 강황잎 함유 생리활성성분에 관한 참고문헌 및 자료가 없어 LC-QTOF를 이용한 Library 분석으로 생리활성물질을 검색하기로 하였다.

(2) LC-QTOF를 이용한 강황잎 추출물의 생리활성성분 분석

① 강황잎이 포함하고 있는 성분에 대한 문헌조사 결과, 지표성분 또는 생리활성성분으로 추정할 수 있는 성분에 대한 연구보고가 없어서 LC-QTOF를 이용하여 HPLC 분리조건을 확립하고, TCM Library(Traditional Chinese Medicine Library)를 이용하여 강황잎 추출물의 지표성분을 탐색하고자 하였다.

② 강황잎 열수 추출물로부터 total compound group 추출 및 크로마토그램을 확인하기 위하여 UPLC-QTOF 분석을 아래와 같은 조건으로 수행하였다.

ㄱ. Instrument: Agilent 1290 Infinity II & Agilent 6550 QTOF

ㄴ. Column: AdvanceBio Peptide Map, 2.1×250 mm, 2.7 µm

ㄷ. Column Oven Temperature: 25°C

ㄹ. Injection Volume: 5 µL

ㅁ. Acquisition Mode: non targeted

ㅂ. Ion Polarity: Positive Mode

ㅅ. Mobile Phase and Gradient Condition:

A: 0.1% formic acid in water, B: 0.1% formic acid in methanol

Total time (min)	Flow rate (µL/min)	A%	B%
0	200	95	5
1	200	95	5
12	200	5	95
15	200	5	95
15.1	200	95	5
20	200	95	5

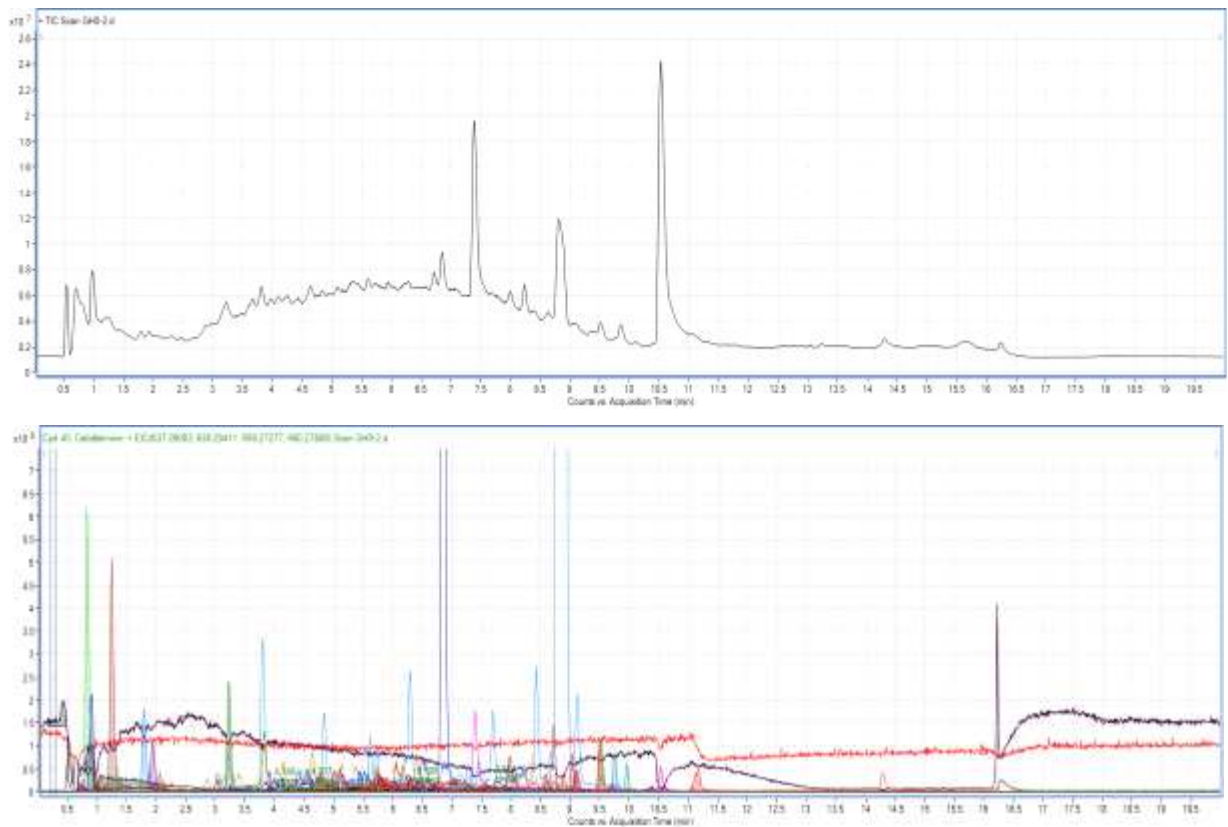


그림 37. LC-QTOF를 이용한 강황잎 추출물의 total compound group

③ LC-QTOF를 통하여 추출된 강황잎 함유 total compound group을 TCM Library를 통하여 match score가 95% 이상인 성분만 검출한 결과 아래 표와 같이 총 45종의 물질이 강황잎에 함유되어 있는 것으로 확인되었다. 이 중 비교적 함량이 높고, 지표성분 및 생리활성성분으로 활용 가능한 물질로 nicotinic acid(vitamin B3)를 선정하여 강황잎 추출물 중의 함량을 분석하였다.

표 20. LC-QTOF 분석을 통한 강황잎 함유 성분 분석 결과 (TCM Library)

#	Name	Formula	RT	Score	Mass	Area
1	gamma-Amino-alpha-methylene butyric acid	C5 H9 N O2	1.07	98.25	115.06326	173439
2	N,N-Dimethyl glycine methyl ester	C5 H11 N O2	0.896	99.86	117.07887	368152
3	N,N-Dimethyl glycine methyl ester	C5 H11 N O2	0.424	99.87	117.07891	408151
4	Purine	C5 H4 N4	15.959	99.25	120.04364	74664
5	Santene	C9 H14	3.222	99.77	122.10946	1052114
6	Nicotinic acid	C6 H5 N O2	0.904	99.83	123.03204	1007839
7	1-Octen-3-ol	C8 H16 O	9.09	99.58	128.12002	181643
8	Alloisoleucine	C6 H13 N O2	1.244	100	131.09465	2173696
9	Isopropenyl toluene	C10 H12	1.798	99.56	132.09381	913514
10	Yibeissine	C27 H41 N O4	9.504	96.28	443.30375	486420
11	Calafatimine	C38 H40 N2 O7	7.914	96.73	636.28354	42155
12	4-Guanidino-1-butanol	C5 H13 N3 O	0.821	99.26	131.10596	2660383
13	p-Aminobenzoic acid	C7 H7 N O2	4.819	99.3	137.04767	206379

14	Caprylic acid	C8 H16 O2	10.53	99.74	144.11506	308056
15	Spermidine	C7 H19 N3	1.07	99.41	145.15795	1237887
16	Phthalic anhydride	C8 H4 O3	11.159	99.88	148.01611	328192
17	(E)-6-Methyl-3,5-heptadien-2-one	C10 H16 O	5.572	99.57	152.11998	122484
18	(E)-6-Methyl-3,5-heptadien-2-one	C10 H16 O	5.432	99.58	152.11999	149540
19	Indole-3-acetaldehyde	C10 H9 N O	1.93	99.41	159.06842	557514
20	Phenylalanine	C9 H11 N O2	2.055	98.68	165.07908	207742
21	2,4-Dimethoxybenzaldehyde	C9 H10 O3	9.528	99.7	166.06314	576020
22	(+)-Iridodial	C10 H16 O2	3.04	99.2	168.11507	81639
23	(+)-Iridodial	C10 H16 O2	1.79	96.31	168.11514	113568
24	Echinorine	C11 H12 N O	7.029	96.35	174.09187	24162
25	Tecostanine	C11 H21 N O	2.617	98.55	183.16222	38149
26	4-(1,5-Dimethyl-1,4-hexadienyl)-1-methyl -cyclohexene	C14 H22	10.364	96.69	190.17199	56222
27	alpha-Ionone	C13 H20 O	7.575	95.67	192.15138	73068
28	Theaspirone	C13 H20 O2	4.546	95.9	208.14613	152580
29	(-)-Guaia-1(10),11-dien-15-al	C15 H22 O	4.993	99.05	218.16716	197362
30	(-)-Guaia-1(10),11-dien-15-al	C15 H22 O	4.778	97.7	218.16713	165861
31	Pterosin C	C14 H18 O3	9.007	96.28	234.12562	67819
32	(-)-Guaia-1(10),11-dien-15,2-olide	C15 H22 O2	9.802	98.97	234.16192	52353
33	1,2,3,3alpha,8,8alpha-Hexahydro-2,2,8-trim ethyl-5,6-azulenedimethanol	C15 H24 O2	4.778	96.83	236.17756	88088
34	gamma-L-Glutamyl-glutamine	C10 H17 N3 O6	0.755	95.83	275.11164	163124
35	3alpha-Hydroxy-androst-4-ene-17-one	C19 H28 O2	10.364	98.6	288.20913	62557
36	Methyl linoleate	C19 H34 O2	6.681	98.37	294.25573	78878
37	Methyl 9-octadecenoate	C19 H36 O2	7.807	98.33	296.27153	57968
38	Linoleyl acetate	C20 H36 O2	6.499	97.36	308.27155	95525
39	(2S)-3',4'-Methylenedioxy-5,7-dimethoxyfla vane	C18 H18 O5	9.719	98.14	314.11515	76876
40	(-)-17-Hydroxy-16beta-kauran-19-oic acid	C20 H32 O3	9.04	96.6	320.23542	308127
41	Siegesetheric acid II	C22 H36 O3	9.959	99.3	348.26675	246334
42	Siegesetheric acid II	C22 H36 O3	9.752	95.99	348.26653	355254
43	Saussureamine C	C19 H26 N2 O5	11.06	96	362.18401	22162
44	12-Gingerol	C23 H38 O4	11.755	96.05	378.27722	9335
45	Homofukinolide	C25 H34 O6	14.296	95.19	430.23565	12369

④ nicotinic acid(vitamin B3)은 식품공전 상의 분석법을 이용하였고, 강황잎 추출물 중 함량 분석은 아래의 조건으로 수행하였다.

ㄱ. Column: Capcellpak UG120V (4.6×250 mm, 5.0 μm) 또는 이와 동등한 것

ㄴ. Column Oven Temperature: 40°C

ㄷ. Injection Volume: 10 μL

ㄹ. Flow rate: non targeted

ㅁ. Mobile Phase and Gradient Condition:

A: 5 mM sodium hexanesulfonate/0.1% acetic acid

B: 5 mM sodium hexanesulfonate/0.1% acetic acid : methanol (35 : 65)

A:B = 100:0 (3 min hold) → 3%/min → A:B = 70:30 (7 min hold)

ㅂ. Detector and Wavelength: UV Detector, 260 nm

⑤ nicotinic acid 표준물질을 이용하여 검량곡선을 설정해본 결과, retention time은 8.59 min, R2

값은 0.991로 우수한 정량곡선 결과를 얻었다. 강황잎 추출물을 5배 희석하여 분석한 결과, 표준화된 강황잎 추출물(10 Brix)의 nicotinic acid 함량은 25.18 µg/mL로 확인되었다. 본 결과를 통해 도출된 지표성분 분석조건을 기반으로 유전독성시험 및 생산공정 확립에 이용할 예정이다.

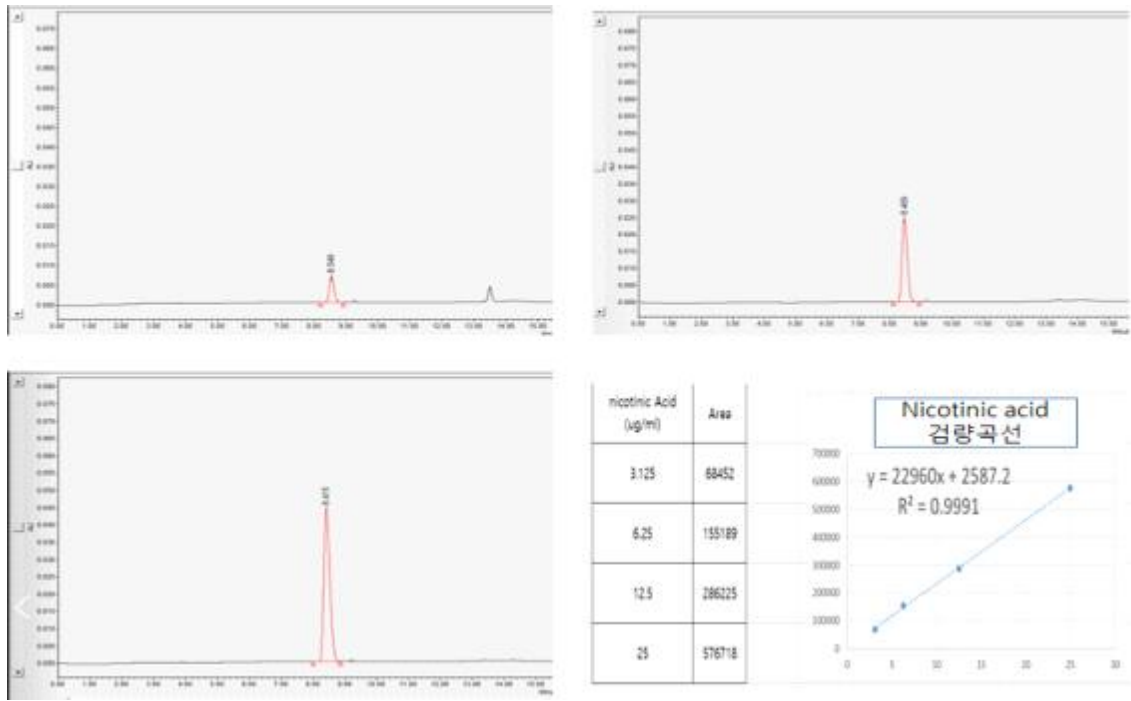


그림 38. Nicotinic acid 검량곡선

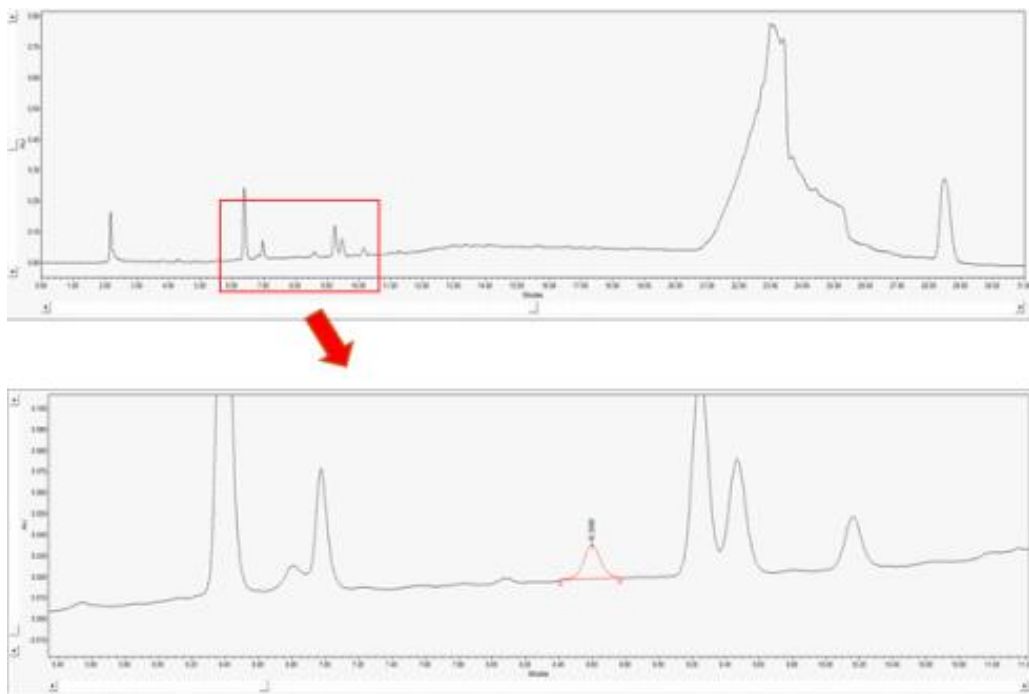


그림 39. 강황잎 추출물(10 Brix, 5배 희석) 중 nicotinic acid 함량 분석 결과

(3) 전자코(E-nose) 분석을 통한 강황잎 추출물의 분석

① 강황잎 추출물의 향기특성을 확인하기 위하여 강황 및 건조 강황의 추출물과 강황잎 추출물의 향기특성 차이를 전자코로 분석하고자 하였다. 각각의 추출물 3 g이 들어있는 vial을 300 rpm 으로 교반하면서 60℃를 유지하였고, 주입구 온도는 130℃인 상태에서 주입하였다. 사용한 가스는 헬륨으로, 50 mL/min의 유속으로 흘려보냈으며, 분석시간은 2분이었다. syringe purge는 3초를 유지한 후 thermostated tray holder에 놓은 후 headspace syringe를 이용하여 5 mL를 취하였다. 시료는 자동시료채취기가 연결된 전자코(GC type E nose heracles II, Alpha MOS, France)로 분석하였다. 분석에 사용된 전자코는 2개의 MXT-5-FID1 column을 이용하여 분석하였고, 분석은 6회 반복하여 실시하였다. 통계 처리는 Alpha MOS에서 제공된 소프트웨어를 사용하였다.

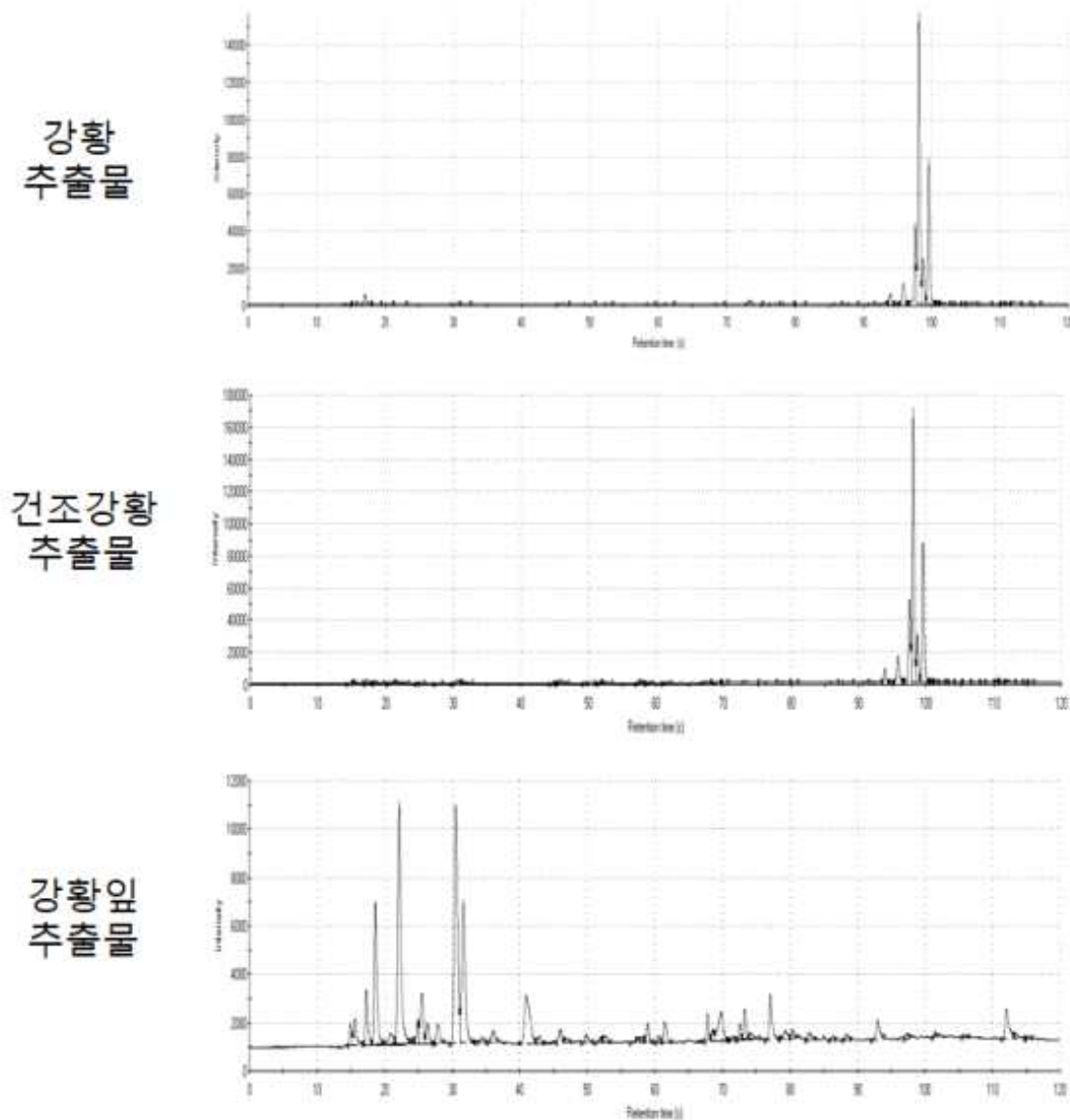


그림 40. 전자코 분석을 통한 강황, 건조 강황, 강황잎 추출물의 TIC

② 전자코 분석 크로마토그램(그림 40)을 살펴보면 강황 추출물 및 건조 강황 추출물 사이에는 큰 차이가 없었으나, 강황잎 추출물의 경우 2종의 강황 추출물과 확연한 차이를 나타냈고, 모든 시간대에 걸쳐 다양한 향미성분이 존재하는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 각각의 추출물의 특성을 비교하기 위하여 주성분 분석을 수행한 결과, 그림 41과 같은 결과를 얻을 수 있었다. 제1주성분은 총 변동에 대해 99.9%, 제2주성분은 0.01%로 거의 100%에 가까웠으며, 주성분 1의 값을 기준으로 강황과 강황잎을 확실히 구분할 수 있을 것으로 판단되었다.

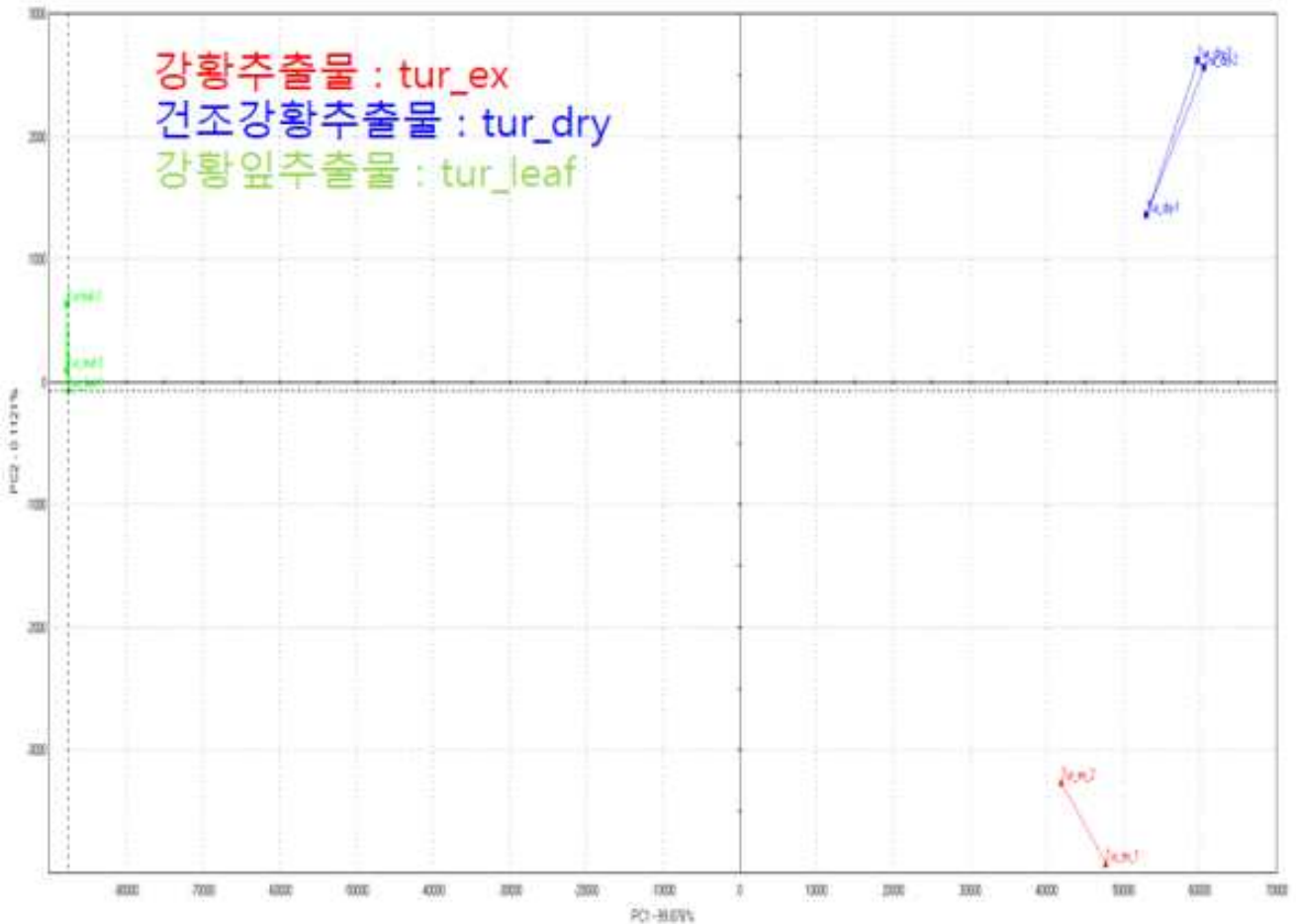


그림 41. 강황, 건조 강황, 강황잎 추출물의 주성분 분석 결과

(4) 총 페놀 함량 측정

① 강황잎 중 총 페놀 함량과 총 플라보노이드 함량 측정을 위하여 열수 추출물과 에탄올 추출물 (10, 30, 50%)을 10 mg/mL 농도로 제조하였다. 총 페놀 함량 측정을 위하여 추출물 0.5 mL와 증류수 0.3 mL를 혼합한 후, 10% sodium carbonate solution을 0.75 mL 가하여 3분 방치하였다. 그리고 증류수 0.95 mL, Folin-Ciocalcu reagent 0.25 mL를 더하여 실온에서 30분간 반응시켰다. 반응 후, UV/Visible spectrophotometer를 이용하여 750 nm의 파장에서 흡광도 값을 측정하였고, gallic acid를 표준물질로 작성한 검량곡선에 대입하여 총 페놀 함량을 정량하였다.

