

**RTE(Ready To Eat) 채소류의 안전성 및 기능성 향상을  
위한 천연보존제 개발**

(Development of Natural Food Preservative for Promotion  
of Functionality and Safety of Ready To Eat Vegetables)

동국대학교

농 립 수 산 식 품 부

# 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “RTE(Ready To Eat) 채소류의 안전성 및 기능성 향상을 위한 천연 보존제 개발에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2012 년 7 월 10 일

주관연구기관명 : 동국대학교

주관연구책임자 : 성 정 석

세부연구책임자 : 성 정 석

연 구 원 : 고건, 고은비, 최경진

협동연구기관명 : 동국대학교

협동연구책임자 : 이 광 근

연 구 원 : 이동현, 서준호, 이은지

협동연구기관명 : (주) 세니젠

협동연구책임자 : 박 정 응

연 구 원 : 우동진

# 요 약 문

## I. 제 목

RTE(Ready To Eat) 채소류의 안전성 및 기능성 향상을 위한 천연보존제 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

건강 증진을 위한 웰빙식품에 대한 관심증가, 외식산업의 확대, 편이성 위주의 식습관 확산에 따라 신선편이 RTE(Ready To Eat) 채소식품류의 수요가 급증하고 있으며, 이들 채소류의 효과적인 유통과 안전성 제고를 위해 세척 및 보존을 위한 다양한 화학제제가 사용되고 있다. 채소류 수확 후 화학제제 처리는 유기농 농산물에 대한 상품 가치를 저하시키고 이들 화학적 방부제의 장기간 섭취로 초래될 인체 유해성으로 인해, 이를 대체할 수 있는 천연보존제의 개발이 요구되는 상황이다. 천연보존제는 식품첨가물, 의약품, 공업용 등으로 이용 범위가 넓으며, 관련 식품첨가물의 세계시장 규모는 1백억 달러로 매년 6%씩 성장하고 있다. 따라서 기능적 소재를 이용한 천연보존제 개발은 국민의 건강 증진에 기여함과 더불어 농산물 관리와 식품 유통의 효율성을 증대시키는 고부가가치 시장을 창출할 수 있다. 세계적으로 소비가 증가하고 있는 RTE 채소류에 효율적으로 적용할 수 있는 천연보존제 개발에 있어, 식인성 질병균 등에 대한 항균성 및 식품보존능에 대한 평가, 섭취 시 인체에 대한 안전성 및 기능성에 대한 평가, 소재의 식품학적 관능 및 경제성 평가 등을 종합적으로 고려하는 연구의 수행을 통해 경쟁력을 갖추는 천연보존제 개발이 필요하다.

본 연구에서는 신선편이 채소식품류 중 수요가 급증하고 있는 RTE 채소류의 미생물학적 안전성과 식품기능성을 높이기 위한 2종의 천연식품보존제를 개발하고 멀티기능성 부여를 통한 고부가가치 수출용 천연보존제를 시제품화하기 위해 6개의 단계적 연구목표를 설정하였다.

1. 천연한방소재 및 개화식물과 낙엽성수목을 포함한 식물유래 소재로부터, 0.1% 농도에서 10분 접촉 시 세균 수 90% 이상 감균력을 지닌 5종의 천연보존제 후보 추출물을 선별하고 이에 대한 멀티기능성(인체 항산화능 및 항암작용) 평가기법을 개발한다.
2. 선정된 5종의 천연보존제 후보 추출물/분획물 선별을 위해 식물유래 천연물로부터 추출/분획 조건에 대한 최적화 기법을 개발한다.
3. RTE 채소류에 대한 천연보존제 후보 분획물의 적용성(안전성, 효능, 관능평가 포함) 프로토타입을 개발한다.
4. 최종 2종의 천연보존제를 개발하고 이에 대한 시제품 생산을 위한 공정조건을 최적화한다.

5. 천연보존제의 항균성, 채소류 보존능, 식품관능, 기능성 평가를 통해 고부가가치 천연보존제 시작품의 멀티기능성을 확립한다.
6. 고부가가치 천연식품보존제의 항산화능 최적화를 통한 갈변 억제 및 신선도를 유지할 수 있는 복합 처리기술을 개발한다.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

#### 1. 천연추출물의 항균효능 평가

- 식품공전 및 문헌조사를 통한 식물유래 천연보존제 적용 대상 천연물 선정
- 후보물질 선별을 위한 추출법 개발(열수추출법, 중심합성계획법, Mini TAP통계법 수행)
- 천연추출물의 1차적 항균효능 평가(대상균: *E. coli*, *B. cereus*, *S. aureus*)
- 6가지 천연물 선별(감초, 육계, 목단피, 백작약, 오배자, 황련)
- 선정된 천연물 대상 항균효능 평가를 통한 추출조건 최적화
- 화학보존제와의 항균효능 비교평가(대상 화학제제: potassium sorbate, sodium benzoate, sodium carbonate, lactic acid)
- 항균효능 극대화를 위한 천연추출물의 최적 혼합조성비 산출
- 최종 천연보존제 적용 후보물질 선별(오배자, 백작약, 감초, 육계)

#### 2. 천연추출물의 안전성 검증

- 천연추출물의 1차적 안전성 평가(인체 및 동물세포 실험을 통한 세포생존율 영향 분석)
- 천연추출물의 인체안전성 평가(해부학적, 효소학적 평가)

#### 3. 천연추출물의 기능성 평가

- 천연추출물의 갈변도 억제효능을 통한 보존능 분석(라디칼 소거능 평가 및 채소류 갈변도 분석)
- 천연추출물의 항산화 효능 평가(산화적 손상에 대한 세포보호 효과 분자생물학적 분석)
- 천연추출물의 항암효능 평가(대상 세포주: 간암세포 HepG2, 자궁경부암세포 HeLa, 위암세포 AGS)
- 개별 천연물 추출물의 기능성 평가(백작약, 목단피, 소목, 백련, 생두, 갈매보리수나무 열매, 반지련 등)
- 최종 시제품의 기능성 평가(백작약, 오배자, 감초 혼합물)

#### 4. 천연추출물 유효성분의 정성·정량분석

- 선별된 천연추출물 유효성분의 정성·정량분석(감초-quercetin, 육계-cinnamic acid, 목단피-paeonol, 황련-berberine, 백작약-paeoniflorin, 오배자-gallic acid)

#### 5. 채소류 적용성 평가



- 선별된 천연물의 제품성 평가(관능평가 수행: 색, 향, 맛 평가)
- 천연보존제 후보물질 처리에 따른 식품 품질 평가(중량변화 측정)
- 최종 시제품의 채소류 적용성 평가(갈변도 억제 효능, 관능평가, 경도 변화 분석)

#### 6. 천연보존제 생산공정 개발 및 제품화

- 천연보존제 후보물질의 경제성 및 시제품화 시장성 분석(43가지 대상 천연물의 국내 확보 라인 및 제품화 조사)
- 천연보존제의 채소류 적용성 증대(Masking 기법 적용: 싸이클로덱스트린 첨가를 통한 천연보존제 제품성 평가)
- 천연보존제 formulation 선정 및 최종 시제품 제작(혼합추출물 90% - 백작약 : 오배자 : 감초 = 3 : 6 : 1, 정제수 5%, 싸이클로덱스트린 5%)

### IV. 연구개발결과

본 연구를 통해 신선편이 RTE 채소류에 대한 미생물학적 안전성 및 식품보존성을 높일 수 있는 2종의 천연식품보존제 개발을 수행하였다. 다양한 한방 천연물 및 약용식물들을 대상으로 항균능, 항산화능, 갈변 억제능, 항암효능 등의 멀티기능성 평가를 통해 천연물을 선정하고 이에 대한 추출 최적화 조건을 규명하였다. 채소류의 고유한 관능을 유지하고 보존성을 높이는 3종의 천연추출물(백작약 : 오배자 : 감초)에 대한 최적 기능성을 나타내는 배합비를 선정하고 식품 적용성 평가를 통해 기능성 침지형 및 분무형 타입의 천연보존제를 개발하였다. 각 단계별 연구개발 결과는 다음과 같다.

#### 1. 천연추출물의 항균효능 평가

##### 가. 식품공전 및 문헌조사를 통한 식물유래 천연물 43종 선정

- 천연보존제 적용 항균성 물질 추출을 위해 식품공전 및 문헌조사를 통한 식물유래 천연물 (한방천연물 20종, 개화식물 14종, 수목류 9종) 총 43종을 선정.

##### 나. 천연보존제 후보물질의 스크리닝 및 항균효능 평가기법 구축

- 천연보존제 후보 천연물을 선별하기 위한 rapid screening 기법을 구축함. 대상 시료의 1차적 항균효능을 평가할 수 있는 screening 기법을 구축·평가하고, 유효물질의 최적화를 위한 2·3차 screening 기법을 적용하여 기능성 및 안전성을 제고할 수 있는 효율적인 screening 기법을 구축.

##### 다. 후보물질 선별을 위한 추출법 개발

- 식품 적용성과 항균성을 평가하기 위해 1차적으로 열수추출법에 의해 다양한 천연물의 추출물 제조. 선별된 43종의 한방천연물, 개화식물 및 수목류를 각각 분쇄하여 용매추출이 최적화 될 수 있도록 만든 후, 농축된 추출물을 필터링하고 동결건조하여 파우더 형태화 함.

- 추출기법 최적화를 위해 통계 프로그램인 중심합성계획법을 적용함. 분쇄한 후보물질에 증류수와 에탄올의 비율을 100%, 50%, 0%로 제조하여 가하고 수직환류냉각관을 부착한 후, 각 온도에서 일정시간 추출함. 분쇄된 후보물질은 추출용매(에탄올 100%, 에탄올 50%, 에탄올 0%), 추출온도(60, 70, 80 °C), 추출시간(60, 120, 180분)에 따라 추출함.
- 중심합성계획법에 적용한 15가지의 추출조건으로부터 얻은 항균효능 및 수율을 Mini TAP 통계프로그램에 대입하여 각 후보물질마다 최적의 추출조건을 적용균주와 수율에 따라 각각 다르게 산출함.

#### 라. 천연추출물의 1차적 항균효능 평가

- 천연추출물의 1차적 항균효능 평가를 위해 대표적인 식품오염 지표균인 *E. coli*, *B. cereus*, *S. aureus*를 선정. *E. coli*에 대한 추출물의 항균효능 평가결과, 감초, 육계, 목단피, 백작약, 오배자, 황련 6가지 천연물이 *E. coli*에 대해서 탁월한 항균효능이 있는 것으로 평가됨. *B. cereus*에 대한 추출물의 항균효능 평가결과, 감초, 육계, 목단피, 반지련, 백작약, 소엽, 오매, 오배자, 유자, 황련, 갈매보리수, 백련 12가지 천연물이 *B. cereus*에 대해서 탁월한 항균효능이 있는 것으로 평가됨. *S. aureus*에 대한 추출물의 항균효능 평가결과, 감초, 육계, 목단피, 반지련, 백작약, 오배자, 황련, 녹차, 소목, 생두 10가지 천연물이 *S. aureus*에 대해서 탁월한 항균효능이 있는 것으로 평가됨.
- 1차적 항균효능 평가 결과, 3가지 대상균에 대해 공통적으로 뚜렷한 항균효능을 나타낸 천연물은 감초, 육계, 목단피, 백작약, 오배자, 황련으로 해당 6가지 천연물을 1차적으로 선정.

#### 마. 대상 천연물 추출물에 대한 2, 3차적 항균효능 평가를 통한 최적 추출조건 선정

- 중심합성계획법에 의거한 15가지 조건, Mini TAP 통계프로그램에 의거한 5가지 조건 등 총 20가지 조건에서 분리한 추출물의 항균효능을 평가하여 1차적으로 선별된 6가지 천연물의 최적화 추출조건을 선정함.

#### 바. 천연물 추출물과 화학보존제와의 항균효능 비교 평가

- 국내 및 식품수입에 주로 쓰이는 화학보존제 성분과 6가지 천연추출물의 항균효능 비교를 통해, 향후 대상 천연추출물의 천연식품보존제로서의 적용성 및 타당성을 평가함. 4가지 화학보존제 성분 모두 3가지 대상균에 대해 항균활성을 나타냈으나, 대상균에 특이적 항균활성을 보인 감초, 육계를 제외한 나머지 천연물 모두 화학보존제 성분보다 뛰어난 항균효능을 보이는 것으로 분석됨. 이를 통해 이들 천연물의 배합으로 개발되는 천연보존제에 대해 우수한 항균효능 및 안전성을 보유하는 식품보존제 성분으로서의 활용성을 검증함.

#### 사. 항균효능 극대화를 위한 최적의 혼합조성비 산출

- 선정된 6가지 천연물의 최적화 추출물을 다양한 조성비 비율로 혼합하여 최대의 항균효능을 보이는 최적의 조성비 formulation을 선정하여 천연보존제를 개발하고, 각각의 식품 위해균에 대해 항균효능을 평가함. 감초, 목단피, 황련을 혼합하고, 오배자, 백작약, 육계를 혼합한 결과, 감초 : 목단피 : 황련 = 1 : 2 : 7, 오배자 : 백작약 : 육계 = 7 : 2 : 1 일 때 항균활성이 가장 우수함을 확인함.

아. 천연보존제 적용 최종 물질 선정을 통한 천연보존제 제조 및 항균효능 최적화

- 항균효능, 인체 안전성, 항산화 및 항암 기능성, 관능평가에 의한 제품성, 경제성을 포함한 5가지 항목에 대해 각 천연추출물과 혼합추출물을 평가한 결과를 바탕으로, 오배자, 백작약, 감초, 육계 총 4가지 천연물을 최종 후보물질로 선정하고, 이들의 최적 혼합 조성비를 산출하여 주요 채소류 오염균에 대한 99.9%의 항균능을 가지는 천연보존제를 제조함.

## 2. 천연추출물의 안전성 검증

가. 세포 대상 천연추출물의 1차적 안전성 평가

- 선별된 6가지 천연물을 정상 세포주인 쥐 배아 섬유아세포에 처리하여 1차적 인체안전성을 세포실험을 통해 평가한 결과, 추출물의 독성이 전반적으로 약하거나 거의 영향을 미치지 않음을 확인하였고, 오배자와 황련의 경우, 실제 인체의 표면적(대상시료의 농도/인체 표면적)을 고려할 경우 독성이 미약할 것으로 분석됨.

나. 동물실험을 통한 천연추출물의 인체안전성 평가

- ICR mouse를 대상으로 천연추출물의 독성 및 인체안전성 평가를 수행함. 해부학적 평가를 위해 천연물 추출물을 투여한 후 몸무게 및 간 무게의 변화량을 측정된 결과, 6가지 천연물 모두 안전한 것으로 평가됨. 효소학적 평가를 위해 ALT 및 AST 효소의 활성을 측정된 결과, ALT 효소에 대해서는 6가지 천연물 처리 결과 모두 적정수치 내에 포함되었으며, AST 효소에 대해서는 감초와 육계를 제외한 목단피, 황련, 오배자, 백작약 4가지 천연물이 적정수치 내에 포함됨. 급성실험에서 나온 수치를 식품첨가물로 섭취하는 장기적 복용 용량으로 환산하고, 제품화시 20배 이상 희석되는 추출물 농도를 적용할 경우 감초와 육계도 안전성이 유효한 것으로 평가됨. 따라서 6가지 천연물 추출물에 대한 해부학적 효소학적 인체안전성을 확보함.

## 3. 천연추출물의 기능성 평가

가. 천연추출물의 라디칼 소거능 평가를 통한 갈변억제 효과 분석

- 천연추출물의 갈변억제 효능을 평가하기 위해 천연물의 DPPH radical 소거능력을 통한 산화방지 능력을 평가한 결과, 6가지 천연물 모두 라디칼 소거능을 지닌 것으로 확인됨. 특히 목단피, 오배자, 백작약추출물의 경우, 0.1 mg/mL의 낮은 농도에서도 라디칼 소거능이 70% 이상임을 확인하였고, 백작약추출물이 가장 뛰어난 라디칼 소거능을 보이는 것을 확인함. 위 결과를 통해 6가지 천연추출물 모두 라디칼 소거능을 가짐으로서 갈변 방지 효능에 적합한 소재임을 확인함.

나. 천연추출물의 세포 내 항산화 효능 평가

- 배양 동물 및 인간 세포에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 산화적 스트레스를 유발한 후, 천연물을 처리하여 배양함. Trypan blue로 염색한 후, 세포수를 측정하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 유도하는 산화적 손상에 대해 각 천연물이 세포보호 효과를 나타내는지 세포 생존율, 세포사멸 apoptosis 완화능, 세포주기 조절기전 분석을 통해 평가한 결과, 백작약, 목단피, 소목, 백련, 생두, 갈매보리수나무

열매, 반지련 등 천연물의 추출물이 산화적 세포 손상에 대해 보호 효능이 뛰어나다는 점을 규명함.

#### 다. 천연추출물의 항암효능 평가

- 인간 간암세포(HepG2), 자궁경부암세포(HeLa), 위암세포(AGS)에 천연물 처리 후, MTT assay를 통해 세포 생존율과 이와 관련된 지표물질을 평가함. 백작약, 목단피, 소목, 반지련추출물이 농도 의존적으로 간암세포와 자궁경부암세포에 대해 세포 생존율을 감소시키는 것을 확인함. 특히 간암세포에 대해서는 감초추출물이, 자궁경부암 세포에 대해서는 감초와 목단피추출물의 효능이 가장 뛰어남을 규명함.

#### 라. 혼합추출물의 기능성 평가

- 항균성 및 갈변억제능이 우수한 천연물 혼합물과 최종 천연보존제 제품에 함유된 추출물 혼합물(백작약 : 오배자 : 감초)에 대한 라디칼 소거능 평가 결과, 합성항산화제 대비 우수한 항산화능을 나타냈고, 산화적 손상에 대한 세포보호 효과도 2배 향상시킬 수 있음을 확인함. 천연추출물 혼합물 처리 시 암세포주에 대한 세포증식 억제 효과를 확인하였고 암세포 사멸과 관련된 분자마커의 변화 규명을 통해, 선정된 천연물 추출혼합물과 최종 천연보존제 제품의 기능성을 검증함.

### 4. 천연추출물 유효성분의 정성·정량분석

#### 가. 선별된 천연추출물 유효성분의 정성·정량분석

- 선별된 6가지 천연물의 유효성분을 HPLC를 이용해 분석함. 항산화 및 항균과 관련된 감초의 유효성분인 quercetin, 육계의 유효성분인 cinnamic acid, 목단피의 유효성분인 paeonol, 황련의 유효성분인 berberine, 백작약의 유효성분인 paeoniflorin, 오배자의 유효성분인 gallic acid에 대해 정성·정량적으로 분석함으로써, 기능성에 대한 천연물별 지표물질을 검출함.

### 5. 채소류 적용성 평가

#### 가. 선별된 천연물의 제품성 평가

- 제품성 평가는 적용성 평가 후, 색, 향, 맛 등을 관능평가 함으로써 이루어짐. 당근에 천연물을 처리한 후 기호도를 조사한 결과, 목단피, 황련, 육계는 한약재 특유의 향으로 인하여 낮은 점수를 평가 받았고 황련의 경우 색소성분이 관능평가 시료의 고유의 색을 변질시켜 점수가 낮게 평가됨. 감초, 오배자, 백작약이 비교적 높은 평가를 받음.

#### 나. 천연보존제 후보물질 처리에 따른 식품 품질 평가

- 천연물 처리에 따른 중량 변화를 측정하기 위하여 상추, 피망, 오이를 천연물에 침지시킨 후, 시간 변화에 따른 중량 변화를 측정함. 오배자추출물 처리 시, 상추의 중량변화가 가장 적었으며, 목단피추출물 처리 시, 피망, 오이의 중량변화가 가장 적었으나 대조군과 비교해서 유의적 차이는 없음을 확인함.

#### 다. 시제품의 식품 보존능 및 적용성 평가

- 천연추출물 처리 후 채소 및 과일류 표면색도 변화를 통한 갈변도 억제 효능 평가를 실시함. 콜라비, 사과, 화이트로즈에 최종 후보물질인 감초, 오배자, 백작약, 육계추출물을 처리한 결과, 백작약, 오배자, 감초 혼합추출물과 오배자, 육계 혼합추출물이 우수한 효능을 나타내어 최종 시제품 선택에 있어 판단의 근거로 채택함.
- 관능평가를 위해 양상추, 당근, 방울토마토에 다양한 혼합추출물 처리 후, 외관, 향, 맛, 씹힘성, 전체적인 기호도를 평가한 결과, 백작약, 오배자, 감초 혼합추출물이 가장 우수한 효능을 나타내어 최종 시제품 선택에 있어 판단의 근거로 채택함.
- 갈변도 억제 및 경도 변화 측정에 있어서도 최종 개발된 천연보존제(백작약, 오배자, 감초 혼합추출물)가 가장 우수한 성능을 나타내었으며, 분무방식보다 침지방식의 효능이 더 탁월한 것으로 평가됨.

### 6. 천연보존제 생산공정 개발 및 제품화

#### 가. 천연보존제 시장 경쟁력 분석

- 연구에 적용된 43가지 대상 천연물의 국내 확보라인을 조사한 결과, 다양한 루트를 통하여 비교적 저가의 해당 천연물을 확보할 수 있음. 또한 선별된 천연물 중 감초를 제외한 나머지 천연물에 대해서는 제품화 경력이 없어 제품화할 시 높은 시장성과 제품화 적용가능성이 높을 것으로 분석됨.

#### 나. 천연보존제의 식품 적용성 증대기법 개발

- 천연물이 가지는 고유의 향을 억제하는 masking기법에 의한 저감화 방식을 적용함. 열과 산·염기에 대해서 안정하며 식품의 저장성을 향상시켜주는 masking제제로서 천연 식품 첨가물인 싸이클로덱스트린(cyclodextrin)을 선정하고, 최종 천연보존제에 첨가함으로써 이취를 제거하고 천연추출물 본연의 향균효능을 유지할 수 있는 식품 적용성을 최적화함.

#### 다. 천연보존제 시제품 제작

- 다양한 혼합추출물의 향균효능, 관능, 기능성, 안전성, 경제성을 종합적으로 고려하여 최종 천연보존제 시제품을 제작함. 최종 시제품의 성분함량은 혼합추출물(백작약 : 오배자 : 감초 = 3 : 6 : 1) 1.0 mg/mL 용액 90%, 정제수 5%, 싸이클로덱스트린 5% 비율의 formulation으로 제조하고, 채소류의 대용량 세척 시 적용할 수 있는 침지형 농축액과 가정에서 편리하게 적용할 수 있는 분무식 희석액으로 시제품을 제작함.



<최종 제작된 침지식 및 분무식 타입의 천연보존제 시제품>

## V. 연구성과 및 성과활용 계획

### 1. 연구성과

- 가. 채소류 세척 및 보존에 사용되는 화학보존제에 대한 자연친화적 대체재 개발.
- 나. 고부가가치 기능성 천연보존제 시제품화.
- 다. 한방천연물 및 약용작물의 항균능, 항산화능, 식품 보존효과에 대한 종합적 분석자료 제시.
- 라. 천연물 기능성에 대한 연구결과를 토대로 SCI 5편 및 학진등재 3편의 연구논문 투고발표.
- 마. 천연물을 이용하는 식품 위해세균 항균성 증대 및 보존성 향상에 대한 3건의 특허출원.
- 바. 산학 연계 공동 제품개발을 통한 기술교류.
- 사. 천연보존제의 다양한 평가기법 개발을 통한 웰빙 식품산업 관련 기술의 선진화.

### 2. 성과활용

- 가. 천연물 소재를 활용하는 식품 적용 천연보존제는 현재 국내외적으로 체계적인 상품화 연구가 진행되지 않은 상황으로, 본 사업을 통하여 개발된 안정성과 기능성을 보유하는 천연보존제에 대한 지적재산권 기술이전을 실시하여 친환경농산물 유통 및 관리 시장에 진출.
- 나. 국내 한방천연물의 항균 및 기능성 효능에 관련된 특허 출원으로 지적재산권을 확보함으로써 향후 국외기업 등으로의 기술이전을 통한 로얄티 확보 및 해외수출 모색.
- 다. 기존에 사용되고 있는 화학식품보존제는 강력한 산화력으로 오히려 채소류의 갈변을 촉진시켜 보존능 및 유통기한을 감축시키는 결과를 초래함. 반면 본 연구에서 개발된 제품 중 하나인 고기능성 분사식 천연보존제는 소비자가 가정에서 채소류에 직접적으로도 적용이 가능하며, 이를 통해 장기간 항균·항산화 효과에 의한 채소의 보존능을 높일 수 있고, 식품안정성과 부가적인 기능성 또한 높여 웰빙시대에 경쟁력 있는 제품으로서 시장성이 높음.
- 라. 신선편이 채소류의 식품안전성을 제고할 수 있는 신개념의 천연보존제 개발 및 처리는 수요가 증대되고 있는 포장용 신선편이 채소류 제품의 매출신장으로 이어져 국내 채소 생산농가의 소득증대 및 수출 증대에 기여할 것임.
- 마. 신선채소 적용 천연보존제를 추출/분획하는 기술을 개발함으로써 다양한 천연물 소재 유효성분 추출/검증에 대한 고유기술을 확보할 수 있으며, 본 연구에서 적용된 소재의 효능에

대한 최적화 추출기법 연구는 천연유래 소재를 활용하는 기타 기능성 식품류 및 첨가물 개발에 있어 기능성을 향상시킬 수 있는 기법을 제시함.

바. 본 사업을 통해 개발된 식물유래 한방약용 작물을 대상 원료로 하는 천연보존제 추출 생산 기술은 다양한 기능성 작물을 대상으로 하는 농업 분야뿐만 아니라, 약용작물을 적용하는 신약 개발 등의 의료보건 기술 분야에 신기술을 보급하는 효과를 파생시킬 것임.



# SUMMARY

## I. Title

Development of natural food preservative for promotion of functionality and safety of Ready-To-Eat vegetables

## II. Objectives and necessities of the research

The market demand for Ready-To-Eat (RTE) vegetables has been soaring due to growing interests in wellness food for health promotion and expansion of food service industry with increasing demand for convenience for food. To assure effective distribution and safety of RTE foods, numerous chemical agents have been applied. However, treatments of fresh vegetables with chemical agents not only cause a decrease in the value of goods but also results in a deleterious effects on health by long-term accumulation of harmful chemicals. Therefore, it is required to develop natural food preservatives alternative to chemical preservatives. The world market of natural food preservatives is about \$ 10 billion and growing 6% annually, and its application are varied as food additives, medicinal drugs, and industrial materials. Development of natural food preservative with additional functionalities will contribute to national health promotion as well as opening new market for value-added agricultural products. In the development of natural food preservative for RTE vegetables, it is necessary to determine antimicrobial properties against bacteria causing food-borne diseases, effectiveness for food preservation, sensory evaluation of food, and economic evaluation.

Objectives of this study is to develop two types of natural food preservatives that provide food functionalities and antimicrobial safety for RTE vegetables, which market demands are rapidly growing. In order to develop prototype of natural food preservatives with multi-functionalities as a high-value export product, the following six phased research objectives are set.

1. To determine 5 natural products, among natural materials used in oriental medicine and plant-derived materials including deciduous trees, which are applicable to natural food preservatives based on their antibacterial activities that provide 90% reduction of bacterial growth, and to develop the methodology for evaluation of multi-functionalities (anti-oxidative and anti-cancer activity in human).
2. To develop the methodology for optimization of the process for extracting and selecting

effective fractions from 5 selected natural materials.

3. To develop protocols utilized in the evaluation of selected natural materials for the application to natural food preservative for RTE vegetables, with respect to their safety, functionality, and sensory characteristics.
4. To develop final 2 types of natural food preservatives and optimize formulation and process conditions.
5. To establish multi-functionalities of the value-added natural food preservatives by evaluating anti-bacterial activities, and effectiveness as food preservatives, sensory satisfaction by consumers, and additional functional activities.
6. To develop the processing technology to prevent browning of RTE vegetables using natural food preservatives by optimization of its anti-oxidative properties.

### III. The contents and range of the research

1. Evaluation of antibacterial activities for natural product extracts
  - Selection of natural products subjected to development of natural food preservatives based on literature study and Korean Food Code
  - Development of extraction methods for selecting effective natural products (aqueous extraction method, central composite design, Mini-TAP statistical analysis)
  - 1st evaluation for antibacterial activities of natural product extracts (target bacteria: *E. coli*, *B. cereus*, *S. aureus*)
  - Selection of 6 natural products (*Glycyrrhiza uralensis*, *Cinnamomum cassia*, *Paeonia suffruticosa*, *Paeonia japonica*, *Galla rhois*, *Coptis chinensis*)
  - Optimization of extraction conditions and methods by evaluation of antibacterial activity of selected natural products
  - Comparative analysis for antibacterial properties of natural products and chemical preservatives (potassium sorbate, sodium benzoate, sodium carbonate, lactic acid)
  - Determination of optimal mixing ratio of the natural product extracts for maximizing antibacterial effects
  - Selection of final natural products applicable to developing natural food preservative (*Galla rhois*, *Paeonia japonica*, *Glycyrrhiza uralensis*, *Cinnamomum cassia*)
2. Evaluation of safety for natural product extracts
  - 1st evaluation for safety of natural product extracts (analysis of the effects of extract

treatment on the viability of human and mammalian cells)

- Evaluation of safeness of natural products on human health (anatomical and enzymatic analysis)

### 3. Evaluation of functionalities of natural product extracts

- Analysis of the effects of natural product extracts on food preservation by evaluating anti-browning activities (analysis of radical scavenging activity and the effects on browning characteristics of vegetables)
- Evaluation of antioxidative effects of natural product extracts (cellular and molecular analysis of cytoprotective effects on oxidatively damaged cells)
- Evaluation of anticancer effects of natural product extracts (target cancer cell line: HepG2, HeLa, and AGS)
- Evaluation of functionalities of individual natural product (*Paeonia japonica*, *Paeonia suffruticosa*, *Caesalpinia sappan*, *Hippophae rhamnoides* fruit, *Scutellaria barbata*, *Nelumbo nucifera* Gaertner, *Coffee Arabica* green bean etc.)
- Evaluation of functionalities of the developed natural food preservative (extract mixtures of *Paeonia japonica*, *Galla rhois* and *Glycyrrhiza uralensis*)

### 4. Qualitative and quantitative analysis of active components in natural products

- Analysis of active components in the extracts of selected natural products (*Glycyrrhiza uralensis*-quercetin, *Cinnamomum cassia*-cinnamic acid, *Paeonia suffruticosa*-paeonol, *Coptis chinensis*-berberine, *Paeonia japonica*-paeoniflorin, *Galla rhois*-gallic acid)

### 5. Evaluation of natural products for the application compatibility with vegetables

- Evaluation of selected natural product extracts for the product compatibility (Sensory test for color, fragrance, and taste)
- Evaluation for the effects of the treatment vegetables with natural product extracts on food quality (measurement of the changes of product weight)
- Evaluation of natural preservative prototype for the application compatibility with RTE vegetables (analysis of anti-browning effect, sensory characteristics, and effects on vegetable texture)

### 6. Development of the product line of natural food preservative prototype

- Economic and marketability analysis of natural products (research on domestic supply and product development for 43 natural materials)
- Optimization of application properties of natural food preservative prototype (application of masking method: analysis of application properties of cyclodextrin)
- Determination of the formulation of natural food preservative prototype (90% of mixture of *Paeonia japonica* : *Galla rhois* : *Glycyrrhiza uralensis* at 3 : 6 : 1, 5% pured water, 5% cyclodextrin)

## IV. Results of research development

In this study, we developed two types of natural food preservatives that provide food functionalities and antimicrobial safety for RTE vegetables. Selection of target natural materials was carried out by screening of various medicinal plants and natural materials by evaluating their multi-functionalities including antibacterial, antioxidative, anti-browning, and anticancer activities, and the methodology for optimizing extraction of natural products was developed. Mixing formulation of three natural product extracts (*Paeonia japonica* : *Galla rhois* : *Glycyrrhiza uralensis*) in natural food preservative prototype was determined to maximize properties for preservation and sensory characteristics of vegetables. Final prototypes of natural food preservative were developed as immersion type and spray type, based on the results of evaluation for the application compatibility to vegetables. Overall results of this study are as follow.

### 1. Evaluation of antibacterial activities for natural product extracts

#### a. Selection of 43 natural products

- Total 43 classes of natural products were selected to extract antibacterial materials applicable to based on literatures and Korean Food Code (20 natural products used in oriental medicine, 14 flowering plants, 10 deciduous trees).

#### b. Establishment of protocols for evaluation of antibacterial activities and screening of natural products

- Rapid screening methodology was developed to select appropriate natural product extracts. Primary screening for antibacterial effect and second and third selection screening processes for optimization of effective properties were applied to assure safety and functionalities of natural food preservative.

#### c. Development of methodology for extraction of natural materials

- In order to test antibacterial and application properties of natural products, aqueous extraction method was developed and applied. To obtain extracts from natural products, extraction was carried out and dried pellet of extracts was collected, solubilized, and filtered to obtain final powder form of extract.
- To optimize the extraction conditions, a statistical program called central composite design was applied. Candidate natural products were smashed and treated with 100%, 50%, and 0% ethanol mixed with water, and extracted with various solvents (100%, 50%, and 0% ethanol), temperatures (60, 70, 80 °C), and times (60, 120, 180 min).
- Based on the central composite design analysis, 15 different extracts obtained from various conditions were analyzed for antibacterial effects and extraction yields to

determine optimal extraction condition that assures maximal antibacterial activity and yields for each natural products, respectively.

d. Evaluation of 1st antibacterial effects of natural product extracts

- Target bacteria for testing antibacterial effects were *E. coli*, *B. cereus*, *S. aureus*. Evaluation of antibacterial activities of each extract of natural products results in significant effects on the growth inhibition of *E. coli* by 6 natural products, *Glycyrrhiza uralensis*, *Cinnamomum cassia*, *Paeonia suffruticosa*, *Paeonia japonica*, *Galla rhois*, and *Coptis chinensis*. Antibacterial activities against *B. cereus* was determined in 12 natural products, *Glycyrrhiza uralensis*, *Cinnamomum cassia*, *Paeonia suffruticosa*, *Scutellaria barbata*, *Paeonia japonica*, *Folium perillae*, *Mume fructus*, *Galla rhois*, Yuza fruit, *Coptis chinensis*, *Hippophae rhamnoides*, and *Nelumbo nucifera* Gaertner. Significant antibacterial activities against *S. aureus* was determined in 10 natural products, *Glycyrrhiza uralensis*, *Cinnamomum cassia*, *Paeonia suffruticosa*, *Scutellaria barbata*, *Paeonia japonica*, *Galla rhois*, *Coptis chinensis*, *Camellia sinensis*, *Caesalpinia sappan*, and *Coffee Arabica* green bean.
- Significant antibacterial activity against all three species of bacteria was determined by 1st screening and 6 candidate natural products were initially selected to apply for natural food preservative; *Glycyrrhiza uralensis*, *Cinnamomum cassia*, *Paeonia suffruticosa*, *Paeonia japonica*, *Galla rhois*, and *Coptis chinensis*.

e. Determination of optimal extraction condition of selected natural products by 2nd and 3rd evaluation of antibacterial activities

- Total 20 different extraction condition (15 by central composite design and 5 from Mini TAP) for each selected natural product was applied to obtain various extracts of natural materials, which were then evaluated for its antibacterial activities to define optimal extraction condition.

f. Comparative analysis for antibacterial properties of natural products and chemical preservatives

- Chemical food preservatives in global and domestic market and 6 selected natural product extracts were tested for their antibacterial activities. All 4 chemical food preservatives showed antibacterial properties on all three species of bacteria. Significantly higher antibacterial activity on all three species of bacteria were determined from the extracts of 6 selected natural product, while *Glycyrrhiza uralensis* and *Cinnamomum cassia* extract showed specific antibacterial activity on *E. coli*. These results suggest that the natural food preservative developed as mixture of these natural product extracts will provide effective antibacterial activity and safety.

g. Determination of optimal mixing ratio of the natural product extracts for maximizing

antibacterial effects

- Mixing formulation of 6 selected natural product extracts were varied and determined which formulation provide optimal antibacterial properties. The ratio of each materials showing optimal activity are as following; *Glycyrrhiza uralensis* : *Paeonia suffruticosa* : *Coptis chinensis* = 1 : 2 : 7, *Galla rhois* : *Paeonia japonica* : *Cinnamomum cassia* = 7 : 2 : 1.

h. Selection of final natural products applicable to developing natural food preservative prototype

- Based on the results from evaluating antibacterial activity, safety, antioxidative and anticancer properties, and sensory characteristics, 4 natural products (*Galla rhois*, *Paeonia japonica*, *Glycyrrhiza uralensis*, *Cinnamomum cassia*) were selected, and applied to develop the natural food preservative prototype that exhibit 99.9% bacterial killing effects for all three bacteria.

2. Determination of safety for natural product extracts

a. 1st evaluation for safety of natural product extracts

- Treatment of mouse embryonic fibroblast cells with the extracts obtained from 6 selected natural products resulted in no significant effects on the cell viability, suggesting these natural products do not contain cytotoxic properties.

b. Animal tests for safeness of natural products on human health

- ICR mouse were subjected to test long-term effects of natural products on human health. Analysis of effects on the body weight and liver of mouse fed with natural product extracts showed no significant changes. Enzymatic analysis for ALT and AST in these mouse showed normal level of each enzyme, while mouse treated with the extracts from *Glycyrrhiza uralensis* and *Cinnamomum cassia* showed slightly increased level of both enzymes. However, large volume of titration of such extracts in the product can avoid such deleterious effects. Therefore, anatomical and enzymatic analysis in animal tests provide safeness of 6 selected natural product.

3. Determination of functionalities of natural product extracts

a. Analysis of anti-browning activities by evaluation of radical scavenging properties of natural product extracts

- To determine anti-browning effects, DPPH radical scavenging assay was performed and determined strong radical removal activity present in natural product extracts. In particular, the extract from *Paeonia suffruticos*, *Galla rhois*, and *Paeonia japonica* exhibits most significant radical scavenging activity at low concentration of 0.1

mg/mL. All 6 tested natural product extracts exhibit radical removal effects applicable to anti-browning materials.

b. Evaluation of antioxidative effects of natural product extracts

- Cultured mammalian cells were damaged by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment, and incubated with natural product extracts. Counting of viable cells stained with trypan blue showed that the treatment with natural product extracts attenuated cell death induced by oxidative stress. Analysis of cell viability, apoptotic cell death, cell cycle regulation showed that the extracts from *Paeonia japonica*, *Dioscorea batatas*, *Paeonia suffruticosa*, *Hippophae rhamnoides*, *Coffea Arabica* green bean, and *Nelumbo nucifera* Gaertner exhibit cytoprotective effects on oxidatively damaged cells.

c. Determination of anticancer effects of natural product extracts

- Cell proliferation and the expression level of marker proteins were analyzed after treatment of cancer cells including HepG2, HeLa, and AGS with natural product. Extracts from *Paeonia japonica*, *Scutellaria barbata*, *Paeonia suffruticosa*, and *Caesalpinia sappan* exhibit inhibitory effects on the cell proliferation of HepG2 and HeLa. In particular, most effective anticancer activities were found in *Glycyrrhiza uralensis* for HepG2, and *Glycyrrhiza uralensis* and *Paeonia suffruticosa* for HeLa.

d. Evaluation of functionalities of the developed natural food preservative prototype

- Natural food preservative prototype containing mixtures of *Paeonia japonica*, *Galla rhois* and *Glycyrrhiza uralensis* extracts were tested for antioxidative effect and showed better antioxidative activity compared to chemical preservative as well as attenuating cytotoxicity induced by oxidative stress. Anticancer activity of the prototype was also confirmed by determination of molecular markers related with cancer cell proliferation.

4. Analysis of active components in natural products

a. Qualitative and quantitative analysis of active components in selected natural products

- HPLC analysis of active components in the extracts of selected natural products confirmed effects of each natural products related with each component; *Glycyrrhiza uralensis*-quercetin, *Cinnamomum cassia*-cinnamic acid, *Paeonia suffruticosa*-paeonol, *Coptis chinensis*-berberine, *Paeonia japonica*-paeoniflorin, *Galla rhois*-gallic acid.

5. Determination of application compatibility with vegetables

a. Determination of natural product extracts for the product compatibility

- Selected natural product extracts were tested for sensory characteristics of color,

fragrance, and taste. Treatment of carrot with each extract and following sensory test resulted in lower scores for *Paeonia suffruticosa*, *Coptis chinensis*, and *Cinnamomum cassia* caused by their distinct fragrance, in particular, color changes by *Coptis chinensis*. Higher scores sensory test were obtained for *Glycyrrhiza uralensis*, *Galla rhois*, and *Paeonia japonica* extracts.

b. Effects of natural product extracts on food quality

- Treatment of lettuce, paprika and cucumber was performed by immersion of samples in the natural product extracts or prototype solution, and the changes of vegetable weight were measured. Reduction of product weight was observed less in lettuce by *Galla rhois* extract, and less in paprika and cucumber by *Paeonia suffruticosa*, while no significant changes in overall.

c. Evaluation of natural preservative prototype for the application compatibility with RTE vegetables

- Anti-browning effect of the extracts of *Glycyrrhiza uralensis*, *Galla rhois*, *Paeonia japonica*, *Cinnamomum cassia* was tested on kohlrabic, apple, and white rose. The mixture of *Paeonia japonica*, *Galla rhois* and *Glycyrrhiza uralensis* and the mixture of *Galla rhois* and *Cinnamomum cassia* displayed most effective anti-browning properties, which provide the principle for the selection of natural products subjected in prototype natural preservative.
- Sensory test for the treatment with various extract mixtures was carried out for lettuce, carrot, and tomato. The mixture of *Glycyrrhiza uralensis*, *Paeonia japonica*, *Galla rhois*, and *Cinnamomum cassia* was selected.
- Determination of texture changes of vegetables and analysis of anti-browning effects indicated that the mixture of *Paeonia japonica*, *Galla rhois*, and *Glycyrrhiza uralensis* provide best functionalities for food preservative. Immersion of vegetables in the mixture appeared to give better effects compared to spray-type application.

6. Development of the product line of natural food preservative prototype

a. Economic and marketability analysis

- All 43 natural products initially applied in this study appeared to be obtainable easily with low price through various routs. Except *Glycyrrhiza uralensis*, few products with application of food preservative using natural products selected in this study, suggesting competitiveness of our prototype natural preservative in the market.

b. Optimization of application properties of natural food preservative prototype

- To improve application properties of prototype mixture, cyclodextrin, a natural masking component with properties resistant to heat and rapid pH change, was added for



masking fragrance and improving the product compatibility.

c. Natural food preservative prototype

- Optimal formulation of natural food preservative prototype was determined (90% of mixture of *Paeonia japonica* : *Galla rhois* : *Glycyrrhiza uralensis* at 3 : 6 : 1, 5% pure water, 5% cyclodextrin). Two types of preservative prototype were produced; concentrated immersion type applicable in washing large quantity vegetables and spray type for easy and rapid use.



<Prototypes of natural food preservative for RTE vegetables>

## V. Achievement and its application plan

### 1. Achievement

- a. Development of natural food preservative alternative to chemical preservative for washing and preserving vegetables.
- b. High-valued natural food preservative prototype with multi-functionalities.
- c. Data for antibacterial, antioxidative, food preservation functions of domestic natural products and plants used in Korean traditional medicine.
- d. Submission and publication of 5 SCI papers and 3 KSCI papers with the results of functional analysis for various natural products.
- e. Application of 3 patents for antibacterial activities and functionalities for food preservation.
- f. Exchange of technology via academic partnership with industry.
- g. Development of various tools in evaluation for food preservative.

### 2. Application plan

- a. Since the natural food preservative using pure natural products has not been commercialized in worldwide, the intellectual property rights obtained in this study will be subjected to TOT (Transfer Of Technology) and contribute to market for organic agricultural products and food distribution.
- b. Patents for the novel functions of domestic natural products applicable to TOT for export domestic products.
- c. Comparing with chemical preservative that accelerate browning of fresh food by oxidation, our spray-type natural preservative can be used in consumer-friendly way at home and provide effectiveness in long-term preservation of fresh vegetables, which is competitive in well-being food market.
- d. Development of natural food preservative will provide beneficial effects on fresh foods and affect consumption of RTE vegetables, which lead to increase of farm income and

export for vegetables.

- e. Various tools for evaluation of functionalities of natural products was developed in this study and will be utilized in development of functional food and food additives.
- f. Technology for effective extraction of active components from medicinal plants will contribute to advance methodology for drug development in the field of pharmacy and medicine.

# CONTENTS

<b>Chapter 1. Synopsis of the project of research and development</b> .....	<b>27</b>
Section 1. Objective of the research and development .....	27
Section 2. Necessity of the research and development .....	28
Section 3. Contents and scope of research and development .....	29
<b>Chapter 2. Status of technical development in Korea and overseas</b> .....	<b>32</b>
Section 1. Domestic status .....	32
Section 2. Foreign status .....	34
<b>Chapter 3. Contents and results of the performance of research and development</b> .....	<b>36</b>
Section 1. Evaluation of antibacterial activities for natural product extracts .....	36
Section 2. Determination of safety for natural product extracts .....	81
Section 3. Determination of functionalities of natural product extracts .....	86
Section 4. Analysis of active components in natural products .....	115
Section 5. Determination of application compatibility with vegetables .....	132
Section 6. Development of the product line of natural food preservative prototype .....	154
<b>Chapter 4. Attainment and contribution for the related fields</b> .....	<b>170</b>
Section 1. Attainment .....	170

Section 2. contribution for the related fields ..... 176

**Chapter 5. Achievement and its application plan ..... 178**

Section 1. Plans for practicality and industrialization ..... 178

Section 2. Plans for the spread of technology ..... 179

Section 3. Plans for obtainment of patents and papers ..... 181

Section 4. Plans for application to additional research and other projects ..... 184

**Chapter 6. The overseas scientific and technical information during research and development process ..... 185**

**Chapter 7. Reference ..... 186**

# 목 차

<b>제 1 장 연구개발과제의 개요</b> .....	<b>27</b>
제 1 절 연구개발의 목적 .....	27
제 2 절 연구개발의 필요성 .....	28
제 3 절 연구개발의 내용 및 범위 .....	29
<b>제 2 장 국내외 기술개발 현황</b> .....	<b>32</b>
제 1 절 국내 현황 .....	32
제 2 절 국외 현황 .....	34
<b>제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과</b> .....	<b>36</b>
제 1 절 천연추출물의 항균효능 평가 .....	36
제 2 절 천연추출물의 안전성 검증 .....	81
제 3 절 천연추출물의 기능성 평가 .....	86
제 4 절 천연추출물 유효성분의 정성·정량분석 .....	115
제 5 절 채소류 적용성 평가 .....	132
제 6 절 천연보존제 생산공정 개발 및 제품화 .....	154
<b>제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도</b> .....	<b>170</b>
제 1 절 목표달성도 .....	170
제 2 절 관련분야의 기여도 .....	176
<b>제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획</b> .....	<b>178</b>

제 1 절 실용화·산업화 계획 .....	178
제 2 절 교육·지도·홍보 등 기술확산 계획 .....	179
제 3 절 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 .....	181
제 4 절 추가연구, 타연구에 활용 계획 .....	184
<b>제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....</b>	<b>185</b>
<b>제 7 장 참고문헌 .....</b>	<b>186</b>

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 목적

신선편이 채소식품류 중 수요가 급증하고 있는 RTE(Ready To Eat) 채소류의 미생물학적 안전성과 식품기능성을 높이기 위한 2종의 천연식품보존제를 개발하고 멀티기능성 부여를 통한 고부가가치 수출용 천연보존제를 시제품화하기 위해 6개의 단계적 연구목표를 설정하였다.

1. 천연한방소재 및 개화식물과 낙엽성수목을 포함한 식물유래 소재로부터, 0.1% 농도에서 10분 접촉 시 세균 수 90% 이상 감균력을 지닌 5종의 천연보존제 후보 추출물을 선별하고 이에 대한 멀티기능성(인체 항산화능 및 항암작용) 평가기법을 개발한다.
2. 선정된 5종의 천연보존제 후보 추출물/분획물 선별을 위해 식물유래 천연물로부터 추출/분획 조건에 대한 최적화 기법을 개발한다.
3. RTE 채소류에 대한 천연보존제 후보 분획물의 적용성(안전성, 효능, 관능평가 포함) 프로토타입을 개발한다.
4. 최종 2종의 천연보존제를 개발하고 이에 대한 시제품 생산을 위한 공정조건을 최적화한다.
5. 천연보존제의 항균성, 채소류 보존능, 식품관능, 기능성 평가를 통해 고부가가치 천연보존제 시작품의 멀티기능성을 확립한다.
6. 고부가가치 천연식품보존제의 항산화능 최적화를 통한 갈변 억제 및 신선도를 유지할 수 있는 복합 처리기술을 개발한다.



## 제 2 절 연구개발의 필요성

- 산업발달로 인한 경제적 여유가 뒷받침되면서 편리함이 두드러지는 식품에 대한 요구가 증가하는 추세이다. 이런 현상에 편승하여 신선편의 채소식품류의 수요가 급증하고 있으며, 이들 채소식품류를 보존하기 위해 화학방부제를 사용하고 있다. 그러나 장기간 화학방부제를 사용할 시 그 독성과 자극성으로 인해 유해하기 때문에 인체에 무해하고 기능성이 풍부한 천연보존제의 개발이 필요한 상황이다.
- 천연보존제는 식품첨가물, 의약품, 공업용 등으로 이용범위가 넓으며 식품첨가물의 세계시장 규모는 1백억 달러로 매년 6%씩 성장하고 있다. 현대의 웰빙트렌드는 식품을 섭취하는 소비자들로 하여금 안정성과 관련된 우려로 인해 화학적합성 식품첨가물을 피하고 있는 실정이다. 특히 식품의 보존기간을 연장하기 위하여 첨가하는 부틸파라벤(안식향산) 등의 기존 광범위하게 사용되고 있는 식품보존제는 안정성문제가 끊임없이 제기되고 있어, 이를 대체할 수 있는 천연보존제의 개발이 시급한 실정이다.
- 현대의 라이프스타일이 바뀌면서 세척·선별·박피·절단 등의 가공을 거쳐 곧바로 섭취하거나 조리 이용될 수 있는 신선편이 농산물에 대한 소비자의 수요가 증가하고 있고 시장규모가 약 1조원에 육박한다. 이 중 현대인들이 선호하는 샐러드, 과일, 쌈채소 등 생식용 채소류의 수요는 점차 증가하고 있는 추세이다. 하지만 고부가가치의 친환경 신선편이 농산물의 경우 염소계류의 살균소독제를 사용하지 못하기 때문에 미생물에 의한 경제적 손실이 매우 큰 편이다. 이러한 문제를 해결하기 위한 가장 적합한 방법 중의 하나가 천연보존제를 통해 미생물을 제어하는 것으로 신선편이 농산물에 적용하기 위한 연구개발이 필요하다.
- 대표적인 천연보존제로는 편백나무, 목련, 자몽종자추출물 등이 개발되어 있으나 상용화되어 있는 제품이 많이 존재하지 않아 천연보존제의 시장규모는 합성보존제의 17%에 불과하다. 고부가가치 시장 창출의 기회를 제공하고 국민의 건강증진과 신선편이 농산물시장 수요증대에 부응하기 위해서는 경제적이고 효과적인 천연보존제의 개발이 필수적이다.



<RTE채소류 적용 천연보존제 개발의 필요성>

### 제 3 절 연구개발의 내용 및 범위

구분	연구개발의 목표	연구개발의 내용	연구범위
1차년도	천연보존제 후보물질의 스크리닝 및 기초효능 평가, 적용성 분석	항미생물 활성, 기능성, 안정성에 대한 rapid screening 기법 구축	- Screening 방법을 통한 항미생물 활성 분석 - 최적화된 rapid screening 구축
		천연추출물의 항미생물 활성 분석	- 천연추출물의 항균활성 측정 - 기존의 식품보존제와 천연추출물의 항균활성 효과 비교검토
		천연추출물의 기능성 분석	- 천연추출물의 갈변도 변화 측정 - 천연추출물의 항산화능 측정
		천연추출물의 안전성 검증	- Cell level에서의 1차적 안전성 평가
		분획 별 항균효능 분석	- <i>In vitro</i> 실험을 통한 항균력 검증
		분획 별 기능성 및 안전성 분석	- 성분분획의 기능성 및 안전성 검증 - <i>In vivo</i> 실험을 통한 항산화능, 항암작용 등의 멀티기능성 분석
		천연보존제 후보성분의 보존능 평가	- 후보성분의 항균성 분석을 통한 일차적 보존효능 평가 - 항산화능을 적용하여 갈변억제를 통한 보존효능 분석 및 평가
	후보성분의 채소류 적용성 검토	- 후보성분 처리 채소의 생리학적 적용성 검토	
	천연보존제 후보물질의 추출 기법 구축	천연보존제 후보소재 선정	- 식물유래 천연항균성 소재 선정 - 대상군: 한방약초류, 과실류, 수목류
		후보 추출물 선별을 위한 추출법 개발	- 열수추출 방법에 의한 천연물 추출
		추출조건 최적화	- 온도, 추출시간, 추출용량
		후보 추출물 분획 공정기술 개발	- 단계별 용매 분획기법 적용 - 항균력과 기능성을 높게 가지는 유효 분획물 선정
		후보 분획물 유효성분의 정성·정량분석을 위한 지표물질 동정	- 지표물질을 동정함으로써 잔존율 측정에 이용할 수 있는 표준물질 선정 - 항균활성이 뛰어난 용매 분획물을 정제 단계를 거쳐 단일물질로 동정
	천연보존제 후보물질의 formulation	천연보존제 후보 분획물의 채소류 적용성(제품성) 평가	- 천연보존제 파일럿 제조 시, 생약재 순수 추출물 자체를 사용 - 식품위생법상 허용되는 담체, 부형제, 희석제등과 혼합하여 분말, 표면세척수 또는 분무제 등으로 제조
		천연보존제 후보물질의 formulation	항균성 및 기능성을 바탕으로 한 천연보존제 후보물질의 formulation

구분	연구개발의 목표	연구개발의 내용	연구범위
2차년도	천연보존제의 RTE(Ready To Eat) 채소류 적용에 대한 기능성 평가	1차년에 개발된 천연보존제 처리에 따른 RTE 채소의 항균성 비교평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 기존 화학보존제 첨가 RTE 채소류의 미생물 현황 조사</li> <li>- 기존 천연보존제 첨가 채소류의 미생물 현황조사를 통한 항균효능 비교분석</li> <li>- 기존 화학보존제와 개발된 천연보존제의 항균효능 비교평가</li> </ul>
		1차년에 개발된 천연보존제 처리에 따른 RTE 채소류의 생물학적 유용성(기능성 및 안전성) 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 천연보존제 처리에 따른 RTE 채소의 생리활성 및 생화학적인 변화 조사</li> <li>- 세포실험을 통한 천연보존제의 일차적 안전성 평가</li> <li>- 천연보존제의 <i>in vivo</i> 파일럿 동물실험 적용</li> <li>- 파일럿 동물실험 수행 및 결과분석을 통한 천연보존제의 인체안전성 평가</li> </ul>
	천연보존제의 RTE(Ready To Eat) 채소류 최적화 적용 기술 개발	천연보존제 최적농도 설정 및 채소류 처리의 최적화	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 천연보존제 최적 농도 확립을 위한 문헌조사 및 안전성 평가</li> <li>- 초침지 또는 분무방법을 이용하여 생약재 추출물을 농도별 처리에 따른 평가</li> </ul>
		천연보존제 처리에 따른 식품 품질 평가 및 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 중량 변화, 표면색도 변화, 표면경도 변화 평가</li> <li>- 저장중인 RTE 채소류 시료에 대해 일정간격으로 중량변화 측정</li> <li>- 420nm에서 흡광도 측정을 통한 표면색도 변화 평가</li> <li>- Texturemeter를 이용하여 천연보존제 처리군 및 무처리군의 표면경도 변화 평가</li> </ul>
		천연보존제의 적용성 증대	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 천연보존제 이취제거</li> <li>- 천연보존제 masking 기법 개발</li> </ul>

구분	연구개발의 목표	연구개발의 내용	연구범위
3차년도	RTE(Ready To Eat) 채소류 천연보존제 제품화	최종 천연보존제 scale-up 생산기법 표준화	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 기존 식품보존제의 제조공정 분석 및 현 천연보존제의 생산 및 제조공정과의 비교</li> <li>- 향상된 천연보존제의 생산기법 선발</li> </ul>
		천연보존제 유효성 평가 및 검증	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 제품화 천연보존제의 RTE 채소에 적정량 적용 평가</li> <li>- 제품화 천연보존제의 항균력 및 안전성 분석</li> </ul>
		천연보존제 처리 후 지표물질 잔존율 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>- RTE 채소류에 처리된 천연보존제 물질의 질량분석 및 시료검출을 통한 잔존율 측정</li> </ul>
		천연보존제 처리에 따른 식품의 관능평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 천연보존제를 저온저장중인 RTE 채소류에 처리하여 관능검사 실시</li> <li>- 시험항목은 색의 변화, 향의 변화, 맛의 변화, 조직감의 변화, 씹힘성의 변화, 전반적 외형의 변화</li> </ul>
		세균작용 갈변의 억제에 대한 유통안전성 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 천연보존제 처리 후, 총균수 변화 측정</li> </ul>
		최종 제품화된 천연보존제의 추출공정과 formulation 공정에 관한 파일럿 규모의 생산	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 협동기관 (주)세니젠 생산</li> </ul>
		경제적 실수요 호응도 조사 및 시장성 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 천연보존제의 제품가격 설정</li> </ul>

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 국내 현황

- 식품첨가물 중 일반적으로 식품에 가장 많이 사용하고 국민의 관심이 집중되고 있는 것은 안식향산 등 21개 품목의 보존료와 24개 품목의 산화방지제가 있으며 국내식품에 대한 사용실태 조사결과, 보존료 중에는 소르빈산칼륨이 60%이상으로 가장 많이 사용되고 있으며 그 외 파라옥시안식향산부틸, 안식향산나트륨 순으로 사용 빈도가 높게 나타남. 산화방지제는 사용량으로는 구연산이 28.9%, 아스코르빈산과 에리쓰르빈산나트륨이 그 다음 순으로 높았으며 표시사항조사에서는 에리쓰르빈산나트륨이 49.1%로 가장 사용빈도가 높다고 보고되고 있음. 수입식품에 대하여는 보존료는 소르빈산칼륨이 31.8%, 산화방지제는 아스코르빈산이 55.4%로 각각 사용빈도가 높다고 알려져 있음.
- 근래 소비자들의 건강욕구 증대에 따라 화학적 합성보존료 및 산화방지제의 사용에 많은 제약과 이목이 집중되고 있어 이를 대체 하려는 움직임이 활발한 것으로 알려져 있으며 그 대상이 되는 천연 항균성 물질은 avidin, lysozyme과 같은 단백질 성분과 탄소수가 12~18개의 지방산들이 많은 관심을 받고 있음. 이 외에 항균효과를 갖는 정유성분이 식품 미생물에 항균효과가 있음이 보고되어 다양한 생약재에 대한 연구가 이루어지고 있으나 폭넓은 항균작용과 식품보존제로서 가져야 할 식품과의 조화(무미, 무취), 적절한 사용량 등 식품산업 적용 시 고려되어야 할 여러 요소를 만족시키는 성분은 거의 없는 것으로 알려져 더 많은 연구가 필요한 실정임.
- 또한 현대 소비자들의 경우 천연성(natural), 안전성(safe) 및 복합적인 건강 유효성(multi-health benefits)이 겸비된 제품들을 선호하는 경향이 있기 때문에 식물유래 천연식품보존제가 첨가된 채소류 역시 이 같은 소비자들의 요구에 부응할 것으로 여겨짐.
- 그러나 천연물 소재를 활용하는 천연식품보존제 개발 기술은 현재 국내적으로 미약한 상황으로, 안정성과 기능성을 지니는 천연식품보존제를 개발하고 상품화함으로써 기존 보건의료 시장에서 뒤떨어진 국내 기술을 농업분야에서 만회하는 한편 세계시장에서 우위를 점할 수 있는 천연물 활용 기술 개발의 연구가 더욱이 필요한 실정임.
- 현재 국내 천연 보존제로 가장 대표적인 상품명 DF-100(ABCON Chemie Co. LTD)은 자몽씨추출물이 주성분으로 자몽씨추출물 70%와 glycerin 30%로 구성되어 있으며 미농무성과 미식품의약품처의 인가를 취득한 천연식품보존제임. 수용성 항산화제로 인정되어 비금속성이고 부식성이 없으며 무색·무취의 천연 유기 혼합물로서 사람과 동물에 전혀 해를 끼치지 않으며 환경오염의 원인이 되지 않는다고 보고되고 있음. 자몽종자 추출성분은 ascorbic acid, amino acids, peptide, tocopherol, methyl-hydroxy groups 등으로 구성되어 있다고 보고되었고 대장균, 곰팡이, 살모넬라균 등에 효과가 있다고 알려짐. 이 외에 허브추출물(로즈

마리 등), 녹차추출물, 키토산 등 주로 항산화 효과를 나타내는 원료들이 화학적 합성품(화학적합성첨가물)을 대체 하고 있는 추세임.

- 하지만 국민 소득의 증대에 따른 구매력 상승과 국민건강에 관한 지나칠 정도로 소비자 관심은 화학적 합성 보존료를 천연 보존료로 대체하기 위한 낙관적인 시장형성의 바탕으로 효과적인 천연보존료의 등장 시 그 시장은 폭발적으로 증가할 것으로 기대됨.

<국내 야채, 식육 관련 세척 및 살균 제품의 성분>

성분	이염화이소시아눌산나트륨	주정발효알콜(식품첨가물)	오존수
형태	발포정	액상	액상
판매제품수	4	5	5
수요처	위탁급식, 외식, 패스트푸드, 식품단순가공	위탁급식, 외식, 패스트푸드, 식품단순가공	식품단순가공, 학교급식
연 매출액(억 원)	6	60	8
과정	원료수입 및 제품 타정	원료 단순 회석 판매	기기에서 오존수 생성
장점	효과적인 살균	식품첨가물	사용편리
단점	염소계, 냄새, 부화합물생성, 발포성 떨어짐	살균력 떨어짐	살균력 떨어짐, 냄새, 부식

<국내 천연보존제 제품>

추출물	성분	특징	연구기관 및 출처
편백나무 추출물	히노키티올	미생물 살균효과로 천연보존제로 응용	천연자원연구원
차나무 추출물	-	독성 없는 향균물질로 유가공제품 효과 입증	산림청 임목육종연구소
황칠나무 추출물	-	제주 청정식품에 적용	제주테크노파크 종다양성연구소
자몽씨 추출물	발효주정	식품첨가물로서 주정알코올 함유	world chem

## 제 2 절 국외 현황

- 채소류와 같은 신선식품은 제품 특성상 가열살균을 비롯한 가혹조건에서의 살균처리가 어렵고, 기존의 살균제 이용은 소비자의 기피 및 인체 유해성 등으로 사용범위에 많은 제한을 안고 있음. 지금까지는 채소류 표면살균에는 주로 염소계 등 화학제제를 사용하였으나 그 대체수단으로서 이미 선진 외국에서는 선도에 영향을 미치지 않고 인체에 무해한 살균효과를 가지는 천연식품보존제 개발에 주력하고 있음.
- 선진 외국에서는 선도에 영향을 미치지 않고 인체에 무해한 살균효과를 가지는 천연보존제의 개발에 주력하고 있고, 일부는 식품산업과 청과물 유통에 부분적으로 적용되어 품질의 고급화를 도모하고 있는 실정을 감안할 때, 국내 식물유래 천연식품보존제 개발 필요성은 더욱이 절실하다고 볼 수 있음.
- 전 세계적으로, 특히 선진화가 진행되는 국가들을 중심으로, 신선 채소류 포장식품의 시장 규모는 향후 계속 확대될 것으로 예측되며, 이에 대한 국내 천연보존제 개발은 세계시장에서의 수요를 창출할 수 있음.
- 미국에서는 인간이 장기간 식용으로 사용되었던 천연물을 그대로 이용하거나 추출하여 보존제로 사용하는 경우 이를 generally recognized as safe(GRAS) list로 분류하여 관리하고 있으며 이러한 GRAS list에 등재된 천연물에서 유용한 생리활성과 항균효과가 있는 물질에 대한 탐색이 활발히 이루어지고 있는 추세임.
- 하지만 이들 중에는 특유의 맛과 냄새, 자극성으로 인하여 식품에 적용하기 위해 관능적 측면에서 해결되어야 할 문제가 남아 있는 것도 있고, 항균력이 약하거나 항균스펙트럼이 좁아 아직까지 상품화된 제품은 극히 일부에 지나지 않고 있는 상황임.
- 미국과 일본을 포함한 세계 각국에서는 합성 보존료의 식품에 대한 사용량 관리를 위해 식품첨가물 사용기준 및 규격을 설정하고 있음. 따라서 천연항균제의 상품화는 합성보존료를 대체할 수 있다는 측면에서 전 세계적인 수요의 급증이 예상됨.

