

발간등록번호

11-1541000-000712-01

보안과제 (), 일반과제 (O)

과제번호 108138-2

정선군 특산 오가자와 고려엉겅퀴를 활용한 주류 · 음료
개발 및 생리활성 연구

(Development of new products using Ogaja and *Cirsium setidens* from Jeongseon and physiological activities)

오가자·고려엉겅퀴 막걸리 및 브랜드의 개발

(Development of Makgeolli and Brandy using Ogaja & *Cirsium Setidens*)

오가자를 활용한 곡물음료 개발

(Development of Cereal Beverages using Ogaja)

오가자 색소체의 화학적 구조 동정, 대량생산 및 제품 적용성 향상
방안 탐색

(Purification of Ogaja Pigment and Exploration of Improving Application for Mass Production)

오가자/고려엉겅퀴 시제품 및 색소체의 기능활성 탐색

(Physiological Functionalities for Products and Ogaja Pigment)

(농)국순당정선명주(주)

농림수산식품자료실



0000578

농림수산식품부

.7
39x
011-14

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “정선군 특산 오가자와 고려엉겅퀴를 활용한 주류·음료 개발 및 생리활성 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2010년 12월 일

주관연구기관명 : 국순당정선명주(주)

주관연구책임자 : 홍 동 의

세부연구책임자 : 홍 동 의

연 구 원 : 김 계 원

연 구 원 : 문 영 진

연 구 원 : 전 인 수

연 구 원 : 문 정 영

협동연구기관명 : 정선군농업기술센터

협동연구책임자 : 최 대 성

협동연구기관명 : 세종대학교

협동연구책임자 : 유 상 호

협동연구기관명 : 성균관대학교

협동연구책임자 : 홍 성 렬

요 약 문

I. 제 목

정선군 특산 오가자와 고려엉겅퀴를 활용한 주류·음료 개발 및 생리활성 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

강원도 정선군에서 정선군농업기술센터가 주축이 되어 오가피를 정선군의 특화작목으로 선정하고, 오가자 수율이 높은 품종의 육종 및 가공 식품의 개발 등에 대한 다양한 연구를 실시. 또한 정선군에서 강원 영서지역 특산물인 고려엉겅퀴 (곤드레)를 이용한 지역 관광 상품으로 활용. 실질적인 농가 소득 증대로 연계시키기 위하여 육종된 품종의 농가 보급 및 재배 기술 제공을 통한 오가자의 안정적 생산기반을 마련하였으나 수년 후 오가자 수확량 증대에 따른 신규 수요처 개발이 필요한 실정이다. 이에 정선군 특산물인 오가자와 고려엉겅퀴를 활용하여 웰빙 막걸리·브랜드와 곡물음료를 개발하고 오가자 함유 막걸리와 곡물음료 중 오가자 색소체 성분의 이화학적 안정성 확보를 위한 안정성 개선 공정을 개발하고자 한다. 또한 오가자 색소체의 정제 공정과 컨셉을 개발하여 기능성 소재로 활용 가능한 방안을 모색하며, 개발된 시제품과 오가자 색소체에 대한 생리 기능활성을 규명하고자 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

오가자 및 고려엉겅퀴 등을 활용한 기능성과 특색을 보유한 웰빙 오가자 및 고려엉겅퀴 (곤드레) 막걸리와 오가자 발효 원주를 증류한 세계 유일의 오가자 브랜드 및 오가자 추출물을 적용한 곡물음료 등 시제품을 개발하며, 이들 시제품의 상품화를 모색하고자 한다.

오가자 과실 내의 천연 색소체를 추출, 색소체의 분자 구조를 동정하고자 하였으며, 식품 가공상 발생할 수 있는 물리적 처리 조건 하에 오가자 유래의 색소체의 안정성을 검토하였으며, 색소체의 제품 적용 시 발생하는 품질저하 요인을 탐색하고 이를 해결하기 위한 방안을 마련하고자 한다. 오가자 색소체의 생리 기능활성 (항암 및 항염증)을 규명하여 건강 기능성 컨셉을 제공하며, 개발된 시제품의 생리 기능활성도 규명하고자 한다.

IV. 연구개발결과

오가자와 고려엉겅퀴 (곤드레)를 활용한 막걸리 개발하기 위해, 주원료로 감자와 쌀의 혼합 비율·담금 급수 비율·오가자 또는 곤드레의 첨가 비율을 결정하였다. 각 실험 조건별로 alcohol·RS (환원당)·산도 (acidity) 등 발효 프로파일을 분석하여 recipe를 도출하였으며 이를

바탕으로 시제품을 제조하였다. 또한 상품화를 모색하기 위해, 발효 과정 중 오가자의 색 안정성을 측정하였다. 가혹조건 (alcohol 14%, 산도 7.0)에서 살균된 막걸리와 미살균 막걸리를 냉장 저장하면서 일반분석과 색도 변화를 관찰하였다. 그 결과 4개월까지 색 안정성을 확인하여 냉장 유통시 색 변에 의한 품질 저하는 없을 것으로 결정하였다. 최종 제품의 규격은 alcohol 6%, 산도 3.0으로 다양한 용량의 시제품을 개발하였다. 오가자·곶드레 막걸리의 술덧을 증류하여 브랜드를 시제품의 제조하였다.

오가자를 활용한 곡물음료를 개발하기 위해, 백미를 열을 이용한 호화과정 후 효소추출액을 첨가하여 당화공정을 수행했다. 효소추출액은 맥아분을 증류에 넣고 상온에서 추출·여과 과정을 거쳐 사용하였다. 오가자 추출물을 첨가하여 recipe를 개발하였다.

오가자 과실의 추출액을 Sep-pak Plus C₁₈ cartridge를 이용하여 색소체를 조추출하였고, HPLC-PDA를 이용하여 색소체 조성을 분석한 결과 518 nm에서 피크면적 95.4%를 차지하는 주요 색소체가 안토시아닌임을 확인할 수 있었고, 오가자의 붉은색을 나타내는 색소체의 정확한 구조를 동정하기 위해 HPLC-ESI-MS를 이용하여 분석하였다. 그 결과, 피크면적 95.4%이 물질의 mass-to-charge ratio (m/z)가 581.3이며, 모분자에서 당쇄결합이 제거된 후 생성된 비배당체의 분자량 (m/z)이 287.3인 것을 확인하여 비배당체는 안토시아닌 중 시아니딘의 구조임을 확인하였다. 이 주요 색소체를 recycling-preparative HPLC를 이용하여 분리, 정제하였고, 모분자에서 결합된 당의 구조를 확인하고자, 정제한 시료를 산 분해 하여 HPTLC, HPAEC를 통해 정확한 구조를 규명하고자 하였다. 분석 결과 비배당체 형태인 cyanidin에 xylose, glucose가 몰비율 0.8:1로 결합된 구조임을 확인할 수 있었다. 당쇄결합 뿐만 아니라, 결합패턴 등 최종적인 구조분석을 위해 분리, 정제한 시료를 H-과 C-NMR을 이용하여 분석하여, 오가자 내의 주요 색소체는 Cyanidin-3-O-sambubioside (Cya-3-O-sam)으로 동정하였다. 이러한 주요색소체의 효율적인 추출, 대량생산시스템의 확립을 위해, 다양한 용매와 극성세기를 달리하여 추출 효율을 검토하였다. 오가자 색소체 정제 물을 표준물질로 하여 오가자 안토시아닌 함량을 측정된 결과, 80% 메탄올 (374 mg/100 g), 60% 에탄올 (291 mg/100 g)에서 가장 효율적으로 추출되는 것을 알 수 있었으며, 독성이 적은 에탄올 추출은 대량생산을 가능하게 하는 기초자료로 활용이 가능할 것으로 예상된다. Gallic acid를 표준물질로 하여 물과 메탄올 추출에서의 각 추출액의 총 페놀함량을 측정된 결과, 물 추출액의 경우 오가자 과실 100 g 당 1384 mg, 메탄올 추출액의 경우 오가자 과실 100 g당 785 mg이 함유되어 있음을 확인할 수 있었다.

정제된 오가자 색소체의 색안정성은 저장기간을 달리한 각 물리적 처리조건에 따른 흡광도의 변화로 측정하였다. 비 배당체인 시아니딘은 80°C에서 저장 1시간 만에 색안정성이 90% 소실되었으나, 배당체인 Cya-3-O-sam의 경우는 저장 6시간 이후에도 색안정성이 52%수준으로 존재하여, 비배당체보다 열에 대하여 안정함을 알 수 있다. 또한 오가자 색소체의 빛에 대한 안정성 평가에 있어서는 형광과 UV 조건 하에서도 Cya-3-O-sam이 비배당체인 시아니딘보다 더 안정함을 알 수 있었다. 색소체 안정성 증진방안으로 copigmentation 효과를 검토하기 위해 ascorbic acid, ferulic acid, rosmarinic acid, tannic acid를 첨가하여 저장기간에 따른 색소체의 색안정성을 살펴본 결과, ascorbic acid를 제외한 모든 실험군에서 저장기간에 따라 높은 안정성 증진효과를 나타내었다. ascorbic acid의 경우 오가자 색소체의 색 안정성을 오히려 저해하는 것으로 나타내었다. 오가자 색소체를 제품에 적용 시 식품내의 단백질 성분은 색소체 성분과 상호작용하여 표면에 피막을 형성하고, 탁도를 증가시키는 haze를 형성하였다. 이

를 해결하기 위해 haze가 형성되는 요인을 탐색한 결과, positive control이 되는 gelatin-tannic acid군과 SPI (soy protein isolate)-오가자 추출물군에서 haze가 생성되었다. 정제된 안토시아닌 Cya-3-O-sam은 식품내의 단백질 성분과 반응하여 불용성 침전과 탁해짐을 일으키는 haze 형성의 우려가 없어 식품에 대한 직접적인 적용가능성이 크다고 판단된다.

오가자 추출물과 SPI간에 생성되는 haze의 경우 haze-active protein을 protease 적용을 통해 가수분해 함으로써 저해 할 수 있다. 이러한 결과는 폴리페놀-단백질 간 상호작용에 의한 haze 형성은 protease의 적용을 통한 HA-protein의 가수분해로 haze 형성을 저해할 수 있는 가능성을 확인하였다. 반응의 최적조건은 SPI를 bacterial protease로 2시간 가수 분해 후 오가자 추출물 첨가시 haze 형성 저해에 가장 효과가 컸으며 이때의 효소 사용량은 1.0 U/mL 이 적절하다고 판단된다.

또한 오가자 색소체 (Cyanidin-3-O-sambubioside)와 syringic acid 및 정선 특산물을 활용하여 제조한 시제품 (오가자 또는 곤드레막걸리 등)의 생리 기능활성 (항암과 항염증) 탐색과 작용 기전을 규명하고자 하였다. Cya-3-O-sam와 syringic acid는 유정란 배아의 용모막 요막 (Chick embryonic chorioallantoic membrane, CAM)에서 신생혈관 생성 및 혈관내피세포 (Human Umbilical Vein Endothelial Cell, HUVEC)의 관상구조 형성 억제를 관찰하였다. 이들 물질에 의한 인간 유방암 세포주의 암세포 이동력과 matrix metalloproteinase (MMP)의 활성과 발현량의 농도의존적 감소를 확인하였다. 정선 특산물을 이용하여 제조한 시제품에서 신생혈관 생성과 암세포 전이력 저해를 확인하였다. 뿐만 아니라, LPS에 의해 유도된 염증 저해 활성을 평가하기 위하여, 대식세포 RAW264.7에 의한 Nitric Oxide (NO)의 생성량을 측정 한 결과, 이들 시제품에 의해 NO의 생성이 감소하였으며 COX-2 및 iNOS의 mRNA 수준의 발현량 저해를 관찰하였다. 이 결과를 종합하여, Cya-3-O-sam와 syringic acid가 신생혈관 생성과 암세포의 전이를 억제하는 항암 활성을 가지며, 정선 특산물을 활용하여 제조한 시제품은 NO의 생성과 염증반응을 유도하는 인자들을 감소시킴으로써 항염증 효과를 나타낸다고 사료된다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

고려영경귀를 이용한 막걸리 (곤드레 막걸리)를 개발 완료하여 제품으로 출시하였으며, 이와 관련하여 확보된 기술에 대해 자체기술 활용을 통한 기술이전을 실시하였다. 오가자를 활용한 막걸리의 시제품 개발을 완료하였으며 2011년 상반기에 제품을 출시할 오가자 막걸리는 오가자 색소체 안정성 개선 공정 프로세스를 제품에 적용하여, 오가자 색소체에 기인하는 품질 저해 요인을 제거하여 고품질의 제품으로 출시될 예정이다. 또한 오가자를 활용한 브랜드와 곡물음료에 대한 시제품 개발도 완료하여 상품화를 추진할 계획이다.

이와 더불어, 오가자 유래 색소체를 분리·동정하였으며 그에 대한 이화학적 특성을 규명하였으며 색소체의 제품 적용 시, 품질 저하 요인에 대한 탐색과 해결 방안을 마련하였다. 오가자 색소체 및 개발된 시제품에 대한 생리 기능활성 탐색·규명을 완료하였으며 SCI급 논문을 발표하여 건강 기능 컨셉을 부여할 수 있도록 추진할 계획이다.

SUMMARY

(영문요약문)

1. Title

Development of new products using Ogaja and *Cirsium setidens* from Jeongseon and physiological activities

2. Background and purpose

Since Jeongseon Agricultural Technology and Extension center has selected the specialized crop as *Acanthopanax sessiliflorus*, many scientists have been researching about the improvement of yield and processed foods. It is necessary to increase the income of farmers and find the new route of Ogaja (the fruit of *Acanthopanax sessiliflorus*) and Gondre. In this work, we aimed to develop the Ogaja or Gondre-based beverages including Makgeolli, brandy, and cereal beverage and to purify the ogaja-derived pigment (Cyanidin-3-O-sambubioside) from *Acanthopanax sessiliflorus*. In order to maintain the physical and chemical stability of this pigment, we established the improvemental system for stability. In addition, we investigated the physiological functionalities of Ogaja-derived pigment and prototypes.

3. Results and discussion

In order to develop Ogaja or Gondre-based Makgeolli, we determined the mixture rate of main materials (potato and rice), the additional ratio of Ogaja or Gondre, and rate of water. Fermentation profiles such as alcohol, pH, acidity, and reducing sugar (RS) were measured in each experimental condition, elucidating the final recipe and producing the prototypes of Makgeolli. Gondre Makgeolli has an alcohol content of 6% and was released to domestic market. Ogaja Makgeolli will be launched at next year. In addition, prototype of Ogaja brandy was made by distillation methods using Ogaja Makgeolli. To develop Ogaja-based cereal beverage, rice was treated by heating and saccharified by adding enzyme-extract, elucidating final recipe and producing the prototype with Ogaja extract. Enzyme extract has been used as malt that was extracted and filtered in room temperature.

Anthocyanin isolated from native ogaja (*Acanthopanax sessiliflorus*) fruit extract was highly purified using a recycling prep-HPLC, which was structurally identified with HPLC-MS and NMR analysis. As a result, the mass-to-charge ratio (m/z) of the colorant was determined to be 581, and it was identical to molecular mass of cyanidin-3-*O*-sambubioside (Cya-3-*O*-sam). The acid-hydrolyzed purified colorant fraction was analyzed by TLC and HPAEC analyses, with the consequence that the sugar moieties linked to aglycone was xylose and glucose. The linkage patterns among sugars and core cyanidin structure were determined by H- and C-NMR analyses. The effect of heat, light

and ascorbic acid on anthocyanin stability was investigated during 7-day storage period. Cya-3-*O*-sam (diglycoside) showed improved color stability in response to heat, light, ascorbic acid and with copigments compared to cyanidin (aglycone). In the ultraviolet light exposure for 7 days, cyanidin-3-*O*-sam showed the greater color stability.

Interaction of polyphenols with haze-active protein (HAP) forms a complex, resulting in the formations of haze in the solution and a thin film on the solution surface. These HAP-polyphenol hazes may decrease the bioavailability of valuable proteins and the bioactive functions of polyphenols. Thus, in this study we also investigated the haze formation pattern between food-grade proteins and a polyphenol extract (PE) from an edible berry, and determined the effects of proteolytic enzymes on the HAP-polyphenol haze formation. The haze formation was induced by mixing the PE from ogaja fruit and soy protein isolate (SPI) to be the ratio of 1:1 (v/v) at 0.1% (w/v) level each. This mixture was stored at various temperatures (4, 25, 40°C) for 24 h. A mixture of tannic acid (TA) and gelatin was used as a positive control. The polyphenol-protein mixtures were treated with plant (papain) and bacterial (*Streptomyces griseus*) proteases, and the turbidity change was analyzed at 660 nm using a UV/Vis spectrophotometer. The greatest change in absorbance was observed from the mixture of SPI-PE at 40°C by haze development, while the major cyanidin-3-*O*-sambubioside purified from the PE did not react with both of proteins. When the protein dispersions were treated with the bacterial protease (relative to papain) for 2 h prior to the addition of PE, the haze formation was effectively prevented for both of gelatin-TA and SPI-PE mixtures. In this study, we identified that SPI as a HAP appeared to interact favorably with this specific PE. Our results suggested that the haze formation from protein-polyphenol interaction would be practically reduced by partial hydrolysis of HAP using selected proteolytic enzymes.

The results may provide invaluable information for developing natural colorants from anthocyanin-based compounds and for understating the interaction of this unique colorant with other functional food ingredients.

We investigated the physiological function (anti-cancer and anti-inflammation) and working mechanism of Cyanidin-3-*O*-sambubioside, syringic acid and the prototypes manufactured by using Jeongsun indigenous product. It was observed that the inhibition of blood vessel formation on the CAM and tube formation of Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) by Cyanidin-3-*O*-sambubioside and syringic acid. We identified that motility of cancer cell and activity and expression of matrix metalloproteinase (MMP) were reduced by these compounds in dose-dependent manner. It was observed that Inhibition of blood vessel formation on the Chick embryonic chorioallantoic membrane (CAM) and motility of cancer cell by the prototypes. In addition, to test the inhibitory effects on the inflammation induced by lipopolysaccharide (LPS), we measured the production of nitric oxide (NO) from macrophage Raw264.7. NO production, expression of COX-2 and inducible nitric oxide synthase (iNOS) were decreased by the prototypes. These results indicate that Cyanidin-3-*O*-sambubioside and syringic acid exhibit anti-cancer activities by inhibiting

the angiogenesis and metastasis and prototypes manufactured by using Jeongsun indigenous product display anti-inflammatory effects by reducing the NO production and inflammation-inducing factors.

CONTENTS
(영 문 목 차)

Description for submission	1
Summary	2
Summary in English	5
Contents in English	8
Contents	9
Part 1. Introduction	10
1. Backgrounds	10
2. Purpose	11
Part 2. Present status of the techniques	13
1. Domestic and foreign trends in research field	13
2. Expectation effects of technical development	13
Part 3. Methods and Results	14
1. Research section 1	14
2. Research section 2	30
3. Research section 3	37
4. Research section 4	106
Part 4. Evaluation	122
1. Annual evaluation	122
2. Achievement	125
Part 5. Practical use and application	126
1. Plan of practical use and industrialization	126
2. Plan of technical proliferation	127
3. Plan of intellectual property	127
Part 6. Foreign technical information	129
Part 7. References	130

목 차

제출문	1
요약문	2
영문요약문	5
영문목차	8
목차	9
제 1 장 연구개발과제의 개요	10
제 1 절 연구개발의 필요성	10
제 2 절 연구개발의 목표 및 내용	11
제 2 장 국내외 기술개발 현황	13
제 1 절 연구개발 대상의 국내·외 기술 현황	13
제 2 절 기술개발의 기대 효과	13
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	14
제 1 절 세부연구과제	14
제 2 절 제1협동연구과제	30
제 3 절 제2협동연구과제	37
제 4 절 제3협동연구과제	106
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	122
제 1 절 연구개발 목표 및 평가 착안점	122
제 2 절 연구개발 목표 달성도	125
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	126
제 1 절 실용화·산업화 계획	126
제 2 절 교육·지도·홍보 등 기술 확산 계획	127
제 3 절 특허·논문 등 지적재산권 확보 계획	127
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	129
제 7 장 참고문헌	130

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1절 연구개발의 필요성

1. 연구개발의 경제적·산업적 중요성

최근, 웰빙 식생활이 문화적 트렌드를 형성하였으며 건강 기능식품 산업이 빠른 속도로 증가하고 있다. 실제로 세계 기능성 식품 시장 규모는 2001년 기준으로 112,280백만 달러의 규모 (식사보충제까지 포함)를 형성하고 있다. 국내의 경우, 지속적으로 시장이 성장하고 있으며 2002년 매출은 1조 5천억 정도로 추정하고 있다. 또한 건강 기능식품에 대해 식품의약품안전청 (KFDA)에서 원료 성분 인정 등 제도적 장치를 구축하였다. 하지만, 지역 특산물 이용한 기능식품은 거의 찾아 볼 수 없는 현실이다.

기능식품에 대한 관심 증가로 다양한 종류의 제품들이 개발되고 있다. 많은 기능식품으로 개발·상품화된 오가피는 식품학적 관점보다 약리학적 연구부터 시작되었다. 오가피 뿌리에서 분리된 lignin계 배당체의 생리활성 연구, 오가피의 항암 및 수명연장 효과 등 연구가 수행되었다. 지금까지 오가피 생리활성에 관한 연구는 주로 잎, 줄기, 뿌리를 주소재로 진행되었으며, 식품 가공도 주로 줄기를 활용하는 방향으로 이루어졌다. 하지만, 본 연구에서 개발하고자 하는 오가피열매 (이하 오가자) 및 색소체는, 식품 소재 및 생리활성에 관한 연구도 전무한 상황이며, 극히 일부만이 식용으로 소비되고 있다.

강원도 정선군에서 정선군농업기술센터가 주축이 되어 오가피를 정선군의 특화작목으로 선정하고, 오가자 수율이 높은 품종의 육종 및 가공 식품의 개발 등에 대한 다양한 연구를 실시하여 오가자를 사용하여 과실주를 제조하는 기술을 확립하고, 기술내용에 대하여 국내 특허(특허공고번호: 1006437350000) 획득과 함께 PCT 출원 및 미국, 일본, 러시아, 중국, EU 출원을 통하여 오가자를 산업적으로 활용할 수 있는 기반 경쟁력을 확보하였다. 이 기반 기술을 실질적인 농가 소득 증대로 연계시키기 위하여 육종된 품종의 농가 보급 및 재배 기술 제공을 통한 오가자의 안정적 생산기반을 마련하였으며, 과실주 제조를 위한 가공시설을 구비하여 오가자를 활용한 과실주 제조의 산업화 기반을 구축하였다. 정선군의 오가자에 대한 연구·투자의 성과를 기반으로 국순당은 오가자 과실주 산업화를 위한 협약을 체결하고, 정선군 내 오가자 생산 농민들과 국순당이 참여하여 오가자과실주 제조 및 판매를 위한 농업회사법인국순당정선명주(주)를 설립하여 2006년 8월 1일 “오가명작” 브랜드로 오가자 과실주를 출시하였다. 이 사업은 지자체 기반 기술 제공, 농민의 원료 제공 및 지역 주민의 고용 창출, 기업의 생산 기술과 영업·마케팅 및 자본 제공과 더불어 대학의 연구력 등이 결집함으로써 서로가 상생할 수 있는 새로운 농업 정책의 방향을 제시하는 효시가 되었으며, 시장 확대에 따라 실질적인 농가 소득 증대를 기대할 수 있을 것이다. 현재, 원료인 오가자는 1kg 당 2만원에 수매하고 있으며, 분석결과 농가에서는 평당 0.4kg 생산, 10a당 조수입 2,400천원, 소득 1,700천원으로 평가되어 지역특화작물로서의 가능성이 증대되고 있으며, 오가자 수확량은 매년 약 30~50%로 증가하고 있어 2006년도 수확량 7.3톤, 2007년 9.5톤이 전량 수매되어 과실주 원료로 사용되고 있으며, 수년 후 오가자 수확량 증대에 따른 신규 수요처 개발이 필요한 실정이다.

일명 곤드레로 잘 알려진 고려엉겅퀴(*Cirsium setidens* Nakai)는 국화과에 속하는 다년생 초본으로 우리나라에서만 자란다. 봄철에 어린순을 캐서 나물로 먹기도 한다. 전국 각지에

분포하는 우리나라 특산물의 하나로써 지혈, 토혈, 비혈 및 고혈압의 치료에 이용되어 왔다. 정선군에서는 강원 영서지역 특산물인 곤드레를 이용한 곤드레나물밥을 지역 관광 상품으로 활용하고 있으며, 지역 특화 작물로 육성을 위한 기초 연구를 지속적으로 실시하고 있다.

2. 연구개발의 필요성

이런 이유로 본 연구에서는 지역 특산물인 오가피열매, 곤드레를 활용한 주류 (막걸리 및 브랜드) 및 식품 (곡물음료)의 제품을 개발하고자 한다. 동시에 오가자의 색소체의 안전성 증대 방안을 확립하여 오가자를 활용한 제품의 품질 증대 추구하고 더불어 오가자를 활용한 제품과 색소체의 생리 기능 활성 (항암-신생혈관억제, 항염증) 규명을 통한 시제품의 건강지향적 고부가가치를 제공하며 새로운 기능식품의 시장을 개척하고자 한다.

제 2절 연구개발의 목표 및 내용

1. 연구개발의 최종목표

가. 연구개발의 최종목표

- ◇ 오가자 및 고려엉겅퀴를 활용한 시제품 개발 (막걸리 등 5제품) 및 상품화를 위한 특허 출원 1건 이상
- ◇ 오가자 색소체 분리·동정 기술 개발을 통한 SCI급 논문 1편 이상 발표
- ◇ 색소체 성분의 이화학적 안정성 확보를 통한 제품의 품질 향상 공정개선 확립
- ◇ 오가자를 활용한 제품 및 색소체의 항염증·항암 (혈관신생억제) 활성 규명을 통한 SCI급 논문 2편 이상 발표

나. 연구개발의 성격

- ◇ 정선군 특산물인 오가자와 고려엉겅퀴를 이용한 주류 (막걸리 및 브랜드) 및 곡물음료를 개발하여 상품화의 가능성을 타진하고 오가자 색소체의 안정성 향상 기술개발을 통한 개발된 제품의 품질 향상을 추구하는 실용화 연구개발이다.
- ◇ 또한 이들 제품과 색소체의 생리 기능 활성 기전을 규명으로 웰빙/고부가가치 컨셉을 부여할 계획이다.

2. 연구개발의 목표 및 내용

<세부연구과제>

- ◇ 오가자(오가피 열매) 및 고려엉겅퀴 등을 활용한 기능성과 특색을 보유한 오가자·고려엉겅퀴 (곤드레) 막걸리 개발 및 상품의 해외 수출 가능성 타진
- ◇ 오가자 발효 원주를 증류한 세계 유일의 오가자 브랜드의 시제품 개발

<제1 협동연구과제>

- ◇ 오가자 추출물을 이용한 적용 상품 (곡물음료) 개발 및 특허출원

<제2 협동연구과제>

- ◇ 오가자 색소체 정제 공정 개발 및 오가자 색소체 안정성 개선 기술 개발
- ◇ 오가자 적용 제품 중 색소체의 이화학적 안정성 개선 공정 개발 및 품질 개선

<제3 협동연구과제>

- ◇ 오가자를 활용한 주류 및 곡물음료의 항염증 및 항암-혈관생성억제 활성 규명
- ◇ 오가자 색소체의 항염증 및 항암 활성 규명을 통한 상용화 컨셉 개발
(항암-암세포 증식, 이동, 및 전이 등 암예방/항암 활성의 기작을 규명)

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 연구개발 대상의 국내·외 기술 현황

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
(주)래디안	생약초 건강 기능성 시제품 개발	오가자를 이용한 시제품 개발 가능성 확인
정선군농업기술센터	오가피를 활용한 요리 개발	오가자차, 밥, 빵, 장아찌 등 가정용 음식 개발
서울대 천연물과학연구소	오가자 추출물이 in vivo 상에서 암세포 성장을 억제함을 확인	논문 게재
서울대 천연물과학연구소	민오가피열매와 오가와인 중의 elutheroside를 정량하여 원재료의 성분이 가공후에도 존재함을 확인	논문 게재
한림대 및 강원대 (주)삼양식품	고려엉겅퀴 및 컴프리를 이용한 양조간장의 개발	고려엉겅퀴를 이용한 양조간장 개발
강원대 및 강원도 보건환경연구원 정선군농업기술센터	부위별 고려엉겅퀴(<i>Cirsium setidens Nakai</i>)의 이화학적 성상 및 항산화 활성 효과	논문 게재
(주)국순당	탁주의 제조방법	국내 특허 출원

제 2 절 기술 개발의 기대 효과

1. 기술적 측면

- ◇ 정선군 특산물을 이용한 농민소득 증대를 위한 다양한 제품 개발 기술 확립
- ◇ 오가자 색소체 분리/정제 기술 확립 및 적용 제품의 품질 안정성 기여
- ◇ 오가자 색소체의 기능성 규명을 통한 상용화 컨셉 개발
- ◇ 제품 및 색소체의 기능성 규명을 통한 다양한 기능성 연구 기술 확립을 통한 관련 부가가치 제고

2. 경제적·산업적 측면

- ◇ 정선군 특산물 (오가자/고려엉겅퀴)를 이용한 시제품 개발
- ◇ 시제품의 상품화·사업화 추진 시, 지역 생약초 재배 농업인의 소득 증대, 정선군 지역 특산물의 안정적 판로 확보 및 관광상품 개발을 통한 지역경제 활성화 기여
- ◇ 제품개발을 위한 특허 출원을 통한 지적 재산권 확보
- ◇ 정선군 특산물 적용 제품의 생리 기능활성 규명으로 통한 웰빙 컨셉 부여 및 고부가가치 이미지 창출

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절

세부과제: 오가자·고려영경귀 막걸리 및 브랜드의 개발

- 국순당정선명주(주) 홍 동 의

1. 오가자/곶드레 막걸리 recipe 개발

1) 감자와 쌀의 혼합 비율 결정

- 전통적으로 막걸리 원료로 널리 사용되어 온 국내산 백미를 주원료로 하여 정선 특산품의 하나인 감자를 부원료로 사용하고자 쌀과 감자의 적절한 혼합 비율을 설정하여 안정적이며, 고효율의 발효 조건을 설정하고자 함.(이때 사용된 누룩의 양은 원료량의 2%를 사용함.)
- 강원도 정선의 특산품인 감자를 사용할 수 있는 한 다량 하고자 발효가 안정적이며, 고알코올이 생성될 수 있는 Fig. 3의 배합비를 선정하여 세부적인 혼합비율을 조정함.(그림에서 R.S.는 reducing sugar 임.)

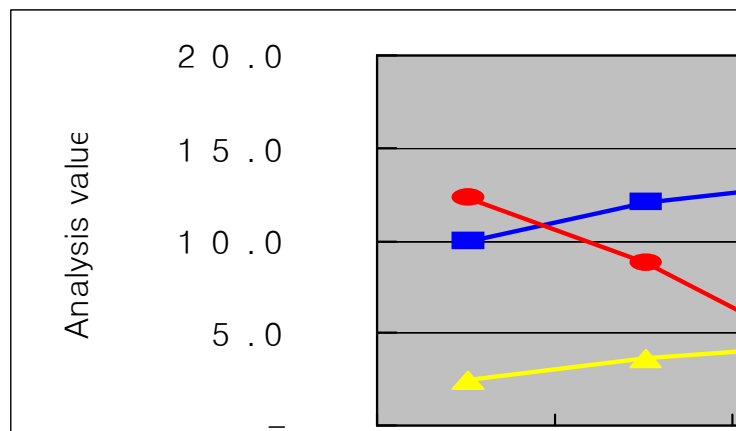


Fig. 1. Alcohol fermentation data on the mixture ratio of the rice 86% versus potato 14%.

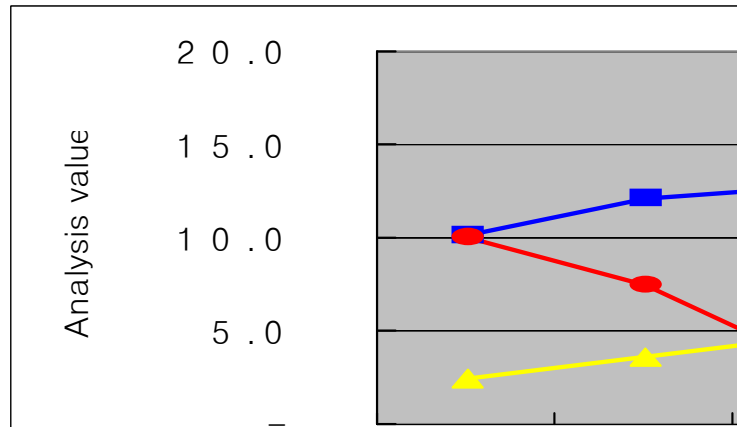


Fig. 2. Alcohol fermentation data on the mixture ratio of the rice 79% versus potato 21%.

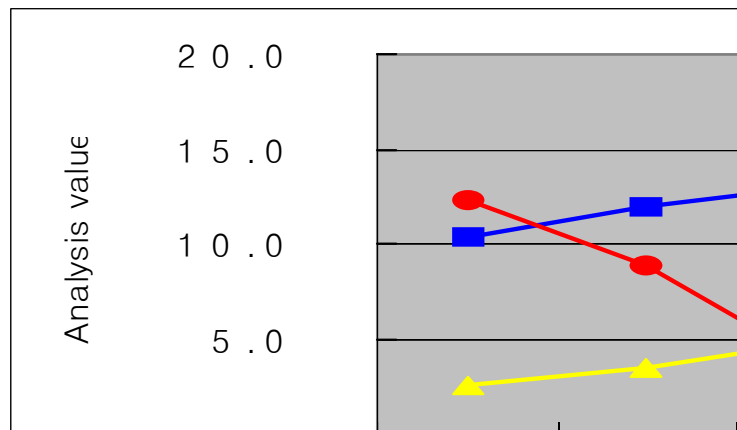


Fig. 3. Alcohol fermentation data on the mixture ratio of the rice 72% versus potato 28%.

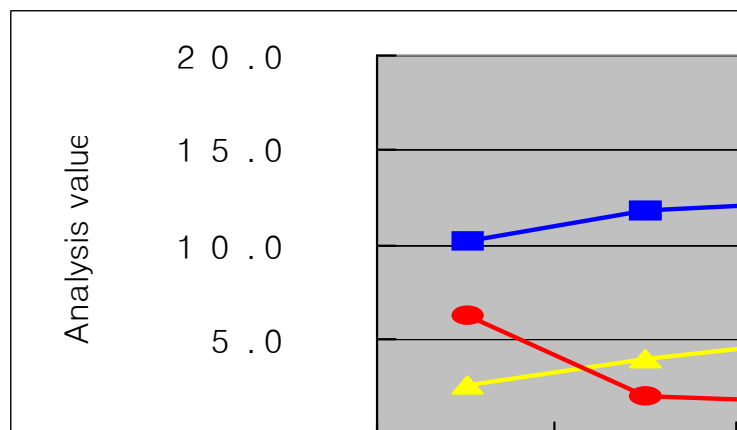


Fig. 4. Alcohol fermentation data on the mixture ratio of the rice 65% versus potato 35%.

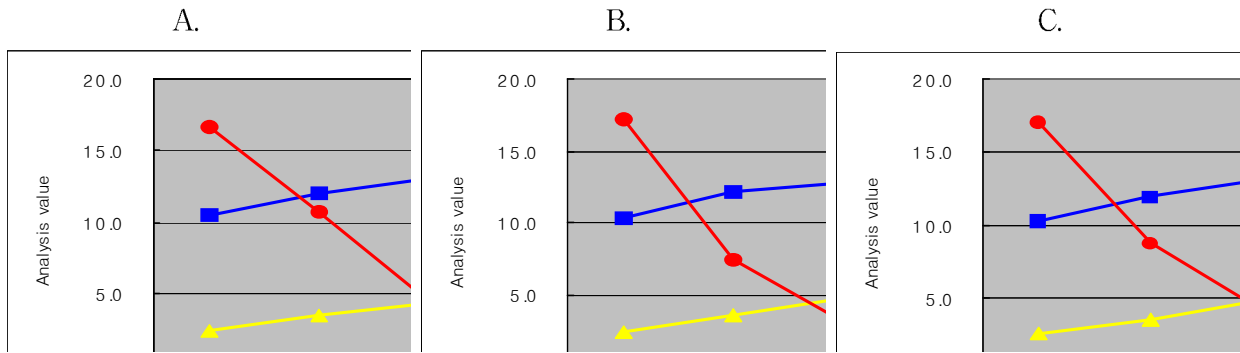


Fig. 5. Alcohol fermentation data on the mixture ratio detailed of the rice versus potato. (A; rice 77% vs potato 23%, B; rice 75% vs potato 25%, C; rice 73% vs potato 27%, -■-; alcohol concentration(%), -●-; reducing sugar(mg/mL), -▲-; acidity)

- Fig. 3에서 선정한 배합비를 세부적으로 선정하기 쌀과 감자의 혼합비를 각각 77%: 23%, 75%: 25%, 73%: 27%로 설정하여 발효경과를 분석한 결과 Fig. 5와 같은 결과가 나타난 바, 안정적인 발효 경과를 나타내면서(산도 5이하), 감자를 가능한 많이 사용되는 실험구 B(쌀 75%: 감자 25%)를 적절한 혼합비율로 설정함.

2) 담금 급수 비율 결정

- 안정적인면서 고효율의 발효 조건을 설정하고자 담금 시 사용되는 물의 양을 결정하기 위하여 원료에 대한 급수 비율을 각각 100%, 75%, 50%, 25%로 설정하여 실험한 결과(Fig. 6, 7, 8, 9), 안정적인 발효 패턴을 나타내는 원료 대비 급수율 75%로 설정함.(Fig. 7).
- 또한 발효가 종료된 술덧을 제성하여 관능 평가한 결과 원료 대비 75%로 물을 첨가하여 발효시킨 나주가 가장 우수한 관능 평가 결과를 나타냄.(data 생략 함.)

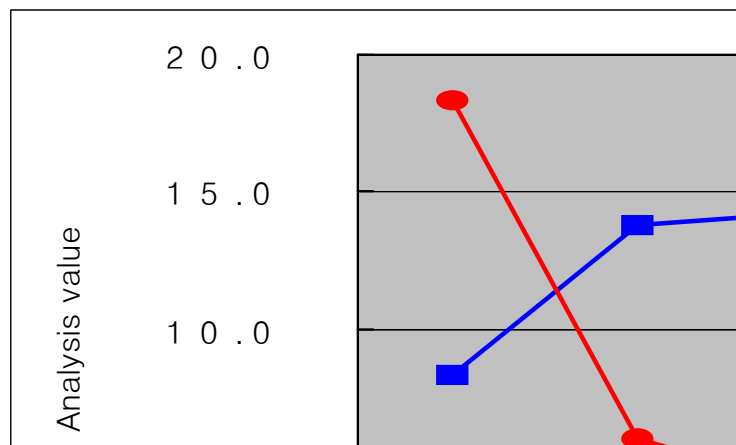


Fig. 6. Alcohol fermentation data on the ratio of water added 100% to the cereals.

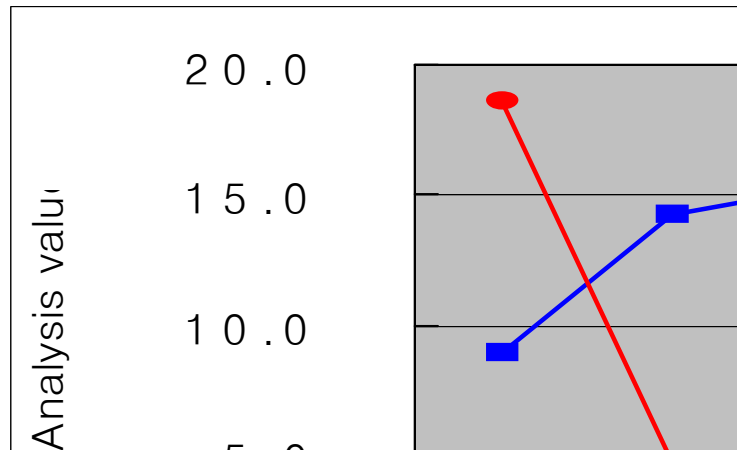


Fig. 7. Alcohol fermentation data on the ratio of water added 75% to the cereals.

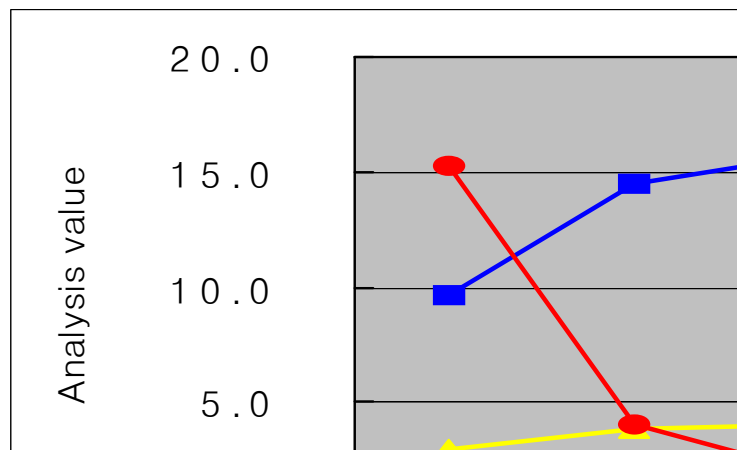


Fig. 8. Alcohol fermentation data on the ratio of water added 50% to the cereals.

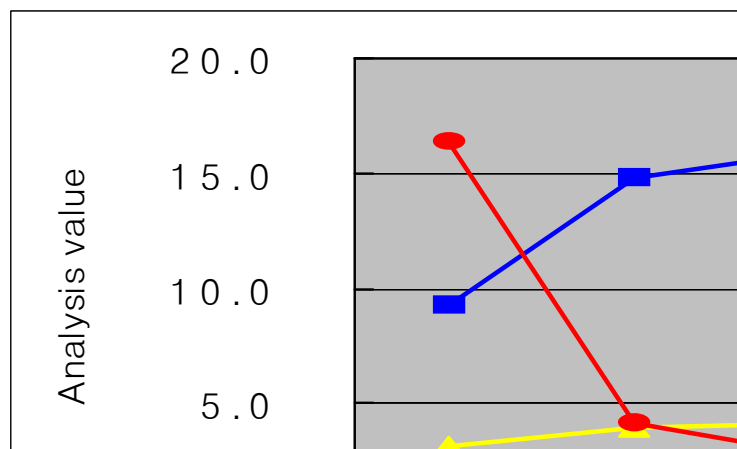


Fig. 9. Alcohol fermentation data on the ratio of water added 25% to the cereals.