(5) 총 플라보노이드 함량 측정

- ① 강황잎 중 총 플라보노이드 함량 측정을 위하여 10 mg/mL 농도의 강황잎 추출물 0.5 mL, 10% aluminium chloride 0.1 mL, 1 M potassium acetate 0.1 mL, methanol 1.5 mL, 증류수 2.8 mL를 혼합하여 실온에서 30분간 반응시켰다. 반응 후, UV/Visible spectrophotometer를 이용하여 750 nm의 파장에서 흡광도 값을 측정하였고, Quercetin을 표준물질로 작성한 검량 곡선에 대입하여 총 페놀 함량을 정량하였다.

표 21. 강황잎 중 총 페놀 및 총 플라보노이드 함량 (µg/mL) 분석 결과

Sample	water	10% EtOH	30% EtOH	50% EtOH
Total phenol (µg/mL)	2.741±0.099	2.552±0.464	2.106±0.370	1.628±0.271
Total flavonoid (µg/mL)	4.776±0.010	3.575±0.010	1.731±0.012	1.606±0.013

(6) DPPH radical 소거능 측정

- ① 강황잎 추출물의 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical 소거능은 Soo-Jin Heo (2005)의 방법을 참고하여 측정하였다. ethanol을 이용하여 0.4 mM의 농도로 희석한 DPPH solution 2.9 mL에 시료 0.1 mL를 더한 후, 실온에서 30분간 반응시켰다. 반응 후, UV/Visible spectrophotometer를 이용하여 516 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 소거능을 나타내기 위한 inhibition 비율은 blank와 비교하여 나타내었다.

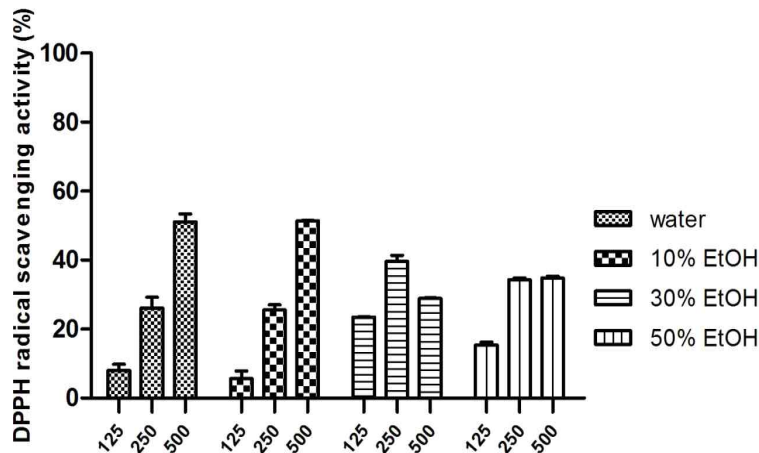


그림 42. 강황잎 추출물의 DPPH radical scavenging activity (%) 분석 결과

(7) Hydrogen peroxide 소거능 측정

- ① 강황잎 추출물의 hydrogen peroxide radical 소거능은 Soo-Jin Heo (2005)의 방법을 참고하여 측정하였다. 0.1 M phosphate buffer (pH 5.0) 0.1 mL와 시료 0.1 mL를 잘 혼합한 후, 96 well plate에 분주하였다. 0.02 mL의 hydrogen peroxide를 각 well에 더한 후, 37°C에서 5분간

반응시켰다. 반응 후, 1.25 mM ABTS와 1 unit/mL peroxidase를 각각 0.03 mL씩 첨가하고 37°C에서 10분간 반응시켰다. 반응 후, UV/Visible spectrophotometer를 이용하여 405 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

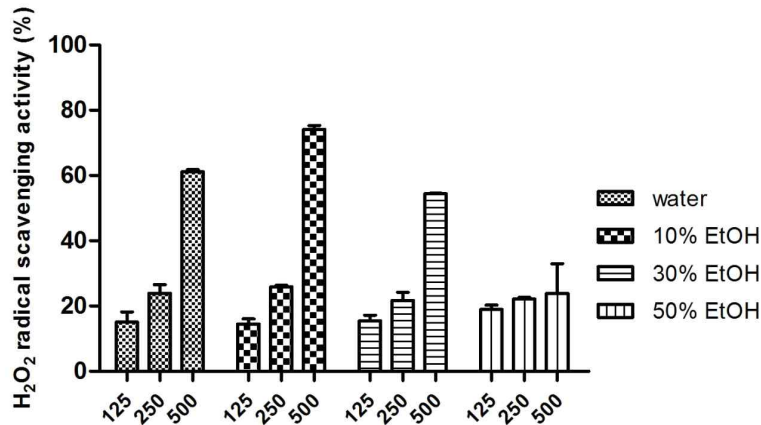


그림 43. 강황잎 추출물의 H₂O₂ radical scavenging activity (%) 분석 결과

(8) ABTS radical 소거능 측정

① 강황잎 추출물의 ABTS radical 소거능은 Lin Zheng (2016)의 방법을 참고하여 측정하였다. 먼저 7 mM ABTS ammonium을 증류수에 희석한 후, 2.45 mM potassium persulfate와 혼합하여 실온에서 12~16시간 동안 빛을 차단하여 ABTS가 생성되도록 반응시켰다. 이후에 ABTS 용액은 50 mM phosphate buffer에 pH별로 희석(pH 6.0, 6.6, 7.4, 8.0)하였고, 시료도 동일한 buffer에 희석하였다. 96 well plate에 희석한 ABTS 용액과 시료를 각각 0.15 mL, 0.5 mL 옮긴 후, 30°C에서 1분 간격으로 60분간 흡광도를 측정하였다. blank를 측정하기 위하여 시료를 대신하여 50 mM PBS (pH 7.4)를 넣고, 동일한 방법으로 측정하였다. ABTS는 734 nm에서 0.70±0.02의 blank 값을 얻기 위하여 PBS로 희석하였으며, 표준 항산화물질로 trolox를 사용하였다. ABTS radical 소거능은 trolox 농도에 따른 표준검량곡선에 대입하여 구하였으며, 단위는 µmTE/mol sample으로 나타내었다.

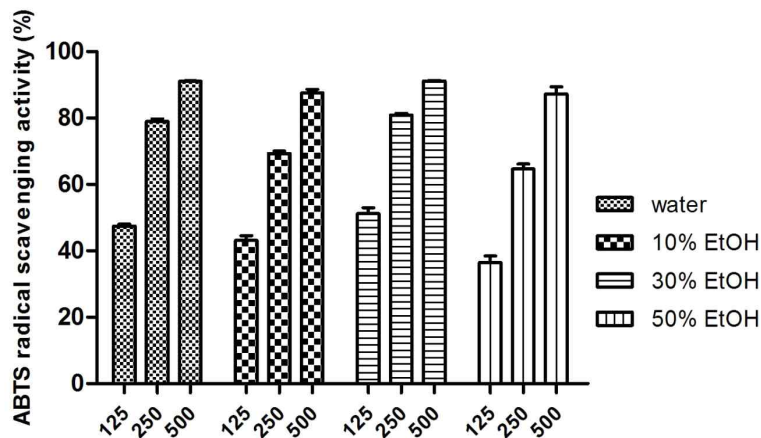


그림 44. 강황잎 추출물의 ABTS radical scavenging activity (%)

표 22. 강황잎 추출물의 항산화 활성 IC50 값 (µg/mL)

Activity	IC50 values (µg/mL)			
	열수 추출물	10% 에탄올 추출물	30% 에탄올 추출물	50% 에탄올 추출물
DPPH	486.78±12.73	483.54±6.01	>2,000	>2,000
H ₂ O ₂	849.06±23.07	727.80±4.31	940.32±1.52	>1,000
ABTS	123.19±2.42	143.60±5.67	246.20±8.80	401.311±6.96

9) 강황잎 추출물의 항염증 효능 평가

(1) 세포독성 확인 (MTT Assay)

- ① 강황잎 추출물에 대한 세포 생존율은 Raw 264.7 macrophage 세포를 이용하여 측정하였다. Raw 264.7 세포는 DMEM(Dulbecco Modified Eagle Medium)에 10% fetal bovine serum과 1% streptomycin/penicillin을 추가한 배지로, 5% CO₂, 37°C 조건의 인큐베이터에서 배양하였다. 안정화 기간을 가진 후에 배양 세포의 배지를 제거하고 세척한 다음, 새로운 배지를 3 mL 첨가하여 cell scrapper로 세포를 떼어내었다. 떼어낸 세포는 15 mL tube에 옮긴 후, 배지를 더한 다음, 125×g에서 3분간 원심 분리하여 pellet을 확보하였다.
- ② 상층액을 제거한 후, 새로운 배지를 10 mL 더하여 pellet을 single cell로 풀어주고, hemacytometer를 이용하여 counting 하였다. 세포는 96 well plate의 각 well에 5×10⁴의 농도로 분주하고, 24시간 후에 추출물 시료의 농도가 6.25, 12.5, 25, 50, 100 µg/mL가 되도록 각각의 well에 분주하였다. 시료 처리 1시간 후, LPS 처리를 한 군에는 LPS의 최종농도가 1 µg/mL가 되도록 분주하여 18~24시간 동안 배양하였다. 배양 후, 세포 상층액을 최대한 취하여 실험에 사용하였으며, 남은 세포는 MTT Assay를 진행하였다.
- ③ MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay를 위하여 세포 상층액을 제거하고, 5 mg/mL로 제조한 MTT stock solution을 최종 농도가 100 µg/mL가 되도록 각 well에 분주하였다. 2~4시간 후, 청색의 formazan이 형성되면 상층액을 제거하고 DMSO(dimethyl sulfoxide)로 용해한 다음, UV/Visible spectrophotometer를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

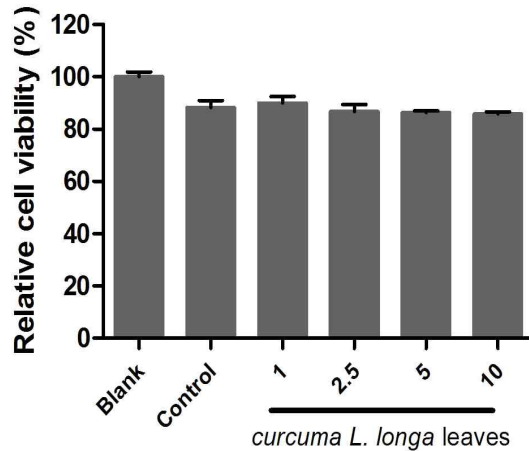


그림 45. 강황잎 추출물 처리에 따른 세포독성

(2) NO(Nitric Oxide) 생성 확인

① 강황잎 추출물의 항염 효능은 Raw 264.7 세포를 배양하여 측정하였다. Raw 264.7 세포를 96 well에 5×10^4 /well의 농도로 seeding한 후, 농도별 강황잎 추출물 시료와 LPS (최종 농도 $1 \mu\text{g/mL}$)를 처리하여 18~20시간 동안 배양하였다. 배양 후, 세포 상층액과 Griess reagent를 1:1의 비율로 반응하여 UV/Visible spectrophotometer를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

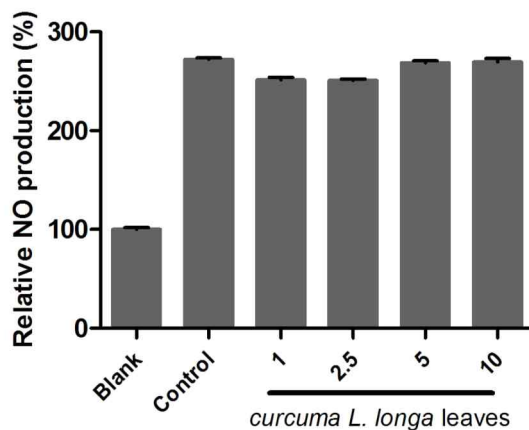


그림 46. 강황잎 물 추출물 처리에 따른 NO의 생성량

(3) Cytokines 발현 확인

① 강황잎 추출물의 항염증 효능은 Raw 264.7 세포를 통해 확인하였다. Raw 264.7 세포를 96 well에 5×10^4 /well의 농도로 seeding한 후, 농도별 강황잎 추출물 시료와 LPS (최종 농도 $1 \mu\text{g/mL}$)를 처리하여 24시간 배양하였다. 배양 후, 상층액을 취하여 cytokines인 IL- 1β , MCP-1, TNF- α 의 발현을 3회 반복하여 측정하였다.

- ② IL-1 β 발현 측정을 위하여 시료 처리한 상층액과 standard를 각각 100 μ L 첨가하고, 교반하며 실온에서 2.5시간 반응시켰다. 반응 후, 상층액을 제거하고 1X wash solution으로 4회 washing한 후, wash buffer 300 μ L를 채워서 washing 하였다. washing 후, 남은 buffer를 모두 제거하고 1X prepared detection antibody를 각 well 당 100 μ L씩 더하였다. 용액을 제거한 후, washing을 3회 반복하였다. 1X prepared streptavidin solution을 각 well 당 100 μ L 더하고, 교반하며 실온에서 45분간 반응시켰다. 3회 washing한 후, TMB one-step substrate reagent를 100 μ L씩 넣고, 교반하며 실온에서 30분간 반응시켰다. stop solution을 50 μ L 첨가한 후, UV/Visible spectrophotometer를 이용하여 450 nm의 파장에서 즉시 흡광도를 측정하였다. 측정 결과, IL-1 β 는 blank에 대비하여 control에서 유의적으로 증가하였으며, control에 대비하여 강황잎 시료의 농도에 따라 감소하였음을 확인할 수 있었다.

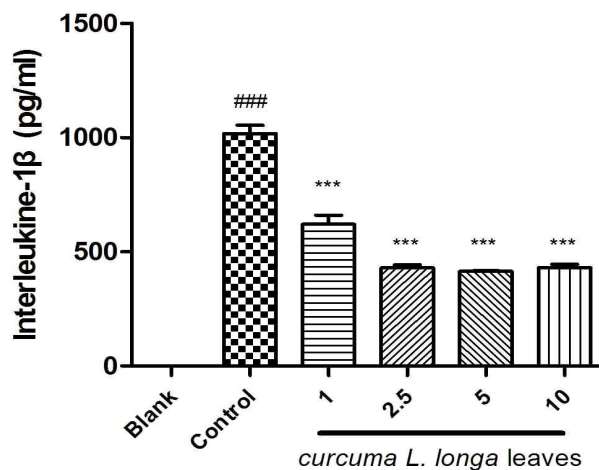


그림 47. 강황잎 물 추출물 처리에 따른 IL-1 β 발현

- ③ MCP-1 발현 측정을 위하여 시료 처리한 상층액과 standard를 각각 100 μ L 첨가하고, 교반하며 실온에서 2.5시간 반응시켰다. 반응 후, 상층액을 제거하고 1X wash solution으로 4회 washing한 후, wash buffer 300 μ L를 채워서 washing 하였다. washing 후, 남은 buffer를 모두 제거하고 1X biotinylated MCP-1 detection antibody를 각 well 당 100 μ L씩 더하고, 교반하며 실온에서 1시간 반응시켰다. 용액을 제거한 후, washing을 3회 반복하였다. 1X HRP-streptavidin solution을 각 well 당 100 μ L씩 더하고, 교반하며 실온에서 45분간 반응시켰다. 3회 washing한 후, TMB one-step substrate reagent를 100 μ L씩 넣고, 교반하며 실온에서 30분간 반응시켰다. stop solution을 50 μ L 첨가한 후, UV/Visible spectrophotometer를 이용하여 450 nm의 파장에서 즉시 흡광도를 측정하였다. 측정 결과, MCP-1은 blank에 대비하여 control에서 유의적으로 증가하였으며, control에 대비하여 강황잎 시료의 농도에 따라 감소하는 경향을 보였으나, 유의적 차이는 존재하지 않았다.

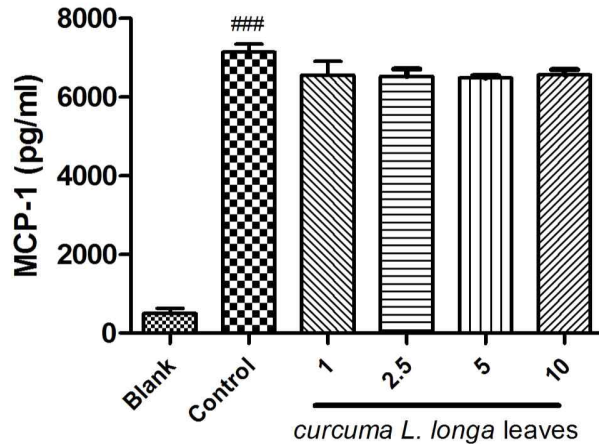


그림 48. 강황잎 물 추출물 처리에 따른 MCP-1 발현

- ④ TNF- α 발현 측정을 위하여 시료 처리한 상층액과 standard를 각각 100 μ L 첨가하고, 교반하며 실온에서 2.5시간 반응시켰다. 반응 후, 상층액을 제거하고 1X wash solution으로 4회 washing한 후, wash buffer 300 μ L를 채워서 washing 하였다. washing 후, 남은 buffer를 모두 제거하고 1X biotinylated TNF- α detection antibody를 각 well 당 100 μ L씩 더하고, 교반하며 실온에서 1시간 반응시켰다. 용액을 제거한 후, washing을 3회 반복하였다. 1X HRP-streptavidin solution을 각 well 당 100 μ L씩 더하고, 교반하며 실온에서 45분간 반응시켰다. 3회 washing한 후, TMB one-step substrate reagent를 100 μ L씩 넣고, 빛을 차단한 상태로 교반하며 실온에서 30분간 반응시켰다. stop solution을 50 μ L 첨가한 후, UV/Visible spectrophotometer를 이용하여 450 nm의 파장에서 즉시 흡광도를 측정하였다. 측정 결과, TNF- α 은 blank에 대비하여 control에서 유의적으로 증가하였으며, control에 대비하여 강황잎 시료의 농도에 따라 감소하는 경향을 보였으나, 유의적 차이는 존재하지 않았다.

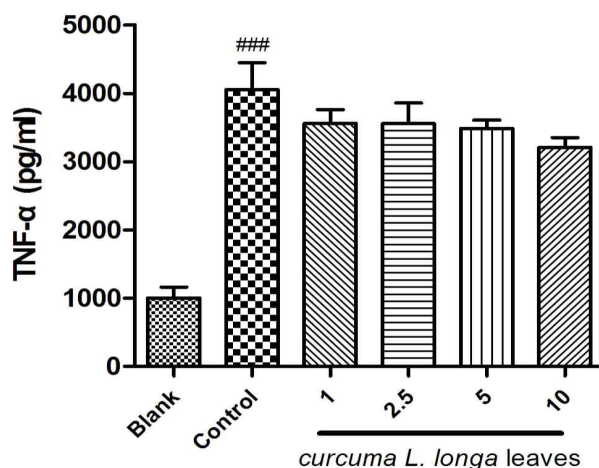


그림 49. 강황잎 물 추출물 처리에 따른 TNF- α 발현

- ⑤ 세포 내 cytokines 발현량 측정 결과, 대조군인 control과 비교했을 때, 강황잎 추출물에 처리를 한 군에서 IL-1 β 의 발현이 유의적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 강황잎 처리

농도가 증가함에 따라 IL-1 β 의 발현도 유의적으로 감소하는 경향을 보여 강황잎 추출물의 염증 억제 효능에 대한 가능성을 확인할 수 있었다. MCP-1와 TNF- α 의 발현도 마찬가지로 강황잎 추출물 처리 농도가 증가함에 따라 감소하는 것으로 나타났지만, 유의성이 나타나지 않았다. 따라서 추가적인 연구를 통한 검증이 필요할 것으로 사료되었다.

10) 강황잎 추출물의 Vero 세포에서의 항산화 효능 평가

(1) 강황잎 열수 추출물 및 다당 추출물의 세포독성 확인

① 강황잎 열수 추출물 및 다당 추출물의 세포독성을 확인하기 위하여 그리벳 원숭이 (*Cercopithecus aethiops*)의 신장 세포인 vero cell line을 이용하여 실험을 진행하였다. vero 세포는 DMEM(Dulbecco Modified Eagle Medium)에 10% fatal bovine serum과 1% streptomycin/penicillin을 추가한 배지로, 5% CO₂, 37°C 조건의 인큐베이터에서 배양하였다. 안정화 기간을 가진 후에 배양 세포의 배지를 제거하고, trypsin/EDTA를 1 mL 처리하여 부착 세포를 떼어내고 배지로 세포를 회수하였다. 1000 rpm에서 3분간 원심 분리하여 세포를 침전시킨 후, 상층의 배지를 제거하고, 새로운 배지를 넣어 세포를 풀어준 후, counting 하였다. 목적으로 하는 세포 수에 맞춰 배지를 이용하여 세포를 희석하고, 이를 96 well flat-bottom plate에 10⁴/well의 농도로 seeding 하였다. 16~24시간이 지난 후, 배지는 serum이 없는 배지로 교체하고, 시료와 hydrogen peroxide를 700 μ g/mL의 농도로 처리하였다. 그리고 강황잎 열수 추출물과 다당 추출물을 10, 25, 50, 100 μ g/mL의 농도로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후, 상층의 배지를 제거하고 MTT 용액이 100 μ g/mL의 농도로 포함된 배지를 100 μ L씩 분주하였다. 1~3시간 동안 배양한 후, 배지를 제거하고 DMSO를 100 μ L씩 분주한 다음, 800 rpm의 microplates shaker에서 5분간 혼합하였다. 그리고 UV/Visible spectrophotometer를 이용하여 570 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 강황잎 열수 추출물 및 다당 추출물의 세포 생존율은 다음과 같이 나타났다. (그림 50, 그림 51).

