

발간등록번호

11-1541000-001067-01

보안과제(), 일반과제(○) 과제번호: 308007-03

마의 부가가치 증대 및 산업화를 위한 가공기술의 개발

Processing Technology of Chinese Yam for the Development
of Value-added Products and Industrial Application

안동대학교

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “마의 부가가치 증대 및 산업화를 위한 가공기술의 개발”의 보고서로 제출합니다.

2011년 6월 24일

주관연구기관명 : 안동대학교

주관연구책임자 : 박 윤 문

세부연구책임자 : 박 동 진

정 형 진

권 인 숙

손 호 용

임 재 환

김 태 완

권 순 태

이 중 화

정 구 민

권 기 석

제1협동연구기관 : 연세대학교

협동연구책임자 : 김 재 능

제2협동연구기관 : 성균관대학교

협동연구책임자 : 표 석 능

제3협동연구기관 : 경북농업기술원

협동연구책임자 : 강 동 균

요 약 문

I. 제목

마의 부가가치 증대 및 산업화를 위한 가공기술의 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

최근 국내에서 재배되는 마(*Dioscorea batatas* Decne.)의 건강증진 효능(노화방지, 혈당강하, 장관활동촉진, 항균, 항비만, 해독 작용, 면역조절작용)이 널리 알려지면서 신선 마는 물론 가공 제품에 대한 관심이 높아지고 있다. 이와 함께 마의 생산면적 및 생산량은 급격한 증가추세에 있다.

그러나 마의 기능적 우수성에도 불구하고, 신선 마 품질관리체계가 미흡하고 기호도를 충족시킬 수 있는 독특한 맛이나 풍미가 없어 마 가공제품에 대한 소비자의 선호도가 매우 낮은 편이어서 마 가공산업은 건조 및 분말화 등의 단순한 1차가공의 수준에 그치고 있다.

마의 소비량과 부가가치를 상승시켜 마 산업 확대를 위해서는 신선 마의 저장유통기술과 포장 시스템 등 기초적인 지원시스템이 갖추어져야 할 것이며, 보다 과학적이고 설득력이 있는 기능성의 검증, 효용 물질의 활용도를 높이기 위한 적용기술이 뒷받침되어야 한다. 이와 함께 소비자의 기호를 만족시킬 수 있는 다양한 가공기술이 개발되고 제품이 만들어져야 할 것이며 이들 제품이 시장에 진입하여 성장할 수 있는 마케팅 및 디자인 지원이 필요하다.

III. 연구개발 내용 및 범위

주관기관의 3개 세부 과제 영역에 따라 3개의 협동과제를 추가하여 연구 내용을 구성하였다.

1. 제1 세부에 해당하는 기초지원연구 영역에서는 수확후관리기술 확립, 마 산업 분야와 마케팅 분석 및 디자인 지원을 수행하였고 협동과제로서 포장기술 개발 및 표준화를 보완하였다.
2. 제2 세부에 해당하는 기능성 신소재개발 영역은 주관기관 세부과제 6개와 협동과제 1개로 구성하여 마와 마 재배 부산물인 영여자의 기능성 탐색 및 검증, 기능성 물질의 효용 증대를 위한 부가기술 개발에 초점을 맞추었다.
3. 가공기술 개발을 위한 제 3 세부과제는 신선편이 식품 상품화를 위한 공정, 정과 제조기술, 발효식품류의 개발을 추진하였고, 특히 협동과제에서는 지역 특산물과 연계된 복합 가공식품 개발을 목표로 하여 다양한 제품화 공정을 제시하였다.

연구개발 주요 내용		범위
세부 1: 수확후 관리, 마케팅	- 생마 수확후 관리기술 개발	- 생마 수확후 관리 모델 제시
	- 마케팅 전략수립 및 디자인 지원	- 신선 마 제품 및 가공제품 마케팅 전략 수립, 홍보전단지 및 상품디자인 제시
협동 1: 포장기술	- 표준 포장재·기법 개발	- 생마 및 가공 상품의 품질유지를 위한 포장재 및 포장기법 개발
세부 2: 기능성 신소재개발	- 마 자원의 생리활성물질 탐색 및 대량생산기술 개발	- 마의 생리활성 성분 분석 및 효능검증 (항산화, 항노화, 항골다공증, 항염증) - 마 유래 기능성 증대를 위한 물질 분리 - 기능성 물질 소재화를 위한 증식기술
협동 2: 전임상실험	- 마 유래의 기능성 신소재 및 가공 제품의 전임상실험	- 마 제품 및 소재의 전임상실험
세부 3: 가공기술 및 제품 개발	- 신선편이(fersh-cut) 제품 및 기능성 강화 식품개발	- fresh-cut, 갈아놓은 마의 제조 방법 - 생리활성기능을 강화한 인스턴트 차, 레토르트 파우치형 즉석마죽 및 마 첨가 목
	- 마를 이용한 수출 맞춤형 마 기호 제품개발	- 마를 이용하여 홍삼정과와 유사한 마 당절임 제품 등 기호 제품을 개발
	- 젖산발효에 의한 기능성 강화 발효 음료 제품개발	- 젖산발효 및 미생물 대사산물 GABA 첨가에 의한 기능강화용 발효음료제품 - 발효조건 최적화 공정 (단독 및 복합발효 특성)
협동 3: 산지연계형 제품개발	- 산지연계형 특산물복합형 마 가공식품개발	- 경북 북부권 과수 및 축산농가 연계 - 특산물 복합형 마 가공식품 개발 (마 사과음료, 마 사과정과, 마 치즈, 마 사과잼, 마 된장 및 마 초콜릿)

IV. 연구개발결과

1. 기초기술 지원 분야

신선 마 장기 공급체계에서의 품질관리를 위한 수확후 처리기술로서 29℃ 치유(curing) 기술을 제시하였고 수확후 생리에 기초한 저장조건으로는 4~7℃ 온도범위를 반영하여 수확후 관리 체계를 확립하였다.

제품 유형별 포장 기술로는, 신선편이식품으로서 절편 마의 경우 연신 나일론(ON) 필름이 적합하였다. 절편 마의 포장 내 가스 조성은 O₂ 5%+CO₂ 50% 조합에서 품질유지 효과가 우수하였고 코팅처리로는 가식성 소재인 CMC(carboxymethyl cellulose) 처리가 갈변현상을 억제하였다. 같은 마 제품에 있어서는 불투명 알루미늄 박층 필름 중 알루미늄 코팅 필름보다는 증착 필름이 품질유지에 보다 효과적이었다. 수분함량이 가장 중요한 품질 저하요인으로 작용하는 분말화 마 제품의 경우에는 저온유지와 투습도가 낮은 포장재 활용이 필요한 것으로 조사되었다.

마 산업 확대를 위한 마케팅 지원 과제에서는 신선 마와 가공식품 산업의 마케팅 전략을 수립하고, 마의 판촉활동을 강화하기 위해 제품상자의 시각디자인 및 카탈로그 디자인을 개발하였다. 마케팅 전략 수립을 위해 마 및 마 가공식품 산업 외부환경(메가트렌드 분석/ 동향· 전망 분석/ 산업 성장분석)을 분석하였고, 신시장 진출 비즈니스 모델 개발 및 단계별 (도입기, 성장기, 성숙기) 마케팅 전략을 제시하였다. 2단계 전략으로서는 마 및 마 가공제품 소비자 분석을 통한 신시장 발굴, 설문지법에 의한 데이터 수집 및 분석에 기초한 마케팅믹스 전략을 개발하였다. 최종 적용단계에서는 지역에 소재한 3개 마 가공제품 회사를 대상으로 실행계획을 개발하여 제공하였다. 실행계획 개발을 위해 3년간 참여기업에게 시각디자인 지원 4건, 카탈로그 디자인 지원 3건을 수행하여 경쟁력을 확보하도록 도움을 주었다.

2. 기능성 신소재 개발 분야

마로부터 유래되는 기능성 물질의 효능 검증, 새로운 소재의 발굴, 효능 물질의 강화를 위한 공정 개발, 마 부산물의 약리적 효용 검증을 수행하였고 이들 물질의 대량 생산 가능성을 타진하는 bioreactor 증식기술을 제시하였다.

마로부터 분리추출한 뮤신과 조사포닌의 산화적 손상억제력을 평가한 결과, 뮤신은 높은 항산화 활성을 통하여 산화적 DNA 손상 및 세포손상을 억제하였으나 조사포닌은 산화적 세포 손상 억제력이 없었다. 그러나 조사포닌 추출물은 IkBa의 인산화와 IkBa 감소의 억제를 통해 전사조절인자인 NF- κ B 신호전달을 효과적으로 억제함으로써 iNOS의 과도한 발현을 억제하여 NO의 생성을 조절한 것으로 보아 항염증 활성이 있는 것으로 나타났다. 반면, 뮤신은 항염증 활성이 없었다.

마의 생리활성 성분으로 밝혀진 diosgenin이 뼈 형성을 촉진하는 기능이 있는지를 조골세포의 세포분화 촉진 및 칼슘화 촉진 기능을 입증함으로써 증명하였으며, 안동 산 참마 유기용매 추출물이 또한 뼈 형성 촉진 기능을 탐색하였다. 이러한 연구결과는 안동산 참마가 골형성 촉

진기능과 항골공증 기능성식품으로서의 개발을 가능케 할 것이다.

마에 함유된 신물질 탐색 연구에 있어서는, 마 추출물의 저분자 복합체(1400 Da 이하)를 분리한 후 RP_HPLC를 사용하여 6개 분획물로 구분하였으며 분획물(#2, #4) 처리 시에 HIF1A와 PARP1의 발현 감소와 STAT3와 DENR의 발현 증가를 확인하였다. 가장 높은 염증 및 노화 억제 효능을 보이는 분획물 2, 4번의 경우 LC-MS/MS 분석을 통하여 10여개의 특이적 화합물을 확인하였다. 또한 4번 분획물에 포함된 페놀화합물과 당 함유량은 각각 31.4 μ g과 121.4 μ g으로 확인되었다. 결과적으로 마 저분자 분획물의 성분 분석 및 노화 관련 유전자 발현의 억제 및 염증 유발 유전자 발현의 억제 효능을 확인하였고 항 위염효능을 검증하였다.

마 효능 물질의 활성을 증대시키고 식품가치를 높이기 위한 공정 개발 결과, 발효공정을 거친 마와 증자숙성공정을 거친 마, 볶음 공정을 거친 마의 실험결과 각각의 처리공정을 거쳤을 때 일반 마보다 유효활성 성분 및 항산화 효능이 최대 2배까지 증가하는 것을 확인하였다. 또한 증자숙성처리된 마의 경우 카라멜화와 메일라드 반응의 결과로 제품의 색깔이 흑화 되어 최근 건강기능식품 트렌드의 한 부류인 칼라푸드로서 '흑마'라는 브랜드를 통해 제품으로 시장에 출시되었다. 흑마제품은 증자숙성공정을 통하여 고유의 풍미와 감미가 부여되어 관능검사 결과 소비자의 선호도가 크게 개선되었다. 또한 마에는 다른 농식품보다 훨씬 높은 알란토인 함량을 나타내었는데, 자외선조사에 따른 피부상피세포의 손상 시 세포재생효과가 우수하여 피부미용 제품으로의 개발가능성이 높은 것으로 나타났다.

전임상단계의 동물실험에서는, 마 유래 성분에 의해 대식세포의 NO 생성이 억제되었으며 염증 초기 단계에 관여하는 세포부착분자의 발현 또한 그 발현이 감소하였다. 이를 토대로 전임상실험(부종실험 및 아토피 실험)을 수행한 결과 마 유래 성분이 염증으로 인한 부종의 크기를 감소시켰으며 아토피성 피부염도 완화시킴을 확인하였다. 또한 만성 염증질환의 하나인 동맥경화 동물모델을 이용하여 마 유래 성분의 항동맥경화성 효능을 검토한 결과 마 유래 성분에 의해 동맥경화의 진행이 완화되었다.

한편, 마 재배 부산물인 영여자로부터 항진균 활성 및 항암활성이 우수한 6,7-dihydroxy-2,4-methoxy phenanthrene을 분리하고 이의 항진균 및 항암기작이 NAG-1 활성화와 관련되어 있음을 확인하였다. 또한 영여자 활성물질 6,7-dihydroxy-2,4-methoxy phenanthrene은 적혈구 용혈활성을 나타내지 않으며, Comet assay에서도 DNA 수식, 절단 활성을 나타내지 않아 실제적 이용이 가능하리라 판단된다.

마 효능 성분의 대량생산 체계를 위한 연구에서는 뿌리 및 지상부를 급속으로 증식할 수 있는 배지성분(생장조절제, 당, 질소원 등) 조건, 배양환경조건(온도, 광, 산도)이 구명되었으며, 바이오리액터를 이용하여 대량생산할 수 있는 시스템이 확립되었다. 마 추출물에서 방사선에 노출된 식물체의 핵 DNA의 손상을 현저히 억제시킬 수 있는 분획이 탐색되었다.

3. 가공기술 및 제품 개발 분야

신선편이 식품 및 마 분말을 활용한 기능성 강화 가공식품으로서, fresh-cut 마의 제조 방법, 안전성 향상기술 및 품질 특성을 구명하였고 마를 첨가한 고추장 및 마 첨가 목 제품을 개발하였다.

소비 기호도를 고려한 마 정과 제조공정으로는, 마를 박피 후 끓는 물에서 1분간 데치기하고

50%와 70% 당액에 순차적으로 침지 가열한 다음 표면의 당을 세척하고 건조하는 것이다. 사용하는 당은 올리고당과 과당을 3:1로 혼합한 당을 사용하는 것이 씹힘성이 좋고 저장성이 우수하였으며 소비자의 선호도가 좋았다. 개발된 마 과자와 마 머랭 제조는 마 분말 고유의 비선택되는 맛을 제거하는 데 부족하여 추가적인 연구가 더 요구된다.

마를 이용한 발효음료 개발을 위해서는 ACE 저해활성 및 GABA 생산능이 우수한 *Monascus* sp. 균주와 *Lactobacillus* sp.를 선발하였으며, 발효마의 제조를 위하여 마를 1단 발효 및 2단 발효를 실시하여 발효 조건에 따른 생리활성 효과를 측정하였다. 또한 2단 발효마 분말을 첨가한 요구르트의 제조를 통하여 첨가 농도에 따라 비례적으로 생리활성 효과가 증가되었으며, 발효마 분말을 0.5% 첨가시 생균수가 1.14×10^{10} (CFU/ml)로 가장 높았고, 이때 GABA 함량의 경우 421.9mg/L의 함량을 나타내었다.

지역 특화 농산물과 연계한 제품개발로는, 쌀가루 15%, 호화 마 분말 5%, 호정 콩 분말 5% 등을 함유한 마 생칼국수, 7% 당화 마 분말을 함유한 마 초콜릿, 절편 생마를 50°Birx 사과농축액에 침지하여 제조하는 마 사과 정과, sodium trimetaphosphate로 제조한 마 변성전분을 10% 함유한 마 치즈, 생마 10%를 함유한 마 사과 잼, 마 당화액을 7% 함유한 마 사과 음료 및 5% 마 분말을 함유한 마 메주 및 된장 제조기술을 확립하였다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 연구성과

가. 목표

(1) 연구성과 목표

특허		신제품, 상품등록	논문	
출원	등록		SCI(E)	비SCI
10	0	11	4	23

(2) 연구성과 활용 목표

기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보
6	10	2	4	6

나. 성과

(1) 학술발표: 34건

- 국내 학술대회: 28건

- 국제, 해외 학술대회: 6건
- (2) 학술지 게재: 15편
- 학진 등재지 게재: 10편
 - SCI 급 학술지 게재: 5편
 - 향후 게재 예정: SCI 2편, 국내 학술지 10편 준비 중
- (3) 특허 등 지적 재산권: 9건
- 기술특허 등록: 1건
 - 기술특허 출원: 7건
 - 상표 등록: 1건
- (4) 신제품개발 및 상품화: 9건
- 상품 디자인: 4건
 - 카탈로그: 3건
 - 제품화: 2건
- (5) 홍보: 12건
- 신문 3건
 - TV 3건
 - 라디오 2건
 - 전시회 참가 등: 4건
- (6) 교육지도 등 산학협력: 10건
- 마 및 가공제품 마케팅 전략 및 실행 계획 전수: 4건
 - 마 재배 관련 농업인 교육: 3회
 - 기술 및 제품 공동개발: 2건
 - 창업지원: 1건
- (7) 인력 양성 효과
- 박사급: 1명
 - 석사급: 12명
 - 기타: 6명
- (8) 수상 실적: 2건
- 최우수 논문상 및 학술대회 우수 발표상 등

2. 연구성과 활용계획

가. 기초지원 기술 분야: 수확후 관리, 포장 및 마케팅 분석

- 마 유통업체에 수확후 관리기술 보급
- 절편 마, 분말 마, 갈은 마의 포장 시 설계 기준을 제시함
- 참여기업 및 주력 기업의 실행계획(action plan)을 지원

나. 기능성 신소재 개발 분야

- 한방천연물소재의 유효분획성분 추출공정 확립
- 마로부터 분리된 뮤신과 조 사포닌을 함유한 천연 항산화 및 항염증 치료제 개발
- 지역특산 약용식물의 미용기능성 검증

다. 가공기술 및 제품 개발 분야: 신선편이, 분말 제품, 정과, 지역 특산물 연계 상품 등

- 마 가공식품업체에 기술전수
- 기능성을 갖는 유용균주의 산업재산권 확보
- 마 신선편이 및 간편가공, 조리기술 홍보에 따른 소비촉진

SUMMARY

Title: Processing technology of Chinese yam for the development of value-added products and industrial application

The research project was conducted to expand domestic Chinese fresh yam (*Dioscorea batatas* Decne.) market and processing industry as related to consumers' need for healthy and biologically active food material. To achieve the goal, the study was performed in three areas; 1) fundamental supporting technology including basic postharvest technology, packaging technology, and market analysis, 2) search for active ingredients, investigation their functionality, and enhancement of their use, and 3) development of processing technology and a variety of food products.

The quality of fresh Chinese yam is easily deteriorated after harvest, especially during storage and physical distribution. To extend storage potential of fresh Chinese yam, effects of curing treatments and optimum range of storage temperature were investigated. Heat-curing seemed to be beneficial to maintain uniform quality after storage. Temperature range from 4 to 7°C was optimum to avoid chilling injury and, at the same time, to reduce losses. The overall data of postharvest experiment suggested that maximum storage potential could be extended to 1 year through the adequate curing treatment and optimized storage environment.

Studies of packaging technology for Chinese yam also provided effective approaches to extend the shelf life of the fresh-cut sliced, grinded, and powdered products. For fresh-cut slices, oriented nylon (ON) film packaging effectively maintained quality. Adequate modified atmosphere (MA) inside the package seemed to be O₂ 5%+CO₂ 50% combination. Edible film coating treatment with carboxymethyl cellulose (CMC) also improved quality by suppressing the incidence of browning. In ground yam products, multi-layer aluminium film packaging was effective for quality maintenance. Quality of powder products was influenced by storage temperature and relative humidity indicating that water vapor barrier film packaging and low temperature conditions should be provided for long term storage.

In the marketing studies of Chinese yam, marketing strategies and visual design for the packages and catalogues were provided to expand yam industry. To establish basic marketing strategies of the business model, analysis of environmental aspects of the yam industry, megatrend, trend and prospect of industry growth were performed. Marketing mix strategies and action plans were provided for three yam processing companies. At the same time, visual designs of four product packaging boxes and three catalogues were developed and provided for commercial use of the participating company.

As for the functionality of compounds from Chinese yam and by-products, aerial bulbils, various biological activities were investigated.

Biological activities of mucin and saponin, the representative compounds from yam extracts, were investigated against oxidative damage. Mucin inhibited oxidative damage induced by hydroxyl radical, whereas saponin did not show significant inhibitory effect. In contrast, saponin inhibited the production of inflammatory mediators such as iNOS and NO via suppressing NF- κ B signaling pathway, while effect of mucin was insignificant. Both mucin and saponin exerted protective effects against gastric ulcer induced by 70% ethanol/0.5 N HCl.

Specific biocompound from Chinese yam, diosgenin, had the functional role for stimulating bone formation and bone mineralization and the study results showed that diosgenin increased the protein synthesis of the osteogenic biomarkers and bone matrix mineralization. Research data suggest that diosgenin can be developed as the ingredient for bone-stimulating and anti-osteoporosis functional foods.

In order to search other potential biocompounds, low molecular-weight (LMW) compounds were fractionated and divided into six sub-fractions with RP-HPLC. Treatment of fractions #2, #4 on HEK001 and SNU484 cell lines lead transcriptional activation of STAT3 and DENR and repression of HIF1A and PARP1. LC-MS/MS analysis showed 10 specific compound containing in fractions #2, #4. Also, contents of phenolic compounds and total sugar were determined 31.4 μ g and 121.4 μ g in fractions #4, respectively. Overall data indicated that LMW fraction from Chinese yam contained functional molecules and exerted suppressive effects on aging, inflammation and gastric ulcer.

In the study of processing technology to improve the health promoting functionality and organoleptic properties of yam, fermentation process and steaming (plus aging) process were developed. Fermented yam with *Bacillus spp.* improved the antioxidant activity with higher phenolic compounds and also showed decreased viscosity and higher reducing sugar content. Steaming and aging process of yam resulted in a black yam product which showed two-fold higher antioxidant activity than normal yam product. Especially, the water soluble compounds in steamed black yam were increased by the process and thus may be more easily digested and absorbed to human body. The black yam product was also shown to be better in sensory evaluation due to its unique flavor and sweetness.

To expand the medicinal usage of Chinese yam, 6,7-dihydroxy-2,4-methoxy phenanthrene was isolated from the aerial bulbils, the byproduct from Chinese yam plants. The compound showed strong antifungal and anti-proliferative activity against different pathogenic fungi and human cancer cell lines, respectively. Furthermore, 6,7-dihydroxy-2,4-methoxy phenanthrene did not showed hemolytic activity against human RBC and DNA cleavage in comet assay.

Potential of rapid production of biomass using a bioreactor system was investigated to enhance pharmaceutical use of Chinese yam. Optimal medium for increases in fresh weight and multiplication of multi-shoot was in the single strength of MS salt with 60 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ sucrose and half strength of KNO_3 . The number of leaves and nodes were sharply increased from 2 to 5 weeks, whereas plant fresh weight was steadily increased from 3 to 11

weeks after inoculation. Pretreatment of EtOAc extract showed 20% higher cell viability and fresh weight growth than that of cells without pretreatment in 20 Gy radiation treated tobacco cells. In comet assay, T/H ratio of control-cells and treated-cells at 20 Gy were 1.05 and 1.68, and % head DNA of those cell were 86.7 and 71.3%, respectively, suggesting that nuclei of tobacco cells were severely damaged in the integrity of DNA by the treatment of γ -radiation.

In vivo tests of biological activities of diosgenin and other yam extracts were conducted to provide solid scientific facts of functionality. Atherosclerosis is the primary cause of cardiovascular disease that involves inflammation and lipid accumulation within the intima. There has been an increasing interest in development of novel pharmaceuticals from plants that have the same or better immunosuppressants accompanied by less side effects. In the present study, therefore, effects of Chinese yam were examined on immune responses within macrophage and vascular smooth muscle cells. Anti-inflammatory, anti-allergic, and anti-atherosclerotic effects were also tested with animal models. The results demonstrated that biocompounds from yam suppressed inflammation within the atherosclerotic lesion and modulate immune response, suggesting that it has a potential therapeutic use for preventing the advancement of chronic inflammatory diseases including atherosclerosis.

In the area of processing technology and product development, potential of five types of products were investigated.

In the study of fresh-cut product using Chinese yam, effects of sodium hypochloride on reduction of microorganisms was determined. The economical optimum condition is considered as dipping in 50 ppm of sodium hypochloride solution for 1 min at 20°C and washing twice for 30 sec. The ozonic water, citrate, and NaCl were also effective.

For the development of yam powder-based products, red pepper soy paste and Muk with Chinese yam were developed and physiochemical properties and quality changes were determined.

As for the development of a yam snack considering consumer's preferences, optimized process for sugared Chinese yam product was provided as follows: peeling yam and cutting into 3.5mm thickness slices, branching in boiling water for 1 min, heating in 50% and then 70% sugar solution, respectively, for 2 h at 95-100°C, washing the surface with water, and drying at 60°C. Mixture of oligosaccharide and fructose in 3:1 ratio gave an excellent product with excellent texture and taste.

For functional fermentable beverage development from Chinese yam, quality characteristics and biological activities of the yogurt containing dual fermentation MFCY (Monascus-Fermented Chinese yam) powder with *Lactobacillus brevis* HJ59. Six different contents (0, 0.1, 0.3, 0.5, 1.0 and 2.0%, w/v) of MFCY powder were added to raw milk and 5% skim milk followed by fermentation with lactic acid bacteria at 37°C for 12hr, and then the biological activities of the samples were investigated. The results show that after fermentation in raw milk and 5% skim milk added with MFCY powder. The yogurt can produced pH, titrable acidity, number of viable cells, total polyphenol contents, DPPH

radical scavenging activity and reducing power at 4.12~4.25 (pH), 0.94~0.97 (TA)%, $7.50 \times 10^9 \sim 1.14 \times 10^{10}$ CFU/ml, 161.4~329.9 (TP,mg/l), 54~94 (DPPH)% and 1.13~1.53 (R.P), respectively. In addition, the showed ACE inhibitory activity and GABA contents was 67.1~87.7% and 304.6~685.4(mg/l).

To enhance food values in association with local produces, various processed foods made of chinese yam. The best addition ratios of chinese yam for individual processed foods were proposed as follows: 5% of chinese yam powder gelatinized for noodle: 7% of chinese yam powder saccharified for chocolate: 10% of chinese yam powder cross-bonded with phosphate diester for cheese: 10% of fresh chinese yam for jam: 7% of water extract of chinese yam treated with α -amylase for beverage: 5% of chinese yam powder for Meju and Daenjang.

CONTENTS

Chapter 1 Introduction	1
Chapter 2 Current Development of Related Technology	2
Chapter 3 Research Output	4
- Approaches, Results, and Discussion	
Section 1 Postharvest technology of fresh Chinese yam	4
Section 2 Market analysis of Chinese yam industry	25
Section 3 Development of packaging technology	41
Section 4 Development of biologically active extracts via analysis of anti-aging functionality	66
Section 5 Potential osteogenic activity of yam biocompound, diosgenin and yam extracts	83
Section 6 Suppressive effects of low molecular weight extracts from Chinese yam on inflammatory gastric ulcer.	102
Section 7 Enhancement of functional ingredients from yam by fermentation and steaming processes	119
Section 8 Development of novel antifungal and anti-proliferative agent from the aerial bulbils of Chinese yam.	148
Section 9 Rapid production of biomass and bioactive compounds through <i>in vitro</i> culture and bioreactor system	164
Section 10 <i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> anti-inflammatory and immunomodulating effects of Chinese yam compound	185
Section 11 Development of fresh-cut product and functional food using Chinese yam powder	215
Section 12 Development of sugared Chinese yam products	225
Section 13 Development of intensive functional beverage by lactic acid fermentation of Chinese yam	242
Section 14 Development of processed Chinese yam foods associated with local produces	267
Chapter 4 Achievement Evaluation	288
Chapter 5 Practical Application of the Results	292
Chapter 6 Scientific Information Collected through the Project	305
Chapter 7. Literature Cited	309

목 차

제 1 장 연구개발 과제의 개요	1
제 2 장 국내외 기술개발 현황	2
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	4
제 1절 손실저감을 위한 수확후관리기술	4
제 2절 마 및 마 가공식품 마케팅 활성화	25
제 3절 마의 품질유지를 위한 표준 포장재·기법개발	41
제 4절 마 자원의 향노화 기능성 분석을 통한 유효 분획물 개발	66
제 5절 마 추출물의 골 형성 촉진기능 검증	83
제 6절 마 추출 저분자단백질 복합체의 향노화, 항염증 효능 분석	102
제 7절 발효 및 증자건조 공정을 통한 기능성분 소재화	119
제 8절 영여자로부터 신규 항진균제, 항암제 개발 및 기작 규명	148
제 9절 Biomass 대량생산 체계 확립 및 유용생리활성 탐색	164
제 10절 마 유래 성분의 면역조절작용 및 기전연구	185
제 11절 마를 활용한 신선편이 및 기능성 강화 식품 개발	215
제 12절 마 정과의 제조	225
제 13절 젖산발효에 의한 마 기능성 강화 발효음료제품 개발	242
제 14절 산지 연계 복합형 마 가공식품 개발	267
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	288
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	292
제 6 장 연구개발 과정에서 수집한 해외과학기술정보	305
제 7 장 참고문헌	309

제 1장 연구개발 과제의 개요

마는 마과의 덩굴성 다년생 식물을 말하며 덩이뿌리를 식용으로 사용한다. 흔히 ‘참마’로 불리는 국내 재배 마는 *Dioscorea batatas* Decne.(이명: *Dioscorea opposita* Kunth.)를 말하며 크게는 진주 지역에서 많이 재배되는 장마와 안동지역을 중심으로 재배되는 단마가 이에 속한다. 한방에서는 산과 들에 자생하는 마를 한약제로 사용할 때 ‘산약’이라는 명칭을 사용하고 있어서 일반 식품으로 사용할 때의 마와 구분한다.

최근 마의 건강증진 효능(노화방지, 혈당강하, 장관활동촉진, 항균, 항비만, 해독 작용, 면역조절작용)이 널리 알려지면서 신선 마는 물론 가공제품에 대한 관심이 높아지고 있다. 이와 함께 마의 생산면적 및 생산량은 급격한 증가추세에 있다.

그러나 마의 기능적 우수성에도 불구하고, 신선 마 품질관리체계가 미흡하고 마 가공산업은 건조 및 분말화 등의 단순한 1차가공의 수준에 그쳐, 소비자의 기호도를 충족시키지 못하고 있다.

마의 소비량과 부가가치를 상승시켜 마 산업 확대를 위해서는 신선 마의 저장유통기술과 포장 시스템 등 기초적인 지원시스템이 갖추어져야 할 것이며, 보다 과학적이고 설득력이 있는 기능성의 검증, 효용 물질의 활용도를 높이기 위한 적용기술이 뒷받침되어야 한다. 이와 함께 소비자의 기호를 만족시킬 수 있는 다양한 가공기술이 개발되고 제품이 만들어져야 할 것이며 이들 제품이 시장에 진입하여 성장할 수 있는 마케팅 및 디자인 지원이 필요하다.

본 연구과제는 신선 마와 가공제품의 소비시장을 확대하여 마 산업을 활성화하고자 수확후관리와 마케팅 등 기초지원 분야, 생리활성 물질 탐색 및 소재화 분야, 마를 활용한 다양한 가공기술과 제품개발 분야를 망라하여 산업현장에서 필요로 하는 정보와 기술을 제공하고자 하였다.

제1 세부에 해당하는 기초지원 연구 영역에서는 수확후관리기술 확립, 마 산업 분야와 마케팅 분석, 전략과 실행계획 개발 및 판매촉진을 위한 디자인 지원을 수행하였고 협동과제로서 포장기술 개발 및 표준화를 보완하였다.

제2 세부에 해당하는 생리활성 물질 탐색 및 기능성 신소재개발 영역은 주관기관 세부과제 6개와 협동과제 1개로 구성하여 마와 마 재배 부산물인 영여자의 기능성 탐색 및 검증, 기능성 물질의 효용 증대를 위한 부가기술 개발에 초점을 맞추었다.

가공기술 개발을 위한 제 3 세부과제는 신선편이 식품 상품화를 위한 공정, 마를 주원료로 하는 정과 제조기술, 발효식품류의 개발을 추진하였고, 특히 협동과제에서는 지역 특산물과 연계된 복합 가공식품 개발을 목표로 하여 다양한 제품화 공정을 제시하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 지원기술: 수확후 관리, 마케팅, 포장

지원기술 분야로서 수확후 관리기술은 현장의 생산자와 유통업체에서 경험적으로 쌓여온 기술이 주로 활용되고 있고 기술개발은 기초적인 저장 온도 구명에 한정되어 있다.

마의 포장기술에 대한 기존 특허는 마 가공품의 시각적 포장디자인, 포장 구조 디자인 등에 치우쳐 있는 반면, 마의 품질변화를 고려하여 마의 유통기한을 연장시키는 포장기술 개발은 전무한 실정이다. 연구논문에도 있어서도 마의 건조방법 및 온도조절을 통한 마의 저장 품질 특성 향상 분야에만 치중되어 있고 전처리나 온도조절을 반영한 최적의 포장모델 개발에 대한 연구가 제한적이다.

마케팅 측면에서 살펴 본 국내 마 관련 제품의 개발 현황을 살펴보면, 1980년대 후반 마분말 제품이 출시되어 현재까지 시판되고 있고, 90년대 중반부터(1995년경) 마분말 첨가 가공제품(드링크류)이 개발되어 시판되고 있다(북안동농협, CJ). 현재는 마 죽 같은 선식류가 마제품류에 추가되어 시판되고 있다(영농조합법인).

마에 관한 포괄적인 마케팅 조사 및 연구는 전무하며 부분적인 접근방식을 활용한 4P's 중 product, 즉 제품화 방안에 대한 연구로서, “마(산약)/하수오를 이용한 고부가가치 제품개발 방안”(강과 김, 2008), “마(산약)를 이용한 가공식품 개발연구”(김, 1997)가 발표된 바 있다.

2. 생리활성 물질 탐색 및 기능성 신소재개발

한방기능성 소재의 개발 및 기능성 검증 측면에서 볼 때, 우리나라 고유의 기술로서 *in vitro* 및 *in vivo* 테스트를 통한 소재 및 완제품의 품질 및 기능성의 체계적인 검증이 요구되지만, 국내 기술 환경여건은 객관적이고 과학적인 검증을 거치지 않은 이미지 제품에 머물고 있다.

여러가지 형태의 한방재료를 첨가하여 화장품이나 건강음료가 쏟아져 나오고 있는 시점에서 보다 체계적인 연구가 미비한 실정이다. 국내 화장품업체뿐만 아니라 바이오 벤처기업, 제약회사 등을 중심으로 천연물(한약재)을 이용한 기능성 화장품 개발에는 적극적이나, 항노화 및 피부염 억제 등에 관련된 생리활성 연구는 극히 미비한 실정이다. 따라서 국제적인 경쟁력 강화를 위해 향후에 이 분야에 대한 연구가 집중적으로 이루어져야 될 것이다. 기능성이 포함된 신기능성 항노화 및 피부염 억제 소재에 대한 산업적 및 과학적 연구가 필수적으로 진행이 되어야 하며 이에 따라 고부가가치 산업의 창출뿐만 아니라, 국가적은 측면에서 수입 대체 효과를 기대 할 수 있다.

폴다공증 예방 및 치료에 관한 연구보고는 1-2편 관련 논문(Jin et al., 2006; Yin et al., 2004)이 보고되어 있을 뿐이며, 마 순수성분에 대한 기능성 연구보다는 한약제의 복합성분으로 보고되어 있다(Yen et al., 2005). 이러한 마에 관한 국제적 연구보고 및 기술개발 수준은 현재 한국 연구팀과 중국 연구팀에서 보고된 사례이며, 기타의 다른 나라에서는 아직 연구가 되어 있지 않다. 따라서 마에 관한 연구개발 개발은 우리나라가 선도적으로 나간다면 국제적으로도 기술개발 우위를 점할 수 있을 것으로 낙관된다.

현재까지는 제한된 마의 생산량 때문에 유효생리활성성분의 대용량추출을 통한 산업화에 대

한 시도도 전무했으며, 일부 기술적인 한계로 활성성분의 대량생산을 위한 세포배양기법이나 유전자조작을 통한 과발현 등과 같은 생물공학적이법을 활용한 연구 및 불용자원인 영여자를 활용한 유용소재 개발에 대한 보고도 전무하다.

3. 가공기술 및 제품개발

마의 생리활성에 관한 연구 결과를 바탕으로 소비자의 관심과 수요가 높아지고 있지만, 현재 까지 마를 이용한 국내 식품가공기술의 개발 수준은 건조 및 분말화 등의 일반적인 단순가공에 그치고 있다. 최근에는 시중에서 판매되는 마 관련 제품 역시, 마를 단순가공한 마분말, 마추출물을 당화시켜 만든 마 드링크, 마의 식이섬유와 다당질을 이용한 건면, 마 보리빵 등으로 제한되어 있다. 다만, 소비자 기호를 고려한 제품으로서 마 젤리, 건강기능성을 부각시킨 참마비타 등과 같이 가공제품의 다양화가 시도되고 있다.

일본은 마의 관능과 조직감을 그대로 살린 1차 가공식품인 마 페이스트(일본명: 토로로), 절임식품(매실과 붉은 차조기 추출물), 진공동결제품(건조야채 분말과 혼합), 메밀 마국수 등의 가공식품과 필리핀은 야생마 분말을 이용하여 케익, 패스트리, 캔디 및 아이스크림 가공식품이 개발되어 있다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절 손실저감을 위한 수확후 관리기술

1. 서언

최근 마의 건강 기능성이 알려지면서 생마의 소비시장이 확대되고 있으며 기능성 식품으로서의 가공기술에 대한 관심이 높아지는 추세를 보이고 있으나 신선 마의 장기 공급을 위한 수확후 관리체계가 확립되지 못하고 있다. 특히 마는 국내에서도 다양한 종류가 재배되고 있으므로 종이나 계통에 따른 수확후 생리나 저장력 평가가 필요하다.

지하 괴근이 식품으로 이용되는 마는 수확 시에 상처를 입기 쉽고, 부패균에 의한 손실이 우려되므로(Ryu 등, 2006), 장기저장을 위한 전제조건으로 부패부위의 제거 및 수세에 의한 오염물질 감소 처리가 필요한 것으로 나타나고 있다. 실제로 저장 용 마는 바람이 잘 통하는 그늘에서 2~3일 예비저장하여 상처가 아문 다음 본 저장을 하도록 권하고 있으나 재배지역, 농가, 저장 취급자에 공통적으로 적용할 수 있는 기준이 제시되지 못하고 있다. 지하 괴근을 이용하는 고구마의 경우에도 저장 중 부패에 의한 손실이 많아 이에 대한 대책으로 수확 시 입은 상처의 치유처리(curing)가 확립되어 있다(Key, 2010). 고구마의 치유를 위해서는 $29\pm 1^{\circ}\text{C}$ 온도와 90~97%의 높은 상대습도 조건에서 4~7일 정도 소요된다고 하였다(Kushman, 1975; Ray and Ravi, 2005; Wang 등, 1998). 이러한 관점에서 볼 때, 마에 있어서도 수확후 치유처리기술을 통해 저장과정에서의 손실을 낮추어 저장기간 연장이 가능할 것으로 생각된다.

한편 경북지역을 중심으로 많이 재배되는 단마(*Dioscorea batatas* Decne.)의 저장 온도는 일반적으로 $4\sim 7^{\circ}\text{C}$ 로 알려져 있으나(Kang, 2008), 체계적인 연구에 따른 적정 온도에 대한 국내의 연구결과는 매우 미흡하다. 최근 저장온도 별, 부패율에 따른 저장가능기간을 제시한 기본자료에 따르면(Ryu 등, 2009), 참마에 속하는 장마의 경우, 16°C 저장에서는 미생물성 부패와 멩아에 의한 손실이 크게 발생하지만 4°C 에 저장에서는 품질 변화나 손실 발생이 미미하여 49주까지 저장이 가능하다고 하였다. 고구마의 경우에 있어서도 수확후 치유를 거쳐 $14\pm 1^{\circ}\text{C}$, 90% RH의 저장 조건을 유지하면 1년까지 저장이 가능하다는 보고를 볼 때(Picha, 1986), 마 역시 적정 저장조건을 조성한다면 1년까지 저장이 가능할 것으로 예측된다. 다만, 저장 후 유통과정에서의 품질변화를 고려하여 유통온도나 저장 후 처리 기술에 대해서도 연구가 필요할 것으로 판단된다.

본 연구에서는 마 중에서 특히 안동지역에서 특화되어 있는 단마의 시장 소비와 가공품의 원료 공급기간을 연장하고자 수확후 처리기술과 저장기술을 최적화하여 수확후 관리 모델 정립하고자 하였다. 수확후 처리기술로는 치유 조건과 세척의 효과를 조사하였고, 저장기술로는 마의 저온장해 여부를 판명하는 수확후 생리를 고려하여 적정온도를 밝히고자 하였다. 또한 시장 유통기간을 고려하여 저장 후 유통과정에서 상품성의 저하 요인을 분석하였다.

2. 연구방법론

가. 실험 재료

경상북도 안동지역에서 11월7일(1년차), 11월 12일 (2년차), 11월 12일(3년차) 수확한 단마를 사용하였다.

나. 실험 처리

(1) 1년차

평균 15°C, 60% RH의 외기 환경과 29°C, RH 80~90% 조성 환경에서 각각 3일간 치유처리를 한 후 0.5 및 7.5°C에 4개월 저장하였으며 저장 후에는 상온(평균 11°C)에서 7일간 모의 유통과정을 거쳤다(Table 1).

Table 1. 마 수확후 관리 모델 설정을 위한 실험처리, in 2008~2009 season.

실험처리		저장방법
치유 방법 (온도 및 습도 조건)	저장온도	
상온 치유 3일 평균 15°C, 60% RH	0.5°C	-저장고 습도: 85~90% 유지 -저장 용기: 5kg 들이 골판지 박스 -0.03mm 비닐포장 겹치기: 바늘구멍 처리된 필름 -저장기간: 6개월 -저장 후 유통조건: 20°C, 7일
	7.5°C	
열풍치유, 3일 29°C, 80~90% RH	0.5°C	
	7.5°C	

(2) 2년차

1년차 실험결과를 반영하여 수확후 치유를 기본조건으로 설정하되 치유기간을 3일, 5일로 설정하였다. 저장 온도 조건 역시 1년차 연구결과를 바탕으로 4°C, 7°C로 하였으며 저장 시 습도를 유지하기 위하여 과습방지용 통기구를 처리한 30µm LDPE 필름으로 포장한 후 골판지 박스에 담아 저장 챔버에 치상하였다(Table 1).

실험에 사용한 마는 단마 계통으로 2009년 11월 12일 경북 안동 지역 농가에서 수확 직후 구입하여 이용하였다.

Table 2. 마 수확후 관리 모델 설정을 위한 실험처리 (2년차)

실험처리		저장방법
치유 기간	저장온도	
3일 (29°C, 80~90% RH)	4.0°C	- 저장 습도: 85~90% 유지 - 저장 용기: 5kg 골판지 박스 - 30µm LDPE 필름 liner 포장 방법: 직경 5mm 통기구 4개 처리된 필름 - 저장기간: 6개월 (2개월 간격 3회 조사) - 저장 후 유통조건: 20°C, 7일
	7.0°C	
5일 (29°C, 80~90% RH)	4.0°C	
	7.0°C	

(3) 3년차 실험

(가) 3년차 연구에서는 치유효과의 검증(Table 3)과 손실경감을 위한 수확후 세척처리(Table 4) 효과를 검증하는 실험을 수행하였다.

Table 3. 수확후 치유조건 검증, (3년차, 2010-2011).

실험처리		저장방법
치유	저장온도	
하지 않음	3℃	- 저장고 습도: 85~90% 유지(실제로는 포장내부 습도) - 저장 용기: 골판지 박스 (뚜껑 있는 5kg들이 골판지 박스 활용) + 0.03µm PE 필름 포장 겹치기: 바늘구멍 처리 필름 → 85-90% 습도 유지 - 저장기간: 5개월, 7개월 (2회 조사) - 저장 후 유통조건: 20℃, 7일 (골판지 박스+ PE 필름 liner)
	5℃	
상온 7일 (음건)	3℃	
	5℃	
29℃, 80~90% 5일	3℃	
	5℃	

Table 4. 수확 후 치유 전 세척 효과 검증을 위한 실험처리, (3년차, 2010-2011).

치유 후 세척	저장방법
하지 않음	- 치유: 29℃, 80~90% - 저장: 5℃, RH 85~90% - 저장기간: 7개월 - 저장 후 유통: 20℃, 7일 (골판지 박스+ PE 필름 liner)
수돗물 세척	

(나) 저장 후 유통 전 열처리 및 유통온도 효과 조사

저장 마의 유통과정에서 상품성 저하를 초래하는 뿌리발생(기근, aerial root)을 억제하는 방법으로 성장활성을 제어하기 위한 60℃ 열처리를 수행하였다. 열처리를 하지 않은 마는 저온유통과 상온유통 조건에서 품질변화를 조사하였다.

Table 6. 품질유지를 위한 저장 후 열처리 및 유통온도 처리

실험처리		저장방법
저장 후 처리	유통온도	
하지 않음	20℃	- 치유: 29℃, 80~90% - 저장: 5℃, RH 85~90% - 저장기간: 7개월 - 유통 조건: 20℃(골판지 박스+ PE 필름 liner)
하지 않음	7℃	
열풍처리 (60℃, 10분)	20℃	

다. 품질평가 및 수확후 생리대사 조사

(1) 색도 측정

색도는 마의 등근 상단 부분을 비스듬히 슬라이스한 후 색차계를 이용하여 L*, a*, b*값을 측정하였고 L* 값을 비교하여 변색 정도를 판단하였다.

(2) 경도 및 점도

마 조직의 경도는 마의 중앙 부분에서 2cm 두께의 절편을 취한 후 물성측정기(TAXT2i Texture Analyser)를 이용하여 침투해 들어가는 힘을 측정하였다. 점도는 경도를 측정한 동일한 지점을 탐침기가 2회 왕복할 때, 빠져나오면서 나타나는 저항값으로 측정하였다.

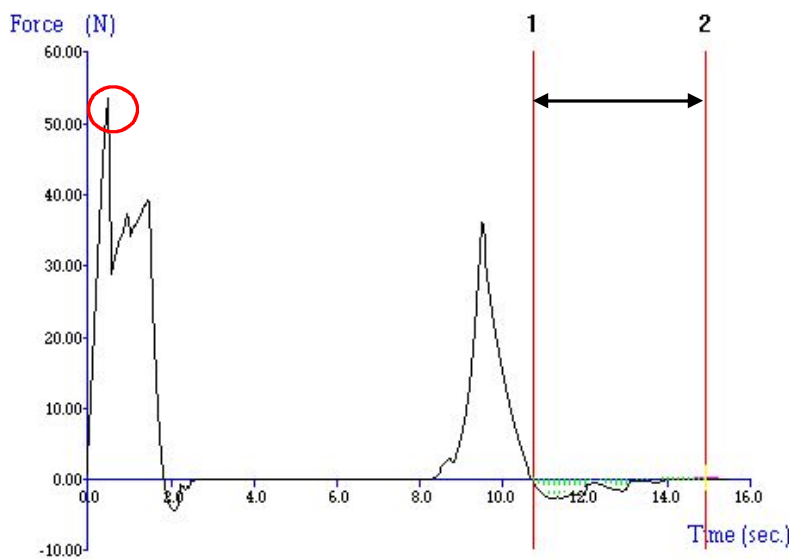


Fig. 1. 마의 경도 및 점도 측정 그래프. (○ : 경도측정 피크, ↔ : 점도측정 구간)

(3) 상품성 평가

마의 저장 및 유통 후 상품성은 외관의 부패 발생정도와 절단면의 변색 정도를 고려하여 5점 채점법을 적용하였다 ((Fig. 2).

상품 지수 5점: 품질 우수	상품 지수 3점: 판매 가능	상품 지수 1점: 상품성 없음

Fig. 2. Marketability ratings of fresh yam after 4-month storage plus 7 days on the shelf.

(4) 호흡속도

마의 호흡속도는 20℃에서 24시간 온도평형 후 5L 밀폐용기에 전체 마를 밀봉한 후 4시간 동안의 이산화탄소 증가량을 mL CO₂·kg⁻¹·h⁻¹로 환산하였다.

3. 연구결과

가. 1년차: 단마의 수확후 치유방법과 저장온도에 따른 품질 변화

치유 직후 단마의 호흡속도는 고온+고습도 환경에서 치유한 마가 상온(외기온)에서 치유한 마에 비해 뚜렷하게 낮았다. 그러나 4개월, 6개월 저장 후 호흡속도는 치유의 효과는 유의성이 없었고 저장 온도의 영향이 크게 나타나, 0.5℃ 저온저장 마에서 4~5배 높았다(Table 7). 0.5℃ 저장 마에서 나타나는 호흡속도의 증가는 저온장해(chilling injury)에 의한 이상대사 현상으로 풀이된다.

조직 경도는 고온+고습도 치유 및 7.5℃ 저장 마에서 높게 유지되었고(Table 8), 점도는 치유 직후에는 상온치유 처리에서 높았으나 저장 후에는 열풍건조 치유 처리에서 높은 경향이 있었다(Table 9).

절단면의 명도 값(L*) 역시 고온+고습도 치유 마에서 높은 경향을 보였다(Table 10).

0.5℃ 저온저장은 중량감소를 줄이는 효과를 보였으나(Table 11), 저장 후 유통과정에서는 호흡대사의 급격한 증가와 함께 육질 경도 및 상품성의 저하를 유기하는 등(Table 12) 저온장해를 유기하는 것으로 추정되었다.

1년차 연구 결과, 제한적이거나 품질유지에 효과가 있었던 고온+고습도 치유기술과 저온장해를 회피하는 적정 저장온도의 연계적용 모델 설정이 필요한 것으로 판단되었다.

Table 7. Changes in respiration rates of Chinese yam as influenced by curing treatment and storage temperature.

Treatment		Respiration rate at 20℃ equilibrium (CO ₂ mL·kg ⁻¹ ·h ⁻¹)					
Curing environment	Storage (℃)	At harvest	After curing	After 4-month storage		After 6-month storage	
				Day 0	Day 7	Day 0	Day 7
Ambient (15℃, RH 60%)	0.5	9.0±1.5	15.0 a ^z	12.0 a	24.7 a	68.0 a	73.1 a
	7.5			9.8 a	4.4 b	13.3 a	11.4 b
Controlled (29℃, RH 90%)	0.5		6.0 b	9.1 a	21.9 a	59.7 a	60.5 a
	7.5			4.2 a	5.3 b	12.9 a	15.7 b
Source of variation							
Curing(C)			*	NS	NS	NS	NS
Storage(S)			-	NS	**	*	**
C×S			-	NS	NS	NS	NS

^zMean separation within columns by DMRT at P = 0.05.

NS,*,** Nonsignificant or significant at P = 0.05 or ≤ 0.01, respectively.

Table 8. Changes in firmness of Chinese yam as influenced by curing treatment and storage temperature.

Treatment		Firmness (N/8 mm ϕ)					
Curing environment	Storage ($^{\circ}\text{C}$)	At harvest	After curing	After 4-month storage		After 6-month storage	
				Day 0	Day 7	Day 0	Day 7
Ambient (15 $^{\circ}\text{C}$, RH 60%)	0.5	44.4 \pm 9.4	58.0 a ^z	47.2 b	51.0 b	72.3 a	52.2 a
	7.5			62.9 a	67.6 a	55.2 b	62.4 a
Controlled (29 $^{\circ}\text{C}$, RH 90%)	0.5		79.2 a	61.9 a	63.9 a	52.2 b	58.2 a
	7.5			68.2 a	68.5 a	55.1 a	59.2 a
Source of variation							
Curing (C)			NS	*	*	NS	NS
Storage (S)			-	**	**	NS	NS
C \times S			-	NS	NS	NS	NS

^zMean separation within columns by DMRT at $P = 0.05$.

NS,*,** Nonsignificant or significant at $P = 0.05$ or ≤ 0.01 , respectively.

Table 9. Changes in tissue viscosity of Chinese yam as influenced by curing treatment and storage temperature.

Treatment		Viscosity (N \cdot sec ⁻¹)					
Curing environment	Storage ($^{\circ}\text{C}$)	At harvest	After curing	After 4-month storage		After 6-month storage	
				Day 0	Day 7	Day 0	Day 7
Ambient (15 $^{\circ}\text{C}$, RH 60%)	0.5	1.1 \pm 0.8	3.2 a ^z	1.5 ab	1.2 b	0.6 a	0.6 a
	7.5			1.5 ab	0.8 ab	0.7 a	1.5 b
Controlled (29 $^{\circ}\text{C}$, RH 90%)	0.5		1.9 a	0.9 a	0.8 ab	0.7 a	1.0 ab
	7.5			2.0 b	0.7 a	1.9 b	2.6 c
Source of variation							
Curing (C)			NS	NS	NS	*	**
Storage (S)			-	NS	NS	*	**
C \times S			-	NS	NS	*	NS

^zMean separation within columns by DMRT at $P = 0.05$.

NS,*,** Nonsignificant or significant at $P = 0.05$ or ≤ 0.01 , respectively.

Table 10. Change of lightness of Chinese yam as influenced by curing treatments and storage method.

Treatment		CIE L* value					
Curing environment	Storage (°C)	At harvest	After curing	After 4-month storage		After 6-month storage	
				Day 0	Day 7	Day 0	Day 7
Ambient (15°C, RH 60%)	0.5	86.6±1.5	85.1 az	83.0 a	80.6 a	79.8 a	80.6 a
	7.5			84.5 a	81.1 a	81.7 a	78.5 a
Controlled (29°C, RH 90%)	0.5		81.9 a	83.9 a	83.2 a	80.7 a	82.6 a
	7.5			86.0 a	84.8 a	82.3 a	82.7 a
Source of variation							
Curing (C)			NS	NS	NS	NS	NS
Storage (S)			-	NS	NS	NS	NS
C×S			-	NS	NS	NS	NS

^zMean separation within columns by DMRT at $P = 0.05$.

^{NS}Nonsignificant at $P = 0.05$.

Table 11. Changes in weight loss of Chinese yam as influenced by curing treatment and storage temperature.

Treatment		Weight loss (%)		
Curing environment	Storage (°C)	After curing	After 4-month storage	After 6-month storage
			Ambient (15°C, RH 60%)	0.5
	7.5	7.6 a	12.2 a	
Controlled (29°C, RH 90%)	0.5	2.4 a	1.9 b	5.6 b
	7.5		6.5 a	10.3 a
Source of variation				
Curing (C)		**	NS	*
Storage (S)		-	**	**
C×S		-	NS	*

^zMean separation within columns by DMRT at $P = 0.05$.

^{NS,*,**}Nonsignificant or significant at $P = 0.05$ or ≤ 0.01 , respectively.

Table 12. Changes in marketability of Chinese yam as influenced by curing treatment and storage temperature.

Treatment		Marketability index score ^z					
Curing environment	Storage (°C)	At harvest	After curing	After 4-month storage		After 6-month storage	
				Day 0	Day 7	Day 0	Day 7
Ambient (15°C, RH 60%)	0.5	3.0	3.0 a ^y	2.0 a	1.0 a	1.8 a	1.3 b
	7.5			2.5 b	3.0 c	2.3 a	1.0 b
Controlled (29°C RH 90%)	0.5	3.0	3.0 a	2.0 a	1.0 a	1.8 a	1.0 b
	7.5			3.0 c	2.0 b	2.3 a	2.0 a
Source of variation							
Curing (C)			NS	NS	**	NS	*
Storage (S)			-	**	**	NS	*
C×S			-	NS	**	NS	**

^zMarketability: 1=not acceptable with substantial decay; 2=limited salability; 3= salable with acceptable appearance.

^yMean separation within columns by DMRT at $P = 0.05$.

NS,*,** Nonsignificant or significant at $P = 0.05$ or ≤ 0.01 , respectively.

나. 2년차: 열풍 치유기간과 저장온도에 따른 6개월 저장 후 및 유통 후 품질 분석

치유기간에 따른 치유 후 단마의 외관 품질은 큰 차이는 없었으나 5일 치유한 마의 외피부분이 좀 더 건조한 경향을 보였다(Fig. 3).

저장 4개월과 6개월 후, 호흡속도는 수확 시에 비해 낮았다(Table 13, 14). 4개월 저장 후 호흡속도에 미치는 치유기간의 영향은 유의성이 없었던 반면, 저장온도의 영향이 유의하게 나타나 4°C 저장 마의 호흡속도가 높았다. 20°C 상온 유통 후에도 저장온도 간 호흡속도의 차이는 비슷한 경향이었으나 유통과정에서 전반적으로 다소 감소하여 처리별 차이는 유의성이 나타나지 않았다. 저장 6개월 직후 호흡속도는 처리 간 유의성이 없었으나 7일 유통 후 호흡속도는 4°C 저장 마가 높은 경향이였다. 7°C 저장 마에 비해 4°C 저장 마에서 호흡속도가 높은 현상은, 1년차 0°C 저장 마에서 관찰되었던 바와 같이 생리대사의 이상을 의미하는 것으로 해석되지만, 2년차 4°C 저장 마에서는 1년차 0.5°C 저장 마에서 관찰되었던 조직괴사 등 저온장해 현상은 나타나지 않았다. 이러한 결과를 종합해볼 때, 마의 적정 저장온도는 4°C 내외로 추정되며 정확한 저장온도 범위에 대한 검증이 필요한 것으로 판단된다(3년차 검증시험 계속).

조직의 경도는 수확 후에 비해 저장 및 유통 후 오히려 증가하였으며 치유처리기간과 저장온도의 영향은 저장기간에 따라 다소 상이한 경향을 보였다(Table 13, 15). 치유기간은 저장 4개월 까지 조직 경도에 큰 영향을 미치지 않았으나 6개월 후에는 치유기간 5일이 3일에 비해 마의 조직경도를 높게 유지하는 효과를 보였다. 저장온도 별로는 저장 4개월, 6개월 후 유통 7일을 거쳤을 때 7°C 저장 마의 조직 경도가 높은 경향이였다. 4°C 저장 마에서 관찰되는 상대

적으로 낮은 마 조직의 경도는 호흡속도의 차이에서 유추된 바와 같이 저온장해에 의해 유기되는 조직의 이상증상으로 풀이될 수 있으므로 이에 대한 검증이 요구된다.

마의 가공 시 중요한 품질요인인 절단면의 색도는 4개월, 6개월 저장 및 유통 후에도 모든 처리에서 수확 시와 큰 차이를 보이지 않았고 절단 30분 후에도 갈변 현상은 진행되지 않는 것으로 조사되었다 (Table 13, 16)

저장 중 중량 감소율은 4개월까지 모든 처리에서 1% 미만, 6개월 후에는 3일 치유+4℃ 저장 마에서만 1.5%였고 나머지 처리에서는 1% 수준이 유지되어(Fig. 4), 1년차 연구 결과(5~10%)에 비해 매우 낮았다. 처리별로는 치유기간이 짧고 저장온도가 낮은 마에서 중량감소율이 높은 경향이였다.

저장 중 상품성의 변화는 저장 2개월까지 뚜렷한 저하 현상이 나타나지 않았고(data 미제시), 저장 4개월까지도 마의 저장 중 발생하는 손실 유형 중 가장 큰 요인의 하나인 부패현상은 관찰되지 않았으며 저장 6개월 경과 시점에서 외부에 곰팡이가 피는 정도의 미미한 발생을 보였다(Table 17). 곰팡이 발생은 특히 수확 과정에서 발생한 상처나 패인 표피 부분에서 균사 발생 형태로 관찰되었으나 상품성에 지장을 줄 정도는 아니었고 심한 내부조직 부패(Fig. 2, 5) 수준까지는 진행되지 않았다.

6개월 저장 후나 이후 추가적인 상온유통 7일 후 마의 전반적인 상품성은 비교적 우수한 수준을 유지하였다(Table 18). 다만, 저장 후 유통과정, 특히 상온유통 시 우려되는 상품성 저하 요인은 뿌리 정단부, 즉 수확 시 절단이 이루어진 부위에서의 멍아현상인 것으로 나타나(Fig. 5), 정단부 멍아현상의 억제를 위한 수확 후 또는 저장 후 유통전 처리기술에 대해서도 보완이 필요한 것으로 보인다.

2년차 연구결과를 종합해 볼 때, 마의 치유는 29℃에서 5일이 적합한 것으로 보이며 저장온도는 4~7℃ 범위에서 책정되어야 할 것으로 판단되었다.

Table 13. Quality and respiration rates of Chinese yam at harvest and after 7-day curing at ambient temperature in 2009 season.

Time	Quality contribute			
	Firmness (N/8 mm \emptyset)	Viscosity (N·sec ⁻¹)	CIE L* value	Respiration rate, 20℃ (CO ₂ mL·kg ⁻¹ ·h ⁻¹)
At harvest (Nov. 12)	29.0±0.7 ^z	1.48±0.6	80.3±0.5	4.6±0.8
After 7 day curing at ambient temp	32.6±1.1	1.74±0.1	81.4±1.0	2.7±0.6

^zMean ± S.E. (n=4).

Table 14. Respiration rates of Chinese yam after 4- and 6-month storage plus 7-day marketing as influenced by curing treatment and storage temperature.

Treatment		Respiration rate at 20°C (CO ₂ mL·kg ⁻¹ ·h ⁻¹)			
Curing ^z (days)	Storage (°C)	After 4 month storage		After 6 month storage	
		Day		Day	
		0	7	0	7
3	4	3.1 a ^y	1.7 a	1.9 a	2.8 a
	7	1.6 b	1.0 a	1.8 a	2.0 b
5	4	2.0 ab	2.2 a	1.8 a	1.6 b
	7	1.7 b	1.4 a	1.5 a	1.4 b
Source of variation					
Curing (C)		NS	NS	NS	**
Storage (S)		**	NS	NS	NS
C×S		NS	NS	NS	NS

^zAt 29°C, 80~90% RH

^yMean separation within columns by DMRT at $P = 0.05$.

NS,** Nonsignificant or significant at $P \leq 0.01$, respectively.

Table 15. Flesh firmness of Chinese yam after 4- and 6-month storage plus 7-day marketing as influenced by curing treatment and storage temperature.

Treatment		Firmness (N/8 mm ø)			
Curing ^z (days)	Storage (°C)	After 4 month storage		After 6 month storage	
		Day		Day	
		0	7	0	7
3	4	41.5 a ^y	39.8 b	37.3 a	37.0 b
	7	45.9 a	45.8 a	36.5 a	39.3 ab
5	4	43.8 a	41.1 b	42.1 a	38.0 b
	7	44.5 a	43.0 ab	44.9 a	46.4 a
Source of variation					
Curing(C)		NS	NS	*	NS
Storage(S)		NS	**	NS	*
C×S		NS	NS	NS	NS

^zAt 29°C, 80~90% RH.

^yMean separation within columns by DMRT at $P = 0.05$

NS,*** Nonsignificant or significant at $P \leq 0.05$ or 0.01, respectively.

Table 16. Lightness on the cut surface of Chinese yam after 4- and 6-month storage plus 7-day marketing as influenced by curing treatment and storage temperature.

Treatment		CIE L* value ^y			
Curing ^z (days)	Storage (°C)	After 4 month storage		After 6 month storage	
		Day		Day	
		0	7	0	7
3	4	81.2 a ^x	81.2 ab	81.2 a	81.8 a
	7	78.8 a	82.4 a	81.4 a	80.5 a
5	4	81.3 a	81.0 ab	80.4 a	80.3 a
	7	82.4 a	80.0 b	81.7 a	81.4 a
Source of variation					
Curing (C)		NS	NS	NS	NS
Storage (S)		NS	NS	NS	NS
C×S		NS	NS	NS	NS

^zAt 29°C, 80~90% RH.

^yMeasured 30 minutes after transverse cutting through middle part of the yam.

^xMean separation within columns by DMRT at $P = 0.05$

^{NS}Nonsignificant at $P = 0.05$.

Table 17. Incidence of decay in Chinese yam after 4- and 6-month storage plus 7-day marketing as influenced by curing treatment and storage temperature.

Treatment		External (severity)		Internal (% incidence)			
Curing ^z (days)	Storage (°C)	After 4-month storage	After 6-month storage	After 4-month storage		After 6-month storage	
		Day		Day		Day	
		7	7	0	7	0	7
3	4	+ ^y	+	0.0 a ^x	0.0 a	0.0	0.0
	7	+	++	3.1 a	3.1 a	0.0	0.0
5	4	+	++	0.0 a	0.0 a	0.0	0.0
	7	+	++	0.0 a	0.0 a	0.0	0.0
Source of variation							
Curing (C)		-	-	NS	NS	NS	NS
Storage (S)		-	-	NS	NS	NS	NS
C×S		-	-	NS	NS	NS	NS

^zAt 29°C, 80~90% RH

^ySeverity of fungal infection: +, none to slight (Lower than 5%); ++, little (Marketable after brushing. Lower than 20%); +++, severe(Not marketable. Over 20%).

^xMean separation within columns by DMRT at $P = 0.05$.

^{NS}Nonsignificant at $P = 0.05$.

Table 18. Marketability of Chinese yam after 4- and 6-month storage plus 7-day marketing as influenced by curing treatment and storage temperature.

Treatment		Marketability index score ^y			
Curing ^z (days)	Storage (°C)	After 4 month storage		After 6 months storage	
		Day		Day	
		0	7	0	7
3	4	5.0 a ^x	5.0 a	5.0 a	5.0 a
	7	4.8 a	4.8 a	4.8 a	4.8 a
5	4	5.0 a	5.0 a	4.8 a	4.8 a
	7	5.0 a	5.0 a	4.5 a	4.5 a
Source of variation					
Curing (C)		NS	NS	NS	NS
Storage (S)		NS	NS	NS	NS
C×S		NS	NS	NS	NS

^zAt 29°C, 80~90% RH.

^yMarketability ratings: 1.0, very poor and not marketable; 3.0, acceptable. Critical level for marketing; 5.0, excellent quality.

^xMean separation within columns by DMRT at $P = 0.05$

^{NS}Nonsignificant at $P = 0.05$.

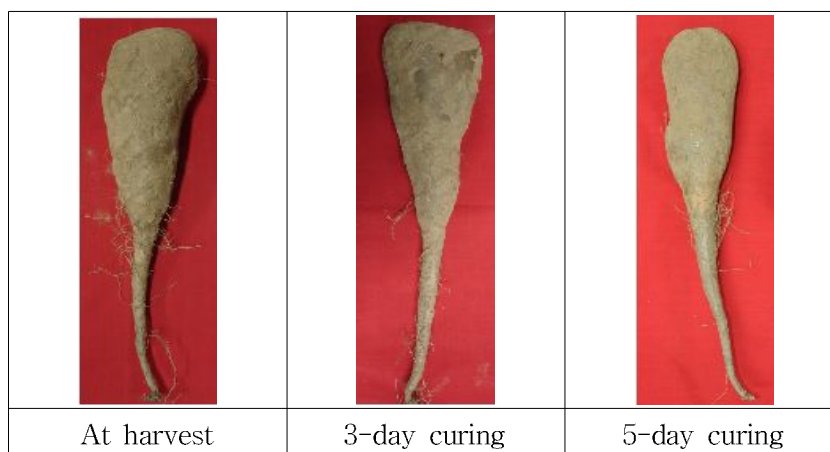


Fig. 3. Appearance of Chinese yam after harvest and curing treatments in 2009.

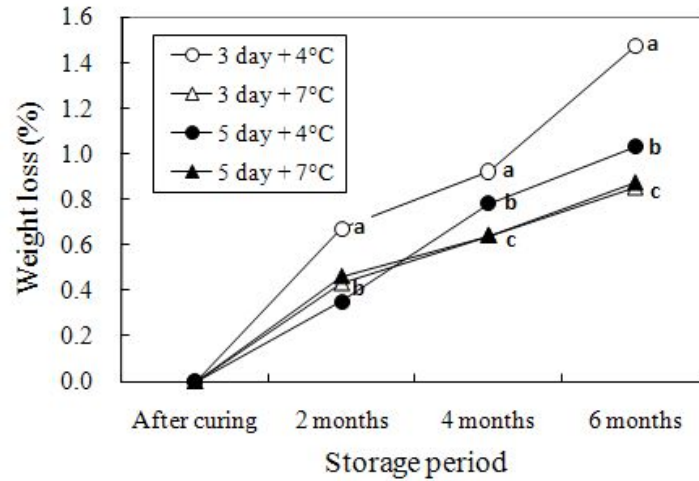


Fig. 4. Changes in weight loss of Chinese yam during curing and storage in 2009~2010 season.



Fig. 5. 단마의 저장과정에서 진행되는 부패 및 발근 현상, 2009~2010 season.

다. 3년차: 수확후 처리기술 및 저장온도 최적화를 통한 저장기간 연장 모델

(1) 수확 시 및 상온 치유 모의 후 품질특성 (2010. 11. 12)

수확 후 및 상온 7일 모의 치유 후 조직의 경도는 2년차 마 시료에 비해서는 다소 높고 호흡속도는 낮은 경향이였다(Table 13, 19). 7일 간 상온에서의 모의 치유 후 특성, 특히 호흡속도의 경우, 2년차와 달리 큰 차이를 보이지 않아. 시료를 구매 한 시점(수확 시)에서 이미 어느 정도의 치유과정이 경과된 것으로 추정되었다.

Table 19. Quality and respiration rates of Chinese yam at harvest and after 7-day curing at ambient temperature, 2010 season.

Time	Quality contribute			
	Firmness (N/8 mm ϕ)	Viscosity (N \cdot sec $^{-1}$)	CIE L* value	Respiration rate, 20 $^{\circ}$ C (CO $_2$ mL \cdot kg $^{-1}$ \cdot h $^{-1}$)
At harvest (Nov. 12)	36.5 \pm 1.7 ^z	1.06 \pm 0.11	81.0 \pm 0.3	5.7 \pm 0.8
After 7 day curing at ambient temp	36.6 \pm 0.8	1.09 \pm 0.20	81.1 \pm 0.3	5.4 \pm 0.3

^zMean \pm S.E. (n=4).

(2) 치유 조건 및 저장 후 유통온도에 따른 품질특성

치유기간에 따른 치유 후 단마의 외관 품질은 큰 차이는 없었으나 상온 7일 치유한 마에 비해 열풍 5일 치유한 마의 외피부분이 좀 더 건조한 경향이 보였다(Fig. 6).

호흡속도는 5개월, 7개월 저장 및 유통 후 모두 수확 시에 비해 다소 낮은 경향을 보였다(Table 20). 저장 5개월+유통 후는 저장 후보다 유통 후의 호흡속도가 낮은 수준을 보였고, 비교적 3°C 저장 마가 5°C 저장 마에 비해 약간 높은 호흡속도를 보였지만 통계적 유의성은 없었다. 7개월 저장 후 호흡속도에 미치는 저장온도의 영향은 유의성이 없던 반면, 저장 직후에는 치유 조건의 영향이 유의하게 나타나 무치유 저장 단마의 호흡속도가 비교적 높았다. 호흡속도의 변화 양상을 요약하면 3°C, 5°C 저장+유통 후 모두 수확 시보다 낮게 나타나, 저온장해의 가능성은 없는 것으로 판단되었다.

마 조직의 경도는 2년차 실험과 동일하게 수확 후에 비해 저장 및 유통 후 오히려 증가하였으나 치유조건과 저장온도의 영향은 조직 경도에 큰 영향을 미치지 않았다(Table 15, 21).

점도 역시 수확 시에 비해 저장 및 유통 후 다소 증가하는 경향을 보였으며, 7개월 저장 후 치유 조건의 영향이 유의성을 나타내 열풍 5일 치유 단마의 점도가 비교적 높았으나 그 외에는 처리 간 뚜렷한 차이가 없었다(Table 22).

마의 절단면 색도는 5개월, 7개월 저장 및 유통 후에도 모든 처리에서 수확 시와 큰 차이를 보이지 않았다(Table 23).

중량감소율은 무치유, 상온치유 7일 + 5°C 저온저장 처리에서 각각 4.78, 4.71%의 비교적 높은 수준을 보였으며 열풍건조 치유와 3°C 저장 조건에서는 낮은 경향이였다. (Fig. 7).

맹아현상은 5개월, 7개월 저장 및 유통 후 모두에서 발생하였으며, 통계적으로는 반복 간 변이로 인해 치유조건과 저장온도의 영향이 유의성이 나타나지 않았으나(Table 24), 7일 유통 후 맹아 발생은 열풍건조 치유 마에서 낮은 경향을 보였다. 2년차 저장 후 관찰된 맹아 현상의 증가와(Fig. 5) 3년차 연구결과를 종합할 때, 저장 후 20°C 유통과정에서 맹아현상이 급격히 증가하므로 이에 대한 대책이 보완되어야 할 것으로 판단되었다.

5개월, 7개월 저장+20°C 7일 유통 후 부패율은 처리 간 통계적 유의성은 없었으나 대체적으로 무치유 5°C에서 저장한 마에서 높은 경향을 보였다(Table 24). 따라서 저온저장이 우려되는 조기 수확 마의 경우 저장온도를 5°C로 설정하기 위해서는 열풍건조 치유과정을 거쳐야 손실률을 감소시킬 수 있을 것으로 판단된다.

저장+ 유통 후 마의 전반적인 상품성은 3°C에서 저장에서 맹아율이 낮아 상품지수 2.8~3.0로 비교적 높았으나 통계적인 유의성은 없었다(Table 25).

3년차 치유 조건 및 저장 후 유통온도에 따른 품질특성 변화의 연구결과를 종합해 볼 때, 장기저장용 마의 경우 치유는 29°C에서 5일, 저장온도는 3~4°C 수준이 최적화된 수확후 관리모델로 보여진다.

Table 20. Changes in respiration rates of Chinese yam during 7-month storage plus 7-day marketing period as influenced by curing treatment and storage temperature.

Treatment		Respiration rate at 20°C equilibrium (CO ₂ mL·kg ⁻¹ ·h ⁻¹)						
Curing environment	Storage (°C)	At harvest	After curing	After 5-month storage		After 7-month storage		
				Day 0	Day 7	Day 0	Day 7	
No curing	3.0	5.7±0.8 ^z	-	4.8 a	3.1 a	4.8 a	4.8 a	
	5.0			4.6 a	2.3 a	4.5 ab	3.8 a	
7 d at ambient (15°C, RH 60%)	3.0		4.1 a ^y	4.1 a	3.2 a	3.2 ab	5.1 a	
	5.0		4.0 a	3.1 a	2.1 b	5.0 a		
5 d by heat dry (29°C, RH 90%)	3.0		4.9 a	4.4 a	2.8 a	3.3 ab	4.5 a	
	5.0		4.3 a	2.7 a	4.0 ab	4.6 a		
Source of variation								
Curing (C)			-	NS	NS	NS	*	NS
Storage (S)		-	-	NS	NS	NS	NS	
C×S		-	-	NS	NS	NS	NS	

^zMean ± S.E. (n=4).

^yMean separation within columns by DMRT at $P = 0.05$.

^{NS,*}Nonsignificant or significant at $P = 0.05$, respectively.

Table 21. Flesh firmness of Chinese yam after 5- and 7-month storage plus 7-day marketing period as influenced by curing treatment and storage temperature.

Treatment		Firmness (N/8 mm ø)					
Curing environment	Storage (°C)	At harvest	After 5-month storage		After 7-month storage		
			Day 0	Day 7	Day 0	Day 7	
No curing	3.0	36.5±1.7 ^z	46.3 a ^y	46.2 ab	51.0 a	50.3 a	
	5.0		46.6 a	48.4 ab	47.9 a	50.8 a	
7 d at ambient (15°C, RH 60%)	3.0		46.0 a	48.8 ab	45.0 a	46.3 a	
	5.0		48.0 a	52.1 a	50.0 a	49.7 a	
5 d by heat dry (29°C, RH 90%)	3.0		48.5 a	42.0 b	45.1 a	44.6 a	
	5.0		45.0 a	48.1 ab	51.9 a	46.6 a	
Source of variation							
Curing (C)			-	NS	NS	NS	NS
Storage (S)		-	NS	NS	NS	NS	
C×S		-	NS	NS	NS	NS	

^zMean ± S.E. (n=4).

^yMean separation within columns by DMRT at $P = 0.05$.

^{NS}Nonsignificant at $P = 0.05$.

Table 22. Changes in tissue viscosity of Chinese yam after 5- and 7-month storage plus 7-day marketing period as influenced by curing treatment and storage temperature.

Treatment		Viscosity (N·sec ⁻¹)					
Curing environment	Storage (°C)	At harvest	After 5-month storage		After 7-month storage		
			Day 0	Day 7	Day 0	Day 7	
No curing	3.0	1.1±0.1 ^z	1.8 a ^y	1.9 b	1.3 a	1.5 a	
	5.0		1.6 a	2.2 ab	1.4 a	1.4 a	
7 d at ambient (15°C, RH 60%)	3.0		2.1 a	2.1 ab	1.7 a	1.6 a	
	5.0		2.2 a	1.8 b	1.7 a	1.7 a	
5 d by heat dry (29°C, RH 90%)	3.0		2.1 a	2.9 a	1.7 a	1.7 a	
	5.0		2.3 a	1.8 b	1.6 a	1.8 a	
Source of variation							
Curing (C)			-	NS	NS	*	NS
Storage (S)		-	NS	NS	NS	NS	
C×S		-	NS	NS	NS	NS	

^zMean ± S.E. (n=4).

^yMean separation within columns by DMRT at $P = 0.05$.

^{NS,*}Nonsignificant or significant at $P = 0.05$, respectively.

Table 23. Lightness of Chinese yam after 5- and 7-month storage plus 7-day marketing period as influenced by curing treatments and storage temperature.

Treatment		CIE L* value					
Curing environment	Storage (°C)	At harvest	After 5-month storage		After 7-month storage		
			Day 0	Day 7	Day 0	Day 7	
No curing	3.0	81.0±0.3 ^z	79.0 a ^y	78.8 a	78.7 a	79.3 a	
	5.0		80.5 a	78.5 a	79.1 a	78.1 a	
7 d at ambient (15°C, RH 60%)	3.0		78.8 a	79.5 a	77.3 a	78.7 a	
	5.0		80.0 a	79.3 a	80.3 a	78.6 a	
5 d by heat dry (29°C, RH 90%)	3.0		79.6 a	78.6 a	79.7 a	78.3 a	
	5.0		78.4 a	78.8 a	79.3 a	77.0 a	
Source of variation							
Curing (C)			-	NS	NS	NS	NS
Storage (S)		-	NS	NS	NS	NS	
C×S		-	NS	NS	NS	NS	

^zMean ± S.E. (n=4).

^yMean separation within columns by DMRT at $P = 0.05$.

^{NS}Nonsignificant at $P = 0.05$.

Table 24. Incidence of sprouting and decay in Chinese yam after 5- and 7-month storage plus 7-day marketing as influenced by curing treatment and storage temperature.

Treatment		Sprouting (% incidence)				Decay (% incidence)			
Curing environment	Storage (°C)	After 5-month storage		After 7-month storage		After 5-month storage		After 7-month storage	
		Day		Day		Day		Day	
		0	7	0	7	0	7	0	7
No curing	3.0	5.0 a ^z	10.0 ab	5.0 a	25.0 a	0.0 a	0.0 a	0.0 a	0.0 a
	5.0	10.0 a	25.0 a	10.0 a	20.0 a	0.3 a	10.0 a	5.0 a	5.0 a
7 d at ambient (15°C, RH 60%)	3.0	5.0 a	10.0 ab	5.0 a	15.0 a	0.0 a	0.0 a	0.0 a	0.0 a
	5.0	15.0 a	15.0 ab	10.0 a	20.0 a	0.0 a	5.0 a	0.0 a	0.0 a
5 d by heat dry (29°C, RH 90%)	3.0	0.0 a	5.0 b	5.0 a	15.0 a	0.0 a	0.0 a	0.0 a	0.0 a
	5.0	10.0 a	5.0 b	5.0 a	15.0 a	0.0 a	0.0 a	0.0 a	0.0 a
Source of variation									
Curing (C)		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Storage (S)		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
C×S		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

^zMean separation within columns by DMRT at $P = 0.05$.

^{NS}Nonsignificant at $P = 0.05$.

Table 25. Changes in marketability of Chinese yam after 5- and 7-month storage plus 7-day marketing period as influenced by curing treatment and storage temperature.

Treatment		Marketability index score ^z				
Curing environment	Storage (°C)	At harvest	After 5-month storage		After 7-month storage	
			Day		Day	
			0	7	0	7
No curing	3.0	3.0	2.8 a ^y	2.8 a	2.8 a	2.8 a
	5.0		2.5 a	2.5 a	2.5 a	2.5 a
7 d at ambient (15°C, RH 60%)	3.0		2.8 a	2.8 a	3.0 a	3.0 a
	5.0		3.0 a	2.8 a	3.0 a	3.0 a
5 d by heat dry (29°C, RH 90%)	3.0		3.0 a	3.0 a	3.0 a	3.0 a
	5.0		2.8 a	2.8 a	2.8 a	2.8 a
Source of variation						
Curing (C)		-	NS	NS	NS	NS
Storage (S)		-	NS	NS	NS	NS
C×S		-	NS	NS	NS	NS

^zMarketability: 1=not acceptable with substantial decay; 2=limited salability; 3= salable with acceptable appearance.

^yMean separation within columns by DMRT at $P = 0.05$.

^{NS}Nonsignificant at $P = 0.05$.

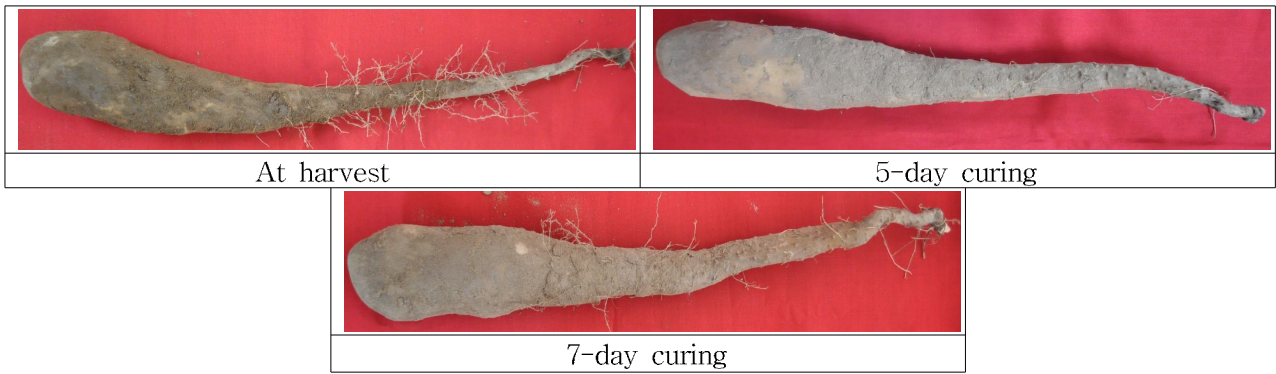


Fig. 6. Appearance of Chinese yam after harvest and curing treatments in 2010 season.

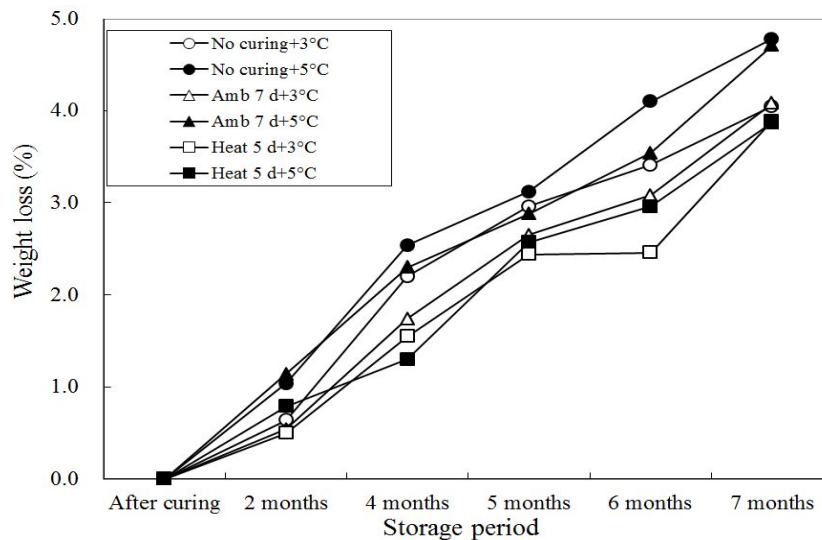


Fig. 7. Changes in weight loss of Chinese yam during storage in 2010~2011 season as influenced by curing treatment and storage temperature.

(3) 세척 처리 효과

수확 후 세척처리를 거쳐 5개월 및 7개월 저장한 마의 호흡속도는 세척 처리에서 비교적 높았다(Table 26, 27). 또한 저장 직후보다는 20°C 상온유통 7일 후의 호흡속도가 낮은 경향을 보여, 1, 2년차 연구결과 및 3년차 치유와 저장온도 효과 검증 실험의 결과와 유사하였다.

저장 후 조직 경도는 5개월 저장 마에서는 유의적인 차이를 보이지 않은 반면, 저장 7개월 및 유통과정을 거친 마에서는 세척 처리한 마의 조직경도가 비교적 낮은 경향을 보였다. 점도와 색도는 처리 간 차이를 보이지 않았다(Table 26, 27).

5개월, 7개월 저장+ 상온유통 7일 후 멍아현상은 통계적 유의성은 없으나 수치로는 세척 처리에서 비교적 높게 나타났다(Table 28). 부패현상 역시 세척 처리 마에서 높았다.

예상과는 다르게 나타나 세척처리의 역효과(품질저하, 손실 증가 경향)는 세척과정에서 오히려 상처가 발생하거나, 세척 후 수분제거가 충분하지 못할 경우 치유가 제대로 진행되지 못한 데서 기인하는 것으로 추정되므로, 장기저장용 마의 수확 후 오염정도가 심하지 않을 때는 세척처리보다는 적정 수준의 치유과정을 적용하는 것이 유리할 것으로 판단된다.

Table 26. Effects of postharvest washing treatment on the quality of Chinese yam after 5-month storage plus 7 days on the shelf.

Washing	Respiration rate at		Quality attributes					
	20°C equilibrium (CO ₂ mL·kg ⁻¹ ·h ⁻¹)		Flesh firmness (N/ 8 mm ϕ)		Viscosity (N·sec ⁻¹)		CIE L* value	
	Day 0	Day 7	Day 0	Day 7	Day 0	Day 7	Day 0	Day 7
None	4.3	2.5	48.4	50.0	1.9	2.4	78.6	80.0
Tap water	5.1	3.8	49.0	47.4	1.7	1.9	78.6	79.4
Significance by t-test ^z	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

^{NS}Nonsignificant at $P = 0.05$.

Table 27. Effects of postharvest washing treatment on the quality of Chinese yam after 7-month storage plus 7 days on the shelf.

Washing	Respiration rate at		Quality attributes					
	20°C equilibrium (CO ₂ mL·kg ⁻¹ ·h ⁻¹)		Flesh firmness (N/ 8 mm ϕ)		Viscosity (N·sec ⁻¹)		CIE L* value	
	Day 0	Day 7	Day 0	Day 7	Day 0	Day 7	Day 0	Day 7
None	4.3	3.0	46.3	52.5	1.5	2.0	78.2	77.5
Tap water	4.8	4.3	45.0	49.1	1.8	1.9	78.8	79.9
Significance by t-test ^z	NS	NS	NS	*	NS	NS	NS	NS

^{NS,*}Nonsignificant or significant at $P = 0.05$, respectively.

Table 28. Incidence of sprouting and decay in Chinese yam after 5- and 7-month storage plus 7-day marketing as influenced by postharvest washing treatment.

Treatment	Sprouting (% incidence)				Decay (% incidence)			
	After 5-month storage		After 7-month storage		After 5-month storage		After 7-month storage	
	Day 0	7	Day 0	7	Day 0	7	Day 0	7
None	5.0	10.0	10.0	15.0	0.0	0.0	5.0	0.0
Tap water	10.0	25.0	10.0	25.0	5.0	0.0	5.0	5.0
Significance by t-test ^z	NS	NS	NS	NS	**	NS	NS	**

^{NS,**}Nonsignificant or significant at $P = 0.01$, respectively.

(4) 유통 품질유지를 위한 처리 효과

5개월, 7개월 저장 후 유통과정에서 마의 호흡속도는 저장후 열처리 없이 7°C 저온 유통을 거친 마에서 비교적 낮았다(Table 29).

마 조직의 경도와 색도의 경우 처리 간 차이가 없었던 반면, 점도는 저장 후 무처리+7°C 저온유통 마에서 높았다(Table 29).

유통 후 멍아현상은 저장 후 무처리+7°C 저온 유통 처리에서 전혀 나타나지 않음으로써 (Table 30), 2년차 실험과 3년차 실험의 저장 후 상온유통 과정에서의 품질저하 원인의 하나였던 멍아현상이 7°C 저온유통 환경에서 효과적으로 억제되었다. 유통 전 60°C에서 10분간의 열풍처리에 따른 멍아 억제효과는 관찰되지 않았다.

부패현상은 저장 후 무처리+20°C 상온유통 처리에서만 10% 수준을 보여(Table 30), 저온유통 혹은 저장 후 열풍처리는 유통과정에서의 부패에 의해 발생하는 손실을 경감시키는 기술로서 활용될 수 있을 것으로 판단되었다, 다만, 현장에서의 적용 가능성을 고려할 때, 이미 수확 후 관리기술로 보급되고 있는 저온유통 체계를 활용하는 관리 모델이 적합한 것으로 보인다.

Table 29. Effects of post-storage treatment and shelf temperature on the quality of Chinese yam after 5- and 7-month storage plus 7 days on the shelf.

Post-storage treatments + shelf temp	Respiration rate at 20°C equilibrium (CO ₂ mL·kg ⁻¹ ·h ⁻¹)		Quality attributes					
			Flesh firmness (N/ 8 mm ϕ)		Viscosity (N·sec ⁻¹)		CIE L* value	
	After 5-month storage	After 7-month storage	After 5-month storage	After 7-month storage	After 5-month storage	After 7-month storage	After 5-month storage	After 7-month storage
	Day 7	Day 7	Day 7	Day 7	Day 7	Day 7	Day 7	Day 7
None + 20°C on the shelf	3.1 a ^z	3.8 a	48.4 a	52.1 a	1.6 a	1.6 a	79.6 a	78.7 a
None + 7°C on the shelf	1.3 b	1.8 b	51.9 a	49.3 a	2.4 a	2.0 a	78.8 a	79.6 a
60°C air, 10 min + 20°C on the shelf	2.7 a	2.9 ab	48.2 a	46.7 a	1.5 a	1.9 a	78.7 a	79.1 a

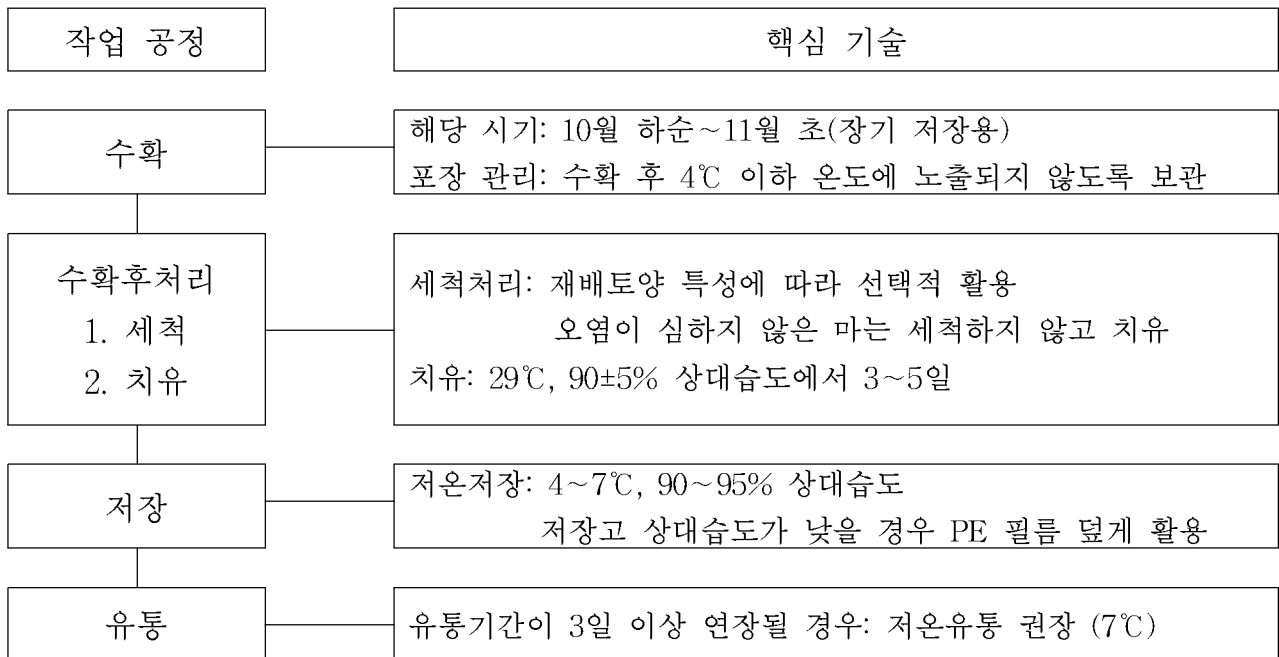
^zMean separation within columns by DMRT at *P* = 0.05.

Table 30. Incidence of sprouting and decay in Chinese yam after 5- and 7-month storage plus 7-day marketing as influenced by post-storage treatment and shelf temperature

Treatment	Sprouting (% incidence)		Decay (% incidence)	
	After 5-month storage	After 7-month storage	After 5-month storage	After 7-month storage
	Day 7	Day 7	Day 7	Day 7
None + 20°C on the shelf	10.0 a ^z	20.0 a	10.0 a	0.0 a
None + 7°C on the shelf	0.0 a	0.0 b	0.0 a	0.0 a
60°C air, 10 min + 20°C on the shelf	10.0 a	10.0 ab	0.0 a	0.0 a

^zMean separation within columns by DMRT at $P = 0.05$.

4. 신선 마 수확후 관리체계



제 2절 마 및 마 가공식품 마케팅 활성화

1. 서언

마의 국내 재배면적은 2006년 추정치로 약 500 ha정도로 이 중 안동지역이 전체면적의 70% 이상을 차지하고 있고, 생산량은 약 5000톤 정도로 추정된다. 최근에는 마의 다양한 건강증진 효능이 알려지면서 건강을 지향하는 소비시장의 확장과 더불어 마의 생산면적이 전국적으로 확대되고 있으며 생산량도 꾸준히 증가하는 추세이다.

국내 마 산업의 지속적인 발전을 위해서는 마의 소비량과 부가가치를 상승시키기 위한 제품 개발, 제품의 성공적인 시장진입을 위한 마케팅 전략이 필요하다.

본 연구는 마 산업의 지속적인 발전을 위해, 마 및 마 가공식품 산업 외부환경 분석(메가트렌드 분석/ 동향·전망 분석/ 산업 성장분석), 신시장 진출 비즈니스 모델 개발 및 단계별 (도입기, 성장기, 성숙기) 마케팅 전략 수립, 마의 소비촉진을 위한 디자인 개발 지원 (홍보전단지, 제품의 디자인 컨셉 등)을 목표로 수행하였다.

2. 마케팅 전략 수립

가. 연구방법론

(1) 2차 자료의 수집: 문헌 연구

- 문헌연구(literature review)란 주어진 연구주제에 관한 서적, 논문 등 공표된 자료(2차 자료, secondary data)를 수집하여 종합하고 분석하는 일련의 과정을 말한다(Lang and Heiss, 1984).

- 본 연구에서는 국제연합(UN) 식량농업기구(<http://faostat.fao.org>), 농림수산식품부(www.mifaff.go.kr), 통계청(www.kostat.go.kr), 경상북도청(www.gb.go.kr), 안동시청(www.andong.go.kr), 북안동농협(www.andongma.com), 국회도서관(www.nanet.go.kr), 한국학술정보(<http://kiss.kstudy.com>), 디비피아(www.dbpia.co.kr) 등과 <http://www.sciencedirect.com> 등 국외 사이트를 이용하였다.

- 마케팅 전략을 수립하기 위한 기본자료로는 경영학, 농업경영 및 마케팅 관련 서적과 참고 문헌을 이용하였다.

(2) 1차 자료의 수집: 대인 면담 및 현장 조사

- 1차 자료(primary data)연구자가 현재 수행 중인 연구문제를 해결하기 위해 직접 수집한 자료를 말한다. 2차 자료의 수집에 비해 인력과 시간 및 비용이 많이 들기 때문에 우선적으로 2차 자료의 존재 및 사용가능성을 확인하고, 2차 자료가 없을 시 1차 자료를 수입하는 것이 일반적이다.

- 1차 자료의 수집 방법에는 (1) 의사소통을 통한 자료수집법(대인면담, 전화면담, 우편조사,

인터넷 조사 등)과 (2) 관찰을 통한 자료수집법이 있다.

- 본 연구를 위해 참여기업 및 참여 연구원을 방문하여 면담하고 현장조사를 병행하였다.

(3) 분석 방법

- 자료 분석을 위해 기술통계, 빈도분석 등을 수행하였다.

나. 연구결과

(1) 마 경쟁환경 분석

(가) 마의 세계 재배면적

대륙별로는 아프리카의 재배면적이 세계면적의 95% 이상을 차지하며, 아시아의 재배면적은 세계 재배면적의 약 0.3%(2007년 기준)에 불과하다. 아시아 재배면적 중 일본이 60% 정도 차지하고 있다(Table 1).

Table 1. 마의 세계 재배 분포 (<http://faostat.fao.org>).

(단위: 천ha)

구분	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007
세계	3,367.0	3,948.0	3,955.0	4,024.0	4,100.0	4,266.0	4,337.0	4,400.0	4,544.0	4,595.0	4,639.0
아프리카	3,217.0	3,798.0	3,811.0	3,875.0	3,951.0	4,113.0	4,177.0	4,234.0	4,370.0	4,409.0	4,448.0
아메리카	118.0	117.0	113.0	115.0	116.0	118.0	123.0	129.0	136.0	149.0	153.0
아시아	15.7	15.4	14.2	14.2	13.8	14.3	14.6	14.5	14.6	15.0	15.8
유럽	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2
오세아니아	16.2	17.2	17.2	18.4	19.7	20.7	22.1	21.8	22.5	22.4	22.5

(나) 마 세계 생산량

대륙별로는 아프리카의 생산량은 세계면적의 96.5% 이상을 차지하며, 아시아의 생산량은 세계 생산량의 약 0.45%(2007년 기준)에 불과하다(Table 2). 아시아 생산량 중 일본이 80% 이상 차지한다(Fig. 1).

Table 2. 마 세계 생산량 (<http://faostat.fao.org>).

(단위 : 천톤)

구분	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007
세계	35,523.5	37,067.3	38,953.4	39,569.0	39,942.1	42,195.5	44,258.1	46,935.9	49,066.8	51,487.2	51,948.1
아프리카	34,127.1	35,645.9	37,451.9	38,009.7	38,335.6	40,579.3	42,587.6	45,204.8	47,314.6	49,723.4	50,137.0
아메리카	927.5	932.5	1,003.4	1,034.6	1,088.3	1,074.4	1,118.9	1,171.2	1,172.3	1,185.4	1,224.9
아시아	216.4	208.9	218.2	226.8	206.7	207.9	205.2	226.4	233.4	230.1	237.0
유럽	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	2.5	2.7
오세아니아	256.4	277.9	278.0	295.7	309.4	331.8	344.3	331.4	344.4	345.9	346.6

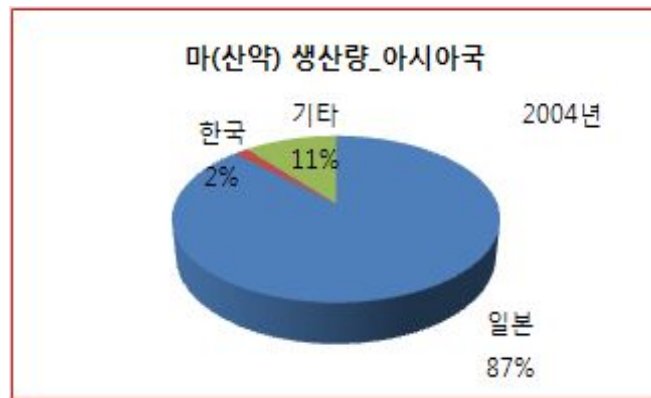


Fig. 1. 아시아 지역의 마 생산량.

(다) 마 가격경쟁력

우리나라에서 재배하는 마와 동일한 식물을 재배하는 국가는 중국, 일본, 대만이며 국내 마의 가격이 일본의 3배, 중국의 16배에 달한다(Table 3).

일본은 마를 주로 식용으로 재배하여 이용하고 있으며, 중국은 약용(산약)과 식용을 겸하고 주로 약용을 한국과 일본으로 수출하고 있다.

Table. 3. 마 국제가격 비교

	가격(원)/kg	자료원
한국	11,620	http://www2.rda.go.kr
일본	3,647	http://faostat.fao.org/
중국	681	수입가기준(식품용)

(라) 마 국내 생산 현황

국내 마의 60% 이상이 안동 지역에서 생산되므로(Table 4) 점진적으로 확대 추세를 보이는 국내 마 산업(Fig. 2)의 활성화를 위해서는 안동지역 마 산업의 발전 모델을 설정할 필요가 있다.

Table. 4. 마 국내 생산현황.

구 분	재배면적(ha)		생산량(M/T)	
	전국	안동	전국	안동
1995	405	284	2,394	1,676
1996	404	283	2,788	1,952
1997	351	246	2,104	1,473
1998	333	233	1,553	1,087
1999	318	223	2,186	1,530
2000	375	263	2,383	1,113
2001	414	290	2,233.50	1,042
2002	365	256	3,563	885
2003	449	314	4,311	1,360
2004	433	-	3,764	-

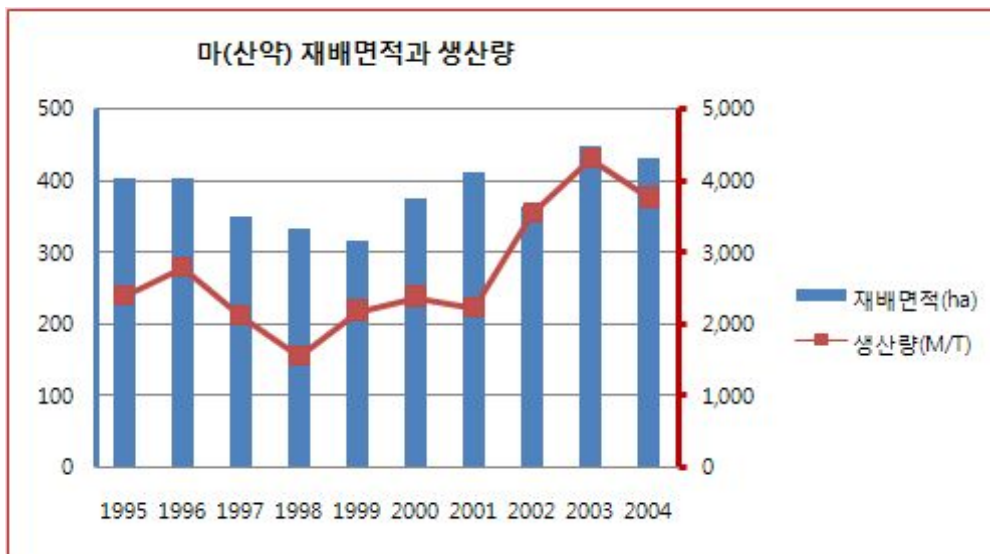


Fig. 2. 연도 별 국내 마 재배면적 및 생산량 추이.

(마) 마 경제성 분석

2007년도 10a당 마 조수입은 3,694,349원, 경영비는 1,680,201원, 소득은 2,014,148 원으로 소득율은 54.5%로 집계되었다(<http://www2.rda.go.kr/>). 10kg 1상자 당으로 환산하면 가격은 133,370원, 경영비는 67,478원으로 추산된다(Fig. 3).

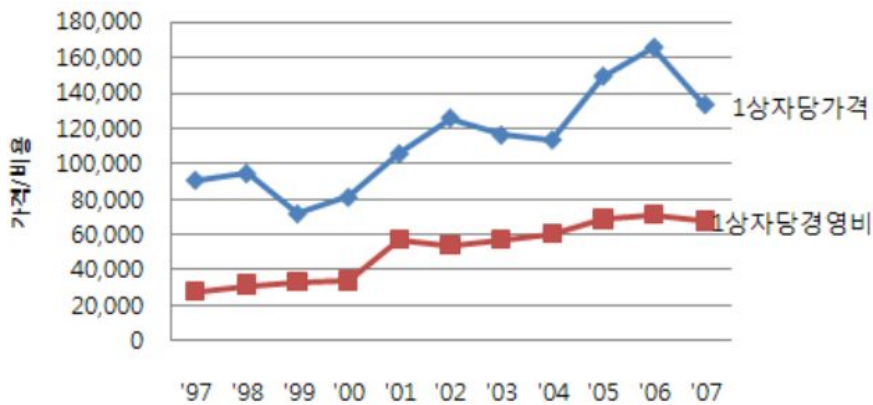


Fig. 3. 연도 별 국내 마 경영비 및 단가.

(사) 마 산업의 SWOT 분석

Table 5. 안동 마 산업 SWOT분석.

강점(Strengths)	약점(Weaknesses)
<ul style="list-style-type: none"> - 고품질 생산기술 및 우수한 유통체계 - 품질경쟁에 의한 내수시장 경쟁력 - ‘산약촌’ ‘안동참마’ 등 브랜드가 있음 - 2005년 ‘안동 산약마을특구’ 지정 - 수출 경쟁력이 있음 	<ul style="list-style-type: none"> - 건강식품이라는 특수성으로 소비패턴이 변할 수 있음 -농산물 특성상 초과 공급이 되면 가격이 폭락할 수 있음
기회(Opportunities)	위협(Threats)
<ul style="list-style-type: none"> - 품질차이로 수입에 의한 전량대체가 불가능 (특히 식용의 경우) -해외시장에서 고품질 한국산 마의 수요가 확대 되고 있는 추세임 	<ul style="list-style-type: none"> - 저가의 수입산 마(산약) 수입으로 인한 가격경쟁력 저하 - 수출가격 경쟁력이 중국보다 현저히 낮음 - 마의 품질규격기준과 수입산과 국내산의 식별기준 미흡

(2) 신시장 진출 비즈니스 수립모델 개발 및 단계별 마케팅전략(1)

(가) 마케팅전략 STP의 수립

- 시장세분화(Segmenting): 전체시장을 기업이 제공하는 마케팅믹스에 대하여 유사한 반응을 할 것으로 추정되는 동질적 고객집단들로 나누는 과정.
- 표적시장선정(Targeting): 여러 개의 세분시장(market segments)들 중에서 경쟁제품보다 고객의 욕구를 더 잘 충족시킬 수 있는 세분시장을 선정하는 것.
- 제품 포지셔닝(Positioning): 소비자의 마음속에 경쟁상표와 비교하여 경쟁우위를 제공하는 위치에 자사상표를 구축하려는 노력.

(나) 신시장 진출 비즈니스 수립모델 개발(1)

- 개척기업: 대규모 자원투입, 폭넓은 제품계열, 높은 제품품질, 집중적 판촉비
예: 북안동농협 산약가공공장
- 조기진입기업: 개척기업보다 더 많은 자원 투입, 보다 우수한 기술, 제품품질, 고객서비스를 통한 추월(도약)전략 (leapfrogging)
예: 현재 시장에 진출한 기업
- 후발기업: 적소시장(niche market)의 집중 공략
예: 시장진입을 추진 중인 기업

(3) 단계별 마케팅전략(2)

(가) 단계별 마케팅전략(1): 도입기 시장전략

- 대중시장 침투전략(mass-market penetration strategy): 북안동농협
- 틈새시장 침투전략(niche penetration strategy): 개척기업
- 초기고가가격전략(skimming strategy): 선두기업

(나) 단계별 마케팅전략(2): 성장기 시장전략

선도기업: 점유율의 유지	후발기업: 시장점유율의 확대
(기존 고객의 지속적 유지, 선택적 수요 유발, 본원적 수요의 자극)	(기존고객의 반복구매 · 대체구매를 꾀아 옴, 신규잠재고객층의 선택적 수요 자극)
<ul style="list-style-type: none"> ◦ 기존 포지션 방어 ◦ 측면방어 ◦ 정면방어 ◦ 시장확장 ◦ 전략적 철수 	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 정면공격 ◦ 도약 ◦ 게릴라공격 ◦ 포위전략 ◦ 측면공격

(다) 단계별 마케팅전략(3): 성숙기 시장전략

	시장선도기업	후발기업
시장점유율 방어전략	고객만족 및 애호도 향상 반복구매 유도	틈새시장 게릴라전법
매출성장을 위한 공격적 마케팅 전략	시장확대전략 - 시장침투율 제고 전략(increased penetration strategy) - 시장 개발 전략(market development strategy) 제품용도 확대 전략	

3. 新시장 개발 전략 수립

가. 연구개발의 절차

(1) 연구개발의 필요성

지금까지 국내 마에 대한 연구들을 살펴보면 기능성 연구, 즉 이학적인 측면의 연구가 주를 이루고 있으며, 개별 생산자 입장의 소비재시장 접근을 위한 효율적인 마케팅믹스전략 수립 및 실행을 위한 연구는 전무한 상황이다.

안동 마 및 마 가공식품의 신상품 개발과 유통활성화 및 대외 경쟁력 확보를 통한 수익 극대화를 위하여 제품(product), 가격(price), 유통(place), 촉진(promotion) 등 4P's를 중심으로 마케팅믹스 전략을 수립할 필요성이 있다.

(2) 연구목표의 수립 단계

- 안동마의 제품 전략적 차원에서 소비자들이 선호하는 마 상품유형과 선택이유 사이에는 어떤 관계가 있는지를 규명한다.

- 안동마의 제품 전략적 차원에서 소비자들이 선호하는 포장유형과 포장크기 사이에는 어떤 관계가 있는지를 규명한다.

- 안동마의 가격 전략적 차원에서 소비자들의 지각된 가격과 구입의도 사이에는 어떤 관계가 있는지를 규명한다.

- 안동마의 유통 전략적 차원에서 소비자들이 선택하는 마 구입장소 유형과 선택이유 사이에는 어떤 관계가 있는지를 규명한다.

- 안동마의 촉진 전략적 차원에서 소비자들의 마 구입장소와 인지경로 사이에는 어떤 관계가 있는지를 규명한다.

- 마의 소비촉진을 위한 디자인 개발을 지원한다(홍보전단지, 제품의 디자인 컨셉 등).

나. 연구방법론

(1) 2차 자료의 수집: 문헌 연구

- 기존 관련 문헌 고찰

- 표준화된 설문지 작성을 위해 경영학, 농업경영 및 마케팅 관련 서적과 참고문헌을 활용.

(2) 1차 자료의 수집: 설문조사

- 표준화된 설문지 작성.

- 2009년 11월 말에서 12월 중순까지 임의표본 추출방식으로 서울, 대구 등 오프라인 성인 남녀 소비자를 대상으로 설문 조사를 실시.

- 166부의 설문지를 실증분석에 이용.

이 조사표에 조사된 모든 내용은 통계목적 이외에는
 절대 사용할 수 없으며, 그 비밀이 보호되도록 통계
 법에 규정되어 있습니다.

NO

「안동마 신상품선호 및 유통촉진을 위한 소비자 조사」

안녕하십니까? 귀하의 무궁한 발전을 기원합니다.

본 설문은 「안동마(생약명 : 산약(山藥)) 신상품 선호 및 유통촉진을 위한 소비자 조사」를 통
 하여 안동마 농가의 소득증대, 지속가능한 우수 신상품개발 및 유통 활성화를 위한 지속적인 대
 외 경쟁력 확보 방안을 제시하는데 그 목적이 있습니다. 바쁘시더라도 본 설문에 응당해주시면
 고맙겠습니다. 본 조사의 응답과 관련하여 의문사항이 있으시면 **면접원과 협의/응답을 통하여 확
 인**하시기 바랍니다.

2009년 11월

주관기관 : 안동대학교
 연 락 처 : 054-820-5426

응답자 기업사항	성 명			
	주 소	시		
	전화번호		e-Mail	

* 위는 자료처리 시 작성하신 내용의 확인을 위한 것으로 외부에 공개하지 않습니다.

가. 응답자의 기본적인 인적 관련 질문

- Q 1. ○○님의 성별은?
 1) 남성 2) 여성
- Q 2. ○○님의 연령은 현재 만으로 어떻게 되십니까? 만 _____(세)
- Q 3. ○○님의 현재 거주 지역은 다음 중 어디에 해당되십니까?
 1) 서울시 2) 인천시 3) 대구시 4) 안동시 5) 기타(기술:)
- Q 4. ○○님은 식품구입 및 이용과 관련하여 주로 어떤 유형에 속한다고 생각하십니까?
 1) 일괄계약형 2) 가족건강(월별)형 3) 고급물 선호형 4) 상품정보탐색형(예: 원산지, 성분)
- Q 5. ○○님은 주변 이웃과 가게소득을 비교할 경우 상대방적으로 어느 계층에 속한다고 보십니까?
 1) 저소득층 2) 중상층 3) 고소득층

Fig. 4. 설문지 기본 양식 예시.

(3) 분석 방법

- 자료분석을 위해 기술통계, 빈도분석, t-검정(t-test) 등을 수행하였다.

다. 연구결과

(1) 표본특성

Table 6. 표본의 특성

표본 특성		응답자(명)	응답비율(%)
성 별	남자	42	25.3
	여자	124	74.7
연 령	20대	12	7.2
	30대	42	25.3
	40대	75	45.2
	50대	28	16.9
	60대 이상	9	5.4
거주 지역	서울시	88	53.0
	인천시	2	1.2
	대구시	64	38.6
	안동시	2	1.2
	기 타	10	6.0
식품구입 및 이용유형	알뜰절약형	37	22.3
	가족건강(웰빙)형	92	55.4
	고급품 선호형	20	12.0
	상품정보탐색형	17	10.2
상대적 소득계층	저소득층	36	21.7
	중 상 층	115	69.3
	고소득층	15	9.0

(2) 식품구입 및 이용유형 관련 라이프스타일 유형 및 프로파일 분석

(가) 소비자 성별과 식품구입 및 이용유형 간의 관계

성별에 따라 식품구입 및 이용유형에 대한 응답자의 분포가 다르게 나타나고 있는데, 여성은 알뜰절약형이 상대적으로 많고, 반대로 남성은 상대적으로 덜 알뜰절약형 혹은 고급품 선호형으로 나타났다(Table 7).

Table 7. 소비자 성별과 식품구입 및 이용유형 간의 교차분석 결과.

	식품구입 및 이용유형					카이제곱
	알뜰절약형	가족건강형	고급품선호형	상품정보탐색형	전체	
남	5(9.4)	23(23.3)	9(5.1)	5(4.3)	42	6.983*
여	32(27.6)	69(68.7)	11(14.9)	12(12.7)	124	
전체	37	92	20	17	166	

* p=0.072.

(나) 소비자 연령과 식품구입 및 이용유형 간의 관계

유의확률(양쪽검정)이 0.688로 나타나(Table 8), 소비자의 연령과 식품구입 및 이용유형 간에는 관련성이 없다고 결론지을 수 있다.

Table 8. 소비자 연령과 식품구입 및 이용유형 간의 교차분석 결과

	식품구입 및 이용유형					카이제곱
	알뜰절약형	가족건강형	고급품선호형	상품정보탐색형	전체	
20대	2(2.7)	6(6.7)	2(1.4)	2(1.2)	12	9.174
30대	7(9.4)	27(23.3)	3(5.1)	5(4.3)	42	
40대	18(16.7)	39(41.6)	12(9.0)	6(7.7)	75	
50대	6(6.2)	15(15.5)	3(3.4)	4(2.9)	28	
60대 이상	4(2.0)	5(5.0)	0(1.1)	0(0.9)	9	
전체	37	92	20	17	166	

(다) 소비자 소득 계층과 식품구입 및 이용유형 간의 관계

- 유의확률(양쪽검정)은 0.000이므로 소비자의 소득 계층과 식품구입 및 이용유형은 유의한 관련성이 있다고 결론내릴 수 있다(Table 9). 즉, 소득 정도에 따라 식품구입 및 이용유형이 다르다는 것을 의미하는데, 고소득층은 중저소득층에 비해 고급품 선호형에 상대적으로 많이 분류되었다.

Table 9. 소비자 소득 계층과 식품구입 및 이용유형 간의 교차분석 결과

	식품구입 및 이용유형					카이제곱
	알뜰절약형	가족건강형	고급품선호형	상품정보탐색형	전체	
저소득층	12(8)	20(20)	2(4.3)	2(3.7)	36	50.444***
중 상 층	23(25.6)	70(63.7)	8(13.9)	14(11.8)	115	
고소득층	2(3.3)	2(8.3)	10(1.8)	1(1.5)	15	
전 체	37	92	20	17	166	

*** $P = 0.000$.

(라) 마 구입 시 마케팅믹스 관련 분석

소비자들이 선호하는 마 상품 유형은 생마가 98명(63.2%), 마분말 57명(36.8%)으로 생마를 더 선호하는 것으로 조사되었다(Table 10).

상품유형의 선택 이유로는 가족건강에 좋기 때문이 84명(50.6%), 마의 효능을 잘 알기 때문이 41명(24.7%), 기능성 식품이기 때문이 29명(17.5%)으로 나타났다.

포장 형태로는 1kg~2kg의 박스포장 형태를 가장 선호하였고, 소비자들의 마 구입장소는 대형할인마트, 전통(재래)시장, 마 산지/농가, 인터넷 쇼핑몰 등 다양하였다.

구입 장소의 선택 이유로는 구입 편리성, 품질, 가격 고려 등의 순이었다.

Table 10. 마 구입 시 마케팅믹스 관련 분석.

항 목	응답자(명)	응답비율(%)	
상품유형	생마(장마/산마)	98	63.2
	마분말	57	36.8
상품유형선택이유	마의 효능을 잘 알기 때문	41	24.7
	질병예방·치료효과 때문	12	7.2
	가족건강에 좋기 때문	84	50.6
	기능성 식품이기 때문	29	17.5
포장형태	비닐포장	44	30.8
	그물포장	11	7.7
	박스포장	88	61.5
포장크기	1kg 이하	60	41.4
	1~2kg	65	44.8
	3kg 이상	20	13.8
가 격	낮음	7	4.2
	적절함	99	60.0
	비쌌	59	35.8
구입 장소	전통(재래)시장	36	23.7
	마산지/농가	26	17.1
	대형할인마트	49	32.2
	인터넷쇼핑몰	25	16.4
	홈쇼핑채널	16	10.5
구입 장소 선택이유	품질이 높기 때문	31	20.4
	가격이 저렴하기 때문	24	15.8
	구입하기가 편리하기 때문	61	40.1
	유명지역의 상표이기 때문	19	12.5
	판매농가/상인을 신뢰하기 때문	17	11.2
인지경로	광고	39	26.0
	가족	14	9.3
	주변사람	75	45.2
	판매원	22	13.3

(3) 안동마의 마케팅믹스 전략

(가) 제품전략

- 안동마의 신상품화는 안동마를 기반으로 기존에 존재하지 않았던 새로운 개념의 상품을 만들어 내어 새로운 가치를 부가하는 것임.
- 조사결과 가족건강을 중시하는 소비자들은 생마와 마 분말 제품 모두를 선호하고 있었음. 생마의 경우 갈아서 마신다든가, 마 전, 마 죽, 마 국수 및 마 튀김과 같이 다양한 형태로 섭취할 수 있음.
- 생마 다량소비자를 위해서는 안동마의 철저한 표준규격화, 수확후 관리, 그리고 기능성 강화와 품질인증을 통한 안동마의 품질경쟁력 향상이 필요하다. 품질인증제도는 소비자에게 판단 근거를 제공하여 소비자의 신뢰도를 제고시키며 일반 매장에서 차별화된 가격으로 판매 가능할 것임.
- 건강기능성이 있는 식품으로써의 안동마의 용도는 현재의 대표적인 분말 제품 외에도 안동마를 이용한 음료수, 칼국수 등과 같은 다양한 식음료 및 식음료 첨가제품으로 개발하되, 일반 및 고급품의 형태로 이원화할 필요가 있음.
- 이러한 핵심제품 외에도 포장 등의 유형제품의 품질을 높이는 것이 필요함. 소비자의 기호 및 편리성을 고려한 상품 포장으로는 구매나 보관이 용이한 1kg 혹은 1kg~2kg의 소포장을 선호하고, 박스포장이나 1회용 스틱제품용 포장 형태를 가장 선호하는 것으로 나타났음. 또한, 단순 외부포장에 그치지보다는 상품 생산자나 제조자명과 원재료, 유통기간의 표시는 물론 조리방법이나 섭취 방법과 같은 정보를 제시함으로써 소비자의 안동마 구매의도를 높일 수 있을 것임. 나아가 구매 후 서비스, 품질보증 같은 확장제품의 품질에도 관심을 가짐으로써 안동마 브랜드를 구축해 나가도록 해야 할 필요성 있음.
- 이와 아울러 마를 포함한 농산업비즈니스는 복합산업화를 도모하고 있는데, 생산, 가공, 유통에 IT와 BT의 접목, 체험, 학습, 도농 교류를 통해 발전가능성을 모색해야 할 것이며, 향후 안동마 제품에 재미와 스토리를 추가하여 문화상품으로 추구하는 것이 필요할 것인데, 예컨대 신라시대의 향가인 서동요의 주인공은 백제의 맛동(薯童)-나중에 백제의 무왕-인데, 이 설화를 바탕으로 '서동마'라는 브랜드로 판매하고 있는 사례를 볼 수 있음.

(나) 가격전략

- 치열한 가격경쟁에 효과적으로 대처하기 위해서는 경쟁 상품과의 차별성을 확보하는 것이 무엇보다도 중요.
- 본 연구에서 가격은 대부분 적절하다고 하고 있고, 비싸다는 의견도 있었음.
- 생마의 경우 신선하고도 우수한 품질의 상품을 상대적으로 저렴한 가격으로 책정하는 반면 가공상품의 경우에는 브랜드를 기반으로 한 기능성 제품으로 명성가격(prestige price)을 책정하는 전략이 필요할 것임.
- 유의할 점은 안동마의 가격정책에 있어서 안동마 혹은 제품이 소비자에게 가치를 제대로 전달하고 있는가? 하는 점을 고려해 가격전략을 수립해야 할 것임.

(다) 유통전략

- 본 연구결과 소비자들은 대형할인마트, 전통(재래)시장, 홈쇼핑, 인터넷 쇼핑몰, 산지 직접

구입 등 다양한 경로를 선택하고 있었음.

- 대형할인마트, 홈쇼핑, 인터넷 쇼핑몰을 구매장소로 많이 선호하는 이유는 구입편리 때문이며, 전통(재래)시장을 선호하는 이유로는 품질과 저렴한 가격을 꼽고 있고, 마산지/농가에서 직접 구매하려는 이유는 유명지역의 상품, 그리고 판매농가와 상인을 신뢰하여 품질이 높다고 생각하기 때문으로 나타났음.

- 소비자의 라이프스타일 변화로 재래시장 보다는 가족단위 대형마트 쇼핑을 선호하고 있으며, 최근 기술의 비약적인 개발과 초고속 인터넷과 방송망과 같은 인프라구축으로 인터넷이나 홈쇼핑이 구입의 편리성과 저렴한 가격을 경쟁력으로 새로운 유통채널로 급부상되고 있음. 이에 안동마를 유통하는데 있어서 고품질의 생마는 전통시장뿐만 아니라 농가직판을 고려하고, 대형할인마트나 인터넷, 또는 홈쇼핑과 같이 대량소비자를 위한 유통경로를 구축하는 등 온오프라인 상의 다양한 경로를 구축할 필요가 있을 것임.

- 특히 전통시장에서는 단골고객을 위해 택배시스템을 갖춰 '시장에서 문 앞까지'(Door to Door) 배달하는 시스템을 갖추어야 할 것이며, 산지직판 및 농업인 인터넷 쇼핑몰을 확대할 필요성이 있을 것임.

- 향후 안동마 물류센터(APC)를 설립 운영함으로써 물류 효율성을 제고할 수 있을 것임.

- 특히, 안동마의 주산지인 북후면 지역과 풍천면 지역은 각각 2008년과 2010년에 농촌마을 종합개발사업에 선정되어 마를 포함한 농산물 및 가공사업에 박차를 가할 수 있는 좋은 기회를 얻었고, 최근 안동시에서는 북후면에 마 체험마을을 조성하여 안동 마 저장고, 직판장, 가공공장, 공원, 전통음식단지, 재배체험장 등을 개발하고 있는데, 장소마케팅 전략을 적절히 전개한다면 안동마 산업이 크게 발전할 수 있을 것으로 사료됨.

(라) 촉진전략

- 안동마의 인지경로는 주변사람, 광고, 판매원, 가족의 순으로 나타났음.

- 전통시장과 마 산지/농가에서 구입하는 경우는 주변사람에 의한 인지가 많고, 인터넷 쇼핑몰이나 홈쇼핑의 경우는 광고에 의한 경우가 상대적으로 많으므로 구전(口傳) 및 인터넷을 통한 바이럴마케팅을 적극적으로 전개할 필요가 있을 것임.

- 단골고객의 경우 오프라인에서도 온라인처럼 고객만족, 고객관계관리, 1:1 마케팅 기법을 적용할 수 있도록 시스템을 갖추어야 할 것임.

- 영향력 있는 매체인 TV나 홈쇼핑 채널을 통해 안동마를 꾸준히 홍보함으로써 기존고객을 유지하고 신규 고객을 확보할 필요 있음.

- 공인된 인증기관의 각종 인증과 수상을 촉진 활동에 적극 활용.

- 안동국제탈춤페스티벌과 같은 지역축제나 관광산업과 연계.

- 1사1촌 운동을 포함한 도농 간의 네트워킹을 강화하고, 관계마케팅을 전개할 필요성 있음

- '안동 참마', '산약촌'과 같은 브랜드를 강화.

(4) 안동마의 마케팅믹스 전략: 종합

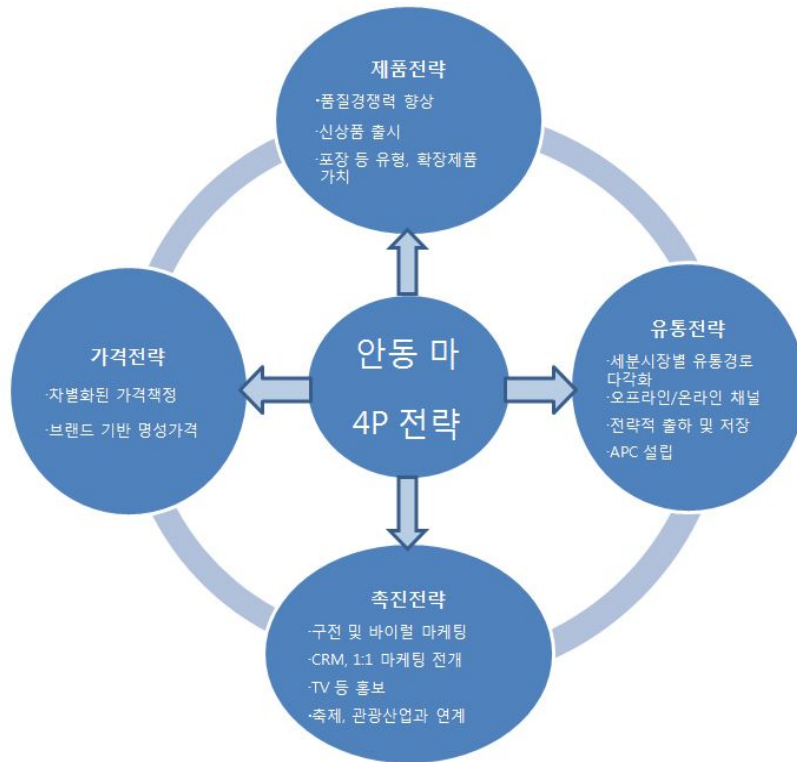


Fig. 6. 안동 마 4P's 전략.

4. 신시장 진출 실행계획 수립

가. 연구개발의 절차

(1) 연구개발의 필요성

- 안동 마 및 가공 기업의 실행계획(action plan)을 지원함으로써 시장경쟁력과 판매증진 및 지역사회에 기여.
- 참여기업(안동북후농협 산약가공공장)의 경쟁력 확보.

(2) 연구목표 수립

- 각 단계별 신시장 관련 마케팅 특징 및 목표 파악
- 단계별 마케팅 전략 및 실행계획 제시
- 지속가능한 판매 증가 및 수익률 극대화

나. 연구방법론

(1) 면담을 통한 현황분석(AS-IS)

- 안동마/마가공식품업체 현황 파악 후 대상업체 선정
- 대표자 심층면접

(2) 마케팅전략 수립/실행안 제시(Action Plan)

- 전문가 활용: 최이규(비즈마코리아 대표)
- 참여교수(박동진, 김태형, 송준협, 제갈돈 교수)와 공동
- 마케팅전략 수립/실행안 개발
- Action Plan 실행 결과 피드백
- 보완전략 수립 및 보고서 작성

다. 연구결과

(1) 마케팅전략 수립을 위한 Action Plan: 북안동농협

특징	주력품목 판매현황	· 주로 홈쇼핑채널/ 온라인 쇼핑몰 통한 판매		
	영업이익률	· 연매출 4억원		
	고객특성	· 주로 40대 후반의 고객 · 20대 젊은 계층에서 온라인 쇼핑을 통한 구입 확대		
	경쟁업체 분석	· 계약재배를 통해 우수 농산물 안정적 조달 공급여건 형성으로 경쟁 우위 확보		
마케팅목적	· 인지도 및 소비확대			
	· 수익률극대화			
	· 경쟁업체들의 시장진입에 따른 대응력 강화			
마케팅전략	도입기	성장기	성숙기	쇠퇴기
제품	시장분석/ 기본제품 출시	제품 확대/ 서비스보증 제공/ 품질 및 이미지 개선	고객분석을 통한 제품전략수립 및 수정	취약 제품의 폐기
촉진	강력한 촉진 활동 전개	인적 판매활동 강화	고객 특성별 차별전략/ 인적 판매 비중 확대/	고수익 상품에 대한 제한적 예산소요 계획
유통	선택적 유통망 구축 유도	집중적 유통망 구축 전국적 유통채널 구축	유통 채널별 차별전략	상대적 저수익 유통채널 경로 폐쇄 전략
가격	원가가산가격 책정	고가전략 유지	원가절감 노력	가격인하

(2) 마케팅전략 수립을 위한 Action Plan: 천세당

특징	주력품목 판매현황	<ul style="list-style-type: none"> • 2010년 매출액 120억 • 2004년 대비 약 20% 판매성장 		
	영업이익률	<ul style="list-style-type: none"> • 매우 높은 영업이익률 		
	고객특성	<ul style="list-style-type: none"> • 주로 수도권 지역 • 장년층에서 젊은 계층으로 수요 확대 		
	경쟁업체 분석	<ul style="list-style-type: none"> • 현재는 일부 업체에 불과, 점차적 증대 예상 		
마케팅목적	<ul style="list-style-type: none"> • 인지도 및 소비확대 			
	<ul style="list-style-type: none"> • 수익률극대화 			
	<ul style="list-style-type: none"> • 경쟁업체들의 시장진입에 따른 대응력 강화 			
마케팅전략	도입기	성장기	성숙기	쇠퇴기
제품	시장분석/ 기본제품 출시	서비스보충 제공/ 생산설비 확충/품목개발	제품전략 수립 및 수정 신상품개발	취약 제품의 폐기
촉진	강력한 촉진 활동 전개	인적 판매활동 강화	고객 특성별 집중적 전략 /인적 판매 비중 확대/ 경쟁브랜드 전환 유도/	고수익 상품에 대한 제한적 예산소요 계획
유통	선택적 유통망 구축 유도	집중적 유통망 구축 다양한 유통채널 구축	유통 채널별 차별전략	선택적 유통 저수익 유통경로 폐쇄
가격	원가상산가격 책정	경쟁지역 및 경쟁사 대비 가격전략 수립	원가절감 노력	가격인하

(3) 마케팅전략 수립을 위한 Action Plan: 안동고을

특징	주력품목 판매현황	<ul style="list-style-type: none"> • 각 품목별 매출액 6~7억으로 비슷 • 상대적 하회탈초콜릿이 주월하는 양상 		
	영업이익률	<ul style="list-style-type: none"> • 하회탈초콜릿 및 안동참마쌀국수는 다소 낮음 		
	고객특성	<ul style="list-style-type: none"> • 안동참마보리빵/안동참마쌀국수 - 판매매장 방문 고객 • 하회탈초콜릿 - 관내 관광명소를 찾는 방문객/ 국내공항, 면세점 이용 고객 		
	경쟁업체 분석	<ul style="list-style-type: none"> • 현재는 일부 업체에 불과, 점차적 증대 예상 		
마케팅목적	<ul style="list-style-type: none"> • 인지도 및 소비확대 			
	<ul style="list-style-type: none"> • 수익률극대화 			
	<ul style="list-style-type: none"> • 경쟁업체들의 시장진입에 따른 대응력 강화 			
마케팅전략	도입기	성장기	성숙기	쇠퇴기
제품	시장분석/ 기본제품 출시	서비스보충 제공/ 차별적 상품형태 확대	제품전략 수립 및 수정 상표와 품목 확대	취약 제품의 폐기
촉진	강력한 촉진 활동 전개	인적 판매활동 강화	고객특성분석 상표전환 유도	고수익 상품에 대한 제한적 예산소요 계획
유통	선택적 유통망 구축 유도	집중적 유통망 구축 전국적 채널화 지향	유통 채널별 차별전략	선택적 유통 저수익 유통경로 폐쇄
가격	원가상산가격 책정	경쟁브랜드 대비 가격침투전략 수행	원가절감 노력	가격인하

제 3절 마의 품질유지를 위한 표준 포장재 · 기법개발

1. 서언

최근 마의 효능이 알려지면서 마에 대한 관심이 높아지고 있다. 그러나 유통 중에 신선 마 및 마 가공품의 품질이 크게 변하여 이에 대한 포장기술의 개발이 필요하다. 따라서 본 연구에서는 신선 마, 분말 마 및 갈은 마의 신선도를 연장하기 위한 포장기법 및 가장 적합한 포장재를 찾기 위한 연구를 수행하였다.