<국외 야채, 식육 관련 세척 및 살균 제품의 성분>

성분	이염화 이소시아눌산 나트륨	이염화 이소시아눌산 나트륨	주정발효알콜 (식품첨가물)	이산화 염소수	베이킹소다	알킬벤젠 설펜산 나트륨
형태	파우더	발포정	액상	액상	파우더	액상
수입판매 제품수	5	3	1	2	1	1
연 매출액 (억 원)	20	15	11	0.1	1	-
장점	효과적인 살균	효과적인 살균	식품첨가물	사용편리	사용편리	1종세척성분
단점	염소계 부화합물 생성	염소계 부화합물 생성	살균력 떨어짐	염소계 부화합물 생성	살균력 떨어짐	살균력 떨어짐

<국외 천연보존제 제품>

추출물	성분	특징	연구기관 및 출처
목련 추출물	메그노놀	폐양을 유발하는 세균을 살균하는 효과 증명	Journal of Agriculture and Food Chemistry
유칼립투스잎 추출물	폴리페놀	부패세균 억제효과	Food Chemistry

<국내·외 기술수준 비교>

개발기술명	관련기술 최고보유국	현재 기술수준		기술개발 목표수준
		우리나라	연구신청팀	
항 미생물 활성측정 rapid screening 기법	미국	70%	서울대학교	90%
천연 항균물질 추출/분획 기법	미국	80%	한국생명공학연구원	90%
천연 항균물질 채소류 적용 기법	미국	50%	한국화학연구원	90%



### 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

#### 제 1 절 천연추출물의 항균효능 평가

##### 1. 식품공전 및 문헌조사를 통한 식물유래 천연물 43종 선정

천연항균성 물질 추출을 위해 ①현재 식품공전에 식품원료로 등재되어 있거나, 식품의약품안전청장이 안전하다고 확인한 생약류 중 최소량 사용가능한 생약류 중에서 항균활성이 보고된 생약류, ②현재 식품공전상 식품원료로 등재되어 있거나 식약청장이 안전하다고 확인한 생약류 중 최소량 사용가능한 생약류 중에서 항균활성이 연구되지 않은 생약류, ③위 항목에는 포함되어 있지 않지만 식품으로 사용 불가된 품목이 아닌 생약류 중에서 항균활성이 보고된 생약류 및 식물 등 총 43종을 선정함. 선정된 한방천연물 20종, 개화식물 14종 및 수목류 9종의 품명, 원산지, 기초효능은 <Table 1, 2, 3>에 나타냄.

<Table 1> 천연보존제 개발을 위해 선정된 한방천연물

대상시료	품명	원산지	기초효능(구전 및 문헌)
한방천연물 (20가지)	감송향	중국	소화촉진, 진정
	감초	중국	진정, 소염, 항염증, 해독
	육계	베트남	건위, 항균, 혈액순환
	과루	한국	해열, 해독, 항염, 항암
	곽향	한국	해열, 진정, 소화촉진
	목단피	중국	해열, 항염증, 항산화
	반지련	중국	항암, 면역조절
	반하	중국	해독, 진정
	백작약	한국	해열, 항염, 소염
	복령	중국	항암, 이뇨촉진, 면역촉진
	산두근	중국	해열, 항암, 진정
	산약	중국	콜레스테롤 감소, 인체저항력증가
	소염	한국	해독, 항염증, 소화촉진
	속단	한국	항염증, 조직재생촉진작용
	오매	중국	거담, 장운동 억제, 항균
	오배자	중국	해열, 해독
	유자	한국	진정, 항염, 해독
	천마	한국	해독, 소염, 항암
	황금	중국	해열, 소염
	황련	중국	해열, 소염

<Table 2> 천연보존제 개발을 위해 선정된 개화식물

대상시료	품명	원산지	기초효능(구전 및 문헌)
개화식물 (14가지)	관동화	중국	진정, 항염, 거담
	괴화	중국	해열, 지혈, 진정
	갯잎	한국	진정, 해독, 세포재생
	고추	한국	소화촉진, 진정, 혈액순환촉진
	마늘	한국	해독, 항암, 항균
	미역	한국	항암, 해독, 항응혈
	백화사설초	중국	해독, 항암, 해열, 항염증
	부추	한국	해독, 진정, 응고
	생강	한국	진정, 해열, 항산화
	신이	중국	진정, 지통
	쑥	한국	면역강화, 항균, 약리
	연자육	한국	진정, 신장 기능강화
	오이	한국	해열, 항산화
	양파	한국	진정, 해열, 약리

<Table 3> 천연보존제 개발을 위해 선정된 수목류

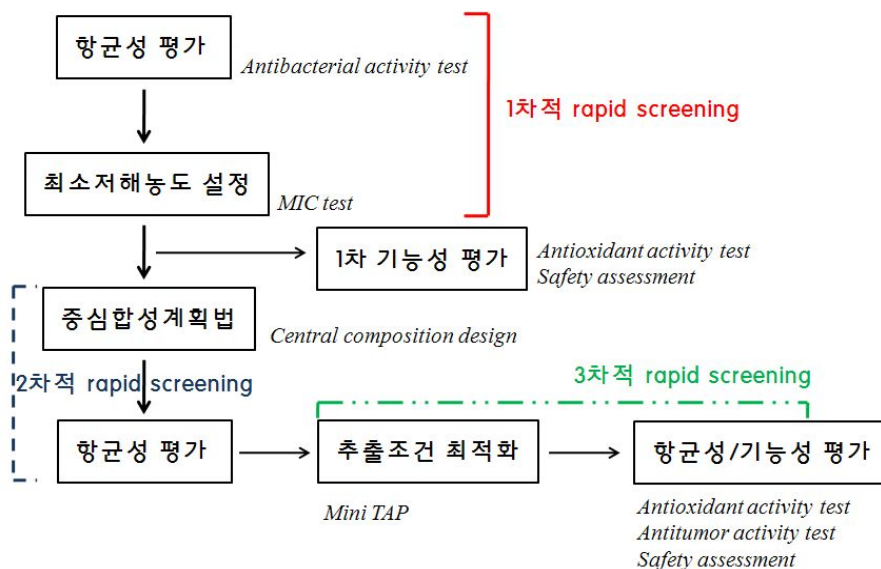
대상시료	품명	원산지	기초효능(구전 및 문헌)
수목류 (9가지)	갈매보리수나무	몽골	해독, 천식, 해수
	녹차	중국	항균, 항산화, 항암
	매실	중국	해독, 해열, 항균,
	소목	중국	항염, 살균, 발취
	유근피	한국	해열, 항염증, 항균
	정향	중국	항염, 항균, 항산화
	치자	중국	해열, 혈압강하
	백련	한국	항산화, 지혈
	생두	콜롬비아	이뇨작용, 지방분해, 소화촉진

## 2. 천연보존제 후보물질의 스크리닝 및 항균효능 평가

### 가. 항균효능에 대한 rapid screening 기법 구축

사전 문헌조사를 통해 선정된 총 43가지 대상 천연물의 항균효능을 평가하고, 천연식품보존제 후보 천연물을 선별하기 위한 rapid screening 기법을 구축함. 각종 문헌을 통하여 편리하고 신속하게 대상시료의 1차적 항균효능을 평가할 수 있는 screening 기법을 구축·평가하고, 2·3차 screening 기법을 적용하여 기능성 및 안전성을 제고할 수 있는 적절하고 타당한 rapid screening 기법을 구축함 <Fig. 1>.

- 1차적 rapid screening : Disc diffusion assay를 통하여 각 대상시료의 항균효능을 1차적으로 평가함. 이후 액체배지 또는 고체배지 희석법을 적용하여 각 대상시료의 최소저해농도 (Minimum Inhibitory Concentration, MIC)를 설정함으로써 선정된 대상시료를 1차적으로 screening함.
- 2차적 rapid screening : 1차적으로 선별된 대상시료를 중심합성계획법(Central Composition Design, CCD)을 이용하여 추출조건을 최적화하고, 최적화된 추출물의 항균효능 평가를 통해 2차적으로 screening함.
- 3차적 rapid screening : 2차적 항균효능 평가 결과를 Mini TAP 프로그램을 이용하여 각 대상군 별 최적화된 천연추출물의 추출조건 범위(용매, 온도, 시간)를 설정하고, 이를 통해 추출된 추출물의 항균효능 및 기능성 평가를 통해 3차적으로 screening함.

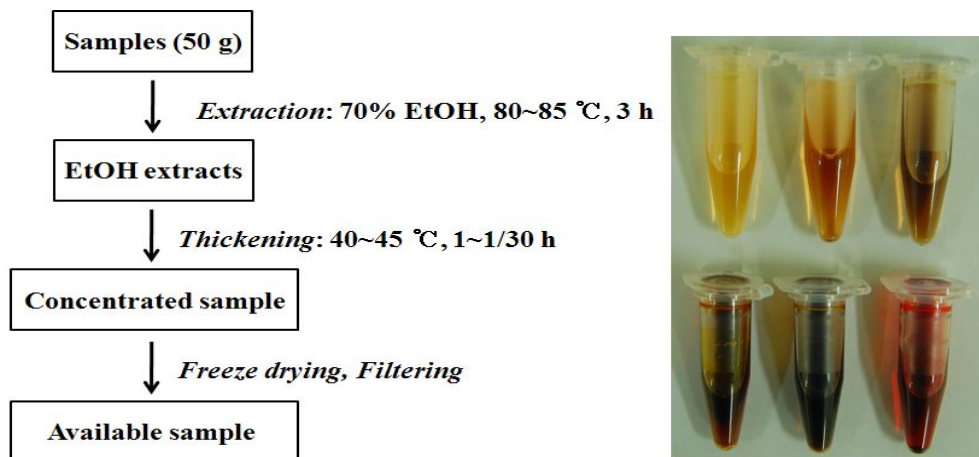


<Fig. 1> 단계별 rapid screening 기법 구축

### 3. 후보물질 선별을 위한 추출법 개발

#### 가. 열수추출법에 의한 천연물 추출

선별된 43종의 한방천연물, 개화식물 및 수목류를 각각 분쇄하여 용매추출이 최적화 될 수 있도록 만든 후, 70% 에탄올로 80~85 °C에서 180분 동안 추출함. 이후 40~45 °C에서 60~90 분 동안 추출물을 감압농축하고, 농축된 추출물을 필터링 후 약 48시간 동결건조하여 파우더 형태화 함. 최종적으로 각각의 추출물을 3차 증류수에 녹인 후, pH값을 7~7.5로 동일하게 보정하여 항균효능 및 기능성 평가에 적용 가능한 시료로 제작함 <Fig. 2>.

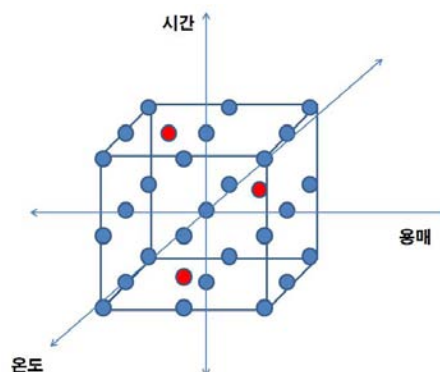


<Fig. 2> 천연물 추출법 개발 및 시료 제작

#### 나. 반응표면분석을 이용한 최적 추출 조건 도출

##### (1) 최적 추출 조건 도출을 위한 중심합성계획법 분석

천연보존제 후보물질의 추출 방법 최적화를 위하여 통계 프로그램인 중심합성계획법(Central Composition Design, CCD)을 적용함 <Fig. 3>.



<Fig. 3> 중심합성계획법(Central Composition Design, CCD)

분쇄한 후보물질에 증류수와 에탄올의 비율을 100%, 50%, 0%로 제조하여 가하고 수직환류 냉각관을 부착한 후, 각 온도에서 일정시간 추출함. 분쇄된 후보물질은 추출용매(에탄올 100%, 에탄올 50%, 에탄올 0%), 추출온도(60, 70, 80 °C), 추출시간(60, 120, 180분)을 달리하여 추출함 <Table 4, 5>. 추출물은 회전 감압농축기를 사용하여 40 °C에서 감압 농축한 후, freezing dryer로 동결건조시켜 -20 °C에 보관하여 사용함.

<Table 4> 중심합성계획법을 이용한 3인자 Box & Behnken 계획

실험번호	인자	A	B	C
	변환된 인자 수준	x <sub>1</sub>	x <sub>2</sub>	x <sub>3</sub>
1	인자 A, B에 의한 2 <sup>2</sup> 요인조합	-1	-1	0
2		-1	1	0
3		1	-1	0
4		1	1	0
5	인자 A, C에 의한 2 <sup>2</sup> 요인조합	-1	0	-1
6		-1	0	1
7		1	0	-1
8		1	0	1
9	인자 B, C에 의한 2 <sup>2</sup> 요인조합	0	-1	-1
10		0	-1	1
11		0	1	-1
12		0	1	1
13	중심점 (n0)	0	0	0
14		0	0	0
15		0	0	0

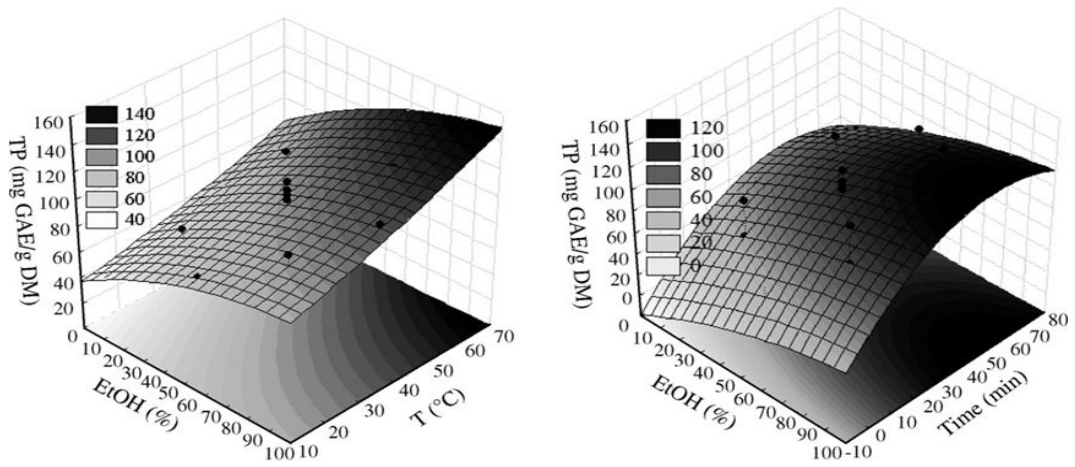
<Table 5> 중심합성계획법에 의한 추출조건

조건	추출용매	온도	시간
1	W 100%	60 °C	2h
2	W 100%	80 °C	2h
3	E 100%	60 °C	2h
4	E 100%	80 °C	2h
5	W 100%	70 °C	1h
6	W 100%	70 °C	3h
7	E 100%	70 °C	1h
8	E 100%	70 °C	3h
9	E 50% + W 50%	60 °C	1h
10	E 50% + W 50%	60 °C	3h
11	E 50% + W 50%	80 °C	1h
12	E 50% + W 50%	80 °C	3h
13	E 50% + W 50%	70 °C	2h
14	E 50% + W 50%	70 °C	2h
15	E 50% + W 50%	70 °C	2h

(2) 최적 추출 조건 산출을 위한 Mini TAP 통계프로그램 분석

중심합성계획법에 적용한 15가지의 추출조건으로부터 얻은 항균효능 및 수율을 Mini TAP 통계프로그램에 대입하여 각 후보물질마다 최적의 추출조건을 적용관주와 수율에 따라 각각

다르게 산출해 냄 <Fig. 4>.



<Fig. 4> Mini TAP 통계프로그램에 의거한 추출조건 산출

#### 4. 43종 천연추출물의 1차적 항균효능 평가

##### 가. 대상균 설정 및 배양조건 확립

구축된 rapid screening 기법을 적용하여 총 43가지 대상 천연추출물의 1차적 항균효능 평가를 위한 대상균을 설정함 <Fig. 5>. 사전문헌조사 및 식품의약품안전청 공시자료를 참고하여 대표적인 식품오염 지표균이면서 그람음성세균인 *Escherichia coli*(대장균, *E. coli*)와 식중독균이면서 대표적인 그람양성세균인 *Bacillus cereus*(바실러스균, *B. cereus*) 및 *Staphylococcus aureus*(황색포도상구균, *S. aureus*)를 대상균으로 설정함. 대표적인 그람음성 및 그람양성세균을 설정하였으므로 대상 추출물의 항균효능이 본 연구수행 대상균 이외의 균에도 적용될 것으로 간주됨. 또한 식품의 오염을 통한 부패를 유발하는 세균인 *E. coli*와 대표적인 식중독균인 *B. cereus* 및 *S. aureus*를 설정함으로써 향후 천연식품보존제로서의 적용성 및 타당성을 고려함.



<Fig. 5> 항균효능 평가 시험 대상균(좌 : *E. coli*, 중 : *B. cereus*, 우 : *S. aureus*)

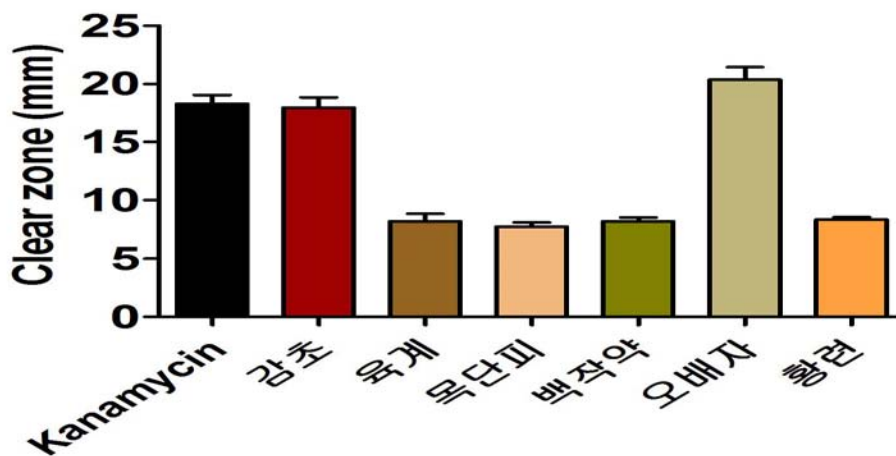
선정된 대상균의 배양조건을 설정하여 항균효능 평가에 적용함 <Table 6>.

<Table 6> 대상균의 설정 및 배양조건

구분	시험균주	배양매지	배양시간	온도
그람음성세균	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	Trypticase	18시간	37 ℃
	<i>Bacillus cereus</i> (ATCC 14579)	Soy	16시간	
그람양성세균	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	Broth	15시간	

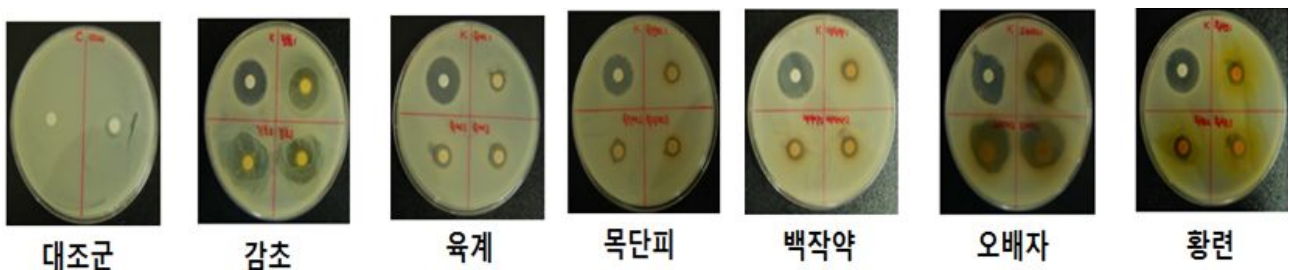
나. *E. coli*에 대한 천연추출물의 항균효능 평가

대표적인 식품오염지표균인 대장균(*E. coli*, ATCC 25922)에 대한 천연추출물의 항균효능을 disc diffusion assay를 이용하여 평가함. 사전문헌조사에 의해 선정된 총 43가지 대상천연물(한방천연물 20가지, 개화식물 14가지, 수목류 9가지)을 70% 에탄올 용매를 이용하여 추출 후, 동결건조하여 생성된 파우더를 cell culture water에 녹여 최종평가 가능한 시료로 제작함. MHA 배지에 *E. coli*를 도말하고 6 mm 디스크를 올린 후, 각각의 천연추출물(100 µg/µL)을 20 µL 접종하여 디스크당 최종 2 mg의 대상시료를 처리함. 대장균을 37 °C 인큐베이터에서 18시간 배양 후, 천연추출물에 의해 생성된 생육저지환(clear zone)을 측정하여 *E. coli*에 대한 천연추출물의 1차적 항균효능을 평가함 <Fig. 6>.



<Fig. 6> *E. coli*에 대한 천연추출물의 항균효능

항균효능 평가 결과, 총 43가지 천연추출물 중 감초, 육계, 목단피, 백작약, 오배자, 황련 6가지 추출물이 *E. coli*에 대해서 탁월한 항균효능이 있는 것으로 평가됨. 감초의 경우  $18.08 \pm 0.88$  mm의 생육저지환이 형성되었고 육계는  $8.56 \pm 0.65$  mm, 목단피는  $7.84 \pm 0.36$  mm의 생육저지환을 갖는 것으로 평가됨. 또한 백작약은  $8.20 \pm 0.34$  mm, 오배자는  $20.4 \pm 1.07$  mm, 황련은  $8.31 \pm 0.22$  mm의 생육저지환을 띄는 것으로 평가됨. 항균효능을 띄는 6가지 천연추출물의 생육저지환은 아래와 같음 <Fig. 7>.

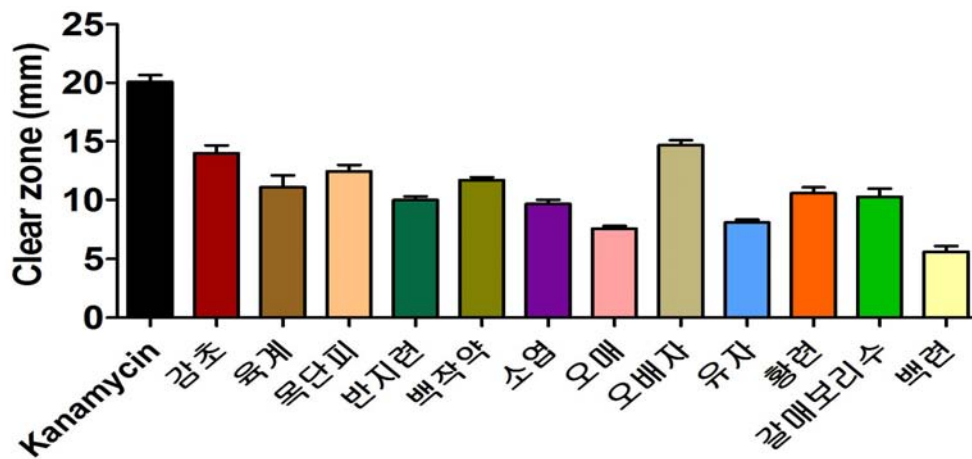


<Fig. 7> *E. coli*에 대한 천연추출물의 생육저지환 형성



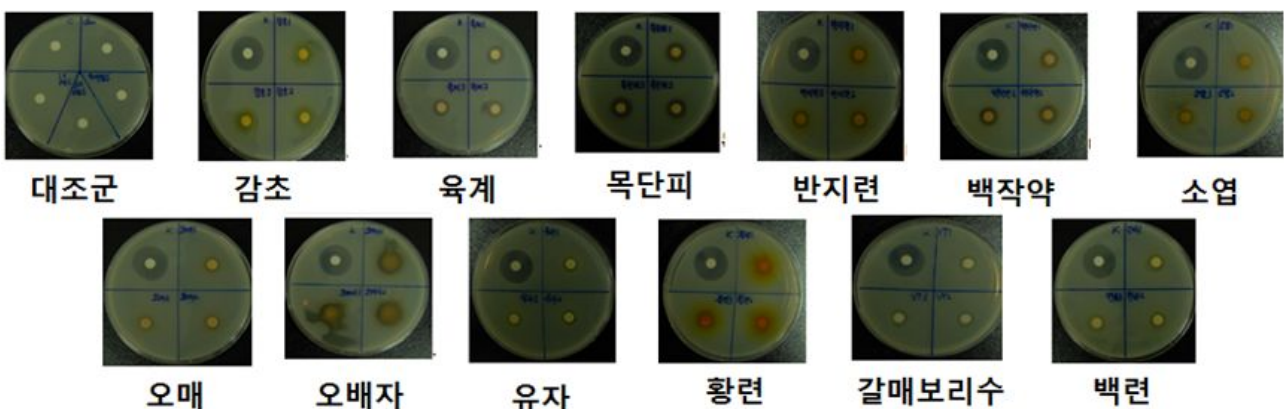
다. *B. cereus*에 대한 천연추출물의 항균효능 평가

대표적인 식중독균인 바실러스균(*B. cereus*, ATCC 14579)에 대한 천연추출물의 항균효능을 위와 동일한 방법 및 조건에서 disc diffusion assay를 이용하여 평가함. MHA 배지에 *B. cereus*를 도말하고 6 mm 디스크를 올린 후, 각각의 천연추출물(100 µg/µL)을 20 µL 접종하여 디스크당 최종 2 mg의 대상시료를 처리함. 대상균을 37 °C 인큐베이터에서 16시간 배양 후, 천연추출물에 의해 생성된 생육저지환(clear zone)을 측정하여 *B. cereus*에 대한 천연추출물의 1차적 항균효능을 평가함 <Fig. 8>.



<Fig. 8> *B. cereus*에 대한 천연추출물의 항균효능

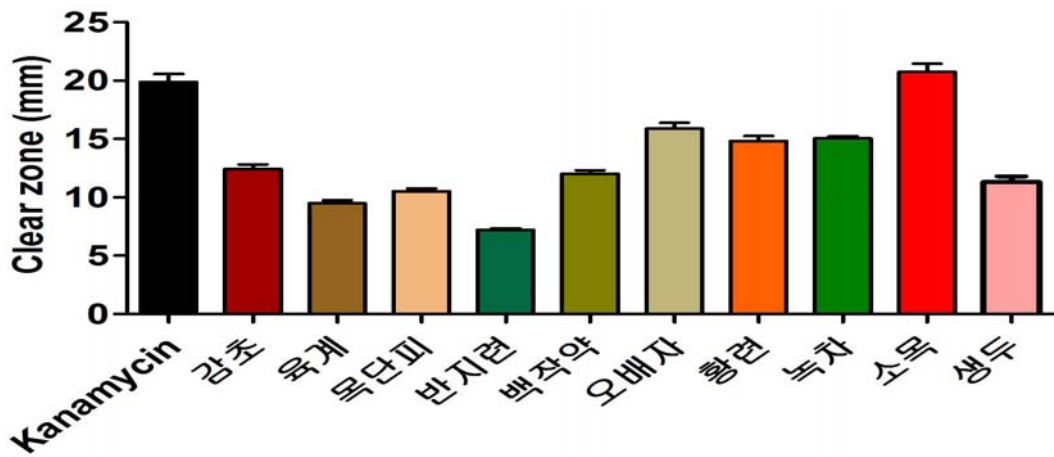
항균효능 평가 결과, 총 43가지 천연추출물 중 감초, 육계, 목단피, 반지련, 백작약, 소엽, 오매, 오배자, 유자, 황련, 갈매보리수, 백련 12가지 추출물이 *B. cereus*에 대해서 탁월한 항균효능이 있는 것으로 평가됨. 감초의 경우  $14.0 \pm 0.66$  mm의 생육저지환이 형성되었고 육계는  $11.1 \pm 0.99$  mm, 목단피는  $12.5 \pm 0.53$  mm, 반지련은  $10.0 \pm 0.30$  mm, 백작약은  $11.7 \pm 0.25$  mm, 소엽은  $9.66 \pm 0.34$  mm의 생육저지환을 갖는 것으로 평가됨. 또한 오매는  $7.56 \pm 0.23$  mm, 오배자는  $14.7 \pm 0.41$  mm, 유자는  $8.08 \pm 0.25$  mm, 황련은  $10.6 \pm 0.50$  mm, 갈매보리수는  $10.3 \pm 0.71$  mm, 백련은  $6.29 \pm 0.09$  mm의 생육저지환을 띄는 것으로 평가됨. 항균효능을 띄는 12가지 천연추출물의 생육저지환은 아래와 같음 <Fig. 9>.



<Fig. 9> *B. cereus*에 대한 천연추출물의 생육저지환 형성

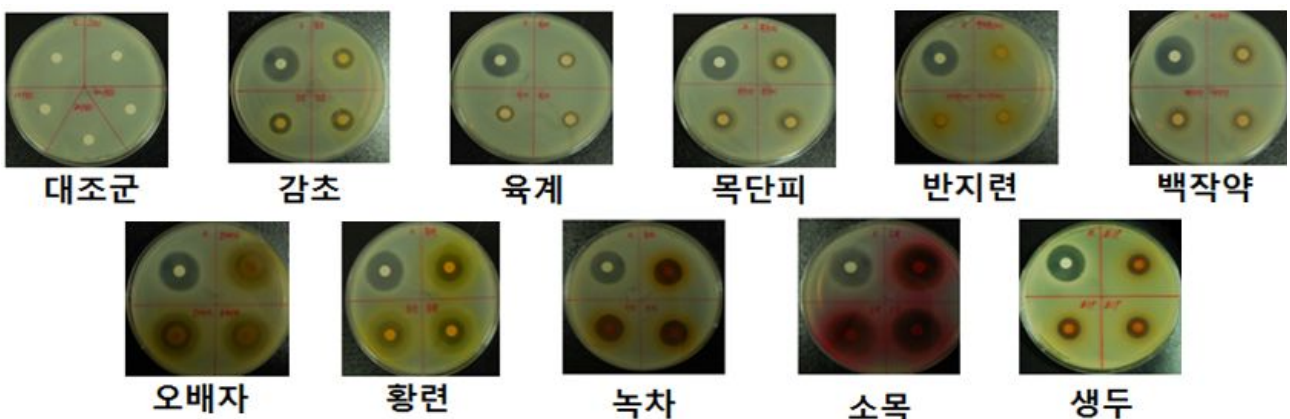
라. *S. aureus*에 대한 천연추출물의 항균효능 평가

대표적인 식중독균인 황색포도상구균(*S. aureus*, ATCC 25923)에 대한 천연추출물의 항균효능을 위와 동일한 방법 및 조건에서 disc diffusion assay를 이용하여 평가함. MHA 배지에 *S. aureus*를 도말하고 6 mm 디스크를 올린 후, 각각의 천연추출물(100 µg/µL)을 20 µL 접종하여 디스크당 최종 2 mg의 대상시료를 처리함. 대상균을 37 °C 인큐베이터에서 15시간 배양 후, 천연추출물에 의해 생성된 생육저지환(Clear zone)을 측정하여 *S. aureus*에 대한 천연추출물의 1차적 항균효능을 평가함 <Fig. 10>.



<Fig. 10> *S. aureus*에 대한 천연추출물의 항균효능

항균효능 평가 결과, 총 43가지 천연추출물 중 감초, 육계, 목단피, 반지련, 백작약, 오배자, 황련, 녹차, 소목, 생두 10가지 추출물이 *S. aureus*에 대해서 탁월한 항균효능이 있는 것으로 평가됨. 감초의 경우, 12.4 ± 0.38 mm의 생육저지환이 형성되었고 육계는 9.49 ± 0.28 mm, 목단피는 10.5 ± 0.25 mm, 반지련은 7.21 ± 0.13 mm, 백작약은 12.0 ± 0.30 mm의 생육저지환을 갖는 것으로 평가됨. 또한 오배자는 15.9 ± 0.50 mm, 황련은 14.8 ± 0.45 mm, 녹차는 15.1 ± 0.19 mm, 소목은 20.8 ± 0.69 mm, 생두는 11.3 ± 0.45 mm의 생육저지환을 띄는 것으로 평가됨. 항균효능을 띄는 10가지 천연추출물의 생육저지환은 아래와 같음 <Fig. 11>.



<Fig. 11> *S. aureus*에 대한 천연추출물의 생육저지환 형성

마. 6가지 천연식품보존제 1차적 후보물질 선별

*E. coli*, *B. cereus*, *S. aureus*에 대한 총 43가지 천연추출물의 1차적 항균효능 평가 결과, 3가지 대상균에 대해 공통적으로 뚜렷한 항균효능을 나타낸 천연추출물은 감초, 육계, 목단피, 백작약, 오배자, 황련으로 해당 6가지 천연추출물을 1차적으로 선별함.

추가적으로 기능성 연구를 위해 현재 고부가가치 식물로 각광 받고 있는 갈매보리수나무, 백련과 선행연구결과 및 사전 문헌조사를 통해 향암 천연물로서 활용가치가 높은 반지련, 소목, 생두를 추가 선정함 <Table 7, 8, 9>.

<Table 7> 항균효능 평가를 통한 한방천연물 선별

구분	천연추출물	생육저지환 (mm)		
		<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>
한방 천연물 (20가지)	감송향	-	-	-
	감초	+++	+++	+++
	과루	-	-	-
	곽향	-	-	-
	목단피	+	+++	++
	반지련	-	++	+
	반하	-	-	-
	백작약	+	++	+++
	복령	-	-	-
	산두근	-	-	-
	산약	-	-	-
	소엽	-	++	-
	속단	-	-	-
	오매	++	+	-
	오배자	+++	+++	+++
	유자	-	+	-
	육계	+	++	++
	천마	-	-	-
	황금	-	-	-
	황련	+	++	+++

- : 생육저지환 없음, + : 7~9 mm 생육저지환, ++ : 9~12 mm 생육저지환, +++ : 12~이상 mm 생육저지환

<Table 8> 항균효능 평가를 통한 개화식물 선별

구분	천연추출물	생육저지환 (mm)		
		<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>
개화 식물 (14가지)	관동화	-	-	-
	괴화	-	-	-
	갯잎	-	-	-
	고추	-	-	-
	마늘	-	-	-
	미역	-	-	-
	백화사설초	-	-	-
	부추	-	-	-
	생강	-	-	-
	신이	-	-	-
	쭈	-	-	-
	연자육	-	-	-
	오이	-	-	-
	양파	-	-	-

- : 생육저지환 없음, + : 7~9 mm 생육저지환, 9~12 mm 생육저지환, 12~이상 mm 생육저지환

<Table 9> 항균효능 평가를 통한 수목류 선별

구분	천연추출물	생육저지환 (mm)		
		<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>
수목류 (9가지)	갈매보리수나무	-	++	-
	녹차	-	-	+++
	매실	-	-	-
	소목	-	-	++
	유근피	-	-	-
	정향	-	-	-
	치자	-	-	-
	백련	-	+	-
	생두	-	-	++

- : 생육저지환 없음, + : 7~9 mm 생육저지환, 9~12 mm 생육저지환, 12~이상 mm 생육저지환

바. 선별된 후보물질의 최소저해농도 설정

선별된 천연추출물의 각 대상균에 대한 최소저해농도(Minimum Inhibitory Concentration, MIC)를 액체배지를 이용한 2-fold dilution 기법과 대상시료의 착색특성으로 인하여 액체배지를 이용한 최소저해농도를 측정할 수 없는 경우, 고체배지평판법을 통해 측정함 <Fig. 12>.



<Fig. 12> 액체 및 고체배지를 이용한 천연추출물의 최소저해농도 설정

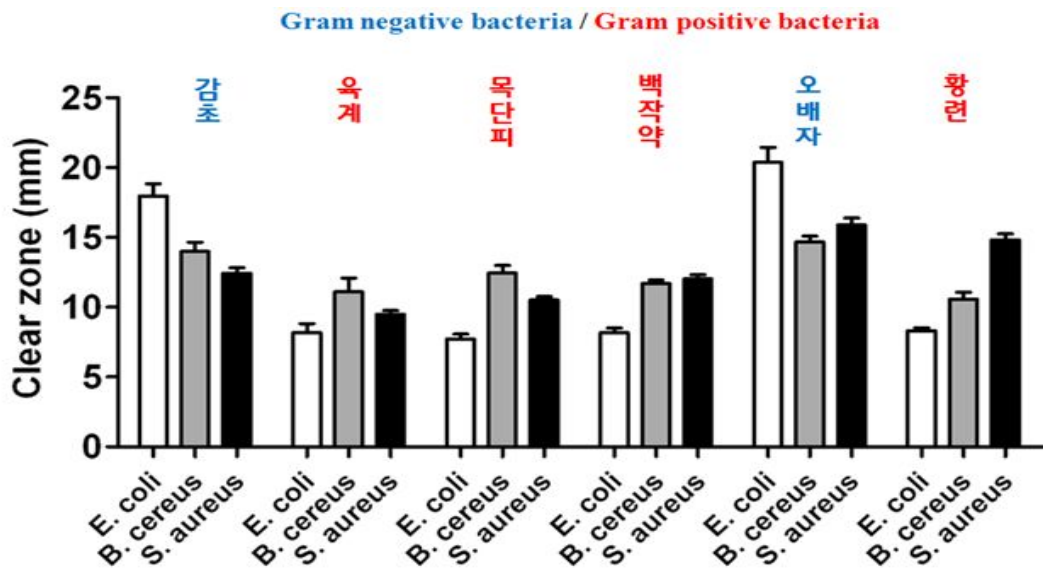
천연추출물의 최소저해농도 범위는 50 µg/mL에서 3,200 µg/mL로 측정되었으며, 전체적으로 낮은 농도에서도 항균효능이 뛰어나다. 각 천연추출물의 최소저해농도는 다음과 같음 <Table 10>.

<Table 10> 천연추출물의 최소저해농도

천연추출물	최소저해농도 (µg/mL)		
	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>
감초	>3,200	> 50	> 400
목단피	> 50	> 200	> 400
백작약	> 800	> 800	> 3,200
오배자	> 50	> 50	> 50
육계	> 3,200	> 200	> 400
황련	> 200	> 200	> 200

#### 사. 선별된 후보물질의 항균효능 다원적 비교평가

1차적으로 선별된 천연추출물의 항균효능을 각 대상균 별로 비교함으로써 추후 배합조성물 제조 시, 중요지표로 사용하고자 다원적 비교평가를 시행함. 그 결과, 감초와 오배자는 그람음성균인 *E. coli*에 더욱 효능이 뛰어나고, 육계, 목단피, 백작약, 황련은 그람양성균인 *B. cereus*와 *S. aureus*에 대해 항균효능이 뛰어나다 <Fig. 13>. 이 결과를 통해 배합조성물 제조 시, 그람음성균에 효능이 뛰어난 감초 및 오배자 그룹과 그람양성균에 효능이 뛰어난 육계, 목단피, 백작약, 황련 그룹을 적절한 조성비로 혼합함으로써 모든 주요 채소류 오염균에 대해 항균효능을 갖는 천연식품보존제의 제조 배합비율을 설정함.



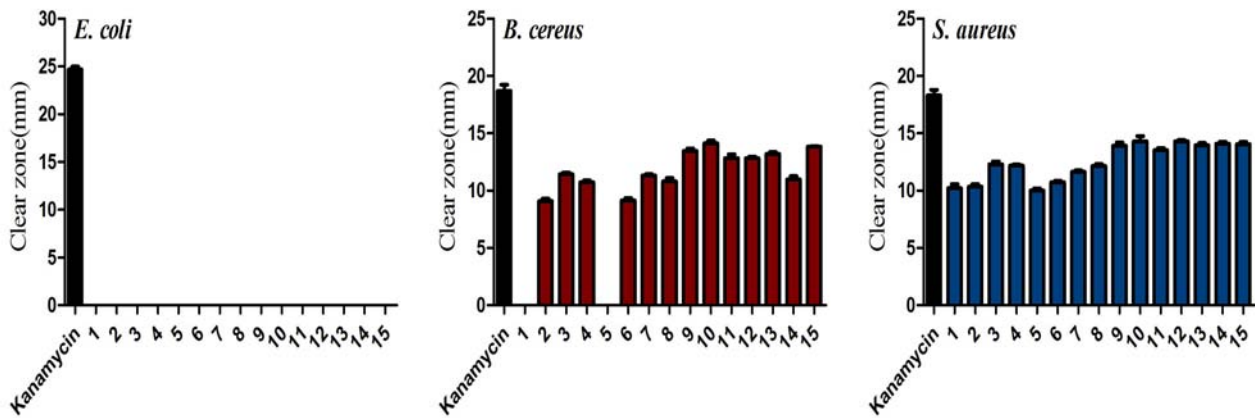
<Fig. 13> 천연추출물 항균효능의 다원적 비교평가

## 5. 2, 3차적 항균효능 평가를 통한 최적 추출조건 선정

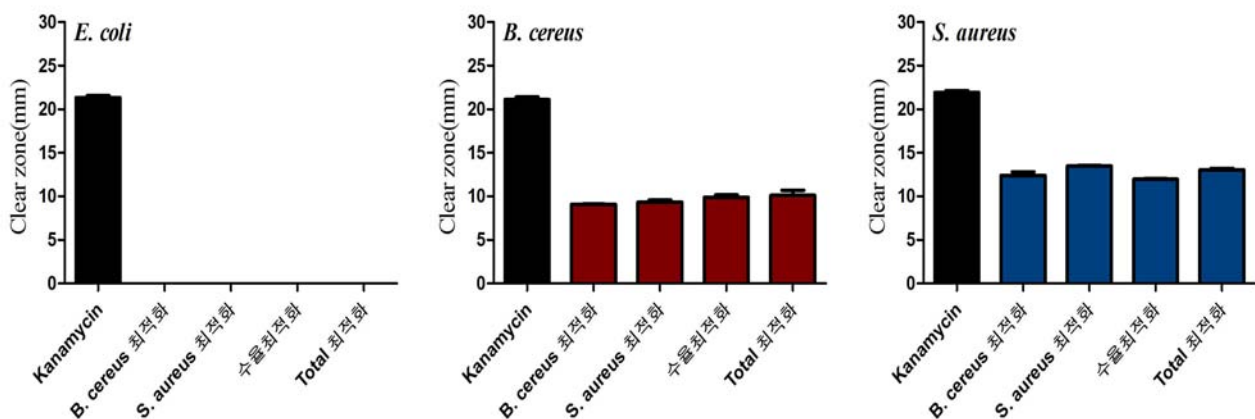
구축된 rapid screening 기법을 적용하여 총 43가지 천연추출물 중 1차적으로 선별된 6가지 천연물(감초, 복단피, 황련, 오배자, 백작약, 육계)의 최적화 추출조건을 선정함.

가. 감초의 최적화 추출조건 선정

1차적 항균효능 평가결과로 선별된 감초를 중심합성계획법에 의거한 15가지 조건으로 추출한 후 disc diffusion assay를 이용하여 2차적 항균효능을 평가함 <Fig. 14>. 2차적 항균효능 평가결과를 Mini TAP 통계프로그램에 적용하여 *E. coli* 최적화, *B. cereus* 최적화, *S. aureus* 최적화, 수율 최적화, total 최적화 총 5가지 조건으로 추출한 후 disc diffusion assay를 이용하여 3차적 항균효능을 평가함 <Fig. 15>.



<Fig. 14> 중심합성계획법에 의거한 감초추출물의 3가지 대상균에 대한 항균효능 평가



<Fig. 15> Mini TAP 통계프로그램에 의거한 감초추출물의 항균효능 평가

중심합성계획법에 의거한 15가지 조건의 추출물과 Mini TAP 통계프로그램에 의거한 5가지 조건의 추출물의 항균효능을 대조군인 kanamycin으로 보정하여 3가지 대상균에 대해 최대의

항균효능을 나타내는 최적화 추출물을 선정함 <Table 11>.

<Table 11> 최적화 조건의 감초추출물 선정

조건	수율	I · E*	kanamycin	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	평균
1	3.35	41.5	100	0	0	55.42	18.47
2	3.89	42.0	100	0	46.17	56.14	34.10
3	4.22	50.0	100	0	58.05	66.80	41.62
4	4.36	49.5	100	0	54.56	66.13	40.23
5	3.37	40.7	100	0	0	54.37	18.12
6	3.75	43.6	100	0	46.49	58.29	34.93
7	3.64	47.2	100	0	57.52	63.09	40.20
8	5.77	49.3	100	0	54.88	65.93	40.27
9	6.61	56.6	100	0	68.35	75.57	47.97
<b>10</b>	<b>5.86</b>	<b>58.1</b>	<b>100</b>	<b>0</b>	<b>71.75</b>	<b>77.58</b>	<b>49.78</b>
11	7.32	55.0	100	0	65.19	73.45	46.21
12	7.43	58.0	100	0	65.15	77.56	47.57
13	6.62	56.8	100	0	67.05	75.84	47.63
14	6.89	57.2	100	0	55.68	76.49	44.06
15	7.23	57.1	100	0	70.30	76.24	48.85
<i>B. cereus</i> 최적화	-	-	100	0	42.17	56.79	32.99
<i>S. aureus</i> 최적화	-	-	100	0	43.35	61.65	35.00
수율 최적화	-	-	100	0	45.96	54.68	33.55
total 최적화	-	-	100	0	46.97	59.71	35.56

I · E\*: Inhibitory effect

Disc diffusion assay 수행 결과, 대조군인 kanamycin의 생육저지환 크기를 절대값 100으로 보정함. 이때 각 조건 감초추출물의 생육저지환 크기를 상대적인 값으로 나타내고 평균값을 통해 3가지 대상균에 대해 최대의 항균효능을 나타내는 최적화 조건의 추출물을 선정함. 그 결과, 감초 최적화 조건 추출물은 중심합성계획법에 의거한 10번 조건의 추출물로 추출조건은 다음과 같음 <Table 12>.

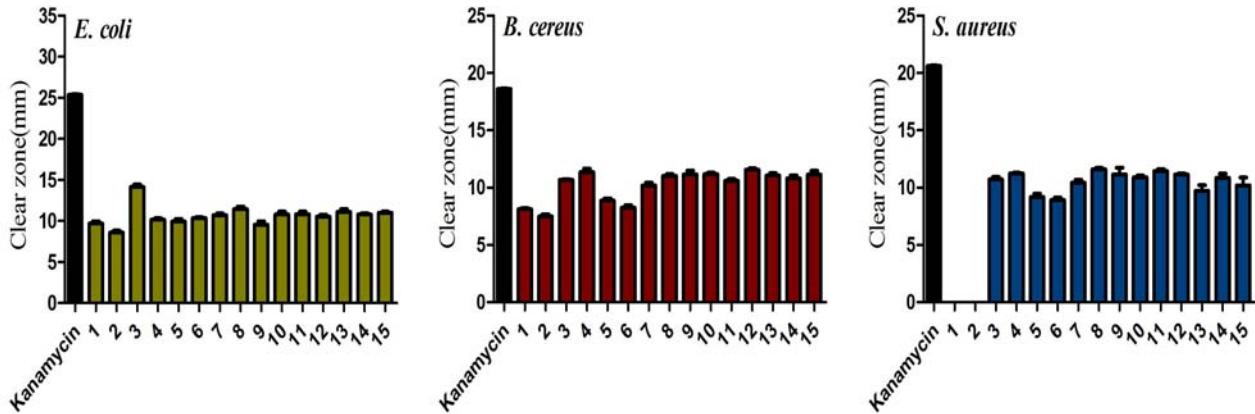
<Table 12> 감초추출물의 최적화 조건

감초	추출용매	온도	시간
10	E50% + W50%	60 °C	3h

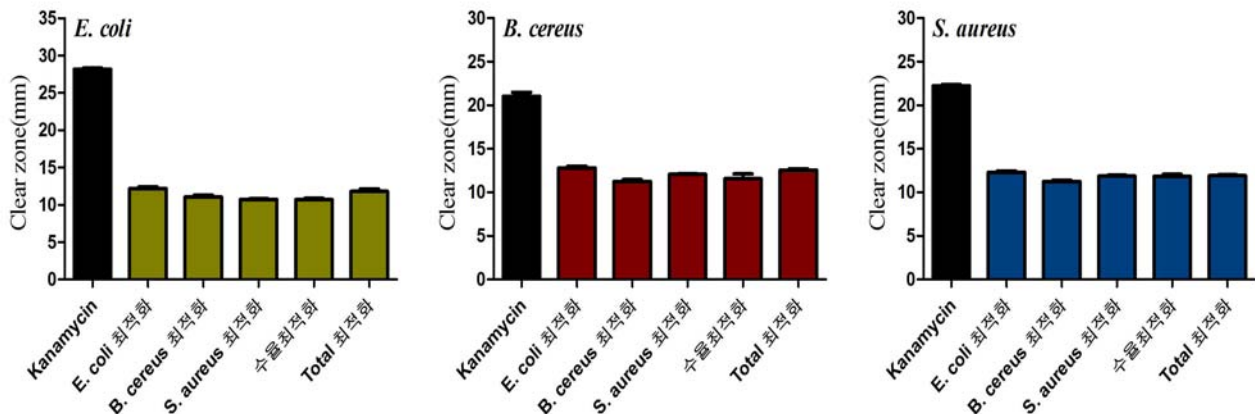


나. 목단피의 최적화 추출조건 선정

1차적 항균효능 평가결과로 선별된 목단피를 중심합성계획법에 의거한 15가지 조건으로 추출한 후 disc diffusion assay를 이용하여 2차적 항균효능을 평가함 <Fig. 16>. 2차적 항균효능 평가결과를 Mini TAP 통계프로그램에 적용하여 *E. coli* 최적화, *B. cereus* 최적화, *S. aureus* 최적화, 수율 최적화, total 최적화 총 5가지 조건으로 추출한 후 disc diffusion assay를 이용하여 3차적 항균효능을 평가함 <Fig. 17>.



<Fig. 16> 중심합성계획법에 의거한 목단피추출물의 3가지 대상균에 대한 항균효능 평가



<Fig. 17> Mini TAP 통계프로그램에 의거한 목단피추출물의 항균효능 평가

중심합성계획법에 의거한 15가지 조건의 추출물과 Mini TAP 통계프로그램에 의거한 5가지 조건의 추출물의 항균효능을 대조군인 kanamycin으로 보정하여 3가지 대상균에 대해 최대의 항균효능을 나타내는 최적화 추출물을 선정함 <Table 13>.

<Table 13> 최적화 조건의 목단피추출물 선정

조건	수율	I · E*	kanamycin	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	평균
1	9.20	39.5	100	39.47	45.60	0	28.36
2	8.62	35.0	100	34.96	42.13	0	25.70
<b>3</b>	<b>6.44</b>	<b>57.6</b>	<b>100</b>	<b>57.59</b>	<b>59.97</b>	<b>52.42</b>	<b>56.66</b>
4	8.45	41.3	100	41.34	63.83	55.01	53.39
5	8.27	40.4	100	40.37	49.83	44.93	45.04
6	8.86	42.2	100	42.17	46.37	43.74	44.09
7	6.80	43.6	100	43.64	57.35	51.03	50.67
8	7.88	46.7	100	46.70	62.01	56.71	55.14
9	12.51	38.9	100	38.90	62.70	54.62	52.07
10	12.88	44.0	100	43.98	62.76	53.35	53.36
11	12.12	44.1	100	44.07	59.56	55.99	53.21
12	12.89	42.9	100	42.87	64.91	54.49	54.09
13	12.34	45.3	100	45.26	62.16	47.59	51.67
14	12.56	43.9	100	43.92	60.74	53.05	52.57
15	12.93	44.7	100	44.73	62.54	49.89	52.39
<i>E. coli</i> 최적화	-	-	100	44.04	62.19	56.12	54.12
<i>B. cereus</i> 최적화	-	-	100	39.95	54.56	51.21	48.57
<i>S. aureus</i> 최적화	-	-	100	38.71	58.59	54.11	50.47
수율 최적화	-	-	100	38.61	56.16	53.94	49.57
total 최적화	-	-	100	42.62	61.00	54.26	52.63

I · E\*: Inhibitory effect

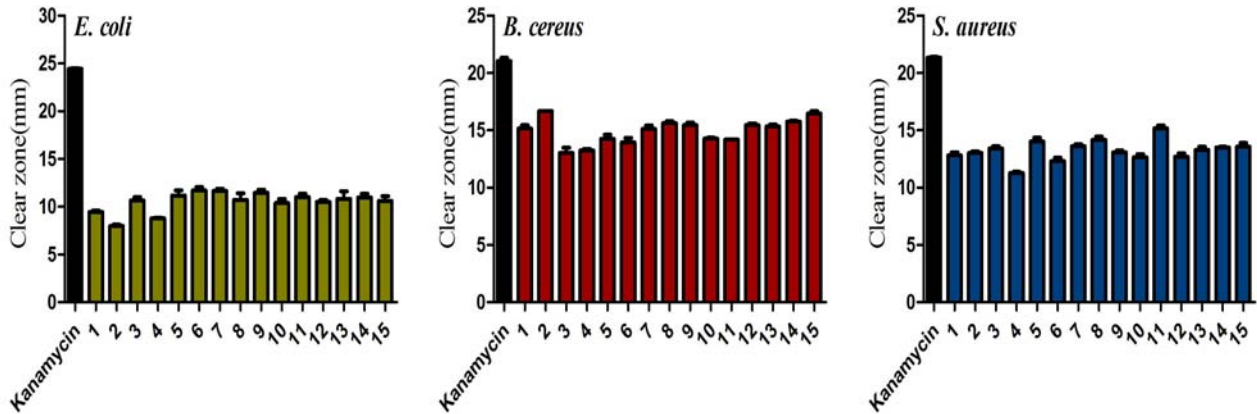
Disc diffusion assay 수행 결과, 대조군인 kanamycin의 생육저지환 크기를 절대값 100으로 보정함. 이때 각 조건 목단피추출물의 생육저지환 크기를 상대적인 값으로 나타내고 평균값을 통해 3가지 대상균에 대해 최대의 항균효능을 나타내는 최적화 조건의 추출물을 선정함. 그 결과, 목단피 최적화 조건 추출물은 중심합성계획법에 의거한 3번 조건의 추출물로 추출조건은 다음과 같음 <Table 14>.

<Table 14> 목단피추출물의 최적화 조건

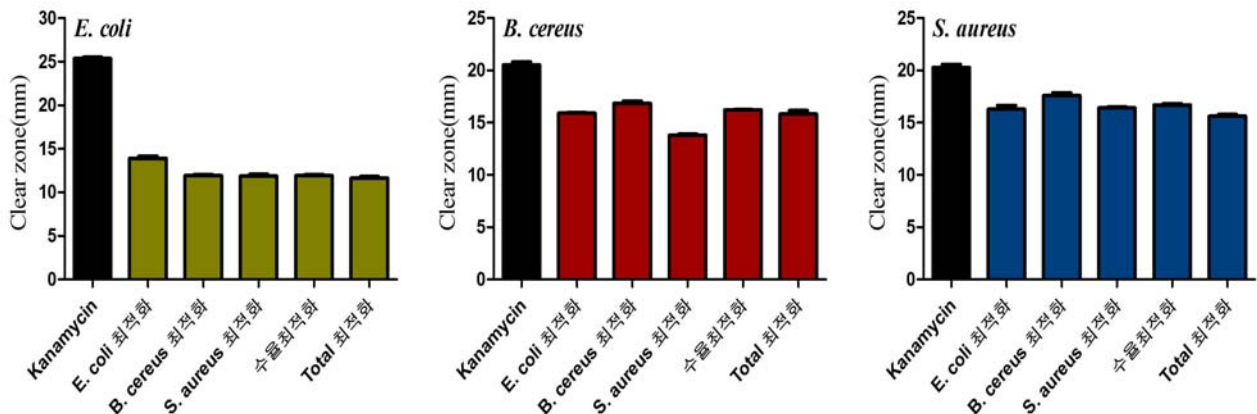
목단피	추출용매	온도	시간
3	E100%	60 °C	2h

다. 황련의 최적화 추출조건 선정

1차적 항균효능 평가결과로 선별된 황련을 중심합성계획법에 의거한 15가지 조건으로 추출한 후 disc diffusion assay를 이용하여 2차적 항균효능을 평가함 <Fig. 18>. 2차적 항균효능 평가결과를 Mini TAP 통계프로그램에 적용하여 *E. coli* 최적화, *B. cereus* 최적화, *S. aureus* 최적화, 수율 최적화, total 최적화 총 5가지 조건으로 추출한 후 disc diffusion assay를 이용하여 3차적 항균효능을 평가함 <Fig. 19>.



<Fig. 18> 중심합성계획법에 의거한 황련추출물의 3가지 대상균에 대한 항균효능 평가



<Fig. 19> Mini TAP 통계프로그램에 의거한 황련추출물의 항균효능 평가

중심합성계획법에 의거한 15가지 조건의 추출물과 Mini TAP 통계프로그램에 의거한 5가지 조건의 추출물의 항균효능을 대조군인 kanamycin으로 보정하여 3가지 대상균에 대해 최대의 항균효능을 나타내는 최적화 추출물을 선정함 <Table 15>.

<Table 15> 최적화 조건의 황련추출물 선정

조건	수율	I · E*	kanamycin	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	평균
1	9.17	81.0	100	40.16	80.86	65.82	62.28
2	9.41	89.1	100	33.88	88.95	66.87	63.23
3	4.73	69.0	100	45.20	69.49	68.95	61.21
4	5.67	70.8	100	37.24	70.75	57.95	55.31
5	8.81	76.2	100	47.42	76.08	72.05	65.18
6	8.99	74.5	100	49.67	74.36	63.29	62.44
7	4.98	80.8	100	49.44	80.67	69.88	66.66
8	5.75	83.6	100	45.52	83.41	72.75	67.23
9	9.87	82.6	100	48.59	82.45	67.28	66.11
10	10.08	76.3	100	44.02	76.15	64.98	61.72
11	9.50	75.9	100	46.71	75.73	77.89	66.78
12	10.37	82.6	100	44.65	82.38	65.17	64.07
13	10.15	82.0	100	46.00	81.81	68.27	65.36
14	10.49	84.2	100	46.65	84.01	69.33	66.66
15	10.33	88.1	100	45.07	87.87	69.69	67.54
<i>E. coli</i> 최적화	-	-	100	55.51	79.20	82.50	72.40
<i>B. cereus</i> 최적화	-	-	100	47.50	83.91	89.20	73.54
<i>S. aureus</i> 최적화	-	-	100	47.32	68.76	83.17	66.42
수율 최적화	-	-	100	47.48	80.78	84.57	70.94
total 최적화	-	-	100	46.42	78.77	79.09	68.09

I · E\*: Inhibitory effect

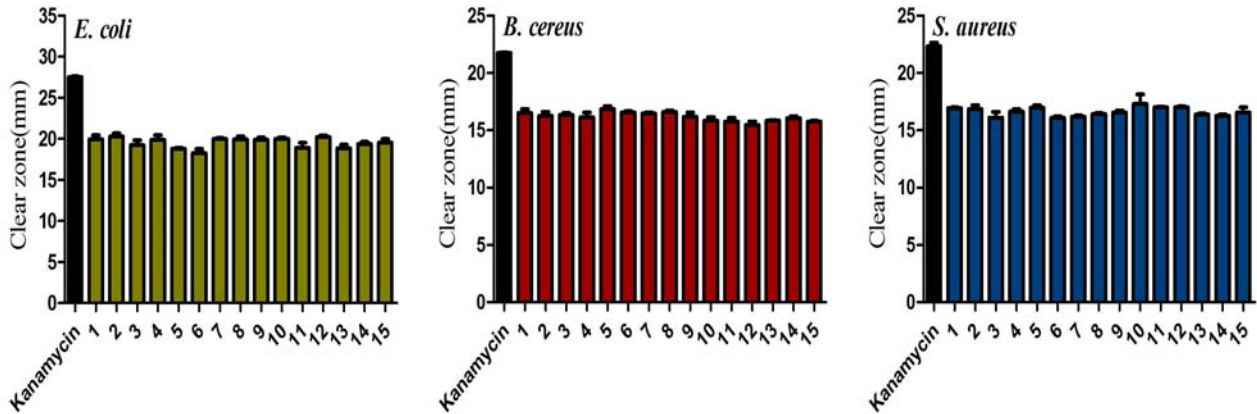
Disc diffusion assay 수행 결과, 대조군인 kanamycin의 생육저지환 크기를 절대값 100으로 보정함. 이때 각 조건 황련추출물의 생육저지환 크기를 상대적인 값으로 나타내고 평균값을 통해 3가지 대상균에 대해 최대의 항균효능을 나타내는 최적화 조건의 추출물을 선정함. 그 결과, 황련 최적화 조건 추출물은 Mini TAP 통계프로그램에 의거한 *B. cereus* 최적화 조건의 추출물로 추출조건은 다음과 같음 <Table 16>.

<Table 16> 황련추출물의 최적화 조건

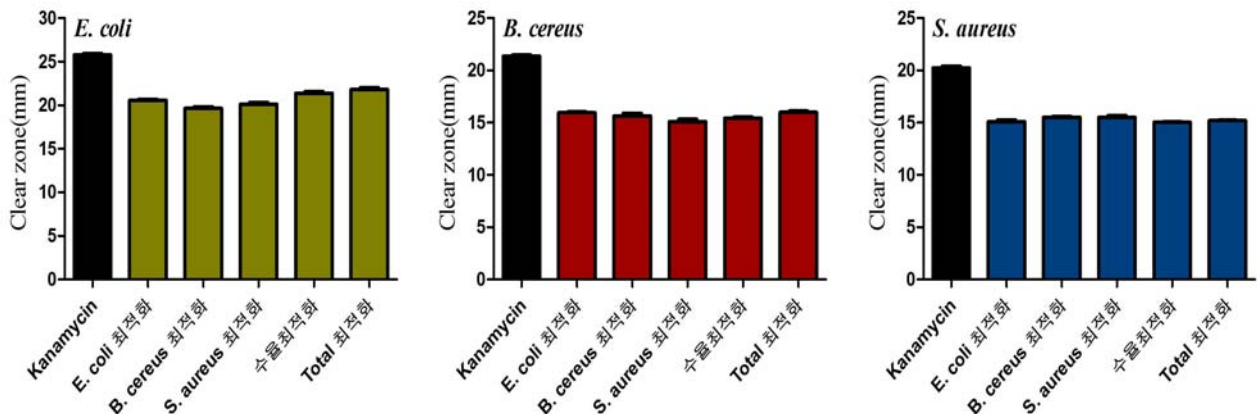
황련	추출용매	온도	시간
<i>B. cereus</i> 최적화	E50% + W50%	70 °C	2h

라. 오배자의 최적화 추출조건 선정

1차적 항균효능 평가결과로 선별된 오배자를 중심합성계획법에 의거한 15가지 조건으로 추출한 후 disc diffusion assay를 이용하여 2차적 항균효능을 평가함 <Fig. 20>. 2차적 항균효능 평가결과를 Mini TAP 통계프로그램에 적용하여 *E. coli* 최적화, *B. cereus* 최적화, *S. aureus* 최적화, 수율 최적화, total 최적화 총 5가지 조건으로 추출한 후 disc diffusion assay를 이용하여 3차적 항균효능을 평가함 <Fig. 21>.



<Fig. 20> 중심합성계획법에 의거한 오배자추출물의 3가지 대상균에 대한 항균효능 평가



<Fig. 21> Mini TAP 통계프로그램에 의거한 오배자추출물의 항균효능 평가

중심합성계획법에 의거한 15가지 조건의 추출물과 mini TAP 통계프로그램에 의거한 5가지 조건의 추출물의 항균효능을 대조군인 kanamycin으로 보정하여 3가지 대상균에 대해 최대의 항균효능을 나타내는 최적화 추출물을 선정함 <Table 17>.

<Table 17> 최적화 조건의 오배자추출물 선정

조건	수율	I · E*	kanamycin	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	평균
1	0.97	124.0	100	73.89	78.66	79.74	77.43
2	2.78	129.3	100	75.12	77.38	79.32	77.27
3	2.24	129.6	100	71.17	77.77	75.85	74.93
4	2.82	127.1	100	73.66	76.87	78.39	76.31
5	1.10	119.6	100	69.55	80.28	79.83	76.55
6	2.18	126.4	100	67.63	78.93	75.76	74.11
7	1.74	127.2	100	73.93	78.46	76.24	76.21
8	2.73	131.2	100	73.88	79.15	77.26	76.76
9	3.74	123.8	100	73.61	77.06	77.83	76.17
10	4.38	122.7	100	74.12	75.57	81.35	77.01
11	4.27	132.8	100	70.02	75.06	79.97	75.02
12	5.55	120.4	100	74.85	73.69	80.02	76.19
13	4.74	109.8	100	69.84	75.44	77.04	74.11
14	4.47	126.4	100	71.71	76.53	76.63	74.96
15	4.85	116.7	100	72.41	75.07	77.84	75.11
<i>E. coli</i> 최적화	-	-	100	80.54	75.17	75.42	77.04
<i>B. cereus</i> 최적화	-	-	100	76.95	73.68	77.54	76.06
<i>S. aureus</i> 최적화	-	-	100	78.83	71.16	77.47	75.82
수율 최적화	-	-	100	83.80	72.72	75.14	77.22
<b>total 최적화</b>	-	-	<b>100</b>	<b>85.47</b>	<b>75.41</b>	<b>75.94</b>	<b>78.94</b>

I · E\*: Inhibitory effect

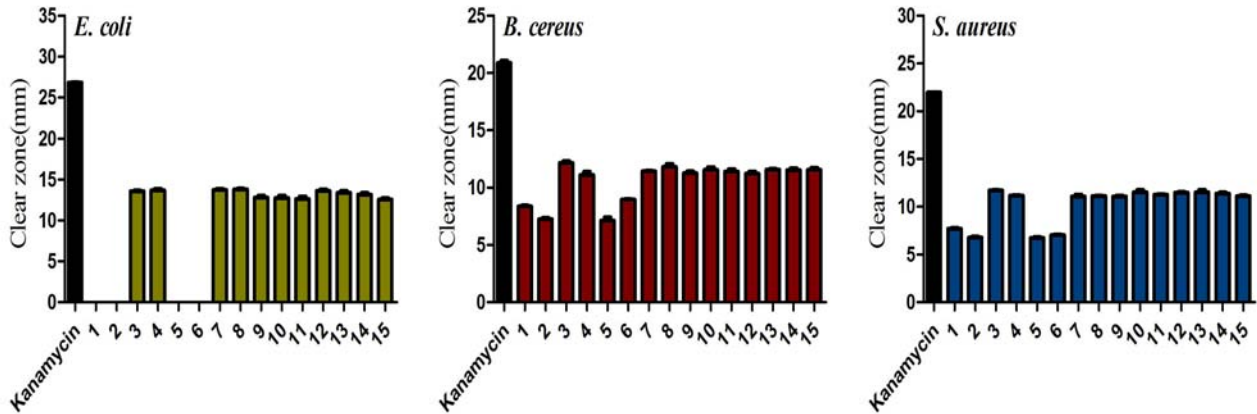
Disc diffusion assay 수행 결과, 대조균인 kanamycin의 생육저지환 크기를 절대값 100으로 보정함. 이때 각 조건 오배자추출물의 생육저지환 크기를 상대적인 값으로 나타내고 평균값을 통해 3가지 대상균에 대해 최대의 항균효능을 나타내는 최적화 조건의 추출물을 선정함. 그 결과, 오배자 최적화 조건 추출물은 Mini TAP 통계프로그램에 의거한 total 최적화 조건의 추출물로 추출조건은 다음과 같음 <Table 18>.