3) 오가자 첨가 비율 결정 및 전처리 방법

- 급수율이 결정된 발효 조건에 오가자 첨가량을 결정하기 위하여 술덧의 곡류 사용량에 대하여 1.7%, 2.0%, 2.3% 농도로 각각 첨가하여 발효경과를 분석하고, 발효가 끝난 후 가장 기호성이 높은 실험구를 선정하였는 바, 발효 프로파일은 첨가량에 관계없이 매우 유사한 경향을 나타내었으며, 제성 후 색감을 비교한 결과 Fig. 13에서 보는 바와 같이 첨가량에 관계없이 매우 기호성이 높은 색감을 나타내었으나, 관능적으로 가장 무난한 오가자 첨가량 2.0%를 선정하였다.
- 오가자 전처리 방법 : 오가자는 재배 및 수확 후 완전 건조 상태로 구매를 하고 습기가 없게 보관하여 담금시 전처리하여 담금한다. 또한 오가자의 성분과 색도가 안정적으로 추출해낼 수 있는 방법을 여러 가지 방법으로 시도하였고, 그 중 냉수에서 추출하는 것이 가장 좋은 방법으로 나타났다. 그러므로 담금시 오가자가 팽윤이 될 때까지 냉수에 침지하여 팽윤이 완료되면 압착하여 오가자 추출액을 제조하여 담금한다.

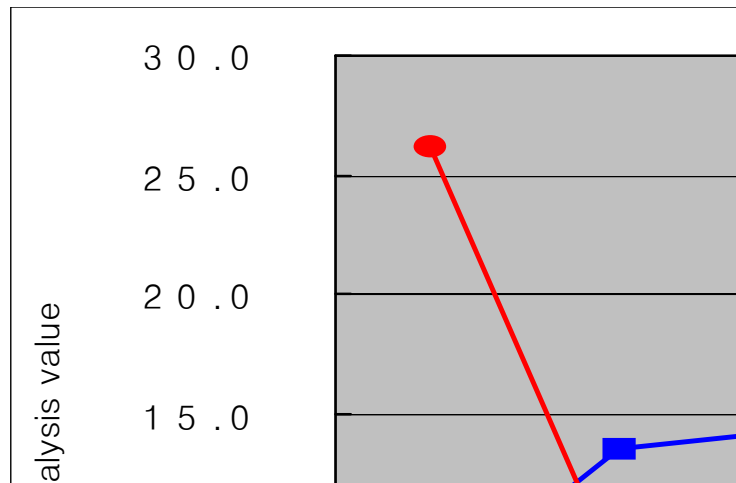


Fig. 10. Alcohol fermentation data on the ratio of Ogaza added 1.7% to the cereals.

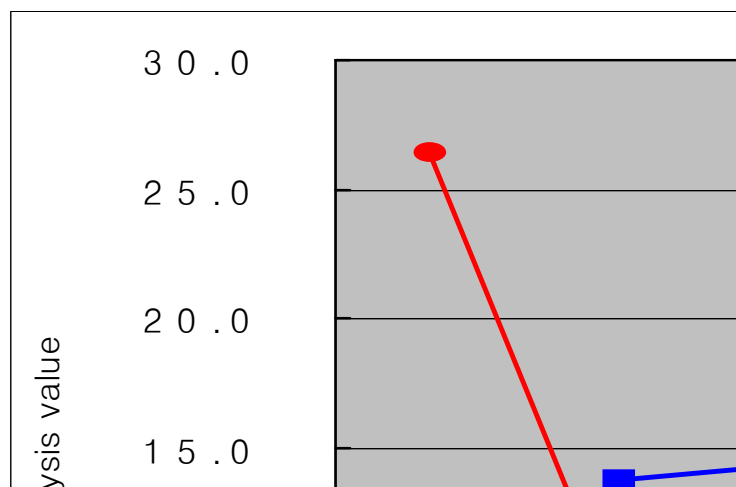


Fig. 11. Alcohol fermentation data on the ratio of Ogaza added 2.0% to the cereals.

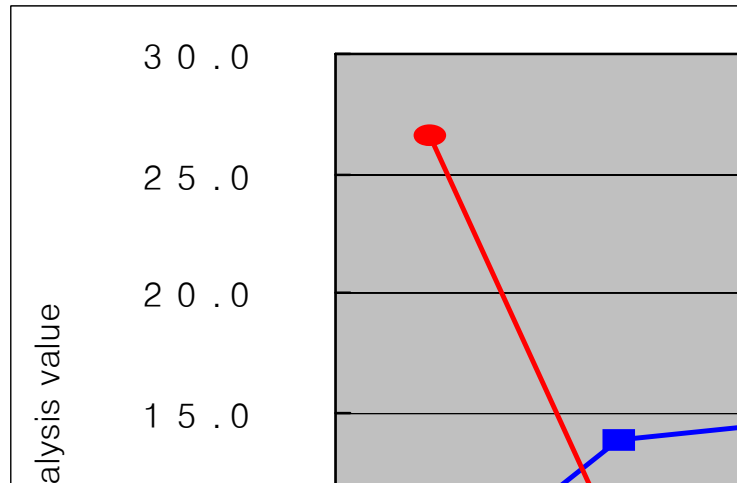


Fig. 12. Alcohol fermentation data on the ratio of Ogaza added 2.3% to the cereals.



Fig. 13. Ogaza makgolli picture on the ratio of Ogaza added to the Moromi.
(A; 1.7%, B; 2.0%, C; 2.3%, D; no addition)

4) 곤드레 첨가 비율 결정 및 전처리 방법

- 급수율이 결정된 발효 조건에 곤드레 첨가량을 결정하기 위하여 술덧의 곡류 사용량에 대하여 1.0%, 2.0% 농도로 각각 첨가하여 발효경과를 분석하고, 발효가 끝난 후 가장 기호성이 높은 실험구를 선정하였는 바, 발효 프로파일은 첨가량에 관계없이 매우 유사한 경향을 나타내었으며, 제성 후 색감을 비교한 결과 Fig. 16에서 보는 바와 같이 첨가량에 민감하게 색감을 나타내었는 바, 관능적으로 가장 양호한 곤드레 첨가량은 1.0% 농도로 결정하였다.
- 곤드레 전처리 방법 : 잘 건조되고 이물질(낙엽 등)이 섞이지 않은 곤드레를 구매하여 보관시에도 습기에 노출되지 않도록 밀봉하여 보관하고 담금 투입전 분쇄하여 쌀 증자시 증자기에 투입하여 증자 후 담금한다.

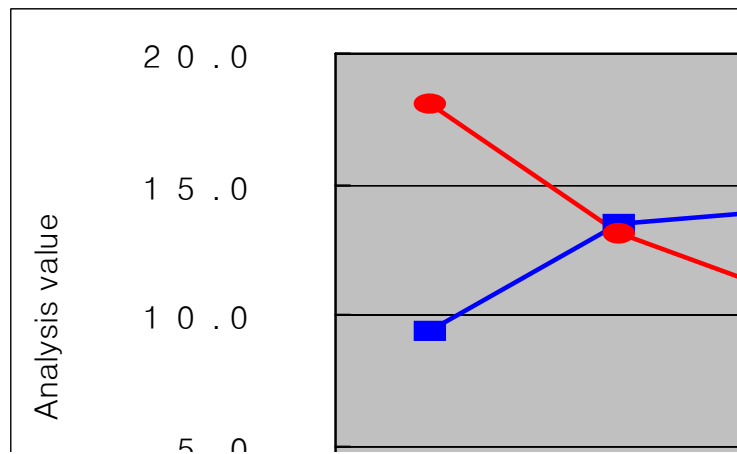


Fig. 14. Alcohol fermentation data on the ratio of Gondre added 1.0% to the cereals.

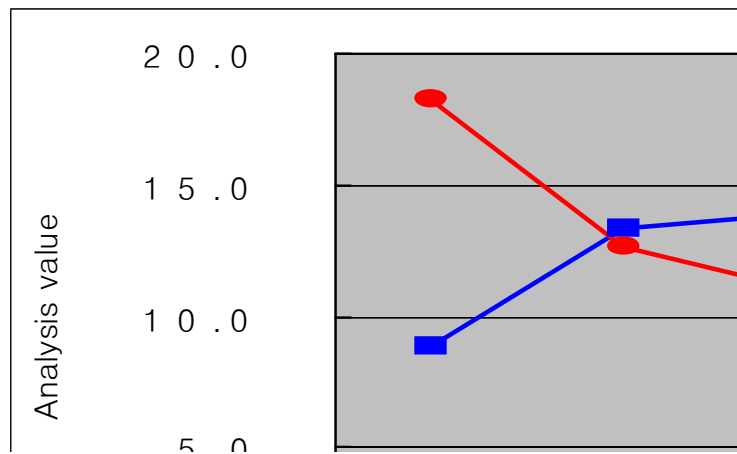


Fig. 15. Alcohol fermentation data on the ratio of Gondre added 2.0% to the cereals.



Fig. 16. Ogaza makgolli picture on the ratio of Ogaza added to the Moromi.

(A; ogaza 1.0%, B; ogaza 2.0%, C; no addition)

2. 생산 공정 적용 및 시제품 개발

1) 생산 공정 적용을 위한 오가자의 색안정성 측정

- 오가자의 주요 색소 성분은 anthocyanin 계열의 색소로 구성되어 매우 안정성이 약한 상태로 존재하는 바, 발효 중에 색소의 파괴 여부를 측정하고자, 일반 막걸리의 환경보다 2배 가혹한 조건에서(알코올 농도 14%, 산도 7.0), 65℃에서 15분간 살균된 막걸리와 미살균 막걸리를 10℃ 이하 냉장 저장하면서 일반분석(알코올, 산도, 당도) 및 색도 변화를 관찰하였다.
- 일반분석 항목인 알코올, 산도는 유의적 변화를 나타내지는 않았으나(Fig. 17, 18), 탁도의 경우 미살균 실험구에서 증가하는 추세를 나타내었는 바(Fig. 19), 이는 오가자의 여타 성분이 알코올에 의하여 침전되어 나타난 것으로 판단되며, 13주차까지는 허용범위인 탁도 3 이하인 것으로 보아, 제품 유통기한 중에는 영향이 없을 것으로 판단됨.(미살균 탁주의 경우 유통기한 2개월 이내)
- 색도의 변화를 측정한 결과 살균 및 미살균 모두의 실험구에서 실험기간 4개월 동안 유의적인 변화를 나타내지 않아 냉장조건 하에서는 매우 안정한 색안정성을 나타내어 냉장 유통되고 있는 생탁주에 사용 시 유통기한 내 색의 변화에 의한 품질 열화는 없을 것으로 판단됨.(Fig. 20, 21)

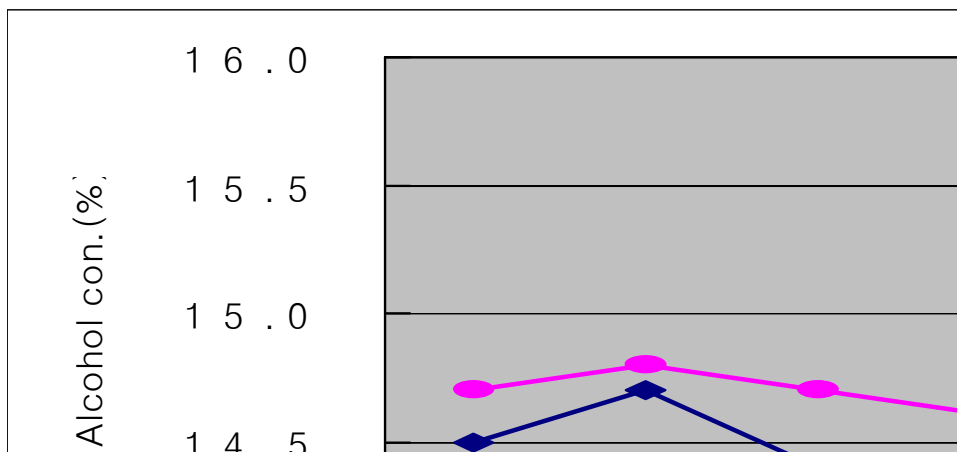


Fig. 17. Change of alcohol concentration in storage condition of 10℃ temp.
(-◆-; no-pasteurization, -●-; pasteurization)

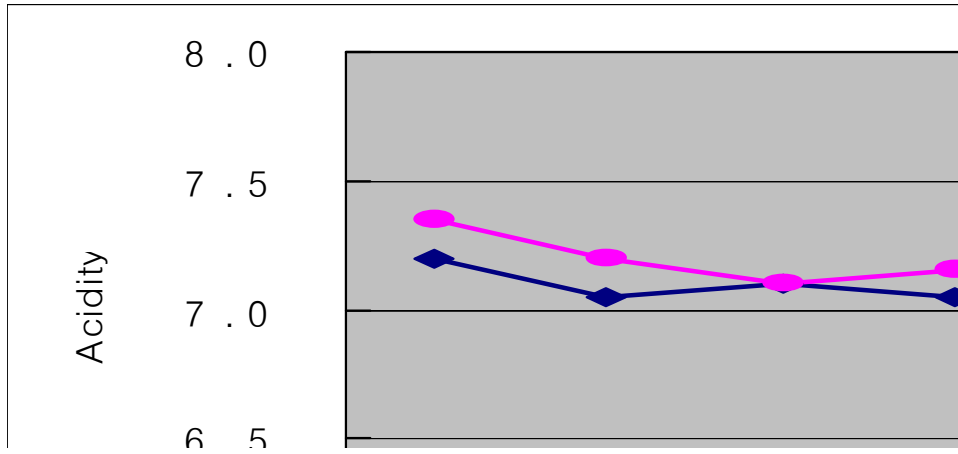


Fig. 18. Change of acidity in storage condition of 10°C temp.(-♦-; no-pasteurization, -●-; pasteurization)

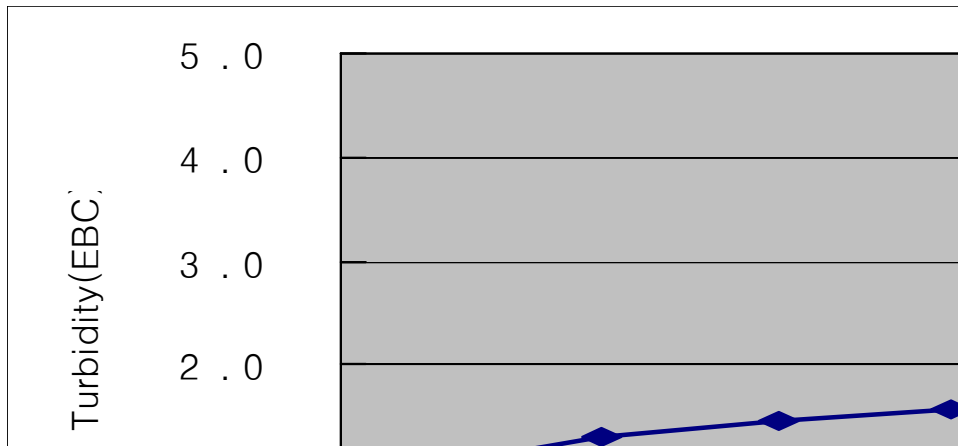


Fig. 19. Change of turbidity in storage condition of 10°C temp.(-♦-; no-pasteurization, -●-; pasteurization)

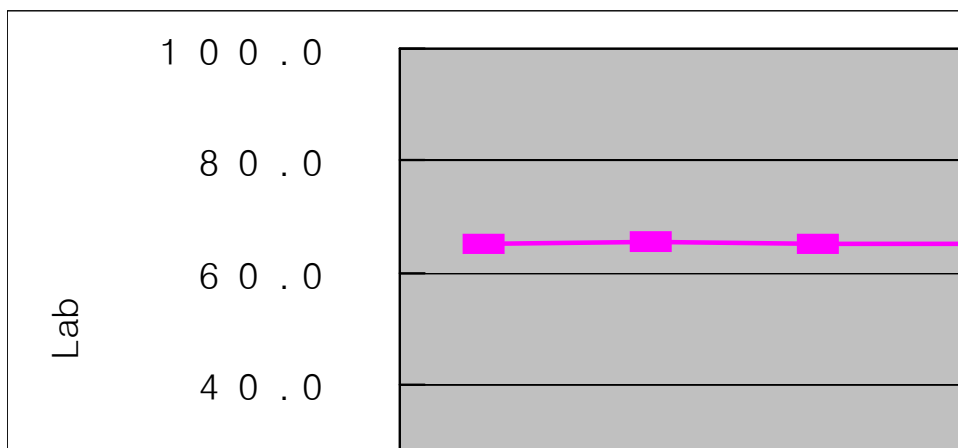


Fig. 20. Change of Lab value in storage condition of 10°C temp. of Makgoli non-pasteurized.

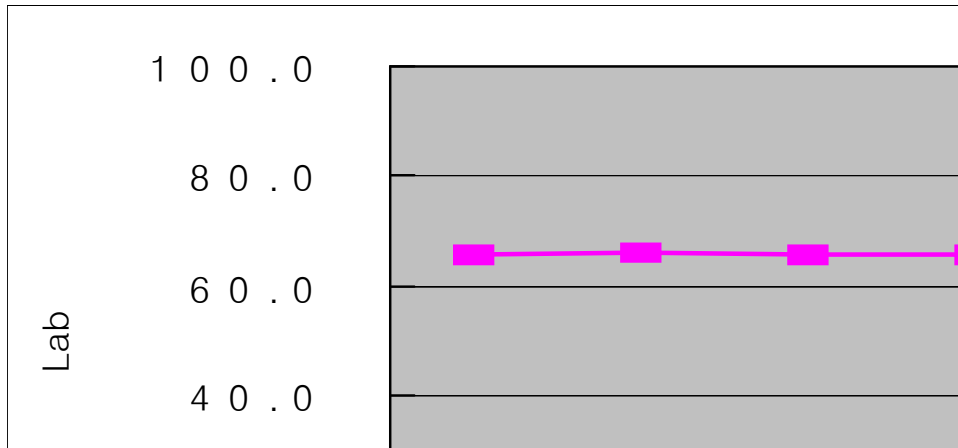


Fig. 21. Change of Lab value in storage condition of 10°C temp. of Makgollı pasteurized.

2) 오가자 및 곤드레 막걸리의 시제품

- 오가자 및 곤드레 막걸리의 시제품의 포장재 및 제품 규격 설정

Kind of Makgeolli	bottle mat'l	volume(mL)	alcohol con't(%)	Acidity
Ogaza	glass	360	6.0	3.0
	pet	500	6.0	3.0
	pet	1,000	6.0	3.0
Gondre	glass	360	6.0	3.0
	pet	500	6.0	3.0
	pet	1,000	6.0	3.0

3) 관능품질 변화 검토

- 온도 : 저장온도가 낮을수록 관능품질의 변화가 없는 것으로 판단됨

- 기간 : 저장기간이 길어질수록 과실취가 감소되었고 쌀취가 풍부해지고 신맛이 끌림

※ 검토사항 : 관능품질의 검사가 Blind test로 진행되더라도 패널의 감정/몸 상태에 따라 변수가 생길 수 있고, 관능품질 검사 제품 및 시료의 보관 상태에 따라서 상이한 결과가 나타날 수 있으니 패널들은 많은 경험을 축적하여 관능품질을 정형화된 검사를 진행 할 정도의 실력을 갖추어야 할 것이며, 시료를 보관시에도 여러 조건을 설정하여 다양한 유통 occasion에 대응하여야 할 것으로 판단됨.



Fig. 22. Prototype picture of Ogaja and Gondre Makgoli

③ 곤드레 막걸리 제품 출시

- 2009. 10. 5. '정선명주 생막걸리 곤드레' 제품 출시

: 용량 1,000mL, 알코올 6.0%, 라벨: shrink film, 용기: PET, 캡: 내압캡



Fig. 23. Product picture of Gondre makgollari

3. 오가자를 활용한 브랜드 개발

1) 실험방법

가. 오가자 추출액 제조

원료인 오가자는 자체 생산된 열매를 자연 건조한 후 진공 포장하여 보관하면서 사용하였다. 과실주 발효는 건조 오가피 중량 대비 5배의 상온수를 가하여 3시간 방치한 후 추출 수율을 높이기 위하여 Chopper로 으갠 다음 압착하였다.

나. 과실주 발효

발효는 오가피 추출액에 당분과 효모를 첨가하여 술 덩의 온도가 18℃로 유지되도록 조절하면서 10일간 발효시켰다. 당분의 첨가량은 오가피 추출액의 총 당분 중량과 첨가하는 당분 중량 합계에 70%가 되도록 하였다.

다. 증류

발효가 종료된 오가피 과실주를 동고리를 이용한 상압 증류와 Stainless Steel 재질의 감압 증류를 비교하였다. 시료는 알코올 농도는 10.5%, 용량은 6,000ml의 오가자 발효 과실주를 사용하였다.

1차 증류한 증류주의 알코올 함량이 낮아 2차 증류를 실시하였으며, 증류액 100ml씩 분획하여 알코올 함량을 부침법에 의하여 측정하였고, 상압 1, 2차 증류 및 감압 1차 증류의 증류 수율을 측정하였다.

감압 증류의 감압은 650mmHg로 실시하였다.

라. 숙성

2차 상압 증류한 각 분획 증류주중 1번 분획분과 분획 증류주중 알코올 농도가 15% 이하를 제외한 분획 분만을 회수하여 Oak Chip을 증류주에 0.3%를 첨가하여 상온에서 숙성시켰다.

2) 실험결과

가. 오가자 추출 수율, 추출액의 당분 함량 및 보당 후 당분 비율

압착 수율은 약 57% 내외였다. 추출 수율 = 추출액 ÷ (건조 오가피 중량 + 추출 수) × 100으로 계산하였다.

오가피 추출액의 당분 함량은 약 7% 내외였고, 당분 첨가 후의 당 농도는 약 21% 내외로 측정 되었다.

나. 오가자 과실주 발효 술 덩 분석

보당한 오가자 과실주의 발효 술 덩의 최종 알코올 함량은 약 10.5% 내외로 분석되었다. 발효 경과를 표 1과 같다. 산도는 여과한 발효 술 덩 10ml을 중화시키는데 소요된 0.1N-NaOH 소비ml수 직당은 국제청지술연구소의 직당 분석 방법에 준하여 측정하였다.

표 1. 발효일수에 따른 일반 성분 변화

	알코올 (%)	산도	직당 (mg/ml)
1일차	0.9	3	152
2일차	4.0	4.1	94
3일차	6.0	4.2	40
4일차	7.9	4.5	2
5일차	8.7	4.5	2
6일차	9.4	4.5	2
7일차	9.8	4.5	2
8일차	10.1	4.5	2
9일차	10.4	4.5	2
10일차	10.5	4.5	0

다. 증류방법에 따른 증류 패턴 변화

증류 방법에 따른 증류 용량별 알코올 변화를 Fig. 24에 나타내었다.

상압 증류 1차 증류하여 회수한 증류주의 용량은 2,600ml이었고, 알코올 함량은 약 22.5%로 측정되었다.

상압 증류를 3회 실시하여 회수한 증류주를 2차 증류를 실시하였으며, 이때 시료의 알코올 농도는 22.5%였고, 용량은 1차와 동일한 6,000ml을 사용하였다.

2차 상압 증류주는 2,900ml를 회수 하였으며, 알코올 농도는 43.8%로 측정되었다.

증류 수율은 1차 증류에서는 약 92.7%였고, 2차 증류에서는 약 94%로 분석되었으며, 최종 증류 비율은 약 87%로 산출되었다. 감압 증류는 상압 증류와 동일한 시료를 7,000ml을 증류하였다. 3,600ml을 증류 회수하였으며, 알코올 농도는 약 25.8% 였고, 증류 비율은 약 94.9%로 산출되었다.

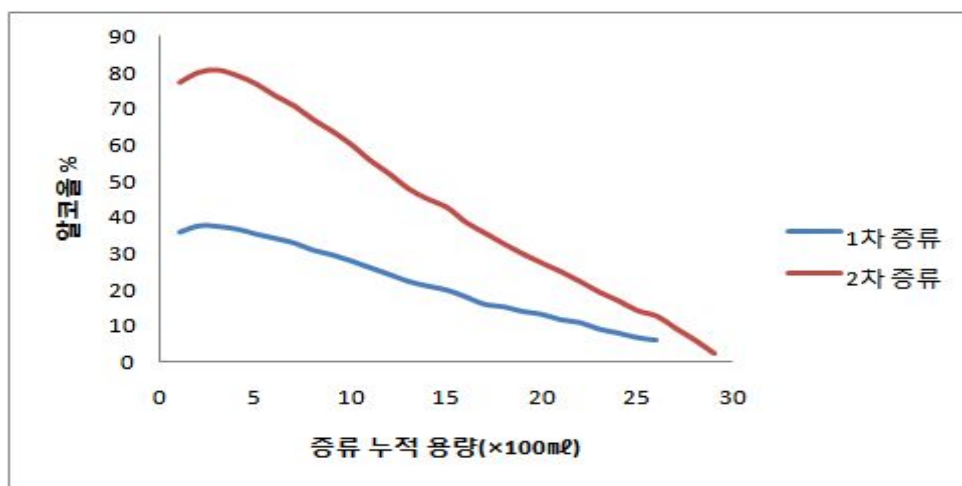


Fig. 24. The pattern of distillation 1

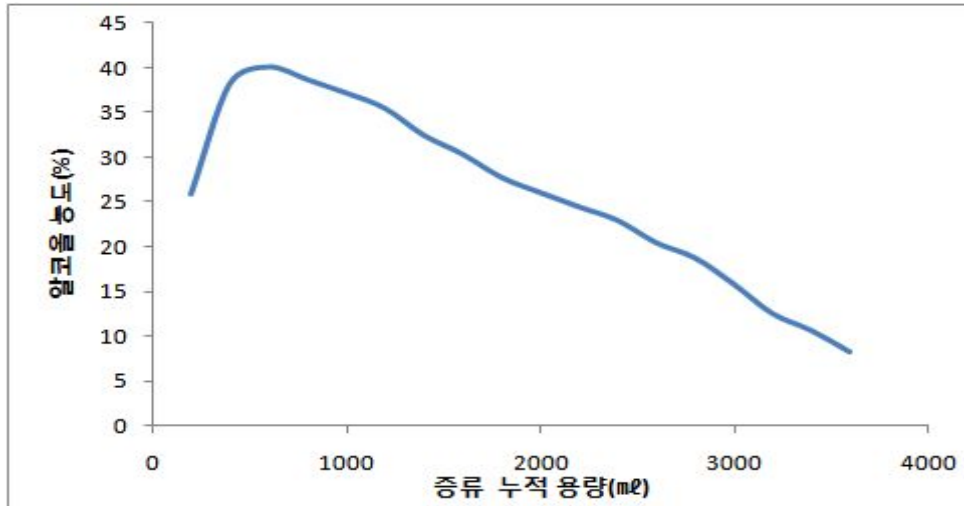


Fig. 25. The pattern of distillation 2

라. 숙성

Oak Chip을 첨가한 증류주 숙성주의 성상은 그림 26와 같다.

3) 고찰 및 결론

상압 증류에서 증류주의 알코올 농도가 약 17%이하에서는 약간의 탄내가 느껴졌다. 실험에 사용한 상압 증류기는 구리재질이며, 직화 방식으로 가열하기 때문에 증류 과정에서 거품이 발생하고, 잔존하는 시료는 감소하기 때문에 증류기 내부 기벽에 고형분이 부착된 상태로 가열되기 때문에 증류 말기에는 탄 내가 증류주에 혼재되었다고 사료된다.

감압 증류는 증류가 시작되는 시점의 증류 술 덂 온도는 40℃였으며, 증류 종료 시점에는 49℃까지 상승하였다.

감압 증류주에서는 후반 증류 분획분에서는 상압 증류에 비하여 탄내가 적었으며, 그 이유는 간접 가열 방식이며, Jacket 부위가 하부에 설치되어 술 덂의 용량이 감소하여도 가열 부위와 접촉되지 않은 이유로 사료된다.



Fig. 26. Prototype picture of Ogaja cereal beverage

제 2 절

제1협동과제: 오가자를 활용한 곡물음료 개발 - 정선군농업기술센터 최대성

1. 실험방법

가. 오가피 추출

오가피 열매는 자체 생산된 열매를 사용하였으며 자연건조 후 진공포장하여 보관하였다(Fig.1). 오가피 추출액은 줄기와 열매의 두 분류를 사용하였으며 오가피 열매는 중량의 20배로 가수하여 상온에서 16~24시간 추출한 후 여과하여 사용하였다(Fig.1). 오가피 줄기는 상온수에서는 추출효율이 낮기 때문에 20배액으로 가수하여 고온고압으로 추출하였다.

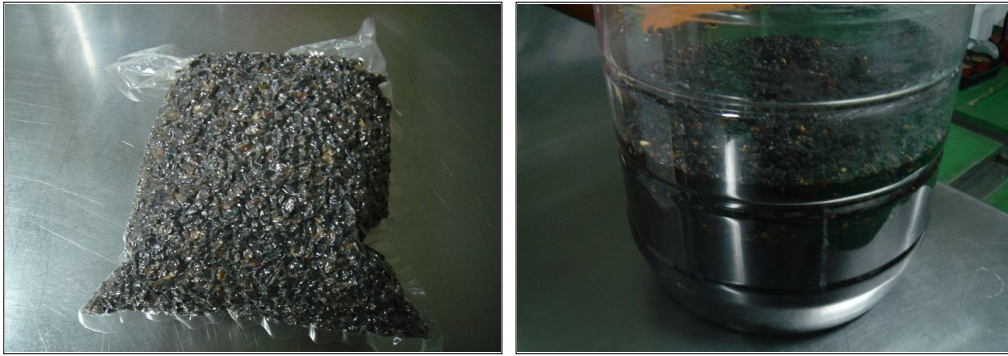


Fig. 29. *Ogaza* and *Ogaza* extraction

나. 효소 추출

엿기름을 5%(w/v)로 2시간동안 상온에서 교반하여 추출한 후 filter paper (Whatman No.2, 8 μ m)로 여과하여 사용하였다(Fig.2).



Fig. 30. Enzyme extraction and filtration

다. 호화

쌀을 깨끗이 씻은 후 2시간 동안 물에 불린다. 1시간동안 물을 빼고 찜통에서 찌서 호화시켰다. 호화시간은 1시간으로 하였다.

라. 당화

당화공정은 아래와 같은 순서로 진행하였다(Fig.3). 백미, 효소추출액 및 정제수를 일정비율로 첨가한 후 온도, 재료비율, 시간 등의 조건변화를 통하여 최적 조건을 찾도록 하였다. 옛기름에서 추출된 효소의 초기 활성화를 위하여 백설탕으로 1%Brix의 농도로 맞춰준 이후에 당화를 시작하였다. 당도는 상온에서 휴대용 굴절당도계(LINK, RHB-32)를 이용하여 측정하였다.



Fig. 3. saccharification process

2. 실험결과

가. 온도 및 시간에 따른 변화

온도와 시간에 따른 당도변화를 살펴본 결과, 온도가 증가할수록 당화 속도와 수율이 증가하는 것을 볼 수 있었다(Fig.4).

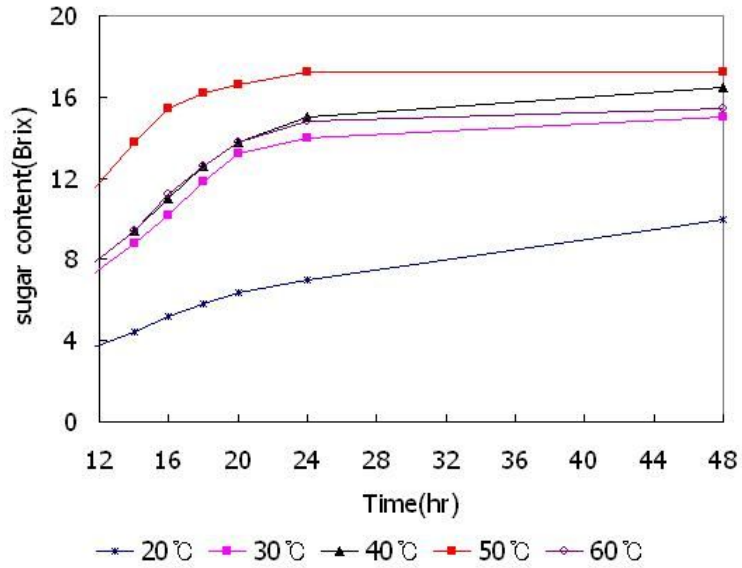


Fig. 4. Effect of temperature on saccharification

50°C에서 가장 높은 당화수율을 보인 이후에 60°C에서는 다시 당화수율이 떨어지는 것을 볼 수 있었다. 위 결과를 통하여 50°C에서 16시간이면 당화가 모두 진행되는 것을 알 수 있었다.

나. 쌀 형태에 따른 변화

호화 이후에 쌀의 형태에 변화를 준 결과는 아래와 같다(Fig.5). 호화 후에 당화효율을 높이기 위하여 쌀을 분쇄한 경우가 당화 속도가 가장 빠른 것으로 나타났으나 쌀이 겔형태로 되어 공정상에 어려움이 있었다. 또한 살균과 병행하기 위하여 고온·고압에서 호화를 진행하였을 경우에는 무처리군과의 차이가 없었다. 하지만 scale-up을 할 경우 생산비를 고려하여 아무런 처리를 하지 않는 것이 효율적이라 판단된다.

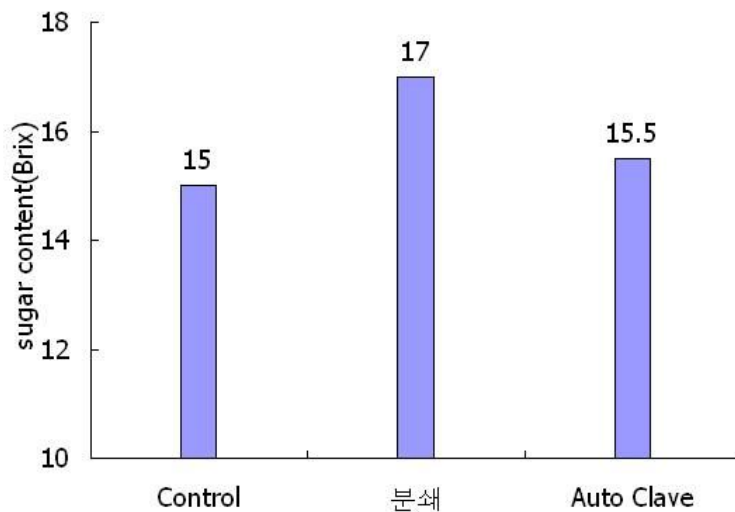


Fig. 5. Effect of shape on Saccharification

다. 추출액 첨가에 따른 변화

추출물의 첨가에 따른 당도변화를 Fig.6에 나타내었다.

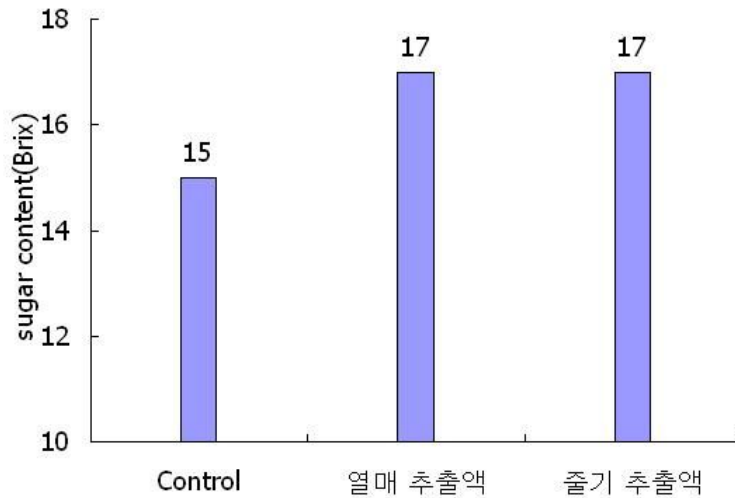


Fig. 6. change by addition of Ogaza extract

각 추출액은 20배액으로 가수하여 추출한 원액을 그대로 사용하여 당도 변화만을 살펴 보았다. 열매와 줄기 추출액을 첨가하여 당화시킨 경우가 무첨가군보다 당도가 2°Brix 높게 측정되었는데 추출액에 소량의 탄수화물이나 당성분이 있기 때문으로 판단된다. 추출물의 첨가에 의한 당도 변화가 크지 않고 이후에 희석하여 추출액을 사용할 것이기 때문에 추출물의 의한 변화는 고려하지 않아도 될 것으로 생각된다.

열매 추출액을 첨가하였을 경우에는 짙은 적색을 나타내었고 줄기 추출액을 첨가하였을 경우에는 옅은 노란색을 나타내었다(Fig.7). 맛에서는 무첨가군은 단맛이 강했지만 추출물을 첨가한 경우에는 모두 쓴맛이 강하였다.



Fig. 7. Saccharification with an additive(Control and Ogaza fruit extract, Ogaza stem extract)

오가피 열매 추출물의 첨가용량에 따른 색상변화를 살펴보기 위하여 열매 추출물을 전체 중량의 0.25%(2g), 0.5%(4g), 0.75%(6g), 1.0%(8g)로 넣어 살펴보았다(Fig.8, 9). 오가피열매 추출물은 동결건조를 통해 고형분으로 만들어 사용하였다. 20배수 가수하여 추출하면 오가피 열매 추출액의 1.57%가 고형분이었다.

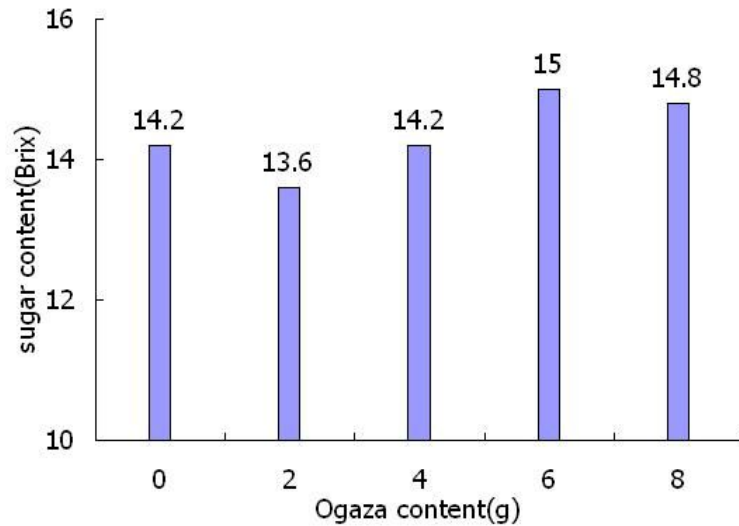


Fig. 8. Effect of Ogaza fruit extract on Saccharification



Fig. 9. Saccharification by Ogaza fruit extract content

당도에는 변화가 없음을 다시 확인할 수 있었고 대조군과 비교하여 0.5%w/w 이상에서 뚜렷한 색의 차이를 보였다. 그러나 붉은 빛의 주류를 이루는 안토시아닌의 특성상 열에 약하여 변색이 심하게 나타났다. 열매추출액을 소량 넣어 당화를 완료한 이후에 열매추출액을 추가 투입하는 것이 색의 조성에 적합할 것으로 판단된다.

라. 백미함량에 따른 변화

적당한 쌀의 함량을 알아보기 위한 실험에서는 쌀의 중량이 전체 중량의 20%(160g) 이상 일때 10°Brix를 넘는 것으로 나타났다(Fig.10, 11). 쌀 중량이 25%(200g)일 때에는 쌀이 불어

음료제조에 부적합하였고 첨가물을 최소화하여 단맛을 내기 위해서는 쌀과 물의 비율이 중량 대비 1:4로 하는 것이 적당할 것으로 판단된다.

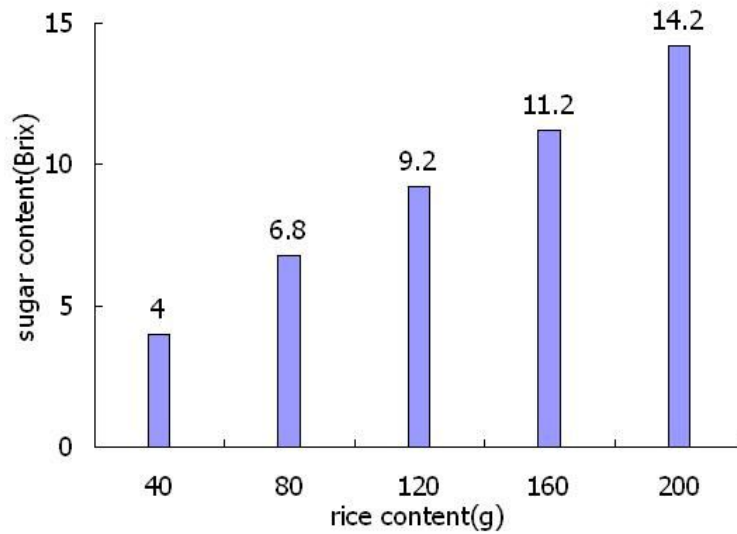


Fig. 10. Effect of rice content on Saccharification



Fig. 11. Saccharification by rice content

3. 고찰 및 결론

- 위 결과를 바탕으로 쌀의 사용량은 전체 중량의 20%로 하였으며 오가피 추출 원액을 희석하여 첨가한 후 50℃에서 16~20시간 동안 당화시켰다.
- 오가피의 추출방법은 질량대비 20배액의 물을 넣고, 열매는 상온에서 하루 동안 추출하

고 줄기는 고온고압에서 2시간동안 추출을 한다.

- 당화가 완료되면 추출원액으로 색을 맞추고 당도 13°Brix가 되도록 당을 첨가한다. 또한 구연산을 0.1~0.2%w/w 첨가하여 색을 뚜렷하게 하고 변색을 방지한다.

- 용기는 유리병 1000ml, 500ml, 180ml과 페트병 500ml을 사용하였다.

가. 오가자 추출물을 첨가한 곡물음료



Fig. 12. Rice beverage added with Ogaza fruit extract

나. 줄기추출물의 첨가한 곡물음료



Fig. 13. Rice beverage added with Ogaza stem extract

제 3 절

제2협동과제: 오가자 색소체의 화학적 구조 동정, 대량생산 및 제품 적용성 향상 방안 탐색 - 세종대학교 유 상 호

I. 오가자 구성성분 정량분석 및 색소체 구조 동정

1. 오가자의 일반성분 및 유효성분의 분석

(1) 오가자 시료 전처리

- 건조된 오가자 200 g을 증류수 1 L를 가해 4℃에서 24시간 용출한 후, 100 mesh 체를 이용하여 과육을 제거한다. 감압여과를 거친 시료를 유리당 분석, 유기산 분석, 아미노산 분석에 이용한다.

(2) 오가자 유리당 분석

1) Sample preparation:

- ① 전처리된 오가자 추출액을 40배 희석 후 0.45 μ L membrane filter로 여과 후 HPLC에 주입.
- ② Standard materials: D(-)Fructose, D(+)Glucose anhydrous, D(+)Galactose (Sigma-Aldrich Chemical Co. MO, USA)

- 분석조건은 Table 1과 같다.

