

발 간 등 록 번 호

11-1541000-001243-01

# 염증 및 알러지 개선용 기능성 제품 개발

Functional product development  
for prevention of  
inflammation and allergy

계명대학교 산학협력단

농림수산식품자료실



0004571

농 립 수 산 식 품 부

※ 보고서 겉표지 뒷면 하단에 다음 문구 삽입

## 주 의

1. 이 보고서는 농림수산물식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산물식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.

# 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “염증 및 알러지 개선용 기능성 제품 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2012년 2월 일

주관연구기관명 : 계명대학교 산학협력단

주관연구책임자 : 양 선 아

연 구 원 : 유 미 희

연 구 원 : 최 준 혁

연 구 원 : 이 은 정

연 구 원 : 이 은 주

연 구 원 : 김 민 주

연 구 원 : 채 인 경

연 구 원 : 김 미 진

연 구 원 : 정 연 섭

연 구 원 : 박 성 진

연 구 원 : 정 영 태

연 구 원 : 김 지 은

위탁연구기관명 : 한국식품연구원

위탁연구책임자 : 최 희 돈

협동연구기관명 : (재)대구테크노파크

바이오산업지원센터

협동연구책임자 : 임 효 권

참여기업: 비슬청록농장 김 형 대

# 요 약 문

## I. 제 목

염증 및 알러지 개선용 기능성 음료 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

최근 건강과 삶의 질 향상에 대한 관심이 높아지면서 천연물 및 한방 소재로부터 기능성 성분을 탐색하고 제품 개발에의 활용에 관심이 고조되고 있다. 따라서 유용식물을 이용한 신약 개발 및 농업 신소재로 천연물을 이용하려는 연구가 가속화되고 있으며, 특히 천연 식물자원을 대상으로 항균, 항노화, 성인병 예방, 면역증강, 항산화 효과 등에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 천연물 유래의 활성 성분들은 인체의 각종 생리기능 조절계에 작용하여 생체 기능에 대한 강력한 조절 효과를 나타낼 수 있다. 따라서 이러한 천연물 유래 활성 인자들의 작용기작 및 구조해석 등의 정확한 규명은 대단히 중요한 의미를 가지고 있다.

만성 난치성 염증질환인 알러지성 질환은 최근에 세계적으로 가장 급속히 증가하는 질병의 하나로, 미국의 경우 전 인구의 약 20%에서 관찰될 정도로 심각하며 우리나라의 경우 11%가 넘는 어린이가 식품 알러지를 나타내는 것으로 보고되었다. 현재는 식품의 알러지원을 제거하는 방법과 corticosteroid에 의한 치료가 있으나 부작용이 심각하다. 특히 알러지성 질환의 경우 어린이의 유병률이 높은데 특이한 사항은 처음에는 피부염의 형태를 나타내나 차츰 천식을 거쳐 비염질환으로 질환이 유병되어 청소년기에 이르는 양상을 나타내며 진행하므로 지속적인 치료가 요망되는 질환이다. 따라서 이러한 국내외적인 추세에 부응하고 3종의 자생식물(미나리, 개다래, 생강)의 신시장을 개척하기 위해서 이들의 면역질환 개선효과 중에서도 알러지성 질환에 대한 연구와 이를 제품화로 연결하는 것이 필요하다.

개다래는 다래나무(미후리)과에 속한 낙엽 덩굴성 식물로서, 열매를 먹을 수 있으며 식용으로 사용가능하지만 헛바닥을 쏘는 듯한 맛이 나고 달지 않아 식용으로 사용하지 못하는 실정이다. 개다래는 통풍과 류마티스성 관절염 치료에 큰 효험이 있지만 주로 민간 혹은 한방에서만 통풍 치료 목적으로 사용되고 있다. 생강은 특유의 맛과 향기를 지니고 있는 향신료의 하나로서 혈액순환을 촉진하며 소염 및 진통에 효과가 있다고 알려져 있다. 생강 추출물과 주요 성분으로 알려진 6-gingerol, 6-shogaol 등의 항산화 및 항염증 효능은 보고되어 있으나 알러지 및 이로 인한 염증 반응에 대한 효과와 관련 제품은 현재 없는 것으로 조사되었다. 또한 미나리는 우리나라 전역에서 자생하고 있으며 농가에서 특용작물로 재배하고 있다.

현재 식물의 유용성분을 추출하기 위한 방법으로는 특정 용매에 대한 구성물의 용해도 차이를 이용하는 용매 추출법이 널리 사용되고 있으나 고온으로 인한 유효 성분의 파괴 및 용매에의 잔존 등의 문제로 효율적인 방법이라고 할 수 없다. 따라서 환경 친화적인 추출방법인 초임계 추출법이 식품 산업에 확대되고 있으며, 저온에서 조작할 수 있어 매우 유용한 방법이



지만 체계적인 연구보고는 전무한 상태이다. 본 과제에서는 개다래와 생강의 초임계 추출물과 미나리 발효액을 중심으로 알러지 및 염증 증상에 대한 예방과 개선 효과와 미나리 발효액의 다양한 효능을 검증하고, 각 소재에 함유되어 있는 유효성분을 분석하여 기능성이 부여된 고부가가치 식품을 제품화함으로써 관련 질병의 예방과 개선에 기여코자 한다.

### III. 연구개발 내용 및 범위

#### 1) 제 1 세부과제: 염증 및 알러지 개선용 기능성제품 개발을 위한 소재 연구

- 개다래의 초임계 추출 부산물 박 에탄올추출물의 알러지 및 염증 개선 효능 연구
- 개다래 초임계 박 추출물의 항염증 활성 성분 규명
- 생강 초임계 추출물의 알러지 및 염증 개선 효능 연구
- 생강 초임계 추출물의 항알러지 기전 연구
- 미나리 발효액의 간 기능 개선에 대한 효능 연구(*in vitro, in vivo*)
- 미나리 발효액의 유효성분 분석

#### 2) 위탁과제: 기능성 음료 제조용 개다래와 향신료의 초임계 추출물 제조 기술 개발

- 개다래의 초임계 추출 최적화 조건 설정
- 생강의 초임계 추출 최적화 조건 설정
- 생강 추출물 대량생산을 위한 현장적용시험
- 미나리 당발효액 품질 특성
- 아토피 예방용 제품 개발

#### 3) 협동과제: 천연 발효물을 이용한 기능성 음료 개발

- 개다래와 미나리 발효추출물의 음료개발을 위한 레시피 결정 및 음료제조공정 설계, 시제품 생산
- 생강과 미나리 발효추출물의 음료개발을 위한 레시피 결정 및 음료제조공정 설계, 시제품 생산
- 생강과 미나리를 이용한 발효음료 개발을 위한 레시피 결정 및 제품 생산

### IV. 연구개발결과

#### 1) 제 1 세부과제: 염증 및 알러지 개선용 기능성제품 개발을 위한 소재 연구

본 연구는 개다래, 생강의 초임계 추출물을 비롯한 다양한 분획물과 미나리 발효액의 염증과 알러지에 대한 조절효과를 평가하고 기호성을 향상시키는 추출방법을 모색하여, 친환경적인 기능성제품 개발을 위한 연구를 수행하는데 중점을 두었다. 효율적인 과제 수행을 위하여 위탁과제에서 추출한 개다래와 생강의 초임계 추출물을 대상으로 효능을 검증하여 비교하였으며, 미나리는 참여업체에서 제조한 발효액에 대하여 효능 평가 및 유효 성분 분석을 하였다.

개다래는 초임계 추출법으로 오일을 제거하고 박을 에탄올 추출하여 효능을 대식세포주인 Raw 264.7 세포와 비만세포주인 RBL-2H3 세포를 이용하여 각각 nitric oxide 생성 억제 효과와 histamine 방출에 대한 지표인 b-hexosaminidase 방출 억제효과를 평가한 결과, 오일 제거 후에 기호성이 향상되었으며 염증과 알러지에 대한 억제 효능의 저하는 나타나지 않아 초임계 추출 후의 이용인 결과, 오의 추출물을 기능성 소재로서 활용하는 방안을 제시하였다. 또한, 개다래의 에 기호성이성분을 분리, 동정하여 효능을 확인하였으며 actinidiamide로 명명하였다.

생강은 오일과 gingerol, shogaol에 대해서 항균, 항산화 및 항염증 효능이 잘 알려져 있으나, 추출물과 오일의 효능과 성분 비교 등 체계적인 보고가 부족하였다. 따라서 최적의 추출물을 기능성 식품 소재로 활용하기 위하여, 용매, 초임계, 초고압 등을 이용한 추출물을 제조하여 수율, 항산화능, 항염증 효과를 비교하여 최적의 추출방법과 조건을 설정하였다. 다양한 분획의 효능 6-gingerol 및 추출물과 비교 검토한 결과, 생강 초임계 오일의 높은 항염증 효과를 확인하였으며 부산물인 박 에탄올 추출물에서는 알러지에 대한 강한 억제 활성을 확인하였다. 초임계 추출로 얻은 오일은 LPS로 처리한 Raw 264.7 세포의 nitric oxide, proinflammatory cytokines, prostaglandin E2(PGE2) 생성과 iNOS, COX-2의 단백질 발현을 효율적으로 억제하였으며, 박 추출물은 IgE 매개로 antigen으로 활성화된 RBL-2H3세포의 탈과립을 강하게 억제하고 항산화 단백질로 알려진 Heme oxygenase-1의 발현을 유도하는 것으로 나타났다. 박 추출물에 대한 효능 검증은 최초이며, 6-gingerol은 항알러지 효능이 낮으므로 새로운 활성성분을 함유하고 있는 것으로 추측되고 성분의 분석을 진행 중이다.

미나리는 참여업체에서 보유하고 있는 자연 발효공법 기술로 제조하였으며, 올리고당과 흑설탕을 이용하여 1년간 상온에서 발효한 후, 1~3년간 숙성시킨 발효액에 대하여 다양한 효능을 검토하였다. 발효액은 발효 기간에 따라 맛과 향이 개선되어 상품으로써의 가치가 향상되었으며, 높은 알러지 억제 효과가 있음을 확인하였다. 또한 간 기능 개선 효능을 산화적 스트레스로 손상을 준 HepG2 세포와 사염화탄소로 지방간을 유도한 rat을 이용한 동물실험을 통하여 확인하였으며, 효능이 입증된 실리마린과 비슷한 효능이 있는 것을 밝혔다. 알려진 간 기능에 대한 활성성분을 이용하여 발효액을 분석한 결과, 주요 성분으로 caffeic acid, chlorogenic acid, ferulic acid가 함유되어 있는 것을 확인하였다.

본 연구의 결과로부터, 초임계 추출법을 이용하여 활성성분과 효능에 차이가 있는 생강과 개다래의 추출물을 얻을 수 있으며, 부산물로 버려지던 초임계 추출 후의 박도 기능성 소재로서 활용이 가능한 점을 분명히 밝혔다. 또한 미나리 발효액에 첨가하여 효능을 확인하고 다양한 형태의 고부가 가공 제품을 개발함으로써 농산물의 저장 방법에 따른 손실을 방지하고 지역 재배 농가의 소득 증대를 기대할 수 있다.

## 2) 위탁과제: 기능성 음료 제조용 개다래와 향신료의 초임계 추출물 제조 기술 개발

기능성 음료 제조용 개다래의 초임계 추출물을 제조하였다. 추출온도(35, 45, 55℃)와 추출압력(1500, 3000, 4500 psi), 추출시간(1시간, 2시간)을 달리하여 개다래를 초임계 추출한 결과 동일한 온도에서는 압력이 증가할수록 추출수율이 증가하고, 동일한 압력에서는 온도가 증가할수록 추출수율이 감소하는 것으로 나타났다. 개다래의 적정 초임계 추출조건은 45℃, 4500

psi, 1시간이었다. 개다래와 초임계 추출 후 남은 개다래박의 이화학적 성분과 관능적 특성을 분석하였다. 유리당, 유리아미노산, 총 폴리페놀, 총 플라보노이드의 함량에 있어서는 거의 차이가 없었으며, 총 향기성분 함량은 개다래  $99.7 \pm 14.4$  mg/kg, 개다래박  $58.0 \pm 5.8$ 로 개다래박의 향기성분이 개다래에 비해 상당히 낮게 나타났는데 이는 초임계 추출에 의해 개다래의 향기성분이 많이 소실되었기 때문으로 판단된다.

개다래와 개다래박의 추출물에 대한 향미묘사시험을 한 결과, 쓴맛, 뚝은맛, 단맛, 구수한 맛 등의 맛 특성과 한약재향, 흙냄새, 박하향 등의 향기 특성 등 총 7가지의 관능적 특성을 도출하였다. 이 중 쓴맛, 뚝은맛, 한약재향 등의 강도가 강한 것으로 나타났으며, 개다래 박 추출물이 개다래에 비해 대부분의 향미 강도가 상당히 감소하는 것으로 나타났다. 또한 추출물에 대한 관능적 기호도 실시 결과에서도 개다래에 비해 개다래 박의 추출물의 기호도가 높은 것으로 나타났다. 개다래는 높은 기능성(항염증, 통풍 등)을 나타내지만 이를 활용한 다양한 기능성, 가공제품(예, 음료 등)을 개발하고자 할 때 기호적으로 양호하지 않은 맛과 향기 특성을 나타내기 때문에 많은 제약이 따른다. 하지만 개다래를 초임계 처리를 할 경우 개다래가 지니는 기능성과 기능성 성분이 전혀 손실되지 않는 반면 개다래의 양호하지 않은 맛과 향기성분이 제거되어 그 강도가 약해지고 관능적 기호도도 증가하는 것으로 나타났다. 따라서 초임계 처리가 개다래의 기능성을 향상시키고 양호하지 않은 맛과 향기특성을 제거하기에 매우 효과적임을 알 수 있었다.

기능성 음료 제조용 개다래의 초임계 추출물을 제조하였다. 추출온도(35, 45, 55℃)와 추출압력(100, 200, 300, 400 bar)을 달리하여 생강을 초임계 추출한 결과 동일한 온도에서는 압력이 증가할수록 추출수율이 증가하는 것으로 나타났다. 추출압력이 증가할수록 생강 고유의 색소성분이 많이 추출되어 색이 진하여지면서 400 bar에서는 붉은 계통의 적갈색을 나타내었다. 초임계 추출조건별 생강 추출물의 유동특성 (flow behavior) 측정 결과 압력이 증가할수록 점조도 지수와 겔보기점도가 증가하였으며 동일한 압력에서는 온도가 증가할수록 감소하는 경향을 나타내어 35℃, 400 bar에서 가장 높은 값을 나타내었다. 초임계 추출조건별 생강추출물의 gingerol 함량 변화를 분석한 결과 6-gingerol이 가장 높은 함량을 나타내었고(10.78~17.17%) 8-gingerol (2.38~4.08%), 10-gingerol (1.01~3.07%), 6-shogaol (0.64~1.09%)의 순으로 나타났으며, 추출온도와 상관없이 100 bar에서 가장 낮은 gingerol 함량을 나타내었고 추출온도가 증가할수록 감소하는 반면 200~400 bar의 범위에서는 21.46~24.48%로서 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 초임계 추출조건별 생강추출물의 항산화 활성을 분석한 결과 추출온도에 상관없이 100 bar에서 가장 낮은 항산화 활성을 나타내고 200~400 bar의 범위에서는 큰 차이가 나지 않는 것으로 나타나 gingerol 함량 결과와 거의 유사한 경향으로 생강 추출물의 항산화 활성이 gingerol 함량과 매우 큰 상관관계가 있음을 알 수 있었다.

초임계 생강 추출물 대량생산을 위한 현장적용 시험을 위해 초임계 추출 vessel의 용량(0.5 L, 3 L, 10 L)을 달리하여 생강 추출물을 제조한 결과 추출 vessel의 용량이 0.5 L와 3 L의 경우 CO<sub>2</sub>/시료의 비율 변화에 따른 추출 수율이 거의 유사한 경향을 나타낸 반면 10 L 용량의 경우 작은 추출용량에 비해 동일 CO<sub>2</sub>/시료의 비율에서 상당히 낮은 추출수율을 나타내는 것으로 나타나 초임계 생강 추출물을 대량생산하기 위해서는 추출 vessel 용량이 커짐에 따라 CO<sub>2</sub>/시료의 비율도 증가하여야 할 것으로 판단된다.

초임계 생강 추출물과 미나리 추출물을 혼합하여 또는 미나리 추출물만을 사용하여 아토피 예방용 크림, mist, body wash 등의 제품을 개발하였으며, 아토피 증상이 심한 어린이를 대상으로 크림제품을 이용하여 임상시험을 수행한 결과 약 20일 경과 후 외관뿐만 아니라 가려움 등의 증상이 상당히 호전되는 것으로 나타났다.

### 3) 협동과제: 천연 발효물을 이용한 기능성 음료 개발

천연소재를 이용한 발효물을 산업적으로 이용하여 고부가가치 산업의 경쟁력을 확보하고 개다래 및 생강과 같은 천연소재를 발효추출물과 함께 사용하여 기능성 음료의 개발하고자 하며 이를 위한 레시피 결정, 음료 시제품을 생산하였다.

연차별로 개다래, 생강 등 천연물을 미나리 발효액과 혼합하여 기능성 음료를 개발하였으며, 개발 할 음료의 조성물 형태나 외형의 형태를 달리 개발하여 신제품 제형의 다양성과 시장진입의 최적화를 높이하고자하였다.

각각 음료의 개발은 위하여 소비자 기호도 평가에 따른 배합비를 설정하여 75 mL 엑기스타입, 75 mL 스포츠타입, 180 mL 다류타입, 180 mL 스포츠타입 등 4가지의 시제품을 개발하였다. 각각 다르며, 1-4차에 이르는 기호도 평가를 통해 제품별 레시피를 설정하였다. 각각 개발된 제품의 품질변화를 확인하기 위하여 당도, pH, 갈색도, 총 균수 관능 등의 평가를 12주간 온도별(4℃, 20℃, 30℃, 40℃, 50℃, 60℃)품질변화를 측정하였고, 이결과를 바탕으로 하여 개발된 제품의 유통기한을 설정하였다.

당도의 경우는 저장기간이나 보존환경에 크게 차이가 생기지 않았고, pH 또한 그 변화가 크지 않았다. 색도는 4℃에서는 그 변화가 미미하고 농도가 높아짐에 따라 그 변화의 폭이 점점 늘어나는 것을 확인하였고, 갈색도는 50℃, 60℃ 조건에서 4주차 이상으로 지나면 그 값이 증가 하는 것을 확인하였다. 총 균수의 경우 20℃, 30℃에서 측정하였는데 모든 조건에서 미생물이 검출 되지 않다. 관능평가에 따른 품질 변화는 온도가 높아짐에 따라, 저장기간이 길어짐에 따라서 값이 낮아지는 것을 확인하였다. 특히 30℃이하 상온과 그 이상의 차이가 현저함을 알 수 있게 하는 결과이며, 상품자체의 상품가치로서 소명성을 가지는 값은 관능의 최종 종합적기호도가 6점 이하인 것을 알 수 있었다.

## V. 연구 성과 및 성과활용 계획

본 연구는 전문성과 효율성을 극대화시켜서 최종목표를 달성하기 위하여, 주관기관, 위탁기관, 협동기관, 참여업체로 구성하여 연구를 수행하였다. 그 결과, 선정된 소재(개다래, 생강, 미나리)의 심도 있는 효능 검증과 작용 기전을 검토하였고 최적의 추출 방법과 조건을 설정하였으며, 기능성이 확인된 시제품 개발과 상품화를 달성하였다. 이러한 성과를 바탕으로, 참여업체의 소득증대를 위하여 수출 상품 개발 및 제품 홍보를 계획하고 있으며, 연구를 계속 진행하여 미나리 발효액을 이용한 건강기능식품 인증 및 제품 개발을 위한 기본 결과로 활용할 예정이다.

# SUMMARY

## (영문요약문)

### I. Title

Functional product development for prevention of inflammation and allergy

### II. Objective and Significance

*Actinidia polygama* (Silver vine) and ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) are used as folk medicines in Korea for treating pain, gout, and inflammation. However, there are only a few studies providing detailed information about their medicinal efficacy and most effective extraction method to apply as functional food resources. Dropwort (*Oenanthe javanica*) is a medicinal food commonly used to treat diseases such as jaundice, hypertension, and polydipsia in Korea, Japan, and China. To investigate the regulatory effects against allergy, inflammation, and hepatocytotoxicity and develop functional products, supercritical fluid extraction method using CO<sub>2</sub> was applied to *Actinidia polygam* and ginger. Moreover, fermented dropwort extracts were analyzed *in vitro* and *in vivo* to maximize its medicinal efficacy.

### III. Research Summary

- A study on the development of functional food materials for prevention related to inflammation and allergy reaction.

The present study was conducted to investigate the anti-inflammation and anti-allergy effects of *A. polygama* and ginger. Moreover, the hepatoprotective effects of fermented dropwort extracts were investigated. Anti-allergic effect of marc extract after supercritical fluid extraction (SFE) comparing the crude extract from *A. polygama* was investigated to increase its potential for use as a new source of functional food that reduced non-favorable flavor. The results tested by thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) assay indicated that the ethanol extract of *A. polygama* (ETOH) and ethanol extract of SFE marc (SFEM) showed no cytotoxic effects on IgE-sensitized rat basophilic leukemia RBL-2H3 cells under the conditions. ETOH and SFEM inhibited antigen-induced degranulation in RBL-2H3 mast cells dose dependently. The morphological change of the cells treated with compound 48/80 was prevented by the extracts. Production of tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  on the activated RBL-2H3 cells was also reduced by ETOH and SFEM, similarly. Moreover,

the total phenolic content of the extracts seems to correlate with the anti-allergic activity. In conclusion, the results suggest that the flavor improved SFE marc extract suppressed the antigen-induced allergic reactions in RBL-2H3 mast cells. In addition, a novel active component against inflammation and allergy was identified by activity-guided fractionation.

Ginger is widely used as a spice throughout the world, and it has been shown to have anti-inflammatory, anti-oxidant, anti-thrombotic and anti-cancer activities. Ginger extracts contain numerous biologically active constituents, such as gingerols and shogaols. In this study, the inhibitory effects of ginger extracts prepared SFE on allergic inflammation were investigated using RBL-2H3 and Raw 264.7 cells. The cell viabilities of IgE-sensitized RBL-2H3 cells were not affected by ginger extracts and the release of  $\beta$ -hexosaminidase,  $\text{PGE}_2$ , and IL-4 were significantly inhibited by SFE oil and ethanol extract of SFE marc significantly. In addition, SFE oil and ethanol extract of SFE marc significantly showed strong inhibitory effect against the production NO and  $\text{PGE}_2$  in LPS-stimulated Raw 264.7 cells. SFE oil and ethanol extract of SFE marc significantly reduce oxidative stress and inflammatory status through down-regulation of the protein expressions of iNOS and COX-2 in LPS-stimulated Raw 264.7 cells. Particularly, in LPS-stimulated Raw 264.7 cells, SFE marc from ginger induced HO-1 expression in a concentration-dependent manner. Thus the SFE oil and ethanol extract of SFE marc from ginger may be beneficial in the treatment of mast cell-mediated allergy and inflammatory reactions.

Dropwort (*Oenanthe javanica*) is a medicinal food commonly used to treat diseases such as jaundice, hypertension, and polydipsia in Korea, Japan, and China. The hepatoprotective properties of naturally fermented dropwort extracts were investigated in this study. Our results showed significant concentration-dependent inhibitions of HepG2 proliferation by the three extracts, but no effects on normal liver Chang cells viability. The inhibitory effects on cell morphology changes were also observed. In addition, antioxidative properties of the extracts, including total phenolic and flavonoid contents and radicals scavenging activity were examined. Moreover, we analyzed caffeic acid and ferulic acid, known as main active components for hepatoprotective effect, by using HPLC and caffeic acid was detected in the crude extracts about 3-4%, but very little amount of ferulic acid was detected.

- Development of manufacturing technology for the superficial extract of *Actinidia polygama* and ginger for functional products

A supercritical extract of *A. polygama* was manufactured for functional beverages. The supercritical extraction of *A. polygama* at varying extraction temperatures (35, 45, 55°C),

extraction pressures (1500, 3000, 4500 psi), and extraction times (1 h, 2 h) showed that the extraction yield was increased as the pressure increased under the same temperature, and the extraction yield was decreased as the temperature increased under the same pressure. The optimal supercritical extraction condition for *A. polygama* was 45°C, 4500 psi, and 1 h. The physicochemical properties and sensory characteristics of *A. polygama* and the marc of *Ac. polygama* left after supercritical extraction were analyzed. The contents of free sugars, free amino acids, total polyphenols, and total flavonoids were not different, and the content of the total aroma compounds was 99.7±14.4 mg/kg in *A. polygama* and 58.0±5.8 mg/kg in the marc of *A. polygama*, showed considerably lower content in the marc of *A. polygama* compared to that of *A. polygama*, which suggests the significant loss of aroma compounds in *A. polygama* due to supercritical extraction.

The flavor profile analysis of the extract of *A. polygama* and the marc of *A. polygama* showed a total of 7 sensory characteristics such as taste characteristics including bitter, astringent, sweet, and savory tastes and aroma characteristics including oriental herbal medicine, earth, and mint aromas. Among these, bitter taste, astringent taste, and oriental herbal medicine aroma showed higher intensity, and the most flavor strength was greatly decreased in the extract of the marc of *A. polygama* as compared to *A. polygama*. In addition, sensory acceptability was higher in the extract of the marc of *A. polygama* compared to *A. polygama*. Although *A. polygama* showed high functionality, there have been many limitations in developing various functional processed foods using this because of poor taste and aroma characteristics. However, when *A. polygama* had supercritical treatment, those poor taste and aroma compounds were eliminated and their intensity was weakened to increase the sensory acceptability while the functionality and functional compounds of *A. polygama* were not lost at all. Thus, supercritical treatment was very effective in improving the functionality of *A. polygama* and eliminating poor taste and aroma characteristics.

A supercritical extract of ginger was manufactured for functional beverages. The supercritical extraction of ginger at varying extraction temperatures (35, 45, 55°C) and extraction pressures (100, 200, 300, 400 bar) showed that the extraction yield was increased as the pressure increased under the same temperature. As the extraction pressure increased, unique pigment compounds of ginger were extracted to make it darker with reddish brown color at 400 bar. The measurement of the flow behavior of ginger extract by supercritical extraction condition showed that the consistency index and apparent viscosity were increased as the pressure increased, and that they decreased as the temperature increased under the same pressure, showing the highest value at 35°C and 400 bar. The analysis of the gingerol content of ginger extract by supercritical extraction condition showed that 6-gingerol had the highest content (10.78~17.17%), and then in the order of 8-gingerol (2.38~4.08%), 10-gingerol (1.01~3.07%), and 6-shogaol (0.64~1.09%).

The lowest gingerol content was shown at 100 bar regardless of the extraction temperature, and the content was decreased as the extraction temperature increased, while it was 21.46~24.48% between 200~400 bar without great differences. The analysis of the antioxidant activity of ginger extract by supercritical extraction condition showed that the lowest antioxidant activity was observed at 100 bar regardless of the extraction temperature and the activity was not greatly different between 200~400 bar, which is similar to the results of gingerol content, suggesting that the antioxidant activity of ginger extract is highly correlated with gingerol content.

A ginger extract was manufactured with varying supercritical extraction vessel capacity (0.5 L, 3 L, 10 L) for the pilot test for mass production of supercritical ginger extract. The results showed that the extraction yield following the CO<sub>2</sub>/sample ratio change was similar in the case of 0.5 L and 3 L extraction vessel capacity, while a considerably lower extraction yield was observed in 10 L capacity under the same CO<sub>2</sub>/sample ratio compared to smaller extraction capacities, suggesting that the CO<sub>2</sub>/sample ratio should be increased as the extraction vessel capacity increases to mass produce the supercritical ginger extract. A series of creams, mists, and body wash products for the prevention of atopic skin problems were developed by using a mixture of supercritical ginger extract and water dropwort extract or by using water dropwort extract only. A clinical trial was performed using a cream product for children with severe atopic skin problems and the results showed that not only appearance but also symptoms including itching were greatly improved after 20 days.



# CONTENTS

Cover letter	
Summary (Korean)	
Summary (English)	
Contents (English)	
Contents (Korean)	
Part I. Outline of research and development	26
Chapter 1. The purpose of research and development	26
Chapter 2. The need for research and development	26
Chapter 3. The scope of research and development	29
Part II. State-Of-The-Art	30
Part III. Results of research and development	33
Chapter 1. Anti-inflammation and anti-allergy effects of marc from <i>A. polygama</i> prepared by supercritical fluid extraction (SFE)	33
1. Evaluation of extraction methods of <i>A. polygama</i>	33
1) Materials and methods	33
2) Results	34
i. Cytotoxicity and effects on nitric oxide production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells	34
ii. Cytotoxicity in IgE-sensitized RBL-2H3 cells	35
iii. Inhibitory effects on the release of b-hexosaminidase	35
2. Anti-inflammatory effects of supercritical fluid extracts	36
1) Materials and methods	36
2) Results	38
i. Cytotoxicity and effects on nitric oxide production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells	38
ii. Inhibitory effects on PGE2 and TNF- $\alpha$ production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells	38
3. Anti-allergy effects of supercritical fluid extracts	39
1) Materials and methods	39

2) Results -----	40
i . Cytotoxicity in IgE-sensitized RBL-2H3 cells -----	40
ii. Inhibitory effects on degranulation in antigen-stimulated RBL-2H3 cells -----	41
iii. Inhibition of TNF- $\alpha$ production in antigen-stimulated RBL-2H3 cells ----	43
4. Characteristics of <i>A. polygama</i> extracts treated with various enzymes ---	44
1) Materials and methods -----	44
2) Results -----	44
5. GC/MS analysis -----	46
1) Materials and methods -----	46
2) Results -----	47
6. Analysis of major compounds of the marc extract -----	47
1) Materials and methods -----	47
2) Results -----	47
7. Identification of an active compound from ethyl acetate fraction -----	49
1) Materials and methods -----	49
2) Results -----	51
i . Anti-allergy effects of various fractions -----	51
ii. Anti-inflammatory effects of various fractions -----	51
iii. Structure determination -----	52
Chapter 2. Anti-inflammation and anti-allergy effects of ginger extracts prepared by SFE -----	55
1. Evaluation of antioxidative properties -----	55
1) Materials and methods -----	55
2) Results -----	57
i . Solvents fractionation -----	57
ii. SFE oil -----	60
iii. Ethanol extract of marc from SFE -----	65
iv. Super-High Pressure Liquify Extract -----	70
2. Anti-inflammation effects -----	72
1) Materials and methods -----	72
2) Results -----	73
i . Inhibitory effects of various fractions on cytotoxicity and effects on nitric oxide production -----	73
ii. Inhibitory effects of SFE oil on cytotoxicity and effects on nitric oxide	

production -----	74
iii. Inhibitory effects of ethanol extract from SFE marc on cytotoxicity and effects on nitric oxide production -----	75
iv. Inhibitory effects of gingerol on cytotoxicity and effects on nitric oxide production -----	76
v. Effects on protein expressions related inflammatory reaction -----	77
 3. Anti-allergy effects -----	79
1) Materials and methods -----	79
2) Results -----	81
i. Cytotoxicity of SFE oil in IgE-sensitized RBL-2H3 cells -----	81
ii. Inhibitory effects of SFE oil on the release of b-hexosaminidase -----	82
iii. Inhibitory effects of SFE oil on PGE2 production in antigen-stimulated RBL-2H3 cells -----	83
iv. Inhibitory effects of SFE oil on IL-4 production in antigen-stimulated RBL-2H3 cells -----	84
v. Cytotoxicity of ethanol extract from SFE marc in IgE-sensitized RBL-2H3 cells -----	85
vi. Inhibitory effects of ethanol extract from SFE marc on the release of b-hexosaminidase -----	86
vii. Inhibitory effects of ethanol extract from SFE marc on PGE2 production in antigen-stimulated RBL-2H3 cells -----	87
viii. Inhibitory effects of ethanol extract from SFE marc on IL-4 production in antigen-stimulated RBL-2H3 cells -----	88
 4. Analysis of active compounds by HPLC -----	89
1) Materials and methods -----	89
2) Results -----	89
i. Contents of gingerols and shogaols -----	89
 Chapter 3. Hepatoprotective effects of fermented dropwort extracts -----	91
 1. Evaluation of antioxidative properties -----	91
1) Materials and methods -----	91
2) Results -----	91
i. Total flavonoid content -----	91
ii. Radical-scavenging effects against DPPH radicals -----	92
 2. Protective effects against tert-butylhydroperoxide (t-BHP)-induced oxidative damage -----	92
1) Materials and methods -----	92
2) Results -----	92

i . Effects on cell viability -----	93
ii. Effects on lactate dehydrogenase (LDH) leakage -----	94
3. Inhibitory effects on the proliferation of liver cancer cell HepG2 -----	94
1) Materials and methods -----	94
2) Results -----	95
i . Effects on cell viability -----	95
ii. Effects on cell morphology -----	95
4. Analysis of active compounds -----	96
1) Materials and methods -----	96
2) Results -----	97
i . HPLC analysis -----	97
ii. MS analysis -----	98
iii. HPLC reanalysis -----	98
5. Protective effects of fermented dropwort extract against tert-butylhydroperoxide (t-BHP)-induced oxidative damage -----	100
1) Materials and methods -----	100
2) Results -----	101
i . Effects on cell viability -----	101
ii. Effects on lactate dehydrogenase (LDH) leakage -----	101
6. Inhibitory effects of fermented dropwort extract on the proliferation of liver cancer cell HepG2 -----	102
1) Materials and methods -----	102
2) Results -----	102
i . Effects on cell viability -----	102
ii. Effects on cell morphology -----	102
7. Hepatoprotective effect of fermented dropwort extract against carbon tetrachloride (CCl <sub>4</sub> )-induced toxicity in SD rats -----	103
1) Materials and methods -----	103
2) Results -----	104
i . Effects on serum biochemical parameters -----	104
ii. Effects on gene expressions related hepatoprotection -----	106
iii. Histochemical examination of liver sections -----	107
Chapter 4. Development of manufacturing technology for the superficial extract of <i>Actinidia polygama</i> and ginger for functional products ----	109
1. Evaluation of the optimal SFE condition for <i>A. polygama</i> -----	109

1) Materials and methods -----	109
2) Results -----	111
i . Yields of SFE -----	111
ii. Comparison of basic nutrients -----	112
iii. Antioxidative properties -----	114
iv. The flavor profiles -----	114
2. Evaluation of the optimal SFE condition for ginger -----	115
1) Materials and methods -----	115
2) Results -----	117
i . Yields of SFE -----	117
ii. Comparison of appearances -----	117
iii. Fluid characteristics -----	118
iv. Contents of gingerols -----	119
v . Antioxidative properties -----	120
vi. Flavoury compounds -----	121
3. Fields test for mass production ginger SFE extracts -----	124
1) Materials and methods -----	124
2) Results -----	124
4. Qualities of fermented dropwort extracts -----	127
1) Materials and methods -----	127
2) Results -----	128
Chapter 5. Development of functional beverages using fermented extracts -----	137
1. Development of functional beverages using dropwort fermented extract and A. polygama extract -----	137
1) Materials and methods -----	137
2) Results -----	138
2. Design for manufacturing natural plants extracts -----	143
1) Materials and methods -----	143
3. Quality tests during storage periods -----	145
1) Materials and methods -----	145
2) Results -----	146
4. Evaluation of storage period for optimal taste -----	149

Part IV. Achievements and contribution to related-field -----	153
Part V. Application plan of obtained results -----	156
Part VI. Oversea technical information collected during the research -----	165
Part VII. References -----	166

# 목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	26
제 1 절	연구개발의 목적	26
제 2 절	연구개발의 필요성	26
1.	기술적 측면	28
2.	경제 산업적 측면	28
3.	사회 문화적 측면	28
제 3 절	연구개발의 범위	29
1.	염증 및 알러지 개선용 기능성제품 개발을 위한 소재 연구	29
2.	기능성 음료 제조용 개다래와 향신료의 초임계 추출물 제조 기술 개발	29
3.	천연 발효물을 이용한 기능성 음료 개발	29
제 2 장	국내외 기술개발 현황	30
제 1 절	해외	30
제 2 절	국내	30
제 3 장	연구 개발 수행 내용 및 결과	33
제 1 절	개다래 초임계 박 추출물의 알러지 및 염증 개선 효능 연구	33
1.	개다래의 추출 조건에 따른 분획의 효능 비교	33
가.	시료 및 실험 방법	33
(1)	개다래의 열수 및 주정 추출	33
(2)	초임계 추출 및 개다래 박의 주정 추출	33
(3)	세포배양 및 세포 독성 측정	33
(4)	Nitric oxide(NO) 생성량 측정	33
(5)	$\beta$ -hexosaminidase 방출 억제능 측정	34
나.	결과	34
(1)	RAW 264.7 cell에 대한 세포 독성 측정 및 Nitric oxide(NO) 생성량 측정	34
(2)	RBL-2H3 cell에 대한 세포독성	35
(3)	$\beta$ -hexosaminidase 방출 억제능 측정	35
2.	개다래 및 개다래 박 추출물의 항염증 효과	36
가.	시료 및 실험 방법	36
(1)	세포주 배양	36
(2)	세포독성 측정 및 NO 생성량 측정	37
(3)	PGE2 및 TNF- $\alpha$ 생성량 측정	37

나. 결과	38
(1) 세포 독성 측정 및 Nitric oxide(NO) 생성량 측정	38
(2) PGE2 및 TNF- $\alpha$ 생성량 측정	38
3. 개다래 및 개다래 박 추출물의 항알러지 효과	39
가. 실험 방법	39
(1) 세포배양 및 세포독성 측정	39
(2) $\beta$ -Hexosaminidase 방출 억제능 측정	39
(3) Compound 48/80에 의한 탈과립에 대한 보호효과	40
(4) TNF- $\alpha$ 생성 억제능 측정	40
나. 결과	40
(1) 세포독성	40
(2) 비만세포 보호 효과	41
(3) TNF- $\alpha$ 생성 억제능	43
4. 개다래 효소처리 추출물의 관능특성	44
가. 실험방법	44
(1) 개다래 효소처리 추출	44
나. 결과	45
5. 개다래 박 추출물의 GC/MS 분석	46
가. 실험방법	46
(1) GC/MS 분석	46
나. 결과	47
6. 개다래 박 추출물의 활성 성분 분석	47
가. 방법	47
(1) 계통분획	47
(2) NO 생성 억제능	47
(3) Sepbox 2D 분획	47
나. 결과	47
(1) 개다래 박 분획물의 활성 검색	47
7. 개다래 에틸아세테이트 분획으로부터 활성 성분의 분리 및 동정	49
가. 실험 방법	49
(1) 세포배양 및 세포독성 측정	49
(2) $\beta$ -Hexosaminidase 방출 억제능 측정	49
(3) 세포 독성 측정 및 Nitric oxide(NO) 생성량 측정	49



(4) 성분 분리 및 동정	50
나. 결과	51
(1) 개다래 추출물, 분획, 단일성분의 항알러지 효과	51
(2) 개다래 추출물, 분획, 단일성분의 항염증 효과	51
(3) 구조	52
제 2 절 생강 초임계 추출물의 알러지 및 염증 개선 효능 연구	55
1. 생강 추출물의 항산화능 비교	55
가. 시료 및 실험 방법	55
(1) 시료 조제	55
(2) 용매추출	55
(3) 초임계추출	56
(4) 초고압추출	56
(5) 총 폴리페놀 함량 측정	56
(6) 총 플라보노이드 함량 측정	56
(7) 3-3. $\alpha$ - $\alpha$ -Diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl(DPPH) radical 소거활성	57
(8) ABTS radical 소거활성	57
나. 결과	57
(1) 생강 용매추출물의 항산화능 검색	57
(가) 수율	57
(나) 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량	57
(다) DPPH radical 소거활성	58
(라) ABTS free radical 소거활성	59
(2) 생강 초임계 오일추출물의 항산화능 검색	60
(가) 수율	60
(나) $\alpha$ - $\alpha$ -Diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl(DPPH) radical 소거활성	61
(다) ABTS radical 소거활성	63
(3) 생강 초임계박 추출물의 항산화능 검색	65
(가) 수율	65
(나) 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량	66
(다) $\alpha$ - $\alpha$ -Diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl(DPPH) radical 소거활성	67
(4) 생강초고압 추출물의 항산화능 검색	70
(가) 수율	70
(나) 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량	70
(다) DPPH radical 소거활성	71
2. 생강의 항염증 효과	72
가. 시료 및 실험 방법	72
(1) 세포주 배양	72

(2) Nitric oxide(NO) 생성량 측정	72
(3) Western blot에 의한 단백질 발현 조절 효과 측정	72
나. 결과	73
(1) Nitric oxide(NO) 생성량 측정	73
(가) 추출물 및 분획의 세포독성 및 NO 생성 억제능 측정	73
(나) 초임계 오일의 세포독성 및 NO 생성 억제 활성 측정	74
(다) 초임계 박의 세포독성 및 NO 생성 억제 활성 측정	75
(라) Gingerol의 세포독성 및 NO 생성 억제 활성 측정	76
(2) Western blot에 의한 단백질 발현 조절 효과 측정	77
(가) 초임계 오일의 iNOS, COX-2 단백질 발현 억제 효과	77
(나) 박 에탄올 추출물의 iNOS, COX-2 및 HO-1 단백질 발현 억제효과	78
3. 생강의 항알러지 효과	79
가. 시료 및 실험 방법	79
(1) 생강 오일의 항알러지 효과	79
(가) 세포생존율 측정	79
(나) $\beta$ -Hexosaminidase 방출 억제 측정	79
(다) Prostaglandin E2(PGE2) 방출 억제 측정	80
(라) Interleukin 4(IL-4) 생성 억제 측정	80
(2) 생강 박의 항알레르기 효과	80
(가) 세포생존율 측정	80
(나) $\beta$ -Hexosaminidase 방출 억제 측정	81
(다) Prostaglandin E2(PGE2) 방출 억제 측정	81
(라) Interleukin 4(IL-4) 생성 억제 측정	81
나. 결과	81
(1) 생강 오일의 항알러지 효과	81
(가) 생강 오일의 세포독성	81
(나) $\beta$ -Hexosaminidase 방출 억제 활성	82
(다) PGE2 생성 억제 활성	83
(라) IL-4 생성 억제 활성	84
(2) 생강 박의 항알레르기 효과	85
(가) 생강 박의 세포생존율	85
(나) $\beta$ -Hexosaminidase 방출 억제 활성	86
(다) PGE2 생성 억제 활성	87
(라) IL-4 분비 억제 활성	88
4. 생강의 활성 성분 분석	89
가. 시료 및 실험 방법	89
(1) Gingerol 및 shogaol 함량	89

나. 결과	89
(1) 생강 추출물 및 분획의 gingerol 및 shogaol 함량 측정	89
제 3 절 미나리 발효액의 간 기능 개선에 대한 효능 연구	91
1. 흑설탕과 올리고당으로 발효한 추출물의 항산화 효과	91
가. 시료 및 실험 방법	91
(1) 미나리 발효 추출물의 제조 방법	91
(2) 총 플라보노이드 함량 측정	91
(3) DPPH Free Radical-Scavenging 활성 측정	91
나. 결과	91
(1) 미나리 추출액의 총 플라보노이드 함량 측정	91
(2) DPPH Free Radical-Scavenging 활성 측정	92
2. 발효액의 tert-butylhydroperoxide(t-BHP)에 의한 산화적 손상에 대한 보호 효과	92
가. 시료 및 실험 방법	92
(1) 세포배양 및 손상 유도에 대한 간세포 생존율 측정	92
(2) Lactate dehydrogenase(LDH) leakage 억제 효과	93
나. 결과	93
(1) 세포배양 및 손상 유도에 대한 간세포 생존율 측정	93
(2) Lactate dehydrogenase(LDH) leakage 억제 효과	94
3. 발효액의 간암 세포 성장 억제 효과	94
가. 시료 및 실험 방법	94
(1) 세포배양 및 생존율 측정	94
(2) HepG2 세포의 형태 변화 관찰	94
나. 결과	95
(1) 세포배양 및 생존율 측정	95
(2) HepG2 세포의 형태 변화 관찰	95
4. 미나리 발효액의 활성 성분 분석	96
가. 시료 및 실험 방법	96
(1) HPLC 분석	96
(2) MS 분석	97
(3) HPLC 재분석	97
나. 결과	97
(1) HPLC 분석	97

(2) MS 분석	98
(3) HPLC 재분석	98
5. 미나리 발효액의 유용 성분인 caffeic acid, chlorogenic acid, ferulic acid의 tert-butylhydroperoxide(t-BHP)에 의한 산화적 손상에 대한 보호효과	100
가. 시료 및 실험 방법	100
(1) 세포배양 및 손상 유도에 대한 간세포 생존율 측정	100
(2) Lactate dehydrogenase(LDH) leakage 억제 효과	100
나. 결과	101
(1) 세포배양 및 손상 유도에 대한 간세포 생존율 측정 결과	101
6. 미나리 발효액의 유용 성분인 caffeic acid, chlorogenic acid, ferulic acid의 간암 세포 성장 억제 효과	102
가. 시료 및 실험 방법	102
(1) 세포배양 및 생존율 측정	102
나. 결과	102
(1) 세포배양 및 생존율 측정 결과	102
7. 사염화탄소 투여로 유발된 랫트의 간 손상에 대한 미나리 발효액의 보호 효과	103
가. 시료 및 실험 방법	103
(1) 공시동물	103
(2) 실험동물의 분류 및 처리	103
(3) 혈청의 화학성분 및 효소활성 검사	103
(4) 조직학적 평가	103
(5) RT-PCR에 의한 mRNA 발현변화	103
(가) Total RNA 추출	103
(나) cDNA 합성	104
(다) Polymerase chain reaction (PCR)	104
나. 결과	104
(1) 혈청 인자들에 대한 미나리 발효액의 전처리 영향	104
(2) 조직학적 평가	106
(3) RT-PCR에 의한 mRNA 발현변화	107
제 4 절 기능성 음료제조용 개다래와 생강의 초임계 추출물 제조 기술 개발	109
1. 개다래의 초임계 추출 최적화 조건 설정	109
가. 시료 및 실험 방법	109
(1) 초임계 추출	109

(2) 개다래와 개다래박의 열수 및 주정추출	109
(3) 일반성분	109
(4) 유리아미노산	109
(5) 유리당	110
(6) SDE법에 의한 휘발성 향기성분의 추출	110
(7) 휘발성 향기성분의 분석	110
(8) 개다래 및 개다래 박 추출물의 특성 비교	110
(가) 총 폴리페놀 함량	110
(나) 총 플라보노이드 함량	110
(다) 항산화력	111
(9) 묘사분석 및 기호도 평가	111
나. 결과	111
(1) 개다래의 초임계 추출 수율	111
(2) 개다래 및 개다래 박의 성분 비교	112
(3) 개다래 및 개다래 박 추출물의 특성 비교	114
(4) 묘사분석 및 기호도 평가	114
2. 생강의 초임계 추출 최적화 조건 설정	115
가. 시료 및 실험 방법	115
(1) 초임계 추출	115
(2) 색도	116
(3) 유동 특성	116
(4) Gingerol 함량	116
(5) DPPH(2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl) radical 소거능	116
(6) ABTS radical 소거능	116
(7) Linoleic acid와 $\beta$ -carotene의 coupled oxidation에 대한 항산화 활성	117
(8) 휘발성 향기성분의 추출 및 분석	117
나. 결과	117
(1) 생강의 초임계 추출 수율	117
(2) 생강 추출물의 색도 및 외관	117
(3) 생강 추출물의 유동특성	118
(4) 생강 추출물의 gingerol 함량	119
(5) 생강 추출물의 항산화 활성과 Linoleic acid와 $\beta$ -carotene의 coupled oxidation에 대한 항산화 활성	120
(6) 생강 추출물의 휘발성 향기성분	121
3. 생강 추출물 대량생산을 위한 현장적용 시험	124
가. 시료 및 실험 방법	124
나. 결과	124

4. 미나리 당 발효액의 품질특성 -----	127
가. 시료 및 실험 방법 -----	127
(1) 미나리 발효 및 숙성 -----	127
(2) pH 및 적정산도 -----	127
(3) 당도 및 환원당 -----	127
(4) 색도 -----	127
(5) 묘사분석 및 관능검사 -----	127
(6) 아토피 예방용 제품 개발 -----	127
(7) 통계 분석 -----	128
나. 결과 -----	128
(1) 미나리 추출액의 이화학적 특성 -----	128
(2) 색도 -----	128
(3) 미나리 추출액의 관능적 특성 -----	129
제 5 절 천연 발효물을 이용한 기능성 음료 개발 -----	137
1. 개다래와 미나리 발효물을 이용한 음료(75mL, Bot)개발 -----	137
가. 시료 및 실험 방법 -----	137
(1) 소비자 기호도 평가에 의한 배합비 설정 -----	137
(가) 일반성분 검사 -----	137
(나) 1차 기호도 평가 -----	137
(다) 2차 기호도 평가 -----	137
(라) 3차 기호도 평가 -----	138
(마) 최종 기호도 평가 -----	138
나. 결과 -----	138
(1) 소비자 기호도 평가에 의한 배합비 설정 -----	138
(가) 일반성분 분석 -----	138
(나) 1차 기호도 평가 -----	139
(다) 2차 기호도 평가 -----	139
(라) 3차 기호도 평가 -----	141
(마) 최종 기호도 평가 -----	141
2. 천연물 추출 공정도 확립 -----	143
가. 추출조건 확립 -----	143
(1) 대추의 추출조건 확립 -----	143
(2) 감초의 추출조건 확립 -----	144
(3) 혼합단계 -----	145
(4) 살균단계 -----	145
(5) 충전단계 -----	145
3. 제품의 품질변화 실험 -----	145

가. 시료 및 실험 방법	145
(1) 당도측정	145
(2) pH측정	145
(3) 색도측정	145
(4) 갈색도 측정	145
(5) 총 균수 측정	145
(6) 관능평가	145
나. 결과	146
(1) 당도측정	146
(2) pH측정	146
(3) 색도측정	146
(4) 갈색도 측정	148
(5) 총 균수 측정	148
(6) 관능평가	148
4. 품질지표 규명 및 유통기한 예측	149
가. 품질지표 규명 및 유통기한 예측	149
제 4 장    목표달성도 및 관련분야에의 기여도	153
제 1 절 연구개발 착안점 및 달성도	153
1. 연구계획시의 착안점	153
2. 연구시행후의 달성도	154
제 2 절 관련분야 기술발전에의 기여도	155
제 5 장    연구개발 성과 및 성과활용 계획	156
1. 연구개발 성과	156
가. 학술발표	156
나. 논문게재 및 투고	158
다. 특허출원	159
라. 기타(홍보, 시제품 및 상품화 실적)	160
마. 실용화·산업화 계획	163
바. 기술 확산 계획	164
사. 추가연구, 타 연구에의 활용	164
제 6 장    연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	165
제 7 장    참고문헌	166

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 목적

- 개다래, 생강, 미나리의 초임계 추출물과 발효액의 염증 및 알러지 예방 기능과 간 세포 보호 효과 등의 *in vitro*, *in vivo*에서의 정량적 검정과 과학적인 규명
- 시료처리에 따른 다양한 분획물의 염증 및 알러지 예방 효능 비교를 통한 최적의 시료 선정, 기능성 성분의 분리, 정제 및 동정
- 미나리, 개다래, 생강을 활용한 다양한 고부가가치형 염증, 알러지, 간 기능 개선 기능성 소재개발 및 제품 개발

## 제 2 절 연구개발의 필요성

- 알러지, 통풍, 류마티스 관절염 및 기관지 천식 등과 같은 만성 난치성 염증질환의 경우는 세계적으로 많은 약물이 개발되어 사용되고 있으나, 천연물로부터 예방을 위한 기능성식품으로 개발된 제품은 미미한 실정임.
- 대사성 관절염인 통풍의 경우, 다양한 원인으로 인체에 요산이 과량 생산되거나 배설이 저하되어 고요산혈증을 일으키고, 이것이 지속되면 여러 관절이나 조직에 침착하여 관절염을 일으키며 여러 가지 성인병을 동반하여 합병증으로 사망하게 됨. 현재 통풍의 치료제로서 크산틴 산화효소의 저해제로서 하이포크산틴(Hypoxanthine)과 구조가 유사한 알로푸리놀(Allopurinol)과 같은 약물이 사용되고 있으나 피부발진, 위장장애, 골수억제, 가려움증, 구역질, 근육통 등과 같은 심각한 부작용이 있어 안전하고 부작용이 없으면서 통풍을 예방하고 치료할 수 있는 식품 및 치료제의 개발이 요구됨.
- 알러지성 질환은 최근에 세계적으로 가장 급속히 증가하는 질병의 하나로, 미국의 경우 전 인구의 약 20%에서 관찰될 정도로 심각하며 우리나라의 경우 11%가 넘는 어린이가 식품 알러지를 나타내는 것으로 보고되었음. 현재는 식품의 알러지원을 제거하는 방법과 corticosteroid에 의한 치료가 있으나 부작용이 심각함. 천식, 비염, 피부질환 등 다양한 알레르기 반응은 대부분 비만세포를 매개로 일어나므로 비만세포를 매개로 하는 실험이 중요함. 비만세포에서 유리되는 화학성 매개물질에 의해 혈관 확장, 부종 등에 의한 증상이 주로 나타나서 알러지성 피부염의 제증상인 가려움증, 통증, 각질화 등의 증상을 나타냄. 특히 알러지성 질환의 경우 어린이의 유병률이 높는데 특이한 사항은 처음에는 피부염의 형태를 나타내나 차츰 천식을 거쳐 비염질환으로 질환이 유병되어 청소년기에 이르는 양상을 나타내며 진행하므로 지속적인 치료가 요망되는 것이 현실임. 특히 알러지성 질환은 1980년대 이후 아파트보급과 1988년 이후 자동차보급의 비율과 유사한 양상으로 나타나는 등의 급속한 산업화



로 인한 유병률의 증가된 것이 현실이므로 향후 알러지성 질환에 소요되는 국가적 비용이 더욱 증가되는 것이 전망되며 이러한 현실은 국내외를 망라하여 전세계적인 것이 추세임. 따라서 이러한 국내외적인 추세에 부응하고 3종의 자생식물(미나리, 개다래, 생강)의 신시장을 개척하기 위해서 이들의 면역질환 개선효과 중에서도 알러지성 질환에 대한 연구와 이를 제품화로 연결하는 것이 필요함.

- **미나리**는 미나리과에 속하는 다년초 초본으로 습지에서 자생하며 한국, 일본, 중국, 대만, 말레이시아, 인도 등지에 본포하며 한국의 농가에서는 특용작물로 재배하고 있음(Rhee *et al.*, 1993. J Science Education). 미나리는 식품 영양학적으로 보면 플라보노이드 화합물뿐만 아니라(Park *et al.*, 2002. Food Industry Nutrition) 비타민과 칼륨, 칼슘 및 철분이 들어 있는 대표적인 알칼리 식품임(Kim, 2002. J Fd Hyg Safety). 미나리는 수분 93%, 조단백질 2%, 조지질 0.3%, 조회분 0.7%의 일반성분을 포함하고 있으며, 독특한 향기성분인 정유, myristicin 등이 들어 있음(Kim, Yoon. 1999 Kor Soc Hygienic Sciences). 미나리는 독특한 향미 때문에 연한 부분을 채취하여 김치, 나물, 강회 등에 이용되고 있으며(Rhee *et al.*, 1995. Kor J Soc Food Sci) 그 엽경은 한방요법으로 지혈, 정력강장, 보혈, 이뇨, 주독 및 폐렴 등을 치유하는 데 사용되었고, 혈압강하, 해열, 전정, 변비예방, 일사병 및 하혈 등에도 효과가 있는 것으로 기록되고 있음(Park *et al.*, 1993 Kor J Pharmacogn, Mun *et al.*, 1990, J Korean Soc Food Nutr, Lee *et al.*, 2001. Kor J Food Culture). 예로부터 한방에서 간의 보호 등의 효능이 널리 알려져 왔고, 또한 미나리 추출물이 이질균의 생육을 기하는 항균작용(Kim *et al.*, 1993. J Korean Soc Food Nutr)과 황달, 수종, 고혈압(Lee *et al.*, 2001. Kor J Food Culture) 등에 효과가 있다고 알려져 왔으며(Park *et al.*, 1994 J Korean Soc Food Nutr), 이는 뿌리보다 잎이 활성이 더욱 강하다고 보고된 바 있음(Whang *et al.*, 1999. Kor J Medicinal Crop Sci). 재배방법에 따라서는 논에서 재배한 미나리에 비하여 밭에서 재배한 화순 돌미나리에서 가장 높은 활성이 나타났다고 보고되었음(Hwang *et al.*, 1998. J Kor Soc Hort Sci). 또한 미나리는 습지나 물가에서 영양번식을 하므로 생활 폐수가 유입되는 곳에서도 생육에 저해를 받지 않고 잘 자라므로 중금속을 흡수, 제거하는 기능도 가지는 것으로 알려져 있음(Park *et al.*, 1996. Agric Chem Biotechnol). 현재 미나리를 이용한 제품으로는 미나리생즙, 미나리 분말, 미나리 엑기스 등의 1차적인 가공형태로 만들어져 판매되고 있는 경우가 많다. 아토피나 피부건강을 목표로 하여 출시되어 있는 환 형태의 기능성 제품도 있기는 하나 그 효능에 대한 자료가 분명하게 제시되어있지 않고 민간과 한방에서 이야기하는 효능 등을 인용하거나 대중적으로 알려져 있는 효능을 제시한 경우가 대부분인 실정이다. 따라서 미나리를 소재로 가공제품개발로 부가가치를 창출함으로서 국내 미나리 농가소득을 향상시키는 것이 필요함.

- **생강**(*Zingiber officinale Roscoe*)은 생강과(Zingiberaceae) 식물에 속하는 진지버(*Zingiber*)속 아열대성 다년생 식물로서 근경을 주로 식용하며, 기원전 3세기경부터 세계적으로 기호성이 좋은 향신료로 널리 이용되고 있음. 한방에서는 소화불량, 구토, 설사에 효과가 있고, 혈액순환을 촉진하며, 항염증 및 진통효과가 알려져 있음(Yang *et al.*, 2006, 약제학회지). 현재

생강은 편강, 생강즙, 생강분말, 생강차, 생강환 등의 형태로 가장 많이 판매되고 있으며 생강한과나 생강 쿠키의 형태로도 많이 판매되고 있음. 최근에는 생강을 원료로 한 기능성 음료나 생강의 맛과 효능이 첨가된 기능성 초콜릿도 출시되었음. 이 제품들은 일반적으로 피로 회복, 노화방지, 항암작용, 혈액순환촉진, 항염작용 등의 기능을 가진다고 제시되어 있으며 항알레르기나 항아토피의 효능을 목적으로 하는 제품은 현재 없는 것으로 조사되어 다양한 기능성 식품에 적용한 제품 개발이 필요함.

