최 종
연 구 보 고 서

국내산 채소류로 부터 생체방어 효소계 활성소재 탐색기술 개발 및 이를 이용한 건강음료 제조

Screening of chemopreventive agents from domestically-cultivated vegetables and its application to development of health drinks

경 상 대 학 교

농 림 부

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림수산특정연구사업의 연구보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림수산특정연구사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.

국내산 채소류로부터 탐색기술 개발 및 이를 이용한 생체방어 효소계 건강음료 제조 활성소재

농림부

최 종 보 고 서

1995년도 농림수산특정연구사업에 의하여 완료한 “국내산 채소류로 부터 생체방어 효소계 활성소재 탐색기술 개발 및 이를 이용한 건강음료 제조” 에 관한 연구의 최종보고서를 별첨과 같이 제출합니다.

첨부 : 1. 최종보고서 8부
2. 최종보고서 디스켓 1매

1997년 11월 30일

주관연구기관 : 경상대학교

총괄연구책임자 : 김 정 환 (인)

주관연구기관장 : 경상대 총장 (직인)

농 림 부 장 관 귀 하

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “국내산 채소류로 부터 생체방어 효소계 활성소재 탐색기술 개발 및 이를 이용한 건강음료 제조”의 최종보고서로 제출합니다.

1997년 11월 30일

주관연구기관명 : 경상대학교
총괄연구책임자 : 김 정 환
연 구 원 : 이 상 원
협동연구기관명 : 인제대학교
협동연구책임자 : 김 정 상
위탁연구기관명 : 한국식품개발연구원
위탁연구책임자 : 김 성 수

요 약 문

I. 제목

국내산 채소류로 부터 생체방어 효소계 활성소재 탐색기술 개발 및 이를 이용한 건강음료 제조

II. 연구개발의 목적 및 중요성

최근 수십년간 국내 질병패턴의 특징은 감염성질환이 현저히 감소하고 순환기계 질환, 암, 당뇨, 간질환등과 같은 만성질환의 비율이 급격히 증가한다는 것이다. 이는 산업사회에서 공통적으로 관찰되는 현상으로, 食餌패턴의 변화와 같은 환경적인 인자와 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 이가운데 암은 국내 사망원인 1위를 차지하고 있으며, 지난 10년간 가장 높은 비율(18.2%)로 증가하였다(통계청 1994). 미국에서는 지난 25년간 엄청난 연구비가 암관련 연구에 투자되었다. 그 결과 분자생물학등 관련 학문의 비약적인 발전의 계기가 되었지만, 암 정복까지는 아직 더 많은 투자와 노력이 필요한 것으로 생각된다. 실제로 같은 기간동안 암사망율은 오히려 약 6.3% 증가한 것으로 나타났다(Rennie 1996). 매년 1백만명의 암환자가 발생하며, 1996년도 암으로 인한 사망자수는 555,000명 정도가 될 것으로 추정하고 있다(Rennie 1996). 국내에서도 매년 암에 의한 사망율이 증가하고 있으며, 1994년 전체 사망자의 21.3%에 해당하는 4만9천명이 암으로 사망한 것으로 나타났다(통계청 1994). 세계적으로 볼때에도 매년 6백만명정도가 암과 관련하여 사망하는 것으로 추산되고 있어, 암의 정복은 인류가 시급히 해결해야할 과제의 하나로 남아 있다.

암의 주요원인으로 환경적인 인자가 지목되고 있으며 특히 산업화에 따른 환경공해, 식품의 오염, 식생활패턴의 변화등이 질환의 발생과 깊은 연관을 갖고 있는 것으로 추정되고 있다 (Steinmetz 1996). 특히 식품에 의한 암예방은 최근들어 미국이나 일본등 선진국에서 많은 관심을 모으고 있으며, 이러한 현상은 최근 식품중에 암을예방하는 성분들의 존재가 과학적으로 증명되고 있는데 기인한다 (Zhang 1992, Jang 1997). 우리가 일상적으로 섭취하는 식품으로서 암예방효과가 있는 것으로 알려진 것들이 다수 있으며, 이들 가운데에는 과일, 채소류가 주류를 이루고 있다. 그러나 신뢰성이 높은 암예방물질을 탐색하기 위해서는 동물실험을 거쳐야하기 때문에, 천연물로 부터 암예방성분의 탐색은 이와같은 시간적, 경제적제약 조건하에서 느린 속도로 진행되어 왔다. 비교적 최근에 암예방물질을 동물세포를 이용하여 탐색하는 시스템이 미국의 존스홉킨스대학 연구팀에 의하여 개발되어 암예방물질의 탐색은 신기원을 맞이했다고 평가되고 있다 (Prochaska 1994). 이 시스템의 원리를 간략히 요약하면, 동물의 해독효소계가 잘 보존된 mouse hepatoma 세포 (hepa1c1c7 cells)를 이용하여 탐색하고자 하는 대상시료를 세포에 일정시간 노출시킨 다음, 세포의 해독효소의 활성을 신속하게 assay하는 것이다 (Prochaska 1992). 이전의 많은 연구자들에 의해서 해독효소계의 지표효소인 quinone reductase가 많은 암예방활성을 나타내는 성분들에 의해서 유도된다는 것이 알려졌다 (Wattenberg 1992, Sparnins 1982, Spencer 1990, Jang 1997). 따라서 hepa1c1c7세포의 quinone reductase를 유의적으로 활성화시키는 능력은 곧 해독성분뿐만 아니라 암예방활성성분의 존재를 의미하는 것으로 평가할수 있다는 것이다. 이 방법은 국내외적으로 암예방성분을 탐색하는데 사용되는 공식적인 방법으로 인정되어 있다 (Jang 1997, Prochaska 1994, http://yes.snu.ac.kr). 본 연구자들은 이 시스템을 이용하여 국산 채소류 30종에 대하여 생체방어효소계 (암예방효소계 및 해독효소계)의 지표효소인 quinone reductase의 활성을 유도하는 능력을 실험하였으며, 부가적으로 arylhydrocarbon hydroxylase (발암물질의 활성화와 관련된 1상효소), Ames test, superoxide dismutase 유사활성 등을 측정함으로서 생체방어효능이 높은 신기능 식품소재를 탐색하였다. 이러한 연구에서 얻어진 결과를 바탕으로 고부가가치의 신기능 건강음료를 개발하였으며 상품화를 위하여 계속 노력하고 있다. 이러한 연구결과가 효율적으로 홍보되어 산업화를 가속화시킨다면 위축되고 있는 국내 1차산업의 활성화에도 크게 기여하리라 기대된다. 따라서 본 연구의 구체적인 목표는 다음과 같이 요약할수 있다.

1. 생체방어기능이 우수한 소재를 대량으로 신속하게 탐색하는 기술의 확립
2. 생체방어효능이 우수한 원료의 선정 및 활성소재의 가공적성 규명
3. 활성성분의 추출방법 확립
4. 생체방어활성이 확인된 채소류를 이용한 신기능 건강음료의 개발

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 국산 채소류 30종을 대상으로 생체방어효소계 활성유도능을 조사하고 이를 소재로 음료의 최적 formulation 및 제조공정의 확립

2. 생체방어활성은 동물세포모델계를 이용하여 탐색하고 실험동물을 이용하여 효능을 검증함

3. 본 연구에서 개발한 건강음료의 가공중 활성성분의 안정성 및 품질변화 조사

4. 채소류로부터 생체방어성분의 추출조건 확립

5. 생체방어성분의 분리 및 동정

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

본 연구는 국내산 채소류에 대하여 생체방어활성이 높은 소재를 발굴하고 이를 이용하여 새로운 스타일의 건강음료를 개발하고자 수행되었다. 2년간의 연구를 통하여 다음과 같은 결과를 도출하였다.

1. 국내에서 소비되는 채소류 가운데 문헌조사를 통하여 생리활성의 존재가

예상되는 30종의 채소(근채류 10종, 엽채류 20종)를 선정 본 연구에 사용하였다.

2. 우리나라 사망원인 1위인 암의 발병을 예방할수 있는 소재를 탐색하는데 초점을 맞추어 연구를 수행하였으며, 이를 위하여 신뢰도가 높으면서도 단시간에 활성을 효율적으로 검색할수 있는 시스템을 확립하였다. 즉, 암예방물질의 검색시스템으로서는 기존의 Ames test와 최근에 개발된 동물세포모델계를 이용하여 2상효소계의 활성유도 정도를 평가하는 quinone reductase induction assay 시스템을 사용하였다. 한편 발암의 주요원인인 활성산소를 소거하는 능력을 함유하는 소재의 탐색을 위하여 SOD 유사활성을 측정하였다.

3. 채소류의 메탄올 추출물에대한 hepa1c1c7 (mouse hepatoma) 세포생육억제 실험에서 양파 =들깻잎> 마늘> 냉이=생강등의 순으로 독성이 강하게 나타났으며, 본 실험에 사용한 대부분의 채소류들은 세포독성이 낮은 것으로 확인되었다.

4. Hepa1c1c7 세포의 QR활성을 50%이상 증가시킨 채소류는 무, 우엉, 갓, 고비, 고사리, 배추, 쑥갓, 양배추, 적채등 9종이었으며, 미나리의 추출물도 효소활성을 30% 이상 증가시켰다.

5. 1상효소계에 의한 polycyclic aromatic hydrocarbon류 (PAHs)의 생활성(bioactivation)은 발암성을 증가시키는 것으로 보고되어 있어, 암예방지표효소인 QR을 증가시키는 채소류 가운데 1상효소계를 지나치게 활성화하는 채소를 선별적으로 제외시키기 위하여 1상효소계의 지표효소인 arylhydrocarbon hydroxylase (AHH)의 활성 유도정도를 측정한 결과, 적채(27.7배), 양배추(9.2배), 배추(5.2배), 고비(4.7배), 무(4.2배)등의 메탄올추출물이 AHH 효소활성을 크게 증가시키는 것으로 나타났다. 반면, 우엉(2.3배), 갓(3.3배), 고사리(1.1 배), 쑥갓(2.2배)등은 상대적으로 AHH효소를 활성화하는 정도가 낮았다.

6. AHH활성은 제한적으로만 활성화시키면서 QR효소활성을 유의적으로 유도하는 채소들, 즉, 우엉, 갓, 고사리, 쑥갓에 대하여 용량에 따른 QR활성유도관계를 조사한 결과, 쑥갓과 우엉이 가장 우수한 소재로 확인되었다. 한편 쑥갓과 우엉 추출물들은 여러 변이원 처리에 대한 항돌연변이원성도 지니고 있으며 SOD 유사활성도 지니고 있어 매우 우수한 생체방어 활성소재임을 확인할 수 있었다.

7. 우엉, 갓, 고사리, 쑥갓에 대하여 상호 조합하였을 때 QR활성유도에 상승적으로 작용하는지 확인하기 위한 실험에서 쑥갓과 우엉을 1:2로 혼합하였을 때 가장 효과적인 것으로 나타났다.

8. 예비적인 관능검사에서 쑥갓이 음료 소재로 가장 적합한 것으로 나타나, 쑥갓을 우엉과 함께 기능성음료 소재로 선정하였다. 쑥갓에 대한 in vivo계 효능을 검증하기 위하여, 흰쥐를 이용하여 6일간 쑥갓을 급이한 군과 대조군의 장기를 채취하여 QR 및 AHH활성을 측정하였다. 쑥갓을 섭취시킨 쥐들의 간, 소장, 신장, 폐등 모든 장기에서 QR활성이 유의적으로 증가되는 것이 확인되었다. 따라서 쑥갓은 세포모델계에서 뿐만 아니라 실험동물에서도 암예방효소계의 활성을 증가시킴으로써 강력한 암예방효과를 발현할 것으로 예상된다.

9. 쑥갓의 음료로서의 가공적성을 평가하기위하여 pH별, 온도별 쑥갓의 QR활성유도능의 안정성을 시험한 결과, pH 3 7 범위에서 안정하였으며, 음료의 통상적인 살균조건인 80oC 30초 90oC, 2분 범위에서 활성변화가 없어, 쑥갓에 존재하는 QR 활성유도물질은 매우 안정한 화합물로 추정된다. 쑥갓과 우엉추출물중의 항돌연변이원성 역시 열처리와 산성 pH에서 매우 안정하였다.

10. 쑥갓으로부터 암예방 활성성분을 추출하기 위한 용매로 물, 메탄올, 에탄올을 사용하였을 때, 알콜의 농도가 20% 이상일 때부터 활성성분이 추출되기 시작하였으며, 농도가 증가할수록 추출율이 증가하는 경향을 보였다. 그러나 물에 의해서는 활성성분이 전혀 추출되지 않았다.

11. 쑥갓의 80% 메탄올 추출물을 용매분획하였을 때, hexane과 ethylacetate층에서 암예방 활성이 가장 높은 것으로 나타났다. 쑥갓의 ethylacetate 분획을 prepaparative TLC로 전개했을 때. Rf 값이 0.57과 0.78에서 활성이 높게나왔으며 현재 활성물질의 동정이 진행중이다.

12. 기능성음료 제조를 위한 쑥갓과 우엉추출물의 최적 음용농도를 결정하였으며 기호성을 높이기 위한 여러 부재료 (토마토 퓨레, 사과퓨레, 포도농축액, 결명자 추출액, 오미자 추출액, 구연산, 고과당, 설탕, vitamin C등)들의 최적혼합비를 결정하였다. 쑥갓의 최적음용농도는 300 mg/100 ml 이고 우엉의 경우 300- 500

mg/100 ml였다.

13. 결정된 최적혼합비에 따라 쑥갓, 쑥갓혼합음료 그리고 우엉음료를 제조하여 관능검사를 실시한 결과 기호성이 우수한 것으로 나타났다. 최종 음료들의 당도는 7.2-8.4 Brix, pH는 3.3-3.6, 적정산도는 0.13-0.2 그리고 아미노태질소함량은 21.0-52.5 mg%이었다.

14. 제조한 음료들의 저장성을 조사하기 위해 37℃에서 4주간 저장하면서 일주일 간격으로 이미, 이취 발생 및 색도변화등의 관능적 특성 변화를 조사한 결과 처리구와 대조구 (-18℃에서 보관한 시료) 간의 차이를 볼수없었기 때문에 저장성은 양호한 것으로 판단되었다.

2. 활용에 대한 건의

본 연구 결과로부터 국산 채소류 가운데 몇가지 강력한 암예방활성이 예상되는 채소류들을 선별할수 있었으며, 이를 이용하여 기능성음료를 개발하였다. 본 연구자들은 이 결과를 다음과 같이 활용하고자 계획하고 있다.

1. 국산농산물의 기능적 특성을 홍보함으로써 해당작물의 소비 촉진 및 가공을 통한 새로운 수요 창출.

2. 참여기업인 (주) 종근당 건강의 제안에 따라, 본 연구결과를 전문학술지등에 투고하고 소재에 대한 홍보와 이와 연계한 개발제품의 상품화를 계획하고 있슴.

3. 본 연구결과는 국제식량공학회 지역심포지엄(1996. 10, 서울), FASEB(1997.4, 미국 뉴올리언즈)국제학술대회, 한국식품과학회 학술대회(1997. 11. 1, 서울)에서 발표하였으며, 현재 (주) 종근당건강의 동의하에 국제전문학술지에 투고 준비중.

4. 활성성분의 탐색이 종결되어 신물질로 확인될 경우 물질특허 출원 예정.

5. 본 연구에서 확립된 세포모델계 탐색기법을 이용하여 단시간에 많은 다른 종류의 시료에 대한 생체방어활성소재 검색에 응용.