1차년도는 예비실험의 단계로 절편 마와 분말 마 제품에 대해 상온과 저온 저장에서 포장재료에 따른 품질변화를 연구하였고, 2차년도에는 절편마의 유통 중 품질유지를 위한 포장기법의 개발을 위해서 알코올 침지처리 및 MA 포장, 가식성 필름 코팅, 포장 후의 블랜칭에 대한 연구를 수행하였다. 3차년도에는 갈은 마의 유통 중 품질유지를 위하여 3가지 포장방법 및 포장재료의 선정 및 포장 방법의 최적화를 도모하였다.

2. 연구 방법론

가. 마 재료 및 실험처리 방법

(1) 절편 마 시료

마는 경북 안동 소재 필창농산에서 10월에 수확한 단마를 구매하였다. 마는 껍질을 벗겨낸 후 증류수로 세척하여 0.5mm 두께로 마 절편을 제조하였다.

포장 필름용 소재는 연신 폴리프로필렌(OPP), PET, 연신 나일론(ON) 등 3종을 사용하였고, 저장은 5℃, 20℃ 및 40℃ 가속시험 조건에서 수행하였다.

품질유지를 위한 전처리로는 알코올 침지와 블랜칭 처리를 수행하였다. 알코올 처리는 농도별(0, 5, 10%), 침지시간(5, 10분)을 달리하여 수행하였고 절편 제품은 30μm OPP 필름으로 포장한 뒤 15℃, 60% RH 조건에서 저장하였다.

(2) 갈은 마 시료

경북 북안동농협에서 2011년 1월에 제공받은 장마(*Dioscorea opposita* Thunb.)를 이용하였다. 증류수로 씻어낸 후 살균 처리된 플라스틱 강판을 이용하여 뿌리 부분과 껍질 그리고 이물질을 제외한 식용 가능한 부분만 갈아서 사용하였다.

포장 재료는 예비 실험을 거쳐 선정된 PET/PE/VM-PET/PE, PET/AL/LLDPE, NY/LLDPE, 차단성NY/LLDPE을 사용하고 대조군으로는 지퍼백(LDPE/LLDPE)을 이용하여 상온 기체 포장으로 가속 실험하였으며 각각의 포장재에 갈은 마 350cc 이상 충전 한 후 실링 처리하였다. 온도는 상온 20℃, 저온 5℃로 조절하였다.

(3) 분말 마 제품

2008년 8월 분말 마를 구입하여 저온, 상온, 가속조건 실험을 하였다. 2008년 10월과 안동에서 구입한 생마를 온도별, Firm별 처리하여 저장실험을 하였다. 온도 조건은 5℃, 20℃, 40℃가속 저장을 하였으며, 포장 필름은 OPP, PET, ON을 이용하였다.

나. 이화학 품질 측정

이화학 품질 지표로는 pH, 색도, 당도, 경도, 점도를 측정하였다.

같은 마 제품의 산도는 pH meter (UB-5, Denver, USA)을 이용하여 측정하였다.

색도는 색차계(CR-10, Konica Minolta, Japan; CR-100, Konami, Japan)를 이용하여 생마 절편, 같은 마 및 마 분말 표면의 L, a, b 값을 측정하였다. 분말 마는 분말이 날려 색차계의 측정부로 유입되어 측정오류를 일으킬 수 있으므로 광원노즐을 랩으로 싸고 마 분말 표면에 수직으로 밀착하여 측정하였다. 같은 마 제품의 저장 중 색도 변화의 평가는 chroma value를 계산하여 $\Delta E = \sqrt{a^2+b^2}$ 으로 산출하였다.

당도 측정은 굴절당도계(Master-M, ATAGO, Japan)를 이용하였다. 절편 생마는 믹서로 같은 후 균질화 시켜 측정 하였으며, 분말 마는 3차 증류수를 이용하여 중량대비 2:1로 섞어서 점도가 있도록 한 후 적당량을 덜어 당도계 계측부에 놓은 Brix % 수치로 나타내었다.

마 조직의 경도는 1차년도에는 과실경도계(5kg)를 이용하여 측정하였고 2차년도 후에는 Texture Analyzer(TA-XT2 Plus, Stable micro system, UK)를 이용하여 측정하였다. Probe는 직경 5mm를 사용하였으며 측정 속도는 10mm/min로 설정하였다.

절편마의 점도는 Brookfield 점도계(RVDV II+, Brookfield, USA)를 이용하여 측정하였다. 측정 조건은 20℃, spindle NO10. 50rpm, 5min이었다. 같은 마의 점도는 회전식 아날로그 점도계인 (Visco tester Portable & Tabletop VT-04F, Rion, Japan)을 이용하여 No.3 Roter (지름 45mm 높이47mm)을 이용하였다. 회전수는 62.5rpm, 재현성은 지시치의 $\pm 5\%$ 이내이며 샘플의 최소량인 350cc를 넘기는 범위에서 측정하였다.

다. 수분함량, 중량감소율 및 부패율

수분함량은 건열건조법으로 측정하였다. 향량이 측정된 알루미늄 수기에 마 슬라이드 1장과 분말 마를 5g 채취하여 넣고 105℃ 건조오븐(JSVO-60T, JSR, JAPAN)에서 24시간 건조시킨 후 데시케이터에서 30분 동안 열을 식힌 후 건조된 시료의 무게를 화학천칭(CP-224S, Sartorius, GERMANY)을 이용하여 측정한다.

$$\text{수분함량(\%)} = \frac{W1 - W2}{W1 - W0} \times 100$$

W0 : 건조 용기의 무게

W1 : 건조 용기 + 건조 전 시료의 무게

W2 : 건조 후 시료의 무게

중량 감소율은 전자저울(CP-224S, Sartorius, GERMANY)을 이용하여 무게 변화량을 조사하고 초기의 시료 무게에 대한 감소율로 환산하였다.

부패율은 육안관찰을 통해 평가하였다. 부패 여부의 기준은 마 절편이나 분말이 담겨있는 페트리디쉬에서 발생한 미생물성장, 색도 및 탁도의 부분적 변화, 그 외 초기보다 변화가 있음이 확인되었을 때로 하여 발생부위를 총면적에 비례하여 백분율로 나타내었다.

라. 미생물 활성 조사

신선편이식품의 품질규정에 따라 총균 10⁴이하 대장균군은 음성을 유통기한 기준으로 삼았다. 시료 10g을 취하여 멸균된 0.1% pepton 용액 90mL에 넣고 stomacher(BAGMIXER 400, France)로 1분간 균질화하였다. 이중 1mL을 취하여 멸균된 0.1% pepton 용액에 희석하여 사용하였다. PCA(plate count agar, Difco, USA)를 사용하여 배양하였으며, 36±1℃ 배양기에서 48시간 배양한 후 형성된 균집수(colony)를 헤아려 CFU/g으로 나타내었다.

마. PPO 활성도 조사

PPO 활성도 실험법은 Galeazzi 등(1981)의 방법을 일부 변경하여 사용하였다. 10g의 마 절편을 취하여 12mL 50mM phosphate buffer (pH 7), 1% PVP(polyvinyl pyrrol idone)와 0.5% Triton X-100을 섞어 2분간 마쇄하였다. 마쇄 시료를 5000rpm으로 20분간 원심분리 한 후, 상정액만을 취해 여과지(NO. 1)로 감압여과 한 후 냉장 보관하여 효소액으로 사용하였다. 반응기 질로는 2mL 10mM catechol을 사용하였다. 25℃에서 3분간 반응시키며 UV/VIS Spectrophotometer(Optizen 2120UV, Mecasys Co, Korea)를 이용하여 420nm로 측정하였다. 효소활성 1 unit은 분당 흡광도를 0.001 증가시키는데 필요한 효소의 양(absorbance/min/mL)으로 정의하였다.

바. 관능평가

포장재와 보관방법에 따른 같은 마의 품질변화에 따른 관능검사는 연세대학교 패키징학과 전공자 5명을 대상으로 검사방법과 특성을 충분히 교육시킨 후 검사를 실시하였다. 각각의 시료번호를 임의의 표기하여 같은 시간과 같은 장소에서 동일한 방법으로 반복적으로 시행하였다. 외관, 향미, 맛, 느낌 등 항목에 대해 5점 척도법으로 평가하였다.

3. 연구 결과

가. 마의 유통 실태조사 및 문제점

(1) 생산 농가의 영세성

생산 농가의 영세성으로 개별 출하능력의 부재로 산지 유통인을 통한 수집기능이 유통구조에 추가되므로 마의 가격상승을 가져오고 유통 프로세스가 표준 규격화되지 않았다(Fig. 1, 2).

(2) 유통 관리기구의 이원화

식용(마)으로 유통될 경우에는 농림수산식품부에서, 약용(산약)으로 유통될 경우에는 보건복지가족부에서 유통을 관리하기 때문에 부처 간 시각차의 존재로 체계적인 유통관리가 상대적으로 취약하다.

(3) 물류연계성을 고려한 포장 표준화 부재

규격화, 표준화된 포장제품은 물류 효율성을 향상시켜 유통비용의 절감을 가져올 수 있지만 일원화되지 않은 포장규격으로 인해 포장의 표준화가 필요하다.



Fig. 1. Physical distribution channel of domestic Chinese yam.



Fig. 2. Selection, processing, storage of chinese yam at Andong si

나. 실제 사용되고 있는 마 포장재 분석

포장은 물리적, 화학적 및 생물학적 품질변화 요인으로부터 마 제품을 보호할 수 있어야 한다. 현재 사용되는 포장재는 물리적 요인에 의한 손실을 줄이기 위해 골판지 상자를 사용하는 수준에 불과하다(Fig. 3).



조사지역	인동	품명	단마
구분	겉포장		포장 상태
포장 치수 (장×폭×고) (mm)	장:415 폭:280 고:140		
중량(kg)	5 kg		
포장재료구분	골판지(내면 A골 / 외면 B골)		
포장 재질 구성	이중양면골판지		
비고	1. 속포장 및 단위포장이 없기 단마제품 그대로 겉포장 골판지 상자로 포장 2. 단마의 형태 및 크기가 균일하지 않아서 단위포장이 어려우며, 따라서 제품의 규격이 표준·규격화될 때 포장 표준화가 가능함.		

Fig. 3. Corrugated box packaging of Chinese yam.

다. 생마 절편 신선편이제품의 shelf-life 분석

(1) 필름 소재 및 저장온도조건에 따른 품질변화 분석

OPP 필름 처리구가 다른 포장처리에 비하여 L-value가 낮게 측정되는 것으로 나타났다(Fig. 4). 저장 2일차 이후 가속 OPP 처리구가 다른 처리구들에 비하여 급격히 L-value가 떨어졌으며 상온 처리 OPP역시 저장 4일째를 기점으로 급격하게 떨어졌다. 나일론(ON) 처리구가 모든 온도에서 저장기간 중 L-value가 가장 안정적으로 유지되었다. 이유는 ON의 낮은 산소 투과도 때문이라 볼 수 있다. b-value는 갈변이 증가하는데 영향을 받은 것으로 나타났다(Fig. 4). L-value와 마찬가지로 OPP 처리구가 다른 필름들에 비하여 높게 나타났는데, 갈변은 산소의 영향을 크게 받기 때문에 산소 투과도가 높은 OPP가 가장 급격하게 반응 했다고 볼 수 있다. 그러나 저온 저장의 경우는 ± 2.0 정도의 변화폭을 보여 갈변이 일어났다고 보긴 어렵다고 판단된다.

경도의 경우 갈변과 저장 중 중량감소율의 영향을 많이 받았다고 판단된다. 가속저장 조건에서 OPP의 경도의 저하가 약 1.2kgf로 가장 많이 일어났으며 ON의 경우는 일정하게 유지되었다(Fig. 5). 저장 중 OPP의 경우 수분 투과도가 낮아 포장 내 습기가 차고, 갈변이 생기면서 조직의 연화 및 붕괴로 빠르게 경도가 낮아짐을 보인다. OPP의 경우 중량감소율이 가장 낮게 나타났고 경도 역시 가장 빠르게 떨어졌다. 당도는 저장 4일째까지 큰 변화가 없었으나 4일째 이후 감소하는 추세를 나타냈으나, 상온 조건의 ON의 경우 6일째까지 당도가 유지되었다. OPP의 경우 다른 측정 항목과 마찬가지로 다른 처리구에 비하여 급격하게 떨어지는 것으로 보아 품질변화가 많이 일어난 것으로 추정되었다(Fig. 6).

OPP의 경우 용기 내에 낮은 수분 투과도로 인한 습기의 생성과 높은 산소 투과도로 인한 충분한 산소 조건하에 갈변과 미생물의 번식이 쉽게 일어난다. 때문에 다른 처리구들에 비하여 부패율이 70% 정도로 매우 높았다(Fig. 7).

중량 변화의 경우 ON이 저장 2일째를 기점으로 급격하게 떨어지는 것을 볼 수 있다(Fig. 8). 이는 ON필름의 특성상 수분에 약한 성질을 보이는 것과 관계가 있어 보인다. 그러나 저온과 상온 저장에서는 3종의 필름 모두 무게변화의 폭이 작았다.

수분함량은 증량변화와 비슷한 추이를 나타냈다(Fig. 9). OPP 및 PET로 포장한 생마의 수분함량이 약 5% 이상 상승하였으며, 가속 저장 조건에서는 ON은 반대로 4%이상의 수분함량의 감소를 나타냈다. 이는 외부의 수분이 포장재 내부로 유입될 때 수분에 민감한 ON필름이 수분을 흡착하면서 상대적으로 유입되는 수분의 양이 낮아짐으로 내부의 생마가 건조되기 때문이라고 추정된다.

저장기간 중 품질변화가 가장 적었던 포장소재는 ON 필름이었고, 적합한 온도는 저온저장이었다. ON 필름에 저장한 생마의 색, 당도, 부패도, 경도 등에서 다른 필름에 비하여 품질유지 효과가 높게 나타났으나, ON 필름은 수분에 매우 민감하므로 이 부분의 개선이 필요할 것으로 판단되었다.

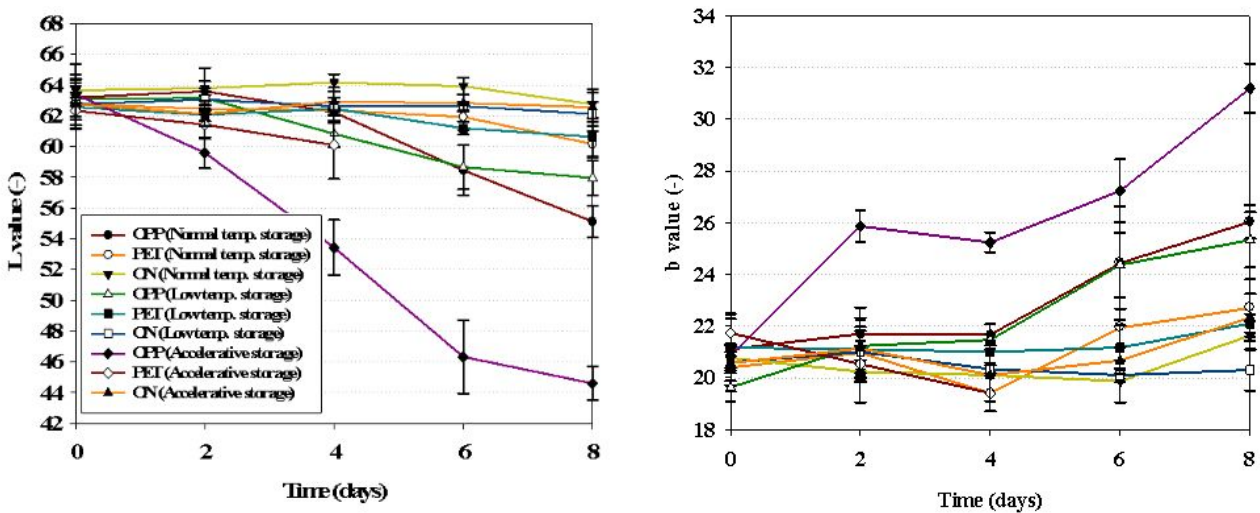


Fig. 4. Changes in color of fresh-cut Chinese yam during storage at different temperature as influenced by film materials.

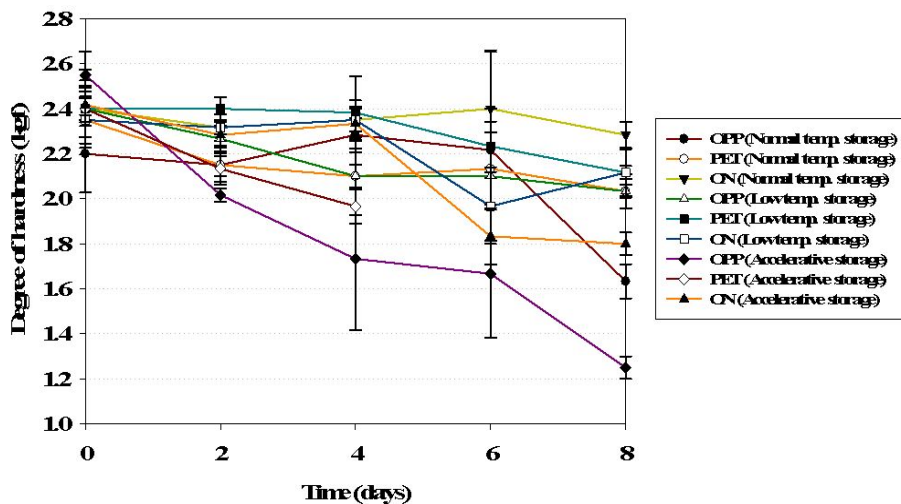


Fig. 5. Changes in flesh firmness of fresh-cut Chinese yam during storage at different temperature as influenced by film materials.

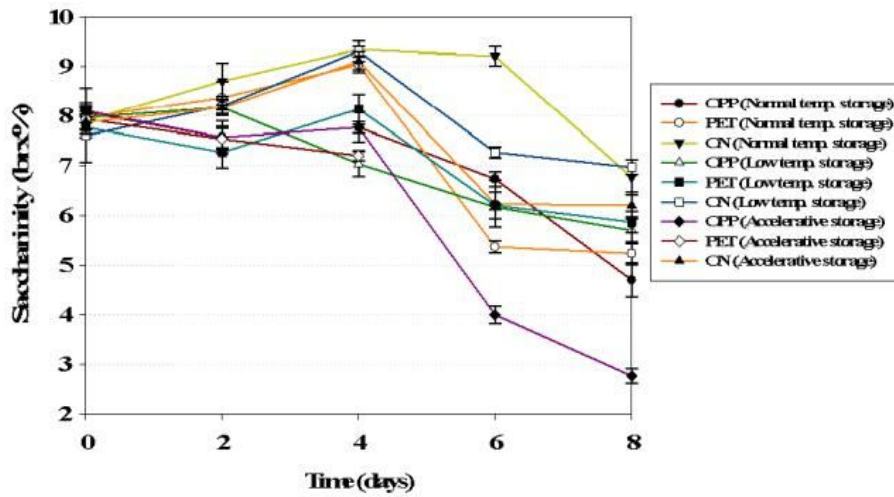


Fig. 6. Changes in saccharinity of fresh-cut Chinese yam during storage at different temperature as influenced by film materials.

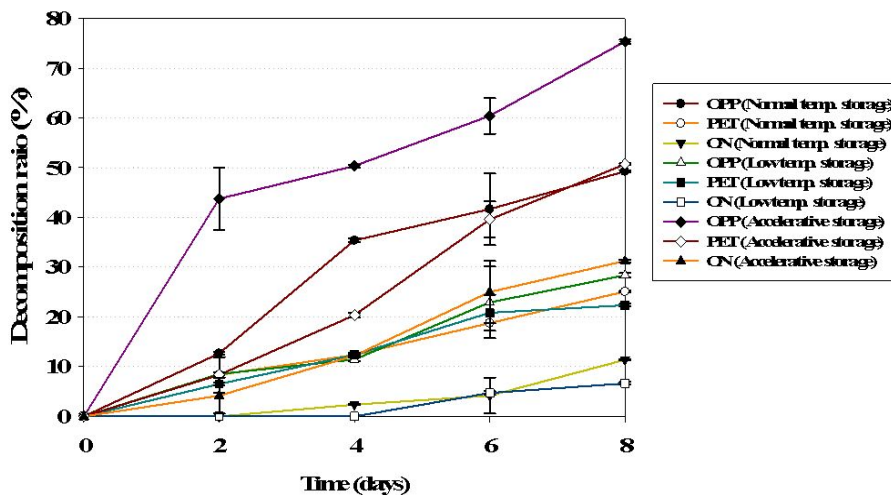


Fig. 7. Changes in decomposition of fresh-cut Chinese yam during storage at different temperature as influenced by film materials.

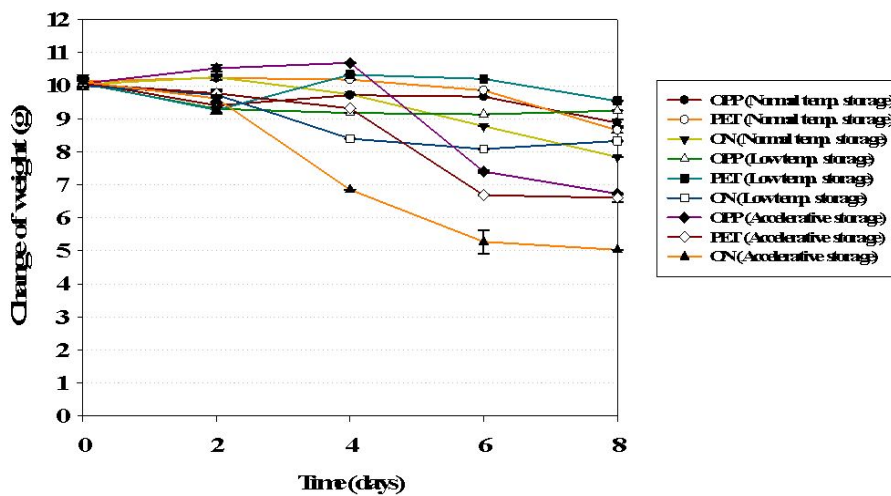


Fig. 8. Change in weight of fresh-cut Chinese yam during storage at different temperature as influenced by film materials.

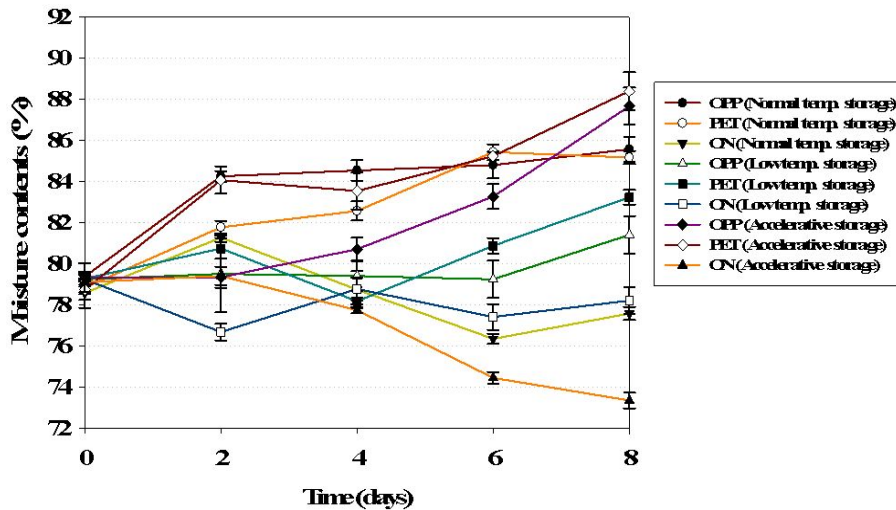


Fig. 9. Change in moisture contents of fresh-cut Chinese yam during storage at different temperature as influenced by film materials.

(2) 알코올 침지 전처리가 절편 마의 품질변화에 미치는 영향

색도 변화는 알코올 침지 시간에 따른 차이는 없으나, 농도에 따른 유의적인 차이를 나타냈다(Fig. 10). 농도 별로는 5% 알코올 처리가 control과 10% 처리보다 갈변억제에 우수한 효과를 나타냈음을 알 수 있었다.

갈변 억제 효과면에서는 10% 처리의 경우 저장 2일까지는 대조구보다 우수하였으나 4일 이후 타 처리구와 큰 차이를 보이지 않았던 반면, 5% 처리는 타 처리구에 비해 갈변 억제 효과가 뛰어난 것을 확인할 수 있었다(Fig. 11).

경도는 모든 처리구에서 유의적인 차이가 나지 않았다(Fig. 12).

이취(알코올 발효취)는 알코올 10% 처리에서 심하게 발생하였고, 5% 처리구에서도 이취가 발생하긴 하였으나 10%에 비하여 비교적 양호하였다(Fig. 13).

알코올의 살균효과에 의해 미생물 안전성이 양호하게 나타났으며, 처리농도가 높을수록 미생물 안전성이 높았다. 침지시간의 효과는 알코올 농도 5%에서만 차이가 있었다(Table 1).

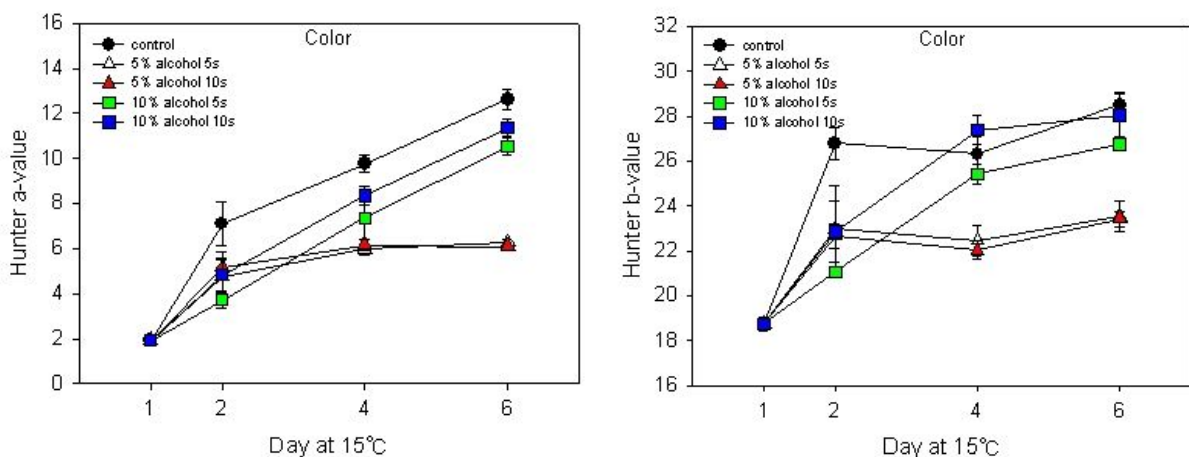


Fig. 10. Change in color of sliced Chinese yam as influenced by alcohol concentrations during storage at 15°C.

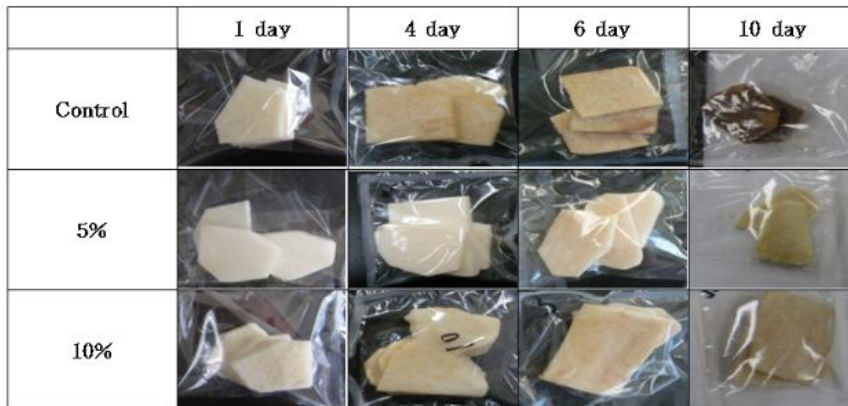


Fig. 11. Browning of sliced Chinese yam as influenced by alcohol concentrations during storage at 15°C.

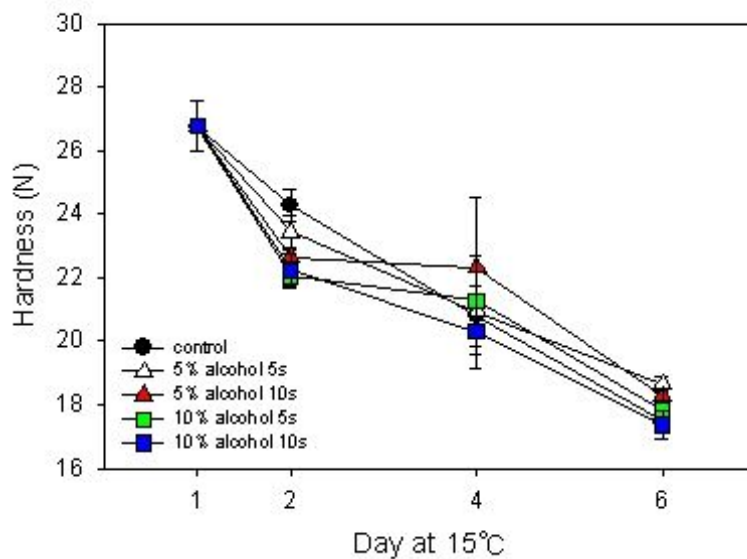


Fig. 12. Change in hardness of sliced Chinese yam as influenced by alcohol concentrations during storage at 15°C.

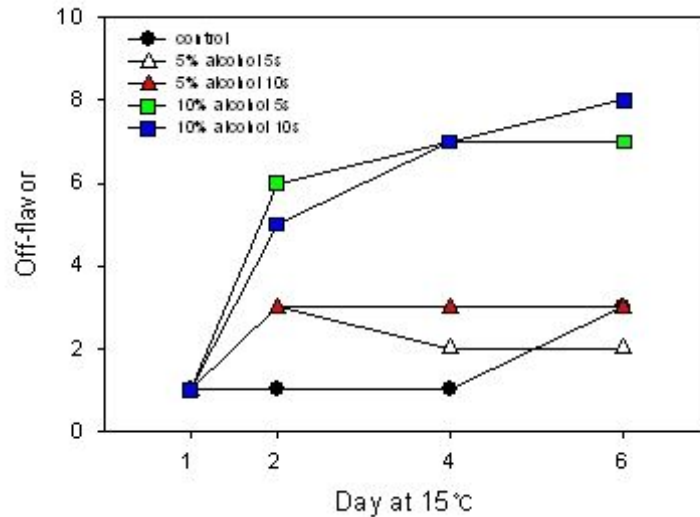


Fig. 13. Changes in off-flavor of sliced Chinese yam as influenced by alcohol concentrations during storage at 15°C.

Table 1. Change in total microbial count in sliced Chinese yam as influenced by alcohol concentrations during storage at 15°C.

Treatment	Days at 15°C			
	1	2	4	6
Control	ND	4.25×10^3	2.25×10^4	3.12×10^5
Alcohol 5% 5s	ND	ND	1.24×10^2	2.36×10^3
Alcohol 5% 10s	ND	ND	ND	2.16×10^2
Alcohol 10% 5s	ND	ND	ND	2.20×10^2
Alcohol 10% 10s	ND	ND	ND	2.08×10^2

(3) 블랜칭 처리가 질편 마의 품질변화에 미치는 영향

블랜칭 시간과 PPO(polyphenol oxidase)의 활성도는 비례하는 것으로 나타났으나 블랜칭 시간이 길수록 기율기는 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 14). 또한 0.09mm 포장재로 진공 포장 후 1분간 블랜칭 처리 시 PPO 활성도가 40% 이하로 감소하는 것으로 보아 블랜칭 초기에 PPO가 활성을 잃었다고 볼 수 있다. 표면색의 변화는 저장 3일째까지 모든 처리구에서 유의적인 차이가 나타나지 않았다.

L-value는 서서히 감소하는 경향을 보였으며, 저장 7일째까지 모든 처리구에서 유의적인 차이를 보이지 않았다(Fig. 15). 저장 5일째부터 대조구와 10sec 블랜칭 처리구에서 외관상으로 미비한 갈변이 발생하였으며, chroma-value가 1min 이상 블랜칭한 처리구들보다 높게 나타났다(Fig. 16). 저장 7일째까지 1min 이상 블랜칭한 처리구들은 색의 변화가 없었다. 따라서 PPO의 활성이 40%이하로 떨어질 경우 저장 7일째까지 갈변이 발생하지 않는다고 판단된다. 또한 0.09mm 포장재를 사용할 경우 75°C에서 10sec 이상 블랜칭이 필요하다고 판단된다.

블랜칭 온도와 시간은 마의 당도에 영향을 미치지 않는다고 판단된다(Fig. 17).

과육 경도는 블랜칭 시간이 길수록 낮아지는 경향을 보였다(Fig. 18). 10sec 이하의 블랜칭 시 마의 당도에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 저장 3일째 이후 1mm 이상 블랜칭한 처리구들은 경도가 감소하기 시작하여 저장 7일째에는 10N이상 차이가 났다. 또한 1min 이상 블랜칭한 처리구들은 대조구에 비하여 표면이 물러져 상품가치를 상실함으로 1분 이상의 블랜칭은 의미가 없다고 판단되었다. 블랜칭의 처리가 외관의 품질변화에는 영향을 미치지 않아 저장 시 문제가 없다고 보인다. 하지만 저장 5일째 이후 1min 이상 블랜칭한 처리구들은 조직의 연화에 의해 변화가 외형적인 변화가 일어났음을 알 수 있었다. 이는 블랜칭 후 초기에는 마의 조직이 유지되다가 저장 기간이 지남에 따라 자가분해 또는 블랜칭에 의한 조직붕괴가 가속화됨을 알 수 있었다.

또한 블랜칭 처리시간이 길수록 미생물의 발생이 현저하게 줄어드는 것을 관찰할 수 있었는데(자료 미제시) 대조구의 경우 저장 3일째에 1.92×10^2 의 미생물이 발생하였으나 블랜칭 처리구는 발생하지 않는 것으로 보아 블랜칭 처리구가 무처리구에 비하여 미생물 안정성이 높다고 볼 수 있다. 또한 3min 이상 처리 시 저장 7일째까지 미생물이 전혀 발생하지 않아 블랜칭의 미생물 억제 효과가 뛰어나다고 판단된다. 그러나 1min 이상 블랜칭 시 경도저하에 의한 상품성 손실이 있으므로 10sec 이상 1min 미만의 블랜칭 시간이 적당하다고 판단된다. 포장 후 절편마의 블랜칭이 마의 갈변과 미생물을 억제하며 경도를 제외하고 품질저하가 발생하지 않는 것으로 나타났다. 따라서 향후 경도강화처리와 함께 복합적인 진행이 필요할 것이라 판단되며 포장공장과 블랜칭 공정을 따로 처리할 필요 없이 포장재와 마의 두께를 고려하여 열수축 포장공정에 적용시킨다면 더 효과적일 것이라 본다.

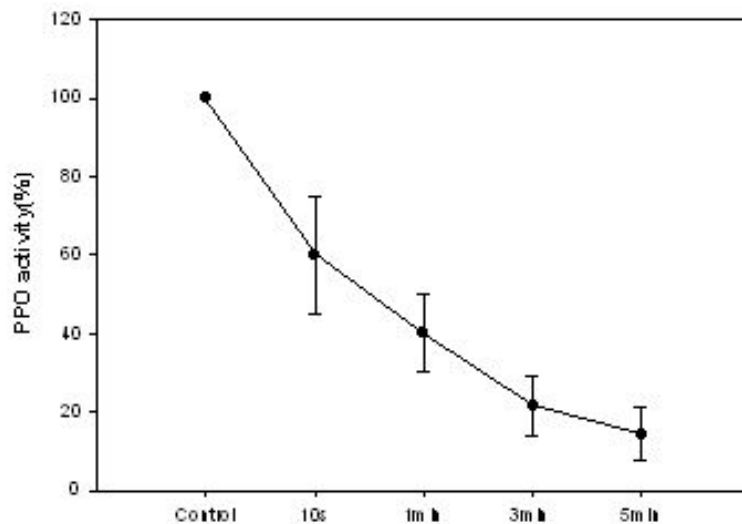


Fig. 14. Percent values of PPO activity in 75°C water-blanching fresh-cut Chinese yam compared to non-blanching sample.

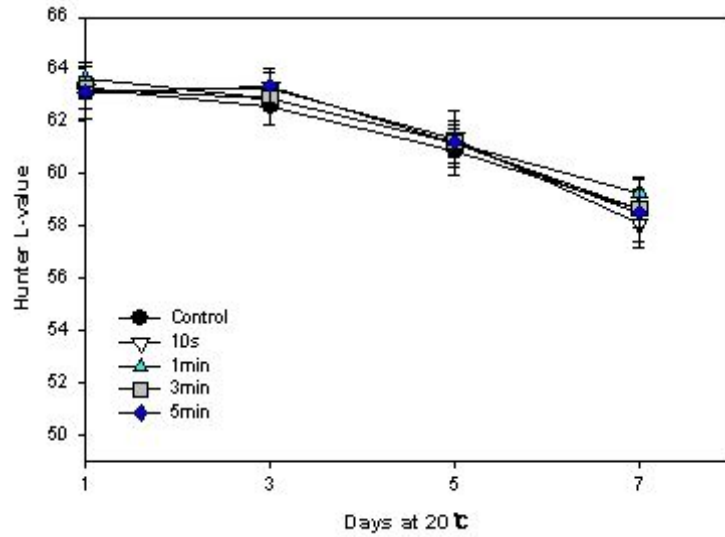


Fig. 15. Change in L-value of fresh-cut Chinese yam during storage at 20°C as influenced by blanching treatment.

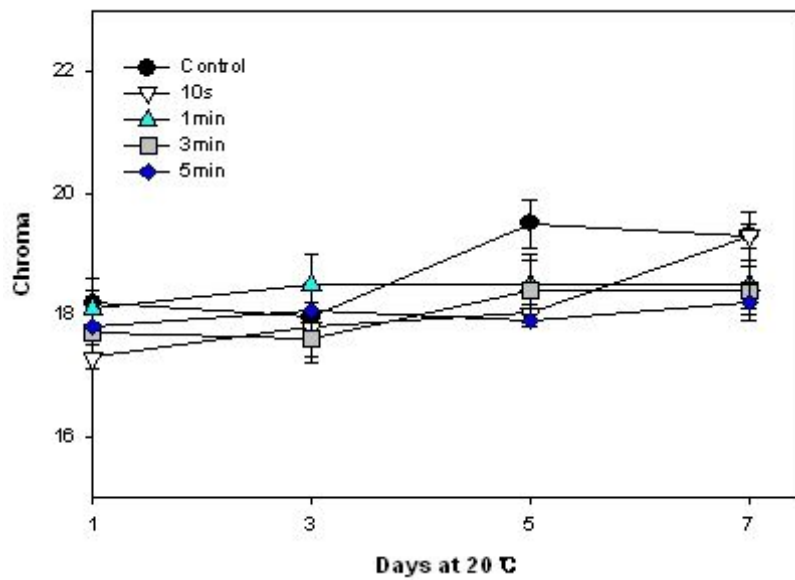


Fig. 16. Change in chroma of fresh-cut Chinese yam during storage at 20°C as influenced by blanching treatment.

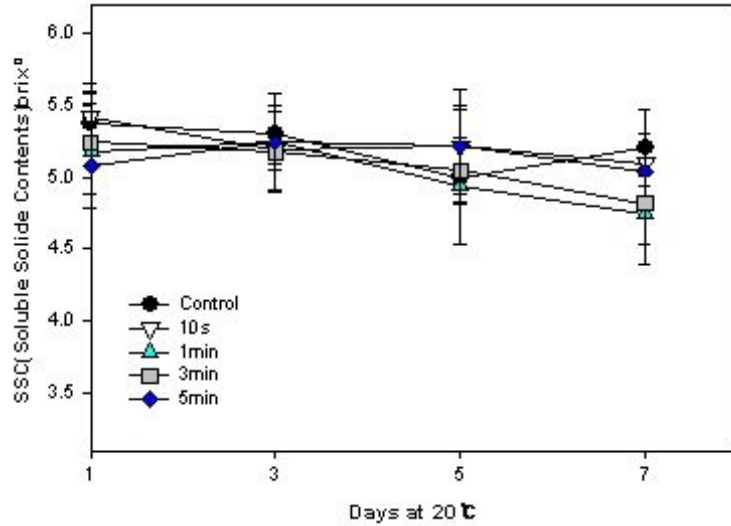


Fig. 17. Change in SSC of fresh-cut Chinese yam during storage at 20°C as influenced by blanching treatment.

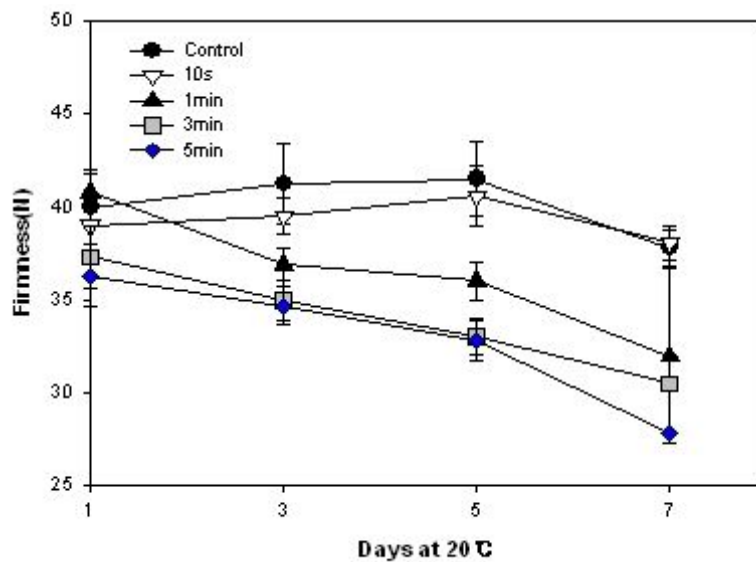


Fig. 18. Change in flesh firmness of fresh-cut Chinese yam during storage at 20°C as influenced by blanching treatment.

나. 같은 마 제품의 포장 방식에 따른 품질변화 분석: 3차년도

같은 마의 색도는 저온저장 조건(5°C 냉장 보관)에서는 뚜렷한 변화를 보이지 않았다(Fig. 19). 색도변화에서는 갈변 진행에 따라 백색도(L)와 황색도(b)는 감소하고 적색도(a)는 증가한다. 냉장 온도에서는 백색도와 적색도의 변화는 거의 없었고(Fig. 19, 20) 황색도의 경우 실험 후 2일차부터 투명하고 차단성이 낮은 포장재가 PET/PE/VM-PET이나 PET/Al/LLDPE로 알루미늄이 증착된 차단성이 좋은 재질보다 낮아져 일주일 후에 큰 차이를 보였다(Fig. 21).

E값은 0~12 까지 수치를 나눠서 초기 상태와 비교하여 차이를 수치로 나타낸 것이다. 0~

0.5 사이가 차이가 없음을 나타내고 1.5~3.0 사이가 감지할 정도의 차이를 나타내고 6.0~12 사이가 현저한 차이를 나타낸다. 냉장에서 보관했을 경우 Fig. 22.에서 보듯이 차단성이 좋은 포장재의 경우 8일차 이후까지도 0~1 사이로 근소한 차이를 보인 반면 차단성이 떨어지는 포장재의 경우 감지할 정도의 차이를 보였다.

저온저장 조건에 비해 상온(20℃)에서의 색도 변화는 PET/Al/LLDPE , PET/PE/VM-PET , 차단성NY/LLDPE , NY/LLDPE 순으로 변화를 보였다. 백색도(L), 황색도(b), 적색도(a)의 변화는 2일차까지 모든 포장재에서 크게 변화하였고 그 이후로 위와 같은 순서로 불투명하고 차단성이 좋은 포장재가 변화폭이 적었던 반면, 투명하고 차단성이 떨어지는 포장재가 6일까지 빠른 갈변현상을 보였다(Fig. 23~25). NY/LLDPE의 경우 4일차 까지 백색도(L), 황색도(b), 적색도(a) 모두 큰 폭으로 감소하여 갈변반응이 빠르게 진행됨을 알 수 있었다.

전반적인 색도 변화를 해석하면, 무차단성에 투명 재질인 NY/LLDPE의 ΔE값이 12를 넘어 다른 계통의 색 수준까지 변화하는 것으로 조사되었다(Fig. 26). 다른 포장재도 냉장조건에서와는 달리 상온에서는 2일까지 빠른 갈변 현상을 보여 현저한 색 차이를 보였고 PET/Al/LLDPE 로 알루미늄이 증착된 필름을 제외한 나머지는 일주일 후에는 E 값이 12가 넘는 다른 계통의 색으로 보일 정도의 갈변 반응이 진행되었다.

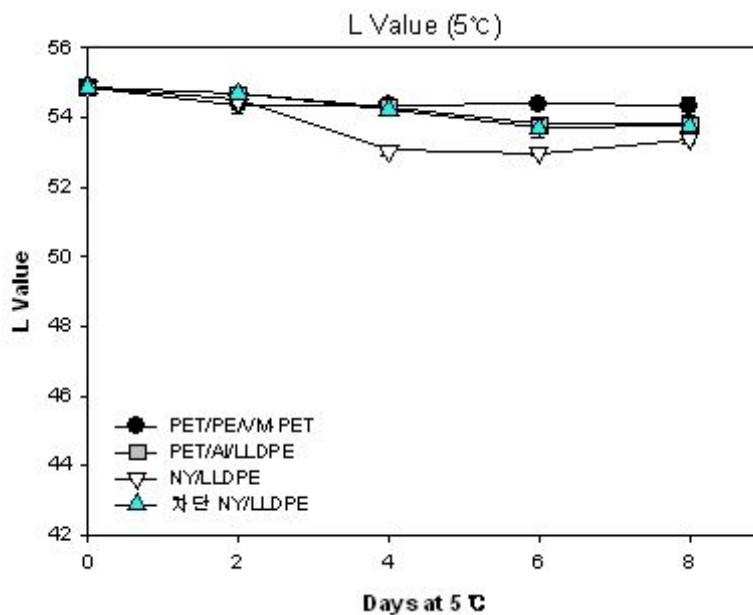


Fig. 19. Change in L value of ground Chinese yam product during storage at 5°C as influenced by film packaging materials.

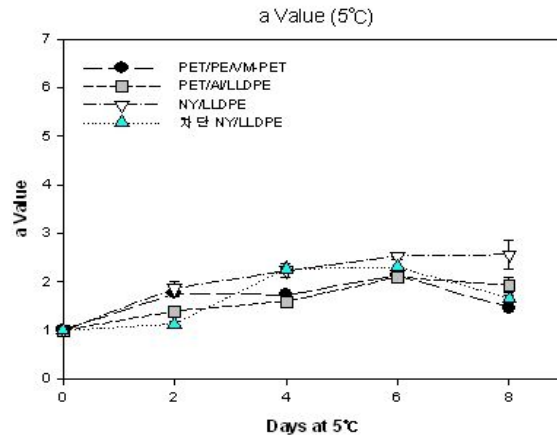


Fig. 20. Change in a value Change in L value of ground Chinese yam product during storage at 5°C as influenced by film packaging materials.

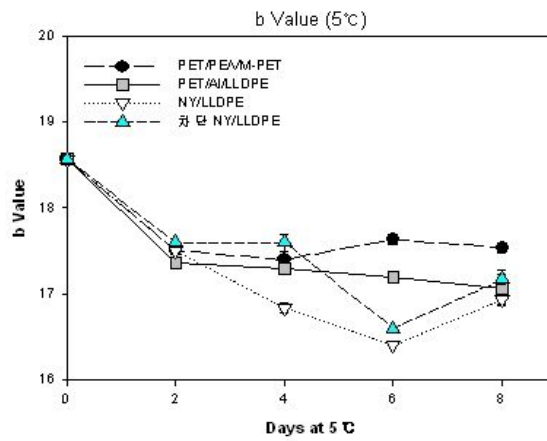


Fig. 21. Change in b value Change in L value of ground Chinese yam product during storage at 5°C as influenced by film packaging materials.

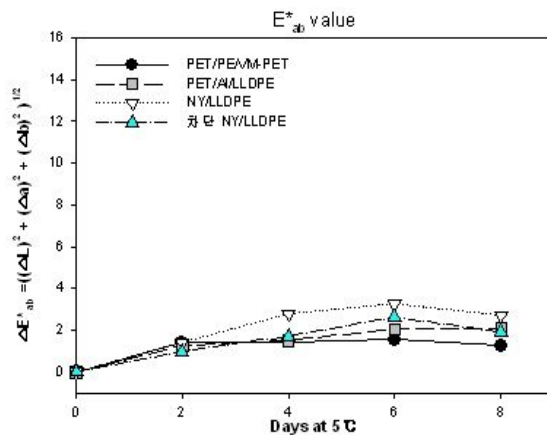


Fig. 22. Change in ΔE value of ground Chinese yam product during storage at 5°C as influenced by film packaging materials.

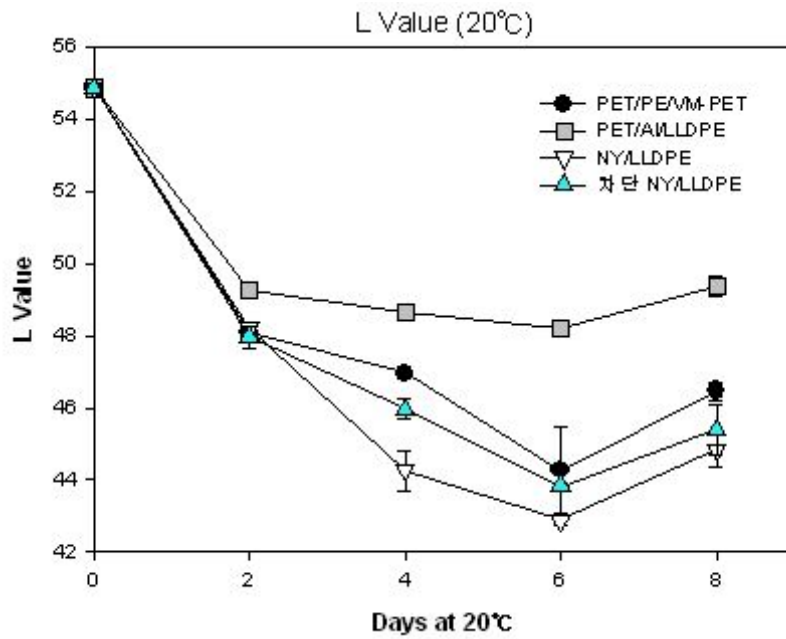


Fig. 23. Change in L value of ground Chinese yam product during storage at 20°C as influenced by film packaging materials.

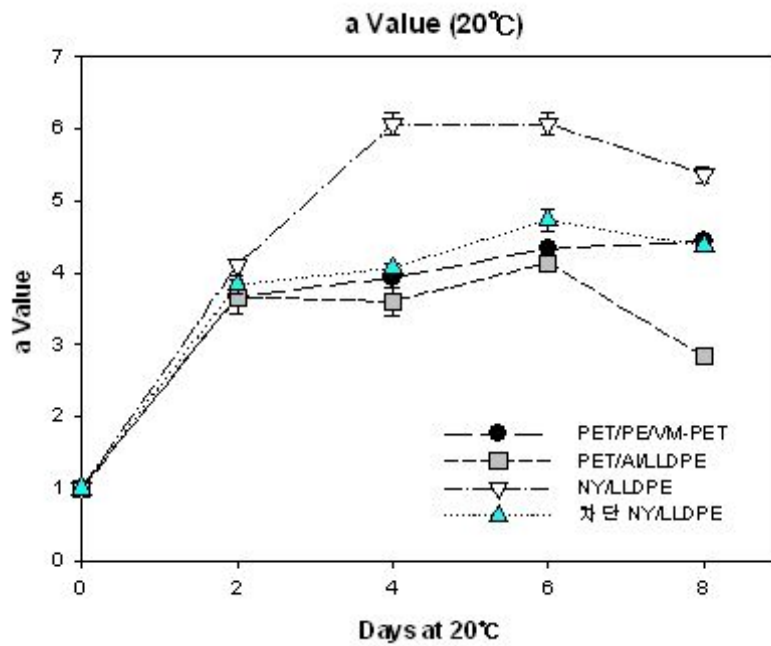


Fig. 24. Change in a Value of ground Chinese yam product during storage at 20°C as influenced by film packaging materials.

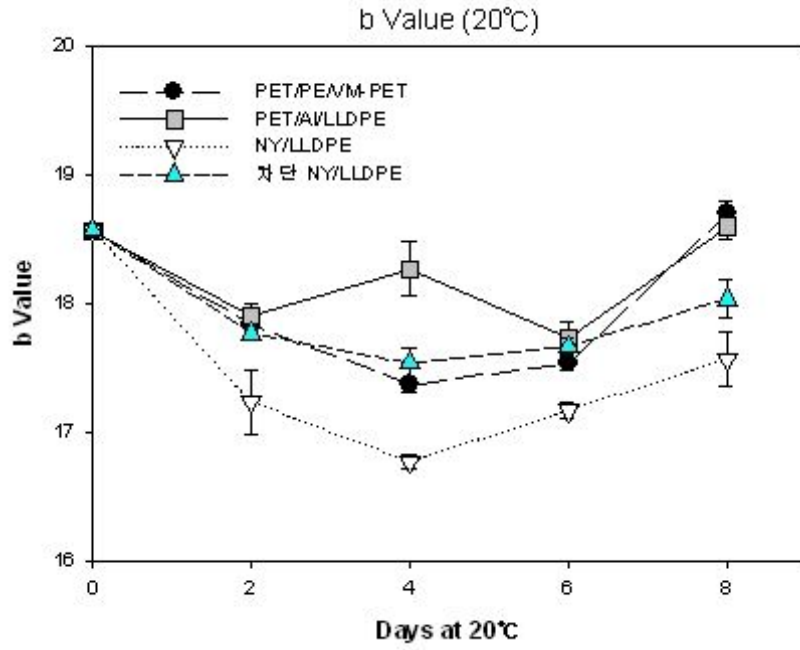


Fig. 25. Change in b Value of ground Chinese yam product during storage at 20°C as influenced by film packaging materials.

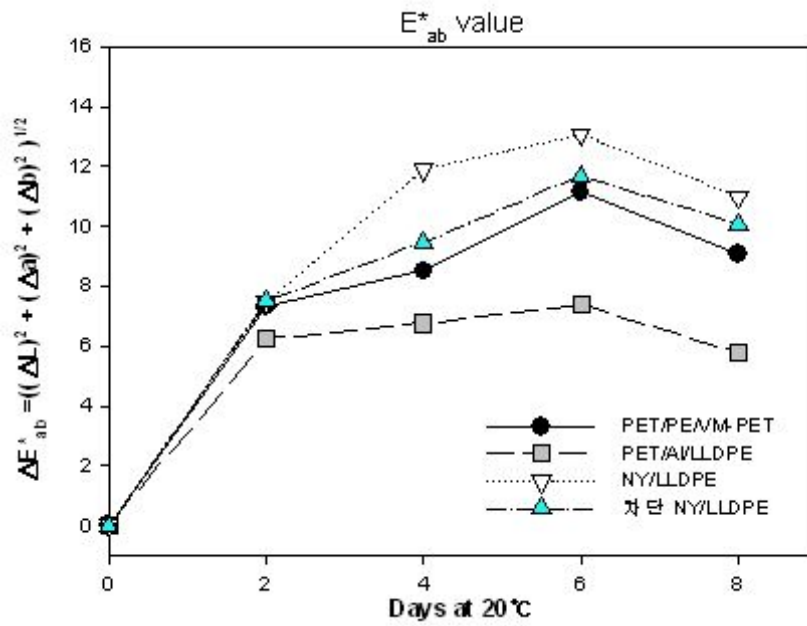


Fig. 26. Change in E value of ground Chinese yam product during storage at 20°C as influenced by film packaging materials.

같은 마의 pH는 냉장(5°C)의 경우 4일차 까지 감소하다가 다시 증가하는 변화를 보인 반면 (Fig. 27), 상온(20°C)의 경우는 저장 기간 8일 동안 계속 감소하는 변화를 보였다(Fig. 28). 포장 소재별로는 차단성이 좋은 알루미늄이 증착된 PET/Al/LLDPE 필름으로 변화가 가장 적었고 다음으로 VM-PET 증착 필름인 PET/PE/VM-PET 필름이고 다음으로 차단성이 떨어지는 차단성 NY/LLDPE과 NY/LLDPE 순으로 변화를 보였다.

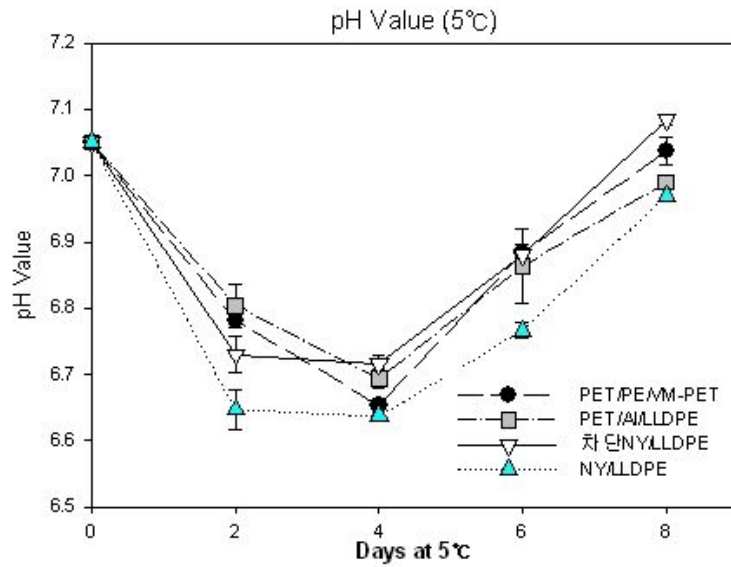


Fig. 27. Change in pH value of ground Chinese yam product during storage at 5°C as influenced by film packaging materials.

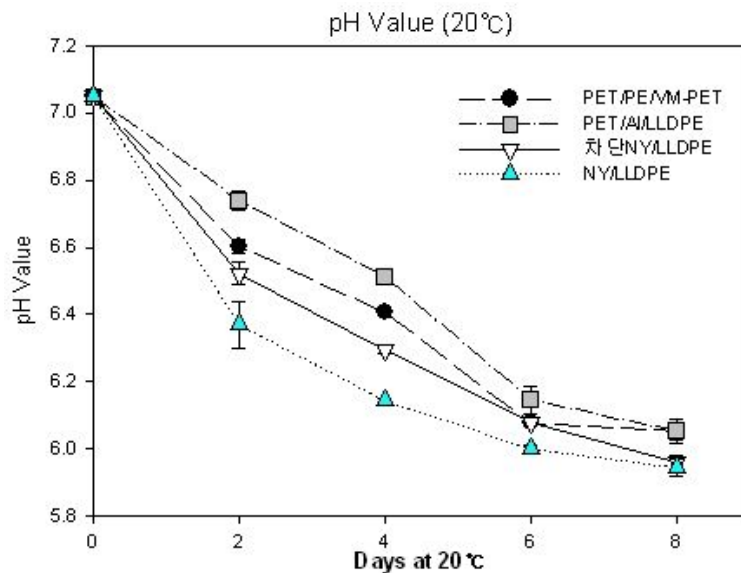


Fig. 28. Change in pH value of ground Chinese yam product during storage at 20°C as influenced by film packaging materials.

점도 변화는 같은 마의 경우 저장 기간이 지날 수록 감소하는 변화를 보였다. 이는 미생물에 의한 물의 생성에 의한 것으로 사료된다. Fig. 35에서 보듯이 냉장(5°C)에서는 차단성이 좋은 포장재에서 변화가 가장 적었고 다음으로 차단성 NY/LLDPE, NY/LLDPE 순이었다. 상온(20°C)의 경우는 Fig. 36.에서 보듯이 2~4일 사이에 큰 변화폭을 보였고 차단성이 좋은 포장재의 경우는 어느 정도 점도를 유지했지만 차단 NY/LLDPE이나 NY/LLDPE의 경우는 6일 이후에는 큰 폭으로 계속 감소해 상품 가치가 거의 없었다.

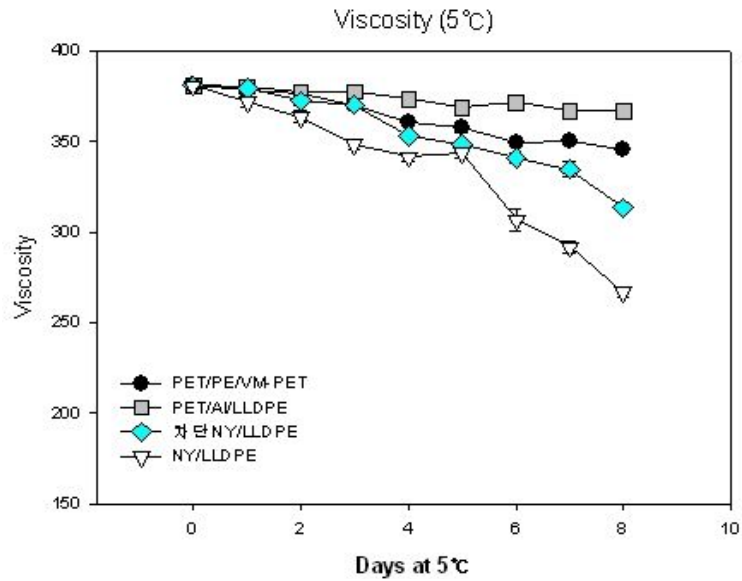


Fig. 29. Change in viscosity ground Chinese yam product during storage at 5°C as influenced by film packaging materials.

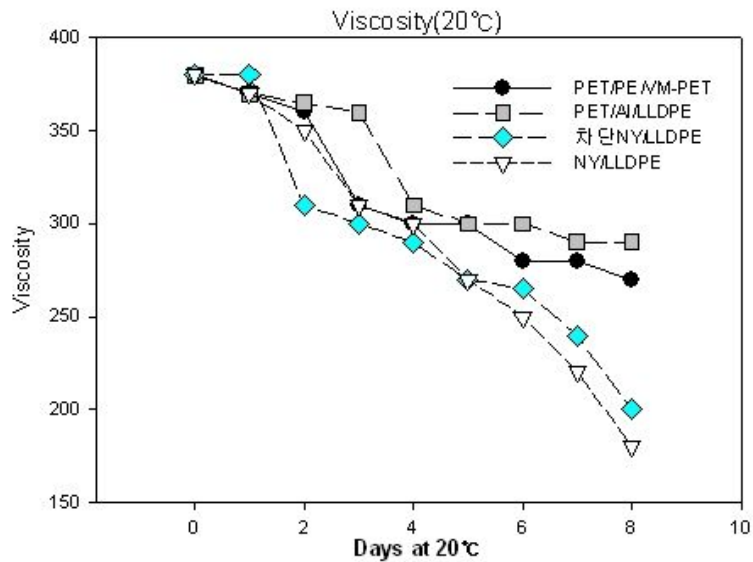


Fig. 30. Change in viscosity ground Chinese yam product during storage at 20°C as influenced by film packaging materials.

미생물 변화는 10^5 만큼 희석된 시료에서 채취되는 총 균수가 30~40개 사이에 있어야 하고 이를 넘어가면 식품으로서의 가치를 잃어버린다. 냉장(5°C) 보관한 같은 마의 경우, 저장기간 8일 동안 NY/LLDPE를 제외한 모든 포장재가 총 균수의 변화를 거의 보이지 않았다(Fig. 31). 이는 낮은 저장이 미생물의 생육 조건에 맞지 않기 때문이다.

이에 비해 상온(20°C)에 저장한 같은 마의 총 균수는 4일차까지 큰 변화를 보이지 않다가 NY/LLDPE 포장에서 기준치 이상의 총 균수가 검출되어 상품으로서의 가치를 잃었고 다른 포장재는 6일까지 변화를 보이지 않다가 그 이후에 기준치를 초과 하였다(Fig. 32). NY/LLDPE를 제외한 다른 차단성 포장재가 이를 정도 더 보관 가능하였다.

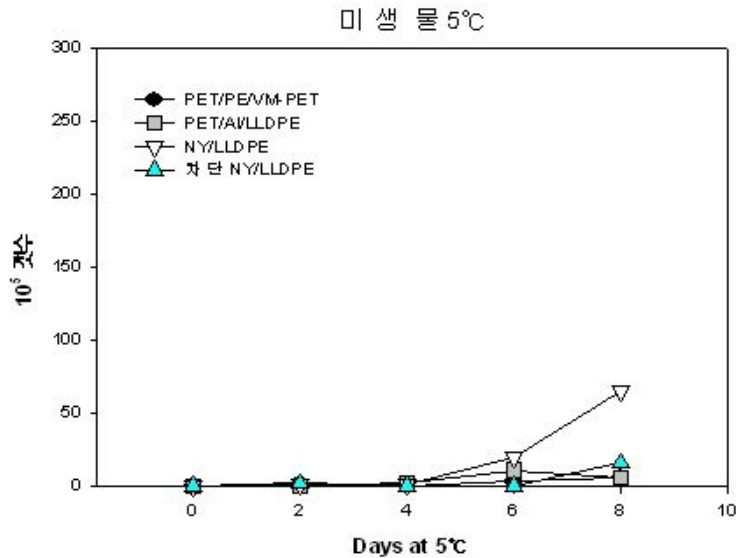


Fig. 31. Change in microbial colony count of ground Chinese yam product during storage at 5°C as influenced by film packaging materials.

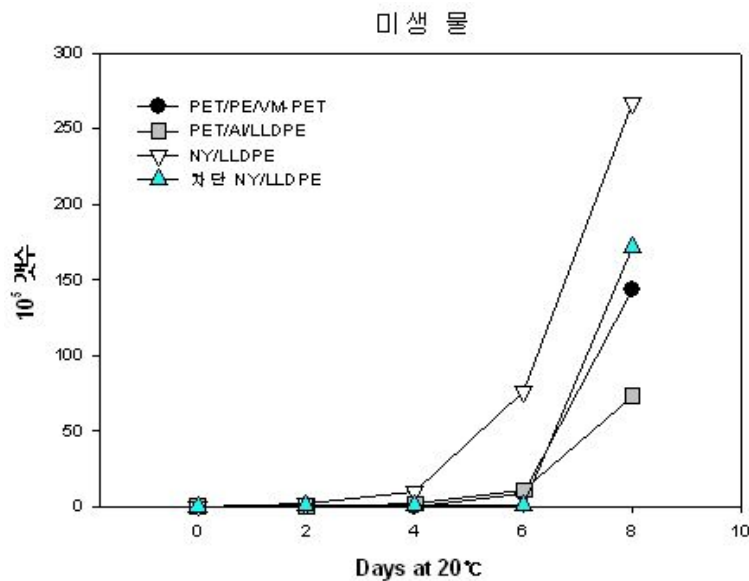


Fig. 32. Change in microbial colony count of ground Chinese yam product during storage at 20°C as influenced by film packaging materials.

관능평가는 외관, 향미, 맛, 느낌, 총 평가 이렇게 5가지로 5점 척도법으로 평가하였다. 상온 (20°C)의 경우, 3일차까지는 맛이나 향미를 평가할 수 있었지만 4일차가 되면서 갈변도 초기 보다 많이 진행되었고 향이나 외관에서 평가자들이 거부감을 느꼈고 맛 또한 평가할 수 없을 정도로 상태 변화를 일으켜 4일차 이후로는 관능평가가 불가능하였다(Fig. 33). 이에 비해 냉장 (5°C)의 경우는 품질 변화가 크게 나타나지 않았다(Fig. 34).

포장재에 따른 관능평가 결과 같은 마의 품질 변화는 알루미늄이 증착된 PET/Al/LLDPE, VM-PET이 증착된 PET/PE/VM-PET, 차단성NY/LLDPE, NY/LLDPE 순으로 평가 점수가 나왔다.

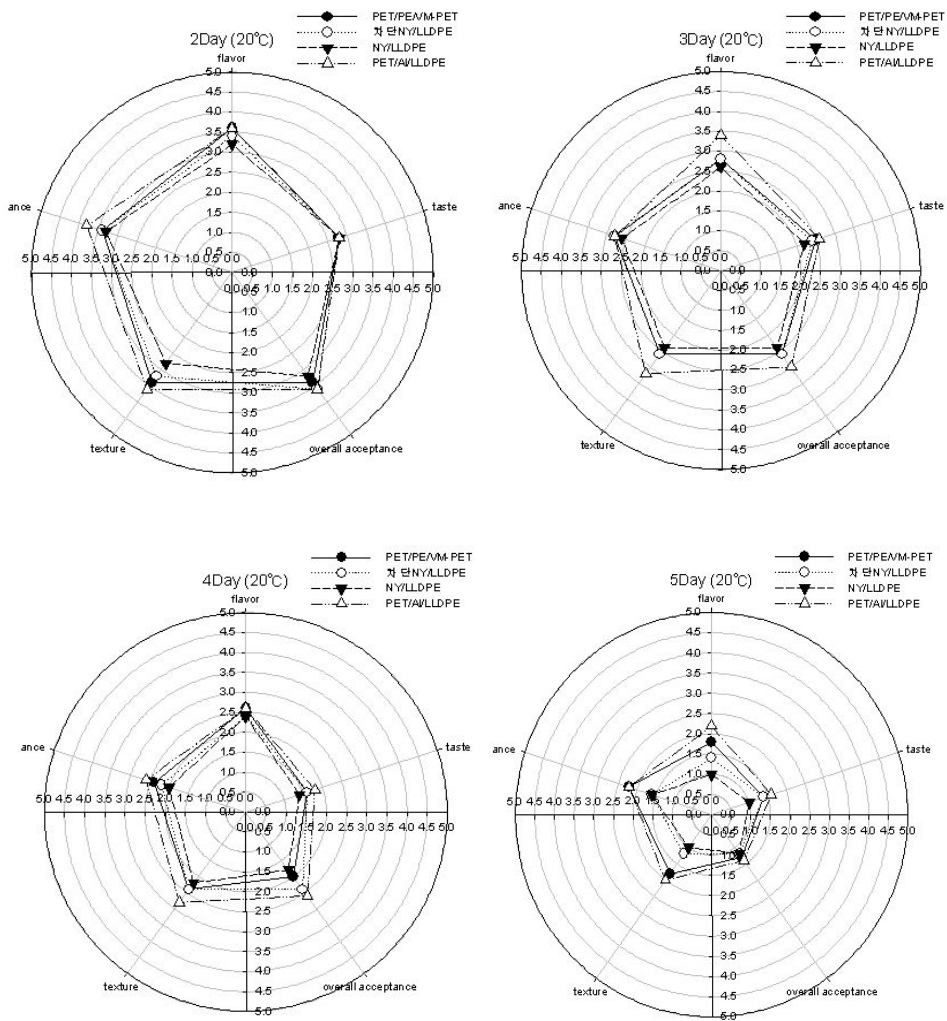


Fig. 33. Change in sensory test of ground Chinese yam product during storage at 20°C as influenced by film packaging materials.

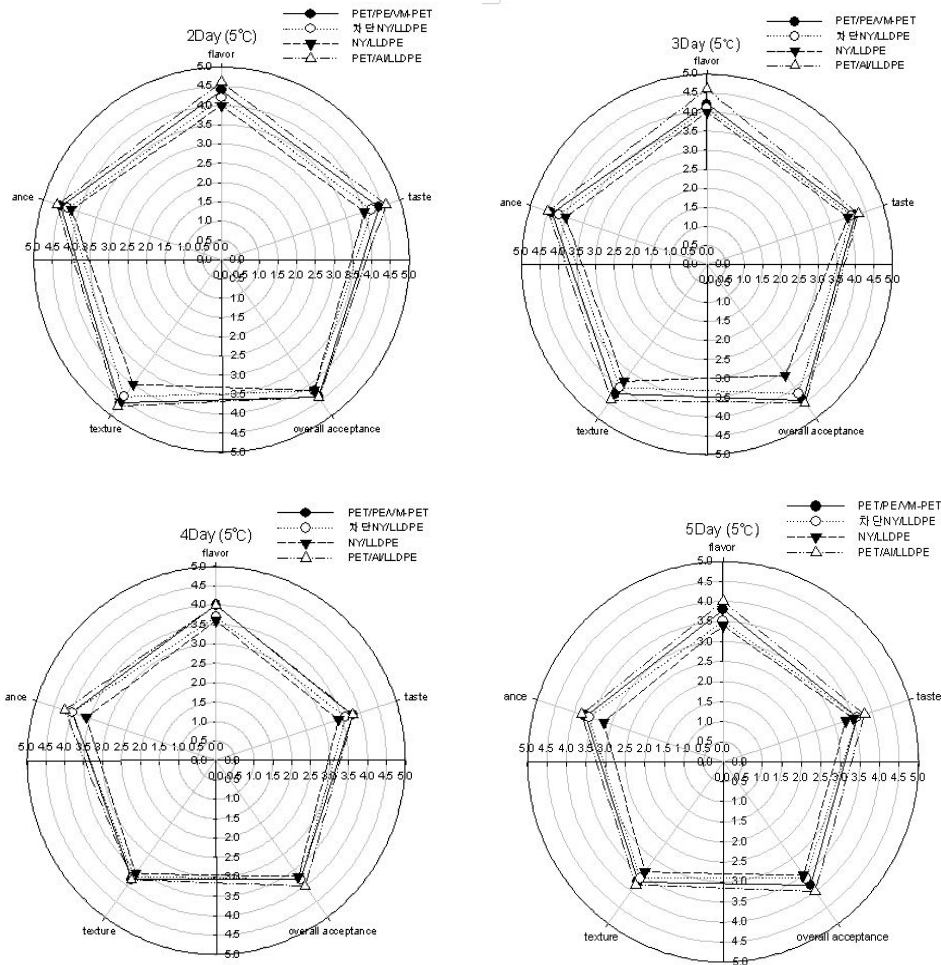


Fig. 34. Change in sensory test of of ground Chinese yam product during storage at 5°C as influenced by film packaging materials.

다. 마 분말의 저장과정에서의 품질변화

(1) 저장 온도의 효과

마 분말의 갈변현상 척도인 Hunter L, b value의 변화를 분석하였다(Fig. 35). 저장 기간이 흐를수록 b-value가 높아져서 전반적으로 갈변이 진행되고 있음을 알 수 있으며 저온 저장조건에서 5일차부터 b-value의 상승이 지연 되었고 L-value와의 상관성을 보았을 때 마 분말의 갈변 진행 속도는 가속 > 상온 > 저온저장 순으로 높았다.

저온저장 조건의 경우 분말 마의 무게변화는 거의 없었고, 상온 저장과 가속 저장조건에서는 무게가 점차 증가하는 양상을 보였다(Fig. 36). 가속저장 조건에서 최대 약 20% 폭으로 무게가 증가한 것을 볼 수 있으며 이는 마 분말 미립자의 흡습특성 때문에 수분 함량이 증가하면서 무게증가에 기인한 것으로 판단된다.

저온저장 조건의 경우 분말 마의 수분함량이 10% 내외로 저장기간 동안 유지 되었으나 상온저장과 가속저장 조건에서는 수분함량이 각각 약 17%, 20%까지 수분 함량이 증가하였다(Fig. 36). 특히 가속 저장 조건에서 5일차부터 큰 폭으로 수분함량의 증가가 진행되었다.

당도는 저온저장 조건의 경우 초기보다 약 1brix 증가한 당도 값인 10brix 정도에서 유지되었지만 상온저장과 가속 저장 조건에서는 당도가 점차 떨어지는 것으로 나타났다(Fig. 37). 특히 가속 저장의 경우 초기보다 2brix 이상의 당도 감소를 보였다. 원인은 미생물 번식에 의한 양분 소모 및 부패에 의한 감소라고 판단된다.

부패율은 저온 저장 조건의 경우 15일차부터 부패가 진행되어 약 10% 정도이고, 상온 저장 조건에서는 10일차부터 부패가 시작되어 약 30% 정도인 것에 반해, 가속 저장의 경우 실험 개시 후부터 점차 부패도가 증가하여 약 85% 이상의 부패가 진행되어 상품가치가 완전히 상실되었다고 볼 수 있다(Fig. 37).

분말 마는 저온 저장을 하였을 때 품질의 변화가 거의 없이 유지되었으나 온도가 높은 여름철의 경우 5일 이상 유통기한을 유지하기 어려운 것으로 나타났다. 따라서 저 투습성 필름을 이용하여 저장 중 모니터링이 필요하다.

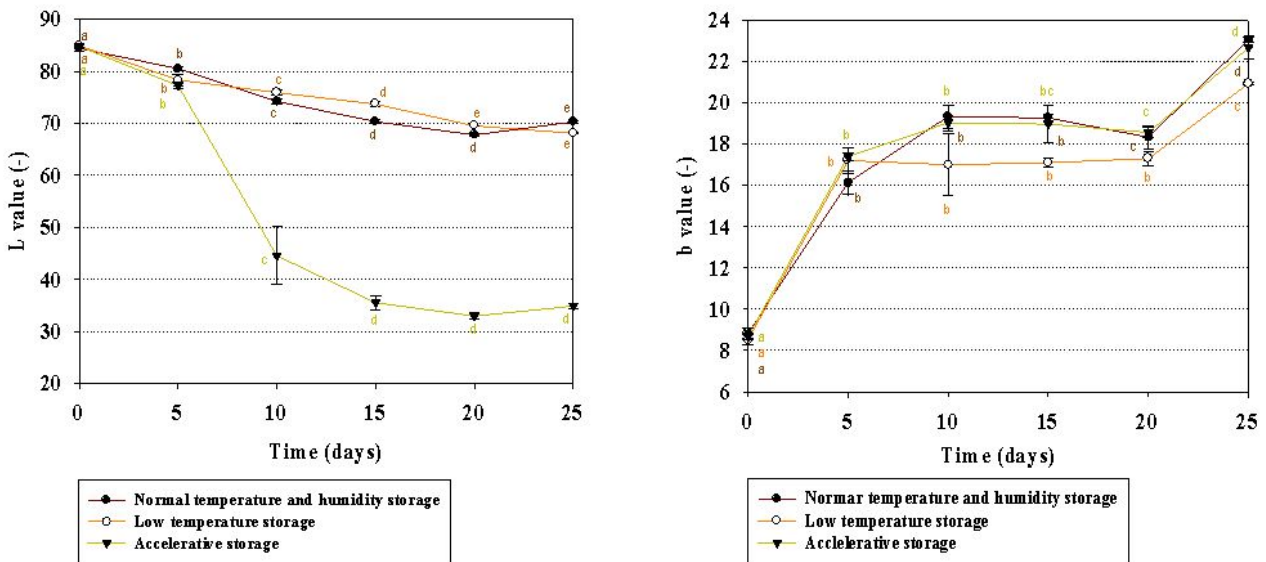


Fig. 35. Change in color of different temperature and film of powder yam during storage at different temperature.

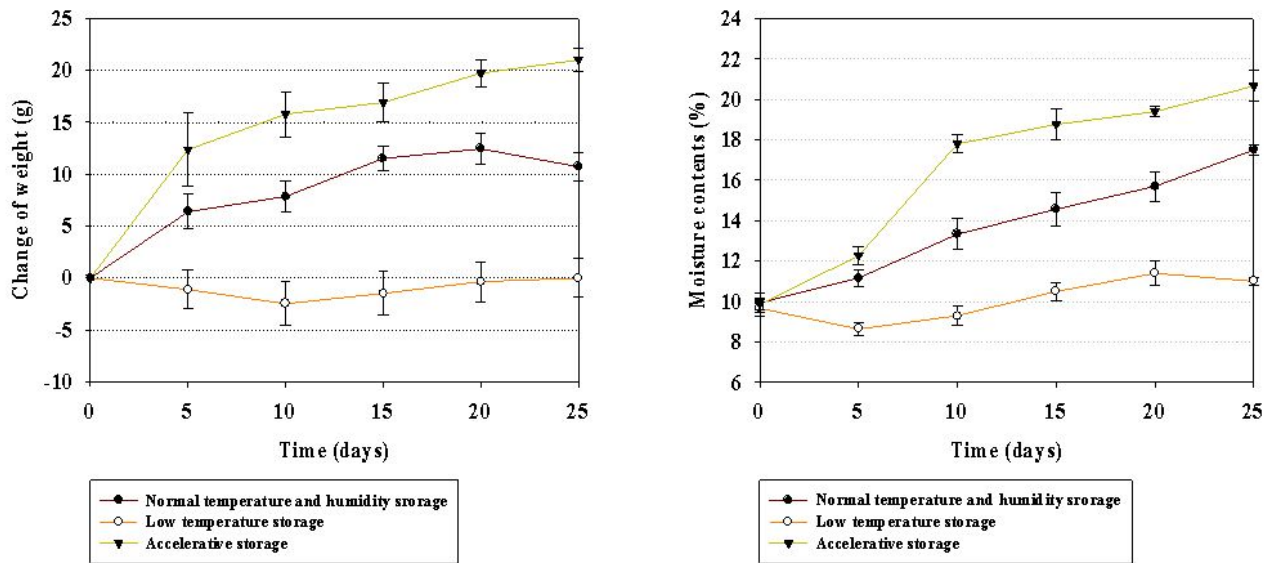


Fig. 36. Changes in weight and moisture content of Chinese yam powder during storage at different temperature.

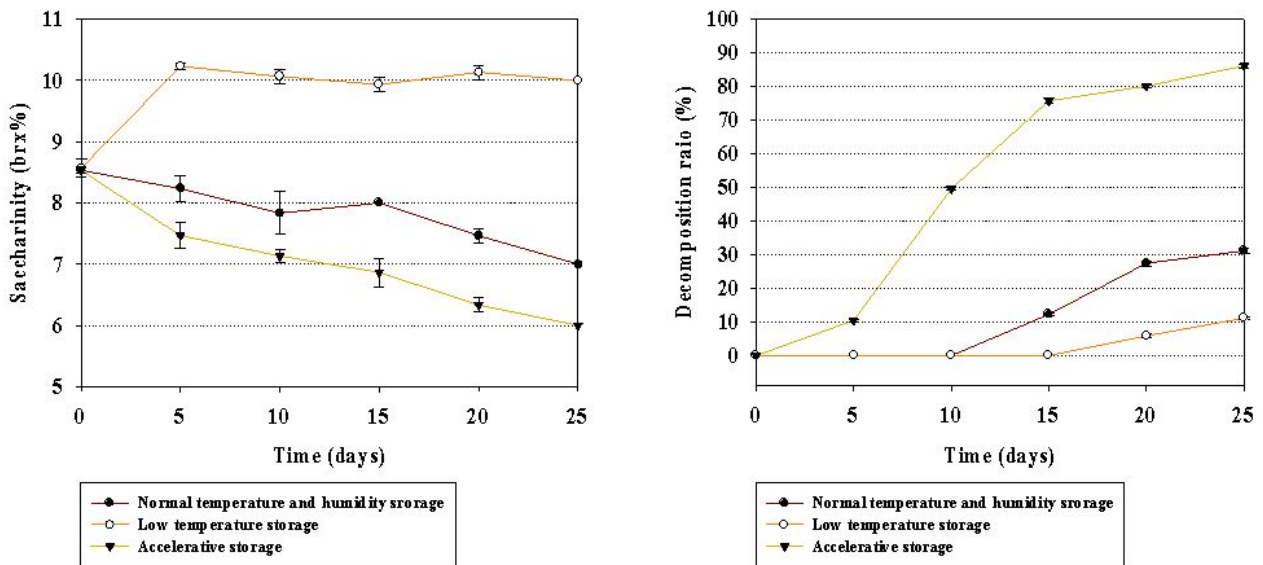


Fig. 37. Changes in saccharinity and decomposition Chinese yam powder during storage at different temperature.

(2) 습도에 따른 분말 마의 품질 변화

습도가 분말 마와 슬라이드 생마의 저장 중 품질 변화에 어떠한 영향을 주는지 모니터링 하기 위하여 분말 마와 생마를 4°C로 고정 후 습도를 30, 50, 80%로 달리하여 습도별 저장마의 품질변화를 조사하였다.

분말 마의 색도는 저장 7일 동안 거의 변화가 없는 것으로 나타났다(Fig. 38). Hunter

b-value만 약간 감소하여 유지되고 있다. 중량의 변화는 미미하게 일어나나 큰 차이는 없는 것으로 나타난다. 수분함량 역시 저장 7일째까지 변화가 없다(Fig. 39).

분말 마의 추가 연구과정에서 밝혀진 바로는, 기존 포장 분말 마의 경우, 저장 5일차부터 여러 가지 품질 요인에 변화가 왔으나 ON 필름을 적용시키자 저장 7일째까지 유통기한을 연장시키고 습도의 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 향후 유통기한이 길어질 것을 염두에 두고 습도별 가속실험을 준비하고 있으며 현재 유통 중인 포장재와의 비교를 통한 분석이 보완되어야 할 것으로 판단된다.

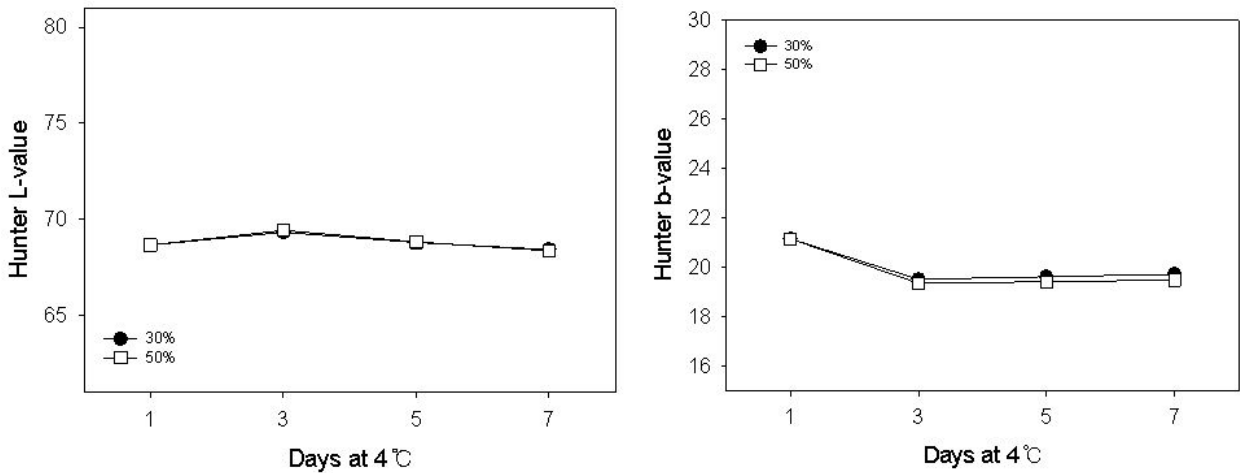


Fig. 38. Changes in color of Chinese yam powder during storage at 4°C as influenced by relative humidity.

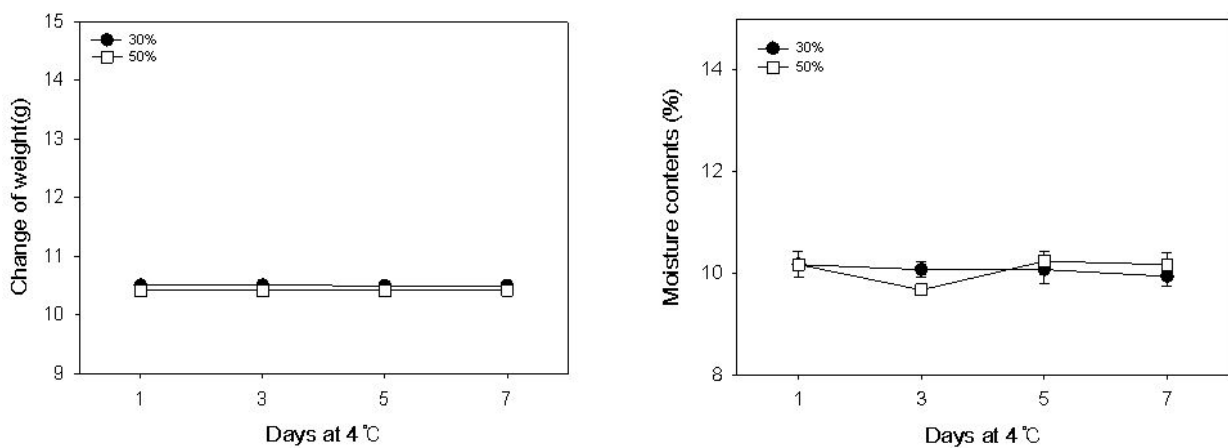


Fig. 39. Changes in weight and moisture content of Chinese yam powder during storage at 4°C as influenced by relative humidity.

제 4절 마 자원의 항노화 기능성 분석을 통한 유효 분획물 개발

1. 서언

인간을 포함한 호기성 호흡을 하는 생명체는 정상적인 에너지 대사과정과 같은 내부요인에 의해 또는 흡연, 스트레스, 그리고 여러 가지 환경오염과 같은 외부요인으로 인하여 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)을 생성한다. ROS에는 superoxide radical($-O_2$), hydrogen peroxide(H_2O_2) 및 hydroxyl radical($-OH$)등의 종류가 있다. ROS는 모든 호기성 유기체에 생산되며, 세포의 성장과 산화-환원 반응에 작용하는 신호전달체계에 필수불가결한 것이기도하다. 산화물질은 화학적으로 DNA, 지질 그리고 단백질들과 같은 ROS의 표적이 되는 거대 분자(macromolecule)를 화학적으로 쉽게 수식(modification)할 수 있는 능력을 가진다. 이는 정상적인 세포대사의 과정에서 발생하는 부산물이지만 과도하게 생성되면 산화과정과 같은 치명적인 반응을 유발하여 생체 세포막 구성성분인 불포화 지방산을 공격하여 과산화 반응을 일으켜 malondialdehyde(MDA), 4-hydroxynonenal (4-HNE)와 같은 과산화지질이나 산화분해물이 생체 내에 축적되고, 축적된 과산화 지질은 일시적 혹은 영구적으로 생체에 손상을 주어 생체 내 DNA를 손상시켜 세포노화, 세포막 분해 등 심각한 생리적인 장애를 일으킨다.

활성산소 중 nitric oxide($\cdot NO$)는 대식세포, 호중구(neutrophil) 등에서 생성되며 nitric oxide synthase(NOS)에 의해 L-arginine을 기질로하여 합성되는 반응성이 크고 반감기가 아주 짧은 무기 저분자 라디칼로 신경전달 기능, 혈액응고 및 혈압조절 기능, 암세포에 대항하는 면역 기능이 알려져 있다(Lee et al., 2004; Ignarro et al., 1987; Angus et al., 1989; Slavemini et al., 1993; Busse et al., 1995).

그러나 lipopolysaccharide(LPS)와 같은 면역학적인 자극에 의해서 정상 농도 보다 과량 생산되는 nitric oxide는 cyclooxygenase(COX)의 활성을 촉진시켜 prostaglandin 등의 생합성을 유도하여 염증반응을 심화시킨다(McCartney-Francis et al., 1993). 또한 nitric oxide는 세포막을 쉽게 확산하여 다른 활성 산소들과 반응할 수 있는데, 특히 superoxide anion radical과 반응하여 강력한 산화제인 peroxynitrite($ONOO^-$)를 생성하여 단백질과 펩타이드의 산화 및 지질을 과산화유도하여 세포독성을 야기할 뿐 아니라 생리적 pH에서 proton화 되어 분해되기 전까지 세포막의 산화 도는 세포막을 통과한 후 더욱 빠르게 산화반응하며 반응속도는 H_2O_2 에 비하여 수천 배에 이르는 것으로 알려져 있어 짧은 시간 내에 급속한 손상을 유발 하는 것으로 알려져 있다. 이에 식품과학 분야에서는 천연 약용식물로부터 항산화력이 우수한 물질을 탐색하는 연구가 활발히 행해지고 있으며 나아가 이들 생리활성 소재를 추출하여 첨가한 기능성 식품의 개발에 대한 연구가 진행되고 있다(Oh and Kim, 2006). 또한 천연 약용식물은 천연식물의 약리적 효능과 더불어 항산화 작용을 할 수 있는 생리활성 물질이 있어 유용한 연구재료가 되고 있다(Yoo et al., 2007; Lee et al., 2006; Lee et al., 2007).

마(Dioscorea Rhizoma)는 마과에 속한 다년생 초목인 마(*Dioscorea batatas* Thunberg) 또는 참마(*Dioscorea japonica* Thunberg)의 뿌리줄기를 건조하여 사용하는 한약재로 주요성분들의 약리작용으로는 혈당 강하효과 (McAnuff et al., 2005), 콜레스테롤 저하작용(Chen et al., 2003), 비만조절(Kwon et al., 2003), 마의 주요 성분인 methyl protodioscin, methyl protoneogracilin, graciillin, dioscin 등의 인간 암세포에 대한 항종양효과 (Hu et al., 2003; Jing

et al., 2002), 면역조절효과(Choi et al., 2004), phospholipase A₂ 저해작용(Kim et al., 2004), 항진균성/세포독성의 활성, 골다공증 억제효과(Yin et al., 2004) 등이 보고되고 있다.

따라서 본 연구에서는 마로부터 분리된 mucin과 조사포닌의 항산화력 및 비정상적인 신호전달 억제와 항염증 작용 규명을 통한 항암활성을 분석하여 고 부가가치의 기능성 식품 및 암 예방적 의학소재로서의 이용 가능성을 알아보고자 하였다.

2. 연구방법론

가. 추출 및 동정

(1) Mucin

동결건조 시료 500g을 50mM Tris-HCl buffer를 이용하여 침지하여 여과한 추출물을 각각 농축하여 Fig. 1과 같은 방법으로 분획한 후 추후 실험을 위한 시료를 확보하였다.

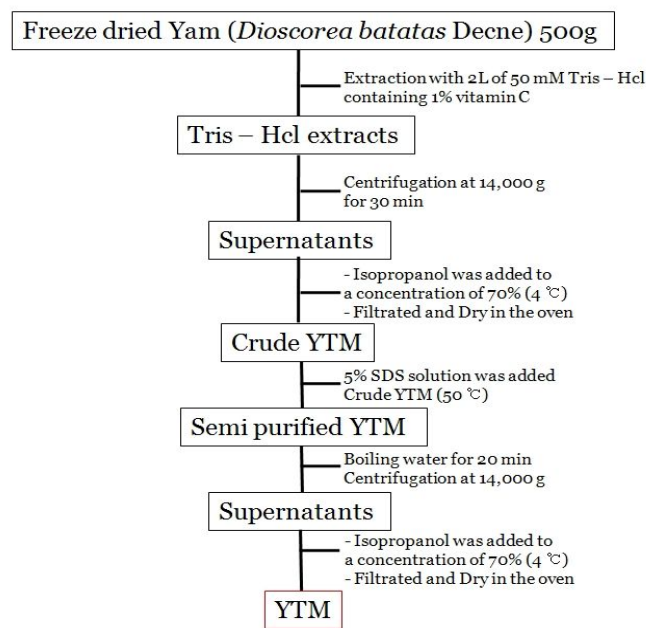


Fig. 1. Fractionation of Mucin.

(2) Saponin 추출 및 동정

추출은 동결건조 시료 40g을 80% MeOH를 이용하여 80 °C에서 중탕 2회 반복하여 여과한 추출물을 각각 농축하여 Fig. 2와 같은 방법으로 분획한 후 추후 실험을 위한 crude saponin을 확보하였다.

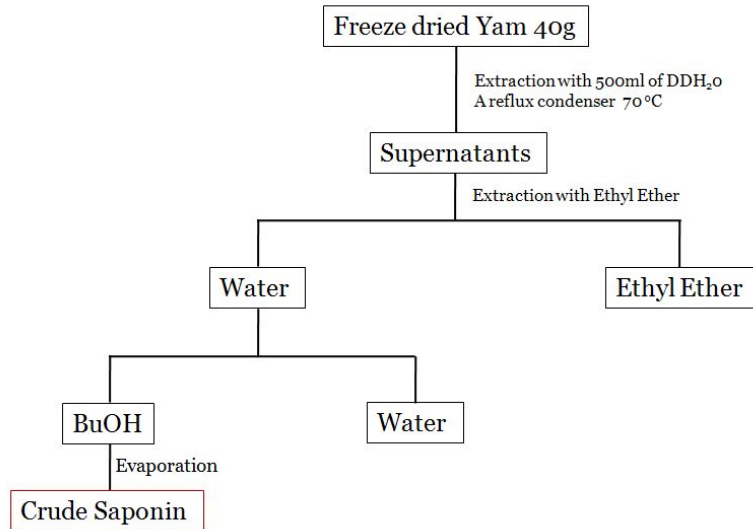


Fig. 2. Fractionation of Saponin.

나. 항산화 활성 평가

(1) DPPH에 대한 전자 공여능 측정

마로부터 추출된 뮤신과 조 사포닌의 DPPH에 대한 전자 공여능은 Bondet 방법에 의해 측정하였다. 여러 농도의 추출물 40 μ L를 300 μ M DPPH/EtOH 760 μ L에 첨가한 후 30분간 37°C에 방치한 후 UV/Visible spectrophotometer(Berkman, USA)을 이용하여 515nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 추출물의 전자 공여능은 다음 식으로 %를 구하였다.

$$\text{소거능(\%)} = \{1 - (\text{추출물 첨가구의 흡광도} / \text{추출물 무 첨가구의 흡광도})\} \times 100$$

(2) Hydroxyl 라디칼 소거능

마로부터 추출된 뮤신과 조 사포닌의 hydroxyl 라디칼 소거 능은 Smirnoff and Cumbes (1989)방법에 따라 FeSO₄와 H₂O₂의 Fenton 반응에 의해 생성된 Hydroxyl 라디칼에 의해 가수분해 되는 정도를 통해 측정되었다. 1.5mM FeSO₄와 6 mM H₂O₂ (3.5 : 5)의 37°C에서 Fenton 반응에 의해 생성된 hydroxyl 라디칼 760 μ L와 농도별 시료 40 μ L를 혼합한 후 37°C에서 약 30분간 반응시켰다. 반응 후 200mM sodium salicylate 200 μ L를 첨가 한 후 UV/Visible spectrophotometer(Berkman, USA)을 이용하여 562nm에서 흡광도를 측정하였다. Positive control로 합성 항산화제인 ascorbic acid를 동일한 방법으로 실험하여 추출물이 가지는 소거능과 비교 하였고 다음 식으로 소거능(%)을 구하였다.

$$\text{소거능(\%)} = \{1 - (\text{추출물 첨가구의 흡광도} / \text{추출물 무 첨가구의 흡광도})\} \times 100$$

(3) Iron-chelating 능

마로부터 추출된 뮤신과 사포닌의 iron-chelating 활성은 Hus(2006) 방법에 의해 측정되었다. 2mM FeCl₂ 60 μ L, 농도별 시료 40 μ L와 증류수 700 μ L를 혼합한 후 상온에서 약 10분간 반응 시켰다. 반응 후 5mM ferrozine을 첨가하여 Fe²⁺-ferrozine complex를 유도하기 위해 상온에서 약 5분간 반응시켰다. 반응 후 UV/Visible spectrophotometer(Berkman, USA)을 이용하여 562nm에

서 흡광도를 측정하였다. Positive control로 iron chelating제인 deferoxamine을 동일한 방법으로 실험하여 추출물이 가지는 chelating 능과 비교 하였고 다음 식으로 chelating 능(%)을 구하였다.

$$\text{chelating 능(\%)} = \{1 - (\text{추출물 첨가구의 흡광도} / \text{추출물 무 첨가구의 흡광도})\} \times 100$$

다. 산화적 DNA 손상 억제활성평가

(1) Ψ X-174 RF I plasmid DNA cleavage assay

마로부터 추출된 뮤신과 조사포닌의 산화적 Ψ X-174 RF I plasmid DNA cleavage 억제활성은 Jung 등(2001)의 방법에 의해 측정하였다. 플라스미드 DNA의 supercoiled 형태가 open-circular와 linear 형태로 변환되는 정도는 산화적 DNA 손상 지표로 사용되어왔다 (Jung and Surh, 2001). 1.5mM FeSO₄와 6mM H₂O₂ (3.5:5)의 37°C에서 Fenton 반응에 의해 생성된 hydroxyl 라디칼 760 μ l와 농도별 시료 40 μ l를 혼합한 후 37°C에서 약 30분간 반응시켰다. 30분 후 반응 혼합물 20 μ L와 Ψ X-174 RF I plasmid DNA 5 μ L를 다시 혼합하여 37°C에서 약 30분간 재 반응 시켰다. 5 μ L 버퍼 (50% glycerol (v/v), 40mM EDTA and 0.05% bromophenol blue)를 첨가하고 1% agarose gel로 전기영동을 실시 한 후 ethidium bromide로 염색하여 UV하에서 사진촬영을 하였다.

(2) Intracellular DNA migration assay

마우스 피부 섬유아세포 인 NIH 3T3 세포 주 (2 \times 10⁶) 을 6 well plate에서 약 24시간 동안 배양하였다. 마 추출물을 농도별로 첨가 30분 후 최종농도가 1mM이 되도록 FeSO₄와 H₂O₂를 첨가한 후 약 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후 intracellular DNA 추출을 위해 세포를 회수하고 lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 0.5% SDS and 0.5mg/mL proteinase K) 20 μ L로 약 55°C에서 60분간 lysis시켰다. Lysis 후 원심 분리하여 세포 debris를 제거하고 RNase 5 μ L 첨가 후 약 55°C에서 60분간 재반응 시켰다. 주입버퍼(50% glycerol (v/v), 40 mM EDTA and 0.05% bromophenol blue) 10 μ L를 첨가한 후 70°C에서 10분간 방치 후 2% agarose 겔로 전기영동을 실시하였다. 전기영동 후 ethidium bromide로 염색하여 UV하에서 사진촬영을 하였다.

라. 산화적 세포 손상 억제활성 평가

(1) MTT assay

마로부터 추출된 뮤신과 조사포닌의 산화적 손상에 의해 야기되는 세포사멸억제활성은 Carmichael 등 (1987)의 방법에 따라 MTT assay를 실시하였다. 마우스 피부 섬유아세포 인 NIH 3T3 세포 주를 96 well plate에 1 \times 10⁴ cells/well이 되게 100 μ L씩 분주하고 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 전 배양에 사용된 배지를 제거하고 배지 100 μ L, 각 추출물 농도별 시료 그리고 최종농도가 1mM에 되도록 FeSO₄와 H₂O₂를 첨가한 후 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후 각 well에 MTT 용액(1mg/mL)을 100 μ L씩 첨가하여 동일한 배양 조건에서 4시간 배양하였다. 배양액을 제거하고 각 well 당 DMSO 100 μ L를 첨가하여 shaking incubator에서 30분간 교반한 후, ELISA reader(Versamax, USA)로 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

(2) Lipid peroxidation assay

마로부터 추출된 뮤신과 조 사포닌의 산화적 지질 산화 억제력은 Kang 등(2008)의 방법에 의해 측정되었다. 마우스 피부 섬유아세포인 NIH 3T3 세포 주를 6 well plate에 2×10^6 cells/well이 되게 1mL씩 분주하고 37°C에서 24 시간 동안 배양하였다. 전 배양에 사용된 배지를 제거하고 배지 2mL, 각 추출물 농도별 시료 그리고 최종농도가 1mM에 되도록 FeSO₄와 H₂O₂를 첨가한 후 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후 차가운 phosphate-buffered saline (PBS)으로 세척 후 세포를 회수하고 차가운 1.15% KCl을 이용하여 동결화하였다. 동결화 후 8.1% sodium dodecylsulfate 0.1mL, 20% acetic acid (pH 3.5) 0.75mL 그리고 0.8% thiobarbituric acid (TBA) 첨가하고 95°C에서 약 2시간 반응시켰다. 반응물을 상온에서 상온화 후 n-butanol/pyridine 혼합물 (15:1, v/v) 2.5mL을 첨가한 후 1000g에서 10분간 원심분리하였다. 상징액을 분획한 후 UV/Visible spectrophotometer(Berkman, USA)을 이용하여 532nm에서 흡광도를 측정하였다.

(3) Western blot

마우스 피부 섬유아세포 인 NIH 3T3 세포 주를 6 well plate에 2×10^6 cells/well이 되게 1mL씩 분주하고 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 전 배양에 사용된 배지를 제거하고 배지 2mL, 각 추출물 농도별 시료 그리고 최종농도가 1mM에 되도록 FeSO₄와 H₂O₂를 첨가한 후 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후 차가운 phosphate-buffered saline (PBS)으로 세척 후 세포를 회수하고 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질을 25μg을 15% Tris-HCl 겔을 이용하여 SDS-PAGE 후 PVDF membrane으로 transfer blot을 하였다. 단백질이 transfer된 PVDF를 blocking 버퍼 (5% non-fatmilk/0.1% Tween 20/1×TBS)로 약 1시간 30분간 blocking 후 0.1% Tween 20/1×TBS로 3회 세척하였다. 세척 후 p21 1차항체가 1:1000비율로 희석된 5% non-fatmilk/0.1% Tween 20/1×TBS를 이용하여 4°C에서 24시간동안 반응시켰다. 반응 후 0.1% Tween 20/1×TBS로 3회 세척하고 2차 항체 anti-rabbit이 1:1000비율로 희석된 5% non-fatmilk/0.1% Tween 20/1×TBS를 이용하여 상온에서 1시간동안 반응시켰다. 반응 후 0.1% Tween 20/1×TBS로 3회 세척 후 detection agent (Amersham Biosciences) 로 membrane을 염색한 후 즉시 polaroid film을 사진촬영을 하였다. p21의 발현에 미치는 마 추출물의 영향은 soft Un-SCAN-IT gel Version 5.1(Silk Scientific. Inc)을 사용하여 측정하였다.

(4) Apoptotic body assay

마우스 피부 섬유아 세포 인 NIH 3T3 세포 주를 cover glass가 들어있는 6 well plate에 2×10^6 cells/well이 되게 1mL씩 분주하고 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 전 배양에 사용된 배지를 제거하고 배지 2mL, 각 추출물 농도별 시료 그리고 최종농도가 1mM에 되도록 FeSO₄와 H₂O₂를 첨가한 후 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 각각 well의 cover glass를 4% paraformaldehyde로 약 20분간 고정한 후 1×PBS로 3회 세척하였다. 세척 후 Hoechst 33342 염색 시약을 최종농도 1μg/mL이 되도록 15분간 처리하였다. 1×PBS로 3회 세척 후 fluorescent microscope로 사진 촬영을 하였다.

마. 항염증 활성 평가

(1) Nitric oxide 측정

RAW 264.7 세포주로부터 생성된 nitric oxide(NO)의 양은 세포 배양액 중에 존재하는 NO_2^- 의 형태로서 Griess 시약을 이용하여 측정하였다. 즉, RAW 264.7 세포를 24-well plate에 $5 \times 10^5/\text{well}$ 이 되도록 분주하고 12시간 배양하였다. 마 추출물을 농도별 처리 30분 후 lipopolysaccharide(LPS) $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도 처리하여 24시간 배양하였다. 24시간 후 세포배양 상등액 $200\mu\text{L}$ 와 Griess 시약[0.1% N-(1-naphthyl)-ethylenediamine, 1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid] $800\mu\text{L}$ 를 혼합하여 10분 동안 상온에서 반응시킨 후 540nm 흡광도를 측정하였다. NO_2^- 의 농도는 sodium nitrate를 희석하여 흡광도를 측정하여 표준곡선을 얻었다.

(2) Western blot을 통한 iNOS 단백질 발현정도 비교분석

RAW264.7 세포를 24-well plate에 $5 \times 10^5/\text{well}$ 이 되도록 분주하고 12시간 배양. 추출물을 농도별 처리 30분 후 lipopolysaccharide(LPS) $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도 처리하여 24시간 배양시켰다. 그 후 차가운 phosphate-buffered saline(PBS)으로 세척 후 세포를 회수하고 단백질을 추출하고, 추출한 단백질 $25\mu\text{g}$ 을 15% Tris-HCl 겔을 이용하여 SDS-PAGE 후 PVDF membrane으로 transfer blot. 단백질이 transfer된 PVDF를 blocking 버퍼(5% non-fatmilk/0.1% Tween 20/1×TBS)로 약 1시간 30분간 blocking 후 0.1% Tween 20/1×TBS로 3회 세척하였다. 세척 후 iNOS 1차 항체가 1:1000비율로 희석된 5% non-fatmilk/0.1% Tween 20/1×TBS를 이용하여 4°C에서 24시간동안 반응시키고, 반응 후 0.1% Tween 20/1×TBS로 3회 세척하고 2차항체 anti-rabbit이 1:1000비율로 희석된 5% non-fatmilk/0.1% Tween 20/1×TBS를 이용하여 상온에서 1시간동안 반응시켰다. 반응 후 0.1% Tween 20/1×TBS로 3회 세척 후 detection agent(Amersham Biosciences)로 membrane을 염색한 후 즉시 Polaroid film을 사진촬영을 하였다. 단백질의 발현에 미치는 추출물의 영향은 soft Un-SCAN-IT gel Version 5.1(Silk Scientific, Inc)을 사용하여 측정하였다.

(3) Western blot을 통한 전사조절인자인 NF- κ B의 activation 억제력 비교

RAW264.7 세포를 24-well plate에 $5 \times 10^5/\text{well}$ 이 되도록 분주하고 12시간 배양시켰다. 추출물을 농도별 처리 후 lipopolysaccharide(LPS) $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도 처리하여 30분간 배양시켰다. 그 후 차가운 phosphate-buffered saline(PBS)으로 세척 후 세포를 회수하고 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질 $25\mu\text{g}$ 을 15% Tris-HCl 겔을 이용하여 SDS-PAGE 후 PVDF membrane으로 transfer blot하고 단백질이 transfer된 PVDF를 blocking 버퍼(5% non-fat milk/0.1% Tween 20/1×TBS)로 약 1시간 30분간 blocking 후 0.1% Tween 20/1×TBS로 3회 세척하였다. 세척 후 ikBa, phospho-ikBa 1차항체가 1:1000비율로 희석된 5% non-fatmilk/0.1% Tween 20/1×TBS를 이용하여 4°C에서 24시간동안 반응시켰다. 반응 후 0.1% Tween 20/1×TBS로 3회 세척하고 2차 항체 anti-rabbit이 1:1000비율로 희석된 5% non-fatmilk/0.1% Tween 20/1×TBS를 이용하여 상온에서 1시간동안 반응시켰다. 반응 후 0.1% Tween 20/1×TBS로 3회 세척 후 detection agent(Amersham Biosciences)로 membrane을 염색한 후 즉시 polaroid film을 촬영하였다. 단백질의 발현에 미치는 추출물의 영향은 soft Un-SCAN-IT gel Version

5.1(Silk Scientific, Inc)을 사용하여 측정하였다.

(4) 실험동물 및 식이

실험동물은 체중 $100 \pm 15\text{g}$ 의 Sprague-Dawley (SD)계 수컷 흰쥐로서 사육기간 중 일정한 조건(온도 $21.4 \pm 0.05^\circ\text{C}$, 습도 $61 \pm 1\%$, 명암은 12 시간 주기)에서 1 주간 (주)중앙실험동물에서 구입한 Dyets사 사료로 순치시킨 후 사육하였다. 순치 후 난괴법(randomized complete block design)으로 8마리씩 한 군으로 자연치유군, 위궤양 유도 후 뮤신 처리군과 조 사포닌 처리군의 3군으로 분류하여 실험하였다. 식이와 식수는 자유 섭취시켰으며 실험기간 동안 식이 섭취량과 체중은 일정한 시간에 매일 측정하였다. 모든 동물실험 과정은 NIH (National Institutes of Health)의 실험동물관리 규정(Principle of Laboratory Animal Care)과 안동대학교의 실험동물 관리와 사용 지침의 규정에 따라 수행하였다.

(5) 위궤양 유도

체중 $130 \pm 23\text{g}$ 의 수컷 흰쥐 8 마리를 1 군으로 하여 24 시간 절식시킨 후 EtOH-HCl (70% ethanol에 0.5N HCl을 함유)을 흰쥐의 전체 체중 1%를 경구 투여하였다. 1 시간 후 다시 체중의 1%의 mucin과 saponin을 경구 투여 하였으며, 절식 · 절수 하에서 1 시간 동안 방치 후 실험하였다.

(6) 위 병변의 조직학적 검사

대만부를 따라 위를 절개한 후 생리식염수로 내용물을 씻어내고, 코르크판에 고정시킨 후 실체현미경으로 10배 확대하여 위 조직을 관찰하였다. 조직학적 지표로 위의 출혈, 울혈 및 괴사 정도를 관찰한 후 위 조직 사진을 촬영하였다.

(7) 광학 현미경적 관찰

조직을 절취하여 FAA로 24 시간 고정 후 수세, 탈수 과정을 거친 후 일반적인 조직 제작 방법에 따라 조직을 paraffin 포매 하였다. 이 후 paraffin block을 두께 $4 \sim 6\mu\text{m}$ 로 제작하여 hematoxylin과 eosin에 이중염색한 후, 광학현미경(Olympus BX50, Japan)하에서 관찰하였으며 사진 촬영은 Olympus DP-71을 사용하였다.

3. 연구결과

가. 마로부터 추출된 mucin과 saponin의 항산화 활성 평가

생체 내 산소가 유입되어 세포 내에서 이용될 때, superoxide anion radical ($\cdot\text{O}_2$), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$), single oxygen ($^1\text{O}_2$), 그리고 지질의 free radical 즉, alkoxy radical($\text{RO}\cdot$), alkoxy peroxy radical ($\text{ROO}\cdot$)과 같은 활성산소종이 부산물로 생성 된다(Singh, 1989). 이러한 활성산소 종은 많은 질환을 초래하기 때문에 활성 종에 의해 유발된 질환을 예방할 뿐만 아니라, 그 발암성과 독성이 문제시되고 있는 합성 항산화제를 대체하기 위해, 천연물로부터 강력하면서도 독성이 없는 천연 항산화제를 찾아내는 것이 절

실히 요구 된다(Moure et al., 2001). 그 중에서도 특히 식물로부터 매우 효력 있고 안전하며 경제적인 항산화제의 발견을 위한 연구가 끊임없이 계속되고 있다(Choi et al., 2002).

DPPH가 추출물 내 항산화물질에 의해 전자나 수소를 받아 불가역적으로 안정한 분자를 형성하여 환원되어짐에 따라 짙은 자색이 탈색되어지는 원리를 이용하여 측정된 마로부터 추출된 mucin과 saponin의 DPPH 소거능은 오직 saponin에서 그 활성을 나타내었다(Fig. 3).

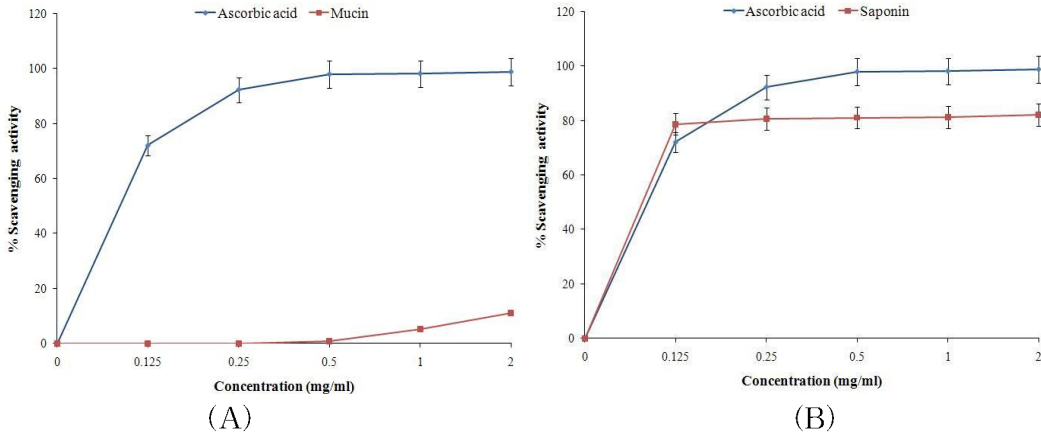


Fig. 3. DPPH free radical scavenging activity of mucin (A) and saponin(B) from *Dioscorea batatas*. The absorbance values were converted to scavenging effects (%) and data plotted as the means of replicate scavenging effect (%). Bars indicate mean±S.D. (n=3).

활성산소 중 중, hydroxyl radical은 가장 반응성이 강하고 생체분자들에 심각한 손상을 초래하기 때문에 hydroxyl radical의 소거 능은 항산화제의 중요한 조건이라 여겨지고 있다 (Sakanaka et al., 2005; Stohs and Bagchi, 1995). 마로부터 추출된 뮤신 추출물과 조 사포닌 추출물에서 뮤신 추출물에서만 hydroxyl radical 소거능이 존재하였다. 뮤신 추출물은 hydroxyl radical을 0.125 mg/mL 농도에서 약 12%, 0.25mg/mL농도에서 15%, 0.5mg/mL농도에서 약 32%, 1 mg/mL농도에서 약 56% 그리고 2 mg/mL농도에서 약 64% 정도 제거하였다(Fig. 4).

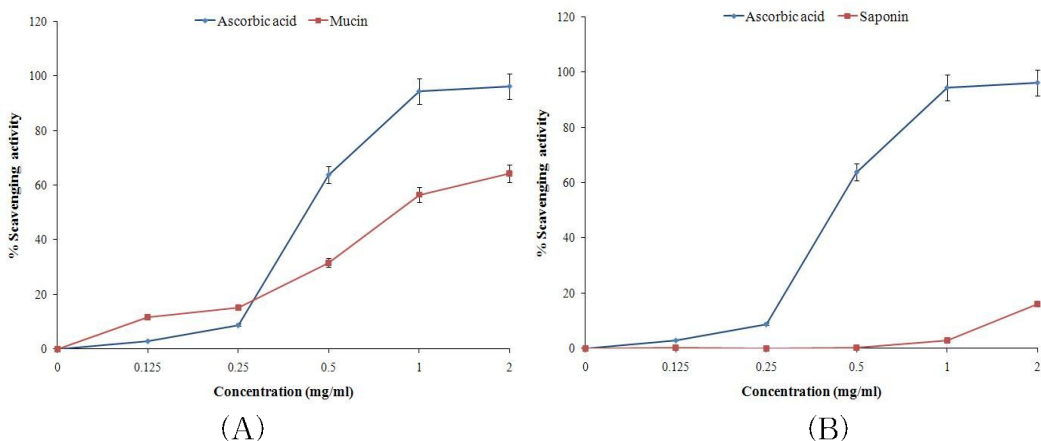


Fig. 4. Hydroxyl radical scavenging activity of the from *Dioscorea batatas*. Hydroxyl radical was generated from Fenton reaction between H_2O_2 and $FeSO_4$. The absorbance values were converted to scavenging effects (%) and data plotted as the means of replicate scavenging effect (%). Bars indicate mean±S.D. (n=3).

철은 호흡, 산소의 수송 그리고 여러 효소의 꼭 필요한 성분이다. 그러나 철은 원자의 최외각 껍질에서 불안전양이온을 만드는 전이 금속으로 극도로 반응성이 높아 생체내에서 Fenton 반응($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} \text{OH}^- + \text{OH}\cdot$)을 통해 세포의 지질 및 단백질의 산화를 초래하고 식품의 가공 및 저장 중에는 지방질의 산화를 촉매한다(Decker et al., 1992). 따라서 Fe^{2+} 이온의 chelating 능력은 항산화제의 중요한 조건 중 하나로 여겨진다. 현재 미국에서 유일하게 효과가 검증되고, 상용화되어 있는 iron chelating agent는 deferoxamine이나 이것은 경구로 흡수가 안되며, plasma에서 빨리 대사 된다는 점은 이 약의 사용에 치명적 단점으로 여겨진다(Emara et al., 2006). 마로부터 추출된 뮤신 추출물과 조 사포닌 추출물 중 뮤신 추출물에서만 Fe^{2+} chelating 활성이 존재하였다. 뮤신추출물은 Fe^{2+} 이온을 0.125mg/mL농도에서 약 14%, 0.25mg/mL농도에서 약 19.1%, 0.5mg/mL농도에서 약 74% 그리고 1mg/mL과 2mg/mL농도에서 약 98%정도 chelation시켰다.

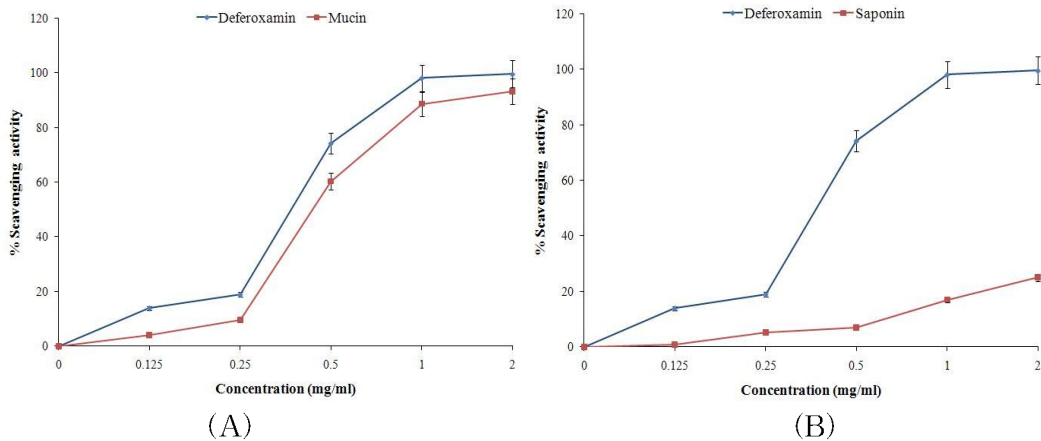


Fig. 5. Fe^{2+} chelating activity of the extracts from *Dioscorea batatas*. Fe^{2+} ion was generated from FeCl_2 . The absorbance values were converted to scavenging effects (%) and data plotted as the means of replicate scavenging effect (%). Bars indicate mean \pm S.D. (n=3).

나. 마로부터 추출된 뮤신의 산화적 DNA 손상 억제활성 평가

대사과정 중에 생성된 반응성 산소종을 비롯한 다양한 산화물들은 DNA 손상을 유도함이 증명되어 왔다 (Fairbairn et al., 1995). 즉 노화, 흡연, 환경오염, 만성 감염 등의 요인에 노출되면 신체 내에서 광범위한 해로운 활성을 가진 반응성 산소종(reactive Oxygen species)의 생산이 비정상적으로 높아진다. 증가한 반응성 산소종 농도가 황산화계의 방어한계를 넘어서면 산화적 스트레스가 일어나고 그 결과로 암 발생을 유발시키게 된다 (Ames et al., 1993; Pryor & Stone, 1993).

암은 유전적인 요인과 환경적인 요인이 복합적으로 작용하여 진행되는 다단계 과정이다. 정상세포에서 암 조직으로 발달 되는 데는 크게 개시(initiation), 촉진(promotion), 진행(progression)의 세 단계를 거쳐 발생하는 것으로 알려져 있으며, 발암의 initiation은 전자 친화성 발암인자(initiator)가 생체 내에서 대사적으로 활성화되어 유전자의 핵산에 비가역적으로 결

합함으로써 정상세포의 DNA를 손상시켜 신생물 전구세포(preneoplastic cell)를 형성하는 돌연변이 현상으로 설명된다. 암의 initiation 단계에서 발생하는 DNA 손상은 암 발생과 83% 이상의 높은 상관성을 나타내므로 initiation 단계에서의 DNA 손상 억제는 항암활성에 있어서 중요한 역할을 한다(Surh, 1999; Johnson et al., 1994). 마로부터 추출한 성분 중 산화적 DNA 손상 억제활성은 hydroxyl radical 소거능 및 Fe²⁺ chelating 활성이 존재하는 뮤신을 이용하여 평가하였다. 산화적 DNA 손상 억제 활성은 ΨX-174 RF I plasmid DNA cleavage assay를 이용한 비 세포 적 시스템 및 intracellular DNA migration assay와 phospho-H2AX 단백질 발현여부를 통한 세포 적 시스템으로 평가되었다. 정상적인 plasmid DNA는 supercoiled form (SC, untreated group) 형태로 존재하나 추출물 처리 없이 H₂O₂와 iron의 Fenton 반응에 의해 생성된 hydroxyl radical 또는 iron 존재 하에서는 산화적 손상을 받아 open-circular form (OC)형태로 전환된다. 그러나 hydroxyl radical 존재 뮤신 추출물의 처리는 0.25mg/mL 농도에서 약 26%, 0.5mg/mL 농도에서 약 78%, 1mg/mL 농도에서 79%, 2mg/mL 농도에서 약 95%정도 hydroxyl radical에 의한 산화적 DNA 손상을 억제하였다. 반면, iron 존재 하 작약 추출물의 처리는 1mg/mL 농도에서 65%, 2mg/mL 농도에서 약 85% 이상의 산화적 DNA 손상에 대한 높은 억제력을 보였다 (Fig. 6).

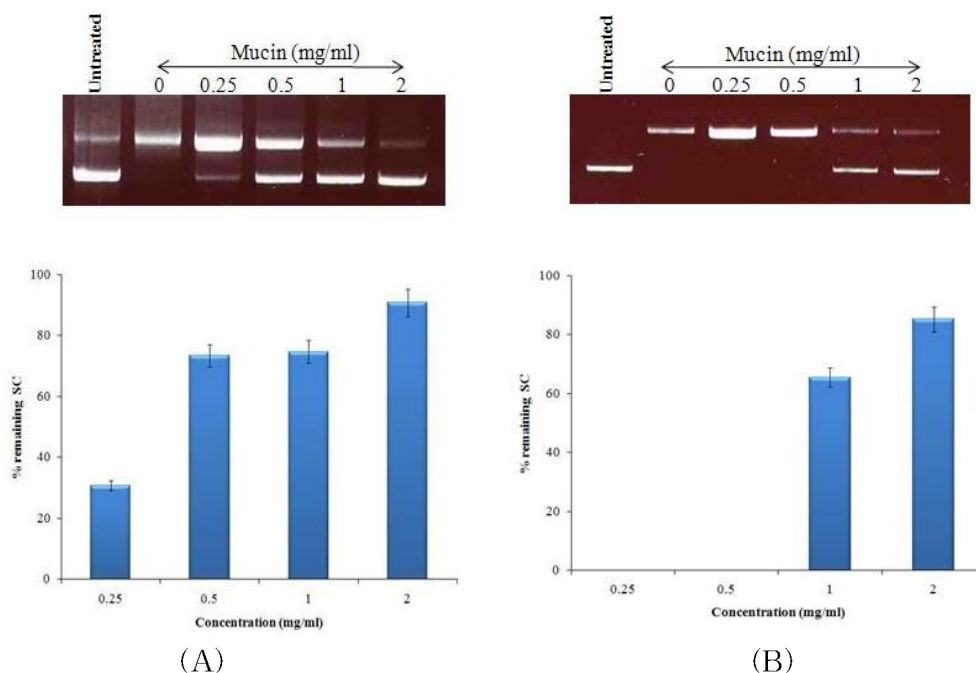


Fig. 6. Protective effect of the Mucin from *Dioscorea batatas* against oxidative DNA damage in presence of hydroxyl radical (A) or iron (B). Hydroxyl radical was generated from Fenton reaction between H₂O₂ and FeSO₄. Iron was generated from FeCl₂.

뮤신 추출물의 산화적 DNA 손상 억제력을 intracellular DNA migration assay와 phospho-H2AX 단백질 발현여부를 통해 세포적 시스템에서 평가하였다. DNA migration 현상은 DNA single strand의 손상 그리고 phospho-H2AX 단백질의 발현은 DNA double strand 손상의 지표로 사용된다(Kang et al., 2008). H₂O₂와 FeSO₄ 존재 하 뮤신 추출물의 처리는 산화적 손상에 따른 DNA migration을 억제하였고(Fig. 7A), DNA 손상 시 발현되는 phospho-H2AX 단백질의 발현정도가 0.25mg/mL 농도에서 23%, 0.5mg/mL 농도에서 약 60%,

1mg/mL농도에서 75% 그리고 2mg/mL 농도에서 91% 감소한 것으로 보아 뮤신 추출물이 산화적 DNA 손상을 억제한 것으로 사료된다(Fig. 7B). 이러한 결과는 phospho-H2AX의 foci 형성을 형광 현미경을 통한 면역 염색한 세포를 통해 확인하였다. 마 추출물 처리 없이 H₂O₂와 FeSO₄ 존재 하 phospho-H2AX의 foci의 형성이 확인되었으나 마 추출물의 처리는 phospho-H2AX의 foci의 형성을 감소시켰다(Fig. 7C).