<Table 18> 오배자추출물의 최적화 조건

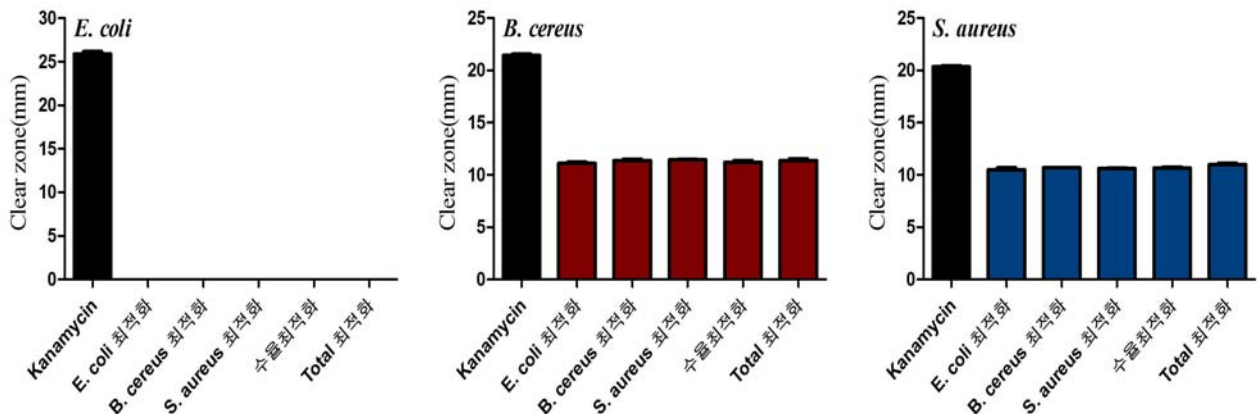
오배자	추출용매	온도	시간
total 최적화	E73.5% + W26.5%	80 °C	1h

마. 백작약의 최적화 추출조건 선정

1차적 항균효능 평가결과로 선별된 백작약을 중심합성계획법에 의거한 15가지 조건으로 추출한 후 disc diffusion assay를 이용하여 2차적 항균효능을 평가함 <Fig. 22>. 2차적 항균효능 평가결과를 Mini TAP 통계프로그램에 적용하여 *E. coli* 최적화, *B. cereus* 최적화, *S. aureus* 최적화, 수율 최적화, total 최적화 총 5가지 조건으로 추출한 후 disc diffusion assay를 이용하여 3차적 항균효능을 평가함 <Fig. 23>.



<Fig. 22> 중심합성계획법에 의거한 백작약추출물의 3가지 대상균에 대한 항균효능 평가



<Fig. 23> Mini TAP 통계프로그램에 의거한 백작약추출물의 항균효능 평가

중심합성계획법에 의거한 15가지 조건의 추출물과 Mini TAP 통계프로그램에 의거한 5가지 조건의 추출물의 항균효능을 대조군인 kanamycin으로 보정하여 3가지 대상균에 대해 최대의 항균효능을 나타내는 최적화 추출물을 선정함 <Table 19>.

<Table 19> 최적화 조건의 백작약추출물 선정

조건	수율	I · E*	kanamycin	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	평균
1	11.00	41.3	100	0	41.28	36.16	25.81
2	9.80	35.8	100	0	35.85	31.88	22.58
<b>3</b>	<b>6.92</b>	<b>60.0</b>	<b>100</b>	<b>51.34</b>	<b>60.00</b>	<b>54.94</b>	<b>55.43</b>
4	7.52	54.9	100	51.78	54.90	52.47	53.05
5	10.13	35.2	100	0	35.24	31.60	22.28
6	10.61	44.3	100	0	44.26	32.96	25.74
7	6.21	56.4	100	51.88	56.45	51.97	53.43
8	6.44	58.3	100	52.26	58.32	52.19	54.26
9	12.47	55.5	100	48.36	55.52	52.02	51.97
10	12.53	57.0	100	48.28	57.01	54.13	53.14
11	12.66	56.3	100	47.65	56.33	52.75	52.24
12	11.96	55.4	100	51.43	55.39	53.86	53.56
13	12.45	57.1	100	50.56	57.09	54.02	53.89
14	12.32	57.0	100	49.83	56.96	53.38	53.39
15	12.54	57.1	100	47.45	57.05	52.03	52.18
<i>E. coli</i> 최적화	-	-	100	0	52.54	51.92	34.82
<i>B. cereus</i> 최적화	-	-	100	0	53.82	52.85	35.56
<i>S. aureus</i> 최적화	-	-	100	0	54.14	52.46	35.53
수율 최적화	-	-	100	0	53.08	52.66	35.25
total 최적화	-	-	100	0	53.82	54.35	36.06

I · E\*: Inhibitory effect

Disc diffusion assay 수행 결과, 대조군인 kanamycin의 생육저지환 크기를 절대값 100으로 보정함. 이때 각 조건 백작약추출물의 생육저지환 크기를 상대적인 값으로 나타내고 평균값을 통해 3가지 대상균에 대해 최대의 항균효능을 나타내는 최적화 조건의 추출물을 선정함. 그 결과, 백작약 최적화 조건 추출물은 중심합성계획법에 의거한 3번 조건의 추출물로 추출조건은 다음과 같음 <Table 20>.

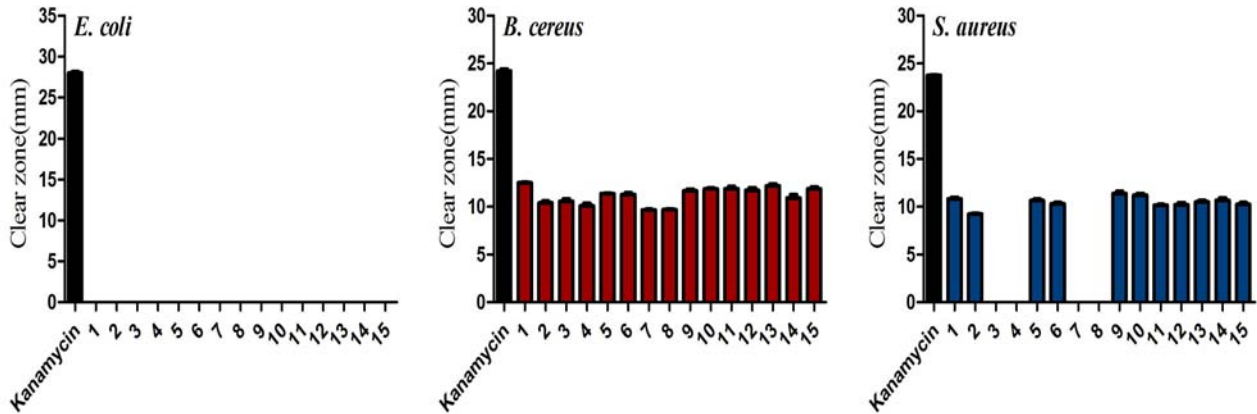
<Table 20> 백작약추출물의 최적화 조건

백작약	추출용매	온도	시간
3	E100%	60 °C	2h

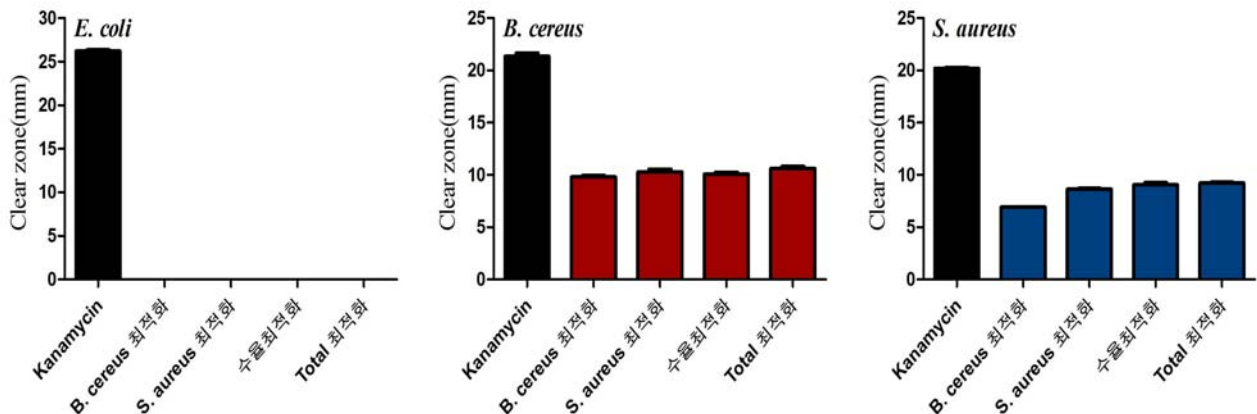


바. 육계의 최적화 추출조건 선정

1차적 항균효능 평가결과로 선별된 육계를 중심합성계획법에 의거한 15가지 조건으로 추출한 후 disc diffusion assay를 이용하여 2차적 항균효능을 평가함 <Fig. 24>. 2차적 항균효능 평가결과를 Mini TAP 통계프로그램에 적용하여 *E. coli* 최적화, *B. cereus* 최적화, *S. aureus* 최적화, 수율 최적화, total 최적화 총 5가지 조건으로 추출한 후 disc diffusion assay를 이용하여 3차적 항균효능을 평가함 <Fig. 25>.



<Fig. 24> 중심합성계획법에 의거한 육계추출물의 3가지 대상균에 대한 항균효능 평가



<Fig. 25> Mini TAP 통계프로그램에 의거한 육계추출물의 항균효능 평가

중심합성계획법에 의거한 15가지 조건의 추출물과 Mini TAP 통계프로그램에 의거한 5가지 조건의 추출물의 항균효능을 대조군인 kanamycin으로 보정하여 3가지 대상균에 대해 최대의 항균효능을 나타내는 최적화 추출물을 선정함 <Table 21>.

<Table 21> 최적화 조건의 육계추출물 선정

조건	수율	I · E*	kanamycin	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	평균
1	3.35	53.4	100	0	53.45	48.03	33.83
2	3.89	44.5	100	0	44.49	40.89	28.46
3	4.22	45.1	100	0	45.13	0	15.04
4	4.36	43.1	100	0	43.05	0	14.35
5	3.37	48.5	100	0	48.55	47.10	31.88
6	3.75	48.2	100	0	48.18	45.71	31.30
7	3.64	41.3	100	0	41.26	0	13.75
8	5.77	41.3	100	0	41.34	0	13.78
9	6.61	49.8	100	0	49.77	50.45	33.41
10	5.86	50.7	100	0	50.70	49.62	33.44
11	7.32	50.7	100	0	50.74	44.97	31.90
12	7.43	50.0	100	0	50.04	45.24	31.76
13	6.62	52.1	100	0	52.08	46.41	32.83
14	6.89	46.6	100	0	46.57	47.26	31.28
15	7.23	50.7	100	0	50.70	45.31	32.00
<i>B. cereus</i> 최적화	-	-	100	0	46.45	34.48	26.98
<i>S. aureus</i> 최적화	-	-	100	0	48.81	43.03	30.61
수율 최적화	-	-	100	0	47.75	45.09	30.95
total 최적화	-	-	100	0	50.36	45.90	32.09

I · E\*: Inhibitory effect

Disc diffusion assay 수행 결과, 대조군인 kanamycin의 생육저지환 크기를 절대값 100으로 보정함. 이때 각 조건 육계추출물의 생육저지환 크기를 상대적인 값으로 나타내고 평균값을 통해 3가지 대상균에 대해 최대의 항균효능을 나타내는 최적화 조건의 추출물을 선정함. 그 결과, 육계 최적화 조건 추출물은 중심합성계획법에 의거한 1번 조건의 추출물로 추출조건은 다음과 같음 <Table 22>.

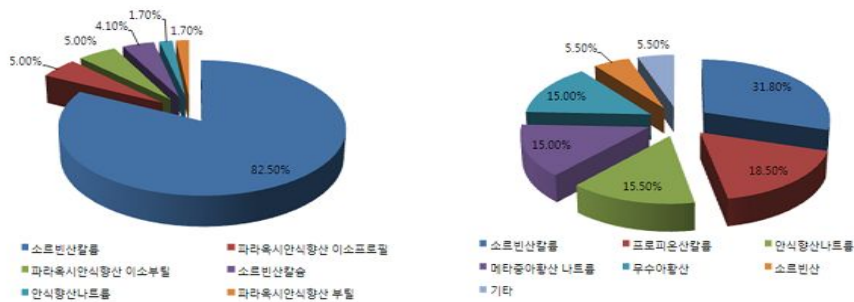
<Table 22> 육계추출물의 최적화 조건

육계	추출용매	온도	시간
1	W100%	60 °C	2h

## 6. 화학보존제와의 항균효능 비교평가

### 가. 대표적인 화학보존제 성분 선정

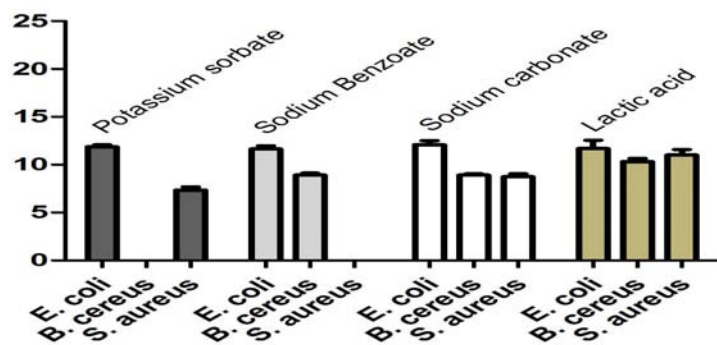
식품의약품안전청에 따르면 국내식품 및 수입식품에 쓰이는 대표적인 화학보존제 성분의 현황은 아래와 같음 <Fig. 26>. 국내식품의 경우 소르빈산칼륨(potassium sorbate)이 80%이상 차지하고 있으며, 수입식품의 경우 소르빈산칼륨과 안식향산나트륨(sodium benzoate)이 50%가량 차지하고 있음. 소르빈산칼륨은 미생물의 발육을 억제하여 음식물의 부패를 막고자 사용하며, 안식향산나트륨은 주로 식음료의 보존제로써 사용됨. 따라서 대표적인 이 두 성분뿐만 아니라 널리 쓰이고 있는 탄산나트륨(sodium carbonate), 젖산(lactic acid)의 항균활성을 평가하고자 함. 본 연구에서는 1차적으로 선별된 6가지 천연추출물과 기존 화학보존제로 쓰이고 있는 성분과의 항균효능 비교를 통해, 향후 대상 천연추출물의 천연식품보존제로서의 적용성 및 타당성을 평가하고자 함.



<Fig. 26> 국내식품 및 수입식품 표기조사에 따른 화학보존제 성분현황

### 나. 대상균에 대한 화학보존제 성분의 항균효능 평가

3가지 대상균에 대한 화학보존제 성분의 항균효능을 disc diffusion assay를 이용하여 평가함. MHA 배지에 대상균을 도말하고 6 mm 디스크를 올린 후, 각각의 화학보존제 성분(100  $\mu$ g/ $\mu$ L)을 20  $\mu$ L 접종하여 디스크당 최종 2 mg씩 처리함. 대상균을 37  $^{\circ}$ C 인큐베이터에서 각각 배양 후, 화학보존제 성분에 의해 생성된 생육저지환(clear zone)을 측정하여 항균효능을 평가함 <Fig. 27>.



<Fig. 27> 3가지 대상균에 대한 화학보존제 성분의 항균효능 평가

항균효능 평가결과, 소르빈산칼륨은 *E. coli*와 *S. aureus*에 대해서만 항균효능이 있었고, 안식향산나트륨은 *E. coli*와 *B. cereus*에 대해서만 항균효능이 있는 것으로 평가됨. 반면 탄산나트륨과 젖산은 3가지 대상균 모두에 대해서 항균효능이 있는 것으로 평가됨 <Table 23>.

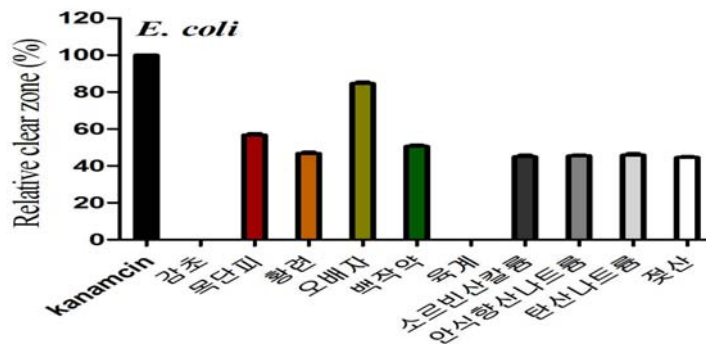
<Table 23> 3가지 대상균에 대한 화학보존제 성분의 생육저지환 크기

화학보존제 성분	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>
소르빈산칼륨	11.87 ± 0.34	-	7.33 ± 0.58
안식향산나트륨	11.63 ± 0.57	8.90 ± 0.36	-
탄산나트륨	12.07 ± 0.75	8.90 ± 0.26	8.73 ± 0.57
젖산	11.67 ± 1.53	10.33 ± 0.58	11.00 ± 1.00

다. 화학보존제 성분과 천연추출물과의 항균효능 비교평가

(1) *E. coli*에 대한 항균효능 비교평가

선별된 6가지 천연물과 4가지 화학보존제 성분과의 항균효능을 비교 평가함. 위 결과에서 선정된 최적화 6가지 천연물의 항균효능을 살펴보면 *E. coli*에 대해서 항균효능이 나타나지 않았던 감초, 육계를 제외한 목단피, 황련, 오배자, 백작약의 항균효능은 4가지 화학보존제 성분보다 항균능이 우수함을 확인함 <Fig. 28>, <Table 24>.



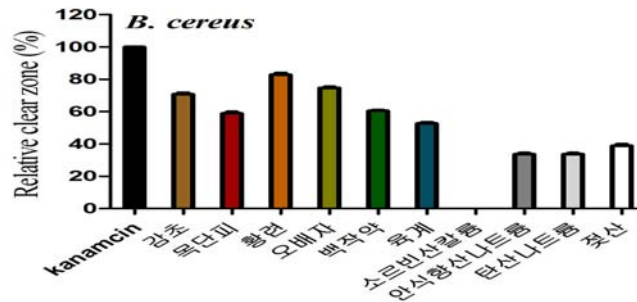
<Fig. 28> *E. coli*에 대한 항균효능

<Table 24> *E. coli*에 대한 상대적 항균효능 비교평가

대상균	순위	대상물질	항균활성도 (%)
<i>E. coli</i>	1	kanamycin	100
	2	오배자	84.7
	3	목단피	56.8
	4	백작약	50.7
	5	황련	46.8
	6	탄산나트륨	45.8
	7	안식향산나트륨	45.5
	8	소르빈산칼륨	45.0
	9	젖산	44.6
	10	감초	-
	11	육계	-

(2) *B. cereus*에 대한 항균효능 비교평가

위 결과에서 선정된 최적화 6가지 천연물의 항균효능을 살펴보면 *B. cereus*에 대해서 모두 탁월한 항균효능을 나타내며, 4가지 화학보존제 성분보다 더 뛰어남. 화학보존제 성분 중 소르빈산칼륨은 *B. cereus*에 대해서 항균효능이 나타나지 않음 <Fig. 29>, <Table 25>.



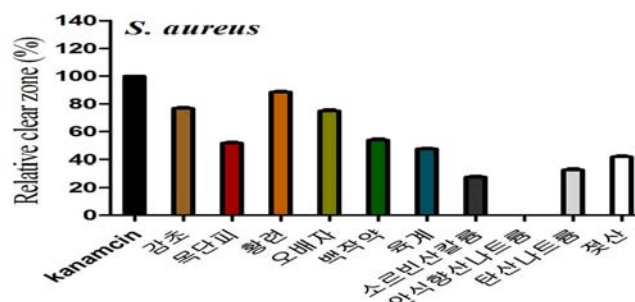
<Fig. 29> *B. cereus*에 대한 항균효능

<Table 25> *B. cereus*에 대한 상대적 항균효능 비교평가

대상군	순위	대상물질	항균활성도 (%)
<i>B. cereus</i>	1	kanamycin	100
	2	황련	83.0
	3	오배자	74.7
	4	감초	70.9
	5	백작약	60.5
	6	목단피	59.0
	7	육계	52.7
	8	젓산	39.0
	9	탄산나트륨	33.7
	10	안식향산나트륨	33.7
	11	소르빈산칼륨	-

(3) *S. aureus*에 대한 항균효능 비교평가

위 결과에서 선정된 최적화 6가지 천연물의 항균효능을 살펴보면 *S. aureus*에 대해서 모두 탁월한 항균효능을 나타내며, 4가지 화학보존제 성분보다 더 뛰어남. 화학보존제 성분 중 안식향산나트륨은 *S. aureus*에 대해서 항균효능이 나타나지 않음 <Fig. 30>, <Table 26>.



<Fig. 30> *S. aureus*에 대한 항균효능

<Table 26> *S. aureus*에 대한 상대적 항균효능 비교평가

대상균	순위	대상물질	항균활성도 (%)
<i>S. aureus</i>	1	kanamycin	100
	2	황련	88.6
	3	감초	76.8
	4	오배자	75.0
	5	백작약	54.0
	6	목단피	51.7
	7	육계	47.5
	8	젓산	41.8
	9	탄산나트륨	32.9
	10	소르빈산칼륨	27.7
	11	안식향산나트륨	-

위 결과에서 분석된 바와 같이 선별된 6가지 천연물 모두 기존 화학보존제 성분보다 우월한 항균효능을 나타냄. 따라서 향후 이들 천연물의 배합으로 개발될 천연보존제는 뛰어난 항균효능을 가지며 안전성이 뛰어난 식품보존제 성분으로써 충분히 활용가치가 있을 것으로 사료됨.

## 7. 항균효능 극대화를 위한 최적의 혼합조성비 산출

구축된 rapid screening 기법을 적용하여 총 43가지 대상 천연물 중 선별된 6가지 천연물(감초, 목단피, 백작약, 오배자, 육계, 황련)에 대해 다양한 비율로 혼합하여 최대의 항균효능을 위한 최적의 조성비를 가지는 formulation 혼합물을 제조하고, 각각의 식품 위해균에 대해 항균효능을 평가함.

가. 감초, 목단피, 황련추출물의 혼합에 따른 항균효능 평가

선별된 6가지 천연물 중 그람음성균인 *E. coli*에 대해 뛰어난 효능을 보였던 감초와 그람양성균인 *B. cereus*와 *S. aureus*에 대해 뛰어난 효능을 보였던 목단피, 황련을 다양한 비율로 혼합하여 항균효능을 평가함. 혼합비율은 1 : 1 : 1, 7 : 2 : 1, 3 : 1 : 1 로 동등, 강 : 중 : 약, 강 : 약 : 약 의 조성으로 혼합함 <Table 27>. 1차적 추출조건의 감초, 목단피, 황련추출물과 가장 활성이 뛰어나게 나온 조건별 추출물(감초 10번, 목단피 3번, 황련 15번)에 대해서 비율별로 혼합한 후, 항균효능을 disc diffusion assay로 평가함. 그 결과 세 가지 혼합추출물이 단독 추출물보다 모든 대상균에 대해 항균효능이 우월하고, 조건별 혼합추출물이 1차적 혼합추출물보다 항균효능이 우월함. 특히 조성비가 감초 : 목단피 : 황련 = 1 : 2 : 7 일 때, 항균효능이 가장 뛰어나 <Table 28, 29>.

<Table 27> 감초, 목단피, 황련의 혼합비율

조건	추출물	혼합비율
1	감초 (33.3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) + 목단피 (33.3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) + 황련 (33.3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	1 : 1 : 1
2	감초 (60 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) + 목단피 (20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) + 황련 (20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	3 : 1 : 1
3	감초 (20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) + 목단피 (60 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) + 황련 (20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	1 : 3 : 1
4	감초 (20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) + 목단피 (20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) + 황련 (60 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	1 : 1 : 3
5	감초 (70 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) + 목단피 (20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) + 황련 (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	7 : 2 : 1
6	감초 (70 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) + 목단피 (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) + 황련 (20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	7 : 1 : 2
7	감초 (20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) + 목단피 (70 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) + 황련 (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	2 : 7 : 1
8	감초 (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) + 목단피 (70 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) + 황련 (20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	1 : 7 : 2
9	감초 (20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) + 목단피 (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) + 황련 (70 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	2 : 1 : 7
10	감초 (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) + 목단피 (20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) + 황련 (70 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	1 : 2 : 7

<Table 28> 감초, 목단피, 황련 혼합추출물의 생육저지환 크기

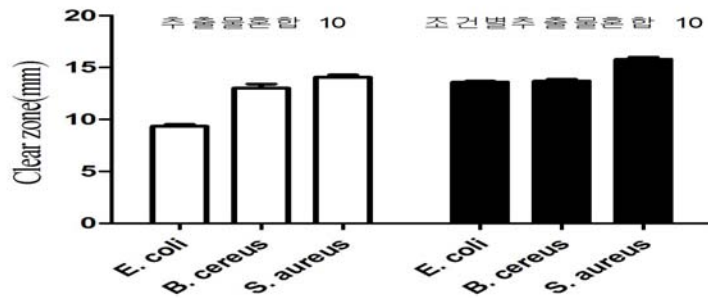
조건	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>
Kanamycin (1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	26.40 ± 0.54	21.49 ± 0.33	21.02 ± 0.50
1	7.94 ± 0.12	9.59 ± 0.50	10.51 ± 0.39
2	9.97 ± 0.63	9.66 ± 0.25	10.67 ± 0.95
3	9.15 ± 0.26	8.96 ± 1.03	8.44 ± 0.65
4	7.94 ± 0.23	11.51 ± 0.27	12.31 ± 0.41
5	9.78 ± 0.98	10.27 ± 0.24	10.41 ± 0.82
6	11.32 ± 0.24	10.54 ± 0.71	11.01 ± 0.33
7	9.66 ± 0.69	8.5 ± 0.87	9.73 ± 0.13
8	8.61 ± 1.36	8.83 ± 0.99	8.95 ± 0.78
9	8.85 ± 0.75	12.38 ± 0.28	12.92 ± 0.16
10	9.35 ± 0.3	13.02 ± 0.66	14.08 ± 0.37

*B. cereus*와 *S. aureus*에 대해서 10번 추출물의 항균효능이 가장 뛰어나며, *E. coli*에 대해서는 6번 추출물의 항균효능이 가장 뛰어나지만 평균값으로 보면 10번 추출물이 3가지 균주에 대해 항균효능이 가장 우월함.

<Table 29> 감초, 목단피, 황련 조건별 혼합추출물의 생육저지환 크기

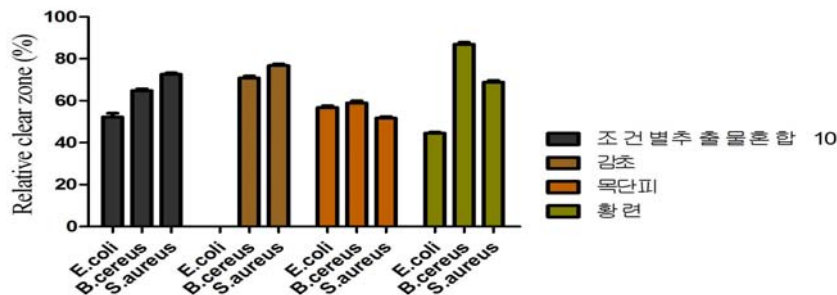
추출물 조건	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>
Kanamycin (1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	26.95 $\pm$ 0.62	20.91 $\pm$ 0.42	21.54 $\pm$ 0.48
1	10.18 $\pm$ 0.10	10.88 $\pm$ 0.47	12.36 $\pm$ 0.31
2	9.95 $\pm$ 0.78	10.91 $\pm$ 0.53	11.35 $\pm$ 0.34
3	10.05 $\pm$ 0.80	9.24 $\pm$ 0.32	10.13 $\pm$ 0.04
4	10.47 $\pm$ 0.26	13.92 $\pm$ 0.54	14.40 $\pm$ 0.03
5	11.01 $\pm$ 1.12	11.45 $\pm$ 0.63	10.60 $\pm$ 0.69
6	11.00 $\pm$ 0.74	10.56 $\pm$ 0.32	12.01 $\pm$ 0.79
7	-	9.11 $\pm$ 1.17	10.17 $\pm$ 0.12
8	-	9.57 $\pm$ 0.94	9.10 $\pm$ 0.60
9	11.00 $\pm$ 0.21	13.64 $\pm$ 0.27	15.78 $\pm$ 0.17
<b>10</b>	<b>13.61 <math>\pm</math> 0.14</b>	<b>13.71 <math>\pm</math> 0.30</b>	<b>15.79 <math>\pm</math> 0.36</b>

*E. coli*와 *S. aureus*에 대해서 10번 추출물의 항균효능이 가장 뛰어나며, *B. cereus*에 대해서는 4번 추출물의 항균효능이 가장 뛰어나지만 평균값으로 보면 10번 추출물이 3가지 균주에 대해 항균효능이 가장 우월함 <Fig. 31>.



<Fig. 31> 1차적 혼합추출물과 조건별 혼합추출물의 항균효능 비교평가

*E. coli*와 *S. aureus*에 대해서 조건별 혼합추출물의 항균효능이 더 뛰어나며, *B. cereus*에 대해서는 두 혼합추출물의 항균효능이 비슷하지만, 평균값으로 보면 조건별 혼합추출물이 1차적 혼합추출물보다 항균효능이 보다 높음을 확인함 <Fig. 32>.



<Fig. 32> 조건별 혼합추출물과 단독추출물의 항균효능 비교평가



감초, 목단피, 황련 혼합추출물의 적용이 *E. coli*에 대한 감초, 황련의 항균효능을 극대화 시켜주며, *B. cereus*에 대한 목단피의 항균효능을 극대화함. *S. aureus*에 대해서는 목단피, 황련의 항균효능을 극대화 시키는 효과를 나타냄. 위 결과의 통계적 분석에서도 3가지 대상균에 대한 단독추출물 적용보다 혼합추출물 적용이 우월한 항균효능을 나타내는 것으로 보아 각각의 선정된 천연추출물 혼합 적용이 3가지 유해미생물 대상균에 대해 감초, 목단피, 황련의 부족한 항균효능을 극대화시킬 수 있는 것으로 평가됨.

#### 나. 감초, 목단피, 황련 혼합추출물의 최소저해농도 설정

감초, 목단피, 황련 혼합추출물의 3가지 대상균에 대한 최소저해농도(Minimum Inhibitory Concentration, MIC)를 2-fold dilution 기법을 적용하여 액체배지 상에서 평가함. 대상균이 성장하지 않은 상태에서 추출물이 함유하고 있는 고유의 색상을 스탠다드로 설정하여 OD값을 측정하고, 대상균이 성장한 이후의 OD값을 측정하여 차감함으로써 정확한 최소억제농도를 설정함. [최종 OD값 - 스탠다드 OD값]. 최종적으로 측정된 OD600 값을 One-way ANOVA (Dunnett법)로 통계 처리하여 비교분석함 <Table 30>.

<Table 30> 혼합추출물의 최소저해농도 설정

혼합추출물	최소저해농도 (µg/mL)		
	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>
감초, 목단피, 황련 조건별 혼합추출물	> 400	> 400	> 400

조건별 혼합추출물의 3가지 대상균에 대한 최소저해농도는 모두 400 µg/mL로 측정되었으며, 전반적으로 낮은 농도의 범위에서도 탁월한 항균효능을 나타냄. 이는 천연보존제 시제품화에 대한 경제성 평가에 있어 긍정적인 결과로 사료됨.

#### 다. 오배자, 백작약, 육계추출물의 혼합에 따른 항균효능 평가

선별된 6가지 천연물 중 그람음성균인 *E. coli*에 대해 뛰어난 효능을 보였던 오배자와 그람 양성균인 *B. cereus* 와 *S. aureus*에 대해 뛰어난 효능을 보였던 백작약, 육계를 다양한 비율로 혼합하여 항균효능을 평가함. 혼합비율은 1 : 1 : 1, 7 : 2 : 1, 3 : 1 : 1 로 동등, 강 : 중 : 약, 강 : 약 : 약의 조성으로 혼합함 <Table 31>. 오배자, 백작약, 육계추출물을 비율별로 혼합한 후, 항균효능을 disc diffusion assay로 측정함. 또한 조건별추출물 중 가장 활성이 우수하게 나온 추출물(오배자 1번, 백작약 3번, 육계 1번)에 대해서도 비율별로 혼합한 후, 항균효능을 disc diffusion assay로 측정함. 그 결과 세 가지 혼합추출물이 단독추출물보다 모든 대상균에 대해 탁월한 항균력을 보이고, 조건별 혼합추출물이 1차적 혼합추출물 보다 항균력이 탁월함. 특히 조성비가 오배자 : 백작약 : 육계 = 7 : 2 : 1 일 때, 항균 활성이 가장 우수함 <Table 32, 33>.

<Table 31> 오배자, 백작약, 육계의 혼합비율

조건	추출물	혼합비율
1	오배자 (33.3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) + 백작약 (33.3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) + 육계 (33.3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	1 : 1 : 1
2	오배자 (20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) + 백작약 (60 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) + 육계 (20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	1 : 3 : 1
3	오배자 (60 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) + 백작약 (20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) + 육계 (20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	3 : 1 : 1
4	오배자 (20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) + 백작약 (20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) + 육계 (60 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	1 : 1 : 3
5	오배자 (20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) + 백작약 (70 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) + 육계 (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	1 : 7 : 2
6	오배자 (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) + 백작약 (70 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) + 육계 (20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	1 : 7 : 2
<b>7</b>	<b>오배자 (70 <math>\mu\text{g}/\mu\text{l}</math>) + 백작약 (20 <math>\mu\text{g}/\mu\text{l}</math>) + 육계 (10 <math>\mu\text{g}/\mu\text{l}</math>)</b>	<b>7 : 2 : 1</b>
8	오배자 (70 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) + 백작약 (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) + 육계 (20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	7 : 1 : 2
9	오배자 (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) + 백작약 (20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) + 육계 (70 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	1 : 2 : 7
10	오배자 (20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) + 백작약 (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) + 육계 (70 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	2 : 1 : 7

<Table 32> 오배자, 백작약, 육계 혼합추출물의 생육저지환

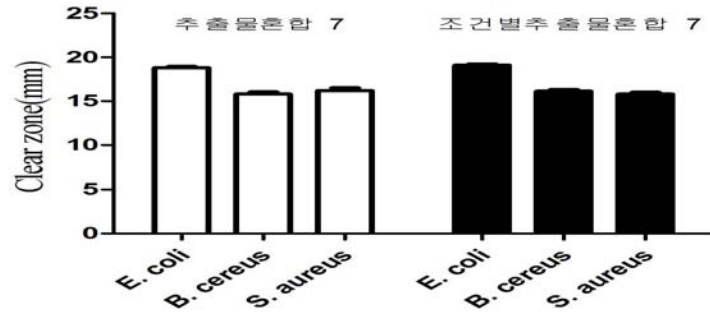
추출물 조건	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>
Kanamycin (1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	20.74 $\pm$ 0.25	21.48 $\pm$ 0.70	21.78 $\pm$ 0.33
1	14.25 $\pm$ 0.01	13.74 $\pm$ 0.27	14.10 $\pm$ 0.12
2	13.57 $\pm$ 0.16	13.43 $\pm$ 0.61	13.36 $\pm$ 0.22
3	18.33 $\pm$ 0.29	15.32 $\pm$ 0.26	15.58 $\pm$ 0.44
4	13.62 $\pm$ 0.37	13.25 $\pm$ 0.12	13.12 $\pm$ 0.40
5	13.78 $\pm$ 0.55	13.46 $\pm$ 0.25	13.31 $\pm$ 0.24
6	13.38 $\pm$ 0.27	11.74 $\pm$ 0.45	12.44 $\pm$ 0.42
<b>7</b>	<b>18.80 <math>\pm</math> 0.24</b>	<b>15.80 <math>\pm</math> 0.44</b>	<b>16.20 <math>\pm</math> 0.53</b>
8	17.59 $\pm$ 0.55	15.76 $\pm$ 0.40	16.13 $\pm$ 0.82
9	12.35 $\pm$ 0.25	12.09 $\pm$ 0.33	12.50 $\pm$ 0.21
10	13.65 $\pm$ 0.22	12.74 $\pm$ 0.12	13.72 $\pm$ 0.23

3가지 균주에 대해서 7번 추출물의 항균력이 가장 우수하며, 평균값으로도 7번 추출물의 항균력이 가장 뛰어난 것으로 평가됨.

<Table 33> 오배자, 백작약, 육계 조건별 혼합추출물의 생육저지환

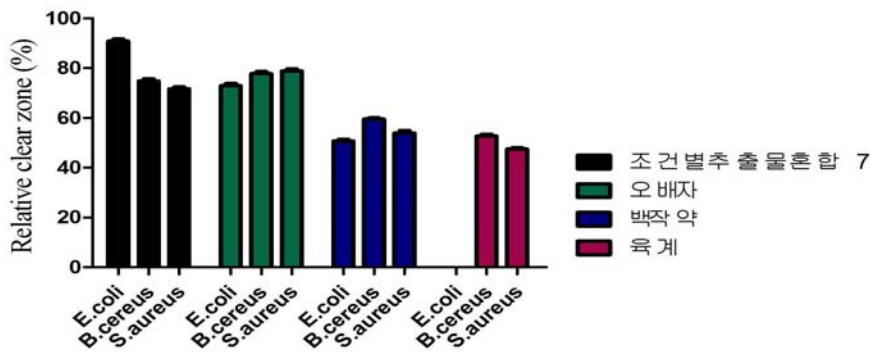
추출물 조건	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>
Kanamycin (1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	20.81 $\pm$ 0.60	21.31 $\pm$ 0.33	21.81 $\pm$ 0.27
1	16.34 $\pm$ 0.72	14.35 $\pm$ 0.22	13.90 $\pm$ 0.33
2	15.72 $\pm$ 0.09	13.80 $\pm$ 0.19	13.31 $\pm$ 0.08
3	19.06 $\pm$ 0.35	15.07 $\pm$ 0.23	15.02 $\pm$ 0.30
4	16.20 $\pm$ 0.28	13.60 $\pm$ 0.23	13.24 $\pm$ 0.60
5	16.26 $\pm$ 0.43	13.73 $\pm$ 0.11	13.57 $\pm$ 0.08
6	15.08 $\pm$ 0.76	13.49 $\pm$ 0.29	13.06 $\pm$ 0.35
<b>7</b>	<b>19.09 <math>\pm</math> 0.27</b>	<b>16.14 <math>\pm</math> 0.30</b>	<b>15.80 <math>\pm</math> 0.38</b>
8	19.06 $\pm$ 0.63	15.49 $\pm$ 0.55	15.84 $\pm$ 0.18
9	14.23 $\pm$ 0.50	12.94 $\pm$ 0.19	13.00 $\pm$ 0.32
10	14.60 $\pm$ 0.25	13.35 $\pm$ 0.30	13.64 $\pm$ 0.55

3가지 균주에 대해서 7번 추출물의 항균력이 가장 높으며, 평균값으로 봐도 7번 추출물의 항균력이 가장 우수함 <Fig. 33>.



<Fig. 33> 1차적 혼합추출물과 조건별 혼합추출물의 항균력 비교

*E. coli* 와 *B. cereus*에 대해서 조건별 혼합추출물의 항균효능이 더 뛰어나며, *S. aureus*에 대해서는 두 혼합추출물의 항균효능이 비슷하지만, 평균값으로 보면 조건별 혼합추출물이 1차적 혼합추출물보다 항균효능이 보다 뛰어나함을 확인함 <Fig. 34>.



<Fig. 34> 조건별 혼합추출물과 단독추출물의 항균력 비교

오배자, 백작약, 육계 혼합추출물이 *E. coli*에 대한 오배자, 백작약, 육계의 항균효능을 극대화 시켜주며, *B. cereus*에 대한 백작약, 육계의 항균효능을 극대화 시켜줌. *S. aureus*에 대해서는 백작약, 육계의 항균효능을 극대화 시켜주는 것으로 평가됨.

본 실험에 적용된 오배자, 백작약, 육계의 최적화된 formulation 혼합물 역시 감초, 목단피, 황련 혼합물과 마찬가지로 단독추출물보다 뛰어난 항균효능을 나타냄. 본 연구결과에서 오배자, 백작약, 육계 천연추출물의 혼합비율에 대한 최적 formulation을 산출하였으며, 이는 최적의 항균효능을 가지는 천연보존제 시제품 생산에 적용될 것임.

#### 라. 오배자, 백작약, 육계 혼합추출물의 최소저해농도 설정

오배자, 백작약, 육계 혼합추출물의 3가지 대상균에 대한 최소저해농도(Minimum Inhibitory Concentration, MIC)를 2-fold dilution 기법을 적용하여 액체배지 상에서 평가함. 대상균이 성장하지 않은 상태에서 추출물이 함유하고 있는 고유의 색상을 스탠다드로 설정하여 OD값을 측정하고, 대상균이 성장한 이후의 OD값을 측정하여 차감함으로써 정확한 최소억제농도를 설정함. [최종 OD값 - 스탠다드 OD값]. 최종적으로 측정된 OD600 값을 One-way ANOVA

(Dunnett법)로 통계 처리하여 비교분석함 <Table 34>.

<Table 34> 혼합추출물의 최소저해농도 설정

혼합추출물	최소저해농도 (µg/mL)		
	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>
오배자, 백작약, 육계 조건별 혼합추출물	> 100	> 50	> 50

조건별 혼합추출물의 3가지 대상균에 대한 최소저해농도는 50~100 µg/mL로 측정되었으며, 전반적으로 낮은 농도의 범위에서도 탁월한 항균효능을 나타냄. 이는 천연보존제 시제품화에 대한 경제성 평가에 있어 긍정적인 결과로 사료됨.

## 8. 천연보존제 적용 최종 물질 선정을 통한 천연보존제 제조 및 항균효능 최적화

### 가. 천연보존제 적용 2차적 후보물질 선정

1차적으로 선별된 6가지 천연물(감초, 목단피, 황련, 오배자, 백작약, 육계)에 대해 항균효능, 인체안전성 평가, 관능평가, 문헌조사를 수행한 결과, 오배자, 백작약, 감초, 육계 4가지 천연물을 2차적 천연보존제 후보물질로 선별함 <Table 35>.

<Table 35> 최종 후보물질 선별

천연물	항균효능	인체안전성 평가	관능평가	문헌조사
감초	△	○	○	○
목단피	○	○	△	X
황련	○	○	△	X
오배자	○	○	○	○
백작약	○	○	○	○
육계	△	○	○	○

※ ○ : 우수, △ : 보통, X : 미약

ICR mouse를 사용한 6가지 천연물의 인체안전성 평가 결과, 감초와 육계에서 미약한 독성이 있음이 나타났지만 제품화 시 농도를 20배 이상 희석하기 때문에 안전할 것으로 사료됨. 반면 문헌조사 결과, 목단피와 황련에서 독성이 있음이 명시됨. 식품의약품안전청 고시 제 2009 - 61호 '건강기능식품에 사용할 수 없는 원료 등에 관한 규정 일부개정고시'에 따르면 건강기능식품의 안전성을 강화하기 위하여 독성이 강한 동·식물성 원료를 건강기능식품에 사용할 수 없는 원료에 목단피가 선정됨. 또한 사이버한의약체험관에 따르면 황련은 차갑고 쓴 성질로 말미암아 다량복용 시 위의 기능을 손상시켜 소화불량 등의 증상이 나타나고 위의 진액을 손상시키기 때문에 비와 위의 기능이 허약한 사람의 복용을 금지하고 있음. 이러한 근거로 후보물질 선별에 있어 목단피와 황련을 제외 시킴. 항균효능 평가 결과, 목단피, 황련, 오배자, 백작약은 3가지 대상균에 대해 탁월한 항균효능을 나타낸 반면 감초와 육계는 대상균 특이적인 항균활성을 보임. 하지만 감초와 육계는 이미 제품화 되어 널리 쓰이는 만큼 관능평가에서 우수한 평가를 받아 천연보존제 개발 시 향, 맛, 기호도를 높이고자 선별함.

위 결과를 통해 오배자, 백작약, 감초, 육계 총 4가지 천연물을 2차적 천연보존제 후보물질로 선별하여 최적 조성비 혼합을 통해 주요 채소류 오염균에 대한 항균효능뿐 아니라, 향, 기호도 등의 관능효능까지 고려한 천연보존제를 제조.

나. 오배자, 백작약, 감초, 육계추출물의 혼합에 따른 항균효능 평가

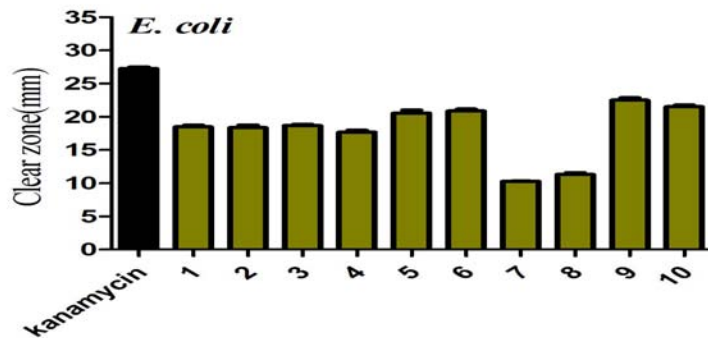
2차적으로 선별된 오배자, 백작약, 감초, 육계를 다양한 비율로 혼합하여 항균효능을 평가함. 혼합비율은 4.5 : 4.5 : 1, 6 : 3 : 1, 8 : 2 로 강 : 강 : 약, 강 : 중 : 약, 강 : 약의 조성으로 혼합함 <Table 36>. 3가지 대상균에 대해 탁월한 항균효능을 나타냈던 오배자와 백작약을 중심으로 관능효능을 향상 시켜줄 감초와 육계를 혼합함. 오배자, 백작약, 감초, 육계추출물을 비율 별로 혼합하여 항균효능을 disc diffusion assay로 평가한 결과, 백작약보다 오배자가 많이 함유된 혼합추출물의 항균효능이 더 탁월하며, 감초와 육계는 항균효능에 큰 영향을 미치지 않음.

<Table 36> 오배자, 백작약, 감초, 육계의 혼합비율

조건	혼합추출물	혼합비율
1	백작약 (45 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) + 오배자 (45 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) + 육계 (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	4.5 : 4.5 : 1
2	백작약 (45 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) + 오배자 (45 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) + 감초 (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	4.5 : 4.5 : 1
3	백작약 (60 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) + 오배자 (30 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) + 육계 (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	6 : 3 : 1
4	백작약 (60 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) + 오배자 (30 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) + 감초 (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	6 : 3 : 1
5	백작약 (30 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) + 오배자 (60 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) + 육계 (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	3 : 6 : 1
6	백작약 (30 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) + 오배자 (60 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) + 감초 (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	3 : 6 : 1
7	백작약 (80 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) + 육계 (20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	8 : 2
8	백작약 (80 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) + 감초 (20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	8 : 2
9	오배자 (80 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) + 육계 (20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	8 : 2
10	오배자 (80 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) + 감초 (20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	8 : 2

(1) *E. coli*에 대한 오배자, 백작약, 감초, 육계 혼합추출물의 항균효능 평가

*E. coli*에 대한 오배자, 백작약, 감초, 육계 혼합추출물의 항균효능을 disc diffusion assay를 이용하여 평가함. MHA 배지에 대상균을 도말하고 6 mm 디스크를 올린 후, 각 조건의 혼합추출물(100  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )을 20  $\mu\text{L}$  접종하여 디스크당 최종 2 mg씩 처리함. 대상균을 37  $^{\circ}\text{C}$  인큐베이터에서 각각 배양 후, 혼합추출물에 의해 생성된 생육저지환(clear zone)을 측정하여 항균효능을 평가함 <Fig. 35>.

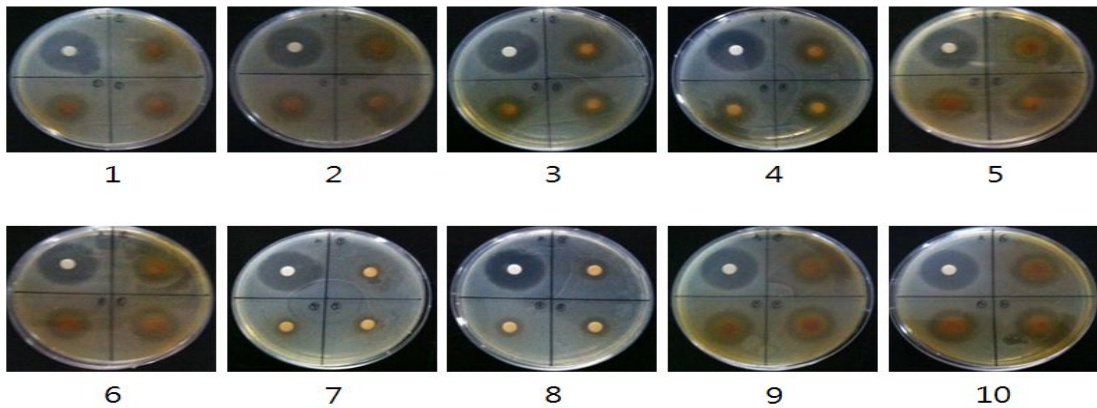


<Fig. 35> *E. coli*에 대한 오배자, 백작약, 감초, 육계 혼합추출물의 항균효능 평가

항균효능 평가결과, 총 10가지 조건의 혼합추출물 중 오배자 함유량이 높은 5, 6, 9, 10번 조건의 혼합추출물이 *E. coli*에 대해서 뛰어난 항균효능이 있는 것으로 평가됨. 특히 5, 6번 조건보다 오배자 함유량이 더 높은 9, 10번 조건 혼합추출물의 항균효능이 더 뛰어나며 감초와 육계는 항균효능에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 평가됨 <Table 37>, <Fig. 36>.

<Table 37> *E. coli*에 대한 오배자, 백작약, 감초, 육계 혼합추출물의 생육저지환 크기

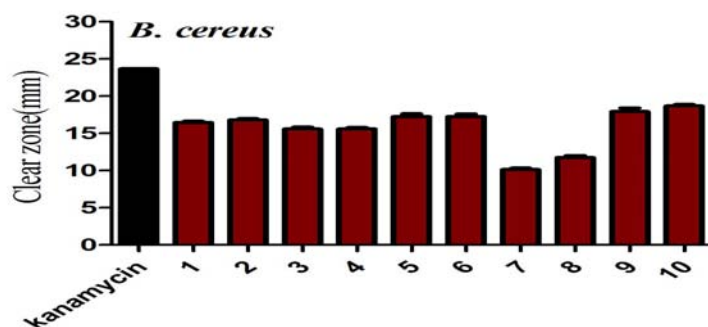
생육저지환 (mm)	추출물 조건				
	1	2	3	4	5
	18.47 ± 0.48	18.36 ± 0.63	18.67 ± 0.32	17.69 ± 0.50	20.56 ± 0.81
	6	7	8	9	10
	20.86 ± 0.54	10.27 ± 0.08	11.32 ± 0.42	22.51 ± 0.61	21.50 ± 0.47



<Fig. 36> *E. coli*에 대한 오배자, 백작약, 감초, 육계 혼합추출물의 생육저지환 형성

(2) *B. cereus*에 대한 오배자, 백작약, 감초, 육계 혼합추출물의 항균효능 평가

*B. cereus*에 대한 오배자, 백작약, 감초, 육계 혼합추출물의 항균효능을 disc diffusion assay를 이용하여 평가함. MHA 배지에 대상균을 도말하고 6 mm디스크를 올린 후, 각 조건의 혼합추출물(100 µg/µL)을 20 µL 접종하여 디스크당 최종 2 mg씩 처리함. 대상균을 37 °C 인큐베이터에서 각각 배양 후, 혼합추출물에 의해 생성된 생육저지환(clear zone)을 측정하여 항균효능을 평가함 <Fig. 37>.

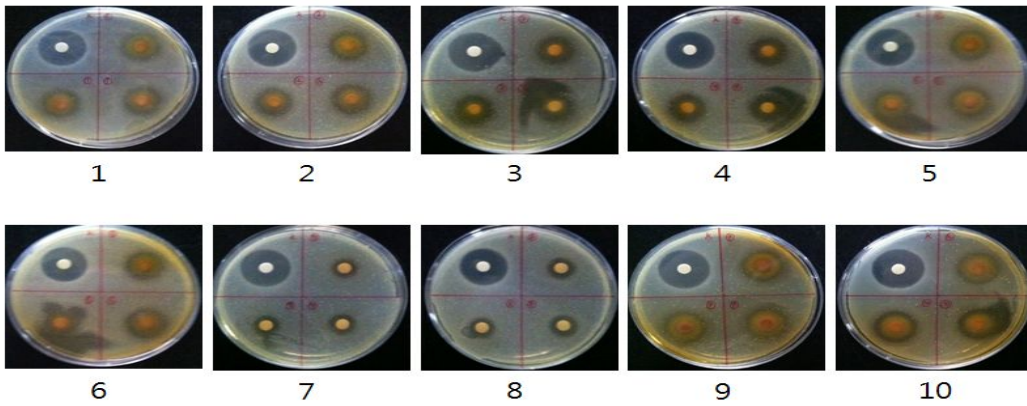


<Fig. 37> *B. cereus*에 대한 오배자, 백작약, 감초, 육계 혼합추출물의 항균효능 평가

항균효능 평가결과, 총 10가지 조건의 혼합추출물 중 오배자 함유량이 높은 5, 6, 9, 10번 조건의 혼합추출물이 *B. cereus*에 대해서 뛰어난 항균효능이 있는 것으로 평가됨. 특히 5, 6번 조건보다 오배자 함유량이 더 높은 9, 10번 조건 혼합추출물의 항균효능이 더 뛰어나며 감초와 육계는 항균효능에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 평가됨 <Table 38>, <Fig. 38>.

<Table 38> *B. cereus*에 대한 오배자, 백작약, 감초, 육계 혼합추출물의 생육저지환 크기

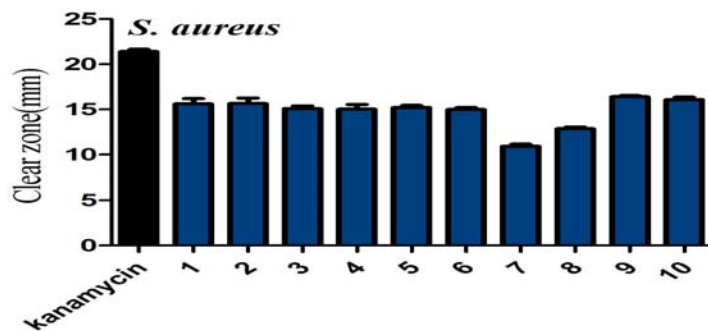
생육저지환 (mm)	추출물 조건				
	1	2	3	4	5
	16.46 ± 0.32	16.81 ± 0.32	15.60 ± 0.39	15.61 ± 0.32	17.27 ± 0.65
	6	7	8	9	10
	17.26 ± 0.61	10.14 ± 0.35	11.76 ± 0.46	17.94 ± 0.81	18.68 ± 0.35



<Fig. 38> *B. cereus*에 대한 오배자, 백작약, 감초, 육계 혼합추출물의 생육저지환 형성

(3) *S. aureus*에 대한 오배자, 백작약, 감초, 육계 혼합추출물의 항균효능 평가

*S. aureus*에 대한 오배자, 백작약, 감초, 육계 혼합추출물의 항균효능을 disc diffusion assay를 이용하여 평가함. MHA 배지에 대상균을 도말하고 6mm 디스크를 올린 후, 각 조건의 혼합추출물(100 µg/µL)을 20 µL 접종하여 디스크당 최종 2 mg씩 처리함. 대상균을 37 °C 인큐베이터에서 각각 배양 후, 혼합추출물에 의해 생성된 생육저지환(clear zone)을 측정하여 항균효능을 평가함 <Fig. 39>.



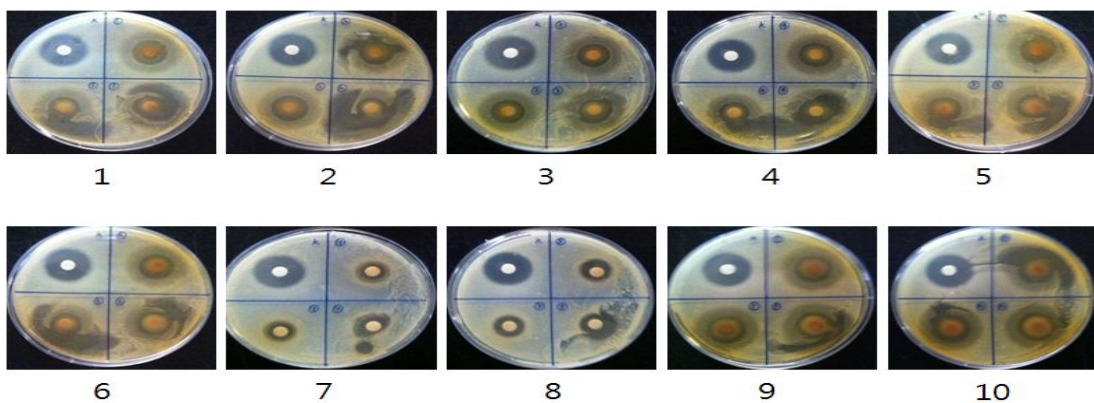
<Fig. 39> *S. aureus*에 대한 오배자, 백작약, 감초, 육계 혼합추출물의 항균효능 평가



항균효능 평가결과, 총 10가지 조건의 혼합추출물 중 오배자 함유량이 높은 9, 10번 조건의 혼합추출물이 *S. aureus*에 대해서 뛰어난 항균효능이 있는 것으로 평가되며, 감초와 육계는 항균효능에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 평가됨 <Table 39>, <Fig. 40>.

<Table 39> *S. aureus*에 대한 오배자, 백작약, 감초, 육계 혼합추출물의 생육저지환 크기

생육저지환 (mm)	추출물 조건				
	1	2	3	4	5
	15.62 ± 0.99	15.65 ± 1.05	15.10 ± 0.48	15.04 ± 0.90	15.22 ± 0.40
	6	7	8	<b>9</b>	<b>10</b>
	14.98 ± 0.40	10.93 ± 0.39	12.87 ± 0.32	<b>16.40 ± 0.24</b>	<b>16.09 ± 0.48</b>



<Fig. 40> *S. aureus*에 대한 오배자, 백작약, 감초, 육계 혼합추출물의 생육저지환 형성

다. 시제품 최적혼합비 선정

3가지 대상균에 대해 항균효능을 평가한 결과, 최대의 항균효능을 나타내는 혼합추출물 조성비를 다음과 같이 선별함 <Table 40>. 선별한 4가지의 혼합추출물 중 최적 1조건을 선정하여 분무 및 침지 타입의 시제품을 제작함.

<Table 40> 선별된 4가지 혼합추출물의 혼합비율

혼합추출물	혼합비율	비고
S1	백작약 : 오배자 : 육계	최종 1가지 조건 선정 (분무, 침지용 시제품 제작)
S2	백작약 : 오배자 : 감초	
S3	오배자 : 육계	
S4	오배자 : 감초	

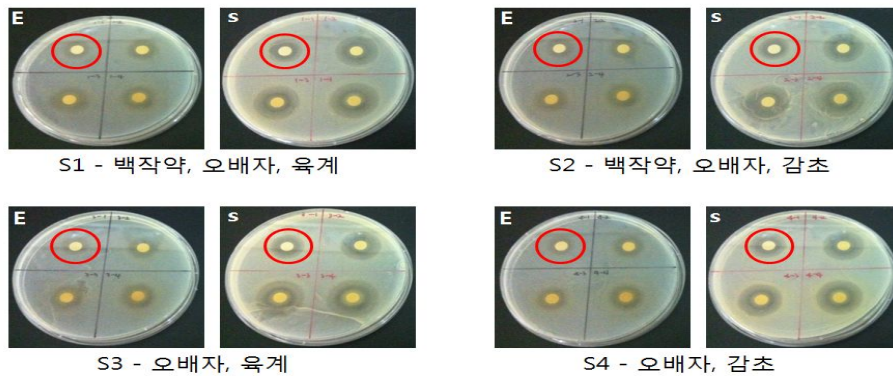
(1) 최소저해농도(MIC) 및 최소살균농도(MBC) 설정

시제품화하기에 앞서 최적의 농도를 설정하기 위해 최소저해농도 및 최소살균농도를 설정함. 액체배지를 이용한 2-fold dilution 기법으로 최소저해농도를 측정 후, 고체배지평판법을 통

해 최소살균농도를 각각 평가함. 추후 실험은 실제 채소 및 과일류에서 가장 많이 검출되는 대표적 식품오염균인 *E. coli*와 *S. aureus*에 대해서만 평가함. 최소저해농도는 4가지 혼합추출물 모두 50 µg/mL로 측정되었으며, 최소살균농도는 0.1 mg/mL로 측정됨 <Table 41>, <Fig. 41>.

<Table 41> 최소저해농도 및 최소살균농도 설정

혼합추출물	최소저해농도 (µg/mL)		최소살균농도 (mg/mL)	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
S1	> 50	> 50	> 0.1	> 0.1
S2	> 50	> 50	> 0.1	> 0.1
S3	> 50	> 50	> 0.1	> 0.1
S4	> 50	> 50	> 0.1	> 0.1



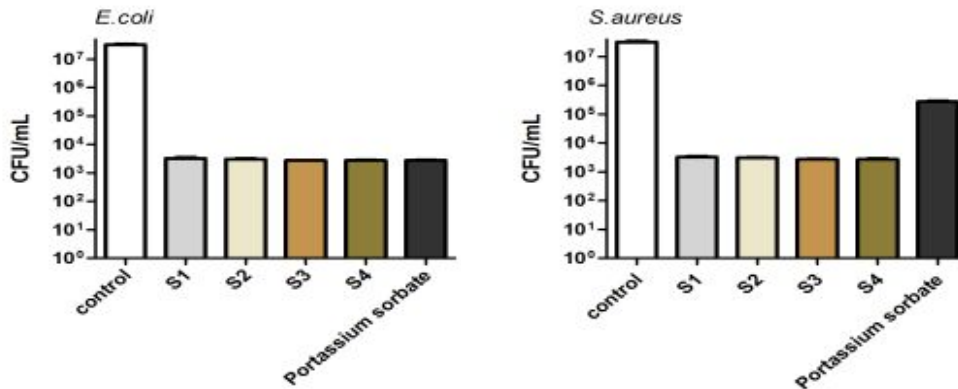
<Fig. 41> 최소살균농도 측정

(2) 99.9% 이상 살균농도 설정

채소 및 과일류에 처리할 천연보존제를 개발하기 위해서는 99.9% 이상의 살균력이 필수적이다. 따라서 총균수 변화 측정을 통한 잔존율 분석을 통해 99.9% 이상의 살균력을 나타내는 농도를 설정함. 식품공전상의 살균소독력시험법에 의거하여 시험관에 1mL의 희석액(peptone water)과 혼합추출물 8mL을 상온에서 5분간 반응시킨 혼합액에 *E. coli*와 *S. aureus*를 각각 1mL씩 첨가하여 30분간 반응시킨 후, 반응혼합액을 1mL씩 취하여 petri film에 분주함. 각 균주의 배양조건에 맞게 *E. coli*는 37 °C에서 18시간동안, *S. aureus*는 15시간동안 배양시켜 생성된 colony 개수에 희석배수를 곱하여 최종 균수를 산출함. 대표적인 화학보존제 성분인 소르빈산칼륨(potassium sorbate)을 대조군으로 설정함. 실험결과, *E. coli*에 대해서는 4가지 혼합추출물과 소르빈산칼륨 모두 99.9%이상의 감균력을 나타낸 반면, *S. aureus*에 대해서는 4가지 혼합추출물은 99.9%이상의 감균력을 나타냈으나, 소르빈산칼륨은 99.0%의 감균력을 나타냄 <Table 42>. 위 결과를 통해 99.9%이상의 살균효능을 가지는 농도를 설정하였고, 화학보존제 성분보다 선별된 혼합추출물이 더 우수함을 증명함 <Fig. 42>.

<Table 42> 99.9%이상의 살균효능 농도 설정

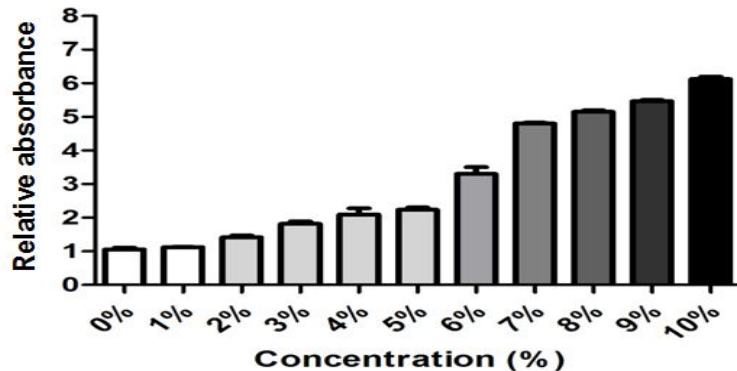
혼합추출물	농도(mg/mL)	대상균주	접종량	처리후 잔존량	감균률
S1	1.0	<i>E. coli</i>	$3.01 \times 10^7$	$> 10^4$	99.9 %
		<i>S. aureus</i>	$2.17 \times 10^7$	$> 10^4$	
S2	1.0	<i>E. coli</i>	$3.01 \times 10^7$	$> 10^4$	99.9 %
		<i>S. aureus</i>	$2.17 \times 10^7$	$> 10^4$	
S3	1.0	<i>E. coli</i>	$3.01 \times 10^7$	$> 10^4$	99.9 %
		<i>S. aureus</i>	$2.17 \times 10^7$	$> 10^4$	
S4	1.0	<i>E. coli</i>	$3.01 \times 10^7$	$> 10^4$	99.9 %
		<i>S. aureus</i>	$2.17 \times 10^7$	$> 10^4$	
Potassium sorbate (1%)	10.0	<i>E. coli</i>	$3.01 \times 10^7$	$> 10^4$	99.9 %
		<i>S. aureus</i>	$2.17 \times 10^7$	$> 10^5$	99.0 %



<Fig. 42> 혼합추출물의 살균효능 평가

(3) Masking 제제 함유량 설정

한방천연 고유의 향을 제거시켜줄 masking제제로 선정된 싸이클로덱스트린(cyclodextrin)의 함유량을 설정함. 사전조사를 통해 masking제제의 함유량이 최대 10% 미만임을 확인하였고, 450~650nm 파장대에서의 흡광도 측정을 통해 1~5%로 범위를 설정함 <Fig 43>, <Table 43>.



