최 종
연구보고서

천연 식용색소의 개발 및 이용

Development and Utilization of Natural Food Colorants

경희대학교

농 림 부

천연 식용색소의 개발 및 이용

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “천연 식용색소의 개발 및 이용” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

1998. 12. .

주관연구기관명 : 경희대학교

총괄연구책임자 : 한 태 룡

연 구 원 : 백 영 숙

연 구 원 : 김 수 언

연 구 원 : 정 인 식

협동연구기관명 : 충남대학교

협동연구책임자 : 윤 혜 현

요 약 문

Ⅰ. 제 목

천연 식용색소의 개발 및 이용

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 중요성

색소는 천연 또는 합성색소가 있으며 식품, 화장품 및 의류염색용 등 다양한 분야에서 사용되고 있다. 합성색소는 착색률이 높고 안정하며 가격이 저렴하여 천연색소를 대신하여 광범위하게 사용되어 왔으나 발암성과 인체에 독성을 갖는 등 안전성문제가 제기됨에 따라 그 사용이 엄격히 규제되고 있다. 최근 소비자들의 색소의 안전성에 대한 인식이 새로워지고 건강식품·위생적 식품에 대한 선호경향이 합성식용색소를 대체할 천연색소의 수요를 급격히 증가시키게 되었다. 또한 많은 천연색소는 살균, 항염 등 생리활성이 있으며 안전하여 화장품 및 기능성 식품으로 큰 잠재적 수요가 있다. 따라서 천연색소 시장이 크게 신장될 것으로 예상되고 있으나 기술 집약적인 산물이므로 현재도 선진국에서만 독점 생산되고 있다. 식용천연색소의 세계시장은 현재 약 2 억불 이상이며, 일본의 경우 1992년 약 200 억엔의 수요가 있었고 앞으로도 계속 커질 전망이다. 천연색소에 관한 연구는 유럽 및 일본 등지에서 anthocyanin, shikonin, carthamin, betacyanin 등에 관하여 이루어져 왔다. 천연색소는 재배농업법, 미생물배양, 식물세포배양법등에 의하여 생산될 수 있다. 미국, 일본 및 캐나다등 선진국에서는 식물세포 배양에 의한 천연색소 생산에 많은 연구를 수행해 왔으나 최근들어 재배농법의 발달등으로 농업재배 및 직접추출에 의한 천연색소 생산 공정의 경제성이 재고되면서 화학적 합성법, 세포 배양법의 단점을 극복할 수 있는 기술로 인식되어 새로운 색소 작물의 탐색과 직접추출 공정개발에 주력할 것으로 사료된다.

우리나라는 유사이래 식물로부터 각종 염료를 생산하여 식용 및 의류염색으

로 사용하여왔으나 이에 대한 체계적이고 과학적인 연구가 거의 없어 이 분야의 현 기술 상태는 매우 취약한 실정이다. 전국적으로 일부 농가에서 수공업 형태로 천연색소를 추출하여 염색 및 식용으로 사용하고 있으나 색소 성분은 물론 공정상의 과학화에 관한 연구도 전혀 이루어지지 않고 있다. 따라서 우리나라 전통색소자원에 대한 조사와 천연색소에 관한 체계적이고 과학적인 연구가 시급한 실정이다.

본 과제에서는 천연색소성분의 분리동정 및 특성연구, 미생물색소 개발, 천연색소 생산공정개발 및 천연색소의 식품활용에 대한 체계적인 연구를 수행 하였다. 본 연구에서 수행한 색소성분에 대한 체계적인 연구와 생산공정의 연구 및 식품활용연구는 농가소득증대는 물론 식품, 화장품, 섬유제품 등의 품질향상과 국제 경쟁력 강화에 크게 기여할 것으로 생각된다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구과제 “천연 식용색소의 개발 및 응용”은 1) 식물 식용색소의 분리동정 및 물리화학적 특성연구, 2) 미생물(홍국균)색소개발, 3) 천연색소 생산공정개발, 4) 천연색소의 식품활용 및 개발의 4개분야 세부과제로 구성되어 있으며 연구내용 및 범위는 다음과 같다.

- 자료수집 및 색소성분 분리
- 색소구조 연구
- 색소생산 공정 기초 연구
- 천연색소 활용식품 조사
- 색소성분 분리 동정 및 안정성 연구
- 색소생산 미생물 개량
- 색소생산의 실용화 연구
- 천연색소의 보존성 및 안정성 조사
- 천연 및 변형 색소성분의 안정성, 생리 및 약리기능 비교
- 색소생산 미생물 분리 육종
- 색소 첨가식품의 개발
- 미생물 유래 색소 안정화
- 천연색소 활용식품의 산업화 연구

Ⅳ. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

본 연구개발 과제 “천연 식용색소의 개발 및 이용”은 1) 식물 식용색소의 분리동정 및 물리화학적 특성연구, 2) 미생물(홍국균)색소개발, 3) 천연색소 생산공정 개발, 4) 천연색소의 식품활용 및 개발의 4개분야 세부과제로 구성되어 있으며 1), 2)의 과제는 색소 자원의 발굴, 색소자원으로부터 색소물질의 분리정제, 색소화합물의 화학구조 규명 등의 연구를 주로 수행하고 3), 4)의 과제는 1), 2)과제에서 발굴된 경제성이 있는 천연색소자원으로부터 대량생산공정을 개발하고 이들 색소의 식품에의 활용을 주로 연구하도록 계획되어 있다. 본 연구개발과제의 주요결과는 다음과 같다.

제 1 세부과제 “식물 식용색소의 분리동정 및 물리화학적 특성연구”에서는 식물 색소자원으로 유색미, 홍화, 자근, 치자를 선정하였다. 색소자원으로부터 cyanidin 3-glucoside (유색미), carthamin (홍화), 시코닌 유도체 (자근), crocin, geniposide (치자)를 분리 동정하고, 분리된 성분의 물리화학적 특성 및 안정성을 연구하였다. 또한 홍화 적색소 carthamin의 생합성에 관여하는 효소를 부분 분리하고, 분리된 효소를 이용하여 황색소인 precathamin의 carthamin으로 변환을 수행하였으며, 치자로부터 분리한 geniposide를 효소와 아미노산을 처리하여 청색소로의 변환을 수행하였다.

제 2 세부과제 “미생물(홍국균)색소개발”에서는 홍국균이 생산하는 수용성 식용색소를 분리하였고, *Monascus anka* IFO4478로부터 *Streptomyces albus* 에서 분리된 polyketide 생합성 유전자와 유사한 염기 서열을 갖는 DNA 절편을 분리하였다.또한 세계 최초로 홍국균 *Monascus anka* IFO4478로부터 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GPD) 유전자를 분리하여, promoter 부분을 포함한 2456개 염기 서열을 결정하고 이 promoter 부분을 이용하여 홍국균을 형질전환할 수 있는 plasmid DNA를 제조하였고, 세계 최초로 외래 DNA로써 홍국균을 형질전환하였다.

제 3 세부과제 “천연색소 생산공정 개발”에서는 색소 추출용매를 선정하고,

추출공정의 회분식 및 연속식 운영방법을 연구하였다. 추출 반응기(5 L)를 제작하였고 여러 종류의 교반기를 제작하여 교반기의 형태에 따른 유체의 혼합정도를 확인하였다. 또한 35 L로 scale-up한 추출 반응기를 이용하여 온도 및 반응시간에 따른 색소추출 효율을 연구하였으며, 초임계 추출공정에 의한 색소추출 연구도 수행하였다.

제 4 세부과제 "천연색소의 식품활용 및 개발"에서는 유색미로부터 분리한 cyanidin 3-glucoside와 홍화로부터 분리한 carthamin의 열, 빛, 금속이온, 당, 유기산 등에 대한 안정성을 연구하였으며, copigment, starch, carboxymethyl cellulose, alginic acid, gum arabic 등을 이용하여 색소성분의 안정화를 시도하였다. 또한 유색미 식혜를 제조하여 색소첨가 식품의 기호도와, 식품중의 천연색소의 안정성을 조사하였으며, 유색미 식혜의 항산화 활성을 조사하였다.

2. 활용에 대한 건의

본 연구에서 이루어진 연구결과의 일부는 산업현장에서 식용천연색소생산에 직접 이용될 수 있는 기술로서 활용이 가능하며 다음의 추가적인 연구가 이루어진다면 보다 효율적인 천연식용색소 생산기술활용이 이루어 질 것으로 사료된다.

가. 고부가가치 적색소(홍화 carthamin)의 생물변환기술 개발

나. 홍화 적색소 carthamin의 식품안정성 제고기술 개발

다. 경제적인 치자 청색소 생산기술 개발

라. 생물변환 천연색소의 경제적인 생산공정기술 개발

마. 천연식용색소의 고부가가치 식품활용기술 개발

바. 천연식용색소의 기능성 식품으로의 활용기술 개발

SUMMARY

To develop and utilize natural food colorants originated in Korea and results are as follows. Four subprojects have been employed.

1. Isolation and physicochemical characterization of food colorants from higher plants
   - ○ Isolation and identification of cyanidin 3-glucoside from pigmented rice (*Oryza sativa* L. var. Suwon 415), carthamin from the petals of safflower (*Carthamus tinctorius*), shikonin derivatives from the roots of *Lithospermum erythrorhizon*, and crocin and geniposide from *Gardnia jasmonoides*. Physicochemical characterization and stability study of the pigments.
   - ○ Partial purification and characterization of biosynthetic enzymes of carthamin.
   - ○ Transformation of geniposide to blue pigments with amino acids.

2. Development of microbial food colors (ie Monascus)
   - ○ Isolation and identification of water-soluble colors produced from *Monascus anka*
   - ○ Isolation and nucleotide sequence determination of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Monascus anka* IFO4478.
   - ○ Transformation of foreign DNA to *Monascus purpureus* DSM1379.

3. Development of mass production process of natural food colors
   - ○ Selection of extracting solvents
   - ○ Investigation on operating methods of batch and continuous processes for color extraction

○ Construction of reactor (5 L) and several types of mixers for color extraction.

○ Effect of mixer types on the patterns of fluid mixing in extraction processes.

○ Investigation on the effects of temperatures and reaction times on the efficiency of extraction using scaled-up reactor (35 L), and development of the color production process using supercritical fluid extraction.

4. Development of utilization of natural food colors

○ Effects of heat, light, metal ions, sugars and organic acids on the stability of cyanidin 3-glucoside from pigmented rice and carthamin from *Carthamus tinctorius*.

○ Effect of copigments and biopolymers on the stability of anthocyanins from Korean pigmented rice variety.

○ Production and antioxidant effect of Shikhae from pigmented rice.

CONTENTS

목 차

제 1 장 서 론

제 1 절 연구개발의 목적과 중요성

색소는 천연 또는 합성색소가 있으며 식품, 화장품 및 의류염색용 등 다양한 분야에서 사용되고 있다. 합성색소는 착색률이 높고 안정하며 가격이 저렴하여 천연색소를 대신하여 광범위하게 사용되어 왔으나 발암성과 인체에 독성을 갖는 등 안전성문제가 제기됨에 따라 그 사용이 엄격히 규제되고 있다. 최근 소비자들의 색소의 안전성에 대한 인식이 새로워지고 건강식품·위생적 식품에 대한 선호경향이 합성식용색소를 대체할 천연색소의 수요를 급격히 증가시키게 되었다. 또한 많은 천연색소는 살균, 항염 등 생리활성이 있으며 안전하여 화장품 및 기능성 식품으로 큰 잠재적 수요가 있다. 따라서 천연색소 시장이 크게 신장될 것으로 예상되고 있으나 기술 집약적인 산물이므로 현재도 선진국에서만 독점 생산되고 있다. 식용천연색소의 세계시장은 현재 약 2 억불 이상이며, 일본의 경우 1992년 약 200 억엔의 수요가 있었고 앞으로도 계속 커질 전망이다. 천연색소에 관한 연구는 유럽 및 일본 등지에서 anthocyanin, shikonin, carthamin, betacyanin 등에 관하여 이루어져 왔다. 천연색소는 재배농업법, 미생물배양, 식물세포배양법등에 의하여 생산될 수 있다. 미국, 일본 및 캐나다등 선진국에서는 식물세포 배양에 의한 천연색소 생산에 많은 연구를 수행해 왔으나 최근들어 재배농법의 발달등으로 농업재배 및 직접추출에 의한 천연색소 생산 공정의 경제성이 재고되면서 화학적 합성법, 세포 배양법의 단점을 극복할 수 있는 기술로 인식되어 새로운 색소 작물의 탐색과 직접추출 공정개발에 주력할 것으로 사료된다.

우리나라는 유사이래 식물로부터 각종 염료를 생산하여 식용 및 의류염색으로 사용하여왔으나 이에 대한 체계적이고 과학적인 연구가 거의 없어 이 분야의 현 기술 상태는 매우 취약한 실정이다. 전국적으로 일부 농가에서 수공업 형태로 천연색소를 추출하여 염색 및 식용으로 사용하고 있으나 색소 성분은 물론 공정상의 과학화에 관한 연구도 전혀 이루어지지 않고 있다. 따라서 우리나라 전통

색소자원에 대한 조사와 천연색소에 관한 체계적이고 과학적인 연구가 시급한 실정이다.

본 과제에서는 천연색소성분의 분리동정 및 특성연구, 미생물색소 개발, 천연색소 생산공정개발 과 천연색소의 식품활용에 대한 체계적인 연구를 수행 하였다. 본 연구에서 수행한 색소성분에 대한 체계적인 연구와 생산공정의 연구 및 식품활용연구는 농가소득증대는 물론 식품, 화장품, 섬유제품 등의 품질향상과 국제 경쟁력 강화에 크게 기여할 것으로 생각된다.