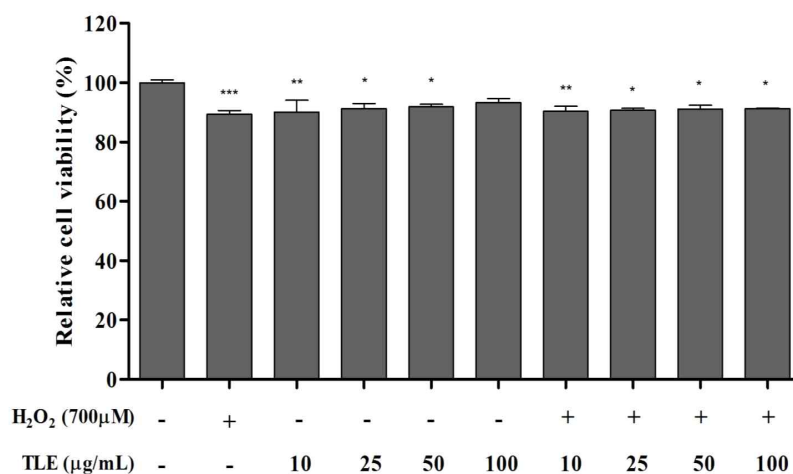


그림 50. 강황잎 열수 추출물의 농도별 세포 생존율

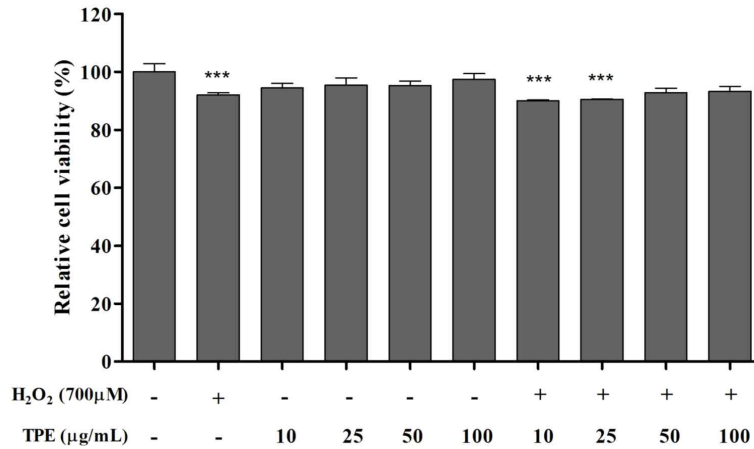


그림 51. 강황잎 다당 추출물의 농도별 세포 생존율

(2) 강황잎 열수 추출물 및 다당 추출물의 활성산소종(ROS) 발생 억제 효능 확인

① 강황잎 열수 추출물과 다당 추출물의 활성산소종 발생 억제 효능은 vero cell line을 이용하여 확인하였다. vero 세포는 안정화를 거친 후, 96 well flat-bottom black plate에 10⁴/well의 농도로 seeding 하였다. 5% CO₂, 37°C 조건의 인큐베이터에서 16~24시간 배양한 후, serum이 없는 배지로 교체하였다. 배지 교체 후 최종 농도가 20 µg/mL인 DCFDA 시약과 농도별 강황잎 추출물을 처리한 후, 30분간 반응시켰다. 반응 후, 배지를 제거하고 따뜻한 PBS 100 µL를 채우고, microplates reader를 이용하여 485 nm/535 nm (Em/Ex)에서 fluorescence를 측정하였다. 강황잎 열수 추출물 및 다당 추출물의 활성산소종 발생 억제 효능은 다음 그림과 같이 나타났다. (그림 52, 그림 53).

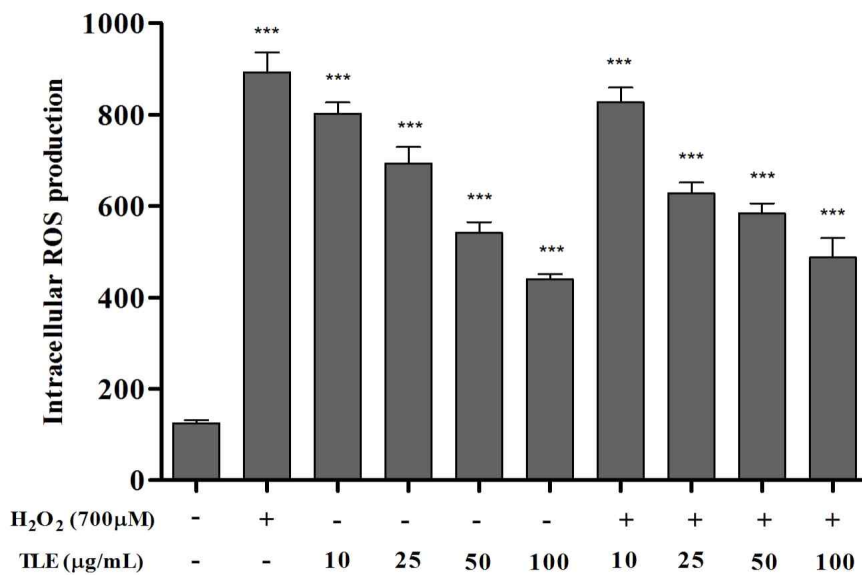


그림 52. 강황잎 열수 추출물의 농도별 활성산소종 발생 억제 효능

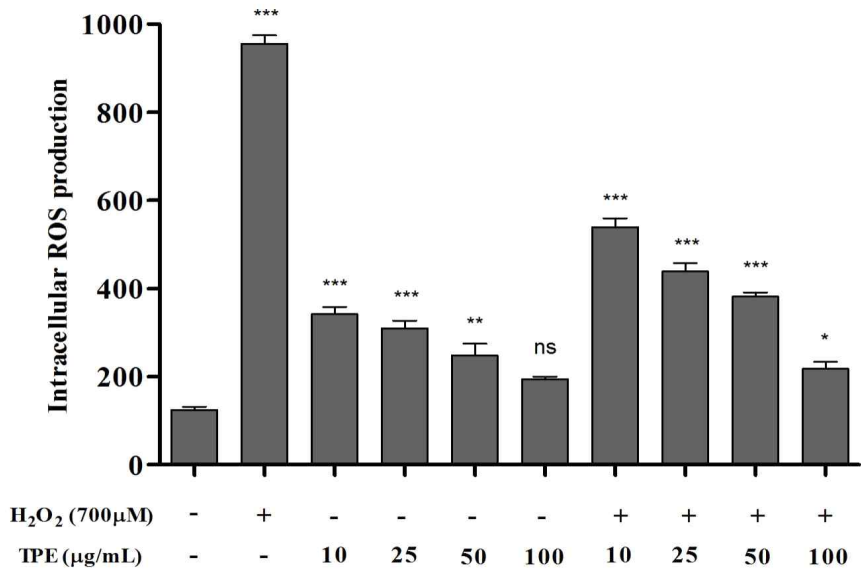


그림 53. 강황잎 다당 추출물의 농도별 활성산소종 발생 억제 효능

(3) 강황잎 열수 추출물 및 다당 추출물이 cell cycle에 미치는 영향 확인

- ① 강황잎 열수 추출물 및 다당 추출물이 vero cell의 cell cycle에 미치는 영향을 확인하기 위하여 PI staining을 거친 후, FACS(Flow Cytometry) 분석을 실시하였다. 먼저 vero 세포는 DMEM 배지를 이용하여 6 well plate에 2×10^5 cells/well의 농도로 seeding 하였다. 16~24시간 후, 700 µM 농도의 hydrogen peroxide와 10, 25, 50, 100 µg/mL 농도의 강황잎 다당 추출물을 각각 처리한 후, 24시간 동안 배양하였다. 배양 후, 세포 상층액을 미리 모아둔 후, 따뜻한 PBS로 washing하고, trypsin을 처리하여 부착된 세포를 떼어낸 후, 모아둔 상층액에 첨가하여 4°C의 micro-centrifuge에서 3000 rpm으로 5분간 원심 분리하였다. 원심 분리 후, 배지를 제거하고 남은 세포 pellet에 PBS를 더하여 잘 풀어주고 (배지 washing 과정), 다시 동일 조건에서 원심 분리하여 세포 pellet을 모았다. 차갑게 준비한 70% 에탄올을 1방울씩 떨어뜨리며, 가볍게 vortex하여 세포를 풀어주었다. 풀어진 세포는 냉장온도에서 1시간 이상 (또는 overnight) 반응시켜 세포 외벽의 투과도를 높여주었다. 반응 종결 후, 동일한 조건에서 원심 분리하여 상층의 에탄올을 제거하고 PBS로 washing하여 다시 원심 분리하였다. 최종 농도가 5 µg/mL가 되도록 ribonuclease A solution을 더하고, PI solution을 10 µg/mL가 되도록 처리한 후, 빛을 차단한 채 ice에 넣어 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후, FACS 기기를 이용하여 분석하였다.
- ② 분석 결과는 다음 그림(그림 54, 그림 55)와 같이 나타났다. sub G1 phase는 H₂O₂ 처리군에서는 24.65%로 나타난 반면, 강황잎 열수 추출물 100 µg/mL 처리 군에서 6.25%로 감소하였고, 다당 추출물 25, 50, 100 µg/mL 처리 군에서 4.97%, 3.20%, 1.59%으로 나타나, 큰 폭으로 감소함을 확인하였다. 해당 결과를 통하여 강황잎 열수 추출물 및 다당 추출물이 탁월한 cell cycle 보호 효능을 지니고 있음을 확인하였다.

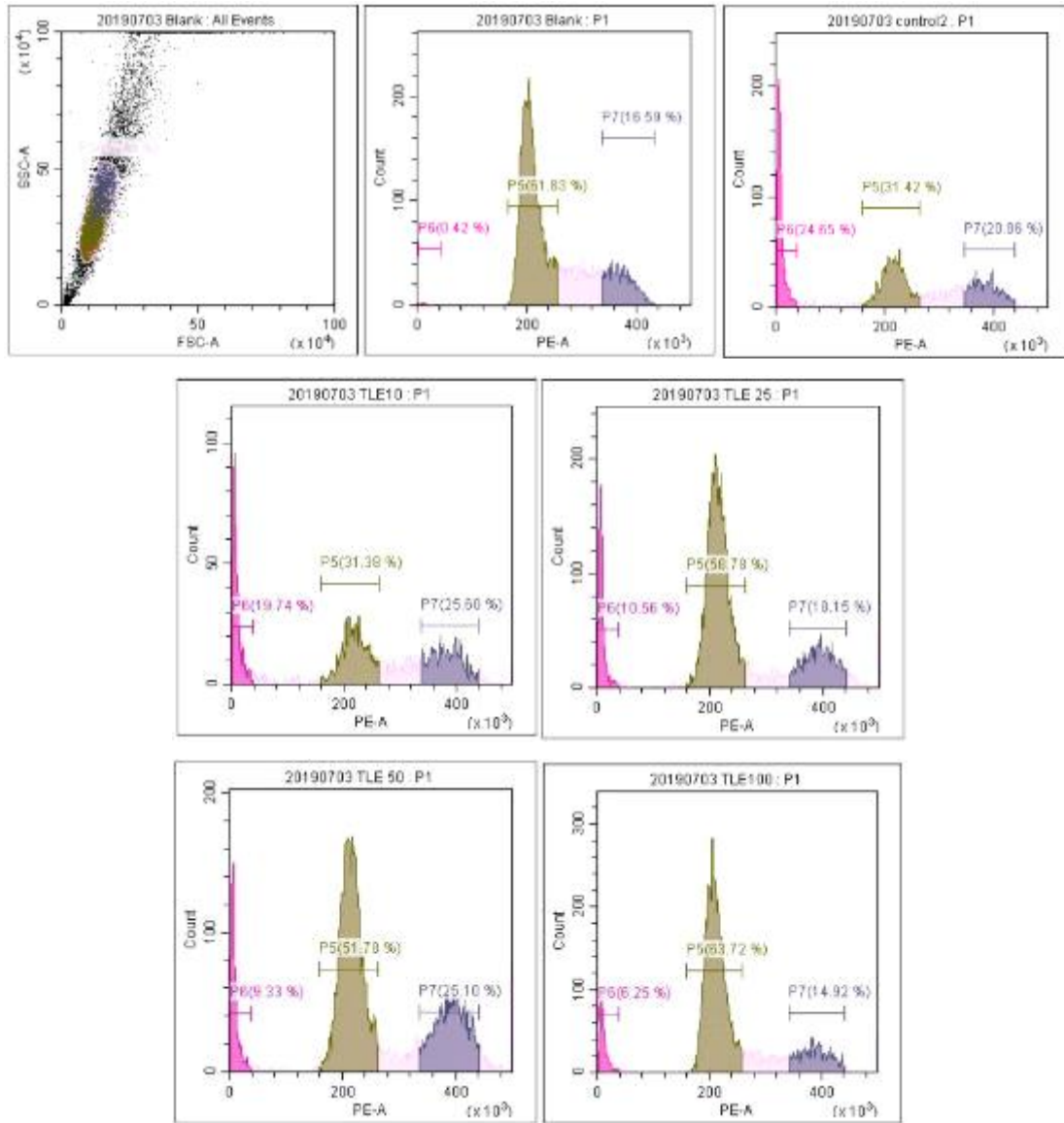


그림 54. 강황잎 열수 추출물이 cell cycle에 미치는 영향 분석 결과

표 23. 강황잎 열수 추출물의 농도별 처리에 따른 cell cycle 비율 변화

Sample	Sub G1 (%)	G1 (%)	G2-M (%)
Blank	0.42	61.83	16.59
Control (H ₂ O ₂)	24.65	31.42	20.86
TLE 10	19.74	31.38	25.50
TLE 25	10.56	58.78	18.15
TLE 50	9.33	51.78	25.10
TLE 100	6.25	63.72	14.92

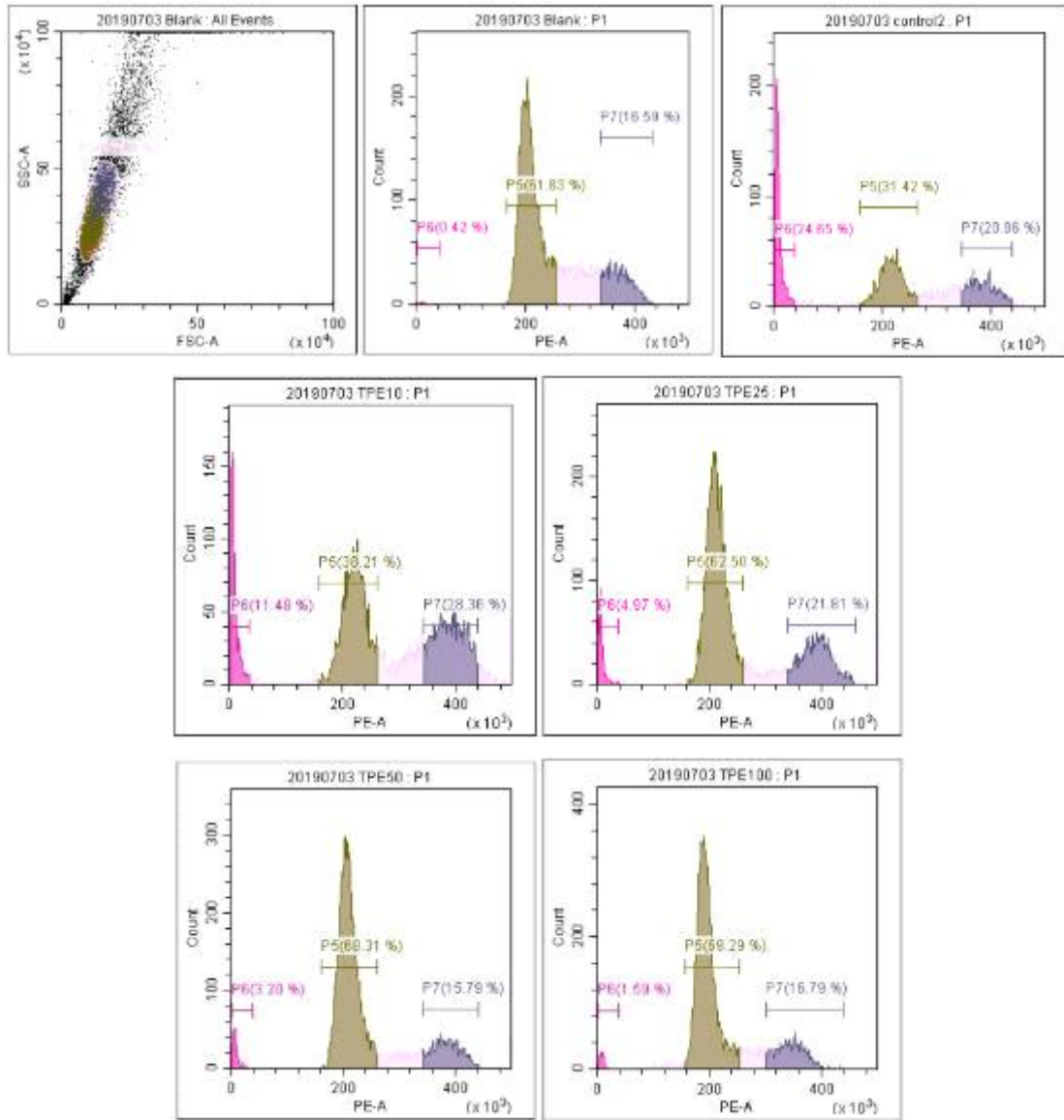


그림 55. 강황잎 열수 추출물이 cell cycle에 미치는 영향 분석 결과

표 24. 강황잎 다당 추출물의 농도별 처리에 따른 cell cycle 비율 변화

Sample	Sub G1 (%)	G1 (%)	G2-M (%)
Blank	0.42	61.83	16.59
Control (H ₂ O ₂)	24.65	31.42	20.86
TLE 10	11.48	38.21	28.36
TLE 25	4.97	62.50	21.81
TLE 50	3.20	68.31	15.79
TLE 100	1.59	69.29	16.79

11) 강황잎 추출물의 장 염증 보호 효능 평가

(1) 강황잎 다당 추출물의 세포독성 확인

① 강황잎 다당 추출물의 세포독성을 확인하기 위하여 인간 대장암 유래 세포주인 Caco-2 cell line을 이용하여 실험을 진행하였다. Caco-2 세포는 MEM(Minimum Essential Media Eagle) 배지에 10% FBS(fatal bovine serum), 1% streptomycin/penicillin, 1% NEAA(Non-Essential Amino Acids)를 추가하여 5% CO₂, 37°C 조건의 인큐베이터에서 배양하였다. 안정화 기간을 가진 후에 배양 배지를 제거하고, trypsin/EDTA를 1 mL 처리하여 세포를 떼어내 동일한 배지로 세포를 회수하였다. 1000 rpm에서 3분간 원심 분리하여 세포를 침전시킨 후, 상층의 배지를 제거하고, 새로운 배지를 넣어 세포를 풀어준 후, counting 하였다. 목적으로 하는 세포수에 맞춰 배지를 이용하여 세포를 희석하고, 이를 96 well flat-bottom plate에 10⁴/well의 농도로 seeding 하였다. 16~24시간이 지난 후, 배지는 serum이 없는 배지로 교체하고, 다당 추출물을 10, 25, 50, 100 µg/mL의 농도로 처리한 뒤, TNF-α를 10 ng/mL의 농도로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후, 상층의 배지를 제거하고 MTT 용액이 100 µg/mL의 농도로 포함된 배지를 100 µL씩 분주하였다. 1~3시간 동안 배양한 후, 배지를 제거하고 DMSO를 100 µL씩 분주한 다음, 800 rpm의 microplates shaker에서 5분간 혼합하였다. 그리고 UV/Visible spectrophotometer를 이용하여 570 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 강황잎 다당 추출물의 세포 생존율은 다음과 같이 나타났다. (그림 56).

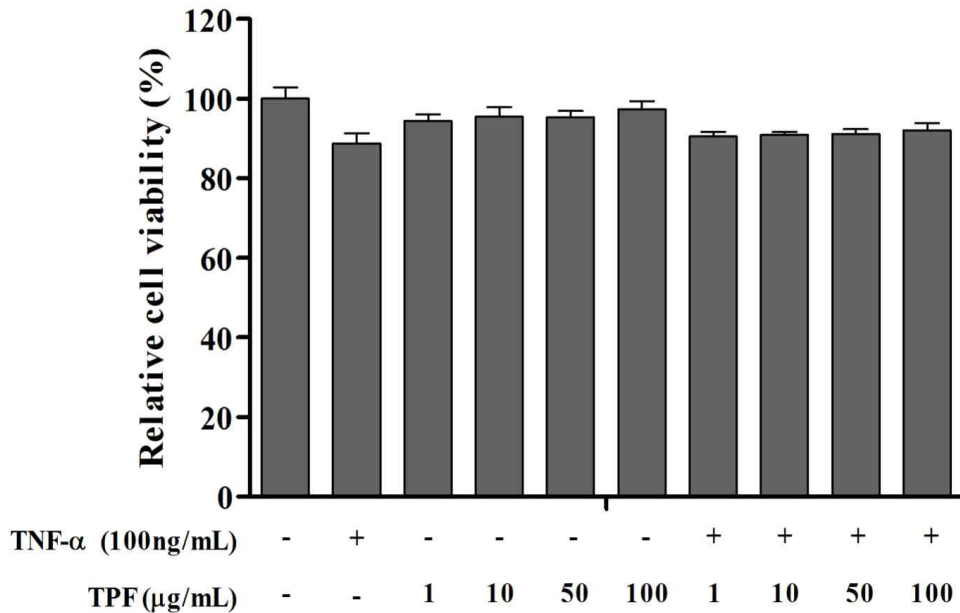


그림 56. 강황잎 다당 추출물의 농도별 세포 생존율

(2) TEER 측정을 통한 강황잎 다당 추출물의 tight junctions 보호 효능 확인

① 강황잎 다당 추출물의 tight junctions 보호 효능을 확인하기 위하여 Caco-2 cell line을 이용하여 실험을 진행하였다. 세포를 seeding 하기 전에 transwell에 rat-tail collagen type I을 코팅하였다. transwell 중 12 well plate를 사용하였으며, 상층의 apical 부분에 300 µL의 collagen

을 처리하여 1시간 동안 코팅하였다. 코팅 후, 사용한 collagen을 회수하여 냉장보관하고, apical은 10분 정도 건조하여 사용하거나 냉장보관 하였다. 사용하기 전에 cold-PBS로 2회 washing한 후, 37°C에서 데운 배지를 분주하고 인큐베이터에서 반응한 다음에 사용하였다.

- ② Caco-2 세포는 12 well transwell plate에 10^5 cells/well의 농도로 seeding 하였으며, 2~3일 간격으로 배지를 교체하는 동시에 TEER 값을 측정하였다. (apical volume: 0.6 mL, basolateral volume: 2.5 mL). TEER 값은 5일 이내로 $500 \Omega/\text{cm}^2$ 까지 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 14일 이후 $1000 \Omega/\text{cm}^2$ 으로 증가하는 것을 확인한 후에 실험에 사용하였다. TEER 값이 $1000 \Omega/\text{cm}^2$ 이상으로 증가하는 것을 확인하고, 강황잎 다당 추출물을 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리하였으며, TNF- α 는 $10 \text{ ng}/\text{mL}$ 농도로 처리하였다. 물질 처리 후, 바로(0시간) TEER 값을 측정하고, 1~72시간까지 TEER 값을 측정하였다. TEER 값 측정 후, 0시간을 기준으로 하여 각 군별 상대값을 계산하여 나타냈다. 실험결과에 따르면 TEER 값은 induction 처리 후 24시간 이후부터 감소하는 경향을 보였으며, 특히 TNF- α 를 처리한 control 군에서 뚜렷하게 나타났다. 강황잎 다당 추출물을 처리한 TPE 군에서는 TNF- α 처리 후 TEER 값의 감소가 나타났지만, control 군에 비해 완화된 경향을 보이며 tight junctions 보호 효능이 있는 것으로 나타났다. (그림 57).