<Fig. 43> 싸이클로덱스트린 함유량에 따른 흡광도 측정

<Table 43> 천연보존제 시제품 제작 조건

조건	1	2	3	4	5
혼합추출물 (%)	90	90	90	90	90
정제수 (%)	9	8	7	6	5
싸이클로텍스트린 (%)	1	2	3	4	5

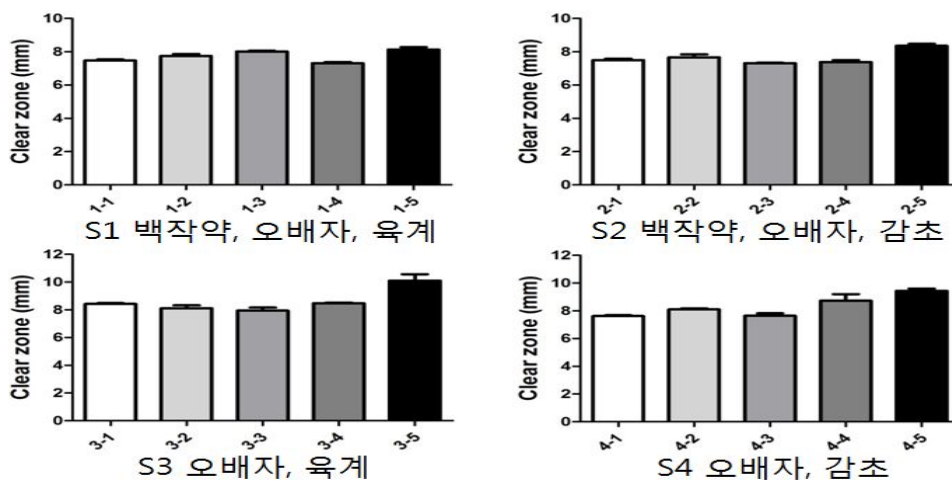
(4) Masking 제제 함유량에 따른 항균효능 평가

싸이클로텍스트린 함유량에 따른 항균효능을 평가함. 사전연구를 통해 싸이클로텍스트린은 항균효능이 없는 것으로 평가됨 <Fig 44>.



<Fig. 44> 싸이클로텍스트린의 항균효능 평가

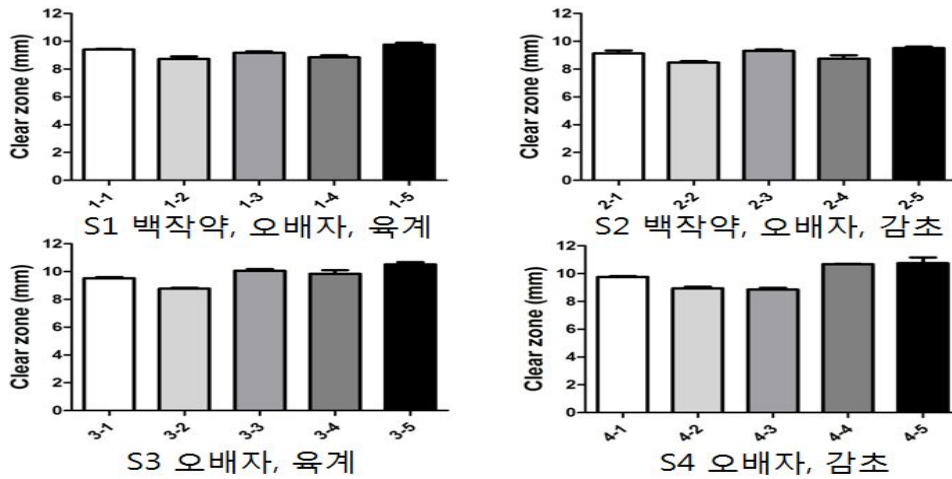
*E. coli*와 *S. aureus*에 대한 항균효능 평가를 통해 싸이클로텍스트린의 최적함유량을 설정함. 시제품 제작 조건에 따라 혼합추출물은 90%, 정제수는 5~9%, 싸이클로텍스트린은 1~5%를 함유하는 샘플을 제작하고 disc diffusion assay로 항균효능을 평가함. 실험결과 *E. coli*와 *S. aureus* 두 가지 균주에 대해 싸이클로텍스트린 5% 함유 시 최대의 항균효능을 나타냄 <Fig. 45, 46>, <Table 44, 45>.



<Fig. 45> 싸이클로텍스트린 함유량에 따른 *E. coli*에 대한 항균효능 평가

<Table 44> 싸이클로텍스트린 함유량에 따른 *E. coli*에 대한 생육저지환 크기

	혼합추출물	싸이클로텍스트린 함유량 (%)				
		1%	2%	3%	4%	5%
생육저지환	S1	7.48 ± 0.11	7.76 ± 0.19	8.02 ± 0.08	7.32 ± 0.12	8.14 ± 0.24
	S2	7.51 ± 0.14	7.67 ± 0.31	7.32 ± 0.06	7.39 ± 0.20	8.36 ± 0.20
	S3	8.42 ± 0.11	8.12 ± 0.35	7.94 ± 0.38	8.47 ± 0.08	10.10 ± 0.80
	S4	7.63 ± 0.10	8.11 ± 0.11	7.65 ± 0.31	8.74 ± 0.81	9.45 ± 0.27



<Fig. 46> 싸이클로텍스트린 함유량에 따른 *S. aureus*에 대한 항균효능 평가

<Table 45> 싸이클로텍스트린 함유량에 따른 *S. aureus*에 대한 생육저지환 크기

	혼합추출물	싸이클로텍스트린 함유량 (%)				
		1%	2%	3%	4%	5%
생육저지환	S1	9.41 ± 0.23	8.74 ± 0.30	9.17 ± 0.18	8.86 ± 0.23	9.77 ± 0.07
	S2	9.13 ± 0.37	8.48 ± 0.17	9.32 ± 0.16	8.75 ± 0.41	9.53 ± 0.16
	S3	9.53 ± 0.13	8.78 ± 0.10	10.06 ± 0.22	9.85 ± 0.43	10.53 ± 0.26
	S4	9.77 ± 0.10	8.95 ± 0.18	8.85 ± 0.24	10.68 ± 0.04	10.75 ± 0.73

위 항균능에 대한 최적화 결과를 바탕으로 최종 개발된 천연보존제 시제품의 제작 조건은 다음과 같음 <Table 46>.

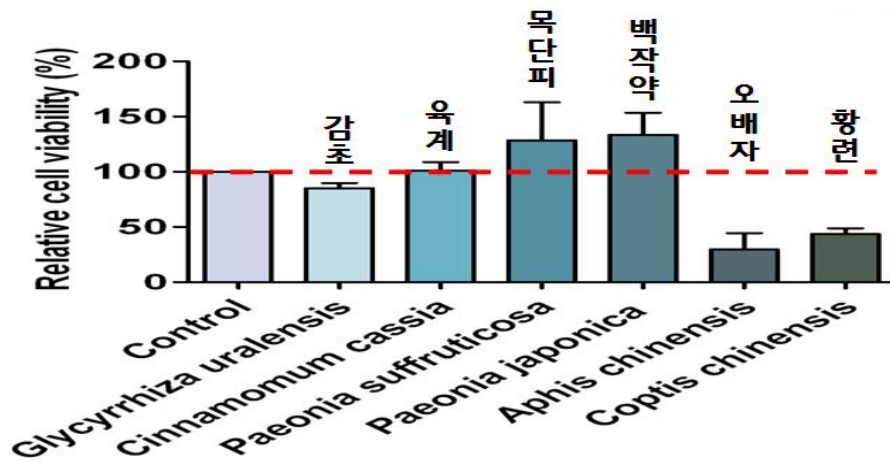
<Table 46> 천연보존제 시제품 제작 조건

천연보존제 시제품 성분함량	
혼합추출물 용액 [1.0 mg/mL]	90 %
정제수	5 %
싸이클로텍스트린	5 %

## 제 2 절 천연추출물의 안전성 검증

### 1. 천연추출물의 1차적 안전성 평가

1차적으로 선별된 6가지 천연물을 정상 세포주인 쥐 배아 섬유아세포(MEF cell)에 0.1 mg/mL의 농도로 처리하여 1차적 인체안전성을 세포실험을 통해 평가함. 실험 결과, 추출물의 MEF 세포에 대한 독성이 전반적으로 약하거나 거의 영향을 미치지 않았고, 오배자와 황련의 경우, 실제 인체의 표면적(대상시료의 농도/인체 표면적)을 고려할 경우 독성이 미약할 것으로 분석됨 <Fig. 47>.



<Fig. 47> MEF 세포 생존율을 통한 천연추출물의 1차적 안전성 평가



## 2. 천연추출물의 인체안전성 평가

1차적으로 선별된 6가지 천연물(감초, 목단피, 황련, 오배자, 백작약, 육계)에 대하여 소동물 실험을 통한 독성평가를 수행하고, 이를 바탕으로 인체세포에 대한 영향 분석을 통해 천연보존제 적용 천연물에 대한 인체안전성 평가를 수행함.

### 가. 대상동물 선정

1차적으로 선별된 6가지 천연물을 각 물질에 대한 독성 및 인체안전성 평가를 파일럿 동물 실험을 통해 수행함. 일반적으로 동물실험은 mouse → rat → dog → pig → monkey와 같이 작은 동물에서 큰 동물 순으로, 점차 사람과 비슷한 고등동물 순으로 진행함. Mouse는 다른 비슷한 크기의 동물에 비해 장기의 해부학적 위치와 형태 및 생리학적 대사 기작이 사람과 90%이상 비슷하며, 대사가 빠르게 진행돼 효과가 단기간에 나타나기 때문에 주로 전임상 실험의 첫 단계로 사용됨. 이에 따라 동물실험 대상군은 mouse로 선정하고, 사전문헌조사를 통하여 생후 7주된 Institute of Cancer Research(ICR) mouse를 사용함 <Fig. 48>. ICR mouse는 발육이 좋고 취급이 용이하며 번식성이 좋아 독성, 약리, 내분비, 영양실험 뿐만 아니라 각종 연구용으로 이용범위가 넓어 본 실험에 가장 적합하다고 판단되어 평가 대상으로 적용함.

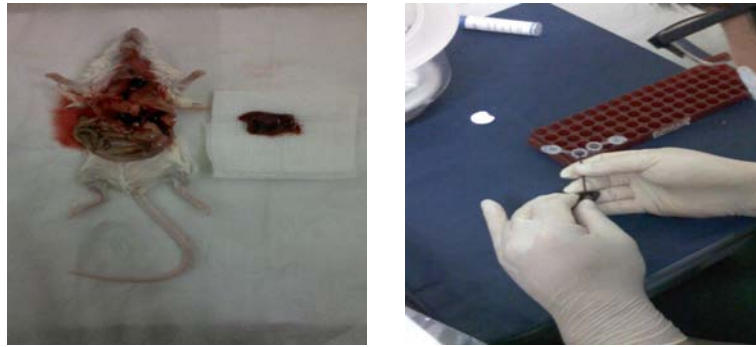


<Fig. 48> 생후 7주 ICR mouse 배양

### 나. ICR mouse를 사용한 독성 및 안전성 평가

ICR mouse를 사용하여 선별된 6가지 천연물에 대한 독성 및 인체안전성 평가를 수행함. 생후 7주된 ICR mouse에 항균 및 기능성 실험에 적용한 농도 대비 최대 농도인 500 mg/Kg 농도의 천연물을 24시간 간격으로 6일 동안 경구투여(oral injection)함. 각각의 실험에서 천연물을 포함하지 않는 대조군을 설정하여 상호 비교실험을 수행함. 현재 식품보존제로 인허가하에 사용되고 있는 화학보존제 성분인 potassium sorbate를 투여하여, 본 연구에서 선정된 천연물과의 상대적인 안전성 여부를 비교함. 소동물실험은 최초 계획서 상에 제시된 바와 같이 식품 섭취에 대한 급성투여 실험으로 진행하고 안전성을 평가함. 생쥐의 개체 수는 각 그룹 별로 5마리 씩 실험에 적용하고, 실험은 3회 반복하여 수행함. 해부학적 평가로 투여 전과 투여 후의 몸무게 변화를 측정하고, 7일째 간을 적출하여 무게를 측정함 <Fig. 49>. 효소학적 평가로 혈청을 채취하여 ELISA 방식으로 Alanine Aminotransferase(ALT), Aspartate Aminotransferase(AST) 효소를 분석함. 독성 평가의 주요 지표로 일반적인 ALT, AST효소의 분석을 통해 1차

적으로 선별된 6가지 천연물의 독성 및 안전성을 평가하고 나아가 잠재적 독성에 대해 성장률, 사망률, 병리학적 측면에서 제고할 수 있음.



<Fig. 49> 실험 소동물 간 적출 및 혈청 채취

다. 해부학적 안전성 평가

ICR mouse에 6가지 천연물의 투여 전과 투여 후의 mouse 체중 변화를 측정된 결과, 황련과 육계를 투여한 그룹은 평균 체중이 감소하였지만, 대조군과 유의성이 없는 차이를 보여 체중 변화에 대한 독성 효과가 없는 것으로 평가됨. 감초, 목단피, 오배자, 백작약을 투여한 그룹은 체중이 증가하였지만 또한 그 정도가 미세하고 유의성이 없어 비만 등의 부작용에 대한 독성이 없는 것으로 평가됨. 대사를 담당하는 주요 기관인 간의 무게 측정 결과, 6가지 천연물 모두 음성대조군인 물과 비슷한 정도의 증가량을 보였고, 전체 무게 대비 간 무게의 비율 측정 결과, 5% 이내의 비율을 보이는 것으로 보아 선별된 6가지 천연물 모두 해부학적 평가로는 안전한 것으로 평가됨 <Table 47>.

<Table 47> 선별된 6가지 천연물의 해부학적 안전성 평가

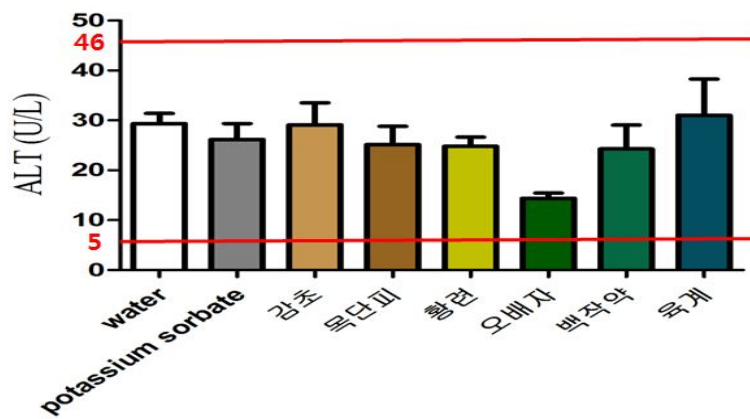
천연물	무게 (g)			간 무게 (g)	간 무게 / 전체 무게 (%)
	투여 전	투여 후	변화량		
water	38.9 ± 2.2	39.6 ± 1.9	0.65 ± 0.36	1.51 ± 0.14	3.81 ± 0.30
potassium sorbate	32.6 ± 3.3	32.8 ± 2.7	0.15 ± 0.36	1.33 ± 0.18	4.05 ± 0.40
감초	36.0 ± 3.7	36.6 ± 3.3	0.55 ± 0.22	1.60 ± 0.19	4.37 ± 0.29
목단피	36.1 ± 2.3	36.5 ± 2.7	0.40 ± 0.21	1.59 ± 0.22	4.34 ± 0.29
황련	37.4 ± 3.2	36.6 ± 2.3	- 0.82 ± 0.59	1.43 ± 0.14	3.70 ± 0.35
오배자	28.3 ± 2.2	29.9 ± 1.9	1.60 ± 0.15	1.47 ± 0.08	4.92 ± 0.28
백작약	31.8 ± 3.6	33.2 ± 3.2	1.35 ± 0.50	1.55 ± 0.28	4.68 ± 0.65
육계	36.8 ± 1.7	36.6 ± 1.7	- 0.13 ± 0.17	1.60 ± 0.13	4.37 ± 0.24



## 라. 효소학적 안전성 평가

### (1) Alanine Aminotransferase(ALT) 효소 활성 측정

ICR mouse에 선별된 6가지 천연물을 6일 동안 투여한 후, 효소학적 평가를 위해 혈청을 채취하여 Alanine Aminotransferase(ALT) 효소를 ELISA 방식으로 측정함. ALT효소는 간세포 내 미토콘드리아에 존재하는 가장 대표적인 효소로 세포가 파괴되면 그 안에 있던 ALT효소가 혈액 속을 돌아다니게 돼 그만큼 수치가 상승하게 되고 이는 간세포의 손상을 의미함. 따라서 이 효소의 수치가 높을수록 독성으로 인해 간이 많이 손상됐다는 의미이며, ALT효소의 정상 수치 범위는 5~46 (U/L)임.

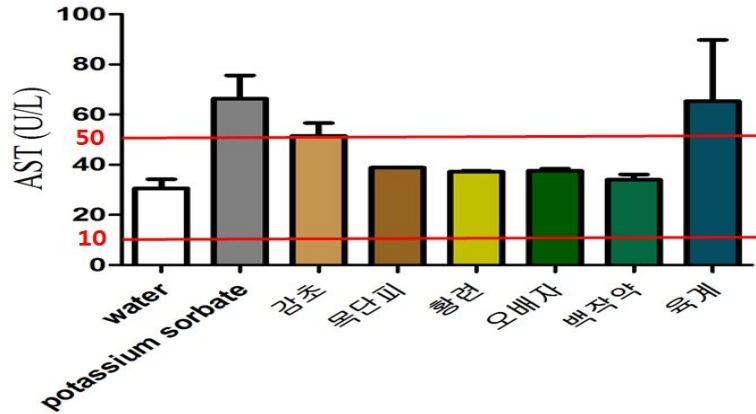


<Fig. 50> 혈청 내 ALT 효소 활성 측정

ALT효소 측정 결과, 1차로 선정된 6가지 천연물 처리군에서 모두 정상수치 범위인 5~46 (U/L)안에 포함되는 것으로 분석되었으며, 안전성 범주의 median 범위인 20~30 (U/L)에 오배자를 제외한 모든 처리군이 해당되는 것으로 평가됨. 감초는  $29.1 \pm 6.2$  (U/L), 목단피는  $25.1 \pm 5.2$  (U/L), 황련은  $24.8 \pm 2.5$  (U/L), 오배자는  $14.3 \pm 1.4$  (U/L), 백작약은  $24.2 \pm 6.7$  (U/L), 육계는  $31.0 \pm 10.2$  (U/L)로 평가됨 <Fig. 50>. 따라서 간 독성에 대한 ALT효소 평가에서, 1차로 선정된 6가지 천연물 모두 천연보존제 적용에 대한 안전성을 입증함.

### (2) Aspartate Aminotransferase(AST) 효소 활성 측정

ICR mouse에 선별된 6가지 천연물을 6일 동안 투여한 후, 효소학적 평가를 위해 혈청을 채취하여 Aspartate Aminotransferase(AST) 효소를 ELISA 방식으로 측정함. AST효소는 간, 심장, 골격근, 콩팥, 뇌, 췌장 등에서 다양하게 분비되는 효소로 세포가 파괴되면 그 안에 있던 AST효소가 혈액 속을 돌아다니게 돼 그만큼 수치가 상승하게 되고 이는 간을 포함하는 다양한 관련 장기의 손상을 의미함. 따라서 이 효소의 수치가 높을수록 독성으로 인해 장기 손상의 가능성이 높아지는 것이며, 소동물실험에서의 AST효소의 정상수치 범위는 10~50 (U/L) 임.



<Fig. 51> 혈청 내 AST 효소 활성 측정

AST효소 측정 결과, 감초와 육계를 제외한 목단피, 황련, 오배자, 백작약 4가지 천연물은 정상수치 범위인 10~50 (U/L) 안에 포함되는 것으로 평가됨. 목단피는  $38.8 \pm 0.2$  (U/L), 황련은  $37.2 \pm 0.5$  (U/L), 오배자는  $37.6 \pm 1.1$  (U/L), 백작약은  $34.1 \pm 2.9$  (U/L)로 평가됨. 감초는  $51.5 \pm 7.2$  (U/L), 육계는  $65.3 \pm 34.5$  (U/L) 로 평가됨 <Fig. 51>. 그러나 만성실험에서는 수치가 수백대 정도로 지속적인 상태를 유지하며 정상수치보다 높은 상태에서 변동하지만, 급성 실험에서는 수치가 순간적으로 1천 단위 이상으로 올라갔다가 낮아짐. 이 실험은 투여기간이 6일로 급성실험이므로 이 정도 수치로 독성이 있다고 보기는 어렵고, 또한 제품화할 시 농도를 20배 이상 희석하기 때문에 감초, 육계도 천연보존제 적용에 대해 안전한 것으로 평가됨. 따라서 6가지 천연물 모두 AST효소에 대해서도 안전한 것으로 평가됨. 실제로 적용되는 화학보존제인 potassium sorbate 투여군의 경우에서도 본 실험조건에서 AST효소 수치가 50 (U/L)보다 높게 나타났고, 따라서 식품보존제 적용의 범위에서는 6가지 천연물 모두 보존제 적용에 대한 안전성에 문제가 없으며, 특히 육계를 제외한 다른 천연물 5종의 경우 potassium sorbate에 비해 AST효소 평가에 대한 높은 안전성을 확보할 수 있음.

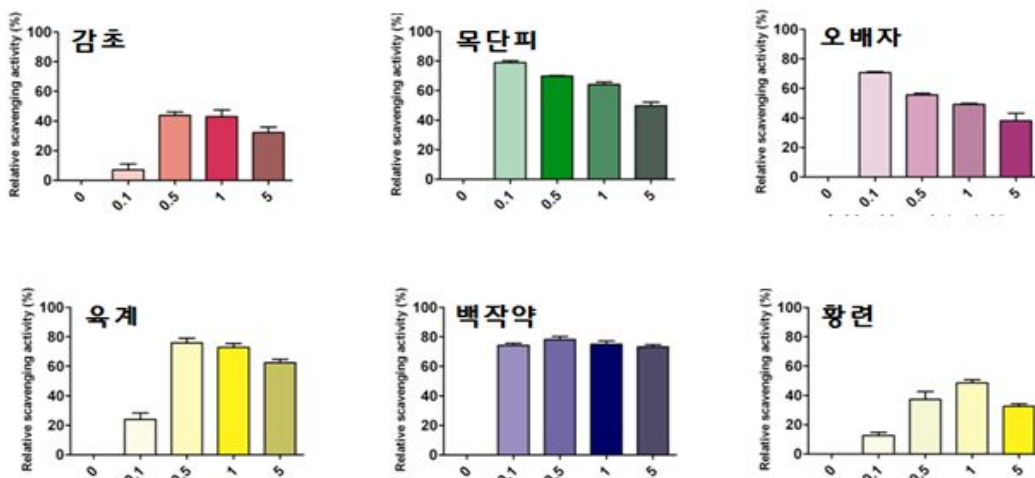
### 제 3 절 천연추출물의 기능성 평가

#### 1. 천연추출물의 라디칼 소거능 평가를 통한 갈변억제 효능 분석

과일이나 채소의 갈변을 일으키는 데는 효소적 갈변, 비효소적 갈변이 있는데, 이 중 비효소적 갈변은 그 반응의 기작에 따라 마이알 반응, 캐러멜화 반응, 아스코르빈산 산화반응에 의한 갈변의 3가지로 구분됨. 식품의 복잡한 구성성분 때문에 식품에서의 비효소적 갈변 반응은 단독반응 보다는 혼합반응으로 일어남. 이 중, 아스코르빈산 산화반응의 기작은 강한 환원력을 가지고 있기 때문에 산화방지제 또는 갈변방지제로서 채소, 과일, 과즙 등 가공 식품의 갈색화 방지를 위해 사용되며 또한 항산화 지표물질로써 DPPH radical 소거능력을 조사하는데 standard로 사용됨.

따라서 본 연구에서는, 천연추출물의 갈변도 억제 효능을 평가하기 위해 천연물의 DPPH radical 소거능력을 통한 산화방지 능력을 조사함. DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)은 화학적으로 안정화된 프리 라디칼을 가지고 있는 수용성 물질로 515nm-520nm 부근에서 최대 흡광도를 가지며, 항산화 활성이 있는 물질과 만나면 전자를 내어주면서 라디칼(DPPH)이 소멸되고 색깔이 변함. 따라서, 화학적으로 안정성 있는 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH)은 여러 종의 항산화 성분이 내재된 추출물에서의 항산화 효과를 분석 할 수 있고, 이를 통해 추출물 자체의 환원력에 의한 갈변 방지 효능을 평가할 수 있음.

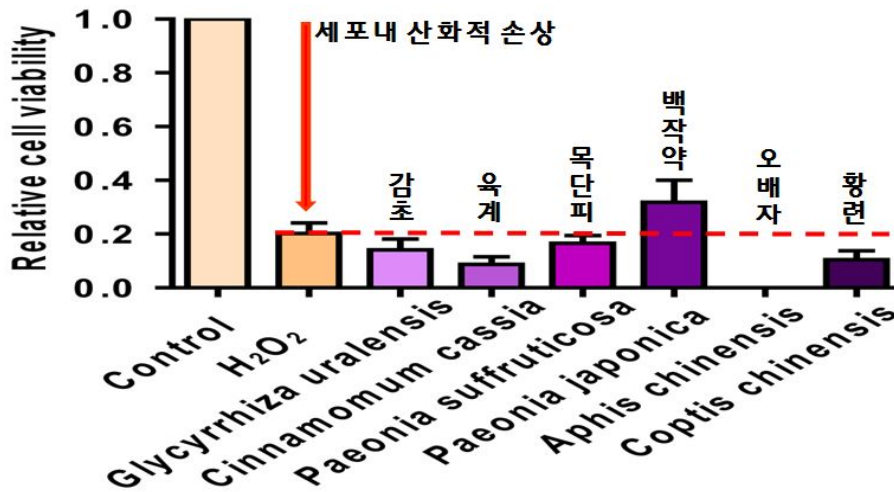
1차적으로 선별된 6가지 천연추출물과 200 μM DPPH를 1 : 1로 암실에서 20분동안 반응시킨 뒤 분광광도계의 517 nm에서 측정함. 감초, 목단피, 오배자, 육계, 백작약, 황련추출물의 농도별 DPPH radical 소거능을 측정한 결과, 6가지 추출물 모두 라디칼 소거능력을 지닌 것으로 평가됨. 목단피, 오배자, 백작약추출물의 경우, 0.1 mg/mL의 낮은 농도에서도 라디칼 소거능력이 70% 이상임이 평가되었고, 특히 백작약추출물이 가장 뛰어난 라디칼 소거능력을 나타냄 <Fig. 52>. 위 결과를 통해 6가지 천연추출물 모두 라디칼 소거능력을 가짐으로서 갈변 방지 효능이 탁월할 것으로 사료됨.



<Fig. 52> 선별된 6가지 천연추출물의 농도별 DPPH radical 소거능력 평가

## 2. 천연추출물의 세포 내 항산화 효능 평가

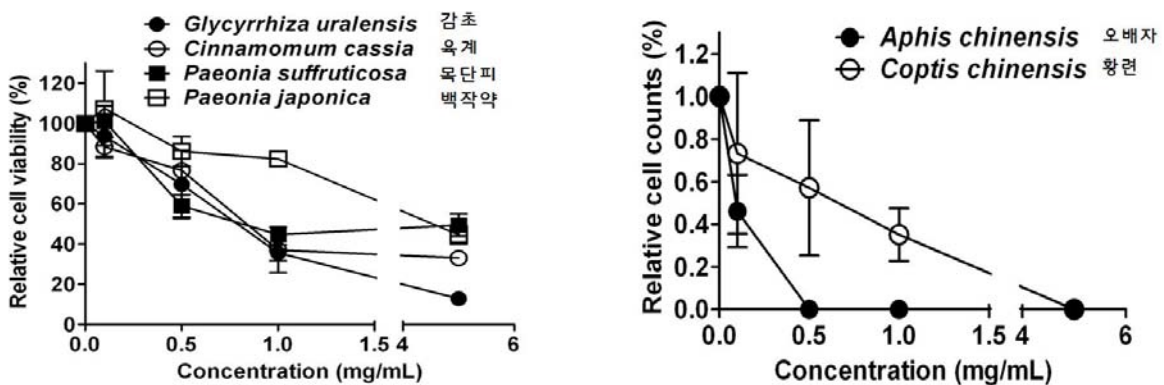
정상 세포주인 쥐 배아 섬유아세포(MEF; Mouse Embryonic Fibroblast)를 페니실린(100 IU/mL), 스트렙토마이신(100 g/mL), 10% FBS(fetal bovine serum)를 함유하는 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)배지를 넣고 37 °C를 유지하며 5% 이산화탄소를 포함하는 배양기 내에서 배양함. 수득된 섬유아세포를 60mm dish에 각  $3.5 \times 10^5$  cells/mL로 분주하여 배양한 후, 세포에  $H_2O_2$ (Hydrogen peroxide)로 산화적 스트레스를 유발하고, 감초, 육계, 목단피, 백작약, 오배자, 황련 추출물을 처리하여 배양함. Trypan blue로 염색한 후, 세포수를 측정하여  $H_2O_2$ 가 유도하는 산화적 손상에 대해 각 추출물이 세포보호 효과를 나타내는지 세포 생존율을 통해 평가한 결과, 백작약추출물이 산화적 세포 손상에 대해 보호 효능이 뛰어나다는 점을 규명함 <Fig. 53>.



<Fig. 53>  $H_2O_2$ 가 유도하는 산화적 손상에 대한 천연추출물의 세포보호 효능 평가

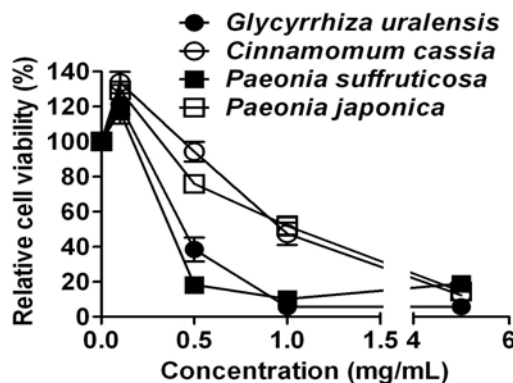
### 3. 천연추출물의 항암효능 평가

1차적으로 선별된 6가지 천연추출물을 인간 간암세포(HepG2)에 24시간동안 처리하여 MTT assay를 통해 세포 생존율을 측정함. 실험결과 감초, 육계, 목단피, 백작약추출물이 농도 의존적으로 인간 간암세포주의 생존율을 감소시킴. 특히 감초추출물의 효능이 간암세포 사멸에 탁월한 효능을 보임. 또한 오배자, 황련추출물을 인간 간암세포주에 24시간동안 처리하여 Trypan blue cell counting assay를 통해 세포 생존율을 측정함. 오배자와 황련추출물의 경우 선행 실험에서 정상세포주인 MEF 세포에 대한 미약한 독성을 확인한 바 있음. 정상세포주에 대한 오배자와 황련추출물의 미약한 독성정도에 비해 인간 간암세포주에 대한 추출물의 농도 의존적인 세포 감소 효과가 뛰어난을 규명함 <Fig. 54>.



<Fig. 54> 인간 간암세포(HepG2)에 대한 천연추출물의 농도별 세포 생존율 평가

6가지 천연추출물을 인간 자궁경부암세포(HeLa)에 24시간동안 처리하여 MTT assay를 통해 세포 생존율을 측정한 결과, 감초, 육계, 목단피, 백작약추출물이 농도 의존적으로 인간 간암세포주의 생존율을 감소시킴. 특히 감초와 목단피 추출물의 효능이 자궁경부암 세포 사멸에 탁월함을 규명함 <Fig. 55>.



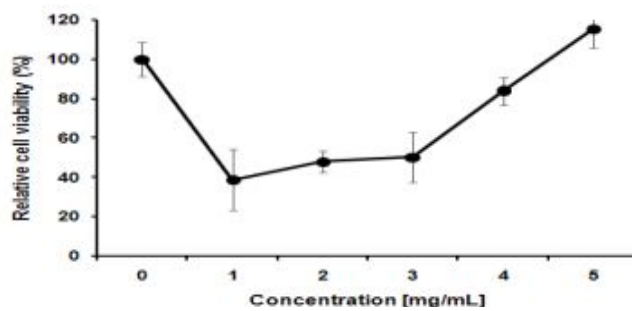
<Fig. 55> 인간 자궁경부암세포(HeLa)에 대한 천연추출물의 농도별 세포 생존율 평가

선별된 대부분의 추출물이 농도 의존적으로 인간 간암세포와 자궁경부암세포에 대한 세포 생존율을 감소시킴을 규명함. 특히 간암세포에 대해서는 감초추출물이, 자궁경부암 세포에 대해서는 감초와 목단피추출물의 효능이 가장 뛰어난을 규명함.

#### 4. 개별 추출물의 기능성 평가

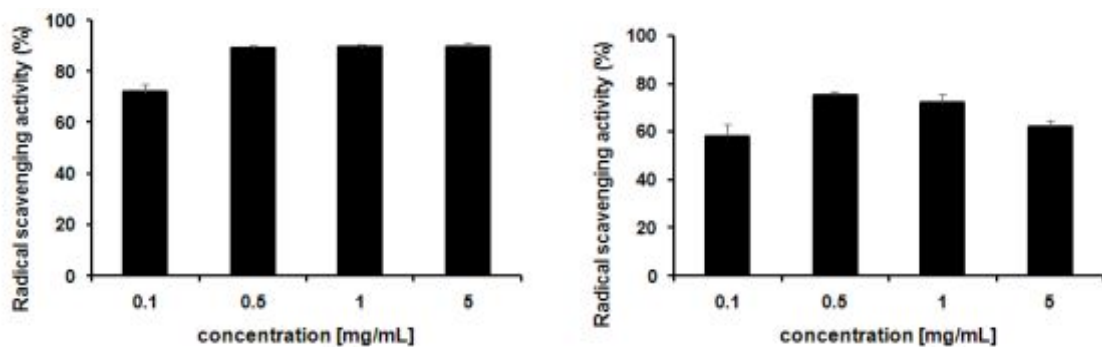
##### 가. 백작약추출물

산화적 세포손상에 대해 뛰어난 보호효능을 나타낸 백작약에 대해 심도 있는 기능성 연구를 진행함. 70% ethanol로 추출한 백작약추출물의 세포독성을 MTT assay를 통해 평가함. 정상세포주인 쥐 배아 섬유아세포(MEF; Mouse Embryonic Fibroblast)를 배양하여 백작약추출물과 MTT 처리 후 분광광도계의 570nm에서 세포 생존율을 측정된 결과, 세포 생존율이 농도 의존적으로 증가함. 5.0 mg/mL의 농도에서 가장 높은 세포 생존율을 보이고, 대조군과 비교하여 백작약추출물이 세포의 성장을 촉진시킴을 규명함 <Fig. 56>.



<Fig. 56> MEF 세포 생존율을 통한 백작약추출물의 세포독성 평가

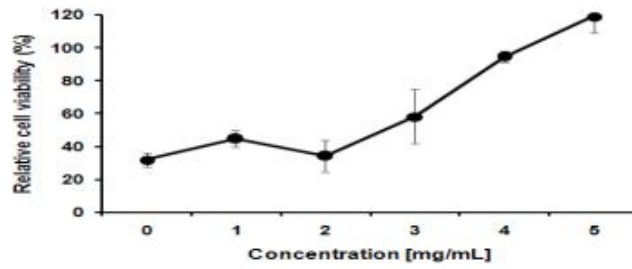
백작약추출물의 라디칼 소거능을 DPPH assay를 통해 평가함. 백작약추출물과 200 μM DPPH를 1 : 1로 암실에서 30분 반응 시킨 뒤 분광광도계의 517nm에서 측정된 결과, 대표적 항산화제로 알려진 BHT에 버금가는 높은 라디칼 소거능력을 나타냄 <Fig. 57>. 본 결과를 통해 백작약추출물이 모든 농도에서 뛰어난 항산화능이 있음을 규명함.



<Fig. 57> 백작약추출물의 라디칼 소거능 평가

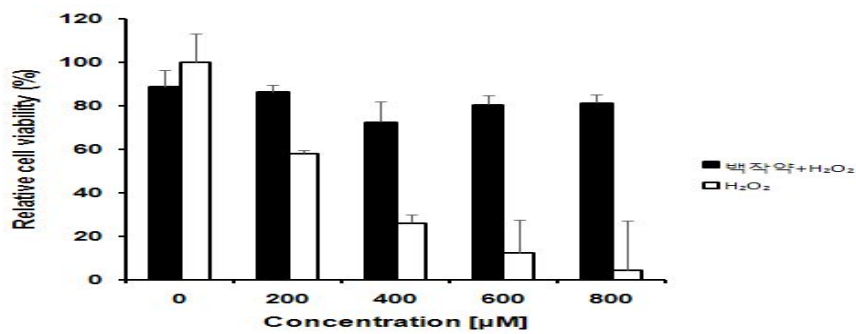
MEF 세포에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 산화적 스트레스를 유발하고, 백작약추출물을 처리하여 배양함. MTT 처리 후 분광광도계의 570nm에서 세포 생존율을 측정된 결과, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 유도한 산화적 손상에 대해 백작약추출물이 1.0 mg/mL, 3.0 mg/mL, 4.0 mg/mL, 5.0 mg/mL의 농도에서 세포 보호 효과를 나타냄. 농도 의존적으로 세포 생존율이 증가하였고, 5.0 mg/mL의 농도에서는 세포 생존율이 120%에 이르는 것으로 보아 백작약추출물이 산화적 스트레스에 대한 세포 손상을 완

화시키고, 세포의 분열 성장을 촉진시키는 기능이 있음을 규명함 <Fig. 58>.



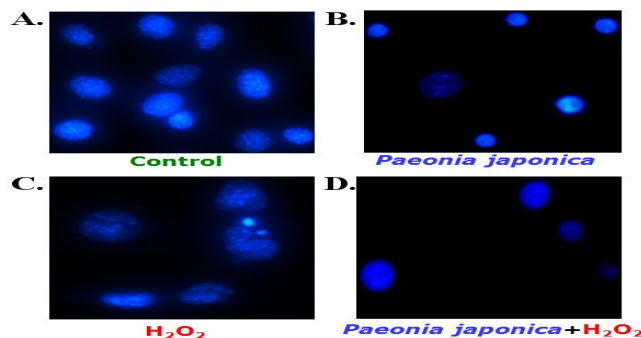
<Fig. 58> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 유도하는 산화적 손상에 대한 백작약추출물의 세포보호 효능 평가

위 결과를 토대로 4가지 농도 (200, 400, 600, 800 μM)의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 5.0 mg/mL의 백작약추출물을 동시처리하여 Growth Inhibition을 평가함. 위와 같은 조건의 세포에 4가지 농도의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (200, 400, 600, 800 μM)와 5.0 mg/mL 백작약추출물을 동시 처리하여 배양함. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 단독 처리군과 비교하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 백작약추출물을 동시 처리하였을 때, 세포 생존율이 눈에 띄게 높아진 것을 확인함 <Fig. 59>. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 농도와 상관없이 생존율을 80% 이상으로 보호하는 것을 통해 백작약추출물의 뛰어난 항산화능을 규명함.



<Fig. 59> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 농도별 산화적 손상과 그에 대한 백작약추출물의 세포보호 효능 평가

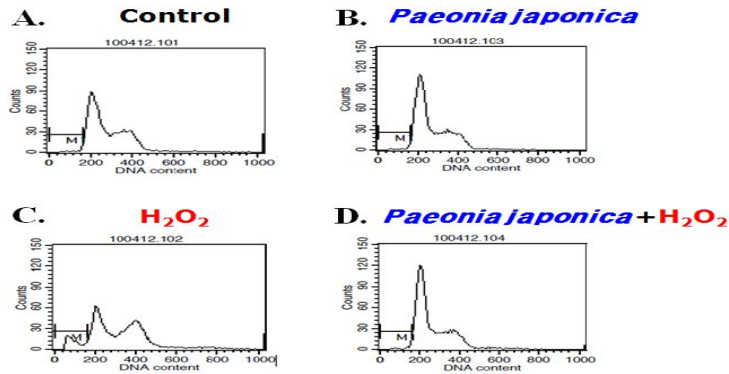
MEF 세포의 핵을 DAPI staining 후 산화적 손상 유발에 따른 세포의 형태를 관찰함. 산화적 손상에 의해 유발된 DNA 분절현상과 염색질의 응축이 백작약추출물의 처리로 인해 감소됨을 직접적인 관찰을 통해 산화적 손상에 대한 백작약추출물의 보호 효능을 규명함 <Fig. 60>.



<Fig. 60> DAPI staining법을 이용한 백작약추출물의 항산화 효능 평가

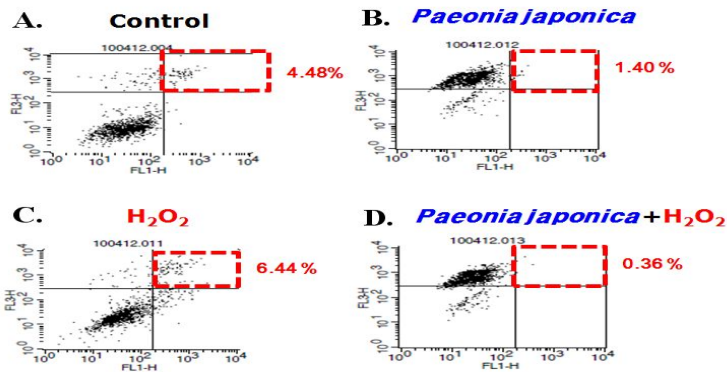


MEF 세포에  $H_2O_2$  (500  $\mu$ M)와 백작약추출물 (5.0 mg/mL)을 6시간 처리한 후,  $H_2O_2$ 를 제거하고 24시간 배양함. cell cycle 분석을 통해 백작약추출물의 세포적 수준에서의 보호효과를 관찰함.  $H_2O_2$ 로 인해 산화적 손상을 입은 세포의 G0/G1기가 백작약추출물의 처리로 인해 정상 세포주기로 유도됨. 또한 산화적 손상으로 인해 증가된 sub-G1기의 세포(apoptosis된 세포)가 백작약추출물 처리 시 감소한 것을 통해 백작약추출물이 산화적 손상을 세포주기 상에서 복구시키는 효과를 규명함 <Fig. 61>.



<Fig. 61> Cell cycle 분석을 통한 백작약추출물의 세포보호 효능 평가

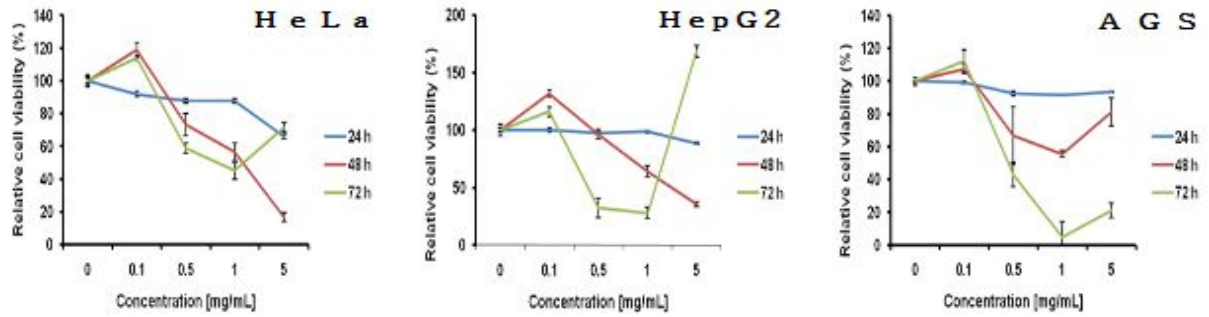
MEF 세포의 apoptosis 발생률을 FITC analysis로 분석한 결과, 백작약추출물 처리 시 apoptosis를 일으키는 세포수가 3% 감소함.  $H_2O_2$  단독 처리군에 비해  $H_2O_2$ 와 백작약추출물을 동시 처리 시 apoptosis 발생률을 6% 감소시킴 <Fig. 62>. 이를 통해 백작약추출물이 산화적 손상을 받은 상태에서 세포자멸을 억제하는 항산화 효능이 있음을 규명함.



<Fig. 62> Apoptosis 패턴 분석을 통한 백작약추출물의 항산화 효능평가

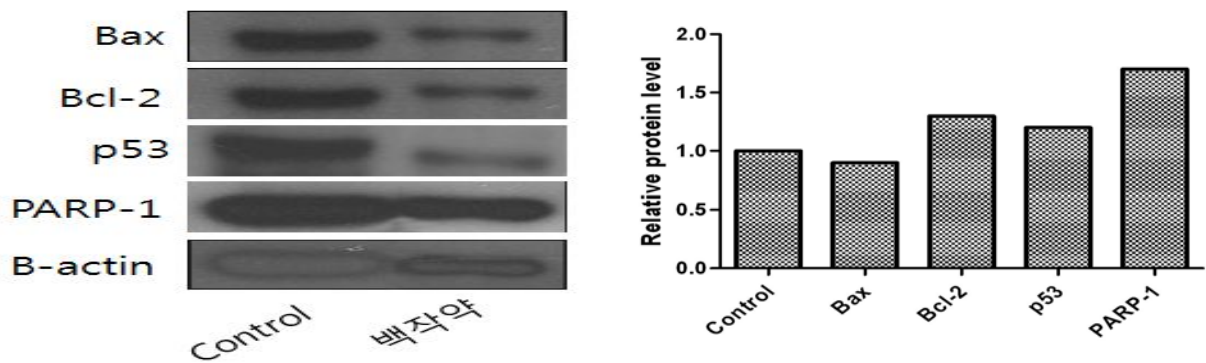
백작약추출물을 3종류의 인간 암세포주(HeLa, HepG2, AGS)에 처리하여 세포의 생존율을 측정된 결과, 3종류의 인간 암세포주에서 백작약추출물의 처리농도와 처리시간 의존적으로 세포 생존율을 크게 감소시킴을 확인함. 간암세포 (HepG2)와 자궁경부암세포(HeLa)에 백작약추출물을 48시간 처리 시 세포 생존율을 크게 감소시켰고, 위암세포(AGS)에 백작약추출물을 72시간 처리 시 세포 생존율이 크게 감소함 <Fig. 63>. 이를 통해 백작약추출물의 3종류의 인간 암세포주에 대한 탁월한 항암효능을 규명함.





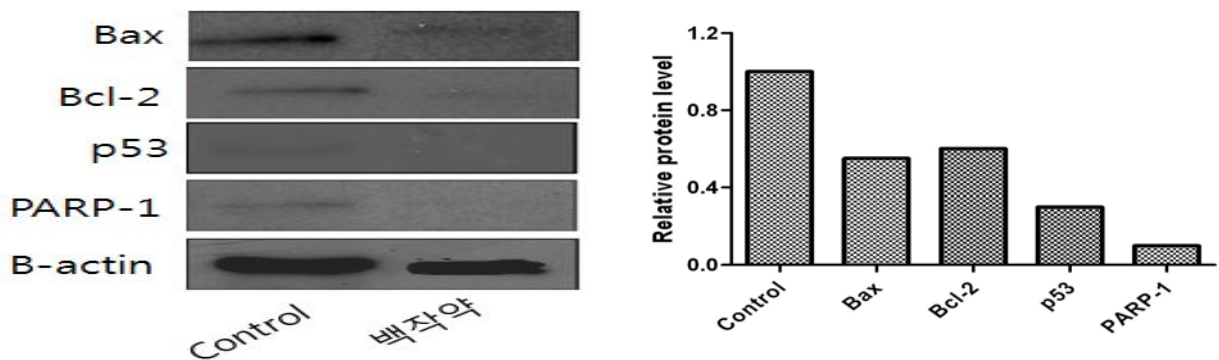
<Fig. 63> 백작약추출물 처리에 따른 인간 암세포주(HeLa, HepG2, AGS)의 생존율 변화 분석

백작약추출물의 세포사멸 효과를 western blotting을 통한 단백질 수준에서 평가함. 백작약추출물을 인간 암세포주(HeLa, HepG2, AGS)에 처리한 후 apoptosis 관련 마커인 Bax, Bcl-2, p53, PARP-1을 비교 평가함. 위암세포에 백작약추출물을 처리했을 시 PARP-1 발현량이 증가함 <Fig. 64>. 이를 통해 백작약추출물이 PARP-1 pathway를 통한 apoptosis 발생과 연관성이 있을 것으로 사료됨.



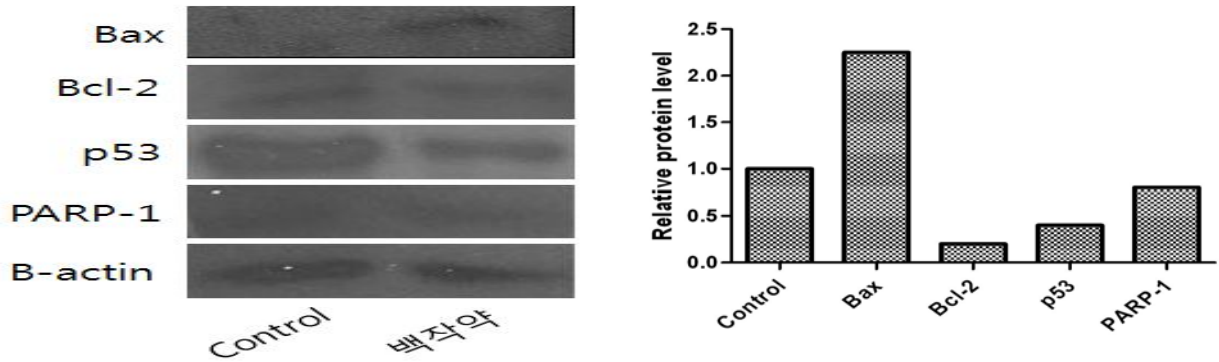
<Fig. 64> 백작약추출물 처리에 따른 위암세포의 단백질 마커 분석 평가

간암세포에 백작약추출물을 처리했을 시 anti-apoptosis 마커인 Bcl-2 발현량이 감소됨 <Fig. 65>. 이를 통해 백작약추출물이 Bcl-2를 억제함으로써 apoptosis를 유도하는 것으로 사료됨.



<Fig. 65> 백작약추출물 처리에 따른 간암세포의 단백질 마커 분석 평가

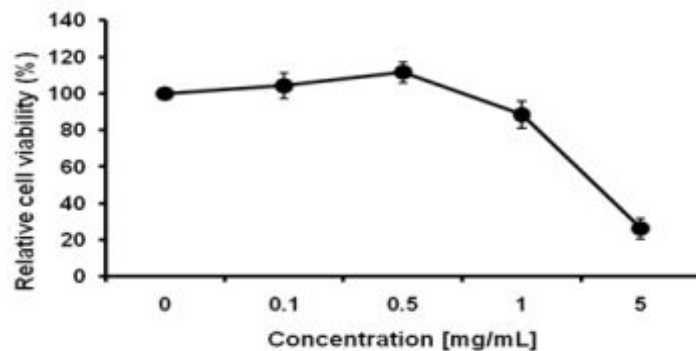
자궁경부암 세포에 백작약추출물을 처리했을 시 apoptosis 마커인 Bax의 발현량이 2배 이상 증가하고 anti-apoptosis 마커인 Bcl-2의 발현량이 현저히 감소함 <Fig. 66>. 이를 통해 백작약추출물이 Bax와 Bcl-2에 의한 apoptosis를 유도하는 기전으로 자궁경부암 세포의 생존율을 감소시키는 것으로 사료됨.



<Fig. 66> 백작약추출물 처리에 따른 자궁경부암 세포의 단백질 마커 분석 평가

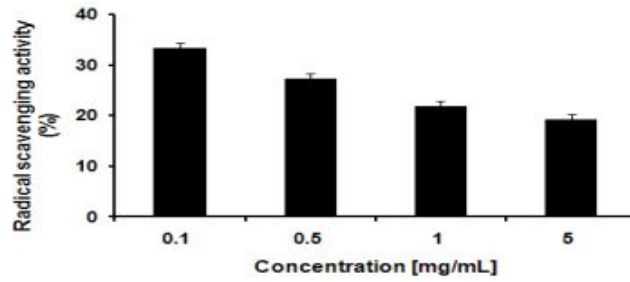
#### 나. 목단피추출물

인간 암세포주에 대해 뛰어난 사멸효능을 나타낸 목단피에 대해 심도 있는 기능성 연구를 진행함. 70% ethanol로 추출한 목단피추출물의 세포 독성을 위와 동일한 방법 및 조건에서 MTT assay를 통해 평가함. MTT 처리 후 분광광도계의 570nm에서 세포 생존율을 측정된 결과, 세포 생존율이 0.5 mg/mL까지는 농도 의존적으로 증가함 <Fig. 67>. 실제 적용이 불가능한 고농도인 5.0 mg/mL에서 세포 생존율이 감소하지만, 이는 실제 인체의 표면적(대상 시료의 농도/인체 표면적)을 고려할 경우 추출물의 독성은 매우 미약할 것으로 사료됨.



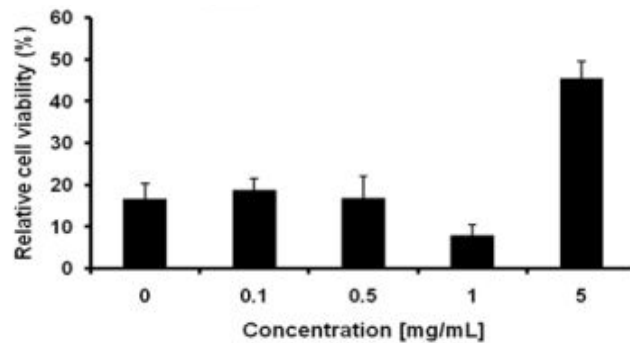
<Fig. 67> MEF 세포 생존율을 통한 목단피추출물의 세포독성 평가

목단피추출물의 라디칼 소거능을 위와 동일한 방법 및 조건에서 DPPH assay를 통해 평가함. 목단피추출물과 200 μM DPPH를 1 : 1로 암실에서 30분 반응 시킨 뒤 분광광도계의 517nm에서 측정된 결과, 농도 의존적으로 라디칼 소거능이 감소함. 고농도에서보다 저농도에서 높은 라디칼 소거능이 있음을 규명함 <Fig. 68>.



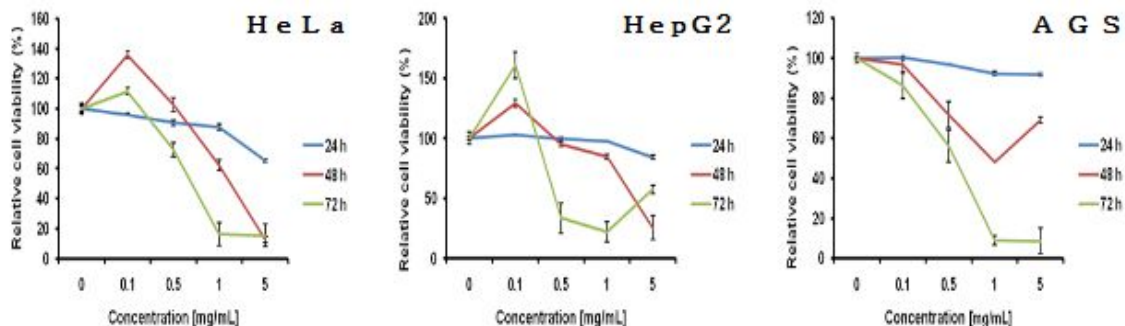
<Fig. 68> 목단피추출물의 라디칼 소거능 평가

MEF 세포에  $H_2O_2$ 로 산화적 스트레스를 유발하고, 목단피추출물을 처리하여 배양함. MTT 처리 후 분광광도계의 570nm에서 세포 생존율을 측정된 결과,  $H_2O_2$ 가 유도한 산화적 손상에 대해 0.1 mg/mL, 0.5 mg/mL, 5.0 mg/mL의 농도에서 세포 보호 효과를 나타냄. 5.0 mg/mL의 농도에서는 세포 생존율이 대조군의 3배 이상 되는 것을 확인함 <Fig. 69>. 이를 통해 5.0 mg/mL의 농도에서 가장 높은 항산화 효능이 있음을 규명함.



<Fig. 69>  $H_2O_2$ 가 유도하는 산화적 손상에 대한 목단피추출물의 세포보호 효능 평가

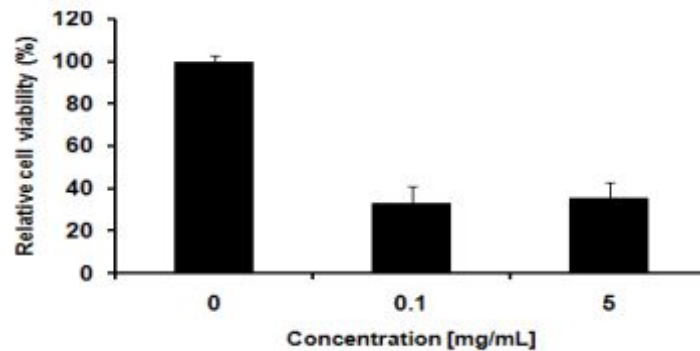
목단피추출물을 3종류의 인간 암세포주(HeLa, HepG2, AGS)에 처리하여 세포의 생존율을 측정된 결과, 3종류의 인간 암세포주에서 목단피추출물의 처리농도와 처리시간 의존적으로 세포 생존율을 크게 감소시킴. 특히, 72시간 목단피추출물 처리 시 세포 생존율이 대폭 감소됨 <Fig. 70>. 이를 통해 목단피추출물의 3종류의 인간 암세포주에 대한 탁월한 항암효능을 규명함.



<Fig. 70> 목단피추출물 처리에 따른 인간 암세포주(HeLa, HepG2, AGS)의 생존율 변화 분석

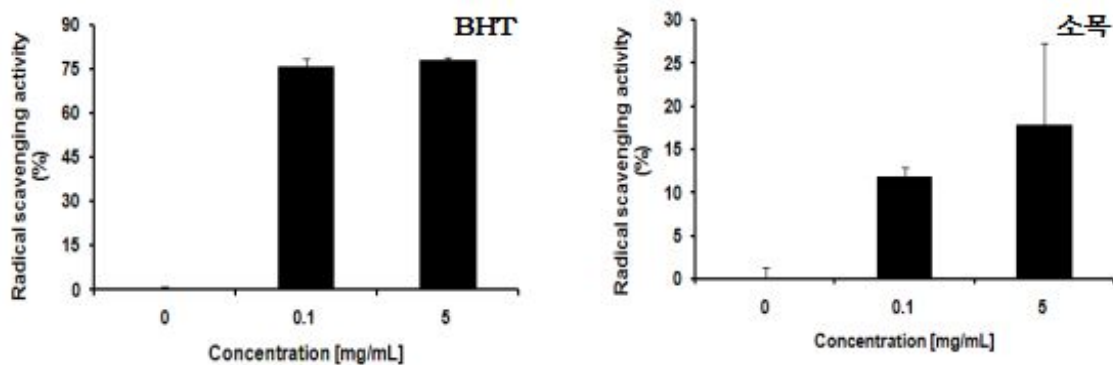
#### 다. 소목추출물

70% ethanol로 추출한 소목추출물의 세포독성을 MTT assay를 통해 평가함. 정상세포주인 쥐 배아 섬유아세포(MEF; Mouse Embryonic Fibroblast)를 배양하여 소목추출물과 MTT 처리 후 분광광도계의 570nm에서 세포 생존율을 측정된 결과, 고농도 처리 시 생존율이 약 40%로 나타나 미약한 세포 독성을 나타냄 <Fig. 71>. 하지만 문헌조사를 통해 소목의 안전성이 검증되었으므로 세포 대상 항암기능과 같은 기능성 측면에서 접근할 수 있는 결과로 사료됨. 실제 동일 세포 대상 항산화 평가에서는 소목추출물이 세포생존을 증가시키는 효과가 있음을 규명함.



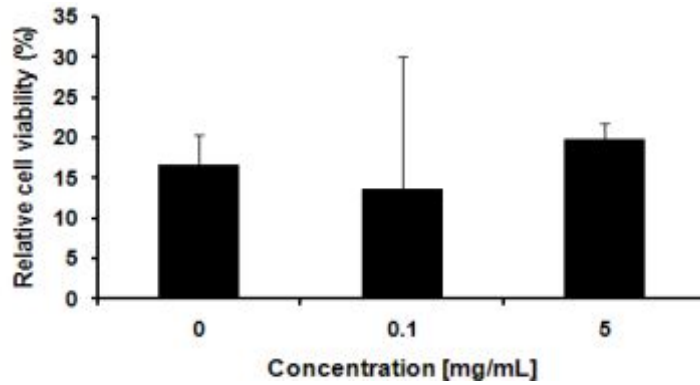
<Fig. 71> MEF 세포 생존율을 통한 소목추출물의 세포독성 평가

소목추출물의 라디칼 소거능을 DPPH assay를 통해 평가함. 소목추출물과 200  $\mu$ M DPPH를 1 : 1로 암실에서 30분 반응 시킨 뒤 분광광도계의 517nm에서 측정함. 대조군으로 합성항산화제로 알려진 BHT를 사용하여 비교한 결과, 0.1 mg/mL과 5.0 mg/mL의 농도에서 라디칼 소거능이 있음을 규명함 <Fig. 72>.



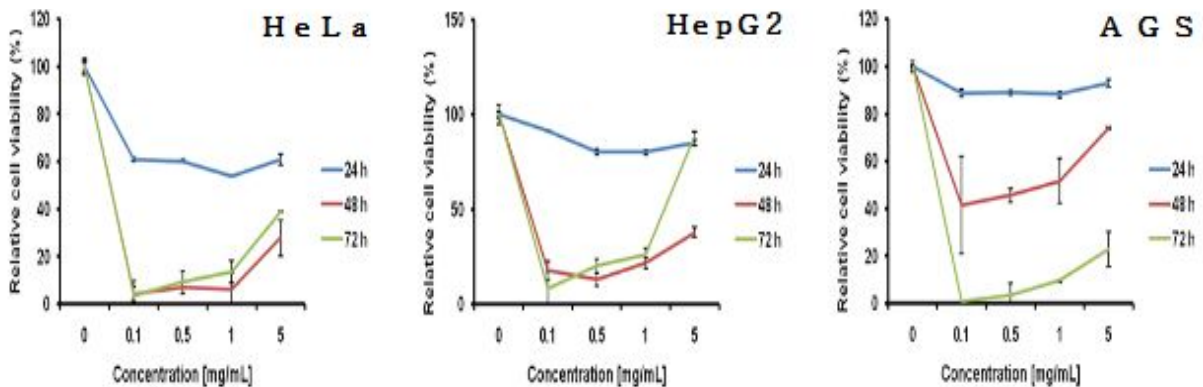
<Fig. 72> 소목추출물의 라디칼 소거능 평가

MEF 세포에  $H_2O_2$ 로 산화적 스트레스를 유발하고 소목추출물을 처리함. MTT 처리 후 분광광도계의 570nm에서 세포 생존율을 측정된 결과,  $H_2O_2$ 가 유도한 산화적 손상에 대해 소목추출물 5.0 mg/mL에서 대조군보다 높은 세포 생존율을 나타냄 <Fig. 73>. 이를 통해 5.0 mg/mL의 농도에서 가장 높은 항산화 효능이 있음을 규명함.



<Fig. 73> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 유도하는 산화적 손상에 대한 소목추출물의 세포보호 효능 평가

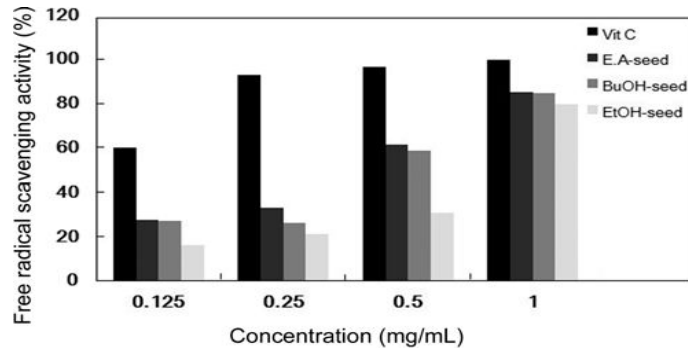
소목추출물을 3종류의 인간 암세포주(HeLa, HepG2, AGS)에 처리하여 세포의 생존율을 측정 한 결과, 3종류의 인간 암세포주에서 소목추출물이 시간 의존적으로 세포 생존율을 크게 감소시킴. 특히, 소목추출물을 0.1 mg/mL로 처리 시 세포 생존율이 급격히 감소하는 것으로 보아, 소목추출물이 3종류의 인간 암세포주에 대해 저농도에서도 뛰어난 항암효능이 있음을 규명함 <Fig. 74>.



<Fig. 74> 소목추출물 처리에 따른 인간 암세포주(HeLa, HepG2, AGS)의 생존율 변화 분석

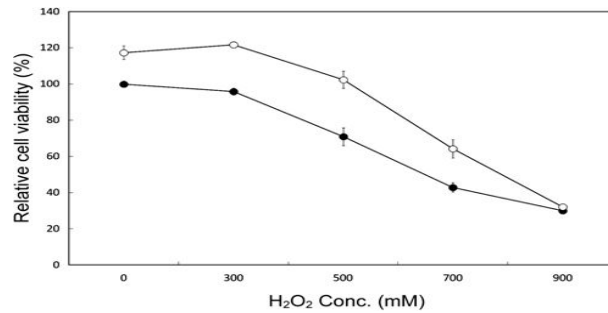
#### 라. 백련추출물

Ethanol, ethyl acetate, butanol로 추출한 백련추출물의 라디칼 소거능을 DPPH assay를 통해 평가함. 백련추출물과 200 μM DPPH를 1 : 1로 암실에서 30분 반응 시킨 뒤 분광광도계의 517nm에서 측정 한 결과, 1.0 mg/mL의 농도에서 대표적 항산화제로 알려진 L-ascorbic acid에 버금가는 높은 라디칼 소거능력을 나타냄 <Fig. 75>. 본 결과를 통해 백련추출물이 농도 의존적으로 항산화능이 증가함을 규명함.