- **개다래**(*Acitiniidia apolygama* PLANCH. et MIXIM.)는 다래나무(미후리)과에 속한 낙엽 덩굴성 식물로서, 열매를 먹을 수 있으며 식용으로 사용가능하지만 혀바닥을 쏘는 듯한 맛이 나고 달지 않아 식품으로 사용하지 못하는 실정임. 독이 없다고 알려진 개다래 열매가 중풍, 구안와사, 냉증, 여성의 허로를 치료하는 효과 외에 특히 염증을 삭이고 통증을 억제하는 효과가 탁월하여 통풍과 류마티스성 관절염 치료에 큰 효험이 있지만 주로 민간 혹은 한방에서만 통풍 치료 목적으로 사용되고 있으므로 항염증 및 항알러지 소재 등 기능성 생물소재로서의 국내 연구가 절대적으로 필요함.

### 1. 기술적 측면

- 알러지에 대한 근본적인 치료법은 없고, 식품 등의 알레르겐을 적극적으로 회피하는 방법 이외에는 이미 발생한 알러지 증상에 대한 적절한 치료법이 개발되어 있지 않음. 현재 시도되는 방법들은 심각한 증상에 한하여 INF- $\gamma$  등의 사이토카인을 투여하기도 하지만, 자칫 전체 면역계의 교란으로 더욱 큰 위험을 초래할 수 있어 그 사용에 매우 신중을 요함.
- 난치성 면역질환인 염증 및 알러지의 예방 자생식물(미나리, 개다래, 생강)의 생체 기능 성분과 효과의 체계적, 과학적인 연구가 자금력, 연구 설비, 관련 기술 등이 부족한 재배농민 및 생산자 단체를 위하여 필요함.
- 현재 단순가공으로 제조되고 있는 지역의 천연물 이용 식품을 건강 기능성이 부여, 입증된 고도 가공 식품으로 개발 및 전환이 전문 연구진에 의하여 필요함.

### 2. 경제 산업적 측면

- 현재 심각한 환자에 한하여 사용되는 사이토카인은 안전성 문제 뿐 아니라, 치료비가 너무 높아 일반인이 쉽게 적용할 수 있는 방법이 아님. 따라서, 알러지 질환자들은 병뿐 아니라 완치 보장 없는 치료에 대하여 높은 의료비를 지불해야하는 이중고에 시달리고 있는 실정임. 미국에서 알레르기 치료비용은 결핵과 에이즈 치료의 합보다 큼.
- 현재 단순가공으로 제조되고 있는 천연소재 이용 식품을, 건강 기능성이 부여, 검증된 부가가치가 높은 고도 가공 식품으로 개발하여, 입법화된 건강기능성 식품의 기본적 요건을 충족하여 환경친화적 고부가가치 산업화의 모델로 추진하는 연구가 필요함.

### 3. 사회 문화적 측면

- 최근 고지방, 고단백 식생활로 인하여 성인병의 발병율이 높고, 환경의 오염과 주거환경의 변화 등으로 인해 난치성 질병이 증가하는 추세임.

- 의료 보험 수가 등, 각종 의료비 부담의 증가가 개인 및 국가 재정적인 측면에서도 공히 범 사회적인 문제로 대두되고 있으며 치료보다 천연물을 이용한 예방의 중요성이 높아지고 있음
- 따라서 국내의 효능이 뛰어난 미나리, 개다래, 생강의 기능성 성분 및 관련 질병 예방의 과학적 구명 연구는 국민의 건강한 생활과 평균수명의 연장, 국민적 의료비 절감, 관련 예산의 절감 등을 도모할 수 있는 중요한 연구임.

### 제 3 절 연구개발의 범위

#### 1. 염증 및 알러지 개선용 기능성제품 개발을 위한 소재 연구

- 개다래의 초임계 추출 부산물 박 에탄올추출물의 알러지 및 염증 개선 효능 연구
- 개다래 초임계 박 추출물의 항염증 활성 성분 규명
- 생강 초임계 추출물의 알러지 및 염증 개선 효능 연구
- 생강 초임계 추출물의 항알러지 기전 연구
- 미나리 발효액의 간 기능 개선에 대한 효능 연구(*in vitro, in vivo*)
- 미나리 발효액의 유효성분 분석

#### 2. 기능성 음료 제조용 개다래와 향신료의 초임계 추출물 제조 기술 개발

- 개다래의 초임계 추출 최적화 조건 설정
- 생강의 초임계 추출 최적화 조건 설정
- 생강 추출물 대량생산을 위한 현장적용시험
- 미나리 당발효액 품질 특성
- 아토피 예방용 제품 개발

#### 3. 천연 발효물을 이용한 기능성 음료 개발

- 개다래와 미나리 발효추출물의 음료개발을 위한 레시피 결정 및 음료제조공정 설계, 시제품 생산
- 생강과 미나리 발효추출물의 음료개발을 위한 레시피 결정 및 음료제조공정 설계, 시제품 생산
- 생강과 미나리를 이용한 발효음료 개발을 위한 레시피 결정 및 제품 생산

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 해외

- 독일 라이프니츠 천연물 연구소 연구진은 버섯에서 관절염과 통풍 치료 효과가 있는 이노틸론(Inotilone) 화합물을 분리하였음(NDSL, 동향 분석, 2006-7-8).
- 미국 농업 연구청(Agricultural Research Service, ARS) 산하 영양 연구센터(Western Human Nutrition Research Center)에서는 체리에 의해 혈액 내 요산(uric acid)의 농도가 상당량 감소됨으로써 체리가 통풍 및 염증에 효과가 있음을 보고함(NDSL, 동향 분석, 2004-5-11).
- Chinese herb의 flavonoids, ellagitannins, anthraquinones 등은 iNOS와 COX-2 유전자의 발현을 억제함으로써 염증에 효과가 있다고 보고됨.
- 1988년 S. Qureshi 등이 최음제와 성적 장애에서의 생강의 작용을 연구.
- 1891년 N. Shoji 등이 생강의 methanol 추출물이 기니아피의 심장에서 심근의 수축력을 증가 시키는 것을 입증함.
- 1989년 S. Holtmann 등이 차멀미 구역질에 대한 생강의 기전 연구.
- 1990년 새로운 항구토제로서의 생강에 대해 M. E. Bone 등이 연구한 바 특히 부인과 수술 후의 구토 및 오심에 효과가 있음을 밝힘.
- 미국 국립 보건국은 실험쥐를 통한 실험을 통하여 생강과의 꽃을 피우는 식물인 심황이 관절염 증상의 완화에 도움이 된다는 연구결과를 발표.
- 진통 및 소염 활성을 갖는 개다래나무(*Acitindia apolygama* PLANCH. et MIXIM.)의 추출 물을 함유하는 약학 조성물 및 건강보조식품이 개발됨.
- Yoshizawa 등은 일본 북부지방에서 자라는 나무 중 작은 열매를 맺는 나무들의 열매즙을 이용하여 암세포 억제활성을 검색한 결과 개다래가 탁월한 억제활성을 나타냄을 보고.
- 개다래 열매로부터 분리한 Linoleic acid는 *in vivo*, *iv vitro*에서 항염증 활성을 가짐.

### 제 2 절 국내

- 미나리에 관한 연구는 미나리의 계통, 형태학적 분류, 단백질 및 아미노산 조성, 향기성분 등에 대한 연구가 보고되어 있음.
- 민간과 한방에서는 미나리 엽경이 혈압강하, 고혈압, 수종, 변비, 일사병, 이뇨 등에 효과가 알려져 있다.
- 미나리를 실험재료로 사용하여 생쥐를 이용한 항염증 및 진통작용에 대한 연구

- 미나리의 비타민, steroid 및 flavonoid 성분, 단백질 또는 아미노산 조성 등의 보고와 최근 미나리 methanol 추출물이 토끼에서 사염화탄소에 의해 유발된 간기능 손상 완화에 효과가 있음을 밝힌 보고가 있음.
- 생강의 성분으로는 전분이 전체의 40~60%를 차지하고, 방향신미성분, 수지 단백질, 섬유소, 펙토산, 무기질 등이 있으며 정유인 zingiberol, zingiberone, zingiberene과 신미성분인 gigerone, gingerol, shogaol, dihydrogingerol, 방향성분인 citral, camphene 등 40여 종이 알려져 있음. 생강 뿌리의 주성분으로는 curcuminoid, flavonoid glycoside, sesquiterpenoid 및 polyphenol 등이 보고되어 있음. 활성에 관한 연구로서는 항산화 작용, 항염증 작용, 살충 작용 및 자궁 이완 작용이 보고되었으며, 생강의 뿌리의 성분에 관한 연구에서는 phenylbutenoid 및 curcuminoid가 보고되었음(김은정 외 1명, KOREA J. SOC. FOOD SCI., 1993).
- 생강은 아열대 및 열대성 다년생 식물로서 근경을 주로 식용하며, 그 특유한 향기와 매운맛으로 인하여 오랫동안 향신료로서 사용되고 있다. 생강의 주요 성분으로는 hydrocarbon류, ketone류, alcohol류 등의 종류 성분과 zingiberene,  $\alpha$ -cadinene 등의 향기 성분 등이 있으며, 특히 정유 성분 중 생강의 매운맛의 주성분인 6-gingerol은 항산화 및 항염증의 특성을 가진 것으로 알려져 있음 (류혜숙, Korean J. Food Nutr. 2007).
- 생강의 생리활성 성분은 항균 작용, 항염 작용, 혈청 콜레스테롤 저하, 항산화 작용을 나타내는 것으로 보고되고 있으며, 한방에서 건위제 및 발한제로 사용되고 있음.
- 생강의 면역과 관련된 연구로는 생강의 oleoresin, gingerol, shogaol 분획이 자연 살해 세포 기능을 활성화시켜 면역능 증진에 효과가 있는 것으로 보고되어 있음(류혜숙, Korean J. Food Nutr. 2007).
- 식물 혼합(고들빼기, 돌미나리, 메밀, 톳, 생강) 물 추출물은 비장세포 증식능과 복강 대식세포에 의한 사이토카인 분비능을 상승시킴으로서 면역 기관의 주요 기능을 증진시킴.
- 개다래 에탄올 추출물은 실험적으로 유도된 고요산혈증 질환모델 쥐에서 유의하게 혈중 요산치를 낮추어 주었으며, 이러한 활성은 지용성 분획인 에테르 분획에서 이송되었음이 보고되어 있음(강효주 외 3명, 약학회지, 2003).
- 항통풍 활성을 갖는 개다래 추출물을 함유하는 약학 조성물 및 진통 및 소염 활성을 갖는 개다래 나무의 추출물을 함유하는 조성물이 보고되어 있음.
- 장생홍도라지 열수추출물은 크산틴 산화효소(Xanthine oxidase)의 활성을 저해하여 혈중 요산의 농도를 낮추어 통풍을 부작용 없이 안전하게 예방하고 치료하는 의약품 또는 기능성 식품소재로 유용함.
- 크산틴 산화효소의 활성을 저해하는 효과가 있는 부추 추출물은 통풍의 예방 및 치료를 위한 의약품과 건강기능식품의 소재로 유용함.
- 현재 통풍의 치료제로서 크산틴 산화효소의 저해제로서 하이포크산틴(Hypoxanthine)과 구조가 유사한 알로퓨리놀(Allopurinol)과 같은 약물이 사용되고 있으나 피부발진, 위장장애, 골수억제, 가려움증, 구역질, 근육통 등과 같은 심각한 부작용이 있어 안전하고 부작용이 없으면서 통풍을 예방하고 치료할 수 있는 식품 및 치료제의 개발이 요구됨.

- 면역반응이 과도하게 활성화되어 나타나는 과민성 질환이나 만성 염증 등 난치성 질환에는 현재 특별한 치료제가 개발되어 있지 못하여 대개 대중적인 치료약물을 반복 사용하거나 기존 약물을 혼용 및 교체하면서 사용하는 실정임.
- 현재까지 알려진 항염증 활성이 있는 천연물은 배초향(*Agastache rugosa*, Labiatae) 뿌리 성분인 caffeic acid methyl ester, rosmarinic acid methyl ester, rosmarinic acid, 오미자(*Schizandrae Fructus*, Schzandraceae)의 phytosterol 혼합물과 citrostadienol, 소목(*Caesalpiniae sappan* L. Legminosae)의 physterol과 brazilein, brazilin, protosappanin A, E가 알려져 있음. 또한 신이(*Magnolia Flos* Magnoliaceae)의 demethoxyaschantin, aschantin, fargesin, pinoresinol dimethyl ether, magnolin, liroresinol-B dimethyl ether 및 (+)-epimagnolin A가 보고되어 있으며, 인동(*Lonicera japonica*)의 flavonoid들과 hederagenin 배당체인 loniceroside A, B, 뽕나무, 당귀, 원방풍, 은행엽 및 죽염에 대한 항염증 작용이 보고되어 있음. 또한, 황금의 flavonoid인 wogonin은 피부염을 억제하고 COX-2와 iNOS 발현을 감소시킴.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 개다래 초임계 박 추출물의 알러지 및 염증 개선 효능 연구

#### 1. 개다래의 추출 조건에 따른 분획의 효능 비교

##### 가. 시료 및 실험 방법

##### (1) 개다래의 열수 및 주정 추출

열수 추출은 시료의 20배에 해당하는 증류수를 넣고 90℃에서 1시간 동안 추출하였으며, 주정추출은 시료의 20배에 해당하는 70% 주정을 넣고 상온에서 24시간 2회 추출하여 여과지 (Watman No. 1)로 여과한 후 여액을 동결 건조하여 시료로 사용하였다.

##### (2) 초임계 추출 및 개다래 박의 주정 추출

개다래의 정유 성분을 표 1에 표기한 추출 조건으로 추출하였으며, 그 중 45℃, 4500 psi, 1시간에서 개다래를 초임계 추출 후 남는 박을 시료로 하여 시료 중량의 20배에 해당하는 70% 에탄올 (식용주정)을 플라스크에 넣은 후, 상온에서 24시간 2회 추출하였다. 추출물은 여과 후, 동결건조 시켰다.

##### (3) 세포배양 및 세포 독성 측정

대식세포 계열 (murine macrophage cell line)인 RAW 264.7 세포주는 한국 세포주 은행 (KCLB, Seoul, Korea)으로부터 분양받았으며, 10% FBS (fetal bovine serum)와 1% antibiotics (penicillin/streptomycin)를 첨가한 DMEM 배지를 이용하여 5% CO<sub>2</sub>가 존재하는 37℃ incubator에서 1주일에 2~3회 계대 배양하였다. 세포 독성을 MTT 법으로 측정하기 위하여, RAW 264.7 세포  $1 \times 10^5$  cells/well을 96 well plate에 분주하고, 37℃, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 배양한 세포를 serum free 배지로 교체한 후 LPS (100 ng/mL)와 시료를 각각 처리하여 24시간 배양하여 5 mg/mL의 MTT 용액 10  $\mu$ L를 각 well에 넣고 incubator에서 4시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후 상등액을 제거하고 각 well에 100  $\mu$ L의 DMSO를 첨가하여 생성된 formazan 결정을 용해시켜 microplate reader로 550 nm에서 흡광도를 측정하였고, 세포독성은 시료의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다.

Rat 유래의 비만세포주(RBL-2H3)에 대한 세포독성능도 MTT 법으로 실험하였다. 본 실험에 사용한 세포주 RBL-2H3 cell은 한국 세포주 은행(Seoul, Korea)을 통해서 분양 받아 계대배양하면서 실험하였다. 세포배양에 사용된 배지는 10% FBS (fetal bovine serum)와 1% antibiotics (penicillin/streptomycin)를 첨가한 MEM 배지를 이용하여 37℃에서 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 2~3일간 배양한 후 사용하였다.

##### (4) Nitric oxide (NO) 생성량 측정

시료의 NO생성 억제능을 측정하기 위하여, 각 시료의 추출물과 LPS를 처리한 배양액을

nitrite 측정을 위해 100  $\mu$ L를 96 well plate에 취하였다. 여기에 동량의 Griess 시약을 넣어 10 분간 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite의 농도는 sodium nitrite( $\text{NaNO}_2$ )를 사용하여 얻은 표준 직선과 비교하여 산출하였고, 산출 값은 3회 반복한 실험 data의 mean  $\pm$  SEM 값으로 나타내었다.

#### (5) $\beta$ -Hexosaminidase 방출 억제능 측정

비만세포주 RBL-2H3을 1 ml( $2 \times 10^5$  cells, 24 well plate)에 anti-DNP IgE( $0.45 \mu\text{g/ml}$ )로 16 시간 감작시키고, DNP-BSA( $10 \mu\text{g/mL}$ )로 활성화시키기 전에 30분 동안  $37^\circ\text{C}$ 에서 농도별 시료를 20 ml 처리하였다. 반응이 끝난 후  $4^\circ\text{C}$ 에서 10분간 400 xg에서 원침하여 얻은 상등액 25  $\mu$ L를 기질 p-nitrophenyl-N-acetyl-b-D-glucosaminide 25  $\mu$ L와  $37^\circ\text{C}$ 에서 1시간 반응시킨 후 stop solution( $0.1 \text{ M NaCO/NaHCO}$ , pH 10) 200  $\mu$ L를 가하여 정지시키고 405 nm에서 흡광도를 측정하여  $\beta$ -hexosaminidase의 양을 계산하였다.

### 나. 결과

#### (1) RAW 264.7 cell에 대한 세포독성 측정 및 Nitric oxide (NO) 생성량 측정

활성질소종(reactive nitrogen species)의 하나이며, 염증반응의 중요한 작용인자로 알려진 NO에 대한 소거활성을 알아보기 위해 각각 18가지의 초임계 오일 및 박 추출물을 처리한 결과, 오일 추출물은  $500 \mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 28~77%의 소거활성을 보였으며, 특히 11, 12, 13, 14에서 70% 이상의 높은 소거율을 보였다. 또한 박 추출물은  $100 \mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 60~86%의 소거율을 보여 초임계 오일 추출물에 비해 우수한 NO 소거활성을 가지는 것으로 나타났다 (Table 1).

Table 1. Effects of SFE (oil and marc ext.) from *Actinidia polygama* Max. on cytotoxicity and LPS-induced NO production in RAW 264.7 cells

Oil (500 $\mu\text{g/mL}$ )	Cell Survival rate (%)	NO Inhibition rate (%)*	Marc ext. (100 $\mu\text{g/mL}$ )	Cell Survival rate (%)	NO Inhibition rate (%)
1	79.64 $\pm$ 17.49	56.06 $\pm$ 2.25	1	96.59 $\pm$ 1.05	76.72 $\pm$ 7.48
2	89.65 $\pm$ 2.64	41.38 $\pm$ 5.53	2	92.23 $\pm$ 0.87	77.25 $\pm$ 5.56
3	95.83 $\pm$ 2.75	28.49 $\pm$ 2.91	3	93.37 $\pm$ 0.50	80.07 $\pm$ 2.83
4	97.77 $\pm$ 1.13	50.52 $\pm$ 3.36	4	96.63 $\pm$ 3.09	69.83 $\pm$ 9.56
5	105.00 $\pm$ 0.64	59.30 $\pm$ 2.62	5	93.99 $\pm$ 1.14	62.92 $\pm$ 6.24
6	101.07 $\pm$ 0.50	62.87 $\pm$ 2.23	6	93.04 $\pm$ 2.06	65.39 $\pm$ 4.93
7	93.72 $\pm$ 10.76	69.72 $\pm$ 3.02	7	97.43 $\pm$ 2.68	78.76 $\pm$ 4.57
8	98.21 $\pm$ 1.11	58.13 $\pm$ 4.27	8	94.69 $\pm$ 4.53	66.32 $\pm$ 4.20
9	73.90 $\pm$ 22.74	67.90 $\pm$ 3.24	9	94.49 $\pm$ 1.50	74.09 $\pm$ 5.10
10	91.58 $\pm$ 1.40	49.78 $\pm$ 5.00	10	99.92 $\pm$ 0.78	78.43 $\pm$ 2.86
11	102.72 $\pm$ 2.23	72.30 $\pm$ 0.56	11	98.17 $\pm$ 1.71	70.58 $\pm$ 3.35
12	101.73 $\pm$ 1.92	70.92 $\pm$ 3.41	12	96.03 $\pm$ 1.26	64.90 $\pm$ 2.75
13	103.24 $\pm$ 1.25	77.14 $\pm$ 5.59	13	93.49 $\pm$ 2.08	83.34 $\pm$ 8.74
14	101.99 $\pm$ 0.23	74.96 $\pm$ 2.88	14	92.67 $\pm$ 1.05	73.57 $\pm$ 2.88
15	105.74 $\pm$ 0.31	55.05 $\pm$ 3.57	15	100.26 $\pm$ 3.64	74.88 $\pm$ 6.25
16	102.44 $\pm$ 0.88	44.84 $\pm$ 1.83	16	99.65 $\pm$ 2.12	60.50 $\pm$ 0.52
17	96.87 $\pm$ 4.15	48.13 $\pm$ 4.60	17	100.70 $\pm$ 0.76	74.93 $\pm$ 3.97
18	100.97 $\pm$ 1.64	64.14 $\pm$ 2.23	18	98.99 $\pm$ 4.55	86.65 $\pm$ 5.87

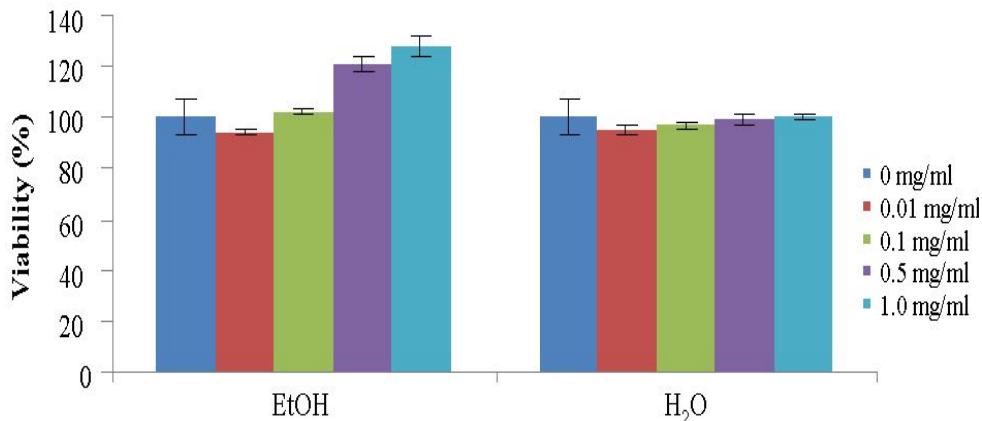
\*The culture supernatants were isolated and analyzed for nitrite levels. Data represent the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments (n=3).



## (2) RBL-2H3 cell에 대한 세포독성

시료로 사용된 개다래 열수, 에탄올 추출물과 초임계추출 오일 분획에 대한 세포 독성을 세포에 12시간 처리하여 측정한 결과, 시료들의 10-1000  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도 구간에서 비만세포주에 독성을 나타내지 않았다(Fig. 1).

A.



B.

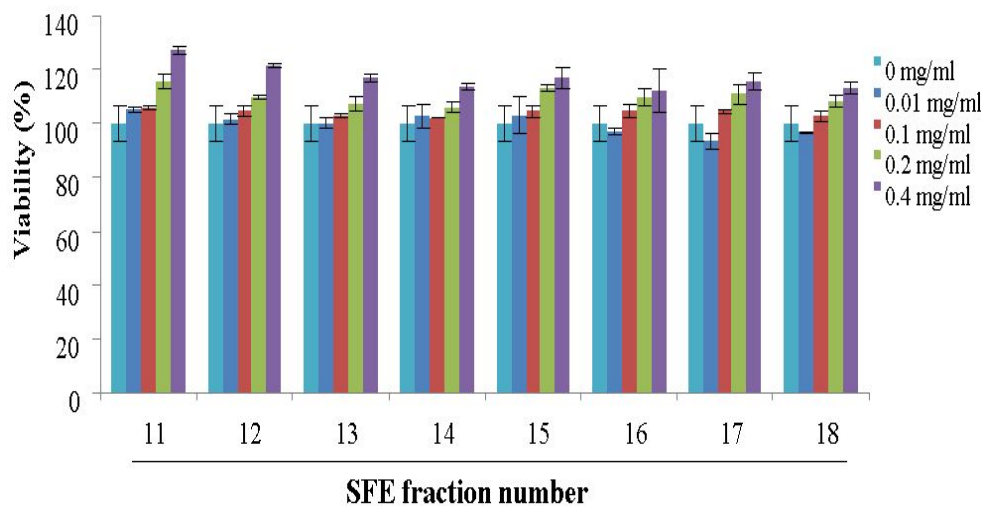
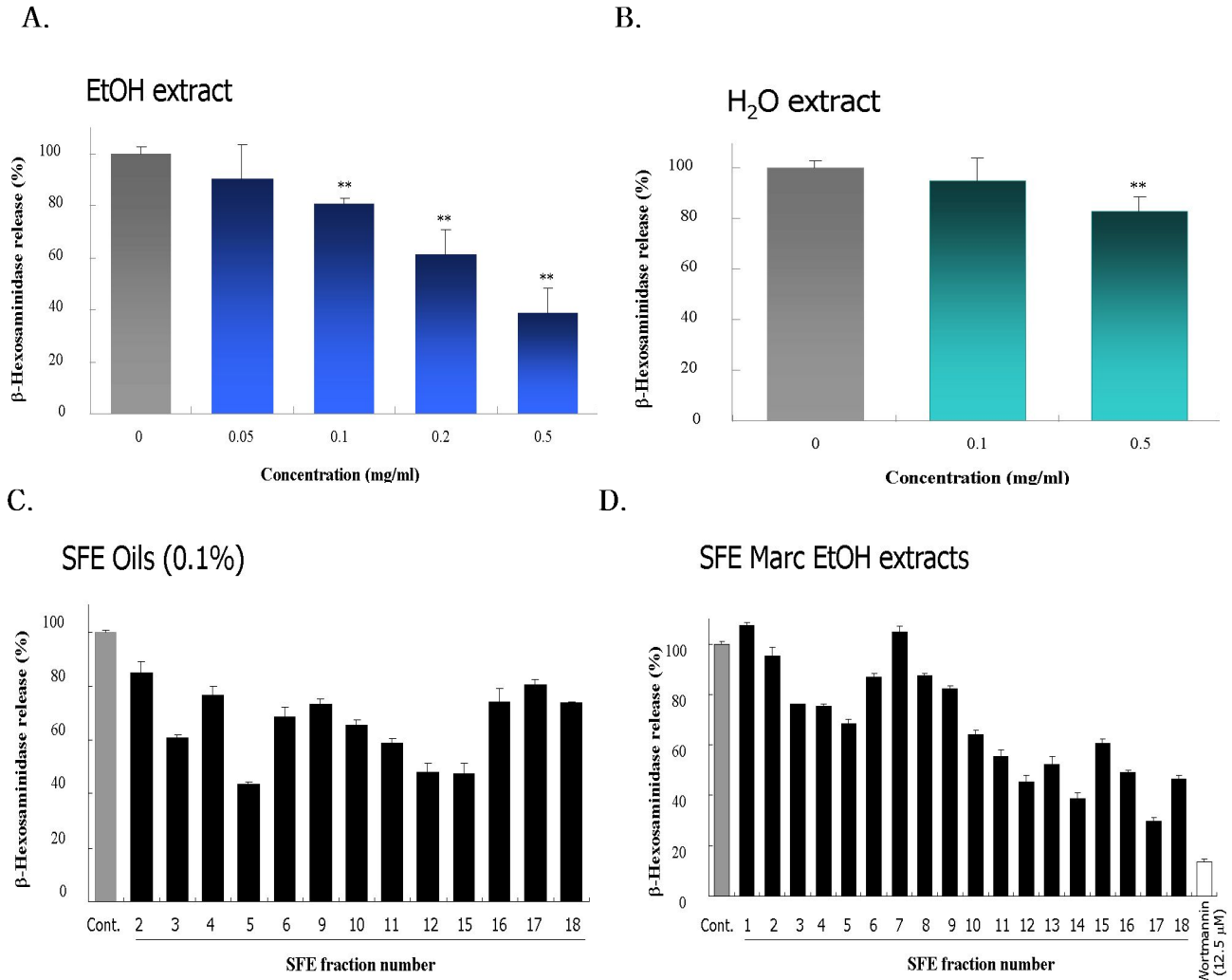


Fig. 1. Cytotoxic effect of the extracts of water (H<sub>2</sub>O), ethanol (EtOH) and EtOH of the Supercritical Fluid Extraction marc. RBL-2H3 cells ( $3 \times 10^4$  cells) were cultured overnight, and after treatment with varying doses of sample extracts, cells were cultured for 12 h. The cytotoxicity on RBL-2H3 cells was determined by MTT assay. The value represents mean  $\pm$  SD of three different experiments.

## (3) $\beta$ -Hexosaminidase 방출 억제능 측정

시료들의 항알러지 효능을 비교하기 위하여, 알러지 반응 시 비만세포의 히스타민과 함께 방출되어 히스타민 증가에 대한 마커효소로 사용되는  $\beta$ -hexosaminidase를 측정하여 시료의 억제 활성을 측정하였다. 개다래의 주정 추출물의 경우, 10-500  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서  $\beta$ -hexosaminidase의 활성을 농도의 존적으로 억제하였으나, 열수 추출물은 거의 효과를 나타내지 않았다. 또한, 초임계추출 오일을 0.1% 농도로 DMSO로 희석하여 활성을 테스트한 결과, 35 $^{\circ}\text{C}$ , 45 $^{\circ}\text{C}$ 에서는 고압에서 추출한

오일에서 억제 활성이 높았으며, 55℃에서는 마일드한 압력 조건에서도 활성이 높게 나타났다 (Fig. 2). 초임계 박 추출물 분획의 억제 효과는 고온에서 오일이 추출된 후의 박에서 강한 억제 활성이 나타났다. 위의 결과에서 추출조건으로 선정된 45℃, 4500 psi에서 1시간 추출한 박의 경우도 높은  $\beta$ -hexosaminidase 억제 활성을 나타냈다.



**Fig. 2.** Inhibitory effects of  $\beta$ -hexosaminidase release from RBL-2H3 cells induced by IgE with DNP-BSA. RBL-2H3 cells ( $2 \times 10^5$  cells) were sensitized with 450 ng/mL of DNP-specific IgE overnight. The cells were pretreated with the EtOH, H<sub>2</sub>O extracts (0.05-0.5 mg/mL) of *A. polygama* and the oils (0.1%) or the marc (0.1 mg/mL) of SFE extract for 10 min. Cells were stimulated with 10  $\mu$ g/mL of DNP-BSA for 10 min. The degranulation was determined by measurement of the activity of  $\beta$ -hexosaminidase in culture media. The value represents mean  $\pm$  SD of three different experiments. 2.14  $\mu$ g/mL wortmannin (WM) was used as a positive control. \*Values are significantly different from control (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

## 2. 개다래 및 개다래 박 추출물의 항염증 효과

### 가. 시료 및 실험 방법

#### (1) 세포주 배양

RAW 264.7 세포를 10% FBS(fetal bovine serum)와 1% antibiotics(penicillin/ streptomycin)를 첨가한 DMEM 배지를 이용하여 5% CO<sub>2</sub>가 존재하는 37°C incubator에서 1주일에 2~3회 계대 배양하였다.

## (2) 세포독성 측정 및 NO 생성량 측정

개다래 주정 및 초임계 추출 오일, 박 추출물의 세포독성을 측정하기 위해 MTT (3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide) assay를 실시하여 측정하였다. RAW 264.7 세포  $1 \times 10^5$  cells/well을 96 well plate에 분주하고, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 배양한 세포를 serum free 배지로 교체한 후 LPS(100 ng/mL)와 시료를 각각 처리하여 24시간 배양하여 5 mg/mL의 MTT 용액 10 µL를 각 well에 넣고 incubator에서 4시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후 상등액을 제거하고 각 well에 100 µL의 DMSO를 첨가하여 생성된 formazan 결정을 용해시켜 microplate reader로 550 nm에서 흡광도를 측정하였고, 세포독성은 시료의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다.

시료의 NO 생성 억제능을 측정하기 위하여, 각 시료의 추출물 혹은 LPS를 처리한 배양액을 nitrite 측정을 위해 100 µL를 96 well plate에 취하였다. 여기에 동량의 Griess 시약을 넣어 10 분간 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite의 농도는 sodium nitrite(NaNO<sub>2</sub>)를 사용하여 얻은 표준 직선과 비교하여 산출하였다.

염증반응이 일어나면 여러 가지 염증인자들(proinflammatory mediators)이 만들어지는데, 염증인자에는 inducible nitric oxide synthase(iNOS)에 의해서 만들어지는 nitric oxide(NO)와 cyclooxygenase-2(COX-2)에 의해서 만들어지는 prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>) 등이 있다. 이러한 염증 인자는 염증반응의 전사인자인 nuclear factor-κB(NF-κB)를 활성화시키며, 그 결과 과량의 NO와 PGE<sub>2</sub>를 생성하여 염증을 일으킨다. 또한 염증인자로 염증성 사이토카인(proinflammatory cytokines)인 tumor necrosis factor-α(TNF-α), interleukin-1β(IL-1β) 등이 포함된다.

## (3) PGE<sub>2</sub> 및 TNF-α 생성량 측정

세포 배양액 내의 PGE<sub>2</sub> 양을 측정하기 위해 commercial competitive enzyme immunoassay kit를 Cayman chemical(Michigan, USA)에서 구입하여 실험하였다. 각 시료의 추출물 혹은 LPS를 처리한 배양액을 이용하여 PGE<sub>2</sub> 측정에 사용하였다. 배양액을 goat anti-mouse로 coating된 96 well plate에 각각 50 µL씩 loading하고, 여기에 primary antibody solution 50 µL와 PGE<sub>2</sub> conjugate 50 µL씩 첨가하여 4°C에서 overnight 반응시켰다. Washing buffer로 4회 세척하고 substrate solution을 200 µL씩 처리하여 5-60분간 반응시킨 후, 50 µL의 stop solution을 처리한 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한, 세포 배양액 내의 cytokines의 양을 측정하기 위해 Enzyme-Liked Immunosorbent Assay(ELISA)를 수행하였다. 각 시료의 추출물 혹은 LPS를 처리한 배양액을 이용하여 TNF-α 측정에 사용하였다. 배양액을 적절한 농도로 희석한 후, cytokine으로 coating된 96 well plate에 50 µL씩 첨가하여 4°C에서 overnight시켰다. Washing buffer로 3회 세척한 다음, 100 µL의 streptavidine-HRP solution을 처리하여 1시간 동안 상온에서 반응시킨 후 다시 washing buffer로 3회 세척하였다. 여기에

di(2-ethylhexyl)-2,4,5- trimethoxybenzalmalonate(TMB) substrate를 100  $\mu$ L씩 처리하여 5-30 분간 반응시킨 후 100  $\mu$ L의 stop solution을 처리한 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 나. 결과

##### (1) 세포독성 측정 및 Nitric oxide(NO) 생성량 측정

개다래 초임계 추출한 18가지 오일과 박 추출물 대한 NO 생성 억제능을 측정한 결과 45℃, 4500 psi에서 1시간 추출한 박은 NO 소거활성이 비교적 우수하였으며 추출수율이 가장 높았으므로, 이 조건으로 얻은 박 추출물(초임계 박)의 NO 소거활성을 개다래 주정 추출물의 효능과 비교하였다. 그 결과, 주정 추출물을 10, 100  $\mu$ g/mL의 농도로 처리하였을 때 NO 생성량은 각각 42.93, 36.45  $\mu$ M을 나타내 NO 소거활성이 미미한 편이었으나, 초임계 박의 경우, 각각 28.97, 13.45  $\mu$ M을 나타내 각 농도에서 약 36, 70%의 우수한 NO 소거활성을 보였다. 따라서 개다래는 주정 추출물에 비해 초임계 추출물의 박 추출물이 우수한 NO 소거능을 가지는 것으로 나타났다. 또한 이들 농도에서 95% 이상의 세포 생존율을 보여 개다래 추출물의 항염증 효과는 세포 생존율의 감소와는 관계없음을 보여준다(Table 2).

Table 2. Effects of ethanol extract and SFE (marc extract) from *Actinidia polygama* Max. on cytotoxicity and LPS-induced NO production in RAW 264.7 cells

Sample	Concentration ( $\mu$ g/mL)	Cell survival rate (%)	NO inhibition rate (%) <sup>*</sup>
EtOH ext.	10	95.32 $\pm$ 5.06	4.61 $\pm$ 0.91
	100	102.73 $\pm$ 0.28	19.00 $\pm$ 2.34
Marc ext.	10	96.18 $\pm$ 4.23	36.63 $\pm$ 4.00
	100	98.17 $\pm$ 1.71	70.58 $\pm$ 3.35

\*The culture supernatants were isolated and analyzed for nitrite levels.

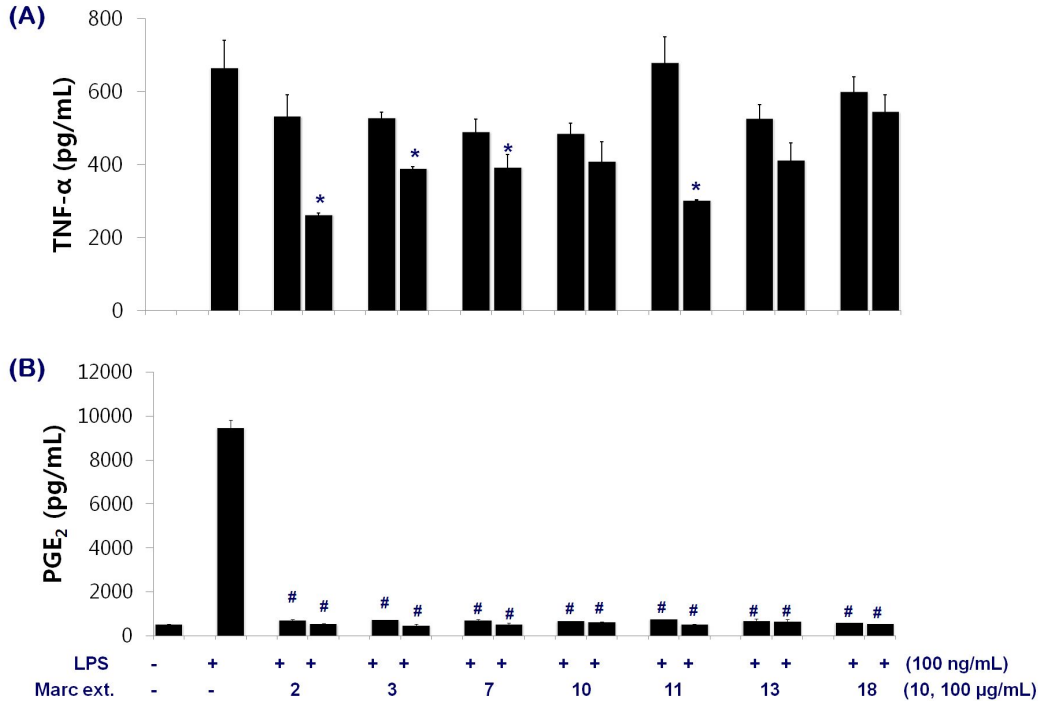
Data represent the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments (n=3).

##### (2) PGE<sub>2</sub> 및 TNF- $\alpha$ 생성량 측정

초임계 박추출물이 TNF- $\alpha$ 와 PGE<sub>2</sub>의 생성량에 미치는 영향을 측정하기 위해 NO 소거활성이 우수했던 개다래 박 추출물 2, 3, 7, 10, 11, 13, 18을 각각 10, 100  $\mu$ g/mL로 처리한 결과, LPS 처리시에 TNF- $\alpha$ 는 효과적으로 유도되었으며, 개다래 박 추출물을 처리했을 때, 10  $\mu$ g/mL의 농도에서는 별다른 영향을 미치지 못했으나, 박 추출물 2, 3, 7, 11의 100  $\mu$ g/mL의 농도에서는 TNF- $\alpha$ 의 생성을 약 50% 이상 감소시켰다(Fig. 3). 또한 RAW 264.7 세포에 100 ng/mL의 LPS를 처리했을 때, PGE<sub>2</sub>의 생성량은 약 20배 증가되었으며, 처리한 박 추출물 모두에서 높은 PGE<sub>2</sub> 생성 억제력을 보였다(Fig. 3).

염증은 외부 자극에 대한 생체조직의 방어반응의 하나로, 임상적으로는 발적, 발열, 종창, 통통, 기능장애 등의 증상이 나타나며, cytokines, PGE<sub>2</sub>, lysosomal enzyme, free radical 등 다양

한 매개물질이 관여하고 있다. RAW 264.7 세포주에 개다래 초임계 박 추출물을 처리하고, LPS를 처리하여 염증을 유발한 후 염증인자인 NO, PGE<sub>2</sub>의 생성, 그리고 proinflammatory cytokines인 TNF- $\alpha$ 의 생성량을 측정한 결과, 개다래 박 추출물은 LPS로 유도된 염증 인자들을 효과적으로 감소시키는 것으로 나타나 동맥경화를 비롯한 고혈압, 암, 당뇨, 관절염 등의 만성 염증성 질환의 예방과 치료에 효과적으로 적용할 수 있을 것으로 생각된다.



**Fig 3.** Effects of SFE (oil and marc ext.) from *Actinidia polygama* Max. on LPS-induced TNF- $\alpha$  (A) and PGE<sub>2</sub> (B) levels in RAW 264.7 cells. The culture supernatants were isolated and analyzed for TNF- $\alpha$ , PGE<sub>2</sub> levels. Data represent the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments (n=3). \*P<0.05, #P<0.001 when compared with the groups treated with LPS (100 ng/mL) alone.

### 3. 개다래 및 개다래 박 추출물의 항알러지 효과

#### 가. 실험 방법

##### (1) 세포배양 및 세포독성 측정

Rat 유래의 비만세포(RBL-2H3)에 대한 세포독성능 측정은 MTT 법으로 실험하였다. 본 실험에 사용한 세포주 RBL-2H3 cell은 한국 세포주 은행(Seoul, Korea)을 통해서 분양 받아 계대배양하면서 실험하였다. 세포배양에 사용된 배지는 10% FBS(fetal bovine serum)와 1% antibiotics(penicillin/streptomycin)를 첨가한 MEM 배지를 이용하여 37℃에서 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 2~3일간 배양한 후 사용하였다.

##### (2) $\beta$ -Hexosaminidase 방출 억제능 측정

비만세포주 RBL-2H3을 1 ml (2 x 10<sup>5</sup> cells, 24 well plate)에 anti-DNP IgE(0.45 mg/ml)로 16시간 감작시키고 DNP-BSA(10 mg/ml)로 활성화시키기 전에 30분 동안 37℃에서 농도별 시

료를 20 ml 처리하였다. 반응리하끝난 후 4℃에서 10분간 400 xg에서 원침하여 얻은 상등액 25 ml를 기질 *p*-nitrophenyl-N-acetyl-b-D-glucosaminide 25 ml와 37℃에서 1시간 반응한 후 stop solution(0.1 M NaCO/NaHCO, pH 10) 200 ml를 가하여 정지시키고 405 nm에서 흡광도를 측정하여  $\beta$ -hexosaminidase의 양을 계산하였다.

### (3) Compound 48/80에 의한 탈과립에 대한 보호효과

시료의 탈과립 억제효과를 비만세포의 형태변화 관찰로 확인하기 위하여, RBL-2H3을 1 ml ( $2 \times 10^5$  cells, 24 well plate)에 4시간 배양한 후, 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ 을 함유하는 200 ml incubation buffer에서 10분간 incubation 한 후, 0.1% DMSO 용액이나 농도별 시료 25 ml를 각각 넣어 37℃에서 10분간 반응시켰다. 반응 후, compound 48/80 용액 25 ml를 첨가하여 20, 40분간 반응시켰다. 반응 후, 광학현미경상으로 비만세포주의 형태를 600배의 배율 하에서 세포를 도립 현미경(LEICA DMIRE2, Germany)으로 관찰하였다. 200배의 배율 하에서 전체적인 탈과립 정도를 확인하였으며, 3회 실험으로 재현성을 확인하였다.

### (4) TNF- $\alpha$ 생성 억제능 측정

RBL-2H3 세포를 24-well plate( $2 \times 10^5$  cells/well)에 분주한 후 12시간 배양하였다. 새로운 MEM 배지에 시료를 농도별로 처리하고, A23187(1  $\mu\text{M}$ )과 PMA(50 ng/mL)를 처리하여 4시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 상층액을 분리하여 -70℃에 보관하였다가 TNF- $\alpha$  ELISA kit를 사용하여 측정하였다. ELISA reader를 사용하여 450nm에서 흡광도를 측정하여 생성된 TNF- $\alpha$ 의 양을 계산하였다.

## 나. 결과

### (1) 세포독성

개다래 주정추출물과 박주정추출물을 IgE와 antigen으로 활성화시킨 세포에 12시간 처리하여 시료의 세포독성을 측정한 결과, 10-400 mg/ml의 농도 구간에서 비만세포주에 독성을 나타내지 않았다(Fig. 4).

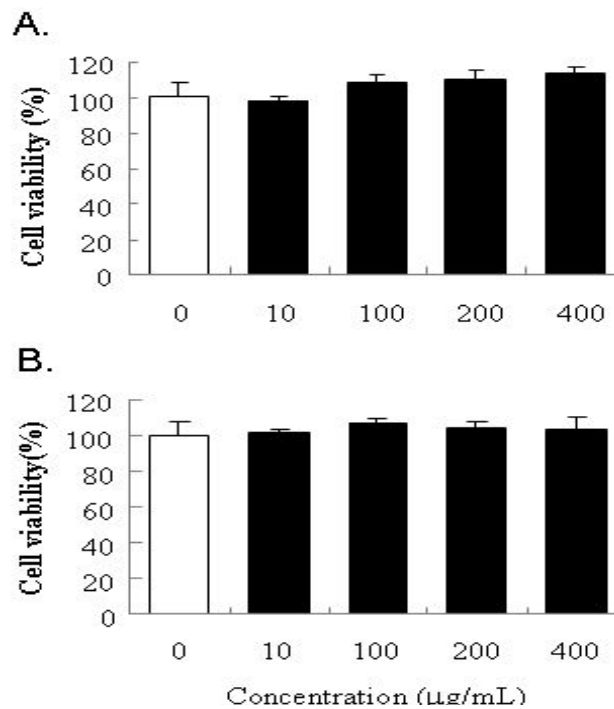


Fig. 4. Cytotoxicity of crude EtOH extract (A) and SFE marc extract (B) of *A. polygama* Max. on IgE-sensitized RBL-2H3 cells.

## (2) 비만세포 보호 효과

알레르기 반응은 크게 4가지 유형으로 나뉘며, 아토피성 피부염, 알레르기성 비염 및 기관지 천식 등의 알레르기 질환들은 제I형 알레르기 반응에 속한다. 비만세포는 이러한 제I형 알레르기 반응에 중요한 역할을 하며 피부, 호흡기, 혈관 주위, 뇌 등 생체 내 기관 및 조직에 널리 분포되어 있다. 이러한 비만 세포가 면역학적 또는 비면역학적으로 활성화되면 탈과립이 유도 되 세포내 과립에 저장되어 있던 히스타민 등이 유리되어 알레르기 증상들이 만세난다. 비만 세포주인 RBL-2H3 세포에서 항원의 자극에 의한 탈과립 시 히스타민과 함께 방출되어 탈과립의 지표물질로 널리 이용되는  $\beta$ -hexosaminidase의 활성을 측정하여 시료의 탈과립 억제능을 측정하였다.

### a. $\beta$ -Hexosaminidase 방출 억제능 측정

Fig. 5와 같이 개다래 주정추출물 10, 100, 400  $\mu$ g/ml의 농도로 처리된 세포에서 유리되는  $\beta$ -hexosaminidase의 활성은 대조군에 비해 각각 87.9%, 45.6%, 27.4%를 나타내며, 개다래 박의 주정추출물의 경우, 73.2%, 54.3%, 42.5%를 나타내어 농도의존적으로 감소함을 확인할 수 있었다. 또한, 주정추출물에서 약간 높은 효과가 있음을 알 수 있다.

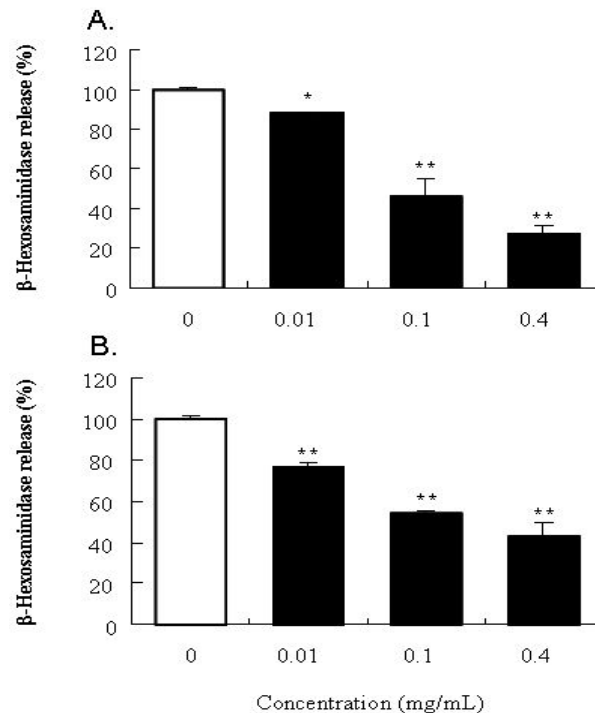


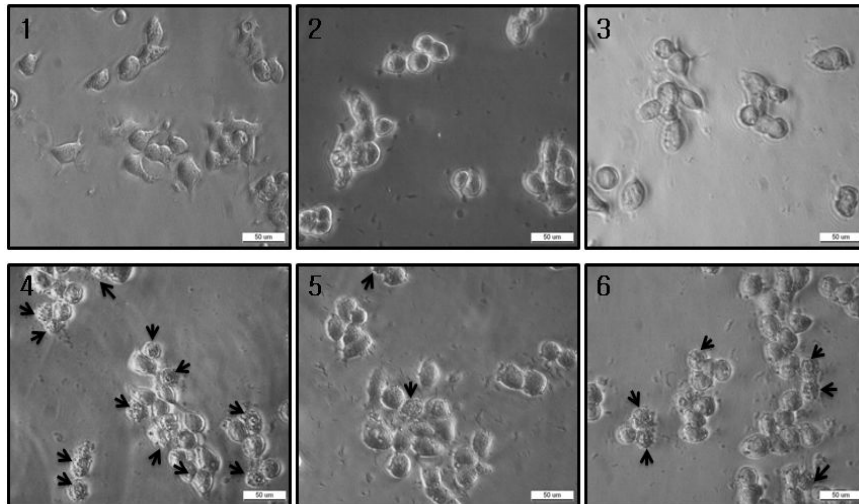
Fig. 5. Inhibitory effects of crude EtOH extract (A) and SFE marc extract (B) of *A. polygama* Max. on b-hexosaminidase release from RBL-2H3 cells induced by IgE with DNP-BSA.

b. Compound 48/80에 의한 탈과립에 대한 보호효과

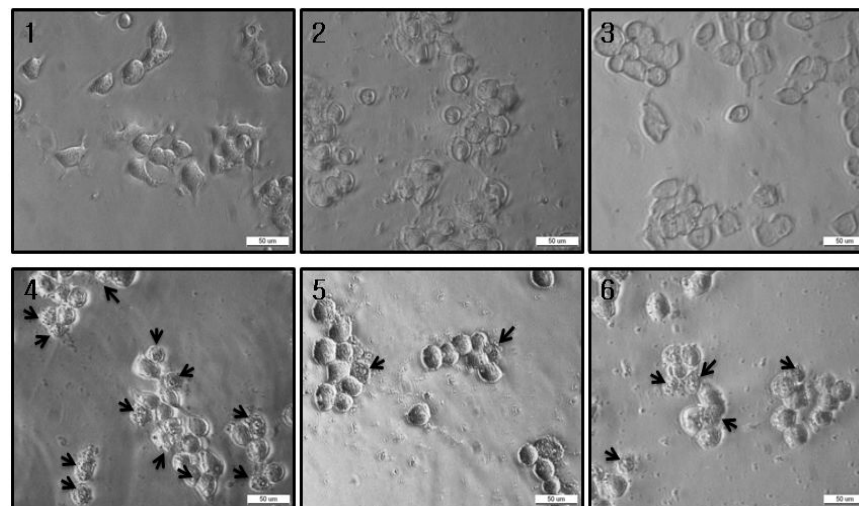
200배의 배율 하에서 전체적인 탈과립 정도를 확인하였으며, 3회 실험으로 재현성을 확인하였다. 정상 비만세포주의 형태는 원형 또는 난원형으로 세포 윤곽이 뚜렷하고, 매끄러운 표면을 갖는 반면, compound 48/80 처리로 활성화되어 탈과립이 일어난 세포의 형태는 세포 윤곽이 불분명하고 크기가 적으며, 세포질 내 과립들이 돌출되거나 세포주위에 흩어져 있는 것을 볼 수 있다(Fig. 6). Compound 48/80으로 처리하지 않고 시료만 처리한 경우, 탈과립은 일어나지 않아 세포의 형태는 변화가 없었으며, 개다래 주정과 박 추출물 모두 0.4 mg/ml의 농도에서 세포를 탈과립으로부터 보호하는 효과를 관찰할 수 있었으며 0.2 mg/ml의 농도에서는 20분 처리 시에는 보호효과가 있었으나(Data not shown), 40분 후에는 거의 보호효과가 사라지는 것을 관찰했다(Fig. 6).



A.



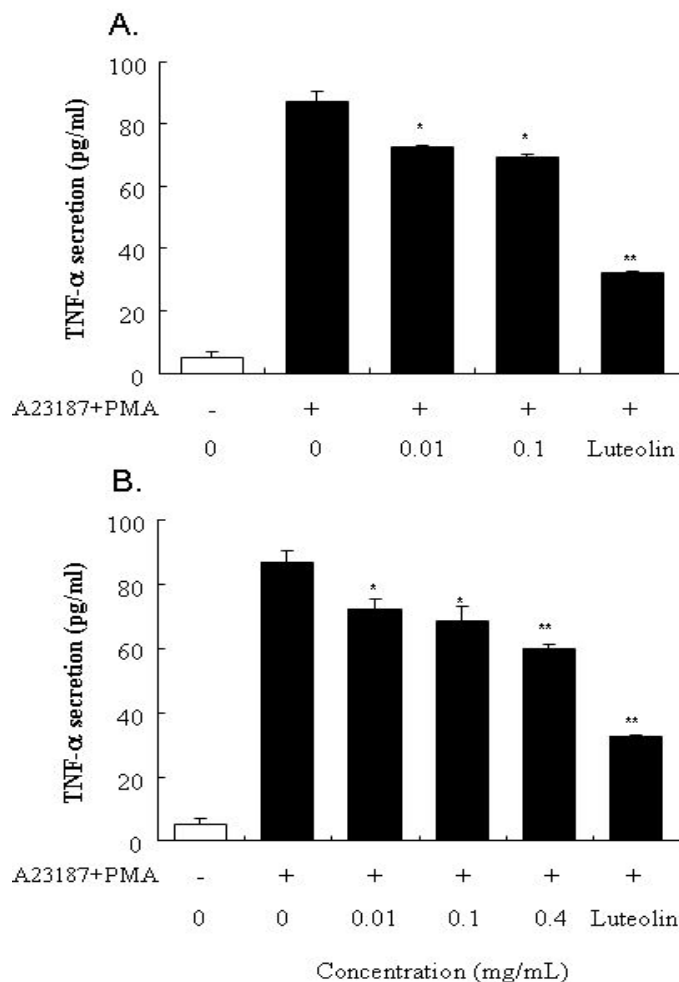
B.



**Fig. 6.** Light microphotographs using inverted microscopy (magnification x 600) of RBL-2H3 cells before (1, 2, 3 of A or B) and after (4, 5, 6 of A or B) stimulation with 50 mg/ml compound 48/80 for 40 min. Cell were pretreated with 0.4 mg/mL (2, 5) or 0.2 mg/mL (3, 6) on with 50 mg/ml compound 48/80 for 40 min. Cell were(3, 6) pretreated with 0. for 10 min prior to stimulation with compound 48/80. Nor cell is generally ch40Celerizompounround sh4pL with fine gr8/umgs48/80regular surface. Degranulated cells shows decreased cell size, disrupted boundary, protruded granules.

### (3) TNF- $\alpha$ 생성 억제능

Proinflammatory 인자인 TNF- $\alpha$ 의 생성에 대한 시료의 억제효과를 측정한 결과, 세포 활성화 전 5.06 pg/ml에서 활성화로 인해 87.14 pg/ml로 현저히 증가하였으며, 0.1 mg/ml의 주정 추출물과 박 추출물에서 69.1%, 68.6%로, 비슷하게 TNF- $\alpha$  생성 억제효과가 있음을 나타내었다(Fig. 7).



**Fig. 7.** Effects of *A. polygama* Max. extract on PMA plus A23187-induced cytokine production in RBL-2H3 cells. Inhibitory effects of crude EtOH extract (A) and SFE marc extract (B) of *A. polygama* Max. on PMA plus A23187- induced TNF- $\alpha$  production in RBL-2H3 cells. The RBL-2H3 cells ( $2 \times 10^5$  cells) were incubated overnight in 24-well plate. The cells were pretreated with various concentrations of the extracts and then stimulated with PMA (50 ng/mL) plus A23187 (1  $\mu$ M) for 4h. The level of cytokine in the supernatant was measured by using ELISA. The value represents the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. Leuteolin (1.43  $\mu$ g/mL) was used positive control. \*Values are significantly different from control (\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01).

이상의 결과로부터, 개다래 초임계 박 추출물은 주정추출물과 비슷한 비만세포 보호효과와 현저히 증가된 nitric oxide 소거능을 나타내어 항염증, 항알러지 효과가 있음을 시사하였으며, 관능평가 결과와 종합하면, 초임계 추출로 인해서 기호도는 향상되고 효능은 비슷하거나 향상 되는 것을 알 수 있다.