Summary

I. Title

Screening of chemopreventive agents from domestically-cultivated vegetables and its application to development of health drinks

II. Objectives and Significance

During last decades, disease pattern in Korea was changed in terms that infectious diseases were decreased while incidences of chronic diseases such as heart disease, stroke, cancer, diabetes, liver diseases were more common. This phenomenon is assumed to be closely related to environmental factors such as changes in dietary habits. Cancer is the major cause of death in Korea and the death rate by cancer was increased by 18.2% during past 10 years. In U.S.A., the huge amounts of research fund were invested on the cancer researches in last 25 years since the former President Richard M. Nixon signed the National Cancer Act in 1971. This caused tremendous progresses in several areas of study such as molecular biology. However, it seems that more efforts and investments are required to reveal the identity of cancer and eventually conquer it. Indeed the death rate caused by cancer rose by 6.3% from 1973 to 1992. Epidemiologists projected that in 1996, more than 550,000 U.S. cancer patients died while in Korea the death tolls by cancer reached 49,000 cases, accounted for 21.3% of total death in 1994. Globally, the WHO estimates that cancer kills more than six million people annually. Thus the conquest of cancer is most imminent mission for our scientists.

It is well established that environmental factors such as diet pattern, environmental pollution and smoking habit play important roles in modulating

the development of certain types of human cancers. There is extensive evidence suggesting a protective role of fruits and vegetables against chemically induced carcinogenesis. However the lack of a reliable tool hampered the screening for chemopreventive agents. Recently Talalay team at Johns Hopkins University developed a new system by which screening possible cancer preventive agents was rapidly performed *in vitro* cell culture system. Briefly, the system is based on the recognition that carcinogenesis could be blocked by increasing cellular level of Phase 2 enzymes and thereby promoting the detoxification processes for environmental carcinogens. This system provides a more rapid screening tool because it employs hepa1c1c7 cells (mouse hepatoma cells) instead of animals. It was proven that quinone reductase, one of the Phase 2 enzymes, is induced in hepa1c1c7 cells by the most compounds that induce Phase 2 enzymes *in vivo*. Thus, this model system has been widely used for screening cancer preventive agents so far and established as a reliable tool. We have investigated the presence of bioactive compounds among 30 selected Korean vegetables to act as blocking agents against neoplastic initiation by inducing the activity of quinone reductase, an anticarcinogenic phase II marker enzyme, in hepa1c1c7 cells. In addition to quinone reductase induction, the induction of arylhydrocarbon hydroxylase, a Phase 1 enzyme involved in activation of precarcinogens, the antimutagenicities and the superoxide dismutase-like activities of vegetables were examined. New types of health drinks based on the results were developed and efforts for optimizing the chemopreventive effects and improving the tastes for commercial production are currently undertaken.
The objectives can be summarized as follows;

1. Establishment of the rapid system for screening cancer preventive agents from a massive number of samples
2. Selection of the vegetables with highest chemoprevntive activities
3. Establishment of optimal extraction conditions for chemopreventive substances
4. Formulation of health drinks with chemopreventive effect

III. Scope and Contents of the Study

1. Screening for the vegetable with highest chemopreventive activity among thirty Korean vegetables and its application to the formulation of health drinks.

2. Confirmation of phase 2 enzyme induction in animal system of the vegetables screened from *in vitro* cell cuture system.

3. Stability of chemopreventive activity and organoleptic quality of drinks during processing and preservation

4. Establishment of optimal extraction conditions for chemopreventive substances

5. Partial purification of chemopreventive agent(s)

IV. Results and Proposal for Future Appication

1. Results

The vegetables with the relatively strong cancer preventive (or chemopreventive) activities were screened and applied to the formulation of a new type of health drinks. The results derived from the 2 year study were summarized as follows;

1. Thirty vegetables (10 root vegetables and 20 leafy vegetables) which were presumed to contain cancer preventive activity were selected and examined in this study.

2. Cell culture system, Ames test and superoxide dismutase-like activity measurements were employed to screen the promising candidates for cancer protection.

3. The methanol extracts of onion, perilla leaf, garlic, Sheperd purse, and ginger were relatively more cytotoxic than those of the other vegetables against hepa1c1c7 cells.

4. Among thirty vegetables tested, *Arctium lappa* (Burdock), *Brassica juncea* (Mustard leaf), *Pteridium aguilinum* (Bracken) and *Chrysanthemum coronarium* (Crown daisy) significantly induced quinone reductase activity with a limited effect on arylhydrocarbon hydroxylase activity. *Arctium lappa* (Burdock), *Brassica juncea* (Mustard leaf) and *Chrysanthemum coronarium* (Crown daisy) induced QR in a dose-dependent manner except braken extract which tended to decrease the enzyme activity after exerting the maximal response at 2.5 mg/ml.

5. Combination of crown daisy with burdock (1:2) had a synergistic effect on quinone reductase induction while other combinations showed a simple additive effect.

6. *In vivo* Study using SD rat confirmed the presence of potent QR inducer(s) in crown daisy.

7. QR induction activity of crown daisy extract was stable in the range of pH 3 7 and not changed by the heat treatment at 90oC, 2min which is a far more rigorous condition than commercial sterilization process for beverage manufacturing. The antimutagenicity of crown daisy extract and burdock extract was not affected by heat treatment (90℃, 20 min) and exposure to acidic pHs.

8. QR inducer(s) from crown daisy was effectively extracted by aqueous solutions of ethyl alcohol and methyl alcohol, and increasing ratio of alcohols enhanced the extraction rate of QR inducer(s).

9. QR induction activity of crown daisy extract has been recovered in hexane and ethylacetate fractions but not in n-butanol and water fractions.

10. Preparative thin layer chromatography showed that fractions with Rf of 0.57 and 0.78 contained active components as ethylacetate fraction was developed in n-butanol : n-propanol : 2 N ammonia (10:60:30). Identification of relevant components are in progress.

11. Health drinks was formulated using tomato puree, apple puree, grape concentrate, cassia seed extract, schzandra fruit extract, citric acid, high fructose corn syrup, sucrose and vitamin C, based upon sensory evaluation results. The optimum concentration of crown daisy and burdock extracts in the drinks were 300 mg/dl and 300-500 mg/dl, respectively.

12. The health drinks were evaluated to be successfully competitive with the similar products on market in preference test by professional panels

13. The indices for developed drinks were are follows; 7.2-8.4 Brix, pH 3.3-3.6, titratable acidity of 0.13-0.20 and amino nitrogen 21.0-52.5 mg%.

14. The beverage did not show any significant change in sensory properties including flavor, taste, color during storage at 37oC for 4 weeks.

2. Proposal for Future Application

A promising candidate for cancer prevention was screened from this study and the results were applied to the formulation of the new type of health drinks. We propose that the results obtained from this study should be used in the following ways;

1. Promote the consumption of the vegetables with chemopreventive activity through advertisement of their beneficial effect.

2. Publish the research results in the scientific journals under agreement with Chong Kun Dang Healthcare Co. Ltd. and establish marketing strategies.

3. The data from this study were presented in the scientific conferences including IUFoST (held in Oct. 1996, Seoul, Korea), FASEB (held in April 1997, New Orleans, USA) and Korean Society of Food Science and Technology meeting (held in Nov. 1997, Seoul, Korea)

4. Apply for a patent in case of the discovery of new compound(s) with chemopreventive activity from crown daisy

5. The cell culture system introduced in this study is recommended for screening other chemopreventive sources.

Contents

목 차

제 1 장 서 론

1. 연구개발의 목적 및 중요성

오래전부터 채소나 과일 섭취는 다양한 종류의 질병을 예방하고 치료하는데 효과가 있는 것으로 생각되어 왔다. 지난 수십년간 과학의 발달과 건강에 대한 사람들의 관심의 증가로 과일·채소류와 건강과의 관계가 활발하게 연구되어 왔으며, 이러한 결과로 많은 과학적인 사실들이 규명되게 되었다. 채소류를 포함한 식물성 식품은 에너지, 아미노산, 필수 지방산, 비타민, 무기질, 그리고 항산화성분등 우리 신체가 건강을 유지하는데 중요한 성분들을 공급한다 (Steinmetz 1996). 그외에도 식물성 식품은 phenolic compounds, alkaloids, tepenes, steroids, carotenes, flavonoidsemd과 같은 소위 phytochemicals의 寶庫로서 최근까지 영야학적인 측점에서 주목을 받지 못했었지만, 최근들어 여러 가지 인체질병의 예방과 치료에 관여한다는 것이 밝혀짐에 따라 그 중요성이 부각되게 되었다. 인간은 농경사회를 거치면서 식물성식품을 주로 섭취하게 되었고, 이에따라 인체는 생리적으로 많은 phytochemicals과 상호연관속에서 건강을 유지해 왔을 것으로 과학자들은 추정한다. 그러나 현대로 접어들면서 동물성식품의 섭취가 증가하게 되고 이에대한 부작용으로 암이나 순환기계질환등 소위 만성퇴행성 질환의 이환률이 증가하게 되었다고 추정하고 있다.

최근 수십년간 국내 질병패턴의 특징은 감염성질환이 현저히 감소하는 대신 순환기계 질환, 암, 당뇨, 간질환등과 같은 만성질환의 비율이 급격히 증가한다는 것이다. 이는 산업사회에서 공통적으로 관찰되는 현상으로, 食餌패턴의 변화와 같은 환경적인 인자와 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 이가운데 암은 국내 사망원인 1위를 차지하고 있으며, 지난 10년간 가장 높은 비율 (18.2%)로 증가하였다. 1994년 전체 사망자의 21.3%에 해당하는 4만9천명이 암으로 사망한 것으로 나타났다 (통계청 1994). 미국에서는 지난 25년간 엄청난 연구비가 암관련 연구에 투자되었으며, 그 결과 분자생물학등 관련 학문의 비약적인 발전의 계기가 되었지만, 암정복까지는 아직 더 많은 노력이 필요한 것으로 생각된다. 실제

로 같은 기간동안 암사망율은 오히려 약 6.3% 증가한 것으로 나타났다. 매년 1백만명의 암환자가 발생하며, 1996년도 암으로 인한 사망자수는 555,000명 정도가 될 것으로 추정하고 있다 (Rennie 1996). 세계적으로 볼때에도 매년 6백만명정도가 암과 관련하여 사망하는 것으로 추산되고 있어, 암의 정복은 인류가 시급히 해결해야할 과제의 하나로 남아 있다.

암의 주요원인으로 환경적인 인자가 지목되고 있으며 특히 산업화에 따른 환경공해, 식품의 오염, 식생활패턴의 변화등이 질환의 발생과 깊은 연관을 갖고 있는 것으로 추정되고 있다. 특히 식이에 의한 원인이 70%까지 차지할 정도로 중요한 위치를 차지하고 있는 것으로 추정되고 있어, 식품에 의한 암예방은 미국이나 일본등 선진국에서 많은 관심을 모으고 있으며, 이러한 현상은 최근 식품중에 암을예방하는 성분들의 존재가 과학적으로 증명되고 있는데 기인한다 (Zhang 1992, Jang 1997). 우리가 일상적으로 섭취하는 식품으로서 암예방효과가 있는 것으로 알려진 것들이 다수 있으며, 이들 가운데에는 과일, 채소류가 주류를 이루고 있다. 그러나 신뢰성이 높은 암예방물질을 탐색하기 위해서는 동물실험을 거쳐야하기 때문에, **천연물로 부터 암예방성분의 탐색은 이와같은 시간적, 경제적제약 조건하에서 느린 속도로 진행되어 왔다**.

비교적 최근에 암예방물질을 동물세포를 이용하여 탐색하는 시스템이 미국의 존스홉킨스대학 연구팀에 의하여 개발되어 암예방물질의 탐색은 신기원을 맞이했다고 평가되고 있다 (Prochaska 1994). 이 시스템의 원리를 간략히 요약하면, 동물의 해독효소계가 잘 보존된 mouse hepatoma 세포 (hepa1c1c7 cells)를 이용하여 탐색하고자 하는 대상시료를 세포에 일정시간 노출시킨 다음, 세포의 해독효소의 활성을 신속하게 assay하는 것이다. 이전의 많은 연구자들에 의해서 해독효소계의 지표효소인 quinone reductase가 많은 암예방활성을 나타내는 성분들에 의해서 유도된다는 것이 알려졌다. 따라서 **hepa1c1c7세포의 quinone reductase를 유의적으로 활성화시키는 능력은 곧 해독성분뿐만 아니라 암예방활성성분의 존재를 의미하는 것으로 평가할수 있다는 것**이다. 이 방법은 국내외적으로 암예방성분을 탐색하는데 사용되는 공식적인 방법으로 인정되어 있다 (Jang 1997, Prochaska 1994, http://yes.snu.ac.kr).

본 연구자들은 이 시스템을 이용하여 국산 채소류 30종에 대하여 생체방어효소계 (암예방효소계 및 해독효소계)의 지표효소인 quinone reductase의 활성을 유도하는 능력을 실험하였으며, 부가적으로 arylhydrocarbon hydroxylase (발암물질의 활성화와 관련된 1상효소), Ames test, superoxide dismutase 유사활성 등을 측정함으로서 생체방어효능이 높은 신기능 식품소재를 탐색하였다. 이러한 연구에서 얻어진 결과를 바탕으로 고부가가치의 신기능 건강음료를 개발하였으며 상품화를 위하여 계속 노력하고 있다. 이러한 연구결과가 효율적으로 홍보되어 산업화를 가속화시킨다면 위축되고 있는 국내 1차산업의 활성화에도 크게 기여하리라 기대된다. 따라서 본 연구의 구체적인 목표는 다음과 같이 요약할수 있다.

가. 생체방어기능이 우수한 소재를 대량으로 신속하게 탐색하는 기술의 확립
나. 생체방어효능이 우수한 원료의 선정 및 활성소재의 가공적성 규명
다. 활성성분의 추출방법 확립
라. 생체방어활성이 확인된 채소류를 이용한 신기능 건강음료의 개발

2. 연구개발 내용 및 범위

본 연구의 내용은 국내산 채소류 30종 (엽채류 20종, 근채류 10종)을 대상으로 이들 중 quinone reductase는 크게 활성화시키면서 동시에 arylhydrocarbon hydroxylase는 제한적으로 유도하는 것들을 선정하여 건강식품개발을 위한 소재로 활용 방안을 연구하는 것이다. 이를 위해 동물세포모델계를 이용하여 탐색하고 실험동물을 이용하여 효능을 검증하며 또 선정된 채소류의 항돌연변이원성 (Ames Test) 과 SOD (superoxide dismutase) 활성을 측정하여 종합적으로 생체방어효과를 조사하였다. 선정된 채소류들을 대상으로 추출물을 얻기위한 최적 추출조건을 확립하며 추출물중 활성성분들의 열 안정성 및 pH 안정성을 조사하여 식품가공중 안정성을 평가하였다. 또한 추출물을 이용하여 기호도가 높은 음료를 제조하기 위한 최적 추출물 첨가농도 결정, 기호성 증진을 위한 부재료의 선택 및 혼합비율등을 조사하여 음료개발을 위한 최적 formulation과 제조공정을 확립하는 것도 주요 연구내용이다. 마지막으로 추출물의 단계적인 분획, 정제를 통한 활성성분의 확인도 본 연구에서 수행되었다.

제 2 장 재료 및 방법

1. 채소시료 및 전처리

본 연구에 사용한 채소시료는 근채류 10 종, 엽채류 20 종으로 표 1에 채소류들을 수록하였다. 가락동 농수산물 시장에서 구입한 채소류를 깨끗이 세척, 절단한 후 냉동건조하였으며 이를 분말화하여 80% MeOH 용액을 시료중량의 10배 정도 가하여 shaking incubator (25℃)에서 하룻밤 추출하였다. 추출액을 여지 (Whatman No. 40)로 여과한후 rotary evaporator로 감압하에 40℃에서 추출용매를 증발시키고 남은 농축물을 냉동건조하여 생체방어 효소계 활성소재 탐색을 위한 시료와 음료제조를 위한 시료로 사용하였다.

2. 세포배양

본 실험에 사용한 모델계는 mouse hepatoma cell의 일종인 Hepa1c1c7 세포로서 American Type Culture Collection (ATCC)에서 분양을 받았다. 세포는 10% fetal bovine serum (charcoal-heat treated, Gibco)와 항생제(penicillin:105 unit, streptomycin: 100mg/L)를 함유하는 α-MEM배지에서 배양하였다. 세포는 disposable culture plate (55cm2, Corning)에서 monolayer로 자라도록 하였으며, CO2 incubator (MCO 96, Sanyo, Japan)를 사용하여 배양 온도 및 CO2 농도를 37oC, 5%로 유지하였다.