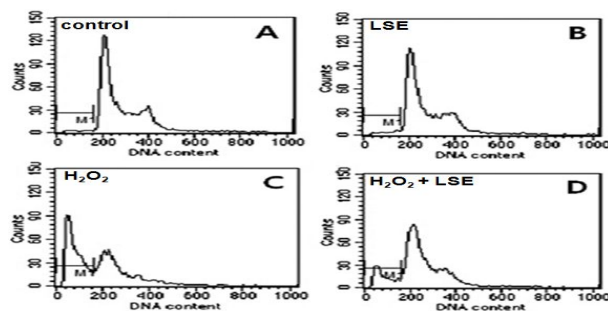
<Fig. 75> 추출용매에 따른 백련추출물의 라디칼 소거능 평가

MEF 세포에  $H_2O_2$ 로 산화적 스트레스를 유발하고, 백련추출물을 처리하여 배양함. MTT 처리 후 분광광도계의 570nm에서 세포 생존율을 측정된 결과,  $H_2O_2$ 가 유도한 산화적 손상에 대해 900  $\mu M$ 을 제외한 모든 농도에서 세포 보호 효과를 나타냄. 300  $\mu M$ , 500  $\mu M$ 의 농도에서는 세포 생존율이 120%에 이르는 것으로 보아 백련추출물이 산화적 스트레스에 대한 세포 손상을 완화시키고, 세포의 분열 성장을 촉진시키는 기능이 있음을 규명함 <Fig. 76>.



<Fig. 76>  $H_2O_2$ 가 유도하는 산화적 손상에 대한 백련추출물의 세포보호 효능 평가

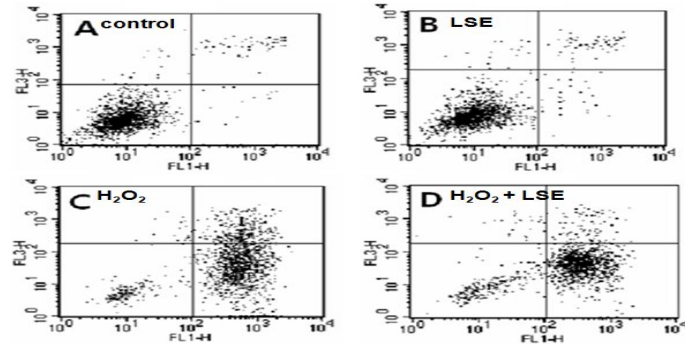
MEF 세포에  $H_2O_2$  (500  $\mu M$ )와 백련추출물 (0.1 mg/mL)을 단독 또는 복합적으로 처리하고 24시간 배양한 후, cell cycle 분석을 통해 백련추출물의 세포적 수준에서의 보호효과를 평가함.  $H_2O_2$ 로 인해 산화적 손상을 입은 세포의 G0/G1기가 백련추출물의 처리로 인해 정상 세포주기로 유도됨. 또한 산화적 손상으로 인해 증가된 sub-G1기의 세포(apoptosis된 세포)가 백련추출물 처리 시 감소한 것을 통해 백련추출물이 산화적 손상을 세포주기 상에서 복구시키는 효능을 규명함 <Fig. 77>.



<Fig. 77> Cell cycle분석을 통한 백련추출물의 세포보호 효능 평가



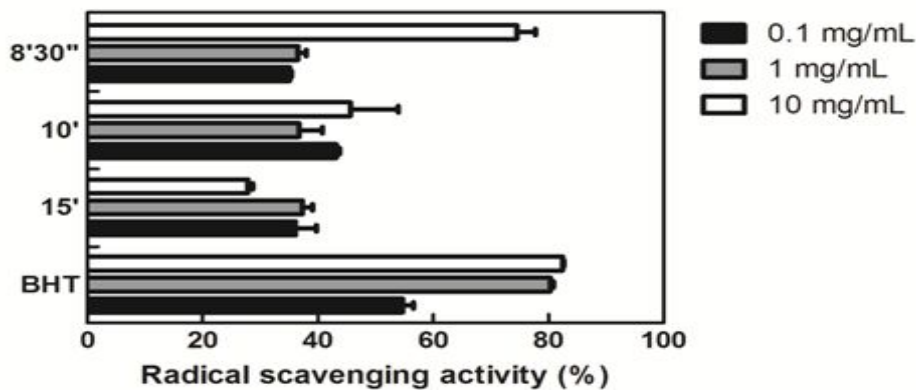
MEF 세포의 apoptosis 발생률을 FITC analysis로 분석한 결과, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 단독 처리군에 비해 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 백련추출물을 동시처리 시 apoptosis 발생률을 13% 감소시킴 <Fig. 78>. 이를 통해 백련추출물이 산화적 손상을 받은 상태에서 세포자멸을 억제하는 항산화 효능이 있음을 규명함.



<Fig. 78> Apoptosis 패턴 분석을 통한 백련추출물의 항산화 효능평가

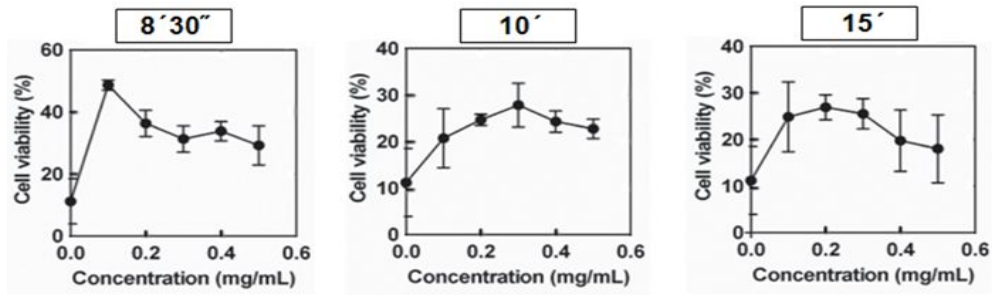
#### 마. 생두추출물

로스팅 시간에 따른 생두추출물의 라디칼 소거능을 DPPH assay를 통해 평가함. 생두추출물과 200 μM DPPH를 1 : 1로 암실에서 30분 반응 시킨 뒤 분광광도계의 517nm에서 측정한 결과, 8분 30초 동안 로스팅한 생두추출물이 대표적 항산화제로 알려진 BHT에 버금가는 높은 라디칼 소거능력을 나타냄 <Fig. 79>. 본 결과를 통해 로스팅 시간이 짧은 생두추출물일수록 뛰어난 항산화능이 있음을 규명함.



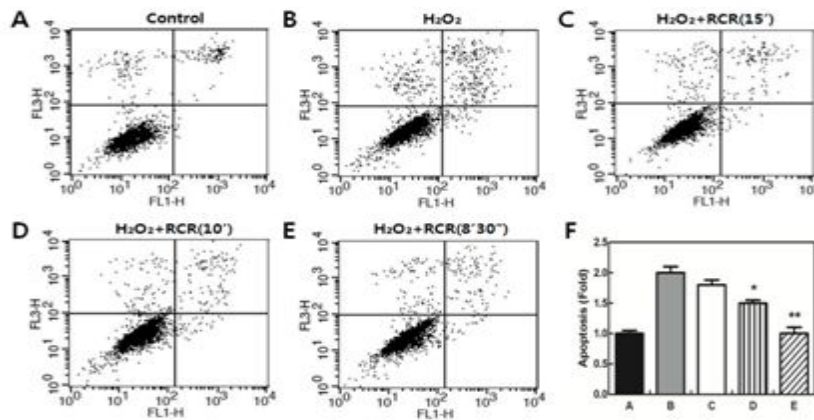
<Fig. 79> 로스팅 시간에 따른 생두추출물의 라디칼 소거능 평가

MEF 세포에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 산화적 스트레스를 유발하고, 생두추출물을 처리하여 배양함. MTT 처리 후 분광광도계의 570nm에서 세포 생존율을 측정한 결과, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 유도한 산화적 손상에 대해 8분 30초 동안 로스팅한 생두추출물이 0.1 mg/mL의 농도에서 세포 보호 효과를 나타냈으며, 저농도 일수록 세포 생존율이 증가함. 위 결과를 통해 생두추출물이 산화적 스트레스에 대한 세포 손상을 완화시키고, 세포의 분열성장을 촉진시킴을 규명함 <Fig. 80>.



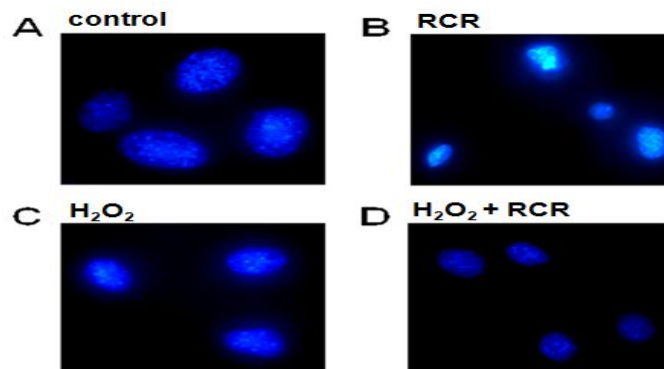
<Fig. 80> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 유도하는 산화적 손상에 대한 생두추출물의 세포보호 효능 평가

MEF 세포의 apoptosis 발생률을 FITC analysis로 분석한 결과, apoptosis를 일으키는 세포수가 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 단독 처리군에 비해 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 생두추출물을 동시 처리 시 apoptosis 발생률을 감소시킴 <Fig. 81>. 이를 통해 생두추출물이 산화적 손상을 받은 상태에서 세포자멸을 억제하는 항산화 효능이 있음을 규명함.



<Fig. 81> Apoptosis 패턴 분석을 통한 생두추출물의 항산화 효능평가

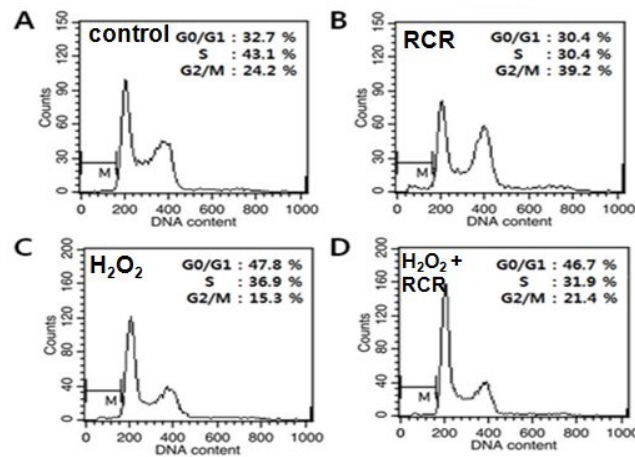
MEF 세포의 핵을 DAPI staining 후 산화적 손상 유발에 따른 세포의 형태를 관찰함. 산화적 손상에 의해 유발된 DNA 분절현상과 염색질의 응축이 생두추출물의 처리로 인해 감소됨을 직접적인 관찰을 통해 산화적 손상에 대한 생두추출물의 보호 효능을 규명함 <Fig. 82>.



<Fig. 82> DAPI staining법을 이용한 생두추출물의 항산화 효능 평가



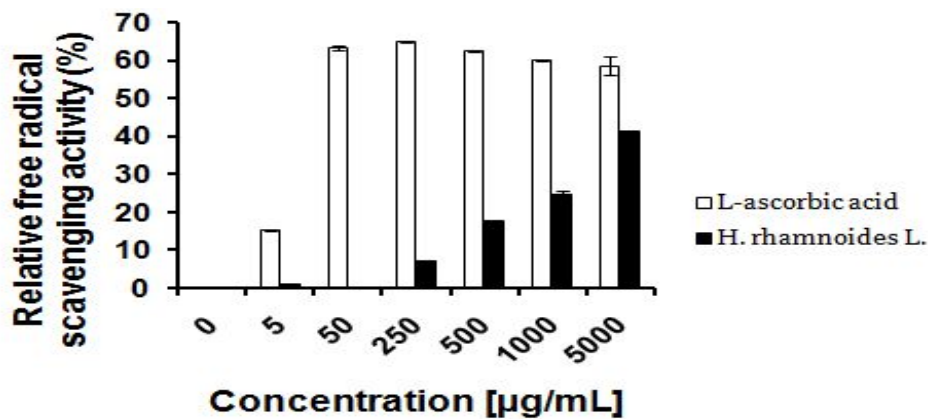
MEF 세포에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (350 μM)와 생두추출물 (0.3 mg/mL)을 6시간 처리한 후, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 제거하고 24시간 배양하여 cell cycle 분석을 통해 생두추출물의 세포적 수준에서의 보호효과를 관찰함. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 인해 산화적 손상을 입은 세포의 G0/G1기가 생두추출물의 처리로 인해 정상 세포 주기로 유도됨. 또한 산화적 손상으로 인해 증가된 sub-G1기의 세포(apoptosis된 세포)가 생두추출물 처리 시 감소한 것을 통해 생두추출물이 산화적 손상을 세포주기 상에서 복구시킴을 규명함 <Fig. 83>.



<Fig. 83> Cell cycle 분석을 통한 생두추출물의 세포보호 효능 평가

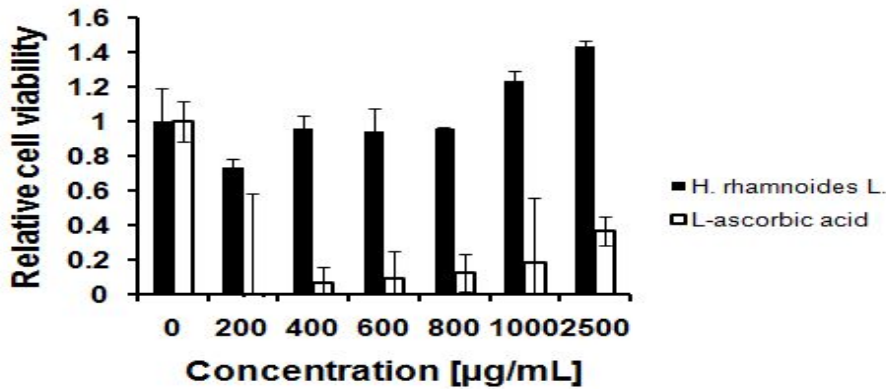
바. 갈매보리수나무 열매추출물

갈매보리수나무는 각종 비타민과 18종의 아미노산을 함유하고 있으며, 그 열매에는 비타민 C 함유량이 사과보다 200배 높아 비타민나무로도 불리며 신생 고부가가치 기능성 소재로 대두되고 있음. 또한, 갈매보리수나무에 포함되어있는 flavonoid를 비롯한 다양한 bioactive components의 항산화·항암·항균·항염증 효능이 최근 보고된 바 있음. 1차적 항균능 평가에서 식중독균인 *B. cereus*에 대해 갈매보리수나무 열매의 항균효능이 평가된바 있으며, 천연보존제의 소재로써 가능성이 있다고 사료되어 갈매보리수나무 열매추출물에 대한 기능성 연구를 심도 있게 진행함.



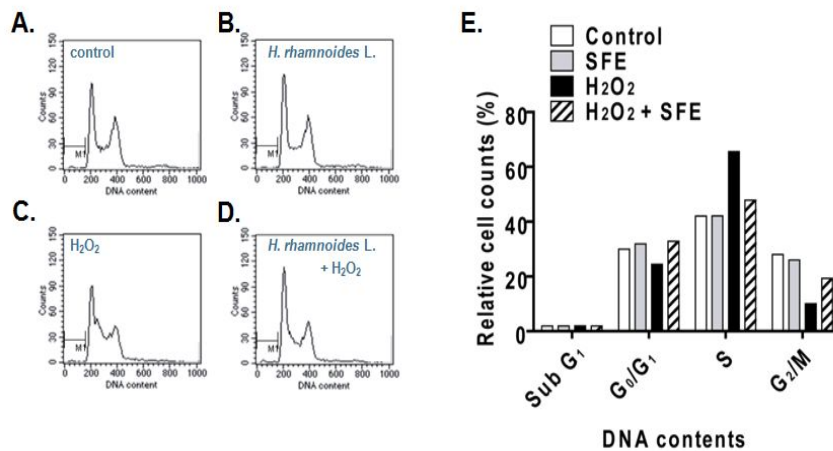
<Fig. 84> 갈매보리수나무 열매추출물의 라디칼 소거능 평가

갈매보리수나무 열매를 70% ethanol로 추출하여 얻은 추출물의 라디칼 소거능을 DPPH assay를 통해 평가함. 대조군으로는 비타민C로 잘 알려진 L-ascorbic acid를 사용하여 라디칼 소거능력을 비교하였고, 본 결과를 통해 갈매보리수나무 열매추출물의 라디칼 소거능력이 농도 의존적으로 고르게 증가함을 확인함. 특히, 갈매보리수나무 열매추출물 5.0 mg/mL 처리 시, 대표적 항산화제로 알려진 L-ascorbic acid의 라디칼 소거능력보다 약 10% 아래인 비교적 높은 라디칼 소거능이 있음을 규명함 <Fig. 84>.



<Fig. 85> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 유도하는 산화적 손상에 대한 갈매보리수나무 열매추출물의 세포보호 효능 평가

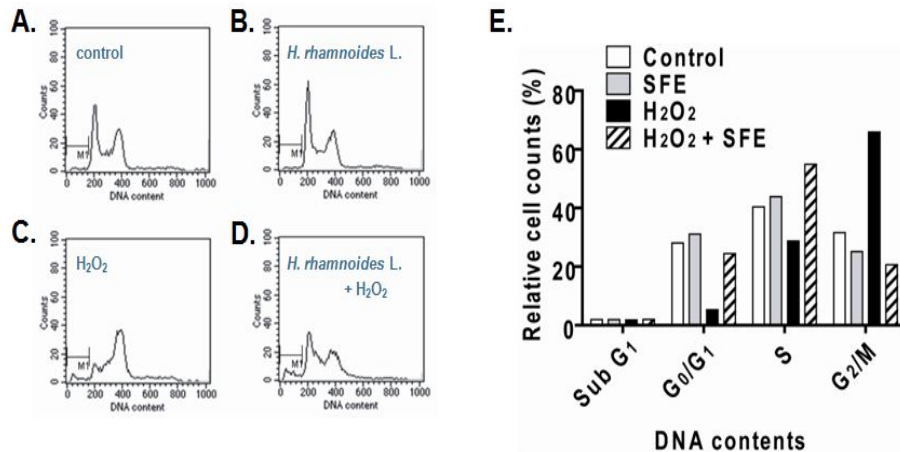
정상 세포주인 쥐 배아 섬유아세포(MEF; Mouse Embryonic Fibroblast)에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 산화적 스트레스를 유발하고, 갈매보리수나무 열매추출물을 처리한 후 배양함. MTT 처리 후 분광광도계의 570nm에서 세포수를 측정하여 세포 생존율을 측정한 결과, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 유도하는 산화적 손상에 대해 갈매보리수나무 열매추출물이 농도 의존적으로 세포보호 효과를 나타내는 것을 확인함. 또한, 갈매보리수나무 열매추출물은 대조군인 L-ascorbic acid와 비교해 약 3.5배 이상의 세포내 항산화 효능이 있음을 규명함 <Fig. 85>.



<Fig. 86> Cell cycle분석을 통한 갈매보리수나무 열매추출물의 세포보호 효능 평가

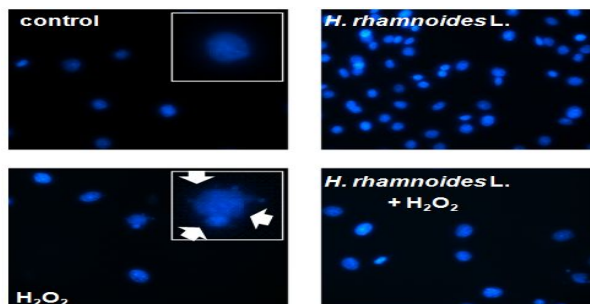
MEF 세포에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (500 µM)와 갈매보리수나무 열매추출물 (5.0 mg/mL)을 24h 처리한 후

cell cycle 분석을 통해 갈매보리수나무 열매추출물의 세포적 수준에서의 보호효과를 관찰함.  $H_2O_2$ 에 의해 산화적 손상을 받은 세포가 S phase 축적을 매개하여 prophase 상태에서 축적되어 mitosis로 가지 못하게 하며 apoptosis와 necrosis로 진행을 유도하는 것을 갈매보리수나무 열매추출물의 첨가가 손상 받은 세포의 S phase 축적을 완화시켜주는 것으로 사료되며, 이를 통해 산화적 스트레스에 대한 추출물의 세포 보호 효과를 규명함 <Fig. 86>.



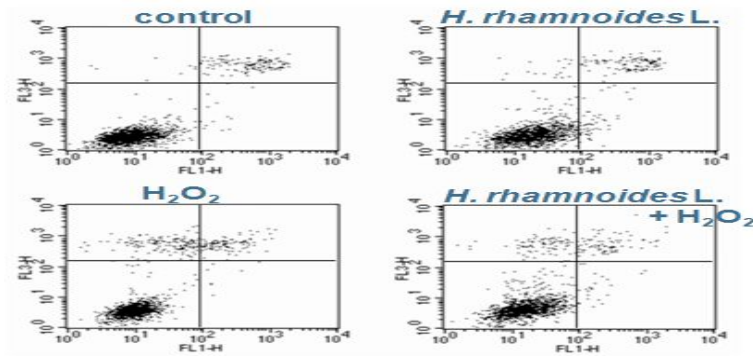
<Fig. 87> Cell cycle 분석을 통한 갈매보리수나무 열매추출물의 세포보호 효능 평가

MEF 세포에  $H_2O_2$  (500  $\mu$ M)와 갈매보리수나무 열매추출물 (5.0 mg/mL)을 6h 처리한 후,  $H_2O_2$ 를 제거하고 24시간 배양한 후, cell cycle 분석을 통해 갈매보리수나무 열매추출물의 세포적 수준에서의 보호효과를 관찰함.  $H_2O_2$ 로 인해 손상을 입어 유발된 세포의 G2/M phase arrest가 갈매보리수나무 열매추출물의 첨가로 인해 정상 세포주기를 되찾음으로써 산화적 스트레스에 의한 세포 보호 효능을 갖는 것으로 사료됨 <Fig. 87>.



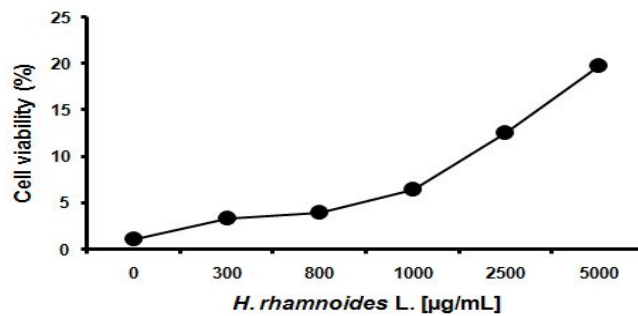
<Fig. 88> DAPI staining법을 이용한 갈매보리수나무 열매추출물의 항산화 효능 평가

MEF 세포의 핵을 DAPI staining하여 관찰하여 산화적 손상 유발에 따른 세포의 morphology를 관찰함. 산화적 스트레스에 의해 유발된 DNA fragmentation과 chromatin의 응축이 갈매보리수나무 열매추출물의 첨가로 인해 감소되는 것을 확인하였고, 산화적 손상에 대한 갈매보리수나무 열매추출물의 보호 효능을 직접 관찰함 <Fig. 88>.



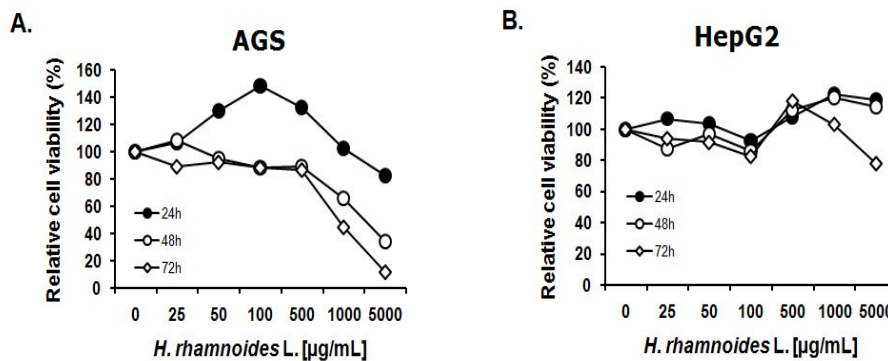
<Fig. 89> Apoptosis 패턴 분석을 통한 갈매보리수나무 열매추출물의 항산화 효능 평가

또한, 갈매보리수나무 열매추출물의 세포치리는  $H_2O_2$ 에 의한 산화적 손상에 의해 야기되는 apoptosis와 necrosis를 동반한 대규모의 세포사멸 완화에 효과가 있는 것을 FITC analysis 기반의 세포 early apoptosis, apoptosis, necrosis 패턴 분석을 통해 확인함 <Fig. 89>.



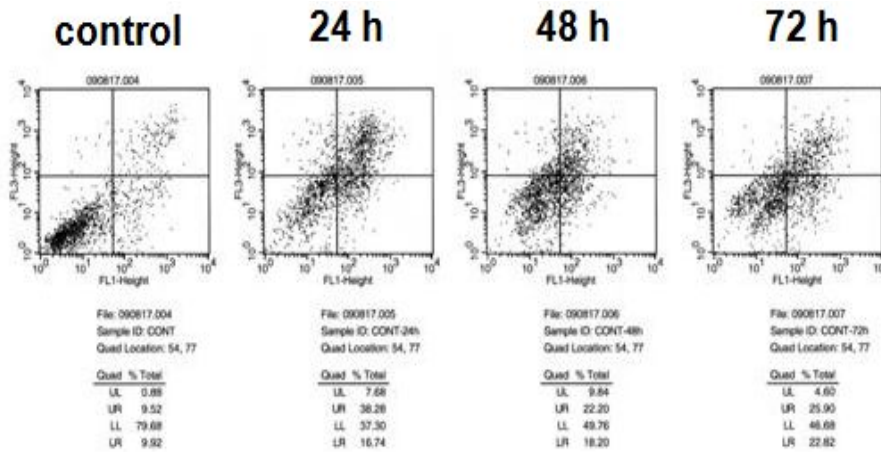
<Fig. 90> MMS가 유발하는 손상에 대한 갈매보리수나무 열매추출물의 세포보호 효능 평가

갈매보리수나무 열매추출물의 세포보호 효과가  $H_2O_2$ 가 유도하는 산화적 스트레스에만 국한된 것인지 평가하기 위해  $H_2O_2$ 와는 다른 종류의 세포손상을 유발하는 DNA alkylating agent인 MMS로 세포손상을 유발 시킨 후, 추출물을 처리하여 세포 생존율을 측정함. MMS가 유발하는 손상에 대해 갈매보리수나무 열매추출물의 농도가 증가할수록 세포 생존율 또한 함께 증가하는 것을 확인하였고, 갈매보리수나무 열매추출물이  $H_2O_2$ 에 의한 산화적 손상뿐만 아니라 MMS가 유발하는 DNA 손상에도 효능이 있음을 규명함 <Fig. 90>.



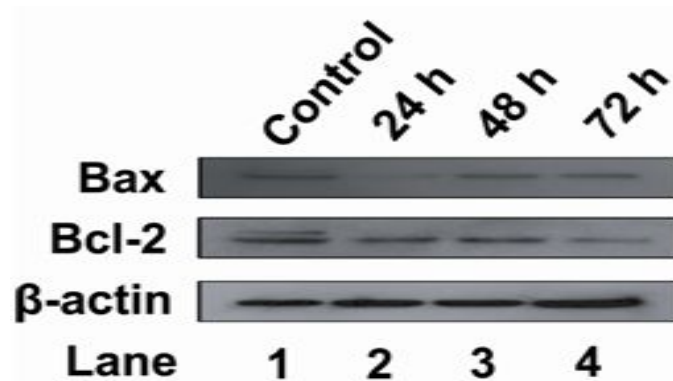
<Fig. 91> 갈매보리수나무 열매추출물 처리에 따른 인간 암세포주(AGS, HepG2)의 생존율 측정

갈매보리수나무 열매추출물을 3종류의 인간 암세포주(AGS, HepG2, HeLa)에 처리하여 세포의 생존율을 관찰한 결과, 인간의 간암세포(HepG2)와 자궁경부암세포(HeLa)에는 별다른 영향을 보이지 않는 반면, 인간 위암세포(AGS)에는 갈매보리수나무 열매추출물의 처리 농도와 시간에 의존적으로 세포 생존율을 감소시키는 효능을 규명함 <Fig. 91>.



<Fig. 92> 갈매보리수나무 열매추출물 처리에 따른 인간 위암세포주의 apoptosis 패턴 분석

갈매보리수나무 열매추출물을 인간의 위암세포에 시간별로 처리한 결과, 추출물의 처리시간이 길어질수록 위암세포의 early apoptosis의 유발이 증가되는 것을 확인함 <Fig. 92>.



<Fig. 93> 갈매보리수나무 열매추출물 처리에 따른 인간 위암세포주의 단백질 마커 분석

시간에 따른 위암세포의 apoptosis증가는 추출물의 처리 시간이 증가함에 따라 anti-apoptosis 마커인 Bcl-2의 발현량이 줄어들어 apoptosis를 안정적으로 유도하여 위암세포의 사멸을 유발하는 것으로 사료됨 <Fig. 93>.

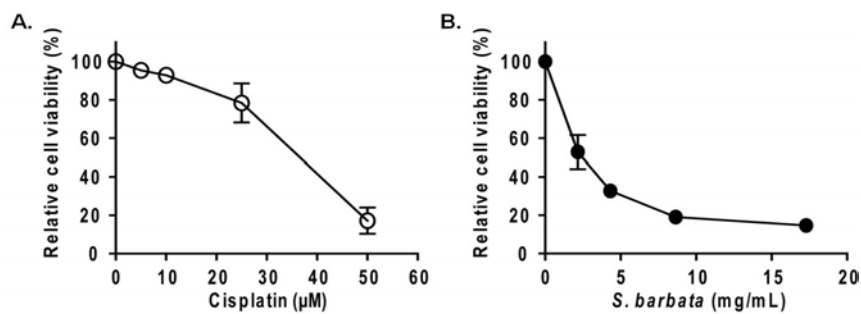
본 연구를 통해 갈매보리수나무 열매추출물의 항산화 능력을 라디칼 소거능력을 통해 확인하였고, 추출물의 세포적 항산화 효능을 규명함. 또한, 갈매보리수나무 열매추출물의 위암세포 특이적인 세포사멸 효과를 확인하였으며, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 유발하는 세포내 산화적 스트레스는 세포노화와 종양형성에 상호 관련이 있으므로 갈매보리수나무 열매 추출물은 항산화, 항노화 및 항암(위암)효능의 멀티기능성을 가질 것으로 사료됨.



사. 반지련추출물

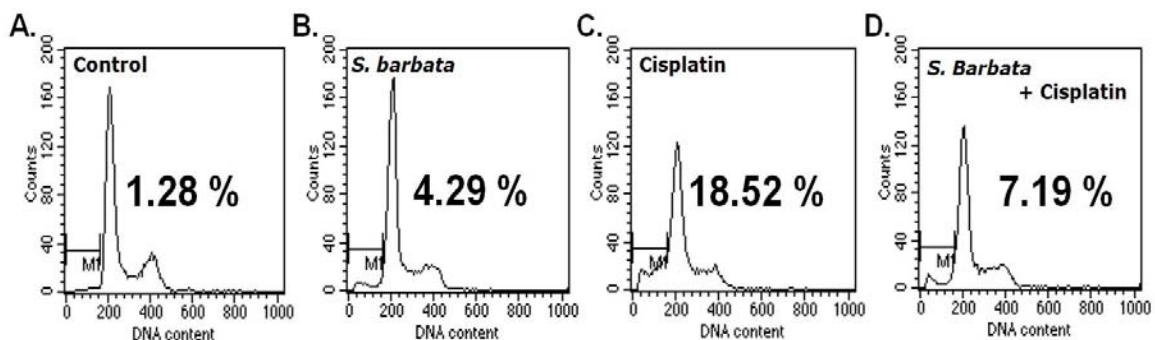
반지련은 꿀풀과에 속하는 다년생 초본으로서 단방으로 혹은 복합 처방에 배합되어 자궁경부암, 소화관암 및 폐암에 대한 치료를 목적으로 활용되고 있음. 또한, 반지련에 포함되어 있는 polyphenol류 및 2차 대사산물의 항산화·항암효능이 알려져 있음. 1차적 항균효능 평가에서 *B. cereus*와 *S. aureus*에 대해 반지련추출물의 항균효능이 평가된바 있으며, 천연보존제의 소재로써 가능성이 있다고 사료되어 반지련추출물에 대한 기능성 연구를 심도 있게 진행함.

반지련추출물의 항암효능을 자궁경부암 세포주인 HeLa cell을 이용하여 MTT assay로 측정 한 결과, 양방향암제인 cisplatin과 유사하게 농도 의존적으로 세포생존을 감소를 유도함. 즉, 반지련추출물이 자궁경부암 세포주에 대해 탁월한 항암효능을 가짐을 규명함 <Fig. 94>.



<Fig. 94> 자궁경부암 세포주에 대한 cisplatin과 반지련추출물의 항암효능 평가

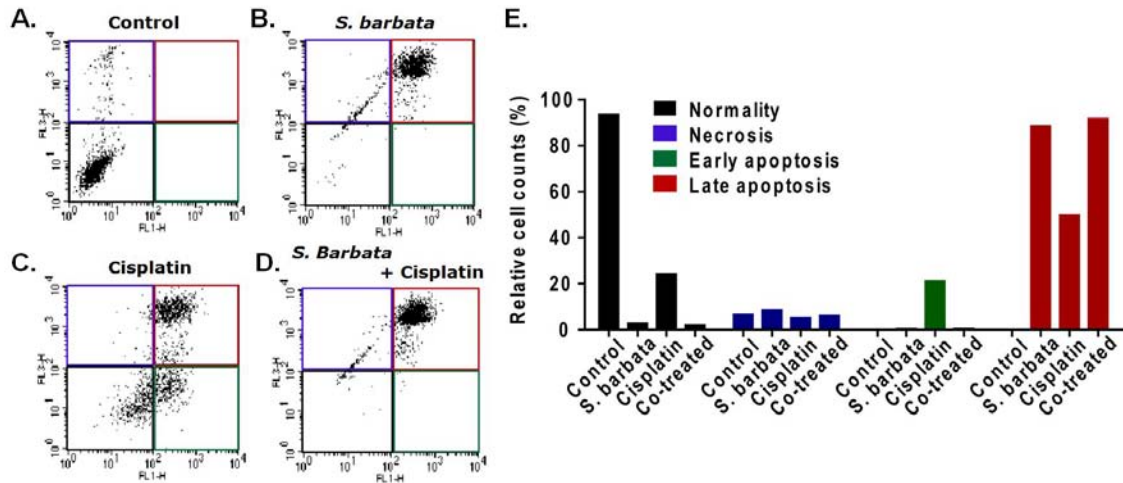
또한 반지련추출물과 cisplatin의 단독처리 및 병용투여가 자궁경부암 세포주의 cell cycle pattern에 미치는 영향을 분석하기 위해서 cell cycle analysis를 수행한 결과, 대조군에 비해서 반지련 추출물의 경우 약 4배가량 자궁경부암 세포를 세포사멸로 유도함을 확인함. 아울러 양 방향암제인 cisplatin과 반지련추출물을 병용투여 시에도 cisplatin 단독처리에 비해서 다소 감소하였지만 뚜렷하게 자궁경부암 세포를 세포사멸로 유도함을 확인함. 이는 궁극적으로 반지련 추출물과 cisplatin이 자궁경부암 세포주에 대해 항암효능이 탁월함을 알 수 있고, 아울러 두 가지 약물의 세포사멸 기작에 차이가 있음을 규명함 <Fig. 95>.



<Fig. 95> Cell cycle analysis를 통한 cisplatin과 반지련추출물의 항암효능 분석

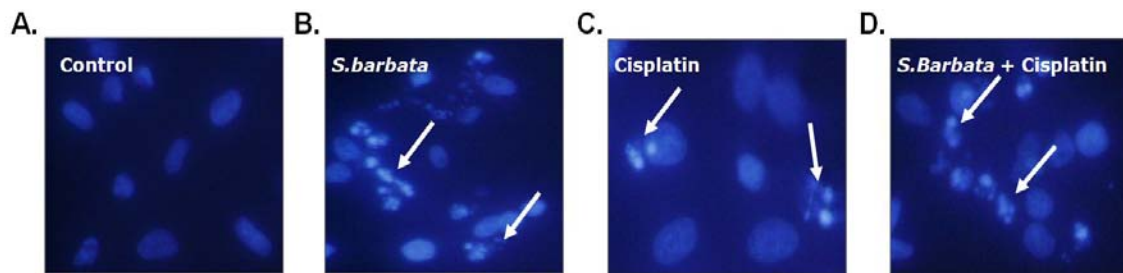
추가적으로 반지련추출물과 cisplatin 단독처리 및 병용투여에 의한 각각의 항암작용을 apoptotic analysis를 통해 직접 비교분석한 결과, 대부분의 세포가 생존한 대조군에 비해서 반

지련 추출물 처리 시, 세포사멸의 비율이 약 80%정도 상승했으며, cisplatin과 반지련추출물의 병용투여 시, 약 90%정도 상승함. 이 결과를 바탕으로 반지련추출물 처리가 자궁경부암 세포주의 세포사멸을 유도함으로서 항암효능을 가진다는 점을 확인할 수 있고, cisplatin과의 병용투여 시 세포사멸 효과가 cisplatin 단독 처리 때보다 약 21.6% 증가하여 또한 항암효능이 탁월함을 규명함 <Fig. 96>.



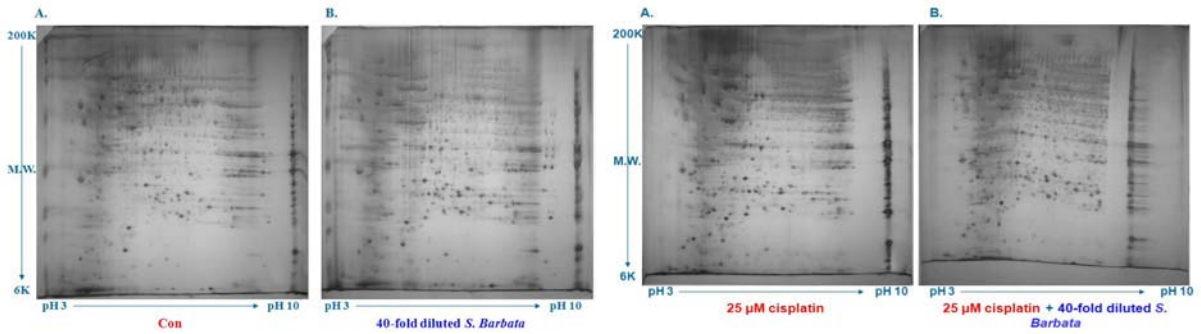
<Fig. 96> Apoptosis analysis를 통한 cisplatin과 반지련추출물의 항암효능 분석

최종적으로 apoptotic hallmark인 DNA 분절화와 세포핵 응축의 변화를 DAPI staining 기법을 이용하여 세포핵을 염색함으로써 형광현미경에서 관찰함. 그 결과, 대조군에서는 세포사멸이 일어나지 않은 균질한 타원형 형광염색된 핵을 관찰하였고, 나머지 그룹에서는 DNA 분절화와 세포핵 응축을 띄는 세포사멸 효과를 확인함. 또한, 반지련추출물과 cisplatin의 병용투여 시, 각각의 약물 단독처리 시보다 뚜렷한 세포사멸 효과를 규명함 <Fig. 97>.



<Fig. 97> DAPI staining을 통한 반지련추출물의 항암효능 분석

반지련추출물의 항암효능을 proteomics 기법인 2-dimensional electrophoresis(2-DE)를 이용하여 2차원 분리 후, 발현 변화가 있는 단백질 spot을 질량분석하여 동정함. 그 결과, 반지련추출물 처리 시, 항산화관련 단백질인 peroxiredoxin1과 종양억제 단백질인 prohibitin의 발현량이 증가함. 즉, 반지련추출물의 항산화 및 항암효능을 단백질 수준에서 입증함 <Fig. 98>.



Name	Function
Peroxioredoxin 1	A scavenger of reactive oxygen species (ROS)
Peroxioredoxin 2	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. An antioxidant enzyme that uses cysteine residues to decompose peroxides</li> <li>2. Catalase and glutathione peroxidase to scavenge low levels of hydrogen peroxide</li> <li>3. Mammalian peroxiredoxin family of thiol proteins It is important in antioxidant defense and redox signaling.</li> </ol>
Annexin A3	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. The suppression of annexin A3 expression inhibits DNA synthesis.</li> <li>2. Plays an important role in the signalling cascade in rat liver regeneration.</li> <li>3. Might serve as a novel biomarker for lymph node metastasis and prognosis</li> </ol>
Prohibitin	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Protection from oxidative stress-induced damage</li> <li>2. Mitochondrial prohibitin complexes control cell proliferation, cristae morphogenesis and the functional integrity of mitochondria.</li> <li>3. A transcriptional corepressor for ERalpha in vitro and in vivo</li> <li>4. A tumor suppresser protein, plays an important role in the transcriptional regulation of various genes involved in cell-cycle control and proliferation.</li> </ol>
Adenomatous polyposis coli	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Tumor suppressor</li> <li>2. The APC gene can modulate the base excision repair (BER) pathway through an interaction with DNA polymerase b (Pol-b) and flap endonuclease 1 (Fen-1).</li> <li>3. APC participation in G1/S is attributed to its recognized role in Wnt signaling.</li> <li>4. Interaction between tumor suppressor adenomatous polyposis coli and topoisomerase IIalpha: implication for the G2/M transition.</li> </ol>

<Fig. 98> 2-DE를 이용한 단백질 수준에서 반지련추출물의 항암효능 분석

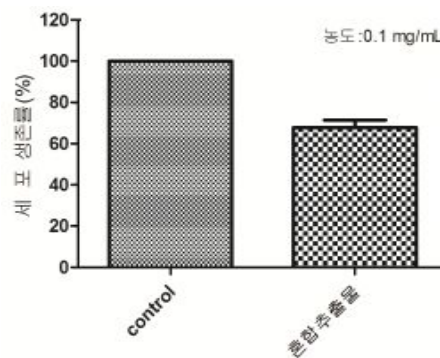
본 연구 결과를 통해 반지련추출물의 항암효능을 다양한 세포실험을 통해 규명함. 또한, 반지련추출물 세포 작용의 Proteomics 기반의 2차원 전기영동 분석을 통해 항산화 및 항암효능에 대한 멀티기능성을 규명함.



## 5. 혼합추출물의 기능성 평가

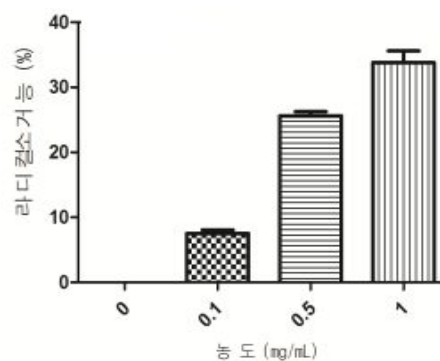
### 가. 감초, 목단피, 황련 혼합추출물의 기능성 평가

감초, 목단피, 황련 혼합추출물의 세포독성을 정상세포인 MEF(Mouse Embryonic Fibroblast)세포를 이용한 cell viability assay로 평가함 <Fig. 99>. 혼합추출물 처리 시 생존율이 약 70%로 미세한 독성을 띄는 것으로 보이지만 실제 식품에 적용할 시 10배 이상의 희석배율을 고려하면 그 정도가 미약할 것으로 사료됨.



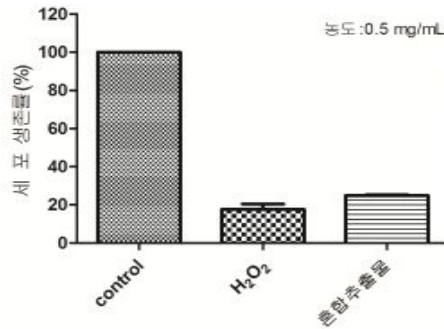
<Fig. 99> MEF 세포 생존율을 통한 혼합추출물의 세포독성 평가

감초, 목단피, 황련 혼합추출물의 항산화 효능을 DPPH assay를 통한 라디칼 소거능력으로 평가함. 낮은 농도에서도 라디칼 소거능력을 가지며 혼합추출물의 농도가 증가할수록 라디칼 소거능력이 농도 의존적으로 증가하는 것으로 보아 혼합추출물의 항산화능을 규명함 <Fig. 100>.



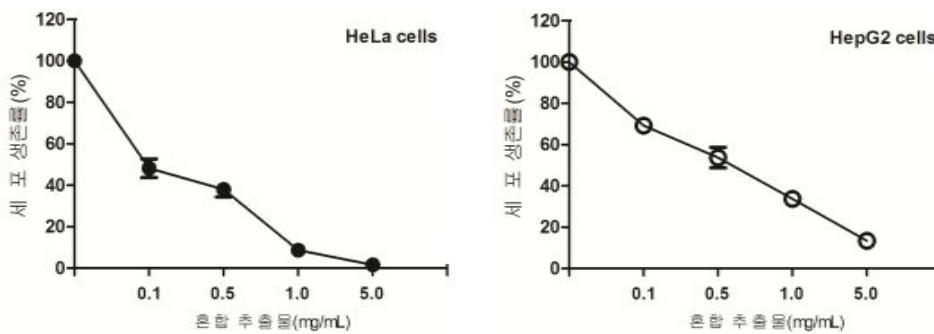
<Fig. 100> 혼합추출물의 라디칼 소거능 평가

감초, 목단피, 황련 혼합추출물의 항산화 효능을 확인하기 위하여 세포실험을 수행함. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 세포에 직접적인 산화적 손상을 유발한 후, 혼합추출물의 산화적 손상 회복 능력을 MTT assay를 이용한 세포 생존율 비교로 직접 평가함. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 단독처리군의 세포 생존율이 약 17%인데 비해 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 전처리 후, 혼합추출물 처리군의 세포 생존율은 약 27%로, 약 10%정도 세포 생존율이 증가함을 보임. 이를 통해 세포 수준에서의 혼합추출물의 항산화 작용을 규명함 <Fig. 101>.



<Fig. 101> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 유도하는 산화적 손상에 대한 혼합추출물의 세포보호 효능 평가

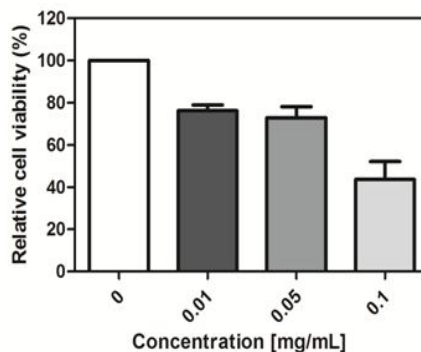
감초, 목단피, 황련 혼합추출물의 항암효능을 2종류의 인간 암세포주(HeLa: 자궁경부암, HepG2: 간암)에 처리하여 MTT assay로 평가함. 2종류의 암세포주 모두에 대해서 농도 의존적으로 생존율이 감소함. 0.5 mg/mL의 농도로 자궁경부암세포에서는 약 40% 정도, 간암세포에서는 약 50% 정도 생존율을 감소시킴 <Fig. 102>. 이를 통해 혼합추출물의 항암효능을 세포 수준에서 규명함.



<Fig. 102> 혼합추출물 처리에 따른 인간 암세포주(HeLa, HepG2)의 생존율 변화 분석

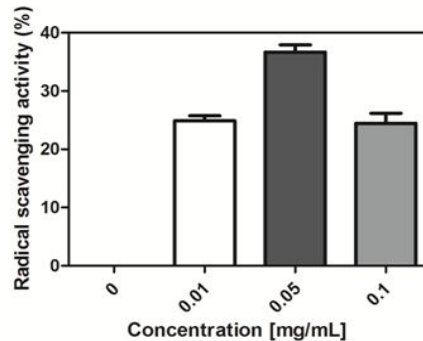
나. 오배자, 백작약, 육계 혼합추출물의 기능성 평가

오배자, 백작약, 육계 혼합추출물의 세포독성을 정상세포인 MEF(Mouse Embryonic Fibroblast)세포를 이용한 cell viability assay로 평가함 <Fig. 103>. 혼합추출물 처리 시 생존율이 농도 의존적으로 미세한 독성을 나타내지만 그 효과가 미약함.



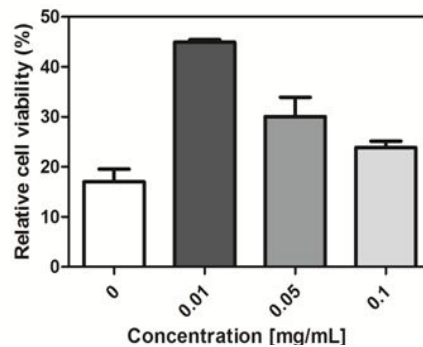
<Fig. 103> MEF 세포 생존율을 통한 혼합추출물의 세포독성 평가

오배자, 백작약, 육계 혼합추출물의 항산화 효능을 DPPH assay를 통한 라디칼 소거능력으로 평가함. 대체적으로 낮은 농도에서 라디칼 소거능력이 탁월함을 알 수 있고, 이를 통해 혼합추출물의 항산화능을 규명함 <Fig. 104>.



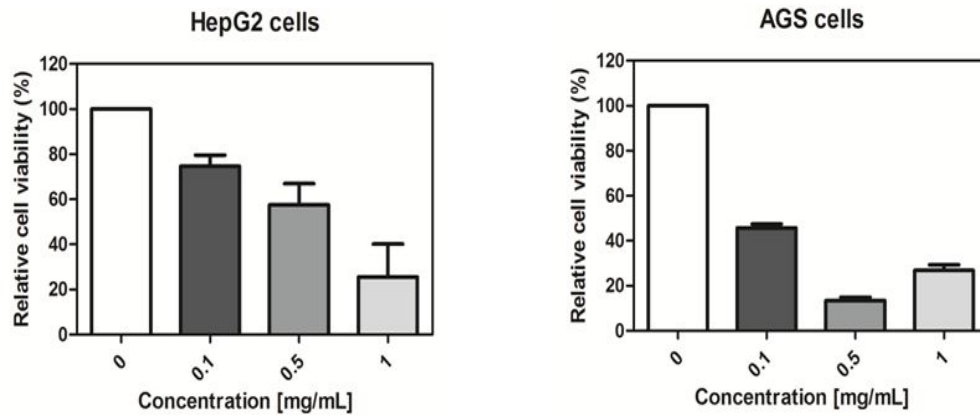
<Fig. 104> 혼합추출물의 라디칼 소거능 평가

오배자, 백작약, 육계 혼합추출물의 항산화 효능을 확인하기 위하여 세포실험을 수행함. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 세포에 직접적인 산화적 손상을 유발한 후, 혼합추출물의 산화적 손상 회복 능력을 MTT assay를 이용한 세포 생존율 비교로 직접 평가함. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 단독처리군의 세포 생존율이 약 17%인데 비해 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 전처리 후, 혼합추출물 처리군의 세포 생존율은 최대 45%로 약 28%정도 세포 생존율이 증가함을 보임. 이를 통해 세포 수준에서의 혼합추출물의 항산화 작용을 규명함 <Fig. 105>.



<Fig. 105> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 유도하는 산화적 손상에 대한 혼합추출물의 세포보호 효능 평가

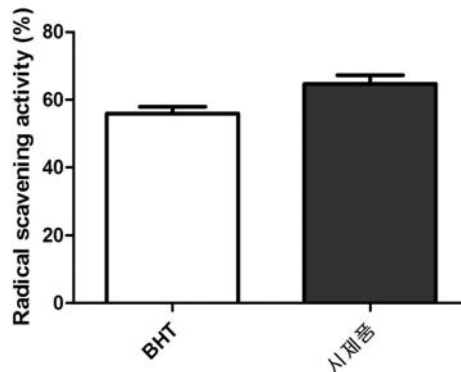
오배자, 백작약, 육계 혼합추출물의 항암효능을 2종류의 인간 암세포주(HepG2: 간암, AGS: 위암)에 처리하여 MTT assay로 평가함. 2종류의 암세포주 모두에 대해서 농도 의존적으로 생존율이 감소함. 특히 간암세포에서는 1.0 mg/mL의 농도로, 위암세포에서는 0.5 mg/mL의 농도로 70% 이상 암세포의 생존율을 감소시킴 <Fig. 106>. 이를 통해 혼합추출물의 항암효능을 세포 수준에서 규명함.



<Fig. 106> 혼합추출물 처리에 따른 인간 암세포주(HepG2, AGS)의 생존율 변화 분석

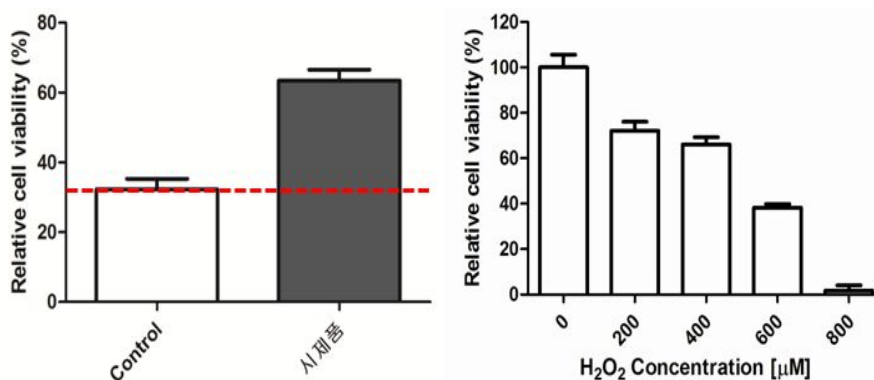
## 6. 최종 시제품의 기능성 평가

최종 개발된 천연보존제 시제품의 라디칼 소거능을 확인하기 위해 DPPH assay를 수행함 <Fig. 107>. 시제품과 200  $\mu$ M DPPH를 1 : 1로 암실에서 30분 동안 반응 시킨 뒤 분광광도계의 492nm에서 측정함. 대조군으로 대표적인 합성항산화제인 BHT(Butylated hydroxytoluene)를 사용하여 비교한 결과, BHT보다 약 10% 높은 라디칼 소거활성을 보이는 것으로 보아 시제품의 항산화능이 뛰어난 것을 규명함.



<Fig. 107> 시제품의 라디칼 소거능 평가

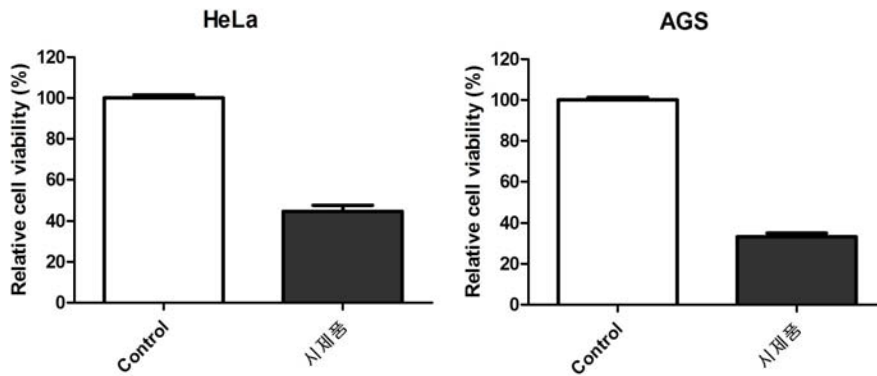
산화적 손상에 대한 시제품의 세포보호 효능을 MTT assay을 통해 평가함 <Fig. 108>. 정상세포에  $H_2O_2$ 로 산화적 스트레스를 유발하고 시제품을 처리함. MTT 처리 후 분광광도계의 570nm에서 세포 생존율을 측정함. 결과,  $H_2O_2$ 를 단독으로 처리한 실험군의 세포 생존율이 약 30%인데 비해,  $H_2O_2$  전처리 후 시제품을 처리한 실험군의 세포 생존율은 약 60%로, 약 30%정도 세포 생존율이 증가함을 보임. 이를 통해 시제품의 높은 산화적 손상 회복 능력 및 항산화 효능을 세포 수준에서 규명함.



<Fig. 108>  $H_2O_2$ 가 유도하는 산화적 손상에 대한 시제품의 세포보호 효능 평가

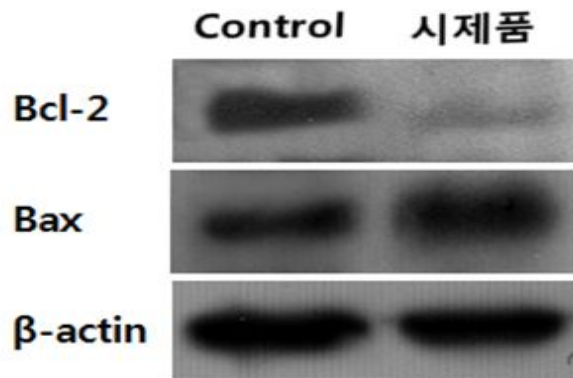
시제품의 항암효능을 확인하기 위해 2종류의 인간 암세포주(HeLa; 자궁경부암, AGS; 위암)에 시제품을 처리하여 MTT assay로 세포 생존율을 평가함 <Fig. 109>. 0.1 mg/mL 농도로 처리하였을 시, 자궁경부암세포에서는 세포 생존율이 약 45%로, 위암세포에서는 세포 생존율이 약 35%로 감소하는 것을 확인함. 이를 통해 두 암세포주 모두에 대한 탁월한 항암 효능을

세포 수준에서 규명함.



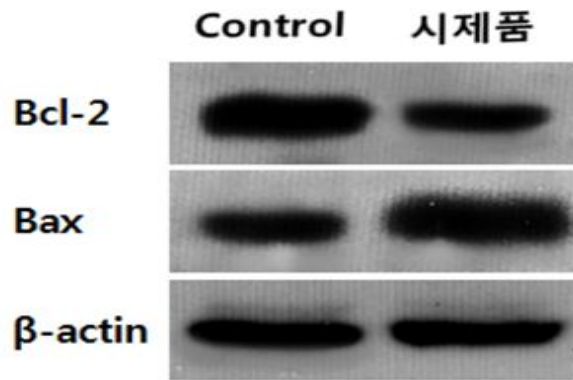
<Fig. 109> 시제품 처리에 따른 인간 암세포주(HeLa, AGS)의 생존율 변화 분석

2종류의 인간 암세포주(HeLa, AGS)에 대한 시제품의 항암 효과를 western blotting을 통해 단백질 수준에서 평가함. 시제품을 자궁경부암세포와 위암세포에 처리한 후, apoptosis 관련 마커인 Bax와 Bcl-2를 확인하고 대조군과 비교분석함. 자궁경부암세포에 시제품을 처리했을 시 대조군과 비교하여 apoptosis 마커인 Bax의 발현량은 증가하고, anti-apoptosis 마커인 Bcl-2의 발현량은 감소되는 것을 확인함 <Fig. 110>. 본 결과를 통해 시제품이 Bax와 Bcl-2 기전을 통해 apoptosis를 유도하여 자궁경부암세포의 생존율을 감소시킴을 규명함.



<Fig. 110> 시제품 처리에 따른 자궁경부암세포의 단백질 마커 분석 평가

위암세포에 시제품을 처리했을 시 대조군과 비교하여 Bax와 Bcl-2의 발현량을 확인한 결과, 자궁경부암세포와 같은 단백질 발현 패턴을 확인할 수 있음 <Fig. 111>. 이를 통해 자궁경부암세포와 유사한 apoptosis 유도기전을 통해 시제품이 위암세포의 생존율을 감소시킴을 규명함.



<Fig. 111> 시제품 처리에 따른 위암세포의 단백질 마커 분석 평가

본 연구를 통해 개발된 시제품의 항산화 능력, 세포안전성, 암세포 특이적인 세포사멸 효과  
 르 확인함. 또한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 유발하는 세포내 산화적 스트레스는 세포노화와 종양형성에 상호 관  
 련이 있으므로 시제품은 항산화, 항노화 및 항암 효능의 멀티기능성 고부가가치의 천연보조제  
 로서의 상품화를 가진 것으로 판단됨.

## 제 4 절 천연추출물 유효성분의 정성·정량분석

### 1. 선별된 천연추출물 유효성분의 정성·정량분석

선별된 천연추출물 유효성분의 정성·정량분석은 Agilent 1100 series HPLC로 분석을 실시함 <Fig. 112>. 문헌검색을 통하여 유효성분을 채택하고, 검증된 표준물질을 구매하여 검량곡선을 작성함.



<Fig. 112> Agilent HPLC

#### 가. 감초의 유효성분 정성·정량분석

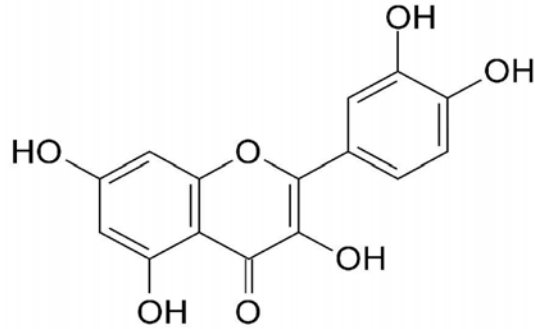
##### (1) 감초의 유효성분인 quercetin

###### ○ Quercetin의 기능성

항산화 물질인 케르세틴은 사과 등 과일과 야채에 많이 들어 있으며 산화적 스트레스로 인한 뇌 세포 손상을 막아 알츠하이머형 치매나 신경변성 뇌 질환을 예방할 수 있다는 것을 시사하는 연구 결과가 미국 코넬대학 연구진에 의해 보고됨. 이 연구 결과는 항산화 물질이 많이 들어 있는 식품을 섭취하면 알츠하이머형 치매나 그와 유사한 뇌질환 발병 위험을 줄일 수 있다는 설을 뒷받침한 최근 발표된 동물 실험 보고에 이어 나온 것으로 Journal of Agricultural and Food Chemistry에 발표됨.

2007년 영양학회지에 보고된 바에 따르면 고혈압이 있는 실험자에게 케르세틴 보충식품을 28일간 투여한 경우 혈압이 크게 감소된 것으로 보아 케르세틴이 혈관수축을 증가시키는 안지오텐신전환효소(angiotensin-converting-enzyme: ACE)를 억제하는 역할을 한다고 가정함. Quercetin의 구조는 아래와 같음 <Fig. 113>.





<Fig. 113> Quercetin 구조

### (2) Quercetin 분석방법 및 분석조건

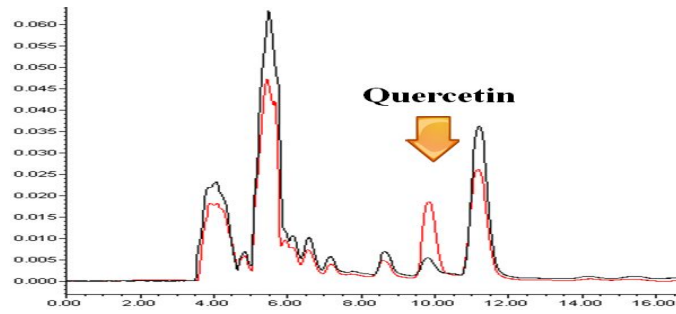
감초의 유효성분인 quercetin의 표준물질을 시그마에서 구입하여 분석에 사용함. Quercetin 표준물질을 전자저울을 사용하여 정확히 0.01g 정취한 후 HPLC용 Methanol 10 mL에 녹인 후, membrane filter에 여과한 후 분석에 사용함 <Table 48>. 표준 검량선 작성을 위해 1, 5, 10, 50, 100 µg/mL의 농도로 희석함.

<Table 48> Quercetin의 분석조건

Instrument	HP1100 series HPLC
Column	RP-C18 column (250mm X 4.6mm X 5µm, Agilent Technologies)
Detector	PDA detector 260nm
Mobile Phase	A : 0.05% phosphoric acid 0.3 mL/min B : Acetonitrile 0.2 mL/min, isocratic elution for 20min
Column flow	0.5 mL/min
Injection volume	10 µL

### (3) Quercetin 선정 근거

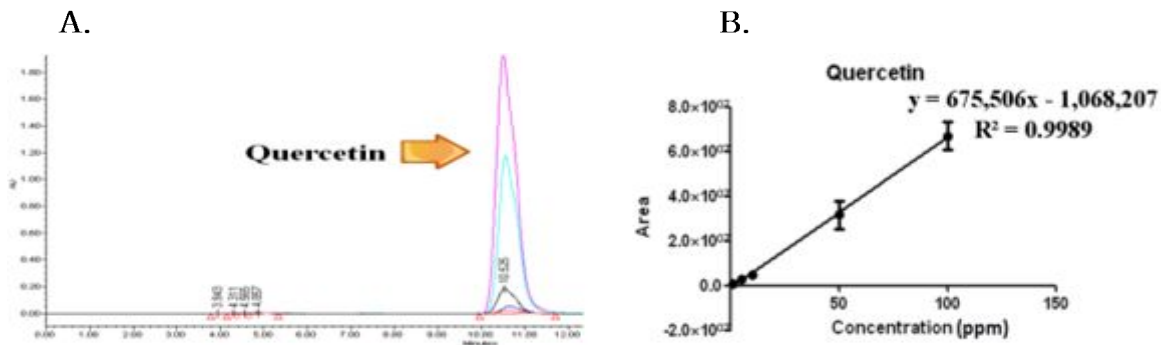
감초에 존재하는 유효성분들 중 지표물질을 선정하여 실제 채소 적용 시 잔존을 측정에 이용할 수 있는 표준물질을 선정하고 측정기법을 개발함. 감초 추출물의 대표성과 항균 활성을 동시에 갖는 성분을 지표물질로 선정하는 것이 필수적 요소임. 이를 위하여 참고문헌 및 논문을 통하여 감초의 지표성분 후보물질을 선별하였으며, HPLC를 이용하여 각 성분의 농도와 항균 활성 결과를 비교 분석하여 최종적으로 지표물질을 선정함. 감초에 존재하는 유효성분과 표준물질의 머무름시간을 비교하여 정성분석을 하였고, 이를 위하여 감초 추출물에 quercetin 표준용액을 주입함(검은색의 크로마토그램이 감초추출물이며, 붉은색 크로마토그램이 추출물에 표준물질을 주입한 것임). 그 결과 약 10분에 quercetin이 검출됨 <Fig. 114>.



