

발 간 등 록 번 호
-------------

11-1541000-001340-01
----------------------

보안과제( ), 일반과제( √ ) 과제번호 109147033SB010

염생식물의 신수요창출을 위한  
안정생산기술 및 고기능성 제품 개발  
Stable Production System &  
Functional Food Development using Halophyte

서울여자대학교

농 립 수 산 식 품 부

# 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “염생식물의 신수요 창출을 위한 안정생산기술 및 고기능성 제품 개발”  
과제의 보고서로 제출합니다.

2012 년 4 월 일

주관연구기관명 : 서울여자대학교

주관연구책임자 : 장매희

세부연구책임자 : 김정희

연 구 원 : 이재구

연 구 원 : 홍정일

연 구 원 : 정서진

연 구 원 : 김미정

협동연구기관명 : 서경대학교

협동연구책임자 : 박두현

협동연구기관명 : 강원대학교

협동연구책임자 : 강호민

연 구 원 : 강위수

참 여 기 업 : (주)샘표

참 여 기 업 : (주)메드빌

# 요 약 문

## I. 제 목

염생식물의 신수요창출을 위한 안정생산기술 및 고기능성 제품 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

고기능성 염생식물의 활용성을 높이기 위한 목적으로 염생식물의 고품질 다수확 안전생산 체계를 확립하고 고기능성 신선 염생식물의 저장 및 유통조건을 확립하는 한편 최적 건조 및 분말제조 기술을 개발하였다. 아울러 식품으로서의 성분분석, 품질관리 및 약용효과 규명과 더불어 항암, 항염증, 항비만 및 순환계 질환 개선을 위한 건강기능식품 개발을 위한 기능성 검증을 실시하였다. 이러한 생산과정 및 기능성 검증 과정을 거쳐 고기능성 천연조미제품, 신선편의식 및 장류 개발을 위한 연구를 수행하였다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

1. 염생식물의 고품질 다수확을 위한 생산기술 개발
  - 베이비 채소 개발을 위한 수경재배 시스템개발 및 기내배양 시스템개발
  - 가정용 수경재배키트개발
  - 신선 채소개발, 베이비 채소 개발
2. 기능성 향상을 위한 신선 저장 및 분말제조기술 개발
  - 염생식물의 수확 후 생리활동 조사를 토대로 최적 저장 조건 확립
  - 신선염생식물의 MAP 등 최적 유통조건 확립
  - 신선염생식물의 신선편이 이용 가능성 조사 및 신선편이 MAP조건 구명
  - 천연 고유의 색상 및 기능성을 유지할 수 있는 원적외선 가공 기술 개발
  - 고품질 염생 식물 미세분말 제품 및 과립 제품 개발
  - 친수성이 우수한 염생식물 재료의 압출 성형 분말 제품 개발
3. 유효성분 분석, 품질관리 및 안전성시험
  - 염생식물의 유효성분, 특수성분 분석
  - 지표물질 설정 및 밸리데이션 연구: HPLC, TLC를 사용하여 시료들을 분석
  - 독성 시험 및 제품의 안정성 연구: 함초 추출물 (MDC 308)의 단회 투여 독성 시험과 복귀돌연변이 시험, 염색체 이상 시험, 소핵 시험 등을 실시

#### 4. 소비자 맞춤형 조리가공 제품 개발

- 염생식물의 관능적 품질 특성 및 조리적성 DB화, 및 천연조미제품개발
- 소비자 맞춤형 염생식물 조리가공 편의식 개발, 부정적인 맛 마스킹 가공기술개발
- 조리가공 편의식의 저장성 및 관능적 품질관리 지침 확립

#### 5. 기능성 장류개발 및 생산공정 개발

##### 1) 건조함초의 염분 제거 및 세척

- 흐르는 물(약 25도)로 30분간 세척하여 소금을 제거하고 재 건조하여 200 메 시 이하의 입자가 되도록 분쇄하여 사용.

##### 2) 함초를 함유한 누룩 및 그 제조.

- 누룩은 일반적으로 가정에서 사용하는 전통적인 방법에 따라 제조
- 발효와 숙성의 효율을 높이기 위하여 재료를 혼합하는 과정에서 7일간 감자 전분 배양액을 사용하여 진탕 배양한 *Aspergillus*속의 균사체를 누룩 제조용 곡물 분말에 1% (v/v) 첨가
- 25도에서 7일간 배양한 후 7일간 숙성하면서 수분을 제거
- 누룩 현탁액의 상등액을 취하여 감자전분을 이용한 포도당 생성률을 정량분석.
- TGGE를 이용한 누룩의 발효과정에 서식하는 미생물 군집 조사.

##### 3) 함초누룩을 이용한 발효 및 조성물 분석.

###### (1) 막걸리제조

- 세 종류의 누룩을 이용한 막걸리 제조
- HPLC를 이용한 막걸리 분석 및 미네랄 분석
- 폴리페놀, 총페놀화합물, 항산화효과 분석
- TGGE를 이용한 막걸리의 발효과정에 서식하는 미생물 군집 조사

###### (2) 식초의 제조

- 막걸리 발효액을 이용한 식초의 제조
- HPLC를 이용한 초산 농도 측정
- 초산발효 중 서식하는 미생물의 군집변화 분석

#### 4) 함초를 이용한 메주 및 간장의 제조

- 대두박 및 쌀과 함초의 혼합물을 이용한 메주의 제조
- 불순물을 제거한 천일염 용액에 숙성시킨 메주를 담귀 숙성.
- 압착 후 간장을 추출.
- 간장 상등액의 총질소, 알코올, pH, 색도, 염도, 나트륨의 함량 측정.
- 미네랄, 유기산함량, 유리아미노산, 총페놀함량, 폴리페놀, 항산화반응 물질의 함량 분석.
- 압착하고 남은 메주 잔여물을 이용한 미생물 군집 분석.

#### 6. 항염증 및 항암기전 평가

- 이용부위별 추출 분획의 제조 및 항암, 항염증 효과에 대한 세포수준에서의 규명
- 항암 및 항염증 기작으로서 부위별 추출 분획의 아라키돈 산 대사의 각 단계별 효소 유도 및 활성화에 대한 효과 규명

#### 7. 항비만 및 심혈관질환개선 건강기능식품 개발을 위한 효능 탐색

- 세포배양모델에서 염생식물의 종류별, 부위별, 추출방법별, 배양조건 등에 따른 항비만유

#### 효성선별

- 선별된 염생식물 유효성분으로 비만 동물모델에서 항비만 효능 검증 및 작용기전 연구
- 선별된 염생식물 유효성분으로 심혈관질환 동물모델에서 심혈관질환 개선 효능 검증 및 작용기전 연구

#### 8. 임상실험모델을 통한 건강증진효과 검증

- 기능성식품 섭취와 비만자의 체성분, 혈중 지질성분, 지질대사 관련 호르몬 효과 구명
- 기능성식품섭취 및 복합운동의 병행에 따른 효과의 구명

### IV. 연구개발결과

#### ○ 기능성 향상을 위한 신선 저장 및 분말제조기술 개발

신선 통통마디의 저장성 향상을 위해 MAP에 적절한 포장재와 저장온도를 구명하고자 본 실험을 수행하였다. 저장중 생체중 감소는 10℃ 이하의 저온과 무공필름에서는 2% 이하로 유지되었으나 25℃의 유공필름처리는 4% 이상의 감소를 보이면서 품질저하가 발생하였다. 저장중 포장재내 대기조성은 필름 투과율에 비례하였는데 이산화탄소는 1~2%, 산소는 15% 이상으로 유지되었다. 25℃를 제외한 모든 처리에서 저장중 포장재내 에틸렌 농도는 7일 이후 급격히 증가하였는데, 2℃에서 가장 높아 저온 장해가 발생한 것으로 추측되었다. 저장 최종일에 이취와 부패율은 5℃에서 가장 낮았으며, 포장재별로는 다른 양상을 보였는데 저장온도중 가장 낮았던 5℃에서는 50μm 두께의 ceramic 필름이 가장 낮은 이취와 부패율을 보였다. 외관상 품질로 본 저장수명 역시 5℃에서 50μm ceramic 필름으로 포장하였을 때 28일 이상으로 가장 길었다.

염생식물 중 생체로 이용되고 있는 수송나물(*Salsola komarovi* Iljin)과 해홍나물(*Suaeda maritima* L. Dum.)의 상품화를 위해 포장 판매 및 저장이 동시에 가능한 MAP(modified atmosphere package)의 저장성을 몇가지 온도에서 비교하였다. 온실에서 재배한 수송나물과 해홍나물을 50μm(ceramic) 필름으로 포장하여 2℃, 10℃, 25℃에 저장하였다. 저장중 생체중 감소는 모두 1% 미만이었으며, 역시 상온에서 가장 빠르게 감소하였으며, 수송에서 감소폭이 컸다. 포장재내 산소 농도는 저장온도별로는 2℃에서 가장 높게 유지되었으며, 25℃에서는 수송이 해홍보다 낮은 농도를 보였다. 포장재내 이산화탄소 농도는 산소농도와 반대로 저장온도별로는 25℃에서 가장 높았으며, 식물별로는 수송에서 높았는데 두 식물 모두 2℃와 5℃에서는 1% 이하로 유지되었다. 포장재내 에틸렌 농도는 10℃에서 2℃보다 높았으나, 통계적인 유의성은 없었다. 10℃에서 에틸렌 농도는 두 식물 모두 20μL·L<sup>-1</sup>으로 같은 수준이나, 2℃에서는 해홍이 다소 높았다. 온도에 따른 포장재내 이산화탄소와 에틸렌 농도는 저장온도가 높을수록 높았는데, 수송나물에서는 2℃와 10℃간 통계적 유의성이 있는 차이를 보인 반면, 해홍나물의 경우 그 차이에 통계적 유의성이 인정되지 않았다. 관능검사로 실시한 외관상 품질은 3점까지 상품성을 인정하였는데, 수송나물의 경우 상품성인 인정된 저장일수가 24℃에서는 3일, 10℃에서는 7.5일 2℃에서는 14일이었고, 해홍나물은 24℃에서는 3.5일, 10℃에서는 9.5일 2℃에서는 11일이었다. 외관상 품질 변화와 포장재내 이산화탄소와 에틸렌 농도로 볼 때 해홍나물의 경우

2℃의 저온에서 저장성이 10℃와 차이가 없어 저온장해가 의심되었다.

성체를 대상으로 3cm, 5cm, 10cm로 제조한 신선편이의 저장성 비교에서 생체중 감소는 10℃에서 크기가 작을수록 감소폭이 큰 경향을 나타냈다. 포장내 산소와 이산화탄소 농도는 크기에 따른 차이가 나타나지 않았고, 외관상 품질은 절편의 크기가 작을수록 좋지 않았다. 이취는 기존의 사용되고 있는 비투과성 필름이 가장 심하였다. 통통마디 신선편이의 크기는 10cm 정도와 저장온도는 5℃이 바람직하며, 기존의 비투과성 필름에 비해 투과성 필름의 저장성이 다소 우수하였으나, 필름 종류별 차이는 일정한 경향은 나타나지 않았다.

어린순과 성체의 저장성 비교에서는 조직이 연한 어린순의 생체중감소가 다소 컸으며, 포장내 산소와 이산화탄소 농도도 어린순에서 변화가 심하였다. 외관상 품질과 이취로 볼 때 어린순은 다소 투과성이 낮은 20,000cc가 적합하였다.

통통마디에 적합한 예냉방법과 예냉이 통통마디의 저장성에 미치는 영향을 알아보았는데, 통통마디의 경우 개체의 크기가 작아 빠른시간에 예냉이 가능하였으나, 예냉속도는 빙랭, 수랭, 강제송풍, 공랭순서였다. 그러나 저장성에 있어서 수랭과 빙랭이 경우 이취발생과 외관상 품질 저하가 커 통통마디의 예냉으로 적합하지 않았으며, 외관상 품질저하와 이취에서 가장 우수한 품질을 보인 공랭(Room-cooling)이 적합하였다.

UVc 로 인한 살균처리로 저장성 향상을 기대하였으나, 통통마디에 UVc 처리 효과는 나타나지 않았고, UVc 세기가 15kJ 이상에서는 호흡과 에틸렌 발생이 증가가 나타났다.

재배조건에 따른 저장성 비교에서는 상토재배 통통마디의 생체중 감소가 다소 컸으며, 저장중 포장재내 이산화탄소 산소 농도의 변화로 갯벌재배에서 보다 크게 나타났는데, 저장 최종일에 외관상 품질도 상토재배에서 다소 낮게 나타나 상토재배에서 재배한 통통마디의 저장성이 갯벌재배한 것에 비해 다소 좋지 않았다.

함초의 엽과 미네랄 성분의 친수성 향상시켜 천연 저염 소재 식품을 개발하기위하여 초미립 분말화와 함초 encapsulation 소재에 대한 기술 연구를 수행하였다.

함초는 엽생식물로서 미네랄 성분을 풍부하게 갖고 있으나, 장기간 보관하기 위하여 건조하면, 건조 과정 중 고유한 성분들이 수축되고, 보관 중 대기 중의 습도, 빛, 온도 등에 의하여 변질되어, 물에 잘 용해되지 않기 때문에 본 연구에서는 함초의 친수성 향상과 장기간 보존 할 수 있는 함초 가공 기술을 개발하고자 하였다.

본 연구에서는 고유한 엽도 및 미네랄 성분을 최대한 보존 할 수 있도록 소재를 개발하기 위하여 원적외선 건조 방법으로 경제적인 건조 조건을 조사하였고, 분쇄 공정으로 ①함초 초미립 분말화와, ②용융압출성형공정으로 함초 encapsulation 소재를 개발하였고, ③개발한 시료의 pH, 전기전도도, 엽도 함량, 양·음이온 농도를 측정한 결과는 다음과 같다.

1) 원적외선 건조 조건은 온도: 60℃, 건조시간 :1시간에서 수분함량 10%까지 경제적인 건조조건 확립.

- 2) 저온초미분쇄방법을 이용하여 함초의 분말입자 범위 <math><45\mu\text{m}</math> 초미립분말 양산화 기술 확립.
- 3) 함초 초미립분말 <math><45\mu\text{m}</math> 시료의 염도 및 미네랄 성분 분석을 통하여 물에 해리된 이온 분석 : Na=>180ppm, Cl= 286ppm, 미네랄인 K=14ppm, Mg=22ppm, NH<sub>4</sub>=6.6ppm, pH =6, 전기전도도=27 - 40mS/cm, 염도=3 - 4% 농도 분석.
- 4) 분말 350 $\mu\text{m}$ <조립분말크기<250 $\mu\text{m}$  함초 시료의 염도 및 미네랄 성분 분석을 통하여 물에 의한 해리된 이온 분석 : Na=<1ppm, Cl=2.8ppm, 미네랄인 K=<19ppm, Mg=<4ppm, NH<sub>4</sub>=1.9, pH=3.8, 전기전도도=4 -5 mS/cm, 염도=1.4 - 1.9% 분석
- 5)용융압출성형을 이용하여 제조한 함초 encapsualtion 시료의 염도 및 미네랄 성분 분석을 통하여 물에 의한 해리된 이온 분석 (함초/쌀전분비 80/20, 50/50, 20/80 경우) : Na = 43 - 141ppm, Cl = 134 - 232ppm, K= 8.5 - 10.2ppm, Mg = 17 - 19ppm , pH=6.2 - 6.3, 전기전도도=22 - 31mS/cm, 염도=2.5 - 3.3%로 분석
- 6)미분말로 가공된 소금과 함초가 첨가된 소금 시료의 염도 및 미네랄 성분 분석을 통하여 물에 의한 해리된 이온 분석 : 경우, Na = 5 - 9ppm, Cl = 14ppm, pH= 5.5 - 6.1이고, 가공소금 시료의 전기전도도=29mS/cm, 염도=2.5%, 함초 첨가소금 시료의 전기전도도=93mS/cm, 염도=6.4%분석.

위의 분석 결과 본 연구에서 개발한 함초시료는 조립 분말보다 <math><45\mu\text{m}</math> 초미립분말화로 가공한 함초 고유한 광물질인 NaCl, KCl, Mg + NH<sub>4</sub> 등 성분들이 물에 용이하게 이온화되어 염도가 2배, 전기전도도는 9배 정도 증가되어, 특히 미네랄 성분이 물에 용이하게 이온화되어, 섭취 시 짠 맛을 더 느끼게 된다.

시중에서 판매하고 있는 미분말로 가공된 소금 시료의 경우 초미분말 함초 시료보다 10배 적은 Na = 5 - 9ppm, Cl = 14ppm 농도에 미네랄 함량이 물에 해리가 소량 형성되어, 염도는 초미립분말 함초 분말시료 보다 1% 정도 적은 2.5%, pH는 5.5, 전기전도도는 28mS/cm로 각각 이온 농도가 작아지는 원인이 되었을 알 수 있었다.

또한 함초를 정제하여 첨가한 함초 첨가 소금 시료 경우에는 물에 이온화 된 미네랄 함량이 초미분말 함초 시료 적으면서, 단지 전기전도도가 2배 정도(93.3mS/cm) 상승되어, 염도 역시 6.4%로 증가되는 원인이 되었음을 분석 할 수 있었다.

위의 연구 결과를 통하여 현재 시장에서 판매하고 있는 기존의 가공 소금보다 개발한 함초 시료의 염도와 미네랄 성분이 소금보다 미시적으로 물 속에서 용이하게 이온화가 되어 농도가 높아, 저염이면서 더 짠 맛을 느낄 수 있고, 간편하게 encapsulation 하여 함초의 고유한 성분을 장기간 보관 할 수 있는 가공 방법이 개발되어, 차 후 경제적으로 대량으로 양산 할 수 있는 기초자료로서 활용 할 것이다.

세계적으로 국민의 건강 보호를 위하여 되도록 염이 적으면서, 일일 요구하는 광물질량을 풍부하게 포함된 기능성 저염 식품에 많은 관심을 갖게 되면서, 핀란드 헬싱키 의대가 인공조미료를 개발하여 핀란드 오리올라사/에스토니아(Orilola/Estonia)에서 제조하고 있으며, 현재 CJ제일제당에서는 수입하여 “팬솔트” 상품명으로 판매하고 있으며, 그 성분은 염화나트륨50%과

암염 작용인 염화칼륨34%, 황산마그네슘12%과 L-라이신염산염2%, 이산화규소2%로 구성되어 있다.

우리나라 서해안 및 남해안에 함초 자원은 야생에 풍부하다. 본 연구에서 개발한 천연 함초 가공기술을 이용하여 인공적이 아닌 천연적으로 짠맛은 그대로 느끼면서, 나트륨 함량은 적게 섭취하면서, 일일 요구되는 K, Mg 함량을 충분히 섭취할 수 있는 신상품 설계 및 개발에 기초 자료로서 활용하기를 바란다.

## ○ 항비만 및 심혈관질환개선 건강기능식품 개발을 위한 효능 탐색

1. 한국산 함초(*Salicornia herbacea* L.)인 통통마디의 항비만 및 순환계 질환 개선 효과를 알아보고자 in-vitro와 in-vivo로 나누어 본 실험을 실시하였다. in-vitro에서는 3T3-L1 adipocytes 세포의 지방분화 억제효과를 살펴보기 위해 함초 Water, Methanol 추출물을 농도별 (Water:125, 250, 500ug/ml / Methanol:62.5, 125, 250ug/ml), 처리시기별(전처리, 동시처리, 후처리)로 나누어 처리하였다. 3T3-L1 adipocytes 세포를 지방분화 하여 Oil Red O 염색한 결과, 함초 Water, Methanol 추출물을 후처리 하였을 때 지방세포 크기가 형태학적으로 감소하였다. 함초 추출물에 따른 지방세포 분화도 측정 결과, 함초 Water, Methanol 추출물 후처리 시 모든 농도에서 지방분화도 수치가 감소하였으며, 특히 함초 Water 추출물은 125ug/ml에서, 함초 Methanol 추출물은 저농도인 62.5ug/ml에서 감소 효과가 가장 컸다. 이는 함초 Water, Methanol 추출물이 후처리 시 지방세포내로 지방이 축적되는 지방생성과정에서 배양액에 존재하는 여러 지방분화인자의 유입에 영향을 미쳐 비만을 억제하는 것으로 사료된다. 그러므로 함초 추출물을 이용하여 비만 예방을 위한 건강기능성 소재의 개발에 반영할 수 있는 기초자료에 유용할 것으로 보인다.

2. 함초 동결건조 분말, 함초 압출성형 추출분말, 함초 동결건조 nano 분말이 고지방식이로 비만을 유도한 흰쥐에게 항비만 효과를 나타내는지 살펴보았다. 실험 결과 고지방식이와 함께 섭취한 5% 함초 동결건조 분말(5%A)은 식이섭취량을 줄여 체중, 간 및 지방조직의 무게 감소 효과를 나타냈으며, 8주간의 체중증가율 역시 5%A군의 경우 6주차 이후 체중의 변화가 크게 나타나지 않았다. 또한 5% 함초 동결건조 분말섭취군(5%A)은 혈중 leptin 농도를 유의적으로 감소시켰으며, 간 세포기질 중 fatty acid synthase(FASN)의 농도를 증가시키는 경향을 보이는 등 지질대사 개선에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 함초 동결건조 분말에 많이 함유된 식이섬유소에 의한 영향으로 보이며, 이는 포만감으로 인해 식욕을 억제하고 지방조직의 체지방 형성에 영향을 미쳐 항비만 효과 및 체내 지질대사 개선과 더불어 비만으로 인한 만성질환 예방 효과까지 나타낼 수 있을 것으로 사료된다. 함초 압출성형 추출분말 및 함초 동결건조 nano 분말의 경우 체중감소 효과를 나타내지 않았는데, 이는 식이섬유 입자가 고온 고압의 압출성형 및 nano화로 인해 장 내에서 식이섬유소로서의 기능을 수행하지 못한 것으로 사료된다. 앞으로 함초 동결건조 분말의 항비만 원인 물질 및 생화학적인 작용기전을 분석하는 연구가 필요하며 동물을 이용한 실험이 아닌 임상



실험을 통한 직접적인 연구가 필요하다.

3. 함초 동결건조 분말, 함초 동결건조 nano 분말이 순환계질환 동물모델에서 심혈관계 질환 개선 효과를 나타내는지 살펴본 결과 5% 수준의 동결건조 함초 분말(5%A)은 HDL-Cholesterol 농도가 유의적으로 증가하는 혈중 지질 개선 효과를 나타냈으며, 혈중 항동맥경화 인자인 Adiponectin의 경우 유의적인 차이가 나타나지 않았으나 증가하는 경향을 나타냈다. 또한 심혈관 지표인자인 hs-CRP의 분석 결과 5%A군이 HFC군과 비교해 유의적으로 감소하였다. 산화적 손상 지표인 Protein carbonyl은 5% 함초 동결건조 분말(5%A)의 섭취에 의해 유의적으로 감소하였으며, 함초 동결건조 nano 분말의 경우 TBARS와 Protein carbonyl의 수치를 감소시키는 경향을 나타내었으나 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 항산화 효소 중 혈청 Superoxide dismutase (SOD) 활성도는 함초 동결건조 nano 분말(1%B, 2%B) 섭취에 따라 유의적으로 증가하였으며, 간세포질 Glutathion Peroxidase 활성도는 5% 함초 동결건조 분말 섭취(5%A)에 따라 유의적으로 증가하였다. 함초 동결건조 nano 분말 역시 간세포질 Glutathion Peroxidase 활성도가 유의적이지는 않지만 증가하는 경향을 나타냈다. 그러나 분변을 통한 중성지방 및 콜레스테롤 배설에 대한 함초의 효과는 나타나지 않아 함초가 중성지방 및 콜레스테롤 흡수 억제 효과를 나타내지는 않는 것으로 사료된다. 이처럼 순환계 질환 모델에서 5% 수준의 동결건조 함초 분말(5%A)은 혈중 지질 개선 효과 및 일부 심혈관 질환 위험 요인 감소효과를 보이며 이는 항산화 효소 활성 증가 및 체내 산화적 손상을 감소시킴으로 인한 것으로 보여진다. 따라서 함초 동결건조 분말의 항심혈관 질환 원인 물질 및 생화학적인 작용기전을 분석하는 연구가 필요하며 동물을 이용한 실험이 아닌 임상 실험을 통한 직접적인 연구가 필요하다.

### ○ 기능성 장류 개발 연구

분쇄한 입자를 열수 (약 80도)로 추출하여 염분 및 기타 성분을 분석한 결과 세척 후 90% 이상의 염분이 제거되었으나 기타 성분은 세척하는 과정에서 약 10% 미만이 제거되는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 함초에 포함된 다양한 영양성분은 건함초의 조직 내에 결합되어 있고 수용성이 강한 염분은 함초가 세척되는 과정에서 수용성이 함께 조직의 밖으로 용출되어 건함초의 표면에서 응고되었기 때문으로 생각된다. 세척 전후 30분간 열수로 추출한 수용성물질에 포함된 함초 성분 가운데 총질소, 총아미노산, 미네랄 성분의 변화는 건조중량과 소금농도의 변화에 비해 상대적으로 매우 적은 것으로 나타났다. 함초에서 발견되는 항산화 효과를 갖는 총페놀화합물과 폴리페놀 등의 성분은 누룩을 제조할 때 효소를 생산하는 균류와 효모 등의 생장에 도움이 될 수 있고 막걸리, 음용식초 등의 기능성 향상에도 도움이 될 수 있을 것으로 사료된다. 특히, 함초에 함유된 항산화 효과를 갖는 성분, 총페놀화합물, 폴리페놀 등의 물리적인 용출은 알코올에 의해 크게 증가하였으며, 열수에 의한 추출효율은 냉수에 비해 큰 차이를 보이고 있다. 쌀, 밀, 쌀과 함초의 혼합물로 만든 누룩에서 용출된 수용성 단백질의 함

량과 효소 반응에 의해 생성된 포도당의 양은 함초의 첨가에 의해 증가한 것으로 나타났다. TGGE의 시행 결과 누룩의 전분을 당화하여 성장하거나 원료물질에 포함된 단백질 등을 기질로 성장하는 생물 종의 다양성은 누룩을 제조하기 위해 사용하는 원료물질에 의해 영향을 받지 않는 것으로 보인다. 포도당의 소비량과 알코올의 생산성은 비례하는 것으로 나타났으며, 최소 8% 이상의 함초를 첨가하면 7일간 180g의 포도당이 완전히 알코올로 전환되는 것으로 확인되었다. 막걸리에 분리한 효모는 18S-rDNA 지문분석을 통해 *Saccharomyces cerevisiae*로 동정되었다. 함초의 주요 영양성분은 단백질, 미네랄, 소금으로 그대로 사용하면 효모의 생장이 저하되는 것으로 확인되었다. 염분을 제거하지 않은 100g/L의 건조함초 분말을 180g/L의 포도당을 함유하는 배양액에 첨가하여 효모를 1주일 동안 배양한 후 알코올 농도를 측정한 결과 3회의 반복 실험에서 36.5~41.8g/L의 알코올이 생산되었으며, 질산은( $\text{AgNO}_3$ )을 이용하여 적정한 결과 29g/L의 소금이 검출되었다. 이러한 결과는 염분을 제외한 함초의 성분은 효모의 알코올 발효대사에서 필수 영양물질로 작용하지만 함초에 함유되어 있는 소금은 효모의 성장을 저해한다는 결과를 보여주는 것이다. 알코올 생산성은 함초의 첨가에 의해 다소 증가하는 경향을 보였으며, 3회의 반복 실험에서 얻어진 결과를 평균하여 얻은 농도의 표준편차를 감안하면 알코올 생산성에 미치는 함초의 효과는 대조실험 대비 20% 이상이다. 폴리페놀, 총페놀화합물, 항산화효과는 함초를 첨가한 누룩에서 뚜렷하게 증가한 것으로 나타났다. 전통적인 밀 누룩을 원료로 사용하여 제조한 막걸리에 비해 쌀 누룩과 쌀-함초 누룩을 사용하였을 때의 특정 유기산의 농도는 큰 차이를 보였다. 쌀누룩과 밀누룩을 사용한 막걸리를 발효하여 생산한 식초에서 검출되지 않는 구연산, 사과산, 호박산이 쌀-함초누룩을 사용하여 제조한 식초에서 선택적으로 검출되었으며, 피로글루탐산은 밀누룩 또는 쌀누룩으로 제조한 식초에 비해 쌀-함초누룩으로 제조한 식초에서 9배와 5배의 농도로 검출되었다. Na를 제외한 Ca, Fe, K, Mg의 함량 또한 쌀-함초에서 상대적으로 높은 농도로 검출되었다. 대두박으로 제조한 간장(이하, 대두간장)과 비교하여 대두박과 함초를 혼합하여 제조한 간장(이하, 함초간장)의 총질소의 함량은 함초의 첨가량과 반비례하여 감소하였고 염류는 차이가 없었다. 그러나 예상과 달리 나트륨의 함량은 함초의 첨가량에 반비례한 것으로 나타났는데, 함초의 섬유질에 나트륨이 흡착되어 간장을 거르는 과정에서 일부가 고정되었기 때문으로 추측된다. 함초간장의 색도는 함초의 첨가량에 비례하여 고도로 증가하는 경향을 나타냈는데, 이는 함초의 잎과 줄기에 포함된 안토시아닌 색소가 건조과정에서 농축되었다가 용출되었기 때문으로 생각된다. 마그네슘, 칼슘, 철, 망간, 아연의 함량은 함초간장에서 상대적으로 높게 나타났으며 함초의 첨가량에 비례하여 증가하였다. 구연산과 사과산의 함량은 함초의 첨가량에 비례하여 현저하게 증가하는 경향을 보였으나, 호박산, 젖산, 초산의 함량은 함초의 첨가량에 비례하여 증가하거나 감소하는 경향을 보이지 않았으며 간장의 종류에 따른 차이가 크지 않았다. 미생물의 대사에 의해 가수분해된 유리아미노산의 함량은 메주를 제조할 때 사용한 대두박의 함량에 비례하는 것으로 나타났다. 대두간장, 함초간장, 쌀간장, 쌀함초간장의 일반적인 특성을 비교하면 전체적으로 총질소의 함량은 예상외로 함초간장에서 가장 높은 것으로 나타났는데 이는 메주가 발효되는 과정에서 대두단백질의 가

수분해 정도의 차이에 의해서 발생한 결과라고 생각된다. 대두간장과 비교하여 쌀간장 및 쌀합초간장의 총질소의 함량은 다소 낮은 것으로 나타났는데 이는 대두박 함량의 차이에 의한 영향이다.

### ○ 임상실험모델을 통한 건강증진효과 검증

본 연구에서는 다양한 연령층의 여성 피검자들을 대상으로 하여 8주 동안에 걸친 함초(jointed grasswort, *Salicornia herbacea* L.)의 섭취와 복합운동 프로그램이 이들의 건강증진에 미치는 영향을 규명하고자 하였다. 첫 번째 연구에서는 40대 여성 40명을 대상으로 하여, 이들을 각각 위약군(n = 10), 함초군(n = 10), 위약+운동군(n = 10) 및 함초+운동군(n = 10)으로 나눈 후에, 함초군 및 함초+운동군의 경우에는 8주 동안에 걸쳐서 1일 15 g씩의 함초환을 복용하도록 하였으며, 위약+운동군 및 함초+운동군의 경우에는 역시 8주 동안에 걸쳐서 유산소운동과 근력운동을 병행하는 복합운동 프로그램을 수행하도록 하였다. 또한, 본 연구에 참여한 피검자 전원에게 대해서는 처치 전·후에 신체조성, 체력, 골밀도, 혈류역학, 폐기능 및 각종 생화학적 변인을 측정하여 함초섭취 및 복합운동에 의한 건강증진 효과를 분석하였다. 연구결과, 함초군에서는 피검자들의 팔과 다리근력이 유의하게 개선되었을 뿐 아니라, 동화호르몬인 혈중 somatomedin C 농도가 증가한 양상을 나타내었으며( $p < .05$ ), 이러한 결과를 나타낸 이유로서, 이들 피험자들의 근력 향상이 적어도 부분적으로는 체내 동화호르몬 합성의 증가에 의한 결과로 사료된다.

두 번째 연구에서는 50대 여성 피검자들을 대상으로 하여, 역시 8주 동안에 걸친 함초섭취와 복합운동이 이들 피검자들의 신체조성, 체력, 혈류 맥파속도 및 혈중 당대사, 지질대사 및 철분대사를 포함하는 각종 생화학적 변인에 미치는 영향을 규명하고자 하였다. 총 71명의 50대 여성 피검자들이 본 연구에 참여하였으며, 이들은 각각 위약군(n = 10), 함초군(n = 17), 위약+운동군(n = 22) 및 함초+운동군(n = 22)으로 구분되었으며, 함초군 및 함초+운동군의 경우에는 8주 동안에 걸쳐서 1일 15 g씩의 함초환을 복용하도록 하였고, 위약+운동군 및 함초+운동군의 경우에는 역시 8주 동안에 걸쳐서 유산소운동과 근력운동을 병행하는 복합운동 프로그램을 수행하도록 하였다. 아울러서, 본 연구에 참여한 모든 피험자들에게 대해서는 각각 처치 전·후에 신체조성, 체력, 혈류역학 및 각종 혈중 생화학적 변인을 두 차례씩 측정하였다. 연구결과, 함초군의 경우에는 처치후에 피검자들의 허리둘레, 헤마토크리트(hematocrit) 및 혈중 HDL-콜레스테롤 농도에 있어서 유의한 개선효과를 나타내었으며, 함초섭취와 복합운동을 병행했던 함초+운동군의 경우에는 체지방율, 근력, 헤마토크리트(hematocrit) 및 혈중 총 콜레스테롤(TC) 농도에서 유의한 개선효과를 나타내었다( $p < .05$ ). 이러한 결과는 함초섭취가 상기한 피험자들에게 대해서 신체조성과 함께 철중 철분 및 지질대사의 개선을 기대할 수 있지만, 함초섭취와 함께 복합운동의 병행 시, 단독적인 함초섭취에 비해서 보다 더 큰 건강증진효과를 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

세 번째 연구에서는 20대 여대생을 피검자로 하여 함초섭취와 복합운동이 이들의 신체조성,

혈중 생화학적 변인 및 피부기능에 미치는 효과를 규명하고자 하였다. 총 40명의 여대생이 본 연구에 참여하였으며, 이들은 각각 10명씩 위약군, 함초군, 위약+운동군 및 함초+운동군으로 무선배정하였다. 연구 결과, 함초섭취와 복합운동을 병행한 함초+운동군에서, 제지방량, 근육량 및 골격근량에서 유의한 증강효과가 관측되었으며, 피부기능과 관련해서는 단지 함초군에서 유의한 피부보습효과가 관측되었다( $p<.05$ ). 이러한 결과는, 함초섭취가 여성의 피부에 대해서 유의한 피부보습효과를 나타낼 가능성이 있음을 시사하며, 추후에는 다양한 연령층의 보다 더 많은 여성피검자를 이용한 후속연구를 수행하는 일이 필요할 것으로 추측된다.

다양한 연령층의 여성피검자들을 대상으로 하여 함초섭취와 복합운동의 효과를 분석한 결과, 단독적인 함초섭취만으로도 참여한 피검자들에 대해서 다양한 건강증진효과가 관측되었으나, 단독적인 함초섭취보다는 복합운동 프로그램의 병행이 보다 더 광범위하고 명확한 건강증진효과가 관측되어, 단독적인 함초섭취보다는 복합운동의 병행이 건강증진을 위해서 보다 더 유용한 방법인 것으로 사료된다.

## ○ 품질 및 안전성 연구

함초시료 분석 결과 함초(통통마디, *Salicornia herbacea*)의 유효성분들은 flavonoid, triterpene 계통의 물질들과 asparagine, 세포질성 삼투물질인 betaine, proline 등의 아미노산, 그리고 uracil 등으로, flavonoid 계통 물질들로 quercetin, isorhamnetin-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside, flavonide glycosides 등이 알려져 있고, triterpene 계통 물질들로 sterol의 일종인  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol 등이 존재하는 것으로 알려졌다. 함초 추출물 내 표준물질의 상대함량을 확인한 결과 chlorogenic acid는 물추출 시료들에서 상대함량이 높은 것으로 나타났는데 비해, quercetin은 동결건조함초P 물추출을 제외하고 소량 존재하여 상대함량이 1%이하인 것으로 나타났다. 이는 flavonoid TLC 결과와 유사한 결과로 이를 통해 물추출 시료 내 quercetin의 함량이 소량임을 재확인할 수 있었다. 시료 전처리 과정과 spike test 시험을 통해 표준물질들의 존재 유무를 확인하고 이들의 함량을 계산한 결과, 최종 산물을 물추출물로 결정하는 경우 표준물질은 chlorogenic acid로 하는 것이 바람직하다는 결론에 도달하였다. Chlorogenic acid는 식물체 내에 광범위하게 포함되어 있지만, 함초의 항산화 기능을 설명하기에 바람직하며 함량도 높아 지표물질로 설정하는 것이 타당하다고 판단되었다.

생산한 함초 시료들 중 생산량이 많은 건조함초 pilot 물추출 시료를 선정하여 영양성분과 미량성분을 분석하였다. 영양성분 확인 결과 탄수화물 함량에 비해 회분함량이 52.2%로 매우 높은 것으로 나타났다. 반면에 열량은 182kcal/100g으로 낮은 수치를 나타내었다. 이는 건조함초 pilot 시료 내 식이섬유 함유량 때문으로 판단되었다. 품질관리 기준 확립을 위해 일반적인 무기이온 및 중금속의 함량 분석을 한국기초과학지원연구원에 의뢰하여 ICP-AES, MS 방법으로 분석하였다. 식품 또는 건강기능식품의 중금속 기준인 총 10.0mg/kg 이하를 중심으로 건조함초 pilot 물추출 시료의 중금속 함량을 확인한 결과 As 0.48mg/kg, Pb 0.36mg/kg, Cd 0.26mg/kg으로 식품의 중금속 기준에 적합함을 확인할 수 있었다. 시험물질 MDC308의 단회 경구투여에 의한 독성을 조사하기 위하여 Sprague-Dawley(SD) 계통 랫드에 시험물질을 경구투여 하였다. 각 군당 10마리(암수 각 5마리)에 0, 555, 1666 및 5000mg/kg 용량으로 단회

경구투여를 실시하였고, 14일간의 사망률, 일반증상, 체중변화를 관찰하고, 관찰종료 후 부검을 실시하여 육안적 소견을 관찰하였다. 시험물질 MDC308의 랫드에 대한 단회경구투여 시험결과, 시험물질에 의한 사망동물 및 일반증상에 있어서 특이적 변화가 관찰되지 않았으며, 체중변화 있어 시험물질의 투여와 연관된 변화가 관찰되지 않았다. 관찰기간 종료후 실시한 부검에서 특이 소견이 관찰되지 않았다.

사망동물이 관찰되지 않았기에 본 시험물질의 반수치사량(LD<sub>50</sub>)은 산출되지 않았으며, 최소치사량(MDL: Minimum Lethal Dose)은 암수 랫드에서 5000mg/kg 이상인 것으로 판단하였다.

복귀돌연 변이 시험결과 시험물질 염생식물(함초)는 본 시험조건에서 박테리아 균주의 복귀돌연변이를 유발시키지 않는 물질로 평가되었다.

염색체 이상 시험 결과 시험물질 염생식물(함초)는 본 시험조건 하에서 CHL 세포에 대한 염색체이상 유발 빈도가 통계적으로 유의한 증가를 보이지 않았다. 따라서 염생식물(함초)가 CHL 세포의 염색체이상을 유발하지 않는다고 판단되었다.

염생식물(함초)의 유전독성 평가를 위해 마우스에서 골수의 미성숙 적혈구 분석을 통해 시험물질에 의해 유발되는 염색체 또는 유사분열기관의 손상을 확인하였다. 본 시험에서는 약 8주령의 수컷 ICR 마우스를 각 군당 5마리씩 사용하였고, 최고농도는 고시의 한계농도인 2000 mg/kg 용량으로 하였다. 공비를 2로 하여 500, 1000, 2000 mg/kg의 3 용량으로 1일 1회씩 1일간 경구 투여하였다. 음성대조군에는 멸균증류수를 10 mL/kg의 투여액량으로 1회 경구 투여하였고, 양성대조군에는 Mitomycin C를 1 mg/kg 용량으로 1회 복강 내 투여하였다. 시험물질, 음성대조물질, 양성대조물질을 최종 투여하고 약 24 시간 후에 골수세포를 수거하여 소핵 유발빈도(MNPCE/2000PCE)와 다염성 적혈구 출현빈도를 평가하였다. 개체 당 2000 개의 다염성 적혈구(PCE, Polychromatic Erythrocyte) 중 소핵을 가진 다염성적혈구(MNPCE, Micronucleated Polychromatic Erythrocyte)의 수를 계수한 결과, 모든 시험물질 투여군에서 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가가 관찰되지 않았으며, 총 적혈구 중 다염성적혈구 비율도 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 이상의 결과에 따라 염생식물(함초)는 본 시험조건 하에서 마우스 골수세포에 소핵을 유발하지 않는 것으로 평가되었다.

## V. 연구성과 및 성과활용 계획

### ○ 초미립분말 이용 상품 개발

첫 번째는 볶은 참깨에 초미립 함초를 바인더와 혼합, 상품화(그림 15)

두 번째는 검은 참깨인 흑임자에 초미립분말 함초 혼합(그림 16)

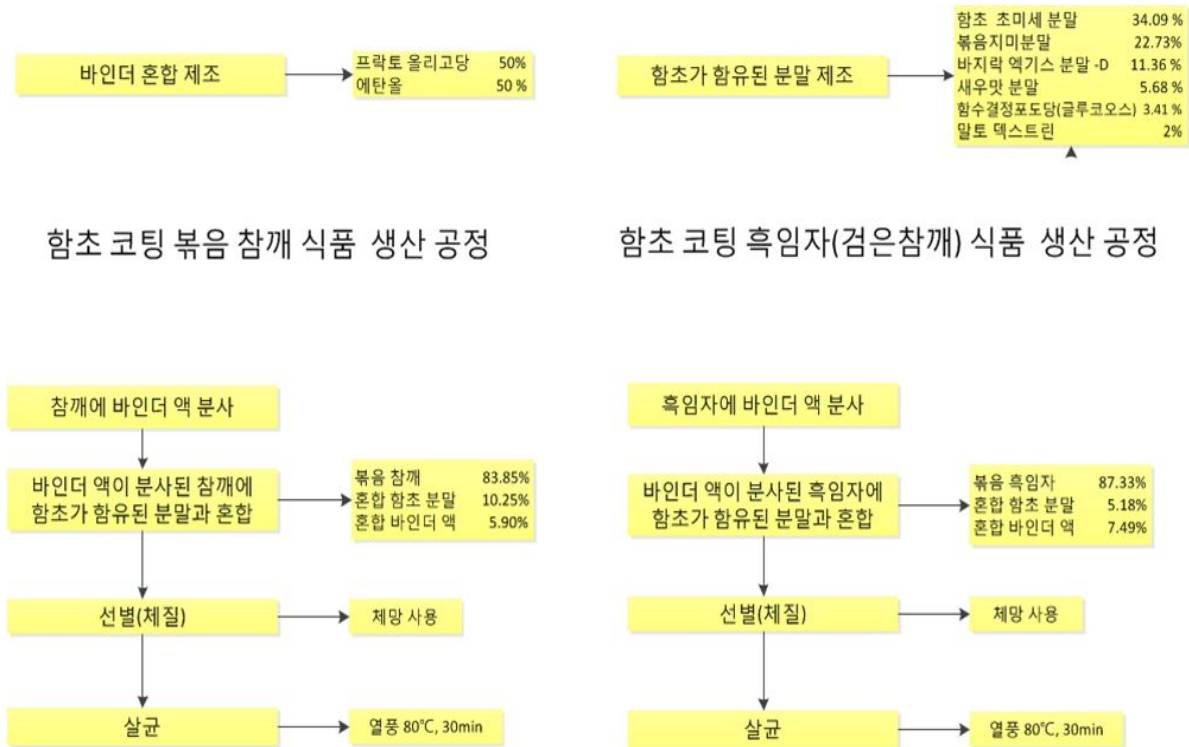


그림 14. 함초 초미분쇄 분말을 이용한 함초 코팅 볶음 식품 생산 공정표



그림 15. 함초코팅 참깨 식품



그림 16. 함초코팅 흑임자 식품

## ○ 장류개발 활용계획

인체에 유용한 성분을 함유하고 있는 것으로 알려져 있지만 생함초나 건조함초 모두는 다른 채소나 나물처럼 식품으로 사용할 수 없는 제한성이 있다. 이러한 한계를 극복하고 식품으로 활용할 수 있는 가장 합리적인 방법은 장류의 원료로서 활용하는 것이다. 특히, 간장은 장시간 추출과정을 통해 완성되기 때문에 메주의 원료로서 첨가한 함초의 성분은 메주의 발효와 간장의 숙성과정에서 효과적으로 추출될 수 있을 것이다. 특정한 공정을 이용하여 양조간장을 생산하는 기업은 메주를 제조하거나 간장을 숙성하는 과정에서 함초와 쌀을 사용할 수 있기 때문에 본 발명이 목적하는 기능성이 향상된 간장을 제조할 수 있고 쌀과 함초의 소비를 촉진할 수 있을 것으로 사료된다.

## ○ 제품화 계획

본 연구 성과를 종합해 볼 때 함초추출물은 다양한 분야에 원료로 사용하는 것이 가능할 것으로 판단 되었다.

1. 건강기능식품의 원료 - 식품산업, 천연물활용 의료산업, 화장품산업의 원료로 사용가능.
2. 식품 첨가물로 사용가능
3. 섬유소 함유 음료로 개발 가능
4. 균형있는 어린이 이유식, 영양식으로 사용가능
5. 청소년의 편식, 성인병, 비만에 대한 대체식품으로 개발 가능 : 다이어트에 관심 있는 인구의 증가로 콜레스테롤 조절 성분을 이용하여 체중조절용 제품으로 개발
6. 고령화 사회에서 노인 건강식품 사용가능 : 항산화 성분을 이용하여 노화를 방지하는 제품으로 개발 가능함.

본 연구성과 활용계획으로 당사가 개발한 적고구마 함유 다이어트 제품에 첨가하여 다이어트 (선식)의 원료로 사용 가능체중 감량을 위한 저열량 식사대체식 제품을 개발함. 최종 제품은 식사대용식으로 개발하기 위해 영양소 균형을 고려하여 일정열량(예> 한포당 150kcal)이 되도록 하고, 그 구성 성분은 5대 영양소가 골고루 포함되도록 함.

## SUMMARY

### (영문요약문)

#### ○ Storability

This study was carried out to compare the storability of *Salsola komarovi* Iljin and *Suaeda maritima* L. Dum which stored at different storage temperatures in MA storage. These plants that had grown in greenhouse packed with 50  $\mu\text{m}$  ceramic film and then stored in 2°C, 10°C, and 25°C temperature. The fresh weight loss both plants was less than 1% in all temperature treatments. The highest fresh weight loss showed at 25°C among storage temperature treatments in *Salsola komarovi* Iljin between plants. The highest carbon dioxide contents in package showed at 25°C among storage temperature treatments in *Salsola komarovi* Iljin between plants, and at 2°C and 10°C temperature treatments remained less than 1%. Oxygen contents in package both plants showed the highest level at 2°C temperature treatment, but *Salsola komarovi* Iljin showed less oxygen contents than *Suaeda maritima* L. Dum. Although there was no significant difference ethylene contents in package between 2°C and 10°C temperature treatments, the higher showed in 10°C than 2°C temperature treatments. The ethylene contents in package both plants were roughly 20  $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$  and the higher was in *Suaeda maritima* L. Dum than *Salsola komarovi* Iljin at 2°C. As increasing the storage temperature, the contents of carbon dioxide and ethylene in package also increased in both plants. The carbon dioxide and ethylene contents of *Salsola komarovi* Iljin showed a significant difference between 2°C and 10°C temperature treatments, but *Suaeda maritima* L. Dum did not show. The shelf life of *Salsola komarovi* Iljin based on visual quality was 14 days at 2°C temperature treatment and 7.5 days at 10°C temperature treatment. However, the shelf life of *Suaeda maritima* L. Dum did not show a significant difference between 2°C temperature treatment that was 11 days, and 10°C temperature treatment that was 9.5 days. Considering visual quality and gas contents in package, *Suaeda maritima* L. Dum might appear chilling injury at 2°C temperature treatment.

These studies were carried out to find the effect of packing materials and storage temperature to enhance the storability of *Salicornia herbacea* L. The fresh weight loss was less than 2% at below 10°C and non-perforated package, but 25°C and perforated package treatment showed more than 4% of fresh weight loss that result to deteriorate quality. The carbon dioxide and oxygen contents remained 1~2% and above 15% in non-perforated package, and these contents were in proportion to gas permeability of packing materials. All the temperature treatments except 25c showed rapidly increasing ethylene concent from



7days after storage, and the highest ethylene content was 2°C treatment that should appear chilling injury. The off-odor and deterioration ratio were lowest in 5°C among the temperature treatments and 50µm thickness ceramic film treatment at 5°C storage, while packing materials did not show any trends among the temperature treatments. The shelf life based on visual quality showed highest in 50µ thickness ceramic film packing and 5°C treatment, and that was 28days.

The length of fresh cut affected the storability of *Salicornia herbacea* L. The fresh weight of fresh cut of *Salicornia herbacea* L. decreased rapidly, as the length was shorted. The carbon dioxide and oxygen contents in package were not different among the size treatments. The visual quality was lowest in the shortest treatment(3cm). The proper length of fresh cut *Salicornia herbacea* L. was 10cm.

This study was carried out to compare the storability of sprouts and adult stem of *Salicornia herbacea* L. in MA storage. The sprouts of *Salicornia herbacea* L. showed higher fresh weight loss and change of carbon dioxide and oxygen contents in package, because it has delicatated tissues. The best stroage condition of sprouts of *Salicornia herbacea* L. were 20,000cc/m<sup>2</sup> • day<sup>-1</sup> • atm<sup>-1</sup> in 5°C.

This study was carried to find out the proper precooling method and effect of cooling on the storage of *Salicornia herbacea* L.. The *Salicornia herbacea* L. cooled very quickly because it was thin diameter and small size. The fastest precooling method was icing, and followed by hydrocooling, forced air cooling, and room cooling. The icing and hydrocooling method was not proper for *Salicornia herbacea* L. because they showed lowest visual quality and highest off-odor at last day of MA storage. Considering visual quality and off-odor, room cooling was proper method for *Salicornia herbacea* L. in MA storage.

UVc treatments did not show an advanged effect of *Salicornia herbacea* L., and besides over 15kJ UVc treatments increased the respiration and ethylene production rate of *Salicornia herbacea* L..

This study was carried out to compare the storability of *Salicornia herbacea* L. cultivated different media that were bed soil and mud flat soil. *Salicornia herbacea* L. grown in bed soil showed higher fresh weight loss and change of change of carbon dioxide and oxygen contents in package. The *Salicornia herbacea* L. showed higher visual quality in mud flat soil treatment than bed soil treatment.

### ○ **Drying, Encapsulation, Pulverization**

Development of technology to encapsulate *Salicornia herbacea*, using hot-melt extrusion, and technology to produce the low salt ultrafine powder of *Salicornia herbacea* in which the

content of salt and mineral is high and of which the hydrophilic property is superior.

Pulverizing *Salicornia herbacea* into ultrafine powder to develop natural low salt food, improving the hydrophilic property of salt and mineral of *Salicornia herbacea*, and the encapsulation of *Salicornia herbacea* were studied in this study.

*Salicornia herbacea*, halophyte, contains much amount of mineral. However, if *Salicornia herbacea* is dried to store for a long time, the amount of active components are decreased during drying process. *Salicornia herbacea* is spoiled by humidity, light and temperature during storage. So *Salicornia herbacea* powder is not dissolved well in water. Therefore, the goal of this research was to develop the processing technology to improve the hydrophilic property of *Salicornia herbacea* and store for a long time.

The economical drying condition was investigated, using a far infrared drying machine to develop material in which the salt and minerals of *Salicornia herbacea* are preserved at most. *Salicornia herbacea* was pulverized into ultrafine powder. The *Salicornia herbacea* encapsulation material was developed, using hot melt extrusion. The pH, electrical conductivity, salinity and ion concentration of developed material were measured. The results are as follows,

1) The far infrared drying condition

Drying temperature : 60°C

Drying time : *Salicornia herbacea* was dried into moisture content of 10% within 1 hour.

2) *Salicornia herbacea* was pulverized into ultrafine powder of which the particle size is <45  $\mu\text{m}$ , using a low temperature turbo mill.

3) The concentrations of ions ionized in water : Na=>180ppm, Cl=286ppm, K=14ppm, Mg=22ppm, NH<sub>4</sub>=6.6ppm, pH=6, electrical conductivity=27 - 40mS/cm and salinity=3 - 4% .

4) The concentrations of ions ionized in water in coarse *Salicornia herbacea* of which the particle size distribution was 250 $\mu\text{m}$ -350 $\mu\text{m}$  : Na=<1ppm, Cl=2.8ppm, K=<19ppm, Mg=<4ppm, NH<sub>4</sub>=1.9, pH=3.8, electrical conductivity=4 -5 mS/cm and salinity=1.4 - 1.9%

5) The concentrations of ions ionized in water in *Salicornia herbacea* encapsulation material produced, using hot melt extrusion (the ratio of *Salicornia herbacea* and rice starch : 80/20, 50/50 and 20/80) : Na = 43 - 141ppm, Cl = 134 - 232ppm, K= 8.5 - 10.2ppm, Mg = 17 - 19ppm , pH=6.2 - 6.3, electrical conductivity=22 - 31mS/cm and salinity=2.5 - 3.3%.

6) The concentrations of ions ionized in water in the mixture of salt and *Salicornia herbacea* which are pulverized into ultrafine powder : Na = 5 - 9ppm, Cl = 14ppm, pH= 5.5 - 6.1, electrical conductivity of salt=29mS/cm, salinity of salt=2.5%, electrical conductivity of *Salicornia herbacea* added salt=93mS/cm and salinity of *Salicornia herbacea* added salt=6.4%.

NaCl, KCl and Mg + NH<sub>4</sub> were ionized in water more in ultrafine powder than in coarse powder. The salinity and electrical conductivity of ultrafine powder was increased by 2 and 9 times, respectively, compared to those of coarse powder. Especially, the minerals of ultrafine powder were ionized more in water and we can feel salty taste.

In salt produced with fine powder purchased in market, the concentration of Na and Cl was 5 - 9ppm and 14ppm, respectively. The salinity was 2.5%, pH was 5.5 and electrical conductivity was 28mS/cm. All values were lower in fine powder purchased in market, compared to those of ultrafine powder.

In salt adding refined *Salicornia herbacea*, the concentrations of minerals were lower, but the electrical conductivity was increased by 2 times, so that salinity was increased by 6.4%.

Minerals were ionized more in developed *Salicornia herbacea* than in pressed salt sold now in market. Therefore, we can feel stronger salty taste in the developed *Salicornia herbacea*, even though salinity is lower. Also, the active components of *Salicornia herbacea* can be preserved for a long time through simple encapsulation. This encapsulation technology can be applied in mass production.

#### ○ Interaction effects of jointed glasswort(*Salicornia herbacea* L.) consumption and combined exercise

The purpose of this study was to investigate the interaction effects of jointed glasswort(*Salicornia herbacea* L.) consumption and combined exercise for 8 weeks on various health-related parameters in women of 20, 40 or 50 years. In the first study, 40 female subjects of 40 years were participated in this study, and they were randomly divided into 4 groups as follows: placebo group(n = 10), jointed glasswort group(n = 10), placebo + exercise group(n = 10) and jointed glasswort + exercise group(n = 10). Jointed glasswort group and jointed glasswort + exercise group were supplemented with the jointed glasswort bolus of 15 g a day for 8 weeks, and combined exercise training including aerobic and strength exercises for 8 weeks were performed in placebo + exercise group and jointed glasswort + exercise group. They were measured twice on body composition, physical fitness factors, bone mineral density, hemodynamics, respiratory function and blood biochemical parameter before and after 8 weeks interventions, respectively. With respect to muscle strength, arm and leg muscle strength were significantly increased in jointed glasswort group(p<.05). Also, jointed glasswort group indicated the significant increase in blood somatomedin C level after 8 weeks intervention(p<.05), and these results suggest that the increase of arm and leg muscle in

jointed grasswort group may be occurred at least in part through the synthesis of the anabolic hormone.

The purpose of second study was to investigate the interaction effects of jointed grasswort(*Salicornia herbacea* L.) consumption and combined exercise for 8 weeks on body composition, physical fitness factors, brachial-ankle pulse wave velocity, blood biochemical parameters related with blood lipid, sugar and iron metabolism in women of 50 years. A total of 71 female subjects of 50 years were participated in this study, and they were randomly divided into 4 groups as follows: placebo group(n = 10), jointed grasswort group(n = 17), placebo and exercise group(n = 22) and jointed grasswort + exercise group(n = 22). Jointed grasswort group and jointed grasswort + exercise group were supplemented with the jointed grasswort bolus of 15 g a day for 8 weeks, and combined exercise training including aerobic and strength exercises for 8 weeks were performed in placebo + exercise group and jointed grasswort + exercise group. They were measured twice on body composition, physical fitness factors, hemodynamics and blood biochemical parameter before and after 8 weeks interventions, respectively. Jointed grasswort group showed the beneficial effects in waist circumference, hematocrit and blood HDL-cholesterol level, while jointed grasswort + exercise group indicated the beneficial effects in percent body fat, muscle strength, hematocrit and blood total cholesterol(TC) level( $p < .05$ ), suggesting the usefulness of interaction effects between jointed grasswort consumption and combined exercise.

Third study tried to investigate the effects of jointed grasswort consumption and combined exercise on the body composition, blood biochemical parameters and skin function in women of 20 years. A total of 40 female subjects of 20 years were recruited in this study, and they were randomly divided into 4 groups including placebo group(n=10), jointed grasswort group(n=10), placebo + exercise group(n=10) and jointed grasswort + exercise group(n=10), respectively. In the case of the body composition, jointed grasswort + exercise group indicated higher increase in fat-free mass, muscle mass and skeletal muscle mass than other groups after intervention( $p < .05$ ). With respect to skin function, only jointed grasswort group showed significantly higher skin moisturizing effect than other groups( $p < .05$ ). Thus, further studies using larger sample size of various ages will be required to elucidate the precise effect of jointed grasswort on skin moisturizing of women.

Taken together, it is likely that jointed grasswort consumption and combined indicate the useful health-promoting effects on various physical and biochemical aspects in women irrespective of age.

### ○ Anti-Obesity Effect

Recently, the obese population in Korea is rapidly increasing thanks to the improvement of people's life quality along with the economic growth and their dietary life patterns changing to western-style ones. At the same time, as a method to improve their dietary habits against obesity, people pay more attention to natural plant ingredients safe enough not to worry about reverse effects, which

requires more researches on seeking for functional plant ingredient efficacious for the treatment of obesity and clarifying their action mechanism as well. As one of the natural plant ingredients, people have more interest in Hamcho, and many researches are being conducted on its various physiological activities. However, most of them focus on its antioxidant and anti-diabetic activities, and only few of them are carried out on its efficacy of anti-obese activity. Therefore, this study attempted to investigate the anti-obese and cardiovascular disease improvement effects of *Salicornia herbacea L.*, which is a Korean inhabiting Hamcho and conducted the related experiments divided into in-vitro and in-vivo.

The in-vitro was conducted to find out the lipolysis inhibitory effect of 3T3-L1 adipocytes, so the water and methanol extracts of *Salicornia herbacea L.* were processed while being divided by concentration (125, 250, 500ug/ml) and processing period (pre-processing and post-processing). When 3T3-L1 adipocytes were differentiated and dyed with oil red O, the size of adipocytes became reduced morphologically after the Hamcho water and methanol extracts were post-processed. As a result of measuring the degree of adipogenic differentiation by the Hamcho water extract, this study found out that numerical values of adipocyte differentiation decreased in all the concentrations in post-processing, and especially the reduction effect was highest in the 125ug/ml water extract treated group.

The in-vivo study about anti-obese effect of Hamcho was conducted to examine whether Hamcho freeze-dried powder and Hamcho freeze-dried nano powder have anti-obese effect on high fat diet-induced obese rat. rat used for this experiment were divided into 8 different groups, each of which was bred for 8 weeks while being provided with a different experimental diet. The 5% Hamcho freeze-dried powder (5%HS) group having taken high fat diet together showed a weight loss effect in weight, liver and adipose tissue by reducing the dietary intake amount. Besides, it was found that the 5%HS group showed a significant reduction of leptin concentration in the blood, while having positive effect on the improvement of lipid metabolism, such as a tendency to increase the concentration of FASN (fatty acid synthase) in blood adiponectin and in cytosol. Such a finding is based on the effect of lots of dietary fibers contained in Hamcho freeze-dry powder, which is even considered to have effect on the improvement of lipid metabolism and prevention effect against obesity-caused chronic diseases as well as anti-obesity effect by suppressing appetite through satiety and affecting the formation of body fat in adipose tissues. However, Hamcho freeze-dried nano powder didn't show weight loss effect. It seems because its dietary fiber particles became too small by nano unit to function as a dietary fiber.

In addition, the in-vivo study about cardiovascular disease improvement effect of Hamch, which was conducted the atherogenic diet induced rat model, showed that serum HDL-cholesterol level was significantly higher and hs-CRP, an risk factor of cardiovascular disease, level was significantly decreased in 5% Hamcho freeze-dried powder fortified group than in atherogenic diet control group. Also serum adiponectin concentration tended to be increased by 5% hamcho freeze-dried powder fortification. Protein carbonyl level was significantly decreased in group with 5% Hamcho freeze-dried powder and showed a tend to be decreased in group with hamcho nano powder. Cytosolic glutathion peroxiase activity was meaningful increased in 5% hamch freeze-dried powder diet group. As a result, 5% hamcho freeze-dried powder fortified diet might be consider to have lipid profile developing effect and antioxidative effect. However, it is needed to conduct a further

research analyzing the anti-obesity or antioxidative substances and biochemical action mechanism of Hamcho freeze-dried powder, which should be a direct research through clinical experiments not through animal experiments.

### ○ Traditional Soy Source Development

Glasswort was used as a raw material in the nuruk-making process, and makgeolli was fermented using the nuruk. The antioxidant, polyphenol, and total phenolic contents extracted from dried glasswort with 10% ethanol were 953 mM, 2,928 mg/kg, and 214 mg/kg, respectively. *Saccharomyces cerevisiae* generated 9.7g/L of ethanol in glucose-defined medium without glasswort, but generated 72.4g/L of ethanol when 20g/L of glasswort was added. Nuruk was prepared from rice, wheat, and a rice-glasswort mixture via traditional techniques. Approximately 93g/L, 91g/L, and 123g/L of ethanol was produced in the makgeolli fermented with rice nuruk (RN), wheat nuruk (WN), and rice-glasswort nuruk (RGN), respectively. Antioxidant, polyphenol, and total phenolic contents in the RGN-makgeolli were significantly higher than in the RN- and WN-makgeolli. The organic acids produced in the nuruk-making or makgeolli-making processes ultimately become constituents of the finished makgeolli product. The organic acid contents of the three types of makgeolli differed significantly from one another. Moreover, the Fe, K, and Mg contents of the RGN-makgeolli were relatively higher than those of the RN-makgeolli and WN-makgeolli. From these results, it may be suggested that the addition of glasswort to the nuruk-making culture enhanced the activity of yeast growth and improved nutritional quality of makgeolli. Three types of nuruk were made from rice, wheat, and a rice-glasswort (6:4) mixture. Nuruk, makgeolli, and vinegar were manufactured with rice nuruk (RN), wheat nuruk (WN), and rice-glasswort nuruk (RGN). The variable region of 18S- or 16S-rDNA amplified with genomic DNA extracted directly from nuruk, makgeolli- and vinegar-making cultures was analyzed via temperature gradient gel electrophoresis (TGGE). The sequence of the 18S-rDNA variable region extracted from the TGGE gel for nuruk was 99% homologous with *Aspergillus* sp. and that for the makgeolli-making culture was 99% homologous with *Saccharomyces* sp. and *Saccharomycodes* sp. The sequence of the 16S-rDNA variable region extracted from TGGE gel for the vinegar-making culture was 98% homologous, primarily with the *Acetobacter* sp. The eukaryotic and prokaryotic diversity in the nuruk, makgeolli-making, and vinegar-making cultures was not significantly altered by the addition of glasswort. Prokaryotic diversity was higher than eukaryotic diversity in the nuruk, but eukaryotic diversity was higher than prokaryotic diversity in the makgeolli-making culture, on the basis of the TGGE patterns. No 18S-rDNA was amplified from the DNA extracted from the vinegar-making culture. The diversity of the microbial community in the process from nuruk to vinegar was slightly affected by the type of raw

material utilized for nuruk-making. The saccharifying activity and ethanol productivity of nuruk, polyphenol content in makgeolli, and acetic acid and polyphenol content in the vinegar were increased as the result of the addition of glasswort. In conclusion, the glasswort may be not simply an activator for the growth of microorganisms during the fermentation of nuruk, makgeolli, or vinegar, but also a nutritional supplement that improves the quality of vinegar. Five types of *meju* were prepared from 100% defatted soybean (DFSG0), a mixture of 90% DFS and 10% glasswort (DFSG1), a mixture of 80% DFS and 20% glasswort (DFSG2), a mixture of 70% DFS and 30% glasswort (DFSG3), and a mixture of 60% DFS and 40% glasswort (DFSG4). Five types of *kanjang* were separately prepared from the 5 types of *meju* by ripening in brine for 6 months. The contents of minerals (Mg, Ca, Fe, Mn, and Zn), organic acids (citric acid, malic acid) and antioxidative effect in the *kanjang* were increased in proportion to the glasswort content in the *meju*. However, the free amino acid contents in the *kanjang* were reduced in proportion to the glasswort content in the *meju*. DFSG1- and DFSG2-*kanjang* were not different distinctly from DFSG0-*kanjang* (reference) based on aroma, flavor, and taste that were compared simply by panel tests. The bacterial and fungal community in the fermented *meju* and *kanjang* was not affected by the addition of glasswort to the *meju*-making process. Bacteria belonging to the *Lactobacillus* and *Bacillus* genera and the *Lactobacillus* family were predominated, and yeasts belonging to the *Saccharomyces* genus and fungi belonging to the *Aspergillus* genus were predominated in the fermented *meju* and *kanjang*. In conclusion, the glasswort was a supplement that nutritionally improved the *kanjang* (except for free amino acid contents) but didn't influence the growth of microorganisms that are responsible for the fermentation of *meju* and *kanjang*. Four types of *meju* were made from 100% defatted soybean (DFS), a mixture of 80% defatted soybean and 20% glasswort (DFS-G), a mixture of 80% defatted soybean and 20% rice (DFS-R), and a mixture of 60% defatted soybean, 20% glasswort, and 20% rice (DFS-GR). Four types of Korean traditional soy sauce were prepared from the four types of *meju*. Mineral and antioxidant contents in the soy sauce made of DFS-G and DFS-GR were significantly higher than others. Citric, malic, succinic, lactic, and pyroglutamic acid contents in soy sauce made of DFS-R and DFS-GR were 1.3-1.5 times higher than others. Total nitrogen and free amino acid contents in soy sauce were correlated with DFS concentration in the *meju*. The bacterial community in the non-fermented *meju*-making ingredients was replaced largely by *Bacillus* sp. in the fermented *meju*. The use of glasswort and rice in the *meju*-making process did not alter the bacterial community responsible for the fermentation of *meju*.

### ○ Quality Control & Safety Identification

This study was carried out to identify quality control and safety of MDC308 which extracts essence from *Salicornia herbacea*. To confirm quality control of MDC308, we have analyzed active element and functional ingredient of MDC308 by HPLC, TLC. To estimate safety of MDC308, it was performed to assess acute oral toxicity test of MDC308 in SD rat. It was determined that this test substance (MDC308) did not have toxic effects at 0, 555, 1666 and 5000mg/kg dose. To evaluate the mutagenic potential of the test substance, bacterial reverse mutation test was performed in bacterial systems. Dose range-finding test was performed using the *Salmonella typhimurium* strains TA98, TA100 and the *Escherichia coli* strain WP2uvrA in the presence and absence of a metabolic activation containing S9 fraction (rat liver postmitochondrial fraction). In conclusion, the test substance (MDC308) was considered to be non-genotoxic under the present test conditions. The chromosome aberration study using cultured Chinese hamster lung fibroblast (CHL cells) was performed to assess the ability of a test substance. To determine the treatment concentration of the test substance in chromosomal aberration test, cytotoxicity test was performed. The test substance was tested at the seven dose levels from 78.13 to 5,000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in the presence and absence of a metabolic activation system (rat liver S9 mix) and showed to be cytotoxic at the high concentrations. It is concluded that the test substance is not clastogenic in CHL cells under the experimental conditions in this report. *in vivo* micronucleus test was designed to determine the mutagenic potential of MDC308 in the micronucleus test using bone marrow cells in mice. In conclusion, the test substance, MDC308, did not induce micronucleated polychromatic erythrocytes in the bone marrow cells in mice.



# CONTENTS

## (영 문 목 차)

Chapter 1. Summary of the research

Chapter 2. Status of domestic and foreign technology development

Chapter 3. Contents of research development and performance results

Chapter 4. Completion and contribution of research purpose

Chapter 5. Application of the research results

Chapter 6. Information from overseas scientific knowledge taken from the research

Chapter 7. Reference

# 목 차

- 제 1 장 연구개발과제의 개요
- 제 2 장 국내외 기술개발 현황
- 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과
- 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도
- 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획
- 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보
- 제 7 장 참고문헌

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 필요성

- 인구의 노령화, 잘못된 식생활, 흡연, 스트레스, 환경 공해, 운동 부족 등은 우리나라의 사망요인을 변화시켰으며, 2006년 사망원인 순위를 1위부터 나열하면 암, 뇌혈관질환, 심장질환, 당뇨병, 간질환 순이며, 이 중 우리 국민의 대표적인 만성 질환이며 동시에 3대 사망원인인 암, 뇌혈관질환, 심장질환에 의한 사망자가 전체 사망자의 47.6%를 차지함. 이들 만성질환은 비만과 높은 관련성이 있으며, 비만은 암, 심혈관계 질환, 당뇨병의 중요한 위험요인 중 하나임.
- 현대는 건강에 대한 관심의 증가로 만성질환 예방을 위한 건강기능성 소재의 개발과 상품화를 통한 건강기능식품 산업이 급속히 발전하고 있으며, 이를 위해 천연물을 이용한 건강기능성 소재의 다양화에 대한 관심이 매우 높은 실정임. 그러므로 앞으로 우리나라 자생식물 이용의 부가가치를 높이기 위해서는 식물을 용도별로 가공 및 이용 방법 등이 개발되어야 함.
- 염생식물은 소금기가 있는 땅에서 사는 식물들로 함초라고도 부르며, 칠면초, 나문재, 천일사초, 해홍나물, 통통마디 등이 있음. 내염성이 강하고, 생명력이 강한 식물로 우리나라에 분포하는 염생식물은 총 16과 40여종이 보고되고 있으며, 특히 서남해안 갯벌의 상부 지역에 발달하여 있음.
- 나문재, 수송나물, 해홍나물, 칠면초 등은 어릴 때 채취하여 나물로 먹거나, 생채, 무침, 볶음, 국거리, 데침 나물, 튀김 등으로 이용하고 있음. 단백질 및 인, 칼슘, 철, 나트륨 등 미량원소, 비타민 A, B1, B2, C 등 많은 영양소가 고루 들어 있어 건강식품이나 민간약초로 쓰이고 있음.
- 이 중 통통마디는 습염생 식물로서 명아주과에 속하고 우리나라 서해안 울릉도 바닷가에서 잘 자라는 일년초로서 그 모양이 통통하고 마디마디가 튀어나와서 우리말로 통통마디라 부름. 통통마디의 줄기는 마디가 많고 두드러지며 가지는 2~3번 갈라져서 마주 나며 가지는 다육질로 비대하고 진한 녹색이며 잎은 없고, 키는 10~40cm쯤 자라고 꽃은 6~8월 가지 끝에 녹색으로 보일 듯 말 듯 피며, 열매는 10월에 납작하고 까맣게 익음.
- 통통마디는 봄부터 여름까지 녹색이다가 가을이 되면 진한 빨강색으로 물든다. 통통마디는 염류 농도가 높은 갯벌에서 자라기 때문에 삼투압을 견디기 위해 식물체내에 육상 식물보다 높은 염류를 저장함.
- 최근 보고에 의하면 Na 성분뿐만 아니라 Ca, K, Mg, Fe, Zn 성분들이 통통마디에 고농도로 존재하는 것으로 알려짐.

- 통통마디 지방산에는 포화지방산보다는 불포화지방산이 많이 함유되어 있으며, 통통마디 가지에는 80%, 줄기에는 74%의 불포화지방산이 함유되어 있는 것을 볼 수 있음.
- 소금기가 많은 곳에서 잘 자라는 함초는 중국의 예 의서인 [신농본초경]에 맛이 몹시 짜다고 하여 염초라 기재하였고, [대화본초]에는 불로장수하게 하는 풀이라고 적혀 있으며, 염초, 복초, 삼지 등의 여러 이름으로 불리었음.
- 함초는 육상식물이면서도 바닷물 속에 있는 모든 미네랄 성분이 고도로 농축되어 있고, 흙속에 스며든 바닷물을 빨아들여 광합성작용으로 물기만 증발시키고 바닷물 속에 있는 갖가지 미네랄 성분을 고스란히 남겨 두는 생리를 지녔으며, 일반 소금과는 달리 함초에 들어있는 소금은 많이 먹어도 갈증이 나지 않고, 식물에 흡수된 형태로 정화된 소금이라 할 수 있음.
- 함초는 숙변을 제거하고 변비를 없애는 효력이 매우 탁월하다고 알려져 있는데, 함초 속에 들어 있는 갖가지 미량원소와 효소가 숙변을 없애고 몸속의 지방질을 분해하여 몸 밖으로 내보내는 작용을 한다고 함. 함초는 숙변을 분해하여 없앨 뿐 아니라 몸속에 있는 중성지방질을 분해하여 몸 밖으로 내보내게 되므로 비만증 치료에도 도움이 된다고 함. 또한 함초의 섬유질은 대장의 연동운동을 도와주고 소금기와 미네랄은 인체에 꼭 필요한 영양소가 되기 때문에 인체에 부족하기 쉬운 미량원소를 보충해주면서 숙변과 변비, 비만증을 한꺼번에 해결해 주는 아주 이상적인 다이어트 식품이라고 할 수 있음.
- 함초는 혈액순환을 좋게 하고 피를 깨끗하게 하여 고혈압과 저혈압을 동시에 치료하며, 심장을 튼튼하게 하고 혈액속의 콜레스테롤과 중성지방질을 제거한다고 하며, 증혈작용이 뛰어나 빈혈증에도 효과 있음.
- 또한, 함초는 각 계절마다 다른 병을 치료하는 약으로 쓸 수 있는데, 이른 봄철에 갓 돋아난 새싹은 콩팥과 방광의 모든 질병 불임증 양기부족 생리통 등에 뛰어난 효력이 있고, 늦은 봄철 한창 자라기시작할 무렵에 채취한 것은 간염 간경화증 지방간 같은 갖가지 간 질환에 효과가 있으며, 가을철에 단풍이 빨갛게 든 것은 심장의 열을 내리고 협심증이나 고혈압. 심근경색 같은 갖가지 심장병을 다스린다고 함. 한 가지 식물로 계절마다 달리 오장의 모든 질병을 다스릴 수 있는 약초는 오직 함초 뿐임.
- 함초는 신비로운 생태와 약초로서의 효능 및 기전이 아직 밝혀지지 않았으며, 함초가 우리나라 서해안에 세계에서 가장 많이 자라는 만큼 이를 잘 보호하고 또 약초로서의 효능을 깊이 연구해야 필요성이 있음. 함초는 우리나라에서는 천덕꾸러기지만 다른 나라에서는 귀하게 여기는 식물로, 일본에서는 천연기념물로 보호하고 있고 프랑스에서는 귀한 요리재료로 쓰임. 우리나라 서해안은 갯벌이 넓고 유기질이 풍부하여 함초가 자라기에 알맞으므로 함초를 이용한 건강기능식품 개발의 가능성을 연구함으로써 고부가가치를 높이고, 생산성에서 경쟁력이 있을 것으로 사료됨.

염생식물은 높은 미네랄 함량과 함께 여러 유용성분을 가지고 있다. 그럼에도 불구하고 재배보다 자연산 채취가 주를 이루고 있어 식용으로 널리 이용되지 못하였고, 최근 들어 함초를 중심으로 관심을 모으고 있다. 그러나 이들 염생식물은 저장이나 유통 방법이 확립되지 않아 건조 및 건조분말상태로 인터넷 등 전자상거래만으로 유통되고 있으며 일부만 신선상태에서 유통되어 나물 등으로 이용되는 형편이다. 따라서 미네랄 및 유용성분이 많은 염생식물의 소비를 높이고 소비자가 쉽게 접근할 수 있도록 신선상태로 일반 유통판매가 필요하리라 본다.

이에 따라 현재 분말, 환, 등 가공품으로만 유통되고 있는 염생식물을 신선농산물로 확대, 유통하여 염생식물에 대한 소비자 인지도를 높이고, 제품화의 다양화를 목적으로 개발 사업을 실시하여야 할 것이다.

아직 염생식물은 신선상태에서의 이용이 나물 이외에는 개발되지 못하고 있으나, 서구의 샐러드에 염생식물이 첨가되는 경우가 있어 신선편이 등으로 이용될 수 있을 것이라 생각된다. 최소 가공된 농산물의 경우 포장없이 현대적인 유통은 불가능하다. 그러나 아직 염생식물은 국내외에서 신선상태에서 이용이 적은 작물이라 적절한 포장방법이 연구되지 않아 대규모 유통체인은 이용한 소비에 문제점을 가지고 있다. 이에 최소 가공된 연근의 포장 및 유통체계의 확립이 절실하다. 그러므로 나물 정도로만 이용되고 있는 신선 염생식물을 신선편이 등 다양한 제품으로 소개하여 염생식물의 소비 패턴을 다양화 하여야 한다. 또한 아직까지 재배 및 수확시기가 제한되는 염생식물은 신선상태로 나물 등으로 이용되거나 신선저장 방법이 개발되지 못하여 이용에 시기적인 한계가 있다. 따라서 장기 저장 기술 개발이 요구된다.

최근 식생활은 급속한 경제 발전과 사회 여건의 변화 등으로 식생활의 간편화, 고급화, 건강식품을 지향하는 경향이 나타나면서 다양한 기능성 성분을 함유하고 있는 식품에 대한 소비자의 관심이 높아지고 있다. 세계인의 염분섭취는 주로 소금으로부터 이루어지고, 한국인의 소금섭취량은 하루에 13.5g 정도이다. 이는 세계보건기구에서 정한 1일 권장섭취량인 5g의 2.5배에 해당하는 수치이다. 이렇게 과량 섭취된 소금 중 흡수되지 않고 체내에 남은 소금은 심장, 신장 등에 심각한 부작용을 일으키고, 고혈압, 골다공증, 비만 등 만성질환을 유발 할 수 있으므로, 이를 억제 할 수 있도록 저염화 방법으로는 간장을 오래 전부터 사용하여 왔으며, 최근 미네랄 함량과 식이섬유 등 유효성분이 풍부한 염생 식물에 대한 소비가 활성화 되고 있다.

표. 1 함초의 성분분석

부위	수분	조 단백질	조 지방	조 회분	염분	나트륨	칼슘	칼륨	마그네슘	아연	철	구리	니켈	망간	식이 섬유 (kcal)	총 미네랄
잎	90.9 (2.4)	1.6 (16.5)	0.2 (2.6)	4.7 (50.0)	3.3 (35.3)	1003	238	650	46.5	13.4	31.5	3.1	1.1	7.2	7.4 2.1 (미나리)	1993 88 (미나리)
줄기	73.9 (2.9)	2.0 (7.6)	0.3 (1.3)	6.1 (22.6)	3.9 (14.4)	1218	159	740	54.0	29.6	66.2	1.1	0.7	3.9		
뿌리	66.2 (1.7)	2.0 (5.7)	0.3 (1.0)	6.2 (18.0)	2.8 (8.0)	1334	22	741	52.5	2.4	84.8	2.1	0.4	3.0		

(국립수산 과학원 위생과학 연구실 이두석, 민진기 박사 제공)

함초는 100g 당 칼륨이 2,083mg 마그네슘 110mg, 칼슘 20mg이 들어 있어 다른식품에 비해 미네랄이 풍부하고 필수 불포화지방산인 리놀레산도 약50%로 다량함유되어 있었으며, 체내에서 합성이 불가능해 반드시 외부로부터 섭취해야하는 발린, 류신, 이소류신, 트레오닌, 페닐알라닌, 메치오닌, 라이신과 같은 필수아미노산의 함량 대비 약40%를 함유한 것으로 알려지고 있다.(이재준 2005)

함초는 특유의 맛과 향기를 지녀 식품의 조리 및 가공중 중요한 향신 조미료 소재로써 이용이 가능하다. 우리나라에서는 아직 대중에게 널리 알려지 있지 않아 일부 지역에서만 식용하고 있으나 함초가 가지고 있는 화학성분의 특성 때문에 기능성 식품소재로서의 이용가치가 매우 높다(Kim et al.,2007). 예를 들어 함초는 항균, 항암, 항산화 및 중금속 제거 효과 등 다양한 생리활성을 가지는 것으로 알려져 있으며 심혈관계 질환예방, 항혈전, 혈압강하 작용 등의 여러 대사장애 조절기능을 가지고 있는 것으로 보고 되고 있다(Lee & An, 2002; Han & Kim, 2003; Cha et al., 2004; Lee et al., 2005; Park et al., 2006; Song et al., 2007; Lee et al., 2007).

한편 함초는 수분함량이 80%이상인면서, 염도가 3%이상 함유되어, 단기간 저장기간 중 중량감소 및 부패 등에 의해 상품가치가 저하될 우려가 있다. 저장성을 향상시키고 기능성 부재료로 활용하기 위해서 열풍건조, 진공건조 및 동결건조 방법을 이용한 함초 분말의 색상과 용해도를 분석하였다. 동결건조와 진공건조 시료는 건조과정중 수분이 기화되면서, 함초조직의 변형이 유사한 경향으로 수축되어, 색도, 용해도, 총당 및 환원당의 차이가 근소하게 조사되었고, 열풍건조 시료는 열에 의하여 조직의 수축과 색도 변화가 증가되어 갈변화 현상이 발생하면서, 총당이 감소되었으나, 용해도는 근소하게 감소됨이 분석되었다(김희정 외 1 2009). 위 연구 결과를 통하여 동결건조 시료는 조직이 균일하게 조직이 치밀하게 수축되어 팽윤력도 낮으면서, 균일한 조직 배열에 의하여 단지 용해도가 약간 향상됨으로서, 건조방법은 함초의 용해도에 미치는 영향이 작다는 것을 알 수 있었다. 함초의 용해도를 증가시키기 방법은 현재의 단순한 물리적 처리인 건조 혹은 비경제적인 발효보다 경제적으로 저렴하게 함초의 고유한 성분을 보존하면서 친수성이 우수한 특성을 가진 함초 가공기술 개발이 요구되고 있는 실정이다.

본 연구에서는 함초의 염과 미네랄 성분이 온도, 습도, 빛에 장기간 보존되면서, 친수성 성질

을 향상시키면서, 경제적으로 양산화 할 수 있는 제품 기술을 개발하기 위하여 용융압출성형 (Hot Melt Extrusion : HME) 제조 방법을 이용하여 함초의 엽과 미네랄이 친수성이 우수한 특성을 가진 가공 제품 제조 기술을 개발하고, 개발된 함초 시료의 물리적 및 화학적 성분을 분석하여 함초의 친수성 향상을 분석하고자 하였다.

1) 함초 초미립 분말화 기술 개발

- 경제적인 건조 조건 확립 : 온도 및 시간

2) 함초의 성분 고체 분산 기술 개발

3) 함초의 엽 용해도 분석

4) 함초의 무기물 함량 분석

따라서 본 연구의 목표는 함초의 고유한 엽과 미네랄 성분이 장기간 보존되면서, 친수성이 우수한 가공 제품을 개발 하기 위하여 용융압출성형기술을 이용하여 함초의 엽과 미네랄을 전달체인 쌀 전분 속에 균일하게 분산시킨 함초 encapsulation 제품을 개발에 기본 실험 자료로서 제공하고자 하였다.

## 제 2 절 연구개발의 개요

### 1. 세부과제별 연구개발의 목표 및 내용

표 5. 세부과제 구성 내용

구분	세부 과제 번호	세부과제명
생산 저장	1-A	염생식물 생산시스템 확립(서울여대 원예학과)
	1-B	최소가공 및 건조 분말가공 포장 및 유통조건 확립 (강원대 원예학과)
분석 조리가공 제품화	2-A	성분분석, 품질관리 및 안전성 연구 ((주)메드빌 중앙연구소)
	2-B	소비자 맞춤형 조미가공품 개발 (서울여대 영양학과)
	2-C	염생식물 활용 장류 제품공정 관리 (서경대 생물공학과, 샘표식품 주식회사)
기능성	3-A	항염증 및 항암기전 평가를 통한 안전성 검증 (서울여대 식품가공학과)
	3-B	항비만 및 순환계 질환 개선 (서울여대 영양학과)
	3-C	생활의학 임상실험 모델을 통한 건강증진효과 연구 (삼육대 체육학과)

표 6. 연구기관의 상호 연구체계 시스템

기관	생산 저장	분석 가공	제품화	기능성	전임상/임상
서울여대 원예학과	■				
강원대 원예학과	■				
서울여대 영양학과		■			
서경대 생물공학과		■			
(주)메드빌 중앙연구소			■		
샘표식품(주)			■		
서울여대 식품가공학과				■	
서울여대 영양학과				■	■
삼육대 체육학과					■



과제	세부사업명	최종목표
1-A	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 염생식물 생산시스템 개발 (서울여대 원예학과)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 번식기술개발(종자 및 영양번식)</li> <li>○ 대량증식을 위한 기내배양기술개발</li> <li>○ 가정용 재배키트 개발</li> <li>○ 수경재배 시스템 도입 및 기능성 증진 재배기술개발</li> <li>○ 안전 다수확을 위한 재배 및 수확기 조사 연구</li> </ul>
1-B	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 고기능성 신선 저장 유통 및 건조분말 제조기술개발 (강원대 원예학과)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 염생식물의 수확 후 생리활동 조사를 토대로 최적 저장 조건 확립</li> <li>○ 신선염생식물의 MAP 등 최적 유통조건 확립</li> <li>○ 신선염생식물의 신선편이 이용 가능성 조사 및 MAP조건 구명</li> <li>○ 고기능성 향상을 위한 염생식물의 최적 건조 및 분말제조 기술 개발</li> <li>○ 천연 고유의 색상 및 기능성 유지 원적외선 가공 기술 개발</li> <li>○ 고품질 염생 식물 미세분말 제품 및 과립 제품 개발</li> <li>○ 친수성이 우수한 염생식물 재료의 압출 성형 분말 제품 개발</li> </ul>
2-A	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 유효성분분석, 품질관리 및 안전성 검증 ((주)메드빌 서울여대 식품공학과)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 식품영양학적 품질 및 이화학적 특성 분석</li> <li>○ 품종별, 수확시기별 일반 성분 및 이화학적 특성 분석</li> <li>○ 지표물질 설정 및 분석법 확립</li> <li>○ 원료의 안정성 및 제품의 안정성 연구</li> <li>○ 안전성 시험 및 유효기간 설정</li> <li>○ 제품 원료의 독성시험 및 돌연변이 시험</li> </ul>
2-B	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 소비자 맞춤형 천연 조미제품 및 조리가공제품 개발 (서울여대 영양학과)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 다양한 종류의 염생식물의 관능적 품질 특성 및 조리 적성 DB화</li> <li>○ 염생식물을 활용한 천연조미제품(seasoning) 및 조리가공 편의식 개발</li> </ul>
2-C	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 고기능성 장류 공정 관리기술개발 (서경대 생물공학과 샘표식품 주식회사)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ pilot reactor 및 생화학 / 미생물학적 공정 개발</li> <li>○ 미생물학적 발효 기술 개발 및 추출효율 분석</li> <li>○ 발효숙성공정 개발</li> <li>○ 장류공정 및 산물 활용</li> <li>○ 통합공정 개발</li> </ul>
3-A	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 항염증 및 항암기전 평가 (서울여대 식품공학과)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 이용 부위별 추출 분획의 제조 및 항암, 항염증 효과에 대한 세포수준에서의 규명</li> <li>○ 항암 및 항염증 기작으로서 식물체 부위별 추출 분획의 아라키돈 산 대사의 각 단계별 효소 유도 및 활성화에 대한 효과 규명</li> </ul>
3-B	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 항비만 및 순환계 질환 개선효과검증 (서울여대 영양학과)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 항비만 유효성분 선별</li> <li>○ 동물모델에서 항비만 효능검정 및 작용기전 연구</li> <li>○ 심혈관 질환 개선 효능검증 및 작용기전 연구</li> </ul>
3-C	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 생활체육 임상모델을 통한 건강증진효과 (삼육대 체육학과)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 식품 섭취가 비만여성의 체성분, 혈중 지질 및 호르몬에 미치는 영향</li> <li>○ 식품섭취와 복합운동의 상호작용이 비만여성의 체성분, 혈중 지질 및 호르몬에 미치는 영향</li> </ul>

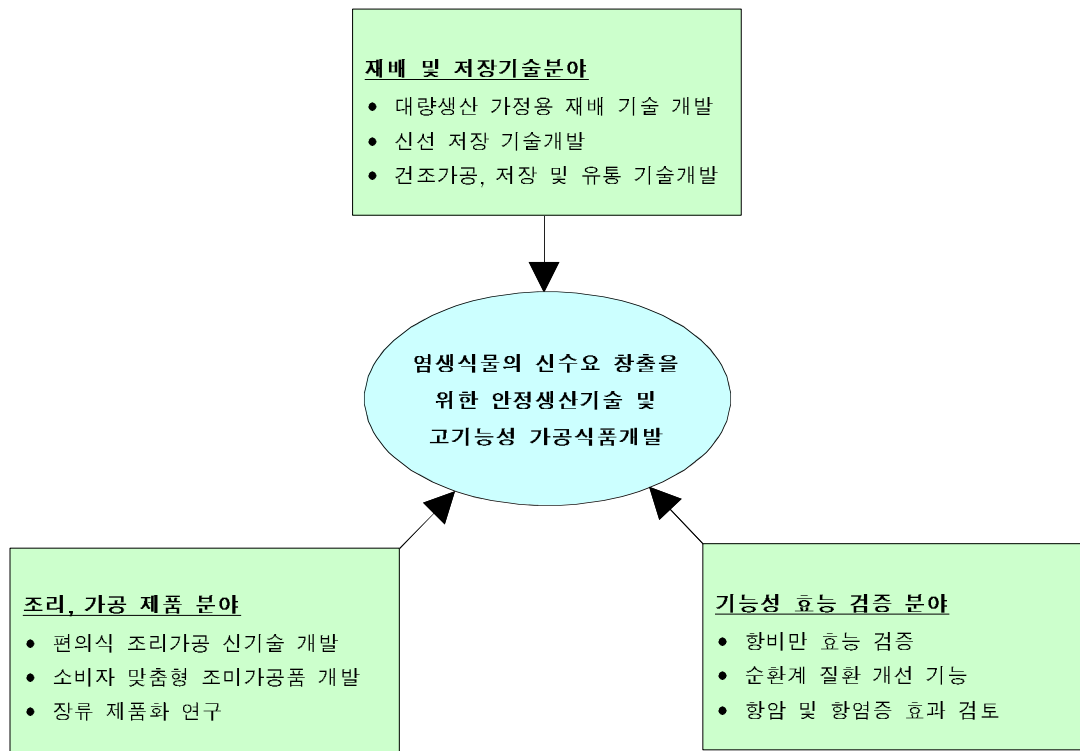


그림 4. 사업 개요

## 1. 소비자 맞춤형 가공 제품 개발

### (1) 조미소재 개발을 위한 함초 분말의 관능적 특성 규명

조미 소재로 함초 분말을 사용하기 위해 다양한 건조 기법으로 가공된 함초 분말에 대해 NaCl 대비 짠맛 강도를 측정하고 주요 관능적 특성을 규명하고자 하였다.

### (2) 함초의 부위와 습식 조리법 종류에 따른 생 함초의 관능적 특성 분석

신선 함초의 부위별 조리 적용성을 검증하기 위해 다양한 습식 조리법을 적용하여 신선 함초의 관능적 특성을 분석하고자 하였다

### (3) 조리 시 조미소재로서 소금(NaCl) 대체 가능성 분석

가. 습식 조리법인 쇠고기국과 시금치 나물에 따른 소금 0.5% 기준으로 대체한 함초 분말 함량에 따라 느껴지는 관능적 특성 분석 및 레시피 표준화하고자 하였다.

나. 건식 조리법인 부추전과 감자채볶음에 따른 소금 1.5% 와 소금 1.3%기준으로 대체한 함초 분말 함량에 따라 느껴지는 관능적 특성 분석 및 레시피 표준화하고자 하였다.

다. 함초 분말을 첨가한 허브 맛 솔트 개발 및 관능적 특성 분석하고자 하였다.

### (4) 함초 분말을 적용한 한식 레시피 개발

### (5) 생 함초 조리 시 식재료로서의 소금(NaCl) 대체 가능성과 소비자 기호도에 미치는 영향 및 품질 관리 지표 도출

가. 신선 함초의 비율에 따른 한식조리의 적용성을 검증하고자 하였다.

나. 신선 함초를 건식조리(해물과전)·습식조리(청포묵무침)에 적용하여 염을 부분적으로 대체하여 염의 저감화가 가능한지 연구하고자 하였다.

다. 신선 함초를 한식조리법·음료에 적용하였을 때 관능적 특성을 분석하고, 식재료로 사용되었을 때 적용가능성을 분석하고자 하였다.

(6) 동결 건조시킨 건 함초 조리 시 조미 소재로서 소금(NaCl) 대체 가능성 및 함초의 고기 누린내 제거 효과 분석 내용 및 결과

가. 동결건조 시킨 함초를 고기수육에 적용하였을 때 조미 소재로서의 기능성을 분석하고 특히 염을 부분적으로 대체하여 염의 저감화가 가능한지 연구하고자 하였다.

나. 동결건조 시킨 함초를 고기수육에 적용하였을 때 건 함초에서 고기 누린내를 제거하는 효과를 분석하고자 하였다.

## 2. 염생식물의 기능성 검증

가. 항염증 및 항암기전 평가를 통한 안전성 검증

- 이용부위별 추출 분획의 제조 및 항암, 항염증 효과에 대한 세포수준에서의 규명
- 항암 및 항염증 기작으로서 부위별 추출 분획의 아라키돈 산 대사의 각 단계별 효소 유도 및 활성화에 대한 효과 규명
- 선별된 추출분획의 아라키돈 산 대사관련 효소에 대한 효소유도량 및 eicosanoids 생성량의 측정

나. 항비만 및 순환계 질환 개선효과 검증

- 세포배양모델을 통한 한국산 염생식물의 항비만 효과 탐색과 유효 추출물 선별 연구
- 선별된 염생식물 유효성분으로 비만 동물모델에서 항비만 효능 검증 및 기전연구
- 선별된 염생식물 유효성분의 순환계 질환 동물모델에서 순환계 질환 개선 효능 검증 및 기전연구

다. 생활의학 임상실험 모델을 통한 건강증진효과 연구 (삼육대 체육학과)

- 항비만효과 증대를 위한 복합운동프로그램의 상호작용효과
- 유산소성 운동을 통한 비만감소효과의 규명
- 등속성근력 및 근지구력 강화 운동을 통한 비만감효과

## 3. 기능성 장류 개발

본 발명의 목적은 건강보조식품으로 활용되고 있는 염생식물의 일종인 함초(뽕뽕마디)를 메주의 제조단계서부터 적용하여 영양성분 및 함량이 다른 콩과 함초를 혼합하여 발효 함으로서 상호 보완적으로 작용하여 미생물의 대사활성을 촉진하고 식품을 제조한 후 식품의 영양학적 기능을 개선할 수 있는 방법을 찾기 위함이다.

국립수산물과학원에서 분석한 자료에 따르면 함초의 잎은 수분 90.9%, 조단백 1.6%, 지질 0.2%, 미네랄 4.7%, 소금 3.3%로 구성되어 있다. 이를 건조중량으로 환산하면 조단백이 16.5%, 지질이 2.04%, 미네랄이 47.9%, 소금이 33.7% 이다. 한편, 콩으로부터 선택적으로 지질을 추출하고 남은 대두박은 과립형(플레이크)의 물질로 단백질 51.88%, 조지방 0.95%, 수분 10.5%, 탄수화

물 33.5%, 미네랄 3.17%로 구성되어 있어 메주를 제조하는데 필요한 단백질과 탄수화물이 충분하지만 상대적으로 미네랄의 함량은 낮은 편이다. 따라서 두 가지 물질을 혼합하면 미네랄과 함초의 유용성분을 함유한 간장의 제조가 가능할 것이므로 이에 관한 구체적 방법을 제시하기 위해 연구를 진행하였다.

### 제 3 절 연구범위 및 연구수행 방법

연도	구분	연구개발의 목표	연구개발의 내용	연구범위
1차 년도	1-A	·인공시설내 엽생식물 재배기술연구	·서해안사구지역별 식물수집 및 식용식물 스크린 ·종자번식체계, 영양번식 ·인공시설내 수경재배시 재배매질 및 염농도별 생육비교	·경기권내의 서해지역 엽생식물 선발 ·종자번식과 영양번식을 위한 매질 및 조직배양 배지조성 연구 ·채소작물재배용 염농도 구명 ·고형배지/액체배지 이용한 대량생산
	1-B	·저장 및 유통조건 확립 ·신선엽생식물의 최적 MAP유통 ·신선편이이용가능성 조사 및 신선편이MAP 조건 구명	·엽생식물 수확 후 생리활동 조사 ·신선엽생식물의 최적 포장방법 구명 ·신선엽생식물의 신선편이 이용 가능성(단독, 혼합 및 신선편이 형태) 조사	·갯명아주, 나문재, 솔장디리, 수송나물, 지채, 함초, 해홍나물 ·재배방법별 호흡량, 에틸렌발생량, 감모율 등 수확후 생리활동 조사 ·신선엽생식물의 MAP 포장법 구명 ·절단방법, 절단면적별 이용 가능성 조사 ·페닐테스트로 혼합 신선편이 가능성 조사
		·고기능성 향상을 위한 최적 건조 및 분말제조 기술 개발	·열풍, 원적외선, 동결건조에 따른 유용성분 분석 ·분쇄 속도 및 초미분말화한 엽생식물의 분급기술 연구	·고유 색깔 및 향미 보존 여부 확인 ·유용성분 함량 조사 ·5 $\mu$ m까지의 분급화된 엽생식물 초미세분말의 제조 ·분쇄속도 분급조건 구명 (100m/s)
	2-A	·성분분석, 품질관리, 안전성 검증	·엽생식물의 성분분석, 원료배치 비교분석, 독성시험	·복합원료 및 단일원료의 영양성분분석 ·특수성분 분석 ·분획의 HPLC 및 HP-TLC분석 ·원료 배치 비교 분석 ·제품 타겟 원료의 랫드 단회투여 독성시험 및 미생물을 이용한 복귀돌연변이 시험
	2-B	·소비자 맞춤형 천연 조미제품 및 조리가공 제품 개발	·엽생식물의 관능적 품질 특성 및 조리 적성 DB화 ·건조 분말 엽생식물을 활용한 천연조미 제품 개발	·향미, 식감 등 관능 특성 분석 ·가열, 염장, 건조 등 조리 기법 저장시 관능적 품질 변화 분석 ·분석적 관능검사 실시 ·건조분말 최적 천연 조미 소재 탐색 ·분석적 관능검사 및 소비자 조사 실시
	2-C	·pilot reactor 공정 개발	·생화학적 추출 공정 적용 ·미생물학적 발효기술 적용	·추출물질의 효소처리 및 반응물 성분 분석 ·미생물학적 기술 적용 및 추출효율 분석
	3-A	·항염증 및 항암 기전평가	·추출분획의 제조 및 기능성 탐색	·부위별 추출분획의 제조 ·세포수준에서의 항암, 항염증효과 규명
	3-B	·세포배양모델을 통한 한국산 엽생식물의 항비만 효과 탐색과 유효 추출물 선별 연구	·한국산 엽생식물의 종류별, 부위별, 추출방법별, 배양조건 등 각 처리 방법에 따른 다양한 추출물의 항비만 효과 탐색 ·각 추출물 중 가장 효과가 높은 추출물의 종류 선별 ·각 추출물별 유효 농도 탐색	·전지방세포(pre-adipocyte)인 3T3-L1 세포를 이용한 항비만 효과 탐색 ·종류별, 추출방법별, 배양조건 등 각 처리 방법에 따른 추출물의 항비만 효과 탐색 및 유효 성분 선별 ·추출물별 유효성분 농도 탐색 ·추출물별 지방세포 형태 및 수 측정 ·지방세포로 분화된 세포내의 지방을 염색하여 분화정도 측정(Oil-Red-O 염색법) ·국내외 연구 자료 분석을 통한 항비만 효과 지표 검색
	3-C	·임상실험모델을 통한 건강증진효과	·운동프로그램과 식품섭취효과 분석	·중년여성의 체성분, 혈중 지질 및 호르몬에 미치는 영향

연도	구분	연구개발의 목표	연구개발의 내용	연구범위
2차 년도	1-A	·수경재배 및 년2모작재배 및 육묘체계확립 ·분화용 키트개발 모델화	·수경시설내에서의 인공재배 -봄과중 및 여름과중 ·육묘를 분화용 키트 ·기내배양묘	·관수방법 및 적정 염 농도 연구 ·인공염시비 및 해수시비에 따른 생육 및 성분 비교 (ICP분석) ·과중시기별 성분분석, 약리성분 분석 ·간이 수경재배용 시스템분화개발
	1-B	·신선염생식물의 신선편이 이용 가능성 조사 및 신선편이 MAP조건구명	·다양한 형태의 신선편이 염생식물의 MAP조건 구명	·신선염생식물의 저장조건 확립: 온도, 습도, CO2/O2농도 ·최적저장조건에 맞춘 포장재료 선발 ·단독 및 혼합 신선편이 염생식물에 적합한 MAP 조건 포장재료 구명
		·초미분 분쇄 및 과립 제조, 친수성이 우수한 압출 성형 가공 기술 개발	·초미분말화, 초미세분말제품 개발 ·유효 성분함량 및 용해도를 증가시킬 수 있는 압출공정변수 연구	·고유 색깔 및 향미 보존 여부 확인 ·염생식물 분말의 미세분말 과립화 및 관련 시작품 제작 ·압출 성형 시 제품의 물성(팽화율, 밀도, WSI(용해도), 식이섬유 함량을 분석
	2-A	·성분분석, 품질관리, 안전성 검증	·지표물질 선정 및 밸리데이션 ·제품 안전성	·지표물질 설정 및 지표물질 분석법 확립 ·지표물질 분석법에 대한 밸리데이션 연구 ·원료의 안정성 및 제품의 안정성 연구 ·포유동물 세포주를 활용한 염색체이상시험 및 마우스 소핵 시험수행
	2-B	·천연조미 제품 및 가공 편의식 개발	·건조 분말 염생식물을 활용한 천연조미 제품 개발 ·소비자 맞춤형 염생식물 조리가공 편의식 개발	·건조 분말 염생식물 base천연 조미료 개발 및 조미 기능성 평가 ·분석적 관능검사 및 소비자 조사 실시 ·조리가공 편의식 개발(장아찌류, 나물류, 한그릇 음식류)시 기호 유도 인자 도출 (external preference mapping) ·분석적 관능검사 및 소비자 조사 실시
	2-C	·장류배양기를 이용한 공정개발	·장류 발효숙성공정 개발	·유기산 나트륨염의 제조 및 장류에의 적용 ·발효 반응 성분 및 함량 분석
	3-A	·항염증 및 항암 기전평가	·아라키돈산 대사의 단계별 효소유도 및 활성화조사	·부위별 활성 및 추출분획선별 ·아라키돈 산 대사관련 효소 cytosolic phospholipase A2, cyclooxygenase, 5-lipoxygenase 에 대한 효소유도량 및 eicosanoids (특히 prostaglandin E2 와 leukotriene A4 생성량의 측정
	3-B	·선별된 염생식물 유효 성분으로 비만 동물 모델에서 항비만 효능 검증 및 기전연구	·실험 모델정립, 기전 연구 용이. ·비만은 당뇨병 및 순환계 질환의 주요 위험인자 ·최근 비만율이 증가, 항비만 기능성 식품소재 개발에 관심집중 ·혈중 지질개선 효과 검토	·체중 증가량, 복부 및 내장 지방 증가량 ·혈중 및 간조직의 지질 및 지단백 함량 측정 (Triglyceride, total cholesterol, LDL-, HDL-cholesterol) ·염생식물 섭취에 의한 체중 증가량, 복부 및 내장 지방 증가량 확인 ·에너지 대사 관련 물질의 변화 측정(혈액중 leptin 함량) ·복부 지방 및 간 조직 중의 지질대사 관련 효소 활성 측정(FAS 활성) ·각 선별 염생식물 유효성분의 적정 섭취 수준 제시
	3-C	·임상실험모델을 통한 건강증진효과	·운동프로그램과 식품섭취효과 분석	·비만여성의 체성분, 혈중 지질 및 호르몬에 미치는 영향

연도	구분	연구개발의 목표	연구개발의 내용	연구범위
3차 년도	1-A	·베이비채소재배, 가정 분화용 키트상품의 산업화, 기능성분을 강화한 엽생식물채소류 개발	·생육단계별 식용성 판단 및 소비자 관능테스트 ·식물의 시기별 영양분 및 독성 안정성 검사를 통한 베이비채소 수확 시기 결정 ·가정용 수경재배시스템 분화 개발에 대한 산업화	·베이비채소로 개발하기 위한 엽생식물의 생육시기별 식물독성 및 식감 테스트 ·기능성 강화 엽생채소류 재배 ·상품화를 위한 관능테스트 실시 ·환경적 스트레스(예: 수분스트레스)에 의한 기능성 강화 ·수경재배시스템 분화의 산업화
	1-B	·신선엽생식물의 최적 MAP를 통한 유통조건 및 신선편이 이용 가능성 조사	·시뮬레이션을 통한 신선엽생식물의 MAP포장 및 유통 ·신선편이 엽생식물의 active MAP 및 장기 저장 방법 연구	·택배배송조건인 상온 및 저온유통 및 기존의 농산물 유통조건에 신선엽생식물의 유통성 비교 ·포장재내 CO2/O2를 조절한 active MAP조건 구명 ·동결건조, 급냉, 뿐만 아니라 다양한 저장방법과 해동 등 원형회복기술 연구
		·최적의 분말과립제조 기술개발 ·친수성이 우수한 압출 성형가공기술	·기능성 첨가제를 함유한 엽생 식물 가공 제품 개발 ·유효 성분 함량 증가 및 분산능의 증가를 위한 스크류 배열 연구	·유용성분 함량 변이 분석 ·압출 성형 시 공정변수 확인 (수분함량, 점도, 체류시간, 다이압력, 소요동력) ·제품의 물성(팽화율, 밀도, WSI(용해도), 식이섬유 함량)을 분석
	2-A	·성분분석, 품질관리, 안전성 검증	·제품 안정성 검토 및 유효기간 연구	·안정성 시험 및 유효기간 설정 ·제품의 컨셉, 구성(formulation) 및 제형 연구 ·시제품 생산에 관한 연구
	2-B	·소비자 맞춤형 엽생식물 조리가공 편의식 개발	·소비자 맞춤형 엽생식물 조리가공 편의식 개발 ·신선 엽생식물을 활용한 조리가공 편의식의 저장성 및 관능적 품질 관리 지침 확립	·조리가공 편의식(장아찌류, 나물류, 한그릇 음식류) 시 recipe 최적화를 위한 관능적 품질 조사 ·분석적 관능검사 및 소비자 조사 실시 ·신선 엽생식물을 활용한 조리가공 편의식(장아찌류, 나물류, 한그릇 음식류)의 저장 중 관능적 품질 수준 모니터링 및 유통기한 설정
	2-C	·통합형 공정 개발	·미생물 선발 및 최적공정 개발	·발효식품 및 식물소금적용 장류 제조 및 분석 ·산물 통합형 공정 기술 개발
	3-A	·항염증 및 항암 기전 평가	·아라키돈산 대사의 각 단계별 효소 유도 및 활성화에 대한 효과	·각 효소유도의 upstream 전사인자인 NFkB, AP-1 활성화에 대한 영향 평가
	3-B	·선별된 엽생식물 유효 성분으로 순환계 질환 동물모델에서 순환계 질환 개선 효과 검증 및 기전연구	·동맥경화, 고지혈증 동물 모델을 이용한 순환계 질환 개선 효과 관찰 ·순환계 질환은 암 다음으로 가장 높은 사망원인을 차지하는 질환. 최근 꾸준히 유병률이 상승하고 있는 주요 만성 질환임. ·엽생식물의 지질개선 효과 및 항 고혈압 효과는 순환계 질환의 개선에 유효할 것임	·8주간 고지방식이 유도된 동물모델(SD-rat)을 이용한 2차년도 실험결과 선정된 엽생식물의 순환계 질환 개선 효과 탐색 ·혈중 항동맥경화 인자 함량 측정 (Adiponectin, hs-CRP) ·혈중 및 간조직의 지질과산화물 함량 및 항산화 효소계 활성화도 측정 (Protein carbonyl, TBARS, SOD, glutathione reductase, glutathione peroxidase) ·분변의 지질(중성지방, 총콜레스테롤)함량 측정
	3-C	·임상실험모델을 통한 건강증진효과	·운동프로그램과 식품섭취효과 분석	·고령자층의 체성분, 혈중 지질 및 호르몬에 미치는 영향

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 염생식물 가공 및 기능성 연구 현황

- 수송나물: 수송나물(*Salsola komarovii* iljin)은 명아주과의 우리나라 각처의 해변가 모래땅에 자라는 한해살이풀이다. 주로 소금기가 있는 토양이나 해변에 많이 나며 특히 북반구에 많이 분포하고 있는데 전세계에 약 100종이 분포되어 있고 우리나라에는 수송나물속에 솔장다리, 수송나물, 날개수송나물이 자라고 있다. 수송나물 및 날개수송나물은 자사봉(刺沙蓬: 중국식물도감), 저모채(猪毛菜, 대시저모채:大翅猪毛菜: 동북식약도지), 찰봉과(?蓬?: 중국약식도감), 풍곤초(風滾草: 길림중초약), 가시솔나물, 돼지털나물, 땅녹미채, 수송, 육해송, 수송채, 미루나(일본) 등으로 부른다.
- 수송나물의 채취시기는 여름에 채취하여 햇볕에 말린다. 수송나물의 맛은 쓰고 성질은 서늘하며 간, 신경에 작용한다. 간기를 고르게 하고 혈압을 내린다. 하루 20~40그램을 물에 달여서 복용한다. 또는 삶아서 나물을 만들어 복용한다. 중국의 <고원중초약치료수책>에서는 고혈압을 일으키는 두통현훈의 치료에 대해 "수송나물, 견모거(絹毛?: 엉거시과의 여러해살이풀(*Sorosseris hookeriana* Stebb. subsp. *erysimoides* 'Hand.-Maxx.' Stebb.) 티베트에서는 소공색이포(掃工色爾布)라고 하며, 해열, 해독, 이습, 지통의 작용이 있어 전초를 하루 4~12그램을 물로 달여서 복용하는 식물, 황금(黃芩)을 물로 달여서 복용한다."고 기록하고 있다.
  - 수송나물은 봄에 올라온 어린잎은 연해서 줄기와 잎을 떼쳐서 나물로 먹을 수 있는데, 조금 지나면 마치 솔잎처럼 또는 억센 돼지털처럼 변하여 먹을 수 없고 약용으로만 사용할 수 있다. 집짐승의 먹이로도 사용하며, 꽃피는 시기에 전초를 채취하며 말려서 사용하는데, 약 0.1%의 알칼로이드가 들어 있어 약재료로 사용한다. 번식은 씨앗으로 하는데, 섭씨 20~25도에서 싹이 잘튼다. 3월 중순에 심어 비닐박막을 씌우면 2달 정도 지나서 수확할 수 있다.
  - 중국에서 펴낸 <중약대사전>에서는 1)성분: 베타인(betaine), succinic acid, 비산 및 아라비아당, galactose, rhamnose, xylose, galacturonic acid, amino acid로 된 다당체를 함유한다. 2)약리: ①수송나물의 탱액, 추출물, 알코올 침액을 마취한 동물에 정맥 주사하면 혈압은 분명히 내려가는데 마취한 고양이의 심장 주기와 진폭에는 영향이 없으며 양측의 미주 신경을 절단하거나 혹은 동시에 교감 신경을 절단해도 강압 작용에는 변함이 없다. ②어린 잎, 개화, 결실기에 채집한 것도 모두 혈압을 낮추는 작용을 나타낸다. ③베타인(betaine)은 마취한 동물에 대하여 경도의 혈압을 낮추는 작용이 있지만 고혈압의 개에 대해서는 무효하며 전해 분석 및 색층분리법으로 분리한 일종의 사포닌(saponin)은 마취한 개 및 고혈압 rat의 혈압을 내린다. 그러나 수송나물 제제(상품명은 증이수(增爾壽))는 색층분리법 및 화학 반응으로 salsoline 및 salsolidine을 함유하고 있다는 사실을 아직 증명하지 못하였으며 그 혈압을 낮추는 적용도 확실치 않다. 3)독성: 추출물 37.5~57g/Kg을 기니피그의 위에 주입하고 또 그의 배가 되는 양을 토끼에게 1주일간 계속 주입하였지만 아무런 중독 현상도 나타나지 않았다. 하남성 정주에서 채취한 날개없는 수송나물(*Salsola komarovee* Iljin)의 어린싹(4월에 채취) 탱액 및 에탄올 침제를 동물의 위에 주입하거나 정맥 주사를 하면 혈압을 상승 시키지만 오래된 수송나물은



대다수의 동물의 혈압을 하강시킨다.

- 일본에서 발행한 <야채도감>에서는 수송나물의 식품 성분에 대해서 이렇게 기록하고 있다. "수송나물의 성분은 살아있는 100그램당에 열량 20칼로리, 수분 9.9%, 단백질 2.3g, 지질 0.2g, 탄수화물/당질 2.7g, 섬유질 0.9g, 회분 2g, 무기질/칼슘 160mg, 인 43mg, 철 1.4mg, 나트륨 60mg, 칼륨 730mg, 비타민/A 레티놀 0 $\mu$ g, 카로틴 3,100 $\mu$ g, A효력 1,700IU, B1 0.06mg, B2 0.14mg, 나이아신 0.5mg, C 35mg, 식염상당량 0.2g가 들어있다."
- 실제 수송나물은 바닷가의 해풍과 파도가 밀어닥쳐도 죽지 않고 강인한 생명력을 가지고 있다. 최근에는 나물로 인기가 있어 하우스를 이용하여 재배를 하여 여름철만이 아니라 사시사철 출하되고 있는 대단히 유익한 나물로 각광을 받고 있는 염생식물 가운데 하나이다.

○ **나문재:** 나문재는 수송나물과 비슷하다. 잎이 솔잎처럼 좁고 가늘어서 '갯솔나물'라고도 부른다. 잎 모양이 수송나물과 닮았지만 키가 더 크고 가지를 더 많이 치는 것이 다르다. 나문재는 바닷가 파도가 치는 곳에서도 잘 자라고, 썰물 때에 드러나는 개펄 같은 데에서도 잘 자랄 만큼 내염성이 강하고 생명력이 질긴 식물이다. 서해안 개펄이나 모래밭에서는 아무 데서나 흔히 볼 수 있다. 간척지 같은 곳에는 수십만 평의 넓은 지역에 무리를 지어 자라고 있어 장관을 이룬다. 서해안, 바닷가에 사는 사람들이 이 나물을 즐겨 먹는다. 나문재라는 이름은 옛날 늘이 나물만 반찬으로 먹던 사람들이 날마다 이것만 먹으려니 맛이 없어 늘 밥상 위에 남은 채소라 하여 '남은채'라고 부르던 것이 '나문재'가 되었다고 한다.

- 나문재는 고혈압에 효과가 탁월하고 간에 쌓인 독을 풀어 간 기능을 회복하는 데 탁월한 효과가 있다. 장 속에 쌓인 숙변과 노폐물을 분해하여 밖으로 내보내는 작용도 뛰어나다. 나문재는 5월 단오가 지나면 줄기가 억세어지고 쓴맛이 나므로 나물로는 먹을 수가 없다. 나물로 먹으려면 단오 무렵에 채취하여 살짝 데쳐 말려서 묵나물로 만들어 두었다가 먹는다. 약효도 5월 단오 무렵에 채취한 것이 제일 좋고 그 이후의 것은 약성이 지나쳐 약간 독이 있다.

○ **함초:** 함초는 우리나라 서해안이나 남해안, 제주도, 울릉도, 백령도 같은 섬지방의 바닷물이 닿는 해안이나 갯벌, 염전 주위에 무리지어 자란다. 우리말로 통통하고 마디마디 튀어나온 풀이라 하여 '통통마디'라고 부른다. 중국의 옛 의학책인 <신농초본경>에는 맛이 몹시 짜다고 하여 함초(鹹草), 또는 염초(鹽草)라고 하였고, 또 몹시 희귀하고 신령스러운 풀이라 하여 신초(神草)라고도 적혔다. 일본에서는 백 년쯤 전인 1891년에 북해도 아게시마 만에서 처음 발견했으며 그 아름다움과 희귀성으로 인하여 1921년에 천연기념물로 지정하였다.

- 함초는 육상 식물이면서도 바닷물 속에 있는 모든 미네랄 성분이 고도로 농축되어 있다. 소금기가 많은 흙일수록 잘 자라지만 바닷물에 잠기면 죽는다. 흙 속에 스며든 바닷물을 흡수하고, 광합성작용으로 수분은 증발시키고 미네랄 성분만을 저장한다.

- 함초의 또 한 가지 특징은 식물학적으로 고생식물, 곧 원시식물의 형태를 고스란히 지니고 있다는 점이다. 그러므로 지구상에서 기원이 가장 오랜, 모든 식물의 조상이 되는 식물이라고 할 수 있다. 지구상의 식물은 고생대 곧 5억 7천만년에서 5억 년쯤 전에 바다에서 육지로 올라와 여러 가지 형태로 진화되어 오늘에까지 이르렀다고 한다. 처음 식물이 바다에서 육지로 올라오면 잎이 없고 줄기와 가지 뿐이었다는 것이 바위틈에서 나온 화석연구에서 밝혀졌다.
- 함초는 숙변을 제거하고 변비를 없애는데 뛰어난 효능을 발휘한다. 바닷물에는 100만분의 1 정도의 효소가 들어 있는데 이 효소는 바닷물속의 갖가지 유기물을 분해하여 물을 정화하는 작용을 하며, 이 효소는 함초속에 많은 양이 농축되어 있다. 함초속에 농축되어 있는 바닷물의 효소는 사람 몸 안에서 작은 창자벽에 붙어 있는 끈적끈적한 노폐물인 숙변을 분해하여 몸밖으로 내보내는 작용을 한다. 함초의 섬유질은 장의 운동을 도와 주고 소금기와 광물질은 인체에 꼭 필요한 영양소를 공급해 준다. 특히 함초는 온갖 광물질의 보물고이기도 하다. 함초 100밀리그램에는 칼슘 670밀리그램, 요드 70밀리그램이나 들어 있다. 또한 함초에는 나트륨 6.5퍼센트, 소금기 16퍼센트, 섬유질이 50퍼센트 들어 있다. 칼슘은 우유보다 7배나 많고 철은 김이나 다시마보다 40배나 많으며 칼륨은 꿀보다 3배나 많다.
- 함초는 숙변 외에도 여러 가지 암, 축농증, 관절염, 고혈압, 저혈압, 요통, 비대증, 치질, 당뇨병, 갑상선염, 천식, 기관지염, 간질환 등에 뛰어난 효과가 있다. 함초가 장을 깨끗하게 하고 피를 맑게 하며 인체의 자연치유력을 높여 스스로 질병을 치료하게 하는 것이다." 이외에 함초는 비만증, 고혈압, 저혈압, 당뇨병, 자궁근종, 악성염증 등에 효과가 뛰어나다. 함초를 복용하는 방법은 바닷가에 자라는 해조류를 먹는 양과 마찬가지로 먹을 수 있다. 건조된 함초 6~12그램을 물로 달여서 하루 3번 먹을 수 있다. 생즙을 내어 커피잔으로 한잔 정도 하루 3번 먹을 수 있고 가루내어 환을 지어 먹을 수 있으며 또는 삶아서 나물을 만들어 먹을 수 있다.

## 제 2 절 세계적 수준 및 국내수준

개념정립 단계	○	기업화 단계		기술 안정화 단계	
---------	---	--------	--	-----------	--

염생식물을 이용한 소비자 맞춤형 천연 조미료 및 조리가공 편의식 개발은 거의 이루어지지 않고 있는 실정이다.

- 고기능성 신선 염생식물의 저장 및 유통조건 확립: 국내는 물론 전세계적으로 염생식물의 저장 및 유통조건에 대한 보고는 없다.
- 고기능성 향상을 위한 염생식물의 최적 건조 및 분말제조 기술 개발: 국내·외로 에너지 소모량이 적고 경제적이며 취급이 용이한 원적외선을 이용하여 고품질의 제품을 대량 생산할 수 있는 건조기는 아직 초기 개발 상태이다.
- 현재 생물 산업분야의 재료가공공장의 분쇄 공정에 사용되는 대표적 분쇄기로는 roller mill, hammer mill, pin mill 등이 있는데 분쇄시 분쇄소요에너지의 95%이상이 마찰열로 생성되고, 나머지 5%이하가 분쇄에 소요되기 때문에 모두 분쇄 열 발생 문제를 가지고 있다.

- 일본, 미국, 독일에서는 고속 회전 축류 기류식 분쇄기를 이용하여 식품 재료를 5 - 1,000 $\mu$ m 까지 회전 속도로 입자 크기를 제어하는데 사용하고 있으나, 1시간 당 100kg 분쇄처리 능력의 분쇄기는 1억원( 700만 엔  $\times$  1071원/엔  $\times$  20%수입 마진) 정도의 고가에 해당한다.

- 2007년도 International Food Nanoscience Conference에서 nano food의 개발에 있어서 가장 중요한 연구 가치는 nanoparticle을 만드는 것이라고 하였으며 nano food의 적용을 위해서는 200-1000nm의 초미립분말을 제조할 수 있어야 하는데 현재 국내의 분쇄산업은 90% < 10 $\mu$ m이하의 수준에 머무르고 있다.

- 국내에서는 엽생식물에 대한 시설재배는 거의 이루어진 바가 없으며, 인공재배시스템 및 인공발아, 조직배양, 기내발아에 관한 연구는 전무후무한 실정이다.

- 가정용 수경재배와 관련하여 엽생식물재배를 위한 소규모 시스템화한 키트개발 현황을 보면 담수를 이용한 수경재배와 관련한 것만 소수 있을 뿐 엽생식물용은 알려진 바 없다.

- 엽생식물의 생태와 약초로서의 효능 및 기전이 명확하지 않고, 식품개발 및 효능 연구가 미비한 실정이다.

- 함초가 우리나라 서해안에 세계에서 가장 많이 자라는 만큼 이를 잘 보호하고 약초로서의 효능을 깊이 연구해야 필요성이 있음. 또한, 우리나라 서해안은 갯벌이 넓고 유기질이 풍부하여 함초가 자라기에 알맞으므로 함초를 이용한 건강기능식품 개발의 가능성을 연구함으로써 고부가가치를 높이고, 생산성에서 경쟁력을 갖출 것으로 사료된다.

- 엽생식물을 이용한 소비자 맞춤형 천연 조미료 및 조리가공 편의식 개발은 거의 이루어지지 않고 있는 실정이다.

- 고기능성 신선 엽생식물의 저장 및 유통조건연구: 국내는 물론 전세계적으로 엽생식물의 저장 및 유통조건에 대한 보고는 없다.

- 고기능성 향상을 위한 엽생식물의 최적 건조 및 분말제조 기술 개발: 국내 보급되고 있는 건조기는 열풍형 순환식 곡물건조기가 주종을 이루고 있는데, 이 건조기는 재료를 순환하면서 열풍공급과 템퍼링과정을 반복하면서 건조가 이루어지는 대류열전달 방식을 채택하고 있으며 사용된 고온의 습공기를 외부로 유출시키는 방법을 사용하고 있다.

- 형성된 습공기가 가진 에너지를 회수하여 열원으로 사용하고, 이 과정에서 응축 제습되어 건조된 공기를 재순환하여 이용하면 상대적으로 낮은 온도에서도 큰 건조 속도를 얻을 수 있다.

- 생물산업에서는 이러한 기술의 적용이 낮은 상태이며 기술개발도 원적외선판에 열풍을 가하여 복사에너지를 만들거나 Nichrome spiral winding의 Quartz tube 또는 Metal sheath를 이용한 경우가 대부분이며 또한 복사에너지 효율이 각각 50%이며 대류와 전도가 각각 50%이다.

### 제 3 절 국내 · 외의 연구현황

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
해양바이오연구원	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 통통마디를 함유한 차 조성물 및 그의 제조 방법</li> <li>• 통통마디 재배 방법</li> <li>• 통통마디 추출액을 함유한 음료</li> <li>• 통통마디 추출액이 함유된 김 및 이의 제조방법</li> <li>• 통통마디 두부 제조 방법</li> </ul>	발명특허등록 및 기술이전
(주) 바이오셀리코	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 통통마디 재배농장운영 (전남 영광군)</li> </ul>	년 이모작 생산과 건조분말 생산
서울여자대학교 원예학과 채소학연구실	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 염생식물의 인공시설내 수경재배</li> </ul>	한국토양비료학회지 논문게재
(주) 다사랑	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 함초가 포함된 식품 및 건강식품 개발</li> </ul>	함초를 이용하여 20가지 건강식품 개발 (환, 차, 건조제품 등)
한국식품연구원 식품자원이용연구본부	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 함초가 포함된 식품 및 건강식품 개발</li> </ul>	다사랑과 공동으로 함초유산균 발효 음료 제품화
배재대학교 생물학과	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 함초의 효능 검증</li> </ul>	다사랑과 공동으로 함초 제품화 연구
서해함초	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 함초가 포함된 식품 및 건강식품 개발</li> </ul>	함초를 이용한 건강식품 개발 (환, 차, 건조제품 등)

#### 1. 염생식물 생산 및 활용현황

- 자료 1(2006-7-21, 농민신문). 『새만금방조제 체절이후 동절기에 소금먼지 발생이 예상되는 노출갯벌에 대하여 지난 5~6월에 파종한 염생식물(나문재 등)이 성공적으로 성장하여 푸른 들녘을 이룸에 따라 환경변화 최소화에 크게 기여할 전망이다. 염생식물 재배 목적: 방조제 체절 후 염생식물을 재배하는 목적은 가을철 혹은 겨울철에 소금먼지 발생이 예상되는 노출 갯벌에 대하여 염생식물을 파종하여 성장한 후 피복효과로 인한 인근지역과 주민, 농작물 등에 대한 피해를 최소화 하는 데 있다. 새만금갯벌에 파종된 염생식물이 푸른들을 이루어 2006년에는 5 ~ 6월에 걸쳐 군산시와 김제시 지역의 갯벌 1,434ha(군산시 162ha, 김제시 1,272ha)에 파종을 실시하였다. 파종방법은 경운파종 1,128ha(79%)와 무경운파종 306ha(21%)를 시행하였고 염생식물 종자는 나문재와 칠면초 약 7톤을 파종하였다.』

- 자료 2(2007-07-04, 한겨레) 『갯벌에 자생하는 한해살이 풀 함초가 농가 소득을 올려줄 ‘무한자원’으로 변신한다. 한국식품연구원(원장 김동수) 이창호 박사팀은 홍삼과 각종 미네랄·아미노산·식이섬유 등이 풍부한 함초를 이용하여 신체근력 효능을 향상시키는 기능성 음료를 개발했다고 4일 밝혔다. 연구팀은 이 기능성 음료의 동물 실험과 인체 시험을 통해 근력 향상 효능을 확인했으며, 운동 후 피로 회복에도 효과가 있다는 것을 입증했다고 덧붙였다. 함초는 농약이나 비료가 필요하지 않은 친환경 식물이자 생약재로 꼽힌다. 이번 연구에 참여한 (주)다사랑은 함초를 이용해 다양한 기능성 식품을 개발하고 있다.』

- 전남 신안군도 올해 함초 기능성 식품 공장 1곳을 선정해 10억원(자부담 포함)을 지원한다. 또 국비를 지원받아 함초 가공산업을 활성화하려는 3개년 계획을 세우고 있다. 군은 서남해안 해풍과 게르마늄 토질에서 생산되는 함초가 품질이 월등하다는 점을 활용할 계획이다. 군 원에게 정광수씨는 “안정적인 판로를 확보하기 위해 국비를 확보하고, 다사랑과 협의해 함초 기능성 식품 공장을 관내에 설립하는 안도 검토하고 있다”고 말했다.

- 자료 3(2008-01-08, 연합뉴스) 『해초를 이용한 사료첨가제로 아미노산의 일종인 DHA를 일반 계란보다 92%나 많이 함유한 신품종 계란 개발. 김포시 농업기술센터는 함초(鹹草)를 이용한 발효액을 사료에 첨가해 암탉에게 먹이는 방법으로 함초란 생산에 성공, 최근 '김포Gold 함초란'으로 상표출원을 신청했다고 8일 밝혔다. 함초는 바닷물이 닿는 해안이나 개펄 염전주위에 무리지어 자라는 식물로 바닷물 속에 녹아있는 소금을 비롯해 칼슘과 마그네슘, 칼륨, 철, 인 등의 미네랄과 바닷물을 정화하는 효소들을 흡수하며 자라는 한해살이 풀이다. 이 해초는 변비와 비만은 물론 암과 축농증, 관절염과 갑상선염, 고혈압 등의 치료에 탁월한 효능을 갖고 있는 것으로 알려져 있다. 농업기술센터는 지난해 7월부터 함초 발효액을 사료에 섞어 암탉 1만 4천마리에 먹이는 실증시험을 한 결과 일반 사료를 먹인 암탉의 계란보다 DHA가 배 가까이 많은 것으로 확인했다. 일반 계란의 경우 DHA가 거의 없거나 가장 많이 함유된 계란도 100g 당 260mg이지만 이번에 개발된 함초란은 100g 당 470mg의 DHA가 함유돼 있으며 미네랄 함유량도 일반 계란보다 많은 것으로 나타났다. 이에 따라 농업기술센터는 올 상반기 중 '김포Gold 함초란'으로 상표등록을 마친 뒤 실증시험을 한 1개 농가에서 함초란을 본격 생산, 일반 계란보다 비싼 가격에 판매할 예정이다. 김포시농업기술센터 관계자는 "함초 발효액을 제조하는데 한계가 있기 때문에 실증시험 농가에서만 함초란을 생산한 뒤 올 하반기에 2~3개 농가를 추가할 방침"이라며 "함초란이 본격적으로 생산될 경우 농가소득에 크게 기여할 것"이라고 말했다.』

- 함초 생산과 동시에 축제의 컨테츠로도 활용되어 다음과 같이 소개된 바 있다.

- 자료 4(2007-02-09, 농민신문). 『'1004의 섬' 전남 신안군 '함초축제' : 안좌, 팔금, 자은면 등 군내 섬 지역에 자라고 있는 염생식물 함초의 우수성을 알리고 소득증대를 위해 안좌면에서 '함초 축제'를 열었다. 갯벌 등 염분이 있는 곳에서 자라는 함초는 미네랄 성분과 섬유질이 풍부해 숙변을 없애주는 우수한 약리작용이 최근 검증되면서 건강보조 식품으로 각광받고 있다. 안좌 구대지구 17만 평 등 군내에 모두 59만 평의 함초재배단지를 조성, 고소득 작목으로 만들고, 박우량 신안군수는 “소금 수입 개방과 염 산업 구조 개선 사업으로 휴, 폐업된 염전에 대규모 함초 재배단지를 조성”, “함초 재배단지가 조성되면 천혜의 자연 관광자원인 신비의 섬과 붉고 푸른 형형색색의 함초가 어우러져 관광객들에게 새로운 볼거리가 될 것이다”고 밝혔다.』

- 자료 5(2007-02-12, 농민신문). 『전남 신안 '통통마디 참숯 돌김'. 신안군은 “게르마늄이 함유된 갯벌에서 생산된 돌김에 함초와 목초액을 이용한 통통마디 참숯 돌김이 서울 등 대도시

소비자들의 인기를 끌고 있다”고 12일 밝혔다. 참숯 돌김은 지난 달 일본 한 업체와 일반 김의 3배인 속(100장) 당 1만5천 원에 15억 원어치 판매 계약을 하는 등 수출길을 열었다. 또 서울 등 대형 백화점과 관광호텔 등 특산품 코너에서도 물량이 부족해 못 팔 정도로 인기가 대단하다. 증도면 증도 김발전영어조합 관계자는 “참숯 백탄과 함초를 이용한 기능성 김 및 그 제조 방법에 대해 지난 해 6월 특허청으로부터 특허를 받았다”면서 “함초라고도 불리는 통통마디를 채취해 물로 깨끗하게 씻은 후 기계로 압축해 함초액을 만들어 사용하고 있다”고 밝혔다. 함초는 미네랄이 풍부하고 필수 아미노산을 다량 함유하고 있는 염생식물로 바닷물과 가까운 갯벌이나 염전 주변에서 자라는 한해살이 풀로 우리말로는 통통마디라고 부른다.』

- 최근 기능성 식품 산업분야에서는 기능성 성분들이 함유된 천연물 소재를 섭취하였을 경우 체내에서 용이하게 용해되어 방출되고, 생체막에 무사히 통과할 수 있도록 나노입자 크기인 분자 수준으로 이온화 된 활성식품성분(AFI : active food ingredient) 혹은 활성약리성분(API : active pharmaceutical ingredient )이 체내에 흡수 할 수 있는 제형기술 개발이 활발히 진행되고 있다.

AFI가 체내에서 용이하게 용해되기 위해서는 다음과 같은 방법을 활용하고 있다 :

- 1) 입자 크기 감소(particle size reduction)
- 2) 염 제형(salt formation)
- 3) 준안정형 제형(metastable forms)
- 4) 고체분산(solid dispersion)
- 5) 지질 기술(lipid technologies)
- 6) 결정질(cocrystals)

본 연구에서는 함초의 염 및 다양한 광물질이 물에 용이하게 용해시킬 수 있는 기술을 개발하기 위해서 위의 방법 중에서 활성식품성분인 염과 미네랄이 분자 수준인 고체 나노 입자 크기로 분산 시스템을 전달체(carrier)인 쌀 전분 속에서 균일하게 분산시킨 함초 encapsulation 제품을 디자인 하고자 하였다.

특히 전달체 속에 분산된 고체나노 분산된 AFI 물질(염, 미네랄 등)이 물, pH, 온도 등의 특정 조건 등에서 용이하게 자발적으로 용해되면서, 외부 환경인 빛, 산소, 수분으로부터 장기간 보호하여 부패 및 오염을 방지하고, 염처럼 반응성이 큰 물질들을 전달체 속에 격리시키고, 고형화시켜 안정화하면서 취급이 간편하고, 내용물의 용출속도를 조절하는 등의 목적으로 이용되는 캡슐화 기술(encapsulation)까지 충족시켜야 한다.

- 최근 용융압출성형은 AFI(활성식품성분)의 용해도를 향상시키면서, 미네랄과 비타민 등의 용출을 제어 할 수 있는 encapsulation 제품을 양산화 기술에 많이 활용하고 있으나, 국내에서는 아직 초기 단계이다.

용융압출성형은 일반적인 압출성형성형과 달리 전달체속에 AFI을 균일하게 분산시켜, 섭취 시

활성성분인 향, 미네랄, 비타민, 당등이 체내의 표적부위에서 용이하게 흡수 될 수 있도록 다음과 같은 장점을 갖고 있다:

- 1) 압출성형은 가공조건인 온도, 바렐의 스크류 설계에 따른 전단속도 바렐 가열, 혼합속도, 투입속도, 수분함량, 가소화에 따른 AFI의 균일 분산 및 친수성이 결정됨
- 2) 압출성형과정중 서로 상호된 활성과 다른 성분 첨가가 가능, 특히 열에 예민한 활성 성분 변성을 최대한 억제 가능
- 3) 다양한 형상 및 크기를 제형화 (펠렛, 구형, 판상 등).
- 4) 제한된 수분함량으로 원래 결정구조에서 비결정으로 전이되어 친수성 향상
- 5) 높은 함량 적체 : 고체 활성 물질 함량 30% 이상 encapsulation 된 압출성형체에 적체
- 6) 경제성 : 연속적으로 다양한 형상 압출 성형체 생산에 의하여 생산비 저렴

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 염생식물의 고품질 다수확을 위한 생산기술 개발

#### 1. 염생식물 수집 및 연구 적용식물 선발

○염생식물을 이용한 기능성 식품개발을 위한 다양한 염생식물을 선발 수집하기 위해 강화도 석모도 및 시흥시 바다에서 통통마디, 나문재, 해홍나물 및 국화과 식물을 수집하였다.



그림 1. 강화도 석모도의 염생식물 수집



그림 2. 통통마디와 나문재의 온실재배 실험



## 2. 배양액내 질소비료 형태가 갯방풍의 생육에 미치는 영향

○산형과에 속하는 갯방풍(*Glehnia littoralis*)은 바닷가 모래땅에서 잘 자라며 초여름에 흰색의 꽃을 피운다. 본 실험은 수분이 많은 상태에서 생장이 가능한 갯방풍의 NO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>, PK조건 하에서의 생육습성을 알아보고 이를 통해 새로운 염생식물자원의 탐색을 위한 기초조사 자료로 활용하고자 한다. 실험방법은 갯방풍을 각각 NO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>, NO<sub>3</sub>+NH<sub>4</sub>, PK의 4개의 처리를 두어 재배하여 생육조사를 실시하였다. 양액은 Hoagland 배양액을 변형 처리하여 5개월간 재배하였다. 식물 생육조사는 초장, 엽장, 엽폭, 엽수를 조사하였다. NO<sub>3</sub>조건 하에서 초장 33.8cm, 엽장 7.04cm, 엽폭9.8cm로 가장 좋은 생육을 확인할 수 엽수 역시 34.2개로 가장 많았다. 반면 NH<sub>4</sub>조건에서는 초장 8.7cm, 엽장 4.0cm, 엽폭 5.4cm, 엽수 9장으로 생육이 낮아지는 경향을 살펴볼 수 있었다. 그 외 PK, 그리고 NO<sub>3</sub>와 NH<sub>4</sub>를 동시에 처리한 경우에는 각각 초장 20.8, 18.2cm, 엽장 5.9, 5.6cm, 엽폭 7.2, 7.3cm, 엽수 22.8, 23.8장으로 비슷한 생육을 보였다.

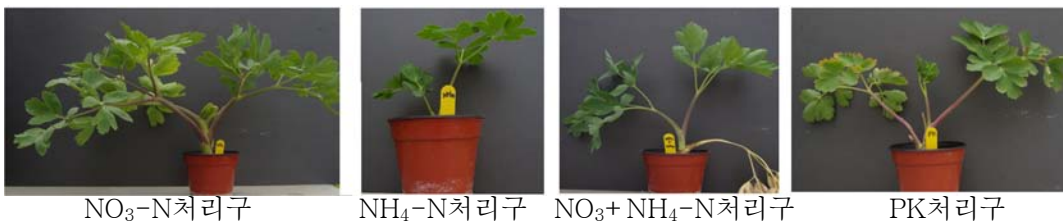


그림 3. 갯방풍의 질소 비료 형태에 따른 생장비교

표 1. 갯방풍의 생육 및 NR 값

Treatment	Plant height (cm)	Leaf length (cm)	Leaf width (cm)	No. leaves (ea)	Nitrate reductase(OD value)
NO <sub>3</sub>	33.8	7.0	9.8	34.2	0.33
NH <sub>4</sub>	8.7	4.0	5.4	9.0	0.36
NO <sub>3</sub> + NH <sub>4</sub>	18.2	5.6	7.3	23.8	0.32
PK	20.8	5.9	7.2	22.8	0.40

## 3. 광 및 염분농도처리가 통통마디 종자의 발아에 미치는 영향

○기능성 염생식물로 활용도가 증가하고 있는 통통마디(*Salicornia herbacea*)는 대량생산 및 실내재배를 위한 발아실험연구가 시급하다. 본 실험에서는 발아에 적합한 광환경과 염 농도를 조사하기 위하여 2008년 전남 신안군에서 채취한 종자를 구매하여 발아실험을 실시하였다. 직경 9.0cm의 perti dish에 종자 20립을 5반복 파종한 후 재배상에서 발아시켰고, 광처리에는 형광등을 사용하여 4000 lux로, 암처리는 알루미늄호일을 이용하였다.

○광조건에 따른 통통마디 종자발아율을 조사한 결과 광처리구에서는 1주 후 56%, 2주 후 65%, 3 주 후 71%가 발아한 반면 암처리구에서는 1주 후 6%, 2주 후 10%의 발아율을 보

였으며, 3주 후는 10%로 변화가 없었다. 이러한 조사결과를 통해 통통마디 종자는 광발아종자인 것으로 나타났다. 염 농도처리에 따른 발아율은 광조건에서 대조구, 50, 100, 200mM 처리구로 나누어 비교하였다. 0mM 처리구에서는 1주 후 32%, 2주 후 52%, 3주 후에는 56%의 발아율을 보여 처리구 중에서 가장 높은 발아율을 보였다. 50mM 처리구에서는 21%, 41%, 41%의 발아율을 보였고, 100mM 처리구는 1주 후의 발아율이 다른 처리구에 16%로 나타났다. 2주 후에는 36%, 3주 후에는 37%의 발아율을 보였다. 가장 높은 농도인 200mM에서는 1, 2, 3주 후의 발아율이 각각 16%, 32%, 34%로 3주 후의 발아율은 처리구 . 이러한 결과를 통해 염처리 농도가 높아질수록 발아율이 감소하는 경향을 보였음을 확인하였다.

표 2. 광조건에 따른 발아율

염농도	광	암
1주 후	56.65	6.65
2주 후	65.00	10.00
3주 후	71.65	10.00



그림 4. 광조건에 따른 발아율(좌: 광조건, 우: 암조건)

표 3. 염농도에 따른 발아율

염농도	0mM	50mM	100mM	200mM
1주 후	32.67	21.33	16.00	16.67
2주 후	52.33	41.33	36.33	32.33
3주 후	56.33	41.33	37.67	34.00

#### 4. 토양 및 N P처리가 통통마디의 생육에 미치는 영향

○통통마디(*Salicornia herbacea*)는 염생식물로서 대량생산을 위한 재배 기술 확보가 시급하다. 따라서 본 실험은 토양의 종류와 N과 P시비처리가 통통마디의 생육에 미치는 영향을 조

사하였다. 종자발아실험은 펠라이트와 원예용 상토처리구로 구분하였고, 시비처리는 수돗물 처리구를 대조구로 하여 PK, NO<sub>3</sub>-N, NH<sub>4</sub>-N 그리고 NO<sub>3</sub>와 NH<sub>4</sub>-N 혼합처리구 등 5처리구로 구분하여 두상 관수하였다.

- 각 처리구별로 생육조사, 엽록소, NR(Nitrate Reductase), 프롤린 함량을 조사였다. 엽록소는 엽록소간이측정기(Minolta SPAD-502)을 사용하여 상대치를 측정하였다. 프롤린함량은 Chinard법에 따라 520nm에서 흡광도를 측정하여 L-프롤린 표준용액의 흡광도와 비교하여 정량하였다. nitrate reductase(NR)활성은 잎과 뿌리 0.5g씩을 5mL의 0.1M Na-phosphate(pH7.5), 0.02M KNO<sub>3</sub>, 5% propanol 혼합액에 넣고 25℃ 암소에서 5시간 반응시켰다(Jaworski,1971). 이 반응액 0.4mL에 3N HCl에 용해된 1% sulfanilamide와 0.02% n-1-naphthyl-ethlenediamine hydrochloride를 각각 0.3mL씩 넣고 20분간 발색시킨 후에 증류수 4mL를 넣어 540nm에서 흡광도(Milton Roy, Spectronic 1201, New York)를 측정하여 비교하였다.
- 펠라이트에 원예용 상토처리구의 통통마디 NO<sub>3</sub>-N 처리구가 가장 컸고, 대조구, NO<sub>3</sub>와 NH<sub>4</sub>-N 혼합처리구, NH<sub>4</sub>-N 처리구, PK 처리구의 . 가지수는 29.18개로 가장 많았으며, PK 17.57로 가장 작았다. 생체중도 대조구가 3.06g으로 가장 컸으며, NO<sub>3</sub>-N처리구, NH<sub>4</sub>-N 처리구, NO<sub>3</sub>와 NH<sub>4</sub>-N혼합처리구, PK 처리구는 1.89, 1.08, 1.03, 0.55g이었다. 엽록소의 경우 NO<sub>3</sub>와 NH<sub>4</sub>-N 혼합처리구, NO<sub>3</sub>-N 처리구에서 9.07, 6.08로 높게 나타났고, 대조구, NH<sub>4</sub>-N, 그리고 PK 처리구는 , 2.20, 5.23, 4.07로 나타났다. NR 값은 NH<sub>4</sub>-N 처리구, PK 처리구가 높았으며, 대조구와 NO<sub>3</sub>-N 처리구 는 낮았다. 프롤린 함량은 NH<sub>4</sub>-N 처리구에서 PK 처리구는 낮았다.

표 4. 상토에서의 통통마디의 생육

Treatment	초장(cm)	가지수(개)	생체중(g)
Control	17.90	29.18	3.06
NO <sub>3</sub> -N	18.75	25.91	1.89
NH <sub>4</sub> -N	15.93	24.00	1.08
NO <sub>3</sub> +NH <sub>4</sub> -N	17.23	22.30	1.03
PK	14.57	17.57	0.55

표 5. 통통마디의 엽록소, NR, 프롤린

Treatment	엽록소	NR	프롤린
Control	2.20	0.063	0.374
NO <sub>3</sub> -N	6.08	0.094	3.884
NH <sub>4</sub> -N	5.23	0.187	1.857
NO <sub>3</sub> +NH <sub>4</sub> -N	9.07	0.107	0.845
PK	4.07	0.134	0.274

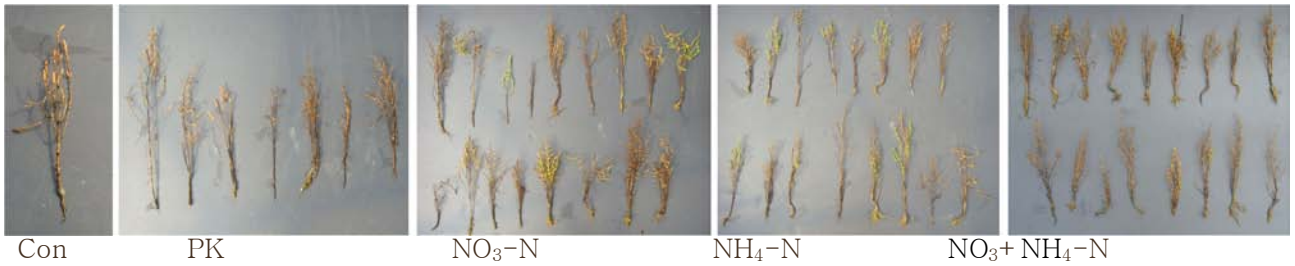
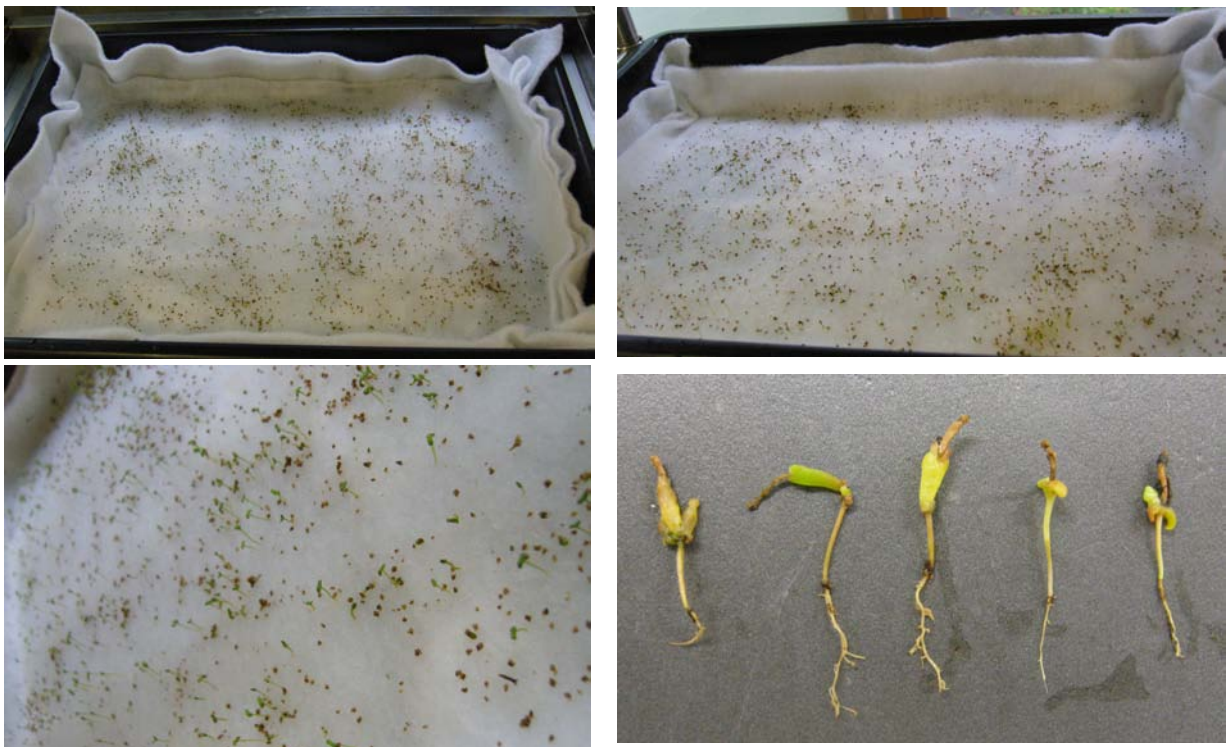


그림 5. 통통마디의 질소 시비에 따른 생육비교

## 5. 시설재배를 통한 통통마디의 2모작 재배 검토를 위한 봄파종과 여름파종 함초의 생육비교

- 통통마디의 년중생산을 위해 2009년 4월, 10월, 2010년 1월에 2008년 전남 신안군에서 채취한 종자를 파종하였다. 파종상은 백색 부직포를 2겹으로 하여 삼상에 깔고 종자를 흩어뿌리고 대조구는 수돗물을 매일 관수하였으며 시비구는 하이포넥스를 2000배 희석하여 관수하였다.
- 발아 및 새싹의 생육은 예상외로 매우 저조하여 식물체의 크기가 2달후 수확할 때 까지 2cm정도의 크기로 매우 작게 성장하였다. 이러한 결과를 통해 부직포가 뿌리가 내리기에는 재질이 너무 강하고 또한 근권부를 확보할 깊이가 낮아 생육해를 받은 것으로 생각하여 차후년도에 실험을 진행하되 매질의 깊이나 매질의 부드러운 토양을 이용한 실험이 추가될 계획이다.