3. 세포독성의 측정

시료추출물 및 분리된 성분들의 세포독성 (cytotoxicity)을 측정하기 위하여 96-well plate에 세포를 5 x 103 cells/well 로 plating 하고, 여기에 일정농도의 시료추출액을 가한 다음, 4일간 배양하였다. 배지를 제거하고 MTT 용액으로 염색하여 Microplate reader (MD uvmax)를 이용하여 580 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료추출물의 세포독성은 세포수를 무처리구의 50%로 감소시키는데 필요한 시료추출물의 고형분 함량 (ED50)으로 표시하였다 (Mosmann 1983).

표 1. 본 연구에 사용한 채소류들

근 채 류 (10)	엽 채 류 (20종)
당근 (Carrot, *Daucus carotu*) **더덕** (Do dok, *Codonopsis lanceolata*) **도라지** (Doraji, *Platycodon grandiflorum*) **마늘** (Garlic, *Allium sativum*) **무**(Korean Radish, *Raphanus sativus*) **생강**(Ginger root, *Zingiber officinale*) **숙주** (Mungbean sprout) **양파** (Onion, *Allium cepa*) **연근** (Lotus root, *Neiumbo nucifera*) **우엉** (Burdock, *Arctium lappa*)	**갓** (Mustard leaf, *Brassica juncea*) **고비** (Royal fern, *Osmunda japonica*) **고사리** (Braken, *Pteridium aguilinum*) **깻잎** (Perilla leaf, *Sesamum indicum*) **냉이** (Shepherd's purse, *Capsella bursapast*) **달래** (Wild garlic, *Allium monanthum*) **미나리** (Water dropwort, *Nasturtium officinale*) **배추** (Chinese cabbage) **부추** (Leek, *Allium odorum*) **상추** (lettuce native) **셀러리** (Celery, *Apium graviolens*) **시금치** (Spinach, *Spinaoia oleracea*) **쑥** (Mugwort, *Artemisia* spp.) **쑥갓** (Crown daisy, *Chrysanthemum coronarium*) **양배추** (Cabbage, *Brassica oleracea* L.) **양상치** (Lettuce, *Lotuca sativa*) **적채** (red cabbage) **취** (Chwi, *Pueraria thunbergiana*) **파** (Green onion, *Allium fistulosum*) **호박잎** (Pumpkin young leaf)

4. Quinone reductase 활성 측정

Hepa1c1c7 세포를 10% FBS과 penicillin (105 units/L), streptomycin (100 mg/L)을 함유하는 α-MEM 배지에서 배양하였다. 세포를 세포배양 plate (55cm2, Corning)에 3 × 104/mL 농도로 분주하고 48시간 배양한 다음, 추출용매에 용해시킨 동결건조 시료를 첨가하여 24시간 더 배양하였다. 배양이 완료되면 배지를 제거하고 phosphate buffered saline (PBS)으로 5 mL씩 3회 반복하여 세척했다. Plate에 0.25 M sucrose용액 1 ml를 가하고, cell scraper를 이용하여 세포를 수집하고, ultrasonic cell disrupter (50W, Kontes)에서 세포를 균질화하였다. 세포균질액 (cell extract)을 microfuge에서 원심분리 (9,000 x g, 20분)한 후 QR 효소활성과 단백질함량 측정에 사용하였다. QR 효소활성은 Benson (1980)등의 방법에 따라, 2,6-dichlorophenolindophenol (DCPIP)를 환원시키는 정도를 측정하여 나타냈다. 즉, 반응액 3 mL에 25 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.7 mg BSA, 0.01% Tween 20, 5 μM FAD, 0.2 mM NADH, 0 또는 10 μM dicumarol, 0.2 mL 세포균질액을 혼합하여 제조하였다. 여기에 40 μM DCPIP를 첨가함으로써 반응을 시작하고 600 nm에서 2분동안 scanning을 수행하였다. QR 효소활성은 1분간 감소되는 흡광도와 DCPIP의 molar extinction coefficient (2.1x104 M-1 cm-1)로부터 환원된 DCPIP의 양을 계산하고 세포균질액의 단백질함량을 측정하여 nmoles DCPIP reduced/min/mg protein으로 나타내었다. 한편 단백질함량은 Lowry (1951)법 으로 측정하였다.

5. Arylhydrocarbon hydroxylase (AHH) 효소활성측정

AHH는 Nebert (1978)의 방법에 따라, benzo(a)pyrene을 기질로하여 측정하였다. 세포배양은 QR 효소활성측정시와 같은 조건하에서 수행하였으며, 1회 측정에 약 5x106 cells를 사용하였다. 2개의 plate (55cm2, Corning)에 가득 자란 세포를 0.15 M KCl-10 mM potassium phosphate 완충용액 (pH 7.25)으로 씻은 후, 같은 용액 1 ml를 가하여 cell scraper로 세포를 수집하고 ultrasonic cell disrupter에서 균질하여 세포균질액을 제조하였다. 0.2 ml 세포균질액과 0.76 ml 반응액을 혼합하여 37oC에서 3분간 예열하고 기질로서 40 μl 2 mM beno(a)pyrene을 가하여 60분간 반응시켰다. 즉, 최종효소반응액 1 ml에는 50 μmol potassium phosphate buffer (pH 7.25), 0.39 μmol NADH, 0.36 μmol

NADPH, 0.2 ml cell extract, 80 nmol benzo(a)pyrene (in 40 ㎕ methanol)이 함유되도록 하였다. 반응을 종결하기 위하여 4.25 ml cold hexane-acetone (3.25:1)를 가하고 37℃에서 10분간 반응산물을 추출하였다. 유기용매층 1 ml와 1.0 N NaOH 3 ml를 혼합한 다음, 1000 × g에서 2분간 원심분리하고, 즉시 알카리층을 취하여 형광광도계 (SFM-25, Kontron)에서 형광광도를 측정 (Ex 398nm, Em 522 nm) 하여 상대적인 효소활성을 계산하였다.

6. 추출물의 항돌연변이효과 측정

채소추출물중 항돌연변이원성 물질의 존재 유무를 조사하기 위해 Maron과 Ames (1983)의 Salmonella mutagenecity test를 실시하였다. *Salmonella typhimurium* TA100 (염기치환형 변이주) 과 TA98 (frame-shift mutant) 균주를 이용, preincubation 방법을 실시하였다. 돌연변이원으로는 S-9 mix에 의한 대사활성화가 필요없는 직접변이원인 sodium azide (SA), 2-nitrofluorene (2NF), 4-nitroquinoline (4-NQO)과 대사활성화가 요구되는 trp-p-1, aflatoxin B1 (AFB1)을 사용하였다. S9 mixture는 Sprague Dawley계 rat (male)에 Maron과 Ames의 방법에 따라 Aroclor 1254를 corn oil과 함께 주사하여 얻었다. 예비실험을 통해 세포의 생육은 저해하지 않으면서 변이원의 첨가량에 비례해 변이가 증가하는 범위를 먼저 결정하였다. 변이원중 SA는 멸균한 MilliQ water에 나머지는 Dimethylsulfoxide (DMSO)에 녹여 사용하였고 plate당 SA는 2 ㎍, 2NF는 5 ㎍, 4NQO는 0.5 ㎍, trp-p-1은 1 ㎍, 그리고 AFB1은 1 ㎍을 사용하였다. 실험방법으로는 멸균된 cap tube에 4% S-9 mix 0.5 ml (대사활성화가 필요없는 경우. 0.2 M phosphate buffer (pH 7.4) 0.5 ml), DMSO에 100 mg/ml 농도로 녹인 추출물 0.1 ml, mutagen 0.1 ml 그리고 nutrient broth에서 하룻밤 배양한 균주 0.1 ml씩을 섞은 다음 37℃에서 20분간 둔 다음 45℃ top agar 2 ml와 섞어 2-3초 혼합한 다음 최소배지에 도말하여 37℃에서 48시간 배양후 자라는 균락수를 구하였다. Vogel-Bonner 최소배지를 사용하였으며 시료당 3개 plate를 사용하여 평균값으로 revertant들의 수를 표시하였다.

7. 추출물의 SOD 역가 측정

추출물의 SOD 효소역가 측정을 위해 두가지 방법을 사용, 비교하였다.

가. Cytochrome C 방법: 3 ml cuvette에 2.0 ml solution A를 50 ul 측정 시료와 섞은 후 흡광도의 변화가 없을 때 50 ul의 solutionB를 잘 섞은 다음 550 nm에서 흡광도의 변화를 측정한다. SOD역가 1 unit는 cytochrome C의 환원속도를 50% 저해하는 시료의 양으로 정의하였다. Solution A: 0.76 mg xanthine을 함유한 0.001 N NaOH 10 ml와 24.8 mg의 환원형 cytochrome C와 0.1 mM EDTA를 함유한 50 mM phosphate buffer (pH 7.8) 100 ml를 섞어서 제조. Solution B: 0.1 mM EDTA 용액에 xanthine oxidase을 첨가하되 첨가량은 550 nm에서 분당 0.025의 흡광도가 증가되도록 한다.

나. Pyrogallol 자동산화법: 시료의 SOD 유사활성 또는 동물조직의 SOD 활성은 알카리상태에서 pyrogallol이 자동산화되는 과정을 억제하는 정도로 측정하였다 (MarKlund 1974). 즉, 시료, 1 mM DTPA와 55.6 mM tris-base를 혼합하고 cacodylic acid로 용액의 pH를 8.2로 정확하게 조정한 다음, 이 용액 2.7 ml와 6 mM pyrogallol (in 10 mM HCl) 0.3 ml를 cuvette에서 혼합하여 420 nm에서의 흡광도 변화를 관찰하였다. 미토콘드리아에 존재하는 Mn-SOD는 1 mM KCN (CuZn-SOD 저해제) 존재하에 효소활성을 측정하였다. SOD 1 unit은 1분동안 pyrogallol의 자동산화를 50% 억제하는데 필요한 효소의 양으로 정의하였다.

8. 동물실험

체중 200±20 g 의 Sprague Dawley계 수컷쥐 20 마리를 대한실험동물센터(음성, 충북)로 부터 구입하여 대조군과 실험군으로 나누어 처음 1주일간은 Chow로 적응을 시키고, 다음 일주일간은 대조군 (AIN-76)과 쑥갓시료 첨가사료 (AIN-76 + 동결건조 쑥갓 10%)를 1주일간 급여하였다. 사육기간 종료후 dry ice로 채워진 desiccator에서 동물을 마취시킨 다음, 간, 폐, 소장, 신장 등을 적출하여 무게를 측정하고 즉시 액체질소에서 급속동결하여 -70oC 냉동고에 보관하면서 QR, AHH 및 superoxide dismutase 효소활성 측정에 사용하였다. 사육기간동안 동물에게 식수를 자유로 섭취할수 있도록 하였으며, 사육실의 온도는 20±2oC를 유지하였다.

9. 추출물의 열안정성, pH 안정성

채소추출물중의 생체방어효소계 활성화 물질이 식품가공중 흔히 접하는 열처리 조건이나 pH 변화에도 안정한지를 조사하였다. 동결건조된 쑥갓추출시료를 pH 완충용액 (pH 3, 4, 5, 6, 7)으로 제조한 80% 메탄올용액에 용해한 다음, 실온에서 24시간 방치한 후, 멸균여과하여 세포배양액에 2.5 mg/ml 농도로 투여하여 quinone reductase 활성유도능이 유지되는지 평가하였다. 한편, 쑥갓추출물의 열안정성은 pH 3과 4로 조절한 시료액을 80, 85, 90℃에서 15초, 30초, 60초 및 120초간 처리한 후 멸균여과하여, hepa1c1c7 세포배양액에 투여하였다. 세포를 24시간 시료에 노출시켜 quinone reductase 활성을 측정하였다.

한편 시료의 열처리 및 pH 변화가 quinone reductase 활성외에 시료의 항돌연변이원성에도 영향을 주는지를 조사하기위해 Ames Test를 실시하였다. 열처리 조건은 채소추출물을 dimethylsulfoxide에 100 mg/ml 농도로 녹인다음 heating block을 사용하여 70, 80, 90℃에서 각각 1, 5, 10, 20, 30분간 둔 다음 꺼내어 항돌연변이원성을 측정하였다. 변이원으로는 4-NQO와 trp-p-1을 사용했고 추출물은 plate당 5 mg 사용하였다. pH 변화에 따른 안정성을 보기위해 추출물을 pH 3, 4, 5, 6, 7로 조정한 80% 메탄올용액에 녹인 다음, 실온에서 8시간 둔 다음 마찬가지로 항돌연변이원성을 측정하였다.

10. 생체방어효소계 활성인자의 분리

동결건조한 쑥갓을 80% 메탄올용액으로 추출하여, 증발농축 및 동결건조과정을 거쳐 분말화하고, 이를 hexane, ethylacetate, n-butanol, 물등으로 순차적으로 용매분획을 수행하였으며, QR유도활성이 가장 높게 나타난 ethylacetate층을 preparative TLC를 이용하여 활성성분을 분리하였다. 즉, 활성이 가장 높았던 분획을 80% 메탄올에 0.1g/ml 농도로 용해하였으며, 분석용 또는 preparative TLC plate (Kieselgel 60 F254, Merck)에 각각 5㎕ 또는 80㎕ 씩 점적하여 n-butanol : n-propanol : 2N ammonia (10:60:30)을 전개용매로 하여 15㎝ 전개시켰다. 전개가 종료된 후 자외선 (short UV light: 254㎚)하에서 분리된 점적 또는 띠를 확인하여 표시하였다. Preparative TLC plate에서 전개한 시료는 Rf값

에 따라 각 분획을 razor blade로 채취하여 80% 메탄올로 추출하고, 원심분리 및 여과를 거쳐 공시하였다. 각 TLC분획은 위에서 기술한 방법과 같이 세포에 투여하여 활성을 측정하였다. 즉, 각 fraction은 40oC 이하에서 증발농축시킨 다음 소량의 용매 (80% 메탄올)에 용해시켜, plate에서 배양한 hepa1c1c7 세포에 20 100 ul씩 투여하여 24시간후 QR효소활성을 측정하였다 (Prochaska 1988).

11. 선정된 소재를 이용한 음료제조

건강음료제조를 위해 일차적으로 생체방어효소계 활성화 정도가 우수한 채소류를 2-3 종 선정하였다. 선정된 채소들을 깨끗이 세척, 절단한 후 냉동건조하였으며 이를 분말화하여 80% MeOH 용액을 시료 중량의 10배 가하여 shaking incubator (25℃)에서 하룻밤 추출하였다. 추출액을 여지 (Whatman No. 40)로 여과한 후 rotary evaporator로 감압하 40℃에서 추출용매를 증발시키고 남은 농축물을 냉동건조하여 이를 음료제조용 소재로 사용하였다. 추출물의 적정 음용농도를 결정키 위해 100 500 mg/100 ml의 농도로 추출액을 첨가하였고, 당도는 7.5o Brix, pH는 4.0으로 조정하고 설탕과 구연산을 적정량 첨가하여 음료를 제조하였다. 풍미 증진을 위한 부재료로 사과과즙 농축액 (72o Brix)과 포도과즙 농축액(50o Brix)은 착즙, 농축하여 사용하였고, 결명자 (2.9o Brix)와 오미자 농축액 (35o Brix)은 볶은 결명자와 오미자를 세척한 후 열수추출하여 농축하여 사용하였으며, 사과 퓨레는 사과를 제핵, 박피한 후 증숙, 파쇄하여, 또 토마토 퓨레는 증숙, 파쇄하여 사용하였다. 음료의 관능성을 9점 검사법으로 조사하여 결과를 분산분석법으로 분석하였다.

12. 음료의 품질특성 조사

제조한 음료에 대해 아래 항목을 측정하였다.

가. 당도

Abbe식 굴절계 (AO MRK2 Refractometer)를 사용하여 측정하였다.

나. 적정산도

음료 25 ㎖을 취하여 0.1 N 수산화나트륨 표준용액으로 pH가 8.4가 될 때까지 적정하였으며 이때 이용된 0.1 N 수산화나트륨 표준용액의 양을 전체

시료에 대해 환산하여 적정산도로 나타내었다.