<Fig. 114> 감초에 존재하는 유효성분과 표준물질의 머무름시간 비교

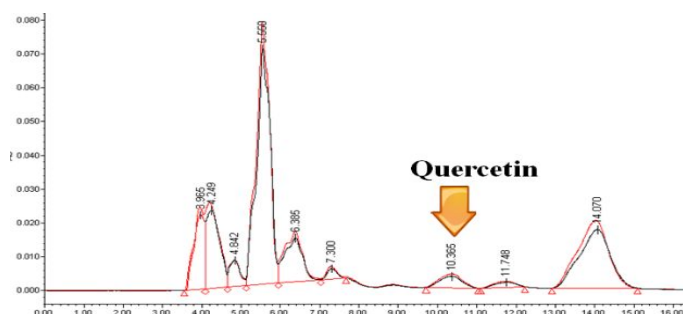
(4) Quercetin의 검량선 및 농도

HPLC의 분석조건에 의해 quercetin의 피크면적으로부터 구한 검량선을 <Fig. 115>에 나타냄. 검량선은 1-100 µg/mL의 범위에서 상관계수(R<sup>2</sup>)는 0.9988로 유효한 직선을 나타냄.



<Fig. 115> Quercetin의 크로마토그램(A) 및 검량선(B)

(5) 최적 조건으로 추출된 감초의 유효성분 정량



<Fig. 116> 최적 조건으로 추출된 감초의 크로마토그램

단위 : ppm = Quercetin's µg/extract mL

시료	농도	I·E*
<i>S. aureus</i> 최적화	1.34 ± 0.04	61.6
<i>B. cereus</i> 최적화	1.39 ± 0.03	56.8

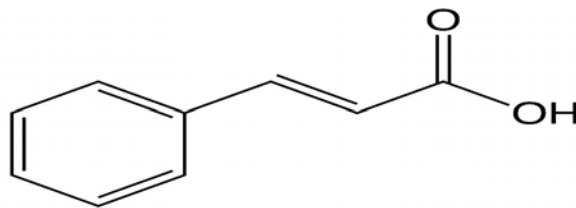
I·E\*: Inhibitory effect

나. 육계의 유효성분 정성·정량분석

(1) 육계의 유효성분인 cinnamic acid

○ Cinnamic acid

Cinnamic acid는 계피산·육계산·β-페닐아크릴산이라고도 하며, 화학식은 C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>임. 건위, 지혈, 거풍, 발한, 해열 진통 등의 한방치료제로 널리 이용되어 왔으며, 이러한 여러 가지 작용의 원인 물질들은 육계의 주성분인 cinnamic aldehyde와 cinnamic acid로 알려져 있음. 보건복지부에서 시행한 한약재 품질표준화 연구사업의 결과, 육계의 지표물질로서 cinnamic acid를 추천함으로써 육계의 지표물질이 cinnamic acid로 결정된 바 있음. 약한 방향을 가진 무색의 바늘 모양 결정으로, 분자량 148.16 g, 녹는점 135 ℃, 끓는점 300 ℃, 비중 1.25로 일반적으로 에탄올·에테르에 녹는 성질을 가짐. 육계유(카시아유)·페루발삼·소합향유 등에 유리상태로 또는 에스터의 형태로 존재함. 페닐기와 카복실기가 이중결합에 대하여 반대쪽에 있는 트랜스형과 같은 쪽에 있는 시스형의 두 이성질체를 생각할 수 있으나 천연으로는 안정한 트랜스형이 존재함. 벤즈알데하이드와 아세트산무수물을 아세트산칼륨의 존재하에 축합시키면 얻을 수 있고, cinnamic acid의 대표적인 기능은 강한 향균활성으로 구조는 아래와 같음 <Fig. 117>.



<Fig. 117> Cinnamic acid의 구조

(2) Cinnamic acid 분석방법 및 분석조건

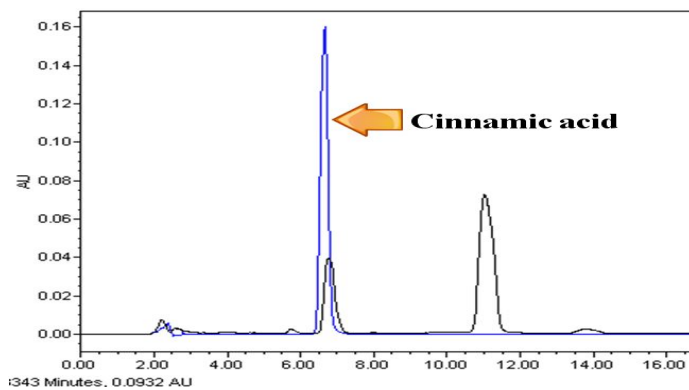
육계의 유효성분인 cinnamic acid와 cinnamic aldehyde의 표준물질을 시그마에서 구입하여 분석에 사용함. Cinnamic acid와 cinnamic aldehyde 표준물질을 전자저울을 사용하여 정확히 0.01 g 정취한 후 HPLC용 Methanol 10 mL에 녹인 후, membrane filter에 여과한 후 분석에 사용함 <Table 49>. 표준 검량선 작성을 위해 1, 5, 10, 50, 100 µg/mL의 농도로 희석함.

<Table 49> Cinnamic acid의 분석조건

Instrument	HP1100 series HPLC
Column	RP-C18 column (250mm X 4.6mm X 5µm, Agilent Technologies)
Detector	PDA detector 260nm
Mobile Phase	A : 0.05% phosphoric acid 0.3 mL/min B : Acetonitrile 0.2 mL/min, isocratic elution for 20min
Column flow	0.5 mL/min
Injection volume	10 µL

### (3) Cinnamic acid 선정 근거

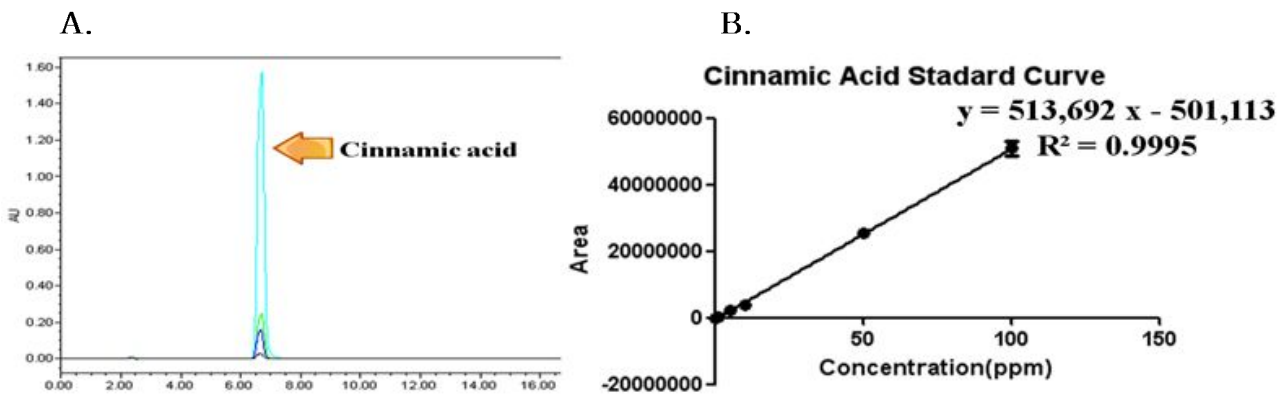
육계에 존재하는 유효성분들 중 지표물질을 선정 하여 실제 채소 적용 시, 잔존율 측정에 이용할 수 있는 표준물질을 선정하고 측정기법을 개발함. 육계 추출물의 대표성과 항미생물 활성을 동시에 갖는 성분을 지표물질로 선정하는 것이 필수적인 요소임. 이를 위하여 참고문헌 및 논문을 통하여 육계의 지표성분 후보 물질을 선별하였으며, HPLC를 이용하여 각 성분의 농도와 항균 활성 결과를 비교 분석하여 최종적으로 지표물질을 선정함. 또한 보건복지부에서 시행한 한약재 품질표준화 연구사업의 결과에서는 육계의 지표물질로서 cinnamic acid를 추천함으로써 육계의 지표물질이 cinnamic acid로 결정된 바가 있음. 육계에 존재하는 유효성분과 표준물질의 머무름시간을 비교하여 정성분석을 하였고, 이를 위하여 육계 추출물에 cinnamic acid 표준용액을 주입함(검은색의 크로마토그램이 육계추출물이며, 푸른색 크로마토그램이 추출물에 표준물질을 주입한 것임). 그 결과 약 7분에 cinnamic acid가 검출됨 <Fig. 118>.



<Fig. 118> 육계에 존재하는 유효성분과 표준물질의 머무름시간 비교

### (4) Cinnamic acid의 표준곡선 및 농도

HPLC의 분석조건에 의해 cinnamic acid의 피크면적으로부터 구한 검량선을 <Fig. 119>에 나타냄. 검량선은 1-100 µg/mL의 범위에서 상관계수(R<sup>2</sup>)는 0.9995로 유효한 직선을 나타냄.



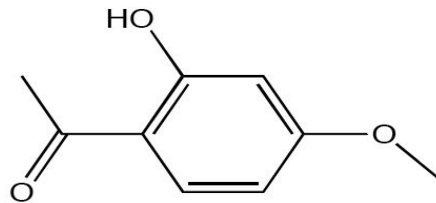
<Fig. 119> Cinnamic acid의 크로마토그램(A) 및 검량선(B)

다. 목단피의 유효성분 정성·정량분석

(1) 목단피의 유효성분인 paeonol

○ Paeonol

목단피는 한방에서는 해열, 진통, 소염, 진경, 통경 등의 한방치료제로 널리 이용되어 왔으며, 이러한 여러 가지 작용의 원인 물질들은 목단피의 주성분인 paeonol로 알려져 있음. 또한, 목단피의 화학성분에 관한 연구로는 paeonol과 그의 배당체인 paeonoside, paeonolide, apiopaeonoside, suffruticoside E 등이 알려져 있고 monoterpene 배당체로서 paeoniflorin, oxypaeoniflorin, benzoyl-paeoniflorin, benzoyl-oxypaeoniflorin 뿐만 아니라 항산화작용이 있는 monoterpene 배당체로서 galloyl-oxypaeoniflorin과 suffruticoside A, B, C, D가 보고됨. 아울러 목단의 미숙과실의 성분에 대하여 sterol, methyl gallate, benzoyl-paeoniflorin, benzoyl-oxypaeoniflorin, paeoniflorin이 알려져 있음. 목단피의 활성에 대한 연구로는 항염증작용과, 주성분인 paeonol의 충수염감염균에 대한 항균작용 및 paeonol의 항돌연변이원성에 관한 연구가 보고됨. Paeonol의 구조는 아래와 같음 <Fig. 120>.



<Fig. 120> Paeonol의 구조

(2) Paeonol 분석방법 및 분석조건

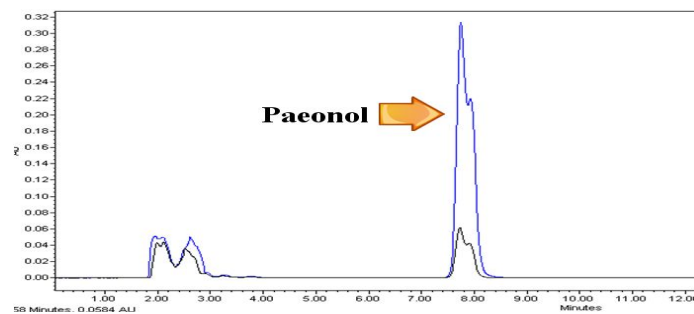
목단피의 유효성분인 paeonol의 표준물질을 시그마에서 구입하여 분석에 사용함. Paeonol 표준물질을 전자저울을 사용하여 정확히 0.01 g 정취한 후 HPLC용 Methanol 10 mL에 녹인 후, membrane filter에 여과한 후 분석에 사용함 <Table 50>. 표준 검량선 작성을 위해 1, 5, 10, 50, 100 µg/mL의 농도로 희석함.

<Table 50> Paeonol의 분석조건

Instrument	HP1100 series HPLC
Column	RP-C18 column (250mm X 4.6mm X 5µm, Agilent Technologies)
Detector	PDA detector 274nm
Mobile Phase	A : 2% glacial acetic acid 0.5 mL/min B : Acetonitrile 0.5 mL/min, isocratic elution for 20min
Column flow	1.0 mL/min
Injection volume	10 µL
Temperature	25 °C

### (3) Paeonol 선정 근거

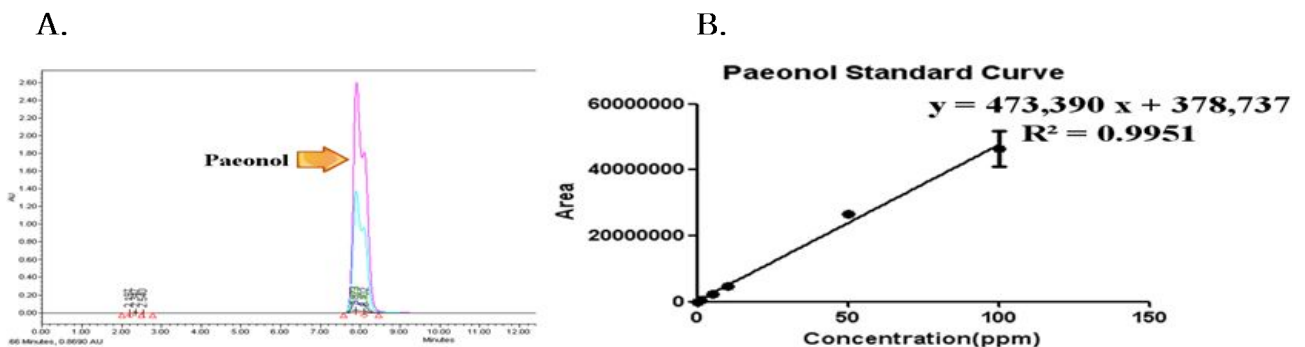
목단피에 존재하는 유효성분들 중 지표물질을 선정하여 실제 채소 적용 시, 잔존을 측정에 이용할 수 있는 표준물질을 선정하고 측정기법을 개발함. 목단피 추출물의 대표성과 항미생물 활성을 동시에 갖는 성분을 지표물질로 선정하는 것이 필수적 요소이므로 이를 위하여 참고문헌 및 논문을 통하여 목단피의 지표성분 후보 물질을 선별하였으며, HPLC를 이용하여 각 성분의 농도와 항균활성 결과를 비교 분석하여 최종적으로 지표물질을 선정함. 목단피에 존재하는 유효성분과 표준물질의 머무름시간을 비교하여 정성분석을 하였고, 이를 위하여 육계 추출물에 paeonol 표준용액을 주입함(검은색의 크로마토그램이 목단피 추출물이며, 붉은색 크로마토그램이 추출물에 표준물질을 주입한 것임). 그 결과 약 10분에 paeonol이 검출됨을 알 수 있음 <Fig. 121>.



<Fig. 121> 목단피에 존재하는 유효성분과 표준물질의 머무름시간 비교

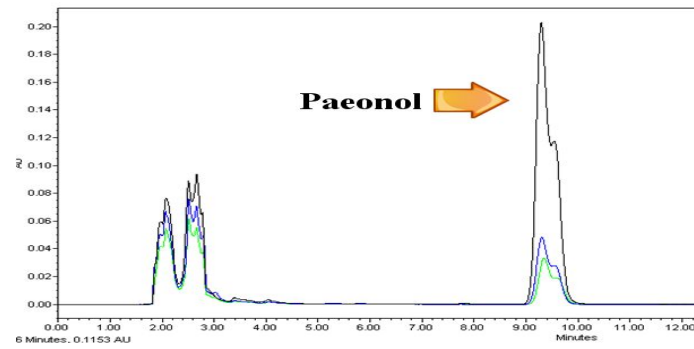
### (4) Paeonol의 표준곡선 및 농도

HPLC의 분석조건에 의해 paeonol의 피크면적으로부터 구한 검량선을 <Fig. 122>에 나타냄. 검량선은 1-100 µg/mL의 범위에서 상관계수(R<sup>2</sup>)는 0.9951로 유효한 직선을 나타냄.



<Fig. 122> Paeonol의 크로마토그램(A) 및 검량선(B)

(5) 최적 조건으로 추출된 목단피의 유효성분 정량



<Fig. 123> 최적 조건으로 추출된 목단피의 크로마토그램

단위 : ppm = Paeonol's  $\mu\text{g}/\text{extract mL}$

시료	농도	I·E*
<i>S. aureus</i> 최적화	0.78 ± 0.10	47.3
<i>B. cereus</i> 최적화	1.43 ± 0.05	43.6
<i>E. coli</i> 최적화	7.9 ± 0.96	41.0

I · E\*: Inhibitory effect

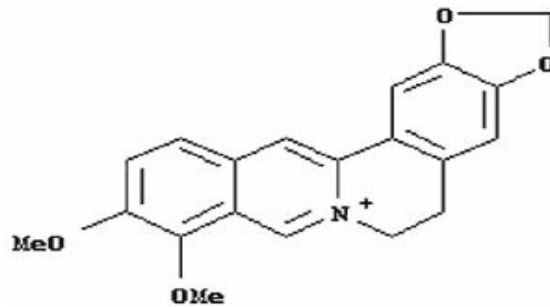
## 라. 황련의 유효성분 정성·정량분석

### (1) 황련의 유효성분인 berberine

#### ○ Berberine

황련뿌리, 황벽나무수피, 매발톱나무의 일종의 뿌리 등에서 얻는 아이소퀴놀린알칼로이드의 한 종류이며 화학식은  $C_{20}H_{19}NO_5 \cdot 5H_2O$ 로 노란색 바늘 모양 결정이며 녹는점 145 °C임. 뜨거운 물이나 에탄올에서 녹고, 클로로폼·벤젠에는 잘 녹지 않고, 에테르에는 녹지 않음. 베르베린은 4급 염기형과 의염기형의 평형으로 존재하며 아세톤 첨가제 8-아세트닐다이하이드로베르베린 형성 등 여러 반응이 이 토토펴리현상으로 설명됨.

양모·명주·피혁 등의 염료로서 사용되었고, 쓴맛이 나므로 황련과 황벽나무는 고미건위약 및 강장제로 쓰임. berberine은 살균작용이 있을 뿐 아니라 내복에 의해서는 미각 반사의 항진에 의해 위액의 분비를 촉진시키고 식욕의 항진도 가져오게 함. 이러한 작용의 주도물질은 berberine이지만 이것은 alkaloid이기는 하지만 일반 알칼로이드가 지니는 전신작용을 지니지 않기 때문에 다량 투여해도 하등의 부작용이 없다는 것이 정장제 뿐만 아니라 우수한 건위제로 쓸 수 있다는 타당성을 제공하는 것으로 잘 알려져 있음. 또한 berberine은 수용성이어서 이 수용액은 유행성 안질이 유행할 때 세안 소독약으로서의 효과도 탁월함. 이것은 berberine이 여러 가지 세균의 내성 획득 영역 밖에 있었기 때문임. 또한 여러 종류의 고무 정장제의 제조 원료가 되고 있으며, 기타 혈압강하, 중추신경억제, 항염증 효과도 보고되어 있음. 동양의약에서는 황련 해독탕, 시호청간산, 형개연교탕 등에 주약 또는 좌약용으로 쓰이고 있는 실정임. Berberine의 구조는 아래와 같음 <Fig. 124>.



<Fig. 124> Berberine의 구조

### (2) Berberine 분석방법 및 분석조건

황련의 유효성분인 berberine의 표준물질을 시그마에서 구입하여 분석에 사용함. Berberine 표준물질을 전자저울을 사용하여 정확히 0.01 g 정취한 후 HPLC용 Methanol 10 mL에 녹인 후, membrane filter에 여과한 후 분석에 사용함 <Table 51>. 표준 검량선 작성을 위해 1, 5, 10, 50, 100 µg/mL의 농도로 희석하여 사용함.



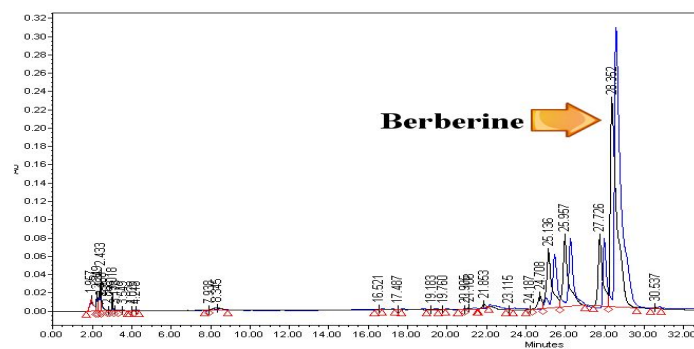
<Table 51> Berberine의 분석조건

Instrument	HP1100 series HPLC
Column	RP-C18 column (250mm X 4.6mm X 5µm, Agilent Technologies)
Detector	PDA detector 254nm
Mobile Phase	A : 10mM hexanesulfonic acid B : Acetonitrile gradient elution for 40min A:B = 85:15 → 65:35(20min) 65:35 → 20: 80(40min)
Column flow	1.0 mL/min
Injection volume	10 µL
Temperature	30 °C

### (3) Berberine 선정 근거

황련에 존재하는 유효성분들 중 지표물질을 선정하여 실제 채소 적용 시, 잔존을 측정에 이용할 수 있는 표준물질을 선정하고 측정기법을 개발함. 황련 추출물의 대표성과 항미생물 활성을 동시에 갖는 성분을 지표물질로 선정하는 것이 필수적인 요건이므로, 이를 위하여 참고문헌 및 논문을 통하여 황련의 지표성분 후보 물질을 선별하였으며, HPLC를 이용하여 각 성분의 농도와 항균활성 결과를 비교 분석하여 최종적으로 지표물질을 선정함.

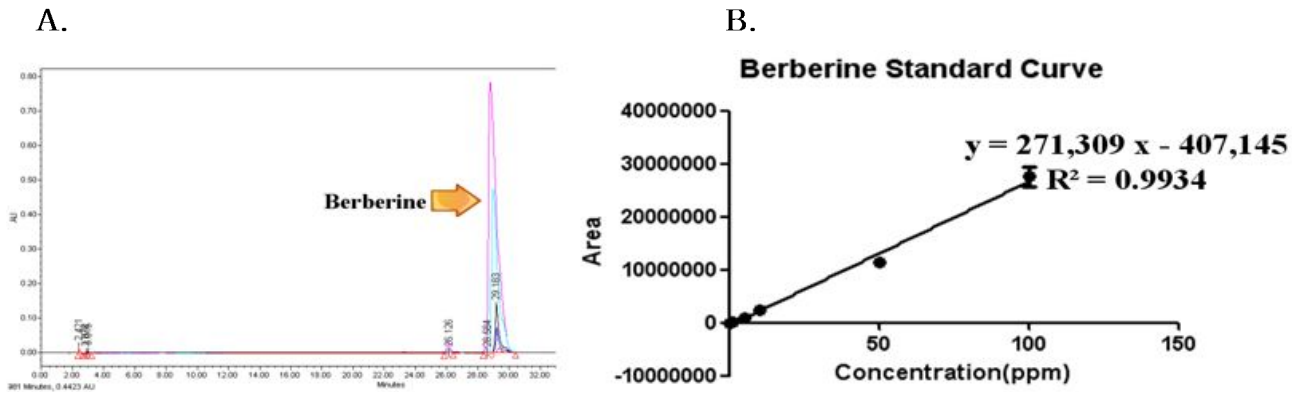
황련에 존재하는 유효성분과 표준물질의 머무름시간을 비교하여 정성분석을 하였고, 이를 위하여 황련 추출물에 Berberine 표준용액을 주입함(검은색의 크로마토그램이 황련 추출물이며, 붉은색 크로마토그램이 추출물에 표준물질을 주입한 것임). 그 결과 약 10분에 berberine가 검출됨을 알 수 있음 <Fig. 125>.



<Fig. 125> 황련에 존재하는 유효성분과 표준물질의 머무름시간 비교

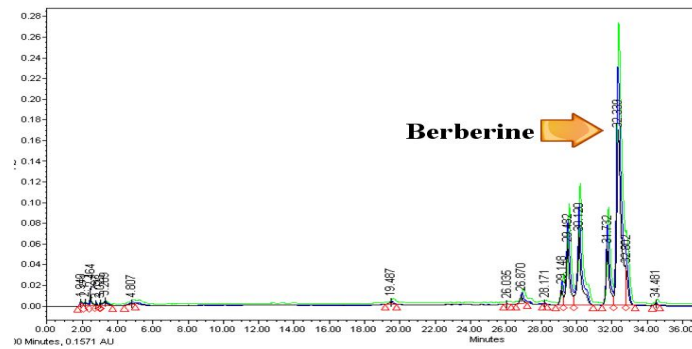
### (4) Berberine의 표준곡선 및 농도

HPLC의 분석조건에 의해 berberine의 피크면적으로부터 구한 검량선을 <Fig. 126>에 나타냄. 검량선은 1-100 µg/mL의 범위에서 상관계수(R2)는 0.9934로 유효한 직선을 나타냄.



<Fig. 126> Berberine의 크로마토그램(A) 및 검량선(B)

(5) 최적 조건으로 추출된 황련의 유효성분 정량



<Fig. 127> 최적 조건으로 추출된 황련의 크로마토그램

단위 : ppm = Berberine's  $\mu\text{g}/\text{extract mL}$

시료	농도	I.E*
<i>S. aureus</i> 최적화	16.5 ± 3.6	85.8
<i>B. cereus</i> 최적화	18.1 ± 1.7	91.6
<i>E. coli</i> 최적화	21.9 ± 0.9	84.0

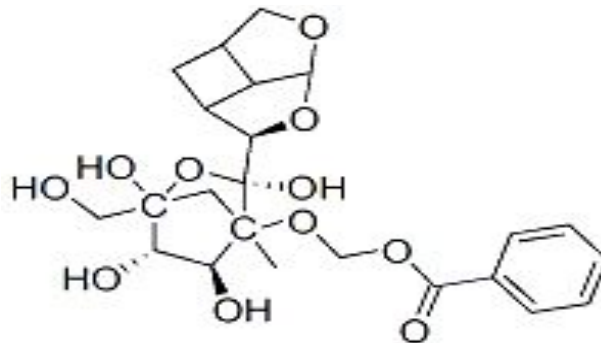
I · E\*: Inhibitory effect

마. 백작약의 유효성분 정성·정량분석

(1) 백작약의 유효성분인 Paeoniflorin

○ Paeoniflorin의 기능성

백작약은 미나리아재비과 작약의 뿌리를 말린 것 또는 찢 것을 말린 것으로 겉껍질을 제거한 것을 백작약이라고 함. 한방에서 진통, 진경, 부인약, 고혈압, 복통 및 염증 치료제로 널리 사용되고 있음. 주요 생리활성물질로서 paeoniflorin 및 albinoflorin과 같은 여러 모노테르펜 글루코사이드(monoterpen glucoside)와 탄닌 및 페놀산 등이 잘 알려져 있음. 백작약에 관한 연구로는 간독성보호효과, 항균작용, 항혈전작용, 항고지혈 작용, 항산화 작용 등이 보고됨. Paeoniflorin의 구조는 아래와 같음 <Fig. 128>.



<Fig. 128> Paeoniflorin의 구조

(2) Paeoniflorin 분석방법 및 분석조건

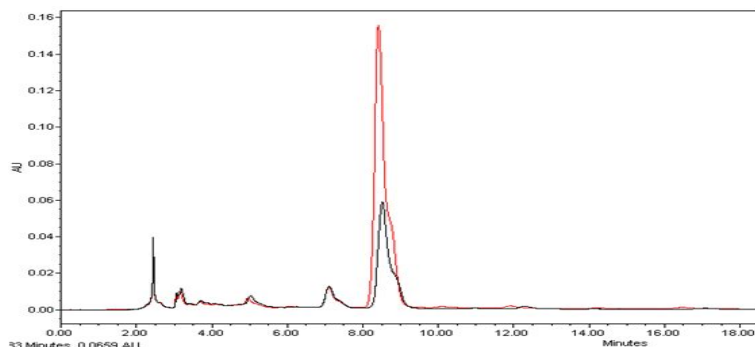
백작약의 유효성분인 paeoniflorin의 표준물질을 Baoji Herbest Bio-Tech Co.,Ltd에서 구입하여 분석에 사용함. Paeoniflorin 표준물질을 전자저울을 사용하여 정확히 0.01g 정취한 후 HPLC용 Methanol 10 mL에 녹인 후, membrane filter에 여과한 후 분석에 사용함 <Table 52>. 표준 검량선 작성을 위해 1, 5, 10, 50, 100 µg/mL의 농도로 희석함.

<Table 52> Paeoniflorin의 분석조건

Instrument	HP1100 series HPLC
Column	RP-C18 column (250mm X 4.6mm X 5µm, Agilent Technologies)
Detector	PDA detector 260nm
Mobile Phase	A : 0.01% phosphoric acid 0.83 mL/min B : Acetonitrile 0.17 mL/min, isocratic elution for 30min
Column flow	1 mL/min
Injection volume	10 µL

### (3) Paeoniflorin 선정 근거

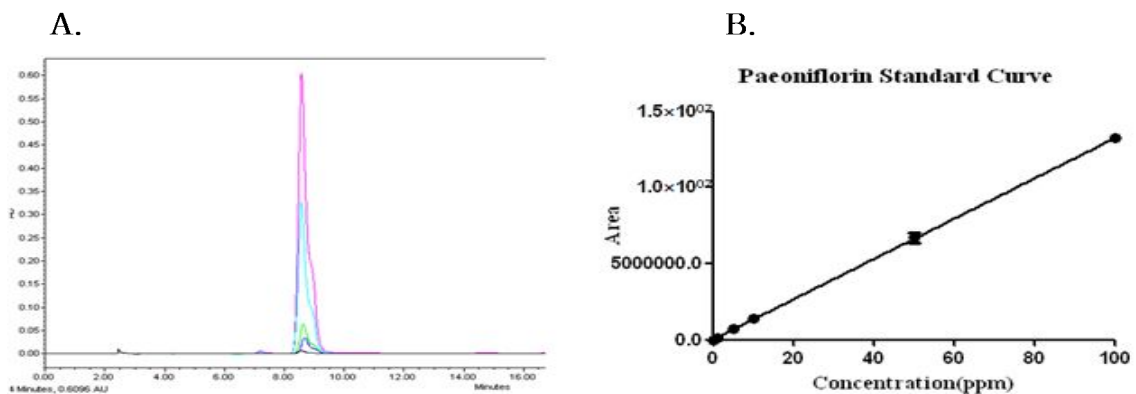
백작약에 존재하는 유효성분들 중 지표물질을 선정하여 실제 채소 적용 시 잔존을 측정에 이용할 수 있는 표준물질을 선정하고 측정기법을 개발함. 백작약 추출물의 대표성과 항균 활성을 동시에 갖는 성분을 지표물질로 선정하는 것이 필수적 요소임. 이를 위하여 참고문헌 및 논문을 통하여 감초의 지표성분 후보 물질을 선별하였으며, HPLC를 이용하여 각 성분의 농도와 항균 활성 결과를 비교 분석하여 최종적으로 지표물질을 선정함. 백작약에 존재하는 유효성분과 표준물질의 머무름시간을 비교하여 정성분석을 하였고, 이를 위하여 백작약 추출물에 paeoniflorin 표준용액을 주입함(검은색의 크로마토그램이 감초추출물이며, 붉은색 크로마토그램이 추출물에 표준물질을 주입한 것임). 그 결과 약 8분에 paeoniflorin이 검출됨 <Fig. 129>.



<Fig. 129> 백작약에 존재하는 유효성분과 표준물질의 머무름시간 비교

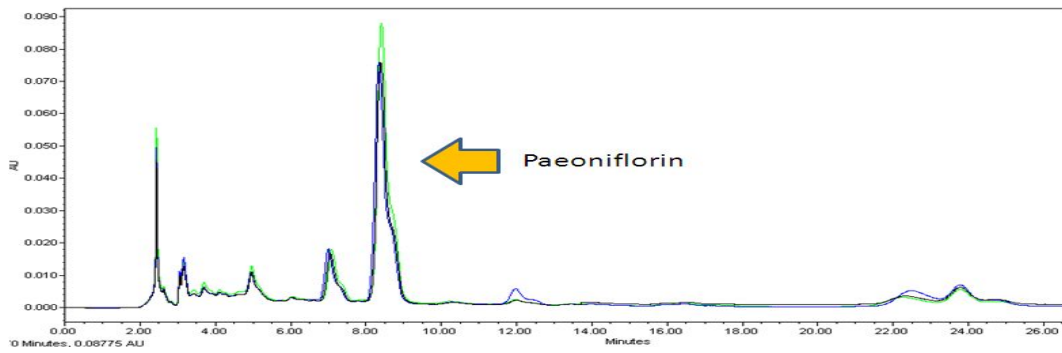
### (4) Paeoniflorin의 검량선 및 농도

HPLC의 분석조건에 의해 paeoniflorin의 피크면적으로부터 구한 검량선을 <Fig. 130>에 나타냄. 검량선은 1-100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 범위에서 상관계수(R2)는 1.0000로 유효한 직선을 나타냄.



<Fig. 130> Paeoniflorin의 크로마토그램(A) 및 검량선(B)

(5) 최적 조건으로 추출된 백작약의 유효성분 정량



<Fig. 131> 최적 조건으로 추출된 백작약의 크로마토그램

단위 : ppm = Paeoniflorin's  $\mu\text{g}/\text{extract mL}$

시료	농도	I·E*
<i>S. aureus</i> 최적화	13.0 ± 0.5	52.5%
<i>B. cereus</i> 최적화	12.2 ± 0.2	53.8%
<i>E. coli</i> 최적화	13.9 ± 2.2	-

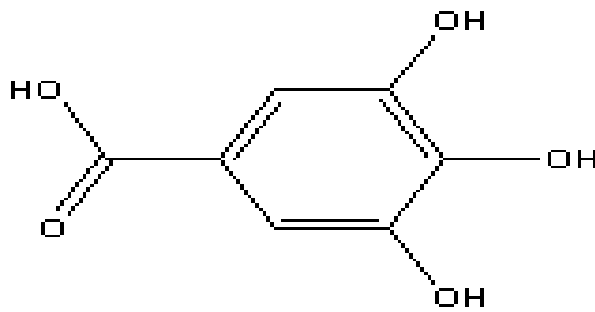
I · E\*: Inhibitory effect

바. 오배자의 유효성분 정성·정량분석

(1) 오배자의 유효성분인 Gallic acid

○ Gallic acid의 기능성

Gallic acid는 식물과 과일, 식품에 많이 존재하는 polyhydroxylphenolic 물질 중의 하나로, 오배자, 옷나무, 오크 나무 껍질, 녹차, 포도, 파인애플, 바나나, 사과 껍질등에 많이 존재함. 보고된 Gallic acid에는 항균 활성, 항 바이러스, 항염증 효과가 있는 것으로 밝혀졌고, 최근에는 백혈병, 전립선암, 폐암, 대장암, 유방암 등에 항암활성을 가진다고 보고됨. 게다가 gallic acid는 scavenge ROS(reactive oxygen species)에 강한 천연 항산화물질로 알려져, 항암 화학 예방에 있어서 유용한 식물 유래 화학물로 알려짐. Gallic acid의 구조는 아래와 같음 <Fig. 132>.



<Fig. 132> Gallic acid의 구조

(2) Gallic acid 분석방법 및 분석조건

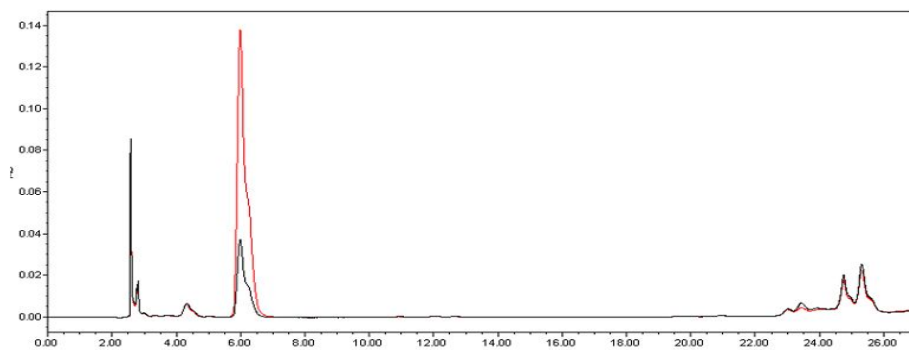
오배자의 유효성분인 gallic acid의 표준물질을 시그마에서 구입하여 분석에 사용함. Gallic acid 표준물질을 전자저울을 사용하여 정확히 0.01g 정취한 후 HPLC용 Methanol 10 mL에 녹인 후, membrane filter에 여과한 후 분석에 사용함 <Table 53>. 표준 검량선 작성을 위해 1, 5, 10, 50, 100 µg/mL의 농도로 희석함.

<Table 53> Gallic acid의 분석조건

Instrument	HP1100 series HPLC
Column	RP-C18 column (250mm X 4.6mm X 5µm, Agilent Technologies)
Detector	PDA detector 260nm
Mobile Phase	A : 0.01% phosphoric acid B : Acetonitrile gradient elution for 35min A:B = 0min, 95:5 → 7min, 95:5 → 12min, 83:17 → 25min, 83:17 → 27min, 80:20
Column flow	1 mL/min
Injection volume	10 µL

### (3) Gallic acid 선정 근거

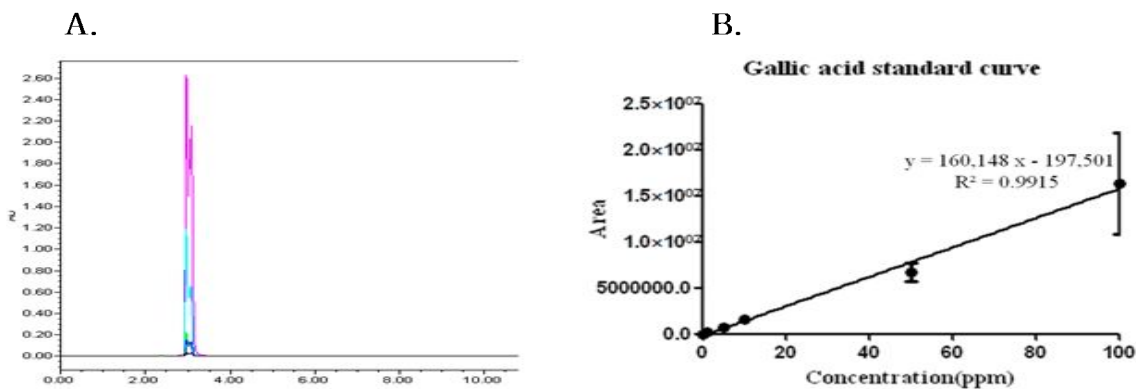
오배자에 존재하는 유효성분들 중 지표물질을 선정하여 실제 채소 적용 시 잔존을 측정에 이용할 수 있는 표준물질을 선정하고 측정기법을 개발함. 오배자 추출물의 대표성과 항균 활성을 동시에 갖는 성분을 지표물질로 선정하는 것이 필수적 요소임. 이를 위하여 참고문헌 및 논문을 통하여 감초의 지표성분 후보 물질을 선별하였으며, HPLC를 이용하여 각 성분의 농도와 항균 활성 결과를 비교 분석하여 최종적으로 지표물질을 선정함. 오배자에 존재하는 유효성분과 표준물질의 머무름시간을 비교하여 정성분석 하였고, 이를 위하여 오배자 추출물에 gallic acid 표준용액을 주입함(검은색의 크로마토그램이 감초추출물이며, 붉은색 크로마토그램이 추출물에 표준물질을 주입한 것임). 그 결과 약 6분에 gallic acid가 검출됨 <Fig. 133>.



<Fig. 133> 오배자에 존재하는 유효성분과 표준물질의 머무름시간 비교

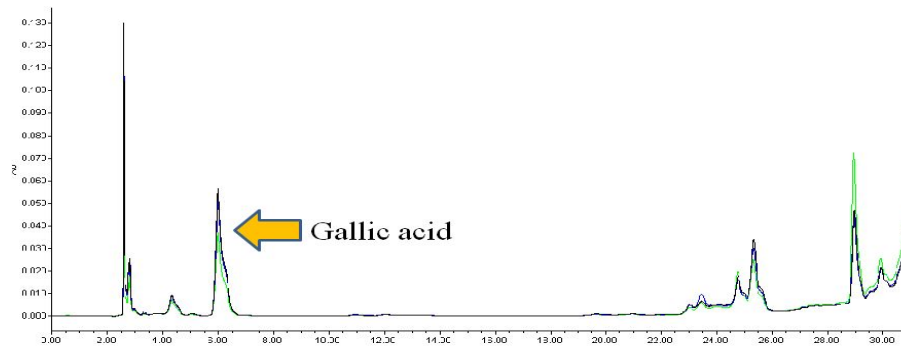
### (4) Gallic acid의 검량선 및 농도

HPLC의 분석조건에 의해 gallic acid의 피크면적으로부터 구한 검량선을 <Fig. 134>에 나타냄. 검량선은 1-100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 범위에서 상관계수( $R^2$ )는 0.9915로 유효한 직선을 나타냄.



<Fig. 134> Gallic acid의 크로마토그램 및 검량선

(5) 최적 조건으로 추출된 오배자의 유효성분 정량



<Fig. 135> 최적 조건으로 추출된 오배자의 크로마토그램

단위 : ppm = Gallic acid's  $\mu\text{g}/\text{extract mL}$

시료	농도	I·E*
<i>S. aureus</i> 최적화	8.2 ± 1.6	77.5%
<i>B. cereus</i> 최적화	7.2 ± 1.7	73.7%
<i>E. coli</i> 최적화	5.6 ± 1.4	80.6%

I · E\*: Inhibitory effect



## 제 5 절 채소류 적용성 평가

### 1. 농도 및 처리 기법의 최적화

가. 최적의 농도 확립을 위한 문헌조사

선별된 6가지 천연보존제 후보물질(감초, 육계, 목단피, 백작약, 오배자, 황련)의 천연보존제 사용을 위한 최적의 농도를 확립하기 전, 사전문헌조사 및 안전성 평가를 수행하여 천연보존제 처리의 최적농도 확립에 참고함. 사전문헌조사는 사이버한의학체험관과 식품의약품안전청 공시 자료를 참고함.

#### (1) 감초

감초는 독성이 없으며, ‘약방의 감초’ 라는 말도 있듯이 한방에서 두루 쓰이는 약재 중의 하나임. 감초의 약리작용에는 해독작용, 이뇨작용, 항염작용, 체중의 증가, 간장기능 회복 등이 있으며, 간염, 두드러기, 피부염, 습진 등에도 유효함. 모든 약의 독성을 해소시키고, 서로 조화시켜서 약효가 잘 나타나게 하는 작용이 있음. 쓴 약을 달게 하여 먹기 좋게 하는 정도의 교미제로도 사용됨. 한국식품영양과학회지에 게재된 열처리한 국산 감초추출물의 항산화활성에 관한 논문 (J Korean Soc Food Sci Nutr 36(6), 689-695(2007))에 따르면 감초의 주요 성분에는 glycyrrhizin, hispaglabridin A, hispaglabridin B, glabridin, 4-O-methylglabridin, isoprenylchalcone derivative, isoliquiritigenin, formononetin 등이 있으며, 이 중에서 가장 많은 양을 차지하는 glabridin은 체내에서 인체에 해로운 LDL(Low Density Lipoprotein)의 산화를 억제시키는 효과가 있다고 알려져 있음.

#### (2) 육계

육계는 독성이 없으며, 효능으로는 혈액순환을 촉진시키고 몸을 따뜻하게 하여 뱃속이 차고 아픈 것을 멈추게 함. 위장의 점막을 자극하여 분비를 왕성하게 하고, 위장의 경련성 통증을 억제하고 위장관의 운동을 촉진해 가스를 배출하고 흡수를 좋게 함. 또한 발한작용, 진통작용이 있어 감기에 많이 사용됨. 대한본초학회지에 게재된 한약재의 보관, 절단, 수치, 전탕법에 관한 논문 (Kor. J. Herbology vol.13, No.2, 1998)에 따르면 육계의 주요 성분에는 cinnamaldehyde, cinnamic acid, cinnamyl alcohol acetate, phenyl propyl acetate, methyl vinyl ketone 등이 있으며, 이 중에서 가장 많은 양을 차지하는 cinnamaldehyde와 cinnamic acid는 방향성, 건위, 지혈, 거풍, 발한, 해열, 진통 등의 한방치료제로 널리 이용된다고 알려져 있음.

#### (3) 목단피

목단피는 독성이 없으며, 효능으로는 생리불순이나 생리통, 멍, 토혈, 코피, 반점이 나타나는 증상에 사용하며, 고열로 일어나는 출혈에 대하여 열을 내리고 지혈시키는 작용을 함. 혈액순

환을 촉진하여 어혈을 없애고 과로로 발생한 요통이나 관절통의 진통작용 및 진정작용, 열압 강하작용, 다리 부종을 억제하는 작용, 항균작용이 있어 한의학에서 염증 치료제로 사용되기도 함. 2010년 12월 29일 교육과학기술부에 따르면 경희대 한의과대학 배현수 교수팀은 목단피에 함유된 성분인 'methyl gallate'가 조절 T세포의 이동을 효과적으로 차단, 암세포 증식을 억제 한다는 사실을 입증함. 하지만 식품의약품안전청 고시 제 2009-61호에 따르면 목단피는 마두령, 마편초, 목방기, 목통, 백굴채, 백부자, 빈랑자, 스코폴리아, 위령선, 천초근, 초오, 키나, 행인, 황백과 함께 건강기능식품에 사용할 수 없는 원료로 규정됨.

#### (4) 백작약

백작약은 독성이 없으며, 효능에는 수렴작용과 해열작용, 간의 기운이 멎친 것을 풀어주고 통증을 감소시켜주는 작용이 있어 각종 통증과 함께 생리불순, 생리통, 대하, 가슴, 옆구리와 배 아픈 증상, 팔다리의 경련과 통증 등에 효과를 나타냄. 한국식품조리과학회지에 게재된 백작약 추출물의 항균효과 및 설기떡의 품질특성에 미치는 영향에 관한 논문(KOREAN J. FOOD COOKERY SCI. Vol. 25, No. 4, pp. 435-444 (2009))에 따르면 백작약의 주요 물질인 paeoniflorin 및 albinoflorin과 같은 monoterpen glucosede와 타닌 및 페놀산 등이 간독성 보호 효과, 항균작용, 항혈전작용, 항고지혈 작용, 항산화 작용이 있다고 보고됨.

#### (5) 오배자

오배자는 독성이 없으며, 효능에는 폐가 허하여 일어나는 오래된 기침과 오랜 설사가 있는 증상에 효과가 있고 해독작용과 지혈작용을 함. Food Chemistry에 게재된 Antioxidant and antimicrobial activities of consecutive extracts from Galls Chinensis : The polarity affects the bioactivities (Food Chemistry Vol. 113, Issue 1, pp 173-179 (2009))논문에 따르면 오배자의 주요 물질인 gallotannin이 nitrosamine의 형성을 억제하며, 물로 추출된 오배자가 항암성과 노화방지 효과가 있다고 보고됨.

#### (6) 황련

황련은 독성은 없으나, 다량복용하면 위의 기능을 손상시켜 소화불량 등의 증상이 나타나고 위의 진액을 손상시키기 때문에 신중하게 복용할 필요가 있음. 황련의 효능에는 정신불안 및 신경쇠약 증상을 치료하고 각종 출혈증에도 사용되며, 불면증과 종양, 종기, 어린이의 감기 치료의 목적으로 사용됨. 생약학회지에 게재된 황련과 단삼의 독성평가를 위한 성분분석 및 안전성 시험에 관한 논문(Kor. J. Pharmacogn. Vol. 40, No. 3, 184-189(2009))에 따르면 황련의 주요 물질인 isoquinoline계 alkaloid는 암세포에 세포독성, SNU-688 위암세포에 apoptosis작용, anti-feeding 활성, aldose reductase 억제활성, 해독작용 등이 있다고 보고됨.

신선편이 채소식품류 중 수요가 급증하고 있는 RTE 채소류의 미생물학적 안전성을 위하여 식품 업계에선 화학적 살균소독제를 많이 사용 중임 <Table 54>. 높은 살균력을 발휘하는 대신 많은 단점을 포함하고 있어 천연보존제의 개발이 시급한 실정임.

<Table 54> 살균소독제의 종류와 장단점

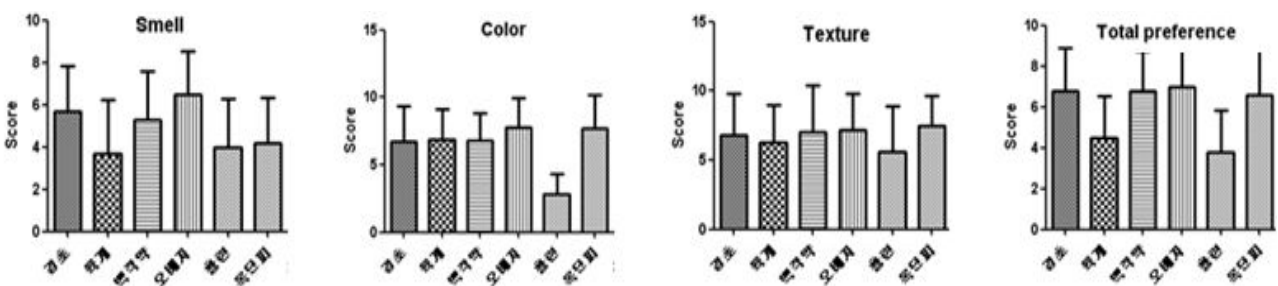
살균소독제	장 점	단 점
염소계	<ul style="list-style-type: none"> <li>·넓은 항균 스펙트럼과 포자살균력</li> <li>·액체 또는 분말형태로 저장 용이</li> <li>·거품을 형성하지 않아 CIP(장차내) 살균에 적합</li> <li>·상대적으로 가격 저렴</li> <li>·피막을 형성하지 않으며 저온에서도 유효</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>·부식성</li> <li>·THMs형성</li> <li>·피부에 자극</li> <li>·살균소독력이 pH에 영향</li> <li>·유기물, 공기, 빛 금속과의 접촉에 살균효과 감소</li> <li>·휘발성이므로 안전성이 낮음</li> </ul>
4급암모늄계	<ul style="list-style-type: none"> <li>·넓은 항균 스펙트럼</li> <li>·살균효과가 지속적</li> <li>·탈취효과</li> <li>·독성이적고 부식성 및 냄새가 상대적으로 적음</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>·세척에 사용된 세척제를 완전히 제거 후 사용</li> <li>·저온에서 활성 저하</li> <li>·그람음성균에 효과 적음</li> <li>·CIP에 사용시 부적합</li> </ul>
알코올계	<ul style="list-style-type: none"> <li>·광범위한 항미생물 역가</li> <li>·부식성이 적음</li> <li>·휘발성이 커서 잔류 확률이 적음</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>·불안정함</li> <li>·고가의 가격</li> <li>·휘발성 및 인화성 특성으로</li> <li>·사용상 주의 요망</li> </ul>
과산화물계	<ul style="list-style-type: none"> <li>·살균력이 강하고 신속</li> <li>·저온에서도 살균효과, 산소, 물 등으로 분해되어 잔류물을 남기지 않음</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>·무기물에 영향</li> <li>·일부 금속에대한 부식성</li> <li>·효모나 곰팡이에 대한 효과 적음</li> </ul>

## 2. 선별된 천연물의 제품성 평가

제품성 평가는 적용성 평가 후, 색, 향, 맛 등을 관능 평가함으로써 이루어짐. 선별된 후보물질 6종(육계, 황련, 감초, 목단피, 백작약, 오배자)에 대한 제품성을 평가하기 위하여 당근을 각 후보물질에 10초 동안 침지한 후 10명의 소비자를 대상으로 기호도 조사를 실시함. 소르빈산칼륨에 침지한 당근과 무 처리 당근을 함께 하여 기호도 조사의 정확도를 높임. 6종의 시료를 소비자에게 제시하여 전체적인 기호도, 외관, 향, 텍스처에 대해 9점 기호척도(1: 대단히 싫다, 2: 매우 싫다, 3: 싫다, 4: 약간 싫다, 5: 좋지도 싫지도 않다, 6: 약간 좋다, 7: 좋다, 8: 매우 좋다, 9: 대단히 좋다)를 바탕으로 평가함. 기호도 조사결과는 SAS 통계프로그램을 이용하여 이원분산분석 (2 way analysis of variance)을 실시하였으며, 유의적 차이를 파악한 후 Duncan의 다중비교검정을 실시하여 시료간의 차이를 파악함 <Table 55>, <Fig. 136>.

<Table 55> 기호도 평가 수치

Sensory characteristics	Mean Scores(n=10)					
	감초	육계	백작약	오배자	황련	목단피
색	6.7±2.7 <sup>a</sup>	6.9±2.2 <sup>a</sup>	6.8±2.0 <sup>a</sup>	7.8±2.1 <sup>a</sup>	2.8±1.5 <sup>b</sup>	7.7±2.5 <sup>a</sup>
향	5.7±2.1 <sup>ab</sup>	3.7±2.5 <sup>b</sup>	5.3±2.2 <sup>ab</sup>	6.5±2.0 <sup>a</sup>	4.0±2.3 <sup>b</sup>	4.2±2.1 <sup>ab</sup>
텍스처	6.8±3.0 <sup>a</sup>	6.3±2.6 <sup>a</sup>	7.0±3.4 <sup>a</sup>	7.2±2.6 <sup>a</sup>	5.6±3.8 <sup>ba</sup>	7.5±2.1 <sup>a</sup>
전체적 기호도	6.8±2.1 <sup>a</sup>	4.5±2.0 <sup>bc</sup>	6.8±1.9 <sup>a</sup>	7.0±2.0 <sup>a</sup>	3.8±2.0 <sup>c</sup>	6.6±2.7 <sup>a</sup>



<Fig. 136> 상대적 기호도 평가

선별된 후보물질 6종(육계, 황련, 감초, 목단피, 백작약, 오배자)에 대한 관능평가의 결과는 <Table 56>과 같음. 목단피, 황련, 육계는 한약재 특유의 향으로 인하여 낮은 점수를 평가 받았고 황련의 경우 색소성분이 관능평가 시료의 고유의 색을 변질시켜 점수가 낮게 평가됨. 감초, 오배자, 백작약은 비교적 높은 평가를 받음.

<Table 56> 선별된 후보물질의 관능평가 결과

천연물	색	향	텍스처	기호도
감초	O	O	O	O
목단피	O	X	O	O
황련	X	X	X	X
오배자	O	O	O	O
백작약	O	O	O	O
육계	O	X	O	△

※ O : 우수, △ : 보통, X : 미약

### 3. 천연보존제 후보물질 처리에 따른 식품 품질 평가

#### 가. 중량 변화

천연보존제 후보물질 처리에 따른 중량 변화를 측정하기 위하여 상추, 피망, 오이를 천연보존제 후보 물질들을 녹인 용매에 침지시킨 후, 시간 변화에 따른 중량 변화를 측정함.

- Ready-To-Eat 야채 시료 준비

상추, 피망, 오이는 서울 시내 대형마트에서 무작위로 구매함. 상추, 피망, 오이를 흐르는 물에 씻은 후, 여분의 물기는 Wypall L25 Wipers Large 300's을 사용하여 제거함. 상추의 무게는  $8.85 \pm 2.24$  g, 피망의 무게는  $3.12 \pm 0.99$  g, 그리고 오이의 무게는  $10.88 \pm 2.00$  g으로 절단함.

- 6종의 천연보존제 후보물질 희석액 처리

6종의 천연보존제 후보물질 희석액을 0.1 mg/mL의 농도로 500 mL를 준비한 후, 절단된 상추, 피망, 오이를 5분간 침지시킴. 5분 후 일제히 희석액에서 꺼낸 후, 여분의 희석액은 Wypall L25 Wipers Large 300's을 사용하여 제거함.

- 시료 저장 및 중량 측정

천연보존제 후보물질 희석액으로 처리된 각 시료들은  $19 \times 12.6 \times 3.1$  cm의 Clear pack에 넣은 후, 4°C 냉장고와 60% 습도와 20°C를 유지하는 항온항습기에 각각 보관함. 냉장고에 보관된 시료들은 24시간 간격으로 5일 동안, 항온항습기에 보관된 시료들은 2시간 간격으로 중량을 측정함. <Fig. 137>는 보관 직전의 사진이며, <Fig. 138>은 냉장고에서 5일 보관 후의 사진임.



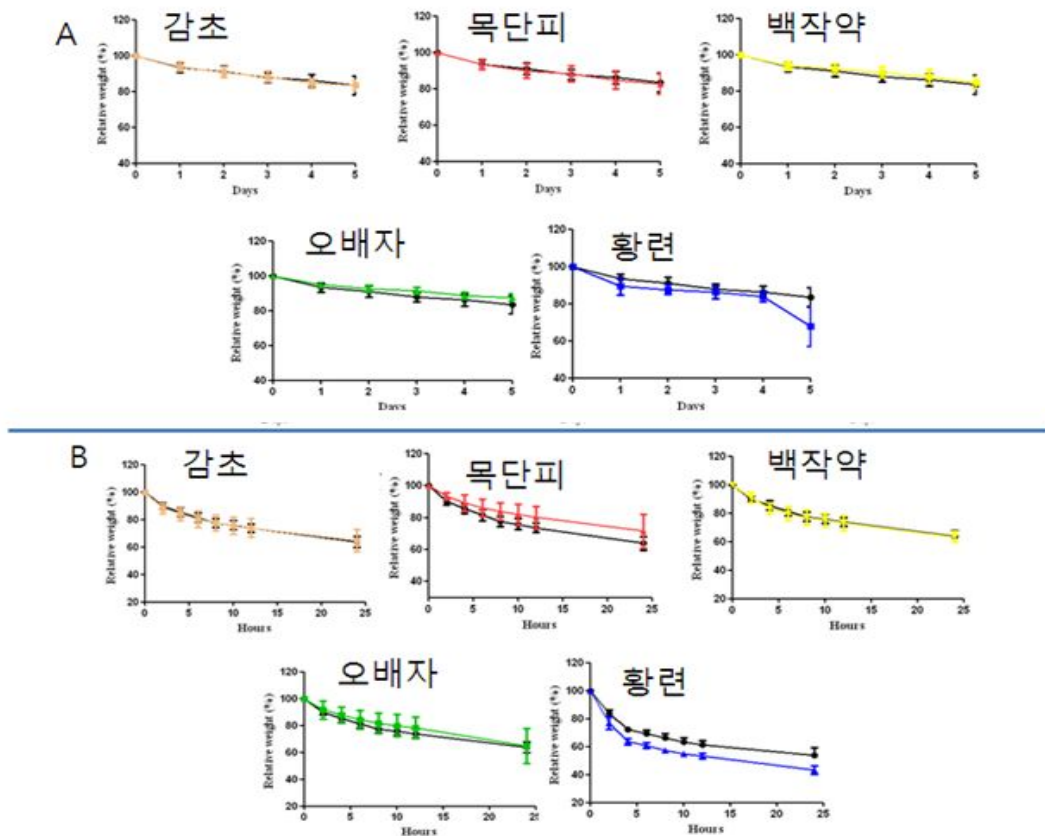
<Fig. 137> 보관 전 샘플(상추, 피망, 오이)



<Fig. 138> 보관 후 샘플(상추, 피망, 오이)

(1) 상추의 증량 변화

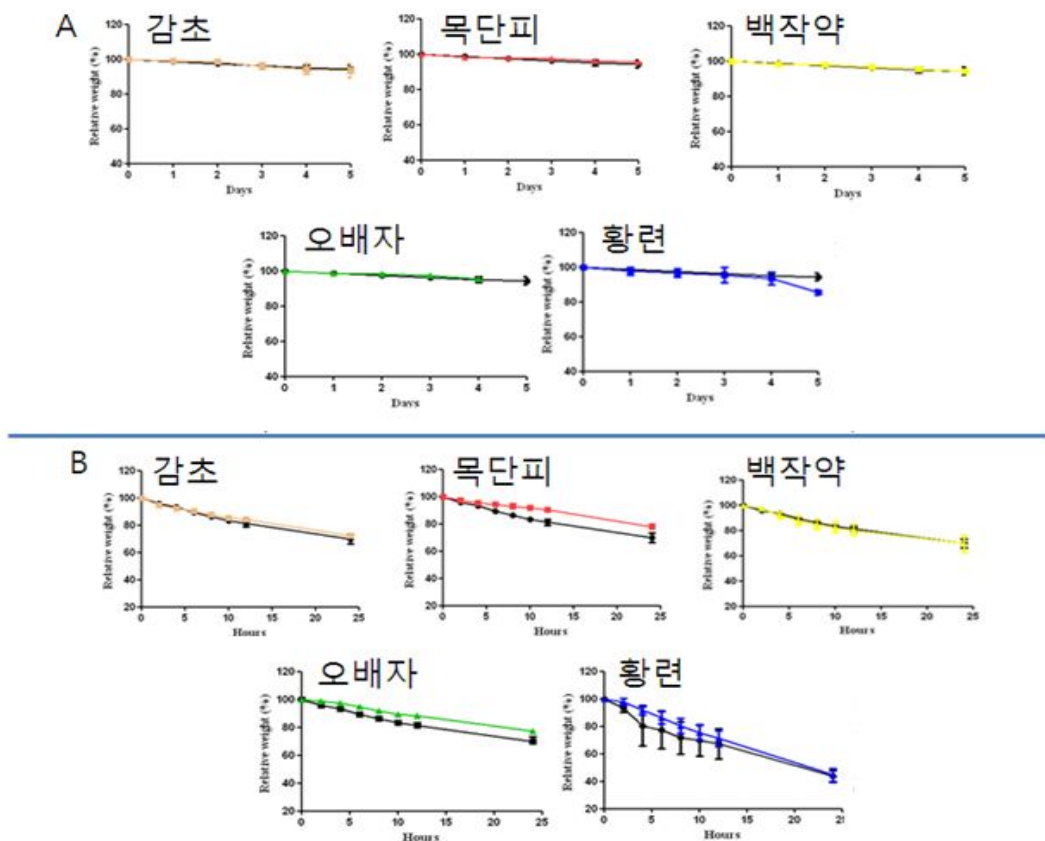
천연보존제 후보물질을 처리한 상추의 증량변화를 측정된 결과, 5가지 추출물 모두 증량변화에 있어 대조군인 증류수를 처리한 것과 유의적 차이가 없는 것으로 나타남. 냉장고 보관의 경우, 대조군은 16.57%의 감소율을 보였고, 천연보존제 후보물질을 처리한 상추의 경우 12.35%에서 17.66%의 감소율을 확인함. 특히 오배자추출물 처리 시, 상추의 증량변화가 가장 작은 것으로 확인함. 항온항습기 보관의 경우, 대조군은 36.16%의 감소율을 보였고, 천연보존제 후보물질을 처리한 상추의 경우 28.46%에서 36.50%의 감소율을 확인함 <Fig. 139>.



<Fig. 139> 감초, 목단피, 백작약, 오배자, 황련추출물 처리 시 상추의 증량 변화 (A : 냉장고 보관, B : 항온항습기 보관)

(2) 피망의 중량 변화

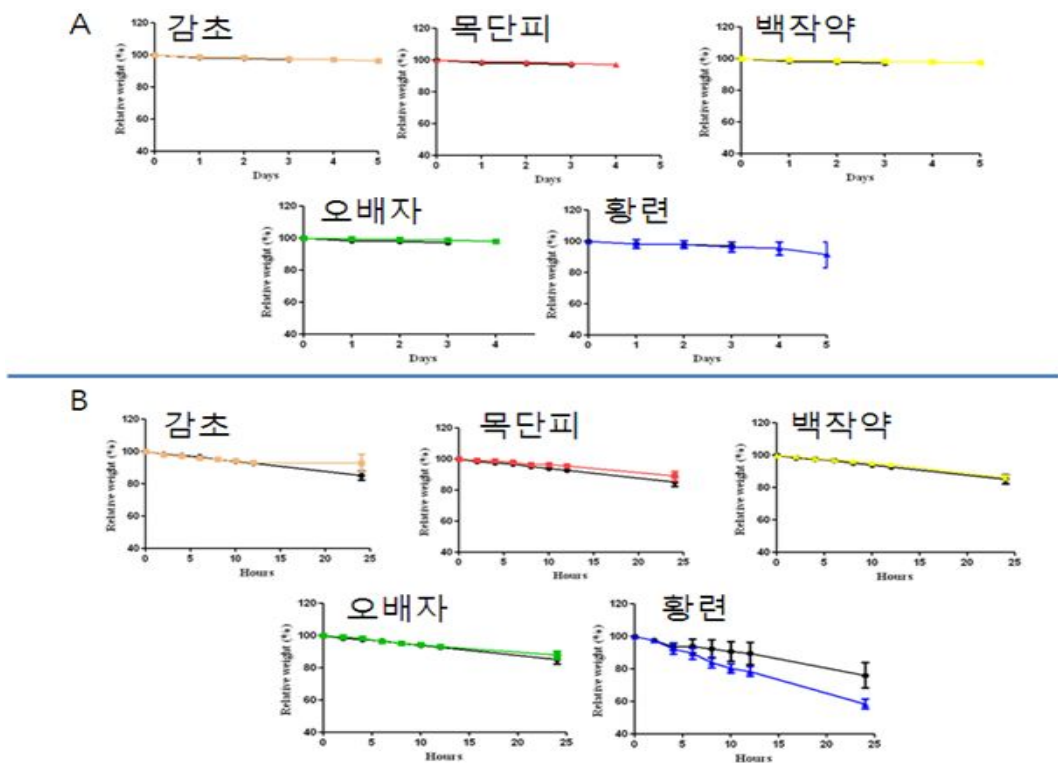
천연보존제 후보물질을 처리한 피망의 중량변화를 측정된 결과, 5가지 추출물 모두 중량변화에 있어 대조군인 증류수를 처리한 것과 유의적 차이가 없는 것으로 나타남. 냉장고 보관의 경우, 대조군은 5.62%의 감소율을 보였고, 천연보존제 후보물질을 처리한 피망의 경우 4.55%에서 6.67%의 감소율을 확인하였음. 특히 목단피추출물 처리 시, 피망의 중량변화가 가장 작으로 확인함. 향온향습기 보관의 경우, 대조군은 30.06%의 감소율을 보였고, 천연보존제 후보물질을 처리한 피망의 경우 22.31%에서 30.34%의 감소율을 확인함 <Fig. 140>.