## 6. 통통마디의 실내용 새싹재배를 위한 적합한 배지선발

- 2008년 전남 신안군에서 채취한 종자를 구매하여 실온보관하면서 실험에 사용하였다. 적합한 새싹재배용 간편 배지를 적용하여 새싹재배 키트를 만들기 위해 우선 스폰지와 솜을 배지로 이용하였다. 스폰지의 두께는 3, 6 cm 두종류로 하였으며, 솜의 경우 3cm 두께에서 새싹 발아 정도를 알아보았다. 용기는 가정이나 주변에서 쉽게 구할수 있는 빈병이나 플라스틱용기 및 투명비닐봉지를 이용하였다.
- 유리용기에 스폰지와 솜을 각각 넣고 종자를 파종하여 새싹의 성장을 보았으며, 플라스틱용기에 스폰지를 넣고 각각 종자를 파종한 것과, 비닐의 경우 스폰지를 넣고 스폰지에 일자형으로 칼집을 0.5cm 깊이로 넣고 그 안에 종자를 줄뿌림으로 파종하여 새싹을 성장을 알아보았다.
- 새싹의 생장은 스폰지 보다 솜에서 생육이 좋은 것으로 나타났는데 이는 솜의 재질이 스폰지 보다 부드러워 종자가 발아하여 뿌리를 내리는 것이 더 유리한 것으로 생각되며 스폰지의 경우 스폰지의 두께에 따른 차이는 없는 것으로 나타났는데 이는 새싹의 생육이 저조하여 지하부의 생육환경을 확보해야 할 만큼의 근권부 확보가 아직 필요치 않아 그결과를 판단하기 어려우나 식물이 생육하여 근권부를 확보해야 할 크기가 되면 배지의 두께가 높은 것이 식물생육에 긍정적인 영향을 미칠 것으로 예상된다.

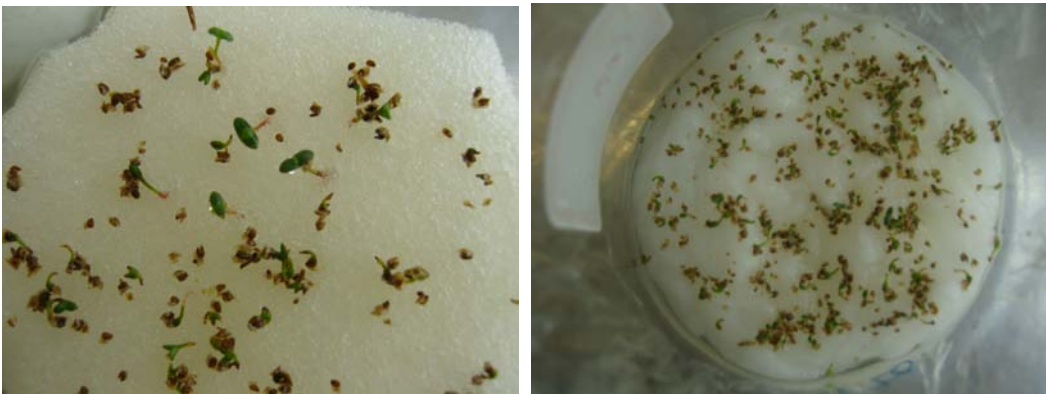


그림 6. 배지의 종류에 따른 새싹 재배 ---스폰지(좌)와 솜(우)



그림 7. 다양한 용기의 종류



그림 8. 스폰지 깊이에 따른 실험(좌측병 3줄은 6cm, 우측병 3줄은 3cm 스폰지 깊이)

## 7. 기내배양을 활용한 통통마디 염조건 규명

○ 육종계통이나 선발된 우수유전자원의 번식과 유지, 또는 추후 유용한 천연물질을 대량 추출하는데 있어 현탁배양이 필요로 함. 현재 함초에 관한 조직배양의 조건 연구는 전무함.

### ○ 실험방법

#### A. 실험재료

본 실험에 사용된 함초종자는 전남 신안군에서 채종한 종자를 (주) 대신함초에서 제공받아, 식물조직배양에서 가장 근본이 되는 무균배양을 하기 위하여, 종자살균방법을 통하여 한 배지 조성당 10립을 치상 하였다.

#### B. 종자살균방법

채종된 함초종자는 전처리로, 멸균수로 5분간 6회 정도 수세 함으로서 채종 시 종자에 묻어 있는 이물질을 제거하였다. 전처리 과정이 끝난 종자들은 무균대안에서 70% 에탄올과 전착제 Tween 20 한 두 방울이 섞인 용액으로 약 1분간 흔들며 살균한 후, 멸균수로 수세한 후에, 전착제가 함유되어있는 2% NaOCl용액으로 약 10분간 흔들며 살균하고, 다시 1% NaOCl용액에서 5분간 살균하였다. 멸균수로 5분간 수세한 후에 3회 3분간 추가적으로 종자를 수세한 후, 멸균된 거름종이 위에 올려 여분의 수분을 제거한 후 배지 치상 준비를 완료하였다.

#### C. 배지조성

자연생태에서 함초는 염류가 높은 환경적 조건에서 잘 자라는 것으로 알려졌으므로, 일반적으로 mineral 함량이 높은 MS염류와 식물조직배양에서 자주 사용되는 B5염류를 이용하여, 기본적으로 Sucrose 3%, Gelrite 0.25% 배지를 사용하였다 (표 1).

표 1. MS배지와 B5배지의 기본염류조성의 비교

Group	Components		B5		MS
Major	CaCl <sub>2</sub>	1.02	mM	2.99	mM
	KNO <sub>3</sub>	24.73	mM	18.79	mM
	MgSO <sub>4</sub>	1.01	mM	1.50	mM
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.09	mM	-	
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.01	mM	-	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-		1.25	mM
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	-		20.61	mM
Minor	CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.11	μM	0.11	μM
	CuSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	0.10	μM	0.10	μM
	FeNaEDTA	100.00	μM	100.00	μM
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	48.52	μM	100.27	μM
	KI	4.52	μM	5.00	μM
	MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	59.16	μM	100.00	μM
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	1.03	μM	1.03	μM
	ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	6.96	μM	29.91	μM
Vitamins	myo-inositol	554.94	μM	554.94	μM
	Nicotinic acid	8.12	μM	4.06	μM
	Pyridoxine HCl	4.86	μM	2.43	μM
	Thiamine HCl	29.65	μM	0.30	μM
	Glycine			26.64	μM

이때, 사용되는 MS 및 B5염류의 양은 1/2x, 1x, 2x과 함께 4개의 다른 NaCl농도 (0mM, 10mM, 50mM, 100mM, 그리고, 200mM)로 하여, 총 24가지 다른 조합을 사용하였다.

#### D. 생육조사

기내과종 6주 후에, 23도의 16시간의 광 조건의 배양실에서 배양되었다. 함초의 기내생장발육 정도를 측정하였고, 함초의 색, 뿌리의 길이, 본엽의 출현 및 발육 정도를 각 처리 구 별로 관찰 하였다.

### ○ 실험결과 및 고찰

#### A. Genotype의 다양성

함초는 2n=18, 36, 38 등 다양한 것으로 알려져 있다. 본 연구에서 사용된 함초 종자는 신안 군에서 자연 수정된 것으로 그 수정과정이 명확하게 알려져 있지 않다. 본 연구에서는 총 240 여개의 종자가 사용되었고, 여기에서 발아되어 성장한 초기 함초 식물의 형태는 다양하였다(그림 1).



그림 1. 기내 발아된 함초식물체(A)와 6주 후 함초식물의 표현형태의 다양성(B)

○ 본 연구에서 이들의 형태적 표현형을 크게 5가지로 분류되었고, 다음과 같은 특징이 관찰되었다(그림 2).

- 유형1(Type1): 떡잎만 부푼 상태로 뿌리와 연결되는 하배축이 짧은 형으로 본엽의 생장이 일어나지 않는 형
- 유형2(Type2): 유형1과 같이 떡잎부분이 부푼 상태이나, 유형1과는 달리 하배축이 긴 형으로 본엽의 생장이 일어나지 않는 형
- 유형3(Type3): 짧은 하배축과 본엽이 짧게 성장한 형
- 유형4(Type4): 유형4와 유사하나 본엽이 3마디 이상 성장한 형
- 유형5(Type5): 하배축의 길이가 길이가 길고 본엽이 한 개가 아닌 여러 개가 나오며 2-3마디 이상 성장한 형



그림 2. 기내발아생육 6주 후 관찰된 함초 식물의 5가지 다른 형태



발달 초기에서 유전자형의 이형성을 언급하는 것은 시기상조일 수 있으나, 여러 배지에서 이러한 표현형의 다양성이 관찰되므로 재료로 사용된 함초 종자가 이형접합성이 높은 것으로 사료된다.

### B. 배지 당 식물체 생육비교

일반적인 식물 조직배양의 기본 배지로 잘 알려진 MS배지는 무기염류가 다른 배지에 비비해 높은 것으로 알려져 있다. 표 1에서와 같이 B5배지의 염류와 비교해 보면, MS배지의 Major group에서는 비교적 높은 N 농도와 Minor group에서 2배높은  $H_3BO_3$ 와  $MnSO_4 \cdot H_2O$  그리고  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 는 4배가 높고, vitamins group에서는 B5배지에서 비타민 B들이 상대적으로 MS 배지에 비해 높고, Glycine이 MS배지에서만 존재 하는 것을 알 수 있다. 기내에서 과중된 종자에서 발아한 함초 식물체 중에서 특히나, B5배지나 낮은 배지염류 1/2배 또는 무처리 NaCl 처리구에서 갈변 되는 함초 식물체가 관찰되었다 (그림 3). 즉, 상대적인 배지의 염 전체농도가 낮으면 갈변화된 함초 식물체의 관찰 수가 많았고, 같은 조건에서 단지 배지 염류 차이인 경우, B5보다는 MS배지에 치상된 식물체에서 녹색의 건전한 식물체가 관찰되었다.



그림 3: 배지 종류 및 염 농도에 따른 함초의 갈변화 (A 저농도염류, B 고농도염류)

이는 함초의 생육에 있어 MS배지가 B5배지보다 더 적합한 것으로 보여지고, 여기에 더불어 적절한 농도의 NaCl의 처리가 함초의 생육에 영향을 끼치는 것으로 관찰되었다. 특히 2x의 MS배지염류에 50-100mM의 추가적인 NaCl 처리구에서 녹색의 생육이 양호한 함초가 많이 관찰되었다.

### 종합고찰

- 식물조직배양의 실험에서 무균상태의 건전한 식물체를 생산하는 것은 필수요인이다. 특히, 함초의 기내배양에 있어 초기의 종자 살균 시, 다른 종자에 비해 강한 살균처리가 필요로 한다. 본 연구에서 사용한 살균시간과 NaOCl의 농도보다는 더 높은 농도의 처리가 필수적이다.
- 본 연구에서 관찰 된 바에 의하면, 사용된 재료의 종자가 고정된 것이 아닌 표현형에서 높은 이형성이 관찰되었다. 이러한 이형성은 균일한 환경조건을 규명하는데 큰 난점이다. 그러나, 본 연구에서 일반적인 함초의 조직배양의 조건이 규명되었고, 이는 후에 생육조사 후, 선별된 함초의 기내배양을 이용한 대량생산의 연구에 기초가 될 것으로 사료된다.

## 8. 토양의 종류에 따른 통통마디의 성장반응

(1) 재료 및 방법 : 식물재료는 2010년 6월에 의 갯벌에서 자생하고 있는 10 cm 내외인 균일한 것을 채취하여 ice box에서 밀봉처리 후 서울여대 온실로 이송하였다.

식물을 직경 5 inch인 플라스틱 화분에 1 inch 크기의 난석, 버미큘라이트, 펄라이트, 난석 + 펄라이트를 매질로 하여(Nam et al., 2007) 1주씩 처리별 15개체를 이식하였다. 성장상의 온도 및 광조건은  $25 \pm 5^\circ\text{C}$ ,  $80 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  하였고, 광주기는 16시간 명기, NaCl 농도는 200mM (Nam et. al., 2007), Hyponex는 2000배로 희석하여 처리하였다(Table 1).

표 2. Composition of experiment.

Matrix	Treatment	Concentration
Poros Mudball (PM)	Control (C),	Tap water
Vermiculite (V)	NaCl (N),	200mM Salt water
Perlite (P)	Hyponex (H),	2000 times diluted Hyponex solution
PM+P	N+H	(x2000 H) 200mM N+ x2000 H

**토양의 종류에 따른 성장반응** 생육조사는 초장과 근장, 생체중, 건물중, 분지수 등을 측정하였다. 건물중은  $70^\circ\text{C}$  건조기에서 3일간 처리하여 측정하였다. 토양종류별 함수율을 측정하였으며 토양에 따른 식물 잎의 엽록소 함량을 측정하기 위하여 지상부 중간부위의 잎 0.5 g을 채취하여 DMSO에 침지시켜 상온에서 24시간 방치한 후 추출액을 분광광도계를 이용하여 645와 663 nm에서 흡광도를 측정하여 Wellburn법(1994)으로 측정하였다. DPPH 항산화활성을 알아보기 위해 Blois(1977) 방법을 변형하여 사용하였으며, 프롤린함량은 Chinard법에 따라 520 nm에서 흡광도를 측정하여 L-프롤린 표준용액의 흡광도와 비교하여 정량하였다.

### (2) 결과 및 고찰

**성장특성** : 양의 종류에 따른 식물생육에는 크게 차이가 나타나지 않았으나 모든 토양에서 염과 복합비료 hyponex를 동시에 처리한 결과 식물의 건물중, 생체중, 초장 및 가지수에서 생육이 좋은 것으로 나타났다(Table 2, Fig. 1). 식물의 200 mM 염처리구가 다공성 난석을 제외하고 초장과 식물의 생체중, 건물중이 모든 매질에서 감소하였는데 이는 식물이 염스트레스에 직면했을 때 줄기나 뿌리의 감소, 초장, 생체중 및 건물중의 감소 등이 나타난다는 보고와 유사한 결과를 보였다(Nam et al., 2007; Lee et al., 1998). Nam(2007)은 해홍나물, 나문재, 통통마디의 염처리에서 100mM 이상에서 생육의 감소가 나타났다고 보고하였다. 그러나 분지수는 일관성이 없었다. 이러한 결과는 토양의 물리적 조건이 식물생육에 영향을 미친다기 보다는 시비와 염조건이 생육에 더 밀접한 관련으로 여겨지며, 이는 통통마디가 생육기간 중 일정한 수분상태를 유지하기 때문에 내염의 범위가 넓은 조건을 가지고 있기 때문으로 사료된다(Ihm & Lee, 1986).

표 3. Effects of different matrix on the growth of *Salicornia herbacea*. (DW; dry weight, FW; fresh weigh, WC; water content of plant, C; control, N; NaCl, H; hyponex )

Matix	Treatment	DW(g)	FW(g)	WC(%)	Plant height(cm)	No. of branch(ea)
PM	C	4.93±0.15	8.95±0.66	44.9	16.39±3.48	16.25±5.85
	N	5.29±0.78	8.76±2.13	39.6	16.11±3.66	17.25±3.11
	H	5.71±0.46	11.46±1.47	50.2	16.89±3.82	15.38±3.02
	N+H	6.65±1.17	13.75±3.75	51.6	18.89±4.62	23.50±2.67
V	C	5.52±0.58	12.02±1.35	54.1	19.23±4.30	18.50±4.47
	N	5.42±0.45	11.68±2.79	53.6	16.65±3.78	16.88±3.94
	H	5.28±0.63	12.02±1.35	51.5	19.69±3.25	16.50±4.07
	N+H	6.04±0.89	15.24±1.97	60.4	19.81±2.75	24.88±5.54
P	C	4.68±0.29	7.49±1.02	37.5	17.33±2.45	16.88±2.53
	N	4.20±0.57	7.99±2.51	47.4	17.22±4.02	21.75±3.77
	H	5.40±0.55	12.64±3.55	57.3	20.33±2.83	21.88±1.81
	N+H	5.67±0.44	13.77±4.87	58.8	18.33±3.81	22.50±2.73
PM+	C	5.33±0.50	8.62±1.25	41.6	16.11±4.26	17.43±4.12
	N	5.27±0.69	9.47±3.62	44.3	16.33±3.46	22.43±3.99
P	H	5.71±0.21	10.45±0.33	45.4	17.11±2.80	19.43±3.87
	N+H	5.79±0.16	13.61±0.39	57.5	19.78±2.77	26.29±2.87

**엽록소 함량.** 엽록소함량은 종에 관계없이 염처리에서 약간 감소하는 경향을 나타냈으나 감소 폭은 토양별로 다르게 나타났다. 염 200 mM 처리조건에서 엽록소 함량이 대조구에 비해 낮아 지지만 염과 복합비료를 동시에 시비한 경우에는 다시 엽록소 농도가 높아졌다. 일반적으로 염 분농도가 증가할수록 엽록소의 함량이 감소하며, 이는 고염도에서 과량의  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  흡수는 엽록소의 구성분인  $\text{Mg}^{++}$ 의 흡수를 저해시켜 엽록소합성이 저해되므로 엽록소 함량이 감소된다고 한 연구보고와 같은 경향을 나타냈지만(Kim et al., 2002), 염처리와 복합비료의 시비를 통해 식물생육과 엽록소함량의 증가에 동시에 영향을 미친 것으로 여겨진다.



그림 4. Effects of different matrix on the growth of *Salicornia herbacea*. (from upper right PM, V, P, and PM+P treatment)

표 4. Effects of salt treatment of chlorophyll contents (mg/g F.W) of *Salicornia herbacea*.

Matix	Treatment	Chl. a	Chl. b	Chl. total
PM	C	6.85±0.99	2.66±1.00	9.50±1.99
	N	6.86±1.08	2.22±0.59	9.07±1.67
	H	6.85±0.68	1.69±0.32	8.54±0.84
	N+H	7.35±1.84	1.85±0.61	9.20±2.42
V	C	8.61±0.78	2.27±0.27	10.88±1.05
	N	7.57±2.04	3.13±1.73	10.70±3.66
	H	10.64±3.96	3.18±1.68	13.81±5.30
	N+H	10.39±0.91	2.68±0.33	13.06±1.25
P	C	7.89±1.25	2.42±0.85	10.31±0.42
	N	4.31±0.73	1.09±0.14	5.41±0.85
	H	9.33±1.09	2.34±0.37	11.67±1.44
	N+H	7.30±0.62	2.79±1.01	10.09±1.63
PM+P	C	7.52±0.83	2.02±0.23	9.54±0.99
	N	7.39±0.98	2.10±1.21	9.55±2.11
	H	7.76±1.93	2.29±1.19	10.05±2.88
	N+H	6.77±0.80	1.59±0.28	8.63±1.08

**Proline 함량** 높은 염농도에서 자라는 식물이 낮은 수분포텐셜을 나타내는 토양에서 수분을 흡수하기 위해서는 토양보다 더 낮은 수분포텐셜을 가져야하므로 체내에 유기용질이나 무기용질 등을 축적하게 된다. 이중에서 프롤린은 식물이 염스트레스와 수분스트레스를 받을 때 증가하는 아미노산의 일종으로 많은 연구자들에 의해 구명되었는데(Kim et al., 2004) 일반적으로 해홍나물, 나문재 등의 염생식물의 경우 염처리에서 체내 방어기작으로 프롤린합성이 증

가하여 수분포텐셜을 조절하는 osmoticum의 작용하는 것으로 (Binzel et al., 1985)알려져 있다. 그러나 본 실험에서도 염처리가 프롤린 함량이 증가에 영향을 미치는 기존의 보고와 동일한 경향을 나타내지는 않았다(Lee et al., 1998).

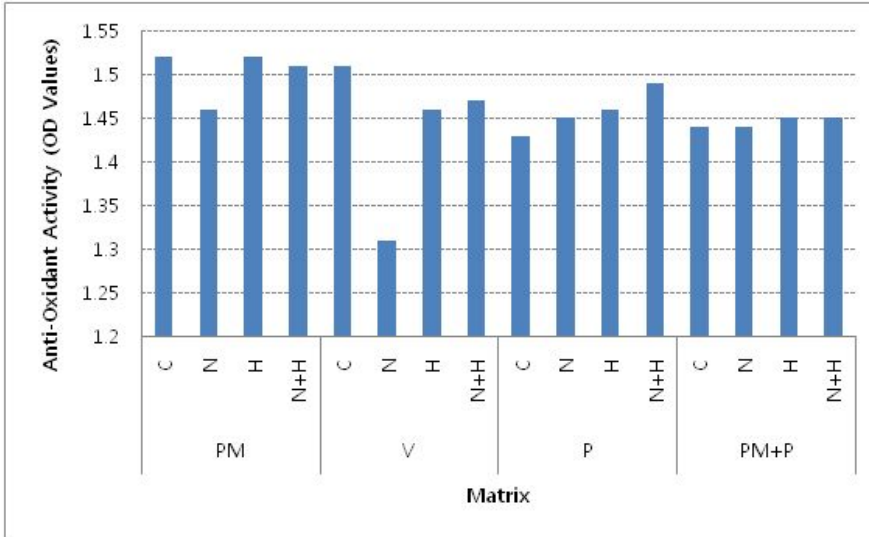


그림 5. Effects of salt treatment of on proline content of *Salicornia herbacea*.

**항산화작용.** 염처리와 토양에 따른 통통마디의 황산화작용은 거의 차이 없고 비슷한 결과로 나타났으며 이는 통통마디의 생육은 인공토양조건에 따른 생육변화가 없어 어떤 토양조건에서도 잘 생육할 수 있으리라 여겨진다. 이상의 결과에서 인공토양과 적정의 염분농도 처리에 따른 인공상의 조건에서 생육이 가능하여 내륙에서의 재배 및 다양한 용도로서 이용 범위가 넓은 유용한 식물자원으로 활용할 수 있을 것이다.

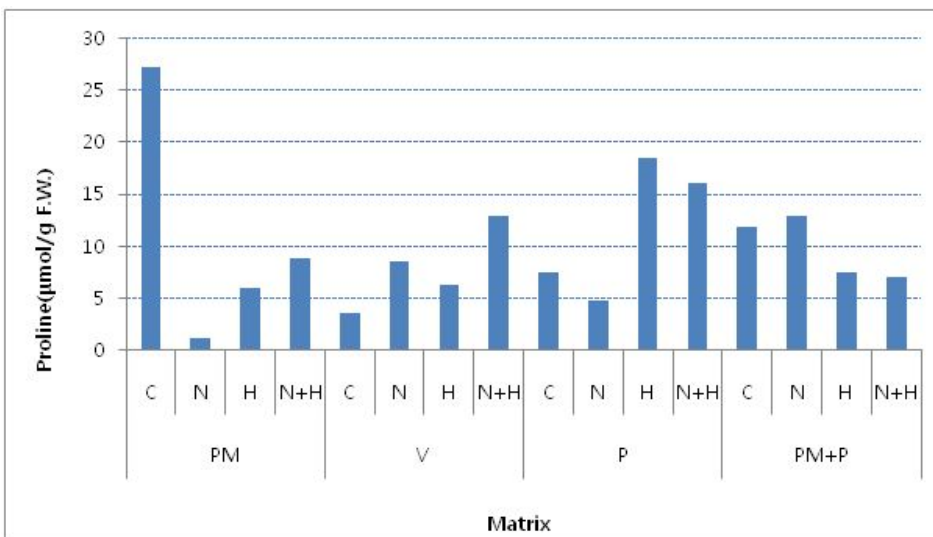


그림 6. Effects of salt treatment of on Anti-oxidant activity of *Salicornia herbacea*.

## 9. 가정재배를 위한 무배수구 유리용기재배 시 통통마디의 성장반응

(1) 유리병 재배 : 용기는 유리병(500ml)을 이용하였으며 용기에 매질은 스폰지각(큐빅형태 1\*1\*1cm), 난석(중), 펠라이트 세 종류를 이용하였다. 실험에 이용된 식물은 7±3cm 크기의 통통마디 묘를 식재하였으며 배양실에서 90일 재배 후 생육을 조사하였다. 시비는 하이포넥스를 시비하였으며 염농도처리 시 100mM의 NaCl을 관수시마다 병에 가득 차도록 채웠으며 약 1주 후 수분이 용기의 바닥에 거의 다 소모된 후 재 관수 관비 하였다.



그림 7. 유리병에 스폰지각, 난석, 펠라이트를 넣고 재배 중인 생육실



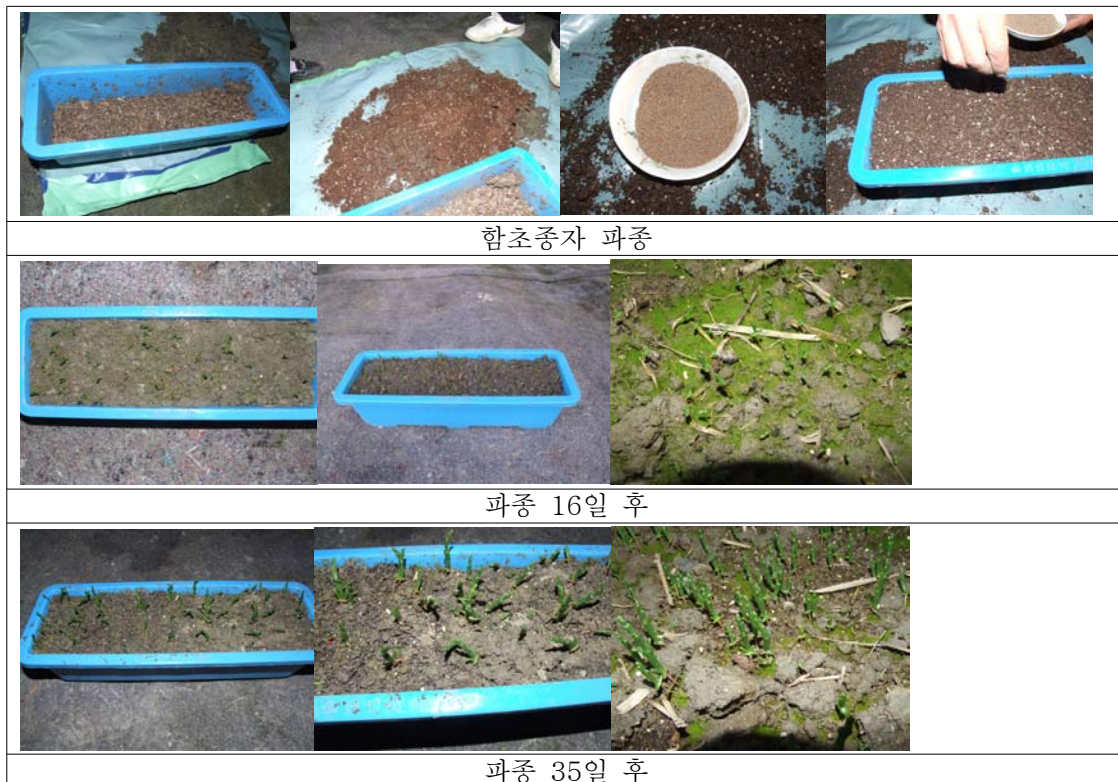
그림 8. 펠라이트, 난석, 스폰지각에 식재된 통통마디의 생육

식물의 생육은 스폰지에서 재배하였을 경우 생육이 조금 저조하였으며 난석과 펠라이트에서 재배한 경우 생육이 조금 우수하였다. 이는 식물의 생육환경에서 토양의 영향을 받는 것으로 스폰지의 지지력이 다른 두 토양에 비해 부족한 것이 그 이유가 아닌가 생각된다. 수경재배에 적합한 매질을 선발하는데 있어 토양조건은 지지가 가능한 토양으로 소독처리가 잘된 토양이면 그 조건을 만족할 것으로 생각되며 시비조건은 복합비료와 염농도를 100mM 처리하면 적절할 것으로 판단된다. 관수시점은 용기의 배수구가 없는 형태로 실험되어진 것이므로 약 1주에 한번 정도 씩 식물마다 조금씩 차이가 나긴 하였지만 수분이 다 소모된 후 용기 바닥에 수분이 조금 남아 있을 때 재관수 시점으로 하여 지하부의 건조를 막으면서도 해안의 바닷물이 들고 나는 원리를 살려 침수와 배수를 고려한 조건으로 통통마디를 재배하는 것이 유리할 것으로 판단 된다. 가정에서 버려지는 폐자원 중 유리용기 들을 활용하여 수경재배 시 간편한 방법으로 접근이 가능할 것으로 사료된다.

표 5. Effects of different matrix of Poros Mudball (PM), Perlite (P), Sponge cubic (S) on the growth of *Salicornia herbacea*. (DW; dry weight, FW; fresh weigh, WC; water content of plant, C; control, N; NaCl, H; hyponex )

Matix	Treatment	FW(g)	WC(%)	Plant height(cm)	No. of branch(ea)
PM	C	8.05±0.56	74.7	14.22±2.55	14.15±3.22
	N	7.76±1.09	67.9	14.34±2.76	15.24±3.09
	H	8.46±0.69	65.4	17.45±2.56	15.54±3.01
	N+H	9.75±1.65	51.6	18.46±3.54	19.51±2.60
S	C	10.02±0.95	64.8	13.21±3.21	16.50±3.27
	N	9.68±1.09	63.9	12.57±2.08	15.78±2.16
	H	10.02±0.95	71.5	16.09±2.05	16.58±2.08
	N+H	10.24±1.07	70.4	16.91±1.75	20.88±3.76
P	C	6.49±0.72	67.2	15.75±1.45	14.38±2.04
	N	7.09±0.81	57.9	14.27±2.88	19.65±2.37
	H	10.64±2.13	67.0	18.39±1.73	20.93±2.98
	N+H	9.77±2.07	68.8	17.13±1.91	20.89±3.93

(2) 포트 재배: 가정내에서 싹채소 및 베이비채소로의 활용 가능성을 확인하고자 가정용 포트 재배를 실시하였다.



## 제2절 함초의 유효성분, 품질 분석 및 안전성시험

### 1. 함초 시료(MDC308) 수율

염생식물 이용한 고기능성 제품 개발을 위해 대표적인 염생식물인 함초를 선택하였고, 신안군의 함초를 구매하여 시료를 생산하였다. 함초를 이용한 고기능성 제품을 생산시의 원료 확보문제를 고려하여 시료 생산을 위해 신안군에서 판매되는 자연건조된 함초, 자연건조함초분말, 동결건조함초분말들을 구매하여 원료로 사용하였다.

함초 내 천연성분들을 추출하기 위해 EtOH추출과 물추출을 병행하여 시료를 생산하였다. 70% EtOH 추출은 48시간동안 실온 조건에서, 물추출은 고온, 가압(2.2기압, 118℃) 조건하에서 시료를 생산하였고, 생산된 시료의 수율을 아래표로 정리하였다.

표 6. 함초 시료 추출 수율 정리

시료명	수율	시료명	수율
건조함초 bench 물추출	26.4%	건조함초 70%EtOH	9.1%
건조함초 pilot 물추출	25.2%	자연건조함초분말 70%EtOH	28.3%
자연건조함초분말 pilot 물추출	27.5%	동결건조함초분말 70%EtOH	32.1%
동결건조함초분말 pilot 물추출	23%		

#### (1) 원료 차이에 따른 수율 비교

함초 원료 차이에 따른 수율을 비교한 결과 물추출의 경우 건조함초와 건조분말들 사이에 수율차가 크게 나타나지 않는데 비해 70%EtOH 추출의 경우 건조함초와 건조분말들 사이에 20% 이상의 수율 차이를 나타내었다. 또한 동결건조분말의 경우 물추출 시에는 다른 원료들에 비해 수율이 23%로 낮은데 비해 70%EtOH추출 시에는 32.1%로 가장 높은 수율을 나타내었다. 이는 함초의 건조방법에 따른 함초성분들의 차이로 판단된다. 이외에도 건조함초와 분말 함초 사이의 20% 이상의 수율차에는 용매에 대한 원료들의 접촉면적의 차이 역시 큰 영향을 미쳤을 것으로 판단된다.

#### (2) 추출조건에 따른 수율 비교

건조함초의 물추출 시료 생산시 추출 조건 중 압력과 온도의 조건을 변화시켜 시료를 생산하였고 이들의 수율을 비교하였다. 건조함초의 bench 추출조건은 126.1℃, 1.4기압, 1.4기압 하에서 1시간으로 고온의 조건인데 비해 pilot 추출조건은 118℃, 2.2기압, 2.2기압 하에서 1시간으로 고압의 조건을 사용하였다. 이들의 수율을 비교한 결과 bench 물추출의 수율은 26.4%, pilot 물추출의 수율은 25.2%로 수율차가 크지 않는 것으로 나타났다. 이를 통해 건조함초의 경우 추출조건 중 일정온도(118℃) 또는 일정압력(1.4기압, 20psi) 이상의 조건은 물추출 시료 생산 수율에 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다.



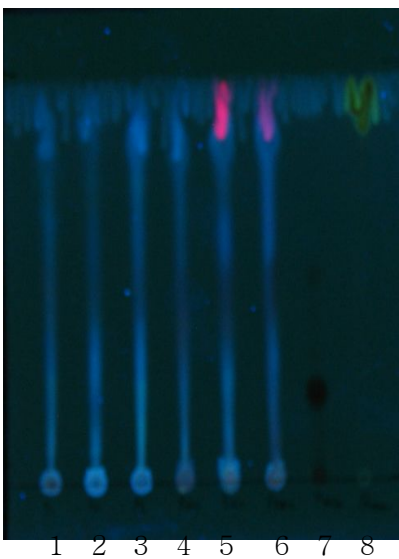
## 2. 함초 시료 분석

함초(통통마디, *Salicornia herbacea*)의 유효성분들은 flavonoid, triterpene 계통의 물질들과 asparagine, 세포질성 삼투물질인 betaine, proline 등의 아미노산, 그리고 uracil 등으로, flavonoid 계통 물질들로 quercetin, isorhamnetin-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside, flavonide glycosides 등이 알려져 있고, triterpene 계통 물질들로 sterol의 일종인  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol 등이 존재하는 것으로 알려졌다.

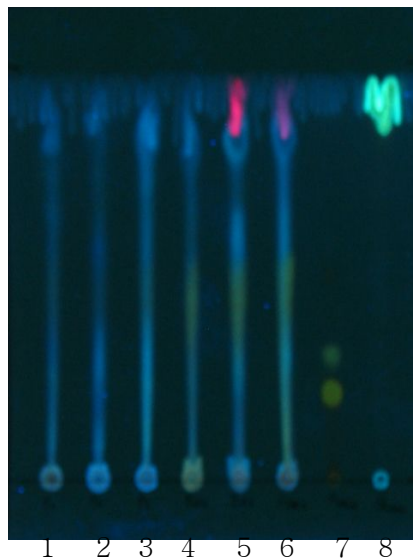
생산한 시료들에 함초의 알려진 유효성분을 존재여부 및 지표물질로 사용가능한 성분들을 확인하기 위하여 HPLC, TLC를 사용하여 시료들을 분석하였다.

### (1) 함초 추출시료 TLC 결과

1) flavonoid - 366nm



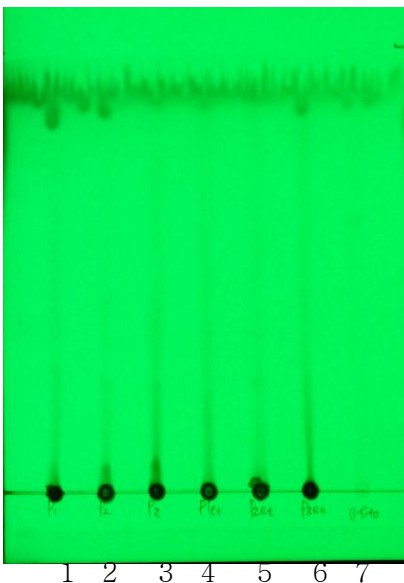
2) flavonoid spray - 366nm



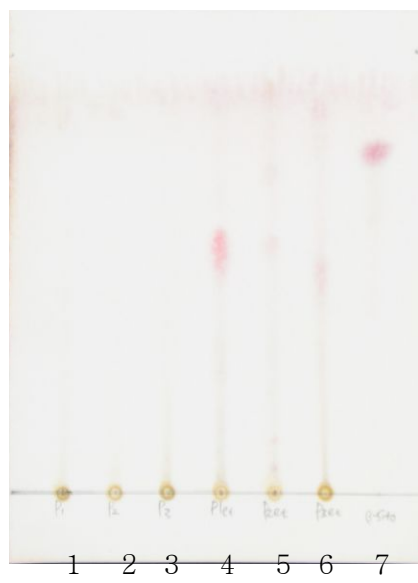
1. 건함물P
2. 자건함분물P
3. 동건함분물P
4. 건함70%EtOH
5. 자건함분70%EtOH
6. 동건함분70%EtOH
7. Rutin
8. Quercetin

flavonoid TLC 결과 시료 내 rutin과 quercetin이 존재하지 않는 것으로 나타났다.

3) Triterpene



4) triterpene spray



1. 건함물P
2. 자건함분물P
3. 동건함분물P
4. 건함70%EtOH
5. 자건함분70%EtOH
6. 동건함분70%EtOH
7.  $\beta$ -sitosterol

Triterpene 조건의 TLC 결과 시료 내  $\beta$ -sitosterol이 존재하지 않는 것으로 나타났다. 이러한 결과들은 시료 내 기존에 보고된 내용과 다른 결과들로, 이는 시료 내 존재하는 quercetin과  $\beta$ -sitosterol의 양이 TLC 상으로 확인하기에는 너무 적은양이기 때문으로 생각된다. 따라서 이를 확인하기 위해서는 시료들에 대한 전처리 과정을 통한 정제과정을 통해 주된 성분들을 농축한 후 TLC를 통한 정성 시험을 진행하여야 할 것으로 판단된다.

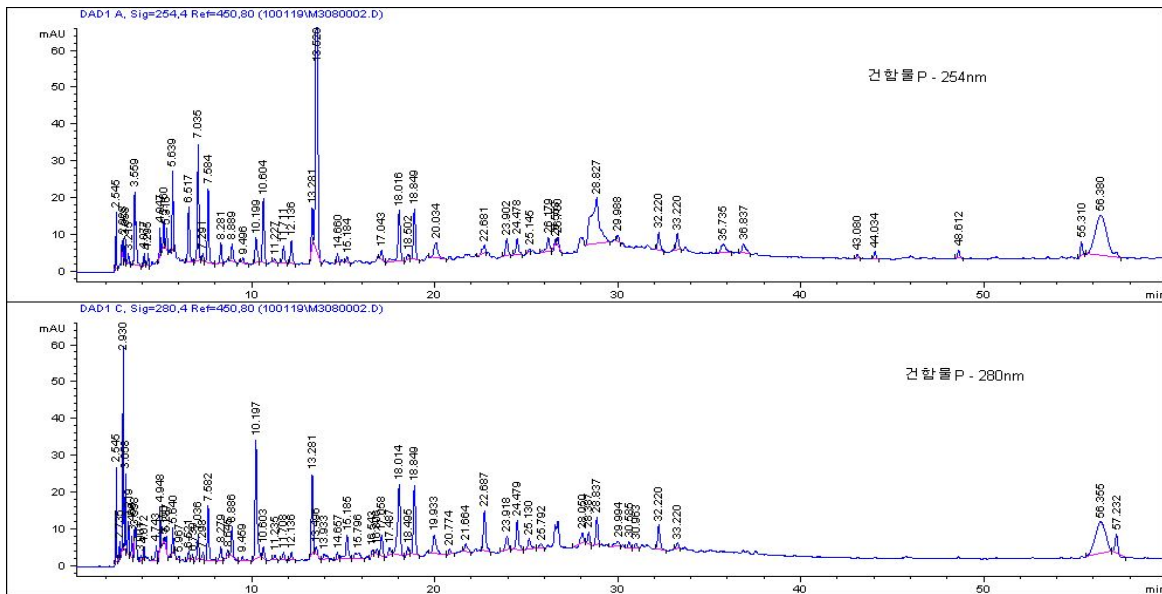
## (2) 함초 추출시료 HPLC 결과

### 1) Phenol 및 flavonoid HPLC 분석 조건

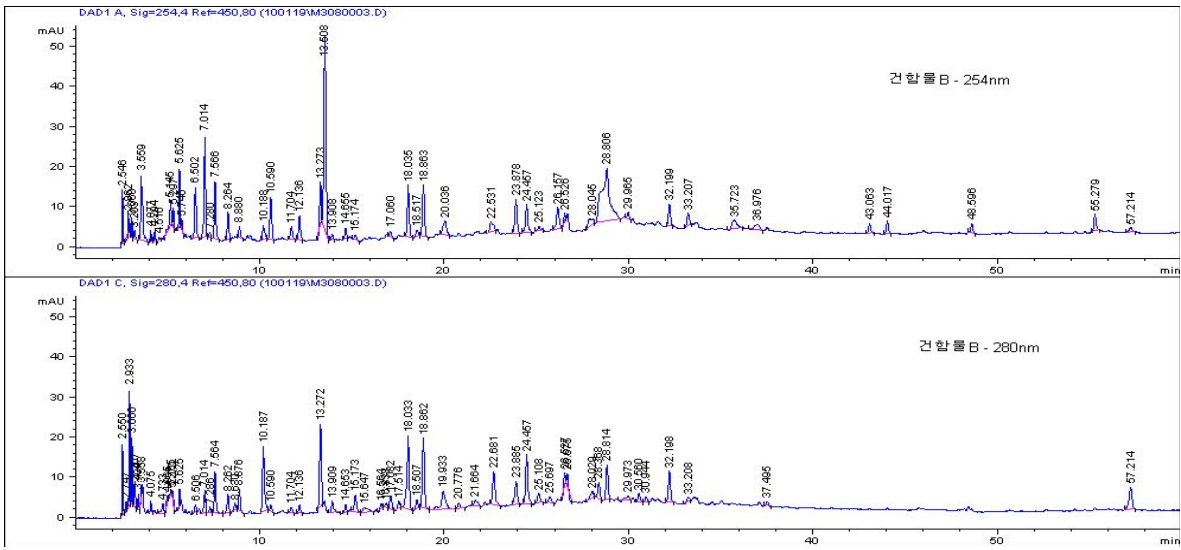
항 목	분 석 조 건
기기	Hewlett packard series II 1090 liquid chromatograph system
software	HP Chemstation
칼럼	Luna 5u C18; 4.6 mm i.d. × 250 mm L (Phenomenex)
이동상	2% 아세트산과 메탄올의 구배 시스템
유속	1 ml/min
검출	photodiode array detector로 254 nm, 280 nm에서 측정

### 2) 추출시료들의 chromatogram 정리

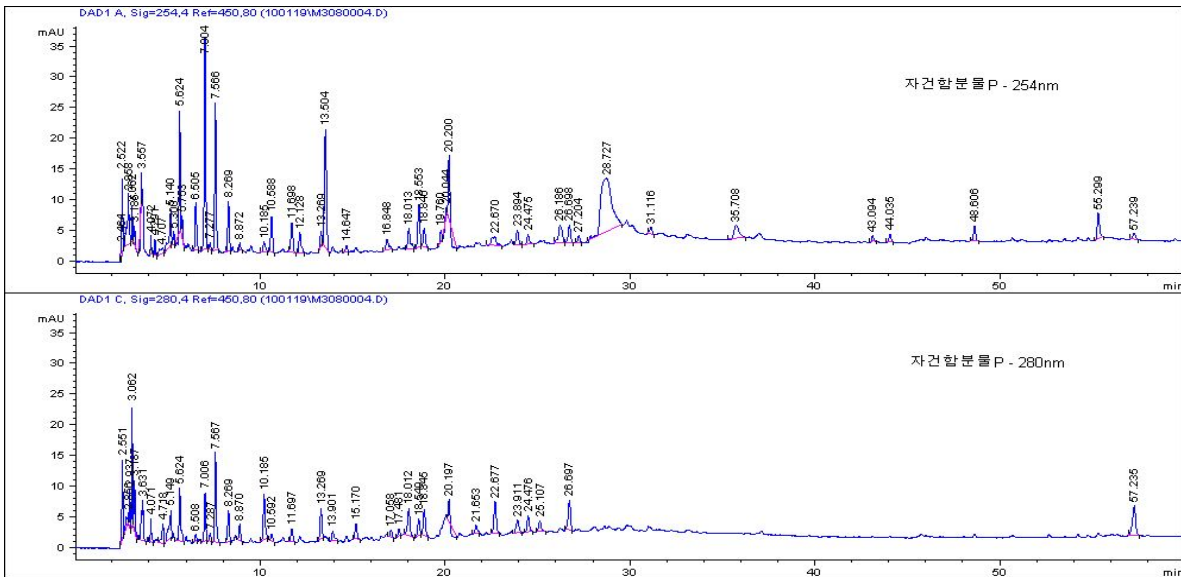
#### a. 건조함초 pilot 물추출 (20mg/ml in D.W.)



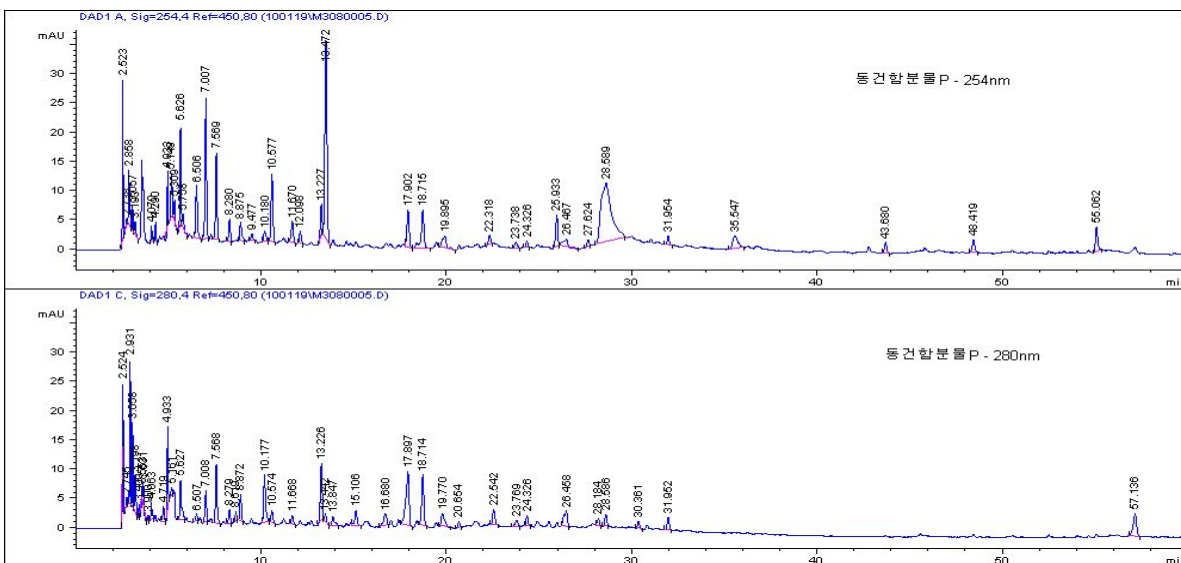
b. 건조함초 bench 물추출(20mg/ml in D.W.)



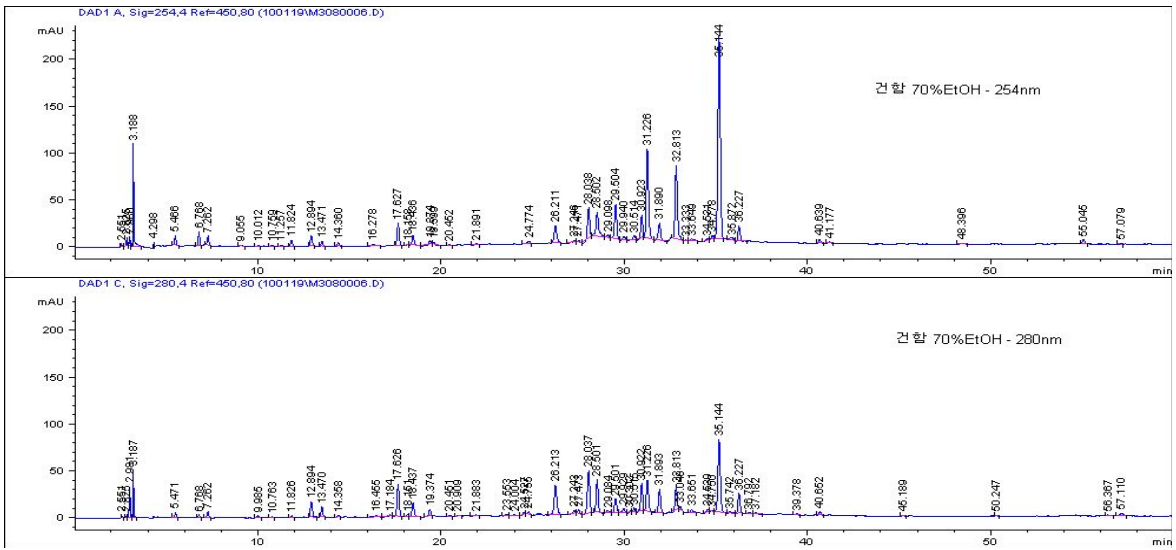
c. 자연건조함초분말 pilot 물추출(20mg/ml in D.W.)



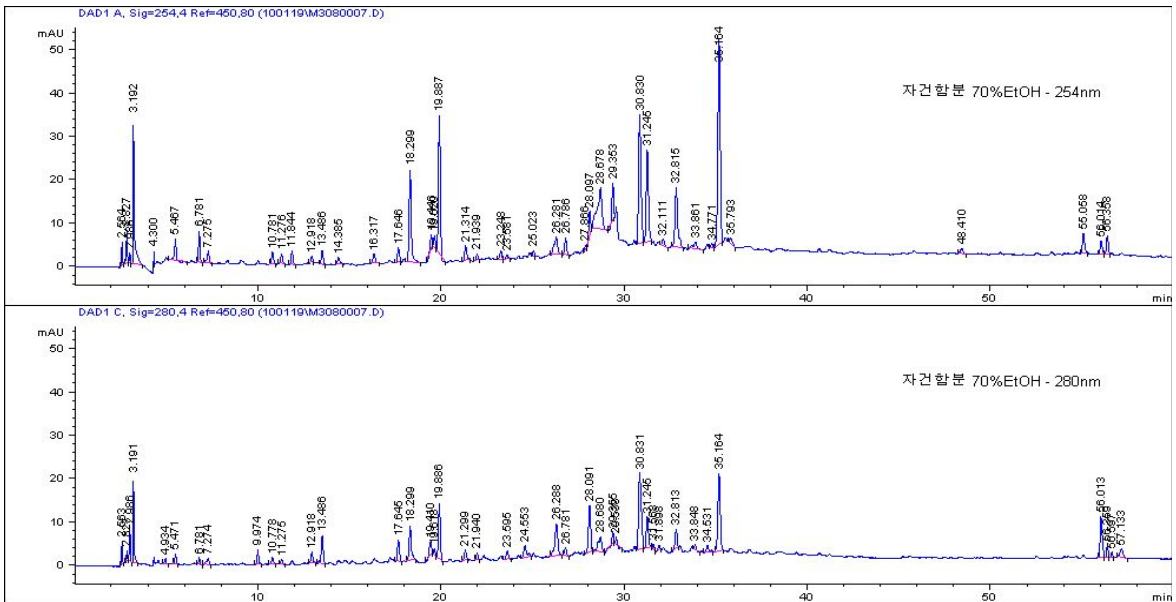
d. 동결건조함초분말 pilot 물추출(20mg/ml in D.W.)



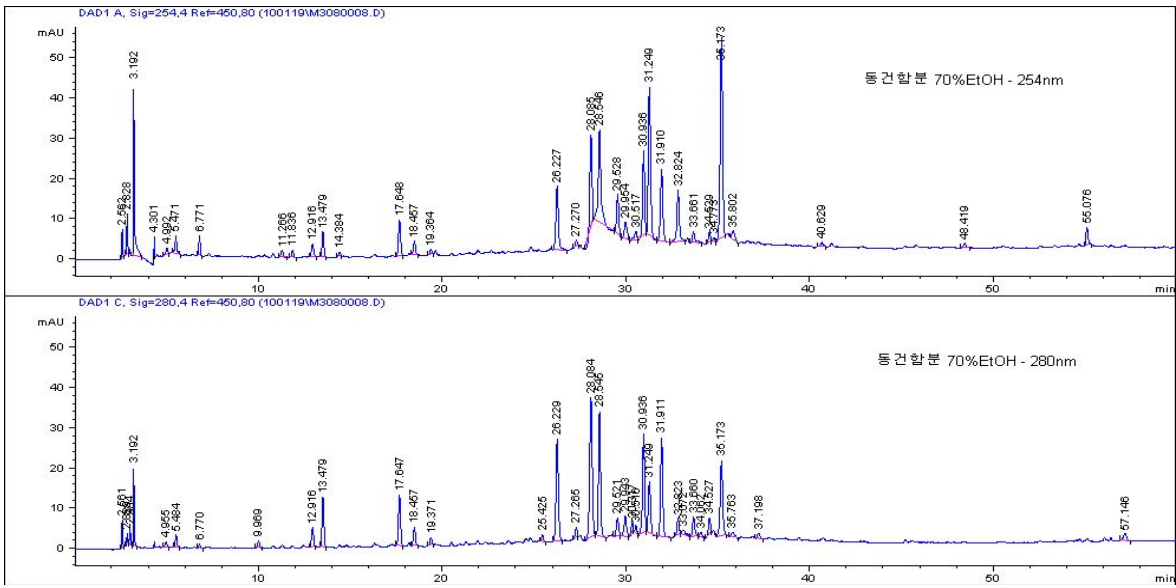
e. 건조합초 70%EtOH 추출(20mg/ml in 50% MeOH)



f. 자연건조합초분말 70%EtOH 추출(20mg/ml in 50% MeOH)



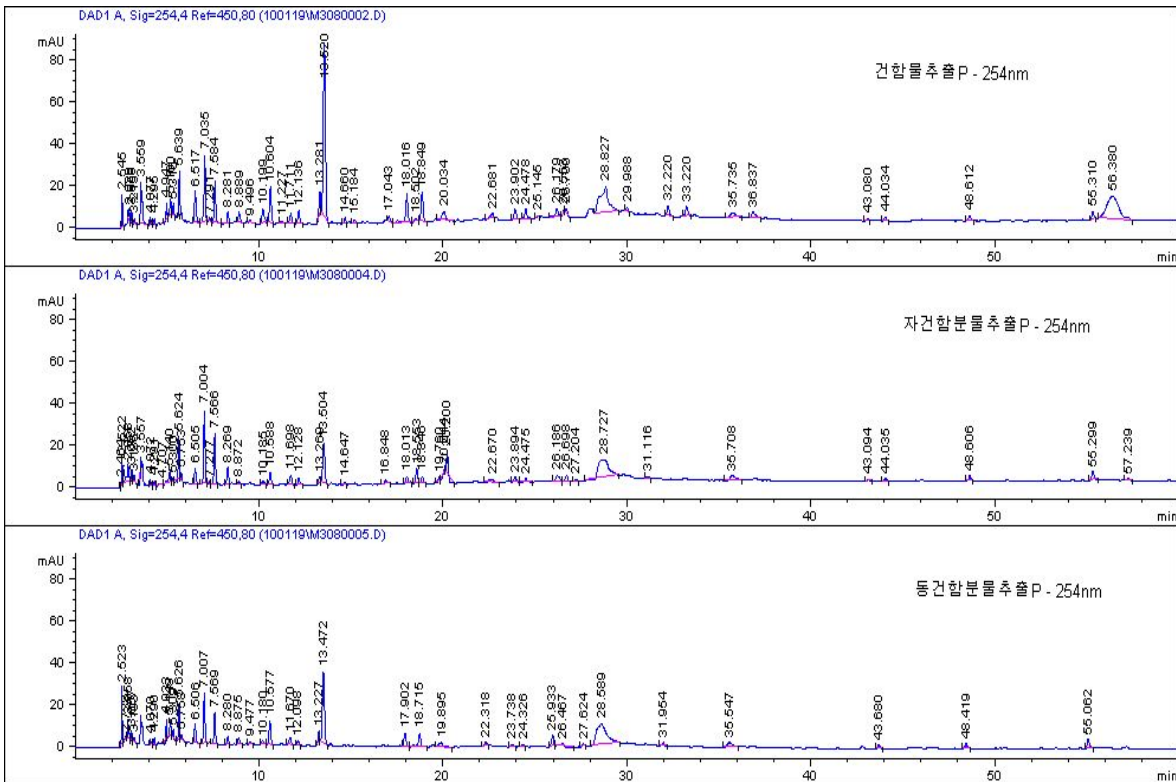
g. 동결건조합초분말 70%EtOH 추출(20mg/ml in 50% MeOH)



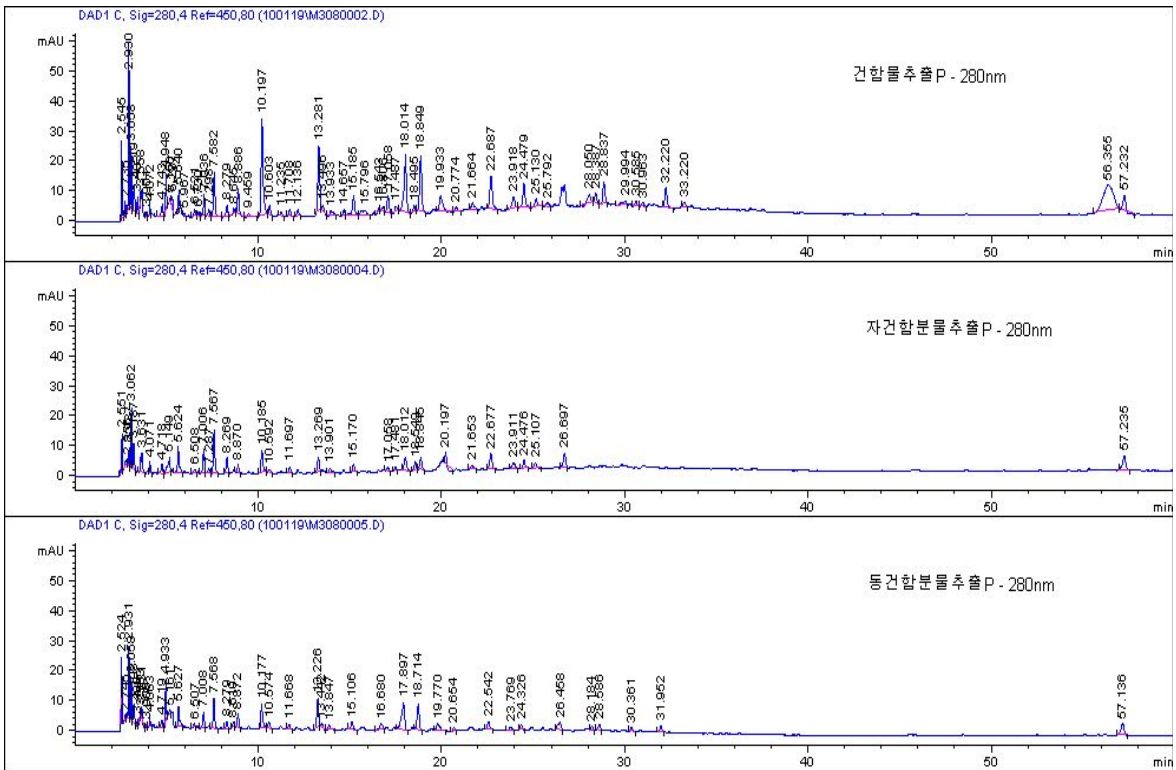
3) 합초 chromatogram 비교 분석

a. 추출원료에 따른 합초 시료들의 chromatogram 비교

i) 물추출 - 254nm

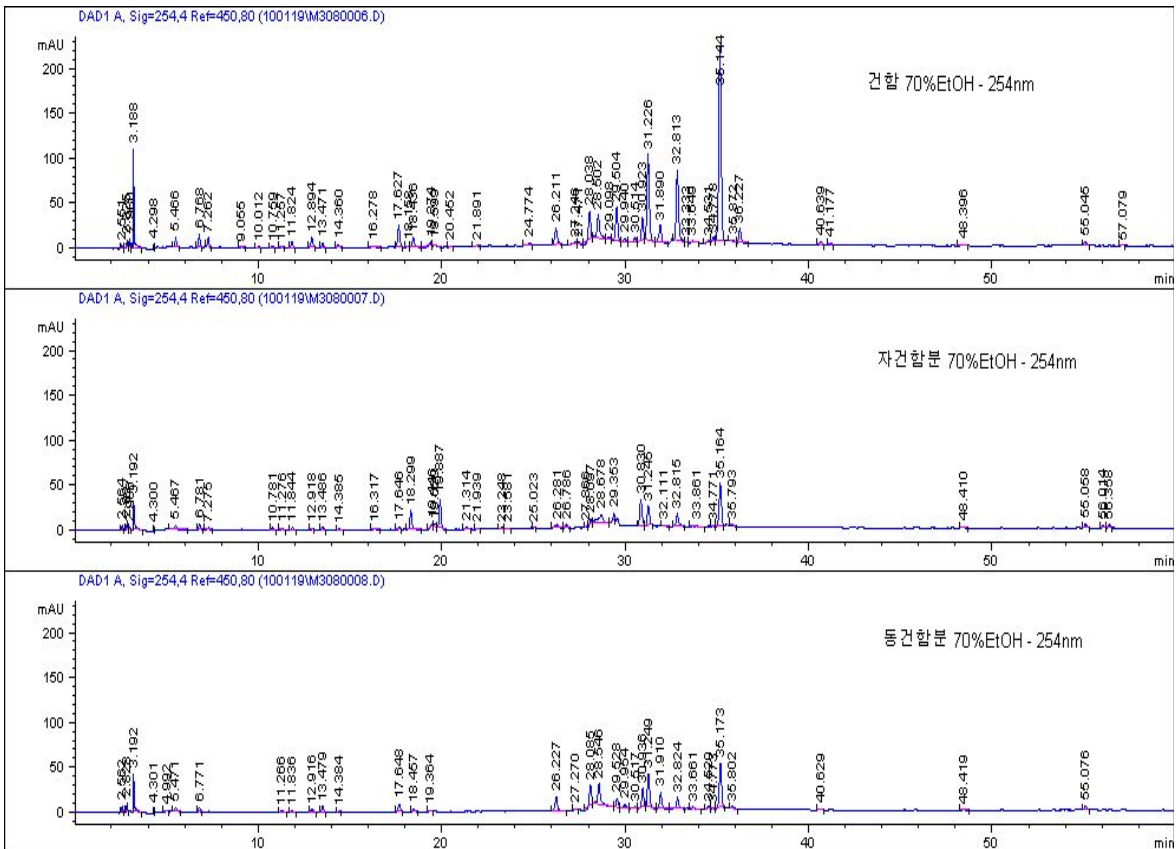


ii) 물추출 - 280nm

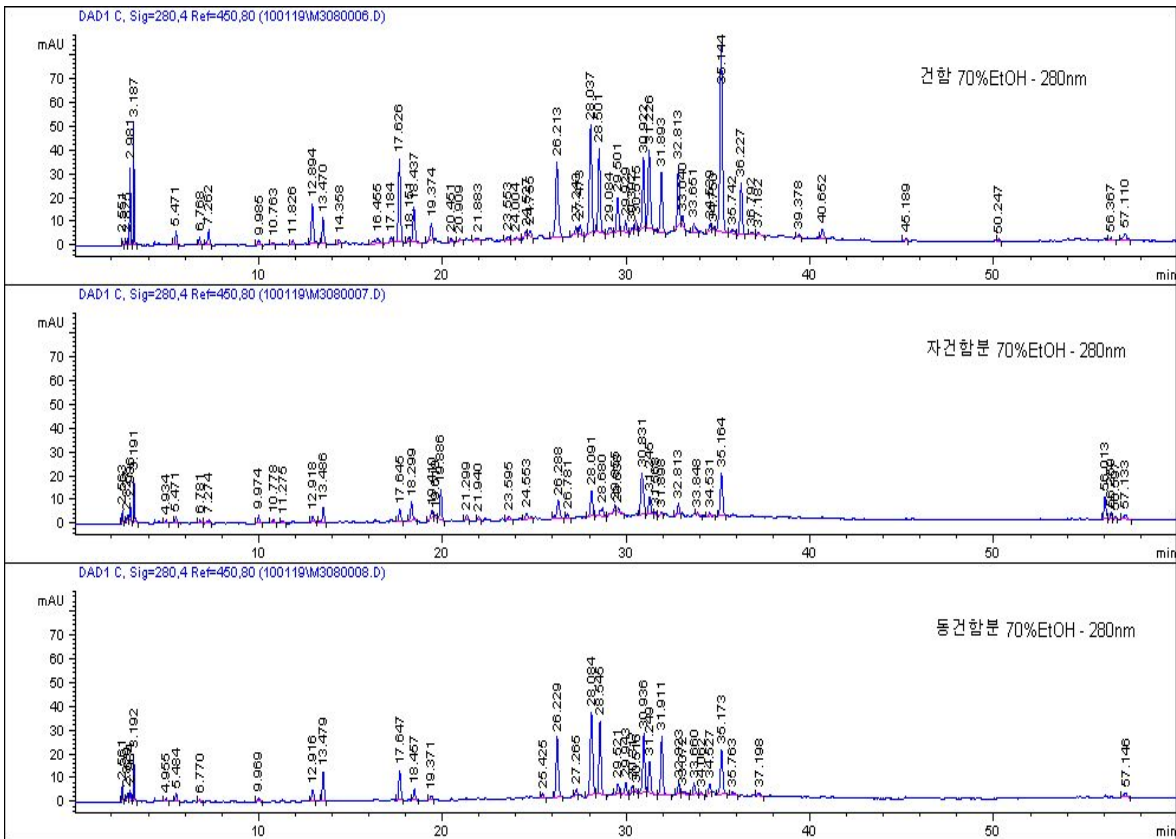


함초 원료 차이에 따른 물추출 시료들의 254, 280nm chromatogram들을 비교한 결과 peak pattern 상의 큰 차이점이 나타나지 않았으나 주된 peak들의 height값은 건조함초 pilot 물추출 시료가 가장 높은 값을 가진 것으로 나타났다.

iii) 70% EtOH 추출 - 254nm



iv) 70% EtOH 추출 - 280nm

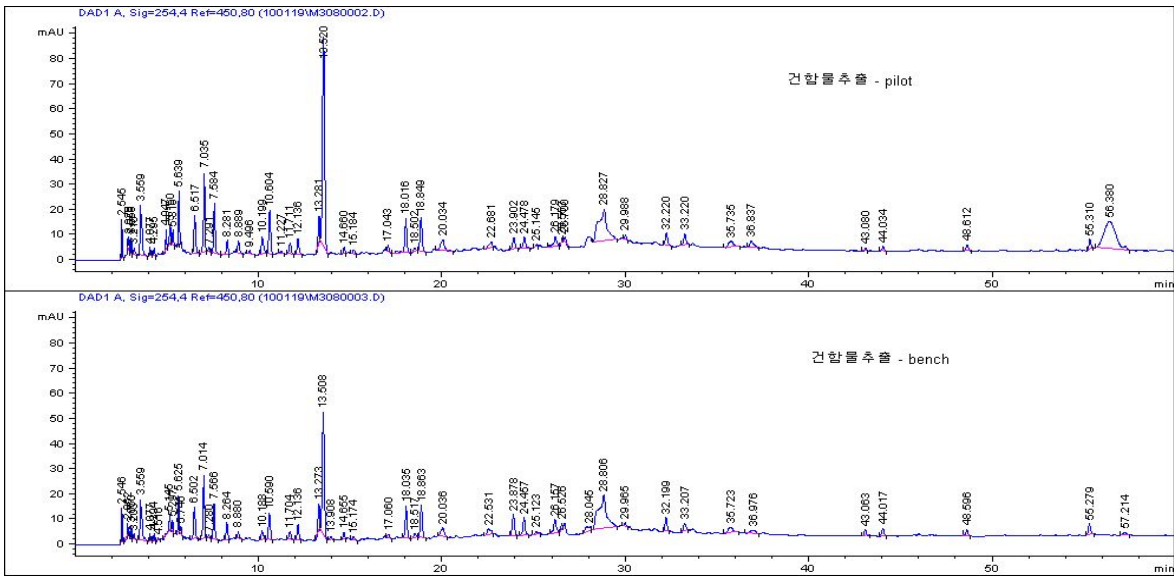


70% EtOH 추출방법으로 생산된 시료들 역시 물추출 시료들과 유사한 결과를 나타내었다. 이들 시료들의 주된 성분들은 RT 16 ~ 18min 사이의 peak들로 peak height값을 비교시 건조함초를 원료로 생산한 시료가 가장 높은 값을 가지는 것으로 나타났다. 즉, 시료들의 수율과 HPLC phenol 분석 chromatogram 결과만을 고려시 건조함초를 원료로 시료를 생산하는 것이 다른 원료들에 비해 시료 품질을 유지하며 생산 단가를 낮추는데 유리한 것으로 판단된다.

b. 추출조건에 따른 함초 물추출 시료들의 chromatogram 비교

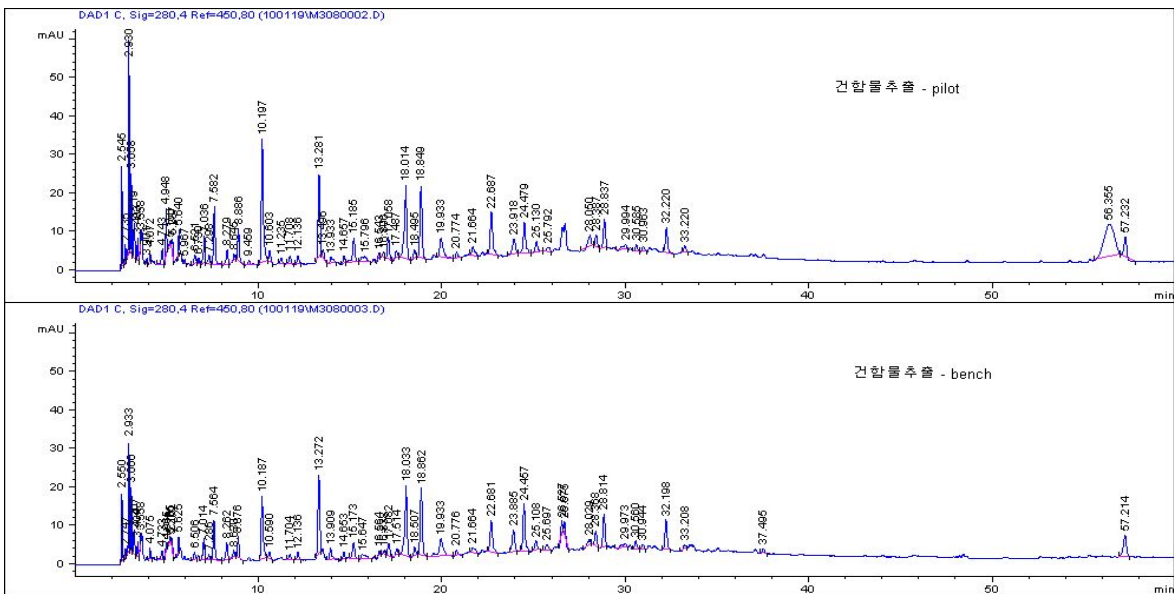
건조함초를 원료로 압력과 온도를 중심으로 변화를 주어 물시료들을 생산하였고, 생산된 시료들을 HPLC 분석을 통해 비교하였다. 건조함초의 bench 추출조건은 126.1℃, 1.4기압, 1.4기압 하에서 1시간으로 고온의 조건이고, pilot 추출조건은 118℃, 2.2기압, 2.2기압 하에서 1시간으로 고압의 조건으로 시료를 생산하였다.

i) 254nm



RT 56.4min의 peak를 제외하고 peak pattern 상의 큰 차이가 나타나지 않았으며, 수율의 결과와 같이 peak height 값은 pilot 시료가 bench 추출시료보다 높은 것으로 나타났다.

ii) 280nm



280nm chromatogram 역시 peak pattern 상에 큰 차이를 나타내지 않았다. 따라서 시료들의 수율과 HPLC phenol 분석 chromatogram을 판단기준으로 할 때 건조함초를 원료로 물추출 시료를 생산할 시에는 시료의 주된 peak들의 함량이 높고, 시료 생산 수율 역시 큰 차이를 나타내지 않는 pilot 추출 조건이 유리한 것으로 판단된다.



#### 4) 시료 내 표준물질 상대함량

HPLC phenol, flavonoid 분석조건하에서 peak RT값을 기준으로 시료 내 존재하는 표준물질들의 상대함량을 확인하여 정리하였다.

표 7. 함초 추출물 내 표준물질 상대함량

시료명	Rosmarinic acid	Chlorogenic acid	Mangiferin	Isorhamnetin	Hesperidin	Quercetin
건조함초P	X	6.86%	X	X	X	1.10%
건조함초B	X	8.58%	X	X	X	1.01%
자연건조함초분말P	X	3.97%	X	X	X	0.74%
동결건조함초분말P	X	10.14%	0.72%	X	0.89%	X
건조함초 70%EtOH	X	X	X	0.21%	X	X
자연건조함초분말 70%EtOH	0.46%	X	X	X	X	X
동결건조함초분말 70%EtOH	X	X	X	X	0.89%	X

함초 추출물 내 표준물질의 상대함량을 확인한 결과 chlorogenic acid는 물추출 시료들에서 상대함량이 높은 것으로 나타났는데 비해, quercetin은 동결건조함초P 물추출을 제외하고 소량 존재하여 상대함량이 1%이하인 것으로 나타났다. 이는 flavonoid TLC 결과와 유사한 결과로 이를 통해 물추출 시료 내 quercetin의 함량이 소량임을 재확인할 수 있었다.

동결건조함초분말P 물추출의 경우 quercetin이 존재하지 않는 것으로 나타났는데 이는 chromatogram 상에서 peak로 인지되는 area 값이하로 존재하기 때문이며, 다른 물추출 시료들보다 존재하는 표준물질이 많은 것으로 나타났다. 이는 함초원료 생산 방법 중 동결건조 방법이 가장 원료 성분 변화에 적은 영향을 주기 때문으로 판단된다.

70%EtOH 시료들의 표준물질 상대함량을 확인한 결과 확인된 표준물질들이 시료마다 다르고 상대함량 역시 매우 낮은 것으로 나타났다. 이는 chromatogram 상에서 peak pattern과는 다른 결과로 70%EtOH 시료들의 주된 peak들과는 달리 시료 생산 원료의 종류가 시료 내 미량 성분들이 영향을 미치는 요소로 작용한 것으로 판단된다.

시료 내 존재하는 것으로 추측되는 표준물질들을 기준으로 시료 전처리 과정과 spike test 시험을 통해 정확한 존재 유무를 확인하고 이들의 함량을 계산하여 지표물질 후보군을 설정할 예정이다.

### 3. 함초 시료의 영양성분 및 미량성분 분석

생산한 함초 시료들 중 생산량이 많은 건조함초 pilot 물추출 시료를 선정하여 영양성분과 미량성분을 분석하였다.

#### (1) 건조함초 pilot 물추출 시료의 영양소 분석

품질관리 기준 확립을 위해 추출물의 영양소를 한국식품연구원에 분석 의뢰하였다.

표 8. 건조함초 pilot 물추출 시료의 영양성분

	건조함초pilot 물추출
열량 (kcal/100g)	182
수분 (%)	3.5
지방 (%)	0.9
단백질 (%)	6.6
회분 (%)	52.2
탄수화물 (%)	36.8

영양성분 확인 결과 탄수화물 함량에 비해 회분함량이 52.2%로 매우 높은 것으로 나타났다. 반면에 열량은 182kcal/100g으로 낮은 수치를 나타내었다. 이는 건조함초 pilot 시료 내 식이 섬유 함유량 때문으로 판단되며, 이를 확인하기 위해서 시료 내 식이섬유량을 분석할 필요가 있다고 생각된다.

#### (2) 건조함초 pilot 물추출 시료의 미량성분 분석

품질관리 기준 확립을 위해 일반적인 무기이온 및 중금속의 함량 분석을 한국기초과학지원연구원에 의뢰하여 ICP-AES, MS 방법으로 분석하였다.

표 9. 건조함초 pilot 물추출 시료의 미량성분 및 중금속의 함량 (농도 : ppb)

	건조함초 pilot 물추출		건조함초 pilot 물추출
Cr	1579	Cd	256.91
Co	695.24	Ba	3477
Ni	5013.73	La	4.30
Cu	918	Ce	22.49
Zn	35966	Pb	359.85
As	482.88	U	1.13
Sr	65059		

식품 또는 건강기능식품의 중금속 기준인 총 10.0mg/kg 이하를 중심으로 건조함초 pilot 물추출 시료의 중금속 함량을 확인한 결과 As 0.48mg/kg, Pb 0.36mg/kg, Cd 0.26mg/kg으로 식품의 중금속 기준에 적합함을 확인할 수 있었다.

표 10. 건조함초 pilot 물추출 시료의 미량성분 함량

(농도 : ppm)

건조함초 pilot 물추출		건조함초 pilot 물추출	
Al	23.0	Mg	10530
Ca	1740	Mn	94.62
Fe	108.2	Na	181200
K	37650	P	5624

건조함초 pilot 물추출 시료의 미량성분 함량을 확인한 결과 Na 함량이 181200mg/kg, K 함량이 37650mg/kg으로 매우 높은 함량을 나타내었다. 이는 염생식물인 함초의 서식환경에 따른 영양으로 판단되며, 이외에도 Mg, P, Ca 등의 미량성분이 풍부하게 존재하는 것으로 확인되었다.

#### 4. 안전성 시험

##### (1) 함초 추출물(MDC308)의 단회투여독성시험 (보고서 첨부)

시험물질 MDC308의 단회 경구투여에 의한 독성을 조사하기 위하여 Sprague-Dawley(SD) 계통 랫드에 시험물질을 경구투여하였다. 각 군당 10마리(암수 각 5마리)에 0, 555, 1666 및 5000mg/kg 용량으로 단회 경구투여를 실시하였고, 14일간의 사망률, 일반증상, 체중변화를 관찰하고, 관찰종료 후 부검을 실시하여 육안적 소견을 관찰하였다. 시험 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 모든 시험군에서 사망동물은 발생하지 않았다.
2. 일반증상의 경우, 투여 후 모든 시험군에서 시험물질에 의한 변화는 관찰되지 않았다.
3. 체중변화의 경우, 모든 시험군에서 시험물질의 투여와 연관된 변화는 관찰되지 않았다.
4. 부검소견의 경우, 모든 시험군에서 시험물질의 투여와 연관된 변화는 관찰되지 않았다.

본 시험조건 하에서 시험물질 MDC308의 랫드에 대한 단회경구투여 시험결과, 시험물질에 의한 사망동물 및 일반증상에 있어서 특이적 변화가 관찰되지 않았으며, 체중변화 있어 시험물질의 투여와 연관된 변화가 관찰되지 않았다. 관찰기간 종료후 실시한 부검에서 특이 소견이 관찰되지 않았다.

사망동물이 관찰되지 않았기에 본 시험물질의 반수치사량(LD<sub>50</sub>)은 산출되지 않았으며, 최소치사량(MDL: Minimum Lethal Dose)은 암수 랫드에서 5000mg/kg 이상인 것으로 판단하였다.

##### (2) 함초추출물(MDC308)의 복귀돌연변이시험 (보고서 첨부)

복귀돌연변이시험: *Salmonella typhimurium* strains TA98, TA100, TA1535, TA1537 및

*Escherichia coli* strain WP2uvrA의 다섯 균주에 시험물질을 처리하였으며 S9 혼합물의 처리조건 및 비처리 조건에서 plate를 3개(triplicate)씩 사용하여 평판법으로 시험을 수행하였다.

그 결과, 시험물질은 S9 혼합물의 처리 조건에서 5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$ , S9 혼합물의 비처리 조건에서 5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$  농도로 처리하였을 때, S9 혼합물의 처리 조건과 비처리 조건에서 다섯 균주에 대하여 유전독성을 나타내는 복귀변이 콜로니수의 용량의존적인 증가가 관찰되지 않았다. 확인시험에서 시험물질을 동일한 농도로 처리하였을 때, S9 혼합물의 처리 조건과 비처리 조건에서 다섯 균주에 대하여 유전독성을 나타내는 복귀변이 콜로니수의 용량의존적인 증가가 관찰되지 않았다.

위의 시험에서, 멸균증류수를 처리한 음성대조군의 복귀변이 콜로니수는 정상범위내로 평가되었고, 양성대조물질 처리 균주에서는 S9 혼합물을 처리한 시험계와 처리하지 않은 시험계에서 모두 복귀돌연변이 콜로니수가 증가하여 뚜렷한 복귀돌연변이 양성반응을 나타냈다. 따라서, 본 시험의 민감도(sensitivity)와 S9 혼합물의 효과에 있어서 타당성이 입증되었다.

**결론:** 이상의 결과로부터 시험물질 염색체이상(함초)은 본 시험조건에서 박테리아 균주의 복귀돌연변이를 유발시키지 않는 물질로 평가되었다.

### (3) 함초추출물(MDC308)의 염색체이상시험 (보고서 첨부)

**세포독성시험 :** 염색체이상시험에서 사용할 시험물질의 처리 농도를 결정하기 위하여 세포독성시험을 실시하였다. 시험물질을 7 단계 농도로 처리하였고, S9 (랫드 간의 균질액 포함) 혼합물의 처리군과 비처리군으로 나누어 세포독성시험을 수행하였다. 그 결과, S9 혼합물 처리 조건하에서 시험물질을 78.1 ~ 5000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도 범위에서 7 단계로 단시간 처리하였을 때, 농도 78.1 ~ 5000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  까지 세포의 viability는 67.7%이상이나와 대사활성 존재하에서 염색체이상 본시험의 최고농도를 5000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 정하였다. S9 혼합물 비처리 조건 하에서 시험물질을 처리하였을 때에는 농도 78.1 ~ 2500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  까지 세포의 viability는 69.7%이상 나오고, 5000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 viability는 31%가 나와 대사활성 부재하에서 물질을 단시간 처리할 때 염색체이상 본시험의 최고농도를 2500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 정하였다. 또 연속처리 시 시험 물질을 농도 78.1 ~ 2500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  까지 세포의 viability는 67%이상 나오고, 5000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 세포의 viability는 11.1%가 나와 대사활성 부재하에서 물질을 연속처리할 때 염색체이상 본시험의 최고농도를 2500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 정하였다 (Fig. 1).

**염색체이상시험 :** 위의 최고 농도에서 공비 2로 각각 3단계의 농도를 사용하여 염색체이상시험을 수행하였다. S9 혼합물을 첨가한 대사활성 존재하에서와 첨가하지 않은 대사활성 부재하의 단시간처리군은 시험물질을 6시간 처리하고 신선한 배양액으로 교환하여 총 24시간을 배양하였다.

S9 혼합물을 첨가한 조건의 세농도 1250, 2500, 5000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 시험하였을 때, 염색체의 구조적 이상 빈도가 통계적(Fisher's exact test)으로 유의한 증가를 유발하지 않았다. (각  $P>0.05$ ) S9 혼합물을 첨가하지 않고 시험물질을 625, 1250, 2500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 단시간 처리하였을 때, 세농도에서 모두 통계적으로 유의한 증가를 유발하지 않았다. 그리고 S9 혼합물을 첨가하지 않고 시험물질을 24시간 연속 처리하였을 때는, 시험물질의 세농도 625, 1250, 2500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 모두 통계적으로 유의하게 염색체의 이상 빈도의 증가가 나타나지 않았다.

음성대조물질 처리에 의한 염색체이상 빈도는 시험적합성판정의 정상범위내로 관찰되었고, 양성대조물질인 cyclophosphamide monohydrate (S9 혼합물 처리시)와 mitomycin C (S9 혼합물 비처리시)는 각각의 조건에서 통계적으로 유의적인(각  $P<0.001$ ) 염색체이상을 유발하여 S9 혼합물의 유효성과 본 시험 시스템의 타당성이 입증되었다.

**결론** : 이상의 결과로부터 시험물질 염생식물(함초)는 본 시험조건 하에서 CHL 세포에 대한 염색체이상 유발 빈도가 통계적으로 유의한 증가를 보이지 않았다. 따라서 염생식물(함초)가 CHL 세포의 염색체이상을 유발하지 않는다고 판단된다.

#### (4) 함초추출물(MDC308)의 소핵시험 (보고서 첨부)

염생식물(함초)의 유전독성 평가를 위해 마우스에서 골수의 미성숙 적혈구 분석을 통해 시험물질에 의해 유발되는 염색체 또는 유사분열기관의 손상을 확인하였다. 본 시험에서는 약 8주령의 수컷 ICR 마우스를 각 군당 5마리씩 사용하였고, 최고농도는 고시의 한계농도인 2000 mg/kg 용량으로 하였다. 공비를 2로 하여 500, 1000, 2000 mg/kg의 3 용량으로 1일 1회씩 1일간 경구 투여하였다. 음성대조군에는 멸균증류수를 10 mL/kg의 투여액량으로 1회 경구 투여하였고, 양성대조군에는 Mitomycin C를 1 mg/kg 용량으로 1회 복강내 투여하였다. 시험물질, 음성대조물질, 양성대조물질을 최종 투여하고 약 24 시간 후에 골수세포를 수거하여 소핵유발빈도(MNPCE/2000PCE)와 다염성 적혈구 출현빈도를 평가하였다. 개체 당 2000 개의 다염성적혈구(PCE, Polychromatic Erythrocyte) 중 소핵을 가진 다염성적혈구(MNPCE, Micronucleated Polychromatic Erythrocyte)의 수를 계수한 결과, 모든 시험물질 투여군에서 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가가 관찰되지 않았으며, 총 적혈구 중 다염성적혈구 비율도 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 이상의 결과에 따라 염생식물(함초)는 본 시험조건 하에서 마우스 골수세포에 소핵을 유발하지 않는 것으로 평가되었다.

## 5. 함초추출물을 활용한 제품 개발

함초 추출물은 다양한 분야에 원료로 사용하는 것이 가능할 것으로 판단됨.

1. 건강기능식품의 원료 - 식품산업, 천연물활용 의료산업, 화장품산업의 원료로 사용가능.
2. 식품 첨가물로 사용가능
3. 섬유소 함유 음료로 개발 가능
4. 균형있는 어린이 이유식, 영양식으로 사용가능
5. 청소년의 편식, 성인병, 비만에 대한 대체식품으로 개발 가능 : 다이어트에 관심 있는 인구의 증가로 콜레스테롤 조절 성분을 이용하여 체중조절용 제품으로 개발
6. 고령화 사회에서 노인 건강식품 사용가능 : 항산화 성분을 이용하여 노화를 방지하는 제품으로 개발 가능함.

### <제품화 concept 제안 예시>

#### (1) 개발 제품 : 다이어트용 선식(파우더)

- 당사가 개발한 적고구마 함유 다이어트 제품에 첨가하여 다이어트 (선식)의 원료로 사용 가능
- 체중 감량을 위한 저열량 식사대체식 제품을 개발함

#### (2) 제품의 concept

- 건강한 다이어트: 최종 제품은 식사 대용식으로 개발하기 위해 영양소 균형을 고려하여 일 정열량(예> 한포당 150kcal)이 되도록 하고, 그 구성 성분은 5대 영양소가 골고루 포함 되도록 함

#### (3) 성분조성

- 1차적인 조성으로 시제품을 제작하고 관능검사를 통해 맛에 대해 모니터링하여 기호도를 측정하여 최종적인 제품의 맛에 반영되도록 하여 최종적인 조성 비율을 결정함.
- 제품의 맛은 오래 먹어도 질리지 않는 맛을 내도록 떡 맛에 가깝도록 구성하며 함초추출물을 첨가하여 맛을 조절함.

● 최종 제품의 성분 조성 예시

제품의 성분	함유량 (%)
혼합 곡류	30~40%
해조류(미역, 김, 다시마), 채소류(시금치, 당근)	10~20%
적고구마 분말	5~25%
결정 과당 및 식이섬유	10% 내외
비타민 및 무기질	4~5%

● < 파우더 > 열량을 조절하여 다이어트의 효과가 날 수 있도록 조성 (150 kcal 기준)

ITEM	다이어트 제품 (체중조절용제품)
QUANTITY	35g*30포, 1일 1회, 1회에 1포씩 섭취
복용방법	(정제수: 200ml에 35g을 녹여 섭취한다)

NO	품 명	함량 (%)	비고
1	대두분리단백	20	
2	자색고구마분말	10	
3	폴리텍스트로스	4	
4	함초추출분말	0.6	
5	율무분말	1.4	
6	밀분말	1.4	
7	알파현미분말	6.6	
8	검정콩분말	1.2	
9	무수포도당	13	
10	검정쌀분말	12	
11	보리분말	1.2	
12	알파전분	23	
13	7종유산균	0.2	
14	가르시니아캄보지아	0.1	
15	플락토올리고당	3.0	
16	차전자피분말	0.5	
17	다시마분말	0.2	
18	옥수수수염추출분말	0.1	
19	석류농축분말	0.2	
20	매실농축분말	0.1	
21	쌀단백분말	0.7	
22	비타민 A, B군, C, D	0.3	
23	무기질	0.2	
	합계	100	

#### (4) 간이 인체시험 계획 예시

- 1) 기간: 2개월
- 2) 대상 인원: 30명
- 3) 간이인체시험 대상자 모집
  - 1-2 차 교육 및 비만 측정(체중 및 허리둘레 측정)을 통하여 인체시험 대상자 선발
  - 비만 원인 파악설문 조사를 통해 평소 생활 습관 파악, 식품 섭취량을 조사하여 분석, 열량 소모량 분석

#### 4) 인체시험의 프로토콜작성

- 선정된 대상자를 대상으로 식이 섭취
- 시제품으로 제작된 파우더 섭취
- 다이어트 프로그램의 구성 : 에너지 요구량에 따른 체중감량 계획 수립
- 저지방 우유나 두유 혹은 물에 다이어트 제품 (함초추출 분말 포함)을 섞어 음용한다.
- 주1회 영양 교육 실시 : 비만의 문제점, 식품모형을 통한 식이 요법, 운동 요법 교육
- 신체계측 : 주1회 체중 측정, 주1회 허리 둘레 측정
- 식이 및 활동량 조사 : 주 3일간 식사일지 작성 후 Can program으로 열량 섭취, 탄수화물, 지방, 단백질 섭취 비율, 비타민 및 무기질 섭취량 분석, 매 주 운동일지 작성으로 열량 소비량 분석

#### (5) 제품 디자인

##### 1) 기획의도

- o 젊은 층에게 활력을 줄 수 있는 색깔을 선택하여 칼라마케팅 기획
- o 용기를 들고 먹을 때 용기 자체가 홍보가 될 수 있도록 기획

##### 2) 디자인의 장점

- o 1회용으로 사용.
- o 식품에 사용할 수 있는 재질로 제작하여 안전성을 높임.





### 제 3 절. 신선 염생식물의 저장 및 유통조건 확립

#### 1. 통통마디의 수확 후 생리활동 조사

가. 서 언

최근 들어 자원 식물의 이용이 증가하면서 그 동안 관심이 적었던 염생식물에 대한 관심이 커지고 있다. 이러한 염생식물 중에는 통통마디는 다량의 미네랄을 함유하고 있어 건조 가공 제품이 건강 보조제로 상품화되기도 하였으며, 어린 가지는 나물 등의 식용으로 이용되고 있다. 통통마디는 우리나라 서해안과 울릉도의 바닷물이 닿는 바닷가에서 자라는 1년 초로서 높이가 10~30cm이며 원줄기는 짙은 녹색으로 뚜렷한 마디가 많고 활으면 짠맛이 난다. 전체가 녹색이나 가을이 되면 홍자색으로 변한다(Lee, 2003). 통통마디는 수분 함량이 95% 수준으로 높고 조직이 연하여 상온에서 7일정도 밖에 저장하지 못한다(Lu 등, 2009). 따라서 저온 유통 체계가 요구된다고 하겠다. 그러나 통통마디의 수확 후 생리에 대한 연구가 부족하여 적합한 저장 유통 조건이 제시된 바 없으며, 특히 저온 관리시 위험이 되는 저온 장해에 대한 보고가 없었다. 기존의 염생식물이나 해조류에 대한 연구로는 신선 상태의 Red macro-algae (*Gracilariaspp.*)(Paull과 Chen, 2008)과 *Salicornia bigelovii* (Lu 등, 2009) 등을 대상을 한 MA저장 연구결과가 보고되고 있었으나 염생식물의 저온장해에 대한 보고는 없었으며, Kang 등 (2009)이 통통마디의 MA저장중 저온장해로 보이는 증상이 발생하였다는 보고만 있었다.

이에 신선상태로 이용되어 저온 유통 체계가 요구되는 통통마디의 수확 후 생리와 저온 장해 증상을 파악하고자 본 연구를 수행하였다.

나. 재료 및 방법

전남 신안군에서 2009년 8월 초순에 채취한 통통마디를 재료로 하여 2℃, 5℃, 10℃, 그리고 25℃에서 호흡률과 에틸렌 발생률 그리고 이온 용출량을 측정하였다. 또한 수분 손실만 최소화하고 MA효과를 최소화하기 위해 wrap으로 포장하여 역시 2℃, 5℃, 10℃, 그리고 25℃에서 저장하였다. 온도별 호흡률과 저장 중 포장재 내 이산화탄소 및 산소 농도는 infrared sensor(checkmate, PMB, Demark)로 측정하였다. 온도별 에틸렌 발생률과 저장 중 포장재 내 에틸렌 농도는 gas chromatography(GC-2010, Shimadzu, Japan) (Kang과Park, 2000)로 측정하였다. 호흡률과 발생률은 밀폐용기 내 4시간동안 정치한 후 측정하였고, 포장재 내 농도는 포장재 외부에 실리콘을 접착시켜 측정기의 바늘을 수차례 관통하여도 가스누출이 없게 처리한 후 infrared sensor와 gas chromatography로 측정하였다. 저온장해 정도는 지표가 되는 전해질 용출량을 electric conductivity meter (SG3,Mettler-Toledo,Switzerland)로 측정하여, 전체 전해질 용출량에 대해 4시간동안 용출된 전해질량을 %로 나타내었다(Kang 등, 2002).

모든 실험은 4반복으로 진행하였으며 Microsoft Excel 2002 program을 사용하여 평균과의 차이를 나타낸 표준 편차를 얻었다.

다. 결과 및 고찰

통통마디의 온도별 호흡률과 에틸렌 발생률은 일반 원예작물처럼 온도가 증가함에 따라 증가하였다(Fig. 1). 온도와 호흡률의 간의 회귀식은  $\text{호흡률} = 1.8534 e^{0.1249 \times \text{온도}}$ 이었으며, 상관계수( $r$ ) = 0.9786으로 5% 유의수준에서 상관관계가 있었다. 이 회귀식으로 구한 통통마디의 호흡  $Q_{10}$ 값은 5°C에서 15°C까지는 2.24, 15°C에서 25°C까지는 2.50으로 일반 원예작물의  $Q_{10}$ 값에 준하였다(Lee 등, 1996). 온도와 에틸렌 발생률 간의 회귀식은  $\text{에틸렌 발생률} = 3.4145 e^{0.133 \times \text{온도}}$ 이었으며, 상관계수( $r$ ) = 0.9778로 5% 유의수준에서 상관관계가 있었다. 이 회귀식으로 계산한 에틸렌 발생  $Q_{10}$ 값은 5°C에서 15°C까지는 2.57, 15°C에서 25°C까지는  $Q_{10}$ 값은 2.80으로 일반 원예작물의  $Q_{10}$ 값에 준하였다(Lee 등, 1996). 호흡률과 에틸렌 발생률의  $Q_{10}$ 값이 5°C에서 15°C로 증가할 때보다 15°C에서 25°C로 증가할 때 각각 11%와 9%의 증가를 보이면서 원예작물의  $Q_{10}$ 값 변화 양상과 같았다. 통통마디의 저온장해 증상을 파악하기 위해 2°C와 10°C에서 7일간격으로 28일까지 조사한 전해질 용출량을 보면 7일부터 두 저장온도가 차이가 나타났으며 14일부터는 그 차이에 통계적 유의성이 나타나 2°C의 저온에서 저온장해가 발생함을 알 수 있었다(Fig. 2).

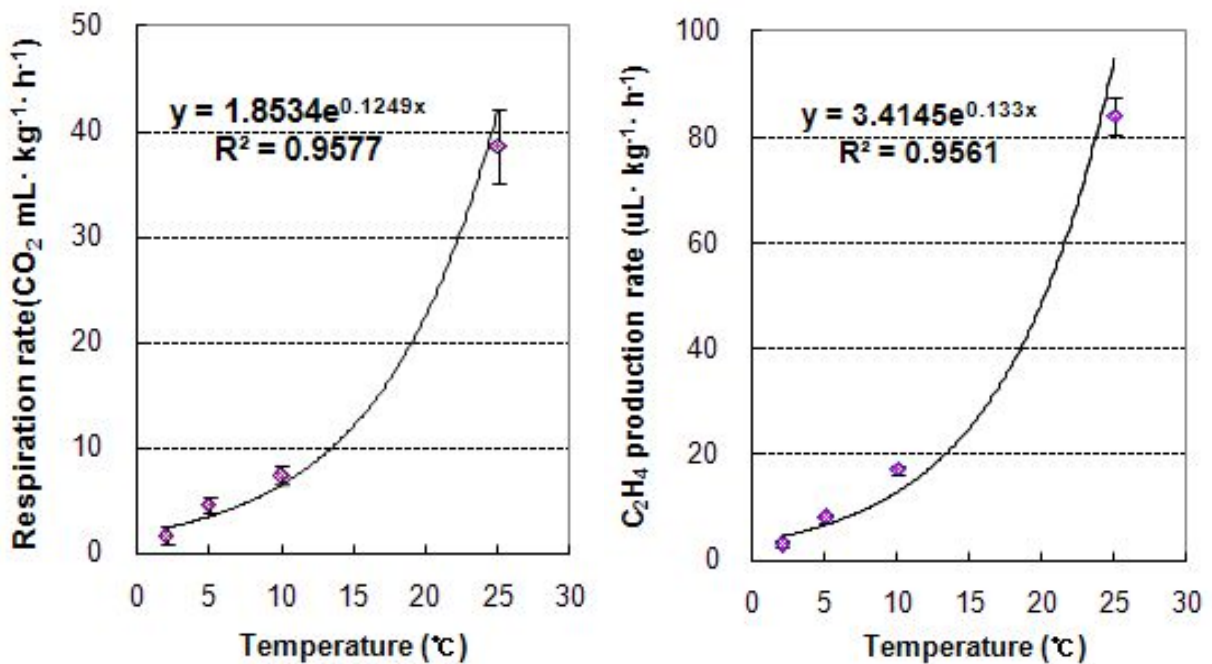


Fig. 1. Ethylene production rate and respiration rate of *Salicornia herbacea* L. at 2°C, 5°C, 10°C, and 25°C. Vertical bars presented  $\pm$ SD of means(n=6).

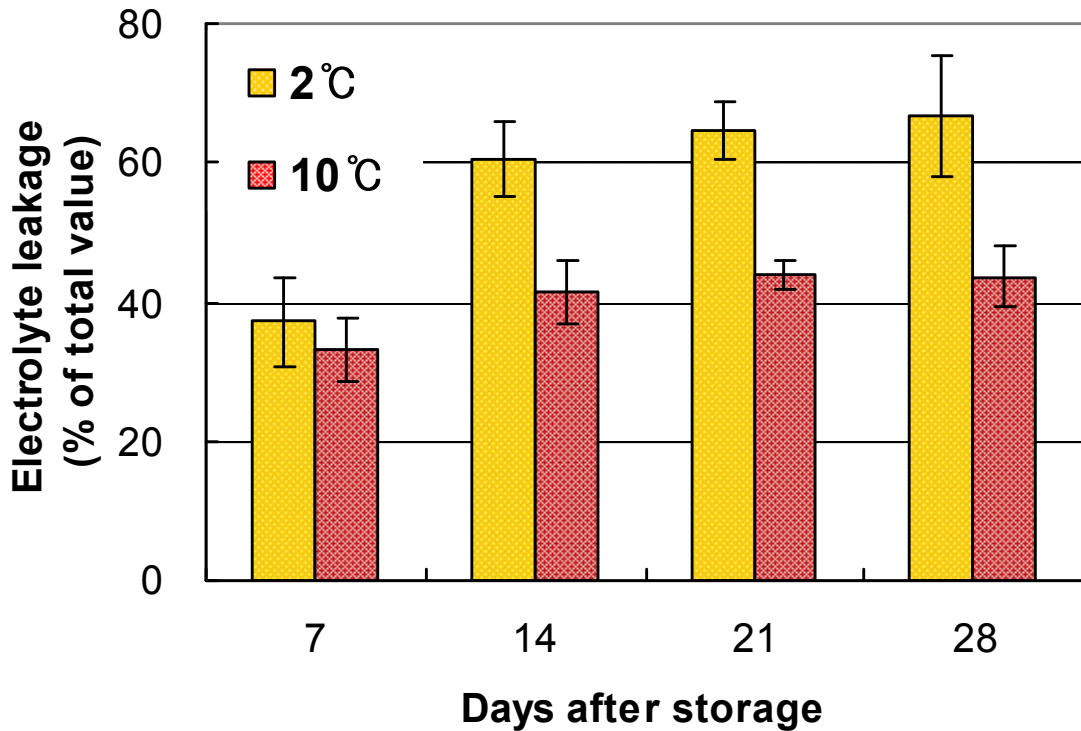


Fig. 2. Electrolyte leakage of *Salicornia herbacea* L. stored for 7, 14, 21, and 28 days at 2°C and 10°C. Vertical bars presented  $\pm$ SD of means(n=6).

저장온도별 생체중 감소율은 저장온도가 높을수록 커지는 양상이었는데, 특히 25°C의 경우 7일만에 4%의 감소율을 보이면서 저장을 종료하게 하였다. 저장온도간 비교에서 10°C이하는 28일까지 3%미만의 감소를 보이면서 생체중 감소에 따른 품질저하는 없었던 것으로 생각된다 (Fig. 3). 원예작물 중 조식이 연하여 생체중 감소에 의한 품질저하가 가장 큰 싹채소의 경우도 3% 이하에서는 품질저하가 없었다고 한다(Kang 등, 2008). 특이하게 저장온도간 비교에서 저장 14일 이후부터 2°C저장이 5°C저장보다 높은 감소율을 보였는데 이는 2°C에서 저온장해 증상이 심했기 때문이라 생각된다. 수분함량이 95%이상이나 되는 통통마디의 경우 저온장해로 조직 밖으로 전해질의 용출이 증가하였고(Lyons, 1973), 본 실험에서 사용한 포장재가 수분투과성이 매우 높은 wrap이었던 관계로 조직 밖으로 누출된 수분이 포장재 밖으로 투과되면서 생체중 감소를 초래했던 것으로 생각된다. 참외에서도 저온장해를 입을 경우 생체중 감소가 증가한다고 하였는데(Kang 등, 2005) 앞서 설명한 전해질 용출량에서도 2°C와 10°C의 차이에 통계적 유의성이 14일부터 나타나 2°C의 높은 생체중 감소가 저온장해의 결과라는 결론을 얻을 수 있었다.

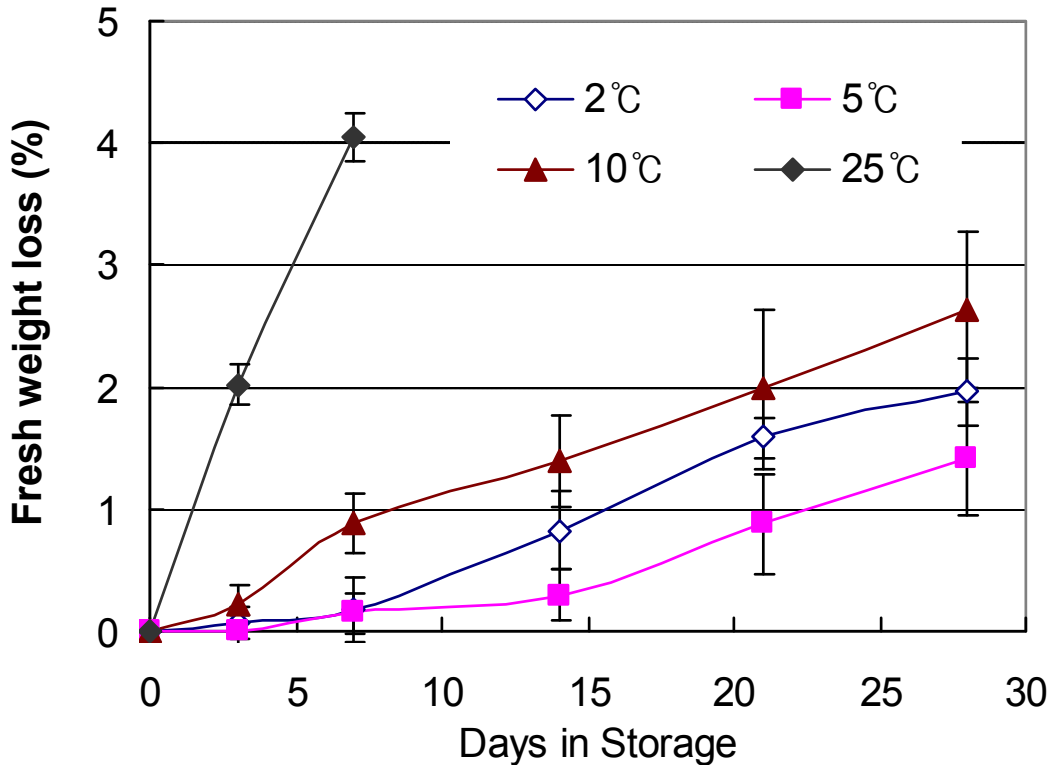


Fig. 3. Change of fresh weight of *Salicornia herbacea* L. packed with wrap and stored at 2°C, 5°C, 10°C, and 25°C. Vertical bars presented  $\pm$ SD of means(n=6).

포장재 내 산소농도의 경우는 예외 없이 저장온도가 높아질수록 낮아지는 결과를 나타내었으며, 가스 투과성이 높은 wrap으로 포장하여 10°C이하에서는 19%보다 높은 농도를 보였다 (Fig. 4). 이산화탄소는 산소농도와 반대로 저장온도가 높아질수록 높아졌는데, 저온장해 증상이 컸을 것이라 예상되는 2°C저장에서 7일째 급격히 높아져 10°C와 같은 수준까지 증가하였다 (Fig. 5).

여러 원예작물이 저온장해로 인한 이산화탄소 발생 증가가 보고된 바 있다(Kang 등, 1999; Kang 등, 2002; Kang 등, 2005). 저장중 포장재 내 에틸렌 농도는 역동적인 변화를 보였는데, 2°C저장에서는 저장 3일째에 5°C저장은 14일째 급격히 증가하였다가 차츰 감소하였다(Fig. 6). 이 또한 저온장해 증상이라 생각되는데, 저온장해로 에틸렌 발생이 증가한다는 보고가 토마토 (Cheng과 Shewfelt, 1988; Autio와 Bramlage, 1986), 고추(Lee와 Yang, 1997), 호박(Lee와 Yang, 1998), 오이(Kang 등, 2002), 참외(Kang 등, 2005) 등에서 있었다.

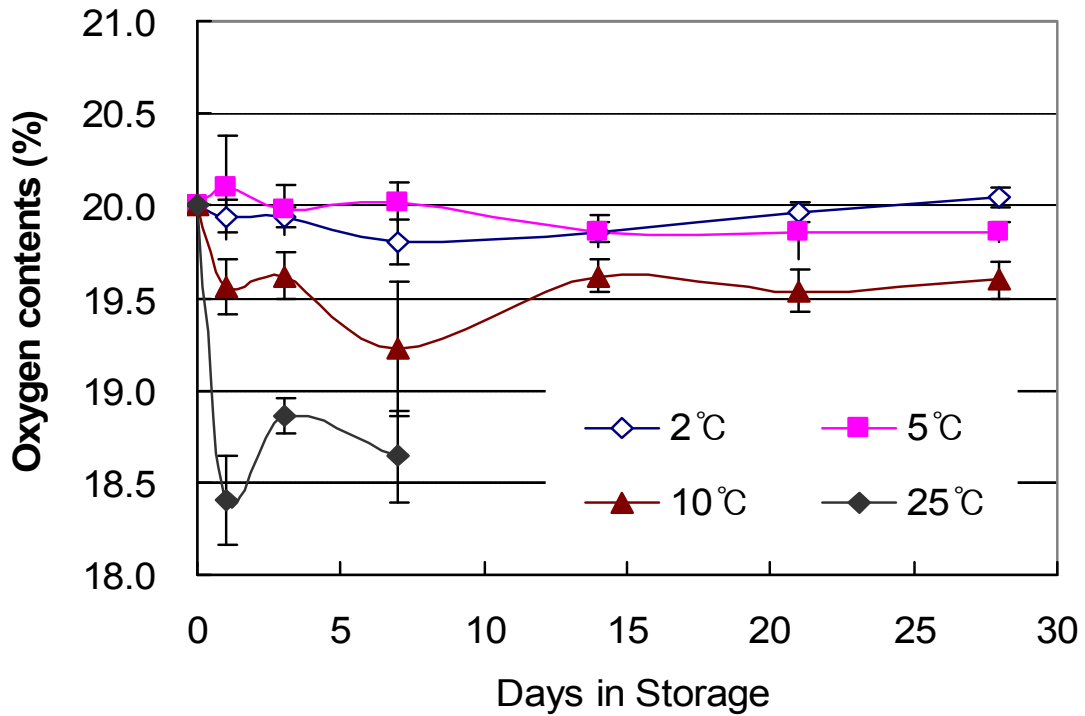


Fig. 4. Change of oxygen contents in wrap package with *Salicornia herbacea* L. stored at 2°C, 5°C, 10°C, and 25°C. Vertical bars presented  $\pm$ SD of means(n=6).

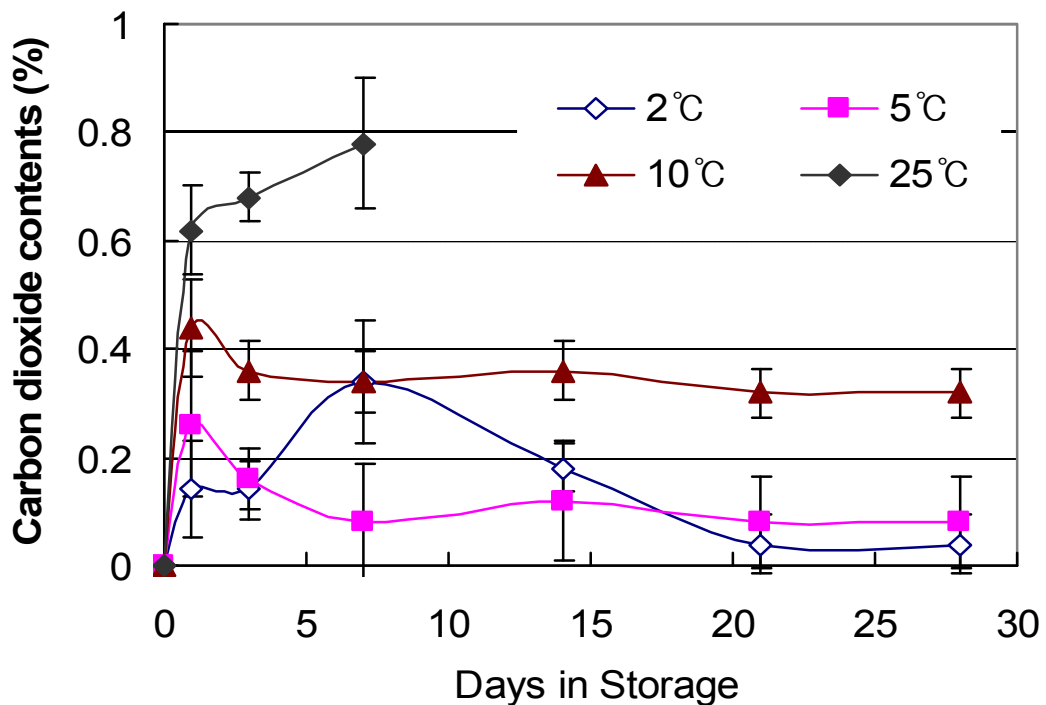


Fig. 5. Change of carbon dioxide contents in wrap package with *Salicornia herbacea* L. stored at 2°C, 5°C, 10°C, and 25°C. Vertical bars presented  $\pm$ SD of means(n=6).

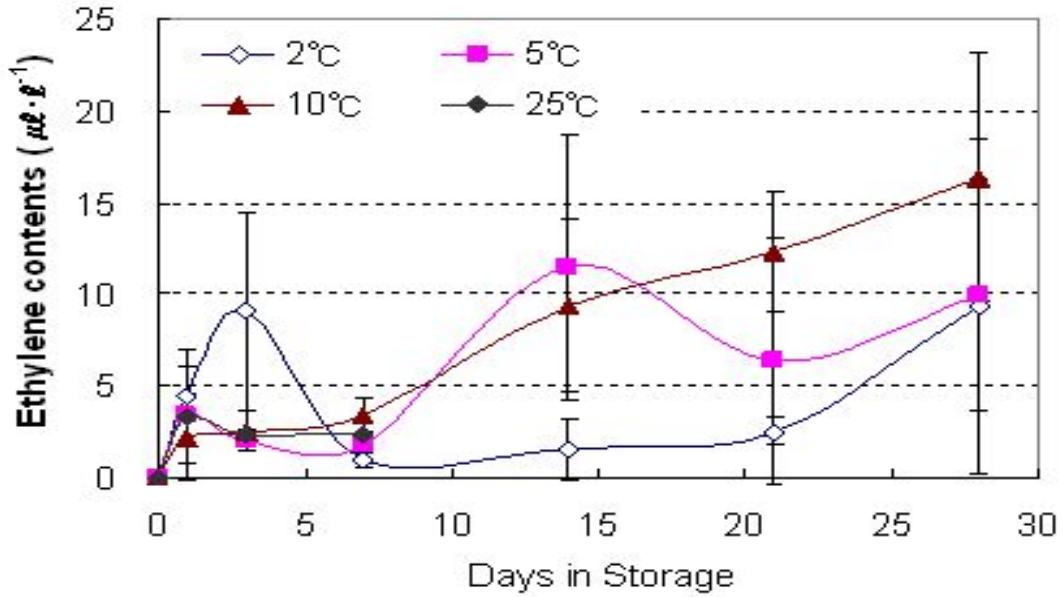


Fig. 6. Change of ethylene contents in wrap package with *Salicornia herbacea* L. stored at 2°C, 5°C, 10°C, and 25°C. Vertical bars presented SD of means(n=6).

저장 중 외관상 품질은 5°C저장에서 가장 높게 유지되었으며, 2°C는 10°C와 유사한 수준을 보이면서 20일 이전 상품성을 잃었다(Fig. 7). 통통마디의 저장수명은 5°C는 27일, 10°C가 15일인데 반해 2°C에서는 18일이 머물러 2°C에서 저온장해가 발생한 것으로 생각된다. 일반적으로 저온장해가 없는 작물은 저장온도가 높을수록 저장수명이 길어지지만(Wang, 1989), 오이나 참외 등은 저온장해가 나타나는 작물들은 오히려 저온에서 저장수명이 단축되었다고 한다(Kang 등, 2002; Kang 등, 2005).

저장 28일째 조사한 이취와 부패율도 5°C 저장에서 모두 가장 낮은 수준이었는데, 저장수명이 3일 더 길었던 2°C 저장이 10°C보다 더 높은 수준을 보여, 저온장해의 결과라 생각된다(Fig. 8). 기존의 보고에서도 저온장해를 입은 식물은 이취, 조직붕괴, 그리고 병원균의 침입 등이 발생하게 되며, 이로 인해 저장성이 저하된다고 하였다(Saltveit와 Morris, 1990; Wang, 1982).

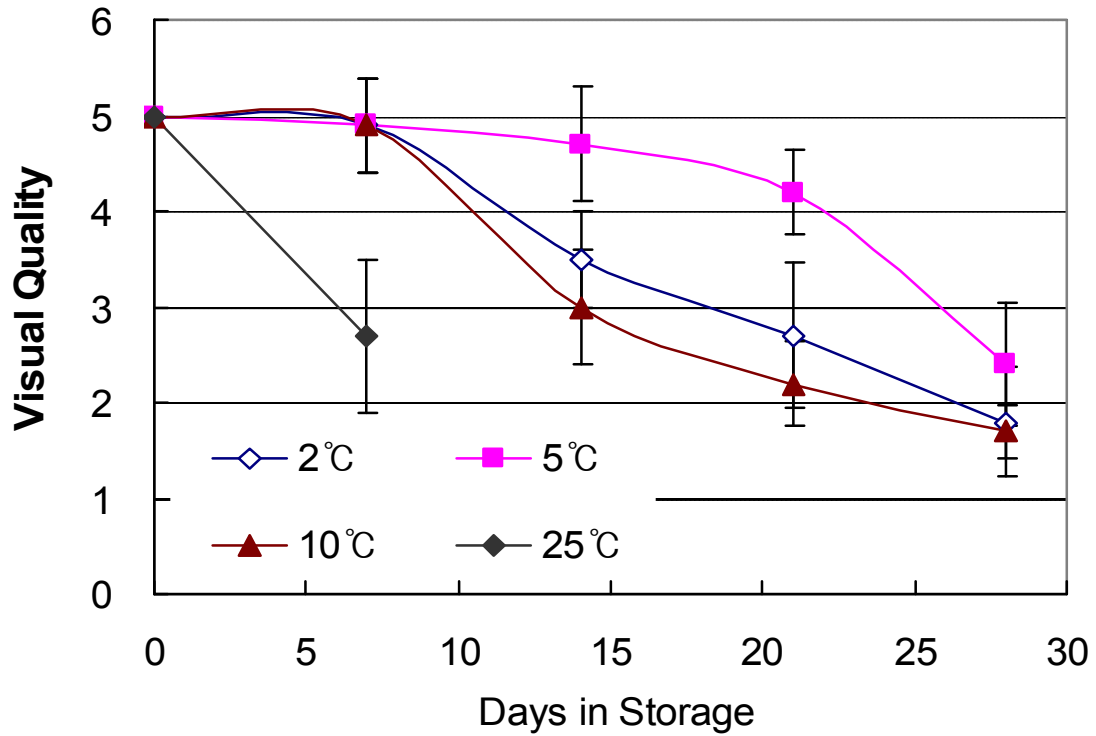


Fig. 7. Change of visual quality of *Salicornia herbacea* L. packed with wrap and stored at 2°C, 5°C, 10°C, and 25°C. Vertical bars presented  $\pm$ SD of means(n=6).

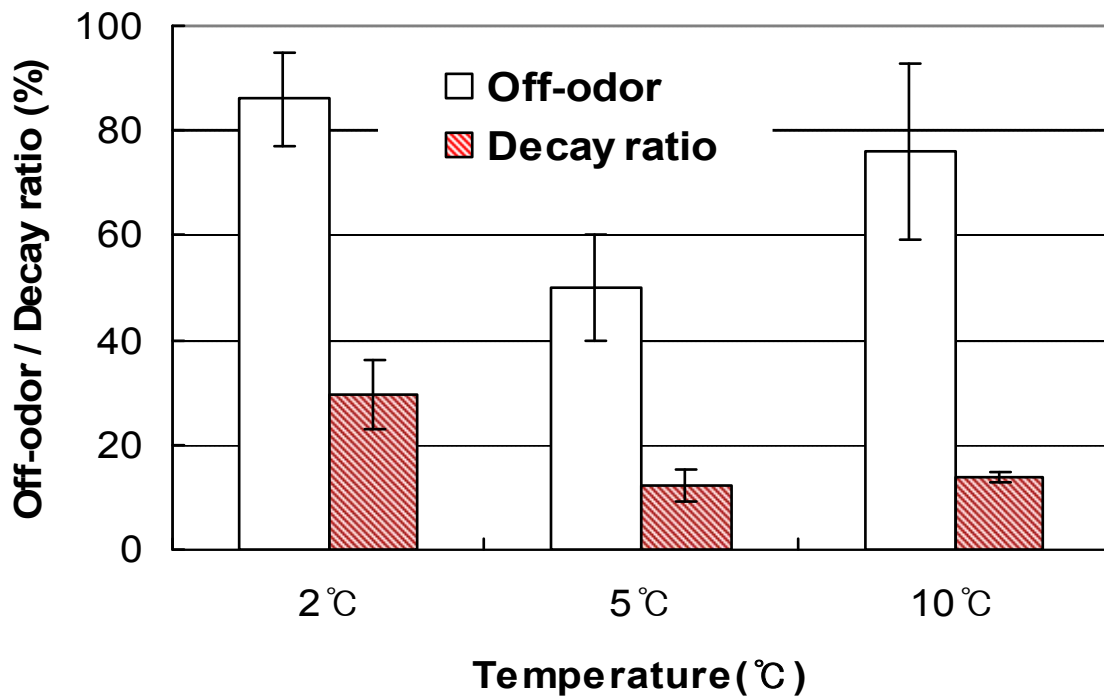


Fig. 8. Off-odor and decay ratio of *Salicornia herbacea* L. packed with wrap at 28days after storage(2°C, 5°C, and 10°C). Vertical bars presented  $\pm$ SD of means(n=6).

이상의 결과에서 저장 중 발생한 저온장해 증상은 2℃의 경우 에틸렌 발생 증가가 저장 3일째, 이산화탄소 증가가 7일째, 생체중 감소가 14일째에 발생하였다. 또한 저온장해 정도를 대표하는 전해질 용출량은 7일부터 차이를 보였으며 14일째에는 통계적 유의성이 있는 차이를 보였다. 이에 반해 5℃의 경우는 에틸렌 발생 증가가 14일째, 이산화탄소 증가는 크게 증가하지 않았으며 생체중의 급격한 감소는 나타나지 않았다. 또한 5℃의 경우 10℃보다 높은 저장성을 보여, 에틸렌 발생량 증가와 같은 약간의 저온장해의 증상은 발생하였으나, 저장성에 영향을 주는 수준은 아니었던 것으로 생각된다.

#### 라. 적 요

통통마디의 온도별 호흡률과 에틸렌 발생률은 일반 원예작물처럼 온도가 증가함에 따라 증가하였다. 온도와 호흡률의 간의 회귀식(호흡률 =  $1.8534 e^{0.1249 \times \text{온도}}$ ,  $r=0.9786$ ,  $p < 0.05$ )으로 구한 통통마디의 호흡 $Q_{10}$ 값은 5℃에서 15℃까지는 2.24, 15℃에서 25℃까지는 2.50이었다. 온도와 에틸렌 발생률 간의 회귀식(에틸렌 발생률 =  $3.4145 e^{0.133 \times \text{온도}}$ ,  $r = 0.9778$ ,  $p < 0.05$ )으로 구한 에틸렌 발생  $Q_{10}$ 값은 5℃에서 15℃까지는 2.57, 15℃에서 25℃까지는  $Q_{10}$ 값은 2.80이었다. 통통마디의 2℃와 10℃에서 전해질 용출량은 7일부터 2℃와 10℃가 차이가 나타났으며 14일부터는 그 차이에 통계적 유의성이 나타나 2℃의 저온에서 저온장해가 발생함을 알 수 있었다. 저장온도별 생체중 감소율이 저장 14일 이후부터 2℃저장이 5℃저장보다 높은 감소율을 보였는데 이는 2℃에서 저온장해 증상이 심했기 때문이라 생각된다. 또한 포장재 내 이산화탄소는 저장온도가 높아질수록 높아졌는데, 저온장해 증상이 컸던 2℃저장에서 7일째 급격히 높아져 10℃와 같은 수준까지 증가하였다. 저장중 포장재 내 에틸렌 농도도 저온장해로 인해 역동적인 변화를 보였는데, 2℃저장에서는 저장 3일째에 5℃ 저장은 14일째 급격히 증가하였다가 차츰 감소하였다(Fig. 6). 저장중 외관상 품질은 5℃저장에서 가장 높게 유지되었으며, 2℃는 10℃와 유사한 수준을 보이면서 20일 이전 상품성을 잃었다. 통통마디의 저장수명은 5℃는 27일, 10℃가 15일인데 반해 2℃에서는 18일이 머물러 2℃에서 저온장해가 발생한 것으로 생각된다. 저장 28일째 조사한 이취와 부패율도 5℃저장에서 모두 가장 낮은 수준이었는데, 저장수명이 3일 더 길었던 2℃저장이 10℃보다 더 높은 수준을 보여, 저온장해의 결과라 생각된다. 이상의 결과에서 통통마디는 원예작물과 유사한 패턴의 호흡률과 에틸렌 발생률을 가지며, 전해질 용출량, 저장중 품질저하, 이산화탄소 및 에틸렌 발생 등으로 볼 때 5℃이하에서 저온장해가 발생한다. 그러나 5℃는 저장성에 영향을 주는 수준은 아닌데 반해 2℃는 저장수명을 5℃에 비해 9일이 감소하였다.

## 2. 통통마디의 최적 포장방법 구명

### 가. 서 언

통통마디는 우리나라 서해안과 울릉도의 바닷물이 닿는 바닷가에서 자라는 1년초로서 높이



10~30cm이며 대생한 가지가 많으며 잎이 없고 원줄기는 짙은 녹색으로 푸릇한 마디가 많고 훑으면 짙맛이 난다. 전체가 녹색이나 가을이 되면 홍자색으로 변한다(Lee, 2003). 통통마디는 다량의 미네랄을 함유하고 있어 건조 가공 제품이 건강 보조제로 상품화되기도 하였으며, 어린 가지는 나물 등의 식용으로 이용되기도 한다. 그러나 통통마디와 같은 엽생식물은 수분 함량이 95% 수준으로 높고 조직이 단단하지 못해 상온에서 7일정도 밖에 저장하지 못한다(Lu 등, 2009). 이에 유통 및 장기 유통을 위해서는 신선농산물에 많이 적용되고 있는 MA저장 기술의 접목이 요구된다. 실제로 MA저장 기술은 모든 채소와 과수류에 적용되어 일반 저온 저장에 비해 상온에서는 50%, 적정온도에서도 25% 이상 저장수명을 증가시킬 수 있다(Kader, 2002). 이러한 MA저장 기술은 작물의 수확후 생리와 포장재의 투과율 등을 고려하여 실시할 때 보다 큰 효과를 얻을 수 있다. 최근 들어 이러한 MA 저장 기술을 엽생식물이나 해조류에도 적용하려는 연구는 진행되고 있는데, 신선 상태의 Red macro-algae (*Gracilaria* spp.) (Paull과 Chen, 2008)과 *Salicornia bigelovii* (Lu 등, 2009) 등을 대상을 한 연구결과가 보고되고 있다. 이러한 최근 연구 동향에 발맞추며, 동시에 엽생식물 중 신선상태로도 식용으로 사용되고 있는 통통마디의 저장성 향상을 위해 적정 MA조건을 찾기 위해 본 연구를 실시하였다.

#### 나. 재료 및 방법

전남 신안군에서 채취한 통통마디를 재료로 하여 2℃, 5℃, 10℃, 그리고 25℃에서 저장하였다. 또한 적절한 MAP조건을 파악하기 위해 25 $\mu$ m 두께의 LDPE 필름과 25 $\mu$ m와 50 $\mu$ m 두께의 ceramic 필름, 그리고 국내 유통 단계에서 많이 사용하는 유공 포장 조건을 위해 1mm 구멍을 1cm<sup>2</sup> 당 10개씩 뚫은 25 $\mu$ m 두께의 LDPE 필름을 이용하여 포장하였다.

처리구간의 외적품질을 알아보기 위해 생체중 감소정도와 외관품질을 조사하였고, 포장재내 산소, 이산화탄소, 에틸렌 농도를 측정하였다. 생체중 감소는 저장 전 중량에 대한 저장 중 감소정도를 백분율로 나타내었고 외관 품질은 패널테스트를 통해 조사하였다. 또한 포장재내부의 이산화탄소와 산소 가스 농도는 포장재 외부에 실리콘을 접착시켜 측정기의 바늘을 수차례 관통하여도 가스누출이 없게 처리한 후 infrared sensor(checkmate, PMB, Demark)로 측정하였다(Kang과 Kim, 2007a). 저장 최종일에 포장재 내부의 에틸렌가스 농도는 gas chromatography(GC-2010, Shimadzu, Japan) (Park 등, 2000)로 측정하였다. 부패율은 저장 최종일에 전체 무게 중 부패한 부분의 무게의 비율로 표시하였고, 이취정도는 패널테스트로 조사하였다. 모든 실험은 4반복으로 진행하였으며 Microsoft Excel 2002 program을 사용하여 평균과의 차이를 나타낸 표준 편차를 얻었다.

#### 다. 결과 및 고찰

저장 중 통통마디의 생체중 감소는 저장온도와 포장재의 영향을 크게 받았다. 저장온도별로는 상온에서 가장 큰 감소율을 보였는데, 특히 유공필름처리의 경우 저장 7일만에 4%의 빠른 감소를 보였으며, 다음으로는 10℃에서 높은 감소율을 보였다(Fig. 1). 그러나 2℃가 5℃보다 높은

생체중 감소를 나타내었는데 이는 저온 장해에 의한 것으로 추측된다. 참외 등에서도 저온장해로 생체중 감소가 증가한다는 보고가 있었다(Kang 등, 2006). 포장재 처리에서는 모든 저장 온도에서 유공필름이 가장 큰 감소율을 보였고 다음으로 25 $\mu\text{m}$  LDPE 필름과 25 $\mu\text{m}$  ceramic 필름이 유사한 경향을 보였으며 50 $\mu\text{m}$  ceramic 필름이 가장 낮은 감소율을 보였다(Fig. 1). 이러한 포장재에 따른 생체중 감소율의 차이는 포장재의 수분투과율에 의한 것인데, 유공필름이 가장 컸고, 다음으로 25 $\mu\text{m}$  LDPE 필름은 25 $\mu\text{m}$  ceramic 필름이 비슷한 수준, 50 $\mu\text{m}$  ceramic 필름이 가장 낮은 수분투과율을 보인다고 한다(Park 등, 1999). 열생식물의 품질저하를 유발하는 생체중 감소 수준은 보고 된 바 없으나, 생체중 감소 허용수준이 가장 낮은 경우가 3%인 것을 고려할 때(Kader, 2002), 4%의 감소를 보인 25 $^{\circ}\text{C}$ 의 유공필름처리만이 저장 7일만에 생체중 감소에 의한 품질 저하가 있었던 것으로 생각된다.

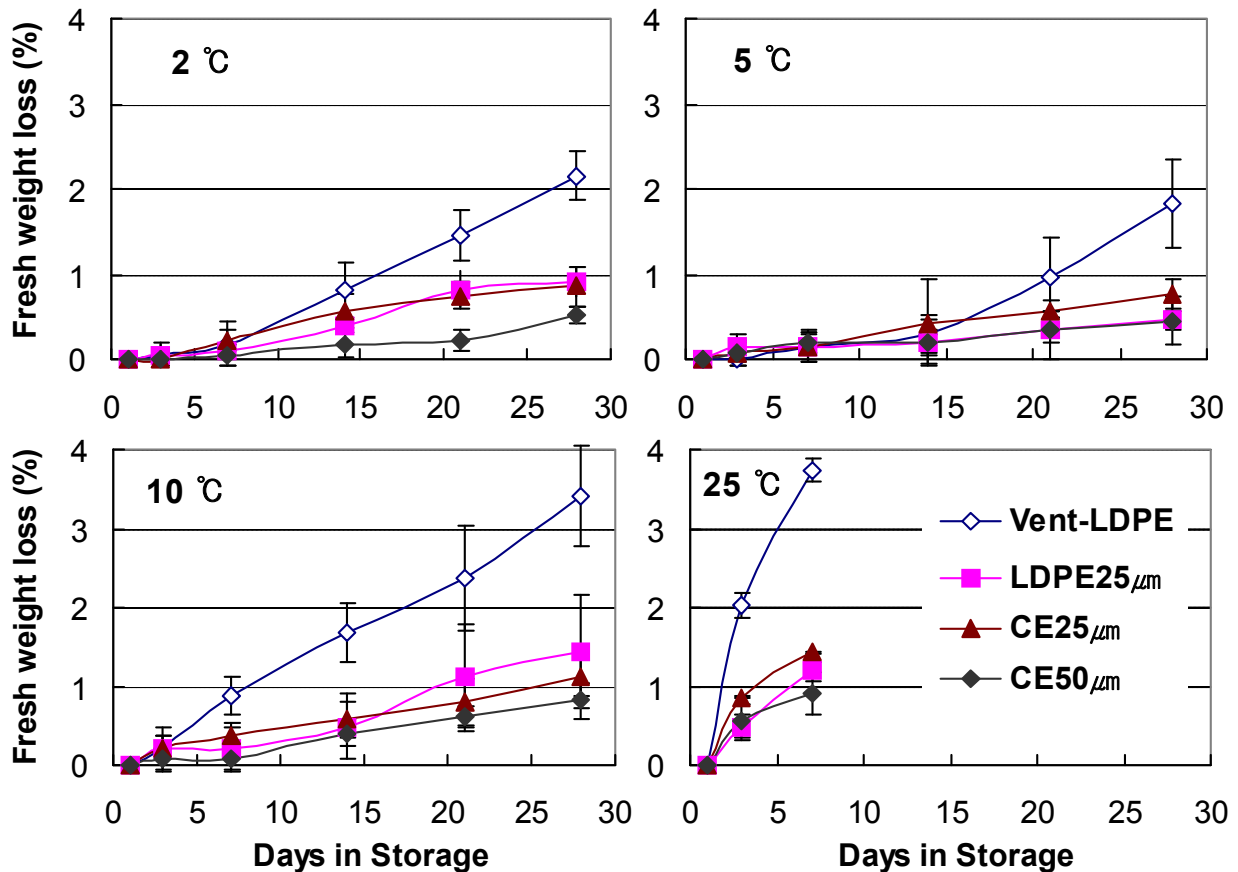


Fig. 1. Change of fresh weight loss of *Salicornia herbacea* L. packaged with 4 different materials and stored 4 different temperatures. Vertical bars presented  $\pm$ SD of means(n=6).

저장 중 포장재내 이산화탄소 농도는 25°C를 제외하고는 대체로 유사한 수준을 보였는데, 2°C와 5°C에서 10°C와 유사한 수준을 보인 것은 저온 장애 증상이라 생각된다. 토마토, 오이, 참외 등에서 저온 장애로 인한 이산화탄소 발생량 증가가 보고된 바 있다(Kang과 Park, 1999; Kang 등, 2002; Kang 등 2005). 포장재별로는 역시 유공필름에서 가장 낮았으며, 다음으로 25  $\mu\text{m}$  ceramic 필름, 25  $\mu\text{m}$  LDPE 필름 그리고 50  $\mu\text{m}$  ceramic 필름의 순서로 높았다(Fig. 2). 이 또한 필름소재의 이산화탄소 투과율에 의한 결과였다(Park 등, 1999). 포장재내 산소 농도는 포장재 종류별로는 이산화탄소와는 정반대의 결과를 보였으며, 저장온도 처리에서는 저장온도가 높을수록 포장재내 산소농도가 높았다(Fig. 3). 이렇게 조성된 MA조건은 유공필름과 25°C을 제외한 모든 처리에서 이산화탄소 1~2%, 산소 15%미만의 수준을 나타내었다. 엽생식물에 대한 적정 MA조건이 제시된 바는 없으나, 본 실험에서 고이산화탄소 장애는 없었던 것으로 생각되는데, 원예작물의 가장 낮은 고이산화탄소 장애농도 수준이 2%이기 때문이다(Kader, 2002).

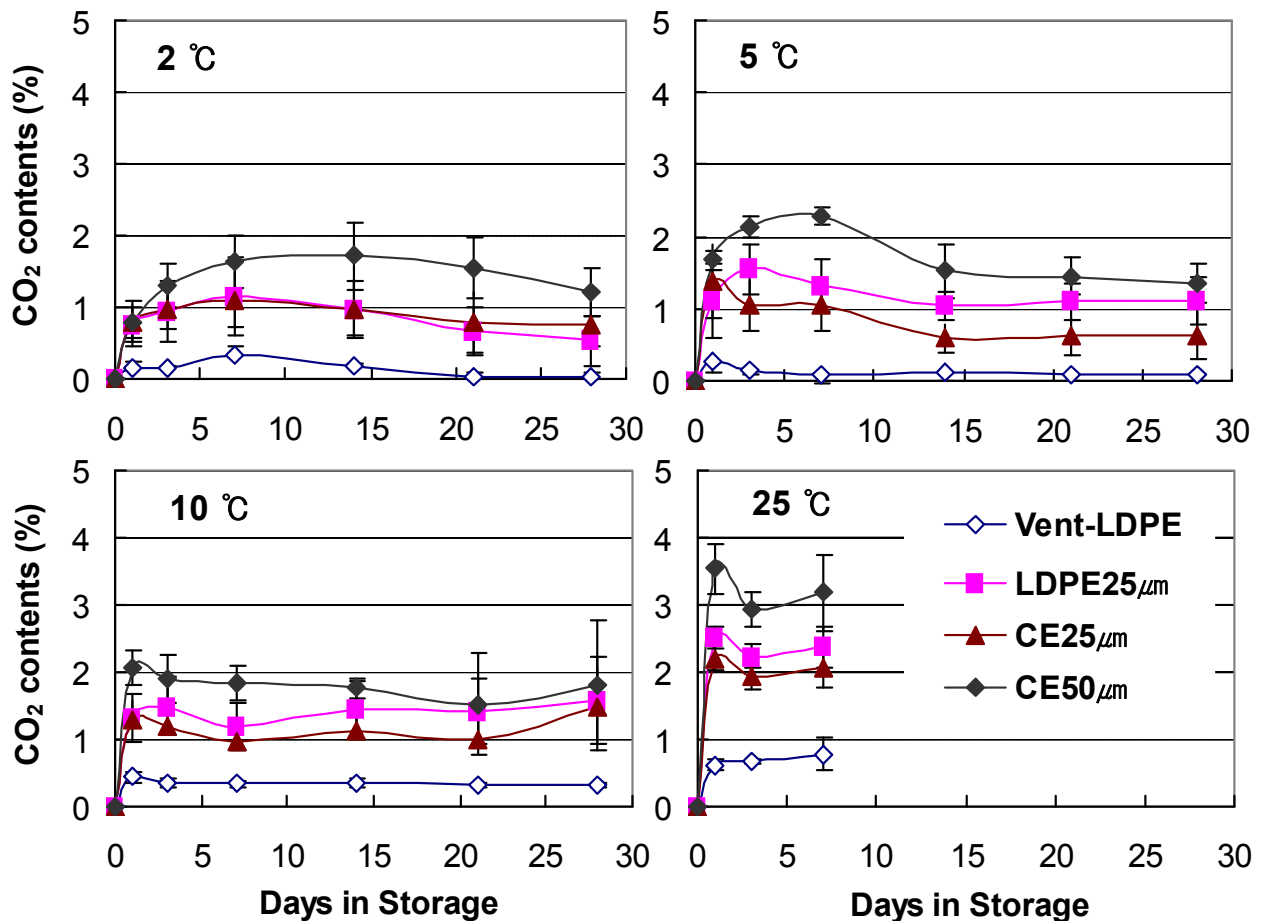


Fig. 2. Change of CO<sub>2</sub> contents in 4 different kinds of package with *Salicornia herbacea* L. stored 4 different temperatures. Vertical bars presented  $\pm$ SD of means(n=6).

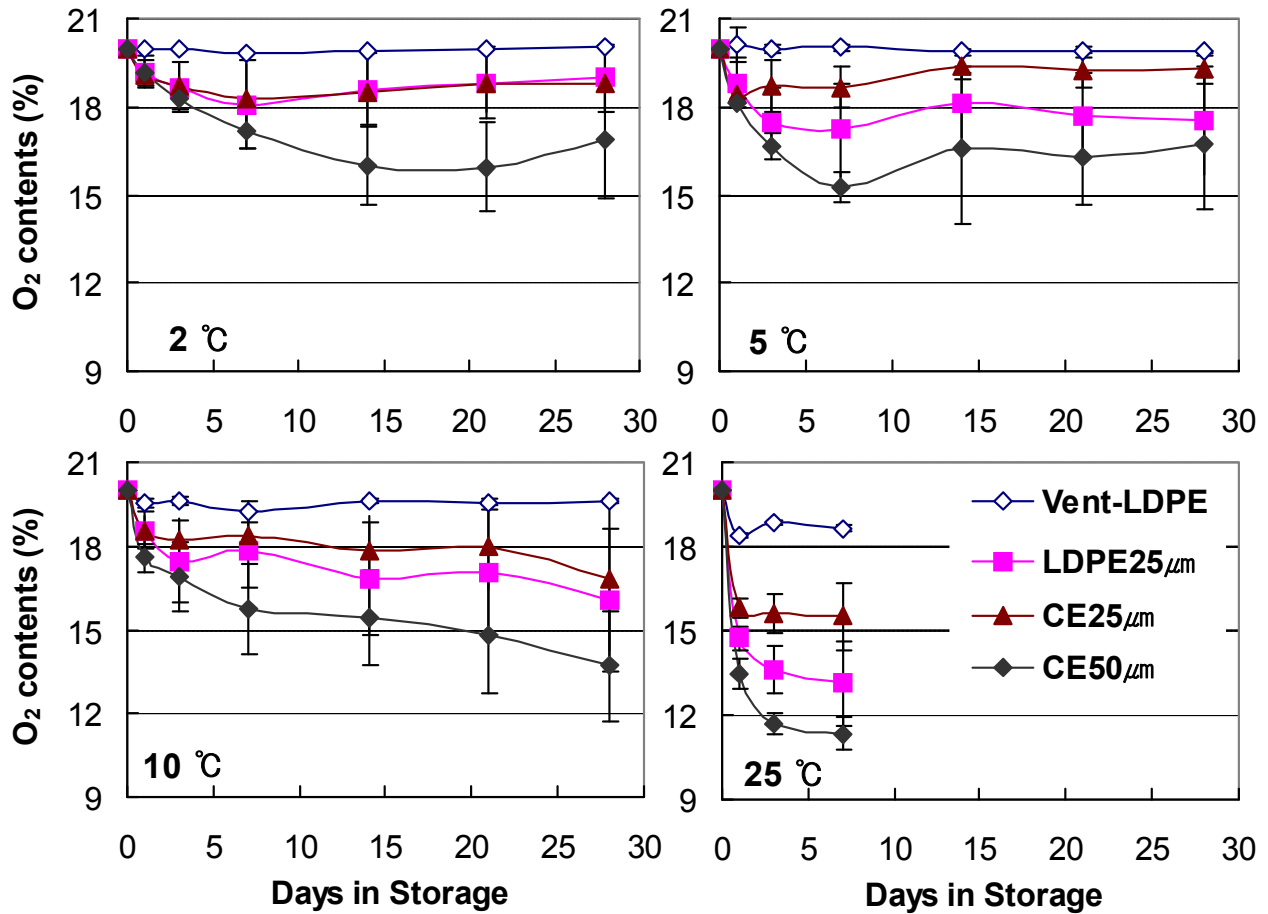


Fig. 3. Change of O<sub>2</sub> contents in 4 different kinds of package with *Salicornia herbacea* L. stored 4 different temperatures. Vertical bars presented  $\pm$ SD of means(n=6).

저장 중 에틸렌 농도는 저장 7일까지는 매우 낮은 수준을 보이다가 이후 급격히 증가하는 양상을 보여 25°C 저장에서는 저장 종료일은 7일까지 4ppm 이하의 매우 낮은 수준을 보였다. 7일까지 에틸렌 농도는 가장 저온인 2°C에서 가장 높았는데, 일반적으로 에틸렌 발생량이 온도가 낮을수록 적은 것(Kays, 2004)에 비교하면 특이한 결과였는데, 이 또한 저온 장해 증상으로 생각된다. 왜냐하면 토마토, 오이, 참외 등에서 저온 장해로 인한 에틸렌 발생 증가가 보고된 바 있기 때문이다(Kang과 Park, 1999; Kang 등, 2002; Kang 등 2005). 포장재별로는 역시 유공 필름에서 가장 낮았으며, 다음으로 25 $\mu$ m ceramic 필름, 25 $\mu$ m LDPE 필름 그리고 50 $\mu$ m ceramic 필름의 순서로 높았다(Fig. 4).

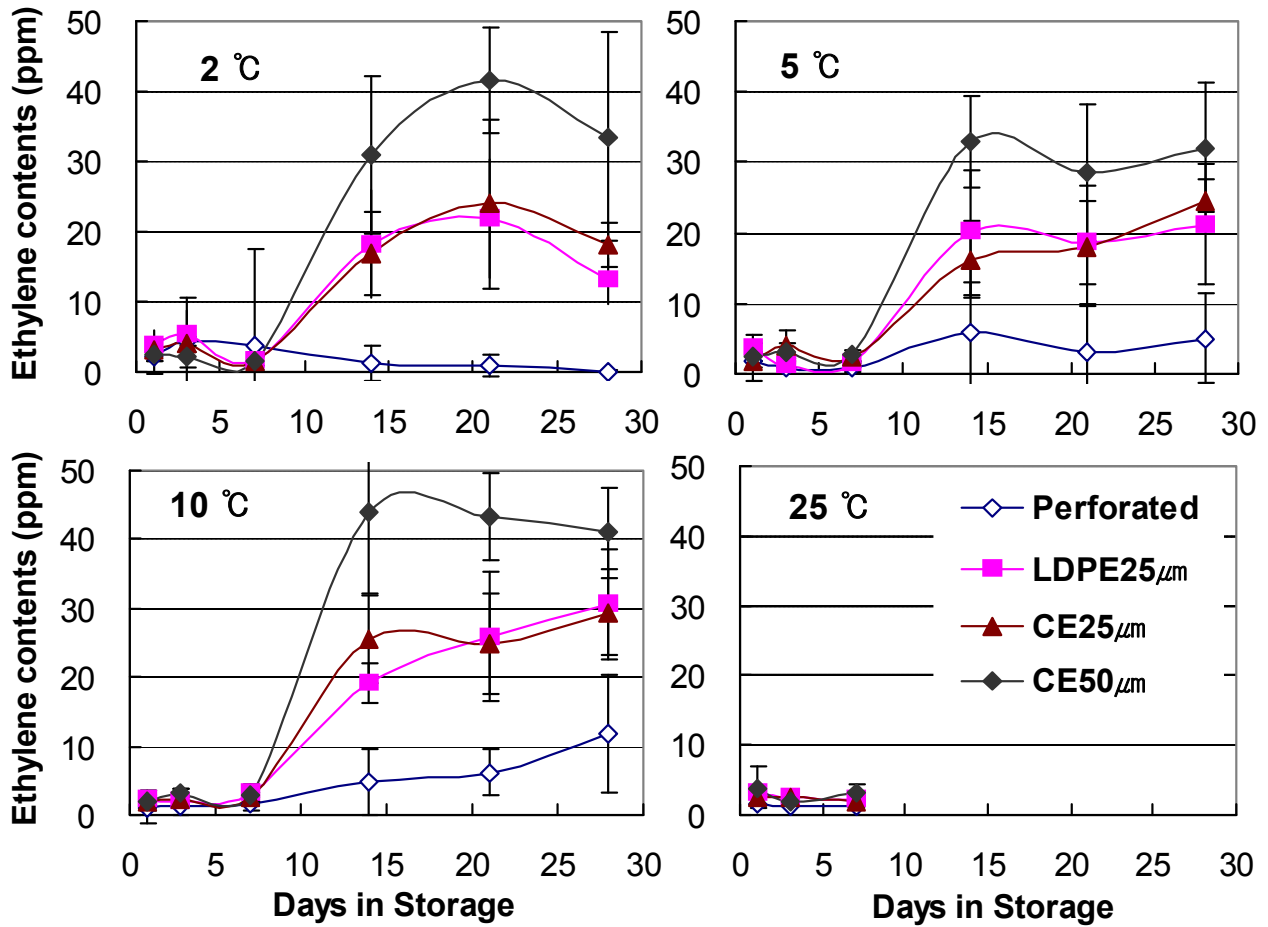


Fig. 4. Change of C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> contents in 4 different kinds of package with *Salicornia herbacea* L. stored 4 different temperatures. Vertical bars presented  $\pm$ SD of means(n=6).