Table 1. Instrumentation and operating condition for SP-LC of ogaja colorant

Instrument	Dionex HPAEC system (DX 600, DIONEX, Corp., Sunnyvale, CA, USA)			
Column	Carbopac PA-1 column (4 Φ ×250 mm, DIONEX)			
Eluents	A: 15 mM sodium hydroxide B: 500 mM sodium hydroxide			
Detector	Dionex ED50 electrochemical detector			
Injection vol.	10 μ L			
Gradient	Time(min)	Flow(mL/min)	%A	%B
Condition	0	1.0	100	0
	35	1.0	0	100
	45	1.0	100	0

2) 오가자 유리당 분석 결과

Table 2. Released amount of free sugars in ogaja water extract.

Free sugars	Unit: mg/100 g
Glucose	218.9 ± 3.47
Fructose	484.9 ± 7.89
Xylose	- (Trace)
Galactose	- (Trace)

- 오가자 물 추출액의 유리당 함량분석 결과는 Table 2와 같다. 오가자 100 g 당 glucose와 fructose가 각각 218.9 ± 3.47 mg/100 g과 484.9 ± 7.89 mg/100 g으로 검출되었다. Xylose와 galactose의 경우, 당 분석 시 기기의 검출한계가 50 pmol 이며, 측정된 피크면적을 pmol 단위로 환산하면 각각 6.41 pmol과 7.71 pmol 이 된다. 이는 분석 시 나타나는 잡음(noise)과 구별하기 어렵기 때문에 xylose와 galactose는 정량이 불가능한 극미량(정량한계)으로 판단된다. 또한 sucrose는 전혀 검출되지 않았다.

(3) 오가자 유기산 분석

1) Sample preparation

- ① 전 처리된 오가자 추출액을 10배 희석 후 0.2 µL membrane filter로 여과 후 HPLC에 주입.
- ② Standard materials: Oxalic acid, Citric acid, Formic acid, Lactic acid, Succinic acid, Acetic acid (Sigma-Aldrich Chemical Co. MO, USA)

- 분석조건은 Table 3과 같다.

Table 3. Instrumentation and operating condition for HPAEC analysis of organic acid.

Instrument	Dionex HPAEC system (DX 600, DIONEX, Corp., Sunnyvale, CA, USA)		
Column	IonPac ICE-AS6 column (9Φ×250 mm, DIONEX)		
Eluent	0.4 mM heptafluorobutyric acid		
Supressor	Anion micro membrane supressor		
Detector	5 mM tetrabutylammonium hydroxide Dionex ED50 electrochemical detector		
Injection vol.	20 µL		
Gradient condition	Isocratic	Flow rate:	1.0 mL/min

2) 오가자 유기산 분석 결과

Table 4. Released amount of free organic acids in ogaja water extract

Free organic acids	Unit: mg/100 g
Oxalic acid	15.78 ± 0.26
Tartaric acid	161.02 ± 2.03
Citric acid	83.38 ± 8
Malic acid	-(Trace)
Lactic acid	30.62 ± 2.79
Formic acid	26.65 ± 2.29
Succinic acid	366.74 ± 19.24

- 오가자 물추출액의 유기산 함량분석결과는 Table 4와 같다. Succinic acid, tartaric acid, citric acid, lactic acid, formic acid, oxalic acid 의 함량이 각각 366.74 ± 19.24 mg/100 g, 161.02 ± 2.03 mg/100 g, 83.38 ± 8 mg/100 g, 30.62 ± 2.79 mg/100 g, 26.65 ± 2.29 mg/100 g, 15.78 ± 0.26 mg/100 g의 순으로 검출되었다. Malic acid의 경우는 유기산의 정량한계가 10 pmol이며, 측정된 피크면적을 pmol단위로 환산하면 38.3 pmol 이 된다. 하지만 유기산의 검출결과 malic acid 는 citric acid 에 겹쳐 나오기 때문에 구별이 어려워서 정량이 불가능한 극미량(정량한계)이 존재하는 것으로 판단된다.

(4) 오가자 유리아미노산 분석

1) 유리아미노산 OPA (O-phthalicdicarboxaldehyde) 유도체화 방법

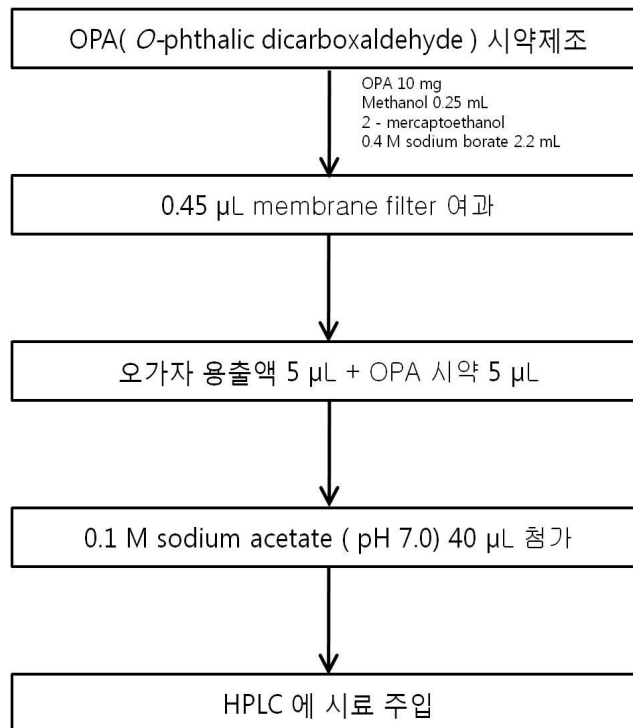


Figure 1. Preparation of derivatized amino acids for HPLC analysis by OPA (O-phthalicdicarboxaldehyde) method.

2) Sample preparation

- ① 전처리 된 오가자 추출액을 3배 희석 후 0.45 μ L membrane filter로 여과 후 HPLC에 주입.
 ② Standard materials: 20 L-Amino acids puls GABA(γ -aminobutyric acid. C₄H₉NO₂)(Sigma-Aldrich Chemical Co. MO, USA)

- 분석조건은 Table 5와 같다.

Table 5. Instrumentation and operating condition for HPLC analysis of free amino acids.

Instrument	Shimadzu HPLC system (Shimadzu, Japan)			
Column	Nova-pak C18 column (Waters Corp., Milford, MA, USA)			
Eluents	A: tetrahydrofuran : methanol : 0.1M sodium acetate(pH 7.2) = 5 : 95 : 900 B: 100% methanol			
Detector	RF-10A XL fluorescence detector (Shimadzu, Japan, ex: 230 nm, em: 450 nm)			
Injection vol.	20 μ L			
Gradient	Time(min)	Flow(mL/min)	%A	%B
	0	1.0	95	5
	1	1.0	90	10
	8	1.0	85	15
	24	1.0	80	20
	25	1.0	75	25
	27	1.0	65	35
	32	1.0	50	50
	40	1.0	35	65
	47	1.0	10	90
	50	1.0	5	95
	51	1.0	0	100

3) 오가자 유리아미노산 분석 결과

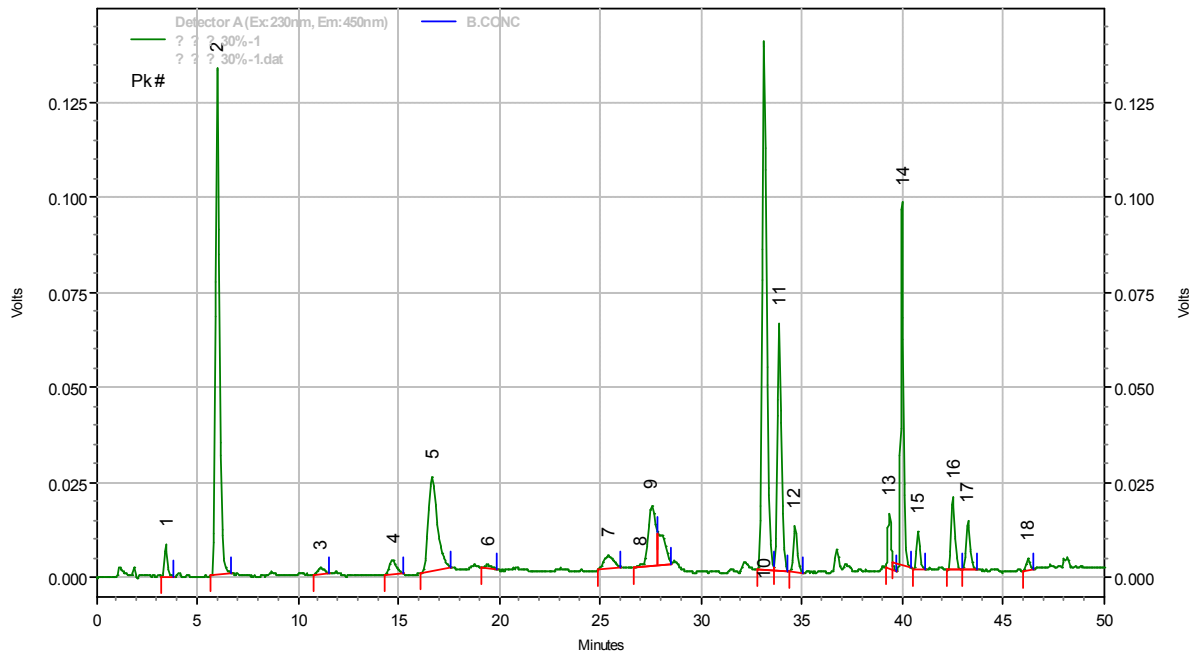


Figure 2. HPLC separation profile of free amino acid in ogaja water extract.

(1. Asn; 2. Glu; 3. Asn; 4. Ser; 5. Gln; 6. His; 7. Gly; 8. Thr; 9. Arg; 10. GABA;
11. Ala; 12. Tyr; 13. Met; 14. Val; 15. Phe; 17. Leu; 18. Lys)

- 오가자 물 추출액의 유리아미노산 분석결과는 Table 6과 같다. 오가자 100 g 당 glutamic acid가 53.7 mg으로 가장 많이 나타났다. GABA(γ -aminobutyric acid, $C_4H_9NO_2$) 38.4 mg, valine 38 mg, alanine 23.4 mg 순으로 검출되었다. 특히, 본 분석결과 오가자 안에 GABA의 함량이 상당량 검출되었는데, GABA는 중추신경계의 억제성 신경전달물질로 작용하며, 혈압상승 억제, 신경안정 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

Table 6. Released amount of free amino acids in ogaja water extract.

Free amino acids	Unit: mg/100 g
Aspartic acid	1.65 ± 0.36
Glutamic acid	53.7 ± 0.74
Asparagine	1.1 ± 0.06
Serine	0.55 ± 0.05
Glutamine	16.16 ± 0.34
Histidine	2.37 ± 0.23
Glycine	3.14 ± 0.71
Threonine	13.84 ± 0.56
Arginine	4.92 ± 0.31
GABA	38.43 ± 0.61
Alanine	23.43 ± 1.72
Tyrosine	2.27 ± 0.23
Methionine	1.06 ± 0.59
Valine	37.96 ± 1.54
Phenylalanine	1.08 ± 0.14
Isoleucine	2.61 ± 0.16
Leucine	2.33 ± 0.1
Lysine	4.78 ± 0.77
Total amino acids	211.39 ± 5.93

2. 오가자 색소체 최적 분리/정제 시스템 확립

(1) 다양한 추출 용매를 이용한 오가자 색소체 최적 추출조건 분석

1) Sample preparation

- 다양한 극성용매의 농도 변화 조건을 통한 최적 추출조건을 탐색.

- ① Methanol 추출: 20%, 40% 60%, 80%, 100% methanol
- ② Ethanol 추출: 20%, 40% 60%, 80%, 100% ethanol
- ③ Methanol+0.01% HCl 추출: 20%, 40% 60%, 80%, 100% methanol(in 0.01% HCl)
- ④ Ethanol+0.01% HCl 추출: 20%, 40% 60%, 80%, 100% ethanol(in 0.01% HCl)
- ⑤ Acetone 추출

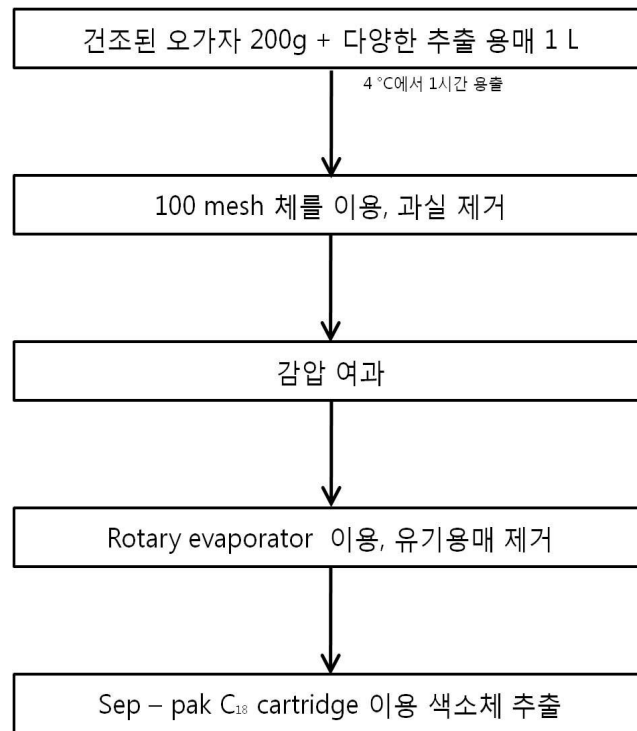


Figure 3. Preparation of ogaja extract for analysis of major colorant.

2) C18 Sep-pak cartridge를 이용한 오가자 색소체 추출

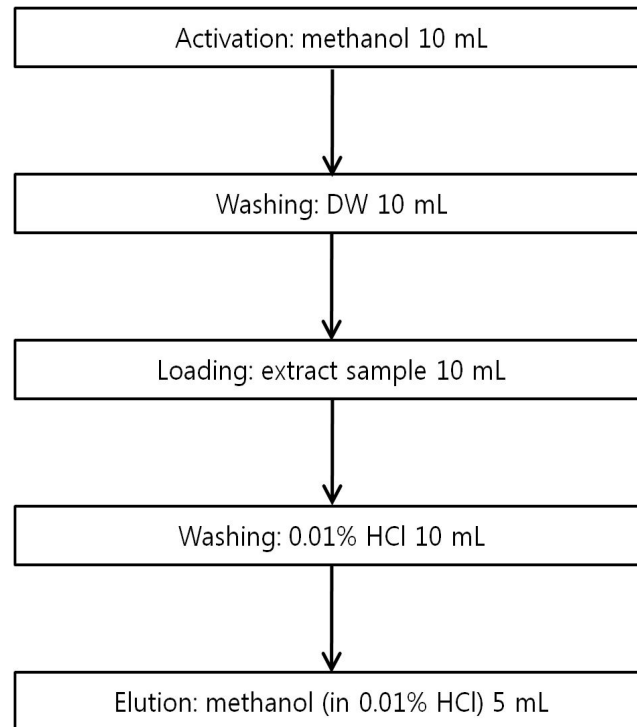


Figure 4. Extraction of colorant in ogaja by C18 Sep-pak cartridge (Waters, Milford, MA, USA).

3) HPLC를 이용한 오가자 색소체 정량 분석

- 오가자 색소체를 C18 Sep-pak cartridge를 이용하여 추출한 후 HPLC에 주입.
- 분석조건은 Table 7과 같다.

Table 7. Instrumentation and operating condition for HPLC analysis of ogaja colorant.

Instrument	Dionex Summit [®] HPLC System (Dionex Corp., Sunnyvale, CA, USA)			
Column	Xterra [™] (4.6cm×250mm, Waters, Ireland)			
Eluent A	0.1% Trifluoroacetic acid (TFA)			
Eluent B	Acetonitrile : H ₂ O = 1 : 1(v/v) in 0.1% TFA			
Detector	Dionex UVD 170U UV/Vis detector (520 nm)			
Injection vol.	20 μL			
Gradient	Time (min)	Flow (mL/min)	%A	%B
	0	1.0	80	20
	5	1.0	76	24
	50	1.0	60	40
	65	1.0	80	20
	75	1.0	80	20

4) 다양한 추출 용매를 이용한 오가자 색소체 함량 분석 결과

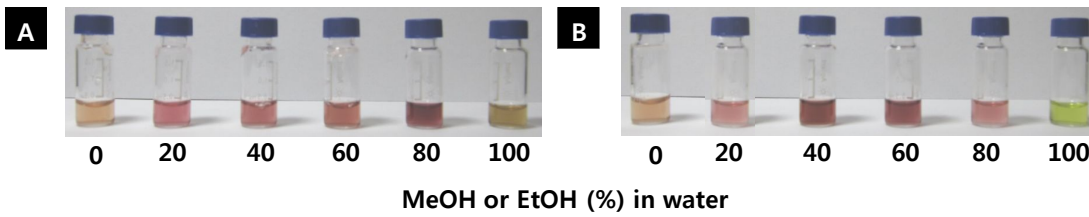


Figure 5. The visual color of anthocyanin extracts from the ogaja at different solvents system. (A, MeOH/water extracts; B, EtOH/water extracts.)

- 오가자 100% 메탄올 추출물에서는 옅은 갈색과 국방색 계열이었으며, 100% 에탄올 추출물에서는 녹색의 색을 나타내어 적색과는 거리가 멀어 안토시아닌 외에 다른 성분이 추출되는 것으로 판단된다. 반면 0~80% 추출물에서는 색의 강도에는 차이가 있으나 적갈색을 나타내었다.

ㄱ) 메탄올 추출

Table 8. Effect of water or acidified water (0.01% HCl) concentration in methanol on ogaja's colorant extraction (Dried basis: mg/100g)

	MeOH	MeOH + 0.01% HCl
0	36.74 ± 0.21	48.13 ± 2.52
20	149.02 ± 3.19	108.5 ± 1.64
40	313.35 ± 1.34	215.26 ± 6.08
60	370.84 ± 3.75	333.37 ± 3.3
80	373.98 ± 4.33	291.33 ± 2.26
100	60.27 ± 0.49	58.8 ± 2.16

- 오가자 메탄올 추출에서는 60~80% 메탄올이 건조과실 100 g당 370 mg이 함유되어 있어 가장 효율적인 추출용매로 판단되었다. 또한 0.01% HCl이 첨가된 메탄올 추출에서도 60% 메탄올이 333 mg이 추출되는 것을 알 수 있었다.

ㄴ) 에탄올 추출

Table 9. Effect of water or acified water (0.01% HCl) concentration in ethanol on ogaja's colorant extraction (Dried basis: mg/100 g)

	MeOH	MeOH + 0.01% HCl
0	36.74 ± 0.21	48.13 ± 2.52
20	91.92 ± 1.99	23.25 ± 0.75
40	147.81 ± 2.53	163.96 ± 1.39
60	290.68 ± 2.39	255.78 ± 2.16
80	193.89 ± 2.42	181.38 ± 4.94
100	1.86 ± 2.1	4.28 ± 0.82

- 오가자 에탄올 추출에서도 약 60% 에탄올이 건조과실 100 g당 290 mg이 함유되어 있어 가장 효율적인 추출용매로 판단되었다. 또한 0.01% HCl이 첨가된 에탄올 추출에서도 60% 에탄올이 255 mg이 추출되는 것을 알 수 있었다.

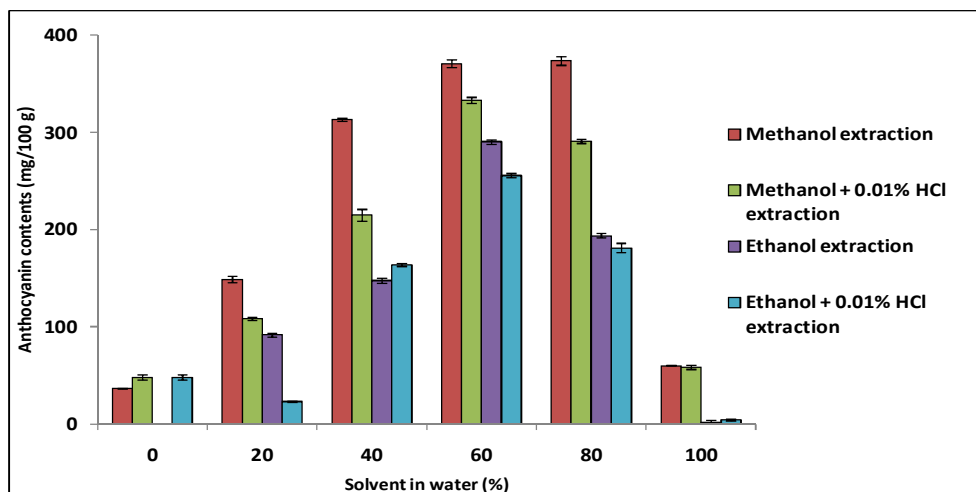


Figure 6. Effect of methanol or ethanol concentration in water and acidified water on ogaja's colorant extraction.

- 용매 추출 조건 별 색소체 함량을 분석한 결과를 Figure 6과 같이 나타내었다. 메탄올 추출이 추출용매로서 가장 효율적임을 알 수 있었다. 메탄올 추출물이 에탄올 추출물과 0.01% HCl이 함유된 메탄올, 에탄올 추출물보다 약 20% 이상 더 많이 추출되었으며, 추출 대상 색소체는 부분적인 친수성과 소수성을 함께 갖고 있는 성분으로 추론된다.

(2) 총 페놀함량 측정

1) Sample preparation

- ① 다양한 용매로부터 추출한 오가자 추출액(5-2-1)을 UV/VIS scanning spectrophotometer(DU 730, Beckman Coulter, Inc., USA)를 이용하여 760 nm에서 측정
- ② Standard material: Gallic acid (Sigma-Aldrich Chemical Co. MO, USA)

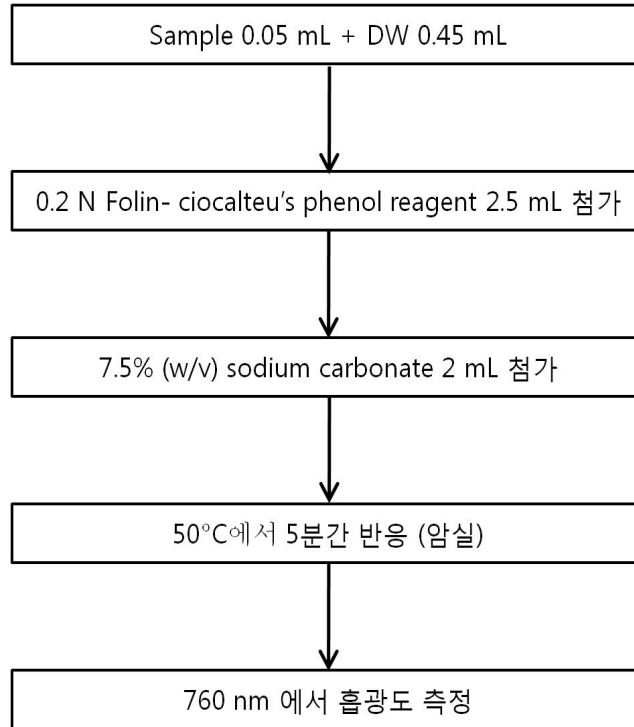


Figure 7. Analysis procedure of total phenolics by spectrometric method.

2) 총 페놀함량 측정 결과

- 오가자에 함유된 색소체 추출조건 분석에서, 페놀성 화합물의 함량의 추출경향을 비교하기 위하여 분광광도계법을 이용한 총 페놀함량을 분석하였다.

ㄱ) 메탄올 추출

Table 10. Effect of water or acidified water (0.01% HCl) concentration in methanol on ogaja's total phenolis extraction(Dried basis: mg/100 g)

	MeOH		MeOH + 0.01% HCl	
0	1785.50 ±	86.41	1669.68 ±	28.80
20	1645.17 ±	33.66	1693.41 ±	58.71
40	1708.48 ±	100.44	1736.46 ±	62.81
60	1772.64 ±	54.96	1559.38 ±	38.09
80	1107.65 ±	78.09	1060.71 ±	22.01
100	652.10 ±	6.69	489.93 ±	16.08

- 총페놀함량에 있어서 메탄올 추출의 경우, 색소체의 최적 추출 조건인 60% 메탄올에서 건조과실 100 g당 1.7 g이 추출되어, 색소체 추출조건과 같이 유사한 추출 경향을 나타내었다. 반면 0.01% HCl에서는 40% 메탄올에서 효율적으로 추출이 되었는데, 이는 색소체 외에 다른 페놀성 화합물의 추출 조건과 관련있다고 판단된다.

ㄴ) 에탄올 추출

Table 11. Effect of water or acidified water (0.01% HCl) concentration in ethanol on ogaja's total phenolis extraction(Dried basis: mg/100 g)

	EtOH		EtOH + 0.01% HCl	
0	1785.50 ±	86.41	1669.68 ±	28.80
20	1641.57 ±	29.54	2211.99 ±	9.91
40	1663.18 ±	63.50	1722.10 ±	29.39
60	1784.82 ±	85.24	1977.29 ±	19.74
80	915.19 ±	35.42	908.47 ±	27.42
100	330.29 ±	7.49	125.06 ±	5.38

- 에탄올 추출의 경우, 색소체의 최적 추출 조건인 60% 에탄올에서 건조과실 100 g당 1.8 g 이 추출되어, 색소체 추출조건과 같이 유사한 추출 경향을 나타내었다. 반면 0.01% HCl에서는 20% 에탄올에서 효율적으로 추출이 되었는데, HCl의 첨가가 다른 페놀성 화합물의 추출에 영향을 미치는 것으로 판단된다.

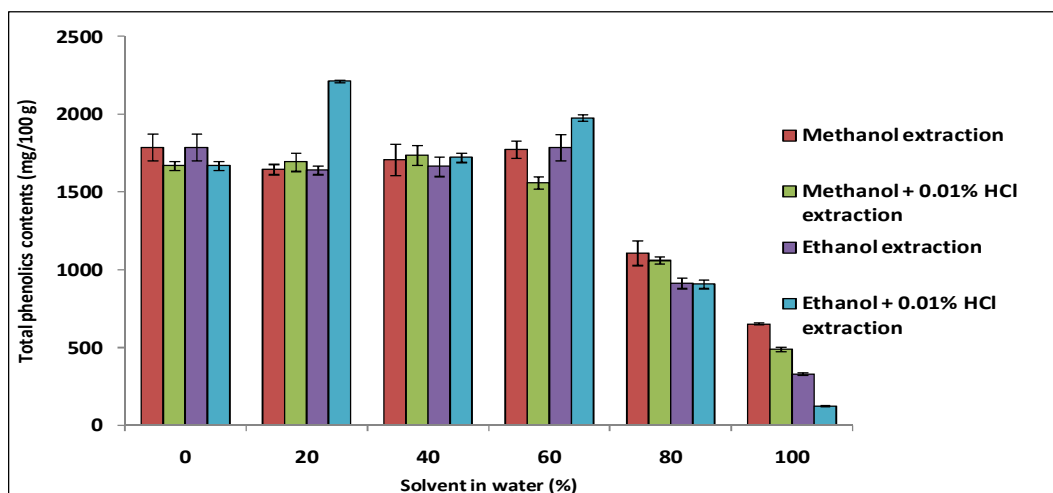


Figure 8. Effect of methanol or ethanol concentration in water and acidified water on total phenolics extraction.

- 용매 추출 조건 별 총페놀함량을 분석한 결과를 Figure 8과 같이 나타내었다. 안토시아닌 색소체 추출조건에서는 60% 의 메탄올, 에탄올 추출농도에서 가장 효율적으로 추출이

되었고, 총페놀함량 추출결과에서는 60%의 메탄올, 에탄올 추출농도 또는 0.01% HCl의 첨가 조건에서의 각각 메탄올, 에탄올 농도 40%, 20%에서 최대 함량을 나타내었다. 하지만 총페놀함량은 색소체 추출조건에서와 달리, 메탄올과 에탄올간의 추출조건에 따른 함량차이는 크게 없었다. 하지만 식품에 응용하기 위해서는 독성인 메탄올보다는 에탄올이 효율적인 추출 용매로 판단되며, 최적 색소체 추출조건과 최적 페놀 추출 조건을 이용한다면, 기능성 소재로서의 오가자 추출물을 이용한 식품으로 응용이 가능하다고 판단된다.

(3) Semi-preparative HPLC를 이용한 오가자 추출액으로부터 색소체 정제 (SP-LC)

1) Sample preparation

① 오가자 색소체 추출을 위한 오가자 최적조건, 60% 에탄올. 에서 추출한 오가자 추출용액에서 sep-pak C18 cartridge를 이용하여 오가자 색소체를 분리한 후, 0.45 µL membrane filter로 여과하여 HPLC에 주입.

- 분석조건은 Table 12와 같다.

Table 12. Instrumentation and operating condition for SP-LC of ogaja colorant.

Instrument	Shimadzu HPLC system (Shimadzu, Japan)			
Column	A PREP-ODS (H) KIT column (30×250 mm, Shimadzu, Japan)			
Eluent A	0.1% Trifluoroacetic acid (TFA)			
Eluent B	Acetonitrile : H ₂ O = 1 : 1(v/v) in 0.1% TFA			
Detector	SPD-10AVP UV-Vis Detector (Shimadzu, Japan)			
Detection range	520 nm			
Fraction collector	FRC-10A collector (Shimadzu, Japan)			
Injection vol.	1 mL			
Gradient	Time(min)	Flow(mL/min)	%A	%B
	0	10	80	20
	10	10	76	24
	50	10	60	40
	65	10	80	20
	75	10	80	20

2) 오가자 추출액으로부터의 anthocyanin 정제 결과

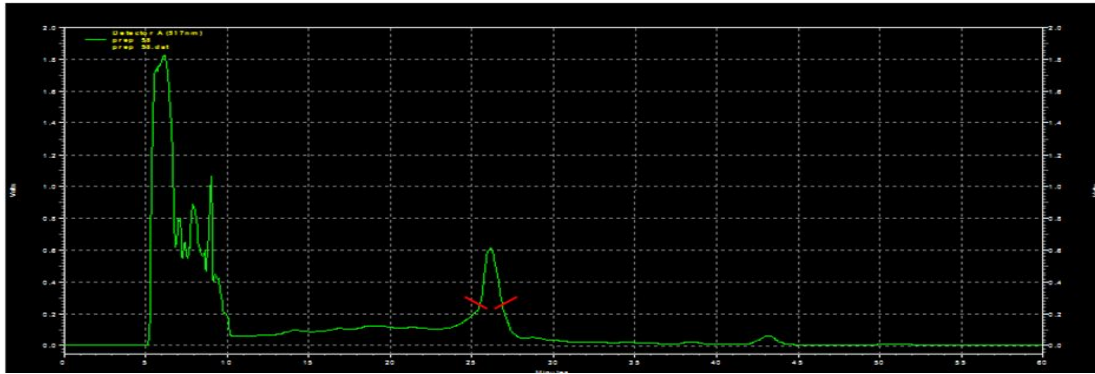


Figure 9. HPLC separation of anthocyanin by preparative HPLC from ogaja extract at 520 nm.

- HPLC-PDA, HPLC-ESI-MS 분석결과, 주요 피크에 해당하는 부분의 profile이 동일하였기 때문에 주된 화합물의 피크만을 semi-preparative HPLC를 이용하여 분취하였다. 또한 HPLC 기기를 이용하여 정제 유무를 확인하였다.

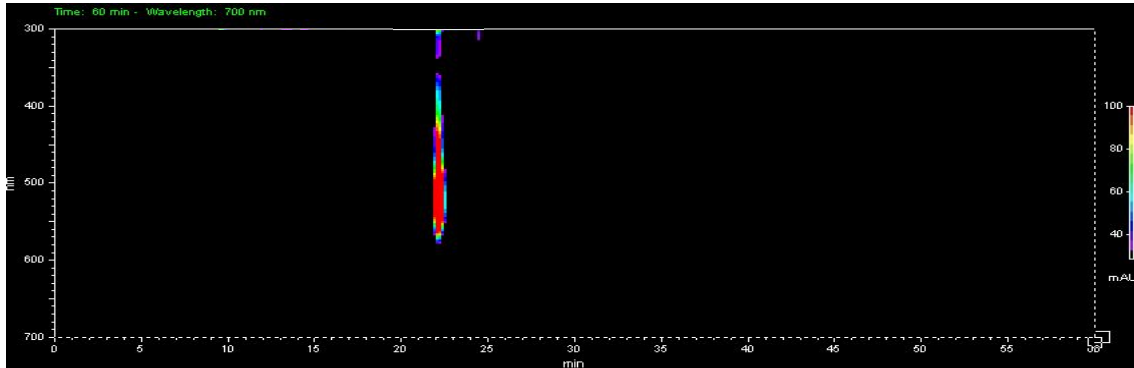


Figure 10. PDA detection diagram of anthocyanin in ogaja extract.

- Semi-preparative HPLC를 이용하여 분취한 오가자의 anthocyanin을 HPLC-PDA를 이용하여 분석한 결과, 520 nm에서 최대 흡광도를 가지는 단일 물질로 정제되었음을 확인할 수 있었다.

3. 오가자 색소체 구조 동정 방법

(1) HPLC-PDA를 이용한 오가자 색소체의 흡수과장 분석

1) Sample preparation

-0.01% HCl을 함유한 메탄올을 이용한 오가자 추출액을 10배 농축하여, 0.45 μ L membrane filter로 여과 후 HPLC에 주입.

- 분석조건은 Table 13과 같다.

Table 13. Instrumentation and operating condition for HPLC analysis of ogaja colorant.

Instrument	Shimadzu HPLC system (Shimadzu, Japan)			
Column	Xterra™(4.6cm×250mm, Waters, Ireland)			
Eluent A	0.1% Trifluoroacetic acid (TFA)			
Eluent B	Acetonitrile : H ₂ O = 1 : 1(v/v) in 0.1% TFA			
Detector	SPD-M10A VP Photo-diode array (Shimadzu, Japan)			
Detection range	190-800 nm			
Injection vol.	20 μ L			
Gradient	Time(min)	Flow(mL/min)	%A	%B
	0	0.8	80	20
	10	0.8	76	24
	50	0.8	60	40
	65	0.8	80	20
	75	0.8	80	20

2) HPLC-PDA를 이용한 오가자 색소체 분석

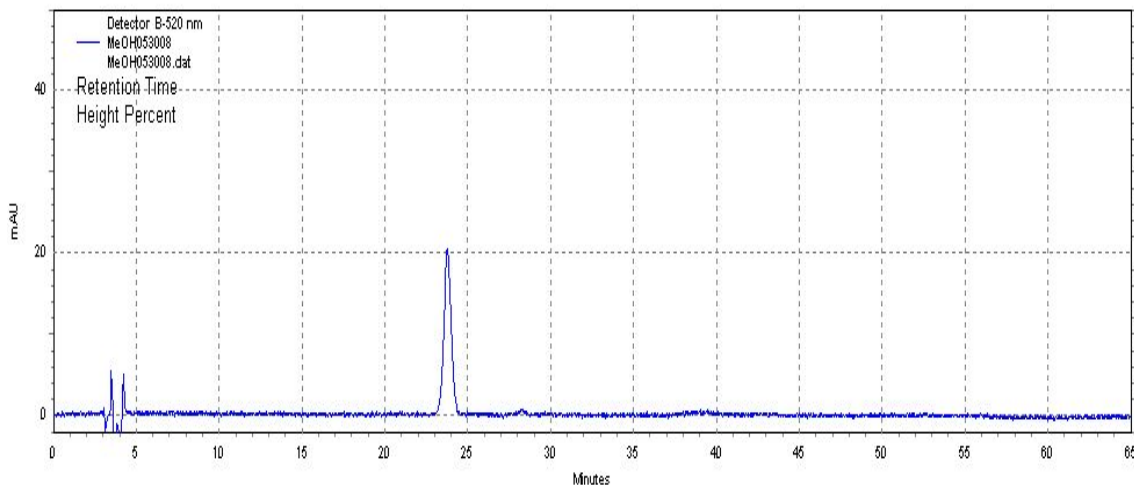


Figure 11. HPLC separation profile of ogaja colorant extract at 520 nm.

- HPLC를 이용하여 오가자 메탄올 추출액의 색소체를 분석한 결과, 520 nm의 크로마토그램에서 단일피크가 나타났다 (Figure 11). 이 단일 peak를 분석하기 위해, photo-diode array

(PDA) 검출 방법이 채택되었다. 정확한 색소체의 구조 분석을 위해 오가자 색소체를 분리 정제를 하였다. HPLC시스템에 의해서 분리된 색소체의 peak는 190-800 nm의 파장범위에서 스캔 되었다. 최대 흡수 파장은 520 nm 인 것으로 나타나 오가자 내의 색소체는 안토시아닌 계열로 판단되었다 (Figure 12 A와B). 이후에는 대량생산을 위한 최적 추출 조건을 탐색하기 위하여 다양한 극성 용매를 이용하여 추출한 후, 정량 분석을 실행하였다.

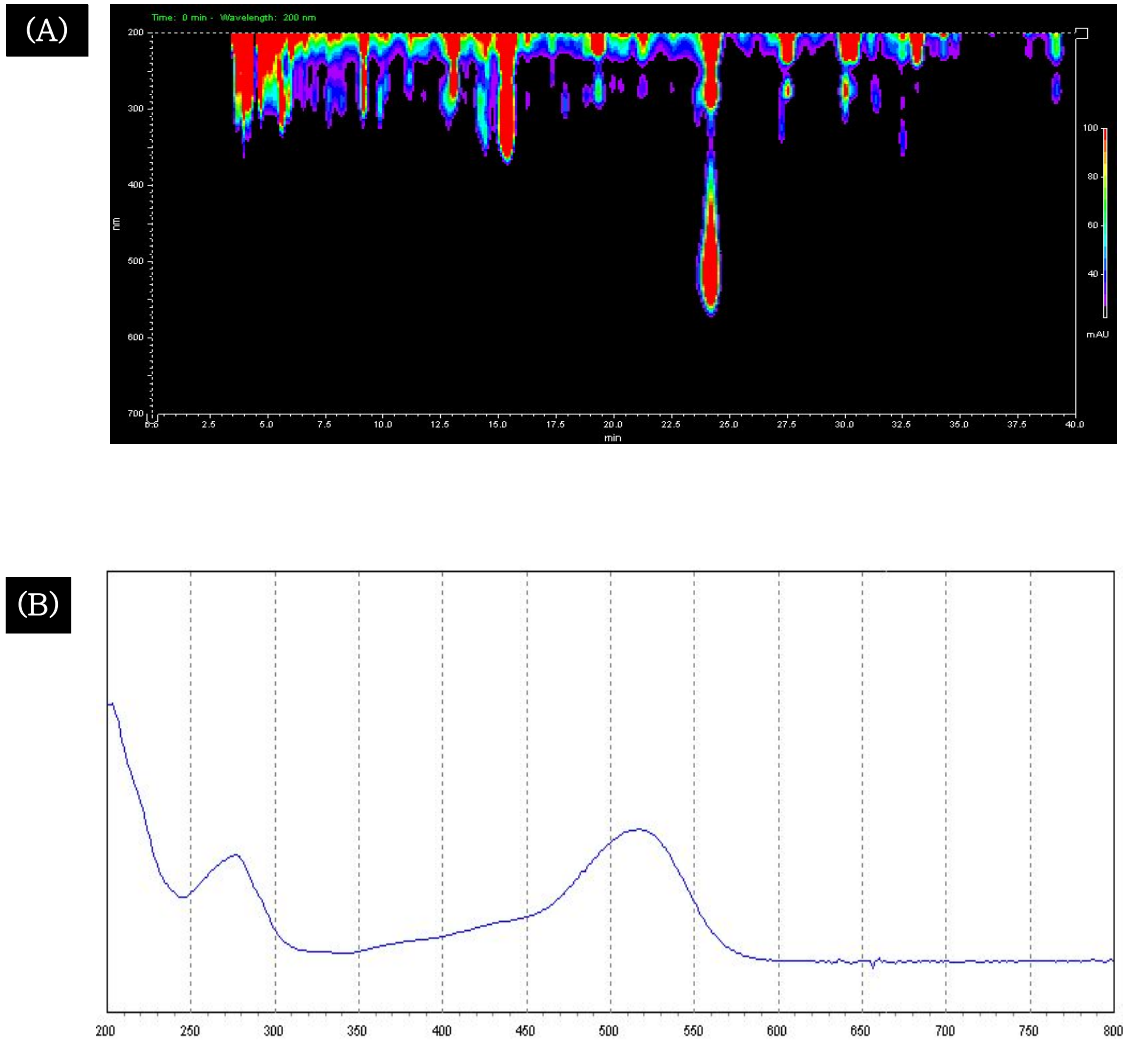


Figure 12. A. photo-diode array (PDA) detection diagram of ogaja colorant extract.
 B: Full UV-Vis wavelength scan (190-800 nm) of the dominating component
 in ogaja colorant extract.

(2) HPLC-ESI-MS를 이용한 오가자 색소체의 구조 동정

1) Sample preparation

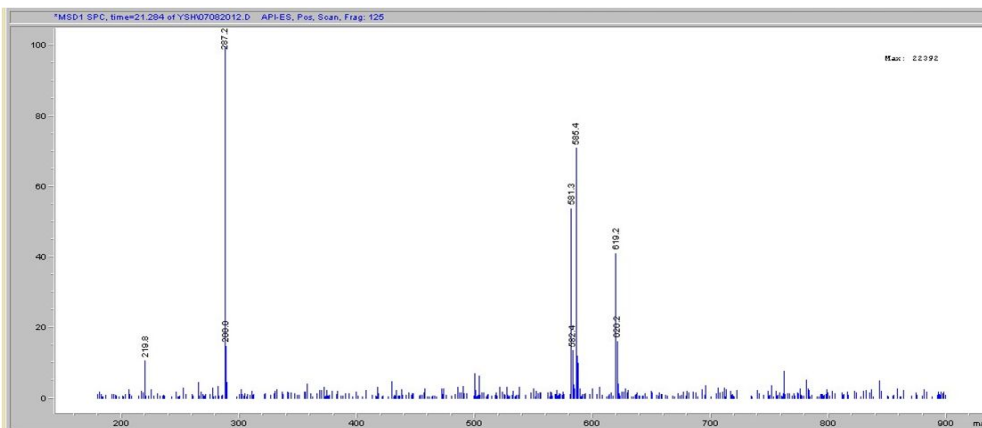
- C18 Sep-pak cartridge를 이용하여 추출한 오가자 색소체를 10배 농축하여, 0.45 μ L membrane filter로 여과 후 HPLC에 주입.
- 분석조건은 Table 14와 같다.

Table 14. Instrumentation and operating condition for HPLC analysis of ogaja colorant.