<Fig. 140> 감초, 목단피, 백작약, 오배자, 황련추출물 처리 시 피망의 중량 변화 (A : 냉장고 보관, B : 향온향습기 보관)

(3) 오이의 중량 변화

천연보존제 후보물질을 처리한 오이의 중량변화를 측정된 결과, 5가지 추출물 모두 중량변화에 있어 대조군인 증류수를 처리한 것과 유의적 차이가 없는 것으로 나타남. 냉장고 보관의 경우, 대조군은 2.92%의 감소율을 보였고, 천연보존제 후보물질을 처리한 오이의 경우 2.21%에서 3.62%의 감소율을 확인하였음. 특히 목단피추출물 처리 시 오이의 중량변화가 가장 작은 것으로 확인함. 항온항습기 보관의 경우, 대조군은 14.95%의 감소율을 보였고, 천연보존제 후보물질을 처리한 오이의 경우 11.03%에서 15.80%의 감소율을 확인함 <Fig. 141>.



<Fig. 141> 감초, 목단피, 백작약, 오배자, 황련추출물 처리 시 오이의 중량 변화 (A : 냉장고 보관, B : 항온항습기 보관)

각 천연보존제 후보물질의 중량 변화 점수는 아래 <Table 57>와 같음.

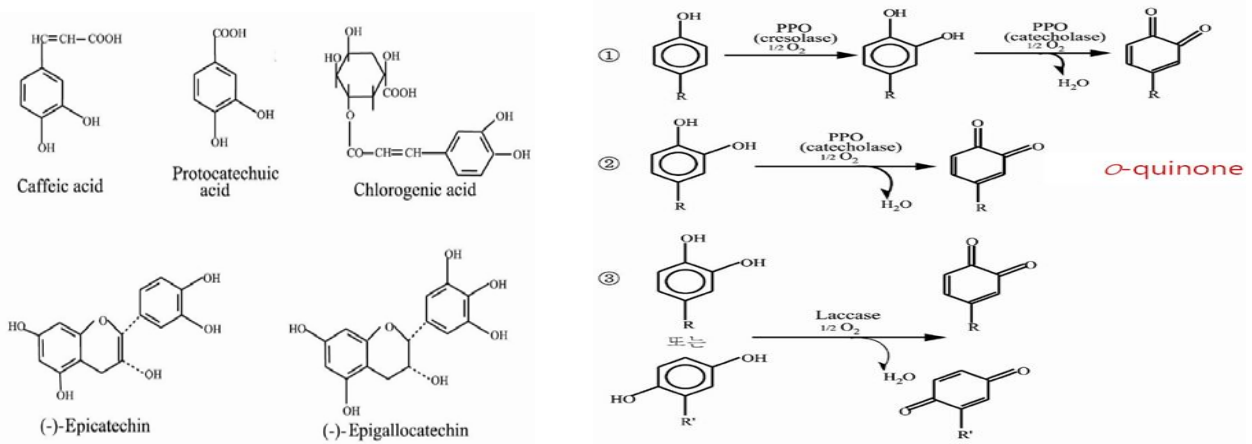
<Table 57> 천연보존제 후보물질 처리 후 중량 변화 결과

	Lettuce		Green pepper		Cucumber	
	Refrigerator	Thermo-humidistat	Refrigerator	Thermo-humidistat	Refrigerator	Thermo-humidistat
Control	83.4±5.2	63.8±4.1	94.3±2.1	69.9±3.4	97.0±0.9	85.0±2.9
감초	83.3±2.8	64.7±7.8	93.3±3.9	72.5±0.9	96.3±0.3	92.7±5.4
목단피	82.7±5.5	71.5±10.5	95.4±1.0	77.6±2.2	96.9±0.6	88.9±2.9
백작약	84.6±3.2	6.4±3.6	94.2±1.5	69.6±6.6	97.3±0.4	85.8±1.5
오배자	87.6±2.3	64.8±13.1	95.4±1.3	77.4±1.0	97.7±0.9	87.7±2.6
황련	67.9±10.8	43.3±2.8	85.3±1.6	44.7±4.7	91.3±8.2	58.4±3.1



나. 표면 색도 변화

갈변은 효소적 갈변과 비효소적갈변으로 나뉘지만, 신선한 과실에서는 주로 효소적 갈변, 가공품은 비효소적 갈변반응이 일어남. 효소에 의한 갈변은 사과, 바나나, 밤, 감자, 가지, 상추 등 과실 및 채소를 절단, 파쇄하거나 껍질을 벗길 때 생기는 물리적 손상이나 심한 온도 변화에 따른 생리적 교란으로 세포가 손상되면 일어남. 이 반응에서는 조직의 손상으로 인하여 산소분자가 존재하는 조건에서, 조직 중의 페놀 화합물이 효소의 작용을 받아 산화되어 갈색 색소인 melanin으로 전환됨. 과실의 갈변에 관계되는 주요 효소로서 polyphenol oxidase가 있고, chlorogenic acid를 비롯하여 caffeic acid, protocatechuic acid, (-)-epicatechin, (-)-epigallocatechin등이 기질로 작용함. 그 결과 quinone으로 변화하여 중합하거나 또는 아미노화합물과 반응하여 그 반응생성물이 중합하여 갈색의 착색물질을 생성, 갈변화가 일어남 <Fig. 142>.



<Fig. 142> 폴리페놀 산화 효소의 기질 및 효소에 의한 반응

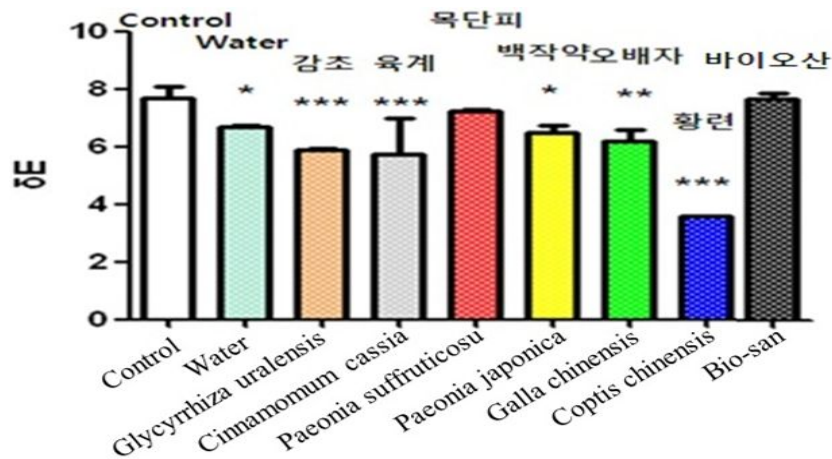
따라서 본 연구에서는, 천연추출물의 갈변도 억제 효능을 평가하기 위하여 천연보존제 후보물질 처리에 따른 표면색도 변화를 통한 갈변도 억제 효능을 평가함. 이를 위해 갈변화에 민감한 시료인 사과를 천연보존제 후보물질들을 녹인 용매에 침지시킨 후, 시간 변화에 따른 표면 색도 변화를 측정함. 색도의 변화는 "ΔE" 값으로 표현함 <Fig. 143>.



<Fig. 143> 갈변도 억제 효능 평가 순서도

표면색도 변화를 측정할 시료인 사과는 서울 시내 대형마트에서 무작위로 구매함. 사과는 약 1 cm의 두께로 절단하였음. 6종의 천연보존제 후보물질 희석액을 1 mg/mL의 농도로 100 mL를 준비한 후, 절단된 사과를 5분간 침지시킴. 5분 후 일제히 희석액에서 꺼낸 후, 여분의 희석액은 Wypall L25 Wipers Large 300's을 사용하여 제거함. 색차계를 이용하여  $L, a, b$  값을 측정하며, 측정은 30분씩 3시간 동안 측정함. 색도의 변화는 " $\Delta E$ " ( $\Delta E = [(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2]^{1/2}$ ) 값으로 표현함. Control은 무처리 실험군이며, 비교 실험군으로는 자몽씨추출물을 첨가한 시제품 바이오산을 사용함.

색도 변화 평가 결과, 목단피를 제외한 모든 천연보존제 후보물질의 색도 변화가 control이나 물로 처리한 것 보다 적었음. 특히 시제품인 바이오산에 비해 색도 변화가 적은 것으로 확인됨. Control은 7.67의  $\Delta E$ 값이 확인되었고, 감초추출물의 경우 5.87, 육계추출물의 경우 5.78, 목단피추출물의 경우 7.24, 백작약추출물의 경우 6.33, 오배자추출물의 경우 6.20, water의 경우 6.70, 바이오산의 경우 7.66의  $\Delta E$ 값이 확인됨 <Fig. 144>.



<Fig. 144> 표면색도 변화 결과

선별된 후보물질 6종(육계, 황련, 감초, 목단피, 백작약, 오배자)에 대한 표면색도 변화 결과에 대한 평가는 <Table 58>과 같음.

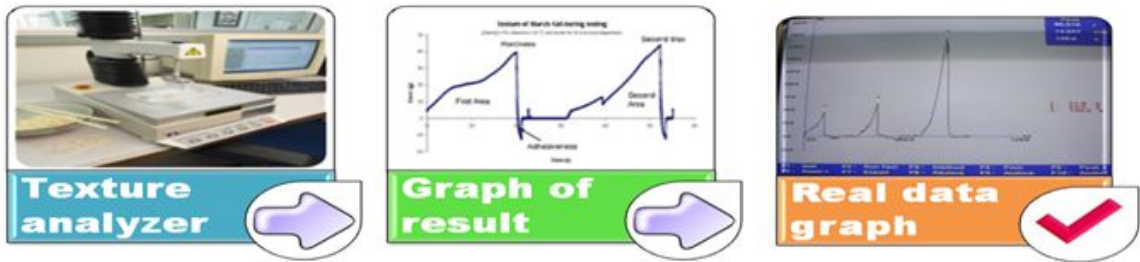
<Table 58> 선별된 후보물질의 표면색도 변화 방지효과

천연물	표면색도 변화 방지
감초	O
목단피	X
황련	O
오배자	O
백작약	O
육계	O

※ O : 우수, Δ : 보통, X : 미약

다. 표면 경도 변화

천연보존제 처리에 따른 표면 경도 변화를 측정하기 위하여 상추를 천연보존제 후보물질들을 녹인 용매에 침지시킨 후, 시간 변화에 따른 표면 경도 변화를 texture analyzer를 이용하여 측정함. 지름 2.5 mm의 probe를 1.0 mm/s 의 속도로 내려 상추의 잎 부분을 구멍을 뚫을 때 필요한 힘을 측정하여 천연보존제 후보물질을 처리하지 않은 대조군과 천연보존제 후보물질을 처리한 실험군의 표면 강도를 비교 측정함 <Fig. 145>.



<Fig. 145> Texture analyzer의 사진과 표면 강도 측정 결과 그래프

상추와 같은 엽채류의 표면 강도 측정의 경우, 측정 시료의 균일화, 측정 위치의 균일화, 대조군과 실험군의 비교 등이 어려워 실험의 재현성이 떨어짐과 더불어 정확한 측정이 불가함. 하지만 대조군과 실험군의 외관적인 모습이나 사람의 촉각은 대조군과 실험군의 차이가 확연히 나타남 <Fig. 146>. 그러므로 이를 평가하기 위하여 texture analyzer 대신하여 관능평가에서 씹힘성, 즉 texture의 변화를 측정함.

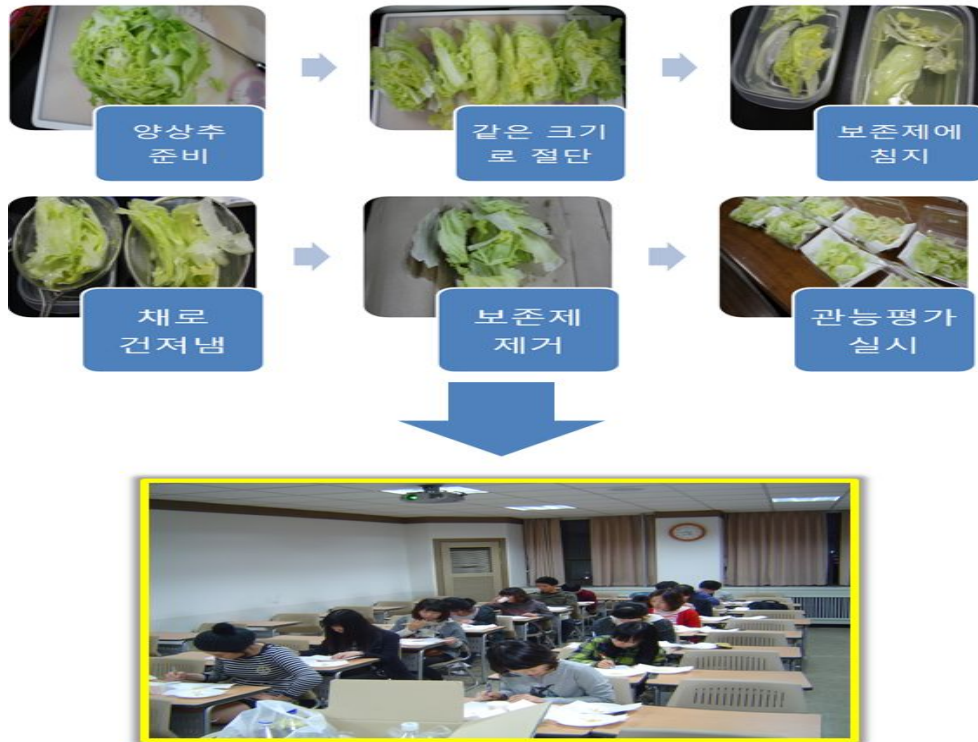


<Fig. 146> 천연보존제 후보물질을 처리한 상추와 처리하지 않은 상추

라. 관능평가

천연보존제 후보물질의 독성을 문헌 조사와 동물 실험 결과를 기초로 하여 처리에 따른 RTE 채소의 제품성을 평가하기 위해 관능평가를 실시함. 관능평가 항목은 전반적인 기호도, 외관, 향, 맛, 씹힘성을 평가하였음. 천연보존제 후보물질 6종(감초, 육계, 목단피, 백작약, 오배자, 황련)에 대한 제품성을 평가하기 위하여 양상추를 각 천연보존제 후보물질 희석액에 5분 동안 침지한 후 20명의 소비자를 대상으로 실시함. 실험방법은 <Fig. 147>에 표시함. 6종의 천연보존제 후보물질을 소비자에게 제시하여 전체적인 기호도, 외관, 향, 맛, 씹힘성에 대해 9

점 기호척도 (1: 대단히 싫다, 2: 매우 싫다, 3: 싫다, 4: 약간 싫다, 5: 좋지도 싫지도 않다, 6: 약간 좋다, 7: 좋다. 8: 매우 좋다. 9: 대단히 좋다)를 바탕으로 평가함. 평가지는 <Fig. 148>에 표시함.



<Fig. 147> 관능평가 준비 순서도

sample NO. \_\_\_\_\_

이름 : \_\_\_\_\_ 날짜 : \_\_\_\_\_

먼저 입을 가신 후 제품을 평가하시기 바랍니다.

1. 전반적인 기호도

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
대단히 싫다				좋지도 싫지도 않다				대단히 좋다

2. 외관

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
대단히 싫다				좋지도 싫지도 않다				대단히 좋다

3. 향

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
대단히 싫다				좋지도 싫지도 않다				대단히 좋다

4. 맛

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
대단히 싫어한다.				좋지도 싫지도 않다				대단히 좋아한다.

5. 씹힘성

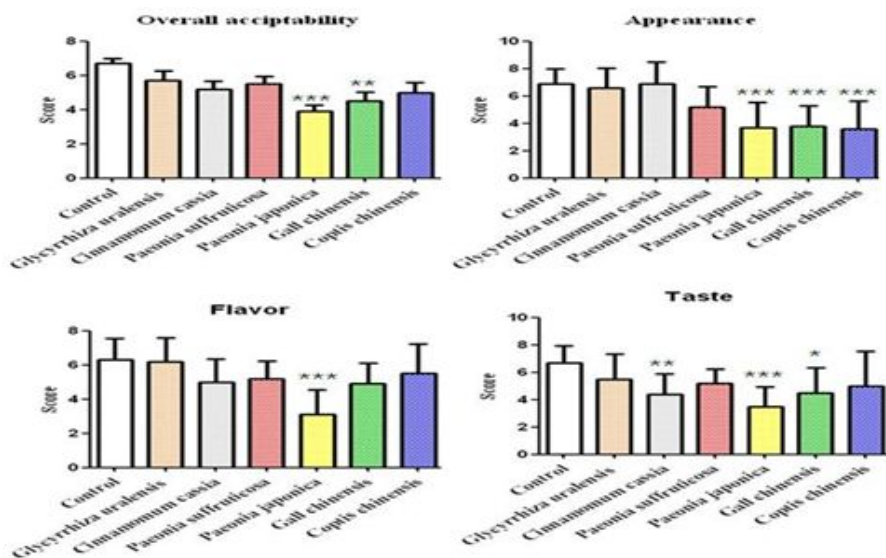
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
대단히 싫다				좋지도 싫지도 않다				대단히 좋다

의견 : \_\_\_\_\_

<Fig. 148> 관능평가지

관능평가 시 검사 방법과 심리적 요인에 의하여 일어날 수 있는 오차까지 극복할 수 있도록 모든 조건들을 엄격하게 통제함. 관능평가는 동국대학교 강의실에서 진행되었으며, 천연보존제 후보물질의 이름은 3자리의 무작위 숫자로 기입되어 제시되었고, 제시순서 역시 무작위로 제시함. 입가심 물은 한 시료의 평가가 시작 혹은 끝날 때마다 사용하게 하였으며, 소비자들에게 관능평가의 중요성과 결과의 기여도에 대한 인식을 심어줌으로써 적극적인 동기를 갖게 하는 동시에 선물을 제공하여 실제적인 동기를 부여함.

천연보존제 후보물질을 처리한 양상추의 관능평가 중 외관을 평가한 결과, 대조군인 증류수를 처리한 양상추의 외관 점수는 평균 6.9점을 받았고, 천연보존제 후보물질을 처리한 양상추의 외관 점수는 평균 3.8점에서 6.9점을 받음. 특히 감초추출물 처리 시 양상추의 외관은 대조군과 같은 점수를 받음. 천연보존제 후보물질을 처리한 양상추의 관능평가 중 향을 평가한 결과, 대조군인 증류수를 처리한 양상추의 향의 점수는 평균 6.3점을 받았고, 천연보존제 후보물질을 처리한 양상추의 외관 점수는 평균 3.1점에서 6.2점을 받음. 특히 감초추출물 처리 시 양상추의 향은 대조군과 비슷한 점수를 받음. 그에 비해 목단피의 경우, 낮은 농도임에도 불구하고 한약재 향이 강하여 가장 낮은 점수를 받음. 천연보존제 후보물질을 처리한 양상추의 관능평가 중 맛을 평가한 결과, 대조군인 증류수를 처리한 양상추의 맛의 점수는 평균 6.7점을 받았고, 천연보존제 후보물질을 처리한 양상추의 맛의 점수는 평균 2.6점에서 5.5점을 받음. 특히 감초추출물 처리 시 양상추의 맛은 대조군과 가장 가까운 점수를 받음. 그에 비해 황련의 경우, 낮은 농도임에도 불구하고 특유의 쓴 맛으로 인해 가장 낮은 점수를 받음. 천연보존제 후보물질을 처리한 양상추의 관능평가 중 전반적인 기호도를 평가한 결과, 대조군인 증류수를 처리한 양상추의 전반적인 기호도 점수는 평균 6.7점을 받았고, 천연보존제 후보물질을 처리한 양상추의 전반적인 점수는 평균 3.6점에서 5.7점을 받음. 특히 감초추출물 처리 시 양상추의 전반적인 기호도 점수는 대조군과 가장 비슷한 점수를 받음. 그에 비해 황련의 경우, 낮은 농도임에도 불구하고 노란 색깔과 특유의 쓴 맛으로 인해 가장 낮은 점수를 받음. 각 천연보존제 후보물질의 관능평가 점수는 아래 <Fig. 149>와 <Table 59>과 같음.



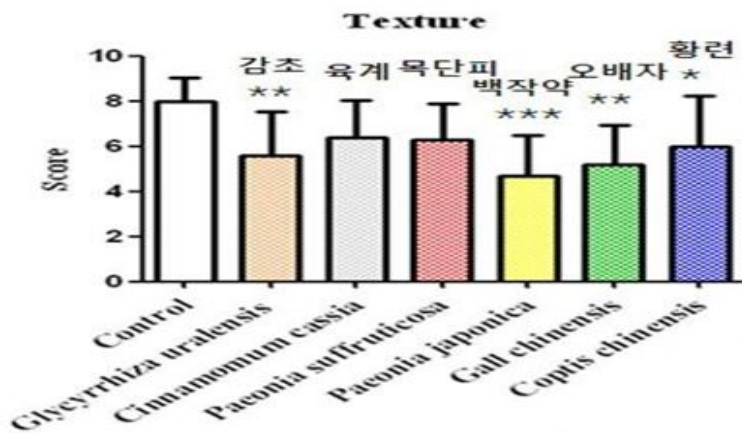
<Fig. 149> 관능평가 결과



<Table 59> 관능평가 결과 수치

Sensory characteristics	Mean Scores (n=20)						
	Control	감초	육계	목단피	백작약	오배자	황련
Color	6.9±1.1	6.9±1.4	6.9±1.6	5.2±1.8	3.7±1.5	3.8±1.5	3.6±2.0
Flavor	6.3±1.3	6.2±1.4	5.0±1.3	5.2±1.5	3.1±1.0	4.9±1.2	5.5±1.6
Taste	6.7±1.3	5.5±1.8	4.4±1.5	5.2±1.4	3.5±1.0	4.5±1.8	5.0±1.3
Total preference	6.7±0.9	5.7±1.8	5.2±1.5	5.5±1.1	3.9±1.4	4.5±1.6	5.0±2.0
Texture	8.0±1.0	5.6±2.0	6.4±1.6	6.3±1.8	4.7±1.6	5.2±1.8	6.0±1.9

천연보존제 후보물질을 처리한 양상추의 물성평가는 관능평가 중 씹힘성 항목으로 평가함 <Fig 150>. 대조군인 증류수를 처리한 양상추의 씹힘성 점수는 평균 8.0점을 받았고, 천연보존제 후보물질을 처리한 양상추의 외관 점수는 평균 4.7점에서 6.4점을 받았음. 비록 평가 시간이 단일조건으로 이루어졌지만 천연보존제 후보물질을 처리한 양상추의 물성은 처리하지 않은 대조군의 양상추의 물성보다 높은 점수를 받지 못함.



<Fig. 150> 관능 평가 중 씹힘성 항목 결과

선별된 후보물질 6종(육계, 황련, 감초, 목단피, 백작약, 오배자)에 대한 보완된 관능평가의 결과는 <Table 60>과 같음. 시제품 개발에 있어서 소비자의 기호도를 증대하기 위한 masking제제 첨가 필요성이 사료됨.

<Table 60>선별된 후보물질의 관능평가 결과

천연물	색	향	맛	텍스처	기호도
감초	O	O	O	△	O
목단피	△	O	O	O	O
황련	X	O	O	O	O
오배자	△	△	△	△	△
백작약	X	X	X	X	△
육계	X	O	△	O	O

※ O : 우수, △ : 보통, X : 미약

#### 4. 시제품 평가

##### 가. 갈변도 평가

시제품의 갈변도 억제 효능을 평가하기 위하여 시제품 처리에 따른 표면색도 변화를 통한 갈변도 억제 효능 평가를 실시함. 실험에 사용한 시료는 RTE용 셀러드의 재료로 사용되는 콜라비, 사과, 화이트로즈를 선택하여 갈변도 억제 효능을 평가함. 시료는 서울 시내 대형마트에서 무작위로 구매하였고 사과와 콜라비는 약 1cm의 두께로 절단함. 4종의 시제품을 침지방식과 분무방식으로 시료에 처리하여 갈변도 억제 효능을 평가하였고 침지방법의 경우 시제품을 100mL을 준비한 후, 절단된 시료를 1분간 침지한 뒤에 꺼낸 뒤 여액을 Wypall L25 Wipers Large 300's를 사용하여 제거함. 색차계 NIPPON DEHNSHOKU NE3000을 이용하여  $L$ ,  $a$ ,  $b$ 를 측정하며, 측정은 1시간씩 3시간 동안 측정을 실시함. 색도의 변화는 다음 식과 같이 표현함.

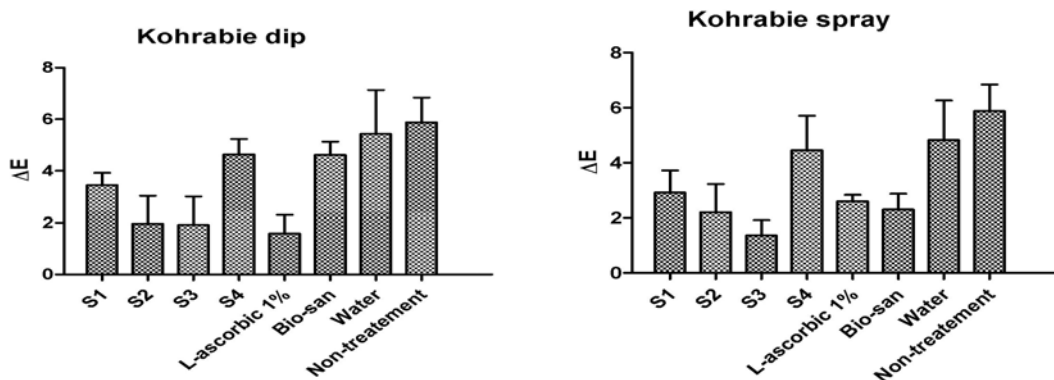
$$\Delta E = [(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2]^{1/2}$$

대조군으로는 무처리 실험군과 대표적인 항갈변 첨가물인 L-ascorbic acid 1%, 증류수, 시중에 유통되고 있는 식품보존제인 Bio-san으로 지정하여 실험을 진행함. 침지 처리한 콜라비와 분무 처리한 콜라비의  $\Delta E$ 의 값은 <Table 61>과 같음. 유의적 차이를 파악하기 위하여 Duncan의 다중비교검정을 실시함. 시제품 S2와 S3의 경우 각각 1.9로 측정되어 4.6으로 측정된 Bio-san보다 색도변화가 적은 것으로 측정됨. 또한 무처리군은 5.8로 측정되었고, 증류수 처리군은 5.4로 측정되어 S2, S3가 이들보다 색도변화가 적은 것으로 측정됨.

<Table 61> 침지처리한 콜라비와 분무처리한 콜라비의  $\Delta E$ 값

Sample	$\Delta E^{1)}$							
	S1 <sup>2)</sup>	S2 <sup>3)</sup>	S3 <sup>4)</sup>	S4 <sup>5)</sup>	L-a <sup>6)</sup>	Bio-san <sup>7)</sup>	Water	Non-treatment
Dip	3.4±0.4 <sup>bc</sup>	1.9±1.0 <sup>cd</sup>	1.9±1.0 <sup>cd</sup>	4.6±0.5 <sup>ab</sup>	1.5±0.5 <sup>d</sup>	4.6±0.5 <sup>ab</sup>	5.4±1.7 <sup>a</sup>	5.8±0.9 <sup>a</sup>
Spry	2.9±0.8 <sup>bc</sup>	2.2±1.0 <sup>c</sup>	1.3±0.5 <sup>c</sup>	4.4±1.2 <sup>ab</sup>	2.6±0.2 <sup>c</sup>	2.3±0.5 <sup>c</sup>	4.8±1.4 <sup>a</sup>	5.8±0.9 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup>  $\Delta E = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2}$ , <sup>2)</sup> 백작약 : 오배자 : 육계 (3 : 6 : 1), <sup>3)</sup> 백작약 : 오배자 : 감초 (3 : 6 : 1), <sup>4)</sup> 오배자 : 육계 (8 : 2), <sup>5)</sup> 오배자 : 감초 (8 : 2), <sup>6)</sup> L-ascorbic acid 1%, <sup>7)</sup> 시중에 유통되고있는 천연보존제인 Bio-san  
Values in the sharing a common letter are not significantly different ( $p \leq 0.05$ )



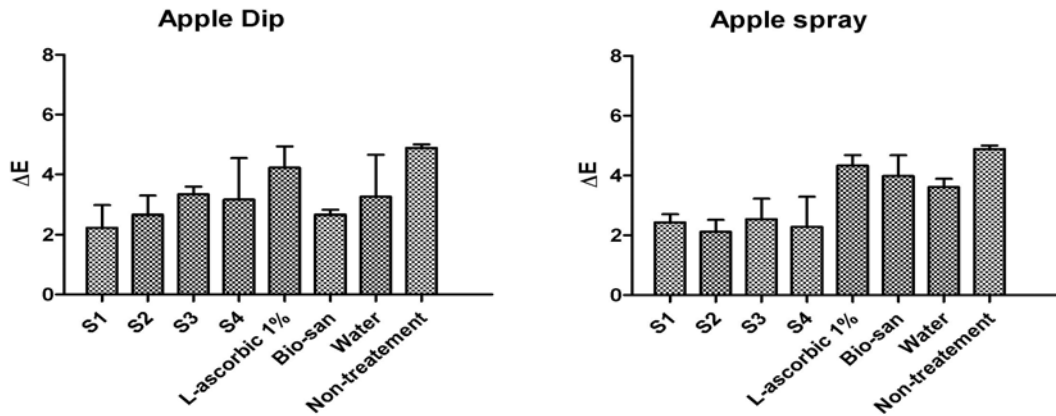
<Fig. 151> 콜라비에 대한 침지 및 분무 처리 평가

침지 처리한 사과와 분무 처리한 사과의  $\Delta E$ 의 값은 <Table 62>과 같음. 침지 처리한 사과의 무처리군의 색변화는 4.8이고 증류수를 처리한 실험군은 3.2의 색변화 값이 측정됨. 시료가 사과일 경우 시제품 중 S2의 색변화가 가장 적게 측정됨.

<Table 62> 침지 처리한 사과와 분무 처리한 사과의  $\Delta E$ 값

Sample	$\Delta E^{1)}$							
	S1 <sup>2)</sup>	S2 <sup>3)</sup>	S3 <sup>4)</sup>	S4 <sup>5)</sup>	L-a <sup>6)</sup>	Bio-san <sup>7)</sup>	Water	Non-treatment
Dip	2.2±0.7 <sup>c</sup>	2.6±0.6 <sup>bc</sup>	3.3±0.2 <sup>bc</sup>	3.1±1.3 <sup>bc</sup>	4.2±0.7 <sup>ab</sup>	2.6±0.1 <sup>bc</sup>	3.2±1.4 <sup>bc</sup>	4.8±0.1 <sup>a</sup>
Spry	2.4±0.2 <sup>c</sup>	2.1±0.4 <sup>c</sup>	2.5±0.6 <sup>c</sup>	2.2±1.0 <sup>c</sup>	4.3±0.3 <sup>ab</sup>	3.9±0.6 <sup>ab</sup>	3.6±0.2 <sup>b</sup>	4.8±0.1 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup>  $\Delta E = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2}$ , <sup>2)</sup> 백작약 : 오배자 : 육계 (3 : 6 : 1), <sup>3)</sup> 백작약 : 오배자 : 감초 (3 : 6 : 1), <sup>4)</sup> 오배자 : 육계 (8 : 2), <sup>5)</sup> 오배자 : 감초 (8 : 2), <sup>6)</sup> L-ascorbic acid 1%, <sup>7)</sup> 시중에 유통되고있는 천연보존제인 Bio-san  
Values in the sharing a common letter are not significantly different (p≤0.05)



<Fig. 152> 사과에 대한 침지 및 분무 처리 평가

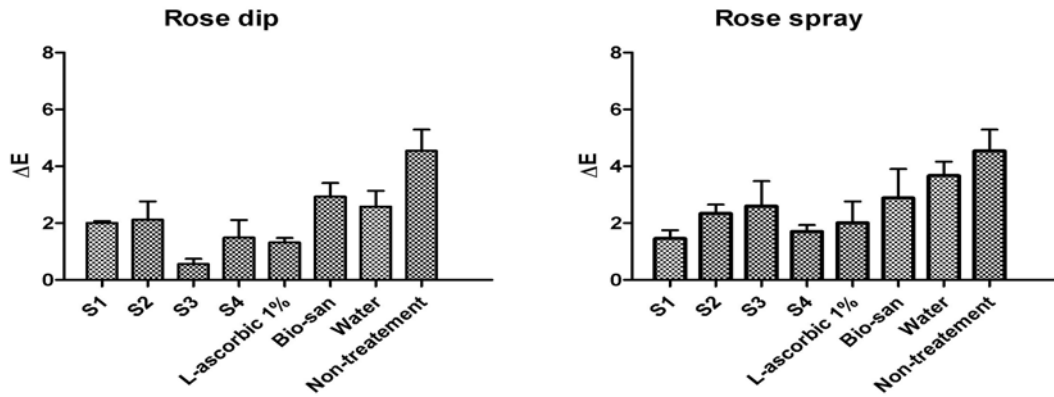
침지 처리한 화이트로즈와 분무 처리한 화이트로즈의  $\Delta E$ 의 값은 <Table 63>과 같음. 침지 처리한 화이트로즈의 경우 S3가 가장 낮은 색변화가 측정되었음. 분무형태로 화이트로즈를 처리하였을 경우 S1이 가장 낮은 색변화를 나타냄.

<Table 63> 침지 처리한 화이트로즈와 분무 처리한 화이트로즈의  $\Delta E$ 값

Sample	$\Delta E^{1)}$							
	S1 <sup>2)</sup>	S2 <sup>3)</sup>	S3 <sup>4)</sup>	S4 <sup>5)</sup>	L-a <sup>6)</sup>	Bio-san <sup>7)</sup>	Water	Non-treatment
Dip	2.0±0.1 <sup>cd</sup>	2.1±0.6 <sup>bcd</sup>	0.5±0.1 <sup>e</sup>	1.4±0.6 <sup>d</sup>	1.3±0.1 <sup>de</sup>	2.9±0.4 <sup>b</sup>	2.5±0.5 <sup>bc</sup>	4.5±0.7 <sup>a</sup>
spray	1.4±0.2 <sup>d</sup>	2.3±0.3 <sup>bcd</sup>	2.5±0.8 <sup>bcd</sup>	1.7±0.2 <sup>cd</sup>	2.0±0.7 <sup>cd</sup>	2.8±1.0 <sup>bc</sup>	3.6±0.4 <sup>ab</sup>	4.5±0.7 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup>  $\Delta E = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2}$ , <sup>2)</sup> 백작약 : 오배자 : 육계 (3 : 6 : 1), <sup>3)</sup> 백작약 : 오배자 : 감초 (3 : 6 : 1), <sup>4)</sup> 오배자 : 육계 (8 : 2), <sup>5)</sup> 오배자 : 감초 (8 : 2), <sup>6)</sup> L-ascorbic acid 1%, <sup>7)</sup> 시중에 유통되고있는 천연보존제인 Bio-san  
Values in the sharing a common letter are not significantly different (p≤0.05)





<Fig. 153> 화이트로즈에 대한 침지 및 분무 처리 평가

4종의 시료를 대상으로 갈변도 억제 효능을 평가한 결과 시제품 S2와 S3가 우수한 갈변도 억제 효능을 평가됨. 이러한 결과는 최종 시제품 선택에 있어 판단의 근거로 채택됨.

<Table 64> 선별된 후보물질의 표면색도 변화 방지효과

시제품	갈변도 방지 효능평가
S1	△
<b>S2</b>	<b>O</b>
<b>S3</b>	<b>O</b>
S4	△

S1 백작약 : 오배자 : 육계 (3 : 6 : 1)

S2 백작약 : 오배자 : 감초 (3 : 6 : 1)

S3 오배자 : 육계 (8 : 2)

S4 오배자 : 감초 (8 : 2)

※ O : 우수, △ : 보통, X : 미약

#### 나. 관능평가

20명의 대학원생을 관능평가 패널요원으로 선정하여 관능평가를 실시함. 관능평가의 장소는 동국대학교 강의실에서 진행 되었으며 관능평가 대상시료는 난수처리를 실시하여 무작위 숫자로 기입되어 제시함. 입가심 물은 한 시료의 평가가 시작 혹은 끝날 때마다 사용하도록 교육하였으며 관능평가의 결과의 기여도에 대한 중요성을 적극적으로 심어 줌으로써 동기부여를 실시함. 관능평가 시료는 천연보존제 시제품을 처리한 당근, 양상추, 방울토마토를 시료로 정하여 9점 척도법으로 관능평가를 실시함. 유의적차이를 판별하기 위하여 Duncan의 다중비교검정을 실시함. 대조군으로 시중에 유통되는 Bio-san과 정제수를 사용함. 시료를 1분동안 천연보존제 및 대조군에 침지하여 처리한 뒤 샐러드스피너로 여액을 제거한 뒤 신선한 상태에서 관능평가를 실시함.

시제품을 처리한 양상추의 관능평가 중 외관을 평가한 결과, 당근은 6.2-6.7의 점수를 평가 받았고, 대조군인 Bio-san과 물을 처리한 군은 각각 6.4 와 6.3의 점수를 받음. 방울토마토는

시제품들이 6.5-7.0의 점수를 받았고 Bio-san과 물은 각각 6.7 과 6.6의 점수를 받음. 양상추의 시제품 점수는 5.4-6.8이고 대조군인 Bio-san과 물은 각각 5.2 와 6.4의 점수를 받음. 외관 점수에서는 S2와 S4의 점수가 비교적 높게 평가 받음 <Table 65>.

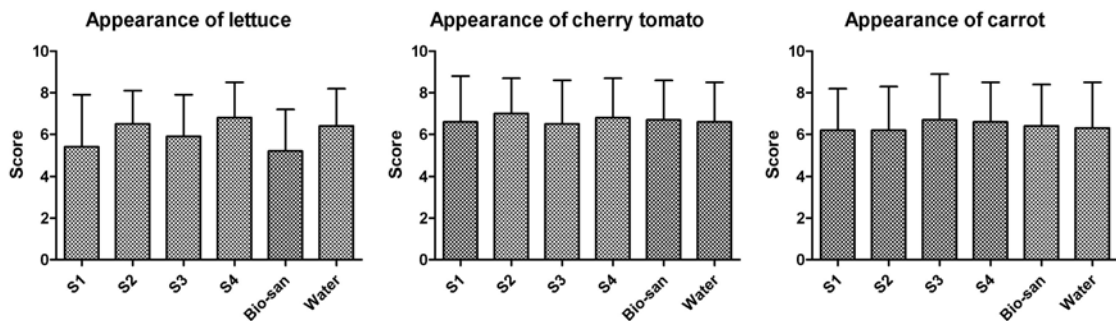
<Table 65> 시료의 외관 관능평가 점수 결과

Sample	Appearance score					
	S1 <sup>1)</sup>	S2 <sup>2)</sup>	S3 <sup>3)</sup>	S4 <sup>4)</sup>	Bio-san <sup>5)</sup>	Water
Carrot	6.2±2.0 <sup>a</sup>	6.2±2.1 <sup>a</sup>	6.7±2.2 <sup>a</sup>	6.6±1.9 <sup>a</sup>	6.4±2.0 <sup>a</sup>	6.3±2.2 <sup>a</sup>
Cherry	6.6±2.2 <sup>a</sup>	7.0±1.7 <sup>a</sup>	6.5±2.1 <sup>a</sup>	6.8±1.9 <sup>a</sup>	6.7±1.9 <sup>a</sup>	6.6±1.9 <sup>a</sup>
Tomato						
Lettuce	5.4±2.5 <sup>ab</sup>	6.5±1.6 <sup>ab</sup>	5.9±2.0 <sup>ab</sup>	6.8±1.7 <sup>a</sup>	5.2±2.0 <sup>b</sup>	6.4±1.8 <sup>ab</sup>

<sup>1)</sup> 백작약 : 오배자 : 육계 (3 : 6 : 1), <sup>2)</sup> 백작약 : 오배자 : 감초 (3 : 6 : 1), <sup>3)</sup> 오배자 : 육계 (8 : 2)

<sup>4)</sup> 오배자 : 감초 (8 : 2), <sup>5)</sup> 시중에 유통되고있는 천연보존제인 Bio-san

Values in the sharing a common letter are not significantly different (p≤0.05)



<Fig. 154> 시료의 외관 관능평가

관능평가중 시제품의 향을 평가 한 결과 시제품을 처리한 당근은 5.1-6.4의 점수를 평가 받았고, 대조군인 Bio-san과 물을 처리한 군은 각각 5.6 와 5.8의 점수를 받음. 방울토마토는 시제품들이 5.0-6.5의 점수를 받았고 Bio-san과 물은 각각 6.1 과 6.0의 점수를 받음. 양상추의 시제품 점수는 4.4-6.0이고 대조군인 Bio-san과 물은 각각 5.2 와 5.5의 점수를 받음. 특징적으로 S1과 S4와 같이 한약재의 향을 나타내는 육계가 첨가된 시제품의 경우 점수가 낮았고 기타 의견사항에 한약재의 향이 난다고 의견을 기록함. 시중에 유통되고 있는 식품보존제인 Bio-san의 경우 고유의 알코올 향이 강하게 난다는 의견이 있었으며 전체적으로 S2와 S4가 비교적 높은 점수를 평가 받음 <Table 66>.

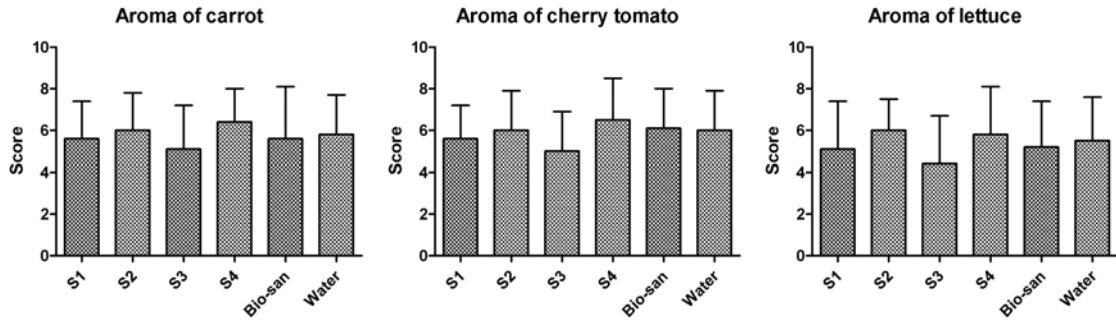
<Table 66> 시료의 향 관능평가 점수 결과

Sample	Aroma score					
	S1 <sup>1)</sup>	S2 <sup>2)</sup>	S3 <sup>3)</sup>	S4 <sup>4)</sup>	Bio-san <sup>5)</sup>	Water
Carrot	5.6±1.8 <sup>a</sup>	6.0±1.8 <sup>a</sup>	5.1±2.1 <sup>a</sup>	6.4±1.6 <sup>a</sup>	5.6±2.5 <sup>a</sup>	5.8±1.9 <sup>a</sup>
Cherry	5.6±1.6 <sup>ab</sup>	6.0±1.9 <sup>ab</sup>	5.0±1.9 <sup>b</sup>	6.5±2.0 <sup>a</sup>	6.1±1.9 <sup>ab</sup>	6.0±1.9 <sup>ab</sup>
Tomato						
Lettuce	5.1±2.3 <sup>ab</sup>	6.0±1.5 <sup>a</sup>	4.4±2.3 <sup>b</sup>	5.8±2.3 <sup>ab</sup>	5.2±2.2 <sup>ab</sup>	5.5±2.1 <sup>ab</sup>

<sup>1)</sup> 백작약 : 오배자 : 육계 (3 : 6 : 1), <sup>2)</sup> 백작약 : 오배자 : 감초 (3 : 6 : 1), <sup>3)</sup> 오배자 : 육계 (8 : 2)

<sup>4)</sup> 오배자 : 감초 (8 : 2), <sup>5)</sup> 시중에 유통되고있는 천연보존제인 Bio-san

Values in the sharing a common letter are not significantly different (p≤0.05)



<Fig. 155> 시료의 향 관능평가

관능평가 중 맛에 대한 관능평가 점수 결과로 시제품을 처리한 당근은 4.7-5.9의 점수를 평가 받았고, 대조군인 Bio-san과 물을 처리한 군은 각각 5.0 와 6.0의 점수를 받음. 방울토마토는 시제품들이 5.8-7.0의 점수를 받았고 Bio-san과 물은 각각 6.5 과 6.5의 점수를 받음. 양상추의 시제품 점수는 5.0-5.9이고 대조군인 Bio-san과 물은 각각 4.3 와 5.7의 점수를 받음. 맛의 관능평가 점수에서는 S2와 S4의 점수가 비교적 높게 평가 받았고 부가적으로 Bio-san의 경우 알코올을 첨가하였기 때문에 양상추 평가에서 알코올 향 때문에 맛이 떨어진다는 의견이 제시됨 <Table 67>.

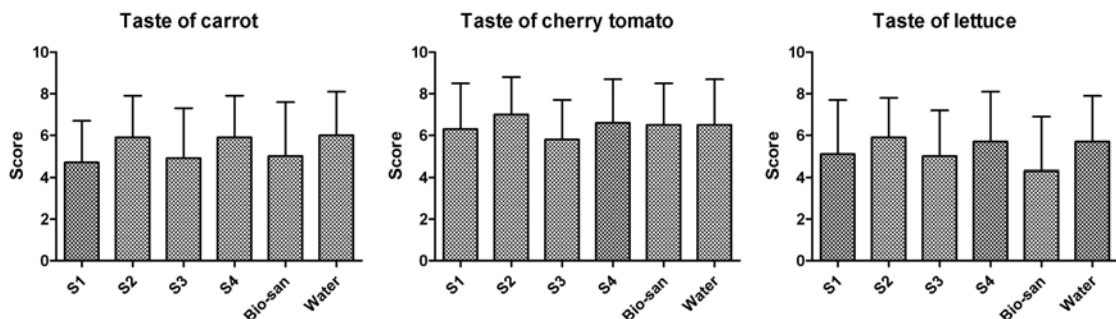
<Table 67> 시료의 맛 관능평가 점수 결과

Sample	Taste score					
	S1 <sup>1)</sup>	S2 <sup>2)</sup>	S3 <sup>3)</sup>	S4 <sup>4)</sup>	Bio-san <sup>5)</sup>	Water
Carrot	4.7±2.0 <sup>a</sup>	5.9±2.0 <sup>a</sup>	4.9±2.4 <sup>a</sup>	5.9±2.0 <sup>a</sup>	5.0±2.6 <sup>a</sup>	6.0±2.1 <sup>a</sup>
Cherry Tomato	6.3±2.2 <sup>a</sup>	7.0±1.8 <sup>a</sup>	5.8±1.9 <sup>a</sup>	6.6±2.1 <sup>a</sup>	6.5±2.0 <sup>a</sup>	6.5±2.2 <sup>a</sup>
Lettuce	5.1±2.6 <sup>a</sup>	5.9±1.9 <sup>a</sup>	5.0±2.2 <sup>a</sup>	5.7±2.4 <sup>a</sup>	4.3±2.6 <sup>a</sup>	5.7±2.2 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup> 백작약 : 오배자 : 육계 (3 : 6 : 1), <sup>2)</sup> 백작약 : 오배자 : 감초 (3 : 6 : 1), <sup>3)</sup> 오배자 : 육계 (8 : 2)

<sup>4)</sup> 오배자 : 감초 (8 : 2), <sup>5)</sup> 시중에 유통되고있는 천연보존제인 Bio-san

Values in the sharing a common letter are not significantly different ( $p \leq 0.05$ )



<Fig. 156> 시료의 맛 관능평가

관능평가 중 씹힘성에 대한 관능평가 점수 결과로 시제품을 처리한 당근은 5.7-6.7의 점수를 평가 받았고, 대조군인 Bio-san과 물을 처리한 군은 각각 6.2 와 6.9의 점수를 받음. 방울토마

토는 시제품들이 5.8-6.2의 점수를 받았고 Bio-san과 물은 각각 6.2 과 6.3의 점수를 받음. 양상추의 시제품 점수는 5.9-6.6이고 대조군인 Bio-san과 물은 각각 5.1 와 6.4의 점수를 받음. 씹힘성의 관능평가 점수에서도 S2와 S4의 점수가 비교적 높게 평가 받았고 관능평가 패널 요원들은 전체적으로 차이를 느끼지 못하겠다는 의견이 제시됨 <Table 68>.

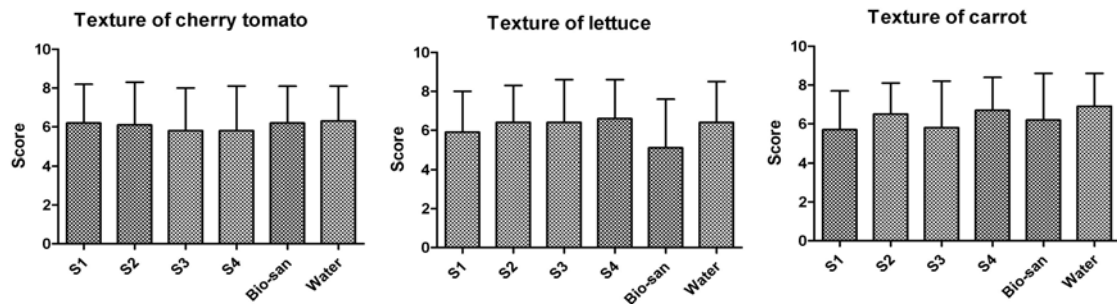
<Table 68> 시료의 씹힘성 관능평가 점수 결과

Sample	Texture score					
	S1 <sup>1)</sup>	S2 <sup>2)</sup>	S3 <sup>3)</sup>	S4 <sup>4)</sup>	Bio-san <sup>5)</sup>	Water
Carrot	5.7±2.0 <sup>a</sup>	6.5±1.6 <sup>a</sup>	5.8±2.4 <sup>a</sup>	6.7±1.7 <sup>a</sup>	6.2±2.4 <sup>a</sup>	6.9±1.7 <sup>a</sup>
Cherry	6.2±2.0 <sup>a</sup>	6.1±2.2 <sup>a</sup>	5.8±2.2 <sup>a</sup>	5.8±2.3 <sup>a</sup>	6.2±1.9 <sup>a</sup>	6.3±1.8 <sup>a</sup>
Tomato						
Lettuce	5.9±2.1 <sup>a</sup>	6.4±1.9 <sup>a</sup>	6.4±2.2 <sup>a</sup>	6.6±2.0 <sup>a</sup>	5.1±2.5 <sup>a</sup>	6.4±2.1 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup> 백작약 : 오메자 : 육계 (3 : 6 : 1), <sup>2)</sup> 백작약 : 오메자 : 감초 (3 : 6 : 1), <sup>3)</sup> 오메자 : 육계 (8 : 2)

<sup>4)</sup> 오메자 : 감초 (8 : 2), <sup>5)</sup> 시중에 유통되고있는 천연보존제인 Bio-san

Values in the sharing a common letter are not significantly different (p≤0.05)



<Fig. 157> 시료의 씹힘성 관능평가

관능평가 중 전반적인 기호도에 대한 관능평가 점수 결과로 시제품을 처리한 당근은 5.1-6.1의 점수를 평가 받았고, 대조군인 Bio-san과 물을 처리한 군은 각각 5.1 와 6.0의 점수를 받음. 방울토마토는 시제품들이 5.7-6.7의 점수를 받았고 Bio-san과 물은 각각 6.3 과 6.2의 점수를 받음. 양상추의 시제품 점수는 5.0-6.2이고 대조군인 Bio-san과 물은 각각 4.8 와 5.5의 점수를 받음. 전반적인 기호도에서 또한 S2와 S4가 좋은 평가를 받았고 시중에 유통되고 있는 Bio-san의 경우 알코올 첨가로 인해 관능평가 점수가 떨어지는 것을 알 수 있음 <Table 69>.

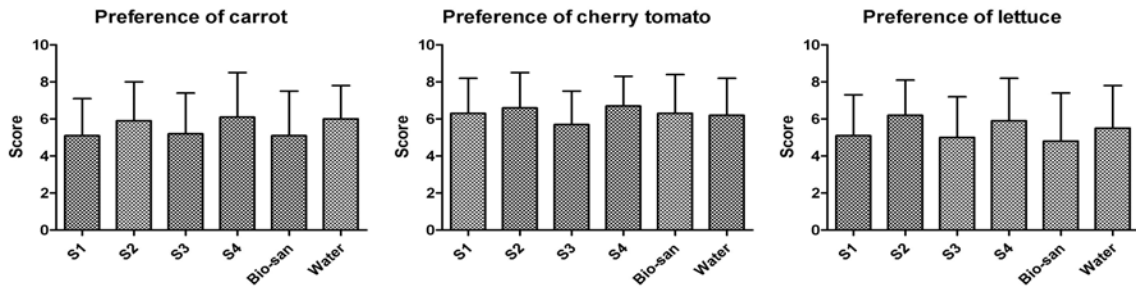
<Table 69> 시료의 전체적인 기호도 관능평가 점수 결과

Sample	Preference score					
	S1 <sup>1)</sup>	S2 <sup>2)</sup>	S3 <sup>3)</sup>	S4 <sup>4)</sup>	Bio-san <sup>5)</sup>	Water
Carrot	5.1±2.0 <sup>a</sup>	5.9±2.1 <sup>a</sup>	5.2±2.2 <sup>a</sup>	6.1±2.4 <sup>a</sup>	5.1±2.4 <sup>a</sup>	6.0±1.8 <sup>a</sup>
Cherry	6.3±1.9 <sup>a</sup>	6.6±1.9 <sup>a</sup>	5.7±1.8 <sup>a</sup>	6.7±1.6 <sup>a</sup>	6.3±2.1 <sup>a</sup>	6.2±2.0 <sup>a</sup>
Tomato						
Lettuce	5.1±2.2 <sup>a</sup>	6.2±1.9 <sup>a</sup>	5.0±2.2 <sup>a</sup>	5.9±2.3 <sup>a</sup>	4.8±2.6 <sup>a</sup>	5.5±2.3 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup> 백작약 : 오메자 : 육계 (3 : 6 : 1), <sup>2)</sup> 백작약 : 오메자 : 감초 (3 : 6 : 1), <sup>3)</sup> 오메자 : 육계 (8 : 2)

<sup>4)</sup> 오메자 : 감초 (8 : 2), <sup>5)</sup> 시중에 유통되고있는 천연보존제인 Bio-san

Values in the sharing a common letter are not significantly different (p≤0.05)



<Fig. 158> 시료의 전체적인 기호도 관능평가

4종의 시료를 대상으로 시제품의 관능평가 실시결과 S2와 S4가 가장 우수하게 평가됨. 이러한 결과는 최종 시제품의 선택에 근거로 채택됨.

<Table 70>시제품의 관능평가 결과

시제품	외관	향	맛	텍스처	기호도
S1	△	△	△	○	△
<b>S2</b>	<b>○</b>	<b>○</b>	<b>○</b>	<b>○</b>	<b>○</b>
S3	△	△	△	○	△
<b>S4</b>	<b>○</b>	<b>○</b>	<b>○</b>	<b>○</b>	<b>○</b>

S1 백작약 : 오배자 : 육계 (3 : 6 : 1)

S2 백작약 : 오배자 : 감초 (3 : 6 : 1)

S3 오배자 : 육계 (8 : 2)

S4 오배자 : 감초 (8 : 2)

※ ○ : 우수, △ : 보통, X : 미약

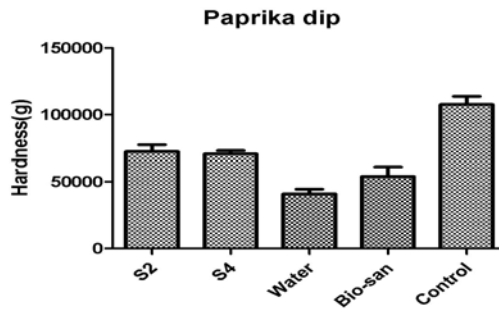
시제품 처리에 따른 표면 경도 변화를 측정하기 위하여 파프리카를 시제품에 침지시킨 후, 4일 뒤 표면 경도 변화를 texture analyzer를 이용하여 측정함. 시제품을 처리하지 않은 대조군과 시제품을 처리한 실험군의 표면 강도를 비교 측정함 <Table 71>.

<Table 71> 침지처리에 따른 파프리카 경도비교

Sample	Hardness (g)				
	S2 <sup>1)</sup>	S4 <sup>2)</sup>	Bio-san <sup>3)</sup>	Water	Control
Spray	75897.5±5115.9	70520.0±72305.0	59007.5±7110.0	38482.5±3517.9	107600.0±6081.1

<sup>1)</sup> 백작약 : 오배자 : 감초 (3 : 6 : 1), <sup>2)</sup> 오배자 : 감초 (8 : 2), <sup>3)</sup> 시중에 유통되고있는 천연보존제인 Bio-san

S2, S4 시제품을 처리한 파프리카가 증류수나 시중에 유통중인 Bio-san을 처리한 파프리카보다 경도가 더 높게 평가되어 초기 texture를 유지할 수 있는 경향을 나타냄 <Fig 159>.



<Fig 159> 침지처리에 따른 파프리카의 경도 비교 분석

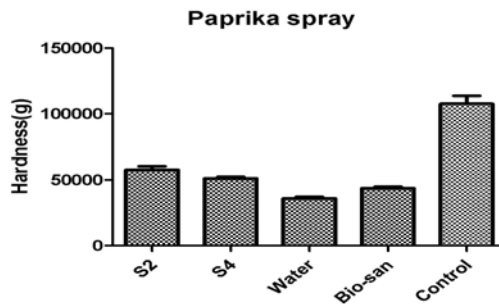
증류수와 Bio-san을 분무처리한 대조군과 시제품을 분무처리한 실험군의 표면 강도를 비교 측정함. Control은 초기 파프리카의 경도를 나타냄 <Table 72>.

<Table 72> 분무처리에 따른 파프리카 경도비교

Sample	Hardness (g)				
	S2 <sup>1)</sup>	S4 <sup>2)</sup>	Bio-san <sup>3)</sup>	Water	Control
Spray	57632.5±28674.3	51175.0±1209.1	35995.0±1152.5	43647.5±1262.1	1074600.0±6081.1

<sup>1)</sup> 백작약 : 오배자 : 감초 (3 : 6 : 1), <sup>2)</sup> 오배자 : 감초 (8 : 2), <sup>3)</sup> 시중에 유통되고있는 천연보존제인 Bio-san

S2, S4 시제품을 분무처리한 파프리카가 증류수와 Bio-san을 분무처리한 파프리카보다 경도가 더 높게 평가되어 초기texture를 유지할 수 있는 경향을 나타냄 <Fig 160>.



<Fig 160> 분무처리에 따른 파프리카의 경도 비교 분석

시제품 S2와 S4 모두 시료의 경도 유지에 뛰어나며 S2의 효능이 더 우수함을 알 수 있고, 처리 방법으로는 침지방향이 더 탁월한 것으로 평가됨 <Table 73>.

<Table 73> 시제품의 경도평가 결과

시제품	경도
S2	O
S4	O
Bio-san	△
Water	X

S2 백작약 : 오배자 : 감초 (3 : 6 : 1)

S4 오배자 : 감초 (8 : 2)

※ O : 우수, △ : 보통, X : 미약

## 제 6 절 천연보존제 생산공정 개발 및 제품화

### 1. 천연보존제 후보물질의 formulation

#### 가. 천연물 확보라인 조사

사전 기초문헌조사를 통해 선정된 총 43가지 대상 천연물의 국내 확보라인을 조사한 결과, 다양한 루트를 통하여 편리하고 신속하게 해당 천연물을 확보할 수 있음. 그러나 많은 천연물이 대부분의 경우, 중국 및 베트남이 원산지로서 정확한 산지의 추적에는 다소 어려움이 존재함. 한방천연물, 개화식물 및 수목류를 포함한 총 43가지 천연물의 구입처, 중량 및 단가는 아래와 같음 <Table 74, 75, 76>.

<Table 74> 한방천연물의 확보라인 조사

대상시료	품명	구입처	중량 (g)	단가 (원)
한방 천연물 (20가지)	감송향	옵니허브	500	5,400
	감초	옵니허브	500	15,000
	과루	한약재시장	600	3,300
	곽향	옵니허브	500	3,700
	목단피	옵니허브	500	5,500
	반지련	옵니허브	500	7,000
	반하	옵니허브	500	15,000
	백작약	옵니허브	500	11,500
	복령	옵니허브	500	5,200
	산두근	한약재시장	600	5,000
	산약	옵니허브	500	5,200
	소엽	한약재시장	600	6,000
	속단	옵니허브	500	6,000
	오매	옵니허브	500	5,500
	오배자	옵니허브	500	11,500
	유자	-	-	-
	육계	한약재시장	600	3,300
	육계	옵니허브	500	3,500
	천마	옵니허브	500	17,000
	황금	옵니허브	500	14,000
황련	옵니허브	500	16,400	

※ 옵니허브 : [www.omnishop.co.kr](http://www.omnishop.co.kr), 한약재시장 : [www.hanyakjae.net](http://www.hanyakjae.net)

<Table 75> 개화식물의 확보라인 조사

대상시료	품명	구입처	중량 (g)	단가 (원)
개화 식물 (14가지)	관동화	한약재시장	600	12,000
	괴화	한약재시장	600	6,500
	갯잎	롯데백화점	-	-
	고추	롯데백화점	-	-
	마늘	롯데백화점	-	-
	미역	롯데백화점	-	-
	백화사설초	한약재시장	600	4,500
	부추	롯데백화점	-	-
	생강	롯데백화점	-	-
	신이	한약재시장	600	5,500
	쑥	롯데백화점	-	-
	연자육	한약재시장	600	5,500
	오이	롯데백화점	-	-
	양파	롯데백화점	-	-

※ 한약재시장 : [www.hanyakjae.net](http://www.hanyakjae.net)

<Table 76> 수목류의 확보라인 조사

대상시료	품명	구입처	중량 (g)	단가 (원)
수목류 (9가지)	갈매보리수나무	몽골 채취	-	-
	녹차	-	-	-
	매실	롯데백화점	-	-
	소목	한약재시장	600	2,800
	유근피	한약재시장	600	4,000
	정향	한약재시장	600	9,000
	치자	한약재시장	600	4,000
	백련	한약재시장	600	5,000
	생두	-	-	-

※ 한약재시장 : [www.hanyakjae.net](http://www.hanyakjae.net)

#### 나. 제품 적용성 및 시장성 분석

사전 문헌조사를 통해 선정된 천연물의 제품화 적용가능성 및 시장경제성을 분석하기 위하여 제품 적용성 및 시장성 판단 근거를 설정하고 <Table 77>, 6가지 판단 근거의 가중치를 동일하게 설정하여 분석함. 그 결과, 한방천연물, 개화식물, 수목류 대부분 국내 라인을 확보하여 다양한 루트를 통해 편리하고 신속하게 구입할 수 있음. 또한 한약재로나 식재료로 쉽게 자주 접할 수 있고, 양대비 가격도 저렴하며 안전한 것으로 보아 시장성이 높은 것으로 사료됨. 한방천연물의 경우 감송향, 감초 및 백작약을 포함한 총 12가지 천연물이 시장성이 높은 것으로 판단되며, 감초를 제외한 나머지 천연물은 모두 제품화 경력이 없어 제품화 적용가능성이 높은 것으로 사료됨. 개화식물의 경우, 괴화, 마늘 및 백화사설초를 포함한 총 12가지 천연물이 시장성이 높은 것으로 판단되고, 개화식물의 경우도 현재까지 제품화 경력은 없었음. 수목류의 경우, 갈매보리수나무, 녹차 및 소목을 포함한 총 6가지 천연물이 시장성이 높은 것으로 판단되며, 현재 녹차는 제품화 경력이 있는 상태이며 추가적으로 자몽씨가 천연식품보존제로서 제



품화 되어 있음. 선정 천연물의 시장성 및 제품화 경력은 아래와 같음 <Table 78, 79, 80>.