#### 4. 개다래 효소처리 추출물의 관능특성

##### 가. 실험방법

##### (1) 개다래 효소처리 추출

효소처리를 통해 개다래 특유의 쓴맛성분과 추출 및 농축시 침전되는 불용성 성분을 제거하기 위하여 개다래를 효소 처리하여 이들 성분의 변화에 대한 연구를 진행하였다. 건조된 개다래 15g에 70% ethyl alcohol 500 mL을 가하고 60℃에서 60분간 환류 냉각 추출한 후, 여과하고 회전감압농축기로 25% 감압 농축시켜 분석 시료로 사용하였다. 각각의 효소를 0.1, 0.5, 1% 첨가하여 Termamyl과 Ultraflo-L은 pH 6.5, Viscozyme-L과 Pectinex는 pH 5.0, Celluclast는 pH 4.8로 보정하고 Termamyl은 90℃에서 30분간 반응시켜 100℃에서 20~30분간 가열하여 반응정지 시킨다. Ultraflo-L, Viscozyme-L, Pectinex, Celluclast은 50℃에서 60분간 반응시켜 95℃에서 5분간 가열하여 반응정지 시킨다.

#### 나. 결과

개다래를 여러 가지 효소를 이용하여 처리한 후 제조한 추출물에 대해 묘사분석을 통해 설정한 쓴맛, 떫은맛, 단맛, 구수한 맛 등의 맛 특성과 한약재향, 흙냄새, 박하향 등의 향기 특성에 대한 강도를 조사한 결과는 Table 3 및 Fig. 8과 같다. 쓴맛과 떫은맛 그리고 한약재향이 전체적으로 강하게 나타났으며 Ultraflo-L와 Termamyl 처리 추출물의 쓴맛이 강한 것으로 나타났다. 떫은맛은 Ultraflo-L 처리 추출물이 가장 강하였으며 Viscozyme-L 처리 추출물이 가장 약하였다. 단맛과 구수한 맛은 전체적으로 약한 것으로 나타났으며 Viscozyme-L 처리 추출물이 다른 효소 추출물에 비해 단맛과 구수한 맛이 강하게 나타났다. 한약재향은 Viscozyme-L과 Ultraflo-L 처리 추출물이, 흙냄새는 Ultraflo-L 처리 추출물이 그리고 박하향은 Viscozyme-L 처리 추출물이 강한 것으로 나타났다.

**Table 3. Analysis of significant factors in the flavor and taste of *A. polygama* Max. ethanol extract treated with various enzymes**

	Viscozyme-L	Ultraflo-L	Termamyl	Pectinex	Celluclast
쓴맛	6.4±0.7	7.4±1.0	7.3±1.1	6.4±1.0	6.4±0.9
떫은맛	5.8±1.2	6.7±0.9	6.3±1.3	6.0±1.1	6.1±0.9
단맛	4.0±1.2	3.3±1.4	3.3±1.5	3.8±1.5	3.2±1.2
구수한맛	4.4±0.5	3.6±0.9	3.3±1.1	3.9±1.1	3.8±1.1
한약재향	6.2±0.8	5.8±1.1	6.4±1.0	5.8±1.4	5.2±2.0
흙냄새	4.6±1.4	4.9±1.8	5.1±2.0	4.3±1.8	4.1±1.8
박하향	4.3±2.3	2.7±1.4	2.8±1.5	3.9±2.4	2.8±2.1

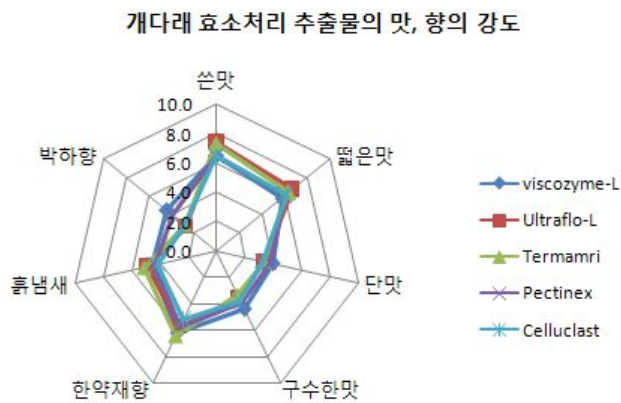


Fig. 8. Analysis of significant factors in the flavor and taste of *A. polygama* Max. ethanol extract treated with various enzymes

개다래 효소처리 추출물의 관능적 기호도를 조사한 결과는 Table 4에서 보는 바와 같이 향, 맛, 바디감, 및 종합적 기호도 등 거의 모든 항목에서 Viscozyme-L이 가장 좋은 것으로 나타났다.

Table 4. Analysis of sensory acceptance of *A. polygama* Max. ethanol extract treated with various enzymes

	Viscozyme-L	Ultraflo-L	Termamri	Pectinex	Celluclast
색	5.8±1.0	4.1±1.1	3.8±0.8	6.1±1.3	6.1±1.1
향	5.9±1.3	4.6±1.0	4.5±1.0	5.1±1.9	4.8±1.7
맛	5.3±1.4	4.1±1.1	3.6±1.1	4.5±1.6	3.9±0.9
바디감	5.1±1.3	4.8±1.5	4.6±1.7	4.5±1.6	4.6±1.8
종합적 기호도	5.3±1.3	4.4±1.1	3.6±1.2	4.4±1.4	4.1±0.9

## 5. 개다래 박 추출물의 GC/MS 분석

### 가. 실험 방법

#### (1) GC/MS 분석

개다래 주정 추출물은 적정 농도로 희석과정을 거친 후 filter하여 GC-2010과 GC-MS(Shimadzu GCMS-QP2010, Kyoto, Japan)을 이용하여 분석하였다. Column은 Rest다사의 RTX-1(0.25mm I.d x 30m, 0.25mm)를 사용하였고 detector는 MS이고 ESI mode에서 70eV의 에너지로 이온화하였으며 TIC의 SCAN mode에서 검출이온 질량범위 35-700으로 설정하여 각 질량 스펙트럼 중에서 가장 강도가 강한 main fragment ion을 중심으로 라이브러리를 검색하여 물질 확인 분석을 하였다. Injector temperature는 220℃, ion source temperature는 200℃, interface temperature는 280℃이며, carrier gas는 helium을 사용하였다. Oven temperature는 최초 120℃에서 2분 동안 유지한 후 4℃/min 속도로 220℃까지 상승시킨 후, 6℃/min으로 250℃, 14℃/min 속도로 320℃까지 온도를 상승시킨 후 15분간 유지하였다.

## 나. 결과

개다래 추출물의 GC-MS 분석한 결과는 Fig. 9.에 보여주는 것과 같으며, alpha-cyclocitral (36.9%), 1-Cyclopentene- 1-methanol, 2-methyl-5- (1-methylethyl)- (16.5%), Methyl linolenate (9.5%), Ethyl palmitate (7.4%), Ethyl stearate (4.8%), Ethyl linoleate (4.5%) 등이 주성분으로 나타났다.

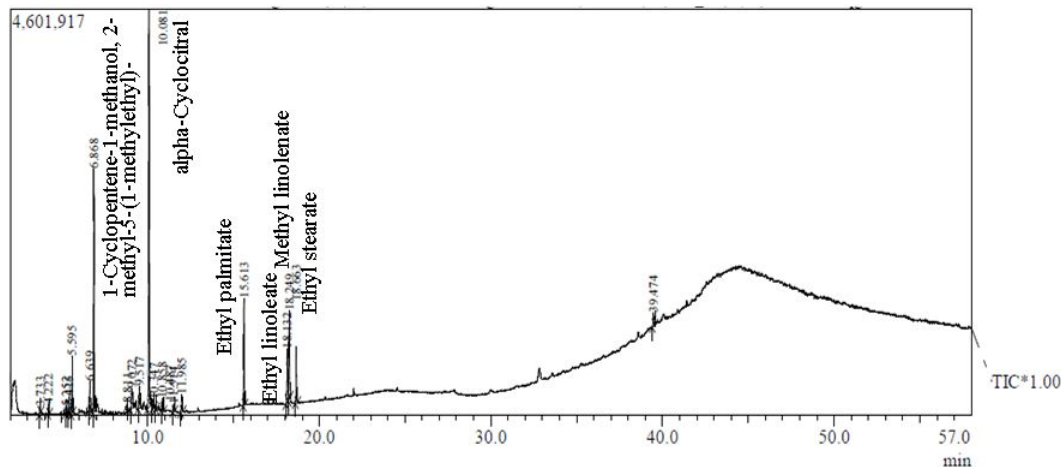


Fig. 9. Total ion chromatogram of GC-MS analysis of the 70% ethanol extract from *A. polygama* Max.

## 6. 개다래 박 추출물의 활성 성분 분석

## 가. 방법

### (1) 계통분획

게다래 박을 80% EtOH로 추출한 후, 이 추출물을 EtAOc로 분배추출하고, 다시 H<sub>2</sub>O층을 n-BuOH로 분배 추출하였다.

(2) NO 생성 억제능

분획한 시료의 NO생성 억제능을 측정하여 효과 있는 분획층을 찾기 위해, 각 시료와 LPS를 처리한 배양액 100  $\mu$ L를 96 well plate에 취하였다. 여기에 동량의 Griess 시약을 넣어 10분간 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite의 농도는 sodium nitrite( $\text{NaNO}_2$ )를 사용하여 얻은 표준 직선과 비교하여 산출하였고, 산출 값은 3회 반복한 실험 data의 mean $\pm$ SEM 값으로 나타내었다.

### (3) Sepbox 2D 분석

EtAOc fraction을 Sepbox 2D 장치로 화합물의 극성차이를 이용하여 분획하였다.

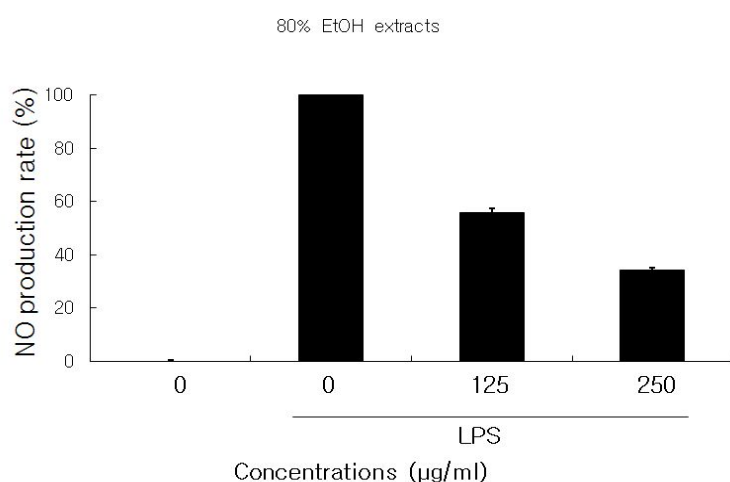
## 나. 결과

### (1) 개다래 박 분획물의 활성 검색

개다래 박 80% EtOH 추출물의 NO활성 검색 결과, Fig. 10. A와 같이 농도 의존적으로 저해하는 것으로 나타났고, 250  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 40% 정도까지 저해하는 것으로 나타났다. 따라서 이를 EtAOc, BuOH, Water층으로 계통 분획하였고, 활성성분이 함유한 분획층을 찾기

위해 모두 25  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 NO생성 억제능을 통해 실험한 결과, Fig. 10. B와 같이 EtAOc층에서 뛰어난 효과를 나타냈다. 따라서 EtAOc층에서 활성 성분을 분석하기 위하여, 시료의 극성차를 이용하여 극성에서 비극성을 분리하는 Sepbox 2D 장치를 이용해 550개의 분획물을 얻었고, 분획물을 통해 NO 생성 억제능을 측정한 결과 Fig. 11과 같이 나타나 EtOAc 층의 비극성 성분이 NO 억제 활성을 나타내는 것을 알 수 있었다. 활성이 높았던 9개의 fraction에 대한 TLC 분석으로 성분을 확인하고, 단일 성분으로서 분리하여 동정하기 위하여 대량 추출, column chromatography를 수행하였다.

A.



B.

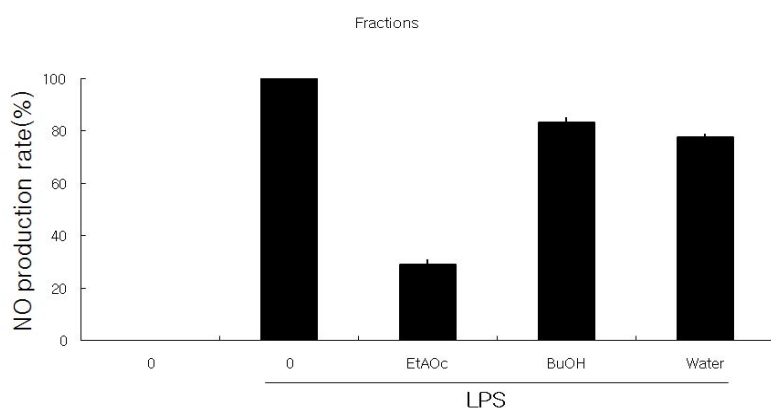


Fig. 10. Effects of 80% EtOH extract (A) and different fractions (B) from *A. polygama* Max. marc on LPS-induced NO production in RAW 264.7 cells

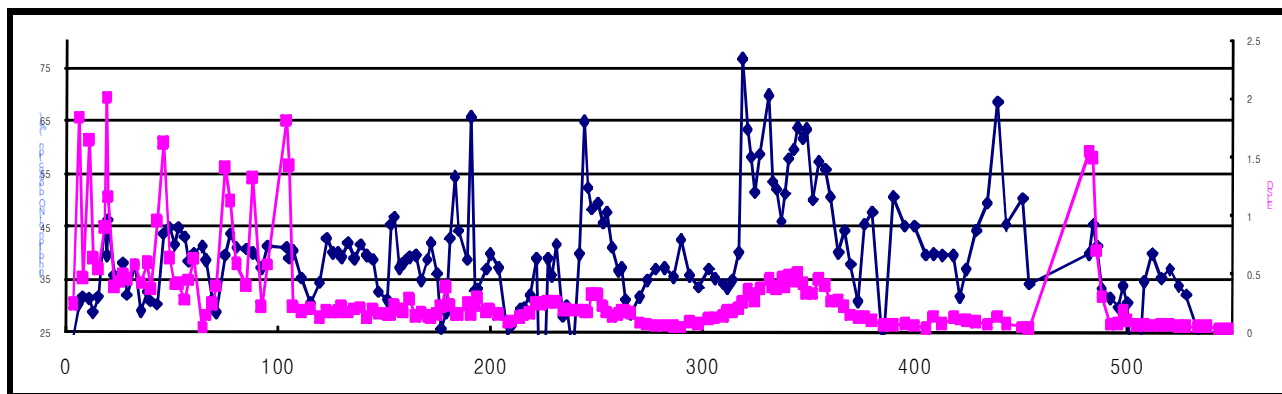


Fig. 11. Sepbox analysis of EtAOc Fractions from *A. polygama* Max. Blue line shows NO inhibition rate (%) and pink line shows ELSD signal.

## 7. 개다래 에틸아세테이트 분획으로부터 활성 성분의 분리 및 동정

### 가. 실험 방법

#### (1) 세포배양 및 세포독성 측정

Rat 유래의 비만세포(RBL-2H3)에 대한 세포독성능 측정은 MTT 법으로 실험하였다. 본 실험에 사용한 세포주 RBL-2H3 cell은 한국 세포주 은행(Seoul, Korea)을 통해서 분양 받아 계대배양하면서 실험하였다. 세포배양에 사용된 배지는 10% FBS(fetal bovine serum)와 1% antibiotics(penicillin/streptomycin)를 첨가한 MEM 배지를 이용하여 37°C에서 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 2~3일간 배양한 후 사용하였다. RAW 264.7 세포를 10% FBS(fetal bovine serum)와 1% antibiotics(penicillin/ streptomycin)를 첨가한 DMEM 배지를 이용하여 5% CO<sub>2</sub>가 존재하는 37°C incubator에서 1주일에 2~3회 계대 배양하였다.

#### (2) $\beta$ -Hexosaminidase 방출 억제능 측정

비만세포주 RBL-2H3 1 ml( $2 \times 10^5$  cells)을 24 well plate에 anti-DNP IgE(0.45 mg/ml)로 16시간 감작시키고 DNP-BSA(10 mg/ml)로 활성화시키기 전에 30분 동안 37°C에서 농도별 시료를 20 ml 처리하였다. 반응이 끝난 후 4°C에서 10분간 400 xg에서 원침하여 얻은 상등액 25 ml를 기질 *p*-nitrophenyl-N-acetyl-b-D-glucosaminide 25 ml와 37°C에서 1시간 반응한 후 stop solution(0.1 M NaCO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub>, pH 10) 200 ml를 가하여 정지시키고 405 nm에서 흡광도를 측정하여  $\beta$ -hexosaminidase의 양을 계산하였다.

#### (3) 세포독성 측정 및 Nitric oxide(NO) 생성량 측정

개다래 주정 및 초임계 추출 오일, 박 추출물의 세포독성을 측정하기 위해 MTT (3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide) assay를 실시하여 측정하였다. RAW 264.7 세포  $1 \times 10^5$  cells/well을 96 well plate에 분주하고, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 배양한 세포를 serum free 배지로 교체한 후 LPS(100 ng/mL)와 시료를 각각 처리하여 24시간 배양하여 5 mg/mL의 MTT 용액 10  $\mu$ L를 각 well에 넣고 incubator에서 4시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후 상등액을 제거하고 각 well에 100  $\mu$ L의 DMSO를 첨가하여 생성된 formazan 결정을 용해시켜 microplate reader로 550 nm에서 흡광

도를 측정하였고, 세포독성은 시료의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다.

시료의 NO 생성 억제능을 측정하기 위하여, 각 시료의 추출물 혹은 LPS를 처리한 배양액을 nitrite 측정을 위해 100  $\mu$ L를 96 well plate에 취하였다. 여기에 동량의 Griess 시약을 넣어 10 분간 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite의 농도는 sodium nitrite( $\text{NaNO}_2$ )를 사용하여 얻은 표준 직선과 비교하여 산출하였다.

염증반응이 일어나면 여러 가지 염증인자들(proinflammatory mediators)이 만들어지는데, 염증인자에는 inducible nitric oxide synthase(iNOS)에 의해서 만들어지는 nitric oxide(NO)와 cyclooxygenase-2(COX-2)에 의해서 만들어지는 prostaglandin  $\text{E}_2$ ( $\text{PGE}_2$ ) 등이 있다. 이러한 염증 인자는 염증반응의 전사인자인 nuclear factor- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)를 활성화시키며, 그 결과 과량의 NO와  $\text{PGE}_2$ 를 생성하여 염증을 일으킨다. 또한 염증인자로 염증성 사이토카인(proinflammatory cytokines)인 tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ), interleukin- $1\beta$ (IL- $1\beta$ ) 등이 포함된다.

#### (4) 성분 분리 및 동정

(가) 시약 및 기기: Column chromatography용 silica gel은 Kiesel gel 60(Merck, Darmstadt, Germany)을 octadecyl silica(ODS) gel은 LiChroprep RP-18(Merck, Darmstadt, Germany)을 사용하였다. Thin layer chromatography(TLC)는 Kieselgel 60  $\text{F}_{254}$ 와 RP-18  $\text{F}_{254s}$ 를 사용하였고, 실험에 이용한 모든 시약은 특급시약을 사용하였다.

NMR 스펙트럼은 Varian Inova AS 400(Varian, California, USA)으로 측정하였고, IR spectrum은 Perkin model 599B(Perkin-Elmer, Massachusetts, USA)로 측정하였다. 녹는점은 Fisher-John's Melting Point Apparatus(Fisher Scientific, Miami, USA)로 측정하였으며, EI/MS와 FAB/MS는 JMS-700 (JEOL, Tokyo, Japan)으로 측정하였다. UV lamp는 Spectr오로 ne(Model ENF-240 C/F, Spectr오rnics Corporation, New York, USA)을 사용하였으며, 비선광도는 Polarimeter P-1020(JASCO, Tokyo, Japan)를 사용하여 측정하였다.

##### (나) EtOAc 분획으로부터 활성물질의 분리

얻어진 MeOH 추출물을 EtOAc(1 l  $\times$  2)/ $\text{H}_2\text{O}$ (2 l)로 분배 추출하였고, 다시  $\text{H}_2\text{O}$ 층을  $n$ -BuOH(1 l  $\times$  2)/ $\text{H}_2\text{O}$ (2.1 l)로 분배 추출 하였다. 각 층을 감압농축하여 EtOAc(580 g),  $n$ -BuOH(138 g) 및  $\text{H}_2\text{O}$ (562 g) 분획을 얻었다.

EtOAc분획(580 g)에 대하여 silica gel column chromatography (c.c)( $\phi$  10  $\times$  17 cm,  $n$ -hexane-EtOAc = 10 : 1  $\rightarrow$  8 : 1  $\rightarrow$  6 : 1  $\rightarrow$  : 3 : 1  $\rightarrow$  1 : 1  $\rightarrow$   $\text{CHCl}_3$ -MeOH = 10 : 1  $\rightarrow$  7 : 1  $\rightarrow$  5 : 1  $\rightarrow$  3 : 1  $\rightarrow$  2 : 1  $\rightarrow$  1 : 1)를 실시하여 11개의 분획물(APE-1~APE-11)을 얻었다. 활성이 확인된 APE-9 (26 g) 분획에 대하여 silica gel (c.c) ( $\phi$  5  $\times$  20 cm,  $n$ -hexane-EtOAc = 10 : 1  $\rightarrow$  7 : 1  $\rightarrow$  5 : 1  $\rightarrow$  : 3 : 1  $\rightarrow$  1 : 1  $\rightarrow$   $\text{CHCl}_3$ -MeOH = 10 : 1  $\rightarrow$  7 : 1  $\rightarrow$  5 : 1  $\rightarrow$  3 : 1  $\rightarrow$  1 : 1)로 정제하여 15개의 분획물(APE-1~APE-15)을 얻었다. 이 중에서 활성이 확인된 APE-9-11(10 g) 분획에 대하여 silica gel (c.c) ( $\phi$  4  $\times$  18 cm,  $n$ -hexane-EtOAc = 2 : 1)로 정제하여 APE9-11-21 [(화합물1, 40 mg, ODS TLC (RP-18  $\text{F}_{254s}$ )  $R_f$  = 0.62, MeOH- $\text{H}_2\text{O}$ = 7 : 1)]을 분리하였다.



## 나. 결과

### (1) 개다래 추출물, 분획, 단일성분의 항알러지 효과

개다래 추출물, 박 추출물, 분획층 및 분리된 단일성분에 대하여 항알러지 활성을 RBL-2H3 cell을 이용하여  $\beta$ -hexosaminidase 방출량 측정하는 방법으로 검색한 결과, 분리된 성분이 1 mg/mL의 농도에서 90%이상 알러지 마커인  $\beta$ -hexosaminidase의 방출을 억제하며 세포독성은 없는 것을 알 수 있다.

Table 5. Effects of extracts and fractions from *A. polygama* on IgE-induced  $\beta$ -hexosaminidase release in RBL-2H3 cells

Sample	Concentration ( $\mu$ g/mL)	$\beta$ -Hexosaminidase release (%)	Cell survival rate (%)
EtOH ext.	10	87.89 $\pm$ 1.18	98.20 $\pm$ 2.49
	100	45.59 $\pm$ 7.77	108.27 $\pm$ 3.68
Marc ext.	10	76.24 $\pm$ 2.79	102.36 $\pm$ 1.09
	100	50.27 $\pm$ 0.95	106.94 $\pm$ 2.14
EtOAc	100	43.06 $\pm$ 3.65	69.27 $\pm$ 7.09
BuOH	100	42.37 $\pm$ 0.87	111.36 $\pm$ 9.27
H <sub>2</sub> O	100	82.20 $\pm$ 5.56	145.96 $\pm$ 9.74
NC	1	8.17 $\pm$ 3.07	132.60 $\pm$ 9.18

\* NC, new compound

### (2) 개다래 추출물, 분획, 단일성분의 항염증 효과

항염증 효과를 검색하기 위하여 NO 생성 억제능을 측정한 결과, 1 mg/mL의 농도에서 56% 억제 효과를 나타내어 염증에도 높은 억제 활성을 나타낼 것으로 사료된다.

Table 6. Effects of extracts and fractions from *A. polygama* on LPS-induced NO production in RAW 264.7 cells

Sample	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	NO inhibition rate (%)	Cell survival rate (%)
EtOH ext.	10	4.61 $\pm$ 0.91	95.32 $\pm$ 5.06
	100	19.00 $\pm$ 2.34	102.73 $\pm$ 0.28
Marc ext.	10	36.63 $\pm$ 4.00	96.18 $\pm$ 4.23
	100	70.58 $\pm$ 3.35	98.17 $\pm$ 1.71
EtOAc	25	70.81 $\pm$ 4.58	103.98 $\pm$ 4.58
BuOH	25	19.80 $\pm$ 0.71	95.32 $\pm$ 3.20
H <sub>2</sub> O	25	ND	88.88 $\pm$ 1.44
NC	1	55.91 $\pm$ 4.71	132.60 $\pm$ 9.18

\* NC, new compound

### (3) 구조

이상의 활성 결과에서 높은 염증과 알러지에 높은 활성을 나타낸 성분의 구조 동정을 실시하였다. 생리활성 탐색 및 효능 검정 연구에 선행하여, 개다래 열매 1.5 kg을 80% MeOH용액으로 실온에서 하루 동안 추출하기를 2번 반복하였다. 용매 극성의 차이에 따라 계통 분획 하여 세가지 분획 즉 EtOAc, *n*-BuOH 및 H<sub>2</sub>O분획을 얻었다. EtOAc분획에 대하여 TLC를 이용하여 함유성분을 추정하였으며, silica gel과 ODS column chromatography 를 반복하여 1종의 new ceramide 화합물을 분리하였다.

화합물 1(white powder)은 TLC에 전개하고 10% 황산을 분무, 건조한 후 발색한 결과 흰색으로 발색 되었다. IR 스펙트럼에서는 hydroxyl(3621  $\text{cm}^{-1}$ ), amide(3434, 1617, 1521  $\text{cm}^{-1}$ )이 관찰되었으며, EI/MS 측정 결과 분자량이 412( $m/z$ ) 로 나타났다. <sup>1</sup>H-NMR 스펙트럼에서 두 개의 terminal methyl groups의 시그널과 aliphatic methylenes 그리고 다수의 methylene 시그널이 확인 되었다. 5 ppm 부근에서 두 개의 olefinic protons 피크가 관측되었다.

<sup>13</sup>C-NMR 스펙트럼에서, 탄소수가 28개이고 methyl carbon이 2개 관측되었음을 확인하였다. 또한 175 ppm 부근에서 한 개의 amide carbonyl기와 130 ppm에서 두 개의 olefinic methine을 확인하였고, 60-80 ppm 부근에서 다수의 oxygenated methine carbon과 methylene을 확인하였다. 또한 53 ppm 근처에서 nitrogenated 시그널과 다수의 40-20ppm 사이에서 다수의 methylen signal을 관측 하였고, 14 ppm 에서 2개의 methyl carbon을 확인하였다. 이를 종합하여 비교한 결과 새로운 ceramide 화합물로 동정하였다.

## <sup>1</sup>H NMR spectrum

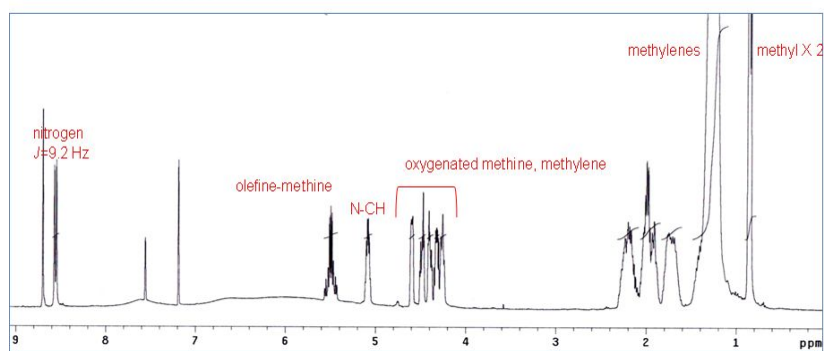
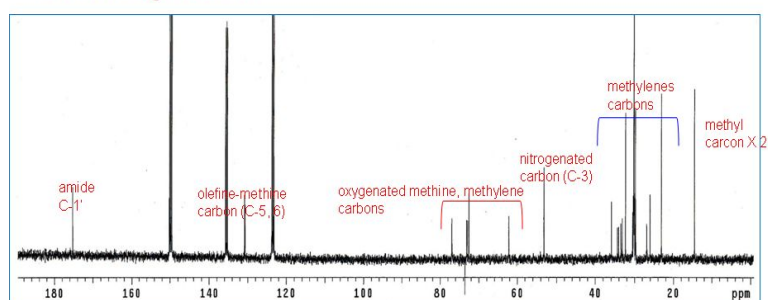


Fig. 12. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, pyridine-D<sub>5</sub>) spectra of new ceramide.

## <sup>13</sup>C NMR spectrum



## DEPT spectrum

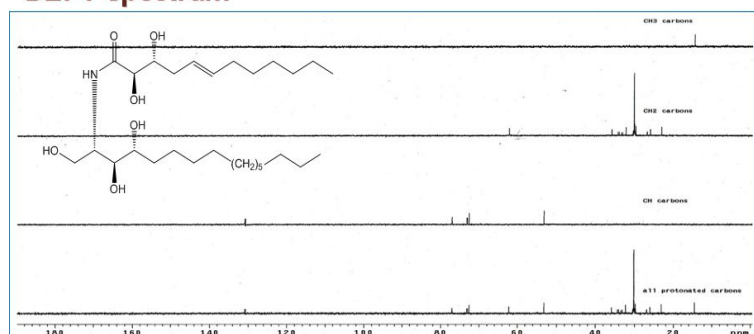


Fig. 13. <sup>13</sup>C NMR & DEPT (100 MHz, pyridine-D<sub>5</sub>) spectra of new ceramide.

## HMBC spectrum

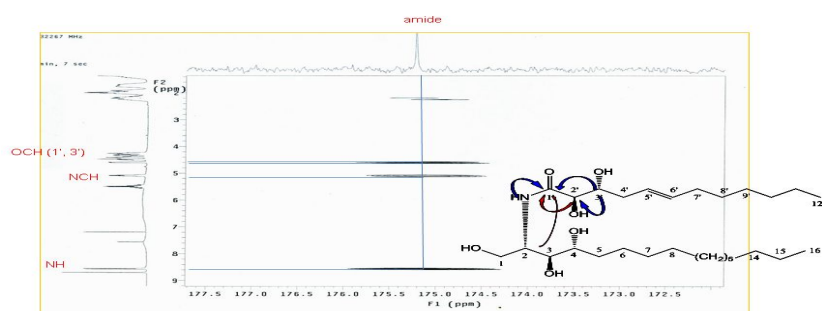
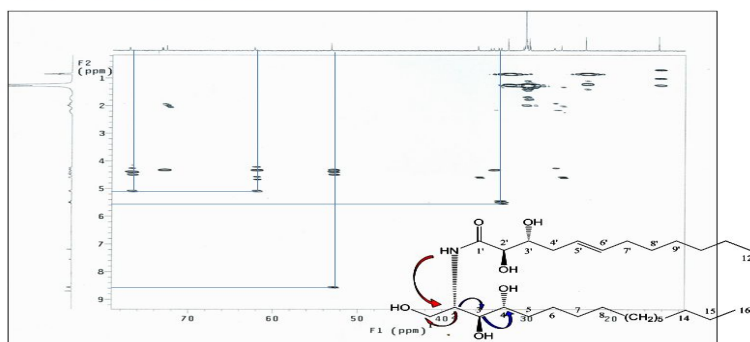


Fig. 14. gHMBC spectrum of new ceramide.

## 제 2 절 생강 초임계 추출물의 알러지 및 염증 개선 효능 연구

### 1. 생강 추출물의 항산화능 비교

#### 가. 시료 및 실험 방법

##### (1) 시료 조제

본 실험에서 사용한 생강은 항생원에서 토종 건 생강을 구입하였으며, 4℃에서 보관하면서 실험에 사용하였다. 본 실험에 불순물 제거를 위해 생강을 수세한 후 건조하여 사용하였고, 생강무게의 약 5.6배량의 70% ethanol 18L를 가하여 24시간 동안 정치하여 총 3회 반복 추출하였다. 추출액은 여과지(Whatman No.3 England)로 여과한 다음 rotary vacuum evaporator (BUCHI Rotavapor R-205, Switzerland)로 55℃에서 감압농축한 후 동결 건조 하여 사용하였다.

##### (2) 용매추출

본 실험에 불순물 제거를 위해 생강을 수세한 후 건조하여 사용하였고, 생강무게의 약 5.6배량의 70% ethanol 18L를 가하여 24시간 동안 정치하여 총 3회 반복 추출하였다. 추출액은 여과지(Whatman No.3 England)로 여과한 다음 rotary vacuum evaporator (BUCHI Rotavapor R-205, Switzerland)로 55℃에서 감압농축한 후 동결 건조 하여 사용하였다. 동결 건조한 생강 에탄올 추출물은 Fig 1.에서와 같이 hexane, chloroform, ethylacetate, butanol로 순차적으로 3회 반복 추출하여 각 용매별로 계통적으로 분획을 하였고 남은 수용성 층은 water 분획으로 감압농축 하여 사용하였다.

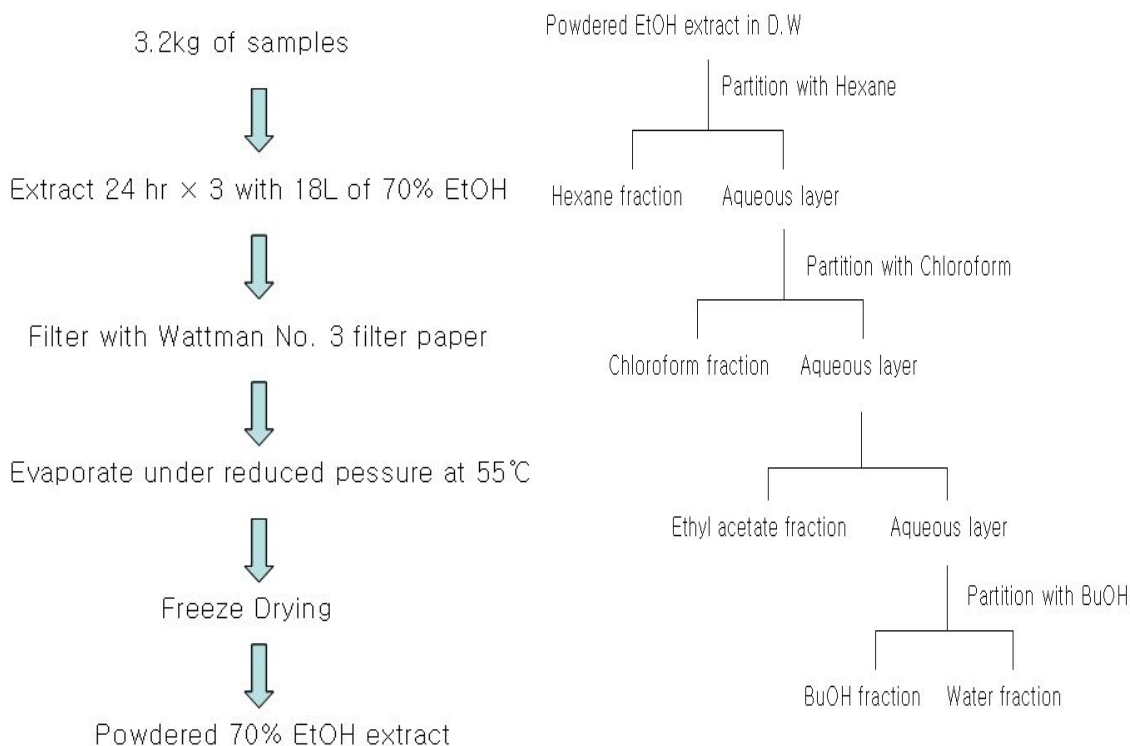


Fig. 15. Fractionation procedure of ethanol extract from ginger using various solvent

### (3) 초임계추출

초임계 유체 추출은 (주)유맥스의 초임계 추출장치(SFE 5L, Natex, Austria)를 이용하였다. 분쇄된 생강 시료를 각각 추출조에 2kg을 넣어 반응기의 온도 35℃, 45℃, 55℃, 온도별 압력 100bar, 200bar, 300bar, 400bar, S/F ratio (supercritical fluid kg/Feed kg) 25~35까지의 조건으로 추출하였다. 또한 보조 용매 에탄올(70%) 50ml씩 3회 반복하여 회수된 추출물을 rotary vacuum evaporator(BUCHI Rotavapor R-205, Switzerland)로 55℃에서 감압 농축한 후 동결 건조하여 10% DMSO에 용해시켜 사용하였다.

### (4) 초고압추출

초고압추출은 생강 200g, 물 500 mL 와 함께 각각 다른 효소를 첨가하여 비닐팩에 넣어 공기가 들어가지 않도록 진공포장 한 후, 초고압액화처리장치(Ilshin autoclave, Daejeon, Korea)를 이용하여 5000bar의 압력으로 24 hr 초고압 추출을 시행하였다. 초고압 추출이 끝난 생강을 여과하여 동결건조 한 후 실험에 사용하였다.

**Table 7. List of enzymes used for Super-High Pressure Liquefy Extractor extraction.**

Product's name	Main component	Purpose
Enzyme "Marugoto A"	Cellulase	Resolution of plant organization
Enzyme "Marugoto D"	Cellulase	Resolution of plant organization (for vegetables)
Enzyme "Marugoto E"	Protease	Resolution of proteins
Enzyme "Marugoto H"	Amylase	Resolution of fruit peel

### (5) 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Folin Denis법을 응용하여 측정하였다. 먼저 70% ethanol추출물 및 분획물 시료 0.1g을 증류수 1 mL에 녹이고 농도별 100, 500, 1000에 2배로 희석한 Folin 시약 60  $\mu$ l 을 첨가하고 잘 혼합한 후 3분간 방치하여 60  $\mu$ l 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>를 서서히 가하였다. 이 혼합액을 1시간동안 방치한 후 UV/visible spectrophotometer를 사용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 총 폴리페놀 화합물은 tannic acid를 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하였다. Tannic acid를 이용한 표준곡선은 tannic acid의 최종농도가 5, 10, 25, 75, 100  $\mu$ g/mL이 되도록 하여 위와 같은 방법으로 700 nm에서 흡광도를 측정하여 작성하였다.

### (6) 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량은 Nieva Moreno 등의 방법에 의해 측정하였다. 시료 농도별 희석 후 10% Aluminum nitrate 20  $\mu$ L, 1 M Potassium acetate 20  $\mu$ L, 80% EtOH 860  $\mu$ L, 시료 100  $\mu$ L를 혼합하여 total 1 mL을 만들어 40분 반응 후 200  $\mu$ L씩 분주하여 450 nm에서 흡광도 측정한다. 이때 total flavonoid 함량은 quercetin을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하였다.

### (7) 3-3. $\alpha$ - $\alpha$ -Diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl (DPPH) radical 소거활성

시료의 free radical 소거활성은 stable radical인 DPPH에 대한 환원력을 측정한 것으로 99% 메탄올에 각 시료를 녹여 농도별로 희석한 희석액 160  $\mu$ L와 메탄올에 녹인 0.15 mM DPPH 용액 40  $\mu$ L를 가하여 실온에 30분 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료 추출물의 유리라디칼 소거활성은 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 1/2로 환원시키는데 필요한 시료의 농도인  $RC_{50}$  값으로 나타내었다. 이때 활성비교를 위하여 BHA를 사용하였다

### (8) ABTS radical 소거활성

ABTS에 의한 시료의 항산화능 측정은 ABTS cation decolourisation assay 방법에 따라 측정하였다. ABTS 시약을 7 mM 농도로 증류수에 용해한 다음 2.45 mM의 potassium persulfate를 가하여 ABTS 라디칼을 생성시켜 실온의 암소에서 24시간 동안 방치 후 사용하였다. 라디칼이 생성된 ABTS용액을 PBS로 희석하여 732 nm에서 흡광도가 0.7+0.02 가 되도록 조정하였다. 소거능은 ABTS 용액 180  $\mu$ L와 시료 20  $\mu$ L를 혼합하여 1분간 반응 후 732 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로 PBS를 사용하였고 비교군으로 Trolox를 사용하였다.

## 나. 결과

### (1) 생강 용매추출물의 항산화능 검색

#### (가) 수율

동결 건조한 생강을 70% EtOH로 추출한 다음 극성이 다른 용매인 hexane 및 chloroform, ethyl acetate, butanol로 분획하였으며 수율은 Table 8과 같다. Butanol fraction 30.94%, chloroform fraction 16.6%, water fraction 6.37%, hexane 6.25%, ethyl acetate fraction 2.5%의 순으로 수율이 나타났다.

Table 8. Yields of ethanol extract of ginger and its fractions

Sample	Yields (%) <sup>1)</sup>
70% ethanol	2.7
Hexane	6.3
Chloroform	16.6
Ethyl acetate	2.5
Butanol	37.0
Water	8.1
Total	73.2

<sup>1)</sup> Percentage of each fraction to ethanol extract content.

#### (나) 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량

식품내의 지질이나 체내의 생체막에 존재하는 지질은 활성산소의 존재 하에 유리기와 연쇄 반응을 일으켜 산화되어 식품의 품질변화 및 생체노화의 원인이 되며, 이러한 산화반응을 방지하기 위한 물질로 페놀성 화합물이 널리 이용되고 있어 추출물 및 분획물에 함유된 페놀성 화합물의 함량을 조사하였다. 본 연구에서는 생강 추출물 및 분획물에 존재하는 총 폴리페놀

및 플라보노이드 함량을 각각 tannic acid, quercetin을 기준물질로 하여 측정하였다(Table 9). 그 결과 폴리페놀 함량은 70% ethanol 추출물이 58.16 $\mu$ g/mg으로 나타났고, 분획물들은 hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol, water 순으로 각각 228.87 $\mu$ g/mg, 49.97 $\mu$ g/mg, 23.1 $\mu$ g/mg, 8.34 $\mu$ g/mg, 40.46 $\mu$ g/mg 으로 나타났다. 폴리페놀의 경우 hexane fraction에서 다른 분획물에 비해 월등히 높은 수치를 나타냈으며, 플라보노이드 함량은 70% ethanol 추출물이 1.76 $\mu$ g/mg 함량을 나타냈다. 에탄올 추출한 Oregano, Sage, Pepper의 폴리페놀 함량은 각각 32.1 $\pm$ 0.8 $\mu$ g/mg, 31.4 $\pm$ 0.4 $\mu$ g/mg, 16.7 $\pm$ 0.5 $\mu$ g/mg로 본 연구와 비교 하였을 때 생강 70% ethanol 추출물에 폴리페놀이 많이 함유되어 있다고 볼 수 있다.

**Table 9. Total polyphenols, flavonoids contents of ginger extract and its fractions**

Plant	Fraction	Total polyphenols <sup>1)</sup> ( $\mu$ g/mg)	Total flavonoids <sup>2)</sup> ( $\mu$ g/mg)
Ginger	70% ethanol	58.16 $\pm$ 13.84	1.76 $\pm$ 0.97
	Hexane	228.87 $\pm$ 34.19	T <sup>3)</sup>
	Chloroform	49.97 $\pm$ 3.68	T
	Ethylacetate	23.1 $\pm$ 0.94	T
	Butanol	8.34 $\pm$ 1.53	T
	Water	40.46 $\pm$ 5.54	T

<sup>1)</sup> Micrograms of total polyphenol content/mg plants based on tannic acid as standard

<sup>2)</sup> Micrograms of total flavonoid content/mg plants based on quercetin as standard

<sup>3)</sup> T: trace amount

#### (다) DPPH radical 소거활성

DPPH는 짙은 자색을 띠는 비교적 안정한 free radical로서 항산화제, 방향족 아민류 등에 의해 환원되어 색이 탈색되는데, 이것은 다양한 천연소재로부터 항산화 물질을 검색하는데 많이 이용되고 있다. 에탄올 추출물·분획물과 합성항산화제인 BHA와의 항산화 효과를 DPPH radical 소거활성을 측정하여 비교하였다.

DPPH radical 소거능을 에탄올로 추출한 생강추출물 및 분획물로 살펴본 결과를 Table 10에 나타내었다. 에탄올 추출물이 Chloroform층을 제외한 분획물에 비해 높은 항산화능을 보였다. DPPH radical을 50% 소거하는 농도인 RC<sub>50</sub>은 chloroform 분획물이 26.85 $\pm$ 1.02 $\mu$ g/ml로 에탄올 추출물의 RC<sub>50</sub>값인 48.89 $\pm$ 8.31 $\mu$ g/ml에 비해 높은 활성을 보였다.

Hawa 등은 생강을 메탄올 추출하여 DPPH radical 소거능을 측정한 결과 에탄올 추출물이 메탄올 추출물보다 항산화능이 높은 것을 보고했다.



Table 10. Scavenging effects of ginger extract and its fraction on  $\alpha, \alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl radicals (DPPH  $\cdot$ )<sup>3)</sup>

Plant	Fraction	Concentration( $\mu$ g/mL)	Scavenging effect (%)	RC <sub>50</sub> <sup>1)</sup> ( $\mu$ g/mL)
Ginger	70% ethanol	25	37.41 $\pm$ 3.79	43.95 $\pm$ 3.07
		50	53.28 $\pm$ 2.24	
		100	61.49 $\pm$ 4.46	
		200	68.11 $\pm$ 4.85	
	Hexane	25	15.64 $\pm$ 13.58	89.08 $\pm$ 14.99
		50	30.64 $\pm$ 12.21	
		100	51.01 $\pm$ 10.60	
		200	97.02 $\pm$ 20.37	
	Chloroform	25	43.47 $\pm$ 15.02	29.38 $\pm$ 29.29
		50	64.33 $\pm$ 11.52	
		100	79.82 $\pm$ 8.55	
	Ethyl acetate	1	7.35 $\pm$ 4.46	10.99 $\pm$ 4.89
		10	54.91 $\pm$ 9.23	
		25	77.76 $\pm$ 9.13	
	Butanol	500	39.53 $\pm$ 11.34	1011.79 $\pm$ 640.71
		1000	54.66 $\pm$ 19.75	
		2500	64.30 $\pm$ 8.31	
		3000	87.83 $\pm$ 41.66	
	Water	100	28.51 $\pm$ 23.14	259.5 $\pm$ 233.96
		250	59.80 $\pm$ 21.11	
		500	71.88 $\pm$ 23.26	
BHA <sup>2)</sup>		1	32.68 $\pm$ 9.89	1.78 $\pm$ 0.43
		2.5	65.39 $\pm$ 8.07	
		5	83.58 $\pm$ 3.65	
		7.5	88.38 $\pm$ 6.78	
		10	90.22 $\pm$ 6.60	

<sup>1)</sup> Concentration required for 50% reduction of DPPH at 30 min after starting the reaction

<sup>2)</sup> BHA : Beta Hydroxy Acid

<sup>3)</sup> DPPH :  $\alpha, \alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl

#### (라) ABTS free radical 소거활성

ABTS와 potassium persulfate를 암소에 방치하면 ABTS+ $\cdot$ 이 생성되는데 추출물의 항산화력에 의해 ABTS+ $\cdot$ 이 소거되어 radical 특유의 색인 청록색이 탈색된다. 이와 같이 ABTS+ $\cdot$ 탈색반응은 이미 생성된 free radical의 제거 정도를 흡광도 값으로 나타내어 ABTS+ $\cdot$ 의 소거활성능을 측정하는 방법으로 ABTS+ $\cdot$ 탈색반응이 1분 안에 종료되므로 단시간에 측정할 수 있고, 소수성과 친수성 모두에 적용 가능하다.

본 실험에서는 생강과 trolox의 ABTS+의 소거활성을 Table 11에 나타내었다. Hexane 분획물 RC<sub>50</sub>은 11.1 $\pm$ 3.62  $\mu$ g/ml로 대조군인 Trolox 22.2 $\pm$ 5.66 $\mu$ g/mM보다 2배 높은 활성을 나타냈다.

**Table 11. Scavenging effects of on ABTS<sup>2)</sup>-radical**

Plant	Fraction	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Scavenging effect (%)	RC <sub>50</sub> <sup>1)</sup> ( $\mu\text{g/mL}$ )
Ginger	70% ethanol	25	15.9 $\pm$ 1.12	74.16 $\pm$ 3.25
		50	35.03 $\pm$ 2.32	
		100	49.51 $\pm$ 2.77	
		200	67.14 $\pm$ 1.66	
	Hexane	1	6.96 $\pm$ 5.01	10.82 $\pm$ 6.94
		5	22.73 $\pm$ 3.61	
		10	39.97 $\pm$ 1.80	
		12.5	62.5 $\pm$ 0.34	
	Chloroform	12.5	13.54 $\pm$ 4.13	55.21 $\pm$ 30.20
		25	24.8 $\pm$ 3.86	
		50	45.98 $\pm$ 2.31	
		100	87.43 $\pm$ 1.29	
	Ethyl acetate	50	23.17 $\pm$ 1.35	130.57 $\pm$ 56.97
		100	46.68 $\pm$ 3.23	
		150	53.03 $\pm$ 0.44	
	Butanol	100	11.37 $\pm$ 1.79	352.99 $\pm$ 178.89
		250	46.08 $\pm$ 4.47	
		500	65.65 $\pm$ 0.84	
	Water	12.5	15.38 $\pm$ 5.74	60.93 $\pm$ 34.25
		25	28.03 $\pm$ 2.91	
		50	45.58 $\pm$ 1.33	
		100	74.2 $\pm$ 2.57	
Trolox		5	14.51 $\pm$ 1.56	19.9 $\pm$ 10.54
		10	30.28 $\pm$ 4.76	
		30	72.54 $\pm$ 4.78	
		60	93.68 $\pm$ 0.51	

<sup>1)</sup> Concentration required for 50 % reduction of ABTS at 1 min after starting the reaction.

<sup>2)</sup> ABTS : 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)

## (2) 생강 초임계 오일추출물의 항산화능 검색

### (가) 수율

생강유의 추출을 위한 최적의 조건을 검색하기 위하여 35, 45, 55 ℃의 온도에서 각각의 압력 100, 200, 300, 400 bar로 하여 초임계 추출한 오일(Supercritical Fluid Extraction oil : SFE oil)의 수율은 Table 12와 같다. 각각의 온도에서 압력이 높아질수록 수율은 높아졌으며 온도의 영향은 받지 않는 것으로 나타났다.

Table 12. Yields of ginger SFE oil.

온도 (°C)	압력 (bar)	시간 (hr)	Yields <sup>1)</sup> (%)
35	100	2	1.9
	200		2.1
	300		2.4
	400		2.7
45	100	2	1.5
	200		2.4
	300		2.7
	400		2.8
55	100	2	1.1
	200		2.4
	300		2.9
	400		3.0

<sup>1)</sup> Percentage of each fraction to ethanol extract content.

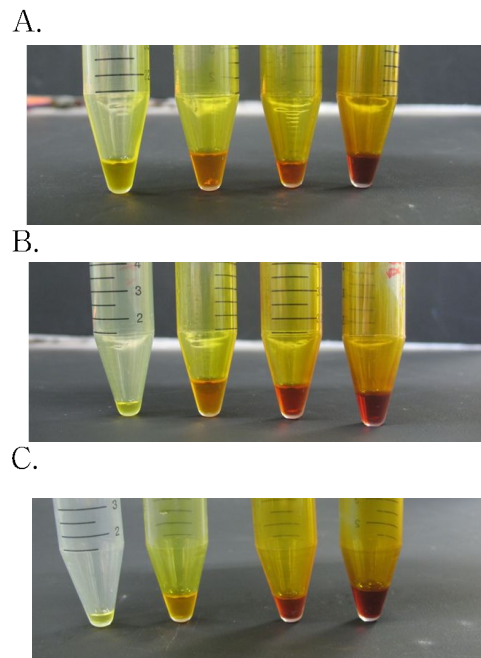


Fig. 16. Ginger oils extracted by SFE using various conditions

A. 35°C, 100, 200, 300, 400 bar    B. 45°C, 100, 200, 300, 400 bar  
C. 55°C, 100, 200, 300, 400 bar

(나)  $\alpha$ - $\alpha$ -Diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl(DPPH) radical 소거활성

SFE oil의 DPPH radical 소거능을 살펴본 결과를 Table 13에 나타내었다. 시료의 농도는 0.015, 0.01, 0.5, 1  $\mu\text{g/mL}$ 로 사용했으며 농도가 높을수록 저해효과는 비례적으로 증가했다. 전체적으로 낮은 농도로도 큰 효과를 나타냈으나 저해효과가 온도와 압력과는 유의적인 상관관계를 나타내지 않는 것으로 나타났다.  $\text{RC}_{50}$ 값을 비교해 보았을 때 45°C, 300 bar에서  $0.09 \pm 0.03$   $\mu\text{g/mL}$ 로 다른 온도와 압력에 비해 효과가 가장 좋게 나타났는데 이는 생강 oil 이 유용성분을 용출하는데 있어 가장 적절한 온도와 압력이 45°C, 300 bar 라고 볼 수 있을 것 같다.

본 연구결과와 잘 알려진 합성항산화제인 BHA를 비교 하였을 때 BHA의  $\text{RC}_{50}$ 값인  $2.53 \pm 1.06 \mu\text{g/mL}$ 와 시료가 비슷한 DPPH 소거활성을 가진다고 볼 수 있다. 따라서 SFE oil은

합성항산화제와 같이 뛰어난 항산화능을 가짐을 알 수 있었다.

**Table 13. Scavenging effects of SFE<sup>2)</sup> oil on  $\alpha,\alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl radicals (DPPH · )**

Condition	Dilution (fold)	Scavenging effect (%)
35℃, 100bar	X150000	27.56±4.11
	X100000	37.08±2.29
	X50000	56.47±3.24
	X10000	86.38±1.74
35℃, 200bar	X150000	27.17±6.39
	X100000	35.85±5.78
	X50000	55.71±3.58
	X10000	86.71±1.01
35℃, 300bar	X150000	33.27±6.31
	X100000	42.54±4.56
	X50000	63.46±5.72
	X10000	89.09±0.86
35℃, 400bar	X150000	29.53±8.34
	X100000	40.60±7.76
	X50000	61.28±9.51
	X10000	87.29±2.25
45℃, 100bar	X150000	12.21±4.65
	X100000	19.98±6.05
	X50000	37.83±6.63
	X10000	75.65±4.50
45℃, 200bar	X150000	30.16±6.27
	X100000	40.48±5.67
	X50000	60.08±4.49
	X10000	88.81±0.91
45℃, 300bar	X150000	42.33±1.52
	X100000	50.10±1.77
	X50000	69.21±0.42
	X10000	92.43±2.10
45℃, 400bar	X150000	37.32±2.30
	X100000	46.52±1.09
	X50000	64.17±3.68
	X10000	90.55±0.55

Condition	Dilution (fold)	Scavenging effect (%)
55℃, 100bar	X150000	10.48±1.45
	X100000	15.95±1.54
	X50000	30.09±2.37
	X10000	73.17±1.52
55℃, 200bar	X150000	38.05±0.99
	X100000	46.66±0.82
	X50000	64.97±0.49
	X10000	89.62±1.52
55℃, 300bar	X150000	36.97±2.89
	X100000	45.33±1.19
	X50000	63.96±1.31
	X10000	90.16±0.45
55℃, 400bar	X150000	39.76±1.81
	X100000	48.88±0.88
	X50000	66.62±1.88
	X10000	90.97±0.71
BHA <sup>3)</sup>	1	26.15±16.63
	2.5	54.04±13.61
	5	77.15±6.77
	7.5	87.30±5.11
	10	89.53±1.39

<sup>1)</sup> Concentration required for 50% reduction of DPPH at 30 min after starting the reaction

<sup>2)</sup> SFE : Supercritical Fluid Extraction

<sup>3)</sup> BHA : Beta Hydroxy Acid

<sup>4)</sup> DPPH :  $\alpha,\alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl

#### (다) ABTS radical 소거활성

SFE oil의 ABTS radical 소거능을 살펴본 결과를 Table 14에 나타내었다. DPPH radical 소거활성 측정에서와 같이 온도와 압력에 따라 농도별로 실험한 결과 농도가 낮아질수록 저해 효과는 증가하는 것으로 나타났다. 전체적으로 압력이 높아질수록  $RC_{50}$  값이 감소하면서 높은 저해효과를 나타냈다. Trolox와 비교해 보면 50배가량 더 낮은  $RC_{50}$  값을 나타내는 것으로 보아 대조군인 Trolox의 비해 우수한 항산화능을 가짐을 알 수 있다.

**Table 14.** ABTS<sup>2)</sup> radical scavenging effects of SFE oils of ginger.

Condition	Dilution (fold)	Scavenging effect (%)
35°C, 100bar	X150000	16.55±0.03
	X100000	24.67±1.49
	X50000	46.03±4.33
	X10000	91.07±0.51
35°C, 200bar	X150000	20.25±0.95
	X100000	27.61±6.89
	X50000	60.01±3.85
	X10000	89.87±0.83
35°C, 300bar	X150000	22.31±0.83
	X100000	30.84±4.67
	X50000	63.49±3.46
	X10000	89.17±0.25
35°C, 400bar	X150000	22.02±1.04
	X100000	29.90±6.17
	X50000	64.77±4.08
	X10000	86.68±0.90
45°C, 100bar	X150000	10.16±0.14
	X100000	16.02±0.93
	X50000	27.15±5.46
	X10000	91.82±0.24
45°C, 200bar	X150000	21.06±0.48
	X100000	30.70±5.63
	X50000	64.83±6.41
	X10000	90.66±0.26
45°C, 300bar	X150000	21.86±1.77
	X100000	35.04±2.91
	X50000	60.31±7.54
	X10000	88.34±0.33
45°C, 400bar	X150000	26.36±2.25
	X100000	31.92±11.4
	X50000	67.84±10.04
	X10000	87.00±1.01

Condition	Dilution (fold)	Scavenging effect (%)
55℃, 100bar	X150000	7.03±1.12
	X100000	12.27±2.01
	X50000	20.65±5.51
	X10000	89.66±1.29
55℃, 200bar	X150000	19.59±1.37
	X100000	31.50±4.17
	X50000	56.60±8.08
	X10000	90.49±0.24
55℃, 300bar	X150000	22.93±4.83
	X100000	36.76±4.50
	X50000	63.46±11.25
	X10000	88.54±1.39
55℃, 400bar	X150000	23.05±3.47
	X100000	36.67±5.46
	X50000	65.80±9.11
	X10000	88.77±0.27
Trolox	5	14.44±0.77
	10	26.56±2.04
	30	75.52±9.33
	60	93.89±0.14

1) Concentration required for 50 % reduction of ABTS at 1 min after starting the reaction

2) ABTS : 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid).