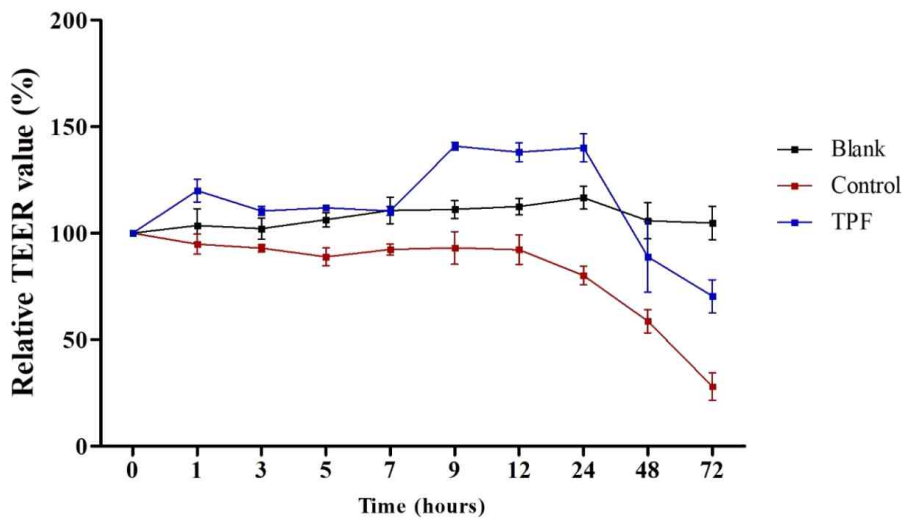


그림 57. TEER 측정을 통한 강황잎 다당 추출물의 장 투과도 안정화 효능

(3) 면역 형광염색법을 통한 강황잎 다당 추출물의 tight junctions 보호 효능 확인

- ① 강황잎 다당 추출물의 장 보호 효능을 확인하기 위하여 면역 형광염색법을 이용하여 tight junctions 발현을 확인하였다. tight junctions의 발현 확인은 6 well flat-bottomed plate에 coverslip을 넣고, UV를 조사한 후, rat-tail type I collagen을 처리하였다. 반응 후, collagen을 다시 회수하고, PBS로 2회 washing한 다음에 실험에 사용하였다. Caco-2 세포는 6 well plate에 2.5×10^5 cells/well의 농도로 seeding 하여 배양하였으며, 3일 이후 monolayer가 형성되고 tight junctions가 관찰되는 시점에 농도별 강황잎 다당 추출물과 TNF- α 를 $10 \text{ ng}/\text{mL}$ 농도로 처리하여 실험을 진행하였다.

② 물질 처리 후 24시간이 지나면 PBS로 3회 washing한 후, 4% formaldehyde를 1 mL 처리하여 20분간 고정하였다. 고정이 끝나면 PBS로 washing한 후, 0.2% Triton-X를 1 mL 처리하여 10분간 반응시켜 투과도를 높였다. 반응 후, PBS로 washing한 후, 5% BSA solution을 처리하여 1시간 동안 blocking 하였다. 이후, 5% BSA에 희석한 primary antibody (ZO-1, Occludin proteins)를 분주하고, parafilm으로 밀봉하여 4°C에서 overnight 또는 실온에서 1시간 반응시킨다. primary antibody 반응이 끝난 후, PBS로 조심스럽게 washing하고, 5%에 BSA에 희석한 secondary antibody (Alexa 488, 555)를 실온에서 1시간 붙였다. 마지막으로 PBS로 washing하고, DAPI가 포함된 mounting solution으로 고정한 후, Nikon Eclipse Ti (Nikon, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다. Alexa 488로 고정된 Occludin은 초록빛으로, Alexa 555로 고정된 ZO-1은 붉은빛으로 반응하였다. (그림 58).

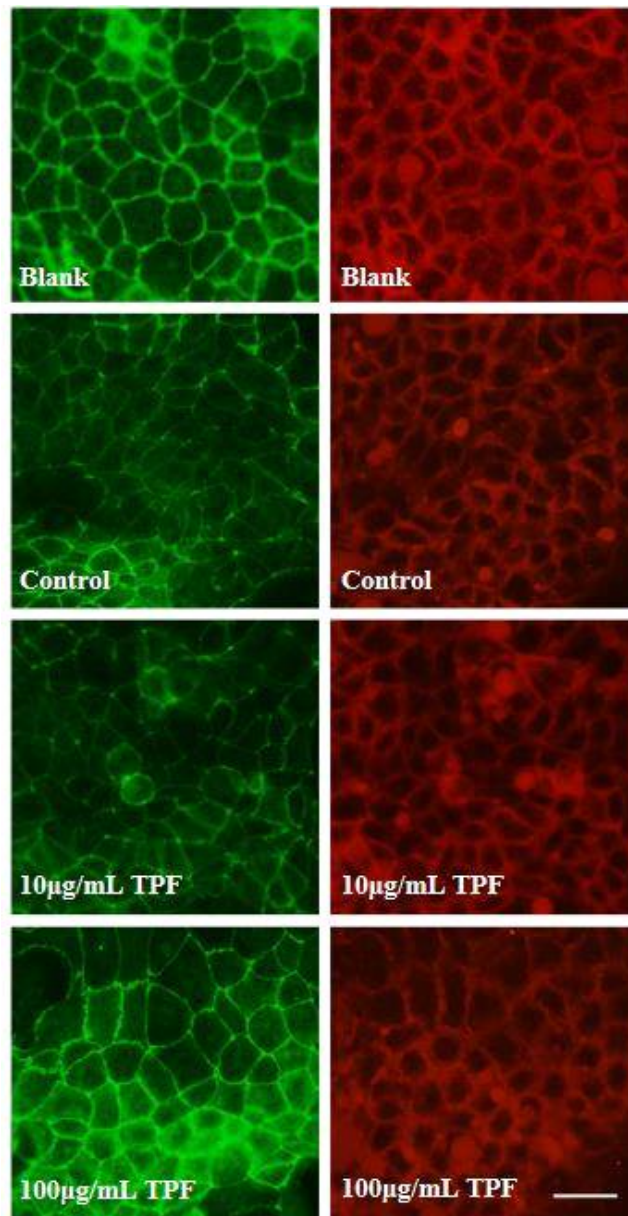


그림 58. 면역 형광염색법을 통한 occludin(좌) 및 ZO-1(우) 단백질의 발현에 미치는 영향

- ③ 강황잎 다당 추출물 처리 군에서 control 군에 대비하여 tight junctions 중 Occludin 단백질의 발현이 유의적으로 농도 개선되는 것으로 나타났으며, ZO-1 단백질 역시 농도 유의적으로 농도 개선되는 것으로 나타났다. 이를 통해 강황잎 추출물이 tight junctions integrity를 유지하여 장 보호 효능을 지니고 있음을 확인할 수 있었다.

12) 강황잎 추출물의 독성시험

(1) 강황잎 추출물의 농축 정도(당도)에 따른 SPME 분석

- ① 강황잎 원물에 대한 독성시험을 의뢰하고, 그 원물을 이용하여 만든 강황잎 추출물에 대한 독성시험을 하는 것이 일반적이거나, 본 건은 전례가 없었기 때문에 식품의약품안전처 신소재식품과로부터 지속적인 정보교류를 요청받았다. 또한, 기존 강황잎 추출물을 더욱 농축하여 당도(Brix)를 최대한 높여서 성분 분석을 하여 그 결과를 전달할 것을 요청받았다. 분석 결과는 다음 그림(그림 59)과 같이 나타났다.

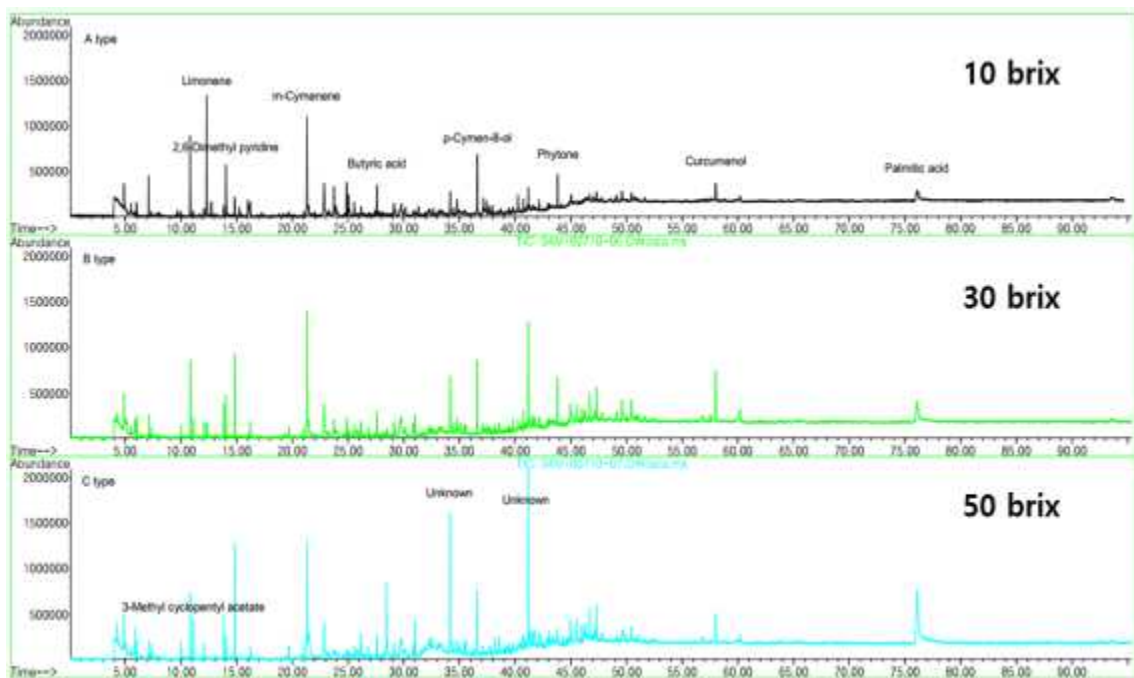


그림 59. 강황잎 추출물의 농축 정도(당도)에 따른 SPME 분석 결과

- ② SPME 분석 결과, 농축을 진행할수록 butyric acid (불쾌한 냄새)가 증가하고, limonene (오렌지, 박하유)가 감소하였다. 이 중 butyric acid는 치즈와 간장에서 느낄 수 있는 불쾌한 냄새의 성분이며, limonene은 감귤류에서 검출되는 대표적인 성분으로서 단순히 향기뿐만 아니라 항균효과도 가지고 있어 이용범위가 매우 넓다고 알려져 있다. 또한 Choi et al. 의 보고에 따르면, 돈육 패티에 감귤껍질을 이용하였을 때, 풍미는 대조군보다 우수하였다고 한다. 이는 감귤껍질이 함유하고 있는 특유의 향기성분인 리모넨(d-limonene)의 영향으로 추측된다고 하였다. 또한, menthol도 감소하는 것으로 나타나 강황잎 추출물 특유의 향 성분이 감소되는 것을 확

인할 수 있었다. 이러한 근거자료들은 강황잎 추출물이 식품의 풍미증진제로서 사용될 수 있다는 가능성을 보여주었다. 그리고 강황잎 추출물의 농축과정 중에 손실되거나 증가되는 성분들은 풍미증진제로서 역할을 하는데 제약을 줄 수 있으므로, 10~12 Brix의 강황잎 추출물에 대한 식품원료 인정을 요청하였다.

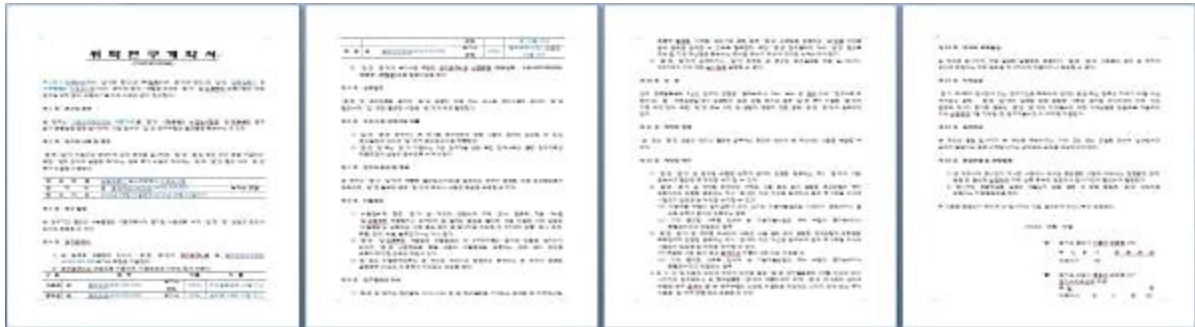


그림 60. 강황잎 추출물 독성시험 의뢰 계약서



그림 61. 강황잎 열수 추출물 COA(좌)와 제조공정규격서(우)

(2) 랫드를 이용한 단회 경구 투여 독성시험

① 시험 목적

- ㄱ. 개략의 독성 확인

② 투여 방법

- ㄱ. 군 구성 : 암수 각각 5마리/군, 대조군 1, 시험군 3

- ㄴ. 투여 경로 : 경구
- ㄷ. 선택 이유 : 임상 예정 경로를 기준으로 선택
- ㄹ. 투여 횟수 및 투여 기간 : 투여 당일 1회 투여

③ 측정 및 관찰 항목

- ㄱ. 일반증상 관찰 : 전 동물에 대하여 매일 1회 이상 증상 관찰
- ㄴ. 체중 측정 : 모든 동물에 대하여 투여 전, 투여 후 1, 3, 7, 14일에 측정
- ㄷ. 부검 : 투여 14일째 오후에 모든 생존동물을 개복하여 모든 장기를 검사

④ 시험결과

시험계 [성별(마리) /주령]	용량 단계	결과
SD 랫드 [암·수컷(각20) /8주령]	3단계 (1,250, 2,500, 5,000 mg/kg/day)	1. 사망동물은 관찰되지 않았음. 2. 일반증상 관찰 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았음. 3. 체중변화 관찰 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았음. 4. 부검소견 관찰 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았음. ⇒ LD50 = 5,000 mg/kg·bw/day 이상으로 판단됨.

(2) 랫드를 이용한 2주 반복 DRF 독성시험

① 시험 목적

- ㄱ. 본 시험의 용량 설정

② 투여 방법

- ㄱ. 군 구성 : 암수 각각 5마리/군, 대조군 1, 시험군 4
- ㄴ. 투여 경로 : 경구
- ㄷ. 선택 이유 : 임상 예정 경로를 기준으로 선택
- ㄹ. 투여 횟수 및 투여 기간 : 1회/1일, 7회/1주, 2주간

③ 측정 및 관찰 항목

- ㄱ. 일반증상 관찰 : 투여한 전 기간에 걸쳐 1일 1회 투여 직후의 일반증상 관찰
- ㄴ. 체중변화 측정 : 투여 당일 및 시험기간 중 주 1회, 부검일에 절식 후의 체중 측정
- ㄷ. 사료 및 물 섭취량 측정 : 투여 당일 및 전 시험기간 중 일정 기간으로 측정
- ㄹ. 안 검사 : 군 분리 시 모든 동물에 대하여 눈의 외관을 관찰
- ㅁ. 요 검사 : 투여 최종 주 시험군별 각 5마리의 동물에 대하여 측정
- ㅂ. 혈액학적 검사 : WBC, RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC, Platelet, 백혈구 감별
- ㅅ. 혈액 응고시간 검사 : 부검일에 PT(prothrombin time) 및 APTT

- . 혈액 생화학적 검사 : AST, ALT, ALP, BUN, CRE, GLU, CHO, PRO, CPK, ALB, BIL, A/G ratio, CLI, IP, Ca, Cl, Na, K
- ㄷ. 부검 : 투여 개시 2주 후
- ㄸ. 장기중량 측정 : 정소, 전립선, 난소, 자궁, 비장, 간장, 부신, 신장, 흉선, 심장, 폐, 뇌, 뇌하수체

④ 시험결과

- ㄱ. 본 시험은 시험물질(강황잎 열수 추출물)을 Sprague-Dawley 랫드에 2주간 반복 경구 투여 하였을 때 나타나는 독성을 검사하여 추후 진행될 반복투여 독성시험의 용량설정에 참고하고자 수행하였다. 강황잎 열수 추출물을 625, 1250, 2500, 5000 mg/kg/day로 투여하는 시험물질 투여 군과 멸균주사 용수만을 투여하는 음성대조군을 설정하였다. 군당 10마리(암수 각 5마리)로 구성하였다. 사망을 포함한 일반증상 관찰, 체중변화 측정, 사료 및 물 섭취량 산출, 안과학적 검사, 요 검사, 혈액학적 및 혈액 생화학적 검사, 장기중량 측정, 부검소견 관찰을 실시하였고, 그 결과는 다음과 같다.
- ㄴ. 일반증상 관찰 결과, 시험물질 색 변이 625 mg/kg/day 이상 투여군 암수 모든 동물에서 Day 12~15에 관찰되었다.
- ㄷ. 체중변화 관찰 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다.
- ㄹ. 사료 섭취량 관찰 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다.
- ㅁ. 물 섭취량 관찰 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다.
- ㅂ. 안과학적 검사 결과, 시험물질에 의한 이상 소견은 관찰되지 않았다.
- ㅅ. 요 검사 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다.
- ㅇ. 혈액학적 검사 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다.
- ㅈ. 혈액 생화학적 검사 결과, 시험물질에 의한 이상 소견은 관찰되지 않았다.
- ㅊ. 장기중량 측정 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다.
- ㅋ. 부검소견 관찰 결과, 시험물질에 의한 이상 소견은 관찰되지 않았다.

(3) 랫드를 이용한 13주 반복 독성시험

① 시험 목적

- ㄱ. 무독성량 및 표적장기 규명

② 투여 방법

- ㄱ. 군 구성 : 암수 각각 10마리/군, 대조군 1, 시험군 3
- ㄴ. 투여 경로 : 경구
- ㄷ. 선택 이유 : 임상 예정 경로를 기준으로 선택
- ㄹ. 투여 횟수 및 투여 기간 : 1회/1일, 7회/1주, 13주간

③ 측정 및 관찰 항목

- ㄱ. 일반증상 관찰 : 투여한 전 기간에 걸쳐 1일 1회 투여 직후의 일반증상 관찰
- ㄴ. 체중변화 측정 : 투여 당일 및 시험기간 중 주 1회, 부검일에 절식 후의 체중 측정
- ㄷ. 사료 및 물 섭취량 측정 : 투여 당일 및 전체 시험기간 중 일정 기간으로 측정

- ㄹ. 안 검사 : 군 분리 시에 모든 동물에 대하여 눈의 외관을 관찰
- ㅁ. 요 검사 : 투여 최종 주 시험군별 각 10마리의 동물에 대하여 측정
- ㅂ. 혈액학적 검사 : WBC, RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC, Platelet, 백혈구 감별
- ㅅ. 혈액 응고시간 검사 : 부검일에 PT(prothrombin time) 및 APTT
- ㅇ. 혈액 생화학적 검사 : AST, ALT, ALP, BUN, CRE, GLU, CHO, PRO, CPK, ALB, BIL, A/G ratio, CLI, IP, Ca, Cl, Na, K
- ㅈ. 부검 : 투여 개시 13주 후
- ㅊ. 장기중량 측정 : 정소, 전립선, 난소, 자궁, 비장, 간장, 부신, 신장, 흉선, 심장, 폐, 뇌, 뇌하수체

④ 시험결과

- ㄱ. 본 시험은 시험물질(강황잎 열수 추출물)을 Sprague-Dawley 랫드에 13주간 반복 경구 투여 하였을 때 나타나는 독성을 검사하여 무독성량 및 표적장기를 알아보고자 수행하였다. 강황잎 열수 추출물을 1250, 2500, 5000 mg/kg/day로 투여하는 시험물질 투여군과 멸균주사 용수만을 투여하는 음성대조군을 설정하였다. 군당 20마리(암수 각 10마리)로 구성하였다. 사망을 포함한 일반증상 관찰, 체중변화 측정, 사료 및 물 섭취량 산출, 안과학적 검사, 요 검사, 혈액학적 및 혈액 생화학적 검사, 장기중량 측정, 부검소견 관찰 및 조직병리학적 검사를 실시하였고, 그 결과는 다음과 같다.
- ㄴ. 일반증상 관찰 결과, 시험물질 색 변이 5000 mg/kg/day 이상 투여군 암수 모든 동물에서 Day 24~92에 관찰되었다.
- ㄷ. 체중변화 관찰 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다.
- ㄹ. 사료 섭취량 관찰 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다.
- ㅁ. 물 섭취량 관찰 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다.
- ㅂ. 안과학적 검사 결과, 시험물질에 의한 이상 소견은 관찰되지 않았다.
- ㅅ. 요 검사 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다.
- ㅇ. 혈액학적 검사 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다.
- ㅈ. 혈액 생화학적 검사 결과, 시험물질에 의한 이상 소견은 관찰되지 않았다.
- ㅊ. 장기중량 측정 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다.
- ㅋ. 부검소견 관찰 결과, 시험물질에 의한 이상 소견은 관찰되지 않았다.
- ㅌ. 조직병리학적 검사 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다.

(4) 비글견을 이용한 단회 경구 투여 독성시험

① 시험 목적

- ㄱ. 개략의 독성 확인

② 투여 방법

- ㄱ. 군 구성 : 암수 각각 2마리/군, 시험군 1
- ㄴ. 투여 경로 : 경구
- ㄷ. 선택 이유 : 임상 예정 경로를 기준으로 선택
- ㄹ. 투여 횟수 및 투여 기간

: 투여 당일 1회 투여, 7일 간격으로 약 3회 투여 (increasing-dose tolerance study)
 해당 증상에 따라 변경

③ 측정 및 관찰 항목

- ㄱ. 일반증상 관찰 : 전 동물에 대하여 매일 1회 이상 증상 관찰
- ㄴ. 체중변화 측정 : 모든 동물에 대하여 투여 전, 투여 후 1, 3, 7, 14일에 측정
- ㄷ. 부검 : 투여 14일째 오후에 모든 생존동물을 개복하여 모든 장기를 검사

④ 시험결과

시험계 [성별(마리) /주령]	용량 단계	결과
비글견 [암·수컷(각6) /5.5~6.5월령]	3단계 (1,250, 2,500, 5,000 mg/kg/day)	1. 사망동물은 관찰되지 않았음. 2. 일반증상 관찰 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았음. 3. 체중변화 관찰 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았음. 4. 부검소견 관찰 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았음. ⇒ LD50 = 5,000 mg/kg·bw/day 이상으로 판단됨.

(5) 복귀 돌연변이 시험

① 시험 목적

- ㄱ. 세균에 있어서 복귀 돌연변이 유발성 여부를 지표로 하여 검색

② 시험계

- ㄱ. 시험 균주명 : Salmonella typhimurium TA1535, TA1537, TA98, TA100
 Escherichia coli WP2 uvrA.