제 2 절 연구개발의 내용과 범위

1. 총괄 목표 및 내용

구 분	연 구 개 발 목 표	연 구 개 발 내 용 및 범 위
1차년도 (1995)	착수 및 탐색단계 : 천연색소자원 기초 연구 및 조사	· 자료수집 및 색소성분 분리 · 색소구조 연구 · 색소생산 공정 기초 연구 · 천연색소 활용식품 조사
2차년도 (1996)	개발초기단계 : 천연색소개발의 기초 연구	· 색소성분 분리 동정 및 안정성 연구 · 색소생산 미생물 개량 · 색소생산의 실용화 연구 · 천연색소의 보존성 및 안정성 조사
3차년도 (1997)	개발 및 응용단계 : 연구천연색소자원의 이용 및 산업화 연구	· 천연 및 변형 색소성분의 안정성, 생리 및 약리 기능 비교 · 색소생산 미생물 분리 육종 · 색소 첨가식품의 개발 · 미생물 유래 색소 안정화 · 천연색소 활용식품의 산업화 연구

2. 과제별 목표 및 내용

가. 제1세부과제 : 식물식용색소의 분리동정 및 물리화학적 특성 연구

구 분	연 구 개 발 목 표	연 구 개 발 내 용 및 범 위
1차년도 (1995)	자료수집 및 색소성분 분리	· 전통식용색소 식물자원의 조사 및 탐색 · 중점연구 식물자원의 선정 · 적절한 용매계를 선정하여 색소식물의 추출액 및 분획 제조 · Flash column, MPLC, HPLC 등 기기를 사용하여 색소 성분의 분리동정 · UV/VIS spectrophotometer를 이용하여 색소성분의 특성연구
2차년도 (1996)	색소성분 분리동정 및 화학적 변형	· 전통식용색소 식물자원의조사 및 탐색 계속, 중점연구 식물자원의 선정 계속 · Flash column, MPLC, HPLC 등을 사용한 색소성분의 분리동정 계속 · NMR, IR, MS spectrometer 등를 이용한 색소성분의 화학구조 규명 · 온도, pH, 빛, 금속이온 등의 존재하에서 색소성분 수용액의 안정성 연구
3차년도 (1997)	천연 및 변형색소성분의 안정성 및 기능성 연구	· Flash column, MPLC, HPLC 등을 사용한 색소성분의 분리동정 계속 · NMR, IR, MS spectrometer 등을 이용한 색소성분의 화학구조규명 계속 · 온도, pH, 빛, 산소, 금속이온 등의 존재하에 색소성분의 안정성 연구 계속 · 생약으로 사용되는 식물로부터 얻은 색소성분의 생리 및 약리기능 검정 · 경제적 측면에서 본 색소성분의 합성 · 색소기능의 향상 측면에서 본 색소성분의 화학적 변형

나. 제2세부과제 : 미생물 (홍국균 등)색소개발

구 분	연 구 개 발 목 표	연 구 개 발 내 용 및 범 위
1차년도 (1995)	색소구조연구 및 미생물 개량	· 미량색소분리 · 미량색소의 구조동정 · 수요성 색소 구조 동정 · 균주 개량 · Biotransformation계 개발
2차년도 (1996)	신규색소생산 연구	· 색소유전자 연구 · Mutasynthesis기질연구 · Mutasynthesis 균주개발
3차년도 (1997)	미생물 분자 육종 및 색소안정화	· 색소유전자 도입 · 색소유전자 조절 · 색소 formulation · 색소의 공업화

다. 제3세부과제 : 천연식용색소 생산공정 개발 및 식품 활용

구 분	연 구 개 발 목 표	연 구 개 발 내 용 및 범 위
1차년도 (1995)	천연색소 추출공정 연구	· 식물체 시료조건의 추출반응에 미치는 영향 연구 · 색소추출용매의 선정연구 · 선정추출 촉매에 의한 추출반응의 기초연구 · 추출 반응기 및 공정 연구
2차년도 (1996)	천연색소 생산 공정 연구	· 공정의 회분식 및 연속식 운영 방법의 비교 연구 · 추출색소의 농축 및 정제 연구 · 종합공정 시스템의 설계 및 제작 · 색소생산 공정의 실용성 조사 · 식용색소 경제성 재평가
3차년도 (1997)	천연색소 생산공정의 실용화	· 색소생산의 최적 종합 공정 도출 · 색소생산 시스템의 Scale-up 연구 · Pilot plant 설계 기초 자료 확보 · 천연색소생산 산업화 기초연구

라) 제4세부과제 : 천연색소의 식품 활용 및 개발

구 분	연 구 개 발 목 표	연 구 개 발 내 용 및 범 위
1차년도 (1995)	천연색소의 식품 활용을 위한 보존성 및 안정성 연구	· 합성식용색소의 소비현황 및 문제점 조사 · 천연색소 활용 식품 조사 및 선정 · 천연색소 안정성 연구 · 천연색소 보존성 연구
2차년도 (1996)	선별식품의 색소이용 기초 연구	· 기본 조리, 가공 공정 중의 색소의 변화 연구 · 색소의 일반적 성질과 안정성을 유지할 수 있는 식품 2-3가지를 선별함 · 각 식품에 대한 색소 첨가 공정의 기초 연구
3차년도 (1997)	색소 첨가 식품의 개발 및 산업화 연구	· 천연색소가 첨가된 식품의 기호도 조사 · 천연색소의 식품 중의 안정성 조사 · 저장기간 동안의 색소 및 일반 성분 및 영양소와의 상호작용 연구 · 색소첨가 식품제조공정 시험 연구

제 2 장 연구개발 결과

본 연구개발 과제 “천연 식용색소의 개발 및 이용”은 1) 식물 식용색소의 분리동정 및 물리화학적 특성연구, 2) 미생물(홍국균)색소개발, 3) 천연색소 생산공정 개발, 4) 천연색소의 식품활용 및 개발의 4개분야 세부과제로 구성되어 있으며 1), 2)의 과제는 색소 자원의 발굴, 색소자원으로부터 색소물질의 분리정제, 색소화합물의 화학구조 규명 등의 연구를 주로 수행하고 3), 4)의 과제는 1), 2)과제에서 발굴된 경제성이 있는 천연색소자원으로부터 대량생산공정을 개발하고 이들 색소의 식품에의 활용을 주로 연구하도록 계획되어 있다. 본 과제는 3년간 당초 계획한 연구내용을 성공적으로 수행하여 16편의 연구논문을 학술지에 발표하였고 34편의 논문을 학술대회에서 발표하였다. 각종 학술지 및 학술대회에 발표한 연구결과는 다음과 같다.

학술지 발표 논문

1) Yoon, H.-H., Paik, Y.-S., Kim, J.-B., and Hahn, T.-R. "Identification of Anthocyanins from Korean Pigmented Rice" *Agr. Chem. Biotech.*, 38, 581-583 (1995).

2) Cho, M.-H., Yoon, H.-H., and Hahn, T.-R. "Thermal Stability of the Major Color Component, Cyanidin 3-glucoside, from a Korean Pigmented Rice Variety in Aqueous Solution" *Agr. Chem. Biotech.*, 39, 245-248 (1996).

3) Cho, M.-H., Paik, Y.-S., Yoon, H.-H., and Hahn, T.-R. "Chemical Structure of the Major Color Component from Korean Pigmented Rice" *Agr. Chem. Biotech.*, 39, 304-308 (1996)

4) Kim, J.-B., Cho, M.-H., Hahn, T.-R., and Paik, Y.-S. "Efficient Purification and Chemical Structure Determination of Carthamin from *Carthamus tinctorius*" *Agr. Chem. Biotech.*, 39, 501-505 (1996)

5) Yoon, J.-M., Cho, M.-H., Hahn, T.-R., Paik, Y.-S., and Yoon, H.-H. "Physicochemical Stability of Anthcyanins from Korean Pigmented Rice

Variety as Natural Food Colorants" *Korean J. Food Sci. Tech.*, 29, 211-217 (1997)

6) Hong, S.-H., Park, S.-H., Ma, S.-D., Paik, Y.-S., Hahn, T.-R., and Chung, I.-S. "Process Optimization for the Production of Natural Food Colors: I. Extraction of Carthamin from Safflower(*Carthamus tinctorius L.*)" *Food Eng. Progress*, 1, 90-102 (1997)

7) Kim, J.-B. and Paik, Y.-S. "Stability of Carthamin from *Carthamus tinctorius* L. in Aqueous Solution : pH and Temperature Effect" *Arch. Pharmacol. Res.*, 20, 643-646 (1997)

8) Lee, J.-M., Ma, S.-D., Hahn, T.-R., Kim, G.-H., Lim, S.-B., and Chung, I.-S. "Supercritical Extraction and Concentration of Carthamin from Safflower" *Kyung Hee J. Genet. Mol. Biol.*, 9, 29-32 (1997)

9) Lee, J.-M., Ma, S.-D., Hahn, T.-R., Kim, G.-H., and Chung, I.-S. “Process Development for the Production of Natural Food Colors: III. Effect of Temperature on the Extraction of Pigments from Safflower (*Carthamus tinctorius*)" *Food Eng. Progress*, 2, 30-33 (1998)

10) Yoon, J.-M., Hahn, T.-R., and Yoon, H.-H. "Effect of Copigmentation on the Stability of Anthcyanins from Korean Pigmented Rice Variety" *Korean J. Food Sci. Tech.*, 30, 733-738 (1998)

11) Lee, J.-Y., Hahn, T.-R., and Paik, Y.-S. "Physicochemical Characteristics for the Transformation of Blue Pigments from Genipin of *Gardenia jasmonoides* with Amino Acids" *Agr. Chem. Biotech.*, 41, 399 - 404 (1998)

12) **한병석, 김공환, 정인식, 초임계 이산화탄소를 이용한 홍화로부터 황색소 추출, 한국농화학회지**, 41, 363 - 366 (1998)

13) Yoon, J.-M., Hahn, T.-R., and Yoon, H.-H. "Physicochemical Stability of Carthamin from Safflower Petals as Food Colarants" *Korean J. Food Sci. Technol.*, submitted(1998)

14) Cho, M.-H., Paik, Y.-S., and Hahn, T.-R. "Propionylshikonin from the Roots of *Lithospermum erythrorhizon*"submit to *Phytochemistry*. (1998)

15) Cho, M.-H., Paik, Y.-S., and Hahn, T.-R. "Identification and Physical Stability of Shikonin Derivatives from the Roots of

Lithospermum erythrorhizon Cultivated in Korea" submit to *Phytochemistry*. (1998)

16) **김수언, 김정구. "색소생성이 변화된** *Monascus purpureus* DSM1379 **형질전환체의 분리" 한국농화학회지, 투고준비중** (1998)

<u>학술회의 발표논문</u> ;

1) Kim, J.-B. and Paik, Y.-S. (1995) "Physical and Chemical Characteristics of a Red Pigment, Carthamin, from *Carthamus tinctorius*" Annual Meeting of Korean Chemical Society, p310, Pusan, Korea, October 20-21.

2) Paik, Y.-S., Kim, J.-B., and Hahn, T.-R. (1995) "Isolation and Characterization of Red Pigment from *Carthamus tinctorius*" Proc. 7th FAOBMB Congress, 1-203, Sydney, Australia, September 24-29.

3) Cho, M.-H., Paik, Y.-S., and Hahn, T.-R. (1996) "Isolation and Chemical Identification of a Major Color Component from Korean Pigmented Rice" Annual Meeting of Korean Agricultural Chemical Society, p57, Jeonju, Korea, May 18.

4) Kim, J.-B. and Paik, Y.-S. (1996) "Efficient Isolation and Color Stability Study of a Red Pigment, Carthamin, from *Carthamus tinctorius*" Annual meeting of Korean Chemical Society, p307, Seoul, korea, May 24-25.

5) Nam, K.-J., Chung, J.-W., Kim, J.-B., and Paik, Y.-S. (1996) "Isolation and Characterization of Natural Colorants from *Lithospermum erithorhizon* and *Gardenia jasminoides*" Annual Meeting of Korean Chemical Society, p398, Seoul, Korea, May 24-25.

6) Cho, M.-H. and Hahn, T.-R. (1996) "Thermal Stability of the Major Anthocyanin, Cyanidin 3-glucoside from Korean Pigmented Rice" Annual Meeting of Korean Agricultural Chemical Society, p58, Jeonju, Korea, May 18.

7) Kim, J.-B., Paik, Y.-S., and Hahn, T.-R. (1996) "Carthamin, a Red Pigment from *Carthamus tinctorius* : Isolation and Physical Stability" Annual Meeting of Korean Agricultural Chemical Society, p76, Jeonju,

Korea, May 18.

8) Hong, S.-H., Park, S.-H., Ma, S.-D., Paik, Y.-S., Hahn, T.-R., and Chung, I.-S. (1996) "Development of Production Process of Traditional Natural Colors : Mass Extraction of Carthamin from *Carthamus tinctorius*" Annual Meeting of Korean Agricultural Chemical Society, p75, Jeonju, Korea, May 18.

9) Kim, J.-G., Jang, H.-S., Kim, S. T., Choi, Y.-D., and Kim, S.-U.(1996) "Molecular Cloning of Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase Gene from Monascus anka IF04478" '96 Agricultural Biotechnology Symposium, Suwon Korea, August 22

10) 마상동, 박승환, 홍성현, 백영숙, 한태룡, 정인식 (1996)"잇꽃 Carthamin의 추출공정연구" 추계한국식품과학회, 서울, 10. 12.

11) Cho, M.-H., Paik, Y.-S., and Hahn, T.-R. (1996) "Isolation and Identification of Shikonin Pigments from *Lithospermum erythrorhizon*" Annual Meeting of Korean Society of Food Science and Technology, Seoul, Korea, October 10-12.

12) Cho, M.-H., Paik, Y.-S., and Hahn, T.-R. (1996) "Physical Stability of Shikonin and Shikonin Derivatives from *Lithospermum erythrorhizon*" Annual Meeting of Korean Society of Food Science and Technology, Seoul, Korea, October 10-12.

13) Kim, J.-B., Paik, Y.-S., and Hahn, T.-R. (1996) "Isolation, Identification, Stability of a Red Pigment, Carthamin from *Carthamus tinctorius*" Annual Meeting of Korean Society of Food Science and Technology, Seoul, Korea, October 10-12

14) Kim, J.-B. and Paik, Y.-S. (1996) "Isolation and Chemical Identification of a Noble Red Pigment from *Carthamus tinctorius*" Annual Meeting of Korean Chemical Society, Daejeon, Korea, October 18-19.

15) Cho, M.-H., Paik, Y.-S., and Hahn, T.-R. (1996) "Isolation and Physical Stability of Shikonin Pigments from *Lithospermum erythrorhizon*" Annual Meeting of Korean Agricultural Chemical Society, Suwon, Korea, October 19.

16) Yoon, J.-M., Hahn, T.-R. and Yoon, H.-H.(1996) "Stability of Anthcyanin Pigments in Korean Pigmented Rice" Annual Meeting of

Korean Society of Food Science and Technology. Seoul. Korea, October 10-12.

17) 윤주미, 한태룡, 윤혜현, (1997) "유색미 안토시아닌의 Model system에서의 안정성" 한국농화학회·한국식품과학회 합동 학술발표회, p92, 대전, 5. 31

18) 윤주미, 한태룡, 윤혜현, (1997) "유색미 안토시아닌의 copigmentation에 의한 안정화 효과" 한국농화학회·한국식품과학회 합동 학술발표회, p92, 대전, 5. 31

19) 윤주미, 한태룡, 윤혜현, (1997) "홍화 적색소 carthamin의 식품색소로서의 안정성" 한국농화학회·한국식품과학회 합동 학술발표회, p93, 대전, 5. 31

20) Cho, M.-H., Paik, Y.-S., and Hahn, T.-R. (1997) "Isolation and Identification of a New Shiconin Derivative from the Root of *Lithospermum erythrorhizon*" Annual Joint Meeting of Korean Agricultural Chemical Society and Korean Society of Food Science and Technology, Daejeon, Korea, May 31.

21) Cho, M.-H., Paik, Y.-S., and Hahn, T.-R. (1997) "Isolation of a Novel Pigment from the Petals of Safflower (*Carthamus tinctorius)*" Annual Joint Meeting of Korean Agricultural Chemical Society and Korean Society of Food Science and Technology, Daejeon, Korea, May 31.

22) Hahn, K.-M., Cho, M.-H., Paik, Y.-S., and Hahn, T.-R. (1997) "Isolation of a Novel Orange-Colored Pigment from Safflower (*Carthamus tinctorius)*" Annual Joint Meeting of Korean Agricultural Chemical Society and Korean Society of Food Science and Technology, Daejeon, Korea, May 31.

23) Lee, J.-Y. and Paik, Y.-S. (1997) "Isolation and Transformation of geniposide from *Gardenia jasminoides*" Annual Meeting of Korean Chemical Society, Taegu, Korea, October 24-25.

24) Kim, J.-G., Choi, Y. D., and Kim, S.-U. (1997) "Development of a Genetic Transformation System for Monascus purpureus Went DSM1379" Annual Meeting of Korean Society for Molecular Biology, Seoul, Korea, October 16-18.