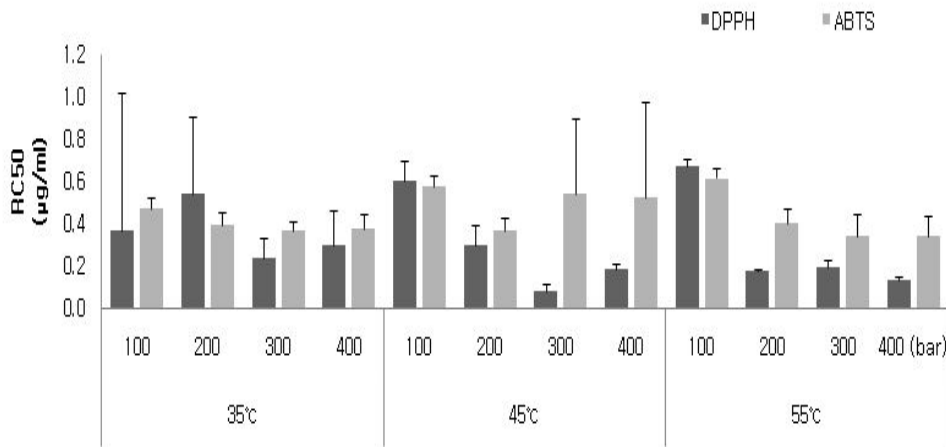


Fig. 17. Comparison of RC<sub>50</sub> values against DPPH- and ABTS-radicals of SFE oils from ginger.

### (3) 생강 초임계박 추출물의 항산화능 검색

#### (가) 수율

생강유 추출 후의 박의 효능을 검토하기 위하여 온도 35, 45, 55℃에 각각의 압력 100, 200, 300, 400 bar로 초임계추출 후의 생강 박을 에탄올 추출한 수율은 Table 15와 같다.

**Table 15. Yields of SFE marc from ginger.**

온도 (℃ )	압력 ( bar )	시간 ( h )	Yields <sup>1)</sup> (%)
35	100	2	16.0
	200		10.0
	300		10.0
	400		10.0
45	100	2	12.0
	200		10.0
	300		8.0
	400		10.0
55	100	2	8.0
	200		10.0
	300		8.0
	400		6.0

<sup>1)</sup> Percentage of each fraction to ethanol extract content.

(나) 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량

온도와 압력별로 폴리페놀 플라보노이드 함량 측정 결과는 Table 16과 같다. 폴리페놀 성분은 압력이 낮고 온도가 높을수록 효과적으로 용출되는 것을 알 수 있다. 이는 oil성분에 많이 함유되어있는 폴리페놀이 추출 시 낮은 압력에서는 오일 성분으로 용출이 안 된 것이라고 볼 수 있다. 이러한 점들을 봤을 때 초임계 오일 추출 시 고온고압에서 폴리페놀이 많이 용출된다는 것을 알 수 있다. 플라보노이드의 함량은 온도와 압력의 큰 영향을 받지 않았으며, 폴리페놀은 55℃, 100 bar에서 84.84±2.77 µg/mg, 플라보노이드는 45℃, 300 bar에서 8.90±1.37 µg/mg으로 가장 높은 함량을 나타냈다.

**Table 16. Total polyphenols, flavonoids contents of SFE marc from ginger**

Extraction condition	Total polyphenols <sup>1)</sup> (µg/mg)	Total flavonoid <sup>2)</sup> (µg/mg)
35℃, 100bar	48.59±14.12	7.54±1.49
35℃, 200bar	45.26±3.39	6.71±1.17
35℃, 300bar	46.04±1.85	7.19±0.18
35℃, 400bar	45.64±1.88	7.62±1.09
45℃, 100bar	67.24±2.30	6.13±0.31
45℃, 200bar	51.32±5.68	6.45±1.34
45℃, 300bar	49.09±3.64	8.90±1.37
45℃, 400bar	47.17±11.72	7.69±0.07
55℃, 100bar	84.84±2.77	6.53±0.34
55℃, 200bar	47.44±1.98	7.15±1.42
55℃, 300bar	45.59±6.24	7.14±0.06
55℃, 400bar	42.66±5.04	7.96±1.27

<sup>1)</sup> Micrograms of total polyphenol content/mg plants based on tannic acid as standard

<sup>2)</sup> Micrograms of total flavonoid content/mg plants based on quercetin as standard



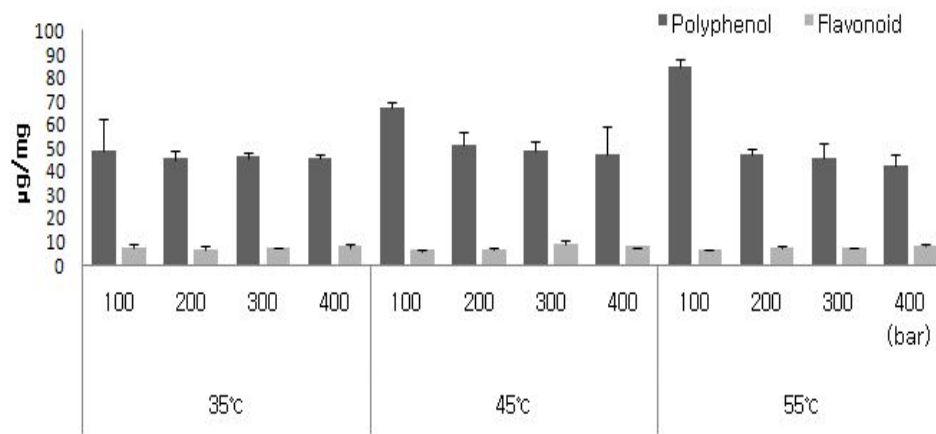


Fig. 18. Comparison of polyphenols and flavonoids contents of SFE marc from ginger

(다)  $\alpha$ - $\alpha$ -Diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl (DPPH) radical 소거활성

초임계 추출한 박의 DPPH radical 소거능을 살펴본 결과를 Table 17에 나타내었다. 시료의 농도를 10, 25, 50, 100  $\mu\text{g/mL}$ 으로 하여 사용했으며 농도가 높을수록 저해능은 비례적으로 증가했다. 55°C, 100 bar에서  $22.87 \pm 3.02 \mu\text{g/mL}$ 로 radical 소거능이 가장 높았다. 폴리페놀함량 또한 55°C, 100 bar에서 가장 높은 함량 나타낸 것으로 보아 DPPH radical 소거능과 상관관계가 있음을 알 수 있다.

**Table 17. DPPH<sup>4)</sup> radical scavenging effects of SFE<sup>2)</sup> marc.**

Part used	Concentration (µg/mL)	Scavenging effect (%)	RC <sub>50</sub> <sup>1)</sup> (µg/mL)
35°C, 100bar	10	11.69±2.76	55.20±22.11
	25	28.82±8.48	
	50	54.13±5.87	
	100	66.33±10.54	
35°C, 200bar	10	11.11±3.97	68.90±5.88
	25	24.59±5.58	
	50	44.15±5.03	
	100	65.9±2.83	
35°C, 300bar	10	10.03±3.89	62.54±14.24
	25	26.77±3.47	
	50	48.53±2.94	
	100	65.68±7.14	
35°C, 400bar	10	9.18±5.02	62.52±12.79
	25	24.71±2.65	
	50	47.61±3.71	
	100	66.59±3.41	
45°C, 100bar	10	20.39±6.47	30.67±6.13
	25	47.46±4.30	
	50	67.94±2.54	
	100	79.16±2.98	
45°C, 200bar	10	15.53±2.24	42.82±4.14
	25	32.73±5.19	
	50	57.22±4.44	
	100	74.11±2.13	
45°C, 300bar	10	11.08±3.16	43.76±3.94
	25	31.76±4.96	
	50	56.06±4.18	
	100	69.96±5.00	
45°C, 400bar	10	10.19±8.20	71.32±6.36
	25	25.14±3.06	
	50	45.04±4.12	
	100	63.72±5.47	

Part used	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Scavenging effect (%)	$\text{RC}_{50}^{1)}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
55°C, 100bar	10	29.47 $\pm$ 1.70	22.87 $\pm$ 3.02
	25	55.93 $\pm$ 2.39	
	50	75.15 $\pm$ 2.46	
	100	82.66 $\pm$ 2.29	
55°C, 200bar	10	13.18 $\pm$ 4.12	60.67 $\pm$ 13.92
	25	32.23 $\pm$ 8.32	
	50	50.9 $\pm$ 2.55	
	100	66.32 $\pm$ 8.98	
55°C, 300bar	10	5.82 $\pm$ 2.18	64.39 $\pm$ 13.48
	25	22.72 $\pm$ 3.77	
	50	45.13 $\pm$ 5.26	
	100	65.18 $\pm$ 1.85	
55°C, 400bar	10	5.67 $\pm$ 1.12	65.09 $\pm$ 13.86
	25	23.37 $\pm$ 4.44	
	50	47.45 $\pm$ 2.84	
	100	64.31 $\pm$ 5.30	
BHA <sup>3)</sup>	1	41.97 $\pm$ 5.93	1.62 $\pm$ 0.66
	2.5	66.73 $\pm$ 13.13	
	5	86.48 $\pm$ 8.08	
	7.5	91.42 $\pm$ 2.89	
	10	93.61 $\pm$ 1.65	

<sup>1)</sup> Concentration required for 50% reduction of DPPH at 30 min after starting the reaction.

<sup>2)</sup> SFE : Supercritical Fluid Extraction

<sup>3)</sup> BHA : Beta Hydroxy Acid

<sup>4)</sup> DPPH :  $\alpha,\alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl

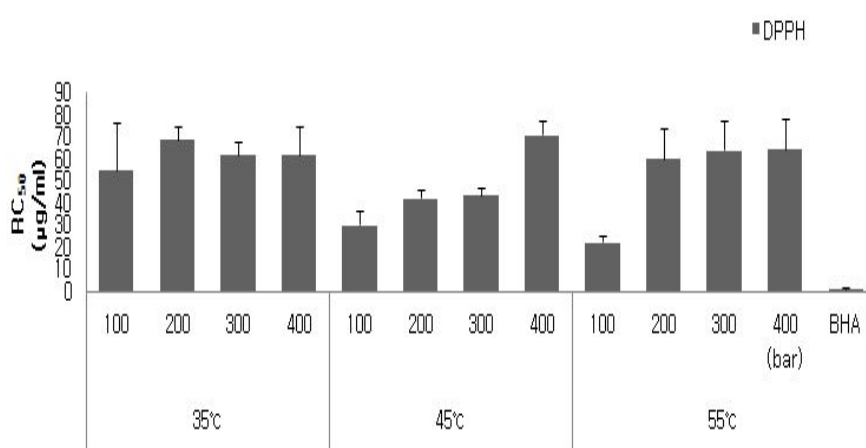


Fig. 19. DPPH radical scavenging activities of SFE marc from ginger

#### (4) 생강초고압 추출물의 항산화능 검색

##### (가) 수율

네 가지의 효소를 이용하여 초고압 액화처리장치로 추출한 생강추출물(Super-High Pressure Liquefy Extractor: SPL)추출한 생강의 추출 수율은 Table 18과 같다. 효소에 따라서 조금씩 차이가 났으며 SPL A 2.4%, SPL D 2.0%, SPL H 1.9%, SPL E 1.6%, SPL 1.1%의 순으로 수율이 나타났다. 이처럼 SPL A의 수율이 2.4%로 가장 높았으며 SPL은 1.1%로 가장 낮은 수율을 보였다.

**Table 18. Yields of SPL extract from ginger.**

Sample	Yields (%) <sup>1)</sup>
SPL <sup>2)</sup>	1.1
SPL A <sup>3)</sup>	2.4
SPL D <sup>4)</sup>	2.0
SPL E <sup>5)</sup>	1.6
SPL H <sup>6)</sup>	1.9

<sup>1)</sup> Percentage of each fraction to high pressure extract content.

<sup>2)</sup> SPL : non enzyme

<sup>3)</sup> SPL A : enzyme "Marugoto A"

<sup>4)</sup> SPL D : enzyme "Marugoto D"

<sup>5)</sup> SPL E : enzyme "Marugoto E"

<sup>6)</sup> SPL H : enzyme "Marugoto H"

##### (나) 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량

폴리페놀 함량 측정 결과 Table 19와 Fig. 20에 나타난 것과 같이 SPL>SPL E>SPL A>SPL H>SPL D순으로 나타났으며 효소를 넣지 않은 것이 26.01±7.16 µg/mg로 가장 높고 SPL D가 17.22±3.01 µg/mg로 가장 낮게 나타났다. 플라보노이드함량은 SPL>SPL D>SPL A>SPL H>SPL E 순으로 나타났으며 폴리페놀과 같이 효소를 넣지 않은 것이 7.65±2.12 µg/mg로 가장 높았으며 SPL E가 4.65±1.20 µg/mg로 가장 낮은 함량을 나타냈다.

**Table 19. Total polyphenols, flavonoids contents in SPL<sup>3)</sup> extract from ginger.**

	Total polyphenols <sup>1)</sup> (µg/mg)	Total flavonoid <sup>2)</sup> (µg/mg)
SPL	26.01±7.16	7.65±2.12
SPL A	21.73±5.03	5.81±0.82
SPL D	17.22±3.01	6.28±1.05
SPL E	23.37±5.33	4.65±1.20
SPL H	20.32±4.92	5.34±1.55

<sup>1)</sup> Micrograms of total polyphenol content/g plants based on tannic acid as standard

<sup>2)</sup> Micrograms of total flavonoid content/g plants based on quercetin as standard

<sup>3)</sup> SPL : Super-High Pressure Liquefy Extractor

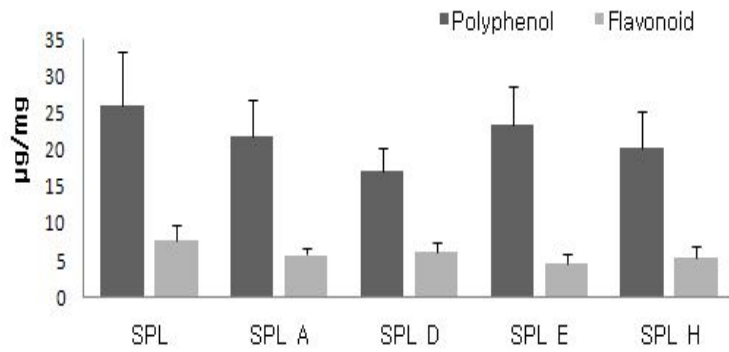


Fig. 20. Polyphenols and flavonoids contents in SPL of ginger.

(다) DPPH radical 소거활성

초고압추출한 생강의 DPPH radical 소거능을 살펴본 결과를 Fig 21에 나타내었다. 농도에 따라 저해효과는 증가했으며  $RC_{50}$  값은 효소를 첨가하지 않은 것이 가장 적은 수치를 나타냄으로 효과가 가장 좋다고 볼 수 있다. 초고압 추출은 용매로 물을 사용하였는데 전체적으로 70% ethanol 추출물에 비해 효과가 좋지 않았고, 나머지 효소 처리한 추출물은 효과가 더 좋을 것이라는 기대와는 달리 효소를 처리하지 않는 것에 비해 낮은 효과를 나타냈다. 이로 봤을 때 물 추출에 있어서는 효소가 큰 영향을 미치지 않는 것으로 볼 수 있다.

Table 20. DPPH<sup>4)</sup>-radical scavenging activities of SPL<sup>2)</sup> extracts

Sample	Concentration (µg/mL)	Scavenging effect (%)	$RC_{50}$ <sup>1)</sup> (µg/mL)
SPL	125	30.68	219.59
	250	56.20	
	500	63.62	
SPL A	250	18.63	779.24
	500	43.05	
	1000	58.70	
SPL D	250	45.08	440.93
	500	40.23	
	1000	96.97	
SPL E	250	37.01	554.52
	500	45.74	
	1000	71.34	
SPL H	250	48.83	297.54
	500	60.86	
	1000	99.81	
BHA <sup>3)</sup>	1	24.40	2.28
	2.5	54.36	
	5	79.08	
	7.5	91.78	
	10	93.67	

<sup>1)</sup> Concentration required for 50% reduction of DPPH at 30 min after starting the reaction

<sup>2)</sup> SPL : Super-High Pressure Liquefy Extractor

<sup>3)</sup> BHA : Beta Hydroxy Acid

<sup>4)</sup> DPPH : α,α-diphenyl-β-picrylhydrazyl

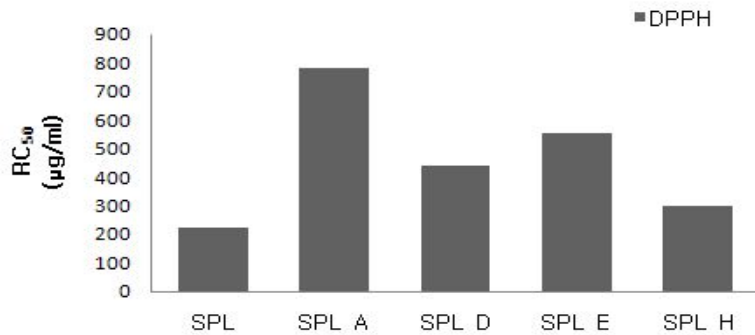


Fig. 21. DPPH radical scavenging activities of SPL extracts from ginger

## 2. 생강의 항염증 효과

### 가. 시료 및 실험 방법

#### (1) 세포주 배양

RAW 264.7 세포를 10% FBS(fetal bovine serum)와 1% antibiotics(penicillin/streptomycin)를 첨가한 DMEM 배지를 이용하여 5% CO<sub>2</sub>가 존재하는 37°C incubator에서 1주일에 2~3회 계대 배양하였다.

#### (2) Nitric oxide(NO) 생성량 측정

Raw 264.7 세포로부터 생성되는 활성질소종인 nitric oxide(NO)의 양은 세포 배양액 중 존재하는 NO<sup>2-</sup> 형태를 Griess Reagent 반응을 이용하여 측정하였다. 먼저 Raw 264.7 세포를 1×10<sup>5</sup> cells/mL로 96-well plate에 분주한 후 시료를 다양한 농도로 처리하여 24시간 동안 배양하고 100 ng/mL의 LPS를 첨가하여 24시간 배양하여 세포를 활성화시켰다. 이후 세포 배양상등액 100 µL과 동량의 Griess 시약(1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethyldiamine in 100% phosphoric acid)을 혼합하여 10분간 반응 시킨 후 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO의 농도(µM)는 sodium nitrate(NaNO<sub>2</sub>)를 사용하여 얻은 표준곡선과 비교하여 산출하였다.

#### (3) Western blot에 의한 단백질 발현 조절 효과 측정

LPS로 활성화된 Raw 264.7 세포로부터 유도되는 다양한 염증 단백질의 발현에 대한 생강 초임계 추출물의 효과를 알아보기 위해 Western blot을 실시하였다.

Raw 264.7 세포(1×10<sup>6</sup> cells/well)를 6-well plate에서 DMEM 배지를 이용하여 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양 후 배지를 제거하고 새로운 배지를 첨가하여 시료와 100 ng/mL의 LPS 처리하여 전 배양과 동일한 조건에서 배양하였다. 세포를 2~3회 PBS로 세척 후 1 mL의 lysis buffer(1 M Tris-HCl, 0.5 M EDTA, 1% Triton X-100, 100 mM PMSF)를 첨가, 30분~1시간 동안 용해시킨 후 13,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 세포막 성분 등을 제거하였다. 단백질 농도는 bovine serum albumin(BSA)를 표준화 한 Bio-Rad Protein Assay Kit를 사용하여 정량하였다. 단백질을 정량한 후 10% running gel과 4.5% stacking gel을 이용하여

125 V에서 SDS-polyacrylamide gel 전기영동을 실시하였다. 전기영동으로 분리한 단백질은 Immobilon-P transfer membrane과 transfer buffer(20% methanol, 25 mM Tris-HCl, 192 mM glycine)를 사용하여 400 mA에서 2시간 transfer시키고 5% non-fat skim milk solution으로 30분간 blocking하였다. TTBS 용액에 1:1000으로 희석한 일차 항체(iNOS, COX-2, HO-1)를 4시간 동안 반응시킨 후 TTBS로 3회 세척하고 1:2000으로 희석된 anti-rabbit IgG conjugated horse radish peroxidase(HRP) 이차 항체를 상온에서 2시간 반응시키고 TTBS로 세척하였다. 항체 반응이 끝난 membrane에 ECL detection kit로 발광하고 X-ray film에 노출시켜 단백질 발현 정도를 확인하였다.

## 나. 결과

### (1) Nitric oxide (NO) 생성량 측정

#### (가) 추출물 및 분획의 세포독성 및 NO 생성 억제능 측정

활성질소종(reactive nitrogen species)의 하나이며, 염증반응의 중요한 작용인자로 알려진 NO에 대한 소거활성을 알아보기 위해 생강 에탄올 추출물과 5가지의 용매 분획을 처리한 결과, 생강 에탄올 추출물 및 분획물은 헥산층 50 µg/mL 외에는 세포독성을 나타내지 않았으며, 부탄올층 외에는 농도 의존적으로 NO 생성을 억제하는 것을 알 수 있다. 특히 헥산층에서 가장 높은 억제능을 보여 오일에서도 높은 활성을 나타낼 것을 시사했다(Fig. 22).

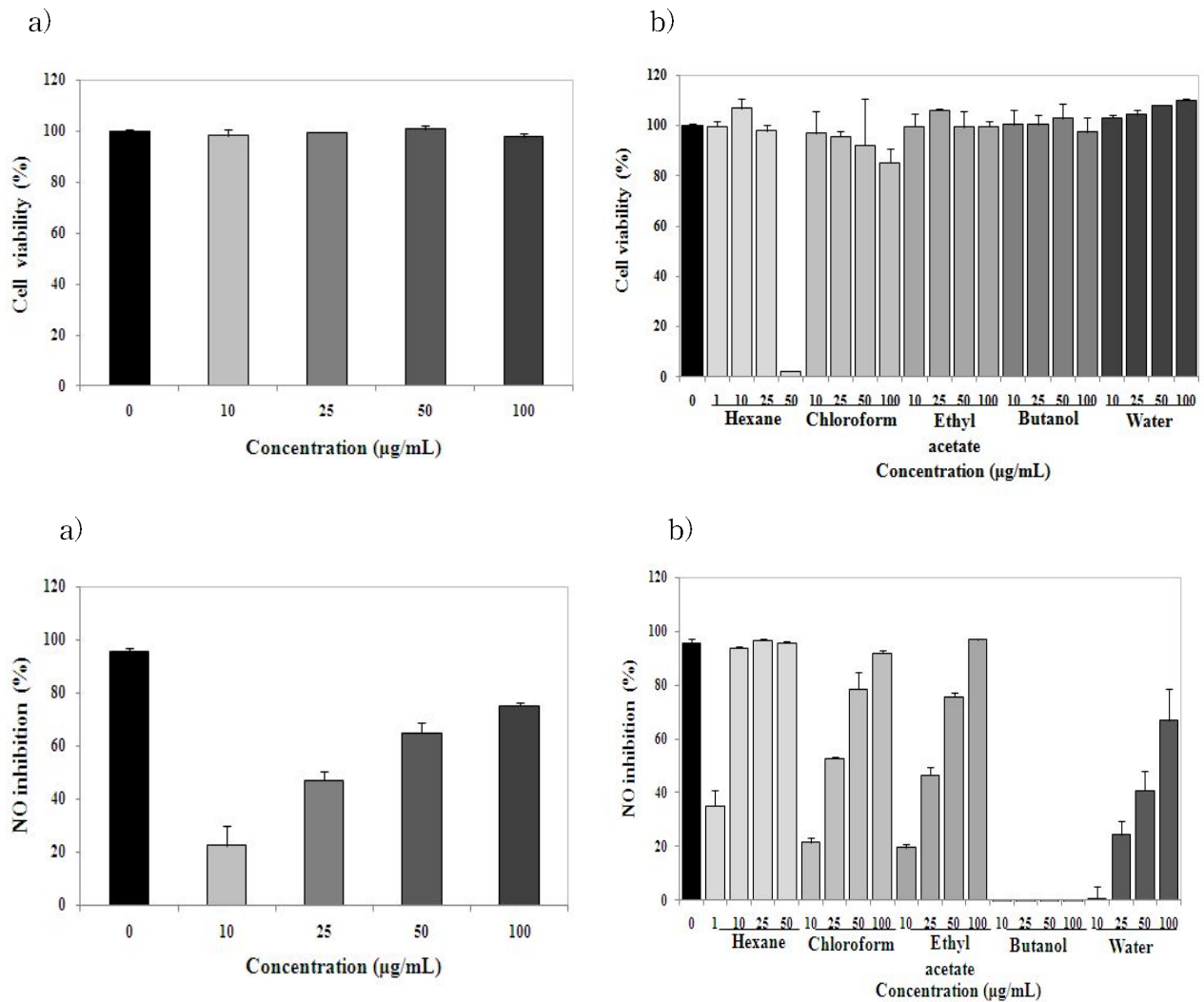


Fig. 22. Effects of ginger extract and fraction on cytotoxicity and LPS-induced NO production in RAW 264.7 cells a) *Zingiber officinale* R. extract b) *Zingiber officinale* R. fraction

(나) 초임계 오일의 세포독성 및 NO 생성 억제 활성 측정

생강의 초임계 추출 오일의 항염증 효과를 측정하기 위해, 100 bar의 압력에서 35, 45, 55°C에서 추출된 오일의 NO 소거 활성을 측정하였다. 그 결과, 55°C의 100 mg/mL 농도에서 약간의 독성이 나타났으며, 추출온도가 높아지면 NO 생성 억제능이 낮아지는 경향을 나타내어 고온에서는 활성을 억제하는 성분도 유출되는 것으로 사료되나, 온도에 의한 유의적인 차는 없었다(Fig. 23). 이와 같이, 35-55°C, 100 bar의 마일드한 조건에서 추출된 생강 초임계 오일에서도 높은 NO 소거능이 나타났다.



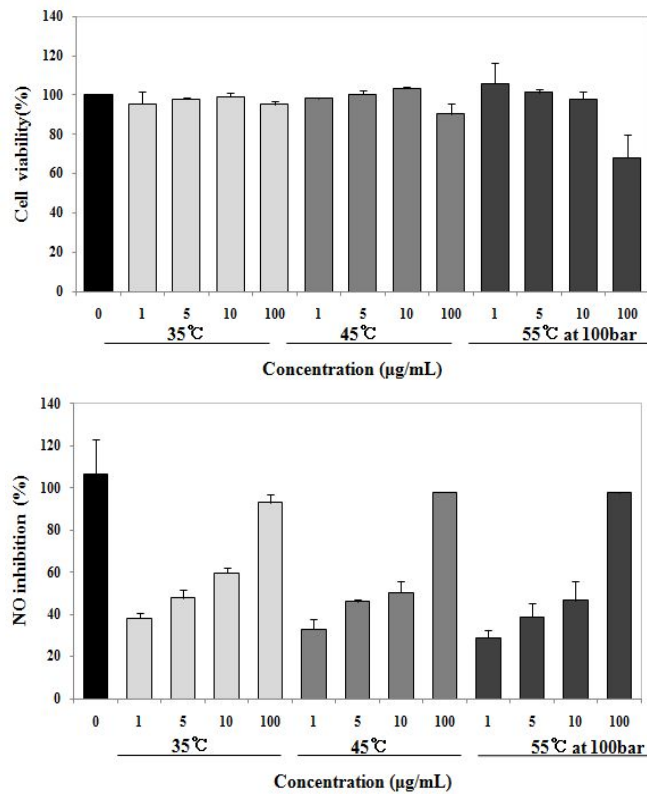


Fig. 23. Effects of SFE oil on cytotoxicity and LPS-induced NO production in RAW 264.7 cells

(다) 초임계 박의 세포독성 측정 및 NO 생성 억제 활성 측정

생강을 초임계 추출하여 오일을 얻은 후 남은 박의 항염증 효과를 검토하기 위하여 에탄올 추출하여 NO 생성에 대한 억제 효과를 실험하였다. 그 결과, Fig. 24 같이 추출 온도에 비례하여 고농도에서 세포 독성이 나타났으며, NO 소거능도 온도 상승과 함께 증가하는 경향을 나타내어 오일 결과와 일치하는 좋은 상관관계를 나타냈다. 10-50 mg/mL의 농도 구간에서 농도 의존적으로 높은 억제율을 나타내어, 오일과 함께 초임계 박도 항염증에 높은 효과가 있을 것으로 사료된다.

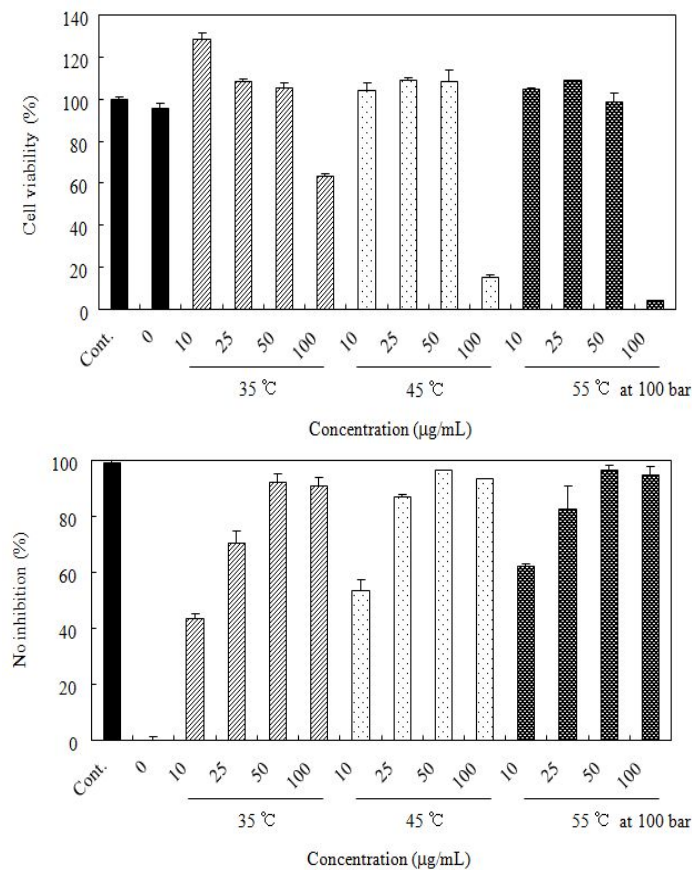


Fig. 24. Effects of SFE marc on cytotoxicity and LPS-induced NO production in RAW 264.7 cells

(라) Gingerol의 세포독성 측정 및 NO 생성 억제 활성 측정

생강의 활성 성분으로 알려진 gingerol의 NO 생성에 대한 억제 효과를 테스트 한 결과, 100 mg/mL 까지는 세포 독성이 없었으며 10 mg/mL에서 50% 정도의 NO 억제능을 나타냈다 (Fig. 25).

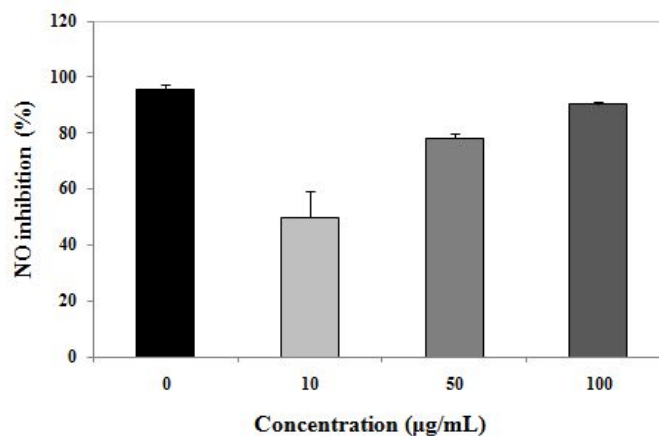


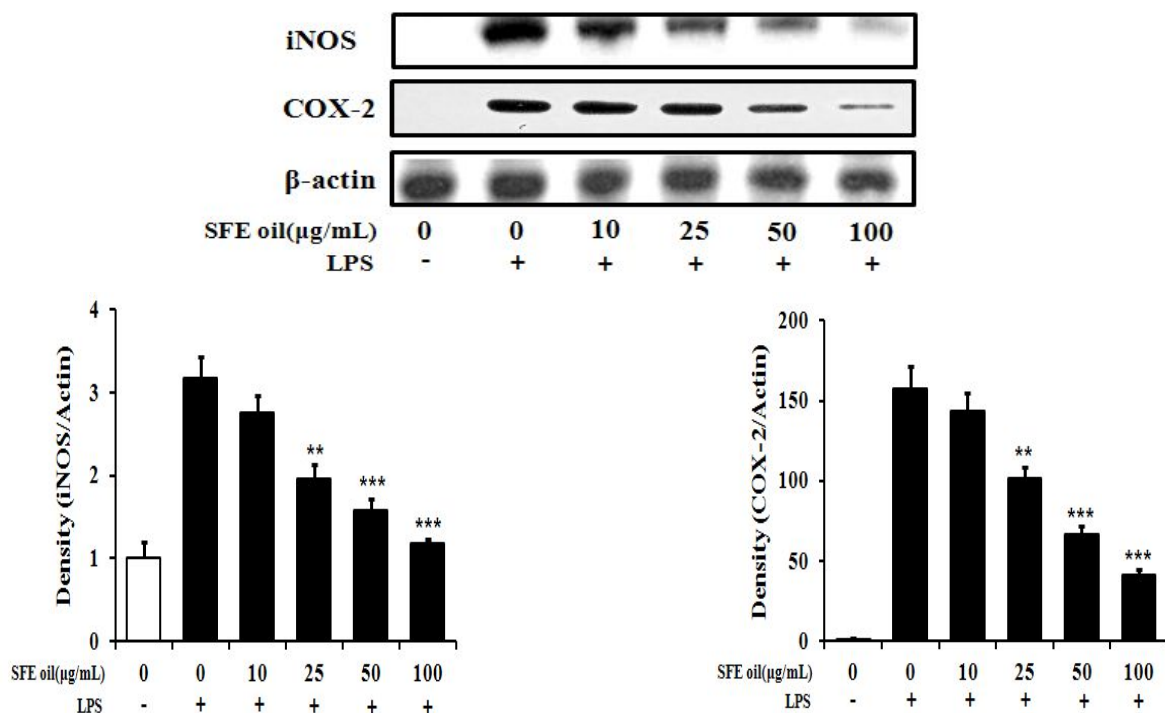
Fig. 25. Effects of Gingerol on cytotoxicity and LPS-induced NO production in RAW 264.7 cells

## (2) Western blot에 의한 단백질 발현 조절 효과 측정

### (가) 초임계 오일의 iNOS, COX-2 단백질 발현 억제 효과

염증 과정 중에는 많은 양의 염증유도 cytokines(pro-inflammatory cytokines), NO 그리고 PGE<sub>2</sub>가 inducible nitric oxide synthase(iNOS)와 COX-2에 의해 생성되며, NO는 신경전달, 혈관의 이완 및 세포 매개성 면역반응에 관여하는데, 특히 대식세포가 interferon- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ ) 또는 lipopolysaccharide(LPS)에 의해 자극될 때, inducible nitric oxide synthase(iNOS)가 발현되어 많은 양의 NO를 생성하게 되고 염증반응의 매개물질 역할을 하게 된다. COX-2는 염증 자극원에 의해 macrophage, fibroblast와 같은 염증성 세포에서 유도되며, 역시 염증반응에서의 prostaglandin은 대부분 COX-2에 의해 생성된다.

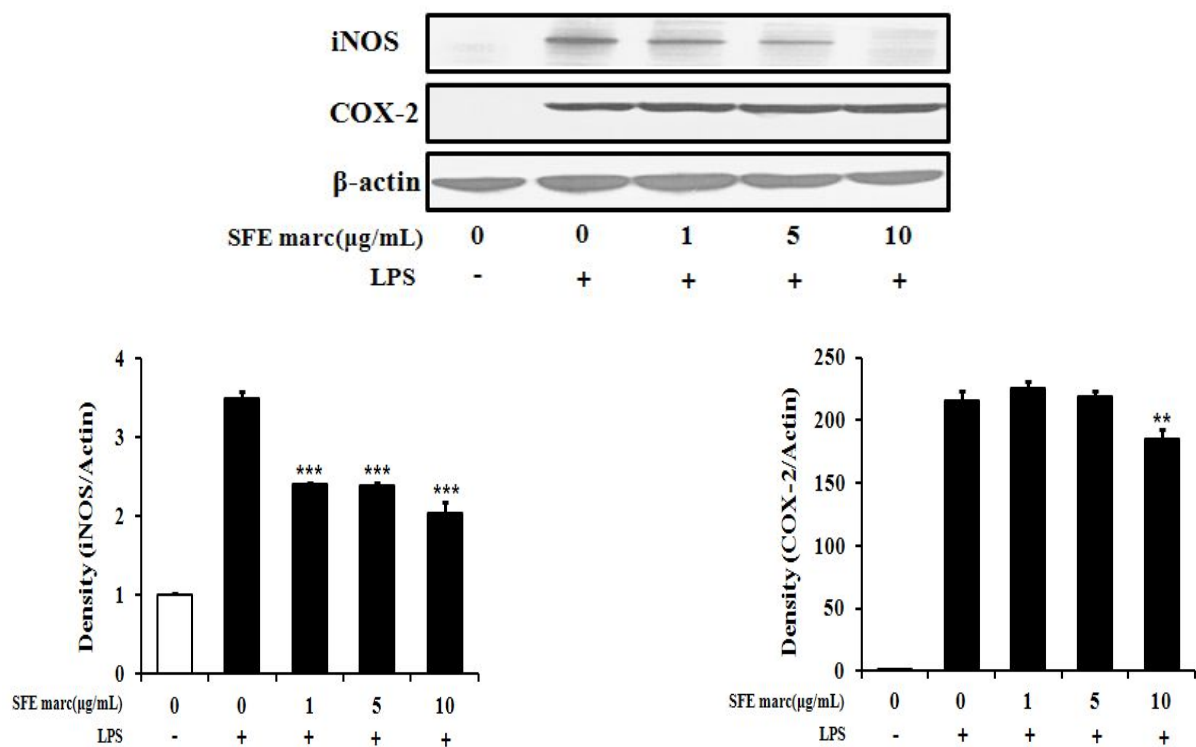
따라서 생강 초임계 오일이 iNOS와 COX-2 단백질에 미치는 영향을 알아보기 위하여 western blot 방법을 이용하여 세포질 내에서의 iNOS와 COX-2 단백질의 발현량을 조사하였다. Raw 264.7 세포에 LPS를 첨가하여 iNOS 단백질을 급격하게 발현시켜 초임계 오일을 농도별(10, 25, 50, 100  $\mu$ g/mL)로 처리한 결과, 발현량이 처리 농도가 증가함에 따라 iNOS 단백질 발현이 유의적으로 억제되었다. 또한, 염증반응에 중요한 역할을 하는 COX-2 단백질 역시에 따라 단백질 발현이 증가하였으나, 초임계 오일의 처리 농도가 높아질수록 COX-2 단백질 발현이 크게 억제되는 것을 확인 할 수 있었다. 이러한 결과는 초임계 오일이 LPS에 의해 활성화된 iNOS, COX-2 단백질 발현을 억제함으로써 염증 반응을 조절하여 예방 할 수 있을 것으로 사료된다.



**Fig. 26. Effects of SFE oil from ginger on the expression of iNOS and COX-2 protein in LPS-stimulated Raw 264.7 cells.** The Raw 264.7 cells ( $1 \times 10^6$  cells/mL) were incubated 24 h and then pretreated with SFE oil in the presence or absence of LPS (100 ng/mL) for 24 h. Equal amounts of total protein were resolved by SDS-PAGE. The data represent the mean  $\pm$  SD of three separate experiments. \*Values are significantly different from control (\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

(나) 박 에탄올 추출물의 iNOS, COX-2 및 HO-1 단백질 발현 억제효과

Raw 264.7 세포를 이용하여 LPS에 의하여 유도되는 박 에탄올 추출물의 iNOS, COX-2 발현 억제 여부를 western blot 방법으로 확인하였다(Fig. 27). 그 결과, LPS 처리에 따라 iNOS 단백질의 발현이 현저히 증가됨을 알 수 있었다. 여기에 박 에탄올 추출물 1, 5, 10  $\mu$ g/mL를 처리하였을 때, 농도 의존적으로 단백질 발현이 감소하였으며, 10  $\mu$ g/mL에서는 LPS에 의하여 유도된 iNOS의 발현이 거의 억제시킴을 확인하였다. 따라서 박 에탄올 추출물에 의한 활성화된 대식세포에서의 NO 생성 억제효과는 iNOS의 유전자발현 억제효과와 연관되는 것으로 나타났다. iNOS와 더불어 염증반응에 중요한 역할을 하는 COX-2의 단백질 발현에 대한 효과를 보았다. 1, 5  $\mu$ g/mL에서는 COX-2 단백질 발현 억제효과가 관찰 되지 않았으나, 10  $\mu$ g/mL에서는 약간의 농도 의존적으로 억제함이 관찰되었다. Heme oxygenase(HO)-1은 heme을 biliverdin으로 전환시키는 기능을 하는 효소이며 이 과정에서 만들어지는 산물이 항염증, 항산화 기능을 가진다고 알려져 있다. 다른 이성체인 HO-2와는 달리 HO-1은 발현이 조절되는 단백질로서, 비장이나 간의 일부 세포 등 특정한 기관을 제외하고는 거의 존재하지 않는다. 하지만 세포에 스트레스를 유발하는 다양한 자극에 의해 급격하게 발현이 증가되는데, 활성산소를 증가시키는  $H_2O_2$ , 자외선 같은 산화적 자극이나 LPS, 사이토카인 등의 염증성 자극, 중금속 등이 HO-1을 유도한다고 알려져 있다. 박 에탄올 추출물이 HO-1 단백질을 증가시키는 지, 증가된 HO-1을 통해 항알러지, 항산화 기능을 나타내는지 알아보았다. 그 결과, LPS에 의해 활성화된 Raw 264.7 세포에 박 에탄올 추출물 1, 5, 10  $\mu$ g/mL의 농도로 처리하였을 때, 무처리군에 비해 농도 의존적으로 HO-1의 발현이 증가됨을 확인하였다. 특히, 10  $\mu$ g/mL에서는 약 15 배 정도 HO-1의 발현이 크게 증가되었다.



**Fig. 27. Effects of ethanol extract in SFE marc from ginger on the expression of iNOS and COX-2 protein in LPS-stimulated Raw 264.7 cells.** The Raw 264.7 cells ( $1 \times 10^6$  cells/mL) were incubated 24 h and then pretreated with SFE marc extract in the presence or absence of LPS (100 ng/mL) for 24 h. Equal amounts of total protein were resolved by SDS-PAGE. The data represent the mean  $\pm$  SD of three separate experiments. \*Values are significantly different from control (\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

### 3. 생강의 항알러지 효과

#### 가. 시료 및 실험 방법

##### (1) 생강 오일의 항알러지 효과

##### (가) 세포생존율 측정

RBL-2H3 세포에 대한 세포독성은 IgE로 민감성을 증가시켜 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoleum bromide) 방법으로 측정하였다. RBL-2H3 세포( $1 \times 10^5$  cells/well)를 96-well plate에 450 ng/mL의 DNP-specific IgE를 함께 처리하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 배양 한 다음, 시료를 농도별로 처리하여 24시간 배양하였다. 각 well에 5 mg/mL 농도의 MTT 용액을 10 μL씩 넣고 4시간 동안 배양하면서 환원 반응시켰다. well의 배지를 제거하고 formazan 결정을 100 μL의 DMSO로 용해하여 ELISA reader로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 시료를 처리하지 않고 세포만 배양한 무처리군의 100% 생존율을 기준으로 상대적인 세포생존율(Cell viability; %)을 계산하였다.

##### (나) β-Hexosaminidase 방출 억제 측정

RBL-2H3 세포는 10% FBS, 1% antibiotics(penicillin/streptomycin)를 포함하는 DMEM 배지를 사용하였으며 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 세포 수를  $5 \times 10^5$  cells/well로 조절 한 후, 450 ng/mL의 IgE를 14~16시간 동안 감작시켰다. 배양 후 세포를 siraganian

bu5% C(119 mM NaCl, 5 mM KCl, c4 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM PIPES, 40 mM NaOH, pH 7c2)로 세척한 후, incubator bu5% C(119 mM NaCl, 5 mM KCl, c4 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM PIPES, 40 mM NaOH, 5c6 mM glucose, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, c1% bovine s Cum bu5% C, pH 7c2)를 넣고 10분간 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 반응하였다. 농도별 시료를 첨가하고 10분간 반응시키고, 10 µg/mL의 DNP-BSA를 첨가하고 다시 10분간 배양하여 세포를 활성화시켰다. 배양 후 ice 상에서 10분간 반응을 정지시키고 원심 분리하여 상층액 25 µL와 동량의 1 mM 기질용액 (p-ni에서 phenyl-β-acetyl-glutosamide in citrate bu5% C c1 M, pH 4c5)을 넣고 37°C incubator에서 1시간 동안 반응 시켰다. 반응 후, stop solutior( c1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub>, pH 10) 200 µL 씩 첨가하여 반응을 정지시키고 ELISA reader를 사용하여 405 nm에서 측정하였다.

#### (다) Prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>) 방출 억제 측정

활성화된 세포로부터 생성되는 염증 매개 물질인 Prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)의 양을 세포 배양액으로부터 항원-항체 반응을 이용하여 측정하였다. RBL-2H3 세포(1×10<sup>6</sup> cells/well)를 6-well plate에 450 ng/mL의 IgE를 처리하여 16시간 동안 배양하였다. 새로운 배지에 시료를 농도별로 처리하고 DNP-BSA(10 µg/mL)를 처리하여 4시간 동안 배양시켰다. 배양 후, 분비된 PGE<sub>2</sub>를 ELISA kit를 이용하여 생성량을 측정하였으며, ELISA reader로 420 nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였다.

#### (라) Interleukin 4(IL-4) 생성 억제 측정

활성화된 RBL-2H3 세포로부터 생성되는 전염증성 사이토카인인 IL-4의 양을 항원-항체 반응을 이용하여 측정하였다. RBL-2H3 세포를 6-well plate에 1×10<sup>6</sup> cells/mL로 450 ng/mL의 IgE를 함께 처리하여 16시간 동안 배양하였다. 새로운 배지에 시료를 농도별로 처리하고 DNP-BSA(10 µg/mL)를 첨가하여 4시간 동안 배양시켰다. 배양 후, 분비된 IL-4를 kit를 이용하여 생성량을 측정하였으며, ELISA reader로 405~420 nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였다.

### (2) 생강 박의 항알레르기 효과

#### (가) 세포생존율 측정

RBL-2H3 세포에 대한 세포독성은 IgE로 민감성을 증가시켜 MTT (3-4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoleumbromide) 방법으로 측정하였다. RBL-2H3 세포(1×10<sup>5</sup> cells/well)를 96-well plate에 450 ng/mL의 DNP-specific IgE를 함께 처리하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 배양 한 다음, 시료를 농도별로 처리하여 24시간 배양하였다. 각 well에 5 mg/mL 농도의 MTT 용액을 10 µL씩 넣고 4시간 동안 배양하면서 환원 반응 시켰다. well의 배지를 제거하고 formazan 결정을 100 mL의 DMSO로 용해하여 ELISA reader로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 시료를 처리하지 않고 세포만 배양한 무처리군의 100% 생존율을 기준으로 상대적인 세포생존율(Cell viability; %)을 계산하였다. 활성화된 RBL-2H3 세포에 대한 박 에탄올 추출물의 독성 정도를 조사하기 위하여 다양한 농도로 세포에 24시간 동안 처리한 다음 MTT assay를 실시하였다.

#### (나) $\beta$ -Hexosaminidase 방출 억제 측정

RBL-2H3 세포는 10% FBS, 1% antibiotics(penicillin/streptomycin)를 포함하는 DMEM 배지를 사용하였으며 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 세포 수를  $5 \times 10^5$  cells/well로 조절한 후, 450 ng/mL의 IgE를 14~16시간 동안 감작시켰다. 배양 후 세포를 siraganian buffer(119 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.4 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM PIPES, 40 mM NaOH, pH 7.2)로 세척한 후, incubation buffer(119 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.4 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM PIPES, 40 mM NaOH, 5.6 mM glucose, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1% bovine serum buffer, pH 7.2)를 넣고 10분간 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 반응하였다. 농도별 시료를 첨가하고 10분간 반응시키고, 10 µg/mL의 DNP-BSA를 첨가하고 다시 10분간 배양하여 세포를 활성화시켰다. 배양 후 ice 상에서 10분간 반응을 정지시키고 원심 분리하여 상층액 25 µL와 동량의 1 mM 기질용액(p-nitrophenyl- $\beta$ -acetyl-glucosamide in citrate buffer 0.1 M, pH 4.5)을 넣고 37°C incubator에서 1시간 동안 반응 시켰다. 반응 후, stop solution(0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub>, pH 10) 200 µL 씩 첨가하여 반응을 정지시키고 ELISA reader를 사용하여 405 nm에서 측정하였다.

#### (다) Prostaglandin E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>) 방출 억제 측정

활성화된 세포로부터 생성되는 염증 매개 물질인 Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)의 양을 세포 배양액으로부터 항원-항체 반응을 이용하여 측정하였다. RBL-2H3 세포( $1 \times 10^6$  cells/well)를 6-well plate에 450 ng/mL의 IgE를 처리하여 16시간 동안 배양하였다. 새로운 배지에 시료를 농도별로 처리하고 DNP-BSA(10 µg/mL)를 처리하여 4시간 동안 배양시켰다. 배양 후, 분비된 PGE<sub>2</sub>를 ELISA kit를 이용하여 생성량을 측정하였으며, ELISA reader로 420 nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였다.

#### (라) Interleukin 4(IL-4) 생성 억제 측정

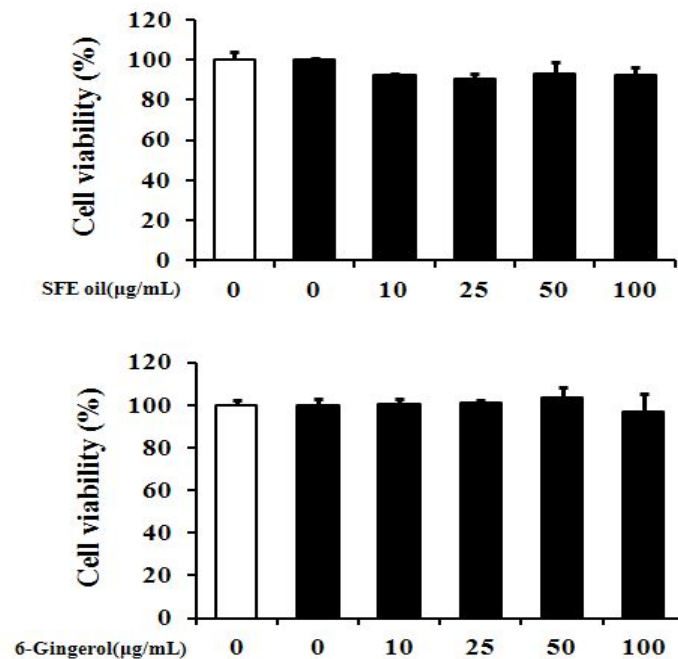
활성화된 RBL-2H3 세포로부터 생성되는 전염증성 사이토카인인 IL-4의 양을 항원-항체 반응을 이용하여 측정하였다. RBL-2H3 세포를 6-well plate에  $1 \times 10^6$  cells/mL로 450 ng/mL의 IgE를 함께 처리하여 16시간 동안 배양하였다. 새로운 배지에 시료를 농도별로 처리하고 DNP-BSA(10 µg/mL)를 첨가하여 4시간 동안 배양시켰다. 배양 후, 분비된 IL-4를 kit를 이용하여 생성량을 측정하였으며, ELISA reader로 405~420 nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였다.

### 나. 결과

#### (1) 생강 오일의 항알러지 효과

##### (가) 생강 오일의 세포독성

대사과정이 온전한 세포의 미토콘드리아 내에 탈수소 효소 노란색 수용성 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoleum bromide)를 비수용성의 자주색 MTT formazan 결정으로 환원시키는 원리를 이용한 것으로 적절한 파장에서 microplate reader로 흡광도를 측정함으로써 대사적으로 왕성한 세포의 농도를 반영하게 된다. RBL-2H3



**Fig. 28. Cell cytotoxicity of SFE oil from ginger and 6-gingerol in RBL-2H3 cells.** The cells ( $1 \times 10^5$  cells/well) were cultured with 450 ng/mL of DNP-specific IgE overnight. After treatment with varying dosed of SFE oil and 6-gingerol, cells were cultured for 24 h. The cytotoxicity of SFE oil and 6-gingerol on RBL-2H3 cells was determined by MTT assay. The value represents mean  $\pm$  SD of three different experiments.

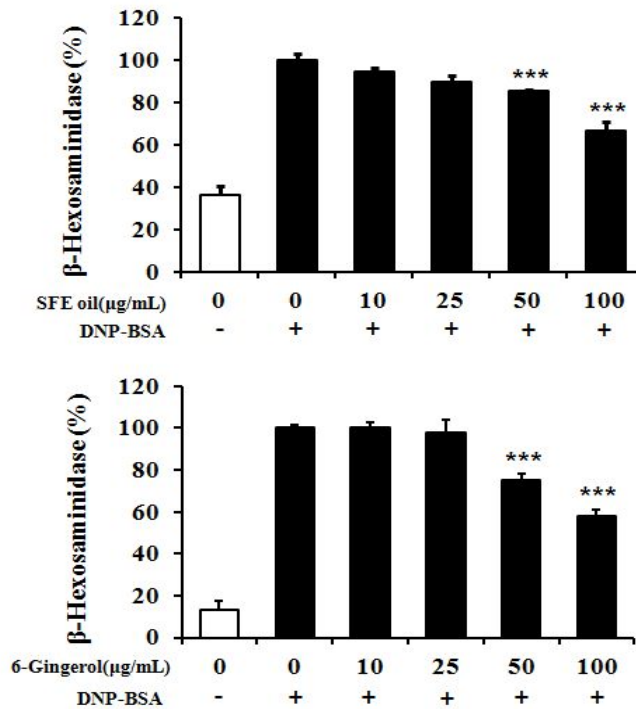
세포에 IgE를 감작시켜 초임계 오일(45°C, 300 bar)과 주성분인 6-성분인 6-gingerol에 대한 독성을 측정하였다(Fig. 28). 그 결과, 초임계 오일과 6-성분인 6-gingerol을 처리하지 않은 대조군을 생존율 100%로 보았을 때, 시료를 10, 25, 50, 100 µg/mL의 농도에서 80% 이상의 높은 생존율을 보여 독성이 없는 것으로 나타났다.

#### (나) $\beta$ -Hexosaminidase 방출 억제 활성

$\beta$ -hexosaminidase는 비만세포가 항원에 의한 면역학적인 또는 비면역학적 자극에 의해 활성화되었을 때 히스타민과 세포외로 분비된다.  $\beta$ -hexosaminidase의 정량은 이들 세포에서 탈과립의 지표이기 때문에 알레르기 억제물질의 생물활성 측정에 유용하게 사용되고 있다.

초임계 오일의 비만세포 활성화 억제효과를 검토하기 위해, RBL-2H3 세포를 IgE로 감작시키고, DNP-BSA를 이용한 항원자극 후 분비되는  $\beta$ -hexosaminidase량을 측정하였다(Fig. 29). 초임계 오일을 10, 25, 50, 100 µg/mL의 농도로 처리하였을 때, 94%, 90%, 85%, 66%로 농도 의존적으로 억제되었다. 주성분인 6-gingerol을 이용하여 같은 농도로 처리하였을 때, 100%, 97%, 75%, 58%로 오일 추출물과 비슷한 수치를 보여주었다. 이는 초임계 오일에 6-gingerol이 15% 정도 함유되어 있으므로 6-gingerol이 단일성분인 점을 고려한다면 초임계 오일이 상당한 알레르기 억제 효과가 우수하다는 것을 알 수 있다.

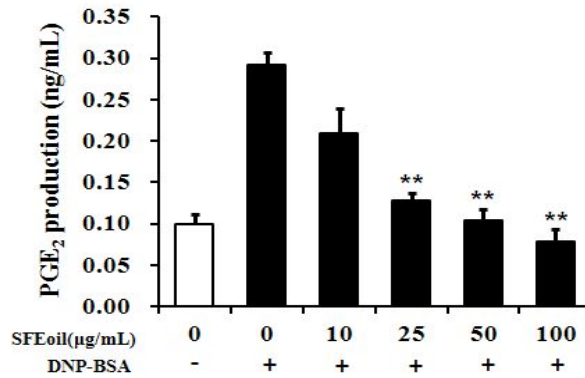




**Fig. 29. Inhibitory effects of SFE oil from ginger and 6-gingerol on  $\beta$ -hexosaminidase release in RBL-2H3 cells induced by IgE with DNP-BSA.** RBL-2H3 cells ( $5 \times 10^5$  cells/well) were sensitized with 450 ng/mL of DNP-specific IgE overnight and pretreated with varying doses of SFE oil from ginger and 6-gingerol for 30 min. Cells were stimulated with 100 ng/mL of DNP-BSA for 30 min. The degranulation was determined by measurement of the activity of  $\beta$ -hexosaminidase in culture media. The value represents mean  $\pm$  SD of three different experiments. \*Values are significantly different from control ( $***p < 0.001$ ).

#### (다) PGE<sub>2</sub> 생성 억제 활성

PGE<sub>2</sub>는 prostaglandin endoperoxide synthase 효소인 COX-2에 의해 합성되는 염증 매개 물질로서 다양한 염증 질환에 기여하며, 과도하면 부작용을 유발하기도 한다. 따라서 활성화된 RBL-2H3 세포로부터 분비되는 염증 매개 물질인 PGE<sub>2</sub>에 대한 초임계 오일의 효과를 조사하기 위하여 10, 25, 50, 100  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하여 ELISA kit 방법으로 측정하였다(Fig. 30). RBL-2H3 세포에 대한 PGE<sub>2</sub>의 분비는 2에만 배양하였을 경우, 0.10 ng/mL인 반면, DNP-BSA의 처리 대는 현저히 증가하였다. 초임계 오일을 10, 25, 50, 100  $\mu\text{g/mL}$  농도로 처리하였을 때, 각각 0.20, 0.13, 0.10, 0.07 ng/mL로 측정되었다. 이로 인해 초임계 오일이 활성화된 RBL-2H3 세포에서 분비되는 PGE<sub>2</sub>의 분비를 농도 의존적으로 유의성 있게 감소하는 것을 알 수 있다.