③ 대조물질

- ㄱ. 양성대조물질 I (대사활성계 적용 시)
 - 명칭 : 2-Aminoanthracene [613-13-8] (약칭 2-AA)
 - 적용균주 : TA100 및 TA98 (각 0.5 µg/plate), TA1535 및 E. coli WP2 uvrA.
 (각 2.0 µg/plate), TA1537 (1.0 µg/plate)
- ㄴ. 양성대조물질 II (대사활성계 미적용 시)
 - 명칭 : Sodium azide [26628-22-8] (약칭 SA)
 - 적용균주 : TA100 및 TA1535 (공히 0.5 µg/plate)
- ㄷ. 양성대조물질 III (대사활성계 미적용 시)

- 명칭 : 4-Nitroquinoline-1-oxide [56-57-5] (약칭 4NQO)
- 적용균주 : TA98 및 E. coli WP2 uvrA. (공히 0.5 µg/plate)

ㄹ. 양성대조물질 IV (대사활성계 미적용 시)

- 명칭 : 9-Aminoacridine [90-45-9] (약칭 9-AA)
- 적용균주 : TA1537 (50 µg/plate)

④ 대사활성계

- ㄱ. S-9 (Aroclor 1254-induced rat liver S-9)
- ㄴ. Cofactor : Cofactor- I

⑤ 시험결과

ㄱ. 농도결정 시험

균주	시험방법					결과
	용량 단계	용량	대사활성	음성대조군	양성대조군	
살모넬라균 TA98	5단계	6.25, 12.5, 25, 50, 100 µL/plate	S9(+) S9(-)	부형제 0.1 mL	B[a]P (S9+)	모든 농도 균에서 침전은 관찰되지 않았으며, 계수 시 플레이트에서도 침 전, 세포독성 및 집락수의 증가는 관찰되지 않았다.
살모넬라균 TA100					2-NF (S9-)	
살모넬라균 TA1535					2-AA (S9+)	
살모넬라균 TA1537					SA (S9-)	
E.coli WP2 uvrA.					2-AA (S9+)	
					4NQO (S9-)	

2-Aminoanthracene (2-AA), Benzo[a]pyrene (B[a]P), Sodium azide (SA), 2-Nitrofluorene (2-NF), 4-Nitroquinoline-1-oxide (4NQO), Acridine Mutagen ICR 191 (ICR-191)

ㄴ. 본 시험

균주	시험방법					결과
	용량 단계	용량	대사활성	음성대조군	양성대조군	
살모넬라균 TA98	5단계	6.25, 12.5, 25, 50, 100 μL/plate	S9(+) S9(-)	부형제 0.1 mL	B[a]P (S9+) 2-NF (S9-)	-미생물 오염으로 인한 집락은 나타나지 않았고, 모든 시험균주에서 세포독성 또한 나타나지 않았다. - 모든 균주에서 대사활성계 적용여부에 관계없이 모든 농도에서 평균 집락수의 실질적인 증가는 나타나지 않았다. - 시험타당성 기준을 모두 만족하고, 양성판정기준을 만족시키지 못하였다. 따라서 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 판단되었다.
살모넬라균 TA100					2-AA (S9+) SA (S9-)	
살모넬라균 TA1535					2-AA (S9+) SA (S9-)	
살모넬라균 TA1537					2-AA (S9+) ICR-191 (S9-)	
E.coli WP2 uvrA.					2-AA (S9+) 4NQO (S9-)	

(6) 염색체 이상시험

① 시험 목적

ㄱ. 배양한 포유동물 세포에서의 염색체 이상 유발성 여부를 지표로 하여 검색

② 시험계

ㄱ. 시험계명 : 배양 CHL 세포

③ 대조물질

ㄱ. 양성대조물질 I (대사활성계 적용 시)

- 명칭 : Cyclophosphamide·H₂O (약칭 CPA)

ㄴ. 양성대조물질 II (대사활성계 미적용 시)

- 명칭 : Ethylmethanesulfonate (약칭 EMS)

④ 대사활성계

ㄱ. S-9 (Aroclor 1254-induced rat liver S-9)

ㄴ. Cofactor : Cofactor- I

⑤ 시험결과

ㄱ. 농도결정 시험 : 세포증식 억제 시험

세포주	시험방법					IC50 또는 RICC55 등
	용량 단계	최고 용량	대사 활성화	음성 대조군	양성대조군	
Chinese Hamster 유래 폐섬유아세포 (CHL/IU cell)	5단계	100 μ l/mL	S9(+) 6시간	멸균 증류수	B[a]P (20 μ g/mL)	- 시험물질 처리 시 모든 처리계열의 45 μ L/mL 농도군 이상에서 혼탁이 관찰되었다. - RICC 값이 45 \pm 5 %가 되는 높은 농도를 추정하여 최고 농도로 설정하였다.
		100 μ l/mL	S9(-) 6시간		4NQO (0.4 μ g/mL)	
		100 μ l/mL	S9(-) 24시간		4NQO (0.4 μ g/mL)	

ㄴ. 본 시험

세포주	시험방법					IC50 또는 RICC55 등
	용량 단계	최고 용량	대사 활성화	음성 대조군	양성대조군	
Chinese Hamster 유래 폐섬유아세포 (CHL/IU cell)	3단계	30 μ l/mL	S9(+) 6시간	멸균 증류수	B[a]P (20 μ g/mL)	- 염색체의 구조적 이상을 가진 중기상의 출현빈도가 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 나타내지 않았다. - 대사활성계 비적용 6시간 처리계열에서는 25 μ L/mL 처리군에서 염색체의 수적 이상을 가진 중기상의 출현빈도가 1.67%로, 음성대조군의 HCD 범위를 벗어났으나, 그 수치가 미미하였고, 음성대조군에 비해 통계학적 유의성이 없었으며, 용량 의존적으로 증가하지 않았다. 따라서 강황잎 추출물은 CHL 세포에 염색체 이상을 유발하지 않는 것으로 판단되었다.
		25 μ l/mL	S9(-) 6시간		4NQO (0.4 μ g/mL)	
		10 μ l/mL	S9(-) 24시간		4NQO (0.4 μ g/mL)	

(7) 소핵시험

① 시험 목적

ㄱ. 변이원성을 설치류(ICR 마우스) 골수세포에 있어서 소핵 유발성 여부를 지표로 하여 검색

② 시험계

ㄱ. 특정 병원균 부재 (SPF) ICR 마우스

③ 대조물질

ㄱ. Cyclophosphamide·H₂O (약칭 CPA)

④ 투여 방법

ㄱ. 투여 경로 : 경구

ㄴ. 선택 이유 : 임상 예정 경로를 기준으로 선택

ㄷ. 투여 횟수 및 투여량 : 대상 물질의 특성에 따라 결정

⑤ 측정 및 관찰 항목

ㄱ. 일반증상 관찰 : 순화기간, 투여 시, 부검 전에 외관 관찰 실시

ㄴ. 체중변화 측정 : 군 분리 시, 투여 시, 부검 시에 실시

ㄷ. 골수 검체 제작 : 골수 검체 제작은 Schmid (1975)의 방법을 이용

ㄹ. 소핵의 계수 및 결과의 표시

: 소핵의 빈도를 산출하기 위해 동물당 2000개의 PCE(polychromatic erythrocyte) 중 나타나는 MNPCE(micronucleated polychromatic erythrocyte, 소핵을 가진 다염성적혈구)의 수를 계수

ㅁ. 결과의 판정

: 투여 군에서의 MNPCE의 빈도가 통계학적으로 유의하며, 용량 의존적으로 증가 또는 하나 이상의 용량에서 재현성 있는 양성반응을 나타낼 경우 양성으로 판정

⑥ 시험결과

ㄱ. 투여량을 결정하기 위하여 동일종, 동일주령의 동물을 사용하여 예비시험을 수행하였다. 예비 시험에서는 투여액량을 1.25, 2.5, 5.0 mL/kg/day로, 시험물질 용량을 1250, 2500, 5000 mg/kg/day로 설정하여 용량 당 암수 각 3마리에 2일간 경구 투여하고, 투여일 포함 4일간 관찰하였다.

ㄴ. 관찰 결과, 모든 동물에서 육안으로 특별한 이상 소견은 관찰되지 않았으며, 성별에 따른 현저한 독성의 차이도 없었다. 따라서 본 시험에서는 수컷 동물을 사용하였고, 예비시험 결과에 따라 5000 mg/kg/day를 본 시험의 고용량으로 설정하고, 공비를 2로 하여 아래로 2개의 군을 두었다. 또한, 멸균주사 용수만을 투여하는 음성대조군을 두었다.

시험계 [성별(마리) /주령]	시험방법					결과
	용량단계 (최고용량)	음성 대조군	양성 대조군	다염성 적혈구 관찰수/출현빈도	PCE/RBC /체중 /육안증상	
SPF 랫드, Sprague -Dawley [수컷(30) /8주령]	3단계 (1250, 2500, 5000 mg/kg)	멸균 증류수	Cyclophos phamide monohydr ate (CPA) (40mg/kg)	4000개/ 유의한 차이 없음	유의한 차이 없음 /유의한 차이 없음 /이상소견 없음	Sprague-Dawley 랫드의 골수세포 에 소핵을 유발 하지 않는 것으 로 판단되었다.

(8) 강황잎 추출물의 독성시험을 통한 식품원료로서의 안전성 판단

: 본 과제를 통해 개발한 강황잎 추출물의 독성과 안전성을 확인하기 위해 독성시험 공인인증 기관인 (주)켄온(ChemOn, Inc.)에 독성시험을 의뢰한 결과, 본 과제를 통해 개발한 강황잎 추출물(10 Brix)은 ‘독성이 없다’고 최종적으로 판단되었으며, 식용으로 섭취 시 ‘안전성에 문제가 없음’을 확인할 수 있었다.

13) 강황잎 추출물을 이용한 식품용 제제 (액상제제, 분말제제)

(1) 액상제제

① 액상제제는 반응표면분석으로 확보한 최적 추출조건(85℃, 2시간 10분)으로 열수 추출하여 얻은 10 Brix의 강황잎 추출물을 이용하였다.

(2) 분말제제

① 분말제제는 액상제제의 강황잎 열수 추출물에 30~40%의 텍스트린을 첨가하여 homo-mixer로 균질화한 후, 160℃, 130,000 rpm의 조건에서 spray dryer를 이용하여 제조하였다.

② 제조한 분말제제에서는 강황잎 추출물의 특유 향미성분이 감소되어 거의 느껴지지 않았고, 푸임 또한 텍스트린 자체의 맛이 더욱 강하게 느껴져서 분말제제를 이용해서 식품의 풍미개선을 이끌어내기에는 어려움이 있었다. 따라서 강황잎 추출물을 식품 풍미개선제로 사용하기 위해서는 분말제제보다 액상제제가 적합한 것으로 판단되었다.



그림 62. Homo-mixer(좌)와 Spray dryer(우)



그림 63. 강황잎 추출물의 분말제제

(3) 식품군으로의 강황잎 추출물 적용 실험

- ① 개발된 제제(액상제제)를 오렌지 주스에 0, 0.1, 0.3% 첨가하여 저장온도(25℃, 4℃)에 따른 pH 변화 측정, 색도 값 측정, 미생물 검사를 실시하였다. pH 변화 측정은 pH meter를 이용하였고, 색도 값 측정은 minota 색차계를 이용하였으며, 미생물 검사는 petrifilm (일반세균용, 곰팡이용)을 이용하였다.
- ② 카레, 커피 유음료, 호떡믹스(반죽), 소고기 양념소스, 아이스크림 등의 식품군에 액상제제를 적용해보는 실험을 수행하였다.

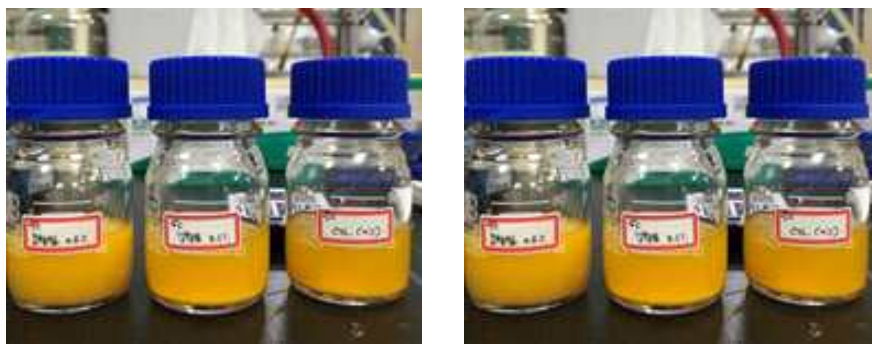


그림 64. 강황잎 추출물의 액상제제 (오렌지 주스)

ㄱ. pH 변화는 상온 보관 시에 강황잎 추출물 무첨가 군에서 가장 급격한 감소가 나타났다. 강황잎 추출물의 첨가 농도가 0.1%, 0.3%로 높아질수록 pH의 감소가 더욱 적게 나타났다. 냉장 보관 시에도 강황잎 추출물 무첨가, 0.1% 첨가, 0.3% 첨가 순으로 pH의 감소가 적게 나타났다. 이러한 결과는 강황잎 추출물의 항산화 효과 때문으로 사료되었다.

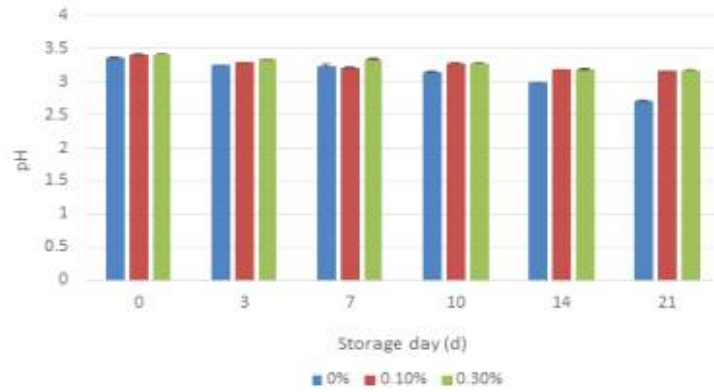


그림 65. 강황잎 추출물의 저장기간에 따른 pH 변화 (25°C)

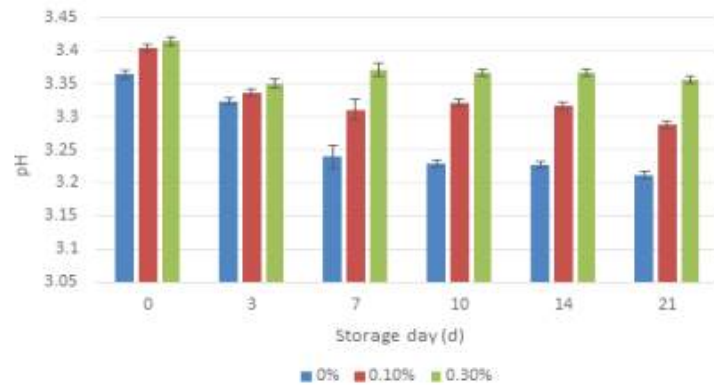


그림 66. 강황잎 추출물의 저장기간에 따른 pH 변화 (4°C)

ㄴ. 색도 값은 상온 보관 시에 강황잎 추출물 무첨가, 0.1% 첨가, 0.3% 첨가 순으로 첨가 농도가 증가할수록 L* 값에서 유의적인 차이가 나타났다. 냉장 보관 시에도 강황잎 추출물 무첨가, 0.1% 첨가, 0.3% 첨가 순으로 L* 값의 감소가 적게 나타났다. 이러한 결과는 강황잎 추출물의 항산화 효과 때문에 갈변이 지연되기 때문으로 사료되었다.

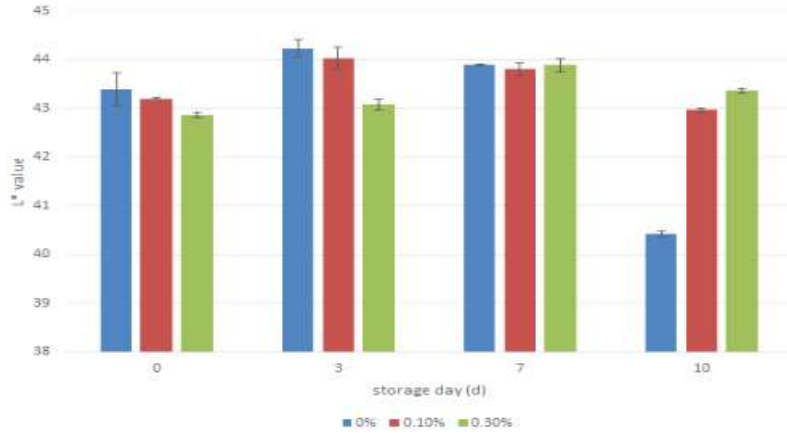


그림 67. 강황잎 추출물이 첨가된 오렌지 주스의 밝기 관찰 (L* value, 25°C)

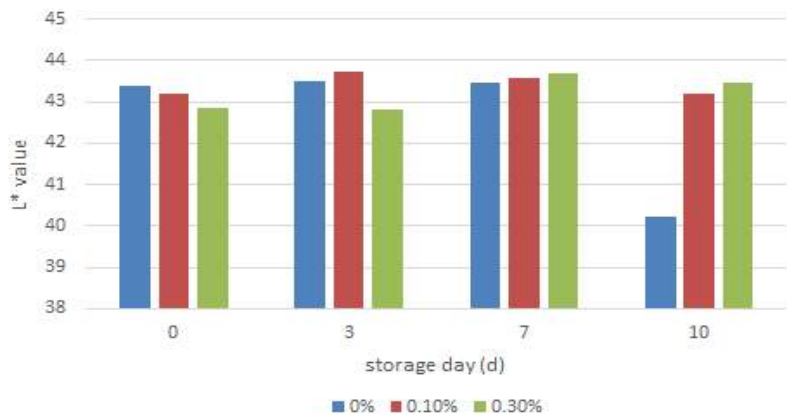


그림 68. 강황잎 추출물이 첨가된 오렌지 주스의 밝기 관찰 (L* value, 4°C)

ㄷ. 미생물 검사 결과는 상온 보관 시에 강황잎 추출물 무첨가 군에서 7일차에 곰팡이가 관찰되었다. 그러나 0.1% 첨가, 0.3% 첨가 군에서는 21일차에서도 곰팡이가 관찰되지 않았다. 냉장 보관 시에는 21일차까지 모든 시료에서 곰팡이가 관찰되지 않았다. 실제로 강황잎 추출물을 0.5%, 1.0% 사용하여 일반세균에 대해 저해정도를 관찰하였다. 그 결과, 1.0%에서 항균 효과를 나타내었고, 식품에 강황잎 추출물을 첨가함으로써 항산화 효과뿐만 아니라 항균 효과도 기대할 수 있을 것으로 사료되었다.



그림 69. 강황잎 추출물의 저장기간에 따른 곰팡이 발생유무 관찰

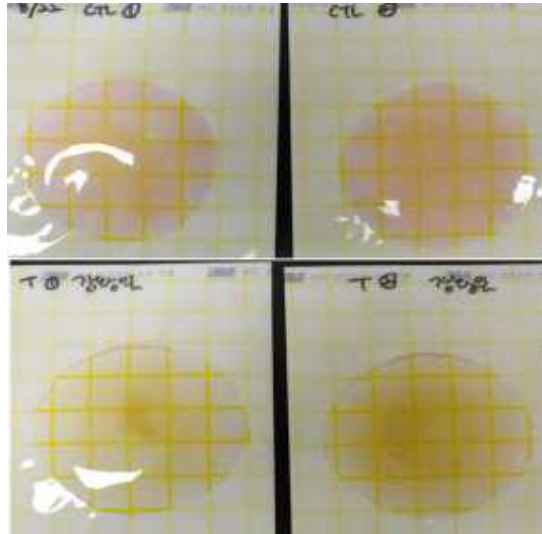


그림 70. 강황잎 추출물의 항균 효과 관찰

르. 강황잎 추출물을 식품에 첨가할 경우, 품질유지기한을 연장시켜줄 수 있는 항산화 및 항균 효과가 관찰되어 기능성소재로서의 활용을 기대해볼 수 있었다.




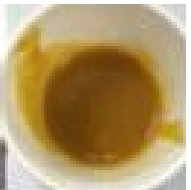
③ 강황잎 추출물이 들어간 식품군에 대해 패널을 대상으로 하여 선호도 및 강도 9점 척도법을 이용한 관능평가를 진행하였다. 관능평가로 20~50세의 성인남녀 50명을 패널으로 선정하여 커피음료, 호떡믹스, 불고기 양념 소스, 아이스크림에 대하여 강황잎 추출물 첨가 농도에 따른 맛의 차이를 확인하고, 평점법을 이용하여 전체적인 기호도를 평가해보았다.

< 관능검사 기준 : 10점 (전체적으로 아주 좋음) ~ 0점 (전체적으로 아주 나쁨) >

표 24. 품목별 강황잎 추출물 사용 농도

품목	사용량 (% , v/v)	비고
카레	0.1~0.5%	액상 카레 기준
커피 음료	0.1~0.5%	유음료 기준
소스	0.5~3.0%	소불고기 소스
아이스크림	0.1~0.5%	초콜릿 맛





ㄱ. 카레

강황잎 추출물 첨가 농도			
0.1%	0.2%	0.5%	0%
			

농도	색	향	맛 (풍미)	종합적 기호도
0.1%	8.0	8.0	8.0	8.0
0.2%	9.0	8.0	9.0	9.0
0.5%	8.0	9.0	9.5	9.5
0%	8.0	7.0	8.0	8.0

- 카레에 강황잎 추출물을 첨가한 경우, 특유의 강한 향신료의 향을 잡아줌으로써 부드러운 느낌을 주어 패널들의 높은 선호도가 나타났다. 이러한 결과로 보아 추후에 카레의 순한 맛에 적용 가능할 것으로 기대되었다.

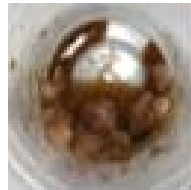
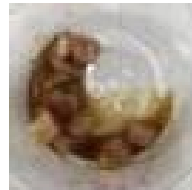



ㄴ. 커피 음료

강황잎 추출물 첨가 농도			
0.2%	0.5%	1.0%	0%
			

농도	색	향	맛 (풍미)	종합적 기호도
0.2%	8.0	8.0	8.0	8.0
0.5%	9.0	8.0	10.0	9.5
1.0%	9.0	9.0	9.0	9.0
0%	8.0	6.0	8.0	7.5

- 커피 유음료에 강황잎 추출물을 첨가한 경우, 커피의 쓴 맛과 강황잎 추출물 자체의 단맛이 더해져 커피 유음료의 풍미를 증진시켜준다는 평가가 있었다. 이러한 결과로 보아 커피음료에 적용 가능할 것으로 기대되었다.



ㄷ. 불고기 양념 소스

강황잎 추출물 첨가 농도				
0.2%	0.4%	0.6%	0.7%	0%
				

구분	색	향	맛 (풍미)	종합적 기호도	 불고기 조리 후
0.2%	8.0	8.0	8.0	8.0	
0.4%	9.0	8.0	8.0	8.0	
0.6%	8.0	8.5	9.0	9.5	
0.7%	8.0	8.5	9.5	9.5	
0%	8.0	8.0	8.0	8.0	

- 불고기 양념 소스에 강황잎 추출물을 첨가하여 재워둔 다음 패널들의 평가를 받았다. 그 결과, 소스의 자극적인 맛을 부드럽게 잡아주는 동시에 소 불고기의 풍미가 진하게 느껴진다는 긍정적인 평가가 나왔다.

ㄷ. 아이스크림 (초콜릿 맛)

강황잎 추출물 첨가 농도				
0.1%	0.5%	1.0%	3.0%	0%
				

농도	색	향	맛 (풍미)	종합적 기호도
0.1%	8.0	8.0	8.0	8.0
0.5%	9.0	8.5	8.0	8.5
1.0%	9.0	7.5	7.0	7.5
3.0%	7.0	7.0	6.5	6.5
0%	8.0	8.0	8.0	8.0

- 아이스크림에 강황잎 추출물을 첨가한 경우, 강황잎 추출물의 단맛이 초콜릿 맛을 증진시켜 초콜릿 향이 더욱 진한 느낌이 났다는 평가가 나왔다. 이러한 결과는 강황잎 추출물에서 검출된 vanillic acid가 초콜릿의 바닐라 성분과의 상승작용을 이끌어냈기 때문으로 사료되었다.

④ 본 연구과제를 통해 10~12 Brix의 강황잎 추출물을 낮은 농도(0.1~0.5%)로 첨가하여도 식품의 관능적 특성에 유의적인 영향을 주는 것으로 나타났다. 강황잎 추출물 첨가했을 때 나타난 영향은 대체로 풍미를 증진시켜주는 것이었으며, 이를 통해 강황잎 추출물을 식품용 풍미증진제로 사용할 수 있을 것이라는 가능성을 확인할 수 있었다. 더 나아가 현재 부산물로 폐기되는 강황잎의 부가가치를 높여주어 농가소득에 이바지할 수 있다는 긍정적인 결과도 나타날 수 있을 것으로 기대되었다.

14) 강황잎 추출물의 대량생산을 위한 scale-up 공정 연구

(1) 대량생산을 위한 강황잎 세척 및 전처리 공정 확립

- ① 1차 연도의 '강황잎 추출물을 이용한 식품용 제제 (액상제제, 분말제제)'의 실험결과를 통해 강황잎 추출물을 식품소재(식품 풍미개선제)로 사용하기 위해서는 분말제제보다 액상제제가 적합한 것으로 사료되어 강황잎 추출물을 액상제제로 이용하기로 하였다. 추출조건은 반응표면 분석으로 얻은 최적 추출조건(85℃, 2시간 10분)으로 설정하였으며, 강황잎을 열수 추출하여 얻은 약 10 Brix의 추출물을 최종적인 강황잎 추출물로서 간주하였다.
- ② 대량생산을 위한 scale-up 공정 연구를 하는 데 있어 한불화농의 설비가 미흡한 점이 있어 진도울금 주식회사의 설비를 이용하였고, 두 연구기관 사이의 협업을 통해 강황잎의 전처리 및 강황잎 추출물의 대량생산 공정 확립을 위한 scale-up 실험을 진행하였다.
- ③ 강황잎으로부터 추출물을 얻기 전, 물의 온도, 물 사용량, 세척 횟수를 변수로 하여 여러 번의 실험과 시행착오를 통해 강황잎의 세척 공정을 확립하였고, 건조물의 양, 온도, 시간, 통풍의 양을 변수로 하여 강황잎의 건조 공정을 확립하였다.
- ④ 추출시간이 지남에 따라 시간별로 소량의 추출물을 취하여 그 상태를 육안으로 비교해보았을 때, 추출시간이 2시간 이후인 추출물들의 색도는 큰 차이가 없었다. 이러한 결과는 반응표면분석으로 얻은 최적 추출조건(85℃, 2시간 10분) 결과와 부합되는 것으로 나타났다.