25) 윤주미, 한태룡, 윤혜현, (1997) "홍화 적색소 Carthamin의 식품색소로서의 안정화 연구" '97 추계 한국식품과학회, 서울, 11. 1.

26) 이종민, 정충식, 한태룡, 김공환, 정인식 (1997) "잇꽃색소의 추출공정 연

구" '97 추계 한국생물공학회, 대구, 10. 9-11.

27) 이종민, 한병석, 김공환, 한태룡, 정인식, (1997) "잇꽃 carthamin의 초임계 추출", 한국산업식품공학회 추계학술발표회, 수원, 11. 22.

28) Lee, J.-Y. and Paik, Y.-S. (1998) "Separation and Elucidation of Blue Pigments from *Gardnia* Fluits Origin" Annual Meeting of Korean Chemical Society, p326, Seoul, Korea, April 24-25.

29) 김미숙, 윤혜현, 한태룡 (1998) "유색미 식혜제조 및 특성연구" 한국식품과학회-한국식품영양과학회 합동 학술발표회, p92, 부산, 5. 30.

30) Cho, M.-H., Shin, E.-H., Paik, Y.-S., and Hahn, T.-R. (1998) "Purification of Carthamin Synthesizing Enzyme from Yellow Petals of Safflower and Enzymatic Synthesis of Carthamin" Annual Meeting of Korean Agricultural Chemical Society, p113, Taegu, Korea, May 29-30.

31) Lee, J.-Y., Hahn, T.-R., and Paik, Y.-S. (1998) "Physical Stability of the Blue Pigments Transformed from *Gardnia* Fruits" Annual Meeting of Korean Agricultural Chemical Society, p122, Taegu, Korea, May 29-30.

32) Cho, M.-H., Paik, Y.-S., and Hahn, T.-R. (1998) "Biochemical Properties of a Carthamin Synthesizing Enzyme from Yellow Petals of *Carthamus tinctorius*" Annual Meeting of Korean Biochemical Society, Daegeon, Korea, October 15-16.

33) 김미숙, 윤혜현, 한태룡 (1998) "유색미 식혜 및 phenol 추출물의 항산화성" 한국식품과학회 학술발표회, 서울, 11. 7.

34) 마상동, 이종민, 한태룡, 김공환, 정인식(1998) "천연 식용색소 생산 공정의 개발 : Ⅳ. 잇꽃 색소의 추출 및 농축 연구" 농업생물 신소재 연구 심포지움, 수원, 11. 5.

제 1 절 식물식용색소의 분리동정 및 물리화학적 특성 연구

1. 식물 색소자원의 조사 및 탐색과 중점연구 식물자원의 선정

예로부터 전통적으로 사용해 왔던 천연색소의 식물자원에 대해 문헌 및 직접방문을 통해 조사 탐색한 결과, 우리나라에서는 총 150종 이상의 색소식물을 이용하여 각종의 색깔을 꺼내어 이용한 것으로 밝혀져 있다. 식용 천연색소로서의 중요성과 경제성을 고려해 볼 때 특히 적색색소가 중요하므로, 본 연구에서는 적색색소 식물자원을 집중적으로 조사하였고, 선정의 대상으로 삼았다. 연구대상 식물색소자원은 다음과 같다.

가. 유색미

적미, 자색미 또는 흑미로 불리우는 새로운 벼품종으로서 농촌진흥청 작물시험장에서 육종되었다. 이러한 유색미의 존재는 오래전부터 알려져 왔으나 그 유용성은 최근 UR 대응 고품질 신작물의 필요성이 대두되면서 크게 인식되고 있다. 최근 육종된 유색미중 본 연구에 이용된 수원 415호에는 진한 흑색의 색소가 겨층에 집적되어 있으며 이러한 겨층은 총 중량의 30-40% 에 이른다. 따라서 적색 천연 식용색소로 대단히 경제적이며 유용한 자원으로 생각되어 연구에 착수하였다.

나. 잇꽃 (홍화, *Carthamus tintorius*)

홍화는 연지의 적색색소를 주로 얻는 식물색소 자원으로 화장품 및 의류의 염색 등 적색 과 황색 색소원으로 예로부터 가장 다양하게 이용되어 왔고, 어혈 등의 증상에 한방에서 중요하게 여기는 색소식물이다. 최근 홍화의 황색색소는 물론 적색색소도 인체에 무해함이 밝혀졌고 적색색소인 carthamin과 황색색소인 safflower yellow는 FAO와 WHO에서 식용천연색소로의 사용이 허용된 바 있으나 우리나라에서는 홍화의 색소성분에 대하여 전혀 연구된 바 없다. 본 연구에서는 경제성을 고려하여 고가인 적색색소를 중심으로 연구에 착수하였다.

다. 지치 (자초, 자근, *Lithospermum erythrorhizon*)

자초의 뿌리인 자근은 자홍색 색소원으로 화장품용, 식품착색용, 의류염색용, 항균작용 등의 특성을 이용한 의약용으로 널리 사용되어 왔으나 80년대이후 새포배양법이 성공함에따라 이 분야 연구가 거의 이루어지지 않고 있다. 우리나라에서는 진도지역을 중심으로 제배되어 홍주 등의 제조에 이용되고 있으나 자근색소의 화학성분과 이들의 물리화학적 성질에 관하여 거의 연구된 바 없다. 본 연구에서는 자근에 포함된 시코닌 색소성분을 분리하여 그 물리화학적 성질을 규명하였다.

라. 치자(*Gardenia jasminoides*)

해열, 항균, 지혈작용 등의 약리효과를 지니는 치자의 황홍색 열매는 민간에서 황색색소원으로 널리 쓰여왔으며 최근에는 치자로부터 청색소도 얻을 수 있게 되었다. 본 연구에서는 이들 색소화합물에 대한 기초연구를 수행하였다.

2. 색소식물의 추출액 및 분획제조

가. 유색미 (*Oryza sativa* var. Suwon 415)

유색미는 자색 또는 검은색을 띠는 쌀로서, 색소성분은 주로 안토시아닌이다. 한국산 유색미(*Oryza sativa* var. Suwon 415)의 색소를 0.1% HCl-MeOH 추출하여 적색의 색소 추출물을 얻었다. 얻이진 추출물을 감압농축한 후 Amberlite XAD-7 관 크로마토그래피로 분획하였다. 분획한 시료를 감압농축한 후 종이 크로마토그래피를 이용하여 분리하여 적색의 색소를 얻었다.

나. 잇꽃 (홍화, *Carthamus tintorius*)

홍화로부터 적색색소성분을 추출하기 위하여, 우리나라의 전통적인 연지를 얻는 방법을 개량하여 사용하였다. 마른 홍화 꽃잎을 증류수로 수회 씻어내어 수용성 황색소를 제거하고, 다시 메탄올을 가하여 황색색소와 그 외 유기물을 추출해낸다. 황색소가 제거된 홍화 꽃잎을 건조한 후 분쇄하여 시료로 사용하였다. 분쇄한 홍화시료에 0.1M potassium carbonate 수용액을 가하여 적갈색 수

용액을 얻었다. 찌꺼기는 여과후 버리고, 여과액에 0.1M citric acid 수용액을 가해서 4℃ 암소에 2시간 동안 방치하여 침전물 형태의 적색색소를 얻었다.

다. 지치 (자초, *Lithospermum erythrorhizon*)

자근은 자초의 뿌리로서 예로부터 식품착색, 의류염색, 의약용으로 사용되어왔다. 자근을 hexane으로 추출하여 적색의 색소추출물을 얻었다. Hexane 추출물을 감압농축한 후 silica gel column에 loading 한 후 hexane : ethyl acetate의 비율이 20 : 1 에서 1 : 1 까지 gradient elution을 하여 6개의 분획을 얻었다.

라. 치자(*Gardenia jasminoides*)

치자열매에 들어있는 수용성 carotenoid 색소인 crocin을 추출하기 위하여 치자분말 100g에 1L의 메탄올을 가하고 2일간 암소에서 반복 추출하였다. 여과액에 같은 양의 ether를 가한 다음 암소에서 침전시켰다. 침전물에 물을 가하여 녹지않는 물질을 제거하여 corcin 분획을 얻었다.
치자에는 황색소외에도 iridoid화합물이 함유되어 있고, 이 성분은 청색소로 변환이 가능하다. 치자의 iridoid 화합물인 geniposide 를 얻기위해 분쇄한 치자를 $CHCl_3$로 씻어내어 유기물을 제거한 후 메탄올로 추출하였다. 메탄올 추추액을 감압농축한 후 chacoal에 흡착시킨 후 물과 EtOH-H_2O (1 : 9)로 황색소를 제거한 후 메탄올로 용출시켜 geniposide 분획을 얻었다.

3. 색소성분의 분리동정 및 화학구조 규명

가. 유색미 (*Oryza sativa* var. Suwon 415)

한국산 유색미(*Oryza sativa* var. Suwon 415)를 1%HCl-MeOH로 추출하고, 추출액을 감압농축 하였다. 얻어진 색소용액은 Amberlite XAD-7 column에 가하고 20%MeOH-H_2O로 용출하였다. 용출액을 감압농축한 후 종이 크로마토그래피를 이용하여 유색미 적색소를 분리하였다. 분리된 색소의 구조는 종이크로마토그래피, 산 가수분해, UV/Vis 및 NMR 스펙트로스코피를 이용하여 분석하였다. 분리

된 색소의 UV/Vis 스펙트럼에서의 최대흡수파장과 종이크로마토그래피상의 Rf 값을 문헌상의 값과 비교해본 결과 분리된 색소의 구조는 cyanidin 3-glucoside 로 추정되었다. 분리된 색소를 산 가수분해하여 얻어진 결합당은 종이크로마토그래피로 분석한 결과 한 결과 포도당이었다. NMR 스펙트로스코피를 이용하여 분석한 결과 분리된 색소의 구조는 cyanidin 3-*O*-β-D-glucopyranoside로 결정되었다(Fig. 1-1).

나. 잇꽃 (홍화, *Carthamus tintorius*)

홍화 꽃잎을 증류수로 24시간씩 3회 처리하여 수용성 황색소를 녹여내고, 다시 메탄올을 가하여 남아있는 황색소 및 유기물을 제거한 다음 건조 후 분쇄하였다. 분쇄한 홍화 시료를 0.1M potassium carbonate용액으로 추출하여 적갈색수용액을 얻고, 이 용액에 0.1M citric acid 용액을 가하여 적색소를 침전시켰다. 침전된 적색소를 셀룰로오스에 흡착시킨 다음, 증류수로 수회 씻어내어 황색소를 제거하였다. 셀룰로오스에 흡착된 적색소를 아세톤으로 녹여내고 감압농축하여 적색소를 얻었다. 얻어진 적색소는 Sephadex LH-20 column에 가하고 MeOH/acetone(1:1)로 용출하여 분리하였다. 에탄올에 녹인 적색색소의 UV/Vis spectrum은 519nm 와 372nm에서 λ_{max} 를 보여주었고 IR spectrum 은 3400 cm-1 의 넓은 영역에서 hydroxyl 기에 의한 강한 흡수띠를 보여주었다. 홍화의 적색소의 화학구조는 NMR spectroscopy를 이용하여 분석한 결과 enolized β-triketone, p-hydroxycinnamoyl, methine 및 glucosyl moiety를 가진 carthamin으로 확인하였다(Fig. 1-2).

분쇄한 홍화 꽃잎을 메탄올로 20시간동안 추출하여 주황색의 색소용액을 얻었다. 메탄올로 추출한 나머지 시료를 건조한 후 0.1M potassium carbonate로 추출한 후 0.5M citric acid를 가하고 4℃에 방치하여 침전물을 얻었다. 침전물을 BuOH/H_2O로 분획하고, 물층을 silica gel column chromatography를수행하여 색소분획을 얻었다. 얻어진 색소분획을 preparative TLC를 수행하여 적색소를 분리하였다. 분리된 적색소는 carthamin과는 매우 다른 UV/Vis 스펙트럼을 보였고, TLC상에서 확연히 구별되었다. 따라서 분리된 적색소는 carthamin과는 다른 새로운 홍화 적색소로 생각되며, NMR, mass spectrometry와 원소분석 등을

이용하여 구조를 밝히는 연구를 수행중이다. 홍화의 메탄올 추출액을 silika gel column chromatography와 preparative TLC를 이용하여 주황색 색소를 분리하였다. 분리된 주황색소는 UV/Vis 스펙트럼에서 최대흡수파장이 482, 264 nm로 현재까지 보고된 홍화색소와는 다른값을 보였다. 따라서 분리된 색소는 지금까지 보고되지 않은 새로운 색소로 생각되며, 그 구조를 밝히기 위한 연구가 수행중이다.

다. 지치(자초, *Lithospermum erythrorhizon*)

Silica gel columnn chromatography로 얻어진 분획을 preparative TLC를 수행하거나, 또는 silica gel column chromatography를 수행하여 여섯가지의 적색소를 분리하였다. 분리된 색소들은 275 nm와 520 nm근처의 최대흡광도를 가지는 전형적인 시코닌 유도체의 UV/Vis 스펙트럼을 보였다. 분리한 색소성분의 화학구조는 NMR 및 mass spectrometry를 이용하여 규명하였다. 분리한 색소는 각각 deoxyshikonin, isobutylshikonin, propionylshikonin, acetylshikinin, shikonin, β-hydroxyisovalerylshikonin으로 밝혀졌다(Fig. 1-3). 이중 다섯가지는 이미 보고된 시코닌 색소였으나, propionylshikonin은 자근에서는 분리된 적이 없는 시코닌 유도체인 것으로 생각된다.

다. 치자(*Gardenia jasminoides)*

치자열매로부터 얻은 황색소 수용액에 에탄올을 가한 다음 석출물을 제거하고, 여기에 에탄올과 에테르를 가하고 냉장고에 방치하여 황색소 결정을 얻었다. 얻어진 황색소는 NMR spectroscopy로 분석한 결과 crocin으로 확인되었다(Fig. 1-4). Geniposide는 chacoal에 흡착된 성분을 메탄올로 용출한 후 silica gel column chromatography에 가하고 MeOH:CH_3Cl (3 : 7)로 용출한 후 아세톤으로 결정하여 흰색 결정을 얻었다. 분리한 시료는 UV/Vis 스펙트럼에서 최대흡수파장이 237 nm로 문헌상의 값과 일치하였고, m.p.도 158 - 163 ℃로 geniposide의 값과 일치하였다. 분리한 시료를 NMR을 이용하여 분석한 결과 genioside임이 확인되었다(Fig. 1-5).

4. 색소성분의 특성

가. 유색미 적색소 : cyanidin 3-glucoside

유색미로부터 분리한 cyanidin 3-glucoside는 UV/Vis spectrum에서 최대흡수파장(λmax)이 281nm와 529nm 였으며, AlCl3를 첨가하였을 때 +39nm의 bathochromic shift를 보였다(Table 1-1). 유색미색소 수용액에서 pH에 따라 색상과 spectrum이 변하였으며, 산성조건(pH 2.0)에서 적색(λvismax = 511nm)을 나타
내었고, 염기성조건(pH 9.0)에서는 청색(λvismax = 572nm)을 나타내었다.

Table 1-1. Rf values and spectral properties of cyanidin 3-glucoside from Korean pigmented rice (*Oryza sativa* var. Suwon 415)

Rf values (x100) in			Spectral data in 0.01% HCl-MeOH		
BAW	BuHC	1% HCl	λmax(nm)	A440/A529(%)	+AlCl3
37	29	6	281, 529	23	+39nm

Solvent key ; BAW = n-BuOH : AcOH : H2O (4 : 1 : 5, upper layer),
BuHCl = n-BuOH : 2M HCl (1 : 1), 1% HCl = conc. HCl : H2O (3 : 97).