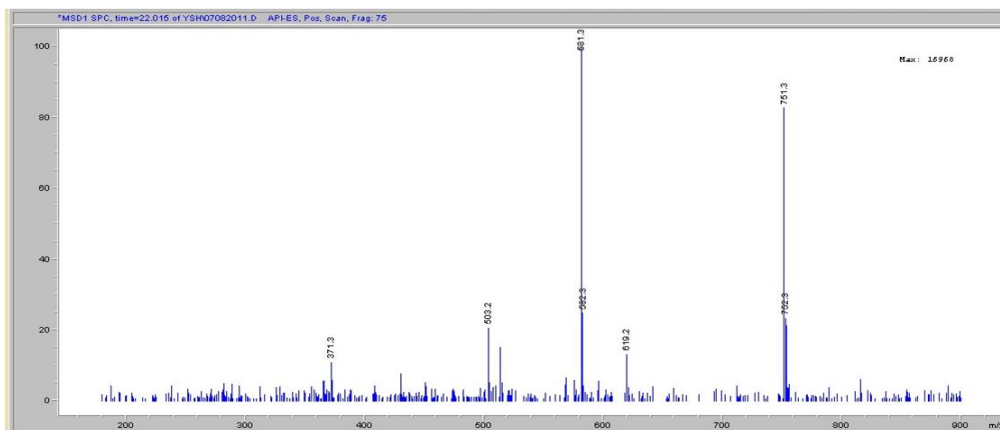
Instrument	Agilent 1100 series LC/MSD (Agilent Tech, Palo Alto, CA, USA)			
Column	Xterra™(4.6cm×250mm,Waters,Ireland)			
Eluent A	0.1% Trifluoroacetic acid (TFA)			
Eluent B	Acetonitrile : H ₂ O= 1 : 1(v/v) in 0.1% TFA			
Detection	520 nm			
Injection vol.	10 μ L			
Gradient	Time(min)	Flow (mL/min)	%A	%B
	0	0.6	80	20
	5	0.6	76	24
	50	0.6	60	40
	65	0.6	80	20
	75	0.6	80	20

2) LC-ESI-MS를 이용한 오가자 색소체 분석

(A) 75 eV



(B) 125 eV



(C) 180 eV

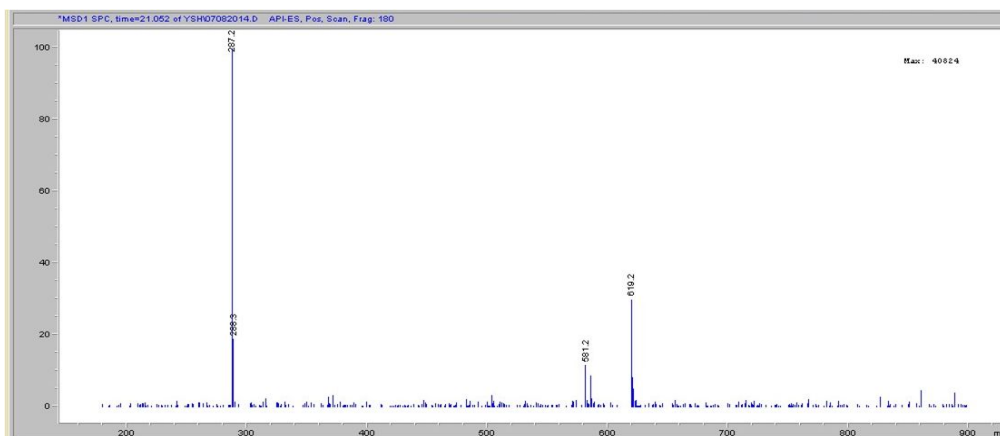


Figure 13. ESI mass spectra of ogaja colorant extract.

The MS fragmentor voltages are (A) 75 eV, (B) 125 eV, (C) 180 eV.

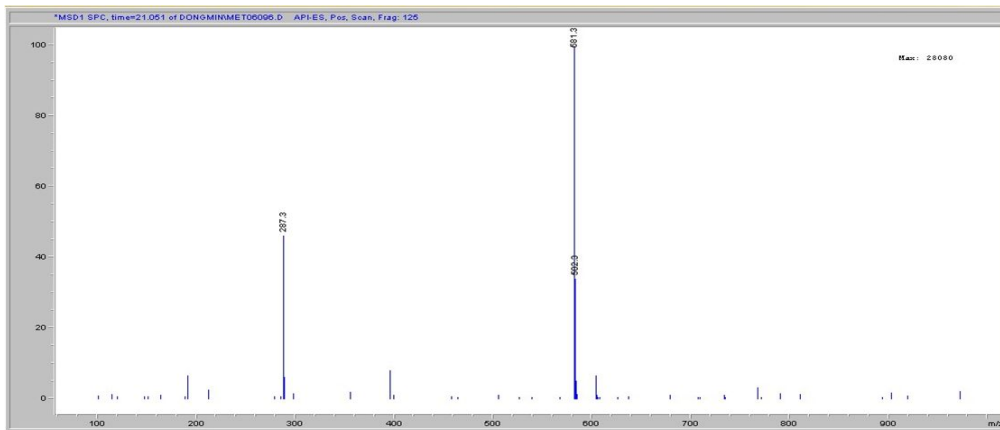
- 오가자 색소체의 구조 동정을 위해 ESI-MS를 이용하여 분석한 결과는 Figure13과 같다. Fragment voltage 75 eV에서 m/z 581의 분자량을 확인하였고, fragment voltage가 커질수록 m/z 581이 작아지면서 m/z 287의 피크가 생성되는 것을 확인하였다. 이와 같은 결과로 오가자 색소 추출물에 함유되어 있는 주된 화합물의 aglycone 분자량이 287인 cyanidin임을 확인할 수 있었다. 모 분자 이온 질량은 m/z 581로 cyanidin의 구조에 glucose와 xylose가 결합되어있는 Cyanidin-3-O-sambubioside으로 판단된다.

(3) HPLC-ESI-MS를 이용한 정제된 색소체의 구조 동정

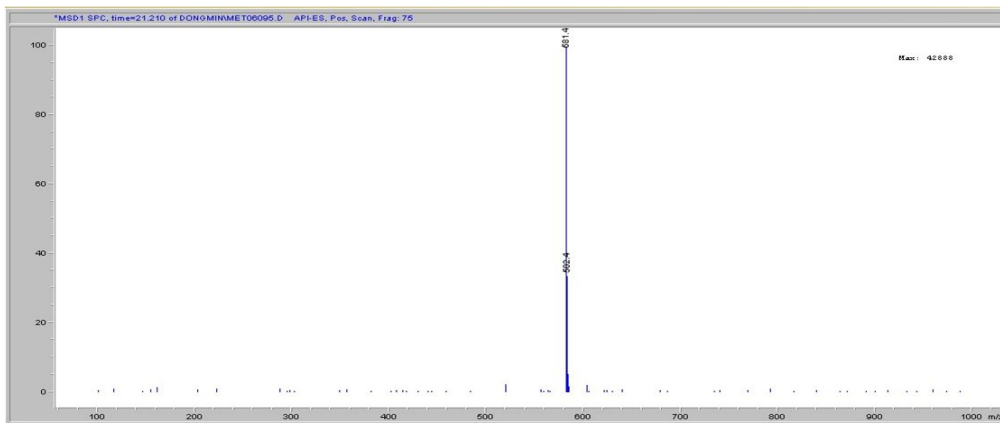
- 정제한 색소체를 HPLC/UV-Vis로 확인한 결과, 하나의 피크로 확인되어 Agilent 1100 series LC/MSD (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)를 사용하여 anthocyanin의 구조를 확인.
- 분석조건은 이 전의 오가자 색소체의 구조 동정 분석방법(5-3-2)과 동일하게 사용하였다.

1) HPLC-ESI-MS를 이용한 정제 anthocyanin의 구조 동정

(A) 75 eV



(B) 125 eV



(C) 180 eV

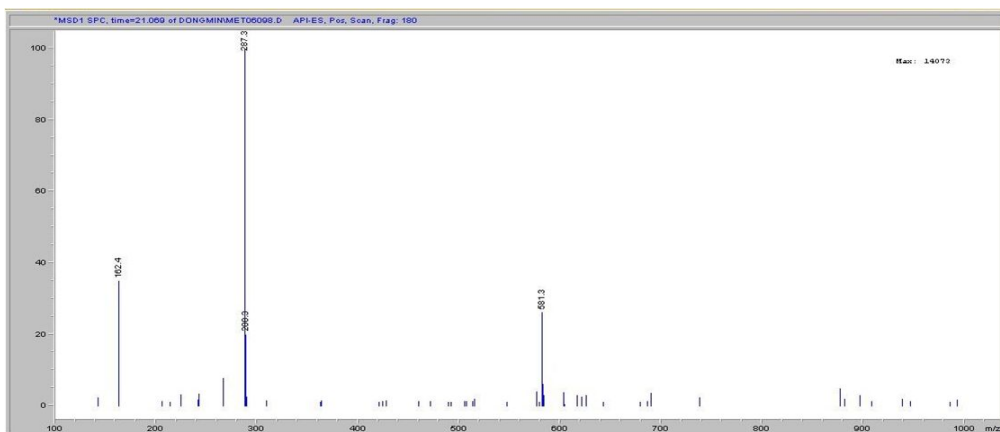


Figure 14. ESI mass spectra of anthocyanin in ogaja colorant extract. The MS fragmentor voltages are (A) 75eV, (B) 125eV and (C) 180 eV.

- Semi-preparative HPLC을 이용하여 정제하여 얻은 화합물을 HPLC/MSD로 확인한 결과, fragment voltage 75 eV에서 m/z 581(cyanidin-3-O-sambubioside)의 분자량을 확인하였고, fragment voltage 커질수록 m/z 581이 작아지면서 sambubioside가 분리되기 때문에 m/z 287의 피크(cyanidin)가 생성되는 것으로 판단된다.

(4) HPAEC-ECD 방법을 이용한 색소체의 구성당 분석

1) 정제 색소체의 산 · 가수분해

- Sample preparation:

- ① 정제한 시료를 10배 농축한 농축액 1 mL과 4M TFA 1 mL를 reaction vial에 담아 1시간 동안 방치.
- ② 121°C에서 2시간 동안 반응시킨 후, 질소가스로 건조.
- ③ 이것을 다시 증류수 500 μ L에 녹인 다음, 분석시료로 사용.

2) 산 · 가수분해물을 이용한 HPAEC-ECD 분석

- HPAEC-ECD를 이용한 당분석 조건은 오가자 유리당 분석조건②와 동일.

3) HPAEC-ECD방법을 이용한 anthocyanin의 구성당 분석 결과

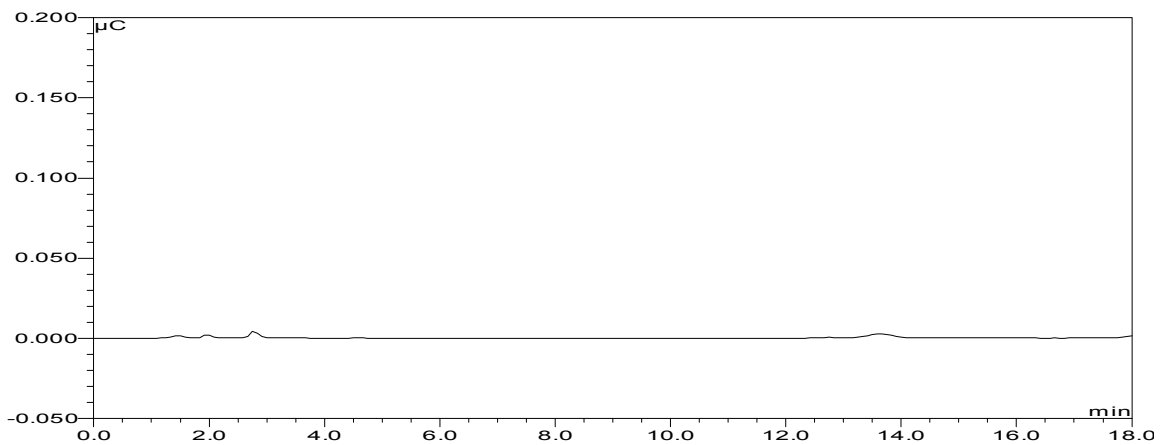


Figure 15. HPAEC separation profile of before acidic hydrolysis of colorant from ogaja water extract.

- 오가자에서 추출한 anthocyanin 화합물을 산분해 이전의 대조구로 HPAEC- ECD로 분석한 결과, anthocyanin 화합물에 결합된 당이 가수분해 되지 않았기 때문에 당이 검출되지 않았다.

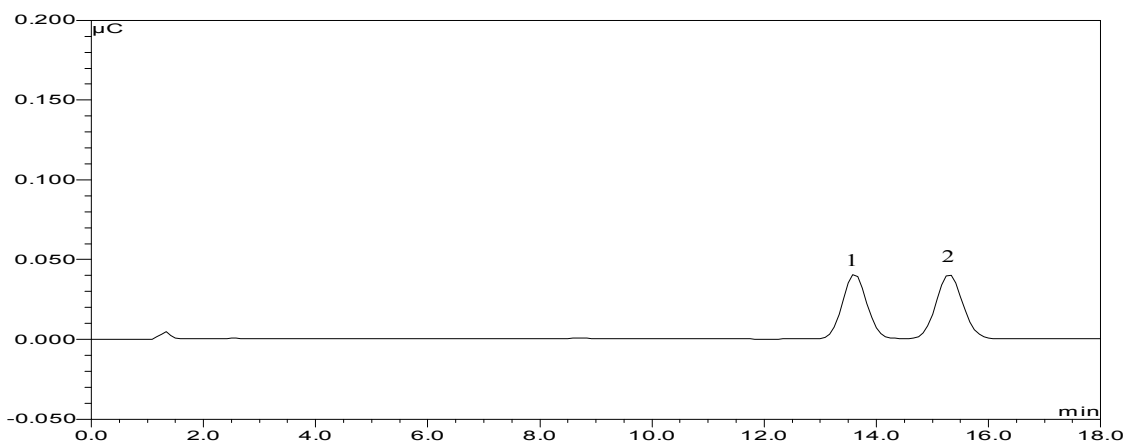


Figure. 16. HPAEC separation profile of after acidic hydrolysis of colorant from ogaja water extract. 1. glucose; 2. xylose.

- 산 분해를 이용하여 정제한 anthocyanin 화합물의 추가 구조를 확인하기 위하여 HPAEC-ECD로 분석한 결과, glucose와 xylose로 구성되어 있으며, 그 비율은 몰농도 환산 0.92:1의 비율로 anthocyanin과 각각 결합되어 있음을 확인할 수 있었다. glucose와 xylose의 분자량을 cyanidin의 분자량에 더한 결과, 오가자 추출물의 주요 anthocyanin 화합물 분자량과 일치함을 알 수 있었다.

(5) 정제 색소체의 HPTLC 분석

- HPTLC를 이용한 분석은 Si 5000 HPTLC 플레이트(10x20cm, Merck, Germany)를 사용.

1) Sample preparation

- ① 전개용매: n-propanol : water : triethylamine : 30% NH₃ (80:20:0.2:4, v/v/v/v)의 비율로 제조.
- ② 발색시약: N-(1-naphyl) ethyleneamine : sulfuric acid : methanol (0.3 : 5 : 95)의 비율로 제조.
- ③ 표준물질: D(-)Fructose, D(+)Glucose anhydrous, D(+)Galactose, D(+)Xylose (Sigma-Aldrich Chemical Co. MO, USA)을 사용.
- ④ 산분해물을 로딩한 후, 전개용매로 전개 후 1시간 동안 방치.
- ⑤ 발색시약을 도포한 후 121°C에서 10분간 발색.

2) 정제 anthocyanin의 HPTLC 분석

① 구성당 분석



Figure 17. Compositional analysis of the purified colorant: Sugar composition analysis by HPTLC (Lane: 1,4: standard monosaccharides, 2. Acidic hydrolyzate, 3. Purified fraction).

② 안토시아닌 분석

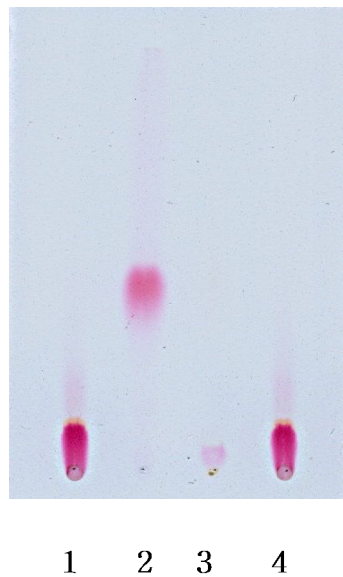


Figure 18. Compositional analysis of the purified colorant: Anthocyanin composition analysis by HPTLC (Lane: 1,4: standard cyanidin-HCl, 2. Purified fraction, 3. Acidic hydrolyzate.).

- HPTLC를 이용하여 정제된 anthocyanin 화합물과 산분해물의 anthocyanin 조성을 확인하고자 하였다. Figure 18에서와 같이, 당이 가수분해 되지 않은 상태로 붙어있는 anthocyanin 화합물의 경우에는 당의 친수성 때문에, 전개용매에 의한 전개가 잘 이루어 지는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 당이 가수분해 된 산가수분해물과 anthocyanin 표준물질의 산 가수

분해물의 경우에는 친수성이 거의 없기 때문에, HPTLC상에서 거의 전개가 되지 않는 것을 확인할 수 있었다.

(6) 핵자기공명기기 (NMR: nuclear magnetic resonance)를 이용한 오가자 색소체 구조 분석

- 오가자 색소체의 정확한 구조와 결합패턴을 확인하기 위한 핵자기공명기기를 이용한 분석.
- Bruker Avance 500 MHz NMR Spectrometer (Bruker Biospin, Rheinstetten, Germany)를 이용하여 분석하였으며, ^1H , ^{13}C NMR분석은 각각 500.15 MHz, 125.77 MHz에서 분석.
- 구조분석은 TopSpin2.0 software (Bruker Biospin, Rheinstetten, Germany) 소프트웨어를 통한 구조 규명.
- Sample preparation: 정제된 색소체 10 mg을 $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}:\text{CD}_3\text{OD}=1:19$ 에 녹여 분석.

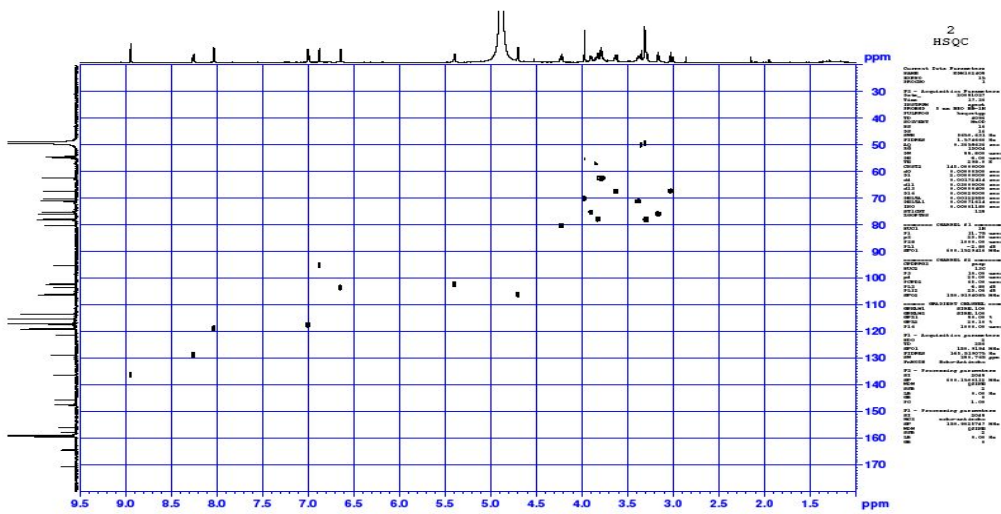


Figure 19. Heteronuclear single Quantum correlation NMR spectrum (HSQC) of Cyanidin-3-O-sambubioside, dissolved in $\text{CD}_3\text{OD}:\text{CF}_3\text{COOD}(19:1)$.

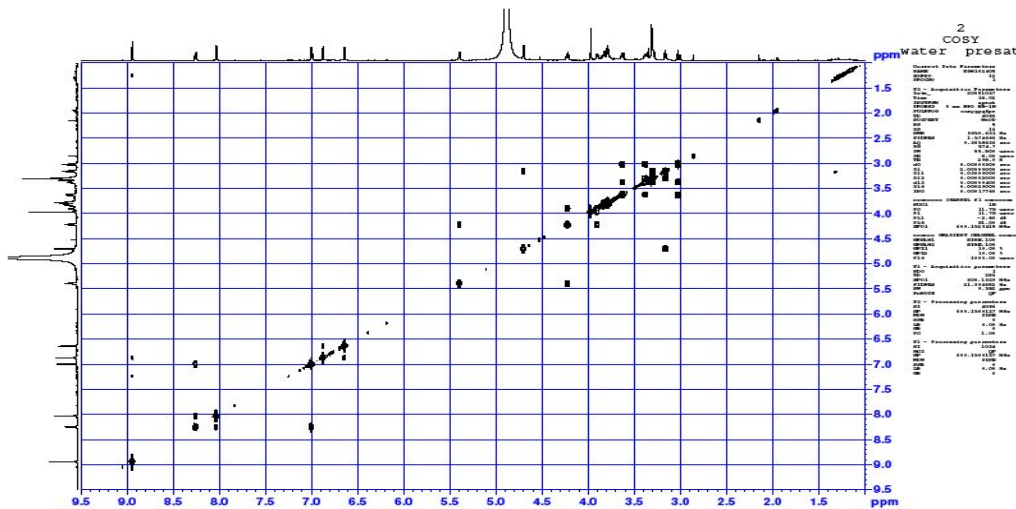


Figure 20. Correlation spectroscopy NMR spectrum (COSY) of Cyanidin-3-O-sambubioside, dissolved in $\text{CD}_3\text{OD}:\text{CF}_3\text{COOD}(19:1)$.

Table 15 ¹H- and ¹³C-NMR chemical shift for Cya-3-O-sam.

	¹ H NMR d (ppm) <i>J</i> (Hz)	¹³ C NMR d (ppm)
Aglycone (Cyanidin)		
2		164.3
3		145.49
4	8.94 s	136.24
5		159.55
6	6.64 s	103.49
7		170.43
8	6.87 s	95.18
9		157.64
10		113.35
1'		121.39
2'	8.12 d 2.4	118.72
3'		147.12
4'		155.92
5'	6.99 d 9.0	117.51
6'	8.25 dd 8.4 2.4	128.71
3-O-glucoside		
1''	5.39 d 7.8	102.2
2''	4.05 t 16.8	80.16
3''	3.9 dd 9.0 3.0	75.21
4''	3.97 s	70.18
5''	3.86 dd 19.8 3.0	77.96
6''a	3.81 dd 8.4 12.0	62.93
6''b	3.77 dd 11.4 5.4	
2''-O-xylosyl		
1'''	4.7 d 7.8	106.45
2'''	3.16t 16.8	75.92
3'''	3.30t 18.0	78.25
4'''	3.37 dd 14.4 9.6	71.08
5'''a	3.63 dd 12.0 4.8	67.28
5'''b	3.02t 21.6	

- 오가자의 유효성분을 분석한 결과, 오가자 100 g당 glucose (0.22 g), fructose (0.49 g)의 두 가지 당이 대표적으로 검출되었다. 또한 유기산의 경우 오가자 100g 당 succinic acid (0.37 g), tartaric acid (0.16 g), citric acid (0.08 g), lactic acid (0.03 g), formic acid (0.03 g), oxalic acid (0.02 g) 순으로 검출되었으며, 아미노산의 경우, 그 중 GABA가 검출되었는데, 그 함량은 0.04 g을 함유함을 알 수 있었다.

- 오가자 추출물을 HPLC-PDA를 이용하여 색소체 조성을 분석한 결과, 520 nm에서 피크 면적의 98.1% 차지하는 주요 색소체가 존재함을 확인하였다. 오가자 과실의 붉은 색을 나타내는 색소체인 anthocyanin의 주요 피크를 동정하기 위하여 HPLC-ESI-MS를 이용하여 분석한 결과, m/z값이 581.3이었으며, 당쇄 결합이 떨어져 나간 후 생성된 비배당체의 m/z값이 287.3인 것을 확인하였다. 또한, 이 주요 색소체는 semi-preparative HPLC를 이용하여 분취하였으며, 정확한 분자구조의 동정을 위하여 분취한 시료를 이용, 산 분해를 실행하였다. HPAEC와 HPTLC를 이용하여 분석한 결과, 비배당체인 cyanidin에 glucose, xylose가 몰 비율 0.9 : 1로 결합된 구조인 cyanidin-3-O-sambubioside임을 확인할 수 있었다

- 이상의 연구 결과들을 바탕으로, 오가자를 가공하는 중에 다른 식품인자와 색소체와의 상호작용을 이해하는데 기초자료로 이용될 수 있을 것으로 생각되며, 향후 가공식품의 개발을 위한 기술 및 기초자료를 제공할 수 있을 것이다. 또한 안토시아닌 유래의 천연 색소체 개발에 유용한 정보를 제공할 수 있을 것으로 사료된다.

II. 오가자 색소체 안정성 향상 및 적용제품의 품질 개선

1. 오가자 색소체의 물리적 조건 변화에 따른 안정성 변화 탐색

(1) 오가자 시료로부터 색소체의 분리 및 정제

- 빛, 열, pH, copigment 조건 하에서의 오가자 색소체의 안정성 변화를 관찰하기 위해 오가자 시료로부터 색소체를 분리 정제하였음. 오가자 시료로부터 색소체를 단일물질로 분리 정제하는 다음의 과정은 본 연구 과제 1차년도에 보고하였음.

1) Sample preparation

① 오가자 시료의 전처리

- 선행 연구 결과에 따라 색소체의 최적 추출 조건인 60% EtOH에서 색소체를 추출 함.

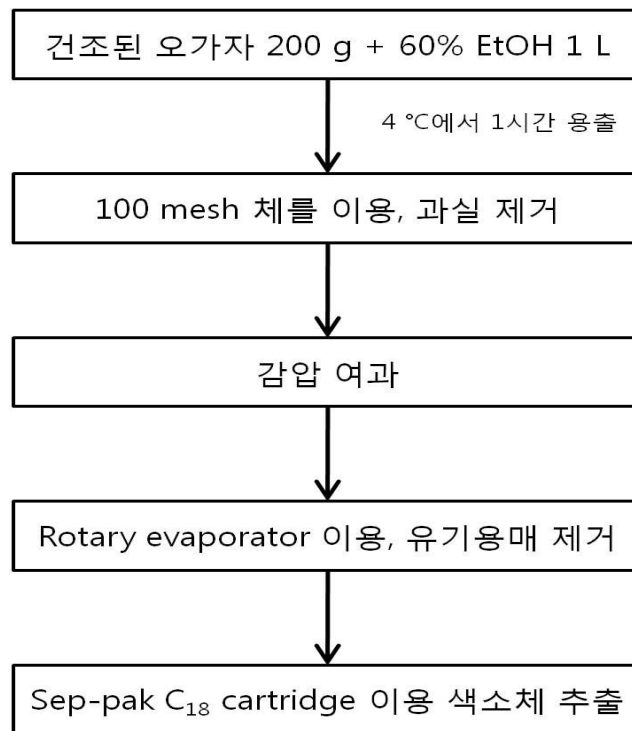


Figure 1. Preparation of ogaja extract for analysis of major colorant.

② C18 Sep-pak cartridge를 이용한 오가자 색소체 추출

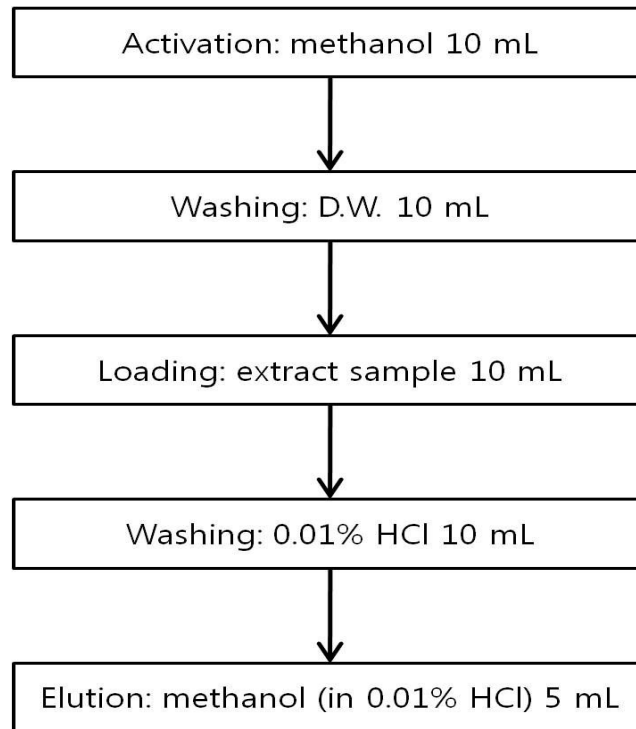


Figure 2. Extraction of colorant in ogaja by C18 Sep-pak cartridge (Waters, Milford, MA, USA).

③ Semi-preparative HPLC를 이용한 오가자 추출액으로부터 색소체 정제 (SP-LC)

- 오가자 색소체 추출을 위한 오가자 최적조건인 60% 에탄올에서 추출한 오가자 추출 용액을 Sep-pak C18 cartridge를 이용하여 오가자 색소체를 분리한 후, 0.45 μ m membrane filter로 여과하여 HPLC에 주입함.

- HPLC 분석조건은 Table 1과 같음.

Table 1. Instrumentation and operating condition for SP-LC of ogaja colorant

Instrument	Shimadzu HPLC system (Shimadzu, Japan)			
Column	A PREP-ODS (H) KIT column (30×250 mm, Shimadzu,Japan)			
Eluent A	0.1% Trifluoroacetic acid (TFA)			
Eluent B	Acetonitrile : H ₂ O = 1 : 1(v/v) in 0.1% TFA			
Detector	SPD-10AVP UV-Vis Detector (Shimazu, Japan)			
Detection range	520 nm			
Fraction collector	FRC-10A collector (Shimazu, Japan)			
Injection vol.	1 mL			
Gradient	Time(min)	Flow(mL/min)	%A	%B
	0	10	80	20
	10	10	76	24
	50	10	60	40
	65	10	80	20
	75	10	80	20

(2) 빛에 따른 오가자 색소체의 안정성 변화

- 빛에 대한 안정성 측정을 위해 색소의 파괴정도를 분석하였다. 오가자 색소체 용액과 대조구 용액을 암실보관, 형광, 자외선 조건에 보관하면서 2, 6, 12, 24, 48, 72, 120, 168 시간마다 UV/Vis scanning spectrophotometer(DUØ 730, Beckman Coulter, Inc.USA)를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정함.

1) Sample preparation

① 오가자 색소체 용액: 오가자로부터 정제한 anthocyanin을 0.01% HCl에 녹여 최종 농도를 0.01 mM로 제조함.

② 대조구 용액: 표준물질인 cyanidin chloride(Extrasynthèse, Genay France)를 0.01% HCl에 녹여 최종 농도를 0.01 mM로 제조함.

2) 빛에 대한 안정성 실험

① 암실

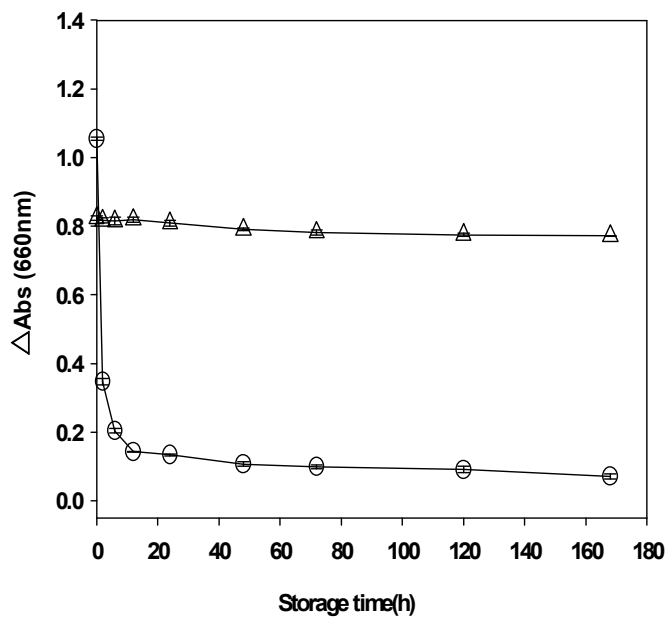


Figure 3. Light effect on color degradation of anthocyanins under the dark during storage.
(○, cyanidin; △, cyanidin-3-O-sambubioside)

- 암실 조건에서 cyanidin의 경우 상온에서 저장 2시간 내에 67.1%의 색소체 파괴가 진행되었다. 당이 결합되지 않은 비배당체인 cyanidin의 색소체 안정성이 급격하게 떨어지는 반면, 당이 결합된 배당체인 오가자의 주 색소체 cyanidin-3-O-sambubioside는 저장 7일째에도 색소 잔존율이 93.7% 이상으로 유지되어 당의 결합으로 색소체의 안정성이 증진됨. 이는 당의 결합으로 cyanidin의 안정성이 증진되는 것으로 판단함.(1)

② 형광

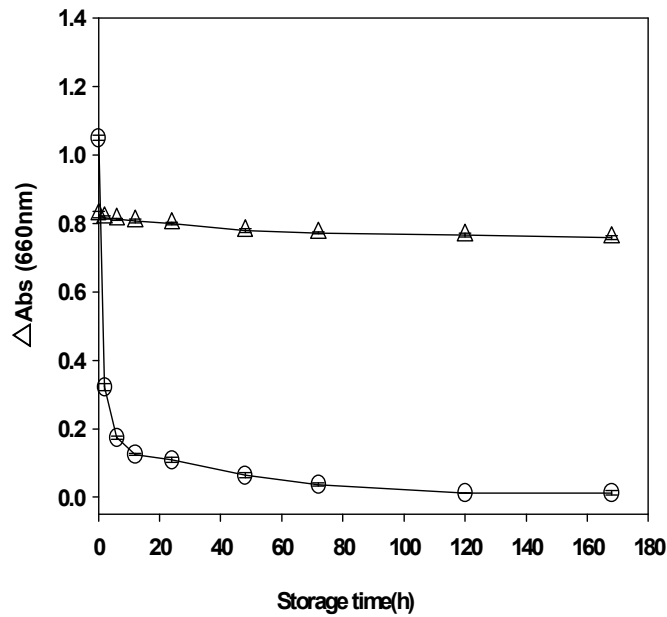


Figure 4. Light effect on color degradation of anthocyanins under the fluorescent light during storage. (○, cyanidin; △, cyanidin-3-O-sambubioside)

- 형광 조건(최대 1000 lux 이하)에서 cyanidin은 상온 저장에서 2시간 내에 색소체 파괴율이 70.1% 진행되었고 저장 7일째에는 색소체의 거의 대부분인 99.7%가 파괴되어 색채 잔존율이 0.3%에 불과함. 이는 암소 조건에서보다 cyanidin 색소체의 파괴가 더욱 급속도로 이루어진 결과임. 배당체인 cyanidin-3-O-sambubioside의 경우에는 저장 7일째 색소 잔존율이 91.9%로 당의 결합으로 색소 안정성이 현저하게 증가하는 것으로 파악됨. 이는 형광 조건에서도 당이 결합된 배당체인 오가자의 주 색소체 cyanidin-3-O-sambubioside는 안토시아닌 계열 색소체인 cyanidin의 구조적 안정성을 증진시켜 단기 저장동안 형광 빛에 대한 영향을 거의 받지 않는 것으로 판단됨.

③ UV

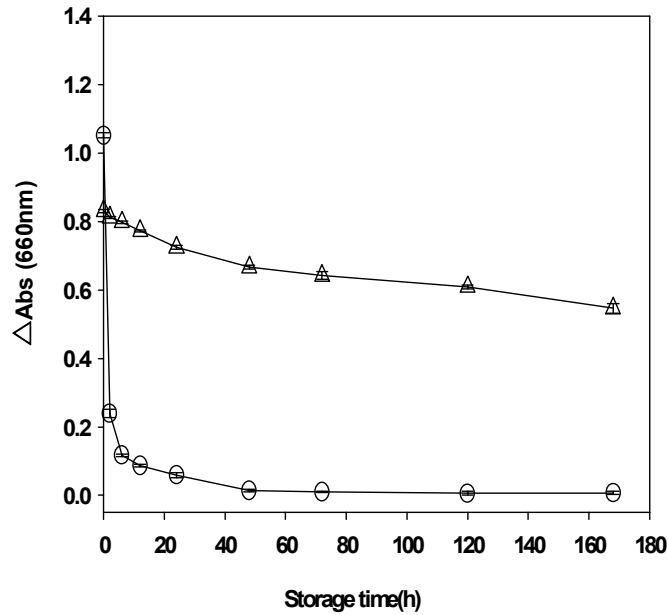


Figure 5. Light effect on color degradation of anthocyanins under the UV light during storage. (○, cyanidin; △, cyanidin-3-O-sambubioside)

- UV 조건(254 nm)에서 cyanidin은 상온 저장 2시간 내에 색소 파괴율이 77.3% 진행되었고 저장 48시간째에는 색소 파괴율이 98.6% 진행되어 색소 잔존율이 1.4%에 불과함. 암소 조건에서 cyanidin의 경우 저장 48시간째 색소 잔존율이 10.2%, 형광 조건에서는 6.1% 이었던 것에 비해 UV 조건에서는 1.4%로 UV조건이 색소체의 안정성에 더욱 부정적인 영향을 미치는 것으로 나타남. Cyanidin-3-O-sambubioside는 저장 7일째에 색소 잔존율이 65.8%이었고 당의 결합으로 안정성이 증가하였지만, 암소 및 형광 조건과 비교하여 UV 조사 시 색소 잔존율이 현저히 낮음.

- 또한 cyanidin에 대한 당의 결합은 색소체의 빛에 대한 안정성을 증진시키는 것으로 나타났음. 하지만 UV 조사시 색소 잔존율이 다른 암소와 형광 조건과 달리 현저히 떨어짐으로 저장기간 중 UV의 차단 기술의 적용은 오가자 색소체를 함유한 식품의 색채 품질을 높이기 위한 중요한 방법으로 파악됨. 당의 결합은 색소체의 빛에 대한 안정성을 증가시키는 것으로 나타났지만 저장기간 중 UV의 차단 기술의 적용은 오가자 색소체를 함유한 식품의 색채 품질을 높이기 위한 중요한 방법으로 파악됨.

(3) 열에 대한 오가자 색소체의 안정성 변화

- 온도별 안정성 측정을 위해 색소체의 파괴정도를 분석함. 오가자 색소체 용액과 대조구 용액을 4, 25, 80°C 조건에서 저장하면서 2, 6, 12, 24, 48, 72, 120, 168 시간마다 UV/Vis scanning spectrophotometer(DUO 730, Beckman Coulter, Inc.,USA)를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정함.

- 빛에 의한 영향을 제거하기 위하여 빛이 없는 암소 조건 하에 저장하면서 실험을 진행함.

1) Sample preparation

① 오가자 색소체 용액: 오가자로부터 정제한 anthocyanin을 0.01% HCl에 녹여 최종 농도를 0.01 mM로 제조함.

② 대조구 용액: 표준물질인 cyanidin chloride(Extrasynthèse, Genay France)를 0.01% HCl에 녹여 최종 농도를 0.01 mM로 제조함.

2) 열에 대한 안정성 실험

① 4°C

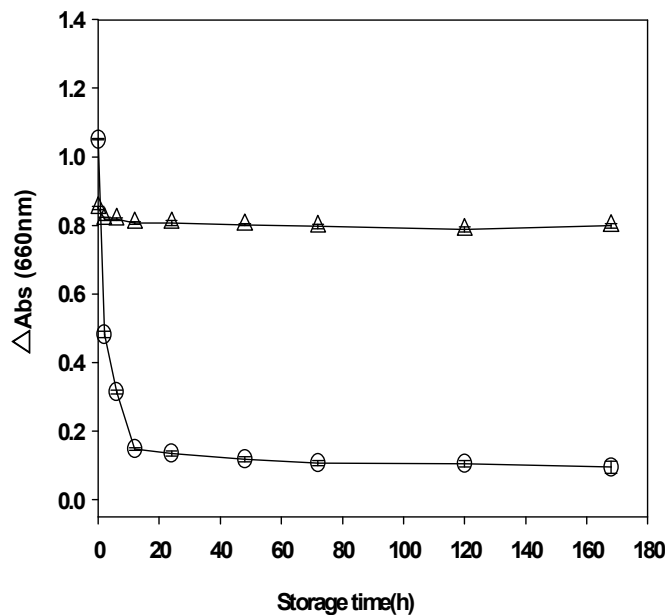


Figure 6. Thermal effect on color degradation of anthocyanins at 4°C during storage.

(○, cyanidin; △, cyanidin-3-O-sambubioside)

- 4°C 저장의 경우, cyanidin에서는 저장 2시간 만에 색소가 54.1% 파괴되었지만, cyanidin-3-O-sambubioside은 저장 7일째에도 93.9%의 색소 잔존율을 보여줌. 4°C에서의 색소 안정성은 비배당체 보다 배당체가 훨씬 안정하였고, 특히 배당체구조는 7일째에도 색소 안정성이 매우 우수한 것으로 나타나 7일 이후 저장기간 동안의 안정성 평가 수행이 필요하다고 판단됨.

② 25°C

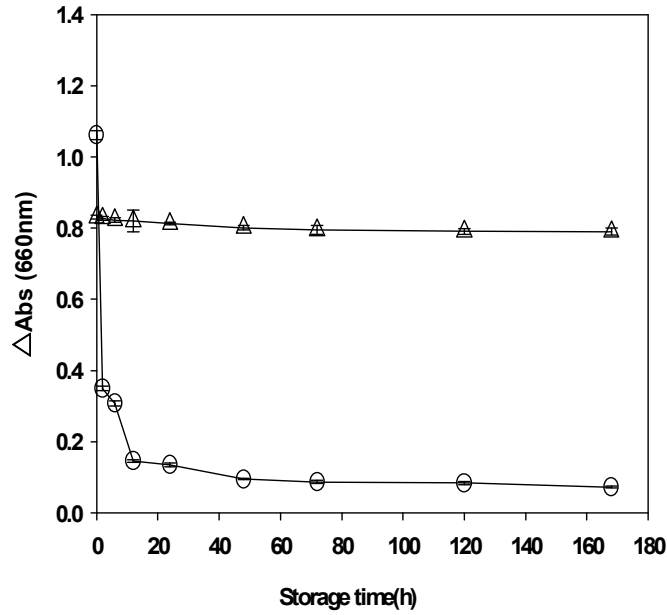


Figure 7. Thermal effect on color degradation of anthocyanins at 25°C during storage.
(○, cyanidin; △, cyanidin-3-O-sambubioside)

- 25°C 저장의 경우, cyanidin은 저장 2시간 만에 색소 파괴율이 67.0% 진행되어, 4°C 에서 보다 색소 파괴가 더욱 많이 진행됨. Cyanidin-3-O-sambubioside의 경우에는 반응 7일째에도 색소 잔존율이 95.1% 수준으로 유지됨. 따라서 비배당체 cyanidin의 경우 상온까지의 온도 증가에도 색소체 구조가 민감하게 반응하여 색소 안정성의 저하가 확연히 나타나는 반면 배당체의 경우 거의 미미한 수준에서의 안정성의 감소가 이루어진 것으로 보임.