다. 아미노태 질소 (포르몰태 질소, Formol Nitrogen)

250 ㎖ 비이커에 음료 10 ㎖와 증류수 100 ㎖를 넣고 교반시킨 후 이를 0.1 N 수산화나트륨 용액으로 pH 8.4까지 적정하였다. 여기에 포르말린용액 (37%) 20 ㎖을 가한 후 다시 수산화나트륨 용액으로 pH가 8.4가 될 때까지 적정하였다. 별도의 바탕시험을 행한 후 다음과 같은 식에 의해서 아미노태 질소함량을 계산하였다.

$$\text{아미노태질소 (mg\%)} = \frac{(A - B) \times 1.4 \times f \times 100}{\text{시료량 (g)}}$$

여기서 A : 0.1 N 수산화나트륨 용액의 시료 적정량 (㎖)
B : 0.1 N 수산화나트륨 용액의 바탕시험 적정량 (㎖)
f : 0.1 N 수산화나트륨 용액의 농도계수

라. pH

pH 측정기 (Corning Type 3AG)를 이용하여 측정하였다.

마. 색도

색차계 (ColorQUEST Ⅱ, HunterLab)를 이용하여 밝기 (lightness, L), 적색도 (redness, a), 황색도 (yellowness, b) 값으로 측정하였으며, 이때 표준색판으로는 백색판 (L=99.41, a=- 0.18, b=0.49)을 사용하였다.

바. 저장성시험

제조한 3가지 음료의 저장성을 시험하기 위하여 37℃에서 저장하면서 이미, 이취등의 관능적인 특성의 변화를 일주일 간격으로 4주간 조사하였다. 이때 - 18℃에서 보관한 시료를 대조구로 하였다.

제 3 장 결 과

1. 채소추출물 조제 및 수율

실험방법에 기술한 대로 엽채류 20종과 근채류 10종, 모두 30종의 채소류를 냉동건조하고 80% MeOH 용액으로 추출, 농축후 냉동건조하였을 때의 수율은 표 2와 같다 원료를 추출, 농축한 후 냉동건조하였을 때 전반적으로 엽채류에 비해 근채류의 수율이 높게 나타났으며, 고비와 고사리가 각각 0.4, 0.6%로 가장 낮게, 마늘이 25.3%로 가장 높게 나타났다. 이것은 엽채류에 비하여 근채류의 고형물함량이 높고 또한 MeOH 가용성 성분도 더 높기 때문인 것으로 사료된다. 이렇게 얻은 동결건조된 채소시료들은 -76℃ 심온동결고에서 보관하면서 필요시 일정농도가 되게 용매에 녹여 사용하였다.

2. 추출물의 세포독성 측정

Quinone reductase 활성소재 탐색에 앞서 추출물의 적정투여량을 결정하기 위한 목적으로 수행되었다. 즉 계속 노출시 세포생육을 50% 이내로 억제하는 추출물의 최소농도를 결정하여 이를 QR 활성유도 유무 실험에 적용하였다. 결정된 채소 시료별 ED_{50} (세포증식을 50% 억제하는 농도) 값을 표 3에 나타내었다. 파, 깻잎, 냉이, 달래, 생강, 도라지등의 ED_{50}값이 0.08-0.31 mg/ml 로 낮아 세포독성이 강한 것으로 나타났다. 이 결과에서 이들 시료들은 in vivo 계에서 항암효과를 나타낼 가능성이 있음을 보여준다. 시금치, 취, 고비등도 ED_{50} 값이 1.25-2.5 mg/ml 로 중간정도의 세포생육 억제활성을 보였다. 그외 채소류들, 특히 생체방어효소계 활성화 정도가 우수한 쑥갓, 우엉, 갓등은 ED_{50}값이 5 mg/ml 이상으로 세포독성이 낮게 나타나 많은 양을 첨가할 수 있었다.

3. 추출물의 Quinone reductase 활성유도

추출물의 Quinone reductase 활성유도 정도를 측정하였다. 세포독성실험

결과에 기초하여 투여량을 결정하였으며 시료 투여량 및 Quinone reductase 효소 활성 유도 결과를 표 4에 나타내었다. 표에 나타난 바와 같이 검색한 30종의 채소류가운데 근채류에서는 무와 엉이, 엽채류에서는 양배추, 쑥갓, 갓, 미나리, 배추, 적채, 고비, 고사리등 10종이 생체방어효소계 (Quinone Reductase)의 활성을 대략 50% 이상 증가시켰으며, 당근도 약 30% 세포의 QR효소활성을 증가시키는 것으로 나타났다.

4. 추출물의 AHH 효소활성 측정

QR에 대해 유도활성이 높게 나온 위의 10종의 채소류에 대하여 AHH (Arylhydrocarbon hydroxylase) 활성유도 정도를 측정하여 그 결과를 표 5에 나타내었다. 표에 나타낸바와 같이 QR 유도활성을 유의적으로 유도한 10 종의 채소류 가운데 적채, 고비, 무, 배추, 양배추등은 1상계 효소중 전발암성 물질 (procarcinogen)의 활성화와 관련이 깊은 AHH의 활성도 비교적 높은 수준으로 증가시키는 것으로 나타나 건강식품제조를 위한 소재로는 바람직하지 않은 것으로 판단되었다. 고비의 경우 Ames Test에서 5 mg/ml 농도로 첨가시 변이원의 첨가없이도 높은 빈도로 돌연변이를 유도하였다. 표 4와 표 5의 결과를 종합해 볼때 실험한 30종의 채소류중에서는 독성과 PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons) 등과 같은 생체외이물질(xenobiotics)의 독성발현가능성이 낮으면서도 생체방어능이 우수한 쑥갓, 갓, 우엉이 건강음료 제조를 위한 소재로 가장 적합하다고 사료되어 이들을 음료 제조 실험의 대상으로 선정하였다.

5. 추출물의 용량-반응 (dose-response) 관계 및 병용효과

쑥갓, 갓, 고사리 및 우엉 추출물 농도를 0.1 mg/ml 부터 5.0 mg/ml 까지 증가시키면서 QR 효소활성 유도에 미치는 영향을 조사하여 그 결과를 표 6에 나타내었다. 네종류의 시료 공통적으로 1.0 mg/ml 이상 농도에서 유도효과가 나타났고 갓의 유도 정도가 가장 크고 쑥갓, 우엉은 낮았다. 그러나 시료농도가 2.5 mg/ml 이상에서는 쑥갓의 유도정도가 가장 높게 나왔다. 사용한 최고 농도인 5 mg/ml에서 쑥갓 과 우엉이 생체방어효소계 유도활성이 가장 높은 것으로 나타나 음료개발을 위한 적당한 소재로 판단되었다. 채소추출물들을 함께 첨가하는 것이 QR 효소 유도시 상승효과를 나타내는지를 조사하였다. 시료의 병용효과

표 2. 채소류 냉동건조 추출물의 수율

원 료	원 료 무 게	냉동건조 후의 무게 (%)	추출,농축, 냉동건조 후의 무게 (%)
엽 채 류			
부 추	1315 g	144.6 g (11.0)	42.1 g (3.2)
파	1726 g	183.0 g (10.6)	60.4 g (3.5)
냉 이	1277 g	249.0 g (19.5)	38.3 g (3.0)
양 배 추	1159 g	104.3 g (9.0)	48.7 g (4.2)
미 나 리	1531 g	99.5 g (6.5)	47.5 g (3.1)
달 래	1723 g	224.0 g (13.0)	74.1 g (4.3)
갓	1816 g	163.4 g (9.0)	56.3 g (3.1)
깻 잎	1552 g	228.1 g (14.7)	35.7 g (2.3)
쑥 갓	1626 g	116.7 g (8.8)	53.6 g (3.3)
양 상 치	2442 g	90.2 g (3.7)	45.1 g (1.8)
시 금 치	1051 g	74.2 g (7.1)	11.5 g (1.1)
샐 러 리	1176 g	129.1 g (11.0)	46.1 g (3.9)
고 사 리	1764 g	150.0 g (8.5)	10.1 g (0.6)
상 추	2140 g	111.0 g (5.2)	28.8 g (1.4)
배 추	2299 g	139.8 g (6.1)	69.1 g (3.0)
고 비	1323 g	112.6 g (8.5)	4.5 g (0.4)
호 박 잎	1953 g	157.3 g (8.1)	34.8 g (1.8)
적 채	1563 g	135.9 g (8.7)	62.4 g (4.0)
쑥	1189 g	128.8 g (10.8)	27.7 g (2.3)
취	1570 g	93.7 g (6.0)	14.5 g (0.9)
근 채 류			
무	1839 g	119.7 g (6.5)	65.2 g (3.5)
당 근	2020 g	255.3 g (12.6)	93.5 g (4.6)
우 엉	1529 g	167.3 g (10.9)	60.0 g (3.9)
연 근	1855 g	364.9 g (19.3)	75.0 g (4.0)
마 늘	1055 g	373.8 g (35.4)	266.7 g (25.3)
양 파	1569 g	163.6 g (10.4)	105.3 g (6.7)
생 강	1005 g	174.4 g (17.4)	24.7 g (2.5)
숙 주	957 g	52.2 g (5.5)	28.7 g (3.0)
더 덕	408 g	96.4 g (23.6)	26.8 g (6.6)
도 라 지	967 g	171.9 g (17.8)	68.9 g (7.1)

표 3. 채소추출물의 세포독성

시 료		농 도 (mg/ml)									ED50 (mg/ml)
		0	0.04	0.08	0.16	0.31	0.63	1.25	2.5	5.0	
근채류	당근	100	-	-	-	-	99	108	107	84	> 5.0
	더덕	100	-	-	-	100	97	83	68	9	2.5 5.0
	도라지	100	-	-	-	-	76	16	8	8	0.63 1.25
	마늘	100	-	-	-	-	95	88	76	38	2.5 5.0
	무우	100	-	-	-	88	80	72	51	10	2.5 5.0
	생강	100	-	102	95	76	32	13	8	14	0.31 0.63
	숙주	100	-	-	-	-	106	96	101	61	> 5.0
	양파	100	-	-	-	-	103	93	90	38	2.5 5.0
	연근	100	-	-	-	-	106	104	96	55	> 5.0
	우엉	100	-	-	-	-	93	81	78	55	> 5.0
엽채류	갓	100	-	-	-	78	100	100	61	73	> 5.0
	고비	100	-	-	-	-	93	87	49	25	1.25 2.5
	고사리	100	-	-	-	99	87	67	33	6	1.25 2.5
	깻잎	100	41	53	31	22	14	19	19	19	0.08 0.16
	냉이	100	74	78	65	52	43	45	33	21	0.31 0.63
	달래	100	100	100	52	23	20	20	27	8	0.16 0.31
	미나리	100	-	-	-	78	73	81	50	13	2.5 5.0
	배추	100	-	-	-	-	90	89	78	66	> 5.0
	부추	100	-	-	-	80	73	83	61	47	2.5 5.0
	상추	100	-	-	-	-	88	91	91	67	> 5.0
	셀러리	100	-	-	-	-	90	81	86	61	> 5.0
	시금치	100	-	-	-	-	87	78	30	14	1.25 2.5
	쑥	100	-	-	-	-	95	84	75	18	2.5 5.0
	쑥갓	100	-	-	-	100	91	100	83	87	> 5.0
	양배추	100	-	-	-	80	88	70	75	46	2.5 5.0
	양상치	100	-	-	-	-	98	90	89	68	> 5.0
	적채	100	-	-	-	-	88	89	78	64	> 5.0
	취	100	-	-	-	-	90	65	12	24	1.25 2.5
	파	100	52	66	22	16	8	0	0	0	0.08 0.16
	호박잎	100	-	-	-	-	96	95	83	64	> 5.0

표 4. 채소시료에 의한 Quinone reductase 활성유도

시 료		사용농도(mg/ml)	효소활성 (nmoles DCPIP reduced/ min/ mg protein)	효소활성증가(%)
대 조 군		0	122	100
근채류	당 근	5.0	168	137
	더 덕	2.5	148	121
	도라지	0.63	90	74
	마 늘	2.5	110	90
	무 우	2.5	196	161
	생 강	0.31	125	102
	숙 주	5.0	149	121
	양 파	2.5	130	105
	연 근	5.0	95	78
	우 엉	5.0	178	145
엽채류	갓	5.0 (2.5)	174 (226)	143(185)*
	고 비	2.5	223	182
	고사리	2.5	173	142
	깻 잎	0.16	135	111
	냉 이	0.31	128	105
	달 래	0.16	144	118
	미나리	2.5 (5.0)	162 (223)	133 (183)*
	배 추	5.0	180	147
	부 추	2.5	124	102
	상 추	5.0	151	123
	셀러리	5.0	147	120
	시금치	1.25	138	113
	쑥	2.5	146	120
	쑥 갓	5.0	195	160
	양배추	2.5	187	153
	양상치	5.0	111	90
	적 채	5.0	196	160
	취	1.25	134	109
	파	0.05	123	101
	호박잎	5.0	139	113

*, ** : 농도를 달리하였을때 관측된 QR 효소활성 증가임.

표 5. 채소시료에 의한 AHH의 활성유도

시 료		사용농도 (mg/ml)	효소활성증가 (fold)
대 조 군		0	1
근채류	우 엉	5.0	2.3
	무 우	2.5	4.2
엽채류	갓	2.5	3.3
	고 비	2.5	4.7
	고사리	2.5	1.3
	미나리	5.0	3.0
	배 추	5.0	5.2
	쑥 갓	2.5	2.4
	양배추	5.0	9.2
	적 채	5.0	27.7

표 6. QR 효소활성에 미치는 채소 추출물농도의 효과

농 도 (mg/ml)	QR induction (%)			
	갓	쑥갓	우엉	고사리
-	100	100	100	100
0.1	81	80	86	82
0.5	101	92	93	105
1.0	137	120	114	115
2.5	140	162	135	145
5.0	153	168	165	-

표 7. QR 효소활성에 미치는 시료들간의 병용효과

시 료	농도(㎎/㎖)	QR induction (%)
Control	-	100
갓 / 쑥갓	5.0 / 0.0	153
	3.3 / 1.7	133
	2.5 / 2.5	136
	1.7 / 3.3	155
	0.0 / 5.0	168
갓 / 우엉	5.0 / 0.0	153
	3.3 / 1.7	171
	2.5 / 2.5	163
	1.7 / 3.3	174
	0.0 / 5.0	165
쑥갓 / 우엉	5.0 / 0.0	168
	3.3 / 1.7	179
	2.5 / 2.5	166
	1.7 / 3.3	**203**
	0.0 / 5.0	165
고사리/우엉	5.0 / 0.0	106
	3.3 / 1.7	138
	2.5 / 2.5	139
	1.7 / 3.3	170
	0.0 / 5.0	165
고사리/쑥갓	5.0 / 0.0	106
	3.3 / 1.7	133
	2.5 / 2.5	114
	1.7 / 3.3	127
	0.0 / 5.0	168

(combination effect)를 측정한 결과를 표 7에 나타내었다. 표에서 보는 것 처럼 갓과 쑥갓, 갓과 우엉, 고사리와 쑥갓등의 혼합은 QR 효소 활성에 대해서 상승효과를 나타내지 않으나 쑥갓과 우엉을 1:2로 혼합했을 때는 QR 유도활성이 현저히 높아져서 쑥갓과 우엉이 적절히 혼합된 음료를 제조하는 것이 바람직한 것으로 추정된다.

결론적으로 본 연구에서 검색한 30종의 채소류 가운데 쑥갓, 갓, 우엉이 생체방어효소계 활성이 가장 높고 부작용 가능성이 가장 낮아, 이들을 소재로 건강음료을 개발하는 것이 최적이라 판단된다.