저장중 통통마디의 외관상 품질은 5°C에서 가장 높게 유지되었으며, 포장재별로는 통계적 유의성은 없었으나 50 $\mu$ m ceramic 필름에서 가장 높게 유지되었다(Fig, 5). 앞서 생체중 감소나 포장재내 이산화탄소와 에틸렌 농도에서 언급한 바와 같이 통통마디의 경우 저온장해가 나타나는 것으로 보이며, 이 때문에 저장온도가 가장 낮았던 2°C에 비해 오히려 5°C에서 높은 품질이 유지되었던 것으로 생각된다. 외관상 품질에서 상품성이 있는 점수인 3점이 유지되었던 저장기간을 보면 25°C의 무공필름처리는 5일 미만으로 가장 짧았고, 5°C의 50 $\mu$ m ceramic 필름이 28일 이상으로 가장 길었다. 저장 최종일의 이취의 경우도 외관상 품질이 가장 높았던 5°C에서 가장 낮았으며, 필름종류별로는 가장 가스 투과성이 낮은 50 $\mu$ m ceramic 필름에서 가장 낮았다(Fig. 6). 이로 볼 때 본 실험에서 나타난 2% 수준의 이산화탄소는 통통마디의 무기호흡을 유도하는 수준은 아니었던 것으로 생각된다.

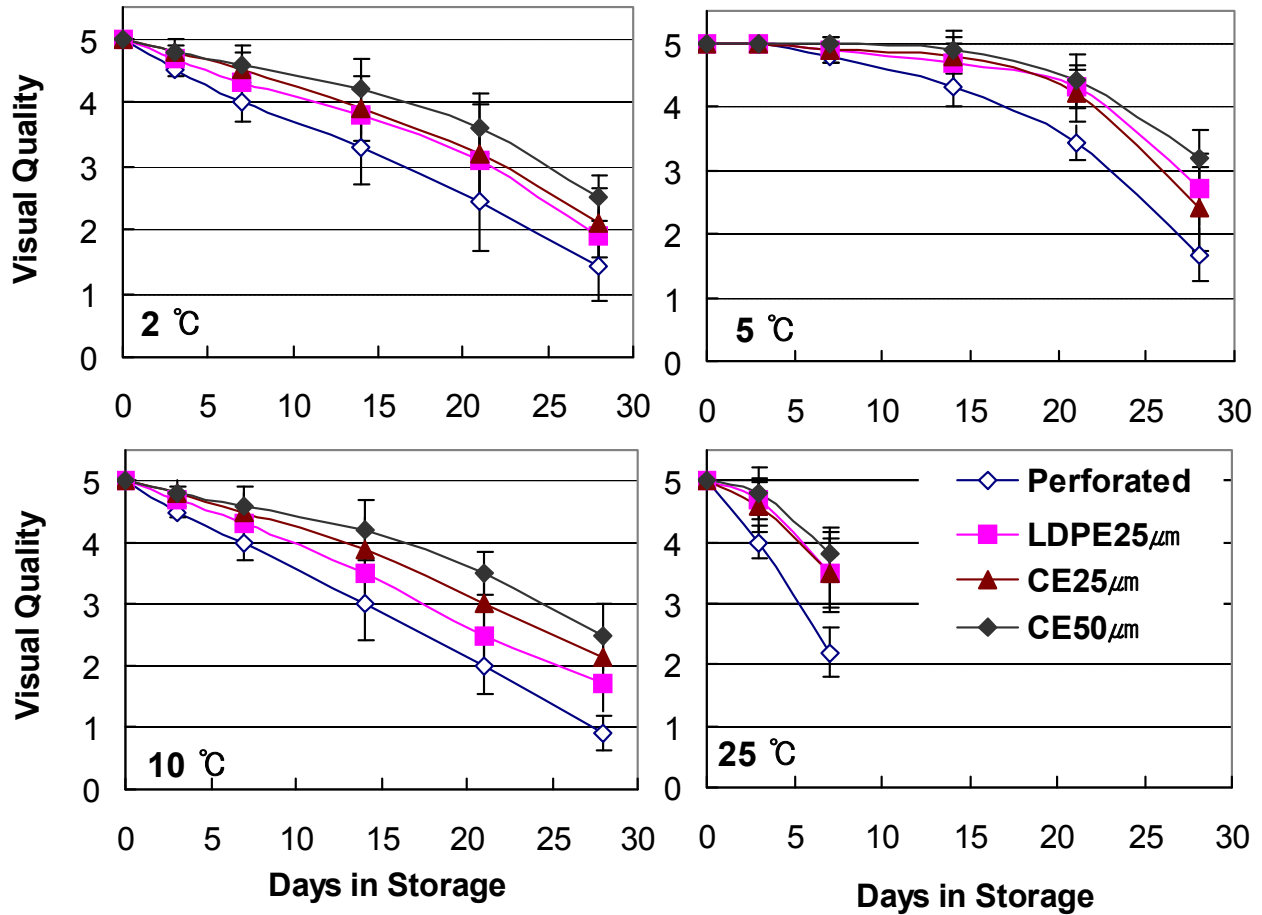


Fig. 5. Change of visual quality of *Salicornia herbacea* L. packaged with 4 different materials and stored 4 different temperatures. Vertical bars presented  $\pm$ SD of means(n=6). visual quality scores were 5: excellent, 4: very good, 3: good, marketable, 2: bad, 1: waste.

역시 저장 최종일에 조사한 부패율도 10°C에서 가장 컸으며 다음으로 2°C, 그리고 5°C에서 가장 낮아 외관상 품질과 같은 결과를 보였다. 필름 종류별로는 온도에 따라 다른 양상을 보였는데, 가장 낮은 온도였던 2°C에서는 투과성이 좋았던 유공필름에서 가장 컸고, 10°C에서는 유공필름에서 가장 작았다. 이에 반해 5°C에서는 필름 종류간 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 7). 이와 같이 온도에 따라 포장재별 부패율이 다른 것은 2°C에서는 무공필름처리로 포장재내 높아진 이산화탄소가 저온장해를 완화시켜(Lee와 Yang, 2000) 유공필름보다 부패율이 낮았던 것으로 생각되고, 10°C에서는 유공필름처리로 증가한 포장재내 에틸렌 가스가 부패를 촉진시킨 것으로 생각된다(Kays, 1991).

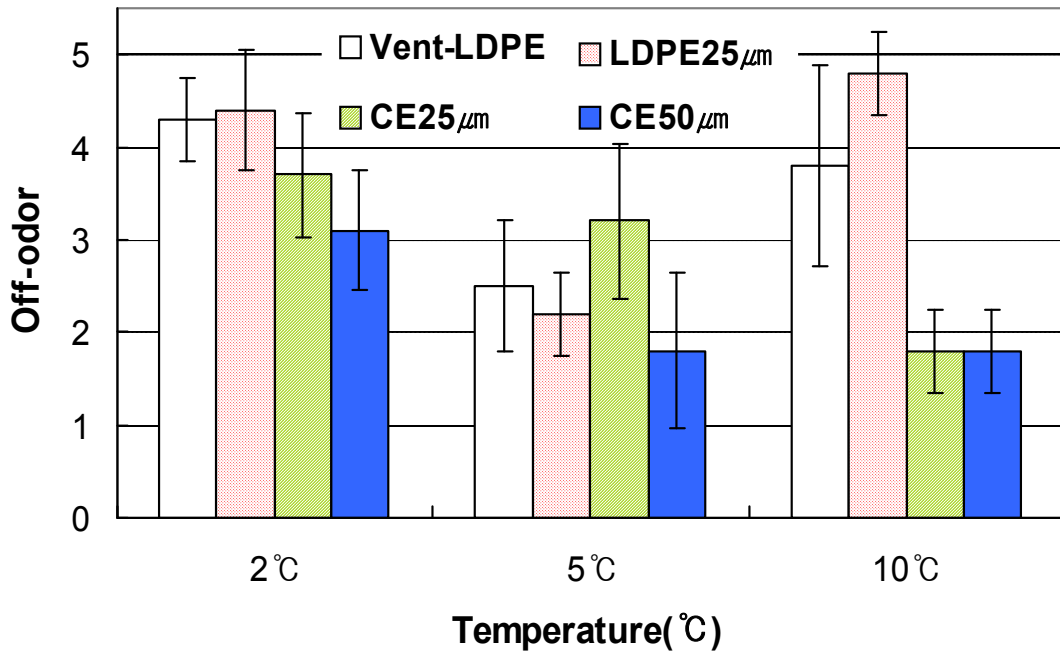


Fig. 6. Off-odor of *Salicornia herbacea* L. packaged with 4 different materials and stored 3 different temperatures. Vertical bars presented  $\pm$ SD of means(n=6). Off-odor scores were 5: most serious, 4: more serious, 3: moderate, 2: slightly 1: nothing

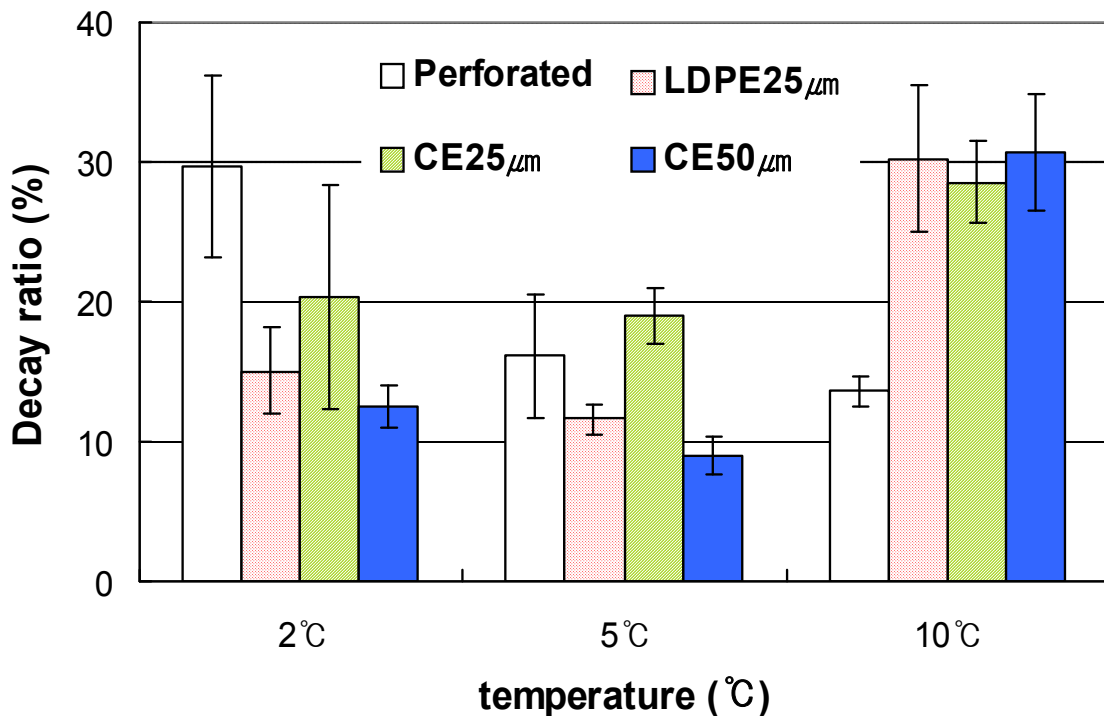


Fig. 7. Decay ratio of *Salicornia herbacea* L. packaged with 4 different materials and stored 3 different temperatures. Vertical bars presented  $\pm$ SD of means(n=6).

이상의 결과를 종합하면 통통마디의 경우 저온장해가 발생하는 것으로 추측되어 5℃ 이상의 온도가 적절한 것으로 생각되며, 3~4%의 이산화탄소에서도 이취발생이 조장되지 않은 것으로 보아 비교적 투과성이 낮은 필름으로 포장하는 것이 적절할 것이라 사료된다. 또한 이와 같이 적절한 온도와 포장재를 사용할 경우 기존의 7일이 지나지 않았던 저장수명을 28일까지 연장할 수 있을 것으로 생각된다.

#### 라. 적 요

신선 통통마디의 저장성 향상을 위해 MAP에 적절한 포장재와 저장온도를 구명하고자 본 실험을 수행하였다. 저장중 생체중 감소는 10℃이하의 저온과 무공필름에서는 2%이하로 유지되었으나 25℃의 유공필름처리는 4% 이상의 감소를 보이면서 품질저하가 발생하였다. 저장중 포장재내 대기조성은 필름 투과율에 비례하였는데 이산화탄소는 1~2%, 산소는 15%이상으로 유지되었다. 25℃를 제외한 모든 처리에서 저장중 포장재내 에틸렌 농도는 7일 이후 급격히 증가하였는데, 2℃에서 가장 높아 저온 장해가 발생한 것으로 추측되었다. 저장 최종일에 이취와 부패율은 5℃에서 가장 낮았으며, 포장재별로는 다른 양상을 보였는데 저장온도중 가장 낮았던 5℃에서는 50 $\mu$ m 두께의 ceramic 필름이 가장 낮은 이취와 부패율을 보였다. 외관상 품질로 본 저장수명 역시 5℃에서 50 $\mu$ m ceramic 필름으로 포장하였을 때 28일 이상으로 가장 길었다.



### 3. 신선염생식물의 저장조건 확립: 온도, 습도, CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>농도

- 해홍 나물과 수송나물의 온도별 저장성 비교와 포장재내 CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 농도 그리고 C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> 농도 변화 조사 -

#### 가. 서 언

염생식물은 최근 들어 가공 기술의 발달과 먹거리에 다양화 등에 힘입어 다양한 형태로 식품화 되고 있는데, 건조상태나 가공상태가 대부분으로 신선상태의 제품화는 아직 미비하다. 현재 국내에서 통통마디가 어린 상태에서 신선상태로 유통 판매되고 있는데, 염생식물은 수분 함량이 95% 수준으로 높고 조직이 단단하지 못해 저장성이 좋지 않아 신선상태의 통통마디의 경우 상온에서 7일정도 밖에 저장하지 못한다(Lu 등, 2009). 염생식물 중 통통마디와 함께 어린 순을 나물로 신선상태로 이용되는 수송나물(*Salsolakomarovi* Iljin)과 해홍나물(*Suaedamaritima* L.Dum.)은 명아주과 1년생 초본 식물인데, 수송나물은 가시솔나물이라고도 불리우며 우리나라 전국의 해변과 일본, 중국, 시베리아, 그리고 호주 등지에 넓게 분포하며 갯나문재 또는 나문재 나물이라고 불리우는 해홍나물은 우리나라 중부 이남의 해변에 분포한다(Lee, 2003). 본 실험은 식품에 다양화와 새로운 먹거리의 유통 저장성 증진을 위해 지금까지 생체로 유통되지 않았던 수송나물과 해홍나물의 MA저장성을 온도별로 비교하고자 실시하였다.

#### 나. 재료 및 방법

온실에서 수송나물(*Salsolakomarovi* Iljin)과 해홍나물(*Suaedamaritima* L.Dum.)을 원예용 무비상토(토실이, 신안그루)에서 파종하여 재배하였다. 이들 염생식물의 재배방법은 기존의 연구(Kim 등, 2001)에서 통통마디 재배에서 생육이 가장 우수한 것으로 보고된 N-P-K 비율 0.29- 0.52- 0.29의 시비조건에서 해수 30% 수준으로 관수하여 재배하였다. 초장이 30cm 이상 생육한 수송나물과 해홍나물을 수확하여 염생식물인 통통마디(*Salicornia herbacea* L.)의 MA 저장에서 외관상 품질 등에서 가장 우수하였던(Kang 등, 2009) 50 $\mu$ m 두께의 ceramic 필름으로 포장하여 2 $^{\circ}$ C, 10 $^{\circ}$ C, 그리고 25 $^{\circ}$ C에서 저장하였다. 포장재 내 산소, 이산화탄소, 에틸렌 농도를 측정하였다. 생체중 감소는 저장 전 중량에 대한 저장 중 감소 정도를 백분율로 나타내었다. 포장재내부의 이산화탄소와 산소 가스 농도는 포장재 외부에 실리콘을 접착시켜 측정기의 바늘을 수차례 관통하여도 가스누출이 없게 처리한 후 infrared sensor(checkmate, PMB, Demark)로 측정하였다(Kang과 Kim, 2007a). 저장 최종일에 포장재 내부의 에틸렌가스 농도는 가스크로마토그래피(CLASS-GC10, Shimadzu, Japan, 강원대학교 농업과학연구원 임대) (Park 등, 2000)로 측정하였다. 모든 실험은 5반복으로 진행하였으며 Microsoft Excel 2002 program을 사용하여 평균과의 차이를 나타낸 표준 편차를 얻었다.

#### 다. 결과 및 고찰

저장 중 수송나물과 해홍나물의 생체중 감소는 저장온도에 크게 영향을 받았다. 두 식물 모

두 저장중 생체중 감소는 1%미만이었는데, 역시 상온에서 가장 빠르게 감소하였으며, 다음으로 10℃와 2℃ 순이었다. 식물별로는 수송나물이 해홍나물에 비해 감소폭이 컸다 (Fig. 1). 저장중 생체중 감소는 농산물의 품질 저하 요인 중 가장 큰 요인 중 하나인데, 엽생식물의 경우 수분손실에 의한 생체중 감소가 품질저하를 유발하는 생체중 감소 수준은 보고 된 바 없으나, 체내 수분 함량이 높은 엽채류나 오이의 경우가 3~5%인 것을 고려할 때(Kays와 Paull, 2004), 체내 수분 함량이 높은 엽생식물의 경우도 이 수준이 되리라 생각된다. 본 실험에서는 모든 저장 온도에서 수송나물과 해홍나물이 1% 미만의 감소를 보여 생체중 감소에 의한 품질 저하는 없었던 것으로 생각된다.(Fig.1)

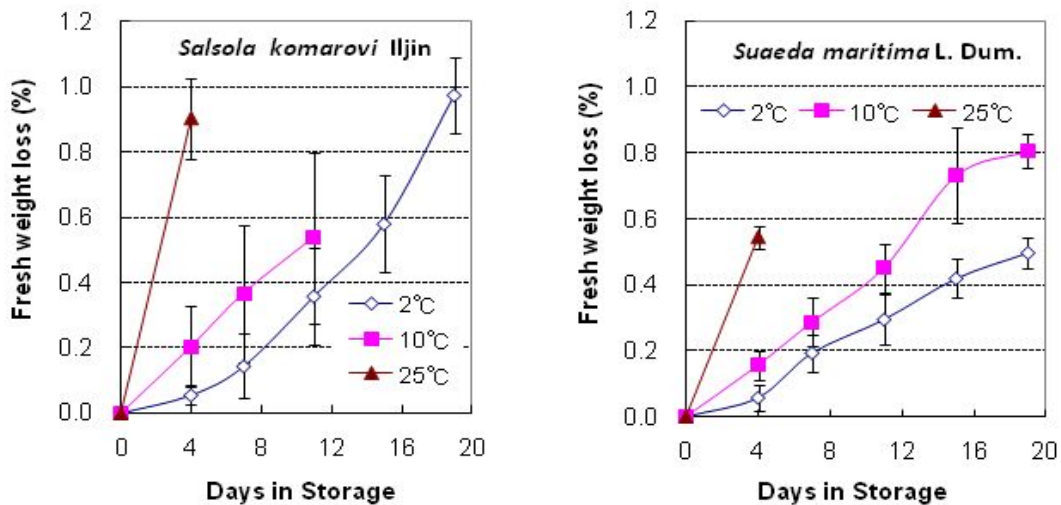


Fig. 1. Change of fresh weight loss of *Salsola komarovi* Iljin and *Suaedamaritima*L.Dum. packaged with 50 $\mu$ m thickness ceramic film and stored at 2 $^{\circ}$ C, 10 $^{\circ}$ C and 25 $^{\circ}$ C Vertical bars presented SD of means(n=6).

포장재내 산소 농도는 수송의 경우 2 $^{\circ}$ C 가장 높게 유지 되었으며 10 $^{\circ}$ C에서는 2 $^{\circ}$ C에 비해 큰 차이가 없이 저장 기간 내에 18~20% 유지 하였으나 25 $^{\circ}$ C에서 2 $^{\circ}$ C,10 $^{\circ}$ C에 비해 감소 하였다. 해홍의 산소 농도는 2 $^{\circ}$ C가장 높게 유지되며 저장 4일 후 오히려 산소 농도가 소폭 상승 하였으며 10 $^{\circ}$ C에서는 2 $^{\circ}$ C비해 낮은 농도를 보였으나 큰 차이는 없었다. 25 $^{\circ}$ C 경우 수송과 같이 2 $^{\circ}$ C, 10 $^{\circ}$ C에 비해 감소했으나 수송에 비해 그 감소량이 적었다. 두 식물을 비교 했을때 2 $^{\circ}$ C, 10 $^{\circ}$ C 18~20% 수준을 나타내며 큰 차이가 25 $^{\circ}$ C에서는 두 식물 모두 2 $^{\circ}$ C,10 $^{\circ}$ C에 비해 산소 농도가 감소하나 해홍이 수송보다 그 감소량이 적었다(Fig. 2).

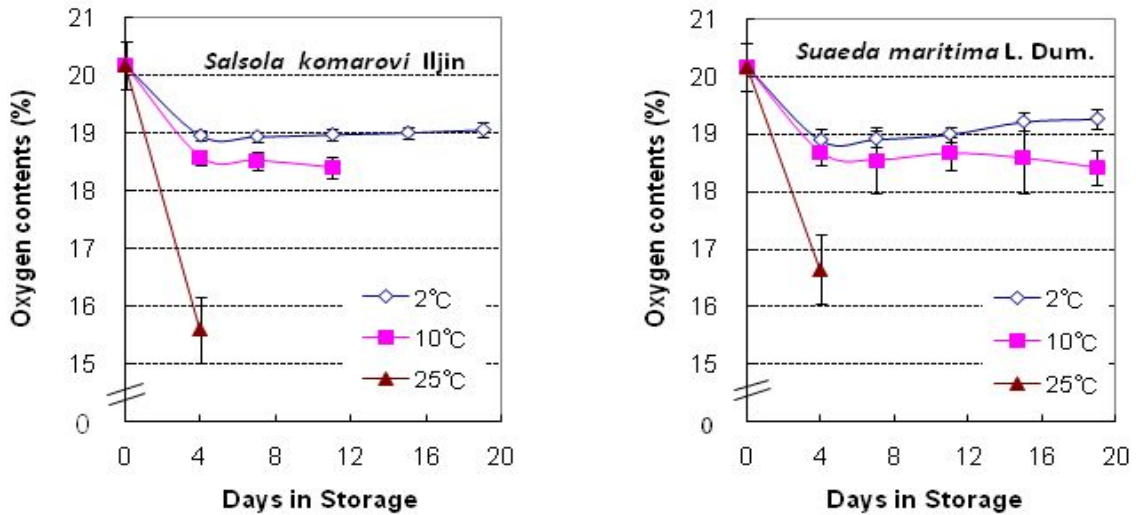


Fig. 2. Change of O<sub>2</sub> contents of *Salsola komarovi* Iljin and *Suaeda maritima* L. Dum. packaged with 50 $\mu$ m thickness ceramic film and stored at 2 °C, 10 °C and 25 °C. Vertical bars presented  $\pm$ SD of means (n=6).

포장재내 이산화탄소 농도는 산소농도와는 반대로 저장온도에서는 25°C, 식물별로는 수송에서 높았으며 두 식물 모두 2°C와 10°C에서는 1%이하로 유지되었다. 2°C와 10°C의 저장온도간 이산화탄소 농도 차이는 수송나물의 경우 통계적 유의성이 있었으나, 해홍나물에서 통계적으로 차이가 인정되지 않았다(Fig. 3). 해홍나물에서 2°C와 10°C의 저장온도간 이산화탄소 농도 차이가 없었던 것은 일종의 저온 장애 증상이라 생각되는데, 토마토, 오이, 참외 등의 원예작물에서 저온 장애로 인한 이산화탄소 발생량 증가가 보고된 바 있다(Kang과 Park, 1999; Kang 등, 2002; Kang 등 2005). 염생식물에 대한 적정 MA조건이 제시된 바는 없으나, 본 실험에서 25°C 저장을 제외한 조건에서 두 식물 모두 이산화탄소 농도는 1% 이하, 산소농도는 19% 내외의 수준을 나타내어 고이산화탄소 장애와 저산소 장애는 없었던 것으로 생각된다. 기존의 보고에 의하면 원예작물의 가장 낮은 고이산화탄소 장애농도 수준이 2%, 가장 높은 저산소 장애 농도는 5% 수준이기 때문이다(Kader, 2002).

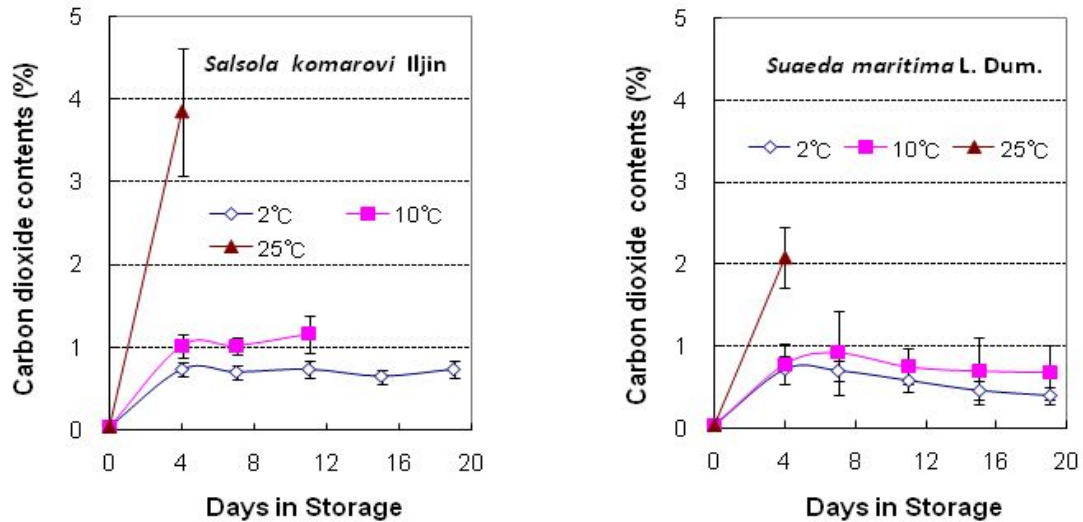


Fig. 3. Change of CO<sub>2</sub> contents of *Salsola komarovi* Iljin and *Suaeda maritima* L. Dum. packaged with 50µm thickness ceramic film and stored at 2°C, 10°C and 25°C. Vertical bars presented SD of means (n=6).

포장재내 에틸렌 농도는 7일 이상 저장했던 2°C와 10°C에서는 10°C에서 식물별로는 해홍나물에서 높게 나타났다. 수송나물의 에틸렌 농도는 10°C 저장에서 25~30 µL·L<sup>-1</sup> 수준으로 20 µL·L<sup>-1</sup> 수준이었던 2°C 저장과의 차이에 통계적 유의성을 보였으나, 해홍나물의 경우 30 µL·L<sup>-1</sup> 이상의 수준을 보인 10°C 저장과 20~25 µL·L<sup>-1</sup> 수준을 보인 2°C 저장간 차이에 유의성이 없었다 (Fig. 4). 일반적으로 에틸렌 발생량은 저장온도가 낮을수록 감소하는데 (Kays와 Paull, 2004) 해홍나물의 경우 2°C 저장이 10°C 저장에 비해 낮았으나 통계적 유의성을 보일 만큼의 차이를 나타내지 않아 포장내 이산화탄소 농도에서 보인 저온 장해 증상을 의심하게 되었다. 일반적으로 아열대 및 열대산 식물의 경우 저온 장해로 인한 에틸렌 발생 증가가 보고된 바 있기 때문이다 (Kang과 Park, 1999; Kang 등, 2002; Kang 등 2005).

포장재내 이산화탄소와 에틸렌 농도로 볼 때 해홍나물의 경우 2°C의 저온에서 저장성이 10°C와 차이가 없어 저온장해가 의심되었다. 해홍나물과 같은 염생식물인 통통마디의 경우에서도 2°C의 저온 저장에서 저온장해로 의심되는 증상이 나타났다고 한다 (Kang 등, 2009).

이상의 결과를 종합하면 명아주과 염생식물인 수송나물과 해홍나물의 온도별 MA저장성을 보면, 수송나물은 저온일수록 저장성이 증가하였으나, 해홍나물의 경우 2°C에서는 저온장해가 일어난 것으로 생각된다. 앞으로 해홍나물의 경우 저온장해 증상과 관련된 보다 세밀한 연구가 필요하리라 생각된다.

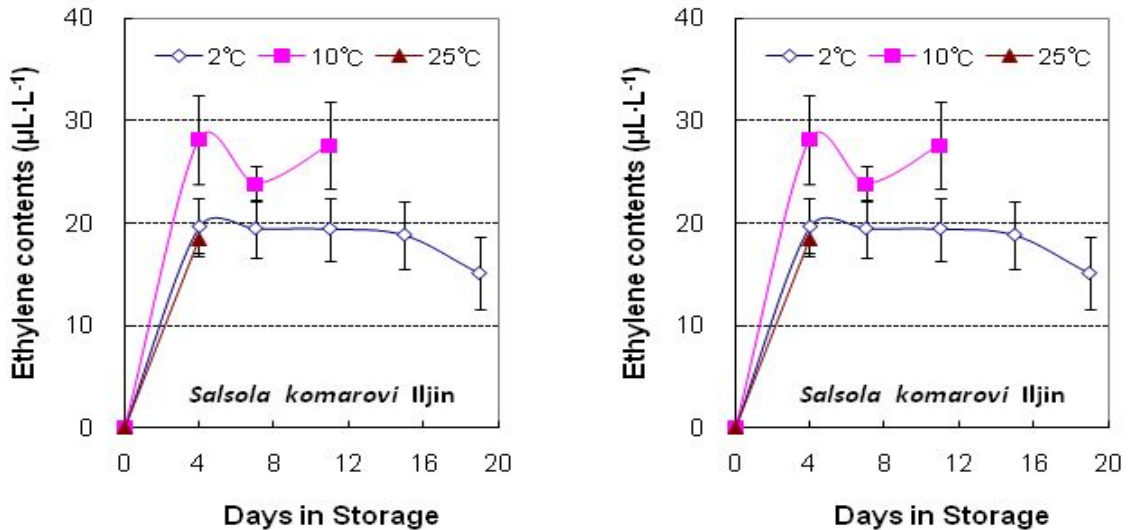


Fig. 4. Change of  $C_2H_4$  contents of *Salsola komarovi* Iljin and *Suaedamaritima* L.Dum. packaged with  $50\mu m$  thickness ceramic film and stored at  $2^\circ C$ ,  $10^\circ C$  and  $25^\circ C$ . Vertical bars presented  $\pm SD$  of means( $n=6$ ).

#### 라. 적 요

염생식물 중 생체로 이용되고 있는 수송나물(*Salsolakomarovi* Iljin)과 해홍나물(*Suaedamaritima* L.Dum.)의 상품화를 위해 포장 판매 및 저장이 동시에 가능한 MAP(modified atmosphere package)의 저장성을 몇가지 온도에서 비교하였다. 온실에서 재배한 수송나물과 해홍나물을  $50\mu m$  (ceramic) 필름으로 포장하여  $2^\circ C$   $10^\circ C$   $25^\circ C$ 에 저장하였다. 저장중 생체중 감소는 모두 1% 미만이었는데, 역시 상온에서 가장 빠르게 감소하였으며, 수송에서 감소폭이 컸다. 포장재내 산소 농도는 저장온도별로는  $2^\circ C$ 에서 가장 높게 유지되었으며,  $25^\circ C$ 에서는 수송이 해홍보다 낮은 농도를 보였다. 포장재내 이산화탄소 농도는 산소농도와 반대로 저장온도별로는  $25^\circ C$ 에서 가장 높았으며, 식물별로는 수송에서 높았는데 두 식물 모두  $2^\circ C$ 와  $5^\circ C$ 에서는 1%이하로 유지되었다. 포장재내 에틸렌 농도는  $10^\circ C$ 에서  $2^\circ C$ 보다 높았으나, 통계적인 유의성은 없었다.  $10^\circ C$ 에서 에틸렌 농도는 두 식물 모두  $20\mu L\cdot L^{-1}$ 으로 같은 수준으나,  $2^\circ C$ 에서는 해홍이 다소 높았다. 온도에 따른 포장재내 이산화탄소와 에틸렌 농도는 저장온도가 높을수록 높았는데, 수송나물에서는  $2^\circ C$ 와  $10^\circ C$ 간 통계적 유의성이 있는 차이를 보인 반면, 해홍나물의 경우 그 차이에 통계적 유의성이 인정되지 않았다. 관능검사로 실시한 외관상 품질은 3점까지 상품성을 인정하였는데, 수송나물의 경우 상품성인 인정된 저장일수가  $24^\circ C$ 에서는 3일,  $10^\circ C$ 에서는 7.5일  $2^\circ C$ 에서는 14일이었고, 해홍나물은  $24^\circ C$ 에서는 3.5일,  $10^\circ C$ 에서는 9.5일  $2^\circ C$ 에서는 11일이었다. 외관상 품질 변화와 포장재내 이산화탄소와 에틸렌 농도로 볼 때 해홍나물의 경우  $2^\circ C$ 의 저온에서 저장성이  $10^\circ C$ 와 차이가 없어 저온장해가 의심되었다.

#### 4. 신선엽생식물 예냉 조건 확립: 공랭, 빙랭, 수랭

##### - 통통마디에 적합한 예냉 조건 구명 -

###### 가. 서 언

모든 원예작물의 수확후 높은 품온은 원예작물의 호흡 등 물질대사율을 증가시키고 호흡열을 발생시켜 많은 에너지를 소모하게 한다(Kader, 2002; Ryall과 Lipton, 1979). 따라서 수확후 대사활동을 저하시키고 노화를 지연시키기 위해서는 온도가 낮을 때에 수확하거나, 수확후 즉시 예냉처리로 호흡열의 제거가 필요하다. 원예작물에 대한 예냉 처리와 이에 대한 효과는 엽채류 뿐만 아니라 과실류, 그리고 버섯류에서도 보고되고 있다(Beik 등, 2009; Choi 등, 2000; Lee 등, 2010; Kim 등, 2007; Park, 2003). 그러나 통통마디의 경우 예냉 관련 연구 보고는 없었다. 통통마디의 경우 대부분 고온기인 늦은 봄부터 여름까지 바닷가에서 채취하여 판매하기 때문에 수확 중 호흡 등의 생리 대사 활성이 증가하게 되어 예냉이 요구되는 작물이다. 이에 본 연구는 엽생식물 통통마디에 적합한 예냉방법을 알아보고자 수행하였다.

###### 나. 재료 및 방법

전남 신안군 온실에서 통통마디(*Salicornia herbacea* L.)을 원예용 무비상토(토실이, 신안그루)에서 파종하여 재배하였다. 시비 및 관수는 기존의 연구(Kim 등, 2001)에서 통통마디 재배에서 생육이 가장 우수한 것으로 보고된 N-P-K 비율 0.29- 0.52- 0.29의 시비조건에 해수 30% 수준으로 관수하였다.

수확 후 냉장상태에서 실험실로 수송하여 상온에 12시간 정치하였다. 품온이 상온까지 상승한 상태에서 빙랭(얼음과 물을 4:1로 섞어 온도가 -1℃가 되게 하여 처리함), 수냉(얼음과 물을 1:4로 섞은 후 수온이 1℃가 되게 한 후 처리함), 강제송풍(2℃ 냉장고에 풍속 6m/sec으로 처리함), 공랭(2℃ 냉장고에 풍속 1m/sec 이하로 정치 처리함)처리하였다. 각 예냉방법의 효과를 알아보기 위해 처리 중 품온 변화를 적외선 온도계(#E-39650-20, Cole Parmer Co., USA)로 1시간 간격으로 품온이 2±1℃로 저하될 때까지 측정 하였다. 통통마디의 MA 저장에서 외관상 품질 등에서 가장 우수하였던(Kang 등, 2009) 50 μm 두께의 ceramic 필름으로 포장하여 온도별 실험에서 가장 우수한 결과를 얻은 5℃에서 저장하였다. 저장 중 포장재 내 산소, 이산화탄소, 에틸렌 농도를 측정하였다. 생체중 감소는 저장 전 중량에 대한 저장 중 감소 정도를 백분율로 나타내었다. 포장재내부의 이산화탄소와 산소 가스 농도는 포장재 외부에 실리콘을 접착시켜 측정기의 바늘을 수차례 관통하여도 가스누출이 없게 처리한 후 infrared sensor(checkmate, PMB, Demark)로 측정하였다(Kang과 Kim, 2007a). 저장 최종일에 포장재 내부의 에틸렌가스 농도는 가스크로마토그래피 (CLASS-GC10, Shimadzu, Japan, 강원대학교 농업과학연구원 임대) (Park 등, 2000)로 측정하였다. 모든 실험은 5반복으로 진행하였으며 Microsoft Excel 2002 program을 사용하여 평균과의 차이를 나타낸 표준 편차를 얻었다.

다. 결과 및 고찰

예냉 처리에 따른 통통마디가 2℃에 도달하기까지의 시간의 경과에 따른 성체의 온도를 조사한 결과, 공랭(Room cooling)이 24시간으로 가장 시간이 오래 걸렸고, 강제송풍(Forced air cooling)이 8시간, 수냉(Hydrocooling)이 4시간, 그리고 빙랭(Icing)이 2시간의 순으로 나타났다. 예냉에 따른 생체중 감소율은 공랭에서 가장 높은 감소율을 나타냈다.

Table 1. The change of temperature and fresh weight of *Salicornia herbacea* L. treated room cooling, forced air cooling, hydrocooling, or icing in cold chamber.

	Product temperature (°C) after cooling							Half cool time (min)	Fresh weight loss (%)
	0 hr	1 hr	2 hr	4 hr	8 hr	12 hr	24 hr		
Room cooling	24	22	18	15	10	8	2	300 a <sup>Z</sup>	4.5 a
Forced air cooling	24	20	14	7	2	-	-	120 b	2.1 b
Hydro-cooling	24	18	10	2	-	-	-	84 c	0.5 c
Icing	24	12	2	-	-	-	-	60 c	0.1 c

<sup>Z</sup> Mean separation within raw by DMRT 5%.

## 5. 다양한 형태의 신선편이 염생식물의 MAP조건 구명

가. 서 언

통통마디는 우리나라 서남해안 해안지대의 염전이나 바다를 막아 조성된 간석지 등 바다와 육지가 맞닿은 해안선 내륙에서만 자라므로 당연 해초가 아닌 육상 식물이며 학명은 통통마디 (*Salicornia herbacea* L.)라고 한다. 통통마디(*Salicornia herbacea*)는 우리나라 남해안과 서해안간척지 바닷가의 염습지대에 자생하는 1년생 초본류로서 저위염습지, 하구의 간조대, 폐염전 등에 군락을 형성하고 있으며, 염 스트레스에 대해 내성을 갖는 특징이 있다(Kim 과 Chae, 1983; Min, 1990). 통통마디는 여름철에 주로 생체로 판매되고 있는데 현재는 10cm이상 크기의 성체를 판매하고 있는데, 통통마디 신선제품의 다양화를 위해 신선편이 크기별 MA 저장시 온도와 필름종류가 저장성에 미치는 영향을 조사하기 위해 실험하였다.

나. 재료 및 방법

전라남도 신안군에서 자생하는 통통마디의 어린순과 성체를 대상으로 저장온도는 5℃와 1

0℃에 저장하였다. 신선편이의 크기는 한가지 전체를 사용한 것(10cm 이상, 현재 유통상태)과 4-5마디(5cm 이상), 그리고 2-3마디(3cm미만)으로 하였고 10℃에 비교 저장하였다. 포장필름은 미세천공필름(Cont.)와 최근 국내에서 개발된 femtosecond laser로 가공한 비천공 필름인 산소 투과도가 5,000cc, 20,000cc, 50,000cc, 100,000cc/m<sup>2</sup> • day<sup>-1</sup> • atm<sup>-1</sup>인 필름과 진공필름(PVPF)을 사용하였다.

저장기간 중 저장 전 중량에 대한 저장 중 생체중 감소정도를 백분율로 생체중 감소 정도를 측정하여 나타내었고, infrared sensor(checkmate, PBI, Denmark)를 사용하여 이산화탄소와 산소농도, gas chromatography(GC-2010, Shimadzu, Japan)을 사용하여 에틸렌 농도를 측정하였다. 저장 종료일에 패널테스트를 통하여 우수한 외관은 5점, 시장성의 한계에 달하는 것은 3점, 외관상 품질이 가장 떨어지는 것을 1점으로 하여 조사를 실시하였다. 이취는 가장 많은 이취가 발생하는 것을 5점으로 하여 차등을 두어 패널테스트를 통하여 조사하였다. 모든 실험은 6반복으로 진행하였으며 통계처리는 Microsoft Excel 2007 program을 이용하여 평균과의 차이를 나타낸 표준편차로 나타내었다.

#### 다. 결과 및 고찰

5℃에서는 25일, 10℃에서는 15일 동안 저장되었는데, 생체중 감소는 대체적으로 100,000cc 필름에서 가장 많은 생체중 감소를 보였다. 5℃에서는 신선편이 크기별 차이는 나타나지 않았고, 모든 처리구에서 98% 이상의 생체중을 보이며, 생체중 감소로 인한 저장성 저하는 나타나지 않았다. 10℃에서는 100,000cc 필름에 포장된 5cm 처리구가 가장 많은 생체중 감소를 나타내었다(Fig. 1). 산소투과도가 가장 높았던 필름에서 저장기간 수분이 증발하며 큰 중량감소를 보이며 저장성에 영향을 미친 것으로 생각되어 진다. 이산화탄소 농도와 산소 농도는 진공필름(PVPF) 처리구에서 다른 처리구에 비해 매우 높은 이산화탄소 농도와 낮은 산소 농도를 나타내었는데, 신선편이 크기에 따른 차이는 나타나지 않았다. 진공필름을 제외한 나머지 처리구중 5,000cc 처리구에서 가장 높은 1-2%의 이산화탄소 농도를 보여 MA저장 효과가 나타났을 것으로 판단되었다(Fig. 2,3). 저장기간 중 에틸렌 농도는 진공(PVPF) 처리구에서 5℃와 10℃ 모두에서 1,000ppm이 넘는 수치를 나타내어(Fig. 4), 나머지 처리구의 비교가 불가능하여 PVPF 처리구를 제외한 나머지 처리구를 대상으로 비교하였다. 5℃와 10℃ 모두 투과도가 가장 낮은 5,000cc 처리구에서 가장 높은 에틸렌 농도를 나타내었고, 투과도가 가장 높은 100,000cc 처리구에서 가장 낮은 에틸렌 농도를 나타냈다(Fig. 5). 외관과 이취는 높은 이산화탄소 농도와 낮은 산소농도를 보인 진공필름에서 다른 처리구에 비해 가장 낮은 외관 점수와 높은 이취 점수를 나타내었다. 따라서 저장온도는 10℃보다는 5℃에서, 3, 5, 10cm 신선편이 크기별 차이는 나타나지 않았다(Fig. 6,7).

기존의 비투과성 필름에 비해 투과성 필름의 저장성이 다소 우수하였으나, 필름 종류별 차이는 일정한 경향은 나타나지 않았다.



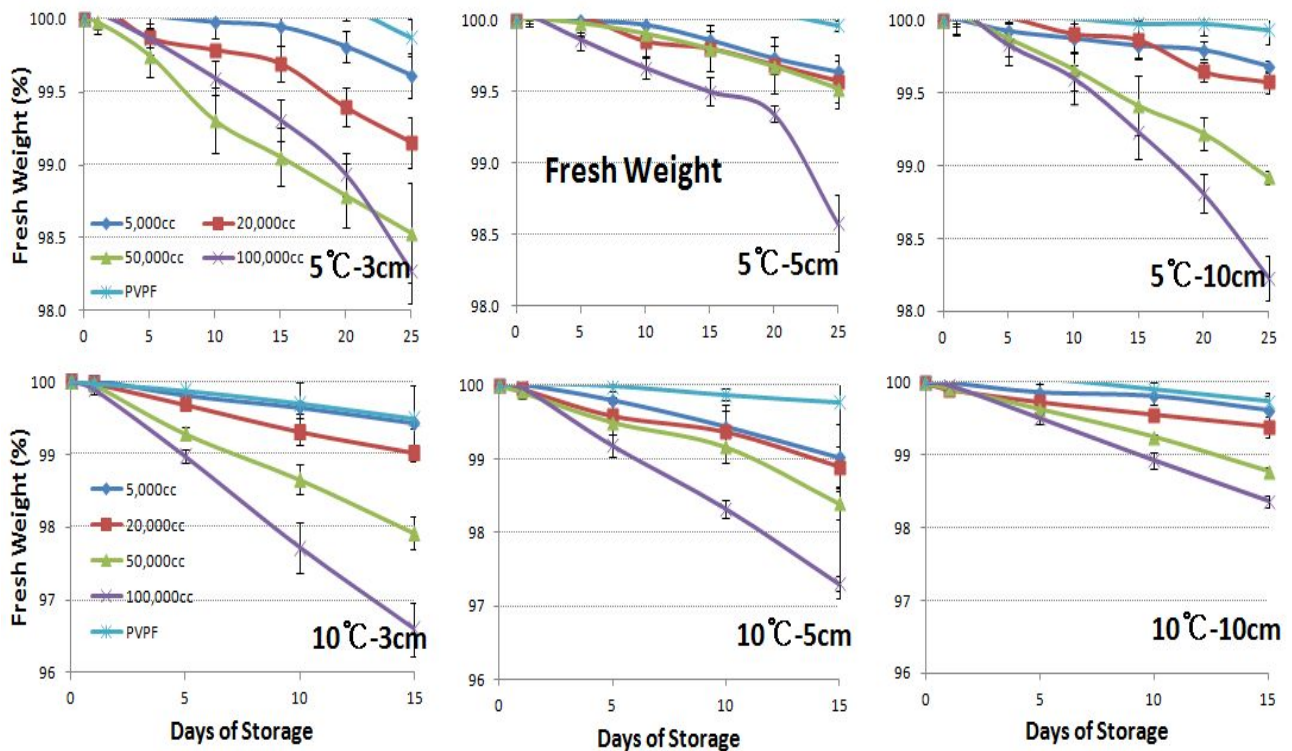


Fig. 1. Change of fresh weight of fresh-cut *Salicornia herbacea* L. Vertical bars represent  $\pm$ SD(n=5).

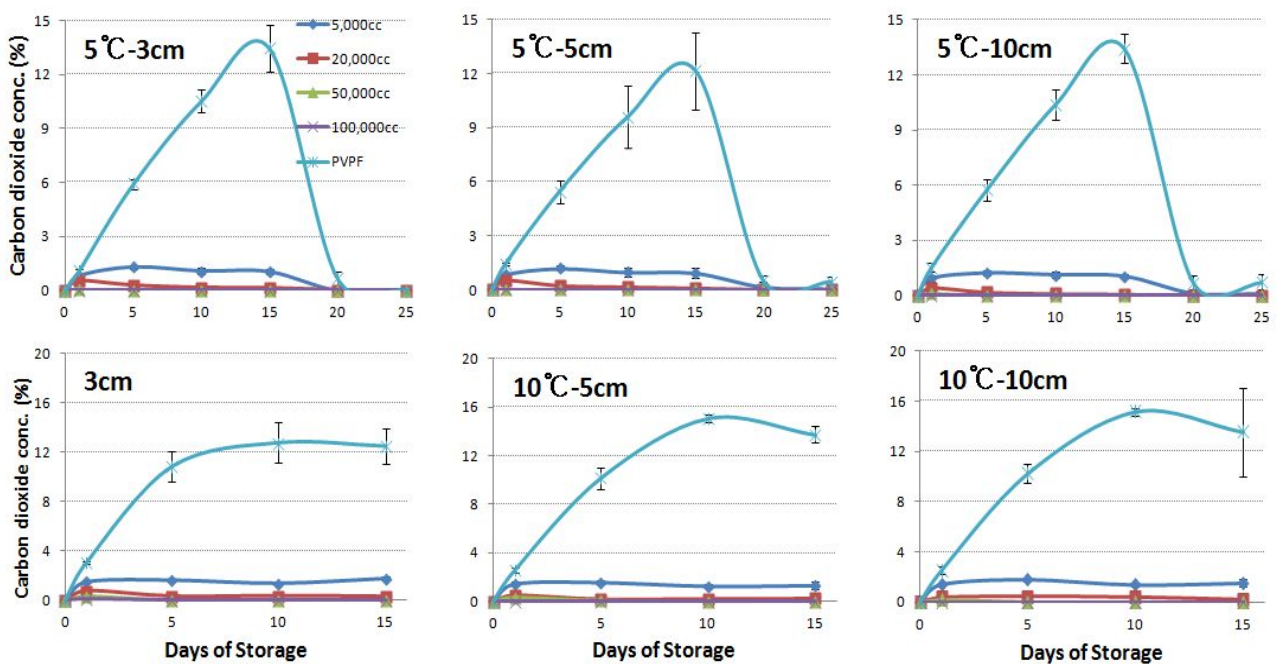


Fig. 2. Change of carbon dioxide conc. of fresh-cut *Salicornia herbacea* L. Vertical bars represent  $\pm$ SD(n=5).

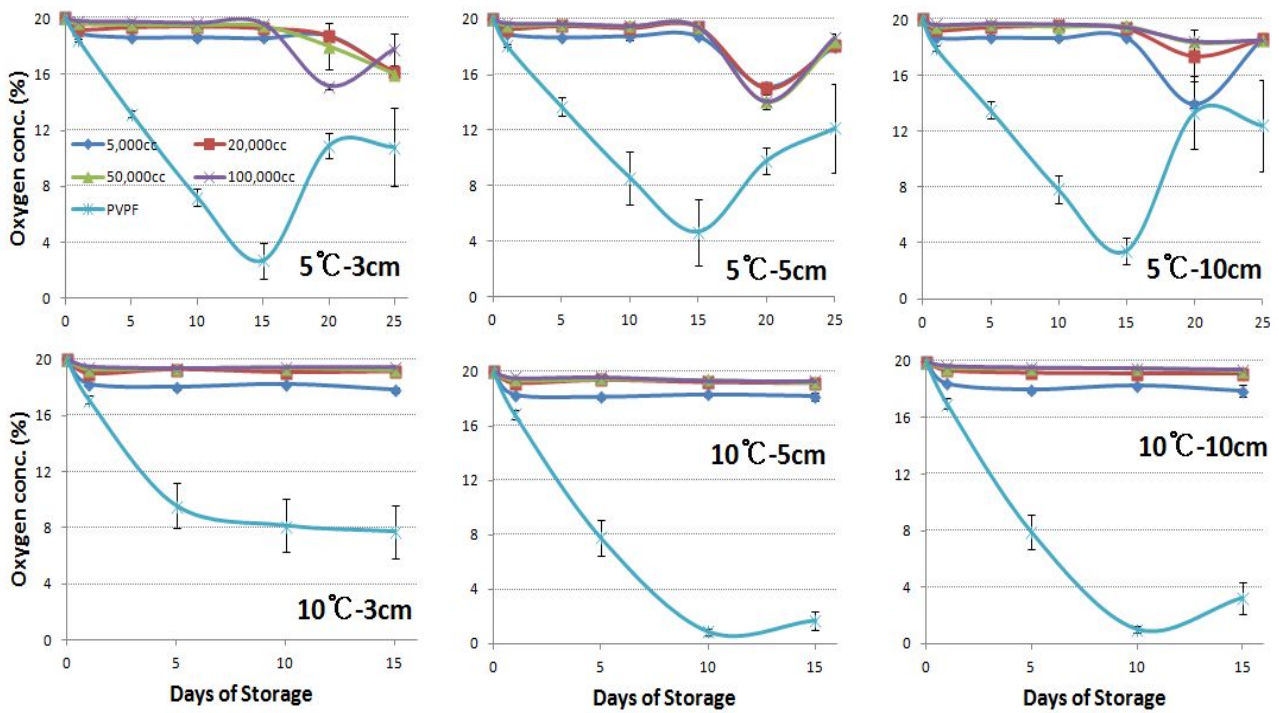


Fig. 3. Change of oxygen conc. of fresh-cut *Salicornia herbacea* L. Vertical bars represent  $\pm$ SD(n=5).

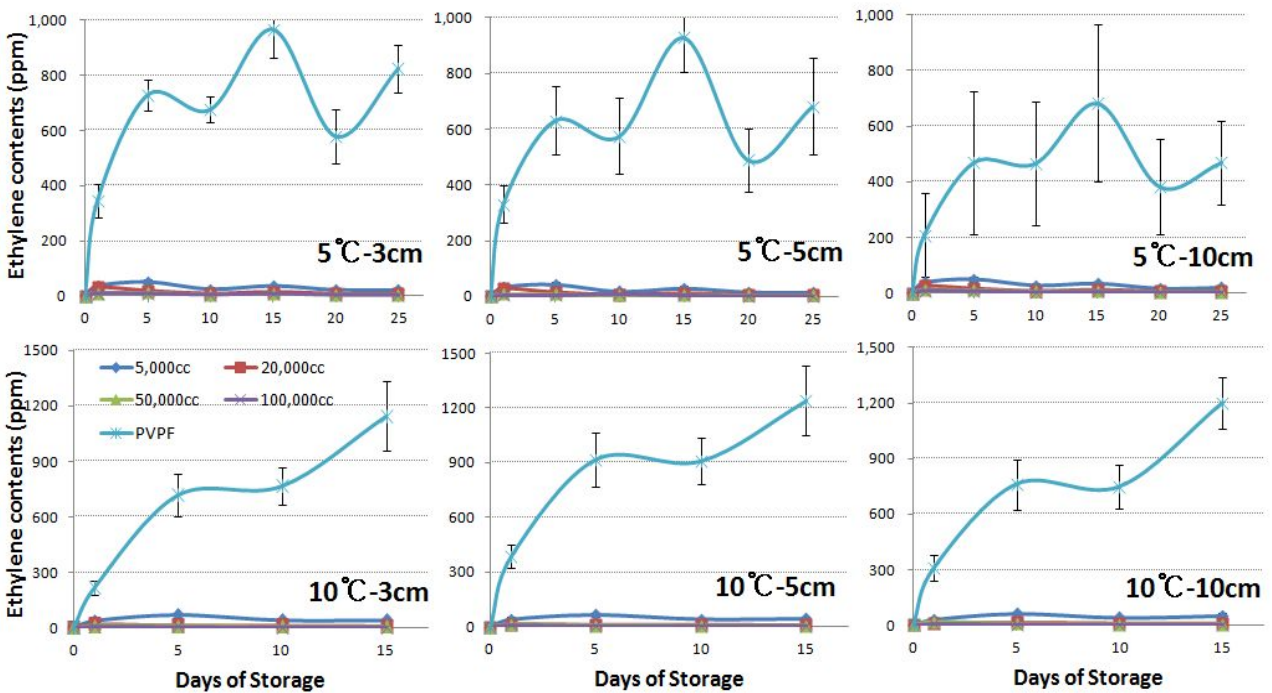


Fig. 4. Change of ethylene contents of fresh-cut *Salicornia herbacea* L. Vertical bars represent  $\pm$ SD(n=5).

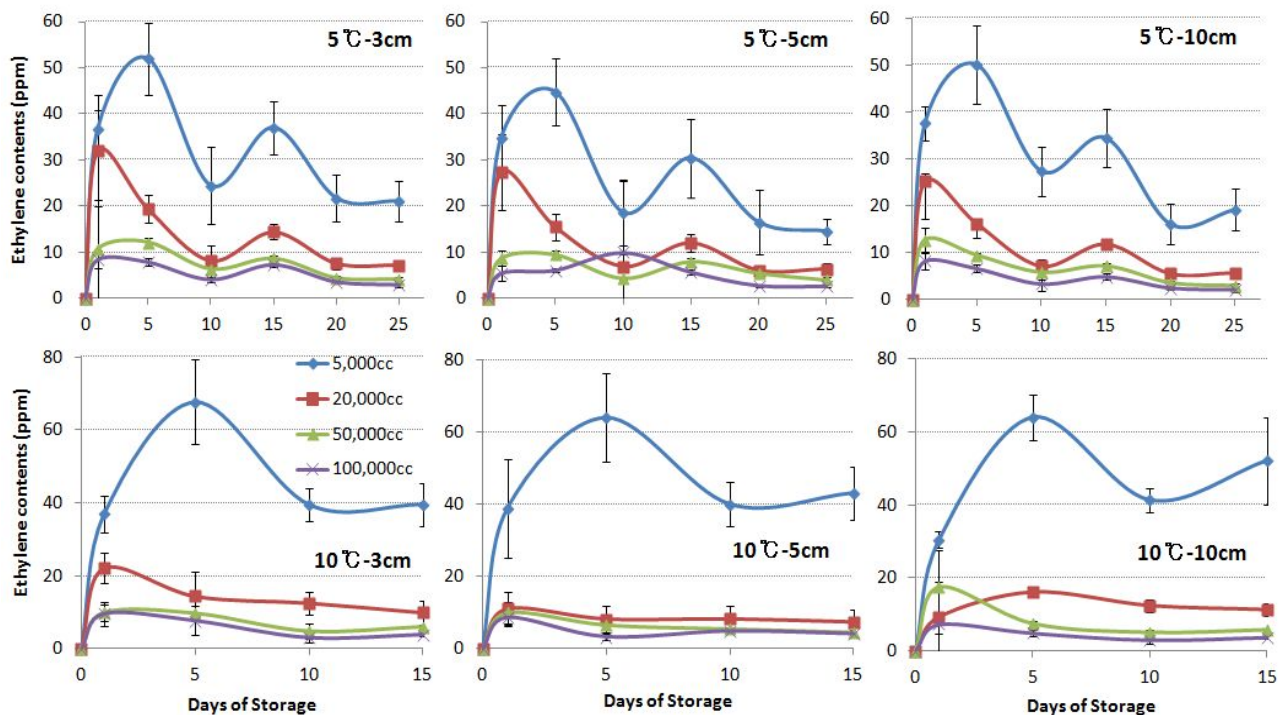


Fig. 5. Change of ethylene contents of fresh-cut *Salicornia herbacea* L. excepted PVPF treatment. Vertical bars represent  $\pm$ SD(n=5).

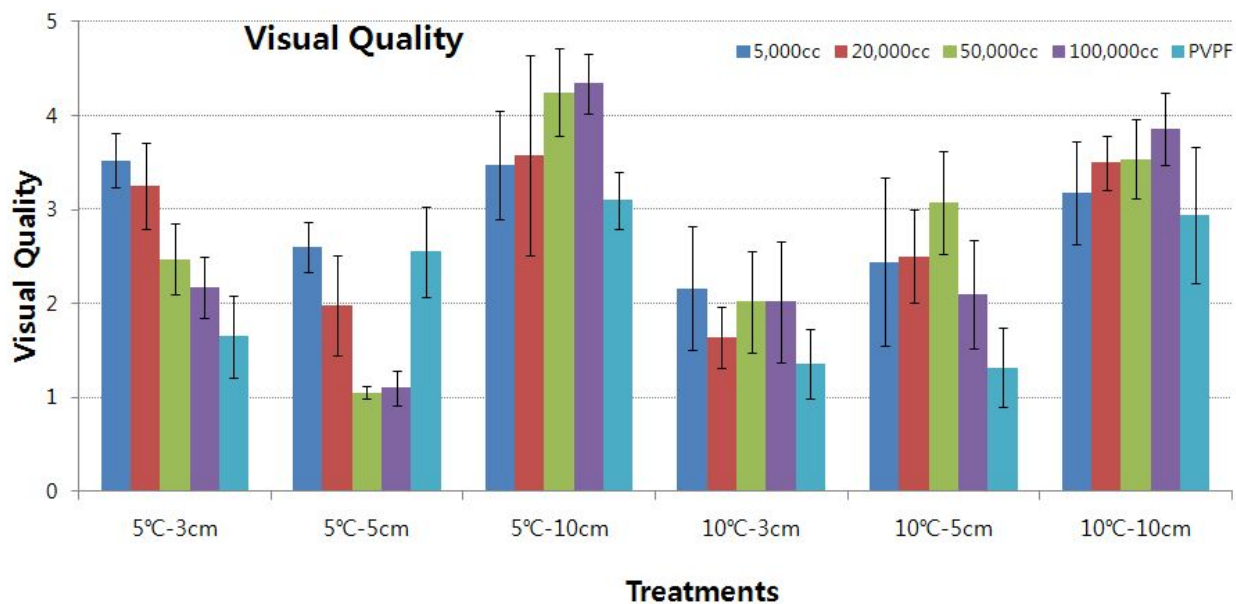


Fig. 6. Visual quality of fresh-cut *Salicornia herbacea* L. stored at 5 °C and 10 °C for 25 days. Vertical bars represent  $\pm$ SD(n=20).

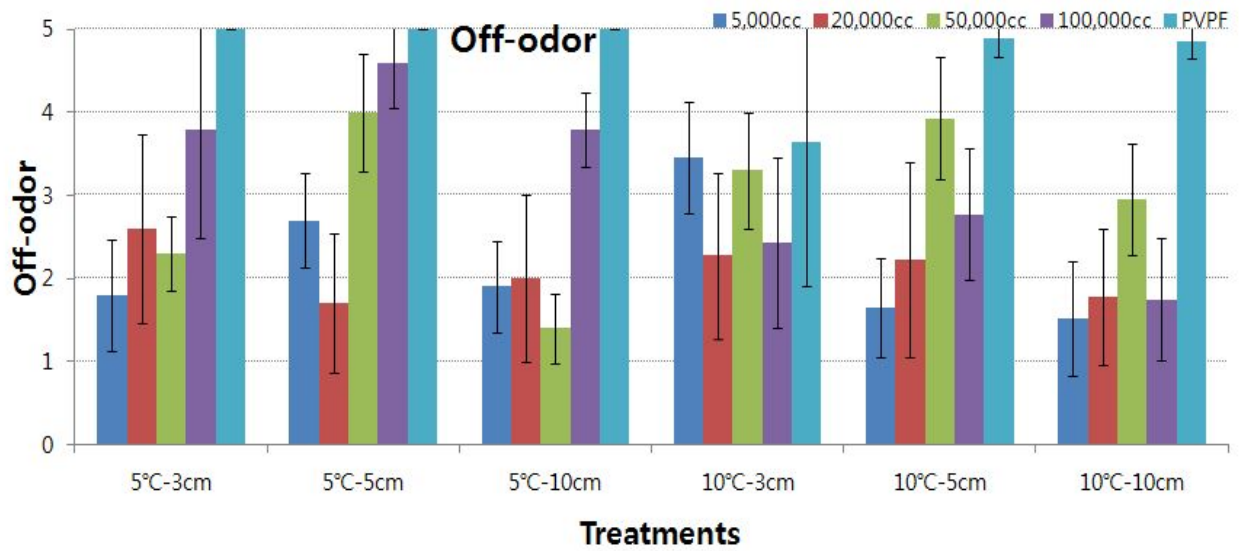


Fig. 7. Off-odor of fresh-cut *Salicornia herbacea* L. stored at 5 °C and 10 °C for 25 days. Vertical bars represent  $\pm$ SD (n=20).

## 6. 신선엽생식물(어린순과 성체)의 저장조건 확립: 온도, 습도, CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>농도

### 가. 서 언

통통마디는 현재 주로 건조상태에서 판매중에 있으며, 노지 수확시기인 여름철에는 성체와 함께 부드러운 어린순을 판매하고 있다. 어린순은 조직이 연하여 성체보다 이용이 쉬워 성체보다 어린순의 이용가치가 늘어날 것으로 전망한다. 그러나 어린 조직은 수분함량이 높아 저장성이 낮으며 저장기간 중 중량감소 및 부패 등에 의해 상품가치가 저하될 우려가 있다. 따라서 성체와 어린순의 적정 저장 온도를 비교하여 어린순 저장성 향상을 구명하기 위해 이 실험을 실행하였다.

### 나. 재료 및 방법

전라남도 신안군에서 자생하는 통통마디의 어린순과 성체를 대상으로 저장온도는 5℃와 10℃에 저장하였다. 포장재와 조사항목은 “다양한 형태의 신선편이 엽생식물의 MAP조건 구명”의 연구와 동일하였다.

### 다. 결과 및 고찰

성체와 어린순을 비교한 결과, 생체중 감소는 미세천공(Cont.)에 저장한 어린순과 성체 모두 가장 높은 생체중 감소율을 나타내었는데 그중에서도 어린순이 성체에 비해 다소 높은 생체중 감소율을 나타내었다. 100,000cc 필름 처리구에서도 어린순이 성체에 비해 높은 생체중 감소율을 나타내었는데, 이는 성체에 비해 조직이 연하여 산소투과도가 높은 필름을 이용하여 저장하였을 때 수분감소로 인한 생체중 감소가 크게 나타났으나, 생체중 감소율이 3% 미만으로 나타나 생체중 감소율로 인한 상품성 저하는 없는 것으로 보였다(Fig. 1). 이산화탄소 농도 변화는 진공필름 처리구에서 가장 높은 이산화탄소 농도를 나타내었고, 무처리구와 진공필름 처리구를 제외한 나머지 처리구에서는 성체보다 어린순에서 다소 높은 이산화탄소 농도를 나타내었다. 산소 농도 변화도 이산화탄소 농도 변화와 비슷한 결과를 나타내었다(Fig. 2,3). 저장기간 중 에틸렌 농도는 진공(PVPF) 처리구에서 1,000ppm이 넘는 수치를 나타내어(Fig. 4), 나머지 처리구의 비교가 불가능하여 PVPF 처리구를 제외한 나머지 처리구를 대상으로 비교하였다. 투과도가 가장 낮은 5,000cc 처리구에서 가장 높은 에틸렌 농도를 나타내었고, 투과도가 높은 50,000cc 처리구와 100,000cc 처리구에서 낮은 에틸렌 농도를 저장 종료일까지 비슷한 농도를 나타냈다(Fig. 5). 미세천공과 진공필름 처리구를 제외한 나머지 처리구중 50,000cc 처리구의 어린순과 성체 모두 높은 외관 점수를 나타내었고, 20,000cc 처리구 어린순과 성체 모두 낮은 이취 점수를 나타내었다(Fig. 6,7). 따라서 어린순은 성체에 비해 조직이 연하므로 산소 투과도가 높은 필름 저장은 적합하지 않으며, 저장 종료일에 외관과 이취 조사결과 어린순은 성체에 비해 저장성이 떨어지는 것으로 나타났다.

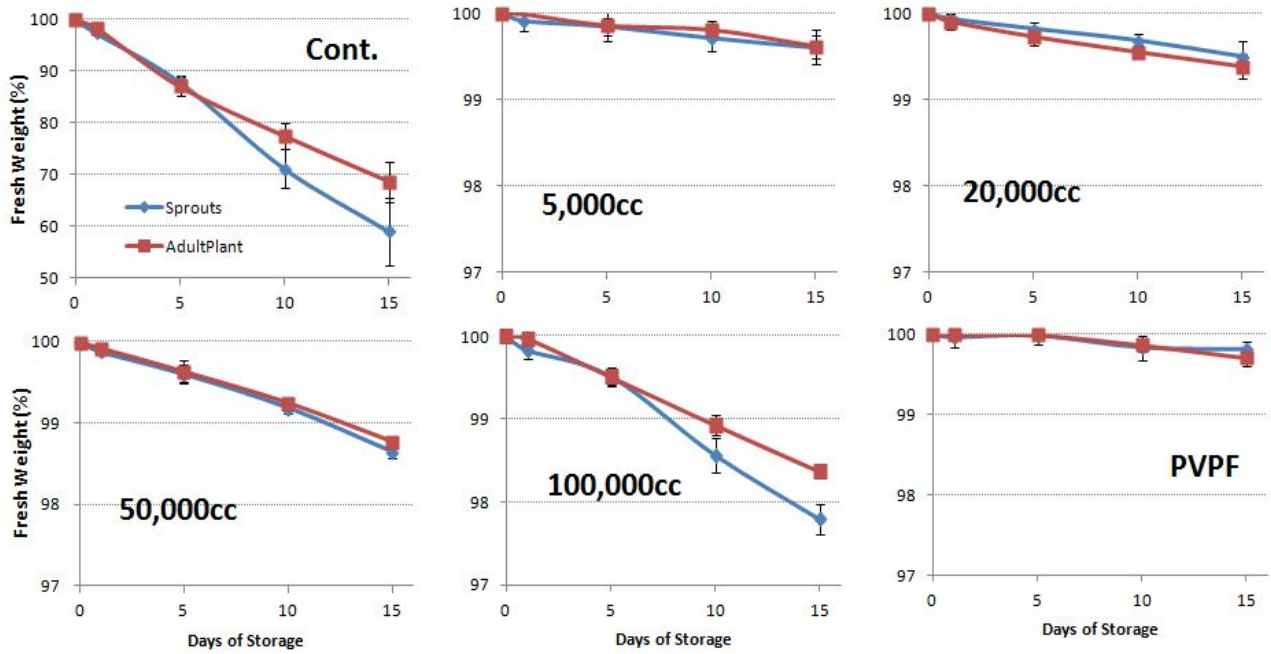


Fig. 1. Change of fresh weight of *Salicornia herbacea* L. Vertical bars represent  $\pm$ SD(n=5).

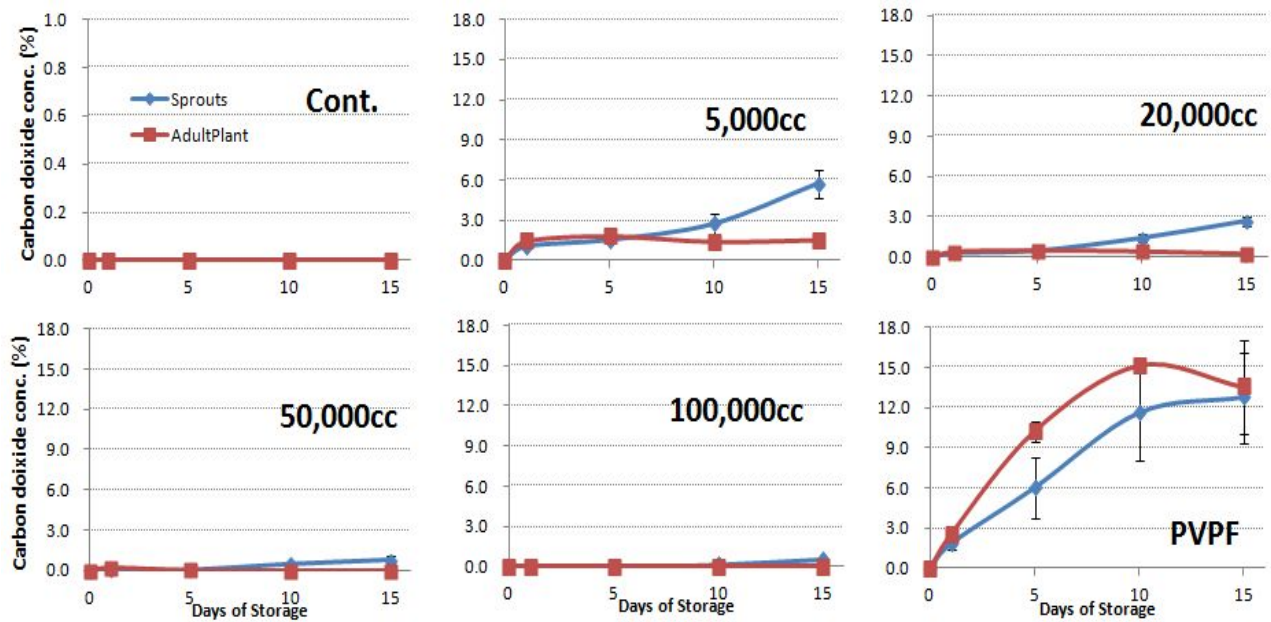


Fig. 2. Change of carbon dioxide conc. of *Salicornia herbacea* L. Vertical bars represent  $\pm$ SD(n=5).

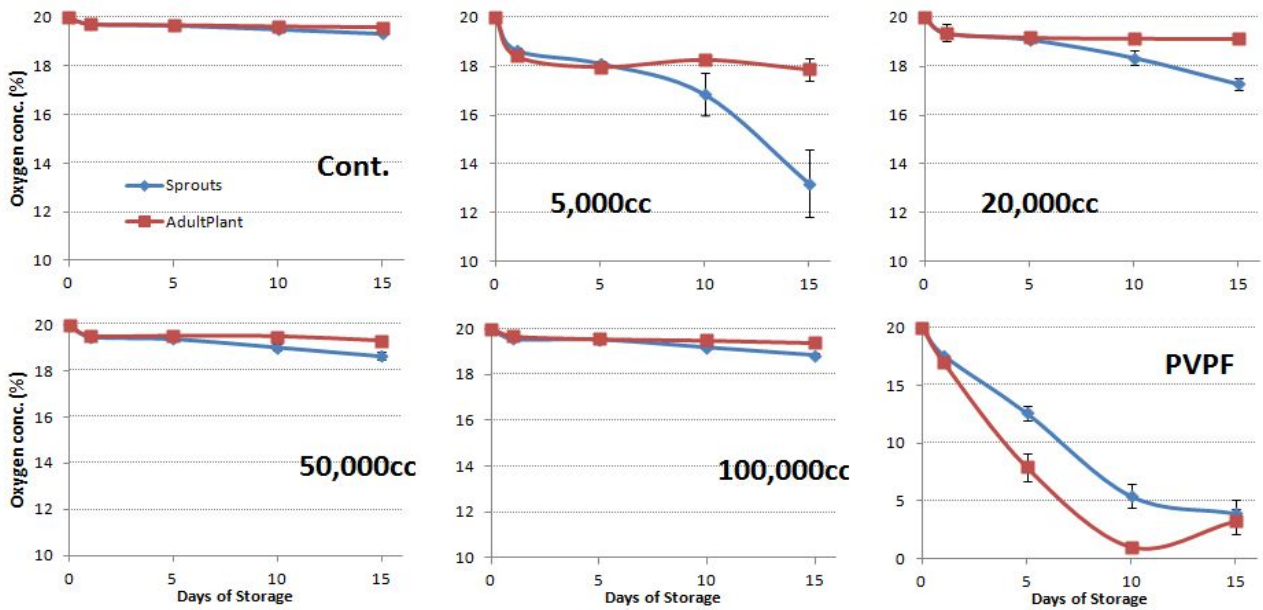


Fig. 3. Change of oxygen conc. of *Salicornia herbacea* L. Vertical bars represent  $\pm$ SD(n=5).

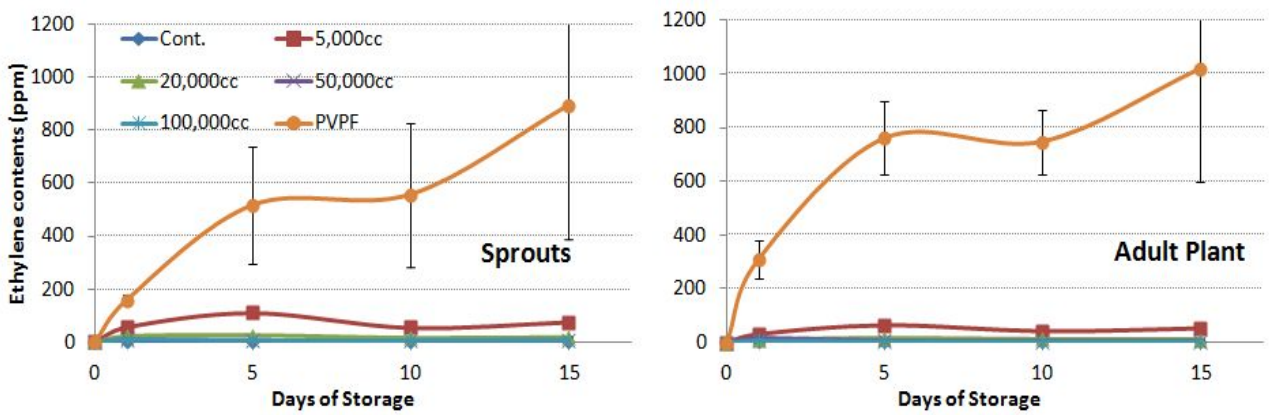


Fig. 4. Change of ethylene contents of *Salicornia herbacea* L. Vertical bars represent  $\pm$ SD(n=5).

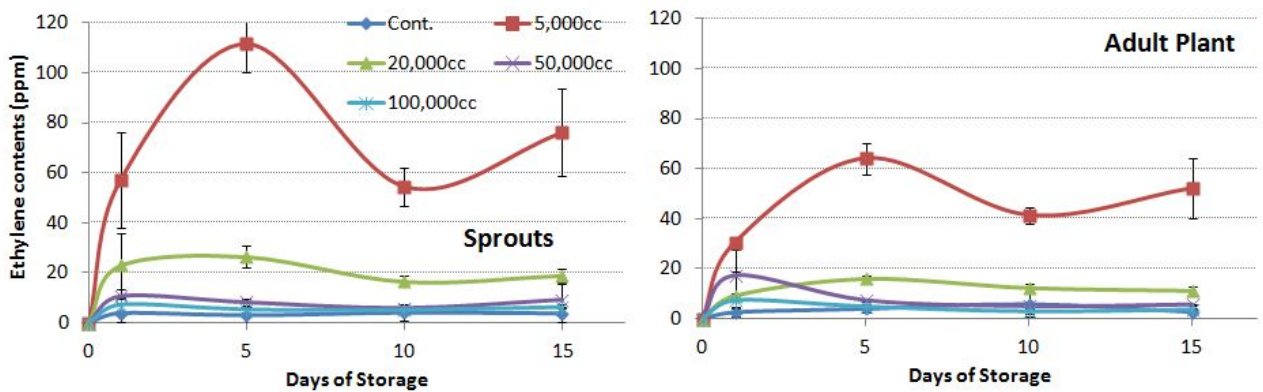


Fig. 5. Change of ethylene contents of *Salicornia herbacea* L. excepted PVPF treatment. Vertical bars represent  $\pm$ SD(n=5).

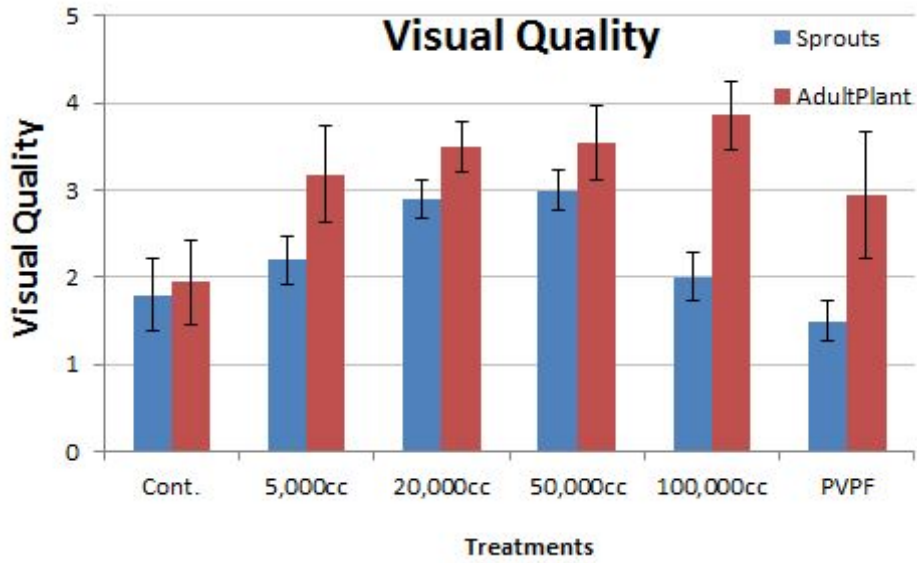


Fig. 6. Visual quality of *Salicornia herbacea* L. stored at 10 °C for 15 days. Vertical bars represent  $\pm$ SD(n=20).

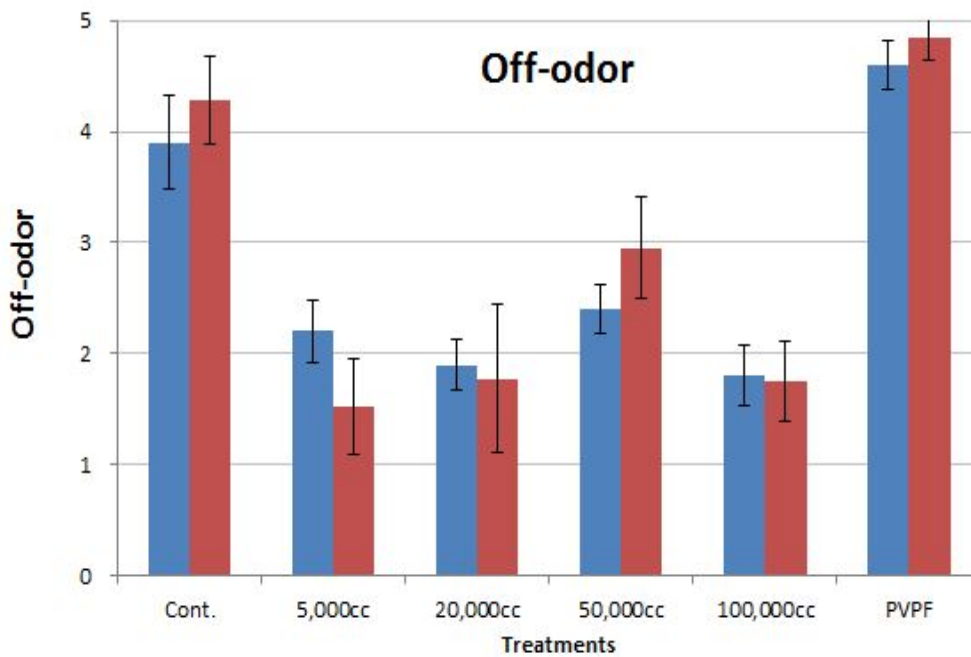


Fig. 7. Off-odor of *Salicornia herbacea* L. stored at 10 °C for 15 days. Vertical bars represent  $\pm$ SD(n=5).



## 7. 신선엽생식물 예냉 조건 확립: 공랭, 강제송풍, 빙랭, 수랭

### 가. 서 언

모든 원예작물의 수확후 높은 품온은 원예작물의 호흡 등 물질대사율을 증가시키고 호흡열을 발생시켜 많은 에너지를 소모하게 한다(Kader, 2002; Ryall과 Lipton, 1979). 따라서 수확후 대사활동을 저하시키고 노화를 지연시키기 위해서는 온도가 낮을 때에 수확하거나, 수확후 즉시 예냉처리로 호흡열의 제거가 필요하다. 원예작물에 대한 예냉 처리와 이에 대한 효과는 엽채류 뿐만 아니라 과실류, 그리고 버섯류에서도 보고되고 있다(Beik 등, 2009; Choi 등, 2000; Lee 등, 2010; Kim 등, 2007; Park, 2003). 그러나 통통마디의 경우 예냉 관련 연구 보고는 없었다. 통통마디의 경우 대부분 고온기인 늦은 봄부터 여름까지 바닷가에서 채취하여 판매하기 때문에 수확 중 호흡 등의 생리 대사 활성이 증가하게 되어 예냉이 요구되는 작물이다. 이에 본 연구는 엽생식물 통통마디에 적합한 예냉방법을 알아보려고 수행하였다.

### 나. 재료 및 방법

전남 신안군에서 재배된 통통마디(*Salicornia herbacea* L.)를 대상으로, 수확 후 냉장상태에서 실험실로 수송하여 상온에 12시간 정치하였다. 품온이 상온까지 상승한 상태에서 빙랭(얼음과 물을 4:1로 섞어 온도가 -1℃가 되게 하여 처리함-Icing), 수냉(얼음과 물을 1:4로 섞은 후 수온이 1℃가 되게 한 후 처리함-Hydrocooling), 강제송풍(2℃ 냉장고에 풍속 6m/sec으로 처리함-Forced air cooling), 공랭(2℃ 냉장고에 풍속 1m/sec 이하로 정치 처리함-Room cooling)처리 하였다. 각 예냉방법의 효과를 알아보기 위해 처리 중 품온 변화를 적외선 온도계(#E-39650-20, Cole Parmer Co., USA)를 이용하여 품온을 계속 확인하여 품온이 2±1℃로 저하될 때까지 측정하였다.

최근 국내에서 개발된 femtosecond laser로 가공한 비천공 필름인 산소투과도가 20,000cc/m<sup>2</sup> • day<sup>-1</sup> • atm<sup>-1</sup>인 필름을 사용하여 5℃에 저장 비교하였다.

저장기간 중 저장 전 중량에 대한 저장 중 생체중 감소정도를 백분율로 생체중 감소 정도를 측정하여 나타내었고, infrared sensor(checkmate, PBI, Denmark)를 사용하여 이산화탄소와 산소농도, gas chromatography(GC-2010, Shimadzu, Japan)을 사용하여 에틸렌 농도를 측정하였다. 저장 종료일에 패널테스트를 통하여 우수한 외관은 5점, 시장성의 한계에 달하는 것은 3점, 외관상 품질이 가장 떨어지는 것을 1점으로 하여 조사를 실시하였다. 이취는 가장 많은 이취가 발생하는 것을 5점으로 하여 차등을 두어 패널테스트를 통하여 조사하였다. 모든 실험은 6반복으로 진행하였으며 통계처리는 Microsoft Excel 2007 program을 이용하여 평균과의 차이를 나타낸 표준편차로 나타내었다.

#### 다. 결과 및 고찰

처리별 생체중 감소율은 무처리구에서 저장 종료일인 25일에 가장 높은 0.8%의 생체중 감소율을 나타내었고, 수냉(Hydrocooling)처리구에서 가장 낮은 약 0.5% 정도의 생체중 감소를 보였다. 그러나 모든 처리구에서 1% 미만인 감소율을 나타내며, 저장 기간중 수분손실에 의해 생체중 감소로 인한 품질 저하 현상은 나타나지 않았다. 저장중 이산화탄소 농도와 산소 농도는 저장을 한 후 급격한 증가하고 감소를 보였다. 이산화탄소 농도는 저장 직후 급격히 증가하여 저장 1일에 모든 처리구가 약 0.6% 농도를 나타낸 후, 저장 10일 경과 일까지 상대적으로 소폭 증가하면서 약 0.7 - 0.8% 정도의 이산화탄소 농도를 나타냈다. 저장 10일 후 점차적으로 감소하여 저장 20일 경과 된 시점에서는 이산화탄소는 거의 나타나지 않았다. 산소 농도는 저장 직후 상대적으로 급격히 감소하여 모든 처리구에서 약 19.0%의 농도를 나타냈고, 저장 20일까지 모든 처리구에서 비슷한 형태로 약 19.5 - 18.5% 농도의 범위에서 변화하였다. 저장 20일 이후 무처리구와 빙랭은 각각 17.85%, 18.2%로 낮은 산소 농도를 나타냈고, 이를 제외한다면 나머지 처리구는 약 18.8% 수준의 농도를 나타냈다. 이산화탄소는 0.8% 내외에서, 산소는 2.5% 내외에서 변화되며 이산화탄소와 산소는 저장 중 통통마디의 품질 변화에 영향을 끼치지 않았으리라 생각된다. 에틸렌 농도는 저장 직후 급격한 증가를 보이며 저장 1일에 모든 처리구에서 약 11.5ppm의 농도를 나타내며 저장기간 중 가장 높은 농도를 보였다. 저장 1일후 역시 모든 처리구에서 급격히 감소하며 저장 5일 후에는 1-2ppm의 농도에서 유지되며 처리구간의 차이를 나타내지 않았다(Fig. 1). 페닐테스트를 통한 외관 조사 결과, 무처리구만이 상품성이 있다고 판단되는 한계점인 3점에 해당하는 외관을 보였고, 공랭(Room-cooling), 강제송풍(Forced air cooling), 수냉(Hydrocooling), 빙랭(Icing)의 순으로 외관의 수치가 낮게 조사되었다. 이취에서는 외관에서 가장 낮은 점수를 받은 빙랭 처리구에서 가장 많은 이취가 발생하였고, 외관 결과 중 가장 높은 점수를 나타내었던 무처리구에서 많은 이취가 발생하였다. 공랭 처리구에서 가장 낮은 이취를 발생하였다(Fig. 2). 따라서 상대적으로 양호한 외관 상태와 낮은 이취를 발생하였던 공랭 처리가 통통마디의 예냉 처리에 가장 적합하다.

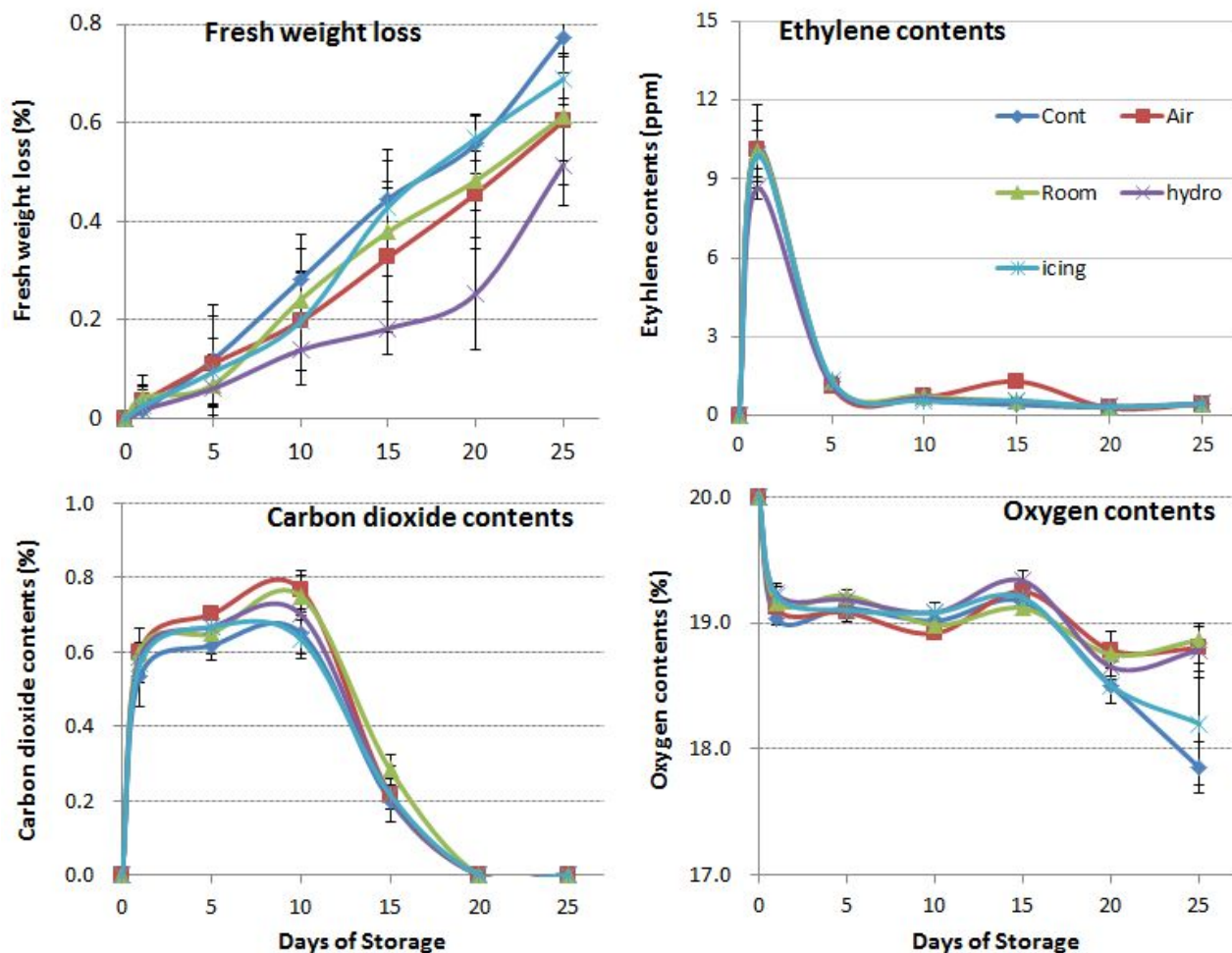


Fig. 1. Change of Fresh weight loss, carbon dioxide contents, oxygen contents, and ethylene contents of *Salicornia herbacea* L. Vertical bars represent  $\pm$ SD(n=6).

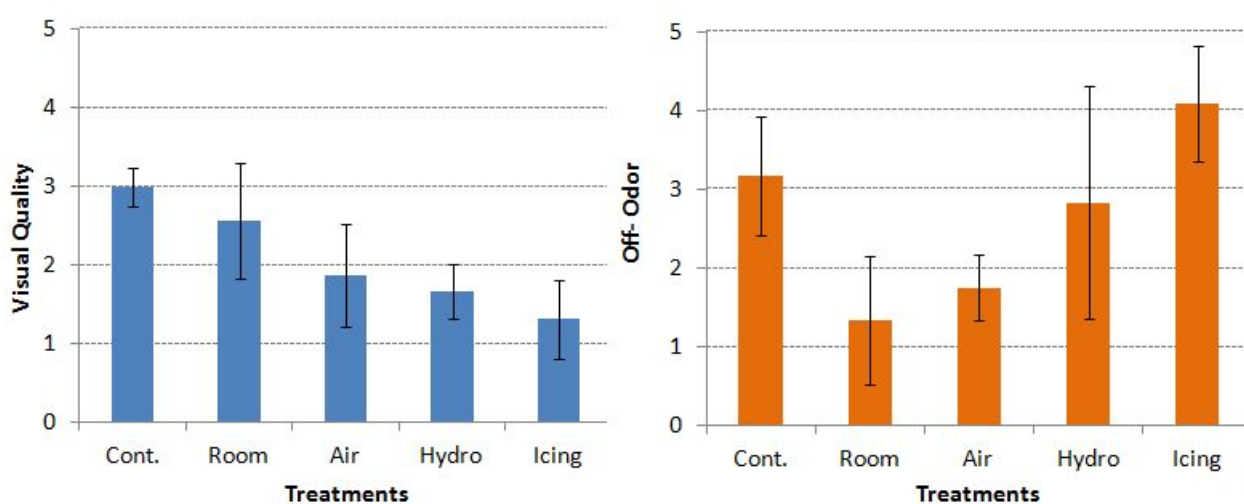


Fig. 2. Change of Visual quality and Off-odor of *Salicornia herbacea* L. Vertical bars represent  $\pm$ SD(n=6).



Fig. 3. Appearance of *Salicornia herbacea* L. stored at 15°C for 25 days.

## 8. UVc처리 및 재배토양이 염생식물 MAP 저장성에 미치는 영향

### 1. UVc처리 실험

#### 가. 서 언

태양에서 방사되는 자외선(Ultraviolet radiation)은 100nm-400nm의 파장역에 속하며 진공자외선(100-200nm), 원자외선(200-300nm), 근자외선(300nm-400nm)으로 분류되거나, UV-A(400-320nm), UV-B(320nm-280), UV-C(280-200nm)의 3개 영역으로 분류된다(Yun 등, 2003). 그 중 UV-C는 이미 의료계 및 산업계에서 쓰레기와 물 등의 소독에 이용되고 있다(Decho, 2000 ; Wilson, 2004). 살균은 자외선을 조사함으로써 미생물내의 핵산 성분이 화학변화를 일으켜 대사장해를 가져와 증식능력을 잃게 됨으로써 이루어지는 데(Kim 과 Chae, 1983; Marianne 등 1991), 이에 본 연구는 UVc 처리가 통통마디의 저장성에 미치는 영향에 대해 알아보하고자 수행되었다.

#### 나. 재료 및 방법

전라남도 신안군에서 재배된 통통마디를 가지고 UVc 살균 실험을 진행하였다. 기존에 살균에 주로 사용해 온 UVc(245nm)를 통통마디에 처리하여 품질향상과 살균효과를 조사하였다. 각 처리에 필요한 경과시간을 다르게 하여, 0kJ(무처리)와 5kJ, 10kJ, 15kJ, 그리고 20kJ로 처리하였다. 최근 국내에서 개발된 femtosecond laser로 가공한 비천공 필름인 산소투과도가  $20,000\text{cc}/\text{m}^2 \cdot \text{day}^{-1} \cdot \text{atm}^{-1}$ 인 필름을 사용하여 5°C에 저장 비교하였다.

저장기간 중 저장 전 중량에 대한 저장 중 생체중 감소정도를 백분율로 생체중 감소 정도를 측정하여 나타내었고, infrared sensor(checkmate, PBI, Denmark)를 사용하여 이산화탄소와 산소농도, gas chromatography(GC-2010, Shimadzu, Japan)을 사용하여 에틸렌 농도를 측정하였다. 저장 종료일에 패널테스트를 통하여 우수한 외관은 5점, 시장성의 한계에 달하는 것은 3점, 외관상 품질이 가장 떨어지는 것을 1점으로 하여 조사를 실시하였다. 이취는 가장 많은 이취가 발생하는 것을 5점으로 하여 차등을 두어 패널테스트를 통하여 조사하였다. 모든 실험은 6반복으로 진행하였으며 통계처리는 Microsoft Excel 2007 program을 이용하여 평균과의 차이를 나타낸 표준편차로 나타내었다.

#### 다. 결과 및 고찰

저장온도와 UVc 처리 정도를 다르게 하여 저장기간 중 생체중 감소를 조사한 결과, 5°C에서는 25일, 10°C에서는 15일 저장하였다. 각각 5°C와 10°C저장한 모든 처리구에서 저장 종료일까지 1.0% 미만의 수치를 보였으며, 그 중에서도 10°C에 저장한 UVc 15kJ 처리구가 저장 종료일 15일에 가장 낮은 약 0.3%의 수치를 나타냈다(Fig. 1). 생체중 감소로 인한 품질 저하 현상은 나타나지 않았다.

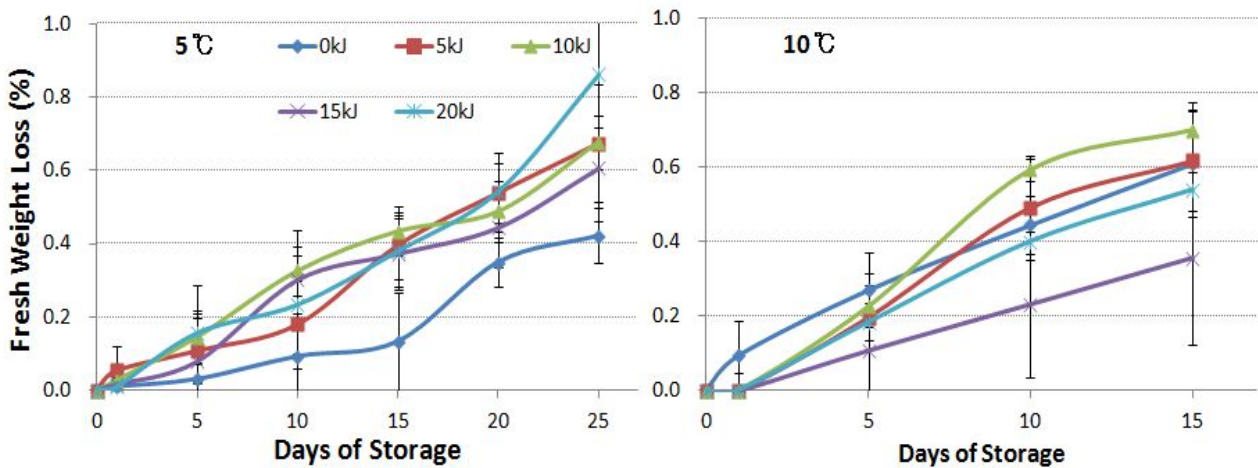


Fig. 1. Change of fresh weight loss of *Salicornia herbacea* L. Vertical bars represent  $\pm$ SD(n=5).

저장기간 중 이산화탄소의 농도 변화는 5°C의 모든 처리구는 저장 직후 상대적으로 급격한 증가를 보였고, 그 중 10kJ와 15kJ 처리구가 가장 높은 0.8%의 이산화탄소 농도를 나타냈다. 저장 1일 경과 후 대체적으로 모든 처리구에서 점차 감소하여 20일 이후에는 이산화탄소 농도가 거의 나타나지 않았다. 10°C에서도 저장 직후 높은 증가를 보이며, 5kJ과 10kJ 처리구가 0.9%의 이산화탄소 농도를 나타냈다. 저장 1일 경과 후 모든 처리구가 서서히 감소하여 저장 종료일인 15일 경과된 시점에서는 모든 처리구의 이산화탄소 농도는 약 0.2%-0.4%에 머물렀다. 산소 농도 변화는 5°C에서 저장 15일 경과 시점까지 모든 처리구에서 19% 농도 내외에서 유지되었고, 저장 15일 이후 급격히 감소하여 저장 후 20일에 15kJ과 20kJ 처리구에서 약 16%의 가장 낮은 산소 농도를 나타냈다. 10°C에서의 산소 농도는 저장 직후부터 저장 종료일까지 모든 처리구에서 19% 농도를 유지하였다(Fig. 2).

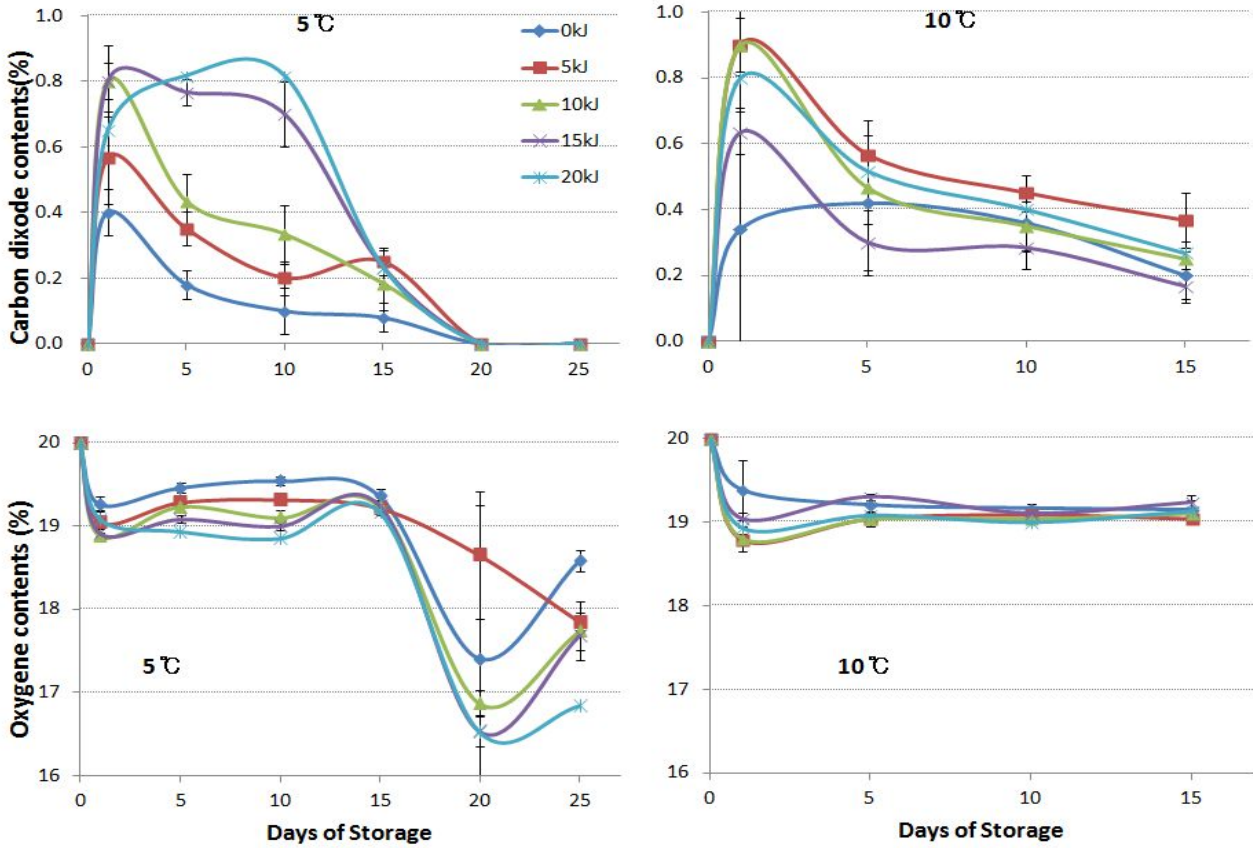


Fig. 2. Change of carbon dioxide contents and oxygen contents of *Salicornia herbacea* L. Vertical bars represent  $\pm$ SD(n=5).

에틸렌 농도 변화는 5°C에서 저장 직후 급격한 농도 증가로 인해 10kJ 처리구에서 가장 높은 약 31ppm의 높은 에틸렌 농도를 나타냈고, 5kJ은 약 23ppm, 15kJ은 약 20ppm, 그리고 0kJ(무처리구)는 11.5ppm의 농도를 나타내었고, 처리구 중 20kJ 처리구만 무처리구보다 다소 낮은 약 8ppm의 에틸렌 농도를 나타냈다. 저장 후 5일 경과된 시점에서 모든 처리구에서 2ppm 정도의 수치를 나타내며 저장 종료일까지 낮은 에틸렌 농도를 유지하였다. 10°C에서도 저장 직후 농도가 증가하였는데, 5kJ 처리구에서 약 29ppm의 가장 높은 이산화탄소 농도를 나타낸 후 감소하였으며, 무처리구를 포함한 나머지 처리구들은 저장 직후 8-10ppm정도의 농도로 상대적으로 5kJ의 수치보다 다소 낮게 나타낸 후 감소하여 저장 종료일까지 낮은 농도로 유지되었다(Fig. 3).

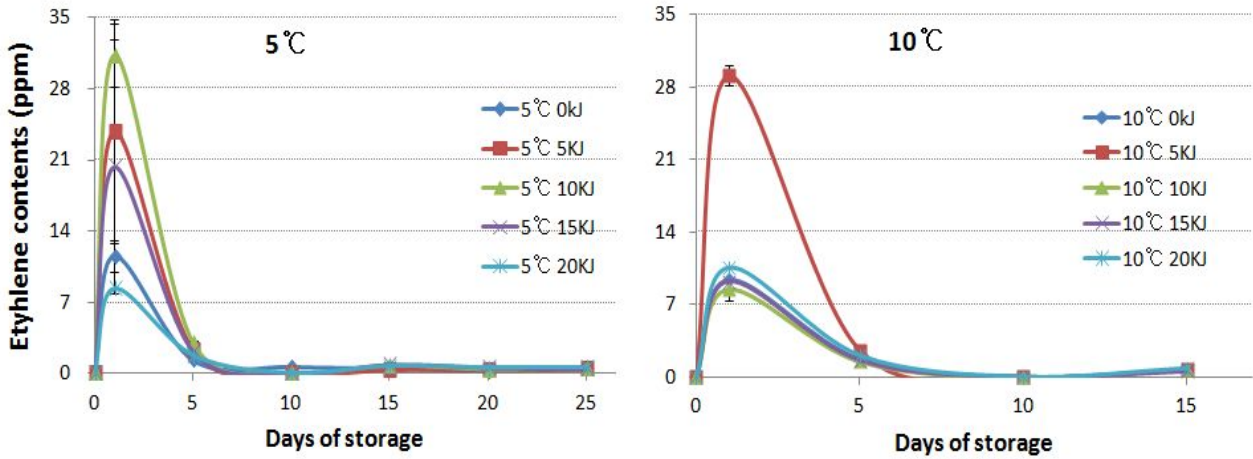


Fig. 3. Change of Ethylene contents of *Salicornia herbacea* L. Vertical bars represent  $\pm$ SD(n=5).

저장 종료일에 실시한 패널테스트로 외관과 이취를 조사한 결과, 외관은 20kJ 처리구가 5°C와 10°C에서 모두 높았으며, 5kJ 처리구가 두 온도에서 가장 낮았다. 이취의 경우 5°C에서는 15kJ, 5kJ, 20kJ 그리고 10kJ의 순으로, 10°C에서는 5kJ, 10kJ, 15kJ 그리고 20kJ의 순으로 이취가 많이 발생하였다(Fig. 4). UVc 로 인한 살균처리로 저장성 향상을 기대하였으나, 통통마디에 UVc 처리 효과는 나타나지 않았고, UVc 세기가 15kJ 이상에서는 호흡과 에틸렌 발생이 증가가 나타났다.

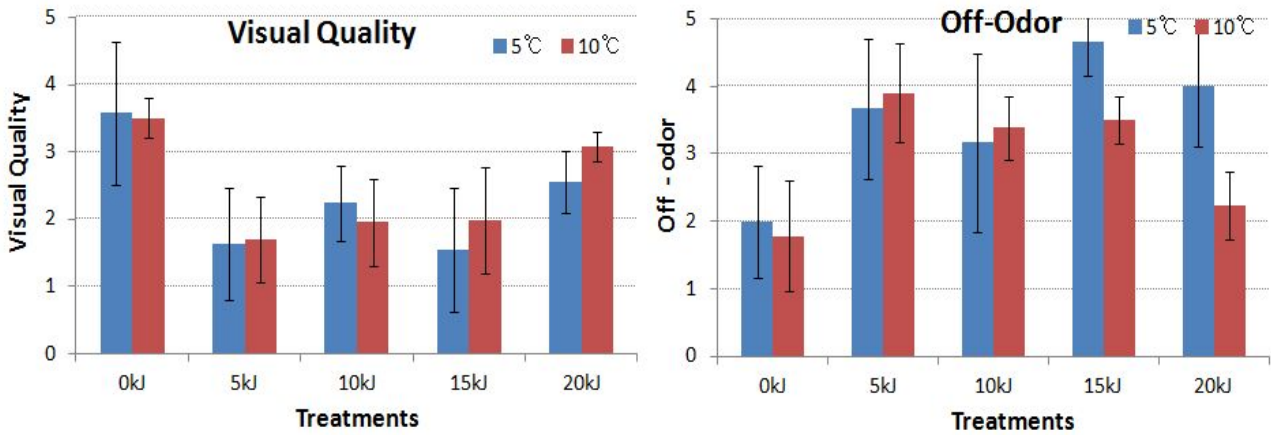


Fig. 4. Visual quality and off-odor of *Salicornia herbacea* L. stored at 5 °C and 10 °C for 25 and 15 days. Vertical bars represent  $\pm$ SD(n=5).



## 2. 재배조건에 따른 저장성 비교

### 가. 서 언

토양 염분농도가 높은 토양에 서식하는 식물을 염생식물이라고 하는데, 통통마디는 명아주과에 속하는 일년생 식물로 우리나라의 대표적인 염생식물이다(Kim, 2010). 통통마디는 염 축적형 식물로, 흡수된 염을 액포에 저장하고 식물체내 수분량을 증가시켜 희석효과를 통하여 염 스트레스에 대한 내성을 갖는 것으로 보고된 바 있다(Breckle, 1990). 이에 본 연구는 일반적인 원예용 상토에 통통마디를 파종하여 갯벌에 재배된 통통마디와의 저장성을 비교하였는데, 원예용 상토는 피트모스와 코이어 같은 유기성 재료에 펄라이트 질석, 압면 등과 같은 무기성 재료로 혼합한 상토이다. 염도가 높은 갯벌에 비해 원예용 상토는  $3.6 \text{ cmol}^+ \cdot \text{L}^{-1}$ 의 낮은 나트륨 함량을 나타낸다(Kim, 2002).

### 나. 재료 및 방법

서울여대 온실에서 재배된 통통마디의 종자를 대상으로 재배조건을 다르게 하여 재배한 후 저장성 비교를 하였다. 원예용 상토와 강화도에서 채취한 갯벌토를 128공 트레이에 파종하였다. 파종 후 갯벌토양은 210일, 상토는 183일이 경과된 통통마디 성체를 가지고, femtosecond laser로 가공한 비천공 필름인 산소투과도가  $20,000 \text{ cc/m}^2 \cdot \text{day}^{-1} \cdot \text{atm}^{-1}$ 인 필름을 사용하여,  $5^\circ\text{C}$ 와  $10^\circ\text{C}$ 에 저장하였다.

저장기간 중 저장 전 중량에 대한 저장 중 생체중 감소정도를 백분율로 생체중 감소 정도를 측정하여 나타내었고, infrared sensor(checkmate, PBI, Denmark)를 사용하여 이산화탄소와 산소농도, gas chromatography(GC-2010, Shimadzu, Japan)을 사용하여 에틸렌 농도를 측정하였다. 저장 종료일에 패널테스트를 통하여 우수한 외관은 5점, 시장성의 한계에 달하는 것은 3점, 외관상 품질이 가장 떨어지는 것을 1점으로 하여 조사를 실시하였다. 이취는 가장 많은 이취가 발생하는 것을 5점으로 하여 차등을 두어 패널테스트를 통하여 조사하였다. 모든 실험은 5반복으로 진행하였으며 통계처리는 Microsoft Excel 2007 program을 이용하여 평균과의 차이를 나타낸 표준편차로 나타내었다.

### 다. 결과 및 고찰

$10^\circ\text{C}$ 에서는 30일간,  $5^\circ\text{C}$ 에서는 20일간 저장되었다. 생체중 감소율 조사 결과,  $5^\circ\text{C}$ 에서는 상토에서 재배된 처리구가 갯벌에 재배된 처리구보다 약 2배 가량 높은 2.0%에 가까운 생체중 감소율을 나타내었고,  $10^\circ\text{C}$ 에서도 갯벌에 비해 상토에서 재배된 처리구가 저장 종료일에 약 1.8배 높은 생체중 감소율을 나타냈다. 이산화탄소 농도의 변화는  $10^\circ\text{C}$ 에서 저장 직후 급격한 농도 증가를 보이며, 상토 처리구는 0.9%, 갯벌 처리구는 0.7%의 농도를 보인 후 저장 15일 경과일 까지 꾸준히 낮아지는 결과를 보였다.  $5^\circ\text{C}$ 에서는 상토 처리구만 저장 직후 약 0.2% 농도의 저장 기간 중 가장 높은 수치를 보인 후 저장 10일 경과 일까지 낮아지는 형태를 보였고, 갯벌

처리구는 저장 기간 동안 0.1% 미만의 낮은 농도를 유지하였다. 산소 농도는 10℃에서 저장 직후 다소 낮아져 저장 종료일까지 19.0% - 19.5%의 수치를 계속 유지하였다. 5℃에서도 저장 15일까지 19.5% 농도 내외의 수치를 유지 하다가, 저장 20일 이후 농도가 낮아져 저장 종료일에 상토 처리구는 18.4%, 갯벌 처리구는 18.2%의 농도를 보였다. 에틸렌 농도는 저장 후 5일까지 꾸준한 증가를 보이며, 모든 처리구가 약 15±3ppm 수준의 농도를 나타냈다. 5℃의 경우 저장 10일 이후 약 5ppm 정도의 농도를 저장 종료일까지 유지하였고, 10℃에서도 5℃와 같은 패턴으로 변화하였고, 저장 20일 후 다소 감소하였다. 상토 처리구 보다 갯벌의 처리구의 에틸렌 농도가 다소 낮았으나 통계적 차이는 나타나지 않았고, 저장온도에 의한 농도 차이도 나타나지 않았다(Fig. 1).

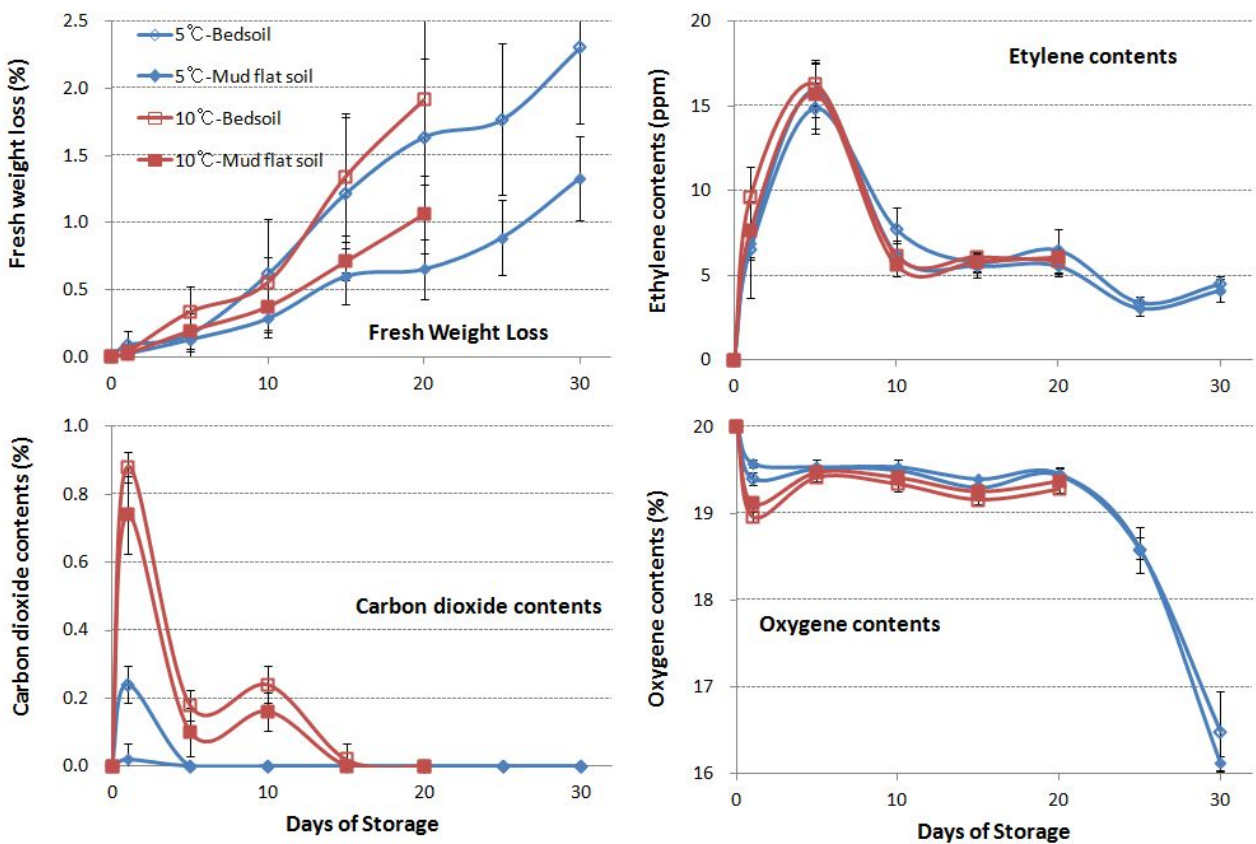


Fig. 1. Change of fresh weight loss, carbon dioxide contents, oxygen contents and ethylene contents *Salicornia herbacea* L. Vertical bars represent ±SD(n=5).

저장 종료일에 외관은 상토 처리에 비해 갯벌 처리구가 다소 높았으나 두 처리 모두 3점 이하의 좋지 않은 외관을 보였고, 이취는 상토 처리에 비해 갯벌 처리에서 많은 이취 발생을 나타냈다(Fig. 2). 따라서 저장온도는 10℃보다 5℃에 저장하는 것이 더 오래 저장할 수 있으며, 상토에 재배하기 보다는 갯벌에서 재배하는 것이 바람직하다.

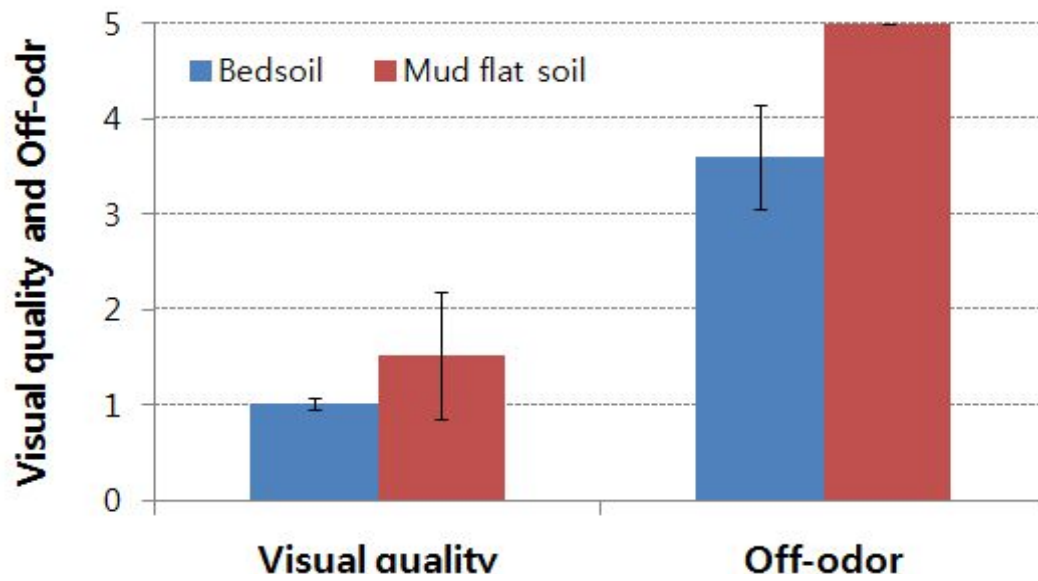


Fig. 2. Visual quality and off-odor of *Salicornia herbacea* L. stored at 5 °C for 30 days. Vertical bars represent  $\pm$ SD(n=20).

## 9. 초미분 분쇄 및 과립제조, 친수성이 우수한 압출성형 가공기술 개발

### 1. 초미분말화

#### 가. 연구내용(재료 및 방법)

본 연구에서는 최적의 건조방법에 따른 통통마디를 초미분을 만들기 위하여 열풍, 동결, 원적외선 건조된 함초의 활성식품성분(active food ingredient AFI)인 엽과 미네랄 성분이 물에 용이하게 용해할 수 있는 함초분말을 설계하기 위하여 80℃에서 120min 건조시킨 분말을 pin mill(JIC-P10, Jeil co., Ltd Seoul, Korea)을 이용하여 1조립함초분말을 제조하였고, 강원대학교에서 공동 연구 개발한 turbo mill을 이용하여 초미립함초 분말을 제조하였다. 저온 초미분말 미분쇄기(Turbo Mill, Korea Energy Technology, Korea, 그림 1-1)를 사용하였다. 함초 분쇄 시 분쇄기 선속도를 100m/s로 선정하여 실험하였다.



그림 1-1. Turbo mill



그림1-2 . Turbo mill의 저온 챔버

분쇄생성물의 입도분포는 Particle Size Analyzer(Malvern Ins. Ltd, Mastersiser - 2000, U. K)를 이용하여 분석하였다. 공시재료의 분산제(分散劑)는 2차 증류수를 사용하였고, 분쇄물을 분산제에 넣은 후 1분간 분산시킨 후 5회 반복하여 입자를 측정하였다.

#### 나. 연구결과 요약(결과 및 고찰)

Turbo 분쇄기 선속도 100m/s 조건에서 분쇄한 함초 초미립 분말 시료의 입도 분석 값은 표 2과 같이 나타내었다. 열풍건조는 d(0.1)이 4.7 $\mu$ m, d(0.5)는 16.4 $\mu$ m 그리고 d(0.9)는 43.5 $\mu$ m로 초미립분말화 되었고, 건조방법을 동결건조와, 원적외선 건조 방법으로 변화시켜도 분말 입자 크기 차이는 약 1 $\mu$ m 정도로 편차가 발생함으로서, 함초 분말의 입자크기는 건조 방법에 영향을 받지 않음이 분석되었다.

표 2. 건조방법에 따른 초미세 분쇄 후 입도분석 결과

건조방법	d(0.1)	d(0.5)	d(0.9)
열풍건조	4.732	16.421	43.493
동결건조	3.592	13.905	38.658
원적외선건조	4.461	14.906	39.673

건조 시간에 비해 가장 분쇄 입도의 편차가 적은 원적외선 건조 방법을 이용해 통통마디의 잎과 줄기를 각각 분리하여 건조 후 초미세 분쇄한 시료 분말의 결과는 표. 3과 같다. 줄기시료에 비하여 잎의 경우 d(0.1)이 3.961 $\mu\text{m}$ , d(0.5)는 15.486 $\mu\text{m}$  그리고 d(0.9)는 39.896 $\mu\text{m}$ 로 섬유소 양에 따라 1~5 $\mu\text{m}$  정도의 편차가 발생하였으며, 줄기도 초미분말화 하였을 경우 충분히 잎처럼 <45 $\mu\text{m}$  분말을 제조 할 수 있음이 분석되었다.

표. 3 통통마디 부위에 따른 초미세 분쇄 후 입도분석 결과

부위	d(0.1)	d(0.5)	d(0.9)
줄기	4.488	16.587	44.554
잎	3.961	15.486	39.896

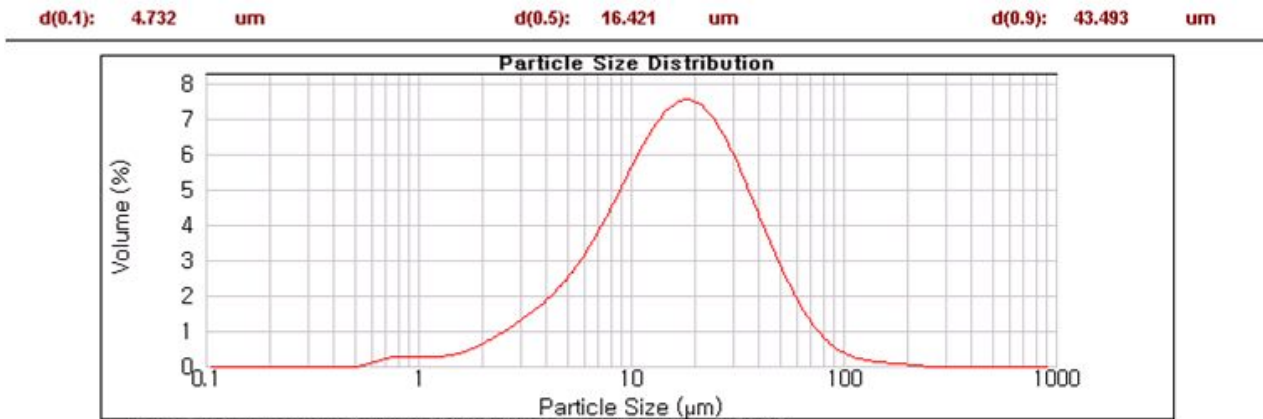


그림 2. 열풍건조 초미분 입도 분석

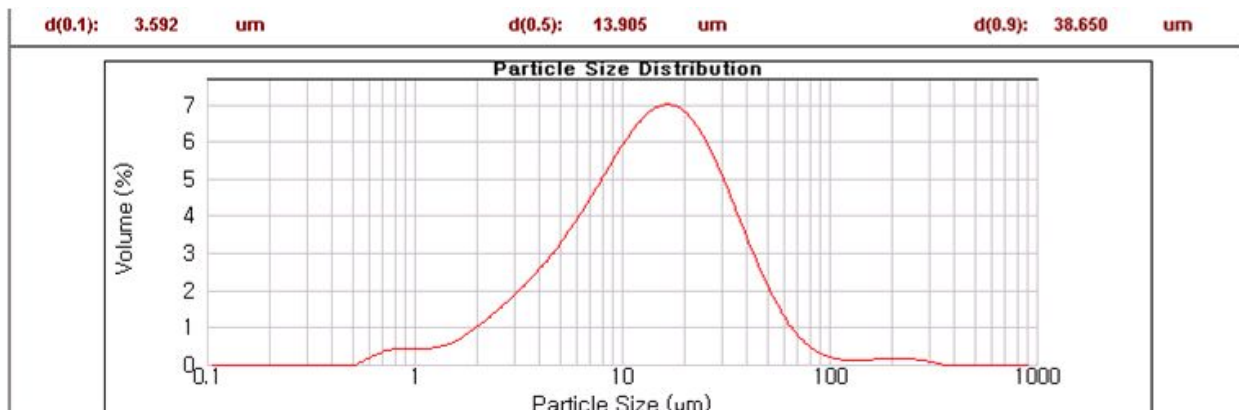


그림 3. 동결건조 초미분 입도 분석

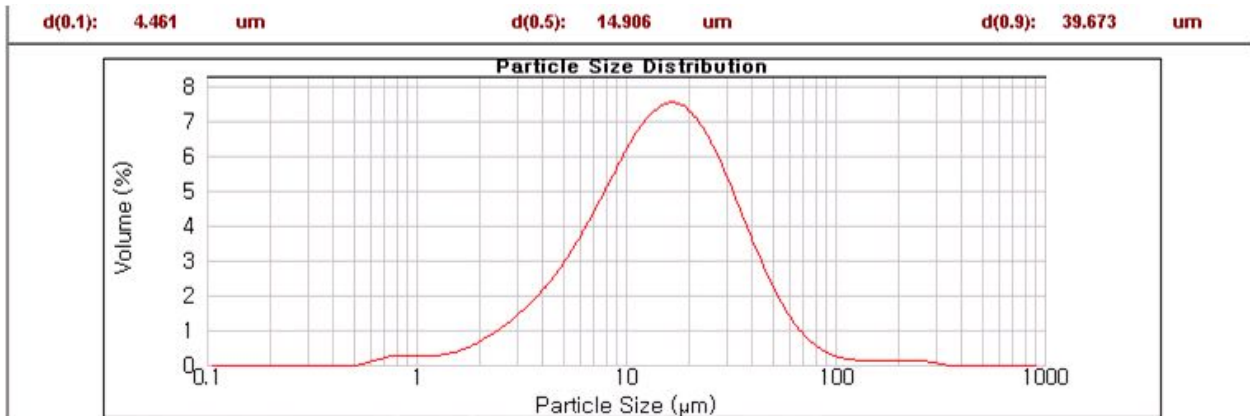


그림 4. 원적외선 건조 초미분 입도 분석

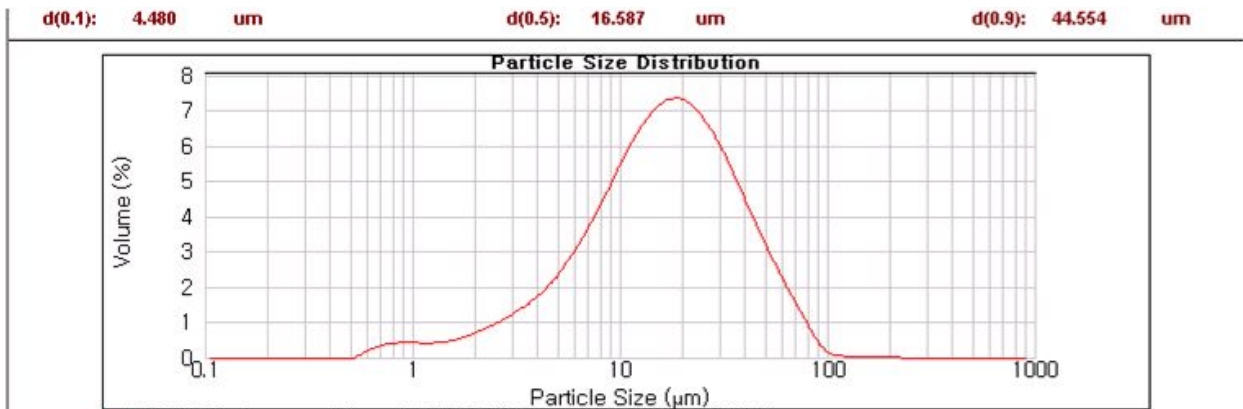


그림 5. 함초 즐기 건조 초미분 입도 분석

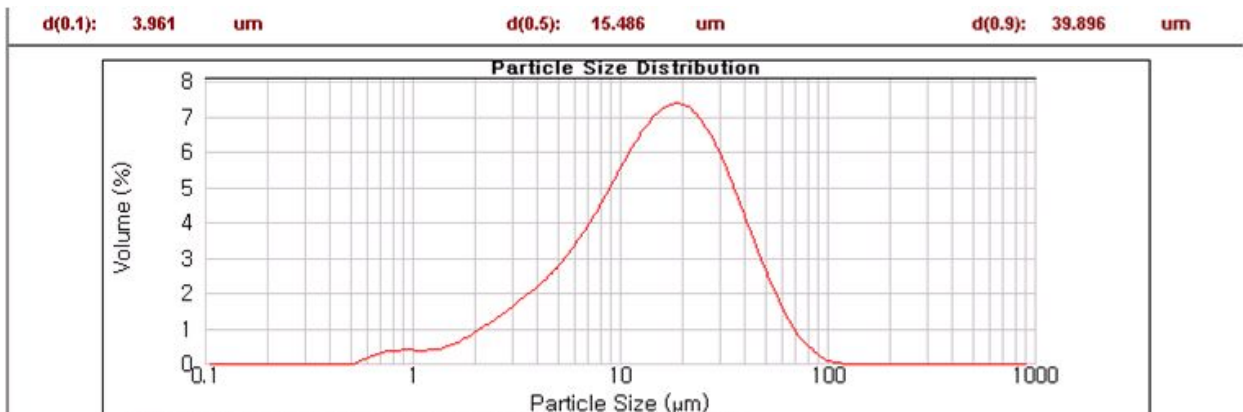


그림 6. 함초 잎 건조 초미분 입도 분석

## 10. 유효 성분함량 및 용해도를 증가시킬 수 있는 압출공정 변수 연구

### - 연구내용(재료 및 방법)

본 연구에서는 함초의 엽 및 미네랄 성분이 물에 용이하게 용해될 수 있으며, 대기중의 수분, 빛, 온도에 의하여 함초의 고유한 성분이 물리적 및 화학적으로 변질이 되지 않도록 함초가 전분속에 균일하게 분포 및 분산된 함초 encapsulation 미립 분말을 제조하고자 한다.

함초의 엽과 미네랄 성분이 우수한 친수성 성질으로 개질된 함초 encapsulation 분말을 용융압출 성형방법으로 제조하는 기술을 개발하고자 다음과 연구를 수행 하였다

- 1)함초 압출성형 조건확립(온도, 함수, 압출량, 압출속도)
- 2)함초/쌀 전분 배합비 확립(100/0, 80/20, 50/50,
- 3)수분 함량이 함초 압출 성형체에 미치는 영향 분석  
(함초/쌀 전분 : 80/20 일정한 상태에서 수분 함량 25%. 30% 변화)
- 4)함초 encapsulation 시료의 유효성분 함량의 용해도 향상에 대한 설계
- 5)시료의 활성식품성분(엽, 미네랄 성분) 분석

### - 실험 재료 및 압출성형의 분말제조

본 연구에서는 사용된 함초는 전라남도 신안에서 자란 것으로 구입하여, 수세한 후 야채 탈수기를 이용하여 함초 표면의 수분을 제거 한 다음 4℃ 냉장고에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

쌀은 강원도 홍천군에서 생산된 햇곡원 홍천강수라쌀, 화촌농산(주) 구입하였다. 압출성형 하기 위해 원재료를 pin mill 분쇄기(JIC-P10, Jeil co., Ltd Seoul, Korea)를 이용하여 20 mesh screen을 분쇄 후 체 망을 이용하여 150<X<250( $\mu$ m)사이의 걸러진 입자를 압출 성형 실험에 사용하였다.

### 1. 압출성형 이용을 위한 함초의 효율적인 건조 값을 찾기 위한 실험

#### 가. 건조 실험

함초 건조에 사용된 건조기는 (VS-1202D3N, scientific co., LTD, Seoul, Korea)열풍건조기를 사용하여 온도조건 및 건조시간은 표 .6 와같이 60, 80, 100℃에서 온도조건을 설정하여 30min 간격으로 120분 측정하였다.

나. 압출성형공정

본 실험에서 사용한 압출성형기는 동방향 완전 맞물림형 이축 압출 성형기(co-rotating intermeshing type twin-screw extruder, HANKOOK E.M Ltd., Gyeonggi-do, Korea)로서 barrel은 총 7개의 단위 section이 연결된 형태로 구성되어 있으며, L/D의비가 29:1이었고 사출구는 직경이 3.0mm이며, 직류 전동기 전력은 7.5kW, 380V(3상), 60Hz, 17A이며, 스크류 최대회전 속도는 1,800rpm이다.

기어박스에서 스크류 축에 발생하는 추력(trust force) 때문에 트러스트베어링을 사용해 감속비가 4.40:1로 스크류 회전 최대속도는 408.74rpm이다

원료의 투입은 single scerw feeder를 이용하였으며, 수분의 공급은 정량 펌프인 (L/S pump, Barnant Co., Ltd., USA)를 원료투입구를 이용하여 원료와 같이 투입되게 구성되어있다.

다. 압출성형의 공정변수

함초와 쌀을 배합한 제조 시 공정변수(온도, 수분함량, 스크류 배열에 및 종류에 따른 전단력의 크기)에 따른 소요에너지, 압출압력, 팽화율 등 화학적 성분 및 물리적 성질에 미치는 영향을 분석하고자 공시재료 함초와 쌀 중분쇄 미분하여 350<X<450 μm사이의 걸러진 입자를 이용하였으며, 공정변수인 온도변화는 바렐 7번에서 2번까지 section까지 130/130/110/90/60 °C 순으로 설정 하였으며, 스크류 속도는 250rpm으로 고정하였고, 스크류 조건은 그림 .7과 같이 Type 1 Screw (2 Lobe 45° kneading Element x 2 x 3)사용하였다.

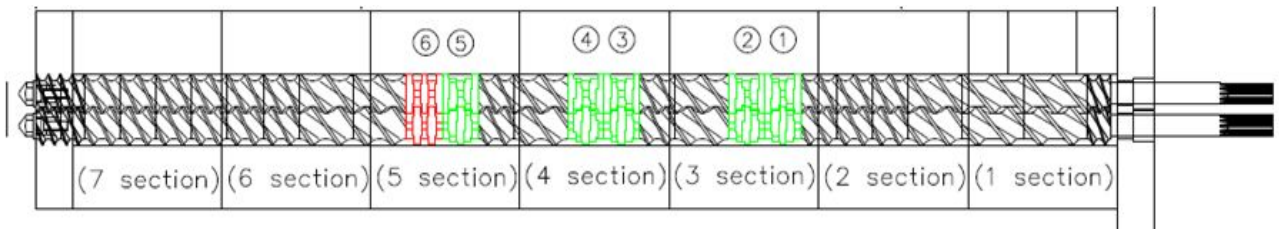


그림 7. 전단력 크기가 팽화미의 물성에 미치는 영향을 분석하기 위한 전단력 압출 성형 스크류 디자인 및 배열 설계도. Type 1 Screw (2 Lobe 45° kneading Element x 2 x 3)

- 토크 및 비기계적 에너지 투입량(Specific Mechanical Energy, SME).

비기계적에너지투입량은 원료가 투입되어 압출성형기를 통과할 때 원료의 단위 질량당 소비된 전기에너지로서, 토크 및 비기계적 에너지 투입량은 시료가 투입되어 압출성형기를 통과할 때 원료의 단위 질량당 소비된 기계적 에너지의 총 투입량으로 정의된다. (Guan and Hanna 2006: 996; Yuliani et al., 2006). 압출성형 중의 토크 측정은 5분 이상 압출 성형 후 토크가 안정된 상태(Stead stat)에서 토크 측정기(TRE-20K, Dacell Co., LTD., Korea)를 통해 측정된 값을 계속 장비(Dewe-book, Dwetron, Germany)를 이용하여 1분간 5회 측정 후 평균화 하였다.

다음 식은 비계적 에너지투입량 즉, SME를 측정하는 계산식이다.



$$SME = \frac{\text{Mechanical Energy input}}{\text{Mass Flow rate}} = \frac{N_{act}}{N_{max}} \times \frac{T_{act}}{T_{max}} \times \frac{K_w}{Q}$$

여기서,

$N_{act}$ 는 실제 스크류 회전 속도(rpm),

$N_{max}$ 는 최대 스크류 회전 속도(408.74rpm),

$T_{act}$ 는 실제 토크 값(N·m),

$T_{max}$ 는 최대 토크 값(196.13 N·m),

$K_w$ 는 직류 전동기 전력(7.5kW),  $Q$ 는 생산량(kg/h)을 나타냄.

- 압출 압력(Die pressure)측정: 압출압력은 일정한 조건으로 5분 이상 운전 중 압력이 안정된 상태(Steady-state)에서 계측장비를 이용하여 1분간 discharge 부분과 die의 3포인트에서 측정 후 평균값을 계산함.



그림 8. 실험에 사용된 DEWE soft6 와 연결된 압력 측정 장비

표 4. 압출성형시 함초와 쌀의 배합비

Sample	Mix proportion			
함초	100%	80%	20%	50%
쌀	0%	20%	80%	50%

라. 색도 측정

색도는 색차계(Model CM-600d, Minolta Co., Osaka, Japan)를 사용하여 CIE(Commission International de l'Eclairage)에 의한  $L^*, a^*, b^*$  값으로 나타내었다.

## 2. 온도변화에 따른 함초 분말 및 압출성형 처리 후 분말 용해도 및 분말 특성

원재료 함초와 쌀과 배합 시킨 후 압출성형 처리한 함초 분말의 온도 따른 용해도 비교 실험을 실시하였다. 실험에 사용된 분말은 입자크기는 sieve를 사용하여 400 $\mu$ m이하 값의 분말을 2g씩 각각의 온도 5, 20, 75 $^{\circ}$ C에서 증류수를 사용하여 30초간 Vortexing 한 후 여과지(Whatman No.2, 8 $\mu$ m)에 두 번 filtering 하였다. 양 · 음이온 농도 측정시 필터링 되어진 용액 0.2ml에 증류수 10ml로 희석하였다.

처리구: Trt1:

1. 조과쇄, 2. 초미분쇄, 3. 쌀 8: 함초 2 (M.C-25%), 4. 쌀 5: 함초 5 (M.C-25%), 5. 쌀 2: 함초 8 (M.C-20%), 6. 쌀 2: 함초 8 (M.C-25%) 7. 쌀 2: 함초 8 (M.C-30%), 8. 판매 분말, 9. 함초 소금

조사내용: pH, EC, 염도, 양 · 음이온 농도

<pH: pHmeter(Mettler Toledo. SG8. Switzerland) / EC: ECmeter(Mettler Toledo. SG3. Switzerland) / 양.음이온: Ion Chromatograph (Dionex, DX-120, USA)>

가. 무기물 함량 분석

건조시료 0.5g 씩 100ml 삼각플라스크에 넣고, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1ml 과 60% HClO<sub>4</sub>용액 10ml 첨가하여 서서히 가열한 후, 200 $^{\circ}$ C에서 분해 시켜 투명하게 될 때까지 분해한 다음, 분해액 온도가 떨어진 후 증류수로 희석 한 후 여과 처리 한다. 0.025ml에 증류수 50ml 로 희석 시키고, 여과액을 Ion Chromatograph (Dionex, DX-120, USA) 분석한다.

나. 연구결과 요약(결과 및 고찰)

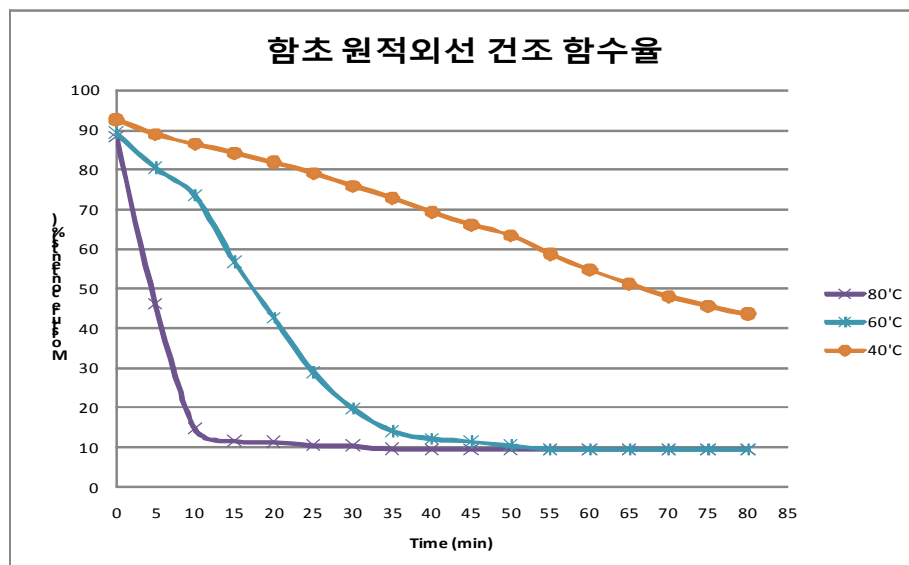


그림. 9. 함초를 이용한 원적외선 건조 함수율 측정

건조 시간에 따른 원적외선 건조 온도별 함수율의 변화 함수율 변화곡선을 그림 .9)로 나타냈다. 원적외선 건조 시간의 경우 80℃에서는 약 45분, 60℃에서는 60분에 종결되지만 40℃에서는 80분이 경과하여도 완전히 건조되지 않는 특성을 가진다. 반면 원적외선 80℃의 경우 육안으로도 색상 변화가 심하여 60℃를 이용하여 건조 하는 것이 최적의 건조 방법으로 사료된다.

표 6. 열풍건조 온도 조건에 따른 시간대별 함초의 수분함량

time(min)	30		60		90		120	
Temp(℃)	수분 함량	건조 속도	수분 함량	건조 속도	수분 함량	건조 속도	수분 함량	건조 속도
60	86.54 %*	0.45	84.30 %*	0.07	76.38 %*	0.26	71.47 %*	0.16
80	86.52 %*	0.45	70.01 %*	0.55	30.93 %*	1.30	6.14% *	0.82
100	84.93 %*	0.50	68.82 %*	0.54	28.67 %*	1.34	5.82% *	0.76

\*수분함량 (moisture content)%

생 함초 시료의 건조조건을 분석하기 위하여 건조온도 60℃에서 건조한 시료는 초기 30분간은 0.45wt.%/min 로 수분이 증발되어 건조되었으나, 60분에서 120분까지 건조시켜도 건조속도는 0.2wt.%/min으로 건조 효율이 매우 낮게 조사되었다. 80℃에서 건조한 시료의 건조 속도는 90분 이내 0.45에서 1.3wt.%/min 범위로 건조속도가 상승되어 30% 정도 수분 함량에 도달하였고, 120분 시료에서는 완전 건조되었다. 함초는 자체 다량의 수분을 포함하고 있기 때문에 저장성과 가공성에 있어서 많은 문제점을 가지고 있었다. 이러한 결과를 토대로 함초의 장기적인 저장성과 가공성을 향상과 이에 따른 함초의 기능성 성분을 포집하기 위해 압출성형을 통한 분말의 용해도를 증가시키고자 할 때, 압출성형 실험에 앞서 압출성형 공정변수값과 공정 조건에 부합하는 재료의 형태로 가공처리를 하기위해 함초를 열풍건조법을 이용하여 표.5같이 건조 온도 60, 80, 100℃를 설정하고 30min 간격으로 수분함량 측정하였다. 초기 30min 에는 각각의 온도에서 함초의 탈수화가 크게 나타나지 않았으나, 80℃를 기준하여 60min 때에 수분의 변화를 크게 나타남을 알수있었다. 이러한 결과를 토대로 압출성형시 함초와 쌀의 배합비와 압출성형 공정조건값인 시료의 흐름성과 전단 압력을 고려하여 압출성형에 사용할 함초의 수분함량을 50%미만의 값을 갖도록 하기위한 실험을 실시하였다. 열풍건조 조건값을 온도 조건 80℃에서 건조시간은 70min으로 설정하여 함초를 건조하여 압출성형 제조에 사용하였다.