③ 80°C

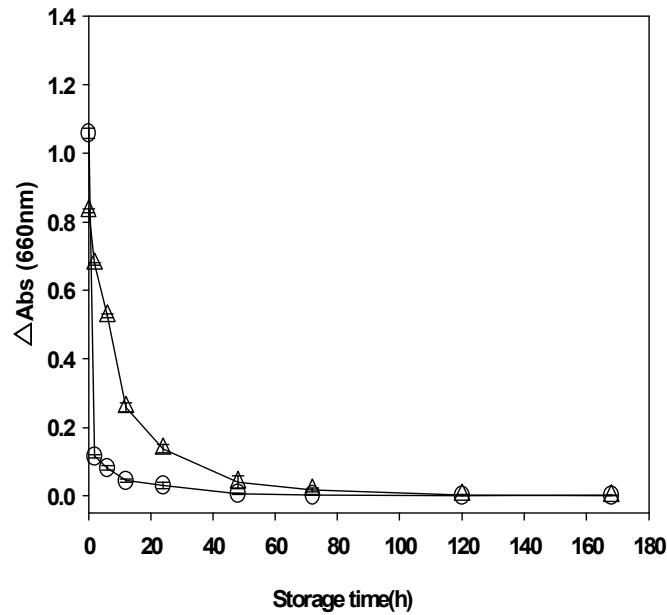


Figure 8. Thermal effect on color degradation of anthocyanins at 80°C during storage.

(○, cyanidin; △, cyanidin-3-O-sambubioside)

- 80°C 저장 조건에서 cyanidin은 저장 2시간 만에 색소 파괴율이 89.0% 진행되었고, 다른 온도 조건에서 보다 가장 색소 안정성이 떨어짐. 저장 6시간 이후는 적색 색소가 거의 소실되어 육안으로도 거의 색을 확인할 수 없었음. cyanidin-3-O-sambubioside의 경우에는 저장 6시간 경과 후까지 색소 잔존율이 50.0% 이상 되었고, 12시간까지는 색채가 명확히 검출될 정도로 유지되다가, 저장 24시간 이전에 적색의 색채가 대부분 소실됨. 이는 온도 증가를 통한 열에너지의 공급이 색소체에 구조에 대한 가장 큰 파괴력을 보여주는 것으로 비배당체와 비교하여 배당체의 경우 상대적으로 안정한 경향을 보여주었으나 이 역시 급속한 속도로 색채의 손실을 보여주어 당 결합의 안토시아닌 색소체 열안정성에 대한 역할이 크지 못한 것으로 파악됨.

(4) pH에 따른 오가자 색소체의 안정성 변화

- pH에 대한 오가자 색소체의 안정성 측정을 위해 색소의 파괴정도를 분석하였다. 오가자 색소체 용액과 대조구 용액을 암실에서 4 °C, 25 °C, 80 °C 로 보관하면서 pH를 달리하여(pH 2, 3, 5) 2, 6, 12, 24, 48, 72, 120, 144 시간마다 UV/Vis scanning spectrophotometer(DUØ 730, Beckman Coulter, Inc.USA)를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정함.

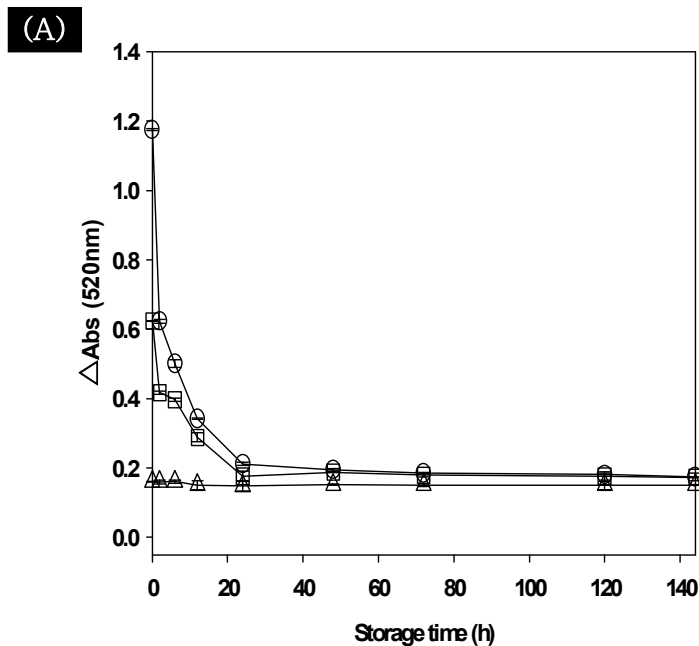
1) Sample preparation

① 오가자 색소체 용액: 오가자로부터 정제한 anthocyanins를 pH 2 (KCl-HCl buffer), pH 3 (KH phthalate-HCl buffer), pH 5 (KH phthalate-NaOH buffer)의 buffer에 각각 녹여 최종 농도를 0.01 mM로 제조함.

② 대조구 용액: 표준물질인 cyanidin chloride(Extrasynthèse, Genay France)를 pH 2 (KCl-HCl buffer), pH 3 (KH phthalate-HCl buffer), pH 5 (KH phthalate-NaOH buffer)의 buffer에 녹여 최종 농도를 0.01 mM로 제조함.

2) pH에 대한 안정성 실험

① 암실-4 °C 저장 시 pH에 따른 색소 안정성 변화



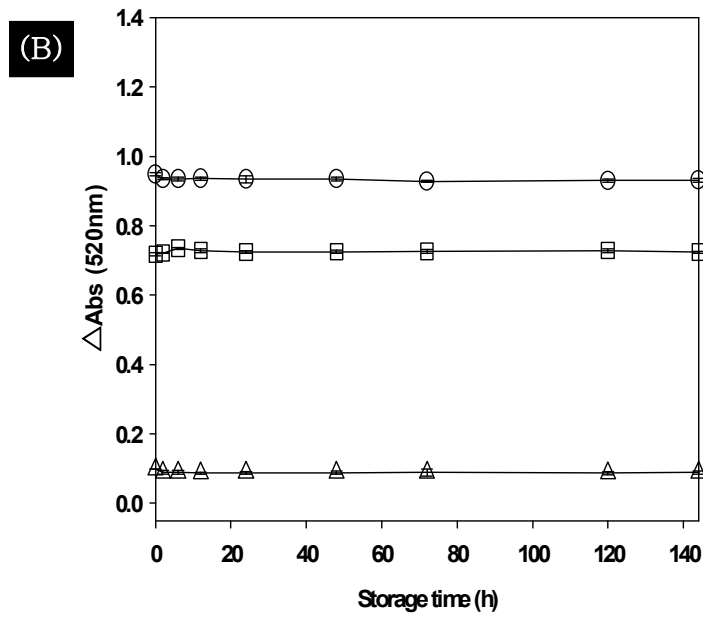


Figure 9. pH effect on color degradation of anthocyanins in various pH buffer solutions under the dark condition at 4 °C during storage. (A, cyanidin; B, cyanidin-3-O-sambubioside: ○, pH 2; □, pH 3; △, pH 5)

-암실-4 °C조건하에서 색채 안정성은 pH가 낮을수록 높게 나타났으며, pH2 조건에서 144시간 경과 후 대조구인 cyanidin의 색소 파괴율은 82.0% 진행되었지만 cyanidin-3-O-sambubioside는 4.0%에 불과함. pH가 5일 때는 낮은 흡광도 값을 유지하였음.

② 암실-25 °C 저장 시 pH에 따른 색소 안정성 변화

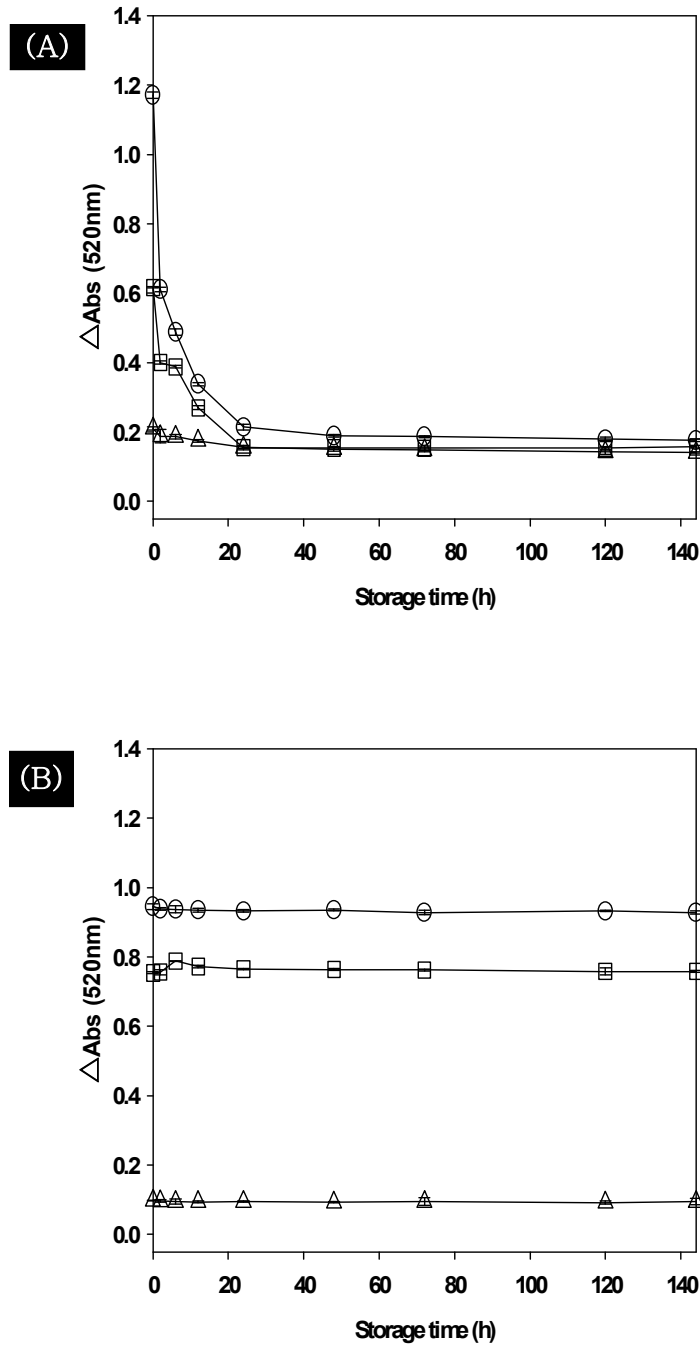


Figure 10. pH effect on color degradation of anthocyanins in various pH buffer solutions under the dark condition at 25 °C during storage. (A, cyanidin; B, cyanidin-3-O-sambubioside: ○, pH 2; □, pH 3; △, pH 5)

-암실-25 °C 조건에서의 색소 안정성 역시 pH가 낮을수록 높게 나타났으며, pH 2 조건에서 144시간 후의 색소파괴율은 cyanidin의 경우 83.0%, cyanidin-3-O-sambubioside는 3.0% 정도 임.

③ 암실-80 °C 저장 시 pH에 따른 색소 안정성 변화

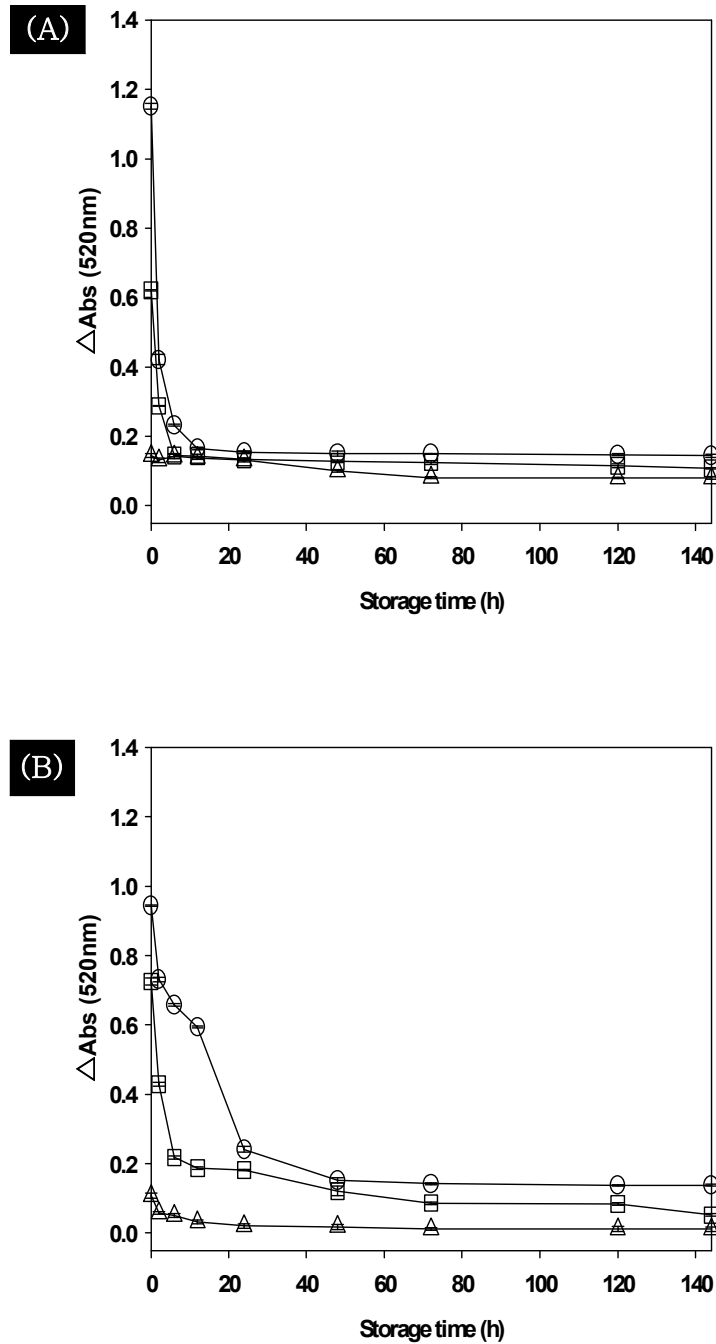


Figure 10. pH effect on color degradation of anthocyanins in various pH buffer solutions under the dark condition at 80 °C during storage. (A, cyanidin; B, cyanidin-3-O-sambubioside: ○, pH 2; □, pH 3; △, pH 5)

- 암실-80 °C 조건에서의 색소 안정성 또한 pH가 낮을수록 높게 나타났으며, cyanidin의 색소 파괴율은 다른 온도와 비슷한 82.0%정도이며 cyanidin-3-O-glucoside의 색소 파괴율은 78.0%정도로 다른 온도에 비해 높게 나타남.

2. 오가자 색소체의 안정성 향상 방안 탐색

(1) Copigments 존재하의 오가자 색소체 안정성 관찰

- 빛과 열의 물리적 조건을 달리하여 색소체 안정성 평가를 실시한 결과, 오가자 색소체는 빛이 차단된 암소 조건에서 색소 안정성이 우수하였고 당의 결합으로 색소 안정성에 대한 저장 온도의 영향을 덜 받는 것으로 나타남. 본 연구에서는 오가자 색소체의 안정성을 향상시킬 수 있는 방안으로 copigments의 첨가가 색채 안정성에 미치는 영향을 암소, 25°C 조건에서 실시함.(2)

2) Sample preparation

- ① 오가자 색소체 용액: 오가자 에서 정제한 cyanidin-3-O-sambubioside을 0.01% HCl에 녹여 최종 농도를 0.01 mM로 제조함.
- ② 대조구 용액: 표준물질인 cyanidin chloride (Extrasynthèse, Genay France)를 0.01% HCl에 녹여 최종 농도를 0.01 mM로 제조함.
- ③ Copigments 용액: L-Ascorbic acid, ferulic acid, rosemarinic acid, 와 tannic acid를 0.01% HCl에 녹여 최종 농도를 0.01 및 0.02 mM로 제조함.
- ④ 각각의 anthocyanins과 copigment용액을 몰비율 1:1, 1:2 (v/v)로 혼합한 뒤 실험함.
 - 오가자 색소체 용액과 대조구 용액을 4, 25, 80°C 조건에서 보관하면서 2, 6, 12, 24, 48, 72, 120, 168 시간마다 UV/Vis scanning spectrophotometer(DUÒ 730, Beckman Coulter, Inc., USA)를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정함.

3) Copigments 존재 하의 안정성 실험

① L-Ascorbic acid

- Cyanidin은 L-ascorbic acid의 첨가에 상관없이 급속한 색소 파괴 율을 보였고, 당이 결합된 배당체 경우에도 L-ascorbic acid에 의한 copigmentation 효과는 기대할 수 없었으며 오히려 prooxidant로서의 부정적인 영향을 주는 것으로 파악됨 (Table 1)(3). 그리고 색소체 용액과 L-ascorbic acid 몰비율이 1:2로 높아질 경우 cyanidin에서 뿐만 아니라 배당체 형태의 cyanidin-3-O-sambubioside에서도 저장기간이 길어질수록 안정성이 떨어지는 것을 확인할 수 있었음. 결과적으로 copigment로서의 역할을 기대하며 첨가된 L-ascorbic acid는 색채 안정성에 영향을 주지 못하거나 오히려 안정성을 떨어뜨리는 결과를 보여줌. 따라서 L-ascorbic acid에 의한 copigments 효과는 없는 것으로 판단됨.

Table 2. Copigmentation effect of L-ascorbic acid on color degradation of anthocyanins during storage (25°C, under the dark)

(M/M)	Cyanidin		Cyanidin-3-O-sambubioside	
	(1:1)	(1:2)	(1:1)	(1:2)
Storage Time	Δ Abs	Δ Abs	Δ Abs	Δ Abs
0	1.051± 0.002	1.021± 0.010	0.838± 0.007	0.839± 0.002
2	0.347± 0.009	0.312± 0.012	0.841± 0.002	0.837± 0.004
6	0.211± 0.012	0.188± 0.006	0.835± 0.002	0.828± 0.008
12	0.141± 0.009	0.139± 0.004	0.828± 0.005	0.847± 0.008
24	0.137± 0.003	0.129± 0.004	0.818± 0.006	0.813± 0.002
48	0.107± 0.007	0.109± 0.007	0.772± 0.008	0.763± 0.006
72	0.105± 0.004	0.093± 0.003	0.746± 0.004	0.732± 0.009
120	0.091± 0.009	0.085± 0.005	0.683± 0.009	0.656± 0.007
168	0.068± 0.003	0.054± 0.004	0.654± 0.008	0.627± 0.031

② Ferulic acid

- Ferulic acid에 의한 영향을 살펴보면, 비 배당체인 cyanidin은 ferulic acid와의 몰비율이 1:1 일 때 색소가 93.9% 파괴되었고, 몰비율이 1:2 일 때 96.8% 파괴되어 몰비율에 관계없이 대부분의 색소가 파괴됨. 이에 반해 배당체인 cyanidin-3-O-sambubioside는 저장 7일째에 ferulic acid와의 몰비율이 1:1과 1:2일 때 색소 잔존율이 각각 95.8%와 96.7%로 몰비율에 관계없이 색소가 매우 안정하게 유지됨. 또한 ferulic acid가 cyanidin-3-O-sambubioside의 색소 안정성에 미치는 영향으로 저장 7일 이후에 대한 측정이 필요한 것으로 판단됨 (Table 3).

Table 3. Copigmentation effect of ferulic acid on color degradation of anthocyanins during storage (25°C, under the dark)

Molar ratio	Cyanidin		Cyanidin-3-O-sambubioside	
	(1:1)	(1:2)	(1:1)	(1:2)
Storage Time	Δ Abs	Δ Abs	Δ Abs	Δ Abs
0	1.047± 0.007	1.018± 0.007	0.841± 0.004	0.834± 0.011
2	0.342± 0.011	0.341± 0.008	0.829± 0.006	0.832± 0.003
6	0.193± 0.004	0.208± 0.006	0.826± 0.006	0.835± 0.005
12	0.134± 0.004	0.165± 0.008	0.816± 0.006	0.829± 0.004
24	0.059± 0.008	0.135± 0.003	0.81± 0.006	0.825± 0.003
48	0.083± 0.012	0.093± 0.005	0.802± 0.003	0.806± 0.004
72	0.068± 0.004	0.07± 0.001	0.798± 0.010	0.806± 0.004
120	0.067± 0.003	0.049± 0.002	0.804± 0.006	0.811± 0.002
168	0.064± 0.004	0.033± 0.001	0.806± 0.004	0.807± 0.004

③ Rosemarinic acid

- Rosemarinic acid에 의한 영향을 살펴보면, ferulic acid와 마찬가지로 비 배당체인 cyanidin의 경우 몰비율에 관계없이 색소가 90% 이상 파괴됨. 이에 반해 배당체인 cyanidin-3-O-sambubioside는 저장 7일째에 ferulic acid와의 몰비율이 1:1과 1:2일 때 색소 잔존율이 각각 96.8%와 97.4%로 몰비율에 관계없이 색소가 매우 안정하게 유지됨. 또한 rosemarinic acid가 cyanidin-3-O-sambubioside의 색소 안정성에 미치는 영향으로 저장 7일 이후에 대한 측정이 필요한 것으로 판단됨 (Table 4).

Table 4. Copigmentation effect of rosemarinic acid on color degradation of anthocyanins during storage (25°C, under the dark)

Molar ratio	Cyanidin		Cyanidin-3-O-sambubioside	
	(1:1)	(1:2)	(1:1)	(1:2)
Storage Time	Δ Abs	Δ Abs	Δ Abs	Δ Abs
0	1.035± 0.005	1.04± 0.003	0.845± 0.006	0.834± 0.004
2	0.35± 0.006	0.373± 0.007	0.838± 0.006	0.844± 0.002
6	0.193± 0.005	0.226± 0.009	0.841± 0.002	0.832± 0.001
12	0.166± 0.003	0.181± 0.002	0.834± 0.001	0.828± 0.003
24	0.134± 0.006	0.145± 0.008	0.826± 0.004	0.823± 0.002
48	0.088± 0.007	0.093± 0.007	0.821± 0.002	0.803± 0.002
72	0.078± 0.003	0.087± 0.006	0.815± 0.003	0.808± 0.003
120	0.072± 0.006	0.084± 0.004	0.813± 0.002	0.814± 0.004
168	0.068± 0.003	0.074± 0.008	0.818± 0.004	0.813± 0.002

④ Tannic acid

- Tannic acid에 의한 영향을 살펴보면, 비 배당체인 cyanidin은 저장 7일째 색소 잔존율이 tannic acid와의 몰비율이 1:1과 1:2일 때 각각 5.1%와 5.4%로 매우 낮았음. 이에 반해 배당체인 cyanidin-3-O-sambubioside는 저장 7일째에 tannic acid와의 몰비율이 1:1과 1:2일 때 색소 잔존율이 각각 95.8%와 96.4%로 매우 높았음. 또한 tannic acid가 cyanidin-3-O-sambubioside의 색소 안정성에 미치는 영향으로 저장 7일 이후에 대한 측정이 필요한 것으로 판단됨(Table 5).

Table 5. Copigmentation effect of tannic acid on color degradation of anthocyanins during storage (25°C, under the dark)

Molar ratio	Cyanidin		Cyanidin-3-O-sambubioside	
	(1:1)	(1:2)	(1:1)	(1:2)
Storage Time	Δ Abs	Δ Abs	Δ Abs	Δ Abs
0	1.04± 0.005	1.035± 0.013	0.842± 0.002	0.839± 0.002
2	0.385± 0.007	0.42± 0.008	0.835± 0.006	0.836± 0.004
6	0.241± 0.006	0.264± 0.008	0.831± 0.002	0.833± 0.002
12	0.188± 0.005	0.219± 0.006	0.825± 0.012	0.831± 0.002
24	0.159± 0.008	0.167± 0.003	0.826± 0.003	0.822± 0.004
48	0.111± 0.010	0.121± 0.010	0.81± 0.006	0.809± 0.003
72	0.096± 0.006	0.101± 0.010	0.813± 0.002	0.804± 0.001
120	0.085± 0.004	0.076± 0.004	0.82± 0.004	0.813± 0.011
168	0.054± 0.002	0.056± 0.004	0.807± 0.006	0.809± 0.008

- cyanidin-3-O-sambubioside의 경우는 색소체와 첨가하는 copigments의 몰비율에 관계없이 저장 7일째까지 L-Ascorbic acid를 제외한 모든 copigments 실험 구에서 95.8% 이상의 높은 색소 잔존율을 보였음. 하지만, 실험의 진행을 압소, 25°C에서 진행한 만큼 배당체인 cyanidin-3-O-sambubioside의 copigments 효과에 의한 색소 안정성 향상 효과를 탐색해 보기 위해 25°C보다 높은 온도인 80°C에서의 실험을 추후 진행해 볼 필요가 있다고 판단 됨.

3. 색소체의 제품 적용 시 품질저하 요인 탐색 및 해결 방안 마련

(1) 제품 적용 시 품질저하 요인 탐색

- 오가자 추출물의 페놀성 화합물이 식품내의 단백질 성분과 상호작용하여 표면에 피막을 형성 하거나 탁도를 증가시키는 haze를 형성하는 것으로 파악함. 이러한 현상은 유용한 단백질의 생체이용률과 페놀성 화합물의 생리활성 작용을 저해 할 뿐 아니라 이를 활용한 가공제품의 외관상 품질저하의 문제가 야기됨. 따라서 본 연구를 통해 haze 혹은 피막형태의 침전이 형성 되는 요인을 탐색 하고 이를 해결할 수 있는 방안을 마련하기 위한 기초데이터를 제시하고자 함.

1) Sample preparation

① 폴리페놀 용액

- 대조구: tannic acid를 물에 녹여 최종 농도가 0.02, 0.05, 0.1%가 되도록 제조함.
- 오가자 extract: 오가자 건조과실을 20%로 물 추출 하여 총 페놀함량이 0.02, 0.05, 0.1%가 되도록 제조함.
- Cyanidin-3-O-sambubioside: 정제한 오가자 주색소체인 cyanidin-3-O-sambubioside를 물에 녹여 최종 농도가 0.02, 0.05, 0.1%가 되도록 제조함.

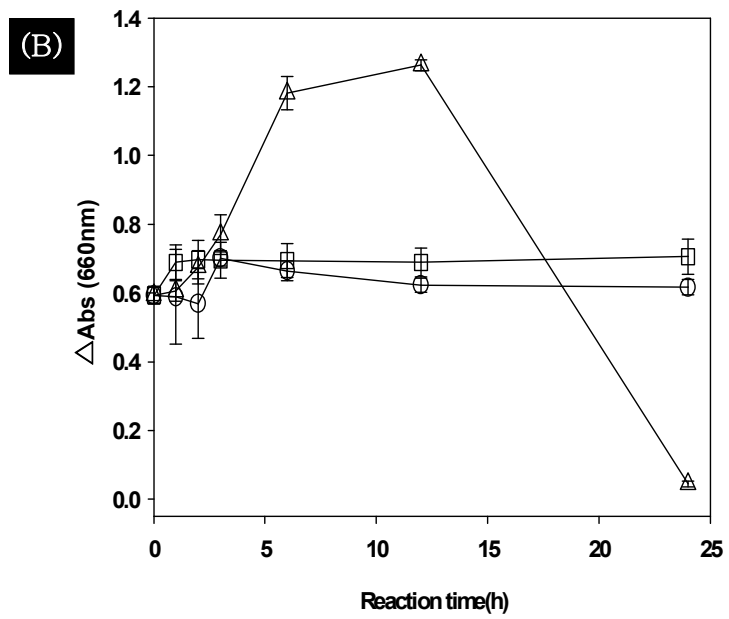
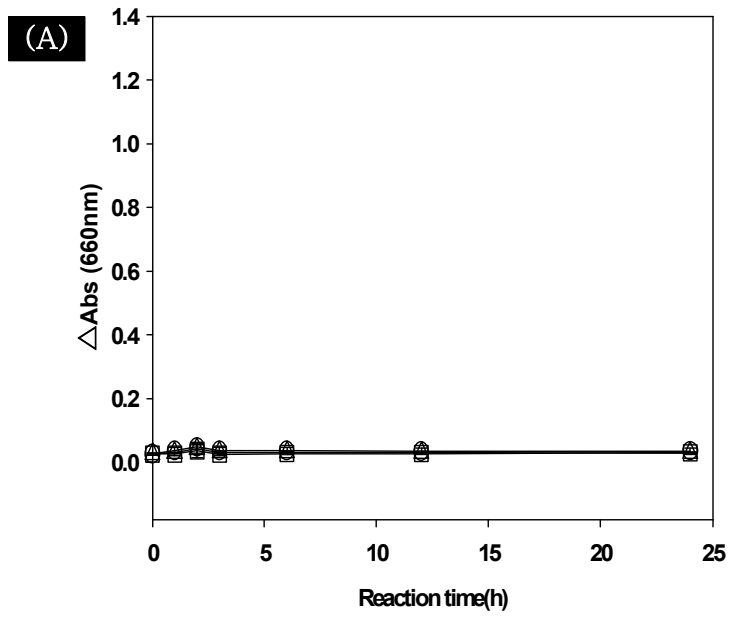
② 단백질 용액

- 대조구: 식품성분 중 단백질 대조구로 gelatin을 0.1%로 물에 현탁시킨 후 끓는 물에서 20분간 가열하여 제조함.
- SPI(Soy Protein Isolate): 분리대두단백을 0.1%로 0.02 M potassium phosphate buffer에 녹인 후 끓는 물에서 20분간 가열하여 제조함.

2) 폴리페놀-단백질 상호작용

- 0.02, 0.05, 0.1%(w/v) 폴리페놀 용액과 0.1%(w/v) 단백질을 각각 1:1(v/v)로 혼합하여 4, 25, 40°C에서 0, 1, 2, 3, 6, 12, 24 시간 간격으로 상호작용에 의한 haze가 형성 되는 정도를 관찰하기 위하여 UV/Vis scanning spectrophotometer(DUØ 730, Beckman Coulter, Inc., USA)를 이용하여 660 nm에서 흡광도의 변화를 측정함.

① Gelatin-Tannic acid간의 상호 작용



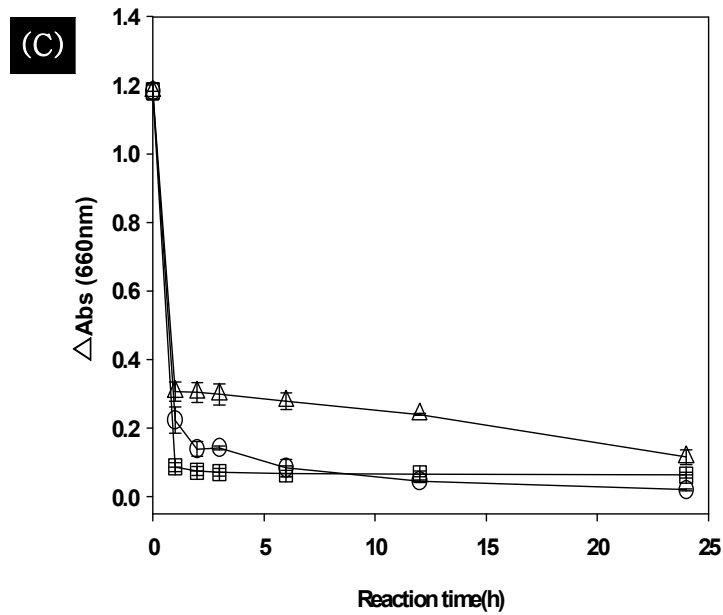
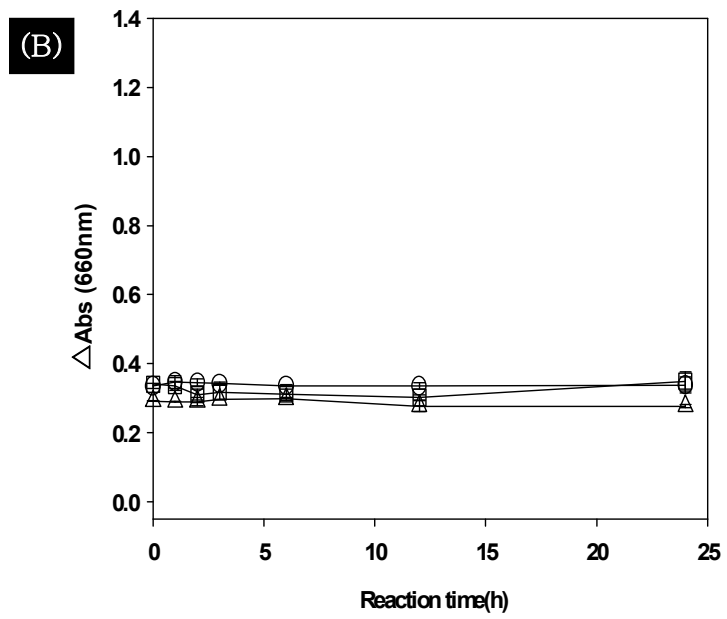
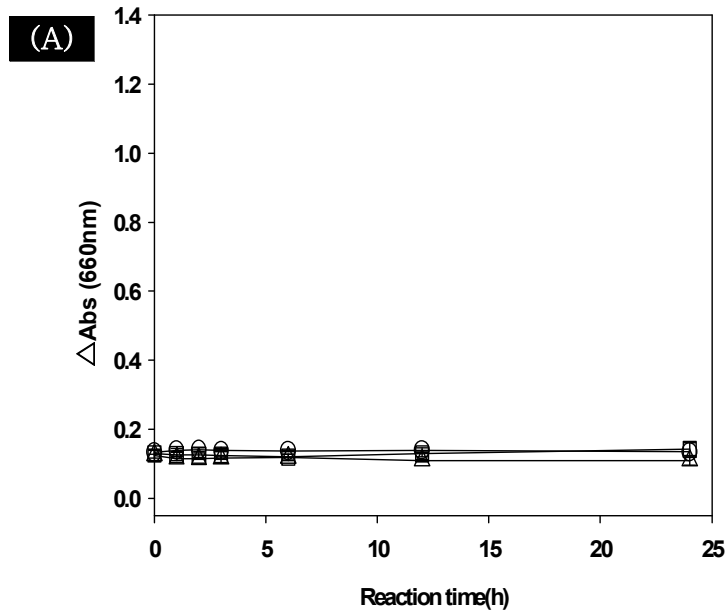


Figure 15. Effect of tannic acid and reaction temperature on the haze formation of gelatin solution. (A, 0.02% tannic acid; B, 0.05% tannic acid; C, 0.1% tannic acid: ○, 4°C; □, 25°C; △, 40°C)

- 0.1% gelatin 용액에 0.02% tannic acid를 첨가하였을 때는 절대적인 상호작용의 양이 적어 haze 형성이 미미한 관계로 흡광도 변화가 거의 없었으나, 0.05% tannic acid 농도 수준에서는 혼합 직후부터 haze 형성이 급속하게 진행되어 이미 탁도가 현저하게 증가하였음. 4 및 25°C의 반응온도에서는 혼합 2시간 이내에 탁도의 증가가 진행된 후 24 시간이 경과할 때까지의 흡광도 값이 유지되는 양상을 보여 줌. 반면 0.05% tannic acid를 첨가한 시험구의 40°C 반응 조건에서는 12 시간이 경과한 후 흡광도 값의 변화가 1.3까지 증가하여 현저한 탁도 증가를 보이다가 haze 입자 크기의 성장으로 침전되어 상등액의 탁도가 감소한 것으로 나타남. 0.1% tannic acid를 첨가한 실험 구에서는 반응 1시간 이내에 형성된 haze가 모두 침전되어 흡광도 변화가 초기 최대 1.2에서 1시간 이내에 0-0.3 사이로 떨어지는 것으로 나타남.

② Gelatin-오가자 추출물간의 상호작용



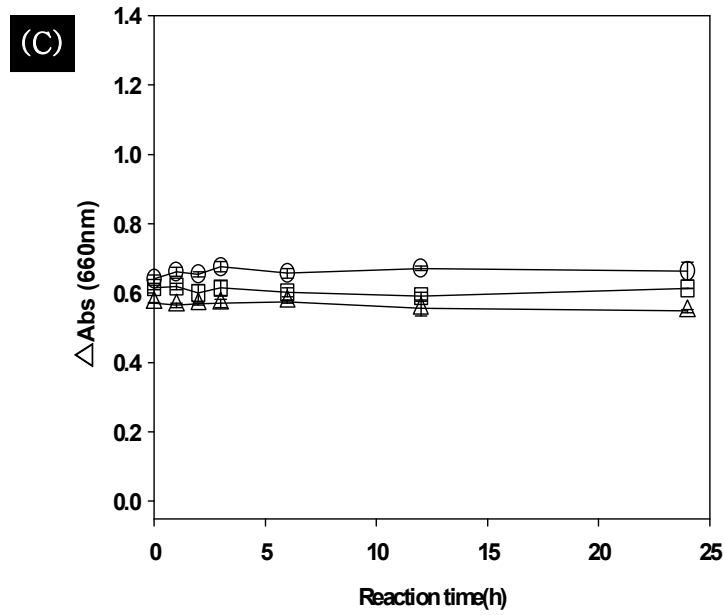
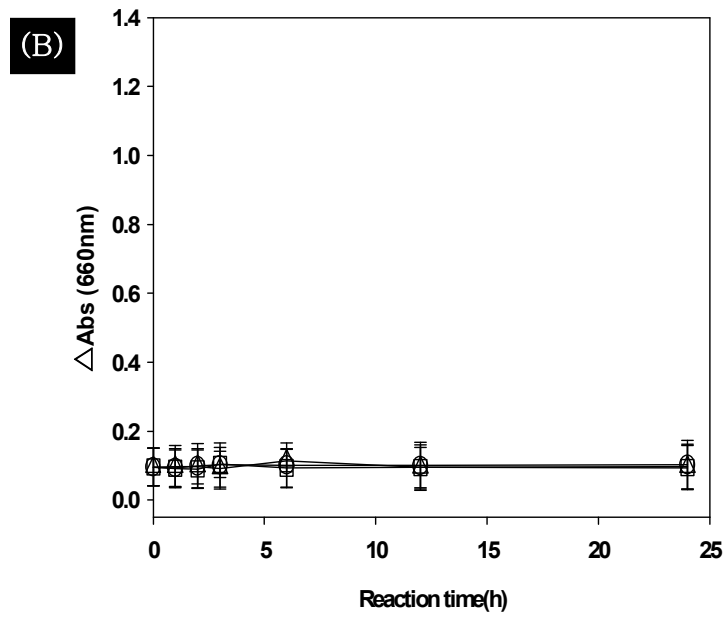
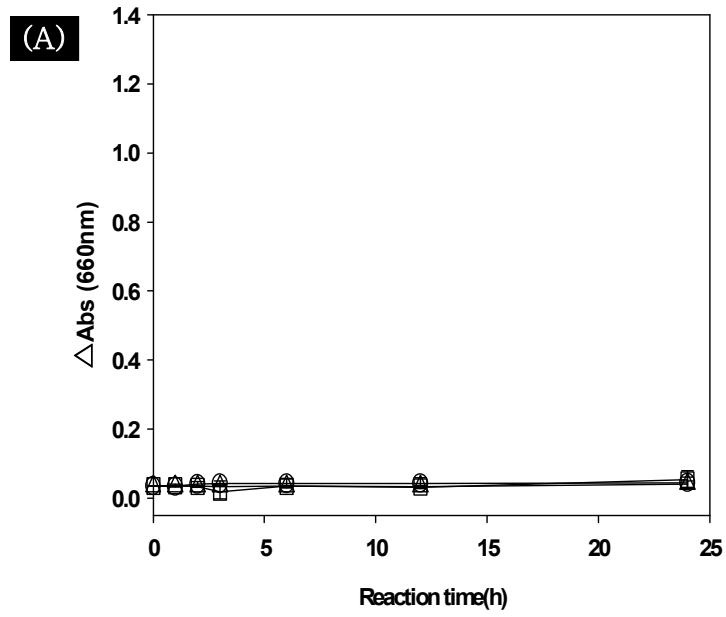


Figure 16. Effect of ogaja extract and reaction temperature on the haze formation of gelatin solution. (A, 0.02% extract; B, 0.05% extract; C, 0.1% extract: ○, 4°C; □, 25°C; △, 40°C)

- 오가자 추출물과 0.1% gelatin과의 반응에서, 오가자 추출물이 0.02%일 때의 초기 흡광도 값은 0.14 정도이고 0.05%일때는 0.34, 0.1%일때는 0.65인 것은 오가자 추출물의 농도가 증가함에 따라 초기 흡광도 값도 증가한 것임. 하지만 반응 시간에 따라서는 온도에 관계없이 각각의 초기 흡광도 값대로 유지한 것은 오가자 추출물의 polyphenol과 gelatin은 haze형성 반응을 거의 하지 않는 것으로 판단됨.