6. 시료의 항돌연변이원성 조사

실험에 사용한 직접변이원들인 sodium azide (SA), 2-nitrofluorene (2NF), 4-nitroquinoline (4-NQO) 중에서 추출물 첨가시 돌연변이가 억제되는 정도는 4NQO에서 가장 현저하였다. 따라서 4-NQO를 S-9 mix에 의한 대사활성화가 필요없는 직접 변이원으로 주로 사용하였고 얻어진 결과를 표 8과 9에 나타내었다. 사용균주는 *S. typhimurium* TA100이며 4-NQO의 첨가량은 0.5 ㎍/plate 이며 추출물의 첨가량은 ( )내에 표시하였다. (5)는 5 mg/plate, (10)은 10 mg/plate를 나타낸다. 표의 맨 오른칸에 있는 괄호 속의 수치는 채소시료 첨가시 4NQO에 의한 돌연변이가 억제되는 정도를 (%) 나타내며, 억제효과는 (돌연변이원만 존재시 colony 수- 돌연변이원과 추출물이 다 있을때의 colony 수)/ (돌연변이원만 존재시 colony 수- 둘 다 없을 때 colony 수) x 100 으로 계산하였다. 근채류중에서 숙주, 마늘, 연근은 항돌연변이 효과가 없었고 생강(49.1%), 양파(47.6%), 더덕 (33.5%)이 비교적 돌연변이억제 효과가 우수했다. 엽채류들은 모두 다 항돌연변이 효과를 보였고 이중 달래 (59.7%)와 부추 (57.5%)가 비교적 높게나왔다. 고비의 경우 5 mg/plate 농도로 변이원없이 단독 첨가시 돌연변이를 유발함도 알수 있었다. 한편 예비실험을 통해 추출물의 항돌연변이 억제효과는 첨가량에 비례하는 것으로 나타났다. S-9 mix에 의한 대사활성화가 필요한 변이원인 trp-p-1 (1 ㎍/plate)을 사용한 실험에서는 *Salmonella typhimurium* TA98을 시험균주로 사용하였고 그 결과는 표 10에 나타내었다. 전 시료들 중에서 냉이 (69.3%), 양상치(58.5%), 부추 (57.5%), 대파 (56.9%) 의 저해효과가 높게

나왔고 생체방어효소계 활성화가 우수한 우엉 (44.0%), 쑥갓 (22.5%), 갓 (31.8%) 들도 돌연변이 억제효과를 지닌 것으로 나타났다. 따라서 생체방어효소계를 활성화시키는 우엉, 갓, 쑥갓들은 항돌연변이원성 그리고 SOD 유사활성 (아래 설명 참조) 까지 지니고 있어 성격이 다른 여러 세포보호기작들에 의해 이들을 섭취시 총체적으로 건강증진효과를 줄것이 예상되어 건강음료 제조를 위한 좋은 소재임을 확인할 수 있었다.

7. 시료의 SOD 효소역가 측정

SOD 유사활성을 두가지 방법 즉 cytochrome C reduction test와 pyrogallol autoxidation test에 의해 측정한 결과를 표 11에 나타내었다. Cytochrome C 방법에서 높은 활성을 나타낸 시료는 근채류의 연근 (2956)과 우엉 (1052)이었으며 엽채류에서는 양상치 (6699), 깻잎 (3061), 적채 (2109), 갓 (1027)이었다. 특히 양상치는 분석된 시료 중 가장 높은 수치를 나타냈다. Pyrogallol autoxidation 방법에서 높은 활성을 보인 시료는 근채류에서는 마늘 (206)과 생강 (100)이었으며 나머지는 대부분 활성을 나타내지 않았다. 엽채류에서는 숙주 (371), 고사리 (302), 쑥 (319), 고비 (206), 상추 (162), 부추 (152), 호박잎 (149)이 100이상의 높은 활성을 나타내었다. 식물체에서는 다양한 물질이 항산화성을 나타내는 것으로 알려져 있다. Vitamin C와 vitamin E 같은 vitamin류도 항산화성을 나타내기도 하지만 식물에 존재하는 항산화성은 대부분의 경우 polyphenol성 물질에 기인하는 것으로 밝혀져 있다. 따라서 분석된 근채류와 엽채류가 나타내는 SOD 유사활성은 vitamin 보다는 시료에 함유된 polyphenol성 물질에 의한 것으로 추정되어지며 이를 입증하기 위해서는 SOD유사활성을 나타낸 추출시료에 대한 세밀한 성분분석이 요구된다고 할 수 있다.

8. 쑥갓추출물 급여가 흰쥐의 생체방어효소계에 미치는 영향

쑥갓은 30종의 채소류가운데 생체방어활성이 가장 우수하면서 또 예비적인 음료개발실험에서 관능적으로도 우수한 것으로 평가되어 흰쥐에 냉동건조한 쑥갓을 투여하여 생체 (in vivo) 효능실험을 수행하였다. 본 동물실험에 사용한 냉동건조한 쑥갓의 일반조성, 식이조성을 측정한 결과를 표 12 와 13에 나타내

표 8. 근채류 추출물의 항돌연변이 효과

변이원 / 추출물		(-) control	4NQO (0.5 ㎍/plate)
근채류 5mg/plate	(-) control	82	1539
	당근	90	1275 (18.1%)
	(-) contrrol	78	1603
	더덕	92	1092 (33.5%)
	무우	130	1537
	(-) control	102	1476
	도라지	125	1117 (26.1%)
	숙주	568	1612
	양파	95	822 (47.6%)
	(-) control	102	1403
	마늘	130	1503
	생강	105	764 (49.1%)
	(-) control	84	1456
	연근	128	2365
	(-) control	108	1924
	우엉	155	1320 (33.3%)

표 9. 엽채류추출물의 항돌연변이 효과

추출물 \ 변이원		(-) control	4NQO (0.5 ㎍/plate)
엽채류 5 mg/plate	(-) control	118	2532
	고비	1167	1606 (38.4%)
	(-) control	109	1939
	적채	143	1471 (25.6%)
	(-) control	102	1476
	양상치	121	1083 (28.6%)
	(-) control	82	1539
	샐러리	116	1054 (33.3%)
	배추	112	1334 (14.1%)
	(-) control	102	1403
	쑥	102	970 (33.3%)
	호박잎	105	943 (35.4%)
	(-) control	84	1456
	시금치	106	901 (40.5%)
	상추	129	1027 (31.3%)
	취	103	1063 (28.6%)
엽채류 10mg/plate	(-) control	132	2155
	양배추	192	1724 (21.3%)
	쑥갓	170	1638 (25.6%)
	갓	191	1907 (12.3%)
	미나리	191	1782 (18.4%)
	깻잎	214	2005
	(-) control	130	2563
	냉이	202	2223 (14.0%)
	달래	223	1111 (59.7%)
	대파	190	1258 (53.6%)
	부추	185	1164 (57.5%)

표 10. trp-p-1에 대한 채소추출물의 항돌연변이 효과

변이원 / 추출물		(-) control	trp-p-1 (1.0 ㎍/plate)
근채류 5 mg/plate	(-) control	24	1160
	당근	32	695 (40.9%)
	더덕	20	1292
	무우	33	2644
	도라지	26	998 (15.0%)
	양파	23	766 (35.0%)
	연근	26	2816
	(-) control	28	1479
	우엉	28	841 (44.0%)
	(-) control	29	1472
	숙주	41	1994
엽채류 5 mg/plate	(-) control	24	1160
	양상치	25	496 (58.5%)
	샐러리	32	1156
	배추	33	720 (38.7%)
	(-) control	29	1472
	쑥	34	1172 (20.8%)
	호박잎	36	806 (46.2%)
	시금치	38	1430
	상추	33	1118 (24.5%)
	취	32	1420
	깻잎	33	901 (39.6%)
	냉이	39	472 (69.3%)
	달래	26	802 (46.4%)
	대파	28	651 (56.9%)
	부추	28	642 (57.5%)
	(-) control	28	1479
	양배추	31	2333
	쑥갓	30	1153 (22.5%)
	갓	23	1017 (31.8%)
	미나리	25	1149 (22.7%)

표 11. 채소추출물의 SOD 유사활성 측정

Sample		Unit / g	
		cytochrome C reduction test	pyrogallol autoxidation test
근채류	달 래	392.40	53.83
	당 근	124.22	-
	더 덕	118.84	-
	도라지	165.30	-
	마 늘	544.06	205.94
	무 우	144.12	-
	생 강	632.26	100.25
	양 파	-	-
	연 근	2956.42	-
	우 엉	1051.52	-
엽채류	갓	1026.88	96.21
	고 비	890.70	206.43
	고사리	408.33	302.22
	깻 잎	3060.91	84.64
	냉 이	731.42	95.87
	대 파	274.90	74.11
	미나리	194.60	-
	배 추	422.35	-
	부 추	665.26	151.50
	상 추	266.13	161.94
	샐러리	-	-
	숙 주	360.83	371.16
	시금치	283.06	-
	쑥	602.11	318.77
	쑥 갓	332.99	-
	양배추	349.21	70.47
	양상치	6699.33	-
	적 채	2108.96	-
	취	306.12	-
	호박잎	493.21	149.16

었다. 실험기간 동안 흰쥐의 몸무게는 매일 평균 6.16 7.16 g 증가하는 것으로 나타났으며, 쑥갓섭취군과 대조군과의 유의적인 차이는 관찰되지 않았다. 식이 섭취량에서는 쑥갓군이 약간 적게 섭취하는 것으로 나타났다 (표 14). 쑥갓 투여후 실험동물의 장기를 추출하여 효소활성을 측정한 결과, 10% 쑥갓 급여 흰쥐군에서 세포모델계에서 관찰되었던 것과 유사한 생체방어효소계의 증가 패턴을 확인할수 있었다. 표 15에 나타난 것 처럼 모든 장기에서 쑥갓투여군의 경우 quinone reductase 효소활성이 증가되는 것이 관찰되었다. 특히 폐> 소장 > 간등의 순으로 효소활성유도 정도가 큰 것으로 나타났다. 한편, 쑥갓의 섭취가 흰쥐의 폐와 소장의 AHH 효소활성을 유의적으로 증가시키는 것으로 나타났으나, 간과 신장에는 영향을 미치지 않았다 (표 16). 전발암성분이 1상계효소에 의해서 발암성분으로 활성화되는 간에서 1상계효소계의 지표효소인 AHH 효소활성이 증가하지 않은 것은 쑥갓의 음료소재로서 장점을 더욱 향상시켜주는 결과로 판단된다. 한편, 표 17에 보인 바와 같이 전체적인 superoxide dismutase 효소활성은 쑥갓 섭취에 의해서 변화를 받지 않았다. 신장에서 Mn-SOD 효소활성이 약간 감소하는 경향이 관찰되었으나, 전체적인 SOD 활성에서는 유의적인 변화가 관찰되지 않아 쑥갓 섭취에 의해서 유해산소가 발생하거나, 쑥갓이 생체내에 흡수되어 SOD 유사활성을 나타내지는 않는 것으로 생각된다. 이상의 동물실험 결과를 종합하여 볼때 쑥갓은 매우 훌륭한 건강식품소재로 사료된다.

9. 쑥갓추출물의 pH, 열안정성 평가

쑥갓의 생체방어활성성분은 음료로 사용되는 pH 3 7 영역에서 안정한 것으로 나타났으며 (표 18), 열처리에 대해서도 안정한 것으로 확인되었다. 즉, 쑥갓의 80% 메탄올추출물을 pH 3, 4, 5, 6, 7용액에서 24시간 방치한 다음, 세포배양액에 투여하여 hepa1c1c7 세포의 QR 효소활성 유도정도를 측정한 결과 QR효소활성유도가 대조군의 230 270%로 pH에 따른 유의적인 변화가 없었다. 또한 음료 제조 조건에 해당하는 pH 3 과 4에서 여러 음료살균온도 (80, 85, 90℃)에서 처리한 다음, 세포배양액에 투여하여 세포의 생체방어효계인 QR효소활성 유도능을 측정한 결과, 활성이 온전히 유지되는 것이 확인되었다 (표 19, 20). 따라서 쑥갓에 존재하는 QR유도성분 (생체방어성분)은 비교적 열에 안정한 것으로 판단되며, 특히 음료제조중 가열에 의한 생체방어성분의 활성의

변화는 없을 것으로 사료된다.

또한 쑥갓과 우엉중의 항돌연변이성을 나타내는 성분도 열처리와 산성 pH에서 매우 안정한 것으로 나타났다. 즉, 쑥갓추출물을 90℃에서 10, 20 및 최대 30분 까지 열처리한 다음 돌연변이원인 trp-p-1 (1 ㎍/plate)과 함께 *S. typhimurium* TA98에 첨가했을 때 추출물의 항돌연변이원성은 열처리를 하지 않은 대조구와 차이를 보이지 않았다 (표 21). 표 21에서 보는 것 처럼 30분간 열처리를 한 쑥갓추출물을 trp-p-1과 함께 *S. typhimurium* TA98에 첨가한 경우에 얻는 revertant의 수는 145개로 열처리를 받지않은 대조구의 165 개 보다도 오히려 그 수가 적어 추출물의 항돌연변이원성은 전혀 영향을 받지 않았음을 보여준다. 돌연변이원으로 S9 mixture에 의한 대사 활성화가 필요없는 4-NQO (0.5 ㎍/plate) 를 변이원으로 사용한 경우에도 동일한 결과를 보여서 90℃에서 30분간 열처리한 쑥갓추출물은 1,095개 그리고 열처리하지 않은 추출물은 1,172개 revertant들을 나타내었다. 우엉추출물의 경우에도 열처리에 대해 안정한 것으로 나타났다. 표 22은 우엉추출물을 90℃에서 0, 10, 20 및 30분까지 열처리한 다음 변이원들에 대한 항돌연변이원성을 측정한 결과이다. 변이원 trp-p-1에 대해 20분간 열처리한 추출물은 130개 그리고 대조구는 129개 revertant들을 나타내었고 4-NQO에 대해서는 각각 167과 319개 revertant들을 나타내어 우엉추출물의 항돌연변이원성은 열에 안정함을 보여준다.
S. typhimurium TA100을 시험균주로 하여 쑥갓과 우엉추출물의 열안정성을 조사한 결과는 표 23에 나타내었다. TA98에서와 동일한 결과를 확인할 수 있었다.

쑥갓과 우엉 추출물의 항돌연변이원성은 여러 산성 pH에서도 안정한 것으로 나타났다 (표 24-26). 재료 및 방법에서 언급한 대로 pH 3, 4, 5, 6 및 7에서 여러 시간 둔 추출물을 4-NQO와 섞어서 *S. typhimurium* TA98 또는 TA100에 첨가하여 revertant들의 수를 조사한 결과 pH에 따른 차이가 전혀 없어 쑥갓 (표 24, 25)과 우엉추출물 (표 26)들의 항돌연변이원성은 열처리에 대해서 뿐만 아니라 낮은 pH에서도 안정함을 보였다. 따라서 이들 결과들로 미루어 볼 때 쑥갓과 우엉 추출물들은 통상적인 식품가공 처리조건하에서는 이들이 지닌 생체방어 활성 및 항돌연변이원성을 상실하지 않으리라 생각된다.

표 12. 동결건조 쑥갓의 일반조성

	Moisture (%)	Crude protein (%)	Crude fat (%)	Crude ash (%)	Carbohydrate (%)	
					sugars	TDF
Crown daisy	1.1	27.0	6.3	17.6	22.0	26.0

표 13. 실험동물 식이의 조성

	대조군 (%)	쑥갓 급여군* (%)
Casein	20	17.3
Corn starch	15	12.8
Sucrose	50	50
DL-Methionine	0.3	0.3
Corn oil	5	4.4
AIN-76 Mineral mixture	3.5	3.5
AIN-76 Vitamin mixture	1.0	1.0
Cellulose	5	2.4
Crown daisy*	-	10
Choline bitartrate	0.2	0.2

* 동결건조한 쑥갓 분말사용

표 14. 흰쥐의 체중증가율, 식이섭취량, 및 사료효율

	대조군	10% 쑥갓급여군
체중증가율 (g/day)	7.16±2.19 n.s	6.16±1.29
식이섭취량 (g/day)	27.44±4.93	21.90±1.43*
사료효율1) (%)	25.74±5.14 n.s	27.99±4.92

1) 사료효율(%)=체중증가율÷식이섭취량×100

* 5%유의수준에서 t-검정

표 15. 쑥갓급여가 흰쥐의 quinone reductase 효소활성에 미치는 효과

	Group	QR activity (nmole DCPIP reduced/mg protein)	
Liver	Control	98.67±5.96	(100±6.04)
	10% Crown daisy	145.50±12.50*	(147±12.67*)
Kidney	Control	72.67±7.25	(100±9.98)
	10% Crown daisy	94.80±10.91*	(130±15.01*)
Lung	Control	238.33±42.95	(100±18.02)
	10% Crown daisy	397.30±72.37*	(167±30.37*)
Small intestine	Control	95.11±11.47	(100±12.06)
	10% Crown daisy	142.70±8.04*	(150±8.45*)

All values are Means±SD (n=10). Data were analyzed by t-test to determine whether mean values were different. Values in parentheses are relative QR activities to control.