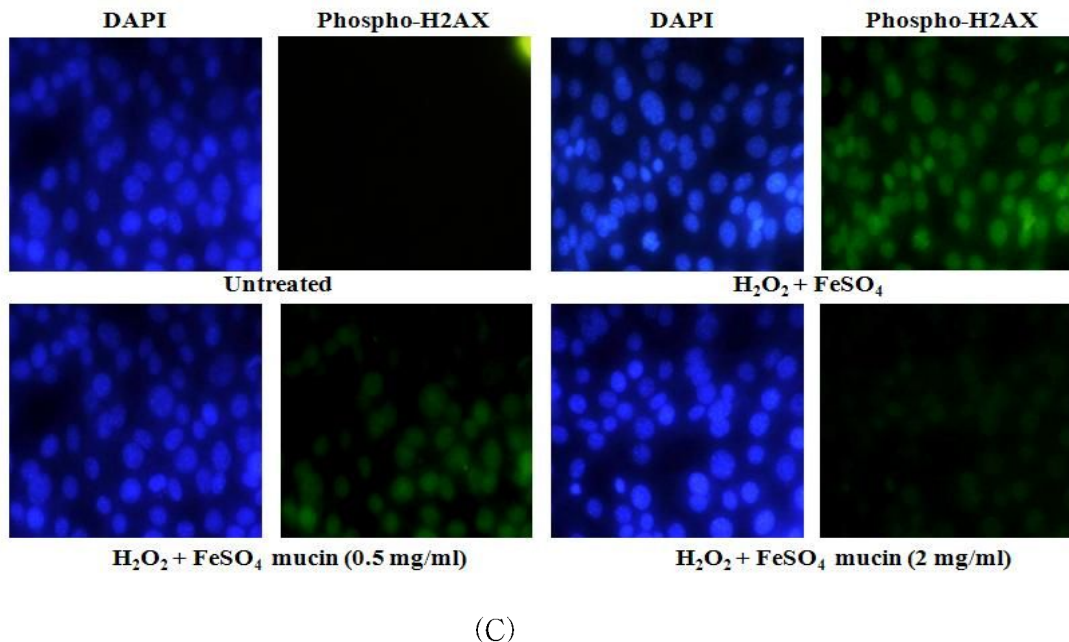
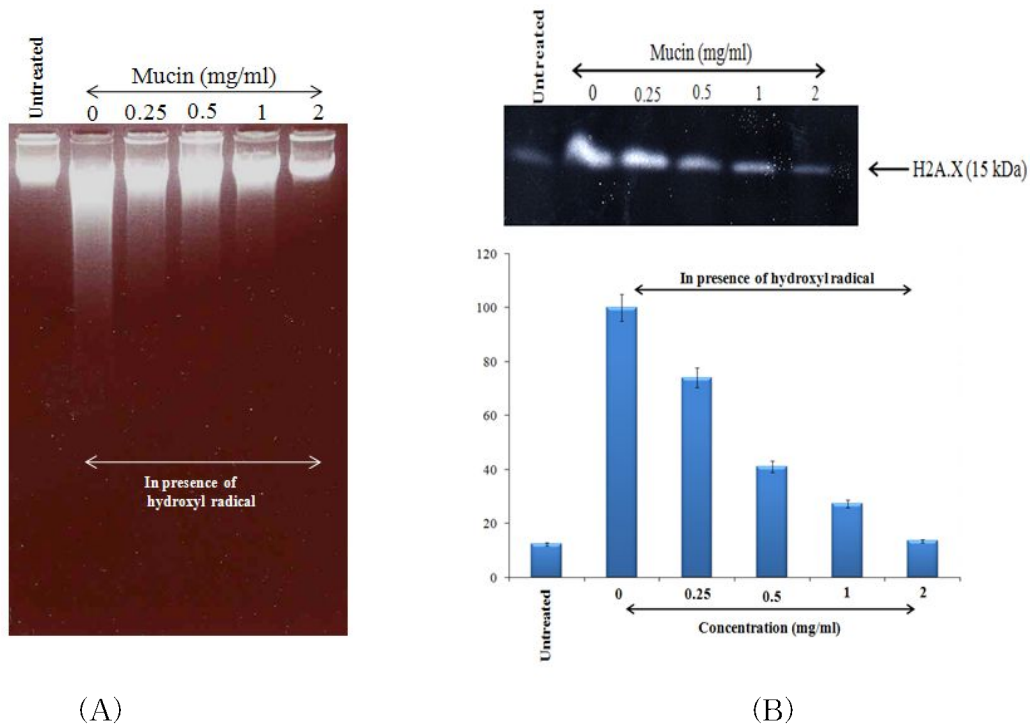


Fig. 7. Protective effect of the Mucin from *Dioscorea batatas* against oxidative DNA damage in the cellular system. The protective effect was evaluated by intracellular DNA migration assay (A), western blot for the level of phospho-H2AX expression (B) and immuno-staining for the formation of phospho-H2AX foci (C).

다. 마로부터 추출된 뮤신의 산화적 세포 손상 억제활성 평가

활성산소는 세포 내 여러 구성성분인 지질, 단백질, 핵산 그리고 DNA를 산화시켜 염증을 유발하고 세포내 여러 조직을 손상시켜 세포의 파괴를 유발한다. 특히 생체막이나 지단백질로 존재하는 지질은 체내에서 발생하는 활성산소의 공격을 받아 여러 종류의 과산화물을 형성하는데, 이 과산화물들과 분해산물들은 반응성이 좋아 주변의 생체분자들의 구조와 기능을 변화시켜 여러 가지 만성질환을 초래하게 되는 것으로 알려져 있다. 이것을 과산화 지질이라 하는데 인체에 대단히 치명적이다. 이는 유전자 구조나 변이를 촉진하며 단백질 손상을 초래함으로써 심혈관계의 성인병을 유발하여 노화를 촉진할 뿐 아니라 암 등의 악성 신생질환을 유발하고 폐기종, 백내장 등의 질환을 유발 한다(Dreher and Junod, 1996; Griffiths and Lunec, 1996). 특히 지질산화 시 유발되는 산물인 malondialdehyde는 DNA 손상을 유발시키기 때문에 종양개시인자로 여겨진다(Vaca et al., 1988, Esterbauer, 1982). 뮤신 추출물의 Hydroxyl radical에 의해 야기되는 세포 손상억제활성은 lipid peroxidation assay를 통해 평가되었다. Hydroxyl radical에 의해 세포의 주요한 손상은 세포막 손상이다. Lipid peroxidation는 주로 동물세포의 세포막 손상의 지표로 사용된다. 뮤신 추출물은 0.5mg/mL에서 56.1%, 1mg/mL에서 76%, 그리고 2mg/mL에서 85%정도 세포 내 지질산화를 억제하였다(Fig. 8B).

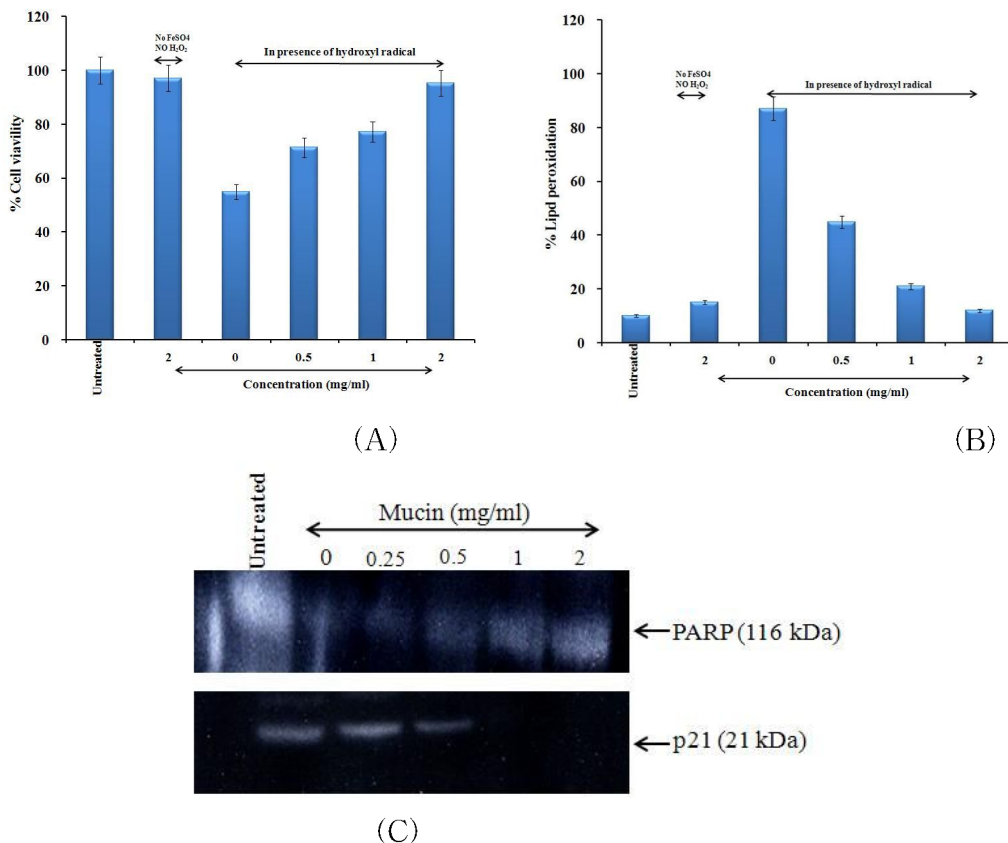


Fig. 8. Protective effect of the Mucin from *Dioscorea batatas* against oxidative cell damage. This protective effect was evaluated by MTT assay (A), lipid peroxidation assay (B), western blot for the level of PARP, p21 protein expression (C).

또한, 마로부터 추출된뮤신의 산화적 세포파괴에 의한 세포 사멸 억제 영향을 세포주기조절에

관여하는 종양억제단백질인 p21 단백질 발현여부로 평가한 결과(Fig. 8C), 추출물 처리 없이 FeSO₄와 H₂O₂ 존재 하 p21 단백질의 발현이 높은 것으로 보아 산화적 세포사멸이 유도되었다고 사료된다. 반면 뮤신 추출물의 처리는 0.25mg/mL에서 약 11%, 0.5mg/mL 농도에서 약 46%, 1mg/mL에서 약 87% 그리고 2mg/mL에서 약 93%정도 p21 단백질의 발현이 감소한 것으로 보아 산화적 세포사멸이 억제되었음을 알 수 있다.

Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)는 DNA손상과 복구기능을 갖는 복합요소로 면역반응을 조절한다. Caspase-3가 활성화되어 단백질 분절이 일어나면 PARP 또한 분절되어 apoptosis가 진행된다. 따라서 PARP 분절 정도와 apoptosis 진행이 정비례한다. Mucin처리 없이 FeSO₄와 H₂O₂ 존재 하 PARP 단백질의 발현이 줄어들었으나 mucin의 처리구에서는 농도별 PARP의 발현이 높아졌다.

라. 마로부터 추출된 뮤신과 조 사포닌의 항염증 활성 평가

염증반응은 세균이나 외부 이물질의 침입에 대한 생체조직의 국소적 방어 반응으로 일어나며 동시에 염증성 세포와 방어기작으로 대식세포가 활성화된다. 외부자극에 의하여 활성화된 대식세포는 여러 신호 경로를 통하여 염증 매개 효소 (iNOS, COX-2), 사이토카인 (TNF- α , IL-1 β , IL-6), 히스타민, PGE₂, 보체 및 chemokine 등을 생성한다. 일반적으로 정상적인 상태에서 소량 생성되는 NO, PGE₂, TNF- α , IL-1 β 와 IL-6는 정상적인 생리 기능 조절에 관여하지만 자극에 의하여 과량 생성되면 당뇨병, 동맥경화, 알츠하이머, 질환, 백내장, 재관류 상해, 암 그리고 뇌수막염 및 류마티스성 발열과 같은 감염 후 질환, 침투성 흥반성 낭창 및 류마티스 관절염 등 류마티스 질환과 같은 다양한 염증성 질병을 초래한다(Mariette, 2006; Jang et al., 2005). 현존하는 항 염증제는 주로 비 스테로이드성으로 이러한 항염증제는 위장관계의 소화성 궤양출혈로 인한 이차적 빈혈 초래, 혈소판 기능 억제, 분만 유도 억제, 신장에 대한 부작용, 간장 손상 또는 과민반응과 같은 부작용을 초래하기 때문에(Bremner and Heinrich, 2002) 부작용이 없는 천연 항 염증제의 개발이 시급한 실정이다.

마로부터 추출된 뮤신과 조 사포닌의 항염증 활성은 nitric oxide (NO)와 iNOS 단백질 생성 정도를 통해 평가되었다. NO는 피부손상 및 노화의 주요원인이 되며 매우 불안정한 화합물로서 lipopolysccaride (LPS)와 같은 염증유발물질에 의한 NO 생성효소인 iNOS의 활성화를 통해 생성된다. RAW 264.7 cells은 LPS 자극에 의하여 염증신호가 전달되면 다량의 NO를 생성하며, 생성된 NO는 배지로 방출된다. 활성화된 RAW 264.7 cell을 배양하여 마로부터 추출된 mucin과 saponin의 NO 생성 억제정도를 규명하기 위해 마 추출물을 농도별로 24시간 처리하여 배양 상층액 내의 NO 생성량을 측정하였다(Fig. 9). 마 추출물중 조 사포닌은 효과적으로 NO 생성을 억제시키는 것이 관찰되었는데, 자극 하지 않은 안정 상태의 RAW 264.7 cells에서는 2.5 μ M의 NO가 생성되었으며, LPS로 자극된 RAW 264.7 cells은 약 16배 이상 증가한 40 μ M의 NO가 생성되었다. 그러나 LPS 존재 하 mucin의 처리는 NO 생성량이 농도별로 감소하지 않는 것으로 보아 NO 생성의 억제효과가 없다고 사료된다. 한편, iNOS의 단백질은 세포만 배양하였을 때와 saponin 처리하였을 때는 발현되지 않았으며, LPS 처리 후 발현이 증가되었다(Fig. 9C). 하지만 LPS에 의해 유도된 iNOS 단백질의 발현은 saponin 처리를 하였을 때 농도에 따라 점차적으로 억제되는 것으로 나타났다.

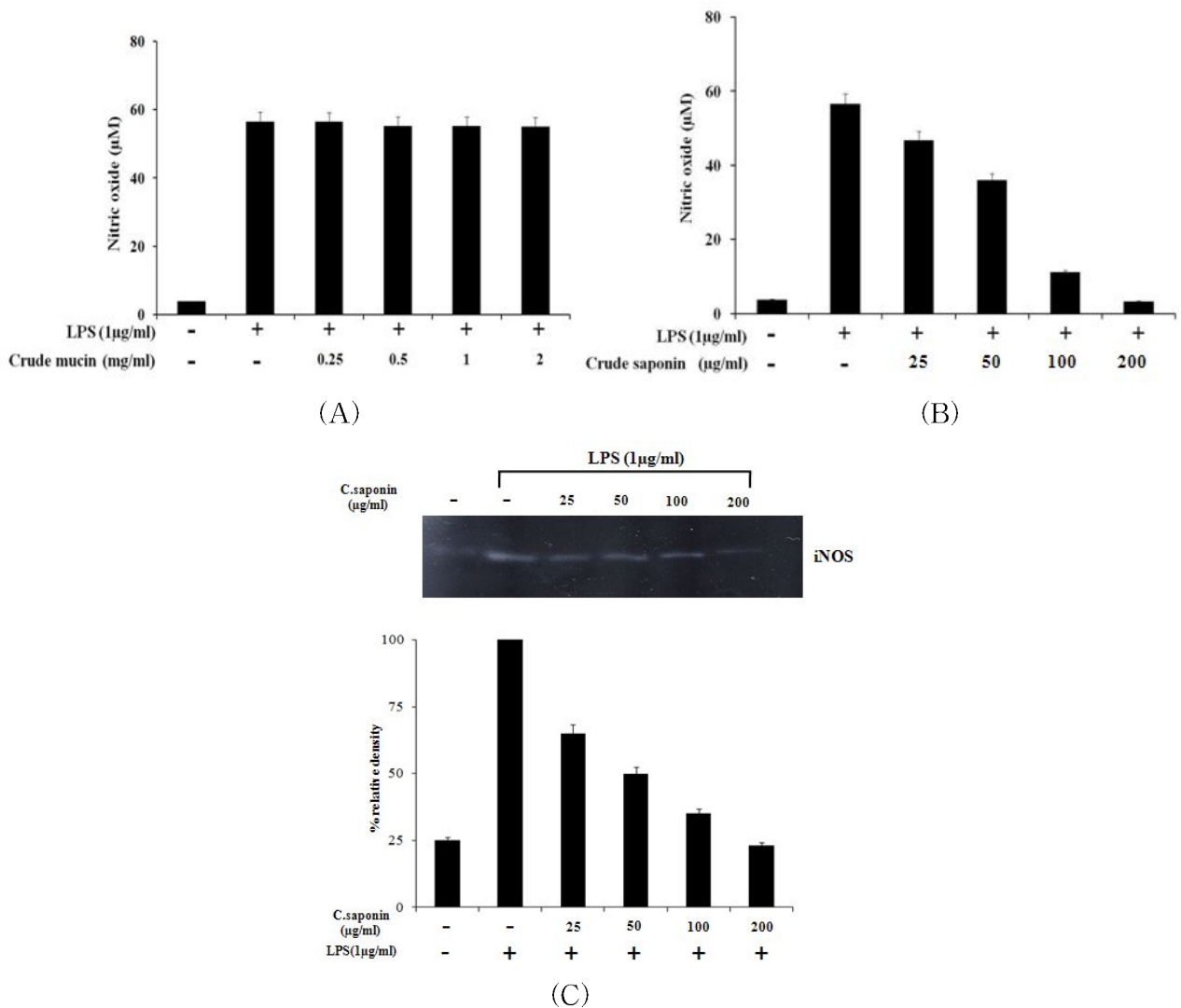


Fig. 9. Inhibitory effect of the mucin and saponin from *Dioscorea batatas* on NO generation (A-B), western blot for the level of iNOS expression in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. The cells for NO and western blot of iNOS were collected at 24 hours after LPS treatment. In western blot, each well was loaded with 25 µg protein. % relative density of expressed iNOS bands in western blot was calculated by the density using the software Un-SCAN-IT gel Version 5.1 (Silk Scientific, Inc.).

산화적 스트레스의 증가는 iNOS와 COX-2를 포함한 많은 유전자의 조절단백질 중의 하나인 NF-κB를 활성화시켜 면역 반응과 염증 반응을 유도한다(Xie et al., 1994). NF-κB는 p50 subunit family(p50, p52)와 p65 subunit family(p65, c-Rel, RelB)의 동종 이합체 (homodimer) 또는 다종 이합체(heterodimer)로 구성되며, 보통 상태에서는 세포질에서 그 억제제 (inhibitor) 인 IκB 단백질(IκBa, IκBβ, IκBγ, IκBε, Bcl3)들과 결합하고 있어 비활성화 된 상태로 세포질에 존재한다. 그러나 cytokine(TNF-α, IL-1), 세균/바이러스 감염(LPS, dsRNA), 스트레스 (ROI, UV, adriamycin, 방사선) 등의 다양한 자극에 의해 IκB 단백질이 인산화되어 분해됨으로서 유리된 NF-κB는 핵으로 들어가 표적 유전자의 NF-κB 결합부위에 결합하여 염증관련 유전자, anti-apoptosis 유전자 등의 발현을 유도한다(Baeuerle and Baltimore, 1996). IκB 단백

질의 인산화는 IκB 활성화소로 알려진 IKK(IKKα, β)가 다양한 자극에 의해 활성화되어 IκB 단백질의 세린잔기(serine residue)를 인산화시키고, 인산화된 IκB 단백질은 26S proteasome에 의해서 분해된다. 전사인자 NF-κB는 TNF-α, IL-1β 등의 proinflammatory cytokine과 LPS 등에 의해 활성화가 유도되어 염증 효소 iNOS와 COX-2 등의 발현을 증가시켜 염증 반응을 가속화함으로써 조직손상을 유도한다(Andrea et al., 2000). 따라서 NF-κB 신호전달의 효과적인 억제제는 염증 및 암 예방에 있어 중요한 역할을 한다.

LPS에 의해 야기되는 대식세포 RAW264.7 세포주의 IκBa 인산화에 의한 IκBa의 감소에 대한 조 사포닌의 억제영향을 평가한 결과(Fig. 10), LPS는 처리 IκBa의 과도한 인산화를 유도해 IκBa를 감소시켰다. 그러나 조 사포닌 분획물의 처리는 IκBa의 과도한 인산화를 억제해 IκBa의 감소를 억제하였다.

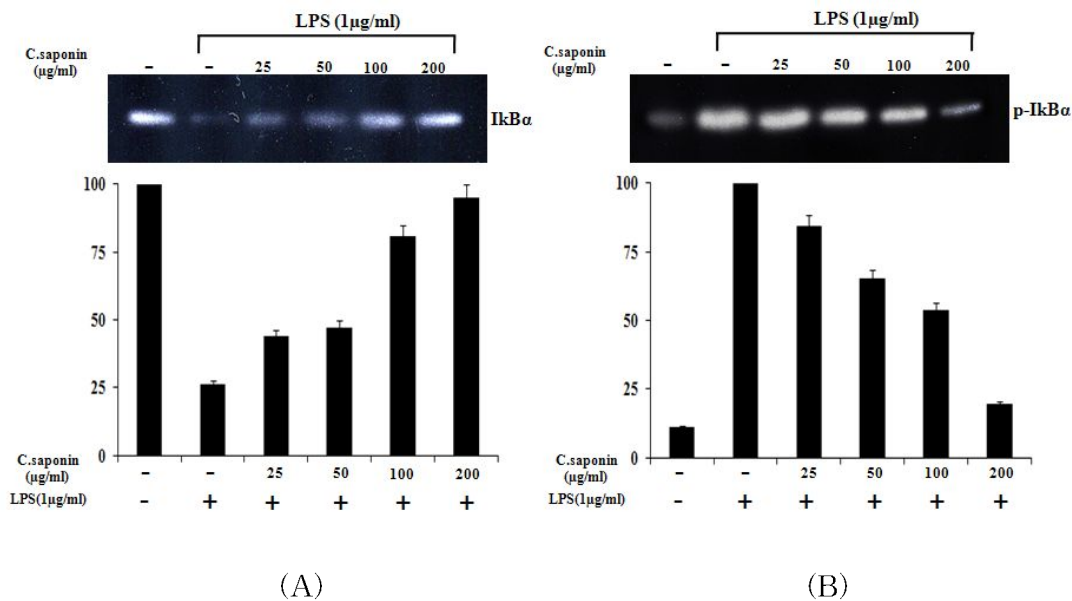


Fig. 10. Effect of extracts from Crude saponin from *Dioscorea japonica* Thunb on LPS-induced NF-κB activation. Western blot analysis of IκBa (A) and phospho-IκBa (B) in cytosol. Cells were pre-treated with C.saponin or 1 hour and then 1 μg/mL of LPS was treated for 30 min. Cells were harvested and resuspended with lysis buffer. In SDS-PAGE/Western blot analysis, 50 μg protein was separated with 15% reducing sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel. Relative ratio in western blot was calculated by the density using the software Un-SCAN-IT gel Version 5.1 (Silk Scientific, Inc.).

마. 마로부터 추출된 뮤신과 조 사포닌의 위궤양 보호효과

위궤양(gastric ulcer)은 위산과 펩신의 작용으로 상부 소화관이 손상을 받아 발생한 결손이 위점막근층 이하까지 침범한 상태를 말하는 것으로 이러한 위궤양은 세계적으로 발생빈도가 높은 질환 중 하나이다(Lim, 2006). 위궤양은 한 가지 원인에 의해 발생하는 것이 아닌 스트레스 또는 술이나 담배, 약 등 여러 가지 인자들이 복합적으로 작용한다. 이러한 궤양의 발병 원인 중의 하나인 알코올은 소화성 궤양, 지방간, 만성질환의 위험, 알코올 중독 등 건강상의 문제를 야기하는데, 소화성 궤양의 경우 알코올의 과다 섭취가 이의 원인이 되기도 한다(Bayyurt

et al., 2007; Garrido *et al.*, 2007). 또한 궤양은 상복부에 동통, 흉통, 위산과다, 위장관 출혈, 경련, 압박감 등을 호소하며 가끔 오심, 구토, 식욕부진, 체중감소 등을 초래하기도 한다(Ruth, 1998). 위궤양의 치료를 위해서는 현재 제산제 및 위산 분비 억제제가 주 치료 약물로서 사용되고 있으나 이런 약물들은 장기적으로 복용할 경우 약물의 용량과 관련하여 부작용과 독성 그리고 내성이 생겨 문제가 발생하고 있다(Oh *et al.*, 1996). 따라서 본 연구에서는 EtOH-HCl에 의한 급성 위궤양 유도는 에탄올이 위점막을 직접적으로 자극하여 점막하근층의 부종 유발 및 국소적 부위에 일시적인 허혈 상태를 발생시킨 후 마로부터 추출된 뮤신과 조사포닌을 처리한 결과 (Fig. 11), EtOH-HCl에 의한 위 조직의 손상은 위궤양 유도 직후 매우 심각한 위점막의 손상을 야기하지만 뮤신과 조사포닌의 처리에서는 뮤신은 위점막의 손상억제를 보이지 못한 반면 조사포닌은 위점막의 손상을 억제하였다.

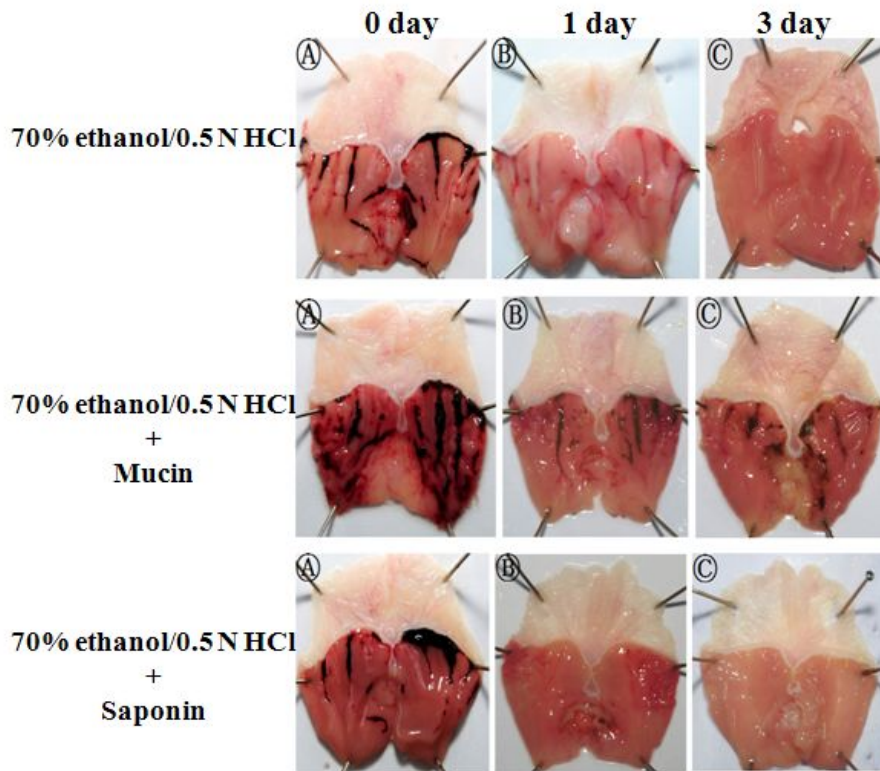


Fig. 11. Protective effect of musin and saponin from *Dioscoreae* rhizoma against gastric ulcer induced by 70% ethanol/0.5 N HCl. Mucin and saponin were orally administrated at 1 hour before the treatment of 70% ethanol/0.5 N HCl.

위 조직의 조직학적 관찰 결과(Fig. 12), EtOH-HCl에 처리구는 점막층이 매우 심한 괴사 및 출혈이 있었으며 점막하층의 국소성 괴사가 관찰되어 알코올에 의한 위 조직 손상은 심각하였다. 하지만 조사포닌 처리구는 위궤양 유도 후 시간이 경과함에 따라 조직적 손상이 빠르게 회복되어 과다 출혈 및 괴사가 나타나지 않으므로 위장 보호 효과가 높게 나타난 반면 뮤신은 위장보호 효과가 없었다. 따라서 조사포닌은 알코올로 유도된 위궤양 모델에서 항염증 작용 규명을 통

한 위장기능 손상의 보호 및 치유효과를 분석하여 고 부가가치의 기능성 식품 및 소화기 질환의 의학소재로서의 이용 가능성이 높다고 사료된다.

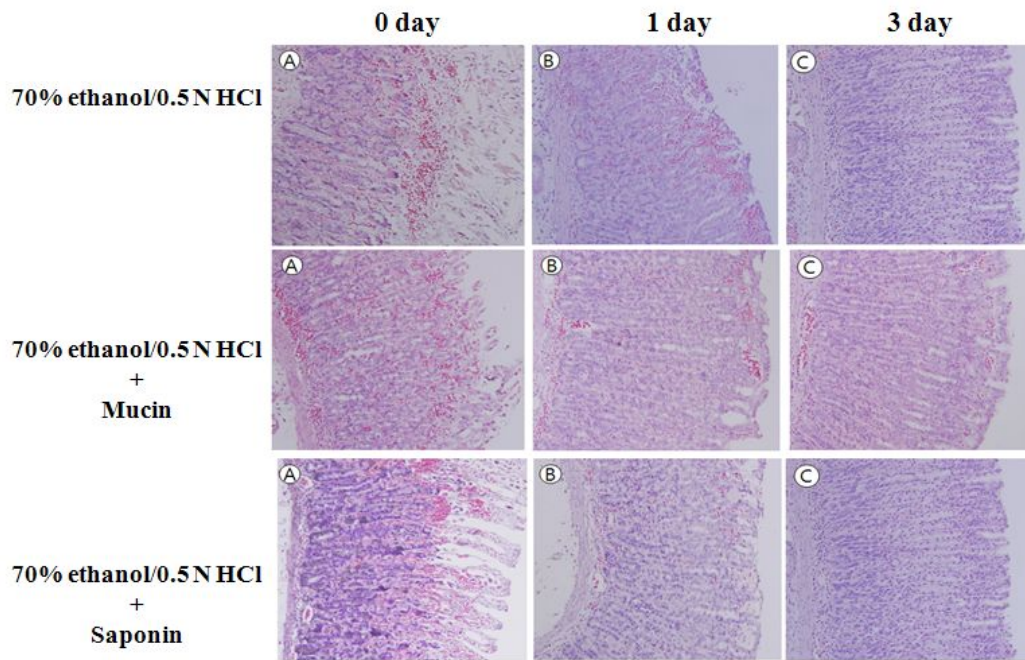


Fig. 12. Protective effect of musin and saponin from *Dioscoreae* rhizoma against gastric ulcer induced by 70% ethanol/0.5 N HCl. Musin and saponin were orally administrated at 1 hour before the treatment of 70% ethanol/0.5 N HCl.

제 5절 마 추출물의 골 형성 촉진기능 검증

1. 서언

현재 노화에 따른 골다공증 치료 및 예방에 대한 신소재 개발에 대한 수요는 매우 높은 편이며, 기존의 약물요법에서 천연재료를 이용한 자연식 예방 및 치료에 대한 관심은 매우 높은 편이다. 골 조직은 연골과 골격계를 구성하며 기계적 기능으로 지지와 근 부착의 역할을 하고, 생체기관 및 골수를 보호하는 기능을 하며, 칼슘과 인 이온의 항상성 유지를 위해 이들을 보존하는 기능을 담당한다. 이러한 골 조직은 교원질, 당단백질과 같은 세포 기질과 조골세포, 파골세포 및 골세포 등 여러 종류의 세포들로 이루어진다. 골수 내 간질세포 (bone marrow stromal cell)로부터 유래한 조골세포는 골 형성에 주된 역할을 담당하며, 조혈모세포로부터 유래 되는 파골 세포는 파괴된 노화된 골의 흡수를 담당하여, 조골세포와 파골세포의 균형 있는 작용을 하여 골의 재형성(remodeling)을 유지하게 된다.

골 대사성 질환은 생체 내에서 파골 세포와 조골세포와의 평형이 깨짐으로써 발생한다. 골 대사성 질환의 예로써 골다공증을 들 수 있는데 골다공증은 조골세포에 비하여 파골 세포의 활성이 증가함으로써 총 골량(total bone mass)이 감소하면서 경미한 충격에도 뼈가 쉽게 부서지게 되는 질환을 말한다. 이 외에도 종양이 전이된 전이성 암, 류마티스성 관절염, 퇴행성 관절염 및 세균의 감염에 의해 치조골의 파괴를 유발하는 치주 질환 등이 있다. 골 대사 질환 등은 파골 세포가 과도하게 활성화되어 뼈를 쉽게 파괴하는 결과를 초래하게 된다. 파골 세포 전구체(osteoclast progenitor)는 골수에서 기원하는 단핵 세포/대식 세포(monocyte/macrophage) 계통의 조혈 세포(hematopoietic cell)이다. 파골세포 전구체는 골수에서 생성되는 성장인자와 사이토카인에 의해 파골 세포로 분화되며 파골 세포는 뼈를 파괴 또는 흡수하는 역할을 한다.

조골 세포는 간엽줄기세포에서 기원하여 형성되는데 조골 세포의 분화에 의해 형성되는 칼슘 등을 포함한 무기질화는 뼈의 세기를 유지시켜줄 수 있을 뿐만 아니라, 신체 전체의 칼슘 및 호르몬 대사의 항상성에도 매우 중요한 기능을 하고 있다. 조골 세포의 분화에 의한 칼슘 형성은 비타민 D 및 부갑상선 호르몬(parathyroid hormone) 등에 의해 조절되며, 세포 내에서 뼈형태 형성단백질(bone morphogenetic protein; BMP), Wnt, MAP 키나아제, 칼시뉴린-칼모둘린 키나아제(calcineurin-calmodulin kinase), NF- κ B, AP-1 등의 다양한 신호 전달 체계의 상호 작용(cross-talk)에 의해 조골 세포의 분화에 관련된 알칼라인 포스파타제(alkaline phosphatase; ALP)가 초기 분화단계에서 합성된 후, 무기질화에 관련된 오스테오펀틴(osteopontin), 오스테오칼신(osteocalcin), 타입 I 콜라겐 (type 1 collagen) 등이 합성됨으로써 조골 세포의 분화에 의한 골 형성이 이루어진다고 알려져 있다. 그러나, 이러한 인체의 골은 형성과 재형성 과정을 통해 항상성을 유지하며, 재형성은 조골세포 및 파골세포로 구성된 골다세포성 단위체(bone multicellular unit: BMU)에서 일어나며 이들 세포는 각각 조골형성과 골흡수 과정에서 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 이 과정에서의 두 세포 간 협력체계에 손상이 올 경우 골다공증 등을 포함한 다양한 골대사 질환이 생기게 된다. 하지만 현재까지 완치를 위한 효과적인 치료법이 없으며 예방이 강조되고 있는 실정이다.

최근 생체 외 배양조건에서 조골세포를 생산하고 이를 이용하여 골조직의 기능을 강화하거나 손상을 치료하고자 하는 노력이 급증하고 있다. 현재 골형성 첨가물(Osteogenic

supplement)로 사용되고 있는 아스코르브산, 베타-글리세로포스페이트(β -glycerophosphate), 덱사메타손(dexamethasone) 등이 조골세포 분화유도에 효과적임이 보고된 바 있고(Karp et al., 2006; Cao et al., 2005; Bielby et al., 2004; Sottile et al., 2003), 현재 엑티빈, 골형성 단백질(Bone Morphogenic Protein: BMP), 인히빈, 성장/분화 인자 (growth/differentiation factor: GDF) 등을 포함하는 변형 성장 인자 베타계 (Transforming Growth factor-beta (TGF-beta) subfamily)가 골조직의 형성과 유지에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있고, 특히 BMP2 또는 BMP4 등을 배양배지에 첨가하여 배양할 경우 조골세포로의 분화유도가 증가됨이 보고되고 있다.

그러나 임상적으로 우수한 기능을 수행할 수 있는 세포치료제 확보를 위한 조골세포 분화 기전 이해와 분화유도기술이 아직은 미약한 수준으로, 이를 극복하기 위해서는 골세포 분화유도에 관여하는 인자 및 작용기전을 이해하는 것이 중요하다. 또한 이들의 활성을 조절하는 물질을 발굴하여 분화유도 기술에 활용하는 것이 매우 중요하다고 할 수 있다. 이러한 연구 배경하에, 본 연구는 마의 기능성 신소재의 개발을 목적으로 마의 주요 성분인 diosgenin 및 마 추출물의 골형성 촉진 및 항골다공증 기능을 입증하여 추후 산업화로의 및 식의약품을 개발하고자 하였다.

2. 연구방법론

가. 연구 I: 마의 주요 성분인 diosgenin의 골 형성 촉진 기능 및 항골다공증 기능 확인 연구

(1) 실험 재료

마우스 조골세포인 MC3T3-E1 세포를 1×10^4 cell/mL 농도로 접종하여서, 10% 우태아 혈청(미국, Gibco), 1mM의 피루브산 나트륨(미국, Sigma), 100 unit/L 페니실린 및 100mg/L 스트렙토마이신(Gibco)이 첨가된 α -최소 필수 배지(미국, Gibco, α -MEM)를 포함하는 통상적인 성장 배양 배지에서 37°C, 5% CO₂ 조건으로 배양하였다.

(2) 실험 처리

세포가 80% 정도로 충분히 자랐을 때, 세포를 조골 분화 배지인 3mM 인산나트륨(미국, Sigma) 및 50 μ g/mL 아스코르브산(미국, Sigma)이 첨가된 분화배지에서 배양하였다. Diosgenin을 DMSO 및 에탄올에 녹여 0-10 μ M의 농도로 세포에 처리하였으며, 배지는 이를 간격으로 교환하였다. Diosgenin이 처리되지 않은 분화배지에서 배양한 세포는 조골화(OSM)의 대조군으로 사용하였다.

(3) 분석방법

(가) 세포증식 측정- MTT assay

MTT assay(Mosmann, 1983)는 살아있는 세포에서의 세포 증식이나 세포 독성을 측정하는데 사용되는 방법으로, 대사적으로 활성이 있는 세포의 mitochondria에 의해 tetrazolium salt가

환원되는 원리를 이용하는 것이다. 환원된 tetrazolium salt는 색이 있는 불용성의 formazan salt로 되며, 유기용매에 의해 용해된 formazan의 양을 측정하게 된다. 96-well plate에 조골세포(MC3T3-E1 cell)를 1×10^4 cells/mL로 분주하고 10% 우태아 혈청이 함유된 α -MEM 배양액 200 μ l를 넣어 동일 조건에서 배양하였다. 각 세포에 Diosgenin 또는 마 추출물을 농도별로 처리하여 배양한 후, MTT assay를 시행하였다. 각 well에서 배양액을 제거하고 50 μ l의 MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl] - 2,5-diphenyltetrazolium bromide) 용액(5mg/mL)를 첨가한 후 4시간동안 반응시킨다. 반응액을 제거하고 200 μ l의 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 첨가하여 형성된 formazan 결정을 용해한 후 ELISA reader로 파장 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(나) 세포배양액 Collagen type I 농도 측정

조골세포(MC3T3-E1 cell)를 1×10^4 cell/mL로 10cm² dish에 분주하고 3일 동안 분화유도배지를 교환하여 배양하였다. 3일마다 배지 교환을 하며, 시간별 세포배양액은 12,000rpm에서 10분간 원심분리 후 상등액을 모아 사용하기 전까지 -80 °C에 저장하였다. Collagen standards는 Collagen type I을 사용하고, 0~400 μ g/mL의 범위로 준비하였다. 세포배양액과 Collagen type I standards (0~400 μ g/mL)를 96-well plate에 50 μ l씩 각각 well에 넣은 후 37°C에서 16시간 동안 incubation 후 dry oven에 60°C에서 24시간 동안 incubation하였다. Incubation 후에 200 μ l DDH₂ O를 이용하여 3회 washing하였다. Saturated picric acid에 Sirius Red F3BA 0.1%되게 만들어 100 μ L를 각 well에 넣고, 37°C incubator에서 1시간 동안 incubation하였다. 10mM HCl solution을 각 well에 200 μ L 넣어 5회 washing하였다. 각 well에 0.1N NaOH 200 μ L를 5분간 incubation 후 new plate에 옮긴 후, ELISA reader로 540nm에서 측정하였다.

(다) 세포외기질 골 형성 마커 Collagen type I 염색법

Van Gieson's Stain 방법을 사용하여 조골세포의 Collagen type I 합성 정도를 염색하였다. 24-well plate에 조골세포(MC3T3-E1 cell)를 1×10^4 cells/mL로 seeding한 뒤, 배지를 제거하고 PBS로 한번 세척한 뒤, 2% formaldehyde (in PBS)로 4°C에서 10분간 고정시킨 후, PBS로 두 번 세척하였다. Van Gieson's stain 용액을 500 μ L를 각 well에 넣고 5분 동안 염색하였다. 그 뒤, DDH₂ O로 2번 세척 후, nonspecific stain 된 것을 제거하기 위해 PBS로 2~3번 헹구어 주고 표면이 마르지 않게 PBS 200 μ L를 넣은 후, 현미경으로 nodule 정도를 관찰하였다.

(라) alkaline phosphatase 효소 활성 측정

포화 배양된 MC3T3-E1 cell을 1×10^4 cell/mL로 조정하여 10cm² dish에 분주하고 3일 동안 분화유도배지를 교환하여 배양하였다. 3일마다 배지 교환 시키며, 시간별 ALP 효소를 측정하였다. 0.02% Triton X-100/0.9% NaCl 용액을 1mL씩 첨가하여 30초간 sonication 한 뒤, 12000 rpm에서 5분간 원심분리 후 상등액을 1mL e-tube에 모은다. Lysis 된 cell의 상등액 중 50 μ L는 단백질 정량에 사용하고, 남은 상등액 중 150 μ L는 ALP 측정에 사용하였다. 상등액 150 μ L에 1M Tris-HCl 500 μ L와 5mM MgCl₂ 100 μ L와 Lysis buffer 150 μ L와 5mM *p*-nitrophenolphosphate(*p*-NPP)를 첨가한 후 37 °C에서 30분간 반응시킨다. 반응 후 1 N NaOH 250 μ L로 반응을 중지하고, 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. ALP activity는 *p*-NPP로부터 생성된 *p*-nitrophenol (PNP)를 측정하여 *p*-NP에 대한 표준그래프를 작성한 후 활성도를

도출하고, 단백질은 bovine serum albumin 을 표준물질로 사용하여 Brad-ford (Bio-Rad Laboratories, Inc, USA)법으로 정량하였다. 측정된 ALP activity를 단백질량으로 나누어 단위 단백질량 당 효소활성도 (U activity/mg protein)를 산출하였다.

(마) 세포외기질 ALP 효소 활성 염색법

ALP 효소 활성의 염색 정도를 측정하기 위해 6-well plate에 조골세포(MC3T3-E1 cell)를 1×10^4 cells/mL로 처리하고 추출물을 적정농도로 희석처리 한 후 시간경과에 따른 효소활성을 측정하였다. 염색은 alkaline phosphatase(AP) kit (Sigma Chemical Co, USA)를 사용하여 측정하였다. 먼저 배지를 제거하고 2% formaldehyde (in PBS)을 첨가하여 약 30초간 실온에 보관하였다가 45초간 증류수로 washing하였다. 준비된 diazonium solution (sodium nitrite: FRV-alkaline: naphthol AS-BI alkaline solution = 1:1:1)을 첨가하여 약 15 분간 실온에서 방치한 뒤 2분간 증류수로 세척하고 hematoxyline solution으로 2분간 다시 염색한 뒤 DDH_2O 로 염색액을 제거한 다음 현미경으로 관찰하였다.

(바) Alizarin-red stain에 의한 세포외기질 무기질화 (bone nodule) 분석

6-well plate에 조골세포를 1×10^4 cell/mL로 처리한 뒤, 배지를 제거하고 PBS로 한번 세척한 뒤, 2% formaldehyde (in PBS)로 4°C에서 1시간 동안 고정시킨다. Alizarin Red Solution (Sigma Chem. Co., St. Louis, USA)은 20mL의 DDH_2O 에 40 μM 이 되게 농도를 맞춰준 후 0.5% ammonium hydroxide (Sigma Chem. Co., St. Louis, USA)로 pH를 4.2로 맞추는 후 0.20 μm syringe filter로 여과하였다. 고정이 끝나면 준비한 AR solution으로 shaker 위에서 속도 2로 10분간 염색하였다. 염색이 끝난 뒤 DDH_2O 로 2번 세척한 뒤 염색이 되지 않은 부분은 PBS로 2번 washing하고 표면이 마르지 않게 PBS 500 μL 를 넣고 현미경으로 nodule 정도를 관찰하였다.

(사) Von Kossa stain에 의한 세포외기질 무기질화 (bone nodule) 분석

ALP 염색법과 동일하게 6-well plate에 조골세포(MC3T3-E1 cell)를 1×10^4 cells/mL로 처리한 뒤, 배지를 제거하고 PBS로 한번 세척한 뒤, 2% formaldehyde (in PBS)로 4°C에서 10분간 고정시킨 후, PBS로 한번 세척하였다. 그 뒤, silver nitrate, 99% titration (Sigma Chem. Co., St. Louis, USA)을 DDH_2O 100mL에 3g silver nitrate로 silver nitrate solution을 만든다. 이때, solution을 갈색병에 냉장보관하였다. PBS로 세척한 well에 silver nitrate solution을 각각 3mL씩 넣은 후, 색깔이 나타날 때까지 자외선에 노출시킨 후, DDH_2O 로 2번 세척 후, non-specific stain된 것을 제거하기 위해 PBS로 2~3번 헹구어 주고 표면이 마르지 않게 PBS 500 μL 를 넣은 후, 현미경으로 nodule 정도를 관찰하였다.

(아) Western blot 분석

분화된 조골세포(MC3T3-E1 cell)로부터 total lysate (0.1% Triton, 0.125 M KPO_4 /1mM EDTA, 10% Glycerol, 1 mM aprotinin, 0.1M PMSF, 0.1 M DTT)를 첨가하여 30초간 sonication 한 뒤, 12,000rpm에서 15분간 원심분리 후 상등액을 1mL e-tube에 모은다. Cell lysate의 단백질 농도는 bovine serum albumin을 표준물질로 사용하여 Brad-ford (Bio-Rad Laboratories, Inc, USA)법을 사용하여 측정하였다. Cell lysate (50 μL or 100 μL) 10~20 %

sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel(SDS-PAGE)에서 전기영동을 실시하였다. 이 과정에서 분리된 단백질을 이용하여 coomassie brilliant R-250 염색용액으로 염색시킨 뒤 단백질 분포 양상을 확인 후, 동일 단백질을 polyvinylidene difluoride membrane (Millipore, Bedford, MA, USA)를 이용하여 전기적으로 이동시킨다. Membrane은 5% Skim milk-PBST (0.1% Tween 20)에서 1시간 blocking하고, 일차항체(monoclonal rabbit anti-human antibody, Santa Cruz Biotech. Inc., Santa Cruz, CA, USA)를 1:200배로 희석하여 교반하면서 배양한 후에 goat anti-rabbit horseradish peroxidase(1:2,000, Santa Cruz Biotech. Inc., Santa Cruz, CA, USA)의 이차항체로 1시간 배양하였다. PVDF membrane에 있는 골 형성 단백질은 Supersignal West pico chemiluminescence(Pierce Biotech. Inc., Rockford, IL, USA)로 검출하여 Chemi Doc(Rio-Rad, USA)을 통해 단백질 밴드를 측정하였다. 기타 연구계획에서 제시하는 모든 분자물의 단백질 발현에 대해서도 같이 시행하였다.

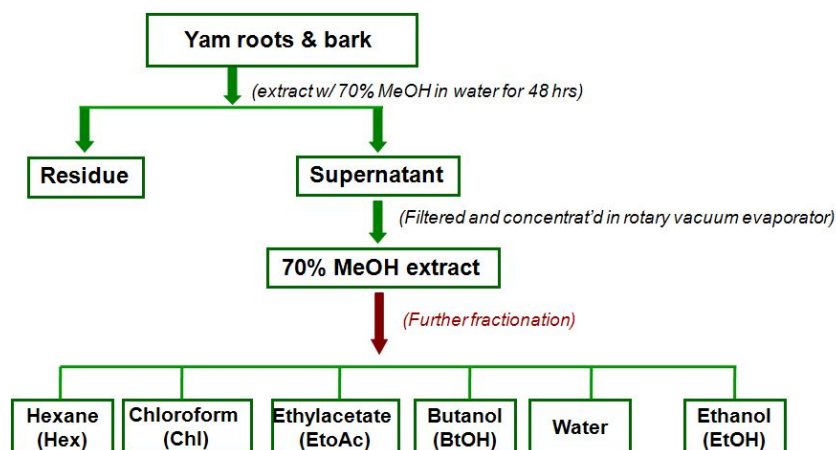
(자) 통계분석

각 실험은 최소 3회 반복 수행하였다(실험 당 n=3). 모든 자료는 평균 ± 표준오차 (mean ± SEM) 로 표시하였다. 통계학적 분석은 SPSS software package(ver. 12.0 SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 ANOVA로 분석하며, 통계적 유의성이 있을시, post-hoc analysis로 분석하였다. 각 실험군들의 평균 간 유의성은 $P < 0.05$ 수준에서 검증하였다.

나. 연구 II: 마 추출물 분획의 골 형성 촉진 및 항골다공증 기능 검증

(1) 실험 재료

마의 뿌리 부분과 껍질부분을 70% ethanol에서 48시간동안 추출한 후, 추출액만 여과하여 얻어낸다. 추출액은 다시 vacuum evaporator로 농축시킨 후, hexane, chloroform, ethylacetate, butanol, water에 각각 분획하여 얻는다.



(2) 실험 처리

마우스 조골세포인 MC3T3-E1 세포를 1×10^4 cell/mL 농도로 접종하여서, 10% 우태아 혈청 (미국, Gibco), 1mM의 피루브산 나트륨(미국, Sigma), 10 unit/L 페니실린 및 10 mg/L 스트렙

토마아신(Gibco)이 첨가된 α -최소 필수 배지(미국, Gibco, α -MEM)를 포함하는 통상적인 성장 배양 배지에서 37°C, 5% CO₂ 조건으로 배양하였다. 세포가 80% 정도로 충분히 자랐을 때, 세포를 조골 분화 배지인 3mM 인산나트륨(미국, Sigma) 및 50 μ g/mL 아스코르브산(미국, Sigma)이 첨가된 분화배지에서 배양하였다. 유기용매를 이용한 각각의 마 추출물을 농도별로 세포에 처리하였으며, 배지는 이를 간격으로 교환하였다. 마 추출물이 처리되지 않은 분화배지에서 배양한 세포는 조골화(OSM)의 대조군으로 사용하였다.

(3) 분석방법

실험1에서와 동일한 방법을 사용하였다.

3. 연구결과

가. 연구 I. 마의 주요 성분인 diosgenin의 골 형성 촉진 기능 및 항골다공증 기능 확인

조골세포 MC3T3-E1 cells을 Diosgenin 0-10 μ M 농도로 1일 및 3일(조골세포 초기 증식기간, cell proliferation period) 및 6일(조골세포 기질 성숙 기간, matrix maturation period) 동안 배양하여 세포 증식률을 MTT assay로 측정하였다. 1, 3, 6일 기간 동안의 증식 실험에서 Diosgenin을 용해시킨 vehicle (DMSO)의 영향은 없었으며(Fig. 1A), 이 기간 동안에 Diosgenin은 0.01-5 μ M 구간에서 정상 조골세포 배양액(normal osseogenic medium, OSM)에서 배양한 그룹에 비해 조골세포의 증식을 유도하였다. ($P < 0.05$). 또한 이러한 Diosgenin의 세포 증식 촉진 패턴은 세포분열을 의미하는 세포 단백질 농도 측정에서도 같은 양상으로 보였다(Fig. 1B). 따라서 마 추출물 Diosgenin은 골 형성 초기 증식 및 골기질 성숙 기간에 저농도 구간(0.01-5 μ M)에서 조골세포의 증식을 증가시키는 것으로 해석된다(Fig. 1A & 1B).

Diosgenin은 마우스 조골세포(mouse osteoblastic MC3T3-E1 cells)에서 세포외기질의 주요 단백질인 collagen type I의 세포내 합성, 세포외기질로의 분비 및 세포외기질에의 침착을 증가시킨다. Collagen type I은 세포외기질의 주요 단백질로서 골조직의 성숙 및 칼슘화를 촉진시키는 역할을 한다. Diosgenin은 위의 실험결과 1에서처럼 조골세포의 증식을 유도한 양상과 일치하게 저농도 구간 (1-5 μ M)에서 조골세포의 collagen type I의 세포내 합성을 촉진시켰으며 (Fig. 2A), 비슷한 양상으로 세포외로의 분비를 일치되게 증가시켰다(Fig. 2B). 또한 이렇게 분비된 collagen type I의 세포외기질 침착도 증가시킴을 확인하였다(Fig. 2C).

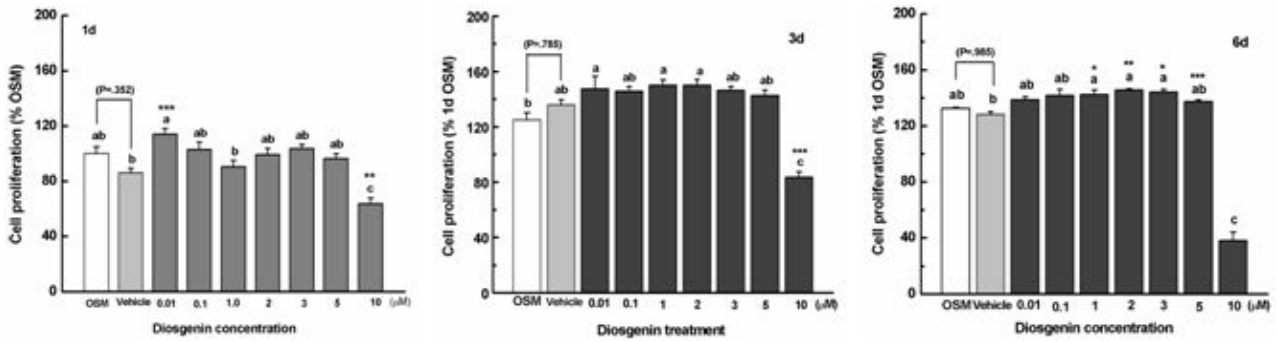
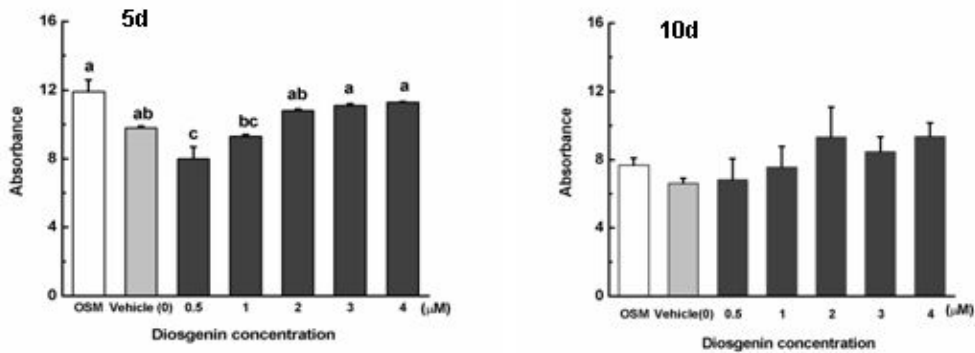
A**B**

Fig. 1. Diosgenin effect on osteoblast proliferation (A) and protein synthesis (B) in MC3T3-E1 cells. Diosgenin was dissolved in DMSO (0.14 M) as vehicle and treated to the cells. (A) Cell proliferation was measured using AlamaBlue[®] kit* (Invitrogen) or MTS assay (Promega). No vehicle cytotoxicity was observed, compared to normal osteogenic differentiation media (OSM). Diosgenin stimulated osteoblast proliferation up to 6 days within the range of 0.01–5 mM. Mean SEM (n=6), abc: analyzed by one-way ANOVA, followed by Tukey test for mean comparison. As compared to vehicle, * P<0.05, **P<0.01, and ***<0.001. (B) Cellular protein synthesis, measured by BCA assay (Promega), also showed the same pattern of cellular proliferation at day 5 with significance and the same trend at day 10. Mean SEM (n=4), abc: Tukey test, one-way ANOVA, P<0.05.

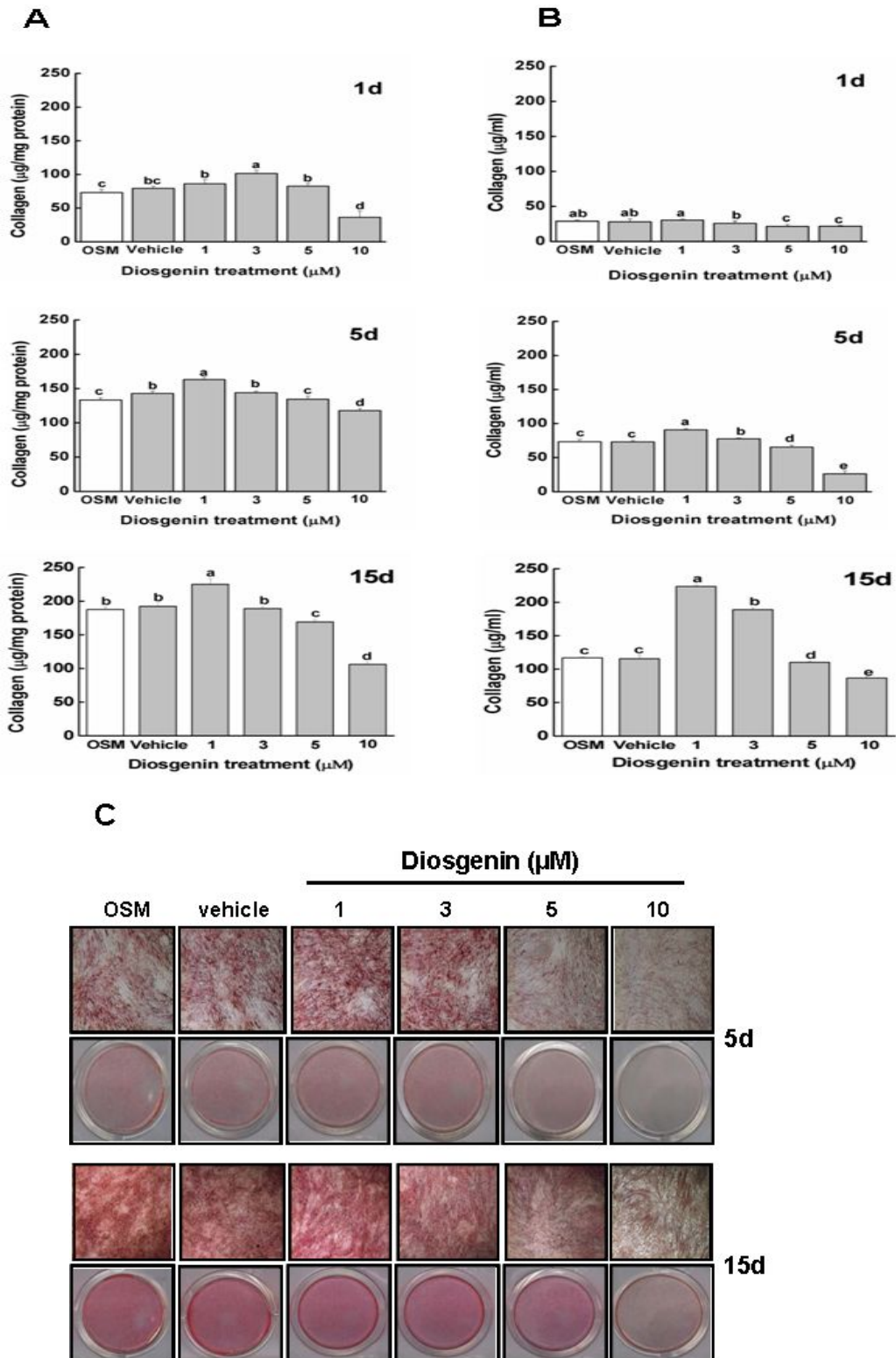
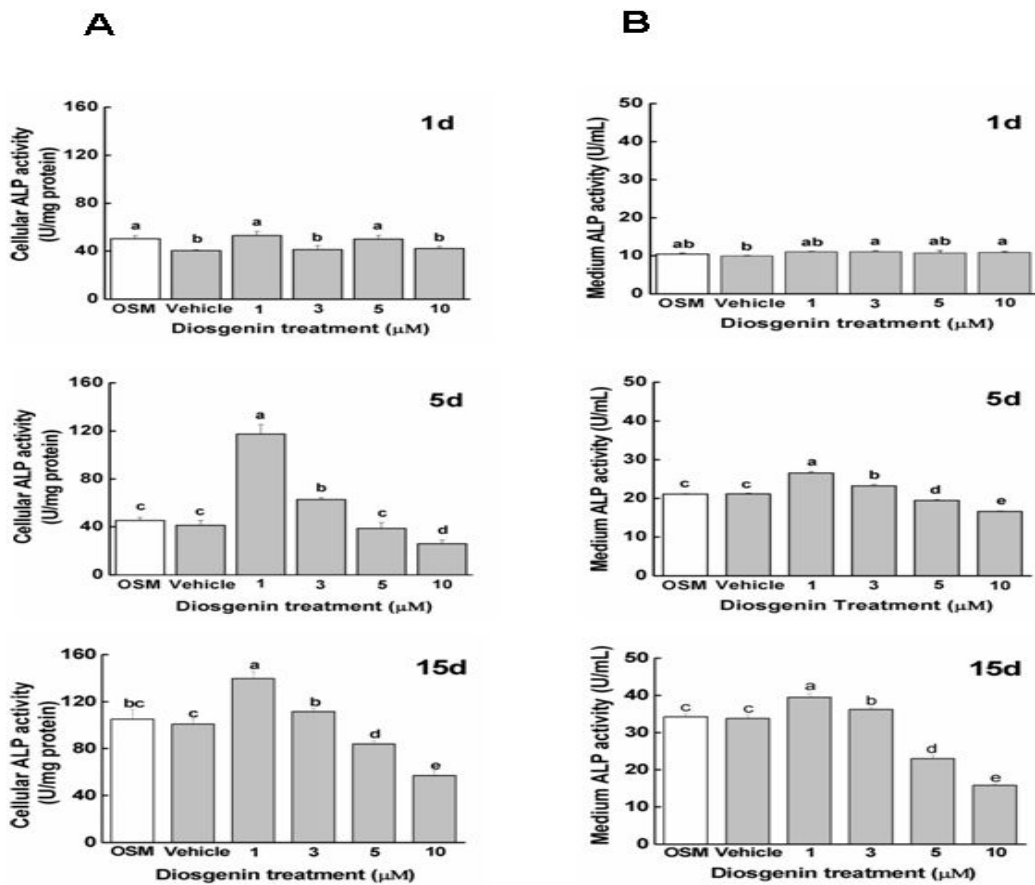


Fig. 2. Cellular (A) and medium (B) collagen quantification and cell matrix collagen staining (C) by diosgenin treatment. Cells were treated with varying levels of diosgenin and DMSO as vehicle for 1, 5 and 15 days. (A) & (B): Cellular and medium collagen level were measured by colorimetric method using Picro-Sirius Red. Collagen synthesis was normalized with protein concentration. Means having different superscripts indicate

significant difference between diosgenin treatments at $p < 0.05$ by ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test ($n=8$, mean8).(OSM=osteogenic medium, vehicle=DMSO). (C) The effect of diosgenin on the formation of collagen scaffold for mineralization was assessed by staining and presented as the image of the phase contrast microscopic morphology (upper images) and the cellular layer on each culture dish (lower images). Matrix collagen shown as red stain intensity was stimulated by diosgenin treatment in a dose- and time-dependant manner and it was more prominent on day 5 and 15. Representative image of four wells.

ALP는 조골세포 분화 및 골 형성 초기에 합성되어 세포 밖으로 분비되면, 세포외기질(extracellular matrix)에서 유기물의 인을 알칼리 상태에서 유리시키는 효소로 전형적인 골세포의 마커로 알려져 있다. ALP 수준 및 효소 작용이 높다 하면 조골세포의 분화가 잘 되며, 골기질의 성숙화(matrix maturation) 및 무기질화(mineralization)에 대한 조건이 좋아짐으로 해석되어 골 형성을 촉진하는 상황으로 해석된다. ALP 효소는 조골세포에서 합성되어 세포 외로 분비되어 골조직의 세포외기질에서 인산을 분해하는 효소로서 골 형성 초기의 주요한 골 형성 주요 단백질로 평가된다. Diosgenin은 세포증식에 대한 효과와 일치되게 저농도 구간($1 < 5\mu\text{M}$)에서 세포내 ALP의 활성을 증가시켰으며(Fig. 3A), 또한 조골세포외의 골기질로의 분비된 효소의 활성 역시 증가 되었으며 (Fig. 3B), 또한 골기질 matrix에서의 ALP 효소활성도 증가시켰다(Fig. 3C).



C

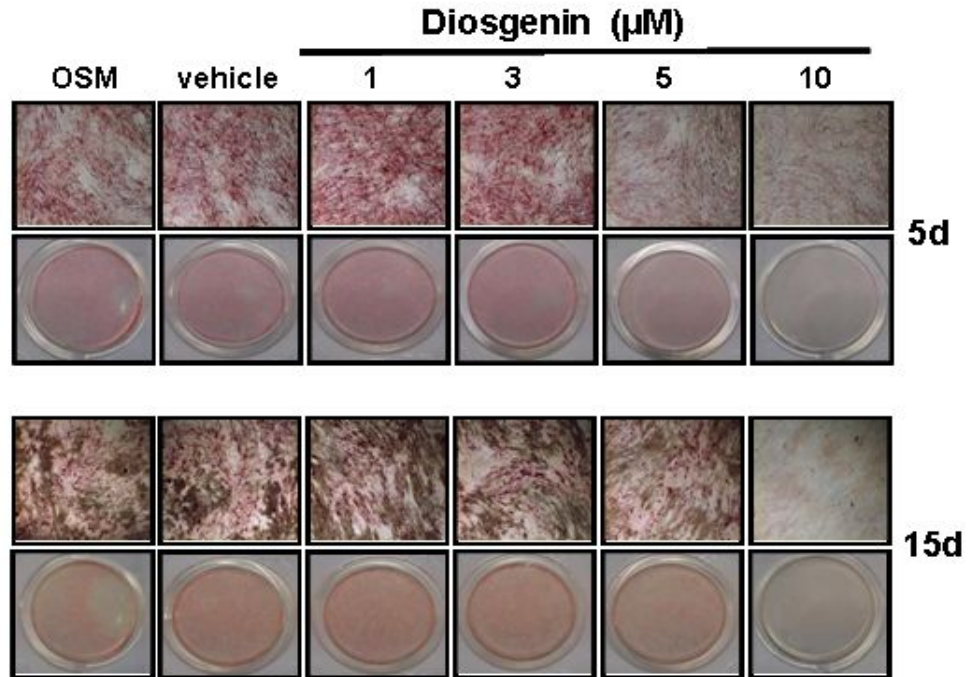


Fig. 3. Cellular (A) and medium (B) ALP activity and cell matrix ALP activity staining (C) by diosgenin treatment. Cells at confluence were treated with varying levels of diosgenin and DMSO as vehicle for 1, 5 and 15 days. (A) & (B) Cellular and medium ALP were measured by colorimetric method using PNPP as substrate. ALP activity was normalized with cellular protein concentration. Means having different superscripts indicate significant difference between diosgenin treatments at $p < 0.05$ by ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test. ($n=8$, mean \pm SD). (OSM=osteogenic medium, vehicle=DMSO). (C) The effect of diosgenin on extracellular matrix ALP activity was measured by staining the products of enzyme activity and presented as the image of the phase contrast microscopic morphology (upper images) and the cellular layer on each culture dish (lower images). The cells were cultured in 6-well plates and incubated in AS-MX phosphate solution as substrate with Fast Red salt as stain. Matrix ALP activity shown as red stain intensity was stimulated by diosgenin treatment in a time- and dose-dependant manner and was more prominent on day 5 and 15.

골 형성의 주요 두 가지 사안은 조골세포의 분화에 따른 세포외기질의 골 특이적 단백질의 합성 및 분비, 그리고 골기질에서의 칼슘화이다. Diosgenin의 골기질의 칼슘화를 촉진시키는데 대한 실험을 수행한 결과, diosgenin은 조골세포에서 저농도 구간 ($0.01 - < 3\mu\text{M}$)에서 일반 조골세포 배양액에 비해 (OSM) 칼슘 침착화를 증가시켰다(Fig. 4A). Fig. 4A에서 붉은 색은 Alizarin red 염색약이 골기질에 침착된 Ca과의 결합을 나타낸 것이다. 또한 골기질에는 칼슘과 비례해서 P이 침착하는 바, 이러한 P을 측정하는 실험이 Fig. 4B로서 silver nitrate 염색약이 P와 결합한 부분이 검은 색으로 나타나 있으며, 이는 골 칼슘화를 측정하는 것으로 해석된다. 이러한 diosgenin에 의한 골기질 Ca화는 시간에 비례해서도 나타났다.

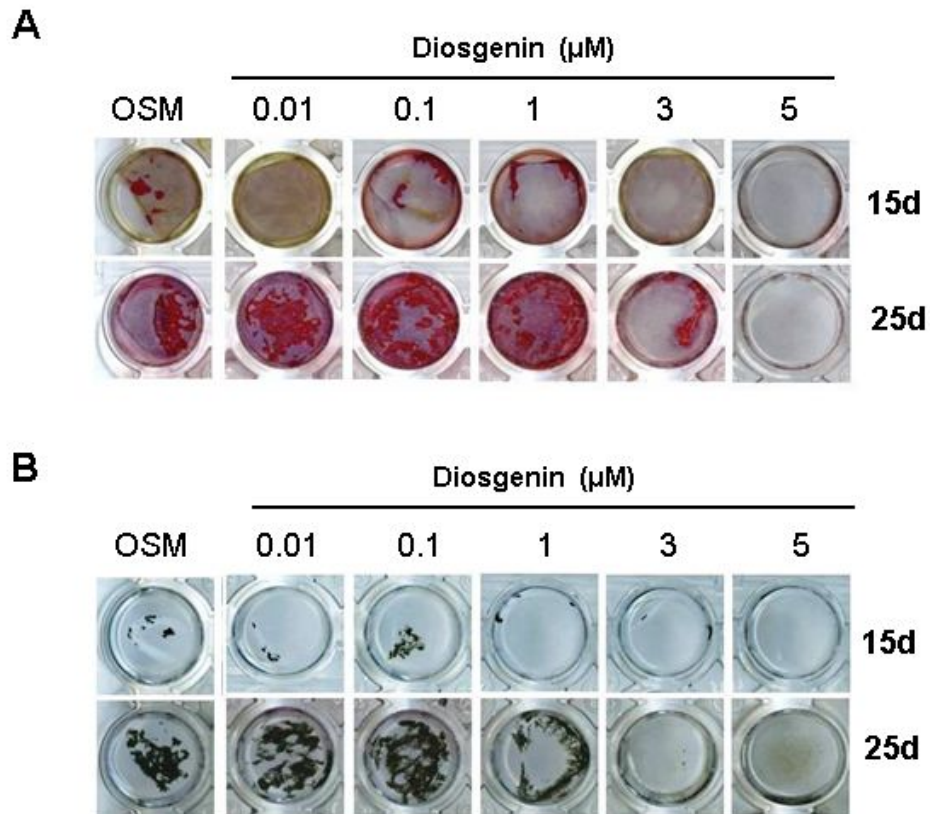


Fig. 4. Alizarin red (A) and von Kossa (B) staining for Ca deposits (bone nodule) by diosgenin treatment in MC3T3-E1 cells. Extra cellular matrix Ca deposits for matrix mineralization was measured using Alizarin red S dye which binds with Ca and silver nitrate dye which binds with P in cell layer matrix. Diosgenin treatment in low concentration (0.01-1 μM) increased mineralization as compared to control groups in 25 day culture.

Diosgenin이 골기질의 주요 단백질인 collagen type I 효소인 ALP의 세포내 단백질 발현을 증가시키는 지에 대한 실험을 하였다. 세포증식 및 collagen type I 및 ALP의 농도 및 활성 실험결과와 일치되게 (Fig. 2-3), diosgenin은 저농도 구간(0.01-3 μM)에서 OSM 또는 vehicle (DMSO)만 처치한 그룹에 비해 단백질 발현이 증가되었다(Fig. 5A). 또한 Diosgenin은 골 특이적 전사인자인 Runx2의 단백질 발현도 0.01-0.1 μM 구간에서 control인 OSM 처치군에 비해서 증가되었으며, 이러한 Runx2의 diosgenin에 의한 촉진 발현 양상은 Runx2에 의해 조절을 받고 있는 조골세포 마커인 osteopontin 단백질 발현에서도 같은 양상을 나타내었다 (Fig. 5B). Runx2 및 osteopontin의 단백질 발현은 immunoprecipitation을 한 후에 Western immunoblotting을 실시하였다.

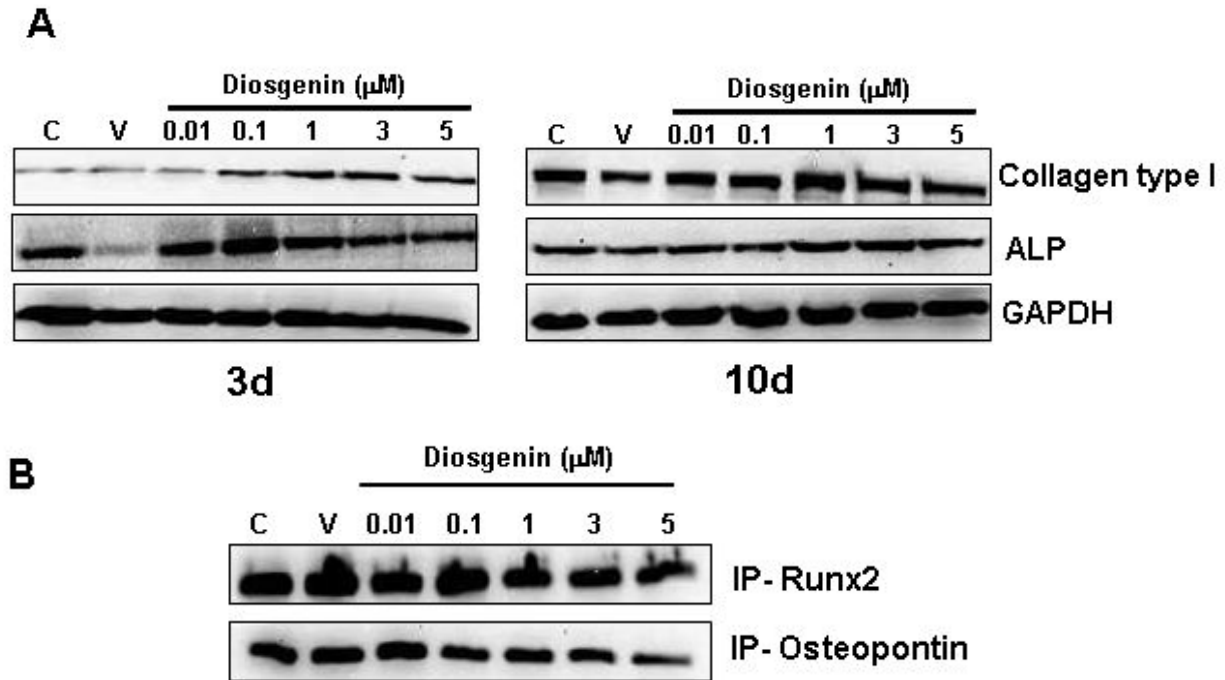


Fig. 5. Effect of diosgenin on bone matrix proteins, bone-specific transcription factor Runx2 and osteopontin. (A) The protein expressions of bone matrix and also early osteoblast differentiation marker proteins, collagen type I and ALP, were analysed by western blot analysis at 3 and 10 days diosgenin treatment (0–5 mM). Diosgenin increased the protein expression of collagen type I and ALP within the low range of diosgenin (0.01–1 mM). (B) Runx2 and osteopontin were immunoprecipitated and their expressions were subsequently analyzed by western blot analysis at 10d diosgenin treatment. Representative image of two replicates with repeating twice for both immunoblotting and immunoprecipitated blotting.

연구결과를 종합해 볼 때, 마 주요성분의 하나로 알려진 iosgenin은 저농도(1-7mM 수준)에서 조골세포 분화 및 골형성 마커인 alkaline phosphatse의 세포내 합성, 세포외 기질로의 분비, 세포매트릭스의 ALP 효소 활성을 증가시키고, 또한 골기질 조성 단백질인 collagen type I의 세포내 합성, 세포외기질로의 분비, 세포외기질 침착을 증가시킴으로서 조골세포의 골분화 및 골기질의 무기질화를 통한 골 형성 촉진 및 항골다공증 기능이 있다고 할 수 있다.

나. 연구 II. 마 추출물의 골 형성 촉진 기능 확인 연구

유기용매를 이용한 마 추출물 중 일부 분획 성분들의 골 형성 기능을 탐색하였다. 다음은 본 연구진에서 각기 다른 용매를 사용하여 추출한 다양한 마 추출물(ethanol, hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol, water)을 이용하여 어느 용매의 추출물이 가장 조골세포의 증식률을 증가시키는 지에 대한 실험을 하였다. 이 실험에서는 각각 마 뿌리(yam roots) 추출물과 마 줄기(yam barks)을 이용하여 위의 유기용매로 추출한 실험을 하였는데, 이는 마 뿌리 성분과 더불어 줄기 성분 추출물도 조골세포의 골 형성 기능이 있는지를 확인하기 위해서이다. 마 뿌리 및 줄기 성분의 추출액 농도를 각각 100, 200, 400ppm 수준에서 뿌리 및 줄기 추출물로 6가지 다른 용매추출물의 조골세포 증식능을 측정 비교해

보았다(Fig. 6- 8). 전반적으로 추출물의 농도 수준이 좀 높았던 관계로 조골세포 증식능은 일반 배양액에 비해서 같거나 근소하게 저하하는 것으로 나타내었다. 100 및 200ppm 수준에서는 뿌리 및 줄기 성분 모두에서 ethanol과 hexane 추출물이 근소하게 세포증식능을 증가시켰고, 400ppm 수준에서는 이런 현상을 나타내지 않았다. 400ppm에서는 ethyl acetate가 예외적으로 증가된 증식률을 보였다.

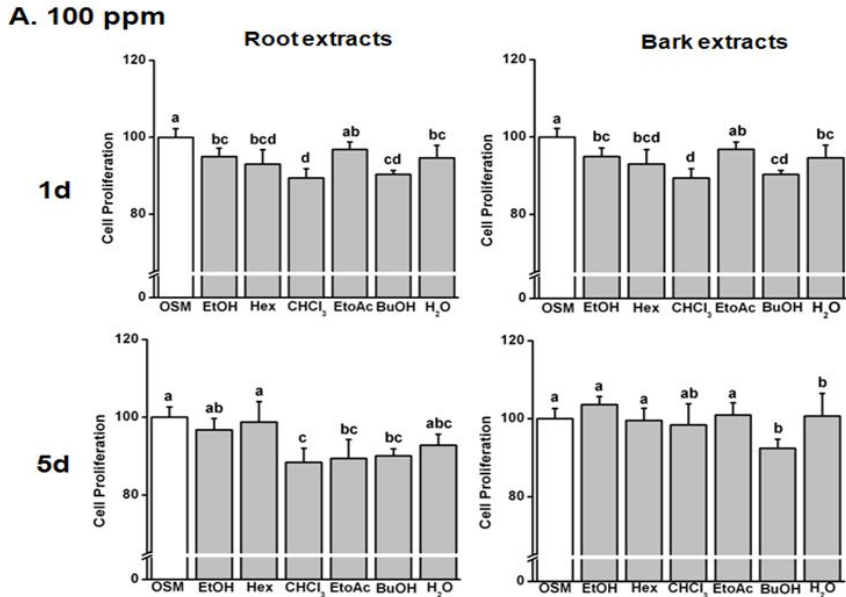


Fig. 6. Cell proliferation of osteoblastic MC3T3-E1 cells treated with various yam extracts (100 ppm) at 1 and 5 d. Cell proliferation was measured by MTT assay. Osteoblastic MC3T3-E1 cells were cultured in α -MEM until confluence. At confluence, cells were treated with 100 ppm of different yam extracts for 1 and 5 d. Proliferation is presented as % of proliferation in normal osteogenic medium (OSM). The effect of the different extracts was analyzed by one-way ANOVA at $p < 0.05$ followed by Tukey as *posthoc* test. Means having different superscripts indicated significant results among treatments.

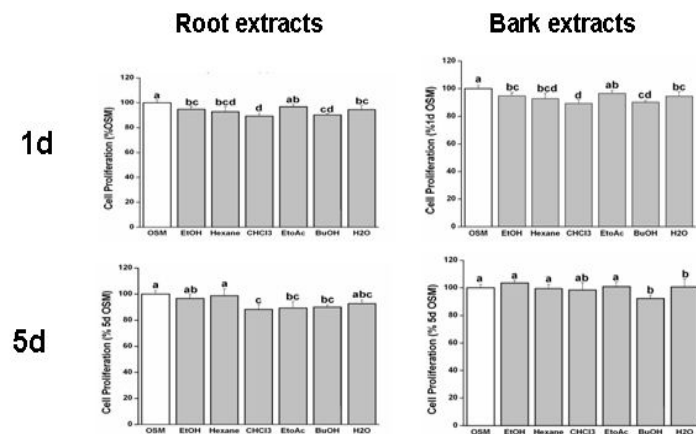


Fig. 7. Cell proliferation of osteoblastic MC3T3-E1 cells treated with various yam extracts (200 ppm) at 1 and 5 d. Same as in Fig. 6.

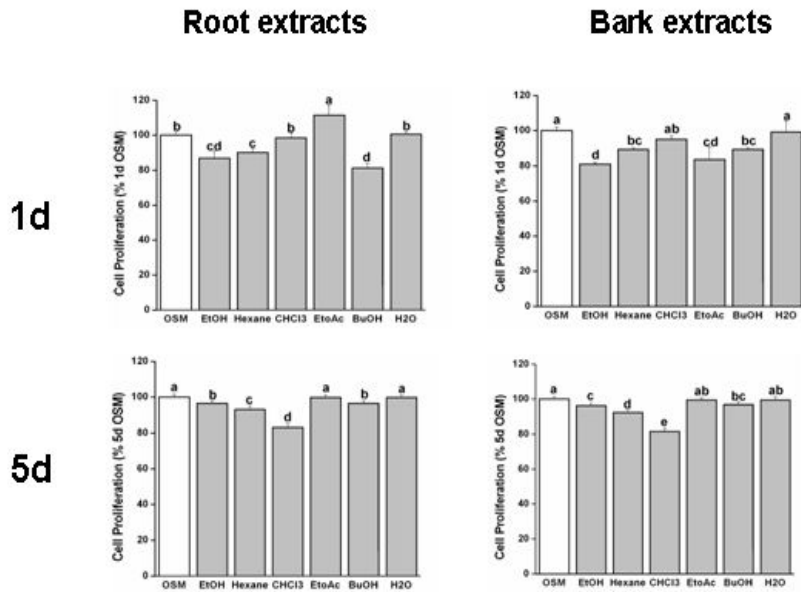


Fig. 8. Cell proliferation of osteoblastic MC3T3-E1 cells treated with various yam extracts (300 ppm) at 1 and 5d. Same as in Fig. 6.

조골세포 MC3T3-E1 cells을 에탄올과 물 추출물 0-30mg/L 농도로 6, 13, 15, 39일 동안 배양하여 세포 증식률을 MTT assay로 측정하였다. 마 에탄올 추출물을 처리한 증식 실험에서 6, 13일 기간 동안에 마를 추출해낸 vehicle (에탄올)의 영향은 없었으며, 15일에는 조골세포배양액 (normal osgeogenic medium, OSM)에서 배양한 그룹에 비해 낮았으나 그 이후인 39일에는 다시 세포 증식을 유도하였다(Fig. 9A). 15일에는 마 에탄올 추출물 15-30mg/L 구간에서 정상 조골세포배양액에서 배양한 그룹에 비해 조골세포의 증식을 유도하였다($P < 0.05$). 반면, 마 물 추출물은 전체 기간 동안 vehicle(물)의 영향은 없었으며(Fig. 9B), 13일에 마 물 추출물 15-30mg/L 구간에서 조골세포의 증식을 유도하였다. 또한 이러한 마 에탄올과 물 추출물은 세포 단백질 농도 측정에서 같은 양상으로 보였다(Fig. 9B). 따라서 마 에탄올과 물 추출물은 고농도 구간 (15-30mg/L)에서 조골세포의 증식을 증가시키는 것으로 해석된다(Fig. 9A, 9B).

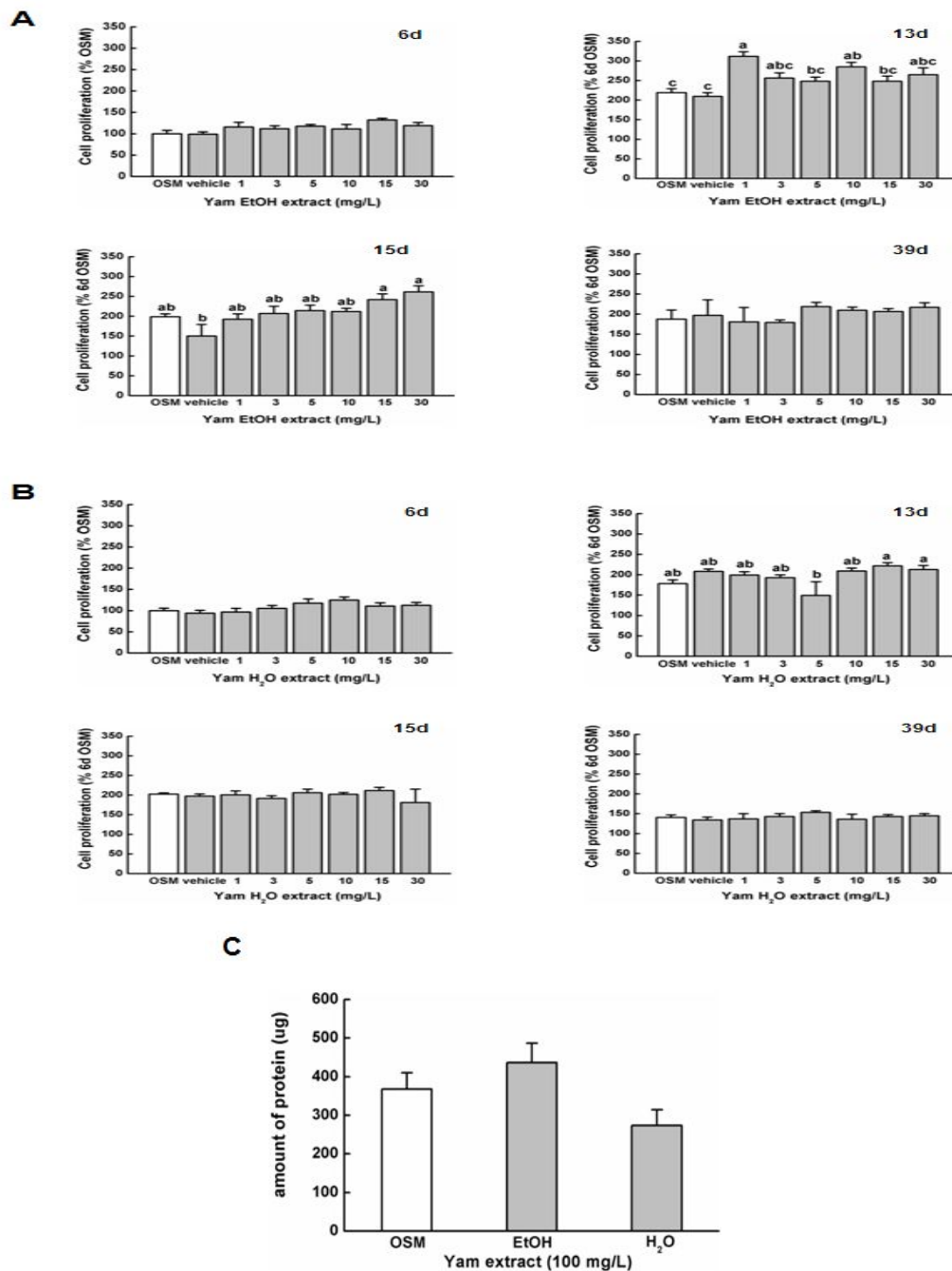


Fig. 9. Yam ethanol and water extract effect on osteoblast proliferation (A), (B) and protein synthesis in MC3T3-E1 cells (C). (A), (B) Cell proliferation was measured by MTT assay. Osteoblastic MC3T3-E1 cells were cultured in α -MEM until confluence. At confluence, cells were treated with varying concentrations (0-30 mg/L) of different yam ethanol and water extracts for 6, 13, 15d and 39d. Proliferation is presented as % of proliferation in normal osteogenic medium (OSM). The effect of the different extracts was analyzed by one-way ANOVA at $p < 0.05$ followed by Tukey as *post hoc* test. Means having different superscripts indicated significant among treatments. (C) Osteoblastic MC3T3-E1 cells were cultured in α -MEM until confluence. At confluence, the cells were treated with yam ethanol and water extracts (100 mg/L). Cells were harvested on 6th day. Protein concentration was measured by BCA protein assay. NS (non-significant, $n=3$)

Collagen type I은 세포외기질의 주요 단백질로서 골조직의 성숙 및 칼슘화를 촉진시키는 역할을 한다. 마 에탄올과 물 추출물은 각각 고농도 (15-30mg/L) 구간에서 세포외기질로의 분비를 증가시켰다(Fig. 10A). 또한 이렇게 분비된 collagen type I의 세포외기질 침착도 시간이 지남에 따라 증가시킴을 확인하였다(Fig. 10B).

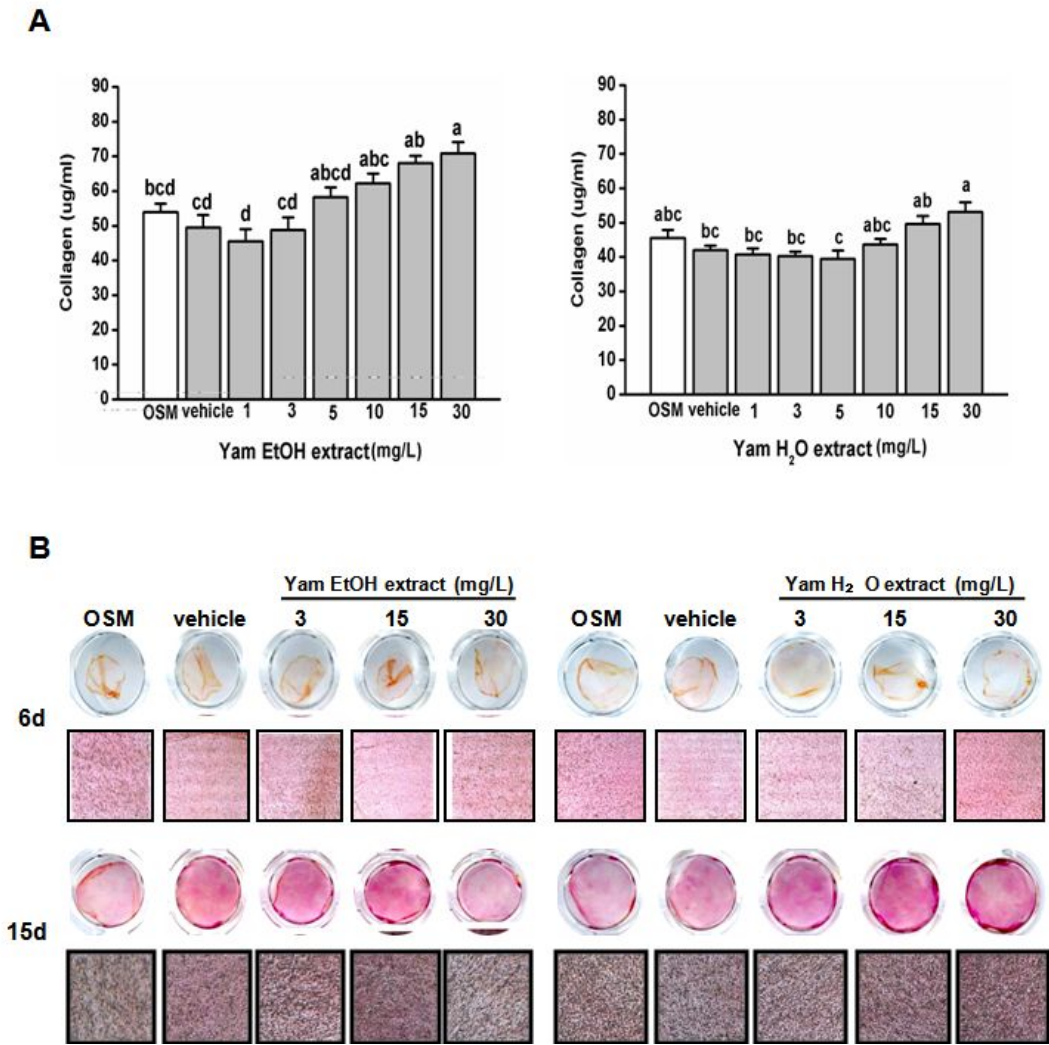


Fig. 10. (A) Medium collagen quantification and (B) cell matrix collagen staining by yam ethanol and water extracts. (A) Cells at confluence were treated with varying concentrations (0-30 mg/L) of different yam ethanol and water extracts for 39days. Medium Collagen level were measured by colorimetric method using Picro-Sirius Red. Collagen synthesis was normalized with protein concentration. Means having different superscripts indicate significant difference yam extracts at $p < 0.05$ by ANOVA followed by Tukey's *post hoc test*. (B) The effect of yam ethanol and water extract on the formation of collagen scaffold for mineralization was assessed by staining and presented as the cellular layer on each culture dish (upper images) and the image of the phase contrast microscopic morphology (lower images). Matrix collagen shown as red stain intensity was stimulated by yam ethanol and water extract in a dose- and time-dependant manner and it was more prominent on day 6 and 15.

ALP 효소는 조골세포에서 합성되어 세포 외로 분비되어 골조직의 세포외기질에서 인산을 분해하는 효소로서 골 형성 초기의 주요한 골 형성 주요 단백질로 평가된다. 마 에탄올 추출물은 농도 간 ALP의 세포외기질로의 분비가 차이는 없으나, 3-5mg/L 구간에서 조골세포배양액보다 활성이 높다. 마 물 추출물 역시 농도 간에 ALP 효소 활성 차이는 없으나, 0-10mg/L 구간에서 조골세포배양액보다 높다(Fig. 11A). 또한 골기질 matrix에서의 ALP 효소 활성도 세포외기질로의 분비와 같은 양상으로 농도별 증가가 나타났으며, 시간이 지남에 따라 증가되었다(Fig. 11B).

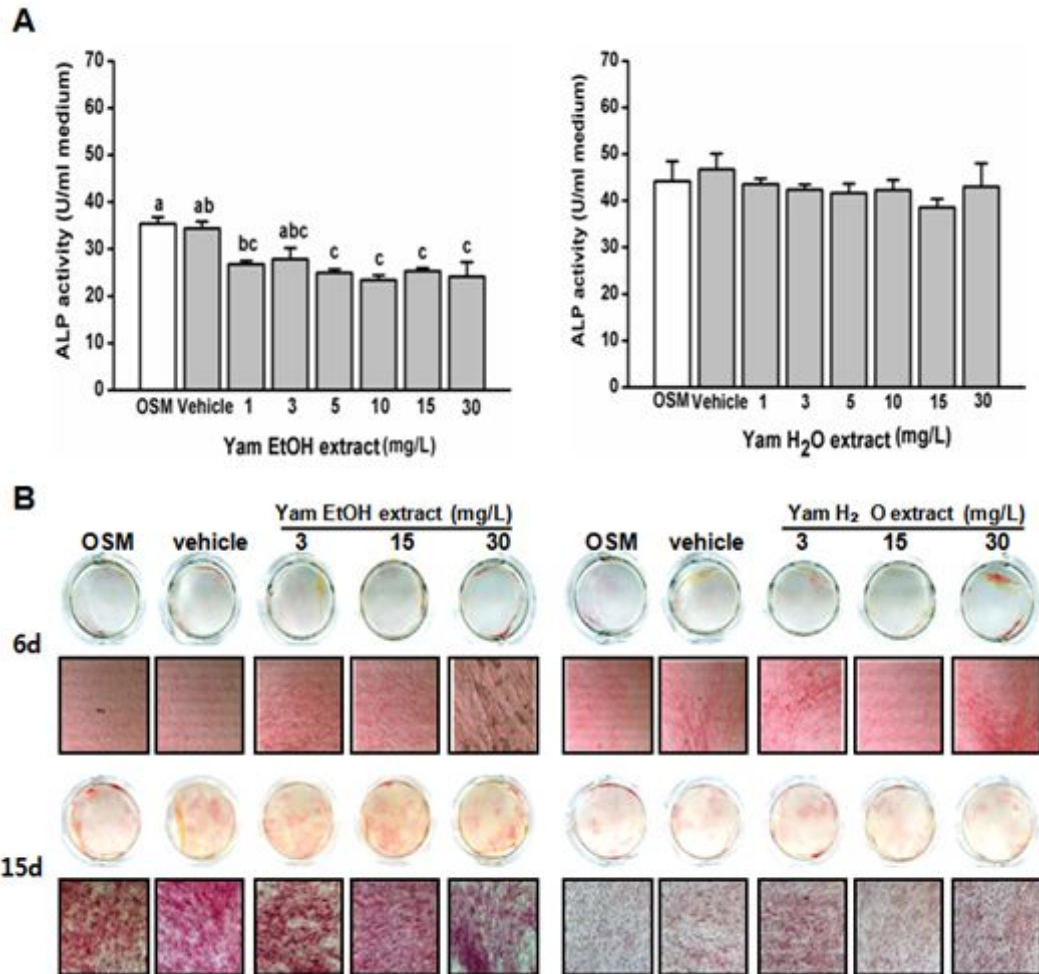


Fig. 11. (A) Medium ALP activity and (B) cell matrix ALP activity staining by yam ethanol extract. (A) Cells at confluence were treated with varying concentrations (0-30 mg/L) of different yam ethanol and water extracts for 39days. Medium ALP activity was measured by colorimetric method using PNPP as substrate and normalized with protein concentrations. Means having different superscripts indicate significant difference between yam extracts at $p < 0.05$ by ANOVA followed by Tukey's *post hoc test*. (B) The effect of yam ethanol and water extract on extracellular matrix ALP activity was measured by staining the products of enzyme activity and presented as the cellular layer on each culture dish (upper images) and the image of the phase contrast microscopic morphology (lower images).

마 에탄올과 물 추출물이 골기질의 칼슘화를 촉진시키는지에 대한 실험을 수행한 결과, 두 추출물 모두 칼슘 침착화를 시켰다 (Fig. 12A). Fig. 4A에서 붉은 색은 Alizarin red 염색약이 골기질에 침착된 Ca과의 결합을 나타낸 것이다. 또한 골기질에는 칼슘과 비례해서 P이 침착하는 바, 이러한 P을 측정하는 실험이 Fig. 12B로서 silver nitrate 염색약이 P과 결합한 부분이 검은 색으로 나타나 있으며, 이는 곧 칼슘화를 측정하는 것으로 해석된다.

마 물 추출물 및 유기용매 추출물(ethanol, butanol, hexane) 처리는 골기질 단백질 collagen type I의 발현을 증진시키는 효과를 보였다(Fig. 13).

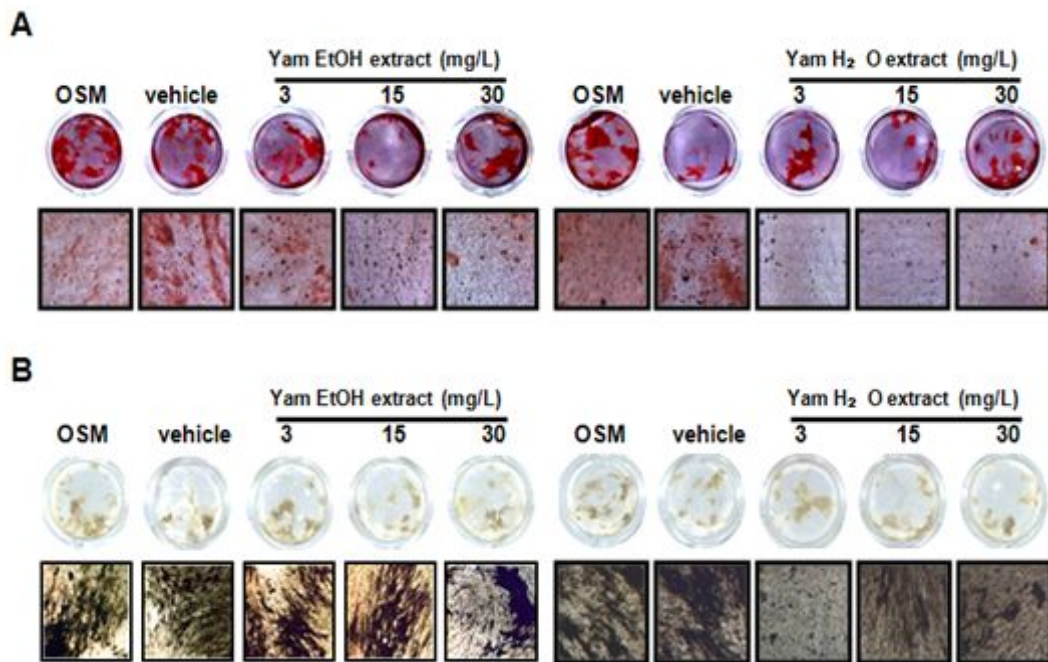


Fig. 12. Alizarin red (A) and von Kossa (B) staining for Ca deposits (bone nodule) by yam ethanol and water extracts in MC3T3-E1 cells. Extra cellular matrix Ca deposits for matrix mineralization was measured using Alizarin red S dye which binds with Ca and silver nitrate dye which binds with P in cell layer matrix.

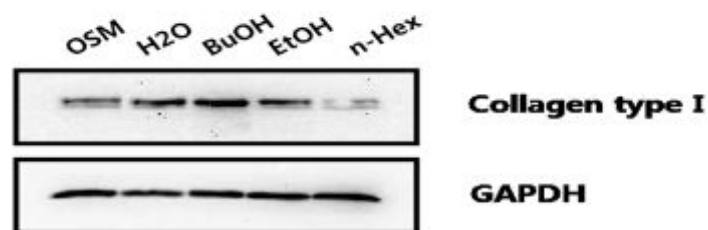


Fig. 13. Effects of various extracts from Chinese yam root on collagen type 1 expression. The expression was analyzed by western blot analysis 6 days after treatments (100 mg/L). Equal protein loading was confirmed by GAPDH expression.

일부 마 추출물(hexane 및 ethanol)은 조골세포의 증식을 증가시키며 마 ethanol과 water 추출물이 세포 증식을 미미하게 증가시켰으며, 세포외기질 단백질인 collagen type I의 세포외분비 및 기질로의 침착, 골 형성 마커인 ALP의 분비와 세포외기질에서의 침착화를 증가시켰고, 세포기질에서의 칼슘을 침착화시켰다. 다양한 유기용매 마 추출물 중에서 ethanol, hexane 및 ethyl acetate 용매 추출물이 다른 용매 추출물 보다 조골세포의 증식률을 증가시켰으며, roots와 barks 추출물 비교 실험에서 이 두 성분에 따른 세포증식률의 변화는 거의 없었다. 실험결과를 종합해볼 때, 마 추출물이 골 형성 작용을 촉진시킬 수 있는 가능성을 제시하고 있다.

제 6절 마 추출 저분자단백질 복합체의 항노화, 항염증 효능 분석

1. 서언

마(*Dioscoreae Rhizoma*)는 마과에 속한 다년생 초본인 마(*Dioscorea batatas* Decaisne) 또는 참마(*Dioscorea japonica* Thunberg)의 주피를 제거한 뿌리줄기(담근체)를 건조하여 사용하는 약재로 항산화 효과, 혈당강하 효과, 콜레스테롤 저하 작용, 비만, 장 기능 개선 효과 등이 있으며, 마의 주요 성분인 methyl protodioscin, methyl protoneogracillin, gracillin, dioscin 등은 인간 암세포에 대한 항종양 효과, 면역조절 효과, phospholipase A₂ 저해작용, 항진균성/세포독성의 활성화, 골다공증 억제 효과 등이 알려져 있다.

염증 생성이 주 원인인 위염과 위궤양은 소화기 질환 중에서 가장 빈도수 높은 질병으로서, 위장관 점막이 위산에 의해 소화되어 궤양을 형성하는 상태를 말하며, 인구의 약 10% 가량이 평생 중 한번은 위염이나 위궤양을 경험한다는 보고가 있다. 또한 우리나라는 위암이 국내 발생 암 빈도수에서 1위로 알려져 있다. 하지만 위염 및 위궤양은 발생빈도가 높은 것에 비해 발생원인은 정확히 밝혀져 있지 않으며, 공격인자의 증가나 방어인자의 약화에 의해 발생하는 것으로 알려져 있다. 공격인자의 증가 요인으로는 산, 펩신분비의 증가 등을 들 수가 있고 방어인자의 약화 요인으로는 위점막의 구조나 형태의 결손, 점액분비의 감소, 중탄산 이온 분비의 감소, 프로스타글란딘 생산의 저하 등을 들 수 있으며, 최근 *Helicobacter pylori*의 감염에 의해서도 위궤양이 발생된다는 보고가 있다.

또한 세포 노화의 경우 세포 주기 및 세포 증식 등을 조절하는 전자조절 인자와 목표 유전자의 기능이 많이 알려져 있으며 이들을 대상으로 하여 마 추출물의 효능을 분석할 수 있다.

이에 본 연구에서는 마 추출물 유래의 노화 및 염증 관련 유전자의 발현 억제 효능의 분석과 저분자 복합체 내의 성분을 분석, 동정함으로써 마 추출물 내의 저분자 복합체 및 효능인자 동정을 바탕으로 기능성 소재 등록 및 제품화 추진에 기여하고자 하였다.

2. 연구방법

가. 연차별 연구수행 방법

마로부터 기능성 물질을 추출하여 HPLC 분석을 거친 후(1년차), 이로부터 단백질 복합체를 분리한 후(2년차), 이들 저분자 단백질을 동정하여 항노화 및 항염증 기능을 검증하였다.



나. 실험 재료

(1) 마 분획물 준비

본 연구에 사용된 마는 시중에 유통되는 단마를 구입하여 껍질을 벗기고 믹서기로 갈아준 뒤 증류수 200mL을 넣고, 다시 믹서기로 섞어주었다. 멸균된 거즈로 1차적으로 마즙을 걸러내고 dialysis bag(MWCO 3500)에 넣고 dialysis bag을 2L의 3차 증류수가 담긴 비커에 담아 4°C chamber에서 48시간 용출하였다. dialysis bag을 제거하고 비커에 용출된 저분자 펩타이드를 회수하기 위해 동결건조를 하였다.

(2) 저분자 복합체 분리

저분자 복합체 분리를 위해 동결건조된 마 추출물은 RP-C18 column을 통하여 HPLC를 이용하여 elution time에 따라 분획하였다. 6 분획으로 분획물을 각각 동결 건조하여 LC-MS로 분석하여 포함되어진 저분자 물질을 분석하였다.

다. 분석 방법

(1) Tricine SDS Gel electrophoresis

회수한 마 저분자 펩타이드를 세포주에 처리할 양을 정하기 위해 1mg/mL, 2.5mg/mL, 10mg/mL, 20mg/mL의 농도의 마 추출물을 20% Tricine SDS Ge 에 loading 하여 전기영동한 후 Coomassie brilliant blue R staining 과 silver staining 방법으로 염색한 후 분석하였다.

(2) 세포배양

본 연구에 사용된 HEK001 세포주는 미국세포주은행(American Type Culture Collection [ATCC], USA)에서 구입하였다. 세포는 Keratinocyte-Serum Free Medium (Keratinocyte-SFM) (Gibco BRL, USA)에 1% antibiotics-antimycotic (Gibco BRL, USA)와 0.04 μ g/ μ L 농도의 EGF(Epidermal Growth Factor, Gibco BRL, USA)를 100 μ L(최종농도 8pg/ μ L) 넣어 배양하였다. 90 mm 배양접시에 1 X 10⁷ cell을 seeding하였고, 배양조건은 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 세포배양기에서 배양하였다. 배양하는 동안 이틀에 한 번씩 배지를 교환해 주었고 배양접시에 70%정도 자랐을 때 마 추출물을 100, 250 1000 ppm이 되도록 처리하여 각 12시간과 48시간 후에 TRIzol(InvitrogenTM, USA) 1mL을 넣고 세포주를 회수하였다.

또한 위염억제 효능을 확인하기 위한 실험에 사용한 SNU 484 세포주는 한국 세포주은행으로부터 구입하여 사용하였으며, RPMI-1640배지에 10% FBS(GIBCO, USA)와 1% antibiotics-antimycotic (GIBCO, USA)을 첨가하여 5% CO₂가 존재하는 37 $^{\circ}$ C incubator에서 2~3일에 한 번씩 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

(3) Cell viability test (MTT assay)

HEK001 세포에 마 추출물의 독성도를 측정하기 위하여 HEK001 세포를 대상으로 MTT assay를 수행하였다. 0.04 μ g/ μ L 농도의 EGF(Epidermal Growth Factor, Gibco BRL, USA) 과 1% antibiotics-antimycotic (Gibco BRL, USA)가 들어간 Keratinocyte-SFM(Gibco BRL, USA)에 5 X 10⁴ cell을 96 well plate에 seeding하고 마 추출물을 각각 최종농도가 100ppm, 250ppm, 1000ppm이 되도록 처리한 후 24시간 동안 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 24시간 후 배양된 배지를 버리고 난 다음 새로운 배지로 교환해주고, 5 mg/mL MTT(Sigma, USA) solution 10 μ L/well을 첨가하여 3시간 동안 배양한 후 DMSO(Sigma, USA) 150 μ L를 첨가하고 96 well plate reader(infinite M200, Austria)에 30분 shaking incubation하여 MTT를 녹인 뒤 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포에 대한 독성은 각각의 대조군의 평균 흡광도 값에 대한 백분율로 나타내었다.

(4) Total RNA preparation 와 cDNA 합성

마 추출물이 처리된 배양접시에 배지를 제거하고 DPBS (WelGENE, Korea) 4mL로 washing 한 후 TRIzol reagent(InvitrogenTM, USA) 1mL을 넣어준 후 scrap하여 15mL polypropylene tube에 담아 5분 동안 상온에 두었다. 이후 0.2mL의 Chloroform(Sigma, USA)을 넣고 15초간 흔든 다음에 상온에서 3분간 배양해준 다음 1.5mL 튜브로 옮겨서 2~8 $^{\circ}$ C, 12000xg에서 10분간 원심분리 하였다. 상층액을 새 1.5mL 튜브로 옮긴 후 0.5mL의 Isopropyl alcohol(Sigma, USA)을 첨가하여 상온에서 10분간 배양한다. 이후 2~8 $^{\circ}$ C, 12000xg에서 10분간 원심분리하여 RNA pellet을 생성하였다. 상층액을 버리고 1mL의 -20 $^{\circ}$ C의 75% 에탄올을 넣고 2~8 $^{\circ}$ C, 7500 x g에서 5분간 원심분리하였다. 상층액을 버리고 튜브에 남아있는 에탄올을 모두 제거되도록 건조한다. RNase-free water 50 μ L를 넣고 pipeting하여 pellet을 60 $^{\circ}$ C에서 10분간 녹인 후 -80 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

또한, 본 실험에 사용된 cDNA는 Superscript III RT kit(InvitrogenTM, USA)를 구입하여 매뉴얼에 따라 cDNA를 합성하였다. 그 과정을 간단히 요약하면 각 샘플의 total RNA를 정량하여 3 μ g/8 μ L가 되도록 0.2mL 튜브에 각각 넣어준 다음 제공된 50 μ M oligo dT 1 μ L와 10mM

dNTP mix 1μL를 넣고 잘 섞어 65°C에서 5분 배양한 다음 ice에 1분간 두었다. 0.2mL 튜브에 다음의 시약들을 추가적으로 넣어 최종 반응 부피를 20μL으로 맞추어 주었다. 1X RT buffer, 5mM MgCl₂, 0.01M DTT, RNaseOUT™ 40 unit, SuperScript III RTase 200 unit을 넣고 50°C에서 50분간 반응시켰다. 반응을 종결시키기 위하여 85°C에서 5분간 배양하고 1분간 얼음에 꽂아 두었다. 1μL의 RNase H를 각각 넣고 37°C에서 20분간 배양시킨 다음 -20°C에서 보관하였다.

(5) Quantitative RT-PCR

합성한 cDNA를 25ng/μL로 희석하여 2μL씩 사용하였으며 Forward & Reverse primer를 각각 0.5μL 씩 사용하였고, Ex Taq(TaKaRa™, Japan) 0.3μL와 제공된 10X buffer 3μL, 2.5mM dNTP Mix 4μL를 넣고 9.7μL의 Cell/Tissue Culture Grade Water (WelGENE, Korea)를 넣어 최종 반응 부피를 20μL로 맞추어 주었다. PCR 반응과정은 94°C: 15sec, annealing 온도: 프라미어 종류에 따라 지정, 72 ; 30sec를 총 24 cycle로 정하여 수행하였다.

Table 1. Oligonucleotide primers used for qRT-PCR for detecting anti-aging effects of yam extract.

Gene	F Primer	R Primer
HIF1A	CGGACAGCCTCACCAAACA	TTGCCCCAGCAGTCTACATG
E2F1	CCCATCCCAGGAGGTCACTT	TGCCCATCCGGGACAA
AKT1	CGCTGGACGATAGCTTGGA	GAGGACAGCGTGGCTTCTCT
RB1	CAAGCAACCTCAGCCTTCCA	AAGGGCTTCGAGGAATGTGA
STAT3	ACCTCGGAGTGCCTACCT	CACCCCCCGCCACAT
TFDP1	ACACACCCCCAGCACTCACT	GGCCCTTGCCATTCTTCTCT
PARP1	GACAGTGTGCAGGCCAAGGT	GCTGGCATTGCGCTTCAC
AIFM1	CCCGCTCTCACAGCCATT	TGCCTCTCGGCTTCTTAGGA
ATF2	AGGTCATGGTAGCGGATGG	GCTGGAGAAGCCGGAGTTTC
SHC1	CCGGTTTGGGTTGGGATAAC	ATGGGAGGGCAGGCCTTA
HMGBl	CCCCGATGTTGGCTATGAAG	AGGCCTCGGACTCTGTCTCA
TGFB1	GCCCAGCATCTGCAAAGC	GGTCCTTGCGGAAGTCAATG

Table 2. Oligonucleotide primers used for qRT-PCR for detecting effects of anti-inflammation

Gene	Forward sequence	Reverse sequence
CHOP	CTTCTCTGGCTTGGCTGACT	TCTGTTTCCGTTTCCTGGTT
STAT3	ACCTCGGAGTGCCTACCT	CACCCCCCGCCACAT
DENR	CGCACCCAGCCTGAGT	CAGCGCACATACATGGTTTT
NRF2	AGTCCCAGTGTGGCATCAC	GGGATATGGAGAGCTTTTGC
GAPDH	ACCACAGTCCATGCCATCAC	TCCACCACCCTGTTGCTGT

(6) 마 저분자물질 HPLC 분획물 내 총 phenolic compound 함량 및 총 당 함량 비교

마 저분자물질 HPLC 분획물의 polyphenol 함량을 분석하기 위해 시료 50 μ L에 Folin-Ciocalteu's Phenol 시약을 50 μ L 넣고 상온에서 5분 반응시켰다. 그 다음 0.7M Na₂CO₃ 500 μ L을 넣어 1시간 반응시킨 후 OD 750nm에서 측정된 후 표준용액으로 Tannic acid 100~500 ppm을 사용하여 비교 정량하였다.

마 저분자 물질 HPLC 분획물 내 총 당함량을 분석하기 위해 시료 50 μ L과 5% phenol 50 μ L 그리고 황산용액 250 μ L을 넣고 잘 섞어 주었다. 끓는 물에 10분 반응 시키고 ice에 15분 반응시킨다. OD 490nm에서 측정된 후 표준용액으로 sucrose 100 ~ 500 ppm을 사용하여 비교 정량하였다. 또한 마 저분자 물질 HPLC 분획물에 함유되어 있는 당 종류를 분석하기 위해 당 전기영동을 수행하였다. 각 분획물 sample 10 μ L와 0.15M ANTS(8-AminoNaphthalen-1,3,6-Trisulfonic acid disodium salt) 5 μ L, 1M 시안화나트륨(NaCN₃H) 5 μ L를 넣고 50 $^{\circ}$ C 항온 수조에서 15시간 반응시켰다. 반응 후 50 $^{\circ}$ C에서 2시간 농축하고 20% glycerol 50 μ L 넣고 섞어 준 후, sample 10 μ L를 well에 loading하고 100V에서 1시간, 200V에서 4시간 running 하였다. Standard로는 galactose와 dextran를 사용하였다.

(7) 마 추출물 처리에 따른 세포 총 단백질 분리 및 immunoblot assay

마에서 분리한 저분자 물질 HPLC 분획물을 HEK001 세포에 처리한 후 2mM PMSF(Sigma, USA)와 phosphatase inhibitor(Roche, Germany)가 포함된 2X RIPA buffer(Cell signaling, USA) 0.2mL 처리하고 cell을 회수하여 1.5mL tube로 옮긴 후 26GX 1mL syringe needle에 10회 통과시키며 세포를 파쇄하였다. 14,000xg, 4 $^{\circ}$ C, 10분 원심분리하여 회수한 protein sample을 8% SDS-PAGE를 이용하여 분리한 후 SuperSignal[®] West Femto (Thermo scientific, USA)를 이용하여 immunoblot 분석을 하였다.

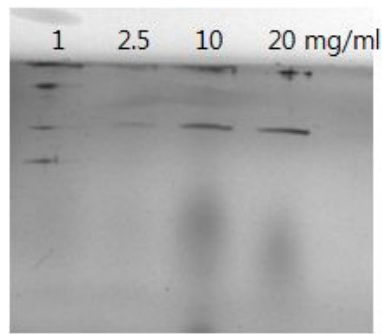
3. 연구결과

가. 저분자 복합체 분리

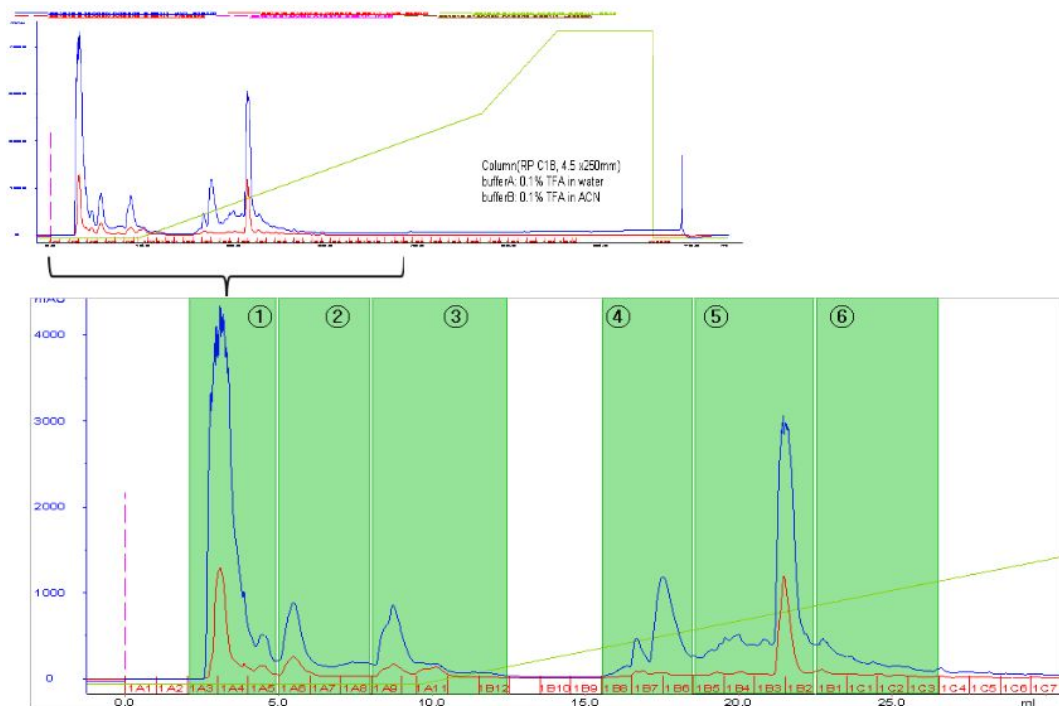
마 저분자 펩타이드를 세포주에 처리할 양을 정하기 위해 20% Tricine SDS Gel에 농도별 마 추출물을 loading하였다. Silver staining으로 확인한 결과 저분자 펩타이드의 처리량을 최대 1000ppm으로 정하였다. 또, RP-HPLC를 이용하여 마 추출물을 분획한 후 분획물(Fraction 1~6)을 동결 건조한 후 실험에 사용하였다(Fig. 1).

나. Cell viability test (MTT assay)

HEK001 세포의 MTT assay를 통하여 마 추출물의 독성도를 측정하였다. 마 추출물을 HEK001 세포주에 처리한 결과 대조군과 비교하여 처리군에서 거의 비슷한 생존율을 보임으로 회수한 저분자 펩타이드가 세포주에 전혀 독성을 보이지 않는 것을 확인하였다(Fig. 2).



(A)



(B)

Fig 1. Fractionation of low sized molecules by RP-HPLC. A) Tricine SDS-PAGE. Peptides were extracted and dialyzed against buffer (20 mM Tris, pH. 7.0 20 mM NaCl) with from yam extract, B) Fractionation profile of LMP eluted using RP-C18.

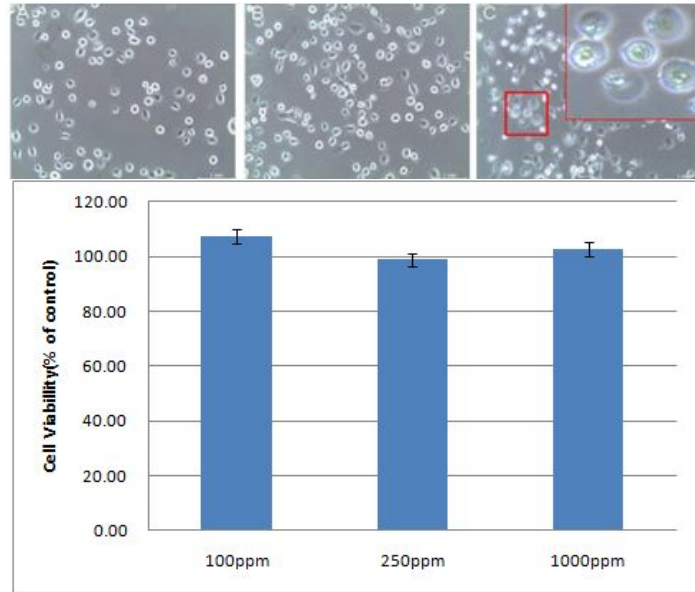


Fig. 2. Relative viability of HEK001 after treatment with yam extract. HEK001 cells were plated at 5×10^4 cells/well in a 96-well plate and incubated with 100ppm, 250ppm, 1000ppm yam extract for 24hr. Cell viability was measured after treatment with each extract by MTT assay at 570nm. Indicated values were measured with cell amount in proportion to the amount of untreated cell.

다. RT-PCR을 활용한 노화 억제 효능 분석

마 추출물의 노화 억제 효능을 분석하기 위하여 마 추출물을 HEK001 세포에 최종농도가 각각 100, 250, 1000ppm이 되도록 처리한 후 각 12시간과 48시간 배양하였다. TRIzol (Invitrogen™, USA) 1mL을 사용하여 세포주를 회수하였다. 회수된 세포를 이용하여 RNA 분리하였고 RNA를 주형으로 하여 cDNA 합성한 후 각 시료를 multiplex-PCR 분석을 위해 개별 PCR을 진행하였다.

디자인된 PCR primer를 사용하여 마 추출물을 처리하였을 때 농도별 시간별 각 노화관련 유전자의 발현변화를 본 결과 HIF1A는 1000ppm처리 후 12시간에서 두드러지게 발현양이 증가하였다(Fig. 3). AKT1유전자는 처리 후 12시간의 모든 농도에서 발현이 증가하였으며 100ppm 농도에서 12시간과 48시간을 비교하였을 때 급격히 발현양이 감소하는 것을 볼 수 있었다. RB1유전자는 12시간 처리군에서 농도 의존적으로 발현양이 증가하는 것을 볼 수 있었고, 1000ppm 처리 후 48시간에서 발현이 약간 증가하였다. STAT3 유전자는 250ppm 처리 후 48시간에서 발현이 증가하였다. AIFM1 유전자는 1000 ppm 처리 후 12시간과 48시간에서 발현이 증가하였고, 12시간 처리군에서 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보였다.

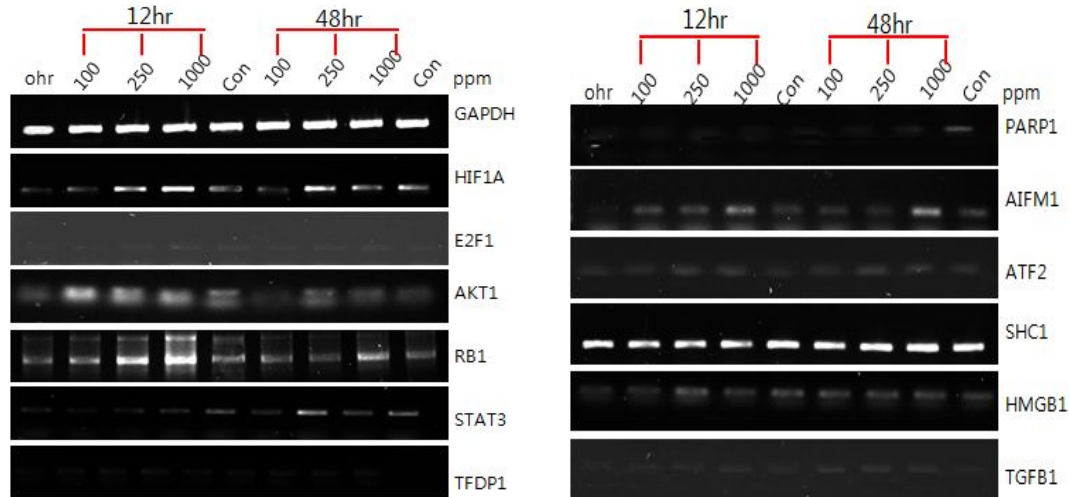


Fig. 3. Profiles of gene expression related to anti-aging. cDNA of aging-related genes were synthesized with total RNA purified from the cells after treatment with indicated yam extract.

HMGB1 유전자는 250ppm 처리 후 12시간에서 발현이 조금 증가하였다. E2F1, TFDP1, PARP1, TGFB1, ATF2 유전자는 발현양의 변화가 미비하였다. 전체적으로 250ppm 이상의 농도에서 각 유전자의 발현양이 증가하는 것을 확인하였으며 처리 후 12시간에 발현이 대부분 증가하는 것을 볼 수 있었다. 각 유전자는 신호전달 물질 혹은 전사인자이며 항암, 항산화, 세포성장 및 분화, apoptosis 등에 연관되어 있다고 알려져 있다. PARP1은 성장과 분화에 관련되어 있지만 AIF가 translocation되면 함께 세포사멸을 이끈다. PARP1 양과 활성의 감소는 세포의 주기가 늘어난다고 보고된바 있다(Grube and Burkle, 1992).

STAT3는 성장인자와 cytokine들을 활성화 시키며 노화관련 질병에 연관되어있다고 알려져 있다. AKT1은 IGF와 같은 성장인자를 transduction하며 genotoxic stress를 protect한다. 종합적으로 마의 저분자 펩타이드 처리된 HEK001 세포주에서 250ppm 이상의 농도에서 항산화, 항암, apoptosis 억제력을 검증할 수 있었으며 그에 연관된 항노화 효능도 확인할 수 있었다.

라. RT-PCR을 활용한 염증 억제 효능 분석

마 분획물이 SUN 484 세포주에 미치는 영향을 알아보기 위하여 분획물을 처리하지 않은 대조군(0, 24h)과 분획물 6가지를 처리한 실험군의 CHOP, STAT3, DENR, NFR2, GAPDH mRNA의 발현 정도를 측정하였다. NFR2, GAPDH의 경우 대조군과 실험군 모두에서 발현차이가 보이지 않았다. 반면 CHOP, STAT3는 대조군에 비해 실험군에서 발현 증가를 보였고, DENR은 Fraction 5 처리군에서 발현이 감소하였다. (Fig 4.). GAPDH 유전자의 발현량으로 normalization 하여 각 유전자별 발현 변이 형태 분석 결과는 아래와 같다.

유전자명	발현 분석
CHOP	대조군에 비해 분획물 처리군에서 발현이 증가하였고, Fraction 5 처리군에서 다른 분획물 처리군에 비해 발현이 감소하였다
STAT3	대조군에 비해 분획물 처리군에서 발현이 증가하였고, Fraction 4 처리군에서 다른 분획물 처리군에 비해 발현이 증가하였다.
DENR	대조군과 분획물 처리군에서의 발현이 비슷하였고, Fraction 4 처리군에서 발현이 증가하였다.
NFR2	대조군에 비해 처리군에서 발현이 약간 증가하였고, Fraction 6 처리군은 대조군에 비해 발현차이가 없었다.

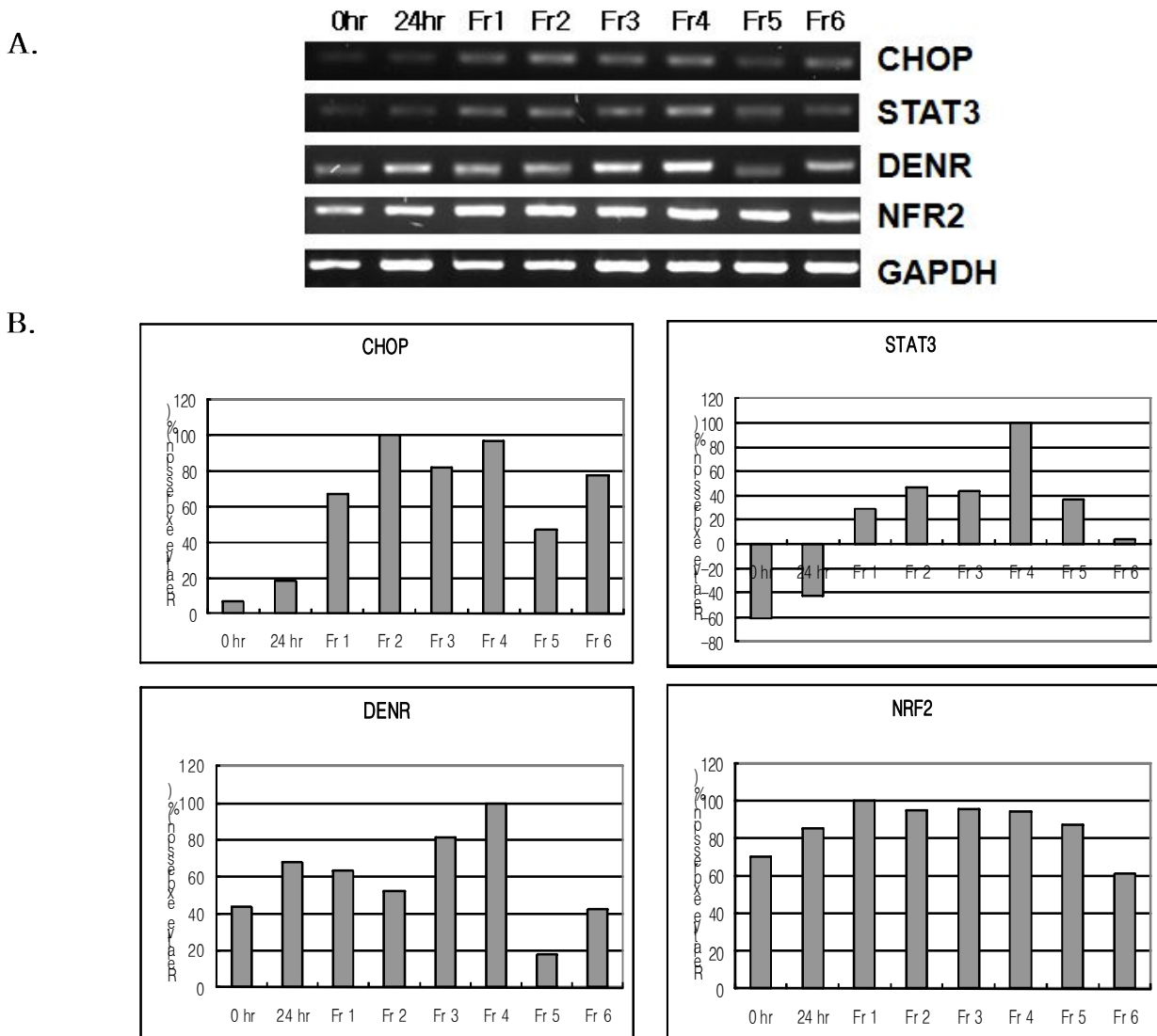


Fig 4. Relative expression of genes related inflammation in SNU 484 after treatment with each fractions of *Dioscoreae Rhizoma* extract. cDNA of inflammation-related genes were synthesized with total RNA purified from the cells after treatment with indicated yam extract.

다. 분리 저분자 복합체 동정 분석

RP-C18 column을 이용하여 HPLC elution time에 따라 분획되어진 저분자 복합체 동정을 위해 6 종의 분획물을 동결 건조하여 LC-MS/MS 로 분석하였다(Fig. 5). 항염증 효능을 보인 Fr 2번, Fr 4번, Fr 6번의 저분자 결합체 내에 수십 종 이상의 저분자 물질이 포함되어 있는 것을 확인하였다. 향후 항염증 효능을 바탕으로 한 물질동정 실험을 진행하였다.