③ Gelatin-Cyanidin-3-O-sambubioside간의 상호작용



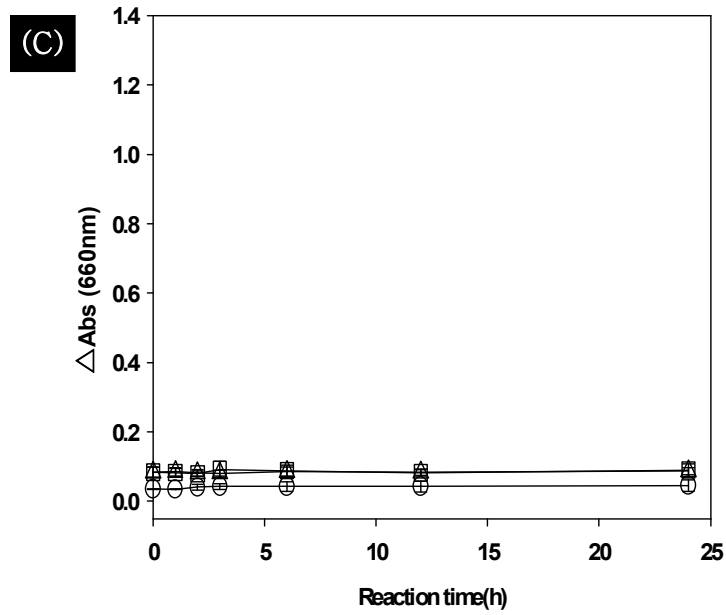
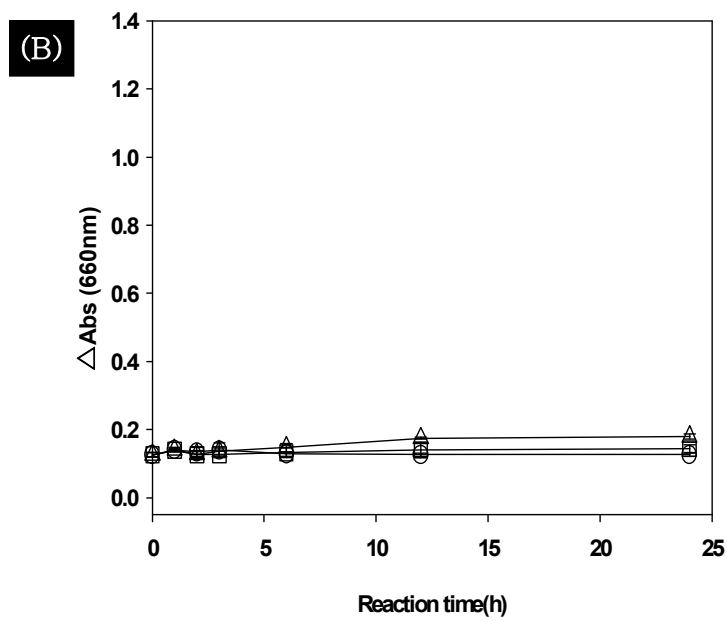
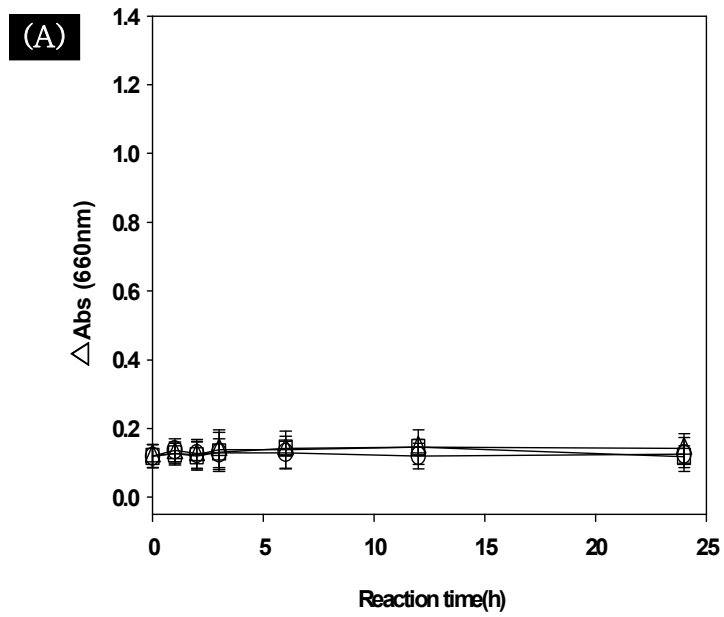


Figure 17. Effect of polyphenol concentration and temperature in 0.1% gelatin on haze formation. (A, 0.02% Cyanidin-3-O-sambubioside; B, 0.05% Cyanidin-3-O-sambubioside; C, 0.1% Cyanidin-3-O-sambubioside: ○, 4°C; □, 25°C; △, 40°C)

- Cyanidin-3-O-sambubioside는 용액의 농도가 0.02%에서 0.1%로 증가함에 따라 초기 흡광도의 미세한 변화는 색소체의 농도에 따른 변화로 보임. 또한 반응 24시간까지 흡광도 값이 초기의 흡광도 값과 큰 차이가 없는 것은 cyanidin-3-O-sambubioside가 0.1% gelatin과 반응하여 반응온도에 관계없이 haze를 형성하지 않는 것으로 판단 됨.

④ 분리대두단백(SPI)-tannic acid 간의 상호작용



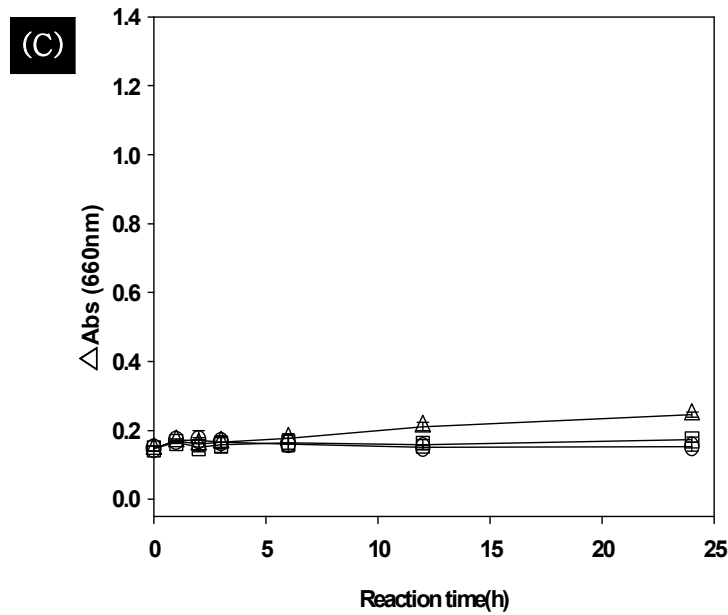
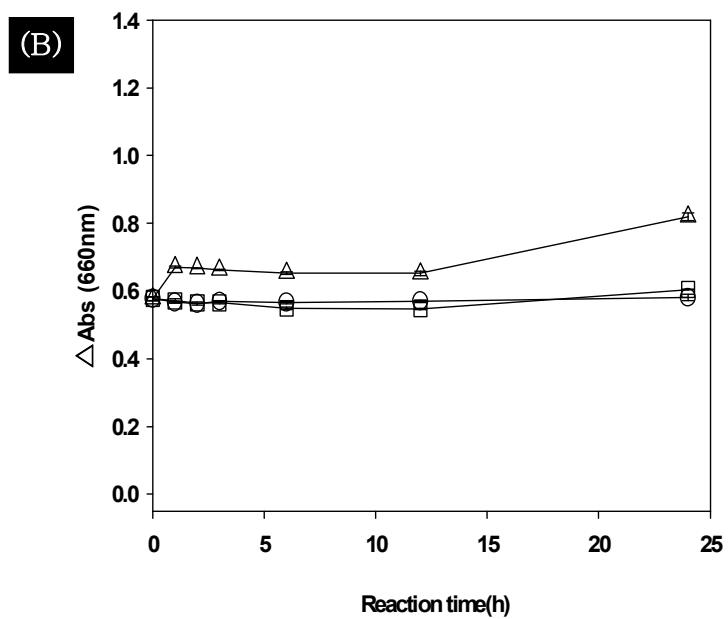
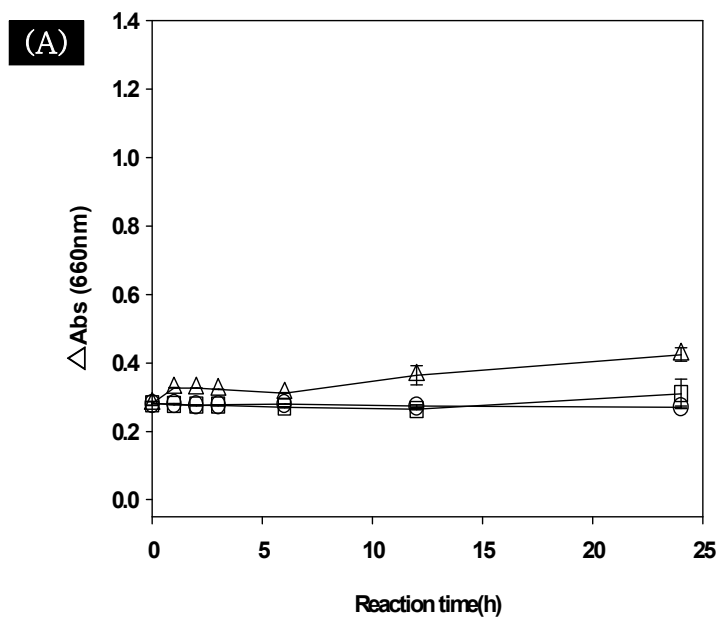


Figure 18. Effect of polyphenol concentration and temperature in 0.1% SPI on haze formation.(A, 0.02% tannic acid; B, 0.05% tannic acid; C, 0.1% tannic acid: ○, 4°C; □, 25°C; △, 40°C)

- Tannic acid와 SPI간의 반응에서는 tannic acid의 첨가량과 반응온도에 변화를 주어도 본 실험조건외 범위에서는 haze가 거의 형성되지 않는 것으로 나타남. 40°C 조건에서 0.02% 농도와 0.05%농도의 SPI에서는 24시간이 지난 후 흡광도 값이 0.03 정도 증가하였고 0.1%농도에서는 0.1정도 증가하였지만 4°C, 25°C조건에서는 불과 0.02 정도의 변화만이 나타남. 이는 단백질의 아미노산 조성 및 배열, 3차구조 등에 따라 페놀 화합물의 복합체 형성능에 영향을 주는 것으로 이해할 수 있음. 기존 보고에서는 Proline을 많이 함유하는 단백질의 경우 특정 페놀계 화합물과의 복합체 형성능이 높아 쉽게 haze를 형성하는 것으로 나타남(4). SPI의 경우 proline 함량이 약 5%로 proline이 12%인 gelatin에 비해 proline 함량이 적어 tannic acid와의 반응을 통하여 haze 형성능 자체가 감소하는 것으로 추측이 가능함. 즉 tannic acid의 경우 proline-specific 한 상호작용이 진행되었을 가능성을 시사해 주는 결과임.

⑤ 분리대두단백-오가자 추출물간의 상호작용



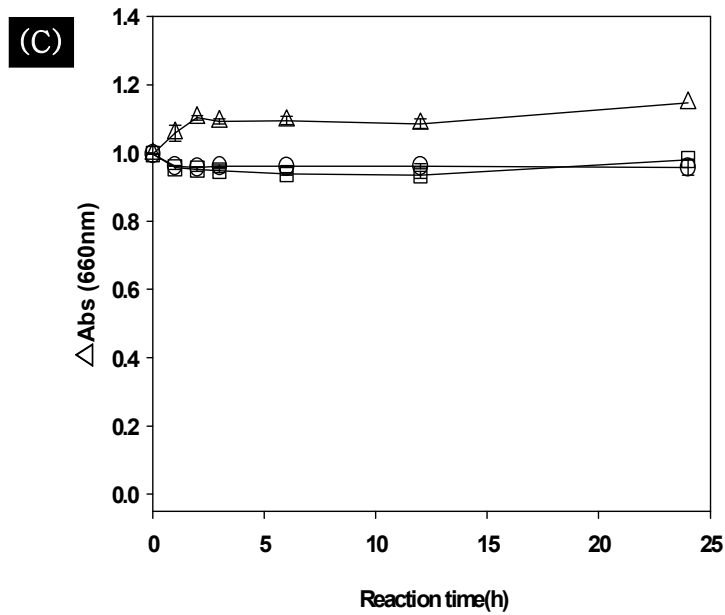
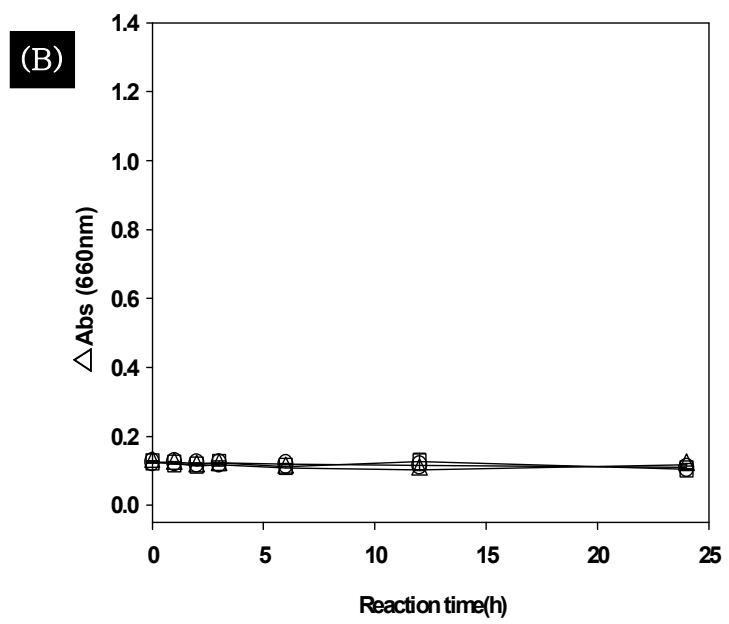
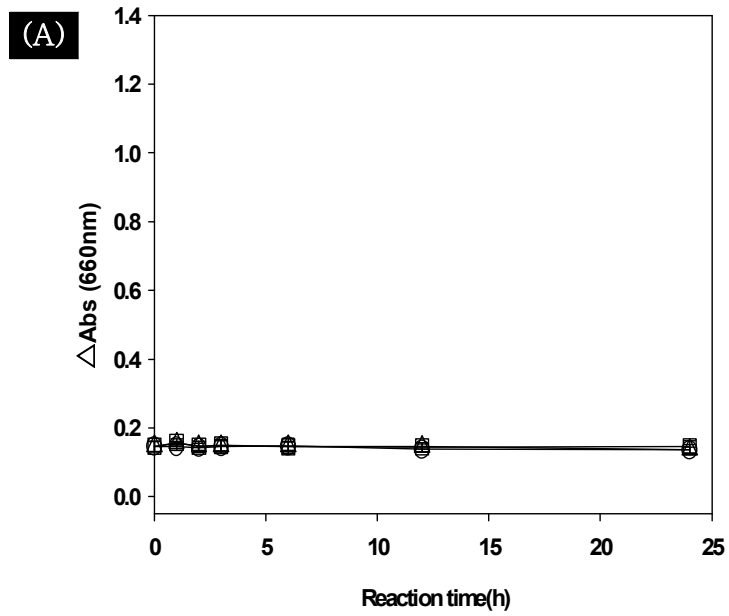


Figure 19. Effect of polyphenol concentration and temperature in 0.1% SPI on haze formation. (A, 0.02% extract; B, 0.05% extract; C, 0.1% extract: ○, 4°C; □, 25°C; △, 40°C)

- 0.1% SPI와 오가자 추출물을 반응시킨 결과, 25°C의 반응온도에서는 흡광도의 변화가 거의 없어 흡광도 값이 거의 일정하지만, 40°C에서는 모든 오가자 추출물 농도별 실험 구에서 반응 시간이 지남에 따라 haze 형성이 점차 증가하는 것으로 나타남. 오가자 추출물의 농도가 높아 질수록 반응 초기 흡광도 값이 올라가는데 이는 오가자 추출물 자체의 흡광도에 의한 차이임. 이 결과는 대조구로 선택한 페놀계 화합물인 tannic acid와 SPI간의 상호작용보다 오가자 추출물과 SPI간의 반응을 통해 현저하게 haze 형성을 보여주는 결과로 단순히 proline 함량에 따른 차이로 설명하기 보다는 페놀계 화합물 종류 역시 특정 단백질과의 특이적인 복합체 형성을 위해 중요한 요소임을 판단할 수 있음.

⑥ 분리대두단백-Cyanidin-3-O-sambubioside



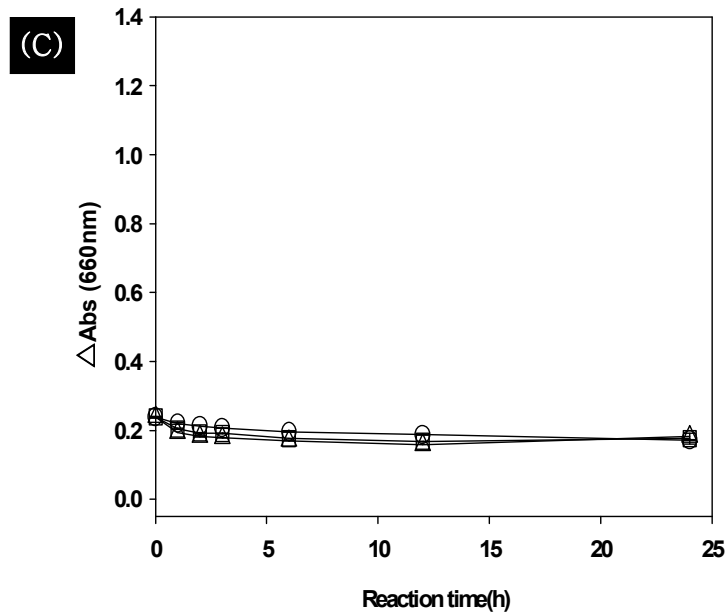


Figure 20. Effect of cyanidin-3-O-sambubioside and reaction temperature on the haze formation of SPI solution. (A, 0.02% cyanidin-3-O-sambubioside; B, 0.05% cyanidin-3-O-sambubioside; C, 0.1% cyanidin-3-O-sambubioside: ○, 4°C; □, 25°C; △, 40°C)

- 오가자 추출물에서 정제한 cyanidin-3-O-sambubioside를 SPI와 반응시켰을 때, 반응 24시간 까지 흡광도 값이 초기의 흡광도 값과 큰 차이가 없는 것은 cyanidin-3-O-sambubioside가 0.1% SPI와 반응하여 반응온도에 관계없이 haze를 형성하지 않는 것으로 판단 됨.
- SPI와 오가자 추출액에서의 haze 형성은 오가자 추출액 주색소체인 cyanidin-3-O-sambubioside와 SPI간의haze 형성이 아닌 오가자 추출액내의 아직 미동정된 미지의 폴리페놀 계통의 물질이 관여하는 것으로 추측해 볼 수 있음. 따라서 추가적인 연구를 통해 실제 SPI와 특이적으로 상호작용하는 폴리페놀 화합물의 탐색이 필요함.
- Gelatin과의 반응에서는 대조구였던 tannic acid만이 haze 형성을 일으켰고, 나머지 군에서는 haze가 형성되지 않아 proline이 풍부한 단백질 환경에서 오가자 추출물과 정제한 cyanidin-3-O-sambubioside는 haze를 잘 형성하지 않음. SPI와의 반응에서는 tannic acid보다 오히려 오가자 추출물 군에서 haze가 형성되었고, 정제한 cyanidin-3-O-sambubioside의 경우에는 gelatin과 마찬가지로 haze가 형성되지 않아 오가자 추출물 내의 아직 미동정된 미지의 폴리페놀 계통의 물질이 haze 형성에 관여한 것으로 보임.
- 이상의 결과에서 살펴본 바에 의하면 정제한 안토시아닌을 단백질 식품에 적용하더라도 불용성 침전과 탁해짐의 우려가 없어 식품에 대한 직접적인 적용성이 그 적용가능성이 큼. 다만 식품 산업에서 정제된 단일물질을 사용하는 점에 대한 문제가 지적될 수 있으며, 추가적인 연구를 통해 오가자 추출물내의 성분 중에서 직접적으로 SPI와 특이적으로 복합체를 형성하는 페놀계 화합물을 탐색할 필요가 있음.

(2) 폴리페놀-단백질 간 상호작용에 의한 haze 형성 저해방안 모색

1) Protease 적용을 통한 haze-active protein 가수분해

- 단백질과의 상호작용을 통해 haze 형성을 유도하는 polyphenol 류는 적어도 두 개 이상의 단백질 사슬과 결합할 수 있는 site를 가지는데, 이것은 단백질의 가교결합을 가능하게 하여 불용성 침전을 생성하거나 용액의 탁도를 증가시킴.(6) Haze를 형성하는 입자의 크기는 haze-active(HA) polyphenol의 종류와 HA protein의 종류에 따라 영향을 받음. 따라서 protease의 적용을 통한 HA protein의 가수분해로 haze 형성을 저해할 수 있는 가능성이 높을 것으로 판단함. 본 실험에서는 기존 연구논문 (7)을 통해 보고된 gelatin과 tannic acid 사이의 haze 형성을 positive control로 활용하여 폴리페놀과 단백질간의 상호작용을 통한 haze 형성을 확인하기 위해, 식품에서 단백질 급원으로 많이 이용되는 분리대두단백(SPI, soy protein isolate)을 haze 형성능을 확인하기 위한 추가적인 단백질 모델 균으로 이용함. 예비실험결과를 토대로 haze 형성이 현저하게 일어나는 반응조건의 탐색을 통해 최종 반응조건을 확립하고, 2종의 protease 작용에 의한 haze 형성 저해 능을 측정 함.(4)

2) Sample preparation

① Polyphenol preparation

- 대조구: tannic acid를 물에 녹여 최종 농도가 0.1%가 되도록 제조함.
- 오가자 extract: 오가자 건조과실을 20%로 물 추출 하여 total phenol함량이 0.1%가 되도록 제조함.

② Protein preparation

- 대조구: 식품성분 중 단백질에 대한 대조구로 gelatin을 물에 녹여 0.1%로 제조한 후 끓는 물에서 중탕으로 20분간 끓여서 사용함.
- SPI(Soy Protein Isolate): 분리대두단백질을 0.02M phosphate buffer에 녹여 0.1%로 제조하여 끓는 물에서 중탕으로 20분간 끓여서 사용함.

③ protease

- Plant protease: papain from Papaya latex (Sigma-Aldrich, USA). papain을 0.02 M potassium phosphate buffer에 녹여 1.0 U/mL, 10.0 U/mL가 되도록 제조함.
- Bacterial protease: protease type XIV from Streptomyces griseus (Sigma-Aldrich, USA) protease를 0.02 M potassium phosphate buffer에 녹여 1.0 U/mL, 10.0 U/mL가 되도록 제조.

3) 폴리페놀-단백질 간 상호작용에 의한 haze 형성 저해 실험을 위한 조건 설정

- 예비실험을 통해 haze가 가장 많이 형성된 0.1% gelatin + 0.1% tannic acid 실험군의 40°C 반응조건에서의 papain의 적용을 통한 haze 형성 저해 정도를 알아보기 위해 protein을 효소로 분해 후 polyphenol을 첨가한 기존의 연구를 참고하여(5) 0.1% gelatin에 papain 1.0 U/mL을 0, 1, 2시간 반응 후 tannic acid를 첨가하여 0, 1, 2, 3, 6, 12, 24 시간 마다 haze가 형성이 저해 되는 정도를 UV/Vis scanning spectrophotometer(DU⁰ 730, Beckman Coulter, Inc., USA)를 이용하여 660 nm에서 흡광도를 측정함. 별도의 다른 처리방법으로는 0.1% tannic acid에 papain 1.0 U/mL 첨가하여 0, 1, 2 시간 경과한 후 gelatin를 첨가하여 0, 1, 2, 3, 6, 12, 24 시간 마다 haze가 형성이 저해 되는 정도를 흡광도로 측정함.

① 0.1% gelatin을 1.0 U/mL의 papain으로 0, 1, 2시간 분해 후 tannic acid 첨가

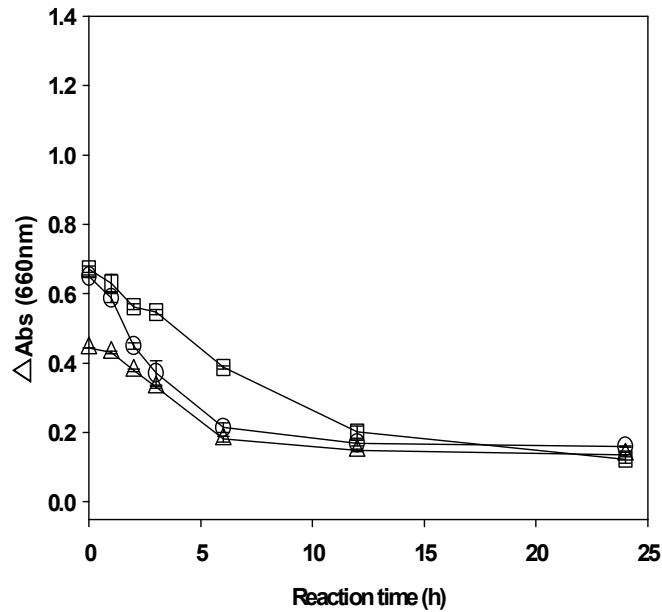


Figure 21. Effect of papain on the inhibition of haze formation during the incubation at 40°C. (○, 0 hr; □, 1 hr; △, 2 hr)

- 0.1% gelatin에 1.0 U/mL의 papain을 넣어 준 후 0, 1, 2 시간 반응 시킨 후 0.1%의 tannic acid를 첨가했을 때 papain에 의한 haze 형성 저해로 초기 흡광도 값이 0.5-0.7 수준이었음. 이는 효소를 반응시키지 않는 조건에서 0.1% gelatin과 0.1%의 tannic acid를 반응시켰을 때의 초기 흡광도 값 1.2 보다 감소한 수치이다. 초기 흡광도 값은 gelatin을 papain으로 3시간 분해 후 tannic acid를 첨가한 시험구가 가장 낮았다. 이는 papain에 의한 haze형성 저해 효과인 것으로 판단된다. 효소반응 시작 이후 5시간이 경과함에 따라 소량의 haze가 형성되어 흡광도 값이 0.2 정도 낮아진 것으로 보임.

② 0.1% tannic acid용액에 1.0 U/mL papain 첨가 0, 1, 2 시간 경과 후 gelatin 첨가

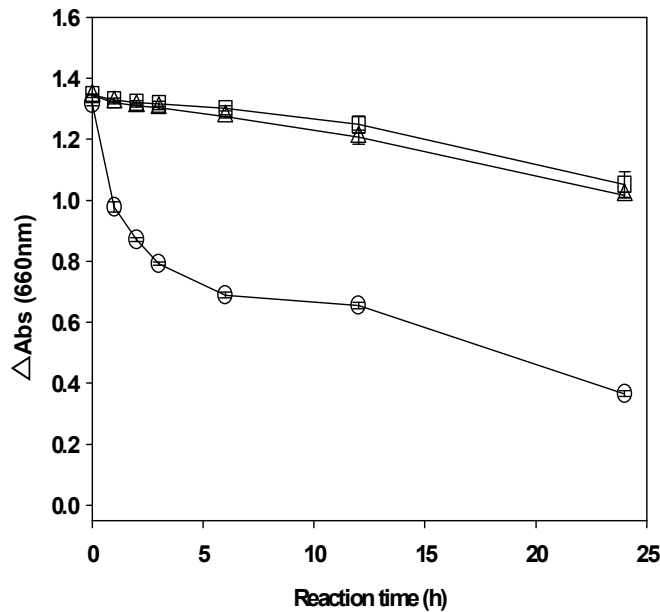


Figure 22. Effect of papain reaction time on the inhibition of haze formation during the incubation at 40°C. (○, 0 hr; □, 1 hr; △, 2 hr)

- 0.1% tannic acid에 1.0 U/mL의 papain을 첨가 한 후 0, 1, 2 시간 경과 후에 0.1% gelatin을 첨가한 경우의 초기 흡광도 변화 및 24시간 반응 후의 흡광도의 변화가 gelatin에 먼저 papain을 첨가하여 가수분해 반응을 유도했을 때 보다 모두 높게 나타났음. 특히 0.1% gelatin에 1.0 U/mL의 papain을 먼저 반응시킨 실험 구에서의 초기 흡광도 값이 0.5-0.7인 것에 비하여 0.1% tannic acid에 1.0 U/mL의 papain을 먼저 반응시킨 실험구의 초기 흡광도 값은 1.4로 매우 높았음. 하지만 0.1% tannic acid을 1.0 U/mL의 papain로 2시간 분해후 0.1% gelatin을 첨가한 경우는 침전이 느리게 진행되면서 haze형성이 어느정도 저해되는 것으로 보임. Papain을 첨가한 후 0시간 경과 후에 gelatin을 반응시킨 경우 효소가 haze형성을 저해시켜 24시간이 지난 후의 흡광도 변화값이 0.95 정도로 대조구(Fig 15-C)에 비해 0.2 정도 적었으며 papain 첨가 후 2시간 경과 후 gelatin을 반응시킨 경우 24시간 경과 후의 흡광도 변화값이 0.25 정도 이므로 더욱 haze형성을 저해시킨 것을 알 수 있음. Gelatin에 papain을 0시간 반응 시킨 후 tannic acid를 첨가 한 경우(Fig. 21), tannic acid를 넣기 전에 이미 효소가 반응하여 haze 형성을 저해시켜 초기 흡광도 값이 낮은 것으로 보임.

- Protease에 의한 HA-protein 가수분해 실험의 조건 설정을 위한 예비 실험에서 protein을 protease로 먼저 분해 후 polyphenol을 넣어준 것과 polyphenol을 먼저 protease로 반응 시키고 나서 protein을 넣어준 것 모두 2시간의 반응에서는 haze 형성을 저해하는 것으로 보였으므로 각각의 실험에 대한 효소 반응은 2시간으로 고정하여 진행함. 예비실험에서 사용한 papain 이외에도 bacterial protease를 사용하였고, 효소를 예비실험에서 사용한 양인 1.0 U/mL과 효소량을 늘려 10.0 U/mL의 반응도 함께 진행하였음.

4) Protease에 의한 HA-protein의 가수분해 실험

- Protein에 protease를 반응하여 40°C에서 2시간 반응 시킨 후 polyphenol을 첨가하여 0, 1, 2, 3, 6, 12, 24 시간 마다 haze 형성이 저해 되는 정도를 UV/Vis scanning spectrophotometer(DUO 730, Beckman Coulter, Inc., USA)를 이용하여 660 nm에서 흡광도를 측정함.

- Polyphenol에 protease를 첨가하여 40°C에서 2시간 경과 후 protein을 반응시켜 0, 1, 2, 3, 6, 12, 24 시간 마다 haze 형성이 저해 되는 정도를 UV/Vis scanning spectrophotometer(DUO 730, Beckman Coulter, Inc., USA)를 이용하여 660 nm에서 흡광도를 측정함.

① 0.1% Gelatin을 1.0-10.0 U/mL의 papain으로 분해 후 0.1% tannic acid 첨가

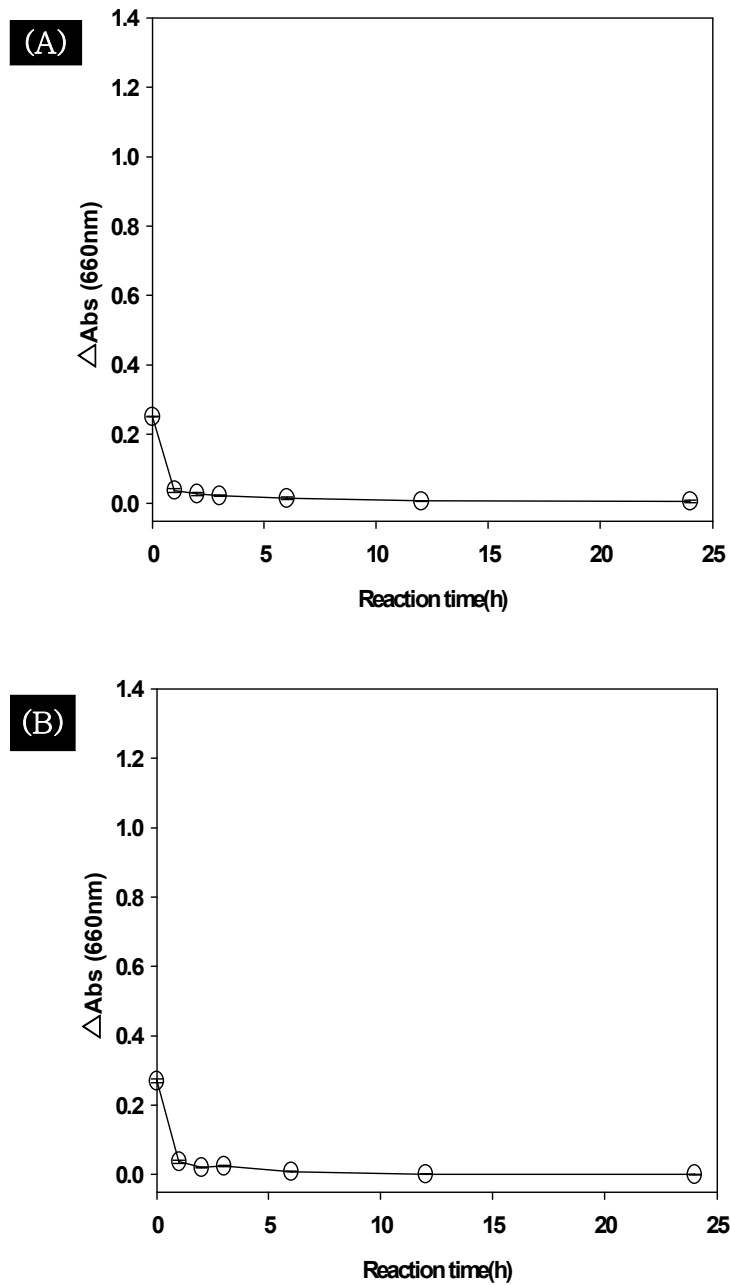


Figure 23. Effect of papain concentration on inhibition of haze formation during the incubation at 40°C. (A, 1.0 U/mL; B, 10.0 U/mL)

- Gelatin을 papain으로 2시간 동안 충분히 분해시켜 준 후 tannic acid를 첨가 하였으므로, 효소 unit수에 관계없이 초기에 생성되는 haze가 적어 반응 0시간에서의 흡광도 값은 0.3 정도로 효소를 사용하지 않았을 때의 흡광도 값인 1.2보다 (Fig. 15C) 0.9정도 감소함. 반응이 1시간 정도 지난 후에는 적은 양의 haze가 형성됨에 따라 불용성 침전물이 침전되어 상등액의 흡광도는 0을 유지함.

② 0.1% Gelatin을 1.0-10.0 U/mL의 bacterial protease로 분해 후 0.1% tannic acid 첨가

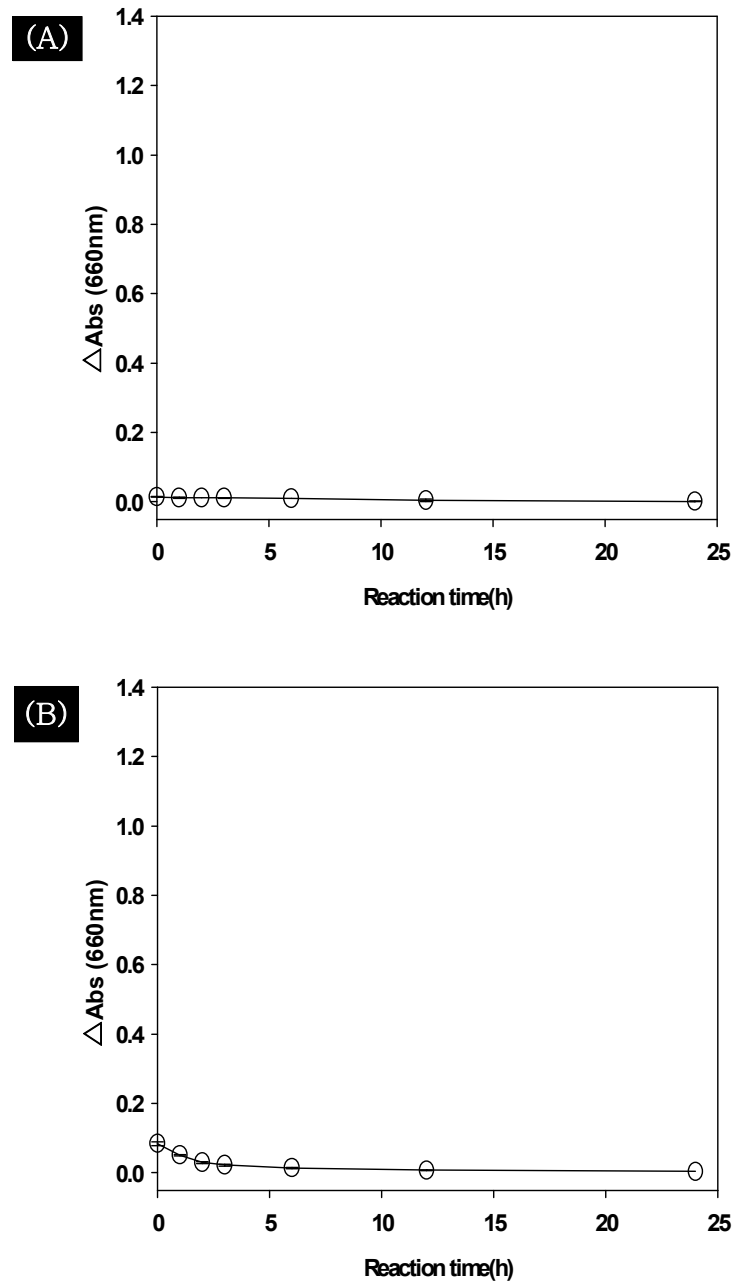


Figure 24. Effect of bacterial protease concentration on inhibition of haze formation during the incubation at 40°C. (A, 1.0 U/mL; B, 10.0 U/mL)

- Bacterial protease 반응구 역시 효소 unit수에 관계없이 대조구(Fig. 15C)에 비해 낮은 초기 흡광도 값을 나타내었으나, 10.0 U/mL를 넣어준 경우 효소 자체가 가지는 탁도에 의해 1.0 U 일 때보다 0.1 정도 높은 흡광도 값을 보임. 24시간 경과 후 소량의 haze가 형성됨에 따라 흡광도 값은 0을 유지함.

③ 0.1% SPI에 1.0-10.0 U/mL의 papain 첨가 후 0.1% 오가자 추출물 첨가

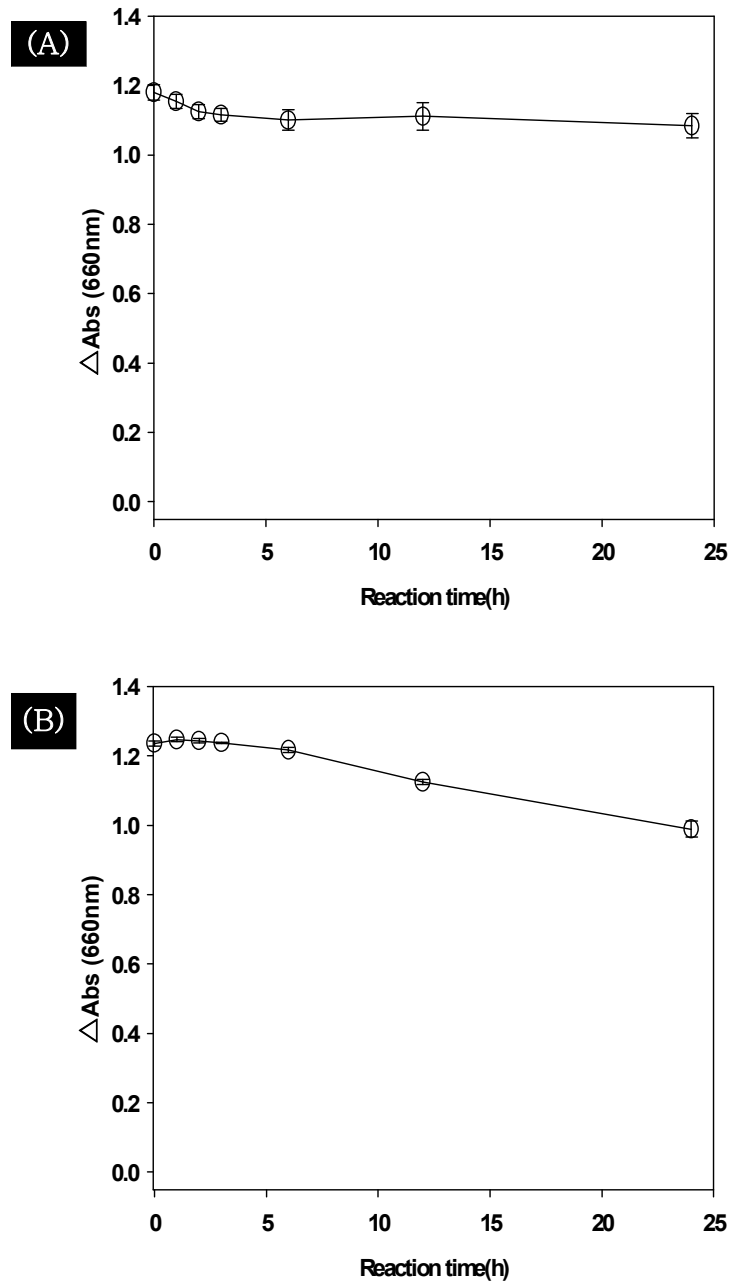


Figure 25. Effect of papain concentration on inhibition of haze formation during the incubation at 40°C. (A, 1.0 U/mL; B, 10.0 U/mL)

- 오가자 추출물과 SPI의 상호작용에 의한 haze형성 시 흡광도 값이 0.25 정도 증가되지만 (Fig. 19C) 효소를 첨가하였을 때는 haze 형성을 저해하여 흡광도 값이 줄어드는 것을 알 수 있음. 0.1% SPI을 papain과 반응 시킨 경우 24시간이 지난 후의 흡광도 값이 초기 흡광도 값에 비해 0.1 정도 줄어듦. 효소 Unit수에 관계 없이 24시간 후에는 흡광도 값이 1.1정도로 비슷하였음.

④ 0.1% SPI에 1.0-10.0 U/mL의 bacterial protease 첨가 후 0.1% 오가자 추출물 첨가

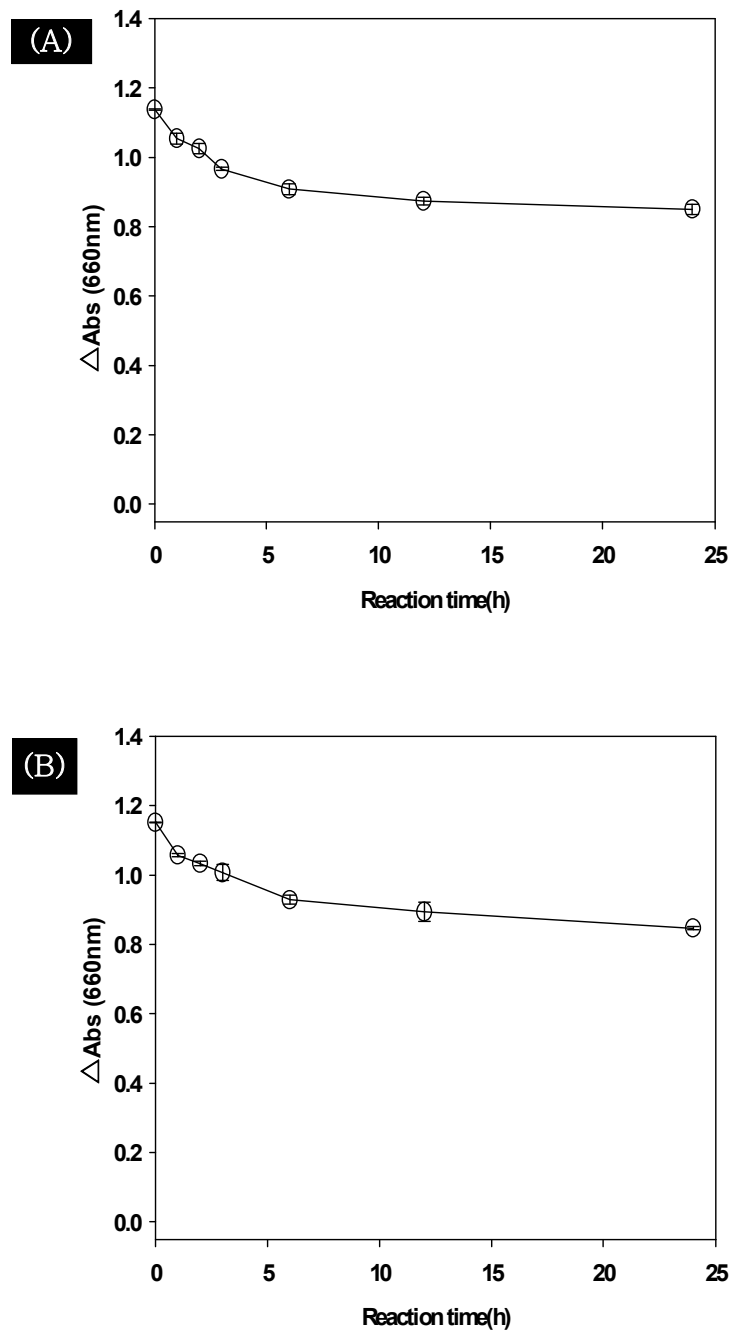


Figure 26. Effect of bacterial protease concentration on inhibition of haze formation during the incubation at 40°C. (A, 1.0 U/mL; B, 10.0 U/mL)

- 0.1% SPI에 bacterial protease를 반응 시킨 후 오가자 추출물을 첨가 한 경우 초기 흡광도 값에 비해 24시간 후의 흡광도 값이 0.3 정도 줄어들며, 효소 Unit수에 따른 차이를 보이지 않음. 이는 papain을 반응 시킨 경우와 유사한 경향이며 bacterial protease를 반응시킬 경우에도 효소 사용량에 따른 차이를 보이지 않았음.