* Values are significantly different from each other ($p<0.05$)

표 16. 쑥갓급여가 흰쥐의 arylhydrocarbon hydroxylase 효소활성에 미치는 효과

Organ	Group	AHH activity (fluorescence/mg protein)	
Liver	Control	4.27±0.72	(1±0.17)
	10% Crown daisy	4.81±1.59	(1.13±0.37)
Kidney	Control	2.18±0.78	(1±0.36)
	10% Crown daisy	2.87±0.90	(1.32±0.41)
Lung	Control	2.11±0.74	(1±0.35)
	10% Crown daisy	4.80±0.94*	(2.27±0.45*)
Small intestine	Control	0.36±0.13	(1±0.36)
	10% Crown daisy	0.60±0.27*	(1.67±0.75*)

All values are Means±SD (n=10). Data were analyzed by t-test to determine whether mean values were different. Values in parentheses are relative QR activities to control.

* Values are significantly different from each other ($p<0.05$)

표 17. 쑥갓급여가 흰쥐의 superoxide dismutase 효소활성에 미치는 효과

Organ	Group	Specific activity (unit/mg protein/min)		
		Total SOD	Mn-SOD	CuZn-SOD
Liver	Control	2.56±0.41	1.54±0.58	1.11±0.45
	10% Crown daisy	2.63±0.84	1.80±0.71	0.81±0.41
Kidney	Control	3.89±0.78	2.56±0.60	1.33±0.51
	10% Crown daisy	3.63±0.65	1.85±0.64*	1.80±0.63
Lung	Control	5.08±1.15	1.75±0.87	3.34±1.18
	10% Crown daisy	5.46±1.11	2.76±1.45	2.70±1.22
Small intestine	Control	3.87±0.83	1.77±0.59	2.11±0.61
	10% Crown daisy	4.62±0.70	2.06±0.45	2.56±0.63

All values are Means±SD (n=10). Data were analyzed by t-test to determine whether mean values were different. Values in parentheses are relative QR activities to control.

* Values are significantly different from each other ($p<0.05$)

표 18. 쑥갓추출물의 pH 안정성

pH	Concentration (mg/ml)	Relative QR Activity (%)
no sample added	-	100
3	2.5	250
4	2.5	268
5	2.5	248
6	2.5	232
7	2.5	248

표 19. 쑥갓추출물의 열처리 조건별 세포의 quinone reductase 활성유도능 (pH 3.0)

Treatment		Concentration (mg/ml)	Relative QR Activity(%)
Control		0	100
80℃	0 sec	5	250
	30 sec	5	228
	60 sec	5	286
	120 sec	5	257
85℃	15 sec	5	247
	30 sec	5	203
	60 sec	5	271
	120 sec	5	332
90℃	15 sec	5	279
	30 sec	5	254
	60 sec	5	259
	120 sec	5	294

표 20. 쑥갓추출물의 열처리 조건별 세포의 quinone reductase 활성유도능 (pH 4.0)

Treatment		Concentration (mg/ml)	Relative QR Activity (%)
Control		0	100
80oC	0 sec	5	283
	30 sec	5	263
	60 sec	5	245
	120 sec	5	231
85oC	15 sec	5	230
	30 sec	5	-*
	60 sec	5	265
	120 sec	5	211
90oC	15 sec	5	206
	30 sec	5	264
	60 sec	5	223
	120 sec	5	228

*Assay could not be completed due to bacterial contamination in cell culture.

표 21. 90℃ 열처리한 쑥갓 추출물의 항돌연변이원성

변이원	추출물	추출물의 90℃ 열처리 시간			
trp-p-1	쑥갓	0 분	10 분	20 분	30 분
-	-	118*			
+	-	328			
-	+	132			
+	+	165	152	172	145
4-NQO	쑥갓	0 분	10 분	20 분	30 분
-	-	119			
+	-	1,716			
-	+	128			
+	+	1,172	1,066	1,020	1,095

***** *S. typhimurium* TA98**의** revertant **수를 나타낸다**.

표 22. 90℃ 열처리한 우엉 추출물의 항돌연변이원성

변이원	추출물	추출물의 90℃ 열처리 시간			
trp-p-11	우엉	0 분	10 분	20 분	30 분
-	-	1162			
+	-	328			
-	+	122			
+	+	129	137	130	nd3
4-NQO4	우엉	0 분	10 분	20 분	30 분
-	-	93			
+	-	1,170			
-	+	226			
+	+	319	281	167	nd

1: 1 ㎍/plate trp-p-1**이 사용되었음**.

2: *S. typhimurium* TA98**의** revertant **수를 나타낸다**.

3: nd (not determined)

4: 4NQO **농도는** 0.5 ㎍/plate **사용**

표 23. 90℃ 열처리한 쑥갓과 우엉 추출물의 항돌연변이원성

변이원	추출물	추출물의 90℃ 열처리 시간			
trp-p-11	쑥갓	0 분	10 분	20 분	30 분
-	-	1182			
+	-	244			
-	+	145			
+	+	129	107	130	98
trp-p-1	우엉	0 분	10 분	20 분	30 분
-	-	116			
+	-	244			
-	+	93			
+	+	123	116	109	nd3

1: 1 ㎍/plate trp-p-1이 사용되었음.

2: *S. typhimurium* TA100의 revertant 수를 나타낸다.

3: nd (not determined)

표 24. 쑥갓추출물 항돌연변이원성의 pH 안정성

(*S. typhimurium* TA 98)

변이원	추출물	pH				
4-NQO1	쑥갓	3	4	5	6	7
-	-					119
+	-					2,339
-	+					635
+	+	426	411	586	618	nd

1. 4NQO : 0.5 ㎍/plate

표 25. 쑥갓추출물 항돌연변이원성의 pH 안정성

(*S. typhimurium* TA 100)

변이원	추출물	pH				
4-NQO1	쑥갓	3	4	5	6	7
-	-					131
+	-					2,997
-	+					604
+	+	434	403	483	452	480

1. 4NQO : 0.5 ㎍/plate

표 26. 우엉추출물 항돌연변이원성의 pH 안정성

(*S. typhimurium* TA 98)

변이원	추출물	pH				
4-NQO1	우엉추출물	3	4	5	6	7
-	-					286
+	-					2,850
-	+					687
+	+	1,370	1,433	1,123	1,480	1,430

1. 4NQO : 0.5 ㎍/plate

10. 쑥갓으로부터 생체방어활성 성분의 분리

QR을 유도하는 쑥갓의 메탄올 추출물을 hexane, ethylacetate, n-butanol, 물로 순차적으로 용매분획한 결과, 표 27에 나타낸바와 같이 hexane과 ethylacetate 층에서 활성이 높게 나타났으며, n-butanol과 물층에는 활성성분이 존재하지 않는 것으로 확인되었다. 한편 각 분획별 고형분 함량비율은 물층이 70.4%로 가장 많았으며, n-butanol 층이 25.6%, ethylacetate 층과 hexane 층이 2.6% 및 1.4%로 존재하였다. 계속하여 preparative TLC로 분획하여 6개의 주요한 band를 분리하여 (그림 1) 각 분획을 취하여 메탄올로 추출, 여과, 농축과정을 거쳐 세포에 0.125 mg/ml 농도로투여하여 QR 활성 유도를 측정한 결과는 표 28과 같다. Rf 값이 0.57인 성분과 0.78인 2개의 band가 다른 분획에 비하여 유의적으로 활성이 높았다. 또한 이 두 band의 추출물은 투여농도 (0.125 mg/ml)에서 세포독성이 나타나 관측된 효소활성이 과소평가되었을 가능성이 크다. 따라서 세포독성이 나타나지 않는 농도범위에서 실험할 경우 QR활성유도는 훨씬 높게 나타나리라 예상된다. 이렇듯 두 band가 쑥갓의 주요 생체방어활성 (암예방활성)성분을 함유하고 있는 것으로 추정된다.

11. 음료개발을 위한 추출용매의 선정실험

쑥갓 시료로 부터 생체방어 활성성분을 추출하기 위한 용매로서 메탄올외에 에탄올, 물을 검토한 결과, 메탄올의 경우 무수알콜과 80% 수용액이 쑥갓으로부터 QR inducer, 즉, 암예방성분의 추출율이 가장 높았으며, 알콜의 농도가 낮아질수록 추출율이 감소하였으며, 특히 40%에서 20%로 감소될 때 추출율이 현저히 저하되었다. 한편 추출용매로 에탄올을 사용한 경우 알콜농도 60% 이상에서 100% 까지 QR활성성분의 높은 추출율을 보였으며 메탄올의 경우와는 달리 20%와 40% 용액 추출물에 의해서도 QR효소활성이 유의적으로 유도되는 것으로 나타났다 (표 29). 그러나 물만으로는 활성성분이 추출되지 않았다. 한편 80% 메탄올에 의한 추출율이 고형분 기준으로는 약 10% 정도인 점을 감안한다면, 경제성을 높이고 가공공정을 단순화하기 위하여 음료제조를 위한 원료로는 추출물이 아닌 쑥갓 전체를 이용하는 방안을 적극 검토할 필요성이 있다고 판단된다.

표 27. 쑥갓으로부터 quinone reductase 활성성분의 용매분획

Solvent Fraction	Relative Yield (%)	Concentration (mg/ml)	Relative QR Activity (%)
Control	-	-	100
Hexane	1.4	0.25*	224
Ethylacetate	2.6	1	331
n-Butanol	25.6	5	108
Water	70.4	5	103

* 0.25 mg/ml 이상 농도에서는 효소역가를 측정하기에는 세포독성이 강하였다.

표 28. Ethylacetate층을 TLC로 분획한 성분들의 QR 효소 유도 활성

TLC Fraction (Rf Value)	Concentration (mg/ml)	QR activity (nmoles DCPIP reduced/ min/ mg protein)	Relative QR Activity (%)
Control	-	153	100
0.24	0.125	209	137
0.46	0.125	198	130
0.51	0.125	208	136
0.57	0.125	238	**156**
0.68	0.125	213	139
0.78	0.125	231	**151**

* **전개용매조성**: n-butanol : n-propanol : 2 N ammonia (10 : 60 : 30)

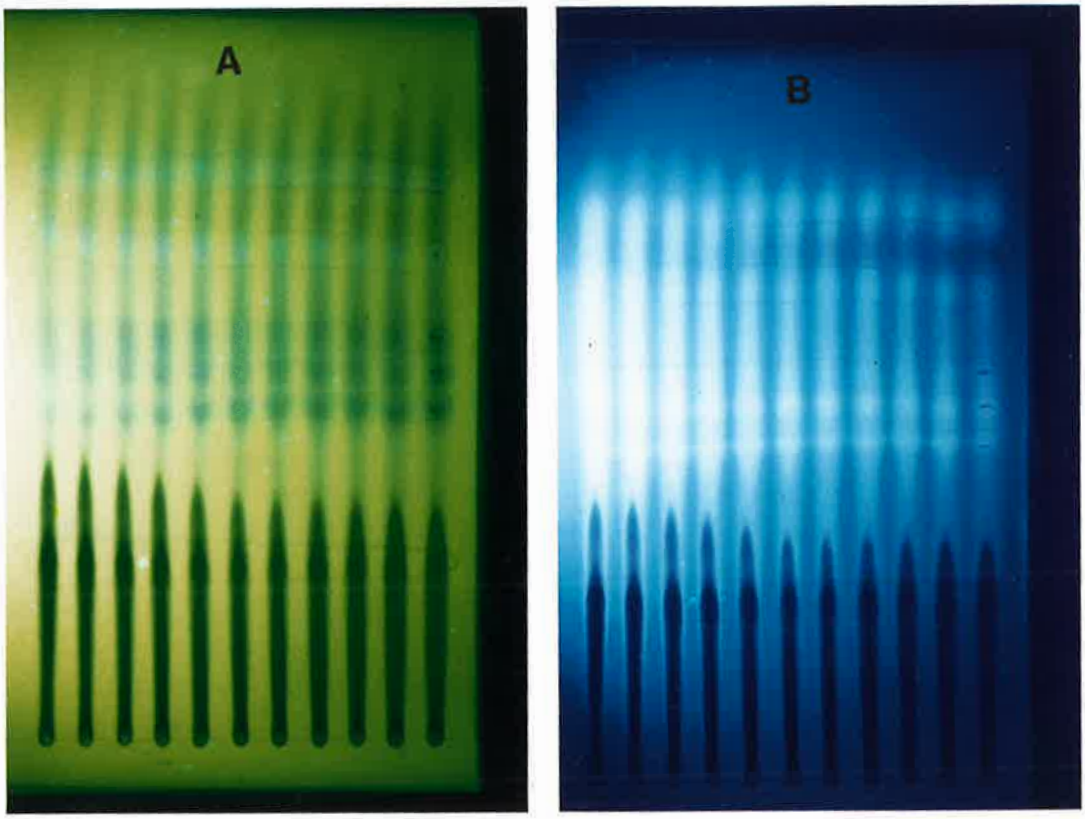

그림 1. 쑥갓추출물의 ethylacetate 분획의 Thin layer chromatograms. A: 자외선 단파장영역에서 본 것. B: 자외선 장파장영역에서 본 것.

표 29. 추출용매에 따른 quinone reductase 활성유도 효과 비교

Solvent		Concentration (mg/ml)	Relative QR Activity(%)
Control		-	100
Methanol	100%	0.5	241
	80%	2.5	240
	60%	2.5	182
	40%	2.5	175
	20%	2.5	138
Ethanol	100%	0.125	232
	80%	1.25	208
	60%	1.25	213
	40%	2.5	171
	20%	2.5	176
Water		2.5	110

12. 음료제조를 위한 적정 음용농도 결정

생체방어 효소계 활성이 뛰어난 것으로 확인된 쑥갓, 갓 및 우엉의 추출물을 이용하여 음료를 제조하였다. 추출물의 적정 음용 농도를 결정하기 위하여 100 500 mg/100 ㎖의 농도로 추출액을 첨가하고 당도를 7.5o Brix, pH를 4.0으로 조정한 다음 표 30의 배합비율에 의거해 음료를 각각 제조하였다. 얻어진 음료들에 대해 9점 검사법으로 관능검사를 실시하였으며 이를 분산분석법으로 분석한 결과는 표 31에 수록하였다. 쑥갓의 경우 표에서 보는 바와 같이 전체적인 기호도에 있어서는 추출물의 첨가농도가 300 mg/100 ㎖에서 가장 좋았으며 향에 있어서는 농도가 높아질수록 풋내가 강하게 나타나 기호도는 낮게 나타났다. 갓의 경우도 표에서 보는 바와 같이 전체적인 기호도에 있어 쑥갓과 마찬가지로 300 mg/100 ㎖의 첨가농도에서 가장 좋았으며 쑥갓에 비해 풋내가 적은 것으로 나타났다. 우엉의 경우에는 전체적인 기호도에 있어 300 500 mg/100 ㎖의 농도에서 유의적인 차이가 없었으며 쑥갓, 갓과 달리 풋내는 나지않으나 약간 떫은 맛이 나는 것으로 나타났다.