표 7. 열풍건조 온도 조건(80℃)에 따른 시간대별 함초의 색차값

Target값	L42.1	a -3.1	b 2.2
Sample(min)	Color		
	L1)	a2)	b3)
30m	26.9	-2.8	5
60m	27.1	-3	4.4
90m	38.3	-3.3	4.3
120m	39.1	-3.3	8

표 8. 열풍건조 온도 조건(100℃)에 따른 시간대별 함초의 색차값

Sample(min)	Color		
	L1)	a2)	b3)
30m	25.9	-2.5	4.1
60m	32.6	-2.4	4.3
90m	38.1	-3	7.6
120m	38.7	-2.5	7.7

건조온도(80℃, 100℃)가 함초의 밝기와 적색도(L, a, b)에 미치는 영향에 대하여 조사한 결과는 표.7, 표. 8에 나타난 바와 같이, 밝기 나타내는 L1) 값의 경우, 초기 밝기값에서 점차적으로 함초의 탈수분화 되면서 밝기값이 높아지는 경향을 알 수 있다. 건조온도 80℃ 경우 시료의 밝기는(표4) 수분 70wt.% 함유한 60분까지는 어두운 청색을 나타내었으나, 30 wt.%이하인 90min 건조시료에서는 청색이 밝게 변하였고, 건조시간을 120min 까지 증가하여도 색도는 변하지 않았다. 이때 온도의 따른 시간조건은 대략적으로 80min을 기준하여 밝기가 상대적으로 높아 짐을 알 수 있다. 1차 실험의 결과 80℃와 100℃로 건조한 시료가 90분에 수분함유량이 50% 미만인 것을 알 수 있다. 하지만 색차 값을 보았을 때, 100℃조건에서 건조한 시료는 황색도를 나타내는 b3) 값의 경우 함초 생물과의 b3)값의 차이가 급격하게 증가한 것을 알 수 있으며, 또한 80℃열풍건조 조건에서도 100분 이상 건조시켰을 때 b3) 이 급격히 증가함을 알 수 있었다. 이러한 결과는 황색 변색이 일어났다고 판단하였다. 그러므로 함초 본연의 색체를 유지한 압출성형의 조건에 적합한 조건을 갖지 못함을 알 수 있었다. 적색도를 나타내는 a2)값의 경우 건조에 따른 밝기값의 변화에 크게 영향을 받지 않음을 알 수 있었다. 건조방법에 따른 차가버섯분말의 실험에서도 유사한 결과가 보고된 바 있다(Lee et al., 2007). 반면 80℃로 건조한 시료에서는 변색이 일어나지 않았기 때문에, 최초 수분함량 50%가 되는 시간을 찾기 위한 재 건조 실험을 하는 조건값으로 사용하였다.

\* 재건조 실험

표 9. 80℃에서 2차 건조실험. 채취 시간에 따른 색차값과 수분함량

Sample(min)	color			수분함량
	L1)	a2)	b3)	
65m	26.3	-2.5	3.8	64.60%
70m	27.4	-2.2	4.4	56.80%
75m	27.8	-2.1	5.1	51.20%
80m	32.4	-1.7	5.3	47.60%
85m	33.5	-1.9	5.3	46.00%
90m	33.7	-1.4	5.5	45.20%

앞서 열풍건조 실험에서 초기 함초의 탈수분화를 유도하는 건조 조건 실험에서는 시간별 온도조건에서 80, 100℃에서 압출성형시 효율적인 함초의 수분함량 값을 구할 수 있었으나, 이에 따른 색차값 측정결과 100℃에서의 건조에서 황색도 값이 열풍건조 조건으로 보았을 때, 부적합하여 1차 건조 실험을 토대로 80℃에서 재건조 실험을 실시하였다.

실험결과, 표.8 에서와 같이 건조 시간 75min을 기준으로하여 함초의 밝기값인 L<sub>1</sub>) 값 상승함을 알 수 있으며, 이에따른 황색도를 나타내는 b<sub>3</sub>) 값이 증가하기 시작하였다는 것을 확인하였다. 함초와 쌀의 배합하여 용해도 향상을 위한 압출성형 실험 시 함초의 수분함량 조건인 50% 이내 값을 얻기 위한 열풍건조실험에서 함초 갈변화를 줄 일수 있는 열풍건조 조건값을 온도 조건 80℃에서 건조시간은 70min으로 설정하여 함초를 건조하여 압출성형 제조에 사용하였다.

### 3. 용융압출성형에 의한 함초 encapsulation과 함초의 염 과 미네랄 성분 친수성 우수한 저염 분말 시스템 제조 기술 개발

#### 함초/쌀 전분 설계

함초의 고유한 염과 미네랄 성분이 장기간 보존에도 유지되면서, 물에서 염이 용이하게 용해되어, 즉 염의 포화 농도를 향상시켜 저염 식품 분말화 함초를 개발하고자 한다. 함초는 난용성인 불용성 식이섬유를 많이 포함하고 있으므로, 가공 과정 중 수용성 식이섬유화를 변이 시켜야, 식품으로 섭취시 체내의 불순물을 제거 역할을 하는 수용성 식이섬유 역할을 할 수 있도록 설계하였다. 특히 본 연구에서는 활성 식품성분인 함초의 염과 미네랄 성분이 물속에서 용이하게 용해 할 수 있도록 전달체를 만들어 그 matrix 속에 균일하게 함초의 염과 미네랄 성분이 혼입시킨 분말을 제조하고자 하였다. 함초의 AFI를 전달체 속에 균일하게 분산시킨 함초 encapsulation 제조는 용융압출 성형기를 이용하여 제조하고자 하였다.

전달체인 쌀 전분에 건조한 함초를 균일하게 혼합시키면서 압출성형시 쌀 전분과 함초의 비에 따른 유동성을 분석하기 위하여 표5와 같이 혼합하여 Capillary Rheometer를 이용하여 압출성

형시 유동성이 형성됨을 측정하였다. 섬유질이 많은 시료 1과 2번 시료인 함초 90 - 100% 범위에서는 유동성이 작아, 압출에 높은 압력이 요구됨이 모세관 점도계에 의하여 분석됨으로서, 실제 압출성형시 바렐내에서 함초와 쌀 전분 혼합이 어려움을 예측 할 수 있었다. 시료3번인 함초 80%/쌀 20% 시료에서는 유동성이 형성됨이 되어, 압출 성형시 적당한 압출 압력이 형성되면서, 연속적으로 전달체인 쌀 전분 사이에 함초를 균일하게 분포 및 분산 시킬 수 있음이 분석되었다.

함초 80/쌀 20 중량비의 시료에 염도는 함초 100% 시료의 염도 3.2%에서 1.8%로 감소되었으나, 실제 고추장이나 된장의 염도도 2%정도이므로, 염이 적절하게 용해되었다고 사료되어, 함초80/쌀전분 20비율로 설계하였다.

표 10. 쌀전분과 함초 배합비율이 유변성과 염도에 미치는 영향

시료	1		2		3		4		5		6	
배합비율	함초	쌀	함초	쌀	함초	쌀	함초	쌀	함초	쌀	함초	쌀
	100	0	90	10	80	20	70	30	60	40	50	50
유동성	적음		적음		있음		있음		있음		있음	
염도	3.2%		2.1%		1.8%		1.6%		1.4%		0.8%	

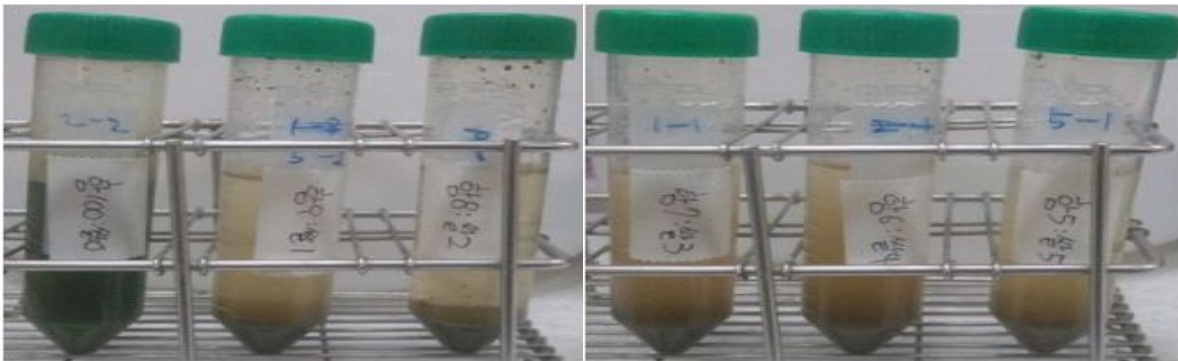


그림. 10 ① 함초 100 : 쌀 0 ② 함초 90 : 쌀 10 ③ 함초 80 : 쌀 20  
 ④ 함초 70 : 쌀 30 ⑤ 함초 60 : 쌀 40 ⑥ 함초 50 : 쌀 50

가. 압출성형 공정값

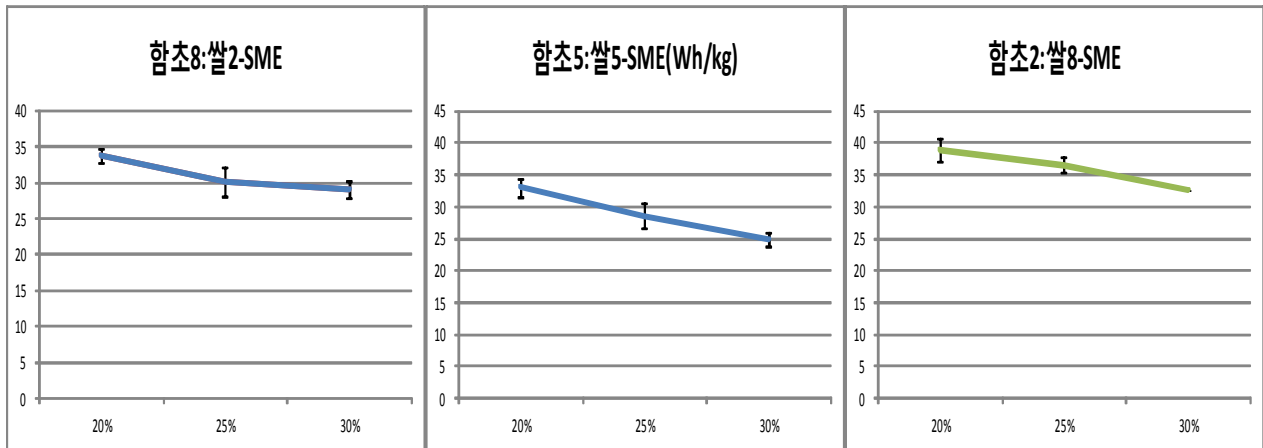


그림 11. 함초 쌀의 배합비에 따른 비기계적 에너지값 (SME)Wh/kg

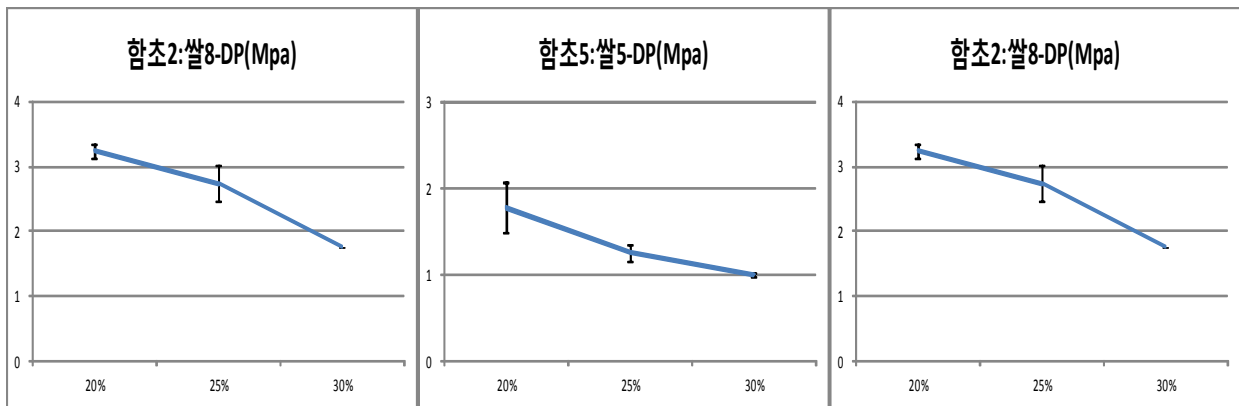


그림 12. 함초 쌀의 배합비에 따른 Die 압력값 (DP)Mpa

일반적인 전단력 Type 1 Screw이 SME, DP, ER에 크게 영향을 미치게 되어진다. 압출성형 시 수분함량과 압출성형 공정조건인 온도값의 변화에 따라 밝혀진 연구 자료를 토대로 압출소요에너지와 함수의 상관관계를 이용하여 함초와 쌀을 이용한 저염 분말 제조를 위한 압출성형 공정 값은 온도 조건 130℃로 고정 시키고 수분함량 20, 25, 30%로 점차적으로 증가 시켰으면 feeder를 통한 시료의 공급량은 50g/min을 계산하여 공급하였다. 이때 정량펌프를 이용하여 수분을 공급하는 이유는 압출성형기 바렐 내부의 유동성을 갖기위해 수분을 공급하였다.

압출 온도 130℃, 함수율 20%에서 함초와 쌀의 배합비 2:8에서 SME = 36Wh/kg로 압출하는데 바렐내에서 증밀림에 의한 유동성을 부여하는데 필요한 에너지가 함초와의 배합비 중 가장 크게 소요되었고, 쌀의 호화특성으로 인한 유동성이 작아 다이 압출 압력 DP= 3.24MPa(30bar)로 압력이 형성되었다. 또한 함수율 25% 경우 압출에 소요되는 SME= 33.02Wh/kg, DP=2.4MPa 이었고, 함수율30% 증가 경우 비중이 1.13인 강한 겔 조직이 충전된 상태로 압출되었다. 즉, 이 축 압출성형기에서도 바렐내부에 열에 의한 자기 발열이 생성 되기 때문에 수분 30%까지 압

출할 수 있었고, 함초의 수분함량이 과량이 경우 조직의 흐트러짐 형상이 적게 나타났다. 또한 수분함량을 20% 이하 값으로 압출성형을 하였을 경우 압출소요에너지가 증가함으로 기계적 오류가 발생될 수 있으나 함초 자체 수분함량을 열풍건조법에 의한 수분함량 50% 이내 값 갖도록 하였으므로 압출소요에너지의 큰 변화는 관측되지 않았다. 쌀의 비율이 높을 수록, 수분 함량이 낮을수록 비기계적 에너지 SME 값이 높게 나타나는 경향을 보였으나, 함초20:쌀80을 섞은 시료와 함초80:쌀20을 섞은 시료의 비기계적 에너지 SME 값이 큰 차이가 나지 않으므로 보아 함초의 함량이 높아져도 일정량 이상의 쌀이 첨가되면 압출성형이 가능한 충분한 점성을 갖는다는 것을 알 수 있다. DP=MPa 또한 바렐내의 전분 층과 함초의 용융되어 용이하게 이동되어, Die에 압력이 작게 형성되었고, 또한 Die를 통과한 함초와 쌀의 압출성형물이 일정하게 나타났다.

#### 4. 온도변화에 따른 함초 분말 및 압출성형 처리 후 분말 용해도 및 분말 특성

##### 가. 무기물 함량 분석

표 11. 함초 분말의 입자의 크기와 함초 encapsulation의 전분 시료의 온도에 따른 pH 변화

시료	1	2	3	4	5	6	7	8	9
성분	함초100% 조파쇄	함초100% 초미분쇄	함초20% 쌀80%	함초50% 쌀50%	함초80% 쌀20%- 수분함량 20%	함초80% 쌀20%- 수분함량 25%	함초80% 쌀20%- 수분함량 30%	소금	함초소금
ph	3.82-3.85	5.90-5.95	6.16-6.20	6.16-6.20	6.23-6.28	6.18-6.25	6.11-6.12	5.46-5.53	5.97-6.09

건조한 함초 조립 분말과 초미립 분말의 염과 미네랄 성분이 물의 온도상승(5°C, 20°C, 75°C)에 따른 pH 값을 조사하여 표. 11에 나타내어, 함초 염과 미네랄 성분이온화 변화를 분석하고자 하였다. 조립 분말한 함초의 pH값은 3.8인 산로 조사되었으나, 초미립 분말한 함초시료에서의 pH값은 5.9로 염과 미네랄 성분이 용해되어 양이온이 증가되었고, 쌀 전분을 이용한 함초 encapsulation 시료의 pH값은 6.11- 6.28 범위로 양이온이 약간 증가되어 중성으로 변이된 것을 알 수 있다. 그러나 소금은 pH 값 5.5, 함초 소금은 6.05 pH값이 조사되었다. 위의 결과를 통하여 함초 시료는 입자의 크기를 감소하거나 전달체에 함초성분을 혼입시킴으로서 조립 함초 및 가공 소금, 함초소금처럼 물에 염과 미네랄 성분이 잘 용해됨을 알 수 있다. 특히 물의 온도 5°C 차가운 조건에서 75°C 더운물에서도 pH값의 차이가 근소한 경향으로 조사됨으로서, 가공된 함초의 용해도는 우수하게 가공되었음을 분석할 수 있다.



표 12. 함초 분말의 입자의 크기와 함초 encapsulation의 전분 시료의 온도에 따른 전기전도도(총 이온양 ms/cm) 변화

시료	1	2	3	4	5	6	7	8	9
성분	함초100% 조파쇄	함초100% 초미분쇄	함초20% 쌀80%	함초50% 쌀50%	함초80% 쌀20%- 수분함량 20%	함초80% 쌀20%- 수분함량 25%	함초80% 쌀20%- 수분함량 30%	소금	함초소금
EC	4.32-4.98	37.4-39.8	25.5-30.3	27.6-31.3	19-21.3	20.3-29.2	28.6-30.6	27.5-28.6	78.4-93.3

조립 함초분말의 전기전도도는 4.98 ms/cm 값이 조사되었고, 초미립분말 함초 시료에서는 39.8ms/cm로 8배가 증가되었다. 함초의 염과 미네랄성분이 물에서 용해되어 이온화량이 증가되었음을 알 수 있다.

쌀 전분을 이용한 함초 encapsulation 시료에서는 전기전도도가 함초의 함량비에 따라 20 - 30 ms/cm 범위로 분석되었다. 압출 성형공정에서 함수율이 25%에서 30%로 증가시키면 20ms/cm에서 30ms/cm로 전기전도도가 증가된것은 압출성형과정 중 함초가 균일하게 쌀 전분인 전달체 속으로 분포 및 분산 작용으로 인하여 총 이온화된 양이 증가되었다고 사료됨.

가공소금시료의 전기전도도는 29ms/cm 조사되었고, 함초를 가미한 소금 시료의 전기전도도는 약 4배가 증가 된 93.3ms/cm로 조사된 것은 함초의 미네랄 성분이 이온화 되어 전기전도도가 증가되었다고 사료된다.

표 13. 함초 분말의 입자의 크기와 함초 encapsulation의 함초/전분 배합비가 온도에 따라서 염도에 미치는 영향에 대한 염도 분석치

시료	1	2	3	4	5	6	7	8	9
성분	함초100% 조파쇄	함초100% 초미분쇄	함초20% 쌀80%	함초50% 쌀50%	함초80% 쌀20%- 수분함량 20%	함초80% 쌀20%- 수분함량 25%	함초80% 쌀20%- 수분함량 30%	소금	함초소금
염도	1.4-1.9	3.4-3.7	2.4-3.0	2.8-3.3	2.5-3.0	2.1-2.6	3.0-3.3	2.3-2.5	5.2-6.4

조립 함초분말 시료의 염도는 온도 5℃ 경우1.4%에서 온도 75℃로 증가시킨 경우 단지 1.9% 증가되었다. 초미립함초 분말 시료의 염도는 온도 5℃ 경우 3.4%에서 75℃로 가열한 물속에서는 미소하게 증가된 3.7%로 분석되었다. 초미립화 시킨 함초는 물속에서 용이하게 염이 용해되어 조립 함초분말보다 찬물 5℃에서는 2.4배, 더운물 75℃에서 1.9배 농도를 증가시켰다.

함초 encapsulation 시료에서 함초비가 20%에서 80% 증가 시료에서의 염도는 2.4 -3.3% 농도

범위로 분석되었으며, 압출성형 시 수분함량 30% 첨가한 시료의 경우 3.0 - 3.3%로 균일한 혼련에 의하여 증가되었다. 가공소금 시료의 염도는 2.3 - 2.5%, 함초를 첨가한 소금 시료의 염도는 2.6배가 증가한 5.2 - 6.4% 염도값이 분석되었다.

함초의 염 농도 증가는 초미분말화 하면서 입자크기에 감소가 큰 영향을 미치게 되었으며, 함초의 염이 전달체 속에 분산된 함초 encapsulation 시료에서도 물에 염과 미네랄이 용이하게 용해되어 조립함초분말과 가공 소금시료보다 염의 농도가 증가된 친수성이 우수한 함초 encapsulation 시료를 설계 할 수 있었다.

표 14. 함초 분말의 입자의 크기와 함초 encapsulation의 함초/전분 배합비가 온도 상승별 물에 용해된 양 음이온 농도 분석치

시료	1	2	3	4	5	6	7	8	9
성분	함초100% 조과쇄	함초100% 초미분쇄	함초20% 쌀80%	함초50% 쌀50%	함초80% 쌀20%- 수분함량 20%	함초80% 쌀20%- 수분함량 25%	함초80% 쌀20%- 수분함량 30%	소금	함초소금
Na	0.5-0.8	181-184	141	88		43-92	6	5-9	9
K	27	42	14	14	15	9	5	1-2	1
Mg	3-4	21-23	18-19	20-21		17	16	0.3-5	0.4
Ca	8-10	0.5	10-20	11		12	7	3	0.3
Fe	0.9	0.4	0.4	0.3	0.3	0.3	0.3	0.2-2	0.2-2
Cl	3	273-287	180-212	208-232	140-147	134-216	147	14	14

표 14에 함초 분말의 입자의 조립 분말, 초미립분말, 함초 encapsulation의 함초/전분 배합비 20/80, 50/50, 80/20, 수분함량에 따른 시료 속의 양이온 : Na, K, Mg, Ca, 음이온 : F, Cl가 물의 온도 5℃, 20℃, 75℃에서 용해된 양을 Ion Chromatograph 로 양이온과 음이온 농도를 분석한 결과를 나타내었다.

표 15. 함초 분말의 입자의 크기와 함초 encapsulation의 함초/전분 배합비에 따른 무기함량 분석치

시료	1	2	3	4	5	6	7	8	9
성분	함초100% %조과쇄	함초100% 초미분쇄	함초20% 쌀80%	함초50% 쌀50%	함초80% 쌀20%- 수분함량 20%	함초80% 쌀20%- 수분함량 25%	함초80% 쌀20%- 수분함량 30%	소금	함초소금
Na	2.9	94	140	144	130	131	130	114	646
K	27	42	14	14	15	16	16	8	5
Mg	14	27	16	18	15	14	14	16	17

본 실험에서는 함초의 염과 미네랄 성분이 물에 얼마나 용해되었는가를 분석하였다. 조립 함초 분말 입자 250 - 350 $\mu\text{m}$  시료의 Na은 단지 물에 <1ppm, Cl은 2.8ppm, 미네랄인 K = <19ppm, Mg = <4ppm 이온 농도가 조사되었다. 이 경우 pH는 3.8, 전기전도도는 4 -5 mS/cm, 염도는 1.4 - 1.9%salt로 조사되었다. 그러나 <45 $\mu\text{m}$  입자 크기를 가진 초미립화 분말 시료에서는 Na는 >180 ppm, Cl는 286ppm, 미네랄인 K = 14ppm, Mg = 22ppm으로 이온농도가 증가되어, pH는 6, 전기전도도는 27 - 40mS/cm, 염도는 3 - 4%로 증가됨이 분석되었다. 이 실험결과를 통하여 함초의 입자를 <45 $\mu\text{m}$ 에서는 함초의 염과 미네랄 성분이 물에 용이하게 이온화 되어, 친수성을 향상시킬 수 있다고 판단할 수 있었다.

용융압출성형기로 제조한 함초 encapsulation 인 함초/쌀전분비 80/20, 50/50, 20/80 시료에서는 Na = 43 - 141ppm, Cl = 134 - 232ppm, K= 8.5 - 10.2ppm, Mg = 17 - 19ppm 이온이 해리되면서, pH가 6.2 - 6.3, 전기전도도가 22 - 31mS/cm, 염도가 2.5 - 3.3%로 증가되었다.

#### 나. X-선 회절도

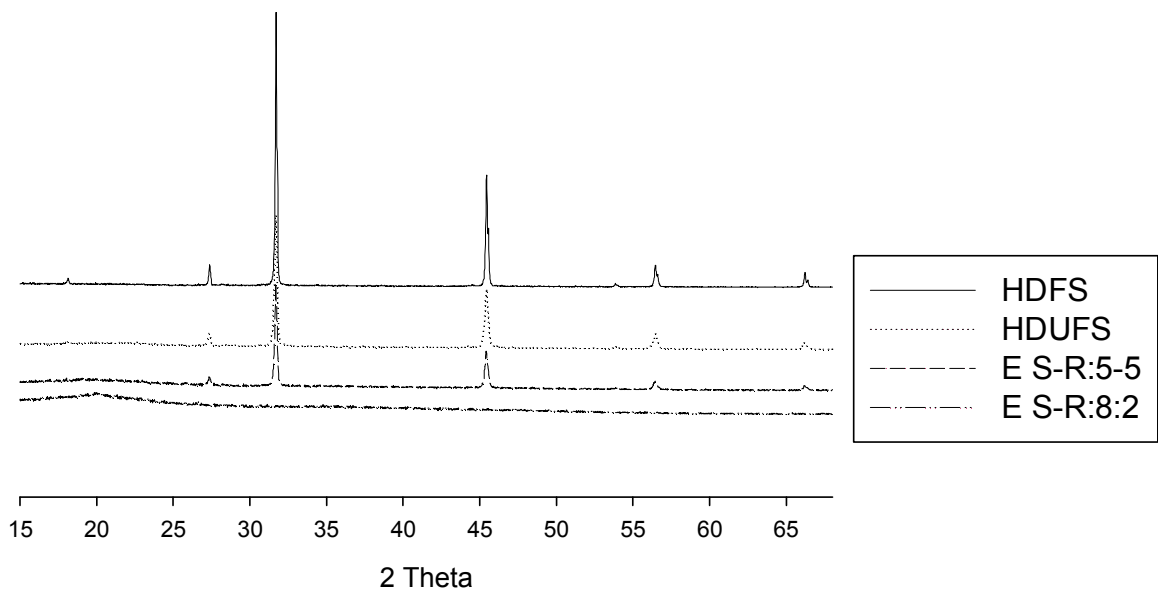


그림. 13 함초의 함량별 X-ray diffraction 측정 결과

X-선 회절도 양상은 그림.13 과 같다. 회절각도(2 $\theta$ )에 의하여 조립분말과 초미립분말, encapsulation 시료의 결정도를 분석한 결과 함초 조립분말 시료는 회절각  $\theta = 31, 24, 22$ 에서 peak가 나타남으로서 함초 성분이 결정되었음이 분석되었고, 초미분말 화 한 시료는 회절각의 peak 값이 작아짐으로서 부분 결정화 경향을 나타내었고, 전분을 전달체로 사용한 함초

encapsulation 시료 경우 회절각의 peak 값이 작아짐으로서 비결정화 되어 물에 용이하게 염과 미네랄이 이온으로 해리되었음을 분석할 수 있었다.

즉 전달체인 쌀 전분 속에 함초 분말이 분산한 시료는 물속에서 함초의 염과 미네랄이 용이하게 이온화할 수 있다고 사료된다.

## 제4절 함초의 항염증 및 항암 기전 평가

### 1. 추출분획의 제조 및 기능성 탐색

가. 함초 종자 추출물 분획 제조 및 기능성 평가 염생식물 중 가장 보편적으로 섭취되고 있는 함초의 성장단계 별 기능성 평가를 위해 기존에 전혀 연구가 되어 있지 않은 함초 종자에 대한 연구를 처음으로 시도함.

- 함초종자 물 및 70% 메탄올 추출물을 제조하여 DPPH, ABTS radical 및 nitric oxide 소거 등의 항산화 활성을 비교한 결과 메탄올 추출물이 약간 활성이 높은 활성을 나타내었음.
- 함초종자 추출물 분획; 70% 메탄올 함초 종자추출물을, 용매로 분획하여 hexane(Fr.H), ether(Fr.E), ethyl acetate(Fr.EA), water(Fr.W) 분획물을 얻었으며 Fr.W가 가장 높은 수율을 보임.
- 함초종자 추출물 분획의 항산화 활성평가: 각 분획 중 총 polyphenols 및 flavonoids 함량은 Fr.EA에서 가장 높았고 가장 강한 DPPH 라디칼 및 nitric oxide 소거 활성을 나타내었음
- 함초 종자 추출물 분획의 세포 독성 평가: 각 분획을 HCT-116와 HT-29 대장암세포주에 처리한 결과, Fr.E가 가장 강한 세포 독성을 나타내었고 20-30  $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 50%의 세포 사멸을 유도하였음. Fr.H와 Fr.EA는 30-50  $\mu\text{g/mL}$ 에서 50% 세포사멸효과를 보였으며, Fr.W는 뚜렷한 세포 독성을 나타내지 않음.
- 암세포 vs 정상세포 비교: 세포 독성을 보인 Fr.E, Fr.H와 Fr.EA를 정상 장관계 세포주 (INT-407)에 처리하였을 때 HCT-116 세포주와 유사한 정도의 세포독성을 나타내었으며 선별적인 세포독성은 나타나지 않음.

나. 함초 추출물의 기능성 탐색 및 분획물 제조

- 함초 물 및 70% 메탄올 추출물을 제조하고 각 추출조건에서 항산화 및 세포 독성을 평가함.
- 물 추출물과 메탄올 추출물 사이에 유의적인 DPPH, ABTS 등의 각종 radical에 대한 소거능은 크게 나타나지 않았으며 장관계 세포에 대해서도 250  $\mu\text{g/mL}$ 까지 장관계 세포 독성을 나타내지 않음.
- 함초 메탄올 추출물의 대량 추출 및 용매별 분획; 함초를 대량 동결건조한 후 분말화하고 이에 대해 70% 메탄올로 추출물을 제조함. 메탄올 추출물에 대하여 용매 극성에 따라 hexane(Fr.H), ether(Fr.E), ethyl acetate(Fr.EA), butanol (Fr.B) 및 water(Fr.W) 분획물을 제조하고 건조하여 향후 항암, 항염 세포실험 재료를 얻음.

다. 염수 및 담수 재배 함초의 활성 비교를 위한 추출물 제조

- 함초를 비롯한 염생식물류들은 담수에서도 재배가 가능하고 성장에 큰 차이를 보이지 않으며, 담수재배시 sodium 등의 바람직하지 못한 성분들에 대한 효과를 배제할 수 있으므로 담수재배 함초에 대한 일반성분(염류를 중심으로) 및 기능성 탐색을 위해 추출시료를 제조함.

## 2 함초 종자 생리활성 분석

### (1) 화학적 특성

- 함초 종자의 추출방법 및 추출 수율을 비롯한 화학적 특징을 각각 Fig.1과 Table 1에 나타내었다.

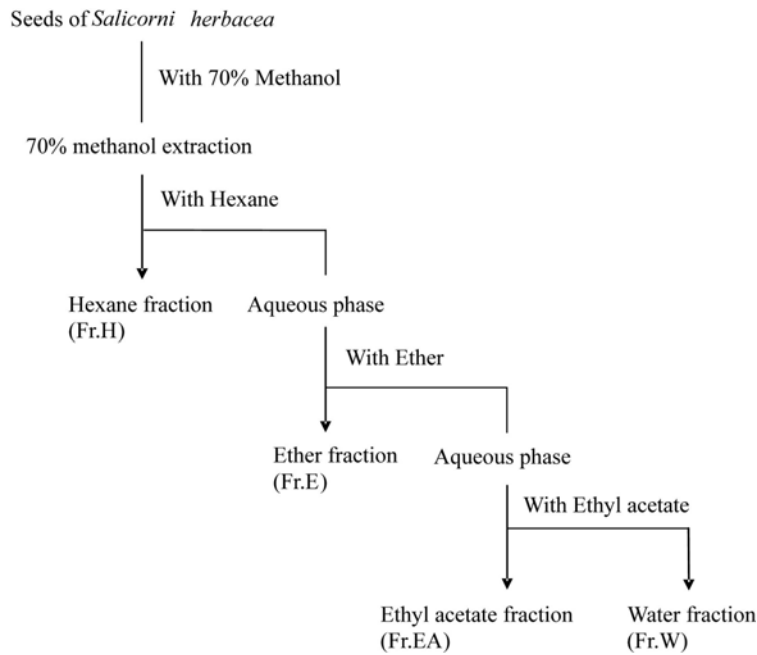


Figure 1. Fractionation of 70% MeOH extracts from *S. herbacea* seeds using series of different solvents

- 함초 종자를 70% MeOH로 추출하였을 때 전체적인 수율은 3.58% (w/w)로 나타났으며, 70% MeOH 추출물에 대한 용매 분획 Fr.H, Fr.E, Fr.EA의 수율은 각각 17.8, 12.9, 9.0% (w/w)로 나타났다. 최종 분획물인 Fr.W의 추출 수율은 59.8% (w/w)로 분획 중 가장 높은 수율을 나타내었다. 함초 종자 추출물과 각 분획 별 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량은 70% MeOH 추출물에서 mg당 각각 15.7  $\mu$ g와 17.5  $\mu$ g이었고 Fr.EA > Fr.E > Fr.H > Fr.W 순으로 나타났다.

Table 1. Characteristics of the 70% MeOH extract and fractions of *S. herbacea* seeds

	Yield (%)	Total polyphenols 1) ( $\mu$ g/mg solids)	Total flavonoids 2) ( $\mu$ g/mg solids)	Abs. at 285 nm (at 0.1 mg/mL)
70% MeOH	3.58 3)	15.71 4)	17.51 $\pm$ 0.45	0.0144)
Fr. H	17.8 5)	7.08	7.59 $\pm$ 0	0.011
Fr. E	12.9	29.25	15.12 $\pm$ 0.25	0.026
Fr. EA	9.03	48.86	28.09 $\pm$ 0.55	0.031
Fr. W	59.8	9.40	4.54 $\pm$ 0.43	0.009

1) Microgram of contents/mg of extracts based on tannic acid as a standard.

2) Microgram of contents/mg of extracts based on catechin as a standard.

3) Percent yield based on seed weight extracted (w/w)

4) Mean of duplicate results within 5% variation

5) Percent yield based on 70% MeOH extract (w/w)

## (2) Radical 소거 효과

- 시료 추출물에 의한 DPPH radical 소거능은 517 nm에서 흡광도를 측정하여 평가하였으며, 그 활성은 Fr.EA > Fr.E > 70% MeOH > Fr.H > Fr.W 순으로 나타났다. 각 시료에 의한 ABTS radical 소거능을 715 nm에서 측정하여 Fig. 2B에 나타내었다. 함초 종자 추출물과 각 분획 별 ABTS radical 소거능을 알아본 결과, Fr.EA > 70% MeOH > Fr.W 순으로 그 활성이 높게 나타났다. 분획 중 Fr.EA의 ABTS radical에 대한 IC50(radical을 50% 소거하는 농도)는 0.87 mg/mL로 분획 중 가장 뛰어난 효과를 나타내었고, Fr.H와 Fr.E는 ABTS radical에 대한 IC50를 계산할 수 없었다.

- 함초 종자 추출물과 각 분획 별 NO소거활성은 Fr.EA, Fr.E > Fr.W > 70% MeOH > Fr.H 순으로 나타났다. Fr.EA와 Fr.E의 IC50는 0.2 mg/mL 정도로 나타났고, 다른 분획에 비해 비교적강한 NO 소거능을 보였다. 특히, Fr.EA는 NO 소거능 뿐만 아니라 DPPH, ABTS radical을 소거하는데 뛰어난 효과를 나타내었고 이러한 효과는 각 분획 별 폴리페놀과 플라보노이드 함량과 일관된 경향을 나타내었다. 함초종자 추출물과 분획의 각종 radical에 대한 소거효과를 Fig.2에 정리하여 나타내었다.

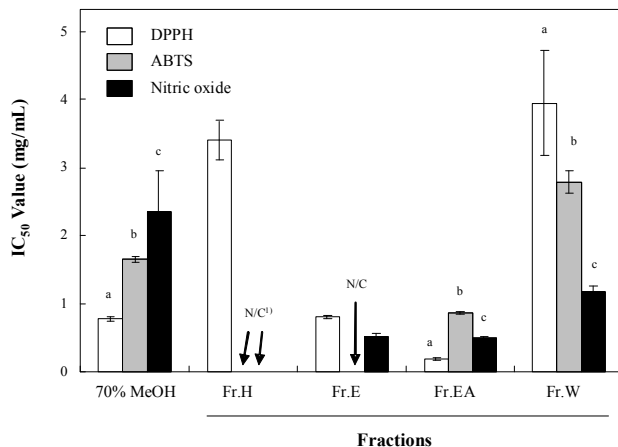


Figure 2. Scavenging effects (IC50 value) of the fractions from *S. herbacea* seeds on DPPH, ABTS radicals, and NO. Each value represents the mean±S.D. (n=3). 1)Not calculated. Different letters indicate a significant difference ( $p < 0.05$ ) based on one-way ANOVA and the Tukey's test.

## (3) 과산화지질 억제효과

지질 과산화 발생 과정에서 형성되는 MDA (malondialdehyde)는 TBA (thiobarbituric acid)와 반응하여 적색의 화합물(TBA-reactive substances, TBARS)을 형성한다. 이 반응을 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하여 지질과산화물의 생성 정도를 측정하였을 때 각 분획에 의한 지질 과산화물 생성 억제 효과는 Fr.E > Fr.EA > Fr.H > Fr.W 순으로 나타났다. 철 이온은 지질 과산화를 촉매 하는데 중요한 역할을 할 뿐만 아니라 조직에 산화적 손상 유발과 관련하여 많은 연구 결과가 보고되고 있다. 각 분획 별 Fe<sup>2+</sup> chelating 효과를 분획과 Fe<sup>2+</sup>

와 10분간 반응시킨 후 잔류하는 Fe<sup>2+</sup> 량으로 측정된 결과, Fr.E는 0.4 mg/mL 농도에서 free Fe<sup>2+</sup> 을 40% 이상 감소시켰으므로써 가장 강한 활성을 나타내었으며, Fr.W는 동일 농도에서 30% 정도 감소시켜 Fe<sup>2+</sup> chelating 효과에 뛰어난 효능을 보였다. 이상의 결과를 Fig.3에 나타내었다.

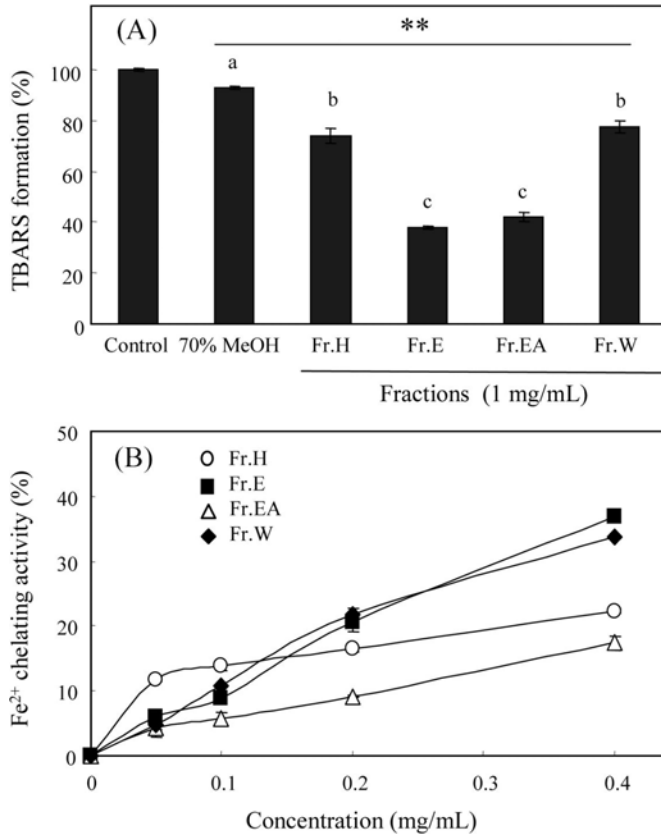


Figure 3. Effects of the fractions from *S. herbacea* seeds on lipid peroxidation (A), and ferrous (Fe<sup>2+</sup>) ion chelating activities (B). Each value represents the mean±S.D. (n=3). \*\*Significantly different from control according to Student's t-test (p<0.01). Different letters indicate a significant difference (p<0.05) based on one-way ANOVA and the Tukey's test (A).

#### (4) 장관계 세포 독성 평가

- 함초 종자 추출물과 각 분획을 대장암 세포주인 HCT 116, HT-29와 정상 장관계 세포인 INT-407에 처리하여 세포 독성을 평가하였다. 함초 종자 추출물 및 각 분획을 250 µg/mL 농도로 세포에 처리하였을 때, 70% MeOH 추출물은 HCT 116와 INT-407의 성장을 각각 53, 57% 억제하였으며, 이와 동일한 농도에서 HT-29는 독성 효과를 나타내지 않았고 오히려 세포의 성장을 10% 정도 촉진하는 것으로 나타났다. 분획 중 Fr.H, Fr.E 및 Fr.EA이 강한 독성을 보여 250 µg/mL 농도로 처리했을 때 모든 세포주에서는 90% 이상의 세포가 사멸하였다.
- 이 3가지 분획을 각 세포주에 농도 별로 처리하였을 때 농도 의존적으로 세포 독성효과를 나타내었으며, HCT 116에서 가장 높은 독성을 나타내었으며 HT-29에서는 상대적으로 낮은 독성 효과를 보였다. Fr.H와 Fr.EA의 장관계 세포들에 대한 IC<sub>50</sub> (세포생존을 50% 저해하는 농도)는 40- 96 µg/mL 범위로 나타났으며, 특히 Fr.E는 정상 장관계 세포보다 암세포에 대한



독성 효과가 더 큰 것으로 나타났으며, 암세포에 대한 선택적 세포 독성을 나타낸 것으로 판단된다. 분획 중 Fr.W는 400-800 mg/mL 농도 범위에서 각 세포주에 대한 독성을 나타내지 않았으며, 오히려 10-30% 정도 세포의 성장을 촉진하는 효과를 나타내었다. 이상의 결과를 Fig.4에 나타내었다.

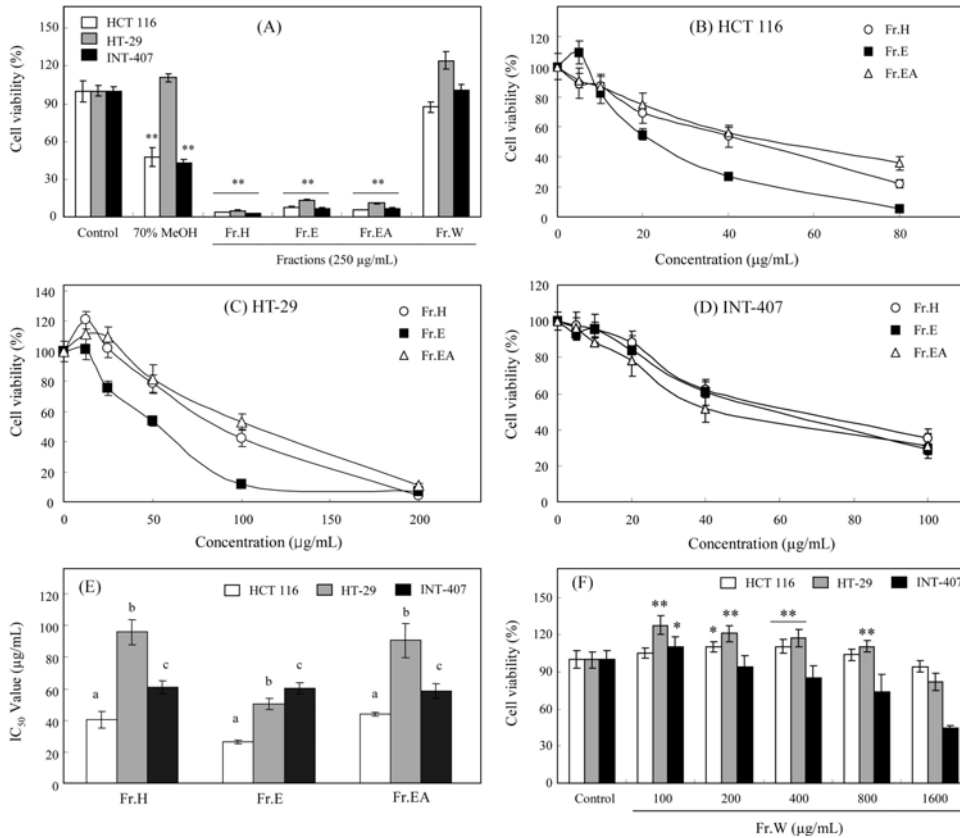


Figure 4. Effects of the fractions from *S. herbacea* seeds on colon cancer and normal intestinal cells. Cells were treated with 70% methanol extracts or each fraction at 250 µg/mL for 24 hr (A). Concentration-dependent effects of Fr.H, E, and EA on HCT 116 (B), HT-29 (C) human colon cancer cells and INT-407 normal intestinal cells (D) were analyzed. The IC<sub>50</sub> values of each compound for different cell lines (E), and effects of Fr.W are also shown (F). Each value represents the mean±S.D. (n=8). Each bar represents the mean±S.D. (n=8). \*, \*\* Significantly different (A) or higher (F) from its corresponding control according to Student's t-test (\*,p<0.01; \*\*,p<0.001). Different letters indicate a significant difference (p<0.05) based on one-way ANOVA and the Tukey's HSD test (E).

### 3. 함초 줄기 생리활성 분석

#### (1) 화학적 특성

- 함초 지상부 줄기의 추출방법 및 추출 수율을 비롯한 화학적 특징을 각각 Fig.5과 Table 2에 나타내었다. 함초 줄기 70% MeOH 추출물을 각 용매를 이용하여 분획 한 결과 Fr.H, Fr.E, Fr.EA, Fr.B의 추출 수율은 각각 5.58, 1.39, 1.05, 4.49% (w/w)로 나타났으며, Fr.W는 87.48% (w/w)로 현저히 높은 수율을 나타내었다. 함초 줄기 70% MeOH 추출물의 각 분획 별 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량은 Fr.EA > Fr.B > Fr.H > Fr.E > Fr.W 순으로 높게 나타났다.

Figure 5. Fractionation of 70% MeOH extracts from the aerial part of *S. herbacea* using series of different solvents

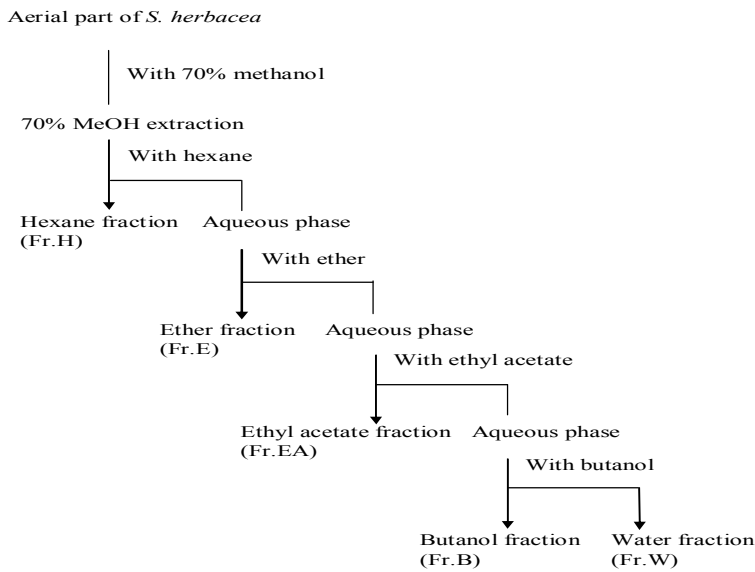


Table 2. Characteristics of the fractions from the aerial part of *S. herbacea*.

	Yield (%)	Total polyphenols 1) ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ solids)	Total flavonoids 2) ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ solids)	Abs. at 285 nm (at 0.5 mg/mL)
Fr.H	5.58 3)	87.95 $\pm$ 3.29	104.11 $\pm$ 1.86	0.073
Fr.E	1.39	73.80 $\pm$ 0.14	51.43 $\pm$ 2.94	0.105
Fr.EA	1.05	224.37 $\pm$ 1.82	383.24 $\pm$ 10.15	0.016
Fr.B	4.49	153.60 $\pm$ 2.51	207.15 $\pm$ 6.46	0.005
Fr.W	87.48	12.74 $\pm$ 0.14	14.33 $\pm$ 0.65	0.003

1) Microgram of contents/mg of extracts based on tannic acid as a standard.

2) Microgram of contents/mg of extracts based on catechin as a standard.

3) Percent yield based on weight of *S. herbacea* extracted (w/w)

## (2) 각종 radical 소거 효과

- 함초 줄기 70% MeOH 추출물의 분획 별 DPPH radical 소거능을 측정한 결과, Fr.EA > Fr.B > Fr.H > Fr.E > Fr.W 순으로 그 활성이 높게 나타났다. 분획 중 Fr.EA가 가장 강한 소거 활성을 나타내었고, IC50는 29.84  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 나타났다. Fr.W는 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 3% 이내의 radical 소거활성을 보여, 다른 분획과 비교해 보았을 때 현저히 낮은 활성을 나타내었다. ABTS radical 소거능은 Fr.EA > Fr.B > Fr.H > Fr.E > Fr.W 순으로 나타났고 Fr.EA의 IC50는 28.83  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , Fr.B는 58  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 비교적 높은 활성을 나타내었다. 함초 줄기 70% MeOH 추출물의 분획 별 NO 소거 활성은 Fr.EA > Fr.B > Fr.H > Fr.E > Fr.W 순으로 나타났으며, Fr.EA는 Fr.W보다 10배 이상의 높은 활성을 나타내었다. 이러한 효과는 각 분획의 폴리페놀 및 플라보노이드성 물질의 함량과 일관된 경향을 나타내었다. 따라서 함초 줄기의 항산화 활성은 폴리페놀 및 플라보노이드성 물질과 밀접한 관계가 있을 것으로 사료된다. 각종 radical에 대한 IC50을 Fig.6에 정리하였다.

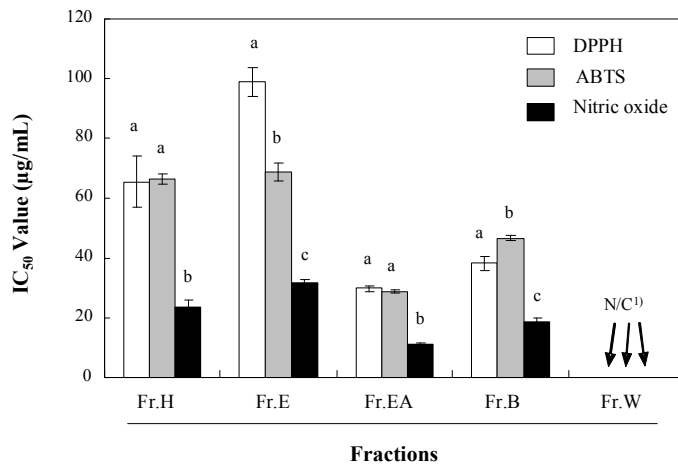


Figure 6. Scavenging effects (IC<sub>50</sub> value) of the fractions from aerial parts of *S. herbacea* on DPPH, ABTS radicals, and NO. Each value represents the mean±S.D. (n=3). 1) Not calculated. Different letters indicate a significant difference (p<0.05) based on one-way ANOVA and the Tukey's HSD test

### (3) 지질 과산화 억제 효과

- 함초 줄기 추출물의 분획 별 지질 과산화 억제 효과를 측정한 결과, 1 mg/mL 농도에서 유의적인 효과를 보였으며, Fr.B > Fr.EA > Fr.E > Fr.H > Fr.W 순의 활성을 나타내었다. Fr.B와 Fr.EA는 1 mg/mL 농도에서 linoleic acid 산화를 78-80% 정도 억제함으로써 분획 중 가장 높은 활성을 나타내었고 Fr.W는 15% 정도 억제함으로써 분획 중 지질 과산화물 생성 억제 효과에 있어 가장 낮은 활성을 나타내었다. 함초 줄기 추출물의 분획 별 Fe<sup>2+</sup> 소거 활성을 측정한 결과 Fr.W > Fr.B > Fr.H > Fr.EA > Fr.E 순의 활성을 나타내었다. 각종 radical 소거에 있어 가장 낮은 활성을 나타내었던 Fr.W는 1 mg/mL 농도에서 Fe<sup>2+</sup>를 42% 정도 감소시킴으로써 가장 높은 Fe<sup>2+</sup> 소거 활성을 나타내었다.

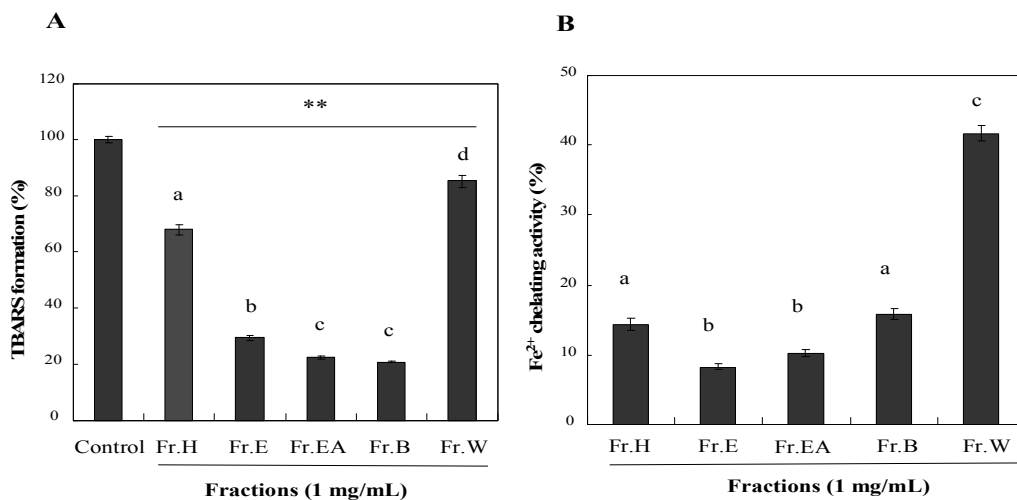


Figure 7. Effects of the fractions from aerial part of *S. herbacea* on lipidperoxidation (A), and ferrous (Fe<sup>2+</sup>) ion chelating activities (B). Each value represents the mean±S.D. (n=3). \*\* Significantly different from control according to Student's t-test (p<0.01). Different letters indicate a significant difference (p<0.05) based on one-way ANOVA and the Tukey's test (A,B).

(4) 장관계 세포 독성 효과

- 함초 줄기 추출물의 분획을 대장암 세포주인 HCT 116, HT-29와 정상 장관계 세포인 INT-407에 처리하여 세포 독성을 평가하였다. 각 분획을 400 µg/mL 농도로 처리하였을 때 Fr.E, Fr.EA는 HCT 116, INT-407에 대해 80% 정도 세포생존을 저해한 반면, HT-29에 대해서는 40% 이하의 독성을 나타내었다.

- Fr.E와 Fr.EA를 농도 별로 처리한 결과, 농도 의존적으로 세포사멸 효과가 나타났으며, Fr.E는 HCT 116와 INT-407에 대해 각각 265 µg/mL와 212 µg/mL 농도의 IC<sub>50</sub> 수치를 나타내었고, Fr.EA는 HCT 116와 INT-407에 대해 각각 138 µg/mL와 211 µg/mL 농도에서 50% 정도 세포 독성을 나타내었다. 분획 중 Fr.H는 400 µg/mL 농도에서 HCT 116와 HT-29에 대한 독성 효과를 나타내지 않았으며, Fr.W의 경우 동일 농도에서 모든 세포주에 대해 독성을 나타내지 않았을 뿐만 아니라 오히려 대장암 세포주에서 5-15% 정도 세포의 성장을 유도한 것으로 나타났다.

- 함초 줄기 추출물의 분획에 의한 세포 독성 효과 또한 분획 내 존재하는 폴리페놀성 물질에 의한 효과로 판단되며, 향후 세포독성을 유도하는 유용성분 및 기작에 대한 연구가 필요할 것으로 보인다. 이상의 결과를 Fig.8에 정리하여 나타내었다.

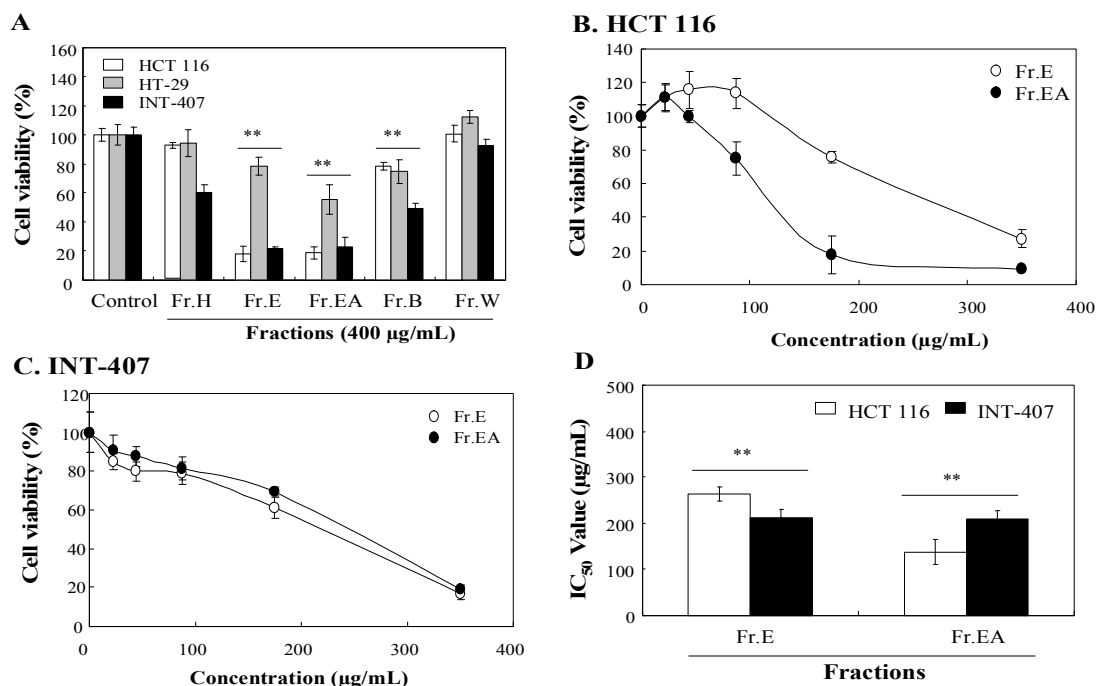


Figure 8. Effects of the fractions from aerial part of *S. herbacea* on colon cancer and normal intestinal cells. Cells were treated with each fraction at 400µg/mL for 24hr (A). Concentration-dependent effects of Fr.E and Fr.EA on HCT116 (B) human colon cancer cells and INT-407 normal intestinal cells (C) were analyzed. The IC<sub>50</sub> values of each compound for different cell lines (D). Each value represents the mean±S.D. (n=8). Each bar represents the mean±S.D. (n=8). \*, \*\* Significantly different (A) from its corresponding control according to Student's t-test (\*, p<0.01;\*\*p<0.001).

#### 4. 염수 또는 담수 재배 함초의 효과

##### (1) 화학적 특성

- 염수 또는 담수 재배 함초를 열수 추출하여 얻은 추출물의 수율 및 화학적 특성을 Table 3에 나타내었다. 염수 재배 함초 추출물의 추출 수율은 42.4% (w/w)로 나타났으며, 담수 재배 함초 추출물은 염수 재배 함초 추출물보다 5% 정도 낮은 37.0% (w/w)의 추출 수율을 나타내었다. 염수 또는 담수 재배 함초 열수 추출물의 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량은 mg당 각각 16.1, 11.7  $\mu$ g과 39.0, 36.5  $\mu$ g이었으며, 담수 재배 함초는 염수 재배 함초 보다 폴리페놀 및 플라보노이드를 2배 이상 함유하고 있는 것으로 나타났다. 각 추출물의 285 nm에서의 흡광도를 측정한 결과, 0.5 mg/mL 농도에서 담수 재배 함초의 흡광도가 0.159로 염수 재배 함초 보다 약 1.5배 높게 나타났다.

**Table 3. Characteristics of the extracts from the *S. herbacea*.**

	Yield (%)	Total polyphenols 1) ( $\mu$ g/mg solids)	Total flavonoids 2) ( $\mu$ g/mg solids)	Abs. at 285 nm (at 0.5 mg/mL)	Salinity (1 mg/mL, %)
SWE	42.4	16.13 $\pm$ 0.21	11.72 $\pm$ 0.33	0.105	0.063 $\pm$ 0.005
FWE	37.0	39.03 $\pm$ 0.19	36.50 $\pm$ 1.38	0.159	0.047 $\pm$ 0.003

1) Microgram of contents/mg of extracts based on tannic acid as a standard.

2) Microgram of contents/mg of extracts based on catechin as a standard.

##### (2) 항산화 활성

- 염수 또는 담수 재배 함초 추출물의 DPPH radical 소거능을 측정한 결과, 각 시료 추출물은 0-0.6 mg/mL 농도 범위에서 농도 의존적으로 radical 소거 활성을 나타내었다. 담수 및 염수 재배 함초 추출물의 DPPH radical 소거 활성에 대한 IC50를 계산한 결과 각각 0.25, 0.65 mg/mL로 나타났으며, 담수로 재배한 함초는 염수 재배 함초 추출물보다 DPPH radical의 소거능이 2배 정도 높게 나타났다.

- ABTS radical 소거 활성을 측정하였을 때, 담수 재배 함초 추출물의 IC50는 0.22 mg/mL로 나타났으며, 염수 재배 함초 추출물의 경우 0.54 mg/mL로 나타났다. 염수 또는 담수 재배 함초 추출물의 NO 소거 활성을 측정한 결과, 염수 또는 담수 재배 함초 추출물의 NO 소거능에 대한 IC50는 각각 0.23 mg/mL과 0.13 mg/mL로 나타났다. 한편 염수 재배 함초 추출물은 1 mg/mL 농도에서 24% 정도의 지질과산화물의 형성을 억제하였으며, 담수 재배 함초 추출물은 동일한 농도에서 12% 정도를 억제함으로써 담수 재배 함초 추출물의 지질 과산화물 억제 효과는 염수 재배 함초 추출물보다 유의적으로 높았다. 염수 또는 담수 재배 함초 추출물의 Fe<sup>2+</sup> chelating 효과를 측정한 결과, 염수 또는 담수로 재배 함초 추출물은 2.5 mg/mL 농도에서 free Fe<sup>2+</sup>를 각각 52%와 45% 감소시키는 결과를 나타내었고, 담수 재배 함초 추출물이 염수 재배 함초 추출물 보다 다소 높은 Fe<sup>2+</sup> chelating 효과를 보였다. 이상의 연구 결과를 통해 담수 재배 함초 추출물은 염수 재배 함초 추출물보다 총 폴리페놀 및 플라보노이드 물질을 더 많이 함유하고 있었으며, NO 및 DPPH, ABTS radical을 소거활성을 비롯한 과산화지질억제 활성에 있어서 유의적으로 높은 활성을 나타내었다.

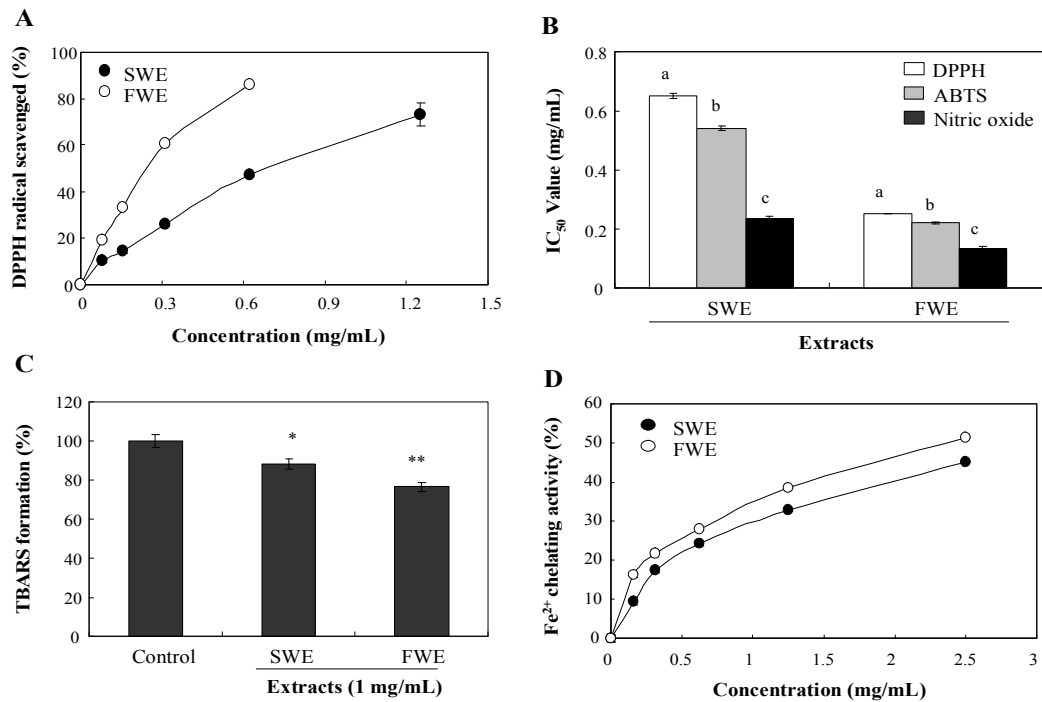
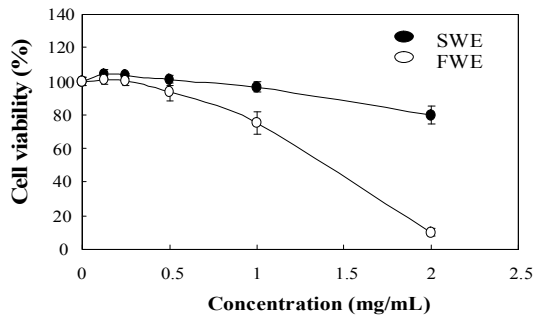


Figure 9. Effects of the extracts from freshwater-cultivated (FWE) (○) and naturally-grown (in saltwater) *S. herbacea* (SWE) (●) on DPPH, ABTS radicals, and NO (A and B), lipid peroxidation (C), and ferrous (Fe<sup>2+</sup>) ion (D). Each value represents the mean±S.D. (n=3). 1) Not calculated. Different letters indicate a significant difference (p<0.05) based on one-way ANOVA and the Tukey's test (B). \*,\*\* Significantly different from control according to Student's t-test (\*,p<0.01; \*\*,p<0.001) (C).

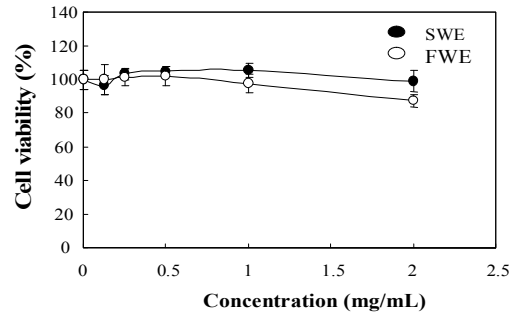
### (3) 세포 독성 평가

- 인간 대장암 세포인 HCT 116, HT-29에 담수 또는 염수 재배 함초 추출물을 처리하여 세포 독성을 평가한 결과, 각 추출물은 HCT 116에 대해 HT-29 보다 더 강한 독성을 나타내었다. 특히 담수 재배 함초 추출물은 염수 재배 함초 추출물보다 HCT 116를 사멸시키는 효과가 크게 나타났다. HT-29의 경우 각 시료 추출물 농도 0.125-1 mg/mL 범위까지 독성 효과를 나타내지 않았으며, 2 mg/mL 농도에서 담수 재배 함초 추출물에 의해 10% 정도 세포 증식이 억제되었다. 인간 정상 장관계 세포인 INT-407에 대해 담수 재배 함초 추출물은 2 mg/mL 농도에서 30% 정도 세포 독성 효과를 보였으며, 이는 대장암 세포인 HCT 116에 대한 독성 효과와 비교해 보았을 때 3배 정도 낮은 것은 결과이다. 염수 재배 함초 추출물은 INT-407에 대해 2 mg/mL 농도 범위까지 특별한 독성 효과가 나타나지 않았으며, 1-2 mg/mL 범위의 농도에서는 오히려 세포의 성장을 15% 증가시키는 것으로 나타났다.

### A. HCT 116



### B. HT-29



### C. INT-407

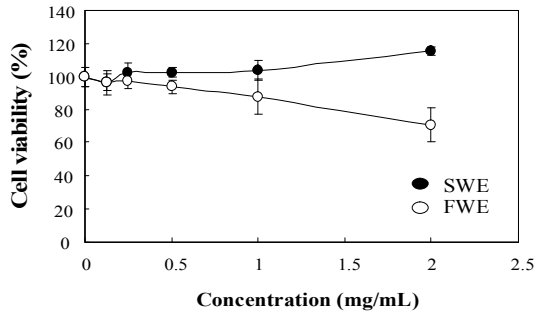


Figure 10. Cytotoxic effect of the extracts from freshwater-cultivated (FWE) (○) and naturally-grown (in saltwater) *S. herbacea* (SWE) (●) *S. herbacea* on colon cancer and normal intestinal cells. HCT 116 (A), HT-29 (B), and INT-407 (C) cells were treated with concentration of each extract. Each value represents the mean±S.D. (n=8). Different letters indicate a significant difference ( $p < 0.05$ ) based on one-way ANOVA.

#### (4) 항염증 효과

- 종자, 지상부 추출물 및 각 분획의 항염증 효과는 NO 생성 억제 효과 및 아라키돈 산 대사 작용에 관련된 효소계에 대한 영향을 분석함으로써 평가가 진행되고 있다.

RAW264.7에 함초 종자 추출물 및 분획 별 세포 독성을 평가한 결과 RAW 264.7은 20  $\mu$ g/mL 농도에서 세포 독성을 나타내지 않았으며, 10-70% 정도 성장이 촉진되었다. 따라서 20  $\mu$ g/mL 농도로 각 추출물 및 분획을 LPS에 의해 자극된 RAW264.7에 24 및 48시간 처리하여 NO 생성량의 변화를 분석한 결과 70% MeOH 추출물은 LPS에 의해 유도된 RAW264.7의 NO에 대한 생성저해 효과를 나타내지 않았으나, 각 분획은 RAW264.7 세포로부터 NO 생성을 저해하여 Fr.EA > Fr.E > Fr.H > Fr.W 순으로 그 활성이 나타났다. 함초 줄기 70% MeOH 추출물의 각 분획을 50  $\mu$ g/mL 농도로 하여 RAW264.7에 처리한 결과 세포에 독성을 나타내지 않았으며 오히려 세포의 성장을 촉진하는 것으로 나타났다 (Fig. 14A). 특히, Fr.H와 Fr.E에 의해 세포의 성장이 각각 83%, 55% 정도 촉진되었으며, 이외에 다른 분획은 20% 이내로 세포의 성장을 촉진시키는 것으로 나타났다. 위 결과를 토대로 LPS로 자극한 RAW264.7 세포에 각 분획을 50  $\mu$ g/mL 농도로 처리하고, 24와 48시간 후 배지 중 NO량을 측정된 결과 각 분획의 NO 생성량 억제 정도는 Fr.E > Fr.H > Fr.EA > Fr.B > Fr.W 순으로 나타났다.

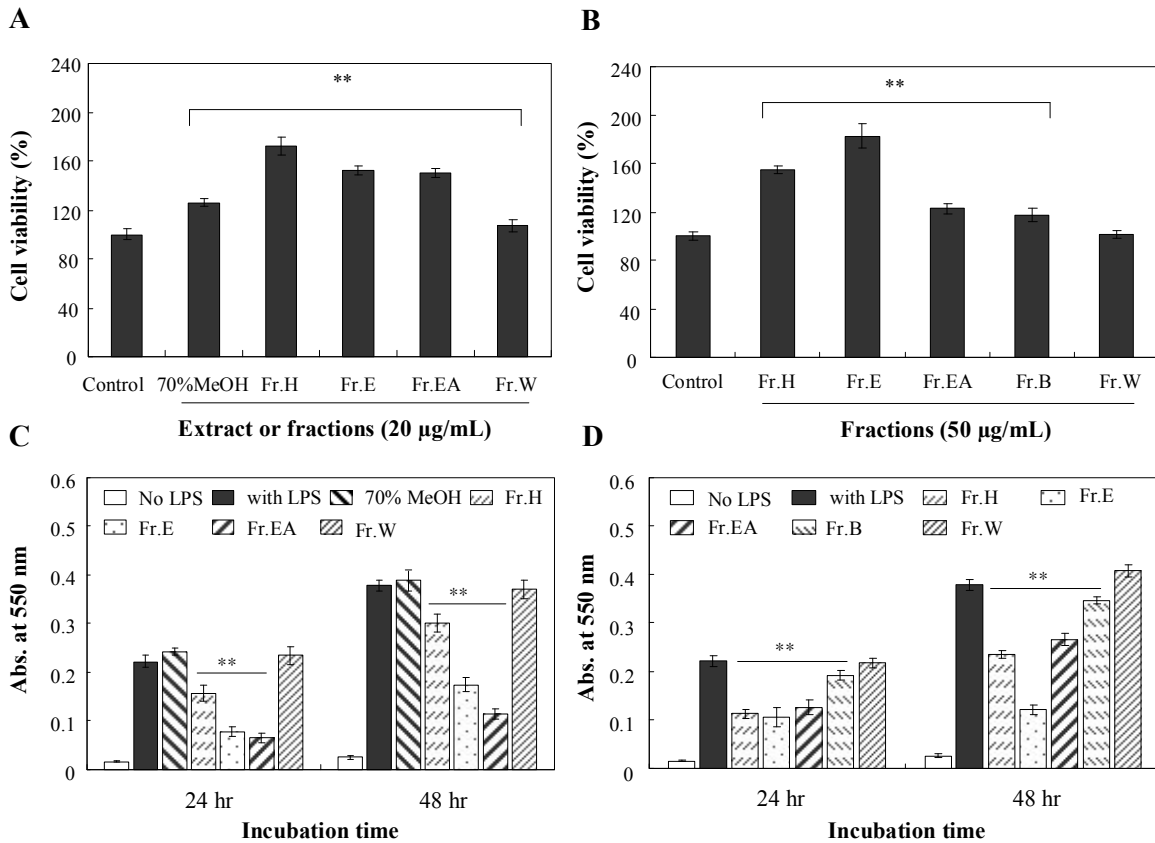


Figure 11. Effect of the fractions from *S. herbacea* seeds and aerial parts on RAW264.7 cell viability (A and B) and NO production (C and D). The viability of RAW264.7 cell in the absence or presence of 20 µg/mL and 50 µg/mL of the seed (A) or aerial part (B) fractions, respectively, were analyzed. RAW264.7 cells were stimulated with 2 µg/mL LPS for 1hr, and fresh medium containing each seed (C) or aerial part (D) fraction (20 µg/mL or 50 µg/mL, respectively) was then replaced. After 24 or 48hr NO level in the medium was determined. Each value represents the mean±S.D. (n=8 in A; n=4-8 in B). \*\*, Significantly different from its corresponding control according to Student's t-test (\*\*,p<0.01).

## 5. 항염증 및 항암 기전평가

### 가. 항염증 효과 및 관련 기전

#### (1) 함초 종자추출물에 의한 항염증 기전

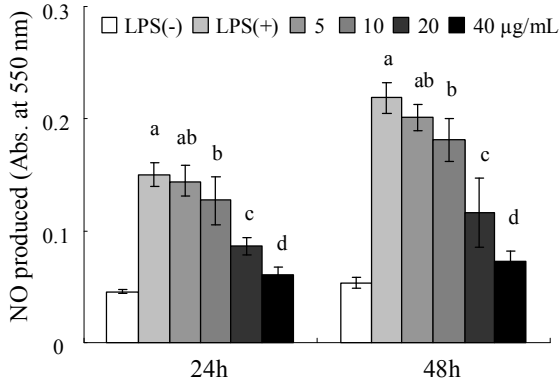
- 함초 종자 각 분획에 대한 항염증 기작은 LPS에 활성화된 RAW264.7 macrophage에서 평가하였다. iNOS는 일반적으로 정상상태의 세포 내에는 존재하지 않으나, 다양한 자극에 의해 유도되어 다량의 NO를 생성하며, NO는 세포독성, 조직손상 등을 유발하는 것으로 보고되었고, 염증상태에서 iNOS에 의해 생성된 NO는 혈관 투과, 부종 등의 염증반응을 촉진시키고 염증매개 물질의 생합성을 촉진시킨다.

LPS에 의해 활성화된 RAW264.7 macrophage에 각 종자분획을 농도별로 24 또는 48시간 처리하여 생성된 NO량을 측정하였다(Fig.12A-D). 그 결과 Fr.W를 제외한 모든 분획에서 농

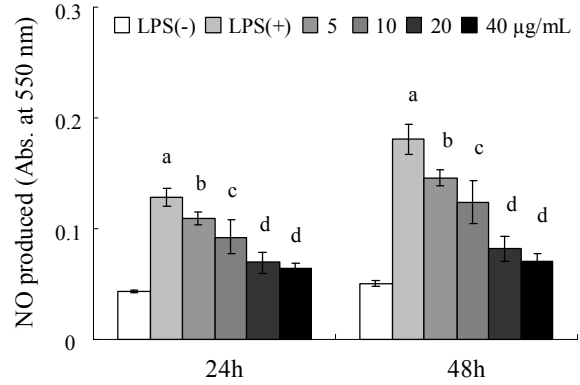


도의존적인 NO생성 저해 효과를 나타내었으며 Fr.H와 E가 가장 강한 효과를 나타내었다. Fr.H를 24시간 처리하였을 때 40 µg/mL농도에서 60-70%의 NO생성 저해효과를 나타내었고, 48시간째의 효과가 더욱 크게 나타났다. Fr.W는 400 µg/mL에서 48시간 처리한 세포에만 유의적인 감소현상을 보였다.

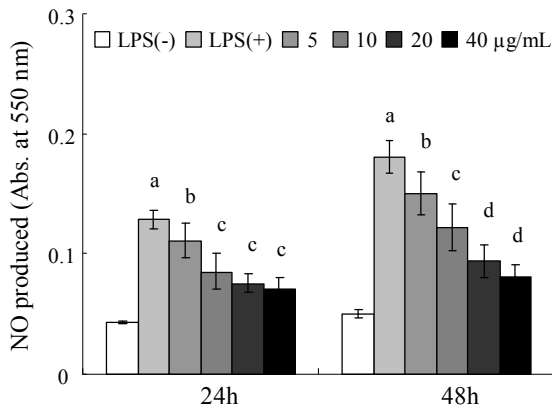
**A. Fr. H**



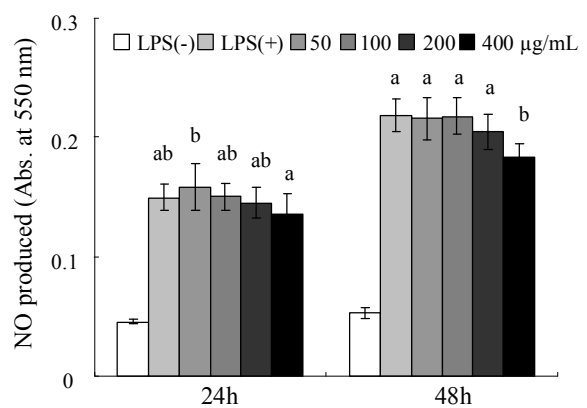
**B. Fr. E**



**C. Fr. EA**



**D. Fr. W**



**Figure 12.** Effect of the fractions from *S. herbacea* seeds on NO production from LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. RAW264.7 cells were stimulated with 1 µg/mL LPS for 1 hr, and fresh medium containing different concentrations of each seed fraction was then replaced. After 24 or 48 hr, NO levels in the medium was determined. Each value represents the mean±S.D. (n=8). Different letters indicate a significant difference ( $p < 0.05$ ) based on one-way ANOVA and the Tukey's HSD test.

한편 LPS에 유도된 RAW264.7에 함초 종자 추출물과 각 분획을 20 µg/mL 농도로 처리한 후, iNOS를 비롯한 주요 염증관련 효소 단백질 cPLA<sub>2</sub>, COX-2 발현량의 변화를 Western blot 을 통해 분석하여 그 결과를 Fig. 13A에 나타내었다. LPS 미자극 RAW264.7 세포는 iNOS를 발현하지 않았으며, LPS처리에 의해 과량의 iNOS가 유도되었다. 각 시료에 의한 iNOS 발현량 변화를 측정된 결과, 70% MeOH 추출물은 LPS에 유도된 RAW264.7의 iNOS 발현량에 영향을 주지 않았으나, 분획 중 Fr.E, Fr.EA와 Fr.H에 의해 iNOS 발현량이 현저히 감소되는 결과를 나타내었다 (Fig. 13B). 또한 세포의 막 구조에 존재하여 아라키돈산을 유리시키는 cPLA<sub>2</sub>의 경우, LPS 비처리구에서도 상당량의 cPLA<sub>2</sub>수준을 유지하고 있었으나, LPS에 의해 그 발현량이 현저하게 증가하였다 (Fig. 13C). 시료 처리구 중에서는 Fr.E, Fr.EA와 Fr.H에

의해 cPLA<sub>2</sub>의 발현량이 유의적으로 감소하는 결과를 나타내었다.

함초 종자 추출물과 분획에 의한 COX-2의 발현 정도를 알아본 결과, LPS 비처리구에서는 COX-2의 발현이 유도되지 않았으며, LPS 처리구에서는 COX-2의 발현이 유도되었다 (Fig. 13D). 70% MeOH 추출물을 처리한 세포의 COX-2 발현량에는 유의적인 차이를 나타내지 않았으나, 분획 별 COX-2 발현량 변화 측정 시 Fr.E, Fr.EA와 Fr.H에 의한 COX-2의 발현량이 현저히 감소하였다. 이상의 결과를 통해 함초종자 분획 성분들은 iNOS 발현의 억제를 통한 기작 뿐만 아니라, 아라키돈산과 관련된 cPLA<sub>2</sub> 및 COX-2 등의 효소 발현을 억제함으로써 항염증 효과를 나타낼 수 있을 것으로 사료된다.

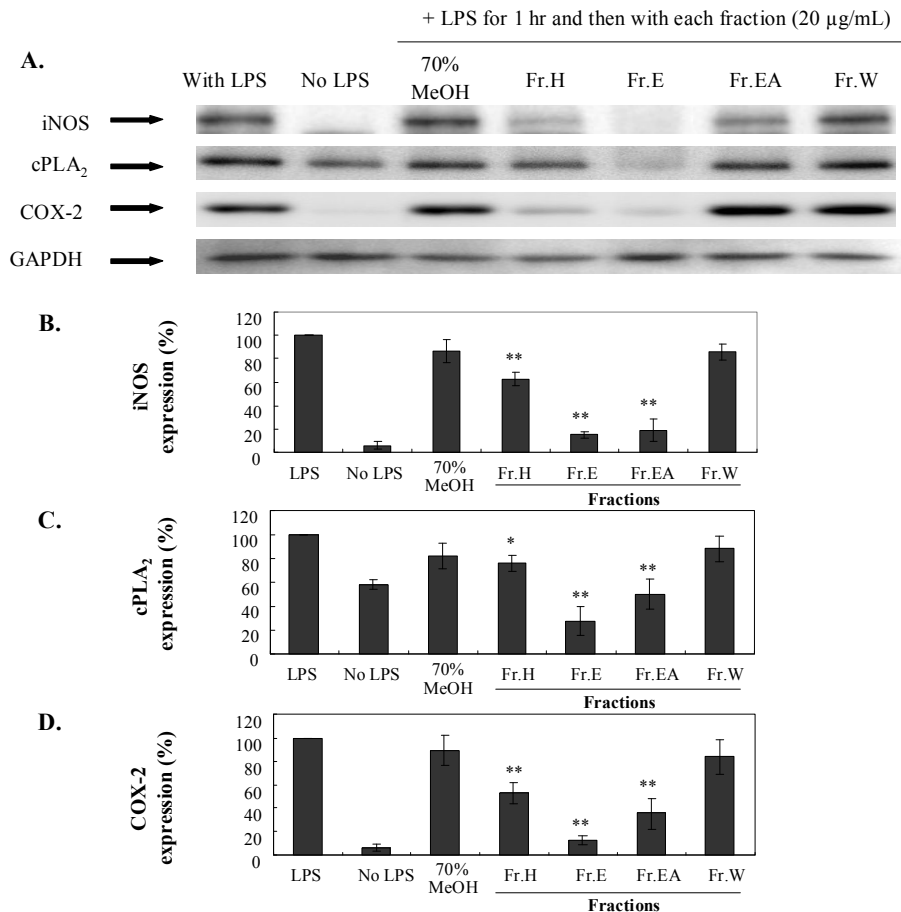


Figure 13. Effects of the fractions from *S. herbacea* seeds on the expression of iNOS, cPLA<sub>2</sub>, and COX-2 in LPS-stimulated RAW264.7 cells. After stimulating with 2 µg/mL LPS for 1 hr, cells were incubated with or without 20 µg/mL of each fraction for 24 hr. Western blot analysis was performed on cell lysates containing 25 µg protein with an antibody against iNOS, cPLA<sub>2</sub>, COX-2, or GAPDH. The results are representative of triplicate experiments (A). Blotted protein including iNOS (B), cPLA<sub>2</sub> (C), and COX-2 (D) were quantified using a luminescent image analyzer. \*, \*\* Significantly different from its corresponding control according to Student's *t*-test (\*,  $p < 0.01$ ; \*\*,  $p < 0.001$ ).

각 종자 추출물 분획은 macrophage에서 LPS에 의해 유도된 COX-2에 대해 대체적으로 농도의존적 발현 억제효과를 나타내었다. Fr.E와 H가 가장 강력한 효과를 나타내어 20 µg/mL에서 70%이상의 억제효과를 나타내었으나 그 이하의 농도에서는 현저하게 효과가 감소하였다. Fr.EA의 경우 40 µg/mL이상의 농도에서 90% 가량의 억제효과를 보였으며 Fr.W의 경우에도 200 µg/mL에서 유의적인 억제효과를 나타내었다 (Fig. 14A and B).

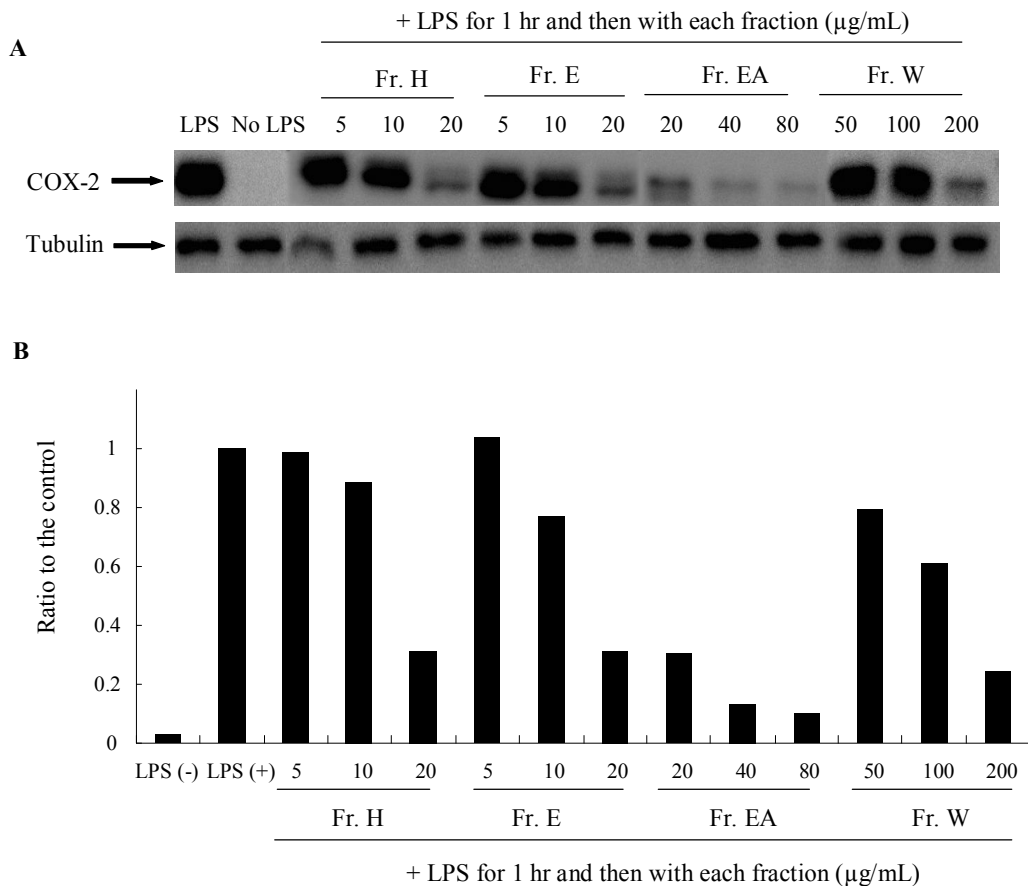


Figure 14. Concentration-dependent effects of the fractions from *S. herbacea* seeds on the expression of COX-2 in LPS-stimulated RAW264.7 cells. After stimulating with 1 µg/mL LPS for 1 hr, cells were incubated with different concentrations of each fractions for 24 hr. Western blot analysis was performed on cell lysates containing 20 µg protein with a antibody against COX-2 and α-tubulin. Blotted protein including COX-2 were quantified using a luminescent image analyzer. The results indicate a representative of duplicate experiments which show similar patterns.

## (2) 함초 줄기 추출물에 의한 항염증 기전

LPS에 의해 활성화된 RAW264.7에 함초 줄기 추출물의 분획을 50 µg/mL 농도로 처리하여 24시간 배양한 후, 배양 세포의 lysate를 제조하여 Western blot을 실시하였다. 함초 줄기 추출물의 분획에 의한 RAW264.7의 iNOS, cPLA<sub>2</sub>, COX-2 발현변화를 Fig. 15A에 나타내었다. 함초 줄기 추출물의 분획에 의한 iNOS 발현량을 측정된 결과, LPS 처리에 의해 iNOS의 발현이 현저히 유도되었으며, 분획 중 Fr.E, Fr.H와 Fr.EA에 의해 iNOS의 발현량이 감소하는 결과를 나타내었다 (Fig. 15B). 각 시료 추출물에 의한 cPLA<sub>2</sub>의 발현량을 측정된 결과, 역시 Fr.E, Fr.H와 Fr.EA에 의해 cPLA<sub>2</sub> 발현량이 감소하는 결과를 나타내었다 (Fig. 15C). COX-2의 발현 정도의 변화에 있어서도, Fr.E, Fr.H와 Fr.EA에 의해 현저히 발현량이 감소하는 것으로 나타났다. 한편 Fr.B와 Fr.W는 iNOS의 발현량을 약간 감소시켰으며, cPLA<sub>2</sub>와 COX-2 발현량에는 거의 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다 (Fig. 15D). 따라서 함초 줄기 추출물 분획 중 Fr.E, Fr.H와 Fr.EA에 의한 iNOS, cPLA<sub>2</sub>, 및 COX-2의 발현억제 효과가 두드러졌으며,

이들에 의한 항염증 효과를 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

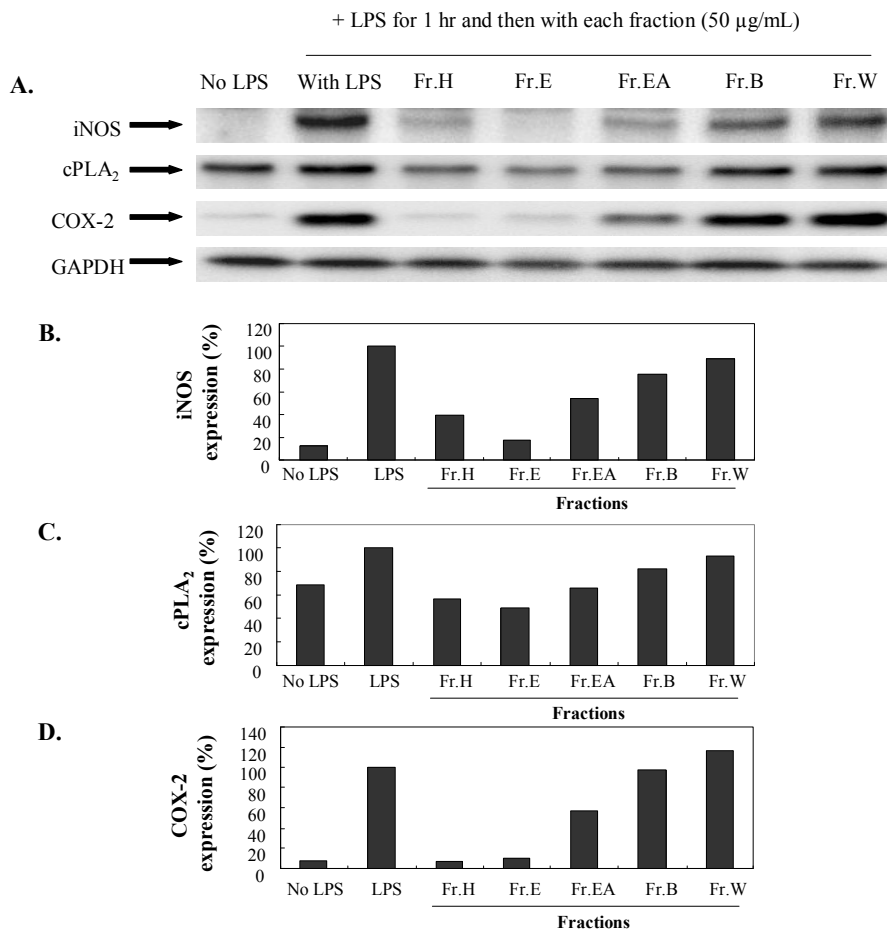
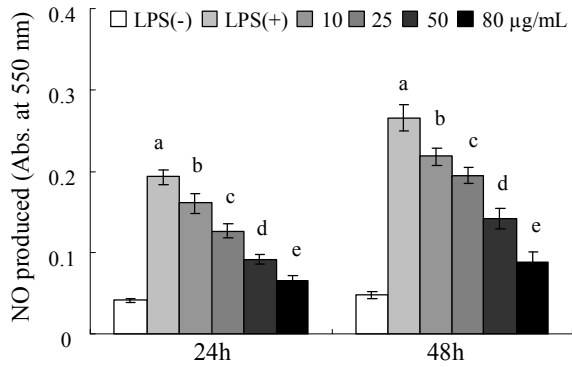


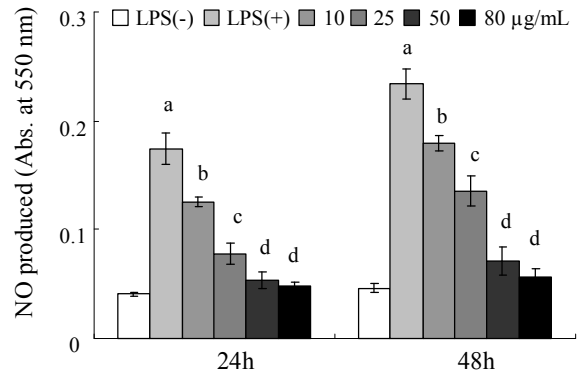
Figure 15. Effects of the fractions from aeriar part of *S. herbacea* on the expression of iNOS, cPLA<sub>2</sub>, and COX-2 in LPS-stimulated RAW264.7 cells. After stimulating with 2 µg/mL LPS for 1 hr, cells were incubated with or without 50 µg/mL of each fraction for 24 hr. Western blot analysis was performed on cell lysates containing 25 µg protein with an antibody against iNOS, cPLA<sub>2</sub>, COX-2, or GAPDH. The results are representative of triplicate experiments (A). Blotted protein including iNOS (B), cPLA<sub>2</sub> (C), and COX-2 (D) were quantified using a luminescent image analyzer.

한편 LPS에 의해 stimulation된 RAW264.7 세포에서 지상부 추출물 각 분획에 대한 농도별 NO생성 억제효과를 24시간 48시간 incubation한 후 분석하였다(Fig. 16). 그 결과 Fr.E에 의해 가장 강력한 NO생성 억제효과가 나타났는데 10 µg/mL의 농도에서도 유의적으로 NO생성이 저해되었으며, 50 µg/mL 이상의 Fr.E는 대부분의 NO를 봉쇄하는 것으로 나타났다(Fig. 16B). 이는 Western blot의 결과에서 보여진 Fr.E의 iNOS유도 억제효과와 일치하는 것으로 Fr.E의 NO저해효과에 대한 기작은 iNOS의 유도를 억제하는 것으로 판단된다(Fig. 15). 다음으로 Fr.H가 높은 효과를 나타내었고 역시 10 µg/mL의 농도에서 유의적으로 NO생성을 저해하였다(Fig. 16A). Fr.B는 80 µg/mL 농도에서 유의적인 효과를 나타내어 약 15%의 NO가 저해되었으며(Fig. 16D), Fr.W의 경우 400 µg/mL의 농도에 도달하여야 유의적인 저해효과가 나타났다(data not shown). 이상의 결과는 지상부 추출물의 대식세포에서의 NO저해활성기작이 대부분 NO에 의한 직접적인 quenching보다는 iNOS의 유도억제에 의한 효과임을 시사한다.

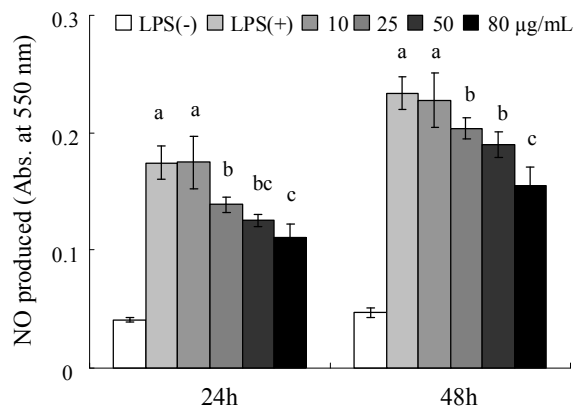
A. Fr. H



B. Fr. E



C. Fr. EA



D. Fr. B

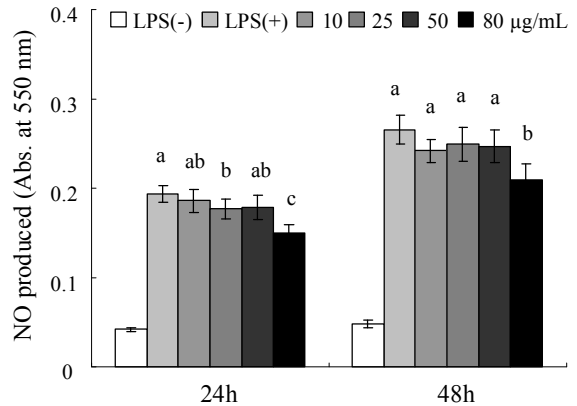


Figure 16. Effect of the fractions from aerial parts of *S. herbacea* on NO production from LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. RAW264.7 cells were stimulated with 1 µg/mL LPS for 1 hr, and fresh medium containing different concentrations of each fraction was then replaced. After 24 or 48 hr, NO level in the medium was determined. Each value represents the mean±S.D. (n=8). Different letters indicate a significant difference ( $p < 0.05$ ) based on one-way ANOVA and the Tukey's HSD test.

### (3) 염수 또는 담수 재배 함초 추출물에 의한 iNOS, cPLA<sub>2</sub>, COX-2 발현량 변화

LPS에 유도된 RAW264.7에 염수 또는 담수 재배 함초 추출물을 50 µg/mL 농도로 처리하여 24시간 배양한 후, 배양 세포를 이용하여 Western blot을 실시하였다. 염수 또는 담수 재배 함초 추출물에 의한 iNOS, cPLA<sub>2</sub>, COX-2의 발현량의 변화를 Fig. 18A에 나타내었다. 염수 또는 담수 재배 함초 추출물에 의한 염증관련 효소 단백질의 발현량 변화를 측정한 결과, 50 µg/mL 농도로 처리한 RAW264.7 세포의 iNOS, cPLA<sub>2</sub>, COX-2의 발현량에 유의적인 변화를 가져오지 않았다 (Fig. 18B). 따라서 염수 및 담수재배 함초 시료간의 항염증 활성을 비교 분석하기 위해서는 용매 별 분획 추출을 통한 보다 구체적인 실험 및 분석이 필요한 것으로 판단된다.

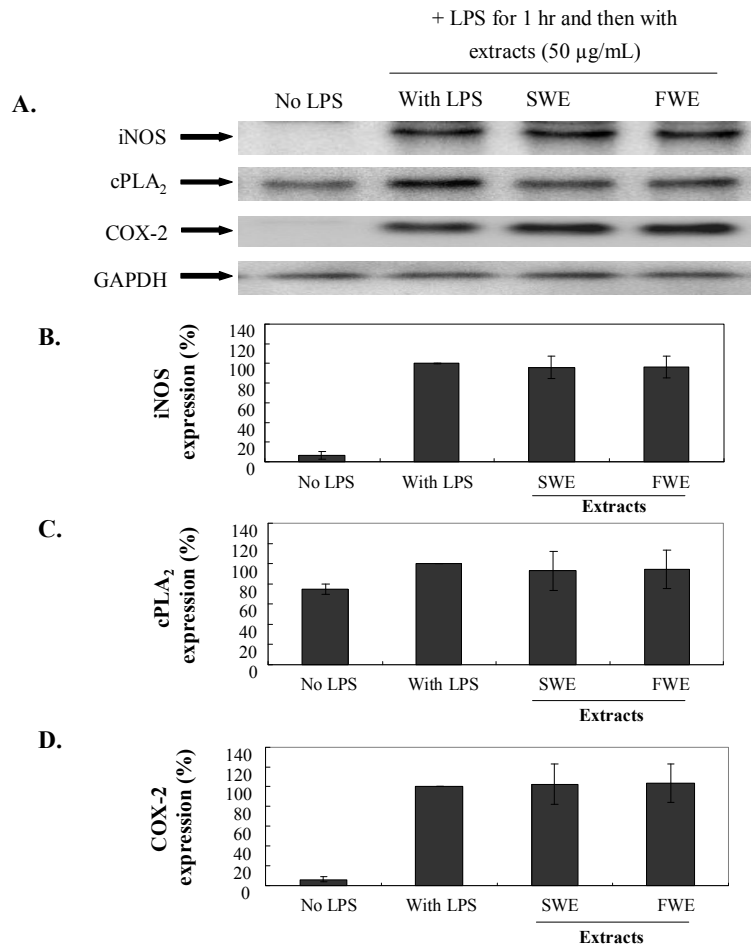


Figure 18. Effects of the extracts from freshwater-cultivated (FWE) and naturally-grown (in saltwater) *S. herbacea* on the expression of iNOS, cPLA2, and COX-2 in LPS-stimulated RAW264.7 cells. After stimulating with 2 µg/mL LPS for 1 hr, cells were incubated with or without 50 µg/mL of the extracts for 24 hr. Western blot analysis was performed on cell lysates containing 25 µg protein with an antibody against iNOS, cPLA2, COX-2, or GAPDH. The results are representative of triplicate experiments (A). Blotted protein including iNOS (B), cPLA2 (C), and COX-2 (D) were quantified using a luminescent image analyzer.

#### 나. 함초 추출물의 면역세포 활성화 효과 및 관련 기전

일반적으로 과도한 염증반응은 조직의 손상 및 발암 등의 해로운 효과를 유발하지만 적절한 정도의 면역세포 활성화는 암은 물론 다양한 질병에 대한 방어기작을 상승시키는 작용을 할 수도 있다. 지금까지 진행된 실험은 LPS에 의해 유도된 염증반응에서 각 함초의 지상부 및 종자 추출물의 분획이 얼마나 이를 억제하는 활성을 나타내는가에 초점을 맞추었으나, 이후 진행된 실험에서는 함초 추출물 자체가 대식세포 RAW264.7을 활성화 할 수 있는가에 대한 여부를 분석하였다. 각 함초 종자 및 지상부 추출물 분획을 RAW264.7에 직접 처리한 후 NO생성 및 COX-2 유도능 여부를 조사한 결과, 함초 종자 추출물의 Fr.W만이 대식세포를 활성화하는 것으로 나타났다 (data not shown). 따라서 종자 Fr.W의 농도별로 처리하여 NO생성 및 iNOS유도능을 조사하였다(Fig. 19A and B). 그 결과 Fr.W 농도의존적으로 RAW264.7 macrophage로부터 NO생성 및 iNOS가 유도되었으며 50 µg/mL의 처리농도에서도 iNOS가

발현되는 것으로 나타났다. COX-2에 대한 유도효과 역시 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  이상의 처리농도에서 확연하게 나타났으나, cPLA2에 대한 유도 또는 발현량 조절 효과는 거의 나타나지 않았다 (Fig. 19C and D). 이러한 면역세포에 대한 활성화 event가 실제 세포에 유리하게 작용할 것 인지에 대한 연구가 추후 진행되어야 할 것으로 사료된다.

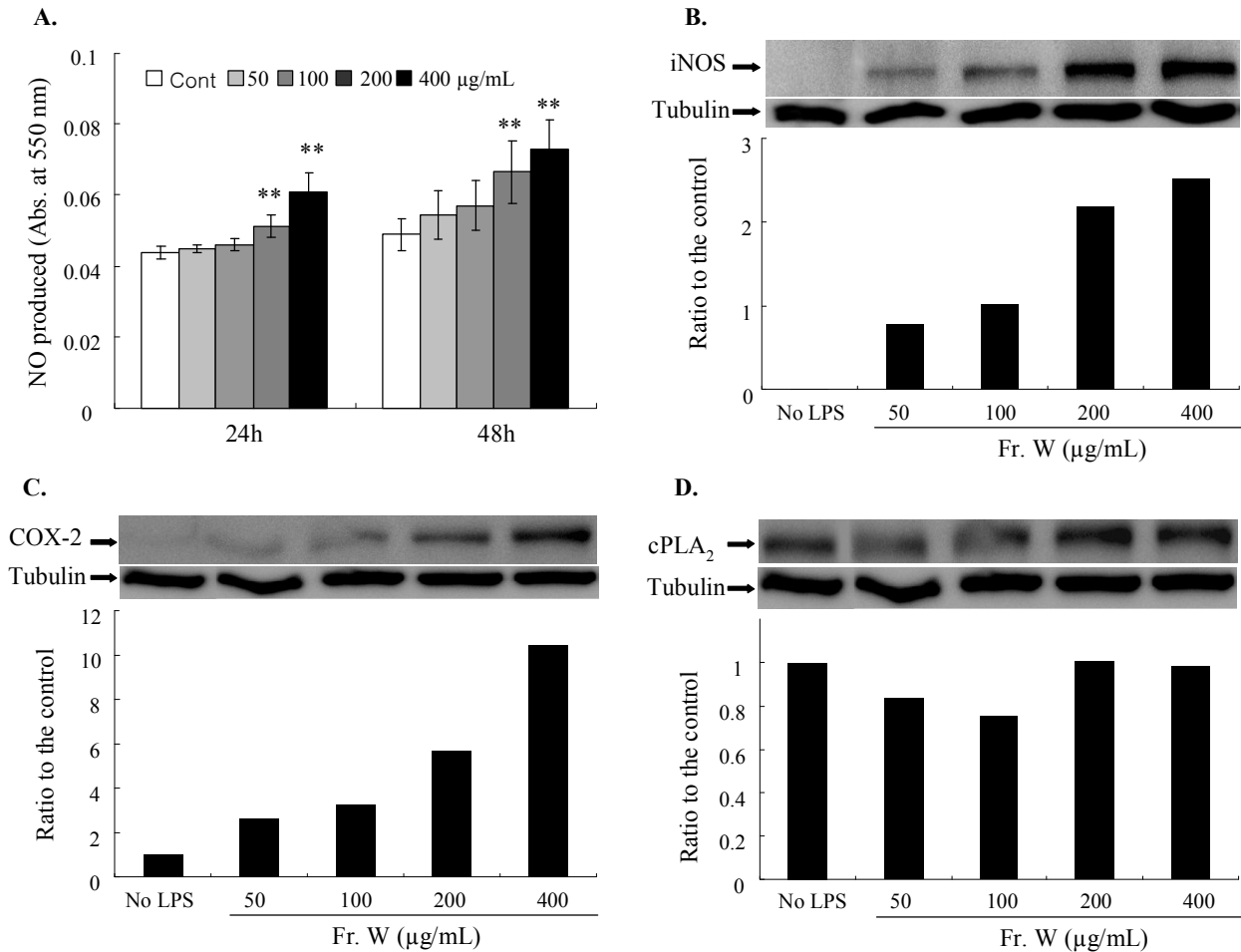


Figure 19. Concentration-dependent effects of Fr. W from *S. herbacea* seeds on the expression of iNOS, cPLA<sub>2</sub>, and COX-2 in RAW264.7 cells. After pre-incubation with serum free RPMI for 8 hr, RAW cells were incubated with Fr. W for 24 hr. Western blot analysis was performed on cell lysates containing 20  $\mu\text{g}$  protein with a antibody against iNOS, cPLA<sub>2</sub>, COX-2, or tubulin. Blotted protein including COX-2 (B), Inos (C), and c PLA<sub>2</sub> (D) were quantified using a luminescent image analyzer. \*\*, Significantly different from its corresponding control according to Student's t-test (\*\*,  $p < 0.01$ ) ( $n = 8$  in A). The results (in B-D) are representative of duplicate experiments.

## 제 5 절 염생식물의 항비만 및 심혈관질환 개선 효능 탐색

### 1. 세포배양모델을 통한 한국산 염생식물의 항비만 효과 탐색과 유효 추출물 선별 연구

가. 3T3-L1 세포를 이용한 한국산 염생식물의 항비만 효과 탐색

- 3T3-L1 adipocytes 세포를  $1 \times 10^5$  cells, 3ml/well로 넣고 5일간 배양함. 그 후 10%의 FBS Serum과 5%의 Penicilin을 첨가한 DMEM배지에 MDI처리하여 2일간, insuline 처리하여 2일간 배양한 후 FBS로 배지를 갈아 준 후 6일간 분화유도. Oil-Red O로 지방 세포 염색하여 3T3-L1 세포를 이용한 지방세포분화 모델을 확립하였음.

나. 함초 추출물별 항비만 효과 유효 농도 탐색

- 함초 물 추출물을 이용하여 전지방세포를 이용한 MTT assay 결과, 함초 물 추출물은 48시간과 96시간 처리 시 62.5ug/ml에서 서서히 수치가 감소하였으나, 이는 물질 처리시간이 길어짐에 따른 것으로 사료됨. 따라서 함초 물 추출물의 최고농도는 500ug/ml, 중간농도는 250ug/ml, 최소농도는 125ug/ml로 설정하였음.

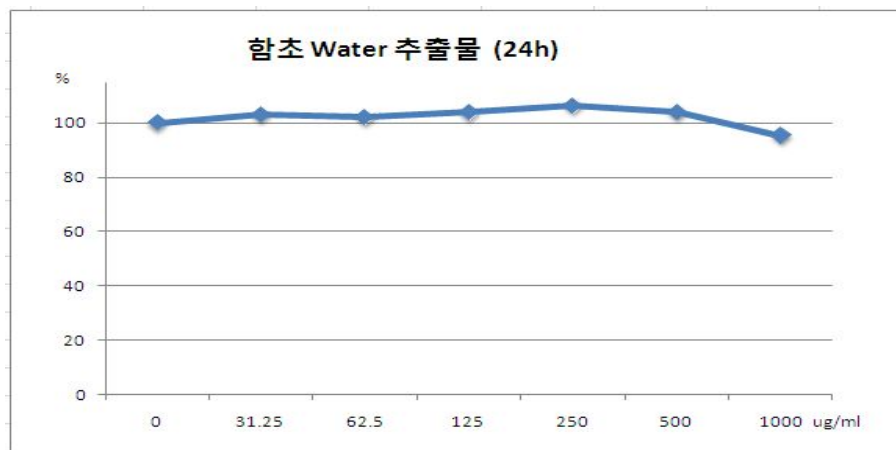


Fig 1. 함초 Water 추출물 24시간 처리 후 세포독성반응 결과

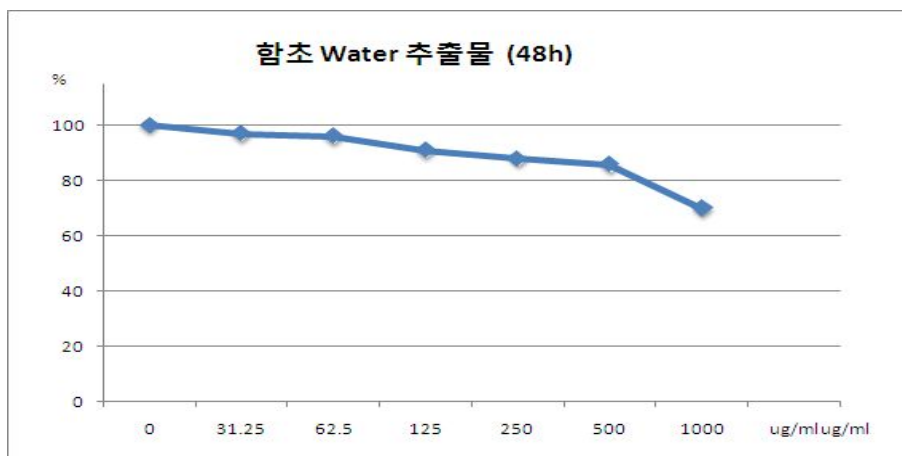


Fig 2. 함초 Water 추출물 48시간 처리 후 세포독성반응 결과



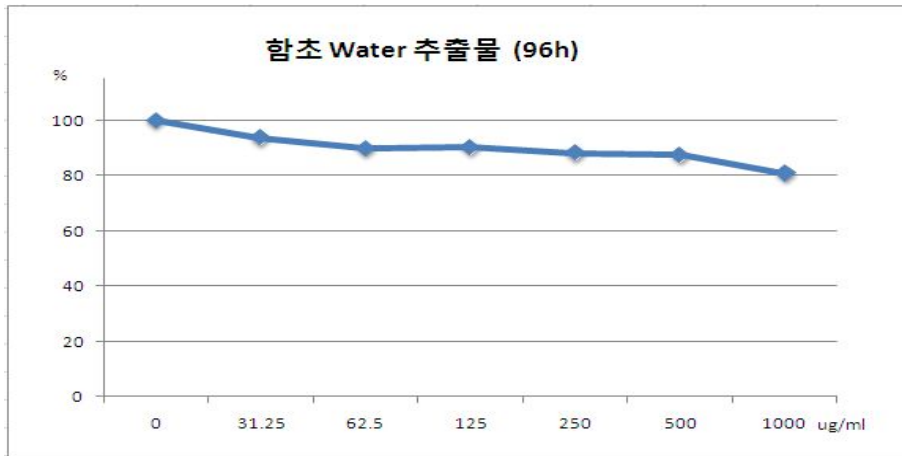


Fig 3. 함초 Water 추출물 96시간 처리 후 세포독성반응 결과

- 함초 메탄올 추출물 역시 48시간과 96시간 처리 시 62.5ug/ml에서 서서히 수치가 감소하였으나, 96시간 처리 시 세포 생존율 감소정도가 48시간 처리 시에 비해 적었으며, 500ug/ml부터 크게 감소하는 것을 볼 수 있었음. 따라서 함초 메탄올 추출물 최고농도는 250ug/ml, 중간농도는 125ug/ml, 최소농도는 62.5ug/ml로 설정하였음.

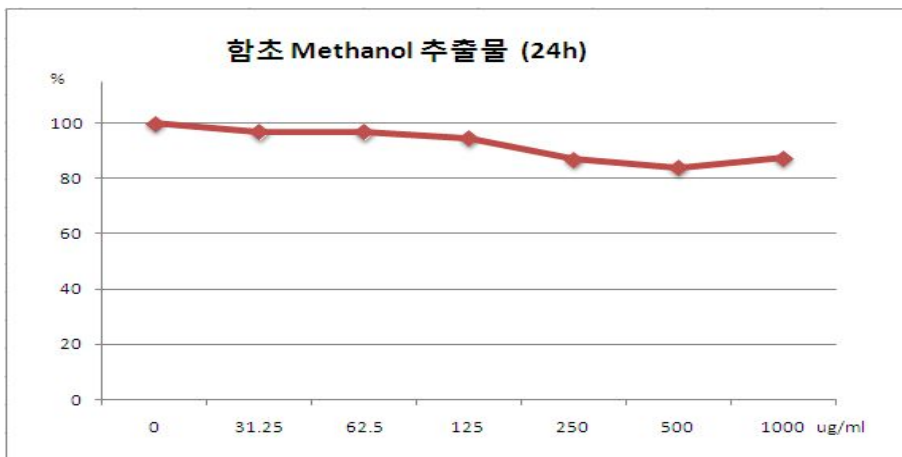


Fig 4. 함초 Methanol 추출물 24시간 처리 후 세포독성반응 결과

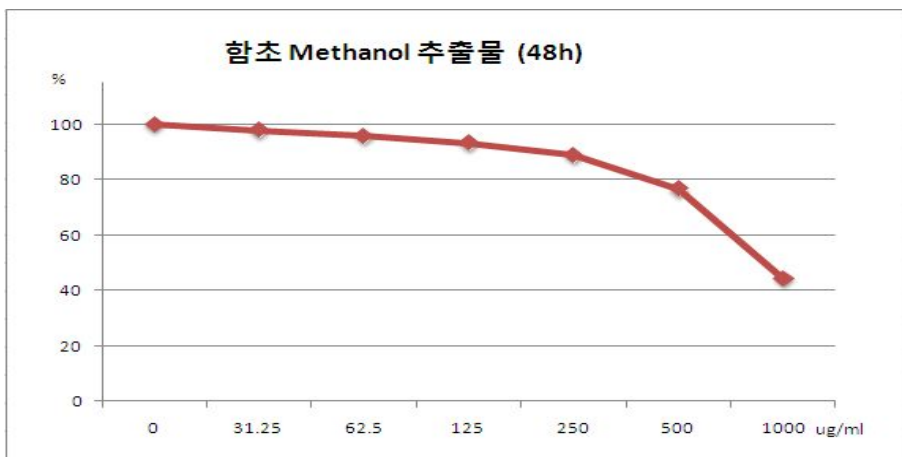


Fig 5. 함초 Methanol 추출물 48시간 처리 후 세포독성반응 결과

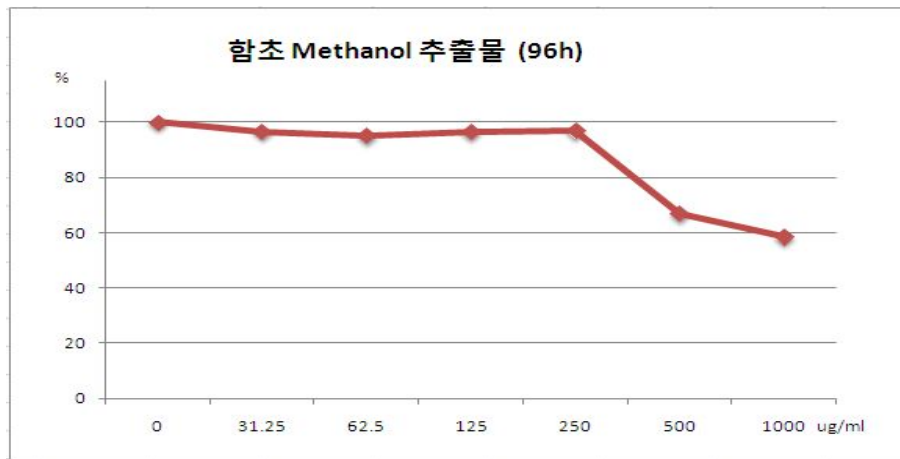


Fig 6. 함초 Methanol 추출물 96시간 처리 후 세포독성반응 결과

다. 함초 추출물별 지방분화억제 효과 측정

- 물질처리 농도 예비실험 결과에 따라 함초 물 추출물의 최고농도는 500ug/ml, 중간농도는 250ug/ml, 최소농도는 125ug/ml로 설정하고, 함초 메탄올 추출물의 최고농도는 250ug/ml, 중간농도는 125ug/ml, 최소농도는 62.5ug/ml로 설정하여 3T3-L1 세포를 이용하여 지방분화 억제 효과 본 실험을 진행.
- 물질 처리시점을 지방분화 유도 물질인 MDI와 insuline 처리시점에 따라 전처리, 동시처리, 후처리로 나누어 지방분화세포의 변화를 측정.
- 분화된 지방세포를 Oil-red로 염색한 후 DMSO에 녹여 540nm에서 흡광도를 측정하여 물질처리를 하지 않은 normal 세포와 비교 분석함.

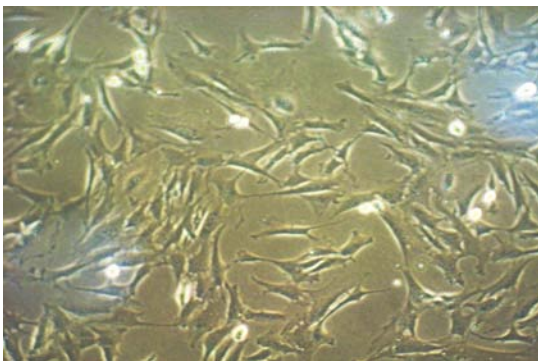


Fig 7. 3T3-L1 adipocytes

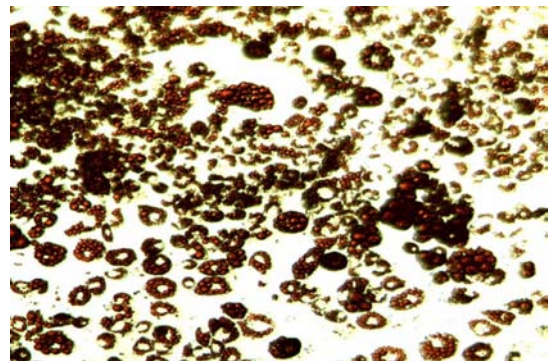


Fig 8. 지방분화 된 3T3-L1 adipocytes

- 3T3-L1 세포에 함초 물 추출물을 처리한 결과, 함초 물 추출물은 전처리, 동시처리 시 농도 125ug/ml에서 normal과 비교해 수치가 조금 감소한 것을 볼 수 있었으나, 큰 차이가 나타나지 않음. 그러나 전처리 시 농도 500ug/ml와 후처리 시 농도 125ug/ml에서 normal에 비해 지방분화 정도가 약 20% 감소함. 이는 함초 물 추출물이 전처리 시 농도 500ug/ml와 후처리 시 농도 125ug/ml에서 지방세포분화에 영향을 많이 준 것이라 사료됨.

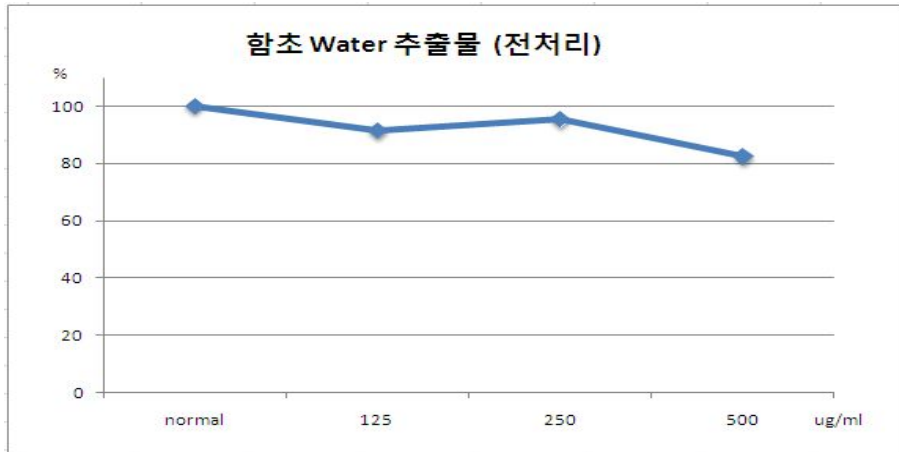


Fig 9. 3T3-L1 세포에 함초 Water 추출물 전처리 후 결과

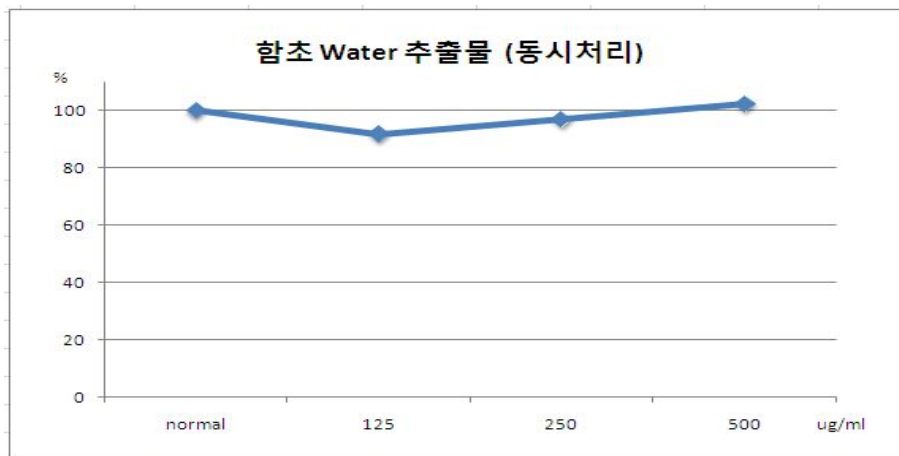


Fig 10. 3T3-L1 세포에 함초 Water 추출물 동시처리 후 결과

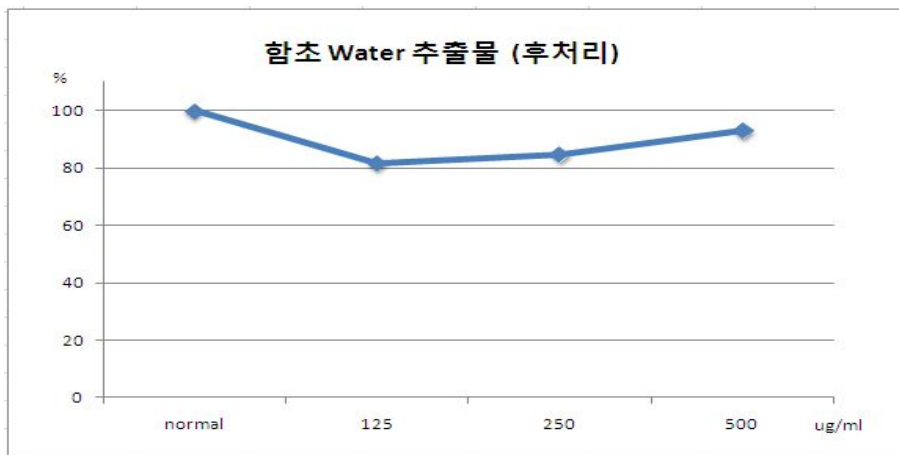


Fig 11. 3T3-L1 세포에 함초 Water 추출물 후처리 후 결과

- 3T3-L1 세포에 함초 메탄올 추출물을 처리한 결과, 함초 메탄올 추출물은 전처리, 동시 처리 시 모든 농도에서 normal의 수치와 비교해 보았을 때 큰 차이가 나타나지 않음. 그러나, 후처리 시 농도 62.5ug/ml에서 큰 폭으로 수치가 감소하였으며(normal에 비해 약 30% 감소효과), 농도 125ug/ml, 250ug/ml에서도 62.5ug/ml와 유사한 결과를 나타냄.

이는 합초 메탄올 추출물이 전처리, 동시처리 보다 후처리 시 지방세포분화에 영향을 많이 준 것이라 사료됨. 그러나 농도가 증가함에 따른 농도 의존적인 결과 차이는 보이지 않음.

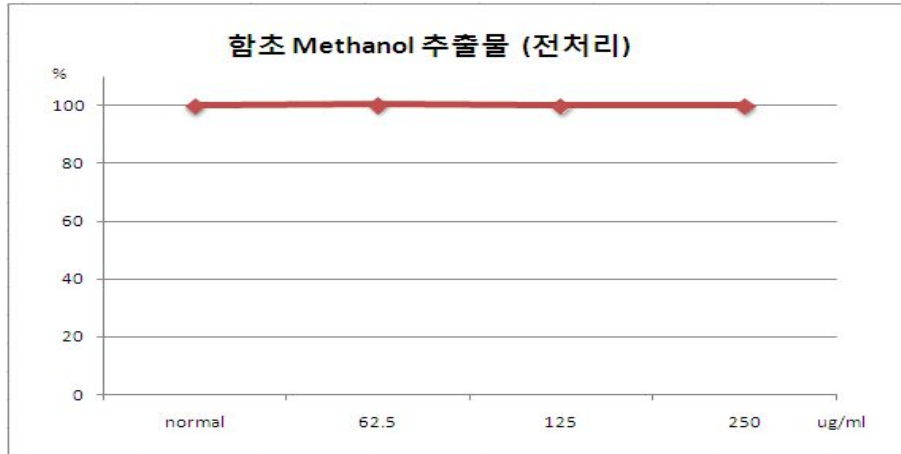


Fig 12. 3T3-L1 세포에 합초 Methanol 추출물 전처리 후 결과

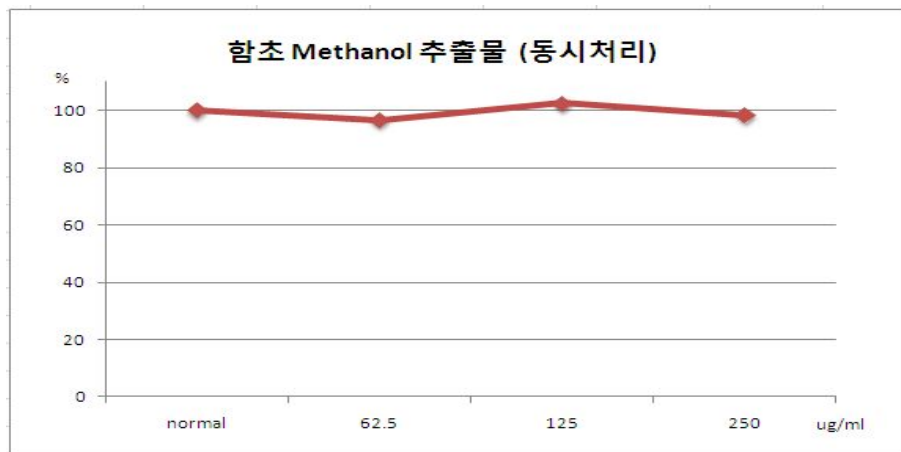


Fig 13. 3T3-L1 세포에 합초 Methanol 추출물 동시처리 후 결과

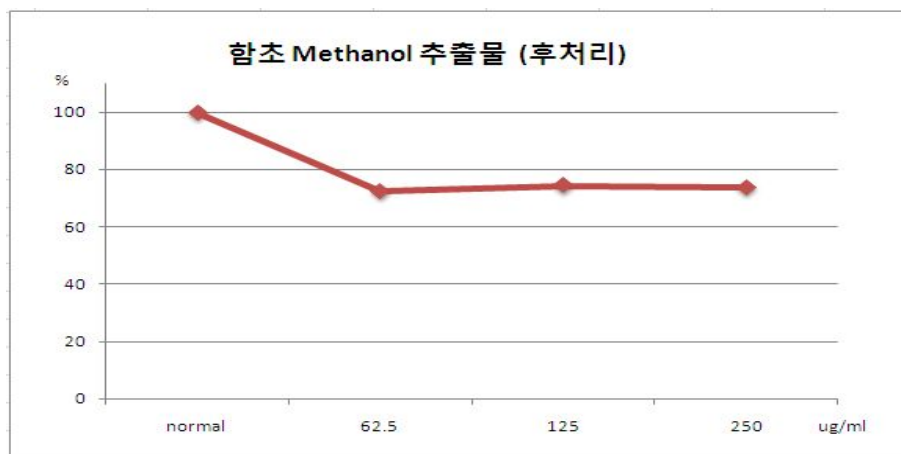


Fig 14. 3T3-L1 세포에 합초 Methanol 추출물 후처리 후 결과

- 10×10 배율 현미경으로 관찰한 결과 분화된 지방세포크기가 normal보다 함초 추출물을 처리하였을 때 크기가 감소함. 특히 함초 메탄올 추출물 후처리 시 모든 농도에서 지방세포의 크기와 수가 모두 감소함을 관찰함.

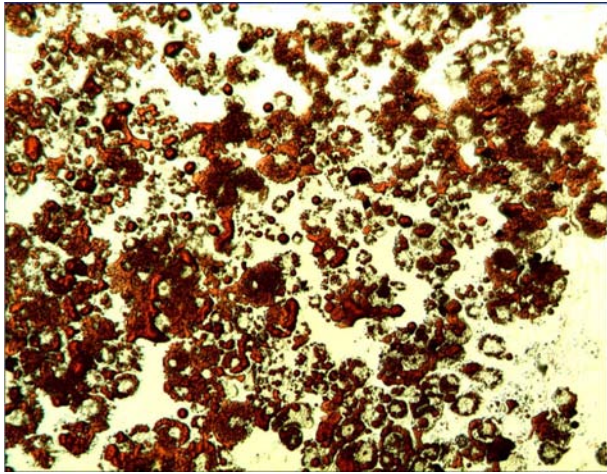


Fig 15. normal 지방분화세포

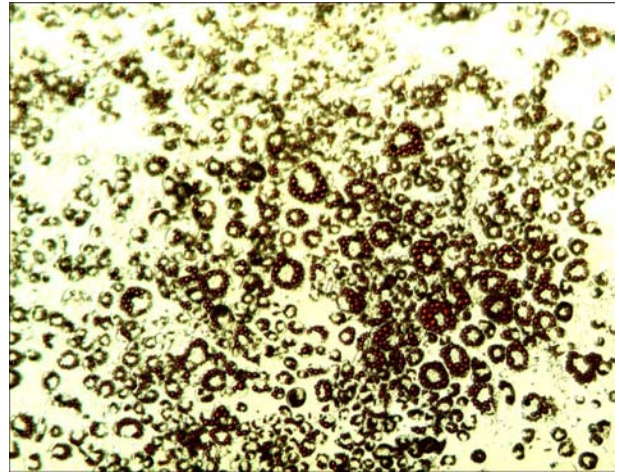


Fig 16. 메탄올 추출물 125ug/ml 후처리한 지방분화세포

## 2. 선별된 염생식물 유효성분을 이용한 비만 동물모델에서의 항비만 효능 검증 및 기전 연구

### 가. 연구내용 및 실험방법

#### (1) 실험동물 및 사육

- 본 연구는 6주령된 SD-Rat(수컷) 83마리를 나라 바이오텍에서 공급받아 사용하였으며, 일주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 체중을 측정하여 난괴법에 의해 10마리씩 8군으로 나누어 8주간 사육하였다.
- 채광은 12시간(07:00~19:00) 주기로 하였으며, 식이 공급과 물은 Rat이 마음대로 섭취할 수 있도록 하였다.

Table 1. 실험동물 군별 n수

NC	HFC	A		B		C	
		HFC+ 동결건조분말		HFC+ 압출성형추출분말		HFC+ nano화분말	
		2%	5%	1%	2%	1%	2%
12 마리	11 마리	10 마리	10 마리	10 마리	10 마리	10 마리	10 마리

#### (2) 실험 식이

- 모든 식이는 AIN-76(American Institute of Nutrition 1977)을 기초로 하여 본 실험 목적에 맞게 수정하였으며, 실험에 사용된 식이의 구성성분은 다음과 같다.

Table 2. Composition of control and experimental diet(%)

	NC	HFC	HFC+ 동결건조분말		HFC+ 압출성형한분말		HFC+ nano화분말	
			2%	5%	1%	2%	1%	2%
casein	20	20	20	20	20	20	20	20
DL-methionine	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
corn starch	29	12.5	10.5	7.5	11.5	10.5	11.5	10.5
sucrose	36	36	36	36	36	36	36	36
cellulose	5	5	5	5	5	5	5	5
corn oil	5	5	5	5	5	5	5	5
lard	0	15	15	15	15	15	15	15
AIN-76a mineral Mix	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
AIN-76a vitamin Mix	1	1	1	1	1	1	1	1
choline chloride	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
cholesterol	0	1	1	1	1	1	1	1
sodium cholate	0	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
halophyte powder	0	0	2	5	1	2	1	2
total	100	100	100	100	100	100	100	100

### (3) 시료 준비

- 8주간 사육한 SD-Rat(수컷) 83마리를 해부 전 12시간 동안 절식시킨 후, diethyl ether 로 마취시켜 혈액과 간을 적출하였다.
- 채취한 혈액은 4℃에서 3000rpm으로 20분간 원심 분리하여 serum을 분리하였으며, -80℃에서 보관하였다가 분석 시 꺼내어 사용하였다.
- 간의 homogenate와 cytosol 분획은 Masmoudi(1989)의 방법에 따라 분리하였으며, -80℃에서 보관하였다가 분석 시 꺼내어 사용하였다.
- 간의 homogenate의 지질은 Bligh와 Dyer의 방법을 이용하여 추출하였으며, -80℃에서 보관하였다가 분석 시 꺼내어 사용하였다.

### (4) 생화학적 분석

#### (가) 혈청 지질 분석

- Triglyceride, Total Cholesterol, HDL-Cholesterol, LDL-Cholesterol의 함량은 모두 분리된 serum을 사용하여 측정하였다.
- Triglyceride의 함량은 sale의 방법을 수정한 효소법(바이오크리니칼시스템 BCS Triglyceride kit)을 이용하여 ELISA법으로 plate reader(Spectra Max 250, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, U.S.A)를 이용하여 측정하였다.

- Total Cholesterol의 함량은 sale의 방법을 수정한 효소법(바이오크리니칼시스템 BCS Total Cholesterol kit)을 이용하여 ELISA법으로 plate reader(Spectra Max 250, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, U.S.A)를 이용하여 측정하였다.
- HDL-Cholesterol의 함량은 sale의 방법을 수정한 효소법(바이오크리니칼시스템 BCS HDL- Cholesterol kit)을 이용하여 ELISA법으로 plate reader(Spectra Max 250, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, U.S.A)를 이용하여 측정하였다.
- LDL-Cholesterol의 함량은 식을  $\{ \text{Total Cholesterol} - (\text{HDL-Cholesterol} + \text{Triglyceride} / 5) \}$  사용하여 측정하였다.

#### (나) 간조직 분석

- 간의 homogenate에서 추출한 지질에서 Triglyceride와 Total Cholesterol을 측정하였다.
- Triglyceride의 함량은 sale의 방법을 수정한 효소법(바이오크리니칼시스템 BCS Triglyceride kit)을 이용하여 ELISA법으로 plate reader(Spectra Max 250, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, U.S.A)를 이용하여 측정하였다.
- Total Cholesterol의 함량은 sale의 방법을 수정한 효소법(바이오크리니칼시스템 BCS Total Cholesterol kit)을 이용하여 ELISA법으로 plate reader(Spectra Max 250, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, U.S.A)를 이용하여 측정하였다.

#### (다) Leptin 분석

- Leptin은 serum을 이용하여 분석하였으며, Leptin mouse/rat EIA Kit(SPI-Bio, France)를 사용하여 ELISA법으로 plate reader(Spectra Max 250, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, U.S.A)를 이용하여 측정하였다.

#### (라) FAS 분석

- FAS는 간의 membrane 분획으로 얻어낸 cytosol을 이용하여 분석하였으며, Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit For Rat Fatty Acid Synthase / FASN(Usen Life Science, U.S.A)를 사용하여 ELISA법으로 plate reader(Spectra Max 250, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, U.S.A)를 이용하여 측정하였다.

### 나. 실험 결과

#### (1) 시료 성분검사 결과

- 통통마디 압출성형추출 분말과 동결건조 nano 분말을 ‘한국식품연구원’에서 영양성분을

검사한 결과, 통통마디 동결건조 nano 분말의 식이섬유는 40.1g/100g로 압출성형추출 분말의 식이섬유(8.3g/100g)에 비해 높은 것을 알 수 있었다.

Table 3. 각 시료별 영양성분 검사 결과

항목	분석결과	
	B (압출성형추출)	C (통통마디 동결건조 nano)
열량(kcal/100g)	331	259
수분(g/100g)	6.8	4.7
지방(g/100g)	0.1	1.6
단백질(g/100g)	9.3	11.0
회분(g/100g)	10.6	32.5
탄수화물(g/100g)	73.2	50.2
식이섬유(g/100g)	8.3	40.1

- 통통마디 동결건조 분말과 압출성형추출 분말, 동결건조 nano 분말을 ‘한국기초과학연구원’에서 무기질 함량 성분을 검사한 결과, 통통마디 동결건조 분말과 동결건조 nano 분말은 큰 차이가 보이지 않았으나 압출성형추출 분말은 Fe을 제외한 모든 무기질의 양이 감소하였다. Fe의 함량은 증가하였다.

Table 4. 각 시료별 무기질 함량 검사 결과

항목	분석결과		
	A (통통마디 동결건조)	B (압출성형추출)	C (통통마디 동결건조 nano)
Ca (%)	0.31	0.20	0.28
K (%)	1.43	1.12	1.34
Mg (%)	1.24	0.58	1.04
P (%)	0.21	0.17	0.21
Na (%)	13.3	7.45	12.2
Fe (mg/kg)	138	387	161

(2) 체중, 간무게, 부고환 지방조직 및 식이섭취량

- 최종체중은 5% 통통마디 동결건조 분말을 섭취한 군이 high fat diet 군과 비교해 유의적으로 감소한 것을 볼 수 있으며 normal diet 군보다도 낮은 것을 볼 수 있다.
- 간무게는 5% 통통마디 동결건조 분말을 섭취한 군이 high fat diet 군과 비교해 유의적으로 감소한 것을 볼 수 있으며 normal diet 군보다는 유의적으로 높게 나타났다.
- 상대적인 간무게를 살펴보면 1% 통통마디 동결건조 nano 분말을 섭취한 군이 high fat diet 군과 비교해 유의적으로 감소한 것을 볼 수 있으며 5% 통통마디 동결건조 분말을 섭취한 군도 유의적인 차이는 없지만 high fat diet 군과 비교해 감소하는 경향이



보였다.

- 부고환 지방조직량은 왼쪽 오른쪽 모두 5% 통통마디 동결건조 분말을 섭취한 군이 high fat diet 군과 비교해 유의적으로 감소한 것을 볼 수 있으며 normal diet 군보다도 낮은 것을 볼 수 있다.
- 식이섭취량을 살펴보면 high fat diet 군이 normal diet 군보다 유의적으로 낮은 것을 볼 수 있으며, 5% 통통마디 동결건조 분말을 섭취한 군은 high fat diet 군보다 유의적으로 낮았다. 나머지 군들은 high fat diet 군보다는 증가하는 경향이 보였다.

Table 5. Effect of *Salicornia herbacea L.* powder on Final body weight, liver weight, Relative liver weight, epididymal white adipose tissue weight, and Food intake in SD-rat<sup>1)</sup>

Group (n)	Final body weight (g)	liver weight (g)	Relative liver weight (g/100g body weight)	epididymal white adipose tissue-left (g)	epididymal white adipose tissue-right (g)	Food intake (g/day)
NC (12)	436.45±30.21 <sup>b</sup>	12.24±0.92 <sup>c</sup>	2.82±0.31 <sup>c</sup>	4.48±0.78 <sup>ab</sup>	4.52±0.66 <sup>a</sup>	20.02±0.33 <sup>a</sup>
HFC (11)	477.02±32.00 <sup>a</sup>	31.72±2.79 <sup>a</sup>	6.66±0.58 <sup>a</sup>	4.32±0.55 <sup>ab</sup>	4.45±0.49 <sup>a</sup>	18.64±0.64 <sup>c</sup>
2% A (10)	473.64±36.07 <sup>a</sup>	30.03±3.94 <sup>a</sup>	6.33±0.51 <sup>ab</sup>	3.99±0.47 <sup>b</sup>	4.18±0.50 <sup>a</sup>	18.74±1.04 <sup>c</sup>
5% A (10)	387.90±36.23 <sup>c</sup>	25.44±3.93 <sup>b</sup>	6.52±0.50 <sup>ab</sup>	2.46±0.39 <sup>c</sup>	2.50±0.51 <sup>b</sup>	16.95±1.15 <sup>d</sup>
1% B (10)	490.73±26.16 <sup>a</sup>	30.77±2.32 <sup>a</sup>	6.27±0.26 <sup>ab</sup>	4.84±0.96 <sup>a</sup>	4.68±0.66 <sup>a</sup>	19.07±0.65 <sup>bc</sup>
2% B (10)	488.20±16.50 <sup>a</sup>	30.59±2.48 <sup>a</sup>	6.26±0.37 <sup>ab</sup>	4.34±0.81 <sup>ab</sup>	4.35±0.77 <sup>a</sup>	19.47±0.83 <sup>ab</sup>
1% C (10)	495.88±18.32 <sup>a</sup>	31.41±2.40 <sup>a</sup>	6.13±0.39 <sup>b</sup>	4.23±0.92 <sup>ab</sup>	4.42±0.90 <sup>a</sup>	19.09±0.45 <sup>bc</sup>
2% C (10)	490.67±16.49 <sup>a</sup>	31.61±4.02 <sup>a</sup>	6.43±0.67 <sup>ab</sup>	4.60±0.38 <sup>ab</sup>	4.77±0.49 <sup>a</sup>	19.51±0.43 <sup>ab</sup>

n : number of animals

NC : normal diet group

HFC : high fat diet group

2% A : high fat diet group with 2% *Salicornia herbacea L.* freeze drying powder group

5% A : high fat diet group with 5% *Salicornia herbacea L.* freeze drying powder group

1% B : high fat diet group with 2% *Salicornia herbacea L.* compression molding powder group

2% B : high fat diet group with 2% *Salicornia herbacea L.* compression molding powder group

1% C : high fat diet group with 1% *Salicornia herbacea L.* freeze drying nano powder group

2% C : high fat diet group with 2% *Salicornia herbacea L.* freeze drying nano powder group

1) Values are mean ± SD

Means with the different superscripts are significantly different at p<0.05 by duncan's multiple range test

- 체중증가율을 살펴보면 매주 모든 군에서 증가하는 경향이보였으나, 5% 통통마디 동결건조 분말을 섭취한 군의 경우 6주차 이후로 체중의 변화가 나타나지 않는 경향이 보였다.

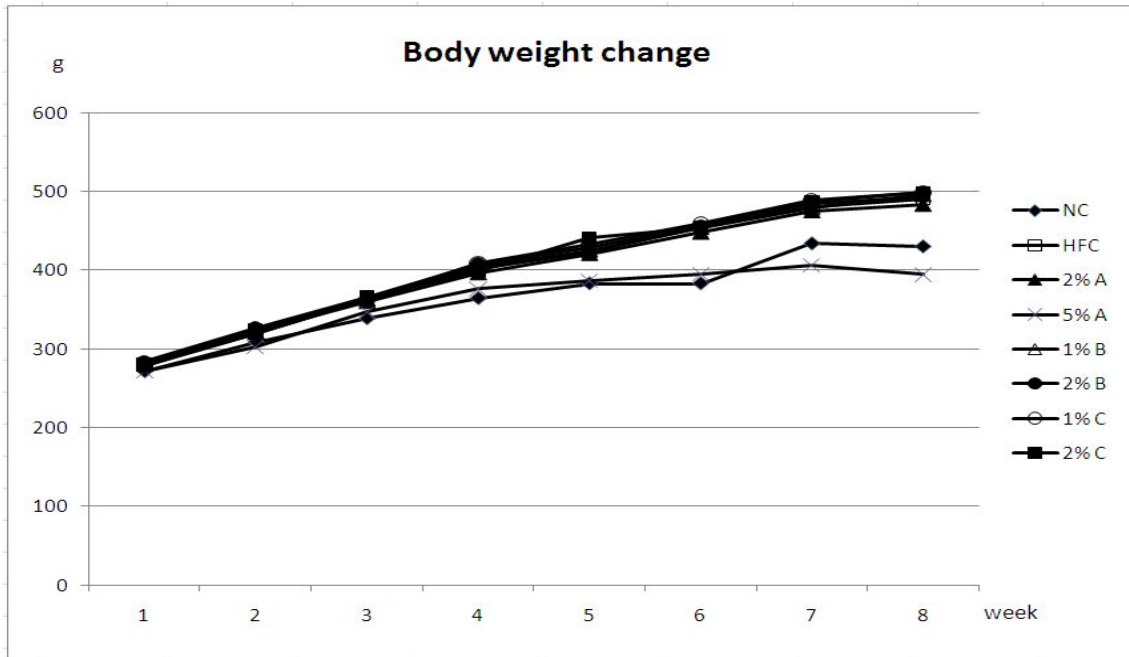


Figure 1. body weight change

(3) 혈액 생화학적 검사 결과

- Triglyceride의 경우 normal diet 군이 high fat diet을 기본으로 한 다른 군들에 비해 유의적으로 증가한 것을 볼 수 있다.
- Total Cholesterol을 살펴보면 high fat diet 군과 비교하면 normal diet 군을 제외한 모든 군에서 유의적인 차이가 나타나지 않았지만, 5% 통통마디 동결건조 분말을 섭취한 군과 2% 통통마디 동결건조 nano 분말을 섭취한 군의 경우 high fat diet 군과 비교해 감소하는 경향이 보였다.
- HDL-Cholesterol의 경우에도 high fat diet 군과 비교하면 모든 군에서 유의적인 차이가 나타나지 않았지만, 5% 통통마디 동결건조 분말을 섭취한 군의 경우 high fat diet 군과 비교해 증가하는 경향이 보였다.
- LDL-Cholesterol의 경우 high fat diet 군과 비교하면 모든 군에서 유의적인 차이가 나타나지 않았다.