5) Protease에 의한 HA polyphenol과 HA protein의 반응 저해 실험

① 0.1% tannic acid를 1.0-10.0 U/mL의 papain을 첨가 후 0.1% gelatin 첨가

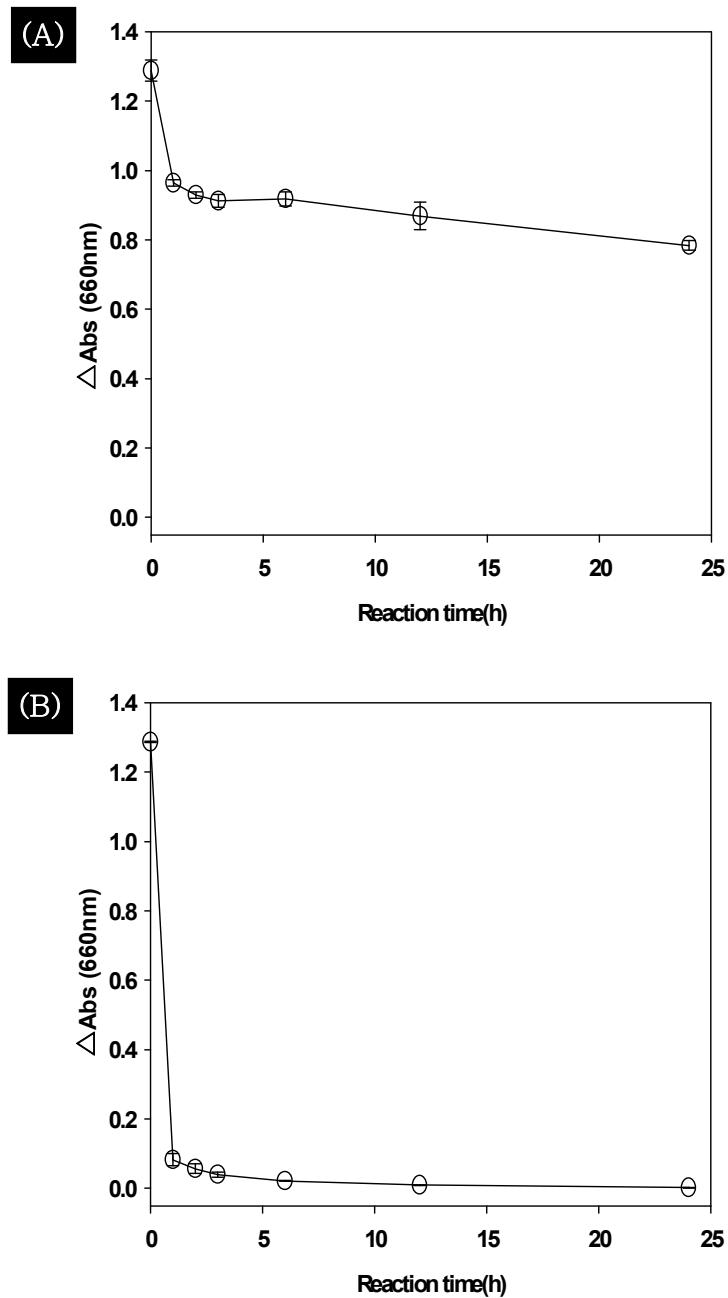


Figure 27. Effect of papain concentration on inhibition of haze formation during the incubation at 40°C. (A, 1.0 U/mL; B, 10.0 U/mL)

- Tannic acid에 papain을 첨가한 후 gelatin을 첨가 시킨 경우 초기 흡광도 값이 1.3정도이며 haze가 형성됨에 따라 불용성 침전이 형성되어 흡광도 값이 점차 줄어듦. 이는 효소를 처리하지 않은 대조구(Fig. 15C)와 유사한 경향이므로 효소에 의한 haze 저해 효과를 보지 못한 것으로 보여짐. Gelatin에 papain을 먼저 첨가 시킨 경우(Fig. 23) gelatin이 분해되어 초기 흡광도

값이 낮으며 효소 unit 수에 관계없이 haze를 저해하므로 gelatin을 papain 1.0 U/mL로 분해시킨 후 tannic acid를 첨가하는 것이 효과적임.

② 0.1% tannic acid를 1.0-10.0 U의 bacterial protease와 반응 후 0.1% gelatin 첨가

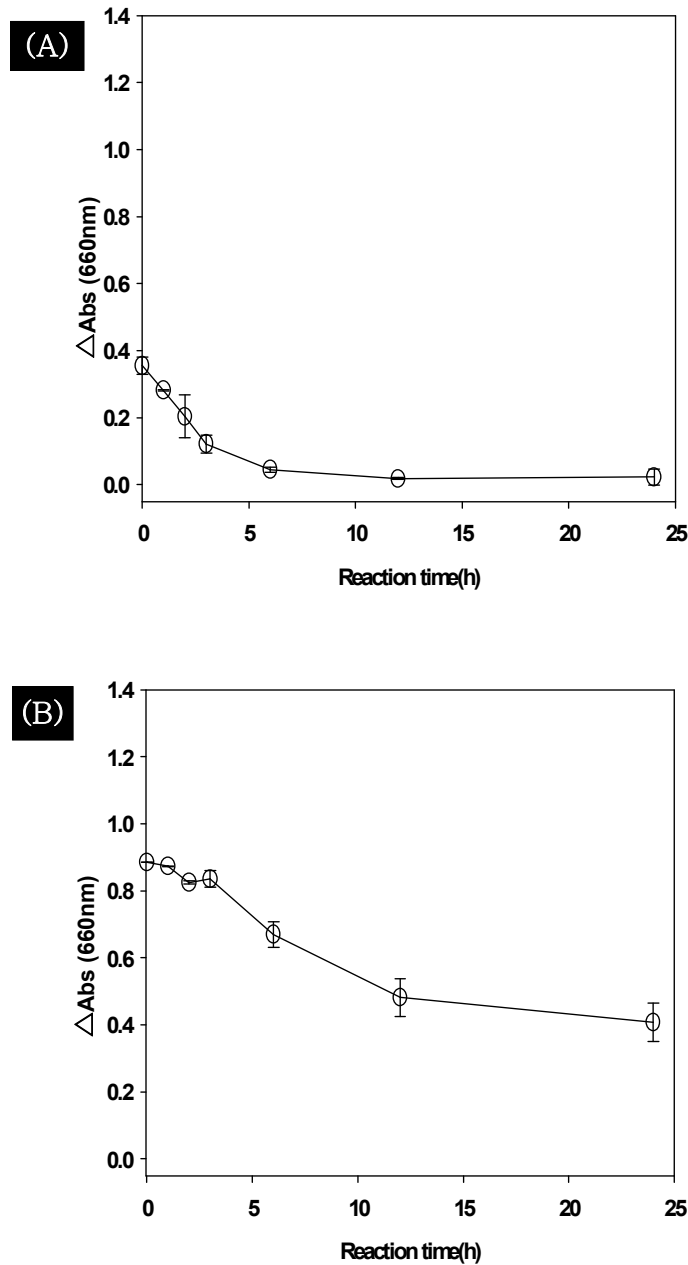


Figure 28. Effect of bacterial protease concentration on inhibition of haze formation during the incubation at 40°C. (A, 1.0 U/mL; B, 10.0 U/mL)

1.0 U/mL의 bacterial protease를 사용하였을 때 초기 흡광도 값은 0.9이고 24시간 후에는 0.5 정도 감소하였으며 10.0 U/mL의 효소의 경우 초기 흡광도 값이 상대적으로 낮은 0.4정도 이고 24 시간 후에는 0.35 정도 감소됨. 따라서 Protease에 의한 HA polyphenol과 HA protein의 반

응 저해 실험에서 tannic acid의 경우는 bacterial protease에 의해 haze형성 저해효과가 있으며 이때의 효소 사용량은 10.0 U/mL가 효과적인 것으로 판단됨.

③ 0.1% 오가자 추출물에 1.0-10.0 U/mL의 papain 반응 후 0.1% SPI 첨가

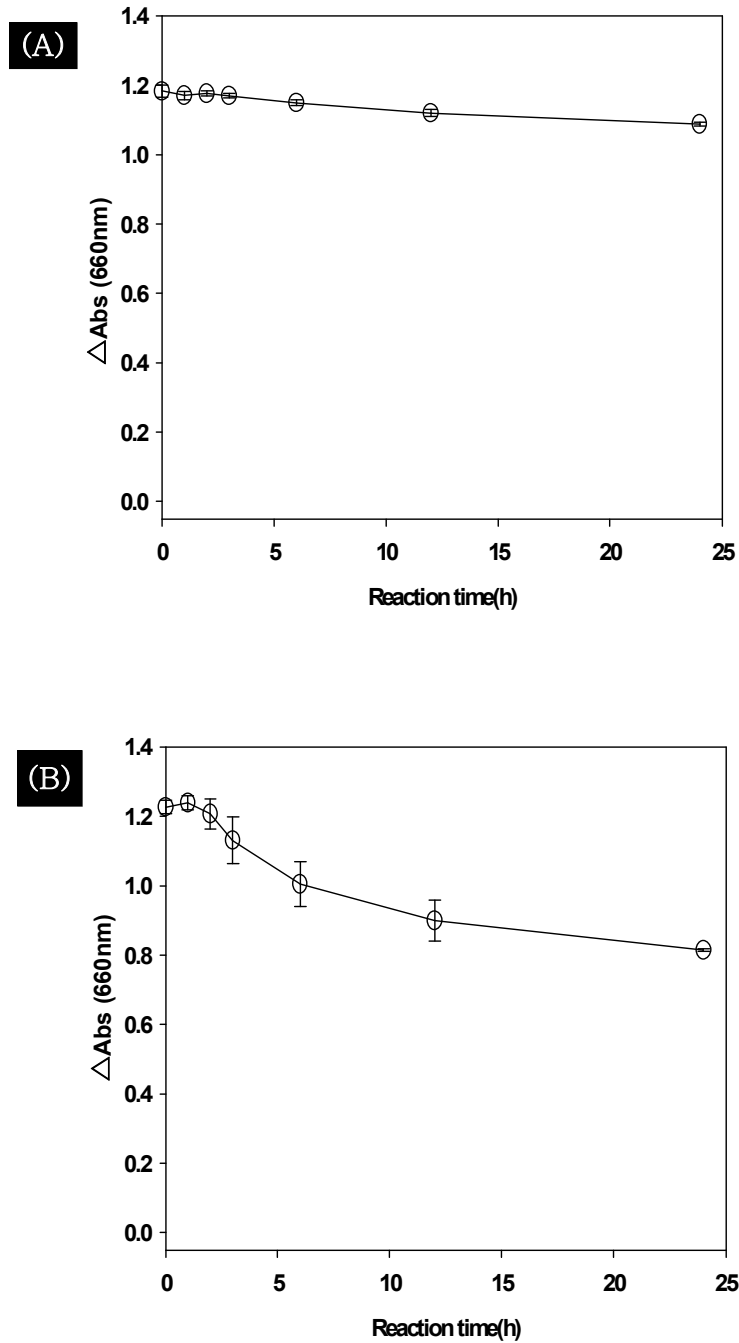


Figure 29. Effect of papain concentration on inhibition of haze formation during the incubation at 40°C. (A, 1.0 U/mL; B, 10.0 U/mL)

- 오가자 추출물에 papain을 먼저 첨가 한 후 SPI를 반응시킨 경우 효소 unit 수에 관계없이

초기 흡광도 값은 1.2로 동일하지만 효소농도가 높은 10.0 U/mL에서는 시간의 경과에 따라 흡광도 값이 낮아지므로 haze형성을 저해시키는데 효과적임을 알 수 있음.

④ 0.1% SPI에 1.0-10.0 U/mL의 bacterial protease 첨가 후 0.1% 오가자 추출물 첨가

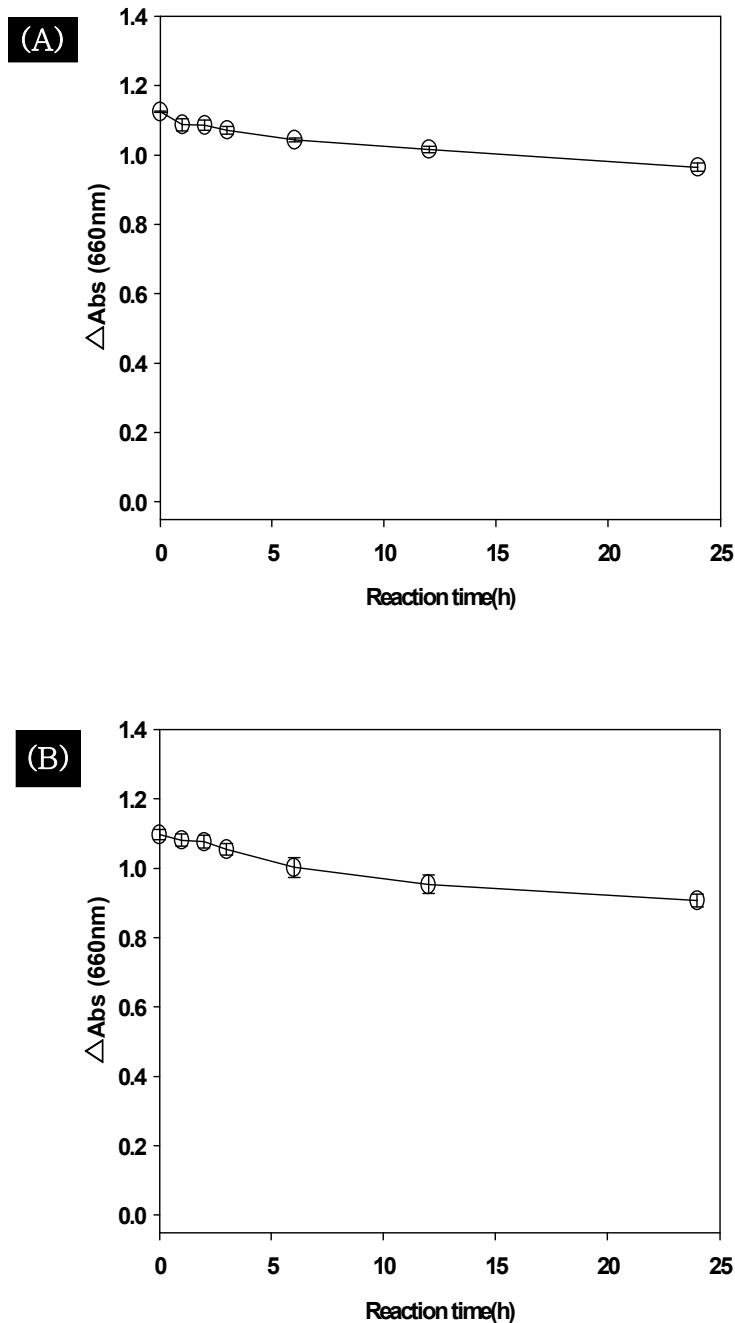


Figure 30. Effect of bacterial protease on inhibition of haze formation during the incubation at 40°C. (A, 1.0 U/mL; B, 10.0 U/mL)

- 오가자 추출물에 bacterial protease를 먼저 처리한 후 SPI를 넣어준 균에서는 1.0 U/mL와 10.0 U/mL 모두 haze 형성이 저해되어 흡광도 값이 낮아짐을 보임. 그러나 1.0 U/mL와 10.0

U/mL로 사용한 효소의 양에 따른 haze 형성이 저해되는 것 사이에 많은 차이를 보이지 않음. 따라서 protease에 의한 HA polyphenol과 HA protein의 반응 저해 실험에서 오가자 추출물의 경우는 bacterial protease에 의해 haze형성 저해효과가 있으며 1.0 U/mL과 10.0 U/mL의 효소 사용량에 따른 차이는 보이지 않았음.

- 단백질에 단백질분해효소를 먼저 처리한 후 페놀성 화합물을 첨가하여 HA-protein 분해로 인한 haze 형성을 저해한 것과 페놀성 화합물에 미리 단백질 분해효소를 넣어준 후 단백질을 첨가하여 HA-polyphenol과 HA-protein의 가교 형성을 저해한 것 군 모두 papain 보다는 bacterial protease에서 haze형성 저해 효과가 컸으며, 효소의 사용량에 있어서도 초기 흡광도 값의 차이가 있었지만 6시간 이후부터는 1.0 U/mL와 10.0 U/mL간의 차이가 크지 않았음. 오가자 추출물에 papain을 먼저 첨가 한 후 SPI를 반응시킨 경우를 제외하고 효소의 사용량에 있어서의 차이는 없었음. 따라서 효소 사용량에 대한 구체적인 추후실험이 필요하다고 판단 됨.

- 이상의 결과를 종합해 볼때 폴리페놀-단백질 간 상호작용에 의한 haze 형성 저해 방안으로 protease의 적용을 통한 HA-protein의 가수분해로 haze 형성을 저해할 수 있는 가능성이 높은 것을 확인 하였음. 본 실험에서는 대조구가 아닌 실험구의 조건 중 SPI에 bacterial protease를 2시간 먼저 처리한 후 오가자 추출물 을 첨가하여 haze 형성을 저해한 것이 가장 효과가 컸으며 효소의 사용량은 1.0 U/mL이 가장 적절하다고 판단됨.

제 4 절

제3협동과제: 오가자/고려엉겅퀴 시제품 및 색소체의 기능활성 탐색 - 성균관대학교 홍성렬

가. 오가자 색소체

(1) 항암활성

① 혈관 생성 억제 활성

인체조직을 구성하고 있는 모든 세포의 생존은 혈관에 의한 산소와 영양분의 공급 및 대사산물의 배출이 필수적으로 요구된다. 이런 혈관 생성 기전은 두 가지 생성기전으로 나뉘는데 하나는 혈관형성 (Vasculogenesis)으로써 혈관 전구세포인 angioblast의 분열과 분화에 의해 혈관과 혈구 세포들이 만들어지는 *de novo* 혈관생성 과정으로 초기 발생과정에서만 일어난다. 또 다른 과정은 혈관신생 (Angiogenesis)로 기존의 혈관이 자극에 의해 발아가 일어나 새로운 혈관이 생성되는 과정이다. 혈관신생의 과정은 세포외 기질의 proteolytic degradation, endothelial cell-matrix adhesion, migration, proliferation, differentiation 단계로 이루어진다 (15). 이런 생물학적 반응은 암, 류마티스 관절염, 건선 등과 같은 몇몇 질병과 연관되어 있다. 그리고 다양한 growth factor들이 *in vitro*와 *in vivo* 상에서 angiogenesis를 유도할 수 있다고 알려져 있는데 그 중 대표적으로 Vascular Endothelial Cell Growth Factor (VEGF)와 basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)가 주로 많이 발현된다.

기존에 존재하는 혈관으로부터 새로운 혈관의 성장, 즉 신생혈관 생성은 목표로 하는 내피세포에서 점착(adhesion), 이동(migration), 생존 기작(survival machinery) 등 등위적 신호에 의해 조절된다. 따라서 이러한 과정을 방해하는 물질들은 신생혈관 기작을 저해할 수 있다. 닭 배아의 용모막요막 (Chick embryonic chorioallantoic membrane, CAM)은 활성을 탐색하고자 하는 물질의 혈관내(intravascular) 뿐만 아니라 국소적(topical) 주입의 효과를 모두 관찰할 수 있고, 다른 실험에 비해 상대적으로 신속하며, 종양 성장과 같은 신생혈관 기작과 연관된 다른 연구에 쉽게 적용될 수 있다는 장점이 있다. 이처럼 CAM assay는 *in vivo*상에서 신생혈관 촉진 및 억제 물질의 상호작용에 대한 연구가 가능하도록 생리적인 환경을 제공해준다.

수정된 유정란의 표면을 70% 에탄올로 닦아준 후 37°C에서 배양하였다. 3.5일 후 유정란의 알부민을 3ml 추출한 후 window를 내고 4.5일이 되는 날 시료를 농도별로 chorioallantoic membrane (CAM)에 처리하였다. 6.5일째, 유정란의 CAM에 intralipose를 채워 맥관 형성을 관찰하였다.

오가자 색소체에 대한 혈관 생성억제 활성을 CAM assay 방법으로 측정하였다 (Table 1-1 & Figure 1-1). Negative control인 0.1% HCl을 처리했을 때 신규 혈관 형성이 일어났지

만, 오가자 색소체는 10 ug/ml/egg에서 약 50% 이상의 antiangiogenic 효과를 보였고, 30 ug/ml/egg에서는 80% 수준의 매우 높은 혈관생성억제 활성을 확인하였다 (Table 1 & Figure 1).

Table 1. Anti-angiogenic effect of cyanidin-3-O-sambubioside

Sample	Concentration	No. of survived eggs	No. of positive eggs	% Relative activity
0.1% HCl	-	9	0	0
Retinoic acid	10 uM	9	4	44.4
cyanidin-3-O-sambubioside	1 ug/ml	14	5	35.7
	10 ug/ml	15	8	53.3
	30 ug/ml	13	10	76.9

※ 대조군(0.1% HCl과 retinoic acid)은 10개, 각 시료별로 20개의 유정란을 사용하였다.

※ % relative activity는 (number of positive eggs / number of survived eggs) × 100을 통해 산출하였다.

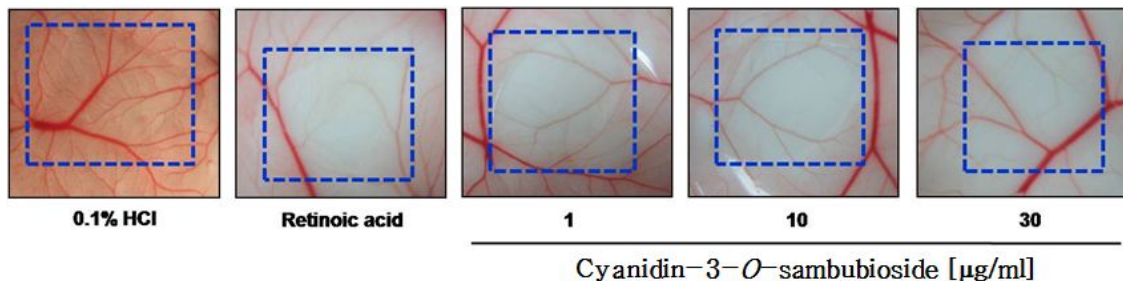


Figure 1. Effect of cyanidin-3-O-sambubioside on angiogenesis in the CAM assay

② HUVEC에서 Tube Formation 억제 활성 탐색

신생혈관과 관련된 현상을 연구하기 위한 가장 특징적인 실험 방법 중 내피세포가 3차원적인 구조 (tube)를 형성하는 능력을 측정하는 것이다. 어떠한 기원의 내피세포라도 자연적으로 관상의 구조(tubular structure)를 형성하게 되고, 이는 적당한 종류의 세포외기질 (extracellular matrix, ECM)을 도말한 *in vitro* 상에서도 관찰된다. Extracellular matrix를 도말한 *in vitro* assay의 경우에서와 마찬가지로 *in vivo* 에서도 이러한 현상은 상당히 충실하게 지켜진다. 특히 Engelbreth Holm Swarm (EHS) 종양세포로부터 주로 laminin으로 구성된 Matrigel을 이용하여 *in vitro*에서 24시간 내에 tube formation을 유도할 수 있다.

10 mg/ml의 Matrigel을 12-well plate에 코팅하였다. HUVECs (Human Umbrellal Vein Endothelial Cells)의 1.5×10^5 cells/ml의 농도로 Matrigel로 코팅된 plate에 seeding하고 37°C 배양기에서 60분 동안 배양하였다. 오가자 색소체를 농도별로 처리하고 추가 배양하였다. 24시간 후 현미경으로 tube 형성 여부를 측정하였다.

대조군에서는 뚜렷한 관상구조의 tube를 형성하였으나 30 μ g/ml의 오가자 색소체를 처리한 HUVECs은 불완전한 형태의 관상구조가 형성되었다. (Figure 2).

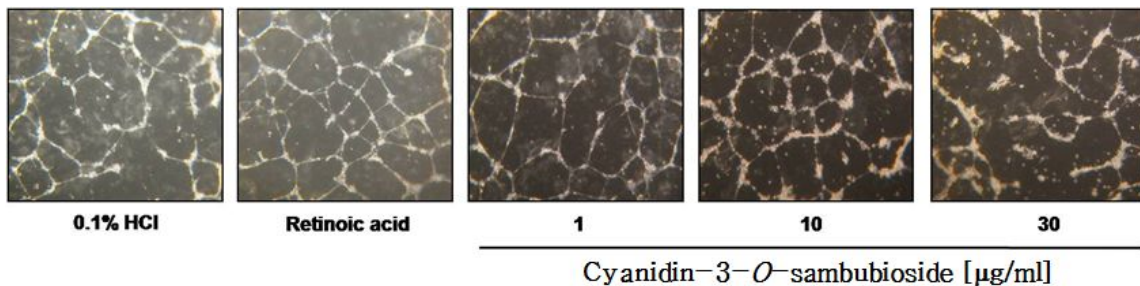


Figure 2. Inhibition of cyanidin-3-*O*-sambubioside on HUVEC tube formation on Matrigel

③ 암 전이 억제 활성 탐색

암에서 분리되어 나온 세포는 순환계 (림프관 및 혈관)를 타고 신체의 다른 부위로 이동하여 또 다른 새로운 종양을 형성한다. 이처럼 종양이 그 원발부위에서 여러 경로를 따라 다른 신체의 부위에 이식되어 그곳에서 정착, 증식하는 현상을 암의 전이 (metastasis)라 한다. 암의 침윤과 전이는 암세포와 세포외기질 (extracellular matrix)의 파괴 및 신혈관 생성을 포함하는 다단계 과정을 거친다. 세포외기질의 분해에 관여하는 metalloproteinase (MMP)는 암 전이와 침윤에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다 (12). 이런 이유로 암 전이 억제 활성은 암의 이동성 (cell motility) 및 MMP의 저해 활성을 평가하였다.

㉞ 암세포 이동성 억제 활성 탐색

인간 유방암 세포주인 MDA-MB-231을 사용하여 암 전이 억제활성을 평가하였다. 암 세포주 (2×10^5 cells/ml)를 24-well 세포배양 플레이트에 seeding하고 10~12 시간 배양 후, 과밀도로 자란 세포들을 yellow-tip을 사용하여 세포표면에 wound를 만들고 PBS로 2번, 무혈청 배지로 한번 세척하였다. FBS가 포함된 배지를 첨가하고 오가자 색소체를 원하는 농도별로 처리한다. 24시간 배양 후 현미경으로 각 세포들의 전이현상을 1% paraformaldehyde로 고정시킨 후 관찰하였다.

오가자 색소체의 1차 암 전이 억제활성을 wound healing assay를 통해 평가하였다 (Figure 3). 인간 유래 유방암 세포주인 MDA-MB-231에서 오가자 색소체의 농도 의존적인 암 전이 억제 활성을 나타내었다.

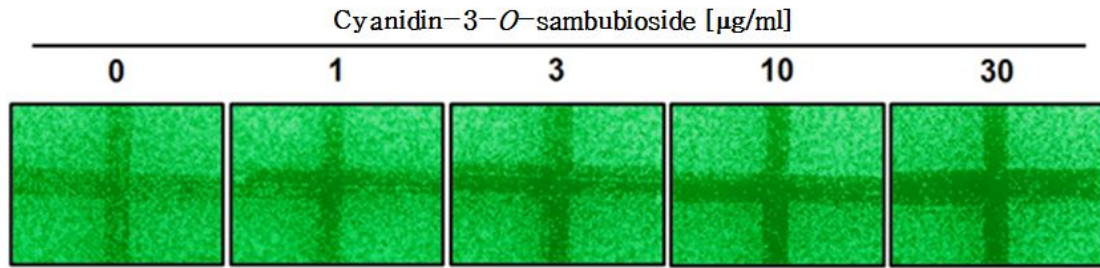


Figure 3. Anti-metastatic activities of the extracts of cyanidin-3-*O*-sambubioside on the human breast cancer cell line, MDA-MB-231

㉔ MMP의 저해 활성

인간 유방암 세포주인 MDA-MB-231을 사용하여 MMP 억제 활성을 평가하였다. 암 세포주 (2×10^6 cells/ml)를 100×20 mm 세포배양 플레이트 seeding하고 10~12 시간 배양 후, 과밀도로 자란 세포들에 FBS가 포함된 배지를 첨가하고 오가자 색소체를 원하는 농도별로 처리한다. 24 시간 배양 후, 배지를 수집하여 농축하여 acrylamide gel에 전기영동 하였다. 이 후 37°C에서 18시간동안 developing 후, Coomassie brilliant blue로 염색한 뒤 탈색했다.

오가자 색소체의 MMP의 저해 활성을 zymography를 통해 평가하였다 (Fig. 4). 인간 유래 유방암 세포주인 MDA-MB-231에서 오가자 색소체의 농도 의존적인 MMP-9의 활성 감소가 나타났다.

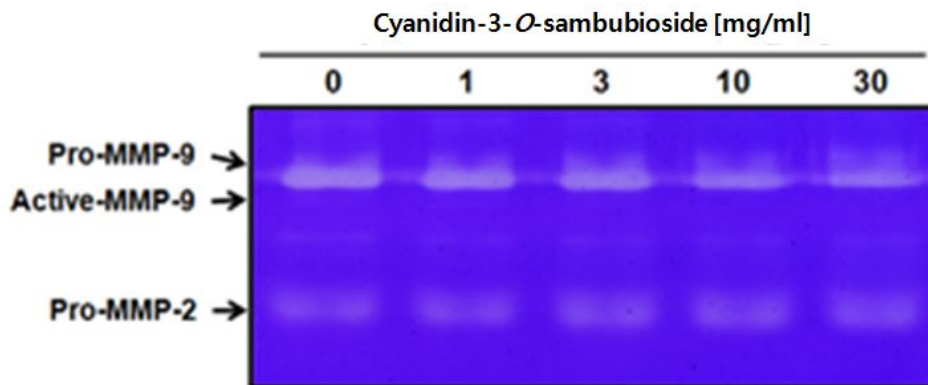


Figure 4. Decrease of MMP activities from the human breast cancer cell line, MDA-MB-231 by the extracts of cyanidin-3-*O*-sambubioside

㉕ 혈관생성 인자의 mRNA 수준의 발현 억제 탐색

혈관내피성장인자 (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF)는 암의 혈관 신생에 관여하여 암의 성장, 진행 및 전이에 중요한 역할을 한다 (9). VEGF의 발현을 유도하는 상위조절 핵심인자는 저산소증-유도전사인자 (hypoxia-inducible transcription factor, HIF)-1로 이는 HIF-1 α , HIF-1 β subunit으로 구성된 이질이량체 (heterodimer)이다. 종양의 빠른 성장과 진행에 따라 발생하는 종양 내 저산소증은 일부 고형 종양에서 HIF-1 α 의 지속적인 발현을 유도하여 VEGF 발현을 활성화시킴으로서 종양의 진행을 촉진한다.

암의 혈관생성에 영향을 주는 VEGF, HIF-1 α , TIMP1, 그리고 TNF- α 의 mRNA 발현 변화를 오가자 색소체 처리 후 역전사 중합효소연쇄반응으로 확인하였다. 인간 유방암 세포주인 MDA-MB-231에 오가자 색소체를 농도별로 처리한 결과, 암의 혈관생성에 영향을 주는 인자들의 발현량에는 큰 변화가 없는 것을 확인하였다 (Figure 5).

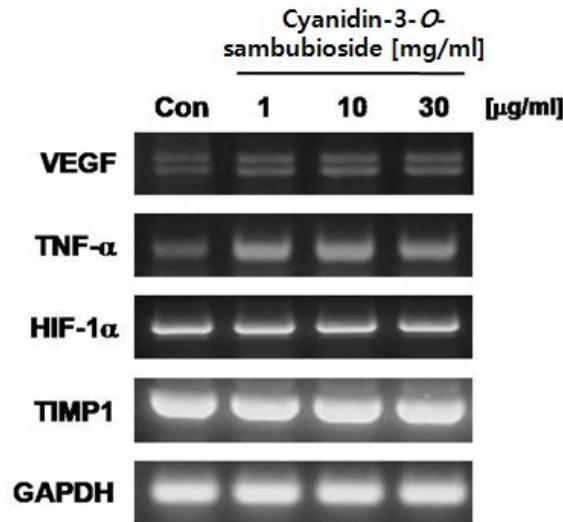


Figure 5. Effects of cyanidin-3-O-sambubioside on VEGF, HIF-1 α , TIMP1 and TNF- α in MDA-MB-231

⑤ 암 전이 인자의 mRNA수준의 발현 억제 탐색

Matrix metalloproteinase-2와 -9 (MMP-2, -9)은 세포외기질을 분해하여 암 세포의 전이에 중요한 역할을 하는 단백질이다. 반면, Tissue Inhibitors of Metalloproteinase-1, -2 (TIMP-1, -2)는 Matrix metalloproteinase의 활성을 저해하는 인자로서, 암 세포의 전이를 억제한다.

암 전이에 영향을 주는 MMP-2, MMP-9, TIMP-1, 그리고 TIMP-2의 mRNA 발현 변화를 오가자 색소체 처리 후 역전사 중합효소연쇄반응으로 확인하였다. 인간 유방암 세포주인 MDA-MB-231에 오가자 색소체를 농도별로 처리한 결과, MMP-9과 TIMP-2의 mRNA 합성이 감소하는 양상을 보인 반면, TIMP-2의 mRNA의 합성은 변화가 없는 것을 확인하였다 (Figure 6).

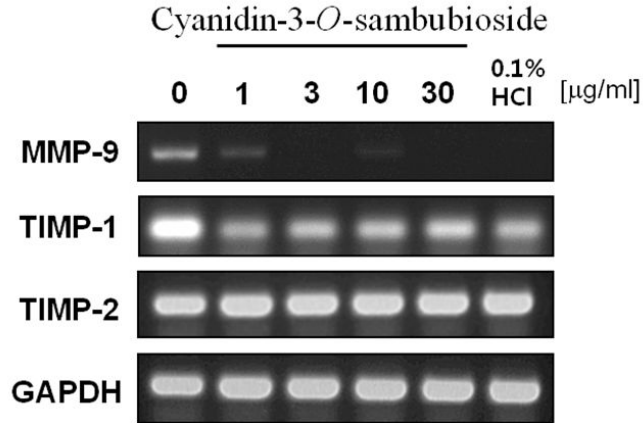


Figure 6. Effects of cyanidin-3-*O*-sambubioside on mRNA synthesis encoding MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 in MDA-MB-231

⑥ 암 전이 인자의 단백질 수준의 발현 억제 탐색

MMP는 세포외기질을 분해하여 암세포의 전이에 중요한 역할을 한다. Serine/threonine protein kinase (Akt)는 세포이동성에 관여하며 인산화되어 활성을 나타낸다. 또한, Protein Kinase C (PKC)는 암의 진행을 촉진하는 역할을 한다 (13).

인간 유방암 세포주인 MDA-MB-231에 오가자 색소체를 농도별로 처리한 후, MMP-2, serine/threonine protein kinase (Akt), phospho-Akt (p-Akt), Protein Kinase C (PKC)의 단백질 발현량을 western blot을 통해 확인하였다. MMP-2와 phospho-Akt의 발현량이 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였으나, PKC의 발현량은 변화가 없는 것으로 나타났다. 이것은 오가자 색소체가 PKC 신호전달경로가 아닌 Akt의 인산화를 저해함으로써 암전이 억제 활성을 나타낸다고 할 수 있다.

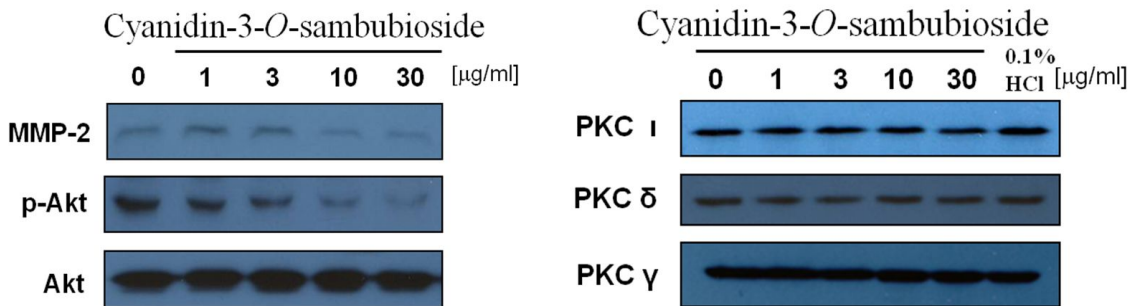


Figure 7. Effects of cyanidin-3-*O*-sambubioside on expression of MMP-2, p-Akt, Akt, PKCs in MDA-MB-231

(2) 면역증강 활성화

① 대식세포 유래 세포독성물질 (NO) 정량과 세포 생존율 (cell viability) 측정

Nitric oxide (NO)는 면역·신경·심혈관계 조직을 포함한 많은 생물학적 시스템에서 중요한 신호전달 messenger인 동시에 effector molecule이다. NO는 신체 대부분의 세포에 존재하는 nitric oxide synthase에 의해 합성된다. NO localization은 다양한 범위의 생리학적 과정에 관여하지만 병리적인 과정에 관여하는 단백질과의 주된 반응 때문에 해로울 수 있다.

NO 생성을 알아보기 위한 방법은 NO에서 만들어지는 안정하고 비휘발성 산물인 nitrite를 측정하는 Griess reagent assay가 일반적이다. 이 assay는 산성 조건 하에서 sulfanilamide와 N-1-naphthylenediamine dihydrochloride (NED)에 의한 화학반응을 기반으로 하고 있다. 이 시스템은 plasma, serum, urine 과 tissue culture medium과 같은 생물학적 또는 실험적 liquid matrices에서 nitrite를 측정할 수 있다.

대식세포인 RAW264.7에서 NO 억제 활성화 및 세포독성 활성을 평가하였다. 오가자 색소체를 농도별로 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS 로 활성화시킨 RAW264.7에 처리하고 37°C에서 배양하였다. 24시간 후 배지와 sulfanilamide와 N-1-naphthylenediamine dihydrochloride (NED)를 1:1의 비율로 반응시켜 발색된 정도를 비교하여 NO 생성 저하 활성을 평가하였으며 대식세포 생존율은 MTT assay 방법으로 확인하였다. 오가자 색소체의 추출물질인 cyanidin-3-O-sambubioside에서는 대식세포인 RAW264.7과 미세교세포인 BV-2에서 NO 생성을 억제하지 못하였다 (Figure 8).

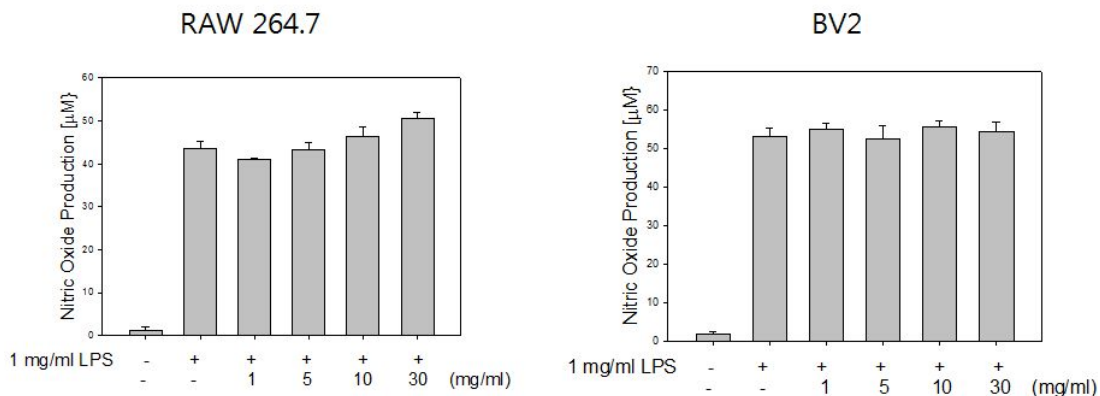


Figure 8. Effects of cyanidin-3-O-sambubioside on inhibition of NO production in RAW 264.7 and BV-2

나. Syringic acid

(1) 항암 활성화

① 혈관 생성 억제 활성화

syringic acid에 대한 혈관 생성억제 활성을 CAM assay 방법으로 측정하였다 (Table

2 & Figure 9). 고려영경귀에서 분리한 syringic acid에 대한 혈관 생성억제 활성을 CAM assay 방법으로 측정하였다. 50 μ g/ml의 농도에서 60% 이상의 antiangiogenic 효과를 보였다 (Table 2).

Table 2. Anti-angiogenic effect of syringic acid

Sample	Concentration	No. of survived eggs	No. of positive eggs	% Relative activity
EtOH	-	18	0	0
Retinoic acid	10 uM	18	7	38.9
Syringic acid	1 ug/ml	20	6	30.0
	10 ug/ml	17	3	17.7
	50 ug/ml	18	11	61.1

※ 각 시료별로 20개의 유정란을 사용하였다.

※ % relative activity는 (number of positive eggs / number of survived eggs) × 100을 통해 산출하였다.