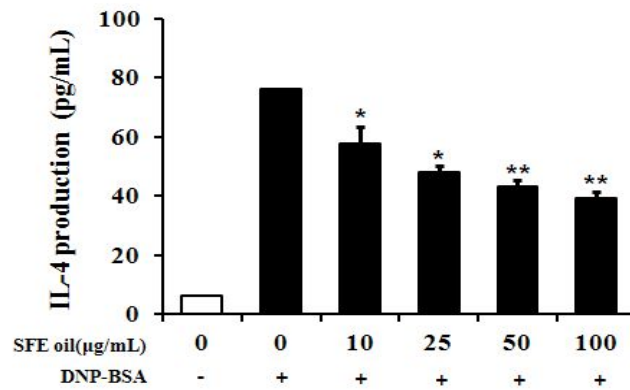


**Fig. 30. Effects of SFE oil from ginger on IgE with DNP-BSA-induced PGE<sub>2</sub> production in RBL-2H3 cells.** The RBL-2H3 cells ( $1 \times 10^6$  cells/well) were incubated overnight in 6-well plate with 450 ng/mL DNP-specific IgE in medium. The cells were pretreated with various concentration of SFE oil from ginger and then stimulated with 10 µg/mL DNP-BSA for 10 min. The level of cytokine of in the supernatant was measured by using ELISA kit assay. The value represents the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. \*Values are significantly different from control (\*\* $p < 0.01$ ).

#### (라) IL-4 생성 억제 활성

초임계 오일의 IgE 항원으로 활성화된 RBL-2H3 세포로부터 분비되는 염증 cytokine인 IL-4에 대한 효과를 알아보기 위해 농도별로(10, 25, 50, 100 µg/mL) 처리한 후 ELISA kit 방법으로 측정하였다(Fig. 31).

그 결과, 세포만 배양한 경우 6 pg/mL로 IL-4의 생성이 낮게 검출되었으며, DNP-BSA 처리에 따라 76 pg/mL로 현저히 증가함을 알 수 있었다. 반면, 활성화된 RBL-2H3 세포에 의해 유도된 IL-4의 생성은 초임계 오일을 10, 25, 50, 100 µg/mL로 처리하였을 때, 각각 57, 48, 43, 39 pg/mL로 농도 의존적으로 억제 되는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 초임계 오일은 활성화된 RBL-2H3 세포로부터 분비되는 IL-4의 생성을 억제하는 것으로 나타나 염증 반응을 유도하는 사이토카인의 생성을 조절시키는 것을 확인 할 수 있었다.

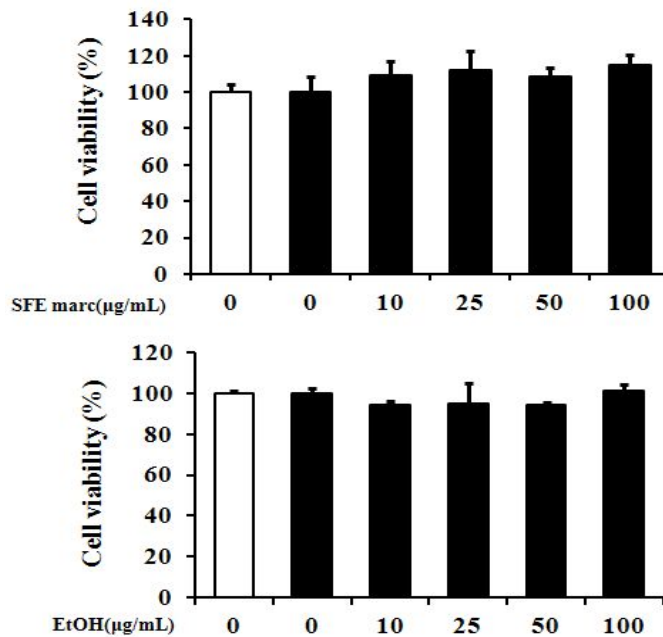


**Fig. 31. Effects of SFE oil from ginger on IgE with DNP-BSA-induced IL-4 production in RBL-2H3 cells.** The RBL-2H3 cells ( $1 \times 10^6$  cells/well) were incubated overnight in 6-well plate with 450 ng/mL DNP-specific IgE in medium. The cells were pretreated with various concentration of SFE oil from ginger and then stimulated with 10 µg/mL DNP-BSA for 10 min. The level of cytokine of in the supernatant was measured by using ELISA kit assay. The value represents the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. \*Values are significantly different from control (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

## (2) 생강 박의 항알레르기 효과

### (가) 생강 박의 세포생존율

세포생존율은 RBL-2H3 세포만 배양했을 때의 세포생존도 100%를 기준으로 박 에탄올 추출물(55°C, 100 bar)과 에탄올 추출물을 농도별(55°C, 100 bar)과 에탄올 추출)에서 약 90% 이상의 생존율이 확인되어 이후 실험은 독성이 없는 농도범위에서 실험을 수행하였다. 이는 박 에탄올 추출물이 보여주는 항 알레르기 효과가 세포 생존율의 감소에 의한 것이 아니라 추출물의 고유한 특성임을 알 수 있다.



**Fig. 32. Cell cytotoxicity of ethanol extract in SFE marc from ginger and ethanol extract in RBL-2H3 cells.** The cells ( $1 \times 10^5$  cells/well) were cultured with 450 ng/mL of DNP-specific IgE overnight. After treatment with varying dosed in ethanol extract of SFE marc and ethanol extract, cells were cultured for 24 h. The cytotoxicity in ethanol extract of SFE marc and ethanol extract on RBL-2H3 cells was determined by MTT assay. The value represents mean  $\pm$  SD of three different experiments.

#### (나) $\beta$ -Hexosaminidase 방출 억제 활성

박 에탄올 추출물의 항 알레르기 효과를 알아보기 위해 탈과립을 초래하는  $\beta$ -hexosaminidase 분비에 미치는 영향을 RBL-2H3 세포에서 측정하였다(Fig. 33). 먼저 RBL-2H3 세포에 탈과립을 유도하기 위하여 IgE를 감작시킨 후, DNP-BSA에 의한 항원 자극을 시켜 분비를 유도시켰다. 그 결과, 10, 25, 50, 100  $\mu$ g/mL의 농도를 처리하였을 때, 에탄올 추출물(90%, 84%, 82%, 79%)에 비해 박 에탄올 추출물은 각각 86%, 65%, 63%, 47%의 결과를 나타내어  $\beta$ -hexosaminidase 분비에 대한 억제 활성이 우수함을 알 수 있었다.

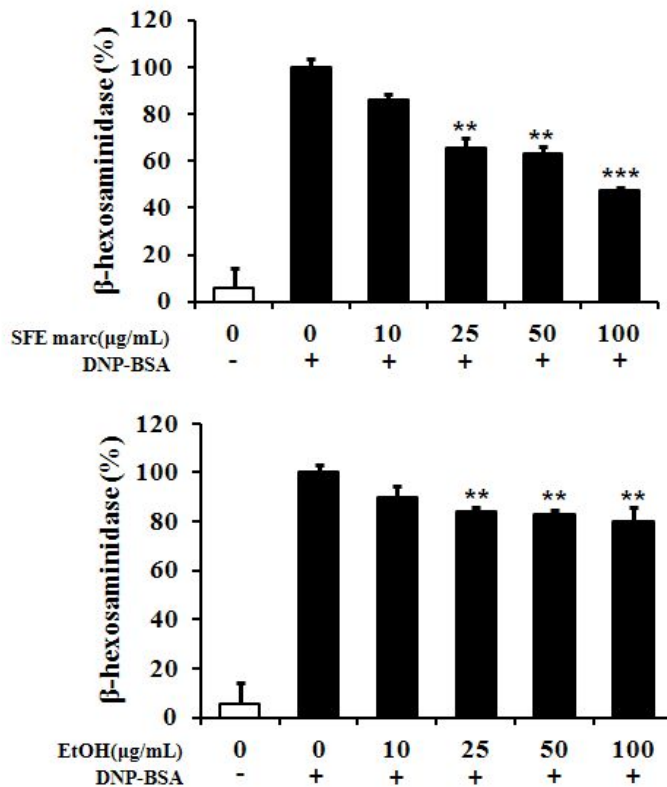
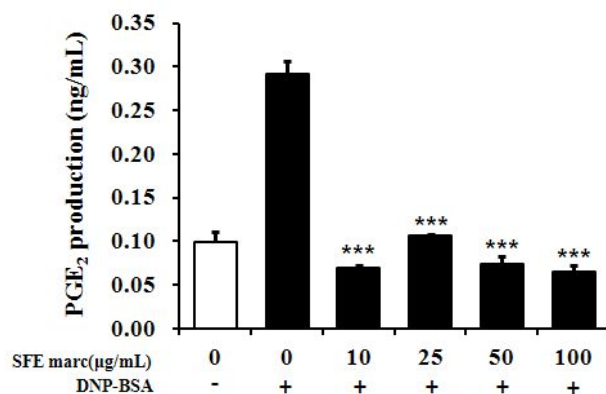


Fig. 33. Inhibitory effects of ethanol extract in SFE marc from ginger and ethanol extract on  $\beta$ -hexosaminidase release in RBL-2H3 cells induced by IgE with DNP-BSA. RBL-2H3 cells ( $5 \times 10^5$  cells/well) were sensitized with 450 ng/mL of DNP-specific IgE overnight and pretreated with varying dosed in ethanol extract of SFE marc from ginger and ethanol extract for 10 min. Cells were stimulated with 10  $\mu$ g/mL of DNP-BSA for 10 min. The degranulation was determined by measurement of the activity of  $\beta$ -hexosaminidase in culture media. The value represents mean  $\pm$  SD of three different experiments. \*Values are significantly different from control (\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

#### (다) PGE<sub>2</sub> 생성 억제 활성

활성화된 RBL-2H3 세포로부터 분비되는 염증매개물질인 PGE<sub>2</sub>에 대한 박 에탄올 추출물의 효과를 알아보기 위해 10, 25, 50, 100  $\mu$ g/mL의 농도로 처리하여 ELISA kit 방법으로 측정하였다(Fig. 34).

RBL-2H3 세포에서 PGE<sub>2</sub>의 분비는 세포만 배양했을 경우 0.09 ng/mL로 매우 낮게 검출된 반면, DNP-BSA에 의한 항원자극에 의해서는 0.29 ng/mL로 현저히 증가하였다. 박 에탄올 추출물을 10, 25, 50, 100  $\mu$ g/mL의 농도로 처리하였을 때 활성화된 RBL-2H3 세포로부터 분비되는 PGE<sub>2</sub>가 박 에탄올 추출물의 처리에 농도 의존적으로 유의성 있게 분비를 억제하였다. 따라서 박 에탄올 추출물이 염증반응을 유도하는 염증 매개물질인 PGE<sub>2</sub>의 생성을 억제함으로써 항염증 효과를 나타낸다는 것을 알 수 있다.



**Fig. 34. Effects of ethanol extract in SFE marc from ginger on IgE with DNP-BSA-induced PGE<sub>2</sub> production in RBL-2H3 cells.** The RBL-2H3 cells ( $1 \times 10^6$  cells/well) were incubated overnight in 6-well plate with 450 ng/mL DNP-specific IgE in medium. The cells were pretreated with various concentration in ethanol extract of SFE marc from ginger and then stimulated with 10 µg/mL DNP-BSA for 10 min. The level of cytokine of in the supernatant was measured by using ELISA kit assay. The value represents the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. \*Values are significantly different from control (\*\*\*) $p < 0.001$ .

#### (라) IL-4 분비 억제 활성

박 에탄올 추출물의 활성화된 RBL-2H3 세포로부터 분비되는 염증 cytokine인 IL-4의 억제 효과를 알아보기 위해 농도별로 (10, 25, 50, 100 µg/mL) 처리한 후 ELISA 방법을 이용하여 측정하였다(Fig. 35). 그 결과, 세포만 배양한 경우, 6 pg/mL로 IL-4의 생성이 낮게 검출되었으며, DNP-BSA 처리군에서는 76 pg/mL의 수치로 현저히 증가함을 볼 수 있었다. 반면, 활성화된 RBL-2H3 세포에 의해 유도된 IL-4의 생성은 박 에탄올 추출물을 10, 25, 50, 100 µg/mL의 농도로 처리하였을 때, 각각 57, 48, 43, 39 pg/mL로 억제 되는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 박 에탄올 추출물은 활성화된 RBL-2H3 세포로부터 분비되는 IL-4의 생성을 억제 하는 것으로 나타나 염증 반응을 유도하는 사이토카인의 생성을 조절시키는 것을 확인 할 수 있었다.

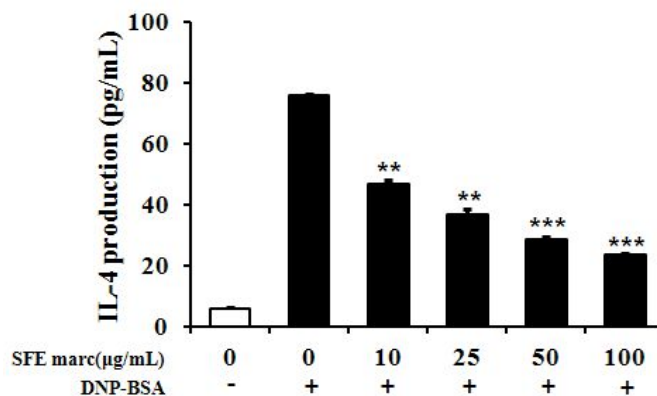


Fig. 35. Effects of ethanol extract in SFE marc from ginger on IgE with DNP-BSA-induced IL-4 production in RBL-2H3 cells. The RBL-2H3 cells ( $1 \times 10^6$  cells/well) were incubated overnight in 6-well plate with 450 ng/mL DNP-specific IgE in medium. The cells were pretreated with various concentrations in ethanol extract of SFE marc from ginger and then stimulated with 10 µg/mL DNP-BSA for 10 min. The level of cytokine of in the supernatant was measured by using ELISA kit assay. The value represents the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. \*Values are significantly different from control (\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

#### 4. 생강의 활성 성분 분석

##### 가. 시료 및 실험 방법

##### (1) Gingerol 및 shogaol 함량

생강 분획물 및 초임계 추출물에 함유된 6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol, 6-shogaol 등의 gingerol 함량을 HPLC(Jasco Co., Japan)를 이용하여 정량하였다. 컬럼은 Waters symmetry C-8 reversed phase column(150  $\times$  3.9 mm, Cat. No. WATO 54235)을, 이동상은 methanol-water(46:35, v/v)를 1 mL/min의 속도로 용출하였고 시료의 검출은 UV detector로 282 nm에서 methan. 분석표준물질은 6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol, 6-shogaol은 Chromadex사에서 구입하여 사용하였다. 생강추출물을 5 mg/mL 농도로 메탄올에 녹인 후 0.45 µm syringe filter(Millipore)로 여과하여 제조하였고 이를 분석용 시료로 사용하였다.

##### 나. 결과

##### (1) 생강 추출물 및 분획의 gingerol 및 shogaol 함량 측정

생강의 유용 성분으로 알려진 6-, 8-, 10-gingerol, 6-shogaol, curcumin의 분획에 따른 함량을 검토하기 위하여, 에탄올 추출물과 그 분획물인 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올, 물층을 HPLC로 분석하였다. 그 결과, 헥산층에서 높은 함량의 진저롤과 쇼가올을 확인하였다. 특히, 6-gingerol이 헥산층에 24.9%로 진저롤 중 가장 높은 함량을 나타냈다. 이는 생강 오일에 6-gingerol 함량이 온도와 압력에 따라 15~20% 함유되어 있는 것과 일치되는 것을 알 수 있다(Table 21).

Table 21. 생강추출물의 gingerol 함량

Sample	Content (%)				
	6-gingerol	curcumin	6-shogaol	8-gingerol	10-gingerol
EtOH	1.67	0.15	0.12	0.30	0.19
Hexane	24.97	0.90	3.54	6.23	4.76
Chloroform	3.74	1.49	0.14	0.37	0.23
EtOAc	0.46	0.00	0.02	0.00	0.00
BuOH	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Water	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00



### 제 3 절 미나리 발효액의 간 기능 개선에 대한 효능 연구

#### 1. 흑설탕과 올리고당으로 발효한 추출물의 항산화 효과

##### 가. 시료 및 실험 방법

##### (1) 미나리 발효 추출물 제조 방법

미나리를 깨끗이 수세한 후 세척 및 살균된 용기에 넣어 침출제로서 흑설탕과 프락토 올리고당을 사용하여 세척 미나리 원료와 당의 비율을 1:1(W/W)로 혼합하였다. 당에 절여진 미나리를 상온에서 1년간 방치하면서 원료 중의 유용성분이 삼투압에 의하여 용출과 동시에 자연 발효가 일어나도록 하였다(미나리 발효 추출액 1년). 미나리의 추출이 완전히 이루어지면 발효 추출액을 저장용기에 옮겨 4℃ 냉장실에서 냉장보관하면서 1년(미나리 발효 추출액 2년) 또는 2년간(미나리 발효 추출액 3년) 후 발효시킨 시료를 본 실험에 사용하였다.

##### (2) 총 플라보노이드 함량 측정

각 시료 농축액이 아닌 원액 0.1 mL를 80% 에탄올 0.9 mL에 희석한 후 0.1 mL를 취하여 10% aluminium nitrate와 1 M potassium acetate를 함유하는 80% 에탄올 4.3 mL에 혼합하여 실온에서 40분 방치한 뒤 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 total flavonoid 함량은 케르세틴(quercetin)을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하였다.

##### (3) DPPH Free Radical-Scavenging 활성 측정

시료 원액의 free radical 소거 활성은 stable radical인 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)에 대한 환원력을 측정한 것으로, 메탄올에 각 시료를 녹여 농도별로 희석한 희석액 0.8 mL와 메탄올에 녹인 0.15 mM DPPH 용액 0.2 mL를 가하여 실온에 30분 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료 추출물의 유리라디칼 소거 활성은 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 1/2로 환원시키는데 필요한 시료의 농도인  $RC_{50}$  값으로 나타내었다. 이때 상대 활성의 비교를 위하여 대조군으로 부틸히드록시아니솔(BHA; Butylated Hydroxy Anisole)을 사용하였다.

##### 나. 결과

##### (1) 미나리 추출액의 총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량 측정 결과는 표 22와 같다.

측 결과, 수와 골드에서 모두 1년이 플라보노이드 함량이 높았으며, 숙성과 함께 플라보노이드 함량이 감소하는 경향을 보였다.

**Table 22. 미나리 발효추출물의 총 플라보노이드 함량**

시료	Total flavonoids ( $\mu\text{g/mL}$ )
Su 1 yr	1696.85 $\pm$ 8.26
Su 2 yr	354.42 $\pm$ 0.28
Su 3 yr	343.52 $\pm$ 0.56
Gold 1 yr	288.36 $\pm$ 0.29
Gold 2 yr	105.33 $\pm$ 0.11
Gold 3 yr	58.67 $\pm$ 0.06

(2) DPPH Free Radical-Scavenging 활성 측정

측정 결과는 표 23과 같이 수에서 낮은 IC<sub>50</sub>값을 나타냈으며, 숙성 기간과 함께 소거능은 하는 경향을 나타내어 총 플라보노이드 함량이 감소하는 것과 일치되는 것을 알 수 있었다. 이는 발효 과정 중 불안정한 플라보노이드계 화합물이 변화하는 것에 기인하는 것으로 사료된다.

**Table 23. 미나리 발효추출액의 DPPH 라디칼 소거능**

시료	IC <sub>50</sub> (mg/mL)
Su 1 yr	41.92 $\pm$ 12.26
Su 2 yr	64.87 $\pm$ 16.69
Su 3 yr	62.68 $\pm$ 5.99
Gold 1 yr	120.15 $\pm$ 12.18
Gold 2 yr	105.42 $\pm$ 10.69
Gold 3 yr	186.85 $\pm$ 18.25

**2. 발효액의 tert-butylhydroperoxide(t-BHP)에 의한 산화적 손상에 대한 보호효과**

가. 시료 및 실험 방법

(1) 세포배양 및 손상 유도에 대한 간세포 생존율 측정

인간 유래의 간암 세포주인 HepG2 세포에 대한 세포 독성은 MTT 법으로 측정하였다. 본 실험에 사용한 세포주 HepG2 세포는 한국세포주은행(Seoul, Korea)으로부터 분양 받아 계대 배양하여 사용하였다. 세포배양에 사용된 배지는 10% FBS(fetal bovine serum)와 1% antibiotics (penicillin/streptomycin)를 첨가한 MEM 배지를 이용하여 37℃에서 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 2-3일간 배양한 후 사용하였다.

배양된 HepG2 cell을 1×10<sup>5</sup> cells/well로 분주한 후 CO<sub>2</sub> incubator에서 16~24시간 예비 배양한 후, 농도별로 희석한 시료를 세포에 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 그 후 t-BHP(최종농도 1 mM)를 첨가하고 이를 다시 4시간 동안 배양한 다음, MTT(3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide) assay로 세포의 생존율을 측정하였다. 시료를 각각 처리하여 24시간 배양한 세포에 5 mg/mL의 MTT 용액 10 mL를 각 well에 넣고 incubator에서 4시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후 상등액을 제거하고 각 well에 100 mL의 DMSO를 첨가하여 생성된 formazan 결정을 용해시켜 microplate reader로 550 nm에서 흡광도를 측정하였고, 세포독성을 시료의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다.

## (2) Lactate dehydrogenase(LDH) leakage 억제 효과

간세포 손상 시 배양액으로 유리되어 나오는 LDH의 양을 측정함으로써 간세포 손상 여부를 확인할 수 있다. 미나리 수와 골드의 간세포 손상에 대한 영향을 조사하기 위해 배지내의 LDH 활성을 측정하였다. 배양된 HepG2 cell을 96 well에  $1 \times 10^5$  cells/well로 분주한 후 CO<sub>2</sub> incubator에서 16~24시간 예비 배양한 후, 농도별로 희석한 시료를 세포에 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 그 후 t-BHP(최종농도 1 mM)를 첨가하고 이를 다시 4시간 동안 배양한 다음, 각각의 세포 배양액을 위하여 LDH assay kit(BioVision, USA)를 이용하여 LDH 활성을 측정하였다.

## 나. 결과

### (1) 세포배양 및 손상 유도에 대한 간세포 생존율 측정

간세포내의 t-BHP는 일차 배양된 간세포 내에서 cytochrom P-450에 의해 peroxy 및 alkoxy radical 등과 같은 독성물질로 전환되며, 이러한 radical이 초기 지질과산화 반응을 일으킨다. 다른 대사 과정은 GSH peroxidase가 t-BHP와 결합하여 tert-butyl alcohol과 산화된 glutathione으로 전환됨으로서 해독되는 과정이다. 이러한 대사 과정을 통하여 간세포 내에서 상당량의 t-BHP는 free radical을 생성하게 되고, 이렇게 생성된 free radical은 세포막을 구성하는 불포화 지방산과 직접적 및 간접적으로 반응을 통해 결과적으로 MDA를 형성한다. 이러한 일련의 과정을 거쳐 t-BHP는 간세포의 자연괴사나 세포괴사를 일으킨다. 본 실험에서는 미나리 발효엑기스의 간세포 보호 효과를 규명하기 위하여 HepG2 세포에 농도별로 엑기스를 전처리한 다음, t-BHP를 처리하여 세포 생존율을 관찰한 결과(Fig. 36), 아무런 처리를 하지 않은 대조군의 세포 생존율을 100%로 보았을 때, 1 mM t-BHP를 처리한 실험군에서는 세포 생존율이 42.8%로 현저히 낮아졌다. 이는 간세포가 산화적 손상을 받아 괴사되었음을 나타낸다. 반면, 미나리 발효 농축액을 최종농도 0.001~1 mg/mL로 처리 한 결과 농도 의존적으로 손상으로부터 보호하는 효과를 보였다. 특히, 1 mg/mL에서는 Su 1, 2, 3 yr 및 Gold 1, 2, 3 yr 모두 생존율이 100% 정도로 현저하게 증가하였다.

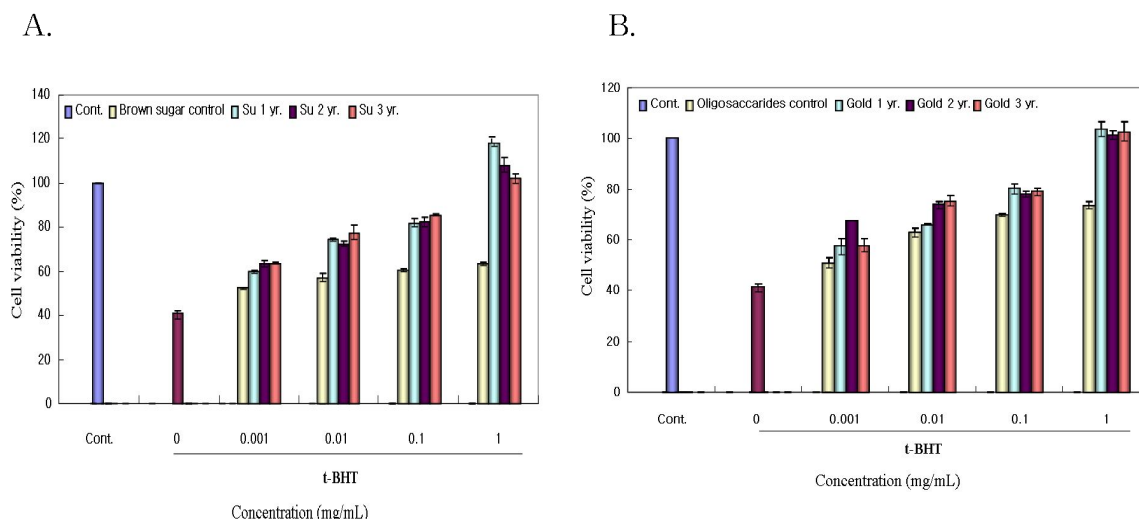


Fig. 36. t-BHP로 유도된 HepG2 세포독성에 대한 미나리 수(A) 및 골드(B)의 간세포 보호 효과. 3회 반복한 실험 data의 mean±SEM 값

## (2) Lactate dehydrogenase(LDH) leakage 억제 효과

LDH는 lactate를 pyruvate로 전환하는 효소로 세포에 이상이 있을 경우세포 외로 유출되어 배지 중에서 증가하게 된다. 간세포에서 t-BHP에 의해 유도된 산화적 스트레스에 대한 보호 효과가 있는지 여부를 세포막 손상 시 배양액내로 유출되는 LDH 활성도를 측정한 결과, Fig. 37과 같이 t-BHP에 의해 세포내의 LDH가 배양액으로 급격히 유출되었으며, 수와 골드로 전처리함으로써 LDH농도는 숙성 기간에 의한 유의적인 차이는 없었으나 농도 의존적으로 감소하였다. 흑설탕 또는 올리고당만의 효과에 비해서 시료 처리의 경우 유의적인 억제효과가 있는 것을 알 수 있다.

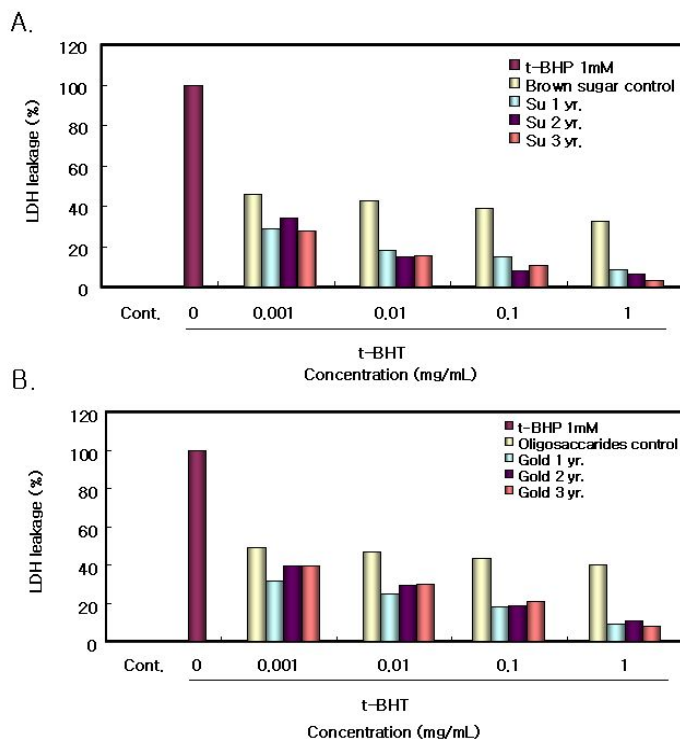


Fig. 37. t-BHP로 유도된 HepG2 세포의 LDH 방출에 대한 미나리 수(A) 및 골드(B)의 간세포 보호 효과

## 3. 발효액의 간암 세포 성장 억제 효과

### 가. 시료 및 실험 방법

#### (1) 세포배양 및 생존율 측정

인간 유래의 정상 간 세포주인 Chang 세포 및 간암 세포주인 HepG2 세포에 대한 세포 생존율은 MTT 법으로 측정하였다. 본 실험에 사용한 세포주 Chang 세포와 HepG2 세포는 한국세포주은행(Seoul, Korea)으로부터 분양 받아 계대 배양하여 사용하였다. 세포배양에 사용된 배지는 10% FBS(fetal bovine serum)와 1% antibiotics (penicillin/streptomycin)를 첨가한 MEM 배지를 이용하여 37°C에서 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 2-3일간 배양한 후 사용하였다.

미나리 발효액기스의 간암세포 성장억제 효과를 테스트하기 위해 정상 간세포주와 간암 세포주에 농도별로 시료 처리를 한 후 각 세포의 성장에 대한 효과를 측정하였다.

#### (2) HepG2 세포의 형태 변화 관찰

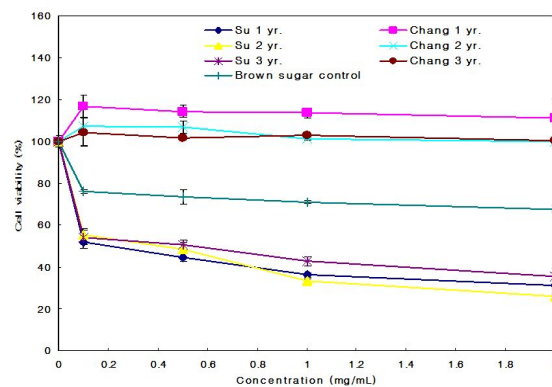
HepG2 세포를 6-well plate( $2 \times 10^6$  cells/well)에 24시간 배양한 후 수와 골드로 농도별로 처리하였다. 세포를 PBS로 배지를 제거한 후 도립현미경(DM IRE2, Leica, Wetzlar, Germany)으로 100, 200, 400배의 배율 하에서 세포 형태와 세포 수에 대한 영향을 관찰하였다. 시료 처리하지 않은 군과 시료를 0.1, 1 mg/mL로 처리한 군에 대해 3회 실험으로 재현성을 확인하였다.

## 나. 결과

### (1) 세포배양 및 생존율 측정

미나리 발효엑기스의 간암세포 성장억제 효과를 테스트하기 위해 정상 간세포주와 간암 세포주에 농도별로 시료 처리를 한 후 각 세포의 성장에 대한 효과를 측정하였다. 그 결과, 수와 골드 모두 정상 간세포의 성장에는 영향을 미치지 않았으며, 미나리 수보다 골드에서 억제 효과가 컸으며, 특히 골드 1년에서 현저히 억제한 효과를 확인하였다(Fig. 38).

A.



B.

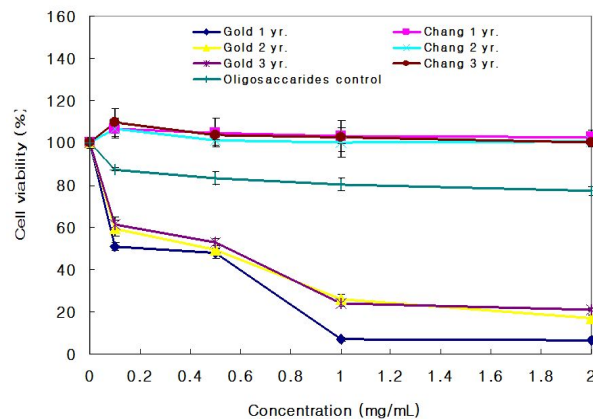


Fig. 38. HepG2 세포와 Chang 세포 성장에 대한 미나리 수(A) 및 골드(B)의 영향.

3회 반복한 실험 data의 mean  $\pm$  SEM 값

### (2) HepG2 세포의 형태 변화 관찰

시료 처리하지 않은 군과 시료를 0.1, 1 mg/mL로 처리한 군에 대해 3회 실험으로 재현성을 확인하였다. 그 결과, 콘트롤로 사용된 흑설탕과 올리고당만 처리한 경우는 세포 형태와 수에 영향이 없었으며, 수와 골드를 처리한 군에서 농도 의존적으로 세포 수가 감소되었으며 크기 도 줄어드는 변화를 확인하였다(Fig. 39).

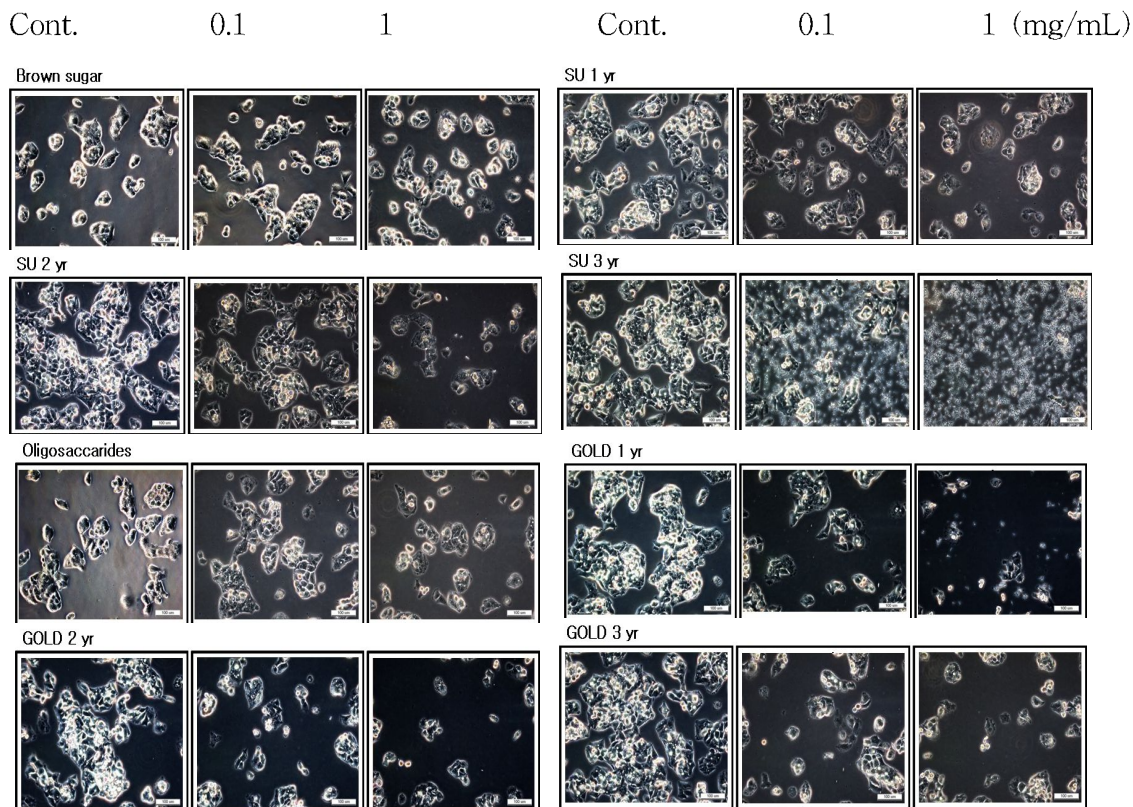


Fig. 39. 간암세포주 HepG2 세포의 증식과 형태변화에 대한 미나리 수 및 골드의 영향

#### 4. 미나리 발효액의 활성 성분 분석

##### 가. 시료 및 실험 방법

##### (1) HPLC 분석

HPLC는 Shimdazu Prominence LC20A를 이용하여 YMC C<sub>18</sub> column(4 um, 150 mm x 4.6 mm i.d.)를 40℃에서 사용하였으며, buffer A(0.1% 트리플루오로아세트 산을 함유한 증류수)와 buffer B (0.1% 트리플루오로아세트 산을 함유한 70% 아세토니트릴)를 gradient로 하여 1.0 ml/min의 유속으로 50분간 분석하였다. 분리를 위한 gradient 조성은 표 2에 나타내었다. 검출은 UV-VIS detector(SPD-20A)를 사용하여 254 nm에서 검출하였다(Table 24).

Table 24. HPLC gradient 조성변화

Time (min)	Buffer A (%)	Buffer B (%)
0	100	0
30	50	50
35	0	100
40	100	0
50	100	0

## (2) MS 분석

HPLC 분석 결과 두 개의 높은 intensity를 보였던 피크의 fraction을 받아 mass spectrometry 으로 분석하였다. MS 기기는 Thermo Electron Corp.의 Thermo Finnigan LTQ mass spectrometer를 사용하였다. ESI 방법으로 이온화 하였고, negative ion mode를 사용하여  $m/z$  50-500의 질량 범위에서 평균 40 스캔 하였다. 시료주입은 microsyringe를 이용하여 5  $\mu$ l/min의 flow rate로 흘려주었다.

## (3) HPLC 재분석

대조군은 1% 메탄올을 포함한 buffer A 에 녹여 사용하였다. Caffeic acid는 0.1, 0.5, 1, 2, 5 pmol의 농도로, chlorogenic acid는 0.1, 1, 2, 5 nmol의 농도로 calibration curve를 작성하였다 (도 42). 미나리 추출물에서 검출된 주된 두 개의 피크가 MS 실험결과 확인된 chlorogenic acid 와 caffeic acid 임을 확인하기 위해 미나리 추출물과 0.1 mM의 chlorogenic acid(도 43, A) 또는 미나리 추출물과 0.1 mM의 caffeic acid를 1:1 비율로 혼합하여 HPLC를 재수행하였다. Chlorogenic acid와 caffeic acid의 함량은 Table 25에 나타내었다.

## 나. 결과

### (1) HPLC 분석

미나리 추출물을 HPLC로 분석한 결과, 여러 피크가 보였으나 추출물에 전체적으로 큰 분포를 보이는 14.2, 14.6 min에서의 2개의 피크를 확인하였다.

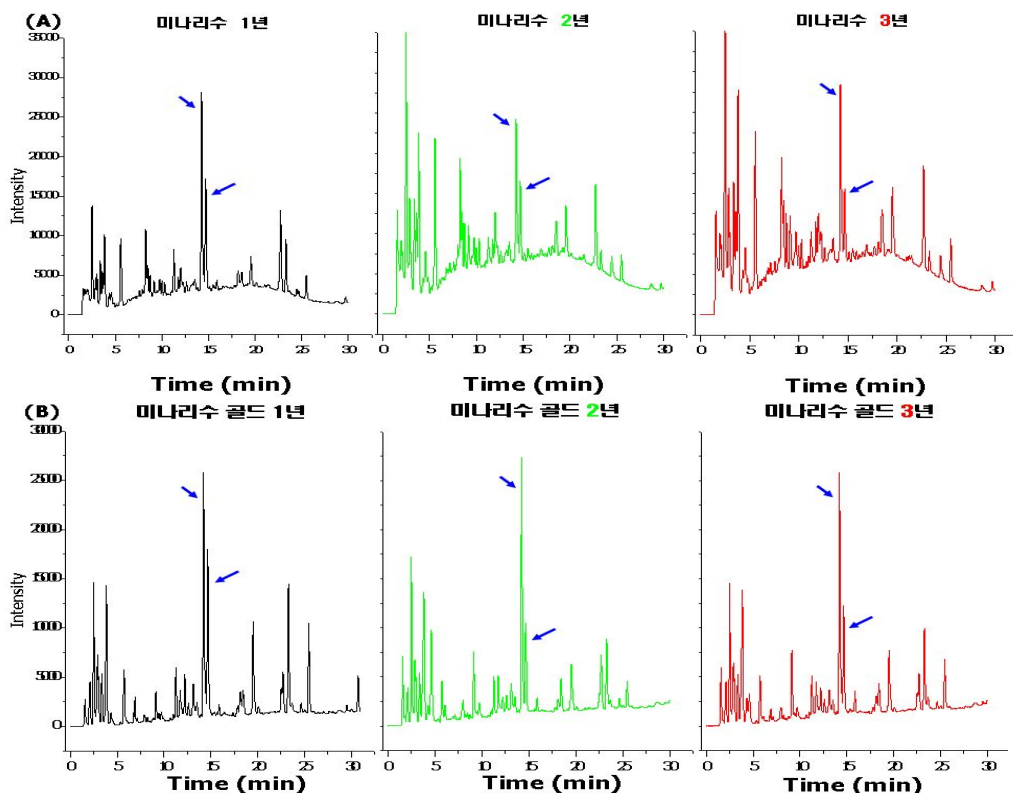


Fig. 40. 미나리 추출물의 HPLC 분석 결과

(A)흑설탕 추출 미나리수, (B)올리고당 추출 미나리수



## (2) MS 분석

Negative mode를 사용하였으므로 얻어지는 분자량은  $[M-H]^-$ 이다. Chlorogenic acid의 분자량은 354이므로 negative mode에서는 353이 되며, caffeic acid의 분자량은 180이므로 negative mode에서는 179가 된다. 도 41의 (A)에서 353에 해당하는 피크가 나타났으며 MS/MS 결과 353과 191이 검출되어 chlorogenic acid임을 확인하였다. (B)에서 179에 해당하는 피크가 나타났으며 MS/MS 결과 179와 135가 검출되어 caffeic acid임을 확인하였다.

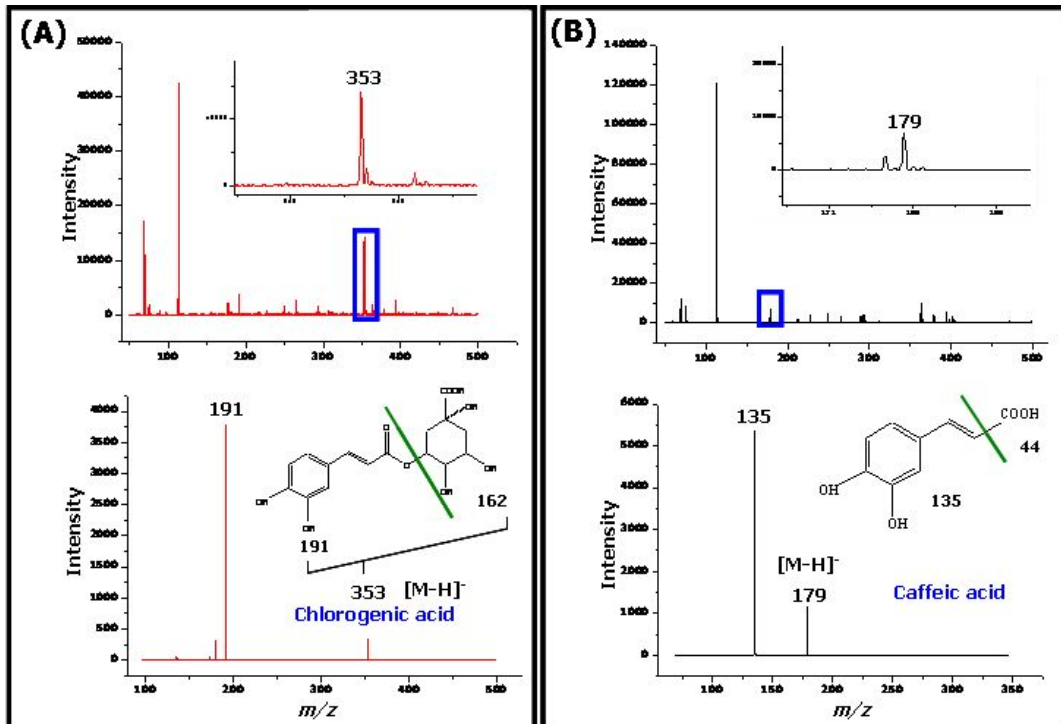


Fig. 41. 미나리 추출물 HPLC 분석 결과에서 높은 intensity를 보였던 두 피크의 MS, MS/MS 분석 결과

(A) chlorogenic acid, (B) caffeic acid

## (3) HPLC 재분석

HPLC의 재수행 결과 caffeic acid를 coinjection 한 시료에서는 14.6 분 부근에서 검출된 caffeic acid 피크만 증가를 보였고, chlorogenic acid를 coinjection 한 경우에는 14.2분 부근에서 검출된 chlorogenic acid의 피크만 증가하였다. 따라서 MS로 동정한 caffeic acid와 chlorogenic acid가 미나리 발효액에 주된 화합물임을 확인하였다. HPLC로 검출한 caffeic acid와 chlorogenic acid의 상대적 함량은 Table 25에 나타내었다.



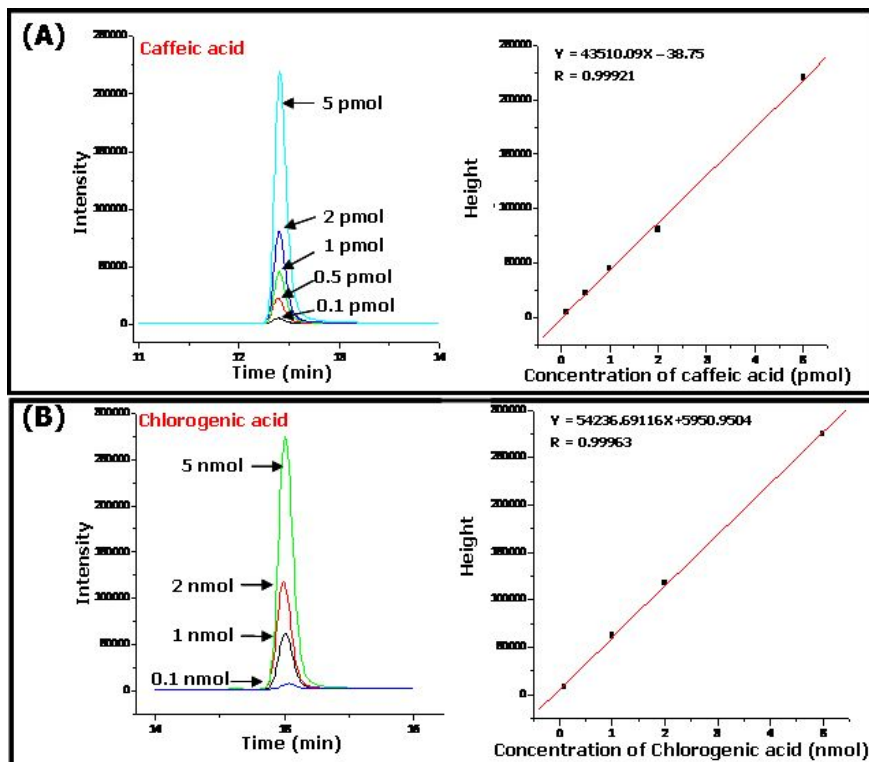


Fig. 42. 대조군의 calibration curves

(A) caffeic acid, (B) chlorogenic acid

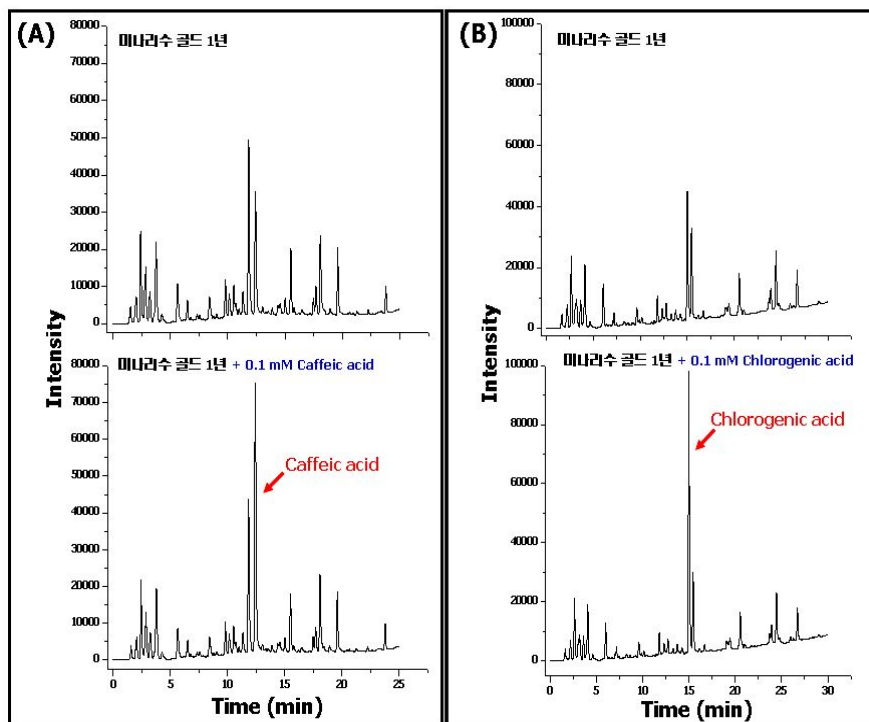


Fig. 43. 대조군 (caffeic acid, chlorogenic acid)과 미나리 추출물의 co-injection 분석결과

과 (A) 골드 1년 + 0.1 mM caffeic acid, (B) 골드 1년 + 0.1 mM chlorogenic acid

**Table 25. 미나리 추출물의 Caffeic acid와 Chlorogenic acid의 상대함량**  
(CGA<sup>1</sup> : Chlorogenic acid, CA<sup>2</sup> : Caffeic acid)

Sample		Peak	Peak area (%)
Dropwort with brown sugar	1년	CGA <sup>1</sup>	0.9
		CA <sup>2</sup>	1.3
	2년	CGA	0.9
		CA	1.5
	3년	CGA	0.8
		CA	1.2
Dropwort with oligosaccharide	1년	CGA	2.4
		CA	3.0
	2년	CGA	1.5
		CA	3.0
	3년	CGA	0.6
		CA	1.2

## 5. 미나리 발효액의 유용 성분인 caffeic acid, chlorogenic acid, ferulic acid의 tert-butylhydroperoxide(t-BHP)에 의한 산화적 손상에 대한 보호효과

### 가. 시료 및 실험 방법

#### (1) 세포배양 및 손상 유도에 대한 간세포 생존율 측정

인간 유래의 간암 세포주인 HepG2 세포에 대한 세포 독성은 MTT 법으로 측정하였다. 본 실험에 사용한 세포주 HepG2 세포는 한국세포주은행(Seoul, Korea)으로부터 분양 받아 계대 배양하여 사용하였다. 세포배양에 사용된 배지는 10% FBS(fetal bovine serum)와 1% antibiotics(penicillin/streptomycin)를 첨가한 MEM 배지를 이용하여 37℃에서 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 2-3일간 배양한 후 사용하였다.

배양된 HepG2 cell을 1×10<sup>5</sup> cells/well로 분주한 후 CO<sub>2</sub> incubator에서 16~24시간 예비 배양한 후, 농도별로 희석한 시료를 세포에 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 그 후 t-BHP(최종농도 1 mM)를 첨가하고 이를 다시 4시간 동안 배양한 다음, MTT(3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide) assay로 세포의 생존율을 측정하였다. 시료를 각각 처리하여 24시간 배양한 세포에 5 mg/mL의 MTT 용액 10 mL를 각 well에 넣고 incubator에서 4시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후 상등액을 제거하고 각 well에 100 mL의 DMSO를 첨가하여 생성된 formazan 결정을 용해시켜 microplate reader로 550 nm에서 흡광도를 측정하였고, 세포독성을 시료의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다.

#### (2) Lactate dehydrogenase(LDH) leakage 억제 효과

간세포 손상 시 배양액으로 유리되어 나오는 LDH의 양을 측정함으로써 간세포 손상 여부를 확인할 수 있다. 미나리 발효액(FDE)와 caffeic acid의 간세포 손상에 대한 영향을 비교하기 위해 배지내의 LDH 활성을 측정하였다. 배양된 HepG2 cell을 96 well에 1×10<sup>5</sup> cells/well로 분주한 후 CO<sub>2</sub> incubator에서 16~24시간 예비 배양한 후, 농도별로 희석한 시료를 세포에 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 그 후 t-BHP(최종농도 1 mM)를 첨가하고 이를 다시 4시간 동안 배양한 다음, 각각의 세포 배양액을 위하여 LDH assay kit(BioVision, USA)를 이용하여 LDH 활성을 측정하였다.

## 나. 결과

### (1) 세포배양 및 손상 유도에 대한 간세포 생존율 측정 결과

간세포내의 t-BHP는 일차 배양된 간세포 내에서 cytochrom P-450에 의해 peroxy 및 alkoxy radical 등과 같은 독성물질로 전환되며, 이러한 radical이 초기 지질과산화물을 일으킨다. 다른 대사 과정은 GSH peroxidase가 t-BHP와 결합하여 tert-butyl alcohol과 산화된 glutathione으로 전환됨으로서 해독되는 과정이다. 이러한 대사 과정을 통하여 간세포 내에서 상당량의 t-BHP는 free radical을 생성하게 되고, 이렇게 생성된 free radical은 세포막을 구성하는 불포화 지방산과 직접적 및 간접적으로 반응을 통해 결과적으로 MDA를 형성한다. 이러한 일련의 과정을 거쳐 t-BHP는 간세포의 자연괴사나 세포괴사를 일으킨다. 본 실험에서는 미나리 발효액과 caffeic acid, chlorogenic acid, ferulic acid의 간세포 보호 효과를 검토하기 위하여 HepG2 세포에 농도별로 시료를 전처리한 다음, t-BHP를 처리하여 세포 생존율을 관찰한 결과(도 44), 아무런 처리를 하지 않은 대조군의 세포 생존율을 100%로 보았을 때, 1 mM t-BHP를 처리한 실험군에서는 세포 생존율이 42.8%로 현저히 낮아졌다. 이는 간세포가 산화적 손상을 받아 괴사되었음을 나타낸다. 반면, 미나리 발효액을 최종농도 0.001 ~ 1 mg/mL로 처리 한 결과 농도 의존적으로 손상으로부터 보호하는 효과를 보였다. 특히, 0.1 mg/mL에서는 caffeic acid, chlorogenic acid, ferulic acid와 비교하였을 때 비슷한 보호효과가 나타났다.

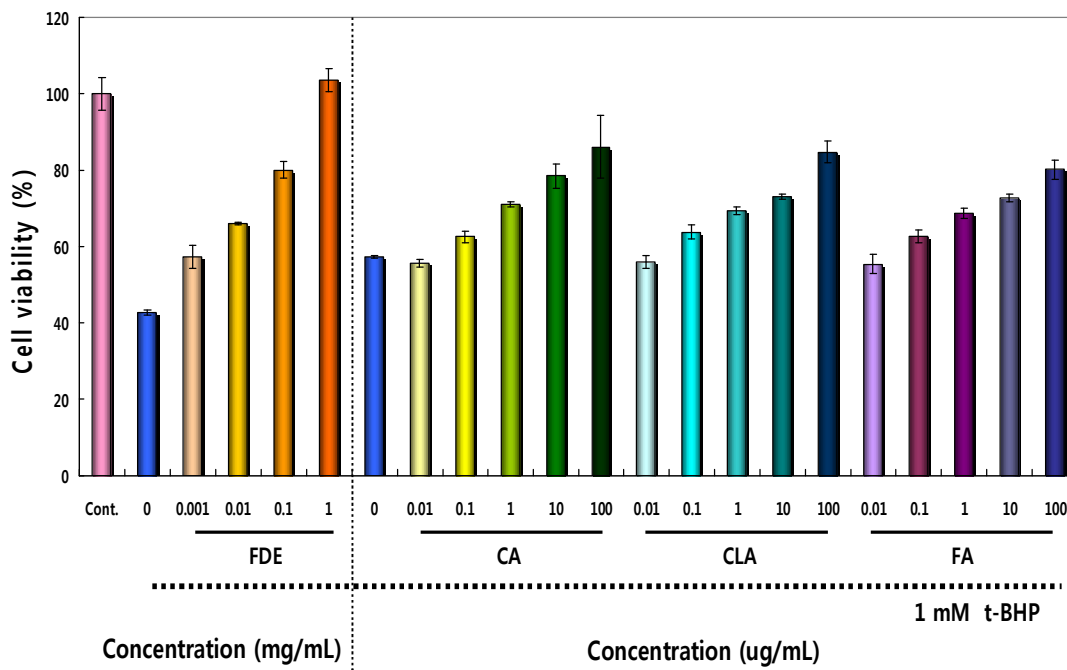


Fig. 44. t-BHP로 유도된 HepG2 손상에 대한 미나리 발효액(FDE), caffeic acid, chlorogenic acid, ferulic acid의 간세포 보호 효과.

3회 반복한 실험 data의 mean±SEM 값

## 6. 미나리 발효액의 유용 성분인 caffeic acid, chlorogenic acid, ferulic acid의 간암 세포 성장 억제 효과

### 가. 시료 및 실험 방법

#### (1) 세포배양 및 생존율 측정

인간 유래의 간암 세포주인 HepG2 세포에 대한 세포 생존율은 MTT 법으로 측정하였다. 본 실험에 사용한 세포주 HepG2 세포는 한국세포주은행(Seoul, Korea)으로부터 분양 받아 계대 배양하여 사용하였다. 세포배양에 사용된 배지는 10% FBS(fetal bovine serum)와 1% antibiotics (penicillin/streptomycin)를 첨가한 MEM 배지를 이용하여 37℃에서 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 2-3일간 배양한 후 사용하였다.

### 나. 결과

#### (1) 세포배양 및 생존율 측정 결과

미나리 발효액과 유용 성분인 caffeic acid, chlorogenic acid, ferulic acid의 간암세포 성장억제 효과를 비교하기 위해 간암 세포주에 농도별로 시료 처리를 한 후 각 세포의 성장에 대한 효과를 측정하였다. 그 결과, 모두 암세포 성장을 농도 의존적으로 억제하였으나, 같은 농도에서 비교하였을 경우 발효액에서 효과가 크게 나타나 세 가지 성분의 시너지 효과 혹은 이외의 다른 활성성분이 존재할 가능성을 시사하고 있다. 이를 명확히 하기 위하여 발효액에 함유되어 있는 함량과 같이 섞어서 효과를 측정할 필요가 있는 것으로 나타났다.