<Table 77> 제품 적용성 및 시장성 판단 근거

항목	단가	가격 유동성	원재료 확보성	제품화 경력	유효효능
가중치	1	1	1	1	1

<Table 78> 한방천연물의 시장성 및 제품화 경력

대상시료	품명	시장성	제품화 경력	대상시료	품명	시장성	제품화 경력
한방 천연물	감송향	높음	없음	한방 천연물	소엽	높음	없음
	감초	높음	있음		속단	낮음	없음
	과루	높음	없음		오매	높음	없음
	곽향	높음	없음		오배자	낮음	없음
	목단피	낮음	없음		유자	높음	없음
	반지련	높음	없음		육계	높음	없음
	반하	낮음	없음		천마	낮음	없음
	백작약	높음	없음		황금	높음	없음
	복령	낮음	없음				
산두근	높음	없음	황련	낮음	없음		
산약	낮음	없음					

<Table 79> 개화식물의 시장성 및 제품화 경력

대상시료	품명	시장성	제품화 경력	대상시료	품명	시장성	제품화 경력
개화식물	관동화	낮음	없음	개화식물	부추	높음	없음
	괴화	높음	없음		생강	높음	없음
	갯잎	높음	없음		신이	높음	없음
	고추	높음	없음		쑥	높음	없음
	마늘	높음	없음		연자육	높음	없음
	미역	낮음	없음		오이	높음	없음
	백화사설초	높음	없음		양파	높음	없음

<Table 80> 수목류의 시장성 및 제품화 경력

대상시료	품명	시장성	제품화 경력	대상시료	품명	시장성	제품화 경력
수목류	갈매보리수	높음	없음	수목류	정향	높음	없음
	녹차	높음	있음		치자	높음	없음
	매실	낮음	없음		백련	높음	없음
	소목	높음	없음		생두	낮음	없음
	유근피	높음	없음				

다. 기존 천연보존제 제품화 현황

사전 문헌조사 결과, 현재 제품화되어 시중에 유통되고 있는 천연보존제 첨가물 현황은 다음 <Table 81>과 같음. 대부분이 과일 또는 한방천연물, 수목류에 속하며 쉽게 접할 수 있고, 보존제 외에 음료나 식품으로서 더 널리 사용되고 있음.

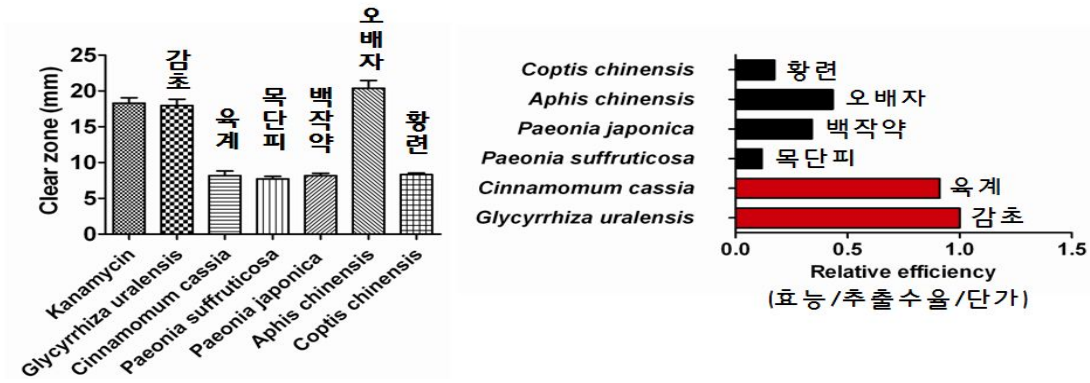
<Table 81> 기존 천연보존제 제품화 현황

자몽추출물	성분	자몽씨추출물, 글리세린
	특징	○ 식품첨가물공전에 천연첨가물로 등재되어 있음. ○ 사용대상 식품의 제한이 없음.
	효과	○ 세균, 곰팡이, 바이러스 등의 부패성 및 병원성 미생물에 대해 살균 작용을 함. ○ 항산화기능이 있어 지방의 산패를 방지하고, 산패취 발생을 억제함.
복합황금추출물	성분	황금, 감초, 대추, 황기
	특징	○ 액상이며 이취가 적음.
	효과	○ <i>E. coli</i> 와 <i>S. aureus</i> 에 대한 항균력이 뛰어남. ○ 관능적으로 우수함.
복합황금추출분말	성분	황금, 녹차, 썩, 어성초, 유자
	특징	○ 수용성 분말제품으로 사용 편의성이 높음.
	효과	○ 진균 및 곰팡이에 대한 항균 활성이 뛰어남.
황금녹차혼합추출물	성분	황금, 녹차, 썩, 어성초, 유자
	특징	○ 페이스트상이며 이취가 적음.
	효과	○ 진균 및 곰팡이에 대한 항균 활성이 있음.

라. 항균효능 평가를 통한 적용가능성 및 시장성 분석

3가지 대상균에 대해 항균효능 평가가 이루어진 천연추출물을 대상으로 항균효능, 추출수율 및 단가 3가지 요소를 고려하여 이를 제품화 가능성 및 시장성을 분석함. 그 결과 *E. coli*에 대해서는 감초와 육계가 상대적 효용성이 탁월한 것으로 나타남. 이는 사전 적용가능성 및 시장성 분석과 일치함 <Fig. 161>.

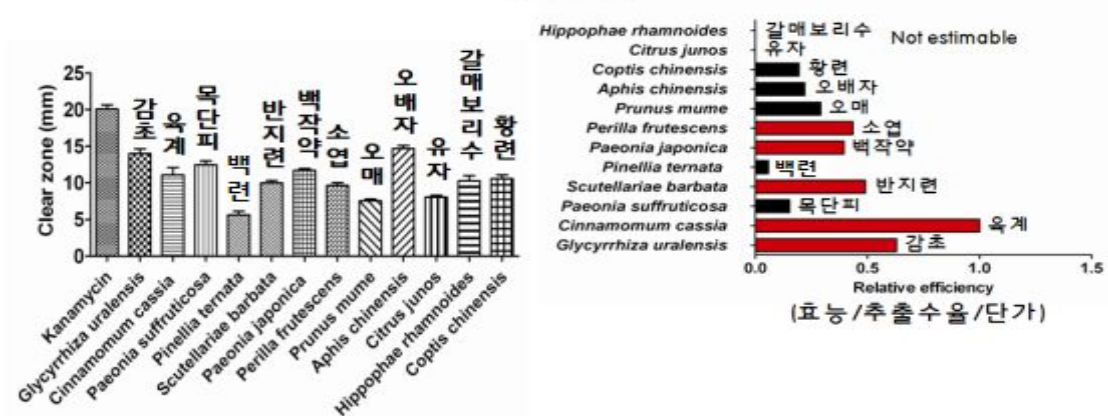
*E. coli*



<Fig. 161> *E. coli*에 대해 항균효능을 갖는 천연추출물의 적용가능성 및 시장성 분석

*B. cereus*에 대해서는 감초, 육계, 반지련, 백작약 및 소엽이 상대적 효용성이 탁월한 것으로 나타남. 이 또한 사전 적용가능성 및 시장성 분석과 일치함 <Fig. 162>.

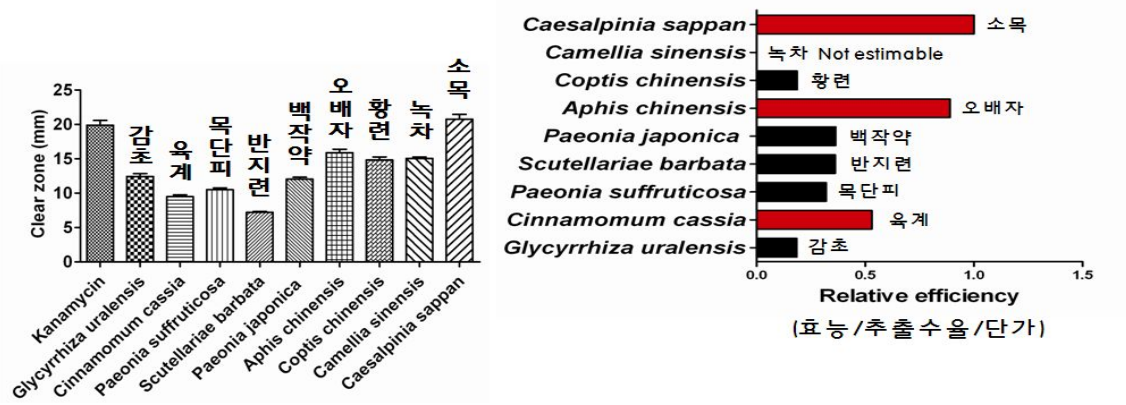
*B. cereus*



<Fig. 162> *B. cereus*에 대해 항균효능을 갖는 천연추출물의 적용가능성 및 시장성 분석

*S. aureus*에 대해서는 육계, 오배자 및 소목이 상대적 효용성이 탁월한 것으로 나타남. 낮은 시장성을 보이는 오배자를 제외한 육계와 소목은 사전 적용가능성 및 시장성 분석과 일치함 <Fig. 163>.

*S. aureus*



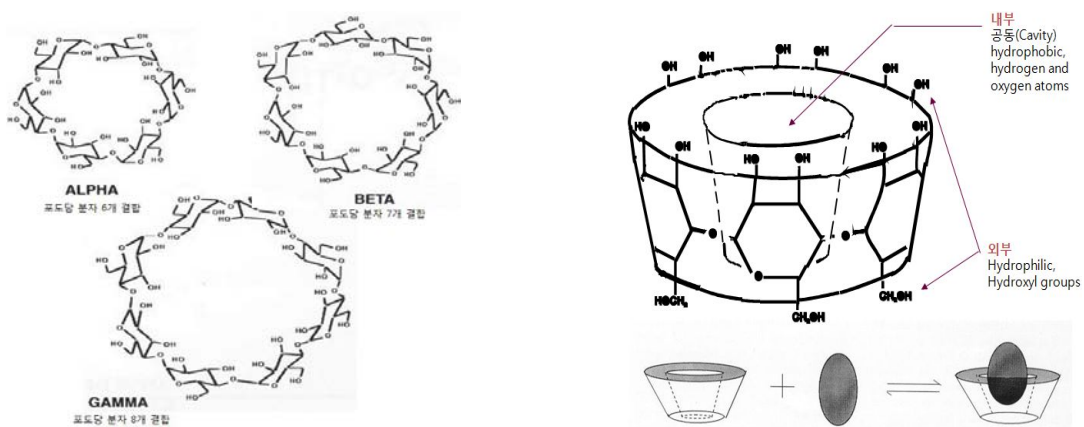
<Fig. 163> *S. aureus*에 대해 항균효능을 갖는 천연추출물의 적용가능성 및 시장성 분석

## 2. 천연보존제의 적용성 증대

### 가. Masking기법 개발 및 적용

천연보존제를 시제품화 하기에 앞서 대상 식품의 향, 질감 등에 영향을 미쳐서는 안 되므로 천연물이 가지는 고유의 향을 억제해야 할 필요성이 있음. 이취를 최소화하는 방안으로는 Masking기법에 의한 저감화, 다른 물질과의 결합을 통한 저감화, 제조과정 개선을 통한 저감화 방법 등이 있음. 위 결과를 통해 선별된 감초, 육계는 대상균 특이적인 항균활성을 나타내지만, 이미 제품화 되어 널리 쓰이고 있을 정도로 관능성이 뛰어나 시제품화시 첨가하여 이취를 최소화 하고자 함. 또한 문헌조사를 통해 선정한 싸이클로덱스트린 (cyclodextrin)을 첨가함으로써 이취를 제거하고 천연추출물 본연의 항균효능을 유지할 수 있는 최적의 조건 및 방법을 적용함.

싸이클로덱스트린은 전분을 원료로 효소반응에 의해 제조되는 환상구조의 기능성 올리고당으로 유기물의 포접에 의한 복합체 형성, 유기물/무기물과 hydroxyl group의 결합에 의한 복합체를 형성함. 싸이클로덱스트린의 성분 및 구조는 아래와 같음 <Fig. 164>. 싸이클로덱스트린은 열에 대해 안정하여 약 300 °C에서 분해되고, 산, 염기에 대해서도 안정하여 거의 분해되지 않음. 또한 열, 빛에 의해 분해되기 쉬운 물질을 안정화 시켜주고 식품의 저장성을 향상시켜줘 masking제제로써 탁월함.



<Fig. 164> 싸이클로덱스트린 성분 및 구조

### 3. 천연보존제 시제품 제작

#### 가. 최종 시제품 선정 조건 및 성분함량

다양한 혼합추출물의 항균효능 평가, 관능평가, 기능성평가, 안전성평가를 고려하여 최종 시제품을 제작함. 시제품의 선정 조건 및 성분함량은 아래와 같음 <Table 82>, <Table 83>. 4가지 혼합추출물 모두 항균효능과 안전성은 뛰어나나, 관능평가지 육계가 함유된 샘플에서는 선호도가 많이 떨어짐. 추가적으로 S1, S3 샘플은 제외하고 S2, S4 샘플에 대해서 기능성평가를 수행한 결과, 백작약이 함유된 S2 샘플의 기능성이 탁월하게 나타남. 따라서 S2 샘플을 최종 천연보존제 시제품 조건으로 선정하여 제작함.

<Table 82> 천연보존제 시제품 선정 조건

혼합추출물		혼합비율	항균효능	관능평가	기능성평가	안전성평가
S1	백작약 : 오배자 : 육계	3 : 6 : 1	O	X	O	O
<b>S2</b>	<b>백작약 : 오배자 : 감초</b>	<b>3 : 6 : 1</b>	<b>O</b>	<b>O</b>	<b>O</b>	<b>O</b>
S3	오배자 : 육계	8 : 2	O	X	△	O
S4	오배자 : 감초	8 : 2	O	O	△	O

※ O : 우수, △ : 보통, X : 미약

<Table 83> 천연보존제 시제품 성분함량

천연보존제 시제품 성분함량	
혼합추출물 [1mg/mL 기준] (공정에 따라 농축액 적용 가능)	90 (%)
정제수 (용도에 따라 식용알코올 적용 가능)	5 (%)
싸이클로텍스트린	5 (%)

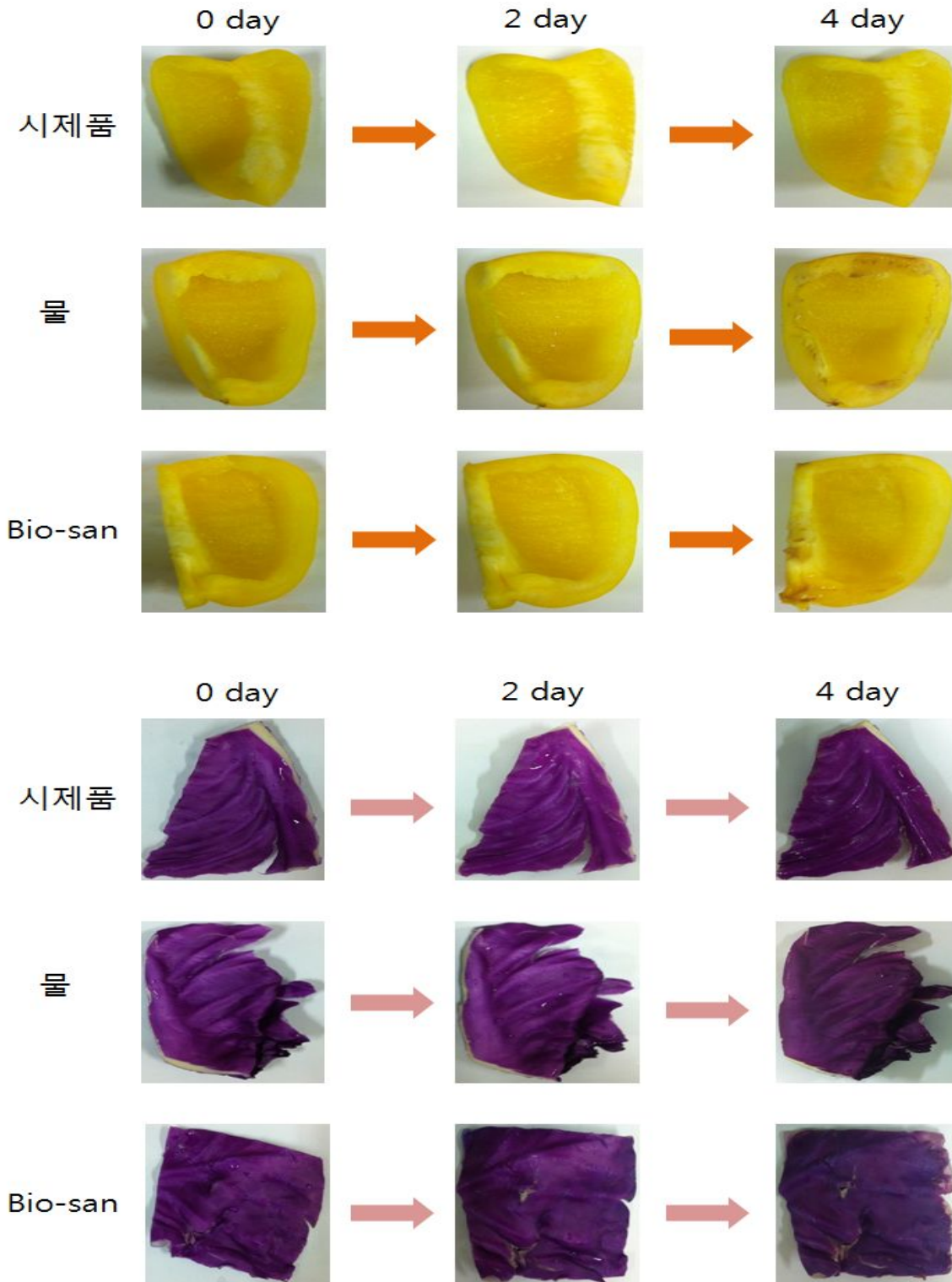
#### 나. 기존제품과의 비교평가

제작된 시제품을 현재 시중에 유통되고 있는 천연 식품신선도 보존제 바이오산과의 비교평가를 위해 파프리카, 적채, 콜라비에 적용함. 항균효능과 항갈변능을 채소를 대상으로 직접 적용함으로써 추후 제품 개발 시 지표근거로 삼고자 함.

##### (1) 항갈변능 비교평가

적용채소로는 파프리카, 적채를 선정함. 제작된 시제품과 바이오산, 증류수에 절단한 파프리카를 분무한 후, 24시간 간격으로 확인함. 2일 후부터 물과 바이오산에 처리한 파프리카에서 갈변현상이 나타났으며, 4일 후에는 갈변현상이 뚜렷하게 보이고 갈변으로 인한 무름현상도 같이 확인됨. 시제품에서도 무름현상은 나타나기 시작했으나, 물과 바이오산보다 약했으며 갈변현상도

더디게 나타남. 추가적으로 적체를 시제품과 바이오산, 증류수에 침지한 후, 24시간 간격으로 확인함. 적체 고유의 색으로 인해 파프리카보다 갈변현상이 뚜렷하게 보이지 않지만 2일 후부터 점차 시드는 것을 확인함. 또한 바이오산에 침지한 샘플은 2일째부터 탈색현상이 나타나기 시작함. 이는 바이오산이 함유하고 있는 발효주정으로 인한 현상으로 사료됨 <Fig. 165>.

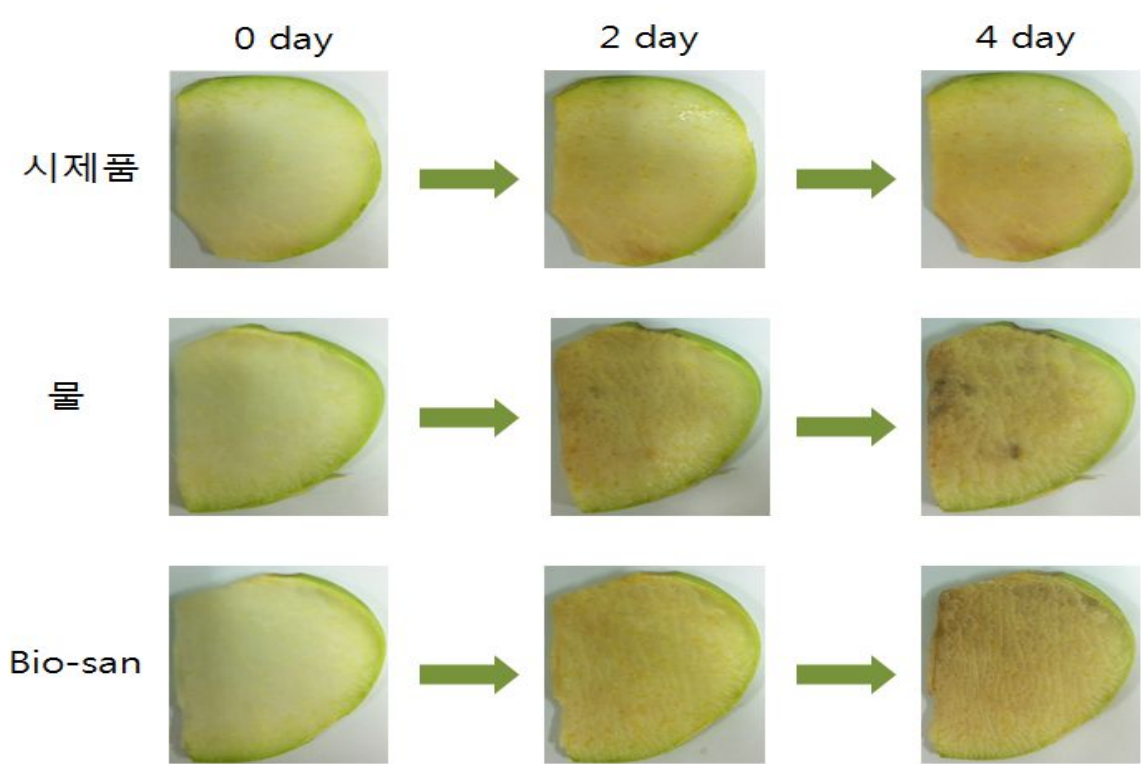


<Fig. 165> 침지 및 분무에 따른 향갈변능 비교 측정



(2) 항균효능 비교평가

콜라비에 *E. coli*와 *S. aureus*를 접종시킨 후, 시제품과 바이오산, 증류수에 침지하여 24시간 간격으로 확인함. 물에 침지한 샘플은 1일 후부터 균이 배양되어 부패가 진행되기 시작했으며, 바이오산은 2일 후부터 부패가 확인됨. 4일 후에는 물에 침지한 샘플은 90%정도 부패되었고, 바이오산에 침지한 샘플은 60%정도 부패됨. 반면 시제품에 침지한 샘플은 20%정도 부패되어 시제품의 항균효능을 확인함 <Fig. 166>.



<Fig. 166> 침지에 따른 항균효능 비교 측정



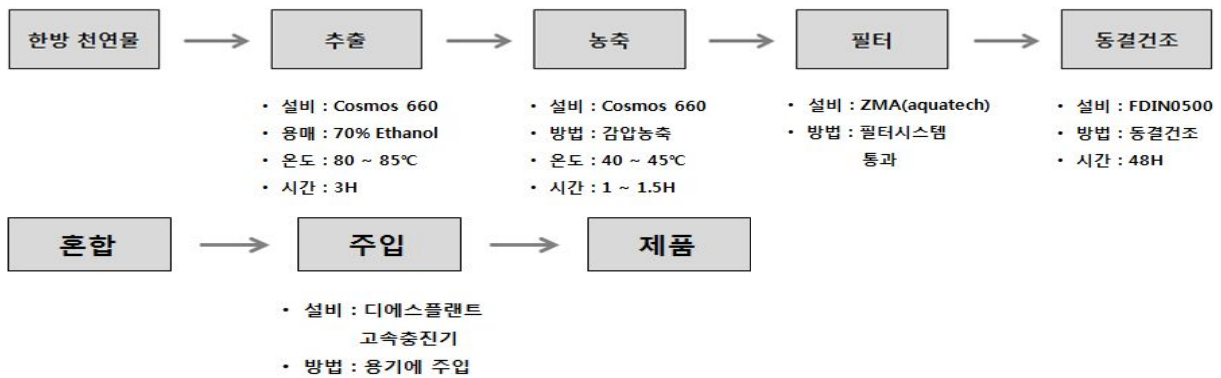
다. 제형화 공정라인 최적화 설계

(1) 생산설비 디자인

천연보존제인 네이처베스트의 생산성을 높이고 효율적으로 관리하며, 품질의 표준화를 위하여 확립된 실험방법에 알맞은 생산 설비를 확인 및 확보하는 것이 중요함. 뿐만 아니라 생산설비 계획은 추출을 위한 온도와 시간에 대한 공정법의 신뢰 확보를 위하여 반드시 이루어져야 하는 단계임.

(2) 생산단계

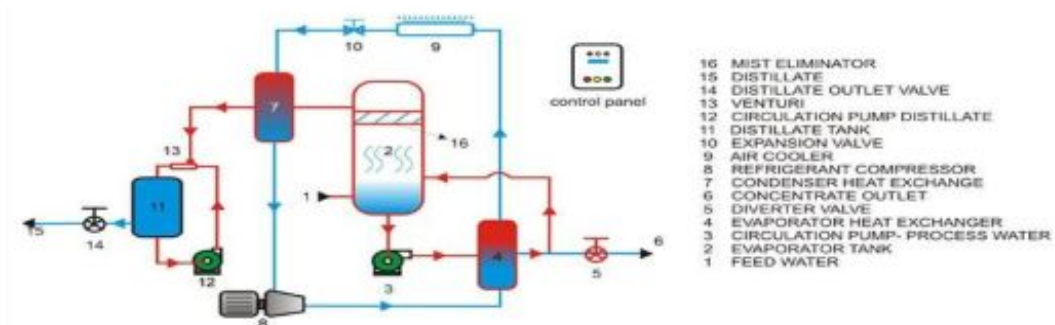
네이처베스트의 생산은 크게 두 가지 단계로 한방 천연물을 추출하는 추출단계와 추출된 파우더 형태의 한방 천연물과 증류수를 혼합하는 혼합단계로 나눌 수 있음 <Fig. 167>.



<Fig. 167> 시제품 생산단계

(가) 추출 및 농축 단계

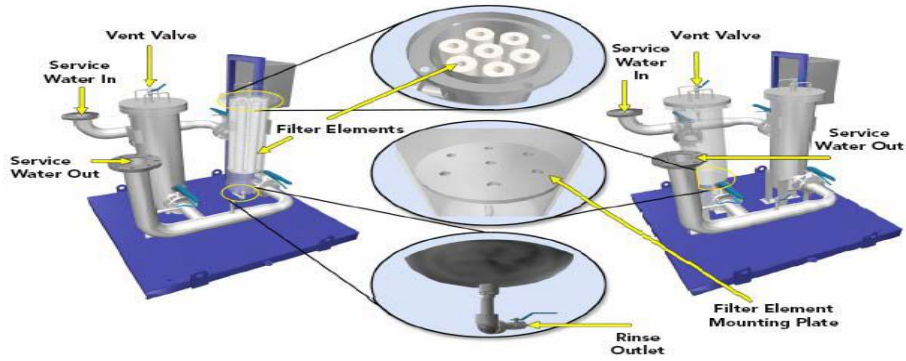
추출단계에서는 한방천연물을 extract 장치를 이용하여 추출 후, 감압농축기를 이용한 농축 과정을 거치게 되며 농축액은 필터를 거쳐 동결건조 과정을 거쳐 파우더형태로 제작되며 추출과 농축과정의 모식도는 다음과 같음 <Fig. 168>.



<Fig. 168> 추출 및 농축과정 모식도

(나) 필터링 단계

추출 및 농축과정이 완료된 한방추출물은 다음과 같은 필터링 과정을 거쳐 불순물을 제거함 <Fig. 169>. 이 필터 시스템의 경우, 제약과 식품, 주류, 음료 여과에 주로 사용되는 필터 시스템으로 시스템에 가해지는 압력은 10kg/cm<sup>2</sup>로 작동됨.



<Fig. 169> 필터 시스템의 모식도

(다) 동결건조 단계

필터 시스템을 통과한 한방추출물은 동결건조 과정을 통해 파우더 형태로 만들게 되며, 이때 사용되는 동결건조 시스템은 다음과 같음 <Fig. 170>.



<Fig. 170> 동결건조 시스템

(라) 주입 단계

동결건조 과정까지 완료된 한방추출물이 파우더 형태가 되면, 혼합조에 넣어 증류수, 싸이클로덱스트린과 혼합한 후, 제작된 용기에 주입하여 제품을 완성함 <Fig. 171>.



<Fig. 171> 주입단계 과정

생산라인에 위와 같은 생산 설비를 구축 시, 대형 스케일의 생산을 표준화 할 수 있게 되며 생산효율을 높일 수 있음.

라. 제품의 경제성 분석

1L 용량의 시제품을 제작할 때의 필요한 단가는 다음과 같음 <Table 84>. 현재 유통되고 있는 바이오산제품 1L와 비교했을 때 시제품이 약 458원 가량 적은 단가로 제작이 가능하며, 적용한 단가는 소비자가격으로 추후 공장화 시스템에서 대용량으로 제작할 시, 아래가격보다 20%이상 저렴한 가격으로 제작이 가능할 것으로 사료됨.

<Table 84> 시제품의 제작 단가

재료	단가	추출 효율	예상 가격
오배자	11,500원 (500G)	80%	17.25원
백작약	11,500원 (500G)	6%	115원
감초	15,000원 (500G)	24%	12.6원
싸이클로텍스트린	75,000원 (15KG)	-	250원
주정	39,000원 (20L)	-	113원
용기제작	용기 1,000원 (1L/개) 라벨 54원 (개)	- -	1,000원 54원
임가공비	인건비 100,000원 (일) 주입비 30원 (개)	- -	200원 30원
<b>합계</b>		<b>1,792 원/L</b>	
<b>바이오산</b>		<b>2,250 원/L</b>	

※인건비기준: 100,000원/일, 8시간 근무, 하루 1,000개 생산, 2인 생산 방식

마. 제품의 시장성 분석

(1) 국내시장 규모

현재 국내 시장의 규모를 바탕으로, 제품의 사용률을 분석하고 확인함에 따라 제품 예상판매 금액을 예측하고 제작 규모를 확인하고자 함. 현재 연구 개발된 시제품은 식품에 침지 혹은 분무하여 식품의 신선도 유지 및 각종 세균을 제거해 주는 목적으로 개발된 제품으로 주 사용처는 식품을 제조하는 공장 혹은 식품을 취급, 판매하는 외식관련 업종의 프랜차이즈 점, 일반가정이 될 것임. 이점에 착안하여 프랜차이즈 점포의 수를 예상하여 네이처 베스트의 판매 규모를 판단할 수 있음.

공정거래위원회에서 제시한 2010년 기준 프랜차이즈 점포의 규모는 전체 분야를 통틀어 대략 15,300개의 점포가 국내에 분포되어 있으며, 업종 별 프랜차이즈 점포의 수를 패스트푸드, 제과제빵, 기타 외식분야로 나눌 때, 패스트푸드를 취급·판매하고 있는 매장의 수는 약 5,000개이며, 제과제빵과 관련된 프랜차이즈 점포의 수는 약 600개, 그리고 기타 외식분야의 프랜차이즈 점은 약 4000개의 매장이 국내에 존재하고 있음 <Table 85>.

<Table 85> 국내 분포 되어 있는 프랜차이즈 현황 (2008~2010)

업종	2008	2009	2010
패스트푸드	3,419	4,716	5,145
제과제빵	478	561	601
기타외식	3,625	3,896	4,178
총계	7,522	9,173	9,924

(2) 국내시장 규모에 따른 예상 확보량

국내 분포 되어 있는 총 프랜차이즈 점포수는 15,654개이며, 대략적으로 15,000 개로 나타냄. 국내시장 중에 경쟁제품들을 감안하여 시제품을 판매할 수 있는 점포의 수가 15,000개 이며, 시장 점유율을 10%로 산정하였을 경우, 네이처베스트는 15,000개의 10%인 1,500개 내외의 국내 점포에서 사용할 것이라고 추정할 수 있음.

$$15,000(\text{전국 프랜차이즈 점포 수}) \div 10\%(\text{시장점유율}) = 1,500(\text{네이처베스트 사용 점포 수})$$

여기에 각 점포당 한 달 사용 금액을 30,000원으로 책정한다면, 4,500만원의 월 매출을 예상할 수 있음.

$$1,500(\text{네이처베스트 사용 점포 수}) \div 30,000 \text{ 원}(\text{각 점포당 한 달 사용량}) = 45,000,000 \text{ 원}$$

그러므로 이러한 매출 산출 방법에 의하여 연매출을 계산하면 1년에 540,000,000원, 즉, 5억 4000만원의 매출을 예상할 수 있음.

마. 최종제품 제작

항균효능, 관능평가, 기능성 평가, 안전성 평가결과를 종합하여 최종제품을 제작함. 분무 및 침지 방식의 500 mL, 1 L, 10 L 3가지 유형으로 제작함. 500 mL은 분무식 희석액으로 가정에서도 손쉽게 사용할 수 있고, 1 L와 10 L는 침지식 농축액으로 5배로 희석하여 사용하며, 업소에서 사용할 수 있도록 대용량으로 제작함 <Fig. 172>.



A. 분무식 (1 x 원액)

B. 침지식 (5 x 농축액)

<Fig. 172> 최종제품 (분무식 및 침지식 타입)

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 목표달성도

#### 1. 1차년도

연구개발내용	추진계획												결과 (%)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
천연보존제 개발 대상 천연물의 항균성 및 기능성에 대한 rapid screening	■	■	■										100
천연추출물의 1차적 항균활성 분석			■	■	■	■	■						100
세포실험 및 분자생물학적 기법을 통한 천연추출물의 기능성 분석							■	■	■	■	■	■	100
세포실험을 통한 천연추출물의 좌적 인체안전성 검증							■	■	■	■	■	■	100
천연보존제 후보성분의 보존능 평가									■	■	■	■	100
식물유래 천연물 후보소재 선정	■	■	■	■	■								100
천연항균물질 추출법개발을 위한 추출 조건 최적화					■	■	■	■	■				100
후보 추출물 분획 공정기술 개발								■	■	■	■	■	100
분리된 후보 추출물 유효성분의 정성·정량분석									■	■	■	■	100
후보 천연보존제의 채소류 적용성 (제품성) 평가									■	■	■	■	100
천연물 국내 확보라인 조사	■	■	■	■	■	■	■	■					100
적용성 및 시장경제성 조사 및 분석							■	■	■	■	■	■	100

가. 천연보존제 개발 대상 천연물의 항균성 및 기능성에 대한 rapid screening

- (1) 천연물의 천연보존제 적용 평가기법 개발
- (2) 항균성에 대한 rapid screening
- (3) 동물세포 대상 안전성 및 항산화능 rapid screening
- (4) 최적화 추출 천연물의 항균성 rapid screening

나. 항균 감수성 평가를 통한 천연추출물의 1차적 항균활성 분석

- (1) 그람 양성균 및 그람 음성균 대상 항균감수성 분석
- (2) 천연보존제 적용 한방천연물의 항균효능에 대한 최소저해농도 설정

다. 세포실험 및 분자생물학적 기법을 통한 천연추출물의 항산화·항암효능 분석

- (1) 천연추출물의 항산화 작용 분석
- (2) 천연보존제 적용 대상 추출물의 세포 작용에 대한 분자생물학적 조사
- (3) Proteomics 기법을 적용하여 천연추출물의 작용 기전 분석

라. 세포실험을 통한 천연추출물의 1차적 인체안전성 검증

- (1) 세포생존율의 변화 분석

마. 천연보존제 후보성분의 보존능 평가

- (1) DPPH radical scavenging activity 분석

바. 식물유래 천연물 소재 선정

- (1) 총 43종 선정 - 한방천연물 20종, 개화식물 14종, 수목류 9종 선정

사. 천연항균물질 추출법개발을 위한 추출 조건 최적화

- (1) 중심합성계획법, Mini TAP 통계프로그램에 의거한 추출조건 최적화

아. 분리된 후보 추출물 유효성분의 정성·정량분석

- (1) 선별된 6종에 대한 HPLC 분석

자. 6종 후보 천연보존제의 채소류 적용성(제품성) 평가

- (1) 채소에 적용하여 색, 향, 맛 등의 관능평가



2. 2차년도

연구개발내용	추진계획												결과 (%)	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
혼합조성비 적용 천연추출물 항균효능 및 기능성 극대화														100
기존 화학보존제와 개발된 천연보존제 처리에 따른 RTE 채소류의 항균성 비교평가														100
RTE 채소류 적용 기존 천연보존제와 개발된 천연보존제 처리의 항균성 비교평가														100
개발된 천연보존제가 적용된 RTE 채소류의 생물학적 세포학적 작용 평가														100
천연추출물의 부가적 기능성 효과 평가														100
개발된 천연보존제가 처리된 RTE 채소류의 1차적 안전성 검증														100
파일럿 동물실험을 통한 천연보존제의 독성 및 인체안전성 평가														100
천연보존제 최적농도 설정 및 채소류 처리기법의 최적화														100
천연보존제 처리에 따른 RTE 채소류의 중량 변화 평가 및 분석														100
천연보존제 처리에 따른 RTE 채소류의 표면색도(갈변화) 평가 및 분석														100
천연보존제 처리에 따른 RTE 채소류의 표면경도 변화 평가 및 분석														100
천연보존제 처리에 따른 RTE 채소류의 관능지수 및 품질변화 평가 및 분석														100
기존 화학보존제, 천연보존제와의 효능 및 시장성 비교연구														100
천연보존제의 이취제거 및 적용 RTE 채소류의 관능평가														100
관능적 특성을 감압한 천연보존제 masking formula 개발														100
시제품 마케팅 전략 개발														100

가. 선별된 후보물질에 대한 소동물(생쥐) 대상 독성 및 안전성 평가

(1) 해부학적 평가 및 효소학적 평가

나. 선별된 후보물질의 최적화 추출물 선정

(2) 중심합성계획법과 Mini TAP 통계프로그램에 의거한 항균효능 비교평가

다. 화학보존제 성분과 선별된 후보물질의 항균활성 비교평가

(1) 국내 및 수입식품에 쓰이는 대표적인 화학보존제 성분의 항균효능 평가

라. 혼합조성비 적용 항균효능 극대화

(1) 감초, 목단피, 황련 혼합 (1 : 2 : 7)

(2) 오배자, 백작약, 육계 혼합 (7 : 2 : 1)

(3) 오배자, 백작약, 감초, 육계 혼합

마. 인간 세포실험을 통한 in vitro 인체안전성 검증

(1) 정상세포에 대한 세포생존율의 변화 분석

바. 세포실험 및 분자생물학적 기법을 통한 혼합 및 개별추출물의 기능성 분석

(1) 항산화·항암효능 분석

(2) Proteomics 기법을 적용한 작용 기전 분석

사. 천연보존제 최적농도 및 처리기법의 최적화

(1) 최적화 추출법으로 추출된 추출물의 항균 평가 실시

(2) 침지 시간의 최적화 확립을 위하여 침지시간(5분, 15분, 30분)을 달리하여 도출

아. 천연보존제 처리에 따른 식품 품질 평가 및 분석

(1) 중량변화, 표면색도 변화, 표면경도 변화, 관능평가

자. 6종의 천연보존제 후보물질 처리한 채소류 관능 평가

(1) 외관, 향, 맛, 씹힘성, 전체적 기호도

차. 기존 합성보존제 및 천연보존제와의 비교 연구

(1) 문헌조사를 통한 유형 및 목적에 따른 추후 시제품 개발 방향 설정

카. 이취제거 기법 적용 및 개발

(1) 항균효능 및 관능평가 결과를 통한 이취제거 천연물 선정

(2) Masking 제제 선별

### 3. 3차년도

연구개발내용	추진계획												결과 (%)	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
천연보존제 유효성 평가 및 검증														100
총균수 변화 측정을 통해 세균작용 감변의 억제에 대한 유통안전성 평가														100
천연보존제 처리 후 지표물질 잔존율 분석														100
천연보존제 처리에 따른 식품의 관능 평가														100
최종 천연보존제 scale-up 생산기법 표준화														100
최종 제품화된 천연보존제의 추출공정과 formulation 공정에 관한 파일럿 규모의 생산														100
천연보존제의 제품가격을 설정하여 경제적 실수요 호응도 조사 및 시장성 분석														100

가. 천연보존제 유효성 평가 및 검증

(1) 시제품의 향균효능 및 적정량 적용 평가

나. 총균수 변화 측정을 통해 세균작용 감변의 억제에 대한 유통안전성 평가

(1) 식품공전에 의거한 *In vitro*상에서의 99.9% 이상 살균농도 설정

다. 천연보존제 처리에 따른 식품의 관능 평가

(1) 색의 변화, 향, 맛, 조직감, 씹힘성, 전체적인 외형

라. 최종 천연보존제 scale-up 생산기법 표준화

(1) 기존 식품보존제의 제조공정 분석 및 비교

마. 최종 제품화된 천연보존제의 추출공정과 formulation 공정에 관한 파일럿 규모의 생산

(1) 잔존을 평가를 통한 공정 최적화

바. 천연보존제의 제품가격을 설정하여 경제적 실수요 호응도 조사 및 시장성 분석

(1) 시장규모조사를 통한 제품 호응도 평가

## 제 2 절 관련분야의 기여도

### 1. 기술적 측면

- 가. 천연물 소재를 활용하는 식품 적용 천연보존제는 현재 국내외적으로 체계적인 상품화 연구가 진행되지 않은 상황으로, 본 사업을 통하여 안정성과 기능성을 보유하는 천연보존제를 연구 개발하고 상품화함으로써 기존 보건의료 시장에서 뒤떨어진 천연물 활용기술에 대해 국내 기술을 농업분야에서 만회하는 한편, 세계시장에서 우위를 점할 수 있는 천연물 활용 기술 개발의 기반을 마련할 수 있음.
- 나. 신선채소류, 즉석 편이식품, 축산품 등의 국가간 수출 증대와 유통체계 복잡화에 따라 식인성질병(foodborne disease)을 일으킬 수 있는 위해미생물의 식품 오염의 관리가 중요시되고 있으며, 이에 따른 자연친화적 항균제의 평가기술 개발과 제품 개발 연구결과는 향후 식품보존제 개발연구에 기여할 수 있는 기초 자료를 제공할 것임.
- 다. 유기농 농산물에 대한 소비자 수요 증가에 따라 농식품에 적용하는 세척제제 및 식품첨가물에 대한 천연물 소재를 개발함으로써, 화학제제 사용에 따른 인체위해성을 감소시키고 천연물 소재 자체가 가지는 기능성을 식품에 부가하는 효과를 부과하여 고부가가치 농산물 관리에 기여할 수 있음.
- 라. 세척단계와 포장단계의 각 단계별 유형에 따라 효과적으로 적용될 수 있는 천연보존제 적용기술 개발은 다양한 RTE 채소류 및 과일류의 상품 유통을 원활히 하고 식품안전성 확보에 크게 기여할 수 있음.
- 마. 신선채소 적용 천연보존제를 추출/분획하는 기술을 개발함으로써 다양한 천연물 소재 유효 성분 추출/검증에 대한 고유기술을 확보할 수 있으며, 본 연구에서 적용된 소재의 효능에 대한 최적화 추출기법 연구는 천연유래 소재를 활용하는 기타 기능성 식품류 및 첨가물 개발에 있어 기능성을 향상시킬 수 있는 기법을 제시함.
- 바. 본 사업을 통해 개발되는 식물유래 한방약용 작물을 대상 원료로 하는 천연보존제 추출 생산기술은 다양한 기능성 작물을 대상으로 하는 농업 분야뿐만 아니라, 약용작물을 적용하는 신약 개발 등의 의료보건 기술 분야에 신기술을 보급하는 효과를 파생시킬 것임.
- 마. 본 연구를 통해 천연물의 항산화 및 항암 작용 등에 대한 기능성과 식품 위해 세균에 대한 항미생물 효능에 대한 심도 있는 결과가 도출되었고, 이러한 결과의 국제학술대회 발표 및 국제 학술지에 게재함으로써 국내 한방 작물의 기능성에 대한 발굴과 채소류를 대상으로 하는 천연보존제 개발 연구 분야에 학문적 기여를 할 수 있음.

## 2. 경제·산업적 측면

- 가. 신선편이 채소류의 시장 점유율 증가 추세로 볼 때, 본 연구에서 개발된 연구결과를 기초로 향후 개선되어 시제품화 되는 천연보존제의 본격적인 산업화 이후 5년간 직접적 경제효과는 약 200억원으로 추산되며, 한방식물의 활용성 증대에 따른 경제적 파급효과 100억원과 채소류 및 과실류 적용에 따른 부가가치 창출액 약 500억원으로 합계 750억원의 경제 기대효과를 예상하고 있음.
- |           |                      |
|-----------|----------------------|
| 직접 경제효과   | 20,000(백만 원)         |
| 경제적 파급효과  | 10,000(백만 원)         |
| 부가가치 창출액  | 50,000(백만 원)         |
| <b>합계</b> | <b>80,000 (백만 원)</b> |
- 나. 신선편이 채소류의 식품안전성을 제고할 수 있는 신개념의 천연보존제 개발 및 처리는 수요가 증대되고 있는 포장용 신선편이 채소류 제품의 매출신장으로 이어져 국내 채소 생산 농가의 소득증대 및 수출 증대에 기여할 것임.
- 다. 전 세계적으로, 특히 선진화가 진행되는 국가들을 중심으로, 신선 채소류 포장식품의 시장 규모는 향후 계속 확대될 것으로 예측됨. 본 연구에서 수행된 국내 유용작물로부터 추출된 천연보존제 개발과 이에 대한 효능 및 기능성 확립을 통해 향후 세계시장의 천연식품 보존제 생산에 국내에서 생산되는 약용작물과 기능성 작물이 적용될 수 있는 새로운 수요를 창출할 수 있을 것으로 예상함.
- 라 국내를 비롯한 전 세계적인 신선채소식품류의 매출 증대에 편승하여 채소/채소 농가의 소득향상 및 경제 활성화의 견인차가 될 수 있음.
- 마. 침체된 국내 식품 안전성관련 업계에 새로운 산업아이템을 부여하여 관련 산업의 활성화에 기여할 수 있음.
- 바. 국내에 농작되는 식물유래 천연물질을 활용한 제품개발은 국가 자원의 고부가가치화 향상과 국제적 농가공식품 경쟁력을 높일 수 있을 것임.
- 사. 기존에 사용되고 있는 염소계 및 화학제제 식품보존제는 강력한 산화력으로 오히려 채소류의 갈변을 촉진시켜 보존능 및 유통기한을 감축시키는 결과를 초래함. 반면 본 연구에서 개발된 제품 중 하나인 고기능성 분사식 천연보존제는 소비자가 가정에서 채소류에 직접적으로도 적용이 가능하며, 이를 통해 장기간 항균·항산화 효과에 의한 채소의 보존능을 높일 수 있고, 식품안정성과 부가적인 기능성 또한 높여 웰빙시대에 경쟁력 있는 제품으로서 시장성이 높음.
- 아. 현재 웰빙에 대한 소비자의 욕구 증대로 인하여 농산물에 대한 화학보존제 처리와 이에 따른 부정적 이미지는 소비자들의 적극적 구매를 촉진시키지 못하는 상황임. 신개념 천연보존제 적용은 농산물에 대한 자연친화적 천연 이미지를 부가하여 소비자의 호응을 얻을 뿐만 아니라, 효능이 입증된 고기능성 제품으로 건강에 관심이 높은 많은 소비자들에 의한 수요를 창출할 수 있을 것으로 예상됨.

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 제 1 절 실용화 · 산업화 계획(기술실시 등)

#### 1. 상품화

- 업체명: (주) 세니젠(대표이사 박정웅)
- 제품명: 네이처베스트(Nature Best) - 한방추출물 소재의 천연식품보존제
- 제품유형: 식품첨가물 혼합제제(분무식 희석액: 500 mL, 침지식 농축액: 1 L, 10 L)



<최종 제작된 침지식 및 분무식 타입의 천연보존제 시제품>

## 제 2 절 교육·지도·홍보 등 기술 확산 계획

### 1. 교육 및 지도 활용

#### 가. 한방천연물 유래 기능성 소재의 개발동향

- 교육장소: 동국대학교
- 교육대상: 동국대학교 생명과학과 및 식품공학과 학부생/대학원생/전임교원/자문위원
- 교육내용: 본 교육에서는 최근 선호되고 있는 한방천연물 유래 기능성 소재를 중심으로 그 종류와 기능 및 이를 응용한 시제품의 연구개발 동향을 살펴보고, 한방천연물을 이용한 천연식품보존제의 국내외 특허기술 분석을 통해 한방천연물로부터의 새로운 식품보존제 연구개발론을 교육하였음.
- 기대효과: 본 교육을 통하여 해당과제 책임자와 참여연구원 뿐만 아니라 타분야 전문가 및 일반학생들에게도 Natural Product Science분야를 소개하고, 또한 본 연구 참여자들도 타분야 전문가들과 상호협력의 장을 마련하였음.

#### 나. 식품미생물 검출 및 식물유래 기능성 유효성분의 항균성 평가법

- 교육장소: 동국대학교
- 교육대상: 동국대학교 생명과학과 및 식품공학과 학부생/대학원생/전임교원/자문위원/ 협동기관 (주) 세니젠 실무담당 직원
- 교육내용: 본 교육에서는 National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, USA)를 기반으로 한 식품미생물 검출 요령 및 식물유래 기능성 유효성분의 항균성 평가기법을 소개하고, 표준 평가기법을 교육하였음.
- 기대효과: 본 교육을 통하여 습득한 기본적인 식품미생물 검출 요령 및 표준 항균성 평가기법을 일반학생은 다른 연구과제에 접목시킬 수 있을 것으로 기대되며, 특히 본 연구과제 참여연구원의 연구수행에 있어서 직접적인 도움이 되었을 것으로 예상됨.

#### 다. 한방천연물의 항균 및 기능성 제품 개발법

- 교육장소: 동국대학교
- 교육대상: 동국대학교 바이오시스템대학 학부생/대학원생/전임교원/자문위원/협동기관 (주) 세니젠 실무담당 직원
- 교육내용: 본 교육에서는 실험결과를 통한 한방천연물의 항균 및 항산화, 항암효과에 대한 분석을 통해 식품보존제로서의 역할 외 기능적인 측면을 보여줌으로써 새로운 분야의 연구개발에 대해 교육하였음.
- 기대효과: 본 교육을 통해 타 분야 전문가와 연구원들 및 일반학생들에게 새로운 분야를 소개하고, 상호 협력할 수 있는 장을 마련함.

#### 라. 식품 및 동물적용을 통한 인체안전성 평가법

- 교육장소: 동국대학교



- 교육대상: 동국대학교 생명과학과 및 식품공학과 학부생/대학원생/전임교원
- 교육내용: 본 교육에서는 식품에 적용하여 효능을 알아보는 기법과 동물에 적용하여 인체 안전성 평가에 대해 알아보는 기법에 대하여 교육하였음.
- 기대효과: 본 교육을 통해 습득한 식품 및 동물적용 평가법으로 안전성을 확실하게 보여 줄 수 있으며, 유사한 연구에 적용시킬 수 있을 것으로 기대됨.

마. 식물유래 천연추출물의 기능성 세포분화유도 및 항암효능 검증

- 교육장소: 동국대학교
- 교육대상: 동국대학교 생명과학과 학부생/대학원생/전임교원
- 교육내용: 본 교육에서는 식물유래 천연추출물을 인체 신경유도세포에 처리하여 신경 또는 다기능성 세포로의 분화를 유도함. 또한 다양한 인간 암세포주에도 처리하여 세포사멸 유도 및 작용기작에 대한 항암효능을 분석함으로써 식물의 기능성 연구에 대한 효능을 보여줌.
- 기대효과: 본 교육을 통해 생명과학분야 연구원들 및 일반학생들에게 식물의 다기능성에 대해 소개하고 직접 적용할 수 있는 연구의 장을 마련함.

### 제 3 절 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획

#### 1. 특허출원

가. 감초 추출물, 목단피 추출물 및 황련 추출물을 유효성분으로 함유하는 천연 식품 보존제  
(출원번호: 10-2011-0010013 - 등록 심사 중)

나. 백작약 추출물, 육계 추출물 및 오배자 추출물을 유효성분으로 함유하는 천연 식품 보존제  
(출원번호: 10-2011-0058425 - 등록 심사 중)

다. 백작약 추출물, 오배자 추출물, 감초 추출물을 함유하는 천연 식품 산화방지제  
(출원번호: 10-2012-0033373 - 출원완료)

#### 2. 논문 및 발표

##### 가. 논문발표

- (1) Sun-Young Goo, Sae-Rom Lim, Jung-Suk Sung, Dong-Il Kim  
Anti-cancer effects of Samultang-Gami on HeLa HepG2 AGS cells  
The Journal Of Oriental Obstetrics & Gynecology 23(3) 38-55  
2010. 08. 30 출판됨
- (2) Sun-Young Goo, Eun-Bi Go, Jung-Suk Sung, Dong-Il Kim  
Antioxidant effects of Samultang-Gami on MEF cells  
The Journal Of Oriental Obstetrics & Gynecology 23(3) 23-37  
2010. 08. 30 출판됨
- (3) Hee-Jung Yoon, Eun-Bi Go, Min-Sun Choi, Dong-Il Kim, Jung-Suk Sung  
Antioxidant effects of Paeonia Japonica Extracts on Mouse Embryonic Fibroblast Cells  
The Journal Of Oriental Obstetrics & Gynecology 25(2) 78-88  
2012. 05. 30 출판됨
- (4) Jihoon Sung, Jung-Suk Sung and Han-Seung Shin  
Cytoprotective effects of lotus (Nelumbo nucifera Gaertner) seed extracts on oxidative  
damaged mouse embryonic fibroblast cell  
Food Science and Biotechnology 20(6) 1533-1537  
2011. 12. 31 출판됨

- (5) Jung-Suk Sung, Eun-Bi Go and Han-Seung Shin  
 Cytoprotective activity of extract of roasted coffee residue on mouse embryonic fibroblasts cells against apoptosis induced by oxidative stress  
 Food Science and Biotechnology 21(1) 137-143  
 2012. 02. 29 출판됨
- (6) Eun-Bi Go, Geon Go and Jung-Suk Sung  
 Extracts of *Paeonia japonica* exhibit antioxidant activity and inhibit oxidative damage induced apoptosis in mouse embryonic fibroblast cells  
 Biosci. Biotechnol. Biochem. (submitted)
- (7) Jiyeon Kim, Hyunseok Kim, Geon Go, Jung-Suk Sung, Kwang-Geun Lee  
 Evaluation of antibacterial and antioxidant properties of 35 medicinal plants  
 International Journal of Antimicrobial Agents (submitted)
- (8) Sae-Rom Lim, Eun-Bi Go, Geon Go, Han-Seung Shin, Jung-Suk Sung  
 Antioxidative Mechanisms of Sea Buckthorn Fruit Extract in Mouse Embryonic Fibroblast Cells  
 Food Science and Biotechnology (submitted)

나. 학회발표

- (1) Proteomic analysis of cytotoxic effects of *Scutellaria barbata* and cisplatin on mammalian cells, The 64th Annual Meeting of The Korean Association of Biological Sciences, 2009-08-21
- (2) Cytotoxic effects of *Scutellaria barbata* extracts and cisplatin on mammalian cells , 1st Korea Risk Assessment Symposium of the Journal of Toxicology and Environmental Health, 2009-10-15
- (3) Development of Natural Food Preservatives to Improve the Functionality and Safety of RTE (Ready-To-Eat) Vegetables, International Association for Food Protection, 2009-11-13
- (4) In vitro investigation of antibacterial and antioxidant activities of thirty-five Korean traditional medicinal plants, 2010 한국생화학분자생물학회, 2010-05-18
- (5) Induction of apoptosis in cancer cells by treatment with herbal extract of *Paeonia japonica*, 제65회 한국생물과학협회 정기학술대회, 2010-08-19

- (6) Evaluation of antibacterial and antioxidant activities of *Glycyrrhiza uralensis*, *Paeonia suffruticosa* Andrews and *Coptis chinensis*, 2011 한국생화학분자생물학회, 2011-05-17
- (7) Evaluation of the antibacterial and antioxidant properties of *Coptis chinensis* and *Glycyrrhiza uralensis* among 35 medicinal plants, International Association for Food Protection, 2011-08-02
- (8) Evaluation of antibacterial and antioxidant activities of *Paeonia japonica* and *Cinnamomum cassia*, 제66회 한국생물과학협회 정기학술대회, 2011-08-19

## 제 4 절 추가연구, 타연구에 활용 계획

1. 한방추출물 외에 기능성에 대해서 잘 알려진 버섯과 자실체를 연구에 적용할 계획임.
2. 전 세계 또는 아시아에 자라는 식물이 아닌 우리나라에서만 자라는 특이적인 고유종 식물에 대해 연구를 진행하고 적용할 계획임.



## 제 7 장 참고문헌

1. Doh E.S., Chang J.P., Kil K.J., Choi M.S., Yang J. K., Yun C.W., Jeong S.M., Jung Y.H., Lee G.H. (2011). Antioxidative activity and cytotoxicity of fermented *Allium victorialis* L.Extract
2. Fazlina Mustaffa, Jayant Indurkar, Sabariah Ismail, Marina Shah and Sharif Mahsufi Mansor. An Antimicrobial Compound Isolated from *Cinnamomum Iners* Leaves with Activity against Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*. *Molecules* 2011;16:3037-3047.
3. Yu Xionga, Yuqing Yang, Jin Yang, Hongyan Chaia, Ying Li, Jing Yang, Ziming Jia, Zhengrong Wang. Tectoridin, an isoflavone glycoside from the flower of *Pueraria lobata*, prevents acute ethanol-induced liver steatosis in mice. *Toxicology* 2010;276:64-72.
4. Yuexin Xu, Jingwen Chen, Xiao Yu, Weiwei Tao, Fengrong Jiang, Zhimin Yin, Chang Liu. Protective effects of chlorogenic acid on acute hepatotoxicity induced by lipopolysaccharide in mice. *Inflammation Research* 2010;59:871-877.
5. Vittorio C., Maddalena V., Ida C., Letizia A., Eugenio P., Filippo P. (2010), Variation of microbial load and visual quality of ready-to-eat salads by vegetable type, season, processor and retailer. *Food Microbiology* 27, 1071-1077.
6. Bajpai VK, Al-Reza SM, Choi UK, Lee JH, Kang SC. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of leaf essential oil and extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu. 2009;47:1876-1883.
7. Sohn DW, Han CH, Jung YS, Kim SI, Kim SW, Cho YH. Anti-inflammatory and antimicrobial effects of garlic and synergistic effect between garlic and ciprofloxacin in a chronic bacterial prostatitis rat model. *Int J Antimicrob Agents* 2009;34:215-219.
8. Martini S, D'Addario C, Colacevich A, Focardi S, Borghini F, Santucci A, Figura N, Rossi C. Antimicrobial activity against *Helicobacter pylori* strains and antioxidant properties of blackberry leaves (*Rubus ulmifolius*) and isolated compounds. *Int J Antimicrob Agents* 2009;34:50-59.
9. Risch, S.J., (2009). Food packaging history and innovations. *J. Agric. Food Chem.* 23, 8089-8092.

10. Hae-Yeon Choi. (2009). Antimicrobial Activity of *Paeonia japonica* Extract and Its Quality Characteristic Effects in Sulgidduk. Korean J. Food Cookery SCI. Vol. 25, No. 4, 435-444.
11. Ha JY, Goo SY, Sung JS, Shin HS. Antioxidant and cytoprotective activity of the olive leaf (*Olea europaea* L. var. Kalamata) extracts on the mouse embryonic fibroblast cells. Food Sci. Biotechnol 2009;18:965-970.
12. Lee M.K., Lee J.S., Kwack S.J., Kim J.M., Kang T.S., Lee J.H., Woo M.H., Choi J.S., Bae K.H., Min B.S. (2009). Analysis and stability test of the extract of *Coptidis Rhizoma* and *Salviae Miltiorrhizae Radix* for toxicity study
13. Rao, C. V., Vijaykumar, M., Sairam, K., & Kumar, V. (2008). Antidiarrhoeal activity of standardized extract of *Cinnamomum tamala* in experimental rats. Journal of Natural Medicine, 62, 396 - 402.
14. Matkowski A. Plant in vitro culture for the production of antioxidants. Biotechnol Adv 2008;26:548-560.
15. Kim I.D., Kwon R.H., Heo Y.Y., Lee D.G., Lee J.H., Lee A.H., Ha J.M., Ha B.J. (2008). The preventive effect of *Paeonia radix* extract against LPS-induced acute hepatotoxicity. L FD Hyg Safety 23(3), 222-226
16. Kaefer CM, Milner JA. The role of herbs and spices in cancer prevention. J Nutr Biochem 2008;19:347-361.
17. Kwak M.J., Kwon J.S., Lee, S.H. (2008). Natural dyeing of chitosan crosslinked cotton fabrics (Gallnut). J Korean Soc Cloth Ind 10, 377-384
18. Wang, R., Wang, R., & Yang, B. (2008). Extraction of essential oils from cinnamon leaves and identification of their volatile compound composition. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 10, 289 - 292.
19. Wang JF, Wei DQ, Chou KC. Drug candidates from traditional Chinese medicines. Curr Top Med Chem 2008;8:1656-1665.
20. Ha, T.A. (2008). Studies on the cytoprotective and anti-inflammatory effects of isolated from *Galla Rhois*. Master Thesis, Wonkwang university.
21. Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK. Metabonomics in pharmaceutical R&D. FEBS J



2007;274:1140-1151.

22. Singh, G., Maurya, S., deLampasona, M. P., & Catalan, C. A. N. (2007). A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents. *Food and Chemical Toxicology*, 45, 1650 - 1661.

23. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell. Biol* 2007;39:44-84.

24. Rico, D., Martin-Diana, A.B., Barat, J.M., Barry-Ryan, C., (2007). Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetables, a review. *Trends Food Sci. Technol.* 18, 373-386.

25. Yang, J. H., Li, B., & Ji, B. P. (2006). Study on antioxidant activities of edible plants and medicinal plants common in China. *Food Science*, 27, 87-91.

26. Gurib-Fakim A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol Aspects Med* 2006;27:1-93.

27. Cabrera C, Artacho R, Giménez R. Beneficial effects of green tea. *J Am Coll Nutr* 2006;25:79-99.

28. Kong, Q. (2005). Preliminary study on the extraction of tannins from *Galla chinensis* and its inhibition to nitrosation. *Applied Science and Technology*, 32, 62-64.

29. Zaidan MR, Noor Rain A, Badrul AR, Adlin A, Norazah A, Zakiah I. In vitro screening of five local medicinal plants for antibacterial activity using disc diffusion method. 2005;22:165-170.

30. Azaizeh H, Ljubuncic P, Portnaya I, Said O, Cogan U, Bomzon A. Fertilization-induced changes in growth parameters and antioxidant activity of medicinal plants used in traditional Arab medicine. *Evid Based Complement Alternat Med* 2005;2:549-556.

31. Taylor PW, Hamilton-Miller JM, Stapleton PD. Antimicrobial properties of green tea catechins. *Food Sci Technol Bull* 2005;2:71-81.

32. Borchers AT, Keen CL, Gershwin ME. Mushrooms, tumors, and immunity: an update. *Exp Biol Med*. 2004;229:393-406.

33. Bielory L. Complementary and alternative interventions in asthma, allergy, and immunology. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2004;93:45-54.
34. Kim SH, Shin DS, Oh MN, Chung SC, Lee JS, Oh KB. Inhibition of the bacterial surface protein anchoring transpeptidase sortase by isoquinoline alkaloids. *Biosci Biotechnol Biochem* 2004;68:421-424.
35. Willcox JK, Ash SL, Catignani GL. Antioxidants and prevention of chronic disease. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2004;44:275-295.
36. Wee J.H., Moon J.H. Park K.H. (2004). Isolation and identification of pratensein with antimicrobial activity from the peanut shells. *Korean J. Food Sci. Technol.* Vol 36, No. 4, 643-547.
37. Park S, Jun DW, Park CH, Jang JS, Park SK, Ko BS, Kim BJ, Choi SB. (2004). Hypoglycemic effects of crude extracts of Moutan Radicis Cortex. *Korean J Food Sci Technol* 36,472-477.
38. Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn J. Sci. Technol* 2004;26: 211-219.
39. Shen HM, Lin Y, Choksi S, Tran J, Jin T, Chang L, Karin M, Zhang J, Liu ZG. Essential roles of receptor-interacting protein and TRAF2 in oxidative stress-induced cell death. *Mol Cell Biol* 2004;24:5914-5922.
40. Darshan S, Doreswamy R. Patented antiinflammatory plant drug development from traditional medicine. *Phytother Res* 2004;18:343-357.
41. Motsei ML, Lindsey KL, Van Staden J, Jaeger AK. Screening of traditionally used South African plants for antifungal activity against *Candida albicans*. *J Ethnopharmacol* 2003;86:235-241.
42. Hamil FA, Apio S, Mubiru NK, Bukenya-Ziraba R, Mosango M, Maganyi OW, et al. Traditional herbal drugs of Southern Uganda, II: literature analysis and antimicrobial assays. *J Ethnopharmacol* 2003;84:57-78.
43. Fukai T, Satoh K, Nomura T, Sakagami H. (2003). Preliminary evaluation of antinephritis and radical scavenging activities of galbridin from *Glycyrrhiza glabra*, *Fitoterapia*. 74, 624-629.

44. Jae.Sun Hwang, Young Sil Han. (2003). Isolation and Identification of Antimicrobial Compound from Mokdan Bark (*Paeonia suffruticosa* ANDR) J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.32(7), 1059-1065
45. Alma MH, Mavi A, Yildirim A, Digrak M, Hirata T. Screening chemical composition and in vitro antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils from *Origanum syriacum* growing in Turkey. Biol Pharm Bull 2003;26:1725-1729.
46. Tsukiyama R, Katsura H, Tokuriki N, Kobayashi M. Antibacterial activity of licochalcone A against spore-forming bacteria. 2002;46:1226-1230.
47. Karmanoli K. Secondary metabolites as allelochemicals in plant defence against microorganisms of the phyllosphere. Sci. Publishers Inc. 2002;277-288.
48. Son S.M., Moon K.D., Lee C.Y. (2001) Inhibitory effects of various antibrowning agents on apple slices. Food chemistry 73, 23-30.
49. Duffy CF, Power RF. (2001). Antioxidant and antimicrobial properties of some Chinese plant extracts. Int J Antimicrob Agents 17,527-529.
50. Galato D, Ckless K, Susin MF, Giacomelli C, Ribeiro-do-Valle RM, Spinelli A. Antioxidant capacity of phenolic and related compounds: correlation among electrochemical, visible spectroscopy methods and structure-antioxidant activity. Redox Rep 2001;6:243-250.