Table 6. Effect of *Salicornia herbacea* L. powder on serum lipid profiles in SD-rat<sup>1)</sup>

Group (n)	Triglyceride Conc(mg/dl)	Total Cholesterol Conc(mg/dl)	HDL-Cholesterol Conc(mg/dl)	LDL-Cholesterol Conc(mg/dl)
NC (12)	123.10±72.53 <sup>a</sup>	78.39±19.38 <sup>c</sup>	54.71±11.99 <sup>a</sup>	-
HFC (11)	61.12±15.63 <sup>b</sup>	117.72±25.22 <sup>ab</sup>	43.69±17.81 <sup>abc</sup>	61.81±29.00 <sup>a</sup>
2% A (10)	57.52±12.25 <sup>b</sup>	103.99±16.05 <sup>b</sup>	38.05±13.82 <sup>c</sup>	54.44±22.68 <sup>a</sup>
5% A (10)	49.32±7.74 <sup>b</sup>	126.85±25.22 <sup>ab</sup>	53.35±17.01 <sup>ab</sup>	63.63±28.52 <sup>a</sup>
1% B (10)	67.89±21.22 <sup>b</sup>	111.08±24.80 <sup>ab</sup>	37.58±10.65 <sup>c</sup>	59.92±28.63 <sup>a</sup>
2% B (10)	61.34±13.30 <sup>b</sup>	105.21±12.76 <sup>b</sup>	37.10±10.50 <sup>c</sup>	55.84±19.42 <sup>a</sup>
1% C (10)	51.37±17.20 <sup>b</sup>	112.50±20.68 <sup>ab</sup>	30.95±8.29 <sup>c</sup>	71.27±25.89 <sup>a</sup>
2% C (10)	63.59±21.77 <sup>b</sup>	137.20±56.34 <sup>a</sup>	40.49±19.01 <sup>bc</sup>	83.99±59.60 <sup>a</sup>

n : number of animals

NC : normal diet group

HFC : high fat diet group

2% A : high fat diet group with 2% *Salicornia herbacea* L. freeze drying powder group

5% A : high fat diet group with 5% *Salicornia herbacea* L. freeze drying powder group

1% B : high fat diet group with 2% *Salicornia herbacea* L. compression molding powder group

2% B : high fat diet group with 2% *Salicornia herbacea* L. compression molding powder group

1% C : high fat diet group with 1% *Salicornia herbacea* L. freeze drying nano powder group

2% C : high fat diet group with 2% *Salicornia herbacea* L. freeze drying nano powder group

1) Values are mean ± SD

Means with the different superscripts are significantly different at p<0.05 by duncan's multiple range test

#### (4) 간조직 생화학적 검사 결과

- 간조직의 경우 Triglyceride와 Total Cholesterol 모두 high fat diet 군과 비교하면 모든 군에서 유의적인 차이가 나타나지 않았다.

Table 7. Effect of *Salicornia herbacea* L. powder on liver Triglyceride and Total Cholesterol contents in SD-rat<sup>1)</sup>

Group (n)	Triglyceride Conc(mg/g liver)	Total Cholesterol Conc(mg/g liver)
NC (12)	36.80±14.68 <sup>b</sup>	3.50±0.91 <sup>b</sup>
HFC (11)	48.99±14.45 <sup>ab</sup>	26.04±8.23 <sup>a</sup>
2% A (10)	54.48±19.97 <sup>a</sup>	31.88±7.67 <sup>a</sup>
5% A (10)	46.63±13.36 <sup>ab</sup>	28.11±9.63 <sup>a</sup>
1% B (10)	49.19±11.59 <sup>ab</sup>	29.77±6.33 <sup>a</sup>
2% B (10)	50.14±16.33 <sup>ab</sup>	29.54±10.04 <sup>a</sup>
1% C (10)	52.73±11.11 <sup>a</sup>	29.63±6.37 <sup>a</sup>
2% C (10)	59.26±17.28 <sup>a</sup>	30.89±5.86 <sup>a</sup>

n : number of animals

NC : normal diet group

HFC : high fat diet group

2% A : high fat diet group with 2% *Salicornia herbacea* L. freeze drying powder group

5% A : high fat diet group with 5% *Salicornia herbacea* L. freeze drying powder group  
 1% B : high fat diet group with 2% *Salicornia herbacea* L. compression molding powder group  
 2% B : high fat diet group with 2% *Salicornia herbacea* L. compression molding powder group  
 1% C : high fat diet group with 1% *Salicornia herbacea* L. freeze drying nano powder group  
 2% C : high fat diet group with 2% *Salicornia herbacea* L. freeze drying nano powder group

1) Values are mean ± SD

Means with the different superscripts are significantly different at p<0.05 by duncan's multiple range test

(5) Leptin, FAS 검사 결과

- Leptin의 경우 5% 통통마디 동결건조 분말을 섭취한 군이 high fat diet 군과 비교해 유의적으로 감소한 것을 볼 수 있다. 그러나 FAS의 경우 high fat diet 군과 비교하면 normal diet 군을 제외한 모든 군에서 유의적인 차이가 나타나지 않았다.

Table 8. Effect of *Salicornia herbacea* L. powder on serum leptin and cytosolic fatty acid synthase in SD-rat<sup>1)</sup>

Group (n)	Leptin-Serum Conc(pg/dl)	Group (n)	FASN-cytosol Conc(ng/ml)
NC (12)	1812.52±812.20 <sup>a</sup>	NC (10)	13.02±2.63 <sup>a</sup>
HFC (11)	1274.69±702.78 <sup>ab</sup>	HFC (10)	6.97±1.97 <sup>b</sup>
2% A (10)	790.00±426.40 <sup>bc</sup>	2% A (10)	7.27±2.02 <sup>b</sup>
5% A (10)	237.29±112.10 <sup>c</sup>	5% A (10)	7.90±1.25 <sup>b</sup>
1% B (10)	1106.00±896.82 <sup>b</sup>	1% B (10)	7.88±2.66 <sup>b</sup>
2% B (10)	742.57±393.24 <sup>bc</sup>	2% B (10)	7.85±2.95 <sup>b</sup>
1% C (10)	1066.00±966.77 <sup>b</sup>	1% C (10)	7.49±1.87 <sup>b</sup>
2% C (10)	880.57±512.00 <sup>b</sup>	2% C (10)	6.60±1.14 <sup>b</sup>

n : number of animals

NC : normal diet group

HFC : high fat diet group

2% A : high fat diet group with 2% *Salicornia herbacea* L. freeze drying powder group

5% A : high fat diet group with 5% *Salicornia herbacea* L. freeze drying powder group

1% B : high fat diet group with 2% *Salicornia herbacea* L. compression molding powder group

2% B : high fat diet group with 2% *Salicornia herbacea* L. compression molding powder group

1% C : high fat diet group with 1% *Salicornia herbacea* L. freeze drying nano powder group

2% C : high fat diet group with 2% *Salicornia herbacea* L. freeze drying nano powder group

1) Values are mean ± SD

Means with the different superscripts are significantly different at p<0.05 by duncan's multiple range test

#### 다. 결론

- 본 연구는 SD-Rat에게 high fat diet와 세 가지(A: 통통마디 동결건조 분말, B: 통통마디 압출성형 분말, C: 통통마디 동결건조 nano 분말)의 농도가 다른 통통마디 분말을 8주간 섭취시켰을 때 나타나는 항비만 효과를 탐색하기 위해 실시하였다.
- 실험 결과를 전체적으로 살펴보면 5%의 통통마디 동결건조 분말을 섭취시킨 군이 식이섭취량은 낮았지만 체중, 부고환 지방조직, 간무게가 high fat diet군과 비교하여 유의적으로 감소하는 것을 알 수 있다.
- 통통마디 동결건조 nano 분말의 성분을 분석한 결과 식이섭취 양이 높은 수치를 나타내는 것을 볼 수 있는데, 이는 통통마디 동결건조 분말의 성분에도 높은 식이섭취소가 들어 있음을 예상할 수 있다. 이처럼 많은 양의 식이섭취소는 포만감을 초래하여 섭취하는 식이의 양에 영향을 미칠 수 있을 것으로 사료된다.
- 또한 5%의 통통마디 동결건조 분말을 섭취시킨 군의 serum 속 Total Cholesterol은 유의적인 차이는 없었지만 high fat diet군과 비교하여 감소하는 경향을 보였으며, 반대로 HDL-Cholesterol은 증가하는 경향이 나타났다.
- 따라서 5%의 통통마디 동결건조 분말이 식이섭취량에 영향을 미쳐 지방조직 증가에 대한 억제효과가 있을 것으로 사료된다.

### 3. 선별된 염생식물 유효성분으로 비만 동물모델에서 항비만 효능 검증 및 기전 연구

#### 가. 연구내용 및 실험방법

##### (1) 실험동물 및 사육

- 본 연구는 6주령된 SD-Rat(수컷) 60마리를 나라 바이오텍에서 공급받아 사용하였으며, 일주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 체중을 측정하여 난피법에 의해 10마리씩 6군으로 나누어 8주간 사육하였다.
- 채광은 12시간(07:00~19:00) 주기로 하였으며, 식이 공급과 물은 자유로 섭취할 수 있도록 하였다.

Table 1. 실험동물 군별 n수

NC	HFC	HFC+ 통통마디 동결건조분말		HFC+ 통통마디 동결건조 nano화분말	
		2%	5%	1%	2%
10 마리	10 마리	10 마리	10 마리	10 마리	10 마리

(2) 실험 식이

- 모든 식이는 AIN-76(American Institute of Nutrition 1977)을 기초로 하여 본 실험 목적에 맞게 수정하였으며, 실험에 사용된 식이의 구성성분은 다음과 같다.

Table 2. Composition of control and experimental diet(%)

	NC	HFC	HFC+ 통통마디 동결건조분말		HFC+ 통통마디 동결건조 nano화분말	
			2%	5%	1%	2%
casein	20	20	20	20	20	20
DL-methionine	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
corn starch	29	12.5	10.5	7.5	11.5	10.5
sucrose	36	36	36	36	36	36
cellulose	5	5	5	5	5	5
corn oil	5	5	5	5	5	5
lard	0	15	15	15	15	15
AIN-76a mineral Mix	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
AIN-76a vitamin Mix	1	1	1	1	1	1
choline chloride	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
cholesterol	0	1	1	1	1	1
sodium cholate	0	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
halophyte powder	0	0	2	5	1	2
total	100	100	100	100	100	100

(3) 시료 준비

- 8주간 사육한 SD-Rat(수컷) 60마리를 해부 전 12시간 동안 절식시킨 후, diethyl ether 로 마취시켜 혈액과 간을 적출하였다.
- 채취한 혈액은 4°C에서 3000rpm으로 20분간 원심 분리하여 serum을 분리하였다.
- SD-Rat의 분변은 실험동물을 희생하기 전(8주차) metabolic cage에서 24시간 동안의 분변을 받아내어 수집하였다.
- 간의 cytosol 분획은 Masmoudi(1989)의 방법에 따라 분리하였으며, 분변의 지질은 Bligh, Dyer의 방법을 이용하여 추출하였다.
- 모든 시료는 -80°C deep freezer에서 보관하였다가 분석 시 꺼내어 사용하였다.

(4) 생화학적 분석

(가) 혈청 지질 분석

- Triglyceride, Total Cholesterol, HDL-Cholesterol, LDL-Cholesterol의 함량은 모두 분

리된 serum을 사용하여 측정하였다.

- Triglyceride의 함량은 sale의 방법을 수정한 효소법(바이오크리니칼시스템 BCS Triglyceride kit)을 이용하여 ELISA법으로 plate reader(Spectra Max 250, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, U.S.A)를 이용하여 측정하였다.
- Total Cholesterol의 함량은 sale의 방법을 수정한 효소법(바이오크리니칼시스템 BCS Total Cholesterol kit)을 이용하여 ELISA법으로 plate reader(Spectra Max 250, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, U.S.A)를 이용하여 측정하였다.
- HDL-Cholesterol의 함량은 sale의 방법을 수정한 효소법(바이오크리니칼시스템 BCS HDL-Cholesterol kit)을 이용하여 ELISA법으로 plate reader(Spectra Max 250, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, U.S.A)를 이용하여 측정하였다.
- LDL-Cholesterol의 함량은 식을  $\{Total\ Cholesterol - (HDL-Cholesterol + Triglyceride/ 5)\}$  사용하여 측정하였다.

(나) Adiponectin & hs-CRP 분석

- 혈청 Adiponectin은 Adiponectin(rat) ELISA Kit(ALPCO, U.S.A)를 사용하여 ELISA법으로 plate reader(Spectra Max 250, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, U.S.A)를 이용하여 측정하였다.
- 혈청 HS-CRP는 Rat High Sensitive CRP ELISA(KAMIYA, USA)를 사용하여 ELISA법으로 plate reader(Microplate reader, VERSAmax, USA)를 이용하여 측정하였다.

(다) TBARS 분석

- 혈청 Thiobarbituric acid reactive substances(TBARS)는 TBARS Assay kit(ZeptoMetrix, U.S.A)를 사용하고 plate reader(Spectra Max 250, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, U.S.A)를 이용하여 측정하였다.

(라) Protein Carbonyl 분석

- 혈청 Protein Carbonyl은 Protein carbonyl Enzyme Immuno-Assay Kit(Biocell Corp, New Zealand)를 사용하여 ELISA법으로 plate reader(Spectra Max 250, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, U.S.A)를 이용하여 측정하였다.

(마) Superoxide dismutase 분석

- 혈청 Superoxide dismutase(SOD)는 Superoxide dismutase Assay kit(Cayman, U.S.A)를 사용하고 plate reader(Spectra Max 250, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, U.S.A)를 이용하여 측정하였다.

(바) Glutathione Reductase 분석

- 간 세포질 Glutathione Reductase는 Glutathione Reductase Assay kit(Cayman, U.S.A)를 사용하고 plate reader(Spectra Max 250, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, U.S.A)를 이용하여 측정하였다.

(사) Glutathion Peroxidase 분석

- 간 세포질 Glutathion Peroxidase는 Glutathion Peroxidase Assay kit(Cayman, U.S.A)를 사용하고 plate reader(Spectra Max 250, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, U.S.A)를 이용하여 측정하였다.

(아) 분변의 지질 분석

- 24h동안 수집한 분변은 상압가열 건조법으로 건조하여 Bligh, Dyer 방법을 이용하여 지방을 추출한 후 Triglyceride와 Total Cholesterol을 측정하였다.
- Triglyceride의 함량은 sale의 방법을 수정한 효소법(바이오크리니칼시스템 BCS Triglyceride kit)을 사용하고, plate reader(Spectra Max 250, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, U.S.A)를 이용하여 측정하였다.
- Total Cholesterol의 함량은 sale의 방법을 수정한 효소법(바이오크리니칼시스템 BCS Total Cholesterol kit)을 사용하고, plate reader(Spectra Max 250, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, U.S.A)를 이용하여 측정하였다.

나. 실험 결과

(1) 시료 성분검사 결과

- ‘한국식품연구원’에서 통통마디 동결건조 분말과 동결건조 nano 분말의 영양성분을 검사한 결과, 전반적으로 두 시료 모두 큰 차이가 나타나진 않았다. 그러나 통통마디 동결건조 분말의 지방은 1.0g/100g으로 통통마디 동결건조 nano 분말의 지방(1.6g/100g)에 비해 낮은 것을 알 수 있었으며 회분, 탄수화물, 식이섬유의 함량은 다소 높은 것을 알 수 있었다.

Table 3. 각 시료별 영양성분 검사 결과



항목	분석결과	
	통통마디 동결건조 분말	통통마디 동결건조 nano 분말
열량(kcal/100g)	260	259
수분(g/100g)	4.6	4.7
지방(g/100g)	1.0	1.6
단백질(g/100g)	11.1	11.0
회분(g/100g)	31.7	32.5
탄수화물(g/100g)	51.6	50.2
식이섬유(g/100g)	41.3	40.1

- ‘한국식품연구원’에서 통통마디 동결건조 분말과 동결건조 nano 분말의 무기질 함량 성분을 검사한 결과, 두 시료 모두 큰 차이가 나타나진 않았다. 그러나 전반적으로 통통마디 동결건조 분말의 Ca, K, Mg, P, Na 함량이 통통마디 동결건조 nano 분말보다 조금 높았으며, Fe의 함량은 통통마디 동결건조 분말이 138mg/kg으로 통통마디 동결건조 nano 분말의 Fe(161mg/kg)에 비해 낮은 것을 알 수 있었다.

Table 4. 각 시료별 무기질 함량 검사 결과

항목	분석결과	
	통통마디 동결건조 분말	통통마디 동결건조 nano 분말
Ca (%)	0.31	0.28
K (%)	1.43	1.34
Mg (%)	1.24	1.04
P (%)	0.21	0.21
Na (%)	13.3	12.2
Fe (mg/kg)	138	161

(2) 체중, 간무게, 체중 상대적 간무게 및 식이섬유량

- 최종체중은 5% 통통마디 동결건조 분말을 섭취한 군이 high fat diet 군, normal diet 군과 비교해 유의적으로 감소한 것을 볼 수 있었다.
- 간무게는 5% 통통마디 동결건조 분말을 섭취한 군이 high fat diet 군과 비교해 유의하게 감소하였다.
- 상대적인 간무게의 경우 high fat diet 군과 비교하였을 때 normal diet 군을 제외한 모든 군에서 유의적인 차이가 나타나지 않았다.

- 식이섭취량을 살펴보면 high fat diet 군이 normal diet 군보다 유의적으로 낮은 것을 볼 수 있으며, 5% 통통마디 동결건조 분말을 섭취한 군은 high fat diet 군보다 유의적으로 낮았다. 나머지 군들은 high fat diet 군보다는 증가하는 경향이 보였다.

Table 5. Effect of *Salicornia herbacea* L. powder on Final body weight, liver weight, Relative liver weight and Food intake in SD-rat<sup>1)</sup>

Group (n)	Final body weight (g)	liver weight (g)	Relative liver weight (g/100g body weight)	Food intake (g/day)
NC (10)	429.29±17.34 <sup>b</sup>	12.33±0.92 <sup>c</sup>	2.88±0.25 <sup>b</sup>	20.04±0.36 <sup>a</sup>
HFC (10)	482.67±27.34 <sup>a</sup>	31.91±2.86 <sup>a</sup>	6.62±0.60 <sup>a</sup>	18.60±0.66 <sup>c</sup>
2% A (10)	473.64±36.07 <sup>a</sup>	30.03±3.94 <sup>a</sup>	6.33±0.51 <sup>a</sup>	18.74±1.04 <sup>c</sup>
5% A (10)	387.90±36.23 <sup>c</sup>	25.44±3.93 <sup>b</sup>	6.52±0.50 <sup>a</sup>	16.95±1.15 <sup>d</sup>
1% B (10)	495.88±18.32 <sup>a</sup>	30.41±2.40 <sup>a</sup>	6.13±0.39 <sup>a</sup>	19.09±0.45 <sup>bc</sup>
2% B (10)	490.67±16.49 <sup>a</sup>	31.61±4.02 <sup>a</sup>	6.43±0.67 <sup>a</sup>	19.51±0.43 <sup>ab</sup>

n : number of animals

NC : normal diet group

HFC : high fat diet group

2% A : high fat diet group with 2% *Salicornia herbacea* L. freeze drying powder group

5% A : high fat diet group with 5% *Salicornia herbacea* L. freeze drying powder group

1% B : high fat diet group with 1% *Salicornia herbacea* L. freeze drying nano powder group

2% B : high fat diet group with 2% *Salicornia herbacea* L. freeze drying nano powder group

1) Values are mean ± SD

Means with the different superscripts are significantly different at p<0.05 by duncan's multiple range test

- 체중증가율을 살펴보면 매주 모든 군에서 증가하는 경향이보였으나, 5% 통통마디 동결건조 분말을 섭취한 군의 경우 6주차 이후로 체중의 변화가 나타나지 않는 경향이 보였다.

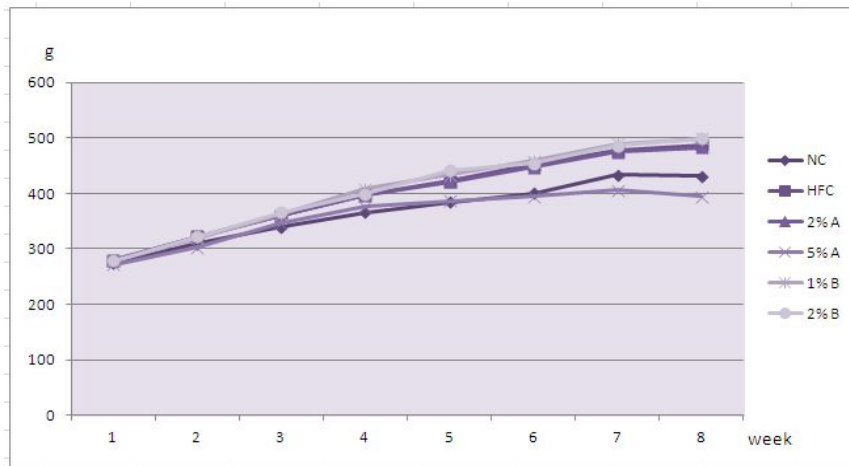


Figure 1. body weight change

(3) 혈액 생화학적 검사 결과

- Triglyceride의 경우 normal diet 군이 high fat diet을 기본으로 한 다른 군들에 비해 유의적으로 증가한 것을 볼 수 있다.
- Total Cholesterol을 살펴보면 high fat diet 군과 비교하면 normal diet 군을 제외한 모든 군에서 유의적인 차이가 나타나지 않았지만, 2% 통통마디 동결건조 분말을 섭취한 군의 경우 high fat diet 군과 비교해 감소하는 경향이 보였다.
- HDL-Cholesterol의 경우에도 high fat diet 군과 비교하면 2% 통통마디 동결건조 nano 분말을 섭취한 군에서 유의적이지는 않지만 증가하는 경향을 볼 수 있었으며, 5% 통통마디 동결건조 분말을 섭취한 군의 경우 high fat diet 군과 비교해 유의적으로 증가하는 것을 볼 수 있었다.
- LDL-Cholesterol의 경우 high fat diet 군과 비교하면 모든 군에서 유의적인 차이가 나타나지 않았다.

Table 6. Effect of *Salicornia herbacea L.* powder on serum lipid profiles in SD-rat<sup>1)</sup>

Group (n)	Triglyceride Conc(mg/dl)	Total Cholesterol Conc(mg/dl)	HDL-Cholesterol Conc(mg/dl)	LDL-Cholesterol Conc(mg/dl)
NC (10)	121.09±77.25 <sup>a</sup>	77.51±20.25 <sup>c</sup>	54.82±13.24 <sup>a</sup>	-
HFC (10)	63.14±14.88 <sup>b</sup>	117.25±26.53 <sup>ab</sup>	39.65±12.34 <sup>c</sup>	63.97±28.50 <sup>a</sup>
2% A (10)	57.52±12.25 <sup>b</sup>	103.99±16.05 <sup>bc</sup>	38.05±13.82 <sup>c</sup>	54.44±22.68 <sup>a</sup>
5% A (10)	49.32±7.74 <sup>b</sup>	126.85±25.22 <sup>ab</sup>	53.35±17.01 <sup>ab</sup>	63.63±28.52 <sup>a</sup>
1% B (10)	51.37±17.20 <sup>b</sup>	112.50±20.68 <sup>ab</sup>	30.95±8.29 <sup>c</sup>	71.27±25.89 <sup>a</sup>
2% B (10)	63.59±21.77 <sup>b</sup>	137.20±56.34 <sup>a</sup>	40.49±19.01 <sup>bc</sup>	83.99±59.60 <sup>a</sup>

n : number of animals  
NC : normal diet group

HFC : high fat diet group

2% A : high fat diet group with 2% *Salicornia herbacea L.* freeze drying powder group

5% A : high fat diet group with 5% *Salicornia herbacea L.* freeze drying powder group

1% B : high fat diet group with 1% *Salicornia herbacea L.* freeze drying nano powder group

2% B : high fat diet group with 2% *Salicornia herbacea L.* freeze drying nano powder group

1) Values are mean ± SD

Means with the different superscripts are significantly different at p<0.05 by duncan's multiple range test

#### (4) Adiponectin, hs-CRP 분석 결과

- Adiponectin의 경우 5% 통통마디 동결건조 분말을 섭취한 군이 high fat diet 군과 비교해 유의적인 차이는 없지만 증가하는 경향이 나타났다.
- hs-CRP의 분석 결과 5% 통통마디 동결건조 분말을 섭취한 군이 high fat diet 군과 비교해 유의적으로 감소하였다.

Table 7. Effect of *Salicornia herbacea L.* powder on serum Adiponectin and hs-CRP contents in SD-rat<sup>1)</sup>

Group (n)	Adiponectin Conc(mg/ml serum)	hs-CRP Conc(µg/ml serum)
NC (10)	11.951±2.280 <sup>a</sup>	293.30±41.61 <sup>a</sup>
HFC (10)	6.312±1.597 <sup>bc</sup>	169.80±31.41 <sup>b</sup>
2% A (10)	7.042±1.131 <sup>bc</sup>	180.05±27.41 <sup>b</sup>
5% A (10)	7.612±1.910 <sup>b</sup>	138.65±35.32 <sup>c</sup>
1% B (10)	6.029±1.102 <sup>c</sup>	181.30±28.67 <sup>b</sup>
2% B (10)	6.707±1.530 <sup>bc</sup>	171.50±27.73 <sup>b</sup>

n : number of animals

NC : normal diet group

HFC : high fat diet group

2% A : high fat diet group with 2% *Salicornia herbacea L.* freeze drying powder group

5% A : high fat diet group with 5% *Salicornia herbacea L.* freeze drying powder group

1% B : high fat diet group with 1% *Salicornia herbacea L.* freeze drying nano powder group

2% B : high fat diet group with 2% *Salicornia herbacea L.* freeze drying nano powder group

1) Values are mean ± SD

Means with the different superscripts are significantly different at p<0.05 by LSD test

#### (5) TBARS, Protein Carbonyl 분석 결과

- TBARS의 경우 high fat diet 군과 비교해 보았을 때 1% 통통마디 동결건조 nano 분말을 섭취한 군에서 감소하는 경향이 보였으나 유의적인 차이는 없었다.
- Protein Carbonyl의 경우 high fat diet 군과 비교해 보았을 때 통통마디 동결건조 nano 분말을 섭취한 군(1%B, 2%B)에서 감소하는 경향이 보였으나 유의적인 차이는 없었으나, 5% 통통마디 동결건조 분말을 섭취한 군에서는 유의적으로 감소하는 것을 볼 수 있었다.

Table 8. Effect of *Salicornia herbacea L.* powder on serum Thiobarbituric acid reactive substances and Protein carbonyl contents in SD-rat<sup>1)</sup>

Group (n)	TBARS <sup>2)</sup> Conc(nmol/ml)	Protein carbonyl <sup>3)</sup> Conc(nmol/mg)
NC (10)	15.34±3.299 <sup>a</sup>	0.932±0.411 <sup>a</sup>
HFC (10)	14.21±4.815 <sup>ab</sup>	0.855±0.106 <sup>a</sup>
2% A (10)	13.04±1.756 <sup>ab</sup>	0.854±0.163 <sup>a</sup>
5% A (10)	14.07±4.228 <sup>ab</sup>	0.609±0.136 <sup>b</sup>
1% B (10)	11.78±1.881 <sup>b</sup>	0.809±0.132 <sup>ab</sup>
2% B (10)	12.34±2.957 <sup>ab</sup>	0.719±0.175 <sup>ab</sup>

n : number of animals

NC : normal diet group

HFC : high fat diet group

2% A : high fat diet group with 2% *Salicornia herbacea L.* freeze drying powder group

5% A : high fat diet group with 5% *Salicornia herbacea L.* freeze drying powder group

1% B : high fat diet group with 1% *Salicornia herbacea L.* freeze drying nano powder group

2% B : high fat diet group with 2% *Salicornia herbacea L.* freeze drying nano powder group

1) Values are mean ± SD

Means with the different superscripts are significantly different at p<0.05 by duncan's multiple range test

2) TBARS : Thiobarbituric acid reactive substances

3) 평균 ± 2표준편차로 N수 보정함

### (6) Superoxide dismutase 분석 결과

- Superoxide dismutase(SOD)의 경우 high fat diet 군과 비교해 보았을 때 통통마디 동결건조 분말을 섭취한 군(2%A, 5%A)에서 증가하는 경향이 보였으나 유의적인 차이는 없었다. 그러나 통통마디 동결건조 nano 분말을 섭취한 군(1%B, 2%B)에서는 유의적으로 증가하는 것을 볼 수 있었다.

Table 9. Effect of *Salicornia herbacea L.* powder on serum Superoxide dismutase activity in SD-rat<sup>1)</sup>

Group (n)	Superoxide dismutase Activity(U/ml)
NC (10)	20.68±3.349 <sup>ab</sup>
HFC (10)	19.51±3.573 <sup>b</sup>
2% A (10)	22.85±3.759 <sup>ab</sup>
5% A (10)	20.60±3.835 <sup>ab</sup>
1% B (10)	24.46±5.825 <sup>a</sup>
2% B (10)	23.99±4.619 <sup>a</sup>

n : number of animals

NC : normal diet group

HFC : high fat diet group

2% A : high fat diet group with 2% *Salicornia herbacea L.* freeze drying powder group

5% A : high fat diet group with 5% *Salicornia herbacea L.* freeze drying powder group

1% B : high fat diet group with 1% *Salicornia herbacea L.* freeze drying nano powder group

2% B : high fat diet group with 2% *Salicornia herbacea L.* freeze drying nano powder group

1) Values are mean ± SD

Means with the different superscripts are significantly different at  $p < 0.05$  by duncan's multiple range test

(7) Glutathione Reductase, Glutathion Peroxidase 분석 결과

- Glutathione Reductase의 경우 high fat diet 군과 비교해 보았을 때 통통마디 섭취에 따른 유의적인 차이가 나타나지 않았다.
- Glutathion Peroxidase의 경우 high fat diet 군과 비교해 보았을 때 2% 통통마디 동결 건조 분말을 섭취한 군과 통통마디 2% 동결건조 nano 분말을 섭취한 군에서 증가하는 경향이 보였으나 유의적인 차이는 없었다. 그러나 5% 통통마디 동결건조 분말을 섭취한 군에서는 유의적으로 증가하는 것을 볼 수 있었다.

Table 10. Effect of *Salicornia herbacea L.* powder on cytosol Glutathion reductase and Glutathione peroxidase activity in SD-rat<sup>1)</sup>

Group (n)	Glutathion reductase Activity(umol/min/mg protein)	Glutathione peroxidase Activity(umol/min/mg protein)
NC (10)	7.139±0.865 <sup>c</sup>	450.34±57.66 <sup>a</sup>
HFC (10)	9.233±2.551 <sup>ab</sup>	240.19±27.66 <sup>cd</sup>
2% A (10)	10.607±2.146 <sup>a</sup>	255.87±44.45 <sup>c</sup>
5% A (10)	8.662±1.221 <sup>bc</sup>	315.15±79.09 <sup>b</sup>
1% B (10)	9.247±1.894 <sup>ab</sup>	208.89±37.59 <sup>d</sup>
2% B (10)	9.672±1.832 <sup>ab</sup>	276.66±43.88 <sup>bc</sup>

n : number of animals

NC : normal diet group

HFC : high fat diet group

2% A : high fat diet group with 2% *Salicornia herbacea L.* freeze drying powder group

5% A : high fat diet group with 5% *Salicornia herbacea L.* freeze drying powder group

1% B : high fat diet group with 1% *Salicornia herbacea L.* freeze drying nano powder group

2% B : high fat diet group with 2% *Salicornia herbacea L.* freeze drying nano powder group

1) Values are mean ± SD

Means with the different superscripts are significantly different at  $p < 0.05$  by LSD test

(8) 분변의 지질 분석 결과

- 분변의 양을 조사한 결과 high fat diet 군과 비교해 보았을 때 통통마디 동결건조 분말을 섭취한 군(2%A, 5%A)과 2% 통통마디 동결건조 nano 분말을 섭취한 군에서 분변량이 증가하는 경향이 보였으나 유의적인 차이는 없었다.
- 분변의 수분함량의 경우 high fat diet 군과 비교해 보았을 때 통통마디 섭취군(2%A, 5%A, 1%B, 2%B)에서 수분함량이 높게 나타났으나 유의적인 차이는 없었다.

Table 11. Effect of *Salicornia herbacea*L. powder on Fecal, Dry fecal and Fecal water contents in SD-rat<sup>1)</sup>

Group (n)	Fecal (g)	Dry fecal (g)	water content (%)
NC (10)	1.470±0.77 <sup>b</sup>	1.111±0.53 <sup>a</sup>	23.42±10.89 <sup>a</sup>
HFC (10)	1.970±1.00 <sup>ab</sup>	1.281±0.52 <sup>a</sup>	30.26±12.90 <sup>a</sup>
2% A (10)	2.320±0.87 <sup>a</sup>	1.423±0.28 <sup>a</sup>	35.16±12.30 <sup>a</sup>
5% A (10)	2.050±1.17 <sup>ab</sup>	1.276±0.60 <sup>a</sup>	33.44±10.61 <sup>a</sup>
1% B (10)	1.900±0.75 <sup>ab</sup>	1.225±0.44 <sup>a</sup>	32.35±17.27 <sup>a</sup>
2% B (10)	2.300±0.42 <sup>a</sup>	1.483±0.21 <sup>a</sup>	33.31±17.14 <sup>a</sup>

n : number of animals

NC : normal diet group

HFC : high fat diet group

2% A : high fat diet group with 2% *Salicornia herbacea* L. freeze drying powder group

5% A : high fat diet group with 5% *Salicornia herbacea* L. freeze drying powder group

1% B : high fat diet group with 1% *Salicornia herbacea* L. freeze drying nano powder group

2% B : high fat diet group with 2% *Salicornia herbacea* L. freeze drying nano powder group

1) Values are mean ± SD

Means with the different superscripts are significantly different at p<0.05 by LSD test

- 분변 중 Triglyceride와 Total Cholesterol 모두 normal diet 군이 high fat diet을 기본으로 한 다른 군(HFC, 2%A, 5%A, 1%B, 2%B)들에 비해 유의적으로 감소한 것을 볼 수 있다.
- 분변 중 Triglyceride와 Total Cholesterol의 경우 모두 high fat diet 군과 비교해 보았을 때 통통마디 섭취에 따른 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 이러한 결과는 식이섭취량을 보정하여 살펴본 결과에서도 같은 결과를 나타냈다.

Table 12. Effect of *Salicornia herbacea* L. powder on fecal Triglyceride and Total Cholesterol contents in SD-rat<sup>1)</sup>

Group (n)	Triglyceride Conc(mg/fecal)	Total Cholesterol Conc(mg/fecal)
NC (10)	5411.19±2570.44 <sup>b</sup>	2585.39±1224.70 <sup>b</sup>
HFC (10)	25727.47±15137.49 <sup>a</sup>	19950.72±11107.49 <sup>a</sup>
2% A (10)	22283.97±6279.78 <sup>a</sup>	17033.94±4763.02 <sup>a</sup>
5% A (10)	20470.06±12019.13 <sup>a</sup>	14669.34±9197.74 <sup>a</sup>
1% B (10)	22486.31±8267.77 <sup>a</sup>	17287.10±7844.76 <sup>a</sup>
2% B (10)	27342.95±16373.17 <sup>a</sup>	16278.87±12019.24 <sup>a</sup>

n : number of animals

NC : normal diet group

HFC : high fat diet group

2% A : high fat diet group with 2% *Salicornia herbacea* L. freeze drying powder group

5% A : high fat diet group with 5% *Salicornia herbacea* L. freeze drying powder group

1% B : high fat diet group with 1% *Salicornia herbacea* L. freeze drying nano powder group

2% B : high fat diet group with 2% *Salicornia herbacea* L. freeze drying nano powder group

1) Values are mean ± SD

Means with the different superscripts are significantly different at p<0.05 by LSD test

#### 다. 결론

- 본 연구는 SD-Rat에게 high fat diet와 두 가지(통통마디 동결건조 분말, 통통마디 동결건조 nano 분말) 농도가 다른 통통마디 분말을 8주간 섭취시켰을 때 심순환계질환 지표로 이용되는 혈중 지질조성, Adiponectin 및 HS-CRP, 산화적 손상 지표 및 항산화 효소 활성도에 미치는 영향을 탐색하기 위해 실시하였다.
- 실험 결과를 전체적으로 살펴보면 5%의 통통마디 동결건조 분말을 섭취시킨 군이 식이 섭취량은 낮았지만 체중, 간무게가 high fat diet군과 비교하여 유의적으로 감소하는 것을 알 수 있다.
- 통통마디 동결건조 분말 및 통통마디 동결건조 nano 분말의 성분을 분석한 결과 두 시료 모두 식이섬유 양이 높은 수치를 나타냈다. 이처럼 많은 양의 식이섬유는 포만감을 초래하여 섭취하는 식이의 양에 영향을 미칠 수 있을 것으로 사료되었으나, 체중 감소의 효과는 통통마디 동결건조 분말을 섭취한 군에서만 나타났다. 이는 nano화가 식이섬유 효능을 감소시키는데 발현되었다 사료된다.
- 통통마디 섭취에 따른 혈중 Triglyceride 및 Total Cholesterol 수준의 차이는 없었으나, 5% 통통마디 동결건조 분말 섭취에 의해 혈중 HDL-Cholesterol 농도가 유의적으로 증가하였다.
- 혈중 항 동맥경화 인자인 Adiponectin의 경우 역시 5% 통통마디 동결건조 분말의 섭취에 의해 유의적인 차이가 나타나지 않았으나 증가하는 경향을 나타냈다.
- 심혈관 지표인자인 hs-CRP의 분석 결과 5% 통통마디 동결건조 분말을 섭취한 군이 high fat diet 군과 비교해 유의적으로 감소하였다.
- 산화적 손상 지표인 Protein carbonyl은 5% 통통마디 동결건조 분말의 섭취에 의해 유의적으로 감소하였다. 통통마디 동결건조 nano 분말의 경우 TBARS와 Protein carbonyl의 수치를 감소시키는 경향을 나타내었으나 유의적인 차이는 나타나지 않았다.
- 항산화 효소 중 혈청 Superoxide dismutase (SOD) 활성도는 통통마디 동결건조 nano 분말 섭취에 따라 유의적으로 증가하였으며, 간세포질 Glutathion Peroxidase 활성도는 5% 통통마디 동결건조 분말 섭취에 따라 유의적으로 증가하였다. 통통마디 동결건조 nano 분말 역시 간세포질 Glutathion Peroxidase 활성도가 유의적이지는 않지만 증가하는 경향을 나타냈다.
- 그러나 분변을 통한 중성지방 및 콜레스테롤 배설에 대한 통통마디의 효과는 나타나지 않아 통통마디가 중성지방 및 콜레스테롤 흡수 억제 효과를 나타내지는 않는 것으로 사료된다.



## 제 6 절 임상실험모델을 통한 건강증진효과 검증

### 1. 함초복용과 운동수행이 중년 여성의 혈중지질 및 당 대사 변인, 맥파속도, 신체조성, 골밀도, 체력요인에 미친 영향

#### 가. 개요

- 함초가 건강에 미치는 영향은 주로 동물모델을 이용한 연구를 통해서 항산화 및 항당뇨 효과 및 장운동 개선 그리고 면역증강 활성화 등이 보고되었다. 그러나 지금까지 인체를 대상으로 한 적절한 임상적 효과를 검증한 연구는 보고된바 없었기에 본 연구에서는 함초복용 및 운동요법이 중년 여성들의 신체조성, 혈액 및 혈관탄성변화에 따른 맥파속도 개선, 당대사, 그리고 국소부위의 골밀도변화, 체력요인 등에 미치는 영향을 구명하고자 다음과 같이 연구수행하였다.

#### 나. 연구대상 및 실험방법

##### (1) 연구대상 및 실험설계

- 본 연구의 피험자들은 중년여성을 대상으로 하여 본 연구설명회를 시행한 후, 자발적으로 참여의사를 밝히고 참가동의서를 신청한 희망자 중에서 본 연구에 적합한 대상자 68명을 선정하였다. 대상자로 선정된 피검자들은 5개 집단으로 무선 랜덤 배정하였다.

##### (2) 식이섭취량 분석

- 피검자들의 기본적인 일일식이섭취량의 특성을 살피고자 주 3일간 일일식이섭취내용을 회상기법을 통하여 기록 제출토록 하였다. 제출된 식이섭취설문서는 전문영양사의 확인과정을 거친 후 식이섭취분석소프트웨어인 CAN program(식품영양학회)을 이용하여 분석하였다. 분석 후 본 연구에 영양을 미칠 수 있는 대상자의 경우는 피검자에서 배제하였다.

##### (3) 실험처치식품(함초분말) 제조

- 함초관련 특허자료들을 기초로하여 함초 및 위약식품(환)을 샘플제조(정우당)한 후, 불특정 다수자들을 대상으로 한 시음을 통하여 본 연구에 적합한 형태의 처치식품을 제조하였다. 위약의 경우, 함초환과의 시각적인 차이를 확인할 수 없도록 위약의 표면을 함초와 동일한 색상으로 코팅 처리하였다. 또한 처치식품은 복용은 반드시 구강저작 없이 물과 함께 식음하도록 하였다.

##### (4) 함초 및 위약복용량

- 함초관련 특허에 기초하여 일일 권장량 15그램을 하루 2회 분할하여 비운동군의 경우는 식후에 섭취토록 하였으며, 운동군의 경우는 식후 및 운동후 식후 복용토록 하였다. 또한 피검자의 체중을 고려한 개인별 복용기준량을 제시하여 주었으며, 대략 1인당 8주간 동안 약 0.9-1.2킬로그램의 복용량이 처치되게 하였다.

(5) 운동군을 위한 운동프로그램

- 함초 및 위약복용 운동군 모두는 주 4회, 1회 90분간 지정된 체육관에서 운동지도사의 지도하에 운동을 처치 받고 있다. 각 피검자들은 개별 운동차트(측정항목 및 개인운동 프로그램일지)를 작성 비치하여, 매 운동종료 후 개인별 운동내용을 기록하도록 하였다. 운동시간은 주 4일, 월화/목금을 원칙으로 하였으며, 수, 토는 정규운동요일에 결석한 경우, 보충운동을 하도록 하였다. 운동은 오전9시부터 10시30분까지 스트레칭, 유산소 운동, 웨이트 트레이닝을 하도록 하였다.

(6) 비운동군 및 대조군

- 비운동군과 대조군은 본 연구기간 동안에는 어떠한 규칙적인 운동프로그램에 참여하지 않도록 서약하였으며, 또한 본 연구에 영향을 줄 수 있는 각종 건강보조식품 및 약물섭취도 금하도록 요청하였다.

(7) 집단별 피검자의 무선배정 분포

집단	인원
1. 함초+ 운동	14
2. 함초	13
3. 운동+ 위약	14
4. 위약	13
5. 대조군	13

(8) 측정변인 및 측정방법

(가) 신체조성평가

- 본 연구 대상자들은 서울 소재의 S대학교 체력측정실에 내방하여 안정을 충분히 취한 후, 신장과 체중을 측정하고, 생체전기임피던스법(모델; Inbody 720, Korea)에 의하여 신체조성 분석을 수행하였다.
- 생체전기저항법을 이용한 자동 신체조성 분석기인 InBody 720(Biospace Co.한국)를 이용하여 오전 9시부터 11시 사이에 체중, 체지방률(%), 체지방량(fat mass), 체지방량(lean body mass)을 측정하였다. 체질량지수(BMI)는 체중과 신장을 이용하여 산출하였다. 혈압 및 맥박측정은 체성분 분석 후, 약 5분간 안정을 취한 후 자동혈압기를 이용하여 3회 반복 · 측정하여 동일 또는 평균 값을 채택하였다.

(나) 혈액분석

- 채혈당일 공복 상태를 유지하기 위하여 최소 12시간 식이제한(fasting)토록 하였다. 혈액채취 전, 안정을 취한 후 전완 주정맥(antecubital vein)에서 1회용 주사기를 이용하여 약 10ml를 채혈하였다. 채혈된 일부의 혈액을 혈청분리용 tube로 옮긴 후에 혈청으로부터 지질 및 혈당농도를 측정하였다.
- 총 콜레스테롤(total cholesterol; TC)은 콜레스테롤 산화효소법을 이용하였으며, 중성지방(triglyceride; TG)은 글리세롤 인산산화효소법으로 분석하였다. 또한 HDL은 우선

혈청에 황산텍스트란 염화마그네슘을 첨가한 후에 원심분리법을 이용하여 측정하였으며, LDL은 전술한 혈청 지질농도값을 이용하여 Friedewald 방정식(1972)에 대입하여 추정하였다.

- 혈당은 당 산화효소법에 의하여 분석하였다. 혈청 IGF-1은 전완의 주정맥에서 약 5 ml를 채혈하여 전문 혈액분석기관에 의뢰 분석하였다.

#### (다) 체력평가

- 체력요인은 근력(악력), 유연성(좌전굴), 평형성 등을 한국체육과학연구원(1994)이 제시한 방법에 따라 측정하였다. 측정기기는 S보건소의 체력측정실내 설치운동 중인 기초체력측정 및 진단시스템(Helmas system, 한국)을 이용하였다. 반복측정이 가능한 요인들은 3회 측정하여 유사한 두 값의 평균을 측정값으로 선택하였다.

#### (라) 골밀도 측정

- 요추와 대퇴골두의 각 국소부위 골밀도 측정은 S대학 내 설치되어 있는 DEXA(Dual X-Ray Absorptiometry) 분석기(모델 Lunar DPX system, USA)의 표준화된 방법에 따라 요추부위와 우측 대퇴골두의 2부위(Femur neck, trochanter)와 골두부위 전체(Femur head total)에 대하여 수행되었다.
- 골밀도 측정은 피험자가 가장 가벼운 복장으로 누운 상태에서 Dual Energy X-ray Absorbtiometry (DEXA)를 이용하여 측정하였다. Single scan은 150개로서 약 1 mm 간격으로 설정하였으며, 골밀도와 골미네랄 함량을 측정하기 위한 세밀한 scan 분해 및 분석은 연결된 software에 의해 처리되었다 (그림 1).



<식이섭취 조사서 작성 방법>

- ① 음식 섭취시 가능한 밥(공기), 국, 찌개(대접)가 그릇에서 어느 정도인가 확인하고 부식을 다른 접시에 따로 담아 섭취함으로써 눈대중치를 정확히 하여 3일 연속 섭취한 주식과 부식, 간식의 음식명, 눈대중치, 재료, 분량을 쓴다.
- ② 음식명 기입시 주식(밥) - 부식(국, 찌개-단백질 부식-채소류- 등등) 순으로 쓴다.
- ③ 눈대중 또는 표준치를 기술한 것이므로 당신이 섭취한 양과 다를 수 있습니다. 당신이 섭취한 양과 가장 가까운 근사치 값을 써주십시오.

이름 :		조사일 : _____ 년 ____ 월 ____ 일			
구 분	음 식 명	눈대중량	식 품 명	섭 취 량	비고
아 침	흰쌀밥	한 공기	백미	90 g	
	콩나물	한그릇	콩나물(삶은 것)	70 g	
간 식	우유	한 컵	우유	200 ml	

식품섭취조사표 (day1)

\_\_\_\_\_ 월 \_\_\_\_\_ 일 \_\_\_\_\_ 요일

식사구분	음식명	재료명/상품명	분량 또는 눈대중량	비고
아침				
간식				
점심				
간식				
저녁				
간식				

(바) 근력요인 측정

- 근력변인은 등척성 근수축력을 우측에서 측정하였으며, 악력(Hand griping), 완견인력(Arm rowing strength ; 의자에 앉아서 우측 팔을 겨드랑이 선에 붙인 자세에서 장력계를 수평으로 잡아 당겨서 측정), 각신전력(Knee extensor ; 의자에 앉아서 무릎을 90도로 맞추고, 발목에 장력계를 뒤로 걸어서 측정)을 각각 3회씩 반복 측정하여 가장 높은 값을 측정 값으로 하였다.

(사) 운동프로그램

- 모든 운동대상자들은 조별로 지정된 시간에 헬스센타에 내방하여 준비운동과 스트레칭을 약 30분정도 실시한 후, 2개 그룹으로 편성하여 유산소운동을 먼저 하는 군과 웨이트트레이닝을 먼저 하는 군으로 나누고, 교대로 운동프로그램을 지도자의 지시에 따라 실행하도록 하였다. 우선 유산소운동은 30분간 트레드밀에서 걷기(약 5mph)로부터 출발하여 5분마다 1mph씩 속도를 증가시키는 방식으로 수행하였으나, 개인에 따라 약간의 운동속도의 차이는 허용하였다.
- 또한 2주 후부터는 각 개인에 따라 운동부하(속도) 조절은 각 스테이지 당 5분간씩 유지하는 것을 자유롭게 조절할 수 있도록 하였으나, 모든 유산소운동은 30분으로 제한하였다. 개별적으로 소비칼로리를 기록하도록 하였으며, 유산소운동으로 소비된 운동칼로리는 대략  $247 \pm 53$ 칼로리 수준이었다. 웨이트트레이닝의 경우는 스쿼트, 벤치프레스, 카프레이즈, 싯업, 랫풀다운 머신기구를 이용토록 구성하였다.
- 각 기구의 중량부하는 각 개인별 15회 반복으로 3세트를 실행토록 하였으며, 2주마다 각 기구의 부하중량을 약 3-5%수준에서 증가시키도록 하였다. 최종적으로 중량부하의 증가율은 개인에 따라 18-30%까지 증가되게 하였다.

(아) 측정항목 및 측정변인 정리

- 본 연구의 성과분석을 위하여 다음과 같은 변인들에 대하여 처치전 후간의 차이를 측정 분석 및 검증하고자 하였다. 변인측정은 혈액분석의 경우는 전문기관에 의뢰분석하였으며, 골밀도, 혈관탄성도 및 신체조성 변인에 대하여는 측정장비 렌탈을 통하여 측정 분석하였다.

= 신체조성: 신장, 체중, BMI, 근육량, 체지방량, 체지방율, 등

= 혈액변인: RBC, Hb, Hct, ionized Ca, TC, TG, HDL, LDL, Glucose, HbA1c, Insulin, Iron, somatomedin-C(IGF-1)

= 혈관탄성변인 : PWV

= 호흡기능: 폐활량, 1초율

= 체력요인 :평형성, 유연성 ,

= 근력 : knee extension, arm pulling, griping등

= 골밀도 : 요추부위, 대퇴골두부위

= 식품섭취량분석

다. 연구결과

(1) 처치 전 각 변인들에 대한 측정분석결과

- 본 연구에 참여한 모든 피험자들로부터 측정된 변인들의 평균치는 아래와 같다.

변인	최소값	최대값	평균	표준편차
나이	35.0	158.0	46.1	15.7
체중	46.0	81.1	58.8	7.7
신장	147.0	169.0	158.2	4.8
BMI	19.3	31.3	22.9	4.1
근육량	16.2	26.0	21.5	2.1
체지방량	7.3	35.5	18.9	5.5
체지방율	18.7	43.1	32.3	5.1
체지방량	30.0	56.6	40.1	4.3
L1 BMD	0.7	1.4	1.1	0.2
L2 BMD	0.1	1.7	1.2	0.2
L3 BMD	0.9	1.6	1.2	0.2
L4 BMD	0.6	1.6	1.2	0.2
Total BMD	0.7	1.4	1.0	0.1
Neck BMD	0.7	1.7	1.1	0.3
Troch BMD	0.6	1.7	1.1	0.3
TC	130.0	276.0	195.6	37.6
TG	50.0	273.0	119.9	45.3
LDL-C	48.0	193.0	111.5	33.7
HDL-C	36.0	75.0	53.4	9.6
Iron	23.0	222.0	94.9	50.0
RBC	3.7	5.1	4.4	0.3
HCT	30.9	45.6	39.6	2.9
Hb	8.1	15.8	12.9	1.3
Ionized Ca <sup>2+</sup>	1.0	1.3	1.2	0.1
Glucose	68.0	279.0	95.1	27.4
Insulin	1.8	32.7	6.7	5.5
baPWV L	1025.7	1986.0	1298.0	251.8
baPWVR	1049.0	1807.0	1314.1	170.5
FVC	1.2	31.0	3.2	3.6
FVC(%)	46.0	112.0	88.0	12.6
FEV1	1.2	3.7	2.4	0.4
FEV1(%)	0.9	109.0	85.6	16.6
Somatomedin C	38.4	182.0	109.0	27.2
악력 R	15.6	36.7	24.5	4.0
안력 L	15.4	32.8	23.5	3.9
팔근력 R	10.0	32.0	19.8	4.1
팔근력 L	9.0	30.0	18.9	4.3
다리근력 R	16.2	35.0	28.2	5.5
다리근력 L	12.0	35.0	27.8	5.9
유연성	-1.0	31.4	16.2	6.8
수축기혈압	100.0	142.0	119.6	9.8
확장기혈압	30.0	100.0	78.6	10.9

(2) 함초복용에 따른 변인들의 변화

- 본 연구에 참여한 피험자들 중에서 8주간에 걸쳐 함초를 복용한 집단에 대한 생리적, 대사적 변인의 변화를 조사한 결과, 아래와 같은 결과를 얻었다.

(가) 신체조성 및 골밀도 변인

변인	처치 전	처치 후	t value	p
나이	45.84±15.71	-	-	-
체중	60.1±6.9	59.6±7.3	1.307	0.203
신장	156.49±15.85	-	-	-
BMI	23.1±5.3	24.3±2.8	-1.342	0.191
근육량	22.0±1.9	21.5±2.4	2.415	0.023
체지방량	19.4±5.1	19.8±5.1	-1.615	0.118
체지방률	41.1±4.5	39.8±3.6	2.367	0.026
체지방율	32.3±4.9	31.9±5.1	-1.243	0.225
수축기혈압	119.5±8.4	123.7±6.3	-1.983	0.079
확장기혈압	60.9±9.6	77.9±6.1	0.803	0.443
BMD L1	1.1±0.1	1.1±0.1	0.788	0.438
BMD L2	1.2±0.1	1.2±0.1	0.595	0.557
BMD L3	1.3±0.1	1.3±0.1	0.188	0.852
BMD L4	1.2±0.1	1.3±0.1	-1.164	0.255
BMD Total	1.2±0.1	1.2±0.1	2.080	0.048
BMD Neck	1.3±1.9	1.0±0.1	1.008	0.323
BMD troch	0.8±0.1	0.8±0.1	1.001	0.326

- 본 연구에 참여한 피험자들 중에서 8주간에 걸친 함초 복용에 따른 신체조성 및 골밀도에 미치는 효과를 분석한 결과, 신체조성 및 골밀도에 대한 유의한 개선효과가 관측되지 않았다.

(나) 일반혈액 및 혈중지질 변인

변인	처치 전	처치 후	t value	p
T.Chol	184.7±36.9	189.0±32.7	-1.261	0.219
HDL Chol	52.5±9.5	55.0±12.0	-1.825	0.079
LDL Chol	100.0±30.5	101.7±24.3	-0.479	0.636
Triglyceride	120.3±44.4	113.6±50.1	0.979	0.337
Iron	76.1±46.6	88.9±48.9	-1.379	0.180
RBC(B)	4.4±0.3	4.6±0.9	-1.306	0.203
HCT	38.6±3.1	37.9±7.5	0.529	0.601
Hb	12.5±1.5	13.6±5.6	-1.080	0.290
Ionized Calcium	1.2±0.1	1.6±2.4	-0.992	0.330

- 본 연구에 참여한 피험자들 중에서 8주간에 걸친 함초 복용에 따른 혈중 지질변인을 포함한 생화학적 측정치의 변화를 분석한 결과, 혈청 HDL-cholesterol 농도의 상승효과가 관측되었으나, 통계적인 유의성을 나타내지는 않았다.



(다) 당대사 변인

변인	처치 전	처치 후	t value	p
Glucose(P)	91.0±8.0	93.3±16.4	-0.833	0.413
Insulin	5.9±2.7	11.2±19.2	-1.426	0.166

- 본 연구에 참여한 피험자들 중에서 8주간에 걸친 함초 복용에 따른 당뇨병과 관련된 대사변인의 변화 양상을 분석한 결과, 약 2배 정도의 혈중 인슐린 농도의 상승이 관측되었으나, 통계적 유의성을 나타내지는 않았다.

(라) 호흡 및 순환기능

변인	처치 전	처치 후	t value	p
baPWV-R	1321.0±174.1	1275.0±178.3	2.489	0.020
baPWV-L	1273.4±311.0	1249.9±176.3	0.499	0.622
FVC	3.9±5.5	3.9±5.3	0.014	0.989
FVC%	88.3±14.3	90.1±14.2	-0.871	0.392
FEV1	2.4±0.4	2.7±0.9	-1.509	0.143
FEV1%	84.6±20.5	92.3±13.2	-1.837	0.078

- 본 연구에 참여한 피험자들 중에서 8주간에 걸친 함초 복용에 따른 호흡 및 순환기능을 조사한 결과, 호흡기능에는 유의한 영향을 나타내지 않았으나, 혈류맥파속도로 측정된 순환기능에서 유의한 개선 효과가 나타났다. 특히, 우측 혈류 맥파속도의 경우, 함초 복용 후 유의한 개선 효과를 나타내었으며, 비록 통계적으로 유의하지는 않았지만, 좌측 혈류 맥파속도 역시 유사한 경향을 나타내었다. 이러한 결과는, 8주간의 함초 복용이 혈관 탄성도의 개선을 통한 죽상동맥경화증의 발병을 억제할 가능성이 있는 결과로 주목되며, 향후, 보다 더 많은 연구 대상자를 이용한 추사가 필요할 것으로 사료된다.

(마) 근력육성 변인

변인	처치 전	처치 후	t value	p
Somatomedin-C	112.4±26.9	144.0±37.2	-5.504	<0.001
약력	R25.6±4.1	26.1±4.7	-0.800	0.431
	L24.5±3.9	24.3±4.3	0.330	0.744
팔근력	R19.2±3.1	22.0±3.3	-5.322	<0.001
	L19.3±4.4	21.7±3.6	-3.994	0.001
다리근력	R27.5±5.1	30.1±4.5	-4.003	<0.001
	L27.9±5.2	29.0±5.6	-1.4330	0.164
유연성	16.4±7.0	16.4±7.1	0.069	0.945

- 본 연구에 참여한 피험자들 중에서 8주간에 걸친 함초 복용에 따른 근력과 관련된 변인들의 변화 양상을 분석한 결과, 양측 팔근력 및 우측 다리근력의 증가 현상이 관측되었으며, 비록 통계적으로 유의성을 나타내지는 않았지만, 좌측 다리근력 역시 증가하는 경향을 나타내었다. 또한, 동화 호르몬의 일종인 somatomedin-C의 혈중 농도 역시, 8주간의 함초 복용 후에 유의한 증가 양상을 나타내었는데, 이러한 근력 증가 효과를 나타낸 이유는 함초 복용을 통한 단백질 합성 증가가 근력 증가로 이어진 결과

로 사료된다.

#### 라. 결론

- 본 연구에 참여한 피험자들 중에서 8주간에 걸친 함초를 복용한 집단에 대한 생리적, 대사적 변인의 변화 양상을 조사한 결과, 신체 조성, 골밀도, 혈중 지질 농도 및 당 대사에서는 유의한 건강증진 효과를 관측하지 못 하였으나, 혈류 맥파속도의 감소를 통한 혈관 탄성의 유의한 개선이 확인되었으며, 이에 대한 추시가 필요할 것으로 사료된다. 또한, 함초 복용이 피험자들의 somatomedin-C와 같은 동화호르몬 농도의 증가와 근력의 증가 효과를 나타냈는데, 이는 함초가 풍부한 아미노산 조성을 보유한 관계로 활발한 단백질 합성에 의한 결과로 추측되며, 향후 이와 관련된 후속 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 2. 함초복용과 운동수행이 중고령 여성의 신체조성, 혈중지질 및 당대사 변인, 맥파속도, 철분대사변인 및 체력요인에 미친 영향

#### 가. 개요

- 함초(*Salicornia herbacea* L.)는 명아주과(Chenopodiaceae)의 1년생 식물로 우리나라의 서해안과 남해안의 갯벌이나 간척지 그리고 염전 등에 널리 분포하고 있으며, 고농도의 염분 조건에 적응한 결과로 해수에 포함된 것과 유사한 조성의 미네랄(mineral)을 다량 함유하고 있을 뿐 아니라, 각종 아미노산(amino acid) 및 식이섬유 (cellulose) 역시 풍부한 것으로 알려져 있다. 이처럼, 함초는 주변에서 비교적 저렴한 가격으로 쉽게 구할 수 있을 뿐 아니라 인체에 유용한 각종 영양분을 함유하고 있는 관계로, 건강기능성 식품으로 개발될 수 있는 잠재성을 갖고 있으며, 실제로 함초를 이용한 다양한 제품들이 개발되고 있거나 이미 출시되어 일반 대중들에게도 널리 소개되고 있다.
- 그러나 함초에 대한 많은 건강관련 효능들이 일반대중들에게 소개되고, 다양한 제품들이 개발되고 출시되고 있음에도 불구하고, 함초 섭취가 인체에 미치는 영향이나 건강증진 효과를 과학적으로 입증한 연구는 아직 부족한 실정이다. 현재까지 알려진 함초의 효능에 관해서는 주로 동물모델을 이용한 연구를 통해서 알려졌다. 항산화 효과, 항당뇨 효과, 혈중 지질대사의 개선, 피부미백 효과 및 장기능 개선 등의 효과가 보고되었다. 그렇지만, 인체를 대상으로 하여 함초의 임상적 효과를 검증한 연구는 아직 부족한 실정인 관계로, 본 연구에서는 폐경기가 지난 관계로 각종 만성퇴행성 질환에 취약한 50대 여성을 대상으로 하여 함초 섭취에 따른 건강증진 효과를 규명하고자 하였다. 아울러서, 주로 동물모델을 이용한 연구를 통해서 밝혀진 함초의 각종 효능들, 일례로 항산화, 항당뇨 및 혈중 지질대사 개선등과 같은 효과는 운동에 의해서도 역시 개선될 수 있는 관계로, 함초 섭취와 복합운동을 병행할 경우에 영양 및 운동의 병행에 의해서 보다 더 큰 건강증진 효과를 기대할 가능성이 있는 관계로 본 연구에서는 50대의 중년 여성 피험자들을 위약군, 함초섭취군, 위약+복합운동군 및 함초+복합운동군으로 구분한 후에, 함초섭취 및 복합운동의 효과를 규명하고자 하였다.

## 나. 연구대상 및 실험방법

### (1) 연구대상 및 실험설계

- 본 연구의 피험자들은 50-60대의 중고령 여성들을 대상으로 하여, 설명회를 통해서 본 연구에 대한 취지를 자세하게 설명한 후에(그림 1), 자발적으로 본 연구에 참여하는데 동의한 71명을 선정하였으며, 이들의 의사에 따라서 4개의 집단으로 사전에 배정하였다.



<그림 1> 연구설명회 장면.

### (2) 실험처리식품(함초분말) 제조

- 함초와 관련된 문헌 및 특허자료들을 참조하여 건조된 함초(그림 2)를 사용한 함초환 및 위약식품환 ((주)백장생과 정우당)을 샘플제조한 후에, 불특정 다수자들을 대상으로 한 시음을 통하여 본 연구에 적합한 형태의 처리식품을 제조하였다.



<그림 2> 건조된 함초(*Salicornia herbacea* L.)

- 위약의 경우에는, 주성분이 찹쌀분말로 이루어져 있으며, 함초환과의 모양이나 크기 그리고 시각적인 차이를 최소화하기 위하여, 그 표면에 함초와 비슷한 색상으로 코팅 처리하였다 <그림 3>.



<그림 3> 함초환과 위약환.

(3) 함초 및 위약복용량

- 함초관련 특허에 기초하여 함초환이나 위약환을 일일 권장량 15그램으로 하여 하루에 3회씩, 1회 5그램을 섭취하도록 하였으며, 비운동군의 경우에는 식후에 섭취하도록 하였으며, 복합운동군의 경우에는 식후 및 운동 후 식사 후에 복용하도록 하였다. 또한 피험자의 체중을 고려한 개인별 복용기준량을 제시하여 주었으며, 대략 1인당 8주 동안 약 0.9-1.2킬로그램의 함초환이나 위약환을 섭취하도록 하였다.

(4) 운동군을 위한 운동프로그램

- 함초섭취 및 위약복용을 하는 운동군의 구성원들은 주 4회, 1회 90분 동안 지정된 체육관에서 운동지도사의 지도하에 복합운동 프로그램을 수행하였다. 각 피험자들은 개별 운동차트(측정항목 및 개인운동프로그램일지)를 작성 비치하여, 매 운동종료 후 개인별 운동내용을 기록하도록 하였다. 운동시간은 주 4일, 월화/목금을 원칙으로 하였으며, 수, 토는 정규운동 요일에 결석한 경우, 보충운동을 하도록 하였다. 운동은 오전 9시부터 10시30분까지 스트레칭, 유산소 운동 및 웨이트 트레이닝을 하도록 하였으며, 운동 프로그램의 내용은 다음과 같다 (표1).

표1. 복합운동 프로그램

운동유형	내용	강도	지속기간
준비운동	Stretching	Mild-intermediate	20min
유산소운동	Treadmill (walk & jog)	4mph-9mph (1mph ↑/ 5min)	30min
근력운동	Squat Bench press Sit ups Leg extension Leg curl Shoulder press Calf raise Back extension	1RM 60%-80%(3set) Reps 10/exercise	40min
정리운동	Stretching	Mild-Intermediate	10min

(5) 위약군 및 함초군

- 위약군 및 함초군은 본 연구기간 동안에는 어떠한 규칙적인 운동프로그램에 참여하지 않도록 서약하였으며, 또한 본 연구에 영향을 줄 수 있는 각종 건강기능성 식품 및 약물섭취를 하지 않도록 요청하였다.

(6) 집단별 피검자의 무선배정 분포

- 본 연구에 참여한 피험자들에 대한 자발적인 의사를 가능한 한 존중하여, 이들의 의사에 따라서 비운동군과 운동군으로 나누었으며, 운동군에 참여하기를 원하는 피험자들의 비율이 더 높았다. 하지만, 비운동군과 운동군 모두 피험자들에게는 함초를 복용하는 것으로 공지하였으며, 비운동군과 운동군의 구성원들을 위약군과 함초섭취군으로 배정하는데 있어서는 이들을 임의로 무선배정하였다(표2).

표2. 집단별 피검자의 무선배정

집 단	인원
1. 위약군	10
2. 함초군	17
3. 함초+ 운동군	22
4. 위약+ 운동군	22

(7) 측정항목

- 함초섭취 및 복합운동에 대한 건강증진 효과를 분석하기 위하여 다음과 같은 변인들에 대하여 처치전과 8주간에 걸친 처치후 사이의 차이를 측정하고 이를 분석 및 검증하고자 하였다. 각각의 변인들에 대한 측정에 있어서 혈액분석의 경우에는 전문기관에 의뢰분석하였으며, 신체조성이나 혈관탄성도와 같은 변인들에 대해서는 측정장비 렌탈을 통하여 측정 분석하였다.

(가)신체조성: 신장, 체중, BMI, 근육량, 체지방량, 체지방율, 골격근량, 허리둘레 등.

(나)혈액변인: RBC, Hb, Hct, Iron, Haptoglobin, TC, TG, HDL, LDL, Lp(a), Glucose, HbA1c, Insulin

(다)혈관탄성 변인 : 혈류맥파속도(PWV).

(라)혈류역학: 수축기혈압, 확장기혈압.

(마)근력 : knee extension, arm pulling, griping 등.

(8) 혈류역학 및 혈류맥파속도 측정

- 피험자들의 혈압 및 혈류맥파 속도를 측정하기 위하여, 피험자들로 하여금 실험하기 약 30분전에 실험실에 도착하게 한 후에, 안정을 취한 후에, 우선 심장과 같은 높이에 커프를 감은 후에, 수은혈압계를 이용하여 혈압을 측정하였고, 그 후에는 피험자들을 편안한 자세로 눕힌 후에, Arterial function tester (PWV3.0, Korea)를 이용하여 혈류맥파속도를 측정하였다(그림 4).



그림 4. Arterial function tester (PWW3.0, Korea).

(9) 자료처리

- 8주간에 걸친 실험 처치 전과 후 사이에서 측정된 변인들의 변화 양상은 paired-t test에 의해서 그 결과를 분석하였으며, 4군 사이에 나타나는 차이의 비교는 one-way ANOVA test를 이용하여 그 결과를 비교하였다.

다. 연구결과

- 본 연구에서는 많은 생리적, 생화학적 변인들을 측정된 관계로, 측정된 자료들 중 유의성이 관측되거나 중요성이 있는 결과들을 위주로 나타내었다.

(1) 피험자들의 임상적인 특징들

- 본 연구에 참여한 모든 피험자들은 위약군, 함초군, 위약+운동군 및 함초+운동군으로 구성된 4군으로 이루어져 있으며, 이들 각각에 대한 신체적인 특징을 다음의 도표에 제시하였다 (표3).

표3. 피험자들의 임상적인 특징

변인	위약군(n=10)	함초군(n=17)	위약+ 운동군(n=22)	함초+ 운동군(n=22)
나이(year)	55.6±3.8	56.4±4.2	54.6±3.0	53.7±4.5
신장(cm)	154.2±5.9	156.2±3.3	156.5±4.6	156.1±5.5
체중(kg)	55.8±8.2	57.5±5.6	59.6±5.5	57.8±8.2
BMI(kg/㎡)	23.4±2.9	23.5±2.1	24.4±2.4	23.7±3.0
체지방율(%)	33.3±4.3	33.9±3.4	33.8±4.2	32.8±5.1

(2) 함초섭취에 따른 변인들의 변화

- 본 연구에 참여한 피험자들 중에서 8주간에 걸쳐 함초를 섭취한 집단에 대한 생리적, 생화학적 변인들의 변화 양상을 조사한 결과, 다음의 항목들에서 유의성이 관측되었다 (표4).

표4. 8주간에 걸친 함초섭취군에서 나타난 유의한 변화 양상을 보인 변인들

변인	Before	After	p-value
허리둘레(cm)	31.1±1.8	29.6±1.7	0.014
HCT(%)	43.6±2.4	45.2±3.1	0.047
HDL-cholesterol(mg/dl)	55.3±10.7	62.8±11.9	0.001

- 함초섭취군의 경우에는 신체조성에서 비만과 관련된 위험요인들 중 하나인 허리둘레에서 유의한 감소효과를 나타내었으며, 그리고, 철분대사의 경우에는 HCT가 증가하여 빈혈과 관련하여 긍정적인 효과가 있는 것으로 나타났다. 아울러서 혈중 지질대사와 관련해서는 혈중 HDL-cholesterol 농도가 큰 폭으로 상승하여 혈중 지질대사의 개선효과 역시 관측되었다.

(3) 함초섭취와 복합운동의 병행에 따른 변인들의 변화

- 본 연구에 참여한 피험자들 중에서 8주간에 걸쳐 함초를 섭취한 집단에 대한 생리적, 생화학적 변인들의 변화 양상을 분석한 결과, 체지방율, 허리둘레, LFL, LFR, 상완R, 상완L 근력 및 혈중 HCT 및 TC 농도의 개선효과가 관측되어, 함초의 단독섭취에 비해서 복합운동을 병행할 경우에 보다 더 많은 변인들에서 유의한 곤강증진 효과가 관측되었다 (표 5). 이러한 결과는 50대 중년여성의 경우에 함초의 단독섭취 보다는 함초섭취와 복합운동을 병행했을 경우에 각종 만성퇴행성 질환과 관련된 다양한 요인들에 대해서 훨씬 더 큰 건강증진 효과를 나타낸다는 사실을 시사하고 있다.

표5. 8주간에 걸친 복합처치(함초섭취와 운동)군에서 나타난 유의한 변화 양상을 보인 변인들

변인	Before	After	p-value
체지방율(%)	33.0±5.2	31.8±5.9	0.013
허리둘레(cm)	30.5±3.5	29.6±3.5	0.007
하지굴근력(우측)	10.3±2.4	18.1±7.9	0.001
하지굴근력(좌측)	9.9±3.4	18.7±7.4	0.001
상완견인력(우측)	18.9±2.7	22.4±3.5	0.001
상완견인력(좌측)	19.1±3.0	22.4±4.3	0.002
HCT(%)	42.9±3.0	43.7±2.7	0.055
TC(mg/dl)	220.6±37.2	207.1±40.4	0.023

- 그렇지만, 혈중 지질대사 변인들의 경우에는 일반적으로 함초섭취와 운동의 복합처치가 함초의 단독섭취에 비해서 보다 더 긍정적인 개선효과를 나타냈지만, 예외적으로 혈중 Lp(a) 농도의 경우에는 함초의 단독섭취에 의해서는 혈중 Lp(a)농도가 감소된 반면에 함초섭취와 운동을 병행했을 경우에는 그 농도가 오히려 증가한 것으로 나타났다(그림 4).

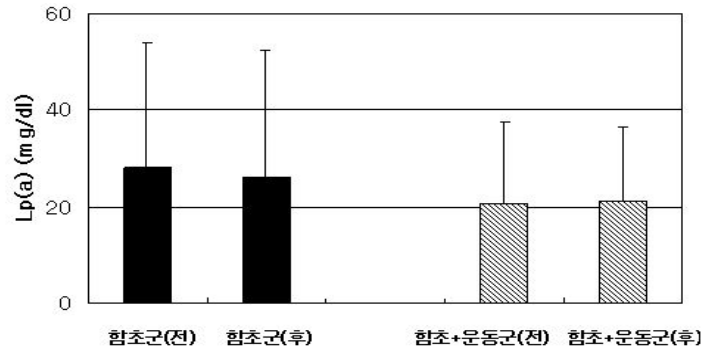


그림5. 4군 사이에 혈중 Lp(a) 농도의 변화.

- 혈중 Lp(a) 농도의 상승은 fibrinogen, homocysteine 및 C-reactive protein (CRP)과 함께 새롭게 대두되고 있는 4대 심혈관계질환과 관련된 위험인자의 하나로 주목을 받고 있으며, 개체 사이에 거의 1,000배에 달하는 농도차이를 나타낼 뿐 아니라, 개체 내에서 연령이 증가하여도 쉽게 변화되지 않으면서 운동에 의해서도 잘 개선되지 않을 뿐 아니라, 심한 운동 시 그 농도가 증가할 수도 있는 관계로 일종의 급성반응 단백질과 같이 행동하는 것으로 알려져 있다. 또한, 역학조사에 의하면, 혈중 Lp(a) 농도가 약 30 mg/dl 이상이면 심혈관계 질환에 걸릴 위험성이 매우 높아지는 것으로 알려져 있을 뿐 아니라, 강한 유전적 영향을 받는 것으로 알려져 있는데, apolipoprotein(a) 유전자가 Lp(a) 농도에 대한 주요한 결정인자인 것으로 알려졌다. 따라서, 이러한 결과는 혈중 Lp(a) 농도가 30 mg/dl 이상으로 높은 피험자들이거나 apolipoprotein(a) 유전자의 변이가 있는 피험자들에 대해서 별도로 합초의 단독섭취에 의해서 혈중 Lp(a) 농도가 변화하는 양상을 보다 더 자세히 규명하기 위한 추가연구가 필요할 것으로 사료된다.

(4) 4군 사이에 나타나는 생리적, 생화학적 변인들에서 나타나는 차이의 비교분석

- 본 연구에 참여한 총 4군의 피험자들에 대한 생리적, 생화학적 변인들에서 나타나는 차이를 비교분석한 결과, 체지방율, 골격근량, LFR 및 LFL에서 유의한 차이가 관측되었으며, 체중과 혈중 인슐린 농도에 있어서 marginal한 차이를 나타내었다. 우선 체중에 대해서는 합초의 단독섭취군에서 가장 큰 감소효과를 나타내어 합초섭취가 비만도의 개선에 유의한 효과를 나타낸다는 기존의 연구를 뒷받침하였다 (그림6).

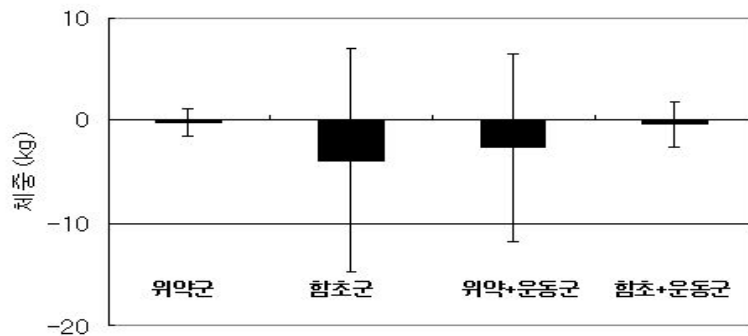


그림6. 4군 사이에 체중의 변화.



- 하지만, 체지방율 (그림7) 및 골격근량(그림8)의 경우에는 함초섭취와 운동을 병행한 집단에서 가장 긍정적인 효과를 나타내어 신체조성과 관련해서는 함초의 단독섭취 보다는 운동의 병행이 보다 더 긍정적인 건강증진 효과를 나타낸다는 사실을 보여주고 있다.

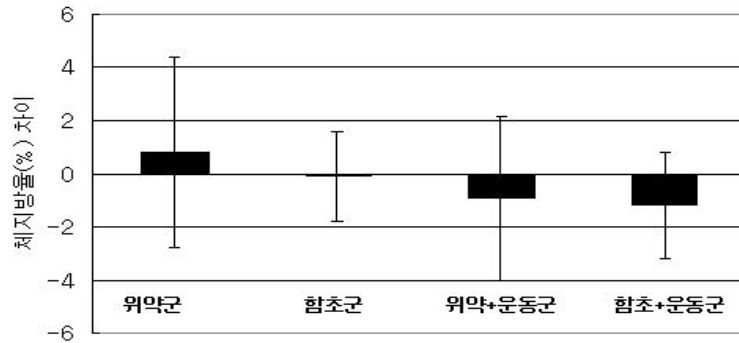


그림7. 4군 사이에 체지방율의 변화.

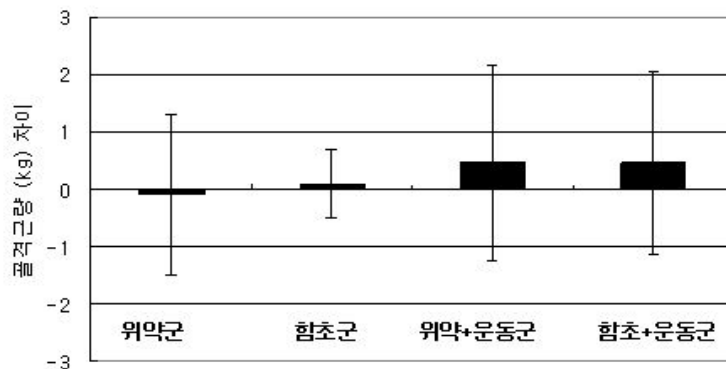


그림8. 4군 사이에 골격근량의 변화.

- 하지굴근력(우측) 값(그림9)과 하지굴근력(좌측) 값(그림10)의 경우에는 역시 함초섭취 군 보다는 함초섭취 및 운동을 병행한 집단에서 가장 큰 폭의 상승효과를 나타내었으며, 함초군에 비해서 위약+운동군이 보다 더 큰 폭의 상승효과를 나타낸 것으로 보아, 함초섭취에 의한 효과보다는 운동이 보다 더 유의한 효과를 나타낸 것으로 추측된다.

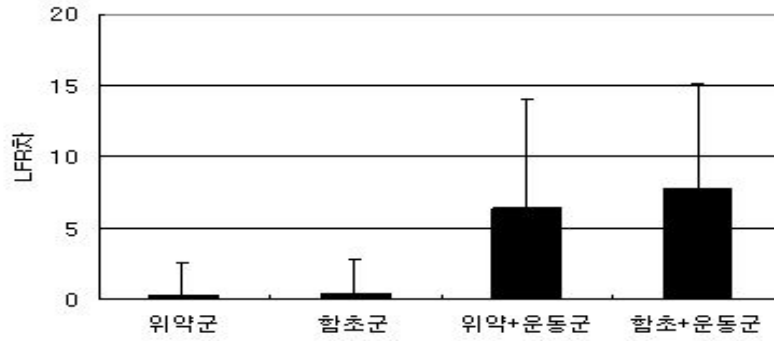


그림9. 4군 사이에 하지굴근력(우측)값의 변화.

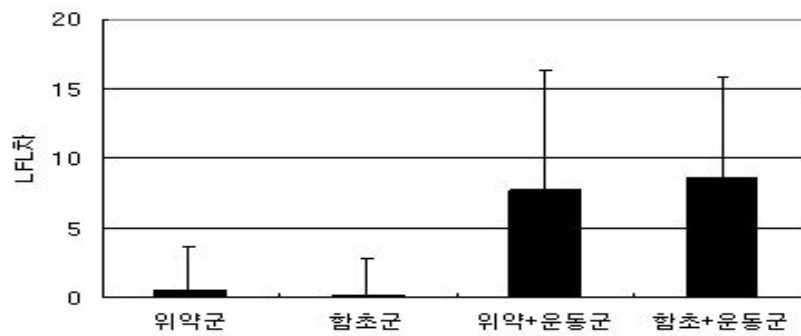


그림10. 4군 사이에 하지굴근력(좌측)값의 변화.

- 혈중 인슐린 농도의 경우에 있어서도 합초섭취와 운동을 병행하는 집단에서 단지 혈중 인슐린 농도의 감소를 나타내어 표적조직이 인슐린에 대한 감수성을 증가시켜서 인슐린 저항성을 방지하기 위해서는 합초섭취와 운동의 병행이 보다 더 유의한 효과를 나타내는 것으로 추측된다(그림11).

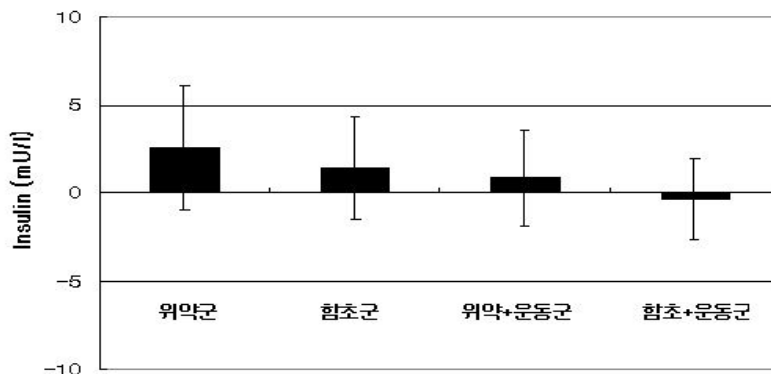


그림11. 4군 사이에 혈중 인슐린 농도의 변화.

라. 결론

- 본 연구에 참여한 50-60대의 비만한 중고령의 여성들을 대상으로 하여 8주간에 걸친 합

초섭취 및 운동에 대한 생리적, 생화학적 변인들의 변화 양상을 분석한 결과, 함초의 단독섭취만으로도 신체조성, 혈중 철분대사 및 혈중 지질대사 등에 있어서 몇몇 유익한 개선효과가 관측되었지만, 함초섭취와 운동을 병행했을 때, 훨씬 다양한 변인들에 대해서 보다 더 큰 폭의 건강증진 효과를 나타내었다.

- 하지만, 이러한 긍정적인 효과가 모든 변인들에 대해서 일관적으로 나타난 것은 아니었다. 즉 심혈관계질환의 위험인자중의 하나인 혈중 Lp(a) 농도의 경우에는 운동이 오히려 부정적인 영향을 미칠 가능성이 있는 것으로 나타났으며, 이 변인에 대해서는 오히려 함초의 단독섭취가 운동을 병행했을 때에 비해서 보다 더 긍정적인 효과를 나타낼 수 있을 것으로 짐작되었다.
- 그렇지만, 본 연구에 참여한 피험자들로는 집단 내에서 1,000배에 달하는 심한 개인차를 나타내는 혈중 Lp(a) 농도의 변화 양상을 정확하게 규명하고, 명확한 결론을 내리기에는 일정한 한계가 있는 관계로, 피험자들에 대한 Apolipoprotein(a) 유전자의 변이의 분석을 통해서, Apolipoprotein(a) 유전자의 이상을 나타내는 피험자들이나, 심혈관계질환에 대한 높은 위험인자로 작용할 수 있는 30mg/이 이상의 혈중 Lp(a) 농도를 나타내는 피험자들을 가능한 한 많이 모집한 상태에서의 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.
- 혈중 Lp(a) 농도는 다른 지질대사 변인들과는 달리 연령에 의한 변화 양상을 나타내지 않을 뿐 아니라, 운동에 의해서도 잘 개선되지 않음에도 불구하고, 현재까지 혈중 Lp(a) 농도를 감소시킬 수 있는 이렇다할 방법이 알려진 바가 거의 없다. 다만, 혈중 Lp(a) 농도를 감소시키기 위한 하나의 방안으로 이태리에서 수행된 연구의 결과에서는 저항성 탄수화물의 일종인 이눌린이 풍부한 파스타 복용이 높은 혈중 Lp(a) 농도를 나타내는 피험자들의 혈중 Lp(a) 농도를 낮추었다는 보고가 있으며, 함초에도 역시 저항성 탄수화물이 풍부한 관계로, 향후 3차년도 과제에서는 20대 비만 여성을 대상으로 하여 함초섭취가 이들의 혈중 Lp(a) 농도의 감소효과에 대한 보다 더 정밀한 분석이 필요할 것으로 사료된다.
- 아울러서, 본 연구에서 운동에 의한 혈중 Lp(a)가 상승하는 현상이 관측되었는데, 이에 대한 하나의 원인으로는 혈중 Lp(a)가 급성반응단백의 효과를 나타낸다는 보고가 있는 관계로, 대표적인 급성반응단백이면서 염증반응을 나타내는 지표인 CRP의 변화양상을 함께 추적조사한다면, 혈중 Lp(a) 농도가 운동에 의해 증가된 본 연구의 결과가 혈중 급성반응단백의 효과에 의한 결과인지를 명확히 파악할 수 있을 것이며, 동물실험을 통한 선행연구에서 보고된 바 있는 함초의 항염증효과에 대해서 임상실험을 통해서 보다 더 명확한 결론을 도출할 수 있을 것이다.
- 또한, 선행연구 결과에 의하면 함초섭취가 피부미백 효과를 나타낸다는 보고도 있는데, 비만인 여성인 경우에는 특히 skin trouble에 대한 문제가 자주 발생하는 관계로, 함초섭취가 이들에 대해서 일반적인 항비만 효과와 함께 피부미백에 미치는 효과를 구명하기 위한 3차년도 연구에 확대 포함하고자 한다.

### 3. 함초복용과 운동수행이 여대생의 신체조성, 체력, 대사증후군 및 심혈관계 질환과 관련된 혈중 생화학적 변인과 피부미용에 미치는 효과

#### 가. 개요

- 함초(*Salicornia herbacea* L.)는 주로 우리나라와 일본의 조수간만의 차가 큰 해안가에 서식하는 대표적인 염생식물의 일종으로, 해안 서식지에 적응한 결과로 다양한 종류의 미네랄(mineral)을 함유하고 있을 뿐 아니라, 각종 필수 아미노산(essential amino acids) 및 필수 지방산(essential fatty acids)을 포함하고 있기 때문에, 이를 재료로 한 건강기능성 식품 및 다양한 식재료가 꾸준히 개발되고 있다.
- 현재까지 수행된 실험동물 및 인간을 대상으로 한 연구 결과에 의하면, 함초 섭취가 장 기능을 개선시키고, 혈당 조절 및 혈중 지질대사에 유익한 효과를 나타내는 것으로 알려졌다. 뿐만 아니라, 항산화 효과는 물론 면역기능의 개선 및 간 보호 효과와 함께 항암 효과를 나타낼 가능성도 제기되고 있다.
- 또한, 함초섭취가 피부에 유익한 효과를 나타낸다는 사실이 이미 오래전부터 알려져 있었으며, 최근에 수행된 *in vitro* 연구결과에 의하면, 함초 추출물(extract)이 melanoma 억제능을 나타낼 뿐 아니라, melanin 합성에 중요한 역할을 담당하는 효소의 일종인 tyrosinase에 대한 억제효과가 보고되어 피부미백 효과를 나타낼 가능성이 제기되었으며, 임상연구 결과에서도 함초 섭취가 여드름 개선 및 피부탄력의 유지와 같은 피부미용에 유익한 효과를 나타낸 것으로 보고되었다. 게다가, 함초에는 전술한 바와 같이 다량의 미네랄(mineral)을 포함하고 있는 관계로, 운동에 의한 탈수예방 및 전해질의 적절한 균형유지에도 일정한 역할을 수행할 가능성이 제기되었으며, 실제로 한 연구에서는 함초 음료를 섭취한 집단이 몸통과 사지에서 수분량이 약간 증가하는 현상이 관측되기도 하였다.
- 결국, 이러한 선행연구 결과들은 함초가 피부에 대해서 상기한 미백효과와 함께 보습효과를 나타낼 가능성이 있음을 시사하며, 운동이 피부미용에 미치는 효과에 대한 연구가 매우 부족한 상황에서 함초섭취와 운동이 피부기능에 어떠한 상호작용 효과를 나타내는지를 분석하는 일은 함초섭취가 피부에 미치는 영향을 보다 더 자세히 규명하기 위해서 반드시 필요한 작업이라고 사료된다.
- 그러므로, 본 연구에서는 특히, 피부미용에 매우 민감하고 관심도가 높은 연령대인 10대 후반에서 20대 초반의 여대생들을 대상으로 하여 함초섭취와 함께 복합운동이 이들 피험자들의 신체조성 및 혈중 생화학적 변인에 미치는 효과를 분석함과 함께, 피부의 보습도, 미백도 및 pH 변화에 미치는 효과를 아울러 분석하고자 하였다.

#### 나. 연구대상 및 실험방법

##### (1) 연구대상 및 실험설계

- 본 연구에 참여한 피험자들은 모두 체지방율이 30% 이상이면서 10대 후반에서 20대 초반의 비만인 여대생들로써, 이들은 모두 본 연구에 관한 내용과 취지를 충분히 청취한 후에, 본 연구에 참여하는데 있어서 자발적으로 동의한 총 40명의 인원으로서 구성되어 있다. 이들 40명의 피험자들은 각각 10명씩 위약 섭취군, 함초 섭취군, 위약섭취와 복합운동을 병행하는 집단 및 함초섭취와 복합운동을 병행한 4집단으로 무선배정하였으며, 총 9주 동안에 걸쳐서 식이와 함께 운동프로그램을 수행하였다. 본 연구에 참여한 피험자들에 대한 신체적인 특징은 <표1>에 제시되어 있다.

표1. 피험자의 신체적인 특징(n=40)

집단	연령(years)	신장(cm)	체중(kg)	BMI(kg/m <sup>2</sup> )
위약군(n=10)	21.3±1.8	167.1±7.9	71.7±10.5	25.8±4.4
함초군(n=10)	22.7±4.6	161.7±5.8	60.4±6.4	23.1±1.8
위약+운동군(n=10)	23.0±2.9	160.8±5.8	68.5±11.2	26.4±3.0
함초+운동군(n=10)	22.5±4.2	163.9±5.6	73.5±16.9	27.5±6.9

(2) 함초환 및 위약의 제조 및 섭취

- 함초환은 건조시킨 함초를 분쇄기에 넣어 분말로 분쇄한 후에 제조한 것을 사용하였으며, 위약환은 주로 찹쌀로 이루어진 분말에 약간의 물엿을 섞은 후에, 그 표면을 함초환과 비슷한 색상으로 코팅처리한 것을 사용하였다. 함초환이나 위약환의 섭취량은 피험자당 1회 5g씩, 1일 3회씩, 1컵의 미지근한 물과 함께 총 9주 동안에 걸쳐서 섭취하도록 하였다.

(3) 복합운동 프로그램

- 본 연구에 참여한 피험자들 중에서 위약+운동군 및 함초+운동군의 경우에는 1주일에 3일 동안 총 9주에 걸친 복합운동 프로그램을 수행하도록 하였다. 이 과정을 수행하기 위해서, 상기한 집단에 속한 피험자들을 2조로 나눈 후에, 유산소운동을 먼저 수행하는 조와 근력운동을 먼저 수행하는 조로 나누어서 각 조에 속한 운동 프로그램을 완성한 후에, 조를 바꾸어서 번갈아가면서 다른 형태의 운동을 수행하도록 조치하였다. 본 연구에서 수행했던 복합운동 프로그램에 대한 상세한 내용은 <표2>에 기술되어 있다.

표2. 9주 동안에 걸친 복합운동 프로그램

Step	Exercise type	Intensity	Time
Warm up	Stretching	Mild-intermediate	15 min
Aerobic exercise	Treadmill walking	4 mph ~ 9 mph	30 min
Resistance exercise	Squat, Sit up, Bench press, Leg extension, Leg curl, Shoulder press, Calf rise	60 ~ 80% of 1RM	40 min
Cool down	Stretching	Mild-intermediate	15 min

(4) 측정항목

- 10대 초반에서 20대 후반의 비만인 여대생들을 대상으로 하여 함초섭취 및 복합운동이

이들의 신체조성, 혈중 생화학적 변인 및 피부미용에 미치는 효과를 분석하기 위하여 하기와 같은 변인들을 분석하였다. 신체조성과 관련된 변인들은 InBody 4.0(Biospace, Korea)를 이용하여 측정하였으며, 혈중 생화학적 변인은 혈액분석 전문기관에 의뢰하여 분석하였고, 피부미용 효과는 Multi Probe Adapter System을 이용하여 피부분석 전문가의 판정에 의해 분석하였다. 본 연구에서 분석한 변인들은 <표3>에 기재되어 있다.

<표3> 피험자들에 대해 측정한 변인들

번호	변인	세부항목
1	신체조성	신장, 체중, BMI, 체지방량, 근육량, 골격근량, 체지방량, 체지방율
	체력	유연성(좌전굴), 평형성(외발서기R, 외발서기L), 신근력(ExR, ExL), 상체근력(상완R, 상완L)
2	혈중 생화학적 변인	TG, TC, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol, Glucose, Insulin, HOMA-IR, HOMA $\beta$ -cell, CRP
3	피부기능	피부 보습도, 미백도, 홍반도, pH, 경표피 수분 증발량

#### (5) 자료처리

- 위약군, 함초군, 위약+운동군 및 함초+운동군에 대해서 9주 동안에 걸친 변화 양상은 paired t-test를 이용하여 분석하였으며, 4군의 집단사이에 9주간에 걸친 처치효과에 대한 분석은 이원분산분석(two-way ANOVA test)를 이용하여, 집단, 시기 및 집단과 시기의 상호작용 효과를 분석하였다. 상기한 모든 통계적 유의수준은  $\alpha=0.05$ 로 설정하였으며, 통계처리는 SPSSWIN version 18.0 program을 이용하여 수행하였다.

#### 다. 결과

##### (1) 함초섭취 및 복합운동에 의해 유의한 변화를 나타낸 변인들

- Paired t-test를 이용하여 9주 동안에 걸친 함초섭취 및 복합운동에 의해 유의한 변화를 나타낸 변인들을 조사한 결과, 단지 함초만을 섭취한 함초섭취군의 경우에는 체중( $t=2.4322$ ,  $p=.038$ ), BMI( $t=2.646$ ,  $p=.027$ ), 체지방량( $t=3.505$ ,  $p=.007$ ), 좌전굴( $t=-2.830$ ,  $p=.020$ ), 상완R( $t=-2.976$ ,  $p=.016$ ) 및 혈당( $t=4.575$ ,  $p=.001$ ) 및 CM825( $t=-4.228$ ,  $p=.003$ ), 홍반도( $t=3.240$ ,  $p=.012$ ), TM300( $t=6.424$ ,  $p<.001$ ) 및 pH905( $t=3.400$ ,  $p=.009$ ) 등의 변인들에 대해서 유의한 변화를 나타내었으며, 복합운동군의 경우에는 Homa  $\beta$ -cell( $t=-2.945$ ) 및 홍반도( $t=3.792$ ,  $p=.004$ )에 있어서 유의한 변화를 나타내었다. 이에 비해서 함초섭취와 복합운동을 병행한 함초-운동군의 경우에는 혈당( $t=7.116$ ,  $p<.001$ ), 혈중 중성지방 농도( $t=-2.793$ ,  $p=.023$ ), 홍반도( $t=2.832$ ,  $p=.022$ ) 및 TM300( $t=3.716$ ,  $p=.006$ )에 대해서 유의한 변화 양상을 나타내었다.

##### (2) 집단 간 신체조성의 변화에 있어서 나타난 차이

- 비만인 여대생을 대상으로 하여 9주 동안에 걸친 함초섭취 및 복합운동 프로그램이 신체조성과 관련된 변인에 미치는 효과를 이원분산분석에 의해 조사한 결과, 체중( $p=.009$ ), BMI( $p=.031$ ), 체지방량( $p=.001$ ), 근육량( $p=.001$ ) 및 골격근량( $p=.001$ )에 있어서 4집단 사이에 유의한 효과가 관측되었으나, 시기 및 시기와 집단의 상호작용 효과는 관

측되지 않았다<표4>. 이들 신체계측치에 대한 변인들 중에서, 체중 및 BMI 값은 다른 집단에 비해서 위약+운동군에서 가장 큰 폭의 감소양상을 나타내어, 함초의 섭취보다는 복합운동이 이들 변인들의 감소에 가장 큰 영향을 미친 것으로 관측되었다.

- 그렇지만, 체지방량, 근육량 및 골격근량의 경우에 있어서는 다른 집단들의 경우에는 9주 후에 이들 변인들이 약간씩 감소한 양상을 나타낸 반면에, 유일하게 함초+운동군의 경우에는 이들 변인들이 증가하는 양상을 나타내었다.

표4. 9주간에 걸친 4집단 사이의 신체조성의 변화

변인	집단	사전	사후	p-value		
				집단	시기	집단X시기
체중 (kg)	위약군	71.7±10.5	70.4±11.1	.009	.678	1.000
	함초군	60.4±6.4	59.5±6.5			
	위약+운동군	68.5±11.2	66.9±11.7			
	함초+운동군	73.5±16.9	72.2±16.9			
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	위약군	25.8±4.4	25.2±4.3	.031	.636	1.000
	함초군	23.1±1.8	22.7±1.9			
	위약+운동군	26.4±3.0	25.7±3.2			
	함초+운동군	27.5±6.9	27.0±6.8			
체지방량 (kg)	위약군	46.4±6.3	45.3±6.1	.001	.943	.928
	함초군	40.4±5.0	40.1±4.5			
	위약+운동군	42.0±3.3	41.6±4.3			
	함초+운동군	46.4±4.9	47.8±7.0			
근육량 (kg)	위약군	43.5±5.9	42.5±5.7	.001	.940	.939
	함초군	37.9±4.6	37.6±4.2			
	위약+운동군	39.4±3.0	39.0±4.0			
	함초+운동군	43.6±4.7	44.9±6.5			
골격근량 (kg)	위약군	25.4±3.7	24.8±3.6	.001	.898	.929
	함초군	21.9±2.9	21.6±2.7			
	위약+운동군	22.9±1.8	22.5±2.4			
	함초+운동군	25.5±2.9	26.3±4.2			
체지방량 (kg)	위약군	25.3±6.6	25.1±7.0	.086	.587	.976
	함초군	20.0±5.1	19.4±4.8			
	위약+운동군	26.5±8.0	25.4±8.1			
	함초+운동군	27.1±13.2	24.4±11.0			
체지방율 (%)	위약군	35.0±5.9	35.2±6.1	.262	.597	.948
	함초군	32.9±6.6	32.4±6.0			
	위약+운동군	38.0±5.7	37.2±6.2			
	함초+운동군	35.1±9.5	32.5±7.7			

(3) 집단 간 체력 변화에 있어서 나타난 차이

- 비만인 여대생을 대상으로 하여 9주 동안에 걸친 함초섭취 및 복합운동 프로그램이 유연성, 평형성 및 근력과 관련된 변인에 미치는 효과를 이원분산분석에 의해 조사한 결과, 좌전굴(p=.05), ExR(p=.010), ExL(p=.0017), 상완R(p=.002) 및 상완L(p=.025)에 있어서 4집단 사이에 유의한 효과가 관측되었다<표5>.
- 좌전굴에 의해 측정된 유연성의 경우에는, 다른 3집단에 비해서 함초군에서 가장 큰 폭의 증가양상을 나타내었으며, ExR과 ExL로 표시된 신근력의 경우에는 비록 4 집단 간에 통계적으로 유의한 차이가 관측되었다고 해도, 모든 집단에서 감소하는 양상을 나타내어 함초섭취와 복합운동이 20대 비만인 여대생의 신근력의 증가에 유의미한 효과를

나타내지는 않은 것으로 사료된다. 아울러서, 상완R과 상완L로 표현된 상체근력의 경우에는, 4 집단 모두 9주 간의 처치 후에 모두 증가하는 양상을 나타내기는 하였지만, 위약군에서 가장 큰 폭의 증가를 나타낸 관계로, 상체근력 역시, 함초섭취와 복합운동이 20대 미만인 여대생의 상체근력에 유의한 효과를 발휘하지는 못했던 것으로 사료된다.

표5. 9주간에 걸친 4집단 사이의 체력의 변화

변인	집단	사전	사후	p-value		
				집단	시기	집단X시기
좌전굴	위약군	16.9±10.4	19.3±6.5	.050	.386	.843
	함초군	14.0±9.7	19.1±10.9			
	위약+ 운동군	9.2±11.1	10.9±11.0			
	함초+ 운동군	11.4±8.9	10.5±11.2			
외발서기R	위약군	10.3±8.2	20.3±18.2	.401	.537	.381
	함초군	8.3±7.3	12.1±13.9			
	위약+ 운동군	11.7±9.1	6.3±4.7			
	함초+ 운동군	15.0±24.1	14.4±12.4			
외발서기L	위약군	11.3±10.0	14.3±12.7	.540	.898	.716
	함초군	14.3±13.2	11.2±9.7			
	위약+ 운동군	10.4±8.6	8.1±8.2			
	함초+ 운동군	12.8±7.7	16.7±17.6			
ExR	위약군	27.1±13.6	21.3±6.9	.010	.076	.948
	함초군	18.5±13.2	13.8±6.4			
	위약+ 운동군	14.0±5.0	11.9±3.4			
	함초+ 운동군	18.8±13.3	15.1±8.5			
ExL	위약군	25.4±10.2	20.9±7.9	.007	.067	.101
	함초군	18.0±11.6	13.2±6.5			
	위약+ 운동군	14.0±4.5	12.0±5.0			
	함초+ 운동군	18.4±11.0	14.8±7.8			
상완R	위약군	17.7±4.2	22.7±5.7	.024	.002	.868
	함초군	14.3±4.3	17.0±4.0			
	위약+ 운동군	14.6±2.6	17.2±4.9			
	함초+ 운동군	15.4±1.7	19.2±6.9			
상완L	위약군	19.6±5.9	22.4±8.0	.025	.138	.980
	함초군	15.1±5.2	17.0±3.1			
	위약+ 운동군	14.7±3.1	16.3±6.0			
	함초+ 운동군	16.2±4.4	17.4±6.3			

(4) 집단 간 혈중 지질대사와 관련된 변인의 변화에 있어서 나타난 차이

- 9주 동안에 걸친 함초섭취 및 복합운동 프로그램이 혈중 지질대사와 관련된 변인에 미치는 효과를 이원분산분석에 의해 조사한 결과, 혈중 중성지방(p=.042)에 있어서 4집단 사이에 유의한 효과가 관측되었지만, 집단과 시기 사이에 유의한 상호작용 효과는 관측되지 않았다<표6>. 혈중 중성지방 농도의 경우에는, 4 집단들 중에서 단지 위약군의 경우에만 혈중 중성지방 농도가 약간 감소하는 양상을 나타낸 반면에, 다른 3집단에서는 이러한 감소양상을 나타내지 않은 관계로, 함초섭취 및 복합운동 모두 20대 미만인



여대생에 대해서는 유의한 건강증진 효과가 관측되지 않은 것으로 사료된다.

표6. 9주간에 걸친 4집단 사이의 혈중 지질대사 변인의 변화

변인	집단	사전	사후	p-value		
				집단	시기	집단X시기
TG (mg/dl)	위약군	129.1±128.6	127.4±105.5	.042	.585	.970
	합초군	61.7±19.3	67.0±15.8			
	위약+ 운동군	84.9±30.4	96.8±51.2			
	합초+ 운동군	103.1±72.1	124.0±74.9			
TC (mg/dl)	위약군	174.4±40.9	185.1±25.3	.290	.535	.927
	합초군	164.5±22.1	170.7±24.2			
	위약+ 운동군	178.8±32.6	175.4±29.1			
	합초+ 운동군	184.8±43.0	189.6±28.2			
LDL-C (mg/dl)	위약군	92.9±31.8	105.6±23.2	.685	.280	.943
	합초군	87.3±18.5	95.6±22.3			
	위약+ 운동군	95.6±27.7	97.9±22.8			
	합초+ 운동군	99.4±36.4	103.6±27.9			
HDL-C (mg/dl)	위약군	57.4±14.8	55.4±16.3	.670	.517	.951
	합초군	63.1±4.2	60.0±7.1			
	위약+ 운동군	62.0±11.9	57.9±9.0			
	합초+ 운동군	60.8±20.1	61.7±18.2			

(5) 집단 간 혈중 당대사와 관련된 변인의 변화에 있어서 나타난 차이

- 9주 동안에 걸친 합초섭취 및 복합운동 프로그램이 혈중 당대사와 관련된 변인에 미치는 효과를 이원분산분석에 의해 조사한 결과, 혈당, 혈중 인슐린 농도 및 HOMA-IR 및 HOMA β-cell을 포함하는 어떠한 변인들에 대해서도 4 집단 사이에 유의한 차이가 관측되지 않았을 뿐 아니라, 유의한 상호작용 효과 역시 관측되지 않았다<표7>.

표7. 9주간에 걸친 4집단 사이의 혈중 당대사 변인의 변화

변인	집단	사전	사후	p-value		
				집단	시기	집단X시기
Glucose (mg/dl)	위약군	87.9±6.1	72.9±8.5	.552	<.001	.121
	합초군	86.3±7.3	75.5±10.0			
	위약+ 운동군	84.8±5.0	80.3±10.3			
	합초+ 운동군	91.8±6.5	75.8±6.6			
Insulin	위약군	10.5±6.4	8.8±6.2	.520	.307	.327
	합초군	5.0±1.8	9.1±13.9			
	위약+ 운동군	6.6±2.4	13.8±11.3			
	합초+ 운동군	11.5±9.5	10.1±6.8			
HOMA-IR	위약군	2.3±1.5	1.6±1.1	.329	.755	.143
	합초군	1.1±0.4	1.6±2.3			
	위약+ 운동군	1.4±0.5	2.9±2.6			
	합초+ 운동군	2.7±2.4	1.9±1.2			
HOMA β-cell	위약군	146.3±76.4	833.4±997.0	.536	.005	.648
	합초군	84.3±45.2	437.5±1068.8			
	위약+ 운동군	114.9±54.3	367.0±238.8			
	합초+ 운동군	134.2±86.3	395.4±520.7			

(6) 집단 간 혈중 염증지표의 변화에 있어서 나타난 차이

- 9주 동안에 걸친 합초섭취 및 복합운동 프로그램이 염증지표인 혈중 CRP 농도에 미치는 효과를 이원분산분석에 의해 조사한 결과, 4 집단 사이에 유의한 농도 차이가 관측되지 않았을 뿐 아니라, 유의한 상호작용 효과 역시 관측되지 않은 것으로 나타났다

<표8>.

표8. 9주간에 걸친 4집단 사이의 혈중 CRP 농도의 변화

변인	집단	사전	사후	p-value		
				집단	시기	집단X시기
CRP (mg/L)	위약군	0.4±0.2	0.5±0.3	.174.	.211	.795
	합초군	1.1±1.8	0.8±1.3			
	위약+운동군	0.7±0.9	0.3±0.2			
	합초+운동군	1.7±2.1	0.9±1.2			

(7) 집단 간 피부미용 효과의 변화에 있어서 나타난 차이

- 9주 동안에 걸친 함초섭취 및 복합운동 프로그램이 피부미용에 미치는 효과를 이원분산분석에 의해 조사한 결과, 피부의 보습도(p=.017), 미백도(p=.001) 및 홍반도(p=.002)에 대해서 4 집단 사이에 유의한 차이가 관측되었다<표9>. 우선, 피부의 보습도의 경우에는 함초군이 피부의 보습도에 있어서 가장 큰 증가 양상을 나타내었으며, 함초+운동군이 그 다음으로 높은 증가양상을 나타내어, 함초섭취가 20대 비만인 여대생의 피부보습에 유의한 효과를 나타낸 것으로 인식된다.
- 피부의 미백도의 경우에는, 4 집단 중에서 단지 위약+운동군에서 멜라닌 지수가 증가하는 것으로 나타났으며, 함초군 및 함초+운동군의 경우에는 멜라닌 지수가 약간 감소하는 양상을 나타내었지만, 그 감소폭이 위약군 보다도 적은 것으로 나타나, 함초섭취가 20대의 비만인 여대생에 대해서 유의한 피부미백 효과를 나타낸 것 같지는 않다.
- 홍반도 지수의 경우에는 함초+운동군, 위약+운동군, 함초군 및 위약군의 순서로 홍반도가 감소하는 것으로 관측되었으며, 함초섭취와 복합운동의 병행이 홍반도 감소에 가장 높은 효과를 나타낸 것으로 관측되었다.

표9. 9주간에 걸친 4집단 사이의 피부미용 효과의 변화

변인	집단	사전	사후	p-value		
				집단	시기	집단X시기
보습도 (AU)	위약군	52.8±7.3	56.9±9.2	.017	.001	.760
	합초군	53.9±4.5	64.9±6.3			
	위약+운동군	46.1±10.9	53.4±12.9			
	합초+운동군	48.2±12.6	56.4±5.7			
미백도	위약군	155.9±19.2	148.1±16.7	.001	.527	.893
	합초군	127.9±17.3	122.6±19.0			
	위약+운동군	150.8±27.8	153.6±24.1			
	합초+운동군	149.9±19.1	147.2±24.3			
홍반도 (mJ/cm <sup>2</sup> )	위약군	365.6±69.6	345.3±87.0	.002	.011	.875
	합초군	294.6±42.8	268.7±34.4			
	위약+운동군	331.0±52.8	289.6±54.9			
	합초+운동군	334.9±36.5	288.4±38.5			
TM300 (g/h/m <sup>2</sup> )	위약군	16.6±8.3	15.7±5.1	.983	.002	.285
	합초군	20.2±5.7	12.8±4.1			
	위약+운동군	17.9±5.7	15.1±4.5			
	합초+운동군	18.3±2.7	13.6±3.3			
pH905	위약군	6.1±0.2	5.9±0.2	.936	.023	.609
	합초군	6.1±0.2	5.9±0.3			
	위약+운동군	6.1±0.2	5.9±0.3			
	합초+운동군	5.9±0.2	5.9±0.4			

라. 결론

- 20대의 비만인 여대생들을 대상으로 하여 9주 동안에 걸친 함초섭취 및 복합운동 프로그램이 신체조성, 체력, 대사증후군 및 심혈관계 질환과 관련된 혈중 생화학적 변인과 함께 피부미용에 미치는 효과를 분석한 결과, 위약+운동군의 경우에는 체중 및 BMI와 같이 주로 비만도에 영향을 미치는 신체조성에 대해서 유의한 감소효과를 나타내었는데, 이는 복합운동이 상기한 비만과 관련된 변인들의 개선에 긍정적인 효과를 나타낸다는 국내·외에서 수행된 많은 연구결과들을 지지하는 양상을 나타내었다.
- 함초군의 경우에는 피부미용과 관련하여 피부의 보습도에 대해 긍정적인 효과를 나타내었다. 이에 반해서, 주로 근력과 밀접한 관련성을 나타내는 제지방량, 근육량 및 골격근량의 경우에는 다른 4집단에 비해서 함초섭취와 복합운동을 병행한 집단에서 유일하게 개선된 양상을 나타내었는데, 이는 함초에 포함된 다량의 아미노산이 근육의 단백질 합성을 위한 원료를 제공함과 함께, 복합운동을 구성하는 운동의 형태 중에서 근력운동이 상기한 변인들의 강화효과에 대해서 함초섭취와 상호작용하여 이와같은 건강증진 효과를 나타낸 것으로 사료된다.
- 피부미용과 관련해서는, 함초군과 함께 함초+운동군을 포함하는 함초를 섭취하는 집단에서 유의미한 피부보습 효과를 나타내었는데, 이러한 결과는 함초에 포함된 다량의 미네랄이 체내에서 전해질의 균형에 긍정적인 영향을 미친 결과로 사료되며, 추후에는 함초를 이용하여 스포츠 음료로 개발하기 위한 후속연구를 수행하는 일이 필요할 것으로 사료된다.
- 피부의 홍반도 지수와 관련해서는, 함초+운동군, 위약+운동군, 함초군 및 위약군의 순서로 홍반도가 감소하는 것으로 관측되어, 함초섭취보다는 복합운동이 홍반도의 감소에 보다 더 유의미한 영향을 미친 것으로 관측되었는데, 이는 복합운동을 구성하는 운동의 형태 중에서 유산소운동이 혈액순환의 개선과 함께 신진대사를 촉진시킨 결과로, 상기한 효과를 나타낸 것으로 추측된다.
- 종합하면, 함초섭취는 20대 비만인 여대생들에 대해서 유의미한 피부보습 효과를 나타낸 것으로 관측되었을 뿐 아니라, 여기에 복합운동을 병행할 경우에는 주로 근력과 밀접한 관련이 있는 신체조성의 증가를 통해서, 간접적으로 비만을 예방하는데 기여할 수 있는 것으로 나타났으며, 피부의 홍반도를 감소시켜서 궁극적으로 피부미용에 긍정적인 효과를 발휘할 수 있는 것으로 사료된다.

## 제 7 절 소비자 맞춤형 조미가공 제품 개발

### 1. 조미소재 개발을 위한 함초 분말의 관능적 특성 규명

#### (1) 실험 방법

##### 가. 시료

압출 조파쇄(쌀20%:함초80%)[압출함초80%], 압출 조파쇄(쌀2:함초1)[압출함초33.3%], 압출 조파쇄(함초100%)[압출함초100], 열풍건조 함초줄기 초미분[열풍줄기], 열풍건조 함초잎 초미분[열풍잎], 열풍건조초미분[열풍건조], 동결건조 초미분[동결건조], 원적외선 초미분[원적외선] 등 총 7종의 시료에 대한 묘사분석 평가가 이루어졌다.

##### 나. 묘사분석 패널

평소 묘사분석에 관심이 있는 20대 여대생 9명 (서울여자대학교)이 참여하였다.

##### 다. 묘사분석 절차

묘사분석은 훈련과 본 실험으로 나뉘어졌다. 훈련 과정 중에는 우선 NaCl대비 함초 분말 시료의 짠맛 강도를 정확하게 평가하기 위해 NaCl 수용액에 대한 짠맛 강도 표준 척도를 개발하였다. 즉, NaCl 수용액 0.05%, 0.1%, 0.2%, 0.4%, 0.6%, 0.8%에 대해 0-14점 강도 척도를 이용하여 인지되는 짠맛 강도를 평가하여 각 NaCl 농도의 강도를 1점, 2점, 4점, 8점, 11점, 14점으로 정하였다. 이렇게 확립된 짠맛 척도에 대해 묘사분석 패널이 완벽하게 숙지하도록 각 NaCl수용액을 반복하여 맛보게 하고 각 농도의 짠맛 강도 점수를 외우게 하였다. 각 패널의 짠맛 표준 척도에 대한 숙지 여부는 다양한 농도의 NaCl 수용액에 대해 짠맛 강도를 평가하게 하여 정답률이 70%이상인 경우 본 실험에 참여하도록 하였고 정답률이 70% 미만인 패널에 대해서는 70% 이상의 정답률을 보일 때까지 계속해서 짠맛에 대한 훈련을 하도록 하였다.

짠맛에 대한 표준척도를 숙지한 후 묘사분석 패널은 7종의 함초 분말시료에 대해 관능적 특성 용어를 개발하였으며 개발된 관능적 특성 용어에 대한 정의, 각 정의에 해당하는 표준 시료 및 표준 강도를 확립하였다. 함초 분말 시료에 대한 관능적 특성 및 표준시료는 <표1-1>과 같다. 묘사분석 패널이함초 분말에 대한 평가가 분별성(discriminability) 및 재현성(reproducibility) 있게 평가할 때까지 훈련은 계속 되었다.

본 실험은 훈련 과정 중에 개발된 관능적 특성과 이들에 대한 표준시료를 사용하여 7종의 함초분말 시료에 대한 강도 평가가 진행되었다. 함초 분말 시료에 대한 1반복 실험은 총 2세션으로 구성되었으면 첫 세션에서는 4개의 시료, 두 번째 세션에서는 나머지 3개의 시료를 평가하였다. 각 함초 분말 시료는 분말의 형태로 각 패널에게 0.02g씩 3봉지를 제공하였다. 패널은 설문지를 받고 각 시료마다 표준시료와 비교하여 관능적 특성 강도를 평가하였으며 0-14점 항목 척도를 사용하였다. 시료의 제시 순서는 윌리엄라틴 방법으로 제공한다. 패널은 실험 1시간 전 음식물의 섭취를 금하였고 평가시 패널간 대화를 금하였다. 각 시료와 시료 사이는 물로 입안을 행구었다. 총 4회 반복하여 실험을 진행하였다.

## 라. 통계분석

7종 시료의 관능적 특성 강도가 유의적으로 차이가 있는지 분석하기 위해 분산분석 및 Duncan의 다시료 검정을 실시하였다. 또한 각 함초 분말 시료의 관능적 특성을 시각적으로 요약하기 위해 주성분 분석을 실시하였다. 전자의 분석은 SPSS를 사용하였고 후자의 분석은 XLSTAT을 사용하였다.

## (2) 실험 결과

함초 분말의 관능적 특성: 7종의 함초 분말에 대해 묘사분석을 실시한 결과 외관 1개(입자크기), 향 1개(한약재), 맛과 향미 10개(전반적맛, 단맛, 감칠맛, 짠맛, 쓴맛, 녹차, 해조비린, 전분, 고소함, 탄), 그리고 뒷맛 1개(텃텃함) 특성 등 총 13개 특성이 개발되었다.

7종의 함초 분말 시료간 13개의 관능적 특성 강도의 차이가 있는 지 분산 분석을 실시한 결과 모든 관능적 특성에서 함초 시료간 유의적 차이( $p < 0.0001$ )가 있는 것으로 나타났다. 즉, 분말 가공 기법에 따라 함초 분말의 관능적 특성이 달라지는 것으로 분석되었다 <표 1-2>. 압출분쇄하여 건조 분말화 한 시료는 전반적으로 입자 크기가 크며 단맛과 고소함을 제외한 나머지 특성의 강도는 상대적으로 약한 것으로 나타났다. 압출 분쇄한 시료 중 함초가 33.3% 함유된 시료는 80%나 100%로 시료에 비해 전반적으로 향미가 약했으며 함초 함유 80%와 100%의 시료는 관능적 특성의 차이가 거의 없는 것으로 평가되었다. 그러나 짠맛은 80%시료에서 유의적으로 더 강하였고 100%의 시료는 텃텃함이 더 강한 것으로 나타났다.

건조 방법에 따라 평가한 결과 전반적인 맛 강도는 동결건조>열풍건조>원적외선건조 순인 것으로 나타났으나 함초의 일만을 사용하여 열풍 건조를 실시한 경우 전반적인 맛 강도와 짠맛 강도가 동결건조 수준으로 증가하는 것으로 나타났다. 짠맛이 강한 동결건조, 열풍 잎, 원적외선, 열풍건조 등의 시료는 이와 함께 해조비린, 녹차, 쓴맛 등이 함께 유의적으로 강하게 평가되었다<그림 1-1>. 열풍 건조한 함초 줄기의 관능적 특성은 다른 시료와는 매우 다른 관능적 특성 경향을 보였다. 즉, 타 시료에서 강하게 발현되는 녹차, 해조비린, 짠맛 등의 강도는 상대적으로 약하였고 고소함, 전분 향미, 텃텃함 등이 타 시료에 비해 강한 것으로 나타났다.

함초 분말 시료의 관능적 특성을 시각적으로 요약하기 위해 주성분 분석을 실시한 결과 주성분 1과 2가 총 분산의 약 95%를 설명하는 것으로 나타났다 <그림 1-2, 1-3>. 총 분산의 78.6%를 설명한 제 1주성분은 양의 방향으로 전반적맛, 쓴맛, 짠맛, 녹차, 해조비린, 감칠맛 등이 강하게 부하되었으며 동결건조, 열원적외선, 열풍건조, 열풍 잎 등이 이러한 특성이 강한 것으로 나타났다. 반면, 음의 방향으로는 단맛, 입자의 크기, 고소함 등이 강하게 부하되었으며 압출분쇄 시료, 특히 압출함초33.3% 시료가 이러한 특성이 강한 것으로 분석되었다. 제 2주성분은 17.7%의 설명력을 가졌으며 양의 방향으로 텃텃함, 전분, 탄내, 고소함 등이 강하게 부하하였다. 이들 특성과 상관관계가 높은 시료는 열풍줄기 시료로 나타났다.

본 실험 결과 천연 조미료 소재로 적합한 시료는 짠맛 강도가 강한 동결건조, 원적외선, 열풍건조 시료인 것으로 나타났으며 원적외선 시료의 경우 짠맛 강도가 강한 반면 쓴맛 등의 부정적 특성 강도는 상대적으로 타 시료에 비해 약하여 천연 조미료 소재로 가장 적합할 것으로 사료된다. 이들 시료는 전체적으로 해조비린 향미가 강하여 천연조미료 개발 시 이러한 부정적인 특성을 억제할 수 있는 소재를 함께 사용하는 것이 바람직할 것이라고 판단된다.

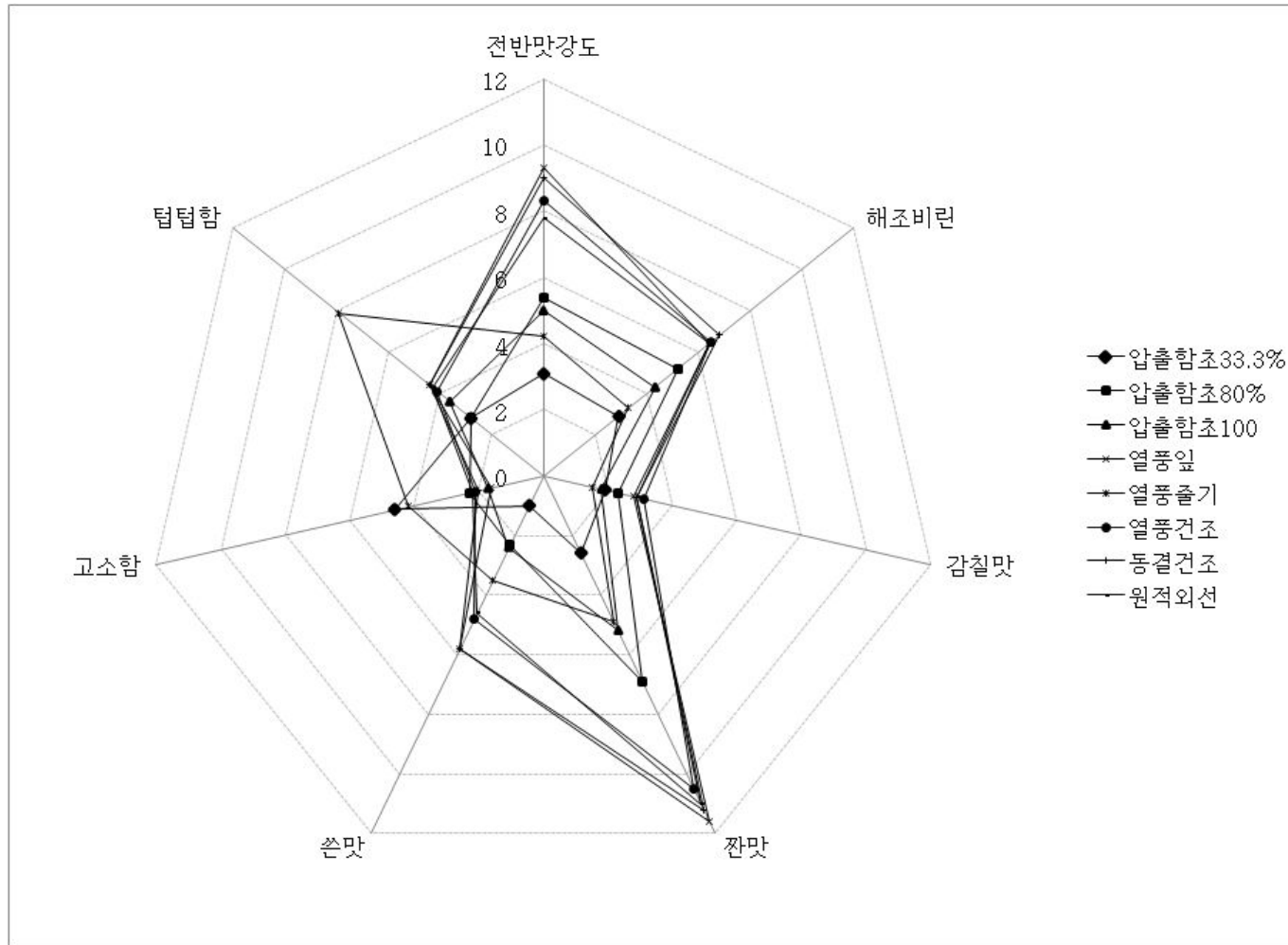
향후 본 조사에서 선정된 함초 분말 소재를 기반으로 하는 천연복합 조미료를 개발하여 실제 식품에 적용하여 조미 기능성을 분석할 예정이다.

<표1-1> 함초 분말 시료의 관능적 특성 용어, 정의, 표준시료 및 표준시료의 표준강도

	특성	정의	표준시료	강도
외관	입자크기	함초시료 입자의 크기	—	
향	한약재	한약재에서 느끼는 향	쌍화탕	12
맛 과 향미	전반적맛	함초시료의 전반적인 맛 강도	—	
	단맛	설탕수용액에서 느껴지는 단맛	설탕수용액 0.7%	4
	감칠맛	MSG수용액에서 느껴지는 감칠맛	MSG수용액 0.03%	3
	짠맛	소금에서 느껴지는 짠맛	NaCl수용액 0.05%	1
			NaCl수용액 0.1%	2
			NaCl수용액 0.2%	4
			NaCl수용액 0.4%	8
			NaCl수용액 0.6%	11
	NaCl수용액 0.8%	14		
	쓴맛	카페인수용액에서 느껴지는 쓴맛	카페인수용액 0.07%	9
	녹차	가루녹차에서 느껴지는 녹차향미	가루녹차(설록차)	10
	해조비린	해조류에서 느껴지는 비린향미	마른 다시마	13
전분	생 전분에서 느껴지는 향미	감자전분	3	
고소한	볶은곡물에서 느껴지는 향미	미숫가루	11	
탄	곡식태운 향미	밀가루태운 것	8	
뒷맛	텃텃함	입안에서 남는 건조하고 가루와 같은 느낌	—	

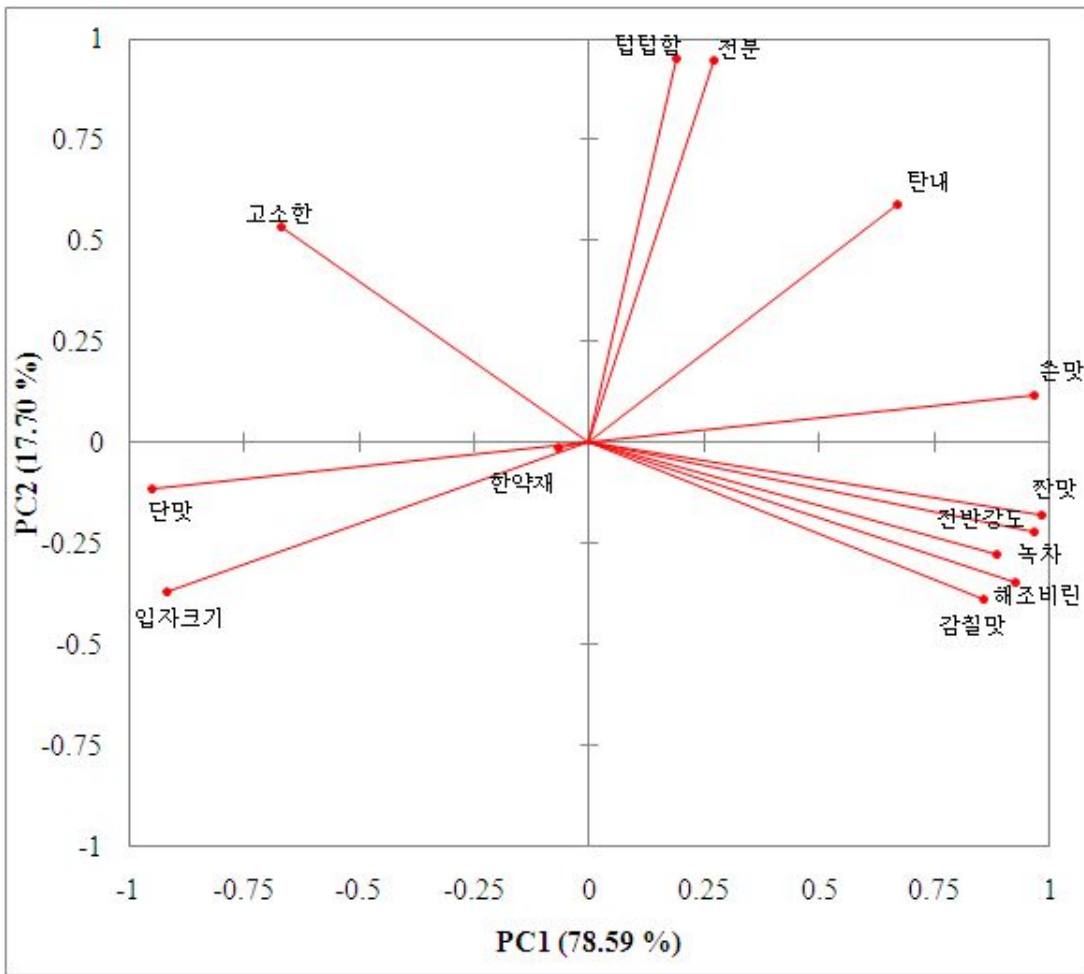
<표1-2> 7종의 함초 분말 시료의 관능적 특성 강도 평균값

	입자크기	전반적 맛강도	한약재	녹차	해조비 린	단맛	감칠맛	짠맛	쓴맛	고소함	전분	탄	텃텃함
압출함초33.3%	<u>9.1f</u>	3.1a	1.8a	3.8a	2.9a	<u>2.4c</u>	1.9ab	2.6a	1.0a	<u>4.6c</u>	1.2a	1.4ab	2.8a
압출함초80%	4.7d	5.4c	2.9bc	4.2ab	5.2c	1.8b	2.3b	6.9c	2.3b	2.3b	1.0a	1.3ab	2.8a
압출함초100	7.8e	5.0bc	<u>3.3c</u>	4.9bc	4.3b	1.8b	1.8ab	5.2b	2.4b	1.7ab	0.8a	1.8bc	3.6b
열풍잎	1.2a	<u>9.3f</u>	2.5b	6.1d	<u>6.4d</u>	1.4ab	<u>2.8c</u>	<u>11.6e</u>	<u>5.8e</u>	1.6a	2.0b	<u>2.1c</u>	4.4b
열풍줄기	2.1c	4.2b	2.7bc	3.9a	3.3a	1.7ab	1.5a	4.9b	3.5c	4.2c	<u>5.5e</u>	<u>2.1c</u>	<u>7.9b</u>
열풍건조	1.8bc	8.3de	2.3ab	5.6cd	<u>6.5d</u>	1.4ab	<u>3.1c</u>	10.5d	4.8d	2.1ab	2.9d	1.4ab	4.1b
동결건조	1.1a	9.0e	2.4ab	<u>6.8e</u>	<u>6.8d</u>	1.3a	<u>2.9c</u>	<u>11.2de</u>	<u>5.8e</u>	2.0ab	2.7cd	0.9a	4.4b
원적외선	1.3ab	7.8d	2.5b	6.0d	<u>6.4d</u>	1.3a	<u>2.9c</u>	<u>11.0de</u>	4.6d	2.2ab	2.3bc	1.8bc	4.3b

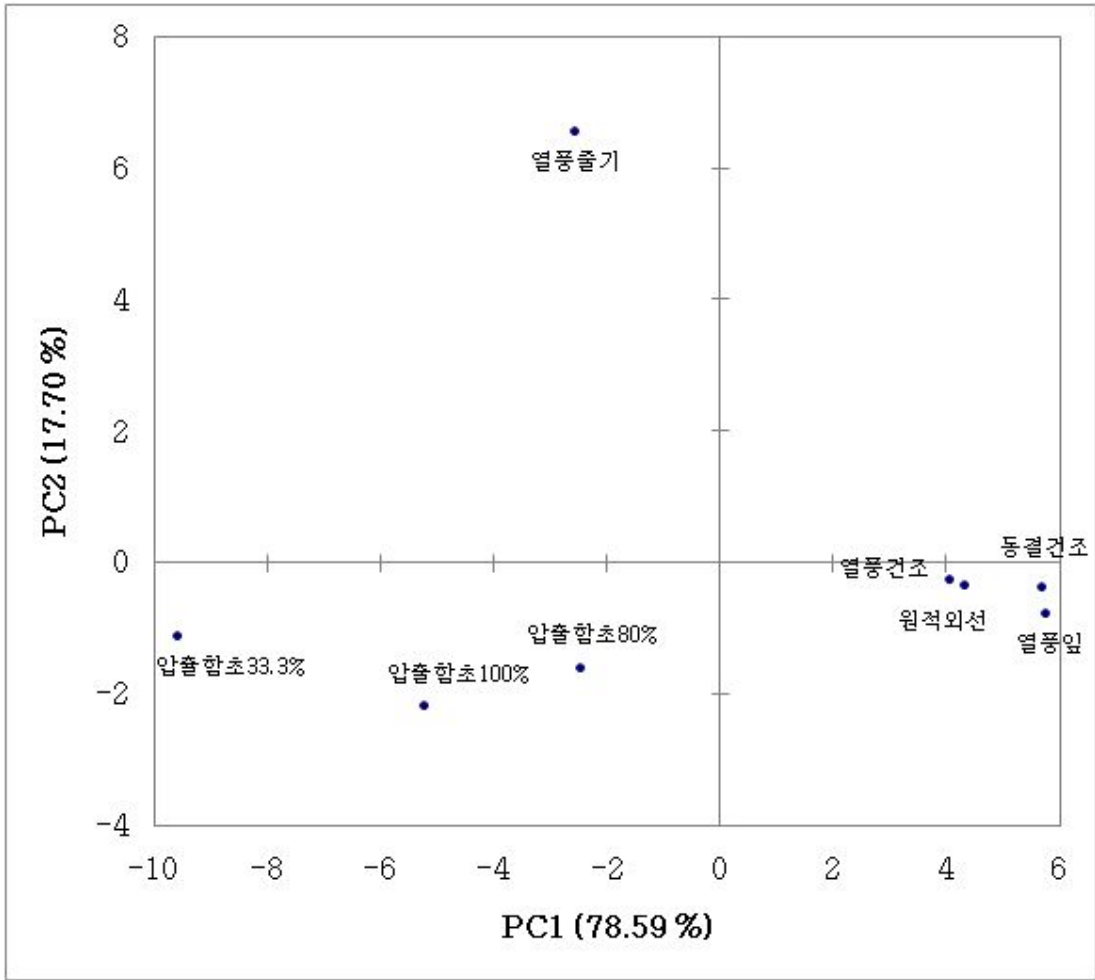


<그림1-1> 7종의 함초 분말 시료의 주요 관능적 특성 강도에 대한 방사형 그래프





<그림1-2> 함초 분말 시료의 관능적 특성에 대한 주성분 분석 도표화



<그림1-3> 7종의 함초 분말 시료에 대한 주성분 분석 도표화

## 2. 함초의 부위와 습식 조리법 종류에 따른 생 함초의 관능적 특성 분석

### (1) 실험 방법

#### 가. 시료

생함초(대신 함초)를 잎과 줄기 부위로 나누어 각각의 함초를 조리하지 않은 상태, 데치기(30초), 데치기(3분), 삶기(5분), 찌기(5분), 찌기(8분)등의 습식 조리법을 적용하여 총 12종의 함초 시료를 준비한 후 관능적 특성을 분석하기 위해 묘사분석이 진행되었다. <표 2-1>

#### 나. 묘사분석 패널

평소 묘사분석에 관심이 있는 20대 여대생 9명 (서울여자대학교)이 참여하였다.

#### 다. 묘사분석 절차

묘사분석은 훈련과 본 실험으로 나뉘어졌다. 훈련 과정 중에는 우선 NaCl대비 생함초 시료의 짠맛 강도를 정확하게 평가하기 위해 NaCl 수용액에 대한 짠맛 강도 표준 척도를 개발하였다. 즉, NaCl 수용액 0.4%, 0.6%, 0.8%, 1.0%, 1.3%, 1.6%에 대해 0-14점 강도 척도를 이용하여 인지되는 짠맛 강도를 평가하여 각 NaCl 농도의 강도를 3점, 5점, 7점, 9점, 12점, 14점으로 정하였다. 이렇게 확립된 짠맛 척도에 대해 묘사분석 패널이 완벽하게 숙지하도록 훈련하였다. 짠맛에 대한 표준 척도를 숙지한 후 묘사분석 패널은 12종의 함초 시료에 대해 관능적 특성 용어를 개발하였으며 개발된 관능적 특성 용어에 대한 정의, 각 정의에 해당하는 표준 시료 및 표준 강도를 확립하였다. 함초 시료에 대한 관능적 특성 및 표준시료는 <표 2-2>과 같다. 묘사분석 패널이 함초시료에 대한 평가를 분별성 (discriminability)과 재현성(reproducibility)있게 할 때까지 훈련은 계속 되었다.

본 실험은 훈련 과정 중에 개발된 관능적 특성과 이들에 대한 표준시료를 사용하여 12종의 함초 시료에 대한 강도 평가를 실시하였다. 함초 시료에 대한 1반복 실험은 총 2세션으로 구성되었으면 첫 세션에서는 조리법이 다양한 함초 잎 6개 시료를, 두 번째 세션에서는 함초 줄기 6개 시료를 평가하였다. 각 함초 잎, 줄기 시료는 패널에게 10g씩 White Cup(60cc)에 제공하였다. 패널은 설문지를 받고 각 시료마다 표준시료와 비교하여 관능적 특성 강도를 평가하였으며 0-14점 항목 척도를 사용하였다. 시료의 제시 순서는 윌리엄라틴 방법으로 제공하였으며, 패널은 실험 1시간 전 음식물의 섭취를 금하였고 평가시 패널간 대화를 금하였다. 각 시료와 시료 사이는 물로 입안을 헹구었다. 총 4회 반복하여 실험을 진행하였다.

#### 라. 통계분석

12종 시료의 관능적 특성 강도가 유의적으로 차이가 있는지 분석하기 위해 분산분

석 및 Duncan의 다시오 검정을 실시하였다. 또한 조리법 별 함초 잎, 줄기 시료의 관능적 특성을 시각적으로 요약하기 위해 주성분 분석을 실시하였다. 전자의 분석은 SPSS를 사용하였고 후자의 분석은 XLSTAT을 사용하였다.

## (2) 실험 결과

### 가. 신선 함초의 관능적 특성 용어

12종의 생함초에 대해 묘사분석을 실시한 결과 외관 1개(녹색정도), 향 3개(한약재, 암모니아, 가루녹차), 맛과 향미 9개(짠맛, 단맛, 감칠맛, 쓴맛, 구수한, 녹차, 해조비린, 삶은 호박잎, 풀), 뒷맛 2개 (약초, 뚝은맛), 그리고 질감 2개(아삭함, 질긴 정도) 특성 등 총 17개 특성이 개발되었다.

### 나. 신선 함초의 부위별, 조리법 별 관능적 특성

12종의 조리된 생함초 시료간 17개의 관능적 특성 강도의 차이가 있는 지 분산 분석을 실시한 결과 모든 관능적 특성에서 함초 시료간 유의적 차이( $p < 0.05$ )가 있는 것으로 나타났다. 즉, 습식 조리법에 따라 생 함초의 관능적 특성이 달라지는 것으로 분석되었다 <표 2-3>. 잎, 줄기에 따라서 감칠맛과 쓴맛, 아삭함, 질긴정도가 다르게 나타났으며, 줄기 부위가 잎 부위에 비해서 강도가 상대적으로 더 강한 것으로 분석 되었다<그림 2-1>.

생, 데치기, 삶기, 찌기의 조리법에 따라서는 감칠맛, 짠맛, 쓴맛, 구수한 향미, 해조비린 향미, 뿌리 나물, 뚝음, 아삭함, 질긴정도의 특성에서 다르게 평가되었다.

조리되지 않은 생 함초는 쓴맛, 뿌리나물, 뚝은 맛, 아삭함, 질긴정도의 특성이 더 강하게 나타났으나, 다른 시료에 비해 상대적으로 감칠맛, 구수한 향미, 해조비린 향미의 특성이 약한 것으로 분석되었다. 이와는 반대로 삶기로 조리한 경우, 쓴맛과 뿌리나물, 뚝은 맛, 아삭함, 질긴정도가 조리되지 않은 생 함초에 비해 월등히 감소한 것을 볼 수 있다.

찌기의 습식 조리법은 4가지의 조리법과는 다르게 감칠맛과 구수한 향미의 특성이 조리했을 때 좋아지는 특성으로 높게 평가된 것에 반해 반대로 감소되었으면 하는 짠맛, 해조비린 향미 2가지 특성도 같이 강한 것으로 나타났다.

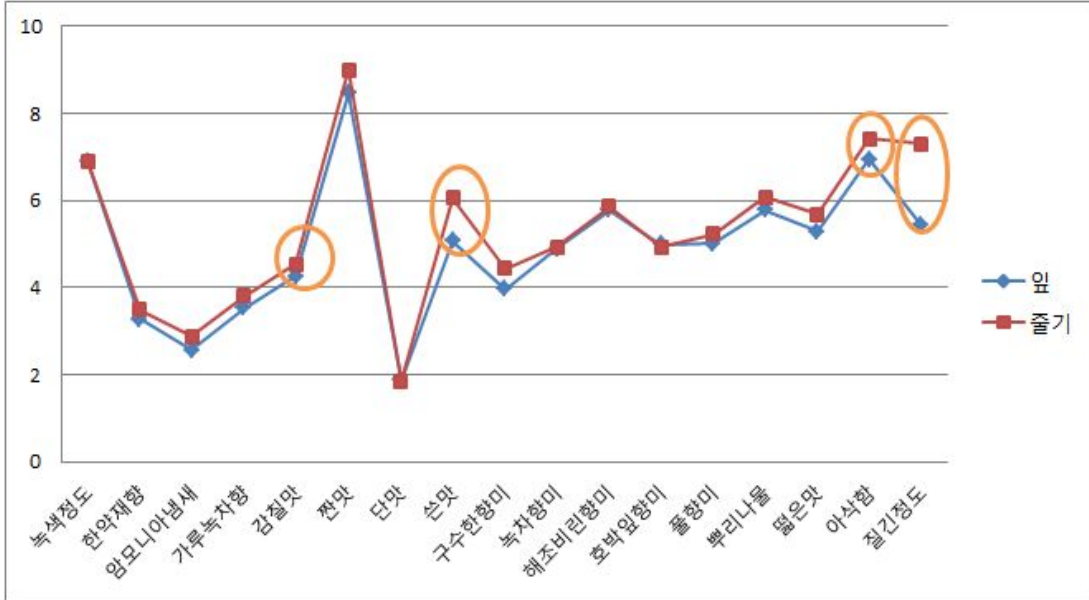
습식 조리 시, 암모니아냄새와 짠맛을 제외한 모든 관능적 특성에 영향을 주는 것으로 보여진다. 아삭함과 뚝은 맛, 뿌리나물, 풀향미, 쓴맛의 특성은 습식 조리 했을 때 감소된 것으로 분석되며, 그 외의 특성들은 습식 조리 시에 증가하는 것으로 나타났다.