나. 홍화 적색소 : carthamin

홍화 적색소 carthamin은 UV/Vis spectrum에서 최대흡수파장(λmax)이 244, 372, 519 nm였으며, 녹는점은 300℃였다. carthamin의 silica gel TLC 상에서의 Rf값은 Table 1-2에 정리하였다.

Table 1-2. Rf values of carthamin purified from *Carthamus tinctorius* on silica gel in various solvent systems.

Solvent	Rf value (x 100)	Visible color
5% formic acid/MeOH	83	red
Forestal	70	orange-yellow
BAW	56	orange
1% HCl	3	bright yellow

Solvent key ; Forestal = comc. HCl : AcOH : H_2O (3:30:10), BAW = n-BuOH : AcOH : H_2O (4 : 1 : 5, upper layer), 1% HCl = conc. HCl : H_2O (3 : 97).

다. 자근 적색소 : 시코닌 유도체

자근으로부터 분리한 6가지의 시코닌 유도체들은 유사한 UV/Vis spectra**를 보였으며, 최대흡수파장(**λmax**)은 성분에 따라 약간의 차이를 나타내었다**(Table 1-3). **또한** silica gel TLC**상에서도 각각 다른 이동성을 나타내었다**(Fig. 1-6). **색소용액은** pH**에 따라 색상 및** UV/Vis spectrum**이 변하였으며, 산성과 중성 조건**(pH 2 - 7)**에서는 적색을 나타내었고, 염기성 조건**(pH9 - 12)**에서는 청색을 나타내었다** (Fig. 1-7).

Table 1-3. UV/Vis spectral data of the purified shikonin derivatives from the roots of *Lithospermum erythrorhizon*

Pigment	γmax (nm)							
	in EtOH				in MeOH			
Deoxyshikonin	277	485	514	552	273	485	512	
Shikonin	278	486	516	554	275	487	515	558
Acetylshikonin	275	489	520	560	273	489	517	
Isobutylshikonin	275	488	520	561	275	489	518	558
β-Hydroxyisovalerylshikonin	276	489	520	560	275	489	518	558
Propionylshikonin	276	489	521	561				

5. 색소성분의 기능 및 안정성 분석

가. 유색미 적색소 : cyanidin 3-glucoside

유색미의 안토시아닌 색소는 산성(pH 2.0)과 염기성(pH 9.0) 완충용액에서 각각 강한 적색과 청색을 나타내었고 열에 의한 색소의 분해반응은 20 mM phosphate (pH 2.0)와 20 mM CHES (pH 9.0) 완충용액에서 50℃ 90℃의 온도범위에서 수행되었다. 색소의 분해정도는 UV/Vis 스펙트럼의 변화를 측정하여 결정하였으며, 350nm (pH 2.0)와, 275, 310, 및 405nm (pH 9.0)에서 isosbestic point를 나타내었다. 이 결과는 색소분해반응이 1 차 반응임을 의미한다. 유색미 안토시아닌은 산성조건에서 매우 안정하였고 염기성조건에서도 비교적 안정하였으며, 반감기는 70℃에서 각각 50.3h 과 0.6h 이었다(Table 1-4). 색소분해반응의 활성화에너지(Ea)와 Arrhenius frequence factor(A)는 pH 2.0에서는 26.9 kcal mol-1과 6.0 × 1011 s-1이었고, pH 9.0에서는 15.2 kcal mol-1과 1.4 × 106 s-1이었다.

Table 1-4. Rate constants(*k*) and half-life(T1/2) of thermal degradation reactions of cyanidin 3-glucoside at acidic (pH 2.0) and alkaline (pH 9.0) pHs at different temperatures.

Temperature (℃)	Rate constant (s-1)		Half-life (h)	
	pH 2.0	pH 9.0	pH 2.0	pH 9.0
50		7.7×10-5		2.5
60		1.5×10-4		1.3
70	3.8×10-6	3.2×10-4	50	0.61
75	7.8×10-6		25	
80	1.3×10-5	5.8×10-4	15	0.33
85	2.0×10-5		9.7	
90	3.6×10-5	1.0×10-3	5.3	0.19

나. 홍화 적색소 : carthamin

홍화 적색소 carthamin 수용액은 pH 5.0와 pH 7.0에서의 UV/Vis spectra는 λmax가 각각 520nm와 511nm로 빨간 색을 띠는 반면, pH 12.0 에서는 λmax가 485nm로 그 색이 현저하게 변하는 것을 볼 수 있었다. 여러 pH와 온도에서 carthamin이 분해되는 pattern을 UV/Vis spectrum을 측정하여 온도에 따른 분해 속도상수와 반감기를 구하였고(Table 1-5) 이들 속도상수를 이용하여 Arrehenius plot을 통해 활성화 에너지를 계산하였다. 활성화 에너지는 pH 5.0, 7.0, 12.0에서 각각 15.6, 15.7, 16.7 kcal/mol이었다.

Table 1-5. The rate constants of thermal degradation reactions of carthamin at acidic (pH 5.0, 0.1M acatate buffer), neutral (pH 7.0, 0.1M phosphate buffer), and alkaline (pH 12.0, 0.1M phosphate buffer) conditions at different temperatures.

Temperature (℃)	Rate constant (s-1)		
	pH 5.0	pH 7.0	pH 12.0
25	4.81 x 10-5		1.54 x 10-5
40	1.38 x 10-4	9.87 x 10-5	4.81 x 10-5
50	2.96 x 10-4	2.46 x 10-4	1.48 x 10-4
60	6.79 x 10-4	5.50 x 10-4	2.57 x 10-4
70	1.39 x 10-4	8.88 x 10-4	6.42 x 10-4
80	2.75 x 10-3	1.86 x 10-3	

다. 자근 적색소 : 시코닌 유도체

자근으로부터 분리한 시코닌과 시코닌 유도체의 pH, 온도, 빛에 대한 안정성을 조사하였다. 분리한 시코닌 색소들은 산성과 중성(pH 3.0, 5.0, 7.0)에서는 최대흡수파장이 520 nm인 적색을 염기성(pH 12.0)에서는 최대흡수파장이 623 nm인 청색을 나타내었다. 분리한 시코닌 색소들은 온도에 대해서는 매우 안정하였고, 빛에 대해서도 비교적 안정하였다. 분리한 시코닌 색소의 안정성을 50%

ethanol 수용액에서 조사한 결과 시코닌 유도체에 따라 60℃에서 15-55h 의 다양한 값을 보였으며 활성화 에너지는 deoxyshikonin이 12.5 kcal mol-1로 가장 큰 값을 보여주었다(Table 1-6, 1-7). 빛에 대한 시코닌 색소의 안정성을 조사한 결과, 10000 Lux의 빛에 대해 반감기가 최저6.6 시간에서 최고 7.9시간이었다. 다양한 빛의 세기에 대한 시코닌 색소의 안정성을 조사하였다(Table. 1-8).

Table 1-6. Rate constants (k) and half-life values ($t_{1/2}$) of the thermal degradation reactions of the purified shikonin pigments in 50% EtOH-H_2O at pH 3.0 (50 mM glycine buffer) at different temperatures.

Temperature (℃)	Rate constant ($s^{-1} \times 10^6$)					Half-life (h)				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
40	4.17	2.49	2.87	6.36	2.94	46.2	77.4	67.0	30.3	65.4
50	8.22	2.93	3.55	7.85	3.24	23.4	65.6	54.2	24.5	59.4
60	13.2	3.55	4.79	9.98	3.51	14.6	54.2	40.2	19.3	54.8
70	24.9	4.41	6.15	12.8	3.74	7.73	43.7	31.3	15.1	51.4

1 : Deoxyshikonin

2 : Shikonin

3 : Isobutylshikonin

4 : Acetylshikonin

5 : β-Hydroxyisovalerylshikonin

Table 1-7. Activation energies (Ea) of the thermal degradation reactions of the purified shikonin pigments in 50% EtOH- H2O at pH 3.0 (50 mM glycine buffer).

	Activation energy (kcal mol-1)
Deoxyshikonin	12.5
Shikonin	4.06
Isobutylshikonin	4.97
Acetylshikonin	5.51
β-Hydroxyisovalerylshikonin	1.71

Table 1-8. Rate constants (*k*) and half-life values (t1/2) of the photodegradation reactions of the purified shikonin pigments in 50% EtOH-H2O at pH 3.0 (50 mM glycine buffer) under different light intensities at room temperature.

Light intensity (Lux)	Rate constant (s-1×105)					Half-life (h)				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
5000	2.01	1.46	1.60	1.36	1.34	9.59	13.2	12.0	14.1	14.3
10000	2.88	2.53	2.78	2.37	2.44	6.67	7.60	6.92	8.11	7.90
15000	3.33	3.15	3.70	3.18	3.22	5.78	6.12	5.21	6.06	5.99
20000	3.78	3.83	4.58	4.19	4.13	5.08	5.03	4.21	4.59	4.65

1 : Deoxyshikonin

2 : Shikonin

3 : Isobutylshikonin

4 : Acetylshikonin

5 : β-Hydroxyisovalerylshikonin

6. 천연색소 생합성 효소의 분리 및 특성 연구

홍화에는 safflower yellow A, B, safflomin A, B, C, precarthamin등의 황색소와 적색소인 carthamin이 함유되어 있다. 황색소들은 색소생합성 과정의 중간 산물로 생각되며, 생합성의 마지막 단계는 황색소인 precarthamin이 적색소인 carthamin으로 전환되는 과정이라고 생각된다(Fig. 1-8). 본 연구에서는 홍화 꽃잎에서의 색소 생합성의 마지막단계인 carthamin의 합성에 관여하는 효소를 분리하고 그 특성을 연구하였다.

가. 효소활성 분석방법의 확립

Carthamin 생합성 효소의 활성측정은 전구체인 precarthamin과 효소반응 산물인 carthamin의 최대흡수파장(λmax)이 각각 406nm와 520nm로 다른점을 이용하였다. 효소반응의 기질인 precarthamin 시료는 홍화 노란꽃잎을 30% acetone-H_2O로 추출한 후, 색소용액을 trichloroacetic acid로 단백질을 제거하여 얻었다. 효소활성은 50mM citrate buffer (pH 5.0) 에서 precathamin 시료와 효소시료를 섞어준 후 carthamin의 생성을 520nm에서 흡광도의 증가로 측정하였다.

나. 효소의 분리 및 특성 연구

홍화의 노란 꽃잎을 0.5mM PMSF, 5mM 2-mercaptoethanol이 함유된 50mM Tris buffer로 추출하고 ammonium sulfate로 두 번 분획하였다. Ammonium sulfate 분획을 DEAE Sepharose column에 가하고 50mM Tris buffer, pH 7.5로 용출한 후 농축하여 Macro-Prep Ceramic Hydroxyapatite column에 가하였다. 10mM에서 200mM sodium phosphate buffer, pH 7.0으로 용출하여 활성 분획을 모은후 Bio-Gel A-0.5m column chromatography를 이용하여 carthamin 합성 효소를 부분 분리하였다(Fig. 1-9). 분리된 효소의 분자량은 SDS PAGE를 이용해서 약 33,000dalton으로 결정되었고, 효소의 K_M값은 164 uM, 최적 pH는 5.0이었다. 분리된 효소는 50℃이하의 온도에서 10분간 열처리 했을 때는 안정하였으나 60℃ 이상의 온도에서는 효소활성이 급격히 감소 하였다.

7. 천연색소의 화학적 및 생화학적 변형

가. 홍화 적색소

홍화 적색소 carthamin은 홍화 꽃잎에서 전구체인 precarthamin으로부터 생합성 되어 진다. 본 연구에서는 분리한 precathamin을 초자내에서 효소를 이용하여 carthamin으로의 생화학적 변형을 시도하였다.

Precarthamin은 홍화의 노란꽃잎을 1% TFA-acetone으로 추출한 후 농축하고, Sephadex LH-20 column 에 가한 후 20% - 80% CH_3CN-H_2O, 1% TFA로 용출하였다. Sephadex LH-20 column chromatography 분획을 preparative HPLC (C18 column, 1.0×25cm, solvent : H_2O/MeOH/CH_3CN/TFA(59/10/30/1), flow rate : 1ml/min)를 이용하여 분리하였다.

분리한 precathamin과 carthamin 생합성 효소를 50mM citrate buffer, pH 5.0 조건에서 반응시켜 적색소를 얻었다. 생합성 적색소는 UV/Vis spectrophotometer, TLC(Fig. 1-10), HPLC로 분석한 결과 홍화 꽃잎에서 분리한 carthamin과 동일하였다.

나. 치자 청색소

치자(*Gardenia jasminoides* Ellis)에는 식품 및 옷감등에 응용될 수 있는 황색 천연색소를 다량 함유하고 있다. 또한 치자로부터 추출된 무색의 geniposide 성분으로부터 간단한 enzyme과 amino acid 처리를 통해 청색소로 전환할 수 있다.

치자로부터 청색소를 얻는 과정은 치자과실에서 메탄올을 이용해 geniposide 성분을 추출해내고 이를 charcoal과 silica gel column chromatography를 통해 정제한 후 얻어진 geniposide를 β-glucosidase를 이용해서 가수분해하여 genipin을 얻었다. Genipin을 여러종류의 아미노산과 pH 3.0, 5.0, 7.0, 9.0과 12.0의 완충용액에서 각각 반응을 시켰을 때, 중성(pH 7.0)에서 가장 효과적인 청색소로의 변환을 보여주었고, 약산성(pH 5.0)이나 알칼리성(pH 9.0)에서는 반응성이 떨어졌고, 강산성(pH 3.0)과 강염기(pH 12.0)를 띤 완충용액에서는 반응이 거의 진행되지 않음을 UV/Vis spectrum을 통해서 관

찰했다. 또한 이 반응은 사용되는 아미노산의 종류에 따라서도 반응성 및 색상의 차이를 나타냈는데(Fig. 1-11), 염기성 아미노산인 lysine의 경우 반응속도가 가장 빨랐고, 산성 아미노산인 glutamate의 경우 가장 느리게 진행되었다. 색상에서는 phenylalanine 사용시 최대 흡수파장은 287과 602㎚(sky-blue)를 glycine의 경우에는 285와 596㎚의 최대 흡수파장(dark-blue)을, histidine과 반응했을때는 290과 601㎚ (violish-blue), lysine의 경우는 282와 573㎚(bluish-violet)의 최대 흡수파장을 각각 나타내었다.

8. 천연 및 변형색소성분의 안정성 및 기능성 탐색

치자 청색소는 일단 생성되면 산성 용액에서는 약간 불안정한 면을 보이지만 중성이나 알카리 용액에서 그리고 온도에 대해서 상당한 안정성을 보여주는 색소로 식품이나 음료의 착색제로 그 응용범위가 매우 넓다.

본 연구에서는 phosphate buffer(pH 7.0), 70℃ 온도 조건에서 5시간 반응하여 얻어진 dark-blue 색소를 이용했다. 이 치자 청색소를 pH 5.0, 7.0, 9.0의 완충용액에서 70, 75, 80, 85℃와 90℃의 각각의 온도에서 UV/Vis spectrophotometer를 이용해서 1시간 간격으로 측정한 결과 치자 청색소는 온도에 대해 대단히 안정하였으며 염기성 용액에서 더 안정하였다 (Table 1-9).