그림 71. 추출시간에 따른 강황잎 추출물의 상태



그림 72. 추출시간에 따른 강황잎 추출물의 상태

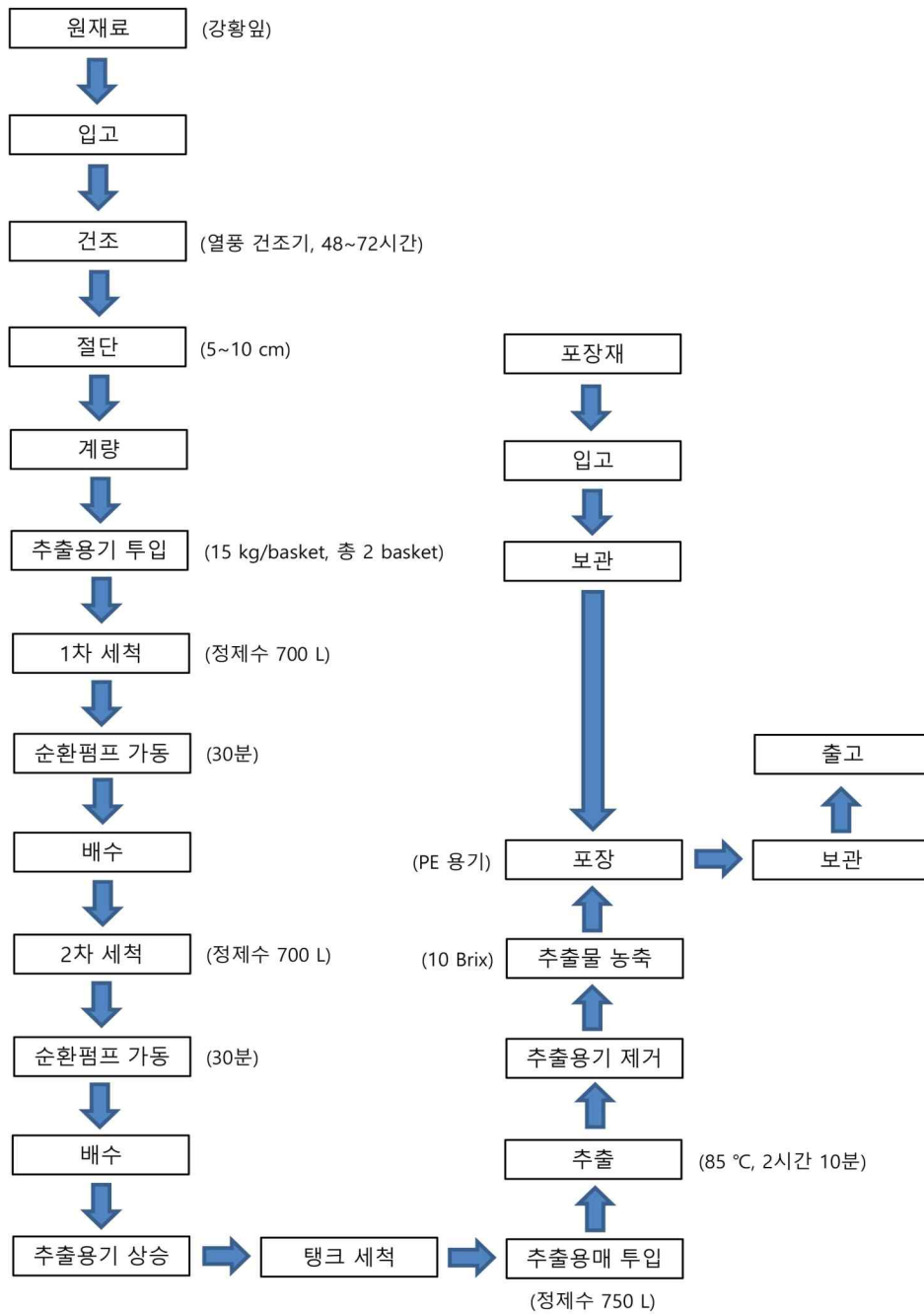


그림 73. 강황잎 추출물(10 Brix)의 제조 공정도

15) Pilot plant 규모의 생산을 통한 시제품 개발

(1) 과립 형태의 시제품

- ① 진도울금 주식회사에서 기존에 판매하고 있던 분말 형태의 강황 제품에 강황잎 추출물을 첨가한 뒤, 과립 형태로 제조하여 시제품을 개발하였다.



그림 74. 기존 분말 형태의 강황 제품에 강황잎 추출물을 첨가하여 만든 과립 형태의 시제품

(2) 음료 형태의 시제품

- ① 강황잎 추출물이 제제화 될 수 있을만한 시제품 후보로서 음료와 푸딩을 선정하였으며, 현재 시장상황을 고려해보았을 때, 이익 창출과 판매가 용이한 음료 형태의 시제품으로 결정하였다.
- ② (주)한불화농의 회사 내 식품향팀 및 Application Lab과의 협업을 통해 강황잎 추출물이 제제화된 음료 형태의 시제품을 개발하였고, 이에 대한 관능 평가 및 제조원가와 경제성을 분석해보았다.



그림 75. 강황잎 추출물이 첨가된 음료 형태의 시제품

(3) 망고 주스 소비자 기호도 평가

- ① 시료는 망고 주스(대조군)과 강황잎 추출물이 0.1% 함유된 망고 주스(실험군)로 설정하였다. 소비자 기호도 평가는 한국식품연구원 관능검사실에서 총 96명을 대상으로 수행하였다. 소비자 기호도 평가에 참여한 96명의 정보는 표 25와 같다. 소비자의 성별, 연령대, 망고 주스의 제품 기호도, 망고 주스의 섭취빈도, 망고 주스의 중요한 특성은 직접 작성하도록 하였으며, 시료 평가는 원내 자체 프로그램을 통해 진행하였다. 소비자들은 제시된 망고 주스 제품 2종에 대해 전반적인 기호도, 외관 기호도, 향 기호도, 맛 기호도, 후미의 기호도와 4가지 특성(단맛, 신맛, 쓴맛, 망고향미)을 평가하였다.
- ② 소비자들에게 한 번에 1개의 시료(망고 주스 시료)를 제시하였으며, 제시 순서에 의한 오차를

줄이기 위해 제시 순서는 무작위로 진행하였다. 평가 시 소비자들에게 시료와 다음 시료를 제시하는 중간에 물을 제공하여 이전 시료가 다음 시료의 평가에 미치는 영향을 최소화하였다. 평가 장소의 온도는 20℃이었으며, 형광등이 있는 개별 부스에서 평가를 진행하였다.

표 25. 망고 주스 소비자 기호도 평가 참여자 정보

항목	명	비율(%)
○ 성별		
남	48	51.6
여	48	51.6
○ 연령대		
20대	20	21.5
30대	45	48.4
40대	18	19.4
50대 이상	13	14.0
○ 망고 주스 기호도		
매우 좋아한다.	12	12.9
많이 좋아한다.	25	26.9
좋아한다.	26	28.0
약간 좋아한다.	18	19.4
좋아하지도 싫어하지도 않는다.	10	10.8
약간 싫어한다.	2	2.2
싫어한다.	2	2.2
많이 싫어한다.	1	1.1
매우 싫어한다.	0	0
○ 망고 주스 섭취빈도		
연 6회 미만	32	34.4
연 6회 이상 12회 미만	37	39.8
월 1회 이상 4회 미만	24	25.8
주 1회 이상 3회 미만	3	3.2
주 3회 이상 5회 미만	0	0
주 5회 이상	0	0

③ 평가한 시료의 전반적인 기호도 및 외관, 향, 맛, 조직감의 기호도는 표 26에 나타내었다. 외관 기호도 측면에서는 두 시료 모두 비슷하게 나왔으나, 그 외 전반적인 기호도, 향, 맛, 후미 모두 일반 망고 주스보다 더 좋은 기호도를 나타내었다. 이러한 결과는 소비자가 망고 주스에 대해서는 비교적 익숙하지만, 강황잎 추출물의 향에 대해서는 낯설게 느끼기 때문으로 사료되었다. 감각적 특성 평가는 표 27에서와 같이 신맛과 망고향미에는 크게 영향을 미치지 않는

것으로 나타났으나, 강황잎 추출물이 함유된 망고 주스에서는 단맛이 줄어들고 쓴맛이 다소 늘어나는 것으로 나타났다. 이러한 결과와 더불어 구매 의향을 확인해 본 결과, 망고 주스는 3.55, 강황잎 추출물이 함유된 망고 주스는 2.92로 비교적 낮게 나타났다. 따라서 향후에 강황잎 추출물로 인한 기호도 감소 효과를 줄일 수 있는 제품에 대한 연구를 수행해야 할 것으로 판단되었다. 그리고 각 항목별 연관성을 확인해본 결과, 전반적인 기호도에 가장 크게 영향을 미치는 요인은 맛, 후미, 향의 순으로 나타난 것을 확인할 수 있었다. (표 27).

표 26. 감각적 특성의 강도 평가 결과

시료	기호도 ¹⁾				
	전반적인	외관	향	맛	후미
망고 주스	6.57	6.77	6.61	6.69	6.52
강황잎 추출물 함유 망고 주스	5.74	6.74	5.98	5.60	5.25

1) 1=약하다, 9=강하다, 소비자 96명의 평균값

표 27. 기호도 평가 항목별 상관관계

항목	전반적인 기호도	외관의 기호도	향의 기호도	맛의 기호도	후미의 기호도	단맛	신맛	쓴맛	망고 향미
전반적인 기호도	1.0	0.175	0.426	0.710	0.618	0.249	0.000	0.174	0.342
외관의 기호도	0.175	1.0	0.164	0.133	0.083	0.074	0.005	0.013	0.087
향의 기호도	0.426	0.164	1.0	0.509	0.380	0.137	0.004	0.092	0.303
맛의 기호도	0.710	0.133	0.509	1.0	0.741	0.209	0.000	0.186	0.310
후미의 기호도	0.618	0.083	0.380	0.741	1.0	0.285	0.000	0.207	0.246
단맛	0.249	0.074	0.137	0.209	0.285	1.0	0.002	0.047	0.151
신맛	0.000	0.005	0.004	0.000	0.000	0.002	1.0	0.155	0.004
쓴맛	0.174	0.013	0.092	0.186	0.207	0.047	0.155	1.0	0.016
망고향미	0.342	0.087	0.303	0.310	0.246	0.151	0.004	0.016	1.0

(4) Focus group interview를 이용한 강황잎 추출물이 함유된 제품의 특성 도출

- ① 강황잎 추출물이 함유된 제품에 대한 감각적 특성의 도출은 대표적인 정성적 연구방법인 FG(Focus Group)을 이용하였다. 대인관계 및 상호작용 특성이 있는 FG는 단 한 사람의 응답자로부터는 얻지 못하는 정보를 얻을 수 있다. FG는 일반적으로 회의를 진행하는 1~2명의 진행자와 8~12인의 목표 집단 소비자로 구성되며, 녹음·녹화 시설 및 one-way mirror가 설치된 회의실에서 진행한다. 강황잎 추출물이 함유된 망고 주스, 커피, 카레 제품에 대한 FG는 녹음 및 녹화를 할 수 있으며, 의뢰인이 Focus group 진행을 실시간으로 관찰하며 의견을 제시할 수 있도록 one-way mirror가 설치된 한국식품연구원 내 FG 실험실에서 수행하였다. 본 실험에서는 실험 참여 동의서(Appendix 1-a)에 서명한 원외 소비자 패널(n=8; 여=8)을 대상으로 진행하였다. 토론 진행자는 사전에 준비된 진행자 가이드를 바탕으로 토론을 이끌고, 보조 진행자는 토의 중 내용을 기록하고, 녹음·녹화를 담당하였다. 이를 통해 샌드위치 제품의 감각 특성에 대한 설명자료를 도출하였으며, 평가시간은 약 120분이었다.



그림 76. 한국식품연구원 FG 실험실 및 FGI 진행 장면

- ② FGI 실험 결과, 모든 제품군에서 강황잎 추출물을 함유한 제품에 대한 기호도가 높은 것으로 나타났다. 망고 주스의 경우, 원재료의 풍미를 살리고 인공첨가물이 덜 함유된 느낌을 받는 것으로 나타났다. 커피의 경우, 특유의 쓴맛과 탄맛을 masking하는 효과는 있지만, 커피 특유의 향미가 줄어드는 것으로 나타났다. 카레의 경우, 강한 향신료의 향이 약해져 부드러운 맛을 느끼는 것으로 나타났다. 또한, 녹차, 홍차, 쌍화당과 같은 제품과 잘 어울릴 것 같다는 의견도 제시되었다.

ㄱ. 강황잎 추출물 0.1% 함유 망고 주스 결과

Q. 망고주스 제품 섭취 빈도

- 365일. 애들이 좋아해서.
- 1년에 다섯 번 정도
- 한 달에 한 번도 안 먹을 때가 있음
- 대부분 한, 두 달에 1-2번이며 자주 마시는 편은 아님

Q. 어떤 망고주스 제품을 구입하거나 섭취하십니까?

- 대부분 델몬트
- 테트라팩으로 된 Dole 제품

Q. 어디서 망고주스 제품을 구입하거나 섭취하십니까?

- 대부분 대형마트
- 쿠팡 등 온라인으로 주문하는 경우도 있음

Q. 망고 주스를 구입하실 때 가장 중요하게 생각하는 부분은 무엇입니까?

- 당 함유량
- 아이가 걱정이 되서 칼로리, 유통기한도 보는 편
- 브랜드나 회사
- 대형마트에서 파는 제품은 망고 맛은 아닌 것 같아서 아이들이 주시 같은 곳에서는 많이 사 먹는 편
- 커피숍에서 저는 커피를 마시고 아이는 망고주스를 마심

Q. 망고 주스(Control) 외관, 향, 맛, 단/신/쓴맛, 삼킨 후 특성은 어떠합니까?

- 점도가 있어 보이고, 색깔이 탁해 보임.
- 망고향, 달콤한 향, 아주 단향
- 망고보다는 다른 과일도 섞인 맛, 향에 비해 싱거운 맛. 다른 맛(열대과일 등)이 혼합되어 있는 느낌. 약간의 신맛, 보통의 맛보다는 달지 않음.
- 눈으로 봤을 때보다 마셨을 때가 더 가벼운 느낌
- 후미의 경우 망고 맛 보다는 오렌지, 복숭아, 배 같은 다른 과일 맛이 남.
- 쿨피스 맛
- 조직감이 가벼워서 입안이 깔끔, 잔여감이 없음.

Q. 망고 주스(sample) 외관, 향, 맛, 단/신/쓴맛, 삼킨 후 특성은 어떠합니까?

- 좀 더 진한 색, 약간 갈색빛, 맛있어 보이지 않는 색.
- 첫 번째 시료(control) 보다 전반적인 향이 약하고, 단향도 약함. 쓴 향이 남. 약간 메주향이 남. 첫 번째 시료의 경우 만들어진 향이었다면 이 시료는 생 망고 향이 남. 다른 과일향이 남.

- 시럽 같은 감기약맛, 약간 쓴맛이 남.
- 첫 번째 시료보다 더 걸쭉한 느낌.
- 후미에서 망고향이 느껴지고 잔여감이 더 남는 느낌.
- 첫 번째 시료가 시판되는 거라면 이건 안 먹어본 맛임. 덜 익은 망고맛.
- 여러 가지가 섞이지 않은 느낌, 끝맛에 떫은 느낌.
- 얼음 등에 희석해서 마시면 더 맛있을 것 같은 느낌. 더 진한 맛.

Q. 망고 주스 제품간 가장 큰 차이점은 무엇이라고 생각하십니까?

- 향, 색깔(첫 번째가 더 향이 강하고, 단향도 많이 남).
- 첫 번째 시료(control)는 첨가물이 든 듯한 익숙한 맛이면 두 번째 시료(sample)는 망고 맛이 많이 남.

Q. 망고 주스 제품 중 더 선호하는 것은 어떤 제품입니까?

- 첫 번째 시료(control) 을 선호: 3명.
- 익숙한 맛이 나며, 더 달고 향도 진하기 때문에 선호함. 두 번째 시료(sample)의 경우 떫은 맛이 너무 싫고, 향도 덜하고, 싱거운 맛이 나서 선호하지 않음.
- 두 번째 시료(sample) 을 선호: 7명.
- 망고 맛이 많이 나서 원재료 맛이 충분히 많이 나는 것 같고, 많이 달지 않아서 선호함. 첫 번째 시료(control)의 경우, 인공적인 느낌이 많이 나서 별로였음.

ㄴ. 강황잎 추출물 0.1% 함유 커피 결과

Q. 커피 제품을 얼마나 자주 드십니까?

- 하루에 1-3잔
- 거의 안 마시거나 한 달에 1번 정도

Q. 어떤 커피 제품을 구입하거나 섭취하십니까?

- 캡슐, 카누, 맥심, 네스카페, 조지아 액상형, 드립용 커피.

Q. 어디서 커피 제품을 구입하거나 섭취하십니까?

- 마트 등

Q. 커피 제품을 구입하실 때 가장 중요하게 생각하는 부분은 무엇입니까?

- 향, 맛
- 광고, 사은품(머그컵 등 추가사은품 유무), 브랜드 등

Q. 커피 제품(control) 외관, 향, 맛, 단/신/쓴맛, 삼킨 후 특성은 어떠합니까?

- 일반적인 색깔, 진한 갈색, 투명도가 있음.

- 쓴향, 탄향, 커피가루 분말향, 원두의 향이 강하진 않음
- 강한 쓴맛, 구수한맛, 신맛, 탄 맛, 누룽지 탄맛, 누룽지 송늬 끓였을 때 맛 등
- 분말 커피 같음.
- 끝이 부드러움

Q. 커피 제품(sample) 외관, 향, 맛, 단/신/쓴맛, 삼킨 후 특성은 어떠합니까?

- 첫번째 시료(control) 보다 색이 진함. 카키색, 녹색빛이 도는 검정색. 많이 진하고 한약 같음.
- 향이 약함, 특별한 향 없음. 색깔에 비해 연한 냄새.
- 보리차같이 많이 진하지 않은 맛, 한약 향미, 부드러운 맛(느낌), 끝맛이 쓰긴 하나 커피 같은 느낌은 아님.
- 약간 쓰면서 신맛. 산도가 있음
- 커피라기보다 결명자 같은 걸 섞어서 만든 진한 차 같은 느낌.
- 끈적이는 느낌, 목 넘김이 첫번째 시료(control)보다 좋음.
- 첫 번째 시료(control)보다 조금 더 묵직한 느낌. 조금 더 풍부한 느낌.

Q. 커피 제품간 가장 큰 차이점은 무엇이라고 생각하십니까?

- 향, 맛이 가장 다름(control 시료는 탄 향이 조금 있고, 더 쓴맛, 탄맛이 강함. sample 시료는 부드럽고 신맛도 나고, 풍부한 느낌. 그렇지만 커피의 느낌을 좀 잃은 느낌. 커피가 아닌 것 같은 느낌. 커피향을 좋아하는 사람은 별로 일 것 같을 정도로 향이 너무 없음. 커피가 아닌 차에 가까운 맛)

Q. 커피 제품 중 더 선호하는 것은 어떤 제품입니까?

- 첫 번째 시료(control)를 선호: 3명.
- 늘상 먹던 익숙한 맛이었고, 두 번째는 익숙하지 않은, 많이 접해보지 않은 생소한 맛.
- 두 번째 시료(sample)를 선호: 7명.
- 첫 번째 시료(control)은 자극적인 커피 같고, 너무 탄맛도 강해서 커피를 로스팅한 향이 아니라 탄향이 첨가된 것 같고, 전체적인 밸런스가 두 번째 시료(sample)가 나왔음. 그렇지만 향이 약한 게 아쉬움. 마시기 편하고, 커피를 즐겨 마시지 않으니까 카누를 넣고 물을 많이 부어넣은 것 같은 맛이어서 괜찮았음.

ㄷ. 강황잎 추출물 0.2% 함유 결과

Q. 카레 제품을 얼마나 자주 드십니까?

- 일주일에 1번 내지는 한 달에 1-2번

Q. 어떤 카레 제품을 구입하거나 섭취하십니까?

- 오투기 카레, 백세 카레. 카레 여왕 등. 대부분 분말형(가루형).
- 일본산 고체 카레를 많이 먹었는데 지금은 먹지 않음.

Q. 어디서 카레 제품을 구입하거나 섭취하십니까?

- 보통 마트에서 구입.

Q. 카레 제품을 구입하실 때 가장 중요하게 생각하는 부분은 무엇입니까?

- 순한맛/매운맛 등 매운 단계 정도
- 카레여왕도 다양한 종류가 있듯이 그걸 보면서 고름. 어떤 재료가 들어갔는지를 보고 고름.
- 주로 오투기 제품을 구입하며, 오투기 제품처럼 인지도가 있고 무난, 익숙한 제품 등

Q. 카레 제품(control) 외관, 향, 맛, 단/신/쓴맛, 삼킨 후 특성은 어떠합니까?

- 감자 밖에 안 보여서 부실해 보임. 내용물이 자잘함. 조그만 고기 등
- 묽어 보이는 농도.
- 카레향이 덜하고 하이라이스 같은 시큼한 냄새가 남. 매운향.
- 딱 3분 카레맛. (약간) 매운맛. 후추맛. 단맛. 맵고 텁텁한 맛. 강한 신맛 등
- 약간 풀 같은 느낌
- 카레 향미가 많이 나고 심하지는 않은데 혀가 약간 얼얼한 느낌.
- 육안으로도 후추가 보이는 것 같고 후추향이 많이 남.

Q. 카레 제품(sample) 외관, 향, 맛, 단/신/쓴맛, 삼킨 후 특성은 어떠합니까?

- 내용물이 부실하고, 색이 더 진한 갈색.
- 향이 진하게 느껴지지 않고 호박향, 단향, 한약냄새 등이 남. 카레향이 약한 것 같음.
- 단맛이 더 강하게 나고 신맛이 많이 남. 약간 시큼한 맛.
- 첫 번째 시료(control) 보다 신맛이 많이 나고 덜 자극적이고 더 부드러움.
- 카레 맛만 느껴지고 다른 향신료 맛이 덜 느껴져서 덜 자극적이게 느껴짐.
- 매콤한 끝 맛

Q. 카레 제품 중 더 선호하는 것은 어떤 제품입니까?

- 첫 번째(control) 시료: 4명
- 개인적으로 매운 맛을 좋아해서 더 매콤한 편이라 선호. 칼칼해서 좋음.
- 두 번째(sample) 시료: 6명
- 카레향이 싫어서 잘 못 먹는데 이건 카레향이 덜 나서 선호. 향신료 향이 전체적으로 약해져서 좋고 부드러워서 좋음. 약간 단맛이 나면서 부드러운 느낌.

르. 기타 질문

Q. 어떠한 제품에 첨가하면 좋을 것이라 생각됩니까?

- 녹차, 홍차, 쌍화탕
- 망고주스도 좋고 원재료의 맛을 살릴 수 있다면 과일 주스 등

- 인공 감미료 맛을 약간 줄여주고 전반적으로 부드러워지면서 풍미를 높여주니까 비린내를 잡아 줄 수 있는 걸로 사용해도 좋을 것 같음(불고기나 수육의 고기 잡내 제거 등).
- 고기 양념 등도 활용도가 높을 것 같음. 연두 제품처럼 조미료로 활용해도 좋을 것 같음.
- 월계수 잎 쓰듯이 가루형태로 만들어 시판하면 좋을 것 같음.

Q. 그렇다면 망고주스, 커피, 카레 중 어떤 제품이 가장 적합하다고 생각되니까?

- 망고주스 8명.
- 커피의 맛은 좋긴 한데 색이 너무 별로고 (커피 고유의) 향이 많이 죽음. 맛은 부드러워졌으나 향이 줄어서 좋지 않음. 카레나 커피 제품의 경우 향이 중요한 것이어서 별로였음.

(5) 생산 표준화에 따른 제조원가 및 경제성 분석

① 제조원가

비용	일 생산량	단가	금액
원재료비 (강황잎)	60 kg	5,000 원	300,000 원
가공비	-	500,000 원/일	500,000 원
합계			800,000 원

30 kg의 건조 강황잎을 이용하여 1 batch 생산 시, 강황잎 추출물은 18 kg 생산되며, 불연속적으로 생산 시 하루에 2 batch 생산 가능하며, 제조원가는 800,000 원/추출물 36 kg = 22,222 원/kg으로 계산되었다.

② 연속공정으로 생산할 경우, 일 생산량은 54 kg/일 까지 가능할 것으로 판단된다.

비용	일 생산량	단가	금액
원재료비 (강황잎)	90 kg	5,000 원	450,000 원
가공비	-	500,000 원/일	500,000 원
합계			950,000 원

30 kg의 건조 강황잎을 이용하여 1 batch 생산 시, 강황잎 추출물은 18 kg 생산되며, 연속적으로 생산 시 하루에 3 batch 생산 가능하며, 제조원가는 900,000 원/추출물 54 kg = 17,593 원/kg으로 계산되었다.