마 저분자 물질 HPLC 분획물의 각 구간별로 포함된 성분 분석을 위해 매트릭스 보조 레이저 탈착 질량분석 시스템(MALDI-TOF, Micromass, UK)을 이용하여 전체 분석 범위를 10-4000Da으로 정하고 10-800Da, 800-1400Da, 1400-4000Da 세 구간으로 나누어 분석하였다 (Fig. 6).

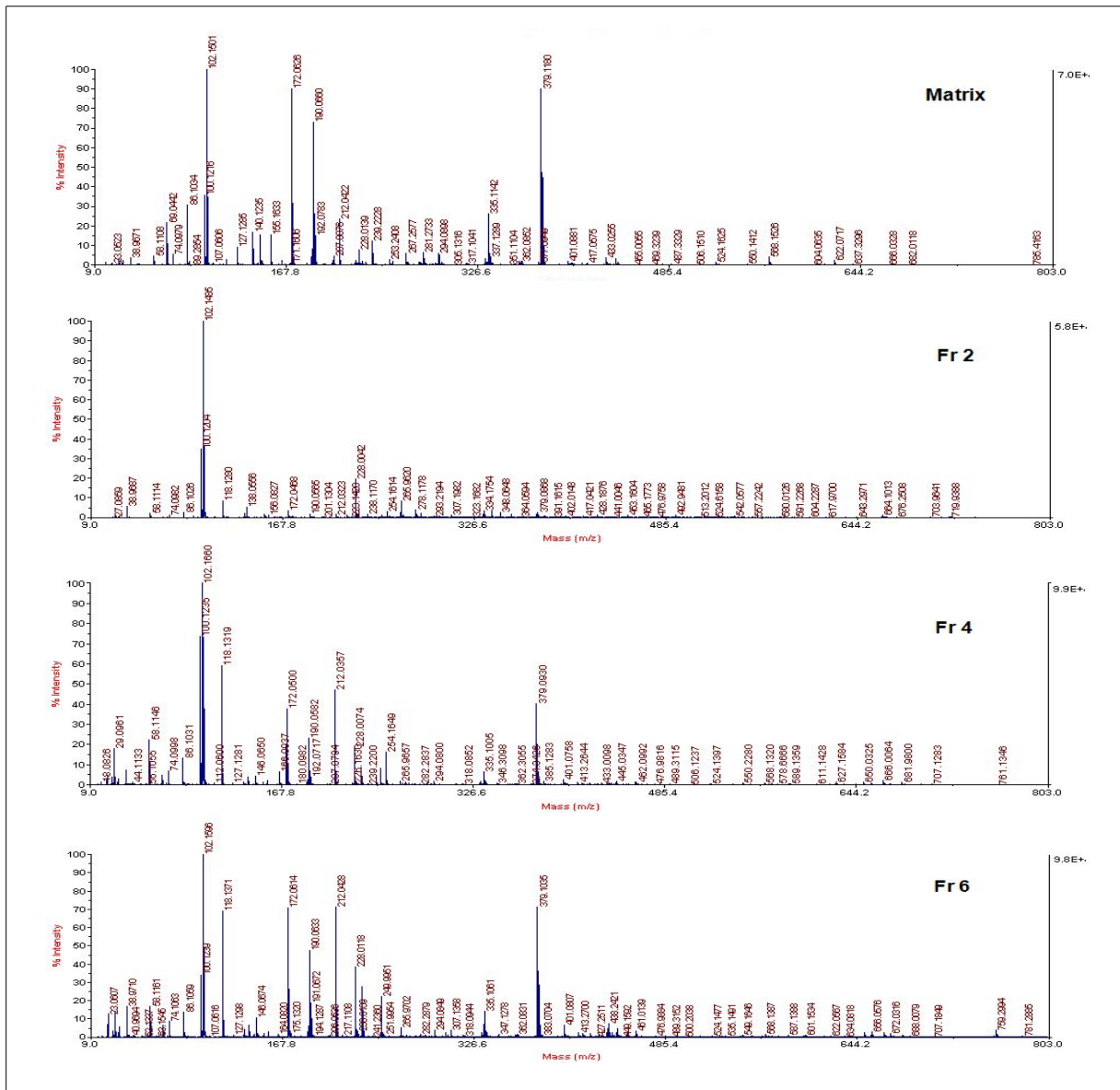
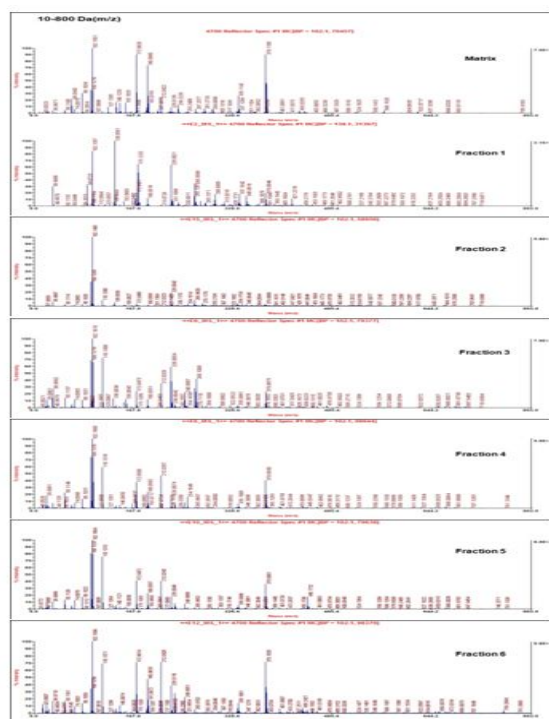


Fig 5. LC-MS/MS chromatogram of Fr2 and Fr4 fractionated using RP-C18 column. Each fraction (10-4000 Da) was analyzed with LC-MS.

A



B

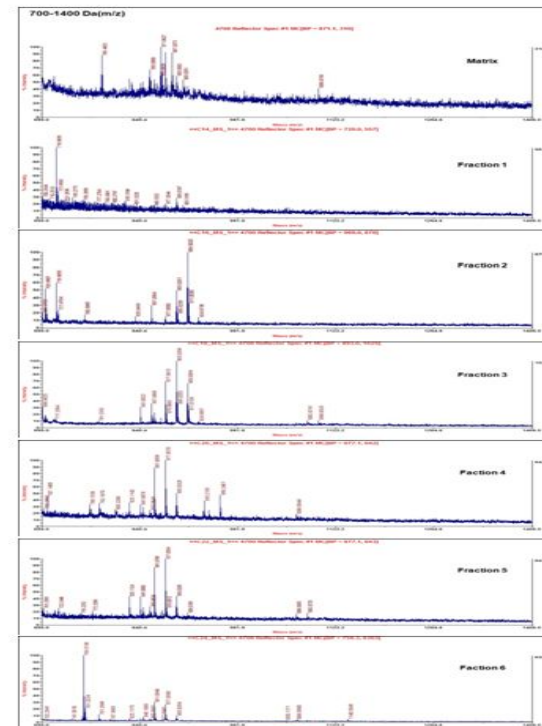


Fig. 6. Identification of low sized molecules in 10-800 Da range(A) and in 800-1400 Da range(B) from HPLC-fractionated yam extract by LC-MS.

각 fraction에 포함된 mass들을 각 fraction의 효능과 비교 분석하였을 때 (Table 3), fraction 1의 138.0578과 fraction 4의 707.1398, 767.1554, 933.1931 그리고 fraction 6의 190.0645, 379.0157 등이 fraction 간의 차이를 나타내는 화합물일 것으로 판단된다. 따라서 각 mass 값을 MS/MS DB 분석을 통해 물질을 동정하여 각 화합물의 효능을 입증하고 그 화합물의 동정이 추가로 필요하다.

Table 3. Selected mass value in each fraction.

#	Fraction1	Fraction2	Fraction3	Fraction4	Fraction5	Fraction6
Mass (m/z)	102.1357	102.1485	102.1615	102.166	102.1664	102.1596
	138.0578	228.0041	118.1308	118.1319	118.1313	118.1371
	228.0025	703.9909	228.0056	172.0516	172.0482	172.062
	719.9634	719.9655	268.1074	212.036	212.0345	190.0645
		857.0566	379.0888	707.1398	379.0905	212.0456
		893.0245	699.971	767.1554	446.1734	228.012
		909.002	841.07	861.0664	825.0994	379.1057
			857.0413	877.0403	841.0668	759.3135
			877.0342	893.013	861.0645	861.0826
			893.0055	933.1931	877.0372	877.059
			909.9821	956.2212	893.0075	
					908.9819	

* Bold letter represent the specific mass in each fraction among fractions.

바. 마 저분자물질 HPLC 분획물 내 총 phenolic compound 함량비교

천연물 소재에 함유된 폴리페놀 성분은 항균, 항암, 항염증 등에 활성을 지니며, 독성은 거의 나타나지 않는 것으로 알려져 있으며 강력한 항산화 활성을 가진 폴리페놀에 관한 연구가 최근 천연물 소재의 재조명과 함께 지속적으로 이어지고 있다.

각 분획구간별 phenol 화합물의 함량을 비교한 결과(Fig. 7), fraction 1 ~ 6번 순으로 941.2 μg , 32.7 μg , 95.5 μg , 31.4 μg , 169.8 μg , 59.4 μg 으로 fraction 1번에서 함량이 가장 많은 것으로 분석되었다.

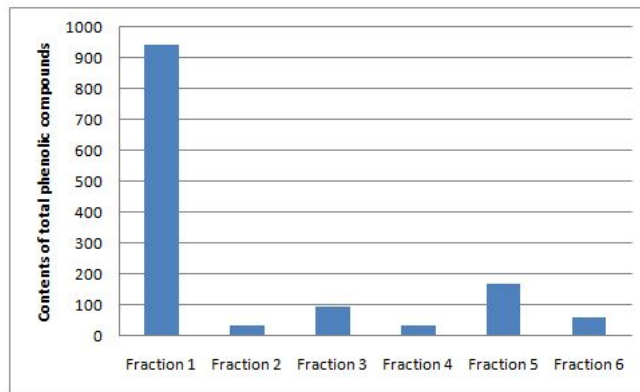


Fig 7. Quantitation of total phenolic compounds in HPLC fractions

사. 마 저분자물질 HPLC 분획물 내 총 당 함량비교

마 저분자 물질 HPLC 분획물 내 총 당함량 측정하기위해 표준용액으로 100 ~ 500ppm 농도의 sucrose를 사용하여 분석하였다. 당류는 음식의 맛을 좋게 하고, 장기간 보존 할 수 있게 할 뿐만 아니라 주요 열량원으로 작용하며 당 구조를 가진 대부분의 화합물은 세포내에서 신호 전달 물질로 기능하기도 한다. 또한 비만 등의 현대병이 사회문제로 등장하면서 각 분획물에 포함된 당류의 분석을 통하여 그 함량이 제품화에 문제가 되는지를 확인할 필요가 있다.

각 분획구간별 총 당 함량을 비교한 결과(Fig. 8), fraction 1 ~ 6 순으로 46.860mg, 125.9 μg , 126.5 μg , 121.4 μg , 102.7 μg , 104.9 μg fraction 1번에서 함량이 가장 많은 것으로 분석되었다.

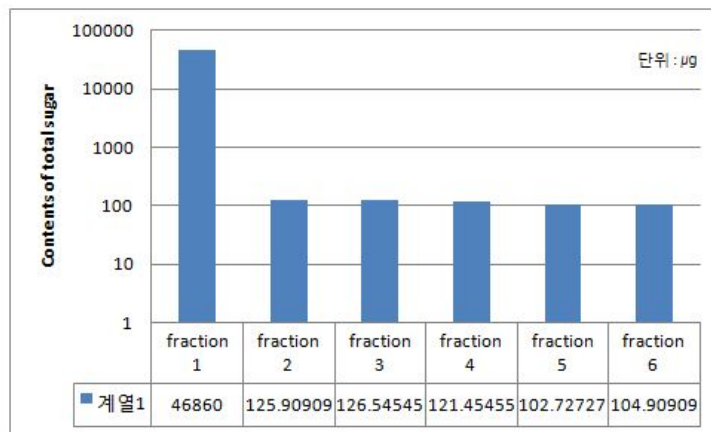


Fig. 8. Quantitation of total sugar compounds in HPLC fractions

또한 마 저분자 물질 HPLC 분획물에 함유되어 있는 당 종류를 당 전기영동을 수행하여 분석하였다. 단당류 standard로 galactose를 사용하고 다당류 standard로 dextran을 사용하여 비교 하였을 때(Fig. 9), 모든 분획구간에서 5당 이상의 올리고당은 형성되지 않았고 4당 크기 이하의 당을 포함하고 있는 것으로 판단된다.

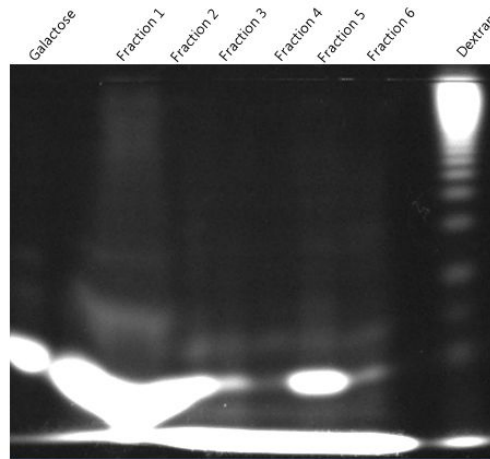


Fig. 9. Determination the type of oligosaccharides in low molecular weight fractions of yam extract

아. 마 저분자물질 HPLC 분획물의 노화 억제 효능 분석 - RNA 발현 중심

마 저분자 물질 HPLC 분획물에 함유되어 있는 펩타이드를 분석하기 위해 이차원 전기영동을 수행하였으나 대부분의 분획물에서 단백질 성분이 검출되지 않았다. 또한 마 저분자 물질 HPLC 분획물의 노화 억제 유전자 발현 억제 효능을 분석하기 위하여 먼저 HEK001 세포주에 분획물을 처리한 결과 분획물을 처리하지 않은 대조군과 비교하여 처리군에서 거의 비슷한 생존율을 보이므로(Fig. 10), 회수한 저분자 물질이 세포주에 전혀 독성을 보이지 않는 것을 확인하였다.

마 저분자 물질 HPLC 분획물의 노화 억제 유전자 발현 억제 효능을 분석하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다. 디자인된 PCR primer를 사용하여 마 저분자 물질 HPLC 분획물을 처리한 후 각각 24h, 48h 동안 처리한 fraction 별 처리군과 처리하지 않은 대조군의 RNA를 분리하고 RT-PCR을 통하여 HIF1A, HMGB1, PARP1, RB, TFDP1, TGFβ1, CREB1, AIFM1의 발현양을 분석하였다(Table 4).

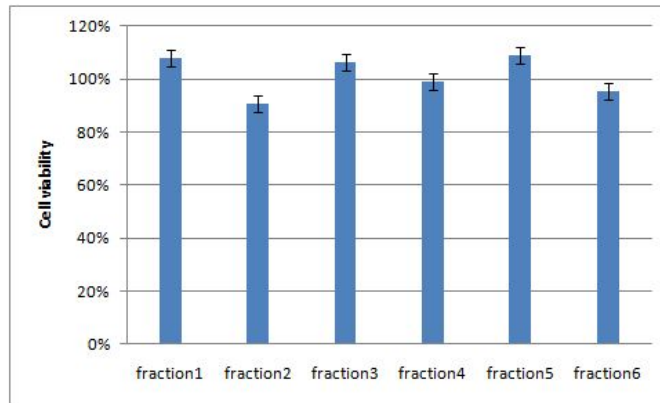


Fig. 10. Relative viability of HEK001 after treatment with lower molecule of yam extract fractionated by HPLC. HEK001 cells were plated at 5 X 10⁴ cells/well in a 96-well plate and incubated with 10ppm lower molecule of yam with fractionated by HPLC for 24hr. Cell viability was measured after treatment with each extract by MTT assay at 570nm. Indicated values were measured with cell amount in proportion to the amount of untreated cell.

Table 4. RNA expression analysis in the fractions of Chinese yam extract.

유전자	발현 분석
HIF1A	전체적으로 처리하지 않은 대조군에 비해 발현양이 감소하는 것을 확인하였으며 Fraction 2, 4의 경우 24h 처리군과 fraction 2, 4, 6의 경우 48h 처리군에서의 발현양이 더 감소하는 것을 확인할 수 있었다.
HMGB1	Fraction 3의 경우 24h 처리군은 미처리 대조군과 비슷한 발현을 보였으며, 나머지 처리군의 발현은 대조군에 비해 감소하였다. Fraction 2, 4의 경우 48h 미처리군 대조군에 비해 48h 처리군의 발현은 크게 감소하였으며, 나머지 처리군의 발현은 대조군에 비해 약간 감소하였다.
PARP1	Fraction 2, 4의 경우 24h 미처리 대조군에 비해 24h 처리군에서의 발현은 크게 감소하였으며, 나머지 처리군은 대조군과 비슷한 발현을 보였다. Fraction 5, 6 처리의 경우 48h 미처리 대조군에 비해 48h 처리군에서의 발현이 크게 감소하였으며, fraction 2의 처리 경우에는는 약간 감소하였다.
RB	Fraction 2, 4의 경우 24h 미처리 대조군에 비해 24h 처리군에서의 발현은 크게 감소하였으며 fraction 6 처리의 경우에는는 약간 증가하는 것을 확인하였다. Fraction 2 처리 경우만 제외하고 나머지 처리군에서는 48h 처리군에서의 발현만이 감소하였고 대조군과 비슷한 발현을 보였다.
TFDP1	Fraction 3의 경우 24h 처리군에서 24h 미처리 대조군과 비슷한 발현을 보였으며, 나머지 처리군의 발현은 대조군에 비해 감소하였다. Fraction 2, 4의 처리시 48h 미처리군에 비해 48h 처리군에서의 발현만이 약간 감소하였다.
TGFβ1	Fraction 3 처리시 24h 처리군은 24 hr 미처리군과 비슷한 발현을 보였으며, 나머지 처리군의 발현은 대조군에 비해 감소하였다. Fraction 4, 6의 경우 48h 처리군에서 발현은 크게 감소하였으며 다른 분획물의 처리시에는 48h 미처리군에 비해 48h 처리군의 발현은 모두 감소함을 보였다.
CREB1	Fraction 2, 4, 5의 경우 24h 처리군에서 발현이 약간 감소하였으며, 나머지 처리군은 대조군과 비슷한 발현을 보였다. Fraction 2 처리 시 48h 처리군에서의 발현이 크게 감소하였다.
AIFM1	Fraction 2 처리시 24h 처리군에서 발현이 크게 감소하였으며, 나머지 처리군은 대조군에 비해 발현이 약간 감소함을 보였다. 또한 Fraction 1, 3, 6의 경우에서 48h 처리군의 발현은 모두 감소함을 보였으며, Fraction 2, 4, 5의 경우에는는 발현이 크게 감소하였다.

각 유전자는 신호전달 물질 혹은 전사인자이며 항암, 항산화, 세포성장 및 분화, apoptosis 등에 연관되어 있다고 알려져 있다. HIF1A는 혈관 내 산소비율이 1%이하 일 때 발현이 유도되며 정상산소 비율일 때 분해된다. HIF1A는 VEGF를 활성화시키고 VEGF는 MAPK와 AKT 등의 pathway에 연결되어 혈관신생을 촉발한다. 세포 성장과 생존에 관련된 유전자를 전사하는 인자인 CREB1 또한 HIF1A가 activation 되었을 때 함께 세포의 방어작용에 관련된 유전자의 전사요소로 사용된다. CREB knockout mice가 normal mice에 비해 수명이 짧다고 보고된 바 있어(Rudolph et al., 1998) 노화의 중요한 전사인자로 생각된다. PARP1은 성장과 분화에 관련되어 있지만 AIF가 translocation되면 함께 세포사멸을 이끈다(Joza et al., 2001). PARP1 양과 활성의 감소는 세포의 주기가 늘어난다고 보고된 바 있다(Grube, 1992). AKT1은 IGF와 같은 성장인자를 transduction하며 genotoxic stress를 protect한다. 종합적으로 HEK001 세포주에 처리된 마 저분자 물질 HPLC 분획물중 1번과 6번에서 항산화, 항암, apoptosis 억제력을 검증 할 수 있었으며(Fig. 11), 그에 연관된 항노화 효능도 확인 할 수 있었다.

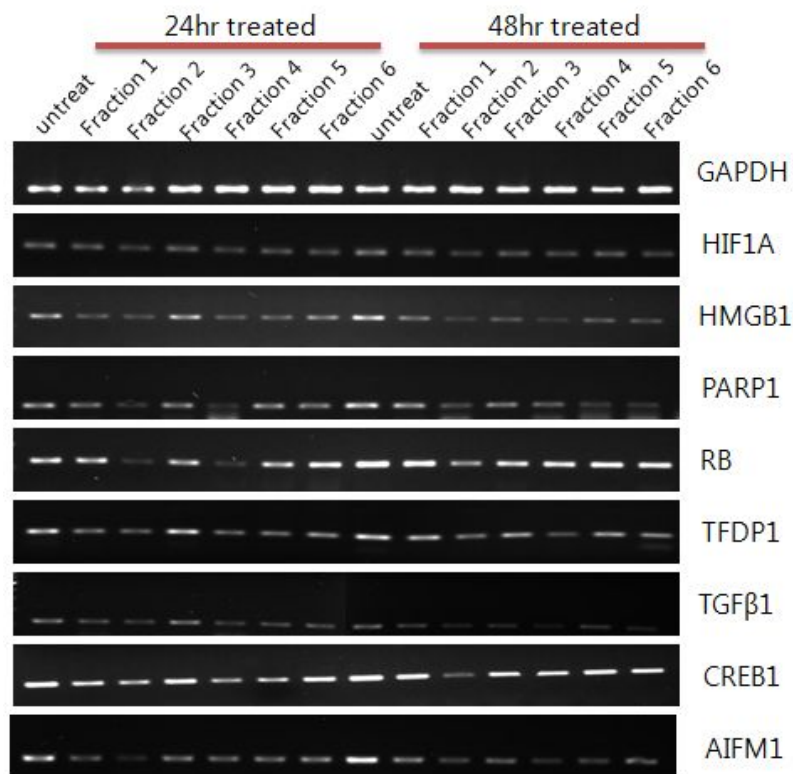


Fig 11. Quantitative analysis of aging-related gene expression. cDNA were synthesized with total RNA purified from the cells after treatment with indicated concentrations of each fractions of yam extract.

자. 마 저분자물질 HPLC 분획물의 노화 억제 효능 분석 - 단백질 발현 중심

마 저분자 물질 HPLC 분획물의 노화 억제 유전자 발현 억제 효능을 단백질 수준에서 분석하기 위하여 각 단백질 특이적 항체를 이용하여 immunoblot을 수행하였다.

Fraction 1, 6 처리 시에 세포내의 AIFM의 발현양이 감소되는 것으로 확인되었으며 또한 fraction 6의 경우는 세포처리 후 48시간이 지나면 그 효율이 감소한 것으로도 판단된다(Fig. 12). ATF2는 Oxidative stress의해 반응하는 것을 포함하여 다양한 기능을 가진 전사요소이다(Kurata, 2000; Waas *et al.*, 2001). ATF2는 피부암 세포에서 비정상적으로 발현이 증가한다고 보고된 바 있다(Leslie and Bar-Eli, 2005; Papassava *et al.*, 2004). 분획물 처리시 ATF2의 발현 감소 결과는 분획물에 의한 oxidative stress의 감소결과로 보여진다. SHC는 p46, p52, p66 세 이형단백질을 암호화하는데 p66에 double-mutant된 mice에서 수명이 30% 길어지는 것이 보고된바 있다(Migliaccio *et al.*, 1999). Fraction 4의 경우에서 24, 48시간 처리군에서 대조군에 비해 RB1의 발현이 증가하는 것을 확인하였다(Table 5). PCR 결과 분석 시 1, 2, 4, 6번 fraction 등에서도 유의한 발현 결과를 보여주었으나 단백질 분석에서는 fraction 4에서의 유전자 발현 조절 기능이 강하게 나타났으며 이는 실제적인 항암 효능으로 여겨질 수 있다. Fraction 1,6 처리 시에는 mRNA 발현 분석결과에서와 비슷하게 apoptosis 억제력과 항노화 효능을 보인다.

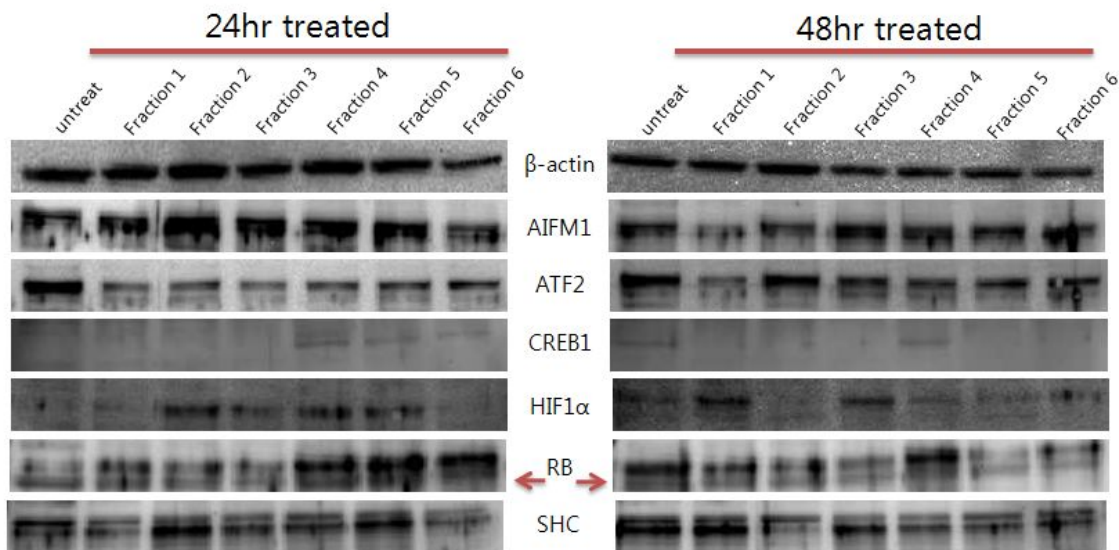


Fig 12. Relative Expression of aging-related proteins in HEK001 cell line after treatments with indicated concentrations of each fractions of yam extract.

Table 5. Analysis of protein expression in the fractions of Chinese yam extracts.

단백질명	발현 분석
AIFM1	Fraction 2, 3, 4, 5의 경우 24h 처리군에서의 발현이 크게 증가하였다. Fraction 1,6의 경우 24h 처리군과 treated fraction 1의 48h 처리군의 경우 대조군에 비해 발현양이 감소하는 것을 확인하였다.
ATF2	모든 fraction 처리시에 24h 처리군에서의 발현이 모두 감소하였다. Fraction 1 처리시에는 48h 처리군에서도 발현이 크게 감소하였다.
CREB1	Fraction 4, 5, 6 의 경우 24h 처리군에서의 발현이 크게 증가하였고, 48h 처리군에서의 발현은 대조군에 비해 모두 감소하였고, fraction 4 처리시에는 대조군과 비슷한 발현을 보였다
HIF1 α	Fraction 2, 3, 4, 5의 경우 24h 처리군에서의 발현은 증가하였고, fraction 1, 3 의 처리의 경우 48h 처리군에서의 발현이 크게 증가하였다.
RB	Fraction 4, 5의 경우 24h 처리군에서의 발현이 증가하였고, fraction 4의 처리 경우에서 48hr 처리 시에 발현이 증가하였고, fraction 5, 6 의 48h 처리 시에는 발현이 크게 감소하였다.
SHC	Fraction 2, 5의 경우 24h 처리군에서의 발현이 크게 증가하였고, fraction 1, 6 에서의 경우 그 발현이 약간 감소하였다. Fraction 1, 3 의 경우 48h 처리군에서 발현이 약간 증가하였으며, 나머지 처리군의 발현은 대조군에 비해 감소하였다.

제 7절 발효 및 증자건조 공정을 통한 기능성분 소재화

1. 서언

마의 기능적 우수성에도 불구하고, 마 가공산업은 건조 및 분말화 등의 단순한 1차가공의 수준에 그쳐, 소비자의 기호도를 충족시키지 못하고 대부분의 마 소비는 생마와 건조분말제품의 섭취가 주를 이루고 있다.

마의 소비량과 부가가치를 높이기 위해서는 마의 영양학적, 기능적 우수성을 증진시키는 발효 공정 등 새로운 기술을 개발하여 소비자의 기호를 만족시킬 수 있는 다양한 제품의 개발이 필요하다.

본 연구는 마의 발효공정 개발에 따른 마제품의 효능 및 관능적 특성 개선, 증자숙성 가공공정을 통한 마의 효능 증대와 제품개발을 목표로 수행되었다.

2. 연구방법론

가. 실험 재료

마(*Dioscorea rhizoma*)는 안동시 생물자원연구소에서 지원받았으며 동결건조 혹은 세절 후 60℃에서 열풍건조 후 실험에 사용하였으며, 시제품의 경우 (주)안동흑마에서 생산하여 분석하였다.

나. 실험 처리

(1) 발효 마 제조

발효마의 제조방법은 먼저 삼각플라스크(250mL)에 건조시료 3g씩을 넣고, 증류수와 함께 고압멸균 시켰다. 멸균된 시료는 clean bench 안에서 멸균된 증류수를 100mL씩 첨가 후, 발효미생물을 접종하여(1×10^7 CFU/mL) 진탕배양하였다(250rpm, 37℃). 시료는 발효시간대별로 취한 후 동결 건조시켜 제조하였다.

(2) 증자건조 숙성 마의 제조

증자·건조마를 만드는 방법은 우선 마를 깨끗이 세척한 후 일정한 크기로 세절을 하였다. 세절된 마를 60℃ 열풍건조기를 이용하여 24시간 건조한 후 고압솥에서 증자를 하는 a공정과 증자된 마를 다시 50℃ 열풍건조기에서 건조하는 b공정을 순차적으로 반복을 하였다. 이렇게 만들어진 마를 냉수추출과 70% 에탄올 추출을 이용하여 활성성분의 변화를 확인하였다.

(3) 흑마차 제조

흑마차 제조 공정은 증자 및 건조공정을 거친 마와 동일한 공정인 고압솥에서 증자를 하는 공정과 증자된 마를 다시 50℃ 열풍건조기에서 건조하는 b공정을 순차적으로 반복을 하였다.

이렇게 만들어진 마를 볶음기기에서 한번 볶은 후, 냉수추출과 70% 에탄올 추출을 이용하여 활성성분의 변화를 확인하였다.

다. 분석 방법

(1) 단백질 함량

단백질 함량을 구하기 위하여 Lowry 등(1951)의 방법에 따라 시료를 100 μ L 이용하여 Lowry 시약을 이용하여 발색한 후, 분광광도계(SHIMADZU, UV-1700)를 사용하여 750nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도는 Bovine Serum Albumine(Sigma, A-7030)을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 시료 중의 단백질함량을 추정하였다.

(2) 유리아미노산 함량

유리아미노산 함량 측정을 위해 0.55M Na₂CO₃, Phenol reagent-2N (Folin_Ciocalteu reagent) 시약을 사용하여 확인하였다. 실험 방법은 우선 sample 100 μ L와 0.55M Na₂CO₃ 용액을 1mL을 microtube에 넣는다. 그리고 Folin_Ciocalteu reagent 반응시약을 넣고 30 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응을 시킨 후 vortexing을 한다. 150 μ L씩을 취하여 96 well에 넣고 750nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준시약으로 tyrosine을 사용하였다. tyrosine은 증류수에 녹지 않으므로 1M HCl을 사용하여(25mg/mL) 녹인 후 증류수로 최종 용량을 맞추었다.

(3) 폴리페놀 화합물 함량

총 폴리페놀의 함량(total polyphenol content)은 Folin-Denis방법을 변형하여 측정하였다. 추출물 100 μ L에 1N Folin-Ciocalteu reagent 100 μ L를 가하여 혼합, 3분간 반응 후 0.7M Na₂CO₃ 용액을 100 μ L를 첨가하였다. 이 혼합액을 1시간 동안 반응 후 분광광도계(UV/VIS spectrometer, Jasco, Hachioji, Japan)를 사용하여 750nm에서 흡광도를 측정하고, 표준물질로 tannic acid를 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 총 폴리페놀 함량(mg/mL)을 구하였다.

(4) 총당 함량

총당 변화를 측정하기 위하여 페놀 황산법을 이용하여 측정하였다. 시약은 Conc. sulfuric acid와 5% phenol을 사용하였다. 실험 방법은 tube에 sample 500 μ L, 5% phenol 500 μ L, 2.5mL Conc. sulfuric acid를 넣고 잘 섞은 후 끓는 물에 10분간 반응 시킨 후 아이스에서 15분간 식힌 후 분광광도계(UV/VIS spectrometer, Jasco, Hachioji, Japan)를 사용하여 490nm에서 흡광도를 측정하였다. standard로는 sucrose를 사용하여 정량하였다.

(5) 환원당 함량

환원당 변화를 측정하기 위하여 DNS법을 응용하여 측정하였다. 시약은 DNS시약(Dinitrosalicylic Acid Reagent Solution 1% 와 Dinitrosalicylic acid: 10g , Phenol: 2g (optional, see Note 1), Sodium sulfite: 0.5g, Sodium hydroxide: 10g, Add water to: 1 liter), Potassium sodium tartrate solution 40%를 사용하였다. 실험방법은 우선 tube에 sample 1mL, DNS 3mL를 넣은 후 40% Potassium sodium tartrate solution 을 첨가하고 끓는 물에 5분간

반응을 시킨 후 꺼내어 얼음에 넣어서 급냉하였다. 그리고 분광광도계(UV/VIS spectrometer, Jasco, Hachioji, Japan)를 사용하여 575nm에서 값을 확인하였다. 표준용액 시약으로는 glucose (dextrin)를 사용하여 정량하였다.

(6) 색도측정

Visko(비스코)사의 분광측색계인 konica minolta spectro photometer CM-3500d 모델을 사용하여 측정하였다. 기계에서 나타내는 L*(명도), a*(지각색도지수), b*(지각색도지수), 값 중 일반적으로 L*(명도)로 많이 나타낸다.

(7) DPPH radical 소거능

DPPH radical 소거능 측정은 Blois의 방법을 변형하여 측정하였다. 사용된 시약 2,2-diphenyl-1-picryl-1-hydazyl(DPPH, Sigma Cematic Co., USA) 에서 구입하여 사용하였다. 시료용액 1mL에 0.2mM의 2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl(DPPH) 0.5mL 넣고 교반 후 10분 방치한 다음 517nm에서 흡광도를 측정하였다. 유리라디칼 소거활성은 동일 농도의 시료를 비교하였다.

(8) ABTS radical 소거능

ABTS radical을 이용한 항산화력 측정은 ABTS+· cation decolourisation assay 방법에 의하여 시행하였다. 7mM 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-e-6-sulfonic acid) (ABTS, Wako Chemical Co., Japan) 와 2.45mM potassium persulfate를 최종농도로 혼합하여 실온인 암소에서 24시간 동안 방치하여 ABTS+· 을 형성시킨 후 734nm에서 흡광도 값이 0.80(±0.02)이 되게 phosphate buffer saline(PBS, pH7.4)로 희석하였다. 희석된 용액 100μL에 시료 5μL를 가하여 5분 동안 방치한 후 흡광도를 측정하였다. 유리라디칼 소거활성은 동일 농도의 시료를 비교하였다.

(9) 금속봉쇄력

시료에 증류수를 넣고 FeCl₂를 넣은 후 ferrozine를 넣고 실온에서 20분간 방치하고 562nm에서 흡광도를 측정하였다.

(10) 항염증 활성

(가) MTT assay에 의한 세포독성

추출물이 세포독성에 미치는 농도를 조사하여 NO측정실험에 사용될 농도 범위결정을 위해서 MTT assay를 시행하였다. RAW264.7 세포(1×10^5 cells/mL)를 96-well culture plate에 100 μL의 DMEM 배지와 함께 하룻밤 배양한 다음, 여러 농도의 약물을 처리하여 24시간 배양하였다. 각 well에 5mg/mL 농도의 MTT 용액을 10μL씩 넣은 후 3시간 동안 배양하면서 환원반응을 유도하였으며, 100μL의 DMSO 용액을 첨가하여 보라색의 formazan 결정을 완전히 용해하였다. 발색정도를 microplate reader를 이용하여 570nm에서 흡광도를 측정하였으며, 세포독성 (cell toxicity)은 세포만 배양한 무처리군의 생존도 100%를 기준으로 약물처리군의 상대적인 세포생존도를 계산하였다.

(나) Nitric Oxide(NO) 생성량 측정

RAW264.7 세포로부터 생성되는 NO의 양을 세포 배양액 중 존재하는 NO_2^- 의 형태로 Griess reagent 반응법을 이용하여 측정하였다. 즉 LPS($1\mu\text{g}/\text{mL}$)를 1시간 전처리한 다음, RAW264.7 세포에 다양한 농도의 약물을 처리하여 24시간 배양하였다. 세포배양액을 수거하여 배양액 100 μL 에 동일한 양의 Griess시약(0.1% NED/1% sulfanilamide in 5% H_3PO_4)을 넣은 후 15분간 암반응 하였다. 발색정도를 microplate reader의 540nm 흡광도에서 측정하였다. 100% 활성은 LPS만 처리한 군의 분비량으로 정의하여 상대적인 생성량(% of control)을 계산하였다.

3. 연구결과

가. 발효처리 공정을 통한 마의 효능 물질 증진

(1) 발효마의 pH 측정

발효시간에 따른 마의 pH 변화를 측정하였다. 각각의 균주에 대한 pH를 측정한 결과 시간이 경과함에 따라 바실러스 계열(BL1, B2)의 pH는 증가하였지만, 유산균 계열(SE1, L. *Acidophilus*)의 경우 pH가 떨어지는 것을 확인할 수 있었다. 또한 바실러스 계열 균주의 pH는 시간이 경과할수록 계속 증가하였고(BL1은 8.6, B2는 7.7) 유산균 계열 균주의 pH는 12시간 이후부터 크게 변화하지 않았다.(Fig. 1). 이러한 결과를 종합하면 pH는 균이 자라면서 생성하는 산과 알칼리에 의해서 영향을 받는 것으로 사료된다.

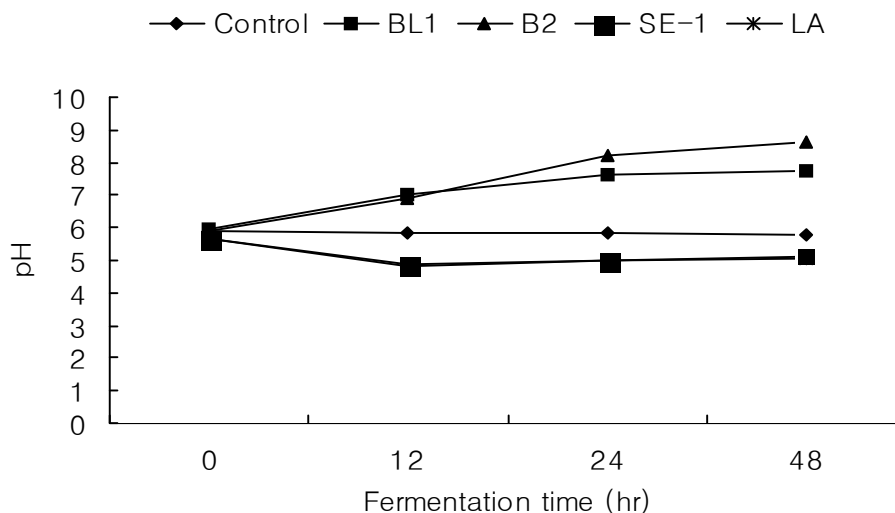


Fig. 1. pH profiles of fermented yam products during fermentation at 37°C.

(2) 발효마의 단백질함량

발효시간에 따른 마의 단백질함량 변화를 Lowry assay를 이용하여 측정하였다. 그 결과 BL1 균주의 경우 발효시간이 증가함에 따라 단백질 함량이 유의적으로 높게 나타났으며 48시간째의 단백질 함량은 대조군에 비해 3배정도 높게 나타났다. B2 균주의 경우 단백질함량은

발효 후 12시간째에 높게 나타났으며 이후 단백질함량이 일정하게 유지되는 것으로 나타났다 (Fig. 2). 이처럼 단백질의 함량이 증가하는 것은 균이 증가함에 따라 균이 가지고 있는 단백질이 함께 측정된 것으로 사료되어진다.

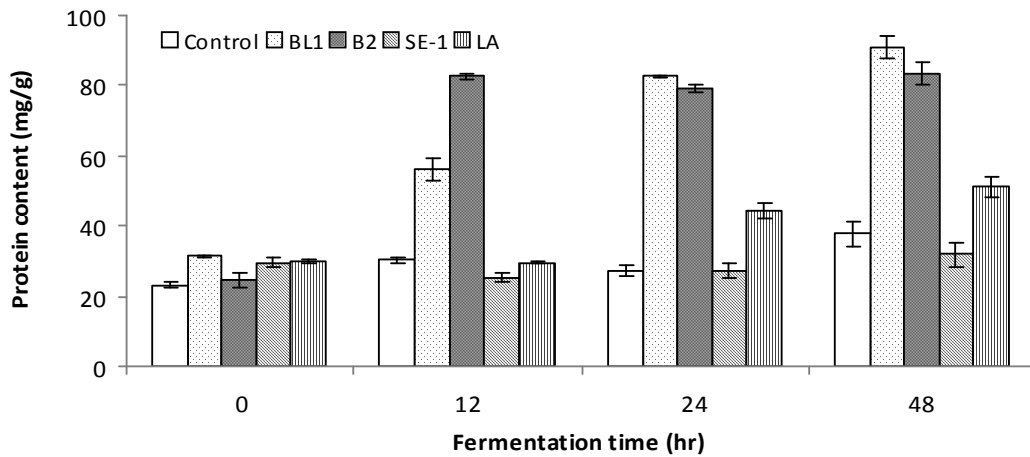


Fig. 2. Changes in protein contents of fermented yam products during fermentation at 37°C.

(3) 발효마의 유리아미노산 측정

유리아미노산 함량의 측정은 tyrosine을 사용하여 작성한 검량곡선에 대입하여 계산하였다. 그 결과 측정된 아미노산의 함량은 Fig. 3과 유사한 경향을 보여주었다. 단백질 함량이 높게 나타난 BL1과 B2의 경우 유리아미노산 함량이 또한 높게 나타났다. 이것은 미생물이 단백질을 분해하여 아미노산을 많이 생성한 것으로 보이며 BL1과 B2의 유리아미노산 함량은 각각 14.08mg/g, 13.84mg/g으로 대조군군(control 10.3mg/g)보다 높게 나타났다(Fig. 3).

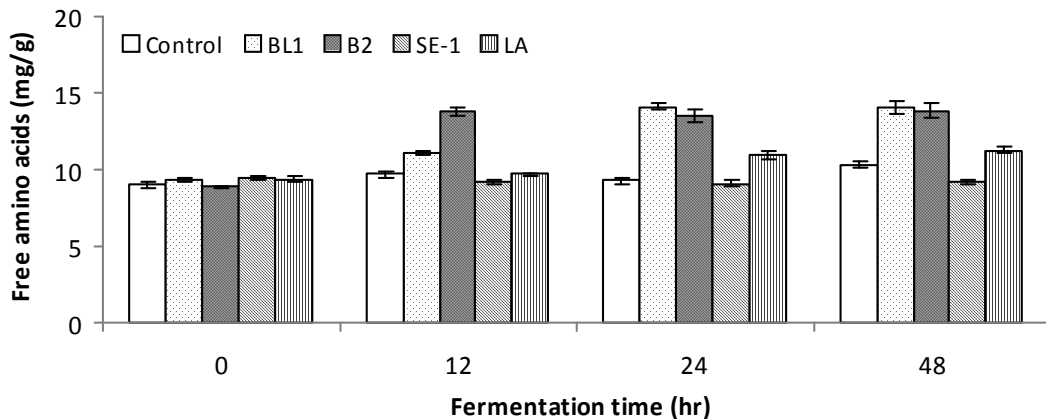


Fig. 3. Changes in free amino acid contents of fermented yam products during fermentation at 37°C.

(4) 발효마의 총당 측정

발효시간에 따른 마의 당성분 변화를 측정하기 위해서 페놀, 황산법을 이용하였다. 총당은 sucrose를 이용하여 작성한 검량곡선에 측정된 OD값을 대입하여 정량하였다. 그 결과 총당은 미생물이 성장하면서 소모되는 것으로 나타났다. 대조군의 경우 발효 후 총당의 변화가 거의 없는 것으로 나타났다. 반면에 발효시료의 경우 발효 후 총당 함량이 줄어들었으며 12시간 이

후에는 총당이 조금씩 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 4).

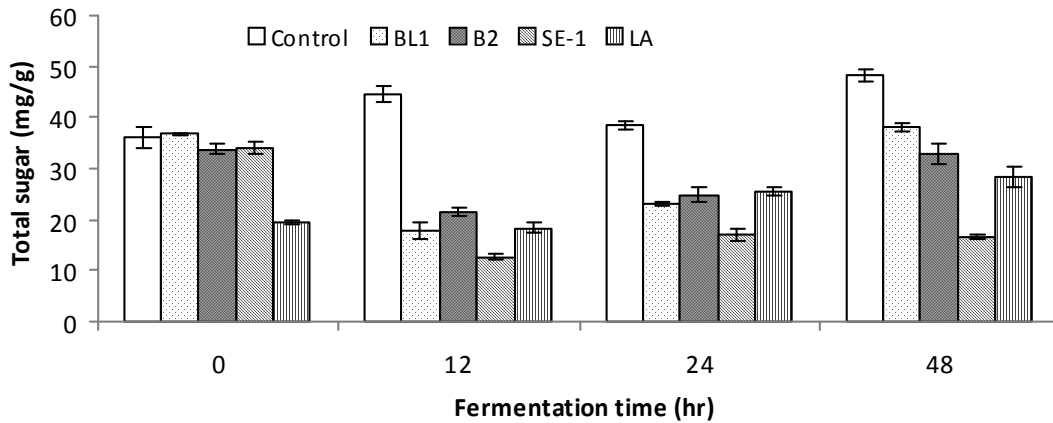


Fig. 4. Changes in total sugar contents of fermented yam products during fermentation at 37°C.

(5) 발효마의 환원당 측정

발효시간에 따른 환원당의 변화는 DNS법을 사용하여 측정하였다. 환원당은 glucose를 이용하여 작성한 검량곡선에 OD값을 대입하여 구하였다. 각각의 발효시료들은 발효가 시작되기 전 (0시간)보다 조금씩 증가하는 경향을 보였다. 특히 B2는 최종 발효(48시간) 후 control에 비해 2배가량 높게 나타났다. 발효가 진행되면서 미생물이 당을 분해하여 환원당을 많이 만들어 내는 것으로 보인다. 12시간 이후부터 48시간까지는 큰 차이를 보이지 않았지만 B2는 발효 0시간(6.01mg/g)때보다 발효 48시간(11.52mg/g)때 2배가량 양이 증가하는 것을 보였다.

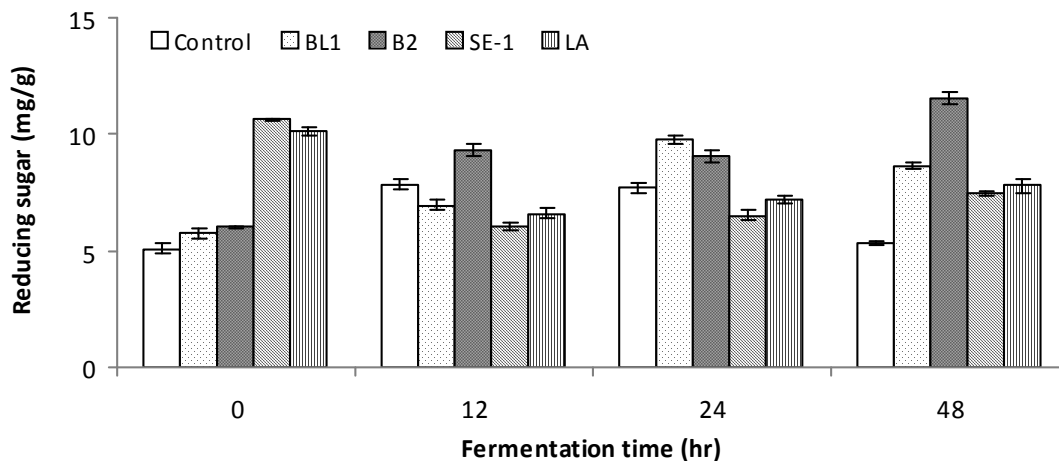


Fig. 5. Changes in reducing sugar contents of fermented yam products during fermentation at 37°C.

(6) 발효마의 총균수 측정

발효시간에 따른 마의 균수를 측정하기 위해 colony count법을 사용하였다. 그 결과 각각의 균주에 대한 균수를 측정한 결과 발효시간이 경과함에 따라 총균수가 증가하였다. 모든 균주에서 총균수는 발효 후 12시간까지는 비슷한 경향으로 나타났지만 발효 후 24시간째부터는 바실러

스 계열의 BL1, B2의 총균수가 높게 증가하는 것으로 나타났다. 발효 후 24시간째부터는 균수가 크게 증가하지 않았다(Fig. 6).

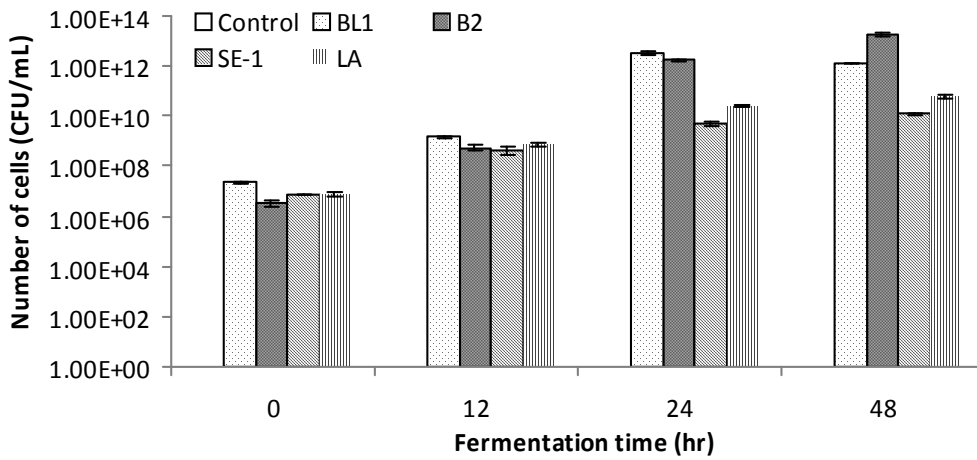


Fig. 6. Changes in viable cell numbers of fermented yam products during fermentation at 37°C.

(7) 발효마의 폴리페놀함량 측정

식물계에 널리 분포되어 있는 페놀화합물은 구조식에 hydroxyl기가 존재하므로 공명 안정화된 구조를 갖게 되며, 따라서 전자를 수용하는 기작으로 항산화 반응에 직접적으로 기여하게 된다. 발효마의 폴리페놀함량을 측정한 결과 바실러스 계열의 BL1, B2의 페놀화합물 함량은 발효가 진행됨에 따라 증가하였으며 발효 48시간째의 페놀함량은 대조군에 비해서 50%이상 증가하였다(Fig. 7). 이는 고조균이 생성한 단백질분해효소에 의해 뮤신단백질이 분해되어 페놀성물질의 가용화가 이뤄진 것으로 판단된다.

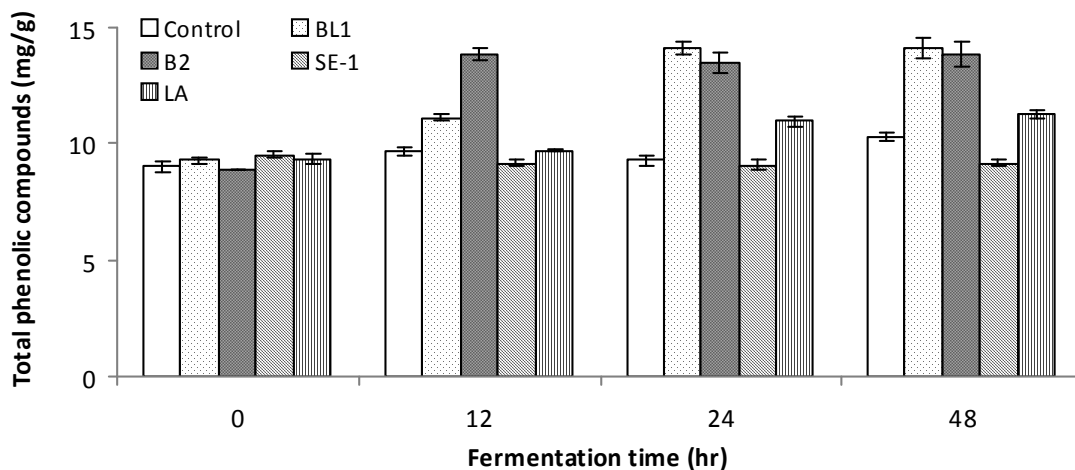


Fig. 7. Changes in total polyphenol contents of fermented yam products during fermentation at 37°C.

(8) DPPH radical에 대한 전자공여능

전자공여능 측정에 사용된 DPPH는 안정한 자유 라디칼로서 그것의 비 공유전자로 인해 517nm 부근에서 최대 흡수치를 나타내며, 전자 또는 수소를 받으면 517nm 부근에서 흡광도가 감소하기 때문에 각 추출물에서 이러한 라디칼을 환원시키거나 상쇄시키는 능력이 크면 높은 항산화 활성 및 활성산소를 비롯한 다른 라디칼에 대하여 소거 활성을 기대할 수 있으며 인체 내에서 활성 라디칼에 의한 노화를 억제하는 척도로도 이용할 수 있다. 1mg/mL 농도로 각각 발효 마 추출물의 전자공여능을 측정한 결과 큰 차이가 나타나지 않았으며 바실러스 계열 BL1과 B2 경우 발효가 진행될수록 전자공여능이 점차 감소하였다. 또한 대조군과 유산균 계열의 SE1, LA의 전자공여능의 유의적인 차이는 나타나지 않았다(Table 1).

Table 1. DPPH radical activity of fermented yam products of 1 mg/mL during fermentation at 37°C.

Sample	DPPH radical scavenging activity(%)			
	0 h	12 h	24 h	48 h
Control	42.81	44.28	40.93	51.88
BL1	45.73	46.36	38.14	31.31
B2	37.96	47.05	34.16	33.92
SE1	51.77	45.66	50.01	47.84
LA	51.44	48.25	60.12	57.67

(9) ABTs 활성 측정

혈장에서 ABTs의 양이온 라디칼의 흡광도가 항산화제에 의해 억제되는 것에 기초하여 개발된 라디칼 소거 활성법이다. ABTs와 potassium persulfate를 암소에 방치하여 ABTs⁺이 생성되면 추출물의 항산화 활성에 의해 ABTs⁺이 소거되어 radical 특유의 색인 청록색이 탈색되는데 이를 흡광도 값으로 나타내어 ABTs⁺의 소거 활성을 측정할 수 있다. ABTs⁺는 600~750nm의 범위에서 강한 흡수를 보여주며 이로 인해 분광 분석으로 쉽게 측정할 수 있다. 이러한 원리를 이용하여 ABTs 활성을 측정한 결과 바실러스 계열 BL1과 B2의 경우 발효 후 48시간째의 ABTs 활성은 각각 95.77%, 86.01%로 대조군 48.54%보다 두 배 이상 증가하였다(Table 2). 이것은 DPPH와는 다른 결과로 바실러스 계열 균주에 의해 수용성 항산화성분이 더욱 용출되어 항산화력을 개선하는 것으로 판단된다.

Table 2. ABTs activity of fermented yam products during fermentation at 37°C.

Sample	ABTs radical scavenging activity(%)			
	0 h	12 h	24 h	48 h
Control	36.72	70.32	46.16	48.54
BL1	60.63	92.82	97.38	95.77
B2	49.80	70.89	74.59	86.01
SE1	56.63	48.46	46.70	48.75
LA	54.19	57.74	68.58	76.77

(10) 발효마의 항염증 효능 검증

(가) Raw264.7 세포에 대한 세포독성

Raw264.7 세포에 발효마 추출물을 50µg/mL, 100µg/mL, 200µg/mL의 농도별로 처리한 후, 농도 증가에 따른 세포독성에 미치는 효과를 측정된 결과 200µg/mL 농도로 처리한 SE1 48시간 발효마 추출물을 제외한 모든 처리구에서 세포독성이 나타나지 않았다(Fig. 8).

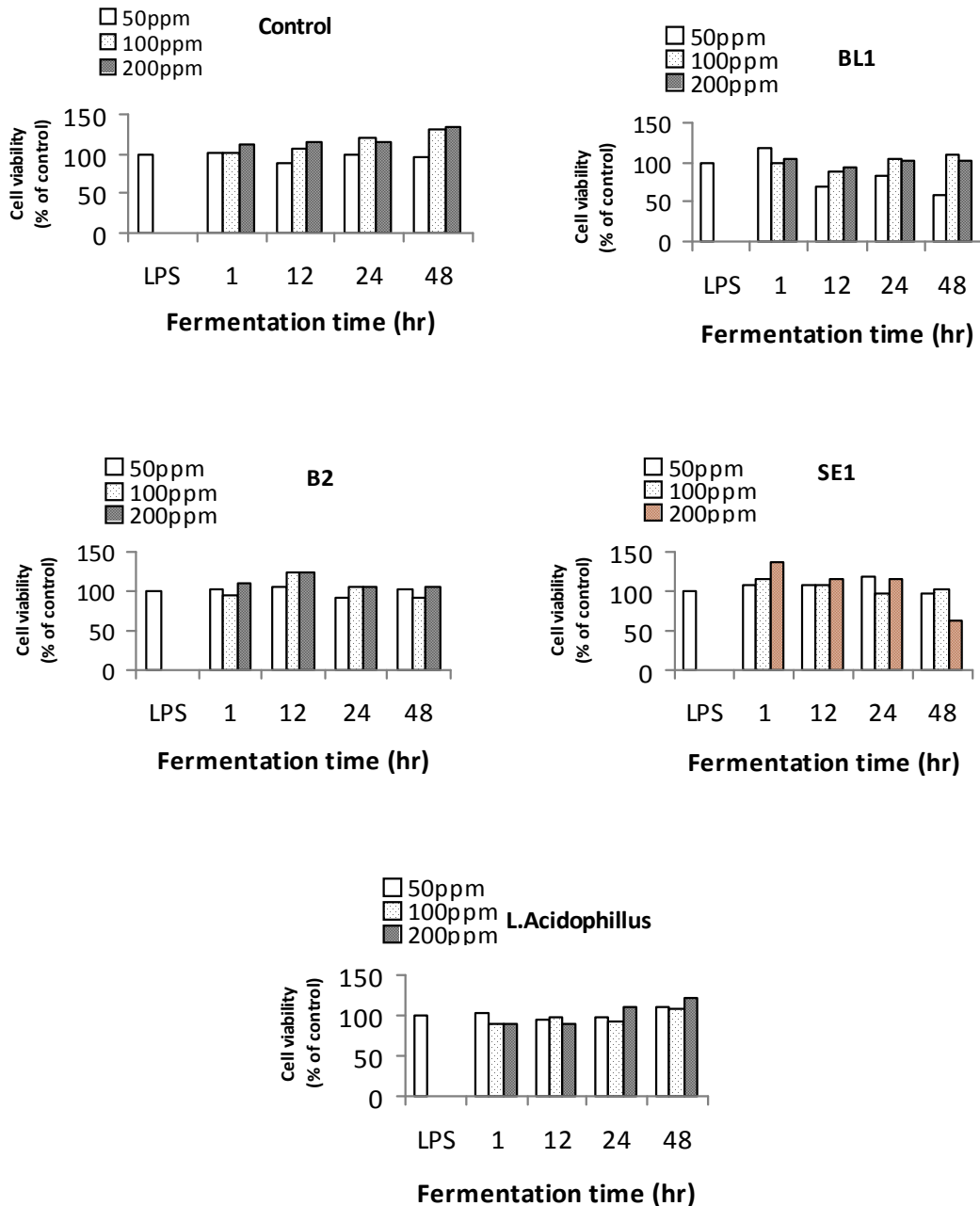


Fig. 8. Cell viability in Raw264.7 cells by fermented yam treatment.

(나) Nitric Oxide(NO) 생성량 측정

발효마가 항염증 활성화에 미치는 영향을 조사하기 위하여 먼저 발효마가 RAW264.7 세포에서 LPS로 유도한 NO 생성에 미치는 영향을 조사하였다. LPS로 유도된 RAW cell의 NO의 생성에 대한 저해능을 조사한 결과 대조군(발효전 시료) 및 모든 발효마 추출물 처리군에서 NO 생성량이 억제되었고 대조군과 발효마 추출물 처리군 간에는 차이가 없는 것으로 나타났다(Fig. 9).

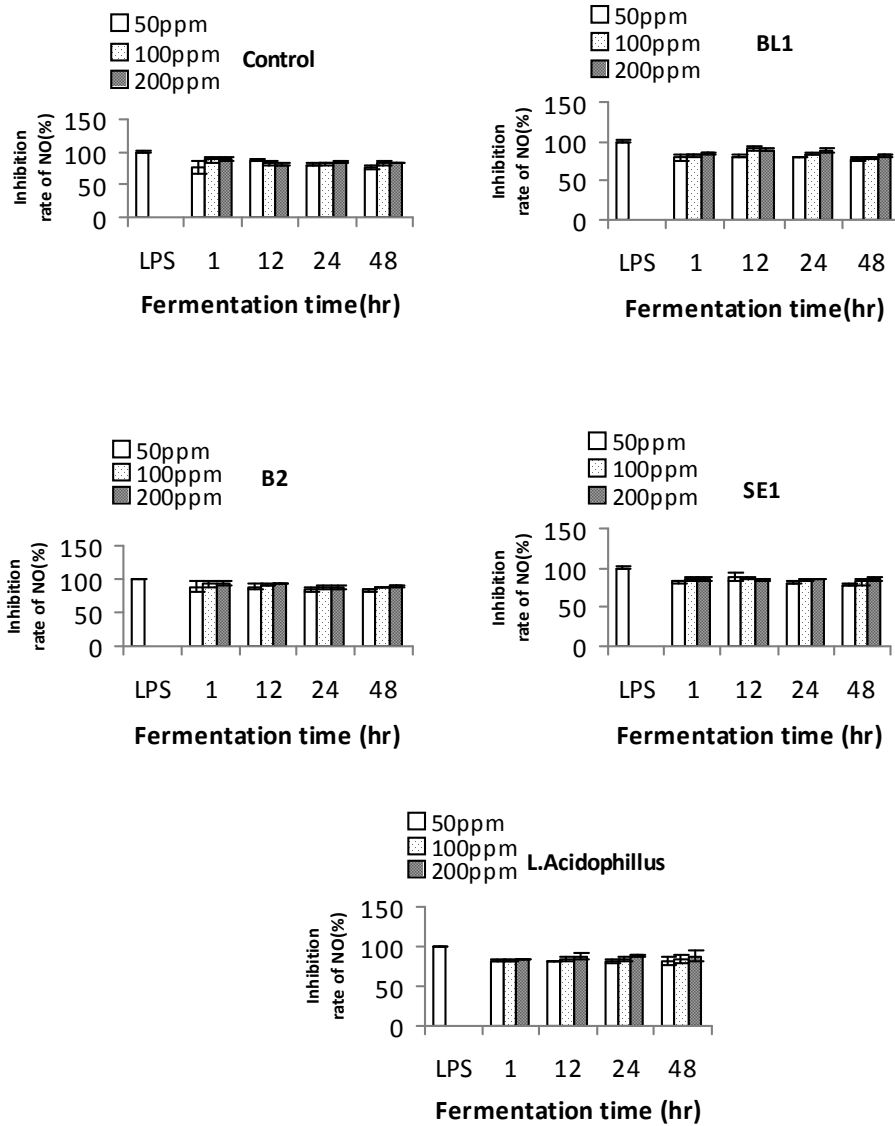


Fig. 9. Inhibitory effect of fermented yam on NO production in LPS-induced Raw264.7 cell.

(11) 발효마의 세포손상 회복능

(가) 자외선 처리 및 시료의 처리

UV에 의한 세포 손상 완화 효과를 알아보기 위해 MTT assay를 통해 세포 생존율을 측정하였다. 자외선을 조사한 후 마의 활성 성분인 Allantoin을 농도별로 처리하여 자외선 조사 후

시료를 처리하지 않은 대조군과 세포 생존율을 비교하였다. 양성 대조군으로 retinol 3 μ g/ml을 처리하였다. 그 결과 Allantoin은 농도 의존적으로 자외선에 의해 줄어든 CCRF S-180 II 세포의 cell viability를 크게 향상시켰다(Fig. 10). 즉, 2.5~20 μ g/mL 농도에서 세포독성이 존재하지 않으며 자외선에 의한 세포 손상을 악화시키지는 않았다. 이들 결과는 Allantoin이 피부손상 예방 및 치료를 위한 화장품소재로써 이용가능성을 보여주었다.

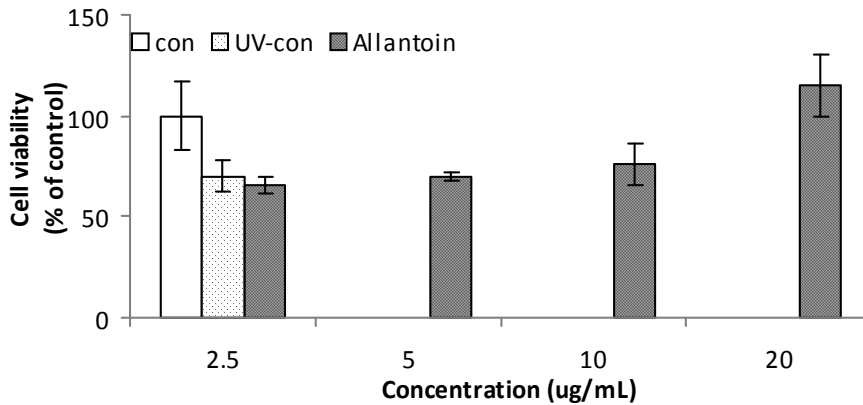


Fig. 10. Protection effects of the CCRF S-180 II cell damage induced by UV.

나. 증자 및 숙성공정을 통한 마 실험 결과

(1) 흑마의 추출수율

1~6차 증자 및 숙성 공정을 거친 흑마 추출물의 추출수율을 구한 결과 에탄올 추출물에 비해 물 추출물에서 No Slice에 비해 slice에서 추출수율이 더 높게 나타났다(Table 3). 공장 시제품의 경우 추출수율이 비슷하였고 건조마를 이용한 흑마 제품에 비해 생마를 이용한 흑마 제품의 추출수율이 더 높게 나타났다(Table 4).

Table 3. Yield (%) of black yam extracts processed with steam & dry manufacturing yam.

Sample	Yield (%)			
	Water extract		EtOH extract	
	Slice	No slice	Slice	No slice
Control ¹⁾	14.19	7.03	10.56	3.06
1차	17.98	6.75	12.12	8.02
2차	17.97	7.53	11.63	6.93
3차	17.64	6.89	10.11	3.93
4차	14.85	6.51	6.50	4.87
5차	17.09	5.70	7.31	3.01
6차	21.27	14.61	9.73	5.28

¹⁾Control : drying yam of non steam & dry manufacturing

Table 4. 공장 시제품 추출물의 추출수율.

	물 추출물		에탄올 추출물	
	생마->흑마 ¹⁾	건조마->흑마 ²⁾	생마->흑마	건조마->흑마
수율(%)	15.40	10.20	18.90	10.00

1)생마->흑마: 생마를 이용하여 증자 및 숙성공정을 거친 흑마

2)건조마->흑마: 건조마를 침지한 후 증자 및 숙성공정을 거친 흑마

(2) 흑마 물 추출물의 성분분석

(가) 단백질 함량

증자 및 숙성 정도에 따른 흑마 물 추출물의 단백질함량 변화를 Lowry assay를 이용하여 측정하였다. 그 결과 흑마 물 추출물의 경우 No slice, Slice 모두 증자 및 숙성의 횟수가 증가할수록 단백질 함량이 유의적으로 높게 나타났으며 No slice의 경우 4차 sample이 대조군에 비해 1.5배, Slice의 경우에는 2차 sample의 단백질 함량이 가장 높게 증가하였다(Fig. 11).

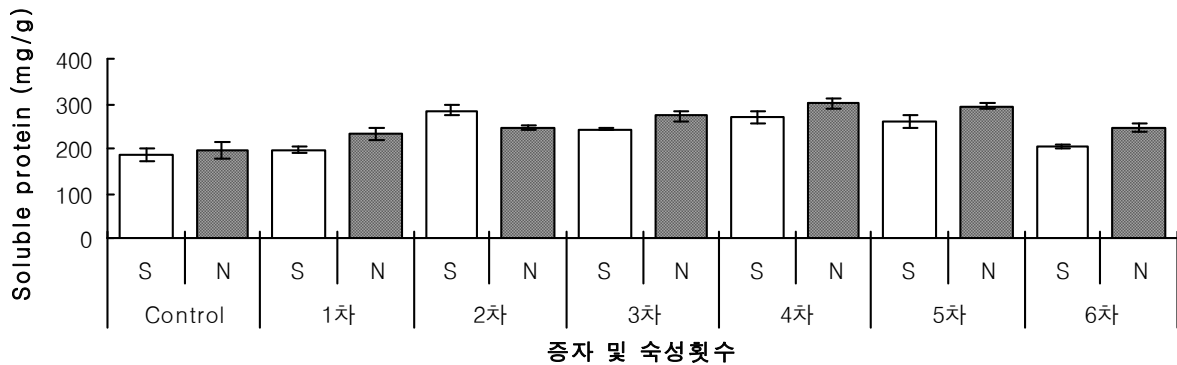


Fig. 11. Changes in protein content of water extract from black yam. S: Slice, N: No slice.

(나) 유리아미노산 함량

흑마 물 추출물의 유리아미노산 함량은 tyrosine을 사용하여 작성한 검량곡선에 대입하여 계산하였다. 그 결과 흑마 물 추출물의 유리아미노산 함량은 단백질 함량과 유사한 경향을 보여 주었고 단백질 함량이 높게 나타난 sample에서 유리아미노산 함량 또한 높게 나타났다(Fig. 12).

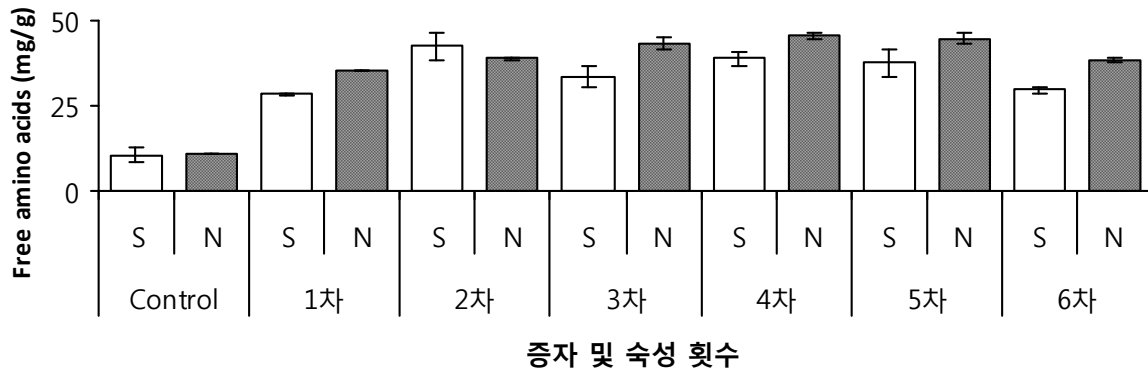


Fig. 12. Changes in free amino acid content of water extract from black yam. S: Slice, N: No slice.

(다) 폴리페놀 화합물 함량

식물계에 널리 분포되어 있는 페놀 화합물은 구조식에 hydroxyl기가 존재하므로 공명 안정화된 구조를 갖게 되며, 따라서 전자를 수용하는 기작으로 항산화 반응에 직접적으로 기여하게 된다. 흑마 물 추출물의 폴리페놀함량을 측정된 결과 대조군에 비해 모든 sample에서 폴리페놀 화합물 함량이 증가했으며 그 중에서도 4차 sample의 폴리페놀 함량이 가장 높게 나타났다 (Fig. 13).

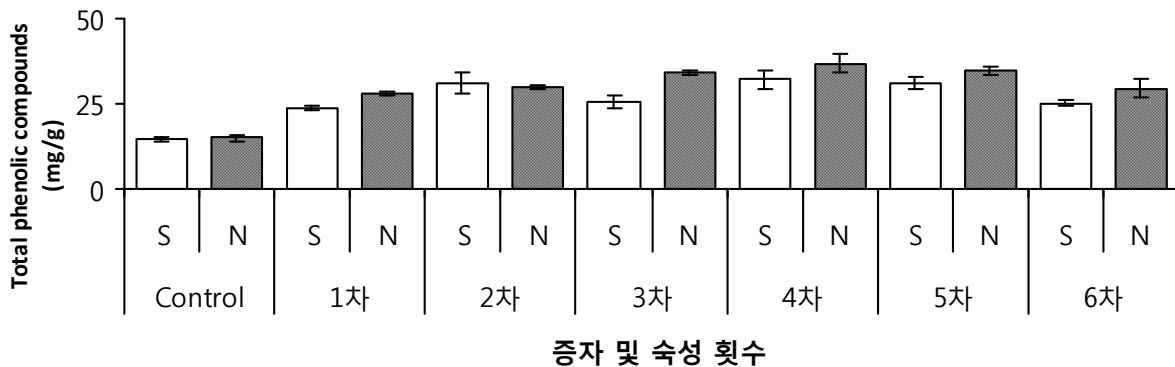


Fig. 13. Changes in polyphenol content of water extract from black yam. S: Slice, N: No slice.

(3) 흑마 에탄올 추출물의 일반성분 분석

(가) 단백질 함량

증자 및 숙성 정도에 따른 흑마 에탄올 추출물의 단백질함량 변화를 Lowry assay를 이용하여 측정하였다. 그 결과 control의 경우 No slice에 비해 slice에서 단백질 함량이 3배가량 높은 것은 추출수율에 의한 것으로 사료된다. 또한 증자 및 숙성의 횟수가 증가할수록 단백질 함량이 높게 나타났다. No slice의 경우 5차 sample에서 대조군에 비해 단백질 함량이 높게 나타났고 Slice의 경우에도 5차 sample에서 단백질 함량이 가장 높게 나타났다(Fig. 14).

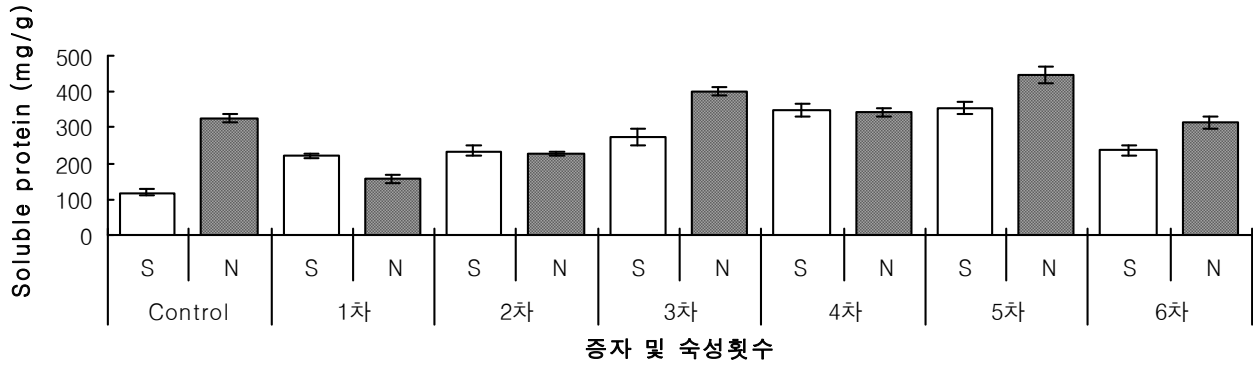


Fig. 14. Changes in protein content of 70% EtOH extract from black yam. S: Slice, N: No slice.

(나) 유리아미노산 함량

흑마 에탄올 추출물의 유리아미노산 함량은 tyrosine을 사용하여 작성한 검량곡선에 대입하여 계산하였다. 그 결과 흑마 에탄올 추출물의 유리아미노산 함량은 단백질 함량과 유사한 경향을 보여주었고 단백질 함량이 높게 나타난 sample에서 유리아미노산 함량 또한 높게 나타났다(Fig. 15).

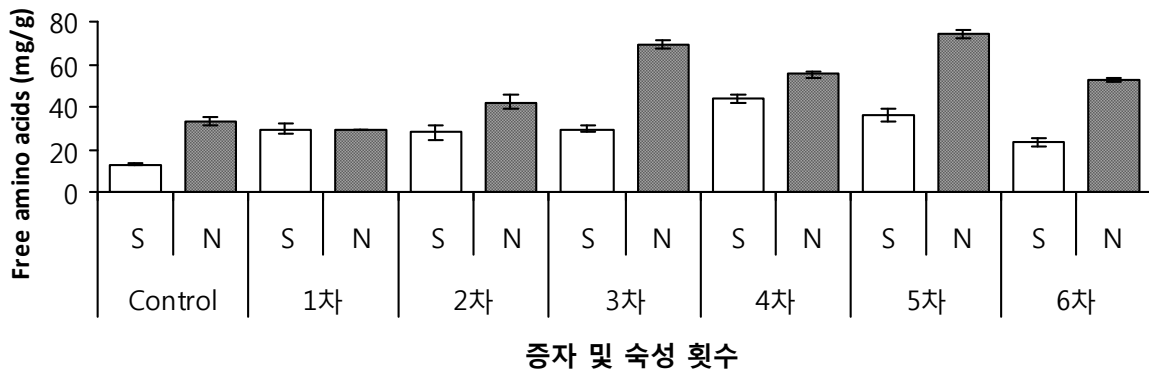


Fig. 15. Changes in free amino acid content of 70% EtOH extract from black yam. S: Slice, N: No slice.

(다) 폴리페놀 화합물 함량

페놀 화합물은 구조식에 hydroxyl기가 존재하므로 공명 안정화된 구조를 갖게 되며, 따라서 전자를 수용하는 기작으로 항산화 반응에 직접적으로 기여하게 된다. 흑마 에탄올 추출물의 폴리페놀함량을 측정한 결과 단백질 및 유리아미노산 함량과 같이 대조군에 비해 모든 sample에서 폴리페놀 함량이 증가했다. 모두 화합물의 함량은 증가했다. No slice의 경우 5차 sample에서, slice의 경우에는 4차 sample에서 폴리페놀 함량이 높게 나타났다(Fig. 16).

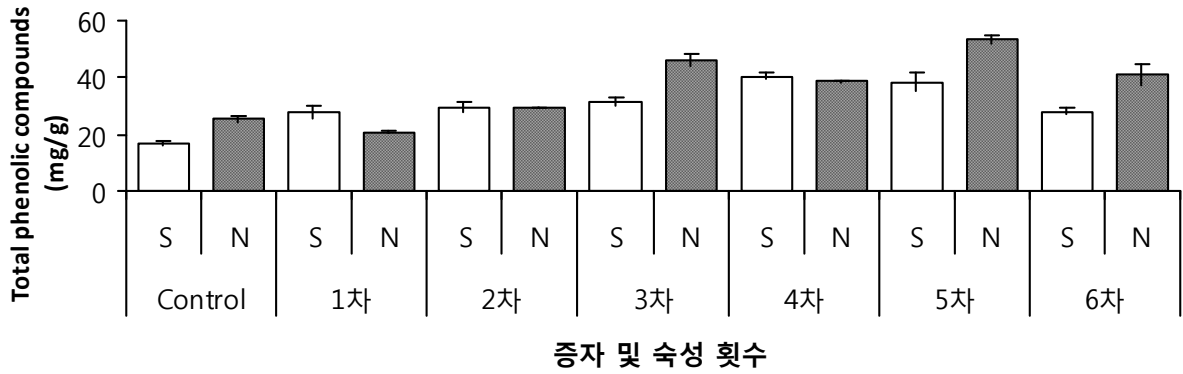


Fig. 16. Changes in polyphenol content of 70% EtOH extract from black yam. S: Slice, N: No slice.

(4) 공장 시제품의 일반성분 분석

(가) 단백질 함량

공장 시제품의 단백질함량 변화를 Lowry assay를 이용하여 측정한 결과 물 추출물의 경우 건조마를 이용한 시제품의 단백질 함량이 생마를 이용한 시제품에 비해 2배 높게 나타났고 에탄올 추출물의 경우에는 단백질 함량이 비슷하게 나타났다(Fig. 17).

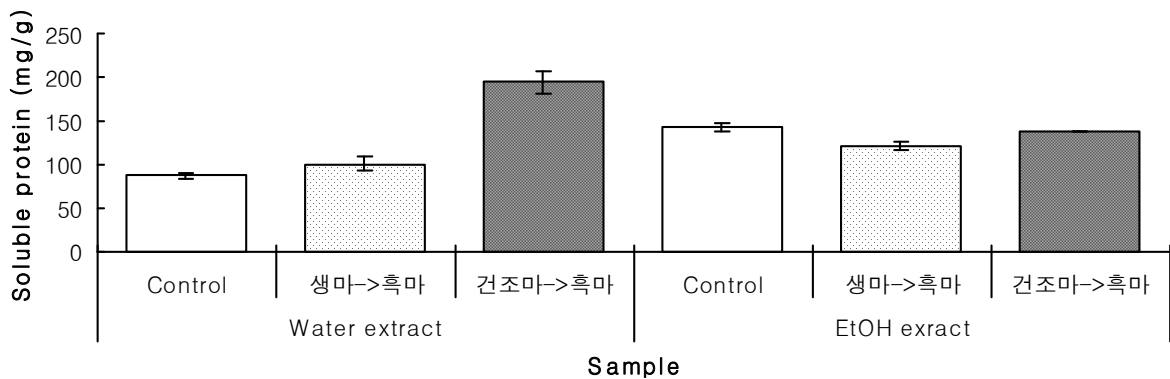


Fig. 17. Changes in protein content of extracts from black yam.

*생마->흑마: 생마를 이용하여 증자숙성공정을 거친 흑마.
 건조마->흑마: 건조마를 침지한 후 증자숙성공정을 거친 흑마.
 Control: 증자 및 숙성과정을 거치지 않은 건조마.

(나) 유리아미노산 함량

공장 시제품 추출물의 유리아미노산 함량은 tyrosine을 사용하여 작성한 검량곡선에 대입하여 계산하였다. 그 결과 공장 시제품 추출물의 유리아미노산 함량은 단백질 함량과 유사한 경향을 보여주었고 건조마를 이용한 시제품의 물 추출물에서 유리아미노산 함량이 높게 나타났다(Fig. 18).

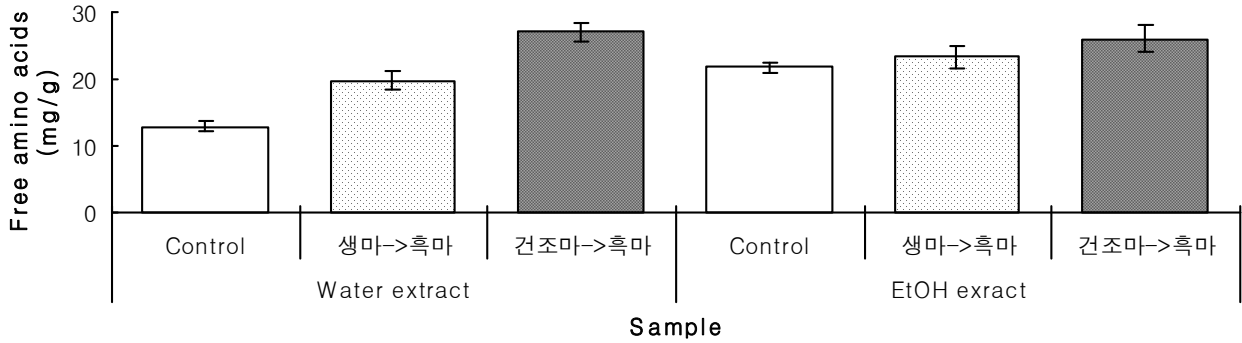


Fig. 18. Changes in free amino acid content of extract from black yam.

*생마->흑마: 생마를 이용하여 증자숙성공정을 거친 흑마.
 건조마->흑마: 건조마를 침지한 후 증자숙성공정을 거친 흑마.
 Control: 증자 및 숙성과정을 거치지 않은 건조마.

(다) 폴리페놀 화합물 함량

폴리페놀 화합물은 구조식에 hydroxyl기가 존재하므로 공명 안정화된 구조를 갖게 되며, 따라서 전자를 수용하는 기작으로 항산화 반응에 직접적으로 기여하게 된다. 공장 시제품의 폴리페놀 화합물 함량을 측정한 결과 sample간에 폴리페놀화합물의 함량에는 큰 차이가 없었지만 Control에 비해서는 높다.(Fig. 19).

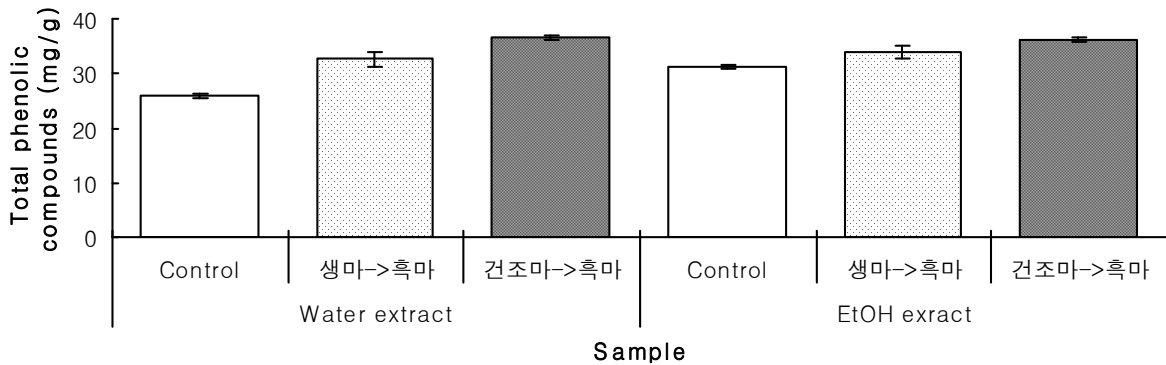


Fig. 19. Changes in polyphenol content of extracts from black yam.

*생마->흑마: 생마를 이용하여 증자숙성공정을 거친 흑마.
 건조마->흑마: 건조마를 침지한 후 증자숙성공정을 거친 흑마.
 Control: 증자 및 숙성과정을 거치지 않은 건조마.

(라) 총당 함량

공장 시제품의 당성분 변화를 측정하기 위해서 페놀-황산법을 이용하여 총당을 측정하였다. 총당은 sucrose를 이용하여 작성한 검량곡선에 측정된 흡광도 값을 대입하여 정량하였다. 그

결과 물 추출물의 경우 건조마를 이용한 흑마의 총당 함량이 생마를 이용한 흑마에 비해 3배 정도 높게 나타났는데 이것을 추출수율에 대입해보면 건조마를 이용한 흑마의 총당 함량이 생마를 이용한 흑마에 비해 2배 정도 높게 나타났다(Fig. 20).

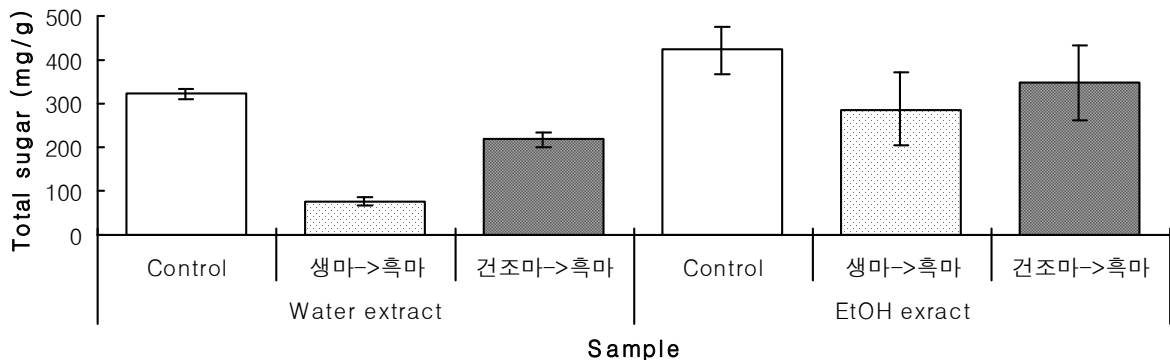


Fig. 20. Changes in total sugar content of extracts from black yam.

*생마->흑마: 생마를 이용하여 증자숙성공정을 거친 흑마.
 건조마->흑마: 건조마를 침지한 후 증자숙성공정을 거친 흑마.
 Control: 증자 및 숙성과정을 거치지 않은 건조마.

(마) 환원당 함량

공장 시제품의 환원당 변화는 DNS법을 사용하여 측정하였다. 환원당은 glucose를 이용하여 작성한 검량곡선에 흡광도 값을 대입하여 구하였다. 물 추출물의 경우에는 환원당의 양이 비슷하지만 에탄올 추출물의 경우에는 생마를 이용한 흑마의 환원당 함량이 건조마를 이용한 흑마에 비해 2배 정도 높은 것으로 나타났다(Fig. 21).

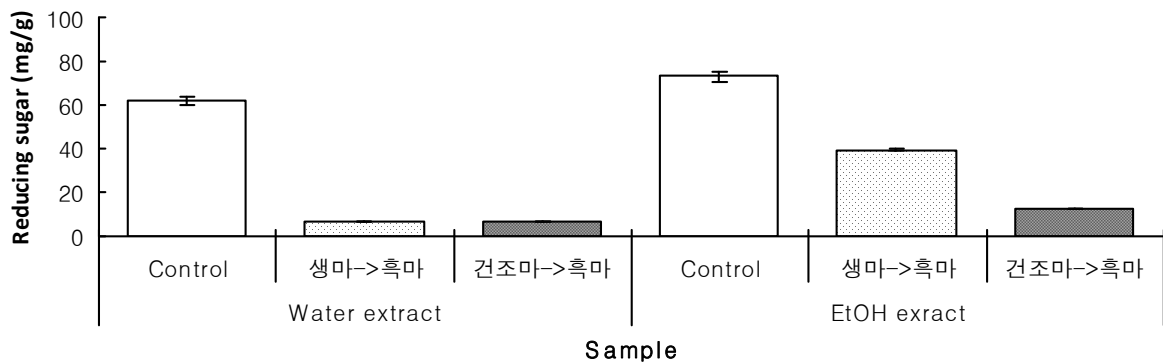


Fig. 21. Changes in reducing sugar content of extracts from black yam.

*생마->흑마: 생마를 이용하여 증자숙성공정을 거친 흑마.
 건조마->흑마: 건조마를 침지한 후 증자숙성공정을 거친 흑마.
 Control: 증자 및 숙성과정을 거치지 않은 건조마.

(5) 흑마 물 추출물의 항산화 활성

(가) DPPH radical 소거능

전자공여능 측정에 사용된 DPPH는 안정한 자유라디칼로서 전자 또는 수소를 받으면 517nm 부근에서 흡광도가 감소하기 때문에 각 추출물에서 이러한 라디칼을 환원시키거나 상쇄시키는 능력이 크면 높은 항산화 활성 및 활성산소를 비롯한 다른 라디칼에 대하여 소거 활성을 기대할 수 있으며 인체 내에서 활성 라디칼에 의한 노화를 억제하는 척도로도 이용할 수 있다. 0.5mg/mL 농도에서 각 sample의 전자공여능을 측정한 결과 증자 및 숙성의 횟수가 증가할수록 항산화 활성이 높아졌으며 No slice 경우에는 4차 sample에서, slice 경우에는 7차 sample에서 전자공여능이 가장 높게 나타났다(Fig. 22).

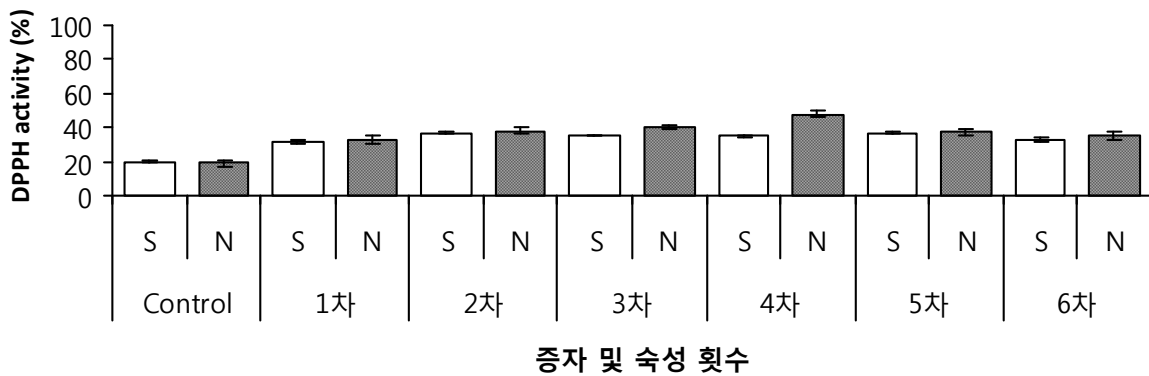


Fig. 22. DPPH radical activity of water extract from black yam. S: Slice, N: No slice.

(나) ABTS radical 소거능

혈장에서 ABTS의 양이온 라디칼의 흡광도가 항산화제에 의해 억제되는 것에 기초하여 개발된 라디칼 소거 활성법으로 ABTS⁺는 600~750 nm의 범위에서 강한 흡수를 보여주며 이로 인해 분광 분석으로 쉽게 측정할 수 있다. 이러한 원리를 이용하여 ABTS 활성을 측정한 결과 DPPH 결과와 마찬가지로 증자 및 숙성 횟수가 증가할수록 활성이 증가하였다(Fig. 23).

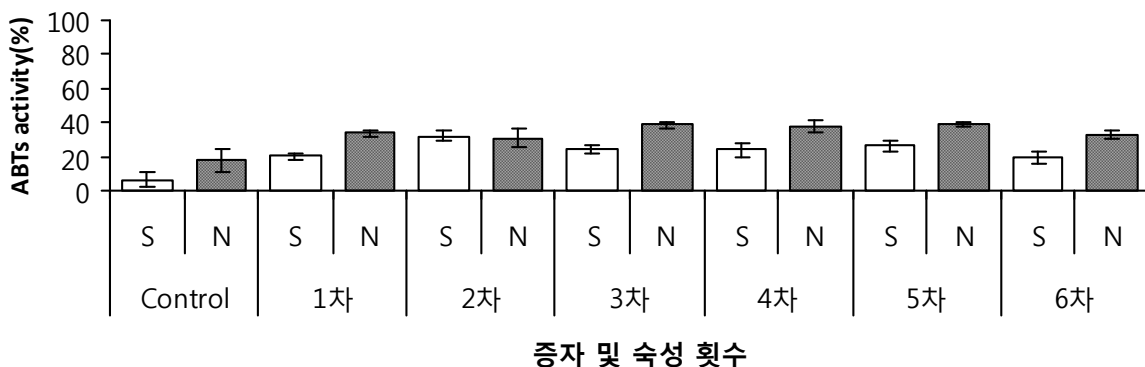


Fig. 23. ABTS radical activity of water extract from black yam. S: Slice, N: No slice.

(6) 흑마 에탄올 추출물의 항산화 활성

(가) DPPH radical 소거능

전자공여능 측정에 사용된 DPPH는 안정한 자유라디칼로서 그것의 비 공유전자로 인해 517nm 부근에서 최대 흡수치를 나타내며, 전자 또는 수소를 받으면 517nm 부근에서 흡광도가 감소하기 때문에 각 추출물에서 이러한 라디칼을 환원시키거나 상쇄시키는 능력이 크면 높은 항산화 활성 및 활성산소를 비롯한 다른 라디칼에 대하여 소거 활성을 기대할 수 있으며 인체 내에서 활성 라디칼에 의한 노화를 억제하는 척도로도 이용할 수 있다. DPPH radical 소거능을 측정한 결과 또한 물 추출물과 마찬가지로 증자 및 숙성의 횟수가 증가할수록 DPPH radical 소거능이 높게 나타났으며 No slice의 경우에는 4차 sample에서, slice의 경우에는 5차 sample에서 전자공여능이 가장 높게 나타났다(Fig. 24).

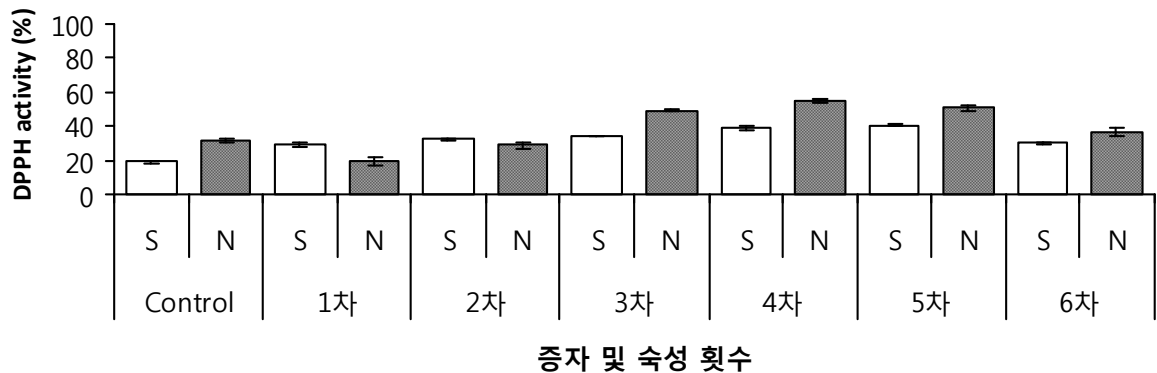


Fig. 24. DPPH radical activity of 70% EtOH extract from black yam. S: Slice, N: No slice.

(나) ABTS radical 소거능

ABTS와 potassium persulfate를 암소에 방치하여 ABTS⁺이 생성되면 추출물의 항산화 활성에 의해 ABTS⁺이 소거되어 radical 특유의 색인 청록색이 탈색되는데 이를 흡광도 값으로 나타내어 ABTS⁺의 소거 활성을 측정할 수 있다. ABTS⁺는 600~750nm의 범위에서 강한 흡수를 보여주며 이로 인해 분광 분석으로 쉽게 측정할 수 있다. 이러한 원리를 이용하여 ABTS 활성을 측정한 결과 No slice의 경우 5차 sample에서 ABTS 활성이 높게 나타났다(Fig. 25).

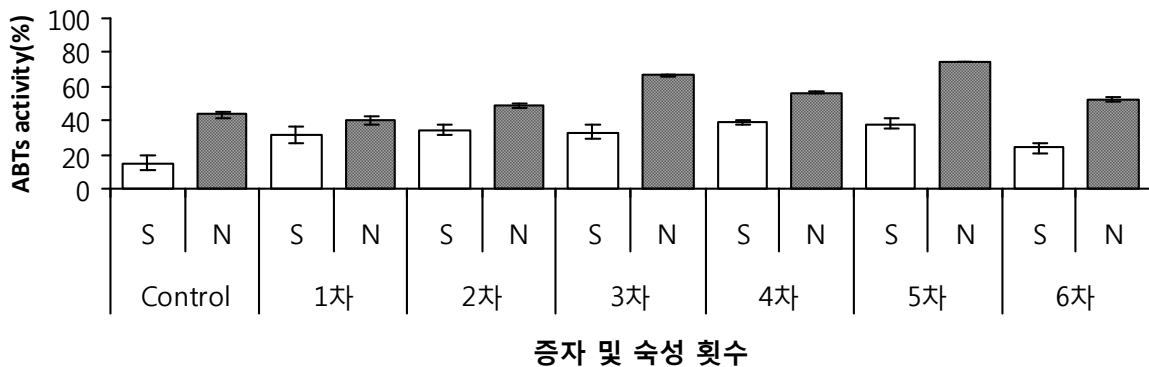


Fig. 25. ABTS radical activity of 70% EtOH extract from black yam . S: Slice, N: No slice.

(7) 공장 시제품의 항산화 활성

(가) DPPH radical 소거능

DPPH는 안정한 자유라디칼로서 그것의 비 공유전자로 인해 517nm 부근에서 최대 흡수치를 나타내며, 전자 또는 수소를 받으면 517 nm 부근에서 흡광도가 감소하기 때문에 각 추출물에서 이러한 라디칼을 환원시키거나 상쇄시키는 능력이 크면 높은 항산화 활성 및 활성산소를 비롯한 다른 라디칼에 대하여 소거 활성을 기대할 수 있으며 인체 내에서 활성 라디칼에 의한 노화를 억제하는 척도로도 이용할 수 있다. 공장 시제품을 이용하여 1,000ppm 농도에서 DPPH radical 소거능을 측정한 결과 공장 시제품 추출물 간의 DPPH radical 소거능은 차이가 없는 것으로 나타났다(Fig. 26).

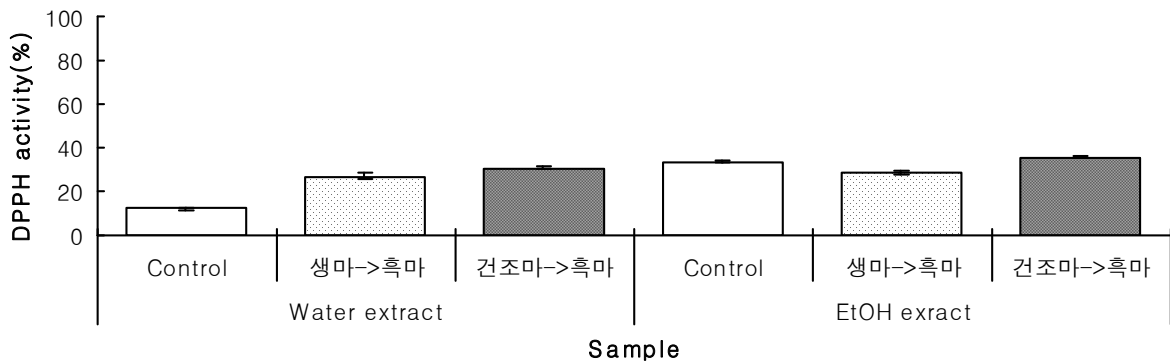


Fig. 26. DPPH radical activity of extracts from black yam.

*생마->흑마: 생마를 이용하여 증자숙성공정을 거친 흑마.

건조마->흑마: 건조마를 침지한 후 증자숙성공정을 거친 흑마.

Control: 증자 및 숙성과정을 거치지 않은 건조마.

(나) ABTS radical 소거능

ABTs와 potassium persulfate를 암소에 방치하여 ABTs⁺이 생성되면 추출물의 항산화 활성에 의해 ABTs⁺이 소거되어 radical 특유의 색인 청록색이 탈색되는데 이를 흡광도 값으로 나타내어 ABTS⁺의 소거 활성을 측정할 수 있다. ABTS⁺는 600~750nm의 범위에서 강한 흡수를 보여주며 이로 인해 분광 분석으로 쉽게 측정할 수 있다. 이러한 원리를 이용하여 1,000ppm의 농도에서 공장 시제품 추출물의 ABTS radical 소거능을 측정한 결과 물 추출물의 경우 생마를 이용한 흑마제품에 비해 건조마를 이용한 흑마제품의 ABTS radical 소거능이 2배 정도 높게 나타났다(Fig. 27).

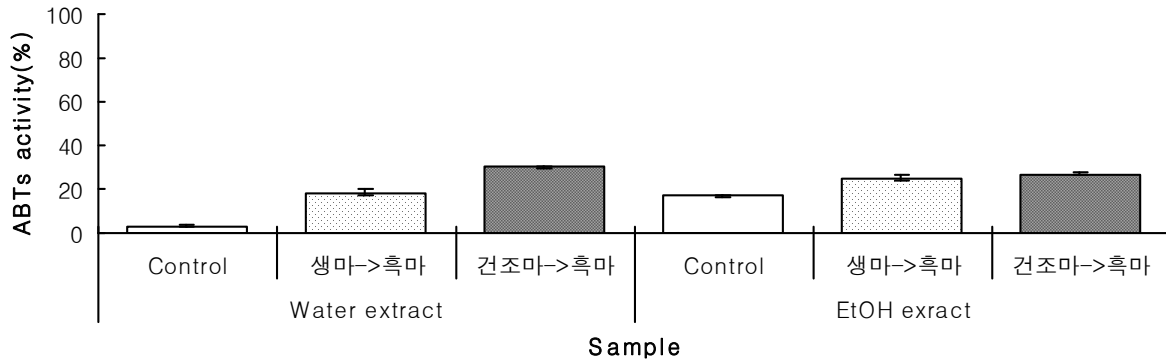


Fig. 27. ABTS radical activity of extracts from black yam.

*생마->흑마: 생마를 이용하여 증자숙성공정을 거친 흑마.
 건조마->흑마: 건조마를 침지한 후 증자숙성공정을 거친 흑마.
 Control: 증자 및 숙성과정을 거치지 않은 건조마.

(다) 금속 봉쇄력

공장 시제품의 금속 봉쇄력을 측정한 결과, 생마로 만든 흑마제품과 건조마로 만든 흑마제품 모두 농도가 증가할수록 유의하게 금속봉쇄력이 높아지는 것을 알 수 있다(Fig. 28).

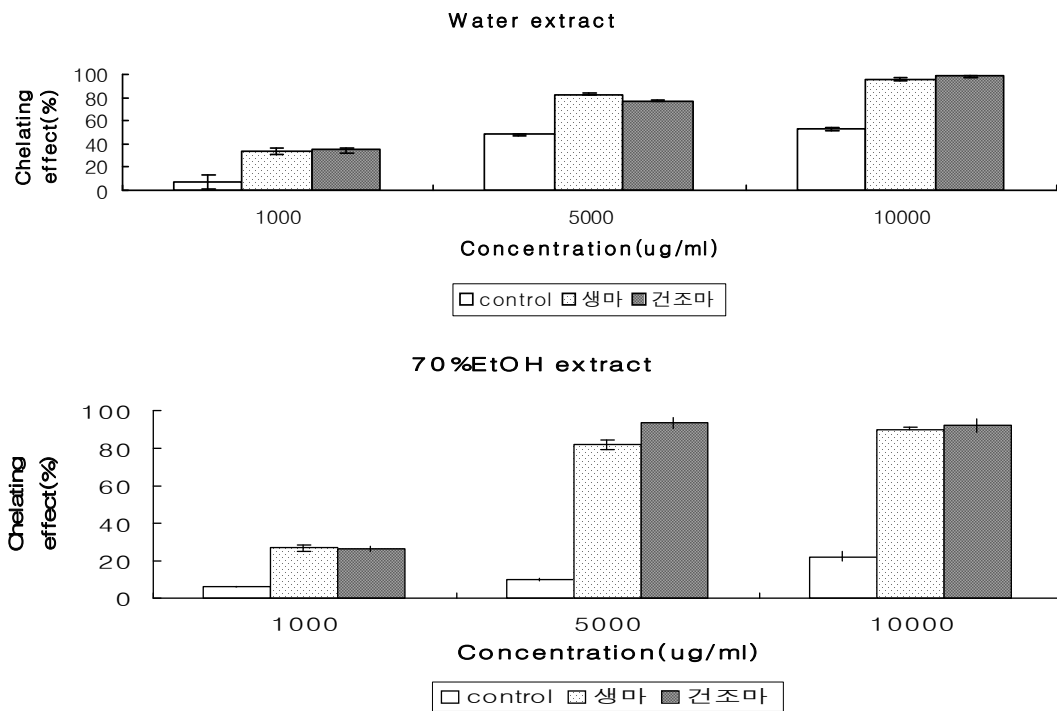


Fig. 28. Ferrous chelating effect of extracts from black yam. A: Water extract; B: 70% EtOH extract.

*생마->흑마: 생마를 이용하여 증자숙성공정을 거친 흑마.
 건조마->흑마: 건조마를 침지한 후 증자숙성공정을 거친 흑마.
 Control: 증자 및 숙성과정을 거치지 않은 건조마.

(8) 흑마 추출물의 항염증 효능 검증

(가) MTT assay에 의한 세포독성

흑마 추출물이 대식세포에 독성을 통한 염증 매개 물질 저해의 가능성을 배제하고 또한 최적 용량 범위를 설정하기 위해 MTT assay를 실시하였다. RAW 264.7 세포에 흑마 추출물을 200µg/mL 농도로 처리했을 때까지 세포독성이 나타나지 않았다(Fig. 29, 30). 흑마 추출물의 항염증 효과를 세포독성이 없는 범위 내에서 실험하기 위해 RAW264.7 세포에 10-200µg/mL 농도로 설정하고 이후 실험을 진행하였다.

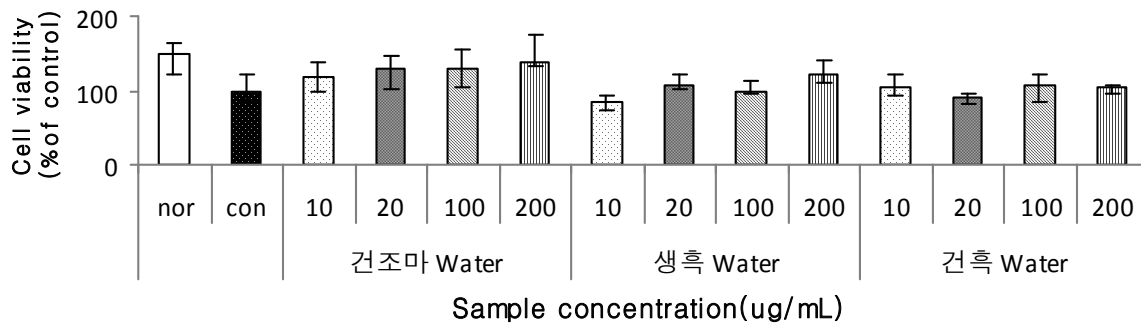


Fig. 29. Cytotoxicity of water extract from black yam in RAW264.7 cells.

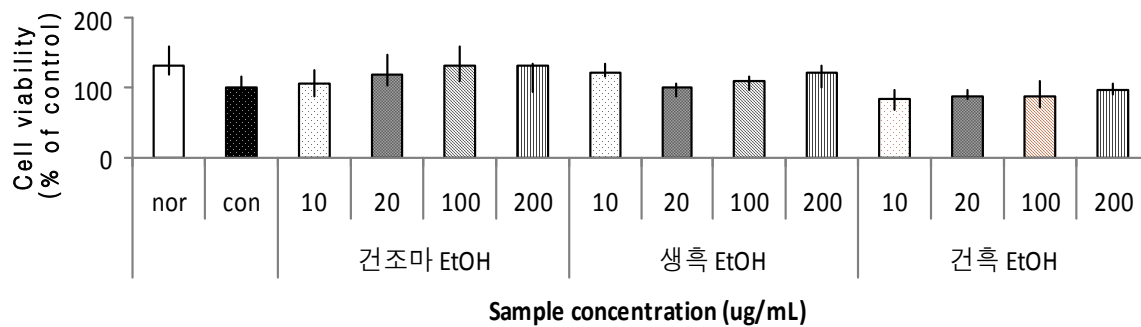


Fig. 30. Cytotoxicity of 70% EtOH extract from black yam in RAW264.7 cells.

(나) Nitric Oxide(NO) 생성량 측정

흑마 추출물이 항염증 활성화에 미치는 영향을 조사하기 위하여 먼저 흑마 추출물이 RAW 264.7 세포에서 LPS로 유도된 NO 생성에 미치는 영향을 조사하였다. LPS로 유도된 NO 생성에 대한 저해능을 조사한 결과, 농도에 상관없이 NO 생성이 저해되지 않았다(Fig. 31, 32). 이는 증자 및 숙성공정을 통해서 얻은 흑마가 항염증 활성화에는 효과가 없다는 것을 보여준다.

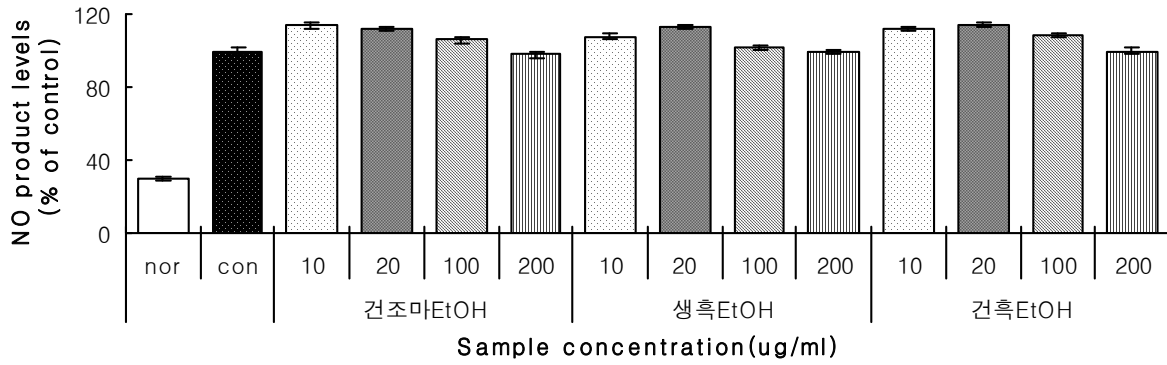


Fig. 31. Inhibition of lipopolysaccharide (LPS)-induced nitrite (NO) production in RAW264.7 cells by 70% EtOH extract from black yam.

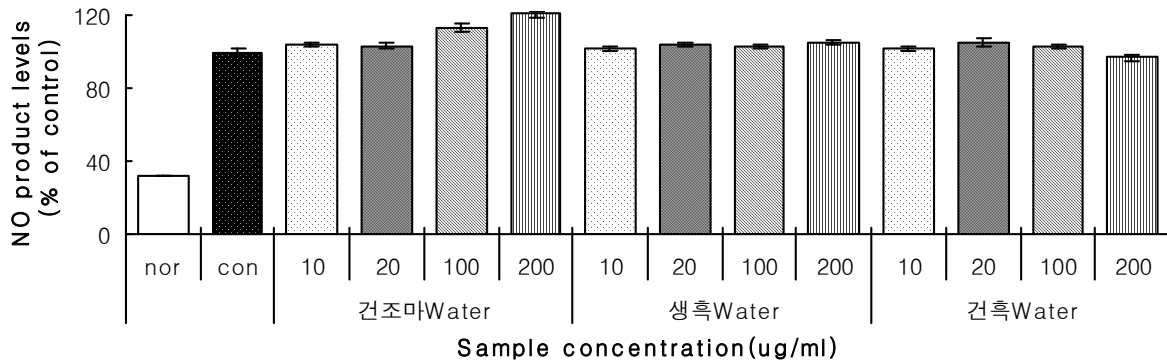


Fig. 32. Inhibition of lipopolysaccharide (LPS)-induced nitrite (NO) production in RAW264.7 cells by water extract from black yam.

(9) 흑마의 색도

증자횟수가 증가할수록 와 공장 시1~6차 증자 및 숙정공정을 거친 흑마의 색도를 측정한 결과증자횟수가 증가할수록 명도(lightness)를 나타내는 L값이 감소하는 경향을 보였다. 대조구가 가장 밝았고, 증자횟수가 증가할수록 짙어지는 것을 알 수 있었다. 적색(redness)을 나타내는 a값의 경우 대조구가 1.8로 가장 낮은 값을 보였으며, 1~6차 증자 및 숙정공정을 거친 흑마는 증자횟수에 상관없이 7~8범위로 나타났다. 또한 황색(yellowness)을 나타내는 b값은 대조구에서 8.8의 값을 보였고, 1~6차 증자 및 숙정공정을 거친 흑마는 17~22의 범위로 나타났다(Table 5). 공장 시제품의 색도는 4차~6차 증자 및 숙성공정을 거친 흑마와 비슷하였다 (Table 6).

Table 5. 1~6차 증자 및 숙성 공정을 거친 흑마의 색도.

증자횟수	L*	a*	b*
control	83.0±0.35	1.8±0.05	8.8±0.27
1차	67.3±0.22	7.0±0.06	17.5±0.21
2차	69.1±0.16	7.3±0.05	21.3±0.09
3차	63.2±0.31	7.8±0.03	22.2±0.09
4차	59.1±0.16	7.4±0.03	20.4±0.09
5차	55.4±0.09	8.0±0.10	20.1±0.20
6차	55.8±0.53	7.5±0.12	19.6±0.13

Table 6. 공장 시제품의 색도.

Sample	L*	a*	b*
생마->흑마	50.47±0.00	10.21±0.01	23.46±0.01
건조마->흑마	52.96±0.01	7.97±0.00	19.59±0.01

(10) 흑마성분 기기분석

(가) 공장 시제품의 기기분석 조건

증자 및 숙성 공정을 거친 흑마 sample 중 5차 sample과 공장 시제품의 폴리페놀 함량을 기기분석을 통해서 분석하였으며 조건은 Table 7과 같다.

Table 7. 기기분석 조건.

Requester	Condition
Column	ACE5 Phenyl (250 X 4.6mm <i>id</i>) Gradient elution (90min, Linear) A / B = 90 / 10 → 90 / 10 (2min) A / B = 90 / 10 → 80 / 20 (20min) A / B = 80 / 20 → 55 / 45 (40min) A / B = 55 / 45 → 0 / 100 (60min) A / B = 0 / 100 → 0 / 100 (70min) A / B = 0 / 100 → 90 / 10 (80min) A / B = 90 / 10 → 90 / 10 (90min)
Mobile Phase	A : 98% water, 2% glacial acetic acid in 0.018M ammonium acetate B : 70% solvent A, 30% organic solution Organic solution : 82% methanol, 16% n-butanol, 2% glacial acetic acid in 0.018M ammonium acetate
Temperature	25℃
Flow Rate	1.0 mL / min
Injection volume	10µL
Detection	Absorption (320nm)

(나) 공장 시제품의 기기분석 결과

각 sample의 물 추출물(Fig. 33~36)과 알코올 추출물(Fig. 37~40)에 대한 기기분석 결과, 증자 및 숙성공정을 거치면서 마의 구조변환이 일어난 것을 확인할 수 있었고 이러한 결과는 증자 및 숙성공정을 거친 흑마가 일반 건조마보다 효능이 좋다는 결과를 뒷받침해준다.

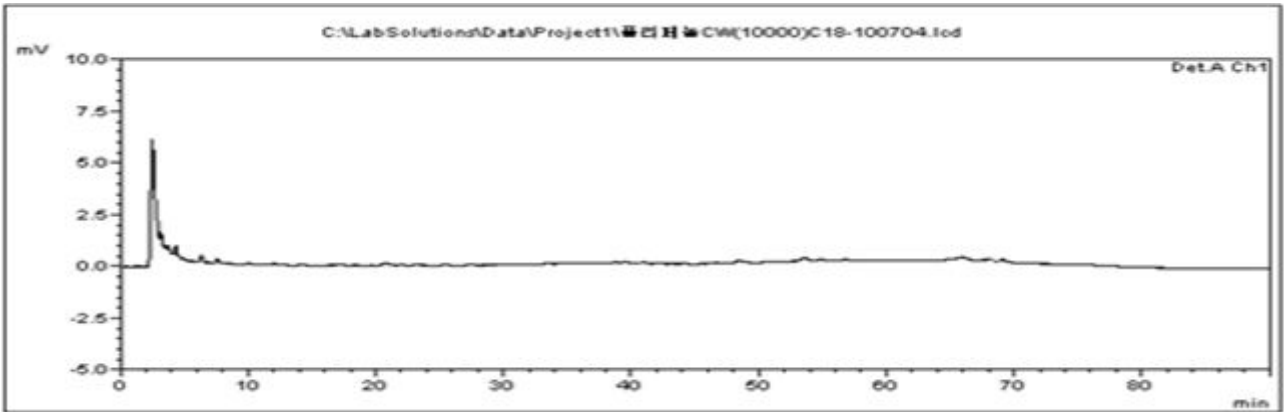


Fig. 33. Analysis of polyphenol of water extract from drying yam by HPLC (control).

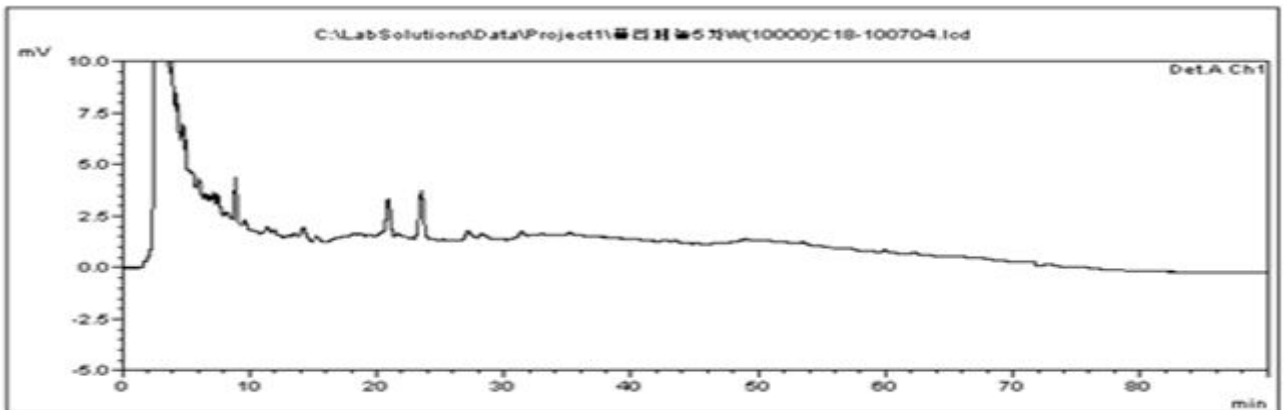


Fig. 34. Analysis of polyphenol of water extract by HPLC (5차 sample).

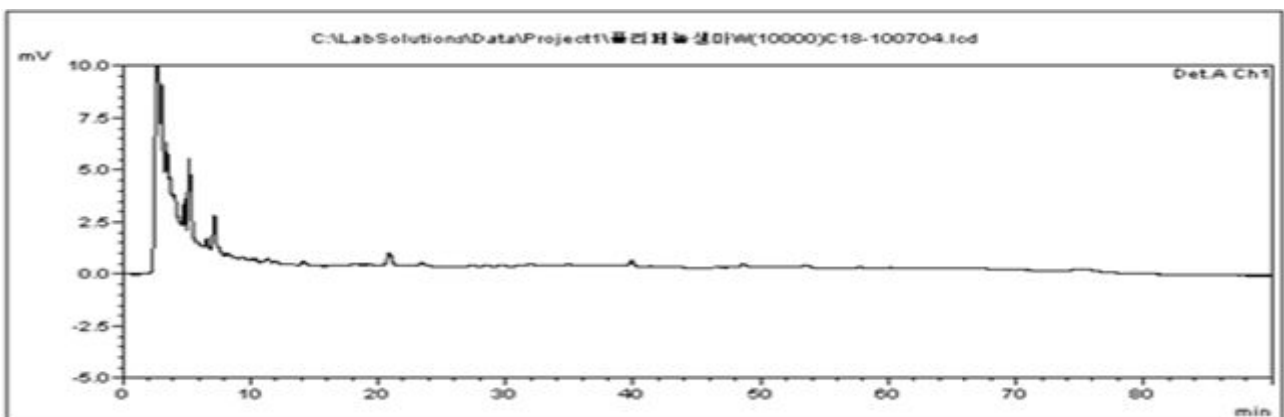


Fig. 35. Analysis of polyphenol of water extract by HPLC(생마->흑마).

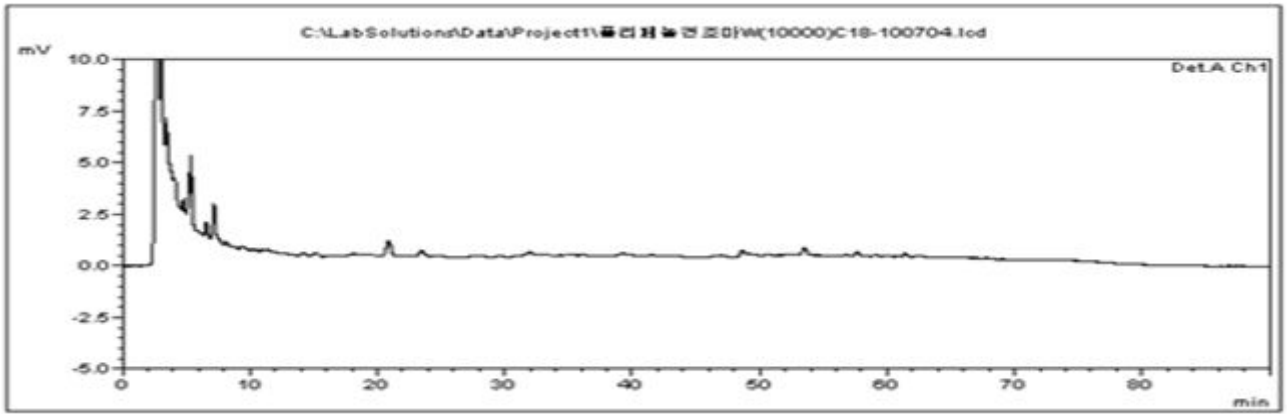


Fig. 36. Analysis of polyphenol of water extract by HPLC(건조마-→흑마).

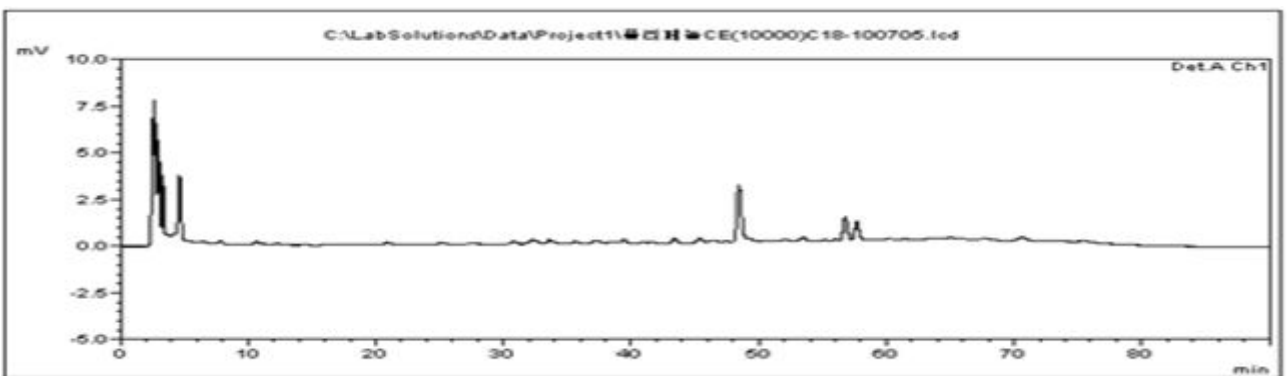


Fig. 37. Analysis of polyphenol of ethanol extract by HPLC (control).

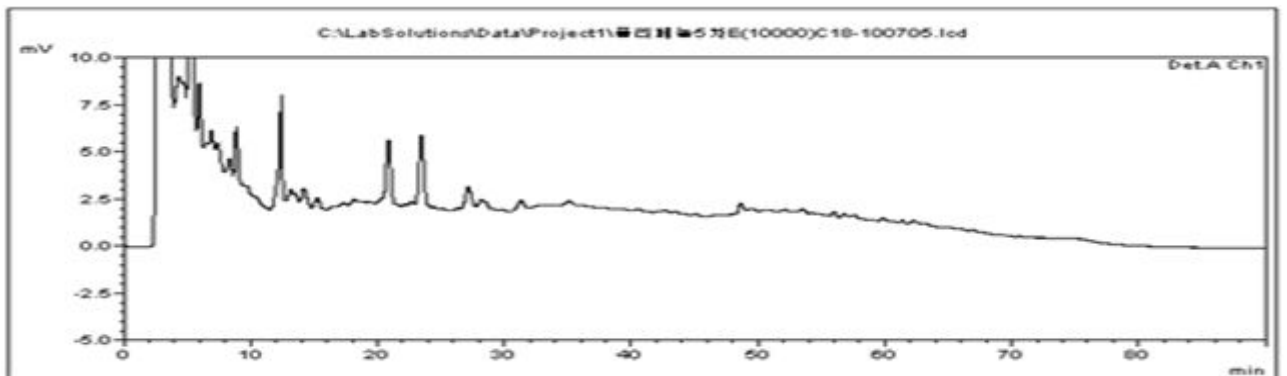


Fig. 38. Analysis of polyphenol of ethanol extract by HPLC (5차 sample)

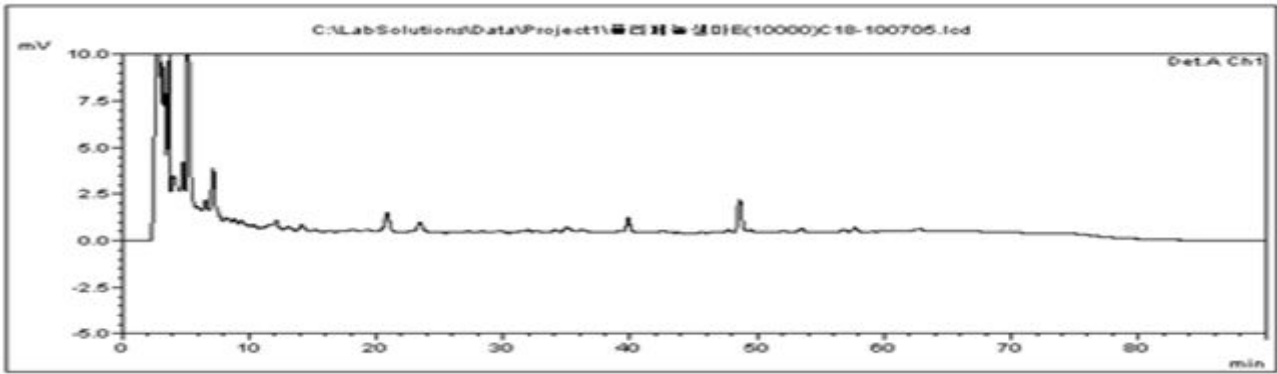


Fig. 39. Analysis of polyphenol of ethanol extract by HPLC (생마->흑마)

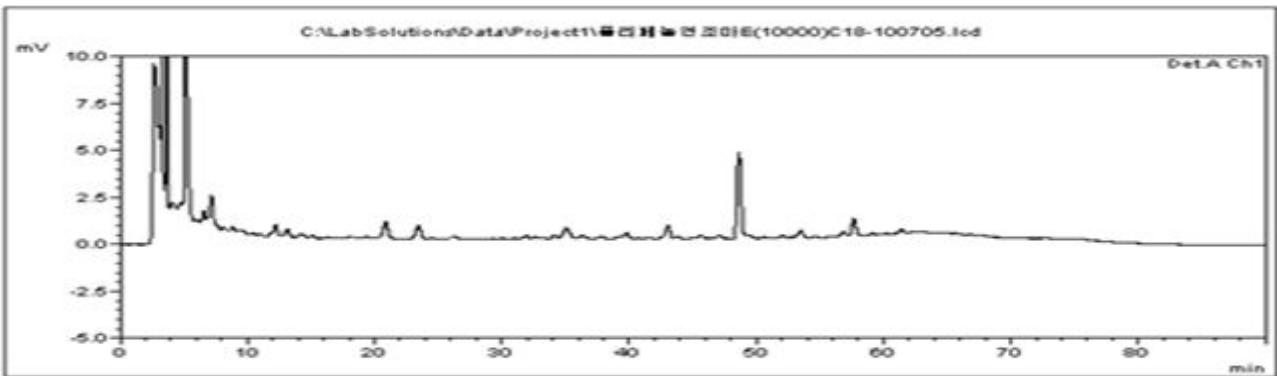


Fig. 40. Analysis of polyphenol of ethanol extract by HPLC (건조마->흑마)

다. 볶음공정을 통한 흑마의 실험결과(흑마 차)

(1) 추출 수율

Table 8. 흑마 차의 추출수율.