Table 1-9. Rate constants of thermal degradation reactions of Gardenia blue pigment in 100mM acetate (pH 5.0) and 100mM phosphate (pH 7.0) buffer systems at different temperatures.

T(℃)	Rate constant (s-1)	
	pH 5.0	pH 7.0
70	7.68×10-5	5.69×10-5
75	6.71×10-5	6.89×10-5
80	6.99×10-5	6.78×10-5
85	9.55×10-5	7.28×10-5
90	9.36×10-5	7.24×10-5

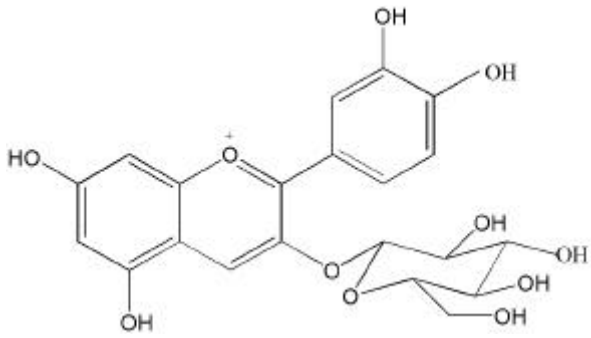


Fig. 1-1. Chemical structure of cyanidin 3-*O*-β-D-glucopyranoside purified from Korean pigmented rice (*Oryza sativa* var. Suwon 415).

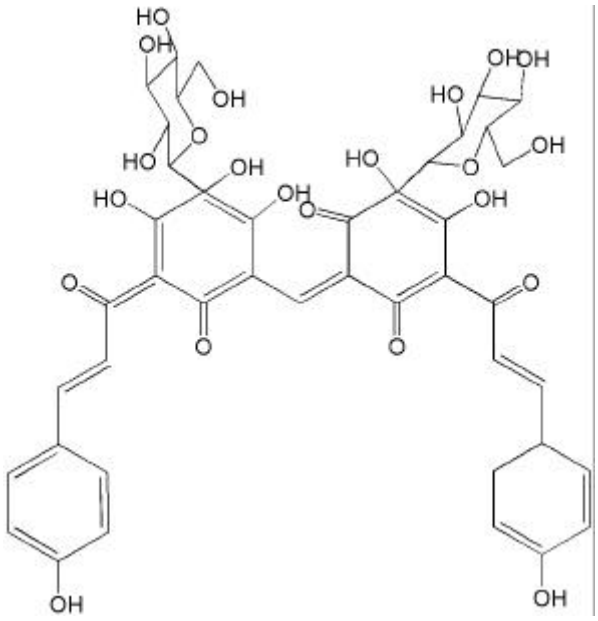
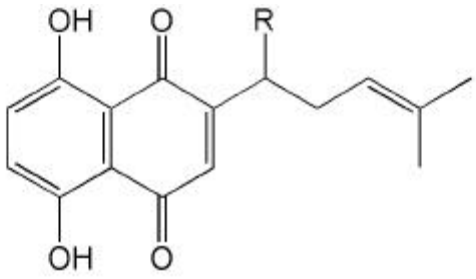


Fig. 1-2. Chemical structure of carthamin purified from *Carthamus tinctorius*.



R =	H	Deoxyshikonin
	OH	Shikonin
	$OCOCH_3$	Acetylshikonin
	$OCOCH_2CH_3$	Propionylshikonin
	$OCOCH(CH_3)_2$	Isobutylshikonin
	$OCOCH_2C(CH_3)_2OH$	β-Hydroxyisovalerylshikonin

Fig. 1-3. Chemical structures of the purified shikonin derivatives from *Lithospermum erythrorhizon* cultivated in Korea.

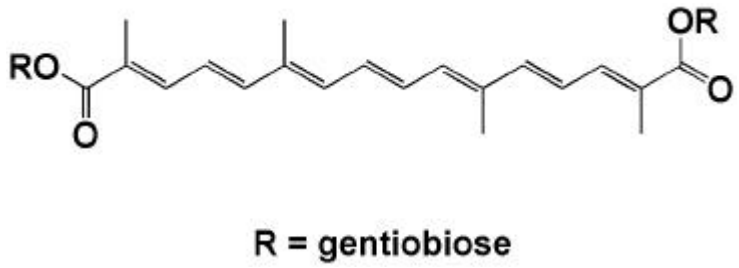


Fig. 1-4. Chemical structure of crocin purified from gardenia fruit.

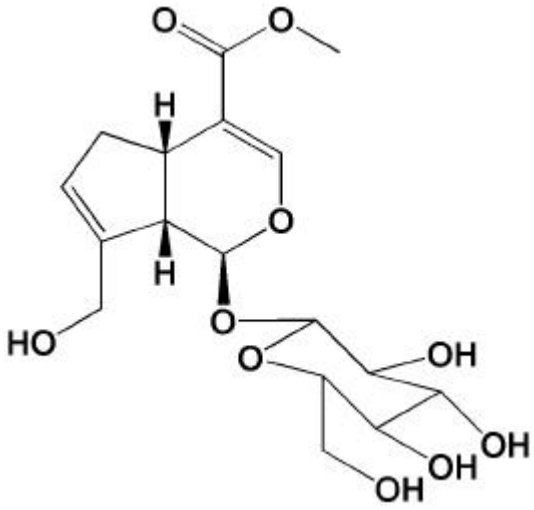


Fig. 1-5. Chemical structure of geniposide purified from gardenia fruit.

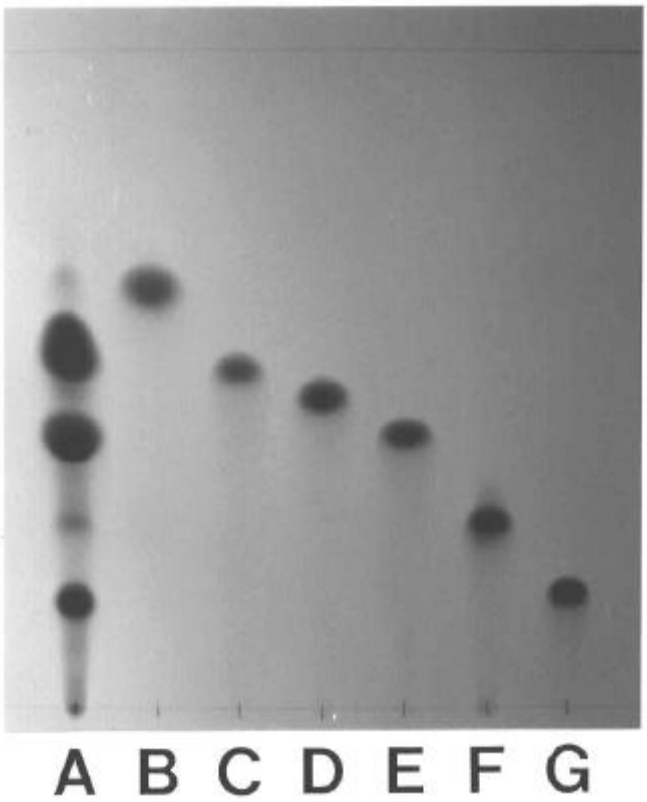


Fig. 1-6. TLC chromatogram of the purified shikonin pigments from the roots of *Lithospermum erythrorhizon*.

A : total extract, B : deoxyshikonin, C : isobutylshikonin,
D : propionylshikonin, E : acetylshikonin, F : shikonin,
G : β-hydroxyisovalerylshikonin.

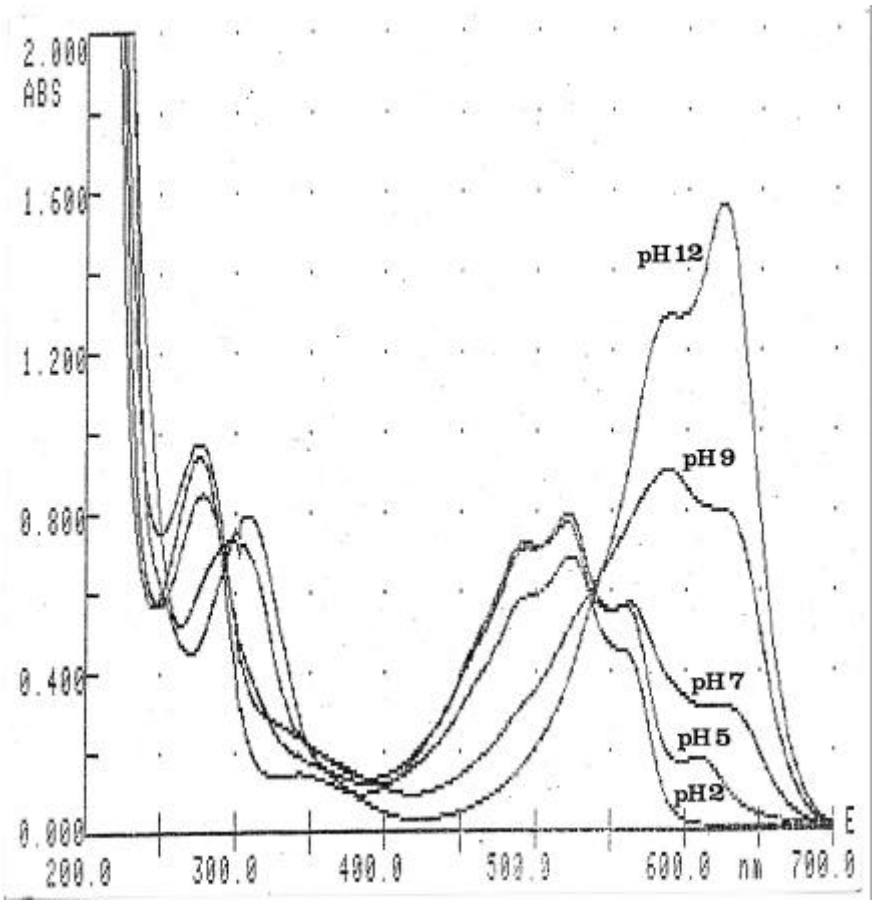


Fig. 1-7. UV/Vis spectra of acetylshikonin at different pHs.

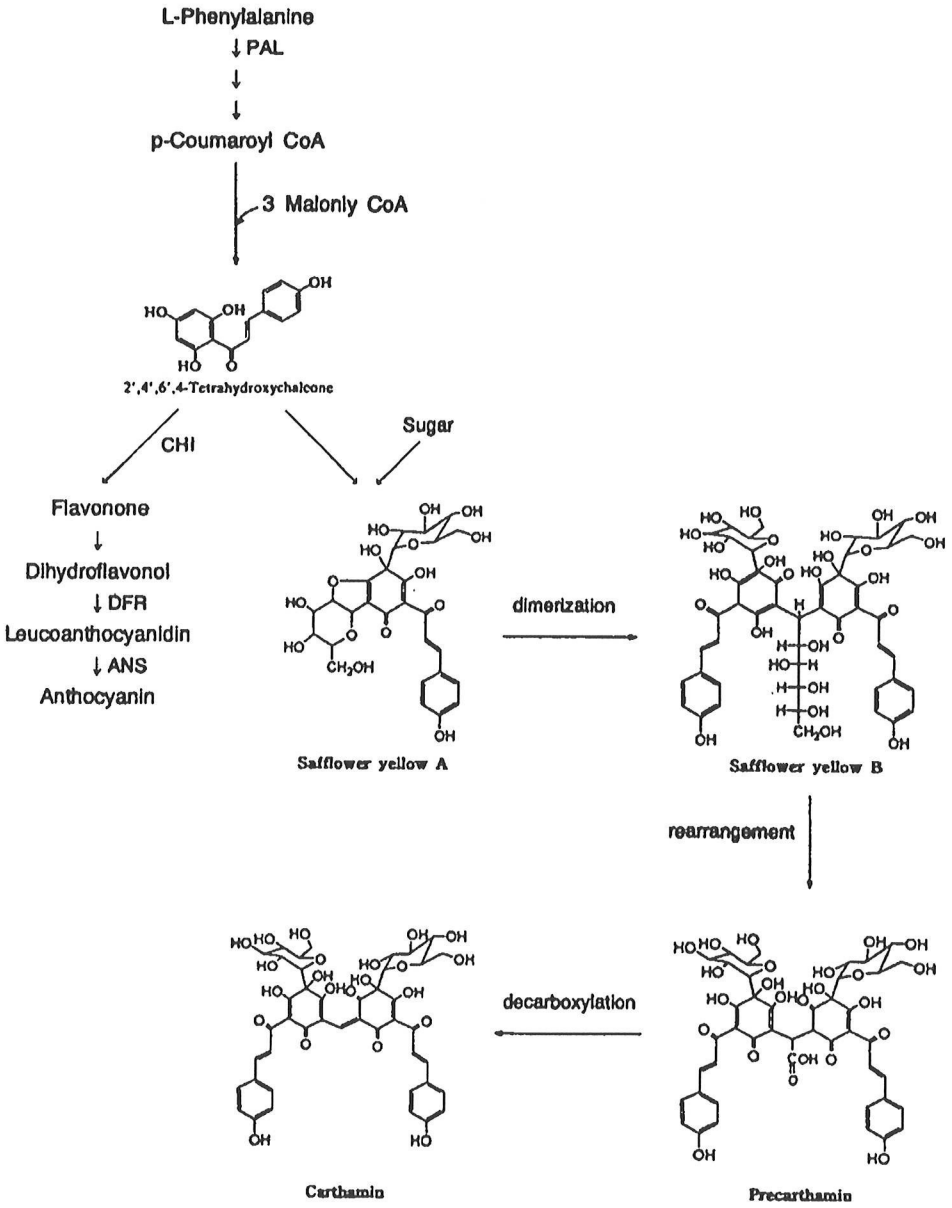


Fig. 1-8. Tentative biosynthetic pathway of carthamin.

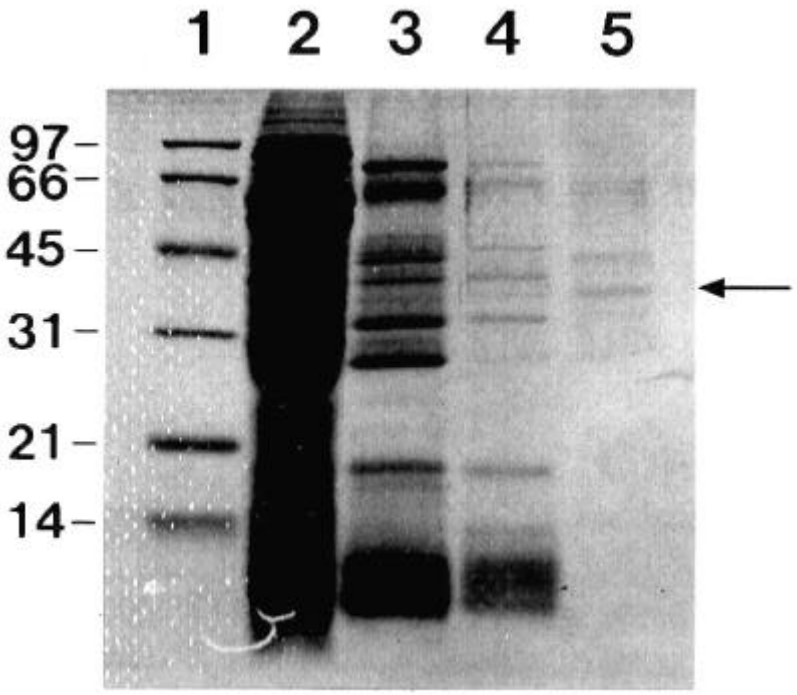


Fig. 1-9. SDS PAGE of the samples from each purification step.