<표 2-1> 습식 조리법에 따른 생 함초 시료 종류

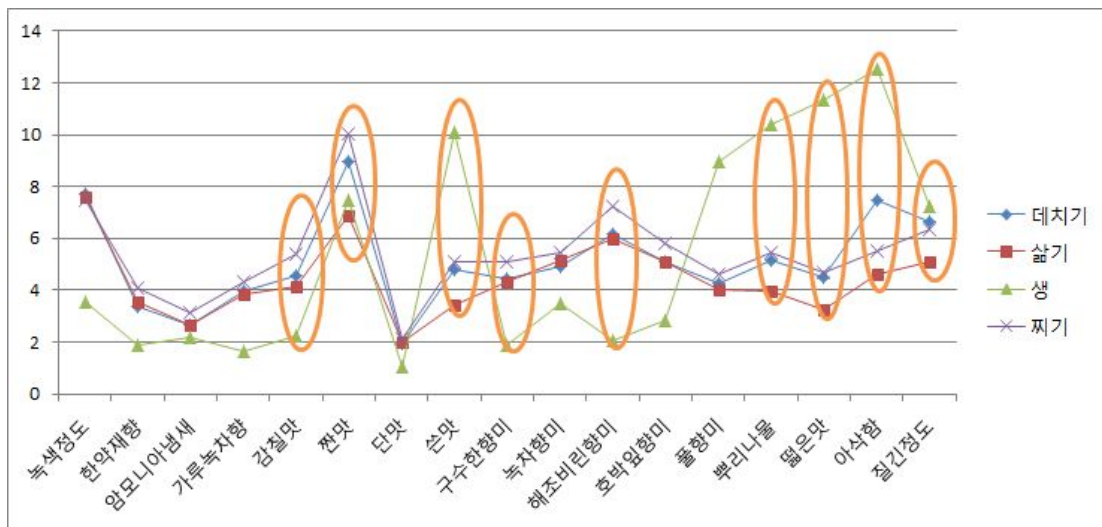
부위	조리법
잎	데치기(30s)
	데치기(3m)
	삶기(5m)
	찌기(5m)
	찌기(8m)
	생(0s)
줄기	데치기(30s)
	데치기(3m)
	삶기(5m)
	찌기(5m)
	찌기(8m)
	생(0s)

<표 2-2>. 습식 조리된 생함초(잎, 줄기) 시료의 관능적 특성 용어, 정의, 표준시료 및 표준시료의 표준강도

	특성	정의	표준시료	점수
외관	녹색정도	조리된 생함초 시료의 녹색정도	—	7
향	한약재향	한약재에서 느껴지는 향	쌍화탕	9
	암모니아냄새	암모니아 수용액에서 느껴지는 향	암모니아 수용액 0.04%	5
	가루녹차향	인스턴트 가루 녹차에서 느껴지는 향	인스턴트가루녹차(설록차)	6
맛	감칠맛	MSG 수용액에서 느껴지는 감칠맛	MSG 수용액 0.03%	3
	짠맛	소금에서 느껴지는 짠맛	NaCl수용액 0.4%	3
			NaCl수용액 0.6%	5
			NaCl수용액 0.8%	7
			NaCl수용액 1.0%	9
			NaCl수용액 1.3%	12
NaCl수용액 1.6%	14			
단맛	설탕수용액에서 느껴지는 단맛	설탕 수용액 0.7%	3	
쓴맛	카페인수용액에서 느껴지는 쓴맛	카페인수용액 0.07%	6	
향미	구수한 향미	우린 옥수수차에서 느껴지는 구수한 향미	우린 옥수수차 (동서 옥수수차)	8
	녹차향미	우린 녹차에서 느껴지는 녹차향미	우린 녹차 (동원 보성녹차)	10
	해조비린향미	불린 미역에서 느껴지는 비린향미	불린미역	12
	호박잎향미	삶은 호박 잎에서 느껴지는 향미	삶은 호박잎	7
	풀향미	깎은 잔디에서 느껴지는 향미	깎은 잔디	7
뒷맛	약초	뿌리나물(더덕, 도라지 등)에서 느껴지는 약초 느낌	도라지	12
	뽀름	밤껍질에서 느껴지는 뽀름 맛	밤껍질	14
질감	아삭함	샐러리에서 느껴지는 아삭함	샐러리	14
	질긴 정도	함초에서 느껴지는 질긴 정도	—	7



<그림 2-1> 앞, 줄기 구분에 따른 17개의 관능적 특성 강도에 대한 꺾은선 그래프



<그림 2-2> 습식 조리법에 따른 17개의 관능적 특성 강도에 대한 꺾은선 그래프

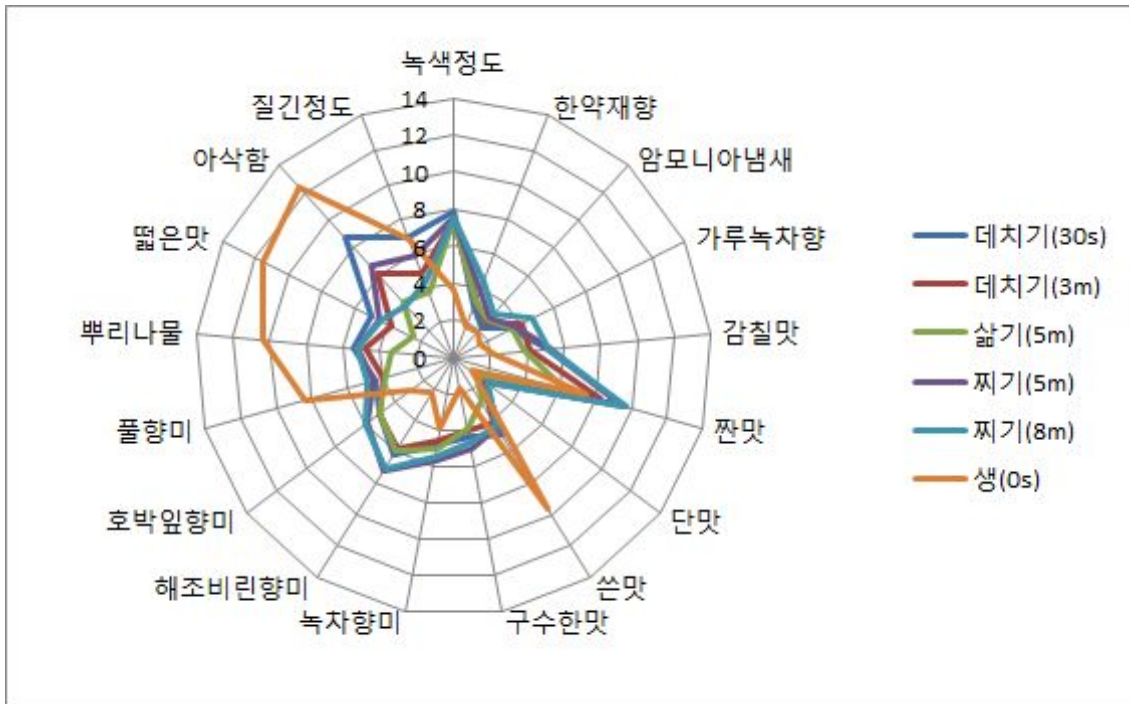
<표 2-3> 12종의 습식 조리법에 따른 생함초 시료의 관능적 특성 강도 평균값

부위	조리법	녹색정도	한약재향	암모니아 냄새	가루녹차향	감칠맛	짠맛	단맛	쓴맛
잎	데치기(30s)	7.83 <sup>c</sup>	2.97 <sup>b</sup>	2.17 <sup>ab</sup>	3.42 <sup>b</sup>	4.97 <sup>cde</sup>	9.58 <sup>de</sup>	2.06 <sup>cd</sup>	4.94 <sup>bcd</sup>
	데치기(3m)	7.47 <sup>c</sup>	3.36 <sup>bc</sup>	2.64 <sup>abc</sup>	4.14 <sup>bcd</sup>	4.14 <sup>bc</sup>	8.28 <sup>bc</sup>	1.94 <sup>cd</sup>	4.19 <sup>b</sup>
	삶기(5m)	7.42 <sup>c</sup>	3.19 <sup>bc</sup>	2.67 <sup>abc</sup>	3.53 <sup>b</sup>	3.78 <sup>b</sup>	6.36 <sup>a</sup>	1.64 <sup>bc</sup>	2.81 <sup>a</sup>
	찌기(5m)	7.56 <sup>c</sup>	3.86 <sup>cde</sup>	2.83 <sup>bc</sup>	3.69 <sup>bc</sup>	5.28 <sup>de</sup>	9.42 <sup>cde</sup>	2.19 <sup>cd</sup>	4.42 <sup>bc</sup>
	찌기(8m)	7.50 <sup>c</sup>	4.42 <sup>e</sup>	3.22 <sup>c</sup>	4.78 <sup>d</sup>	5.14 <sup>cde</sup>	9.67 <sup>de</sup>	2.25 <sup>d</sup>	4.36 <sup>bc</sup>
	생(0s)	3.67 <sup>a</sup>	1.83 <sup>a</sup>	1.89 <sup>a</sup>	1.58 <sup>a</sup>	2.17 <sup>a</sup>	7.44 <sup>ab</sup>	1.17 <sup>a</sup>	9.61 <sup>e</sup>
줄기	데치기(30s)	8.00 <sup>c</sup>	3.42 <sup>bc</sup>	2.72 <sup>abc</sup>	3.78 <sup>bc</sup>	4.44 <sup>bcd</sup>	9.47 <sup>cde</sup>	1.92 <sup>cd</sup>	5.53 <sup>cd</sup>
	데치기(3m)	7.44 <sup>c</sup>	3.64 <sup>bcd</sup>	2.94 <sup>bc</sup>	4.53 <sup>cd</sup>	4.75 <sup>bcde</sup>	8.50 <sup>bcd</sup>	1.81 <sup>cd</sup>	4.53 <sup>bc</sup>
	삶기(5m)	7.72 <sup>c</sup>	3.92 <sup>cde</sup>	2.61 <sup>abc</sup>	4.11 <sup>bcd</sup>	4.47 <sup>bcd</sup>	7.42 <sup>ab</sup>	2.33 <sup>d</sup>	4.08 <sup>b</sup>
	찌기(5m)	8.06 <sup>c</sup>	3.78 <sup>cde</sup>	3.19 <sup>c</sup>	4.11 <sup>bcd</sup>	5.56 <sup>e</sup>	10.42 <sup>e</sup>	2.28 <sup>d</sup>	5.81 <sup>d</sup>
	찌기(8m)	6.81 <sup>b</sup>	4.25 <sup>de</sup>	3.33 <sup>c</sup>	4.67 <sup>d</sup>	5.64 <sup>e</sup>	10.58 <sup>e</sup>	1.83 <sup>cd</sup>	5.83 <sup>d</sup>
	생(0s)	3.44 <sup>a</sup>	1.89 <sup>a</sup>	2.47 <sup>abc</sup>	1.67 <sup>a</sup>	2.31 <sup>a</sup>	7.53 <sup>ab</sup>	0.97 <sup>a</sup>	10.61 <sup>e</sup>

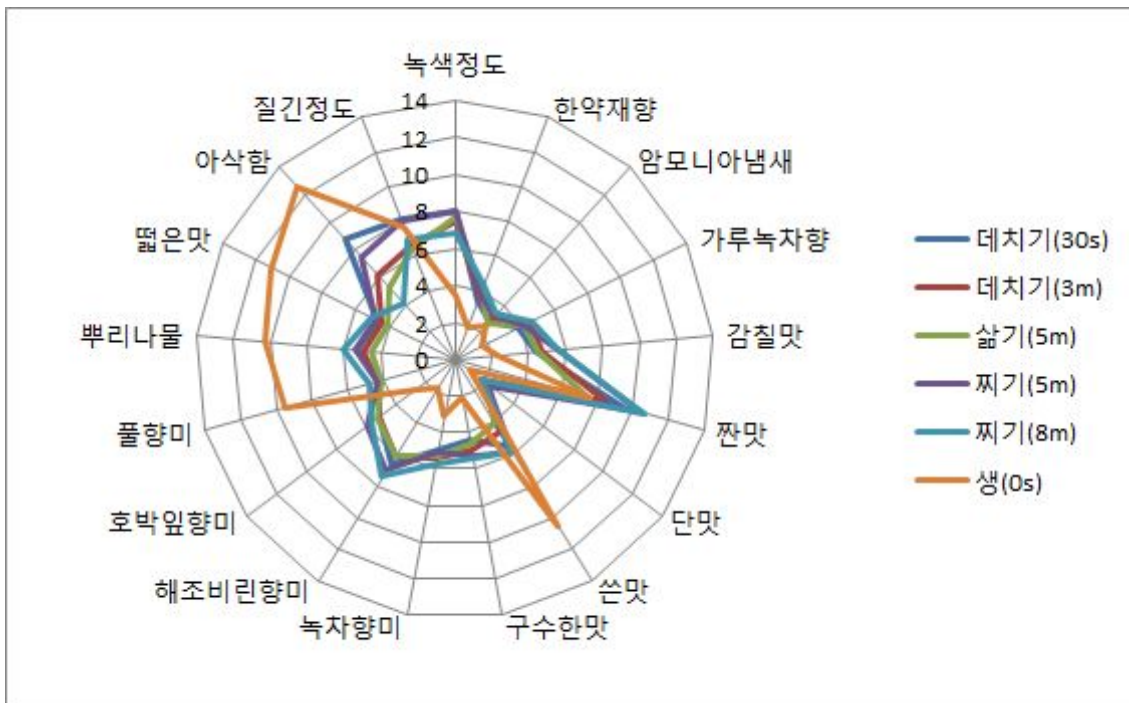


<표 2-3> 12종의 습식 조리법에 따른 생함초 시료의 관능적 특성 강도 평균값(계속)

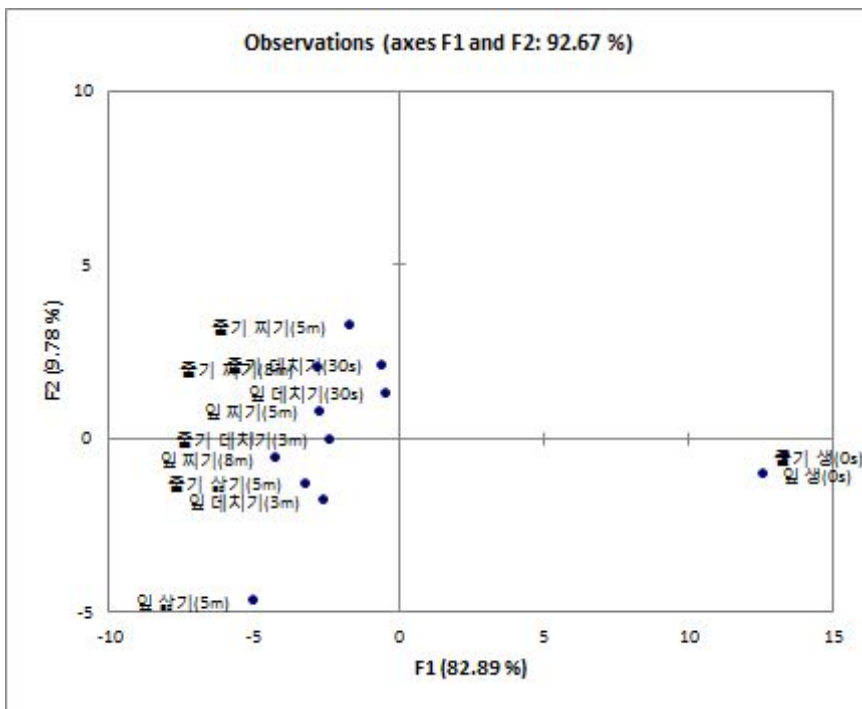
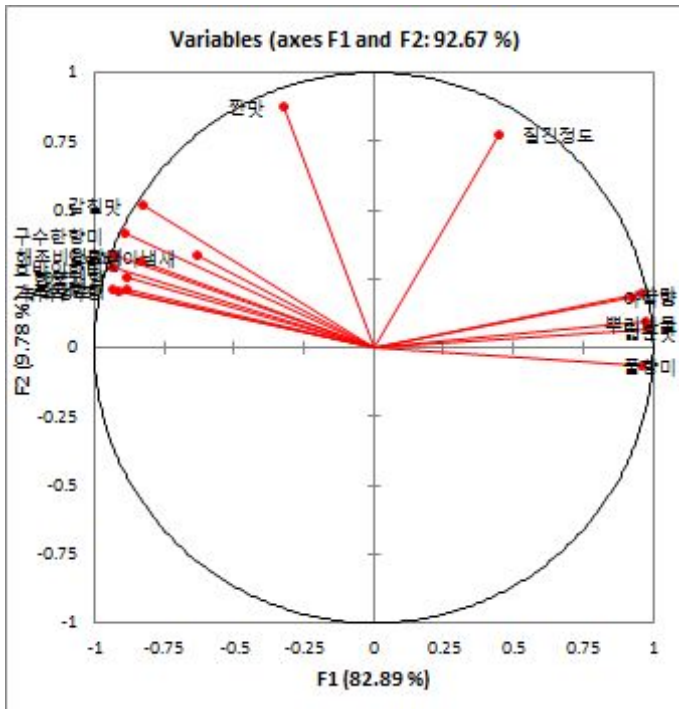
부위	조리법	구수한향미	녹차향미	해조비린 향미	호박잎향미	풀향미	뿌리나물	뽕은맛	아삭함
잎	데치기(30s)	4.39 <sup>bcd</sup>	4.78 <sup>bcd</sup>	6.19 <sup>bc</sup>	5.00 <sup>b</sup>	4.39 <sup>ab</sup>	5.42 <sup>bc</sup>	4.94 <sup>b</sup>	8.75 <sup>e</sup>
	데치기(3m)	4.06 <sup>bc</sup>	4.56 <sup>bc</sup>	5.78 <sup>b</sup>	5.06 <sup>bc</sup>	4.00 <sup>ab</sup>	4.86 <sup>bc</sup>	3.83 <sup>b</sup>	6.08 <sup>c</sup>
	삶기(5m)	3.97 <sup>b</sup>	5.06 <sup>cd</sup>	5.94 <sup>b</sup>	5.03 <sup>bc</sup>	3.83 <sup>a</sup>	3.44 <sup>a</sup>	2.44 <sup>a</sup>	3.97 <sup>a</sup>
	찌기(5m)	5.03 <sup>de</sup>	5.64 <sup>d</sup>	7.28 <sup>d</sup>	5.81 <sup>bc</sup>	4.50 <sup>ab</sup>	5.28 <sup>bc</sup>	4.47 <sup>b</sup>	6.64 <sup>c</sup>
	찌기(8m)	4.67 <sup>bcd</sup>	5.42 <sup>cd</sup>	7.14 <sup>d</sup>	6.00 <sup>c</sup>	4.86 <sup>b</sup>	5.22 <sup>bc</sup>	4.39 <sup>b</sup>	3.81 <sup>a</sup>
	생(0s)	1.72 <sup>a</sup>	3.92 <sup>ab</sup>	2.28 <sup>a</sup>	3.00 <sup>a</sup>	8.39 <sup>c</sup>	10.42 <sup>d</sup>	11.58 <sup>c</sup>	12.44 <sup>f</sup>
줄기	데치기(30s)	4.42 <sup>bcd</sup>	5.00 <sup>cd</sup>	6.56 <sup>bcd</sup>	5.14 <sup>bc</sup>	4.22 <sup>ab</sup>	5.33 <sup>bc</sup>	4.64 <sup>b</sup>	8.78 <sup>e</sup>
	데치기(3m)	4.92 <sup>cde</sup>	5.39 <sup>cd</sup>	6.14 <sup>b</sup>	5.14 <sup>bc</sup>	4.39 <sup>ab</sup>	5.00 <sup>bc</sup>	4.47 <sup>b</sup>	6.19 <sup>c</sup>
	삶기(5m)	4.64 <sup>bcd</sup>	5.28 <sup>cd</sup>	6.08 <sup>b</sup>	5.17 <sup>bc</sup>	4.17 <sup>ab</sup>	4.50 <sup>ab</sup>	4.06 <sup>b</sup>	5.28 <sup>b</sup>
	찌기(5m)	5.28 <sup>de</sup>	5.08 <sup>cd</sup>	7.06 <sup>cd</sup>	5.89 <sup>bc</sup>	4.36 <sup>ab</sup>	5.36 <sup>bc</sup>	4.83 <sup>b</sup>	7.47 <sup>d</sup>
	찌기(8m)	5.36 <sup>e</sup>	5.69 <sup>d</sup>	7.44 <sup>d</sup>	5.58 <sup>bc</sup>	4.78 <sup>ab</sup>	6.00 <sup>c</sup>	5.06 <sup>b</sup>	4.17 <sup>a</sup>
	생(0s)	2.06 <sup>a</sup>	3.08 <sup>a</sup>	1.83 <sup>a</sup>	2.67 <sup>a</sup>	9.47 <sup>d</sup>	10.31 <sup>d</sup>	11.03 <sup>c</sup>	12.58 <sup>f</sup>



<그림 2-3> 습식 조리법 6종류에 따른 생 함초잎 시료의 주요 관능적 특성 강도에 대한 방사형 그래프



<그림 2-4> 습식 조리법 6종류에 따른 생 함초 줄기 시료의 주요 관능적 특성 강도에 대한 방사형 그래프



<그림 2-5> 습식 조리법에 따른 생함초 시료의 관능적 특성에 대한 주성분 분석 도표화

<그림 2-6> 12종의 습식 조리법에 따른 생함초 시료에 대한 주성분 분석 도표화



### 3. 조리 시 조미소재로서 소금(NaCl) 대체 가능성 분석

#### (1) 실험 방법

가. 시료

(1) 쇠고기국

(가) 재료 및 분량(1 시료당)

쇠고기 양지 300g, 물 3L, 대파 흰 대 18g, 통마늘 15g, 생강 17g (총 약 2.5L)

(나) 만드는 방법

- ① 양지를 찬물에 30분 담가 핏물을 제거한다.
- ② 냄비에 물을 붓고 대파 흰대, 통마늘, 생강, 양지를 넣고 센 불에서 끓이고 거품을 걷어 낸다.
- ③ 끓기 시작하면 불을 줄이고 한 시간 은근히 끓이면서 중간에 거품을 거뒀다.
- ④ 다 끓으면 식혀서 건더기는 건지고 육수를 체에 거른다.

(다) 실험설계

테스팅 시료는 보온병 500ml에 담아 한 시료씩 30~40g 따라서 제공. 입가심 물질 생수. 시료의 제공은 윌리엄라틴 방법으로 제공. 설문지를 주고 각 sample마다 표준시료와 비교하여 어느 정도의 강도인지 체크 실시. 관능 부스에서 빨간불을 켜고 실시하고 외관은 마지막으로 자연광로 평가하게 함. 실험을 3회 반복.

(2) 시금치 나물

(가) 재료 및 분량(1 시료당)

데친 시금치 600g, 물 3L, 다진 파 13g, 다진 마늘 13g, 참기름 10g, 참깨 3g

(나) 만드는 방법

- ① 시금치는 뿌리를 다듬어 씻는다.
- ② 끓는 물에 40초 데친 다음, 찬 물에 씻어 꼭 짠다.
- ③ 양념을 넣고 무친다.

(다) 실험설계

테스팅 시료는 30~40g 제공. 입가심 물질 생수, 햇반. 시료의 제공은 윌리엄라틴 방법으로 제공. 설문지를 주고 각 sample마다 표준시료와 비교하여 어느 정도의 강도인지 체크 실시. 실험을 3회 반복.

(3) 부추 전

(가) 재료 및 분량(1시료당)

전 처리한 부추150g, 밀가루 300g, 물 450g, 식용유 32.5g (2.5g 코팅)

(나) 만드는 방법

- ① 부추를 씻어서 4cm로 썬다.
- ② 부추와 밀가루 물을 섞는다.
- ③ 기름 ¼ 작은술을 팬에 두르고 코팅을 한 뒤 팬에 기름 2큰술을 넣고 반죽을 넣은 뒤에 2분 구워 내고 뒤집어 기름1 큰술 넣은 후 2 분 더 굽는다.

(다) 실험설계

테스팅 시료는 20g 제공. 입가심 물질 생수, 햇반. 시료의 제공은 윌리엄라틴 방법으로 제공. 설문지를 주고 각 sample마다 표준시료와 비교하여 어느 정도의 강도인지 체크 실시. 실험을 3회 반복.

(4) 감자채 볶음

(가) 재료 및 분량(1 시료당)

채 썬 감자 480g, 채 썬 양파 20g, 식용유 32.5g (2.5g 코팅)

(나) 만드는 방법

- ① 감자를 감자칼로 껍질을 제거 후 채칼로 채 썬다.
- ② 채썬 감자를 물에 담구어 놓는다.
- ③ 양파는 0.5cm로 채 썬다.
- ④ 기름 1큰술과 양념을 섞어 채소를 넣어 버무린다.
- ⑤ ¼ 작은술을 팬에 넣고 코팅한 후 식용유 1 큰술을 넣고 중간 불에서 3분 볶은 다음 식용유 1큰술을 넣고 1분 더볶는다.

(다) 실험설계

테스팅 시료는 20g 제공. 입가심 물질 생수, 햇반. 시료의 제공은 윌리엄라틴방법으로 제공. 설문지를 주고 각 sample마다 표준시료와 비교하여 어느 정도의 강도인지 체크 실시. 관능 부스에서 빨간불을 켜고 실시하고 외관은 마지막으로 자연광로 평가하게 함. 실험을 3회 반복.

(5) 허브맛 솔트

(가) 재료 및 분량(전체)

전분 12g, 후추 1.5g, 바질 1.5g, 한주 소금, 함초 분말

(나) 만드는 방법

- ① 재료를 다 저울로 잰 후 food processor에 갈아준다.
- ② 약포지에 0.02g 잰 후 제공한다. (삼겹살 2\*4.5cm 크기로 같이 제공.)

(다) 실험설계

테스팅 시료는 0.02g 3포 제공. 입가심 물질 생수, 핫반. 시료의 제공은 윌리엄라틴 방법으로 제공. 설문지를 주고 각 sample마다 표준시료와 비교하여 어느 정도의 강도인지 체크 실시. 관능 부스에서 빨간불을 켜고 실시하고 외관은 마지막으로 자연 광로 평가하게 함. 실험을 3회 반복.

나. 묘사분석 패널

평소 묘사분석에 관심이 있는 20대 여대생 6명 (서울여자대학교)이 참여하였다.

다. 묘사분석 절차

묘사분석은 훈련과 본 실험으로 나뉘어졌다. 훈련 과정 중에는 우선 NaCl대비 생함 초 시료의 짠맛 강도를 정확하게 평가하기 위해 NaCl 수용액에 대한 짠맛 강도 표준 척도를 개발하였다. 즉, NaCl 수용액 0.4%, 0.6%, 0.8%, 1.0%, 1.3%, 1.6% (범위 확인)에 대해 0-14점 강도 척도를 이용하여 인지되는 짠맛 강도를 평가하여 각 NaCl 농도의 강도를 3점, 5점, 7점, 9점, 12점, 14점으로 정하였다. 이렇게 확립된 짠맛 척도에 대해 묘사분석 패널이 완벽하게 숙지하도록 훈련하였다. 짠맛에 대한 표준척도를 숙지한 후 묘사분석 패널은 12종의 함초 시료에 대해 관능적 특성 용어를 개발하였으며 개발된 관능적 특성 용어에 대한 정의, 각 정의에 해당하는 표준 시료 및 표준 강도를 확립하였다. 함초 시료에 대한 관능적 특성 및 표준 시료는 <표 3-1, 표 3-2, 표 3-3, 표 3-4, 표 3-5>과 같다. 묘사분석 패널이 함초시료에 대한 평가를 분별성 (discriminability)과 재현성(reproducibility)있게 할 때까지 훈련은 계속 되었다.

본 실험은 훈련 과정 중에 개발된 관능적 특성과 이들에 대한 표준시료를 사용하여 12종의 함초 시료에 대한 강도 평가를 실시하였다. 함초 시료에 대한 1반복 실험은 총 2세션으로 구성되었으면 첫 세션에서는 조리법이 다양한 함초 잎 6개 시료를, 두 번째 세션에서는 함초 줄기 6개 시료를 평가하였다. 각 함초 잎, 줄기 시료는 패널에게 10g씩 White Cup(60cc)에 제공하였다. 패널은 설문지를 받고 각 시료마다 표준시료와 비교하여 관능적 특성 강도를 평가하였으며 0-14점 항목 척도를 사용하였다. 시료의 제시 순서는 윌리엄라틴 방법으로 제공하였으며, 패널은 실험 1시간 전 음식물의 섭취를 금하였고 평가시 패널간 대화를 금하였다. 각 시료와 시료 사이는 물로 입안을 행구었다. 총 4회 반복하여 실험을 진행하였다.

라. 통계분석

12종 시료의 관능적 특성 강도가 유의적으로 차이가 있는지 분석하기 위해 분산분석 및 Duncan의 다시오 검정을 실시하였다. 또한 조리법 별 함초 잎, 줄기 시료의 관능적 특성을 시각적으로 요약하기 위해 주성분 분석을 실시하였다. 전자의 분석은 SPSS를 사용하였고 후자의 분석은 XLSTAT을 사용하였다.

## (2) 실험 결과

가. 신선 함초의 관능적 특성 용어

12종의 생함초에 대해 묘사분석을 실시한 결과 외관 1개(녹색정도), 향 3개(한약재, 암모니아, 가루녹차), 맛과 향미 9개(짠맛, 단맛, 감칠맛, 쓴맛, 구수한, 녹차, 해조비린, 삶은 호박잎, 풀), 뒷맛 2개(약초, 뚝은맛), 그리고 질감 2개(아삭함, 질긴정도) 특성 등 총 17개 특성이 개발되었다. <표 3-1>

나. 신선 함초의 부위별, 조리법 별 관능적 특성

12종의 조리된 생함초 시료간 17개의 관능적 특성 강도의 차이가 있는 지 분산 분석을 실시한 결과 모든 관능적 특성에서 함초 시료간 유의적 차이( $p < 0.05$ )가 있는 것으로 나타났다. 즉, 습식 조리법에 따라 생 함초의 관능적 특성이 달라지는 것으로 분석되었다 <표>. 잎, 줄기에 따라서 감칠맛과 쓴맛, 아삭함, 질긴정도가 다르게 나타났으며, 줄기 부위가 잎 부위에 비해서 강도가 상대적으로 더 강한것으로 분석되었다<그림 >.

생, 데치기, 삶기, 찌기의 조리법에 따라서는 감칠맛, 짠맛, 쓴맛, 구수한 향미, 해조비린 향미, 뿌리 나물, 뚝음, 아삭함, 질긴정도의 특성에서 다르게 평가되었다.

조리되지 않은 생 함초는 쓴맛, 뿌리나물, 뚝은 맛, 아삭함, 질긴정도의 특성이 더 강하게 나타났으나, 다른 시료에 비해 상대적으로 감칠맛, 구수한 향미, 해조비린 향미의 특성이 약한 것으로 분석되었다. 이와는 반대로 삶기로 조리한 경우, 쓴맛과 뿌리나물, 뚝은 맛, 아삭함, 질긴정도가 조리되지 않은 생 함초에 비해 월등히 감소한 것을 볼 수 있다.

찌기의 습식 조리법은 4가지의 조리법과는 다르게 감칠맛과 구수한 향미의 특성이 조리했을 때 좋아지는 특성으로 높게 평가된 것에 반해 반대로 감소되었으면 하는 짠맛, 해조비린 향미 2가지 특성도 같이 강한것으로 나타났다.

습식 조리시, 암모니아냄새와 짠맛을 제외한 모든 관능적 특성에 영향을 주는 것으로 보여진다. 아삭함과 뚝은 맛, 뿌리나물, 풀향미, 쓴맛의 특성은 습식 조리 했을 때 감소된 것으로 분석되며, 그 외의 특성들은 습식 조리시에 증가하는 것으로 나타났다.



<표 3-1> 함초 분말을 첨가한 쇠고기국 시료의 관능적 특성 용어, 정의, 표준시료 및 표준시료의 표준강도

	특성	정의	표준시료	점수
외관	탁한 정도	쇠고기 국에서 느껴지는 탁한 정도	—	7
	부유물	함초 가루가 떠있는 정도	—	7
향	한약재향	한약재에서 느껴지는 향	쌍화탕	9
	흙 냄새	흙에서 느껴지는 향	흙	4
	고기 누린내	삶은 고기에서 느껴지는 냄새	삶은 쇠고기	7
맛과 향미	전반적인 맛	소고기국에서 전반적으로 느껴지는 맛 강도	—	7
	짠맛	소금에서 느껴지는 맛	NaCl 수용액 0.1% 40g	2
			NaCl 수용액 0.2% 40g	4
			NaCl 수용액 0.4% 40g	8
			NaCl 수용액 0.6% 40g	11
			NaCl 수용액 0.8% 40g	14
	쓴맛	카페인수용액에서 느껴지는 쓴맛	카페인 수용액 0.07% 40g	9
	감칠 맛	MSG수용액에서 느껴지는 감칠 맛	MSG 수용액 0.3% 40g	7
헤조비린향미	해조류(다시마) 에서 느껴지는 향	불린 다시마	10	
입안 감촉	텃텃함	우린 녹차(티백)에서 느껴지는 텃텃함	우린 녹차 40g	7
	코팅감	쇠고기국을 먹었을 때 기름이 입안을 감싸는 감촉	—	7
	무게감	쇠고기국을 먹었을 때 입안의 묵직한 정도	—	7
뒷맛 [후미]	후미 신맛	구연산 수용액에서 느껴지는 신맛 정도	구연산 수용액 0.05% 40g	9

<표 3-2> 함초 분말을 첨가한 시금치 나물 시료의 관능적 특성 용어, 정의, 표준시료 및 표준시료의 표준강도

	특성	정의	표준시료	점수
외관	녹색 정도	시금치 나물에서 느껴지는 녹색 정도	—	7
맛과 향미	전반적인 맛	시금치 나물에서 전반적으로 느껴지는 맛 강도	—	7
	짠맛	소금에서 느껴지는 맛	NaCl 수용액 0.1% 30g	2
			NaCl 수용액 0.2% 30g	4
			NaCl 수용액 0.4% 30g	8
			NaCl 수용액 0.6% 30g	11
			NaCl 수용액 0.8% 30g	14
	단맛	설탕 수용액 5%에서 느껴 지는 단맛	설탕 수용액 5% 30g	7
	감칠 맛	MSG수용액에서 느껴지는 감칠 맛	MSG 수용액 0.03%	7
	해조비린향미	해조류(다시마) 에서 느껴지 는 향미	불린 다시마	10
	마늘 향미	다진 마늘에서 느껴지는 마늘 향미	다진 마늘 2.5ml	12
	파 향미	다진 파에서 느껴지는 파 향 미	다진 파 2.5ml	9
고소한 향미	참기름에서 느껴지는 고소한 향미	참기름 5ml	11	
풍부한 향미	시금치 나물에서 느껴지는 다양한 향미	—	7	
입안 감촉	떫떫함	우린 녹차(티백)에서 느껴지 는 떫떫함	우린 녹차 30g	7
뒷맛 [후미]	후미 쓴맛	카페인수용액에서 느껴지는 쓴맛	카페인 수용액 0.07% 30g	7
질감	아삭함	샐러리에서 느껴지는 아삭함	샐러리	14

<표 3-3> 함초 분말을 첨가한 부추전 시료의 관능적 특성 용어, 정의, 표준시료 및 표준시료의 표준강도

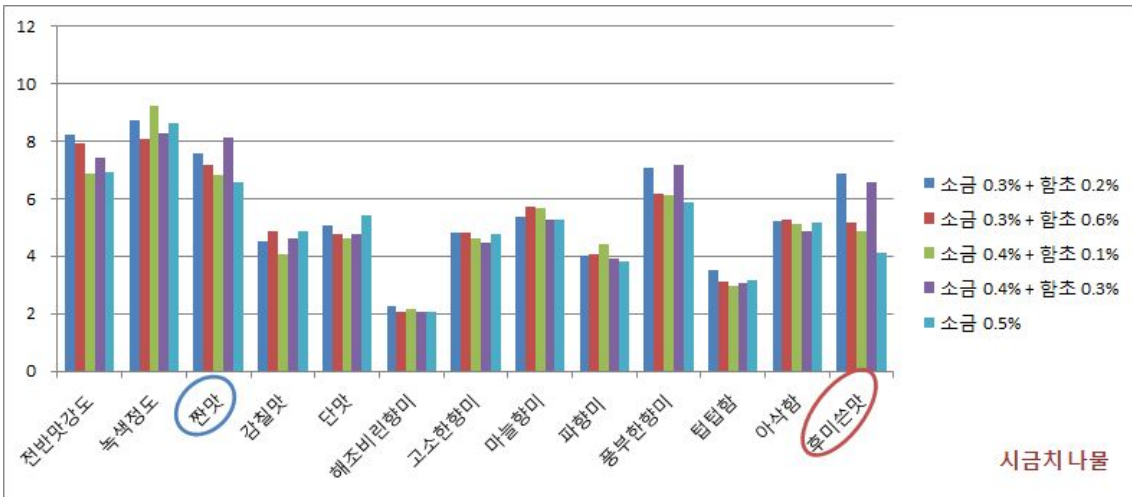
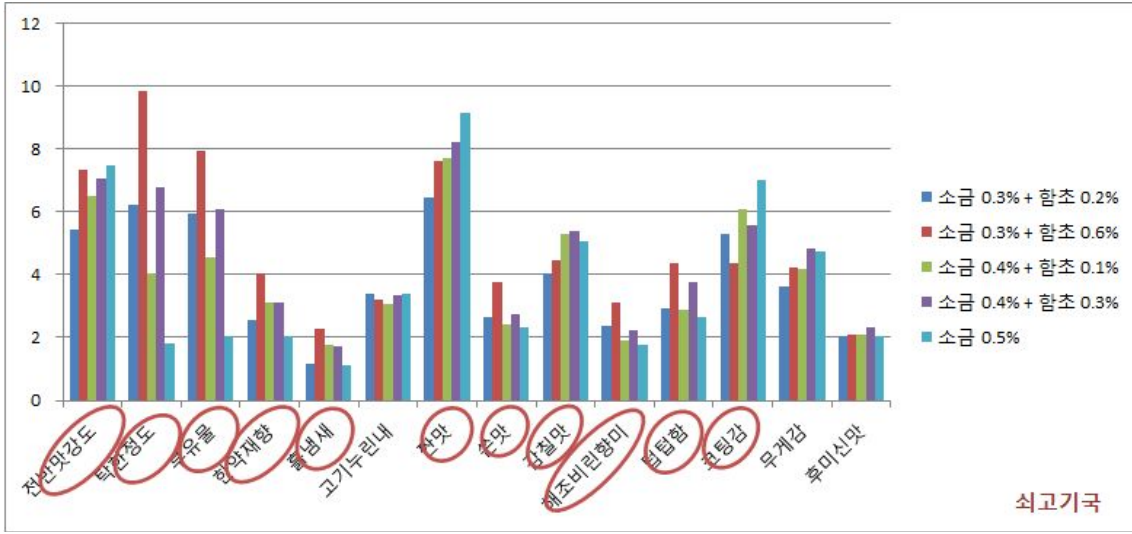
	특성	정의	표준시료	점수
외관	노르스름한 정도	부추전에서 느껴지는 녹색 정도	—	7
맛과 향미	전반적인 맛	부추전에서 전반적으로 느껴지는 맛 강도	—	7
	짠맛	소금에서 느껴지는 맛	NaCl 수용액 0.1% 30g	2
			NaCl 수용액 0.2% 30g	4
			NaCl 수용액 0.4% 30g	8
			NaCl 수용액 0.6% 30g	11
			NaCl 수용액 0.8% 30g	14
	단맛	설탕 5% 수용액에서 느껴지는 단맛	설탕 5% 수용액 30g	7
	감칠 맛	MSG수용액에서 느껴지는 감칠 맛	MSG 수용액 0.07% 30g	7
	해조비린향미	해조류(다시마)에서 느껴지는 향미	불린 다시마	10
	밀가루 향미	밀가루에서 느껴지는 향미	밀가루 5ml	9
고소한 향미	전에서 느껴지는 고소한 향미	—	7	
풀향미	부추와 같은 풀 채소를 먹을 때 느껴지는 풀 향미	—	7	
입안 감촉	느끼함	부추전에서 느껴지는 느끼함	—	7
뒷맛 [후미]	후미 쓴맛	카페인수용액에서 느껴지는 쓴맛	카페인 수용액 0.07% 30g	7
질감	바삭함	부추전에서 느껴지는 바삭함	—	7

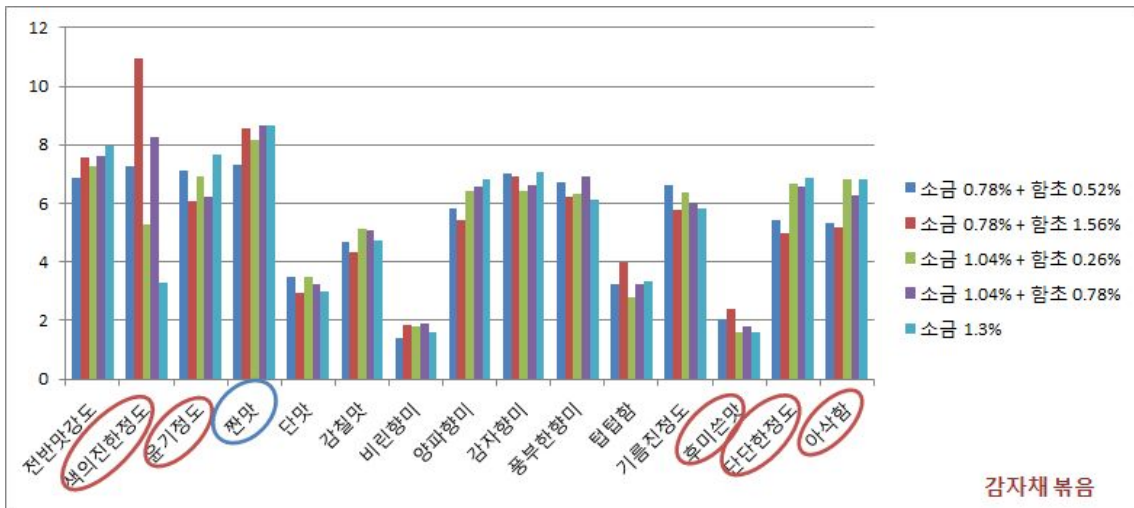
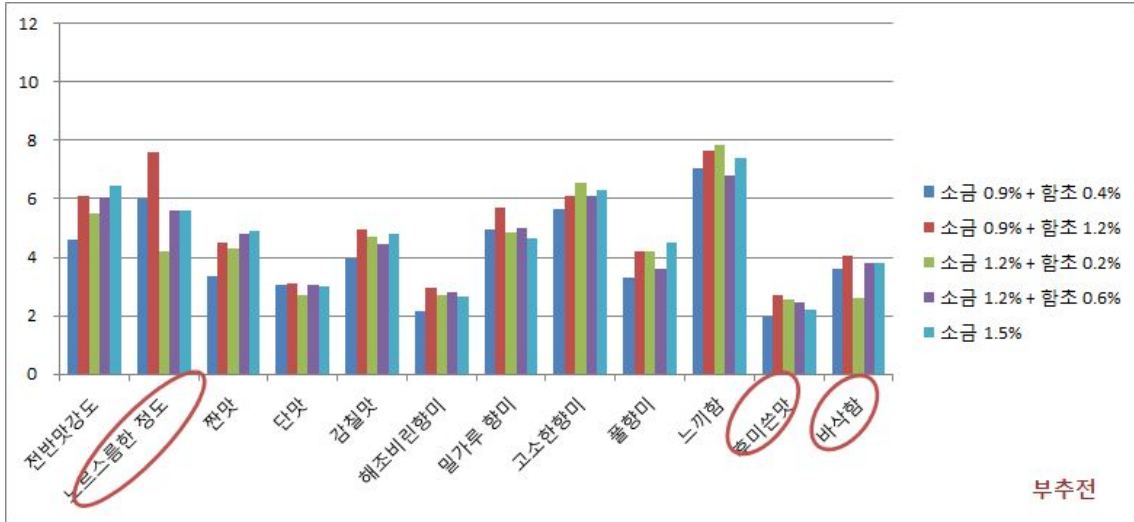
<표 3-4> 함초 분말을 첨가한 감자채볶음 시료의 관능적 특성 용어, 정의, 표준시료 및 표준시료의 표준강도

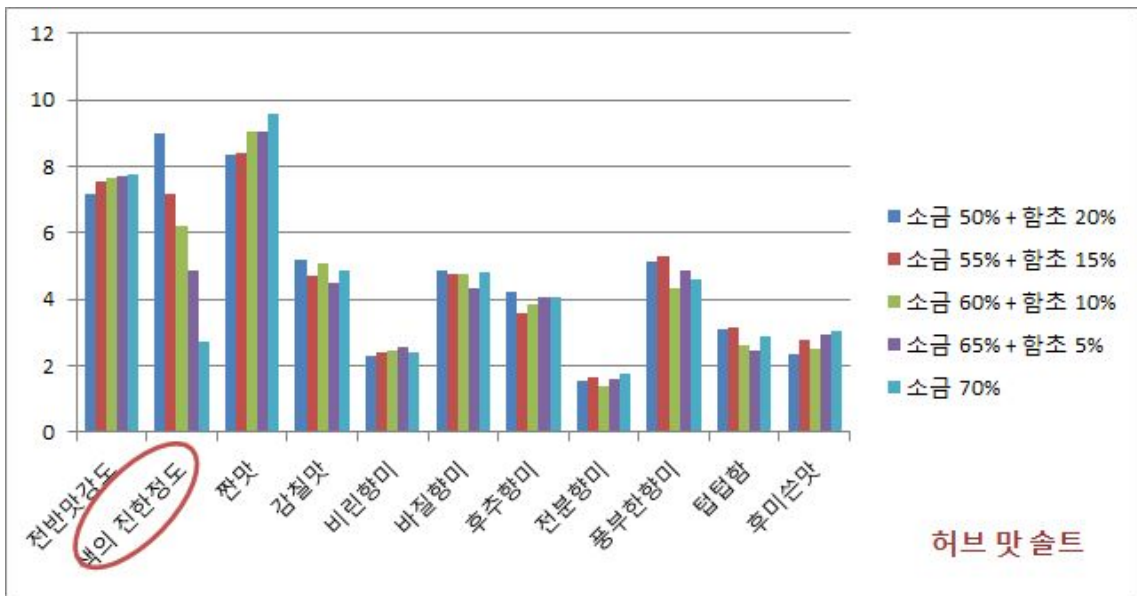
	특성	정의	표준시료	점수
외관	색의 진한 정도	감자채볶음에서 느껴지는 색의 진한 정도	—	7
	윤기 정도	감자채볶음에서 느껴지는 윤기 정도	—	7
맛과 향미	전반적인 맛	감자채볶음에서 전반적으로 느껴지는 맛 강도	—	7
	짠맛	소금에서 느껴지는 맛	NaCl 수용액 0.1% 30g	2
			NaCl 수용액 0.2% 30g	4
			NaCl 수용액 0.4% 30g	8
			NaCl 수용액 0.6% 30g	11
			NaCl 수용액 0.8% 30g	14
	단맛	설탕 5% 수용액에서 느껴지는 단맛	설탕 5% 수용액 30g	7
	감칠 맛	MSG수용액에서 느껴지는 감칠 맛	MSG 수용액 0.07% 30g	7
	비린향미	해조류(다시마) 에서 느껴지는 향미	불린 다시마	10
	감자 향미	삶은 감자에서 느껴지는 익은 감자 향미	익은 감자	12
	양파 향미	볶은 양파에서 느껴지는 익은 양파 향미	볶은 양파	12
풍부한 향미	감자채볶음에서 느껴지는 다양하고 풍부한 향미	—	7	
입안 감촉	텃텃함	감자전분에서 느껴지는 텃텃함	감자전분 5ml	14
	기름진 정도	감자채볶음에서 느껴지는 기름진 정도	—	7
뒷맛 [후미]	후미 쓴맛	카페인수용액에서 느껴지는 쓴맛	카페인 수용액 0.07% 30g	7
질감	아삭함	감자채볶음에서 느껴지는 아삭함	셀러리	14
	단단한 정도	감자채볶음에서 느껴지는 단단한 정도	—	7

<표 3-5> 함초 분말을 첨가한 허브맛솔트 시료의 관능적 특성 용어, 정의, 표준시료 및 표준시료의 표준강도

	특성	정의	표준시료	점수
외관	색의 진한 정도	허브맛솔트 분말에서 느껴지는 색의 진한 정도	—	7
맛과 향미	전반적인 맛	허브맛솔트 분말에서 전반적으로 느껴지는 맛 강도	—	7
	짠맛	소금에서 느껴지는 맛	NaCl 수용액 0.1% 30g	2
			NaCl 수용액 0.2% 30g	4
			NaCl 수용액 0.4% 30g	8
			NaCl 수용액 0.6% 30g	11
			NaCl 수용액 0.8% 30g	14
	감칠 맛	MSG수용액에서 느껴지는 감칠 맛	MSG 수용액 0.07% 30g	7
	비린향미	해조류(다시마)에서 느껴지는 향미	불린 다시마	10
	바질 향미	바질 가루에서 느껴지는 바질 향미	바질 가루 2g (이마트 바질)	9
	후추 향미	후추 에서 느껴지는 후추 향미	후추 1g (순후추 100%)	10
전분 향미	감자 전분에서 느껴지는 전분 향미	감자 전분 20g	3	
풍부한 향미	허브맛솔트 분말에서 느껴지는 다양하고 풍부한 향미	—	7	
입안 감촉	텃텃함	입안에서 남는 건조하고 가루와 같은 느낌	—	7
뒷맛 [후미]	후미 쓴맛	카페인수용액에서 느껴지는 쓴맛	카페인 수용액 0.07% 30g	7









#### 4. 함초 분말을 적용한 한식 레시피 개발 내용 및 결과

##### (1) 함초 적용 레시피 목차

국- 떡국, 들깨 감자 국, 어묵 국, 쇠고기 무 국, 오징어 국, 조개탕, 알 탕  
찌개- 동태찌개, 순두부찌개, 청국장찌개  
전골- 불고기 전골, 곱창 전골, 두부전골  
조림- 삼치조림, 알 감자조림, 두부조림,  
찜- 복령 두부 찜, 새우젓 달걀 찜, 깻잎 고추 찜  
구이- 더덕구이, 연근 찹쌀 구이, 대합구이  
전- 애호박 전, 표고 전, 고사리 전, 깻잎 전, 꿀 전  
부침개- 녹두 전, 부추 전, 감자 전  
편육- 양지머리 편육, 돼지고기 편육  
볶음- 청경채 버섯볶음, 감자채 볶음, 낙지 볶음, 어묵 볶음

\*\*다음의 조리서를 참고하여 레시피를 변형 적용함.

4천만이 검색한 오늘의 요리/중앙북스/이혜영/2010  
자연이 가득한 채식요리/리스컴/이양지/2008  
한복선의 우리음식/리스컴/한복선/2009  
건강 밀반찬/동아일보사/요리,한국의맛 연구회/2004  
최경숙의 매일 반찬/동아일보사/최경숙/2009  
한국조리/자연을 담음 엄마의 밥상/북센스/동네부엌/2010

국- 떡국, 들깨 감자 국, 어묵 국, 쇠고기 무 국, 오징어 국, 조개탕, 알 탕

## 1. 떡국

(가) 재료 및分量(2-3인분)

쇠고기(양지) 100g, 떡국용 떡 3줌(300g), 달걀 1알, 대파 1대, 다진 마늘 1/2큰술, 김1/2장, 국 간장 1큰술, 다시마 물 5컵, 후추 약간, 소금 3.5g, 함초 분말가루 1.5g

(나) 만드는 방법

- ① 쇠고기는 찬물에 담가 핏물을 뺀 다음 냄비에 넣고 달달 볶다가 다시마 물을 부어 끓인다.
- ② 육수가 끓는 동안 달걀 흰자와 노른자 지단을 부쳐서 곱게 채 썰어 놓는다.
- ③쇠고기가 충분히 익고 육수가 우러나도록 팔팔 끓으면 떡을 넣는다.
- ④떡이 익으면서 떠오르면 대파와 다진 마늘을 넣고 국 간장, 소금, 후추로 간을 맞추고 다음 달걀 지단과 김 채를 올린다.

## 2. 들깨감자 국

(가) 재료 및分量(2인분)

들깨가루(껍질을 잘 제거한 것) 3/4컵, 감자(또는 토란) 1개, 함초 분말가루 1.5g  
새 송이 버섯(중간크기)2개, 소금 3.5g,  
다시마국물: 5\*5cm 다시마 3-4장, 물 3컵

(나) 만드는 방법

- ① 들깨가루는 체에 받쳐 껍질을 제거하고 고운 가루만 받는다.  
(껍질을 말끔히 제거한 것을 구입하면 편리하다.)
- ② 깨끗한 행주로 다시마의 흰 가루를 털어내고 잡티를 닦은 다음 물을 붓고 중불에서 끓이다가 끓으면 다시마를 건진다.
- ③감자는 깨끗이 씻어서 사방 1.5cm 정도 크기로 네모지게 썰고, 새 송이 버섯도 씻어서 감자와 비슷한 크기로 썬다.
- ④다시마 국물에 감자를 넣고 끓이다가 감자가 거의 익을 무렵 버섯을 넣고 들깨가루를 넣어 고소한 맛을 낸다.
- ⑤국물이 끓어오르면 국자나 수저로 위에 노랗게 뜨는 들깨기름을 깔끔하게 걷어내고 소금으로 간한다.

### 3. 어묵 탕

(가) 재료 및分量(7-8인분)

모듬 어묵 1봉지(400g), 게맛살, 삶은 달걀 각 2개, 썩갯 1줌(80g), 다진 파o국 간장 각 2큰 술, 다진 마늘 1/2큰 술, 후추 약간, 소금4g. 함초 분말가루 1g

국물: 무 1/4개(150g), 대파 1대, 양파 1/2개, 국물용 멸치 1줌(30g), 건 새우 1/2줌(15g), 다시마(사방 10cm 크기)1장, 물 10컵

양념 간장: 진간장 2큰 술, 다진 파 1큰 술, 설탕 1/2작은 술, 맛 술 1작은 술

(나) 만드는 방법

- ① 큰 냄비에 물 10컵과 나머지 국물 재료를 넣고 센 불에서 끓이다가 국물이 끓기 시작하면 다시마는 건지고 중 불로 줄여서 10분간 더 끓인다.
- ② 끓는 물에 꼬치는 썩 어묵을 넣고 살짝 데쳐서 기름기를 뺀다.
- ③ 1의 국물이 다 끓으면 멸치와 건 새우는 체에 걸러낸다.
- ④ 국물에 다진 마늘, 국 간장, 어묵, 게맛살, 삶은 달걀을 넣고 어묵이 부드러워질 때까지 끓인 다음 소금과 후추로 간을 하고 다진 파와 썩갯을 엷는다.

### 4. 쇠고기뭇국

(가) 재료 및分量(4인분)

쇠고기(양지) 150g, 무1/3개(200g), 대파 1/2대, 다시마 물 6컵, 소금4g, 함초 분말가루 1g, 식용유 약간

고기양념: 국 간장o다진 마늘 각 1큰 술, 생강가루 1/2작은 술, 참기름 1/2큰 술, 후추 약간

(나) 만드는 방법

- ① 쇠고기는 종이 타월로 눌러 핏물을 제거하고 양념으로 무쳐 간이 배도록 20분 이상 재워둔다.
- ② 달군 냄비에 식용유를 두르고 양념한 쇠고기를 달달 볶다가 쇠고기가 익기 시작하면 무를 넣고 함께 볶는다.
- ③ 무가 투명하게 익기 시작하면 다시마 물(다시마포함)을 붓고 끓이다가 끓기 시작하면 다시마는 건지고 중 불이나 약 불로 줄여서 20분 이상 푹 끓인다.
- ④ 국물이 충분히 끓으면 대파를 넣고 소금으로 간을 맞춘 다음 한소끔 더 끓인다.
- ⑤ 3에서 건진 다시마를 얇게 채 썰어 고명으로 올린다.

## 5. 오징어 국

(가) 재료 및 분량(4인분)

오징어 2마리(400g), 무 1/4개(150g), 양파 1/2개, 대파 1/2대, 두부 1/3모, 멸치 육수 6컵

양념장: 고춧가루 2.5큰 술, 고추장 1/2큰 술, 국 간장 1큰 술, 다진 마늘 각 1큰 술, 소금 4g, 함초 분말가루 1g

(나) 만드는 방법

- ① 냉동 오징어는 자연 해동해서 깨끗이 씻은 다음 몸통 안쪽에 사선으로 칼집을 내고 먹기 좋은 크기로 채 썬다.
- ② 양념장을 만들어서 무와 골고루 버무린 다음 냄비에 넣고 볶다가 멸치 육수를 붓고 끓인다.
- ③ 끓기 시작하면 중불로 줄여서 5분간 무가 푹 무르도록 끓이다가 구수한 냄새가 나면 오징어를 넣고 다시 살짝 끓인다.
- ④ 오징어가 하얗게 익었을 때 두부, 양파, 대파를 넣고 한소끔 더 끓인다.

## 6. 조개탕

(가) 재료 및 분량(3-4인분)

모시조개 20개(200g), 청양고추 1개, 홍 고추 1/2개, 쪽파 1대, 다진 마늘 2큰 술, 다시마 물 6컵, 소금 6.4g, 함초 분말 가루 1.6g, 후추 약간

(나) 만드는 방법

- ① 모시조개는 열은 소금물에 2-3시간 담가 해감 한 후 깨끗이 행군다.
- ② 냄비에 모시조개와 다시마 물을 붓고 조개가 입을 벌릴 때까지 끓인다.
- ③ 체에 면 보를 받치고 맑은 육수를 걸러내어 냄비에 조개, 다진 마늘과 넣고 5분간 중 불에서 끓인다.
- ④ 청양고추, 홍 고추를 넣고 살짝 끓인 다음 소금과 후추로 간을 맞추고 쪽파를 얹는다.

## 7. 알 탕

(가) 재료 및 분량(2인분)

명태 알(또는 대구 알) 200g, 미더덕 1/2줌(100g), 무 1/8개(75g), 콩나물 2줌(100g), 대파 1/2개, 청양고추 1개, 홍 고추 1개, 팽이버섯 1줌(80g), 멸치 육수 4컵, 소금 2.5g, 함초 분말가루 2.5g

매운탕 양념: 고춧가루o양파즙 각2큰 술, 국 간장o청주o새우젓o다진 마늘 각 1큰 술, 생강즙 1작은 술

(나) 만드는 방법

- ① 명태 알, 곤이, 미더덕은 열은 소금물에 헹궈서 체에 밭쳐놓는다.
- ② 분량대로 재료를 섞어 매운탕 양념을 만든다.
- ③ 멸치 육수에 무를 넣고 무가 투명해질 때까지 센 불로 끓이다가 명태 알, 곤이, 미더덕을 넣고 맛이 우러나도록 10분 정도 끓인다.
- ④ 콩나물과 매운탕 양념을 넣고 뚜껑을 덮은 채 한소끔 끓이다가 대파, 청양고추, 홍 고추, 미나리를 얹어 살짝 더 끓이고 소금으로 간을 맞춘다.

## 찌개- 동태찌개, 순두부찌개, 청국장찌개

### 1. 동태찌개

(가) 재료 및分量(4인분)

동태(대) 1마리(약800g), 무 1/5개(120g), 호박 1/3개, 두부 1/3모, 청양고추 2개, 홍 고추 1개, 대파 1대, 썩갯 1줌(50g), 멸치육수 7컵

양념장: 고추장 2큰 술, 고춧가루 3큰 술, 국 간장·청주·다진 마늘 각 1큰 술, 생강즙 1/2큰 술, 소금 4g, 함초 분말가루 4g, 양파 간 것 4큰 술, 후추 약간

(나) 만드는 방법

- ①分量대로 재료를 섞어 양념장을 만든다.
- ②냄비에 멸치 육수를 붓고 동태 머리와 무를 넣은 다음 양념장의 1/3을 넣고 끓인다.
- ③무가 투명하게 익으면 동태 토막과 알 또는 내장을 넣어 끓이다가 끓기 시작하면 중 불로 줄여 5분 이상 더 끓인다.
- ④동태가 완전히 익으면 나머지 양념장과 호박, 대파, 청양고추, 홍 고추를 넣은 다음 잠시 더 끓이다가 두부를 넣고 한소끔 끓인 뒤 마지막으로 썩갯을 넣는다.

### 2. 순두부찌개

(가) 재료 및分量(4인분)

순두부 1봉지(400g), 오징어 1/2마리(100g), 바지락 20개(200g), 각테일 새우 4마리, 소금 3.5g,

함초 분말가루 1.5g, 배추김치 1/2컵(150g), 대파 1/3대, 청양고추 1개, 달걀 노른자 1알, 참기름 1작은 술, 물 1.4컵, 고추기름 2큰 술, 고춧가루·새우젓 각 1큰 술, 다진 마늘 1/2큰 술

(나) 만드는 방법

- ①물1.5컵에 해감 시킨 바지락을 넣고 입이 벌어질 때까지 끓여서 바지락은 따로 건져놓고 바지락 육수는 체에 받쳐 담아놓는다.
- ②뚝배기를 달군 다음 고추기름과 고춧가루를 넣고 타지 않도록 살짝 볶다가 김치를 넣고 볶는다.
- ③1에서 만든 바지락 육수를 붓고 끓이다가 오징어, 새우, 바지락, 새우젓을 넣고 순두부를 숟가락으로 큼직하게 떠 넣어 팔팔 끓인다.
- ④끓어오르면 청양고추, 다진 마늘, 대파를 넣고 한소끔 더 끓이다가 달걀 노른자를 가운데 띄우고 참기름을 살짝 넣은 뒤 소금으로 간을 맞춘다.

### 3. 청국장찌개

(가) 재료 및分量(3-4인분)

청국장 200g, 배추김치 1줌(200g), 돼지 삼겹살 150g, 두부 1/4모, 대파 1/2대, 양파 1/3개, 홍 고추·청양고추 각1개, 멸치육수 2.5컵, 소금 3.5g, 함초 분말가루 1.5g

(나) 만드는 방법

- ① 배추김치와 양념으로 밀간 한 삼겹살에 멸치 육수를 붓고 끓인다.
- ② 끓으면서 김치가 익기 시작하면 청국장을 넣고 불을 줄여 끓이다가 두부와 양파를 넣는다.
- ③ 청국장이 골고루 퍼지고 양파가 투명하게 익으면 홍 고추와 청양고추를 넣고 한소끔 더 끓인다.
- ④ 마지막으로 대파를 넣고 소금으로 간을 맞춘다.

## 전골- 불고기 전골, 곱창 전골, 두부전골

### 1. 불고기 전골

(가) 재료 및分量(2인분)

쇠고기(양념한 불고기) 300g, 팽이버섯 20g, 느타리버섯 100g, 표고버섯 42g, 썩갯 50g, 배추 잎 80g, 다시마 국물 1L, 두부 100g, 파 75g, 마늘 12g, 생강즙 약간, 홍 고추 7g, 간장(재래간장) 18ml, 소금 3.5g, 함초 분말가루 1.5g

(나) 만드는 방법

- ① 먼저 다시마를 사방 10cm의 1장을 넣고 20분간 끓여 다시마국물을 준비한다.
- ② 느타리버섯은 먹기 좋게 찢어두고, 표고버섯을 채 썰어서 준비한다.
- ③ 배추 잎은 적당하게 채 썰고 두부도 썰어준다.
- ④ 끓은 육수에 재래간장과 마늘을 넣고 배추와 버섯을 돌려 넣고, 가운데 양념한 불고기를 올려준다.(불고기는 뭉쳐지지 않게 끓이면서 풀어줘야 퍽퍽해지지 않는다).
- ⑤ 국물이 끓어오르면 거품을 거두고 썩갯, 대파, 두부, 홍 고추를 올리고 마무리한다.

### 2. 곱창전골

(가) 재료 및分量(2인분)

소 곱창(삶은 소 곱창) 200g, 쇠고기(삶은 쇠고기) 50g, 느타리 버섯 40g, 애호박 70g, 당근 30g, 배추 40g, 썩갯 40g, 양파 60g, 우동 면 40g, 대파 35g, 간장 22g, 쇠고기 육수 400ml

양념 : 마늘 12g, 간장 22g, 고춧가루 4g, 소금 4g, 함초 분말가루 1g

(나) 만드는 방법

- ① 소 곱창은 소금, 밀가루로 주물러 깨끗하게 씻은 다음 물에 푹 삶아낸다.  
(소 곱창은 밀가루로 씻은 다음 곱창 주위에 있는 큰 덩어리의 기름을 적당하게 잘라낸다.)
- ② 쇠고기를 찬물에 담가 핏물을 뺀 후 물 1컵을 붓고 끓여 육수를 우려낸다.
- ③ 양파와 당근은 굵게 채 썰고(5x0.3x0.3cm), 애호박은 0.4~0.5cm 두께로 반달 썰기 한다.
- ④ 대파, 배추는 어슷하게 썰고 썩갯은 짧게 손으로 끊는다. 느타리버섯은 찢어 둔다.
- ⑤ 다진 마늘, 소금, 고춧가루, 간장을 섞어 양념을 만들어 삶은 내장과 고기는 작



게 썬 다음 만들어 놓은 양념을 반만 넣은 후 고루 주물러 양념한다.

⑥ 전골냄비에 내장과 고기, 채소, 우동 면을 골고루 담고 육수를 부은 다음 남은 양념을 마저 넣어 끓인다.

### 3. 두부전골

(가) 재료 및 분량(4인분)

두부 1모, 소금 조금, 녹말가루 3큰 술, 식용유 적당량, 채 썬 쇠고기 100g, 다진 쇠고기 50g, 마른 표고버섯 4장, 당근 1/3개, 무 1/6개, 실파 3뿌리, 미나리 10줄기, 잣·호두 조금씩,

고기 양념: 국 간장 2큰 술, 다진 파 2큰 술, 다진 마늘·참기름 1큰 술씩, 소금·후춧가루 조금씩

전골 국물: 물 4컵, 국 간장 4큰 술, 소금 3.5g, 함초 분말가루 1.5g

(나) 만드는 방법

① 두부는 3\*5cm 크기로 도톰하게 썰어 소금에 살짝 절인다. 물기가 묻어나오면 닦고 녹말가루를 묻혀 기름 두른 팬에 앞뒤로 노릇하게 지진다.

② 마른 표고버섯은 미지근한 물에 불려 잣만 채 썰고, 고기 양념을 만들어 표고버섯, 채 썬 고기, 다진 고기에 나누어 각각 양념한다.

③ 무와 당근은 5cm 길이로 굵게 채 썰고 실파는 5cm 길이로 썬다. 미나리는 10cm 길이로 썰어 끓는 물에 살짝 데친다.

④ 지진 두부 사이에 양념한 다진 쇠고기를 넣고 데친 미나리로 묶는다.

⑤ 냄비에 두부묶음과 채 썰어 양념한 쇠고기, 각각의 채소를 예쁘게 돌려 담고 전골 국물을 부은 뒤 소금과 국 간장으로 간해 끓이면서 먹는다. 재료가 익으면 잣과 호두를 띄운다.

## 조림- 삼치조림, 알 감자조림, 두부조림

### 1. 삼치조림

#### (가) 재료 및 분량

삼치 500g, 파(흰 부분) 10g, 실고추 약간, 생강즙 1작은 술, 식초 약간, 함초 분말 가루 5g

양념: 진간장 7큰 술, 설탕 2 1/2큰 술, 다진 마늘 2작은 술, 청주 3큰 술, 물 9큰 술

#### (나) 만드는 방법

- ① 삼치는 씻어 머리를 자르고, 4cm 길이로 토막을 내어 한 번만 씻는다.
- ② 파는 3cm길이를 채 썰고, 실고추는 짧게 썰며 생강즙을 만든다.
- ③ 1의 양념을 합하여 조림 장을 만든다.
- ④ 두꺼운 냄비의 1의 조림 장을 넣고 센 불에 올리고 끓기 시작하면 생선을 나란히 넣는다.
- ⑤ 다시 끓기 시작하면 파 채, 실고추, 생강즙을 얹은 후 뚜껑을 살짝 열고 중간 불에서 10-15분간 끓인다.
- ⑥ 그 후로는 뚜껑을 열고 약한 불에서 국물이 거의 없을 때까지 국물을 끼얹어 가며 천천히 조린다. 나중에 식초를 약간 넣는다.
- ⑦ 쟁첩이나 접시에 담아낸다.

### 2. 알 감자조림

#### (가) 재료 및 분량

알 감자 8개, 간장 5큰 술, 설탕 2큰 술, 맛 술 2큰 술, 현미 유 1큰 술, 조청 2큰 술, 참기름 0.5큰 술, 참깨 1작은 술, 함초 분말 가루 3g

#### (나) 만드는 방법

- ① 알 감자 8개를 깨끗하게 씻는다.
- ② 냄비에 1을 넣고 잠길 정도로 물을 부어 15분 정도 끓여 반쯤 익힌다.
- ③ 2에 간장 5큰 술, 설탕 2큰 술, 맛 술 2큰 술, 현미 유 1큰 술, 물 1컵을 넣고 중 불로 20분간 조린다. 알 감자가 완전히 익어 겉이 쪼글쪼글해지면 조청 2큰 술을 넣고 3분간 더 조린 다음 참기름을 넣고 불을 끈다.

### 3. 두부조림

(가) 재료 및 분량(4인분)

두부 2모, 식용유 4큰 술, 물 1컵, 어슷 썬 실파 1큰 술, 실고추·통깨 조금씩,  
함초 분말가루 3g

조림 장: 간장 4큰 술, 설탕 2큰 술, 고춧가루 2작은 술, 다진 파 1큰 술, 다진 마늘 1/2큰 술, 깨소금·참기름 조금씩

(나) 만드는 방법

- ① 두부는 가로세로 2-3cm 크기로 납작하게 썰어 기름 두른 팬에 지진다.
- ② 냄비에 지진 두부를 쪄켜이 깔고 양념장을 끼얹은 다음 물 1컵을 냄비에 가장자리에 흘려 붓고 약한 불에서 조리한다.
- ③ 국물이 자작하게 줄어들면 불을 끄고 두부조림을 접시에 담은 뒤 어슷 썬 실파와 짧게 자른 실고추, 통깨를 솔솔 뿌린다.

## 찜- 복령 두부 찜, 새우젓 달걀 찜, 깻잎 고추 찜

### 1. 복령 두부찜

(가) 재료 및 분량(4인분)

연 두부 1모, 복령가루 1큰 술, 달걀흰자 1개 분, 다진 파 1큰 술, 소금 3.5g,  
함초 분말 가루 1.5g, 후춧가루 조금씩, 송송 썬 실과 2큰 술  
겨자 소스 : 간장 1큰 술, 식초 ? 설탕 ? 연 견자 1/2작은 술씩

(나) 만드는 방법

- ① 연 두부에 복령가루와 달걀흰자, 다진 파, 소금, 후춧가루를 넣어 잘 섞는다.
- ② 내용열기를 담고 송송 썬 실과를 뿌린 뒤 뚜껑을 덮어서 김 오른 찜통에 올려 중간 불에서 20분 정도 찜다.
- ③ 간장과 식초, 설탕, 연 겨자를 한데 섞어 겨자 소스를 만든다.
- ④ 몽글몽글한 복령 두부찜이 완성되면 꺼내어 겨자 소스를 위에 뿌린다.

### 2. 새우젓 달걀 찜

(가) 재료 및 분량 (2인분)

달걀 2알, 새우젓 0.5, 물 1/2컵, 함초 분말가루 1.5g

(나) 만드는 방법

- ① 작은 뚜껑에 물 1/2컵과 새우젓 0.5을 넣고 끓인다.
- ② 달걀 2알을 그릇에 잘 풀어놓는다.
- ③ 1이 끓으면 풀어놓은 달걀을 넣고 휘젓는다.
- ④ 약 불로 줄인 뒤 뚜껑을 덮고 2-3분 후 한번 더 휘저어서 완전히 익힌다.  
(새우젓이 없으면 다식 물을 넣고 소금간을 하세요.)

### 3. 깻잎 고추 찜

(가) 재료 및 분량(4인분)

풋고추 10개, 붉은 고추 4개, 밀가루 1컵, 물 1컵, 깻잎 5-6장, 소금 약간, 함초 분  
말가루 3g

양념: 간장 2큰 술, 붉은 고추 다진 것 1큰 술, 다진 마늘 1작은 술, 다진 파 1작은  
술, 깨소금 1/2큰 술, 참기름 1/2큰 술, 고춧가루 1작은 술

(나) 만드는 방법

- ① 풋고추와 붉은 고추는 어슷하게 썰어서 물에 헹구어 씨를 털어낸다.
- ② 깻잎은 한 장씩 씻어서 건져 물기를 뺀다.
- ③ 밀가루는 체에 한 번 내려서 볼에 담고 물과 소금을 넣어서 잘 섞어 반죽을 한다.
- ④ 3에 고추 썬 것을 넣어서 잘 섞는다.
- ⑤ 오목한 그릇에 깻잎을 깔고 4의 반죽을 붓는다.
- ⑥ 김이 오른 찜통에 5를 넣어서 20분 정도 찜는다.
- ⑦ 양념을 넣어서 양념장을 만든다.
- ⑧ 꼬치로 찔러서 반죽이 묻어나지 않으면 꺼내서 한 김 식힌 후 먹기 좋게 썰어서 양념장과 같이 곁들여서 낸다.

## 구이- 더덕구이, 연근 찹쌀 구이, 대합구이

### 1. 더덕구이

#### (가) 재료 및分量

더덕 100g, 다진 파 1큰 술, 식용유 약간, 함초 분말가루 3g

기름 장: 참기름 1큰 술, 간장 1작은 술

양념장: 고추장 2큰 술, 설탕 1큰 술, 다진 마늘·참기름 각 1작은 술, 간장·통깨 각 1/2작은 술

#### (나) 만드는 방법

- ① 더덕은 껍질을 벗겨서 소금물에 20분간 담가 끈적끈적한 진액을 제거한다.
- ② 더덕의 물기를 종이타월로 닦은 다음 방망이로 가볍게 툭툭 두들겨 납작하게 편다
- ③ 기름 장에 더덕을 펴 발라서 채우고 식용유를 조금 두른 팬에 앞뒤로 굽는다.
- ④ 구운 더덕에 양념장을 앞뒤로 바르고, 달군 팬에 식용유를 두르고 양념한 더덕을 중 불에서 가볍게 구운 다음 다진 파를 뿌린다.

### 2. 연근찹쌀구이

#### (가) 재료 및分量 (2인분)

연근 1개(300g), 찹쌀가루 4큰 술, 함초 분말 가루 2g

초간장 소스: 실과 8뿌리, 붉은 고추1/2개, 간장·물 3큰 술씩, 식초·깨소금 2큰 술씩, 올리고 당 2/3큰 술, 다진 생강 1/2작은 술

#### (나) 만드는 방법

- ① 연근은 양끝의 지저분한 부분을 잘라내고 필러로 껍질을 벗긴 다음 1cm두께로 둥글게 썬다.
- ② 깨끗한 비닐봉지에 연근을 담고 찹쌀가루를 넣어 입구를 손으로 쥔 채 여러 번 흔들면 찹쌀가루가 골고루 묻는다.
- ③ 실과는 송송 썰고 붉은 고추는 잘게 다져서 나머지 재료를分量대로 한데 넣고 고루 섞어 소스를 만든다.
- ④ 기름을 넉넉히 두른 팬에 찹쌀가루 묻힌 연근을 올려 중 불에서 앞뒤로 노릇노릇하게 굽는다.
- ⑤ 접시에 연근구이를 담고 만들어 놓은 초간장 소스를 끼얹는다.

### 3. 대합 구이

(가) 재료 및 분량 (4인분)

대합 3개, 조갯살 100g, 청주 1/2컵, 다진 쇠고기 50g, 두부 1/4모, 밀가루 3큰술, 달걀 1개, 식용유 적당량, 함초 분말 가루 3g

소 양념: 다진 파 1큰술, 다진 마늘 1작은술, 참기름 1작은술, 설탕·소금·깨소금·후춧가루 조금씩

(나) 만드는 방법

- ① 대합은 해감을 토하게 한 뒤 냄비에 물을 붓고 끓인다. 대합 입이 벌어지면 살만 발라내고 껍데기는 씻어서 따로 둔다.
- ② 조갯살을 냄비에 넣고 청주를 조금 부어 살짝 익힌 다음 대합 살과 합하여 곱게 다진다.
- ③ 다진 쇠고기와 칼등으로 곱게 으갠 두부, 다진 조갯살을 한데 섞고 소 양념을 넣어 반죽한다.
- ④ 대합 껍데기의 안쪽에 기름과 밀가루를 살짝 묻힌 다음, 3의 소를 채워 표면을 고르게 하고 다시 밀가루를 얇게 묻힌다.
- ⑤ 4의 대합을 달걀 물에 담갔다가 건져 기름 두른 팬에 소 채운 부분이 아래로 가도록 올려 지진 다음, 석쇠에 올려 중 불에서 굽는다.

## 전- 애호박 전, 표고 전, 고사리 전, 깻잎 전, 굴 전

### 1. 애호박 전

#### (가) 재료 및 분량

애호박 1개, 달걀 1알, 풋고추·홍 고추 각 1/2개, 부침가루 4큰 술, 소금 3.5g, 함초 분말 가루 1.5g, 식용유 약간

#### (나) 만드는 방법

- ① 애호박을 소금에 살짝 절인 다음 물기를 종이 타월로 닦는다.
- ② 호박에 부침가루를 앞뒤로 가볍게 묻힌 다음 달걀 푼 물(달걀+소금)에 적셔서 다진 풋고추와 홍 고추를 올린 다음 약 불에서 노릇노릇 부친다.

### 2. 표고 전&고사리 전

#### (가) 재료 및 분량(4인분)

나른 표고버섯 10장, 고사리 200g, 밀가루 1컵, 달걀4개, 식용유 적당량, 소금 3.5g, 함초 분말 가루 1.5g

밀 양념: 간장 2큰 술, 참기름 1큰 술

양념장: 간장·식초·물 2큰 술씩, 설탕·깨소금 조금씩

#### (나) 만드는 방법

- ① 마른 표고버섯은 따뜻한 물에 불려 기둥을 떼고 물기를 꼭 짰다. 고사리는 깨끗이 씻어 물기를 짰 다음 1cm 길이로 잘게 썬다.
- ② 준비한 표고버섯과 고사리는 각각 간장과 참기름으로 밀 양념을 한다.
- ③ 양념한 표고버섯에 밀가루를 묻히고 달걀 물에 담갔다가 꺼내서 기름 두른 팬에 타지 않게 지진다.
- ④ 고사리는 표고버섯과 비슷한 크기로 뭉쳐서 밀가루를 묻히고 달걀 옷을 입힌 다음 기름 두른 팬에 지진다.
- ⑤ 노릇하게 지진 전은 접시에 담고 양념장을 곁들인다.



### 3. 깻잎 전

(가) 재료 및 분량(4인분)

깻잎 30장, 밀가루 4큰 술, 다진 쇠고기(또는 돼지고기)200g, 달걀 2개, 소금 3.5g,  
함초 분말 가루 1.5g, 식용유 적당량

고기 밑 양념: 간장 1큰 술, 설탕·다진 파 2작은 술씩, 다진 마늘·참기름 1작은 술  
씩, 깨소금·후춧가루 조금씩

(나) 만드는 방법

- ① 작은 크기의 깻잎을 골라 깨끗이 씻은 다음 물기를 털고 한쪽에 밀가루를 얇게 묻힌다.
- ② 다진 쇠고기는 간장과 설탕, 다진 파, 다진 마늘, 참기름 등의 재료로 밑간 한다.
- ③ 깻잎 위에 양념한 쇠고기를 얇게 얹고 반으로 접어 밀가루를 묻힌다. 가루가 묻치지 않게 털어가며 묻힌 뒤 소금을 조금 넣은 달걀 물에 담갔다가 건진다.
- ④ 달군 팬에 기름을 넉넉히 두르고 3의 깻잎을 노릇하게 지져낸다.

### 4. 굴 전

(가) 재료 및 분량(4인분)

굴 100g, 소금 1/2큰 술, 밀가루 1/3큰 술, 달걀 2개, 식용유 적당량, 소금 3g,  
함초 분말 가루 1.5g

초간장: 간장o식초o물 1큰 술씩, 잣가루 조금

(나) 만드는 방법

- ① 굴은 체에 담은 채 열은 소금물에 흔들어 씻어 물기를 뺀다.
- ② 손질한 굴에 밀가루를 묻히고 달걀 물에 담갔다가 건진다.
- ③ 달군 팬에 기름을 두르고 전 옷 입힌 2를 올려 앞뒤로 노릇노릇하게 지진다.
- ④ 노릇하게 지진 굴 전은 종이타월에 받쳐 기름을 뺀 뒤 접시에 담고 초간장을 곁들인다.

## 부침개- 녹두 전, 부추 전, 감자 전

### 1. 녹두전

#### (가) 재료 및分量

간 녹두 2컵(360g), 김치 1컵(300g), 다진 돼지고기 200g, 숙주 2줌(160g), 고사리 1.5줌(225g), 홍 고추 1개, 대파 1/2대, 찹쌀가루 3큰 술, 물 1.5컵, 식용유 약간, 소금 4g, 함초 분말 가루 1g,

고명(고기, 나물, 김치, 대파)밀간: 국 간장 2큰 술, 다진 파·다진 마늘·청주·참기름 각 1큰 술, 후추·소금 약간

#### (나) 만드는 방법

- ① 간 녹두는 깨끗이 씻어 찬물에서 4시간 이상 불린 다음 손으로 바락바락 비벼 행구면서 껍질을 모두 벗긴다.
- ② 숙주와 고사리는 살짝 데친 다음 김치, 돼지고기, 대파와 함께 불에 넣고 밀간 재료로 무쳐서 30분간 재워둔다.
- ③ 불린 녹두는 물기를 빼고 물 1.5컵과 함께 믹서기에 넣어 곱게 간다.
- ④ 곱게 간 녹두에 찹쌀가루를 섞는다.
- ⑤ 완성된 반죽에 밀간 한 고명을 모두 넣고 골고루 섞는다.
- ⑥ 달군 팬에 식용유를 넉넉하게 두르고 반죽을 떠서 올린 다음 홍 고추로 장식해서 부친다.

### 2. 부추 전

#### (가) 재료 및分量

전 처리한 부추150g, 밀가루 300g, 물 450g, 식용유 32.5g, 소금3.5g, 함초 분말 가루 1.5g

#### (나) 만드는 방법

- ① 부추와 청양고추, 홍 고추에 부침가루 반죽(부침가루+ 얼음물+ 달걀)을 섞는다.
- ② 식용유를 두른 팬에 부추 전 반죽을 한 국자씩 올린 다음 앞뒤로 부친다.

### 3. 감자전

#### (가) 재료 및 분량

감자 4개, 부추 100g, 감자전분 4큰 술, 물 2컵, 소금 3.5g, 함초 분말 가루 1.5g, 식용유 적당량

초간장 : 풋고추 1개, 간장 2큰 술, 물 ? 식초 1큰 술씩, 고춧가루 1/2큰 술

#### (나) 만드는 방법

- ① 감자는 껍질을 벗기고 강판에 곱게 간다.
- ② 부추는 깨끗이 다듬어 물에 살살 흔들여 씻은 뒤 3cm 길이로 썰고, 양념장에 들어갈 풋고추는 씨를 빼내고 잘게 다진다.
- ③ 큰 그릇에 감자 간 것과 부추를 섞은 뒤 물과 소금을 넣어 반죽한다. 반죽 농도는 감자전분으로 맞춘다.
- ④ 다진 풋고추에 간장과 물, 식초, 고춧가루를 분량대로 넣고 섞어 양념장을 만든다.
- ⑤ 뜨겁게 달군 팬에 식용유를 두르고 반죽을 한 국자씩 떠서 얇고 동그랗게 편다. 전이 익어 투명해지면 뒤집어 노릇하게 지진 다음 접시에 담고 양념장을 곁들인다.

## 편육- 양지머리 편육, 돼지고기 편육

### 1. 양지머리 편육

#### (가) 재료 및 분량

쇠고기(양지머리) 1.5kg, 물 13C, 초간장 2큰 술, 함초 분말 가루 5g

#### (나) 만드는 방법

- ① 냄비에 물을 넣어 센 불에서 끓인다.
- ② 양지머리는 찬물에 10분 동안 담가 핏물을 뺀다.
- ③ 물이 끓으면 양지머리를 넣고 센 불에서 끓인다. 끓기 시작하면 약한 불에서 더 끓이는데, 이 때 생기는 거품은 숟가락으로 걷어낸다.
- ④ 끓기 시작한 지 60-70분 정도가 되면, 젓가락으로 중심부를 찌러 보아 핏물이 나오지 않고 쉽게 들어가면 불을 끈다.
- ⑤ 삶은 고기를 꺼내어 찬물에 1-2초 동안 담갔다가 건져 높이와 폭을 고르게 하여 베 형질으로 꼭 썬다.
- ⑥ 고기 위아래에 도마를 놓고 무거운 것(3kg)을 올려 4-5시간 정도 누른다.
- ⑦ 근섬유의 방향으로 5cm로 썰고, 다시 근섬유 방향의 직각으로 얇게 썰어 접시에 올려 가지런히 담고 초간장과 함께 낸다.

### 2. 돼지고기 편육

#### (가) 재료 및 분량

돼지고기(생 삼겹살 덩어리) 600g, 물 2L,

향신 재료: 통 계피(10cm 길이) 1개, 생강 1톨, 마늘 5쪽, 통후추 1작은 술, 양파 1/2개, 대파(푸른 잎) 3-4대, 월계수 잎 2장, 된장 1큰 술, 인스턴트 커피 1작은 술, 함초 분말 가루 5g

#### (나) 만드는 방법

- ① 양파와 마늘은 껍질을 벗겨 통으로 준비하고, 파는 씻어서 10cm길이를 썬다. 생강은 편으로 썰고, 계피와 월계수 잎은 키친타월을 물에 적서 닦는다.
- ② 냄비에 물 2L를 붓고 통 계피, 양파, 마늘, 생강, 통후추, 대파, 월계수 잎, 된장, 인스턴트 커피를 넣어 끓인다.
- ③ 2의 국물이 끓어오르면 돼지고기 삼겹살을 덩어리째 넣고 뚜껑을 비스듬히 덮어 40분간 삶는다.
- ④ 돼지고기는 삶은 물에서 실온 상태에서 식힌 후 건져 랩에 싸두었다가 먹을 때 썰어 낸다.

## 볶음- 청경채 버섯볶음, 감자채 볶음, 낙지 볶음, 어묵 볶음

### 1. 청경채 버섯 볶음

(가) 재료 및 분량(4인분)

청경채 4개, 생 표고버섯 4개, 죽순 1/2개, 양송이 4개, 슬라이스 햄 2장, 소금 3.5g, 함초 분말 가루 1.5g, 샐러드유 약간, 맛 술 1/2큰 술, 간장 2작은 술.

(나) 만드는 방법

- ① 죽순은 끓는 물에 데쳐서 찬물에 헹궈서 물기를 뺀 후에 모양을 살려서 얇팍하게 썬다.
- ② 청경채는 끓는 물에 소금을 넣고 뿌리부터 넣어서 데쳐서 찬물에 헹궈서 물기를 뺀 후 3cm 길이로 썬다.
- ③ 표고버섯은 기둥을 떼어내고 얇팍하게 썬다.
- ④ 양송이는 껍질을 벗겨서 얇팍하게 썬다. 햄은 2cm 두께로 썬다.
- ⑤ 프라이팬에 기름을 두르고 죽순을 넣어서 볶다가 버섯을 넣고 잘 볶는다.
- ⑥ 5에 햄과 청경채를 넣어서 다시 잘 볶다가 맛 술과 간장을 넣어서 간을 한다.
- ⑦ 소금과 후춧가루를 넣어서 마지막으로 간을 한다.

### 2. 감자채 볶음

(가) 재료 및 분량

감자 480g, 양파 20g, 소금3.7g, 함초 분말 가루 1.3g

(나) 만드는 방법

- ① 감자를 얇게 채 썰어준다.
- ② 채 썬 감자를 소금물에 담구었다가 건져낸다.
- ③ 감자는 중간 불에 익히고, 감자가 익어 가면 소금을 살짝 뿌린다.
- ④ 양파를 썰어 감자와 함께 넣고 감자랑 볶는다.

### 3. 낙지 볶음

(가) 재료 및 분량(4인분)

낙지2마리(500g), 양파 1/2개, 청o홍 고추 각 1개, 당근 1/5개, 미나리 50g, 대파 1대, 다진 마늘o통깨 각 1큰 술, 참기름 1/2큰 술, 후추·식용유 약간, 함초 분말 가루 3g

낙지손질: 밀가루 2큰 술, 굵은 소금 1큰 술

낙지 데칠 때: 소금 1작은 술, 청주 1큰 술

양념장: 고춧가루 4큰 술, 고추장·간장 각 2큰 술, 설탕 1/2큰 술, 물엿o맛 술o다진 마늘 각 1큰 술, 생강가루 1작은 술

(나) 만드는 방법

- ① 낙지는 머리를 뒤집어 내장과 먹물을 빼낸 다음 밀가루와 굵은 소금으로 바락바락 주물러 비린내를 없애고 미끈거림도 제거한다.
- ② 끓는 물에 소금과 청주를 넣고 손질한 낙지를 살짝 데친 다음 찬물에 헹궈 물기를 빼고 5cm 길이로 자fms다.
- ③ 양념장을 만들어 실온에서 2시간 이상 숙성시켰다가 낙지에 골고루 버무린다.
- ④ 달군 팬에 식용유를 두르고 다진 마늘과 양파부터 볶다가 당근도 넣고 볶는다.
- ⑤ 채소가 익기 시작하면 양념한 낙지와 청·홍 고추, 대파를 넣고 살짝 볶는다.
- ⑥ 마지막으로 미나리를 넣고 재빨리 묽은 다음 통깨와 참기름, 후추로 마무리 한다.

#### 4. 어묵볶음

(가) 재료 및 분량(4인분)

막대어묵 200g, 양파1/4개, 당근1/5개, 청양고추·홍 고추 각 1개, 청주o통깨 각 1큰 술, 식용유 약간, 함초 분말 가루 1.5g

양념장: 간장, 굴 소스, 맛술, 물엿, 각1큰 술, 고춧가루, 다진 마늘 각 1/2큰 술, 참기름 1작은 술, 후추 약간

(나) 만드는 방법

- ① 끓는 물에 청주를 약간 넣고 어묵을 넣어 살짝 데쳐서 기름기를 제거한다.
- ② 달군 팬에 식용유를 두르고 물기 뺀 어묵을 꼬들꼬들해 보일 때까지 충분히 볶는다.
- ③ 어묵이 충분히 볶아지면 양파를 먼저 넣고 볶다가 당근, 청양고추, 홍 고추를 넣고 살짝 볶는다.
- ④ 양념장 재료를 섞어 바글바글 끓이다가 볶은 재료들을 모두 넣고 뒤섞으면서 약간만 줄인 다음 통깨를 뿌린다.

## 5. 동결 건조시킨 건 함초 조리 시 조미 소재로서 소금(NaCl) 대체 가능성 및 함초의 고기 누린내 제거 효과 분석

### (1) 실험방법

다양한 조리법 중 공통으로 들어가는 재료들을 선택하여 표준 레시피를 만들었다. 한식조리법 중 건식조리, 습식조리를 선정 후 해물과전 4종(실과100%, 생 함초 100%, 생 함초75% + 실과25%, 생 함초50%+ 실과25%), 청포묵무침 4종(미나리 100%, 생 함초100%, 생 함초75%+ 미나리25%, 생 함초50%+ 미나리50%)에 적용하였다. 음료는 유제품 5종(요구르트, 플레인 요거트, 불가리스 사과맛, 서울우유, 베지밀두유)에 각 시료 당 동일한 양으로 신선 함초를 첨가하여 바나나주스에 적용하였다. 요리별로 소비자 조사를 이용하였고, 기존 레시피로 조리한 시료와 소금은 신선 함초로 부분 대체한 시료 간 짠맛 강도를 포함한 다양한 관능적인 특성을 비교분석하고, 음료에 신선 함초를 첨가하여 단맛 강도를 포함한 다양한 관능적인 특성을 비교분석하여 식재료로써의 신선 함초의 적용가능성을 분석하였다.

#### 가. 시료

신선 함초는 자연 생 함초를 구매하여 줄기를 제거한 후 잎만 분리하여 사용하였다.

#### (1) 해물과전

##### (가) 재료 및 분량(50인분)

각 시료 당 밀가루 800g, 물 1600g, 해물 모듬 640g은 동일한 양으로 들어가나 실과를 부분적으로 신선 함초를 대체하여 실과가 들어가는 시료는 소금(99.9% 순도의 NaCl, 덕산화학)을 첨가하고, 실과가 들어가지 않는 시료는 소금과 같은 비율의 소금을 신선 함초를 넣는다. 신선 함초를 첨가한 해물과전 시료의 배합 비는 <표 5-1>과 같다.

<표 5-1>해물과전 시료의 첨가된 실과, 신선 함초, Nacl, 밀가루, 물, 해물모듬의 양

	시료1 (실과100%)	시료2 (신선함초100%)	시료3 (신선함초75%+ 실과25%)	시료4 (신선함초50%+ 실과50%)
실과	320g	-	240g	160g
신선함초	-	320g	80g	160g
Nacl	16g	-	16g	16g
밀가루	800g	800g	800g	800g
물	1600g	1600g	1600g	1600g
해물모듬	640g	640g	640g	640g

(나) 시료 준비 방법

오징어와 조갯살과 같은 해물 모듬은 열은 소금물에 흔들어 씻어 건진 후, 잘게 다진다. 실파와 신선 함초는 다듬어 씻고 2cm정도로 자른다. 밀가루 반죽 재료를 모두 섞어 묽은 파전 반죽을 만든 뒤 각 시료에 해당하는 재료들을 넣는다. 뜨겁게 달군 팬에 기름을 두르고, 반죽을 국자로 떠서 얇게 편 다음 해물을 올리고 앞뒤로 노릇하게 지진다.

(다) 시료 제시 방법

관능검사용 시료는 적정온도 (65-70°C)를 유지하기 위해 한 시료씩 30~40g 따라서 제공하였다. 평가 시 시료와 시료사이의 입가심 물질로 크래커와 생수를 제공하였다. 시료의 제시 순서는 윌리엄평방라틴계획 법으로 정하였다. 패널은 설문지에 각 시료마다 표준시료와 비교하여 관능적인 특성 강도를 평가하였다.

(2) 청포묵무침

(가) 재료 및 분량(50인분)

각 시료 당 청포묵 1500g, 소금기가 없는 김 5장, 참기름30g, 으갠 깨 30g은 동일한 양으로 들어가나 미나리를 부분적으로 신선 함초를 대체하여 미나리가 들어가는 시료는 소금(99.9% 순도의 NaCl, 덕산화학)을 첨가하고, 미나리가 들어가지 않는 시료는 소금과 같은 비율의 소금을 신선 함초를 넣는다. 신선 함초를 첨가한 청포묵 시료의 배합 비는 <표 5-2>과 같다.

<표 5-2> 청포묵 무침 시료의 첨가된 미나리,신선 함초의 양

	시료1 (미나리100%)	시료2 (신선함초100%)	시료3 (신선함초75%+ 미나리25%)	시료4 (신선함초50%+ 미나리50%)
미나리	300g	-	224g	150g
신선함초	-	300g	76g	150g
Nacl	5g	-	5g	-
청포묵	1500g	1500g	1500g	1500g
김 가루	5장	5장	5장	5장
참기름	30g	30g	30g	30g
으갠 깨	30g	30g	30g	30g



(나) 시료 준비 방법

청포묵은 씻어서 30초간 데친 후, 1\*4cm 크기로 자른다. 미나리는 흙을 씻어내고 다듬어 줄기만 2cm 크기로 자른 후 데친다. 신선 함초는 미나리의 크기와 같은 2cm 크기로 자른 후 1분간 데친 후 키친 타올에 기울여 물기를 제거한다. 김 가루는 각 시료 당 들어갈 5장을 봉지에 넣고 잘게 부순다. 참기름과 으깬 깨는 각 시료 당 30g씩 준비한다. 준비해 놓은 재료들은 4개의 bowl에 나누어 담고, 섞는다.

(다) 시료 제시 방법

관능검사용 시료는 한 시료씩 30~40g 따라서 제공하였다. 수저를 제공하여 한 순간에 묵과 채소 등 모든 재료들이 한꺼번에 평가될 수 있도록 하였다. 평가 시 시료와 시료사이의 입가심 물질로 크래커와 생수를 제공하였다. 시료의 제시 순서는 윌리엄평방라틴계획 법으로 정하였다. 패널은 설문지에 각 시료마다 표준시료와 비교하여 관능적인 특성 강도를 평가하였다.

(3) 바나나주스

(가) 재료 및 분량(50인분)

각종 유제품 5종(요구르트, 플레인 요거트, 불가리스 사과맛, 서울우유, 베지밀두유)에 각 시료 당 동일한 양으로 신선 함초를 첨가한다. 소금(99.9% 순도의 NaCl, 덕산화학)을 첨가하고, 신선 함초를 첨가한 바나나주스 시료의 배합 비는 <표 5-3>과 같다.

<표 5-3> 바나나주스 시료의 첨가된 바나나, 유제품, 신선 함초의 양

	시료1 (요구르트)	시료2 (플레인 요거트)	시료3 (불가리스 사과맛)	시료4 (서울우유)	시료5 (베지밀두유)
바나나	1320g	1320g	1320g	1320g	1320g
유제품군	1560g	1560g	1560g	1560g	1560g
신선 함초	144g	144g	144g	144g	144g

(나) 시료 준비 방법

바나나는 껍질을 벗기고 속살만 사용한다. 바나나와 각종 유제품 5종(요구르트, 플레인 요거트, 불가리스 사과맛, 서울우유, 베지밀두유)을 섞어 믹서기에 갈아 해당하는 각 시료 통에 담아 시료를 준비한다.

(다) 시료 제시 방법

시간의 경과에 따라 색이 갈변할 수 있으므로 실험직전에 믹서에 갈아 준비한다. 관능검사용 시료는 한 시료씩 30~40g 따라서 제공하였다. 평가 시 시료와 시료사이의 입가심 물질로 생수를 제공하였다. 시료의 제시 순서는 윌리엄평방라틴계획법으로 정하였다. 패널은 설문지에 각 시료마다 표준시료와 비교하여 관능적인 특성 강도를 평가하였다.

(라) 소비자조사 패널

평소 소비자조사에 관심이 있는 20대 여대생 50명 (서울여자대학교)이 참여하였다.

(마) 소비자조사 절차

소비자조사는 해물과전, 청포묵무침, 바나나주스 순서대로 진행하였다. 패널은 설문지를 받고 각 시료마다 기호도 및 좋은 점과 싫은 점을 평가하였다. 각 4종에 해당하는 시료의 평가가 끝난 후, 그중 가장 좋았던 시료와 가장 좋지 않았던 시료를 평가하였다. 모든 시료의 평가가 끝난 후 패널들은 함초의 경험 여부를 묻는 설문을 실시하였다. 패널은 실험 1시간 전 음식물의 섭취를 금하였고 평가 시 패널 간 대화를 금하였다.

(바) 통계분석

각 조리법 별 시료의 소금과 신선 함초의 첨가량에 따라 관능적 특성 강도가 유의적으로 차이가 있는지 분석하기 위해 분산분석 및 Duncan의 다 시료 검정을 실시하였다. 모든 분석은 SPSS를 사용하였다.

**(2) 실험 결과**

가. 소금과 신선 함초의 첨가량에 따른 해물과전의 관능적 특성

(1) 해물과전의 관능적 특성 용어

소금과 신선 함초의 첨가량이 다른 4종의 해물과전 시료 간에 따라 전반적인 기호도, 외관에 대한 기호도, 향미/맛에 대한 기호도, 씹히는 감촉에 대한 기호도, 짠맛 정도, 시료 특성에 좋은 점과 싫음 점(CATA법), 냄새·맛·질감에 익숙한 정도, 다시 먹을 의향을 질문하였다.

(2) 해물과전의 관능적 특성

소금과 신선 분말 함초의 첨가량이 다른 4종의 해물과전 시료 간 관능적 특성 강도의 차이가 있는 지 분산 분석을 실시한 결과 외관 기호도를 제외한 전반적인 기호

도, 향미/맛 기호도, 씹히는 감촉 기호도, 짠맛 정도, 냄새·맛·질감에 익숙한 정도, 다시 먹을 의향 항목에서 시료 간 유의적 차이를(p<0.05) 보였다.

건식 조리법(해물과전)은 함초100%시료가 실과100%시료보다 실제 염의 함량은 낮으나 짠맛 정도가 높게 평가되어 전을 평가할 때, 부분적으로 함초가 씹히면서 짠맛을 더욱 강하게 느끼는 것으로 판단된다. 그리고 전반적인 기호도는 상대적으로 낮게 평가되어 소비자들이 짠맛이 강한 시료를 선호하지 않은 것을 보았고, 반면 중간정도의 짠맛을 보인 실과100%시료는 친숙한 맛, 조화로운 맛의 항목이 긍정적인 영향으로 전반적인 기호도가 높게 평가됨을 알 수 있다.

<표 5-4> 소금과 신선 함초의 첨가량이 다른 해물과전 4종의 관능적 특성 평균값

sample/ 농도	전반적인 기호도	외관 기호도	향미/맛 기호도	씹히는 감촉 기호도	짠맛 정도	냄새, 맛, 씹히는 질감에 익숙한 정도	다시 먹을 의향
실과100%	5.98 <sup>c</sup>	5.76 <sup>a</sup>	6.02 <sup>b</sup>	6.06 <sup>b</sup>	4.42 <sup>b</sup>	6.30 <sup>b</sup>	6.08 <sup>b</sup>
함초100%	4.72 <sup>ab</sup>	5.24 <sup>a</sup>	4.76 <sup>a</sup>	5.48 <sup>a</sup>	5.56 <sup>c</sup>	4.88 <sup>a</sup>	4.40 <sup>a</sup>
함초50%+ 실과50%	4.44 <sup>a</sup>	5.18 <sup>a</sup>	4.52 <sup>a</sup>	5.06 <sup>a</sup>	3.62 <sup>a</sup>	5.06 <sup>a</sup>	4.18 <sup>a</sup>
함초75%+ 실과25%	5.24 <sup>b</sup>	5.76 <sup>a</sup>	5.10 <sup>a</sup>	5.40 <sup>a</sup>	4.60 <sup>b</sup>	5.24 <sup>a</sup>	4.66 <sup>a</sup>

<표 5-5> 소금과 신선 함초의 첨가량이 다른 해물과전 4종의 시료 특성에 좋은 점 상위 20%(CATA법)의 관능적 특성과 비율

실과100%		함초100%		함초75%+실과25%		함초50%+실과50%	
관능적 특성	%	관능적 특성	%	관능적 특성	%	관능적 특성	%
친숙한 맛	38.0	씹히는 감촉	28.0	해산물의 맛	28.0	순한 맛	22.0
조화로운 맛	34.0	해산물의 맛	22.0	외관	22.0	외관	20.0
해산물의 맛	30.0	해당사항없음	22.0			해산물의 맛	20.0
향미의 풍부함	22.0						
반죽의 씹히는 감촉	22.0						
외관	20.0						
순한 맛	20.0						
씹히는 감촉	20.0						

채소의 씹히는 감촉	20.0			
재료가 적절히 익음	20.0			

<표 5-6> 소금과 신선 함초의 첨가량이 다른 해물파전 4종의 시료 특성에 싫은 점 상위 20%(CATA법)의 관능적 특성과 비율

실파100%		함초100%		함초75%+실파25%		함초50%+실파50%	
관능적 특성	%	관능적 특성	%	관능적 특성	%	관능적 특성	%
기름진 정도	44.0	짠맛	26.0	밀가루반죽의 맛	32.0	싱거움	36.0
싱거움	24.0	밀가루반죽의 맛	24.0	싱거움	24.0	밀가루반죽의 맛	32.0
		해산물의 맛	20.0	기름진 정도	22.0	기름진 정도	32.0

#### 나. 소금과 신선 함초의 첨가량에 따른 청포묵무침의 관능적 특성

##### (1) 청포묵무침의 관능적 특성 용어

소금과 신선 함초의 첨가량이 다른 4종의 청포묵무침 시료 간에 따라 전반적인 기호도, 외관에 대한 기호도, 향미/맛에 대한 기호도, 씹히는 감촉에 대한 기호도, 짠맛 정도, 탄력 정도, 시료 특성에 좋은 점과 싫음 점(CATA법), 냄새·맛·질감에 익숙한 정도, 다시 먹을 의향을 질문하였다.

##### (2) 청포묵무침의 관능적 특성

소금과 신선 분말 함초의 첨가량이 다른 4종의 청포묵무침 시료 간 관능적 특성 강도의 차이가 있는 지 분산 분석을 실시한 결과 탄력 정도를 제외한 전반적인 기호도, 향미/맛 기호도, 씹히는 감촉 기호도, 짠맛 정도, 냄새·맛·질감에 익숙한 정도, 다시 먹을 의향 항목에서 시료 간 유의적 차이(p<0.05) 보였다.

습식 조리법(청포묵무침)은 기존의 레시피 재료인 미나리100%의 시료의 풀내/푹내는 부정적인 영향으로 전반적인 기호도, 외관기호도, 향미/맛 기호도, 다시 먹을 의향 항목에서 가장 낮게 평가되었다. 함초100%시료가 전반적인 기호도, 향미/맛 기호도, 씹히는 감촉기호도가 높게 평가되었고, 짠맛 정도, 다시 먹을 의향에 가장 높게 평가되어 소금의 대체 식재료로 가능성을 볼 수 있다.

<표 5-7> 소금과 신선 함초의 첨가량이 다른 청포묵무침 4종의 관능적 특성 평균

sample/농도	전반적인 기호도	외관 기호도	향미/맛 기호도	씹히는 감촉 기호도	짠맛 정도	탄력 정도	냄새, 맛, 씹히는 질감 익숙한 정도	다시 먹을 의향
미나리100%	4.86 <sup>a</sup>	5.76 <sup>b</sup>	4.84 <sup>a</sup>	5.12 <sup>a</sup>	3.92 <sup>a</sup>	4.56 <sup>a</sup>	5.18 <sup>a</sup>	4.42 <sup>a</sup>
함초100%	6.10 <sup>c</sup>	4.84 <sup>a</sup>	6.12 <sup>c</sup>	6.22 <sup>c</sup>	5.66 <sup>c</sup>	4.60 <sup>a</sup>	5.80 <sup>b</sup>	6.08 <sup>c</sup>
함초75%+미나리25%	5.73 <sup>bc</sup>	5.36 <sup>ab</sup>	5.86 <sup>c</sup>	5.80 <sup>bc</sup>	5.24 <sup>c</sup>	4.60 <sup>a</sup>	5.90 <sup>b</sup>	5.52 <sup>bc</sup>
함초50%+미나리50%	5.29 <sup>ab</sup>	5.68 <sup>b</sup>	5.36 <sup>b</sup>	5.58 <sup>b</sup>	4.64 <sup>b</sup>	4.47 <sup>a</sup>	5.08 <sup>a</sup>	5.12 <sup>b</sup>

<표 5-8> 소금과 신선 함초의 첨가량이 다른 청포묵무침 4종의 시료 특성에 좋은 점 상위 20%(CATA법)의 관능적 특성과 비율

미나리100%		함초100%		함초75%+미나리25%		함초50%+미나리50%	
관능적 특성	%	관능적 특성	%	관능적 특성	%	관능적 특성	%
고소한 맛	24.0	고소한 맛	58.0	고소한 맛	44.0	채소의 씹히는 감촉	34.0
청포묵이 씹히는 감촉	24.0	채소의 씹히는 감촉	48.0	채소의 씹히는 감촉	32.0	고소한 맛	32.0
채소의 씹히는 감촉	24.0	목과 채소의 어울림	42.0	채소의 맛	26.0	외관	24.0
풀내/푹내	22.0	채소의 맛	34.0	목과 채소의 어울림	26.0	조화로운 맛	24.0
		양념이 베인 정도	34.0	양념이 베인 정도	22.0	촉촉함	20.0
		친숙한 맛	26.0	외관	20.0		
		조화로운 맛	24.0	풀내/푹내	20.0		
		청포묵이 씹히는 감촉	24.0	청포묵의 맛	20.0		
		향미의 풍부함	22.0	청포묵이 씹히는 감촉	20.0		
		촉촉함	20.0				

<표 5-9> 소금과 신선 함초의 첨가량이 다른 청포묵무침 4종의 시료 특성에 싫은 점 상위 20%(CATA법)의 관능적 특성과 비율

미나리100%		함초100%		함초75%+미나리25%		함초50%+미나리50%	
관능적 특성	%	관능적 특성	%	관능적 특성	%	관능적 특성	%
풀내/푹내	34.0	짠맛	28.0	짠맛	24.0	양념이 베인 정도	28.0
싱거움	32.0	외관	26.0			목과 채소의 어울림	26.0
채소의 맛	28.0					기름짐	24.0
양념이 베인 정도	28.0					풀내/푹내	20.0
채소의 씹히는 감촉	22.0						
목과 채소의 어울림	20.0						

#### 다. 신선 함초의 첨가량에 따른 바나나주스의 관능적 특성

##### (1) 바나나주스의 관능적 특성 용어

신선 함초의 첨가량이 동일한 유제품 5종(요구르트, 플레인 요거트, 불가리스 사과맛, 서울우유, 베지밀두유)의 바나나주스 시료 간에 따라 전반적인 기호도, 외관에 대한 기호도, 향미/맛에 대한 기호도, 입안감촉에 대한 기호도, 맛의 진한정도, 단맛정도, 시료 특성에 좋은 점과 싫음 점(CATA법), 냄새·맛·질감에 익숙한 정도, 다시 먹을 의향을 질문하였다.

##### (2) 바나나주스의 관능적 특성

신선 함초의 첨가량이 동일한 유제품 5종(요구르트, 플레인 요거트, 불가리스 사과맛, 서울우유, 베지밀두유)를 베이스로 한 바나나주스 시료 간 관능적 특성 강도의 차이가 있는 지 분산 분석을 실시한 결과 입안감촉에 대한 기호도를 제외한 전반적인 기호도, 외관 기호도, 향미/맛에 대한 기호도, 맛의 진한 정도, 짠맛 정도, 냄새·맛·질감에 익숙한 정도, 다시 먹을 의향 항목에서 시료 간 유의적 차이를( $p < 0.05$ ) 보였다.

각각 다른 유제품 5종(요구르트, 플레인 요거트, 불가리스 사과맛, 서울우유, 베지밀두유)에 동일한 신선 함초를 첨가하여 단맛의 증진효과를 보기위해 실험을 진행하였다. 전반적인 기호도, 외관에 대한 기호도, 향미/맛에 대한 기호도, 입안감촉에 대한 기호도, 맛의 진한정도, 단맛 정도, 냄새·맛·질감에 익숙한 정도, 다시 먹을 의향

에서 우유시료와 두유시료가 가장 낮게 평가되었고, 전반적인 기호도, 외관에 대한 기호도, 향미/맛에 대한 기호도, 입안감촉에 대한 기호도, 맛의 진한정도, 단맛 정도, 냄새·맛·질감에 익숙한 정도, 다시 먹을 의향에서 요구르트시료가 가장 높게 평가되었다. 적용하는 시료에 따라 많은 기호도의 차이가 나타났고, 신맛이 강한 시료일수록 신선 함초를 첨가하였을 때, 모든 항목에서 높게 평가되었다.

<표 5-10> 신선 함초의 첨가량이 동일한 바나나주스 5종의 관능적 특성 평균값

sample/농도	전반적인 기호도	외관 기호도	향미/맛 기호도	입안 감촉 기호도	맛의 진한 정도	단맛 정도	냄새, 맛, 씹히는 질감에 익숙한 정도	다시 먹을 의향
요구르트	5.40 <sup>c</sup>	5.56 <sup>d</sup>	5.42 <sup>c</sup>	5.14 <sup>a</sup>	6.45 <sup>b</sup>	5.62 <sup>b</sup>	4.78 <sup>c</sup>	5.06 <sup>c</sup>
플레인 요거트	4.48 <sup>b</sup>	4.90 <sup>c</sup>	4.18 <sup>b</sup>	4.82 <sup>a</sup>	6.38 <sup>b</sup>	4.90 <sup>a</sup>	3.98 <sup>ab</sup>	4.08 <sup>b</sup>
불가리스 사과맛	4.42 <sup>b</sup>	4.32 <sup>b</sup>	4.39 <sup>b</sup>	5.20 <sup>a</sup>	6.22 <sup>b</sup>	5.68 <sup>b</sup>	4.38 <sup>bc</sup>	3.96 <sup>b</sup>
서울우유	4.23 <sup>ab</sup>	4.04 <sup>ab</sup>	3.94 <sup>ab</sup>	4.78 <sup>a</sup>	5.26 <sup>a</sup>	4.69 <sup>a</sup>	3.80 <sup>ab</sup>	3.64 <sup>ab</sup>
베지밀두유	3.71 <sup>a</sup>	3.63 <sup>a</sup>	3.48 <sup>a</sup>	4.94 <sup>a</sup>	5.64 <sup>a</sup>	4.74 <sup>a</sup>	3.52 <sup>a</sup>	3.12 <sup>a</sup>

<표 5-11> 신선 함초의 첨가량이 동일한 바나나주스 5종의 시료 특성에 좋은 점 상위 20%(CATA법)의 관능적 특성과 비율

요구르트		플레인 요거트		불가리스사과맛		서울우유		베지밀두유	
관능적 특성	%	관능적 특성	%	관능적 특성	%	관능적 특성	%	관능적 특성	%
바나나 맛	42.0	요구르트 맛	24.0	해당사항 없음	26.0	부드러움	44.0	부드러움	44.0
요구르트 맛	38.0	해당사항 없음	22.0	부드러움	24.0	바나나 맛	28.0	해당사항 없음	30.0
단맛	28.0	바나나 맛	20.0	신선한 향미	20.0	해당사항 없음	22.0	바나나 맛	22.0
조화로운 맛	28.0	부드러움	20.0						
외관	26.0		0						
부드러움	26.0								
색상	24.0								

	.0			
겉쪽함	22			
	.0			

<표 5-12>신선 함초의 첨가량이 동일한 바나나주스 5종의 시료 특성에 싫은 점 상위 20%(CATA법)의 관능적 특성과 비율

요구르트		플레인 요거트		불가리스사과맛		서울우유		베지밀두유	
관능적 특성	%	관능적 특성	%	관능적 특성	%	관능적 특성	%	관능적 특성	%
겉쪽함	50	신맛	40.	요구르트	58.	익숙하지	40.	익숙하지	50
	.0		0	맛	0	않은 맛	0	않은 맛	.0
익숙하지	26	요구르트	38.	신맛	38.	외관	28.	색상	38
않은 맛	.0	맛	0		0		0		.0
요구르트	22	부조화로	28.	익숙하지	38.	입안	26.	부조화로	32
맛	.0	운 맛	0	않은 맛	0	잔여감	0	운 맛	.0
입안	22	익숙하지	28.	부조화로	28.	부조화로	24.	외관	30
잔여감	.0	않은 맛	0	운 맛	0	운 맛	0		.0
익숙하지	20	입안	28.	입안	24.	풀내/푹내	24.	이상한	26
않은 질감	.0	잔여감	0	잔여감	0		0	냄새와 맛	.0
		강한 맛	20.	강한 맛	20.			쓴맛	24
			0		0				.0
								뚝은/뚝뚝	24
								함	.0
								풀내/푹내	20
									.0

## 6. 동결 건조시킨 건 함초 조리 시 조미 소재로서 소금(NaCl) 대체 가능성 및 함초의 고기 누린내 제거 효과 분석

### (1) 실험방법

묘사분석법을 이용하여 고기수육(돼지고기, 닭고기, 오리고기) 3종, 그리고 복합조미료에 일반적으로 첨가되는 소금의 양을 기준으로 건 함초가 대체할 수 있는 소금의 함량을 분석하였다. 각 수육 종류별로 묘사분석을 독립적으로 진행하였고 기존 레시피로 조리한 시료와 소금을 건 함초로 부분 대체한 시료 간 짠맛 강도를 포함한 다양한 관능적인 특성을 비교 분석하여 조미소재로써 건 함초의 소금 대체 가능성과 고기 누린내 제거효과를 분석하였다.

### 가. 시료

건 함초는 동결건조 함초를 구매하여 돼지고기·닭고기·오리고기 수육의 각 시료에



해당하는 양을 면보에 싸서 준비한 후 관능적 특성을 분석하기 위해 묘사분석이 진행되었다.

(1) 돼지고기 수육

(가) 재료 및 분량(1시료 분량)

수입냉동 통 삼겹살 500g, 물 3kg,은 각 시료모두 같은 양에 전통적인 레시피가 적용되는 시료에 된장 15, 마늘 35g, 감초 10g, 청주 30g 통후추 3g가 들어가고 각 시료에만 첨가된 소금(99.9% 순도의 NaCl, 덕산화학)과 건 함초의 양은 <표 6-1>과 같다.

<표 6-1> 돼지고기 수육 시료의 첨가된 NaCl, 신선 함초, 물, 통 삼겹살, 각종 육 수재료의 양

	시료1 (맹물+ 소금100%)	시료2 (맹물+ 건 함초100%)	시료3 (전통레시피+ 소금)	시료4 (전통레시피+ 건 함초)
Nacl	8.34g	-	8.34g	4.17g
건 함초	-	30g	-	15g
물	3kg	3kg	3kg	3kg
통 삼겹	500g	500g	500g	500g
된장	-	-	15g	15g
대파	-	-	50g	50g
마늘	-	-	35g	35g
감초	-	-	10g	10g
청주	-	-	30g	30g
통후추	-	-	3g	3g

(나) 시료 준비 방법

돼지고기는 찬물에 1시간 정도 담가 핏물을 뺀다. 돼지고기 500g에 물3kg를 붓고 고기 삶는 재료를 넣어 끓이다가 끓기 시작하면 중불에서 10분, 약한 불에서 50분간 삶는다. 삶은 수육을 젓가락으로 찢어서 부드럽게 들어가고 핏물이 나오지 않으면 한 김 식혀서 0.4cm두께로 썬다.

(다) 시료 제시 방법

관능검사용 시료는 관능검사용 시료는 적정온도(65-70°C)를 유지하기 위해 갈색 병 100ml에 한 시료 당 고기 3점을 담아 오븐에 보온한 후 제공하였다. 평가 시 시료와 시료 사이의 입가심 물질로 미지근한 물과 크래커를 제공하였다. 시료의 제시 순서는 윌리엄평방라틴계획 법으로 정하였다. 패널은 설문지에 각 시료마다 표준시료와 비교하여 관능적인 특성 강도를 평가하였다. 건 함초 첨가로 인해 시료간의 외관 차이가 있어 갈색 병에 제공하였고, 외관은 마지막에 자연광으로 평가하였

다. 실험은 3회 반복하여 실시하였다.

(2) 닭고기 수육

(가) 재료 및 분량(1시료 분량)

생 닭 1마리 1kg, 물 6kg은 각 시료모두 같은 양에 전통적인 레시피가 적용되는 시료에만 대파100g, 마늘70g, 청주60g이 들어가고 각 시료에 첨가된 소금(99.9% 순도의 NaCl, 덕산화학)과 건 함초의 양은 <표 6-2>과 같다.

<표 6-2> 닭고기 수육 시료의 첨가된 NaCl, 신선 함초, 물, 닭고기, 각종 육수재료의 양

	시료1 (맹물+ 소금100%)	시료2 (맹물+ 건 함초100%)	시료3 (전통레시피+ 소금)	시료4 (전통레시피+ 건 함초)
Nacl	16.68g	-	16.68g	8.34g
건 함초	-	60g	-	30g
물	6kg	6kg	6kg	6kg
생 닭	1kg	1kg	1kg	1kg
대파	-	-	100g	100g
마늘	-	-	70g	70g
청주	-	-	60g	60g

(나) 시료 준비 방법

닭은 꾀지를 떼어내고, 물에 20분 정도 담가 핏물을 뺀다. 닭 1kg, 물6kg을 부은 다음 대파, 마늘, 청주를 넣고 팔팔 끓인다. 센 불에서 5분 정도 끓이다가 불을 줄여 50분 동안 푹 무르도록 끓인다.

(다) 시료 제시 방법

관능검사용 시료는 관능검사용 시료는 적정온도 (65-70°C)를 유지하기 위해 갈색 병 100ml에 한 시료 당 닭다리 살, 가슴살, 껍질 각종 부위(30g-40g)을 담아 오븐에 보온한 후 제공하였다. 평가 시 시료와 시료 사이의 입가심 물질로 미지근한 물과 크래커를 제공하였다. 시료의 제시 순서는 윌리엄평방라틴계획 법으로 정하였다. 패널은 설문지에 각 시료마다 표준시료와 비교하여 관능적인 특성 강도를 평가하였다. 건 함초 첨가로 인해 시료간의 외관 차이가 있어 갈색 병에 제공하였고, 외관은 마지막에 자연광으로 평가하였다. 실험은 3회 반복하여 실시하였다.

### (3) 오리고기 수육

#### (가) 재료 및 분량(1시료 분량)

통 오리 1kg, 물 6kg은 각 시료모두 같은 양에 전통적인 레시피가 적용되는 시료에만 대파100g, 마늘70g, 생강30g, 황기 20g, 청주60g이 들어가고 각 시료에 첨가된 소금(99.9% 순도의 NaCl, 덕산화학)과 건 함초의 양은 <표 6-3>과 같다.

<표 6-3> 오리고기 수육 시료의 첨가된 NaCl, 신선 함초, 물, 오리고기, 각종 육수 재료의 양

	시료1 (맹물+ 소금100%)	시료2 (맹물+ 건 함초100%)	시료3 (전통레시피+ 소금)	시료4 (전통레시피+ 건 함초)
Nacl	16.68g	-	16.68g	8.34g
건 함초	-	60g	-	30g
물	6kg	6kg	6kg	6kg
생 오리	1kg	1kg	1kg	1kg
대파	-	-	100g	100g
마늘	-	-	70g	70g
생강	-	-	30g	30g
황기	-	-	20g	20g
청주	-	-	60g	60g

#### (나) 시료 준비 방법

오리는 잘 씻어 20분간 20분 정도 담가 핏물을 뺀다. 대파, 마늘, 생강, 황기는 흐르는 물에 잘 씻는다. 오리와 대파, 마늘, 생강, 황기를 넣고 1시간 끓인다.

#### (다) 시료 제시 방법

관능검사용 시료는 관능검사용 시료는 적정온도 (65-70°C)를 유지하기 위해 갈색 병 100ml에 한 시료 당 오리다리 살, 가슴살, 껍질 각종 부위(30g-40g)을 담아 오븐에 보온한 후 제공하였다. 평가 시 시료와 시료 사이의 입가심 물질로 미지근한 물과 크래커를 제공하였다. 시료의 제시 순서는 윌리엄평방라틴계획 법으로 정하였다. 패널은 설문지에 각 시료마다 표준시료와 비교하여 관능적인 특성 강도를 평가하였다. 건 함초 첨가로 인해 시료간의 외관 차이가 있어 갈색 병에 제공하였고, 외관은 마지막에 자연광으로 평가하였다. 실험은 3회 반복하여 실시하였다.

#### (라) 묘사분석 패널

평소 묘사분석에 관심이 있는 20대 여대생 8명 (서울여자대학교)이 참여하였다.

#### (마) 묘사분석 절차

묘사분석은 돼지고기·닭고기·오리고기 수육에 대해 각각 독립적으로 진행하였고 각 실험은 훈련과 본 실험으로 나뉘어졌다. 패널은 훈련 중 짠맛에 대한 표준척도를 숙지한 후 각 실험 마다 조리법 별로 관능적 특성 용어를 개발하였으며 개발된 관능적 특성 용어에 대한 정의, 각 정의에 해당하는 표준 시료 및 표준 강도를 확립하였다. 돼지고기·닭고기·오리고기 수육에 대한 관능적 특성 및 표준시료는 표 2-4, 표 2-6, 표 2-8에서 제시된 바와 같다.

본 실험은 훈련 과정 중에 개발된 관능적 특성과 이들에 대한 표준시료를 사용하여 각 시료에 대한 강도 평가를 실시하였다. 패널은 설문지를 받고 각 시료마다 표준시료와 비교하여 관능적 특성 강도를 평가하였으며 0-14점 항목 척도를 사용하였다. 패널은 실험 1시간 전 음식물의 섭취를 금하였고 평가 시 패널 간 대화를 금하였다. 각 조리법 별 총 3회 반복하여 실험을 진행하였다.

#### (바) 통계분석

각 조리법 별 시료의 소금과 함초의 첨가량에 따라 관능적 특성 강도가 유의적으로 차이가 있는지 분석하기 위해 분산분석 및 Duncan의 다 시료 검정을 실시하였다. 모든 분석은 SPSS를 사용하였다.

### (2) 실험 결과

#### 가. 소금과 건 함초의 첨가량에 따른 돼지고기 수육의 관능적 특성

##### (1) 돼지고기 수육의 관능적 특성 용어

소금과 건 함초의 첨가량이 다른 4종의 돼지고기 수육에 대해 묘사분석을 실시한 결과 향 4개(돼지고기냄새, 돼지누린내, 한약재 향, 된장 향), 맛/향미 8개(전반맛 강도, 짠맛, 단맛, 감칠맛, 돼지고기 향미, 돼지고기 누린 향미, 한약재 향미, 된장향미), 입안감촉 4개(입안 코팅감, 촉촉함, 텁텁함/혀끝아림, 펄펄함), 외관 2개 (갈색 정도, 윤기정도) 특성 등 총 18개 특성이 개발되었다<표 6-4>.

<표 6-4>건 함초를 첨가한 돼지고기 수육 시료의 관능적 특성 용어, 정의, 표준시료 표준시료의 표준강도

	특성	정의	표준시료	점수
외관	돼지고기냄새	돼지고기에서 느껴지는 향	편육	12점
	돼지누린내	돼지고기에서 느껴지는 향	막창	12점
	한약재향	한약재에서 느껴지는 향	감초끓인물	9점
	된장향	된장에서 느껴지는 향	된장	9점
맛/향미	전반맛강도	-	-	-
	짠맛	소금수용액에서 느껴지는 짠맛	NaCl 0.5%수용액	5점

	단맛	설탕수용액에서 느껴지는 단맛	설탕 3%수용액	3점
	감칠맛	MSG수용액에서 느껴지는 감칠맛	MSG 0.3%수용액	4점
	돼지고기 향미	돼지고기에서 느껴지는 향미	편육	12점
	돼지누린 향미	돼지고기에서 느껴지는 향미	막창	12점
	한약재 향미	한약재에서 느껴지는 향미	쌍화탕+물	7점
	된장 향미	된장에서 느껴지는 향미	된장	9점
입안감촉	입안코팅감	입안에서기름진정도	-	
	촉촉함	입안에서 촉촉함	-	
	텃텃함/ 혀끝아름	우린녹차에서 느껴지는 텃텃함	우린녹차	7점
	퍽퍽함	닭 가슴살에서 느껴지는 퍽퍽함	삶은 닭가슴살	9점
외관	갈색정도	-	-	-
	윤기정도	-	-	-

(2) 소금과 건 함초의 첨가량에 따른 돼지고기 수육의 관능적 특성

소금과 건 함초의 첨가량이 다른 4종의 돼지고기 수육 시료 간 18개 관능적 특성 강도의 차이가 있는 지 분산 분석을 실시한 결과 갈색정도를 제외한 모든 관능적 특성에서 시료 간 유의적 차이( $p < 0.05$ )가 나타나지 않았다.

돼지누린내, 돼지고기 누린 향미 특성에서 시료간의 유의적 차이( $p < 0.05$ )는 보이지 않으나 맹물+NaCl시료가 가장 높게 평가되었고, 전통레시피+건 함초 시료가 가장 낮게 평가되었다. 이를 통해 건 함초를 적용한 시료에서 상대적으로 돼지누린내, 돼지고기 누린 향미를 감소시키는 경향을 볼 수 있다. 또한, 짠맛 정도 특성에서도 시료간의 유의적 차이( $p < 0.05$ )는 보이지 않으나 건 함초를 적용한 시료 2종(맹물+건 함초, 전통레시피+건 함초)은 짠맛 정도가 낮게 평가되어 동일한 염 농도이나 다량의 무기질을 포함하여 짠맛이 상대적으로 낮은 것으로 사료된다.(<표 6-2>소금과 건 함초의 첨가량이 다른 돼지고기 수육 4종의 관능적 특성 평균값)

<표 6-5> 소금과 건 함초의 첨가량이 다른 돼지고기 수육 4종의 관능적 특성 평균값

	돼지 고기 냄새	돼지 누린 내	한약 재향	된장 향	전반 맛강 도	짠맛	단맛	감칠 맛	돼지 고기 향미	돼지 고기 누린 향미	한약 재향 미	된장 향미	입안 코팅 감	촉촉 함	텃텃 함/ 혀끝 아름	퍽퍽 함	갈색 정도	윤기 정도
맹물 + NaCl	9.96 <sup>a</sup>	8.38 <sub>a</sub>	1.50 <sup>a</sup>	1.50 <sup>a</sup>	7.54 <sup>a</sup>	3.33 <sup>a</sup>	1.67 <sup>a</sup>	3.88 <sup>a</sup>	7.33 <sup>a</sup>	6.54 <sup>a</sup>	1.21 <sup>a</sup>	1.33 <sup>a</sup>	6.08 <sup>a</sup>	6.38 <sup>a</sup>	4.21 <sup>a</sup>	5.33 <sup>a</sup>	5.33 <sup>a</sup>	6.46 <sub>a</sub>
맹물 + 건 함초	10.08 <sub>a</sub>	7.96 <sub>a</sub>	1.71 <sub>a</sub>	1.67 <sup>a</sup>	6.75 <sup>a</sup>	2.46 <sup>a</sup>	1.96 <sup>a</sup>	3.58 <sup>a</sup>	6.96 <sup>a</sup>	5.83 <sup>a</sup>	1.38 <sup>a</sup>	1.29 <sup>a</sup>	6.33 <sup>a</sup>	5.71 <sup>a</sup>	3.92 <sup>a</sup>	5.42 <sup>a</sup>	6.17 <sup>ab</sup>	6.38 <sub>a</sub>
전통 레시 피 + NaCl	9.50 <sup>a</sup>	8.04 <sub>a</sub>	1.42 <sub>a</sub>	1.54 <sup>a</sup>	7.79 <sup>a</sup>	2.92 <sup>a</sup>	1.71 <sup>a</sup>	4.17 <sup>a</sup>	7.75 <sup>a</sup>	5.92 <sup>a</sup>	0.96 <sup>a</sup>	1.04 <sup>a</sup>	6.46 <sup>a</sup>	6.71 <sup>a</sup>	3.46 <sup>a</sup>	5.67 <sup>a</sup>	7.13 <sup>b</sup>	5.38 <sub>a</sub>
전통 레시 피 + 건 함초	9.63 <sup>a</sup>	7.29 <sub>a</sub>	1.75 <sub>a</sub>	1.58 <sup>a</sup>	7.17 <sup>a</sup>	2.79 <sup>a</sup>	1.83 <sup>a</sup>	3.50 <sup>a</sup>	6.92 <sup>a</sup>	5.75 <sup>a</sup>	1.29 <sup>a</sup>	1.00 <sup>a</sup>	5.92 <sup>a</sup>	5.37 <sup>a</sup>	3.79 <sup>a</sup>	6.62 <sup>a</sup>	6.42 <sup>b</sup>	5.37 <sub>a</sub>

나. 소금과 건 함초의 첨가량에 따른 닭고기 수육의 관능적 특성

(1) 닭고기 수육의 관능적 특성 용어

소금과 건 함초의 첨가량이 다른 4종의 닭고기 수육에 대해 묘사분석을 실시한 결과 향 3개(닭고기냄새, 닭고기누린내, 찢밤 냄새), 맛/향미 8개(전반맛 강도, 짠맛, 단맛, 감칠맛, 신맛, 찢밤 향미, 닭고기 향미, 닭고기 누린 향미), 입안감촉 3개(입안코팅감, 촉촉함, 딱딱함), 외관 2개 (갈색정도, 윤기정도) 특성 등 총 16개 특성이 개발되었다<표 6-6>.

<표 6-6> 건 함초를 첨가한 닭고기 수육 시료의 관능적 특성 용어, 정의, 표준시료 및 표준시료의 표준강도

	특성	정의	표준시료	점수
향	닭고기 냄새	닭고기에서 느껴지는 향	삶은 닭 가슴살	9점
	닭고기 누린내	닭 껍질에서 느껴지는 향	삶은 닭 껍질	12점
	찢밤 냄새	찢밤에서 느껴지는 향	찢 밤	10점
맛/향미	전반맛강도	-	-	-
	짠맛	소금수용액에서 느껴지는 짠맛	NaCl 0.5%수용액	5점
	단맛	설탕수용액에서 느껴지는 단맛	설탕 3%수용액	3점
	감칠맛	MSG수용액에서 느껴지는 감칠맛	MSG 0.3%수용액	4점
	신맛	구연산용액에서 느껴지는 신맛	구연산 0.07% 수용액	7점
	찢밤 향미	찢밤에서 느껴지는 향미	찢 밤	12점
	닭고기 향미	닭고기에서 느껴지는 향미	삶은 닭 가슴살	9점
	닭고기 누린 향미	닭 껍질에서 느껴지는 향미	삶은 닭 껍질	12점
입안감촉	입안코팅감	입안에서 기름진 정도	-	
	촉촉함	입안에서 촉촉함	-	
	딱딱함	닭 가슴살에서 느껴지는 딱딱함	삶은 닭 가슴살	9점
외관	갈색정도	닭고기 수육의 갈색정도	-	-
	윤기정도	닭고기 수육의 윤기	-	-

(2) 소금과 건 함초의 첨가량에 따른 닭고기 수육의 관능적 특성

소금과 건 함초의 첨가량이 다른 4종의 닭고기 수육 시료 간 16개 관능적 특성 강도의 차이가 있는 지 분산 분석을 실시한 결과 갈색정도, 윤기정도를 제외한 모든 관능적 특성에서 시료 간 유의적 차이( $p < 0.05$ )가 나타나지 않았다.

닭고기누린내, 닭고기 누린 향미 특성에서 시료간의 유의적 차이( $p < 0.05$ )는 보이지 않으나 건 함초를 적용한 시료 2종(맹물+ 건 함초, 전통레시피+ 건 함초)이 낮게 평가되어 건 함초가 닭고기누린내, 닭고기 누린 향미를 낮추는 경향이 있다. 또한, 외관 평가 항목인 갈색정도, 윤기정도 특성에서 맹물+ 건 함초 시료가 상대적으로 다른 3종의 시료보다 높게 평가되어 시각적으로 긍정적인 영향을 줄 것으로 사료된다. 촉촉함 특성에서 시료간의 유의적 차이( $p < 0.05$ )는 보이지 않으나 건 함초를 적용한 시료 2종(맹물+ 건 함초, 전통레시피+ 건 함초)이 높게 평가되었고, 딱딱함 특성에서도 건 함초를 적용한 시료 2종(맹물+ 건 함초, 전통레시피+ 건 함초)이 낮게 평가되어 건 함초를 적용한 시료들은 육질을 부드럽게 하는 경향이 있다. (<표 6-7> 소금과 건 함초의 첨가량이 다른 닭고기 수육 4종의 관능적 특성 평균값)



<표 6-7> 소금과 건 함초의 첨가량이 다른 닭고기 수육 4종의 관능적 특성 평균값

sample/ 농도	닭고기 냄새	닭 고기 누린 내	찜냄새	전반 맛강 도	짠맛	단맛	감칠 맛	신맛	찜냄 향미	닭고 기향 미	닭 고기 누린 향미	입안 코팅 감	촉촉 함	퍽퍽 함	갈색 정도	윤기 정도
맹물 + Nacl	9.17 <sup>a</sup>	8.29 <sup>a</sup>	5.21 <sup>a</sup>	6.88 <sup>a</sup>	2.54 <sup>a</sup>	1.79 <sup>a</sup>	3.25 <sup>a</sup>	1.88 <sup>a</sup>	5.21 <sup>a</sup>	8.58 <sup>a</sup>	5.42 <sup>a</sup>	4.00 <sup>a</sup>	5.29 <sup>a</sup>	6.08 <sup>a</sup>	5.96 <sup>a</sup>	5.96 <sup>bc</sup>
맹물 + 건 함 초	9.00 <sup>a</sup>	7.79 <sup>a</sup>	6.13 <sup>a</sup>	7.37 <sup>a</sup>	2.67 <sup>a</sup>	1.38 <sup>a</sup>	3.21 <sup>a</sup>	1.58 <sup>a</sup>	5.29 <sup>a</sup>	8.29 <sup>a</sup>	5.21 <sup>a</sup>	3.71 <sup>a</sup>	5.58 <sup>a</sup>	5.79 <sup>a</sup>	7.25 <sup>b</sup>	6.79 <sup>c</sup>
전통 레시 피 + Nacl	9.42 <sup>a</sup>	8.42 <sup>a</sup>	4.75 <sup>a</sup>	7.50 <sup>a</sup>	3.13 <sup>a</sup>	1.75 <sup>a</sup>	3.67 <sup>a</sup>	2.08 <sup>a</sup>	5.13 <sup>a</sup>	8.88 <sup>a</sup>	5.58 <sup>a</sup>	3.79 <sup>a</sup>	5.29 <sup>a</sup>	5.92 <sup>a</sup>	5.33 <sup>a</sup>	5.25 <sup>ab</sup>
전통 레시 피 + 건 함 초	9.42 <sup>a</sup>	7.96 <sup>a</sup>	5.29 <sup>a</sup>	7.54 <sup>a</sup>	2.58 <sup>a</sup>	1.83 <sup>a</sup>	3.67 <sup>a</sup>	1.71 <sup>a</sup>	4.75 <sup>a</sup>	8.62 <sup>a</sup>	4.75 <sup>a</sup>	4.42 <sup>a</sup>	5.75 <sup>a</sup>	5.75 <sup>a</sup>	5.71 <sup>a</sup>	4.92 <sup>a</sup>

다. 소금과 건 함초의 첨가량에 따른 오리고기 수육의 관능적 특성

(1) 오리고기 수육의 관능적 특성 용어

소금과 건 함초의 첨가량이 다른 4종의 오리고기 수육에 대해 묘사분석을 실시한 결과 향 5개(오리고기 누린내, 삶은 돼지 간 냄새, 한약재향, 익힌 채소 향, 생강 향), 맛/향미 10개(전반맛 강도, 짠맛, 단맛, 신맛, 감칠맛, 오리누린 향미, 삶은 돼지 간 향미, 한약재 향미, 익힌 채소 향미, 생강 향미), 입안감촉 3개(입안 코팅감, 촉촉함, 딱딱함), 외관 2개 (갈색정도, 윤기정도) 특성 등 총 20개 특성이 개발되었다<표 6-8>.

<표 6-8> 건 함초를 첨가한 오리고기 수육 시료의 관능적 특성 용어, 정의, 표준시료 및 표준시료의 표준강도

	특성	정의	표준시료	점수
향	오리고기 누린내	오리 껍질에서 느껴지는 향	삶은 오리 껍질	12점
	삶은 돼지 간 냄새	삶은 돼지 간에서 느껴지는 냄새	삶은 돼지 간	12점
	한약재향	한약재에서 느껴지는 향	쌍화탕+물	9점
	익힌 채소 향	익힌 채소에서 느껴지는 향	익힌 파와 마늘	9점
	생강 향	생강 편에서 느껴지는 향	생강편	9점
맛/향미	전반맛강도	-	-	-
	짠맛	소금수용액에서 느껴지는 짠맛	NaCl 0.5%수용액	5점
	단맛	설탕수용액에서 느껴지는 단맛	설탕 3%수용액	3점
	신맛	구연산용액에서 느껴지는 신맛	구연산 0.07% 수용액	7점
	감칠맛	MSG수용액에서 느껴지는 감칠맛	MSG 0.3%수용액	4점
	오리누린 향미	오리 껍질에서 느껴지는 향미	삶은 오리 껍질	9점
	삶은 돼지 간 향미	삶은 돼지 간에서 느껴지는 향미	삶은 돼지 간	12점
	한약재 향미	한약재에서 느껴지는 향미	쌍화탕+물	7점
	익힌 채소 향미	익힌 채소에서 느껴지는 향미	익힌 파와 마늘	10점
	생강 향미	생강 편에서 느껴지는 향미	생강편	10점
입안감촉	입안 코팅감	입안에서 기름진 정도	-	-
	촉촉함	입안에서 촉촉함	-	-
	딱딱함	닭 가슴살에서 느껴지는 딱딱함	삶은 닭 가슴살	9점
외관	갈색정도	오리고기 수육의 갈색정도	-	-
	윤기정도	오리고기 수육의 윤기	-	-

(2) 소금과 건 함초의 첨가량에 따른 오리고기 수육의 관능적 특성

소금과 건 함초의 첨가량이 다른 4종의 오리고기 수육 시료 간 20개 관능적 특성 강도의 차이가 있는 지 분산 분석을 실시한 결과 익힌 채소 향, 갈색정도, 윤기정도를 제외한 모든 관능적 특성에서 시료 간 유의적 차이( $p < 0.05$ )가 나타나지 않았다.

외관항목의 갈색정도 특성에서 시료간의 유의적 차이( $p < 0.05$ )가 있는 건 함초를 적용한 시료 2종(맹물+ 건 함초, 전통레시피+ 건 함초)이 높게 평가되어 수육의 외관을 갈색정도를 진하게 하여 외관에 긍정적인 영향을 주었을 것으로 사료된다. 오리고기누린내, 오리고기 누린 향미 특성에서 시료간의 유의적 차이( $p < 0.05$ )는 없으나 오리고기 특유의 누린내가 강하여 건 함초를 적용한 것보다 전통 레시피가 적용된 2종(전통레시피+NaCl, 전통레시피+ 건 함초)이 낮게 평가되었고, 전반맛 강도 특성은 다양한 재료가 혼합된 전통 레시피가 적용된 2종(전통레시피+NaCl, 전통레시피+ 건 함초)가 높게 평가되었다.(<표 6-9> 소금과 건 함초의 첨가량이 다른 오리고기 수육 4종의 관능적 특성 평균값)

<표 6-9>소금과 건 함초의 첨가량이 다른 오리고기 수육 4종의 관능적 특성 평균값

sample/ 농도	오리 고기 누린 내	삶은 돼지 간 냄새	한약 재향	익힌 채소 향	생강 향	전반 맛 강도	짠맛	단맛	신맛	감칠 맛	오리 고기 누린 향미	삶은 돼지 간 향미	한약 재향 미	익힌 채소 향미	생강 향미	입안 코팅 감	촉촉 함	퍽퍽 함	갈색 정도	윤기 정도
맹물 + Nacl	7.79 <sup>a</sup>	7.25 <sup>a</sup>	1.67 <sup>a</sup>	3.71 <sup>a</sup>	1.63 <sup>a</sup>	6.58 <sup>a</sup>	2.71 <sup>a</sup>	1.29 <sup>a</sup>	2.12 <sup>a</sup>	2.54 <sup>a</sup>	5.21 <sup>a</sup>	6.58 <sup>a</sup>	1.79 <sup>a</sup>	2.92 <sup>a</sup>	1.33 <sup>a</sup>	3.71 <sup>a</sup>	4.42 <sup>a</sup>	6.50 <sup>a</sup>	7.08 <sup>b</sup>	7.38 <sup>c</sup>
맹물 + 건 함초	8.25 <sup>a</sup>	8.00 <sup>a</sup>	2.04 <sup>a</sup>	3.75 <sup>a</sup>	1.54 <sup>a</sup>	6.17 <sup>a</sup>	2.46 <sup>a</sup>	1.17 <sup>a</sup>	2.38 <sup>a</sup>	2.75 <sup>a</sup>	5.38 <sup>a</sup>	7.62 <sup>a</sup>	1.58 <sup>a</sup>	2.71 <sup>a</sup>	1.17 <sup>a</sup>	4.17 <sup>a</sup>	4.25 <sup>a</sup>	6.63 <sup>a</sup>	7.88 <sup>b</sup>	5.17 <sup>a</sup>
전통 레시 피 + Nacl	8.21 <sup>a</sup>	7.46 <sup>a</sup>	1.67 <sup>a</sup>	4.42 <sup>a</sup> <sub>b</sub>	1.79 <sup>a</sup>	6.87 <sup>a</sup>	2.50 <sup>a</sup>	1.58 <sup>a</sup>	1.87 <sup>a</sup>	2.54 <sup>a</sup>	5.04 <sup>a</sup>	7.37 <sup>a</sup>	1.50 <sup>a</sup>	2.71 <sup>a</sup>	1.13 <sup>a</sup>	3.79 <sup>a</sup>	4.17 <sup>a</sup>	6.50 <sup>a</sup>	5.96 <sup>a</sup>	6.50 <sup>b</sup> <sub>c</sub>
전통 레시 피 + 건 함초	8.46 <sup>a</sup>	7.17 <sup>a</sup>	1.92 <sup>a</sup>	4.79 <sup>b</sup>	1.54 <sup>a</sup>	6.54 <sup>a</sup>	2.33 <sup>a</sup>	1.42 <sup>a</sup>	2.29 <sup>a</sup>	2.25 <sup>a</sup>	5.17 <sup>a</sup>	7.58 <sup>a</sup>	1.62 <sup>a</sup>	2.75 <sup>a</sup>	1.13 <sup>a</sup>	4.25 <sup>a</sup>	4.33 <sup>a</sup>	6.00 <sup>a</sup>	7.58 <sup>b</sup>	6.00 <sup>a</sup> <sub>b</sub>

라. 돼지고기·닭고기·오리고기 3종 수육의 육수 조지방과 함유된 함초에서의 조지방 함량 분석결과

(1) 돼지고기 수육

돼지고기 4종의 육수를 채취하고, 레시피가 다른 육수 4종에 건 함초가 첨가된 육수 2종에 함유된 함초 또한 채취하여 조지방의 함량을 검사하였다. 그리고 같은 시료를 한 반복을 더 채취하여 균일한 조지방의 함량을 알아보하고자하였다. 돼지고기 수육의 시료별 육수 조지방과 함유된 함초에서의 조지방 함량이다. <표 6-10> 레시피에 건 함초가 함유되어있는 P2, P4, P2-1, P4-1 4종의 시료는 육수에 상대적으로 많은 조지방이 함유된 것으로 보아 고기에 있는 기름기가 육수로 많이 빠져나왔음을 짐작할 수 있고, 또한 함유된 건 함초에서의 보다 높은 조지방이 포함되어 있어 육수에 빠져있던 기름이 건 함초에 흡수되었으므로 사료된다.

(2) 닭고기 수육

닭고기 4종의 육수를 채취하고, 레시피가 다른 육수 4종에 건 함초가 첨가된 육수 2종에 함유된 함초 또한 채취하여 조지방의 함량을 검사하였다. 그리고 같은 시료를 한 반복을 더 채취하여 균일한 조지방의 함량을 알아보하고자하였다. 닭고기 수육의 시료별 육수 조지방과 함유된 함초에서의 조지방 함량이다. <표 6-11> 레시피에 건 함초가 함유되어있는 C2, C4, C2-1, C4-1 4종의 시료는 육수에 상대적으로 많은 조지방이 함유된 것으로 보아 고기에 있는 기름기가 육수로 많이 빠져나왔음을 짐작할 수 있고, 또한 함유된 건 함초 시료 C2a, C4a, C2a-1, C4a-1에서의 보다 높은 조지방이 포함되어 있어 육수에 빠져있던 기름이 건 함초에 흡수되었으므로 사료된다.

(3) 오리고기 수육

오리고기 4종의 육수를 채취하고, 레시피가 다른 육수 4종에 건 함초가 첨가된 육수 2종에 함유된 함초 또한 채취하여 조지방의 함량을 검사하였다. 그리고 같은 시료를 한 반복을 더 채취하여 균일한 조지방의 함량을 알아보하고자하였다. 닭고기 수육의 시료별 육수 조지방과 함유된 함초에서의 조지방 함량이다. <표 6-11> 돼지고기, 닭고기 수육에 비해 상대적으로 시료들 간의 조지방 함량의 차이가 크게 나지는 않으나 레시피에 건 함초가 함유되어있는 D2, D2-1 2종의 시료는 육수dp 조지방이 함유된 것으로 보아 고기에 있는 기름기가 육수로 많이 빠져나왔음을 짐작할 수 있고, 또한 함유된 건 함초 시료 D2a, D4a, D2a-1, D4a-1에서의 보다 높은 조지방이 포함되어 있어 육수에 빠져있던 기름이 건 함초에 흡수되었으므로 사료된다.

<표 6-10> 돼지고기 수육의 시료별 육수 조지방과 함유된 함초에서의 조지방 함량

시료번호	시료	조지방함량(g/100g)
P1	맹물+Nacl	0.02
P2	맹물+ 건 함초	0.08
P3	전통레시피+Nacl	0.02
P4	전통레시피+ 건 함초	0.07
P2a	맹물+ 건 함초(함초)	1.41
P4a	전통레시피+ 건 함초(함초)	2.50
P1-1	맹물+Nacl	0.02
P2-1	맹물+ 건 함초	0.05
P3-1	전통레시피+Nacl	0.00
P4-1	전통레시피+ 건 함초	0.10
P2a-1	맹물+ 건 함초(함초)	0.67
P4a-1	전통레시피+ 건 함초(함초)	0.93

<표 6-11> 닭고기 수육의 시료별 육수 조지방과 함유된 함초에서의 조지방 함량

시료번호	시료	조지방함량(g/100g)
C1	맹물+Nacl	0.09
C2	맹물+ 건 함초	0.06
C3	전통레시피+Nacl	0.00
C4	전통레시피+ 건 함초	0.25
C2a	맹물+ 건 함초(함초)	1.25
C4a	전통레시피+ 건 함초(함초)	1.10
C1-1	맹물+Nacl	0.00
C2-1	맹물+ 건 함초	0.29
C3-1	전통레시피+Nacl	0.00
C4-1	전통레시피+ 건 함초	0.09
C2a-1	맹물+ 건 함초(함초)	2.91
C4a-1	전통레시피+ 건 함초(함초)	1.80

<표 6-12> 오리고기 수육의 시료별 육수 조지방과 함유된 함초에서의 조지방 함량

시료번호	시료	조지방함량(g/100g)
D1	맹물+Nacl	0.02
D2	맹물+ 건 함초	0.04
D3	전통레시피+Nacl	0.03
D4	전통레시피+ 건 함초	0.01
D2a	맹물+ 건 함초(함초)	0.38
D4a	전통레시피+ 건 함초(함초)	1.06
D1-1	맹물+Nacl	0.09
D2-1	맹물+ 건 함초	1.29
D3-1	전통레시피+Nacl	0.07
D4-1	전통레시피+ 건 함초	0.02
D2a-1	맹물+ 건 함초(함초)	3.57
D4a-1	전통레시피+ 건 함초(함초)	0.94

## 제 8 절 기능성 장류 개발 연구

### 1. 연구내용

염생 식물이 가지는 생리활성물질의 기능을 평가하고 장류 발효에 영향을 미치는 특정 함초 성분의 강화를 위한 함초의 발효 기술과 콩을 적용한 제품 및 제조공정을 개발하였다.

함초는 해조 수준의 미네랄을 함유하고 있으며 녹색식물과 같은 풍부한 항산화물질을 함유하고 있다. 그러나 염분의 함량이 건조중량 기준으로 25-30% 수준으로 직접 식용으로 사용하거나 가공식품을 제조하는데 제약이 있다. 따라서, 함초로부터 염분을 제거하거나 함초의 염분함량이 문제가 되지 않는 식품에 적용하는 것이 함초를 효율적으로 응용하는 방법이다. 건조함초는 구매과정과 저장이 용이하기 때문에 다양한 용도로 사용할 수 있다. 그러나 표면에 결정화된 소금이 붙어 있어 이를 제거하는 과정이 필요하다. 물로 세척하여 흙먼지와 소금을 제거한 함초는 햇볕에 하루 정도 노출시키면 완전히 건조된다. 즉, 탈염과 재건조한 함초를 파쇄하여 과립 상태로 만들고 이를 다시 불밀로 분쇄하여 분말화한다. 분말함초는 식용으로 사용할 수 있는 수준의 미세 입자로 식품가공 과정에서 사용할 수 있다. 장류의 기본인 대두는 분말이나 과립의 상태로 가공하여 함초와 혼합하여 특정한 미생물과 자연접종되는 미생물을 혼용하여 발효한다. 발효과정에서 장류의 발효에 관여하는 미생물은 DNA를 추출하여 염기서열분석을 기반으로 동정하여 장류의 발효과정에서 발생하는 생물학적 작용에 의한 특성을 표준화한다. 전통장류의 품질은 발효와 숙성에 의해 결정되기 때문에 전통적으로 사용하는 방법에 준하여 발효와 숙성과정을 통해 제조되었다.

발효와 숙성과정을 통해 제조한 장류는 영양성분과 기능성성분으로 분류하여 정밀하게 분석하여 전통적인 방법으로 제조한 일반적인 장류와의 기능적인 차별성을 비교한다. 보편적으로 적용하는 분석항목은 미네랄, 유기산, 향기성분, 수용성 아미노산, 질소함량, 항산화물질의 함량으로 장류의 맛과 품질을 결정하는 기준이 된다.