③ 위의 결과를 토대로 설정 가능한 판매가는 약 25,000~30,000 원/kg이며, 이는 식품 등에 사용되는 일반 천연 추출물의 가격과 비교했을 때, 충분한 경제성이 있다고 판단되었다.

④ 현재 연구결과로 볼 때, 강황잎 추출물 제품은 강황잎 추출물의 기능성을 제외하더라도, 일반적인 식품의 맛을 순화시키면서 전반적인 풍미를 증진시킨다는 장점이 있다. 또한, 일반적인

0.1% 미만의 사용량으로도 효과를 볼 수 있어 향후 판매전략에 유리하게 작용할 것으로 판단되었다.

⑤ 적용가능 예상품목 : 음료, 다류, 카레 등의 HMR 식품, 건강기능식품 등

16) 강황잎 추출물 및 강황잎 추출물 시제품의 저장 중 품질변화 분석

(1) 강황잎 추출물의 저장기간에 따른 품질변화 분석

① 건조중량 변화 측정

ㄱ. 건조중량은 Moisture meter (MA37, Sartorius, Goettingen, Germany)로 수분함량을 측정한 후, 다음 식에 대입하여 값을 산출하였다.

$$\text{Solid Contents (g/100 mL)} = 100 - \text{moisture contents (\%M)}$$

ㄴ. 강황잎 열수 추출물의 저장온도에 따른 건조중량 변화를 측정하기 위하여 초기 강황잎 열수 추출물의 당도를 10 Brix로 맞춘 후, 40℃, 25℃, 4℃, -20℃에 각각 보관하여 30일마다 건조중량 변화를 측정하였다. (그림 77).

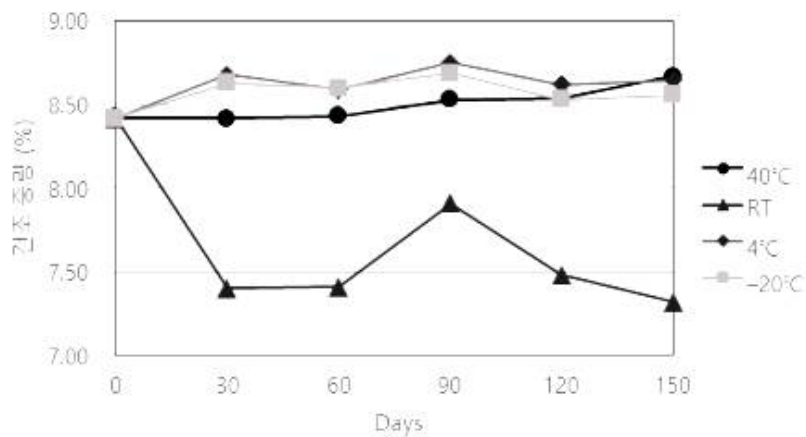


그림 77. 저장 온도에 따른 강황잎 열수 추출물의 건조중량 변화

② pH 변화 측정

ㄱ. pH meter (Starter 300, OHAUS, Seoul, Korea)로 pH 4, pH 7, pH 10 표준용액으로 calibration한 후, pH를 측정하였다. 강황잎 열수 추출물의 저장온도에 따른 pH 변화는 그림 78과 같이 나타났다. 4℃와 -20℃에서 저장한 시료의 pH는 초기와 비슷한 수준을 유지하여 변화가 거의 없는 것으로 나타났다. 그러나 40℃에서 저장한 시료의 경우, 저장기간이 지남에 따라 pH가 감소하였고, 25℃에서 저장한 시료의 경우, 처음 2달 동안 pH가 증가하다가 그 이후에는 감소하였다. 40℃에서 저장하는 것은 acceleration 조건이고, 0일차의 pH가 부패 미생물이 성장할 수 있는 범위였던 것을 고려하였을 때, 미생물의 번식으로 인해 이러한 결과가

초래된 것으로 사료되었다.

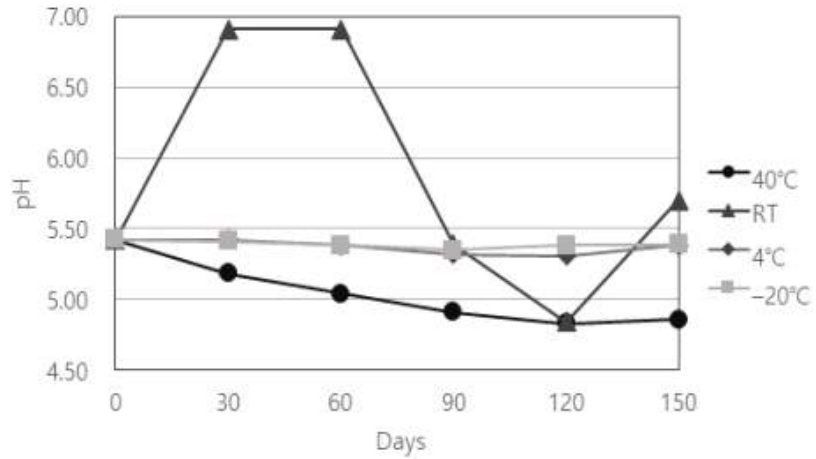


그림 78. 저장온도에 따른 강황잎 열수 추출물의 pH 변화

③ 색도 변화 측정

ㄱ. 시료를 petri dish에 5 mL씩 분주한 후, petri dish 아래쪽에 흰 종이를 깔고 Chroma meter (CR-400, Konica Minolta, Tokyo, Japan)로 색도를 측정하였다. ΔE 값은 다음 식에 대입하여 산출하였다.

$$\Delta E = (L_0 - L_{sample})^2 + (a_0 - a_{sample})^2 + (b_0 - b_{sample})^2^{1/2}$$

ㄴ. 강황잎 열수 추출물의 저장온도에 따른 색도 변화는 표 28과 같이 나타났다. 모든 시료에 대하여 L 값은 큰 차이를 보이지 않았으며, a 값은 감소하였고, b 값은 증가하였다. 색도 변화의 정도는 시료마다 모두 다르게 나타났다.

표 28. 저장온도에 따른 강황잎 열수 추출물의 색도 변화

저장온도	색도	0 day	30 day	60 day	90 day	120 day	150 day
40℃	L	27.17±0.01	26.97±0.02	27.06±0.18	26.80±0.02	27.13±0.29	26.87±0.17
	a	0.61±0.01	0.36±0.02	0.27±0.04	0.35±0.02	0.28±0.03	0.33±0.01
	b	0.19±0.01	0.15±0.01	0.05±0.01	0.22±0.01	0.23±0.05	0.34±0.02
25℃	L	27.17±0.01	27.07±0.01	27.10±0.02	26.83±0.01	27.15±0.27	26.86±0.01
	a	0.61±0.01	0.68±0.01	0.54±0.01	0.45±0.02	0.53±0.02	0.47±0.01
	b	0.19±0.01	0.33±0.01	0.22±0.01	0.27±0.02	0.34±0.02	0.41±0.01
4℃	L	27.17±0.01	27.03±0.01	27.02±0.01	26.85±0.02	26.93±0.03	26.89±0.05
	a	0.61±0.01	0.54±0.02	0.48±0.02	0.68±0.02	0.49±0.02	0.47±0.03
	b	0.19±0.01	0.24±0.01	0.15±0.01	0.32±0.02	0.30±0.01	0.37±0.01
-20℃	L	27.17±0.01	27.04±0.03	27.24±0.08	26.84±0.01	27.08±0.04	26.93±0.11
	a	0.61±0.01	0.53±0.03	0.44±0.01	0.67±0.01	0.49±0.02	0.51±0.02
	b	0.19±0.01	0.24±0.01	0.15±0.01	0.32±0.02	0.29±0.01	0.38±0.01

④ DPPH radical 소거능 변화 측정

ㄱ. 96-well에 시료를 2.5 μL/well 분주한 후, DPPH 용액 (40 μg/mL MeOH)을 247 μL/well, blank에는 증류수를 247 μL/well 분주하여 암실에서 30분간 반응시킨 후, 교반한 다음, UV/Visible spectrophotometer를 이용하여 517 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 소거능은 ascorbic acid를 표준물질로 작성한 검량곡선에 대입하여 정량하였다.

ㄴ. 강황잎 열수 추출물의 저장온도에 따른 DPPH 소거능의 변화는 그림 79와 같이 나타났다. 전체적으로 저장 30일차에 감소하였다가 이후에 증가한 후, 120일차까지 감소하였고, 이후 다시 증가하였다.

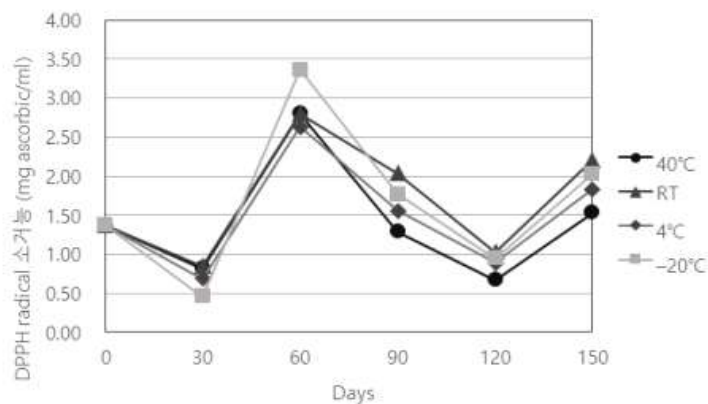


그림 79. 저장온도에 따른 강황잎 열수 추출물의 DPPH radical 소거능 변화

⑤ 총 폴리페놀 함량 변화 측정

ㄱ. 96-well에 시료 13 $\mu\text{L}/\text{well}$, 증류수 7.8 $\mu\text{L}/\text{well}$, 10% sodium carbonate 195 $\mu\text{L}/\text{well}$ 분주한 후, 상온에 3분간 방치하였다. 그 다음 증류수 25 $\mu\text{L}/\text{well}$, Folin-Ciocalteu reagent 6.5 $\mu\text{L}/\text{well}$ 분주한 후, 30분 뒤에 UV/Visible spectrophotometer를 이용하여 750 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 함량은 gallic acid를 표준물질로 작성한 검량곡선에 대입하여 정량하였다.

ㄴ. 강황잎 열수 추출물의 저장온도에 따른 총 폴리페놀 함량 변화는 그림 80과 같이 나타났다. 저장 30일 차에 함량이 급격히 증가하였고, 특히 4°C에서 저장한 시료의 경우, 15.46 mg/mL 까지 증가하였다. 그러나 저장 30일차 이후에 90일차까지 감소하여 7.85~9.11 mg/mL 수준에 이르렀다. -20°C에서 저장한 시료 외에는 120일차에 약간 증가하였으나, 150일차에는 다시 감소하였다. -20°C에서 저장한 시료의 경우, 120일차까지 감소하다가 150일차에 약간 증가하였다. 전체적인 변화량은 40°C에서 저장한 시료가 가장 적었다.

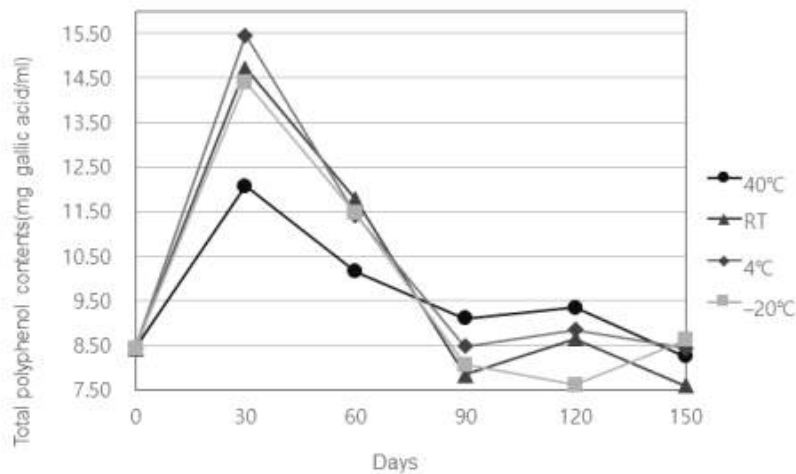


그림 80. 저장온도에 따른 강황잎 열수 추출물의 총 폴리페놀 함량 변화

⑥ 총 플라보노이드 함량 변화 측정

ㄱ. 96-well에 시료 25 $\mu\text{L}/\text{well}$, 10% aluminum chloride 5 $\mu\text{L}/\text{well}$, 1 M potassium acetate 5 $\mu\text{L}/\text{well}$, methanol 75 $\mu\text{L}/\text{well}$, 증류수를 차례로 분주 한 다음, 30분 뒤에 UV/Visible spectrophotometer를 이용하여 750 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 함량은 Quercetin을 표준물질로 작성한 검량곡선에 대입하여 정량하였다.

ㄴ. 강황잎 열수 추출물의 저장온도에 따른 총 플라보노이드 함량의 변화는 그림 81과 같이 나타났다. 모든 시료에서 저장 120일차까지 증가하였고, 40°C에서 저장한 시료는 2.30배(2.97 mg/mL), 25°C에서 저장한 시료는 2.48배(3.20 mg/mL), 4°C에서 저장한 시료는 2.89배(3.73 mg/mL), -20°C에서 저장한 시료는 2.44배(3.15 mg/mL) 증가하였다. 그러나 그 이후에는 급격히 감소하여 0.15 mg/mL까지 감소하였다.

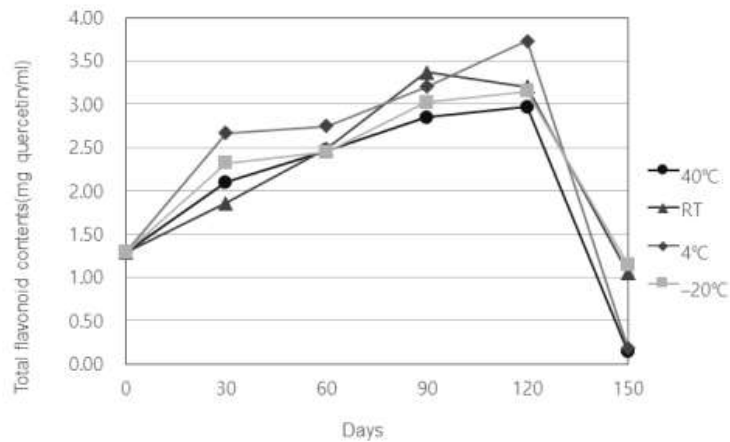


그림 81. 저장온도에 따른 강황잎 열수 추출물의 총 플라보노이드 함량 변화

(2) 강황잎 추출물이 함유된 시제품의 저장성 평가

① 시제품 시료 제조

ㄱ. 시제품의 종류는 음료(망고맛 드링크 음료) 및 과립 형태의 2가지 제품으로 결정하였고, 시제품 시료는 한불화농과 진도올금 주식회사에서 각각 생산한 것을 실험에 사용하였다. 강황잎 추출물의 첨가 농도는 1차 연도의 실험결과를 참고하여 0.5%로 정하였다.

ㄴ. 망고 드링크 음료는 다음 표와 같은 배합비로 제조하였다. (표 29).

표 29. 망고 드링크 음료의 제조 배합비

번호	원재료		Control		Test	
	원 료	단가(/kg)	배합비 (%)	금액(/kg)	배합비 (%)	금액(/kg)
1	정제수		88.26	0.00	87.76	0.00
2	액상과당		8.00	0.00	8.00	0.00
3	정백당		2.40	0.00	2.40	0.00
4	망고농축과즙		0.88	0.00	0.88	0.00
5	강황잎 추출물		0.00	0.00	0.50	0.00
6	구연산		0.10	0.00	0.10	0.00
7	구연산삼나트륨		0.10	0.00	0.10	0.00
8	사과산		0.10	0.00	0.10	0.00
9	향료		0.10	0.00	0.10	0.00
10	비타민C		0.06	0.00	0.06	0.00
합계			100.00	0.00	100.00	0.00



그림 82. 강황잎 추출물이 첨가된 망고 드링크 음료, 대조군(좌), 실험군(우)

ㄷ. 울금 과립 제조는 다음과 같은 과정으로 제조하였다.

- 건조 울금을 분쇄한다.
- 분쇄한 건조 울금에 강황잎 추출물을 3:1 (w/w) 비율로 첨가한 뒤, 교반한다.
- 교반을 통해 형성된 과립을 65°C, 3시간의 조건으로 건조시킨다.
- roasting 과정을 거친 다음에 포장한다.
- 울금 과립 시료를 제조한다. (울금 과립 1.5 g + 물 8.5 g)

② 저장조건 및 저장기간 설정

ㄱ. 저장온도는 상온(25°C)과 냉장온도(4°C)로 설정하였고, 저장기간은 0, 3, 7, 14, 21, 28일로 설정하였다.

③ pH 변화 측정

ㄱ. pH 측정은 pH meter (Seven Compact S230 USP/EP, Mettler Toledo, Switzerland)를 이용하여 28일의 저장기간 동안 상온(25°C) 및 냉장온도(4°C)에서 저장한 대조군과 실험군의 pH를 측정하였다.

ㄴ. pH 측정 결과, 각 온도조건(25°C, 4°C)에 따른 시료의 pH 값 사이에는 유의적인 차이가 나타나지 않았으나, 저장기간에 지남에 따라 pH가 조금 증가하는 경향이 있었다.

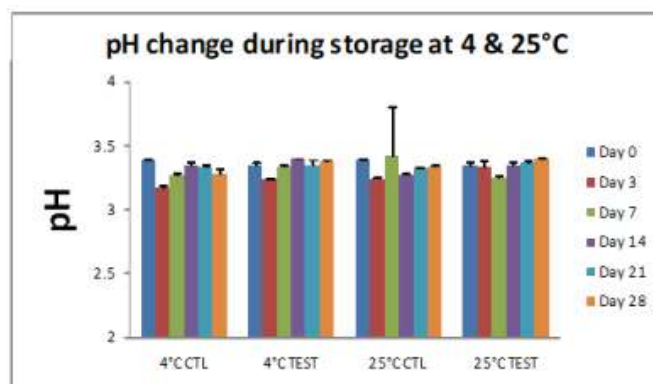


그림 83. 저장 온도조건에 따른 대조군(CTL)과 실험군(TEST)의 pH 변화

④ 색도 변화 측정

ㄱ. Spectrophotometer (UV5, Mettler Toledo, Switzerland)를 이용하여 28일의 저장기간 동안 상온(25°C) 및 냉장온도(4°C)에서 저장한 대조군과 실험군의 색도를 측정하였다.

ㄴ. L* (brightness) 값의 경우, 저장기간과 저장온도에 관계없이 대조군이 실험군에 비해 유의적으로 밝게 나타났으며, 이는 갈색을 띠고 있는 강황잎 추출물의 첨가에 따른 변화라고 사료되었다. a* (redness) 값의 경우, 음(-)의 값이 관찰되어 측정되지 않는 것으로 판단되었다. b* (yellowness) 값의 경우, 대조군에서는 저장기간과 저장온도에 관계없이 유의적인 변화가 나타나지 않았다. 실험군에서는 대조군에 비해 높은 b* 값이 나타났으며, 저장기간이 길어짐에 따라 b* 값이 감소되는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 시간이 지남에 따라 강황잎 추출물 중 갈색을 띠게 하는 성분이 손실되는 현상 때문으로 사료되었다.

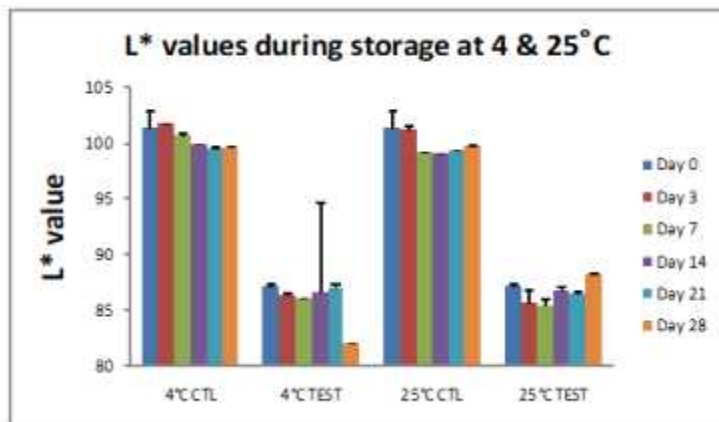


그림 84. 저장 온도조건에 따른 대조군(CTL)과 실험군(TEST)의 L* 값의 변화

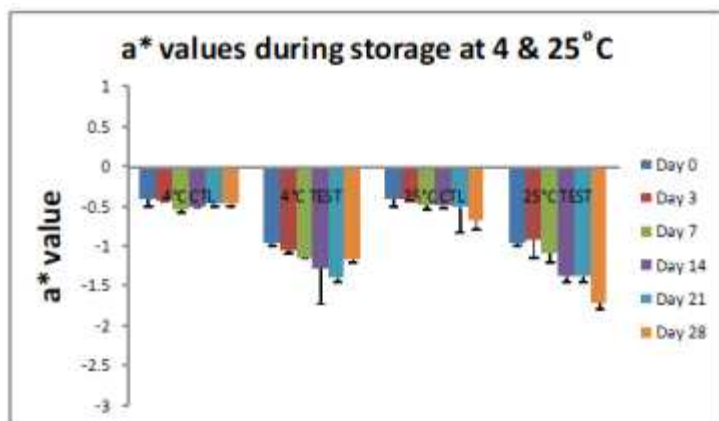


그림 85. 저장 온도조건에 따른 대조군(CTL)과 실험군(TEST)의 a* 값의 변화

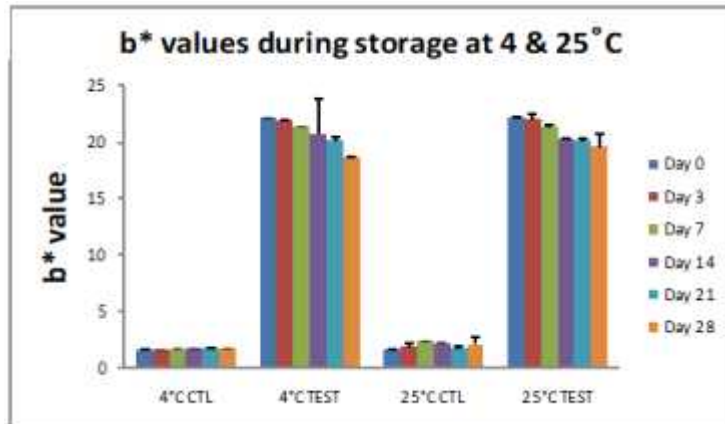


그림 86. 저장 온도조건에 따른 대조군(CTL)과 실험군(TEST)의 b* 값의 변화

⑤ 관능 평가

ㄱ. 28일의 저장기간 동안 상온(25°C) 및 냉장온도(4°C)에서 저장한 대조군과 실험군의 관능 평가를 진행하였다.

ㄴ. 저장 0일차에는 대조군과 실험군에서 모두 차이가 나타나는 것으로 평가하였고, 대부분 산에서 유래되는 신맛을 보정하여 숙성된 맛으로 느낄 수 있게 해준다고 평가하였다. 저장기간이 길어지면서 상온에서 저장한 음료에서는 대조군과 실험군의 차이가 나타나지 않았다. 그러나 냉장온도에서 저장한 음료에서는 지속적으로 차이가 관찰되었으나, 유의적인 수준의 차이는 아니었다. 저장 21일차부터 28일차까지는 안전성을 고려해 관능 평가를 실시하지 않았으며, 전반적으로 강황잎 추출물 성분의 맛 향상은 냉장 보관 시에 크게 나타나는 것으로 사료되었다.

ㄷ. 강황잎 추출물의 첨가는 맛의 향상 또는 숙성 등의 효과와 전반적인 향의 균형을 맞추는 데 도움을 주는 것으로 사료되었다.

⑥ 미생물 검사

ㄱ. 28일의 저장기간 동안 상온(25°C) 및 냉장온도(4°C)에서 저장한 대조군과 실험군의 유해 미생물에 대해 미생물 검사를 실시하였다. 미생물 검사는 총균수(Total Plate Count), 대장균(E. coli)의 수를 측정하여 평가하였다.

ㄴ. 미생물 검사 결과, 각각의 저장 온도조건에서 저장한 대조군과 실험군에서 미생물이 검출되지 않았다.