13. 쑥갓 음료 제조

(1) 쑥갓 추출물을 이용한 쑥갓음료 제조

관능검사 결과 결정된 쑥갓 추출물의 적정 음용농도인 300 mg/100 ㎖의 경우 기호도에 있어서는 비교적 양호하였지만 풋내가 강하기 때문에 쑥갓 고유의 맛을 유지하면서 풋내를 감소시킴과 동시에 쑥갓의 단순한 맛을 보완하기 위하여 95℃ 열처리 방법과 사과농축액 (72o Brix)의 첨가를 병행하였으며 설탕을 고과당 (75o Brix)으로 대체하여 표 32의 배합비에 따라 쑥갓음료를 제조하였다. 이렇게 만든 음료를 대상으로 신맛, 단맛, 풋내, 전체적인 기호도의 항목에 대하여 관능검사를 실시한 결과를 표 33에 나타내었다. 사과 농축액 (72o Brix)의 첨가량이 0.5, 1.0, 1.5%로 증가함에 따라 신맛, 단맛, 풋내 및 전체적인 기호도가 증가하였으며 특히 풋내가 상당히 감소함은 물론 쑥갓의 신선한 풋내가 사과의 맛, 향과 조화를 이루어 기호도가 크게 증가하였으며 전체적으로 쑥갓과 사과의 맛이

잘 어울리는 것으로 판단되었다. 이어서 이 배합비에 구연산 나트륨과 Vitamin C를 혼합하여 표 34에 나타난 쑥갓 음료를 위한 최종배합비를 결정하였다. 최종적으로 결정된 배합비를 보면 쑥갓농축액 (4.6 Brix)이 6.52%, 사과농축액 (72 Brix)이 1.50% 그리고 고과당 (75 Brix)이 9.95% 이고 이외에 구연산 (0.1%), 구연산나트륨 (0.01%) 그리고 비타민 C (0.1%)가 소량 들어있다. 이 배합비에 의해 제조한 쑥갓음료의 품질특성을 조사한 결과는 표 47에 수록되어 있다. 쑥갓음료의 pH는 3.32의 산성이며 당도는 8.4 Brix, 적정산도는 0.13이며 아미노태질소는 21.0 mg%이다.

(2) 쑥갓 혼합음료의 제조

쑥갓 추출물을 이용하면서 씹힘성이 있는 넥타형태의 혼합음료를 제조하기 위하여 현재까지의 연구결과로 역시 생체방어 활성이 있는 것으로 확인된 토마토 (p-coumaric acid, chlorogenic acid)와 포도 (resveratrol)를 첨가하여 쑥갓 고유의 맛과 향기를 살리면서 동시에 기능성과 기호성을 증진시킨 음료를 제조하고자 하였다. 먼저 혼합음료에 씹힘성을 부여하기 위한 토마토 퓨레의 적정 혼합비율을 결정하기 위하여 표 35에 표시된 바와 같이 토마토 퓨레의 첨가량을 11.24, 14.24, 16.24%로 달리하여 혼합음료를 제조하였다. 얻어진 음료들에 대해 관능검사를 실시한 결과 14.24% 첨가구가 가장 씹힘성이 양호하면서 쑥갓의 풋내와 토마토의 부드러운 맛이 잘 어울리는 것으로 확인되었다. 한편 쑥갓음료의 관능검사 결과에서 나타난 사과 농축액의 첨가효과를 토대로 하여 표 36와 같이 토마토 퓨레의 첨가량중 일부를 사과 퓨레로 0, 5, 10, 15% 대체 첨가하여 음료를 제조하였다. 얻어진 음료들에 대해 관능검사를 실시한 결과는 사과 퓨레의 첨가량이 증가할수록 사과의 독특한 맛과 향이 사과 퓨레를 첨가하지 않은 배합의 부드러운 맛을 오히려 저해하여 기호도가 낮아지는 것으로 나타나 토마토 퓨레를 사과 퓨레로 대체하지 않는 것으로 결정하였다.

그리고 관능검사 결과 토마토 과육이 음료내에서 부유하고 있기 때문에 외관상 좋지 않다는 점과 또 맛이 다소 단순하다는 지적들이 있어 이들 문제점들을 해결하기 위하여 표 37에 표시된 것 같이 포도농축액 (50o Brix)을 0, 0.75, 1.45, 2.74%로 달리 첨가하여 음료를 제조한 후 관능검사를 실시하였다. 결과를 보면 포도 농축액의 첨가량이 증가할수록 음료의 외관이 개선되고 맛도 다양해지는 효

과가 있었으나 포도농축액이 2.74% 첨가된 음료의 경우 신맛 등 포도맛이 너무 강해지기 때문에 오히려 바람직하지 않았으며 1.45% 첨가된 음료가 외관과 맛에서 가장 양호한 것으로 나타났다. 이렇게 결정된 배합비 (쑥갓농축액 3.97%, 토마토 퓨레 13.38%, 포도농축액 1.45%) 에 설탕을 고과당으로 대체하고 구연산 나트륨과 Vitamin C를 소량 첨가하여 표 38의 쑥갓을 이용한 혼합음료의 최종배합비를 결정하였다. 혼합음료의 고과당 함량은 7.0%이고 구연산 0.09%, 구연산나트륨 0.01% 그리고 vitamin C는 0.10%이다. 이렇게 제조한 쑥갓 혼합음료의 품질특성 조사 결과는 표 47과 같다. 표에 나타난 것 처럼 혼합음료의 pH는 3.61, 당도는 7.2 Brix, 적정산도는 0.16이며 아미노태질소함량은 36.4 mg%이다.

14. 우엉음료 제조

우엉의 경우 전체적인 기호도에 있어 300 500 mg/100 ㎖의 농도에서 유의적인 차이가 없었으며 쑥갓과 달리 풋내는 나지 않으면서 약간 떫은 맛을 나타내었다. 전체적으로 떫은 맛을 제외한 특징적인 맛이 부족하기 때문에 우엉 추출물의 음용농도 400 mg/100 ㎖를 기준으로 하여 우엉을 주원료로 한 음료에 산뜻하고 부드러운 맛을 부여하기 위하여 결명자와 오미자를 열수추출하여 농축한 농축액을 첨가하였다. 우엉 농축액을 주원료로 한 음료에 맛을 보강하기 위하여 결명자 농축액 (2.9o Brix)을 첨가하여 표 39의 배합비에 의거 음료를 제조하였다. 즉, 우엉농축액 2.67%에 설탕을 7.50% 그리고 구연산을 0.1% 첨가한 다음 결명자 농축액을 3.23% (A), 2.42% (B) 또는 1.61% (C) 첨가하여 음료들을 제조하였고 이렇게 얻은 음료에 대해 관능검사를 실시한 결과를 표 40에 나타내었다. 표 40에서 보는 바와 같이 결명자농축액의 첨가에 의한 뚜렷한 맛의 보강이 이루어지지 않았으며 또한 결명자의 첨가량에 따른 기호도에서의 유의적인 차이도 거의 없는 것으로 나타났다.

표 30. 쑥갓, 갓, 우엉 추출물의 적정 음용농도 결정을 위한 배합비

성 분	A	B	C	D	E
추출물(d.b)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
설 탕	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
구 연 산	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
정 제 수	92.3	92.2	92.1	92.0	91.9
합 계	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

표 31. 쑥갓, 갓, 우엉 추출물의 적정 음용농도 결정을 위한 관능검사 결과

항 목		A	B	C	D	E
쑥갓	색 깔	5.1b	5.8a	6.2a	5.4b	4.3c
	향 미	4.4b	4.7b	5.3a	5.1a	4.8b
	맛	5.2c	6.0b	7.0a	5.3c	5.2c
	전체적인 기호도	5.2c	6.2b	7.4a	5.4c	5.2c
갓	색 깔	3.8b	5.6a	6.6a	6.9a	6.4a
	향 미	4.7b	5.1b	5.6ab	6.2a	5.2ab
	맛	5.1a	6.3a	6.1a	5.6a	5.0a
	전체적인 기호도	5.1ab	6.1ab	6.2a	5.9ab	4.9b
우엉	색 깔	3.8b	5.1a	5.5a	5.8a	5.8a
	향 미	4.2c	4.5ab	4.6ab	4.8ab	4.9a
	맛	4.9b	5.8a	6.0a	5.9a	5.8a
	전체적인 기호도	4.9b	5.8a	6.3a	6.3a	6.3a

표 32. 쑥갓의 풋내를 감소시키기 위한 음료 배합비

(**단위**: %)

성 분	A	B	C
쑥갓 농축액 (4.6 Bx)	6.52	6.52	46.52
고 과 당 (75 Bx)	9.95	9.95	9.95
구 연 산	0.10	0.10	0.10
정 제 수	82.93	82.43	81.93
사과 농축액 (72 Bx)	0.50	1.00	1.50
계	100.00	100.00	100.00

표 33. 쑥갓음료의 관능검사 결과

항 목	A	B	C
신 맛	4.69b	5.63a	6.13a
단 맛	6.13a	6.31a	6.94a
풋 내	5.50b	6.00b	6.88a
전체적인 기호도	5.19c	6.47b	7.25a

표 34. 쑥갓 추출물을 이용한 쑥갓 음료의 최종배합비

성 분	배 합 비 (%)
쑥갓 농축액 (4.6 Bx)	6.52
사과 농축액 (72 Bx)	1.50
고 과 당 (75 Bx)	9.95
구 연 산	0.10
구연산나트륨	0.01
Vitamin C	0.10
정 제 수	81.82
계	100.00

표 35. 씹힘성을 부여하기 위한 토마토 퓨레 첨가량 결정을 위한 배합시험

(단위: %)

성 분	A	B	C
쑥갓 농축액 (4.6 Bx)	4.23	4.23	4.23
토마토 퓨레	11.24	14.24	16.24
설 탕	3.42	3.42	3.42
구 연 산	0.10	0.10	0.10
정 제 수	81.01	78.01	76.01
계	100.00	100.00	100.00

표 36. 사과 퓨레의 토마토 퓨레 대체효과 조사를 위한 배합시험

(단위: %)

성 분	A	B	C	D
쑥갓 농축액 (4.6 Bx)	4.23	4.23	4.23	4.23
토마토 퓨레	14.24	13.53	12.82	12.10
사과 퓨레	0.00	0.71	1.42	2.14
설 탕	3.42	3.42	3.42	3.42
구 연 산	0.10	0.10	0.10	0.10
정 제 수	78.01	78.01	78.01	78.01
계	100.00	100.00	100.00	100.00

표 37. 외관 및 맛 개선을 위한 포도농축액 첨가 배합시험

(단위: %)

성 분	A	B	C	D
쑥갓 농축액 (4.6 Bx)	4.23	4.09	3.97	3.74
토마토 퓨레	14.24	13.80	13.38	12.62
포도 농축액 (50 Bx)	0.00	0.75	1.45	2.74
설 탕	5.00	4.84	4.70	4.43
구 연 산	0.10	0.10	0.09	0.09
정 제 수	76.43	76.42	76.41	76.38
계	100.00	100.00	100.00	100.00

표 38. 쑥갓 추출물을 이용한 쑥갓 혼합음료의 최종배합비

성 분	배 합 비 (%)
쑥갓 농축액 (4.6 Bx)	3.97
토마토 퓨레	13.38
포도 농축액 (50 Bx)	1.45
고 과 당 (75 Bx)	7.00
구 연 산	0.09
구연산 나트륨	0.01
Vitamin C	0.10
정 제 수	74.00
계	100.00

표 39. 우엉과 결명자를 혼합한 음료 배합비

(단 위 : %)

성 분	A	B	C
우엉 농축액 (15.3 Bx)	2.67	2.67	2.67
설 탕	7.50	7.50	7.50
구 연 산	0.10	0.10	0.10
정 제 수	86.50	87.31	88.12
결명자 농축액 (2.9 Bx)	3.23	2.42	1.61
계	100.00	100.00	100.00

표 40. 우엉과 결명자 혼합음료의 관능검사 결과

항 목	A	B	C
떫 은 맛	5.43a	5.29a	5.43a
전체적인 기호도	5.14a	5.14a	5.29a

우엉의 떫고 텁텁한 맛을 보완하기 위하여 앞의 결명자농축액외에 상큼한 맛을 지닌 오미자 농축액의 첨가를 시도하였다. 표 41의 배합비에 의거 오미자농축액을 첨가하여 음료를 제조하였다. 우엉농축액 (15.3 Brix, 2.67%), 설탕 (7.5%) 그리고 구연산 (0.1%) 혼합액에 35 Brix의 오미자농축액을 각각 1.71% (A), 1.29% (B) 그리고 0.86% (C) 첨가 제조한 음료를 관능검사한 결과를 표 42에 나타내었다. 표에서 보는 바와 같이 오미자의 첨가량이 0.86%에서 증가함에 따라 단맛, 신맛에 대한 기호도 및 전체적인 기호도가 급격하게 감소함을 알 수 있었다. 따라서 오미자농축액을 첨가할 경우에는 0.86% 이하에서 적정한 첨가농도를 결정해야 할 것이다.

한편 사과 농축액 (72o Brix) 첨가에 따른 맛의 개선효과를 보기위해 표 43의 배합비에 따라 사과 농축액을 1, 2, 3% 첨가하여 음료를 제조하였고 얻어진 음료들에 대해 관능검사를 실시한 결과 사과농축액을 표 41의 배합비 (우엉농축액 (2.67%), 설탕 (7.5%) 그리고 구연산 (0.1%))에 1% 첨가했을 때 사과의 상큼한 맛을 부여하면서 우엉 고유의 맛과 가장 잘 어울리는 것으로 나타났다. 사과농축액 첨가에 의해 우엉의 맛이 다소 약화된 것으로 판단되어 표 44의 배합비에 따라 우엉 농축액의 첨가량을 2.67, 3.67 및 4.67%로 달리하여 음료를 제조한 후 관능검사를 실시한 결과 우엉의 고형분 농도가 560 mg/100 ㎖에서 가장 적당한 것으로 나타났다.

우엉음료에 다양한 맛을 부여하고 기호성을 증진시키기 위하여 전술한 쑥갓 혼합음료 제조시 사용하였던 토마토 퓨레와 포도 농축액을 사과농축액과 함께 첨가하여 음료들을 제조하였다. 음료에 씹힘성을 부여하기 위한 토마토 퓨레의 양은 쑥갓 혼합음료 제조때와 동일한 양 (13.38%) 으로 하였고 포도 농축액의 첨가량은 표 45의 배합비에 따라 1.41, 1.69 및 1.97%로 달리하여 관능검사를 실시하였다. 그 결과 포도 농축액을 1.41% 첨가한 음료가 맛의 조화가 가장 잘 이루어진 것으로 판단되었다. 이 배합비에서 설탕을 고과당으로 대체하고 구연산나트륨과 Vit C를 혼합하여 표 46와 같은 우엉음료의 최종배합비를 얻었다. 최종배합비는 우엉농축액 (15.3 Bx) 3.67%, 사과농축액 (72 Bx) 1.0%, 토마토퓨레 13.38%, 포도농축액 (50 Bx) 1.41%, 고과당 6.63%, 구연산 0.1%, 구연산나트륨 0.01%, 및 vitamin C 0.1%이다. 한편 제조한 우엉음료의 품질특성 조사 결과는

표 47과 같다. 당도는 7.8 Brix, pH는 3.56, 적정산도는 0.2%이며 아미노태질소는 52.5 mg%이다. 우엉음료의 아미노태질소함량이 쑥갓이나 쑥갓혼합음료와 비교하여 상당히 높은점이 두드러지고 이점은 우엉음료의 적정산도가 쑥갓이나 쑥갓혼합음료보다 높지마는 pH는 낮지않은점과도 관련되어 있을 것이다. 한편 밝기를 나타내는 L값은 쑥갓음료 64.52, 쑥갓혼합음료 26.91, 우엉음료 27.95이었으며 적색도를 나타내는 a값은 쑥갓음료 -0.19, 쑥갓혼합음료 3.84, 우엉음료 5.53, 황색도를 나타내는 b값은 쑥갓음료 14.08, 쑥갓혼합음료 2.48, 우엉음료 3.27으로 나타나 토마토퓨레와 포도농축액을 혼합하는 쑥갓혼합음료와 우엉음료의 색도는 거의 비슷하였다.