### 2. 연구 결과

#### 가. 함초의 발효

##### (1) 연구 결과

- 본 연구에 따르면, 건조분말, 녹즙, 첨가소금, 환, 셀러드 등의 단순가공에 의한 건강보조식품으로서의 한계를 벗어나지 못하는 함초(통통마디)를 식품의 주재료로서 이용할 수 있는 방법의 개발이 가능하다. 재배와 수확시기가 제한되어 있고 특히, 고농도의 염분을 함유하고 있으며 생체로서의 저장성의 한계를 고려하면 건조함초를 이용하는 것이 경쟁력을 갖는다. 생함초 즙으로부터 염분을 제거하는 것이 기술적으로 불가능한 것은 아니지만, 비용과 설비를 고려하면 경제성이 없다. 또한 본 연구 결과에 따르면 생 함초는 고농도의 염분

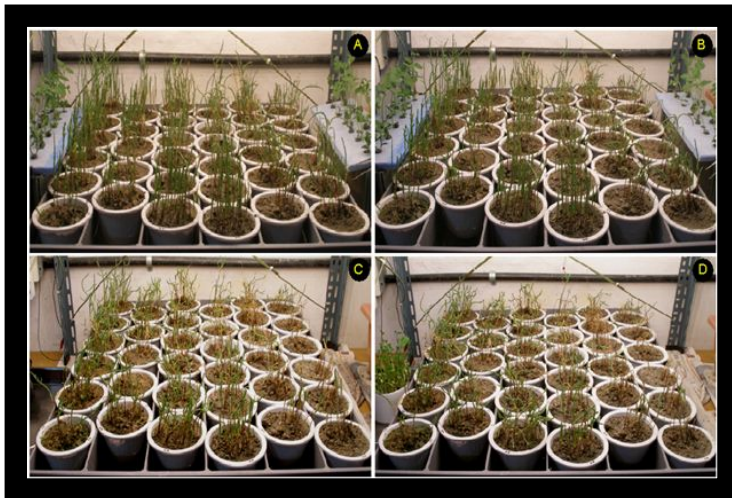
을 포함하고 있어 직접 식용으로 사용하기 어렵고 생즙은 염도와 점도가 높고 익숙하거나 친숙하지 않은 향을 포함하고 있어 식품의 주재료로서 사용하는 것이 용이하지 않다. 따라서 수확시기에 건조하여 장시간 저장하기 좋은 형태로 판매되고 있는 건조함초를 이용하여 본 1차년도 과제에 필요한 연구를 수행함으로써 원료의 수급, 재료의 안정성, 저비용의 탈염, 우수한 미생물의 발효촉진효과 등의 결과를 얻었다.





<그림 1>

NaCl을 제거한 토양을 화분에 담아 함초를 재배하였다.



<그림 2>

NaCl을 농도별로 함유한 토양에서 배양한 함초의 성장 패턴. 왼쪽에서부터 1.3% (line 1), 2.8% (line 2), 3.5% (line 3), 4.4% (line 4), 4.5% (line 5) and 5.2% (line 6)의 NaCl을 포함한다. 함초는 2009년 7월 22일부터 10월 17일까지 배양하였다. 2주 (A), 4주(B), 6주(C), 8주(D)째의 함초의 모습.

NaCl contents in soil (%, w/w)	1.3	2.8	3.5	4.4	4.5	5.2
NaCl contents in glasswort (%, w/w)	27	36	38	39	37	38

<표 1>

NaCl을 함유한 물(%)과 토양(g per 100g of dry soil)에서 6주간 배양한 함초(g per 100g of dry glasswort)의 NaCl 농도를 AgNO<sub>3</sub> 적정법을 사용하여 구하였다.

NaCl contents in water (%, w/v)	0.5>	0.5>	0.5>	-	-	-
NaCl contents in soil (%, w/w)	-	-	-	0.5>	0.5>	0.5>
NaCl contents in glasswort (%, w/w)	25.5	25.4	25.5	28.3	27.7	27.8

<표 2>

NaCl을 함유한 함초를 NaCl을 첨가하지 않은 토양과 물에서 배양하였다. 작은 화분에서 발아시킨 함초를 3개의 수경재배 통(20L)과 3개의 화분(20 L)으로 옮겨 8주간 배양하였다. 수경재배 통의 물은 날마다 추가하여 주었으며 화분에는 하루 두 번 1L의 물을 뿌려주었다. 각각 20개의 함초를 취하여 건조하여 건조중량 대비 NaCl농도를 측정하였다.

- 함초는 신선한 상태에서 추출할 때 바닷물 수준의 염분을 함유하고 있으며 건조중량을 기준으로 측정하면 30% (w/w)의 염분을 함유한다. 이러한 함초의 특성을 이용하여 함초의 염분축적 기능을 실험적으로 확인하였다. 대부도의 갯펄에서 뿌리를 손상하지 않은 함초를 흙과 함께 채취하여 소형 화분에 5-6 그루씩 식재한 후 염분을 함유하지 않은 흐르는 물에 2주간 담가 토양의 염분을 충분히 제거하였다 (그림 1). 염분을 제거한 함초화분을 다시 염분의 농도를 각각 0.5%, 1.5%, 2.5%, 3.5%, 4.5%, 5.5% 함유하는 물에 2주간 담가 토양에 적당한 양의 염분이 흡수되어 평형상태가 되도록 하였다. 평형상태에서 토양의 염분을 측정된 결과 건조중량 기준으로 1.3% (line 1), 2.8% (line 2), 3.5%

(line 3), 4.4% (line 4), 4.5% (line 5), 5.2% (line 6) 였다. 이는 바닷물보다 낮거나 높은 농도로 본 연구를 진행하는데 적합한 조건이다. 토양염분의 평형상태에서 8주간 배양하면서 함초의 생장특성을 확인하였다. 그림 2에서 보는 바와 같이 1.3%의 염분을 함유한 토양에서 배양한 함초는 6주간 이후 생장이 저해되었다. 한편, 염분이 3.5% 이상인 토양에서 배양한 함초는 생장이 저해되거나 시드는 현상이 발견되었다. 이러한 특성은 함초가 바닷물과 같은 3% 이하의 염분을 함유하는 토양에서 정상적으로 성장할 수 있으나 3.5% 이상의 고농도의 염분을 함유하는 토양에서 생장이 저해될 수 있다는 것을 보여주는 것이다.

- 토양의 염분 농도와 함초의 염분함유량의 상관관계를 확인하기 위하여 배양 6주차에 함초를 채취하여 건조중량 대비 염분을 측정된 결과 표 1에서 보는 바와 같이 함초의 염분함량은 토양의 염도의 영향을 받는 것으로 확인되었으나 토양의 염분 농도 보다 높은 염분을 함유하는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 토양의 염도와 함초의 염분 함유량의 상관관계를 예측할 수 있는 유용한 자료이나, 깻펄에서 채취한 함초와 토양을 그대로 사용하였기 때문에 이식하기 전에 함초에 포함되어 있던 염분의 농도(3%, w/v) 때문에 실험적인 오류를 배제할 수 없다.
- 이러한 문제를 해소하기 위해 함초의 종자를 염분을 첨가하지 않은 토양과 모래에서 발아한 후 토양에서 발아한 함초는 그대로 재배하고 모래에서 발아한 함초는 염분을 첨가하지 않은 수돗물에 옮겨 약 4주간 수경재배 하였다. 재배하는 동안 매일 일정량의 수돗물을 살포하거나 첨가하여 수분을 유지하였다. 함초를 채취하여 건조중량 대비 염도를 측정하였다. 표2에서 보는 바와 같이 염분을 첨가하지 않은 토양과 물에서 재배한 함초에서 바닷물 보다 낮지만, 비교적 높은 농도의 염분을 함유하고 있었다. 이러한 결과는 함초가 성장하는 동안 토양이나 물속에 낮은 농도로 존재하는 염분을 흡수하여 세포내에 축적하는 기능이 있다는 것을 보여주는 것이다.
- 이러한 결과를 근거로 microcosm에서 함초를 재배하면서 토양의 염분 도와 함초의 염분함량 변화 등을 관찰할 계획이다. 이러한 함초의 염분축적 기능은 염분이 높은 토양의 염도를 제거하면서 농가소득 작물인 함초를 재배할 수 있는 다목적 경작을 가능하게는 영농기술의 개발을 가능하게 할 것이다. 또한 염분과 함께 미네랄의 축적 기능을 분석 함으로서 인위적으로 특정 미네랄의 축적을 가능하게 하는 재배기술의 개발 또한 가능할 것이다.

(2) 특허 1.

특허명 : 함초가 함유된 함초누룩 및 그 제조방법/ 함초누룩을 이용한 발효 조성물 및 그 제조방법

특허번호 : 10-1082246 / 출원번호 :2010-35703

특허권자 : 샘표식품 주식회사

발명자 : 장덕규, 이유원, 이명숙, 이민영, 박두현, 윤아람, 전보영, 서하나, 김용호

(A) 특허자료

- 본 발명은 건강보조식품으로 활용되고 있는 엽생 식물의 일종인 함초(퉁퉁마디)를 단순히 식품에 첨가하는 방법이 아닌 누룩의 발효단계서부터 적용하여 함초의 영양학적 특성을 발효 또는 식품 미생물의 대사활성 촉진과 식품을 제조한 후 식품의 영양학적 기능의 향상에 응용하는 방법 및 소비가 감소하고 있는 쌀의 소비를 촉진할 수 있는 방법에 관한 것이다.
- 국립수산물과학원에서 분석한 자료에 따르면 함초의 잎은 수분 90.9%, 조단백 1.6%, 지질 0.2%, 미네랄 4.7%, 소금 3.3%로 구성되어 있다. 이를 건조중량으로 환산하면 조단백이 16.5%, 지질이 2.04%, 미네랄이 47.9%, 소금이 33.7%이다. 이는 밀의 성분 (건조중량으로 환산한 함량: 조단백 12.9%, 지질 1.6%, 탄수화물 85.14, 미네랄 5.76%)과 비교하면 누룩을 제조할 수 없는 구성이다. 따라서 엽분을 제거한 함초에 탄수화물이 풍부한 쌀 (건조중량으로 환산한 함량: 전분 91%, 조단백 7.8%, 지질 1.32%, 미량의 미네랄)을 혼합하면, 누룩을 제조하는데 필요한 성분이 충족된다.
- 일반적으로 누룩을 제조할 때 사용하는 밀은 쌀의 영양성분에 비해 미생물의 생장에 유리하다. 일본식 정종의 제조과정에서 쌀을 이용하여 누룩을 제조하고 있고 우리나라에서도 막걸리의 생산에 쌀 누룩이 이용되고 있지만, 막걸리를 빚을 때 누룩과 탄소원으로 모두 쌀을 사용한다면 밀 누룩과 쌀을 탄소원으로 사용한 제품과는 차이가 있을 것이다. 전통적으로 영양성분의 과학적 분석 기술이 없었던 시절부터 누룩의 원료로 밀을 주로 사용해온 것은 경험적으로 밀과 쌀의 영양성분이 막걸리의 품질을 다르게 하는 원인이 되었기 때문으로 추정된다.
- 건조중량 기준으로 누룩을 제조하기 위한 쌀과 함초의 비율을 8:2로 조절하면 이론적으로 탄수화물은 약 73%, 단백질은 약 10%, 지방은 약 1.3%, 미네랄은 약 10%로 탄수화물과 단백질의 함량은 균류가 성장하는데 부족하지 않은 것으로 판단된다.
- 기 출원되거나 등록된 막걸리 제조와 관련된 특허에 따르면 예외 없이 막걸리의

제조과정에서 건강에 유용하다고 알려진 특정 재료 또는 일반적인 식품의 원료(빵잎, 호박, 현미, 매생이, 과일, 허브, 지장수, 해물, 인삼, 연, 솔, 잣, 버섯 등)를 증자한 곡물(주로 쌀)에 첨가하여 발효하거나 그 추출물을 막걸리 배양액에 첨가하는 방법이 적용되었다. 이러한 방법은 막걸리가 발효되는 과정에서 부 재료로서 첨가한 물질의 영양성분이 물 또는 알코올에 의해 추출되어 막걸리의 성분의 일부가 되는 단순한 혼합물의 기능에 제한될 가능성이 있는 기술이다.

- 이론적으로 막걸리의 제조과정에서 누룩은 전분을 당화하는 효소와 당을 발효하여 알코올로 전환하는 효모를 포함하는 효소-미생물의 복합체로서의 기능을 갖는다. 따라서 누룩을 이용하여 쌀이나 기타 전분질의 곡물을 발효할 때 생산되는 알코올과 이산화탄소에 의해 효모 이외의 다른 종류의 미생물이 성장하기에는 매우 불리한 조건이 형성된다. 이를 근거로 유추하면 막걸리의 발효액에 첨가한 다양한 부 재료는 미생물의 발효대사에 이용되어 특정한 기능성 성분으로 전환되기 보다는 물질 고유의 향과 영양성분으로서 막걸리에 혼입될 수 밖에 없을 것이다.
- 누룩은 전분과 단백질을 포함하는 밀기울, 쌀 등에서 다양한 미생물-특히, 전분의 당화기능이 우수한 미생물-이 성장하면서 세포 외 효소를 분비하고 이 효소에 의해 생성된 당을 이용하여 효모가 증식하는 과정에 의해 제조된다. 누룩이 건조되면 효소는 건조된 상태로 활성을 유지하고 효모는 휴면상태에 있다가 수분과 전분이 첨가되면 전분의 당화와 알코올 발효를 촉진하게 된다.

### **(B) 발명이 이루고자 하는 기술적인 과제**

- 발효식품의 특징은 원료물질이 갖는 영양 성분이 미생물의 대사에 의해 다양한 생리활성효과, 맛, 향, 치감(감칠 맛)을 갖는 성분으로 전환되기 때문에 원료에 존재하지 않았던 새로운 성분이 식품에 포함된다는 것이다. 따라서 막걸리의 제조과정에서 부 재료로서 첨가할 대상물질을 초기의 발효단계에서부터 적용하여 미생물의 영양성분으로 사용되거나 대사과정에 의해 순화, 분해, 생화학적 변화 등의 생물학적 작용을 겪게 하는 것이 필요하다. 본 발명은 전통적으로 누룩을 제조할 때 주로 사용하는 분쇄 통밀 또는 밀기울 대신 쌀과 함초를 이용하여 누룩을 제조하고 이 누룩을 이용하여 막걸리와 음용 식초를 생산할 수 있는 재료와 방법에 관한 것이다.

### **(C) 발명의 구성 및 작용**

- 본 발명을 위한 연구에서는 시중에서 판매되고 있는 건조 함초를 사용하였기 때문에 자료를 비교 분석하는데 건조 중량을 기준으로 하였다. 생 함초는 보관이 어렵고 추출과정에서 엽록소 성분이 과다하게 추출되어 점도가 높고, 염분을 제거하기 어렵기 때문에 본 발명이 목적하는 누룩의 제조에 적용하기 어렵다.

- 본 발명의 방법에 있어서 누룩, 막걸리, 식초의 발효는 보편적으로 알려진 내용을 그대로 답습하거나 변형하여 사용하였다. 예를 들면, 누룩을 제조할 때 세포 외 분비 당화효소를 생산하는 *Aspergillus*속의 균사체를 첨가하여 누룩이 발효되는 동안 특정한 미생물이 우점종이 될 수 있도록 유도하였다. 식초의 발효를 촉진하기 위한 초산균을 인위적으로 접종하지 않았으며 발효가 완료된 막걸리를 그대로 추가 배양하면서 알코올과 초산의 함량을 주기적으로 분석하여 배양시간을 조절하였다.

(D) 실시예

(a) 실시예 1

- 함초를 전문으로 생산하는 업체로부터 구매한 건조 함초의 표면에는 고농도의 염분입자가 붙어 있어 10배의 냉수에 10분간 담가 놓으면 물의 염도가 2.8~3.1%가 될 정도로 염분이 매우 빠르게 세척, 용출된다. 이러한 세척과정은 염분을 제거하는 효과 이외에 함초의 표면에 붙어있는 먼지, 토양입자 등을 제거하는 목적을 달성할 수 있다. 염분을 제거하기 위하여 건 함초를 흐르는 물(약 25도)로 30분간 세척하여 소금을 제거하고 재 건조하여 200 메시 이하의 입자가 되도록 분쇄하였다. 분쇄한 입자를 열수(약 80도)로 추출하여 염분 및 기타 성분을 분석한 결과 세척 후 90% 이상의 염분이 제거되었으나 기타 성분은 세척하는 과정에서 약 10% 미만이 제거되는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 함초에 포함된 다양한 영양성분은 건함초의 조직 내에 결합되어 있고 수용성이 강한 염분은 함초가 과하는 과정에서 수용성이 함께 조직의 밖으로 용출되어 건함초의 표면에서 응고되었기 때문으로 생각된다. 바닷물에 포함된 무기물질은 주로 소금과 기타 다양한 금속염 또는 금속이온으로 알려져 있는데, 이러한 미량의 금속염 또는 금속이온은 소금에 비해 수용성이 낮아 세척하는 과정에서 상대적으로 손실이 적은 것으로 생각된다. 표 1에서 보는 바와 같이 세척 전후 30분간 열수로 추출한 수용성 물질에 포함된 함초성분 가운데 총질소, 총아미노산, 미네랄 성분의 변화는 건조중량과 소금농도의 변화에 비해 상대적으로 매우 적은 것으로 나타났다.

표 1. 건조 함초 분말의 세척 전후 수용성 성분(염분, 총질소, 총아미노산, 미네랄) 함량의 변화

	건조중량 (kg)	총질소 (%)	총아미노산 (%)	미네랄 (mg/kg)	NaCl (g/kg)
세척전	1.1±0.1	0.017±0.0	0.07±0.0	2,733±125	288±15
세척후	0.72±0.09	0.016±0.0	0.07±0.0	2,422±176	22±3

(b) 실시예 2

- 광합성 기능을 갖는 식물은 대사과정에서 생산되는 산소분자에 대한 조직의 보호를 위하여 엽록소 이외에, 카로티노이드, 폴리페놀, 안토시아닌, 플라보놀 등의 항

산화효과를 갖는 성분이 포함되어 있어 이를 근거로 건조 함초에 포함된 항산화 물질을 분석하였다. 표 2에서 보는 바와 같이 와 같이 함초에서 발견되는 항산화 효과를 갖는 총페놀화합물과 폴리페놀 등의 성분은 누룩을 제조할 때 효소를 생산하는 균류와 효모 등의 생장에 도움이 될 수 있고 막걸리, 음용식초 등의 기능성 향상에도 도움이 될 수 있을 것으로 사료된다. 특히, 함초에 함유된 항산화 효과를 갖는 성분, 총페놀화합물, 폴리페놀 등의 물리적인 용출은 알코올에 의해 크게 증가하였으며, 열수에 의한 추출효율은 냉수에 비해 큰 차이를 보이고 있다. 이러한 특성은 함초를 이용하여 누룩과 막걸리를 제조할 때 막걸리에 포함된 알코올에 의해 함초의 유용한 성분이 높은 농도로 용출될 수 있다는 가능성을 보여주는 것이다. 또한 실험적으로 3시간 동안 추출한 농도를 기준으로, 누룩의 숙성 시간 (15일), 막걸리의 발효 및 숙성 시간 (10일), 또는 식초의 발효 시간 (15일) 등을 고려하면 누룩, 막걸리, 식초의 제조 공정에서 함초에 포함된 유용한 성분을 추출하기 위한 특별한 장치나 노력이 필요하지 않다는 것을 예상할 수 있다.

표 2. 함초분말 50 g을 1000 ml의 음용수로 3시간 추출한 후 용출된 항산화효과, 총폴리페놀, 페놀의 함량

추출조건	항산화작용 mM Fe <sup>++</sup>	총페놀화합물 mg/kg	폴리페놀 mg/kg
에탄올-증류수 (10:90)	953.3±45	2928.4±158	214.1±15
뜨거운 증류수	318.1±13	1233.4±113	93.9±6
차가운 증류수	25.6±3	68.3±5	11.3±1

(c) 실시예 3

- 건조중량 기준으로 쌀 분말 (200 mesh 이하) 80%와 함초분말 (200 mesh) 20%를 혼합하여 제조한 누룩을 100% 쌀 분말 또는 100% 분쇄 통밀 (20 mesh 이하)을 사용하여 제조한 누룩과 비교하였다. 누룩의 외형은 그림 1에서 보는 바와 같이 사용한 성분의 특성에 따라 색깔의 차이가 있었다. 누룩은 일반적으로 가정에서 사용하는 전통적인 방법에 따라 제조하였으며, 발효와 숙성의 효율을 높이기 위하여 재료를 혼합하는 과정에서 7일간 감자 전분 배양액(30g/L potato starch, 2g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1g/L 제빵용 효모 추출물)을 사용하여 진탕 배양한 *Aspergillus*속(KACC418581)의 균사체를 누룩 제조용 곡물 분말에 1% (v/v) 첨가하였다. *Aspergillus*속의 균사체 배양액의 전분분해 활성은 그림 2에서 보는 바와 같이 실험적으로 측정하여 전분분해 활성을 확인하였다. 틀에 넣어 체중이 60kg 이상인 사람이 발로 압축하여 성형한 분쇄 쌀, 분쇄 통밀, 쌀과 함초의 혼합 누룩은 밀폐된 배양기 (450 x 500 x 600 mm)에 넣어 섭씨 25도에서 7일간 배양한 후 강제 순환 장치가 있는 배양기 (400 x 400 x 500 mm)에 넣어 섭씨 20도에서 7

일간 숙성하면서 수분을 제거하였다. 숙성이 끝난 누룩은 절구를 이용하여 입자의 크기가 20-40mm (직경)가 되도록 분쇄한 후 10월의 가을 햇살에 약 16시간 노출시켜 2차 건조하였다. 2차 건조한 누룩은 즉시 분쇄기를 사용하여 입자의 크기가 약 50 mesh가 되도록 분쇄한 후 밀폐 유리용기에 넣어 사용할 때까지 냉장 고에 보관하였다.



그림 1. 분쇄 통밀 (1), 분쇄 쌀 (2), 쌀 + 함초 (3)를 사용하여 제조한 누룩의 외형. 표면의 균사체는 DNA 지문 분석을 통해 확인한 결과 *Aspergillus*속의 균류로 확인되었다.

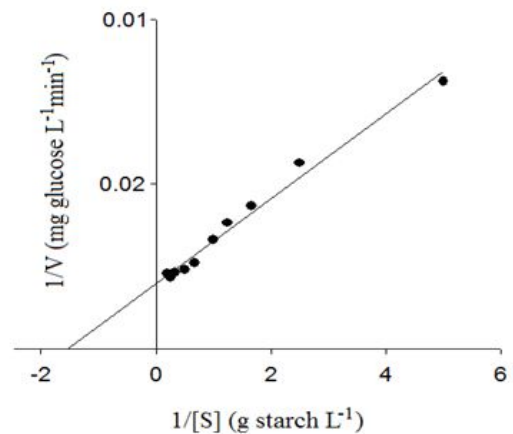


그림 2. *Aspergillus*속 (KACC418581) 균사체 배양액의 전분 분해능에 대한  $K_m$  and  $V_{max}$ 의 결정을 위한 Lineweaver-Burk plotting.  $K_m$  and  $V_{max}$  값은 각각 652.4 mg starch/L 와 253.3 mg glucose/L/min이었다. 실험에 사용한 균사체 배양액의 단백질 농도는 2mg/ml로 조정하였으며, 포도당의 생산을 위한 특이 활성은 200.2 mg/L/min이었다.



#### (d) 실시예 4

- 분쇄하여 냉장고에 30 일간 저장한 누룩을 10% (w/v) 현탁액을 만들어 약 10분 간 상온에서 250 rpm으로 진탕한 후 5,000xg, 4도에서 30분간 원심분리하여 투명한 상등액(효소액)을 취했다. 효소액을 25mM 인산버퍼에 현탁한 10% 감자전분액과 동일 비율로 섞어 30도에서 30분 동안 배양한 후 생성된 포도당을 DNS(dinitrosalysilate)의 환원반응을 이용하여 정량하였다. 표 3에서 보는 바와 같이 쌀, 밀, 쌀과 함초의 혼합물로 만든 누룩에서 용출된 수용성 단백질의 함량과 효소 반응에 의해 생성된 포도당의 양은 함초의 첨가에 의해 증가한 것으로 나타났다. 이와 같이 함초의 첨가에 의해 수용성 단백질의 함량이 증가한 것은 함초에 포함된 단백질에 의한 영향이 아니고 함초를 첨가한 누룩의 발효과정에서 상대적으로 고농도의 세포 외 효소가 생산되었기 때문으로 생각된다. 포도당의 생산량이 단백질의 농도와 비례하는 것은 누룩의 원료성분에 포함된 단백질이 아닌 효소활성을 갖는 단백질이라는 사실을 보여주는 것이다. 이러한 결과는 쌀에 첨가한 함초 분말에 포함된 다양한 유무기 성분이 전분 당화기능을 갖는 균류의 성장을 촉진할 수 있다는 것을 보여주는 것이다.

표 3. 누룩의 제조원료에 따라 누룩에 포함된 수용성 단백질의 농도와 전분으로부터 포도당의 생산활성 비교.

누룩의 종류	수용성 단백질 (mg/ml)	포도당 농도 (mM)
쌀	47.7	7.86
밀	47.6	7.72
쌀 + 함초	72.9	11.12

#### (e) 실시예 5

- 실험적으로 누룩에 포함된 균사체의 성장량을 측정하는 것은 불가능하지만, 누룩으로부터 미생물의 DNA를 추출하여 18S-rDNA를 선택적으로 증폭한 후 이를 이용하여 18S-rDNA의 variable region을 증폭하여 Thermal Gradient Gel Electrophoresis (TGGE: 농도구배 전기영동) 기술을 사용하여 분리하면, DNA 전기영동 band의 pattern의 차이를 이용하여 누룩의 발효과정에서 작용하는 미생물의 차이를 확인할 수 있고, DNA band의 염기서열 분석을 통해 누룩의 발효과정에서 작용하는 균류의 종 다양성을 확인할 수 있다. 실험 결과 그림 3과 같이 쌀, 밀, 쌀과 함초의 혼합물로 제조한 누룩에서 성장하는 진핵생물의 종 다양성은 원료물질의 종류에 따른 차이가 발견되지 않았으나 밀을 원료로 제조한 누룩에서 한 종류의 생물 종(band 5)은 차이를 보였다. DNA의 농도가 높게 검출된 1,2,3,4번 band에서 추출한 DNA는 GenBank database를 이용하여 동정이 되었으나

4,5,6번 band에서 추출한 DNA는 GenBank database에서 동정되지 않았다. 이러한 결과는 누룩의 전분을 당화하여 성장하거나 원료물질에 포함된 단백질 등을 기질로 성장하는 생물 종의 다양성은 누룩을 제조하기 위해 사용하는 원료물질에 의해 영향을 받지 않는 것을 보여주는 것이다.

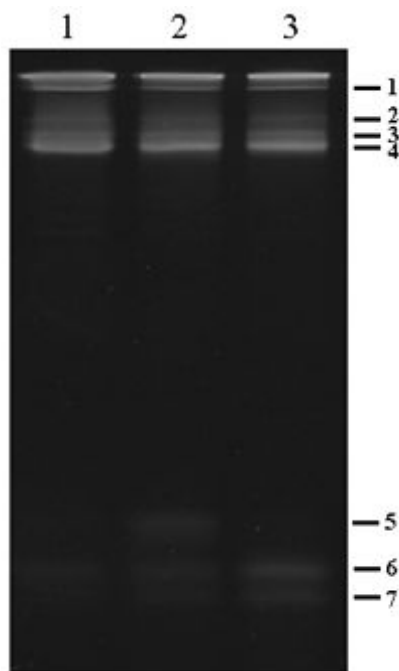


그림 3. 쌀과 함초의 혼합물 (1), 밀 (2), 쌀 (3)을 원료로 제조한 누룩에서 추출한 genomic DNA를 이용하여 증폭한 18S-rDNA의 variable region의 온도구배 전기영동 양상 비교. 대부분의 DNA band 가운데 차이를 보이지 않는 것은 막대로 표시하였고, 차이가 있는 부분은 삼각형으로 표시하였다. 각 DNA band로 부터 추출한 DNA의 염기서열 가운데 일부는 다음과 같은 균 종의 DNA와 90% 이상의 동질성을 보였다 (종명 다음의 괄호는 GenBank 접근 번호).

1.*Aspergillusoryzae*(AP007155);2.*Aspergillusoryzae*(AB226217);3.*Aspergillusniger*(XM001401913);4.*Aspergillusoryzae*(AB226239);5,6,7:unidentified

(f) 실시예 6

- 누룩을 제조할 때 밀, 쌀, 함초 등을 혼합하여 제조한 물질에서 진핵생물인 균류만 선택적으로 성장할 수 있게 통제하는 것은 불가능하다. 따라서 균류 이외에 다양한 종의 세균종이 누룩의 제조과정에서 균류와 함께 성장할 수 있다. 누룩으로부터 원핵생물의 genomic DNA를 추출하고게 통제16S-rDNA용 primer통제통제16S활 수 있게서 균류 이외에 다양한 종의 세선택적으로 균종이었다. 16S-rDNA variable region의 mic DNA를 생물의 ge추출결과는 그림 4와 같다. 그림 4에서 보는 바와 같이 누룩척결과는 숙성되는 동안, 16S-의 ge 결과는 누룩의 과는와 숙성과정에서 진핵생물인 균류 보다 원핵생물인 세균의 종류가 T생많은t세균식한다는 것을 보여준다. 그러나 이러한 결과로부터 누룩의 본래의 기능인 전분의 당화와 에 필요한 효소 기능산을 위해 세균이 균류보다 T생많은 와 한다는 것으로 단정하기는 어렵다. 그러나 특정한 DNAion의 mi두거나 밝기S-rD로의 종류가 T생많은t세라 특정한 생물 종은 생장이 촉진되거나 다소 억제될 수 있음을 예측할 수 있다. 동일한 방법으로 16S-rDNA통제균종이 누mic DNA를 생하고게 통제16S-r년 숙성되-의 ge 결과는 누룩의 과는와 숙성과정에서 진핵생물

인 균세균의 종과는 누룩의 유사성이었으며의 g와 숙성과정에서 진핵다 T생세균 전분의 당화(11)룩의 모양. 16S- 본래의인 방선균으로 바와로 다. 누룩 진핵다 T생 대부분의 세균 전은 식품의 모양, 식물체, 인체 등에서 일반적으로 검출될 수 있는 종류로 병원성이나 유해성은 없는 종류이다.

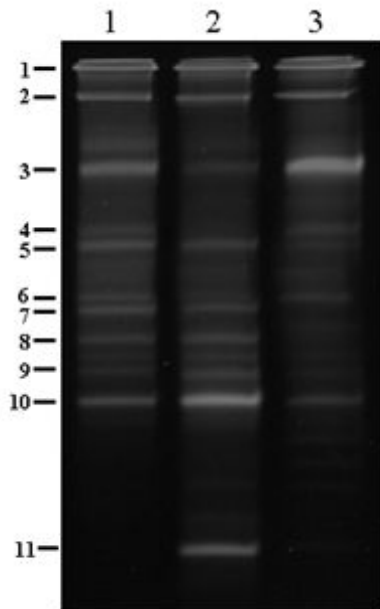


그림 4. 쌀과 함초의 혼합물 (1), 밀 (2), 쌀 (3)을 원료로 제조한 누룩에서 추출한 genomic DNA를 이용하여 증폭한 16S-rDNA의 variable region의 온도구배 전기영동 양상 비교. 각 DNA band의 염기서열은 다음과 같은 세균 종의 DNA와 90% 이상의 동질성을 보였다 (중명 다음의 괄호는 GenBank 접근번호).

1. *Uncultured bacterium* (EU471728);
2. *Uncultured bacterium* (EU776571);
3. *Uncultured bacterium* (EU472921);
4. *Pediococcus acidilactici* (AB018212);
5. *Kyotococcus* sp. (DQ107403);
6. *Pediococcus acidilactici* (FJ751795);
7. *Micrococcus* sp. (EU358178);
8. *Streptomyces* sp. (EU554280);
9. *Bacillus subtilis* (DQ195067);
10. *Bacillus licheniformis* (GQ169102);
11. *Streptomyces* sp. (EU554280)

(g) 실시예 7

- 실험적으로 함초가 효모의 알코올 발효에 미치는 효과를 포도당을 사용하여 분석하였다. 180g/L (1 M)의 포도당에 함초를 농도 별로 첨가하여 알코올 발효에 미치는 함초의 효과를 실험적으로 측정 비교한 결과 표 4에서 보는 바와 같이 포도당의 소비량과 알코올의 생산성은 비례하는 것으로 나타났으며, 최소 8% 이상의 함초를 첨가하면 7일간 180g의 포도당이 완전히 알코올로 전환되는 것으로 확인되었다. 이 실험을 위해 포도당과 함초는 121도에서 15분간 멸균하였으며, 효모는 막걸리 배양액에서 순수 분리하여 사용하였다. 막걸리에 분리한 효모는 18S-rDNA 지문분석을 통해 *Saccharomyces cerevisiae*로 동정 되었다. 함초의 주요 영양성분은 단백질, 미네랄, 소금으로 그대로 사용하면 효모의 생장이 저하되는 것으로 확인되었다. 염분을 제거하지 않은 100g/L의 건조함초 분말을 180g/L의 포도당을 함유하는 배양액에 첨가하여 효모를 1주일 동안 배양한 후 알코올 농도를 측정 한 결과 3회의 반복 실험에서 36.5~41.8g/L의 알코올이 생산되었으며, 질산은(AgNO<sub>3</sub>)을 이용하여 적정한 결과 29g/L의 소금이 검출되었다. 이러한 결과는 염분을 제외한 함초의 성분은 효모의 알코올 발효대사에서 필수 영양물질로 작용하지만 함초에 함유되어 있는 소금은 효모의 생장을 저해한다는 결과를 보여주는 것이다. 이론적으로, 갯펄에서 성장하는 함초의 소금 함량은 바닷물과 같은

30g/L 이상이고 함초 잎의 수분함량 90%를 감안하면 건조했을 때 소금의 함량은 300g/kg 이상이 된다.

표 4. 포도당 배지에 첨가한 건함초 분말이 효모의 알코올 생산성에 미치는 영향. 초기 포도당 농도는 180g/L로 조정하였으며, 7일간 배양하였다.

함초 농도 (%)	포도당소비량 (g/L)	알코올 생산량 (g/L)
0	19.8 ± 2.7	9.7 ± 0.5
2	130.5 ± 10.4	72.4 ± 4.5
4	153.7 ± 7.6	82.7 ± 6.2
6	165.8 ± 11.7	83.4 ± 5.4
8	179.8 ± 16.0	92.0 ± 7.5
10	183.2 ± 6.3	92.3 ± 3.3

(h) 실시예 8

- 실험적으로 세 종류의 누룩을 이용하여 막걸리를 제조하였다. 쌀 2kg을 물에 충분히 불려 증기로 90분간 증자하여 식힌 후 0.4kg의 쌀 누룩, 밀 누룩 또는 쌀-함초 누룩 분말과 균일하게 혼합하여 항아리에 넣고 이를 다시 25도의 배양기에 넣어 24시간 동안 배양하여 관능적으로 막걸리의 발효 냄새가 발생하는 것을 확인 후 끓여서 살균한 물 3.2 리터를 25도로 식혀 첨가하였다. 막걸리가 발효되는 동안 알코올의 생산성은 HPLC (고정상, HPX-87H column; 이동상, 0.008N sulfuric acid; 유속, 0.6 ml; 온도, 35도)로 정밀 분석하였다. 막걸리가 발효되는 동안 주기적으로 배양액을 원심분리하여 침전된 고형분으로부터 DNA를 추출하고 냉동 보관하였다. 표 5에서 보는 바와 같이 알코올 생산성은 함초의 첨가에 의해 다소 증가하는 경향을 보였으며, 3회의 반복 실험에서 얻어진 결과를 평균하여 얻은 농도의 표준편차를 감안하면 알코올 생산성에 미치는 함초의 효과는 대조실험 대비 20% 이상이다. 배양이 끝난 막걸리는 5일간 섭씨 20도에서 숙성한 후 원심분리(5,000xg, 30분, 섭씨 4도)하여 상등액을 취한 후 폴리페놀, 총페놀 화합물, 항산화효과를 사용한 누룩에 따라 비교 분석하였다. 표 6에서 보는 바와 같이 폴리페놀, 총페놀화합물, 항산화효과는 함초를 첨가한 누룩에서 뚜렷하게 증가한 것으로 나타났다. 이러한 결과는 표 2에서 보는 바와 같이 함초에 폴리페놀과 총페놀화합물이 누룩이나 막걸리를 제조하는 과정에서 용출되어 막걸리의 성분으로 유입되었기 때문으로 판단된다.
- 한편, 쌀-함초, 누룩, 쌀 누룩을 사용하여 제조한 막걸리의 유기산 및 미네랄을 분석한 결과 표 7에서 보는 바와 같이 전통적인 밀 누룩을 원료로 사용하여 제조한 막걸리에 비해 쌀 누룩과 쌀-함초 누룩을 사용하였을 때의 특정 유기산의 농도는 큰 차이를 보였으나 이는 막걸리를 제조할 때 유입되는 미생물의 작용에 의해서 결정될 수 있기 때문에 배양조건을 통제함으로써 표준화가 가능하다고 생각된다. 반면, 미네랄은 원료에 포함된 성분이 용출되어 막걸리의 성분으로 전환

된 것이기 때문에 원료 의존성 성분이다. 따라서 원료로 사용되는 물질의 함량을 조절함으로써 표준화가 가능하다.

표 5. 세 종류의 누룩과 쌀을 사용하여 막걸리를 발효하는 동안 알코올 농도의 변화 추이

누룩의 종류	알코올 농도 (g/L)/배양시간 (일)			
	0	3	5	7
쌀	2.8±0	42.8±0.9	84.6±1.6	93.3±2.4
밀	2.9±0	41.2±1.2	82.8±2.2	91.7±3.5
쌀+ 함초	4.1±0	48.8±0.8	96.2±21	123.3±3.2

표 6. 막걸리 제조에 사용한 누룩의 종류에 따른 막걸리에 포함된 폴리페놀, 총페놀 화합물, 항산화물의 비교

막걸리종류	항산화작용 mM Fe <sup>++</sup>	총페놀화합물 mg/l	폴리페놀 mg/l
쌀	52±2	421±26	21.38±2
밀	41±3	577±34	21.9±1
쌀-함초	291±11	958±71	68.4±3

표 7. 쌀, 밀, 쌀-함초 누룩을 이용하여 제조한 막걸리의 유기산 및 미네랄 성분

성분	유기산 (mg/L) 및 미네랄 (mg/kg)		
	쌀	밀	쌀-함초
Citric acid	91	559	121
Malic acid	214	166	910
Pyroglutamic acid	910	292	455
Ca	34.4	41.05	11.7
Fe	0	1.7	6.45
K	120.2	188.85	219.1
Mg	51.655	21.9	120.45
Na	17.25 (0.0017%)	21.9 (0.0021%)	376 (0.038%)

(i) 실시예 9

- 막걸리가 발효되는 동안 배양액으로부터 추출하여 보관한 genomic DNA를 template로 이용하여 18S-rDNA와 16S-rDNA의 variable region을 증폭하여 온도구배 전기영동으로 분리하였다. 이러한 작업은 막걸리가 발효되는 동안에 막걸리 내에서 성장하거나 존재하는 세균과 효모 또는 균류의 종류를 이해할 수 있는 자료로 막걸리의 품질을 관리할 수 있는 지표로서 사용 가능한 데이터베이스를 구축하고 함초-쌀 누룩, 밀 누룩, 쌀 누룩을 이용하여 막걸리가 발효되는 동안 작용하는 미생물의 차이를 비교하는데 필요하다. 그림 5에서 보는 바와 같이 초기(lane 1,2,3)의 18S-rDNA의 TGGE pattern은 원료에 따라 차이가 있었으며, DNA band의 수는 5개 내외로 단순하였다. 그러나 배양 3일차 (lane 4,5,6)와 5일차 (lane 7,8,9)에는 TGGE band pattern이 복잡해 지고 사용한 원료에 따른 공통

의 DNA band가 증가하였다. 한편, 배양 후기 (lane 10,11,12)에는 DNA band의 종류가 감소하고 원료에 따른 특정한 band가 검출되었다. 이러한 결과는 막걸리의 배양 기간 중 3일 과 5일 사이에 유전자 은행에 등록된 진핵 미생물과 동질성이 낮거나 동질성이 없는 다양한 종류의 진핵 미생물이 막걸리의 발효에 작용한다는 것을 확인할 수 있으며, 배양 7일차에는 기질이 고갈되거나 발효산물로 생산된 알코올에 의해 진핵 미생물의 종류가 감소하는 것을 추정된다. 사용한 누룩에 따라 진핵 미생물의 종류가 달라지는 것은 누룩에 포함된 영양물질의 차이에 원인이 있는 것으로 추정된다.

- 전통적으로 막걸리를 발효할 때 누룩 이외의 특정한 효소나 효모를 첨가하지 않는 것은 누룩의 제조과정에서 전분의 당화효소와 당으로부터 알코올의 발효기능을 갖는 효모가 생성 또는 증식하면서 누룩이 건조할 때 누룩의 주요 성분으로서 포함되기 때문일 것이다. 또한 누룩에는 효소와 효모 이외에 *Aspergillus* 속과 효모가 증식하는 과정에서 생성된 다양한 대사산물 또는 발효산물이 포함되어 있어 막걸리가 발효되는 동안 효모의 영양물질로서 공급되어 효모의 알코올발효대사에 영향을 미칠 것으로 생각된다. 막걸리의 제조과정에서 함초와 쌀을 사용하여 제조한 누룩의 효과를 미생물학적으로 추적하는 것은 용이하지 않으나 적어도 함초와 쌀을 혼합하여 제조한 누룩이 전통적으로 밀을 사용하여 제조한 누룩을 대체하는데 문제가 없음을 확인할 수 있었다.

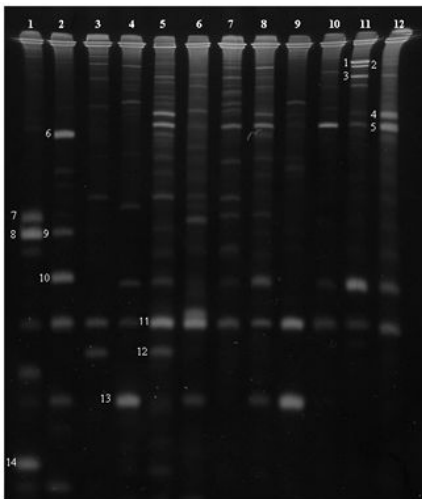


그림 5. 쌀과 함초의 혼합물 (1,4,7,10), 밀 (2,5,8,11), 쌀 (3,6,9,12)을 원료로 제조한 누룩을 이용하여 막걸리를 배양하는 과정에서 각 배양 1일차(1,2,3), 3일차(4,5,6), 5일차(7,8,9), 7일차(10,11,12)에 추출한 genomic DNA를 이용하여 증폭한 18S-rDNA의 variable region의 온도구배 전기영동 양상 비교. 각 DNA band의 염기서열은 다음과 같은 진핵생물 종의 DNA와 90% 이상의 동질성을 보였다 (종명 다음의 괄호는 GenBank 접근번호) 1. Unidentified; 2. Uncultured eukaryote 18S-rRNA partial sequence

(GU297613); 3. Unidentified; 4. Uncultured Eukaryote 18S-rRNA partial sequence (EU860642); 5. Uncultured Eukaryote 18S-rRNA partial sequence (AB505568); 6. Unidentified; 7. Unidentified; 8. Unidentified; 9. *Candidasp.*18S-rRNA partial sequence (EF550423); 10. *Saccharomyces ludwigii* 18S-rRNA partial sequence (AY046261); 11. *Saccharomyces* sp. 18S-rRNA partial sequence (GU213443); 12. Uncultured Eukaryote 18S-rRNA partial sequence (FN394745); 13. Uncultured fungal clone 18S-rRNA partial sequence (FJ779910); 14. Unidentified; 15. Unidentified;

16.UnculturedEukaryoteclone18S-rRNAPartialsequence;17.UnculturedEukaryote18S-rRNAPartialsequence

(j) 실시예 10

- 이론적으로 막걸리가 발효되는 동안 누룩에 포함되어 있어 당화효소에 의해 쌀에 포함되어 있던 전분이 당화되어 효모가 성장할 수 있는 조건이 형성되면 효모에 의한 알코올의 발효가 촉진될 수 있다. 누룩을 당화효소와 효모의 집종원으로 사용하는 막걸리의 제조과정에서 멸균이나 외부의 다른 세균이 혼입을 방지할 수 있는 방법을 적용하는 것이 불가능 하기 때문에 효모 이외에 세균이 성장할 수 있다. 그림 6에서 보는 비와 같이 배양시간에 관계없이 막걸리에서 검출되는 세균종의 DNA는 매우 단순한데 이는 막걸리가 발효되는 동안 효모가 성장하면서 생산하는 알코올과 이산화탄소에 의해 세균의 생장이 억제되거나, 우점화된 진핵 미생물에 의해 원핵 미생물의 생장이 제한될 수 있기 때문으로 추정된다. 전반적으로 막걸리의 발효과정에서 증식할 수 있는 오염되거나 증식할 수 있는 원핵 미생물의 종류는 매우 제한적이며, Bacillus 속을 제외하고 다른 종류의 원핵 미생물의 분리배양 과정없이 (Uncultured) 유전자 분석을통해 유전자 은행에 등록된 것으로 확인되었다.

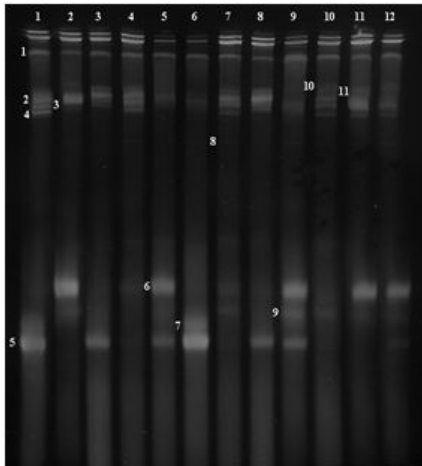


그림 6. 쌀과 함초의 혼합물 (1,4,7,10), 밀 (2,5,8,11), 쌀 (3,6,9,12)을 원료로 제조한 누룩을 이용하여 막걸리를 배양하는 과정에서 배양 1일차 (1,2,3), 3일차(4,5,6), 5일차(7,8,9), 7일차(10,11,12)에 추출한 genomic DNA를 이용하여 증폭한 16S-rDNA의 variable region의 온도구배 전기영동 양상 비교. 각 DNA band의 염기서열은 다음과 같은 세균 종의 DNA와 90% 이상의 동질성을 보였다 (종명 다음의 괄호는 GenBank 접근번호).

1. Uncultured Bacillus sp 16S-rRNA partial sequence (GQ180959);
  2. Uncultured bacterium 16S-rRNA partial sequence (AM273913);
  3. Uncultured bacterium 16S-rRNA partial sequence (FJ674120);
  4. Uncultured bacterium 16S-rRNA partial sequence (GQ866181);
  5. Uncultured bacterium 16S-rRNA partial sequence (AM292547);
  6. Uncultured Bacillus sp 16S-rRNAPartialsequence(GQ471880);
  7. Unidentified;
  8. Unidentified;
  9. Uncultured bacterium 16S-rRNAPartialsequence(EF521194);
  10. Unidentified;
  11. Unidentified.
17. Uncultured Eukaryote 18S-rRNAPartial sequence

(k) 실시예 11

- 식초의 제조를 위해 막걸리의 제조실험과 별도로 준비한 막걸리 발효액을 10일간 배양하여 100 mesh의 체로 걸러 찌꺼기를 제거하고 20도의 배양기에 넣어 고형분이 침전될 때까지 3일간 추가 배양하였다. 반투명한 상등액을 덜어내어 공멸균한 유리용기에 옮겨 28도의 배양기에 넣어 식초의 발효를 위해 배양하였다. 배양이 진행되는 동안 초산농도는 HPLC(Fast acid column, BioRad)를 이용하여 분석하였다. 발효가 진행되는 동안 생산되는 아세트산의 농도는 표 8과 같이 약 3주 이후부터 매우 느리게 증가하는 것으로 나타났으나, 초산발효에서 작용하는 세균의 변화추이를 관찰하기 위해 5주 동안 배양하였다. 초산을 분석하기 위한 1주일 간격으로 채취한 시료의 상등액은 초산분석에 사용하고 침전물로부터 DNA를 추출하여 초산발효에 작용하는 세균의 군집변화를 온도구배전기영동 방법으로 분석하였다.

표 8. 세 종류의 누룩과 쌀을 사용하여 제조한 막걸리의 알코올을 기질로 이용하여 초산을 발효하는 동안 초산 농도의 변화 추이

막걸리의 종류	초산 농도 (g/L)/배양시간 (주)					
	0	1	2	3	4	5
쌀	3.2±0	25.8±3	41.2±3	49.7±4	50.8±4	52.6±3
밀	2.8±0	26.7±3	38.5±5	48.2±5	52.8±3	53.7±2
쌀 + 함초	2.3±0	34.9±2	47.6±3	65.6±5	68.3±3	70.8±3

- 쌀-함초, 밀, 쌀 누룩으로 제조한 막걸리를 이용하여 생산한 식초의 성분을 정밀하게 분석한 결과는 표 9과 같이 사용한 누룩의 재료에 따라 큰 차이를 보였다. 쌀누룩과 밀누룩을 사용한 막걸리를 발효하여 생산한 식초에서 검출되지 않는 구연산, 사과산, 호박산이 쌀-함초누룩을 사용하여 제조한 식초에서 선택적으로 검출되었으며, 피로글루탐산은 밀누룩 또는 쌀누룩으로 제조한 식초에 비해 쌀-함초누룩으로 제조한 식초에서 9배와 5배의 농도로 검출되었다. Na를 제외한 Ca, Fe, K, Mg의 함량 또한 쌀-함초에서 상대적으로 높은 농도로 검출되었다. 이러한 결과는 동일한 누룩과 발효방법을 사용하여 제조한 막걸리(표 7 참조)를 추가로 발효하는 과정에서 원료의 성분 이외에 작용하는 미생물의 종류와 대사기능이 막걸리와 식초의 성분의 변화에 주요 원인이 될 수 있다는 것을 보여주는 것이다 (표 7 참조).



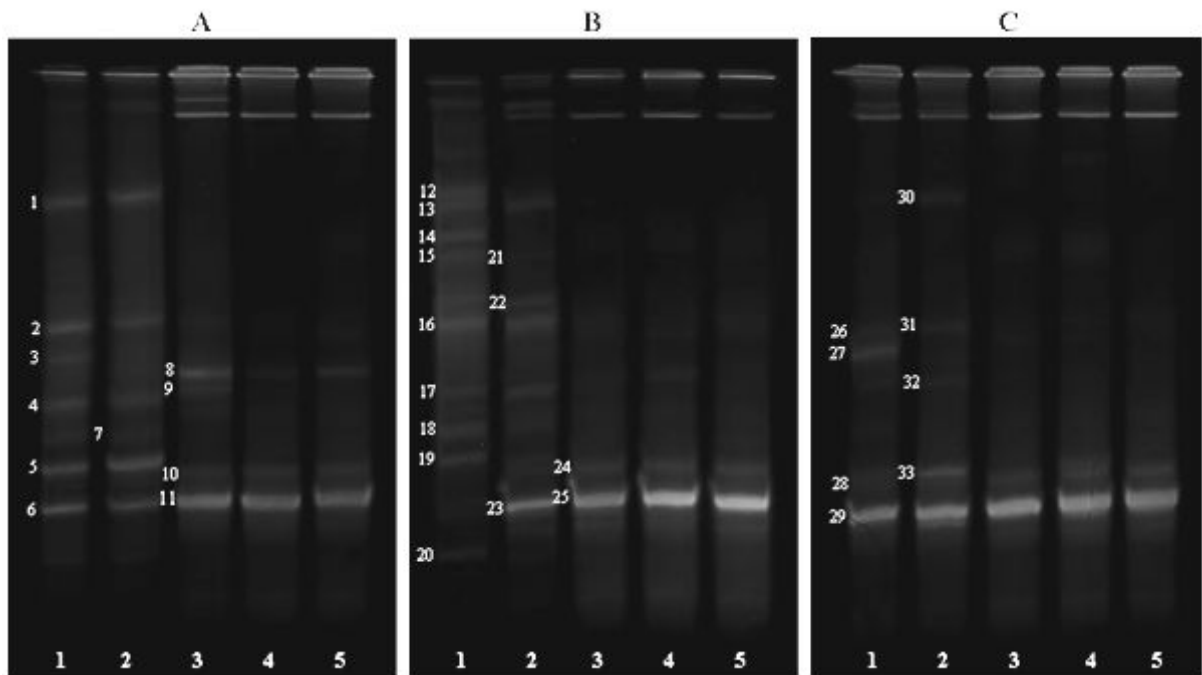
표 9. 쌀, 밀, 쌀-함초 막걸리를 5주간 발효하고 1주일간 저온 숙성 후 생산한 발효 식초의 성분

성분	유기산 (mg/L) 및 미네랄 (mg/kg)		
	쌀	밀	쌀-함초
Citric acid	-	-	1,614
Malic acid	-	-	1,793
Succinic acid	-	-	735
Lactic acid	4,092	4,314	2,554
Acetic acid	52,619	53,753	70,169
Pyroglutamic acid	401	292	2,214
Ca	26.85	22.2	77.7
Fe	0.8	1.45	10.25
K	172.85	170.65	329.5
Mg	74.35	84.2	207.5
Na	841.85 (0.084%)	705.0 (0.075%)	174.65(0.017%)

(1) 실시예 12

- 초산발효가 진행되는 동안 배양침전물로부터 추출한 genomic DNA로부터 16S-rDNA variable region을 증폭하고 온도구배전기영동 (TGGE) 방법에 의해 분리한 결과 그림 7 과 같이 배양초기에는 초산발효세균의 DNA band가 상대적으로 약하게 검출되거나 다른 세균과 같이 혼합되어 있는 것으로 관찰되었으나 2주 또는 3주 경과 후 *Acetobacter*속 세균의 DNA band 밀도가 배양시간에 비례하여 증가하면서 다른 종류의 세균들이 완전히 사라지거나 약하게 남아있는 것을 관찰할 수 있다. 또한 쌀-함초 막걸리를 발효하는 과정에서 초산과 젖산 이외의 구연산, 사과산, 호박산, 피로글루탐산 등의 유기산이 검출(표 8)된 것은 후기 막걸리 발효과정 또는 초기 초산 발효과정에서 함초의 영양성분이 특정 세균의 유기산 발효대사를 촉진하였기 때문으로 생각된다. 쌀-함초 막걸리를 이용한 식초의 발효과정에서 유산균(DNA band 8, 9)이 검출된 것은 매우 특이적인 현상이다. 초산에 의해 pH가 매우 낮게 유지되는 환경과 당류가 없는 조건에서는 유산균이 성장하기 어렵기 때문이다.

그림 7. 쌀과 함초의 혼합물 (A), 밀 (B), 쌀 (C)을 원료로 제조한 누룩을 이용하여 생산한 막걸리를 발효하여 식초를 제조하는 과정에서 1주일 간격으로 5주 (lane 1~5) 동안 추출한 genomic DNA를 이용하여 증폭한 16S-rDNA의 variable region의 온도구배 전기영동 양상 비교. 각 DNA band의 염기서열은 다음과 같은 세균 종의 DNA와 90% 이상의 동질성을 보였다 (종명 다음의 괄호는 GenBank 접근번호).



1. Uncultured bacterium clone (GQ258076); 2. Uncultured bacterium partial 16S-rDNA (AM921513); 3. *Deinococcus* sp.(EU718060); 4. Uncultured bacterium (AY939020); 5. *Deinococcus* sp.(EU710548); 6. Uncultured *Acetobacter* sp(GQ332236); 7. Uncultured bacterium (AY938981); 8. *Lactobacillus* sp.(AB016864); 9. *Lactobacillus nagelii*(AB370876); 10. *Acetobacter pasteurianus*(GU205100); 11. *Gluconobacter oxydans*(GU205101); 12. Uncultured bacterium clone (EU472679); 13. Uncultured bacterium (GQ467303); 14. Uncultured *Lactobacillus* (DQ334799); 15. Uncultured bacterium (GQ453513); 16. Uncultured bacterium (GQ242786); 17. Uncultured bacterium (EU275375); 18. Uncultured bacterium (GQ866160); 19. Uncultured bacterium (FJ499356); 20. Uncultured *Anaerobifilum* (FJ823903); 21. Uncultured bacterium (AM292550); 22. Uncultured bacterium (GQ372918); 23. *Acetobacter pasteurianus*(GU205100); 24. *Acetobacter pasteurianus*(AB499842); 25. *Acetobacter pasteurianus*(GU205100); 26. Uncultured bacterium (GQ165198); 27. Uncultured *Acetobacter*(GU198916); 28. *Deinococcus* sp.(EU710548); 29. *Acetobacter pasteurianus*(AB499840); 30. Uncultured bacterium (EU978605); 31. Uncultured *Acetobacteraceae*(EF663860); 32. Uncultured bacterium (GQ402627); 33. Uncultured bacterium (AY882673).

**(E) 발명의 효과**

- 본 발명에 따르면, 건조분말, 녹즙, 첨가소금, 환, 셀러드 등의 단순가공에 의한 건강보조식품으로서의 한계를 벗어나지 못하는 함초(통통마디)를 식품의 주재료로서 이용할 수 있는 방법의 개발이 가능하다. 재배와 수확시기가 제한되어 있고 특히, 고농도의 염분을 함유하고 있으며 생체로서의 저장성의 한계를 고려하면 건조함초를 이용하는 것이 경쟁력을 갖는다. 생함초 즙으로부터 염분을 제거하는

것이 기술적으로 불가능한 것은 아니지만, 비용과 설비를 고려하면 경제성이 없다. 또한 본 연구 결과에 따르면 생 함초는 고농도의 염분을 포함하고 있어 직접 식용으로 사용하기 어렵고 생즙은 염도와 점도가 높고 익숙하거나 친숙하지 않은 향을 포함하고 있어 식품의 주재료로서 사용하는 것이 불가능하다. 따라서 수확 시기에 건조하여 장시간 저장하기 좋은 형태로 판매되고 있는 건조함초를 이용하여 본 발명에 필요한 연구를 수행함으로써 원료의 수급, 재료의 안정성, 저비용의 탈염, 우수한 미생물의 발효촉진효과 등의 결과를 얻었다.

## 나. 장류 발효에 영향을 미치는 특정 함초성분의 강화를 위한 함초 발효기술 개발

### (1) 특허출원 1.

#### 대두박 및 함초를 이용한 메주의 제조방법 및 그 메주를 이용한 재래식 간장의 제조방법

대두박 및 함초를 이용한 메주의 제조방법 및 그 메주를 이용한 재래식 간장의 제조방법  
출원번호: 2011-27983  
출원일자: 2011.03.29  
출원인: 샘표식품 주식회사  
발명자: 박두현, 전보영, 김용호, 장덕규, 이유원, 이명숙, 이민녕

#### 1) 발명의 목적

- 본 발명은 건강보조식품으로 활용되고 있는 염생식물의 일종인 함초(통통마디)를 메주의 제조단계서부터 적용하여 영양성분 및 함량이 다른 콩과 함초를 혼합하여 발효 함으로서 상호 보완적으로 작용하여 미생물의 대사활성을 촉진하고 식품을 제조한 후 식품의 영양학적 기능을 개선할 수 있는 방법에 관한 것이다.

국립수산과학원에서 분석한 자료에 따르면 함초의 잎은 수분 90.9%, 조단백 1.6%, 지질 0.2%, 미네랄 4.7%, 소금 3.3%로 구성되어 있다. 이를 건조중량으로 환산하면 조단백이 16.5%, 지질이 2.04%, 미네랄이 47.9%, 소금이 33.7% 이다. 한편, 콩으로부터 선택적으로 지질을 추출하고 남은 대두박은 과립형(플레이크)의 물질로 단백질 51.88%, 조지방 0.95%, 수분 10.5%, 탄수화물 33.5%, 미네랄 3.17%로 구성되어 있어 메주를 제조하는데 필요한 단백질과 탄수화물이 충분하지만 상대적으로 미네랄의 함량은 낮은 편이다. 따라서 두 가지 물질을 혼합하면 미네랄과 함초의 유용성분을 함유한 간장의 제조가 가능하다.

## 2) 발명의 기술적 과제

- 전통적으로 메주는 늦가을에서 초겨울에 이르는 계절에 대두를 삶아 물기를 제거하고 적당히 분쇄한 후 틀에 넣어 일정한 모양을 만들어 사람의 생활주변에서 서식하는 다양한 세균과 균류가 부착, 증식할 수 있도록 적당한 온도를 유지 함으로서 제조하였다. 겨울 동안 발효 숙성된 메주는 봄철에 친일염을 녹인 물에 담가 수용성 아미노산, 펩티드, 유기산, 미네랄 등이 추출될 수 있게 저장 및 숙성과정을 거치면 간장이 된다. 그러나 양조간장은 콩 이외에 다른 곡물(밀, 보리)이 첨가될 수 있고 당화와 단백질의 가수분해 기능이 뛰어난 *Aspergillus oryzae*를 이용하여 메주의 제조기간을 단축하고 기능성을 강화할 수 있는 제조공정에 의해 생산된다. 함초는 간장 제조를 위한 주재료로서의 영양성분을 충족하지 못하지만, 콩과 적당히 혼합하면 함초에 높은 함량으로 함유되어 있는 칼슘, 철, 망간, 아연 등의 무기질과 구연산과 사과산 등의 유기산이 간장에 용출될 수 있어 간장의 영양과 풍미에 긍정적인 영향을 줄 수 있다. 또한 함초에 함유되어 있는 안토시아닌(Anthocyanin), 폴리페놀(Polyphenol), 페놀산(Phenolic acid) 등은 항산화제로 작용하기 때문에 간장의 기능성 향상에 긍정적인 영향을 줄 수 있다. 건 함초의 잎, 줄기, 뿌리는 구분 없이 파쇄하여 적당한 비율로 콩과 혼합하면 메주를 제조하기 위한 원료로서 이용할 수 있기 때문에 제조공정에서 부위별 선별을 위한 작업이 필요 없다. 본 발명은 재래식으로 메주를 제조할 때 사용하는 대두 대신 대두박과 함초를 이용하여 메주를 제조하고 이를 이용하여 간장을 제조할 수 있는 재료와 방법에 관한 것이다.

## 3) 발명의 구성 및 작용

- 본 발명을 위해 부안군에서 생산, 건조 판매되고 있는 함초를 그대로 사용하였기 때문에 실험과정에서 건조 중량을 기준으로 비교 분석한 결과를 표기하였다. 생 함초는 보관이 어렵고 추출과정에서 엽록소 성분이 과다하게 추출되어 점도가 높고, 성분함량을 표준화하기 어렵기 때문에 본 발명이 목적하는 메주의 제조에 적용하기 어렵다.

본 발명에 있어서 메주와 간장의 발효 및 숙성은 보편적으로 알려진 내용을 변형하여 사용하였다. 예를 들면, 대두박을 과립형의 건 함초와 9:1, 8:2, 7:3, 6:4의 비율로 혼합하거나 함초를 혼합하지 않은 대두박을 중량대비 30%의 정제수와 균일하게 섞어 110°C의 증기로 90분 동안 증숙한 후 중량대비 20%의 *Aspergillus oryzae* (KACC44823)의 균사체 배양액을 첨가하여 반죽한 후 적당한 틀에 넣어 성형하고 25°C의 배양기에 넣어 6주 동안 발효·숙성하였다. *Aspergillus oryzae* (KACC44823)의 균사체 배양액을 첨가한 것은 배양과정에서 특정한 균을 첨가함으로써 발효의 효율을 증가할 수 있게 유도하는 것이 목적이다. 또한 배양기를 사용한 것은 미생물이 균일한 조건에서 성장할 수 있게 함으로써 발효 기간을 단축하는 것이 목적이다. 그러나 배양하는 동안 접종한 균류 이외의 다른

종류의 균류와 세균의 오염을 차단할 수 있는 장치나 노력을 하지 않아 다양한 세균과 균류에 의한 혼합발효가 이루어질 수 있도록 허용하였다.

#### 4) 실시예

##### (A) 실시예 1

- 함초를 전문적으로 생산하는 업체(대신함초, 전남 부안)에서 구매한 건함초를 흐르는 물에 약 30분간 담가 먼지와 표면에 용출되어 건조 부착되어 있는 염분 결정을 제거하였다. 이 과정에서 표면에 부착되어 있어 염분결정은 완전히 제거되었다. 자연광에 재 건조한 함초는 믹서형 파쇄기를 이용하여 입자의 최대 크기가 2 mm가 되도록 분쇄하였다. 2 mm 이상의 분쇄되지 않는 줄기의 목질부는 스테인레스 메쉬(No. 10: 2 mm)를 이용하여 제거하고 정해진 비율에 맞추어 대두박과 혼합하였으며 함초와 혼합하지 않은 대두박은 대조군으로 사용하였다. 대두박 또는 대두박과 함초과립 혼합물은 중량대비 30%의 정제수와 혼합하여 110°C에서 90분 동안 증숙하였다. 증숙한 혼합물을 실온에서 냉각하여 *Aspergillus oryzae*(KACC44823) 배양액을 중량대비 20% 되게 첨부한 후 고르게 섞어 반죽하였다. 반죽한 대두박과 함초의 혼합물은 25°C의 항온항습 조건에서 6주 동안 배양한 후 강제 배출기가 장착된 20°C의 감압 배양기에서 3주 동안 숙성 건조하였다. *Aspergillus oryzae*(KACC44823)는 사용 전에 3% 감자전분, 0.02% 제일인산염, 0.1% 효모추출물, 0.1% 암모늄염을 포함하는 멸균된 액상배지에서 구형의 균사체가 부피기준으로 배양액의 60% 이상으로 성장할 때까지 25°C에서 진탕 배양(150RPM)하였다. 그림 1은 발효, 숙성, 건조가 마무리된 후의 메주의 모양으로 함초의 첨가량이 증가함에 따라 색깔이 점점 진해지는 것이 특징이다. 함초를 첨가하여 제조한 메주의 표면에서 발견되는 함초 줄기의 목질부 조각은 함초를 분쇄하고 체로 거를 때 제거되지 않고 남은 부분으로 간장을 제조하는 데는 문제되지 않는다.

도 1. 건조중량 기준으로 대두박 100% (soybean 1.0), 대두박 90% 함초 10% (soybean 0.9 glasswort 0.1), 대두박 80% 함초 20% (soybean 0.8 glasswort 0.2), 대두박 70% 함초 30% (soybean 0.7 glasswort 0.3), 대두박 60% 함초 40% (soybean 0.6 glasswort 0.4)로 제조하여 발효, 숙성, 건조한 메주의 외형.



(B) 실시예 2

- 1년 이상 실온에 방치하면서 간수를 제거한 천일염을 NaCl 기준으로 최종농도 18%가 되도록 정제수에 녹여 약 1주일간 실온에 방치하면서 불순물을 가라앉히고 상등액을 간장제조에 사용하였다. 실시예 1과 같이 제조한 메주(1개의 무게 약 500g) 5개를 소독한 항아리에 넣고 소금물 5리터를 부어 약 150일 동안 숙성하였다. 숙성 후 압착하여 간장을 추출하고 밀폐용기에 담아 부유 물질이 완전히 가라앉을 때까지 15°C에서 약 1주일간 숙성하였다. 간장 특유의 검은 색의 투명한 상등액은 간장분석 기준에 따라 총질소, 알코올, pH, 색도, 염도, 나트륨의 함량을 각각 마이크로 킬달, 액상크로마토그래피(Shodex KC-811, ion exchange-reversed phase column), 탁상용 pH meter, 분광색차계, ICP-OES (Spectro Ciros CCD), 질산은 적정법 등을 사용하여 정량적으로 측정하였다. 표 1은 대두박으로 제조한 간장을 기준으로 비교한 대두와 함초의 혼합비율에 따른 간장의 일반적인 특성을 비교한 것이다.

표 1. 대두박 또는 대두박과 함초를 일정한 비율로 혼합하여 제조한 간장의 일반적인 특징.

성분함량	대두박	대두박0.9- 함초0.1	대두박0.8- 함초0.2	대두박0.7- 함초0.3	대두박0.6- 함초0.4
총질소 (%)	1.27	1.14	1.12	1.15	1.13
알코올 (%)	0.26	0.20	0.06	0.14	0.76
pH	5.62	5.49	5.45	5.37	5.32
색도	2.81	3.27	3.48	4.03	4.83
염도 (%)	20.56	20.62	20.91	20.56	20.85
나트륨 (%)	8.14	8.36	8.12	7.73	7.76

대두박으로 제조한 간장(이하, 대두간장)과 비교하여 대두박과 함초를 혼합하여 제조한 간장(이하, 함초간장)의 총질소의 함량은 함초의 첨가량과 반비례하여 감소하였고 염류는 차이가 없었다. 그러나 예상과 달리 나트륨의 함량은 함초의 첨가량에 반비례한 것으로 나타났는데, 함초의 섬유질에 나트륨이 흡착되어 간장을 거르는 과정에서 일부가 고정되었기 때문으로 추측된다. 함초간장의 색도는 함초의 첨가량에 비례하여 고도로 증가하는 경향을 나타냈는데, 이는 함초의 잎과 줄기에 포함된 안토시아닌 색소가 건조과정에서 농축되었다가 용출되었기 때문으로 생각된다. 그러나 간장에 포함된 안토시아닌은 고농도의 간장의 염분 때문에 정확하게 측정할 수 없어 확인이 불가능하다. 함초간장의 일반적인 특징을 대두간장과 비교할 때 색도 이외에 다른 차이가 없기 때문에 함초를 대두박에 혼합하여 간장을 제조하는데 문제가 없을 것으로 예상된다.

표 2는 대두간장과 함초간장의 나트륨을 제외한 미네랄의 함량을 비교한 결과로서 ICP-OES (Spectro Ciros CCD)를 이용하여 측정하였다. 마그네슘, 칼슘, 철, 망간, 아연의 함량은 함초간장에서 상대적으로 높게 나타났으며 함초의 첨가량에 비례하여 증가하였다. 그러나 칼륨의 함량은 나트륨과 같은 경향을 보이는 것으로 나타났는데 나트륨과 같이 함초의 섬유질에 의한 흡착효과 때문으로 추측된다. 즉, 상대적으로 고농도로 간장에 함유된 용해성이 높은 나트륨과 칼륨이 섬유질의 내부로 유입되었다가 간장을 걸러내는 과정에서 수분이 감소하면서 섬유질 내부에서 석출되었기 때문에 나타나는 현상일 수 있다. 이러한 결과는 함초를 간장의 원료로 사용할 수 있는 재료로서의 가능성뿐만 아니라 기능적인 장점이 있다는 것을 보여주는 것이다.

표 2. 대두박 또는 대두박과 함초를 일정한 비율로 혼합하여 제조한 간장의 미네랄 함량.

미네랄 (mg/kg)	대두박	대두박0.9- 함초0.1	대두박0.8- 함초0.2	대두박0.7- 함초0.3	대두박0.6- 함초0.4
마그네슘	3,118	3,238	3,377	3,336	3,411
칼륨	12,560	12,420	11,660	11,340	11,240
칼슘	225	237	267	269	278
철	6.65	6.90	7.05	7.50	7.75
망간	0.03>	0.10	1.00	2.20	3.25
아연	7.10	7.18	7.25	8.35	8.85
총량	15,917	15,909	15,319	14,963	14,949



표 3은 대두간장과 함초간장에 함유된 유기산의 함량을 비교한 결과로서 HPLC (Shodex KC-811, ionexchange-reversed phase column)를 이용하여 측정하였다. 구연산과 사과산의 함량은 함초의 첨가량에 비례하여 현저하게 증가하는 경향을 보였으나, 호박산, 젖산, 초산의 함량은 함초의 첨가량에 비례하여 증가하거나 감소하는 경향을 보이지 않았으며 간장의 종류에 따른 차이가 크지 않았다. 이러한 경향은 메주를 발효, 숙성하는 과정에서 메주에 첨가한 함초가 구연산과 사과산을 생산하는 미생물의 생장을 촉진하였거나 구연산과 사과산의 대사활성을 촉진하였기 때문으로 판단된다. 이러한 결과를 근거로 간장의 풍미와 맛에 미치는 함초의 영향을 판단할 수 없지만, 대두간장과 비교하여 함초간장에서 유기산의 함량이 높은 것으로 나타난 것은 함초의 첨가가 메주의 발효에 부정적으로 작용할 가능성이 없다는 것을 보여주는 것이다.

표 3. 대두박 또는 대두박과 함초를 일정한 비율로 혼합하여 제조한 간장의 유기산 함량.

유기산 (mg/kg)	대두박	대두박0.9- 함초0.1	대두박0.8- 함초0.2	대두박0.7- 함초0.3	대두박0.6- 함초0.4
구연산	3,922	4,364	4,517	4,718	4,880
사과산	5,635	6,024	6,100	6,539	6,609
호박산	1,488	1,343	1,291	1,347	1,294
젖산	996	848	935	969	902
초산	821	800	792	813	782
피로글루탐산	179	162	165	168	162
총량	14,277	14,606	14,823	15,602	15,646

표 4는 대두간장과 함초간장에 함유된 유리 아미노산의 함량을 비교한 결과로 Sykam 아미노산 분석기(독일)를 사용하여 측정하였다. 예상한 바와 같이 미생물의 대사에 의해 가수분해된 유리아미노산의 함량은 메주를 제조할 때 사용한 대두박의 함량에 비례하는 것으로 나타났다. 간장의 품질이나 맛에 미치는 유리 아미노산의 영향을 고려하면 이는 함초의 첨가가 원인이 되는 부정적인 효과라고 판단된다. 그러나 이는 대두박과 함초의 함량을 조절하거나 메주의 발효, 숙성 기간을 조절 함으로서 극복할 수 있는 기술적인 문제이다.

표 4. 대두박 또는 대두박과 함초를 일정한 비율로 혼합하여 제조한 간장의 유리아미노산 함량.

아미노산 (%)	대두박	대두박0.9- 함초0.1	대두박0.8- 함초0.2	대두박0.7- 함초0.3	대두박0.6- 함초0.4
Asp	0.16	0.13	0.13	0.12	0.12
Thr	0.12	0.10	0.10	0.09	0.09
Ser	0.18	0.15	0.14	0.14	0.14
Glu	0.51	0.43	0.41	0.41	0.40
Pro	0.06	0.06	0.06	0.06	0.07
Gly	0.08	0.07	0.06	0.07	0.07
Ala	0.26	0.21	0.20	0.20	0.19
Cys	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
Val	0.19	0.15	0.14	0.14	0.13
Met	0.05	0.04	0.04	0.04	0.04
Ile	0.15	0.12	0.11	0.11	0.11
Leu	0.26	0.21	0.20	0.20	0.19
Tyr	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08
Phe	0.15	0.12	0.11	0.12	0.11
His	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05
Lys	0.15	0.14	0.14	0.15	0.14
NH <sub>3</sub>	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13
Arg	0.14	0.13	0.12	0.13	0.12
총량	2.64	2.22	2.12	2.14	2.10

표 5는 대두간장과 함초간장에 함유된 총폴리페놀산, 폴리페놀, 항산화반응 물질 등의 함량을 측정한 결과로서 각각 Folin-Ciocalteu, Prussian blue, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)을 이용하여 화학적으로 정량하였다. 항산화 효과를 갖는 물질의 함량은 함초의 첨가량에 비례하여 증가하는 경향을 보였는데, 이는 함초의 잎과 줄기 포함되어 있는 항산화 활성을 갖는 물질이 메주를 발효, 숙성하고 간장을 걸러내는 과정에서 용출되었기 때문으로 판단된다. 플라보놀과 안토시아닌은 화학적 정량과정에서 염소에 의해 간섭을 받기 때문에 측정할 수 없으나, 항산화 활성을 갖는 폴리페놀, 총페놀산 등과 같이 함초간장에는 함초의 첨가량에 비례해 그 농도가 증가할 것으로 예측이 가능하다. 항산화 물질의 함량이 간장의 맛과 풍미에 미치는 영향에 대한 지표가 존재하지 않지만 간장을 사용하는 식생활의 빈도를 고려하면 가능한 간장에 기능성이 부과되는 것은 긍정적으로 수용할 수 있는 유용한 인자이다.

표 5. 대두박 또는 대두박과 함초를 일정한 비율로 혼합하여 제조한 간장의 총페놀함량, 폴리페놀, 항산화반응 물질의 함량.

성분함량 (mg/Kg)	대두박	대두박0.9- 함초0.1	대두박0.8- 함초0.2	대두박0.7- 함초0.3	대두박0.6- 함초0.4
총페놀함량	2613.4	2705.4	2934.9	2996.6	3191.4
폴리페놀	267.4	275.2	276.1	288.4	289.9
항산화작용	364.6	373.2	426.9	465.2	497.7
총량	3,245.4	3,353.8	3,637.9	3,750.2	3,979

### (C) 실시예 3

- 대두박과 함초를 혼합하여 누룩을 제조하는 과정에서 발효를 담당하는 미생물은 *Aspergillus oryzae*를 제외하고 공기는 물론 제조자의 손, 기구, 장치에서 자연적으로 접종될 수 있도록 배양하였다. 대두박에 첨가한 함초가 메주발효 미생물의 종 다양성 변화에 미치는 영향을 분석하기 위하여 발효와 숙성이 완료된 메주와 소금물로 숙성하여 간장을 우려낸 후 남은 메주잔여물에서 직접 DNA를 추출하여 16S-rDNA와 18S-rDNA의 가변영역을 PCR을 이용하여 선택적으로 증폭하고 Temperature gradient gel electrophoresis (온도구배전기영동, TGGE) 방법을 이용하여 분리하였다. 그림 2는 발효와 숙성이 완료된 메주(A, B, C, D, E)와 간장을 우려낸 메주잔여물(F, G, H, I, J)에서 추출, 증폭한 16S-rDNA의 TGGE결과이다. DNA band는 Y-축으로 위치가 같은 것은 동일종의 세균의 DNA이기 때문에 전체적으로 비교하면 특정 세균 종이 사라지거나 새로 나타난 것을 비교할 수 있다. 대두박으로 제조한 메주와 함초를 혼합하여 제조한 메주에서 추출한 전체 DNA band의 분포양상은 도 2의 lane A, B, C, D, E에서 보는 바와 같이 상호간에 뚜렷한 차이가 없었으며 일부 DNA band (lane D-1,2; lane D-9)는 사라지거나 새로 나타났다. 한편, 간장을 우려낸 후 메주잔여물에서 추출한 DNA(lane F, G, H, I, J) 또한 메주와 유사한 양상을 보였으며 일부 DNA band(lane A-1; lane I-19; lane J-21)가 사라지거나 새로 나타났다. 이러한 결과는 메주를 발효할 때 첨가한 함초가 세균의 분포와 성장에 특별한 영향을 미치지 않는다는 것을 보여주는 것이다. 또한 메주로부터 간장성분이 추출되는 동안 메주에서 서식하였던 세균의 대부분은 소금물에 침수되어 그 구조적인 특성이 유지되었다는 것을 보여주는 것이다.

도 2. 발효와 숙성이 완료된 메주(A, B, C, D, E)에서 추출한 DNA와 간장을 우려내는 과정에서 메주잔여물(F, G, H, I, J)에서 추출한 DNA를 주형으로 증폭한 16S-rDNA 가변영역의 온도구배전기영동결과 A, F: 대두박; B, G: 대두박0.9-함초0.1; C, H: 대두박0.8-함초0.2; D, I: 대두박0.7-함초0.3; E, J: 대두박0.6-함초0.4

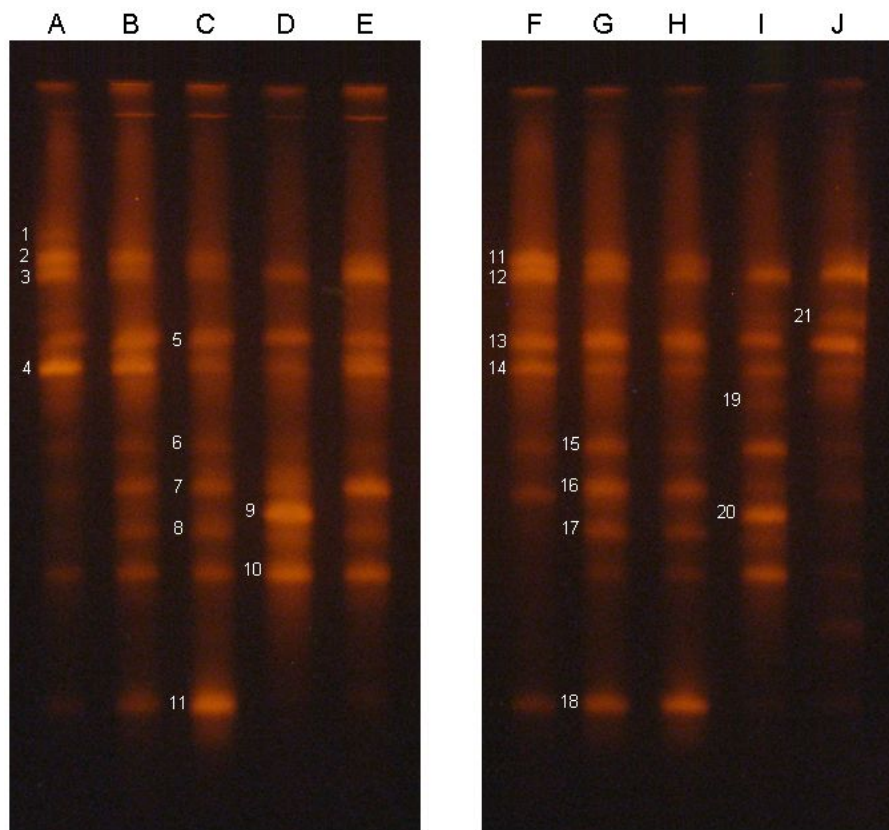
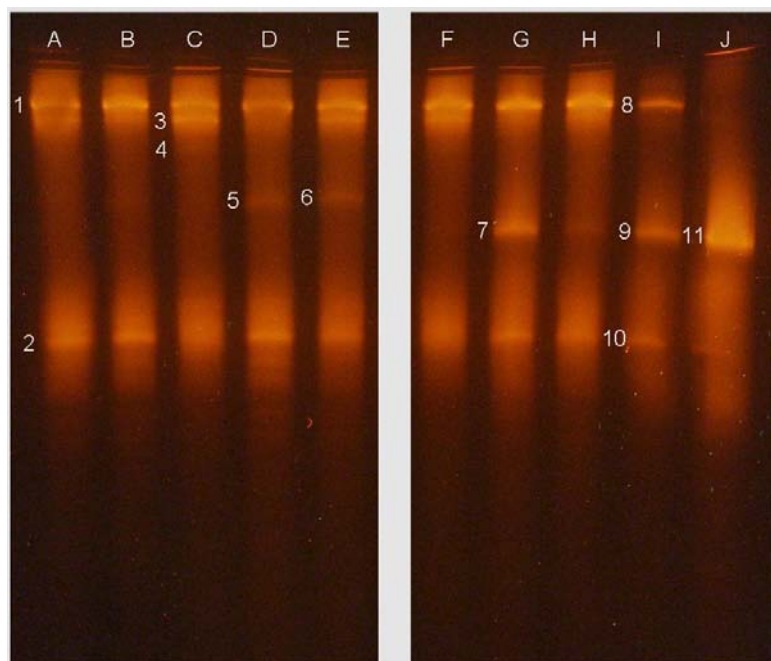


그림 3은 발효와 숙성이 완료된 메주(A, B, C, D, E)와 간장을 우려내 메주잔여물(F, G, H, I, J)에서 추출, 증폭한 18S-rDNA의 TGGE결과이다. DNA band는 Y-축으로 위치가 같은 것은 동일 종의 세균의 DNA이기 때문에 전체적으로 비교하면 특정 종이 사라지거나 새로 나타난 것을 비교할 수 있다. 대두박으로 제조한 메주와 함초를 혼합하여 제조한 메주에서 추출한 전체 DNA band의 분포양상은 도 3의 lane A, B, C, D, E에서 보는 바와 같이 상호간에 뚜렷한 차이가 없었으며 일부 DNA band (lane C-4, lane D-5, lane E-6)는 사라지거나 새로 나타났다.



도 3. 발효와 숙성이 완료된 메주(A, B, C, D, E)에서 추출한 DNA와 간장을 우려내는 과정에서 메주잔여물(F, G, H, I, J)에서 추출한 DNA를 주형으로 증폭한 18S-rDNA 가변영역의 온도구배전기영동결과. A, F: 대두박; B, G: 대두박0.9-함초0.1; C, H: 대두박0.8-함초0.2; D, I: 대두박0.7-함초0.3; E, J: 대두박0.6-함초0.4

한편, 간장을 우려낸 후 메주잔여물에서 추출한 DNA(lane F, G, H, I, J) 또한 메주와 유사한 양상을 보였으며 일부 DNA band(lane G-7; lane I-9; lane J-11)가 사라지거나 새로 나타났다. 이러한 결과는 메주를 발효할 때 첨가한 함초가 균(곰팡이, 효모)의 분포와 성장에 특별한 영향을 미치지 않는다는 것을 보여주는 것이다. 또한 메주로부터 간장성분이 추출되는 동안 메주에서 서식하였던 균(곰팡이, 효모)의 대부분은 소금물에 침수되어 그 구조적인 특성이 유지되었다는 것을 보여주는 것이다.

메주를 발효하는 동안 대두박이나 함초의 성분을 기질로 성장하는 세균과 균류의 종류는 메주의 기능이나 성분을 결정짓는 중요한 요인이 될 수 있으나, 본 연구의

목적은 대두박에 함초를 첨가하였을 때 세균 및 균류의 분포와 종류에 미치는 영향을 비교하는 것이 목적이기 때문에 TGGE 기술을 이용하여 단순 비교하고 DNA band를 추출하여 염기서열을 확인하고 이를 이용하여 세균과 균류(곰팡이, 효모)를 동정하였다 (표 6 참고). 표 6은 발효와 숙성이 완료된 메주와 간장을 우려낸 메주잔여물에서 추출한 DNA를 이용하여 세균과 균(곰팡이, 효모)의 군집을 분석한 결과이다. 16S-rDNA를 분석한 결과 5 종의 유산균 과(family) 또는 유산균 속(genus)에 속하는 세균(*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus*, uncultured *Lactobacillaceae*, *Pediococcus* sp.), 2 종의 바실러스 속(genus)에 속하는 세균 (*Bacillus* sp. *Bacillus subtilis*), 8 종의 미 배양 종(uncultured bacterium), 1 종의 분쇄 올리브에서 발견된 세균 (*Olivibacter sitiensis*), 1 종의 토양에서 유래한 세균(*Flavobacterium* sp.), 1 종의 목화퇴비에서 분리한 세균(*Parapedobacter luteus*) 등이 검출되었으며, 18S-rDNA를 분석한 결과 5 종의 효모 속(*Saccharomyces* sp., *Endomyces* sp., *Ogataea polymorpha*)에 속하는 균류, 3 종의 *Aspergillus* 속 균류, 2 종의 식품제조에 사용되는 균류(uncultured *Eurotiomycetidae* sp., *Monascus* sp.), 토양에서 발견된 균류(*Eladia saccula*) 등이 검출되었다. 특히, *Aspergillus* sp. 가 높은 빈도로 검출된 것은 초기에 메주를 반죽할 때 *Aspergillus oryzae*의 균사체를 첨가한 효과라고 판단된다.

표 6. TGGE 전기영동 겔(도 2, 3)에서 추출한 16S-rDNA와 18S-rDNA와 동질성을 갖는 세균과 균류.

Band No	16S-rDNA		18S-rDNA	
	Genus or species (Accession number)	Homology (%)	Genus or species (Accession number)	Homology (%)
1	<i>Lactobacillus plantarum</i> (HM058985)	98	<i>Saccharomyces fibuligera</i> (EU057520)	97
2	<i>Dialister invisus</i> (GU401642)	97	<i>Endomyces</i> sp. (D86913)	98
3	<i>Lactobacillus pentosus</i> (HM067026)	98	<i>Ogataea polymorpha</i> (FJ914908)	98
4	<i>Parapedobacter luteus</i> (FJ754320)	99	<i>Saccharomyces</i> sp. (DQ345288)	99
5	<i>Flavobacterium</i> sp. (FJ984614)	98	<i>Aspergillus candidus</i> (EU883597)	96
6	Uncultured bacterium (HM263074)	99	<i>Monascus fuliginosus</i> (HM188433)	97
7	Uncultured bacterium (FJ719174)	99	<i>Aspergillus</i> sp. (EU365862)	99
8	Uncultured bacterium (FJ032513)	97	Uncultured <i>Eurotiomycetes</i> sp. (FN598407)	99
9	<i>Bacillus subtilis</i> (AB210949)	99	<i>Aspergillus</i> sp. (DQ810192)	99

10	Uncultured bacterium (GQ093308)	98	<i>Saccharomyces malanga</i> (EU057521)	97
11	<i>Bacillus</i> sp. (EU162022)	99	<i>Eladia saccula</i> (AJ748275)	99
12	<i>Lactobacillus pentosus</i> (HM067026)	99		
13	<i>Flavobacterium</i> sp. (FJ984614)	99		
14	<i>Parapedobacter luteus</i> (FJ754320)	97		
15	Uncultured bacterium (HM263074)	97		
16	Uncultured bacterium (FJ719174)	99		
17	Uncultured bacterium (FJ032513)	99		
18	<i>Bacillus</i> sp. (EU162022)	99		
19	<i>Pediococcus</i> sp. (AF349938)	98		
20	<i>Bacillus subtilis</i> (AB210949)	99		
21	Uncultured bacterium (HM265895)	99		

##### 5) 발명의 효과

- 본 발명에 따르면 건조 함초는 자체의 염도(30%, w/v)가 식품의 주재료나 첨가물로 사용하기에 지나치게 높기 때문에 가공식품이나 건강식품을 제조하는데 제한 요인이 될 수 있다. 따라서 염분을 제거하거나 염분에 의한 영향을 적게 받는 장류에 활용하는 것이 가장 유용하다. 함초는 재배와 수확시기가 제한되어 있어 생체로서 사용하는 데 시간적인 제약이 있고, 생체로서의 저장성의 한계를 고려하면 건조함초를 이용해야 하는데, 건함초로부터 염분을 제거하는 것이 기술적으로 불가능한 것은 아니지만, 함초의 유용성분이 유실될 가능성이 있어 완전한 제거는 어렵다. 그러나 본 연구 결과에 따르면 30 분간 흐르는 물에 담가놓는 것만으로 90% 이상의 염분이 제거되었다. 이는 함초를 건조할 때 세포내부에 있던 염분이 함초의 조직의 표면으로 용출되면서 염분의 결정으로 부착되어 있기 때문이다. 결과적으로 건함초는 세척에 의해서도 최소 3%의 염분을 포함하고 있어 직접 식용으로 사용하기 어렵지만, 장류를 제조하는데 필수과정인 메주의 발효과정에서 첨가할 수 있기 때문에 염도에 의해 발생하는 문제를 해소할 수 있다. 또한 연구결과에 따르면 함초를 대두박과 최대 4:6의 비율로 혼합하였을 때 수분량을 고려하지 않은 염도는 이론적으로 최대 1.2%에 불과하다. 그러나 메주의 수분함량을 고려하면 염도는 최소 0.8% 정도이기



때문에 미생물의 생장이나 대사활성에 부정적인 영향을 미칠 수 없다. 이는 함초의 첨가량에 따른 미생물의 종 다양성을 비교한 결과 함초의 첨가에 의한 염도의 증가가 메주의 발효에 부정적인 영향을 미치지 않은 것으로 확인이 가능하다. 결과적으로 메주가 발효되는 동안 함초의 긍정적인 효과에 반해 염분이 부정적으로 작용하지 않았다는 것을 보여주는 것이다. 결론적으로, 인체에 유용한 성분을 함유하고 있는 것으로 알려져 있지만 생함초나 건조함초 모두는 다른 채소나 나물처럼 식품으로 사용할 수 없는 제한성이 있다. 이러한 한계를 극복하고 식품으로 활용할 수 있는 가장 합리적인 방법은 장류의 원료로서 활용하는 것이다. 특히, 간장은 장시간 추출과정을 통해 완성되기 때문에 메주의 원료로서 첨가한 함초의 성분은 메주의 발효와 간장의 숙성과정에서 효과적으로 추출될 수 있을 것이다.

## (1) 특허출원 2.

### 대두박, 함초 및 쌀을 이용한 메주의 제조방법 및 그 메주를 이용한 재래식 간장의 제조방법

대두박, 함초 및 쌀을 이용한 메주의 제조방법 및 그 메주를 이용한 재래식 간장의 제조방법

출원번호 : 2011-27984

출원일자 : 2011.03.29.

출원인 : 샘표식품 주식회사

발명자 : 박두현, 전보영, 김용호, 장덕규, 이유원, 이명숙, 이민녕

#### 1) 발명의 목적

- 본 발명은 농가의 소득작물로 재배되고 있으나 염도가 높고 직접 식용이 어려워 소비의 한계에 이른 염생의 함초(통통마디)와 생산량에 비해 소비량이 감소함에 따라 재고가 누적되어 소비촉진의 대상이 되고 있는 쌀을 대두박과 혼합하여 간장을 제조함으로써 미네랄과 기능성 물질이 풍부한 간장을 제조하는 방법에 관한 것이다. 국립수산물시험원에서 분석한 자료에 따르면 함초의 잎은 수분 90.9%, 조단백 1.6%, 지질 0.2%, 미네랄 4.7%, 소금 3.3%로 구성되어 있다. 이를 건조중량으로 환산하면 조단백이 16.5%, 지질이 2.04%, 미네랄이 47.9%, 소금이 33.7%이다. 한편, 콩으로부터 선택적으로 지질을 추출하고 남은 대두박은 과립형(플레이크)의 물질로 단백질 51.88%, 조지방 0.95%, 수분 10.5%, 탄수화물 33.5%, 미네랄 3.17%로 구성되어 있다. 한편 쌀은 전분 91%, 조단백 7.8%, 지질 1.32%, 미량의 미네랄로 구성되어 있어 3가지의 재료를 적당히 혼합하면, 단백질, 탄수화물, 미네랄이 풍부한 간장의 필수조건인 아미노산은 물론 미네랄, 유기산, 항산화 물질 등의 기능이 보장된 간장의 제조가 가능하다. 본 발명은 상기의 3가지 물질을 혼합하여 함초와 쌀의 소비를 촉진하고 품질이 개선된 또는 기존의 콩 간장과 품질이 유사

한 간장을 제조하는 것이 목적이다.

## 2) 발명의 기술적 과제

- 이 연구를 수행함에 있어 제한된 시간에 목적하는 결과를 얻기 위해 메주와 간장의 제조시간을 단축 하였으나 자료의 신뢰성을 위해 대두박(80%)과 함초(20%)로 제조한 메주 또는 간장(이하, 함초메주, 함초간장), 대두박(100%)으로 제조한 메주 또는 간장(이하, 대두메주, 대두간장), 대두박(80%)과 쌀(20%)로 제조한 메주 또는 간장(이하, 쌀메주, 쌀간장), 대두박(60%), 쌀(20%), 함초(20%)로 제조한 메주 또는 간장(이하, 쌀함초메주, 쌀함초간장)을 동일한 방법으로 제조하여 상호 비교하였다. 메주는 대두를 삶아 물기를 제거하고 적당히 분쇄한 후 틀에 넣어 일정한 모양을 만들어 자연환경 또는 사람의 생활주변에서 서식하는 세균과 균류 가운데 메주의 발효활성이 있는 미생물이 부착, 증식할 수 있도록 적당한 온도를 유지 함으로서 제조가 가능하다. 발효 숙성된 메주는 천일염을 녹인 물에 담가 수용성 아미노산, 펩티드, 유기산, 미네랄, 기타 수용성 물질 등이 추출될 수 있게 저장 및 숙성과정을 거치면 간장이 된다. 이러한 일반적인 방법에 따라 메주를 제조하기 위해 대두박, 쌀, 함초를 불밀을 이용하여 50 메쉬 이하로 분쇄하고 3,000 g의 대두박 분말과 1,000 g의 쌀 분말을 110°C에서 90 분간 증숙하였다. 증숙한 대두박과 쌀에 1,000 g의 함초 분말을 혼합하고 정제수를 첨가하여 모양이 유지될 정도로 되게 반죽하여 적당한 크기의 틀에 넣어 성형하였다. 함초는 분쇄하기 전에 표면에 결정화되어 붙어 있는 염분을 제거하기 위해 흐르는 물에 약 30 분간 담가 놓았다가 건져내어 자연광을 이용하여 재건조하였다. 성형하여 모양이 형성된 메주는 바닥에 짚을 깔고 그 위에 올려 사람의 출입이 적고 냉난방에 의해 18 - 25°C의 온도가 유지되는 실내에서 5 주 동안 발효, 숙성, 건조하였다. 함초와 쌀은 간장 제조를 위한 주재료서의 영양성분을 충족하지 못하지만, 콩과 적당히 혼합하면 함초의 기능성 물질과, 쌀의 탄수화물에 의해 메주의 발효와 간장의 기능에 긍정적인 영향을 줄 수 있다고 판단된다. 본 발명은 재래식으로 메주를 제조할 때 사용하는 대두 대신 대두박에 쌀과 함초를 첨가하여 메주를 제조하고 이를 이용하여 가정에서 재래식으로 간장을 제조할 수 있는 재료와 방법에 관한 것이다.

### 3) 발명의 구성 및 작용

- 본 발명을 위해 부안군에서 생산, 건조 판매되고 있는 함초를 물에 세척만 하여 그대로 사용하였기 때문에 실험과정에서 건조 중량을 기준으로 비교 분석한 결과를 표기하였다. 본 발명에 있어서 메주와 간장의 발효 및 숙성은 일반 가정에서 보편적으로 사용하는 방법에 따라 진행하였으나 발효 및 숙성 시간은 임의로 단축하였으며 대두 대신 대두박, 쌀, 함초를 혼합하여 재료로 사용하였으며 쌀과 함초의 첨가량은 중량대비 20%로 조정하였다. 이전 연구에서 60%의 대두박과 40%의 함초를 혼합하여 제조한 간장의 성분함량이 총질소와 아미노산 이외에는 100%의 대두박을 사용하여 제조한 간장과 유사한 특성을 갖는 것으로 확인되었다. 이러한 결과를 근거로 쌀과 함초의 첨가비율을 각각 20%로 정하였다. 대두박 분말과 쌀 분말은 110°C의 증기로 90분 동안 증숙하였다. 반면, 건함초는 미생물의 접종원으로서 기능을 고려하여 증숙하지 않고 별도로 증숙한 재료에 첨가하였다. 정제수로 반죽하여 적당한 틀에 넣어 성형한 메주는 사람의 생활을 위해 조성된 실온에서 약 5주 동안 발효, 숙성, 건조하였다. 메주를 발효, 숙성하는 동안 함초로부터 접종된 세균 이외에 다양한 다른 종류의 세균이 짚, 제조자의 손, 도구, 공기 등에서 자연적으로 접종될 가능성이 크지만, 그러한 세균종이 모두 메주의 발효를 위해 작용하는지는 메주의 발효 전후에 미생물 군집의 분석을 통해 확인이 가능하였다.

### 4) 실시예

#### (A) 실시예 1

- 함초를 전문적으로 생산하는 업체(대신함초, 전남 부안)에서 구매한 건함초를 흐르는 물에 약 30분간 담가 먼지와 표면에 용출되어 건조 부착되어 있는 염분 결정을 제거하였다. 자연광을 이용하여 재 건조한 함초는 볼밀을 이용하여 입자의 최대 크기가 0.3 mm가 되도록 분쇄하였다. 0.3 mm 이상의 분쇄되지 않는 줄기의 목질부는 스테인레스 메쉬(No. 50: 300 μm)를 이용하여 제거하고 정해진 비율에 맞추어 동일한 규격으로 분쇄한 대두박 및 쌀과 혼합하였으며 대두박으로 제조한 간장은 비교목적의 대조군으로 사용하였다. 대두박 또는 대두박, 함초, 쌀 등의 혼합물로 빻은 메주는 실온에서 5 주 동안 배양, 숙성, 자연 건조되게 하였다. 메주를 소독한 항아리에 넣고 메주 중량의 2배의 소금물을 부어 약 6개월 간 숙성하였다. 이는 일반적으로 가정에서 사용하는 1 : 4의 비율에 근거하면 2 배로 농축된 간장을 제조하는 결과이다. 숙성 후 압착하여 간장을 추출하고 밀폐용기에 담아 부유 물질이 완전히 가라앉을 때까지 약 1 주일간 방치하였다. 간장 특유의 검은 색의 투명 상등액은 간장분석 기준에 따라 총질소, 알코올, pH, 색도, 염도, 나트륨의 함량을 각각 마이크로 킬달, 액상크로마토그래피(Shodex KC-811, ion exchange-reversed phase column), 탁상용 pH meter, 분광색차계, ICP-OES (Spectro Ciros CCD), 질산은 적정법 등을 사용하여 정량적으로 측정하였다. 함초의 첨가가 간장의 성분함량의 변화

에 미치는 영향을 실험적으로 비교하기 위하여 중량대비 20%의 함초를 60°C 이상의 온수에 약 3시간 이상 침지한 후 걸러내어 간장을 분석하는 기준으로 성분함량을 분석하여 간장과 직접 비교할 수 있게 표에 정리하였다.

표 1 은 대두간장, 함초간장, 쌀간장, 쌀함초간장의 일반적인 특성을 비교한 것이다. 전체적으로 총질소의 함량은 예상외로 함초간장에서 가장 높은 것으로 나타났는데 이는 메주가 발효되는 과정에서 대두단백질의 가수분해 정도의 차이에 의해서 발생한 결과라고 생각된다. 대두간장과 비교하여 쌀간장 및 쌀함초간장의 총질소의 함량은 다소 낮은 것으로 나타났는데 이는 대두박 함량의 차이에 의한 영향이다. 전민선 등(2002, 제조조건에 따른 한국전통간장의 색 특성에 관한 연구, J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 31(1), 32-38)에 따르면 전통메주로 담근 간장의 pH는 4.08-6.8의 범위에, 총질소는 종류에 따라 차이가 있지만 전통메주로 담근 간장은 0.66-2.75, 개량메주로 담근 간장은 0.19-1.14%의 범위에 속하는 것으로 나타났다. 또한 가정에서 수집한 5종의 재래식 간장의 총질소는 0.67-0.91%, 염도는 20.12-25.42, 색도는 2.34-4.01로 나타났다 (이권행 등, 1997, 한국전통간장 및 메주 제조공정에 관한 조사연구, J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 16(3), 390-396).

따라서 본 발명에서 제조한 모든 간장의 pH와 총질소 함량은 2 배로 농축된 효과를 감안하여도 전통메주로 담근 간장의 농도범위에 포함된다.

표 1. 함초간장, 대두간장, 쌀간장, 쌀함초간장의 일반성분

성분함량	함초간장	대두간장	쌀간장	쌀함초간장	20% 함초 추출물
총질소 (%)	1.41	1.27	1.17	1.09	0.08
알코올 (%)	0.12	0.00	0.11	0.05	0.04
pH	5.51	5.66	5.48	5.34	5.37
색도	4.67	3.07	3.05	3.00	7.33
염 (%)	21.14	21.78	21.20	22.24	3.82
나트륨 (%)	7.34	7.65	7.85	8.09	1.2

표 2는 함초간장, 대두간장, 쌀간장, 쌀함초간장, 함초추출물의 나트륨을 제외한 미네랄의 함량을 비교한 결과로서 ICP-OES (Spectro Ciros CCD)를 이용하여 측정하였다. 20% 함초추출물의 미네랄 함량을 기준으로 보면 칼륨을 제외하고 간장에 비해 상대적으로 낮은 것으로 나타나 함초의 첨가가 간장의 미네랄을 보강하는 효과는 있지만, 미네랄의 함량을 크게 증가시키는 요인이 될 수 없는 것으로 판단된다. 그러나 함초의 미네랄 함량은 약 47.9%(국립수산과학원)로 3 시간 동안 추출한 함초추출물에 포함된 미네랄 1.62%( $3.241\text{g} \div 1000\text{g} \times 100 \div 0.2$ )에 비해 매우 높기 때문에 장시간 메주와 간장을 발효하고 숙성하는 동안 함초로부터 추출될 수 있는 미네랄의 양은 더 증가할 수 있을 것으로 판단된다. 결과적으로 대두간장을 기준으로 평가하면 쌀함초간장의 마그네슘, 칼슘, 철, 아연의 함량은 상대적으로 높은 것으로 나타났는데, 함초 또는 쌀에 포함된 미네랄에 의한 효과라고 평가하기에는 간장 종류간 미네랄 함량의 규칙성이 없다. 간장의 미네랄 함량을 기준으로 평가하면 쌀함초간장은 대두간장에 비해 마그네슘, 칼슘, 철, 아연의 함량이 상대적으로 높게 나타나 혼합재료간장의 기능성은 긍정적으로 평가할 수 있다.

표 2. 함초간장, 대두간장, 쌀간장, 쌀함초간장의 미네랄 함량

미네랄 (mg/kg)	함초간장	대두간장	쌀간장	쌀함초간장	20% 함초 추출물
Mg	3204.00	3069.00	3481.00	3723.00	865.00
K	11380.00	12140.00	10160.00	10580.00	2254.00
Ca	240.00	244.00	407.00	331.00	118.15
Fe	9.15	4.80	6.60	6.25	3.55
Mn	0.50	0.03>	0.03>	0.03>	0.03>
Zn	11.65	6.70	7.45	8.55	0.30
Sum	14,845.3	15,464.53	14,062.08	14,648.83	3,241.03

표 3은 대두간장, 쌀함초간장, 함초추출물 등에 함유된 유기산의 함량을 비교한 결과로서 HPLC (Shodex KC-811, ionexchange-reversed phase column)를 이용하여 측정하였다. 20% 함초추출물에 포함된 유기산은 구연산, 사과산, 초산 등으로 한정되어 있고 간장에 비해 상대적으로 함량이 낮기 때문에 함초에 의해 간장의 유기산이 증가할 가능성은 없다. 전체적으로 총 유기산 함량은 대두간장에서 가장 높은 것으로 나타났으며 쌀간장 또는 쌀함초간장에서 상대적으로 낮은 것으로 나타났다. 이러한 결과는 메주를 제조할 때 첨가한 쌀의 성분이 메주의 발효 특성을 결정하는 요인이 되지 않는다는 것을 보여주는 것이다, 즉, 쌀에 포함된 탄수화물이 당발효대사에 영향을 주어 특정한 유기산의 생산성을 향상시키는 요인이 될 수 없다는 것을 보여주는 것이다. 그러나 일반적인 전통간장에 포함된 유기산은 12,000-15,000 mg/kg (생물공학적인 기법에 의한 전통장류의 대량생산 연구, 전북대학교, 과학기술부, 1998)로 본 발명에서 제조한 간장의 유기산 함량과 유사하였다. 따라서 전통적으로 메주와 간장의 발효조건(온도, 습도, 시간 등), 미생물의 종류 등을 인공적으로 통제하지 않는 전통적인 간장 제조방법에 따라 생산되는 간장에 포함되는 유기산의 종류와 함량은 일정하지 않을 것이다.

표 3. 함초간장, 대두간장, 쌀간장, 쌀함초간장의 유기산 함량

유기산 (mg/kg)	함초간장	대두간장	쌀간장	쌀함초간장	20% 함 초 추출물
구연산	4,488	5,109	2,768	3,249	1,196
사과산	7,742	8,274	4,596	4,273	316
호박산	1,733	1,731	1,201	1,251	0
젖산	1,090	791	687	1,459	0
초산	801	759	853	898	434
레블린산	94	289	185	124	0
피로글루탐산	1,338	1,152	938	1,067	0
총합량	17,286	18,105	11,228	12,321	1,945

표 4는 함초간장, 대두간장, 쌀간장, 쌀함초간장에 함유된 유리 아미노산의 함량을 비교한 결과로 Sykam 아미노산 분석기(독일)를 사용하여 측정하였다. 예상과 다르게 함초간장에서 유리아미노산의 함량이 가장 높은 것으로 나타났는데, 이는 메주가 발효, 숙성되는 동안 단백질의 가수분해 활성의 차이에 의해 발생할 수 있는 일종의 변수이다. 전체적으로 유리아미노산의 함량은 쌀을 첨가한 간장에서 상대적으로 낮은 것으로 나타났는데, 쌀에 포함된 탄수화물이 미생물의 영양원으로 작용하여 단백질의 가수분해활성이 상대적으로 저하되었기 때문으로 추정된다. 전민선 등(2002, 제조조건에 따른 한국전통간장의 색 특성에 관한 연구, J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 31(1), 32-38)에 따르면 본 발명에서 제조한 간장의 유리아미노산의 함량은 전통메주로 담근 간장의 유리아미노산(최대 1,425 mg/kg)에 비해 크게 높은 것으로 나타났는데, 이는 전통간장에서 메주와 소금물의 비율을 1 : 4로 조절하는데 비해 본 발명에서 간장을 제조할 때 메주와 소금물의 비율을 1 : 2로 조절하였기 때문에 나타나는 결과라고 판단된다.

표 4. 함초간장, 대두간장, 쌀간장, 쌀함초간장의 유리 아미노산 함량

아미노산 (%)	함초간장	대두간장	쌀간장	쌀함초간장	20% 함초추출물
Asp	0.18	0.16	0.15	0.15	0.00
Thr	0.13	0.13	0.11	0.11	0.00
Ser	0.21	0.19	0.16	0.17	0.00
Glu	0.55	0.49	0.47	0.51	0.00
Pro	0.08	0.06	0.05	0.06	0.00
Gly	0.09	0.09	0.07	0.07	0.00
Ala	0.29	0.28	0.23	0.26	0.00
Cys	0.04	0.05	0.03	0.04	0.02
Val	0.20	0.20	0.17	0.17	0.00
Met	0.05	0.05	0.05	0.05	0.00
Ile	0.16	0.16	0.14	0.13	0.00
Leu	0.28	0.28	0.24	0.23	0.00
Tyr	0.09	0.08	0.08	0.07	0.00
Phe	0.16	0.15	0.15	0.14	0.00
His	0.10	0.09	0.09	0.08	0.04
Lys	0.17	0.15	0.16	0.15	0.00
NH <sub>3</sub>	0.14	0.12	0.12	0.12	0.02
Arg	0.16	0.15	0.13	0.13	0.03
Sum (mg/kg)	2.94 (29,400)	2.76 (27,600)	2.50 (25,000)	2.51 (25,100)	0.05 (500)

표 5는 함초간장, 대두간장, 쌀간장, 쌀-함초간장 및 함초추출물에 함유된 총페놀 함량, 폴리페놀, 항산화반응 물질 등의 함량을 측정한 결과로서 각각 Folin-Ciocalteu, Prussian blue, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)을 이용하여 화학적으로 정량하였다. 함초추출물에 포함된 총페놀함량, 폴리페놀, 항산화 물질 등의 농도를 감안하면 함초를 포함하는 간장에서 이러한 기능성 물질의 농도는 상대적으로 증가할 것이다. 예상과 같이 함초를 첨가하여 제조한 간장에서 항산화 물질의 함량이 상대적으로 높은 것으로 나타났다. 항산화작용이 있는 기능성 물질이 간장의 맛과 풍미에 미치는 영향에 대한 지표가 존재하지 않지만 간장을 사용하는 식생활의 빈도를 고려하면 가능한 간장에 기능성 물질이 포함되는 것은 긍정적으로 수용할 수 있는 유용한 인자이다.

표 5. 함초간장, 대두간장, 쌀간장, 쌀함초간장의 항산화물질의 함량

기능성 물질 (mg/kg)	함초간장	대두간장	쌀간장	쌀함초간장	20% 함 초 추출물
총페놀함량	3,046	2,752	2,789	2,911	4,933
폴리페놀	351.7	270.7	276.2	306.9	379.3
항산화	423.7	329.7	350.7	402.6	1,272

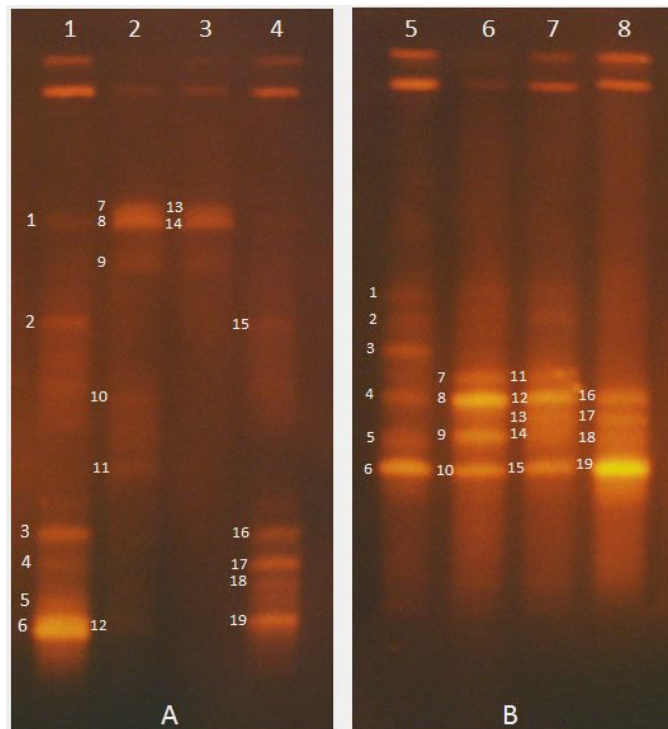
### (B) 실시예 2

- 이전 연구에서 발효와 숙성이 완료된 메주와 간장을 우려낸 후에 메주 잔여물에서 DNA를 추출하여 메주의 발효와 간장의 숙성과정에서 작용하는 미생물의 작용을 비교하였는데, 메주와 간장의 메주 잔여물에서 추출한 DNA의 분석결과는 유의한 차이가 없었다. 따라서 본 발명에서는 메주를 제조한 후 발효 전과 발효 후에 DNA를 추출하여 비교하였다.

대두박과 함초 또는 쌀을 혼합하여 메주를 제조하는 과정에서 다양한 미생물이 공기는 물론 제조자의 손, 기구, 장치에서 자연적으로 오염될 수 있고 인공적으로 메주의 바닥에 깔아준 짚으로부터 접종될 수 있다. 대두박에 첨가한 함초와 쌀이 메주발효 미생물의 종 다양성 변화에 미치는 영향을 분석하기 위하여 발효하기 전과 발효와 숙성이 완료된 다음 메주에서 직접 DNA를 추출하여 16S-rDNA의 가변영역을 PCR을 이용하여 선택적으로 증폭하고 Temperature gradient gel electrophoresis (온도구배전기영동, TGGE) 방법을 이용하여 분리하였다. 도 1은 발효하기 전의 함초메주 (제 1열), 대두메주 (제 2열), 쌀메주 (제 3열), 쌀함초메주 (제 4열)와 발효, 숙성 후 함초메주 (제 5열), 대두메주 (제 6열), 쌀메주 (제 7열), 쌀함초메주 (제 8열)에서 추출한 DNA를 주형으로 증폭한 16S-rDNA의 가변



영역의 TGGE 결과이다. DNA band는 Y-축으로 위치가 같은 것은 동일 종의 세균의 DNA이기 때문에 전체적으로 비교하면 특정 세균 종이 사라지거나 새로 나타난 것을 비교할 수 있다. 메주를 발효하기 전에 검출되었던 세균군집의 대부분은 발효가 진행되는 동안 다른 세균군집으로 대체되었는데, 이는 메주의 원료와 제조자의 손, 도구 등에서 접종되었던 세균이 발효가 진행되는 동안 메주의 영양 조건에서 경쟁력을 갖는 다른 종의 세균에 의해 도태되었기 때문으로 생각된다. 메주의 발효가 끝난 후 세균의 종 다양성은 메주를 제조할 때 사용한 원료의 성분에 따른 차이가 크지 않은 것으로 나타났다.



도 1. 함초메주(제 1, 5열), 대두메주(제 2, 6열), 쌀메주(제 3, 7열), 쌀함초메주(제 4, 8열)의 발효 전 (A)과 발효.숙성 후(B)에 추출한 DNA를 이용하여 증폭한 16S-rDNA의 온도구배전기영동(TGGE) 결과

한편, 도 1의 TGGE gel에서 추출한 16S-rDNA 가변영역의 염기서열을 분석하여 분류학적으로 동질성을 갖는 세균을 GenBank database를 이용하여 분석한 결과 표 6과 같이 메주를 발효하기 전에 *Klebsiella* sp. *Staphylococcus* sp. *Bacillus* sp. 등의 토양유래 세균과 *Halomonas* sp. *Chromohalobacter* sp. 등의 염분이 많은 환경에 유래한 호염성 세균이 우점종을 이루고 있었다. 호염성 세균은 함초를 첨가한 메주에서 선택적으로 검출되었는데, 이는 염분을 함유하는 함초가 해수 또는 갯펄에서 서식하는 다양한 호염성 세균을 운반하는 매개체가 될 수 있음을 보여주는 것이다. 염장식품에서 검출되는 세균 중 가운데 *Chromohalobacter* sp. 와 *Halomonas* sp. 이 포함되어 있는 것을 감안하면 바다에서 수확한 재료를 이용하

여 제조한 식품에서는 호염성 세균이 검출되는 것은 당연한 것이다. 한편, 발효, 숙성, 건조가 완료된 메주에서 검출된 세균은 대부분 *Bacillus* 속에 속하는 세균 종으로 장시간의 배양, 숙성 및 건조가 이루어지는 과정에서 포자를 형성하여 생존이 가능했기 때문에 메주 속에서 우점화되었을 가능성이 크다. 또한 메주를 제조하기 위해 사용한 원료성분의 차이와 관계없이 *Bacillus* 속의 세균 종이 공통적으로 우점화되었는데, 이는 발효 전에 메주의 원료에 포함되어 있거나 외부에서 오염된 세균 중 가운데 메주가 발효되는 동안 메주의 영양환경과 물리화학적 환경에 대한 적응력이 높고 다른 세균 종과 경쟁적으로 우월한 세균 종이 메주 발효의 마지막 단계까지 생존하면서 메주의 품질을 결정하는 작용을 하는 것으로 사료된다.

표 6. 전기영동 겔(도 1의 A, B)에서 추출한 16S-rDNA의 염기서열과 동질성을 갖는 세균

Band No	16S-rDNA (Before fermented)		16S-rDNA (After fermented)	
	Genus or species (Accession number)	Homology (%)	Genus or species (Accession number)	Homology (%)
1	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> (HM216566.1)	100	<i>Bacillus</i> sp. 9 (AF539683.1)	99
2	<i>Chromohalobacter canadensis</i> (AF211861.1)	97	<i>Halomonas ilicicola</i> (EU218533.1)	97
3	<i>Chromohalobacter</i> sp. (FJ494797.1)	98	<i>Bacillus</i> sp. (GU084147.1)	95
4	<i>Halomonas salaria</i> (HQ425657.1)	97	<i>Bacillus licheniformis</i> (GQ392053.1)	100
5	<i>Halomonas subglaciescola</i> (AJ306892.1)	98	<i>Bacillus</i> sp. (FR750270.1)	98
6	<i>Chromohalobacter</i> sp. (AB105160.1)	99	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (GU479922.1)	100
7	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (AP006725.1)	98	Uncultured <i>Bacillus</i> sp. (FJ384524.1)	100
8	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> (HM216566.1)	100	<i>Bacillus licheniformis</i> (GQ392053.1)	100
9	Uncultured bacterium (HM820896.1)	99	<i>Bacillus</i> sp. (FR750270.1)	98
10	<i>Bacillus licheniformis</i> (GQ392053.1)	100	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (GU479922.1)	100
11	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (GU479922.1)	100	Uncultured <i>Bacillus</i> sp. (FJ384524.1)	100
12	<i>Chromohalobacter</i> sp. (AB105160.1)	99	<i>Bacillus licheniformis</i> (GQ392053.1)	100
13	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (AP006725.1)	98	Uncultured <i>Bacillus</i> sp. (HQ397372.1)	97

14	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> (HM216566.1)	100	<i>Bacillus</i> sp. (FR750270.1)	98
15	<i>Chromohalobacter canadensis</i> (AF211861.1)	97	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (GU479922.1)	100
16	<i>Chromohalobacter</i> sp. (FJ494797.1)	98	<i>Bacillus licheniformis</i> (GQ392053.1)	100
17	<i>Halomonas salaria</i> (HQ425657.1)	97	Uncultured <i>Bacillus</i> sp. (HQ397372.1)	97
18	<i>Halomonas</i> sp. (GQ232739.1)	98	<i>Bacillus</i> sp. (FR750270.1)	98
19	<i>Chromohalobacter</i> sp. (AB105160.1)	99	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (GU479922.1)	100

##### 5) 발명의 효과

- 함초는 식품으로 사용 가능한 재료이지만 고도의 염분(생초, 3% 내외; 건조, 30% 내외)을 함유하고 있어 식품의 주재료는 물론 부재료로도 적합하지 않다. 또한 다른 채소와 달리 늦여름에서 가을 사이에 제한적으로 수확을 하기 때문에 주로 건조하여 사용한다. 충분히 성장한 함초는 뿌리와 줄기부분에 목질부가 발달하여 말려 놓으면 나무와 같은 성질을 갖고 있으며, 표면에 염분이 결정체로 붙어 있어 가공하기가 용이하지 않다. 따라서 건함초를 식품의 재료로서 사용하기 위해서는 표면에 붙어 있는 염을 제거하고 목질부를 제거하거나 완전히 분쇄하여 분말형태로 가공할 필요가 있다. 이전 연구에서는 건함초를 최대 2 mm의 과립형태로 분쇄하여 사용하였는데 다른 물질과 혼합할 때 분산성이 낮고 점성이 없어 가공물질을 성형하는데 어려움이 있었다. 본 발명에서는 이를 해결하기 위해 염분을 제거하고 0.3 mm의 분말형태로 가공하여 사용하였다.

메주는 장시간 미생물에 의해 콩의 단백질과 당류가 가수분해되거나 대사산물로 전환되는 과정에서 형성된 수용성 물질을 포함하는 일종의 고상의 미생물 배양배지이다. 메주는 발효, 숙성, 건조 과정을 통해 미생물은 물론 미생물이 생산하는 대사산물과 미생물에 의해 대사될 수 없는 원료물질의 성분이 건조상태로 내재되어 있어 고농도의 소금물에 담가 놓으면 대부분 추출되어 간장의 성분이 된다. 간장의 이러한 제조공정상의 특징과 염생 식물인 함초의 물성에 근거하면 함초는 간장의 제조를 위한 부재료로서 유용하다. 한편, 쌀은 주성분이 탄수화물로서 미생물의 효소에 의해 가수분해되기 쉬운 녹말을 함유하고 있고 생산성에 비해 일반적인 소비가 감소하고 있어 다양한 가공식품으로 개발되고 있고 소비를 권장하고 있는 주요 식품의 재료이다. 대두박은 지질을 제거한 변성 단백질로 구성되어 있어 용도가 가공식품의 재료로서 제한되어 있다. 이러한 물질 특성, 소비 특성, 영양 특성을 갖는 함초, 쌀, 대두박

을 혼합하여 제조한 간장은 대두간장이거나, 함초간장과 비교할 때 특정 영양성분은 적게 포함할 수 있다. 그러나 전반적으로 가정용으로 제조하는 재래식 간장과 비교하여 간장으로서는 성분 및 함량이 충족되기 때문에 쌀, 함초를 대두박과 혼합하여 재래식 간장을 제조하는 것은 가능하다. 함초의 생산자는 함초를 가공할 때 건조과정에서 염분을 50% 정도만 제거하고 분말화하여 판매하면 소비자는 재래식으로 함초간장 또는 쌀함초간장을 제조할 수 있고, 특정한 공정을 이용하여 양조간장을 생산하는 기업은 메주를 제조하거나 간장을 숙성하는 과정에서 함초와 쌀을 사용할 수 있기 때문에 본 발명이 목적하는 가능성이 향상된 간장을 제조할 수 있고 쌀과 함초의 소비를 촉진할 수 있을 것으로 사료된다.

(3) 함초를 이용하여 제조한 된장의 화학적, 생화학적 특성

- 된장의 품질에 대한 함초의 효능을 추정했다. 건조시킨 고운 가루 상태의 함초 (통통마디, G)와 지방을 제거한 대두 (탈지대두, DFS)를 사용하여 메주를 만들고 이를 발효시켰다. 첨가된 탈지대두와 함초의 혼합비율에 따라 세 가지 타입의 메주를 빚었는데 각각 100% 탈지대두, 90% 탈지대두와 10% 함초, 80% 탈지대두와 20% 함초 비율이다. 함초 첨가율에 비례하여 생성된 유리아미노산의 농도도 높아졌으며 이는 된장의 숙성과 직접적인 관련이 있다. 된장에 들어있는 마그네슘, 칼슘, 망간, 철, 아연, 알루미늄 또한 함초에 비례해 증가하였다. 숙신산, 젖산, 피롤리돈카복실산은 함초의 첨가율에 비례하여 증가한 반면 아세트산과 레블린산은 감소하였다. 된장의 항산화 활성은 증가하였으나 폴리페놀은 증가하지 않았다. 메주를 발효시키는 대부분의 세균 군집은 된장의 숙성이 진행되는 동안 보존된다.

### 3. 연구실적(논문, 특허 실적 등)

논문
Effect of Glasswort ( <i>Salicornia herbacea</i> L.) on Microbial Community Variations in the Vinegar-making Process and Vinegar Characteristics J Microbiol Biotechnol 2010 Volume 20 Number 9, 1322-1330. 서하나, 전보영, 윤아람, 박두현
Effect of Glasswort ( <i>Salicornia herbacea</i> L.) on Nuruk-making Process and Makgeolli Quality Food Science and Biotechnology. 2010, Volume 19, Number 4, 999-1004 전보영, 서하나, 윤아람, 이인희, 박두현
Development of <i>Kanjang</i> (Korean traditional Soy Sauce) supplemented with Glasswort ( <i>Salicornia herbacea</i> L.) J Food Sci Nutr 2011, Volum 16, 165~173 김준국, 전보영, 박두현
Effect of Glasswort ( <i>Salicornia herbacea</i> L.) and Rice ( <i>Oryza sativa</i> L.) on Quality of <i>Kanjang</i> (Korean Soy Sauce) Food Science and Biotechnology 2011, Volume 20, Number 4, 979-986 전보영, 박두현
특허
함초가 함유된 함초누룩 및 그 제조방법 특허번호 : 10-1082246 등록일 : 2011.11.03. 출원인 : 샘표식품 주식회사 발명자 : 장덕규, 이유원, 이명숙, 이민녕, 박두현, 윤아람, 전보영, 서하나
함초누룩을 이용한 발효 조성물 및 그 제조방법 출원번호 : 2010-35703 출원일 : 2010.04.19. 출원인 : 샘표식품 주식회사 발명자 : 장덕규, 이유원, 이명숙, 이민녕, 박두현, 윤아람, 전보영, 서하나
대두박 및 함초를 이용한 메주의 제조방법 및 그 메주를 이용한 재래식 간장의 제조방법 출원번호: 2011-27983 출원일자 : 2011.03.29 출원인 : 샘표식품 주식회사 발명자 : 박두현, 전보영, 김용호, 장덕규, 이유원, 이명숙, 이민녕

대두박, 함초 및 쌀을 이용한 메주의 제조방법 및 그 메주를 이용한 재래식 간장의 제조방법

출원번호 : 2011-27984

출원일자 : 2011.03.29.

출원인 : 샘표식품 주식회사

발명자 : 박두현, 전보영, 김용호, 장덕규, 이유원, 이명숙, 이민녕

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 목표달성도

세부사업명	최종목표	달성도(%)
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 엽생식물 생산시스템 개발</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 번식기술개발(종자 및 영양번식)</li> <li>○ 대량증식을 위한 기내배양기술개발</li> <li>○ 가정용 재배키트 개발</li> <li>○ 수경재배 시스템 도입 및 기능성 증진 재배기술개발</li> <li>○ 안전 다수확을 위한 재배 및 수확기 조사 연구</li> </ul>	100
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 고기능성 신선 저장 유통 및 건조분말 제조기술개발</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 엽생식물의 수확 후 생리활동 조사를 토대로 최적 저장 조건 확립</li> <li>○ 신선엽생식물의 MAP 등 최적 유통조건 확립</li> <li>○ 신선엽생식물의 신선편이 이용 가능성 조사 및 MAP조건 구명</li> <li>○ 고기능성 향상을 위한 엽생식물의 최적 건조 및 분말제조 기술 개발</li> <li>○ 천연 고유의 색상 및 기능성 유지 원적외선 가공 기술 개발</li> <li>○ 고품질 엽생 식물 미세분말 제품 및 과립 제품 개발</li> <li>○ 친수성이 우수한 엽생식물 재료의 압출 성형 분말 제품 개발</li> </ul>	100
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 유효성분분석, 품질관리 및 안전성 검증</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 식품영양학적 품질 및 이화학적 특성 분석</li> <li>○ 품종별, 수확시기별 일반 성분 및 이화학적 특성 분석</li> <li>○ 지표물질 설정 및 분석법 확립</li> <li>○ 원료의 안정성 및 제품의 안정성 연구</li> <li>○ 안전성 시험 및 유효기간 설정</li> <li>○ 제품 원료의 독성시험 및 돌연변이 시험</li> </ul>	100
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 소비자 맞춤형 천연 조미제품 및 조리 가공제품 개발</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 다양한 종류의 엽생식물의 관능적 품질 특성 및 조리 적성 DB화</li> <li>○ 엽생식물을 활용한 천연조미제품(seasoning) 및 조리가공 편의식 개발</li> </ul>	100
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 고기능성 장류 공정 관리기술개발</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ pilot reactor 및 생화학 / 미생물학적 공정 개발</li> <li>○ 미생물학적 발효 기술 개발 및 추출효율 분석</li> <li>○ 발효숙성공정 개발</li> <li>○ 장류공정 및 산물 활용</li> <li>○ 통합공정 개발</li> </ul>	100
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 항염증 및 항암기전 평가</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 이용 부위별 추출 분획의 제조 및 항암, 항염증 효과에 대한 세포 수준에서의 규명</li> <li>○ 항암 및 항염증 기작으로서 식물체 부위별 추출 분획의 아라키돈 산 대사의 각 단계별 효소 유도 및 활성화에 대한 효과 규명</li> </ul>	100
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 항비만 및 순환계 질환 개선효과검증</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 항비만 유효성분 선별</li> <li>○ 동물모델에서 항비만 효능검정 및 작용기전 연구</li> <li>○ 심혈관 질환 개선 효능검증 및 작용기전 연구</li> </ul>	100
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 생활체육 임상모델을 통한 건강증진효과</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 식품 섭취가 비만여성의 체성분, 혈중 지질 및 호르몬에 미치는 영향</li> <li>○ 식품섭취와 복합운동의 상호작용이 비만여성의 체성분, 혈중 지질 및 호르몬에 미치는 영향</li> </ul>	100

## 제 2 절 관련분야에의 기여도

### 1. 기여도

#### (가) 기술적 측면

- 국내에서 재배로 자원 확보가 용이한 염생식물을 대상으로 보다 체계적인 약리효능을 검정하고 활성 성분을 비교 분석함으로써 항비만 및 심혈관질환, 고혈압 등 순환기 질환 개선 기능을 가지는 염생식물 종을 선별하여 부작용이 적고 효능이 뛰어난 새로운 기능성 신소재로 개발 이용할 수 있으며 세계적인 한국의 식물자원으로 도약시킬 수 있을 것으로 사료됨.
- 식품이나 약품의 생리 활성 기능을 관찰한 실험들은 대부분 in vitro 실험임. 세포 수준 연구만으로는 whole body에 적합한 섭취 농도 결정과 구강으로 투여된 농도가 세포 수준에 얼마만큼 반영될 지에 대한 예측이 어려우며, 연구의 성과가 실용화되지 못하고 기초 자료 제시로 그칠 가능성이 큼. 이에 in vivo 연구의 가치가 있으며, 개체 전체에 대한 효과를 확인할 수 있는 동물 실험이 필수적으로 요구됨. 궁극적으로는 건강기능식품 개발을 위한 임상시험을 통하여 효능과 안전성을 평가하는 것이 필요
- 따라서 본 연구 통하여 건강기능식품 개발을 위한 in vitro 세포배양 실험, 동물실험과 인체실험 등 체계적이고 종합적인 기술 축적 가능
- 항비만 및 심혈관질환 개선을 위한 기능성 유효 성분 탐색 과정을 통해 기전 연구와 동시에 바이오 마크를 확립할 수 있고 아울러 비만이나 순환계 질환 치료제 개발을 위한 기초 자료를 제공할 수 있음
- 국내 재배로 자원 확보가 용이한 염생식물 (함초)을 대상으로 제품 개발에 앞서 원료로부터 추출한 MDC308의 안전성 과 품질관리를 위한 안정성 연구를 통한 제품 및 원료의 독성시험 및 돌연변이 시험, 염색체 이상 시험을 실시하여 원료 및 제품 생산의 안전성을 확보하는데 기여 하였다. 본 연구를 통하여 건강기능식품 개발을 위한 in vitro 세포배양 실험, 동물실험과 인체 실험 등 체계적이고 종합적인 기술 축적 기능이 가능하게 되었다.

#### (나) 경제적 · 산업적 측면

- 최근 식생활이 서구화 되고 생활양식이 편리해짐에 따라 비만 환자가 급격히 증가하고 있으며, 비만은 지방조직의 기능에 필요한 지방량보다 훨씬 많은 지방이 체내에 축적되어 정상적인 생화학 및 생리적 기능에 장애를 줄 뿐 아니라 여러 가지 질환 특히 고지혈증, 고혈압 및 관상동맥질환의 원인이 되므로 예방과 조기치료에 많은 노력을 기울여야 함.



- 우리나라는 높은 교육수준 및 고령화 추세로 건강에 대한 관심이 증가되고 있으며, 만성 질환의 예방과 치료를 위한 건강식품에 대한 수요가 증가하고 있음. 특히 비만을 예방 및 치료할 수 있는 항비만 효과나 고콜레스테롤혈증 등 혈중 지질의 개선 및 항동맥경화 효과를 가지는 기능성 식품 소재의 개발에 대한 관심이 증가되고 있음.
- 함초는 몸속의 지방질을 분해하여 몸밖으로 내보내는 작용을 하며, 혈액을 맑게 하고, 혈중 콜레스테롤을 낮추는 지질개선 효과가 있는 것으로 알려져 있으나 체지방조직에서 지방분해 및 합성등과 관련된 비만 유발성 개선 효과에 대한 연구 결과가 부족함. 비만에 대한 혈중 지질개선 효과나 체지방량에 대한 함초의 효과에 대한 연구는 순환계 질환의 개선 효과 및 항 당뇨효과에도 중요한 영향을 미칠 수 있으므로 효과규명 연구가 필요함.
- 한국산 함초를 이용하여 비만 및 순환계 질환 예방이나 개선에 유효한 식품의약을 개발하고, 계속하여 활성성분 연구를 통하여 작용기전을 밝힘으로 의약품 소재를 개발할 수 있음. 또한 함초는 우리나라 서해안에 세계에서 가장 많이 자라는 만큼 이를 잘 보호하고 또 약초로서의 효능을 깊이 연구하며, 이를 통해 자원식물로 개발될 경우 재배농가의 소득증대는 물론 위축되어 가는 국내 농업분야에 경제성이 큰 대체작물로 개발될 전망이 큼.
- 함초의 원료로부터 추출한 MDC308을 기존의 메드빌에서 개발한 제품에 첨가함으로써 한국산 함초를 이용하여 비만 및 순환계 질환 예방이나 개선에 유효한 식의약품을 개발하고 지속적인 활성 성분 연구를 통하여 작용기전을 밝힘으로 의약품 소재로 개발 할 수 있는 바탕을 마련하였다. 또한 함초는 우리나라 서해안에 세계에서 가장 많이 자라는 만큼 이를 잘 보호하고 약초로서의 효능을 깊이 연구 하면 이를 통해 자원식물로 개발된 경우 재배 농가의 소득증대 뿐만 아니라 국내 농업 분야에 경제성이 큰 대체 작물로서 개발될 전망이 크다.

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

◎ 세계적으로 국민의 건강 보호를 위하여 되도록 염이 적으면서, 일일 요구하는 광물질량을 풍부하게 포함된 기능성 저염 식품에 많은 관심을 갖게 되면서, 핀란드 헬싱키 의대가 인공조미료를 개발하여 핀란드 오리올라사/에스토니아(Orilola/Estonia)에서 제조하고 있으며, 현재 CJ제일제당에서는 수입하여 “팬솔트” 상품명으로 판매하고 있으며, 그 성분은 염화나트륨50%과 암염 작용인 염화칼륨 34%, 황산마그네슘12%과 L-라이신염산염2%, 이산화규소2%로 구성되어 있다.

◎ 우리나라 서해안 및 남해안에 함초 자원은 야생에 풍부하다. 본 연구에서 개발한 천연 함초 가공기술을 이용하여 인공적이 아닌 천연적으로 짠맛은 그대로 느끼면서, 나트륨 함량은 적게 섭취하면서, 일일 요구되는 K, Mg 함량을 충분히 섭취할 수 있는 신상품 설계 및 개발에 기초자료로서 활용할 수 있다.

◎ 초미립분말을 이용하여 두가지 상품 개발에 활용하였다.

첫 번째는 볶은 참깨에 초미립함초를 바인더와 혼합하여 그림 15와 같이 상품화를 설계하였고,

두 번째는 검은 참깨인 흑임자에 초미립분말 함초를 그림 16과 같이 상품화를 설계하였다.

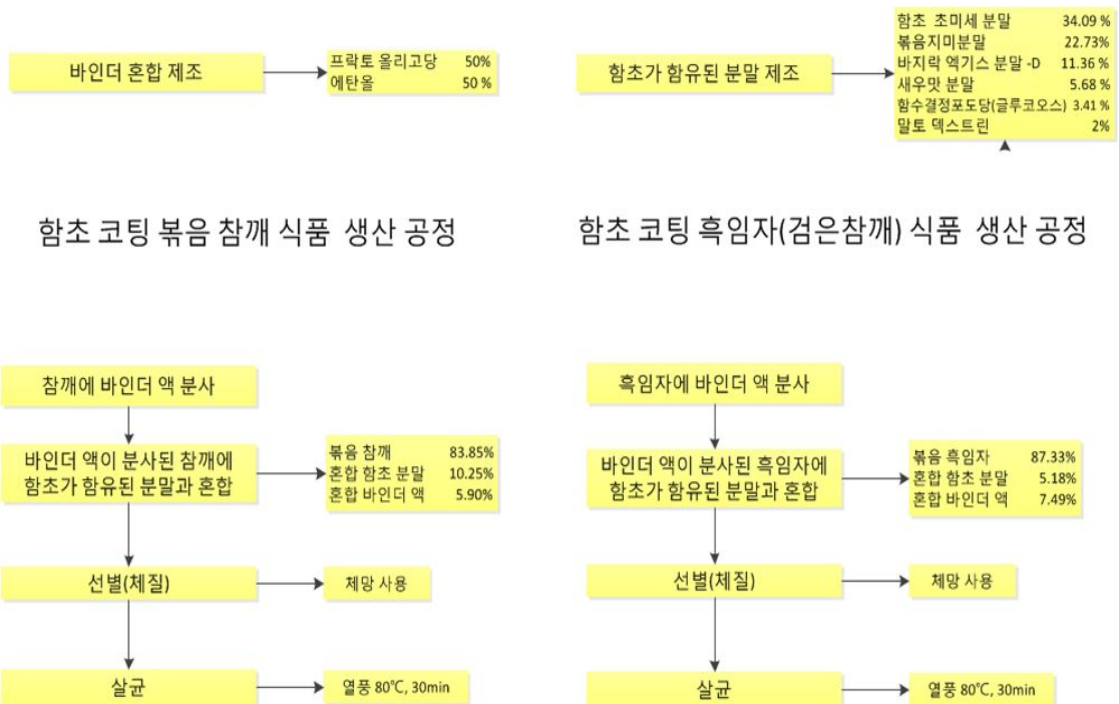


그림 14. 함초 초미분쇄 분말을 이용한 함초 코팅 볶음 식품 생산 공정표



그림 15. 함초코팅 참깨 식품



그림 16. 함초코팅 흑임자 식품

◎ 건강기능식품의 원료 - 식품산업, 천연물활용 의료산업, 화장품산업의 원료로 사용 가능.

- 식품 첨가물로 사용가능
- 섬유소 함유 음료로 개발 가능
- 균형있는 어린이 이유식, 영양식으로 사용가능
- 청소년의 편식, 성인병, 비만에 대한 대체식품으로 개발 가능 : 다이어트에 관심 있는 인구의 증가로 콜레스테롤 조절 성분을 이용하여 체중조절용 제품으로 개발
- 고령화 사회에서 노인 건강식품 사용가능 : 항산화 성분을 이용하여 노화를 방지하는 제품으로 개발 가능함.

## 가. 연구개발결과의 성과 및 활용목표 대비 실적

### (1) 연구성과 목표

(단위 : 건수)

구분	특허		신품종				유전자원 등록	논문		기타
	출원	등록	품종명 명칭 등록	품종수 생산 입판 신고	품종보호			SCI	비SCI	
					출원	등록				
1차년도	목표								1	
	달성								1	2
2차년도	목표	2	1	1				2	8	
	달성							1	2	2 학회발 표 3건
3차년도	목표	2	1	1				2	7	
	달성							1	1	4 학회발 표1건
계	목표							2	6	
	달성								2	8

\* 연차별 연구성과 목표는 향후 연차평가 등의 정량적 평가지표로 활용됨

### (2) 연구성과 활용 목표

(단위 : 건수)

구분	기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	목표					
	달성					

## 나. 논문게재 성과

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2011	합초섭취와 복합운동이 중년여성의 신체조성, 근력 및 혈중 생화학적 변인에 미치는 영향	강병용	이재구	장매희 정인근	한국체육학회지	50(1)	등재지	
2011	Antioxidant Properties and Cytotoxic Effects of Fractions from Glasswort ( <i>Salicornia herbacea</i> ) Seed extracts on Human Intestinal Cells,	Smee Kang	Jungil Hong	Daram Kim, Bo Hyun Lee, Mi-Ri Kim, Maehee Chiang1	Food Science and Biotechnology	20(1)	국내	SCI
2012	9주 동안에 걸친 합초섭취 및 복합운동이 비만 여대생에 대한, 신체조성, 혈중 생화학적 변인 및 피부미용에 미치는 효과	강병용	이재구	오상덕	한국체육과학회지	21(1)	등재지	
2011	토양조건이 통통마디의 생육에 미치는 영향	백정애	장매희		한국생물생산학회지	20(3)	등재지	

논문
<p>Effect of Glasswort (<i>Salicornia herbacea</i> L.) on Microbial Community Variations in the Vinegar-making Process and Vinegar Characteristics</p> <p>J Microbiol Biotechnol 2010 Volume 20 Number 9, 1322-1330.</p> <p>서하나, 전보영, 윤아람, 박두현</p>
<p>Effect of Glasswort (<i>Salicornia herbacea</i> L.) on Nuruk-making Process and Makgeolli Quality</p> <p>Food Science and Biotechnology. 2010, Volume 19, Number 4, 999-1004</p> <p>전보영, 서하나, 윤아람, 이인희, 박두현</p>
<p>Development of <i>Kanjang</i> (Korean traditional Soy Sauce) supplemented with Glasswort (<i>Salicornia herbacea</i> L.)</p> <p>J Food Sci Nutr 2011, Volum 16, 165~173</p> <p>김준국, 전보영, 박두현</p>
<p>Effect of Glasswort (<i>Salicornia herbacea</i> L.) and Rice (<i>Oryza sativa</i> L.) on Quality of <i>Kanjang</i> (Korean Soy Sauce)</p> <p>Food Science and Biotechnology 2011, Volume 20, Number 4, 979-986</p> <p>전보영, 박두현</p>

계재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2009	저장온도와 필름종류가 신선 통통마디( <i>Salicornia europaea</i> L.)의 저장성에 미치는 영향	강호민	강호민	정현진 최인이 원재희	한국생물환경조절학회지	18(4)	국내	X
2009	저장온도와 필름종류가 통통마디의 저장성에 미치는 영향	최인이	강호민	강위수	원예과학기술지	27 별호2	국내 발표초록	X
2009	반응표면분석법에 의한 쌀의 압출성형 공정 분석	선주호	강위수	김동은, 고상훈	한국산업식품공학회	2009년도 추계 학술대회 및 심포지엄	국내 학술발표	X
2010	저장 온도가 MA 저장한 수송나물( <i>Salsola komarovi</i> Iljin)과 해홍나물( <i>Suaeda maritima</i> L. Dum.)의 MA저장성에 미치는 영향	유태종	강호민	김일섭, 강위수	한국생물환경조절학회지	19(3)	국내	X
2010	저장온도가 MA 저장한 수송나물( <i>Salsola komarovi</i> Iljin)과 해홍나물( <i>Suaeda maritima</i> L. Dum.)의 MA저장성에 미치는 영향 <b>&lt;제6회 우수 포스터발표상 수상&gt;</b>	유태종	강호민	정현진, 손진성	원예과학기술지	28권 별호 2	국내 발표초록	X
2010	함초(통통마디, <i>Salicornia europaea</i> L.) 분산제에 관한 연구	민주홍	강위수	고현준, 강호민	한국산업식품공학회	2010년도 추계 학술대회 및 심포지엄	국내 학술발표	X
2011	에냉 처리가 통통마디의 MA 저장성에 미치는 영향	정현진	강호민	유태종, 손진성, 이스람, 모하메드, 조희를, 홍성미, 지수빈	원예과학기술지	29권 별호	국내발표 초록	X
2011	저장온도와 필름종류가 다양한 크기의 통통마디 신선편이의 저장성에 미치는 영향	최인이	강호민	정현진, 손진성	한국생물환경조절학회지	추계 학술대회 논문집	국내발표 초록	X
2011	필름종류가 통통마디( <i>Salicornia herbacea</i> ) 어린순의 MA저장에 미치는 영향	최인이	강호민	정현진, 손진성	한국생물환경조절학회지	추계 학술대회 논문집	국내발표 초록	X
2011	함초(통통마디, <i>Salicornia europaea</i> L.)의 압출성형을 통한 천연조미료개발에 관한 연구	민주홍	강위수	-	한국산업식품공학회	2011년도 추계 학술대회 및 심포지엄	국내 학술발표	X

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2010	3T3-L1 adipocytes를 이용한 한국산 통통마디의 항비만 효과 탐색	전현영	김정희	김미정	한국영양학회	2010년도 추계 학술대회 심포지엄	국내 학술대회 발표	X
2011	고지방식이를 섭취한 흰쥐에서 한국산 통통마디(Salicornia herbacea L.) 분말의 항비만 효과 탐색	전현영	김정희	김미정 박윤지	The Korean Society of Food Science and Nutrition	국제학술대회 논문집	국내 발표초록	X



## I. 학회발표

### 1. 국내학회발표

2009년 한국식품영양과학회 학술대회

강스미, 김다람, 이보현, 김미리, 장매희, 홍정일, 함초 종자 메탄올 추출물 분획의 항산화 활성 및 장관계 세포 독성 평가. 2009, 11.04, 창원, 대한민국

2010년 한국식품과학회 77차 학술대회 (한국식품과학회)

Smee Kang, Daram Kim, Bo Hyun Lee, Mi-Ri Kim, Hyun A Choi, Maehee Chiang, and Jungil Hong, Antioxidant Properties and cytotoxic effects on the intestinal cells of fractions from *Salicornia herbacea* methanol extracts (P11-048) 2010, 6.18 Incheon, Korea

2012년 한국식품과학회 79차 학술대회 (한국식품과학회)

Yoo-Mi Choi, Mi-Ri Kim, Kyung A Park, Hyun Jung Kim, Jungil Hong, Dual immunomodulatory roles of glasswort seeds in macrophages (P11-114) 2012, 6.15, Daejeon, Korea

### 2. 국제학회발표

2010 International conference on nutraceuticals and functional foods (ISNFF)

Smee Kang, Daram Kim, Bo Hyun Lee, Mi-Ri Kim, Hyun A Choi, Jungae Baik, Maehee Chiang, and Jungil Hong, Antioxidant and anti-inflammatory effects of water extracts from freshwater-cultivated *Salicornia herbacea* (P13) 2010, 10.14, Bali, Indonesia

2011 International conference on Foods factors, Nov. 20-23, 2011, Taipei, Taiwan

YOO-MI CHOI, SMEE KANG, KYUNG A PARK, DARAM KIM, HYUN A CHOI, MI-RI KIM, MAEHEE CHIANG AND JUNGIL HONG\* Modulation of nitric oxide synthesis and arachidonic acid metabolism by glasswort (*Salicornia herbacea* L). (P1-295) 2011 International conference on Foods factors, Nov. 20-23, 2011, Taipei, Taiwan

## II. 연구 관련 수상

2012년 한국식품과학회 79차 학술대회 우수포스터상

최유미 Dual immunomodulatory roles of glasswort seeds in macrophages

다. 특허 성과

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호

<p>특허</p> <p>함초가 함유된 함초누룩 및 그 제조방법</p> <p>특허번호 : 10-1082246</p> <p>등록일 : 2011.11.03.</p> <p>출원인 : 샘표식품 주식회사</p> <p>발명자 : 장덕규, 이유원, 이명숙, 이민녕, 박두현, 윤아람, 전보영, 서하나</p>
<p>함초누룩을 이용한 발효 조성물 및 그 제조방법</p> <p>출원번호 : 2010-35703</p> <p>출원일 : 2010.04.19.</p> <p>출원인 : 샘표식품 주식회사</p> <p>발명자 : 장덕규, 이유원, 이명숙, 이민녕, 박두현, 윤아람, 전보영, 서하나</p>
<p>대두박 및 함초를 이용한 메주의 제조방법 및 그 메주를 이용한 재래식 간장의 제조방법</p> <p>출원번호: 2011-27983</p> <p>출원일자 : 2011.03.29</p> <p>출원인 : 샘표식품 주식회사</p> <p>발명자 : 박두현, 전보영, 김용호, 장덕규, 이유원, 이명숙, 이민녕</p>
<p>대두박, 함초 및 쌀을 이용한 메주의 제조방법 및 그 메주를 이용한 재래식 간장의 제조방법</p> <p>출원번호 : 2011-27984</p> <p>출원일자 : 2011.03.29.</p> <p>출원인 : 샘표식품 주식회사</p> <p>발명자 : 박두현, 전보영, 김용호, 장덕규, 이유원, 이명숙, 이민녕</p>

라. 기술료 징수 현황

기 징수액	당해연도 징수액	향후 징수액	합계

마. 사업화 현황

사업화명	사업화내용	사업화 업체 개요				기매출액	당해연도 매출액	매출액 합계
		업체명	대표자	종업원수	사업화형태			

바. 인력활용/양성 성과

(1) 인력지원 성과

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
7	1	4	1		3	3	2		4

- 학위취득

강스미 서울여자대학교 대학원 석사학위 취득(2011년 2월)

논문제목: 함초와 함초종자 추출물의 항산화, 세포독성 및 항염 효과

(2) 장·단기 연수지원 성과

장기 (2월 이상)		단기 (2월 미만)	
국내	국외	국내	국외

(3) 산업기술인력 양성 성과

프로그램명	프로그램 내용	교육기관	교육 개최회수	총 교육시간	총 교육인원

사. 경제사회 파급효과

산업지원 성과 (단위 : 건)				고용창출 성과 (단위 : 명)		
기술지도	기술이전	기술평가	합계	창업	사업체 확장	합계

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외 과학기술정보

○ 염생식물을 이용한 소비자 맞춤형 천연 조미료 및 조리가공 편의식 개발은 거의 이루어지지 않고 있는 실정이다.