1 : Size marker

2 : 2nd ammonium sulfate fractionation

3 : DEAE Sepharose column chromatography

4 : 1st Macro-Prep Ceramic Hydroxyapatite column chromatography

5 : Bio-Gel A-0.5m column chromatography

6 : 2nd Macro-Prep Ceramic Hydroxyapatite column chromatography

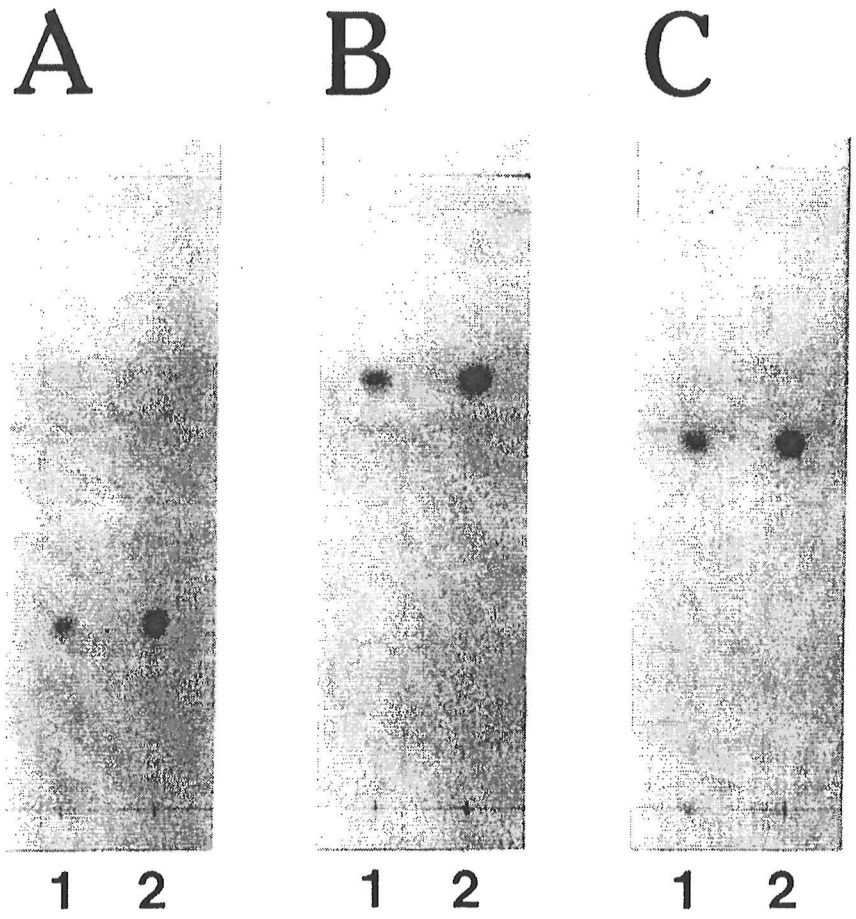


Fig. 1-10. TLC of enzymatically synthesized carthamin (1) and authentic carthamin (2) with various solvent systems.
A : BAW (BuOH:Acetic acid:H_2O = 4:1:5, upper layer)
B : BTPW (BuOH:Toluene:Pyridine:H_2O = 5:1:3:3)
C : BEW (BuOH:EtOH:H_2O = 4:1:2)

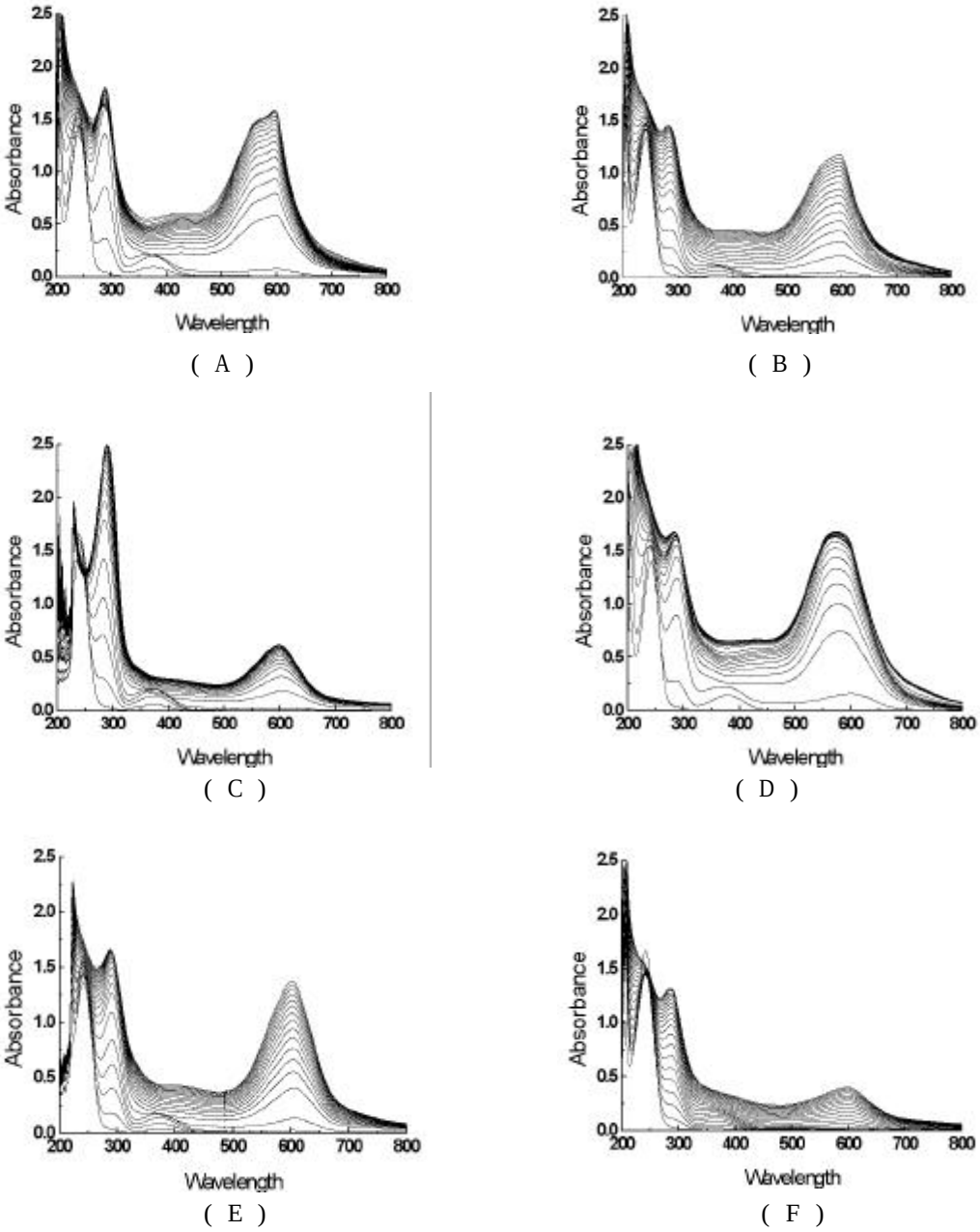


Fig. 1-11. UV/Vis spectra for the formation of blue pigment from genipin with amino acids in 100mM phosphate buffer, pH 7.0 at 70℃. (Scanning interval : 5min) (A) Glycine, (B) Alanine, (C) Histidine, (D) Lysine, (E) Phenylalnine, (F) Glutamate

제 2 절 미생물(홍국균 등) 색소개발

1. 요약

가. 홍국균이 생성하는 수용성 식용색소를 분리하여 sephadex column chromatography 방법으로 분자량이 큰 분획과 작은 분획으로 분리하였다. 분자량이 큰 분획은 단백질과 함께 void volume에서 용출되었으며, 15% acrylamide전기영동에서 저분자량의 단백질과 같이 행동하였다. 따라서 이 색소는 단백질과 결합한 색소라 생각된다.

나. 홍국 색소 생합성의 전구물질을 배양액에 투여하여 색소 생성을 증가시킬 수 있었다.

다. *Monascus anka* IFO4478로부터 *Streptomyces albus*에서 분리된 polyketide 생합성 유전자와 유사한 염기 서열을 갖는 DNA 절편을 분리하였다. 이 유전자는 S. albus의 salinomycin synthase와 40%의 상동성을 보였다.

라. 세계 최초로 홍국균 *Monascus anka* IFO4478로부터 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GPD) 유전자를 분리하여, promoter 부분을 포함한 2456개 염기 서열을 결정하고 이 promoter 부분을 이용하여 홍국균을 형질전환할 수 있는 plasmid DNA를 제조하였다.

마. 세계 최초로 외래 DNA로써 홍국균을 형질전환하였다. 홍국균의 원형질체 (protoplasts)를 제조하고 전기충격법(electroporation)으로 홍국균 *Monascus purpureus* DSM1379에 hygromycin B 저항성 유전자, 또는 hygromycin B 저항성 유전자와 해파리 유래 녹색 형광 단백(GFP) 유전자를 동시에 도입하여 형질전환하였으며 도입된 유전자는 홍국균의 주염색체상에 삽입(integration) 되었음을 확인하였고, 형광현미경으로써 녹색 형광을 관찰하였다.

2. 연구 목표

가. 수용성 홍국색소는 유기용매 가용성, 유리형 색소 분자가 모종의 거대분자와 공유결합으로 결합된 것이라 생각되는 바, 그 구조를 밝힌다.
나. 방선균 등 다른 생물체에서 알려진 기지의 PKS 유전자와 상동성을 갖는 유전자를 홍국균에서 분리하여 그 구조를 해명한다.
다. 외래 유전자를 홍국균에 도입하여 형질전환시키는 기술을 개발한다.

3. 서 론

*Monascus*색소는 주요한 식용색소의 하나이며 색소 외에도 홍국균은 여러 가지 이차대사 산물을 생산한다. 1960년대에 홍국균의 주요한 황색소, 주황 색소, 적색소들의 화학구조가 밝혀졌으나 유기 용매에 추출되지 않는 대부분의 수용성 형태의 색소는 어떤 고분자 물질에 어떠한 양상으로 결합되어 있는지 알려진 바가 거의 없다. *Monascus*를 Nishikawa 배지에서 정치배양하면 균개에 유기용매 가용성 색소가 집적되나, 액침배양에서는 많은 색소가 수용성으로 되어 배양액중에 나타난다. 이 색소를 식용색소로 이용하기 위해서는 유기용매가용성 색소를 생산하는 조건에서 색소를 얻었다 할지라도 수용성으로 전환하여야 한다. 수용성으로 전환하는데는 단백질과 결합하게 하는 것이 보편적이다. 이 연구에서는 *Monascus*가 생성하는 수용성 단백질을 화학적으로 동정하고자 수행하였다. 즉 *Monascus anka* U90-34를 색소 생성균으로 하고 이 균주를 액침배양하며 세포내·외 색소중에서 단백질 혹은 펩타이드와 결합하는 색소를 검색하였다. 궁극적으로는 색소가 결합한 단백질을 분리하여 색소가 결합하고 있는 양태를 밝히는 것이 궁극적 목표이며, 이 곳에서는 수용성 색소를 분리하고 이것이 단백질과 결함하고 있는지 여부를 조사하였다.
여러 종의 *Streptomyces*에서 polyketide 생합성(PKS) 유전자가 알려져

있다. 이들과 유사한 것이 홍국균에도 존재하는가 탐색하고 이를 분리하여 유전자 염기 서열을 결정하였다. 이 유전자는 40%의 상동성을 보였다.

홍국균에 대한 형질전환은 본 보고가 최초이며, 유전자 염기 서열은 본 보고서에 보고하는 *Monascus anka* IFO4478의 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (gpd) 유전자를 포함하여 4개에 불과하다. 나머지는 모두 *M. purpureus*의 RNA 유전자들 뿐이다. 본 연구에서는 균류를 포함하여 보편적으로 강력한 promoter를 갖는 유전자인 *gpd* 유전자를 분리하여 염기서열을 밝히고 그 promoter 부위를 이용하여 transforming DNA를 제조하였으며 형질전환 기술을 개발하였다. GFP를 발현시킴으로써 이 기술로써 외래 유전자를 홍국균에 도입, 발현시킬 수 있음을 확인하였다.

4. 재료 및 방법

홍국균 균주 : *Monascus anka* IFO4478을 gpd 유전자 분리의 재료로 사용하였으며, 이 균주에 자외선 돌연변이를 일으켜 색소 생성이 높은 균주 *M. anka* U90-34를 선발하였다. 수용성 색소 생성 실험 및 생합성 중간체 투여 실험에는 이 균주를 사용하였다. 형질전환 실험에는 *M. anka* IFO4478과 *M. purpureus* DSM1379를 사용하였다.

대장균 균주 : *Escherichia coli* MC1061을 사용하였다.

홍국균 균주의 배양

가. 분생자 생산 조건 : medium C 고체 평판배지에서 4 7일간 배양하여 분생자를 얻었다.

나. 수용성 색소 생성 조건 : 분생자 20만-40만 개를 100 ml 의 Lin's medium에 접종하여 30℃에서 200 rpm으로 7일간 진탕배양하였다.

다. genomic DNA 분리를 위한 균사 생산 조건 : 100 ml 의 starch

mineral medium (3% corn starch, 1% NH_4NO_3, 0.5% KH_2PO_4, 0.1% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.05% $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.005% citric acid monohydrate, 0.005% $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.001% $Fe(NH_4)_2(SO_4) \cdot 6H_2O$, 0.00025% $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0.00005% $MnSO_4 \cdot H_2O$, 0.00005% H_3BO_3, 0.00005% $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)에 3천만개 내외의 분생자를 접종하여 30℃에서 200 rpm으로 2일간 진탕배양하였다.

라. 형질전환용 어린 균사의 생산 조건 : 100 ml 의 YM broth에 1억개 내외의 분생자를 접종하고 30℃에서 4 8시간 진탕배양하였다.

마. 형질전환된 균주의 선발 : 선별 배지(selection plates; 1.2 M sucrose와 50 ppm hygromycin B를 포함하는 YM 한천 평판 배지)에 도말하여 30℃에서 4 7일간 배양하여 집락의 형성을 관찰하였고 이를 50 ppm의 hygromycin B를 포함하는 medium C 평판배지에 옮겨 3번째 옮겼을 때 까지 정상적으로 성장하고 분생자를 형성하는 것만을 진정한 형질전환체로 인정하였다. 형질전환된 균주는 50 ppm hygromycin B를 첨가한 배지에서 배양하였다.

바. 유리형 색소생성의 비교를 위한 균개 생산 조건 : 3.의 방법으로 배양한 배양액 2 ml 와 Nishikawa 배지 (10% sucrose, 1% peptone, 0.2% diammonium hydrogen phsphate, 0.2% potassium nitrate, 0.05% magnesium sulfate heptahydrate, 0.05% arsenic (III) oxide, 0.05% zinc sulfate heptahydrate, 0.0067% calcium chloride dihydrate, 0.3% tartaric acid)10 ml 씩을 Petri dish에 접종하여 30℃에서 15일간 정치 배양하였다.