표 30. 저장 온도조건에 따른 대조군(Control)과 실험군(Test)의 총균수 변화

Days	Total Plate Count (TPC)			
	4°C		25°C	
	Control	Test	Control	Test
Day 0	no growth	no growth	no growth	no growth
Day 3	no growth	no growth	no growth	no growth
Day 7	no growth	no growth	no growth	no growth
Day 14	no growth	no growth	no growth	no growth
Day 21	no growth	no growth	no growth	no growth
Day 28	no growth	no growth	no growth	no growth

표 31. 저장 온도조건에 따른 대조군(Control)과 실험군(Test)의 대장균수 변화

Days	E. coli			
	4°C		25°C	
	Control	Test	Control	Test
Day 0	negative	negative	negative	negative
Day 3	negative	negative	negative	negative
Day 7	negative	negative	negative	negative
Day 14	negative	negative	negative	negative
Day 21	negative	negative	negative	negative
Day 28	negative	negative	negative	negative

2-6. 산업화를 위한 홍보 및 마케팅 전략 수립

1) 전략 수립 배경

(1) 강황잎은 국외에서는 식품소재로서 다양하게 응용되고 있으나, 국내의 경우 식품원료로 등재되어 있지 않아 전량 버려지고 있는 실정이다. 식품으로서의 안전성 입증 및 우수한 향신료로서의 기능을 밝힘으로써 부산물로 폐기되고 있는 강황잎으로부터 신규 부가가치 창출 및 소비자의 욕구를 충족시킬 수 있는 신규 식품소재로 개발하고자 하였다.

2) 강황잎 추출물의 식품원료 등재 신청 및 품종등록

(1) 본 연구개발 과제를 통해 개발한 강황잎 추출물(10 Brix)의 품종등록 및 하나의 식품원료로서

인정받기 위해 식품의약품안전처 신소재식품과와 새로운 식품원료에 관한 '채움 토의'를 진행하였다. 토의 후, 다음과 같은 사항들을 수정하고 보완하도록 요청 받았다. 해당사항들을 수정 및 보완하여 식품의약품안전처에 자료 제출 및 검토를 요청할 예정이다.

- ① 강황잎 추출물의 '새로운 식품원료 인정신청'을 위한 자료 제출
- ② 사용부위를 '잎'과 '줄기' 로 명확히 할 것
- ③ 강황잎 원물 자체의 미생물, 중금속 검사자료도 포함 할 것
- ④ 생산주체는 '(주)한불화농'으로 한다.
- ⑤ 강황잎의 하단부 절단 높이를 수치화 할 것
- ⑥ 국외사용근거 좀 더 추가할 것
- ⑦ 강황잎 추출물 생산 공정 세부적으로 표기 할 것 (시간, 온도 등)
- ⑧ 유통기한 조건 및 기간 설정 할 것
- ⑨ 최대섭취량 부분은 '질병관리본부'에 자료요청 후 활용 가능



그림 87. 강황잎 추출물(10 Brix)의 품종등록을 위한 식품의약품안전처와의 채움 토의

3) 제품 형태 및 판매 개요

- (1) 상용화 형태 : 강황잎 추출물 (10 Brix)
- (2) 수요처 : 식품 회사, 건강기능식품 회사, 화장품 회사
- (3) 예상 판매단가 : 25,000~30,000 원/kg (강황잎 추출물 10 Brix 기준)

4) 제품 판로

- (1) 식품용(음료, 다류, HMR 식품 등)
- (2) 향후 추가 연구개발 이후
: 화장품용(미백, 보습, 안티에이징 등), 건강식품용(간기능 개선, 숙취해소)

5) 사업 추진 계획 (업체 선정)

- (1) 식품업체

- ① 음료 : 롯데, CJ제일제당, 동원 F&B, 풀무원, 정식품, 서울우유, 광동제약, 응진식품 등
- ② 카레 등의 HMR 식품 : 오뚜기, CJ제일제당, 대상, 풀무원, 동원 F&B 등
- ③ 향신료(허브솔트 등) : CJ제일제당, 대상 등
- ④ 다류 : 동원 F&B, 오뚜기 삼화, 담터 등

- (2) 화장품 및 생활용품 : LG생활건강, 애경산업, 코리아나, 유한킴벌리, 코스메카, 태평양 등
- (3) 건강기능식품, 제약 : KT&G, 녹십자, 농협, 동국제약, 동화약품, 보령제약, 마임 등

6) 핵심 경쟁요인

- (1) 진도올금 주식회사의 지속적인 원물수급 가능여부
- (2) 고농도의 유효성분이 함유된 강황잎 추출물을 위한 추출기술 개발
- (3) 다양한 강황잎 제품개발 및 B2B 영업 노하우를 기반으로 한 유통망 활용
- (4) 농업법인 진도올금 주식회사와 (주)한불화농의 소재 경쟁력 우위

6) 수익창출 방안

- (1) 농업법인 진도올금 주식회사로부터의 계약 재배를 통한 원료수급 비용 절감
- (2) 강황잎 추출물(10 Brix)의 수요를 창출할 수 있는 다양한 제품 개발
- (3) 기존 거래선을 통한 제품 판로 확보

7) 강황잎 추출물(10 Brix)을 이용한 1차 제품기획 및 판매전략

- (1) (주)한불화농과 진도올금 주식회사의 협업을 통해 개발한 강황잎 추출물(10 Brix)이 첨가된 과일 형태의 시제품과 음료 형태의 시제품을 홍보하고, 판매하기 위한 방안을 마련하기 위해 회의를 진행하였다.

- ① 식품에 첨가하는 향료를 이용하는 (주)한불화농의 주거래 업체에 강황잎 추출물이 첨가된 식품을 제안함으로써 홍보하는 방안
- ② 진도올금 사업단의 협조를 통해 지역특화제품 개발 사업에 대해 홍보하고, 지역특화제품 판매장을 통해 강황잎 추출물을 이용하여 개발한 제품을 홍보하고 판매하는 방안
- ③ 오프라인/온라인 홍보, 언론 홍보 등

8) 강황잎 추출물(10 Brix)의 홍보

- (1) 향 전문 플래그십 스토어를 이용한 홍보

- ① 서울특별시 강남구 신사동 소재의 로데오거리에 위치하고 있는 “E=qual 브랜드 전시 매장”에 개발한 강황잎 추출물을 전시하여 홍보를 진행하였다.



그림 88. E=qual 브랜드 전시 매장을 통한 강황잎 추출물의 전시 및 홍보

(2) 지역 특산물 체험 홍보관을 이용한 홍보

- ① 진도군청과 진도울금 사업단의 협조를 받아 “진도울금 체험 홍보관”에 개발한 강황잎 추출물을 전시하고, 홍보관을 관람하는 사람들이 강황잎 추출물을 직접 접해볼 수 있도록 함으로써 홍보를 진행하였다.



그림 89. 진도울금 체험 홍보관을 통한 강황잎 추출물의 전시 및 홍보

2-7. 연구 성과

1) 연구개발 성과 목표

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	신규 소재 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자유치		논문		학술 발표			정책 활용	홍보 전시	
												SCI	비SCI						
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건		
가중치	5	10	30	10	10	20	-	-	-	-			-	10	-	-	-	5	-
최종목표	2	2	1	1	30	2	120	250	4		1	2		3				2	
1차년도	1													1					2
2차년도	3		1	1	30	2					1	1		1				2	42
3차년도																			
소 계	4	0	1	1	30	2					1	1		2				2	45
종료 1차년도		1					50	100	2		1	1		1					
종료 2차년도							120	240											
종료 3차년도							260	560	1										
종료 4차년도							350	700											
종료 5차년도							450	900	1										
소 계		1					120	250	4			1		1					
합 계	4	1	1	1	30	2	120	250	4		2	2		3				2	45

(1) 주관연구기관 [(주)한불화농]

- ① 강황잎 식품원료 등재를 위한 독성시험 및 신청서류 완료
- ② 기술이전 1건 (강황잎 추출물 대량생산기술)
- ③ 특허출원 2건, 특허등록 진행 중
- ④ 강황잎 유래 식품소재 개발을 통한 국내·외 매출 (과제종료 후)

(2) 협동연구기관 (한국식품연구원)

- ① 특허출원 2건, 특허등록 진행 중
- ② 기술이전 1건 (강황잎 소재 표준화 및 효능 관련)
- ③ SCI급 논문 2건, KCI급 논문 2건, 학술발표 2건

(3) 협동연구기관 (농업법인 진도올금 주식회사)

- ① 제품 홍보전시 2건

2) 정량적 연구 성과

(1) 국내·외 논문 게재

No.	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)	게재일	등록번호
1	Determination of Curcuma longa L. (Turmeric) Leaf Extraction Conditions Using Response Surface Methodology to Optimize Extraction Yield and Antioxidant Content	Journal of Food Quality	Sera kim	ID 7575206	영국	Hindawi	SCI	2019.11.22	
2	Protective Effects of Polysaccharide fraction Extracted from Turmeric Leaves on Intestinal Epithelial Barrier integrity	Journal of chitin and chitosan	Sera kim	24	한국	Korean Society for chitin and chitosan	비 SCI	2019.06	
3	In vitro and in vivo antioxidant activities of Curcuma longa L. (Turmeric) Leaf Extract	투고 예정	Sang-Hoon Lee				SCI		
4	강황잎 추출물의 저장조건에 따른 품질 특성변화	투고 예정	Sera kim				비 SCI		

(2) 지식재산권 (특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신제품, 프로그램)

No.	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원			등록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
1	강황잎줄기를 이용한 식품용 풍미개선제 제조방법, 이에 의해 제조된 식품용 풍미개선제, 및 이를 포함하는 식품	한국	김정은 외 4명	2018.08.10	10-2018-0093798				100%
2	항산화 활성이 우수한 강황잎 추출물의 최적 추출방법	한국	이상훈 외 4명	2019.04.15	10-2019-0043871				100%
3	강황잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 장기능 개선용 조성물	한국	이상훈 외 6명	2019.08.30	10-2019-0107456				100%

(3) 국내 및 국제 학술회의 발표

No	회의 명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	한국식품영양과학회	이상훈	2018.10.31.	부산	한국
2	Experimental Biology 2019	김세라	2019.04.06	올란드	미국

(4) 기타

① 홍보실적

- ㄱ. 서울특별시 강남구 신사동 “E=qual 브랜드 전시 매장”에서 개발한 강황잎 추출물을 전시하여 홍보하였다.
- ㄴ. 진도군청과 진도울금 사업단의 협조를 받아 “진도울금 체험 홍보관”에서 개발한 강황잎 추출물을 전시 및 체험 홍보하였다.

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

: 미활용 부산물인 강황잎을 식품원료로서 안전성을 인정받고, 강황잎의 소재화를 통한 새로운 고부가가치 천연식품소재의 개발 및 산업화

3-2. 목표 달성도

연구목표	목표대비 결과	목표 달성도 (%)
강황잎 추출물 전처리 및 제조공정 확립	참여기업인 진도올금 주식회사와 함께 원물확보, 수확, 세척, 건조 및 추출까지의 모든 공정을 확립하고 사업성을 검토하였으며, 원물 및 추출물의 안전성을 확보 및 반응표면분석을 이용한 최적 추출조건을 확립하였다.	100
강황잎 추출물 한시적 식품소재 등재를 위한 독성시험	식품의약품안전처와의 논의를 통하여 10 Brix 열수 추출물을 등재 소재로 결정 후, 한시적 식품소재 등재 요건에 필요한 모든 기초자료 및 독성시험 결과자료를 확보하였다. 식품의약품안전처와 채움 토의를 진행하여 신청서 보완중이며, 2020년 신청완료 예정이다.	100
강황잎 추출물 이용 가공식품 및 식품소재용 제형 개발	강황잎 추출물을 이용하여 망고 주스, 커피, 카레, 소고기 양념 등 다양한 가공식품에 적용하고, 품질특성 분석을 통하여 제품화 가능성을 확인하였다. 식품소재로서의 활용성 증대를 위한 액상 및 제형 제조방법을 확립하였다.	100
강황잎 추출물 기호도 평가와 관능적 특성 분석	GC-MS를 이용한 향미성분 분석 및 E-nose 분석을 통하여 강황잎 추출물의 이화학적 특성을 확인하였고, 강황잎 추출물을 적용한 가공제품에 대한 기호도 평가 및 FGI(Focus Group Interview)를 통하여 관능적 특성 분석 및 향후 제품개발 및 마케팅전략을 수립에 필요한 기초자료를 확보하였다.	100
강황잎 추출물의 생리기능성 효능 평가	강황잎 추출물의 향후 산업화를 위해 소재의 우수성을 제시할 수 있는 생리기능성 연구를 추가적으로 수행하였다. (1차년도 단계평가 요구사항). 강황잎 추출물의 항산화, 항염증 및 장 건강 효능평가	100

	를 위한 연구를 수행하여 논문게재 및 학술발표 실적을 달성하였다.	
강황잎 추출물 산업화를 위한 표준화 및 대량생산공정 확립	강황잎 추출물 최적 제조조건을 기반으로 실증생산(1톤)을 수행하여 대량생산공정을 확립하였고, 지표성분 선정(nicotinic acid) 및 품질관리 분석조건을 확립하였다.	100
산업화를 위한 홍보 및 마케팅 전략 수립	제조원가 및 경제성 분석을 통하여 제품가격 책정(25,000~30,000 원/kg)하고 산업화를 위한 유통망, 비즈니스모델 및 마케팅 전략을 수립하였고, 2회의 전시 및 체험 홍보를 수행하였다.	100

3-3. 관련 분야 기여도

1) 기술적 측면

- ① 현재 부산물로 폐기되고 있는 강황잎의 안전성 확보 및 이를 활용하기 위한 소재의 표준화 및 생산기술 확보
- ② 강황잎 추출 이후의 농축과정을 통해 유효성분을 고농도로 얻을 수 있는 최적 추출기술 확립 가능
- ③ 강황잎 추출물을 제조하는 위생적인 생산공정 개발 및 품질관리 기준 마련
- ④ 강황잎 추출물이 첨가된 새로운 식품첨가물 및 가공식품 개발기술 확보
- ⑤ 강황잎 추출공정 및 강황잎 추출물이 첨가된 새로운 제품들에 대한 기술선점 및 특허권 취득 가능
- ⑥ 향후 임상시험을 통한 기능성 식품으로 활용 가능

2) 경제적·산업적 측면

- ① 유효성분을 고농도로 얻을 수 있는 강황잎 추출기술에 대한 특허권을 확보
- ② 강황잎 물 추출물은 각종 소스류에 첨가하여 새로운 천연 식품보존제로서 사용 가능
- ③ 각종 육류 또는 카레 제품에 강황잎 분말을 단독으로 첨가하거나 병합 첨가함으로써 누린내를 제거하는 소취제 또는 풍미 증진을 시켜주는 향신료로서 사용할 수 있고, 티백에 넣어 차 형식으로 마실 수 있어 국내 및 해외 식품 시장에서 새로운 소재로 부각될 수 있을 것으로 기대
- ④ 강황잎 추출물을 첨가한 새로운 식품첨가물 및 기능성 식품을 개발하여 국내시장뿐만 아니라 해외시장으로의 수출 경쟁력 확보
- ⑤ 강황잎 분말 또는 추출물을 식품뿐만 아니라 방향제, 해충기피제, 다양한 의약외품 등에 적용하여 기존에 강황 작물에만 의존하던 농가에 미활용자원인 강황잎을 이용해 2차 소득창출 가능하도록 할 수 있음

3-4. 목표 미달성 시 원인 및 차후대책

- 1) 강황잎 추출물의 한시적 식품원료 신청에 필요한 자료는 확보한 상태이며, 식품의약품안전처와의 채움 토의를 통하여 간단한 보완사항만 지적받은 상황이다. 다만 식품원료로서 신청 시 명시한 식품군에만 사용가능하므로, 적용할 제품에 대한 신중한 검토 후에 2020년 상반기 내 한시적 식품원료 신청을 완료할 예정이다.
- 2) 정량적 실적에서 논문의 경우, 본 연구개발 과제 수행으로 얻은 결과를 이용하여 논문 투고를 준비 중이다. 사업기간이 짧아 약 5개월간 진행한 강황잎 추출물의 저장 특성 연구가 다소 지연되었던 점을 고려 바랍니다.
- 3) 특허등록의 경우, 1차 연도에 출원한 특허가 2차 연도에 등록되기에는 기간이 너무 짧아서 과제 종료 이후 출원한 3건의 특허가 순차적으로 등록될 것으로 판단된다.
- 4) 강황잎 추출물의 경우, 식용이 불가하여 국내 연구가 매우 미비하였으나, 향후 한시적 식품원료로서 인정받게 되면 식품소재뿐만 아니라 다양한 기능성 소재로도 활용 가능할 것으로 판단된다. 따라서 향후 이와 관련된 후속 연구지원이 이루어졌으면 한다.

4. 연구결과의 활용계획 등

- 1) 본 연구개발 과제를 통해 개발된 강황잎 추출물에 몇 가지 생리활성물질이 있고, 독성 및 안전성 검증을 받아 사용가능하게 된다면, 다양한 식품군에 적용 가능한 소재로 개발이 될 것으로 판단된다.
- 2) 본 연구개발 과제를 통해 확보한 소비자 기호도 및 특성 분석 자료를 기반으로 육류의 잡내 제거용 허브 향신료, 카레 분말용 향신료, 기능성 음료 소재, 캔디류 소재 등으로 활용 가능할 것으로 판단된다.
- 3) 현재 국내에서는 강황을 이용한 다양한 식품들이 판매되고 있지만, 본 연구개발 과제를 통해 개발된 강황잎 분말 또는 강황잎 추출물이 새로운 강황 관련 식품소재로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.
- 4) 강황은 국내뿐만 아니라 해외에서도 잘 알려진 건강기능성 약용작물이며, 해외시장에서도 강황을 이용한 다양한 식품들이 판매되고 있다. 따라서 본 연구개발 과제를 통해 소재에 대한 독성 및 안전성 확인과 강황잎 분말 또는 강황잎 추출물을 첨가한 제품의 개발은 식품소재와 관련된 시장 확대에 도움이 될 수 있을 것으로 기대된다.
- 5) 본 연구개발 과제를 통하여 강황잎 추출물의 항산화, 항염증, 장 건강 효능을 확인하였으며, 이외에도 다양한 생리활성성분을 가지고 있을 것으로 판단된다. 향후 고부가가치 기능성 식품소재 및 향장소재로서의 활용을 위한 후속연구가 이루어진다면 최종적으로 농가 소득에도 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

붙임. 참고문헌

1. Chen, X. M., David, D. K.: Flavonoid composition of orange peel extract ameliorates alcohol-induced tight junction dysfunction in Caco-2 monolayer. *Food. Chem. Toxicol.*, 2017, 105, 398-406.
2. Ying, W., Jing, T., Bing, C., Baifang, W., Dai, Z., Bingyuan, W.: Effects of alcohol on intestinal epithelial barrier permeability and expression of tight junction-associated proteins. *Mol. Med. Rep.*, 2014, 9, 2352-2356.
3. Eleonora, C., Angela M., Shelly, N. H., Sandra, V. V., Maureen, A., Steven, M. W., Andrew, L. W., Cesar, G. F., Patricia, I. O.: Anthocyanins inhibit tumor necrosis alpha-induced loss of Caco-2 cell barrier integrity. *Food. Funct.*, 2017, 8, 2915-2923.
4. 장규섭, 고경희, and 정승현. "강황 (*Curcuma longa* L.) 으로부터 초임계 유체 추출한 curcumin 의 생리활성." *한국식품과학회지* 36.2 (2004): 317-320.
5. 고병섭, et al. "가미옥천산의 ICR 마우스 경구 투여에 의한 급성 독성시험 연구." *동의생리병리학회지* 19.5 (2005): 1200-1203.
6. Kim, Young Guk, et al. "강황 수확시기에 따른 생육과 주요 성분 변이." 2016 년 한국약용작물학회 심포지엄 및 춘계학술발표회. 2016.
7. Thomas, Y. M., Micheal, A. B., Dongmei, Y., Ali, P., Hamid, M. S.: Mechanism of TNF- α modulation of Caco-2 intestinal epithelial tight junction barrier; role of myosin light-chain kinase protein expression. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.*, 2005, 288, 422-430.
8. Rana, A-S., Shuhong, G., Dongmei, Y., Manmeet, R., Thomas, Y. M.: TNF- α Modulation of Intestinal Tight Junction Permeability Is Mediated by NIKIKK- α Axis Activation of the Canonical NF- κ B Pathway. *Am. J. Pathol.*, 2015, 186, 1151-1165.
9. Suzuki, T.: Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cell. Mol. Life. Sci.*, 2013, 70, 631-659.
10. 라하나, and 김혜영. "일반강황과 발효강황의 항산화 및 항균 활성 특성." *한국식품조리과학회지* 32.3 (2016): 299-306.
11. 정연섭, et al. "생강, 울금, 강황 추출물의 항산화 효과, AChE 억제활성 및 GABA 함량." *한국식품영양과학회지* 41.10 (2012): 1395-1401.
12. 김남영, 임혜원, and 이현용. "추출 방법에 따른 강황 잎 추출물의 항장 활성 비교." *한국약용작물학회지* 22.4 (2014): 255-261.
13. 최운용, and 이현용. "초고압 공정을 이용한 강황 잎 추출물의 항산화 활성 증진." *한국약용작물학회지* 22.2 (2014): 121-126.
14. Ishita, C., Kaushik, B., Uday, B., Ranajit, K. B.: Turmeric and curcumin: Biological actions and medicinal applications. *Curr. Sci.*, 2004, 87, 44-53.
15. Rana, M., Reddy, S. S., Maurya, P., Singh, V., Chaturvedi, S., Kaur, K., Agarwal, H., Ahmad, H., Naqvi, A., Dwivedi, A.K.: Turmerone enriched standardized *Curcuma longa* extract alleviates LPS induced inflammation and cytokine production by regulating

- TLR4-IRAK1-ROS-MAPK-NFκB axis. *J. Funct. Foods.*, 2015, 16, 152-163.
16. Minakshi, R., Anil, K. D., Preeti, M., Sukka S. R., Vishal, S., Hafsa, A., Madhu, D., Manoj, K. B.: A Standardized Chemically Modified *Curcuma longa* Extract Modulates IRAK-MAPK Signaling in Inflammation and Potentiates Cytotoxicity. *Front. Pharmacol.*, 2016, 7, 1-14.
 17. 김관수, 정명근, and 박시형. "강황 (*Curcuma longa* L.) 색소의 정량 및 안정성." *한국작물학회지* 50 (2005): 211-215.
 18. Choi, WY., Lee, HY.: Enhancement of Antioxidant Activities of *Curcuma longa* Leaves by Ultra High Pressure Extraction. *Korean. J. Med. Crop. Sci.*, 2014, 22, 121-126.
 19. Yunbao, L., Muraleedharan, G. N.: *Curcuma longa* and *Curcuma mangga* leaves exhibit functional food property. *Food. Chem.*, 2012, 135, 634-640.
 20. Mueller, M., Cavarkapa, A., Unger, F. M., Viernstein, H., Praznik, W.: Prebiotic potential of neutral oligo- and polysaccharides from seed mucilage of *Hyptis suaveolens*. *Food. Chem.*, 2017, 221, 508-514.
 21. Glenn, R. G., Marcel, B. R.: Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota Introducing the Concept of Prebiotics *J. Nutr.*, 1994, 125, 1401-1412.
 22. Thitiratsakul, B., Anprung, P.: Prebiotic activity score and bioactive compounds in longan (*Dimocarpus longan* Lour.): influence of pectinase in enzyme-assisted extraction. *J. Food. Sci. Technol.*, 2014, 51, 1947-1955.
 23. Thomas, Y. M., Gary, K. I., Neil, T. H., Vimesh, A., Ali, P., Michel, A. B., Hamid, M. S.: TNF-α induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.*, 2004, 286, 367-376.
 24. Akihiro, W., Yuta, S., Kota H., Kazuki, I., Miho, F., Kiyohito, Y., Masuo, K.: Rebeccamycin Attenuates TNF-α-Induced Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction by Inhibiting Myosin Light Chain Kinase Production. *Cell. Physiol. Biochem.*, 2017, 41, 1924-1934.
 25. Chen, S-H., Chen, G-W., Zhu, J., Wang, X., Zuo, S., Pan, Y-S., Zhang, J-L., Liu, Y-C., Chen, Z-Y., Wang, P-Y.: Protective effect of hydrogen sulfide on TNF-α and IFN-γ-induced injury of intestinal epithelial barrier function in Caco-2 monolayers. *Inflamm. Res.*, 2015, 64, 789-797.
 26. 이광진, 마진열, and 김영식. "초음파 및 침적방법을 이용한 강황 (*Curcuma longa*) 으로부터 Curcuminoids 의 확인." *KSBB Journal* 27.1 (2012): 33-39.

주 의

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