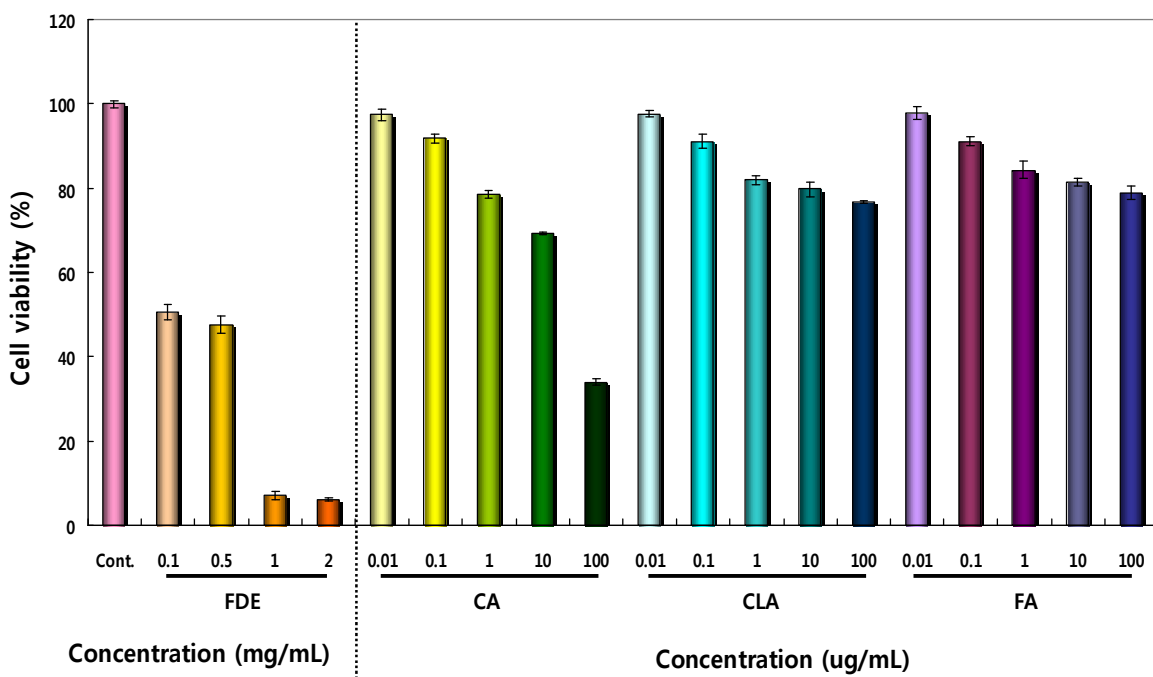


Fig. 45. HepG2 세포에 대한 미나리 발효액(FDE), caffeic acid, chlorogenic acid, ferulic acid의 영향. 3회 반복한 실험 data의 mean±SEM 값

## 7. 사염화탄소 투여로 유발된 췌트의 간 손상에 대한 미나리 발효액의 보호 효과]

### 가. 시료 및 실험 방법

#### (1) 공시동물

실험동물은 6주령 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐 (190-210 g)를 (주)오리엔트바이오로부터 공급받아 1주일 동안 동물실험실환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였으며, 사육실 환경은 온도 20-23℃, 습도 60%, 12시간 light/dark cycle을 유지하고, 사료와 음료는 자유롭게 섭취하도록 하였다.

#### (2) 실험동물의 분류 및 처리

실험물질은 미나리 발효 추출물(FWD) 제품의 용량을 100%로 환산하여, Oligosaccharides로 회석하여 3가지 용량을 설정하였으며, 흰쥐 8 마리를 1군으로 하여 사염화탄소 비투여 대조군(control), 사염화탄소 단독투여군( $\text{CCl}_4$ -treated), 검체와 사염화탄소 투여군(FWD 50 mg/kg +  $\text{CCl}_4$ , FWD 200 mg/kg +  $\text{CCl}_4$ , FWD 400 mg/kg +  $\text{CCl}_4$ )으로 구성하였다. 7 일째, 검체 투여 후 control 군을 제외한 모든 실험군에 올리브 오일에 회석된  $\text{CCl}_4$  (20% v/v) 1 mg/kg으로 경구투여 하여 지방간을 유도하였다.  $\text{CCl}_4$  투여 24 시간 경과 후 절식한 흰쥐를 diethyl ether로 마취하여 복부를 절개하고 채혈 및 간을 적출하였다.

#### (3) 혈청의 화학성분 및 효소활성 검사

생화학적 분석에 필요한 혈청은 심장으로부터 혈액 5-6 mL를 직접 채혈하여 vacutainer(5 mL, 13×75 mm, USA)에 넣고 4℃, 3,000 rpm에서 20분간 원심분리 한 후 1.5 mL eppendorf tube에 1 mL씩 분주하였다. 분석용 시료로 사용되기 전까지 -70℃에 냉동 보관하였다가 본 실험에 사용하였다. 혈청 중 alanine aminotransferase(ALT), aspartate aminotransferase (AST) 활성도는 Reitman-Frankel의 방법, alkaline phosphatase(ALP) 활성도는 Kind-King의 방법, glutamyl transpeptidase( $\gamma$ -GTP) 활성도는 Szaz의 방법에 따라 측정하였다.

#### (4) 조직학적 평가

간 조직의 광학현미경적 변화를 관찰하기 위해 통상적인 조직처리 과정을 수행하였다. 적출된 간 조직을 10% 중성 포르말린 용액에 12시간 고정하고 흐르는 물에 수세한 다음, 탈수(에탄올 70%, 80%, 90%, 100%), xylene으로 투명, 파라핀 침투과정을 거쳐 포매하고 microtome을 이용하여 4  $\mu\text{m}$  두께의 박 절편을 제작하여 탈 파라핀 함수 후 일반염색으로 H&E 염색을 하였다.

#### (5) RT-PCR에 의한 mRNA 발현변화

##### (가) Total RNA 추출

적출한 간을 일정량(1g 내외) 취하여 각 그룹별로 50 mL falcon tube에 넣고 PBS를 5 mL 가하여 잘게 세절하여 원심분리(2000 rpm, 5 min)하였다. 상층액을 제거하고 10배량의 Trizol reagent(Invitrogen, USA)를 첨가하여 pipetting을 수회 실시하여 용해시킨 다음 지질을 제거하고, RNA를 농축시켜 total RNA를 추출하였다. Total RNA는 DEPC-water를 가하여 용해시

키고, 260 nm에서 농도 측정 후 50 µg/mL로 희석하여 -70℃에 보관하면서 cDNA 합성에 이용하였다.

#### (나) cDNA 합성

추출된 total RNA에 10 mM dNTP mixture, Oligo dT를 넣고, Thermocycler(PC-320, ASTEC, Japan) 65℃에서 5 분간 반응시켰다. 여기에 10 × RT buffer, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 M DTT, RNase out이 첨가된 reaction mixture를 첨가하여 42℃에서 2분간 반응시키고, superscript III를 첨가하여 42℃에서 50분, 70℃에서 15분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 여기에 RNase H를 superscript III와 동량으로 첨가하여 남아있는 RNA를 제거하였다. 합성된 cDNA는 1.5 µL씩 분주하여 -20℃에 보관하면서 PCR 실험에 사용하였다.

#### (다) Polymerase chain reaction (PCR)

PCR반응을 위한 reaction mixture는 MQ-water, 15mM MgCl<sub>2</sub> 를 포함하는 10×PCR buffer, sense-primer, antisense-primer, 2.5mM dNTP mixture, Taq polymerase를 첨가하여 제조하였다. cDNA에 reaction mixture를 첨가하여 혼합한 후 Thermocycler(PC-320, ASTEC, japan)를 이용하여 증폭시켰다. 각 primer의 조건은 Table 26과 같다. PCR products는 agarose gel상에서 전기영동(Mupid-2plus, Advance, Japan)하고, GelDoc-It imaging system(UVP, USA)와 image acquisition & analysis software(UVP, USA)를 이용하여 비교 분석하였다.

**Table 26. Polymerase chain reaction primers for mRNA expression used in this study**

		primers		temp(℃ )	Size(bp)
		5′	3′		
CYP2E1	Sense	GAGGTCGATATCCTTAGGGT		56	409
	Antisense	ATTGACAGGGTTATTGGGCC			
CYP2A4	Sense	CTACCTTCGACTGGCTTTTC		55	503
	Antisense	GCATTTCGGATGAGGAAGGAG			
PPARγ	Sense	AGGCCGAGAAGGAGAAGCTGTTG		58	257
	Antisense	TGGCCACCTCTTTGCTCTGCTC			
GAPDH	Sense	CTCTACCCACGGCAAGTTCAA		60	515
	Antisense	GGATGACCTTGCCCACAGC			

#### 나. 결과

##### (1) 혈청 인자들에 대한 미나리 발효액의 전처리 영향

미나리 발효액을 8일 동안 경구투여 한 흰쥐의 체중증가량과 간 무게는 Table 27에서와 같다. 간 무게의 경우 대조군에 비해 CCl<sub>4</sub> 단독 투여군 및 미나리 발효액과 CCl<sub>4</sub>를 투여한 군에서 감소하는 것을 보였으나 유의적인 차이는 보이지 않았다. 한편, 체중증가량은 미나리 발효액 투여군에서 유의적으로 감소하는 것으로 나타났다. 간 중량의 증가는 사염화탄소에 의한

간 세포막 손상으로 투과성이 증가하여 부종 및 지방변성으로 인하여 간에 지질 성분이 대량 축적되어 간장비대가 일어난다고 보고되었다. 본 연구에서는 CCl<sub>4</sub>를 급성으로 투여한 경우 간 무게에 영향을 주지 않았다.

**Table 27. Effect of FDE on weight of body and liver in CCl<sub>4</sub>-treated rats**

Group/Treatment	Body (g)					Liver (g)
	Day 1	Day 3	Day 5	Day 8 <sup>a</sup>	Day 9 <sup>b</sup>	
I: Control	243.1 ±5.7	276.3 ±10.7	303.9 ±11.9	322.9 ±13.4	327.1 ±21.3	13.5 ±1.3
II: CCl <sub>4</sub> 1mL/kg (i.p.)	228.4 ±8.8	266.5 ±6.7	288.1 ±10.9	307.5 ±11.5	291.8 ±26.1	11.9 ±1.2
III: Silymarin 200mg/kg + CCl <sub>4</sub>	237.9 ±10.2	282.4 ±18.5	296.0 ±14.1	313.3 ±13.2	304.9 ±16.3	12.4 ±1.4
IV: FDE 50mg/kg + CCl <sub>4</sub>	238.3 ±7.0	279.3 ±10.5	296.6 ±10.6	309.4 ±12.0	290.8 ±19.8	11.3 ±0.9
V: FDE 200mg/kg + CCl <sub>4</sub>	260.5 ±13.4	287.5 8.2	310.3 ±8.2	329.5 ±12.3	310.9 ±17.3	12.6 ±1.8
VI: FDE 400mg/kg + CCl <sub>4</sub>	269.8 ±4.7	288.6 ±3.8	311.3 ±6.4	328.8 ±5.7	307.4 ±14.1	12.4 ±0.9

<sup>a</sup> Rats were administrated CCl<sub>4</sub> at day 8.

<sup>b</sup> Rats were sacrificed at day 9.

**Table 28. Effects of FDE on serum biochemical parameters in CCl<sub>4</sub> intoxicated rats**

Group/Treatment	ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	GGT (U/L)
I: Control	39.5±2.5b	98.2±10.5b	< 10	1.8±0.4
II: CCl <sub>4</sub> 1 mL/kg (i.p.)	155.3±51.4a	201.0±22.1a	< 10	2.3±0.6
III: Silymarin 200 mg/kg + CCl <sub>4</sub>	68.6±14.9b	114.8±7.8c	< 10	0.8±0.8
IV: FDE 50 mg/kg + CCl <sub>4</sub>	72.0±19.1c	136.0±26.1c	< 10	1.6±0.8
V: FDE 200 mg/kg + CCl <sub>4</sub>	74.0±1.5c	149.0±22.2c	< 10	0.8±0.7
VI: FDE 400 mg/kg + CCl <sub>4</sub>	78.8±7.9c	159.7±19.3c	< 10	0.5±0.5

<sup>a</sup>  $p < 0.01$ , significantly different from control.

<sup>b</sup>  $p < 0.01$ , significantly different from CCl<sub>4</sub> group.

<sup>c</sup>  $p < 0.05$ , significantly different from CCl<sub>4</sub> group.

실험물질 투여에 의한 ALT, AST, ALP 및 GGT활성도는 Table 28과 같다. ALT와 AST 활성도는 대조군 (I)과 비교하여 CCl<sub>4</sub>를 단독으로 투여한 군 (II)에서 각각 유의적인 증가를 나타내었고( $p<0.01$ ), ALT, AST 활성도는 CCl<sub>4</sub> 단독 투여군(II)과 비교하여 실험물질을 투여한 군에서 감소하는 것으로 나타났다.( $p<0.05$ ). 또한, GGT 활성도는 CCl<sub>4</sub> 단독 투여군(II)과 비교하여 실험물질을 투여한 모든 군에서 유의적인 감소를 나타내었으며, 이 결과는 간 손상으로 인한 간세포의 괴사와 간 조직의 파괴가 진행됨에 따라 transaminase가 혈중으로 유리되어 ALT와 AST의 높은 활성치를 나타낸다는 보고에 따라, 실험물질이 CCl<sub>4</sub>로 유발된 흰쥐의 혈청중의 ALT, AST 및 GGT 활성치의 감소를 나타내어 간 손상의 억제 효과가 있는 것으로 사료된다.

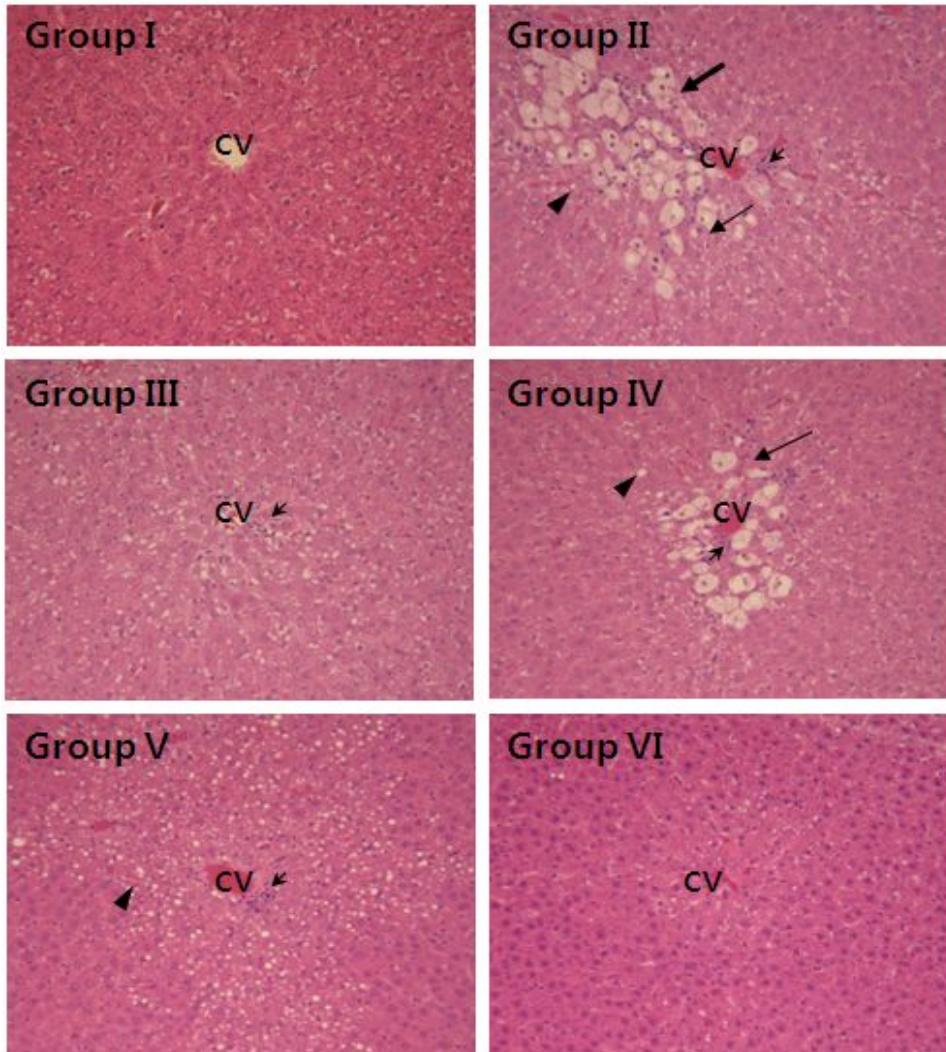
## (2) 조직학적 평가

미나리 발효액의 간 기능 개선 및 간 보호 효과를 조직병리학적으로 평가하기 위해 Hematoxyline-Eosin으로 염색한 뒤 광학현미경으로 관찰하여 조직검사를 실시하였으며, 그 결과는 Fig 46에 나타내었다.

정상군(I)의 흰쥐에서 채취된 간은 정상적인 간소엽과 문맥구조를 보였다. 간세포들이 중심정맥(central vein)을 중심으로 방사상 배열로 이루어져 있어 잘 짜여진 소엽구조를 관찰할 수 있었으며, 간세포의 세포질과 원형의 핵이 모두 균질한 것을 볼 수 있었다.

사염화탄소를 처리한 군(II)의 간 조직은 중심 정맥 주위로 심한 간세포 괴사와 경화가 관찰되어 사염화탄소에 의한 전형적인 간 손상을 보였다. 간소엽의 중심정맥 부위에 광범위한 지역괴사와 아광역괴사가 관찰되었다. 미나리 발효액 50 mg/kg을 처리한 군(IV)은 간 조직이 사염화탄소만 처리한 군(II)에 비해 세포 괴사가 완화되어 간세포 변성면적이 작아짐으로서, 중심정맥 주변에 조직 손상도가 개선된 것을 볼 수 있었다. 그러나 중심정맥 주위로 간세포 괴사가 일부 관찰 되었다. 반면 미나리 발효액 200, 400 mg/kg을 처리한 군(V,VI)은 간 조직이 50 mg/kg을 처리한 군(IV)에 비해 괴사정도가 상당히 개선되어 정상군의 간 구조와 비슷하게 회복되는 것을 볼 수 있었다. V군에서 일부 경미한 괴사가 관찰되긴 하나 이것을 제외하고는 특별한 병변 없이 현저히 회복된 양상을 보였다.





**Fig. 46. Histochemical examination of liver sections (200x) from rats treated with CCl<sub>4</sub> and FDE.** Liver sections of rats treated with various doses of FDE and silymarin showed largely normal appearance. For each dose group, 8 sections were made and the microphotos show representative foci of each group. Tissues were fixed in formalin and stained with H&E. arrow; balloon degeneration, arrow head; fatty change, short arrow; inflammatory cell infiltration, CV; central vein

### (3) RT-PCR에 의한 mRNA 발현변화

RT-PCR을 통하여 CYP2E1의 발현변화를 측정된 결과는 Fig 47과 같다. CYP2A4 mRNA는 CCl<sub>4</sub> 단독 처리군에 비해 미나리 발효액 50, 200 mg/kg을 투여한 군에서는 유의적인 증가를 보였으며, 400 mg/kg를 투여한 군에서는 다소 감소하는 경향을 보였다. 한편 Cytochrome P450 2E1(CYP2E1)은 cytochrome P450의 동종효소로서 간 조직에 가장 높은 농도로 존재하며 알코올의 만성적인섭취나 대량 섭취 시 유도되어 ROS의 생산을 증가시키고, 지질과 산화와 세포손상을 유도하는 사이토카인이며, 만성적인 음주자의 경우 CYP2E1의 발현이 비음주자에 비해 4~10배 높게 나타난다는 보고가 있다. CYP2E1의 경우 CCl<sub>4</sub> 단독 처리군에 비해 감소하는 것을 볼 수 있으며 200, 400 mg/kg을 투여한 군에서 silymarin 투여군 보다 효과적으로 감소시키는 것을 볼 수 있었다. 또한 PPAR $\gamma$ 는 미나리 발효액을 투여한 군에서 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다.

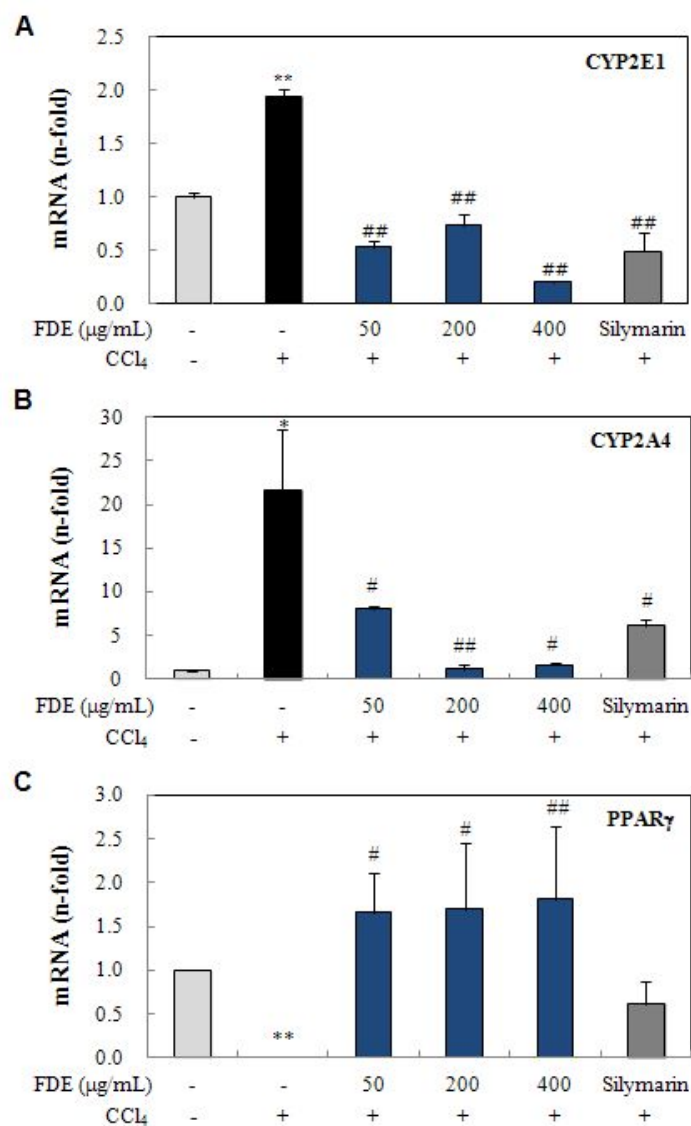


Fig. 47. Rat liver RT-PCR analysis–liver tissue; A. CYP2A4, B. CYP2E1, C. *PPAR<sub>γ</sub>*

## 제 4 절 기능성 음료제조용 개다래와 생강의 초임계 추출물 제조기술 개발

### 1. 개다래의 초임계 추출 최적화 조건 설정

#### 가. 시료 및 실험 방법

##### (1) 초임계 추출

개다래의 정유 성분을 추출하기 위하여 초임계유체추출장치(SFT-100XW, Supercritical Fluid Technologies, Inc., USA)를 사용하여 추출하였다. 즉, 시료 40 g을 100 mL의 추출조에 넣고 일정한 온도와 압력의 추출조건(Table 29)에서 CO<sub>2</sub>의 유속은 2 mL/min로 dynamic mode에서 추출하였으며, 추출물을 곧바로 vial에 받아내었다.

Table 29. 개다래의 초임계 추출조건

	추출조건
추출온도 (°C)	35, 45, 55
추출압력 (psi)	1500, 3000, 4500
추출시간 (hr)	1, 2

##### (2) 개다래와 개다래박의 열수 및 주정추출

열수추출은 개다래와 개다래를 45°C, 4500 psi, 1시간에서 초임계 추출후 남은 박을 시료로 하여 시료의 20배에 해당하는 증류수를 넣고 90°C에서 1시간 동안 추출하였으며, 주정추출은 시료의 20배에 해당하는 75% 주정을 넣고 80°C에서 1시간 동안 추출하여 여과지(Watman No. 1)로 여과한 후 여액을 동결 건조하여 시료로 사용하였다.

##### (3) 일반성분

개다래와 개다래박의 일반성분은 AOAC법에 따라 측정하였다.

##### (4) 유리아미노산

일정량의 개다래 및 개다래 박에 70% EtOH 용액을 가하여 80°C에서 환류추출한 후 여과하고 여액을 감압농축 한 다음 25% trichloroacetic acid(TCA) 용액을 가하여 단백질을 침전시키고 원심 분리하였다. 상정액을 건조 후 PITC(phenylisothiocyanate)로 유도체를 만들고 용매 A에 용해, 원심분리한 후 시료로 사용하였다. 이때 사용한 칼럼은 Waters Symmetry C<sub>18</sub>, 검출기는 UV detector(HP 1100 series, 254 nm)를 사용하였고, 이동상은 용매 A(1.4 mM NaHAc, 0.1% triethylamine, 6% CH<sub>3</sub>CN, pH 6.1)과 용매 B(60% CH<sub>3</sub>CN)를 gradient법으로 용매 이동속도 1.0 mL/min, 시료 주입량 10 µL, 칼럼온도 46°C의 조건에서 분석하였다.

#### (5) 유리당

개다래 및 개다래 박 1 g과 80% EtOH 40 mL을 혼합한 후 80℃에서 유리당을 추출하였고, 이를 여과한 후 10,000×g에서 20분 동안 원심분리하고 상등액을 0.45 µm membrane filter로 여과하여 HPLC로 분석하였다. Carbohydrate column(4.6×250mm, Waters, Milford, MA, USA)을 사용하였고, acetonitrile:water(v/v, 80:20) 용액을 1.2 mL/min의 속도로 40℃에서 RID를 사용하여 분석하였다.

#### (6) SDE법에 의한 휘발성 향기성분의 추출

개다래 및 개다래 박 10 g에 Milli Q water 800 mL를 혼합하고 정량분석을 위해 내부표준 물질로 n-butylbenzene 1 µL(851.4 µg, Aldrich, USA)를 첨가하여 Schultz 등의 방법에 따라 개량된 연속수증기증류추출장치(Likens & Nickerson type simultaneous steam distillation and extraction apparatus, SDE)에서 재증류한 n-pentane과 diethyl ether 혼합용매(1:1, v/v) 100 mL를 사용하여 상압 하에서 2시간 동안 향기성분을 추출하였다. 이 추출액에 무수 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 가하여 -4℃에서 하룻밤 방치시켜 탈수시키고 유기용매층은 vigreux column을 사용하여 약 1.0 mL까지 농축 후 GC/MS 분석시료로 사용하였다.

#### (7) 휘발성 향기성분의 분석

휘발성 향기성분의 정량분석을 위해 GC/MS는 HP 5973 Mass selective detector(Agilent Technologies Inc., USA)가 연결된 HP 6890 Series gas chromatograph를 사용하였다. 휘발성 향기성분의 분리를 위해 column은 DB-WAX(60 m×0.25 mm i.d., 0.25 µm film thickness, J&W Scientific, USA)를 사용하였고, oven의 온도는 40℃에서 3분간 유지한 다음 2℃/min의 속도로 200℃까지 상승시켰으며, carrier gas의 유속은 1 mL/min(He)로 유지하였다. 분리된 화합물의 이온화는 electron impact ionization(EI) 방법으로 행하였으며 ionization voltage와 ion source의 온도는 각각 70 eV와 230℃로 설정하였고, 분석할 분자량의 범위는 40~350(m/z)로 설정하였다.

#### (8) 개다래 및 개다래 박 추출물의 특성 비교

##### (가) 총 폴리페놀 함량

개다래 및 개다래 박의 열수 및 주정 추출물의 총 폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu 방법을 변형하여 측정하였다. 농도별 시액 0.2 mL를 증류수 2.6 mL에 녹이고 Folin 시약을 0.2 mL 첨가하고 잘 혼합한 후 2 mL의 7% sodium carbonate 용액을 서서히 가하였다. 이 혼합액을 90분간 방치한 후 분광광도계를 사용하여 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. Gallic acid를 사용하여 구한 검량선 으로부터 시료 중의 총 폴리페놀 함량을 구하였다.

##### (나) 총 플라보노이드 함량

개다래 및 개다래 박의 열수 및 주정 추출물의 총 플라보노이드 함량은 Jia 등의 방법을 변형하여 측정하였다. 농도별 시액 0.5 mL를 증류수 3.2 mL에 녹이고 5% sodium nitrite 용액 0.15 mL를 첨가하고 잘 혼합한 후 5분간 반응시켰다. 다시 10% aluminium chloride 용액 0.15

mL를 첨가하여 1분간 반응시킨 후, 1 N NaOH 1.0 mL을 첨가하였다. 잘 혼합시킨 후, 분광광도계를 사용하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. Catechin을 사용하여 구한 검량선으로 부터 시료 중의 플라보노이드 함량을 구하였다.

#### (다) 항산화력

추출물의 항산화력은 DPPH 라디칼 소거활성으로 측정하였다. 80% MeOH에 녹인 0.1 mM DPPH 용액 2.95 mL와 각 농도별로 희석한 시료 0.05 mL를 혼합하여 30분경과 후에 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH의 라디칼 소거활성은 시료를 첨가하지 않은 대조구와 비교하여 다음 식에 의하여 백분율로 나타내었다. 또한, 각 추출물의 라디칼 소거활성은 추출물을 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 1/2로 환원시키는데 필요한 추출물의 농도인 IC<sub>50</sub> 값으로 나타내었다.

$$\text{Inhibition \%} = \frac{B - A}{B} \times 100$$

A = 시료 흡광도

B = 대조구 흡광도

#### (9) 묘사분석 및 기호도 평가

개다래와 개다래박의 열수 및 주정 추출물을 동결건조하고 1%의 농도로 조정한 후 9명의 훈련된 관능 검사원을 대상으로 추출액에 대한 향미묘사시험을 통해 관능적 특성을 도출하였고 관능적 특성의 강도에 대한 관능검사를 실시하였다. 그리고 추출액에 대한 관능적 기호도를 측정하기 위하여 평가항목으로 색, 향, 맛, 바디감, 전반적 기호도에 대하여 9점 기호척도법으로 관능검사를 실시하였다.

### 나. 결과

#### (1) 개다래의 초임계 추출 수율

개다래의 초임계 추출 수율은 Table 30와 같이 동일한 온도에서는 압력이 증가할수록 증가하는 것으로 나타났으며, 동일한 압력에서는 온도가 증가할수록 감소하는 경향이였다. 또한 동일한 온도, 압력일 경우 추출시간이 길어질수록 증가하는 것으로 나타났다. 특히 45, 55℃에서 압력이 3000 psi에서 4500 psi로 증가할 경우 수율이 2배 정도 증가하는 경향을 나타내었으나 45℃, 4500 psi의 경우 1시간 추출 시 0.65±0.03%에서 2시간 추출 시 0.72±0.04%로 시간이 증가하여도 추출수율이 크게 증가하지는 않는 것으로 나타났다. 개다래의 적정 초임계 추출조건은 온도, 압력, 추출시간을 고려하여 볼 때 45℃, 4500 psi에서 1시간 동안 추출하는 것이 가장 바람직할 것으로 판단되었다.

**Table 30. 개다래의 초임계 추출 수율 (%)**

추출온도 (℃)	추출압력 (psi)	추출시간	
		1 hr	2 hr
35℃	1500	0.15±0.02	0.31±0.07
	3000	0.38±0.01	0.52±0.02
	4500	0.50±0.03	0.55±0.09
45℃	1500	0.09±0.01	0.18±0.04
	3000	0.34±0.06	0.48±0.04
	4500	0.65±0.03	0.72±0.04
55℃	1500	0.02±0.00	0.07±0.01
	3000	0.31±0.03	0.49±0.02
	4500	0.36±0.01	0.76±0.11

**(2) 개다래 및 개다래 박의 성분 비교**

개다래와 개다래 박의 일반성분, 유리당, 유리 아미노산 및 향기성분 등 여러 가지 성분을 비교하였다. 일반성분(Table 31)에서 조지방의 경우 개다래 1.17%에서 개다래 박 0.48%로 크게 감소된 값을 나타내어 초임계 추출에 의해 개다래의 지용성 성분인 지방이 상당량 추출되어 제거되었음을 알 수 있었으며, 이외의 성분들은 거의 유사한 값을 나타내었다. 또한 유리 아미노산(Table 32)과 유리당(Table 33)의 경우에도 개다래와 개다래 박이 거의 유사한 값을 나타내어 초임계 추출이 개다래의 유리당과 유리 아미노산 값에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 연속수증기증류추출장치를 이용하여 개다래와 개다래 박의 향기성분을 추출한 후 GC로 분석한 결과(Table 34), 총 향기성분 함량이 개다래 99.7±14.4 mg/kg에서 개다래 박 58.0±5.8 mg/kg으로 크게 감소하는 것으로 나타나 개다래 고유의 향기성분이 초임계 추출에 의해 상당히 제거되어 감소하는 것을 알 수 있었다.

**Table 31. 개다래와 개다래 박의 일반성분 (%)**

항목	개다래	개다래 박
수분	4.67	4.44
조지방	1.17	0.48
조단백	14.81	14.98
회분	6.95	7.00
탄수화물	72.40	73.10

Table 32. 개다래와 개다래 박의 유리아미노산 조성

(μg/mg)

	개다래	개다래 박
Cys	0.55	0.60
ASP	0.52	0.51
GLU	0.24	0.24
ASN	1.72	1.75
SER	0.23	0.23
GLN	0.81	0.82
GLY	0.05	0.05
HIS	0.08	0.07
ARG	3.55	3.61
THR	0.10	0.11
ALA	0.97	0.97
PRO	0.18	0.18
TYR	0.20	0.23
VAL	0.19	0.20
MET	0.07	0.06
Cys2	0.04	0.05
ILE	0.08	0.08
LEU	0.06	0.06
PHE	0.30	0.31
TRP	0.46	0.52
LYS	0.33	0.33
Total	10.73	10.97

Table 33. 개다래와 개다래 박의 유리당 조성

(%)

유리당	개다래	개다래 박
Fructose	1.44	1.57
Glucose	1.76	1.62
Sucrose	0.84	0.67

Table 34. 개다래 및 개다래 박의 향기성분

	개다래	개다래 박
총 향기성분 함량 (mg/kg)	99.7±14.4	58.0±5.8

### (3) 개다래 및 개다래 박 추출물의 특성 비교

개다래 및 개다래 박의 열수추출물과 주정추출물의 수율, 총 폴리페놀, 총 플라보노이드 함량 및 항산화력을 분석한 결과는 Table 35과 같다. 열수추출물( $31.1 \pm 0.5 \sim 33.6 \pm 1.4\%$ )이 주정추출물( $21.3 \pm 0.4 \sim 21.8 \pm 1.5\%$ )에 비해 높은 수율을 나타내었지만 개다래와 개다래 박의 차이는 거의 없었으며, 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량도 주정추출물이 열수추출물에 비해 높은 함량을 나타내었지만 개다래와 개다래 박의 총 플라보노이드와 총 폴리페놀 함량 차이는 거의 없는 것으로 나타났다. DPPH 소거활성의 경우에는 열수추출물의 활성( $IC_{50}$ ,  $2.95 \sim 3.02$  mg/mL)이 주정추출물( $IC_{50}$ ,  $3.24 \sim 3.25$  mg/mL)에 비해 약간 높은 것으로 나타났지만 개다래와 개다래 박의 추출물 사이에는 차이가 거의 없는 것으로 나타났다. 따라서 초임계 추출에 의해 제조한 개다래 박을 열수 또는 주정추출 할 때 초임계 추출이 개다래의 수율이나 주요 기능성 성분인 플라보노이드 및 폴리페놀의 추출, 그리고 항산화력에 거의 영향을 미치지 않음을 확인할 수 있었다.

**Table 35. 개다래와 개다래 박의 열수 및 주정 추출물의 수율, 총 폴리페놀, 총 플라보노이드 함량 및 항산화력**

	추출물	수율 (%)	총 폴리페놀 (ppm/gallic acid)	총 플라보노이드 (ppm/catechin)	DPPH 소거활성 ( $IC_{50}$ , mg/mL)
개다래	열수추출물	$31.1 \pm 0.5$	$85.0 \pm 0.6$	$21.2 \pm 0.5$	2.95
	주정추출물	$21.8 \pm 1.5$	$95.6 \pm 1.2$	$26.8 \pm 0.8$	3.24
개다래 박	열수추출물	$33.6 \pm 1.4$	$85.9 \pm 1.0$	$22.3 \pm 0.3$	3.02
	주정추출물	$21.3 \pm 0.4$	$95.9 \pm 1.9$	$27.3 \pm 0.6$	3.25

### (4) 묘사분석 및 기호도 평가

개다래와 개다래박의 열수 및 주정추출물을 1% 농도로 조정한 후 추출액에 대한 향미묘사 시험을 한 결과(Table 36), 쓴맛, 떼은맛, 단맛, 구수한 맛 등의 맛 특성과 한약재향, 흙냄새, 박하향 등의 향기 특성 등 총 7가지의 관능적 특성을 도출하였으며, 이 중 쓴맛, 떼은맛, 한약재향 등의 강도가 강한 것으로 또한 주정추출물이 열수추출물에 비해 맛과 향기특성이 강한 것으로 나타났다. 그리고 초임계 추출에 의해 제조한 개다래 박의 경우 개다래에 비해 열수추출물과 주정추출물 모두 대부분의 특성의 강도가 상당히 감소하는 것으로 나타났다. 개다래와 개다래 박의 열수 및 주정추출물에 대한 관능적 기호도를 측정하기 위하여 평가항목으로 색, 향, 맛, 바디감, 종합적 기호도에 대하여 9점 기호 척도법으로 관능검사를 실시한 결과(Table 37), 개다래 및 개다래 박 모두 주정추출물에 비해서는 열수추출물의 기호도가 모든 항목에서 높은 기호도를 나타내었고, 개다래 보다는 개다래 박의 추출물의 기호도가 높은 것으로 나타났다.

개다래는 높은 기능성(항염증, 통풍 등)을 나타내지만 이를 활용한 다양한 기능성, 가공제품(예, 음료 등)을 개발하고자 할 때 기호적으로 양호하지 않은 맛과 향기 특성을 나타내기 때문



에 많은 제약이 따른다. 하지만 본 연구에서와 같이 개다래를 초임계 처리를 할 경우 개다래가 지니는 기능성과 기능성 성분이 전혀 손실되지 않는 반면 개다래의 양호하지 않은 맛과 향기성분이 제거되어 그 강도가 약해지고 관능적 기호도도 증가하는 것으로 나타났다. 따라서 초임계 처리가 개다래의 기능성을 향상시키고 양호하지 않은 맛과 향기특성을 제거하기에 매우 효과적임을 알 수 있었다.

**Table 36. 개다래 및 개다래 박의 열수, 주정 추출물의 맛, 향기 특성의 강도**

	개다래		개다래 박	
	열수추출물	주정추출물	열수추출물	주정추출물
쓴맛	6.0±0.9	8.7±0.5	5.2±1.3	8.1±0.8
떫은맛	4.9±0.8	7.4±0.9	4.7±1.2	7.3±1.0
단맛	3.3±1.6	2.4±1.5	3.3±2.0	2.6±1.5
구수한맛	4.2±1.2	3.4±1.0	3.9±1.8	2.9±1.3
한약재향	5.4±1.1	5.9±1.7	4.6±0.9	5.2±1.8
흙냄새	5.0±1.4	5.1±1.8	4.2±1.5	4.5±1.2
박하향	2.7±1.4	4.3±1.2	2.6±0.7	3.6±1.1

**Table 37. 개다래 및 개다래 박의 열수, 주정추출물의 관능적 기호도**

	개다래		개다래 박	
	열수추출물	주정추출물	열수추출물	주정추출물
색	6.7±0.5	4.2±1.0	6.7±0.9	4.3±1.7
향	5.8±0.8	5.3±2.0	6.4±1.3	5.9±1.5
맛	5.7±1.0	3.2±1.0	6.2±1.7	3.9±0.8
바디감	5.6±0.5	4.0±1.5	5.6±1.6	4.3±1.3
종합적 기호도	5.8±1.1	3.5±1.1	6.3±1.1	4.4±1.1

## 2. 생강의 초임계 추출 최적화 조건 설정

### 가. 시료 및 실험 방법

#### (1) 초임계 추출

생강 oleoresin을 추출하기 위하여 초임계유체추출장치(SFT-100XW, Supercritical Fluid Technologies, Inc., USA)를 사용하여 추출하였다. 추출조는 내용량 100 mL의 용량으로 생강 분말 18 g을 넣어 추출하였으며 추출조건은 35, 45, 55℃ 온도에서 100, 200, 300, 400 bar로 압력을 변화시키며 실시하였고, CO<sub>2</sub>의 유속은 2 mL/min로 dynamic mode에서 2시간동안 추출하여 추출물을 곧바로 vial에 받아내었다.

## (2) 색도

색도는 color and color difference meter(Color QUEST II, Hunter Lab, USA)를 이용하여 L(lightness), a(redness/greenness), b(yellowness/blueness)값을 측정하였으며, 이때 표준 백색 판은 L=92.68, a=-0.81, b=0.86의 값을 가진 것을 사용하였다.

## (3) 유동 특성

추출물의 유동 특성은 20℃로 설정된 rheometer(Carri-Med CSL 100, TA Instruments, USA)의 plate-plate system(직경: 2cm, 간격: 52 μm)을 이용하여 측정하였다. 시료를 rheometer의 plate에 놓고 0.3~300 sec<sup>-1</sup>의 전단속도( $\dot{\gamma}$ ) 범위에서 측정하였다. 시료의 정상유동 특성은 전단속도 증가시 얻어진 전단속도( $\dot{\gamma}$ )와 전단응력( $\tau$ )의 data로부터 Casson 모델식(식 1)에 의하여 항복응력( $\tau_0$ )을 구하고 이를 Herschel-Bulkley 모델식(식 2)에 적용하여 점조도지수(consistency index) K와 유동성지수(flow behavior index) n을 결정하였다.

$$(1) \sqrt{\tau} = \sqrt{\tau_0} + a\sqrt{\dot{\gamma}}$$

$$(2) \tau = K\dot{\gamma}^n + \tau_0$$

## (4) Gingerol 함량

생강 초임계 추출물에 함유된 6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol, 6-shogaol 등의 gingerol 함량을 HPLC(Jasco Co., Japan)를 이용하여 정량하였다. 컬럼은 Waters symmetry C-8 reversed phase column(150 × 3.9 mm, Cat. No. WATO 54235)을, 이동상은 methanol-water(46:35, v/v)를 1 mL/min의 속도로 용출하였고 시료의 검출은 UV detector로 282 nm에서 측정하였다. 분석표준물질은 6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol, 6-shogaol은 Chromadex사에서 구입하여 사용하였다. 생강추출물을 5 mg/mL 농도로 메탄올에 녹인 후 0.45 μm syringe filter(Millipore)로 여과하여 제조하였고 이를 분석용 시료로 사용하였다.

## (5) DPPH(2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl) radical 소거능

추출물의 항산화력은 Williams 등의 방법을 변형한 DPPH radical 소거활성으로 측정하였다. MeOH에 녹인 0.15 mM DPPH 용액 1 mL와 각 농도별로 희석한 시료 0.05 mL를 혼합하여 20분경과 후에 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH의 radical 소거활성은 시료를 첨가하지 않은 대조구와 비교하여 다음 식에 의하여 백분율로 나타내었다. 또한, 각 추출물의 radical 소거활성은 추출물을 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 1/2로 환원시키는데 필요한 추출물의 농도인 IC<sub>50</sub> 값으로 나타내었다.

$$\text{Inhibition \%} = \frac{B - A}{B} \times 100$$

(B: Absorbance of control / A: Absorbance of sample)

## (6) ABTS radical 소거능

추출물의 ABTS radical 소거능은 Van der Berg 등의 방법을 변형한 방법으로 측정하였다. 실험 12~16시간 전에 제조해 둔 7 mM ABTS 용액은 734 nm에서 0.7±0.02의 흡광도를 나타

내도록 5 mM PBS에 희석한 후 ABTS 용액 1 mL와 각 농도별로 희석한 시료 0.02 mL를 혼합하여 10분경과 후에 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS의 radical 소거활성은 시료를 첨가하지 않은 대조구와 비교하여 다음 식에 의하여 백분율로 나타내었다. 또한, 각 추출물의 radical 소거활성은 추출물을 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 1/2로 환원시키는데 필요한 추출물의 농도인 IC<sub>50</sub> 값으로 나타내었다.

#### (7) Linoleic acid와 $\beta$ -carotene의 coupled oxidation에 대한 항산화 활성

Linoleic acid 60 mg,  $\beta$ -carotene 10 mg 그리고 Tween 80 200 mg과 chloroform 10 mL를 혼합하여 농축시킨 후 증류수 50 mL에 용해하여 용액으로 사용하였다. 혼합용액 1 mL와 증류수 2 mL 그리고 생강 추출물(20 mg/mL EtOH) 0.05 mL를 혼합한 후 40°C water bath에서 24시간 유지하면서 꺼내어 470 nm에서 흡광도를 측정하였다. 제조 직후의 흡광도 값을 100으로 하여 측정된 흡광도 값으로부터 항산화 활성을 산출하였다. 이때 생강 추출물 대신 증류수를 0.05 mL 처리한 것을 대조구로 하였다.

#### (8) 휘발성 향기성분의 추출 및 분석

상기 방법(가-6), (가-7))과 동일한 방법으로 수행하였다.

### 나. 결과

#### (1) 생강의 초임계 추출 수율

생강의 초임계 추출 수율은 Fig. 48와 같이 동일한 온도에서는 압력이 증가할수록 증가하는 것으로 나타났으며, 100 bar에서는 온도가 35°C에서 55°C로 증가할수록 수율이 1.91%에서 1.07%로 감소한 반면 200~400 bar에서는 온도가 증가할수록 추출수율이 증가하여 55°C의 경우 각각 2.41, 2.92, 3.00%를 나타내었다.

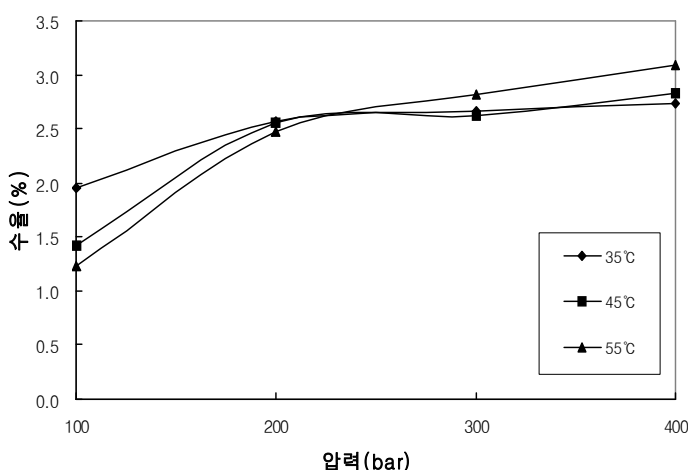


Fig. 48. 초임계 추출 온도와 압력별 생강 추출물의 수율 변화

#### (2) 생강 추출물의 색도 및 외관

Fig. 49는 35°C에서 압력을 달리하여 추출한 생강 추출물의 외관을 나타낸 것으로 100 bar에서는 노란색을 나타내었고 압력이 증가할수록 생강 고유의 색소성분이 많이 추출되어 색이

진하여지면서 400 bar에서는 붉은 계통의 적갈색을 나타내었다. 또한 초임계 추출조건에 따른 생강 추출물의 색도 측정 결과 Table 38에서 보는 바와 같이 모든 온도조건에서 압력이 증가함에 따라 L 값과 b 값이 크게 감소하였으며 특히 b 값의 감소가 큰 것으로 나타나 생강의 색소 추출과 b 값의 관련성이 가장 큼을 알 수 있었다.

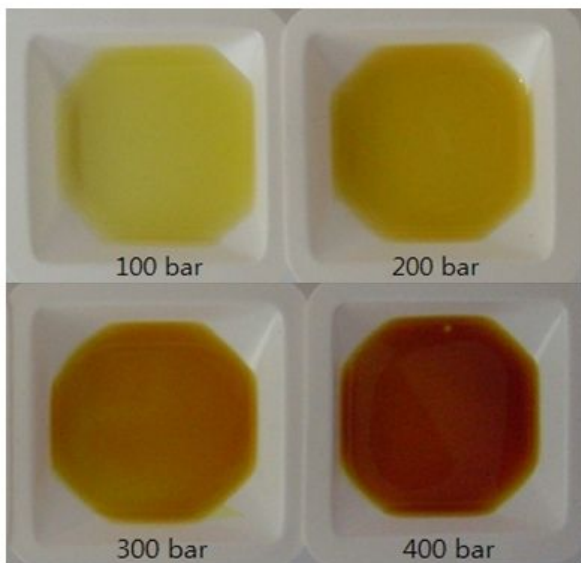


Fig. 49. 초임계 추출 압력별 생강 추출물의 외관

Table 38. 초임계 추출 온도와 압력별 생강 추출물의 색도

온도(℃)	압력 (bar)	Color value		
		L	a	b
35	100	38.8±1.5	6.6±1.0	26.7±2.3
	200	29.4±0.6	10.0±1.7	10.2±1.9
	300	28.6±0.9	16.7±2.4	9.2±1.9
	400	24.4±1.4	5.0±1.1	0.2±0.9
45	100	44.4±0.9	-0.9±0.3	33.0±1.8
	200	34.0±1.3	14.4±1.0	18.7±2.6
	300	27.7±0.8	14.7±0.7	8.5±1.1
	400	24.7±0.5	6.9±0.7	1.2±0.7
55	100	45.3±3.0	-2.0±0.3	30.9±4.6
	200	35.7±1.2	12.6±0.7	21.8±1.8
	300	24.1±0.7	7.9±1.2	2.8±1.0
	400	21.8±0.7	5.0±0.2	0.6±0.1

### (3) 생강 추출물의 유동특성

생강 추출물의 유동특성(flow behavior) 측정 결과는 Table 39과 같다. 전단속도 증가시 얻어진 전단속도와 전단응력의 data를 Casson 모델식에 적용하여 항복응력을 구한 결과 생강 추출물의 항복응력은 거의 나타나지 않았다. 점조도 지수 (K)는 0.014~0.491 Pa·s 범위를 나타내었다. 압력이 증가할수록 점조도 지수는 증가하였으며 동일한 압력에서는 온도가 증가할수록 감소하는 경향을 나타내어 35℃, 400 bar에서 가장 높은 점조도 지수를 나타내었다. 100

sec<sup>-1</sup>에서의 겔보기점도도 점조도 지수와 동일한 경향을 나타내었다. 유동성지수(n)는 0.92~1.05로 1에 근접한 값을 나타내어 Newtonian fluid 특성을 나타내었다.

**Table 39. 초임계 추출 온도와 압력별 생강 추출물의 유동 특성**

온도 (°C)	압력 (bar)	항복력 (Pa)	점조도지수 (Pa·s)	유동성지수	겔보기점도 (ps·s)
35	100	0.0000029	0.190	0.99	0.1680
	200	0.0000031	0.222	1.04	0.2864
	300	0.0000007	0.356	1.01	0.3750
	400	0.0011810	0.491	1.01	0.5092
45	100	0.0000038	0.086	0.92	0.0493
	200	0.0019740	0.156	1.03	0.1790
	300	0.0035050	0.260	0.99	0.2400
	400	0.0001755	0.383	1.00	0.3841
55	100	0.0000054	0.014	1.05	0.0231
	200	0.0070530	0.232	1.00	0.2214
	300	0.0008658	0.241	1.00	0.2473
	400	0.0029350	0.264	1.00	0.2629

#### (4) 생강 추출물의 gingerol 함량

초임계 추출 온도와 압력별 생강추출물의 gingerol 함량 변화를 측정한 결과는 Table 40과 같다. Gingerol 함량 분포는 6-gingerol이 가장 높은 함량을 나타내었고(10.78~17.17%) 8-gingerol (2.38~4.08%), 10-gingerol (1.01~3.07%), 6-shogaol (0.64~1.09%)의 순으로 나타났다. 추출온도와 상관없이 100 bar에서 가장 낮은 gingerol 함량을 나타내었고 추출온도가 증가할수록 각각 20.00, 18.02, 15.13%로 낮아지는 경향이였다. 반면 200~400 bar의 범위에서는 21.46~24.48%로서 큰 차이가 없는 gingerol 함량을 나타내었다.

**Table 40. 초임계 추출 온도와 압력별 생강추출물의 gingerol 함량 변화**

온도 (°C)	압력 (bar)	Gingerol 함량 (%)				
		6-Gingerol	6-Shogaol	8-Gingerol	10-Gingerol	합계
35	100	15.01	0.71	2.47	1.81	20.00
	200	16.02	1.05	3.67	2.75	23.49
	300	17.17	0.98	4.08	2.25	24.48
	400	16.43	1.09	3.40	2.57	23.49
45	100	12.35	0.88	3.01	1.78	18.02
	200	16.01	0.75	3.19	2.52	22.47
	300	15.33	0.64	3.02	2.47	21.46
	400	15.37	0.66	3.17	2.69	21.89
55	100	10.78	0.96	2.38	1.01	15.13
	200	16.37	0.91	3.62	2.90	23.80
	300	16.21	0.68	3.08	2.54	22.51
	400	15.69	0.76	3.58	3.07	23.10

(5) 생강 추출물의 항산화 활성과 Linoleic acid와  $\beta$ -carotene의 coupled oxidation에 대한 항산화 활성

초임계 추출 온도와 압력별 생강추출물의 DPPH와 ABTS radical 소거 활성을 측정한 결과는 Table 41과 같다. DPPH, ABTS radical 소거활성 모두 100 bar에서 가장 높은 IC<sub>50</sub> 값을 그리고 온도가 증가할수록 높은 IC<sub>50</sub> 값을 나타내었고 특히 55℃, 100 bar에서는 각각 1641.0, 1156.7  $\mu\text{g/mL}$ 로 가장 낮은 항산화 활성을 나타내었다. 200~400 bar의 범위에서는 각각 677.3~721.6  $\mu\text{g/mL}$ 과 392.5~434.7  $\mu\text{g/mL}$ 로 큰 차이가 나지 않는 항산화 활성을 나타내었다. 한편 Linoleic acid와  $\beta$ -carotene의 coupled oxidation에 대한 항산화 활성을 측정한 결과는 Fig. 50와 같다. 생강 추출물을 첨가하지 않은 대조구의 경우 2시간 경과 시 71.1%의 항산화 활성을 갖는 것으로 나타나 짧은 시간에 급격히 산화가 일어남을 알 수 있었다. 생강 추출물을 첨가할 경우 처리구에 따라 차이가 있지만 84.4~99.3%의 활성을 나타내어 대조구에 비해 산화가 크게 억제됨을 알 수 있었다. 또한 24시간 경과 시에도 대조구가 52.5%의 항산화 활성을 나타내는 반면 생강 추출물 처리 시에는 57.3~77.8%의 항산화 활성을 나타내는 것으로 나타났다. DPPH와 ABTS radical 소거 활성과 마찬가지로 추출온도에 상관없이 100 bar에서 가장 낮은 항산화 활성을 나타내고 200~400 bar의 범위에서는 큰 차이가 나지 않는 항산화 활성을 갖는 것으로 나타났다. 이와 같은 항산화 활성 결과는 앞에서 기술한 추출물의 gingerol 함량의 경향과 거의 유사한 경향인 것으로 생강 추출물의 항산화 활성이 gingerol 함량과 매우 큰 상관관계가 있음을 알 수 있었다.

**Table 41.** 초임계 추출 온도와 압력별 생강 추출물의 항산화 활성

온도 (℃)	압력 (bar)	IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ )	
		DPPH	ABTS
35	100	811.7	546.3
	200	708.8	415.8
	300	677.3	405.0
	400	685.4	392.5
45	100	1267.8	897.2
	200	693.5	421.4
	300	699.2	418.5
	400	683.5	411.4
55	100	1641.0	1156.7
	200	721.6	434.7
	300	691.4	427.4
	400	718.1	409.9

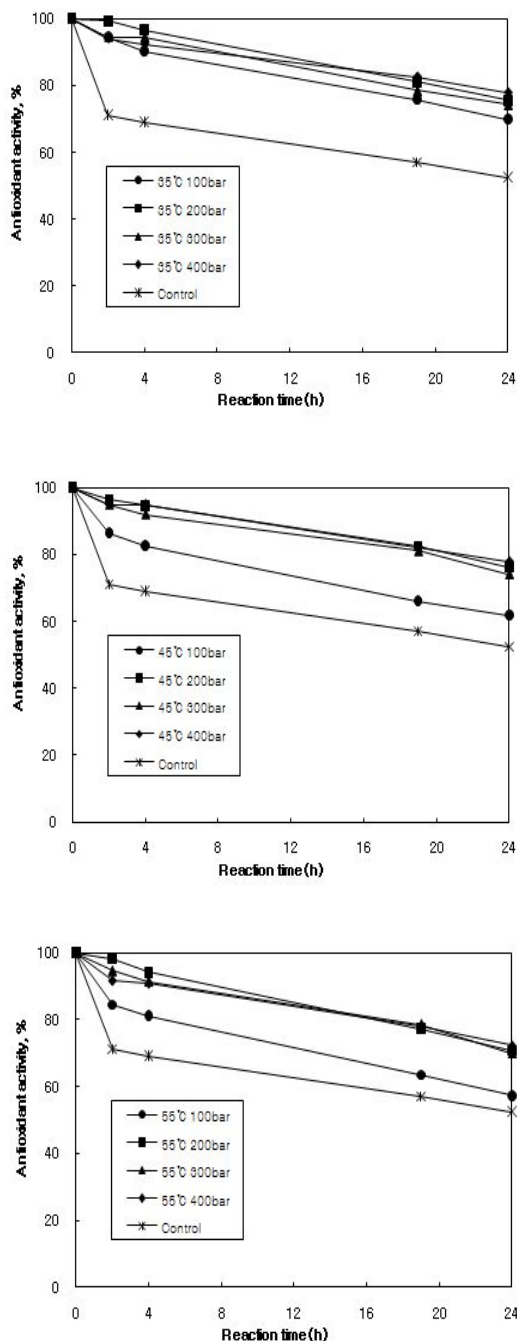


Fig. 50. 초임계 추출 온도와 압력별 생강추출물의 coupled oxidation에 대한 항산화 활성

#### (6) 생강 추출물의 휘발성 향기성분

초임계 추출 온도 35°C에서 압력을 달리하여 제조한 생강추출물의 휘발성 향기성분을 분석하였으며, Fig. 51는 휘발성 향기성분의 total ion chromatogram(TIC)이며, Table 42는 GC/MS 분석에 의하여 동정된 향기성분의 조성이고 동정된 향기성분의 관능기에 따른 상대적 비율은 Table 43에 나타내었다. 총 28종의 향기성분이 동정되었으며, aldehyde류 1종(0.181~0.496%), alcohol류 7종(16.230~22.316%), ketone류 2종(3.471~4.095%), ester류 1종(1.594~1.750%) 및 hydrocarbon류 17종(73.317~7%,63%)이 확인되었다. 생강의 대표적인 향기성분인 [-]-zingiberene이 가장 높은 함량을 나타내었고(23.143~29.247%),  $\alpha$ -curcumen,  $\beta$ -sesquiphellandrene, [-]-borneol, [+,-]- $\beta$ -bisabolene 등이 높은 함량을 나타내었다. 초임계 압

력 조건 중 400 bar에서 가장 높은 총 향기성분의 함량을 나타내었다.