	Water Extract				70% EtOH Extract			
	건조마	생->흑마	건->흑마	흑마차	건조마	생->흑마	건->흑마	흑마차
추출수율(%)	22%	20%	14%	21%	16%	14%	8%	12%

(2) 폴리페놀 화합물 함량 측정

폴리페놀 화합물함량은 구조식에 hydroxyl기가 존재하므로 공명 안정화된 구조를 갖게 되며, 따라서 전자를 수용하는 기작으로 항산화 반응에 직접적으로 기여하게 된다. 각각의 샘플 추출 물 별로 측정한 결과 물 추출물에서는 흑마차가 다른 샘플들에 비해 2~3배 늘어난 것을 알 수 있었으며(Fig. 41) 에탄올 추출물에서도 물 추출물과 같은 경향을 보이고 있다.

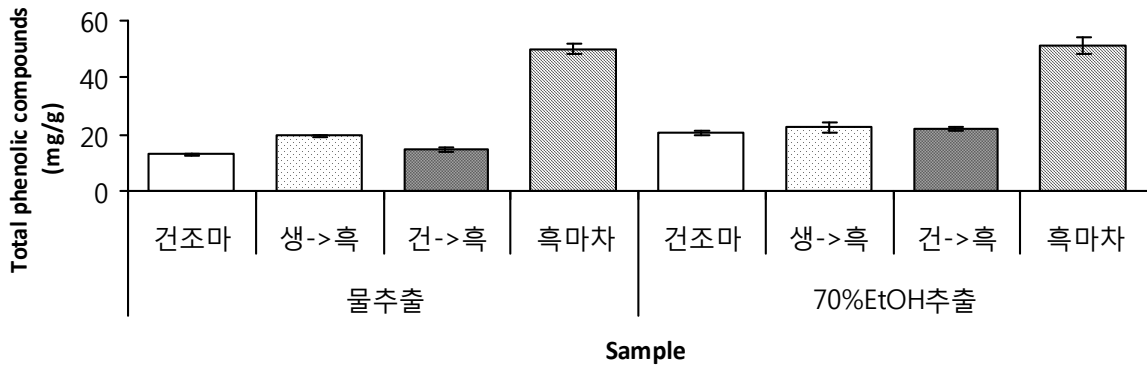


Fig. 41. Polyphenol content in 1 g of water extract from black yam.

(3) DPPH radical 소거능

DPPH는 안정한 자유라디칼로서 그것의 비 공유전자로 인해 517nm 부근에서 최대 흡수치를 나타내며, 각 추출물에서 이러한 라디칼을 환원시키거나 상쇄시키는 능력이 크면 높은 항산화 활성 및 활성산소를 비롯한 다른 라디칼에 대하여 소거 활성을 기대할 수 있으며 인체 내에서 활성 라디칼에 의한 노화를 억제하는 척도로도 이용할 수 있다. 각각의 샘플을 이용하여 100~5000ppm의 다양한 농도로 측정 한 결과 2000과 5000ppm의 고농도에서는 샘플간의 차이가 크게 없지만 500ppm에서 확인한 결과 흑마 차의 항산화력이 월등히 높은 것을 알 수 있다(Fig. 42).

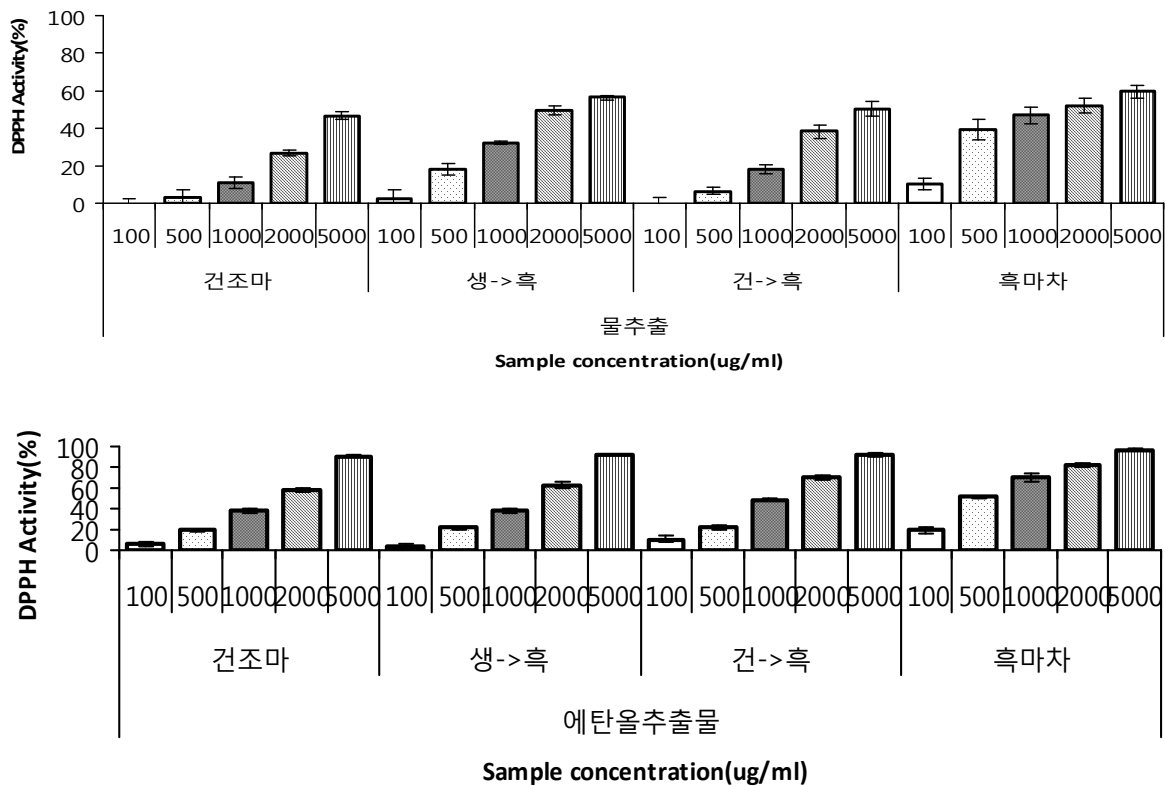


Fig. 42. DPPH radical activity of extracts from black yam tea.

(4) ABTs radical 소거능

ABTs radical 소거능의 경우(Fig. 43), DPPH와 같이 고농도의 샘플에서는 항산화력이 크게 차이 나지는 않지만 500ppm에서 확인해보면 흑마 차의 항산화력이 DPPH의 결과와 같이 월등히 높은 것을 알 수 있다.

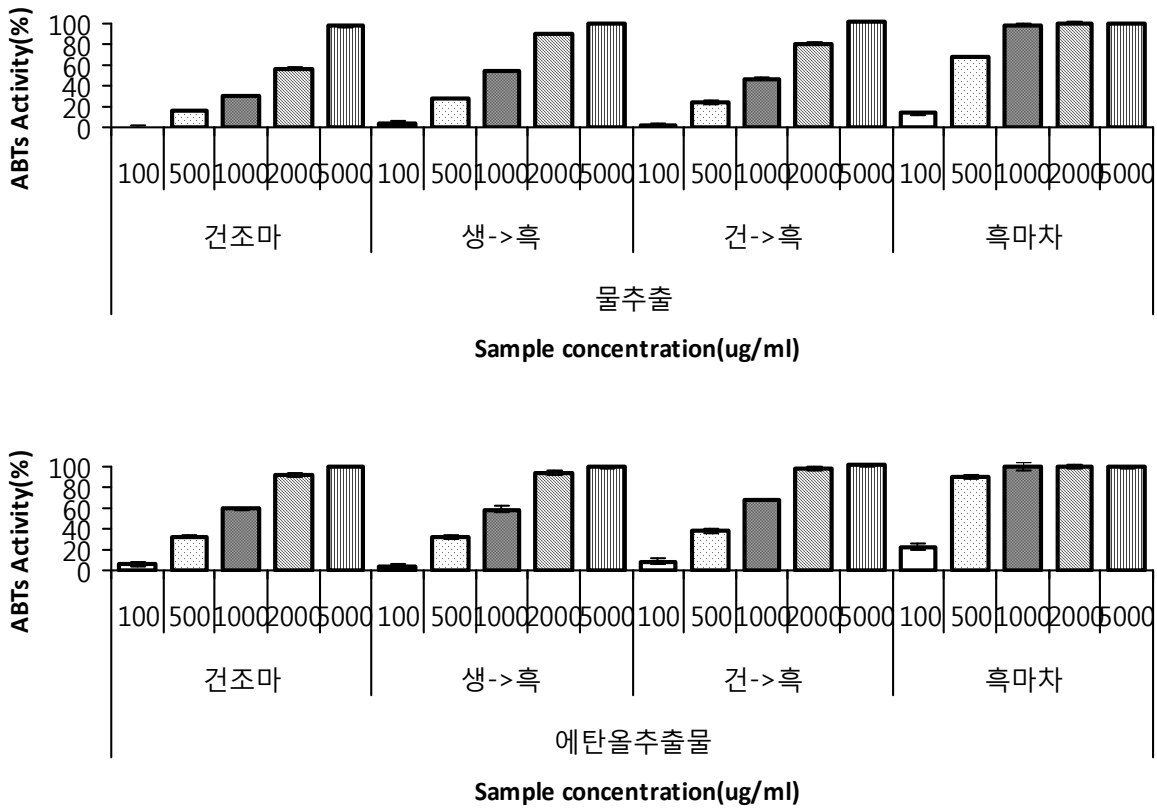


Fig. 43. ABTS radical activity of extracts from black yam tea.

제 8절 영여자로부터 신규 항진균제 및 항암제 개발 및 기작 규명

1. 서언

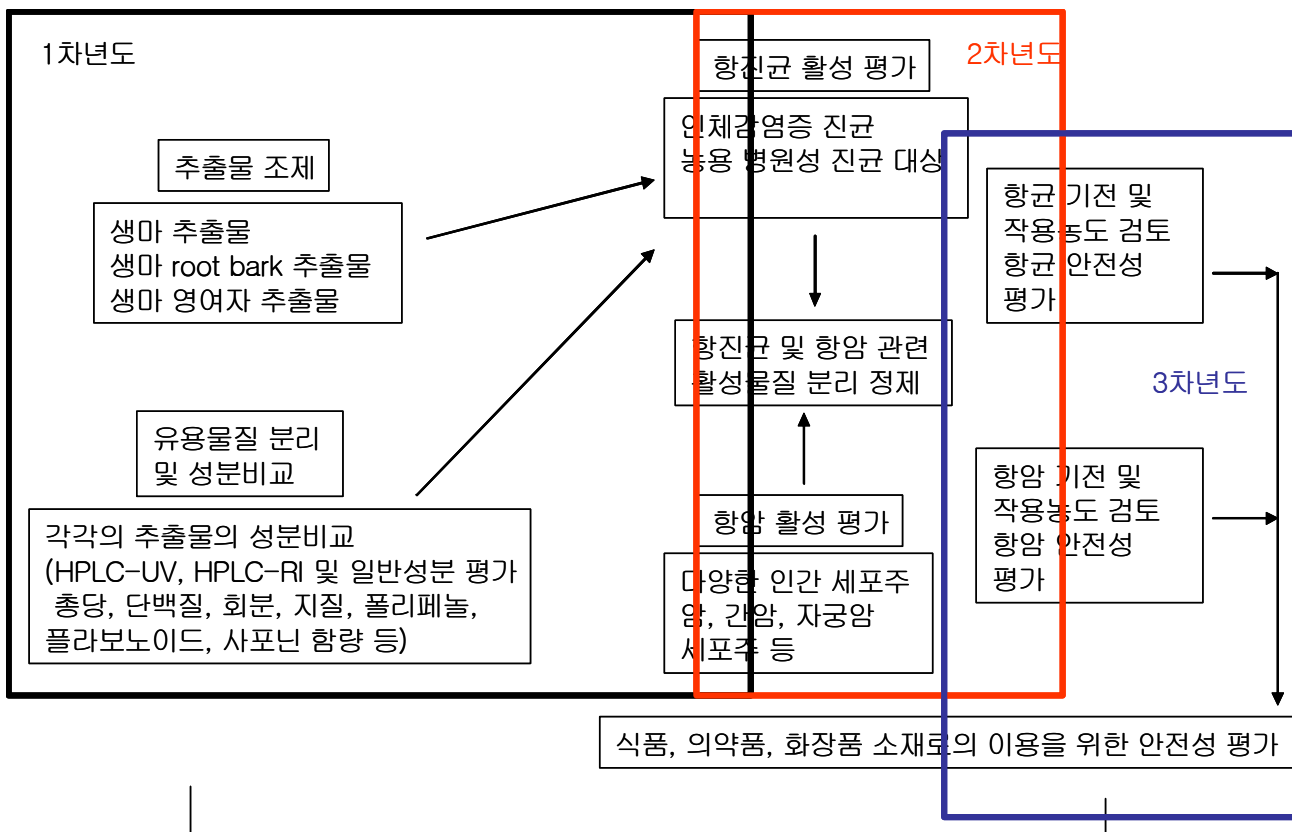
마는 백합목 마과식물(*Dioscoreacea*)로 한국, 일본, 중국 및 열대, 아열대 지역에 널리 분포하고 있는 다년생 덩굴식물로서(Ahn et al., 2005; Kim et al., 2006), 국내에서는 *D. opposita* Thunb 또는 *D. batatas*로 분류되는 종류가 주로 재배되고 있다. 이들의 지하괴근은 우수한 영양성분과 saponin, tannin, polyphenol, allantoin, uronic acid, chellidonic acid, sitosterol, mucin, araginine, yonogenin, kryptogenin, diosgenin 등 다양한 생리활성물질들을 포함하고 있어 건강기능성 식품재료로 인정받고 있다(Ahn et al., 2005; Han et al., 1990). 마는 콜레스테롤 저하효과, 항당뇨, 혈당 강하, 지질분해효소 저해 활성, 항돌연변이 활성, 항비만 및 배변 증대 활성 등이 보고되어 있으며(Kang et al., 2008; Kim et al., 2009; Kwon et al., 2003; Kwon et al., 1999; Kwon et al., 2001, Lee et al., 1995), 급속한 소비증대에 따른 유통 및 저장 분야의 연구도 활발하여, 생마 신선편이 개발 및 갈변, 부패방지에 대한 연구도 진행되고 있다(Ryu et al., 2007). 또한 본 연구팀에서는 최근, 생마의 추가적인 생리활성 탐색을 위해 항균, 항산화 및 항혈전 활성을 평가하여 생마 추출물의 우수한 항세균, 항혈전 및 항산화 활성을 보고한 바 있다(Kim et al., 2009).

영여자는 마의 겨드랑이 씨, 즉 겨드랑눈이 변태된 결눈의 하나로서 양분을 저장하며 식물의 모체에서 쉽게 땅에 떨어져 무성적으로 새 개체가 되는 주아를 말한다. 현재 국내에서는 연간 5,000톤 정도의 마가 생산되고 있으며, 영여자는 그 절반인 2,000~2,500 톤 정도가 생산되고 있다(Kim et al., 2008). 그러나 영여자는 한국 식품의약품안전청의 식품원재료로 인정되지 못하여 상업적 이용의 한계가 있으며, 마의 종자로 이용시에는 생마 괴근을 이용하는 경우보다 수확까지 1년이 더 소요되는 문제로 인해, 특별한 용도를 찾지 못하고 폐기되고 있는 실정이다. 지금까지 영여자에 대한 연구는 전 세계적으로도 미미하며, 영여자의 기내배양 및 분화, 이에 따른 디오스게닌 함량 변화에 대한 연구만이 한정적으로 이루어져 왔다(Ahn et al., 2005). 최근 본 연구팀에서는 영여자로부터 5종의 phenanthrene 화합물을 분리하고, 6,7-dihydroxy-2,4-dimethoxy phenanthrene을 포함하는 이들의 항진균 활성을 보고한 바 있으며(Kum et al., 2006), 본 연구팀의 항진균 활성 이외의 영여자의 또 다른 생리활성이 보고된 적은 없다. 그러나, 경북 북부 지역에서는 오래전부터 생마와 마찬가지로 영여자를 식용 및 약용으로 사용하여 왔으며, 뮤신과 같은 점질성분이 확인되므로 이의 생리활성을 평가하는 것은 의미있다고 판단된다. 따라서 본 연구에서는 영여자의 다양한 생리활성을 평가하고 생마와의 기능성을 비교하기 위해, 건조 영여자로부터 메탄올 추출물을 조제하고, 이로부터 다양한 유기용매 분획을 조제하여 이들의 항균, 항혈전 및 항산화 활성을 평가하였다. 그 결과, 영여자의 메탄올 추출물 및 이의 헥산 및 에틸아세테이트 분획에서 우수한 항세균 활성을, 메탄올 추출물 및 헥산 분획에서 강력한 항혈전 활성을, 또한 에틸아세테이트 분획에서 우수한 DPPH 소거능, SOD 유사 활성 및 환원력을 확인하였다. 또한 영여자의 항진균 활성과 항암활성을 평가하였으며, 그 작용 기작을 규명하였다.

본 연구에서는, 불용성 폐기자원인 영여자가 생마가 가진 유용 생리활성을 거의 동일하게 가지고 있음을 확인하였으며, 영여자의 새로운 생물소재로의 개발 가능성을 제시하고 있다.

2. 연구방법론

본 연구의 전체 모식도는 다음과 같다. 1차년도에서는 영여자 및 다양한 마로부터 다양한 추출물을 조제하고 이들로부터 유용 성분을 분리하였으며, 2차년도에서 조제된 추출물, 분획물 및 순수분리 물질을 이용하여 항균 활성, 항대장암 활성 및 다양한 유용 생리활성을 평가하였으며, 3차년도에는 분리물질의 생리활성 기작, 항균 안전성, 항암 안전성, 유효농도 평가 등의 실제적 적용 가능성을 검토하였다.



가. 실험 재료

실험에 사용한 재료는 크게 영여자와 마 뿌리이며, 영여자의 경우 *Dioscorea batatas* 유래와 *D. bulbifera* 유래의 영여자를 사용하였으며, 마의 경우 장마, 단마, 자색마, 등근 대마의 4종을 사용하였다.

실험에 사용한 미생물은 Table 1에 나타내었다.

Table 1. The used microorganisms in this study.

Gram negative bacteria	<i>Escherichia coli</i> KCTC 1682
	<i>Proteus vulgaris</i> KCTC 2433
	<i>Salmonella typhimurium</i> KCTC 1926
Gram positive bacteria	<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 1916
	<i>Listeria monocytogenes</i> KACC 10550
	<i>Bacillus subtilis</i> KCTC 1924
Fungi	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IF0 0233
	<i>Candida albicans</i> KCTC 1940
	<i>Botrytis cinerea</i> KACC 40574
	<i>Pyricularia grisea</i> KACC 40414
	<i>Rhizoctonia solani</i> KACC 40101
	<i>Glomerella cingulata</i> KCTC 6075
	<i>Collectotrichum gloeosporioides</i> KCTC 6169 <i>Phytophthora capsici</i> KACC 40157 <i>Botryosphaeria dothidea</i>

나. 실험 처리

실험에 사용한 영여자 시료는 2006년 11월 경북 안동에서 수확하여, 브러쉬로 이물질을 제거한 후 두께 약 0.3 cm로 절단하고, 이를 60°C에서 항량 건조시켜 사용하였다. 영여자 시료는 안동대학교 식품영양학과에 보관되어 있으며(시료번호: A0875), 영여자의 수분함량은 70.0%로, 마의 지하괴근(70.3%)과 유사하였다(Kim et al., 2009). 메탄올 추출물 조제를 위해 건조 영여자 10kg에 20L의 메탄올을 가하여 상온에서 24시간씩 3회 추출하였다. 이후, 추출액은 filter paper (Whatman No. 2)로 거른 후 60°C에서 감압 건조하여 조제하였다. 이때 추출효율은 1.05% (w/w)를 나타내어, 마의 메탄올 추출효율 1.1%(w/w)와 유사하였다(Kim et al., 2009). 메탄올 추출물은 물에 현탁한 후, 핵산, 에틸아세테이트 및 부탄올을 이용하여 순차적으로 분획하였으며, 분획물과 물 잔류물은 동일한 방법으로 감압건조하여 분말화 하였다. 각각의 시료 분말은 DMSO에 녹인 후 적당한 농도로 희석하여 항균 활성, 항혈전 활성 및 항산화 활성에 사용하였다. 항혈전 활성 평가를 위한 thrombin time(TT) 측정시, 혈장은 최근 1개월 동안 약물투여를 받지 않은 지원자의 전혈로부터 조제하였으며, 채혈 후 즉시 4°C에서 5,000 g로 5분 동안 원심분리하여 혈장을 분리하고 냉동한 상태로 보관하였으며(신선동결 혈장), 필요시 상온에서 해동하여 사용하였다. 기타 시약은 Sigma Co.(USA)의 제품을 구입하여 사용하였다.

다. 분석방법

(1) 항균 활성 측정

영여자의 메탄올 추출물 및 이들의 분획물의 항균 활성을 평가하기 위해 사용한 세균, 효모 및 식물병원성 곰팡이들은 Table 1에 나타내었다. 항세균, 항진균 및 항곰팡이 활성 평가는 기존의 보고한 방법과 동일하게 사용하였으며, 각각 Nutrient agar (Difco Co., USA), Sabouraud dextrose 및 Potato dextrose agar(Difco Co. USA) 배지를 이용하여 각각의 시료 5μL를 멸균 disc-paper(지름 6.5mm)에 가하여 생육저지환의 크기를 측정하여 평가하였다(Sohn et al.,

2008). 대조구로는 항세균제인 ampicillin과 항진균제인 miconazole(Sigma Co., USA)을 각각 5 µg/disc 농도로 사용하였으며, 생육저지환의 크기는 육안으로 생육이 나타나지 않는 부분의 지름을 mm 단위로 측정하였고, 3회 이상 평가 후 대표 결과로 나타내었다.

(2) 항혈전 활성

항혈전 활성은 시료의 TT를 측정하여 평가하였으며, 트롬빈 저해 활성은 기존의 보고한 Amelung coagulometer KC-1A(Japan)를 이용하여 혈액 응고시간을 측정하여 평가하였다(Singleton et al., 1999; on et al., 2008). 37°C에서 0.5 U 트롬빈(Sigma Co., USA) 50µL와 20mM CaCl₂ 50 µL, 다양한 농도의 시료 추출액 10µL를 coagulometer의 튜브에 혼합하여 2분간 반응시킨 후, 혈장 100µL를 첨가한 후 혈장이 응고될 때까지의 시간을 측정하였으며, 시료 대조군으로는 아스피린(Sigma Co.)을, 용매 대조군으로는 DMSO를 사용하였다. DMSO의 경우 평균 33.0초의 응고시간을 나타내었으며, 트롬빈 저해 활성은 3회 이상 반복한 실험의 평균치를 나타내었다.

(3) 항산화 활성 평가

영여자의 메탄올 추출물 및 이의 분획물의 항산화 활성은 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical 소거능, superoxide dismutase(SOD) 유사활성 및 환원력 측정에 의해 평가하였다. 먼저 DPPH 소거능의 경우, 다양한 농도로 희석한 시료 20µL에 99.5% 에탄올에 용해시킨 2×10^{-4} M DPPH 용액 380 µL를 넣고 혼합하여 37°C에서 30분 동안 반응시킨 후, 516nm에서 microplate reader(Asys Hitech, Expert96, Asys Co., Austria)를 사용하여 흡광도를 측정하였다. 대조구로는 butyl hydroxytoluene(BHT), vitamin C 및 vitamin E(Sigma Co., USA)를 사용하였다. DPPH free radical 소거능은 시료첨가구와 비첨가구의 백분율로 표시하였으며, IC₅₀는 50% 소거능을 나타내는 농도로 계산하였고, 최종결과는 3회 측정값의 평균치로 나타내었다(Sohn et al., 2005). SOD 유사활성 평가는 superoxide와 반응하여 갈변물질을 만드는 pyrogallol 자동산화를 측정하는 Marklund와 Marklund(1974)의 방법을 변형하여(Oh et al., 2008) 측정하였다. 즉 시료용액 0.2mL에 Tris-HCl buffer(50mM tris, 10 mM EDTA, pH 8.5) 3mL와 7.2mM pyrogallol 0.2mL를 가하고, 25°C에서 10분간 반응시킨 후, 1N HCl 1mL로 반응을 정지시킨 후, 420nm에서 흡광도를 측정하였다. SOD 유사활성은 시료 첨가구와 무첨가구와의 흡광도비로 나타내었다. 한편 환원력 평가는 Oyaizu등의 방법을 변형하여 측정하였다(Oh et al., 2008). 에탄올에 용해한 시료 2.5mL에 0.2M sodium phosphate buffer(pH 6.6) 2.5mL와 10% potassium ferricyanide 2.5mL를 첨가하고 50°C에서 20분간 반응시킨 후, 10% trichloroacetic acid 2.5mL를 첨가하여 반응을 종료하고 4000rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 회수하였다. 회수한 상등액은 증류수로 2배 희석한 후, 신선하게 조제된 0.1% ferric chloride 용액과 5:1 (v/v) 비율로 혼합하고 700nm에서 흡광도를 측정하여 평가하였으며, 대조구로는 BHT를 사용하였다. SOD 유사활성 평가 및 환원력 평가결과는 3회 반복실험 후 평균과 편차로 나타내었다.

(4) 기타 분석

총 flavonoid의 함량 측정은 기존의 보고한 방법(Sohn et al., 2005)에 따라 측정하였으며, 각각의 시료를 18시간 메탄올 교반 추출하고 여과한 추출검액 400µL에 90% diethylene glycol

4mL를 첨가하고 다시 1N NaOH 40 μ L를 넣고 37°C에서 1시간 반응 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 시약으로는 rutin을 사용하였다. 총 polyphenol 함량은 추출 검액 400 μ L에 50 μ L의 Folin-ciocalteau, 100 μ L의 Na₂CO₃ 포화용액을 넣고 실온에서 1시간 방치한 후 725nm에서 흡광도를 측정하였다(Sohn et al., 2008). 표준시약으로는 tannic acid를 사용하였다. 총당 정량의 경우에 phenol-sulfuric acid법을, 환원당 정량의 경우에는 DNS 변법을 이용하였다(Sohn et al., 2006).

3. 연구결과

가. 영여자의 메탄올 추출물 조제 및 순차적 유기용매 분획물 조제

영여자 40 kg을 세절 후 실온에서 건조하여 건조 시료 12.0 kg을 회수하였으며, 이 중 10 kg을 이용하여 메탄올 추출물 105 g을 조제하였다(추출율 1.05% w/w). 메탄올 추출물을 순차적 분획한 결과, 헥센, 에틸아세테이트, 부탄올 분획물 및 물 잔류물이 각각 17.48%, 5.29%, 7.06% 및 68.24%로 분획되었다(Table 2). 이는 마 추출물의 분획이 각각 7.65%, 17.52%, 7.26% 및 66.71%인 점을 고려하면(Kim et al., 2009), 영여자 메탄올 추출물 역시 다량의 수용성 성분을 함유하고 있음을 알 수 있으며, 부탄올 분획 효율 역시 마의 경우 7.26%와 매우 유사하였다. 그러나 마 추출물의 헥산 및 에틸아세테이트 분획 효율이 7.65% 및 17.52%인 점을 고려하면, 영여자 추출물은 마 추출물보다 헥산에 용출되는 오일 성분을 더 많이 포함하고 있음을 알 수 있었다. 한편 영여자 메탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량 및 총 플라보노이드 함량은 마 추출물에 비해 각각 12배 및 3.4배 높게 나타났으며, 총당 및 환원당 함량은 마 추출물에 비해 상대적으로 적은 양을 나타내었다(Kim et al., 2009).

Table 2. The organic solvent fraction yields from methanol extract of aerial bulbils of *Dioscorea batatas* Decne and composition of the fractions.

Extract/ Fractionates	Fraction yield (%)	Content (mg/g)			
		Total polyphenol	Total flavonoid	Reducing sugar	Total sugar
Methanol ex.	-	60.60	16.4	58.3	174.2
n-Hexane fr.	17.48	12.63	32.1	31.8	371.16
Ethylacetate fr.	5.29	27.48	70.1	38.6	615.5
Butanol fr.	7.06	17.18	34.2	73.6	116.1
Water res.	68.24	4.03	1.38	56.6	121.1

나. 조제된 메탄올 추출물 및 유기용매 분획물의 항균 활성

먼저 항세균제 대조구로 사용된 ampicillin의 경우, 실험에 사용된 6종의 세균에 대해 모두 강한 항균활성을 나타냈으며, 항진균제인 miconazole의 경우 *C. gloeosporioides*을 제외한 *C. albicans*, *S. cerevisiae* 및 식물 병원성 곰팡이에 대해 강력한 활성을 나타내었다(Table 3). 영

여자의 메탄올 추출물은 500 µg/disc 농도에서 *S. typhimurium*에는 강한 항균력을 나타내었으며, *S. aureus* 및 *B. subtilis*에 대해서도 양호한 활성이 나타났으며, 그 외의 실험군주에서는 항균력이 인정되지 않았다. 이는 마의 메탄올 추출물의 항균 활성과 유사하나, 마 추출물의 경우 *S. aureus*에는 활성을 나타내지 않는 것과는 구별된다. 실제 영여자의 메탄올 추출물뿐 만 아니라, 헥산 및 에틸아세테이트 분획물 역시 *S. aureus*에 우수한 항균 활성을 나타낸 바 (Table 3), 마 추출물 및 이의 분획물에서는 나타나지 않는 영여자만의 항균 특성으로 판단된다.

분획물 중에서는, 영여자 역시 마 추출물의 분획물과 동일하게, 헥산 및 에틸아세테이트 분획에서는 전반적으로 우수한 항세균 활성이 나타났으며, 영여자 추출물에서 생육저지환의 크기가 전반적으로 더욱 크게 나타났다. 시료 모두에서, 영여자에서 분리된 6,7-dihydroxy-2,4-dimethoxy phenanthrene이 나타내는 항진균 활성(Kim et al., 2008)은 나타나지 않은 바, 이는 시료에서의 phenanthrene 화합물 농도가 매우 낮음을 의미한다. 물 잔류물의 경우에는, 마 추출물의 물 분획물과 동일하게 항세균 및 항진균 활성이 전혀 나타나지 않았다. 이러한 결과는 영여자가, 생마의 지하 괴근과 유사한 항균력을 가지고 있음을 나타낸다.

Table 3. Evaluation of antimicrobial activity of methanol extract and its organic solvent fractions of aerial bulbils of *Dioscorea batatas* Decne against different pathogenic and food-spoilage bacteria and fungi.

Microorganism	Clear zone (mm)							
	¹ Amp (5 µg/ disc)	² Mic (5 µg/ disc)	Aerial bulbils of <i>Dioscorea batatas</i> Decne					
			³ M. ex.	⁴ H. fr.	⁵ EA. fr.	⁶ B. fr.	⁷ W. res.	
Gram negative	⁸ EC	23.0	⁹ -	-	-	9.0	8.0	-
	PV	32.5	-	-	7.0	10.5	-	-
	ST	33.0	-	16.0	14.0	16.0	8.5	-
Gram positive	SA	19.0	-	8.0	10.5	13.5	-	-
	LM	28.0	-	-	10.5	13.0	-	-
	BS	27.5	-	8.0	10.5	12.0	-	-
Fungi	SC	-	29.0	-	-	-	-	-
	CA	-	27.5	-	-	-	-	-
	BC	-	28.0	-	-	-	-	-
	PG	-	40.0	-	-	-	-	-
	RS	-	32.0	-	-	-	-	-
	GC	-	18.0	-	-	-	-	-
	CG	-	-	-	-	-	-	-
	PC	-	34.5	-	-	-	-	-
BD	-	32.0	-	-	-	-	-	

¹AMP: ampicillin; ²Mic: miconazole; ³M. ex.: methanol extract of aerial bulbils of *Dioscorea batatas* Decne, ⁴H. fr., ⁵EA. fr., ⁶B. fr. and ⁷W. res.: hexane fraction, ethylacetate fraction, butanol fraction and water residue of the methanol extract of aerial bulbils of *Dioscorea batatas* Decne, ⁸EC: *Escherichia coli*, PV: *Proteus vulgaris*, ST: *Salmonella typhimurium*, SA: *Staphylococcus aureus*, LM: *Listeria monocytogenes*, BS: *Bacillus subtilis*, BC: *Botrytis cinerea*, PG: *Pyricularia grisea*, RS: *Rhizoctonia solani*, GC: *Glomerellacin cingulata*, CG: *Collectorichum gloeosporioides*, PC: *Phytophthora capsici*, and BD: *Botryosphaeri dothidea*. ⁹- : No inhibition.

The concentrations of methanol extract and organic solvent fractions used were 500 µg/disc, respectively. The clear zone: included a size of disc-paper (6.5 mm of diameter).

다. 영여자 메탄올 추출물 및 유기용매 분획물의 항혈전 활성

활성 대조구로 사용된 아스피린은 1.5mg/mL 농도에서, 용매 대조구로 사용된 DMSO에 비해 TT를 약 3배 증대(103.0초)시켜 항혈전제로의 우수성을 확인할 수 있었다(Table 4). 영여자 역시, 메탄올 추출물의 경우, 4.8mg/mL 농도에서 아스피린 1.5mg/mL에 해당하는 92.9초의 TT를 나타내어, 우수한 항혈전 활성을 나타내었다. 분획물의 경우에는 강력한 항혈전 활성이 헥산 분획에서 나타난 바, 4.8 mg/mL 농도에서 300초 이상의 트롬빈 타임을 나타내었으며, 2.4 mg/mL 농도에서도 67초를 나타내었다. 이는 마의 헥센 분획의 경우와 비교할 때 4배 이상의 강력한 활성이며, 아스피린 항혈전 활성의 약 35% 활성에 해당된다. 영여자 추출물의 헥산 분획물이 마 추출물에 비해 양적으로 2배 이상이며, 강력한 항혈전 활성을 가짐을 고려할 때, 영여자의 헥산 분획물은 항혈전제로서의 개발이 가능하리라 판단되며, 현재 활성물질의 정제가 진행 중에 있다.

Table 4. Antithrombin activities of methanol extract and its organic solvent fractions of aerial bulbils of *Dioscorea batatas* Decne against human thrombin.

Concentration (mg/mL)		Thrombin time (sec)
DMSO		33.0±0.8
Aspirin	1.0	84.7±0.4
	1.5	103±2.9
Aerial bulbils of <i>Dioscorea batatas</i> Decne		
Methanol ex.	1.2	33.9±1.4
	2.4	48.7±2.2
	4.8	92.9±4.7
Hexane fr.	1.2	36.2±0.7
	2.4	67.3±2.8
	4.8	> 300
Ethylacetate fr.	1.2	31.2±1.2
	2.4	52.3±2.0
	4.8	73.7±5.1
Butanol fr.	1.2	31.0±0.8
	2.4	34.9±1.4
	4.8	44.6±3.4
Water residue	1.2	29.4±2.1
	2.4	36.7±2.1
	4.8	35.2±1.8

라. 영여자 메탄올 추출물 및 유기용매 분획물의 항산화 활성

영여자 추출물 및 이의 분획물의 항산화 활성을 DPPH 소거능으로 평가한 결과는 Table 5에 나타내었다. 먼저 vitamin C, BHT 및 vitamin E의 IC₅₀들은 각각 15.2, 18.6, 및 35.6µg/mL

를 나타내어 강력한 DPPH 소거능이 나타났다. 영여자의 메탄올 추출물은 376.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 IC_{50} 를 나타내어, 마의 메탄올 추출물($\text{IC}_{50}=602.2 \mu\text{g}/\text{mL}$)보다 우수한 DPPH 소거능을 나타내었다 (Kim et al., 2009).

분획물 중에서는, 마의 경우와 유사하게 에틸아세테이트 분획에서 가장 강력한 DPPH 소거능이 확인되었고($\text{IC}_{50}=38.1 \mu\text{g}/\text{mL}$), 이 역시 마의 에틸아세테이트 분획보다 약 1/2 감소된 IC_{50} (마의 경우 80.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 나타내었다(Table 5). 이는, 영여자의 에틸아세테이트 분획이, 마의 그 분획보다 상대적으로 높은 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량(Table 2)과 관련된 것으로 추측된다. 한편 메탄올 추출물 및 각각의 분획물을 대상으로 SOD 유사활성을 측정한 결과, 모두 농도 의존적으로 활성의 증가가 나타났으나, 물 잔류물과 부탄올 분획물은 매우 약한 활성을 나타내었다(Fig. 1). 마의 경우와 동일하게 에틸아세테이트 분획에서 가장 우수한 활성이 나타났으며, 헥산 분획물, 메탄올 추출물 순으로 활성이 나타났고, 각각 0.83mg/mL 농도에서 에틸아세테이트 분획이 77.22%, 헥산 분획이 46.9%, 메탄올 추출물은 35.8%의 활성을 나타내었다. 대조구로 사용된 vitamin C가 0.18mg/mL 농도에서 58.8%의 활성을 나타낸 것과 비교하면, 에틸아세테이트, 헥산 분획물 및 메탄올 추출물은 각각 vitamin C의 36%, 34% 및 23%에 해당하는 활성이었다.

즉, 영여자 추출물의 SOD 유사활성은 마와 유사하나, 영여자의 헥산 분획물이 마의 헥산 분획에서의 활성보다 우수하였다(Table 2). 한편 메탄올 추출물 및 각각의 분획물을 대상으로 환원력을 평가한 경우는 Fig. 2에 나타내었다. 대조구인 BHT는 0.05mg/mL 농도에서 0.84의 흡광도를 나타내어 강력한 환원력을 나타내었다. 추출물 및 분획물의 환원력은 농도에 비례하여 활성이 증가, 헥산 분획에서 가장 강력한 활성이, 그리고 물 잔류물에서 가장 미약한 활성이 나타났다. BHT의 환원력과 비교할 경우, 메탄올 추출물, 헥산, 에틸아세테이트, 부탄올 분획물 및 물 잔류물은 각각 31.6%, 69.6%, 59.4%, 23.8% 및 13.5%로 나타내었다(Fig. 2). 이는 마의 추출물 및 분획물의 환원력이 동일 조건에서 각각 35.7%, 73.4%, 82.7%, 27.8% 및 20.2%인 것 (Kim et al., 2009)과 비교하면, 영여자는 마가 가지는 환원력과 거의 동일한 환원력을 나타낸다고 볼 수 있다. 이상의 결과는 특별한 용도없이 폐기되고 있는 영여자의 새로운 생물소재 개발 가능성을 제시하며, 영여자가 마의 지하괴근이 나타내는 항세균, 항혈전 및 항산화 활성과 거의 동등하거나, 우수한 활성을 가지고 있음을 나타내고 있다.

Table 5. DPPH scavenging activities of methanol extract and its organic solvent fractions of aerial bulbils of *Dioscorea batatas* Decne.

Chemical/ extract/ fractionates	Vitamin C	Vitamin E	¹ BHT	Aerial bulbils of <i>Dioscorea batatas</i> Decene				
				² M. ex.	H. fr.	EA. fr.	B. fr.	W. res.
DPPH scavenging activity (IC ₅₀ µg/mL)	15.2 ±2.96	35.6 ±5.12	18.6 ±4.05	376.3 ±32.18	180.9 ±24.77	38.1 ±5.82	161.4 ±32.14	> 1,000

¹BHT: butyl hydroxytoluene, ²M. ex.: The abbreviations used are the same as in the Table 3.

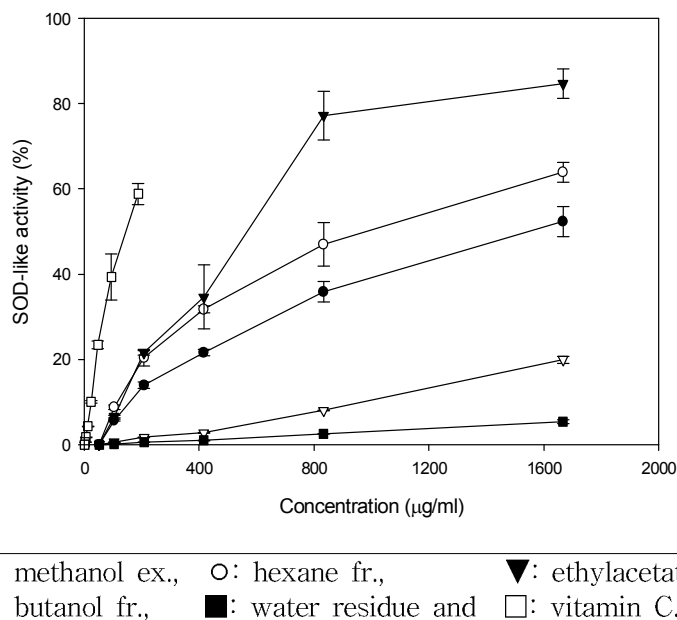
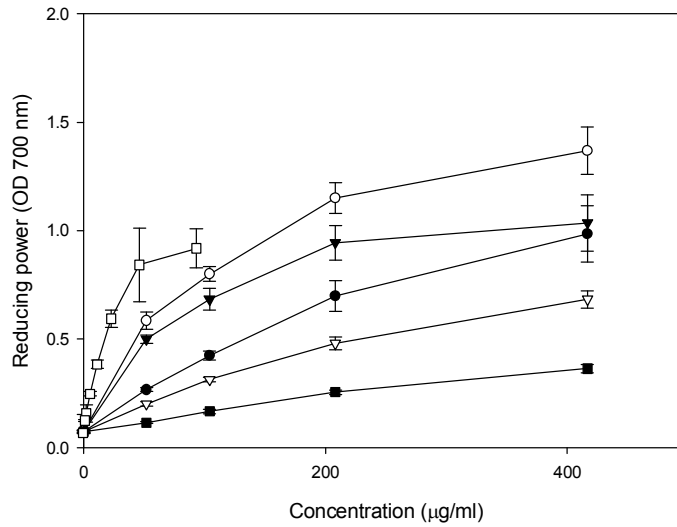


Fig. 1. SOD-like activity of methanol extract and its organic solvent fractions of aerial bulbils of *Dioscorea batatas* Decne.



●: methanol ex., ○: hexane fr., ▼: ethylacetate fr.,
 ▽: butanol fr., ■: water residue and □: butyl hydroxytoluene.

Fig. 2. Reducing power of methanol extract and its organic solvent fractions of aerial bulbils of *Dioscorea batatas* Decne.

마. 영여자 추출물의 hexane 및 ethylacetate 분획의 항생제 내성균주의 제어

현재 사회적으로 큰 문제가 되고 있는 항생제 내성 균주, 특히 항생제 내성 *Candida species* 에 대한 마 영여자의 제어가능성에 대해 검토하였다. 실험에 사용된 다양한 항생제 내성 *Candida species* 및 *Candida* 균주는 Table 6에 나타내었다.

Table 6. *Candida species* and *Sacchromyces cerevisiae* used in this study.

Yeast	Antibiotic resistance (mg/mL)
<i>C. albicans</i> CCARM 14020	¹ AMB (0.5), FC5 (0.5), FCA (1.0), ITR (0.125), MIC (1.0)
<i>C. albicans</i> CCARM 14021	
<i>C. albicans</i> KCTC 7270	
<i>C. albicans</i> KCTC 7965	
<i>C. albicans</i> KACC 30003	MIC (1.0)
<i>C. albicans</i> KACC 30004	MIC (1.0)
<i>C. albicans</i> KACC 30062	
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	
<i>C. kruseis</i> CCARM 14017	AMB (1.0), MIC (1.0)
<i>C. gillermordi</i> CCARM 14018	AMB (1.0), FC5 (16.0), FCA (16.0), ITR (1.0), MIC (1.0)
<i>C. tropicalis</i> CCARM 14019	
<i>C. geochares</i> KACC 30061	AMB (0.5), FC5 (0.5), FCA (1.0), ITR (0.125)
<i>C. saitoana</i> KCTC 41238	AMB (0.5), FC5 (0.5), FCA (1.0), ITR (0.125)
<i>S. cerevisiae</i> IF0 0233	AMB (0.5), MIC (1.0) MIC (1.0)

¹AMB: Amphotericin B, FC5: Flucytosine, FCA: Fluconazole, ITR: Itraconazole, MIC: Miconazole,

조제된 마 영여자 추출물 및 이의 유기용매 분획물을 이용하여 다양한 *Candida* 균주에 대한 항균력을 조사한 결과는 Table 7과 같다. 대조구로는 miconazole 과 amphotericin B를 사용하였으며, 7965 를 비롯한 일부 균들은 항생제 1ug/disc 농도에서 저항성을 나타내었다. 그러나 영여자 메탄올 추출물 및 이의 헥센, 에틸아세테이트 분획은 거의 모든 균에 대해 생육억제를 나타내었다. 따라서 이들 헥센 및 에틸아세테이트 분획의 항생제 내성 진균증 제어 가능성을 검토하였다.

각각의 헥센 분획 및 에틸아세테이트 분획에 의한 생육억제능을 확인하였으며, 다양한 균들에 대한 서로 다른 감수성과 생육억제정도를 비교할 수 있었다. 에틸아세테이트 분획에서는 이미 보고한 6,7-dihydroxy-2,4-methoxyphenanthrene이 확인되어 있다(Fig. 3, 4).

6,7-dihydroxy-2,4-methoxyphenanthrene에 의한 다양한 *Candida* 항생제 내성균주에 대한 항균 활성을 평가하였다. 그 결과 6,7-dihydroxy-2,4-methoxyphenanthrene은 다양한 항생제 내성 균주에 대해 우수한 항균 활성을 나타내며(Table 8), MIC는 25~50ug/mL로 확인되었다. 이러한 결과는 6,7-dihydroxy-2,4-methoxyphenanthrene에 의한 항생제 내성 *Candida* species 의 제어가 가능함을 제시하고 있다.

Table 7. Anti-*Candida* sp. activity of the methanol extract of aerial bulbils of *Dioscorea batatas* Decne and its organic solvent fractions against different *Candida* species.

	Strain No.	Clear zone (mm)						
		MIC ¹	AMB ²	M. Ex ³	H. Fr.	EA. Fr.	B. Fr.	W. Fr.
<i>Candida albicans</i>	7270	28.0	16.0	8.0	8.0	7.5	-	-
	7965	-	14.0	7.5	8.0	8.0	8.0	-
	30003	-	13.0	7.5	8.0	7.5	-	-
	30064	8.0	20.0	7.5	7.5	7.5	8.0	-
	30062	20.0	15.0	7.5	7.5	8.0	-	-
	10231	-	-	-	7.5	7.5	-	-
	14020	-	14.0	7.5	8.0	7.5	-	-
	14021	25.0	14.0	-	7.5	7.5	-	-
<i>Candida sp.</i>	14017	-	-	8.5	8.0	7.5	-	-
	14018	11.0	11.0	-	7.5	8.0	9.0	8.0
	14019	8.0	14.0	8.0	7.5	8.0	8.0	-
	30061	-	-	-	8.0	7.5	-	-
	41238	-	15.0	-	7.5	7.5	8.0	-

¹MIC: miconazole, ²AMB:Amphotericin B, ³M. ex: methanol extract of aerial bulbils of *Dioscorea batatas* Decne, H. fr, EA. fr, B. fr, and W. fr : n-hexane fraction, ethylacetate fraction, butanol fraction, and water fraction of the methanol extract of aerial bulbils of *Dioscorea batatas* Decne. The antimicrobial activity was determined by disc-diffusion method and the growth inhibition zone expressed was included a size of disc-paper (6.5 mm diameter).

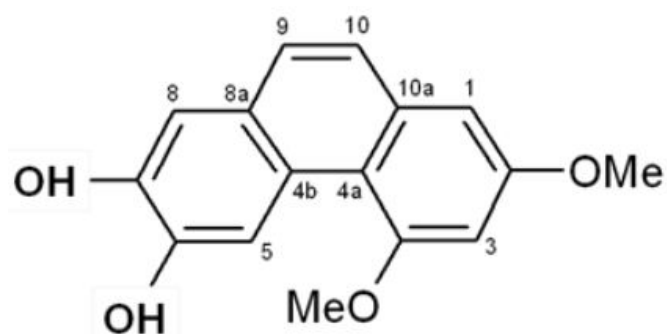


Fig. 3. The structure of 6,7-dihydroxy-2,4-dimethoxyphenanthrene isolated from ethylacetate fraction of the methanol extract of the aerial bulbils of *Dioscorea batatas* Decne.

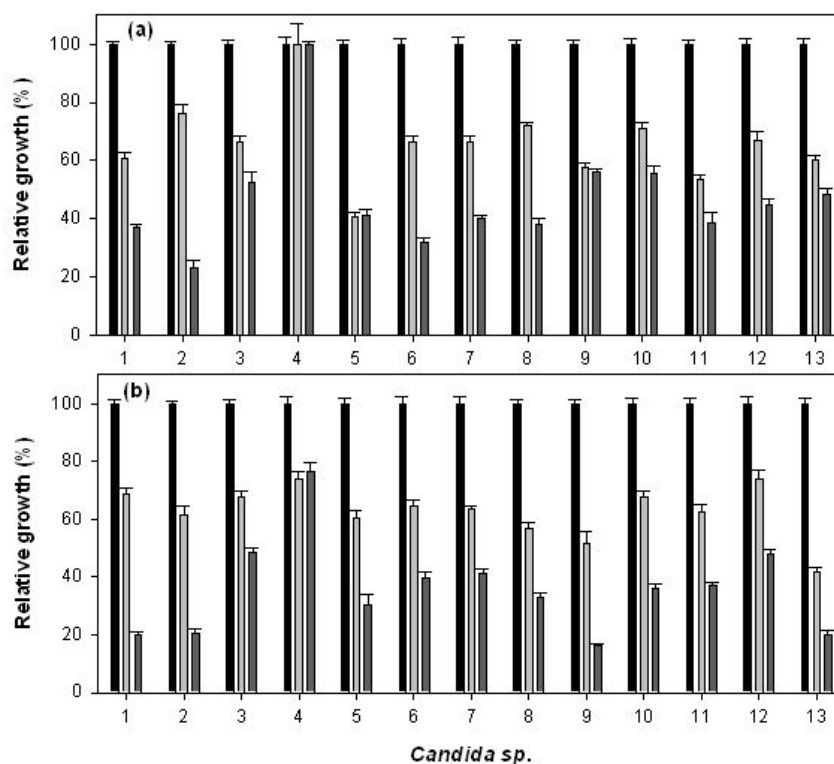


Fig. 4. Growth inhibition of different *Candida* species by treatment of (a) hexane fraction and (b) ethylacetate fraction of the methanol extract of the aerial bulbils of *Dioscorea batatas* Decne.

The numbers indicate the different *Candida* sp., and the different bars represent the treatment concentrations. 1: *C. albicans* KCTC 7270, 2: *C. albicans* KCTC 7965, 3: *C. albicans* KACC 30003, 4: *C. albicans* KACC 30004, 5: *C. albicans* KACC 30062, 6: *C. albicans* ATCC 10231, 7: *C. albicans* CCARM 14020, 8: *C. albicans* CCARM14021, 9: *C. krusei* CCARM 14017, 10: *C. gillermordi* CCARM 14018, 11: *C. tropicalis* CCARM 14019, 12: *C. geochares* KACC 30061, and 13: *C. saitoana* KCTC 41238. Black bar: 0 mg/mL, gray: 1 mg/mL, and dark gray bar: 2 mg/mL, respectively. Cell growth was measured after 24 h cultivation.

Table 8. Minimal inhibitory concentration values of 6,7-dihydroxy-2,4-dimethoxy phenanthrene against different *Candida* species.

Strain No.	<i>Candida albicans</i>				<i>Candida sp.</i>				
	7270 ¹	7965	14020	14021	14017	14018	14019	30061	41238
MIC (mg/mL)	25	25	25	25	25	25	25	50	50

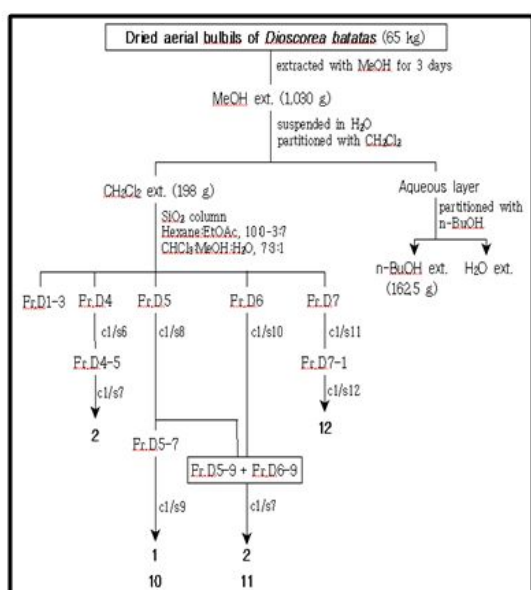
¹7270: *C. albicans* KCTC 7270, 7965: *C. albicans* KCTC 7965, 14020: *C. albicans* CCARM 14020, 14021: *C. albicans* CCARM 14021, 14017: *C. kruseis* CCARM 14017, 14018: *C. gillermordi* CCARM 14018, 14019: *C. tropicalis* CCARM 14019, 30061: *C. geochares* KACC 30061, and 41238: *C. saitoana* KCTC 41238.

사. 영여자 활성분획 및 활성물질(6,7-dihydroxy-2,4-methoxyphenanthrene)의 항암활성

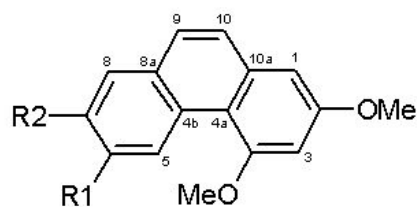
항암 활성에 사용된 시료는 다음의 3종이며, 각각의 분리과정은 다음과 같다(Fig. 5).

이들의 항암 활성 평가 결과는 다음에 나타내었으며, 특히 6,7-dihydroxy-2,4-methoxy phenanthrene 의 경우 실험에 사용한 자궁암 (HeLa), 간암 (HepG2), 및 대장암 (HCT-116) 세포에 모두 매우 강력한 성장억제 활성을 나타내었다 (Table 9, Fig. 6).

Phenanthrene Derivatives from the Aerial bulbils of Yam



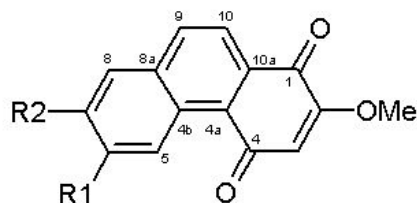
Column: c1; SiO₂ column
 Solvent system:
 s6; Hexane:EtOAc (9:1) → CH₂Cl₂:MeOH (9:1)
 s7; CH₂Cl₂:MeOH (1000:0-1000:8)
 s8; Hexane:EtOAc (98:2-9:1)
 s9; CH₂Cl₂ (100)
 s10; Hexane:EtOAc (98:2-6:4)
 s11; CH₂Cl₂:MeOH (100:0-95:5)
 s12; Hexane:EtOAc (8:2)



SJO-1 R1=OH, R2=OMe; batatasin I

SJO-10 R1=OMe, R2=OH; 7-Hydroxy-2,4,6-trimethoxyphenanthrene

SJO-12 R1, R2=OH; 6,7-Dihydroxy-2,4-dimethoxyphenanthrene



SJO-2 R1 =OH, R2=OMe; 6-hydroxy-2,7-dimethoxy-1,4-phenanthraquinone

SJO-11 R1 =OMe, R2=OH; 7-hydroxy-2,6-dimethoxy-1,4-phenanthraquinone

Fig. 5. Isolation of phenanthrene derivatives from aerial bulbils of *D. batatas*.

Table 9. Anti-proliferation activity of isolated phenanthrene derivatives against different human cell lines.

Cell lines	IC 50 (ug/mL)		
	SJO-1	SJO-2	SJO-12
Cancer	HeLa	> 100	39.6
	HepG2	36.5	36.3
	HCT-116	> 100	11.1
Normal	MC3T3-E1	ND	> 100
	3T3-L1	ND	> 100 (442)

Treatment of SJO-12 into HeLa culture for 24 h.

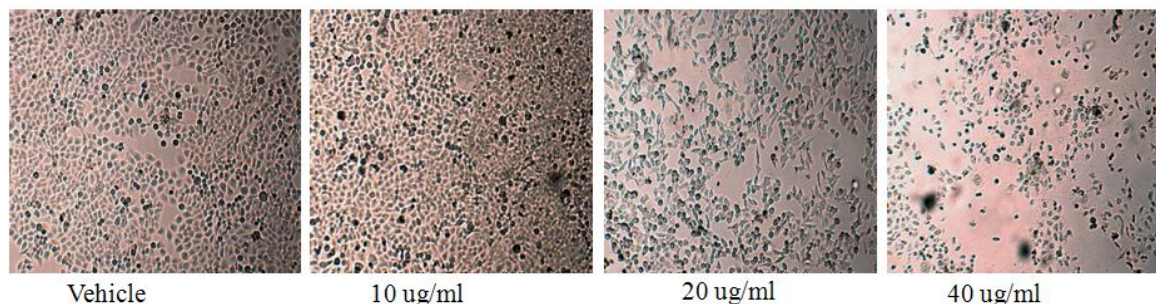


Fig. 6. Photos of anti-proliferation activity of isolated phenanthrene derivatives against different human cell lines.

아. 영여자 활성분획 및 활성물질(6,7-dihydroxy-2,4-methoxyphenanthrene)의 안전성 검토

활성분획 및 항균 활성물질의 급성독성 평가의 일환으로 인간 적혈구 용혈활성을 평가하였다. amphoterin B의 경우 25 ug/mL 농도에서 90% 이상의 용혈활성을 나타내었으나, 6,7-dihydroxy-2,4-methoxyphenanthrene의 경우 27ug/mL 농도에서는 거의 용혈 활성이 인정되지 않았으며, 500 ug/mL 농도에서 20% 미만의 인간 적혈구 용혈활성을 나타내었다(Fig. 7).

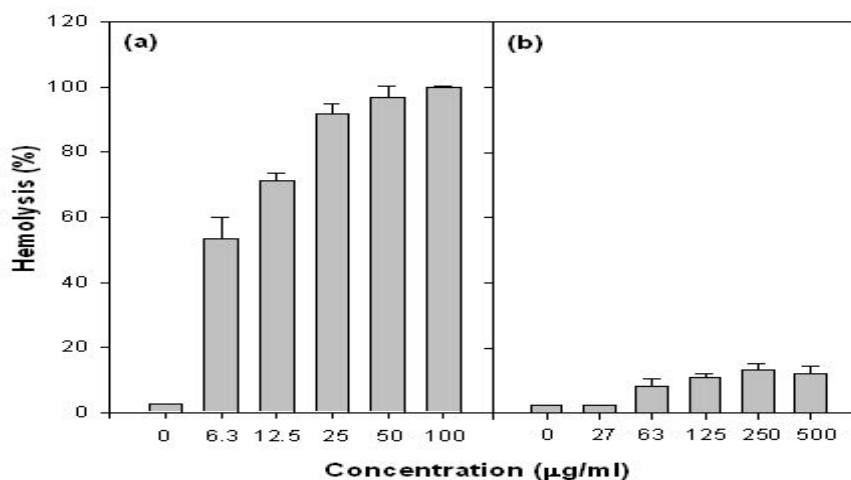


Fig. 7. Hemolytic activity of (a) amphotericin B, and (b) 6,7-dihydroxy-2,4-dimethoxyphenanthrene against human red blood cell.

한편, 인간 lymphocyte를 대상으로 6,7-dihydroxy-2,4-methoxyphenanthrene의 유전독성을 평가하였으며, comet assay방법을 사용하였다. 그 결과 100ug/mL 농도까지는 특이한 DNA 절단효과가 나타나지 않았으며, 200ug/mL 농도에서부터 약간의 comet이 나타났다. 따라서 6,7-dihydroxy-2,4-methoxyphenanthrene의 유전독성도 항균효과가 나타나는 25~50ug/m 농도에서는 거의 나타나지 않으리라 판단된다(Fig. 8).

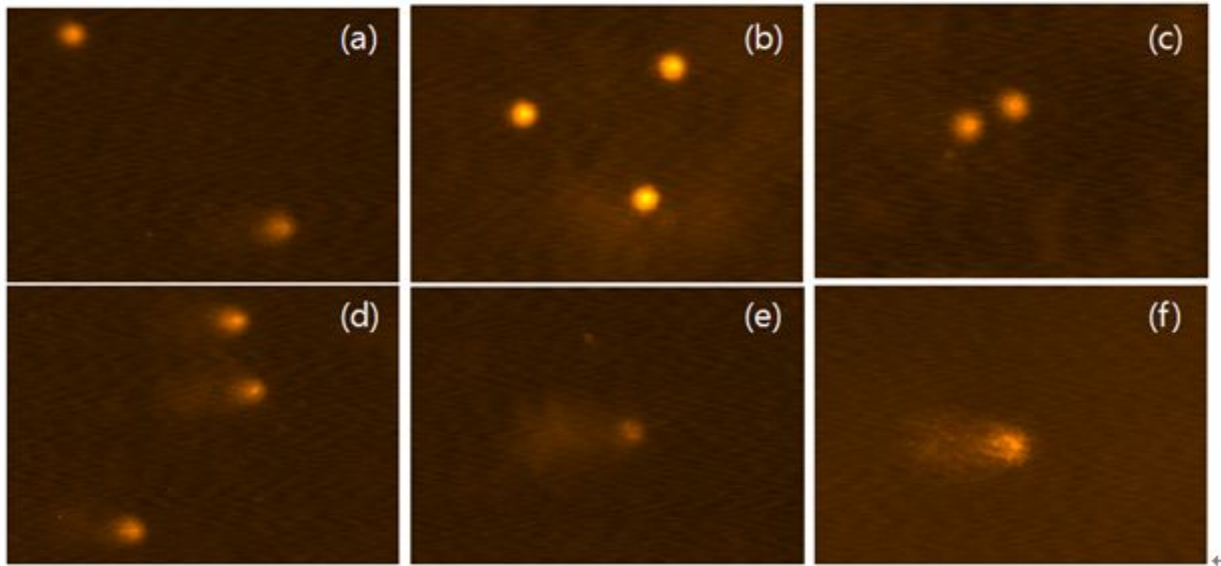


Fig. 8. Evaluation of genotoxicity of 6,7-dihydroxy-2,4-dimethoxyphenanthrene using comet assay. The concentrations of 6,7-dihydroxy-2,4-dimethoxyphenanthrene treated into human lymphocyte were (a) 12.5 mg/mL, (b) 25 mg/mL, (c) 50 mg/mL, (d) 100 mg/mL, (e) 200 mg/mL, and (f) 500 mg/mL, respectively.

자. 영여자 활성분획 및 활성물질(6,7-dihydroxy-2,4-methoxyphenanthrene)의 활성기작

기존의 알려진 phytochemicals의 항암활성 기작은 매우 다양하다. 그러나 가장 일반적으로 보고된 기작은 NAG-1의 활성화를 통한 apoptosis 유발이다(Fig. 9). 본 연구에서는 영여자 활성물질(6,7-dihydroxy-2,4-methoxyphenanthrene)이 NAG-1 활성화에 관여되는지 확인하였다.

실험 결과(Table 10), 6,7-dihydroxy-2,4-methoxyphenanthrene에 의한 apoptosis 유발은 NAG-1 활성화와 관련되어 있음을 확인하였다.

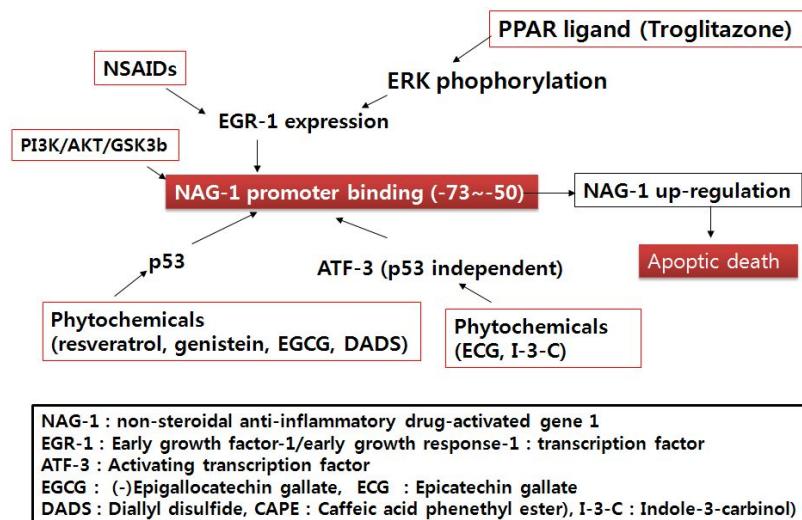


Fig. 9. Apoptosis mechanism induced by different phytochemicals.

Table 10. Changes of gene expressions by treatment of SJO-12.

Gene	HeLa		HCT-116	
	Vehicle	SJO-12 (20 ug/mL)	Vehicle	SJO-12 (5 ug/mL)
ACT1	1.00	1.00	1.00	1.00
NAG1	1.00	3.18	1.00	30.75
EGR1	1.00	11.55	1.00	5.23
ATF3	1.00	4.89		
p53			1.00	1.97
p21	1.00	2.96	1.00	2.58
IRF2BP2			1.00	2.07

제 9절 Biomass 대량생산 체계 확립 및 유용생리활성 탐색

1. 서언

마과에 속한 식물 중 야생종은 부채마, 도꼬로마, 참마, 각시마, 단풍마 등과 같이 다양하나, 재배마는 *D. opposita* Thunb. 또는 *D. batatas*로 분류되는 한 종만이 재배되고 있다. 재배 마의 함유성분은 전분이 생체중의 약 8~24%, 점질물이 약 0.6~2.4%를 차지하며, 점질물은 당단백질의 일종인 mucin과 미량의 비타민(B1, C)을 함유한다. 마의 약용성분으로는 amylose, cholin, saponin 등이며, 한방에서는 신체허약, 폐결핵, 정력부족, 야뇨증, 설사, 당뇨병, 대하증 등에 쓰이고 있다. 한편 마의 주요 약용성분으로 알려진 steroidal saponin은 다양한 생리활성에 관여하는 것으로 알려져 있는데, 세포의 DNA 돌연변이를 방지하는 항 돌연변이원성작용, 항암 및 항염증 작용 등이 알려져 있다.

최근 들어 마는 가공식품이 다양하게 개발되어 약용뿐만 아니라 건강식품으로도 중요한 위치를 차지하며 재배면적은 약 318 ha로 1990년대 초의 83.4ha보다 4.5배가 증가하였다. 전국의 마 재배 면적 중 약 69%인 269ha가 안동, 영주, 봉화를 중심으로 한 경북북부지역에서 재배되고 있으며, 그 생산량은 1,702톤에 달하여 경북북부지역의 중요한 소득작물이다 식물유래 유용물질의 대량생산과 상업화는 시장성이 넓고 고부가가치를 창출하여 상업적으로도 엄청난 파급효과를 가져오기 때문에 선진국을 중심으로 한 연구기관 및 기업체 연구소에서 이 분야에 집중적인 투자를 하고 있는 실정이다. 유용물질의 기내생산 시스템의 개발에 의한 물질의 대량생산 및 상업화는 마의 효능에 대한 인식의 제고로 마의 소비촉진을 초래할 것이며 이는 농가 소득 증대 방안이 될 것이다.

마는 벼 대체 작목으로서 실용성이 높은 작물이며 담전윤환방식으로서 벼와 마 각각의 생산력을 향상시키고, 지력을 배양하며 병충해의 밀도를 낮춰 재배의 합리화와 생산향상에 이점을 주는 작물이다. 마는 건강식품으로 노화방지, 혈당강하, 장관활동촉진, 항균, 항비만, 해독작용, 면역조절작용 등의 건강증진효능이 알려지면서 생산면적 및 생산량은 급격한 증가추세에 있으며, 품질이나 소비자의 선호도, 농가수익성 등이 뛰어나다. 바이러스 이병률이 높은 마는 괴경을 등의 영양번식성 작물로 이병율이 계속 증가하는 추세이며, 괴경을 종묘로 이용하여 재배되므로 수확마의 20%정도가 다시 종묘로 재사용해야하는 문제점이 있다. 이에 농가에서는 전년도에 수확한 마의 약 2할 정도를 씨마로 남겨서 종묘로 사용하고 있다. 괴경을 씨마로 사용할 경우 상당 부분의 영양체를 사용하지 않고 그대로 남겨두어야 하므로 농가수익 측면에서는 경제적 손실이 발생하는 결과가 된다. 한편 일반 재배농가에서 씨마로 남겨둔 괴경이 우량하지 않을 경우가 많아서 수확마의 품질이 지속적으로 저하되는 결과가 초래되고 있는 실정이다.

본 연구에서는 재배기간이 길고 수확작업에 많은 노력과 비용이 소요되는 마를 기내에서 대량생산할 수 있는 시스템을 개발하여, 마의 biomass와 주요 유용물질을 기내에서 대량/급속으로 생산하는 시스템을 확립하기 위해서 수행되었다.

2. 연구방법론

가. Biomass 대량생산체계

실험에 사용된 마 무병식물체의 유지를 위한 배지는 $30\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ sucrose 가 첨가된 MS배지를 pH 5.8로 조정하여 사용하였다. 배양을 위한 절편체는 단마디배양(single-node culture)법으로 한 개의 마디와 한 개의 액아를 가진 절편체 5개씩을 배지 30mL이 들어있는 250mL 삼각플라스크에 치상하여 배양하였다.

각각의 배지는 250mL 삼각플라스크에 30mL의 배지를 첨가하였으며, 액체배지는 일 분당 110회의 속도로 진탕을 하였고, 고체배지는 $2\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ gelrite를 첨가하여 정치 상태에 두었다. 배양실 환경은 $25\pm 1^\circ\text{C}$ 가 유지되는 항온실에 16시간의 광 상태를 유지하였다.

무병식물체의 기내배양에 영향을 미치는 배지의 물리성 효과를 검정하기 위해 액체배지와 고체배지를 비교하였고, 당의 종류와 농도의 영향을 알아보기 위하여 sucrose와 glucose를 각각 $15, 30, 60\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 로 처리하였으며, 배지의 염류농도 효과를 검정하기 위해 MS배지의 염류농도를 $\frac{1}{2}, 1$ 및 2배씩 처리하였다. 질소원의 종류와 농도효과를 검정하기 위해 MS배지의 주요 질소원인 NH_4NO_3 와 KNO_3 의 농도를 각각 $\frac{1}{2}, 1, 2$ 배씩 단독 및 혼합처리 하였으며, MS배지의 pH를 4.8~6.8 범위 내 5수준으로 하여 배지 내 수소이온농도에 따른 배양효과를 검정하였다. 모든 실험에서 배양기간은 6주간이며, 각각의 처리구에서 액아수, 초장, 생체중 및 소피경의 개수를 조사하였다.

마 기내 식물체의 배양기간에 따른 식물의 성장양상을 알아보기 위해, 액체 배지 30mL이 들어있는 250mL 삼각플라스크에 5개씩의 단마디를 치상하여 12주까지 매주마다 치상하였으며 $25\pm 1^\circ\text{C}$ 광상태에서 성장시킨 후 마지막 주에 배양한 전체 묘를 일제히 수확하여 엽수, 마디수, 생체중, 초장, 형성된 소피경의 수와 무게를 측정하였다.

나. 물질추출 및 방사선에 대한 반응 조사

본 실험에 사용된 마의 종류는 병마이며, 경상북도 농업기술원 생물자원연구소로부터 분양받아 사용하였다. 마의 지하부를 2-3 mm의 크기로 절편하여 30°C 에서 감압 건조하고 70% methanol에 120시간 추출하였다. 농축된 추출물은 다시 *n*-hexane, chloroform(CHCl_3), ethylacetate (EtOAc), *n*-butanol (*n*-BuOH) 및 물 층으로 분획하여 완전히 건조시켜 최종 무게를 측정하였다. 모든 추출물은 ethanol 로 다시 녹여 농도가 10mg/mL이 되도록 용액을 제조하였다.

방사선을 처리한 식물세포는 담배 *Nicotiana tabacum* cv. KY14를 사용하였다. 배양세포는 MS 기본염류에 2,4-D 0.5 + kinetin 0.1mg/L 및 sucrose 30g/L가 함유된 액체배지에서 분당 100회 속도로 헤파배양을 하였으며 (Kwon *et al.*, 2001), 계대배양은 매 7일 간격으로 실시하였고, 모든 처리는 배양 후 3일째 된 세포를 이용하였다. 담배 배양세포에 마 추출액의 최종농도가 10mg/L이 되도록 3일간 전처리하여, 방사선(^{60}Co , 선원강도 150 TBq) 0, 20 및 50Gy/4hr를 조사하였다. 방사선과 마 추출액을 처리한 세포를 일정기간 정상상태에 배양하면서 세포의 생체중과 TTC에 의한 세포활력을 측정하였다.

다. 핵 DNA 손상에 대한 마 추출물의 반응

마 추출액과 방사선을 처리한 배양세포를 채취하여 Rojas 등 (1999)의 방법에 따라 핵을 분리하였다. 방사선을 처리한 직 후 배양세포에 0°C의 Sørensen buffer(50mM sodium phosphate pH 6.8, 0.1mM EDTA, 0.5% DMSO)를 첨가하여 핵의 나출을 유도하였고, 나출된 핵은 1,000 rpm에 10분간 원심분리하여 수거하였다. Comet 분석은 슬라이드 준비, 전기영동, 핵의 염색 및 관찰 순으로 실시하였다. 먼저 슬라이드의 준비를 위해 충분히 냉각된 슬라이드에 1.0%의 일반용점 agarose를 골고루 퍼지도록 간 후, 수거한 세포핵 10 μ L와 1.0% 저용점 agarose 90 μ L를 혼합하여 슬라이드에 도포하고, 커버글라스를 덮어 4°C에서 10분간 방치하였다. 제조된 슬라이드를 해리용액 (2.5M NaCl, 1% sodium sarcosinate, 100 mM Na₂EDTA, 10mM Tris, pH 10)에 침지시킨 후 unwinding 완충액 (1mM Na₂EDTA, 300 mM NaOH, pH 13)에서 30분간 침지시키고, 25V, 300mA에서 25분간 전기영동을 실시하였다. 전기영동 후 각각의 슬라이드그라스를 EtBr로 염색한 후 형광현미경으로 처리당 10-20개의 핵을 관찰하였다. Comet 이미지는 머리부분 직경(head length, H), 꼬리부분의 길이(tail length, T) 및 머리부분 DNA의 함량(% head DNA)을 구하였다.

3. 연구결과

가. Biomass 대량생산 체계

(1) 부정근 대량생산

마 절간을 기내 배양하여 생성된 뿌리로부터 부정근 유도를 위한 실험을 수행 중에 있다. 현재 배지 성분 중 질소원의 처리농도, 배지의 염류농도 및 sucrose의 농도 효과를 구명하고 있다. 질소원의 농도효과를 보면 1.0 KNO₃ +1/2 NH₄NO₃를 처리한 경우 250mL 플라스크에 5주간 배양 후 1,694mg으로 1.0 KNO₃ +1.0 NH₄NO₃을 처리한 것(1,451mg)보다 유의하게 효과적이었다(Table 1).

배지종류별 무기염류의 농도를 기본배지의 1/4, 1/2, 3/4 및 1배로 조정하여 부정근의 증식량을 조사한 결과 MS배지 및 SH배지 공히 기본염류의 1/4에서 각각 1,929mg 및 1,921mg을 보여 염류농도를 1/4로 줄이는 것이 부정근의 증식에 효과적이었다(Table 2).

배지 내 sucrose의 농도효과를 보면 60g/L를 첨가한 경우 2,902mg으로 나타났고, 일반적으로 가장 많이 사용하는 농도인 30g/L에서는 1,674mg을 보였다. 그러나 당의 농도를 절반으로 줄인 15g/L처리에서도 2,457mg으로 효과적이었다(Table 3).

Table 1. Effects of various concentrations of nitrogen sources on in vitro adventitious root growth of Chinese yam.

Treatments (KNO ₃ +NH ₄ NO ₃)	Fresh weight(mg) of adventitious root	Degree of root emergence
1.0 + 0.0	1,161 c	+++
1/2 + 1/2	1,479 b	++++
1.0 + 1.0	1,451 b	++++
1.0 + 1/2	1,694 a	++++
2.0 + 1.0	1,433 b	++++
1.0 + 2.0	1,506 b	++++

The 100 mg of sliced roots were initially inoculated into 250 ml E-flask containing 50 ml MS medium with NAA 1.0mg/L and 30 g/L sucrose. Degree of root emergence : poor(+), excellent(+++++).

Table 2. Effects of basal salt strength on in vitro adventitious root growth of Chinese yam.

Salt strength	Fresh weight(mg) of adventitious root	Degree of root emergence
1/4 MS	1,929	+++
1/4 SH	1,921	++++
1/2 MS	1,703	+++
1/2 SH	1,692	+++
3/4 MS	1,617	++++
3/4 SH	1,515	++++
1.0 MS	1,736	++++
1.0 SH	1,750	++++

The 100 mg of sliced roots were initially inoculated into 250 ml E-flask containing 50 mL medium with NAA 1.0mg/L and 30 g/L sucrose. Degree of root emergence : poor(+), excellent(+++++)

Table 3. Effects of basal salt strength on in vitro adventitious root growth of Chinese yam.

Conc. of sucrose (g/L)	Fresh weight (mg) of adventitious root	Degree of root emergence
15	2,457	+++
30	1,674	+++
60	2,902	+++
90	2,110	+++

The 100 mg of sliced roots were initially inoculated into 250 ml Erlenmeyer flask containing 50 mL medium with NAA 1.0mg/L. Degree of root emergence : poor(+), excellent(+++++)

NAA 1.0mg/L에 cytokinin류 성장조절물질인 BA, 2iP 및 kinetin의 혼용효과를 조사한 결과, 3종류의 cytokinin 모두 1.0mg/L보다 적은 농도인 0.1mg/L를 처리한 것이 부정근의 생장에 효과적이었다(Table 4). 가장 효과적인 혼용처리는 NAA 1.0 + kinetin 0.1mg/L처리로서 NAA 1.0mg/L 단독처리가 1,736mg인 것에 비해 혼용처리는 2,683mg으로 155%의 증가효과를 나타내었다. 다음으로는 2iP 0.1mg/L를 혼용처리 한 것으로 2,447mg의 부정근 생장을 보였다.

Table 4. Effects of NAA with cytokinins on adventitious root growth of Chinese yam.

Treatments (NAA 1 mg/L +)	Fresh weight(mg) of adventitious root	Degree of root emergence
BA 0.1	1,974 b	++++
1.0	1,153 d	++
2iP 0.1	2,447 a	++++
1.0	1,467 cd	+++
Kinetin 0.1	2,683 a	++++
1.0	1,781 bc	+++
Control (NAA 1.0mg/L)	1,736 bc	+++

The 100 mg of sliced roots were initially inoculated into 250 ml E-flask containing 50 ml MS medium with NAA 1.0 mg/L and 30 g/L sucrose. Degree of root emergence : poor(+), excellent(+++++)

마 부정근의 기내배양을 위한 최적의 배지조건을 Table 5에 나타내었다. 질소원은 KNO₃+NH₄NO₃의 비율이 1.0+1/2이, 기본염류인 MS 및 SH 배지의 경우 기존염분 농도보다 1/4로 처리하는 것이 가장 효율적 이었다. Sucrose 농도는 30g/L보다 60g/L처리가 양호하였으며 NAA 1.0mg/L와의 와 혼용처리는 kinetin 0.1mg/L 처리가 가장 효과적인 것으로 나타났다.

Table 5. The optimal condition for in vitro adventitious root growth of Chinese yam.

Treatments	Optimal conditions	Yield of adventitious root(fresh wt. mg)	% of control
KNO ₃ +NH ₄ NO ₃	1.0+1/2	1,694	116.8
MS salt strength	1/4	1,929	111.2
SH salt strength	1/4	1,921	109.8
Sucrose	60 g/L	2,902	108.6
NAA+BA	1.0+0.1mg/L	1,974	113.7
NAA+kinetin	1.0+0.1mg/L	2,447	141.0
NAA+2iP	1.0+0.1mg/L	2,683	154.6

The 100 mg of sliced roots were initially inoculated into 250 ml E-flask containing 50 ml MS medium with NAA 1.0mg/L and 30 g/L sucrose. Degree of root emergence : poor(+), excellent(+++++)

부정근의 기내배양에 적합한 조건을 찾은 후 bioreactor를 이용한 대량 배양을 시도하였다. 배양기간은 8주 정도 소요되며, 최초 약 10g의 플라스크 배양체(seed culture)로부터 약 600g 정도의 생체가 수확되어 약 60배의 증식효과가 있는 것으로 나타났다(Fig. 1).

Bioreactor의 배양 효율을 증가시키기 위한 관조건, 공기주입량, 배양 주기, 무균화 공기 주입방법, 기포 발생을 위한 스파저의 재질 등에 대한 연구는 계속되어야할 필요가 있다..

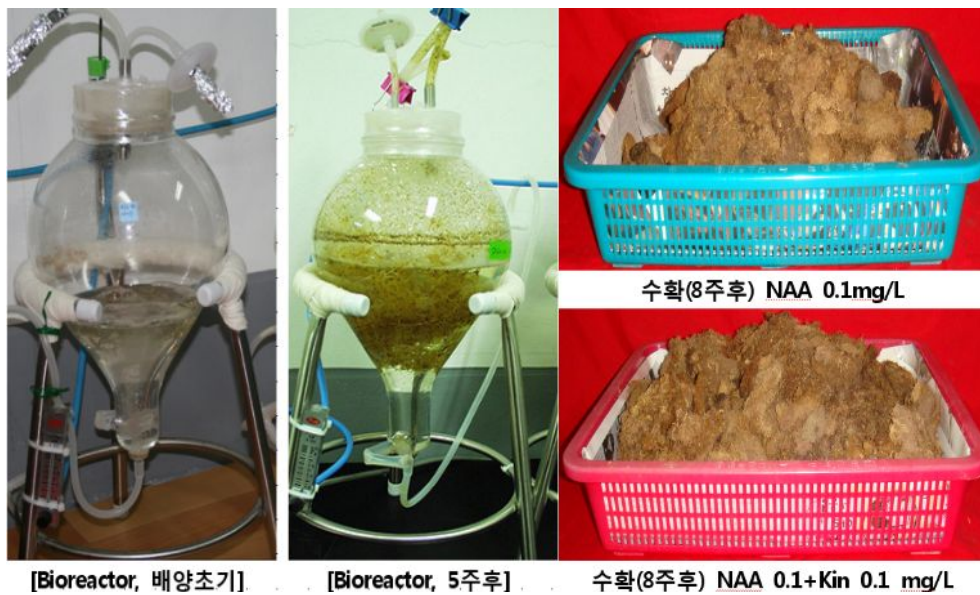


Fig. 1. Bioreactor culture of adventitious roots of Chinese yam.

(2) 지상부 biomass 기내생산

(가) 기본배지 및 염류농도

Table 6은 MS 액체배지와 gelrite $2g \cdot L^{-1}$ 을 첨가한 MS 고체배지의 효과를 비교한 것이다. 배양 6주 후에 조사한 결과 고체배지보다 액체배지에서 액아수, 초장 및 생체중이 모두 높게 나타났다(Fig. 2). 특히 생체중은 플라스크 당 고체배지가 2.2g, 액체배지가 6.0g로 2.7 배가 높았고, 액아수도 액체배지에서 1.5배 가량 증가하여 액체배지가 고체배지보다 마의 기내배양에 효과적이었다. 액체배지는 고체배지에 비해서 양분의 이용이 용이하며, 배양재료에서 나온 독성 물질이 분산되어 희석되고, 배양 중에 영양분의 공급이나 교체가 용이한 장점이 있는 것으로 알려져 있다. 고체배지와 액체배지의 비교실험에서 액체배지가 마의 기내 생장에 더욱 효과적인 것으로 나타나, 금후의 모든 실험은 액체배지 조건에서 수행하였다.

Table 6. Effects of gelrite concentration on *in vitro* growth of Chinese yam plantlet.^z

Gelrite (%)	No. of axillary bud (No./flask)	Plant height (cm)	Fresh weight (g/flask)
0.2	26.3b ^y	6.5b	2.2b
0	37.0a	11.2a	6.0a

^zFive stems having single node were inoculated with three replications on 250 mL Erlenmeyer flask or square vessel containing 30 mL MS medium and cultured at 25±1°C, under 16 hrs light for 6 weeks. ^yMeans separation in columns by Duncan's multiple range test at 5% level.



Fig. 2. Growth of Chinese yam plantlet *in vitro*. Five stems having single node were inoculated on 250 mL E-flask with 30 mL MS and cultured at 25±1°C, under 16 h light.

기본배지로 사용된 MS배지의 무기염 농도별 마 기내 생장에 대한 효과를 조사한 결과는 Table 7과 같다. 무기염류의 농도를 기본배지인 1 배율로 하였을 때는, 염분량을 반으로 줄이거나 두 배로 늘린 배지에서보다 액아수가 28.8개로 가장 많았다. 한편 무기염의 농도를 기본배지의 두 배량으로 하였을 때는 소과경이 전혀 형성되지 않았으며, 무기염류의 농도를 반으로 줄인 배지에서는 기본배지의 1.2개 보다 많은 3.0개가 형성되었다. 이러한 결과는 Shin 등

(2004)이 식물체의 기내배양에 액체배지에서 신초 형성률이 염분을 반으로 줄인 배지보다 기본 무기염류를 함유한 배지에서 효과적이었다는 보고와 유사하다.

Table 7. Effects of basal salt strength on *in vitro* growth of Chinese yam plantlet.^z

Salt strengths	No. of axillary bud (No./flask)	Plant height (cm)	Fresh weight (g/flask)	No. of microbulb (No./flask)
½	24.2ab	8.7a	3.0a	3.0a
1	28.8a	7.5a	3.6a	1.2a
2	21.0ab	4.6b	1.8ab	0a

^zFive stems having single node were inoculated with three replications on 250 mL Erlenmeyer flask containing 30 mL MS medium and cultured at 25±1°C, under 16 h light for 6 weeks. ^yMeans separation in columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

(나) 당의 효과

Table 8은 마 기내 생장에 미치는 sucrose와 glucose의 농도별 효과를 조사한 것이다. Sucrose 60g·L⁻¹ 처리에서 액아의 수가 31.0개, 초장이 6.4cm, 생체중이 3.9g으로 처리 중 가장 높게 나타났고, glucose 60g·L⁻¹ 처리에서는 소피경수가 4.7개로 피경 형성에 효과적인 것으로 나타났다.

Table 8. Effects of sucrose and glucose concentrations on *in vitro* growth of Chinese yam^z

Treatments (g/L)	No. of axillary bud (No./flask)	Plant height (cm)	Fresh weight (g/flask)
Sucrose 15	16.0c ^y	4.4ab	1.3b
30	20.3bc	5.4ab	2.0b
60	31.0a	6.4a	3.9a
Glucose 15	12.7c	3.8b	1.2b
30	22.0abc	5.2ab	2.3ab
60	26.7ab	5.6ab	2.8ab

^zFive stems having single node were inoculated with three replications on 250 mL Erlenmeyer flask containing 30 mL MS medium and cultured at 25±1°C, under 16 hrs light for 6 weeks. ^yMeans separation in columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

(다) 질소원의 효과

배지 내에서 질소원으로 공급량이 큰 NH_4NO_3 와 KNO_3 의 조성에 따른 생육조사를 실시한 결과(Table 9, Fig 3), $\text{NH}_4\text{NO}_3 \times \text{KNO}_3$ 의 조성 비율이 $\frac{1}{2} \times \frac{1}{2}$, $1 \times \frac{1}{2}$, 1×1 인 것이 다른 처리에 비해 생육이 우수한 것으로 나타났으나, 기본 조성인 1×1 의 배지와 큰 차이는 나타나지 않았다. 특히, $1 \times \text{NH}_4\text{NO}_3 + \frac{1}{2} \times \text{KNO}_3$ 에서 39.7개로 액아수가 가장 많았지만 다른 조성에서도 범위의 차이가 크지 않았다(Table 9). 반면 $\text{NH}_4\text{NO}_3 \times \text{KNO}_3$ 의 조성이 2×2 인 것에서는 액아수가 14.0개, 초장이 4.7cm, 2.7g의 생체중으로 처리 중 가장 낮았다.

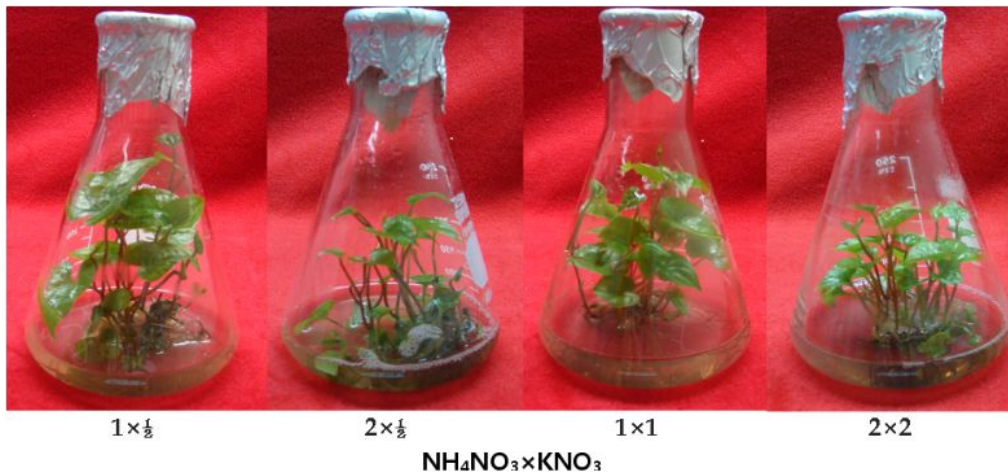


Fig. 3. Growth of plantlets at various strength of ammonium nitrate and potassium nitrate and cultured at $25 \pm 1^\circ\text{C}$, under 16 h light for 6 weeks.

Table 9. Effects of the strength of KNO_3 and NH_4NO_3 as nitrogen source on the growth of Chinese yam^z

$\text{NH}_4\text{NO}_3 \times \text{KNO}_3$	No. of axillary bud (No./flask)	Plant height (cm)	Fresh weight (g/flask)
$\frac{1}{2} \times \frac{1}{2}$	27.0ab ^y	10.6a	5.1abc
$\times 1$	29.3ab	7.9abc	5.9ab
$\times 2$	38.0a	7.4bcd	7.9a
$1 \times \frac{1}{2}$	39.7a	9.6ab	6.3ab
$\times 1$	35.7a	6.3cd	4.7bc
$\times 2$	29.7ab	6.4cd	4.3bc
$2 \times \frac{1}{2}$	32.3a	6.9bcd	3.8bc
$\times 1$	33.0a	6.0cd	5.2abc
$\times 2$	14.0b	4.7d	2.7c

^zFive single nodes were inoculated with than replications on 250 mL Erlenmeyer flask with 30 mL MS and cultured at $25 \pm 1^\circ\text{C}$, under 16 hrs light for 6 weeks. Strength of nitrogen sources are based on MS basal medium. ^yMeans separation in columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

일반적으로 배지 내 암모니아태 질소와 질산태 질소의 비율은 신태 및 뿌리의 형성과 생육에 중요한 역할을 하며 암모니아태 질소는 배형성과 기관발생을 촉진시키고 질산태 질소는 세포생장에 효과적이라고 알려져 있다. 마의 기내 배양에서 배지내 질산태 질소만 넣어준 경우에 신태의 형성율이 높았고, 암모니아태 질소의 단독 첨가나 암모니아태와 질산태 질소의 동등량을 혼합한 처리구에서는 신태 형성률이 저조하다는 결과가 있었으나(Seong *et al.*, 1993), 본 실험 결과에서는 질산태 질소와 암모니아태 질소의 양에 대한 비교에서 별 다른 공통점을 찾을 수 없었다.

(라) pH의 효과

배지 내 수소이온 농도의 차이에 의한 효과를 알아보기 위해 pH 4.8~6.8 까지 pH 5.8을 기준으로 0.5 씩 증감하여 조절한 배지에 마 마디배양을 한 결과, 액아수, 초장 및 생체중과 소피경 형성수에서 각 수준 별로 유의한 차이는 나타나지 않았다(Table 10). 식물조직배양에 사용되는 배지의 일반적인 pH 범위는 주로 5.5~5.8 이며, 식물재료에 따라서 배양에 적합한 pH 범위는 다양하며, 식물종에 따라 유식물체의 분화, 초장의 신장, 뿌리의 분화 및 생체중의 증가에 미치는 효과가 다른 것으로 보고되어 있다. 마의 마디 배양에서는 pH 4.8~6.8 범위에서도 pH 별로 유의차가 없는 것으로 보아 마는 비교적 넓은 범위의 pH에서도 잘 자라는 재배적 특성과 관계가 깊다고 생각된다.

Table 10. Influences of pH on *in vitro* growth of Chinese yam.^z

pH	No. of axillary bud (No./flask)	Plant height (cm)	Fresh weight (g/flask)
4.8	41.0a ^y	7.4a	4.41a
5.3	50.0a	5.9a	5.81a
5.8	52.3a	6.9a	5.43a
6.3	47.0a	6.8a	5.31a
6.8	66.3a	7.5a	5.97a

^zFive stems having single node were inoculated with than replications on 250 mL Erlenmeyer flask containing 30 mL MS medium and cultured at 25±1°C, under 16 hrs light for 6 weeks. ^yMeans separation in columns by Duncan's multiple range test at 5% level.

(마) 잎의 부착 유무

절편체인 'Y'자 형태의 마디에서 가지 중 한쪽에 잎을 제거하지 않은 조직과, 양쪽 가지의 잎을 모두 제거한 조직배양의 비교에서는 잎을 모두 제거한 쪽이 식물체 생장을 위한 배양효율이 뚜렷하게 높았다(Table 11, Fig. 4). 잎을 제거한 절편체는 엽수가 38.3으로 잎이 달린 절편체의 엽수 23.3보다 많고, 액아도 언급한 순서대로 26.3, 10.7로 명확하게 차이가 난다.

Table 11. Effects of with or without a leaf at explants on *in vitro* growth of Chinese yam.

Explants	No. of leaves (No./flask)	No. of axillary bud (No./flask)	Plant height (cm)	Fresh weight (g/flask)
Leaf	23.3	10.7	3.3	3.5
No leaf	38.3	26.3	5.7	6.0

¹⁾ Seven stems having single node were inoculated with three replications on 100mL Phytohealth vessel containing 30mL MS medium and cultured at 25±1°C, under 24hrs light for 6 weeks.

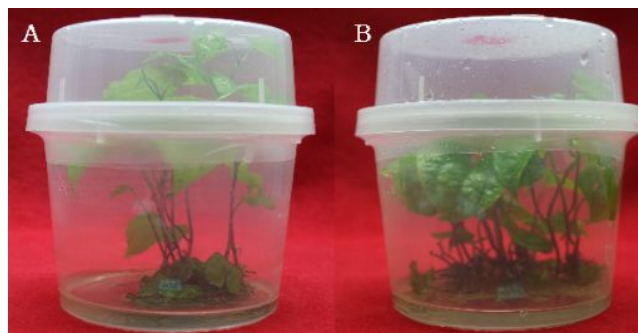


Fig. 4. Comparison of *in vitro* growth of Chinese yam with(A) or without(B) leaf explant.

(바) 배양 용기별 효과

배양효율을 최대화하기 위해 배양용기에 따른 효과를 실험하였다. 배양용기는 부피와 용기재 질에 있어 투명도의 차이가 있는 8가지를 사용하였다(Table 12, Fig. 5). 배양 6주째에 조사한 결과 V6인 Incu-tissue vessel에서 가장 나은 데이터가 나왔다. 엽수가 72.6개, 액아수가 31.3개로 V6이 다른 배양용기의 시료와 큰 차이를 보였다. 그 외 생체중과 괴경의 형성에 있어 다른 처리와 차이가 크다고 할 수는 없었지만, 아래의 조사결과에 의해 엽수와 액아의 수에서 가장 효율이 좋았던 V6을 이후 마 식물체의 유지를 위해 사용하였다.

Table 12. Effects of vessel type on *in vitro* growth of Chinese yam plantlet.¹⁾

Type of Vessel	No. of leaves (No./flask)	No. of axillary bud (No./flask)	Plant height (cm)	Fresh weight (g/flask)
V1	29.0	13.0	6.1	3.3
V2	37.5	18.5	8.1	5.2
V3	37.5	17.5	8.1	4.3
V4	36.3	17.0	9.0	4.6
V5	52.7	23.3	8.9	5.3
V6	72.6	31.3	9.0	4.8
V7	24.7	22.7	9.1	5.2
V8	32.0	18.3	5.8	4.8

¹⁾ Five stems having single node were inoculated with three replications on 250mL E-flask containing 30mL MS medium and cultured at 25±1°C, under 16 hrs light for 6 weeks.

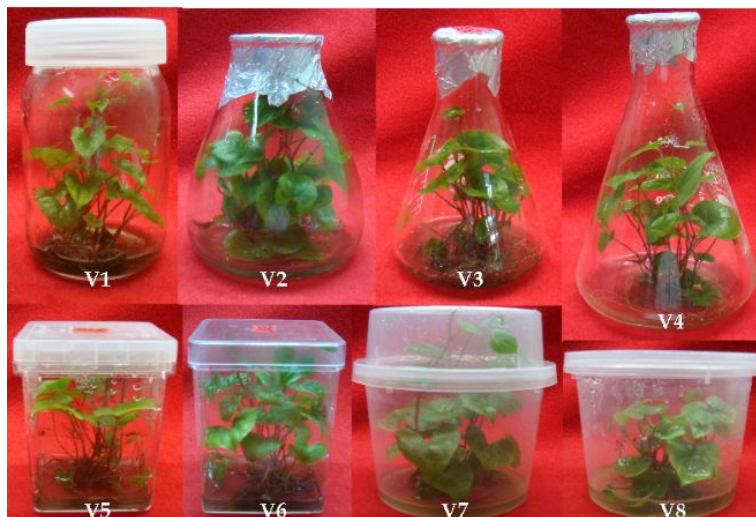


Fig. 5. Various types of culture vessel for *in vitro* culture of Chinese yam.

(사) 온도의 영향

온대성 식물인 마의 기내 적절 배양 온도를 위한 실험을 하였다. 배양온도 25°C와 28°C에서의 비교는 조사한 엽수, 액아의 수, 초장, 생체중, 괴경 형성수와 직경이 28°C배양 온도 효과가 높았다. 조사한 6가지 항목 모두에서 25°C에서보다 수치가 높았지만, 특히 초장과 생체중은 각각 1cm, 1g 썩의 차이를 보였다(Table 13, Fig. 6).

Table 13. Effects of cultured temperature on the growth of Chinese yam plantlet.¹⁾

Temp.(°C)	No. of leaves (No./flask)	No. of axillary bud (No./flask)	Plant height (cm)	Fresh weight (g/flask)
25	41	14	6.9	4.6
28	42	19	7.2	5.6

¹⁾ Five stems having single node were inoculated with three replications on 250 mL Erlenmeyer flask containing 30 mL MS medium and cultured, under 24 h light for 6 weeks.

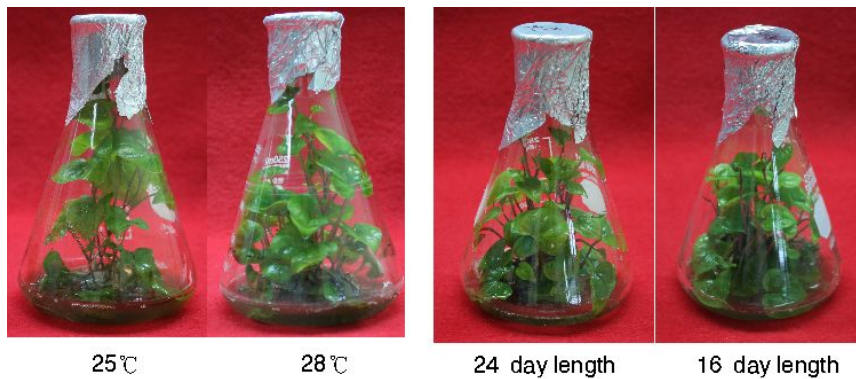


Fig. 6. Growth of plantlets formed 5 single-node of Chinese yam at temperature or photoperiod. 250 mL E-flask containing 30 mL MS medium and cultured for 6 weeks.

(아) 일장의 영향

마 무병 식물체의 대량 증식을 위해 광주기에 대한 효과를 실험한 결과, Table 14와 같이 24시간 광 상태가 16시간 광/8시간 암 조건보다 효율이 높은 것을 알 수 있다. 특히, 엽수는 24시간 광에서 89개, 16시간 광/8시간 암에서 37개로 두 배 이상의 차이가 났으며, 액아도 언급한 순서대로 38개, 23개로 15개의 차이가 있다. 엽록소함량도 24시간 광처리에서 단연 높게 측정되었으며, Fig. 6의 오른쪽 두 그림에서 보이는 바와 같이 육안으로도 엽의 색에 초록색의 농도가 차이 나는 것을 알 수 있다.

Table 14. Effects of photoperiod on *in vitro* growth of Chinese yam plantlet.¹⁾

Day length	No. of leaves (No./flask)	No. of axillary bud (No./flask)	Plant height (cm)	Fresh weight (g/flask)
24/0	89.0	38.0	7.9	4.7
16/8	37.0	23.0	8.0	4.5

¹⁾ Five stems having single node were inoculated with three replications on 250 mL E-flask containing 30 mL MS medium and cultured at 25±1°C for 6 weeks.

(자) 생장곡선

마 기내식물체의 배양 기간에 따라 Fig. 7과 같이, 접종 후 1주부터 잎이 나오고 3주에는 초장이 삼각플라스크의 반 정도가 되며, 6~8주에는 잎과 줄기가 가득 차게 된다 (Fig. 8). 배양 후 12주에는 황화된 잎과 형성된 괴경을 볼 수 있으며, 생장 양상은 Fig. 9와 같다.

엽수, 마디수, 생체중 및 초장을 각각의 최고 수치에 대한 백분율을 구한 결과, 엽수는 마디 배양후, 2주부터 증가하기 시작하여 7주에는 100%로 10배가 증가한 최고 엽수가 되었다. 마디수에서도 접종 2주후부터 5주까지 급격히 증가하여 11주경에 최고개수에 달했으며, 엽수, 마디수 및 초장에 있어서 유사한 경향치를 보였다. 생체중은 배양 3주후부터 10주까지 계속 증가하여 11주에 최고무게에 달했다. 괴경은 접종 후 2주후부터 형성되기 시작하여 5~8주 사이에 급격히 증가하며, 11주까지 증가세를 가진다. 이와 더불어 형성된 괴경의 무게는 5~6주, 10~11주에 증가율이 크고 12주까지 증가하였다.

기내에서 마 식물체를 증식하기 위해서는 마의 신초와 액아가 충분히 확보되어야 한다. 이때 신초는 단순히 길이생장 뿐만 아니라 굵고 튼튼한 마디를 많이 갖고 있어야 풍부한 생장과 나아가 소괴경으로 발달할 가능성을 가지게 되므로, 괴경의 생산량을 늘리기 위해서는 튼튼하고 많은 액아가 선행되어야 한다.

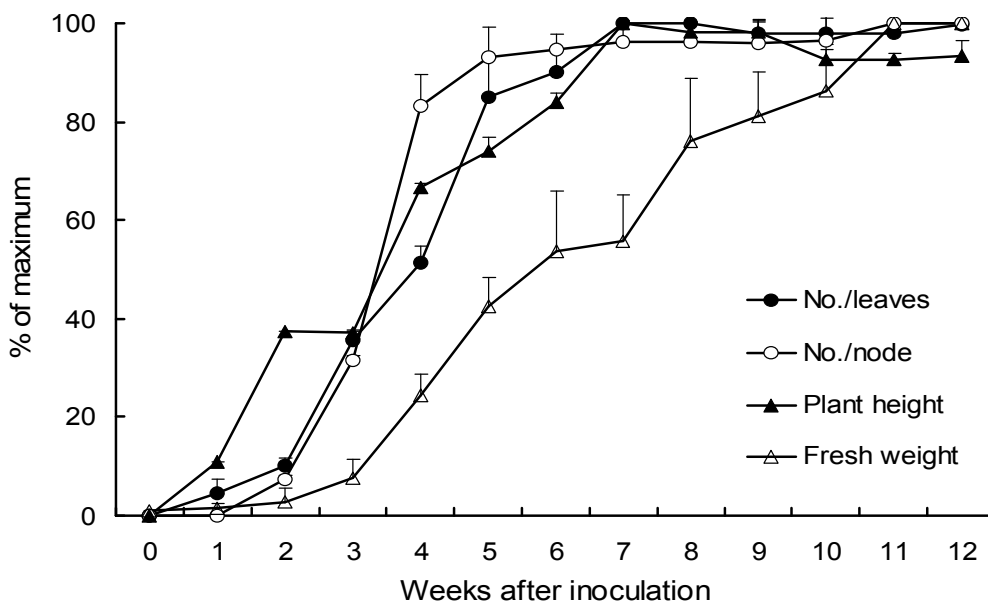


Fig. 7. Changes in number of leaves and nodes, fresh weight, plant height according to *in vitro* cultural periods of yam plantlet.



Fig. 8. Bioreactor culture of yam shoots using single node culture method.

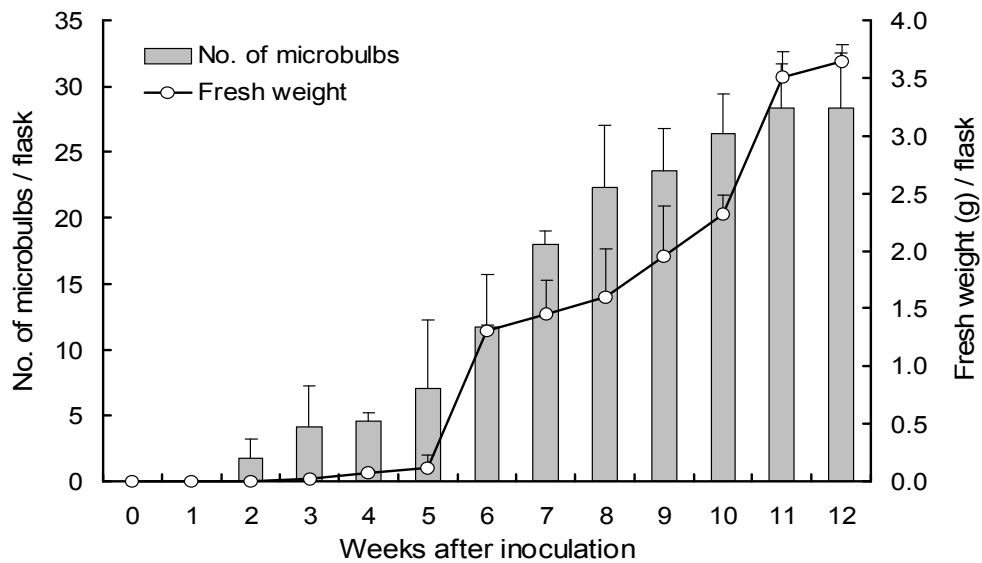


Fig. 9. Changes in number of microbulbs and fresh weight according to *in vitro* cultural periods of yam plantlet.

나. 마 추출의 생리활성

(1) 물질 추출

마 지하부를 껍질부분과 식용부위로 분리하여 메탄올로 추출한 후 n-hexane 등 5종의 용매로 분리하여 추출물의 회수량을 조사하였다. 한편 동일한 방법으로 기내 배양하여 수확한 부정

근을 이용하여 용매추출을 시도하였다(Fig. 10).

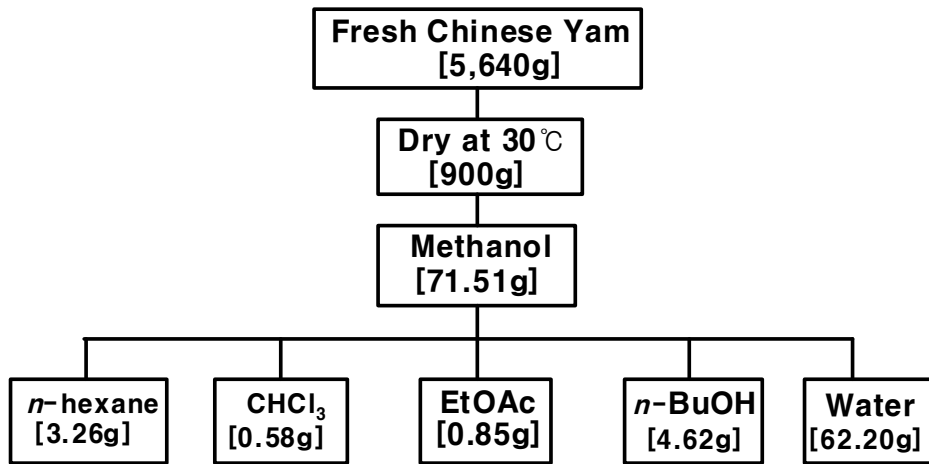


Fig. 10. Procedure of solvent extraction from rhizome of Chinese yam

괴경을 식용부위(edible part)와 껍질부위(bark part)로 구분하여 메탄올 추출액의 용매별 분획의 회수율을 보면, 메탄올 추출액의 회수율은 생체중대비 식용부위는 1.2%였고 껍질부위는 1.8%를 나타내었으며, 용매별 회수율도 일부 차이가 났다(Table 15).

기내 배양된 부정근의 메탄올 추출액의 회수율은 생체중대비 식용부위는 1.4%였고, 용매별 회수율은 괴경의 식용부위와 거의 유사하였다(Table 16). 현재 추출된 물질은 본과제의 공동연구자에 의해 다양한 생리활성을 검정 중에 있다.

Table 15. Yields of solvent extracts from rhizome of yam.

Sample and extracts	Edible part(%)	Bark part(%)
Sample		
Fresh weight	4,480g (100%)	1,160g (100%)
Dry weight	740g (16.6%)	160g (13.8%)
Methanol extracts	51.12g (1.2%)	20.88g (1.8%)
Solvent fractions		
Hexane	2.59g (5.2%)	0.67g (3.3%)
Chloroform	0.40g (0.8%)	0.18g (0.9%)
Ethylacetate	0.65g (1.3%)	0.20g (1.0%)
Butanol	3.78g (7.5%)	0.48g (2.4%)
Water	43.01g (85.3%)	19.11g (92.6%)
Total	50.42g (100%)	20.63g (100%)

Table 16. Yields of solvent extracts from *in vitro* adventitious root cultures.

Sample and extracts	Edible part(%)
Sample	
Fresh weight	1,787g (100%)
Dry weight	156g (8.8%)
Methanol extracts	25.02g (1.4%)
Solvent fractions	
Hexane	1.22g (4.8%)
Chloroform	0.17g (0.7%)
Ethylacetate	0.34g (1.4%)
Butanol	1.74g (7.1%)
Water	20.88g (85.0%)
Total	24.56g (100%)

(2) 세포의 성장과 활력에 미치는 영향

담배배양세포에 단순히 방사선 20 및 50Gy를 처리한 것과 마 추출물 10mg/L을 3일간 전처리한 후 동일한 선량의 방사선을 처리한 것의 경과 시간별 배양세포의 활력변화를 조사하였다(Fig. 11). 먼저 50Gy의 고선량을 처리한 세포는 무처리 세포나 마 추출물을 전처리한 세포 모두 세포활력이 현저히 억제되어, 방사선 처리 12일이 경과한 후에도 세포의 활력이 회복되지 않았다. 그러나 비교적 저선량의 방사선인 20Gy를 처리한 세포는 무처리에 비해 마 추출물을 전처리한 세포가 세포활력의 회복 속도가 빠르게 나타났다(Fig. 11). 방사선을 처리한 후 12일째의 세포활력을 보면 방사선을 처리하지 않은 무처리 세포가 94%, 방사선 20Gy만 단독으로 처리한 세포가 58%였고, 마 추출물을 전처리한 후 방사선 20Gy를 처리한 세포가 73%의 활력을 보였다.

Fig. 12는 방사선을 처리한 후 12일째의 배양세포의 생체중을 조사한 결과이다. 무처리 세포는 플라스크 당 생체중이 2.7g이나 방사선 50Gy를 처리한 경우는 0.5g로 방사선을 처리한 이후에는 식물세포를 정상상태로 되돌려도 세포의 증식이 이루어 지지 않았다. 한편 20 Gy를 처리한 세포의 생체중은 플라스크 당 1.3g으로 방사선을 처리하지 않은 세포(2.7g)의 48.1% 수준을 보였으나, 마 추출물을 처리한 후 방사선 20 Gy를 처리한 경우는 1.8g을 나타내어 무처리 세포와 비교하여 66.7% 수준을 보였다. 이 결과로 보면, 마 추출물을 전처리한 세포가 전처리를 하지 않은 세포보다 20Gy방사선에 의한 세포의 생체중 억제활성이 약 20% 경감되는 것으로 나타났다.

이처럼 추출물을 처리한 배양세포가 방사선 처리에 의한 세포활력과 생체중의 억제를 현저히 감소시키는 효과가 인정되어, MeOH 추출물을 다시 *n*-hexane, CHCl₃, EtOAc, *n*-BuOH 및 water 층으로 분획한 추출물을 담배 배양세포에 처리하였다(Fig. 13).

MeOH 추출물로부터 분획된 5개의 추출물 중 방사선처리에 의한 세포활성과 세포의 생체중 억제효과를 가장 감소시키는 것은 EtOAc층으로 나타났다(Fig. 13). 추출물을 처리하지 않고 방사선 20 Gy만을 처리한 세포의 생체중은 1.34g이고, 세포활력은 58%로 무처리 세포에 비하여 생체중 50.2%, 세포활력 61.1% 수준을 보인 반면, EtOAc 분획의 추출물을 처리하고 방사선 20 Gy를 처리한 세포의 생체중은 2.13g, 세포활력은 74%로 무처리 세포에 비해 각각

78.9%, 77.9%까지 회복된 것을 알 수 있었다. EtOAc 분획 추출물은 MeOH 추출물을 처리한 것보다 방사선에 의한 세포활성 및 생체중 억제를 더욱 경감시키는 것으로 나타났다. 이 결과로 보아 MeOH 추출물의 방사선 피해 감소효과는 MeOH 추출물에 함께 포함된 EtOAc 분획에 존재하는 물질일 것으로 판단된다. 이상의 결과에서 마의 MeOH 추출물은 담배배양세포의 방사선에 의한 피해를 경감시키는 효과가 있는 것으로 인정되고, 그 중 EtOAc 분획에서 추출된 물질이 가장 효과적인 것으로 나타났다. 따라서 방사선에 의한 세포의 핵 DNA 손상을 경감시키는데 어떠한 작용을 알아보기 위하여 comet 분석을 실시하였다.

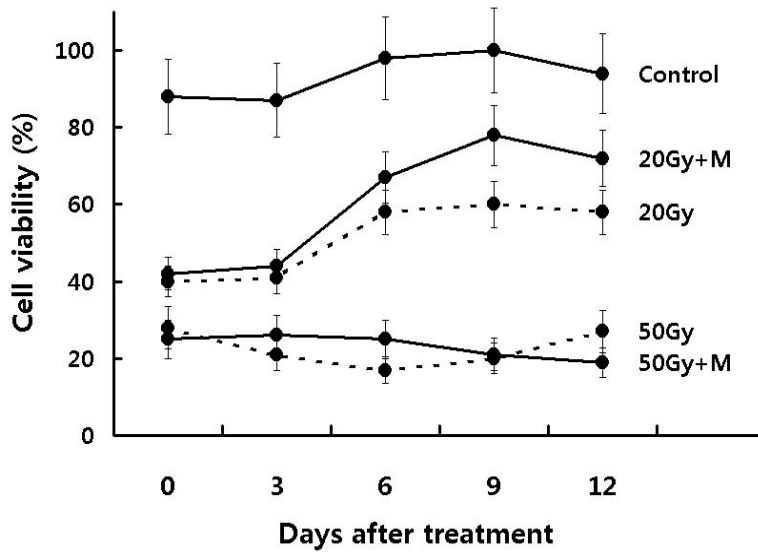


Fig. 11. Changes in tobacco cell viability treated with γ -radiation with or without methanol extracts(M) of Chinese yam. Tobacco cells were treated with 10 mg/L of methanol extract 3 days before radiation treatment. Gy means total dosage of radiation exposed, gray.

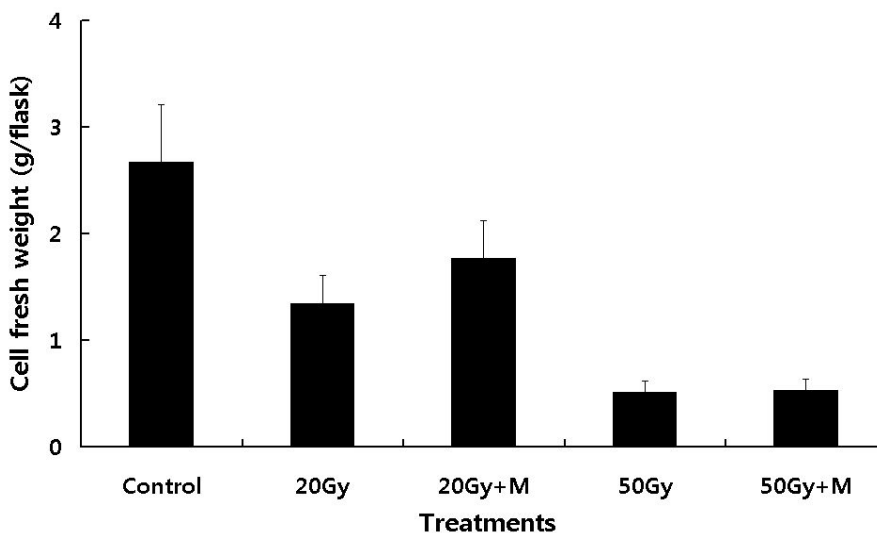


Fig. 12. Fresh weight of tobacco cells treated with γ -radiation with or without methanol extracts(M) of Chinese yam. Tobacco cells were treated with 10 mg/L of methanol extract at 3 days before radiation treatment. Cell fresh weight was determined at 12 days after treatment.

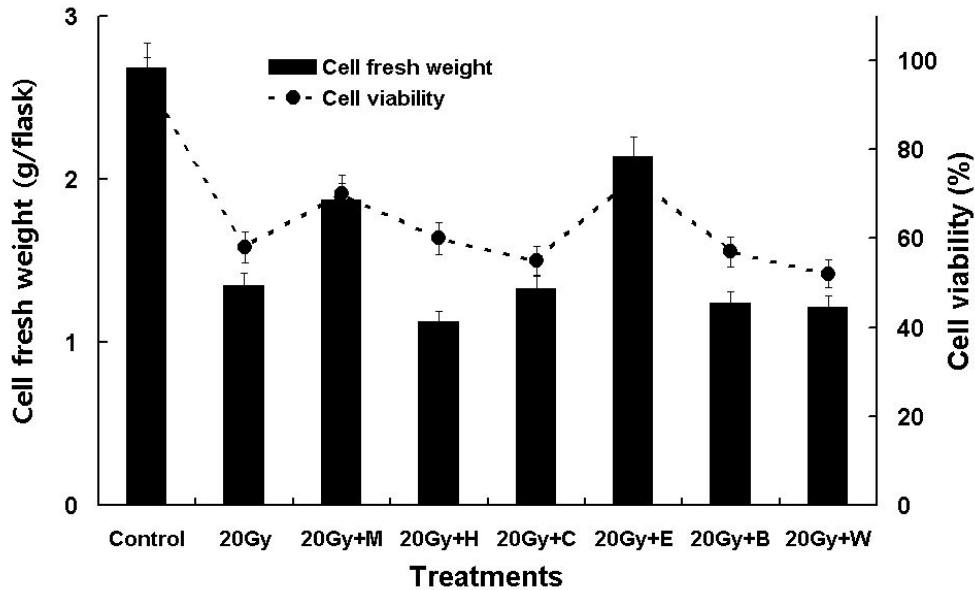


Fig. 13. Cell fresh weight and viability of tobacco cells treated with 20 Gy of γ -radiation and various extracts of Chinese yam. Solvent of extracts M; methanol, H; *n*-hexane, C; chloroform, E; Etylacetate, B; *n*-BuOH, W; water, treated with 10mg/L. Data were determined at 12 days after treatment.

(3) Comet 분석에 의한 핵 DNA 손상검정

방사선을 처리한 담배배양세포에서 핵을 분리하여 comet 분석을 실시한 결과 DNA의 손상 정도에 따라 다양한 형태의 핵 모양을 관찰할 수 있었다(Fig. 14). DNA가 손상을 받지 않은 핵은 거의 구형에 가까운 형태(Fig. 14A)를 보이나, DNA가 손상된 핵은 파괴된 DNA 조각이 전기영동의 원리에 의해 양(+)-전기 쪽으로 이동하여 긴 꼬리를 가진 혜성모양을 형성한다(Fig. 14B). 핵의 모양을 관찰해 보면 동일한 식물체 내에서도 다양한 형태로 나타나게 되는데, DNA 손상이 심해질수록 핵의 머리 부분은 작아지고 꼬리부분은 길어져 심한 경우에는 핵의 머리 부분이 완전히 사라지고 꼬리부분만 관찰되는 경우도 있었다.

Comet 분석에서 핵의 머리길이(head-length, H)와 꼬리길이(tail-length, T)의 비율(T/H ratio)과 머리 부분에 남아있는 DNA 량(% head DNA)을 측정된 결과, 무처리 세포의 핵 DNA의 머리길이(H)와 꼬리길이(T)는 각각 $31.7\mu\text{m}$ 및 $33.4\mu\text{m}$ 로 나타나 T/H 비율은 1.05이었고, 머리부분에 남아있는 DNA 량(% head DNA)는 86.7%로 나타났다(Table 17). 한편 핵 DNA 손상물질로 알려진 EMS 5mM을(Rojas *et al.* 1999; Gichner *et al.* 2000) 처리한 세포는 머리 길이 $20.5\mu\text{m}$, 꼬리길이 $134.9\mu\text{m}$ 로 T/H 비율이 6.58, head DNA는 48.7%로 상당한 핵 DNA 손상을 받은 것을 알 수 있었다. 즉 방사선처리에 의해 손상을 받은 핵일수록 꼬리의 길이가 길어지며 head DNA 양은 감소하는 것을 알 수 있다.

방사선 20Gy를 처리한 경우 머리길이와 꼬리길이는 각각 $29.5\mu\text{m}$ 및 $49.8\mu\text{m}$ 로 관찰되어 T/H 비율이 1.68로 무처리 세포의 T/H 비율(1.05)보다 큰 값을 나타내어 방사선 처리에 의해 핵 DNA가 상당히 손상된 것을 알 수 있었고, head DNA도 71.3%로 나타나 무처리(86.7%)보다 현저히 낮은 값을 보였다. 마 추출물 중 *n*-hexane, chloroform 및 물층을 전처리한 후 20 Gy의

방사선을 처리한 담배 배양세포의 T/H비율은 각각 1.52, 1.58 및 1.65이며, head DNA는 각각 69.3%, 70.3% 및 74.3%로 전처리 없이 방사선 20Gy만을 처리한 세포의 T/H 비율(1.68)과 head DNA(71.3%)간에는 유의차가 인정되지 않았다.

한편, MeOH, EtOAc 및 *n*-Butanol 분획 추출물을 전처리한 경우는 T/H비율이 각각 1.37, 1.01 및 1.10이며, head DNA는 각각 81.5%, 87.6% 및 88.7%로 핵 DNA의 손상정도가 현저히 낮아진 것을 알 수 있었다. 특히 EtOAc층과 *n*-Butanol층을 전처리하고 20 Gy의 방사선을 처리한 경우는 방사선을 처리하지 않은 무처리 세포의 T/H 비율(1.05)과 head DNA(86.7%)가 유사한 값을 보였다. 이 결과는 이들 분획 추출물에는 담배배양세포의 방사선에 의한 DNA 손상을 억제하는 물질이 존재하고 있음을 시사한다.

정상세포의 head-DNA가 100%가 되지 못하는 것은, 스트레스가 없는 상태에서도 일부의 식물세포들은 끊임 없이 소실되고 생성되는 과정을 반복하는 것으로 추정하고 있으며, 일부는 핵을 분리하는 과정에서 핵들이 손상을 받을 수도 있다고 한다(Navarrete *et al.* 1997). 따라서 실험의 수행과정에 온전한 핵을 분리하는 것도 comet 분석의 신뢰성을 높이는 중요한 요인으로 판단된다.

생물체는 끊임없이 외부의 스트레스에 노출되어 있고 특정의 물리·화학적 스트레스는 생물체의 핵 DNA에 손상을 주어 이것이 세포의 생존을 위협하거나 돌연변이를 유발하는 것으로 알려져 있다. 지금까지 알려진 돌연변이 유발물질로는 자외선, 방사선등과 같은 단과장의 스트레스와 화학물질인 EMS, cyclohexamid, cadmium 및 chromium 등이 알려졌으며, 산화적 스트레스를 유발하는 H₂O₂등도 세포핵의 DNA를 손상시키는 것으로 알려져 있다(Navarrete *et al.* 1997).

Comet 분석은 주로 동물세포를 대상으로 약물이나 환경오염물질에 대한 핵 DNA의 손상정도를 신속하게 시각적으로 판단하는 유용한 기법으로 유전독성학, 의학, 환경의 모니터링 등에 다양하게 이용되어 왔다(Fairbairn *et al.* 1995). 식물세포는 동물세포와 달리 세포벽을 가지고 있어 온전한 핵을 나출시키는데 세포벽의 해리과정이 필요하다. 식물에서 comet 분석을 시도한 예를 보면, 돌연변이 유발물질인 EMS를 담배의 잎에 처리하여 핵 DNA의 손상 및 회복 정도와 돌연변이를 파악하였고, maleic hydrazid나 X-ray 등(Koppen and Angelis 1998)을 처리한 식물체의 유전독성효과를 조사한 바 있다.

본 실험에서는 마 추출물을 담배배양세포에 전 처리한 후 방사선을 처리하여 세포의 활력, 세포의 생체중 및 핵 DNA가 손상되는 정도를 분석하였다. 20 Gy의 방사선을 처리하기 전에 마 추출물 중 MeOH 또는 EtOAc 분획 추출물을 처리한 경우 방사선에 의한 세포활력과 생체중의 억제를 현저히 감소시키는 효과가 인정되었다. 한편 분획추출물 중 EtOAc 또는 *n*-Butanol 추출물의 전처리는 방사선이 처리에 의한 세포의 핵 DNA의 손상에 대해 상당한 보호 효과가 있는 것으로 나타났다. 한편 EtOAc 분획 추출물이 방사선을 처리한 세포의 활력과 생체중의 억제를 현저하게 경감한 효과와 동일한 분획 추출물이 방사선에 의한 핵 DNA의 손상을 경감하는 효과와는 밀접한 관련성이 있을 것으로 사료된다. 따라서 EtOAc 분획 추출물에는 세포를 환경 스트레스로부터 보호하여 세포의 생존력을 증가시키는 물질이 존재함을 시사하고 있다.

지금까지 식물체 추출물을 대상으로 생물체의 핵 DNA 손상 억제효과를 연구한 결과가 없으나, 추출물의 구체적인 효과와 기작을 밝히기 위해서는 마 추출물로부터 핵 DNA의 손상을 억제하는 물질의 분리 동정이 필요할 것으로 사료된다. 한편 이들 물질이 동식물의 타 환경스트

레스에 의한 DNA 손상에 미치는 영향에 관한 연구도 필요하다. 금후 이 연구는 마 추출물이 식물의 환경스트레스에 의한 유전독성과 돌연변이 유발을 경감하는 원인물질을 탐색하여 작물 보호에 이용될 수 있을 것이다.

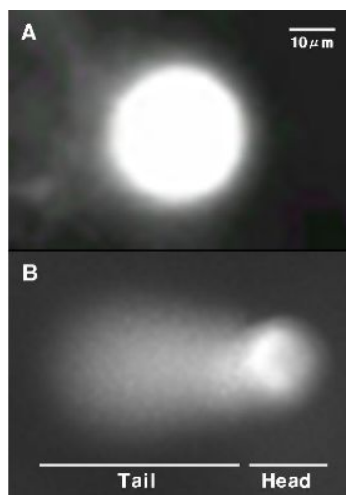


Fig.14. Nuclear-DNA damage analyzed by comet assay. Intact nuclear(A) without comet-tail, damaged nuclear(B) with long comet-tail by treatment of 20 Gy γ -radiation.

Table 17. Percentage head DNA and length of comet for nuclei isolated from tobacco cells treated with 20 Gy of γ -radiation with various extracts of Chinese yam.

Treatments ¹⁾		Length of comet(μm)			% Head DNA
Radiation	Extracts	Head(H)	Tail(T)	T/H	
Control cell		31.7 \pm 2.2	33.4 \pm 3.1	1.05 \pm 0.2	86.7 \pm 8.7
20 Gy	only	29.5 \pm 2.3	49.8 \pm 4.1	1.68 \pm 0.3	71.3 \pm 6.3
	+ MeOH	30.3 \pm 1.7	41.5 \pm 3.2	1.37 \pm 0.2	81.5 \pm 6.4
	+ <i>n</i> -hexane	33.4 \pm 3.1	50.8 \pm 5.4	1.52 \pm 0.8	69.3 \pm 7.2
	+ chloroform	32.7 \pm 1.8	51.8 \pm 3.5	1.58 \pm 0.6	70.3 \pm 2.2
	+ Etylacetate	32.3 \pm 1.7	32.5 \pm 3.2	1.01 \pm 0.4	87.6 \pm 6.8
	+ <i>n</i> -Butanol	31.3 \pm 1.7	34.5 \pm 4.2	1.10 \pm 0.2	88.7 \pm 7.6
	+ Water	29.6 \pm 2.7	48.8 \pm 4.6	1.65 \pm 0.5	74.3 \pm 2.2
5 mM EMS ²⁾		20.5 \pm 1.5	134.9 \pm 7.8	6.58 \pm 2.1	48.7 \pm 2.7

¹⁾Nuclei for comet assay were isolated at 24 hrs after treatment.

²⁾Ethyl methanesulfonate(EMS) treated for 24 hrs before comet assay. Values are mean \pm SE.

제 10절 마 유래 성분의 면역조절작용 및 기전연구

1. 서언

최근의 웰빙 추세에 따라 심혈관질환 예방에 관한 수요는 끊임없이 증가하고 있으며 국내 뿐 만 아니라 국외에서도 천연물을 활용한 항산화 및 항노화 소재에 관한 연구가 급증하고 있다. 식품으로 섭취하는 마가 지니고 있는 효능은 신선 마 자체나 관련 제품을 추출하여 정제한 후 세포수준에서 검증되고 있다.

본 연구는 마에서 유래하는 다양한 성분 중 그 효능이 밝혀지고 있는 디오스제닌과 마 조직에서 추출정제한 물질을 이용하여 면역세포의 기능변화와 맥관 평활근세포에서의 염증매개물질의 조절 효과를 검색하고 이를 토대로 암, 동맥경화등의 만성질환을 치료할 수 있는 면역조절제를 개발하고자 하였다.

효능물질의 전임상 단계의 검증을 위해 1) 만성 염증성 질환인 동맥경화와 관련하여 이에 관계하는 면역계 세포와 맥관평활근세포의 기능 및 활성화에 마 유래 성분이 미치는 영향, 2) 동물 모델(부종 실험)을 이용한 마 유래 성분의 항염증 효능, 3) 동물 모델(아토피성 피부염 질환 모델)을 이용한 마 유래 성분의 항알레르기성 효능, 4) 동물 모델(동맥경화 질환모델)을 이용한 마 유래 성분의 항동맥경화성 효능에 관한 연구를 수행하였다.