대장균의 배양 : 대장균은 LB배지 (1.0% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% sodium chloride, pH 7.0)에서 배양하였다. 고체 배지는 1.5%의 한천을 가하여 만들었으며, pUC18, pUC19 또는 그 유도체로써 형질전환된 대장균은 50 ppm의 ampicillin을 가한 배지에서 배양하였다. 배양 온도는 37℃였고 액체 배지에 배양할 경우는 200 rpm으로 진탕하였다.

세포내·외 색소의 정량 : 세포내·외 색소는 UV spectrophotometer(HP

8453)를 사용하여 각각 427, 480, 521nm와 386, 427, 480, 521nm의 파장에서의 OD를 측정하여 정량적으로 비교하였다.

단백질 결합 색소의 분리 및 동정 : 배양액은 3000rpm에서 15분간 원심분리한 다음, 상등액은 Whatman No. 4로 여과하고 균사와 함께 동결건조기로 건조하였다. 건조한 색소는 -20℃에서 보관하였다. 동결건조한 여과액을 15,000rpm으로 15분간 원심분리하여 상등액을 세포외 색소로 하였고, 동결건조된 균사를 dichloromethane과 물로 각각 48시간 추출하고 Whatman No. 4 여지 여과한 것을 세포내 색소로 삼았다. 세포내·외 색소는 Sephadex G-200를 이용한 gel permeation chromatography로 분리하였고, 단백질 및 당 정량을 통해서 색소 검출 fraction과 일치하는지를 비교, 분석하였다. 칼럼 크기는 19.5 x 410 ㎜이었고, 유속은 분당 0.2 ml이었다. 분획은 2 ml로 하였다.

단백질 분석 : 단백질 정량은 Bradford 방법으로 측정하였다.

당 분석 : phenol-sulfuric acid방법으로 측정하였다.

Feeding 실험 : crotonic acid, sorbic acid, cinnamic acid, vinyl acrylic acid, ethyl crotonate, ethyl sorbate, ethyl cinnamate를 정치 배양에 투여하였다. Nishikawa 배지에서 5일간 배양한 균개를 5ml의 멸균 증류수로 헹구고 1 ml의 에탄올에 전구물질을 녹인 것과 5% sucrose를 포함하는 10 ml의 Nishikawa 배지를 섞어 가하였다. Feeding 후 10일간 더 배양하고 균체를 얻어 분석하였다.

Genomic DNA 분리 (Weigel et al., 1988) : 진탕배양한 배양액으로부터 vacuum filtration으로 12.5 g의 균개를 분리하여 100 ml의 멸균 증류수로 세척하고 액체 질소로 동결한 후 海沙와 함께 마쇄 하였다. 이 마쇄물에 25 ml의 lysis buffer (2% SDS, 1% EDTA, 20 mM Tris·HCl,

0.01 mg/ml proteinase K, pH 8.0)를 가하여 혼합하고 60℃에서 15분간 incubate 하고, 1.4 g의 염화나트륨을 가하고 4℃에 90분간 incubate 하였다. 이 반응물을 6000 rpm에서 20분간 원심분리하여 細胞 殘骸를 제거하고 上澄液을 phenol-chloroform 으로써 추출하였다. 여기에 0.6배 부피의 isopropyl alcohol을 가하고 혼합하여 10000 rpm에서 10 분간 원심분리하였다. 침강한 핵산을 70% ethanol로써 세척하고 2 ml의 TE buffer (10 mM Tris·HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)에 녹였다. 이 용액에 고순도의 RNaseA를 10 ㎍/ml가 되도록 가하고 37℃에서 30분간 incubate 하였다. Phenol-chloroform 추출 후 200 mM 이 되도록 염화나트륨을 가하고 2 배 부피의 ethanol을 가하여 DNA를 spool 하고 70% ethanol로써 세척한 후 건조시키고 TE buffer에 녹여 260 nm 및 280 nm에서의 흡광도를 측정하여 정량하였다.

방사성 탐색자 제조 1. 합성 oligonucleotide로 : 다섯 종의 사상균 *Aspergillus nidulans*, *Podospora anserina*, *Phytophthora infestans*, *Claviceps purpurea* 및 *Ustilago maydis* 에서 알려진 *gpd* 유전자 DNA 염기서열로부터 여러 자리의 보존된 염기서열을 찾아, 그 중 가장 상동성이 높은 부위를 선택하였다. 이로부터 5'-GAG TCC ACC GGT GTC TTC AC-3'의 염기서열이 홍국균 GPD 유전자에도 존재할 것으로 유추하고 이 염기서열과 상보적인 oligonucleotide를 합성하였다. 즉, 20mer로서, 5'-GT GAA GAC ACC GGT GGA CTC-3' 인 것이며 MAGPDH3라 명명하였다. [α-^{32}P]dATP 존재하에 terminal deoxyribonucleotidyl transferase를 처리하여 방사성 탐색자를 제조하였다.

방사성 탐색자 제조 2. DNA 절편으로 : 적당한 DNA 절편 200 ng과 80 ng의 random primer를 혼합하여 95℃ 水浴 상에서 5분간 incubate 하고 곧바로 얼음물에 담가 급랭하였다. 여기에 2 ㎕의 20 mM dithiothreitol, 3 ㎕의 2 mM dCTP, 3 ㎕의 2 mM dGTP, 3 ㎕의 dTTP, 2 ㎕의 10× reaction buffer, 3 ㎕의 [α-^{32}P]dATP, 1 ㎕의 Klenow를

가하여 상온에서 3시간 동안 반응하였다 (random primer extension 방법). 이 반응물을 phenol-chloroform으로 추출하고 20 ㎕의 5% blue dextran과 혼합하고, NET buffer에 팽윤된 Sephadex G-50 column에 가하고 NETS buffer로 용출시켜 합성된 DNA를 분리하였다.

Genomic southern blot analysis : 5 ㎍씩의 genomic DNA를 각각 *Bam*HI, *Bgl*II, *Eco*RI, *Pst*I 중 2 3개의 효소로써 4 시간 동안 37℃에서 가수분해하고 phenol-chloroform으로 추출한 다음 ethanol 침전하고 적당한 positive control DNA 와 함께 0.8% agarose gel 에서 전기영동하였다. 이 gel을 200 ml의 0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl의 denaturation solution에서 30분간 담가 gel 상의 DNA를 denaturation 하고 200 ml의 0.5 M Tris·HCl, 1.5 M NaCl (pH 7.4) 용액에서 30분간 중화하였다. 그리고 10× SSC를 이용하여 nylon membrane (Hybond-N, Amersham 製)에 24 시간에 걸쳐 capillary transfer를 실시하였다. 이 memebrane을 20분간 풍건한 다음 UV로써 15초간 고정하였다. Vinyl bag에 membrane을 넣고 hybridization solution 가하고 2시간 동안 30℃ 또는 42℃에서 50 rpm으로 진탕하였다. 이어서 [^{32}P] 표지된 probe를 가하여 12시간 동안 30℃ 또는 42℃에서 진탕하였다. 진탕이 끝난 뒤 30℃의 0.1% SDS in 6× SSC로 15분간 4회 세척하고 풍건한 후 X-ray film에 노출하였다.

Plasmid library의 제조 1. PKS 유전자 은행 : 30 ㎍의 *M. anka* genomic DNA를 *Bam*HI 으로 8시간 동안 가수분해하고, 0.8% agarose gel 전기영동 후 8 10 kb 부분을 용출하여 이 중 260 ng을 pUC18-*Bam*HI-CIP vector 100 ng 과 ligation 하여 plasmid library를 제조하였다.

Plasmid library의 제조 2. GPD 유전자 은행 : 40 ㎍의 *M. anka* genomic DNA를 *Bgl*II으로 8시간 동안 가수분해하고, 0.8% agarose gel 전기영동 후 10.6 12.5 kb 부분을 용출하여 이 중 43 ng을 pUC18-*Bam*HI-CIP

vector 10 ng 과 ligation 하여 plasmid library를 제조하였다.

Colony hybridization : pUC18 plasmid library로써 *E. coli* MC1061의 competent cell을 형질전환 (transformation) 하여 얻어진 형질전환체들을 LB-ampicillin 한천 배지 상에 도말한 후 12 시간 동안 37℃에서 배양하고, nitrocellulose membrane 또는 nylon membrane에 colony를 옮기고, 10% SDS 용액에 담갔다가 20 ml의 0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl의 denaturation solution에서 30분간 담가 membrane 상의 DNA를 denaturation 하고 20 ml의 0.5 M Tris·HCl, 1.5 M NaCl (pH 7.4) 용액에서 30분간 중화하고 2× SSC 용액에서 세척한 후 2시간 동안 80℃ 진공오븐에서 열처리한 다음 (nylon membrane 의 경우는 열처리 생략하고 UV254 처리) proteinase K를 처리(0.1% SDS, 2× SSC, 62.5 ㎍/ml proteinase K, 65℃, 15 분)하였다. Prehybridization을 거쳐 ^{32}P 표지 probe를 처리하고 (30℃, 12 시간) 0.1% SDS in 6× SSC 또는 0.1% SDS in 0.2× SSC에서 15분씩 4회 세척한 다음 X-ray film에 노출, 현상하였다.

Cloning of pMRN3 : 1,200여개의 colony 중 colony hybridization 결과 비교적 강한 신호를 보인 10개의 colony를 5 ml의 LB ampicillin 배지에서 배양하고 alkaline lysis 방법에 따라 plasmid DNA를 분리하였다. (mini prep.) 분리된 DNA는 *Bam*HI으로 가수분해하고 0.9% agarose gel 전기영동 후 변성, 중화를 거쳐 capillary transfer 방법으로 nylon membrane Hybond-N 에 옮긴 다음 ECL 방법(Amersham, 제조자의 실험 방법을 따름)에 따라 p22-81 probe와 hybridize 하는지를 검색하였다. 그 결과 하나의 clone이 확실히 신호를 보였으며 나머지에서는 신호를 보이지 않았다. 이 clone을 pMRN3라고 명명하였다.

Cloning of pMGPD28 : 3,000여개의 colony 중 colony hybridization 결과 강한 신호를 2개의 colony를 5 ml의 LB ampicillin 배지에서

배양하고 alkaline lysis 방법에 따라 plasmid DNA를 분리하였다. (mini prep.) 분리된 DNA는 EcoRI, HindIII, 또는 EcoRI+HindIII로 가수분해하고 0.9% agarose gel 전기영동 후 변성, 중화를 거쳐 capillary transfer 방법으로 nylon membrane Hybond-N 에 옮긴 다음 ECL 방법(Amersham, 제조자의 실험 방법을 따름)에 따라 oligonucleotide probe와 hybridize 하는지를 검색하였다. 그 결과 두개의 clone이 모두 신호를 보였으며 restriction pattern이 완전히 같았으므로 둘은 동일한 것으로 생각되었다. 둘을 각각 pMGPD28, pMGPD29라 명명하였으며 이 후의 실험은 pMGPD28로써만 실시하였다.

Mapping : plasmid 형태로 cloning 된 DNA는 몇몇 제한효소를 각각 또는 2개씩 처리하여, 때로는 부분적으로 처리하여 mapping을 실시하였다.

Subcloning : 최초에 얻은 clone들을 적당한 제한효소로 절단하여 작은 절편을 얻고 이들을 pUC18 또는 pUC19의 적절한 polylinker cloning sites에 결합시켜 여러 가지 subclone들을 얻고 이들로써 핵산 염기서열을 결정하였다.

재조합 DNA의 염기서열의 결정 : 염기서열은 Sanger의 dideoxynucleotide chain termination 방법(Sanger *et al.*,1977)에 의하여 결정하였다. 사용한 효소는 USB sequenase였다.

대장균의 형질전환 : Sambrook 등의 calcium chloride-cold shock / heat shock 방법에 따라 실시하였다.

형질전환용 DNA의 제조

가. pDH2514 : 미국농무성의 Dan Cullen 박사로부터 분양받은 pDH25를 제한효소 *Xba*I으로 절단한 다음 *Eco*RI을 2 16분간 처리하여 두 개의 제한효소 자리 중 한 곳 만 절단된 절편을 분리하고 이를

pUC18-*Eco*RI-*Xba*I-CIP vector에 접합하여 pDH2514를 제조하였다.

나. pMGPD2861 : pMGPD28의 subclone 중 하나로서 promoter 부위를 포함하는 1.4 kb EcoRV 절편을 가지는 pMGPD2805를 *Eco*RI + *Hin*dIII로 절단한 다음 수 분 간 *Sau*3AI을 처리하여 PROMOTER 부위를 갖는 1.0 kb *Eco*RI-*Sau*3AI 절편을 분리하고 이를 pUC18-*Bam*HI-*Eco*RI-CIP vector에 접합하여 pMGDP2861을 제조하였다.

다. pDH2550 : pDH2514를 ClaI+HindIII로 절단하여 hph-Ttrp을 포함하는 1.7 kb ClaI-HindIII 절편을 분리하고 이를 pUC18-*Acc*I-*Hin*dIII-CIP vector 에 접합시켜 pDH2550을 제조하였다.

라. pDH2857 : pDH2550을 KpnI으로 절단 한 다음, 수 분 동안 XbaI으로 처리하여 4.4 kb 절편을 얻고 calf intestinal alkaline phosphatase로써 탈인산화한 다음, pMGPD2861 로부터 1.0 kb *Kpn*I-*Xba*I 절편을 분리하여 접합시켜 pDH2857을 제조하였다.

마. pSGF557 : pDH2857을 수 분 동안 *Xba*I으로 처리하여 부분 가수분해되도록 하고, Klenow로써 말단채우기 반응을 수행하였다. 이어 *Bam*HI을 처리하고 탈인산화반응을 하였다. 4.5 kb *Bam*HI-*Xba*I 절편 (*Xba*I 말단은 채워져 평활말단이 된 것)을 분리하여 vector로 삼았다. 한편 명지대학교 김주곤 박사로부터 분양받은 pSBG700을 HindIII로 절단하고 Klenow를 이용하여 평활말단으로 채워넣기 반응을 한 다음, *Bam*HI 처리를 하고 sGFP 유전자에 해당하는 0.7 kb *Bam*HI-*Hin*dIII 절편 (HindIII 말단은 채워져 평활말단이 된 것)을 분리하여 vector에 접합시켰다.

바. pSGF957 : pSGF557을 *Sal* I으로 처리하여 절단한 다음, 탈인산화시키고 dNTP 존재하에 Klenow를 사용하여 말단 채워 넣기 반응을 수행하여 vector로 삼았다. 한편 pDH2514를 *Pvu*II로 처리하여 절단하고 Ptrp:*hph*:Ttrp 부위를 포함하는 3.1 kb 절편을 분리하여 vector에 접합하여 pSGF957를 제조하였다.