앞에서 결정된 배합비에 따라 제조한 쑥갓음료, 쑥갓혼합음료, 우엉음료의 저장성을 조사하기 위하여 37℃에서 4주간 저장하면서 일주일 간격으로 이미, 이취발생 및 색도변화등의 관능적 특성의 변화를 조사한 결과 처리구와 대조구 (-18℃에서 보관한 시료) 간의 차이를 볼수없었기 때문에 저장성은 양호한 것으로 판단되었다. 한편 그림 2.에는 제조한 쑥갓음료, 쑥갓혼합음료, 및 우엉음료의 사진을 수록하였다.

표 41. 우엉과 오미자를 혼합한 음료 배합비

(단위: %)

성 분	A	B	C
우엉 농축액 (15.3 Bx)	2.67	2.67	2.67
설 탕	7.50	7.50	7.50
구 연 산	0.10	0.10	0.10
정 제 수	88.02	88.44	88.87
오미자 농축액 (35 Bx)	1.71	1.29	0.86
계	100.00	100.00	100.00

표 42. 우엉과 오미자를 혼합한 음료의 관능검사 결과

항 목	A	B	C
단 맛	3.57b	3.71b	6.43a
신 맛	3.57b	3.71b	6.42a
떫은맛	4.29a	4.57a	5.14a
전체적인 기호도	3.43b	4.14b	5.57a

표 43. 우엉과 사과 농축액을 혼합한 음료 배합비

(단위: %)

성 분	A	B	C
우엉 농축액 (15.3 Bx)	2.67	2.67	2.67
설 탕	7.50	7.50	7.50
구 연 산	0.10	0.10	0.10
정 제 수	88.73	87.73	86.73
사과 농축액 (72 Bx)	1.00	2.00	3.00
계	100.00	100.00	100.00

표 44. 우엉의 적정음용농도를 결정하기 위한 음료 배합비

(단위: %)

성 분	A	B	C
우엉 농축액 (15.3 Bx)	2.67	3.67	4.67
설 탕	7.50	7.50	7.50
구 연 산	0.10	0.10	0.10
정 제 수	88.73	87.73	86.73
사과 농축액 (72 Bx)	1.00	1.00	1.00
계	100.00	100.00	100.00

표 45. 우엉음료의 씹힘성과 기호성을 증진시키기 위한 음료 배합비

(단 위 : %)

성 분	A	B	C
우엉 농축액 (15.3 Bx)	2.67	3.67	4.67
사과 농축액 (72 Bx)	1.00	1.00	1.00
토마토 퓨 레	13.38	13.38	13.38
포도 농축액 (50 Bx)	1.41	1.69	1.97
설 탕	5.00	5.00	5.00
구 연 산	0.10	0.10	0.10
정 제 수	75.44	75.16	74.88
계	100.00	100.00	100.00

표 46. 우엉 추출물을 이용한 우엉음료의 최종배합비

성 분	배 합 비 (%)
우엉 농축액 (15.3 Bx)	3.67
사과 농축액 (72 Bx)	1.00
토마토 퓨레	13.38
포도 농축액 (50 Bx)	1.41
고 과 당 (75 Bx)	6.63
구 연 산	0.10
구연산나트륨	0.01
Vitamin C	0.10
정 제 수	73.80
계	100.00

표 47. 제조한 쑥갓 및 우엉음료의 품질특성

구 분		쑥갓음료	쑥갓혼합음료	우엉음료
당 도 (Brix)		8.4	7.2	7.8
pH		3.32	3.61	3.56
적정산도 (%)		0.13	0.16	0.20
아미노태질소 (mg%)		21.0	36.4	52.5
색도	L	64.52	26.91	27.95
	a	- 0.19	3.84	5.53
	b	14.08	2.48	3.27
	△E	37.44	72.63	71.73

그림 2. 최적 혼합비에 따라 제조한 쑥갓, 쑥갓혼합 및 우엉 음료의 사진

제 4 장 고 찰

채소류와 과일의 섭취는 암을 포함한 다양한 종류의 만성질환을 예방하는 것으로 보고되었다. 이들 식품은 carotenoids, 비타민 C, 엽산, 식이섬유, 그리고 비타민 E의 주요한 공급원이기도 하지만, 최근 연구를 통하여 많은 생리활성 성분의 寶庫임이 확인되고 있다. 본 연구에서는 우리나라의 주요사망원인으로 등장한 암을 예방할수 있는 채소류를 탐색하고, 이 결과로부터 얻어진 정보를 바탕으로 가공식품을 개발하고자 하였다. 이러한 연구를 통하여 국산 농산물의 기능성을 규명함으로서 국내 1차산업의 국제경쟁력의 제고는 물론, 국민보건에도 기여하리라 기대된다.

우리나라의 경우 선진산업사회로 진입하면서 암의 발생과 암에의한 사망률이 급격히 증가하고 있다. 암은 현재까지 개발된 방법으로는 완치율이 낮은 질환으로서 예방이 어느때보다 강조되고 있다. 암의 주요원인으로 식이와 흡연등 환경적인 인자가 가장 중요한 위치를 차지하고 있는 것으로 알려져 있으며, 특히 식생활의 서구화, 육류와 지방섭취의 증가, 곡류 및 채소류섭취의 감소등은 암발생을 높이는 원인으로 생각되고 있다. 특히 신선한 채소류는 비타민등과 같은 필수영양소의 공급원이면서, phytochemicals이 많이 함유된 식품으로서 미국의 국립암연구소 (National Cancer Institute)에서는 암의 예방을 위하여 일일 최소 5 servings을 섭취할 것을 권장하고 있다 (Steinmetz 1996).

지금까지 식물체로부터 많은 종류의 암예방성분들이 탐색되었으며, 그 가운데는 대표적인 것으로 broccoli에서 분리된 sulphoraphane (Zhang 1992), 薑黃 (*Curcuma longa* L.)의 성분인 curcumin, Propolis의 caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid), 마늘의 diallyl sulfide, 녹차의 epigallocatechingallate (EGCG), 과채류중의 ellagic acid (Barch 1994), xanthophyll, astaxanthin, terpenes, organosulfides, ellagic acid, resveratrol, protease inhibitors 등이 알려져 있다.

발암단계는 보통 3단계, 즉, 초기화 (initiation), 촉진화 (promotion), 그리고 진행 (progression)으로 구분되는데, 일반적으로 식물성분들에 따라 작용하는 단계가 다른 것으로 알려져 있다. 예를들어 표 48에 나타낸 성분들은 발암의 초기화단계를 억제하는 것으로 알려져 있으며, protease inhibitor, retinoic acid등은 촉진단계를 억제하는 것으로 알려져 있다 (Wattenberg 1992, Murakami 1996). 표 49에는 발암물질의 활성화를 저해함으로서 암예방효과를 나타내는 물질들을 일부 나타내었다. 십자화과채소류의 aromatic isothiocyanates나 포도에서 분리된 resveratrol (Jang 1996)은 발암의 초기화 단계뿐만 아니라 촉진단계도 억제하는 것으로 보고되었다. 발암초기단계를 억제하는 기작중 대표적인 것이 해독효소계를 활성화시키는 것이다. 생체내에는 xenobiotics (생체외 이물질)에 대하여 민감하게 반응하여 이의 신속한 대사 및 배설을 도와주는 메카니즘이 존재하는데 보통 1상과 2상효소계로 대별된다. 1상효소계는 cytochrome P450s가 대표적인 효소계로서 주로 hydroxylation, oxiation, epoxidation반응을 주관하며, 2상효소계는 quinone reductase, glutathione S-transferase, sulfotransferase, UDP-glucuronyl transferase 등이 존재한다 (Prochaska 1994). 1상효소계는 독성물질의 대사에 중요한 역할을 할뿐만 아니라 간혹 발암물질의 발암능을 증가시키는 작용도 하는 것으로 알려져 있는 반면, 2상효소계의 활성증가는 대체적으로 발암물질의 신속한 대사와 관련하여 암예방의 주요한 메카니즘의 하나라는 것이 많은 연구를 통하여 정립이 되어 있다 (Prochaska 1994, 1988a). *Allium*속 과 십자화과 채소류에서 2상효소계를 활성화시키는 암예방성분들이 보고되었다 (Wattenberg 1992).

본 연구에서 암예방효소계 유도활성이 높았던 소재는 쑥갓으로서 지금까지 항암이나 암예방활성이 보고된 바 없는 채소이다. 특히 지금까지 항암이나 암예방활성이 알려진 채소류들이 주로 십자화과에 속하는 것과는 달리 쑥갓은 국화과에 속하는 식물로서 활성성분도 채소류에서 지금까지 밝혀진 성분들과는 구별되는 화합물일 것으로 추정된다. 쑥갓 (*Chrysanthemum coronarium* L.)은 국화과의 1 2년초로서 유럽원산이며 구미에서는 관상용으로 재배하지만, 우리나라를 비롯한 동양에서는 식용으로 사용된다. 향기가 짙으며, 생으로, 또는 데쳐서 나물로 먹고, 생선국, 찌개에도 넣으며 샐러드 재료로도 사용된다 (동아원색세계대백과사전 1983).

표 48. 식품중에 존재하는 발암초기화 억제성분

Terpenes	Ellagic acid
Organosulfides	Cucurmin
Aromatic isothiocyanates	Coumarins
Indoles	Conjugated dienoic linoleic acids
Dithiolethiones	beta-carotenes
Phenols	18-beta-Glycyrrhetinic acid
Flavones	Glucarates
Tannins	

표 49. 발암물질의 활성화를 저해함으로서 암예방효과를 나타내는 물질

Group	Compounds	Source	Carcinogen inhibited
Aromatic isothiocyanates	Benzyl isothiocyanate	Cruciferrous vegetables	
	Phenethyl isothiocyanate		
Organosulfur compounds	Diallyl sufide	*Allium* sp.	DMH, NMBA
	Diallyl disulfide		NDEA
	Allyl mercaptan		NDEA
	Allyl methyl disulfide		NDEA
Monoterpenes	D-Limonene	Citrus fruit oil	NDEA,NNK
	D-Carvone	Caraway seed oil	NDEA
Glucosinolates	Glucoblassin	Cruciferrous vegetables	DMBA
	Glucotropaeolin		DMBA

NDEA: N-nitosodiethylamine; DMH, 1,2-dimethylhydrazine;
NMBA, N-nitosomethylbenzylamine.

지금까지 밝혀진 쑥갓의 주요성분으로는 비타민 A, B1, B2, C등의 영양성분과 xanthophyll, zusammensetzy, chrysanthemin, capillin등의 비영양성분들이 밝혀져 있다 (한국식물대도감 1989). 이들 비영양성분들이 세포의 QR활성 유도와 관련이 있는지는 알려져 있지 않다. 쑥갓은 우리나라에서 재배되는 작물로서 보통 신선한 상태로 식용되므로 경쟁력이 있는 작물로 사료된다. 더구나 본 연구를 통하여 건강보조기능이 확인되었으므로 이에 대한 수요가 더욱 증가하리라 기대된다. 본 연구를 통하여 쑥갓의 암예방효과의 가능성이 충분히 밝혀졌으므로 향후 임상적인 연구 및 동물실험을 통하여 그 효능이 인체에 대하여도 확인이 된다면 국민보건 차원에서도 매우 유용한 자원으로 활용될수 있을 것으로 기대된다. 본 연구에서는 시간상의 제약으로 암예방관련 물질을 완전하게 분리·동정하는데까지 진행하지 못하였지만, 본 연구자들은 참여업체와 계속 협력하여 관련성분의 동정을 추진할 계획이다.

제 5 장 참고문헌

Barch, D. H. and Rundhaugen, L. M. : Ellagic acid induces NAD(P)H: quinone reductase through activation of the antioxidant responsive element of the rat NAD(P)H: quinone reductase gene. *Carcinogenesis*, 15, 2065 (1994)

Benson, A. M., Hunkeler, M. J., and Talalay, P. : Increase of NAD(P)H: Quinone reductase by dietary antioxdants; Possible role in protection against carcinogenesis and toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 5216-5220 (1980)

Boone C. W., Kelloff G. J. and Malone W. E. : Identification of candidate cancer chemoprotective agents and their evaluation in animal models and human clinical trials: A review. *Cancer Res.*, 50, 2 (1990)

De Long, M. J., Prochaska, H. J. and Talalay, P. : Induction of NAD(P)H: quinone reductase in murine hepatoma cells by phenolic antioxidants, azo dyes, and other chemoprotectors: A model system for the study of anticarcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 787 (1986)

Jang, M, Cai, L, Udeani, G. O., Slowing, K. V., Thomas, C. F., Beecher C. W. W., Fong, H. H, Farnsworth N. R., Kinghorn, A. D., Metha, R. G., Moon, R. C., Pezzuto, J. M. : Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, 275, 218 (1997)

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*. 193, 265 (1951)

Marklund, S. and Marklund, D. : Involvement of the superoxide

anion radical in the autooxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* 47, 469 (1974)

Maron, D. M., and Ames, B. N. : Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Res.*, 113, 173 (1983)

Mosmann, T. : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* 65, 55 (1983)

Nebert, D. W. : Genetic differences in microsomal electron transport:the Ah locus. *Methods Enzymol.* 52:226 (1978)

Murakami, A., Ohigashi, H. and Koshimizu, K. : Anti-tumor Promotion with Food Phytochemicals : A strategy for Cancer Chemoprevention. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60(1), 1-8 (1996)

Nijhoff, W. A., Bosboom, M. A., Smidt, M. A. and Peters, H. M. : Enhancement of rat hepatic and gastrointestinal glutathione and glutathione S-transferases by α-angelicalactone and flavon. *Carcinogenesis*, 16, 603, (1995)

Prochaska, H. J. and Talalay, P. : Regulatory mechanisms of monofunctional and bifunctional anticarcinogenic enzyme inducers in murine liver. *Cancer Res.*, 48, 4776 (1988a)

Prochaska, H. J. and Santamaria, A. B. : Direct measurement of NAD(P)H: Quinone reductase from cells cultured in microtiter wells: A screening assay for anticarcinogenic enzyme inducers. *Anal. Biochem.* 169, 328 (1988b)

Prochaska, H. J., Santamaria, A. B. and Talalay, P. : Rapid detection of

inducers of enzymes that protect against carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 2394 (1992)

Prochaska, H. J. : Screening strategies for the detection of anticarcinogenic enzyme inducers. *J. Nutr. Biochem* 5, 360 (1994)

Rennie, J. and Rusting R. : Making headway against cancer. *Scientific American* 275, 28 (1996)

Sparnins, V. L., Venegas, P. L. and Wattenberg, L. W. : Glutathione S-Transferase activity: Enhancement by compounds inhibiting chemical carcinogenesis and by dietary constituents. *J. Natl Cancer Inst.*, 68(3), 493 (1982)

Spencer, S. R., Wilczak, C. A., and Talalay, P. : Induction of glutathione transferases and NAD(P)H: Quinone Reductase by fumaric acid derivatives in rodent cells and tissues. *Cancer Res.*, 50, 7871 (1990)

Steinmetz, K. A. and Potter, J. D. : Vegetables, fruits, and cancer prevention: review. *J. Am. Diet. Assoc.*, 96, 1027 (1996)

Talalay, P., De Long, M. J. and Prochaska, H. J. : Identification of a common chemical signal regulating the induction of enzymes that protect against chemical carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 8261 (1988)

Tawfiq, N., Heaney, R. K., Plumb, J. A., Fenwick, G. R., Musk, S. R. R. and Williamson, G. : Dietary glucosinolates as blocking agents against carcinogenesis: glucosinolate breakdown products assessed by induction of quinone reductase activity in murine hepa1c1c7 cells. *Carcinogenesis*, 16, 1191, (1995)

Wattenberg, E. T. : Inhibition of carcinogenesis by minor dietary constituents. *Cancer Res.*(suppl), 52, 2085 (1992)

Zhang, Y. S., Talalay, P., Cho, C. G., and Posner, G. H. : A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli-Isolation and elucidation of structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 2399 (1992)

동아원색대백과사전, **동아출판사**, **서울**, p196 (1983)

송주택. **한국식물대도감**, **한국자원식물연구소**, **서울**, p315 (1989)