2. 연구방법론

가. 실험 재료

마 성분	Diosgenin, 영여자(Db-Ex), H1/H2
실험 동물	C57BL/6 mice, BALB/c mice, ApoE knockout mice, Sprague-Dawley rats
세포주	Raw 264.7 cell line, Mouse Vascular Smooth Muscle cell line(MOVAS)
Antibody	iNOS, ICAM-1, VCAM-1, MAPKs, Akt, p65, IκB, CD68, etc.
ELISA kit	TNF-α, IL-6, IL-1β, IL-4, IgE 및 동맥경화 표지인자관련 detection kits

나. 실험 처리

(1) 마 유래 성분에 의한 면역세포와 맥관평활근세포의 기능 및 활성화 변화 연구

동물로부터 분리한 세포 및 세포주에 마 성분을 농도별로 2시간 전처리하고 LPS/IFN-γ 또는 TNF-α를 시간별로 처리하여 배양한 다음 MTT assay, XTT assay, ELISA assay, Western blotting, RT-PCR 등의 방법을 통해 세포의 기능 변화를 검토하였다.

(2) 마 유래 성분의 항알레르기 효능 검토

(가) 마 유래 성분의 부종 억제 효능 검토

쥐에 후족부종을 유도하기 전 물(음성대조군), indomethacin(양성대조군) 및 마 성분을 복강 투여하였다. 투여 30분 후 carrageenan을 피하주입한 다음 시간별로 부종의 크기변화를 측정하였다.

(나) 마 유래 성분의 아토피성 피부염 억제 효능 검토

마우스 등의 털을 제거한 후 DNCB를 3일 간격으로 총 4회 경피 도포하여 아토피성 피부질환을 유발하였다. 아토피성 피부질환이 유발된 마우스의 등에 PBS(음성대조군), dexamethasone(양성대조군) 및 diosgenin을 총 4회 경피 도포한 뒤 아토피성 피부염의 변화를 관찰하였다.

(3) 마 유래 성분의 항동맥경화 효능 검토

ApoE^{-/-} 마우스를 그룹별로 분리한 후 물(음성대조군) 또는 마 성분을 이틀간격으로 주 3회, 총 11주, 21주 간 경구 투여하였으며. 사육 시 동맥경화 유발을 위해 high fat diet를 실시하였다.

다. 분석 방법

(1) Nitrite 정량법 (Griess method)

세포 배양 후, 배양 상등액과 Griess reagent를 반응시켜 micro plate reader로 흡광도를 측정하여 상등액 내 생성된 nitrite의 양을 확인한다.

(2) MTT/XTT assay

세포 배양후 MTT/XTT 용액을 더해주고 4시간 더 배양한 다음 micro plate reader를 사용하여 흡광도를 측정한다.

(3) Zymosan/NBT uptake assay (phagocytosis assay)

세포 배양 후, 탄소원인 zymosan과 NBT 시약을 첨가하여 formazan이 생성되도록 반응시킨 뒤 micro plate reader로 흡광도를 측정한다.

(4) ELISA assay

세포 배양 후, 배양 상등액 내 cytokine 측정 및 세포 표면에 발현되는 CAMs 발현, 동물 실험 시 혈청내 인자들을 확인하기위해 ELISA assay를 수행하였다. Target detection antibody와 Av-HRP를 반응시킨뒤 TMB 기질을 처리하여 발색시킨 다음 micro plate reader를 이용하여 흡광도를 측정한다.

(5) Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

배양 후 세포를 Trizol로 용해시켜 RNA를 분리한 뒤 확인하고자 하는 target에 specific한

primer를 이용하여 PCR을 수행, target의 mRNA 발현 변화를 측정한다.

(6) Western Blot Analysis

배양 후 세포를 lysis buffer로 용해시킨 뒤 SDS-PAGE를 이용하여 단백질을 분리하고 이 단백질을 membrane으로 옮긴 후 antibody를 이용하여 target 단백질의 발현 변화를 측정한다.

(7) Luciferase promoter assay

Dual transfection system을 이용하여 promoter를 주입시킨 후 마 성분 및 LPS/IFN- γ 또는 TNF- α 를 처리하여 세포를 배양한다. 배양된 세포를 용해시킨 뒤 기질과 반응시켜 microplate luminometer를 이용하여 promoter activity를 측정한다.

(8) Cell Adhesion assay

마 성분 전처리 후 TNF- α 를 처리하여 배양한 세포를 염색된 monocyte와 함께 배양하여 monocyte를 부착시킨다. 부착된 monocyte를 용해한 후 fluorescence plate reader를 이용하여 monocyte의 부착 정도를 측정한다.

(9) FACs analysis (ROS 측정)

배양 후 세포를 DCFH-DA와 반응시킨 후 flow cytometry를 이용하여 세포 내 ROS 생성 정도를 측정한다.

(10) H&E/Oil-Red O staining 및 immunohistochemistry

동물 실험 종료 후 조직을 Haematoxylin/Eosin, Oil-Red O, 또는 antibody로 염색한 뒤 조직 내 세포의 calcification, lipid accumulation, 염증부위로의 이동 정도를 microscope을 이용하여 확인한다.

3. 연구결과

가. 마 유래 성분인 Diosgenin의 면역세포 활성화 및 조절 작용

(1) Diosgenin이 복강대식세포의 cellular activity 및 NO 생성에 미치는 영향

복강대식세포에 diosgenin을 농도별로 2시간 전처리한 뒤 상등액을 제거하고 1 μ g/mL의 LPS와 50U/mL의 IFN- γ 를 가하여 24시간 더 배양한 후 세포생존률 및 상등액 내 nitrite 수치, iNOS발현 변화를 확인한 결과 처리한 농도 내에서 세포독성을 나타내지 않음을 확인하였으며 (Fig. 1A), diosgenin의 농도가 증가함에 따라 nitrite의 생성이 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 1B). 또한, nitrite 생성 억제를 더 확인하기 위해 RT-PCR 및 western blotting을 이용하여 iNOS의 발현 변화를 확인한 결과, diosgenin에 의해 iNOS의 mRNA와 단백질 발현이 유의성 있게 감소함을 확인하였다(Fig. 1C-D).

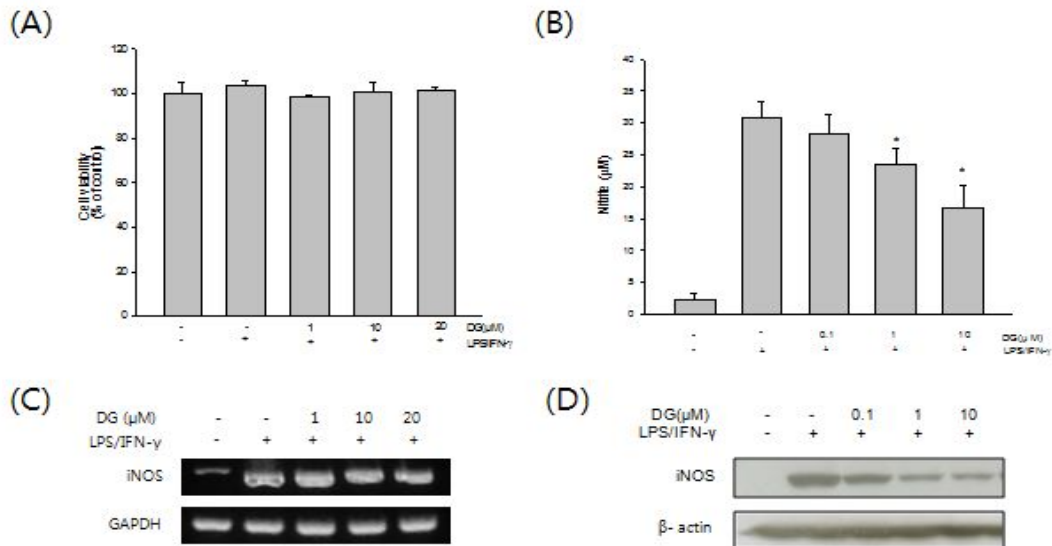


Fig. 1. Effects of diosgenin on cell viability of Macrophage and its Nitrite production. Peritoneal macrophages were pretreated with indicated concentration of diosgenin for 2 h, then incubated with 1 µg/mL of LPS and 50 u/mL of IFN-γ for 24 h. (A) Cell viability was observed by MTT assay. (B) Culture supernatants were collected and the level of Nitrite was obtained by the Griess method. (C) mRNA and (D) protein levels of iNOS were determined by PRC and Western blot analyses, respectively. Results are the means ± S.E. of three experiments. *: significantly different from the group treated with LPS/IFN-γ only at $P < 0.05$.

(2) Diosgenin이 복강대식세포의 탐식작용 및 항암작용에 미치는 영향

Diosgenin에 의한 복강대식세포의 탐식능력변화를 측정하기 위해 diosgenin을 처리한 대식세포에 zymosan을 가하여 탐식 작용을 유도한 결과 탐식작용이 감소하였으나 농도 의존적이지 않음이 확인되었다(Fig. 2A). Diosgenin이 복강대식세포의 항암 작용에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여 diosgenin을 다양한 농도로 전처리 한 세포에 LPS/INF-γ와 흑색종 세포인 B16 암세포를 함께 배양한 후 복강대식세포의 암세포사멸능력을 측정한 결과, LPS/INF-γ에 의해 활성화된 양성대조군에 비하여 diosgenin에 의해 항암능력이 억제되는 것을 확인하였다(Fig. 2B).

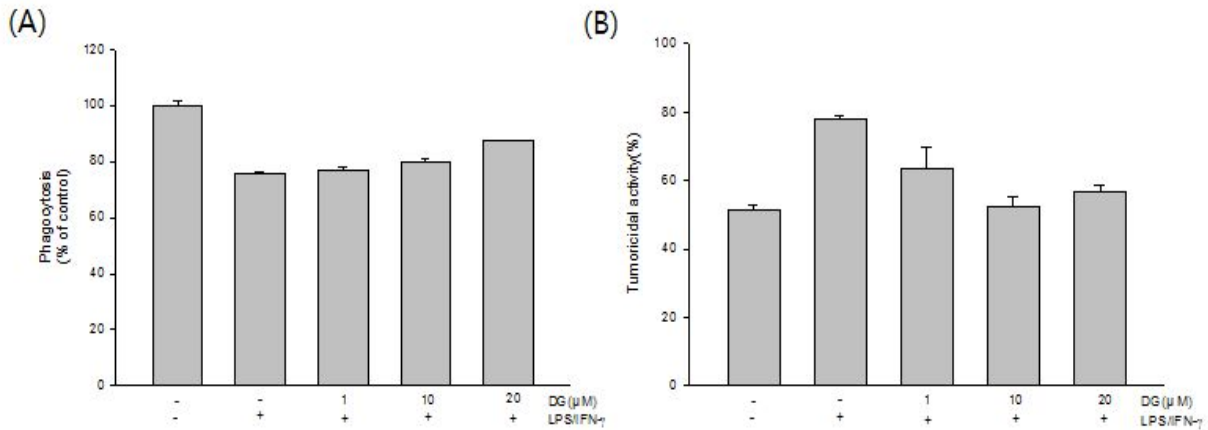


Fig. 2. Effects of diosgenin on phagocytic and tumoricidal activities of peritoneal macrophage. (A) Cells were pre-treated with indicated concentrations of diosgenin for 2 h, then treated with LPS(1 μg/mL) and IFN-γ(50 U/mL) for 24 h. Phagocytic activity was determined by Zymosan/NBT uptake assay. (B) Cells were pre-treated with various concentrations of diosgenin for 2 h. After washed with dPBS, cells were co-cultured with B16 tumor cells for 24 h at effector : target ratio of 10 : 1 in the presence of LPS(1 μg/mL) and IFN-γ(50 Uu/mL). Tumoricidal activity was assessed by MTT assay. Results are the means ± S.E. of two experiment. *: significantly different from the group treated with LPS/IFM-γ only at $P < 0.05$.

(3) Diosgenin에 의한 비장림프구의 세포증식 능력 측정

Diosgenin을 농도별로 처리한 림프구세포의 mitogen에 의한 반응을 측정하기 위하여 B세포 mitogen인 LPS와 T세포 mitogen인 ConA를 각각 처리하여 대조군과 비교한 결과, diosgenin 이 비장림프구의 세포증식활성을 억제시킴을 확인하였다 (Fig. 3).

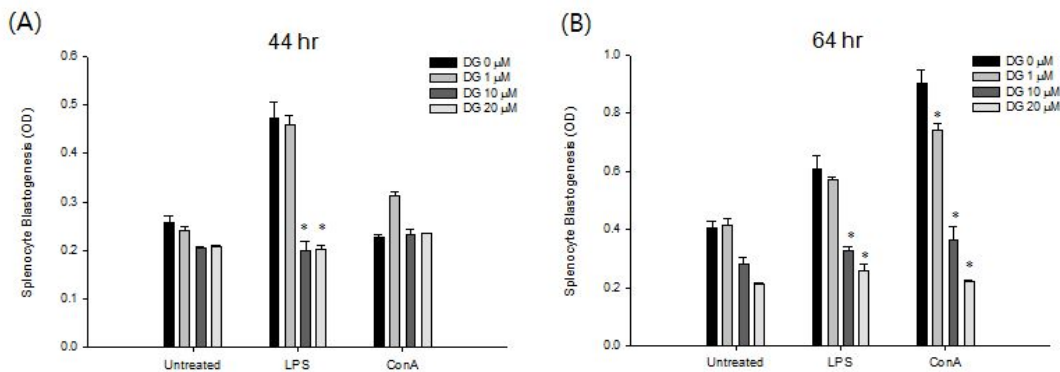


Fig 3. Effects of Diosgenin on the lymphocyte blastogenic function. Splenocytes were pre-treated with various doses of Diosgenin for 2 h, then incubated for 44, 68 h in the presence or absence of LPS or ConA. Proliferation of splenocytes was assessed by XTT assay, and the absorbance was measured at 450nm and 650nm. The results are mean ± S.E. of two experiment. *: significantly different from the cells cultured without diosgenin at $P < 0.05$.

(4) Diosgenin에 의한 자연살해세포의 항암 능력 측정

Diosgenin이 자연살해세포(NK cells)의 기능에 미치는 영향을 알아보기 위하여 diosgenin을 농도별로 처리한 비장림프구세포와 자연살해세포에 민감하게 반응하는 암세포인 YAC-1 세포

를 4시간동안 함께 배양하여 암세포에 대한 자연살해세포의 항암능력을 측정한 결과 diosgenin의 억제기대와는 다르게 자연살해 세포의 항암능력이 diosgenin의 농도에 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 4).

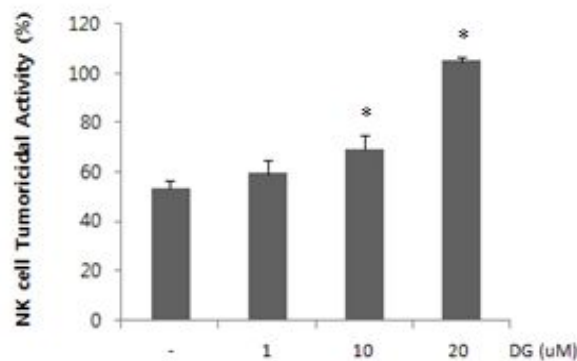


Fig 4. Effects of Diosgenin on the tumoricidal activity of the NK cells. Splenocytes, which were pre-treated with various doses of Diosgenin for 2 h, were co-cultured with target cells (YAC-1) for 4 h in the presence of Diosgenin. Tumoricidal activity was assessed by XTT assay, and the absorbance was measured at 450nm and 650nm. Results are mean \pm S.E. of two experiments. *: significance from the control group at $P < 0.05$.

나. 마 유래 성분에 의한 대식세포주의 기능 변화

(1) Diosgenin이 대식세포의 cellular activity 및 NO 생성에 미치는 영향

Raw 264.7 세포에 diosgenin을 농도별로 2시간 전처리한 뒤 상등액을 제거하고 1 μ g/mL의 LPS와 50u/mL의 IFN- γ 를 가하여 24시간 더 배양한 후 세포생존률 및 상등액 내 nitrite 수치, iNOS발현 변화를 확인한 결과 처리한 농도 내에서 세포독성을 나타내지 않음을 확인하였다(Fig. 5A). 또한, diosgenin의 농도가 증가함에 따라 nitrite의 생성이 감소하는 것을 확인하였으며 (Fig. 5B) diosgenin에 의한 iNOS의 mRNA와 단백질 발현의 감소가 이에 관여함을 확인하였다(Fig. 5C-D).

(2) Diosgenin에 의한 대식세포의 cytokine 및 ROS 생성 억제

Diosgenin이 대식세포의 cytokines 생성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 Raw 264.7세포에 위와 동일한 조건으로 diosgenin을 전처리한 후 LPS, IFN- γ 와 함께 24시간 더 배양하고 나서 상등액을 취하여 그 상등액으로부터 TNF- α , IL-1 β , IL-6 생성 정도를 ELISA assay를 이용하여 확인한 결과 IL-6의 생성이 감소함을 확인하였으며 (Fig. 6C) ROS 생성 또한 감소함을 확인하였다(Fig. 6D).

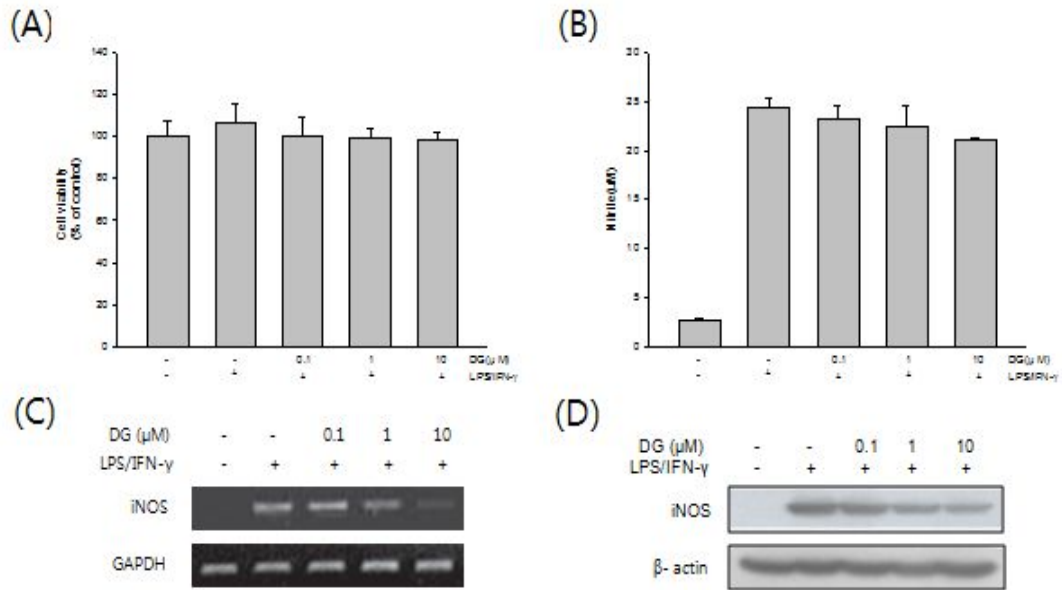


Fig 5. Effects of diosgenin on cell viability and Nitrite production in macrophages. RAW 264.7 cells were pre-treated with indicated concentration of diosgenin for 2 h, then incubated for 24 h in the presence of 1 µg/mL of LPS and 50 U/mL of IFN-γ. (A) Cell viability was observed by MTT assay. (B) Culture supernatants were collected and the level of Nitrite was obtained by the Griess method. mRNA (C) and protein (D) levels of iNOS were determined by PCR and Western blot analyses, respectively. Results are the means ± S.E. of three experiments. *: significantly different from the group treated with LPS/IFM-γ only at $P < 0.05$.

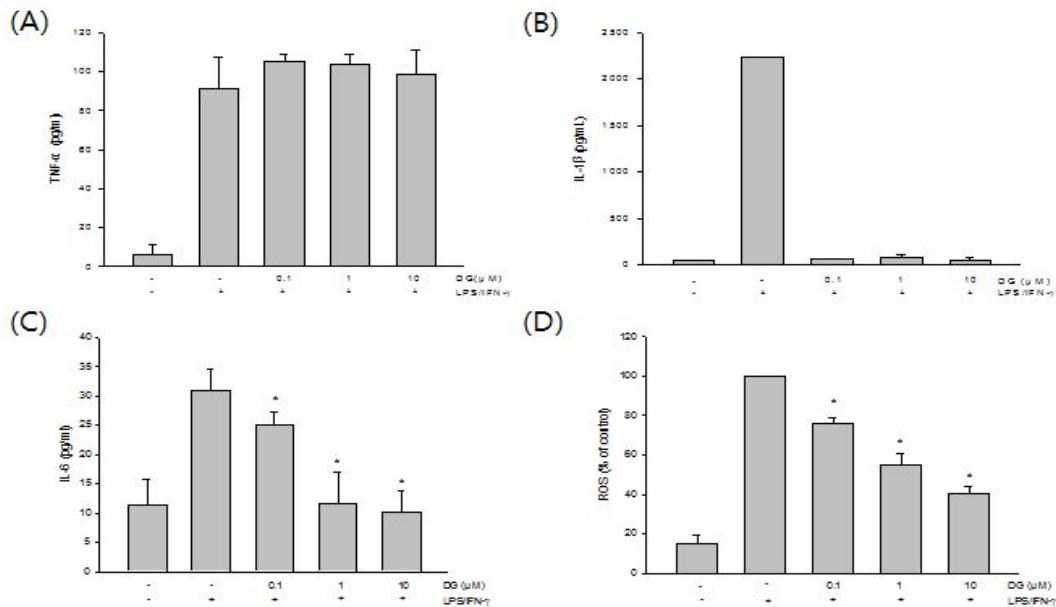


Fig 6. Effects of Diosgenin on the production of cytokines and ROS from RAW 264.7 cells. Cells were stimulated with LPS(1 µg/mL) and IFN-γ(50 U/mL) for 24 h after pre-incubation with indicated concentration of diosgenin for 2 h. The levels of TNF-α (A), IL-1β (B), and IL-6 (C) released from cells were determined by ELISA assay. (D) ROS was measured with flow cytometry analysis. Results are the mean ± S.E. of three experiments. *: significantly different from the group treated with LPS/IFN-γ only at $P < 0.05$.

(3) Diosgenin이 대식세포 내 NF- κ B의 발현 및 활성화에 미치는 영향
 염증반응에 관여하는 전사인자로 알려진 NF- κ B의 발현 및 활성화에 미치는 영향을 확인하고자 세포에 위와 동일한 조건으로 diosgenin을 전처리 한 후 LPS/IFN- γ 와 4시간 배양하여 Luciferase promoter assay를 수행한 결과 NF- κ B의 활성이 감소하였으며 (Fig. 7A) 핵단백질을 분리하여 그 발현을 확인한 결과, LPS/IFN- γ 에 의해 활성화되는 NF- κ B의 단백질 발현이 Diosgenin의 농도에 의존적으로 감소하였다(Fig. 7B). 또한 LPS/IFN- γ 에 의한 I κ B의 Degradation이 diosgenin에 의해 회복됨을 확인하였다(Fig. 7C).

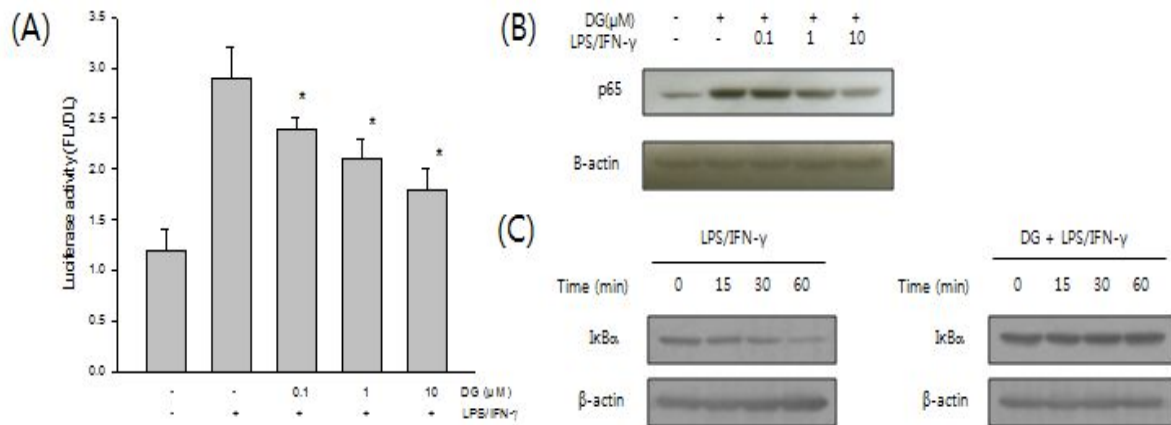


Fig 7. Effects of diosgenin on the activation NF- κ B and I κ B α degradation in LPS/IFN- γ -induced RAW 264.7 cells. (A) Cells were transfected with a pGL3-NF κ B-Luc reporter plasmid and pCMV- β -gal, pretreated with indicated concentration of diosgenin for 2 h before stimulating with LPS(1 μ g/mL) and IFN- γ (50 U/mL) for 4 h. Luciferase activity in the cells was measured. Results are the means \pm S.E. of three experiments. *: significantly different from the group treated with LPS/IFN- γ only at $P < 0.05$. (B) Cells were preincubated with or without diosgenin for 2 h, then treated with LPS(1 μ g/mL) and IFN- γ (50 U/mL) for 4 h. The nuclear protein levels of p65 were monitored by western blotting to analyze the translocation of NF- κ B. (C) Cells were preincubated with or without diosgenin for 2 h, then stimulated with LPS(1 μ g/mL) and IFN- γ (50 U/mL) for the indicated time periods. The whole cell lysates were analyzed by Western blot assay. The results illustrated are from a single experiment, and are representative of three separate experiments.

(4) Diosgenin이 대식세포 내 AP-1의 발현 및 활성화에 미치는 영향

Diosgenin이 AP-1의 발현 및 활성화에 미치는 영향을 확인하고자 위와 동일한 조건으로 세포를 배양하여 Luciferase promoter assay를 수행한 결과 AP-1의 활성이 감소하였으며 (Fig. 8A) 단백질을 분리하여 그 발현을 확인한 결과, LPS/IFN- γ 에 의해 증가하는 c-fos 및 c-jun 단백질의 발현이 diosgenin에 의해 감소하였다(Fig. 8B).

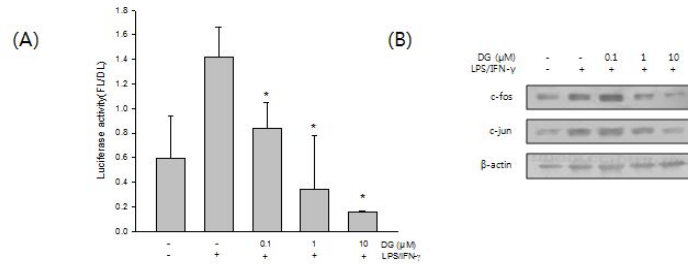


Fig 8. Effects of diosgenin on AP-1 activation c-Jun and c-Fos expression in LPS/IFN- γ -stimulated RAW 264.7 cells. (A) Cells were transfected with a pGL2-AP-1 plasmid and pCMV- β -gal, pretreated with indicated concentration of diosgenin for 2 h before stimulating with LPS(1 μ g/mL) and IFN- γ (50 U/mL) for 4 h. Luciferase activity in the cells was measured. Results are the means \pm S.E. of three experiments. *: significantly different from the group treated with LPS/IFN- γ only at $P < 0.05$. (B) Total protein lysates were isolated and c-Jun and c-Fos levels were detected by Western blotting. The β -actin protein level was considered as an internal control. The results illustrated are from a single experiment, and are representative of three separate experiments.

(5) Diosgenin이 대식세포 내 MAPK 및 CK2 활성화에 미치는 영향

Diosgenin에 의해 대식세포의 nitrite 생성이 억제된 것으로 보아 이와 관련된 신호전달 경로인자로 알려진 MAPK(p38, ERK, JNK)의 발현에 변화가 있을 것으로 사료되어 이들 단백질의 발현 변화를 확인한 결과 JNK의 인산화가 diosgenin에 의해 감소하였으며(Fig. 9A) 염증과 관계된 인자로 알려진 CK2의 발현을 확인한 결과 diosgenin이 CK2a의 핵내 이동을 억제함을 확인하였다(Fig. 9B).

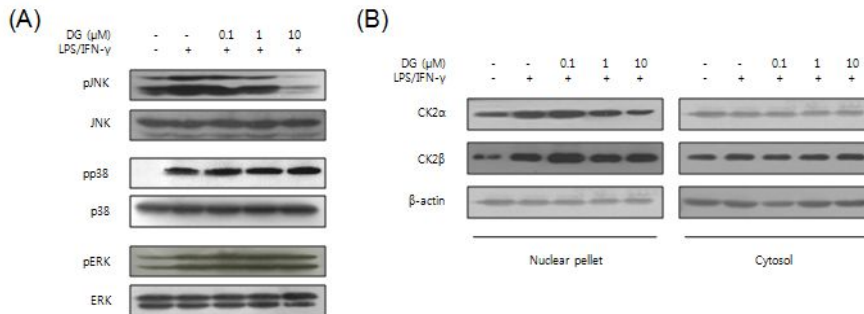


Fig 9. Effects of diosgenin on MAPK activation and CK2 expression in RAW 264.7 cells. (A) Cells were pre-treated with indicated concentrations of diosgenin for 2 h, then treated with LPS(1 μ g/mL) and IFN- γ (50 μ g/mL) for 15 min. The levels of phosphorylated p38 MAPK, JNK and ERK were determined by Western blot analysis with antibodies as indicated. (B) Cells were preincubated with or without diosgenin for 2 h, then stimulated with LPS(1 μ g/mL) and IFN- γ (50 μ g/mL) for 4 h. The nuclear protein levels of CK2 were monitored by western blotting to analyze the its translocation. Results shown are one representative of three independent experiments.

(6) H1/H2가 대식세포의 NO 생성에 미치는 영향

마 추출물인 H1/H2가 대식세포의 NO 생성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 Raw 264.7세포에 H1/H2를 2시간 전처리한 후 LPS, IFN- γ 와 함께 24시간 더 배양하고 나서 상등액을 취하여 상등액 내 nitrite양을 확인한 결과 NO의 생성이 H1/H2에 의해 감소하였으며(Fig.

10A-B) iNOS의 mRNA 및 단백질 발현 또한 감소함을 확인하였다(Fig. 10C-F).

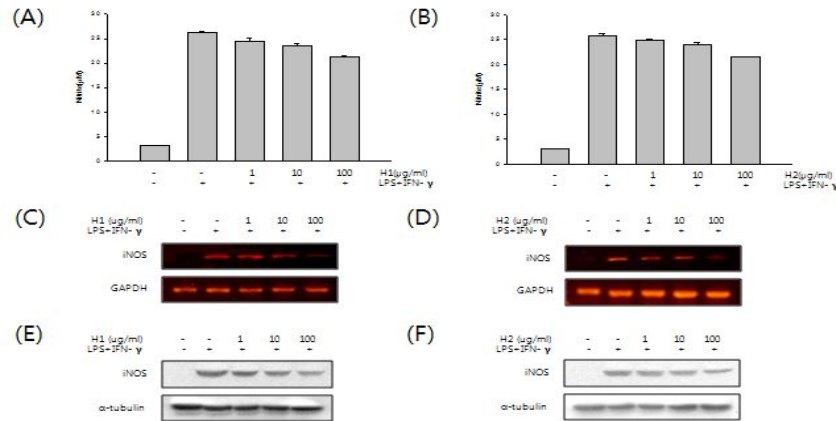


Fig 10. Effects of H1/H2 on the LPS/IFN- γ -induced NO production in macrophages. RAW 264.7 cells were pre-treated with indicated concentration of H1 or H2 for 2 h, then incubated for 24 h in the presence of 1 μ g/mL of LPS and 50 μ mL of IFN- γ . (A & B) Culture supernatants were collected and the level of Nitrite was obtained by the Griess method. mRNA (C & D) and protein (E & F) levels of iNOS were determined by PCR and Western blot analyses, respectively. Results are the means \pm S.E. of three experiments. *: significantly different from the group treated with LPS/IFN- γ only at $P < 0.05$.

(7) H1/H2가 대식세포 내 NF- κ B의 발현에 미치는 영향

H1/H2가 NF- κ B의 발현 및 활성화에 미치는 영향을 확인하고자 세포에 위와 동일한 조건으로 H1/H2를 전처리 한 후 LPS/IFN- γ 와 함께 4시간 배양한 뒤 핵단백질을 분리하여 그 발현을 확인한 결과, LPS/IFN- γ 에 의해 활성화되는 NF- κ B의 단백질 발현이 감소함을 확인하였다(Fig. 11A-B). 또한 LPS/IFN- γ 에 의한 I κ B의 degradation이 H1/H2에 의해 회복되는 것이 관찰되었다(Fig. 11C).

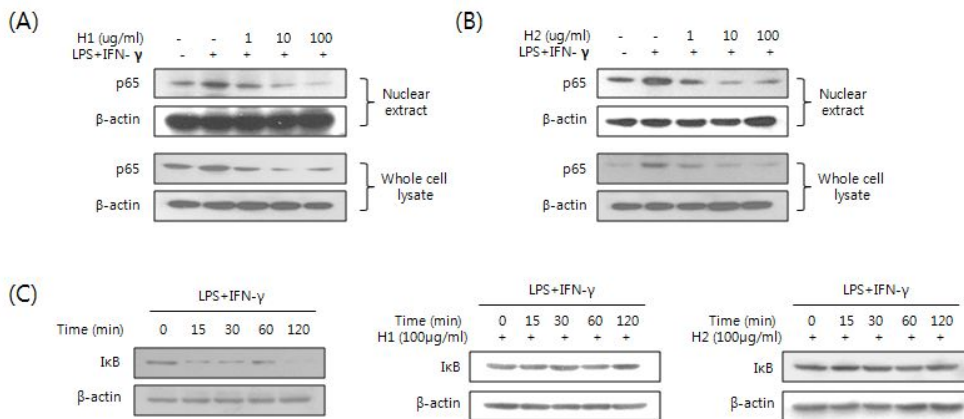


Fig 11. Effects of H1/H2 on the activation NF- κ B and I κ B α degradation in LPS/IFN- γ -induced RAW 264.7 cells. Cells were preincubated with or without H1 (A)/H2 (B) for 2 h, then treated with LPS(1 μ g/mL) and IFN- γ (50 μ mL) for 4 h. The whole cell protein and the nuclear protein levels of p65 were monitored by western blotting to analyze the translocation of NF- κ B. (C) Cells were preincubated with or without H1/H2 for 2 h, then stimulated with LPS(1 μ g/mL) and IFN- γ (50 μ mL) for the indicated time periods. The whole cell lysates were analyzed by Western blot assay. The results illustrated are from a single experiment, and are representative of three separate experiments.

(8) H1/H2가 대식세포 내 MAPK의 활성화에 미치는 영향

H1/H2에 의해 대식세포의 nitrite 생성이 억제된 것으로 보아 이와 관련된 신호전달 경로인 자로 알려진 MAPK(p38, ERK, JNK)의 발현에 변화가 있을 것으로 사료되어 이들 단백질의 발현 변화를 확인한 결과 MAPK의 인산화가 H1/H2에 의해 감소함을 확인하였다(Fig. 12).

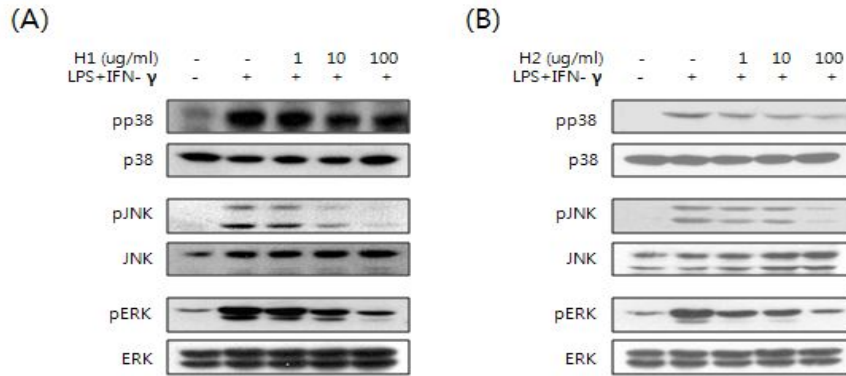


Fig 12. Effects of H1/H2 on MAPK activation in RAW 264.7 cells. Cells were pre-treated with indicated concentrations of H1 (A)/H2 (B) for 2 h, then treated with LPS(1 µg/mL) and IFN-γ(50 U/mL) for 15 min. The levels of phosphorylated p38 MARK, JNK and ERK were determined by Western blot analysis with antibodies as indicated. Results shown are one representative of three independent experiments.

다. 마 유래 성분 에 의한 맥관평활근세포의 기능 변화

(1) Diosgenin에 의한 맥관평활근세포 표면의 세포부착분자 발현 변화

염증반응은 혈관내피세포, 상피세포 혹은 맥관평활근세포에서 발현되는 세포부착분자와 이에 반응하는 면역세포의 부착분자 사이의 발현조절과 결합/친화력의 변화에 의해서 일어난다. Diosgenin 이 이러한 염증반응에 미치는 영향을 확인하고자 맥관평활근세포에 diosgenin을 농도별로 2시간 전 처리한 후 TNF-α로 세포부착물질의 발현을 유도하여 ELISA assay를 통해 세포 표면의 CAM 발현을 측정 한 결과, ICAM-1과 VCAM-1의 발현이 세포표면에서 감소하였으며 (Fig. 13A-B) 이들의 mRNA 및 단백질 발현 또한 diosgenin에 의해 감소함을 확인하였다(Fig. 13D-E).

(2) Diosgenin에 의한 세포부착분자의 발현 조절이 monocyte의 결합에 미치는 영향

Diosgenin에 의한 세포부착분자의 발현 억제를 확인하고자 맥관평활근세포에 THP-1세포를 부착시킨 결과 TNF-α에 의해 유도된 세포부착분자에 결합하는 THP-1 세포의 수가 diosgenin의해 감소함을 확인하였다(Fig. 14).

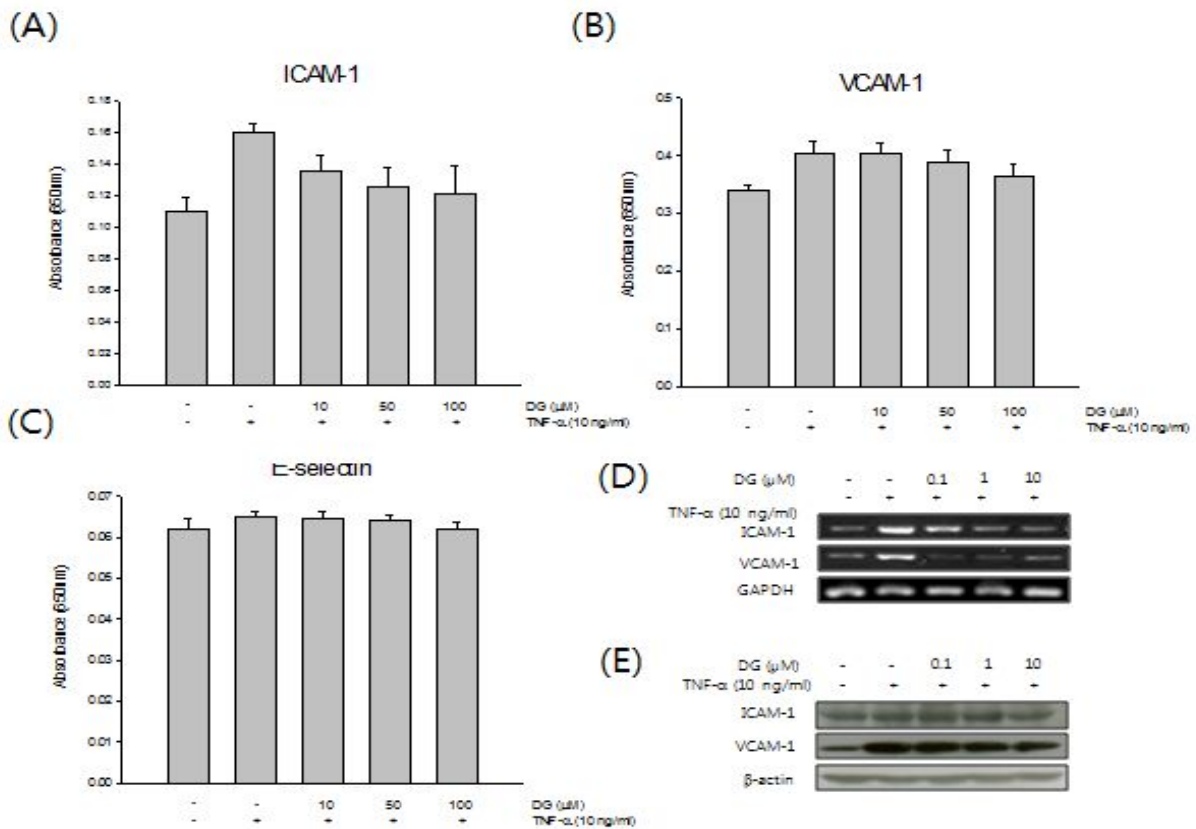


Fig 13. Expression of cell adhesion molecules on the surface of MOVAS after treatment with diosgenin. Cells were pre-treated of 2 h with indicated concentrations of diosgenin, then stimulated with TNF- α (10 ng/mL). After incubating with TNF- α , expressions of ICAM-1 (A), VCAM-1 (B) AND E-selectin (C) on cell surface were measured by ELISA assay. Absorbance of each well was quantified in a microplate reader at 650nm. mRNA (D) and protein (E) levels of adhesion molecules were determined by PCR and Western bolt analyses, respectively. Results shown are mean \pm S.E. of three independent experiments. *: significantly different from the group treated with TNF- α only at $P < 0.05$.

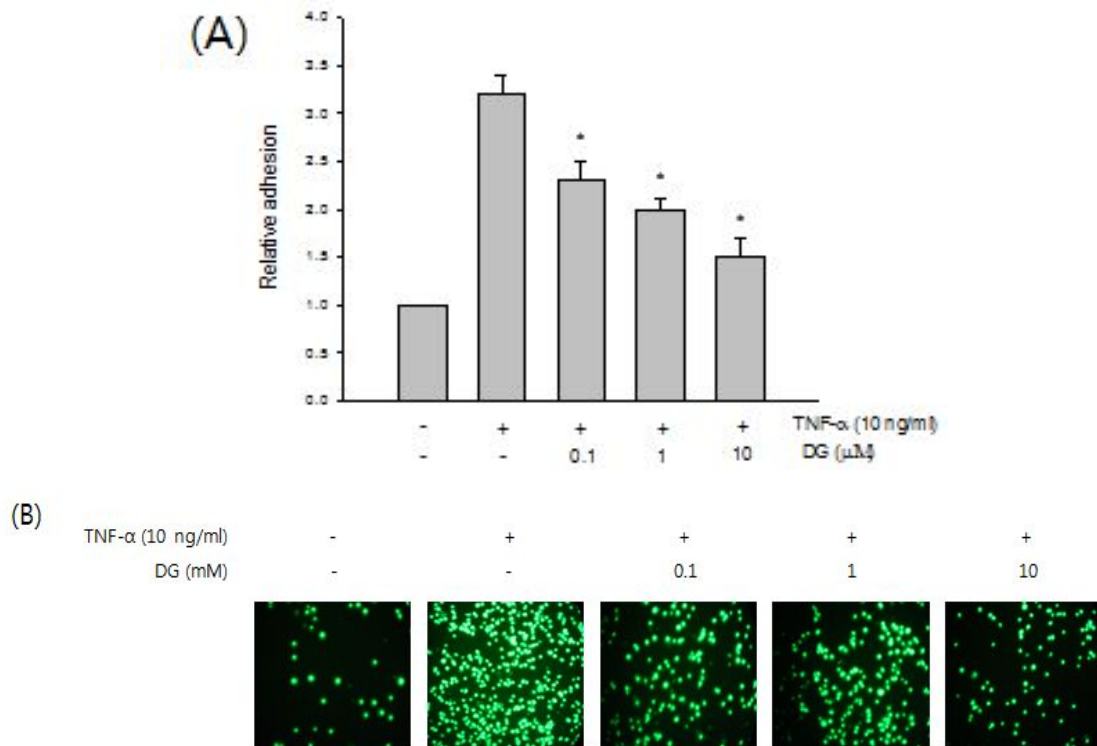


Fig 14. Inhibition of adhesion of THP-1 cell to TNF- α -stimulated VSMCs by diosgenin. Confluent VSMCs were pretreated for 2 h with indicated concentrations of diosgenin, then stimulated with TNF- α (10 ng/mL) for 12 h. The BCECF-labeled THP-1 cells were added to the VSMC monolayer and allowed to adhere for 1 hr. (A) The adhesion was determined by measuring the fluorescence intensity. (B) Adherent THP-1 to VSMCs was observed under a fluorescent microscope at 200 \times magnification. Results shown are mean \pm S.E. of three independent experiments. *: significantly different from the group treated with TNF- α only at $P < 0.05$.

(3) Diosgenin이 맥관평활근세포 내 NF- κ B의 발현 및 활성화에 미치는 영향

TNF- α 자극에 의한 신호전달에 관여하는 전사인자로 알려진 NF- κ B의 단백질 발현 및 활성화에 미치는 영향을 확인하고자 luciferase promoter assay를 수행하였다. 그 결과 TNF- α 에 의해 활성화되는 NF- κ B의 promoter activity 및 단백질의 발현이 감소하였으며(Fig. 15A-B), TNF- α 에 의한 I κ B의 degradation 또한 diosgenin에 의해 회복됨을 확인하였다(Fig. 15C).

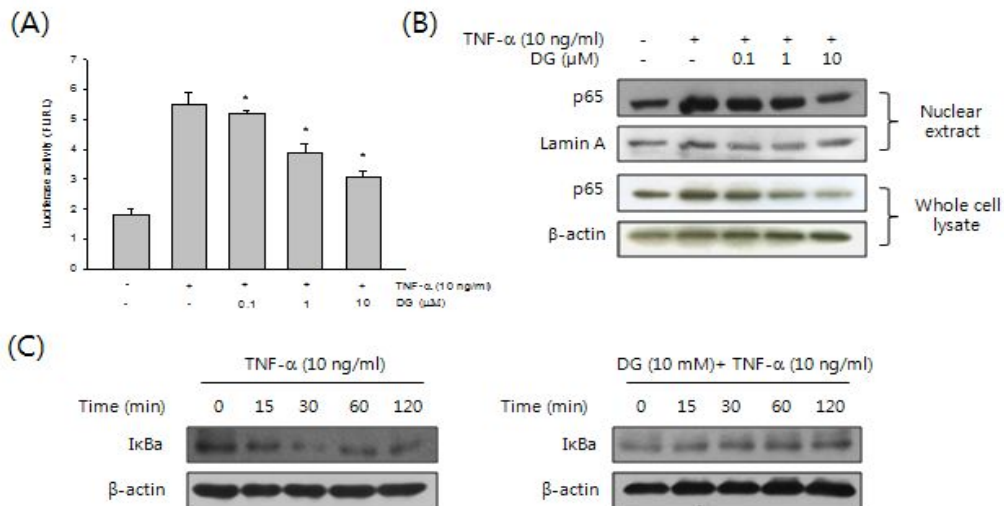


Fig 15. Effects of diosgenin of NF- κ B and I κ B α degradation in TNF- α -stimulated VSMCs. (A) Cells were transfected with a pGL3-NF κ B-Luc reporter plasmid and pCMV- β -gal, pretreated with various concentrations of diosgenin for 2 h before stimulating with TNF- α (10 ng/mL) for 4 h. Luciferase activity in the cells was measured. Results are the means \pm S.E. of three experiment. *: significantly different from the group treated with TNF- α only at $P < 0.05$. (B) Cells were preincubated with or without diosgenin for 2 h, then treated with TNF- α (10 ng/mL) for 4 h. The nuclear protein levels of p65 were monitored by western blotting to analyze the translocation of NF- κ B. (C) Cells were preincubated with or without diosgenin for 2 h, then stimulated with TNF- α (10 ng/mL) for the indicated time periods. The whole cell lysates were analyzed by Western blot assay.

(4) Diosgenin이 맥관평활근세포 내 MAPK 및 Akt의 활성화에 미치는 영향

Diosgenin에 의한 맥관평활근세포 내 MAPK활성 및 Akt의 활성을 western blot analysis를 통해 확인한 결과, diosgenin이 MAPK 및 Akt의 인산화를 모두 감소시킴을 확인하였다(Fig. 16).

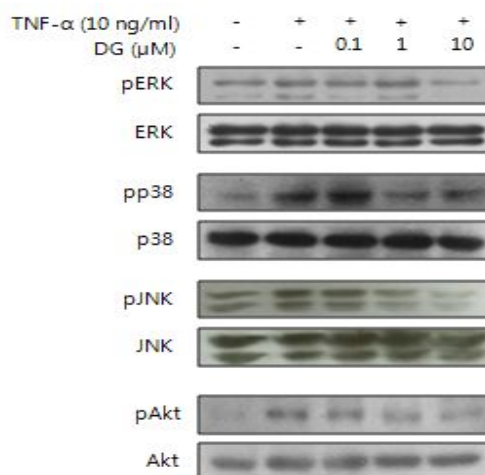


Fig. 16. Effects of diosgenin on MAPK and Akt activation in TNF- α -stimulated VSMCs. Cells were pretreated with the indicated concentration of diosgenin for 2 h, and then incubated with TNF- α (10 ng/mL) for 15 min. The whole cell lysates were analyzed by Western blot. A typical result from three independent experiments is shown.

(5) Diosgenin에 의한 맥관평활근세포 내 ROS 생성조절이 세포부착분자 발현에 미치는 영향
 TNF- α 에 의한 ROS의 생성이 NF- κ B 활성화에 관여하므로 Diosgenin이 맥관평활근세포 내 ROS 생성에 관계할 것으로 사료되어 FACS analysis를 수행하였다. 그 결과 TNF- α 에 의해 증가된 ROS가 Diosgenin에 의해 감소하였으며(Fig. 17A) ROS를 억제하는 것으로 잘 알려진 항산화제, NAC, 처리시 세포부착분자의 발현이 감소하는 것으로 보아(Fig. 17B) diosgenin에 의한 맥관평활근세포 내 ROS 생성 억제가 세포부착분자 발현 억제에 관여할 것으로 사료된다.

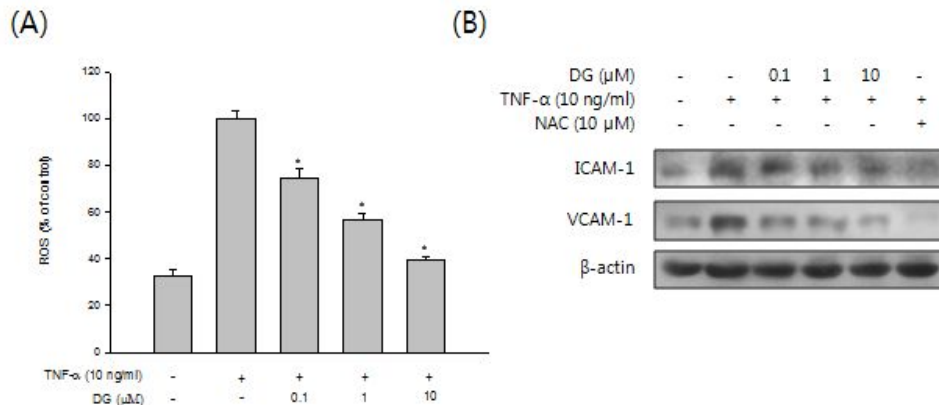


Fig 17. Effects of diosgenin on the production of ROS in TNF- α -stimulated VSMCs and its involvement in the suppression of CAM expression. (A) Cell were treated with diosgenin at the concentrations indicated for 2 h followed by stimulation with TNF- α (10 ng/mL) FOR 30 min. The level of ROS was measured by flow cytometry. (B) The protein levels of CAM suppressed by diosgenin were compared to the CAM levels suppressed by NAC, a well-known antioxidant that is reported to efficiently reduce the expression of adhesion molecules. Results shown are mean \pm S.E. of three independent experiment. *: significantly different from the group treated with TNF- α only at $P < 0.05$.

(6) 영여자에 의한 맥관평활근세포 표면의 세포부착분자 발현 변화

영여자가 맥관평활근세포 내 염증반응에 미치는 영향을 확인하고자 영여자를 농도별로 2시간 전 처리한 후 TNF- α 로 세포부착물질의 발현을 유도하였다. ELISA assay를 통해 세포 표면의 VCAM-1 발현을 측정된 결과, 영여자에 의해 세포표면의 VCAM-1 발현이 감소하였으며(Fig. 18A) 세포부착분자의 mRNA 및 단백질 발현 또한 감소함을 확인하였다(Fig. 18B-C).

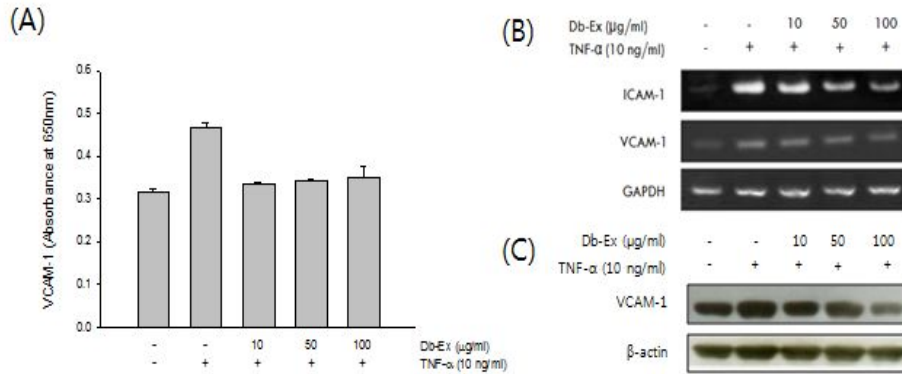


Fig 18. Expression of cell adhesion molecules on the surface of MOVAS after treatment with Db-Ex. Cells were pre-treated for 2 h with indicated concentrations of Db-Ex, then stimulated with TNF- α (10 ng/mL). After incubating with TNF- α , expressions of VCAM-1 (A) on cell surface were measured by ELISA assay. Absorbance of each well was quantified in a microplate reader at 650 nm. mRNA (B) and protein (C) levels of adhesion molecules were determined by PCT and Western blot analyses, respectively. Results shown are mean \pm S.E. of three independent experiments. *: significantly different from the group treated with TNF- α only at $P < 0.05$.

(7) 영여자에 의한 세포부착분자 발현 조절이 monocyte의 결합에 미치는 영향

영여자에 의한 VCAM-1의 발현 감소가 맥관평활근세포와 monocytes간의 결합에 영향을 미치는지 확인하고자 adhesion assay를 수행하였다. 그 결과, VCAM-1발현으로 인한 monocyte의 결합이 영여자에 의해 감소됨을 확인하였다(Fig. 19).

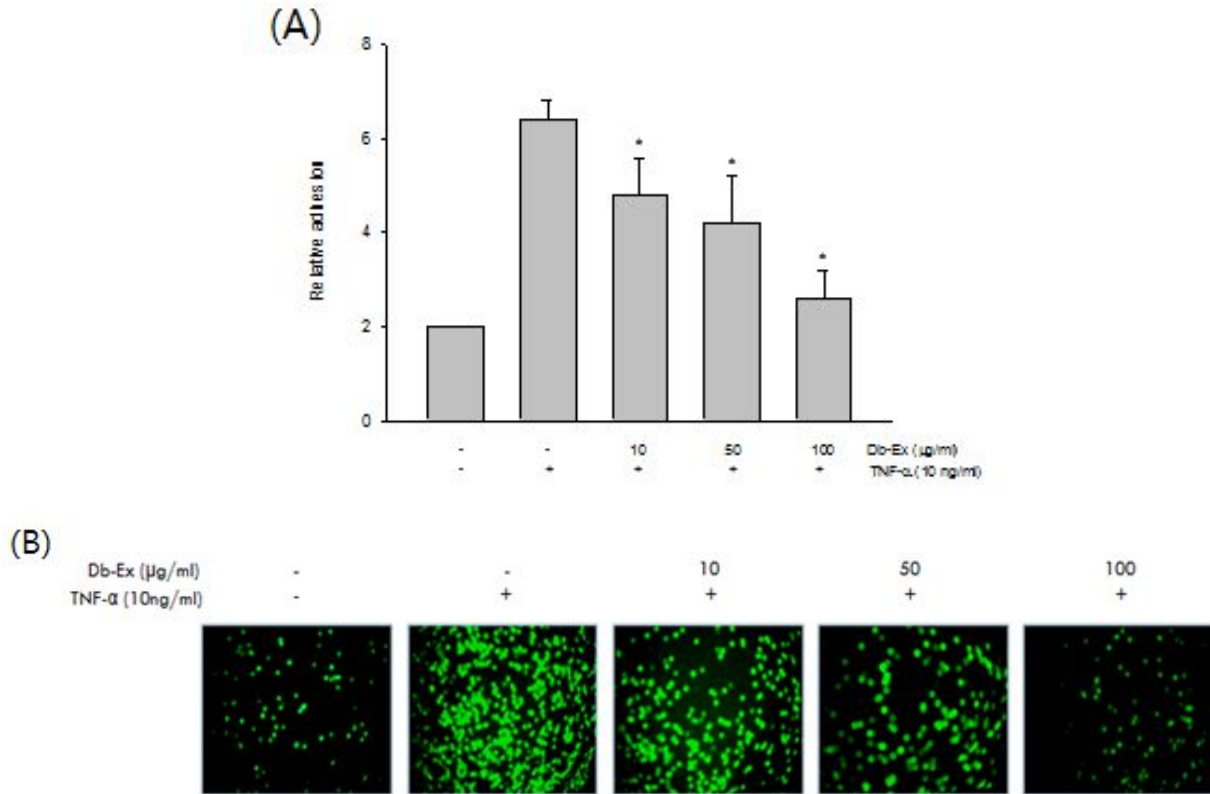


Fig 19. Inhibition of adhesion of THP-1 cell to TNF- α -stimulated VSMCs by Db-Ex. Confluent VSMCs were pretreated for 2 h with indicated concentrations of Db-Ex, then stimulated with TNF- α (10 ng/mL) for 12 h. The BCECF-labeled THP-1 cells were added to the VSMC monolayer and allowed to adhere for 1 hr. (A) The adhesion was determined by measuring the fluorescence intensity. (B) Adherent THP-1 to VSMCs was observed under a fluorescent microscope at 200 \times magnification. Results shown are mean \pm S.E. of three independent experiments. *: significantly different from the group treated with TNF- α only at $P < 0.05$.

(8) 영여자가 맥관평활근세포 내 NF-κB의 발현 및 활성화에 미치는 영향

영여자가 맥관평활근세포 내 NF-κB의 단백질 발현 및 활성화에 미치는 영향을 확인하고자 luciferase promoter assay를 수행하였다. 그 결과 TNF-α에 의해 활성화되는 NF-κB의 promoter activity 및 핵내 단백질의 발현이 감소하였으며(Fig. 20A-B), TNF-α에 의한 IκBα의 degradation 또한 회복됨을 확인하였다(Fig. 20C).

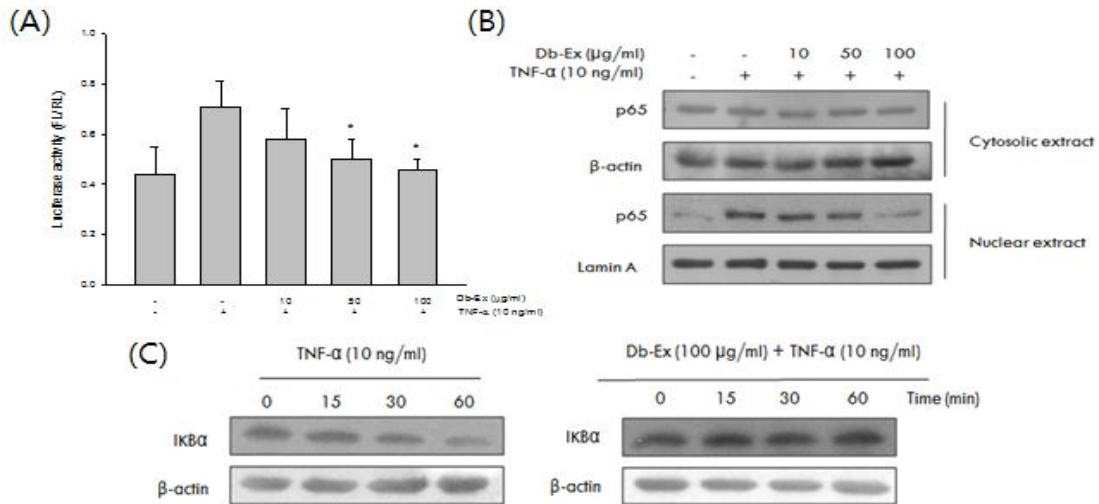


Fig. 20. Effects of Db-EX on NF-κB and IκBα degradation in TNF-α-stimulated VSMCs. (A) Cells were transfected with a pGL3-NFκB-Luc reporter plasmid and pCMV-β-gal, pretreated with various concentrations of Db-EX for 2 h before stimulating with TNF-α (10 ng/mL) for 4 h. Luciferase activity in the cells was measured. Results are the means ± S.E. of three experiments. *: significantly different from the group treated with TNF-α only at $P < 0.05$. (B) Cells were preincubated with or without Db-EX for 2 h, then treated with TNF-α (10 ng/mL) for 4 h. The nuclear protein levels of p65 were monitored by western blotting to analyze the translocation of NF-κB. (C) Cells were preincubated with or without Db-EX for 2 h, then stimulated with TNF-α (10 ng/mL) for the indicated time periods. The whole cell lysates were analyzed by Western blot assay.

(9) 영여자가 맥관평활근세포 내 MAPK 및 Akt의 활성화에 미치는 영향

영여자에 의해 맥관평활근세포의 세포표면부착분자 발현이 억제된 것으로 보아 이와 관련된 신호 전달 경로인자로 알려진 MAPK 및 Akt의 활성화에 변화가 있을 것으로 사료되어 western blotting을 통해 확인한 결과, 영여자가 MAPK 및 Akt의 인산화를 모두 감소시킴을 확인하였다(Fig. 21).

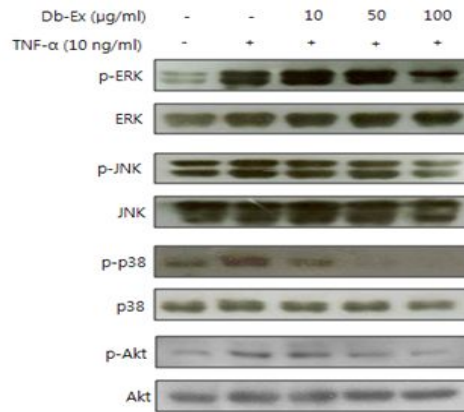


Fig. 21. Effects of Db-EX on MAPK and Akt activation in TNF- α -stimulated VSMCs. Cell were pretreated with the indicated concentration of Db-EX for 2 h, and then incubated with TNF- α (10 ng/mL) for 15 min. The whole cell lysates were analyzed by Western blot. A typical result from three independent experiments is shown.

(10) 영여자에 의한 맥관평활근세포 내 ROS 생성 조절이 세포부착분자 발현에 미치는 영향

영여자가 TNF- α 에 의해 생성된 ROS의 변화에 관여하는지 확인하고자 FACs analysis를 수행한 결과 영여자에 의해 ROS가 감소하였으며(Fig. 22A), ROS를 억제하는 것으로 잘 알려진 항산화제, NAC, 처리시 세포부착분자의 발현이 감소하는 것으로 보아(Fig. 22B) 영여자에 의한 맥관평활근세포 내 ROS 생성 억제가 세포부착분자 발현 억제에 관여할 것으로 사료된다.

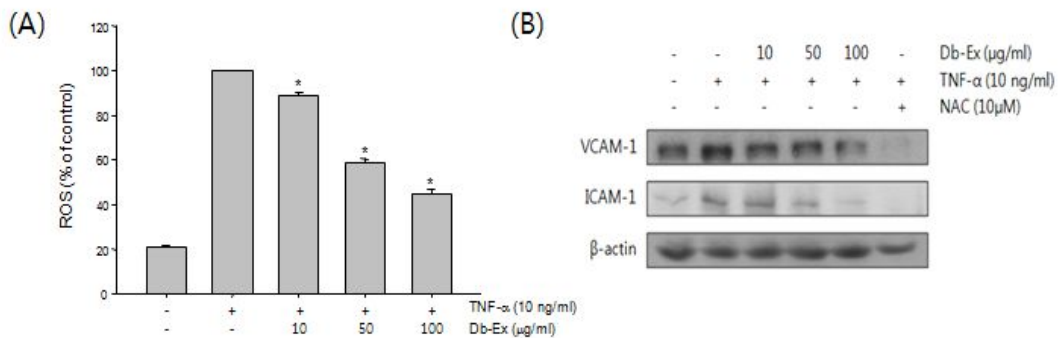


Fig. 22. Effects of Db-EX on the production of ROS in TNF- α -stimulated VSMCs and its involvement in the suppression of CAM expression. (A) Cell were treated with Db-EX at the concentrations indicated for 2 h followed by stimulation with TNF- α (10 ng/mL) for 30 min. The level of ROS was measured by flow cytometry. (B) The protein levels of CAM suppressed by Db-EX were compared to the CAM levels suppressed known antioxidant that is reported to efficiently reduce the expression of adhesion molecules. Results shown are mean \pm S.E. of three independent experiments. *: significantly different from the group treated with TNF- α only at $P < 0.05$.

(11) H1/H2에 의한 맥관평활근세포 표면의 세포부착분자 발현 변화

마 추출물인 H1/H2가 맥관평활근세포 내 염증반응에 미치는 영향을 확인하고자 H1/H2를 농도별로 2시간 전처리한 후 TNF- α 로 세포부착물질의 발현을 유도하였다. ELISA assay를 통해 세포 표면의 VCAM-1 발현을 측정된 결과, H1/H2에 의해 그 발현이 감소하였으며(Fig. 23A-B) 세포부착분자의 mRNA 및 단백질 발현 또한 감소함을 확인하였다(Fig. 23C-F).

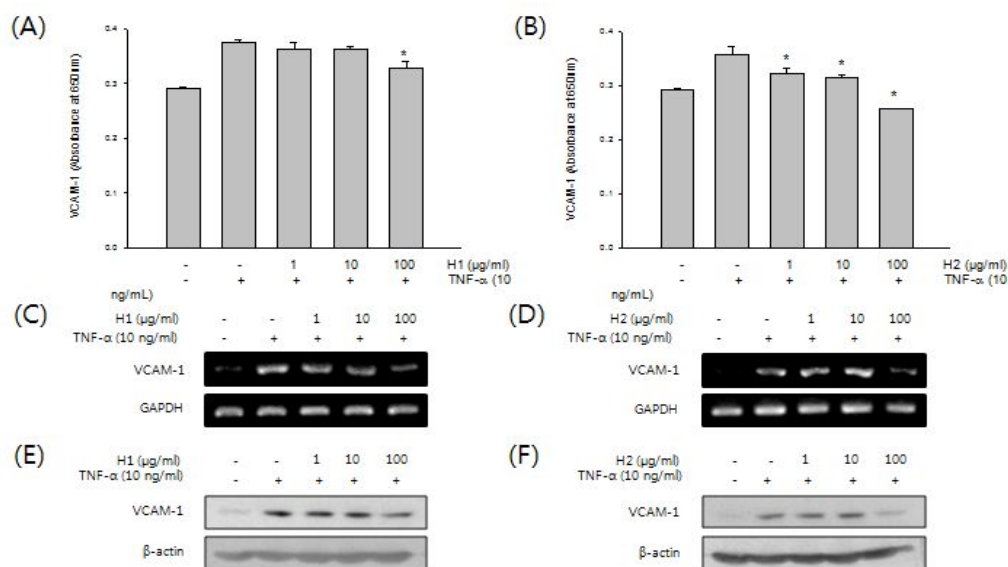


Fig. 23. Expression of cell adhesion molecules on the surface of MOVAS after treatment with H1/H2. Cell were pre-treated for 2 h with indicated concentrations of H1 or H2, then stimulated with TNF- α (10 ng/mL). After incubating with TNF- α , expressions of VCAM-1 (A & B) on cell surface were measured by ELISA assay. Absorbance of each well was quantified in a microplate reader at 650 nm. mRNA (C & D) and protein (E & F) levels of adhesion molecules were determined by PCR and Western blot analyses, respectively. Results shown are mean \pm S.E. of three independent experiments. *: significantly different from the group treated with TNF- α only at $P < 0.05$.

(12) H1/H2에 의한 세포부착분자 발현 조절이 monocyte의 결합에 미치는 영향

H1/H2에 의한 VCAM-1의 발현 감소가 맥관평활근세포와 monocytes간의 결합에 영향을 미치는지 확인하고자 adhesion assay를 수행하였다. 그 결과, VCAM-1발현으로 인한 monocyte의 결합이 H1/H2에 의해 감소됨을 확인하였다(Fig. 24).

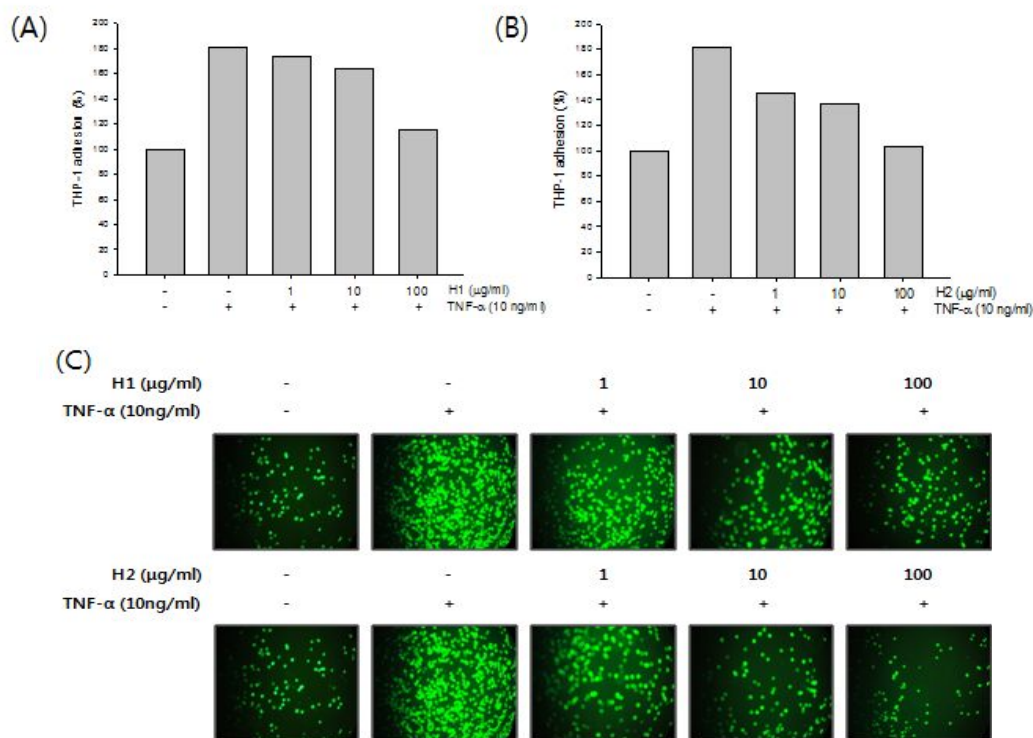


Fig. 24. Inhibition of adhesion of THP-1 cell to TNF- α -stimulated VSMCs by H1/H2. Confluent VSMCs were pretreated for 2 h with indicated concentrations of H1 (A) or H2 (B), then stimulated with TNF- α (10 ng/mL) for 12 h. The BCECF-labeled THP-1 cell were added to the VSMC monolayer and allowed to adhere for 1 hr. The adhesion was determined by measuring the fluorescence intensity. (C) Adherent THP-1 to VSMCs was observed under a fluorescent microscope at 200 \times magnification. A typical result from three independent experiments is shown.

(13) H1/H2가 맥관평활근세포 내 NF-κB의 발현 및 활성화에 미치는 영향

영역자가 맥관평활근세포 내 NF-κB의 단백질 발현 및 활성화에 미치는 영향을 확인하고자 luciferase promoter assay를 수행하였다. 그 결과 TNF-α에 의해 활성화되는 NF-κB의 promoter activity 및 핵내 단백질의 발현이 감소하였으며(Fig. 25A-B), TNF-α에 의한 IκB의 degradation 또한 회복됨을 확인하였다(Fig. 25C).

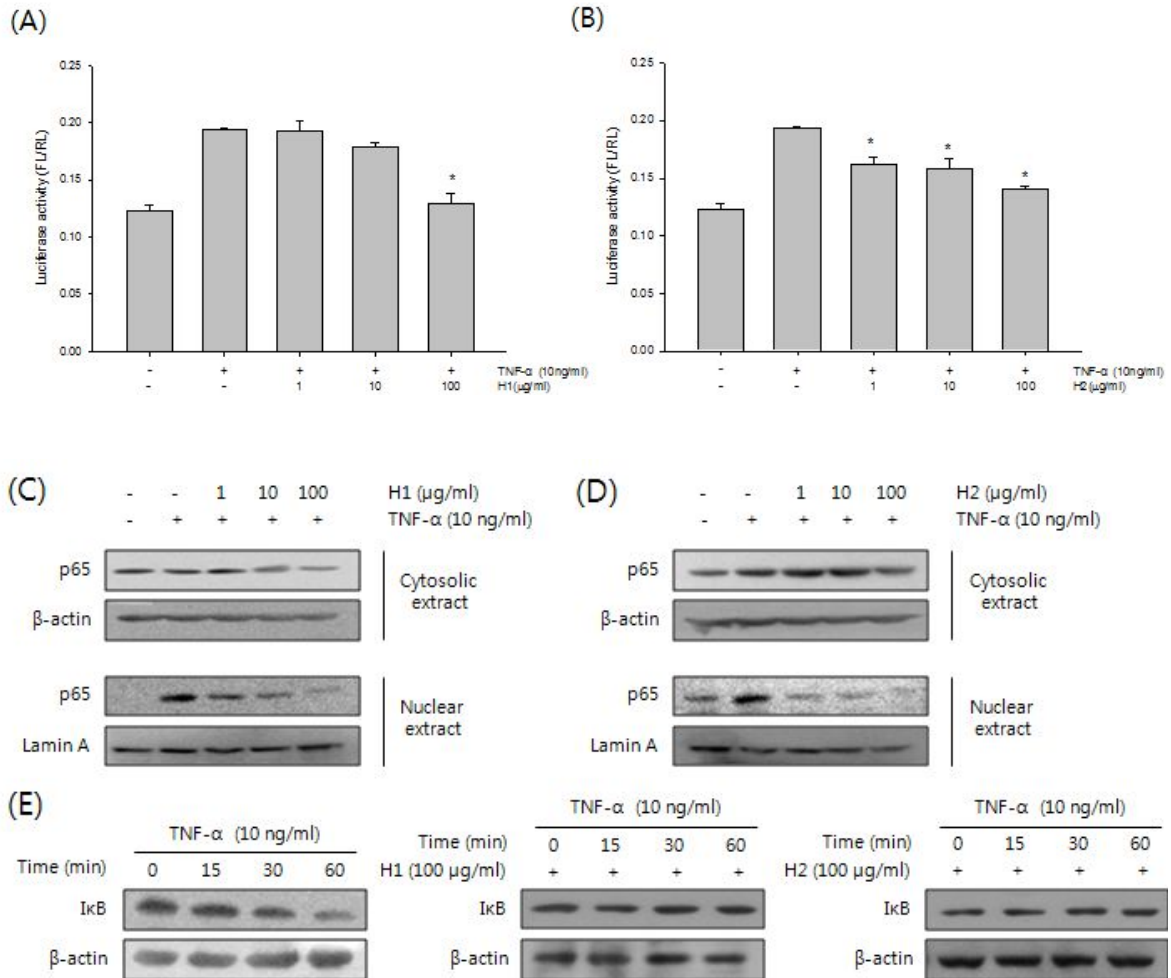


Fig. 25. Effects of H1/H2 on NF-κB and IκBα degradation in TNF-α-stimulated VSMCs. (A & B) Cells were transfected with a pGL3-NFκB-Luc reporter plasmid and pCMV-β-gal, pretreated with various concentrations of H1/H2 for 2 h before stimulating with TNF-α (10 ng/mL) for 4 h. Luciferase activity in the cells was measured. Results are the means ± S.E. of three experiments. *: significantly different from the group treated with NTF-α only at $P < 0.05$. (C & D) Cells were preincubated with or without H1/H2 for 2 h, then treated with TNF-α (10 ng/mL) for 4 h. The nuclear protein levels of p65 were monitored by western blotting to analyze the translocation of NF-κB. (E) Cells were preincubated with or without H1/H2 for 2 h, then stimulated with TNF-α (10 ng/mL) for the indicated time periods. The whole cell lysates were analyzed for IκBα degradation by Western blot assay.

(14) H1/H2가 맥관평활근세포 내 MAPK 및 Akt의 활성화에 미치는 영향

H1/H2에 의해 맥관평활근세포의 세포표면부착분자 발현이 억제된 것으로 보아 이와 관련된 신호 전달 경로인자로 알려진 MAPK 및 Akt의 활성화에 변화가 있을 것으로 사료되어 western blotting을 통해 확인한 결과, H1/H2가 MAPK 및 Akt의 인산화를 모두 감소시킴을 확인하였다(Fig. 26).

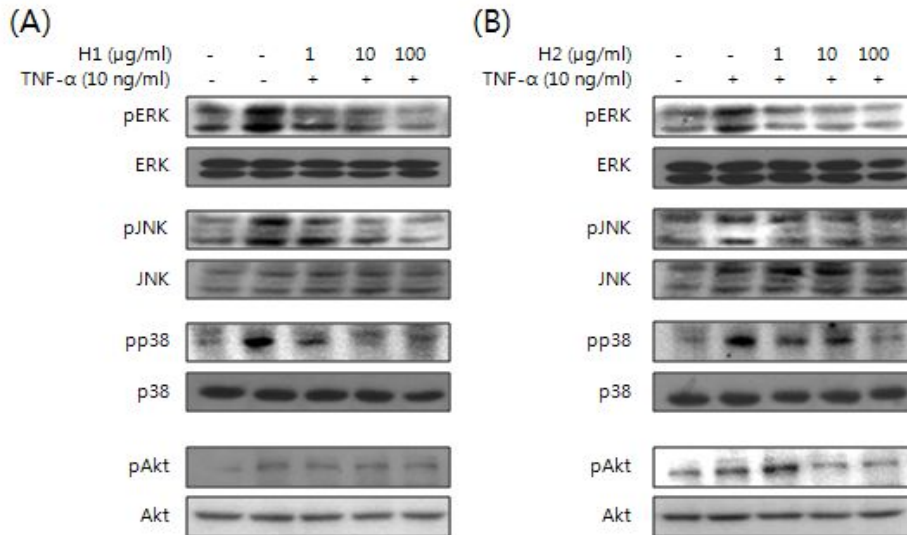


Fig. 26. Effects of H1/H2 on MAPK and Akt activation in TNF- α -stimulated VSMCs. Cells were pretreated with the indicated concentration of H1 (A) or H2 (B) for 2 h, and then incubated with TNF- α (10 ng/mL) for 15 min. The whole cell lysates were analyzed by Western blot. A typical result from three independent experiments is shown.

(15) H1/H2에 의한 맥관평활근세포 내 ROS 생성 조절이 세포부착분자 발현에 미치는 영향

TNF- α 에 의해 생성된 ROS가 세포부착분자 발현에 관여하는지 확인하고자 ROS를 억제하는 것으로 잘 알려진 항산화제, NAC, 처리하여 세포부착분자의 발현을 확인한 결과 H1/H2와 NAC에 의해 그 발현이 감소함을 확인하였다(Fig. 27). 따라서 H1/H2에 의한 맥관평활근세포 내 ROS 생성 억제가 세포부착분자 발현 억제에 관여할 것으로 사료된다.

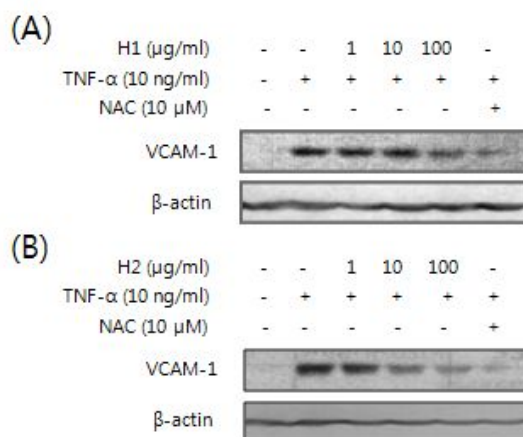


Fig. 27. Involvement of ROS in suppression of VCAM-1 by H1/H2. Cells were treated with H1 (A) or H2 (B) at the concentrations indicated for 2 h followed by stimulation with TNF- α (10 ng/mL). The protein levels of CAM suppressed by H1/H2 were compared to the CAM levels suppressed by NAC, a well-known antioxidant that is reported to efficiently reduce the expression of adhesion molecules. A typical result from three independent experiments is shown.

라. 마 유래 성분의 항염증 효능 - 족부종 억제 효과

마 유래 성분의 항염증 효능을 동물모델에서 확인하고자 부종실험을 수행하였다. 그 결과 carrageenan에 의해 생성된 족 부종의 크기가 diosgenin, 영여자, H1/H2에 의해 감소함을 확인하였다(Fig. 28).

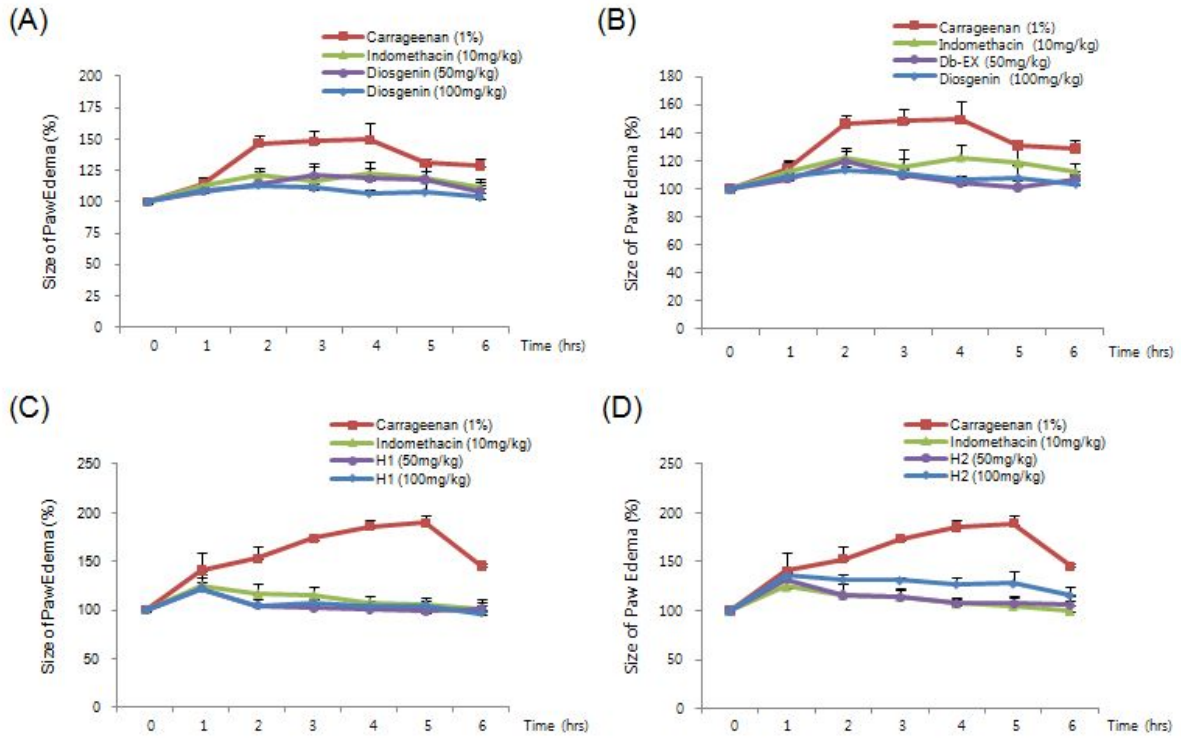


Fig. 28. Effects of bioactive components of yam on the carrageenin-induced paw edema in the rat. Indicated concentrations of diosgenin (A), Db-Ex (B), H1 (C), H2 (D) or the vehicle were administrated intraperitoneally 30 min prior to the carrageenan (1%) injection. Rats were evaluated for indicated time periods. The values represent the mean changes in the paw volume \pm SD (n=6).

다. 마 유래 성분의 항알레르기 효능 - 아토피성 피부염 억제 효능

(1) Diosgenin에 아토피성 피부염에 미치는 영향

Diosgenin의 항알레르기 효능을 확인하고자 아토피성 피부질환이 유발된 마우스에 diosgenin을 경피 도포하여 피부의 변화를 관찰한 결과 염증, 홍반, 가피탈피 등의 아토피성 피부질환이 개선됨을 확인하였다(Fig. 29).

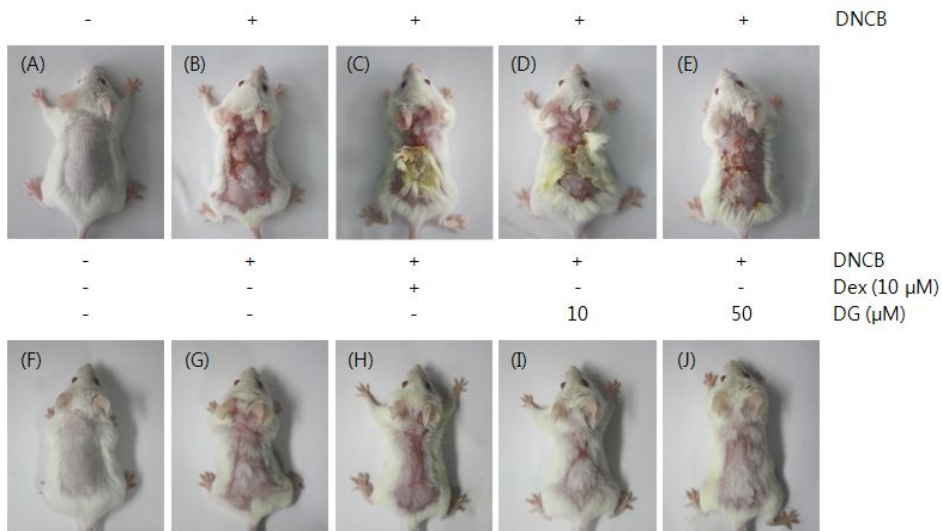


Fig. 29. Atopic dermatitis (AD)-like skin lesions and improvement of skin condition after treatment with diosgenin. AD-like skin lesions were induced by topical application of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (DNCB) for 4 time (B-E), and diosgenin application improved the skin condition (G, treatment with PBS; H, treatment with dexamethasone; I, treatment with 50 μM of diosgenin; J, treatment with 100 μM of diosgenin). Dex, dexamethasone.

(2) Diosgenin이 아토피성 피부염 표지인자에 미치는 영향

아토피성 피부질환의 대표적인 증상인 소양감에 의한 긁는 행동을 관찰한 결과 PBS만 도포한 음성대조군에 비하여 50 μ M의 diosgenin을 도포한 군에서 긁는 횟수가 감소하였으며(Fig. 30A) IgE 생성에 중요한 역할을 하는 IL-4의 생성 또한 음성대조군에 비하여 diosgenin을 처리한 군에서 그 수치가 현저하게 감소함을 확인하였다(Fig. 30B). 또한, 아토피성 피부질환의 대표적인 지표인 혈청 내 IgE 수치를 ELISA assay를 통하여 확인한 결과 diosgenin에 의해 그 수치가 감소함을 확인하였다(Fig. 30C).

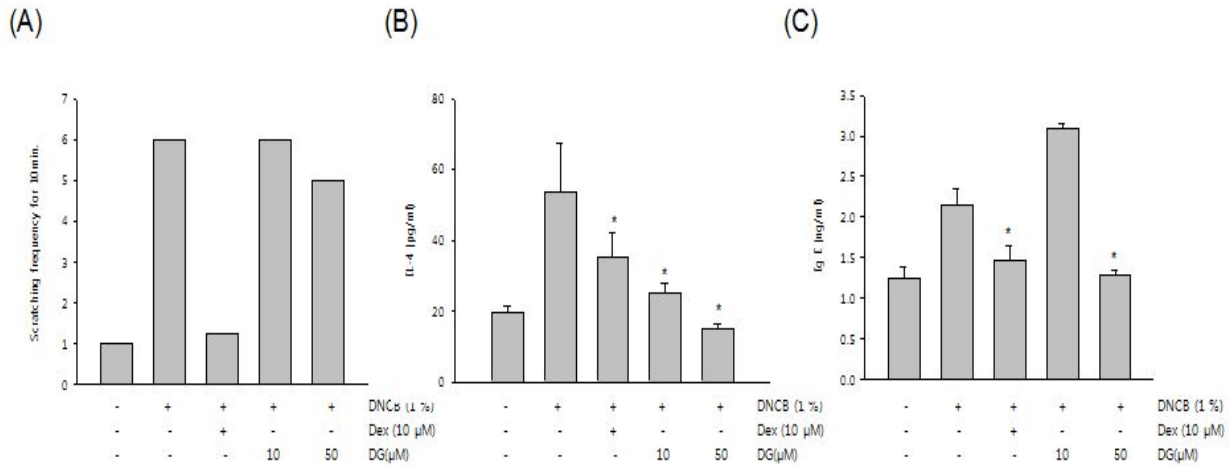


Fig. 30. Inhibitory effects of diosgenin on scratching behaviors, levels of IL-4 and IgE induced by 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (DNCB). (A) Scratching behavior was observed after completion of all treatments. In brief, the number of scratching behaviors was counted for 10 minutes. Measurement was repeated for five times (50 minutes in total). Dex, dexamethasone. (B) After completion of all treatments, splenocytes (5×10^5 cells/well) were incubated for 24 h. Culture supernatants were collected and the level of secreted IL-4 was determined using ELISA. (C) Blood samples were collected from the inferior vena cava and serum was separated after completion of all treatments. Level of serum IgE was measured by ELISA. Results are the means \pm S.E. of three experiments. *: significantly different from the group treated with DNCB only at $P < 0.05$.

(3) Diosgenin이 알레르기성 염증 사이토카인 및 조절인자 발현에 미치는 영향

아토피성 피부질환의 대표적인 사이토카인인 IL-4, IL-10의 mRNA 발현을 확인한 결과, 음성대조군에 비하여 diosgenin을 처리한 군에서 IL-4, IL-10의 mRNA 발현이 감소함을 확인하였다. 또한, 알레르기성 염증 사이토카인의 조절자로 알려진 NFAT1의 발현을 확인한 결과 diosgenin이 NFAT1의 mRNA 발현을 억제시킴을 확인하였다(Fig. 31).

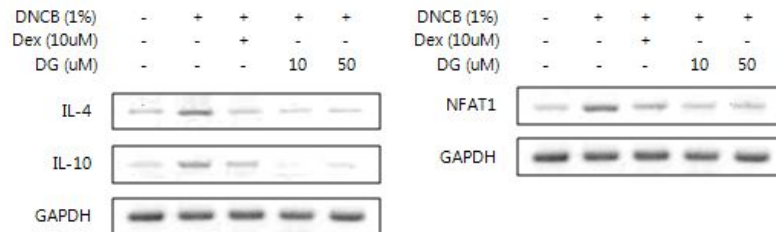


Fig. 31. Inhibitory effects of diosgenin on mRNA expressions of IL-4, IL-10, and the nuclear factor of activated T cells(NFAT) 1. After completion of all treatments, total RNA was extracted from splenocytes. RT-PCR analysis was performed to measure mRNA levels of IL-4, IL-10, and NFAT 1, respectively. The results illustrated are from a single experiment, and are representative of three separate experiments. DNCB, 1-chloro-,4-dinitrobenzene; Dex, dexamethasone.

바. 마 유래 성분의 항동맥경화성 효능 검증 - ApoE^{-/-} 동물 실험

(1) Diosgenin의 동맥 내 지질 침착 억제 효능

Diosgenin의 항염증 효능을 토대로 만성염증 질환의 하나인 동맥경화질환 동물 모델을 이용하여 diosgenin의 항동맥경화 효능을 검토하였다. ApoE^{-/-}마우스에 고지방 사료를 공급하여 동맥경화를 유발시킨 후 고지방 사료와 함께 diosgenin을 11주/21주 동안 경구 투여하였다. 실험 종료 후 심장 및 동맥을 적출하여 H&E staining(Fig. 32A) 및 Oil-Red O staining(Fig. 32B)을 이용, 생성된 동맥경화 병변 상태를 관찰한 결과 WT군과 비교하여 ApoE^{-/-}군에서 calcification(Fig. 32A) 및 지질 침착이 진행되어있음을 확인하였으며(Fig. 32B) diosgenin을 함께 섭취한 군의 경우 calcification 및 지질 침착이 일부 감소함을 확인하였다.

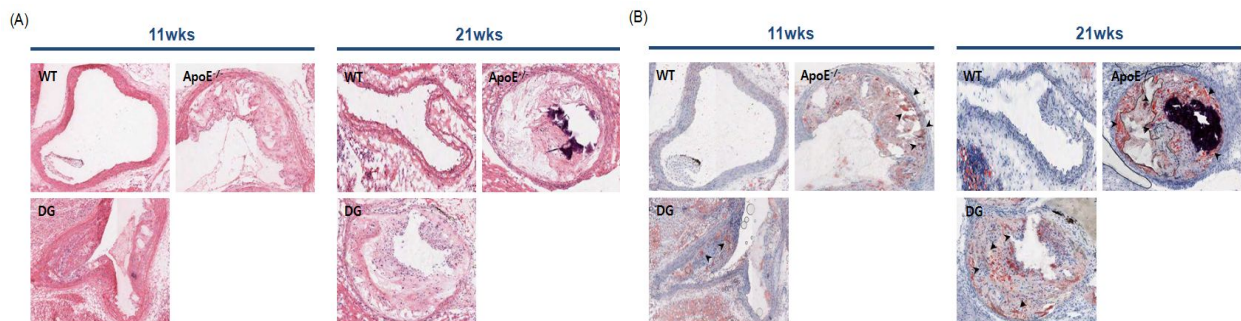


Fig. 32. Effects of diosgenin on the formation of atherosclerotic lesions in ApoE^{-/-} mice. Representative serial sections of aortic valve obtained from each group at weeks of 11 and 21 were shown. Sections were stained with Haematoxylin and eosin (A) and with Oil-Red O (B) to visualize the accumulation of lipid within the aorta.

(2) Diosgenin의 동맥 내 괴사핵 및 섬유화 형성 억제 효능

면역염색법 (immunohistochemistry, CD68)을 이용하여 상기에서 제작한 심장 및 동맥 절편 내 대식세포를 염색, 혈관 내 대식세포의 침착 정도를 측정하였다. 그 결과, ApoE^{-/-}군에서 장기간의 염증반응으로 인한 혈관 내 괴사핵(necrotic core)의 증가와 섬유화 (fibrosis)가 진행된 반면 diosgenin을 섭취한 군의 경우 혈관 내 괴사핵 및 섬유화 형성이 일부 감소한 반면 macrophage infiltration은 일부 증가되어 있는 것으로 보아 diosgenin의 섭취가 동맥경화의 진행을 완화시키는 효능이 있을 것으로 사료된다(Fig. 33).

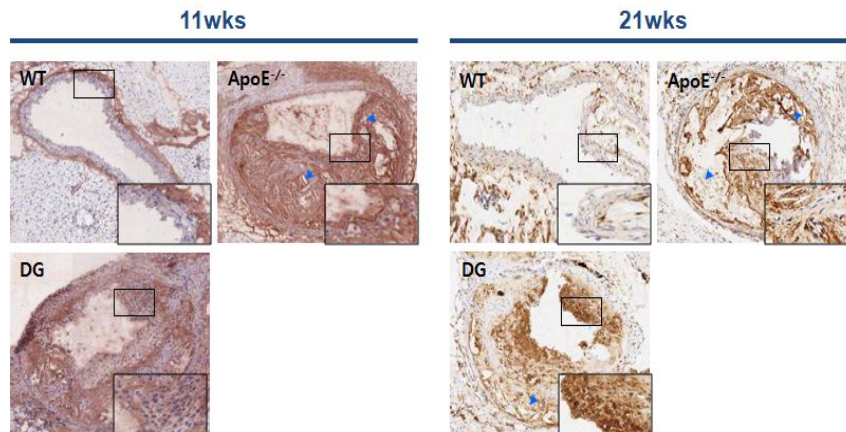


Fig. 33. Effects of diosgenin on macrophage infiltration in aortic valve. Representative serial sections of aortic valve obtained from each group at weeks of 11 and 21 were visualized with antibody against CD68.

(3) Diosgenin이 동맥경화 표지인자에 미치는 영향

위와 동일한 방법으로 동맥경화질환 모델인 ApoE^{-/-}마우스에 diosgenin을 경구투여 한 뒤 혈액을 채취하여 혈청 내 동맥경화 표지인자들의 수치를 비교, 검토하였다. 그 결과, diosgenin의 섭취가 혈청 내 total cholesterol 및 ox-LDL, CRP, MCP-1의 수치를 유의성 있게 감소시킴을 확인하였다(Table 1).

Table 1. Effects of diosgenin on plasma levels of total cholesterol, oxidized LDL, HDL cholesterol, CRP, and MCP in ApoE^{-/-} mice

	11 wk			21 wk		
	WT	ApoE ^{-/-}	Diosgenin	WT	ApoE ^{-/-}	Diosgenin
Total cholesterol (mg/dL)	-	-	-	287.0±1.41	2012.0±226.27 [†]	1496.0±45.25 [‡]
Ox-LDL (ng/mL)	1264.0±56.28	1365.6±13.59 [†]	1352.9±13.58	794.9± 11.2	1340.1±19.9 [†]	1213.1±26.5 [‡]
HDL cholesterol (mg/dL)	-	-	-	76.5±4.3	3.4±1.0 [†]	7.0±1.4
CRP (mg/dL)	-	-	-	0.06±0.00	0.27±0.01 [†]	0.06±0.00 [‡]
MCP-1 (pg/mL)	431.13±42.69	1511.00±307.13 [†]	725.52±247.58 [‡]	170.21±27.09	618.17±33.21 [†]	504.85±55.81

Values are mean±S.E. (n=6).

[†]Significant difference at $p < 0.05$ by Student's t-test between WT and ApoE^{-/-} mouse groups.

[‡]Significant difference at $p < 0.05$ by one-way ANOVA between ApoE^{-/-} and diosgenin mouse groups.

(4) H1/H2의 동맥 내 지질 침착 억제 효능

H1/H2의 항염증 효능을 토대로 만성염증 질환의 하나인 동맥경화질환 동물 모델을 이용하여 H1/H2의 항동맥경화 효능을 검토하였다. ApoE^{-/-}마우스에 고지방 사료를 공급하여 동맥경화를 유발시킨 후 고지방 사료와 함께 H1/H2를 11주/21주 동안 경구 투여하였다. 실험 종료 후 심장 및 동맥을 적출하여 H&E staining(Fig. 34A) 및 Oil-Red O staining(Fig. 34B)을 이용, 생성된 동맥경화 병변 상태를 관찰한 결과 WT군과 비교하여 ApoE^{-/-}군에서 calcification(Fig. 34A) 및 지질 침착이 진행되어있음을 확인하였으며(Fig. 34B), H1/H2를 함께 섭취한 군의 경우 calcification 및 지질 침착이 감소함을 확인하였다.

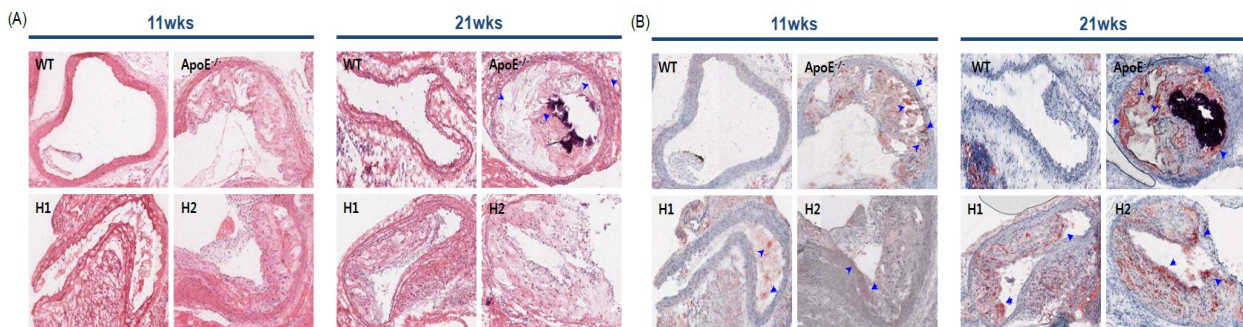


Fig. 34. Effects of H1/H2 on the formation of atherosclerotic lesions in ApoE^{-/-} mice. Representative serial sections of aortic valve obtained from each group at weeks of 11 and 21 were shown. Sections were stained with Haematoxylin and eosin (A) and with Oil-Red O (B) to visualize the accumulation of lipid within the aorta.

(5) H1/H2의 동맥 내 괴사핵 및 섬유화 형성 억제 효능

면역염색법(immunohistochemistry, CD68)을 이용하여 상기에서 제작한 심장 및 동맥 절편 내 대식세포를 염색, 혈관 내 대식세포의 침착 정도를 측정하였다. 그 결과, ApoE^{-/-}군에서 장기간의 염증반응으로 인한 혈관 내 괴사핵(necrotic core)의 증가와 섬유화(fibrosis)가 진행된 반면 H1/H2을 섭취한 군의 경우 혈관 내 괴사핵 및 섬유화 형성이 감소하였다. 또한 ApoE^{-/-}군과 비교하여 H1/H2 섭취군의 macrophage infiltration이 증가되어 있는 것으로 보아 H1/H2의 섭취가 동맥경화의 진행을 완화시키는 효능이 있을 것으로 사료된다(Fig. 35).

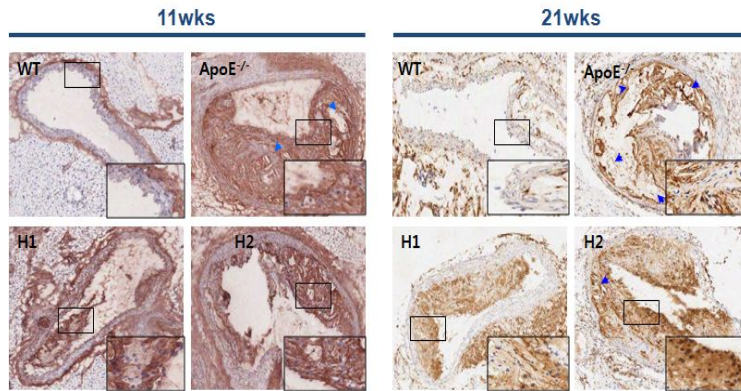


Fig. 35. Effects of H1/H2 on macrophage infiltration in aortic valve. Representative serial sections of aortic valve obtained from each group at weeks of 11 and 12 were visualized with antibody against CD68.

(6) H1/H2가 동맥경화 표지인자에 미치는 영향

위와 동일한 방법으로 동맥경화질환 모델인 ApoE^{-/-}마우스에 H1/H2를 경구투여 한 뒤 혈액을 채취하여 혈청 내 동맥경화 표지인자들의 수치를 비교, 검토하였다. 그 결과, H1/H2의 섭취가 혈청 내 total cholesterol 및 ox-LDL, CRP, MCP-1의 수치를 유의성 있게 감소시킴을 확인하였다(Table 2).

Table 2. Effects of H1 and H2 on plasma levels of total cholesterol, oxidized LDL, HDL cholesterol, CRP, and MCP in ApoE^{-/-} mice

	11 wk				21 wk			
	WT	ApoE ^{-/-}	H1	H2	WT	ApoE ^{-/-}	H1	H2
Total cholesterol (mg/dL)	268.0±13.44	3332.0±659.02 [†]	2916.0±214.96 [†]	2476.0±8.49 [†]	287.0±1.41	2012.0±226.27 [†]	1700.0±158.39 [†]	1734.0±42.43 [†]
Ox-LDL (ng/mL)	1264.0±56.28	1365.6±13.59 [†]	1371.7±10.22	1352.9±10.77	794.9±11.2	1340.1±19.9 [†]	1254.3±35.6 [†]	1273.2±6.8 [†]
HDL cholesterol (mg/dL)	96.5±2.76	6.3±0.00 [†]	9.1±1.06	6.3±1.34	76.5±4.3	3.4±1.0 [†]	5.5±3.4	5.6±2.1
CRP (mg/dL)	0.06±0.00	0.31±0.19 [†]	0.07±0.00 [†]	0.20±0.11	0.06±0.00	0.27±0.01 [†]	0.17±0.00 [†]	0.09±0.01 [†]
MCP-1 (pg/mL)	431.13±42.69	1511.00±307.13 [†]	1101.01±47.32 [†]	1062.82±47.77 [†]	170.21±27.09	618.17±33.21 [†]	459.92±143.00	495.72±54.23

Values are mean±S.E. (n=6).

[†]Significant difference at $p < 0.05$ by Student's t-test between WT and ApoE^{-/-} mouse groups.

^{*}Significant difference at $p < 0.05$ by one-way ANOVA between ApoE^{-/-} and H1 or H2 mouse groups.

제 11절 마를 활용한 신선편이 및 기능성 강화 식품 개발

1. 서언

마는 예로부터 자양, 강장, 당뇨, 설사 등에 효과가 있다하여 약용 및 식용으로 소비되고 있고 최근의 연구에 의하면 마는 일반 성분 외에도 saponin, tannin, polyphenol, 비타민, 당류, 아미노산 및 uronic acid, chelidonic acid, sitosterol 등이 들어 있어 동백경화억제, 중금속제거 등에도 효과가 있는 것으로 밝혀졌으며, 마의 이러한 건강지향적 이미지로 인해 한약재의 원료로 또한 소재로 인식되면서 생산량 및 소비량이 증가 추세에 있다. 그러나 마는 수확 후 저장에 어려움이 많아 수확 직후 단기간(1-2개월 이내) 내에 생마로 유통, 소비되거나 열풍건조(65-70℃)한 후 분쇄하여 가루형태로 판매되고 있는 것이 일반적이다. 현재 시판되고 있는 열풍건조한 마가루는 점성이 거의 없을 뿐 아니라 물에 용해시키면 밀가루처럼 풀어지고 가라앉아 기호도면에서도 바람직하지 않다. 또한 마의 점성을 유지시켰을 경우, 상당히 끈기가 있어 이 또한 소비자가 호감을 갖는 형태는 아니다. 따라서 이러한 단점을 개선하고 마의 소비 증대를 위해 다양한 형태의 고부가가치 제품의 개발이 요구되고 있다. 따라서 이번 연구에서는 마를 이용한 신선편의식품 제조하기 위해 차아염소산나트륨 및 오존수 용액을 사용한 최적의 세척 및 소독조건을 확립함을 목적으로 연구하였다.

현재 국내 마에 대한 연구는 아직 미흡한 실정이며 특히 가공식품으로서의 마 제품은 마분말차와 드링크 류가 시중에 있으나 아직 그에 대한 인지도는 낮은 편이다. 한편 묵은 우리나라 고유의 전통식품으로 일반 가정에서도 쉽게 제조하여 널리 이용할 수 있는 식품이며 맛과 조직감이 중요한 식품 품질 특성을 가지고 있으며 조전분과 물을 함께 가열하여 호화시킨 후 냉각하여 만든 겔 식품으로 특히 도토리 묵은 우리나라에서 많이 생산되는 도토리의 전분을 추출하여 만든 것으로 손쉽게 접할 수 있다. 묵은 모세혈관을 강화해 성인병예방에 도움을 주고 위와 장을 튼튼히 해주는 효능, 뇌출혈 예방, 고혈압, 당뇨, 예방뿐만 아니라 칼로리가 낮아 다이어트 식품으로 각광받고 있다고 보고되고 있으며 이것을 바탕으로 한 연구를 통하여 소비자에게 관심을 유발, 시장의 증가를 높일 수 있을 것으로 예상된다.

묵은 원료의 종류에 따라 품질이 크게 다를 뿐만 아니라 형성된 묵의 조직감, 관능적 특성, 저장기간 등 많은 차이점이 있으며 특히 원료에 따라 가수량, 호화온도 및 시간은 묵의 물리적 특성에 가장 큰 요인으로 작용한다. 일반적으로 묵이 강한 겔을 형성하려면 최소한 전분 농도가 6% 이상 되어야 하며, 전분겔의 성질은 전분의 종류에 따라 달라서 아밀로오스함량이 많을수록 겔 형성 속도가 빠르고 단단한 겔이 형성된다고 보고되고 있다.

따라서 이번 연구에서는 묵의 저장성을 높이기 위해 해조류 또는 마를 첨가한 묵의 젤리 강도 측정, 묵의 수율, 조회분 정량, 칼슘함량 적정, pH측정 등에 대하여 연구하여 해조류 및 마를 첨가한 묵의 품질을 살펴보고자 한다.

2. 연구방법론

가. Fresh-cut 제품 개발을 위한 전처리실험

1) 시료 및 미생물 접종

본 실험에 사용된 재료는 안동 파머스 마켓에서 구입한 안동산 단마를 사용하였다. 각각의 병원성 미생물을 마에 접종하기 위하여 총호기성균과 *Escherichia coli* ATCC 10536, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538을 대상으로 실시하였고 위해미생물의 균액 농도를 10^3 - 10^4 cfu/mL로 조정하여 표면에 점 접종하였다. 접종된 마는 clean bench에서 1-2시간 동안 건조 후 각각의 처리를 위하여 사용되었다.

2) 마의 표면 소독 및 세척 방법

소독에 사용된 염소수는 일반적으로 가장 많이 사용되고 있는 염소 용액(차아염소산나트륨, 유효염소 4%)을 선택하여 실험에 이용하였다. 0-300ppm의 염소계 살균소독제액 200mL에 10g의 마를 넣고 학교급식위생관리지침서에 따라 5분간 침지하면서 20회씩 shaking한 뒤 200mL 수돗물이 담긴 용기에 옮겨 1분간 와류하면서 1회 세척해주었다.

3) 염소계 살균소독제 침지시간 및 침지온도

200ppm의 염소계 살균소독제액 200mL에 10g의 마를 담그고 0.5 - 5분간 침지하여 shaking한 뒤 200mL 수돗물이 담긴 용기에 옮겨 회당 30초씩 1-6회 와류하면서 세척하였으며, 침지온도는 5 °C, 10 °C, 20 °C, 30 °C에서 미생물 경감효과를 관찰하였다.

4) 오존수 처리 및 미생물 조사

오존수 제조는 오존방생장치 super ozon 15를 사용하였고, 오존 농도 0- 10ppm, 처리시간 1-10분에 따른 미생물을 조사하였다. 미생물수 조사는 세균균, 곰팡이 및 효모, 대장균균으로 구분하여 측정하였으며, 세균(일반세균)은 Plate Count Agar 배지(37°C 3일), 곰팡이 및 효모는 Potato Dextrose Agar 배지(30°C, 3일)에서 배양 후 colony 수 측정하였다.

나. 마 고추장 제조

엿기름물 150g과 물에 불린 후 마쇄된 찹쌀 300g의 혼합액을 덩어리가 지지 않도록 섞으면 약 450g의 혼합액이 되고, 이것을 열을 서서히 가해 당화시켰다. 마분말을 0%, 2% 4%, 8%, 10%, 12%, 14% 넣어서 잘 섞어준 다음, 이 당화액에 메주가루 75g을 넣고 혼합하였다. 각각 소금 80g을 첨가한 후 잘 녹인 후 고춧가루 200g씩 넣어 혼합하고 상온에서 숙성하였다. 숙성시킨 고추장을 증류수로 10배 희석하여 pH를 재고, 고추장 sample 1g을 생리식염수로 10^{-7} 까지 희석하여 10^{-6} 과 10^{-7} 짜리를 총균수 측정하였다.

다. 마 첨가 목 제조 실험

1) 목의 제조

도토리 목의 제조는, 냉동 보관된 목 베이스를 25~30℃에서 해동(10시간 정도 예상)시킨 다음, 도토리 목 베이스 200g에 물 1400g을 교반하였다. 용기에 교반액을 넣고 가열한 후(중심온도가 85~90℃까지 가열) 별도의 뜸 공정은 하지 않은 채로 식혀서 균혀 목을 완성하였다. 마를 첨가한 도토리목의 제조 시 마 분말 5g을 추가하였다.

올방개목의 경우, 냉동 보관된 목 베이스를 25~30℃에서 해동(10시간 정)한 다음, 올방개 목 베이스 200g에 물 1400g 김분말 5g을 첨가하여 교반하였다. 용기에 교반액을 넣고 가열하고(중심온도가 85~90℃까지 가열) 별도의 뜸 공정은 하지 않았으며, 식혀서 균혀 목을 완성하였다. 미역을 첨가한 올방개목의 제조 시 미역분말 5g을 추가하였다.

2) 수분함량측정

수분함량 측정기기(SARTORIUS AG GERMANY MA 145Q-000230V1)로 목의 가장 윗부분은 제거해 내고 아래 부분을 채취하여 수분함량을 측정하였다.

3) 총균수측정

목의 가장 윗부분을 제거하고 목을 0.9% NaCl용액에 희석, 균질기(POLYTRON PT-MR2100)로 균질화 하여 PCA배지에 pour plating하여 37℃에서 48시간± 3시간 배양 하였다.

4) 물성, 색도, pH 측정

목의 가장 윗부분은 제거해 내고 아래 부분을 가로, 세로, 높이를 3x3x2cm로 잘라 측정하였다. force 500g distance 5mm로 설정하여 측정하였다. 색도는 목 표면을 자른 후 표면적 부분을 색차계(Minolta model CR-10; Co. , Ltd. , Osaka)를 사용하여 측정하였다. pH는 시료 2g을 10배 희석하여 pH측정기(DMS.US/DP-135M)로 측정하였다.

3. 연구결과

가. 고 안전성 생마 fresh-cut 제품 개발

염소계 살균소독제의 농도 결정조건은 0-500ppm의 염소계 살균소독제액 200mL에 10g의 마를 넣고 학교급식위생관리지침서(채소의 경우)에 따라 5분간 침지하면서 20회씩 shaking한 뒤 200mL 수돗물이 담긴 비이커에 옮겨 1분간 와류하면서 1회 세척해주었다. 염소수 50ppm 농도 이상에서 미생물 경감이 관찰되었으며, 200ppm 이상의 농도에서 효과적으로 미생물을 억제함이 관찰되었다(Table 1).

Table 1 Effects of sodium hypochloride on reduction of microorganisms (log cfu/g).

Microorganism	initial	Conc. of sodium hypochloride (ppm)					
		50	100	150	200	250	300
E. coli	8.4×10 ⁴	1.2×10 ³	3.4×10 ²	3.4×10 ²	3.4×10 ²	2.7×10	neg
S. aureus	7.6×10 ⁴	6.4×10 ³	5.2×10 ³	1.2×10 ³	5.1×10 ²	3.4×10 ²	1.1×10
Total aerobic bacteria	8.7×10 ³	2.3×10 ³	5.0×10 ²	3.6×10	neg	neg	neg

염소계 살균소독제 침지시간 결정조건은 수돗물 처리가 대조군으로 이용되었으며, 법적 최대 허용농도를 기준을 고려하여 200ppm의 염소계 살균소독제액 200mL에 10 g의 마를 담그고 20 분간 침지시켜 각각 20회씩 shaking한 뒤 200 mL 수돗물이 담긴 비이커에 옮겨 1분간 와류하면서 1회 세척해주었다. 그 결과 Table 2에 나타낸바와 같이 침지 시간에 비례하여 미생물이 감소하는 경향을 보였으며, 마의 수분 흡수 및 표면점질물질의 손실 방지를 고려할 때 20℃ 1 분 처리가 효과적으로 판단되었다.

Table 2 Effects of dipping time on reduction of microorganisms (log cfu/g).

Microorganism	Initial	Dipping time (min)			
		0.5	1	3	5
E. coli	7.8×10 ⁴	4.3×10 ³	3.5×10 ²	2.4×10	<10
S. aureus	8.1×10 ⁴	3.9×10 ³	5.2×10 ³	5.3×10	<10
Total aerobic bacteria	6.6×10 ³	8.6×10 ²	<10	neg	neg

물 행침시간을 결정하기 위해 염소계 살균소독제 처리가 대조군으로 이용되었으며, 200ppm의 염소계 살균소독제액 200mL에 10g의 마를 담그고 5분간 침지하면서 각각 20회씩 shaking한 뒤 200mL 수돗물이 담긴 비이커에 옮겨 회당 30초씩 와류하면서 세척해주었고, 이를 새 수조로 옮기면서 각각 1회에서 6회 반복하였다. 그 결과 세척횟수가 많아질수록 미생물이 감소하였으나, 공정에서는 처리과정이 길어지면 2차적인 오염원인을 제공하게 되므로 30초씩 2회 세척함이 적당할 것으로 사료되었다(Table 3). 또한, 세척온도에 따른 효과를 조사하기 위해 염소계 살균소독제 침지온도는 5 ℃, 10 ℃, 20 ℃, 30 ℃에서 100ppm과 200ppm의 염소계 살균

소독제액 200 mL에 10 g의 마를 넣고 1분간 침지하면서 각각 20회씩 shaking한 뒤 200 mL 수돗물이 담긴 비이커에 옮겨 1분간 와류하면서 1회 세척한 다음 미생물 경감 효과를 조사한 결과 세척온도에 따른 차이를 나타내지 않았다(Table 4)

Table 3 Effects of washing time on reduction of microorganisms (log cfu/g)

Microorganism	Initial	Washing time					
		1	2	3	4	5	6
<i>E. coli</i>	9.0×10^4	5.3×10^3	8.3×10^2	2.0×10^2	3.5×10	<10	neg
<i>S. aureus</i>	8.2×10^4	3.8×10^3	6.5×10^2	4.9×10^2	7.6×10	<10	neg
Total aerobic bacteria	4.6×10^3	7.7×10^3	3.8×10^2	<10	neg	neg	neg

Table 4 Effects of washing temp. on reduction of microorganisms (log cfu/g)

Microorganism	Initial	Temp. (°C)			
		5	10	20	30
<i>E. coli</i>	7.8×10^4	7.1×10^2	3.8×10^2	<10	6.9×10
<i>S. aureus</i>	6.0×10^4	6.5×10^2	9.2×10^2	<10	2.8×10
Total aerobic bacteria	5.1×10^3	6.1×10^2	0.8×10^2	neg	<10

염소액 농도 (0-500ppm), 침지시간 (0-20분), 침지 온도 (0-30 °C) 및 물 세척 시간 (0-4분)에 따른 총균수, *E. coli*, *S. aureus*의 살균효과 변화를 살펴 본 결과, 마의 최적 세척 및 소독 방법은 마를 50ppm 이상의 염소계 살균소독제를 20 °C에서 1분간 침지 후 수돗물로 30초씩 2회 세척하는 것이 관능적 기호성의 손실 최소화와 미생물 살균효과에 효과적인 것으로 나타났다. 오존수 처리의 경우 시간, 단가 등의 공정의 최적화 과정을 고려할 때 1ppm의 오존수 농도에서 약 1-5분의 처리로 살균효과를 나타낼 것으로 판단된다(Table 5). 아울러 3% 식염 1분 침지 후 구연산 0.5%첨가로 변색방지 및 미생물 변패 억제 가능한 것으로 나타났다(Table 6, 7). 추후, peroxyacetate(Vandekinderen 등, 2009) 및 sodium acetate(Eano 등, 2010)과 같은 살균세척제에 대해서도 처리 효과의 비교 검토가 필요할 것으로 사료된다.

Table 5. Effects of ozonic water dip on the reduction of microorganisms (log cfu/g).

Micro-organism	Dipping time (min)	Conc. Of ozon (ppm)					
		0	0.5	1	2	5	10
Bacteria	1	3.4×10^4	9.2×10^3	2.8×10^2	7.1×10^2	8.9×10	4.1×10
	3	4.1×10^4	7.4×10^3	8.9×10^2	3.4×10^2	6.1×10^2	<10
	5	6.2×10^4	4.1×10^3	6.3×10^2	7.1×10^2	1.9×10^2	<10
	10	6.4×10^4	2.7×10^3	4.5×10^3	8.7×10	<10	neg
Yeast + Mold	1	4.7×10^4	3.3×10^3	2.7×10^3	8.6×10^2	3.3×10^2	0.4×10^2
	3	3.8×10^4	2.7×10^3	9.3×10^2	2.9×10^2	3.5×10^2	6.5×10
	5	3.0×10^4	6.3×10^3	8.4×10^2	6.2×10^2	9.3×10	4.2×10
	10	5.9×10^4	9.8×10^2	5.2×10^2	1.2×10^2	3.3×10	<10

Table 6. Effects of citric acid treatment on the reduction of microorganisms (log cfu/g).

Microorganisms	Initial	Conc. of citriate (%)				
		0.1	0.2	0.3	0.5	1.0
E. coli	6.4×10^2	1.2×10^3	3.4×10^2	3.4×10^2	<10	neg
Yeast + Mold	3.3×10^3	4.8×10^3	5.2×10^3	1.2×10^3	5.1×10^2	5.1×10^2
Total aerobic bacteria	2.7×10^3	2.3×10^3	5.0×10^2	9.6×10	4.5×10^2	2.8×10^2

Table 7. Effects of NaCl treatment on the reduction of microorganisms (log cfu/g).

Microorganisms	Initial	Conc. Of table salt (%)				
		0.1	0.5	1.0	1.5	2.0
E. coli	8.9×10^2	4.4×10^3	7.1×10^2	3.8×10^2	<10	neg
Yeast + Mold	4.0×10^3	3.1×10^3	4.0×10^3	2.8×10^3	6.3×10^2	8.7×10
Total aerobic bacteria	6.6×10^3	4.5×10^3	8.8×10^2	5.6×10^2	7.5×10	<10

나. 마 첨가 고추장 제조기술 개발

마를 첨가한 고추장의 미생물학적, 이화학적 성분변화를 관찰한 실험 결과 pH의 측정값들은 마 첨가량에 따라 일정하게 변하는 것이 아닌 감소와 증가의 반복적인 경향의 그래프를 보여 주었다(Fig. 1). 마 첨가에 따른 총균수 측정 결과를 보면 이는 마분말의 첨가량이 많아질수록 총균수도 증가하는 것을 알 수 있다(Table 8, Fig. 2). 기존 연구 결과에서도 발효기간 중 생균수는 20일경까지는 증가하였고 이후 40일경에는 감소하다가 60일경에는 다시 증가하였으며, 마 함유 고추장에서 생균수가 많았다고 보고되어 있다. 마 분말이 미생물이 생육하는데 필요한 영양분으로서 역할을 하고 있는 것으로 판단된다. 또한, 마가루 함유량이 증가함에 따라 호화 후 점도가 증가하였다. 총당은 발효가 진행됨에 따라 증가하였고 점도변화는 14% 마가루 함유 고추장에서 가장 컸다(데이터 미제시).

Table 8. Change of pH and microorganisms of hot pepper soy paste with Chinese yam powder.

Yam powder (%)	pH	Total bacteria (CFU/ml)	
		10^{-6}	10^{-7}
0	5.12	105	23
2	4.84	121	19
4	5.46	63	- (contamination)
8	5.15	174	61
10	5.06	226	45
12	5.05	145	28
14	5.11	300 ↑	58

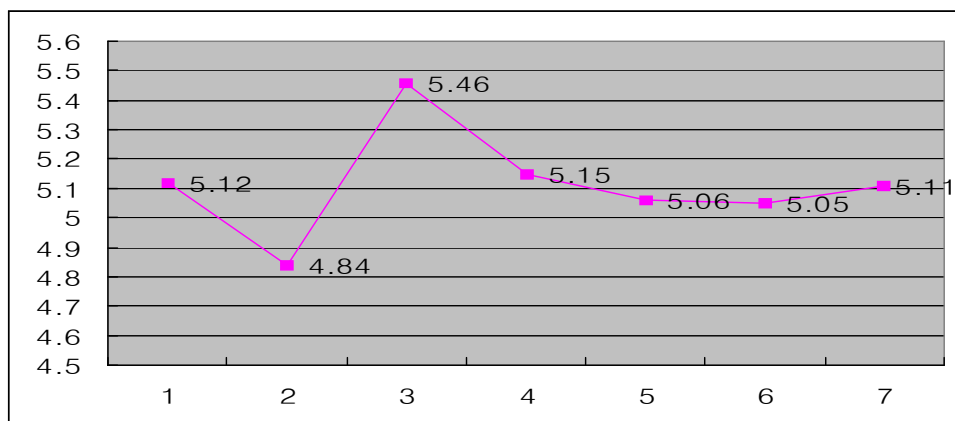


Fig. 1. Change of pH during fermentation of hot pepper soy paste with Chinese yam powder.

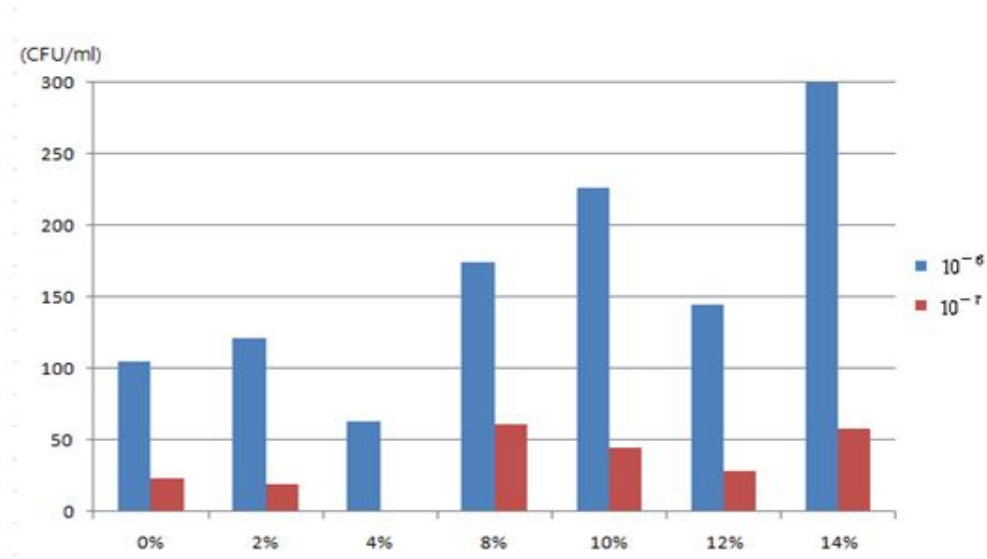


Fig. 2. Change of total bacteria of hot pepper soy paste with Chinese yam powder.

다. 마 첨가 목 제조기술 개발

김을 첨가한 올방개 목과 미역을 올방개 목 그리고 도토리목 마를 첨가한 도토리목의 수분 함량을 측정한 결과 0일째 보다 3일째에서 낮은 수치를 보였고 6일째 다시 높은 수치를 보였다(Table 9).

Table 9. Change in water activity of *Muk* with seaweed and Chinese yam during storage at 15°C for 6 days.

Muk	Period (day)		
	0	3	6
Laver + Olbanga	69.58	57.05	78.06
See mustard + Olbanga	68.93	48.84	66.68
Dotori	80.9	56.97	59.71
Dotori + Chinese yam	66.68	41.04	56.15

김을 첨가한 올방개 목과 미역을 첨가한 올방개 목 그리고 도토리목과 마를 첨가한 도토리목의 총균수를 측정한 결과 Table 10과 같이 나타났다. 초기에는 미역을 첨가한 올방개 목이 가장 낮은 수치의 총균수를 보였고 저장기간에 따라 4일까지 비교했을 때 김을 첨가한 올방개

묵과 미역을 첨가한 올방개 묵의 총균수는 큰 차이가 없었다. 한편 도토리묵과 마를 첨가한 도토리묵의 경우에는 올방개 묵보다 더 많은 양의 총균수 값이 나왔고 마를 첨가했을 경우에는 도토리묵 보다 더 높은 값을 나타냈다.

Table 10. Change in total cfu of *Muk* with seaweed and Chinese yam during storage at 15°C for 6 days.

Muk	Period (day)		
	0	3	6
Laver + Olbangaе	3766.67± 585.95	4766.67± 737.11	6333.33± 1154.7
See mustard + Olbangaе	300± 100	3600± 600	6333.33± 3055.05
Dotori	1233.33± 208.17	13066.67± 1001.67	24000± 4358.9
Dotori + Chinese yam	3533.33± 850.49	9766.67± 2478.58	43000± 8544

김을 첨가한 올방개 묵과 미역을 첨가한 올방개 묵 그리고 도토리묵과 마를 첨가한 도토리묵의 조직감을 비교한 결과는 Table 11과 같이 나타났다. 김을 첨가한 묵과 미역을 첨가한 묵은 큰 차이를 보이지 않았고 도토리묵과 마를 첨가한 도토리묵은 다소 큰 차이를 보이지 않았으며 일반 도토리묵이 가장 낮은 값을 보였고 마를 첨가한 도토리묵이 가장 높았다.

일반적으로 견고성은 변형에 대한 저항성 즉 겔화 되는 성질로서 일반적으로 전분의 함량이 많을수록 더 단단한 묵을 제조할 수 있다고 보고하고 있다(Choo and Ahn, 1995). 또한 묵 외부에 존재하는 수분이 실제로 조직감을 측정 시 영향을 미친다고 보고하고 있다.

김을 첨가한 올방개 묵과 미역을 첨가한 올방개 묵 그리고 도토리묵과 마를 첨가한 도토리묵의 Lab값을 측정한 결과는 Table 12와 같이 나타났다. Lab값 모두 마를 첨가한 도토리묵에서 가장 높았고 다음으로 도토리묵 미역을 첨가한 올방개 묵, 김을 첨가한 올방개 묵 순으로 나타났다. 그러나 기존 연구에 의하면 저장기간이 경과함에 따라 약간씩 감소한다고 보고하고 있으나(Park과 Lee, 2007) 이번 연구에서는 큰 차이를 보이지 않았다. 모든 묵에서 Lab값을 측정한 결과 저장기간이 지남에 따라 큰 차이를 보이지 않았으며 6일이 경과 후에도 묵의 색깔의 변화를 육안으로 구분하기 어려운 정도임을 알 수 있었다.

Table 11. Change in texture of *Muk* with seaweed and Chinese yam during storage at 15°C for 6 days.

Muk	Period (day)		
	0	3	6
Laver + Olbangae	183.5± 4.73	187.1± 30.42	207.1± 8.94
See mustard + Olbangae	153.3± 11.55	151.9± 12.57	201.1± 16.34
Dotori	123.7± 15.08	204.4± 4.91	141.0± 10.51
Dotori + Chinese yam	219.6± 8.63	210.7± 4.59	236.8± 5.52

Table 12. Change in texture of *Muk* with seaweed and Chinese yam during storage at 15°C for 6 days.

Muk	Color		
	L	a	b
Laver + Olbangae	34.6± 0.52	1.5	4.13± 0.41
See mustard + Olbangae	38.43± 0.65	-3.13± 0.12	10.3± 0.62
Dotori	40.97± 0.55	8.7± 0.1	21.97± 0.15
Dotori + Chinese yam	41.67± 0.55	9.27± 0.35	22.5± 0.62

김을 첨가한 올방개 묵과 미역을 첨가한 올방개 묵 그리고 도토리묵과 마를 첨가한 도토리묵의 저장기간에 따른 pH는 Table 13에 나타냈다. 모든 묵에서 저장기간에 따라 6일째에서 가장 낮은 수치를 보였고 저장기간에 따라 다소 낮아 지는 수치를 보였다. 한편 마를 첨가한 도토리묵이 일반 도토리묵 보다 pH가 낮았으며 전체적으로 도토리묵보다는 올방개 묵이 pH가 높은 것을 알 수 있었다.

Table 13. Change in pH of *Muk* with seaweed and Chinese yam during storage at 15°C for 6 days.