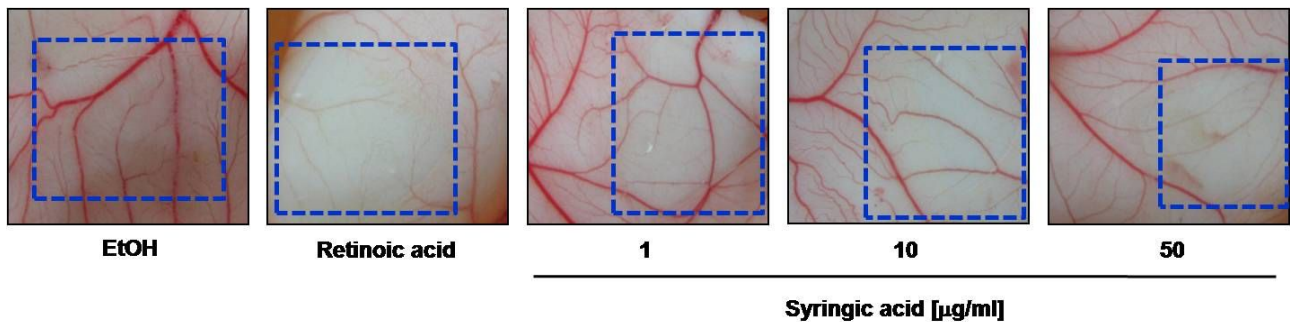


Figure 9. Effect of syringic acid on angiogenesis in the CAM assay

② HUVEC에서 Tube Formation 억제 활성 탐색

Syringic acid를 농도별로 처리하고 24시간 후 현미경으로 tube 형성 여부를 측정하였다. 대조군에서는 뚜렷한 관상구조의 tube를 형성하였으나 syringic acid를 50 μ g/ml의 농도로 처리한 HUVECs은 관상구조의 tube 형성이 불완전한 것을 확인하였다. (Figure 10).

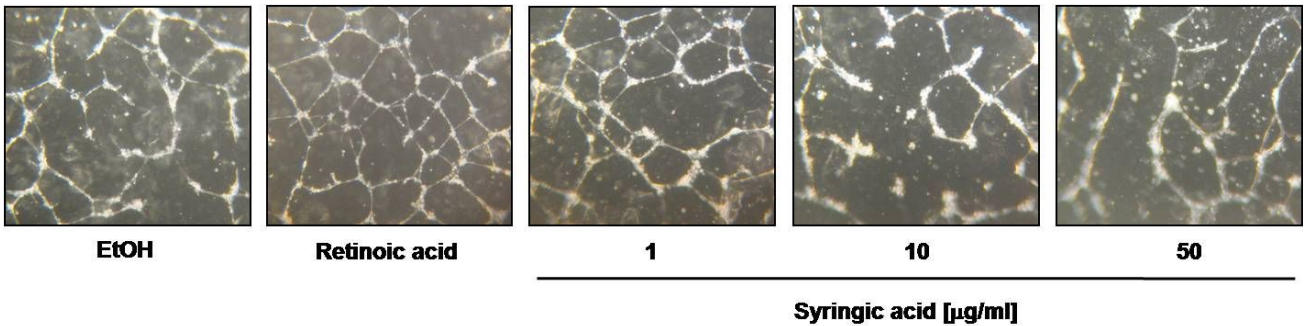


Figure 10. Inhibition of syringic acid on HUVEC tube formation on Matrigel

③ 혈관생성 인자의 mRNA 수준의 발현 억제 탐색

암의 혈관생성에 영향을 주는 VEGF, HIF-1 α , TIMP1, 그리고 TNF- α 의 mRNA 발현 변화를 syringic acid 처리 후 역전사 중합효소연쇄반응으로 확인하였다. 인간 유방암 세포주인 MDA-MB-231에 syringic acid를 농도별로 처리한 결과, VEGF가 1~50 μ g/ml의 농도에서 감소하였다. 하지만 VEGF의 발현을 조절하는 것으로 알려진 HIF-1 α 의 발현양은 변함이 없는 것을 확인하였다 (Figure 11). Syringic acid는 HIF-1 α 의 발현이 아닌 활성화를 억제하여 종양의 빠른 성장과 진행에 따라 발생하는 종양 내 저산소증으로 인한 VEGF의 발현을 저해할 것으로 사료되며 혈관생성억제 및 내피세포의 관상 구조 생성 억제 활성화에 대한 분자수준 작용기전을 설명한다.

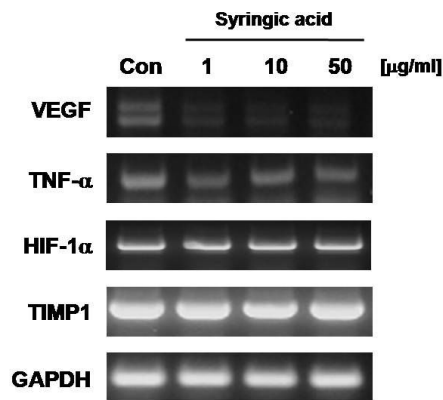


Figure 11. Effects of syringic acid on VEGF, HIF-1 α , TIMP1 and TNF- α in MDA-MB-231

④ 혈관생성 인자의 표적 단백질 발현 및 signal pathway 분석

HIF-1 α 의 활성화에 영향을 끼치는 signaling pathway를 확인하기 위해 Western blot analysis를 수행하였다. Syringic acid를 MDA-MB-231에 1-50 μ g/ml의 농도로 24시간 동안 처리하고 total 단백질을 분리 후, 20 μ g의 단백질을 10% SDS-PAGE를 수행하고 PVDF membrane으로 transfer시켰다. Signaling pathway 관련 antibody를 4 $^{\circ}$ C에서 overnight하여 반응하였다. 그 후 HRP-conjugated된 2차 antibody로 반응을 시킨 후 developing과 fixation 과정을 수행하였다.

HIF-1a를 활성화 시키는 phosphorylated ERK가 농도 의존적으로 증가하고 HIF-1a의 활성을 억제하는 phosphorylated PTEN이 감소하였다. 또한, MMP-9의 발현양이 감소하는 것을 확인하였다 (Figure 12). Western blot analysis 결과, PTEN과 ERK가 아닌 다른 signaling pathway에 의해서 HIF-1a의 활성이 조절 되는 것으로 생각되어 진다.

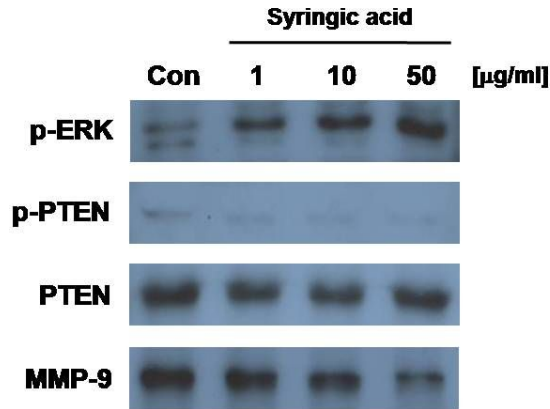


Figure 12. Western blot analysis for p-ERK, p-PTEN, PTEN and MMP-9

(2) 면역증강 활성

고려엉겅퀴의 추출물질인 syringic acid에서는 대식세포인 RAW264.7과 미세교세포인 BV-2에서 NO 생성을 억제하지 못하였다 (Figure 13).

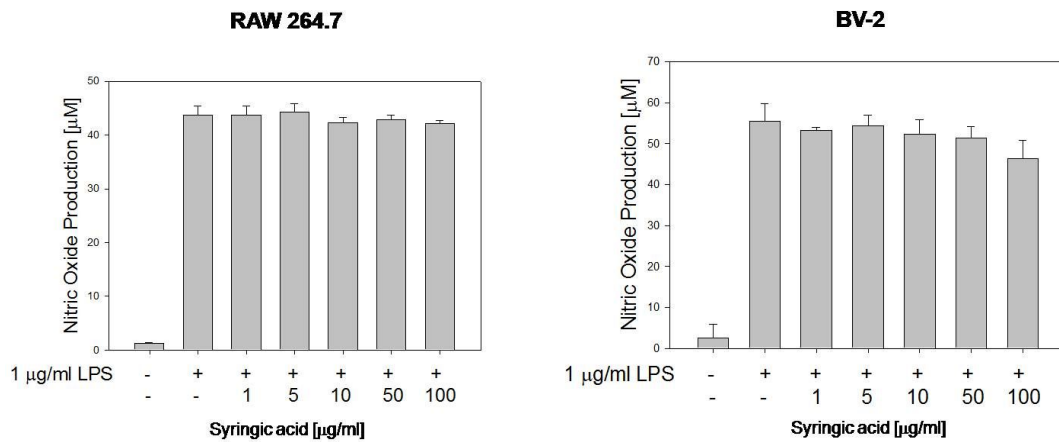


Figure 13. Effects of syringic acid on inhibition of NO production in RAW 264.7 and BV-2

다. 오가자 막걸리와 곧드레 막걸리

(1) 항암활성

① 혈관 생성 억제 활성

오가자 막걸리와 곤드레 막걸리에 대한 혈관 생성억제 활성을 CAM assay 방법으로 측정하였다 (Table 3 & Figure 14). Negative control인 0.1% DMSO를 처리했을 때 신규 혈관 형성이 일어났지만, 10 μ l/ml의 오가자 막걸리와 곤드레 막걸리를 처리했을 때에는 각각 약 50~60%의 anti-angiogenic 효과를 보였다. (Table 3).

Table 3. Anti-angiogenic effect of Gondre Makgeolli and Ogaja Makgeolli

Fractions	Final concentration (μ g/ml)	No. of viable eggs	No. of positive eggs	% Relative activity
DMSO	1	15/18	1	8.33
Retinoic acid	1	19/19	12	63.2
Gondre M.	10 μ l	21/23	13	61.9
Ogaja M.	10 μ l	21/24	10	47.6

※ 대조군(0.1% HCl과 retinoic acid)은 10개, 각 시료별로 20개의 유정란을 사용하였다.

※ % relative activity는 (number of positive eggs / number of survived eggs) \times 100을 통해 산출하였다.

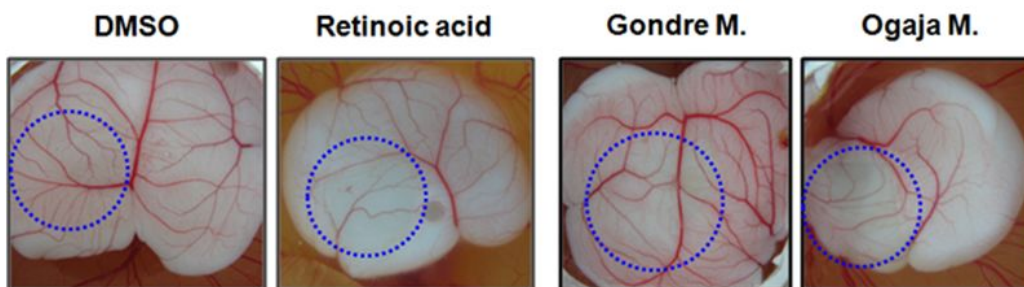


Figure 14. Effect of Gondre Makgeolli and Ogaja Makgeolli on angiogenesis in the CAM assay

② 암 전이 억제 활성 탐색

인간 유방암 세포주인 MDA-MB-231을 사용하여 곤드레 막걸리의 1차 암 전이 억제활성을 wound healing assay를 수행한 결과, 곤드레 막걸리의 암 전이 억제 활성이 관찰되었다 (Figure 15).

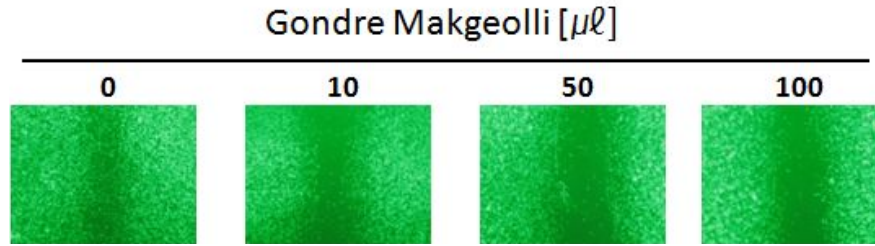


Figure 15. Anti-metastatic activities of Gondre Makgeolli on the human breast cancer cell line, MDA-MB-231

③ 혈관 생성 억제 활성의 mRNA 수준의 발현 억제 탐색

Hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α)는 저산소 상태에서 발현되어 VEGF 신호 전달 경로를 자극하여 혈관 생성에 관여하는 인자이다. 종양 조직은 저산소 상태이기 때문에 HIF-1 α 의 발현이 늘어나게 되어 혈관 생성이 촉진된다 (14).

인간 유방암 세포주인 MDA-MB-231에 곤드레 막걸리 상등액을 농도별로 처리한 후, HIF-1 α 의 mRNA 발현량을 역전사 중합효소연쇄반응으로 측정하였다. 곤드레 막걸리 상등액을 처리한 결과, 대조군에 비해 HIF-1 α 의 mRNA 발현량이 감소하였다 (Figure 16).

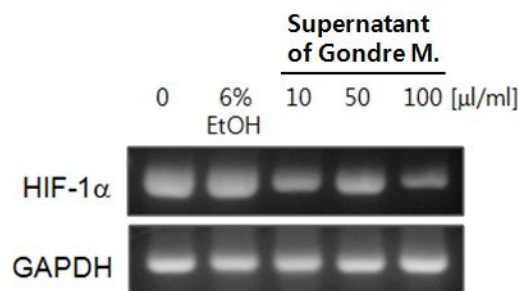


Figure 16. Effects of supernatant of Gondre Makgeolli on COX-2 in MDA-MB-231

(2) 면역증강 활성

① 대식세포 유래 세포독성물질 (NO) 정량과 세포 생존율 (cell viability) 측정

대식세포인 RAW264.7에서 NO 억제 활성 및 세포독성 활성을 평가하였다. 오가자 막걸리의 상등액과 침전물을 농도별로 1 μ g/ml LPS 로 활성화시킨 RAW264.7에 처리하고 37 $^{\circ}$ C에서 배양하였다. 24시간 후 베지와 sulfanilamide와 N-1-naphthylenediamine dihydrochloride (NED)를 1:1의 비율로 반응시켜 발색된 정도를 비교하여 NO 생성 저하 활성을 평가하였으며 대식세포 생존율은 MTT assay 방법으로 확인하였다.

㉞ 오가자 막걸리 상등액

오가자 막걸리 상등액은 농도 의존적으로 NO 생성 억제를 관찰하지 못했지만 200 μ l를 처리해 주었을 때 NO 생성을 22.0~35.5%로 억제하고, 세포 독성을 나타내지 않았다 (Figure 17).

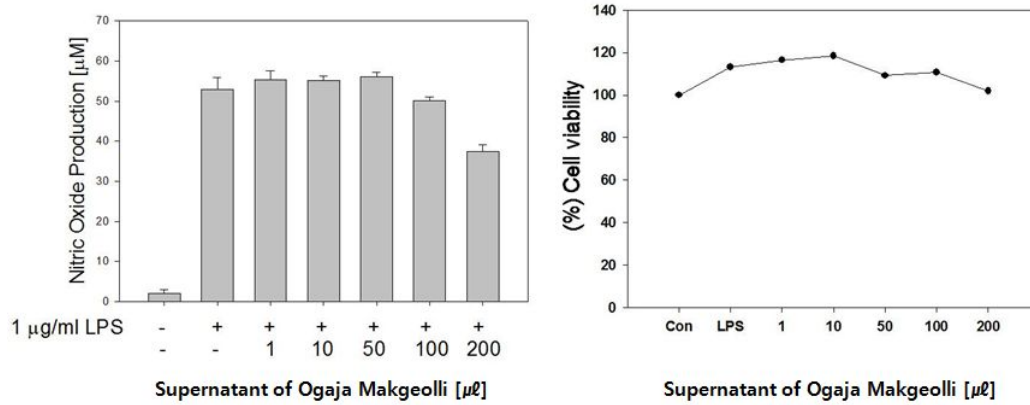


Figure 17. Effects of supernatant of Ogaja Makgeolli on inhibition of NO production and cell viability in RAW 264.7

㉟ 오가자 막걸리

오가자 막걸리에서는 200 μ l를 처리해 주었을 때 NO 생성을 42.6~46.6%로 억제하였으나, 80%이상의 세포 독성을 나타내었다 (Figure 18).

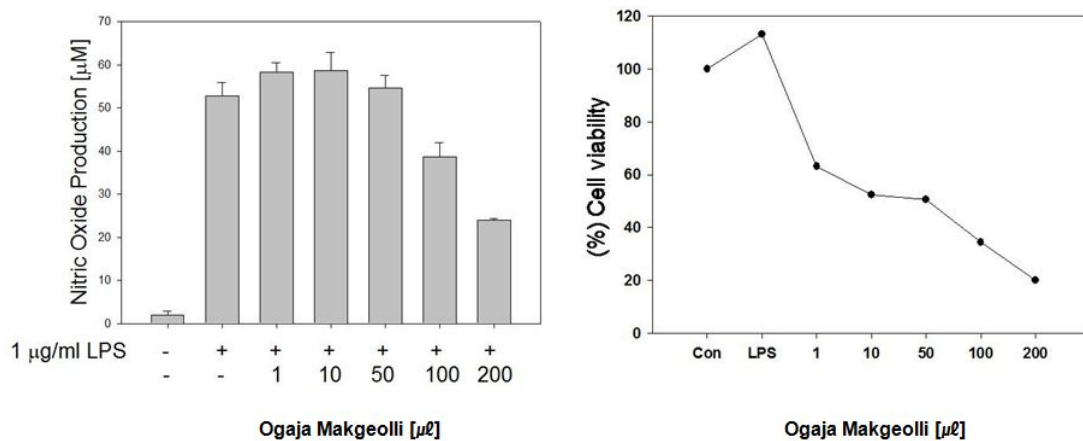
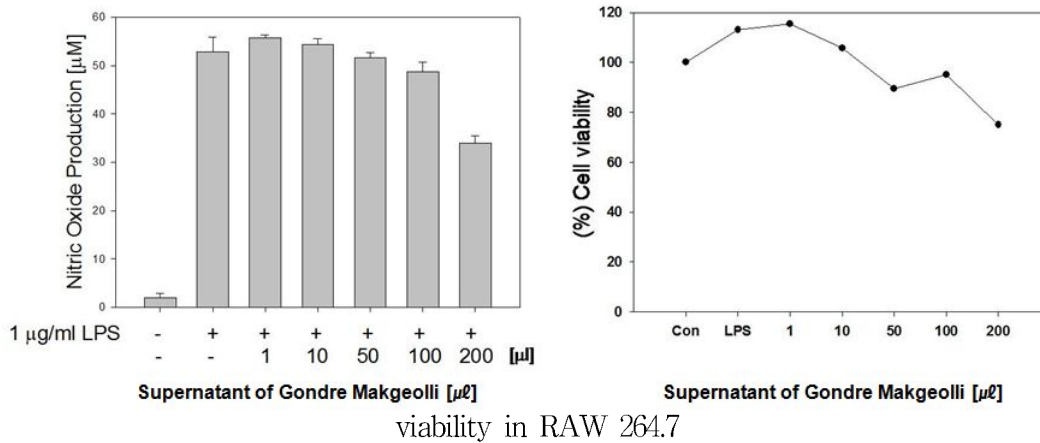


Figure 18. Effects of Ogaja Makgeolli on inhibition of NO production and cell viability in RAW 264.7

㊱ 고려영경귀 막걸리 상등액

고려영경귀 막걸리 상등액은 농도 의존적으로 NO 생성 억제를 관찰하지 못했지만 200 μ l를 처리해 주었을 때 NO 생성을 32.5~39.9%로 억제하고, 세포 생존율은 75.0%을 나타내었다 (Figure 19).

Figure 19. Effects of supernatant of Gondre Makgeolli on inhibition of NO production and cell



㉠ 고려영경귀 막걸리

고려영경귀 막걸리에서는 200µl를 처리해 주었을 때 NO 생성을 71.0~76.7%로 억제하였으나, 90%이상의 세포 독성을 나타내었다 (Figure 20).

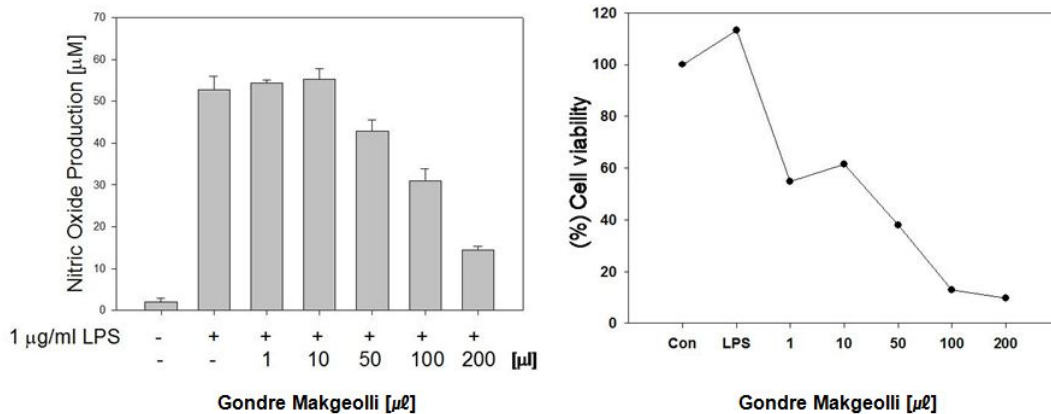


Figure 20. Effects of Gondre Makgeolli on inhibition of NO production and cell viability in RAW 264.7

㉡ 염증 반응과 관련된 인자의 mRNA 수준의 발현 억제 탐색

Cyclooxygenase (COX)는 arachidonic acid를 prostaglandin (PG)으로 변환시키는 rate-limiting enzyme으로, COX-1, 2 두 가지 아형이 있다. 이 중, COX-2는 cytokine, mitogen, 내독소 등에 의해 발현이 유발되고 주로 염증반응이 있는 곳에서 발현된다.

COX-2의 mRNA 발현 변화를 오가자 막걸리와 곤드레 막걸리 상등액 처리 후 역전사 중합효소 연쇄반응으로 확인하였다. 대식세포 RAW 264.7에 오가자 막걸리와 곤드레 막걸리 상등액을 농도별로 처리한 결과, 200µl의 오가자 막걸리 상등액을 처리해 주었을 때, COX-2의 발현양이 감소한 것을 확인하였다. (Figure 21 & 22).

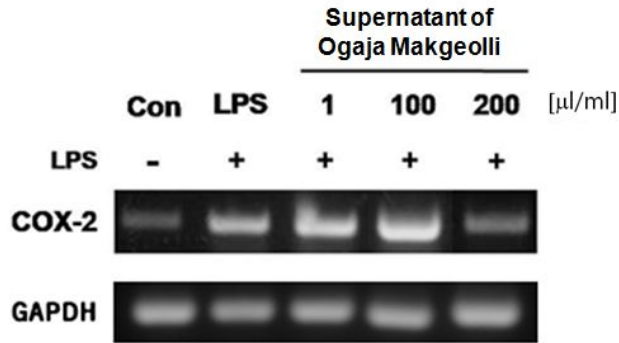


Figure 21. Effects of supernatant of Ogaja Makgeolli on COX-2 in RAW 264.7

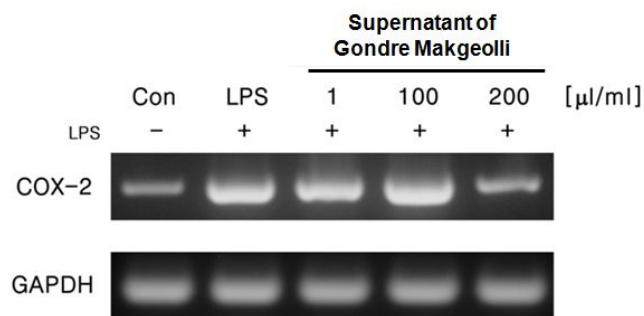


Figure 22. Effects of supernatant of Gondre Makgeolli on COX-2 in RAW 264.7

③ 염증 반응과 관련된 인자의 단백질 수준의 발현 억제 탐색

Cytokine Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS)는 염증반응에 동반되는 일산화질소 합성을 촉매하는 효소이다. 또한, Nuclear Factor Kappa-light-chain enhancer of activated B cell (NF-κB)는 각종 스트레스나 사이토카인, 자외선등에 의해 세포로부터 발현되는 단백질 복합체로써 염증반응에 중요한 역할을 한다. 반면, Nuclear factor of Kappa-light-chain enhancer in B cell inhibitor (IκB)는 NF-κB의 억제자로서, NF-κB에 결합하여 NF-κB의 활성을 억제하지만, IκB Kinase (IKK)에 의해 인산화되면 NF-κB와 분리되어 NF-κB는 활성을 띠게 된다. 즉, 염증반응이 일어날 경우, iNOS, NF-κB의 발현량은 늘어나게 되고 phospho-IκB의 발현량은 줄어들게 된다.

대식세포인 RAW 264.7 세포에 오가자 막걸리와 곤드레 막걸리 상등액을 농도별로 처리한 후, 단백질을 추출하여 western blot analysis를 수행하였다. 오가자 막걸리와 곤드레 막걸리 상등액을 처리한 실험군에서 iNOS의 발현량이 농도 의존적으로 줄어들었다. 하지만, NF-κB와 phospho-IκB의 발현량은 실험군간의 차이가 없었다 (Figure 23).

④ 발효 전·후의 생리활성물질의 변화에 대한 고찰

연구과제 수행기간에 진행되지 못 했던 부분이며, 과제 종료 후 검토하여 연구계획을 수립하여 진행 여부를 결정 할 예정이다. 연구과제의 테마로 진행을 하여도 손색없을 만큼 폭 넓고 깊이 있는 분야로 사료된다.

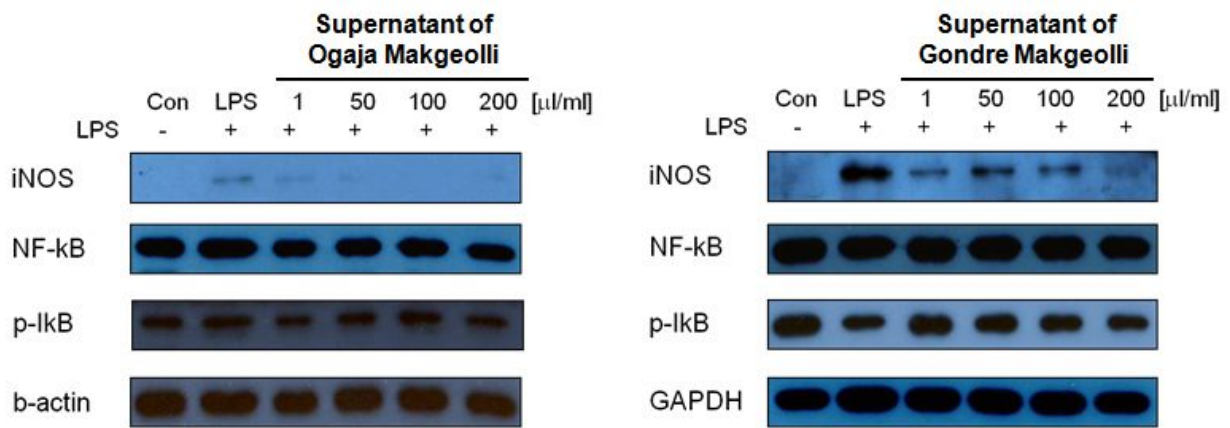


Figure 23. Effects of supernatant of Ogaja Makgeolli and Gondre Makgeolli on iNOS, NF-kB and p-IkB in RAW 264.7

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발 목표 및 평가 착안점

1. 연구개발의 최종 목표

최 종 목 표	내 용
◆ 정선균 특산물인 오가자와 고려 영경귀를 이용한 주류 및 곡물 음 료 개발	◇ 오가자 및 고려영경귀를 활용한 시제품 개발 및 상품화 추진
◆ 오가자 색소체의 안정성 향상 기술 개발	◇ 오가자 색소체 분리·동정 기술 개발 및 이화학적 안정성 확보를 통한 제품의 품질 향상 공정개선 확립
◆ 이들의 생리 기능활성 규명	◇ 항염증 · 항암 (혈관신생억제) 활성 규명 등 동정 ·확인된 기능 성물질을 최대한 활용한 웰빙 전통식품 개발 및 상품화 기술에 필요한 기초 자료를 제공

2. 연구개발 목표, 개발 내용 및 범위

가. 1차년도

구분	연도	연구개발의 목표		연구개발의 내용
1차 년도	2009	(세부)	오가자/고려영경귀 막걸리 개발	◇ 오가자/고려영경귀 막걸리 recipe 개발 ◇ 시제품 생산
		(협동1)	오가자 추출액을 이용한 곡물음료 recipe 개발	◇ 곡물음료 recipe 개발
		(협동2)	오가자 구성성분 정량 분석 및 색소체 구조 동정	◇ 일반/유효성분 정량 분석: 유리당, 유리아미노산(GABA 포함), 유기산, 색소체 ◇오가자 색소체의 분리/정제 시스템 확립: Semi-prep & Recycling-prep HPLC 활용 및 operating 조건 확립 ◇순수한 오가자 색소체의 대량 생산: 수 십 mg quantity ◇오가자 색소체의 구조 동정: HPTLC, LC-MS, NMR 분석법을 활용한 구조 동정
		(협동3)	오가자 색소체, 오가자/고려영경귀 막걸리의 기능활성 규명	◇오가자 색소체에 대한 항암, 항염증 활성 탐색 및 기전연구 ◇오가자/고려영경귀 막걸리의 항염증, 항고혈압 활성 탐색 및 기전연구

나. 2차년도

구분	연도	연구개발의 목표		연구개발의 내용
2차 년도	2010	(세부)	오가자 브랜드 개발	<ul style="list-style-type: none"> ◇오가자브랜드 발효 조건 설정 ◇오가자 브랜드 증류조건 설정 ◇blending 조건 설정
		(협동1)	오가자 추출액을 적용한 곡물음료 시제품 제조	<ul style="list-style-type: none"> ◇ 곡물음료 제조조건 확립 ◇ 관능평가 및 식미적성 평가 ◇ 시제품 제조 및 특허출원
		(협동2)	오가자 색소체 안정성 향상 및 적용제품의 품질 개선	<ul style="list-style-type: none"> ◇물리적 조건 변화에 따른 색소체 안정성 변화 탐색: 빛, 열, pH 등 ◇색소체의 안정성 향상 방안 탐색: 최적 저장 및 가공처리조건 설정, 다른 식품성분과의 상호작용 탐색, copigmentation 효과 탐색 ◇색소체의 제품 적용 시 품질저하 요인 탐색 및 해결방안 마련
		(협동3)	오가자/고려영경귀 막걸리, 곡물음료의 기능활성 규명	<ul style="list-style-type: none"> ◇오가자/고려영경귀 막걸리의 항암 활성 탐색 및 기전연구 ◇곡물음료 추출물에 대한 항암, 항염증 활성 탐색 및 기전연구

3. 연구평가의 착안점

구분	연도	세부연구개발 목표	가중치	평가의 착안점 및 기준
1차 년도	2009	(세부과제) ◇오가자/고려영경귀 막걸리 개발	30 %	recipe·발효조건 확립 / 시제품 개발
		(제1협동과제) ◇오가자를 곡물음료 recipe 개발	15 %	다양한 소재의 곡물음료 recipe 개발
		(제2협동과제) ◇오가자 색소 분리 및 구조 동정	25 %	색소체 분리/정제 공정 개발
		(제3협동과제) ◇오가자/고려영경귀 막걸리, 기능활성 규명	15 %	항염증/항고혈압 활성 및 기전 규명
		◇오가자 색소체의 기능활성 규명	15 %	색소체의 유효성분의 항암, 항염증 활성 및 기전 규명
2차 년도	2010	(세부과제) ◇오가자 브랜드 시제품 개발	20 %	발효/증류조건 확립 및 시제품 제조
		(제1협동과제) ◇오가자 식품의 시제품 제조	20 %	관능/식미적성 평가 및 시제품 제조
		(제2협동과제) ◇오가자 색소체 안전성 확립	15 %	색소체의 안정성 향상 방안 도출
		◇색소체 적용 제품의 품질 개선	15 %	이화학적 안정성 증대 공정 개발
		(제3협동과제) ◇오가자 막걸리 기능활성 규명	15 %	항암-혈관생성억제 활성 및 기전규명
		◇오가자 식품의 기능활성 규명	15 %	곡물음료 추출물의 항항염증 항암 활성 및 기전 규명
최종 평가	-	(세부과제) ◇오가자 막걸리·브랜드 개발	30 %	시제품 제조 및 사업화 추진
		(제1협동과제) ◇오가자 곡물음료 개발	20 %	곡물음료 시제품 제조 및 특허출원
		(제2협동과제) ◇오가자 색소체 분리·동정 및 안전성 확립	25 %	색소체 정제/안정성 개선 공정 개발
		(제3협동과제) ◇오가자 제품의 기능활성 규명	15 %	항염증/항암-신생혈관 억제 활성 및 기전 규명
		◇오가자 색소체의 기능활성	10 %	항염증/항암-신생혈관 억제 활성 및 기전 규명

제 2 절 연구개발 목표 달성도

1. 평가의 착안점에 따른 목표달성도

평가의 착안점	달성도	목표 달성도
◇ 세부과제		
※ 오가자/고려엉겅퀴 ▶ 막걸리 시제품 개발 ▶ 브랜드 시제품 개발	100%	- 콘드레막걸리 개발 및 상품화 성공 - 오가자막걸리 recipe 개발 및 시제품 완료 - 오가자를 활용한 브랜드 시제품 개발
◇ 제1협동과제		
▶ 오가자 곡물음료 개발	100%	- 오가자를 활용한 곡물음료 recipe 및 시제품 개발
◇ 제2협동과제		
▶ 오가자 색소체 정제	100%	- 색소체 분리/정제 공정 개발 완료 - 고순도 오가자 색소체의 제3협동과제의 생리활성 규명 소재로 제공
▶ 안정성 개선 공정 개발	100%	- 색소체의 안정성 향상 방안 도출 및 색소체 추출물의 이화학적 안정성 증대 공정 개발
◇ 제3협동과제		
※ 오가자 색소체 ▶ 항염증 활성 규명 ▶ 항암 활성 규명	100%	오가자색소체 및 고려엉겅퀴 유래 물질의 - 신생혈관생성 및 암 전이 억제와 Akt 신호전달체계 및 MMP-9의 발현 저해 기전 규명 - 항염증 활성 탐색 완료
※ 시제품의 ▶ 항염증 활성 규명 ▶ 항암 활성 규명	100%	개발된 시제품의 - HIF-1a 발현 저해를 통한 신생혈관생성 억제 기전 규명 - COX-II 발현 저해를 매개로한 항염증 활성 기전 규명

제 5 장 연구개발 결과의 활용계획

제 1 절 실용화·산업화 계획 (기술실시 등)

1. 제품 실용화·산업화

1) 고려영경귀 (곤드레)를 활용한 막걸리 제품 개발 및 출시

- 제품 출시 : 2009. 10. 5.
- 제품명 : '정선명주 생막걸리 곤드레'
- 제품 사양 : alcohol 6%, 용량 1,000 mL, 주원료- 백미, 감자 (정선산), 곤드레 (정선산)
- 본 연구과제를 통해 개발된 “정선특산물을 이용한 막걸리 recipe 개발 및 제품화 기술”를 자체기술이전을 통해 제품화에 성공
- 농림수산식품기술기획평가원으로부터 기술료 감면 승인 및 기술이전 실시

2. 제품 실용화·산업화 계획

1) 오가자를 활용한 막걸리 제품 개발 및 출시

- 정선군 특화작물인 오가자를 소재로한 오가자 막걸리 시제품 개발 완료
- 2011년 상반기, 제품 출시 예정
- 제품명 : 정선명주 생막걸리 오가자
- 제품 사양 : alcohol 6%, 용량 1,000 mL, 주원료- 백미, 감자 (정선산), 오가자 (정선산)
- 정선명주 생막걸리 오가자에 대한 제품 디자인 및 패키지 개발도 완료하였으며, 2011년 4월 1일 주세법 개정 후 제품을 시장에 출시할 예정이다.

국산당정선막걸리 a tentative Plan 3



INZAIN 2009.07.20

정선명주 생막걸리 오가자 제품 디자인 시안

2) 수출계획 및 일정

- 수출국 : 일본
- 채널 : 통상업체 및 주류업체 일본지사 등 2개 채널 확보
- 2010년 08월 : 일본 Buyer 내사 및 Meeting
- 2010년 12월 : Package 및 Recipe 개발 완료
- 2011년 03월 : 수출개시 예정

제 2 절 교육·지도·홍보 등 기술확산 계획

1. 인력활용/양성성과

총 인원	학위별, 취득자			성별	
	박사	석사	학사	남	여
10		4		2	2

2. 수상 실적

- 주관 : 농림수산식품부 식품산업진흥과/유통원예과
- 일시 : 2010년 8월 18일
- 내용 : 2010년 제1회 대한민국 우리술 품평회 예비심사 생막걸리 부문 우수상 수상
- 출품작 : 정선명주 생막걸리 곤드레

제 3 절 특허, 논문 등 지적재산권 확보 계획

1. 해외 학술대회 발표

- 1) Effects of pH, light, and temperature on stability and antioxidant activity of anthocyanins. 2010 IFT Annual meeting, Chicago, USA.
- 2) Prevention of protein-polyphenol haze formation by protease treatments. (2011 IFT Annual meeting poster session 발표 예정)
- 3) Guwon Jeong, Sang-Jin Lee, Yong-Woo Jung, Jae Cheol Lee, Jeong-Whan Han, Sang-Ho You, Gye-Won Kim, Sungyoul Hong. Effect of Cyanidin-3-O-Sambubioside from Acanthopanax sessiliflorus Fruit on Angiogenesis through Regulation of Matrix Metalloproteinases. The 18th Annual Meeting of the Japanese Vascular Biology and Medicine Organization and The 8th Korea-Japan Joint Symposium on Vascular Biology. December 1-3, 2010, Osaka, Japan.

2. 논문 출판 및 투고 준비중

가. 게재 논문

- 1) Kim SH, Joo MH, Yoo SH. Structural Identification and Antioxidant Properties of Major Anthocyanin Extracted from Omija (*Schizandra chinensis*) Fruit. *Journal of Food Science*. 74: 134-140

나. 투고 준비 중인 논문

- 1) Dong-Min Kim, Jun-Soo Bae, Da-Som Lee, Heungsook Lee, Mihyun Joo, Sang-Ho Yoo. Positive effects of glycosylated anthocyanin isolated from an edible berry fruit (*Acanthopanax sessiliflorum*) on its antioxidant activity and color stability. *Food Research International* *submitted*
- 2) Lee SJ, Jung YW, Yoo SH, Kim GW, Hong SY. Cyanidin-3-O-sambubioside from *Acanthopanax sessiliflorus* Fruit confer anti-angiogenic and anti-invasive potentials. *Phytotherapy Research*

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. Jian-Bin Li, Fumio Hashimoto, Keiichi Shimizu and Yusuke Sakata. Anthocyanins from Red Flowers of *Camellia reticulata* LINDL.
2. Maria Teresa Escribano-Bailon, Cristina Alcalde-Eon, Orlando Munoz, Julian C. Rivas-Gonzalo and Celestino Santos-Buelga. Anthocyanins in berries of MAqui (*Aristotelia chilensis*(Mol.) Stuntz).
3. V. I. Deineka, V. N. Sorokopudov, L. A. Deineka, E. I. Shaposhnik and S. V. Kol'tsov. Anthocyanins from fruit of some plants of the caprifoliaceae family.
4. Jjung-Chu Cheng, Kou-Sing Kan, Jinh-Ting chen, Kih-Geeng Chen, Hung-Chih Lu, Shu-Mei Lin, Shin-Hao Wang, Kin-Hsing Yang, and Robin Y. -Y. Chiou. Detection of cyaniding in different-colored peanut teste and identification of peanut cyaniding 3-sambubioside.

제 7 장 참고문헌

- (1) S. A. Osmani, E. H. Hansen, C. Malien-Aubert, C. E. Olsen, S. Bak and B. L. Møller. 2009. Effect of Glucuronosylation on Anthocyanin Color Stability. *J. Agric. Food Chem.* 57, 3149-55
- (2) M. J. Eiro and M. Heinonen. 2002. Anthocyanin color behavior and stability during storage: effect of intermolecular copigmentation. *J. Agric. Food Chem.* 50 (25), 7461-7466
- (3) M. H. Choi, G. H. Kim and H. S. Lee. 2002. Effects of ascorbic acid retention on juice color and pigment stability in blood orange (*Citrus sinensis*) juice during refrigerated storage. *Food Res. Int.* 35, 753 - 759
- (4) K. J. Siebert. 1999. Effects of Protein-Polyphenol Interactions on Beverage Haze, Stabilization, and Analysis. *J. Agric. Food Chem.* 47, 353-362
- (5) M. Lopez and L. Edens. 2005. Effective prevention of chill-haze in beer using an acid proline-specific endoprotease from *Aspergillus niger*. *J. Agric. Food Chem.* 53, 7944-7949
- (6) A. Papadopoulou and R. A. Frazier. 2004. Characterization of protein-polyphenol interactions. *Trends Food Sci. Technol.* 15, 186-190
- (7) X. Zhang, M. D. Do and P. Casey. 2010. Chemical Modification of Gelatin by a Natural Phenolic Cross-linker, Tannic Acid. *J. Agric. Food Chem.* 58, 6809-6815
- (8) Crozier A. *et al.* 2009. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat Prod Rep.* 26(8):1001-43
- (9) Oommen S. *et al.* 2010. Vascular endothelial growth factor- A (VEGF-A) Induces endothelial and cancer cell migration through direct binding to integrin {alpha }9 {beta }1: identification of a specific {alpha }9 {beta }1 binding site. *J Biol Chem.* [Epub ahead of print]
- (10) JC. CHENG. *et al.* 2009. Detection of Cyanidin in Different-colored Peanut Testae and Identification of Peanut Cyanidin 3-sambubioside. *J. Agric. Food Chem.*57: 8805-8811
- (11) Wang LS, Stoner GD. 2008. Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Lett.* 269(2):281-90
- (12) Xu D. *et al.* 2010. Matrix metalloproteinase-9 regulates tumor cell invasion through cleavage of protease nexin-1. *Cancer Res.* 70:6988-98
- (13) Matsuoka H, Tsubaki M, Yamazoe Y, Ogaki M, Satou T, Itoh T, Kusunoki T, Nishida S. 2009. Tamoxifen inhibits tumor cell invasion and metastasis in mouse melanoma through suppression of PKC/MEK/ERK and PKC/PI3K/Akt pathways. *Exp Cell Res.* 315:2022-32. Epub 2009 Apr 22.
- (14) Tsuzuki Y, Fukumura D, Oosthuysen B, Koike C, Carmeliet P, Jain RK. 2000. Vascular endothelial growth factor (VEGF) modulation by targeting hypoxia-inducible factor-1alpha hypoxia response element VEGF cascade differentially regulates vascular response and growth rate in tumors. *Cancer Res.* 22:6248-52.

(15) Bruce R. Zetter. 1998. ANGIOGENESIS AND TUMOR METASTASIS. *Annu. Rev. Med.* 49:407.24