○ 고기능성 신선 염생식물의 저장 및 유통조건 확립: 국내는 물론 전세계적으로 염생식물의 저장 및 유통조건에 대한 보고는 없다.

○ 고기능성 향상을 위한 염생식물의 최적 건조 및 분말제조 기술 개발: 국내·외로 에너지 소모량이 적고 경제적이며 취급이 용이한 원적외선을 이용하여 고품질의 제품을 대량 생산할 수 있는 건조기는 아직 초기 개발 상태이다.

○ 현재 생물 산업분야의 재료가공공장의 분쇄 공정에 사용되는 대표적 분쇄기로는 roller mill, hammer mill, pin mill 등이 있는데 분쇄시 분쇄소요에너지의 95% 이상이 마찰열로 생성되고, 나머지 5%이하가 분쇄에 소요되기 때문에 모두 분쇄 열 발생 문제를 가지고 있다.

○ 일본, 미국, 독일에서는 고속 회전 축류 기류식 분쇄기를 이용하여 식품 재료를 5 - 1,000 $\mu$ m 까지 회전 속도로 입자 크기를 제어하는데 사용하고 있으나, 1시간 당 100kg 분쇄처리 능력의 분쇄기는 1억원( 700만 엔  $\times$  1071원/엔  $\times$  20%수입 마진) 정도의 고가에 해당한다.

○ 2007년도 International Food Nanoscience Conference에서 nano food의 개발에 있어서 가장 중요한 연구 가치는 nanoparticle을 만드는 것이라고 하였으며 nano food의 적용을 위해서는 200-1000nm의 초미립분말을 제조할 수 있어야 하는데 현재 국내의 분쇄산업은 90% < 10 $\mu$ m이하의 수준에 머무르고 있다.

## 제 7 장   참고문헌

1. Autio, W.R. and W.J. Bramlage. 1986. Chilling sensitivity of tomato fruit in relation to ripening and senescence. J. Amer. Soc. Hort. Sic. 111:201-207.
2. Breckle, S. W., 1990. Salinity tolerance of different halophyte types, Generic aspects of plant mineral nutrition, Kluwer Academic Publishers, New York, 167-175.
3. Cheng, T.S. and R.L. Shewfelt. 1988. Effect of chilling exposure of tomatoes during subsequent ripening. J. Food. Sci. 53:1101-1105.
4. Decho, A. W. (2000) Microbial biofilms in intertidal systems: An overview. Cont. Shelf. Res., 20: 1257 - 1273.
5. Kader, A.A. 2002. Postharvest technology of horticultural crops. 3rd edition. University of California, Division of Agriculture and Natural Resources. USA.
6. Kang, H.M. and K.W. Park. 1999. Chilling stress alleviation effect of pre-harvest heat treatment during cultivation of mature green tomato at low temperature storage. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 40: 647-651 (in Korean).
7. Kang, H.M. and K.W. Park. 2000. Comparison of storability on film sources and storage temperature for oriental melon in modified atmosphere storage. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 41:143-146.
8. Kang H.M., K.W. Park, and M.E. Saltveit. 2002. Elevated growing temperatures during the day improve the postharvest chilling tolerance of greenhouse-grown cucumber (*Cucumis sativus*) fruit. Postharvest Biology and Technology 24: 49-57 (in Korean).
9. Kang, H.M., K.W. Park, I.S. Kim, and J.H. Won. 2005. Effects of postharvest heat treatment on alleviation chilling injury and improvement storability of oriental melon. J. Bio-Environ. Cont. 14: 137-143 (in Korean).
10. Kang, H.M. and I.S. Kim. 2007. Comparison of Storability of Some Sprout

- Vegetables in MA Storage. J. Bio-Environ. Cont. 16: 415-149 (in Korean).
11. Kang, H.M., I.L. Choi, and I.S. Kim. 2008. Comparison packing materials for proper MAP of mixed sprout vegetables. J. Bio-Environ. Cont. 17:226-230.
  12. Kang, H.M., H.J. Jeong, and I.L. Choi, 2009. Effect of storage temperature and packing materials on storability of *Salicornia europaea* L. J. Bio-Environ. Cont. 18:2XX-2XX(in press).
  13. Kim, C. K., and Q. Chae. 1983. The inactivation effects of UV light on bacteriophage f2. Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng., 11(3): 155-161.
  14. Kim, G. H., 2010. Dynamics and restoration of *Salicornia europaea*, Master Dissertation, Seoul National University, Seoul, Korea.
  15. Lee, S.K. 1996. Postharvest physiology of horticultural crops. Sungkunsu, Suwon.
  16. Lee, T.B. 2003. Coloured Flora of Korea Vol. I. p. 286. HyangMunSa. Seoul (in Korean).
  17. Lee, K.A. and Y.J. Yang. 1997. Physiological characteristics of chilling injury and CA effect on its reduction during cold storage of pepper fruit. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 38:478-482.
  18. Lee, K.A. and Y.J. Yang. 1999. Effect of chemical treatments on reduction of chilling injury and physiological changes during cold storage of squash (*Cucurbitamoschata*). J.Kor.Soc.Hort.Sci.40:669-672.
  19. Lee, K.A. and Y.J. Yang. 2000. Roles of elevated carbon dioxide on postharvest chilling susceptibility in squash(*Cucurbita moschata*). Proceeding of Kor. J, Hort. Sci. & Technol. 18(5): 691 (in Korean).
  20. Lu, D.H., M. Zhang, S.J. Wang, J.L. Cai, C.P. Zhu and X. Zhou, 2009. Effects of modified atmosphere packaging with different sizes of silicon gum film windows on *Salicornia bigelovii* Torr. storage. J. Sci. Food Agric. 89: 1559 - 1564.

21. Lyons, J. M. 1973. Chilling injury in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 24:445-451.
22. Marianne, P., F. Paul, G. Larry, K. Harvey, E. Timothy, and R. C. Paul. 1991. The mechanism of sunlight-mediated inactivation of *Bacillus huringiensis* crystals. *Biochem. J.* 273: 43-47.
23. Paull, R.E. and N.J. Chen, 2008, Postharvest handling and storage of the edible red seaweed *Gracilaria*. *Postharvest Biology and Technology* 48: 302 - 308.
24. Park, K.W., H.M. Kang, D.M. Kim, and H.W. Park. 1999. Effects of the packaging films and storage temperatures on modified atmosphere storage of ripe tomato. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 40: 643-646 (in Korean).
25. Park. K.W., H.M. Kang, and C.H. Kim. 2000. Comparison of storability on film sources and storage temperature for fresh Japanese mint in MA storage. *J. Bio. Env. Con.* 9: 40-46 (in Korean).
26. Saltveit, M. E. Jr and L. L. Morris. 1990. Overview of chilling injury of horticultural crops. p. 3-17. In: C. Y. Wang (ed.). *Chilling injury of horticultural crops*. CRC Press, Boca Raton, Fla.
27. Wang, C. Y. 1982. Physiological and biochemical responses of plants to chilling stress. *HortScience* 17:173-186.
28. Wang, C. Y. 1989. Chilling injury of fruits and vegetables. *Food Rev. Intl.* 5:209-236.
29. Wilson, M. (1994) Bactericidal effect of laser light and its potential use in the treatment of plaque-related diseases. *Int. Dent. J.*, 44: 181 - 189.
30. Yun H. K., Y. C. Kim, T. C. Seo, S. G. Lee, K. Y. Kim, and J. G. Lee. 2003. Effect of Various Kinds of Ultraviolet Irradiation on Growth and Antioxidant Contents of Some Leafy Vegetables. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 21(2): 94-97
31. 김이열. 2002. 원예용 상토의 규격화 및 표준분석법. 한국생물환경조절학회, 심



포지엄 및 학술발표 논문집. 131-186.

31. 김종배, 최선남, 최규홍, 임성한, 채숙진 (2007) : 염생식물의 기능, 수산과학연구소: vol 19(2) 197-205
32. 식품의약품안전청 : 고지혈증치료제에 대한 임상시험평가지침
33. 이정윤 (2005) : 한국 서·남해안 염습지에 분포하는 염생식물의 저토특성과 생장동태에 관한 연구, 목포대학교 대학원
34. 추연식, 송승달 (2000) : 명아주과 식물의 생리생태학적 특성, 한국생태학회지 : vol 23(5) 397-406
35. Kim CS, Song TG (1983) : Ecological Studies on the Halophyte Communities at Western and Southern Coasts in Korea(IV), Korean J Ecology : vol 6(3) 167-176
36. Lee BH, Moon YH, Jeong BC (2002) : Growth Characteristics and It's Potentiality of Halophyte, Suaeda asparagoides MIQ, Kor J Intl Agri : vol 14(2) 87~93
37. Hong SW, Han YC, Choi YK (1970) : Ecological studies of the certain Halophytes on the high saline soil, J Plant Biol : vol 13(1) 25-32
38. Hong SW, Han YC, Choi YK (1969) : Biological Improvement of Reclaimed Tidal Land (I), J Plant Biol : vol 12(1) 7-14
39. Ames, B.M., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975) : Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test, Mutat. Res, 31, 347-364.
40. Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983) : Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, Mutat. Res, 113, 173-275.
41. Kim, B. S., Margolin, B. H. (1999) : Statistical methods for the Ames Salmonella assay: a review, Mutat. Res, 436, 113-122.
42. Singer VL, Lawlor TE, Yue S. (1999) : Comparison of SYBR Green I nucleic acid gel stain mutagenicity and ethidium bromide mutagenicity in the Salmonella/mammalian microsome reverse mutation assay (Ames test), Mutat. Res, 439, 37-47.
43. 일본제약공업협회 의약품평가위원회 기초연구부회 편집

:일본후생성의약품독성시험법 변이 원성시험 Q&A p16

44. OECD (1997) : OECD guidelines for testing of chemicals, (adopted 21 July 1997) Section 4 :Chapter 473, In vitro mammalian chromosome aberration test, Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France.
45. Ishidate Jr. M. and Odashima S. (1997) : Chromosome tests with 134 compounds on chinese hamster cells in vitro—a screening for chemical carcinogens, *Mutat. Res*, 48, 337-354.
46. Kim BS, Zhao B, Kim HJ, Cho M. (2000) : The statistical analysis of the in vitro chromosome aberration assay using Chinese hamster ovary cells, *Mutat. Res*, 469, 243-52.
47. Koyama H. et al (1970) : A new cell line derived from new born chinese hamster lung tissue, *Gann*, 61, 161-167.
48. Galloway S.M, et al (1994) : Report from working group on in vitro tests for chromosomal aberration, *Mutat. Res*, 312, 241-61.

## 부 록

1. 함초추출물(MDC308)의 단회투여독성시험 보고서
2. 함초추출물(MDC308)의 복귀돌연변이시험 보고서
3. 함초추출물(MDC308)의 염색체이상시험 보고서
4. 함초추출물(MDC308)의 소핵시험 보고서

1. 함초추출물(MDC308)의 단회투여독성시험 보고서

함초추출물(MDC308)의 Sprague-Dawley 랫드를  
이용한 단회경구투여독성시험

(시험번호: A01-10001)

(주)메드빌

153-801 서울특별시 금천구 가산동 60-21 IT미래TOWER 15층  
Tel) 02-2027-5775 · Fax) 02-2027-5776 · <http://www.medvill.co.kr>

# 진술서

시험제목: MDC308의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 단회경구투여독성시험

시험번호: A01-10001

상기 시험은 다음의 독성시험기준 및 Good Laboratory Practice (GLP) 규정에 따라 수행하였고, (주)메드빌의 표준작업수순서(SOPs)를 준수하여 실시하였다.

- 식품의약품안전청고시 제2009-183호(2009년 12월 22일) ‘비임상시험관리기준’
- OECD Principles of Good Laboratory Practice (1997)
- 식품의약품안전청고시 제2009-116호(2009년 8월 24일) ‘의약품등의 독성시험기준’
- OECD Guideline for Testing of Chemicals: Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Procedure(Guideline 420, 17 December, 2001)

본 시험은 승인된 시험계획서에 따라 실시되었고, 모든 시험과정은 시험책임자의 책임 하에 수행되었다. 이 보고서는 시험수행을 통해 얻어진 시험기초 자료를 토대로 작성되었으며, 신뢰성을 저해할만한 상황이 발생하지 않았다.

(주) 메 드 빌  
시험책임자 : 김 보 경

\_\_\_\_\_  
년 월 일

(주) 메 드 빌  
운영책임자 : 흥 은 경

\_\_\_\_\_  
년 월 일

# 시 험 개 요

1. 시험제목 : MDC308의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한 단회경구투여독성시험

2. 시험번호 : A01-10001

## 3. 시험목적

Sprague-Dawley 계통의 랫드에서 MDC308을 단회 경구로 투여했을 때의 독성을 조사하기 위하여 실시하였다.

## 4. GLP 대응

시험의 모든 과정은 다음 GLP(Good Laboratory Practice) 규정을 준수하였다.

- 식품의약품안전청고시 제2009-183호(2009년 12월 22일) ‘비임상시험관리기준’

- OECD Principles of Good Laboratory Practice (1997)

본 계획서에 명시된 사항 중 기준에 규정되지 않은 경우는 (주)메드빌 표준작업수순서(SOP)에 따랐다.

## 5. 시험기준

이 시험의 모든 과정은 다음 GLP 규정을 준수하였다.

- 식품의약품안전청고시 제2009-116호(2009년 8월 24일) ‘의약품등의 독성시험기준’

## 6. 시험의뢰기관

1) 명 칭	(주)메드빌
2) 소재지	서울특별시 금천구 가산동60-21, IT미래타워 15층 Tel : 02-2027-5775, Fax : 02-2027-5776

## 7. 시험기관

1) 명 칭	(주)메드빌
2) 소재지	서울특별시 금천구 가산동60-21, IT미래타워 15층 Tel : 02-2027-5775, Fax : 02-2027-5776

#### 8. 시험물질의 보관

본 시험에 사용한 시험물질은 (주)메드빌의 시험물질 조제분석실의 시험물질보관고(보관고번호: MT-A)에 의뢰자가 요청한 보관상 유의사항에 따라 보관하였으며, 시험기관내 코드번호(M-09156)를 부여하였다.

#### 9. 시험자료의 보관

본 시험기간 중 작성된 모든 기록에 관하여는 본 기관의 규정에 따라 5년간 (주)메드빌 자료보관실에 보관한다.

시험기초자료(문서류, 디스켓류) : 자료보관실

시험계획서, 최종보고서(원본) : 자료보관실

#### 10. 시험일정

시험개시일	2010년 1월 11일
동물입수일	2010년 1월 13일
투여일	2010년 1월 19일
실험종료일	2010년 2월 2일
최종보고서(안)제출예정일	2010년 2월 12일
시험종료예정일	2010년 2월 22일

#### 11. 시험관계자

부 문	책 임 자	담 당 자
독 성 시 험	김 보 경	김 다 영, 신 문 근, 최 경 미
조 제 분 석	노 흥 준	지 유 미
신뢰성 보증	육 희 경	가 보 람
자 료 보 관	최 혜 경	최 혜 경



## 목 차

진술서	-----	1
시험개요	-----	2
목 차	-----	4
I. 요약	-----	5
II. 재료 및 방법	-----	6
1. 시험물질 및 시험물질의 조제	-----	6
2. 시험계	-----	6
3. 시험계 사육 환경조건	-----	7
4. 사료 및 음수	-----	7
5. 투여방법	-----	8
6. 시험군의 구성	-----	8
7. 시험방법 및 시험항목	-----	8
8. 통계학적 분석	-----	9
III. 결과	-----	9
IV. 고찰	-----	10
V. 참고문헌	-----	10
VI. 결과자료	-----	11
Table 1. Mortality in male and female rats	-----	11
Table 2. Incidence of clinical signs in male and female rats	-----	12
Table 3-1. Body weights of male rats	-----	13
Table 3-2. Body weights of female rats	-----	15
Table 4. Necropsy finding in male and female rats	-----	17
첨부자료 1. Certificate of analysis	-----	18
첨부자료 2. 시험계 미생물검사 성적서	-----	19
첨부자료 3. 사료 방사선 조사 증명서	-----	20
첨부자료 4. 사료 성분 분석 성적서	-----	21
첨부자료 5. 음수 수질검사 시험성적서	-----	23

## I. 요약

시험물질 MDC308의 단회 경구투여에 의한 독성을 조사하기 위하여 Sprague-Dawley(SD) 계통 랫드에 시험물질을 경구투여하였다. 각 군당 10마리(암수 각 5마리)에 0, 555, 1666 및 5000mg/kg 용량으로 단회 경구투여를 실시하였고, 14일간의 사망률, 일반증상, 체중변화를 관찰하고, 관찰종료 후 부검을 실시하여 육안적 소견을 관찰하였다. 시험 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 모든 시험군에서 사망동물은 발생하지 않았다.
2. 일반증상의 경우, 투여 후 모든 시험군에서 시험물질에 의한 변화는 관찰되지 않았다.
3. 체중변화의 경우, 모든 시험군에서 시험물질의 투여와 연관된 변화는 관찰되지 않았다.
4. 부검소견의 경우, 모든 시험군에서 시험물질의 투여와 연관된 변화는 관찰되지 않았다.

본 시험조건 하에서 시험물질 MDC308의 랫드에 대한 단회경구투여 시험결과, 시험물질에 의한 사망동물 및 일반증상에 있어서 특이적 변화가 관찰되지 않았으며, 체중변화 있어 시험물질의 투여와 연관된 변화가 관찰되지 않았다. 관찰기간 종료 후 실시한 부검에서 특이 소견이 관찰되지 않았다.

사망동물이 관찰되지 않았기에 본 시험물질의 반수치사량(LD<sub>50</sub>)은 산출되지 않았으며, 최소치사량(MDL: Minimum Lethal Dose)은 암수 랫드에서 5000mg/kg 이상인 것으로 판단하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시험물질 및 시험물질의 조제

#### (1) 시험물질

- 1) 명칭 : MDC308 (첨부자료1)
- 2) Lot No. : MBP3080909
- 3) 보관조건 : 상온보관

- 4) 순도 : 천연물(100%)
  - 5) 입수일 : 2010년 1월 11일, 2010년 1월 18일
  - 6) 입수량 : 10g(bottle 포함 38.4g), 20g
  - 7) 외관 및 성상 : 회색분말
  - 8) 공급처 : (주)메드빌
- \*\* 시험물질에 관한 정보, 순도, 동일물질여부, 안정성 등은 공급처로부터 제  
공받았다.

(2) 용매

- 1) 명칭 : Distilled water
- 2) Lot No. : 513085
- 3) 보관조건 : 상온
- 4) 입수일 : 2009년 2월 9일
- 5) 외관 및 성상 : 무색투명한 액체
- 6) 공급처 : GIBCO

(3) 시험물질의 조제 및 분석

- 1) 조제 : 실험실시 당일 필요한 시료의 질량을 정확히 측정하여 부형제에 현  
탁시켜 사용하였다.
- 2) 분석 : 별도로 시행하지 않았다.

## 2. 시험계

- (1) 종 및 계통 : 특정병원균부재(SPF) SD(Sprague-Dawley) 계통의 랫드(첨부  
자료2)
- (2) 시험계 선정 이유 : 본 시험에 사용하는 랫드는 독성시험에 적당한 실험동물  
로서 일반 독성시험에 널리 사용되고 있으며, 풍부한 시험 기초자료가 축적  
되어 있어 시험결과의 해석 및 평가에 이러한 자료를 이용할 수 있기에 선  
정하였다.
- (3) 성별 및 구입 동물 수 : 암수 각 22 마리
- (4) 투여 개시 시 주령 및 체중범위 : 약 9주령, 평균±20g
- (5) 공급원 : (주)오리엔트 바이오 (경기도 가평군 북면 목동리 699-13)
- (6) 입수일 : 2010년 1월 13일

- (7) 동물의 반입 및 개체번호표기법 : 입수 시 체중을 측정하고 체중 측정 순으로 개체식별법에 따라서 꼬리에 유성펜을 이용하여 개체식별표시를 하였다.
- (8) 검역 및 순화방법 및 기간 : 입수 후 5일 이상의 검역순화기간 중 매일 1회, 투여 개시일 까지 일반 증상 관찰을 실시하였다. 검역순화기간 종료 시 체중을 측정하여 시험실시에 적합하고 일반증상에 이상이 없는 건강한 동물을 선발하였다.
- (9) 군 분리법 : 검역순화기간의 종료 후, 체중 증가량 및 일반증상에 이상이 없는 동물을 선별하여 사용하였다. 군 분리 시, 군 평균체중의 표준편차를 계산하여 군간 균등하게 동물을 배치하였다.
- (10) 개체식별 : 군 분리 종료 후 케이지에는 케이지별 라벨을 부착하고, 동물의 개체식별은 유성펜을 이용하여 개체식별법에 따라 꼬리에 표시하였다.

### 3. 시험계 사육 환경조건

- (1) 동물실명 : 동물실 II
- (2) 온·습도 범위 : 온도  $22 \pm 3$  °C, 상대습도  $50 \pm 10$  %
- (3) 환기회수 : 10~20회/시간
- (4) 조명시간 및 명암주기 : 08:00 ~ 20:00 조명(12 hr 점등/12hr 소등)
- (5) 조도 : 150~300 Lux
- (6) 사육상자 종류 및 크기 : Polycarbonate 케이지 (280W X 500L X 200H mm)
- (7) 케이지 당 동물 수 : 케이지 당 3 마리

### 4. 사료 및 음수

- (1) 사료종류 : 실험동물용 고형사료
- (2) 공급원 : (주)오리엔트 바이오
- (3) 급여방법 : 급이기에 고형사료를 넣고, 자유 섭취시켰다.
- (4) 오염물질의 분석 및 미생물 검사 : 사료공급원에서 오염물질을 검사하여 제공한 자료를 이용하였다. (첨부자료3,4)
- (5) 음수종류 : UV 멸균 및 필터를 이용하여 여과된 정제수 (첨부자료5)
- (6) 급수방법 : Polycarbonate 음수병(250mL)에 정제수를 넣어 자유 섭취시켰다.

## 5. 투여방법

- (1) 투여경로 : 경구투여
- (2) 선택이유 : 사람에게 대한 노출경로중의 하나로서 경구투여를 선택하였다.
- (3) 투여횟수 및 투여기간 : 1회 투여/투여당일
- (4) 투여부위 및 투여법 : 투여 전 하룻밤을 절식한 랫드에 경구투여용 주사침 (존데)을 장착한 주사기를 이용하여 강제 경구투여하고, 투여 후 3~4시간 후에 다시 사료를 급여하였다.
- (5) 투여액량 : 투여 당일에 측정된 체중을 기준으로 하여 체중 kg당 10ml로 계산하여 투여하였다.

## 6. 시험군의 구성

- (1) 투여량 설정 : 본 시험물질은 천연추출물로 물질에 대한 독성이 없는 것으로 판단되어, OECD Guideline for Testing of Chemicals; Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Procedure(Guideline 420, 2001년 12월 17일)에서 추천하는 한계용량인 5000mg/kg 을 고농도 투여량으로 설정하고 일정공비(3)를 두어 1666mg/kg의 중간농도 투여군 및 555mg/kg의 저농도 투여군을 설정하였다. 부형제에 대한 영향을 알아보기 위하여 부형제대조군(G1)을 설정하였다.
- (2) 시험군의 구성

군	성별	동물수 (마리)	동물번호	투여액량 (ml/kg)	투여량 (mg/kg)
G1 (부형제대조군)	male	5	1~5	10	0
	female	5	21~25		
G2	male	5	6~10	10	555
	female	5	26~30		
G3	male	5	11~15	10	1666
	female	5	31~35		
G4	male	5	16~20	10	5000
	female	5	36~40		

## 7. 시험방법 및 시험항목

- (1) 일반증상 및 사망동물관찰 : 모든 동물에 대하여 사망 또는 부검일(14day)까지 매일 1회 이상 일반증상 및 사망동물 유무를 관찰하였다. 투여당일에는 투여 후 약 0.5, 1, 2, 3, 4시간에 관찰하였다.

독성증상이 나타나기 시작한 시간과 소멸되기 시작한 시간은 매우 중요하므로 모든 관찰은 체계적으로 기록되었으며, 개체별로 기록하였다.

관찰은 피부 및 털, 눈 및 점막, 호흡계, 순환계, 자율 및 중추신경계, 행동 유형을 포함하였다. 특히 경련, 설사, 유연, 혼수상태 등의 증상은 유의하여 관찰하였다.

(2) 체중측정 : 모든 동물에 대하여 시험물질 투여 직전(0day), 투여 후 1, 3 및 7일에 측정하였다.

(3) 부검 : 시험물질 투여 후 14일째에 모든 생존동물을 CO<sub>2</sub> 가스 마취 하에서 개복한 후에 복대동맥과 복대정맥을 절단하여 방혈 치사시킨 후, 육안으로 모든 장기를 검사할 예정이다.

## 8. 통계학적 분석

시험기간 중의 일반증상 및 체중변화의 결과는 (주) 메드빌의 표준작업수순서에 따라 정리하였다. 체중변화의 결과는 널리 사용되고 있는 통계 패키지인 SPSS를 사용하여 모수적인 다중비교(parametric multiple comparison procedures)를 실시하였다.

• 분석방법: 모수적인 다중비교는 우선 일원배치분산분석(ANOVA)을 통하여 군간 유의성을 관찰한 후, 유의성이 인정되면 *Levene test*를 실시한 다음, 등분산성이 인정되면 *Duncan's multiple range test*를 실시하고, 등분산성이 인정되지 않으면 *Dunnett's T-test*를 실시하였다.

## III. 결과

### 1. 사망동물 및 일반증상

투여 및 관찰기간 사망동물은 관찰되지 않았다.

### 2. 체중변화

투여 및 관찰기간 2주간의 체중변화를 관찰한 결과, 통계적으로 유의한 변화는 나타나지 않았다.

### 3. 부검소견

모든 시험군에서 특이소견이 관찰되지 않았다.

## IV. 고찰

시험물질 MDC308의 단회 경구투여에 의한 독성을 조사하기 위하여 Sprague-Dawley(SD) 계통 랫드에 시험물질을 경구투여하였다. 각 군당 10마리 (암수 각 5마리)에 0, 555, 1666 및 5000mg/kg 용량으로 단회 경구투여를 실시하였고, 7일간의 사망률과 일반증상, 체중변화를 관찰하였다.

시험의 결과, 0, 555, 1666 및 5000mg/kg 의 모든 투여군에서 시험물질의 투여에 의한 사망동물은 발생하지 않았다.

일반증상에 있어 시험물질의 투여와 연관된 특이적 소견이 관찰되지 않았다.

체중변화에 있어서 모든 시험군에서 통계적으로 유의성 있는 변화가 관찰되지 않았다.

부검소견에서 모든 시험군에서 특이적 소견이 관찰되지 않았다.

따라서, 본 시험조건 하에서 시험물질 MDC 308은 암수 랫드에 있어 5000mg/kg 용량에서 독성학적 영향이 없는 것으로 판단되며, 암컷 랫드에 대한 LD<sub>50</sub> 값은 사망동물이 발생하지 않아 산출되지 않았으며, 최소치사량(MLD: Minimum Lethal Dose)은 암수 랫드에서 5000mg/kg 이상인 것으로 판단하였다.

## V. 참고문헌

- (1) 식품의약품안전청 (2009) : 식품의약품안전청고시 제2009-116호(2009년 8월 24일) '의약품등독성시험기준'
- (2) 식품의약품안전청 (2009) : 식품의약품안전청고시 제2009-183호(2009년 12월 22일) '비임상시험관리기준'
- (3) OECD(1997) : Principles of Good Laboratory Practice
- (4) OECD(2001) : OECD Guideline for Testing of Chemicals; Acute Oral Toxicity Study in Rodents(Guideline 420)

## VI. 결과자료

Table 1. Mortality in male and female rats

MORTALITY										
STUDY: A01-10001						SEX : MALE				
GROUP	DOSE (mg/kg)	No. DEAD/ No. DOSED	DAYS AFTER DOSE							
			0	1	2	3	4	5	6	7
G1	0	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0
G2	555	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0
G3	1666	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0
G4	5000	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0

MORTALITY										
STUDY: A01-10001						SEX : FEMALE				
GROUP	DOSE (mg/kg)	No. DEAD/ No. DOSED	DAYS AFTER DOSE							
			0	1	2	3	4	5	6	7
G1	0	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0
G2	555	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0
G3	1666	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0
G4	5000	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0



Table 2. Incidence of clinical signs in male and female rats

INCIDENCE OF CLINICAL SIGNS					
STUDY: A01-10001			SEX : MALE		
DAYS	SIGNS OBSERVED	DOSE LEVEL (mg/kg)			
		0	555	1666	5000
0	Normal	5/5 <sup>a)</sup>	5/5	5/5	5/5
1	Normal	5/5	5/5	5/5	5/5
2	Normal	5/5	5/5	5/5	5/5
3	Normal	5/5	5/5	5/5	5/5
4	Normal	5/5	5/5	5/5	5/5
5	Normal	5/5	5/5	5/5	5/5
6	Normal	5/5	5/5	5/5	5/5
7	Normal	5/5	5/5	5/5	5/5

a) number of animals with the sign/number of animals examined

INCIDENCE OF CLINICAL SIGNS					
STUDY: A01-10001			SEX : MALE		
DAYS	SIGNS OBSERVED	DOSE LEVEL (mg/kg)			
		0	555	1666	5000
0	Normal	5/5 <sup>a)</sup>	5/5	5/5	5/5
1	Normal	5/5	5/5	5/5	5/5
2	Normal	5/5	5/5	5/5	5/5
3	Normal	5/5	5/5	5/5	5/5
4	Normal	5/5	5/5	5/5	5/5
5	Normal	5/5	5/5	5/5	5/5
6	Normal	5/5	5/5	5/5	5/5
7	Normal	5/5	5/5	5/5	5/5

a) number of animals with the sign/number of animals examined

Table 3-1. Body weights of male rats

BODY WEIGHTS(g)							
STUDY: A01-10001							SEX: MALE
DOSE (mg/kg)	ANIMAL ID	Day 0	Day 1	Day 3	Day 7	Day 14	Gains
0	1	298.8	325.7	339.6	382.4	395.8	83.6
	2	289.8	318.3	333.5	365.2	370.7	75.4
	3	285.2	304.8	319.8	346.9	353.1	61.7
	4	272.4	288.9	304.7	337.4	346.6	65.0
	5	275.5	305.4	317.7	340.4	341.2	64.9
	MEAN	284.3	308.6	323.1	354.5	361.5	70.1
	S.D.	10.73	14.14	13.78	18.99	22.17	9.14
N	5	5	5	5	5	5	

BODY WEIGHTS(g)							
STUDY: A01-10001							SEX: MALE
DOSE (mg/kg)	ANIMAL ID	Day 0	Day 1	Day 3	Day 7	Day 14	Gains
555	6	288.3	319.2	339.7	369.0	385.5	80.7
	7	287.4	306.4	327.5	355.2	367.7	67.8
	8	280.2	302.7	319.8	353.1	365.2	72.9
	9	274.8	298.7	314.4	336.9	346.8	62.1
	10	284.2	307.8	329.1	351.7	364.3	67.5
	MEAN	283.0	307.0	326.1	353.2	365.9	70.2
	S.D.	5.57	7.70	9.65	11.42	13.74	7.00
N	5	5	5	5	5	5	

BODY WEIGHTS(g)							
STUDY: A01-10001							SEX: MALE
DOSE (mg/kg)	ANIMAL ID	Day 0	Day 1	Day 3	Day 7	Day 14	Gains
1666	11	286.6	316.5	334.6	367.0	375.9	80.4
	12	284.4	315.8	324.2	361.8	368.1	77.4
	13	285.2	303.2	322.9	340.2	355.4	55.0
	14	275.2	296.8	313.5	340.0	349.4	64.8
	15	279.8	306.0	329.6	359.3	370.8	79.5
	MEAN	284.4	307.7	325.0	353.7	363.9	71.4
	S.D.	4.69	8.44	7.92	12.69	11.09	11.13
N	5	5	5	5	5	5	

<TABLE CONTINUED>

Table 3-1. Body weights of male rats

BODY WEIGHTS(g)							
STUDY: A01-10001							SEX: MALE
DOSE (mg/kg)	ANIMAL ID	Day 0	Day 1	Day 3	Day 7	Day 14	Gains
5000	16	283.6	309.5	328.6	362.7	375.2	79.1
	17	285.1	317.4	326.8	355.0	369.0	69.9
	18	289.1	297.8	319.7	347.2	361.4	58.1
	19	281.5	303.5	315.3	345.2	354.6	63.7
	20	284.5	313.5	321.2	353.9	365.5	69.4
	MEAN	284.8	308.3	322.3	352.8	365.1	68.0
	S.D.	2.78	7.82	5.41	6.95	7.77	7.83
N	5	5	5	5	5	5	

<END OF TABLE>

Table 3-2. Body weights of female rats

BODY WEIGHTS(g)							
STUDY: A01-10001							SEX: FEMALE
DOSE (mg/kg)	ANIMAL ID	Day 0	Day 1	Day 3	Day 7	Day 14	Gains
0	21	212.5	232.4	240.8	256.3	244.5	43.8
	22	204.5	216.2	228.9	244.9	239.1	40.4
	23	206.6	234.1	234.8	242.8	246.1	36.2
	24	209.4	221.4	227.9	233.1	223.9	23.7
	25	207.3	212.3	224.7	236.0	222.2	28.7
	MEAN	208.1	223.3	231.4	242.6	235.2	34.6
	S.D.	3.04	9.68	6.39	9.04	11.37	8.28
N	5	5	5	5	5	5	

BODY WEIGHTS(g)							
STUDY: A01-10001							SEX: FEMALE
DOSE (mg/kg)	ANIMAL ID	Day 0	Day 1	Day 3	Day 7	Day 14	Gains
555	26	207.0	228.5	241.5	248.3	242.8	41.3
	27	203.9	215.2	233.6	243.2	235.7	39.3
	28	204.8	224.0	226.3	240.8	237.5	36.0
	29	212.0	220.5	230.3	246.8	241.8	34.8
	30	208.1	211.3	224.2	242.4	233.1	34.3
	MEAN	207.2	219.9	231.2	244.3	238.2	37.1
	S.D.	3.18	6.84	6.81	3.14	4.09	3.03
N	5	5	5	5	5	5	

BODY WEIGHTS(g)							
STUDY: A01-10001							SEX: FEMALE
DOSE (mg/kg)	ANIMAL ID	Day 0	Day 1	Day 3	Day 7	Day 14	Gains
1666	31	209.5	235.3	241.3	262.4	245.3	52.9
	32	214.5	227.1	235.1	242.0	243.1	27.5
	33	206.3	228.3	240.1	246.8	248.8	40.5
	34	211.2	232.8	232.7	253.2	241.9	42.0
	35	212.9	226.5	228.7	237.2	246.0	24.3
	MEAN	210.9	230.0	235.6	248.3	245.0	37.4
	S.D.	3.17	3.86	5.22	9.85	2.68	11.63
N	5	5	5	5	5	5	

<TABLE CONTINUED>

Table 3-2. Body weights of female rats

BODY WEIGHTS(g)							
STUDY: A01-10001							SEX: FEMALE
DOSE (mg/kg)	ANIMAL ID	Day 0	Day 1	Day 3	Day 7	Day 14	Gains
5000	36	208.2	232.7	243.2	250.8	244.1	42.6
	37	205.3	241.7	246.4	259.7	261.0	54.4
	38	203.6	217.9	232.8	242.1	224.3	38.5
	39	209.5	218.9	218.9	225.7	224.6	16.2
	40	217.1	223.3	225.1	229.2	228.9	12.1
	MEAN	208.7	226.9	233.3	241.5	236.6	32.8
	S.D.	5.22	10.13	11.67	14.31	15.86	18.02
N	5	5	5	5	5	5	

<END OF TABLE>

**Table 4. Necropsy finding in male and female rats**

GROSS FINDINGS				
STUDY: A01-10001			SEX: MALE	
DOSE (mg/kg)	LOCATION	GROSS FINDINGS	FREQUENCY <sup>a)</sup>	
			DEAD	SURVIVORS
0		No gross findings	0/5	5/5
555		No gross findings	0/5	5/5
1666		No gross findings	0/5	5/5
5000		No gross findings	0/5	5/5

GROSS FINDINGS				
STUDY: A01-10001			SEX: FEMALE	
DOSE (mg/kg)	LOCATION	GROSS FINDINGS	FREQUENCY <sup>a)</sup>	
			DEAD	SURVIVORS
0		No gross findings	0/5	5/5
555		No gross findings	0/5	5/5
1666		No gross findings	0/5	5/5
5000		No gross findings	0/5	5/5

a) number of animals with the sign/number of animals examined

첨부자료 1. Certificate of analysis



(주)메드빌 Medvill Co. Ltd.

서울시 금천구 가산동 60-21, IT미래타워  
15층

TEL) 02-2027-5775, 5784

FAX) 02-2027-5776

e-mail) medvill@unitel.co.kr

http://www.medvill.com

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Analytical Tests	Specifications	Results
Name	MDC308	
Lot Numer		MBP3080909
Appearance		gray powder
Purity		100 % (plant extract)
Solubility		water soluble
Moisture	≤ 10 %	3.5 %
Dry Residue		52.2 %
Heavy Metals	≤ 10ppm	pass
Arsenic	≤ 2ppm	pass

Quality Control  
Acceptance Date

2010. 01. 20

Hong-Jun Nho  
Quality control

첨부자료 2. 시험계 미생물검사 성적서

<i>Rat VAF Report</i>		<b>CR Rodent Production</b>		
Location: Orient Co. KP800 SPF Rats		Sponsor: Orient Bio Inc - QC		
Colony: CD Colony # 28804		Reported: Tuesday, January 5, 2010 at 21:53		
Summary Item	Primary Assay	Most Recent		Past 18 Months
		Year-Week *	Positive / Tested	Positive / Tested
<b>Virology</b>				
<i>SEND</i>	MFIA	2009-50	0 / 8	0 / 48
<i>PYM</i>	MFIA	2009-50	0 / 8	0 / 48
<i>SDAV</i>	MFIA	2009-50	0 / 8	0 / 48
<i>KRV</i>	MFIA	2009-50	0 / 8	0 / 48
<i>HI</i>	MFIA	2009-50	0 / 8	0 / 48
<i>RPV</i>	MFIA	2009-50	0 / 8	0 / 48
<i>RMV</i>	MFIA	2009-50	0 / 8	0 / 48
<i>REO</i>	MFIA	2009-50	0 / 8	0 / 48
<i>RTV</i>	MFIA	2009-50	0 / 8	0 / 48
<i>LCMV</i>	MFIA	2009-50	0 / 8	0 / 48
<i>HANT</i>	MFIA	2009-50	0 / 8	0 / 48
<i>MAV</i>	MFIA	2009-50	0 / 8	0 / 48
<b>Microbiology</b>				
<i>B. bronchiseptica</i>	Culture	2009-50	0 / 8	0 / 48
<i>CAR Bacillus</i>	MFIA/PCR	2009-50	0 / 8	0 / 48
<i>C. kустcheri</i>	Culture	2009-50	0 / 8	0 / 48
<i>H. bilis</i>	PCR	2009-50	0 / 8	0 / 48
<i>H. hepaticus</i>	PCR	2009-50	0 / 8	0 / 48
<i>Helicobacter sp.</i>	PCR	2009-50	0 / 8	0 / 48
<i>K. oxytoca</i>	Culture	2009-50	0 / 8	0 / 48
<i>K. pneumoniae</i>	Culture	2009-50	0 / 8	0 / 48
<i>M. pulmonis</i>	MFIA/PCR	2009-50	0 / 8	0 / 48
<i>P. multocida</i>	Culture	2009-50	0 / 8	0 / 48
<i>P. pneumotropica</i>	Culture	2009-50	0 / 8	0 / 48
<i>P. aeruginosa</i>	Culture	2009-50	0 / 8	0 / 48
<i>Salmonella spp.</i>	Culture	2009-50	0 / 8	0 / 48
<i>S. moniliformis</i>	PCR	2009-12	0 / 8	0 / 8
<i>Strep. pneumoniae</i>	Culture	2009-50	0 / 8	0 / 48
<i>Tyzzler's Disease</i>	Exam	2009-50	0 / 8	0 / 48
<b>Pathology</b>				
<i>Gross Exam</i>	Exam, Histopathology	2009-50	0 / 8	0 / 76
<b>Parasitology</b>				
<i>Ectoparasites</i>	Exam	2009-50	0 / 8	0 / 48
<i>Helminths</i>	Exam	2009-50	0 / 8	0 / 48
<i>Giardia sp.</i>	Exam	2009-50	0 / 8	0 / 36
<i>Spiroplasma sp.</i>	Exam	2009-50	0 / 8	0 / 36
<i>Other Protozoa</i>	Exam	2009-50	0 / 8	0 / 36
<i>E. cuniculi</i>	MFIA	2009-50	0 / 8	0 / 48



첨부자료 3. 사료 방사선 조사 증명서



Certificate of Processing  
 STERIGENICS 305 Enterprise Dr. Westerville OH 43081 United States  
 TEL 614 888-4077 FAX 614 888-4223 www.sterigenics.com

R55480102  
 RIS0001

11/05/09 13:40:47 GMT  
 Page - 1 of 1

Customer Name: Purina Mills, LLC  
 P.O.# Trailer # 4816

Processing Facility: Westerville

Work Order # 313116  
 Sales Order # 275574

10-40 kGy

PRM, Gamma Treatment

Received Date/Time: 10/29/09 16:41:00 GMT

SO Line #	Qty	UOM	Customer Item Number / Customer Item Description	Customer Lot Number / Customer Load Number
104.00	434	BC	5053C3N Picolab Rodent 20-Irradiated	OCT26082 NA
103.00	685	BC	5058C3N Picolab Mouse 20-Irradiated	OCT25091 NA
101.00	123	BC	5K75C3N AP Cert PCOLB RDNT 20 - IRR	OCT26082A NA
102.00	204	BC	5ZA3C3N NIH 31 Modified & Irradiated	OCT23083 NA
	1446	BC	Total	

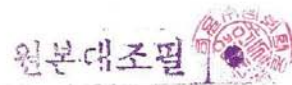
Quality Test Summary

Op#	Quality Test Description	Minimum Spec	Maximum Spec	Result	Pass/Fail	User	Date / Time
450.00	Minimum Dose	10.0 kGy	40.0 kGy	12.7 kGy	Pass	BBYUS Robert Byus	11/05/09 06:34:10 GMT
							Reason Code Test
450.00	Maximum Dose	10.0 kGy	40.0 kGy	27.3 kGy	Pass	BBYUS Robert Byus	11/05/09 06:34:31 GMT
							Reason Code Test

Sterigenics certifies that the materials listed above (as described by the Manufacturer) received the indicated doses within the precision and accuracy of the dosimetry system employed.

Electronically Signed By: LINDA PITTSBARGER  
 Work Order Completions

Date: 11/05/09 13:40:17 GMT



ISO 9001:2000 REGISTERED

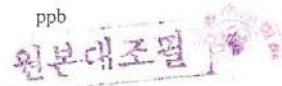
첨부자료 4. 사료 성분 분석 성적서



PRODUCT: 5053 - PICOLAB RODENT 20  
 LOT CODE OCT 26 09 2

Sample No. L42502492

<u>Assay/Analyte</u>		<u>Result</u>	<u>Units</u>
<b>Organophosphate pesticides</b>	<b>ORGP</b>		
Diazinon		<0.0200	ppm
Disulfoton		<0.0200	ppm
Ethion		<0.0200	ppm
Malathion		<0.0200	ppm
Methyl Parathion		<0.0200	ppm
Parathion		<0.0200	ppm
Thimet		<0.0200	ppm
Thiodan		<0.0200	ppm
Trithion		<0.0200	ppm
<b>Organochlorine pest.&amp;PCB's</b>	<b>RSPB</b>		
Heptachlor Epoxide		<0.0200	ppm
Heptachlor		<0.0200	ppm
DDE		<0.0200	ppm
Lindane		<0.0200	ppm
Endrin		<0.0200	ppm
Mirex		<0.0200	ppm
Alpha-BHC		<0.0200	ppm
Delta-BHC		<0.0200	ppm
Aldrin		<0.0200	ppm
Dieldrin		<0.0200	ppm
DDT		<0.0200	ppm
Chlordane		<0.0200	ppm
Methoxychlor		<0.0200	ppm
Beta-BHC		<0.0200	ppm
HCB		<0.0200	ppm
PCB		<0.150	ppm
<b>Aflatoxin screen</b>	<b>AFTC</b>		
Aflatoxins		<5.00	ppb



For additional information, please contact:

- (1) For assay methodology - Customer Services, 314-982-1310
- (2) For Nutritional Interpretation - Dr. Dorrance Haught, 314-317-5178
- (3) All other questions - Richmond, IN Manufacturing Plant, 765-962-9561.

The term "Less Than" is used to signify the lower limit of quantitation of the procedure under the conditions employed. The use of the term "Less Than" does not imply that traces of Analyte were present. Samples submitted to NP Analytical Laboratories for routine analysis will be retained for a minimum of thirty (30) days after the report of analysis is issued. Extended storage requirements must be brought to the attention of NP Analytical Laboratories prior to or at the time of sample submission.

505 North Fourth Street ♦ Richmond, Indiana 47374  
 Phone: 765-962-9561 ♦ Fax: 765-962-8169

첨부자료 4. 사료 성분 분석 성적서



Sample No.: L42502492

Site: RHI

Locator: 5053

Project: PROFILE

PRODUCT: 5053 - PICOLAB RODENT 20

LOT CODE: OCT 26 09 2

Assay/Analyte		Result	Units
<b>Protein, Kjeldahl (N x 6.25)</b>	<b>PRKR</b>		
Protein		19.87	%
<b>Fat</b>	<b>FTEE/FTAH</b>		
Fat		5.42	%
<b>Fiber, Crude</b>	<b>FIBR</b>		
Fiber, Crude		4.62	%
<b>Arsenic</b>	<b>ASF</b>		
Arsenic		<0.200	ppm
<b>Cadmium</b>	<b>CDF</b>		
Cadmium		0.071	ppm
<b>Calcium</b>	<b>CAF</b>		
Calcium		0.72	%
<b>Phosphorus</b>	<b>PF</b>		
Phosphorus		0.60	%
<b>Lead</b>	<b>PB</b>		
Lead		0.251	ppm
<b>Mercury</b>	<b>HGSP</b>		
Mercury		<0.025	ppm
<b>Selenium</b>	<b>SE</b>		
Selenium		0.20	ppm

For additional information, please contact:

- (1) For assay methodology - Customer Services, 314-982-1310
- (2) For Nutritional Interpretation - Dr. Dorrance Haught, 314-317-5178
- (3) All other questions - Richmond, IN Manufacturing Plant, 765-962-9561.



The term "Less Than" is used to signify the lower limit of quantitation of the procedure under the conditions employed. The use of the term "Less Than" does not imply that traces of Analyte were present. Samples submitted to NP Analytical Laboratories for routine analysis will be retained for a minimum of thirty (30) days after the report of analysis is issued. Extended storage requirements must be brought to the attention of NP Analytical Laboratories prior to or at the time of sample submission.

505 North Fourth Street ♦ Richmond, Indiana 47374

Phone: 765-962-9561 ♦ Fax: 765-962-8169

첨부자료 5. 음수 수질검사 시험성적서

시험 성적서

김치번호 : 1W09-03964-001

담당부서	음용수수급
기술책임자	이만호
담당자	권혜리
연락처	570-3215 경기도 과천시 용머리2길 16 (주ilm동1)



본도 : (22 - 24) ℃, 습도 : (45 - 63) % R.H.

1. 의뢰인	대중기기 / 서울 도봉구 쌍문1동 509-1백은빌딩2층
2. 업체명 및 소재지 (저취장소)	(주)테드빌 / 용문실
3. 시료명	먹는물
4. 시험항목 및 방법	일반세균 (CFU/ml)등 46항목, 먹는물수질공중시험방법(2009년)
5. 시험목적	참고용
6. 접수 일자	2009년 9월 11일
7. 시료받은 일자	2009년 9월 25일

시험 결과					
항목	기준	성적	항목	기준	성적
일반세균 (CFU/ml)	100 이하	3	총대장균군 (100ml)	불검출	3검출
유실생대장균군 (100ml)	불검출	불검출	납 (mg/L)	0.05 이하	불검출
칼슘 (mg/L)	1.5 이하	불검출	카드뮴 (mg/L)	0.05 이하	불검출
총칼슘 (mg/L)	0.01 이하	불검출	수은 (mg/L)	0.001 이하	불검출
시안 (mg/L)	0.01 이하	불검출	6가크롬 (mg/L)	0.05 이하	불검출
암모니아질소 (mg/L)	0.5 이하	0.02	중수소 (mg/L)	10 이하	1.2
리튬 (mg/L)	0.005 이하	불검출	보론 (mg/L)	1 이하	불검출
태양 (mg/L)	0.005 이하	불검출	니켈 (mg/L)	0.02 이하	불검출
파라핀 (mg/L)	0.05 이하	불검출	제논 (mg/L)	0.04 이하	불검출
카바릴 (mg/L)	0.02 이하	불검출	1,1,1-트리클로로에탄 (mg/L)	0.1 이하	불검출
테트라클로로에틸렌 (mg/L)	0.01 이하	불검출	트리클로로에틸렌 (mg/L)	0.03 이하	불검출
디클로로에탄 (mg/L)	0.02 이하	불검출	벤젠 (mg/L)	0.01 이하	불검출
벤젠 (mg/L)	0.7 이하	불검출	이산화탄소 (mg/L)	0.3 이하	불검출
크실렌 (mg/L)	0.5 이하	불검출	1,1-디클로로에틸렌 (mg/L)	0.03 이하	불검출
치환벤젠 (mg/L)	0.002 이하	불검출	1,2-디클로로에탄-클로로포름산 (mg/L)	0.003 이하	불검출
경도 (mg/L)	300 이하	43.0	파라질산칼륨스비랑 (mg/L)	10 이하	2.97
염화물 (mg/L)	무위	무위	망간	무위	무위
중 (mg/L)	1 이하	불검출	석회 (도)	5 이하	불검출
세지 (mg/L)	0.5 이하	불검출	수소이온농도	5.8 ~ 8.5	7.4
이온 (mg/L)	3 이하	불검출	염산이온 (mg/L)	250 이하	10
중탄산염 (mg/L)	500 이하	79.0	철 (mg/L)	0.3 이하	불검출
망간 (mg/L)	0.5 이하	불검출	탁도 (NTU)	1 이하	0.510
염산이온 (mg/L)	200 이하	3	알루미늄 (mg/L)	0.2 이하	0.037
최종결과	전항목기준이내				

\* 불검출은 정량한계 미만의  
이 성적서는 의뢰자가 제시한 시료에 한하여 검사, 시험목적 목적 외의 용도, 선전 등에 이용될 수 없습니다.  
오류하신 시료의 검사, 시험결과를 위와같이 통지합니다.

2009년 9월 23일



서울특별시보건환경연구원장

이 성적서는 국제시험기관협력체(International Laboratory Accreditation Cooperation) 상호인정협정(Mutual Recognition Arrangement)에 시험한 한국인정기구(KOLAS)로부터 공인받은 분야에 대한 시험결과입니다.

## 2. 함초추출물(MDC308)의 복귀돌연변이시험 보고서

### 염생식물(함초)의 박테리아 균주를 이용한 복귀돌연변이시험

(주)메드빌

153-801 서울특별시 금천구 가산동 60-21 IT미래TOWER 15층  
Tel) 02-2027-5775 · Fax) 02-2027-5776 · <http://www.medvill.co.kr>

목 차

목 차	-----	2
요 약	-----	3
1. 서론	-----	4
2. 재료 및 방법	-----	4
2.1 시험물질	-----	4
2.2 시험계	-----	4
2.3 양성대조물질	-----	5
2.4 S9 혼합물	-----	6
2.5 배지조성	-----	6
2.6 시험방법	-----	6
2.7 시험 적합성 판정	-----	7
2.8 결과 평가 방법	-----	8
3. 결과 및 고찰	-----	8
3.1 복귀돌연변이시험	-----	8
4. 결론	-----	9
5. 참고문헌	-----	9
6. Tables	-----	10
Table 1. Summary of revertant colony numbers obtained per plate with/without S9 mix		10
Table 2. Summary of revertant colony numbers obtained per plate with/without S9 mix (Confirmation test)		11
7. Figures	-----	12
Figure 1. Dose-response curve without S9 mix: Base replacement type mutation		12
Figure 2. Dose-response curve with S9 mix: Base replacement type mutation		12
Figure 3. Dose-response curve without S9 mix: Frame shift type mutation		13
Figure 4. Dose-response curve with S9 mix: Frame shift type mutation		13
8. Appendices	-----	14
Appendix 1. Revertant colony numbers obtained per plate with/without S9 mix		14
Appendix 2. Revertant colony numbers obtained per plate with/without S9 mix (Confirmation test)		15
Appendix 3. History profile of vehicle and positive control values		16
Appendix 4. S9 fraction quality control statement		17

## 요 약

**복귀돌연변이시험:** *Salmonella typhimurium* strains TA98, TA100, TA1535, TA1537 및 *Escherichia coli* strain WP2uvrA의 다섯 균주에 시험물질을 처리하였으며 S9 혼합물의 처리조건 및 비처리 조건에서 plate를 3개(triplicate)씩 사용하여 평판법으로 시험을 수행하였다.

그 결과, 시험물질은 S9 혼합물의 처리 조건에서 5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$ , S9 혼합물의 비처리 조건에서 5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$  농도로 처리하였을 때, S9 혼합물의 처리 조건과 비처리 조건에서 다섯 균주에 대하여 유전독성을 나타내는 복귀변이 콜로니수의 용량의존적인 증가가 관찰되지 않았다. 확인시험에서 시험물질을 동일한 농도로 처리하였을 때, S9 혼합물의 처리 조건과 비처리 조건에서 다섯 균주에 대하여 유전독성을 나타내는 복귀변이 콜로니수의 용량의존적인 증가가 관찰되지 않았다.

위의 시험에서, 멸균증류수를 처리한 음성대조군의 복귀변이 콜로니수는 정상범위내로 평가되었고, 양성대조물질 처리 균주에서는 S9 혼합물을 처리한 시험계와 처리하지 않은 시험계에서 모두 복귀돌연변이 콜로니수가 증가하여 뚜렷한 복귀돌연변이 양성반응을 나타냈다. 따라서, 본 시험의 민감도(sensitivity)와 S9 혼합물의 효과에 있어서 타당성이 입증되었다.

**결론:** 이상의 결과로부터 시험물질 염생식물(함초)는 본 시험조건에서 박테리아 균주의 복귀돌연변이를 유발시키지 않는 물질로 평가되었다.

## 1. 서 론

*Salmonella typhimurium* 변이주를 이용한 본 시험은 유전자 한 염기쌍의 대체(substitution), 첨가(addition), 제거(deletion)등에 의한 돌연변이를 검색하는 방법으로, 변이의 표적인 히스티딘(histidine) 유전자 G-C (guanidine-cytosine) 염기쌍의 변화가 야기되면서 히스티딘 요구성 변이(His- → His+)로 나타나기 때문에 히스티딘이 적은 배지에서도 콜로니를 형성하게 된다. *Escherichia coli* (WP2uvrA)는 트립토판(tryptophan)을 필요로 하며 염기쌍의 대체(substitution)가 야기되면 트립토판 비의존성 균주가 되어 콜로니를 형성하므로 *Salmonella typhimurium*과 함께 유전독성 검색에 사용한다.

시험물질의 성질에 따라서는 대사물질이 유전독성을 나타내기도 하여 대사를 촉진하는 약물로 전처리를 한 랫드의 간으로부터 조제한 마이크로솜 효소 분획(S9)을 첨가한 시험계(대사활성화)와 첨가하지 않은 시험계(비대사활성화)에서 시험을 수행하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 시험물질

#### 1) 시험물질

- (1) 명칭 : 염생식물(함초)
- (2) 외관 및  
성상 : yellow powder
- (3) 보관조건 : 냉장

#### 2) 용매

- (1) 용매명 : 멸균증류수
- (2) Lot. No : 778298
- (3) 제조처 : Gibco
- (4) 보관조건 : 상온

#### (3) 시험물질의 조제 및 분석

- 조제 : 실험 실시 당일 필요한 시료의 양을 정확히 칭량하여 잘 용해하여 사용하였다.
- 분석 : 별도로 시행하지 않았다.

### 2.2 시험계

#### 1) 사용균주

*Salmonella typhimurium* LT2 주 유래의 histidine 요구성 변이주인 TA98, TA100, TA1535, TA1537 균주와 *Escherichia coli* 유래의 tryptophan 요구성 변이주인 WP2uvrA 균주를 사용하였다.

#### 2) 선택이유



상기 균주는 복귀돌연변이 시험에 광범위하게 사용되고 있어 기초자료가 풍부하고 시험물질의 변이원성을 단기간에 예측하기 적절하여 선택하였다.

3) 공급원

MOLTOX™ 사의 균주를 본 연구실에서 형질을 확인한 후 계대 배양하여 사용하였다.

4) 균주의 보존

진탕배양 균현탁액 0.8 ml에 DMSO(dimethyl sulfoxide)를 0.07 ml의 비율로 혼합하여 -70 °C deep freezer와 액체질소 내에 보관하였다.

5) 균주의 형질 검사

Maron and Ames (1983)에 의해 제시된 방법에 따라 ① Histidine 또는 tryptophan 요구성 ② Crystal violet 감수성 ③ UV 감수성 ④ Ampicillin 또는 tetracycline 내성 ⑤ 자발복귀변이 빈도 등의 유전적인 특성을 확인하였다.

6) 균주배양조건

동결보존중인 균주액으로부터 미량의 균액을 백금이로 떠서 한천 영양 배지에 선긋기 배양하여 master plate를 만든다. Master plate로부터 콜로니를 1.6% nutrient broth 배지액(pH 7.0 ~ 7.5) 10 ml에 접종한 다음 37 °C에 12~14 시간동안 200 rpm의 속도로 선회 배양하였다. 배양시간과 선회속도는  $1\sim2 \times 10^9$ /ml의 균농도가 얻어지는 조건을 설정하고 배양한 균액은 시험 직전까지 냉장보존 하였다.

2.3 양성대조물질

- 1) 양성대조물질 : Maron and Ames (1983)의 방법에 따라 SA는 멸균증류수에 2-AA, 9-AA, 2-NF, AF-2는 dimethyl sulfoxide에 용해하여 조제하였다.

	양성대조물질 I	양성대조물질 II	양성대조물질 III
명 칭	Sodium Azide	2-Nitrofluorene	9-Aminoacridine
약 칭	SA	2-NF	9-AA
CAS No.	26628-22-8	607-57-8	52417-22-8
제조원	Sigma	Aldrich	Sigma
제품번호	S-2002	N16754	A38401
Lot No.	039K0152	S43858	07620TD
입수일	2010년 11월	2010년 11월	2010년 11월
유효기간	2015년 11월	2015년 11월	2015년 11월
보관조건	상온	상온	상온

	양성대조물질 IV	양성대조물질 V
명 칭	2-Aminoanthracene	2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) ) acrylamide
약 칭	2-AA	AF-2
CAS No.	613-13-8	3688-53-7
제조원	Aldrich	Wako
제품번호	A38800	066-01681
Lot No.	STBB1901	SDJ4376
입수일	2010년 11월	2008년 3월
유효기간	2015년 11월	2013년 3월
보관조건	상온	상온

## 2) 양성대조물질 처리 농도 및 균주

	Strain	양성대조물질	처리농도( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )
Without(-) S9 mixture	TA98	2-NF	1.0
	TA100	SA	1.0
	TA1535	SA	1.0
	TA1537	9-AA	80.0
	WP2uvrA	AF-2	0.01
With(+) S9 mixture	TA98	2-AA	0.5
	TA100	2-AA	1.0
	TA1535	2-AA	2.0
	TA1537	2-AA	2.0
	WP2uvrA	2-AA	20.0

## 2.4 S9 혼합물

대사효소로서 S9분획은 Aroclor 1254를 이용해서 유도된 Sprague-Dawley 랫드 간의 균질액 으로부터 유래된 MOLTOX™ postmitochondrial supernatant (Lot No. 2758 Molecular Toxicology, Inc., Appendix 4)를 수입하여 사용하였다. S9 혼합물은 다음과 같이 조제하되 0.5 ml/plate로 처리하였다.

혼합액 조성	용량(ml)
Rat liver S9 균질	2.5
0.4 M MgCl <sub>2</sub> -1.65 M KCl	1.0
1 M Glucose-6-phosphate	0.25
0.1 M NADP	2.0
0.2 M Sodium phosphate buffer, pH 7.4	25.0
Sterile distilled H <sub>2</sub> O	19.25
Total volume	50.0

## 2.5 배지조성

### 1) 하층기저배지(Vogel-Bonner Minimal glucose agar)

변이원성 검색의 배지로서 Vogel-Bonner medium E에 1.5% Bacto-agar와 2% glucose를 함유한 멸균배지를 사용하였다. Plate당 용량은 30 ml이며 plate는 멸균제품을 사용하였다.

### 2) 상층연한천배지(Top agar)

상층연한천배지는 증류수 100 ml 당 NaCl 0.5 g, Bacter-agar 0.6 g을 넣어 고압증기로 멸균하였고 사용 시에는 45 °C에서 0.5 mM histidine-0.5 mM biotin 용액 또는 0.5 mM tryptophan 용액을 10 ml 첨가하여 사용하였다.

## 2.6 시험방법

- 1) -70 °C deep freezer에 동결 보존 균주로부터 master plate를 만들었다.
- 2) Master plate로부터 단일 colony를 10 ml의 1.6% nutrient broth 액에 접종 하여 37 °C에서 200 rpm으로 약 12~14 시간 배양하였다.
- 3) 시험물질 용액 0.1 ml, 균배양액 0.1 ml, S9 혼합물 0.5 ml 또는 SPB 0.5 ml 을 혼합한 후 약 45 °C 정도로 식힌 멸균 된 top agar를 2 ml 씩 분주해 vortex mixer로 2~3초간 다시 혼합 한 후 minimal glucose agar plate에 고르게 부어 굳혔다.
- 4) Top agar가 응고한 다음 plate를 뒤집어 37 °C 배양기에서 48시간 배양 한 후 콜로니를 계수하였다.
- 5) 시험물질 최고농도 용액 0.1 ml 및 S9 혼합물 0.5 ml을 각각 2 ml의 top agar에 혼합해 배양하면서 시료 및 S9의 오염 여부를 검사하였다.
- 6) 각 농도군당 최소 3개의 plate를 사용하였다.
- 7) Plate는 무작위로 선택하여 편중 성향을 낮추었다.
- 8) Plate 뚜껑에 시험번호, 균주명, 농도, S9 혼합물 처리여부 등의 내용을 표시하였다.

## ① 2.7 시험 적합성 판정

복귀돌연변이시험은 다음의 판정기준을 만족시킬 경우 그 결과가 적합하다고 판정하였다.

- 1) 용매처리 음성대조군에서의 각 균주에 대한 복귀돌연변이 콜로니수가 다음의 범위 내

에 있어야 한다.

	Without S9 mixture	With S9 mixture
TA98	15 - 60	20 - 80
TA100	50 - 180	60 - 200
TA1535	10 - 40	10 - 40
TA1537	5 - 20	5 - 60
WP2 <i>uvrA</i>	10 - 60	20 - 120

2) 각 균주에 양성대조물질을 처리하였을 경우 복귀돌연변이 콜로니수가 다음의 범위 내에 있어야 한다.

	Strain	양성대조물질	처리농도( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	판정콜로니수
Without S9 mixture	TA98	2-NF	1.0	150-700
	TA100	SA	1.0	300-1000
	TA1535	SA	1.0	100-1000
	TA1537	9-AA	80.0	80-700
	WP2 <i>uvrA</i>	AF-2	0.01	100-200
With S9 mixture	TA98	2-AA	0.5	150-1000
	TA100	2-AA	1.0	300-2000
	TA1535	2-AA	2.0	100-500
	TA1537	2-AA	2.0	100-500
	WP2 <i>uvrA</i>	2-AA	20.0	250-1500

②

### ③ 2.8 결과 평가 방법

결과는 각 농도군 당 3개의 플레이트에서 계수된 콜로니 수의 평균과 표준편차로 표시하며, 시험물질의 복귀돌연변이 반응의 판정은 다음의 몇 가지 기준에 준하여 복귀돌연변이 유발 물질 또는 복귀돌연변이유발능 양성으로 판정할 수 있다.

- 1) S9 혼합물을 첨가한 또는 첨가하지 않은 조건에서 적어도 한 균주에서 복귀돌연변이 콜로니의 용량의존성 증가가 있을 경우.
- 2) S9 혼합물을 첨가한 또는 첨가하지 않은 조건에서 적어도 한 용량 이상의 용량에서 반복적인 증가가 관찰되거나, 유의한 선형관계가 있는 경우. (그러나, 통계적인 결과가 결정적인 요소가 될 수 없고 결과에 대한 생물학적 타당성이 고려되어야 한다. 따라서 아래의 평가기준을 사용할 수도 있다.)
- 3) 복귀돌연변이 콜로니수가 TA98, TA100, WP2*uvrA* 균주에서 음성대조군의 2배 이상이고 TA1535와 TA1537 균주에서는 3배 이상인 경우.

4) 용량반응관계가 인정되며 재현성이 인정될 경우.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1 복귀돌연변이시험

##### 1) 본시험

*Salmonella typhimurium* strains TA98, TA100, TA1535, TA1537 및 *Escherichia coli* strain WP2uvrA에 대하여 복귀돌연변이 시험 결과에 따른 평균 및 표준편차를 각각 table 1에 제시하였고, 개별 콜로니 수는 appendix 1에 제시하였다. 콜로니 수의 평균값을 사용하여 fig. 1~4의 그래프에 결과를 도식화하였다.

S9 혼합물을 첨가한 대사활성화 시험계에서 TA98, TA100, TA1535, TA1537 및 WP2uvrA 균주를 평판법으로 시험물질(156 ~ 5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$ )에 노출 시켰을 때, 복귀돌연변이를 나타내는 콜로니 수의 용량의존적인 증가는 관찰되지 않았다. S9 혼합물을 첨가하지 않은 조건에서도 시험물질(156 ~ 5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$ )의 모든 농도에서 5균주에 대하여 복귀돌연변이를 나타내는 콜로니 수의 용량의존적인 증가는 관찰되지 않았다.

음성대조물질에 대한 박테리아의 복귀변이 콜로니 수는 시험방법에 제시한 시험적합성 판정기준의 정상 범위내로 관찰되었으므로 본시험이 적절히 수행된 것으로 평가되었다.

양성대조물질에 대한 복귀변이 콜로니 수는 S9 혼합물의 처리 조건에서 음성대조군과 비교하여 급격히 증가하였으며, S9 혼합물을 비처리하였을 때도 현저히 콜로니 수가 증가한 것은 수행된 시험의 타당성과 S9 혼합물의 활성을 입증한 것으로 평가되었다.

##### 2) 확인시험

위의 실험 결과를 확인하기 위해 본시험과 동일한 시험물질 농도를 사용하여 확인시험을 수행하였다. 시험 결과에 따른 평균 및 표준편차를 각각 table 2에 제시하였고, 개별 콜로니 수는 appendix 2에 제시하였다.

S9 혼합물을 첨가 또는 첨가하지 않은 조건에서 TA98, TA100, TA1535, TA1537 및 WP2uvrA 균주를 평판법으로 시험물질(156 ~ 5000  $\mu\text{g}/\text{plate}$ )에 노출 시켰을 때, 복귀돌연변이를 나타내는 콜로니 수의 용량의존적인 증가는 관찰되지 않았다.

본 실험실의 음성대조물질과 양성대조물질의 통계적인 자료(history profile)를 appendix 3에 제시하였다.

### 4. 결론

따라서 시험물질 염생식물(함초)는 본 연구 조건에서 박테리아 균주의 복귀돌연변이를 유발시키지 않는 물질로 평가되었다.

## 5. 참고문헌

- 1) Ames, B.M., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975) : Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test, *Mutat. Res*, 31, 347-364.
- 2) Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983) : Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutat. Res*, 113, 173-275.
- 3) Kim, B. S., Margolin, B. H. (1999) : Statistical methods for the Ames Salmonella assay: a review, *Mutat. Res*, 436, 113-122.
- 4) Singer VL, Lawlor TE, Yue S. (1999) : Comparison of SYBR Green I nucleic acid gel stain mutagenicity and ethidium bromide mutagenicity in the Salmonella/mammalian microsome reverse mutation assay (Ames test), *Mutat. Res*, 439, 37-47.
- 5) 일본제약공업협회 의약품평가위원회 기초연구부회 편집 : 일본후생성의약품독성시험법 변이원성시험 Q&A p16

## 6. Tables

Table 1. Summary of revertant colony numbers obtained per plate with/without S9 mix

S9 mix (5%)	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertant colonies/plate						
		base replacement type			frame shift type			
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537		
-	NC	161 $\pm$ 6	33 $\pm$ 4	44 $\pm$ 1	45 $\pm$ 7	11 $\pm$ 1		
	156	148 $\pm$ 12	26 $\pm$ 6	46 $\pm$ 7	41 $\pm$ 6	10 $\pm$ 3		
	312	152 $\pm$ 15	29 $\pm$ 3	45 $\pm$ 5	40 $\pm$ 9	10 $\pm$ 2		
	625	156 $\pm$ 8	34 $\pm$ 4	48 $\pm$ 3	44 $\pm$ 6	11 $\pm$ 2		
	1250	171 $\pm$ 6	33 $\pm$ 3	43 $\pm$ 2	44 $\pm$ 7	11 $\pm$ 4		
	2500	156 $\pm$ 12	34 $\pm$ 6	45 $\pm$ 5	45 $\pm$ 13	9 $\pm$ 1		
	5000	167 $\pm$ 19	32 $\pm$ 2	45 $\pm$ 2	40 $\pm$ 11	12 $\pm$ 2		
	PC	491 $\pm$ 20	322 $\pm$ 28	155 $\pm$ 34	281 $\pm$ 19	635 $\pm$ 27		

S9 mix (5%)	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertant colonies/plate						
		base replacement type			frame shift type			
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537		
+	NC	166 $\pm$ 6	41 $\pm$ 3	42 $\pm$ 6	40 $\pm$ 1	15 $\pm$ 2		
	156	163 $\pm$ 4	42 $\pm$ 3	44 $\pm$ 3	34 $\pm$ 3	13 $\pm$ 2		
	312	156 $\pm$ 5	43 $\pm$ 11	42 $\pm$ 2	38 $\pm$ 2	12 $\pm$ 3		
	625	176 $\pm$ 10	43 $\pm$ 8	46 $\pm$ 2	37 $\pm$ 6	12 $\pm$ 2		
	1250	181 $\pm$ 2	45 $\pm$ 3	40 $\pm$ 6	35 $\pm$ 3	14 $\pm$ 1		
	2500	173 $\pm$ 7	43 $\pm$ 10	44 $\pm$ 6	35 $\pm$ 6	13 $\pm$ 4		
	5000	175 $\pm$ 9	40 $\pm$ 2	44 $\pm$ 7	41 $\pm$ 2	15 $\pm$ 2		
	PC	454 $\pm$ 34	126 $\pm$ 5	287 $\pm$ 3	327 $\pm$ 15	128 $\pm$ 11		

Data are presented as mean  $\pm$  SD (N=3)

NC : Negative Control (Distilled water, 100  $\mu\text{l}/\text{plate}$ )

PC : Positive Control (100  $\mu\text{l}/\text{plate}$ )

Table 2. Summary of revertant colony numbers obtained per plate with/ without S9 mix (Confirmation test)

S9 mix (5%)	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertant colonies/plate									
		base replacement type						frame shift type			
		TA100		TA1535		WP2uvrA		TA98		TA1537	
-	NC	144	$\pm 10$	14	$\pm 3$	48	$\pm 3$	26	$\pm 2$	7	$\pm 2$
	156	150	$\pm 16$	13	$\pm 2$	48	$\pm 7$	20	$\pm 2$	7	$\pm 1$
	312	161	$\pm 5$	14	$\pm 1$	44	$\pm 5$	24	$\pm 4$	7	$\pm 1$
	625	161	$\pm 4$	17	$\pm 2$	45	$\pm 6$	24	$\pm 6$	8	$\pm 2$
	1250	160	$\pm 2$	16	$\pm 4$	40	$\pm 1$	24	$\pm 5$	6	$\pm 2$
	2500	152	$\pm 11$	15	$\pm 4$	47	$\pm 7$	23	$\pm 5$	6	$\pm 1$
	5000	167	$\pm 6$	16	$\pm 2$	50	$\pm 4$	25	$\pm 4$	6	$\pm 1$
	PC	361	$\pm 32$	187	$\pm 8$	190	$\pm 8$	280	$\pm 31$	611	$\pm 19$

S9 mix (5%)	Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertant colonies/plate									
		base replacement type						frame shift type			
		TA100		TA1535		WP2uvrA		TA98		TA1537	
+	NC	178	$\pm 13$	16	$\pm 1$	53	$\pm 3$	30	$\pm 3$	9	$\pm 3$
	156	177	$\pm 6$	17	$\pm 5$	52	$\pm 0$	27	$\pm 2$	9	$\pm 2$
	312	165	$\pm 13$	19	$\pm 3$	52	$\pm 5$	30	$\pm 4$	11	$\pm 2$
	625	183	$\pm 9$	16	$\pm 1$	56	$\pm 6$	30	$\pm 5$	8	$\pm 3$
	1250	184	$\pm 7$	15	$\pm 3$	52	$\pm 9$	29	$\pm 3$	8	$\pm 2$
	2500	184	$\pm 8$	16	$\pm 6$	52	$\pm 10$	27	$\pm 2$	7	$\pm 3$
	5000	181	$\pm 10$	14	$\pm 3$	54	$\pm 5$	30	$\pm 5$	8	$\pm 3$
	PC	428	$\pm 56$	141	$\pm 7$	497	$\pm 43$	302	$\pm 11$	132	$\pm 11$

Data are presented as mean  $\pm$  SD (N=3)

NC : Negative Control (Distilled water, 100  $\mu\text{l}/\text{plate}$ )

PC : Positive Control (100  $\mu\text{l}/\text{plate}$ )



## 7. Figures

Figure 1. Dose-response curve without S9 mix : Base replacement type mutation

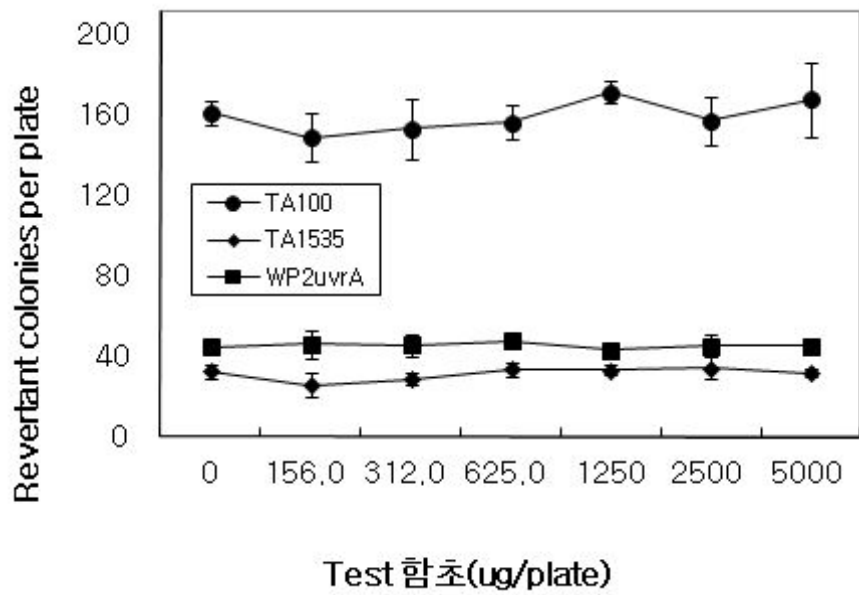


Figure 2. Dose-response curve with S9 mix : Base replacement type mutation

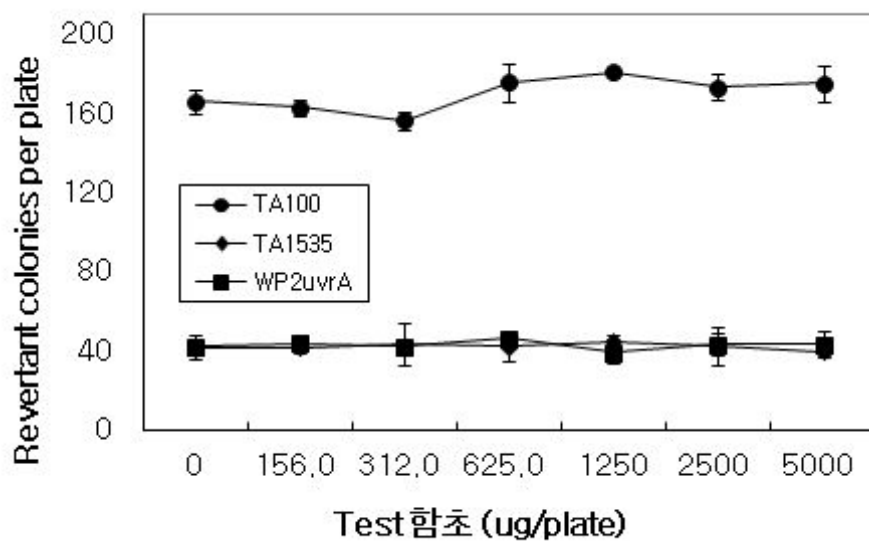


Figure 3. Dose-response curve without S9 mix : Frame shift type mutation

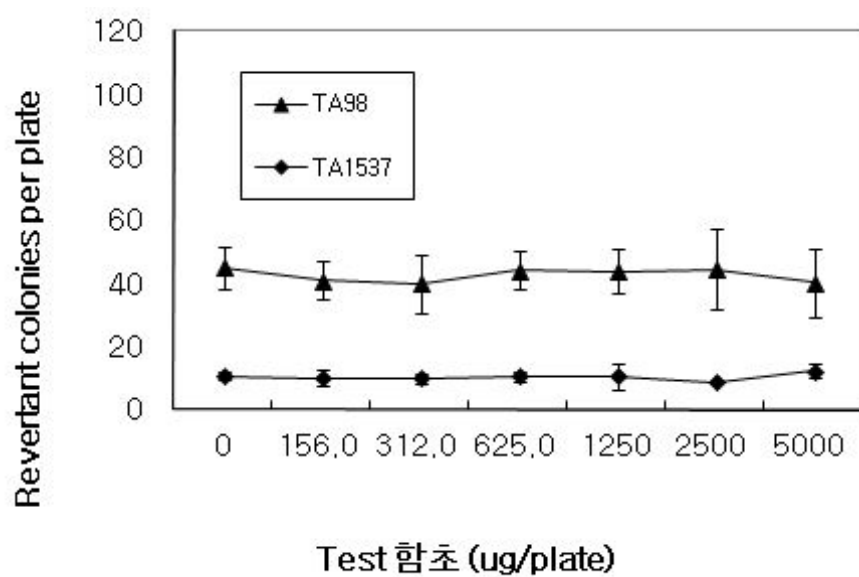
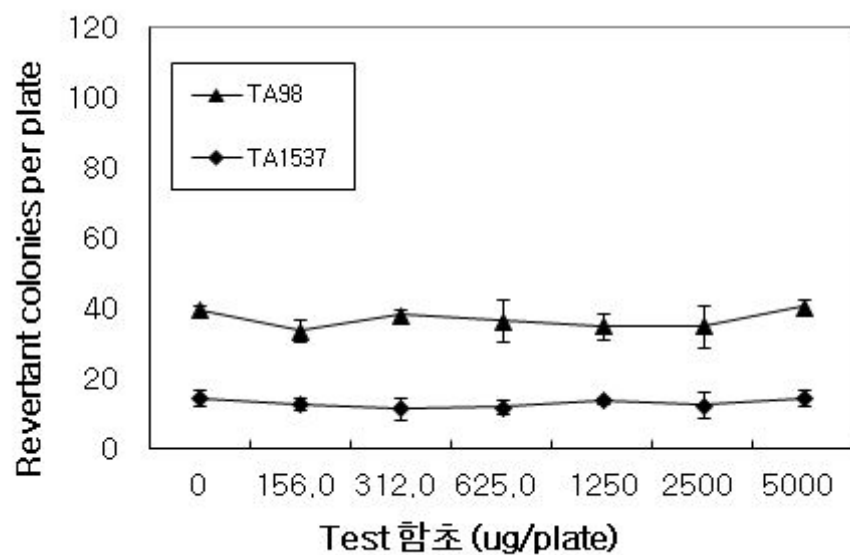


Figure 4. Dose-response curve with S9 mix : Frame shift type mutation



## 8. Appendices

### Appendix 1. Revertant colony numbers obtained per plate with/without S9 mix

Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertant colonies/plate without S9 mix														
	base replacement type						frame shift type								
	TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
NC	160	167	155	29	36	33	44	44	45	37	49	49	10	12	10
5000	146	181	174	31	34	30	47	44	44	38	31	52	15	11	11
2500	145	169	155	36	28	39	39	47	47	49	30	55	9	9	8
1250	177	166	169	30	35	35	41	45	43	36	47	49	7	10	15
625	160	146	161	34	30	37	50	45	48	50	38	45	12	11	9
312	142	169	146	27	32	27	50	40	46	32	38	50	9	12	9
156	161	145	138	21	32	34	54	41	43	35	47	41	8	13	9
PC	490	511	471	296	318	352	151	123	191	264	276	302	604	650	652

Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertant colonies/plate with S9 mix														
	base replacement type						frame shift type								
	TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
NC	166	160	172	38	44	42	45	35	47	39	41	39	13	14	17
5000	171	169	186	42	38	40	37	51	43	40	39	43	12	16	16
2500	181	168	171	45	51	32	48	46	37	35	29	41	16	13	9
1250	181	183	179	47	47	41	43	43	33	33	39	33	15	13	14
625	187	168	172	34	48	46	44	47	48	30	41	39	10	14	12
312	154	153	162	32	45	53	40	44	43	38	37	40	11	15	9
156	163	159	167	42	45	39	42	42	48	31	33	37	12	12	15
PC	493	434	436	130	126	121	290	288	284	310	331	340	118	125	140

NC : Negative Control (distilled water, 100  $\mu\text{l}/\text{plate}$ )

PC : Positive Control (100  $\mu\text{l}/\text{plate}$ )

Appendix 2. Revertant colony numbers obtained per plate with/without S9 mix  
(Confirmation test)

Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertant colonies/plate without S9 mix														
	base replacement type						frame shift type								
	TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
NC	136	155	141	12	14	17	46	46	52	27	27	24	6	9	5
5000	173	167	161	18	15	15	53	51	45	22	24	30	5	6	7
2500	157	139	160	16	11	18	39	50	51	25	27	17	6	7	5
1250	158	161	161	20	12	16	39	39	41	23	29	20	5	8	6
625	162	157	165	18	18	15	40	52	42	17	29	26	9	6	8
312	155	165	162	15	13	15	42	40	50	23	28	20	8	6	6
156	162	131	156	12	12	16	42	47	56	23	19	19	6	7	7
PC	380	324	380	180	185	196	198	189	182	260	316	264	592	611	629

Dose ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	Number of revertant colonies/plate with S9 mix														
	base replacement type						frame shift type								
	TA100			TA1535			WP2uvrA			TA98			TA1537		
NC	178	190	165	16	15	16	51	53	56	31	27	33	9	12	6
5000	170	187	187	16	11	16	59	53	50	35	31	25	5	8	10
2500	191	176	186	22	14	11	62	43	51	26	26	29	6	10	5
1250	179	181	192	13	18	14	43	60	52	28	27	33	9	6	9
625	179	194	177	15	17	16	50	62	56	36	26	29	7	5	11
312	178	153	165	21	19	16	48	50	57	33	31	25	12	9	12
156	182	179	171	12	22	19	52	52	52	26	29	27	7	9	11
PC	372	484	428	141	135	148	448	516	528	290	310	307	121	131	143

NC : Negative Control (distilled water, 100  $\mu\text{l}/\text{plate}$ )

PC : Positive Control (100  $\mu\text{l}/\text{plate}$ )

Appendix 3. History profile of vehicle and positive control values

Vehicle control values 2009-2010						
S9 Mix		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
(-)	Mean	151	17	30	32	10
	SD	17	4	7	12	4
	MIN	102	9	15	15	4
	MAX	189	29	56	64	25
	N	204	204	204	204	204
(+) )	Mean	156	16	30	41	11
	SD	15	4	9	14	5
	MIN	118	8	11	14	4
	MAX	194	30	58	72	29
	N	204	204	204	204	204

Positive control values 2009-2010						
S9 Mix		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
(-)	Mean	614	356	341	284	277
	SD	163	164	238	112	113
	MIN	332	146	101	121	112
	MAX	1328	768	998	764	586
	N	204	204	204	204	204
(+) )	Mean	593	367	320	277	295
	SD	132	184	207	93	110
	MIN	146	105	96	148	128
	MAX	896	750	712	772	592
	N	204	204	204	204	204

SD : Standard deviation.

N : number of values

Appendix 4. S9 fraction quality control statement

POST MITOCHONDRIAL SUPERNATANT (S-9)  
QUALITY CONTROL STATEMENT

LOT NO.: 2758	SPECIES: Rat	PREPARATION DATE: May 06, 2011
PART NO.: 11-011	STRAIN: Sprague Dawley	EXPIRATION DATE: May 06, 2013
VOLUME: 2.1 ml	SEX: Male	BUFFER: 0.154 M KCl/Lyophilization buffer
STORAGE: At or below 20°C	TISSUE: Liver	INDUCING AGENT(s): Aroclor 1254 Monsanto Lot No. KL615

BIOCHEMISTRY:

- PROTEIN

35.7 mg/ml

Assayed according to the method of Lowry et al., JBC 193:265, 1951 using bovine serum albumin as the standard.

- ALKOXYRESORUFIN-0-DEALKYLASE ACTIVITIES

Activity	P450	Fold - Induction
EROD	1A1, 1A2	105.6
PROD	2B1, 3B2	21.9
MROD	1A2	96.6
BROD	3A, 2B	48.5

Assays for ethoxyresorufin-0-deethylase (EROD), pentoxy-, methoxy- and benzyloxyresorufin-0-dealkylases (PROD, MROD, & BROD) were conducted using a modification of the methods of Burke et al., *Biochem Pharm* 34: 3337, 1985. Fold-inductions calculated as the ratio of the sample vs. uninduced control specific activities (SA). Control SA's (pmoles/min/mg protein) were 67.8, 37.3, 19.7, & 85.9 for EROD, PROD, MROD & BROD, respectively.

BIOASSAY:

- TEST FOR THE PRESENCE OF ADVENTITIOUS AGENTS

Samples of S-9 were assayed for the presence of contaminating microflora by plating 1.0 ml volumes on Nutrient Agar and Minimal Glucose (Vogel-Bonner E, supplemented with 0.05 mM L-histidine and D-biotin) media. Duplicate plates were read after 24 - 48 h incubation at 35 ± 2°C. The tested samples met acceptance criteria.

- PROMUTAGEN ACTIVATION

No. His+ Revertants	TA98	TA1535	The ability of the sample to activate ethidium bromide (EtBr) EtBr/CPA and cyclophosphamide (CPA) to intermediates mutagenic to TA98 and TA1535, respectively, was determined according to Lesca et al. <i>Mutation Res</i> 129:299, 1984. Data were expressed as revertants per µg EtBr or per mg CPA.
138.8	846		

Dilutions of the sample S9, ranging from 0.2 - 10% in S9 mix, were tested for their ability to activate benzo(a)pyrene (BP) and 2-aminoanthracene (2-AA) to intermediates mutagenic to TA100. Assays were conducted using duplicate plates as described by Maron & Ames (*Mutat. Res.* 113:173, 1983).

Promutagen	µl S9 per plate/number his <sup>+</sup> revertants per plate					
	0	1	5	10	20	50
BP (5 µg)	101	321	624	1356	1273	1124
2-AA (2.5 µg)	110	1303	1910	2430	2539	2329

MOLECULAR TOXICOLOGY, INC.  
157 Industrial Park Dr.  
Boone, NC 28607  
(828) 264-9099  
[www.moltox.com](http://www.moltox.com)

Approved:



05/09/11

### 3. 함초추출물(MDC308)의 염색체이상시험 보고서

## 염생식물(함초)의 포유동물 세포주를 이용한 염색체이상시험

(주)메드빌

153-801 서울특별시 금천구 가산동 60-21 IT미래TOWER 15층  
Tel) 02-2027-5775 · Fax) 02-2027-5776 · <http://www.medvill.co.kr>

## 목 차

목차	-----	2
요약	-----	3
1. 서론	-----	4
2. 재료 및 방법	-----	5
2.1 시험물질	-----	5
2.2 시험계	-----	5
2.3 양성대조물질	-----	5
2.4 S9 혼합물(대사활성계)	-----	6
2.5 농도결정	-----	6
2.6 시험방법	-----	7
2.7 시험적합성 판정	-----	8
2.8 평가방법	-----	8
3. 결과 및 고찰	-----	9
3.1 세포독성시험	-----	9
3.2 염색체이상시험	-----	9
4. 결론	-----	11
5. 참고문헌	-----	11
6. Tables	-----	12
Table 1. Summary of results obtained from chromosome aberration test of 염생식물(합초)	-----	12
Table 2. Metaphase analysis data	-----	13
7. Figure 1. Results of cytotoxicity test	-----	14
8. Appendices	-----	15
Appendix 1. Historical data of negative control in chromosome aberration tests	-----	15
Appendix 2. Historical data of positive control in chromosome aberration tests	-----	16
Appendix 3. Information sheet for CHL cells	-----	17
Appendix 4. S9 fraction quality control statement	-----	18



## 요 약

**세포독성시험** : 염색체이상시험에서 사용할 시험물질의 처리 농도를 결정하기 위하여 세포독성시험을 실시하였다. 시험물질을 7 단계 농도로 처리하였고, S9 (랫드 간의 균질액 포함) 혼합물의 처리군과 비처리군으로 나누어 세포독성시험을 수행하였다. 그 결과, S9 혼합물 처리 조건하에서 시험물질을 78.1 ~ 5000  $\mu\text{g/ml}$  농도 범위에서 7 단계로 단시간 처리하였을 때, 농도 78.1 ~ 5000  $\mu\text{g/ml}$  까지 세포의 viability는 67.7%이상이나와 대사활성 존재하에서 염색체이상 본시험의 최고농도를 5000  $\mu\text{g/ml}$ 으로 정하였다. S9 혼합물 비처리 조건 하에서 시험물질을 처리하였을 때에는 농도 78.1 ~ 2500  $\mu\text{g/ml}$  까지 세포의 viability는 69.7%이상 나오고, 5000  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 viability는 31%가 나와 대사활성 부재하에서 물질을 단시간 처리할 때 염색체이상 본시험의 최고농도를 2500  $\mu\text{g/ml}$ 으로 정하였다. 또 연속처리 시 시험 물질을 농도 78.1 ~ 2500  $\mu\text{g/ml}$  까지 세포의 viability는 67%이상 나오고, 5000  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 세포의 viability는 11.1%가 나와 대사활성 부재하에서 물질을 연속처리할때 염색체이상 본시험의 최고농도를 2500  $\mu\text{g/ml}$ 으로 정하였다 (Fig. 1).

**염색체이상시험** : 위의 최고 농도에서 공비 2로 각각 3단계의 농도를 사용하여 염색체이상 시험을 수행하였다. S9 혼합물을 첨가한 대사활성 존재하에서와 첨가하지 않은 대사활성 부재하의 단시간처리군은 시험물질을 6시간 처리하고 신선한 배양액으로 교환하여 총 24시간을 배양하였다.

S9 혼합물을 첨가한 조건의 세농도 1250, 2500, 5000  $\mu\text{g/ml}$ 를 시험하였을 때, 염색체의 구조적 이상 빈도가 통계적(Fisher's exact test)으로 유의한 증가를 유발하지 않았다. (각  $P>0.05$ ) S9 혼합물을 첨가하지 않고 시험물질을 625, 1250, 2500  $\mu\text{g/ml}$  의 농도로 단시간 처리하였을 때, 세농도에서 모두 통계적으로 유의한 증가를 유발하지 않았다. 그리고 S9 혼합물을 첨가하지 않고 시험물질을 24시간 연속 처리하였을 때는, 시험물질의 세농도 625, 1250, 2500  $\mu\text{g/ml}$  에서 모두 통계적으로 유의하게 염색체의 이상 빈도의 증가가 나타나지 않았다.

음성대조물질 처리에 의한 염색체이상 빈도는 시험적합성판정의 정상범위내로 관찰되었고, 양성대조물질인 cyclophosphamide monohydrate (S9 혼합물 처리시)와 mitomycin C (S9 혼합물 비처리시)는 각각의 조건에서 통계적으로 유의적인(각  $P<0.001$ ) 염색체이상을 유발하여 S9 혼합물의 유효성과 본 시험 시스템의 타당성이 입증되었다.

**결론** : 이상의 결과로부터 시험물질 염생식물(함초)는 본 시험조건 하에서 CHL 세포에 대한 염색체이상 유발 빈도가 통계적으로 유의한 증가를 보이지 않았다. 따라서 염생식물(함초)가 CHL 세포의 염색체이상을 유발하지 않는다고 판단된다.

## 1. 서론

본 연구는 시험물질 염생식물(함초)의 유전독성을 평가할 목적으로 포유동물 세포주인 Chinese hamster lung fibroblast (CHL) 세포를 사용하여 염색체이상시험을 수행하였다.

본 시험에서 사용한 CHL 세포는 염색체의 수가 적고 커서 관찰이 용이하며 증식이 빠르고 비교적 간단한 배양액을 사용할 수 있고 S9 혼합물에 의한 대사 활성이 용이한 장점을 가지고 있다. 염색체이상은 염색체 수의 변화(이수성 aneuploid, 배수성 polyploid)와 형태의 변화(구조이상)로 구분된다. 수적이상은 주로 세포 분열장치에 작용하여 생기는 염색체의 비분리 또는 분열정지에 기인되며, 구조이상은 DNA 이중쇄 절단에 기인된다고 알려져 있다.

본 시험에서 염색체이상은 일본환경변이학회 포유동물시험분과회의 분류(1988)를 따랐다. 전통적으로 gap은 염색체이상에서 제외되어 왔지만 gap도 DNA의 절단임을 고려하여 본 시험에서는 gap을 포함하지 않은 염색체이상과 gap을 포함한 염색체이상을 모두 표기하였다.

시험물질의 성질에 따라서는 대사물질이 유전독성을 나타내기도 하므로 대사를 촉진하는 약물로 전처리를 한 랫드의 간으로부터 조제된 마이크로솜 효소 분획(S9)을 첨가한 시험계(대사활성화)와 첨가하지 않은 시험계(비대사활성화)에서 시험을 수행하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 시험물질

#### 1) 시험물질

- (1) 명칭 : 염생식물(함초)
- (2) 외관 및 색상 : Yellow powder
- (3) 보관조건 : 냉장

#### 2) 용매

- (1) 용매명 : 멸균증류수
- (2) Lot. No : 805141
- (3) 제조처 : Gibco
- (4) 보관조건 : 상온

#### 3) 시험물질의 조제 및 분석

- (1) 조제 : 실험 실시 당일 필요한 시료의 양을 정확히 칭량하여 잘 용해하여 사용하였다.
- (2) 분석 : 별도로 시행하지 않았다.

### 2.2 시험계

#### 1) 사용세포주

포유동물 세포주 Chinese hamster lung fibroblast (CHL)

#### 2) 선택이유

상기 세포는 염색체이상 시험에 광범위하게 사용되고 있으므로 기초 자료가 풍부하여 선택하였다.

#### 3) 공급원

CHL 세포주는 2007년 2월 28일에 ATCC (American Type Culture Collection)를 통하여 분양 받았다(Appendix 4). 본 연구실에서 세포상태를 확인한 후 계대 배양하여 사용하였다.

#### 4) 세포의 보존

액체질소에 냉동보존하며 시험에 사용할 세포는 해동하여 7일 이상 배양 후 미생물 오염 여부를 확인하여 오염되지 않은 세포를 사용하였다.

#### 5) 세포배양조건

Eagle's minimal essential medium (EMEM, Gibco)에 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco)와 1% antibiotic 용액(Streptomycin/Penicillin, Gibco)을 첨가하여 배양액으로 사용하였고 포화습도하에서 5% CO<sub>2</sub>를 공급하는 37 °C 배양기에서 배양하였다.

#### 6) 특성

염색체 수는 25이며, 세포주기는 15시간이다.

### 2.3 양성대조물질

양성대조물질은 보관 용액을 만들어 처리 직전 배양액에 희석하여 조제하였다.

	양성대조물질 I	양성대조물질 II
명 칭	Mitomycin C	Cyclophosphamide monohydrate
약 칭	MMC	CP
CAS No.	50-07-7	6055-19-2
대사활성여부	S9 mix(-)	S9 mix(+)
처리 농도	0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$	5 $\mu\text{g}/\text{ml}$
제조사	Sigma	Sigma
제품번호	M-0503	C-0768
Lot No.	089K0731	068K1131
입수일	2010년 11월	2009년 3월
보관조건	냉장	냉장
보관기한	2014년 11월	2011년 8월
취급상 주의	유독물질	유독물질

### 2.4 S9 혼합물(대사활성제)

대사효소인 S9는 Aroclor 1254를 이용해서 유도된 Sprague-Dawley 랫드의 간 균질액으로부터 분리된 MOLTOX™ postmitochondrial supernatant (Lot No. 2758, Molecular Toxicology, Inc., Appendix 5)를 수입하여 사용하였다. S9 혼합물은 다음과 같이 조제하되 배양액에 10%가 되도록 처리하였다.

혼합액 조성	용량(ml)
Rat liver S9 균질	3
0.4 M $\text{MgCl}_2$ -1.65 M KCl	0.1
0.1 M Glucose-6-phosphate	0.25
0.1 M NADP	0.2
0.2 M Sodium phosphate buffer, pH7.4	1.25
Sterile distilled $\text{H}_2\text{O}$	0.2
Total volume	5

### 2.5 농도결정

#### 1) 시험농도의 결정

세포독성실험을 통하여 시험물질을 세포주 CHL의 노출 농도를 설정하였다.

- (1) 배양세포의 50% 성장억제농도(IC<sub>50</sub>, 50% Inhibitory concentration)를 구하고자 세포를 분주하고 24시간 배양한 후, 단시간처리군(S9 혼합물 처리군, 비처리군), 연속처리군으로 나누어 시험물질을 포함한 배양액으로 교체하였다.
- (2) 시험물질은 5000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도가 되도록 D.W.에 현탁시켜 공비 2의 7단계 (78.1 ~ 5000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 농도로 조제하였다.
- (3) 음성대조물질로 용매인 D.W.를 사용하였다.

(4) 단시간처리군(S9 혼합물 처리군, 비처리군)은 시험물질을 6시간 처리하고 배양액을 교체하여 총 배양시간을 24시간으로 하였고, 연속처리군(S9 혼합물 비처리군)은 시험물질을 24시간 처리하고 trypan blue assay (relative cell count)를 수행하였다.

(5) 50% 세포 성장억제농도를 포함하는 시험물질의 농도와 침전농도를 고려하여 염색체 이상시험의 최고농도로 하였다.

## 2) 시험군의 구성

위의 실험에서 결정된 최고농도를 활용하여 공비 2로 최고농도를 포함한 3단계 농도의 시험물질 처리군과 양성 및 음성대조군으로 본시험을 구성하였다. D.W.를 음성대조물질로 사용하였고, 양성대조물질은 이미 염색체 이상을 유발하는 것으로 밝혀진 CP(Cyclophosphamide monohydrate)와 MMC (Mitomycin C)를 S9 혼합물을 첨가한 시험계와 S9 혼합물을 첨가하지 않은 시험계에 처리하였다.

시험군	단시간처리		연속처리
	S9 mix (+)	S9 mix (-)	S9 mix (-)
	본시험	본시험	본시험
음성대조군	Distilled water	Distilled water	Distilled water
저농도군	1250 $\mu\text{g}/\text{ml}$	625 $\mu\text{g}/\text{ml}$	625 $\mu\text{g}/\text{ml}$
중농도군	2500 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1250 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1250 $\mu\text{g}/\text{ml}$
고농도군	5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$	2500 $\mu\text{g}/\text{ml}$	2500 $\mu\text{g}/\text{ml}$
양성대조군	CP (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	MMC (0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	MMC (0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

## 2.6 시험방법

### 1) 단시간처리법

CHL 세포를 60 mm의 petri-dish에  $3 \times 10^4$  cells/ml가 되도록 duplicate로 분주하고 단층 세포를 만든 다음, 각 음성대조물질, 시험물질 및 양성대조물질을 함유하는 배양액으로 교환하여 6시간 배양한 후 신선한 배지로 교환하여 총 배양시간이 24시간이 되도록 하였다. S9 혼합물을 첨가하는 경우, S9 혼합물을 포함한 배양액에 시험물질 또는 양성대조물질을 혼합하여 각각 처리하였다. 각 petri-dish에 세포를 수거하기 2시간 전에 0.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 Colcemid를 처리한 다음 세포를 수거하여 검체를 제작하였다.

### 2) 연속처리법

CHL 세포를 60 mm의 petri-dish에  $3 \times 10^4$  cells/ml가 되도록 duplicate로 분주하고 배양하여 단층세포를 만든 다음, 각 음성대조물질, 시험물질 또는 양성대조물질이 포함된 배양액으로 24시간 계속 배양하였다. 세포를 수거하기 2시간 전에 0.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 colcemid를 처리한 다음 세포를 수거하여 검체를 제작하였다.

### 3) 검체의 제작

(1) 검체는 처리 종료 시각에 각 petri-dish로부터 배양액을 제거하고 PBS (Phosphate buffered saline, Gibco)로 3회 세척한 후 0.05% Trypsin-EDTA로 세포를 수거하였다.

(2) 수거한 세포를 75 mM KCl 용액 3 ml에 현탁시켜 37 °C에서 30분간 처리하였다.

- (3) 냉각고정액(Methyl alcohol : Glacial acetic acid = 3 : 1)을 200 $\mu$ l 혼합하여 10분간 고정한 후 다시 냉각 고정액 3 ml로 3회 고정 하였다.
- (4) 공기건조법으로 검체를 제작하였다.
- (5) 5% Giemsa 염색액으로 10분간 염색하여 탈 이온수로 2-3회 세척 후 건조하였다.

4) 검체의 관찰

- (1) 제작된 검체는 현미경의 1000배 배율로 관찰하였다. 각 검체 당 200 개의 세포분열 중기상세포를 관찰하여 염색체 구조이상(Structural aberration)과 수적이상(Numerical aberration) 유무를 관찰하였다.
- (2) 구조이상은 염색분체형(Chromatid type)과 염색체형(Chromosome type)으로 구분하여 계수하였다.

구조이상(Structural aberration)	숫적이상(Numerical aberration)
염색분체형 gap (ctg)	배수체(polyploid)
염색분체형 절단 break (ctb)	핵내변화(endoreduplication)
염색분체형 교환 exchange (cte)	
염색체형 gap (csg)	
염색체형 절단 break (csb)	
염색체형 교환 exchange (cse)	

④

⑤ 2.7 시험적합성 판정

염색체이상시험은 다음의 판정기준을 만족시킬 경우 그 결과가 적합하다고 판정하였다.

- 1) 음성대조군인 용매 처리군에서 염색체이상세포수가 다음의 historical data 범위 내에 있어야 한다.
  - (1) S9 혼합물을 첨가하지 않는 경우 : 200개의 중기상당세포 중에 min=0, max=6 (mean=1.5, SD=0.8), gap을 포함하지 않음.
  - (2) S9 혼합물을 첨가하는 경우 : 200개의 중기상당세포 중에 min=0, max=3 (mean=0.8, SD=0.4), gap을 포함하지 않음.
- 2) 양성대조 물질을 처리한 군에서 염색체이상세포의 수가 통계학적(Fisher's exact test,  $P < 0.05$ )으로 유의하게 증가하여야 한다.

⑥

⑦ 2.8 평가방법

- 1) 염색체이상의 분류는 일본환경변이원학회(JEMS) 포유동물시험분과회(MMS)판 '염색체이상 아틀라스(1988)'에 의하였다.
- 2) 시험결과 및 평가
  - (1) 각 농도군당 200개의 중기상세포에서 염색체이상의 수를 표시하였다.
  - (2) 구조이상은 크게 염색체형 절단 및 교환과 염색분체형 절단 및 교환으로 구별해 계수하고, gap을 염색분체의 폭보다 좁은 결손으로 분류하고 계수하되 염색체이상에 포함시키지 않았다.

- (3) 숫적이상은 4배수체 이상인 polyploid 및 endoreduplication만을 평가하였다.
- (4) 구조이상의 종류를 1개 이상 갖는 세포를 양성세포 1개로 계수하고 퍼센트 값을 구하고 퍼센트 값을 염색체이상빈도로 하였다. 또한, 염색체이상의 종류를 각각 기록하였다.

3) 통계처리

- (1) 염색체이상빈도에 대한 통계처리는 OECD guideline 등에 따라 gap을 포함하지 않는 숫자를 대상으로 실시하였다.
- (2) 각 군의 200개의 증기상세포 중에서 염색체이상 세포 수와 정상세포 수를 표시하였다.
- (3) 용량 의존적인 증가나 반복적인 증가를 보일 때 양성으로 판정하였다.
- (4) Fisher's exact test (Altman, 1993)를 통하여 음성대조군과 시험물질 처리군의 유의성 검증을 위한 통계처리를 실시하였다.  $P$ -value에 따라  $P < 0.05$  일 때 양성 여부를 판정하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1 세포독성시험

염색체이상시험에서 사용할 시험물질의 처리 농도를 결정하기 위하여 세포독성시험을 실시하였다. 시험물질을 7 단계 농도로 처리하였고, S9 혼합물(랫드 간의 균질액 포함)의 처리군과 비처리군으로 나누어 세포독성시험을 수행하였다. 그 결과, S9 혼합물 처리 조건하에서 시험물질을 78.1 ~ 5000  $\mu\text{g/ml}$  농도 범위에서 7 단계로 단시간 처리하였을 때, 모든 농도의 cell viability는 모두 67.7% 이상을 보였다. 따라서 대사활성 존재하에서 염색체이상 본시험의 최고 농도는 5000  $\mu\text{g/ml}$ 으로 정하였다. S9 혼합물 비처리 조건하에서 시험물질을 단시간 처리하였을 때 최고농도에서 cell viability는 31.8% 이었으며, 78.1~2500 $\mu\text{g/ml}$ 의 6 단계 농도에서는 모두 cell viability가 69.7 이상을 나타냈다. 따라서 대사활성 부재하에서 물질을 단시간처리 할 때 염색체이상 본시험의 최고 농도는 2500  $\mu\text{g/ml}$ 으로 정하였다. 연속처리군에서도 최고농도에서 cell viability가 11.1%를 나타냈으며, 나머지 6단계 농도의 cell viability는 67.7% 이상을 나타냈다. 따라서 대사활성 부재하에서 물질을 장시간 처리할 때 염색체이상 본시험의 최고 농도는 2500  $\mu\text{g/ml}$ 으로 정하였다. (Fig. 1).

#### 3.2 염색체이상시험

위의 결과에 따라 염색체이상시험에서 사용한 시험물질의 최고 농도를 본시험의 최고농도로 정하며 공비 2의 3단계 로 정하였다.

##### 단시간처리법

S9 혼합물 첨가하는 조건 : 1250, 2500, 5000  $\mu\text{g/ml}$

S9 혼합물 첨가하지 않는 조건 : 625, 1250, 2500  $\mu\text{g/ml}$

##### 연속처리법

S9 혼합물 첨가하지 않는 조건 : 625, 1250, 2500  $\mu\text{g/ml}$

염색체이상 빈도는 Table 1과 Table 2에 gap을 포함하지 않은 경우와 gap을 포함하는 경우를 각각 기록하였고 다음의 결과 기술 및 염색체이상 유무의 판정은 시험방법에서 제시한 바와 같이 gap을 포함하지 않는 경우를 기준으로 하였다.

##### 1) 단시간처리법

S9 혼합물과 함께 시험물질을 1250, 2500, 5000  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 6시간 동안 처리한 경우, 200개 증기상세포 중 염색체의 구조적 이상 빈도는 각각 0.0, 0.0, 0.0 %으로 통계적(Fisher's exact test)으로 유의한 증가가 유발되지 않았다. ( $P>0.05$ )

S9 혼합물을 첨가하지 않고 시험물질을 625, 1250, 2500  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 6시간 동안 처리한 경우, 염색체의 구조적 이상빈도는 0.0 0.5, 0.0 %으로 통계적(Fisher's exact test)으로 유의한 증가가 유발되지 않았다. ( $P>0.05$ ).



S9 혼합물과 함께 처리한 양성대조물질(CP)은 34.5 %, S9 혼합물을 첨가하지 않은 양성대조물질(MMC)도 31.0 % 로서 현저한 염색체이상을 유발하였다 (각  $P < 0.001$ ) (Table 1). 실험 조건에 따른 염색체이상의 종류는 Table 2에 기록하였다.

## 2) 연속처리법

S9 혼합물을 첨가하지 않고 시험물질을 24시간 동안 연속 처리한 경우도 625, 1250, 2500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 염색체의 구조적 이상빈도가 0.0, 0.0, 0.0 %로 세 농도에서 모두 통계적으로 유의한 증가가 유발되지 않았다( $P > 0.05$ ). 양성대조물질 MMC를 처리한 군은 27.0%로써 현저한 염색체이상이 관찰되었다( $P < 0.001$ ) (Table 1). 실험 조건에 따른 염색체이상의 종류는 Table 2에 기록하였다.

위의 결과에서 양성대조물질인 cyclophosphamide monohydrate와 mitomycin C는 각각의 조건에서 현저한 염색체이상을 유발하여 S9 혼합물의 유효성과 본 시험 시스템의 민감성이 입증되었고, 음성대조군인 용매처리 군에서도 염색체이상세포수가 historical data 범위 내로 평가되어 본 시험의 타당성이 입증되었다.

염색체이상 빈도는 Table 1과 Table 2에 gap을 포함하지 않은 경우와 gap을 포함하는 경우를 각 기록하였고 다음의 결과 기술 및 염색체이상 유무의 판정은 시험방법에서 제시한 바와 같이 gap을 포함하지 않는 경우를 기준으로 하였다.

#### 4. 결론

시험물질 염생식물(함초)를 처리하였을 때, 시간 또는 농도 증가에 따른 색체 이상 유발 빈도의 증가가 나타나지 않았다. 따라서 염색체 이상을 일으키지 않는 물질로 판단된다.

#### 5. 참고문헌

- (1) OECD (1997) : OECD guidelines for testing of chemicals, (adopted 21 July 1997) Section 4 : Chapter 473, *In vitro* mammalian chromosome aberration test, Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France.
- (2) Ishidate Jr. M. and Odashima S. (1997) : Chromosome tests with 134 compounds on chinese hamster cells *in vitro*-a screening for chemical carcinogens, *Mutat. Res*, 48, 337-354.
- (3) Kim BS, Zhao B, Kim HJ, Cho M. (2000) : The statistical analysis of the *in vitro* chromosome aberration assay using Chinese hamster ovary cells, *Mutat. Res*, 469, 243-52.
- (4) Koyama H. et al (1970) : A new cell line derived from new born chinese hamster lung tissue, *Gann*, 61, 161-167.
- (5) Galloway S.M, et al (1994) : Report from working group on *in vitro* tests for chromosomal aberration, *Mutat. Res*, 312, 241-61.

## 6. Tables

Table 1. Summary of results obtained from chromosome aberration test of  
염생식물(합초)

S9Mix (6%)	Exposure period (hours)	Dose ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	No. of counted cells	Cells with Chromosome aberration		
				Aberration cells excluding gaps (%)	Aberration cells including gaps (%)	No. of normal cells
+	6	NC	200	0.5	1.5	197
		1250	200	0.0	1.0	198
		2500	200	0.0	0.0	200
		5000	200	0.0	1.0	198
		CP	200	34.5	40.0	120
-	6	NC	200	0.0	0.5	199
		625	200	0.0	1.0	198
		1250	200	0.5	1.0	198
		2500	200	0.0	0.0	200
		MMC	200	31.0	38.5	123
-	24	NC	200	0.0	0.0	200
		625	200	0.0	0.5	199
		1250	200	0.0	1.5	197
		2500	200	0.0	1.0	198
		MMC	200	27.0	28.5	143

\* :  $P < 0.001$ , significant differences between control and treatment group by  
Fisher's exact test

otherwise :  $P > 0.05$

NC : Distilled water

CP : Cyclophosphamide monohydrate ( $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ )

MMC : Mitomycin C ( $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ )

Table 2. metaphase analysis data

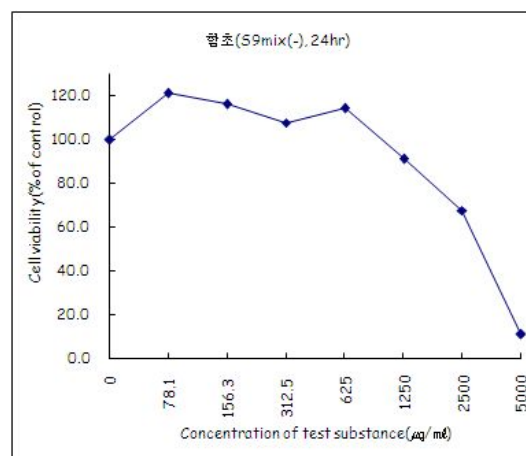
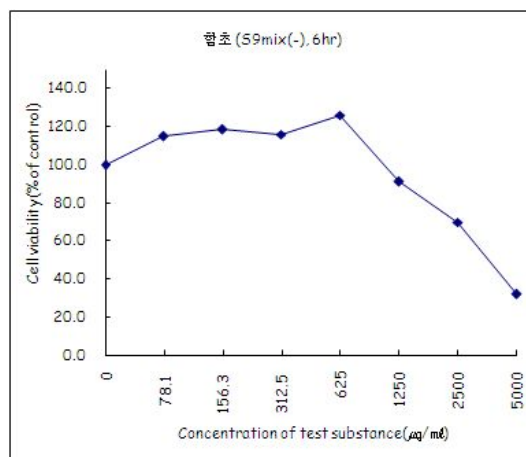
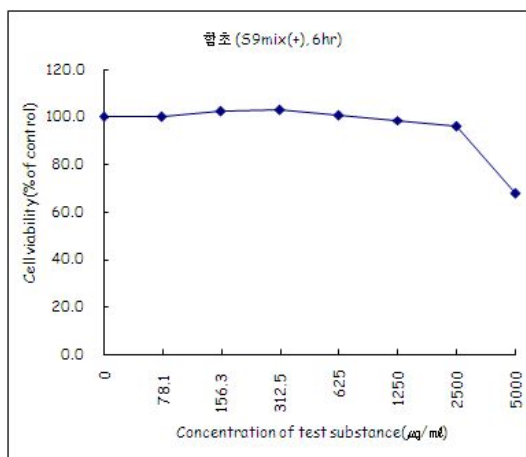
S9 (6%)	Exposure period (hours)	Dose ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	csb	cse	ctb	cte	frg	Aberration excluding gap (%)	csg	ctg	poly	endo	Aberration including gap (%)	Normal cells (No.)	
+S9	6	NC	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	3	97	
			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
		1250	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	2	98
			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
		2500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
		5000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
		CP	36	1	22	12	0	36	5	7	0	0	0	40	60
			9	0	22	22	0	33	5	5	0	0	0	40	60
-S9	6	NC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	
			0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	99
		625	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	2	98
			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
		1250	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	2	98
			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
		2500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
		MMC	13	1	10	17	0	34	9	4	0	0	0	44	56
			10	2	7	18	0	28	9	2	0	0	0	33	67
-S9	24	NC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	
			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
		625	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
			0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	99
		1250	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	99
			0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	98
		2500	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	99
			0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	99
		MMC	2	0	8	33	0	29	2	3	0	0	0	30	70
			6	0	7	28	0	25	3	3	0	0	0	27	73

ctb: chromatid break, cte: chromatid exchange, csb: chromosome break, cse: chromosome exchange, ctg: chromatid gap, csg: chromosome gap, poly: polyploid, endo: endoreduplication

NC: Distilled water

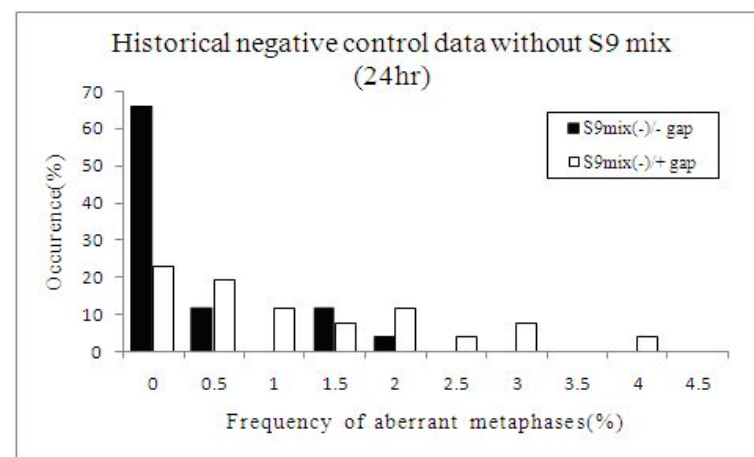
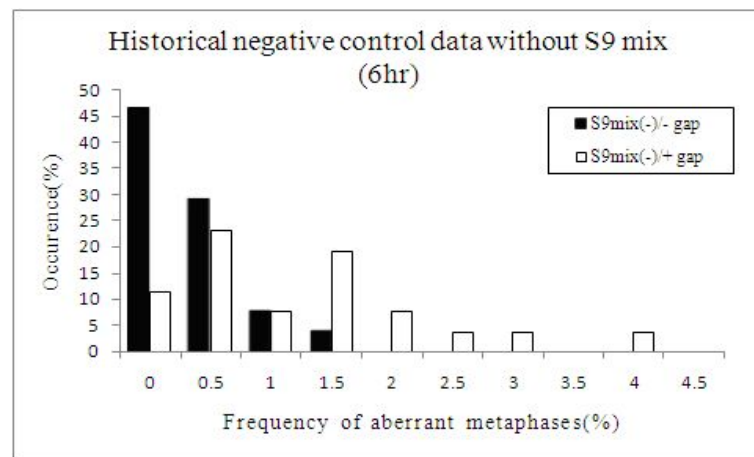
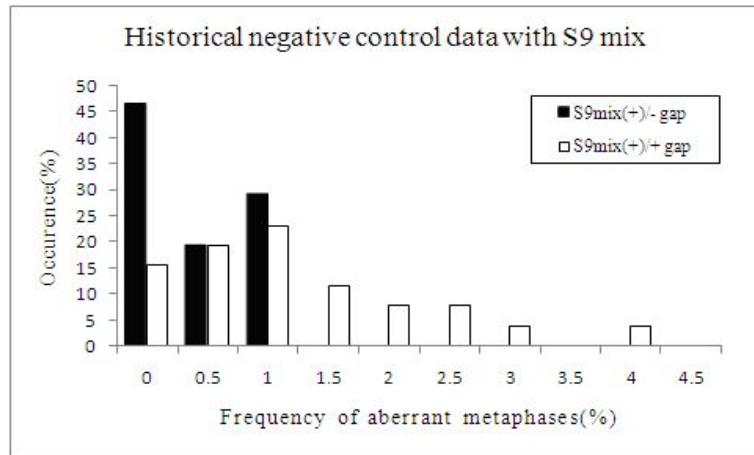
CP: Cyclophosphamide monohydrate ( $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ), MMC: Mitomycin C ( $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ )

7. Figure 1. Results of cytotoxicity test : Effects of test substance on the viability of chinese hamster lung fibroblast cells in the absence or in the presence of S9 metabolic activation

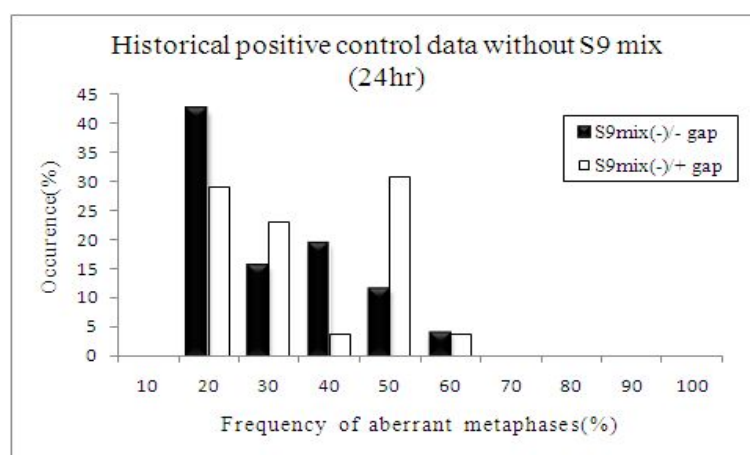
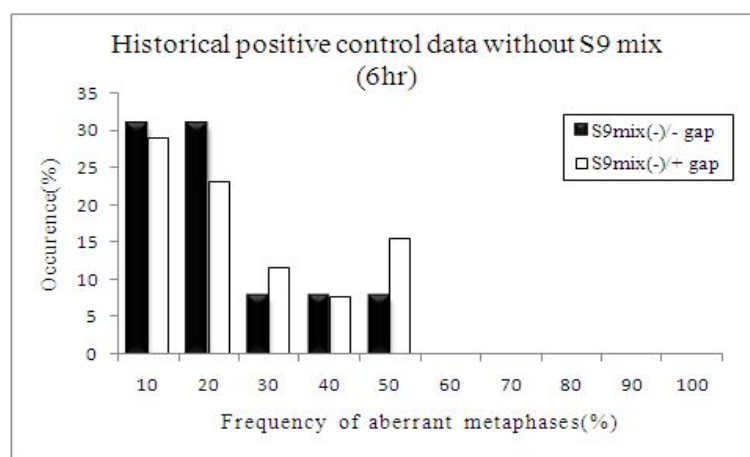
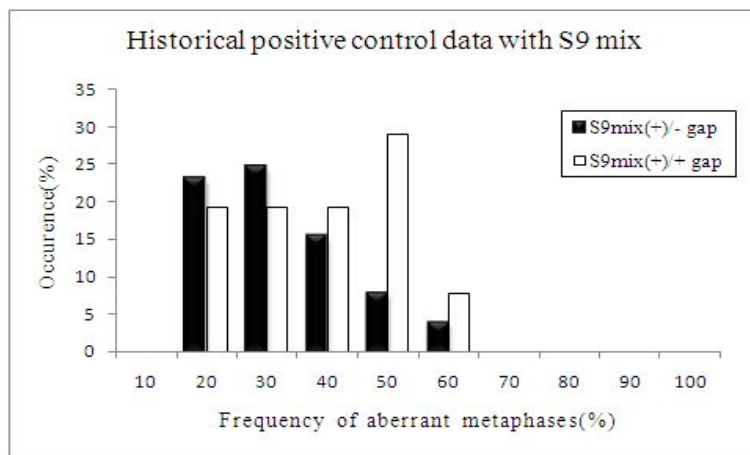


## 8. Appendices

### Appendix 1. Historical data of negative control in chromosome aberration tests (2008 ~ 2010)



Appendix 2. Historical data of positive control in chromosome aberration tests (2008 ~ 2010)



Appendix 4. Information sheet for CHL cells



**Product Information Sheet for CRL-1935**

---

Lot number: 3375917

Designation: CHL/IU Description: Lung; Chinese Hamster  
Total Cells/mL:  $1.2 \times 10^6$   
Expected Viability: 89% to 98%  
Ampule Passage No.: Unknown  
Population Doubling (PDL): N/A  
Dilute Ampule Content: 1:15 in a T-75 flask  
Volume/Ampule: 1 ML  
Date Frozen: 10/09/03

A T-75 setup at a dilution of 1:15, using DMEM with 10% calf serum,  
reaches confluence in 2 days.

Copyright ATCC, 1998; ATCC is a registered trademark of the  
American Type Culture Collection 9-98

**American Type Culture Collection**  
10801 University Boulevard  
Manassas, VA 20110-2209

Ordering info: 800 638-6597 (USA and Canada)  
703 365-2700 (elsewhere) Fax: 7033652750  
email: [sales@atcc.org](mailto:sales@atcc.org) web site: [www.atcc.org](http://www.atcc.org)



## Appendix 5. S9 fraction quality control statement

### POST MITOCHONDRIAL SUPERNATANT (S-9) QUALITY CONTROL STATEMENT

LOT NO.: 2758	SPECIES: <u>Rat</u>	PREPARATION DATE: <u>May 06, 2011</u>
PART NO.: <u>11-011</u>	STRAIN: <u>Sprague-Dawley</u>	EXPIRATION DATE: <u>May 06, 2013</u>
VOLUME: <u>2.1 ml</u>	SEX: <u>Male</u>	BUFFER: <u>0.154 M KCl/Lyophilization buffer</u>
STORAGE: <u>At or below 20°C</u>	TISSUE: <u>Liver</u>	INDUCING AGENT(S): <u>Aroclor 1254</u> <u>Monsanto Lot No. K1615</u>

#### BIOCHEMISTRY:

##### - PROTEIN

35.7 mg/ml

Assayed according to the method of Lowry et al. JBC 193:265, 1951 using bovine serum albumin as the standard.

##### - ALKOXYRESORUFIN-0-DEALKYLASE ACTIVITIES

Activity	P450	Fold - Induction
EROD	1A1, 1A2	105.6
PROD	2B1, 3B2	21.9
MROD	1A2	96.6
BROD	3A, 2B	48.5

Assays for ethoxyresorufin-0-deethylase (EROD), pentoxy-, methoxy- and benzyloxyresorufin-0-dealkylases (PROD, MROD, & BROD) were conducted using a modification of the methods of Burke et al., *Biochem Pharm* 34: 3337, 1985. Fold-inductions calculated as the ratio of the sample vs. uninduced control specific activities (SA). Control SA's (pmoles/min/mg protein) were 67.8, 37.3, 19.7, & 85.9 for EROD, PROD, MROD & BROD, respectively.

#### BIOASSAY:

##### - TEST FOR THE PRESENCE OF ADVENTITIOUS AGENTS

Samples of S-9 were assayed for the presence of contaminating microflora by plating 1.0 ml volumes on Nutrient Agar and Minimal Glucose (Vogel-Bonner E, supplemented with 0.05 mM L-histidine and D-biotin) media. Duplicate plates were read after 24 - 48 h incubation at 35 ± 2°C. The tested samples met acceptance criteria.

##### - PROMUTAGEN ACTIVATION

No. His<sup>+</sup> Revertants

TA98	TA1535
138.8	846

The ability of the sample to activate ethidium bromide (EtBr) EtBr/CPA and cyclophosphamide (CPA) to intermediates mutagenic to TA98 and TA1535, respectively, was determined according to Lesca et al. *Mutation Res* 129:299, 1984. Data were expressed as revertants per µg EtBr or per µg CPA.

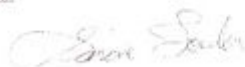
Dilutions of the sample S9, ranging from 0.2 - 10% in S9 mix, were tested for their ability to activate benzo(a)pyrene (BP) and 2-aminanthracene (2-AA) to intermediates mutagenic to TA100. Assays were conducted using duplicate plates as described by Maron & Ames (*Mutat. Res.* 113:173, 1983).

Promutagen	µl S9 per plate/number his <sup>+</sup> revertants per plate					
	0	1	5	10	20	50
BP (5 µg)	101	321	624	1356	1273	1124
2-AA (2.5 µg)	110	1303	1910	2430	2539	2329

#### MOLECULAR TOXICOLOGY, INC.

157 Industrial Park Dr.  
Boone, NC 28607  
(828) 264-9099  
www.moltox.com

Approved:



05/09/11

#### 4. 함초추출물(MDC308)의 소핵시험 보고서

### 염생식물(함초)의 마우스를 이용한 소핵시험

(주)메드빌

153-801 서울특별시 금천구 가산동 60-21 IT미래TWOWER 15층  
Tel) 02-2027-5775 · Fax) 02-2027-5776 · <http://www.medvill.co.kr>

## 목 차

목차	2
요약	3
1. 재료 및 방법	4
1.1 시험물질 및 대조물질	4
1.2 시험물질의 조제 및 분석	4
1.3 시험계	4
1.4 환경조건	5
1.5 사료 및 음수	5
1.6 투여	5
1.7 시험군 구성	6
1.8 관찰 및 검사법	6
1.9 골수세포의 채취 및 도말검체 제작	6
1.10 시험결과의 분석	6
1.11 자료의 통계처리	7
2. 결과	7
2.1 소핵 유발빈도	7
2.2 일반증상	7
2.3 체중	7
3. 고찰 및 결론	8
4. 참고문헌	8
5. Tables	9
Table 1. Results of micronucleus test in male ICR mice	9
Table 2. Body weight changes of male ICR mice	10
6. Appendices	11
Appendix 1. Individual data of micronucleus test in male ICR mice	11
Appendix 2. Individual data of body weight of male ICR mice	12

## 요 약

염생식물(합초)의 유전독성 평가를 위해 마우스에서 골수의 미성숙 적혈구 분석을 통해 시험물질에 의해 유발되는 염색체 또는 유사분열기관의 손상을 확인하였다. 본 시험에서는 약 8주령의 수컷 ICR 마우스를 각 군당 5마리씩 사용하였고, 최고농도는 고시의 한계농도인 2000 mg/kg 용량으로 하였다. 공비를 2로 하여 500, 1000, 2000 mg/kg의 3 용량으로 1일 1회씩 1일간 경구 투여하였다. 음성대조군에는 멸균증류수를 10 mL/kg의 투여액량으로 1회 경구 투여하였고, 양성대조군에는 Mitomycin C를 1 mg/kg 용량으로 1회 복강내 투여하였다. 시험물질, 음성대조물질, 양성대조물질을 최종 투여하고 약 24 시간 후에 골수세포를 수거하여 소핵 유발빈도(MNPCE/2000PCE)와 다염성 적혈구 출현빈도를 평가하였다. 개체 당 2000 개의 다염성적혈구(PCE, Polychromatic Erythrocyte) 중 소핵을 가진 다염성적혈구(MNPCE, Micronucleated Polychromatic Erythrocyte)의 수를 계수한 결과, 모든 시험물질 투여군에서 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가가 관찰되지 않았으며, 총 적혈구 중 다염성적혈구 비율도 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 이상의 결과에 따라 염생식물(합초)는 본 시험조건 하에서 마우스 골수세포에 소핵을 유발하지 않는 것으로 평가되었다.

## 1. 재료 및 방법

### 1.1 시험물질 및 대조물질

#### 1) 시험물질

- (1) 명칭 : 염생식물(합초)
- (2) 외관 및 색상 : Yellow powder
- (3) 보관조건 : 냉장보관

#### 2) 음성대조물질(용매)

- (1) 음성대조물질 : 멸균증류수
- (2) Lot No. : 778298
- (3) 제조처 : GIBCO
- (4) 보관조건 : 상온

#### 3) 양성대조물질

- (1) 명 칭 : Mitomycin C (MMC)
- (2) 로트번호 : 089K0731
- (3) 제조처 : Sigma
- (4) 보관조건 : 냉장
- (5) 입수일 : 2010년 11월

### 1.2 시험물질의 조제 및 분석

조 제 : 실험실시 당일 필요한 시료의 질량을 정확하게 칭량하여 일정공비로 단계 희석하여 시험에 사용하였다.

분 석 : 분석은 별도로 실시하지 않았다.

### 1.3 시험계

#### 1) 종 및 계통

마우스, ICR, SPF

#### 2) 구입처 및 생산자

명칭 : (주)코아텍

주소 : 경기도 평택시 진위면 동천리 406

#### 3) 시험계 선정이유

ICR 마우스는 설치류로서 소핵시험을 비롯한 안전성시험에 가장 널리 사용되고 있으며 비교할 많은 기초자료가 축적되어 있어 선택하였다.

#### 4) 성별 및 구입 동물수

수컷, 30마리

#### 5) 구입시 주령 및 체중범위

7주령, 30.3 ~ 32.6 g

- 6) 동물의 반입 및 개체번호표기법  
입수 시 체중을 측정하고 체중측정순으로 개체식별법에 따라서 꼬리에 유성펜을 이용하여 개체식별표시를 하였다.
- 7) 검역·순화방법 및 기간  
약 5일간의 검역·순화기간 중에 매일 1회 일반증상 관찰을 실시하였다. 검역·순화 기간 종료시 체중을 측정하여 시험실시에 적합하고 일반증상에 이상이 없는 건강한 동물을 선별하였다.
- 8) 균분리법  
검역·순화기간의 종료 후, 체중 증가량 및 일반증상에 이상이 없는 동물을 선별하여 사용하였다. 균분리시, 각 단계별로 체중의 무거운 순서대로 동물을 배치하였다.
- 9) 잔여동물의 처리  
잔여동물은 균분리 종료 후 안락사 시켰다.
- 10) 개체식별  
균분리 종료 후 케이지에는 개체식별카드를 부착하고, 동물의 개체식별은 유성펜을 이용하여 개체식별법에 따라 꼬리에 표시하였다.

#### 1.4 환경조건

- 1) 동물실명 : 동물실 I
- 2) 케이지 종류 및 크기 :  
Polycarbonate 케이지(275W×230D×110H(mm), 대종기기)
- 3) 케이지당 동물 수 : 5 마리
- 4) 온도 : 22 ± 3 ℃
- 5) 습도 : 50 ± 20 %
- 6) 환기회수 및 방식 : 10 ~ 20 회/시간, 전배기방식
- 7) 조명시간 및 명암주기 : 08:00 ~ 20:00 조명 (12시간 점등 / 12시간 소등)
- 8) 조도 : 150 ~ 300 Lux

#### 1.5 사료 및 음수

- 1) 사료 종류 : 실험동물용 고형사료
- 2) 공급원 : (주)오리엔트바이오  
주 소 : 경기도 성남시 중원구 상대원동 143-1
- 3) 급이방법  
급이기에 고형사료를 넣고, 자유섭취 시켰다.
- 4) 오염물질의 분석 및 미생물 검사 : 사료 공급원에서 오염물질을 검사하여 제공한 자료를 이용하였다.
- 5) 음수 종류 : UV 멸균 및 필터를 이용하여 여과된 정제수
- 6) 급수 방법 : Polycarbonate 음수병 (250 ml)에 정제수를 넣어 자유섭취 시켰다.

#### 1.6 투여

- 1) 투여 경로

- 경구투여(시험물질, 음성대조물질), 복강내투여(양성대조군)
- 2) 투여 경로의 선정이유  
사람에 대한 노출 경로 중의 하나로서 경구투여를 선택하였다.
  - 3) 투여 방법  
존데를 사용하여 강제 투여하였다.
  - 4) 투여액량  
체중 측정일에 측정된 체중을 기준으로 투여액량을 계산하였다.
  - 5) 투여횟수 및 투여기간  
시험물질 및 용매(음성대조물질)는 경구로 1회/일을 1일간 투여하고, 양성대조군은 복강내 1회 투여하였다.

### 1.7 시험군 구성

군	성별	동물수 (마리)	동물번호	투여액량 (ml/kg)	투여량 (mg/kg)	투여 경로	투여 회수(회)
멸균증류수 (음성대조물질)	수컷	5	1M01~05	10	0	P.O.	1
염생식물(함초)	수컷	5	2M06~10	10	500	P.O.	1
염생식물(함초)	수컷	5	3M11~15	10	1000	P.O.	1
염생식물(함초)	수컷	5	4M16~20	10	2000	P.O.	1
MMC (양성대조물질)	수컷	5	5M21~25	10	1	I.P.	1

### 1.8 관찰 및 검사법

- 1) 일반증상  
투여 및 골수 채취 당일 실시하며, 일반상태의 변화, 운동성, 외관 등의 일반 증상과 사망동물의 유무를 관찰하였다.
- 2) 체중측정  
투여전과 골수채취 직전에 체중을 측정하여 기록하였다.

### 1.9 골수세포의 채취 및 도말검체 제작

골수세포의 채취는 시험물질의 최종 투여 후, 24시간후에 경추 탈골법으로 마우스를 안락사 시키고 대퇴골을 적출하여 근육을 깨끗이 제거한 후, 그 양 끝단을 가위로 절단하여 200 $\mu$ l의 우태아 혈청을 관류시켜 채취하였다. 채취한 골수를 4 $^{\circ}$ C, 1000 rpm에서 5분간 원심분리하고 상층액을 버린 후, 침전된 골수세포를 잘 부유시켜 소량을 슬라이드글라스에 낙하하고 도말하여 개체당 2 배의 골수도말검체를 제작하였다. 공기 중에서 충분히 건조한 다음 5% Giemsa액으로 염색하고 0.004% Citric acid에 담근 후 커버글라스를 씌워 배율 1000배의 현미경으로 관찰하였다.

### 1.10 시험결과의 분석

### 1) 검체판독

코드화된 검체에 대하여 동물개체별로 다염성적혈구 (PCE, Polychromatic erythrocyte)와 정염성적혈구 (NCE, Normochromatic erythrocyte)의 합이 200개가 되도록 계수하여 총적혈구 중 다염성적혈구의 비[PCE/(PCE+NCE)]를 구하였다. 이어서, PCE가 2000개가 되도록 계수하여 다염성적혈구 중 소핵다염성적혈구 (MNPCE, Micronucleated Polychromatic erythrocyte)의 비[MNPCE/(2000PCE)]를 구하였다.

### 2) 판단기준

소핵을 지닌 다염성 적혈구의 출현빈도가 음성대조군과 비교하여 통계적으로 유의하게 상승하고, 용량에 의존적으로 증가하거나 적어도 1개 이상의 용량군에서 통계적으로 유의한 재현성이 관찰될 때 양성으로 판정하였다.

## 1.11 자료의 통계처리

소핵의 유발빈도에 대해서는 Fisher's exact test를 이용하여 5% 유의수준에서 검증하였다. 다염성 적혈구의 출현빈도와 체중의 변화는 ANOVA test를 실시하여 5% 유의수준에서 통계적 유의성을 검증하였다.

## 2. 결과

### 2.1 소핵 유발빈도 (Table 1 and Appendix 1)

개체 당 2000개의 PCE를 관찰한 결과 MNPCE의 수는 음성대조군, 시험물질의 500, 1000, 2000 mg/kg 용량군에서 평균 1.2, 1.6, 1.6, 1.6이었다. 시험물질 투여군의 소핵 출현 빈도(MNPCE/2000PCE)에 대하여 음성대조군과의 차이를 조사한 결과 통계학적 유의한 증가가 나타나지 않았다. 한편 양성대조군에서는 MNPCE의 수가 평균 41.2으로 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가( $P < 0.001$ )를 나타냈으므로 본시험의 타당성을 입증하였다.

세포독성의 지표인 PCE/(PCE+NCE) 비율은 위와 같은 순서로 평균 0.54, 0.58, 0.58, 0.57 으로 모든 용량군에서 음성대조군과 유의적인 차이를 나타내지 않았다. ( $P > 0.05$ ). 양성대조군의 PCE/(PCE+NCE)비율은 0.53로 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

### 2.2 일반증상

시험물질 투여에 의한 사망동물은 관찰되지 않았고, 일반증상의 특별한 육안적 이상소견이 관찰되지 않았다.

### 2.3 체중 (Table 2 and Appendix 2)

각 군간의 체중을 비교한 결과 통계학적으로 유의한 차이는 관찰되지 않았다.



### 3. 고찰 및 결론

시험물질 염생식물(함초)의 유전독성을 평가하고자 마우스 골수세포를 이용한 소핵시험을 실시하였다. 약 8주령의 수컷 ICR 마우스를 각 군당 5마리씩 사용하였다. 공비 2로 하여 500, 1000, 2000 mg/kg의 3 용량으로 1회 경구 투여하였다. 음성대조군에는 멸균증류수를 10 mL/kg의 투여액량으로 1일 1회씩 1일간 경구 투여하였고, 양성대조군에는 Mitomycin C를 1 mg/kg 용량으로 1회 복강내 투여하였다. 시험물질, 음성대조물질, 양성대조물질을 최종 투여하고 약 24 시간 후에 골수세포를 수거하여 소핵 유발빈도와 다염성 적혈구 출현빈도를 평가하였다.

본 시험에 적용한 용량범위 내에서 개체 당 2000 개의 PCE를 대상으로 소핵을 계수한 결과 시험물질을 투여한 모든 투여군에서 음성대조군에 비해 농도 증가별 통계학적 유의한 증가는 관찰되지 않았다.

세포독성의 지표인 PCE/(PCE+NCE) 비율은 시험물질을 투여한 모든 투여군에서 평균 0.57 이상이었고, 500, 1000, 2000 mg/kg 용량군에서 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 변화는 관찰되지 않았다. 또한 일반증상에서 이상소견이 관찰되지 않았으며, 체중변화에 있어서는 통계학적으로 유의한 증가나 감소도 나타나지 않았다.

이상의 결과로 염생식물(함초)는 본 시험조건 하에서 마우스 골수세포에 소핵을 유발하지 않는 것으로 평가하였다.

### 4. 참고문헌

- (1) OECD : Principles of Good Laboratory Practice (1997년 7월 21일).
- (2) OECD : OECD guideline for the testing of chemicals, Section 4: chapter 474, Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France (1997년 7월 21일).
- (3) CAMBRIDGE University press : Basic mutagenicity tests, 5 In vivo cytogenetics assays, 115-137.

## 5. Tables

Table 1. Results of micronucleus test in male ICR mice

Treated Chemical	Dose mg/kg	Animals per group	MNPCE/2000 PCE (Mean ± SD)	PCE/(PCE+NCE) (Mean ± SD)
멸균증류수	0	5	1.20±1.79	0.54±0.02
염생식물(함초)	500	5	1.60±1.67	0.58±0.03
염생식물(함초)	1000	5	1.60±1.67	0.58±0.03
염생식물(함초)	2000	5	1.60±1.67	0.57±0.02
MMC	1	5	41.20±10.26*	0.53±0.02

멸균증류수 : Negative control

Data are Mean ± Standard deviation

PCE : Polychromatic erythrocyte

NCE : Normochromatic erythrocyte

MNPCE : Micronucleated polychromatic erythrocyte

MMC : Mitomycin C (Positive control)

\* : Significantly different from mice treated with vehicle ( $p < 0.001$ , Fisher's exact test)

Table 2. Body weight changes of male ICR mice

Treated Chemical	Dose mg/kg	Animals per group	Body weights(g) at the time of	
			1st Ad.	Sacrifice
평균증류수	0	5	35.52 ± 1.02	34.76 ± 0.97
염생식물(합초)	500	5	35.20 ± 1.00	34.40 ± 1.18
염생식물(합초)	1000	5	35.16 ± 1.13	34.84 ± 1.07
염생식물(합초)	2000	5	35.08 ± 1.23	34.38 ± 0.72
MMC	1	5	34.98 ± 1.20	34.16 ± 0.76

평균증류수 : Negative control

Data are Mean ± Standard deviation

MMC : Mitomycin C (Positive control)

## 6. Appendices

Appendix 1. Individual data of micronucleus test in male ICR mice

test substance	Dose mg/kg	Route	Animal I.D.	Counted PCE:NCE	PCE/ (PCE+NCE)	MNPCE/ 2000PCE
멸균 증류수	0	P.O.	1M01	109:91	0.55	0
			1M02	116:84	0.58	2
			1M03	106:94	0.53	0
			1M04	108:92	0.54	4
			1M05	105:95	0.53	0
			Mean±SD	-	0.54±0.02	1.20±1.79
염생식물(합초)	500	P.O.	2M06	117:83	0.59	2
			2M07	106:94	0.53	0
			2M08	116:84	0.58	0
			2M09	117:83	0.59	2
			2M10	124:76	0.62	4
			Mean±SD	-	0.58±0.03	1.60±1.67
염생식물(합초)	1000	P.O.	3M11	124:76	0.62	2
			3M12	112:88	0.56	2
			3M13	111:89	0.56	0
			3M14	111:89	0.56	4
			3M15	118:82	0.59	0
			Mean±SD	-	0.58±0.03	1.60±1.67
염생식물(합초)	2000	P.O.	4M16	117:83	0.59	4
			4M17	117:83	0.59	2
			4M18	113:87	0.57	2
			4M19	113:87	0.57	0
			4M20	110:90	0.55	0
			Mean±SD	-	0.57±0.02	1.60±1.67
MMC	1	I.P.	5M21	113:87	0.57	52
			5M22	108:92	0.54	38
			5M23	103:97	0.52	52
			5M24	105:95	0.53	30
			5M25	104:96	0.52	34
			Mean±SD	-	0.53±0.02	41.20±10.26

멸균증류수 : Negative control

MNPCE : Micronucleated polychromatic erythrocyte

PCE : Polychromatic erythrocyte

NCE : Normochromatic erythrocyte

MMC: Mitomycin C

Appendix 2. Individual data of body weight of male ICR mice

test substance	Dose mg/kg	Route	Animal I.D.	Body weight(g) at the time of	
				1st Ad.	Sacrifice
멸균증류수	0	P.O.	1M01	36.60	35.80
			1M02	36.50	35.80
			1M03	35.30	34.30
			1M04	34.20	33.80
			1M05	35.00	34.10
			Mean±SD	35.52±1.02	34.76±0.97
염생식물(함초)	500	P.O.	2M06	36.50	36.20
			2M07	35.80	34.90
			2M08	35.20	34.10
			2M09	34.50	33.40
			2M10	34.00	33.40
			Mean±SD	35.20±1.00	34.40±1.18
염생식물(함초)	1000	P.O.	3M11	36.50	36.40
			3M12	35.90	34.70
			3M13	35.20	35.00
			3M14	34.60	34.70
			3M15	33.60	33.40
			Mean±SD	35.16±1.13	34.84±1.07
염생식물(함초)	2000	P.O.	4M16	36.50	35.20
			4M17	35.90	35.00
			4M18	35.00	34.30
			4M19	34.70	33.90
			4M20	33.30	33.50
			Mean±SD	35.08±1.23	34.38±0.72
MMC	1	I.P.	5M21	36.20	35.30
			5M22	36.00	34.50
			5M23	34.80	33.60
			5M24	34.70	34.00
			5M25	33.20	33.40
			Mean±SD	34.98±1.20	34.16±0.76

멸균증류수 : Negative control

MMC : Mitomycin C

## 주 의

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