Muk	Period (day)		
	0	3	6
Laver + Olbangae	6.74	6.67	6.27
See mustard + Olbangae	6.89	7.03	6.64
Dotori	5.89	5.83	5.65
Dotori + Chinese yam	5.57	5.61	5.44

제 12절 마 정과의 제조

1. 서언

현재 마는 가정이나 식당에서 박피 후 생마를 직접 섭취하거나 요구르트와 같이 갈아 음용하는 방법으로 이용하고 있다. 또한 표면의 끈끈함을 없애 먹기 좋게 하기 위해 표면만을 가볍게 구워 섭취하기도 한다. 한편 마를 가공한 제품을 보면, 제일 보편적인 것이 열풍건조하여 분말화한 것이며, 국수나 빵에 극히 일부의 마를 첨가하여 제조하는 정도이다. 이와 같이 마를 이용한 가공제품은 분말을 제외하고는 마가 주재료가 아니고 부재료로서 마의 효능을 느끼지 못할 정도로 적게 첨가하고 있는 실정이다.

따라서 마의 소비를 늘리고 마의 효능을 직접적으로 느끼면서 섭취하려면 마를 주재료로 이용하는 가공식품의 개발이 필요하다. 물론 마의 가격이 비싼 단점이 있지만 마 가공식품을 인삼과 같이 고부가가치 식품으로 정립시킨다면 그 가능성은 크다고 할 수 있다. 인삼정과를 모델로 하는 마 정과는 마를 이용하는 고부가가치 식품의 하나가 될 수 있다.

당절임 식품의 하나인 마 정과를 제조하기 위해서는 사용하는 당의 종류를 결정해야 하며, 당의 농도, 당침시간 등에 대한 조건을 정립해야 한다. 더군다나 마는 건강에 좋은 식품으로 알려졌기 사용하는 당도 기존의 설탕보다는 보다 건강지향성 당류를 이용하는 것이 바람직할 것이다. 한편 마 정과의 이용 층이 중년 이상이 될 것으로 예상되기 때문에 씹힘성 등의 물성을 이들 소비자에 맞추는 것이 중요하다.

현재 마 분말을 많이 생산하고 있는데 이를 주재료로 이용하는 과자류의 개발도 마의 이용을 늘리는 데 크게 기여할 것으로 여겨진다.

2. 연구방법론

가. 실험 재료

정과제조용 마는 세척과 박피한 용이한 장마를 이용하였으며, 그 밖의 재료로는 설탕(제일제당 백설탕), 올리고당(제일제당 프락토올리고당, 식이섬유 33% 함유), 과당(신동방CP 액상과당), 벌꿀(동서식품 아카시아 꿀) 등 시중에서 쉽게 구할 수 있는 것으로 하였다. 마과자 제조용 마분말은 북안동농협 제품이였다.

나. 실험 처리

(1) 마 정과 제조 공정 확립을 위한 제조공정(1년차)

인삼정과 제조 공정을 모델로 하여 Table 1과 같이 3가지 방법으로 마 정과를 제조하여 적절한 공정을 찾고자 하였다.

Table 1. Processing for sugared Chinese yam.



(2) 마 정과 제조를 위한 당 혼합비 결정 및 품질 분석(2년차)

1년차 실험에서 결정된 공정 3으로 마 정과를 제조하였으며, 사용한 당은 1년차와 동일하였다.

(3) 마 과자와 마 머랭 제조공정(3년차)

(가) 마 과자 제조공정

마분말 + 볶은 콩가루 + 감자전분 + 당 혼합 → 물로 반죽 → 두께를 5mm 되게 밀대로 압연 → 일정한 크기로 절단 → 50℃ 건조 → 마과자

(나) 마 머랭 제조공정

난백 풀기 → 분말형태의 당 첨가 → 거품기로 머랭 제조 → 마분말 첨가 후 혼합 → 찰주머니로 성형 → 100℃ 오븐에서 1시간 굽기 → 마머랭

다. 분석방법

제조한 정과의 물리적 성질(두께-칼리퍼, 색도-색도색차계, 강도-물성측정기), 화학적 성질(수분함량, 수분활성도, 총당함량)을 측정하였다. 항산화력은 마 정과 6g을 용매 40mL로 추출한 후, DPPH 방법과 ABTS법으로 측정하였다. 마과자와 마머랭의 강도도 물성측정기로 측정하였으며, 모든 관능검사는 일반인을 상대로 9점법으로 실시하였다.

3. 연구결과

가. 마 정과 제조 공정 확립을 위한 제조공정(1년차)

(1) 3 공정에 따른 마 정과의 모습

3가지 공정으로 제조한 정과의 모습은 Fig. 1과 같다. 설탕으로 제조한 정과의 색은 흰 편이었으며 과당으로 만든 정과의 색이 가장 진한 갈색으로 나타났다.



Fig. 1. Sugared Chinese yam (numbers in figure mean the processing number).

(2) 정과의 수율, 두께, 수분함량, 수분활성도

단순히 50% 당액에서 1시간 가열하여 제조한 정과(공정 1)의 무게는 240-312g이었으며, 50% 당액에서 1시간 가열하고 균일한 당평형을 위해 60℃에서 24시간 더 침지한 정과(공정 2)의 무게는 311-358g이었다. 당액을 50에서 70%로 증가시키면서 제조한 정과(공정 3)의 무게는 가장 커 406-432g이었다(Table 2). 어느 공정에서나 올리고당을 사용하여 제조한 정과의 무게가 가장 낮았는데, 이는 올리고당의 분자크기가 4가지 당 중에서 제일 커서 마에 침투하기가 어려웠기 때문이라 여겨진다. 또한 올리고당에는 식이섬유가 33% 함유되어 있기 때문에 더욱 더 침투가 어려웠을 것으로 생각된다.

정과의 두께는 전반적으로 3.0-3.7mm이었으며 설탕을 이용한 정과가 제일 두꺼웠다. 이는 설탕이 건조 중 제품 내에서 결정화되었기 때문일 것이다. 공정 방법에 따른 차이는 별로 없었다.

수분함량도 설탕을 이용한 정과가 제일 커서 15% 내외의 수치를 보였으며, 다른 당을 사용한 정과의 수분함량은 10.9-12.4%이었다. 이와 반대로 수분활성도는 설탕이용 정과가 0.72-0.76로 가장 높았으며 과당과 벌꿀을 이용한 정과는 0.36-0.41로 가장 낮았다. 수분함량과 수분활성도도 공정에 따른 차이는 크지 않았다.

페놀-황산 방법으로 측정된 총 당의 함량은 설탕 정과가 77.3-81.6%로 가장 높았으며, 그 밖의 당으로 만든 정과의 당 함량은 71.5-75.5%이었다.

Table 2. Yield, thickness, moisture content, water activity, and total sugar of sugared Chinese yam

Process	Sugar	Product (g)	Yield (%)	Thickness (mm)	Moisture content (%)	Water activity	Total sugar(%)
1	Sugar	298	59.6	3.3	14.7	0.72	81.6±1.4
	Oligo-saccharide	240	48.0	3.1	11.3	0.47	72.7±1.6
	Fructose	312	62.4	3.1	11.4	0.36	75.4±1.7
	Honey	265	53.0	3.1	12.4	0.40	75.5±0.0
2	Sugar	340	68.0	3.7	15.3	0.74	77.3±0.2
	Oligo-saccharide	311	62.2	3.4	11.5	0.50	73.4±1.9
	Fructose	349	69.8	3.1	10.9	0.36	71.5±0.9
	Honey	358	71.6	3.0	11.3	0.39	70.8±0.7
3	Sugar	427	85.4	3.6	15.0	0.76	80.8±0.0
	Oligo-saccharide	406	81.2	3.0	12.3	0.56	73.5±3.2
	Fructose	432	86.4	3.0	11.3	0.41	73.2±0.1
	Honey	441	88.2	3.0	11.1	0.41	71.5±1.6

- Based on 500g of yam.

(3) 정과의 색도

정과의 색은 설탕을 사용한 것이 가장 희게 나타나 L값이 63.4-64.9이었으며, 올리고당, 과당, 벌꿀로 제조한 정과는 갈색을 나타냈으며 L값은 40내외의 값을 보였다(Fig. 1, Table 3).

공정에 따른 차이를 보면 공정 3의 제품이 약간 밝은 것으로 나타났으나 그 차이는 크지 않았다. 붉은 색을 나타내는 a값과 노란 색을 나타내는 b값은 갈색 계통의 색을 띄는 올리고당, 과당, 꿀 이용 정과가 설탕 정과보다 훨씬 높아 a는 12.8-19.4, b는 24.1-30.8이었다. 당에 따라 갈색 정도가 다른 것은 가열 중 당의 갈변정도가 다르기 때문이라 여겨진다. 특히 과당을 사용한 정과가 제일 많이 갈색을 나타냈다.

Table 3. Color of sugared Chinese yam.

Process	Sugar	L	a	b
1	Sugar	64.2±3.1	2.8±0.5	11.5±1.5
	Oligo-saccharide	43.8±2.6	12.8±1.7	24.1±2.3
	Fructose	37.8±1.7	18.6±1.9	24.5±3.3
	Honey	41.8±2.1	16.9±1.1	30.8±2.4
2	Sugar	63.4±1.7	4.8±0.6	14.5±1.0
	Oligo-saccharide	43.9±1.6	14.7±1.5	24.9±1.0
	Fructose	41.6±9.7	19.4±0.9	24.9±2.6
	Honey	41.5±1.3	17.1±1.0	27.0±1.3
3	Sugar	64.9±4.5	5.1±0.5	12.2±1.2
	Oligo-saccharide	44.5±1.6	14.4±1.7	24.7±1.7
	Fructose	42.2±2.2	18.6±2.0	28.3±2.0
	Honey	42.3±1.3	16.1±1.6	28.2±1.7

(4) 정과의 물성

정과를 직경 5mm의 실린더형 탐침으로 제품의 표면으로부터 5mm까지 누르면서 측정한 물성 결과를 보면(Table 4), 설탕을 이용한 정과는 쉽게 부수지는 것으로 나타났다. 이는 마에 침투한 설탕이 건조 중 결정화되었기 때문이라 여겨진다. 공정에 따라 약간의 차이는 있지만 2294-2747g의 힘을 받았을 때 0.73-1.25mm의 침투 깊이에서 파쇄되었다. 반면에 다른 당을 이용한 정과는 탐침의 침투 중 거의 부수지지 않아 최대치의 힘을 보이는 깊이가 5mm에 근접하였다. 특히 공정 1과 2의 정과는 최대치의 힘도 상당히 컸으며 특히 올리고당을 사용한 공정 1의 정과는 12022g의 힘을 보였다. 최대치 힘이 크고 최대치를 보이는 깊이가 크다는 것은 정과가 상당히 질겨 씹기가 어렵다는 것을 의미한다. 마 정과의 주 수요층이 중년이상으로 하였을 때 공정 3으로 제조하는 것이 씹기에 적합하였다.

Table 4. Strength of sugared Chinese yam.

Process	Sugar	Max. strength(g-force)	Distance to Max. strength(mm)
1	sugar	2751±787	0.73±0.25
	oligosaccharide	12022±2056	4.22±0.76
	fructose	4993±948	4.99±0.02
	honey	8617±2205	5.00±0.13
2	sugar	2747±1191	1.25±0.71
	oligosaccharide	6605±1347	4.44±0.56
	fructose	3773±1627	4.75±0.36
	honey	3930±1065	4.53±0.55
3	sugar	2294±782	0.96±0.29
	oligosaccharide	2887±1008	4.76±0.47
	fructose	2310±687	4.75±0.50
	honey	1567±508	4.70±0.38

(5) 결론

마 정과에 쉽게 사용할 수 있는 당액으로 제품을 만들어 본 결과, 색감과 씹힘성을 고려할 때 설탕이 가장 적합한 것으로 나타났으며 올리고당과 꿀은 그다지 적합하지 못하였다. 그러나 건강에 좋은 올리고당과 고급 제품을 위한 꿀을 이용한 정과의 개발도 필요하다 여겨진다. 따라서 설탕과 이들 당을 혼합한 당액으로 정과를 제조하여 씹힘성과 색감도 좋으면서 다양한 마 정과 제품을 생산하기 위한 조건의 설정이 요구된다. 전반적으로 수율이 크고 씹기에 적당한 마 정과는 공정 3에 의한 것이었다.

나. 마 정과 제조를 위한 당 혼합비 결정 및 품질 분석(2년차)

설탕, 과당, 올리고당, 벌꿀을 이용한 1년차 실험 결과, 설탕으로 제조한 것이 씹힘성이 가장 좋은 것으로 나타났다. 그러나 설탕으로 제조한 마 정과는 수분활성도가 0.7정도로 장기 보존에 부적합하고 건강지향적인 마의 이미지에 어울리지 않기 때문에 다양한 당의 혼합으로 마 정과를 제조하고 이들의 품질을 분석하였다.

(1) 설탕과 과당, 벌꿀, 올리고당을 혼합한 정과의 특성

설탕을 기본 당으로 하고 여기에 과당, 벌꿀, 올리고당을 비율을 달리하여 제조하고 12시간 건조한 정과의 품질 특성을 보면(Table 5), 수율은 처리구마다 약간씩 달라 68.4%~83.6%를

보였다. 일반적으로 70%대의 수율을 보였다. 정과의 두께는 설탕으로만 만든 것이 3.3mm인데 비해, 과당, 벌꿀, 올리고당만을 이용한 정과는 수축이 더 많이 되어 설탕보다 작은 2.7~3.0mm였다. 1년차 결과에서도 설탕 정과가 제일 두꺼웠고 다른 3 종류의 당 정과는 이보다 얇았다. 당을 혼합한 것은 중간 값인 2.9~3.1mm를 보였다. 원료의 두께는 3.5mm이었다.

정과의 저장성을 예측해 볼 수 있는 수분활성도는 설탕정과는 0.71로 장기 저장에는 부적합한 것으로 나타났으나, 다른 당 혹은 다른 당을 혼합한 정과는 0.5 이하로 양호한 수치를 보였다. 정과의 총당 함량은 68.6~81.0%로 시료 간에 다소 차이를 보였으나 일정한 경향은 찾을 수 없었다.

Table 5. Properties of sugared Chinese yam made of mixture of sugar, fructose, oligosaccharide, and honey

Sugar	Mixing ratio	Product (g)	Yield (%)	Thickness (mm)	Moisture content (%)	Water activity	Total sugar (db, %)
Sugar	100	513	68.4	3.3	15.17	0.71	75.6
Sugar+fructose	75+25	585	78.1	3.0	14.20	0.50	70.1
Sugar+fructose	50+50	577	77.0	3.0	11.98	0.41	68.6
Sugar+fructose	25+75	624	83.2	3.0	14.13	0.44	70.8
Fructose	100	599	79.8	2.8	13.35	0.40	81.0
Sugar+honey	75+25	590	78.7	3.1	12.88	0.45	76.3
Sugar+honey	50+50	600	80.0	3.0	12.50	0.41	73.6
Sugar+honey	25+75	589	78.6	2.9	12.52	0.37	71.8
Honey	100	627	83.6	2.7	12.43	0.33	70.5
Sugar+oligosacch.	75+25	544	72.5	3.0	12.63	0.41	76.7
Sugar+oligosacch.	50+50	547	72.9	3.0	13.53	0.48	74.9
Sugar+oligosacch.	25+75	569	75.9	3.1	13.42	0.46	77.2
Oligosaccharide	100	566	75.4	3.0	12.15	0.42	72.8

정과의 색도를 보면(Table 6), 설탕만으로 제조한 정과가 제일 희어 L값(명도)이 63.59이었으며 a는 1.25, b는 6.99이었다. 과당으로 만든 것은 L이 32.02, a가 2.43, b가 10.75로 갈색을 나타냈다. 설탕과 과당을 혼합한 것들은 그 중간 값을 나타내 L값이 35.04~38.06을 나타내 전반적으로 갈색을 띠었다. 설탕과 벌꿀을 혼합한 정과도 과당처리 정과와 유사한 색을 띠었다. 올리고당을 혼합한 정과는 과당과 벌꿀을 혼합한 것보다는 덜 갈색으로 착색이 되었다.

정과의 강도는 설탕만으로 만든 정과는 최대 경도가 2753g-force를, 최대치까지의 거리가 1.00mm를 나타내 단단하지만 딱 부러지는 성질을 보여주었다(Table 6). 설탕에 과당 혹은 벌꿀을 혼합한 정과는 설탕처리구보다는 강도가 낮았으나 최대치까지의 거리가 3.27~3.92mm로 다소 질긴 상태를 보여주었다. 실제로 씹었을 때도 질긴 느낌이 있었다. 올리고당을 혼합한 것은

경도도 2056~2963g-force, 최대치까지의 거리가 3.71~4.16mm로 상당히 질긴 상태로 나타나 씹기가 쉽지 않았다.

Table 6. Color and hardness of sugared Chinese yam made of mixture of sugar, fructose, oligosaccharide, and honey.

Sugar	Mixing ratio	Color			Hardness	
		L	a	b	max. strength (g-force)	distance to max. strength (mm)
Sugar	100	63.59±2.06	1.25±0.37	6.99±1.45	2753±793	1.00±0.45
Sugar+fructose	75+25	38.06±1.81	3.51±1.44	14.11±2.68	1507±465	3.76±0.66
Sugar+fructose	50+50	38.50±2.66	3.58±0.84	15.40±1.07	1612±699	3.92±0.84
Sugar+fructose	25+75	35.04±1.75	5.33±1.31	14.23±2.23	1014±225	3.27±0.55
Fructose	100	32.02±1.35	2.43±0.74	10.75±1.63	1263±523	3.74±0.63
Sugar+honey	75+25	44.22±3.27	2.86±1.16	16.22±2.53	1461±273	3.76±0.67
Sugar+honey	50+50	42.27±3.74	3.13±0.77	17.89±2.83	1186±364	3.73±0.67
Sugar+honey	25+75	44.55±3.77	5.41±0.84	22.56±2.29	1118±260	3.50±0.71
Honey	100	34.85±1.30	4.02±0.64	14.75±0.79	1213±424	3.35±0.66
Sugar+oligosacch.	75+25	55.32±4.37	-0.02±0.12	7.87±0.30	2056±354	3.86±0.61
Sugar+oligosacch.	50+50	47.51±2.60	1.03±0.82	10.76±1.77	2963±1315	3.71±0.56
Sugar+oligosacch.	25+75	39.34±1.27	-0.14±0.26	6.70±0.46	2488±546	3.74±0.34
Oligosaccharide	100	50.23±4.28	0.80±0.58	11.07±1.41	2651±783	4.16±0.68

(2) 과당과 올리고당을 혼합한 정과의 특성

다음은 과당과 올리고당을 혼합하여 제조하고 8시간 건조한 마 정과의 특성을 보면(Table 7), 수분활성도는 올리고당의 비율이 클 수록 높아져서 올리고당이 없는 100% 과당이 0.39이었으며 100% 올리고당의 경우 0.52이었다. 혼합의 경우 올리고당 혼합량이 많을수록 수분활성도가 약간 더 증가하였다. 전반적으로 장기 저장에 지장이 없는 수준이었다. 강도는 올리고당만으로 제조한 정과가 1119g-force로 가장 컸으며 과당과 올리고당을 혼합하거나 과당만으로 제조한 정과는 800g-force 이하였다. 최대치까지의 거리가 1.41~2.00mm정도였다. 강도가 약 1000g-force 이하이면 씹는 데 지장이 없는 부드러움을 갖는다. 다만 과당과 올리고당을 혼합한 정과의 경우 표면이 끈적거리 손가락으로 집는데 불편한 점이 있었다.

Table 6에서 과당만으로 제조한 정과의 강도가 1263g-force이고 올리고당만으로 제조한 정과의 강도가 2651g-force 인데 비해, 같은 당으로 처리한 표 7의 정과의 강도가 더 낮은 것은 사용한 마의 차이거나, 건조시간을 12시간이 아닌 8시간으로 하여 건조된 정도가 다르기 때문일 것으로 여겨진다.

Table 7. Properties of sugared Chinese yam made of fructose and oligosaccharide.

Sugar	Mixing ratio	Moistue (%)	Water activity	Hardness		Color		
				max. strength (g-force)	distance to max. strength (mm)	L	a	b
Fructose	100	13.54	0.39	654±170	1.41±0.17	44.6±4.9	4.91±2.07	21.5±4.2
Fruc+oligo	75+25	12.72	0.40	756±172	1.57±0.17	45.9±1.3	4.27±0.26	20.9±3.4
Fruc+oligo	50+50	13.27	0.42	680±94	1.60±0.12	41.0±4.6	2.11±1.89	13.8±4.0
Fruc+oligo	25+75	12.88	0.45	792±83	1.83±0.18	35.8±1.5	1.40±0.93	10.4±1.7
Oligosaccharide	100	14.84	0.52	1119±257	2.00±0.34	36.5±1.7	0.91±0.30	6.6±1.0

(3) 설탕, 올리고당, 벌꿀을 혼합한 정과의 특성

설탕과 올리고당, 벌꿀의 혼합비를 달리하여 제조하고 8시간 건조한 정과의 특성을 보면(표 8), 수분활성도의 경우 모두 0.5이하로 적합한 것으로 나타났다. 강도는 설탕, 올리고당, 벌꿀을 8:1:1로 혼합한 정과가 1863g-force이었으며, 올리고당의 비율이 20%인 것이 비정상적으로 4439g-force로 상당히 높았다. 올리고당이 30, 40% 혼합된 것의 강도는 2108과 2130g-force로 유사하였다. 색도는 올리고당이 많을수록 어두워지는 경향을 보였다. 전반적으로 설탕과 올리고당, 벌꿀을 혼합하여 정과를 제조한다면 8:1:1이 무난할 것으로 보인다. 여기서도 일부 정과 표면이 끈적거림이 나타났다.

당의 혼합비를 달리하여 제조한 정과의 수분활성도, 강도, 끈적임, 맛, 기능성 등을 종합적으로 감안하여 마 정과 제조를 위한 최종 배합을 다음과 같이 3가지 조합으로 정하였다.

제시된 최종 조합: [설탕+올리고당(3:1), 과당+올리고당(1:3), 설탕+올리고당+벌꿀(8:1:1)]

이에 따라 제조한 정과의 품질을 보면(표 9), 수분활성도는 0.52 이하로 적합한 수준이었으며, 강도 또한 1206g-force로 씹기에 무리가 없는 수준이었다. 다만 이들 정과의 표면이 끈적여 손으로 잡는 데 불편한 점이 있기 때문에 분당이나 마분말로 처리하는 것이 필요하였다. 분당이나 마분말로 표면을 처리한 정과의 물 추출물의 항산화력을 보면(Table 10), 시료 간에 DPPH법이나 ABTS법에 의한 수치에 일정한 경향을 찾을 수 없었다.

그러나 70% 에탄올 추출물로 측정된 항산화력에서는(Table 11) 사용한 당의 종류에 상관없이 모든 처리구에서 마 분말을 사용한 것이 분당 처리보다 우월한 항산화력을 보였다. 사용한 당의 종류에 따라서는 과당과 올리고당을 혼합한 정과가 DPPH법에 의한 항산화력이 34.3%와 57.1%(각각, 분당 및 마분말처리 정과)로 다른 당처리 정과보다 훨씬 높았다. ABTS법으로 측정한 항산화력도 과당과 올리고당을 혼합한 정과에서 제일 높아 각각 82.2%와 88.8%이었다. 이는 이 당으로 제조한 정과에서 추출한 총 폴리페놀의 함량이 다른 처리 정과보다 높은 0.53~0.62mg/g이었기 때문이라 여겨진다.

Table 8. Properties of sugared Chinese yam made of fructose, oligosaccharide, and honey.

Sugar	Mix- ing ratio	Mois- ture (%)	Water activity	Hardness		Color		
				max. strength (g-force)	distance to max. strength (mm)	L	a	b
Sugar+oligo+ honey	80+10+ 10	10.57	0.48	1863±443	2.09±0.47	65.7± 1.9	1.79± 0.64	13.1± 1.5
Sugar+oligo+ honey	70+20+ 10	9.57	0.38	4439±2057	2.03±0.50	63.6± 2.9	0.76± 0.59	12.1± 1.1
Sugar+oligo+ honey	60+30+ 10	11.70	0.44	2108±1220	2.13±0.27	58.1± 5.1	1.18± 0.70	12.5± 1.6
Sugar+oligo+ honey	50+40+ 10	9.97	0.39	2130±1194	0.87±0.32	52.4± 6.8	1.53± 0.71	13.3± 2.3

Table 9. Properties of some sugared Chinese yam.

Sugar	Mix- ing ratio	Mois- ture (%)	Water activity	Hardness	
				max. strength (g-force)	distance to max. strength (mm)
Sugar+oligo	75+25	10.00	0.52	1206±413	3.36±1.03
Fructose+oligo	25+75	11.70	0.45	847±184	3.80±0.45
Sugar+oligo+honey	80+10+10	8.41	0.46	896±140	3.69±0.56

Table 10. Antioxidation properties of water extract from sugared Chinese yam.

Sugar	Mixing ratio	Surface treatment	DPPH(%)	ABTS(%)	Total polyphenol (mg/g)
Sugar+oligo	75+25	sugar powder	18.0±0.5	nd	0.37±0.01
		yam flour	28.2±4.0	18.3±3.4	0.45±0.05
Fructose+oligo	25+75	sugar powder	24.3±0.1	14.5±0.2	0.58±0.07
		yam flour	20.1±4.5	14.5±0.2	0.56±0.01
Sugar+oligo+honey	80+10+10	sugar powder	30.5±0.4	nd	0.43±0.00
		yam flour	28.9±6.4	9.7±0.5	0.48±0.01

Table 11. Antioxidation properties of 70% ethanol extract from sugared Chinese yam.

Sugar	Mixing ratio	Surface treatment	DPPH(%)	ABTS(%)	Total polyphenol (mg/g)
Sugar+oligo	75+25	sugar powder	3.5±1.4	67.2±1.3	0.38±0.03
		yam flour	37.3±0.8	81.5±1.0	0.42±0.01
Fructose+oligo	25+75	sugar powder	34.3±0.5	82.2±0.5	0.53±0.02
		yam flour	57.1±0.1	88.8±0.4	0.62±0.03
Sugar+oligo+honey	80+10+10	sugar powder	6.1±0.1	58.8±0.8	0.45±0.01
		yam flour	20.1±0.4	73.9±0.3	0.54±0.07

(4) 결론

여러 가지 당을 혼합하여 마 정과를 제조한 후, 수분활성도에 의한 저장성, 조직감과 씹힘성 등의 물성, 항산화력에 의한 기능성을 조사하였다. 이들 특성을 종합적으로 고려한다면 마를 과당과 올리고당(1:3)으로 당처리한 후 표면에 마분말을 처리하여 제조하는 것이 제일 적합하다고 여겨진다. 더군다나 이들 당 조합으로 제조한 마 정과는 그리 달지 않아 마 정과의 주 소비층인 성인에게 적당할 것이며, 올리고당을 많이 사용함으로써 마가 갖는 건강지향성 이미지에도 어울릴 것으로 판단된다. 이 혼합비로 제조한 마 정과를 일반 소비자 22명을 상대로 관능 검사를 한 결과도 9점 만점에 7점을 받아 긍정적으로 평가되었다(Table 12, Fig. 2). 특히 이 제품의 주 소비층이라 할 수 있는 50대 이상에서 전체적인 기호도에서 7.8의 아주 우수한 점수를 얻었다.

Table 12. Sensory test for sugared Chinese Yam made of mixture of fructose and oligosaccharide (1:3).

Age group	Appearance	Flavor	Taste	Texture	Overall
20	6.8±0.9	5.0±0.8	6.5±1.8	7.0±1.8	6.8±1.2
40	6.8±0.8	6.0±1.3	7.2±1.0	7.2±1.0	6.7±0.5
50	7.5±0.5	7.0±1.7	7.8±1.0	7.7±1.0	7.8±0.8
Total	7.0±0.8	5.8±1.4	7.0±1.5	7.2±1.4	7.0±1.0



Fig. 2. Sugared Chinese yam made of mixture of fructose and oligosaccharide (1:3).

다. 마 과자와 마 머랭 제조: 3년차 연구 결과

(1) 마 과자

마를 주원료로 하고 최대한 열처리를 하지 않아 마의 기능성을 살리는 가공식품을 제조하기 위해, 마 분말을 당과 혼합하여 반죽을 만든 후 밀대를 이용하여 5mm 두께로 압연한 다음 50℃에서 건조하여 마 과자를 제조하였다. 그러나 마 분말만을 사용한 마 과자의 강도가 너무 강하여 씹기가 곤란한 정도였다. 이러한 강도의 증가는 마의 단백질과 전분이 강한 결합을 하기 때문이라 여겨진다.

볶은 콩가루를 마 분말에 첨가하여 만든 마 과자는 콩의 유지 성분 때문에 마 분말만을 사용한 것보다는 부드러운 조직감을 보였으나 여전히 씹기에는 부적당하였다. 따라서 전분을 추가로 혼합하여 마 과자를 제조하였다. 일반적으로 전분은 분말입자의 결속을 방해하여 타블렛 형태의 가공식품의 강도를 낮추는 효과가 있다. 제약공정에서 전분을 첨가하는 것도 전분의 이런 역할 때문이다. 또한 유당도 분말입자의 결속을 방해하여 분산제로 쓰이고 있다.

마 분말과 콩가루에 분산제인 전분과 유당을 첨가하여 제조한 마 과자의 강도를 보면(Table 13), 마 분말과 콩 분말, 감자 전분을 각각 100으로 하고 설탕을 50 넣은 마 과자의 강도는 9900g-force로 상당히 단단하였다. 감자전분대신에 유당을 넣은 것도 7810g-force로 상당히 단단하였다. 전분과 유당을 50씩 첨가한 것이 다소 부드러워 7330g-force의 강도를 보여주었으나 만족할 만한 수준은 아니었다.

Table 13. Hardness of Chinese yam cookie added with potato starch and lactose.

Yam flour	Formular				Hardness (g-force)
	Soy flour	Potato starch	Lactose	Sugar	
100	100	100	0	50	9900±2460
100	100	0	100	50	7810±2020
100	100	50	50	50	7330±2600

설탕 대신에 자일리톨과 솔비톨 그리고 그린스위트(아스파탐)을 첨가하여 마 과자를 제조해 본 결과, 강도 면에서 바람직한 결과를 얻을 수 있었다(Table 14). 자일리톨과 솔비톨을 각각 50 첨가한 마 과자의 강도가 4200과 4380g-force를 보여 씹힘성이 적당하였으며, 그린스위트를 20 넣은 것은 강도가 2010g-force로 너무 부드러워 쉽게 부서지는 경향이 있었다. 그린스위트를 다른 당류보다 적게 넣은 것은 고감미제인 아스파탐이 포함되어 있기 때문이며 전체 감미도를 같은 수준으로 유지하고자 하였다. 솔비톨을 첨가한 것은 균열이 많이 발생하여 자일리톨을 첨가한 것이 가장 우수하였다. 자일리톨은 설탕과 달리 충치를 유발하지 않고 시원한 감을 주기 때문에 건강지향적인 마 과자에 더욱 적합한 당류라고 여겨진다.

콩가루와 감자전분 대신에 흑콩가루와 옥수수전분을 첨가하여도 마 과자의 강도에는 큰 영향을 주지 않았다(표 15). 콩가루(백콩)와 감자전분을 첨가한 것의 강도가 4280g-force였는데, 흑콩가루와 감자전분을 첨가한 것이 4930, 백콩과 옥수수전분을 첨가한 것이 4990g-force로 큰 차이를 보이지 않았다. 다만 흑콩과 옥수수전분 조합이 6180g-force로 다소 높았으나 차이는 크지 않았다. 따라서 콩의 종류(백콩과 흑콩)와 전분의 종류에 따라서는 마과자의 강도에 영향을 주지 않는다는 것을 알 수 있었다.

Table 14. Hardness of Chinese yam cookie made of various sugars

Yam flour	Formular			Hardness (g-force)
	Soy flour	Potato starch	Sugars	
100	100	100	xylitol 50	4200±1350
100	100	100	sorbitol 50	4380±1460
100	100	100	Green sweet 20	2010±390

Table 15. Hardness of Chinese yam cookie made of black soybean and corn starch

Yam flour	Formular			Hardness (g-force)
	Soy flour	Starch	Xylitol	
100	100	100(potato)	50	4280±1500
100	100(black bean)	100(potato)	50	4930±2090
100	100	100(corn)	50	4990±1420
100	100(black bean)	100(corn)	50	6180±2850

실험 결과, 적정 조합으로 판단되는 배합 3가지로 제조한 마 과자의 관능검사를 9점법으로 61명의 학생을 대상으로 실시하였다. 전체적으로 5점 이하의 점수를 얻어 만족할 만한 결과를 얻지 못했다(Table 16, Fig. 3). 그 중에서 감자전분과 자일리톨을 첨가한 것이 전체적인 기호도에서 4.8을 얻어 가장 높았다. 마가 지니고 있는 특유의 맛 혹은 쓴맛으로 인해 젊은 층에 부합하기에는 부족하였으며, 또한 전반적으로 단단하며 치아에 잔류물이 남는다는 지적이 많았다.

관능검사에서 지적된 취약점을 개선하기 위해 말토덱스트린과 쇼트닝 등을 첨가한 제품에서는 말토덱스트린 추가로 인한 강도 증가 경향이 있었고, 쇼트닝은 첨가하면 느끼한 느낌으로 인해 전반적인 관능 개선에는 도움이 되지 못하였다.

Table 16. Sensory test of Chinese yam cookie(9 point method)

Formular	Appearance	Taste	Texture	Overall
1. Yam flour 100 + soy flour 100 + potato starch 100 + xylitol 50	4.8±2.0	4.8±2.0	4.4±2.0	4.8±1.9
2. Yam flour 100 + soy flour 100 + potato starch 50 + lactose 50 + sugar 50	4.9±1.8	4.6±2.0	4.7±2.1	4.6±1.8
3. Yam flour 100 + soy flour 100 + green sweet 20	4.7±2.0	4.1±1.8	4.5±2.0	4.2±1.7



Yam flour 100 +
soy flour 100 +
potato starch 100 +
xylitol 50



Yam flour 100 +
soy flour 100 +
potato starch 50 + lactose
50 + sugar 50



Yam flour 100 +
soy flour 100 +
Green sweet 20

Fig. 3. Chinese yam cookies.

(2) 마 머랭

마 분말에 콩가루와 전분을 참가하여 제조한 마 과자의 강도가 소비자가 받아들이기에는 다소 단단하였기에 마 분말에 난백을 첨가하여 마 머랭을 제조하였다. 머랭은 난백의 기포성을 이용하는 제품으로 제품에 미세한 거품이 포함되므로 강도를 낮추는 데는 크게 효과가 있을 것으로 예상되었다.

마 머랭은 다음과 같이 제조하였다. 먼저 난백을 먼저 거품기로 가볍게 푼 후, 분당 등의 당을 넣고 거품기를 이용하여 저어 크림을 만든다. 여기에 마 분말이나 콩가루를 넣어 빠르게 섞은 다음, 찰주머니에 넣고 짜서 성형시킨 것을 100℃ 오븐에서 1시간 구웠다.

난백 40g에 분당을 30g 첨가하여 크림을 만들고 여기에 마 분말과 콩가루의 혼합물(마에 대한 콩의 배합비는 0, 10, 25, 50, 100%)을 60g 넣어 만든 마 머랭의 수분함량과 파쇄강도를 보면(Table 17), 콩 분말의 배합이 작은 100:0과 100:10 처리로 만든 마 머랭은 강도가 160 과 610g-force로 상당히 약해 쉽게 부서져 적합하지 않았다. 콩 분말의 배합비가 25% 이상에서는 처리에 따라 크게 강도가 다르지 않았으며 부서짐이 없어 강도 면에서는 양호하였다. 분당을 45g으로 높인 처리에서도 콩 배합비가 작은 0과 10%의 머랭은 강도가 약해 쉽게 부서지는 경향을 보여주었다. 일반적으로 분당의 함량이 높은 머랭이 약간 더 쉽게 부서지는 경향이 있었다.

Table 17. Properties of Chinese yam meringue made of sugar powder.

Formular			Moisture content(%)	Water activity	Breaking strength (g-force)
Sugar powder(g)	Yam flour + soy flour(g)	Yam flour : soy flour			
30	60	100 : 0	5.5	0.18	160±110
		100 : 10	5.5	0.16	610±330
		100 : 25	4.0	0.14	2250±630
		100 : 50	3.8	0.13	2560±750
		100 : 100	3.8	0.12	2450±740
45	60	100 : 0	4.0	0.15	110±40
		100 : 10	3.9	0.12	820±410
		100 : 25	4.2	0.15	1290±440
		100 : 50	3.9	0.15	2630±940
		100 : 100	4.7	0.14	2280±990

Formular : based on 40g of egg white.

분당대신에 자일리톨을 배합한 마머랭의 성질을 보면(Table 18), 강도가 상당히 적어 부드러운 성질을 보였다. 강도의 특성은 쉽게 부서져 가루가 되는 것이 아니라 촉촉한 감을 갖는 부드러움을 보여주었다. 자일리톨을 30g함유하고 콩가루가 없는 머랭의 강도가 240g-force로 부드러우면서도 촉촉한 감을 가졌다. 시중의 초코칩 쿠키와 유사한 물성을 가졌다고 할 수 있었다. 수분함량에서는 분당으로 만든 머랭과 큰 차이를 보이지는 않았다. 콩가루가 많이 함유될 수록 수분함량과 수분활성도가 약간 증가하는 경향을 보였으나 저장에 문제가 있는 정도는 아니었다. 다만 자일리톨을 함유한 머랭의 색은 갈색을 띠는 경향을 보였다.

Table 18. Properties of Chinese yam meringue made of xylitol.

Formular			Moisture content(%)	Water activity	Breaking strength (g-force)
Xylitol(g)	Yam flour + soy flour(g)	Yam flour : soy flour			
30	60	100 : 0	5.6	0.15	240±120
		100 : 10	4.6	0.13	580±310
		100 : 25	5.6	0.15	700±340
		100 : 50	8.7	0.33	420±210
		100 : 100	8.9	0.35	560±170
45	60	100 : 0	5.1	0.24	90±40
		100 : 10	5.1	0.15	370±260
		100 : 25	3.8	0.16	220±70
		100 : 50	5.4	0.20	510±140
		100 : 100	7.9	0.41	1360±460

Formular: based on 40g of egg white.

Table 17, 18에서 적합한 배합비로 판단된 3가지 머랭 제품(분당 30 + 마 분말 100과 콩 분말 25, 분당 30 + 마 분말 100과 콩 분말 50, 자일리톨 30 + 마 분말 100)에 대해 32명의 학생을 상대로 관능검사를 실시하였다. 9점 척도법으로 실시한 결과(Table 19, Fig. 4), 외관은 당으로 자일리톨을 사용하고 콩분말이 첨가되지 않은 머랭이 5.8점으로 가장 높았다. 이는 갈변으로 인한 색 때문이라 여겨진다. 다른 면에서는 분당으로 만든 머랭보다 낮은 점수를 보였다. 특히 조직 면에서 4.4점을 얻어 가장 낮았다. 머랭의 촉촉함 때문에 질긴 감이 있고 치아에 남는 문제 때문이라 여겨진다. 분당을 이용한 머랭이 5.1의 점수를 얻어 9점 만점에 중간에 해당하는 점수는 얻었고, 이전의 마 과자의 관능점수 4.4-4.8(표 16)보다는 좋았으나 전체적으로 만족할 만한 수준은 아니었다.

결론적으로 마 분말을 주원료로 하는 과자 등은 마 분말이 갖는 특유한 맛과 향 때문에 젊은 층이 선호하지 않는다고 생각되며, 마 분말을 주재료로 사용하는 가공식품을 개발하려면 부원료의 선택, 향과 조직감 개선 등을 위한 다양한 시도가 있어야 할 것이다.

Table 19. Sensory test of some Chinese yam meringues (9 point method)

Formular	Appearance	Taste	Texture	Overall
sugar powder 30 + flour 60(yam flour 100 : soy flour 25)	5.0±1.4	4.7±1.7	5.5±1.7	5.1±1.4
sugar powder 30 + flour 60(yam flour 100 : soy flour 50)	5.2±1.1	5.3±1.3	4.9±1.5	5.1±1.1
xylitol 30 + flour 60(yam flour 100 : soy flour 0)	5.8±1.6	4.9±1.8	4.4±2.2	4.8±2.0



Sugar powder 30 +
flour 60(yam flour 100 :
soy flour 25)



Sugar powder 30 +
flour 60(yam flour 100 :
soy flour 50)



Xylitol 30 +
flour 60(yam flour 100 :
soy flour 0)

Fig. 4. Chinese yam meringues.

제 13절 젖산발효에 의한 마 기능성 강화 발효음료제품 개발

1. 서언

요구르트(yogurt)는 원유 또는 탈지유를 젖산균, 효모로 발효시켜 만든 유제품으로 산미와 향미가 강화되었으며 우유 성분 이외에 젖산균이 생산하는 lactic acid, peptone 및 peptide 등이 함유되어 있고, 생리활성물질을 비롯한 젖산균의 장내증식으로 인한 정장작용 등으로 건강증진 효과가 있어 수요가 꾸준히 증가하고 있으며, 젖산균의 주요 특성으로 장내 정상 균총의 유지, 면역증진, 항암 효과, 장내 유해균 억제 및 혈중 콜레스테롤 저하 등의 효과가 있는 것으로 보고되고 있다. 최근 들어 이에 대한 소비자들의 관심이 높아짐에 따라 기존의 요구르트가 가지는 기능성 외에 천연의 식품소재를 이용하여 생리활성이 강화된 요구르트를 제조하려는 연구가 활발히 진행되고 있는데, 마카 열수추출물, 버찌 분말, 메밀싹, 오디추출물, 홍삼추출물, 구기자 추출액, 마늘 분말 및 흑마늘 농축액 첨가 등의 연구가 있다.

마(*Dioscorea* sp.)는 다년생 덩굴성 초본으로 전 세계의 열대 및 아열대지방에서 널리 분포하는 식량작물로서, 한방에서는 자양강장, 폐결핵 등에 유효하고 소염, 해독, 진해, 거담, 이뇨, 신경통, 류마티즘에 효과가 있는 것으로 알려져 있으며, 우리나라의 전체 생산량 중 경북북부 지역에서 약 70% 정도가 생산되고 있다. 마(*Dioscorea batatas* Dence)의 주요성분으로는 전분이 생체중의 8~24%, 점질물이 0.6~2.4%를 차지하며, 약용성분으로는 amylose, cholin, saponin 등이 포함되어 있다. 한편 마의 주요 약용성분으로 알려진 steroidal saponin은 다양한 생리활성에 관여하는 것으로 알려져 있는데, 세포의 DNA 돌연변이를 방지하는 항 돌연변이성 작용, 항암 및 항염증 작용 등이 알려져 있다.

예로부터 마는 한약제로 사용되고 있을 뿐 아니라 최근에는 중요한 기능성 식품소재로 인식되어 건강식품 또는 기능성 식품 제조에 첨가되면서 그 사용량이 증가하고 있다. 마의 기능성에 관한 연구로 마 점질물이 중금속 제거능과 angiotensin converting enzyme(ACE) 저해효과를 나타낸다는 보고와, 콜레스테롤 저하효과, 지질 분해효소 저해활성 및 항 돌연변이 활성 등이 보고되어 있다. 그러나 마를 이용한 발효식품과 요구르트 제조에 관한 연구는 미미한 실정이다. 더욱이 *Monascus*속 균주를 활용한 발효마 첨가 요구르트 제조에 대한 연구는 전무하며 특정 발효식품에서 마의 활용적인 측면에 관한 연구가 필요하다.

따라서 본 연구에서는 마 가공식품 연구의 일환으로 동시에 새로운 기능성이 부여된 발효마 함유 요구르트의 제조공정을 확립하기 위하여 수행되었으며, 뛰어난 약리적인 효과가 있는 홍국균 (*Monascus* sp.)과 젖산균을 이용하여 마의 2단발효를 통해 얻어진 발효마 분말을 첨가한 요구르트 제조시 젖산균의 생육에 미치는 영향과 GABA(γ -aminobutyric acid), 항산화활성 등의 생리활성 효과를 조사하였다.

2. 연구방법론

가. 재료 및 시약

본 실험에서 사용한 마 시료는 2009년과 2010년에 경북 안동에서 재배한 것으로 마분말 및 발효마 분말을 사용하였으며, 마분말은 마를 세척 후 껍질을 제거하고, 절단하여 60℃에서 항량 건조하여 사용하였으며, 발효마 분말은 *Monascus* sp. MK2와 *Lactobacillus brevis* HLJ59 균주를 이용한 2단 발효마를 60℃에서 항량 건조 후 분말화하여 본 실험에 사용하였다. 요구르트 제조에 사용된 우유와 탈지분유는 서울우유(Seoul Milk Co., Ltd., Seoul, Korea)에서 생산된 제품을 사용하였고, Folin-ciocalteau's phenol reagent, DPPH, tannic acid, GABA (γ -aminobutyric acid), angiotensin converting enzyme (ACE), hippuril-L-histidine-L-leucine (HHL) 등은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 그 외의 시약은 특급 및 일급 시약을 사용하였다.

나. 사용균주 및 배양

실험에 사용한 균주는 한국식품연구원, 한국미생물보존센터 및 한국생명공학연구원에서 분양 받은 표준균주 및 본 연구실에서 신규 분리한 균주를 사용하였다. 홍국균의 경우 홍국색소 생산능이 우수한 것으로 조사된 *Monascus* sp. MK2 균주를 발효마를 제조하는데 실험균주로 선발하여 본 실험에 사용하였다. 그리고 발효마의 제조를 위해 *Monascus* sp. MK2의 전배양을 위한 기본배지로 3% rice powder, 0.15% NaNO₃, 0.1% MgSO₄ · 7H₂O 및 0.25% KH₂PO₄로 구성된 Lin's 배지를 사용하였으며, 본배양은 전배양과 동일한 Lin's 배지에 전 배양액을 2% (v/v)로 접종한 후 초기 pH 6.0, 배양온도 30℃에서 130rpm으로 5일간 진탕 배양하여, 발효마의 제조를 위한 종균으로 사용하였다. 젖산균의 경우 *Lactobacillus acidophilus* KCTC3171, *Lactobacillus plantarum* KCTC3107 및 *Lactobacillus brevis* HLJ59를 사용하였으며, Lactobacilli MRS broth(Difco, Sparks, USA)에 접종하고 37℃에서 24시간 2회 계대배양하여 균주를 활성화 시킨 후 starter로 사용하였다.

다. 발효마의 제조

발효마를 제조하기 위하여 마는 흐르는 물에 세척하여 뿌리 표면에 부착된 이물질을 없애고 말단 부분과 껍질을 제거한 후, 약 3mm 정도로 절단하고 60℃에서 항량 건조하여 냉동보관 하면서 사용하였다. 1단 발효마의 제조는 건조된 마를 물에 침지한 후 불림을 행하였으며, 침지 후 물빼기를 실시한 다음 100g씩 배양통에 분취하였다. 이후 121℃에서 15분간 가압 멸균하고 실온으로 냉각시킨 다음 *Monascus* sp. MK2 배양액을 4% (v/w)로 접종한 후 30℃에서 7일간 1단 발효하였으며, 배양체의 덩어리 형성을 방지하고자 하루에 3회 흔들어 주었다. 2단 발효마의 제조는 1단 발효와 동일하게 발효를 실시한 다음, 연속하여 *Lactobacillus brevis* HLJ59 배양액을 4%(v/w)로 접종한 후 37℃에서 2일간 2단 발효를 실시하였다. 배양이 완료된 후에는 60℃에서 수분함량 10% 이하로 건조한 후 분쇄하여 냉동보관 하면서 실험에 필요

한 시료로 사용하였다.

라. 요구르트의 제조

발효마 분말 첨가 농도별 요구르트의 제조를 위한 첨가비율은 예비실험을 통해 0, 0.1, 0.3, 0.5, 1 및 2%(w/v)로 결정하였으며, Raw Milk(원유)와 5% 탈지분유에 2단 발효마 분말을 농도별로 각각 첨가하여 균질화 한 다음 100℃에서 30분간 살균하였다. 살균된 기질을 실온으로 냉각시킨 후 starter를 2% (*Lactobacillus acidophilus* KCTC3171, *Lactobacillus plantarum* KCTC3107 및 *Lactobacillus brevis* HLJ59, 1:1:1, v/v)되게 접종하여 37℃에서 12시간 발효시켰다. 발효가 끝난 후에는 저장온도 4℃에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

마. 제품 특성 분석

(1) pH 및 적정산도(titratable acidity)

발효마 분말 첨가 농도별 요구르트의 pH는 pH meter(Orion, model 420A, USA)를 이용하여 3회 반복 측정하였으며, 적정산도는 시료 10g에 동량의 증류수를 가하여 1% phenolphthalein을 지시약으로 하여 3 방울을 가한 후 0.1N NaOH 용액으로 적정하고 옅은 홍색이 30초간 유지되는 시점에서의 소비량을 측정하여 그 적정값을 lactic acid 함량(%)으로 환산하여 표시하였다.

(2) 젖산균 수 측정

발효마 분말 첨가 요구르트의 젖산균수 측정은 시료 1g에 멸균 식염수 9 ml을 넣고 균질화 한 후 10진법으로 희석하여, Lactobacilli MRS agar (Difco, Sparks, USA) 평판배지에 시료를 도말하고 37℃에서 48시간 배양한 뒤 생성된 집락수를 계수하여 시료 1mL당 CFU (colony forming unit)로 나타내었다.

(3) 발효마의 색소 측정

발효마로부터 색소의 측정은 에탄올을 농도별로 하여 각각 추출한 후 추출액을 12,000rpm에서 10분간 원심 분리하여 얻은 상등액을 적정배수까지 희석하여 UV-VIS spectrophotometer (Hewlett Packard 8453, Germany)를 사용하여 yellow 색소는 400nm, orange 색소는 470nm 및 red 색소는 500nm에서 측정한 흡광도 값을 각각의 홍국색소 값으로 나타내었다. 또한 red 색소와 yellow 색소의 생성량을 500nm/400nm의 비율로서 상대적으로 비교하였고, 1.0을 기준으로 하여 그 이상은 red 색소의 생성 비율이 높은 것으로 그 이하는 yellow 색소의 생성 비율이 높은 것으로 나타내었으며, 이때 흡광도 (OD) 1.0을 1 unit로 나타내었다.

(4) HPLC를 이용한 monacolin K의 정량

발효마로부터 monacolin K의 정량은 에탄올을 농도별로 하여 각각 추출한 후 추출액을 12,000rpm에서 10분간 원심 분리하여 얻은 상등액을 사용하였다. 즉, monacolin K의 추출은 홍국쌀 1g에 0~95% 에탄올 20ml을 첨가하여 30℃, 150rpm으로 3시간 동안 교반하고 정치시

킨 후 12,000rpm에서 10분간 원심 분리하여 얻은 상등액을 membrane filter(0.45 μ m, Millipore)로 여과하여 시료로 사용하였으며, 이때 사용한 HPLC 분석조건은 다음과 같다.

Monacolin K의 정량은 Luna 5u Phenyl-Hexyl column (250 × 4.6mm)이 장착된 HPLC를 이용하여 flow rate : 1.0mL/min, UV 237nm에서 검출하면서 injection volume 20 μ L로 하여 acetonitrile : 0.1% Phosphoric acid = 55 : 45의 비율로 용출시킨 후 표준 monacolin K를 이용하여 peak의 면적비로써 비교 정량분석 하였다.

(5) DPPH radical 소거활성 측정

발효마 에탄올 추출물과 첨가 농도별 요구르트의 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical 소거활성은 Blois 등의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 즉, 농도별 시료 200 μ L에 DPPH 용액을 800 μ L를 가하여 혼합한 다음 실온에서 10분간 반응시킨 후 525nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 DPPH radical 소거활성은 시료첨가구와 무첨가구의 흡광도 차이를 비교하여 나타내었으며, 양성대조군으로 ascorbic acid를 사용하였다.

(6) 총 폴리페놀 함량

발효마 에탄올 추출물과 첨가 농도별 요구르트의 총 폴리페놀 함량 측정은 Folin-Denis법을 일부 변형하여 측정하였다. 즉, 농도별 시료 50 μ L에 2% Na₂CO₃ 용액 1mL을 가하고, Folin & Ciocalteu's phenol reagents 50 μ L를 혼합한 다음 실온에서 30분간 반응시킨 후 760nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 tannic acid (Sigma co., USA)를 사용하여 시료와 동일한 방법으로 분석하여 작성한 검량선으로부터 총 폴리페놀 함량을 계산하였다.

(7) 환원력(reducing power) 측정

발효마 첨가 농도별 요구르트의 환원력 측정은 Ferreira 등의 방법을 응용하여 측정하였다. 원심분리한 상등액의 농도별 시료 1mL에 200mM 인산 완충용액(pH 6.6) 및 1%의 potassium ferricyanide 1mL를 차례로 가한 다음 50 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응하였다. 여기에 10% TCA용액 1mL을 가하여 반응을 정지 시킨 다음 10,000rpm에서 5분간 원심분리한 후 얻은 상등액 1mL에 증류수 및 ferric chloride 용액을 각 1mL씩 혼합한 후 700nm에서 흡광도를 측정하였으며, 시료의 환원력을 흡광도 값으로 나타내었다.

(8) ACE 저해활성 분석

발효마 에탄올 추출물과 첨가 농도별 요구르트의 ACE 저해활성의 측정은 Cushman과 Cheung의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 즉, 시료 100 μ L에 100mM sodium borate buffer (pH 8.3) 100 μ L를 가한 후, 37 $^{\circ}$ C에서 5분간 preincubation시켰다. 여기에 기질로서 hippuril-L-histidine-L-leucine (HLL, Sigma, U.S.A) 용액 50 μ L를 가하여 다시 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시킨 후 1N HCl 250 μ L를 가하여 반응을 정지시켰다. 여기에 ethyl acetate 1mL를 가하여 30초간 vortexing한 다음 3,000rpm으로 15분간 원심분리 한 후 상등액 800 μ L를 취하였다. 이 상등액을 120 $^{\circ}$ C에서 40분간 완전히 건조시킨 후 동일조건의 100mM sodium borate buffer 1mL을 가하여 완전히 용해시켜 228nm에서 흡광도를 측정하여 ACE 저해활성을 계산하였다.

(9) GABA 함량 측정

발효마 에탄올 추출물과 첨가 농도별 요구르트의 GABA 함량 측정은 아미노산분석기 (Amino acid analyzer, Sykam, Germany)를 이용한 정량 분석을 실시하여 확인하였다. 발효가 완료된 발효마 에탄올 추출물과 요구르트를 12,000 rpm에서 15분간 원심분리 하여 상등액을 0.45µm membrane (Milipore, Co.)으로 여과한 후 상등액을 분석용 시료로 사용하였다.

3. 연구결과

가. 1단 발효마의 생리활성 효과

(1) 발효균주의 선발

마의 젖산발효에 의한 기능성 yogurt를 개발하기 위하여 혈압강하 등에 대한 기능성물질로 알려진 GABA를 강화하기 위한 수단으로 monacolin K, natural pigments(yellow, orange and red), GABA 등의 물질을 대사산물로 생산하는 균주로 알려진 *Monascus* sp.를 이용하여 1차 적으로 기능성 강화를 위해 GABA의 기능과 연계하여 항고혈압 활성과 관련된 angiotensin converting enzyme 저해활성을 탐색한 결과는 Table 1과 같다.

Table 1. Screening of ACE inhibitor produced by *Monascus* sp. strains.

Strains	ACE inhibitory activity (%)	Strains	ACE inhibitory activity (%)
<i>M. sp.</i> MK2	76.27	<i>M. ruber</i> KCCM 11845	0
<i>M. kaoliang</i> KFRI 1158	0	<i>M. pilosus</i> KFRI 1141	52.34
<i>M. purpureus</i> KFRI 1165	44.78	<i>M. purpureus</i> KFRI 1163	13.58
<i>M. sp.</i> MK 804	60.59	<i>M. purpureus</i> KFRI 1134	65.97
<i>M. sp.</i> MK805	53.88	<i>M. kaoliang</i> KFRI 1155	22.35
<i>M. ruber</i> KCCM 60167	71.71	<i>M. kaoliang</i> KFRI 1159	36.26
<i>M. pilosus</i> KFRI 1140	64.03	<i>M. purpureus</i> KFRI 1137	27.69
<i>M. pilosus</i> KFRI 372	25.33	<i>M. kaoliang</i> KFRI 1157	14.71
<i>M. ruber</i> KFRI 1138	6.54		

그 결과 *Monascus* sp. MK2 균주가 ACE 저해활성이 가장 높은 균주로 선발되어 생마절편을 이용한 1단 발효를 시도하여 7일간 발효한 후 건조하고 분말화하여 시료로 사용하였다(Fig. 1).



Fig. 1. Fermentation of chinese yam by *Monascus* sp. MK2.

(2) 1단 발효마의 색소 측정

본 연구에서는 *Monascus* sp. MK2 균주를 이용하여 마의 발효를 실시하였으며, 1단 발효마 추출물의 에탄올 농도에 따른 색소 생산능을 보면 Table 2와 같다.

에탄올 농도에 따른 발효마 추출물의 색소 생산능을 보면 에탄올 농도가 50%일 때 yellow, orange 및 red 색소는 각각 12.77, 11.66 및 13.48 unit으로 가장 높은 색소의 추출효율을 보였으며, 증류수만을 추출에 사용하였을 경우에는 yellow, orange 및 red 색소가 각각 3.38, 3.28 및 3.38 unit으로 낮은 색소의 추출효율을 나타내었다. 또한 에탄올 농도가 95%일 경우에도 yellow, orange 및 red 색소가 각각 4.09, 3.14 및 3.74 unit으로 낮은 색소의 추출효율을 나타내었다. 이것은 대부분의 홍국색소는 수용성 색소와 지용성 색소의 형태로 존재하는데 50%의 에탄올 농도에서 수용성 색소와 지용성 색소가 대부분 추출됨으로서 가장 높은 추출효율을 나타낸 것으로 사료된다.

Table 2. Effect of ethanol concentration on *Monascus* pigments content from *Monascus*-Fermented Chinese yam.

EtOH concentration (%)	Production of <i>Monascus</i> Pigment (unit)			Red/Yellow
	Yellow	Orange	Red	
0	3.38	3.28	3.38	1.00
25	5.85	6.00	7.01	1.20
50	12.77	11.66	13.48	1.06
75	12.54	10.80	12.74	1.02
95	4.09	3.14	3.74	0.91

(3) 1단 발효마의 monacolin K 생산

Fig. 2에 나타난 바와 같이, 30°C에서 7일간 배양하였을 때 monacolin K 생성량은 에탄올 농도가 높아질수록 점차 높아지다가 에탄올 농도 75% 일 때 462.78mg/kg으로 가장 높은 monacolin K의 함량을 나타내었으며, 에탄올 농도가 95% 일 때는 추출량에 큰 차이를 볼 수 없었으나 443.52mg/kg로 monacolin K의 함량이 다소 낮게 추출되는 것을 알 수 있었다. 이처럼 monacolin K가 물에서는 거의 추출되지 않고 유기용매인 에탄올에 잘 추출되는 것으로 보았을 때 유기용매에 가용성인 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 에탄올 농도가 80% 일 때 monacolin K의 추출효율이 최대였다는 Kwak 등의 결과와 유사하였으며, Lee 등의 결과에서 *Monascus purpureus* NTU 301 균주를 이용하여 30°C에서 10일간 배양하였을 때 monacolin K 생성량이 2,584mg/kg 이었다는 보고와 비교하면 약 5.5배 낮은 결과를 나타내었다. 하지만 Lee 등의 결과에서도 6일간 배양 했을 경우에는 monacolin K 함량이 약 500mg/kg으로 나타났으며, 7일째부터 monacolin K 함량이 증가하는 것으로 보고하였다. 따라서 본 실험에서 사용한 균주 역시 배양기간을 길게 해줄 경우 monacolin K 함량을 증가 시킬 수 있으리라 생각되며, *Monascus* 속 균주의 발효를 통한 이차대사산물의 생산은 균주의 개량, 최적 기질의 선택 및 배양조건의 최적화 등을 통하여 대량생산이 가능하리라 사료된다.

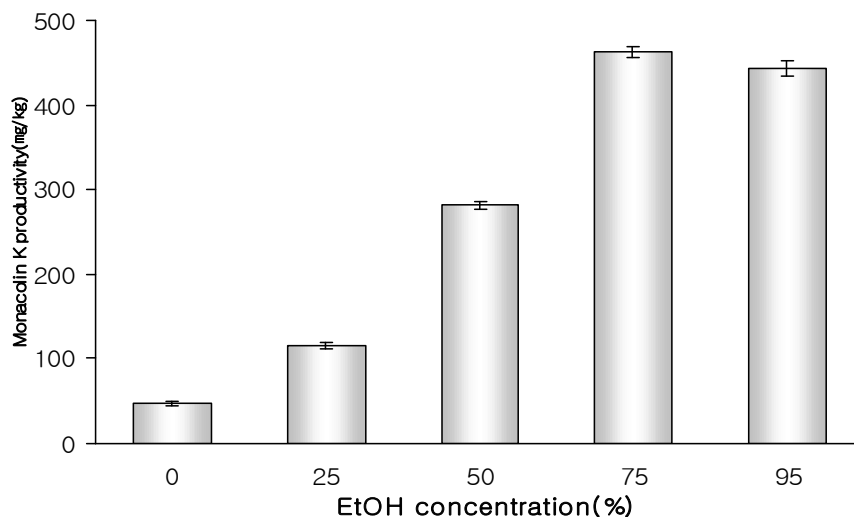


Fig. 2. Effect of ethanol concentration on Monacolin K contents from *Monascus*-Fermented Chinese yam.

(4) 1단 발효마의 총 polyphenol 함량

본 실험에서 사용한 1단 발효마의 에탄올 농도별 추출물의 총 polyphenol 함량을 측정한 결과는 Fig. 3에 나타난 바와 같이 대조구로서 발효를 하지 않은 마와 비교하여 측정한 결과, 대조구의 경우 에탄올 농도가 높아질수록 총 polyphenol 함량 또한 높아지다가 에탄올 농도가 50%일 때 442.5mg/kg으로 가장 높은 함량을 나타내었으며, 그 이후에는 에탄올 농도가 높아질수록 총 polyphenol 함량은 낮아지는 것으로 조사되었다. 발효마 에탄올 농도별 추출물의 경우 대조구와 마찬가지로 에탄올 농도가 높아질수록 총 polyphenol 함량 또한 높아지다가 에탄올 농도가 50%일 때 655.6mg/kg으로 가장 높은 함량을 나타내었으며, 그 이후에는 에탄올 농도가 높아질수록 총 polyphenol 함량 역시 낮아지는 것으로 조사되었다.

이로써 가장 높은 총 polyphenol 함량을 나타낸 50% 에탄올 추출물의 경우 총 polyphenol 함량이 대조구와 비교 시 약 32.5% 증가한 것으로 발효를 통한 총 polyphenol 함량의 증대효과가 있는 것으로 조사됨으로써 향후 관련물질의 분리 및 정제를 통한 특성 규명과 함께, 천연 항산화제로의 사용 가능성과 노화관련 건강기능식품 소재 개발 가능성 또한 있을 것으로 사료된다.

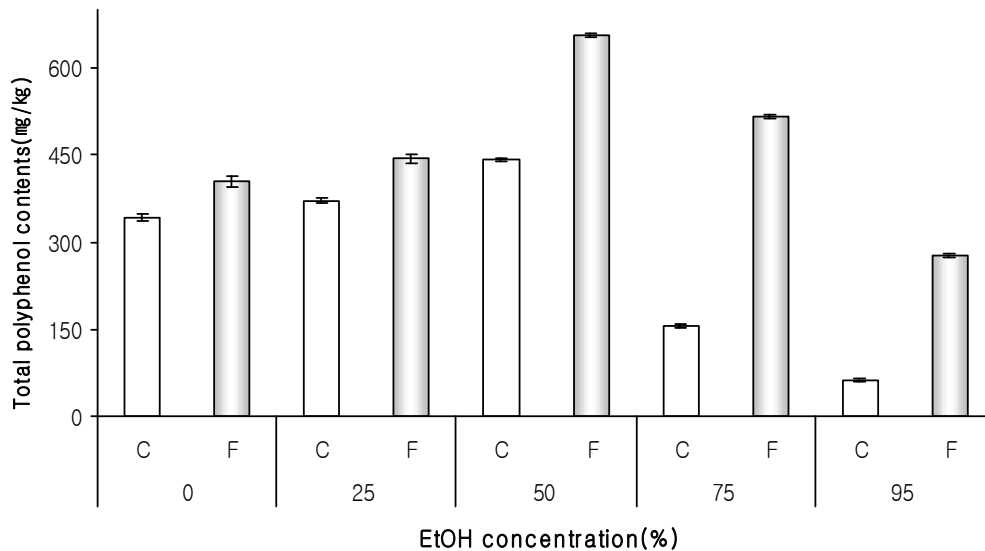


Fig. 3. Effect of ethanol concentration on total polyphenol contents from Chinese Yam (C) and Monascus-Fermented Chinese Yam (F).

(5) 1단 발효마의 DPPH radical 소거활성

본 실험에서 사용한 1단 발효마의 에탄올 농도별 추출물의 DPPH radical 소거활성을 측정한 결과는 Fig. 4에 나타낸 바와 같이 대조구로서 발효를 하지 않은 마와 비교하여 측정한 결과, 대조구의 경우 에탄올 농도가 25%일 때 80.8%로 가장 높은 함량을 나타내었으며, 그 이후에는 에탄올 농도가 높아질수록 DPPH radical 소거활성은 낮아지는 것으로 조사되었다. 발효마 에탄올 농도별 추출물의 경우 대조구와 마찬가지로 에탄올 농도가 높아질수록 DPPH radical 소거활성 또한 높아지다가 에탄올 농도가 50%일 때 92.8%로 가장 높은 함량을 나타내었으며, 그 이후에는 에탄올 농도가 높아질수록 DPPH radical 소거활성 역시 낮아지는 것으로 조사되었다.

이러한 결과는 Chung 등의 보고에서 항산화 성분 함량과 free radical 소거작용과의 상관관계에서 폴리페놀 함량에 비례하여 활성이 증가한다고 보고하였으며, Kwon 등은 산겨릅나무 추출 분획물중에 총 페놀함량이 가장 높았던 추출 분획물에서 가장 높은 DPPH radical 소거활성을 나타내었다는 보고와 일치하였다. 또한 Kang 등은 phenolic acid의 일종인 caffeic acid, ferulic acid, p-courmaric acid 등과 flavonoids의 일종인 catechin, quercetin과 catechol, chlorogenic acid를 포함한 기타 페놀성 물질이 전자공여능에 관여하는 것으로 보고한바 있다. 따라서 본 연구에서 발효마 에탄올 50% 추출물이 DPPH radical 소거활성이 높은 것은 높은 총 폴리페놀 화합물의 함량에 기인하는 것으로 사료된다.

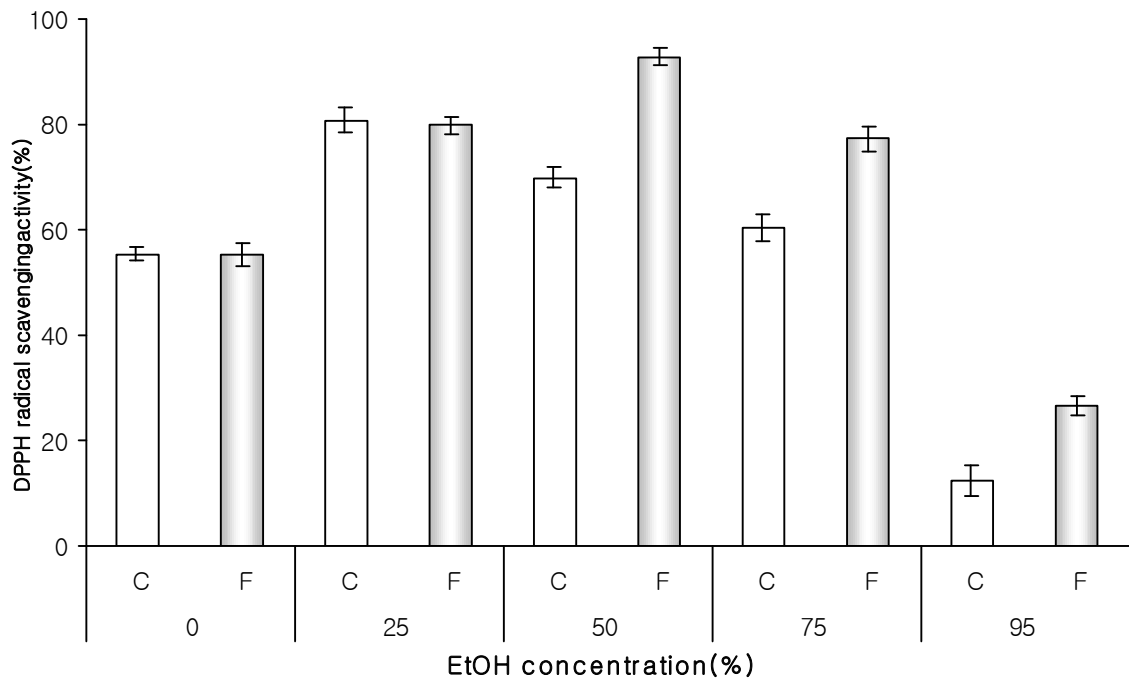


Fig. 4. Effect of ethanol concentration on DPPH radical scavenging activity from Chinese yam (C) and Monascus-Fermented Chinese Yam (F).

(6) 1단 발효마의 Angiotensin converting enzyme 저해활성

본 실험에서 사용한 1단 발효마의 에탄올 농도별 추출물의 ACE 저해활성을 측정한 결과는 Fig. 5에 나타낸 바와 같이 대조구로서 발효를 하지 않은 마와 비교하여 측정한 결과, 대조구와 발효마 에탄올 추출물 모두 물로만 추출하였을 경우에는 ACE 저해활성이 전혀 없었으나, 에탄올 농도가 높아질수록 ACE 저해활성이 높아지는 것으로 조사되었다.

이로써 가장 높은 ACE 저해활성을 나타낸 95% 에탄올 추출물의 경우 ACE 저해활성이 대조구와 비교시 약 33.1% 증가한 것으로 발효를 통한 ACE 저해활성의 증대효과가 있는 것으로 조사되었다. 또한 물 추출에서는 ACE 저해활성이 전혀 없었고 에탄올 농도가 95%일 때 가장 높은 ACE 저해활성을 나타내는 것으로 보아 항산화활성과 관련된 물질이 아닌 또 다른 물질이 ACE 저해활성을 나타내는데 관여했다고 사료되며, 본 연구에서 개발된 1단 발효마는 고혈압을 예방하는데 있어서 기능성 식품으로의 이용가능성이 크다고 생각된다.

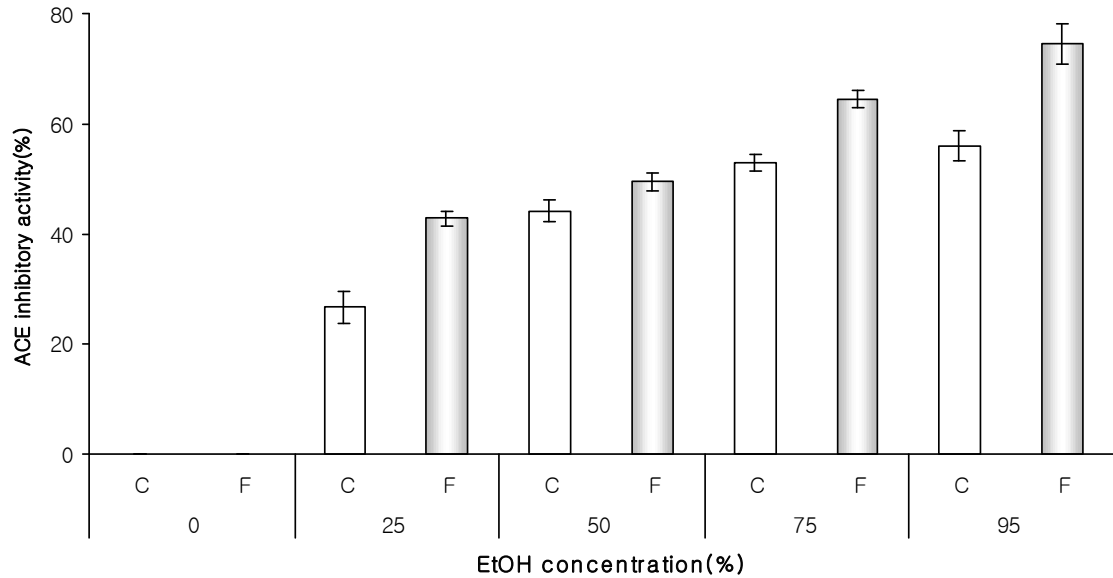


Fig. 5. Effect of ethanol concentration on ACE inhibitory activity from Chinese yam (C) and Monascus-Fermented Chinese yam (F).

나. 마 분말 첨가 항고혈압 yogurt의 생리활성 효과

(1) ACE 저해활성이 우수한 젖산균의 선발

젖산균의 분리는 강원도, 경북, 충북 등에서 제조원이 다른 전통발효식품 중 장류, 김치류 및 젓갈류로부터 68종의 균주를 1차로 선발하고, MRS 액체배지에 접종하여 37°C에서 36시간 정지 배양하였다. 배양 상정액을 원심분리하여 ACE 저해활성을 측정하였으며 그 중 ACE 저해활성을 나타내는 균주 중에서 ACE 저해활성이 98.8%로 가장 높은 HLJ59를 실험 균주로 선발하였다(Table 3).

선발된 HLJ59 균주의 16S rRNA 염기서열을 분석하여 얻은 1468bp의 염기서열을 NCBI의 Genbank에 등록된 염기서열 data base와 비교하여 본 결과 *Lactobacillus brevis*의 표준균주인 ATCC 14869^T 균주의 염기서열과 99.7%의 유사도를 나타내었다(Fig. 6). 따라서 본 연구에서 분리한 HLJ59 균주는 16S rRNA 유전자 염기서열 분석결과를 토대로 *L. brevis* HLJ59로 명명하였다.

Table 3. ACE inhibitory activity by lactic acid bacteria in MRS broth 2% incubated at 37°C.

Strains	Source	ACE inhibitory activity (%)
<i>L. acidophilus</i>	NCFM, Rhone-poulenc	55.4±5.6
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Culture system. Inc.	44.3±5.4
<i>L. paracasei</i> subsp. <i>Paracasei</i>	KCTC 3510	62.6±4.7
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>Lactic</i>	KCTC 3636	72.1±3.9
<i>Lactobacillus brevis</i>	KCCM 40017	66.7±4.2
HLB-A2	Isolated	82.2±2.8
HLR-G1	Isolated	58.7±4.6
HLW-E3	Isolated	75.1±3.3
HLW-F1	Isolated	86.4±4.1
<i>L. brevis</i> HLJ59	This study	98.8±1.1

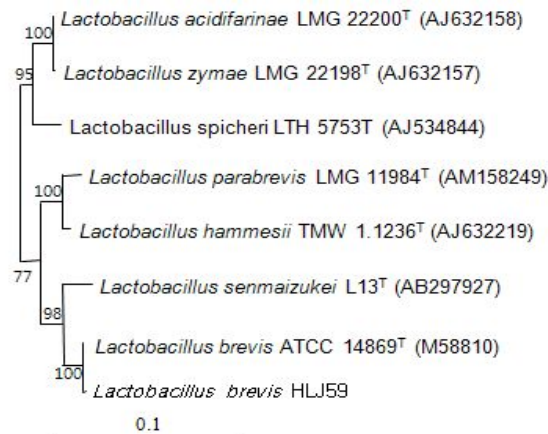


Fig. 6. Phylogenetic position of strain HLJ59 in the genus *Lactobacillus* based on the 16S rRNA gene sequences. The bar represents 0.1% sequence divergence.

(2) 기질 농도에 따른 yogurt의 ACE 저해활성

요구르트의 제조에 있어서 일반적으로 이용되는 raw milk(원유)와 skim milk를 농도별(1, 3, 5, 7 및 10%, w/v)로 하여 전배양한 *L. brevis* HLJ59 균주의 배양액을 4%(v/v) 농도로 접종하고 발효 후 ACE 저해활성을 측정하였을 때 raw milk에 skim milk를 3%로 하여 발효하였을 때 ACE 저해활성이 58.1%로 가장 높은 것으로 나타났다(Fig. 7). 따라서 이후 실험에서는 요구르트 제조의 기본 기질로 raw milk에 skim milk를 3% 농도로 첨가한 것을 사용하였다.

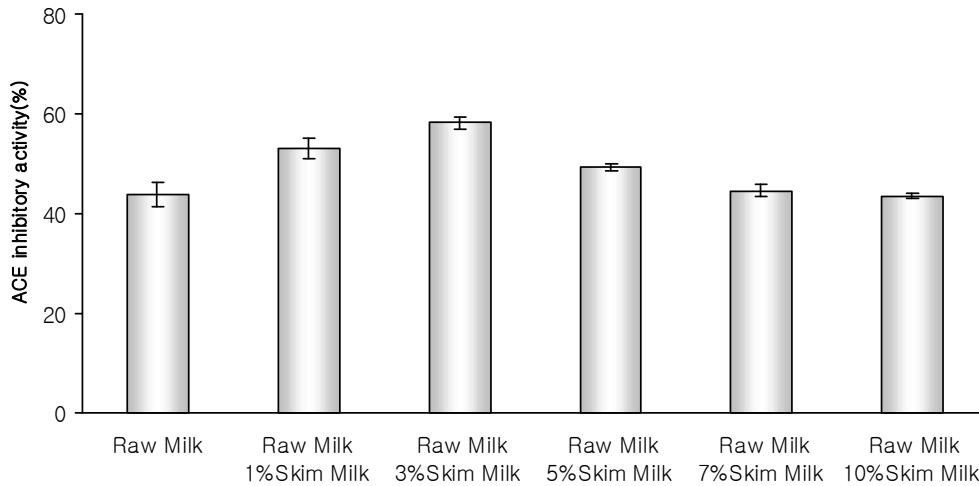


Fig. 7. ACE inhibitory activity in skim milk concentrations fermented by *L. brevis* HLJ59.

(3) 균주 접종농도에 따른 yogurt의 ACE 저해활성

요구르트 제조의 기본 기질로 raw milk에 skim milk를 3% 농도로 첨가한 것을 사용하였을 때 균주의 접종농도(0, 2, 4, 6, 8 및 10%, v/v)에 따른 요구르트의 ACE 저해활성을 조사한 결과(Fig. 8), 4%에서 56.5%의 ACE 저해활성을 보였으며 그 이상의 농도에서는 큰 활성을 차이는 없는 것으로 조사되었다.

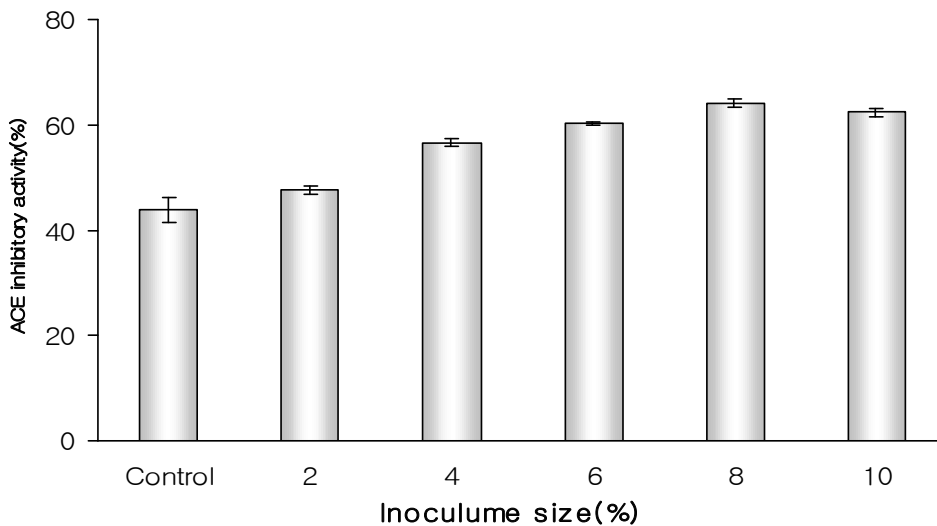


Fig. 8. ACE inhibitory activity in inoculum size concentrations fermented by *L. brevis* HLJ59.

(4) 마 및 발효 마 분말의 첨가에 따른 yogurt의 ACE 저해활성

요구르트 제조의 기본 기질로 raw milk + 3% skim milk를 기본으로 하여 균주접종 농도를 4%로 하였을 때, 마 및 발효마 분말의 농도별(0, 1, 3, 5 및 7%, w/v) 첨가에 따른 ACE 저해활성을 측정된 결과 마 및 발효마 분말 첨가구 모두 3% 첨가 농도에서 ACE 저해활성이 각각

63.7%, 80.7%로서 가장 높은 것으로 조사되었다(Fig. 9). 발효마의 경우 마분말 자체의 첨가에 따른 결과와 비교하였을 때 ACE 저해활성이 약 17% 증가한 것을 알 수 있었다.

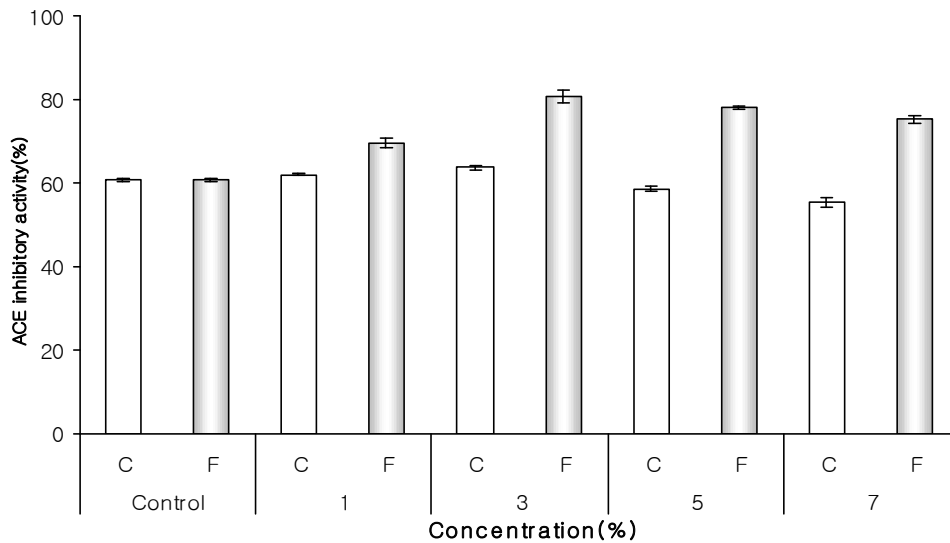


Fig. 9. ACE inhibitory activity by yam (C) and fermented yam (F) concentrations fermented by *L. brevis* HLJ59.

(5) 발효 온도에 따른 yogurt의 ACE 저해활성

요구르트 제조의 기본 기질로 Raw Milk + 3% Skim Milk를 기본으로 하여 균주접종 농도 4% 및 발효마 분말을 3% 첨가하였을 때 발효온도(30, 34, 37 및 40℃) 따른 ACE 저해활성을 측정된 결과(Fig. 10), 34℃에서 발효하였을 때 ACE 저해활성이 81.3%로 가장 높은 것으로 조사되었으며, 발효온도가 높아짐에 따라 ACE 저해활성은 낮아지는 것으로 나타났다.

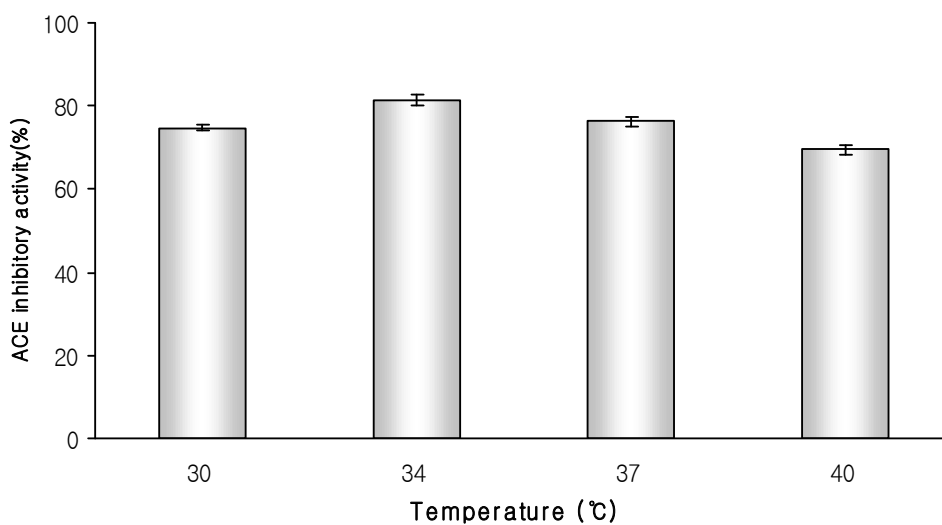


Fig. 10. ACE inhibitory activity in temperature fermented by *L. brevis* HLJ59.

(6) 발효시간에 따른 yogurt의 DPPH radical 소거활성, 젖산균수 및 ACE 저해활성

앞선 실험에서 최적화 된 요구르트 제조의 기본 기질조건인 raw milk + 3% skim milk, 균주접종 농도 4%, 발효마 분말 3% 및 발효온도 34°C로 하여 발효하였을 때 발효시간에 따른 DPPH radical 소거활성, 젖산균수 및 ACE 저해활성을 측정된 결과(Fig. 11), DPPH radical 소거활성을 경우 발효 시간이 길어질수록 점차 높아지다가 24시간 발효하였을 때 79.5%로 가장 높게 나타났으며, 이후에는 거의 비슷한 것으로 조사되었다. 젖산균의 경우 발효 16~20시간 사이에 급격히 증가하여 발효 28시간에 1.6×10^9 CFU/ml로 가장 높은 젖산균의 균체수를 나타내었다.

ACE 저해활성을 경우에도 발효 시간이 길어질수록 점차 높아지다가 24시간 발효하였을 때 83.8%로 가장 높게 나타났으며, 이후에는 거의 비슷한 것으로 조사되었다.

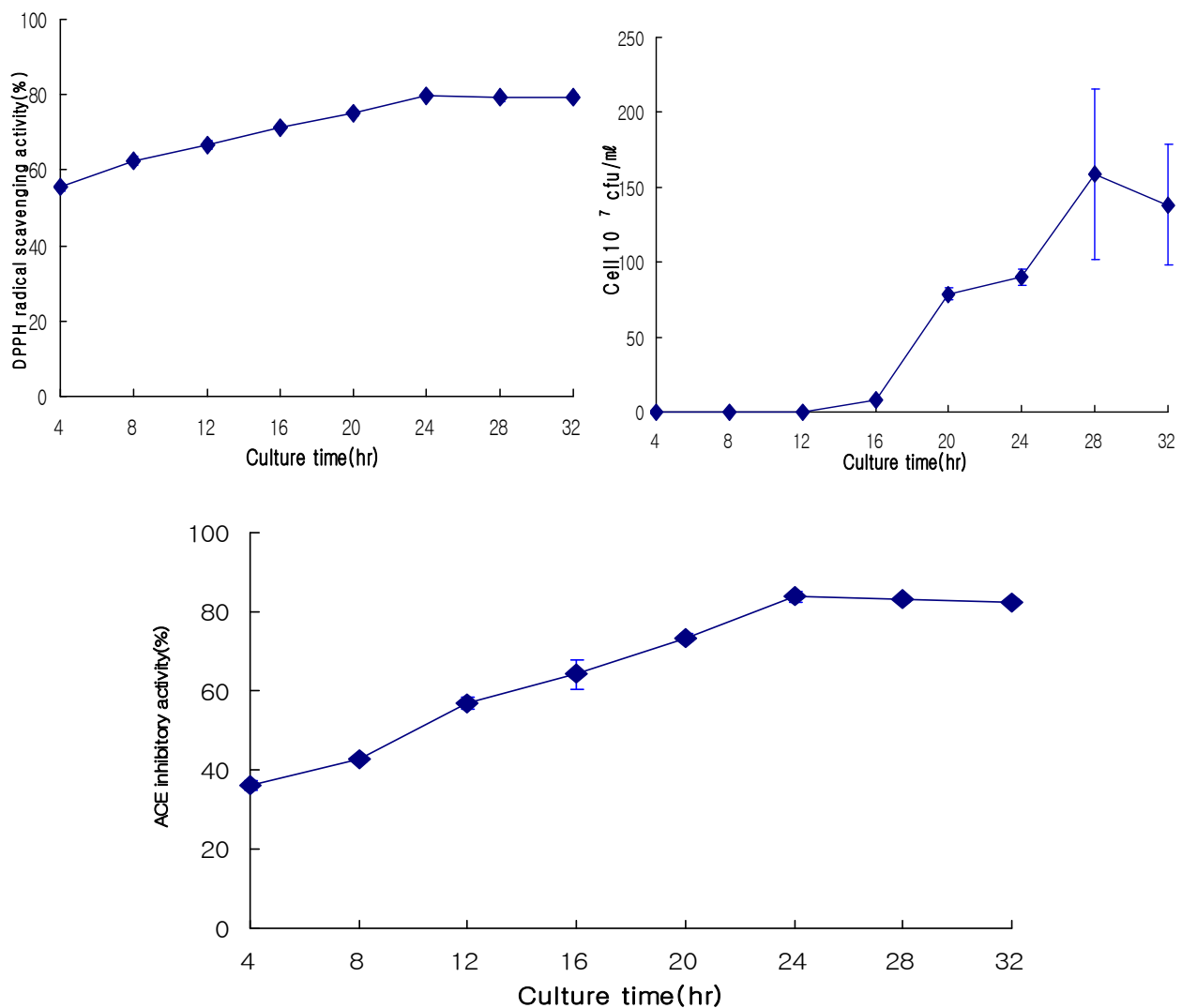


Fig. 11. DPPH radical scavenging activity, viable counts of cell and ACE inhibitory activity in culture time fermented by *L. brevis* HLJ59.

다. 2단 발효마의 생리활성 효과

(1) 2단 발효마의 색소 측정

본 연구에서는 *Monascus* sp. MK2 균주와 *L. brevis* HLJ59 균주를 이용하여 마의 2단 발효를 실시하였으며, 2단 발효마 추출물의 색소 생산능을 보면 Table 4와 같다. *Monascus* sp. MK2 균주를 이용한 1단 발효 시 가장 높은 색소의 생산능을 보였으며, *L. brevis* HLJ59 균주와의 2단 발효에서도 높은 색소 생산능을 보임을 알 수 있었다. 그러나 HJL59/MK2 순서의 2단 발효는 *L. brevis* HLJ59 균주가 생산하는 산의 영향으로 인하여 *Monascus* sp. MK2의 생육이 저해되어 색소의 생산능 또한 낮았던 것으로 생각된다.

Table 4. Production of *Monascus* pigments from one stage and two stage-fermented Chinese yam.

	Production of <i>Monascus</i> Pigment (unit)			Red/Yellow
	Yellow	Orange	Red	
Control	0.15±0.02	0.11±0.01	0.03±0.00	0.20
MK2	14.03±0.56	13.88±0.21	15.71±0.90	1.12
MK2/HLJ59	13.77±0.19	12.66±0.19	14.82±0.39	1.08
HLJ59	0.14±0.02	0.11±0.01	0.02±0.00	0.14
HLJ59/MK2	0.25±0.01	0.22±0.01	0.33±0.01	1.32

(2) 2단 발효마의 Monacolin K의 생산

Fig. 12와 같이, monacolin K 생성량은 *Monascus* sp. MK2 균주를 이용하여 1단 발효 하였을 때 487.9 mg/kg의 Monacolin K의 함량을 나타내었으며, *L. brevis* HLJ59 균주와의 2단 발효에서도 481.7 mg/kg으로 1단 발효와 거의 비슷한 것으로 조사되었다. 그러나 색소에서와 마찬가지로 HJL59/MK2 순서의 2단 발효에서는 *L. brevis* HLJ59 균주가 monacolin K를 직접 생산하지는 않지만 이 균주가 생산하는 산의 영향으로 인하여 *Monascus* sp. MK2의 생육에 저해인자로 작용함으로써 monacolin K의 생산능 또한 낮은 것으로 생각된다.

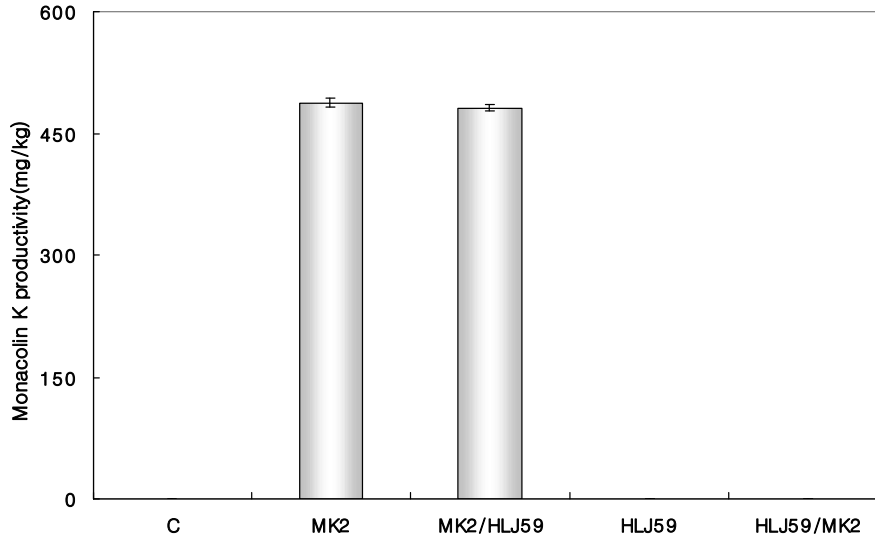


Fig. 12. Production of monacolin K from one stage and two stage-fermented Chinese yam.

(3) 2단 발효마의 총 폴리페놀 함량

Fig. 13과 같이, 총 폴리페놀 함량은 *Monascus* sp. MK2 균주와 *L. brevis* HLJ59 균주를 이용하여 2단 발효 하였을 때 835.8mg/kg의 총 폴리페놀 함량을 나타내었으며, *Monascus* sp. MK2 균주를 이용한 1단 발효에서는 703.6 mg/kg으로 2단 발효 보다는 약간 낮은 총 폴리페놀 함량을 나타내었다. 그러나 *L. brevis* HLJ59 균주를 이용하여 1단 발효 하였을 때와 2단 발효 하였을 경우에는 대조구 자체의 총 폴리페놀 함량인 265.7 mg/kg과 거의 비슷한 함량을 나타내었다. 이러한 결과를 보았을 때 *Monascus* sp. MK2 균주가 생산하는 2차 대사산물이 총 폴리페놀 화합물의 또 다른 인자로서 작용하는 것으로 생각할 수 있다.

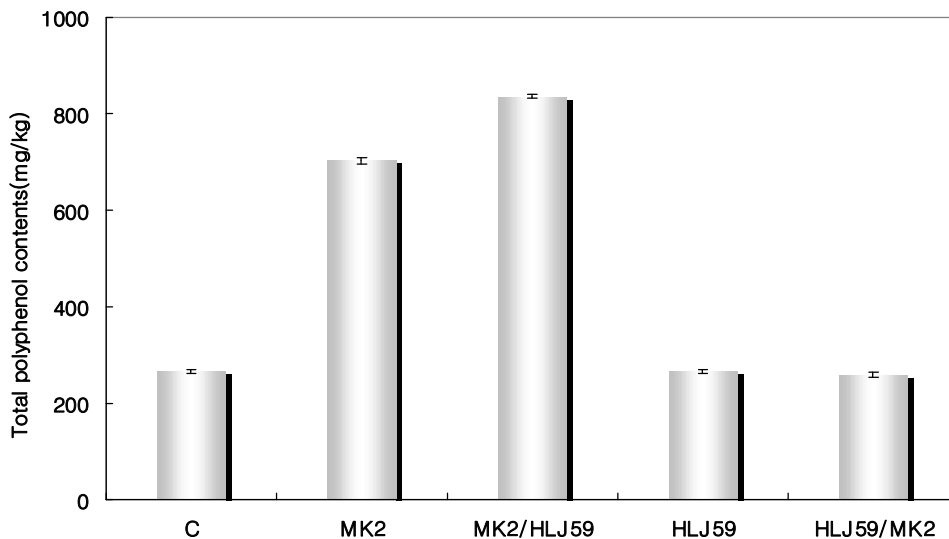


Fig. 13. Comparisons of total polyphenol contents from one stage and two stage-fermented Chinese yam.

(4) 2단 발효마의 총 flavonoid 함량

Fig. 14와 같이, 총 flavonoid 함량은 *Monascus* sp. MK2 균주를 이용하여 1단 발효 하였을 때 326.4mg/kg의 총 flavonoid 함량을 나타내었으며, *Monascus* sp. MK2 균주와 *L. brevis* HLJ59 균주를 이용한 2단 발효에서는 282.3mg/kg으로 1단 발효 보다는 약간 낮은 총 flavonoid 함량을 나타내었다. 총 폴리페놀 함량과 마찬가지로 *L. brevis* HLJ59 균주를 이용하여 1단 발효 하였을 때와 2단 발효 하였을 경우에는 각각 94.8, 79.3mg/kg으로 대조구 자체의 총 flavonoid 함량인 107.9mg/kg과 비교하여 약간 낮아지는 경향을 나타내었다.

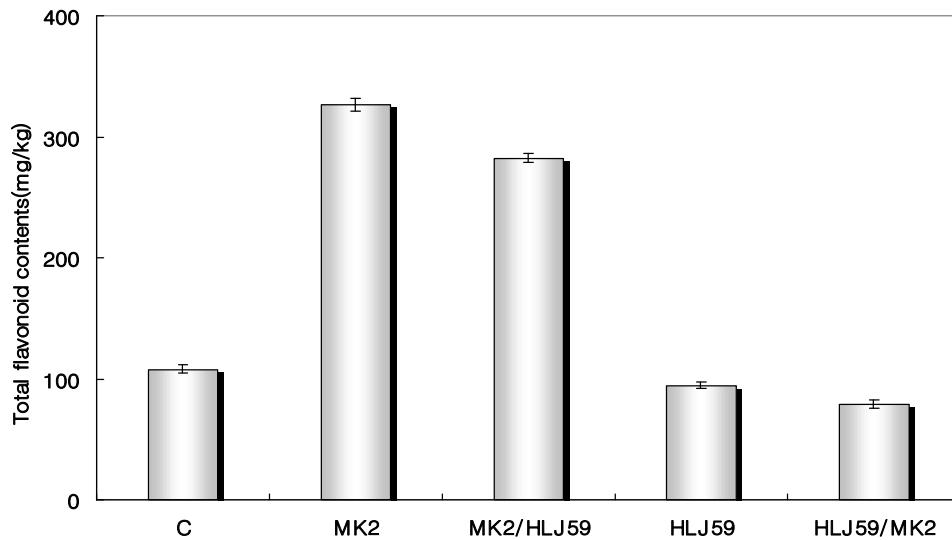


Fig. 14. Comparisons of total flavonoid contents from one stage and two stage-fermented Chinese yam.

(5) 2단 발효마의 환원력(Reducing power)

Fig. 15와 같이, 환원력은 *Monascus* sp. MK2 균주를 이용하여 1단 발효 하였을 때 흡광도 값이 1.5로 나타났으며, *Monascus* sp. MK2 균주와 *L. brevis* HLJ59 균주를 이용한 2단 발효에서는 흡광도 값이 1.3으로 1단 발효 보다는 약간 낮은 환원력을 나타내었다. 총 flavonoid 함량과 마찬가지로 *L. brevis* HLJ59 균주를 이용하여 1단 발효 하였을 때와 2단 발효 하였을 경우에는 흡광도 값이 각각 0.9, 0.8로서 대조구 자체의 흡광도 값인 0.9와 비교하여 거의 비슷한 흡광도 값으로 나타났다.

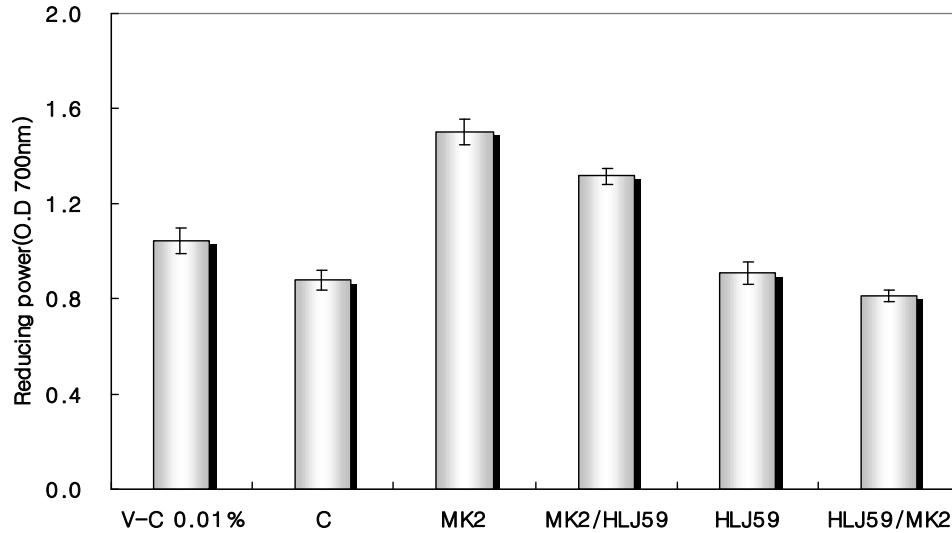


Fig. 15. Comparisons of reducing power from one stage and two stage-fermented Chinese yam.

(6) 2단 발효마의 DPPH radical 소거활성

Fig. 16과 같이, DPPH radical 소거활성은 *Monascus* sp. MK2 균주와 *L. brevis* HLJ59 균주를 이용하여 2단 발효 하였을 때 81.7%의 DPPH radical 소거활성을 나타내었으며, *Monascus* sp. MK2 균주를 이용한 1단 발효에서는 74.7%로 2단 발효 보다는 약간 낮은 DPPH radical 소거활성을 나타내었다. 그러나 *L. brevis* HLJ59 균주를 이용하여 1단 발효 하였을 때와 2단 발효 하였을 경우에는 대조구 자체의 DPPH radical 소거활성인 66.4%와 비교 시 각각 72.8, 68.9%의 DPPH radical 소거활성을 나타내었다.

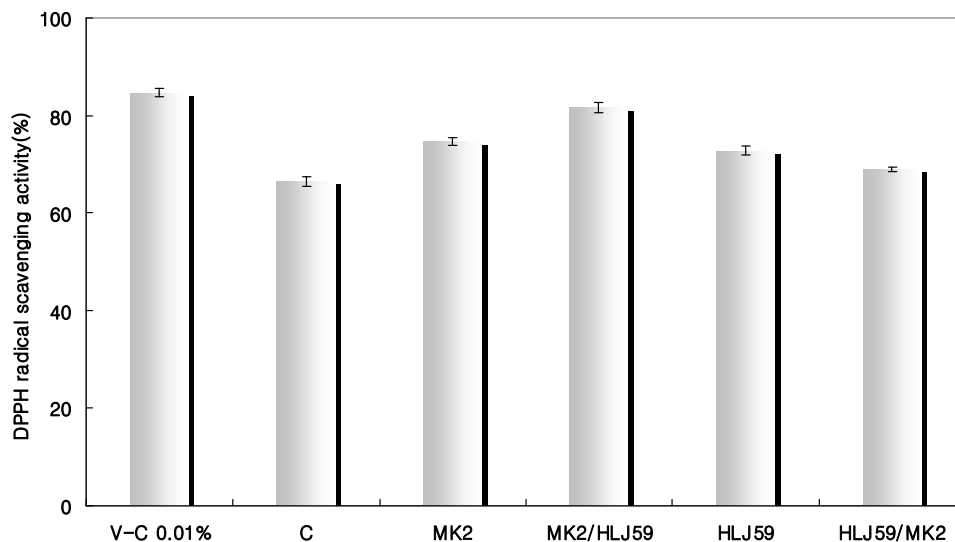


Fig. 16. Comparisons of DPPH radical scavenging activity from one stage and two stage-fermented Chinese yam.

(7) 2단 발효마의 ACE 저해활성

Fig. 17과 같이, ACE 저해활성은 *Monascus* sp. MK2 균주와 *L. brevis* HLJ59 균주를 이용하여 2단 발효 하였을 때 87.0%의 ACE 저해활성을 나타내었으며, *Monascus* sp. MK2 균주를 이용한 1단 발효에서는 71.9%로 2단 발효 보다는 낮은 ACE 저해활성을 나타내었다. 그러나 *L. brevis* HLJ59 균주를 이용하여 1단 발효 하였을 때와 2단 발효 하였을 경우에는 대조구 자체의 ACE 저해활성인 53.9%와 비교시 각각 84.0, 84.4%로서 높은 ACE 저해활성을 나타내었으며, 이것은 *L. brevis* HLJ59 균주의 주요 특징 중에 하나인 ACE 저해물질의 생산능에 기인한 결과라 사료된다.

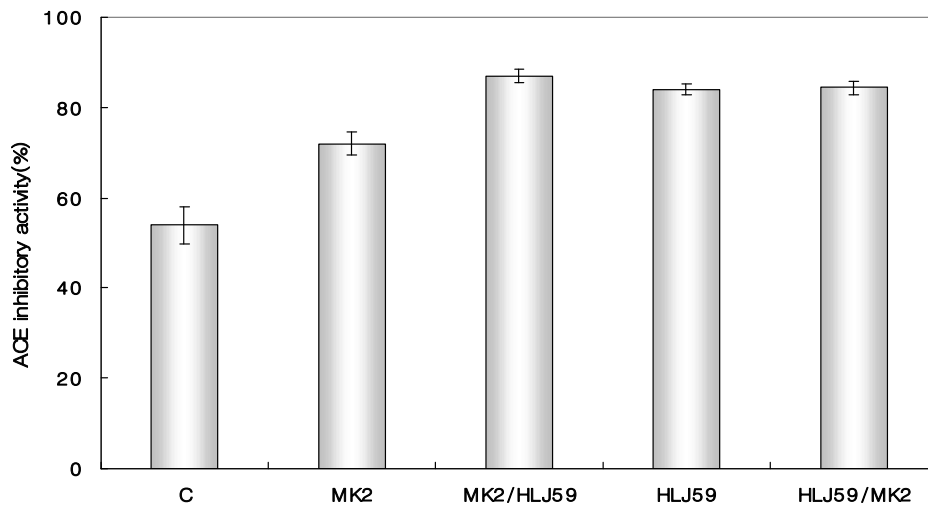


Fig. 17. Comparisons of ACE inhibitory activity from one stage and two stage-fermented Chinese yam.

(8) 2단 발효마의 GABA 함량

Fig. 18과 같이, GABA 함량은 *Monascus* sp. MK2 균주와 *L. brevis* HLJ59 균주를 이용하여 2단 발효 하였을 때 977.4mg/kg의 GABA 함량을 나타내었으며, *Monascus* sp. MK2 균주를 이용한 1단 발효에서는 777.8mg/kg으로 2단 발효 보다는 낮은 GABA 함량을 나타내었다. 또한 *L. brevis* HLJ59 균주를 이용하여 1단 발효 하였을 때와 2단 발효 하였을 경우에는 대조구 자체의 GABA 함량인 66.6 mg/kg과 비교하였을 때 612.1, 615.6mg/kg으로 높은 GABA 함량을 나타내었다. 이러한 결과를 보았을 때 ACE 저해활성과 마찬가지로 *L. brevis* HLJ59 균주의 주요 특징으로 ACE 저해물질의 생산능 이외에 GABA 고생산 균주로서의 특성에 기인한 결과라 사료되며, *Monascus* sp. MK2 균주와 더불어 미생물이 생산하는 대사산물과 관련하여 많은 활용이 기대된다.

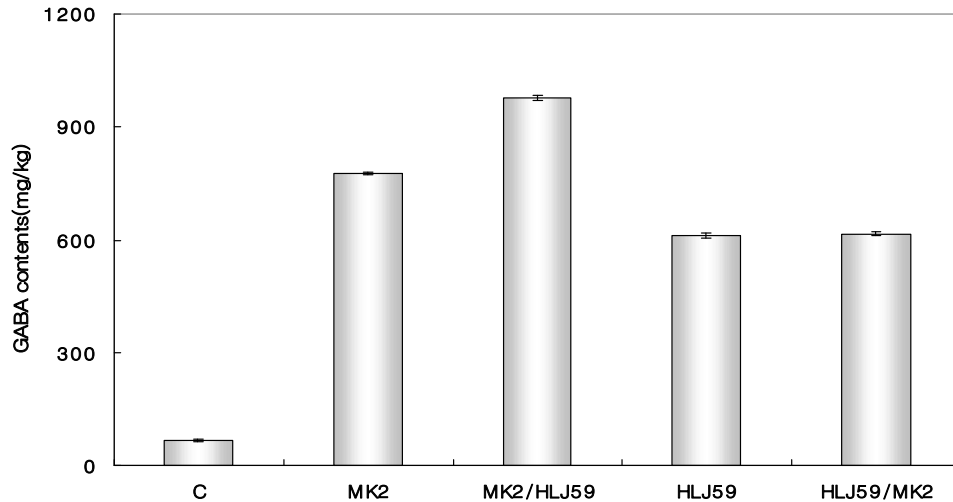


Fig. 18. Comparisons of GABA contents from one stage and two stage-fermented Chinese yam.

라. 2단 발효마 분말 첨가 yogurt의 생리활성 효과

(1) 2단 발효마 분말 첨가에 따른 pH와 적정산도의 변화

2단 발효마 분말을 농도별(0, 0.1, 0.3, 0.5, 1 및 2%, w/v)로 Raw Milk(원유)와 5% 탈지분유에 첨가하고 혼합 starter를 접종하여 37°C에서 12시간 발효 하였을 때 발효에 따른 pH와 적정산도의 변화를 측정하였다. 2단 발효마 분말 첨가에 따른 요구르트의 pH는 Table 5와 같이 무첨가군의 경우 pH 4.05와 비교시 2단 발효마 분말 첨가 농도에 따라 높아졌으며(pH 4.12~4.25), 2단 발효마 분말 첨가량에 비례하였다. 2단 발효마 분말 첨가에 따른 요구르트의 적정산도는 Table 5와 같이 무첨가군의 경우 0.92%와 비교시 2단 발효마 분말 첨가 농도에 따라 적정산도 또한 0.94~0.97%로 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 Cho 등의 결과에서와 같이 마늘 분말의 첨가 농도가 높아질수록 요구르트의 pH 또한 비례적으로 높아졌다는 결과와 같았고 요구르트의 바람직한 pH 범위는 3.27~4.53 사이라는 Chamber의 보고와 일치하였으며, 적정산도는 Rasic 등이 보고한 0.85~1.20% 범위라는 보고에 적합한 것으로 나타났다.

Table 5. Effect of MFCY powder concentration on pH, titratable acidity and number of viable contents of yogurt during lactic acid fermentation at 37°C for 12h.

	Monascus-Fermented Chinese Yam concentration(%)					
	0	0.1	0.3	0.5	1	2
pH	4.05±0.03	4.12±0.01	4.15±0.01	4.18±0.01	4.22±0.01	4.25±0.01
Titratable acidity	0.92±0.01	0.94±0.01	0.95±0.01	0.96±0.01	0.96±0.01	0.97±0.01
Viable cell counts (CFU/ml)	7.50±0.20×10 ⁹	8.77±0.31×10 ⁹	9.03±0.15×10 ⁹	1.14±0.07×10 ¹⁰	9.43±0.25×10 ⁹	8.07±0.35×10 ⁹

(2) 2단 발효마 분말 첨가에 따른 젖산균 수의 변화

2단 발효마 분말 농도별(0, 0.1, 0.3, 0.5, 1 및 2%, w/v) 첨가에 따른 요구르트의 젖산균수의 변화는 Table 5와 같이 2단 발효마 분말의 첨가 농도가 높아질수록 젖산균수 또한 증가하다가 0.5% 첨가시 1.14×10^{10} CFU/mL로 가장 높은 젖산균수를 나타내었으며, 이후 첨가농도에서는 점차 감소 하는 것으로 나타났다. 현행 우리나라의 요구르트 축산물 가공기준 및 성분규격에 의하면 농후발효유의 총 젖산균수는 1.0×10^8 CFU/mL이상으로 규정하고 있으며, 본 실험의 결과에서도 무첨가군 및 2단 발효마 분말 첨가군 모두에서 젖산균수는 적정 범위 이상 이므로 성분 규격에 적합함을 알 수 있었다. 이상의 결과를 보면 2단 발효마 분말의 첨가에 따라 젖산균의 생육이 증대되는 효과를 보였으나 1%와 2%로 첨가량이 증가될 때 젖산균의 생육이 0.5% 첨가시에 비해 다소 낮아지는 결과를 보였다. 그러나 1%와 2% 첨가시에도 무첨가군과 비교시 젖산균의 생육을 증진시킨 것으로 나타났으며, 이것은 2단 발효마 분말에 포함되어 있는 여러 물질들이 젖산균의 증식을 촉진하는 것으로 생각되며 이들 물질에 대한 추가 연구가 필요한 것으로 사료된다.

(3) 2단 발효마 분말 첨가에 따른 총 폴리페놀 함량

총 페놀성 화합물은 다양한 구조와 분자량을 가진 이차대사산물로 식물계에 널리 분포되어 있으며 free radical을 제거함으로써 산화를 억제하여 활성산소의 소거 및 산화적 스트레스를 막아 항암, 항균, 노화방지 및 심장질환 예방을 예방하는 등의 생리활성 물질로 알려져 있으며 식품, 의약품, 화장품 등 많은 분야에 활용되고 있다.

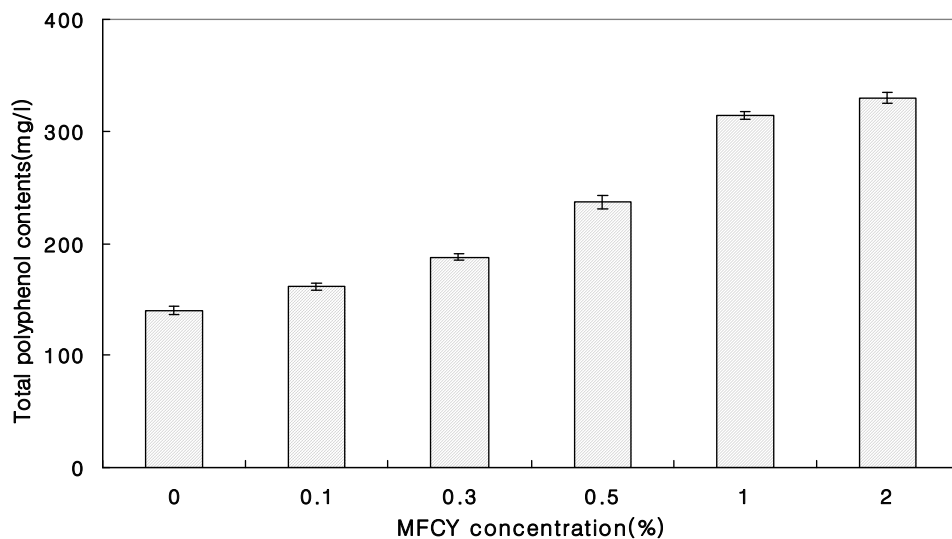


Fig. 19. Effect of MFCY powder concentration on total polyphenol contents of yogurt during lactic acid fermentation at 37°C for 12 h.

본 실험에서는 2단 발효마 분말 농도별(0, 0.1, 0.3, 0.5, 1 및 2%, w/v) 첨가에 따른 요구르트의 총 폴리페놀 함량을 측정된 결과 Fig. 19에 나타난 바와 같이 무첨가군의 139.9mg/L와 비교시 2단 발효마 분말의 첨가농도가 증가할수록 161.4~329.9mg/L로 비례적으로 그 함량 또한 높아지는 것으로 조사되었다. 이는 원재료인 2단 발효마 분말의 경우 에탄올 추출물을 이용한 총 폴리페놀 함량 측정시 높은 활성을 보였던 바, 2단 발효마 분말의 농도별 첨가에 따른

요구르트의 총 폴리페놀 함량 증가 또한 폴리페놀 화합물의 성분 함량이 증가함에 따른 결과라 생각되며, Chung 등이 보고한 마카 열수추출물 첨가량이 증가 할수록 총 폴리페놀 함량이 증가하였다는 보고와, Kang 등의 메밀싹 첨가량에 따라 총 폴리페놀 함량이 증가하였다는 보고와 일치하였다.

(4) 2단 발효마 분말 첨가에 따른 DPPH radical 소거활성

DPPH는 화학적으로 안정화 된 free radical을 가지고 있는 수용성 물질로서 515~525nm 부근에서 최대흡광도를 가지는 보라색의 화합물로 ascorbic acid, BHA, 토코페롤, 방향족 아민류 등에 의해 환원되어 짙은 보라색이 탈색됨으로서 항산화 물질의 전자공여능을 측정할 때 사용된다.

본 실험에서의 2단 발효마 분말 농도별(0, 0.1, 0.3, 0.5, 1 및 2%, w/v) 첨가에 따른 요구르트의 DPPH radical 소거활성을 측정한 결과는 Fig. 20에 나타난 바와 같이 무첨가군의 경우 46% 이었으나 총 폴리페놀 함량과 마찬가지로 발효홍국마 분말의 첨가농도가 높아질수록 DPPH radical 소거활성이 54~94%로 나타났으며 비례적으로 그 활성 또한 높아지는 것으로 조사되었다. 이러한 결과는 총 폴리페놀 함량에서와 같이 발효홍국마 분말의 항산화 활성 성분으로 추측되는 phenol 성분 등에 기인한 것으로 생각되며, 버찌 분말, 단감 분말, 스피루리나, 홍삼추출물 및 구기자 추출물을 첨가한 요구르트에서 높은 DPPH radical 소거활성을 나타내었다고 보고함에 따라 본 연구 결과와 비슷한 경향을 나타내었다.

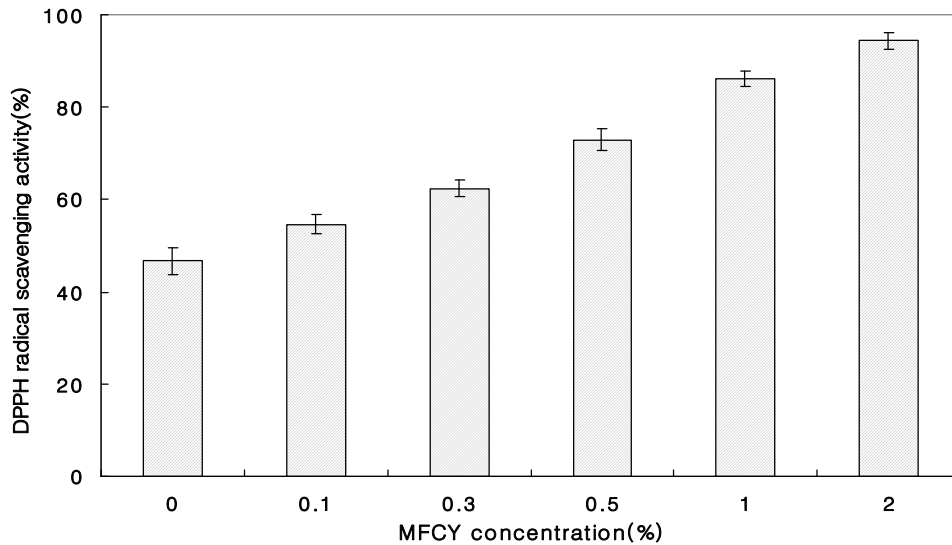


Fig. 20. Effect of MFCY powder concentration on DPPH radical scavenging activity of yogurt during lactic acid fermentation at 37°C for 12h.

(5) 2단 발효마 분말 첨가에 따른 환원력

환원력은 Fe^{3+} 이온을 Fe^{2+} 이온으로 환원 시키는 능력을 측정 하는 것으로 환원력이 클수록 강력한 항산화제가 되는데 이러한 환원력의 정도는 항산화 활성과 관련이 있는 것으로 알려져 있으며 높은 환원력을 가지는 물질은 흡광도 수치가 높게 나타나게 된다.

2단 발효마 분말 농도별(0, 0.1, 0.3, 0.5, 1 및 2%, w/v) 첨가에 따른 요구르트의 환원력을

측정한 결과는 Fig. 21에 나타낸 바와 같이 무첨가군의 경우 흡광도가 0.89 이었으나 2단 발효 마 분말의 첨가 농도가 높아질수록 흡광도가 1.13~1.53으로 나타났으며 총 폴리페놀 함량과 DPPH radical 소거활성과 마찬가지로 첨가 농도에 비례적으로 그 활성 또한 높아지는 것으로 조사되었다. 이러한 결과는 Jeong 등의 보고에서 도라지 지상부 용매 분획물을 이용하여 환원력을 측정한 결과 폴리페놀 성분이 가장 많이 포함되어 있는 부탄올 분획물에서 가장 높은 환원력을 보였다는 결과에 비추어 볼 때, 본 실험에서의 2단 발효마 분말 역시 높은 폴리페놀 화합물들이 높은 환원력을 나타내었다고 사료된다.

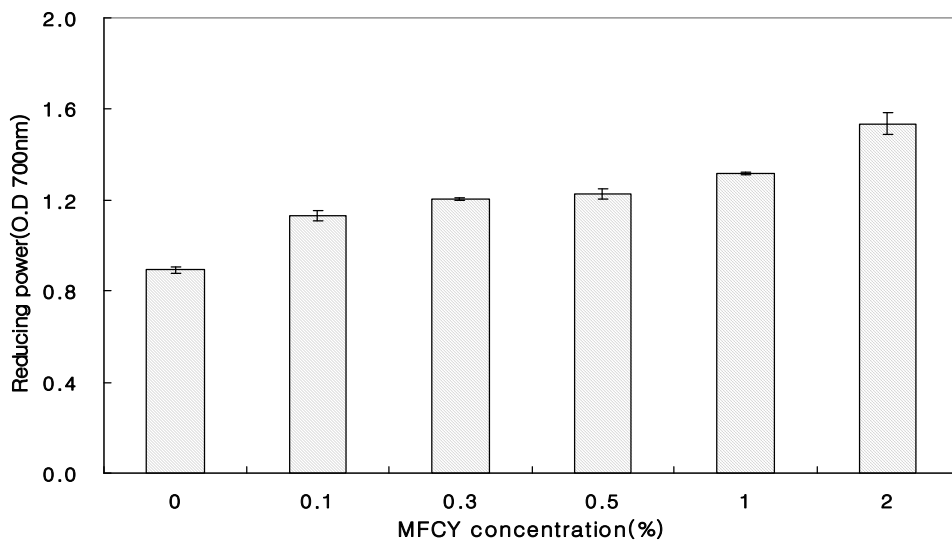


Fig. 21. Effect of MFCY powder concentration on reducing power of yogurt during lactic acid fermentation at 37°C for 12h.

(6) 2단 발효마 분말 첨가에 따른 angiotensin converting enzyme(ACE) 저해활성

ACE는 renin-angiotensin-aldosterone system의 중요한 효소물질로서 불활성형의 angiotensin-I로부터 C-terminal에서 dipeptide인 His-Leu를 분리시켜 가수분해 함으로서 강력한 혈관수축작용을 하는 angiotensin-II를 생성하는데, 혈압을 감소시키는 bradykinin을 불활성화시키는 효소로서 결국 본태성고혈압의 원인이 되고 있다. 따라서 ACE 저해제는 ACE 활성을 저해함으로써 angiotensin-II의 생성저해, aldosterone의 분비 감소, 혈관확장제인 bradykinin의 증가 등의 과정을 통하여 신장혈관을 확장시켜 나트륨의 배설을 촉진시킴으로서 혈압을 낮추어 줄 수 있으며, 이로 인해 심혈관질환 및 뇌혈관질환 등 고혈압과 관련이 깊은 질환을 치료하는데 사용될 수 있다.

본 실험에서의 2단 발효마 분말 농도별(0, 0.1, 0.3, 0.5, 1 및 2%, w/v) 첨가에 따른 요구르트의 ACE 저해활성을 측정한 결과는 Fig. 22에 나타낸 바와 같이 무첨가군의 경우 ACE 저해활성이 60.2% 이었으나 2단 발효마 분말의 첨가농도가 높아질수록 ACE 저해활성이 67.1~87.7%로 나타났으며, 이는 앞선 항산화활성 측정 결과에서처럼 첨가농도에 비례적으로 그 활성 또한 높아지는 것으로 조사되었다. 이처럼 2단 발효마 분말 첨가 요구르트는 고혈압의 예방

에 있어서도 기능성이 우수하리라 생각된다.

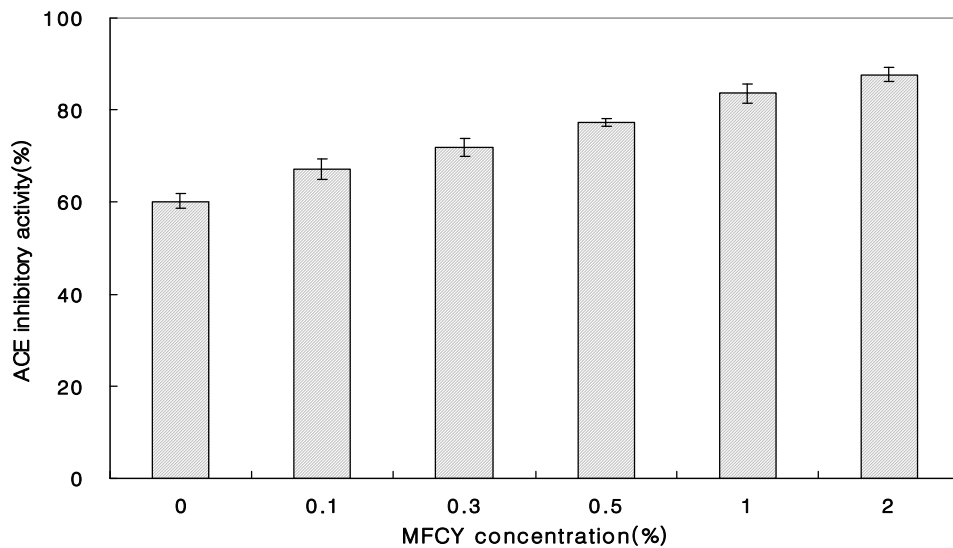


Fig. 22. Effect of MFCY powder concentration on ACE inhibitory activity of yogurt during lactic acid fermentation at 37°C for 12h.

(7) 2단 발효마 분말 첨가에 따른 GABA 함량

γ -aminobutyric acid (GABA)는 단백질에서 발견되지 않는 비단백질성 아미노산으로 뇌와 척수에 존재하는 신경전달 물질로서 혈류를 개선하며 뇌의 산소공급을 증가시켜 뇌의 대사촉진 및 뇌 기억을 증진시키는 뇌의 영양제로 알려져 있다. GABA는 신경전달 물질 중 아미노산계 신경전달물질의 대표적인 물질로서, 동식물계에 널리 분포되어 있는데, 식물에서는 녹차 등에 존재하며 홍국(red yeast rice) 중에도 다량 존재하는 것으로 알려져 있다.

본 실험에서의 2단 발효마 분말 농도별(0, 0.1, 0.3, 0.5, 1 및 2%, w/v) 첨가에 따른 요구르트의 GABA 함량을 측정된 결과는 Fig. 23에 나타난 바와 같이 무첨가군의 경우 GABA 함량이 280.9mg/L 이었으나, 2단 발효마 분말의 첨가농도가 높아질수록 GABA 함량이 높아져 304.6~685.4mg/L로 나타났으며, 이는 앞선 ACE 저해활성에서와 마찬가지로 첨가농도에 비례적으로 그 함량 또한 증가하는 것으로 조사되었다. 이러한 결과는 Park 등이 보고한 *Lactobacillus brevis* OPY-1 균주로 발효한 현미요구르트에서 137mg/L의 GABA가 생산되었다는 결과보다는 GABA 함량이 높았으며, Lim 등(2009)이 보고한 0.1% MSG 함유 환원탈지유(12%)에서 배양한 *Lacidophilus*의 경우 배양 18시간 일 때 GABA 함량이 600mg/L였다는 결과와 유사하였다.

따라서 본 연구에서의 2단 발효마 첨가 요구르트는 항고혈압 활성뿐만 아니라 GABA 고함유 기능성 yogurt로서 개발 및 상업적인 제조 가능성이 크다고 사료된다.

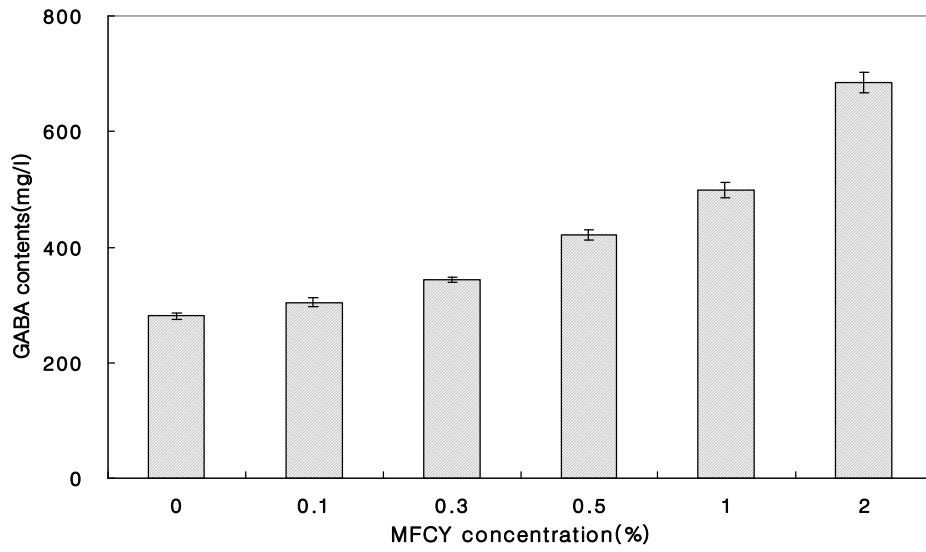


Fig. 23. Effect of MFCY powder concentration on GABA contents of yogurt during lactic acid fermentation at 37°C for 12h.

제 14절 산지 연계 복합형 마 가공식품 개발

1. 서언

마는 백합목 마과 식물(*Dioscoreaceae*)로 한국, 일본, 중국 지역과 열대, 아열대 지역에 널리 분포하고 있는 다년생 덩굴식물이며, 전 세계적으로 장마, 단마, 환마, 참마, 산마, 부채마, 단풍마 등 650여 종이 알려져 있으며, 그 중 10여 종이 식용 및 약용으로 상용되어 왔다. 그 원산지는 중국이며, 한국, 중국, 타이완, 일본 등지의 산지에서 자생하기도 한다. 특히 마의 뿌리를 건조시켜 말린 것은 한방에서 중요한 약재로 사용되는데, 이를 ‘산약’ 또는 ‘서예’라고 한다.

채배 마의 경우 식약청이 식품원료로 지정하였고, 일반적으로 생식으로 소비되고 있다. 국내에서 식용하는 마는 *Dioscorea batatas*로 분류되는 채배종이며, 일반적으로 줄기는 가늘고 길며 성기게 가지가 갈라지며, 잎은 마주나거나 돌려나는데 삼각형으로 잎 밑은 심장형이며 끝이 날카롭다. 잎자루는 길고 잎겨드랑이에 둥근 싹이 있으며, 꽃은 6 ~ 7월에 백색으로 피며, 암수딴꽃으로서 수상 꽃차례이다. 수꽃 꽃차례는 곧추서고 백색꽃이 많이 달리며 암꽃 꽃차례는 밑으로 처지고 몇 개의 암꽃이 달린다. 열매는 삭과로 3개의 날개가 있고 둥근 날개가 달린 종자가 들어 있다. 수확은 10월말에서 11월에 하게 된다. 현재 연간 생산량은 4,311톤으로, 그중 70% 이상이 경북 안동지역에서 생산되고 있다.