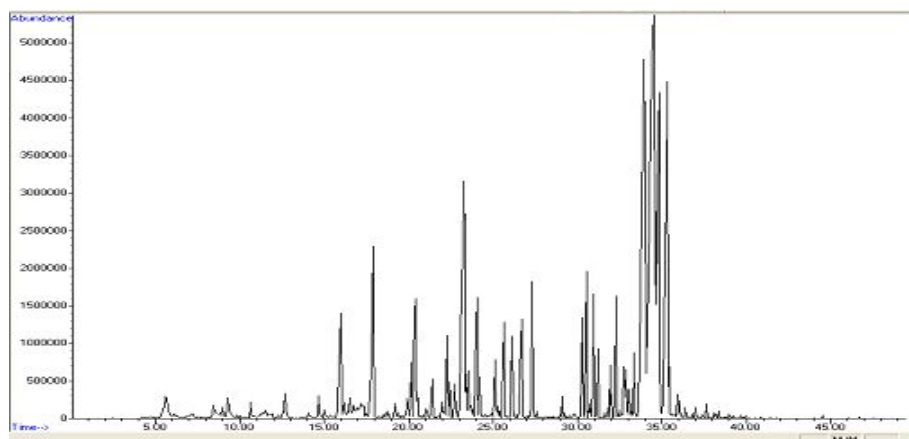


Fig. 51. 생강 초임계 추출물의 GC-MS chromatogram



**Table 42. 초임계 추출 압력별 생강 추출물의 휘발성 향기성분**

No.	RT <sup>1)</sup>	Compound name	MW <sup>2)</sup>	100 bar	200 bar	300 bar	400 bar
1	9.3	hexanal	100	0.496	0.336	0.272	0.181
2	10.7	2,4-dimethyl-, 1-heptene	126	0.198	0.238	0.512	0.483
3	12.7	2-heptanol	116	0.562	0.552	0.697	0.588
4	14.1	$\alpha$ -pinene	136	0.071	0.107	0.319	0.136
5	16.0	5-hepten-2-one, 6-methyl-	126	2.550	2.398	2.871	2.622
6	17.9	1,8-cineol	154	3.842	3.647	9.792	5.274
7	20.4	[+]-linalool	154	3.049	2.902	3.106	2.763
8	22.2	[+]-camphor	152	1.063	1.073	1.224	1.049
9	23.4	[-]-borneol	154	9.584	8.326	8.185	7.487
10	24.0	[r]-[+]- $\alpha$ -terpineol	154	2.402	1.978	2.005	1.866
11	25.1	[r]-[+]citronellol	156	0.835	0.620	0.556	0.569
12	25.7	$\beta$ -citral	152	1.805	1.481	1.940	1.635
13	26.1	2,6-octadien-1-ol, 3,7-dimethyl-, [E]	154	1.563	0.971	0.944	0.890
14	26.7	$\alpha$ -citral	152	2.223	1.756	2.249	1.927
15	27.3	[-]-bornyl acetate	196	1.723	1.604	1.750	1.594
16	30.3	[+]-cyclosativen	204	1.382	1.456	1.807	1.596
17	30.5	$\alpha$ -cubebene	204	1.883	1.993	2.381	2.162
18	31.0	[-]- $\beta$ -elemene	204	1.793	1.821	1.874	1.772
19	32.3	[-]-germacrene D	204	1.400	1.440	1.489	1.377
20	32.7	[Z]- $\beta$ -Farnesene	204	0.722	0.792	0.880	0.798
21	34.0	$\alpha$ -curcumen	202	15.263	15.267	1.762	14.546
22	34.5	[-]-zingiberene	204	23.143	25.807	29.247	26.461
23	34.6	$\gamma$ -muurolene	204	3.236	3.090	3.441	2.944
24	34.8	[+,-]- $\beta$ -bisabolene	204	8.148	8.789	8.983	8.378
25	35.3	$\beta$ -sesquiphellandrene	204	10.615	11.128	11.284	10.531
26	35.9	$\beta$ -patchoulene	204	0.235	0.191	0.203	0.171
27	36.0	1,6,10-dodecatrien-3-ol, 3,7,11-trimethyl-	222	0.134	0.136	0.137	0.114
28	36.4	germacrene B	204	0.081	0.101	0.090	0.087

<sup>1)</sup>Retention time, <sup>2)</sup>Molecular Weight

**Table 43. 초임계 추출 압력별 생강 추출물의 휘발성 향기성분의 기능기 분류**

기능기	기능기별 비율 (%)			
	100 bar	200 bar	300 bar	400 bar
Aldehydes	0.496	0.336	0.272	0.181
Alcohols	18.922	16.230	22.316	16.788
Ketones	3.613	3.471	4.095	3.671
Esters	1.723	1.604	1.750	1.594
Hydrocarbons	76.969	79.963	73.317	79.360

### 3. 생강 추출물 대량생산을 위한 현장적용 시험

#### 가. 시료 및 실험 방법

전년도 연구결과 생강 추출물 제조를 위한 최적 초임계 추출 조건으로 확립된 조건에서 향후 대량생산 시 발생할 수 있는 문제점 및 해결책을 파악하기 위해 추출 vessel의 용량 (0.5 L, 3 L, 10 L)(Fig. 52)을 달리하여 생강 추출물을 제조한 후 CO<sub>2</sub>/시료의 비율 변화에 따른 추출 수율, gingerol 함량을 비교하였다. 수율과 gingerol 함량 분석은 상기와 동일한 방법을 사용하였다.



**Fig. 52. 10 L 용량 초임계 추출장치**

#### 나. 결과

초임계 추출 vessel의 용량 (0.5 L, 3 L, 10 L)을 달리하여 제조한 생강 추출물의 외관은 Fig. 53에서 보는 바와 같이 외관상으로는 거의 차이가 없는 것으로 나타났다. 이때 CO<sub>2</sub>/시료의 비율 변화에 따른 추출 수율을 비교한 결과는 Fig. 56과 같다. 추출 vessel의 용량이 0.5 L와 3 L의 경우 CO<sub>2</sub>/시료의 비율 변화에 따른 추출 수율이 거의 유사한 경향을 나타내었고 CO<sub>2</sub>/시료의 비율이 10:1 정도에서 5.7% 정도로 최대값에 도달하였다. 한편 추출 vessel 용량 10 L의 경우 작은 추출용량에 비해 동일 CO<sub>2</sub>/시료의 비율에서 월등히 낮은 추출수율을 나타내었고 작은 추출용량에서의 추출수율과 비슷한 값을 나타내기 위해서는 CO<sub>2</sub>/시료의 비율이 증가하여 25:1 정도가 될 때 유사한 추출수율을 나타낼 것으로 예상되었다. 따라서 초임계 생

강 추출물을 대량생산하기 위해서는 추출 vessel 용량이 커짐에 따라 CO<sub>2</sub>/시료의 비율도 증가하여야 할 것으로 판단된다.

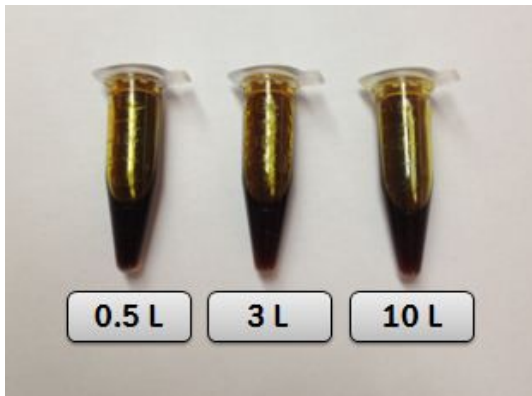


Fig. 53. 초임계 추출용량별 생강 추출물의 외관

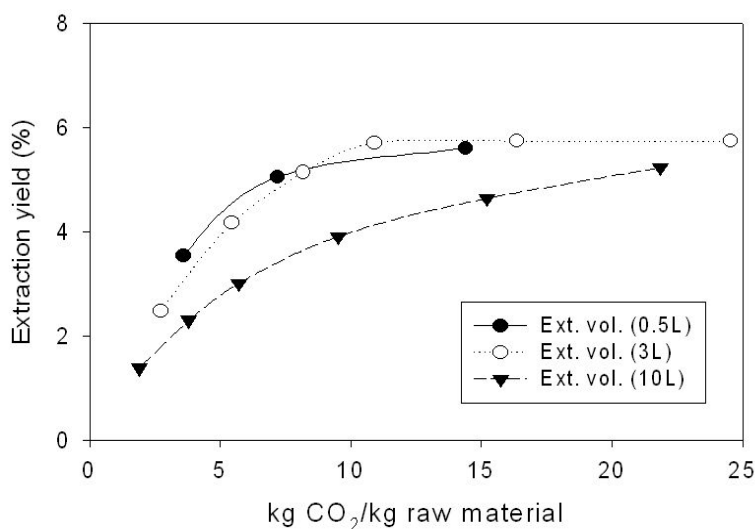


Fig. 54. 초임계 추출용량별 생강 추출물의 추출수율

초임계 추출 vessel 용량별 생강 추출물의 gingerol 함량을 분석한 결과는 Table 44에서 보는 바와 같이 추출용량 0.5 L와 3 L의 추출물의 경우 거의 유사한 함량을 나타내어 총 gingerol 함량이 12.58%와 12.59%를 나타낸 반면 10 L의 경우에는 10-gingerol 함량이 다소 높아 13.21%의 gingerol 함량을 나타내었다. 한편 이들 생강 추출물의 휘발성 향기성분을 분석한 결과는 Table 45에서 보는 바와 같이 생강의 대표적인 향기성분인 [-]-zingiberene이 가장 높은 함량을 나타내었고(25.641~25.814%),  $\alpha$ -curcumen,  $\beta$ -sesquiphellandrene, [-]-borneol, [+,-]- $\beta$ -bisabolene 등이 높은 함량을 나타내었으며, 각각의 조성비와 총 향기성분의 함량에서 추출용량에 따른 차이가 거의 없는 것으로 나타났다

Table 44. 초임계 추출 vessel 용량별 생강 추출물의 gingerol 함량 변화

추출용량	Gingerol 함량 (%)				합계
	6-Gingerol	6-Shogaol	8-Gingerol	10-Gingerol	
0.5 L	9.25	0.41	1.04	1.88	12.58
3 L	8.98	0.48	1.08	2.05	12.59
10 L	8.98	0.52	1.41	2.30	13.21

Table 45. 초임계 추출 vessel 용량별 생강 추출물의 휘발성 향기성분

No.	Compound name	MW			
1	hexanal	100	0.163	0.169	0.165
2	2,4-dimethyl-, 1-heptene	126	0.458	0.462	0.477
3	2-heptanol	116	0.592	0.598	0.588
4	$\alpha$ -pinene	136	0.105	0.099	0.112
5	5-hepten-2-one, 6-methyl-	126	2.286	2.272	2.292
6	1,8-cineol	154	6.110	6.119	6.101
7	[+]-linalool	154	2.553	2.587	2.571
8	[+]-camphor	152	1.257	1.301	1.306
9	[-]-borneol	154	7.276	7.252	7.283
10	[r]-[+]- $\alpha$ -terpineol	154	1.731	1.712	1.731
11	[r]-[+]-citronellol	156	0.677	0.665	0.640
12	$\beta$ -citral	152	1.748	1.757	1.766
13	2,6-octadien-1-ol, 3,7-dimethyl-, [E]	154	0.782	0.814	0.771
14	$\alpha$ -citral	152	1.856	1.828	1.836
15	[-]-bornyl acetate	196	1.726	1.746	1.753
16	[+]-cyclosativen	204	1.752	1.724	1.779
17	$\alpha$ -cubebene	204	1.878	1.869	1.894
18	[-]- $\beta$ -elemene	204	1.825	1.843	1.852
19	[-]-germacrene D	204	1.461	1.438	1.461
20	[Z]- $\beta$ -Farnesene	204	0.735	0.776	0.783
21	$\alpha$ -curcumen	202	15.852	15.605	16.051
22	[-]-zingiberene	204	25.724	25.814	25.641
23	$\gamma$ -muurolene	204	2.587	2.536	2.494
24	[+,-]- $\beta$ -bisabolene	204	7.693	7.734	7.867
25	$\beta$ -sesquiphellandrene	204	10.775	10.874	10.366
26	$\beta$ -patchoulene	204	0.184	0.175	0.188
27	1,6,10-dodecatrien-3-ol, 3,7,11-trimethyl-	222	0.123	0.131	0.127
28	germacrene B	204	0.091	0.100	0.105

#### 4. 미나리 당 발효액의 품질특성

##### 가. 시료 및 실험 방법

##### (1) 미나리 발효 및 숙성

채취한 미나리를 깨끗이 수세한 후 세척 및 살균된 용기에 다져 넣어 침출제로서 흑설탕과 올리고당을 사용하여 세척 미나리 원료와 당의 비율을 1:1로 혼합하였다. 당에 절여진 미나리를 상온에서 1년간 방치하면서 원료 중의 유용성분이 삼투압에 의하여 용출과 동시에 자연발효가 일어나도록 하였다. 미나리의 침출이 완전히 이루어지면 상등액을 저장용기에 옮겨 4℃ 냉장실에서 액상 추출물을 냉장보관하면서 2년째, 3년째 숙성하면서 시료로 사용하였다.

##### (2) pH 및 적정산도

미나리 액상 추출물의 pH는 pH meter(Orion 720A, USA)를 이용하여 측정하였고, 적정산도는 미나리 액상추출물 10ml에 증류수 20ml을 첨가하여 pH meter로 pH가 8.3에 도달할 때까지 0.1N-NaOH로 적정한 소비량을 lactic acid 함량(%)으로 환산하였다.

##### (3) 당도 및 환원당

미나리 액상 추출물의 당도는 디지털당도계(Atago PAL-1, Japan)를 이용하여 °Brix로 측정하였으며, 환원당은 미나리 엑기스를 10<sup>3</sup>배 희석하여, DNS법을 이용해 분광광도계(Spectrophotometer 650, Beckman, USA)로 580nm에서 측정한 값을 %로 나타내었다.

##### (4) 색도

색도는 color and color difference meter(Color QUEST II, Hunter Lab, USA)를 이용하여 L(lightness), a(redness/greenness), b(yellowness/blueness)값을 측정하였으며, 이때 표준 백색 판은 L=92.68, a=-0.81, b=0.86의 값을 가진 것을 사용하였다.

##### (5) 묘사분석 및 관능검사

미나리 추출물에 대해 10명의 훈련된 관능검사 요원을 대상으로 향미묘사시험을 통해 관능적 특성을 도출하였고 관능적 특성의 강도에 대한 관능검사를 실시하였다. 그리고 추출액에 대한 관능적 기호도를 측정하기 위하여 평가항목으로 색, 향, 맛, 바디감, 전반적 기호도에 대하여 9점 기호척도법으로 관능검사를 실시하였다.

##### (6) 아토피 예방용 제품 개발

초임계 생강 추출물과 미나리 추출물을 혼합하여 또는 미나리 추출물만을 사용하여 크림, mist, body wash 등의 제품을 제조하였다(Fig. 56). 초임계 생강 추출물과 미나리 추출물을 혼합한 아토피 예방용 크림(60 mL)은 Table 50의 배합비에 따라 정제수와 oil 성분을 혼합하고 70℃로 유지된 고속 homogenizer로 교반하여 유화한 후 생강 추출물 등 나머지 첨가물을 혼합하여 교반하고 냉각하여 제조하였다. 초임계 생강 추출물과 미나리 추출물을 혼합한 아토피 예방용 mist(100 mL)는 Table 51의 배합비에 따라 정제수와 생강 추출물을 혼합하고 고속 homogenizer로 교반하여 유화한 후 미나리 추출물 등 나머지 첨가물을 혼합하고 교반하여 제

조하였다. 초임계 생강 추출물과 미나리 추출물을 혼합한 아토피 예방용 body wash(280 mL)은 Table 52의 배합비에 따라 정제수와 oil 성분을 혼합하고 70℃로 유지된 고속 homogenizer로 교반하여 유화한 후 생강 추출물 등 나머지 첨가물을 혼합하여 교반하고 냉각하여 제조하였다. 한편 미나리 추출물만을 사용한 아토피 예방용 크림, mist, body wash 등의 제품은 각각 Table 53, 54, 55의 배합비에 따라 제조하였다.

#### (7) 통계분석

모든 실험은 3차 반복 실험을 하였고, 결과 값은 SAS program (SAS Institute Inc., USA, ver. 9.0))))하여 각 시험구의 평균과 표준편차를 산출하고, 각 시험구간의 차이 유무를 ANOVA로 분석한 뒤  $p < 0.05$ 한 뒤유의적 차이가 있는 경우 Duncan's multiple range test (v.10.0)를 이용하여 사후 검증하였다.

### 나. 결과

#### (1) 미나리 추출액의 이화학적 특성

설탕과 올리고당을 이용하여 미나리를 당절임 후 숙성시켜 제조한 추출물의 이화학적 특성을 조사한 결과는 Table 46와 같다. 설탕절임 추출액의 당도, pH와 환원당이 높게 나타났으며, 적정산도의 경우 설탕 1년 추출액의 경우 2.17%를 나타내었지만 2년, 3년 추출액의 경우 0.82~0.80%로 낮아졌으며, 올리고당 추출액의 경우에도 1년 1.41%에서 2~3년 시 1.39~0.78%로 낮아지는 것으로 나타났다. 아미노태질소의 경우에도 설탕과 올리고당 모두 1년차에서 높은 값을 나타내고 2~3년차로 숙성이 진행됨에 따라 감소하는 것으로 나타났으며, 설탕이 올리고당 보다 높은 아미노태질소 함량을 나타내었다.

**Table 46. 설탕과 올리고당을 이용한 미나리 추출물의 이화학적 특성**

시료	당도(°Bx)	pH	환원당(%)	적정산도(%)	아미노태질소 (mg%)
설탕 1년	36.8	3.77	23.2	2.17	1125.2
설탕 2년	54.6	3.91	39.2	0.82	370.9
설탕 3년	54.6	4.01	39.7	0.80	326.9
올리고당 1년	23.1	3.83	15.8	1.41	558.9
올리고당 2년	40.0	3.43	31.5	1.39	241.9
올리고당 3년	41.4	3.67	33.0	0.78	122.5

#### (2) 색도

설탕과 올리고당을 이용하여 미나리를 당절임 후 숙성시켜 제조한 추출물의 외관을 조사한 결과, Fig. 55에서 보는 바와 같이 설탕 추출물의 경우 검고 진한 흑갈색을 나타내는 반면 (Table 47) 올리고당 추출물의 경우 1년차 밝은 진홍색을 띠면서 2~3년차 숙성이 진행되면서 붉은색이 감소하였다. 색도 조사 결과(Table 47), 설탕 추출물의 경우 숙성이 진행됨에 따라 L 값과 b 값이 감소하는 것으로, 올리고당 추출물의 경우에는 L 값은 증가하는 반면 a 값과 b 값은 크게 감소하는 것으로 나타났다.

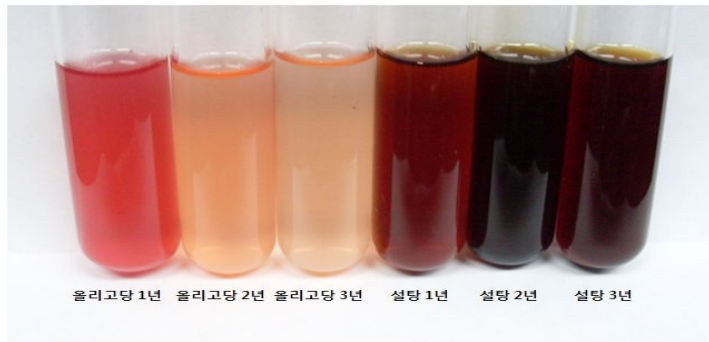


Fig. 55. 설탕과 올리고당을 이용한 미나리 추출물의 외관

Table 47. 설탕과 올리고당을 이용한 미나리 추출물의 색도

시료	색도		
	L	a	b
설탕 1년	26.33	25.94	41.09
설탕 2년	11.42	29.29	17.70
설탕 3년	12.15	27.19	19.38
올리고당 1년	55.90	35.32	16.49
올리고당 2년	65.86	4.30	3.67
올리고당 3년	63.86	1.30	-1.13

### (3) 미나리 추출액의 관능적 특성

설탕과 올리고당을 이용하여 미나리를 당절임 후 숙성시켜 제조한 추출물에 대한 향미묘사 시험을 한 결과(Table 48), 새콤한 향, 달콤한 향, 한약재 향 등의 향기 특성과 단맛, 신맛 등의 맛 특성, 그리고 색, 점도 등의 물리적 특성 등 총 7가지의 관능적 특성을 도출하였으며, 신맛을 제외한 모든 관능적 특성에서 설탕 추출물이 올리고당 추출물에 비해 강한 특성을 나타내는 것으로 나타났다. 설탕과 올리고당 추출물에 대해 색, 향, 맛, 점도 및 종합적 기호도 등에 대한 관능검사를 실시한 결과(Table 49), 색과 향의 경우 올리고당 추출물이, 그리고 맛과 점도의 경우에는 설탕 추출물이 높은 기호도를 나타내었고 종합적인 기호도에서는 설탕 추출물이 유의적으로 높은 기호도를 나타내었다.

Table 48. 설탕과 올리고당을 이용한 미나리 추출물의 관능적 강도

시료	색	새콤한향	달콤한향	한약재향	단맛	신맛	점도
설탕1년	6.7±0.5	6.3±1.3	5.6±1.3	5.7±2.0	5.4±1.5	6.0±1.2	5.4±1.7
설탕2년	8.0±0.0	5.9±1.8	5.6±1.0	6.0±2.0	7.4±1.4	4.4±1.0	5.9±1.7
설탕3년	7.7±0.0	6.1±1.8	5.6±1.0	6.1±2.0	7.0±1.4	4.9±1.0	6.0±1.7
올리고당1년	5.3±0.8	6.0±1.2	5.0±1.0	3.9±0.7	3.7±0.8	6.9±1.4	3.3±0.8
올리고당2년	4.3±0.8	5.6±1.5	4.3±1.3	4.0±1.0	6.0±1.6	6.6±1.4	3.1±0.7
올리고당3년	3.6±0.8	5.6±1.5	4.4±1.3	3.9±1.1	6.4±1.6	5.7±1.7	3.4±0.5

Table 49. 설탕과 올리고당을 이용한 미나리 추출물의 관능적 기호도

시료	색	향	맛	점도	전체적 기호도
설탕 1년	4.6±1.8	5.1±0.9	4.9±2.5	5.7±1.0	4.7±2.5
설탕 2년	3.7±0.8	5.4±0.8	7.3±1.1	5.9±0.9	7.4±0.8
설탕 3년	3.9±0.8	4.9±0.8	6.9±1.1	5.9±0.9	7.0±0.8
올리고당 1년	7.0±0.8	5.9±1.6	2.9±1.4	4.9±1.2	2.9±1.5
올리고당 2년	6.6±1.0	5.9±1.1	3.9±1.4	5.1±1.2	4.3±1.3
올리고당 3년	5.7±1.0	5.6±1.4	4.7±1.4	5.4±1.5	4.7±1.0



Fig. 56. 초임계 생강 추출물과 미나리 추출물을 혼합한 아토피 예방 제품



Table 50. 초임계 생강 추출물과 미나리 추출물을 혼합한 아토피 예방용 크림 배합비

성분	함량(%)	비고
정제수	71.39	Solvent
Isoamyl Laurate	8.0	Skin conditioning agent
Butylene Glycol	5.0	Skin conditioning agent
Glycerin	5.0	Skin conditioning agent
Glyceryl Stearate	4.0	Surfactant-Emulsifying Agent
Cetearyl Alcohol	2.0	Emulsion Stabilizer
Caprylyl glycol	0.3	Skin conditioning agent
Caprylhydroxamic acid	0.1	Chelating Agent
생강 추출물	0.062	생강 초임계 추출 항알러지 효과
미나리 추출물	1.8	미나리 당발효 추출 항알러지 효과
혼합추출물 (홍삼, 사철쭉꽃, 형개, 회향, 서양측백나무잎)	1.2	Skin conditioning agent
동백오일	1.0	Skin conditioning agent
향료	0.15	-

**Table 51. 초임계 생강 추출물과 미나리 추출물을 혼합한 아토피 예방용 mist 배합비**

성분	함량(%)	비고
정제수	67.48	Solvent
Butylene Glycol	2.5	Skin conditioning agent
Glycerin	3.0	Skin conditioning agent
에탄올	16.0	Solvent
Cyclodextrin	0.1	Absorbent
Caprylyl glycol	0.4	Skin conditioning agent
Caprylhydroxamic acid	0.1	Chelating Agent
생강 추출물	0.02	생강 초임계 추출 항알러지 효과
미나리 추출물	1.5	미나리 당발효 추출 항알러지 효과
혼합추출물 (홍삼, 사철쑥꽃, 형개, 회향, 서양측백나무잎)	8.0	Skin conditioning agent
Tocopheryl Acetate	0.1	Skin conditioning agent 비타민 E 유도체
Niacinamide	0.3	Skin conditioning agent Vitamin B3
Copper Tripeptide-1	0.3	Skin conditioning agent
Arginine	0.2	Skin conditioning agent 아미노산

**Table 52. 초임계 생강 추출물과 미나리 추출물을 혼합한 아토피 예방용 body wash 배합비**

성분	함량(%)	비고
정제수	64.78	Solvent
Sodium Laureth Sulfate	15.0	Surfactant-Cleansing Agent
Lauryl Glucoside	6.0	Surfactant-Cleansing Agent
Cocamidopropyl Betaine	6.0	Surfactant-Cleansing Agent
Caprylyl glycol	0.4	Skin conditioning agent
Caprylhydroxamic acid	0.1	Chelating Agent
생강 추출물	0.02	생강 초임계 추출 항알러지 효과
미나리 추출물	1.5	미나리 당발효 추출 항알러지 효과
혼합추출물 (홍삼, 사철쭉쭉, 형개, 회향, 서양측백나무잎)	5.0	Skin conditioning agent
Laurdimonium Hydroxypropyl Hydrolyzed Wheat Protein	0.5	Antistatic agent
향료	0.7	-

**Table 53. 미나리 추출물을 혼합한 아토피 예방용 크림 배합비**

성분	함량(%)	비고
정제수	76.4	Solvent
Isoamyl Laurate	5.0	Skin conditioning agent
Butylene Glycol	6.0	Skin conditioning agent
Glycerin	4.0	Skin conditioning agent
Glyceryl Stearate	3.0	Surfactant-Emulsifying Agent
Cetearyl Alcohol	2.0	Emulsion Stabilizer
Caprylyl glycol	0.4	Skin conditioning agent
Caprylhydroxamic acid	0.1	Chelating Agent
편백오일	0.1	향기성분 피톤치드
미나리 추출물	1.5	미나리 당말효 추출 항알러지 효과
혼합추출물 (홍삼, 사철쭉쭉, 형개, 회향, 서양측백나무잎)	0.5	Skin conditioning agent
동백오일	1.0	Skin conditioning agent

Table 54. 미나리 추출물을 혼합한 아토피 예방용 mist 배합비

성분	함량(%)	비고
정제수	66.8	Solvent
Butylene Glycol	2.0	Skin conditioning agent
Glycerin	3.0	Skin conditioning agent
에탄올	16.0	Solvent
Cyclodextrin	0.2	Absorbent
Caprylyl glycol	0.4	Skin conditioning agent
Caprylhydroxamic acid	0.1	Chelating Agent
편백오일	0.1	향기성분 피톤치드
미나리 추출물	1.5	미나리 당발효 추출 항알러지 효과
혼합추출물 (홍삼, 사철쑥꽃, 형개, 회향, 서양측백나무잎)	9.0	Skin conditioning agent
Tocopheryl Acetate	0.1	Skin conditioning agent 비타민 E 유도체
Niacinamide	0.3	Skin conditioning agent Vitamin B3
Copper Tripeptide-1	0.3	Skin conditioning agent
Arginine	0.2	Skin conditioning agent 아미노산

Table 55. 미나리 추출물을 혼합한 아토피 예방용 body wash 배합비

성분	함량(%)	기능
정제수	41.9	Solvent
Caprylyl glycol	0.4	Skin conditioning agent
Caprylhydroxamic acid	0.1	Chelating Agent
편백오일	0.1	향기성분 피톤치드
미나리 추출물	1.5	미나리 당발효 추출 항알러지 효과
혼합추출물 (홍삼, 사철쭉쭉, 형개, 회향, 서양측백나무잎)	14.0	Skin conditioning agent
Laurdimonium Hydroxypropyl Hydrolyzed Wheat Protein	0.8	Antistatic Agent
Sodium Lauroyl Glutamate	5.6	아미노산계 세정성분
Sodium Cocoyl Apple Amino Acids	3.0	Surfactant-foam booster 아미노산
Lauryl Glucoside	32.0	Surfactant-cleansing agent
향료	0.6	-

아토피 증상이 심한 초등학교 4학년 남자아이를 대상으로 개발한 크림제품을 이용하여 임상 시험을 수행한 결과 Fig. 57에서 보는 바와 같이 약 20일 경과 후 외관뿐만 아니라 가려움 등의 증상이 상당히 호전되는 것으로 나타났다.



Fig. 57. 아토피 예방용 크림 제품 임상시험

## 제 5 절 천연 발효물을 이용한 기능성 음료 개발

### 1. 개다래와 미나리 발효물을 이용한 음료(75mL, Bot)개발

#### 가. 시료및 실험 방법

##### (1) 소비자 기호도 평가에 의한 배합비 설정

##### (가) 일반성분 검사

미나리수의 일반성분은 AOAC법에 따라 측정하였다.

##### (나) 1차 기호도 평가

총 4차에 걸쳐 소비자 기호도 평가를 실시하여 배합비를 확정하였다. 1차 소비자 기호도 검사의 패널 대상은 (재)대구테크노파크 바이오산업지원센터의 숙련된 관능평가요원 15명을 대상으로 하였다. 1차 검사에서는 미나리농축액(Brix50)의 양을 다른 비율로 첨가한 3가지 시료를 준비하였다.

실험 전날 시료를 제조하여 4℃ 냉장고에서 보관하였고, 실험 5분 전 냉장고에서 꺼내 검사 직전에 일회용 플라스틱용기(직경 4.5 cm, 높이 5.5 cm)에 약 30 mL씩 담아 평가 시 온도가 5.5±1℃가 되도록 하였다. 각 시료의 용기에는 난수표에서 선택한 세 자리 숫자를 표시하였고, 제시 순서는 임의의 No.를 부합하여 무작위로 제시하였다. 시료와 시료 사이에 입을 행굴 수 있도록 정수된 물(20±2℃)과 빨는 컵을 함께 제공하여 시료를 평가하기 전에 시료의 특성에 따른 전 시료와의 혼란과 감각의 둔화를 줄이기 위해 2~3번 정도 충분히 입안을 행군 후 실시토록 하였다.

평가는 소비자 패널과 1:1 면접방식으로 진행하여 타인의 의견에 영향을 받지 않도록 하였으며, 단맛, 쓴맛, 식감, 풍미, 전반적인 기호도의 순으로 평가하게 하였다. 전반적인 기호도는 10점 척도법을 사용하여 1점은 ‘매우 좋지 않다’, 10점은 ‘매우 좋다’로 평가하였다. 평가는 왼쪽의 시료부터 실시하였으며, 한 시료에 대해 단맛, 쓴맛, 식감, 풍미, 전반적인 기호도를 한 번에 평가하는 절차를 사용하였다.

##### (다) 2차 기호도 평가

2차 소비자 기호도 검사의 패널 대상은 (재)대구테크노파크 바이오산업지원센터의 숙련된 관능평가요원 15명을 대상으로 하였다. 2차 검사에서는 미나리농축액(brix 50) 20%로 고정하고 대추농축액(Brix 16)의 양만을 다른 비율로 첨가한 3가지 시료를 준비하였다.

1차 소비자 기호도 검사와 마찬가지로 실험 전날 시료를 제조하여 4℃ 냉장고에서 보관하였고, 실험 5분 전 냉장고에서 꺼내 검사 직전에 일회용 플라스틱용기(직경 4.5 cm, 높이 5.5 cm)에 약 30 mL씩 담아 평가 시 온도가 5.5±1℃가 되도록 하였다. 각 시료의 용기에는 난수표에서 선택한 세 자리 숫자를 표시하였고, 제시 순서는 임의의 No.를 부합하여 무작위로 제시하였다. 시료와 시료 사이에 입을 행굴 수 있도록 정수된 물(20±2℃)과 빨는 컵을 함께 제공하여 시료를 평가하기 전에 시료의 특성에 따른 전 시료와의 혼란과 감각의 둔화를 줄이기 위해 2~3번 정도 충분히 입안을 행군 후 실시토록 하였다.

평가는 소비자 패널과 1:1 면접방식으로 진행하여 타인의 의견에 영향을 받지 않도록 하였으며, 단맛, 쓴맛, 식감, 풍미, 전반적인 기호도의 순으로 평가하게 하였다. 전반적인 기호도는 10점 척도법을 사용하여 1점은 ‘매우 좋지 않다’, 10점은 ‘매우 좋다’로 평가하였다. 평가는 왼쪽의 시료부터 실시하였으며, 한 시료에 대해 단맛, 쓴맛, 식감, 풍미, 전반적인 기호도를 한 번에 평가하는 절차를 사용하였다.

#### (라) 3차 기호도 평가

3차 소비자 기호도 검사의 패널 대상은 (재)대구테크노파크 바이오산업지원센터의 숙련된 관능평가요원 15명을 대상으로 하였다. 3차 검사에서는 미나리농축액(Brix 50) 20%, 대추농축액(Brix16) 0.25%로 고정하고 감초농축액(Brix 22)과 개다래 추출물의 양을 다른 비율로 첨가한 3가지 시료를 준비하였다.

실험 전날 시료를 제조하여 4℃ 냉장고에서 보관하였고, 실험 5분 전 냉장고에서 꺼내 검사 직전에 일회용 플라스틱용기(직경 4.5 cm, 높이 5.5 cm)에 약 30 mL씩 담아 평가 시 온도가  $5.5\pm1^{\circ}\text{C}$ 가 되도록 하였다. 각 시료의 용기에는 난수표에서 선택한 세 자리 숫자를 표시하였고, 제시 순서는 임의의 No.를 부합하여 무작위로 제시하였다. 시료와 시료 사이에 입을 헹굴 수 있도록 정수된 물( $20\pm2^{\circ}\text{C}$ )과 빨는 컵을 함께 제공하여 시료를 평가하기 전에 시료의 특성에 따른 전 시료와의 혼란과 감각의 둔화를 줄이기 위해 2~3번 정도 충분히 입안을 헹군 후 실시토록 하였다.

평가는 소비자 패널과 1:1 면접방식으로 진행하여 타인의 의견에 영향을 받지 않도록 하였으며, 단맛, 쓴맛, 식감, 풍미, 전반적인 기호도의 순으로 평가하게 하였다. 전반적인 기호도는 10점 척도법을 사용하여 1점은 ‘매우 좋지 않다’, 10점은 ‘매우 좋다’로 평가하였다. 평가는 왼쪽의 시료부터 실시하였으며, 한 시료에 대해 단맛, 쓴맛, 식감, 풍미, 전반적인 기호도를 한 번에 평가하는 절차를 사용하였다.

#### (마) 최종 기호도 평가

최종 소비자 기호도 검사의 패널 대상은 (재)대구테크노파크 바이오산업지원센터의 숙련된 관능평가요원 15명을 대상으로 하였다. 최종 검사에서는 미나리농축액(Brix 50) 20%, 대추농축액(Brix 16) 0.25%, 복합허브추출물 0.03%, 구연산(함수) 0.02%, 복합황금추출물 0.02%, 개다래추출물 0.1%, 감초농축액(Brix 22) 0.35%로 고정하고 음료의 0을 결정하기 위해 과당의 양을 다른 비율로 첨가한 3가지 시료를 준비하였다. 실험 전날 시료를 제조하여 4℃ 냉장고에서 보관하였고, 실험 5분 전 냉장고에서 꺼내 검사 직전에 일회용 플라스틱용기(직경 4.5 cm, 높이 5.5 cm)에 약 30 mL씩 담아 평가 시 온도가  $5.5\pm1^{\circ}\text{C}$ 가 되도록 하였다. 각 시료의 용기에는 난수표에서 선택한 세 자리 숫자를 표시하였고, 제시 순서는 임의의 No.를 부합하여 무작위로 제시하였다. 시료와 시료 사이에 입을 헹굴 수 있도록 정수된 물( $20\pm2^{\circ}\text{C}$ )과 빨는 컵을 함께 제공하여 시료를 평가하기 전에 시료의 특성에 따른 전 시료와의 혼란과 감각의 둔화를 줄이기 위해 2~3번 정도 충분히 입안을 헹군 후 실시토록 하였다.

평가는 소비자 패널과 1:1 면접방식으로 진행하여 타인의 의견에 영향을 받지 않도록 하였으며, 단맛, 쓴맛, 식감, 풍미, 전반적인 기호도의 순으로 평가하게 하였다. 전반적인 기호도는 10점 척도법을 사용하여 1점은 ‘매우 좋지 않다’, 10점은 ‘매우 좋다’로 평가하였다. 평가는 왼쪽의 시료부터 실시하였으며, 한 시료에 대해 단맛, 쓴맛, 식감, 풍미, 전반적인 기호도를 한 번에 평가하는 절차를 사용하였다.

### 나. 결과

#### (1) 소비자 기호도 평가에 의한 배합비 설정

##### (가) 일반성분 분석

미나리수의 일반 성분검사 결과는 Table 56와 같이 나타났다.



**Table 56. 미나리수의 일반성분 분석**

시험항목	결과
단백질	0 g/17mL
지방	0 g/17mL
열량	35 Kcal/17mL
탄수화물	9 g/17mL
나트륨	20 mg/17mL
포화지방	0 g/17mL
트랜스지방	0 g/17mL
콜레스테롤	0 g/17mL
당류	6g/17mL

(나) 1차 기호도 평가

1차 기호도 평가에 사용된 배합비는 Table 57에 나타내었다. 또한 1차 기호도 평가의 관능 평가 결과는 Table 58과 Fig. 58에 나타내었다.

**Table 57. 1차 기호도 평가에 사용된 배합비** (단위 : %)

제품명	v365	2sr3	7df3
미나리농축액(Brix 50)	10	15	20
정제수	add to 100	add to 100	add to 100

**Table 58. 1차 기호도 관능평가 결과표** (단위 : %)

제품명	v365	2sr3	7df3
단맛	7.26 ± 0.703	7.6 ± 0.632	7.8 ± 0.774
쓴맛	6.86 ± 0.915	7.13 ± 0.639	7.2 ± 0.560
식감	7.4 ± 1.242	7.6 ± 0.985	7.73 ± 0.961
풍미	7.33 ± 1.112	7.4 ± 1.055	7.8 ± 1.014
종합적기호도	7.06 ± 0.703	7.6 ± 0.910	8.33 ± 0.723

(다) 2차 기호도 평가

2차 기호도 평가에 사용된 배합비는 Table 59에 나타내었다. 또한 2차 기호도 평가의 관능 평가 결과는 Table 60과 Fig. 59에 나타내었다.

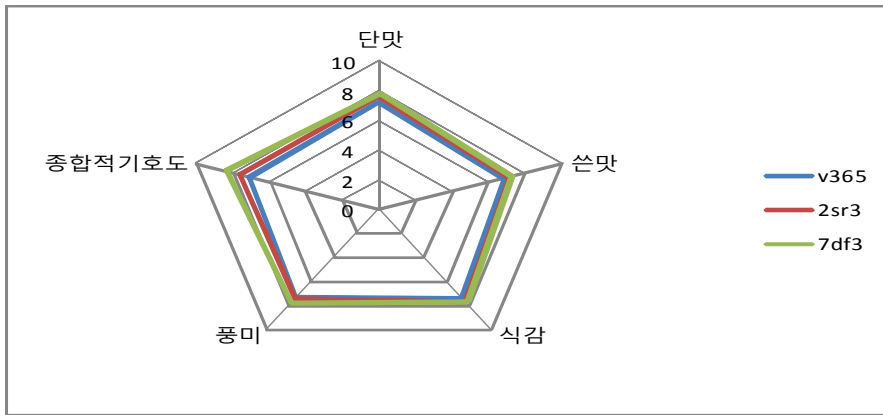


Fig. 58. 1차 기호도 관능평가 결과

Table 59. 2차 기호도 평가에 사용된 배합비 (단위 : %)

	4ge	be33	j67d
미나리농축액(Brix 50)	20	20	20
대추농축액(Brix 16)	0.25	0.2	0.15
정제수	add to 100	add to 100	add to 100

Table 60. 2차 기호도 관능평가 결과표

	4ge	be33	j67d
단맛	7.33 ± 0.975	7.13 ± 0.915	6.8 ± 0.774
쓴맛	6.73 ± 0.703	7.2 ± 0.941	7.2 ± 0.861
식감	7.4 ± 0.828	7.6 ± 0.910	7.73 ± 0.703
풍미	7.53 ± 0.743	7.33 ± 0.816	7.2 ± 0.861
종합적기호도	8.26 ± 0.798	7.8 ± 0.941	7.66 ± 0.899

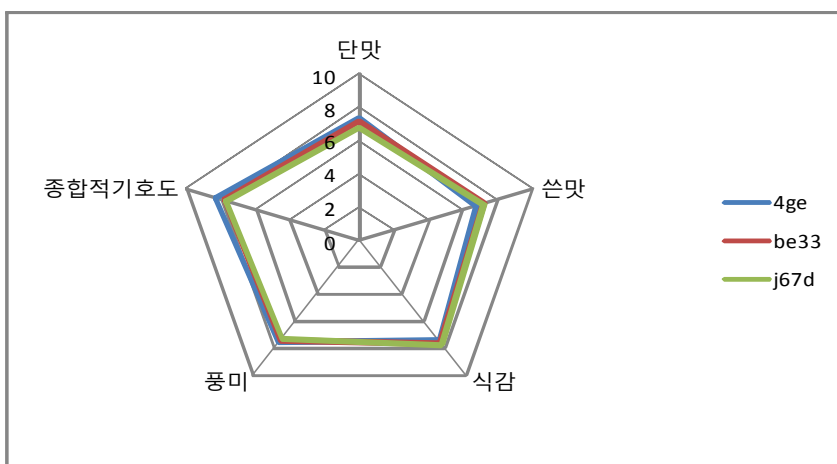


Fig. 59. 2차 기호도 관능평가 결과

(라) 3차 기호도 평가

3차 기호도 평가에 사용된 배합비는 Table 61에 나타내었다. 또한 3차 기호도 평가의 관능 평가 결과는 Table 62과 Fig. 60에 나타내었다.

Table 61. 3차 기호도 평가에 사용된 배합비

(단위 : %)

	ejh9	dwf	we5
미나리농축액(Brix 50)	20	20	20
개다래 추출물	0.05	0.1	0.15
대추농축액(Brix 16)	0.2	0.2	0.2
감초농축액(Brix 22)	0.3	0.35	0.4
정제수	add to 100	add to 100	add to 100

Table 62. 3차 기호도 관능평가 결과표

	ejh9	dwf	we5
단맛	7.26 ± 1.162	7.4 ± 1.121	7.6 ± 1.055
쓴맛	6.4 ± 0.507	6.8 ± 0.774	6.2 ± 0.676
식감	7.6 ± 0.632	7.8 ± 0.676	7.33 ± 1.112
풍미	7.8 ± 1.014	8.13 ± 0.915	7.66 ± 1.234
종합적기호도	8.13 ± 0.99	8.4 ± 0.632	7.8 ± 0.861

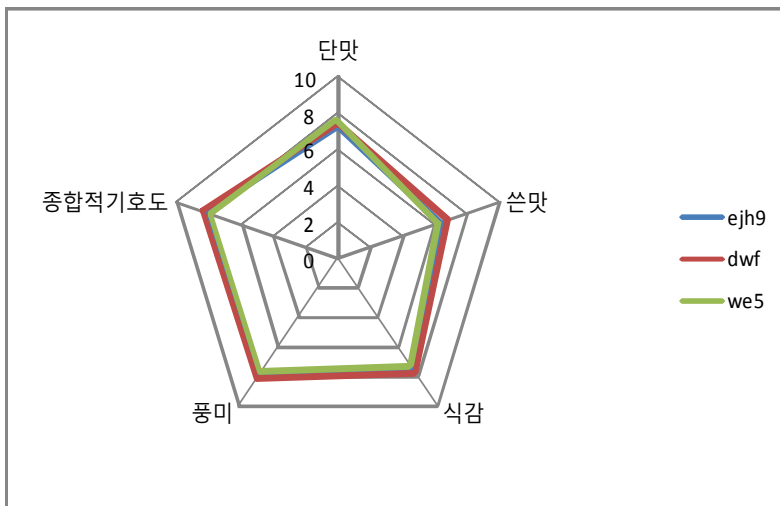


Fig. 60. 3차 기호도 관능평가 결과

(마) 최종 기호도 평가

최종 기호도 평가에 사용된 배합비는 Table 63에 나타내었다. 또한 최종 기호도 평가의 관능평가 결과는 Table 64와 Fig. 61에 나타내었다.

Table 63. 최종 기호도 평가에 사용된 배합비

(단위 : %)

	35d	73g	5j6
미나리 농축액(Brix 50)	20	20	20
대추농축액(Brix 16)	0.25	0.25	0.25
감초농축액(Brix 22)	0.35	0.35	0.35
복합허브추출물	0.03	0.03	0.03
구연산(함수)	0.004	0.004	0.004
개다래 추출물	0.1	0.1	0.1
복합 황금추출물	0.02	0.02	0.02
과당	0.2	0.3	0.4
정제수	add to 100	add to 100	add to 100

Table 64. 최종 기호도 관능평가 결과표

	35d	73g	5j6
단맛	7.33 ± 0.899	7.53 ± 0.991	7.4 ± 1.055
쓴맛	6.26 ± 0.883	6.86 ± 1.06	6.66 ± 0.899
식감	7.6 ± 0.828	7.8 ± 0.941	8.4 ± 0.736
풍미	7.86 ± 0.99	8.2 ± 0.774	8.4 ± 0.632
종합적기호도	7.06 ± 0.961	7.53 ± 0.915	8.33 ± 0.723

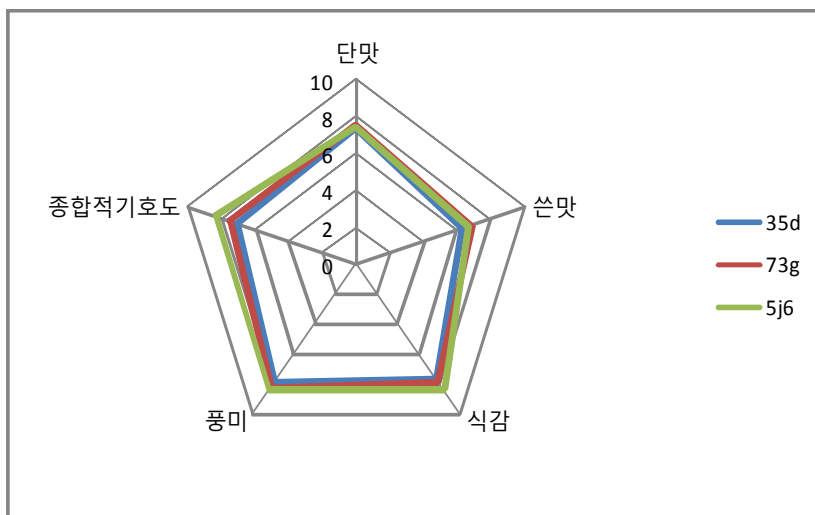


Fig. 61. 최종 기호도 관능평가 결과표

## 2. 천연물 추출 공정도 확립

### 가. 추출조건 확립

각 추출물의 추출조건은 최종 고형분의 함량이 가장 높은 수치를 최적추출조건으로 설정하였다. 또한 실제 제품 생산을 고려하여 생산에 용의한 열수 추출과 열수 추출에 분해효소를 가하는 2가지 방법으로 실시하여, 고형분 함량이 높은 쪽으로 조건을 확정하였으며, 이때는 원물의 투입대비 추출물의 가격이 가장 저렴한 것을 최적으로 하였다. 예를 들어 일반 열수 추출일 경우, g당 100원짜리 원물 100 g이 투입되었을 때 일반 1 brix 용액 1000 mL이 추출되었다면 산술적으로 약 10g의 고형분이 추출된 것으로 보고, 추출물은 100g에 1,000원이 된다. 반면 분해효소를 사용하였을 경우, g당 100원하는 원물을 투입하여 열수추출 할 때 분해효소 A(25,000원/Kg), 분해효소B(30,000원/Kg)를 각각 0.2%, 0.3%를 투입하였다. 즉 원물 100원 + 효소A값 50원 + 효소B값 90원이 더 투입되어 투입시의 총금액은 240원이 된다. 하지만 이 추출액이 최종 Brix 5, 용액 1000 mL가 추출되었다면, 고형분 함량은 산술적으로 50g의 고형분이 추출된 것으로 본다. 이때의 추출물은 100 g을 만드는데 드는 비용이 480원이 된다. 그러므로 분해효소가 투입된 열수추출의 경우가 최종 추출물의 비용이 더 저렴함으로 이를 최적 추출조건으로 설정하였다.

#### (1) 대추의 추출조건 확립

동일한 방법으로 일반 열수 추출과 분해효소를 사용하여 추출하였을 경우를 비교하여 g당 단가를 계산하여 비용이 저렴한 쪽을 선택하였다. 대추의 경우 아래의 Table 65에 열수추출시의 단가를 나타내었고, Table 66에는 분해효소를 사용하였을 때의 g당 단가를 나타내었다.

Table 65. 대추 열수추출시의 g당 단가

원료배합	배합비(g)	원료단가(원/g)	
대추	100	87	8,700
정제수	4,000	—	—
계	4,100		8,700
여과수율: 81%			$8,700/4,100/0.81=2.62$
농축수율: 5%(Brix 16)			$2.62/0.05=52.4$

Table 66. 대추의 분해효소사용시의 g당 단가

원료배합	배합비(g)	원료단가(원/g)	
대추	100	87	8,700
정제수	4,000	—	—
CIROZYME (복합효소, 노보자임)	0.2	30	6
계	4,100.2		8,706
여과수율: 92%			$8,706/4,100.2/0.92=2.3$
농축수율: 4.8%(Brix 16)			$2.3/0.048=47.91$

열수추출만을 했을 경우, 총 액량대비 여과수율이 91%였으며, Brix16으로 농축하였을 때의 농축수율은 5%였다. 따라서 최종 단가는 52.4원이 된다. 또한 분해효소를 사용하였을 경우는 액량대비 여과수율이 92%, Brix16으로 농축하였을 때의 농축수율은 4.8%였으며 최종단가는 47.91원이 되었다. 따라서 대추의 경우 분해효소를 사용한 열수추출의 방법이 열수만으로 추출한 방법이 더 효율적인 것으로 나타났다.

## (2) 감초의 추출조건 확립

동일한 방법으로 일반 열수 추출과 분해효소를 사용하여 추출하였을 경우를 비교하여 g당 단가를 계산하여 비용이 저렴한 쪽을 선택하였다. 감초의 경우 아래의 Table 67에 열수추출시의 g당 단가를 나타내었고, Table 68에는 분해효소를 사용하였을 때의 g당 단가를 나타내었다.

**Table 67. 감초 열수추출시의 g당 단가**

원료배합	배합비(g)	원료단가(원/g)	
감초	100	45	4,500
정제수	4,000	-	-
계	4,100		4,500
여과수율: 93%		$4,500/4,100/0.93=1.18$	
농축수율: 3.1%(Brix 22)		$1.18/0.031=38.06$	

**Table 68. 감초의 분해효소사용시의 g당 단가**

원료배합	배합비(g)	원료단가(원/g)	
감초	100	45	4,500
정제수	4,000	-	
아밀라제	0.2	30	6
계	4,100.2		4,506
여과수율: 91%		$4,506/4,100.2/0.91=1.21$	
농축수율: 3.1%(Brix 22)		$1.21/0.031=39.03$	

감초의 경우는 열수추출만을 했을 경우, 총 액량대비 여과수율이 93%였으며, Brix22로 농축하였을 때의 농축수율은 3.1%였다. 따라서 최종 단가는 38.06원이 된다. 또한 분해효소를 사용하였을 경우는 액량대비 여과수율이 91%, Brix 22로 농축하였을 때의 농축수율은 3.1%였으며 최종단가는 39.03원이 되었다. 따라서 감초의 경우 분해효소를 사용한 열수추출의 방법보다 일반 열수추출이 더 효율적인 것으로 나타났다.

이는 감초와 같이 특유의 목질상 형태의 원물은 열수추출 자체의 어려움이 있고, 분해효소를 사용하여도 화학적 분해가 많이 이루어지지 않는다고 볼 수 있다. 따라서 수율을 증가시키기 위해서 원물을 조분쇄하여 2메쉬 정도의 크기로 잘게 부순 후 추출한다면 그 추출수율이

훨씬 증가할 것으로 예상된다.

### (3) 혼합단계

혼합단계에서는, 미나리농축액(Brix 50) 20%, 대추농축액(Brix 30) 0.25%, 감초농축액(Brix 22) 0.35%, 복합허브추출물 0.03%, 구연산(함수) 0.004%, 과당 0.4%, 개다래추출물 0.1%, 복합 황금추출물 0.04%, 정제수 78.846%의 비율로 음료를 제조하였다.

### (4) 살균단계

살균단계에서는, 음료 혼합물을 98℃의 온도에서 5분간 살균하여 완료하였다.

### (5) 충전단계

충진 단계에서는, 살균단계에서 살균된 음료 혼합물을 충전하여 냉각하였다. 이때에는 80℃ 이상의 핫필링을 하였다.

## 3. 제품의 품질변화 실험

### 가. 시료 및 실험 방법

#### (1) 당도측정

당도는 hand refractometer N-1E (ATAGO Co., Japan)를 사용하여 측정하였다. 단, 샘플링한 시료는 20℃로 유지된 상태에서 측정하였다.

#### (2) pH측정

pH는 pH meter (Metrohm Co., Swiss)를 사용하여 25℃의 조건에서 측정하였다.

#### (3) 색도측정

색도는 Chroma meter CT-310 (Minolta camera Co., Japan)을 사용하여 측정하여 Hunter scale에 의해 L(lightness), a(redness), B(yellowness) 값으로 나타내었다.

#### (4) 갈색도 측정

갈색도는 UV-VIS spectrophotometer(UV-200S, Shimadzu Co.)를 사용하여 460 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### (5) 총 균수 측정

시료의 총 균수 측정을 위해 따로 샘플링한 것을 무균적으로 채취하였다. 시료를 단계별로 희석하고 poring법으로 plate count agar (Merck, Germany) 배지를 이용하여, 35±1℃에서 48시간 배양한 후 Colony를 계측하였다. 단 총 균수 측정은 20℃와 30℃저장시료에 한해서만 실시하였으며, 시료는 각 온도 당 3개씩 3회 반복 측정하였다.

#### (6) 관능평가

관능평가는 (재)대구테크노파크 바이오산업지원센터의 숙련된 요원 15명을 대상으로 하여 실시하였으며, 표준시료를 대조구로 하여 다른 온도에서 보관한 시료와 비교하여 1~10점의 관능점수를 부여하였다. 제품의 가치가 상실되는 지점을 6.0점으로 하였다.

## 나. 결과

### (1) 당도측정

당도측정의 결과는 Fig.62에 나타내었다. 당도는 저장기간이나 보존환경에 크게 차이가 생기지는 않았다.

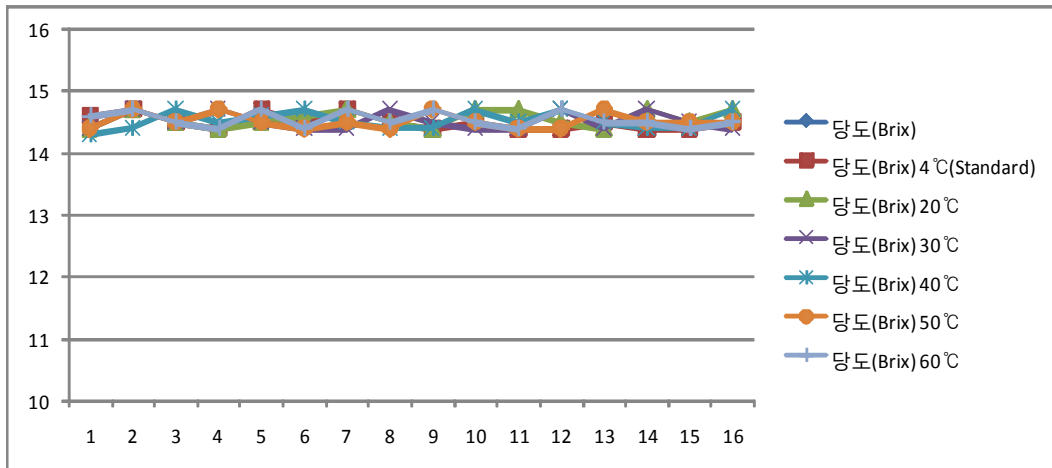


Fig. 62. 저장기간별 음료의 당도변화표

### (2) pH측정

pH측정의 결과는 Fig.63에 나타내었다. pH는 저장기간이나 보존환경에 크게 차이가 생기지는 않았다.