생마는 수분함량 74~76%, 전분 15~20%, 단백질 1.0~1.5%, 총 지질 1% 이하, 회분 1.25% 이하, 총 질소함량 0.1~0.4%이며, 점질다당류, 비타민, 미네랄, 기타 다양한 생리활성물질 등을 포함하고 있다(정, 1995). 식용 마의 일반성분 중 가장 많은 양을 차지하는 전분은 보통 19.5% 정도로 고구마 전분 10.6%, 토란 전분 10.3%, 칩 전분 16%에 비해 그 함량이 높으며, 또한, 호화개시온도는 전분 전처리방법에 따라 변화되나 52.9℃에서 69.7℃로 다른 전분에 비해 낮거나 유사한 것으로 보고되어 쉽게 호화되어 점성이 증대되는 특성이 있으며, 소화 및 흡수가 용이한 것으로 보고되어 있다(최 등, 1992; 권 등, 1998; Ahn 등, 2005).

보고된 약용성분으로는 아밀로스(Amylose), 콜린(Cholin), 사포닌(Saponin), 뮤신(Mucin), 아라기닌(araginine), 요노게닌(yonogenin), 크립토게닌(kryptogenin), 디오스게닌(diosgenin) 등을 함유하고 있으며 먹는 피임약과 성호르몬 생산에 이용되며, 또한 관절염 치료제의 원료로 사용되고 있다. 최근에는 콜레스테롤 저하작용, 항산화작용, 항 당뇨, 항 대장암 효과 및 항 돌연변이 활성 등의 효능이 밝혀져, 건강식품으로 그 소비가 급격히 증가하고 있는 실정이다(김, 2001; 권 등, 2003; 권 등, 2001).

마의 껍질을 제거하여 말린 것을 ‘산약’이라 하며 주로 한약재로 이용되면 마 분말을 이용한 차 또는 약주, 식혜, 선식 등과 생마를 이용한 가공식품으로 마 요구르트 외에는 미진한 실정이다. 마는 주로 생것이나 분말로 가공되어 소비되고 있으나 생것은 유통과 보관이 용이치 않고 거피과정에서 피부 가려움증을 유발하는 문제점이 있어(Kubo 등, 1994) 먹기 편하고 장기보존이 가능한 분말형태로 가공되고 있으나 어린이 및 청소년층에 기호성이 떨어지는 경향이 있어 여러 연령층에 가공제품으로 마를 소비할 수 있도록 다양한 가공제품을 개발하고자 하였다.

2. 연구방법

가. 가공 방법

(1) 마 쌀국수

마 생쌀국수 제조를 위한 호화 마 분말과 호정 콩분말 제조공정은 Fig. 1과 같다.

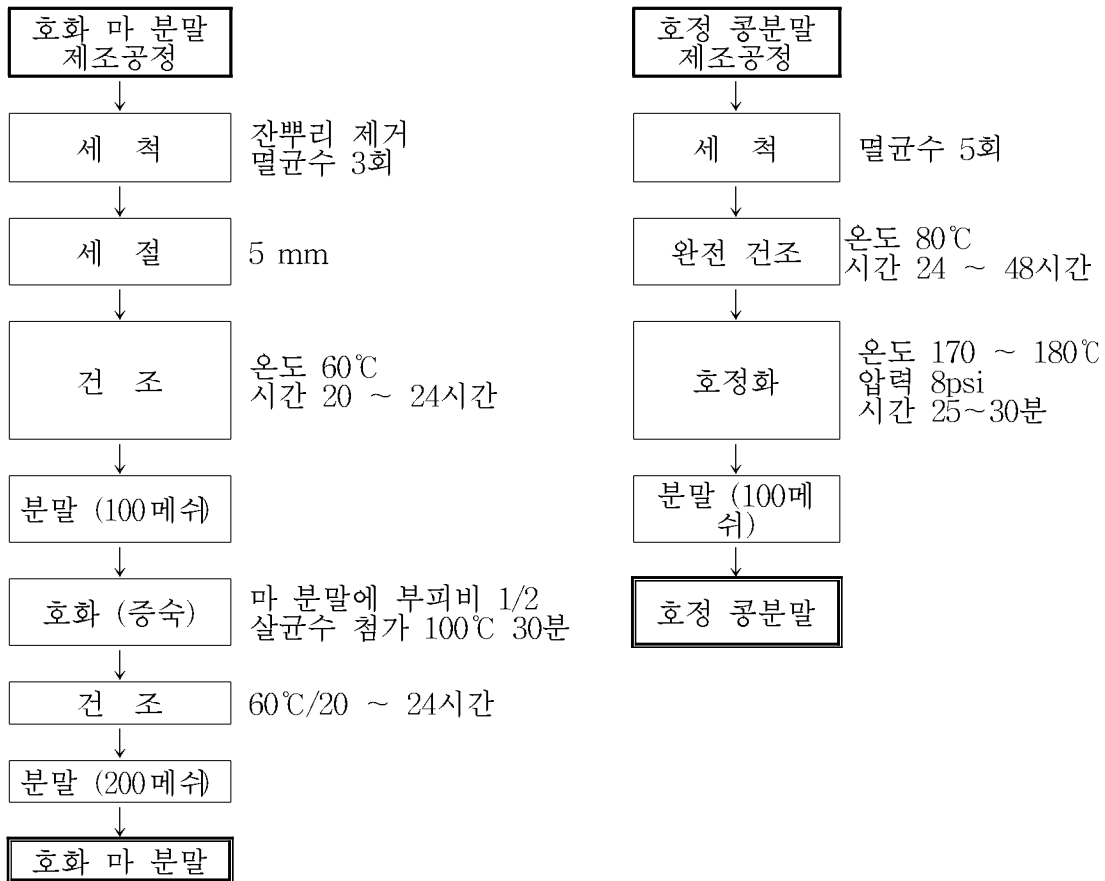


Fig. 1. 호화 마 분말과 호정 콩분말 제조방법.

중량 % 비율로 쌀가루 10~15, 미강 0.2~0.5, 밀가루 중력분 45~55, 호화 마 분말 5~8, 호정 콩분말 3~5, 트레할로스 0.3~0.5, 소금 0.1~0.5%를 골고루 혼합한 다음 멸균수를 15.5~36.4%로 첨가하여 반죽하였다. 반죽된 복합분말을 롤러에 압연시켜 면대를 만든다. 이때 반죽물의 조직감을 높이기 위하여 압연롤러를 7상으로 하여 제면하였다. 7상 압연롤러를 통과한 면대는 폭 1.5 2mm, 두께 1.5mm, 길이 300mm로 절단하여 국수를 제조하였다.

(2) 마 초콜릿 제조

마가 첨가된 초콜릿은 전체 무게 1,000g당 설탕 310~340g, 트레할로스 50g, 당화 마반죽 100~200g, 코코아파우더 120~130g, 코코아버터 410~420g, 레시틴 10g, 주정 100~200mL을 혼합한 것으로 마분말에 동량의 물을 첨가하고 아밀라제(0.5%)로 55°C 정도에서 24시간 정도

당화시킨 다음 코코아버터, 코코아분말, 설탕, 당화 마반죽, 주정, 트레할로스를 혼합하여 45°C에서 반숙한 후 콘칭기로 60°C에서 24시간 콘칭한 것에 레시틴을 60°C에서 10분간 혼합시켜 몰딩하여 마를 이용한 초콜릿을 제조하였다.

(3) 마 사과 정과 제조

마 사과 정과는 Fig. 2에 제시된 방법에 준하여 제조하였다. 생마 껍질을 제거한 것을 6~7mm 두께로 절단한 다음 살짝 데쳐서 표면의 점질물을 제거하여 사과농축액의 침투가 용이하도록 하였다. 이때 사과농축액 처리시간 및 온도는 한(2003)의 방법을 참조하여 40°C에서 5시간 30분간 실시한 다음 표면을 건조하여 정과를 제조하였다.



Fig. 2. 마 사과 정과 제조방법

(4) 마 치즈 제조

치즈 제조에 적합한 물성을 가지는 마 반죽을 제조하기 위하여 변성전분을 제조하였다. 마 반죽의 점성을 높이기 위하여 Fig. 3과 같이 Trimetaphosphate를 이용하여 인산결합 마 변성전분을 제조하였다(W.-M. Kulicke 등. 1990; T. Ojima 등 1986; Ralph M. Trksak. 미국특허).

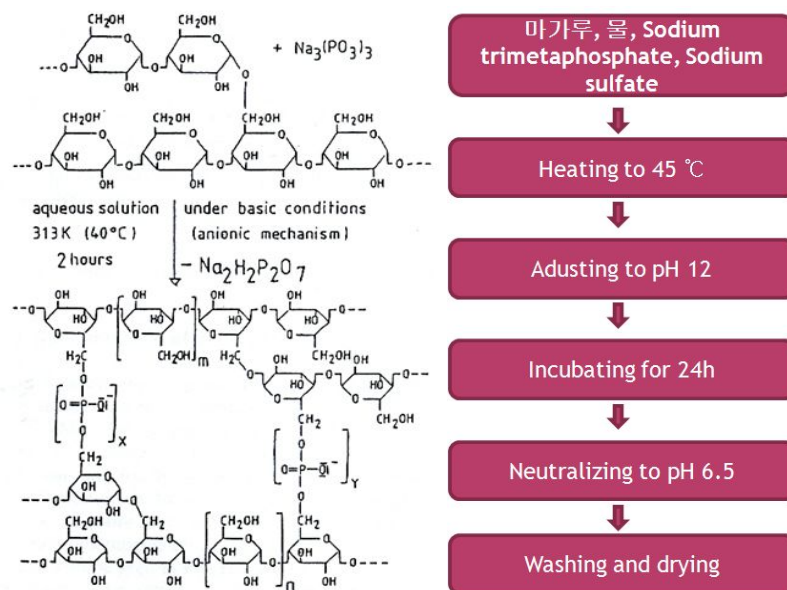


Fig. 3. 마 변성전분 제조방법

마 변성전분 분말 0~16g에 물을 1L를 첨가한 후 80°C에서 20분간 열처리하여 마변성전분이

호화되도록 한 다음 전지분류 94~110g과 stabilizer(0.6g gelatin)를 첨가하였다. 이때 마 변성 전분 분말과 전지분유 첨가량은 전지분유량의 0, 5, 10, 15%가 되도록 조정하였다. 80℃에서 교반하면서 pH를 5.5로 조절하여 응집현상을 발생시킨 후 성형한 마 치즈를 20% 소금물에 15분간 침지하여 제조하였다.

(5) 마 사과 잼 제조

생마와 사과을 세척한 다음 껍질을 제거하고 갈변방지를 위하여 1% 식염수에 침지하였다. 사과 425~500g과 생마 0~75g를 생마의 함량이 0, 5, 10, 15%가 되도록 혼합하여 믹서기를 이용하여 생마와 사과를 갈아 물 300mL과 설탕 200g함께 냄비에 넣고 약한 불로 열을 가하면서 약 15분간 졸여 잼을 완성하였다.

(6) 마 사과 음료 제조

마 분말이 10%의 농도가 되도록 물에 잘 현탁하여 제조한 마 분말액에 알파-아밀라제(액화 효소5000, (주)바이오랜드)를 0.3%, 0.5%, 0.7%, 1.0% 첨가하여 당화반응을 진행하였다. 이 때 반응온도는 제조사의 사용법에 따라 55℃에서 수행하였다. 액화효소500은 원료 전분의 0.02~0.5% 정도 첨가하여 당화하도록 되어 있으나 마는 전분입자가 크고 치밀하여 사용량을 권장량의 2배까지 사용하여 당화실험을 수행하였다. 당화는 시간은 1시간 단위로 하여 6시간까지 수행하였다. 마 사과음료 혼합율은 사과농축액(72Brix) 1%에 설탕 8%와 사과향 0.2%를 기본으로 하여 마 당화액을 3%, 5%, 7%, 10% 첨가하여 마 사과음료를 제조하였고 정제수로 보충하여 마 사과음료를 제조하였다.

(7) 마 메주 제조

콩을 충분히 물에 불린 다음 콩 무게의 0, 5, 10, 15% 마가루를 첨가한 후 콩이 잠길 만큼 물을 넣고 121℃에서 2시간 삶았다. 충분히 뜸을 들인 후 남은 물은 버리고 삶은 콩을 으깨어 1kg 단위로 메주를 성형하였다. 성형한 메주를 40℃에서 24시간 걸말린 다음 30℃, 상대습도 30%에서 10일간 발효한 후 35℃ 변온처리를 24시간하여 메주를 제조하였다.

주요 유기산 및 알콜 분석은 3g 메주가루에 29mL Solvent(ACN:M:W=2:2:1)와 1mL Internal S.D.(30ppm Glycolic acid)을 넣고 2시간 sonication하였다. 원심분리한 상층액 1mL을 완전히 건조시킨 후 100 μ L TMCS와 100 μ L ACN을 넣고 70℃에서 20분 유도체를 만들어 분석시료로 사용하였다. 이때 GC-MS 분석조건은 Injector 온도 200℃, detector 온도 250℃, Split ratio 10:1으로 하였고 오븐온도는 80℃에서 1분 후 분당 3℃씩 온도를 올려서 최종 250℃에서 1분 유지시켜 분석을 진행하였고 물질 동정은 MS 스펙트럼을 Wiley library 7.1 데이터베이스와 비교하여 결정하였고 정량은 내부표준 물질의 피크면적비로 산출하였다.

(8) 마 된장 제조

마 메주 25%, 소금 20%, 물 55%을 공기가 통하는 용기에 넣고 25℃에서 60일간 1차 숙성시킨 후 액체상과 고체상을 분리한 다음 10일간 2차 숙성하여 된장을 제조하였다.

아미노산성 질소는 시료무게의 50배 물을 넣고 2시간 교반하면서 추출하였다. 추출물 50mL를 0.1N NaOH로 pH 8.4까지 적정한 다음 10mL Formalin을 첨가한 후 다시 0.1N NaOH로

pH 8.4까지 적정하였다. 이때 소비된 0.1N NaOH 소비량을 측정하여 아래식을 이용하여 아미노산성 질소를 구하였다.

$$\text{아미노산성 질소(mg \%)} = \frac{(\text{시료 } 0.1\text{N NaOH 소비량} - \text{Blank } 0.1\text{N NaOH 소비량}) \times 14 \times f^*}{\text{시료채취량(g)}} \times 100$$

*f: 0.1N NaOH 용액의 용도계수.

나. 가공제품의 특성 분석

(1) 복합분말의 색도(명도)

색차계(Color JS555, Japan)를 이용하여 반복적으로 3회 측정하고 이의 평균값을 Hunter Color 방식인 L, a 및 b값으로 표시하였다. 이때 표준 백색판의 L, a 및 b값은 각각 98.25, 0.11 및 -0.32였다.

(2) 쌀국수 제조용 복합녹말의 점성

Rapid visco analyser (RVA)를 이용하여 호화 시킨 마 분말, 생콩 및 호정 콩분말을 첨가한 복합분말 3.5g과 증류수 25ml를 정평하여 알루미늄 캔에 넣고 10분간 방치한 다음 최초 가열 온도 50℃에서 가열속도를 분당 10℃씩 95℃까지 점진적으로 온도를 상승시켰다가 일시 고온 상태로 둔 다음 다시 50℃로 점진적으로 냉각시키면서 점도 변화를 조사하였다.

(3) 국수의 물성

2분간 조리한 국수의 부착성, 신장성, 씹힘성 및 경도는 Texture analyser(TA-XT2, England)로 Xtrad program을 이용하여 시료별로 Φ 5mm diameter plunger로 눌렀을 때 얻어지는 힘과 시간으로 산출하여 조사하였다.

(4) 국수 취반 시 용출 고형분 함량

제면 후 세 가닥을 세절한 다음, 1g을 취하여 20 ml 증류수를 넣고 95℃에서 20분간 호화시킨 후 남은 액을 여과 건조 후 중량 %로 산출하였다.

(5) 마 국수 면대 형성도

실제 제면의 산업화를 위하여 제면공장에서 사용하고 있는 7상 롤러를 이용하여 면대 형성도를 측정하였다.

3. 연구결과

가. 마 생쌀국수

마의 기능성분을 활용하여 소비자가 쉽게 접할 수 있는 농산식품개발을 위하여 마와 안동 지역에서 생산된 쌀을 이용한 생쌀국수를 제조하였다.

쌀가루, 미강, 밀가루 중력분, 호화 마 분말 및 호정 콩 분말을 이용하여 복합분말을 만든 다음 0.3% 소금물과 반죽한 Table 1에 나타난 마와 같이 혼합비율을 달리하여 반죽특성을 비교하였다.

복합분말의 명도는 쌀가루 첨가량이 증가할수록 약간 감소하였으며, 적색도는 복합분말의 쌀 첨가량에 따라 일정한 경향을 보이지 않았다. 황색도는 쌀가루의 첨가량이 증가함에 따라 다소 완만하게 증가하였다(Table 1).

복합분말의 호화 점도 특성을 살펴보면(Table 1), 호화개시온도는 쌀가루의 첨가량이 증가할수록 낮아지는 결과를 보였으며, 최고점도는 호화개시온도의 경향과 상반되는 결과를 보여주었다. 전분의 노화특성을 알 수 있는 취반점도는 쌀가루의 함량이 25%첨가되었을 때 가장 높아짐을 알 수 있었다.

Table 1. 복합분말의 색차 및 호화 특성.

측정항목	주요 복합분말 혼합비율(쌀가루:미강:밀가루, %)			
	1 (5:0.5:55)	2 (10:0.5:55)	3 (15:0.5:55)	4 (25:0.5:55)
명도(L)	92.3	91.5	90.5	91.2
적색도(a)	-0.66	-0.69	-0.63	-0.65
황색도(b)	11.34	11.45	11.43	11.53
호화개시온도(T_0)	85.6	84.2	83.3	81.7
최고점도(BU)	2443	2376	2343	2216
최저점도(BU)	1435	1345	1355	1367
취반점도(BU)	104	120	132	138

Table 2는 복합분말의 면대형성도와 물리적 특성을 조사한 것으로, 쌀가루 함유량이 5 ~ 15중량%까지는 면대가 형성되었으나 25중량% 첨가량에서는 면대의 가장 자리가 절출되어 면으로서 가치가 저하됨을 알 수 있었다. 부착성은 쌀가루 첨가량이 증가할수록 감소되었으며 15중량%까지는 15.8인 것보다 25중량%에서는 13.2로 급격히 낮아짐을 알 수 있었다. 신장성은 부착성과 유사한 결과를 보였는데 쌀 첨가량이 증가할수록 완만히 감소되었으며 씹힘성 특성은 쌀가루 첨가량이 증가할수록 감소하였으며 경도는 이와 반대로 쌀가루 첨가량이 증가할수록 강한 특징을 보였다. 조리 후 용출 고형분은 쌀가루의 첨가량이 증가할수록 높아지는 경향을 보였으나 큰 차이는 보이지 않았다.

마 생쌀국수는 조리하였을 때, 소맥분의 냄새가 뚜렷하게 제거되었으며, 또한 복합분 공정

에서 호정 콩분말의 첨가로 고소한 느낌이 향상되었으며 특히 제면공정의 면대형성에서 압연 롤러를 7개 단계를 통과하면서 조직감이 높아져 면대의 부드러움 뿐만 아니라 조리 후에도 텁텁함이 없고 매끈한 느낌이 향상됨을 알 수 있었다.

Table 2. 복합분말의 면대 형성도 및 물성 특성

측정항목	주요 복합분말 혼합비율(쌀가루:미강:밀가루,%)			
	1 (5:0.5:55)	2 (10:0.5:55)	3 (15:0.5:55)	4 (25:0.5:55)
면대 형성도 [†]	1	1	1	3
부착성(adhesiveness)	17.9	16.9	15.8	13.2
신장성(extensibility)	49.7	46.3	45.2	44.5
씹힘성(chewiness)	423	411	398	374
경도(g)	1348	1367	1389	1401
용출 고형분(%)	3.55	3.61	3.67	3.73

[†] 면대 형성도: 혼합분말 반죽 후 7상 롤러를 통과한 후 면대의 끊어짐 정도.

1: 전혀 끊어지지 않음(완전 면대형성), 3: 가장자리 끊어짐(1cm이하: 3.3%이하), 5: 가장자리 끊어짐(2cm이상~3cm: 6.7-10%), 7: 가장자리 끊어짐(3cm이상~4cm: 11-13.3%), 9: 가장자리 끊어짐(4cm이상~5cm: 13.4-16.7%). 백분율: 면대폭 30cm 기준.

나. 마 초콜릿

인체에 유익한 기능을 가진 마 초콜릿 제조시 첨가함으로서 초콜릿의 기능성 증진뿐만 아니라 마에 함유된 전분성분을 당화시켜 사용함으로서 초콜릿 제조시 사용되는 설탕량을 감소 시키면서도 제품의 기호성을 증대시키고자 하였다.

마 분말에 동일량의 물과 중온성 α -아밀라제(대종상사, 35000u/g)과 고온성 α -아밀라제(대종상사, 6000u/g)를 0.5% 혼합하여 중온성 α -아밀라제는 55℃에서 고온성 α -아밀라제는 92%에서 당화시킨 결과, 중온성 α -아밀라제는 24시간까지 당화가 지속되어 환원당은 96.8mg/g까지, 굴절당도는 18Brix까지 증가하였으나 고온성 α -아밀라제는 1.5시간부터 당화반응속도가 현급히 감소하여 24시간까지 환원당은 61.5mg/g, Brix는 12.7°였다. 따라서 마분말의 적정 당화효소로 α -아밀라제를 선발하여 마를 이용한 초콜릿제조에 이용하였다(Fig. 4).

마 초콜릿 제조를 위한 재료혼합비율은 Table 3과 같이 배합하여 가장 적합한 당화 마 분말 첨가비율을 결정하고자 하였다.

당화 마 분말의 첨가량이 증가함에 따라 초콜릿 색이 어두워지는 경향을 보여 L값이 당화 마분말 첨가량의 증가에 따라 감소하였고 a값과 b값의 경우, 마분말 7% 첨가까지는 감소하였다가 10%에서는 증가되었는데 이러한 현상은 마분말 첨가량 증가에 따른 코코아파우더와 코코아버터 첨가량의 감소에 기인한 것이다.(Fig. 5, 6). 마가 가지는 항산화 활성과 초콜릿의 항산화 활성이 상승작용을 일으켜 당화 마 분말 첨가량이 증가함에 따라 항산화 활성이 증가함을 확인하였다(Fig. 7).

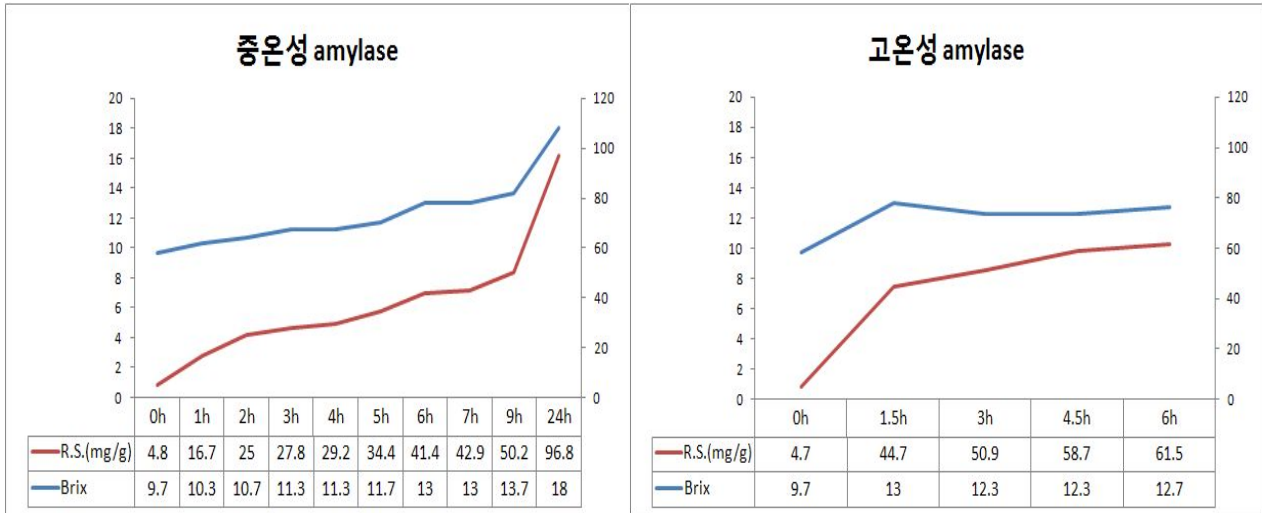


Fig. 4. 마 초콜릿 제조에 알맞은 당화효소 선발 및 특성.

Table 3. 마 초콜릿 재료 배합비율.

재 료	Control	마 5%	마 7%	마 10%
설탕	39%(390g)	34%(340g)	32%(320g)	31%(310g)
트레할로스	5%(50g)	5%(50g)	5%(50g)	5%(50g)
마분말	0%(0g)	5%(50g)	7%(70g)	10%(100g)
코코아파우더	13%(130g)	13%(130g)	13%(130g)	12%(120g)
코코아버터	42%(420g)	42%(420g)	42%(420g)	41%(410g)
레시틴	1%(10g)	1%(10g)	1%(10g)	1%(10g)
주 정	0mL	100mL	140mL	200mL
계	100%(1,000g)	100%(1,000g)	100%(1,000g)	100%(1,000g)

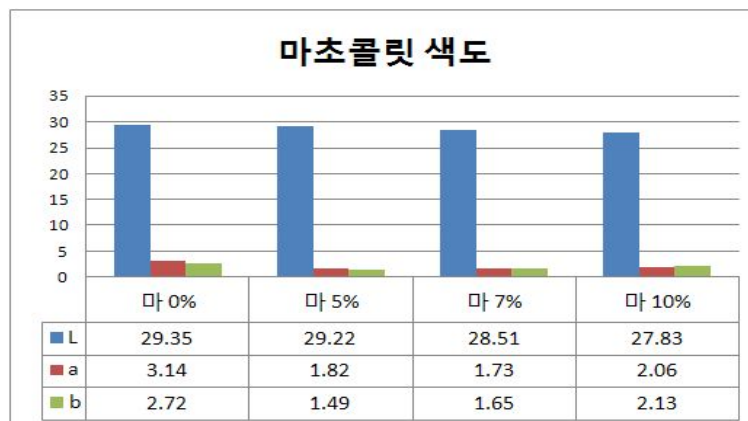


Fig. 5. 마 초콜릿 제조 후 색도 변화.



Fig. 6. 마 초콜릿.

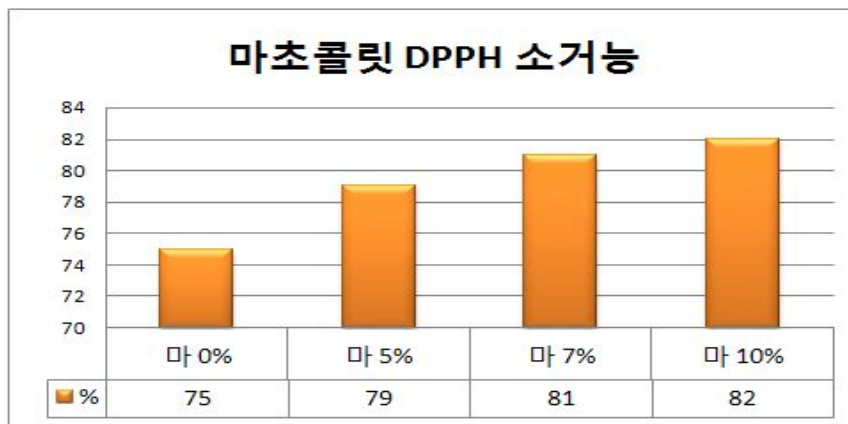


Fig. 7. 마 초콜릿의 항산화 활성 변화.

다. 마 사과 정과

생마를 세척·거피하고 일정 크기에 절단한 것을 데쳐 생마 표면에 존재하는 특유의 점질물을 제거하여 사과농축액이 잘 스며들 수 있도록 한 다음(조 등, 2002), 40℃에서 5시간 30분 동안 사과농축액에 당침하였고 사용한 농도는 40, 50, 60 Brix로 하였다. 수분함량은 40 Brix에서 19.1%로 가장 높았고, pH와 NaOH소비량은 사과농축액 농도가 진할수록 증가하였다. 환원당, 총페놀 함량도 60 Brix에서 각각 37.1%, 98.3mg%로 가장 높았고 특히 총당함량은 40 Brix 13.4%, 50 Brix 13.6%에서 60 Brix에서는 22.5%로 급격히 증가됨을 알 수 있었다(Table 4, Fig. 8).

색도는 사과농축액 농도가 높을수록 a, b값이 높아지고 L값도 높아졌는데 이러한 현상은 생마의 갈변현상을 사과농축액속의 유기산 등이 저해시킨 결과로 생각된다(Table 5).

마 사과 정과의 물성은 사과농축액의 농도가 높을수록 최대응력, 강도, 경도, 항복치가 상승하였고 60 Brix에서는 딱딱한 정도의 식감을 나타내어 60 Brix 이상의 농축액에서 당침하는 것을 식감에 나쁜 영향을 주었다(Table 6).

마 사과 정과의 관능평가를 위하여 맛, 색, 향, 질감, 종합으로 나누어 평가한 결과, 50 Brix에서 가장 높은 점수를 보였다. 이러한 결과는 60 Brix에서는 질감의 점수가 낮았고 40 Brix에

서는 맛에서 낮은 점수를 받았기 때문이다(Table 7).

Table 4. 마 사과 정과의 특성.

사과농축액 (Brix)	수분함량 (%)	pH (1:5)	NaOH소비량 (1:5,ml)	환원당 (%)	총페놀함량 (mg%)
40	19.1	4.53	1.41	33.0	89.5
50	16.3	4.69	1.49	33.6	92.4
60	17.4	4.85	1.65	37.1	98.3

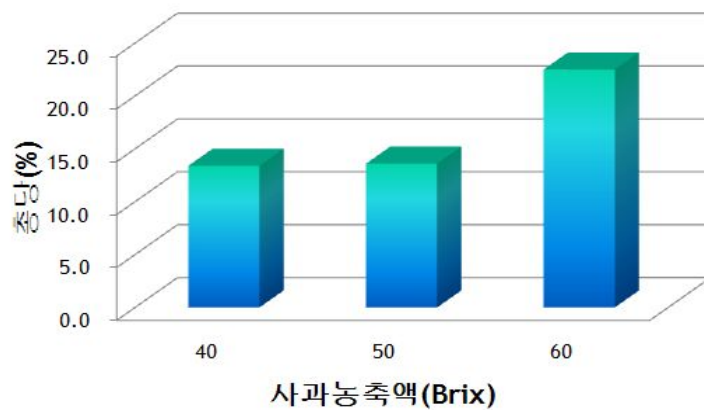


Fig. 8. 침지 사과농축액에 따른 마 사과 정과 총 당함량.

Table 5. 마 사과 정과 색도분석.

사과농축액 (Brix)	색 도		
	L	a	b
40	38.1	9.2	2.0
50	40.5	10.2	2.6
60	46.1	12.3	9.9

Table 6. 마 사과 정과 물성 분석.

사과농축액농도 (Brix)	최대응력 (g)	진입깊이 (mm)	강도 (g/cm ²)	경도 (g/cm ²)	항복치 (g/cm ²)
40	1180	2.02	1.67E+04	3.31E+05	1160
50	1900	2.02	2.69E+04	5.32E+05	1890
60	2340	1.86	3.31E+04	7.12E+05	2320

Table 7. 마 사과 정과 관능평가.

사과농축액 농도 (Brix)	맛	색	향	질감	종합
40	3.2	3.1	2.8	3.8	3.0
50	4.2	3.4	2.7	3.7	4.3
60	4.5	3.5	2.8	3.2	4.2

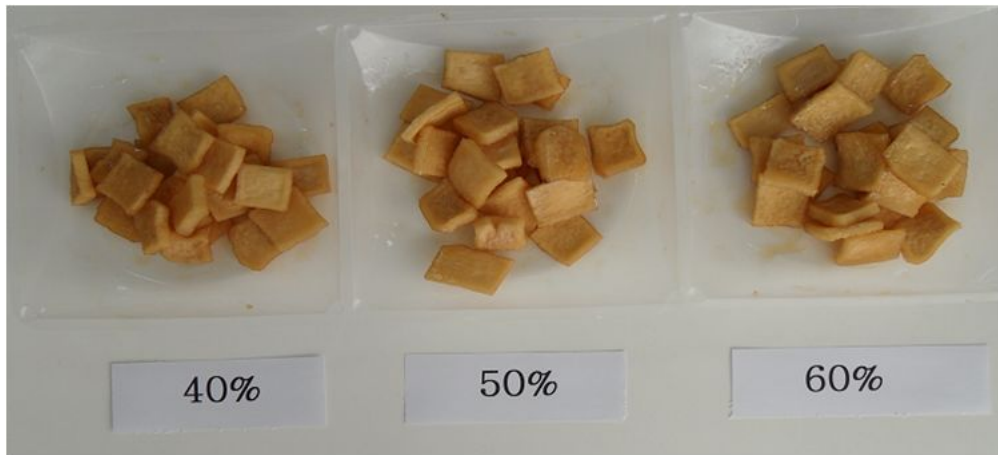


Fig. 9. 사과 농축액 농도에 따른 마 사과 정과의 색도.

라. 마 치즈

마 반죽의 점성을 높이기 위하여 마 전분에 Sodium metaphosphate를 처리하여 전분사슬을 인산으로 연결하여 변성전분을 제조하였다(Fig. 10). 마 전분에 15.9%의 sodium metaphosphate를 처리한 결과, 무처리에 비하여 2배 정도의 응력, 씹음성, 깨짐성, 부착성이 증가하여 전체적으로 점성이 높아져서 치즈제조시 전지분유와 혼합하여 치즈를 제조하였다(Table 8).

마를 5%, 10%, 15%로 전지분유와 혼합하여 제조한 치즈의 총단백질, 고형분, 회분, 총페놀, DPPH 라디칼 소거능을 분석하였다. 총단백질 함량은 변성 마 분말의 첨가비율이 증가할수록 낮아졌으며 고형분은 무첨가 52.6%에서 마 첨가비율에 따라 38.6~45.4%로 변화었는데 마 첨가량이 증가할수록 수분함량이 감소하여 고형분의 비율이 높아지는 결과를 보였다. 회분은 15% 변성 마 분말 첨가 치즈에서 가장 높게 나타났으나 다른 처리에서는 큰 차이를 보이지 않았고 DPPH 라디칼 소거능은 처리수준에 따라 차이가 미미하였다(Table 9).

변성 마 분말이 5%, 10% 첨가된 치즈는 무첨가 치즈에 비하여 응력, 응집성, 씹음성, 깨짐성이 크게 감소하였고 15% 첨가 치즈는 응력, 응집성, 씹음성, 깨짐성은 증가하여 무첨가 치즈에 유사한 수치를 보였으나 부착성이 크게 감소하였다(Fig. 11). 결과적으로 5%, 10% 첨가 치즈는 소프트한 느낌의 치즈가 제조되었고 15% 첨가 치즈는 좀 단단한 형태의 치즈로 제조되었다(Table 10).

Table 8. 결합(Cross-linked) 마 변성전분의 물성.

인산처리농도 (%)	최대응력(Max1) (g)	최대응력(Max2) (g)	응집성 (g)	씹음성 (g)	깨짐성 (g)	부착성 (g)
0	90	110	104.6	94.2	12115.9	-20.0
9.5	80	70	99.3	79.5	9164.8	-20.0
11.9	110	110	100.1	110.1	13317.5	-20.0
15.9	200	200	100.7	201.5	22419.1	-50.0

Table 9. 변성 마 전분 함유 치즈 특성.

마 함량 (%)	총단백질 (%)	고형분 (%)	회분 (%)	총페놀 (mg%)	DPPH소거능 (%)
0%	21.2454	52.6	2.97	21.9	60.5
5%	15.8224	38.8	3.11	17.1	61.2
10%	15.2482	42.6	2.93	16.8	61.0
15%	14.7378	45.4	3.51	16.1	61.3

Table 10. 변성 마 전분 함유 치즈의 물성.

마함량 (%)	최대응력 (Max1, g)	최대응력 (Max2, g)	탄력성 (%)	응집성 (%)	씹음성 (g)	깨짐성 (g)
0	1280	1180	101	87	1116	112,539
5	260	270	111	98	255	28,450
10	270	270	109	99	267	29,241
15	880	920	102	108	948	96,735

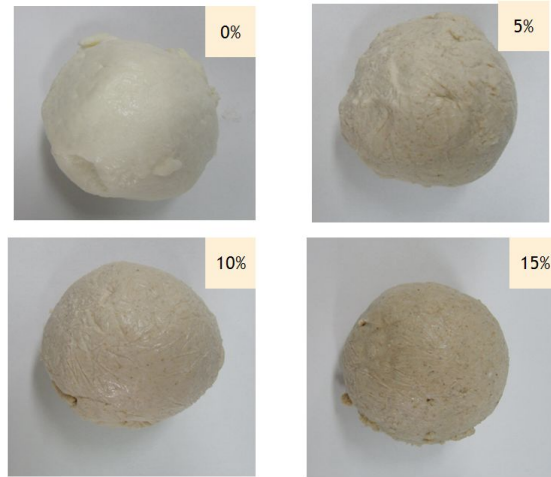


Fig. 10. 변성 마 전분 함유 치즈.

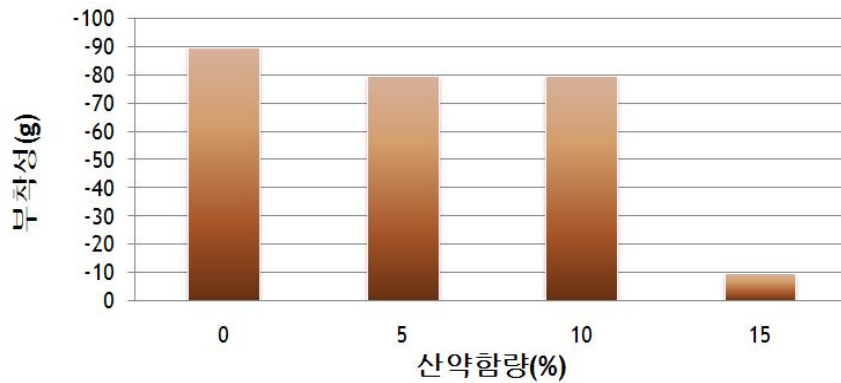


Fig. 11. 변성 마 전분 함량에 따른 치즈의 부착성.

마. 마 사과 잼

생마와 사과를 세척하고 껍질을 제거한 다음, 1% 식염수에 침지시켜 갈변을 억제한 것을 분쇄기로 갈아 생마와 사과를 준비하였다. 사과에 생마를 5%, 10%, 15% 첨가하여 약한 불로 가열하면서 가수 및 설탕을 첨가하여 15분 졸여서 마 사과 잼을 제조하였다(Fig. 12).

제조된 잼의 물성을 분석한 결과, 생마 첨가량이 증가할수록 응집성, 씹음성, 깨짐성이 감소하였다. 특히 15% 이상 첨가 시 무처리 잼의 물성과 큰 차이를 보여 깨짐성은 1898g 이상 감소하는 것을 나타냈다(Table 11). 또한 Fig. 12에서와 같이 잼의 주요특성 중에 하나인 탄력성이 마 함량이 증가함에 따라 감소하였는데 특히 15% 이상에서는 급격히 탄력성이 감소하여 마 첨가량은 10%까지가 적당한 것으로 판단되었다(Fig. 13).

마 사과 잼은 일반 사과 잼에 비해 DPPH 라디칼 소거능이 증가하여 마 유래의 항산화 물질이 사과에 포함된 항산화 물질과 상승작용을 일으켜 활성이 증가하였다(Fig. 14). 항산화 활성은 마 함량 10%까지는 증가하다가 15%에서는 감소하는 경향을 보였는데 이러한 현상은 마 함량이 높아지는데 반하여 사과함량이 감소하여 사과의 항산화물질 감소가 마 사과잼 전체의 항산화능 감소에 영향을 미친 것으로 판단된다.

마 사과 잼의 pH는 마 함량이 높아질수록 사과의 함량이 낮아짐에 따라 사과에 함유된 사과산의 함량이 낮아져 pH가 높아지는 결과를 보였고 변화의 폭은 크지 않았다(Fig. 15).

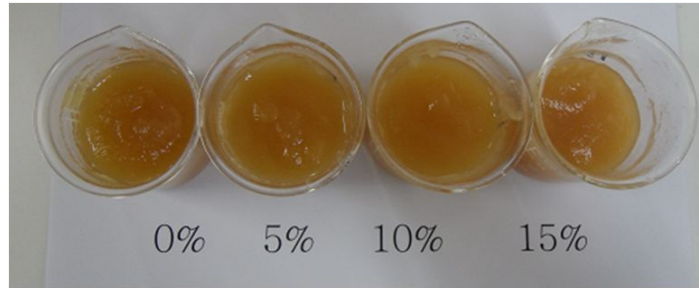


Fig. 12. 마 -사과 잼.

Table 11. 마 -사과 잼 물성.

마 함량(%)	최대응력 (Max1, g)	최대응력 (Max2, g)	응집성 (g)	씹음성 (g)	깨짐성 (g)	부착성 (g)
0%	14	14	118.4	16.6	2752.9	0.0
5%	11	11	112.3	14.2	2615.1	0.0
10%	12	11	104.6	12.6	2054.0	0.0
15%	15	15	90.4	13.6	1898.4	0.0

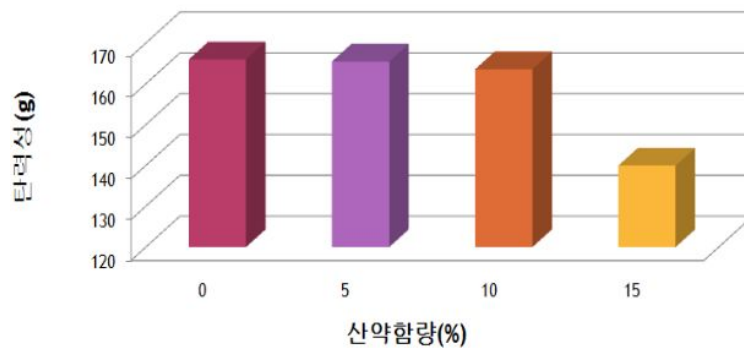


Fig. 13. 마 함량에 따른 마 사과 잼의 탄력성 변화.

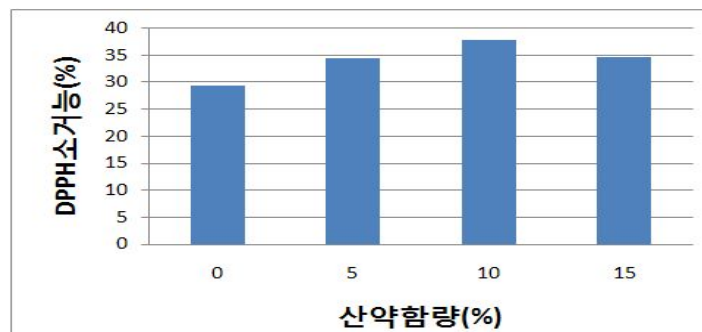


Fig. 14. 마 사과 잼 DPPH라디컬 소거능

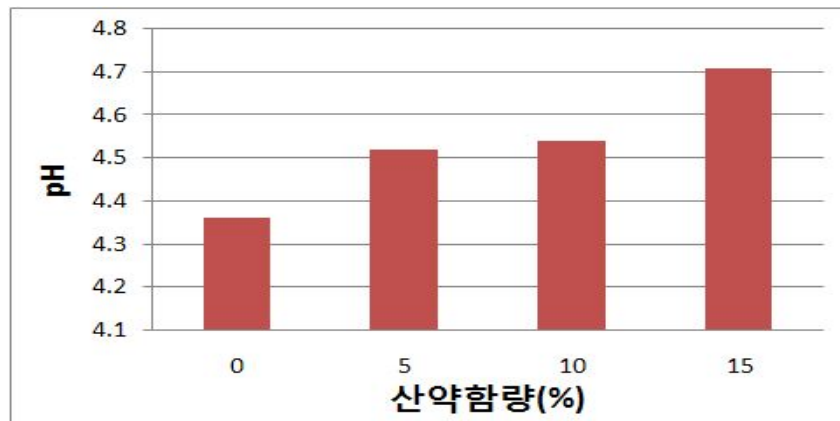


Fig. 15. 마 사과 쥬스 pH.

바. 마 사과 음료

마와 사과 혼합음료는 마 분말 10% 현탁액에 알파-아밀라제(액화효소5000, (주)바이오랜드)를 0.3%, 0.5%, 0.7%, 1.0%를 첨가하여 마 전분을 55°C에서 당화한 후 사과 농축액을 가하여 제조하였다. 액화효소500은 원료 전분의 0.02~0.5% 정도 첨가하여 당화하도록 되어 있으나 마는 전분입자가 크고 치밀하여 사용량을 권장량의 2배까지 사용하여 당화실험을 수행하였다. 당화는 2시간까지 급격히 증가하다가 이후 완만한 증가를 나타내었고 액화효소5000를 1% 처리할 경우 6 Brix 이상까지 증가하였다. 마 사과음료 제조를 위한 마 분말 당화 시간 및 효소 첨가량을 5시간, 1%로 설정하였다(Fig. 16).

사과농축액(72°Brix) 1%, 설탕 8%, 사과향 0.2%에 마 당화액을 3%, 5%, 7%, 10% 수준으로 첨가하여 마 사과음료를 제조하였다. 마 당화액 함량이 높아짐에 따라 Brix가 약간 증가하였고 pH는 4.50~4.92로 주로 사과농축액에 의해 영향을 받을 것을 판단된다.

항산화 활성은 마 당화액 7%까지는 증가하다가 감소하는 경향을 보였고 살균 후에는 10% 마 당화액 함유 음료에서 가장 높은 항산화 활성의 감소를 보였다. 제조한 마 사과음료의 살균 전·후의 Brix, pH, DPPH 라디칼 소거능을 분석한 결과, Brix 및 pH는 큰 변화가 없었으나 DPPH 라디칼 소거능에 다소 변화가 나타나 마 당화액에 함유된 항산화 활성물질이 열에 약한 성분임을 짐작할 수 있다(Table 12).

마 당화액 함유 음료의 색도는 마 당화액 함량이 높을수록 갈색이 진해져서 마 당화액 3%에서 5%로 함량이 증가함에 따라 L값은 82.5에서 54.3으로 낮아졌고 a값은 -0.30에서 1.02로, b값은 7.78에서 13.17로 높아졌다. 마 사과음료의 살균 전·후의 색도변화는 미미한 수준으로 약간의 L, a, b값 감소가 확인되었다(Table 13).

마 사과음료의 관능평가에서는 7% 마 당화액을 첨가한 것이 마 특유의 향과 맛을 나타내어 기호성이 가장 높은 것으로 나타나 마 사과음료 제조 시 마 당화액을 7% 첨가하는 것이 가장 적합한 첨가량으로 판단된다(Table 14).

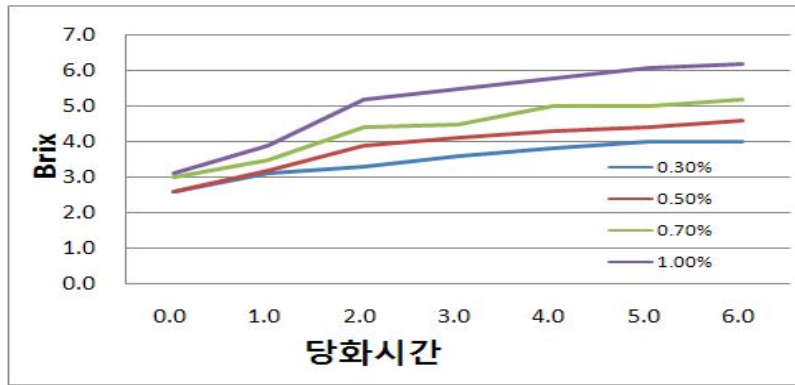


Fig. 16. 알파-아밀라제를 이용한 10% 마 현탁액의 당화.

Table 12. 살균전·후의 마 사과음료 특성.

마 당화액 함량 (%)	살균전			살균후		
	Brix	pH	DPPH소거능 (%)	Brix	pH	DPPH소거능 (%)
3	9.3	4.52	6.7	9.2	4.46	5.7
5	9.3	4.75	6.5	9.2	4.71	7.5
7	9.4	4.93	9.0	9.3	4.91	8.1
10	9.6	4.50	8.9	9.5	5.08	6.6

Table 13. 살균전·후의 마 사과음료 색도.

마 당화액 함량 (%)	살균전			살균후		
	L	a	b	L	a	b
3	82.5	-0.30	7.78	81.0	-0.30	7.91
5	76.6	-0.02	9.90	73.1	0.09	10.06
7	68.7	0.35	11.92	62.7	0.44	11.37
10	54.3	1.02	13.17	49.6	0.93	12.08

Table 14. 마 사과음료 관능평가.

마 당화액함량 (%)	맛	색	향	종합
3	2.7	2.3	3.8	2.7
5	4.2	4.8	4.8	4.1
7	4.9	4.8	4.6	4.8
10	3.2	4.6	4.6	3.7

사. 마 메주

국산 장콩을 24시간 물에 불려 충분히 콩에 수분을 공급한 다음 0, 5, 10, 15% 마가루(불리기 전 콩 무게 기준)를 첨가하여 1kg 단위로 메주를 제조하였다. 잡균 번식억제를 위하여 40℃에서 24시간 메주의 겉면을 건조하였다. 메주발효를 위하여 온도 30℃, 상대습도 30%의 조건에서 10일간 발효한 다음 35℃ 변온처리를 24시간하여 최종적으로 발효가 완료되도록 하였다.

Fig. 17은 발효가 완료된 마 메주의 겉면과 단면으로 마분말이 첨가됨에 따라 곰팡이의 번식이 왕성해져 10% 이상에서는 메주 속에서 곰팡이 균사가 다량 형성됨을 확인할 수 있었다.



Fig. 17. 마 메주.

마 메주의 수분함량은 14.9~16.3%로 거의 건조된 상태였고 마분말 함량이 높을수록 수분함량이 높았고 색도는 마분말 15% 함유 메주에서 가장 높은 L값을 보였다(Table 15). 마분말 함유 메주의 경도는 마분말 15% 메주, 10% 메주, 5% 메주 순으로 마 분말 함량이 높을수록 경도가 증가하는 경향을 보였고 콩메주와 비교시 5%와 10% 마 메주는 경도가 낮았고 15%의 메주는 약 3배 정도 경도가 높은 것으로 나타나서 메주 형성과 건조과정에서 콩과 마의 결합력이 일정 농도 이상에서는 급격히 증가하는 것으로 판단된다.

마 메주의 올리고펩타이드와 아미노산성 질소 함량을 조사한 결과, 5% 마 분말을 함유한 마 메주에서 가장 높은 올리고펩타이드와 아미노산성 질소가 확인되었고 10% 이상의 마 분말을 함유한 마 메주는 콩 메주 보다 낮은 올리고펩타이드와 아미노산성 질소를 함유하고 있었다(Fig. 18, 19). 이러한 이유는 메주발효 과정에서 10% 이상의 마분말을 함유한 메주에서는 세균 보다는 곰팡이의 번식이 활발하여 proteinase에 의한 단백질의 분해활성 보다는 마 분말에 함유된 전분 등을 분해하는 amylase와 같은 전분분해 효소활성이 높은 곰팡이의 생육에 좋은 조건을 제공하였기 때문으로 사료된다.

Table 15. 마 메주의 품질특성.

마분말함량 (%)	수분함량 (%)	색도			경도 (최대응력, g)
		L	a	b	
0	14.9	42.5	6.4	17.6	880
5	15.2	34.8	4.3	12.8	215
10	15.3	40.3	6.4	15.1	540
15	16.3	50.0	4.0	17.5	2,390

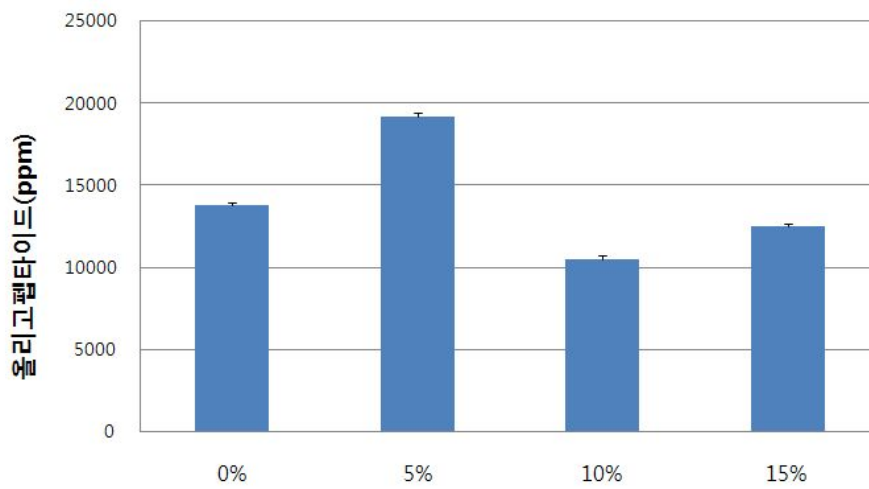


Fig. 18. 마 첨가량에 따른 메주의 올리고펩타이드 함량.

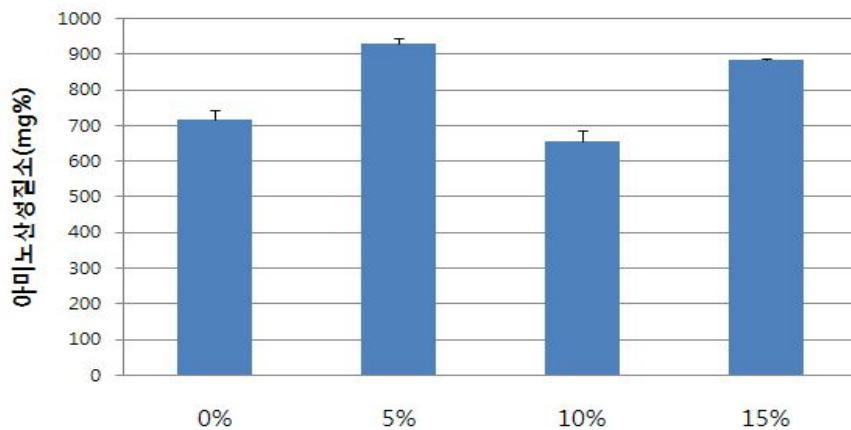


Fig. 19. 마 첨가량에 따른 메주의 아미노산성 질소 함량.

Table 16은 마 메주의 주요 유기산 및 알콜을 분석한 결과로 마분말 15% 함유 마 메주에서는 lactic acid와 propanoic acid만이 검출되어 다른 마 메주와 콩 메주와는 다른 풍미를 나타내었다. Butanoic acid는 0, 5, 10% 마분말 함유 메주에서 비슷하게 나타났고 succinic acid는

5. 10% 마분말 함유 메주에서만 나타났다. 전반적으로 10% 마분말 메주 보다는 5% 마분말 메주에서 높은 유기산과 알콜 함량을 보였는데 이러한 현상은 메주 발효가 5%에서 가장 이상적으로 일어났기 때문으로 보인다.

콩 메주와 5% 마분말 메주를 비교하면(Table 16), butanoic acid, 2-3-butanediol, phenylacetic acid는 콩 메주에서 많았고 2-methylbutyric acid, latic acid, propanoic acid, 3-methyl butanoic acid, butanol, 3-hydroxyisovaleric acid, succinic acid는 5% 마분말 메주에서 높아 5% 정도의 마가루를 함유한 메주에서 보다 많은 양의 유기산과 알콜이 생성됨을 확인하였다.

Table 16. 마 첨가량에 따른 메주의 주요 유기산 및 알콜 함량

Compound	주요 유기산 및 알콜(ppm)			
	마분말 0%	마분말 5%	마분말 10%	마분말 15%
Butanoic acid	45.71	44.17	45.71	-
2-methylbutyric acid	31.43	54.17	18.57	-
2-3-butanediol	84.29	55.00	12.86	-
Latic acid	28.57	64.17	28.57	17.78
Propanoic acid	10.00	23.33	21.43	10.56
3-methyl butanoic acid	2.86	14.17	2.86	-
Butanol	7.14	35.00	-	-
3-hydroxyisovaleric acid	1.43	3.33	18.57	-
Phenylacetic acid	80.00	79.17	32.86	-
Succinic acid	-	2.50	20.00	-

아. 마 된장

마 메주 25%, 소금 20%, 물 55% 비율로 혼합하여 공기가 통하는 용기(버섯 병채배 용기)에 넣고 25℃에서 60일간 숙성시켜 소금이 메주에 스며들게 하였다. 1차 숙성 후 액상의 간장을 된장에서 분리한 다음 된장을 용기에 잘 다져 넣고 10일간 2차 숙성을 거쳐 된장을 완성하였다.

수분함량은 50.2~53.2%로 처리 간에 일정한 경향은 없었고 색도는 5% 마 분말 함유 된장에서 가장 높은 L값을 보였다(Table 17, Fig. 20).

마 된장의 올리고펩타이드 함량은 마 분말 10% 함유 된장이, 아미노산성 질소 함량은 콩 메주에서 가장 높았다(Fig. 21, 22). 특이하게 마 분말 5% 된장의 경우, 마 분말 5% 메주에서와는 반대로 올리고펩타이드와 아미노산성 질소가 가장 낮은 결과를 보였다. 이러한 현상은 수용성 올리고펩타이드와 아미노산성 질소가 간장으로 용출되었기 때문으로 사료된다. 마 된장 제조 시에는 간장을 뽑지 않고 된장을 제조하는 방법이나 마 간장 제조시에는 본 자료의 참조가

필요할 것으로 판단되고 향후 연구에서 마 된장, 간장 품질향상을 위한 연구가 더욱 필요할 것으로 사료된다.

마 된장을 제조하여 연구원을 대상으로 관능평가를 실시한 결과(Table 18), 마 분말 5% 함유 된장이 가장 높은 점수를 받았고 일반적인 된장과 흡사한 것으로 나타났다. 맛에서는 콩 된장 보다 낮은 점수를 받았는데 이러한 현상은 올리고펩타이드와 아미노산성 질소 분석 결과에서와 같이 간장으로 감미성분이 많이 유출된 결과로 제조공정의 개선으로 보다 관능이 우수한 된장의 제조가 가능할 것이다.

Table 17. 마 첨가량에 따른 마 된장의 품질 특성.

마분말함량 (%)	수분함량 (%)	색도		
		L	a	b
0	51.9	45.9	9.7	24.7
5	50.2	47.2	9.7	25.4
10	53.2	42.4	9.7	25.2
15	52.5	43.1	10.0	25.5

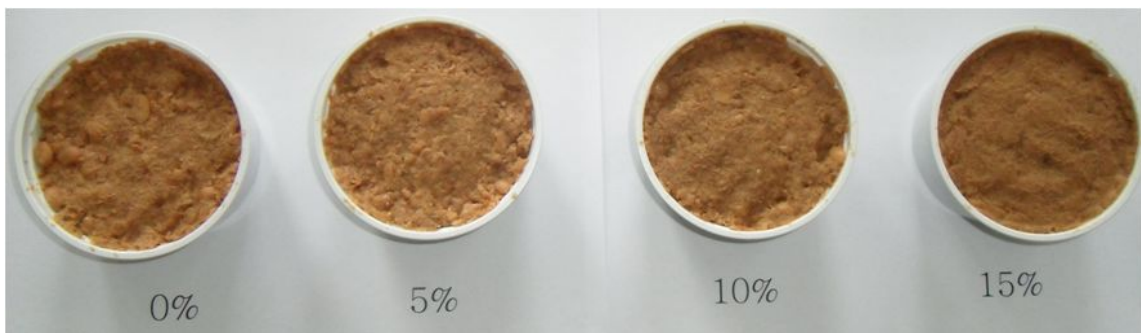


Fig. 20. 마 된장.

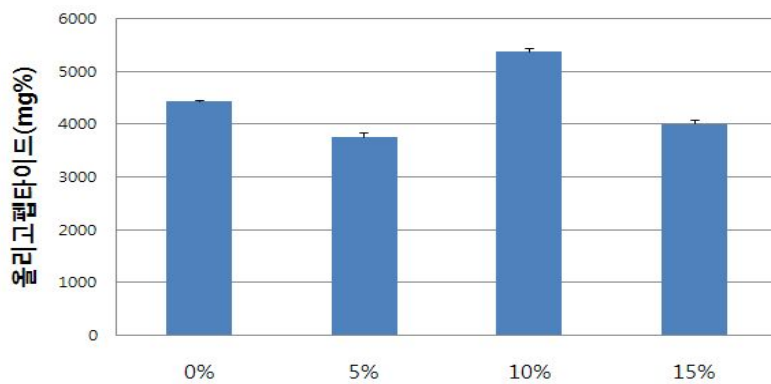


Fig. 21. 마 첨가량에 따른 마 된장의 올리고펩타이드 함량

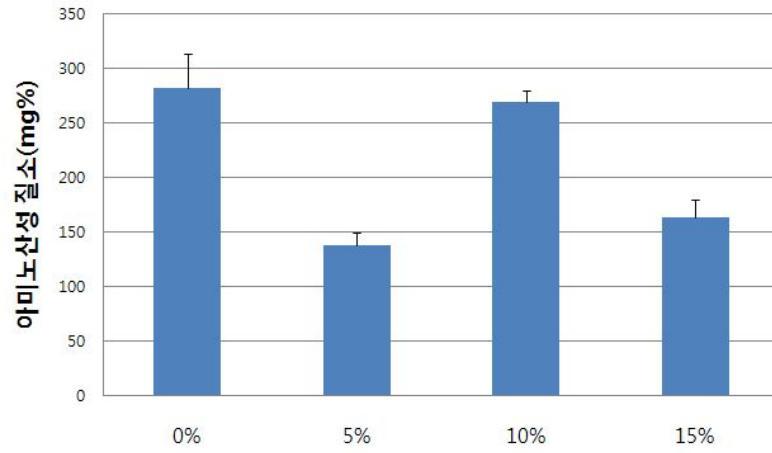


Fig. 21. 마 첨가량에 따른 마 된장의 아미노산성 질소 함량

Table 18. 마 된장 관능 평가

마분말함량(%)	맛	색	향	종합
0	4.0	4.0	3.6	4.0
5	3.6	4.2	4.0	4.2
10	2.8	3.0	2.8	3.0
15	3.2	2.8	2.8	2.8

제 4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 기초 지원기술 분야: 수확후 관리, 마케팅, 포장

연구 목표	달성도 및 기여도
가. 수확후 관리 모델 제시	<p>- 100% 달성</p> <p>1) 생마의 수확후 생리: 저온 장해 현상 증명 → 저장온도 설정 지표</p> <p>2) 수확후 관리 모델 - 수확후 처리(치유) - 저장 - 유통 조건 제시</p> <p>3) 신선 마 저장 손실 감소</p> <p>4) 연중 공급체계 확립에 기여</p>
나. 마 마케팅 지원	<p>- 100% 달성</p> <p>1) 마 및 마 가공식품 산업 외부환경(메가트렌드 분석/동향·전망 분석/ 산업 성장분석)을 분석</p> <p>2) 신시장 진출 비즈니스 모델 개발 및 단계별 (도입기, 성장기, 성숙기) 마케팅 전략을 수립</p> <p>3) 포장 시각디자인 4건 및 카탈로그 디자인 3건 지원</p> <p>4) 마 및 마 가공제품 소비자 분석을 통한 신시장 발굴, 개발 및 4P's 모델 정립</p> <p>5) 신시장 진출 비즈니스 모델 개발 및 마케팅 전략 수립: 3개 마 가공제품 회사를 대상으로 실행계획(Action Plan)을 개발하여 제공</p>
다. 협동 1: 마 포장기술 개발 및 표준화	<p>- 100% 달성</p> <p>1) 국산 마의 유통 및 포장분야 기초자료 분석 및 실태조사</p> <p>2) 갈변 억제와 미생물 오염의 방지 기술 - 고 산소차단성 및 항균 기능 포장소재 활용기술 개발</p> <p>3) 신선편이 절편 마와 같은 마의 유통·저장에 적합한 포장기법 개발 - MAP 포장과 CMC coating 기술 - 차단성이 높은 알루미늄 증착 필름 효과 검증</p>

2. 마 유래성분의 효능 검증 및 기능성 신소재 개발 분야

연구 목표	달성도 및 기여도
<p>가. 마 추출물(뮤신, 조사포닌)의 생물학적 유용성 입증</p>	<p>- 100% 달성</p> <p>1) 마의 유효성분(뮤신, 조 사포닌)의 추출공정확립 2) 마 추출 뮤신과 조사포닌의 항산화 및 항염증 활성검증 3) 마 추출 고기능성 물질의 산업화 방안 모색</p>
<p>나. 마 생리활성물의 항골다공증 효능 검증</p> <p>- Diosgenin 성분의 효능 확인 - 마 추출물의 기능 확인</p>	<p>- 100% 달성</p> <p>1) Diosgenin이 미세한 효과로 조골세포의 증식을 촉진 - 조골세포 분화 및 골 형성 마커인 alkaline phosphatase와 collagen type I의 세포내 합성, 세포외기질로의 분비, 세포매트릭스의 ALP 효소 활성을 증가시킴을 확인. 2) 마 추출물의 일부 성분이 조골세포를 증식시킴을 확인 - 마 ethanol과 water 추출물이 조골세포의 증식을 촉진 - 조골세포 분화 및 골 형성 마커인 alkaline phosphatase와 collagen type I의 세포외기질로의 분비, 세포기질의 ALP 효소 활성을 증가시킴을 확인 - 세포외기질에서 칼슘을 침착시킴을 확인 3) Diosgenin 또는 마 추출물을 소재로 항골다공증 치료제로의 활용가능성을 제시함,</p>
<p>다. 마 추출물의 저분자화합물 분리 및 항노화, 항염증 기능성 탐색</p>	<p>- 100% 달성</p> <p>1) 마 추출물의 저분자화합물 분리 - 마 추출물의 저분자화합물 대량 분획, 정제 2) 마 저분자 추출물의 효능 검증 - 노화 연관 유전자 발현 억제 효능 확인 - 염증 유발 유전자 발현 억제 효능 확인 - 마 추출물의 위염 억제 전임상 효능 3) 마 추출물 함유 제품화에 기여 - 페이스트 시제품 제작</p>
<p>라. 마의 풍미 와 효능 개선을 위한 발효 및 증자숙성 공정 개발</p>	<p>- 100% 달성</p> <p>1) 공적 최적화 - 온도, pH, 시간 등의 조건을 최적화 2) 발효 및 증자숙성 마의 활성성분 분석 - 알란토인, 폴리페놀, 올리고펩티드, 아미노산, 당 분석 3) 발효 및 증자숙성 공정을 통한 효능 강화 검증 - 항산화력, 항염증, 혈압강하 작용 등의 효능 개선 효과 - 면역조절 및 피부재생 효능검증 4) 식품소재화를 위한 안전성 검증 - Benzo pyrene 등의 발암물질 분석 5) 공정의 단순화와 최적화를 통해 산업적 생산을 가능하게 함.</p>

연구 목표	달성도 및 기여도
<p>마. 마 영여자로부터 다양한 천연물 추출물 조제 및 활성 평가</p>	<p>- 100% 달성</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 메탄올 추출물 조제 및 이에 따른 다양한 용매 분획물 조제 2) 영여자 천연물 추출물의 항진균 및 항암활성 평가 3) 5종의 phenanthrene derivatives 확보 완료 4) 폐기되는 마 부산물인 영여자의 산업적 활용가능성 제시
<p>바. 효능물질 대량생산체계 확립</p>	<p>- 100% 달성</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 성장점 배양을 통한 무병(virus-free)묘 육성 과정 확립 2) 성장조절제, 배지성분(당, 질소, 염분 농도 등) 조건 구명 3) 적정 바이오리액터 소재 및 배양시스템 확립 4) 액체배양을 통한 획기적인 생산효율 증대 5) 배양 묘 추출물의 생리활성 검정
<p>사. 협동 2: 생리활성 물질의 전임상 연구</p>	<p>- 100% 달성</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 면역세포 활성 및 조절 작용 검토 <ul style="list-style-type: none"> - Diosgenin에 의한 대식세포의 NO분비 억제 확인 - Diosgenin에 의한 세포부착분자의 발현 억제 및 신호전달 경로 확인 2) 아토피성 피부질환 완화 검토 <ul style="list-style-type: none"> - Diosgenin에 의한 아토피성 피부염의 완화 확인 3) 항동맥경화 효능 <ul style="list-style-type: none"> - 동맥경화 질환모델에서 Diosgenin과 마 추출물 처리는 동맥경화의 진행을 완화시킴 4) 마 유래성분의 약학적 활용 <ul style="list-style-type: none"> - 염증관련 질환, 항염증제 가능성 - 알레르기성 질환 치료제로서의 가능성 제시 - 동맥경화 치료제로의 가능성 제시

3. 가공기술 및 제품개발 분야

연구 목표	달성도 및 기여도
가. 신선편이 제품 및 마 분말을 활용한 기능성 강화 식품개발	<ul style="list-style-type: none"> - 100% 달성 1) 신선편이(fersh-cut) 제품의 안전성 제고 기술 개발 <ul style="list-style-type: none"> - fresh-cut 마의 제조 방법 - 유해미생물 억제 방법 개발 2) 마 첨가 고추장 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 이화학품질, 손실분석 - 안정성 및 가공 적성구명 3) 마 첨가 목 제품 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 기능성분을 부가한 간편식품에 적용(마목) - 기호도, 품질 특성 등 조사
나. 기호성 마 정과 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 100% 달성 4) 다양한 소비계층 대상의 마 제품화 가능성 제시
다. 기능성 강화 발효 음료 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 100% 달성 1) <i>Monascus</i> sp. MK2 및 <i>Lactobacillus brevis</i> HLJ59 균주 선발 2) 선발균주를 활용한 발효마 향고혈압 yogurt의 개발 3) 2단 발효를 통한 GABA 고함유 발효마의 제조 4) GABA 강화 발효유의 제조 및 특성 조사를 통한 고기능성 yogurt의 개발 5) 마를 이용한 기능성 음료의 산업화 가능성 제시
라. 협동 3: 지역연계 상품 개발	<ul style="list-style-type: none"> - 100% 달성 1) 마생쌀국수 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 호화 마 분말과 호정 콩분말의 최적배합 비율 설정 2) 마초콜릿 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 당화 마분말 첨가량 결정 3) 마사과 정과 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 생마 침지에 적합한 사과농축액 농도를 설정 4) 마 치즈 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 마 변성전분을 이용한 치즈제조방법 확립 5) 마 사과 잼 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 잼 제조를 위한 사과와 생마의 적정 혼합비율 설정 6) 마 사과 음료 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 음료 제조를 위한 적정 마 당화액 첨가비율 설정 7) 마 된장 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 마메주 제조에 적합한 마분말 첨가량 결정 - 마된장 제조 시 품질변화 및 관능 분석

제 5장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 연구개발 성과

가. 학술지 게재논문: 15편

논문 구분	논문명	게재지명 권(호):페이지	게재년월	SCI 등재여부
국내	안동마의 마케팅 믹스 전략	농업경영·정책연구 37(3): 548-572.	2010. 9. 30	학진 등재지
국제	Diosgenin stimulates osteogenic activity by increasing bone matrix protein synthesis and bone-specific transcription factor Runx2 in osteoblastic MC3T3-E1 cells	Journal of Nutritional Biochemistry	2011. 2. 1 (e-published) doi:10.1016	SCI (IF 4.4)
국내	Evaluation of antimicrobial, antithrombin, and antioxidant activity of aerial bulbils of <i>Dioscorea batatas</i> DECEN	Kor. J. Microbiol. Biotechnol. 37(3): 266-272	2009. 10. 30	학진 등재지
국내	Effect of temperature on Yam quality during long-term storage	J. Basic and Life Res. Sci. 9(1):61-66.	2009. 12. 30	학진 등재지
국내	Evaluation of antimicrobial, antithrombin, and antioxidant activity of <i>Dioscorea batatas</i> DECEN.	Kor. J. Microbiol. Biotechnol 37(2): 133-139.	2009. 12. 30	학진 등재지
국내	Evaluation of antimicrobial, antioxidant and antithrombin activities of the rhizome of various <i>Dioscorea</i> species	Kor. J. Food Presev. 17: 391-3971	2010. 4. 30	학진 등재지
국내	Antimicrobial, and antioxidant activity of <i>Dioscorea alata</i> L	Kor. J. Microbiol. Biotechnol 38: 283-288.	2010. 6. 30	학진 등재지
국내	Evaluation of antimicrobial, antioxidant and antithrombin activities of domestic fruit and vegetable juice	Kor. J. Microbiol. Biotechnol 39:(2) In press.	2011. 6. 30	학진 등재지
국내	Evaluation of biological activity and characterization of taste and function-enhanced yam chips.	Kor. J. Microbiol. Biotechnol 39(2) In press.	2011. 6. 30	학진 등재지
국내	마 추출물이 방사선 처리 식물세포의 성장과 DNA 손상에 미치는 영향	한국자원식물학회지	2009. 10. 1	학진 등재지
국제	Inhibition of TNF- α -induced adhesion molecule expression by diosgenin in mouse vascular smooth muscle cells via downregulation of the MAPK, Akt and NF- κ B signaling pathways.	Vascul . Pharmacol. 53(5-6):273-80	2010. 10.13	SCI
국제	Diosgenin inhibits macrophage-derived inflammatory mediators through downregulation of CK2, JNK, NF-kappaB and AP-1 activation.	Int. Immunopharmacol. 10(9):1047-54	2010. 6.11	SCI
국제	Ethanollic extract of Aerial Bulbils of <i>Dioscorea batatas</i> Decne inhibits TNF-a-induced adhesion molecule expression in vascular smooth muscle cells through inhibition of MAPK, Akt and NF-kB	Journal of Ethnopharmacology: In press	(2011 .6.20) (예정)	SCI

논문 구분	논문명	게재지명 권(호):페이지	게재년월	SCI 등재여부
국내	국내 새우젓에서 분리한 <i>Lactobacillus brevis</i> HLJH59의 Angiotensin Converting Enzyme 저해활성 및 생리적 특성	한국미생물학회지 46(1):9-14	2010. 3.30	학진등재
국내	Starch properties of chinese yam, <i>Dioscorea opposita</i> Decne	Korean J. of Crop Sci. 54(2):198-202	2009. 3.24	SCI

나. 학술대회 발표: 34편

발표 구분	학술회의명	개최기간	주최국	발표논문명
국내	한국원예학회	2009. 5.22~5.23	한국	단마(<i>Dioscorea opposita</i> Thunb.)의 수확후 치유방법과 저장온도에 따른 호흡특성 및 품질변화
국내	한국원예학회	2010. 10.22~10.23	한국	단마(<i>Dioscorea opposita</i> Thunb.)의 장기저장을 위한 수확후 열풍치유 기간과 저장온도 설정.
국내	한국자원식물학회	2009. 5. 7~5. 8	한국	산약으로부터 활성산소에 의해 야기되는 산화적 DNA 손상억제 및 항산화 활성
국내	한국분자세포생물학회	2010. 2. 3	한국	Mucilage from the yam (<i>Dioscorea batatas</i>) inhibits oxidative DNA damage and apoptosis via antioxidant activity
국내	한국자원식물학회	2010. 10. 7~10. 8	한국	산약으로부터 분리된 조사포닌과 뮤신의 산화적 DNA손상과 항염증 활성
국내	한국식품과학회	2009. 5.27~5.29	한국	Osteogenic activity of disgenin and yam extracts on osteoblastic MC3T3-E1 cells
국내	한국식품영양과학회	2009. 11. 4~11. 6	한국	Diosgenin stimulates proliferation, collagen level and ALP activity in osteoblastic MC3T3-E1 cells
국내	한국식품과학회	2010. 6.16~6.18	한국	Diosgenin stimulates osteogenic activities by increasing bone matrix protein synthesis and bone-specific transcription factor Runx2 and osteopontin expression in osteoblastic MC3T3-E1 cells
국내	한국생명과학회	2010. 10.20~10.21	한국	Diosgenin stimulates osteogenic activities by increasing bone matrix protein synthesis and bone-specific transcription factor Runx2 in osteoblastic MC3T3-E1 cells
국내	한국식품영양과학회	2010. 10.27~10.29	한국	Yam extracts increase bone matrix proteins secretion and synthesis on murine osteoblastic MC3T3-E1 cells
국내	한국식품과학회	2011. 6. 8~6.10	한국	Extracts form wild yam increases bone formation by increasing bone matrix proteins secretion and synthesis on murine osteoblastic MC3T3-E1 cells
국내	한국자원식물학회	2009. 5. 8~5. 9	한국	Evaluation of nucleus-DNA damage as affected the treatment of Chinese yam extract
국내	한국식물과학협회의회 정기학술대회	2009. 10.26~10.27	한국	Radiation induced nucleus-DNA damaged is recovered by yam extract
국내	한국식물과학협회의회 정기학술대회	2009. 10.26~10.27	한국	등근마 무병식물체의 기내대량증식법
국내	한국자원식물학회	2010.	한국	Effect of growth regulators on <i>in vitro</i> culture of

		5.14~5.15		yam
국내	한국자원식물학회	2010. 10. 7 ~10. 8	한국	Mass production of yam microbulb by in vitro culture system
국내	한국분자세포생물학회	2010.10. 07	한국	Anti-Inflammatory and Anti-Gastric Ulcer Effects of <i>Dioscoreae Rhizoma</i> Extracts.
국내	한국분자세포생물학회	2010.10. 07	한국	Age Related Gene Regulation in HEK001 Treated with Yam Extract
국내	한국미생물생명공학회	2009. 6.18~6.20	한국	마의 기능성 개선을 위한 발효공정개발
국내	한국식품과학회	2010. 6.16~6.18	한국	증자숙성 가공공정을 통한 마의 효능 및 품질개선
국내	2009년도 대한 약학회 추계 국제 학술대회	2009. 10.15 ~10.16	한국	Inhibition of TNF- α -induced adhesion molecule expression by diosgenin in mouse vascular smooth muscle cells via downregulation of the JNK/ERK-NF- κ B signaling pathway
국제	Experimental biology 2010	2010. 4.24~4.28	미국	Anti-allergic effect of diosgenin in mice
국내	2010년도 대한 약학회 추계 국제 학술대회	2010. 10.21 ~10.22	한국	Inhibition of LPS/IFN- γ -induced NO production by edible yam extracts (H1) via suppression of MAPK/NF- κ B pathways in macrophages.
국내	2010년도 대한 약학회 추계 국제 학술대회	2010. 10.21 ~10.22	한국	Yam bark extracts(H2) suppress LPS/IFN- γ -induced NO production by MAPKs and NF- κ B activation in Raw 264.7 macrophages.
국제	Experimental biology 2011	2011. 4. 9~4.13	미국	Ethanol extracts of yam potently reduce atherosclerosis in ApoE-deficient mice
국제	Experimental biology 2011	2011. 4. 9~4.13	미국	Anti-atherosclerotic effects of diosgenin in ApoE-deficient mice
국내	한국식품영양과학회	2010. 10.27 ~10.29	한국	마 첨가 고추장의 품질 특성
국내	한국식품영양과학회	2009. 11. 4 ~11. 6	한국	마 정과 제조를 위한 제조 조건 및 품질 분석
국내	한국식품영양과학회	2009. 11. 4 ~11. 6	한국	마 신선편이 제품 개발을 위한 전처리 효과
국내	한국생명과학회	2009. 10.15 ~10.16	한국	Production and Characterization of GABA Yam Yogurt
국내	한국미생물생명공학회	2010. 1.20~1.21	한국	Biological Activities of Fermented Yam by <i>Monascus</i> sp. MK2
국내	한국미생물생명공학회	2010. 6.24~6.25	한국	Characteristics of Fermented Milk with Fermented Yam by <i>Lactobacillus brevis</i> HLJ59
국내	한국미생물생명공학회	2011. 2.18~2.19	한국	Biological Activities of Fermented Chinese Yam by Dual Fermentation with <i>Monascus</i> sp. MK2 and <i>Lactobacillus brevis</i> HLJ59
국내	한국미생물생명공학회	2011. 6.22~6.24	한국	Biological Activities of Yogurt Added with Dual Fermentation <i>Monascus</i> -Fermented Chinese Yam Powder

다. 특허: 출원 8건, 등록 1건

구분	출원/등록 날짜	출원/등록 번호	발명의 명칭	발명자 성명
가공 기술	2009.10.27 (등록)	10-0924752	산약이 첨가된 생쌀국수 및 그 제조방법	김상국, 장동균
가공 기술	2009.04.14 (출원)	10-2009-0032158	마를 포함하는 초콜릿	장동균, 김상국
가공 기술	2010.03.02 (출원)	10-2010-0018579	증자 및 건조가공법을 이용한 흑마를 함유한 고기능성 식품의 제조방법	조병대, 김태완, 조재호, 황대일, 하용근, 김진기, 황주영, 서현주, 신승용
가공 기술	2011.03.23 (출원)	10-2011-0025989	신규한 마 정과 및 그 제조방법	정구민, 박윤문
물질	2009.04.15 (출원)	10-2009-0032697	6,7-디하이드록시-2,4-디메톡시 페난트렌을 함유하는 암세포 증식억제 활성조성물	손호용, 김지인, 박상조, 박윤문
물질	2010.05.04 (출원)	10-2010-0042150	디오스게닌을 포함하는 조골세포 분화 촉진용 조성물 및 그의 용도	권인숙, 알칸타라 등
물질	2011.04.11 (출원)	IP11030902	마 추출물을 포함하는 심혈관계 질환의 예방 또는 치료용 조성물	표석능, 권순태
물질	2011.04.21 (출원)	10-2011-0037023	산약을 이용한 소화성 궤양 예방용 조성물 및 위산 과다 분비 억제용 조성물	임재환 등
상표	2010	30-2010-002247	안동흑마(디자인 출원)	안동흑마

라. 신제품 개발 및 상품화: 9건

(1) 상품 디자인: 4건





(2) 카탈로그 제작: 3건





(3) 제품화: 2건

(가) 안동 흑마 제품화



• 분말 제품 및 액상 제품 생산



(나) 풍산 제약 마 페이스트 시제품



마. 홍보 실적

(1) 신문 홍보: 3건

(가) 2009. 6. 13: 대구 매일신문



2009. 6. 13

(나) 2010. 10. 13일: 대구 문화일보

손호용(45·식품영양학) 안동대 교수는 “마는 노화방지, 혈당강하, 장관활동 촉진, 항균, 항비만, 해독·면역조절작용 등이 알려지면서 안동지역에서 재배면적이 크게 증가하고 있다”고 말했다.



(다) 2010. 7. 9: 경북 매일 신문

월드컵 16강 기원 '안동흑마' 무료로 준다

【안동】(주)안동흑마(대표이사 조병태)은 남아공 월드컵 그리스전을 앞두고 대한민국 국가대표팀의 16강 진출을 기원하는 뜻으로 시민들에게 자사 제품을 무료로 나눠주는 이색 이벤트를 펼친다.

다음 달 초 '안동흑마' 출시를 앞두고 있는 (주)안동흑마는 오는 12일 그리스전에 앞서 공동응원이 펼쳐질 예정인 안동체육관 입구에서 선착순 160명에게 '안동흑마 분말제품'과 셰이크컵, 우유 등을 나눠주며 응원열기를 고조시킬 예정이다.

조병태 대표는 "간강식품인 안동흑마를 먹고 대한민국의 16강 진출을 위해 모든 힘



7월초 출시를 앞두고 있는 '안동흑마'신제품.

을 다해 응원하라는 의미에서 이번 행사를 마련했다"라고 밝혔다.

/권광순기자gskwon@kbmaeil.com

<경북매일신문>

(2) TV 홍보: 4건



2009. 6. 15



KBS 뉴스(2010.7.9)



MBC뉴스(2010.7.10)

(3) 라디오 방송: 2건

마의 기능성 및 마 정과 제조방법	대구 MBC 라디오 여성시대	2011. 01. 18
서동요 이야기 및 마 쥬 제조방법	"	2011. 02. 01

(4) 전시회 참가 등 제품 홍보 등: 4건



2010 대구국제식품산업전 참가
장 소 : 대구 엑스코



2010 농어촌산업박람회 참가
장 소 : 서울 코엑스



월드컵 16강 기원 이벤트 개최
장 소 : 안동시 탈춤공원



2010 안동국제탈춤페스티벌 공식지정 상품

사. 산학협력실적: 6회

실적 구분	산학제목	협력 업체명	참여인원(명)	협력기간	내용요약
공동개발	분말마, 절편마, 갈은마의 포장기술 및 가식성 포장재 개발	(주)주원 P&B	3	2009. 5-2011. 6	포장재개발
산학강좌	마의 기내대량생산 기술	봉화군 농업기술센터	50	2008. 6. 4	농업인 교육
산학강좌	마의 생산과 생리활성	안동대 농업개발원	30	2010. 6.19	농업인 교육
산학강좌	마의 재배와 토양	안동대 농업개발원	30	2010. 6.29	농업인 교육
제품개발	위장보호기능을 가진 마 페이스트 제품의 개발 및 산업화	풍산제약	-	2008. 6. 25 2009. 6. 24	마 추출물을 이용한 위양 예방 효능 강화 페이스트 제품 개발
창업	창업 대표: 조병태 주소: 경북 안동시 태화동 233-16번지	안동흑마	-		개발제품: 흑마분말, 흑마진액 및 음료, 흑마차

아. 수상 등 기타

(1) 과학기술우수논문상(한국과학기술총연합회, 2010. 7. 6)

- 마 추출물이 방사선 처리 식물세포의 생장과 DNA 손상에 미치는 영향.

안동대학교의 공지사항을 알려드립니다.

• 제목	권순태 교수 '한국과학기술단체총연합회 과학기술우수논문상' 수상		
• 구분	술의인		
• 글쓴이	원미옥중학전공	• 등록일	2010. 07. 09
		• 조회수	220

연구과제 : 마의 부가가치 증대 및 산업화를 위한 가공기술의 개발
[농림기술센터, 연구책임자: 박운문교수]

(2) 최우수포스터발표상(한국자원식물학회, 2010 5. 14)

- Effect of growth regulators on in vitro culture of yam.

2. 성과 활용 계획, 실용화·산업화 계획(기술실시 등)

가. 기초지원기술 분야

- (1) 마케팅 전략 수립 및 실행계획을 기업에 전수(4건)
 - 북안동농협(대표: 박실권, www.andongma.com), 천세당(대표 박성현), 안동고을(대표: 탁상훈, bestandong.com/), 안동흑마(대표 조병태, www.hukma.co.kr)
- (2) 마 가공제품 회사를 대상으로 실행계획을 개발하여 제공(3건)
 - 북안동농협(대표: 박실권, www.andongma.com), 천세당(대표 박성현), 안동고을(대표: 탁상훈, bestandong.com/)
- (3) 포장 시각디자인 지원(4건)
 - 북안동농협(대표: 박실권, www.andongma.com)에 3년간 4건 실용화 완료
- (4) 카탈로그 디자인 지원(3건)
 - 북안동농협(대표: 박실권, www.andongma.com)에 3년간 3건 실용화 완료
- (5) 마를 생산하는 농가 및 가공업체에 포장 기술 전수
- (6) 고급 가공제품의 생산, 유통을 위한 CMC 가식성 필름 코팅을 통한 품질유지 포장기술 개발
- (7) 향후 새로운 마 가공품의 개발 시 포장개발의 방법론 전수

나. 생리활성물질 효능 검증 및 소재화 분야

- (1) 조골세포 분화 촉진제 및 칼슘화 촉진제제로의 산업화 가능 여부 확인 중
- (2) 골 대사 질환의 예방 및 치료용 조성물로 사용 가능 여부 확인 중
- (3) 골 기능 개선용 식품 조성물로 사용 가능 여부 확인 중
- (4) 소화성 궤양 예방용 조성물 및 위산 과다 분비 억제용 조성물 특허 출원과 함께 개발된 제품의 기술 이전 및 상품화
- (5) 마 추출물의 기능성 확보에 따라 개별인증형 기능성 식품 등록 추진 예정
- (6) 흑마 활용 산업화
 - 흑마원료에 볶음공정을 가미한 다류 티백 제품 자체 개발
 - 흑마막걸리(안동 회곡양조장),
 - 흑마두유(정식품)
- (7) 영여자의 식품소재화: 현재 식품원재료 등록되어 있지 않으나, 경북 북부지역의 생산지에서 식용하고 있음
- (8) 영여자 추출물의 식품소재화: 생마 추출물 첨가 음료의 대치 및 보완
- (9) 영여자 유용 생리활성물질의 식품 및 의약품 소재화
- (10) 영여자의 대량 생산 관련 및 우수종자 확보기술 연관 발전
 - 영여자 회수 및 처리기계 개발 등의 필요성 증대
- (11) 영여자의 약용 한방소재화
 - 기존 한방에서 사용하는 산약, 서예와 활성비교를 통한 한방자원으로 개발.

- (12) 마 무병묘 생산기술의 산학협력체계 구축
- (13) 대량생산기술 및 바이오리액터 생산기술의 산업체 기술 전수

다. 기능성 강화 가공기술 및 제품 개발 분야

- (1) 마를 이용한 목 제품 생산 업체에 기술전수 및 상품화
- (2) 마 가공제품 생산업체 대상으로 기술 개발 교육
- (3) 기능성을 갖는 유용균주의 산업재산권 확보
- (4) 발효유 개발 및 제품 생산 사업체 등에 기술전수 또는 기술이전
 - Dual stage fermentation system(*Monascus* sp. - *Lacobacillus* sp.) 발효기술의 활용
 - 유산균 발효관련, 건강기능식품회사와의 협의를 통한 기술이전 가능

제 6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 방운성(anti-fogging) 필름을 이용한 청과물 선도 유지 포장재 ‘후레쉬팩’.

폴리에틸렌 등 폴레올리핀 계열의 플라스틱 필름으로 포장된 과일과 채소 등은 증산작용으로 발생한 수증기 때문에 필름 내면에 습기가 찬다. 때문에 대개 플라스틱 포장재에는 이러한 현상을 막기 위해 용기 표면에 구멍을 뚫게 된다. 하지만 구멍을 뚫을 경우에도 표면의 수분이 떨어져 신선도가 낮아지게 된다. 또한 수분이 한쪽에만 몰려서 상품이 썩는 원인이 되기도 한다. 감자나 레몬의 경우 갈변현상이 빠르게 진행돼 곰팡이가 피거나 썩이 나게 된다.

후레쉬팩은 ‘방운성(anti-fogging) 필름’을 통해 이러한 문제를 해결했다. 이는 포장지 내부에 물방울이 맺히는 결로 현상을 방지하는 높은 에너지를 갖고 있어 썩거나 문드러지는 현상을 막아준다. 실제로 국내 기업 (주)아이디아에서 필름 기능재를 활용한 선도도 실험을 한 예로써 상온 25도에서 바나나를 나뒀을 경우 일반 플라스틱 포장재는 검은 반점이 조금씩 나타난 반면, 후레쉬팩은 검은 반점이 생기는 걸 막아주고 연화를 억제해 품질면에서 우수한 것으로 드러났다. 또한 공기투과로 인해 발생하는 갈변과 수분탈취, 윤기탈색 등의 현상도 방지해 준다. 때문에 각종 농산물이 향을 잃지 않고 금방 시드는 걸 막아준다. 또한 산소와 이산화탄소의 균형을 잡아줘 팩 내부의 호흡을 조절하고 과습 상태로 인해 발생하는 선도열화를 억제하기도 한다.

- 출처 : Research trend on freshness keeping agent in Japan.

2. 마와 diosgenin이 대장암을 예방할 수 있다는 연구보고.

- 출처: Cancer Prev. Res. 2011. 4:924-34.

3. Diosgenin이 노화를 예방하는데 효과적이며, cosmeceutical (화장품의료품 분야)에 있어서 시장성이 높음을 제시한 총설

- 출처: J. Cosmet. Dermatol. 2010. 9:218-225.

4. Diosgenin이 노화에 의한 인지 능력저하 및 oxidative damage에 대한 효과가 있음을 증면하는 연구 보고

- 출처: Amer. J. Chin. Med. 2009. 37:880-902.

5. Diosgenin이 항알러지 기능이 있음을 연구보고함.

- 출처: Planta Med. 2009. 75:13000-13005.

6. 마가 폐경기 이후 calpain이라는 단백질의 소실로 인해 야기되는 근육저하에 효과적이라는 연구보고. 그러나 이 연구에서 diosgenin는 이러한 효과가 없었다고 함.

- 출처: Taiwan J. Obstet. Gynecol. 2008. 47:180-186.

7. Curcumin, 염증, 노화 그리고 노화 연관 질병.

염증은 활성산소와 IL-1, IL-6, TNF- α 와 같은 pro-inflammatory cytokine들이 NF- κ B에 의해 활성화되어 유발된다. 건강식의 식이제한을 통해 항염증효능을 증명하는 결과들이 많이 보고되고 있다. 이에 본 연구는 curcumin을 이용하여 NF- κ B dependent 염증 반응 저해 효능을 확인하였다. 본 연구의 결과로 인한 curcumin의 항산화 항염증 효능은 여러 연구에 도움이 될 것이다.

- 출처: Sikora, E., G. Scapagnini, and M. Barbagallo. 2010. Curcumin, inflammation, ageing and age-related diseases. *Immun Ageing*. 7(1):1

8. 피부 질병에 대한 Resveratrol의 항산화 효능 : 전망과 도전

Resveratrol은 포도에 함유되어있는 폴리페놀의 일종으로 많은 효능이 알려져있다. 이에 피부 세포주에 resveratrol이 자외선에 의해 유도된 oxidative stress 억제 효능이 있는지 연구하였다. 본 연구결과로 밝혀진 항산화효능은 피부 노화와 피부암 등의 질병에 대하여 광범위하게 적용할 수 있을 것이다.

- 출처: Ndiaye M.C, Philippe, H, Mukhtar, and N, Ahmad. 2011. The grape antioxidant resveratrol for skin disorders: promise, prospects, and challenges. *Arch Biochem Biophys*. 508(2):164-70.

9. 둥근 대마의 영여자가 강력한 진통효과와 항염증 효과를 나타냄을 제시

둥근대마의 영여자로부터 물 및 메탄을 추출물을 조제하고, 이를 경구투여 (300, 600 mg/kg) 한 결과, 물 추출물의 경우 아세트산 처리, 포르마린 처리, 압력처리 시 염증과 통증 제거효과가 각각 56.38%, 73.06% 및 42.79%로 나타났으며, 메탄을 추출물의 경우 각각 62.70%, 84.54% and 47.70%를 나타내 영여자 성분이 강력한 항진통 항염증 효과가 있음을 확인하였다.

- 출처: Mbiancha M, Kamanyi A, Teponno RB, Tapondjou AL, Watcho P, Nguenefack TB. 2011. Analgesic and Anti-Inflammatory Properties of Extracts from the Bulbils of *Dioscorea bulbifera* L. var sativa (*Dioscoreaceae*) in Mice and Rats. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2011.

10. Steroidal saponin의 기내생산을 위한 당의 농도와 배양절편효과

사포닌의 대량생산을 위한 기내 바이오리액터 배양에서 당의 농도는 biomass의 증식에 결정적인 역할을 하며, 배양체의 삼투압 유지와 이차산물의 생산에도 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다. 배양체의 크기는 영향을 받지 않으나 잎을 부착하지 않는 것이 후기 생장에 유리하였다.

- 출처: Akalezi C.O., S Liu, Q.S. Lig, J.T. Yu, J.J. Zhong. 1999. Combine effects of initial sucrose concentration and inoculum size on cell growth and ginseng saponin production bu suspension culture of *Panax ginseng*. *Proc. Biochem* 34:639-642.

11. 유용성분 생산을 위한 기내배양 식물체의 유전적 변이가능성

인삼, 마, 오갈피, 음나무 등을 특수 양리성분 생산목적으로 한 이용가능성 때문에 효율적인 기내 번식법의 개발은 대량증식을 통한 실용화 측면에서 매우 중요하게 평가되고 있다. 이들의 조직배양은 최초에 무병주의 확보가 필수적이며 단마디 배양법은 병이 발생을 최소화하는 배양법으로 판명되었다. 한편 기내배양의 가장 중요한 단계인 체세포 배발생 과정에서 DNA 수준의 methylation 변화가 관찰되어, 조직배양에서 배양체의 변이 발생에 관한 유전학적 접근이 가능해 지고 있다

- 출처: Chakrabarty D, K.W. Yu, K.Y. Peak. 2003. Detection of DNA methylation changes during sometic embryo genesis of Siberian ginseng. *Plant Sci.* 165:61-68..

12. Comet 분석의 유용성과 이용

Comet 분석은 주로 동물세포를 대상으로 약물이나 환경오염물질에 대한 핵 DNA의 손상정도를 신속하게 시각적으로 판단하는 유용한 기법으로 유전독성학, 의학, 환경의 모니터링 등에 다양하게 이용되어 왔다. 식물세포는 동물세포와 달리 세포벽을 가지고 있어 온전한 핵을 나출 시키는데 세포벽의 해리과정이 필요하다. 식물에서 comet 분석을 시도한 예를 보면, 돌연변이 유발물질인 EMS를 담배의 잎에 처리하여 핵 DNA의 손상 및 회복정도와 돌연변이를 파악하였고, maleic hydrazid나 X-ray등을 처리한 식물체의 유전독성효과를 조사한 바 있다

- 출처: Fairbairn, D.W., P.L. Olivie and K. O'Neill. 1995. The comet assay: a comprehensive review. *Mutation. Res.* 339: 37-44.

13. fresh-cut product에 대한 peroxyacetic acid의 최적 세척 조건 및 평가

Sodium hypochloride를 세척제로 사용함에 있어 몇가지 단점이 있으므로 peroxyacetic acid와같은 대체제의 연구가 진행되고 있다. 실험에 사용한 fresh-cut 양배추, 상치, 당근, 파 에 대한 peroxyacetic acid처리 결과 미생물 제거 효과가 관찰되었으며, 당근의 경우 0.5-3.5 log cfu/g의 감소를, 상치의 경우 0.4-2.4 log cfu/g의 감소를 나타냈다. 또한 peroxyacetic acid의 농도, 처리횟수 및 시간에 관계없이 관능상의 문제가 발견되지 않았다.

- 출처: Vandekinderen I, Devlieghere F, De Meulenaer B, Ragaert P, Van Camp J. 2009. Optimization and evaluation of a decontamination step with peroxyacetic acid for fresh-cut produce. *Food Microbiol.* 26(8):882-8.

14. 대장균 경감을 위한 acidified sodium chlorite 및 sodium hypochlorite 의 효과 비교

신선편이 제품에서 분리된 몇종류의 대장균에 대한 acidified sodium chlorite 및 sodium hypochlorite의 효과를 비교하였다. 대장균 JCM 1649 및 O157:H7 serotypes (CR - 3, MN - 28, MY - 29 및 DT - 66)을 대상으로 시험한 결과 생균 카운트는 NaClO 100 mg/L 3 분 처리 시 4.3 ± 0.9 log CFU/mL 감소하였고, 20 mg/L ASC (pH 4.6) 3 분 처리 시 7.8 ± 1.7 log CFU/mL 감소하였다. 두 종류의 세척제 모두 동일한 효과의 경감 효과를 보여주었다.

- 출처: Elano RR, Kitagawa T, Bari ML, Kawasaki S, Kawamoto S, Inatsu Y. 2010. Comparison of the effectiveness of acidified sodium chlorite and sodium hypochlorite in reducing *Escherichia coli*. *Foodborne Pathog Dis.* 7(12):1481-9.

15. 항염증 약물 monascin과 콜레스테롤 저하 약물 monacolin K의 생산 증대를 위한 마의 *Monascus* 발효

Monascus 속 균주가 생산하는 이차대사산물로 콜레스테롤 생합성 저해인자로서 monacilin K가 있다. *Monascus* 속 균주의 이차대사산물 형성에 있어서 배양 조건 및 방법이 영향을 미친다. 고구마(*Ipomoea batatas*), 감자(*Solanum tuberosum*), 카사바(*Manihotescu lenta*), 마(*Dioscorea batatas*)를 재료로 하였을 때 최고의 monacolin K를 생산하였다. 그 결과, *Monascus purpureus* NTU301을 이용하여 마를 발효하였을 때 2,584 mg/kg의 monacolin K를 생산하였으며 쌀을 기질로 하였을 때 보다 약 5.37배 많은 양을 보였다. 게다가 황색색소의 경우 홍국쌀 보다 홍국마에서 많은 양을 생산할 수 있음을 알 수 있었다. 또한 항염증 약물로서 황색색소에 포함되어 있는 성분이 monascin이라고 동정되었다. 따라서 마는 *Monascus* 속 균주를 이용하여 항염증 약물인 monascin과 콜레스테롤 저하 약물인 monacolin K를 생산하는데 최고의 재료라고 사료된다.

-출처: Lee, C.L., J.J. Wang, S.L. Kun, and T.M. Pan. 2006. *Monascus* fermentation of dioscorea for increasing the production of cholesterol-lowering agent-monacolin K and antiinflammation agent-monascin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74:1254-1262.

제 7장 참고문헌

1. 세부 1, 협동 1: 수확후 관리, 마케팅, 포장기술 지원 분야

- Abu-Ghannam, N. and H. Crowley. 2006. The Effect of low temperature blanching on the texture of whole processed new potatoes, *Journal of Food Engineering* 74(3):335-344.
- Alcantara, E.H., M.Y. Shin, H.Y. Sohn, Y.M. Park, T.W. Kim, J.W. Lim, H.J. Jeong, S.T. Kwon, and I.S. Kwun. 2011. Diosgenin stimulates osteogenic activity by increasing bone matrix protein synthesis and bone-specific transcription factor Runx2 in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J. Nutritional Biochemistry* 22:1055-1063.
- Akissoe, N., J. Hounhouigan, C. Mestres, and M. Nago. 2003. How blanching and drying effect the colour and functional characteristics of yam (*Dioscorea cayenensis-rotundata*) flour, *Food Chemistry* 82(2):257-264.
- Beveridge, T. and S.E. Weintraub. 1995. Effect of blanching pretreatment of color and texture of apple sloces at various water activities. *Food Research International* 28(1):83-86.
- Blankenship, S.M. and M.D. Boyette. 2002. Therdermal adhesion in five sweetpotato cultivars during curing and storage. *HortScience* 37:374-377.
- Gonzalez-Fesler, M., D. Salvatori, P. Gomez, and S.M. Alzamora. 2008. Convective air drying of apples as affected by blanching and calcium impregnation. *Journal of Food Engineering* 87(3):323-332.
- del Valle, J.M., V. Aranguizand, and H. Leon 1998. Effects of blanching and calcium infiltration on PPO activity, texture, microstructure and kinetics of osmotic dehydration of apple tissue. *Food Research International* 31(8):557-569.
- Ikediodi, C.O., R.L. Chelvarajan, and I.U. Agwu. 1989. Biochemical aspects of wound healing in yams (*Dioscorea spp*). *Journal of the Science of Food Agriculture* 48(2): 131-139
- Kang, B.D. 2008. Story of Yam. Jinsol Publ. Co. p. 214. (In Korean)
- Kays, S.J. 2008. Sweetpotato, In: K.C. Gross, C.Y. Wang, and M. Saltveit (eds.). *The commercial storage of fruits, vegetables, and florist and nursery stocks* (Website version). Agr. Handbook No. 66. USDA-ARS.
- Kushman, L.J. 1975. Effect of injury and relative humidity during curing on weight and volume loss of sweet potatoes during curing and storage. *HortScience* 10:275-277.
- Mukherjee, S. and P.K. Chattopadhyay. 2007. Whiring bed blanching of potato cubes and its effect on product quality. *Journal of Food Engineering* 78:52-60.
- Ozo, O.N., J.C. Caygill, and D.G. Cousey. 1984. Phenolics of five yam (*Dioscorea*) species. *Phytochemistry*, 23(2):329-331.
- Picha, D.H. 1986. Weight loss in sweet potatoes during curing and storage: Contribution of transpiration and respiration. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 111:889-892.
- Ray, R.C. and V. Ravi. 2005. Post harvest spoilage of sweetpotato in tropics and control

- measures. *Critical Rev. Food Sci. Nutr.* 45:623-644.
- Ryu, H.Y., J.I. Kim, and H.Y. Sohn. 2009. Effect of temperature on yam quality during long-term storage. *J. Basic and Life Res.Sci.* 9:61-66.
- Ryu, H.Y., Y.S. Kim, S.J. Park, B.H. Lee, S.T. Kwon, and H.Y. Sohn. 2006. Isolation and characterization of yam-putrefactive psychrotrophic bacteria from rotted yam. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 34:109-114.
- Severini, C., A. Baiano, T. De Pilli, R. Romaniello, and A. Derossi. 2003. Prevention of enzymatic browning in sliced potatoes by blanching in boiling saline solutions. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 36(7):657-665.
- Taiwo, K.A. and O.D Baik. 2007. Effects of pre-treatments on the shrinkage and textural properties of fried sweet potatoes. *Food Science and Technology* 40(4):661-668.
- Wang, Y., R.J. Horvat, R.A. White, and S.J. Kays. 1998. Influence of post harvest curing treatment on the synthesis of the volatile flavor components in sweetpotato. *Acta Hort.* 64:207-212.
- 강신욱, 김현경. 2008.마(산약)/하수오를 이용한 고부가가치 제품개발 방안. *경북전문대학 논문집* 26:49-68.
- 김호. 2004. 농산물의 그린 마케팅 전략 도입을 위한 시론(詩論). *식품유통연구* 21(1): 25-42.
- 동의보감국역위원회역편. *국역증보 동의보감*. 남산당. 2000
- 왕성우. 2004. 농촌자원의 유통 및 마케팅 전략. *한국지역사회생활과학회지* 15(2):193-204.
- 이정환, 오세익, 김수석. 2002. 세계화 시대에 한국농업의 경쟁력 제고방안. *농업생명과학연구* 36(3):73-86.
- 장민기. 2009. 신상품, 신브랜드의 성공 방정식. *시선집중 GSnJ* 91:2-16.

2. 세부 2, 협동 2: 기능성 신소재 개발 분야

- Ahn, J.H., K.H. Son, H.Y. Sohn, and S.T. Kwon. 2005. *In vitro* culture of adventitious roots from *Dioscorea nipponica* Makino for the production of steroidal saponins. *Kor. J. Plant Biotechnol.* 32: 317-223.
- Andrea, H., K. Thomas, P. Josef, and S. Konrad. 2000. Physiology and pathophysiology of sphingolipid metabolism and signaling. *Biochemica et Biophysica Acta.* 1485:63-99.
- Angus, J.A., and T.M. Cocks. 1989. Endothelium-derived relaxing factor. *Pharmacol. Ther.* 41: 303-352.
- Barnes, P.J., and M. Karin. 1997. Nuclear Factor- κ B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N. Engl. J. Med.* 336:1066-1071.
- Barreto, R., S. Kawakita, J. Tsuchiya, E. Minelli, K. Pavasuthipisit, A. Helmy, and F. Marotta. 2005. Metal-induced oxidative damage in cultured hepatocytes and hepatic lysosomal fraction: beneficial effect of a curcumin/absinthium compound. *Chinese Journal of Digestive Diseases.* 6:31-36.

- Bayyurt, N., M.F. Abasiyanik, E. Sander, and B.A. Salih. 2007. Canonical correlation analysis of factors involved in the occurrence of peptic ulcers. *Kig. Dis. Sci.* 52:104-146.
- Bende, K. 1997. UV-induced signal transduction. *J Photochem Photobiol.* 37:1-17.
- Bremner, P. and M. Heinrich. 2002. Natural products as targeted modulators of the nuclear factor-kappa B pathway. *J. Pharm. Pharmacol.* 54:453-72.
- Busse, R. and I. Fleming. 1995. Regulation and functional consequences of endothelial nitric oxide formation. *Ann. Med.* 27:331-340.
- Cersosimo, R.J. 1993. Hepatotoxicity associated with cisplatin chemotherapy. *Ann. Pharmacother.* 27:438-41.
- Chen, H. .2003. Effects of Taiwanese yam (*Dioscorea japonica* Thunb var. *pseudojaponica* Yamamoto) on upper gut function and lipid metabolism in Balb/c mice. *Nutrition* 19(7-8):646-51.
- Chen, W.F., C.C. Chang, C.L. Chien, M.L. Kuo, J.L. Su, K.W. Tseng, C.Y. Yang, and M.L. Yen. 2005. Diosgenin induces hypoxia-inducible factor-1 activation and angiogenesis through estrogen receptor-related phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and p38 mitogen-activated protein kinase pathways in osteoblasts. *Mol. Pharmacol.* 68:1061-1073.
- Choi, E.M. and S.J. Koo. 2004 Hwang JK, Immune cell stimulating activity of mucopolysaccharide isolated from yam (*Dioscorea batatas*) *J Ethnopharmacol.* 91(1):1-6.
- Decker, E.A. and H.O. Hultin. 1992. Lipid oxidation in muscle foods via redox iron. In A. J. St. Angelo (Ed.), *Lipid oxidation in food (Chapter 3): ACS Symposium Series 500.* Washington, DC: Americal Chemical Society.
- Del Mastro, L., A. Gennari, and S. Donati. 1999. Chemotherapy of non-small-cell lung cancer. role of erythropoietin in the management of anemia. *Ann Oncol.* 10(Suppl.):91-4.
- Devary, Y. 1992. The mammalian ultraviolet response is triggered by activation of Src Tyrosine kinases. 71:1081-1091.
- Emara, A.M., E.L. Kelany, and R.S. Moustafa. 2006. Comparative study of the protective effect between deferoxamine and deferiprone on chronic iron overload induced cardiotoxicity in rats. *Hum. Exp. Toxicol.* 25(7):375-385.
- Esterbauer, H., D.C.H. McBrien, and T.F. Slater. 1982. Free radicals, lipid peroxidation and cancer. Academic Press, New York, pp. 101-128.
- Fairbairn, D.W., P.L. Olivie, and K. O'Neill. 1995. The comet assay : a comprehensive review. *Mutation. Res.* 339: 37-44.
- Finkel, T. 2000. Redox-dependent signal transduction. *FEBS Lett.* 476:52-54.
- Garrido, A., J.L. Marquez, F.J. Guerrero, E. Leo, M.A. Pizarro, and C. Trigo. 2007. Changes in the etiology, outcome and characteristics of patients with acute gastrointestinal bleeding between 1999 and 2005. *Rev. Esp. Enferm. Dig.* 99:275-279.
- Gichner, T., O. Ptacek, D.A. Stavreva, E.D. Wagner, and M.J. Plewa. 2000. A comparison of DNA repair using the comet assay in tobacco seedlings after exposure to alkylating agents or ionizing radiation. *Mutagenesis* 15: 503-506.
- Griffiths, H.R. and L. Lunec. 1996. The C1q binding activity of IgG is modified in vitro by

- reactive oxygen species: implications for rheumatoid arthritis. *FEBS Lett.* 388:161-164.
- Grube, K. and A. Burkle. 1992. Poly(ADP-ribose) polymerase activity in mononuclear leukocytes of 13 mammalian species correlates with species-specific life span. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89(24):11759-63
- Han, Y.N., S.H. Hahn, and I.R. Lee. 1990. Purification of mucilages from *Dioscorea batatas* and *D. japonica* and their content analysis. *Kor. J. Pharmacogn.* 21:274-283.
- Hu, K. and X. Yao. 2003. The cytotoxicity of methyl protodioscin against human cancer cell lines in vitro. *Cancer Invest.* 21(3):389-393.
- Huo, Y. and K. Ley. 2001. Adhesion molecules and atherosclerosis. *Acta Physiol. Scand.* 173(1):35-43.
- Ignarro, L.J., G.M. Buga, K.S. Wood, R.E. Byrns, and G. Chadhuri. 1987. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 84:9265-9269.
- Jang, H.S., S.K. Kim, J.B. Han, H.J. Ahn, H. Bae, and B.I. Min. 2005. Effects of bee venom on the pro-inflammatory responses in RAW 264.7 macrophage cell line. *J. Ethnopharmacol.* 13:157
- Jing Cai. et al. 2002. Apoptosis induced by dioscin in HeLa cells. *bio. Pharm. Bull.* 25(2):193-196.
- Johnson, T.M., Z.X. Yu, V.J. Ferrans, R.A. Lowenstein, and T. Finkel. 1996. Reactive oxygen species are downstream mediators of p53-dependent apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:11848-11852.
- Joza, N. *et al.* 2001. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death, *nature.* 410(6828):549-554.
- Kang, K.A., R. Zhang, M.J. Piao, D.O. Ko, Z.H. Wang, B.J. Kim, J.W. Park, H.S. Kim, D.H. Kim, and J.W. Hyun. 2008. Protective effect of irisolidone, a metabolite of kakkalide, against hydrogen peroxide induced cell damage via antioxidant effect. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 16:1133-1141.
- Kang, T.H., S. Choi, T. Lee, M. Son, and S. Y. Kim. 2008, Characteristics of antidiabetic effect of *Dioscorea rhizoma* (1) Hypoglycemic effect. *Kor. J. Food Nutr.* 21:425-429.
- Kang, T.H., S. Choi, T. Lee, M. Son, J. Park, and S. Y. Kim. 2008, Characteristics of antidiabetic effect of *Dioscorea rhizoma* (2) - prevention of diabetic neuropathy by NGF induction. *Kor. J. Food Nutr.* 21:430-435.
- Kawakami, Y., K. Yumoto, and T. Kawakami. 2007. An Improved mouse model of atopic dermatitis and suppression of skin lesions by an inhibitor of Tec family kinases. *Allergol Int.* 56:403-409.
- Kim, J.I., H.S. Jang, J.S. Kim, and H.Y. Sohn. 2009. Evaluation of antimicrobial, antithrombin, and antioxidant activity of *Dioscorea batatas* Decne. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 37:133-139.
- Kim, J.O., M.J. Jung, H.J. Choi, J.T. Lee, A.K., Lim, J.H. Hong, and D.I. Kim. 2008. Antioxidant and biological activity of hot water and ethanol extracts from *Phellinus*

- linteus*. J. Kor. Soc. Food Sci Nutr. 37:684-690.
- Kim, M.J. et al. 2004. Methanol extract of *Dioscoreae Rhizoma* inhibits pro-inflammatory arthritis. Int'l. Immunopharmacol. 4(12):1489-1497.
- Koppen, G. and K.J. Angelis. 1998. Repair of X-ray induced DNA damage measured by the comet assay in roots of *Vicia faba*. Environ. Mol. Mutagen 32: 281-285.
- Kum, E.J., S.J. Park, B.H. Lee, J.S. Kim, K.H. Son, and H.Y. Sohn. 2006. Antifungal activity of phenanthrene derivatives from aerial bulbils of *Dioscorea batatas* decne. J. Life Sci. 16:647-652.
- Kurata, S. 2000. Selective activation of p38 MAPK cascade and mitotic arrest caused by low level oxidative stress. J Biol Chem. 275(31):23413-23416.
- Kwon, C. S. et al. 2003. Anti-obesity effect of *Dioscorea nipponica* Makino with lipase-inhibitory activity in rodents. Biosci Biotechnol Biochem. 67(7):1451-6.
- Kwon, C.S., H.Y. Sohn, S.H. Kim, J.H. Kim, K.H. Son, J.S. Lee, J.K. Lim, and J.S. Kim. 2003. Anti-obesity effect of *Dioscorea nipponica* Makino with lipase-inhibitory activity in rodents. Biosci. Biotechnol. Biochem. 67:1451-1456.
- Kwon, C.S., I.S. Son, H.Y. Shim, I.S. Kwun, and K.M. Chung. 1999. Effects of yam on lowering cholesterol level and its mechanism. Kor. J. Food Nutr. 32:637-643.
- Kwon, C.S., Y.S. Kwon, Y.S. Kim, G.S. Kwon, I. Jin, G.C. Ryu, and H.Y. Sohn. 2004. Inhibitory activities of edible and medicinal herbs against human thrombin. J. Life Sci. 14:509-513.
- Kwon, E.G., E.M. Choe, and S.J. Gu. 2001. Effects of mucilage from yam (*Dioscorea batatas* DECNE) on blood glucose and lipid composition in alloxan-induced diabetic mice. Kor. J. Food Sci. Technol. 33:795-801.
- Kwon, S.T., E.A. Jung and J.S. Kim. 2001. Effect of γ -radiation on growth and antioxidant enzyme activities in red pepper. Kor. J. Life Science 11: 612-617.
- Lee I.S., S.Y. Chung, C.S. Shim, and S.J. Koo. 1995. Inhibitory effects of yam (*Dioscorea batatas* DECNE) extracts on the mutagenicity. Kor. J. Soc. Food Sci.. 11:351-355.
- Lee, H.J., Y.A. Kim, J.W. Ahn, B.J. Lee, .S.G. Moon, and Y.W. Soo. 2004. Screening of peroxynitrite and DPPH radical scavenging activities from salt marsh plants. J. Korean Biotechnol. bioeng., 19: 57-61.
- Lee, J.S., Y.K. Park, Y.S. Ahn, H.S. Kim, M.N. Chung, B.C. Jeong, and J.K. Bang. 2007. Antioxidative and biological activities of extracts of sweetpotato tips. Korean J. Crop Sci. 52(2):228-238.
- Lee, K.S., M.G. Kim, and K.Y. Lee. 2006. Antioxidative activity of ethanol extract from Lotus (*Nelumbo nucifera*) Leaf. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 35(2):182-186.
- Leslie, M.C. and M. Bar-Eli. 2005. Regulation of gene expression in melanoma: new approaches for treatment. J Cell Biochem. 94(1):25-38.
- Mariette, M. 2006. Tolerance of anti-TNF alpha: the experience acquired in inflammatory rheumatic disease. Ann. Dermatol. Venereol. 133:158.
- Marklund, S. and G. Marklund. 1974. Involvement of superoxide anion radical in the

- oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* 47:469-474.
- McAnuff M.A. et al. 2005. Hypoglycemic effects of steroidal saponins isolated from Jamaican bitter yam, *Dioscorea polygonoides*. *Food Chem Toxicol.* 43(11):1667-1672
- McCartney-Francis, N., J.B. Allen, D.E. Mizel, J.E. Albina, Q.W. Xie, C.F. Nathan, and S.M. Wahl. 1993. Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J. Exp. Med.* 178:749-754.
- Migliaccio, E., M. Giorgio, S. Mele, G. Pelicci, P. Reboldi, P.P. Pandolfi, L. Lanfrancone, and P.G. Pelicci. 1999. The p66shc adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals nature. 402(6759):309-313.
- Murashige, T., F. Skoog. 1962. Revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant* 15: 473-479.
- Navarrette, M.H., P. Carrera, M. Mitguel and C. Torre. 1997. A fast comet assay variant for solid tissue cells. The assessment of DNA damage in higher plants. *Mutation Res.* 389: 271-279.
- Noroozi, M., W.J. Angerson, and M. Lean. 1998. Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. *Am. J. Clinical Nutrients* 64: 1210-1218.
- Oh, H.S. and J.H. Kim. 2006. Development of functional soy-based stwe sauce including hot water extract of *Coruns officinalis* S, et Z. *Korean J. Food Culture.* 21:550-558.
- Oh, W.G., I.C. Jang, G.I. Jeon, E. Park, H.R. Park, and S.C. Lee. 2008. Antioxidative activity of extracts from *Wisteria floribunda* flowers. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 37:677-683.
- Papassava, P., V.G. Gorgoulis, D. Papaevangelidou, S. Vlahopoulos, H. van Dam, and V. Zoumpourlis. 2004. Overexpression of activating transcription factor-2 is required for tumor growth and progression in mouse skin tumors. *Cancer Res.* 64(23):8573-84.
- Rojas, E., M.C. Lopez, and M. Valverde. 1999. Single cell gel electrophoresis assay; methodology and application. *J. Chromatography B* 772: 225-254.
- Rudolph, D., A. Tafuri, P. Gass, G.J. Hämmerling, B. Arnold, and G. Schütz. 1998. Impaired fetal T cell development and perinatal lethality in mice lacking the cAMP response element binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95(8):4481-4486.
- Ryu, H.Y., E.J. Kum, K.H. Bae, Y.K. Kim, I.S. Kwon, and H.Y. Sohn. 2007. Evaluation for the antimicrobial, antioxidant and antithrombosis activity of Korean traditional liquors. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 35:310-315.
- Ryu, H.Y., S.J. Park, B.H. Lee, and H.Y. Sohn. 2007. Control of yam putrefactive psychrotrophic bacterium using clove oil and preparation of functional fresh-cut. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 35:66-72.
- Ryu, H.Y., Y.K. Kim, I.S. Kwon, C.S. Kwon, I.N. Jin, and H.Y. Sohn. 2007. Thrombin inhibition activity of fructus extract of *Crataegus pinnatifida* Bunge. *J. Life Sci.* 17:535-539.
- Ryu, H.Y., Y.S. Kim, S.J. Park, B.H. Lee, S.T. Kwon, and H.Y. Sohn. 2006. Isolation and

- characterization of yam-putrefactive psychrotrophic bacteria from rotted yam. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 34:109-114.
- Sakanaka, S., Y. Tachibana, and Y. Okada. 2005. Preparation and antioxidant properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (kakinoha-cha). *Food Chemistry.* 89:569-575.
- Sardi, J.E. 2001. Neoadjuvant chemotherapy in gynecologic oncology. *Surg. Clin. North Amer.* 81:965-85.
- Seong, N.S., S.T. Lee, C.H. Park, G.S. Kim, and H.S. Lee. 1993. Establishment of plant factory system techniques in medicinal plants; studies on the *in vitro* proliferation and seedling production system in *Dioscorea batatas* DECNE. Ministry of Science and Technology. Korea. Suwon. p. 21-27 (in Korean).
- Singh, N.N. and D.P. Ramji. 2008. Protein kinase CK2, an important regulator of the inflammatory response? *J. Mol. Med.* 86:887-897.
- Singleton V.L., R. Orthofer, and R.M. Lamuela-Raventos. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol* 299:152-178.
- Slavemini, D., T.P. Misko, J.L. Masferrer, K. Seibert, M.G. Currie, and P. Needleman. 1993. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc. Natl. Acad., Sci.*, 90: 7240-7244.
- Sohn, H.Y., H.Y. Ryu, Y. Jang, H.S. Jang, Y.M. Park, and S.Y. Kim. 2008. Evaluation of antimicrobial, antithrombin, and antioxidant activity of aerial part of *Saxifraga stolonifera*. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 36:195-200.
- Sohn, H.Y., C.S. Kwon, K.H. Son, G.S. Kwon, H.Y. Ryu, and E.J. Kum. 2006. Antithrombin and thrombosis prevention activity of buckwheat seed, *Fagopyrum esculentum* Moench. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 35:132-138.
- Sohn, H.Y., C.S. Kwon, K.H. Son, G.S. Kwon, Y.S. Kwon, H.Y. Ryu, and E.J. Kum. 2005. Antithrombosis and antioxidant activity of methanol extract from different brands of rice. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 34:593-598.
- Sohn, H.Y., H.Y. Ryu, Y.S. Kwon, E.J. Kum, C.S. Kwon, G.S. Kwon, G.W. Kim, and K.H. Son. 2005. Screening of thrombin inhibitors from medicinal and wild plants (II). *Kor. J. Pharmacogn.* 36:263-272.
- Sohn, H.Y., K.H. Son, C.S. Kwon, G.S. Kwon, and S.S. Kang. 2004. Antimicrobial and cytotoxic activity of 18 prenylated flavonoids isolated from medicinal plants: *Morus alba* L., *Morus mongolica* Schneider, *Broussnetia papyrifera* (L.) Vent, *Sophora flavescens* Ait and *Echinosophora koreensis* Nakai. *Phytomedicine* 11:666-672.
- Sohn, H.Y., Y.S. Kwon, Y.S. Kim, H.Y. Kwon, G.S. Kwon, G.J. Kim, C.S. Kwon, and K.H. Son. 2004. Screening of thrombin inhibitors from medicinal and wild plants. *Kor. J. Pharmacogn.* 35:52-61.
- Stohs, S.J., and D. Bagchi. 1995. Oxidative mechanism in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.* 18:321-336.
- Surh, Y.J. 1999. Molecular mechanism of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances. *Mutat. Res.* 428:305-327.

- Towil, L.E. and P. Masure. 1975. Studies on reduction of 2,3,5-TTC as a viability assay for plant tissue. *Can. J. Bot.* 53:1097-1102.
- Vaca, C.E., J. Wilhelm, and M. Harms-Ringdahl. 1998. Interaction of lipid peroxidation products with DNA. A review. *Mutation Research.* 195:137-149.
- Waas, W.F., H.H. Lo, and K.N. Dalby. 2001. The kinetic mechanism of the dual phosphorylation of the ATF2 transcription factor by p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase alpha. Implications for signal/response profiles of MAP kinase pathways. *J Biol Chem.* 276(8):5676-5684.
- Wu, X., J. Kang, C. Xie, R. Burris, M.E. Ferguson, T.M. Badger, and S. Nagarajan. 2010. Dietary blueberries attenuate atherosclerosis in apoprotein E-deficient mice by upregulating antioxidant enzyme expression. *J. Nutr.* 140(9):1628-1632.
- Xie, Q.W., Y. Kashiwabara, and C. Nathan. 1994. Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 269(7):4705-4708.
- Yoo, J.S., Y.K. Song, and H.H. Lim. 2007. Studies on the antioxidant effects of Carthami Flos extract. *J. Korean Oriental Med.* 28(1):137-147.
- Yoon, J.J., Y.J. Lee, D.G. Kang, and H.S. Lee. 2010. Protective role of betulinic acid on TNF-alpha-induced cell adhesion molecules in vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 391(1):96-101.

3. 세부 3, 협동 3: 가공기술 및 식품 개발 분야

- Ahn, J.H., K.H. Son, H.Y. Sohn, and S.T. Kwon. 2005. In vitro culture of adventitious roots from *Dioscorea nipponica* Makino for the production of steroidal saponins. *Kor. J. Plant Biotechnol.* 32: 217-223.
- Baek, S.H., S.H. Kim, K.H. Son, K.C. Chung, and H.W. Chang. 1994. Inactivation of human pleural fluid phospholipase A2 by dioscin. *Arch. Pharm. Res.* 17:218-222.
- Blois, M. S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181:1199-1200.
- Choo, N.Y. and S.Y. Ahn. 1995. Properties of chestnut starch and its gel, *Korean J. Food Sci. Technol.* 27(6):1017-21.
- Chung, H.J., Y.R. Chu, H.N. Park, I.S. Jeon, and Y.S. Kang. 2010. Influence of the Addition of MACA(*Lepidium meyenii*) hot water extract on the quality and antioxidant activity of yogurt. *Kor. J. Food Culture* 25: 334-341.
- Cushman, D.W. and H.S. Cheung. 1971. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharmacology* 20:1637-1648.
- Elano, R.R., T. Kitagawa, M.L. Bari, S. Kawasaki, S. Kawamoto, and Y. Inatsu. 2010. Comparison of the effectiveness of acidified sodium chlorite and sodium hypochlorite in reducing *Escherichia coli*. *Foodborne Pathog Dis.* 7(12):1481-9.
- Ferreira, I.C., F.R. Baptista, P. Vilas-Boas, and L. Barros. 2007. Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. *Food Chem.* 100:1511-1516.
- Gilliland, S.E. 1989. Acidophilus milk products, review of potential benefits to consumer. *J. Dairy Sci.* 72:2483-2489
- Jeon, C.P., Y.H. Kim, J.B. Lee, M.S. Jo, K.S. Shin, C.S. Choi, and G.S. Kwon. 2010. Physiological characteristics and angiotensin converting enzyme inhibitory activity of *Lactobacillus brevis* HLJ59 isolated from salted shrimp. *Kor. J. Microbiology* 46:9-14.
- Jeong, C.H., G.N. Choi, J.H. Kim, J.H. Kwak, D.O. Kim, Y.J. Kim, and H.J. Heo. 2010. Antioxidant activities from the aerial parts of *Platycodon grandiflorum*. *Food Chem.* 118:278-282.
- Jung, D.H. 2007. In: *Encyclopedia of Health and Functional Foods*. Shinil Books Publishing Co., Seoul, Korea. Ma:191-192.
- Kim, C.M., K.H. Son, S.H. Kim, and H.P. Kim. 1991. Steroidal saponin contents in some domestic plants. *Arch. Pharm.* 14:305-310.
- Kubo, Y., S. Nonaka, and H. Yoshida. 1988. Allergic contact dermatitis from *Dioscorea batatas* Decaisne. *Contact Dermatitis* 18(2):111-112.
- Kulicke, W.M., Y.A. Aggour, and M.Z. Elsabee. Hamburg. Preparation, characterisation, and rheological behaviour of starch-sodium trimetaphosphate hydrogels. *Starch* 42(4):134-141.
- Kwon, C.S., H.Y. Shon, S.H. Kim, J.H. Kim, G.H. Son, J.S. Lee, J.K. Lim, and J.S. Kim.

2003. Anti-obesity effect of *Dioscorea nipponica* Makino with lipase-inhibitory activity in rodents. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67:1451-1456.
- Kwon, C.S., I.S. Son, H.Y. Shim, I.S. Kwon, and K.M. Chung. 1999. Effects of yam on lowering cholesterol level and its mechanism. *Kor. J. Food Nutr.* 32:637-643.
- Lee, C.L., J.J. Wang, S.L. Kun, and T.M. Pan. 2006. Monascus fermentation of *Dioscorea* for increasing the production of cholesterol-lowering agent-monacolin K and antiinflammation agent -monascin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74:1254-1262
- Lee, E.H. and G.G. Kahng. 1995. The effect of yam powder on the quality of plain yoghurt. *J. Agric. Tech. Res. Inst.* 8:42-46.
- Lee, S.P., Y.D. Ha, and H.I. Kim. 1999. Effect of yam on the growth of lactic acid bacteria. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 28:805-809.
- Lee, S.Y., J.J. Ahn, and H.S. Kwak. 2011. Effects of the extract yam powder addition on yogurt properties during storage. *Kor. J. Food Sci. Ani. Resour.* 31:66-73.
- Lim, S.D., S.H. Yoo, H.D. Yang, S.K. Kim, and S.Y. Park. 2009. GABA productivity in yoghurt fermented by freeze dried culture preparations of *Lactobacillus acidophilus* RMK567. *Kor. J. Food Sci. Ani. Resour.* 29:437-444.
- Ojima, T., A. Nakamura, and M. Kawasaki. Some properties of cross-bonded phosphate diester of waxy maize starch. 1986. *Starch* 38(9):297-301.
- Park, L.Y. and S.H. Lee. 2007. Effect of Immersion in Chitosan Solutions on Shelf Life of Tofu. *J. Chitin Chitosan* 12(3):128-132.
- Vandekinderen, I., F. Devlieghere, B. De Meulenaer, P. Ragaert, and J. Van Camp. 2009. Optimization and evaluation of a decontamination step with peroxyacetic acid for fresh-cut produce. *Food Microbiol.* 26(8):882-888.
- 권은경, 최은미, 구성자. 2001. 마(*Dioscorea batatas* DECENE) 껍질물이 Alloxan 유발 당뇨 마우스의 혈당 및 지질 성분에 미치는 영향, *한국식품과학회지* 33:795-801.
- 권중호, 이기동, 이수종, 정신교, 최종옥. 1998. 동결건조 및 열풍건조 방법에 따른 마의 성분과 물리적 성질 변화. *한국식품영양과학회지* 27:908-913.
- 권정숙, 손인숙, 심지형, 권인숙, 정구민. 1999. 마(*Dioscorea*)의 콜레스테롤 저하작용 및 그 기전작용. *한국영양학회지* 32(6):637-643.
- 김명화, 임숙자. 1998. 참마 분획물이 당뇨 유발 흰쥐의 혈당 및 에너지대사물농도에 미치는 영향. *한국영양학회지* 31:1093-1099.
- 정혜영. 1995. 한국산 마의 당질 분석. *한국식품과학회지* 27:36-40.
- 최일숙, 이임선, 구성자. 1992, 마 (*Dioscorea batatas* DECAISNE) 전분의 Rheology 및 열적 특성에 관한 연구. *Korean J. Soc. Food. Sci.* 8, 57-63.
- 조응수, 최명희, 권정숙, 김소자, 이성욱, 장재욱. 2002. 안동특산물 산약(마) 절편 정과 개발. *현장애로기술개발사업 농업인 개발과제 결과보고서* p9.
- 한주영. 2003. 마 스낵 제조방법의 개발과 품질평가. *경산대학교 석사학위논문.* p. 11-25.

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.