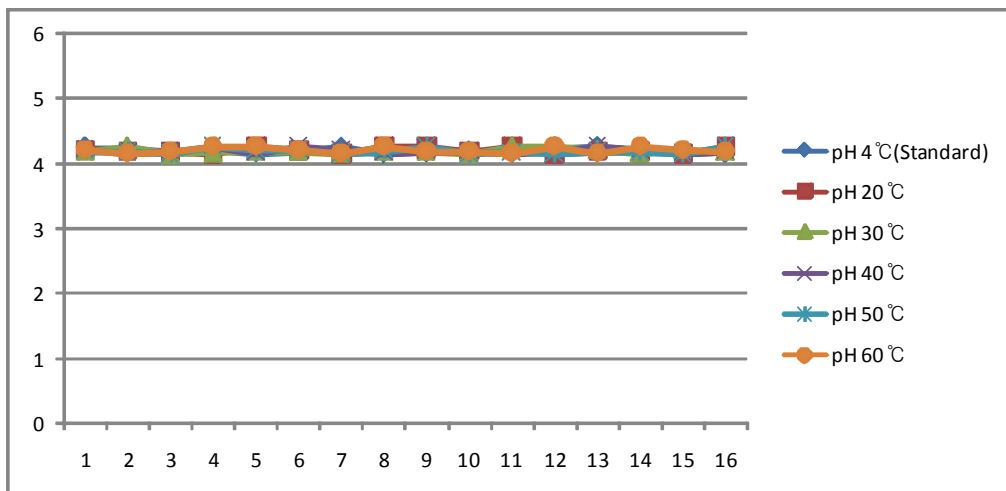


Fig. 63. 저장기간별 음료의 pH변화표

### (3) 색도측정

샘플의 색도변화 중 L값(Lightness)의 경우 4°C에서는 1주차와 16주차의 변화가 거의 없었다. 하지만 20°C와 30°C의 경우 7주 이후부터 수치가 낮아졌으며, 50°C와 60°C의 경우는 3주차가 지나면서 급격히 낮아졌다. L값의 변화는 Fig.64에 나타내었다.



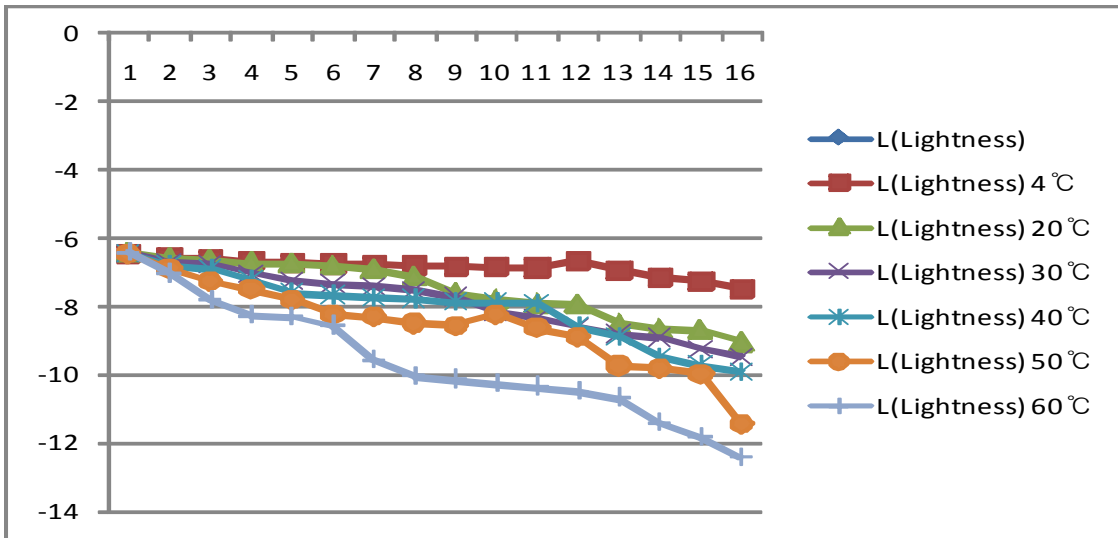


Fig. 64. 저장기간별 음료의 L값(Lightness)의 변화표

샘플의 색도변화 중 a값(Redness)와 b값(yellowness)의 경우 a값 중 4°C의 샘플은 4.82에서 16주 후 5.83으로 증가하였고, 20°C의 샘플도 4°C와 비슷하였다. 30°C에서 60°C까지의 샘플 모두 시간이 지날수록 증가하는 추세를 보여주었다. a, b값은 각각 Fig. 65, 66에 나타내었다.

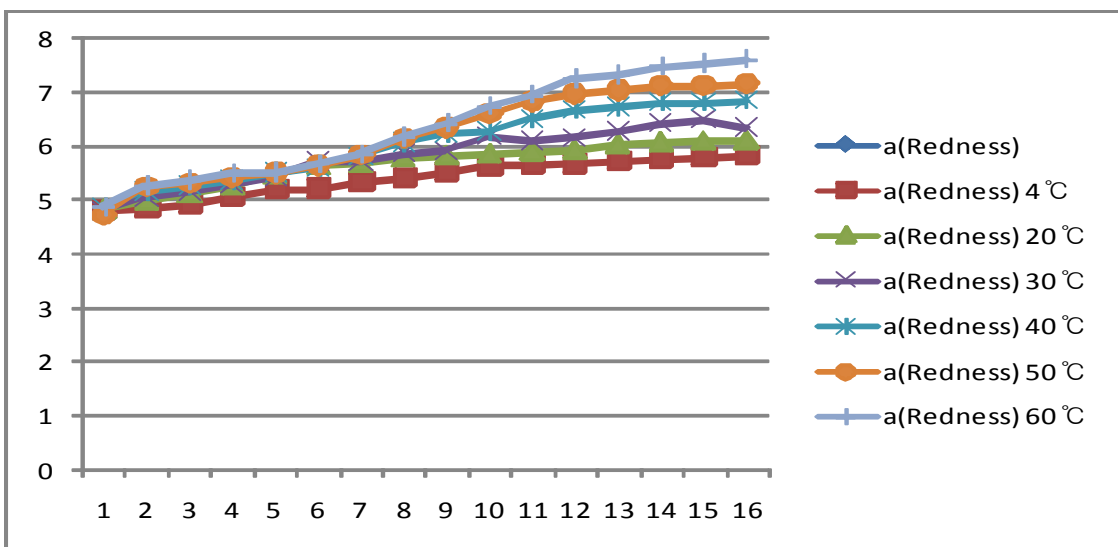


Fig. 65. 저장기간별 음료의 a값(Redness)의 변화표

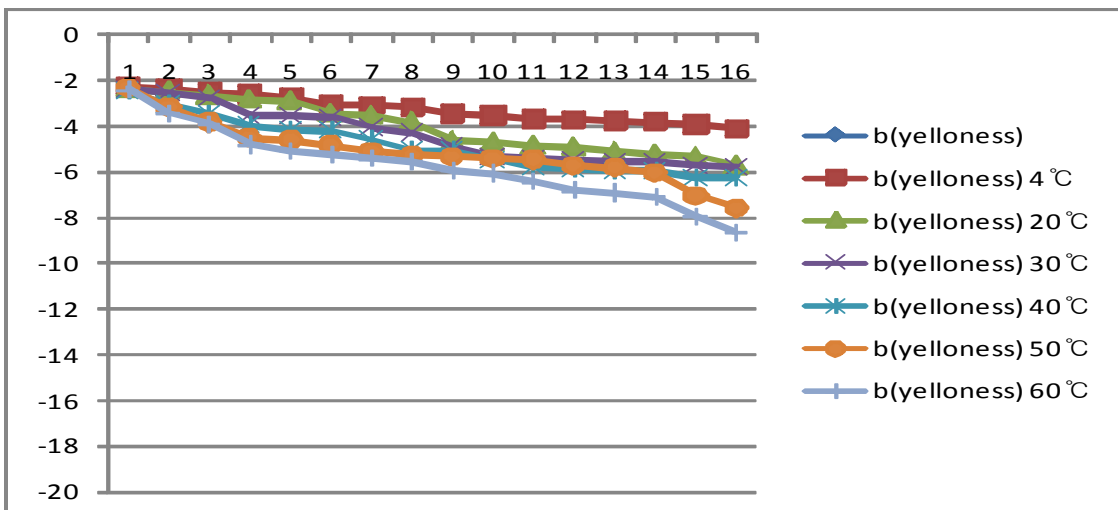


Fig. 66. 저장기간별 음료의 b값(yellowness)의 변화표

#### (4) 갈색도 측정

저장 기간별 음료의 갈색도 변화는 Fig.67에 나타내었다. 50℃와 60℃의 경우는 4주차를 지나면서 갈색도의 값이 증가하는 것을 알 수 있었다. 따라서 이러한 조건하에서는 침전물이 강하게 발생할 수도 있다는 것을 알 수 있다.

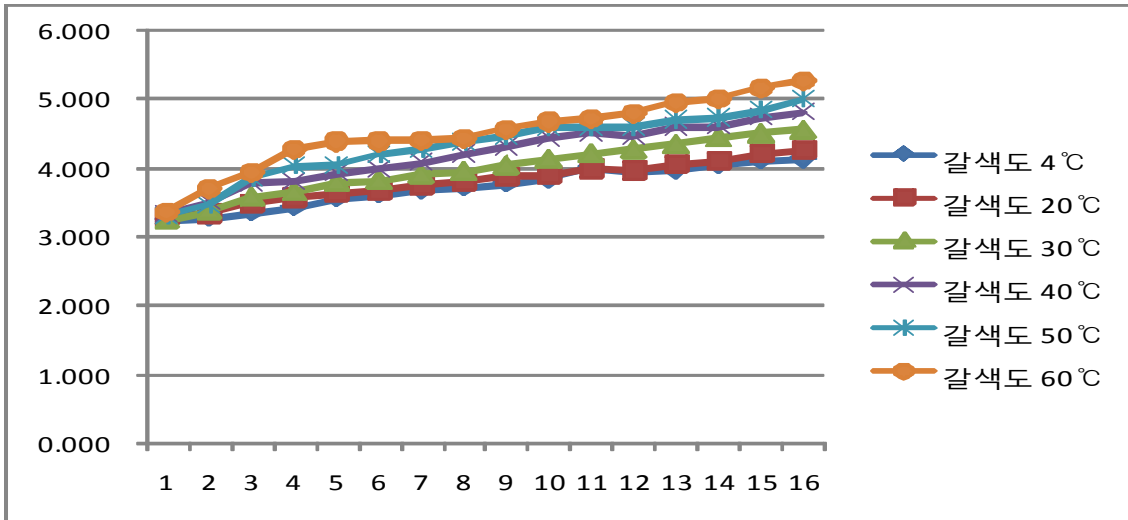


Fig. 67. 저장기간별 음료의 갈색도의 변화표

#### (5) 총 균수 측정

저장기간별 총 균수 측정결과는 Table 69에 나타내었다. 총 균수는 20℃와 30℃의 두 군에서 확인 실험을 하였는데, 두 군데 모두 미생물이 검출되지는 않았다. 이는 살균의 방법이 적절하며 장기간 유통 시에도 안정적인 상품을 제공할 수 있는 지표가 됨을 알 수 있었다.

Table 69. 저장기간별 총 균수 측정

	1주	2주	3주	4주	5주	6주	7주	8주	9주	10주	11주	12주
4℃	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
20℃	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
30℃	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D

#### (6) 관능평가

관능평가의 결과는 아래 Fig.68에 나타내었다. 이를 통해 20℃와 30℃에 비해 40℃, 50℃와 60℃에서는 2~3주 후에도 관능에서 낮은 점수가 측정됨을 알 수 있었다. 이는 30℃이하 상온 정도와 그 이상의 차이가 현저함을 알 수 있게 하는 결과치이며, 상품 자체의 상품가치로서 소멸성을 가지는 값은 관능의 최종 종합적기호도가 6점 이하인 것으로 알 수 있었다.

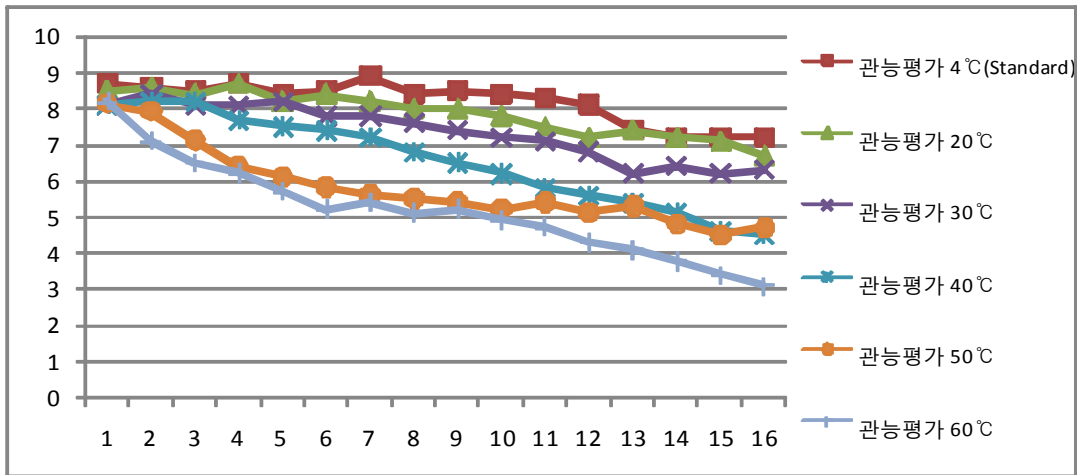


Fig. 68. 저장기간별 음료의 관능평가 변화표

#### 4. 품질지표 규명 및 유통기한 예측

##### 가. 품질지표 규명 및 유통기한 예측

시료의 저장온도 및 기간에 따른 품질특성 값을 관능검사의 전반적인 기호도와 회귀분석을 실시하여 상관관계가 높은 인자를 시료의 품질지표로 삼았다. 저장기간(t)에 따른 품질특성(A)의 변화량으로서 이 결과를 Kinetic plot으로 변형시키면 품질손상의 반응속도 상수(K)를 얻었다.

또한 아래의 Arrhenius 방정식을 이용하였다.

$$-\frac{dA}{dt} = KA^n$$

A : 측정성분의 품질변화량

t : 저장기간

K : 반응속도상수

n : 반응차수

dA/dt : 시간 변화에 따른 성분 A의 변화

$$K = Ae^{-Ea/RT} \text{ (자연로그값(Ln값)으로 전환)} \rightarrow \ln K = -(Ea/R)(1/T) + \ln A$$

A : 아레니우스 상수

Ea : 활성화에너지(cal/mol)

R : 기체상수(1.986 cal/mol)

T : 절대온도(=°C+273)

K : 반응속도상수

이를 통해 b Value의 반응속도(K)를 산출하여, 온도에 따른 활성화 에너지(Ea)를 산출하였다. 이 후 실험하지 않은 구간의 반응속도를 산출하였다.

유통기한 산출 근거로서 1년간의 온도별 일수를 계산하여 실온 유통 시 온도별 유통일수를 유통기한 산출근거로 사용하였다. 이를 통해 유통기한을 설정하였다.

- 평균기온 10°C이하 : 1월, 2월 3월, 11월, 12월(5개월:152일)

- 평균기온 16~18°C : 4월 13일, 5월과 10월(2개월:61일)

- 평균기온 21°C : 6월과 9월(2개월:61일)

- 평균기온 25~26°C : 7월과 8월은 (2개월:61일)

→ 실온유통 시 1년간 온도별 유통일수는 10°C(152일), 15°C(30일), 20°C(61일), 25°C(61일), 30°C(61일), 이를 유통기간 산출의 근거로 사용

# 유통기한 설정 실험결과보고서

## 1. 예측 제품

예측 제품명	스포티(미나리음료)	식품유형	혼합음료
프로젝트 분류	음료/혼합음료		
품질지표	가용성고형분, 관능검사, 색도, 수소이온농도		

## 2. 품질지표별 품질변화

### 2.1 품질지표 가용성고형분 품질변화

저장기간(일)	4℃	20℃	30℃	40℃	50℃
0	12.4000	12.4000	12.4000	12.4000	12.4000
1	12.4333	12.4767	12.4667	12.4833	12.4667
7	12.4433	12.4600	12.4633	12.4767	12.4633
14	12.4233	12.4767	12.4667	12.4767	12.4667
21	12.4333	12.4533	12.4867	12.4767	12.4633
28	12.4433	12.4433	12.4667	12.4567	12.4600
35	12.4333	12.4500	12.4567	12.4533	12.4667
42	12.4333	12.4333	12.4267	12.4500	12.4667
49	12.4500	12.4233	12.4333	12.4600	12.4633
56	12.4567	12.4133	12.4233	12.4233	12.4333
63	12.4667	12.4267	12.4267	12.4233	12.4367
70	12.4233	12.4233	12.4233	12.4267	12.4533
77	12.4267	12.4200	12.4233	12.4133	12.4367

### 2.2 품질지표 관능검사 품질변화

저장기간(일)	4℃	20℃	30℃	40℃	50℃
0	9.2000	9.2000	9.2000	9.2000	9.2000
1	9.2767	9.1633	9.1667	9.0800	8.8267
7	9.2267	9.1367	9.0300	8.4300	8.2233
14	9.2033	9.1000	8.7567	8.0333	7.8200
21	9.1833	8.9633	8.4333	7.8433	7.5633
28	8.9333	8.9600	8.1667	7.7367	7.0433
35	8.9333	8.8267	7.9667	7.4600	6.8467
42	8.9567	8.8633	7.8367	6.8233	6.5567
49	8.9333	8.4533	7.4333	6.8300	6.3667
56	8.8233	8.4633	7.2333	6.7267	6.1467
63	8.8333	8.2733	6.8267	6.4333	5.9267
70	8.8633	8.1333	6.7267	6.2267	5.7900
77	8.8367	7.8433	6.5300	5.9267	5.6033



## 2.3 품질지표 색도 품질변화

저장기간(일)	4℃	20℃	30℃	40℃	50℃
0	0.1810	0.1810	0.1810	0.1810	0.1810
1	0.1833	0.1837	0.1867	0.1863	0.1833
7	0.1843	0.1873	0.1857	0.1867	0.1827
14	0.1833	0.1873	0.1867	0.1900	0.1923
21	0.1877	0.1863	0.1903	0.1967	0.1937
29	0.1907	0.1973	0.1930	0.1963	0.1927
35	0.1937	0.1947	0.1967	0.1940	0.2000
42	0.1953	0.1937	0.1963	0.2030	0.2033
49	0.1963	0.1943	0.2067	0.2027	0.2127
56	0.1943	0.2000	0.2033	0.2090	0.2160
63	0.2060	0.2033	0.2077	0.2120	0.2237
70	0.2047	0.2117	0.2147	0.2227	0.2260
77	0.2103	0.2123	0.2233	0.2303	0.2327

## 2.4 품질지표 수소이온농도 품질변화

저장기간(일)	4℃	20℃	30℃	40℃	50℃
0	3.4000	3.4000	3.4000	3.4000	3.4000
1	3.4267	3.4733	3.4300	3.4433	3.4633
7	3.4367	3.4667	3.4500	3.4733	3.4333
14	3.4633	3.4600	3.4800	3.4700	3.4433
21	3.4733	3.4367	3.4633	3.4433	3.4733
28	3.4433	3.4467	3.4567	3.4233	3.4600
35	3.4667	3.4433	3.4533	3.4367	3.4600
42	3.4767	3.4233	3.4567	3.4500	3.4233
49	3.4333	3.4333	3.4567	3.4467	3.4333
56	3.4433	3.4633	3.4267	3.4433	3.4300
63	3.4333	3.4700	3.4567	3.4300	3.4367
70	3.4233	3.4667	3.4667	3.4333	3.4333
77	3.4267	3.4367	3.4233	3.4233	3.4433

## 3. 품질지표별 반응속도 상수

### 3.1 품질지표 가용성고형분 반응속도 상수

#### 1) 반응차수 0차 결과

온도(℃)	Slope(K)	Intercept(A0)	R <sup>2</sup>
20	-0.0005	12.4557	0.2834
30	-0.0005	12.4595	0.2199
40	-0.0006	12.4675	0.2805
50	-0.0001	12.4550	0.0114

#### 2) 반응차수 1차 결과

--	--	--	--

온도(℃)	Slope(K)	Intercept(A0)	R <sup>2</sup>
20	0.0000	2.5222	0.2829
30	0.0000	2.5225	0.2195
40	0.0000	2.5231	0.2799
50	0.0000	2.5221	0.0113

### 3.2 품질지표 관능검사 반응속도 상수

#### 1) 반응차수 0차 결과

온도(℃)	Slope(K)	Intercept(A0)	R <sup>2</sup>
20	-0.0162	9.2988	0.9311
30	-0.0358	9.2226	0.9954
40	-0.0394	8.8460	0.9623
50	-0.0434	8.6153	0.9463

#### 2) 반응차수 1차 결과

온도(℃)	Slope(K)	Intercept(A0)	R <sup>2</sup>
20	-0.0019	2.2317	0.9226
30	-0.0046	2.2287	0.9933
40	-0.0053	2.1868	0.9764
50	-0.0061	2.1604	0.9723

### 3.3 품질지표 색도 반응속도 상수

#### 1) 반응차수 0차 결과

온도(℃)	Slope(K)	Intercept(A0)	R <sup>2</sup>
20	0.0004	0.1820	0.9011
30	0.0005	0.1813	0.9358
40	0.0005	0.1818	0.9253
50	0.0007	0.1796	0.9735

#### 2) 반응차수 1차 결과

온도(℃)	Slope(K)	Intercept(A0)	R <sup>2</sup>
20	0.0018	-1.7024	0.9061
30	0.0023	-1.7049	0.9448
40	0.0026	-1.7015	0.9363
50	0.0032	-1.7127	0.9775

### 3.4 품질지표 수소이온농도 반응속도 상수

#### 1) 반응차수 0차 결과

온도(℃)	Slope(K)	Intercept(A0)	R <sup>2</sup>
20	0.0001	3.4436	0.0194
30	0.0001	3.4439	0.0168
40	-0.0001	3.4448	0.0376
50	-0.0001	3.4432	0.0065



## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

\* 연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도 및 관련분야의 기술 발전에의 기여도 등을 기술

### 제 1 절 연구개발 착안점 및 달성도

#### 1. 연구계획서의 착안점

구분	년도	세부연구목표	가중치	평가의 착안점 및 척도
1차년도	2008	미나리와 개다래의 다양한 처리에 의한 최적의 시료 조제 및 효능 평가	50%	○효율적인 시료 조제공정 및 효능평가 시스템 구축 ○기능성 성분의 분리·동정
		개다래의 초임계 추출 최적화 조건 설정	30%	○계획된 연구방법의 타당성 ○연구결과와 체계적이고 효율적인 수행정도
		개다래와 미나리를 이용한 발효음료 개발을 위한 레시피 결정 및 제품 생산	20%	○발효추출물의 음료개발을 위한 레시피 결정 및 음료제조공정 설계 ○발효음료 시제품 생산
2차년도	2009	생강의 다양한 처리에 의한 최적의 시료 조제 및 미나리 복합물의 조제	50%	○효율적인 시료 조제공정 및 효능평가 시스템 구축 ○기능성 성분의 분리·동정 ○시제품 개발 ○동물실험에 의한 검증
		생강의 초임계 추출 최적화 조건 설정	25%	○계획된 연구방법의 타당성 ○연구결과와 체계적이고 효율적인 수행정도
		생강과 미나리를 이용한 발효음료 개발을 위한 레시피 결정 및 제품 생산	25%	○발효추출물의 음료개발을 위한 레시피 결정 및 음료제조공정 설계 ○발효음료 시제품 생산
3차년도	2010	미나리 발효 복합물의 효능 평가	30%	○효능 평가 및 안전성 평가 ○품질평가를 위한 지표물질 선정 및 분석법 확립
		추출물의 대량생산을 위한 현장적용 조건 설정	20%	○개발기술의 수행결과 및 효용성 ○개발기술의 산업체 이전 및 실용화 ○개발기술의 경제산업적 파급효과
		복합 소재를 이용한 발효음료 개발을 위한 레시피 결정 및 제품 생산	50%	○발효추출물의 음료개발을 위한 레시피 결정 및 음료제조공정 설계 ○발효음료 시제품 생산
최종평가		기술이전 가능성 여부	20%	○산업화 가능 여부
		개발된 기술의 적용시 3종 국내 천연식물의 소비 증가와 저장성 향상을 통한 소비율의 증가 가능성	40%	○미나리, 개다래, 생강의 대중화에 기여
		3종 국내 천연식물의 수출을 통한 새로운 시장 개척 가능성	40%	○해외의 소비를 증가시켜 새로운 시장 개척

## 2. 연구시행후의 달성도

구분		세부연구목표	달성도(%)
1차년도	2008	○미나리와 개다래의 다양한 처리에 의한 최적의 시료 조제 및 효능 평가 ○개다래의 초임계 추출 최적화 조건 설정 ○개다래와 미나리를 이용한 발효음료 개발을 위한 레시피 결정 및 제품 생산	100 100 100
2차년도	2009	○생강의 다양한 처리에 의한 최적의 시료 조제 및 미나리 복합물의 조제 ○생강의 초임계 추출 최적화 조건 설정 ○생강과 미나리를 이용한 발효음료 개발을 위한 레시피 결정 및 제품 생산 ○개다래의 항염증 활성물질 분리 및 동정	100 100 100 100
3차년도	2010	○미나리 발효 복합물의 효능 평가 ○추출물의 대량생산을 위한 현장적용 조건 설정 ○복합 소재를 이용한 발효 음료 개발을 위한 레시 피 결정 및 제품 생산 ○동물실험에 의한 미나리 발효액의 효능평가	100 100 100 100
최종평가		○발효추출물의 음료개발을 위한 레시피 결정 및 음료 제조공정 설계 ○발효음료 시제품/제품 생산 ○개발된 기술의 적용 시 3종 국내 천연식물의 소 비 증가와 저장성 향상을 통한 소비율의 증가 가 능성 ○3종 국내 천연식물의 수출을 통한 시장 개척 가 능성	100 100 100 100



## 제 2 절 관련분야 기술발전예의 기여도

개다래는 염증을 저해하고 통증을 억제하는 효과와 통풍과 류마티스 관절염 치료에 큰 효험이 있으며 열매를 식용으로 사용 가능하지만, 기호성의 문제로 주로 민간 혹은 한방에서만 통풍 치료 목적으로 사용되고 있다. 생강은 세계적으로 기호성이 좋은 향신료로 널리 이용되고 있으며 향균, 항산화능 등의 기능적인 측면에의 연구가 진행되고 있다. 하지만 식품 소재로서의 활용은 특유의 맛과 향기로 인해서 매우 제한적으로 이루어지고 있는 실정이다. 본 연구를 통해서 기능성과 작용 기작을 체계적으로 검증하였으며, 기호성 향상을 위한 연구를 수행함으로써 친환경 기술을 이용한 천연물의 고부가가치화가 가능하게 되었다. 또한 미나리는 신선야채로의 섭취로부터 다양한 쓰임성이 있는 채소로 간 기능 개선에 관한 기능이 알려져 왔다. 그러나 과학적인 연구의 부족으로 기능성 제품에의 이용과 고부가가치화는 부족한 실정이다.

비슬청록농장은 친환경 농법으로 산미나리를 재배하여 장기간 발효 및 저온 숙성시켜서 미나리 음료를 개발하여 판매하고 있는 업체로, 천연의 영양성분과 맛, 향을 그대로 살리는 기술을 보유하고 있으나, 단순 발효음료로서 미나리의 효능연구나 다양한 제품의 개발을 통한 제품화 및 수출은 안 되는 실정이었다. 다른 농산물과 마찬가지로 산미나리는 수확시기에 일시에 대량으로 생산되는 관계로 생식으로 판매되는 양이 한정되어, 미나리의 저장성 향상을 통한 다양한 가공제품의 생산이 요구되었다. 이에 본 연구에서는 제품에 다양한 추출방법과 발효로 기능성을 가진 미나리 제품을 개발하고, 항염증, 통풍 등의 면역 개선 기능성 성분을 첨가하여 과학적으로 입증된 기능성 제품을 개발하였다. 이러한 성과와 기술을 바탕으로 업체의 소득증대, 고용창출은 물론 지역 미나리 산업을 활성화시키고 나아가 해외시장 개척으로 지역의 산업적, 경제적 효과는 클 것으로 기대한다.

1. 본 연구개발을 통하여 개다래와 생강을 비롯한 향신료의 기능성 식품 소재로서의 이용 가능성이 확대되어 부가가치를 높이는데 기여하였으며, 개다래, 생강, 미나리 발효액을 소재로 식품과 화장품의 시제품 개발과 3건의 기술을 통한 제품화로 기능적으로 업그레이드된 제품의 출시가 가능하게 됨.
2. 참여업체인 비슬청록농장의 미나리 발효액은 대구시 친환경 우수 농특산물 명품 인증(제 09-810-0002, 2009. 12. 18)을 새로 받았으며, 중국, 일본 등의 해외수출을 준비하고 있음.
3. 개다래, 생강 및 미나리의 다양한 분획에 대한 기능성을 밝히고 논문게재, 국내외 학술 발표, 전시회 등에 출품하여 우리 농산물의 우수성을 홍보하는데 도움을 줬으며 지역 생산 농산물의 기능성 생리활성 물질 도출로 연구자들에게 참고 자료 제공.
4. 질환별 기능성 중간소재 개발로 건강기능식품 산업 활성화와 건강기능소재의 수입 대체 효과 기대.

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

- \* 실용화·산업화 계획(기술실시 등)
- \* 교육·지도·홍보 등 기술확산 계획 등
- \* 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등
- \* 추가연구, 타연구에 활용 계획 등
- \* 연구기획사업 등 사업별 특성에 따라 목차는 변경 가능함

### 1. 연구개발 성과

#### 가. 학술발표

- (1) Evaluation of Anti-Allergy Effect of *Actinidia polygama* Extracts. Seun-Ah YANG, Eun-Jung LEE, Nam-Kyung IM, Mi-Hee YU, Hee-Don CHOI, Hyo-Gwon IM, In-Seon Lee, Sam-Pin LEE. 2009. 06. 한국미생물생명공학회 국제학술대회.
- (2) Anti-inflammatory Activity of *Actinidia polygama* Max. Extracted by Supercritical Fluid Extraction. Mi-Hee YU, Jun-Hyeok CHOI, In-Gyeong CHAE, Eun-Jung LEE, Sam-Pin LEE, In-Seon LEE, Hee-Don CHOI, Seun-Ah YANG. 2009. 06. 한국미생물생명공학회 국제학술대회.
- (3) 개다래의 항알러지 효능. 이은정, 채인경, 유미희, 최희돈, 임효권, 이인선, 양선아. 2009. 10. 23-25. 웰빙바이오대전.
- (4) 개다래의 항염증 활성 성분 분석. 채인경, 유미희, 최준혁, 이은정, 방면호, 한민우, 이삼빈, 이인선, 양선아. 2009.10. 23-25. 웰빙바이오대전.
- (5) Separation of Anti-inflammatory Fractions from *Actinidia polygama* Max. In-Gyeong Chae, Seun-Ah Yang, Mi-Hee Yu, Jun-Hyeok Choi, Eun-Jung Lee, Myun-Ho Bang, Min-Woo Han, In-Seon Lee. 2009. 11. 한국식품영양과학회 국제학술대회.
- (6) Anti-allergic effects of ethanol extract and the marc extract of supercritical fluid extraction of *Actinidia polygama* Max. Seun-Ah Yang, Eun-Jung Lee, Jun-Hyeok Choi, In-Gyeong Chae, Mi-Hee Yu, Hee-Don Choi, Hyo-Gwon Im, In-Seon Lee. 2009. 11. 한국식품영양과학회 2009년 국제학술대회.
- (7) Inhibitory effects of wild *Oenanthe javanica* extracts fermented with brown sugar on HepG2 cell proliferation. Min-Ju Kim, Seun-Ah Yang, Jung-Hyun Park, Eun-Jung Lee, Hyung-Dae Kim, Sam-Pin Lee. 2010. 6. 한국식품과학회 국제학술대회.

- (8) Inhibitory effects of wild *Oenanthe javanica* extracts fermented with oligosaccharides on HepG2 cell proliferation. Seun-Ah Yang, Min-Ju Kim, Kwang-Hwan Jhee, Hyung-Dae Kim, In-Seon Lee, Sam-Pin Lee. 2010. 6. 한국미생물생명공학회 국제학술대회.
- (9) Effect of Dropwort extracts fermented with oligosaccharides on allergic inflammation. Eun-Ju Lee, Seun-Ah Yang, Hyung-Dae Kim, Hyo-Gwon Im, Sam-Pin Lee, In-Seon Lee. 2010. 6. 한국미생물생명공학회 국제학술대회.
- (10) Analysis of Caffeic Acid from Dropwort Extract Fermented with Brown Sugar and Oligosaccharides by HPLC. Kwang-Hwan Jhee, Hae-Jung Byun, Kyoung-Ran Kim, Sam-Pin Lee, Seun-Ah Yang. 2010. 6. 한국미생물생명공학회 국제학술대회.
- (11) Anti-allergic inflammation activity of new ceramide from *Actinidia polygama*. MyunHo Bang, YoonSu Baek, InGyeong Chae, DaeYoung Lee, DaeKyun Chung, SeunAh Yang, and NamIn Baek. 2010. 9.24-26. 일본생약학회, 제 5회 한중일 생약학 합동심포지엄
- (12) Inhibitory effects of wild *Oenanthe javanica* extracts fermented with oligosaccharides on HepG2 cell proliferation. Seun-Ah Yang, Min-Ju Kim, Kwang-Hwan Jhee, Jung-Hyun Park, Hyung-Dae Kim, Eun-Ju Lee, Sam-Pin Lee, In-Seon Lee. 2010. 9. 일본 암학회.
- (13) Isolation and identification of the anti-allergic inflammatory active compound from ethyl acetate fraction of *Actinidia polygama* extract. Seun-Ah Yang, Eun-Ju Lee, Myun-Ho Bang, In-Gyeong Chae, Mi-Hee Yu, Sam-Pin Lee, and In-Seon Lee. 2010. 10. 한국식품영양과학회 국제학술대회.
- (14) Protective effects of wild dropwort (*Oenanthe javanica*) extracts fermented with oligosaccharides on tert-butyl hydroperoxide (t-BHP)-induced oxidative damage in HepG2 cells and identification of the active components. Min-Ju Kim, Seun-Ah Yang, Kwang-Hwan Jhee, Hyung-Dae Kim, Sam-Pin Lee. 2010. 10. 한국식품영양과학회 국제학술대회.
- (15) A comparative study on antioxidative property of ginger (*Zinger officinale*) extracts. Eun-Ju Lee, Su-Young Lee, Jung-Min Lee, Hee-Don Choi, Hyo-Gwon Im, Seun-Ah Yang, In-Seon Lee. 2010. 10. 한국식품영양과학회 국제학술대회.
- (16) Antioxidant and anti-inflammation properties of supercritical CO<sub>2</sub> extracts of ginger (*Zinger officinale*). Seun-Ah Yang, Eun-Ju Lee, Su-Young Lee, Jung-Min Lee,

Hee-Don Choi, Hyo-Gwon Im, In-Seon Lee. 2010. 10. 한국식품영양과학회 국제학술대회.

- (17) Identification of Polyphenolic Compounds at Dropwort Extract Fermented with Brown Sugar and Oligosaccharides. Kwang-Hwan Jhee, Hae-Jung Byun, Kyoung-Ran, Kim Sam-Pin Lee, Seun-Ah Yang. 2010. 10. 한국식품영양과학회 국제학술대회.
- (18) 생강 초임계 추출물의 이화학적 특성. 안정택, 오세준, 김윤숙, 박용곤, 최상윤, 양선아, 최희돈. 2010. 10. 한국식품영양과학회 국제학술대회.
- (19) Evaluation of various biological properties of wild dropwort (*Oenanthe javanica*) extracts fermented with brown sugar. Min-Ju Kim, Seun-Ah Yang, Kwang-Hwan Jhee, Hyung-Dae Kim, Sam-Pin Lee. 2010. 10. 한국식품영양과학회 국제학술대회.
- (20) Regulatory effect of ginger marc on allergy inflammation prepared after supercritical fluid extraction. Lee Eun-Ju, Jeong Yeon-Seop, Choi Hee-Don, Im Hyo-Gwon, Lee IS, Yang Seun-Ah. 2011. 06. 한국식품과학회.
- (21) 염증 및 알러지 개선용 기능성 제품 개발. 2011.06.09. 한국식품과학회, 우수기술전시회 강연 및 전시.
- (22) Regulatory effects on allergy and inflammation of 6-gingerol and ginger oil obtained by supercritical fluid extraction. Eun-Ju Lee, Seun-Ah Yang, Hee-Don Choi, Hyo-Gwon Im, In-Seon Lee. 2011. 06. 한국미생물생명공학회.
- (23) Antiinflammatory activity of the marc after supercritical fluid extraction of ginger in RAW 264.7 macrophages through the upregulation of heme oxygenase-1. Eun-Ju Lee, Seun-Ah Yang, Hee-Don Choi, In-Seon Lee. 2011.10. 한국식품영양과학회.
- (24) Hepatoprotective effect of fermented dropwort extract against carbon tetrachloride-induced toxicity in rat. Seun-Ah Yang, Eun-Ju Lee, Yeon-Seop y ig, Seung-Jin Lee, Seung-Chun Park, Min-Ju Kim, In-Seon Lee. 2011.10. 한국식품영양과학회.
- (25) Inhibitory effects on allergy and inflammatory of essential oil obtained by SFE from ginger and its main compounds. Eun-Ju Lee, Seun-Ah Yang, Hee-Don Choi, Hyo-Gwon Im, Key Whang, In-Seon Lee. 2011. 11. ICoFF.

#### 나. 논문게재 및 투고

- (1) Myun-Ho Bang, In-Gyeong Chae, Eun-Ju Lee, Nam-In Baek, Yoon-Su Baek, Dae-Young Lee, In-Seon Lee, Sam-Pin Lee, Seun-Ah Yang. Inhibitory effects of

- Actinidiamide from *Actinidia polygama* on allergy and inflammation. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 2011.11.05. accepted
- (2) 이은주, 양선아, 최희돈, 황기, 이인선. 생강 분획의 gingerols 분석 및 초임계 추출물의 항산화 효과출물의 항산화 효지. 2011, 43(4), 469-474.
  - (3) 김민주, 양선아, 김혁일, 박정현, 이삼빈. 미나리 올리고당 발효액의 발효기간에 따른 품질 특성 및 간암세포 성장억제 효과. 식품과학회지. 2011, 43(4), 432-437.
  - (4) Seun-Ah Yang, Eun-Jung Lee, Hee-Don Choi, Mi-Hee Yu, Myun-Ho Bang, In-Seon Lee, Sam-Pin Lee. Anti-allergy effect of marc from silver vine (*Actinidiapolygama*) prepared by supercritical fluid extraction. Food Sci. Biotechnol. 2010.19(5), 1309-1316.
  - (5) 유미희, 채인경, 최준혁, 임효권, 최희돈, 양선아, 이진호, 이인선. 개다래 초임계 박추출물이 염증 및 동맥경화에 미치는 영향. 한국식품과학회지. 2010. 42(4), 475-480.
  - (6) Seun-Ah Yang, Sang-Kyung Jeon, Eun-Jung Lee, Chang-Hyun Shim, In-Seon Lee. Comparative study of the chemical composition and anticardant activcompof six essential oils and their components. *Natural Product Research*, 2010, 24(2), 140-15
  - (7) 이은정, 황은영, 황기, 이인선, 양선아. 고장초의 항알레르기 효과. 한국식품과학회지. 2009. 41, 717-721.
  - (8) Hyun-Jung Cho, Dong-Chan Yoo, Hee-Joon Kim, Kong-Won Khang, Ho-Soon Jeong, SeuPulegone from the Oriental Herb, *Schizonepeta tenuifolia* Briquet and Demonstration of Supramolecule Formation by Cyclodextrin. *Asian Journal of Chemistry*. 2009. 21, 6536-6546
  - (9) Seun-Ah Yang, Sang-Kyung Jeon, Eun-Jung Lee, Nam-Kyung Im, Kwang-Hwan Jhee, Sam-Pin Lee and In-Seon Lee. Radical Scavenging Activity of the Essential Oil of Silver Fir (*Abies alba*). *J Clin Biochem Nutr* 2009, 44(3), 253-9.n-Ah Yang, In-Seon Lee, Kwang-Hwan Jhee. Efficient, High-Yield Purification of

#### 다. 특허출원

- (1) 양선아, 이삼빈, 최희돈, 유미희, 최준혁, 이은정, 채인경, 임효권, 임남경, 김민주, 김형대, 이인선 “개다래 박 추출물의 제조방법 및 이를 함유하는 염증 또는 알러지 예방 및 치료용 조성물” Method for preparing the extract of marc of *Actinidia polygama* and composition for preventing and treating inflammation or allergy comprising the same. 계명대학교 산학협력단. 출원일: 2009.09.01, 10-2009-0082093.
- (2) 양선아, 이은정, 임남경, 이은주, 강공원, 정호순, 지광환, 이인선, 이삼빈. “생약 추출물을 함유하는 알러지 개선용 조성물” Composition for allergy improvement containing medicinal herb extracts. 계명대학교 산학협력단. 출원일: 2009.12.14, 10-2009-0123729.
- (3) 양선아, 이은정, 최준혁, 채인경, 유미희, 이인선, 이삼빈. “고장초 추출물을 함유하는 알

러지 개선용 조성물” Composition for allergy improvement containing *Zizania latifolia* extracts. 계명대학교 산학협력단. 출원일: 2009.12.30. 10-2009-0133597.

- (4) 임효권, 안재진, 유병혁, 홍주현, 정희경, 양선아, 유미희, 김형대, 김민주 “미나리 농축액과 개다래 추출물을 포함하는 식품 조성물 및 이 조성물을 포함하는 건강음료”

Composition comprising the extract of dropwort and *Actinidia polygama* and health beverage comprising the same. 출원일: 2010.08.17, 10-2010-0079412.

- (5) 양선아, 김민주, 이삼빈, 김형대, 지광환, 변혜정, 김경란, 최희돈, 이은주, 임효권 ‘간 기능 보호 및 개선용 미나리발효액 및 그 제조방법’, 계명대학교 산학협력단. 출원일:

2010.11.08, 10-2010-0110278.

- (6) 임효권, 안재진, 유병혁, 권대준, 김대익, 임애경, 이기동, 양선아, 유미희, 김형대, 김민주. ‘레저스포츠용 건강기능성 음료식품 조성물’, (재)대구테크노파크, 특허출원일: 2010.12.22,

10-2010-0132442.

- (7) 양선아, 최희돈, 이은주, 정연섭, 임효권, 이삼빈, 김민주, 김형대. ‘생강 추출물 제조방법 및 이에 따른 생강 추출물’, 계명대학교 산학협력단. 특허출원일: 2011.01.18,

10-2011-0008991.

- (8) 양선아, 이은주, 정연섭, 김민주, 최희돈, 임효권, 이삼빈, 이인선, 김형대. ‘생강 초임계 오일과 미나리 발효추출물을 함유하는 아토피성 질환 예방 및 개선용 조성물’, 계명대학교 산학협력단. 출원예정일: 2011.12.23.

- (9) 임효권, 안재진, 임애경, 유병혁, 권대준, 홍주현, 양선아, 유미희, 김형대, 김민주. ‘미나리 추출물과 개다래추출물을 이용한 여성용 음료의 제조방법’, (재)대구테크노파크, 출원예정일: 2011.12.19.

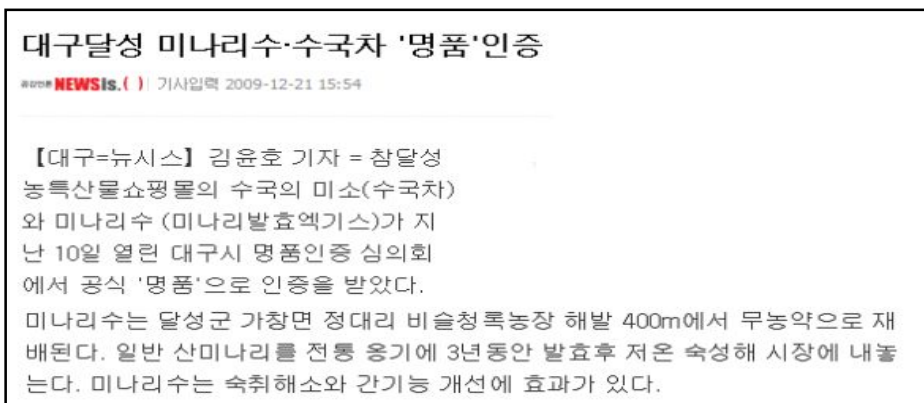
- (10) 임효권, 안재진, 임애경, 유병혁, 권대준, 홍주현, 양선아, 유미희, 김형대, 김민주. ‘미나리 추출물과 생강추출물을 이용한 스포츠 음료의 제조방법’, (재)대구테크노파크, 출원예정일: 2011.12.19.

#### 라. 기타(홍보, 시제품 및 상품화 실적)

- (1) 2009. 6. 12일자 매일신문 기사 : 지역대학-기업이 연계해 제품을 개발해 좋은 반응을 얻고 있다는 내용의 기사.



(2) 2009. 12. 29 매일신문 : 대구시 친환경 우수 농축특산물 명품 인증(2호)



(3) 2011. 08. 27 브레이크신문 : 2009년도 대구시 친환경 우수 농축특산물 명품 - 미나리수 소개

(4) 2011. 10. 27 매일신문 : 2011 행정산업정보박람회 달성홍보관 내 제품전시 및 홍보 기사

(5) 신성장동력 박람회 전시, 2009. 05. 25



(6) 울진 세계친환경농업엑스포(대구시 대표 농축특산물), 2009. 08. 13





(7) 웰빙 바이오 대전, 2009. 10. 23~25, 대구 엑스코



(8) 제9차 세계한상대회 참가(대구시 대표 농축특산물), 2010. 10. 27, 대구 엑스코



(9) 현대백화점 건강식품관 입점, 2010. 03. 03, 서울





(10) 지역발전주간 상품전 참가, 2011. 09. 07~09, 광주



(11) 2011. 10. 14. 지역경제 활성화를 위한 『중소기업 제품 기술 전시회』 참가



(12) 시제품 개발 및 상품화

(가) 미나리 발효액 20% 함유 기능성 음료 '수근'(시제품)을 '린'으로 2010. 10 상품화

(나) 미나리 발효액과 생강 추출물 및 개다래 추출물을 함유하는 건강음료 세트 'Beau Tea & Sport Tea' 시제품 제작. 2011. 12. 02

(다) 미나리 발효 후 박의 추출물을 함유하는 한방 화장품 세트(민감성 피부용 로션, 미스트, 바디워시) 시제품 제작. 2011. 11. 28

(라) 미나리 발효 후 박의 추출물과 생강 초임계 오일을 함유하는 한방 화장품 세트(민감성 피부용 크림, 미스트, 바디워시) 시제품 제작. 2011. 11. 28

마. 실용화 · 산업화 계획

(1) 2차년에 상품화된 '린'의 2차 대량 생산을 계획 중이며, 소재를 업그레이드 시켜서 '린 골드' 출시 예정.

(2) 3차년 시제품 중 사용성 및 효능 확인 테스트를 거쳐서 선정하여 2012년 제품화 예정.

(3) 미나리 발효액 '수', '골드' 및 '린'의 중국 수출을 위하여 진행 중.

바. 기술 확산 계획

- (1) 기능성과 기호성이 최적인 시료 분획을 이용하여 알러지, 염증 및 간 기능 개선 건강기능식품 개발에 활용코자 함.
- (2) 효능평가(in vitro, in vivo)를 통하여 가능성을 확인하였으므로 이에 대한 자료를 보완하고 임상 시험을 거친 후, 건강기능성 제품으로 등재 신청을 위한 자료로 활용 예정임.

사. 추가연구, 타 연구에의 활용

- (1) 생강의 초임계 박 추출물에서 높은 항알러지 효능이 확인되었으나 현재까지 활성성분이 보고된 바 없으므로, 활성성분 분석을 통하여 부산물인 박을 고부가 기능성 제품으로 개발하기 위한 연구를 계속할 예정임.
- (2) 비슬산의 청정 미나리를 이용한 발효초 개발을 위한 연구로 미나리 제품의 다양화를 하고자 함.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 최근 경제적 성장으로 건강, 삶의 질 향상, 그리고 친환경 천연 소재에 대한 관심이 증가하면서 생리활성을 가지면서 부작용이 없는 천연물 유래의 활성물질 탐색에 대한 연구가 가속화 되고 있다. 생강은 항균, 항염증, 혈청 콜레스테롤 저해효과, 항산화 작용이 보고되어 있고, 특히 생강의 매운맛 성분 중 하나인 6-gingerol은 소염, 살균효과 및 항산화 활성을 나타내는 것으로 보고되었다. 생강의 면역 기능 조절에 관한 연구로는 oleoresin, gingerol, shogaol이 자연살해 세포의 기능을 활성화시켜 면역 기능을 향상시키는 효과에 관한 것이 있다.
2. 개다래의 성분으로는 자당, 점액질, 전분, 단백질, 탄닌, 유기산, 비타민 C, 비타민 A, 비타민 P등이 함유되어 있고, 최근 소염, 진통, 통풍에 효과가 있다고 알려져 있다.
3. 미나리에 관한 최근의 연구로는 미나리 추출물의 항동연변이 효과, methylnitro nitrosoguanidine에 의해 유도된 위암세포의 성장을 억제한다는 연구와 동물실험에 의한 진통효과 등이 보고되어 있다. 채소와 녹즙의 경우 저장성이 문제가 되므로 장기 저장과 효능 강화의 목적으로 발효시킨 가공품을 많이 생산하고 있으며, 미나리의 경우도 자연 발효 공정에 의해 보존성이 강화된 가공품이 있으나 자연 발효 공정에 따른 기능 변화에 대한 연구는 매우 미흡한 실정이다.
4. 식물 내 유효성분을 추출하기 위한 일반적 방법인 용매 추출법의 문제점을 보완하기 위한 기술로 초임계 유체를 이용한 초임계 추출법이 주목받고 있다. 초임계 추출공법은 저온 조작이 가능하고 기존 추출법과 비교하여 확산계수가 높고 점도가 낮기 때문에 빠른 추출과 상 분리가 용이하다. 유체 추출기술에는 낮은 임계 온도와 압력으로 온화한 조건에서 추출을 수행할 수 있는 이산화탄소가 가장 널리 이용되는데, 이는 온도에 민감한 물질을 변성이나 분해 없이 분리할 수 있어 식품이나 위약품 등 인체에 직접 적용되는 제품의 생산에 매우 유용한 것으로 알려져 있다.
5. 만성 난치성 질환 예방 및 치료에 효과가 있는 생리활성 물질 관련하여 많은 보고가 이루어지고 있다. 허브의 flavonoids, ellagitannins, anthraquinones 등은 iNOS와 COX-2 유전자의 발현을 억제함으로써 염증에 효과가 있다고 보고되었으며, 버섯에서 inotilone이 분리되었고 체리의 통풍 및 염증 억제효과가 보고되었다. 또한, 개다래 열매에서 분리된 linoleic acid의 항염증 활성이 확인되었다.

## 제 7 장    참고문헌

- (1) Ross R. Atherosclerosis: An Inflammatory disease. New Engl. J. Med. 340: 115-126 (1999)
- (2) Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. Circulation 105: 1135-1143 (2002)
- (3) Kim HY, Park JY. Oxidative stress and atherosclerosis. J. Korean Soc. Endocrinol. 15: 1-14 (2000)
- (4) Sekalska B. Aortic expression of monocyte chemotactic protein-1(MCP-1) gene in rabbits with experimental atherosclerosis. Ann. Acad. Med. Stetin. 49: 79-90 (2003)
- (5) Kodili R, Hajjou M, Berman AB, Bansal MB, Zhang S, Pan JJ, Schechter AD. Chemokines induce matrix metalloproteinase-2 through activation of epidermal growth factor receptor in arterial smooth muscle cells. Cardiovasc. Res. 69: 706-715 (2006)
- (6) Newby AC, Zaltsman AB. Molecular mechanism in intimal hyperplasia. J. Pathol. 190: 300-309 (2000)
- (7) Cho A, Reidy MA. Matric metalloproteinase-9 is necessary for the regulation of smooth muscle cell replication and migration after arterial injury. Circ. Res. 91: 845-851 (2002)
- (8) Lin SJ, Lee IT, Chen YH, Lin FY, Sheu LM, Ku HH, Shiao MS, Chen JM, Chen YL. Salvianolic acid B attenuates MMP-2 and MMP-9 expression in vivo in apolipoprotein-E-deficient mouse aorta and in vitro in LPS-treated human aortic smooth muscle cells. J. Cell Biochem. 22: 372-384 (2007)
- (9) Jung BS, Shin MG. Hyangyak-Dictionary. Younglimsa, Seoul, Korea. p. 386 (1990)
- (10) Park EH, Kahn JH. Supressive effects of propolis in rat adjuvant arthritis. Arch. Pharm. Res. 22: 554-558 (1999)
- (11) Yang KS, Yu JH, Hwan. JI, Yang R. Synergistic effect of citric acid on antioxidant property of red pepper. Korean J. Food Sci. Technol. 6 (1974)
- (12) Chun HJ, Lee SW. Studies on Antioxidative Action of Garlic Components Isolated from Garlic. The Korean Home Economics Association. 24: 43 (1986)
- (13) Teris A, Van Beek, Marteen AP, Gerrit PL. Invastigation of the essential oil of vietnamese ginger. Phytochemistry. 26 (1987)
- (14) Lee YN. Flora of Korea. Kyohaksa. Seoul, Korea. pp. 1107-1109 (1996)
- (15) Lee CB. Illustrated Flora of Korea, Hyangmoon Publish Co. Seoul, Korea pp. 231-231 (1979)
- (16) Leung AY. Encyclopedia of Common Natural Ingredients, John Wiley & Sons, Inc. New York, USA. pp279-274 (1980)
- (17) Sheo HI. The antibacterial action of galic, onion, ginger and red pepper juice. J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr. 18:94-99 (1999)
- (18) Thomson M, Al-Qattan K, Al-Sawan M. The use of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) as a potential anti-inflammatory and antithrombotic agent. Elsevier Science

Ltd. 67:475-478 (2002)

- (19) Balkwill FR, Maylor MS, Malik S. Tumor necrosis factor as an anticancer agent. Eur. J. Cancer. 26:641-644 (1990)
- (20) Cooksley VG. Aromatherapy, Englewood Cliffs, NJ. UK. pp. 349-350 (1996)
- (21) Chang WS, Chang YH, Lu FJ, Chiang HC. Inhibitory effects of phenolics on xanthine. Anticancer Res. 14:501-506 (1994)
- (22) Lee IK, Ahn SY. The antioxidant activity of gingerol. Korean J. Food. Sci. Technol. 17(2):55-59 (1985)
- (23) Zakaria-Runkat, Nurahma, E Prangdimurt, Tejasari. Antioxidant and immunoenhancement activities of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) extracts and compounds *in vitro* and *in vivo* mouse and human system. Nutraceuticals & Food. 8:96-104(2003)
- (24) Yu MH, Im HG, Lee HJ, Ji YJ, Lee IS. Components and their antioxidative of Methanol extracts from sarcocarp and seed of *Zizyphus jujube* var. *inermis* Rehder J. Food Sci. Technol. 38(1):128-134 (2006)
- (25) Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Yang M, Riceevans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biol. Med. 26: 1231-1237 (1999)
- (26) Jeong SH, Chang KS, Kim YJ. Optimization of curcumin extraction from Turmeric(*Curcuma longa* L.) using supercritical fluid CO<sub>2</sub>. Food Engineering Progress. 8(1):47-52(2004)
- (27) Choi HS. Peroxide and nutrition of lipids. J Korean Soc Food Nutr. 23: 867-878 (1994)
- (28) Higasi GS. Appraisalment of antioxidative activity from vegetables. Jap J. Food Ind. 57: 56-64 (2000)
- (29) Cha WS, Kim JH, Lee KH, Kwon HJ, Yoon SJ, Chun SS, Choi UK, Cho YJ. Antioxidative and Inhibition Activities on *Helicobacter pylori* of Spice Extracts. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 35(3): 315-320 (2006)
- (30) Kim HJ, Jun BS, Kim S K, Cha JY, Cho YS. Polyphenolic compound content and antioxidative activities by extracts from seed, sprout and flower of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 29:1127-1132 (2004)
- (31) Park SJ, Lee KS, An HL. Effects of dropwort powder on the quality of castella. J. East Asian Soc. Dietary Life 17: 834-839 (2007)
- (32) Song GS, Kwon YJ. Analysis of the volatile constituents of *Oenanthe stolonifera* DC. J. Korean Soc. Food. Nutr. 19: 311-314 (1990)
- (33) Kim JK. Illustrated Natural Drugs Encyclopedia. Namsangdang, Seoul, Korea p. 244 (1984)
- (34) Jo HW, Lee SH, Nam DH, Kim JY, Lee JS, Park JC. Antioxidant activity and phytochemical study on the aerial parts of *Oenanthe javanica*. Kor. J. Pharmacogn. 39:

142-145 (2008)

- (35) Mun SI, Joh YG, Ryu HS. Protein and amino acid composition of watercress, *Oenanthe stolonifera* DC. J. Korean Soc. Food Nutr. 19: 133-142 (1990)
- (36) Lee HY, Yoo MJ, Chung HJ. Antibacterial activities in watercress(*Oenanthe stolonifera* DC.) cultivated with different culture methods. Korean J. Food Culture 16: 243-249 (2001)
- (37) Fujuta T, Kadoya Y, Aota H, Nakayama M. A new phenylpropanoid glucoside and other constituents of *Oenanthe javanica*. Biosci. Biotech. Bioch. 59: 526-528 (1995)
- (38) Park JC, Han SY, Yu YB, Lee JH. Isorhamnetin sulphate from the leaves and stems of *Oenanthe javanica* in Korea. Planta Med. 61: 377-378 (1995)
- (39) Rhee HJ, Koh MS, Choi OJ. A study on the volatile constituents of the water dropwort (*Oenanthe stolonifera* DC). Korean J. Food. Sci. 11: 386-395 (1995)
- (40) Lee KL, Park KY, Rhee SH. Antimutagenic effect of green-yellow vegetables toward aflatoxin B1 and 4-nitroquinoline-1-oxide. J. Korean Soc. Food Nutr. 21: 143-148 (1992)