홍국균의 형질전환

가. 원형질체 제조 :

1억 2억개의 분생자를 100 ml YM broth**에서** 4 8**시간 동안 진탕배양하여 어린 균사를 얻고, 멸균 증류수로써** 2**회 세척한 다음** 15 ml**의 멸균수에 현탁하고, 같은 부피에** 120 mg**의** Novozyme 234**를 포함하는** 2× protoplasting buffer (0.8 M ammonium sulfate, 0.1 M sodium citrate, pH 5.8)**와 섞어** 30℃**에서** 90 180**분간 두면서 현미경으로 세포벽 파괴 반응과 원형질체 생성을 관찰하였다. 대부분**(90%)**의 균사가 원형질체로 전환되었을 때 반응물을 얼음물로 옮겨 효소 반응을 정지시키고 원심분리한 다음** 1.2 M **의 자당 또는 글리세롤로** 2**회 세척하였다.**

나. 형질전환 : 1.2 M **농도의 자당**(sucrose) **또는** glycerol **용액에** protoplast**를 현탁하고,** 20 ㎍g**의 직쇄상** (linearized)**의** vector DNA**를 혼합하고 얼음에 두었다가 전기 충격을 주었다. 전기적 조건은** *Trichoderma harzianum***에 대해 최적 조건으로 알려진** 2800 V cm-1**을 기준으로 전압을 변화시켜가면서 실험하였으며, 저항은** 200, 500, ∞ Ω**으로 하였고, 정전용량**(capacitance)**은** 50, 71, 250 ㎌F**의 세 수준으로 바꾸어 가면서 시도하였다. 전기충격을 가한 원형질체-**DNA **혼합물은 선별 배지**(selection plates; 1.2 M sucrose**와** 50 ppm hygromycin B**를 포함하는** YM **한천 평판 배지)에 도말하여** 30℃**에서** 4 7**일간 배양하여 집락의 형성을 관찰하였다. 형질전환에 사용한** DNA**는** pDH2514 (pUC18-Ptrp:*hph*:Ttrp), pDH2857 (pUC18-Pgpd:*hph*:Ttrp), pSGF957 (pUC18-Pgpd:*sgfp*:Ttrp-Ptrp:*hph*:Ttrp)**의 세 종류였다. 초기 실험에서는 절단하지 않은** supercoil **형태의** DNA, **제한효소** *Hin*dIII, *Kpn* I **또는** *Pvu* II **로 절단한** DNA**를 사용하였으며, 나중에는 초기 실험 결과에 따라 절단한** DNA**만을 사용하였다.**

형광형미경 관찰 : Zeiss Axiophot**사의** Universal Research

Photomicroscope를 사용하였다. 배율은 400배로, 여기광의 파장은 365 nm, 방출광의 파장 한계는 397 nm 인 04번 filter를 사용하였다. 노출시간 140-270초로 사진을 촬영하여 확실히 그 차이를 관찰하였다.

5. 결과 및 고찰

가. 세포내·외 색소의 정량적 비교

색소의 양은 색소의 OD와 ml로 표시한 색소 부피의 곱으로 나타내었다. 색소의 λ_{max}는 GPC로 분리한 색소의 UV 스펙트럼으로 구하였으며, 동일한 스펙트럼을 갖는 색소의 양을 비교하였다. 세포내·외 조색소의 양은 각각 1g이였으며, 동결건조된 수용성 색소와 균사내 색소의 양적 비는 1:1.5이었다. 세포내·외 색소의 양은 다음 표와 같이 세포외 색소가 세포내 색소보다 약 10배 많았다. 따라서 세포외 색소를 단백질에 결합한 색소의 동정에 이용하였다.

Table 2-1. Production of extracellular and intracellular pigments by *Monascus anka* grown in Lin's Medium.

Pigment	Relative OD at λ_{max}			
	386nm	427nm	480nm	521nm
Extracellular, total		340	283.8	548.3
Intracellular, water-soluble		20.8	19.8	16.3
Intracelluar, CH_2Cl_2-soluble	555			

나. 단백질 결합 색소의 분리 및 동정

세포내·외 색소를 Sephadex G-200으로 분리한 결과, 동일한 스펙트럼을 갖는 2개의 색소를 분리하였다 (Fig 2-1). Void volume에서 분리한 첫 번째 색소는 λ_{max}가 427, 521nm이며 붉은색이고 나중에 용출되는

두 번째 색소는 480nm이었으며 주황색이었다. 세포내 색소의 단백질 및 당 정량 결과, 첫 번째 색소에서 단백질 혹은 펩타이드가 색소에 결합되어 있는 것으로 보이며, 당은 균주가 배지(Lin's medium)를 분해한 산물로 보인다. 앞으로 연구는 단백질 결합 색소의 정체를 더욱 밝히기 위하여 SDS-PAGE와 pepsin, trypsin, proteinase K와 같은 단백질 분해 효소를 이용하여 이 색소가 정말 단백질과 결합하고 있는지, 또 결합하였다면 결합은 어떤 형태인지를 밝혀야 할 것이다.

다. 홍국 색소 생합성의 전구물질로 추측되는 crotonic acid, sorbic acid, cinnamic acid, vinyl acrylic acid, ethyl crotonate, ethyl sorbate, ethyl cinnamate를 정치 배양에 투여하였다. 그 결과 crotonic acid와 sorbic acid를 저농도로 처리시 유의적인 균체의 증가는 없었으나 색소 생성이 증가하였으며, sorbic acid 보다는 crotonic acid 처리시 약 2배 색소 생성이 많았다.cinnamic acid, vinyl acrylic acid의 처리시 색소 생성은 감소하였으나 ester 형태로 투여시는 색소 생성이 증가하였으며 새로운 적색소가 생성되었음을 확인하였다 (Table 2-2).

Table 2-2. The effect of feeding putative starter units in the Nishikawa medium. The culture was grown for 15 days and the values are mean of duplicate experiment.

Treatment	% Increase		
(mM)	A392	A466	A536
Crotonic acid			
0.01	34	47	4
0.10	7	10	-7
1.00	15	24	265
Sorbic acid			
0.01	73	72	573
0.10	4	10	-3
1.00	8	10	42

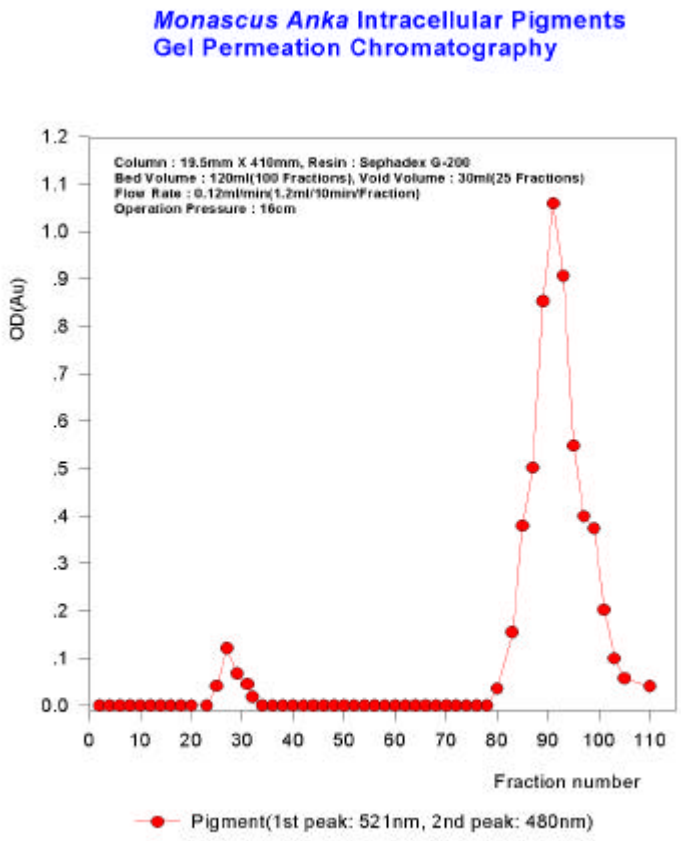


Fig. 2-1. Gel permeation chromatogram of the intracellular pigment fraction from *M. anka* culture. The pigment peaks were monitored at 521 and 480 nm. Sugar and protein contents were not shown for clarity.

라. Genomic Southern blot analysis

1) PKS 유전자 탐색

salinomycin생합성 유전자를 probe로 하여 Southern blot을 행하였다. 그 결과 *Bam*HI 절편중 약 8.7, 4.2, 2.9, 2.5, 1.7 및 0.9 kb의 신호를 관찰 할 수 있었다 (Figure 2-1). 따라서 *Monascus* 유전자에 *Streptomyces*의 PKS인 salinomycine의 생합성효소 유전인자와 hybridize하는 부분이 있음을 알게 되었고 cloining의 가치가 있음을 확인하였다. 또한, *P. patulum*의 PKS 유전자인 plasmid M41으로의 genomic Southern blot analysis에서도 *Bam*HI 절편 중 8.7 kb 절편에서 약하나마 hybridization하는 것을 볼 수 있었다 (Figure 2-2).

2) gpd 유전자 탐색

합성 oligonucleotide를 탐색자로, BamHI, BglII, PstI의 세가지 제한 효소를 처리한 genomic DNA에서 각각 한 개 씩의 뚜렷한 신호를 관찰하였다. 이는 M. anka에 한 copy의 gpd 유전자가 존재함을 시사하였다. BglII 처리시 약 11 kb에서 신호가 관찰된 것을 근거로 plasmid library 제조, cloning을 진행하였다.

3) 도입된 hph 유전자 탐색

모균주 M. purpureus DSM와 네 개의 형질전환 균주 K004, K008, K009, K027에서 genomic DNA를 분리하여 BamHI, BglII로 각각 처리하고 hph 유전자 절편을 탐색자로 하여 genomic Southern blot 분석을 실시한 결과 형질전환되지 않은 모균주에서는 전혀 신호가 관찰되지 않았으나 형질전환체에서는 뚜렷한 신호가 관찰되었으며, 서로 상이한 크기의 DNA 절편에서 신호가 관찰되는 것으로 보아 외래 DNA가 주 염색체상에 삽입되는 기작은 무작위적인 것으로 추정된다.

4) 도입된 sgfp 유전자 탐색

pSGF957로써 형질전환된 균주 중 PF3, PF9의 두 균주에서 genomic DNA를 분리하고 (3)의 방법으로 genomic Southern blot 분석을 실시한 결과 각각에서 뚜렷한 신호를 관찰하였다. 여기에서도 역시 둘은 전혀 다른 크기의 절편에서 신호를 보였으며 외래 DNA가 주 염색체상에 삽입되는 기작은 무작위적인 것으로 추정된다.

5) 색소 생성이 저하된 균주 K047에 대하여

K047의 genomic Southern blot 결과 6.0 및 3.8 kb *Bam*H I 절편에서 신호가 보였고, *Bgl* II 및 *Kpn* I 에서는 10 kb가 넘는 큰 절편에서 각 하나의 신호가 보였다. 정확한 삽입 양상은 좀 더 조사해 보아야 하겠으나 일단은 two copy 또는 그 이상이 이웃하게 삽입된 것이 아닌가 생각된다.

마. 형질전환 효율

pDH2514 (*Pvu* II-linearized)와 pSGF957 (*Pvu* II-linearized) 사이에, 또한 pDH2514 (*Kpn* I- linearized)와 pSGF957 (*Kpn* I-linearized) 사이에 μg DNA 당 형질전환 효율은 유의적인 차가 없었다. 그러나 절단하지 않은 supercoil형 DNA에서는 형질전환체를 전혀 얻을 수 없었다.

바. 항생제 저항성

pDH2514 또는 pDH2857로써 형질전환된 균주들과 마찬가지로 pSGF957로써 형질전환된 균주들의 항생제 저항성도 5회의 계대배양에서도 안정하게 유지되었다. 이들은 500 ppm에서도 균사 성장에 저해를 받지 않았고 분생자를 생성하였다. 그 보다 높은 농도에서는 실험하지 않았다.

사. 형광형미경 관찰

모균주 DSM1379, hygromycin B 저항성 유전자는 가지나 GFP 유전자는 가지지 않는 균주 P74와 K102, hygromycin B 저항성 유전자와 GFP 유

전자를 모두 가지는 균주 PF3과 PF9를 형광 현미경으로 관찰하였다. 그 결과 GFP 유전자를 가지지 않는 균주는 적색 또는 연녹색으로 보이나 녹색의 발광은 보이지 않았으며 GFP 유전자를 가지는 균주에서만 녹색의 발광을 관찰하였다. 대표적인 형광현미경 하의 소견은 Figure 2-2와 같았다. 이는 genomic Southern blot 결과로도 유전자가 삽입된 것을 확인할 수 있었다 (Figure 2-3).

(A) (B)

Figure 2-2. Fluoromicroscopic photos. (A) P74 [hph], exp time=240 sec (B) PF3 {hph-gfp], (C) PF9 {hph-gfp], exp time = 200 sec.exp time = 200 sec

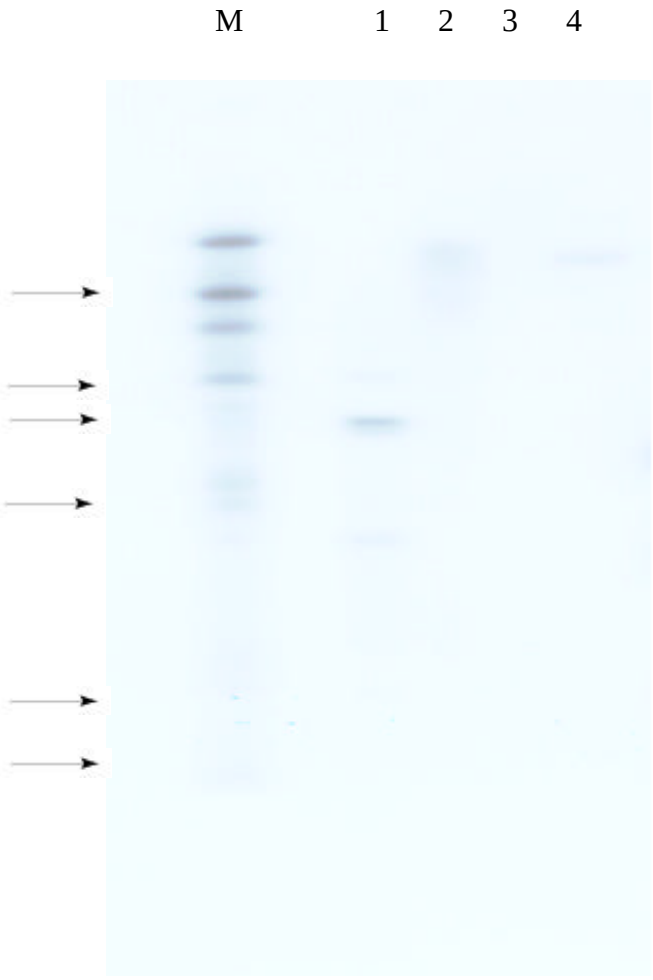


Figure 2-3. Sourthern blot of the *gip*-transformed *Monascus* genomic DNA. Lanes 1, 2, 3, 4 indicate PF3/BamHI, /BglII, PF9/BamHI, /BglII digests, respectively. M indicates ȳ/HindIII digest. Arrows indicates size markers of 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, and 2027 bp from the top.

제 3 절 천연 식용 색소 생산 공정의 개발

1. 색소 측정 방법의 확립

전 처리한 잇꽃시료를 알카리(Na_2CO_3) 용액에 1:2(w/v)로 담가 1시간 정도 저어 주어 충분히 적색소가 녹아 나오게 한다. 그 후 3,500 rpm으로 원심 분리하여 남아 있는 노란색의 침전물을 제거하고 알카리용액의 1/5 부피만큼 99% acetic acid를 첨가하여 4 ℃에서 24 시간 동안 방치한 후 7,000 rpm으로 원심분리하여 carthamin 침전물을 얻는다. 그리고 99.5% 메탄올을 첨가하여 10 분간 진탕혼합기를 이용하여 녹인 후 3,500rpm으로 원심 분리하여 녹지 않은 pellet을 제거한다. 30 ℃에서 증발시킨 후 소량의 99.5% 메탄올로 다시 녹여 521 nm에서 흡광도를 측정한다.

2. 식물체 시료 조건의 추출 반응에 미치는 영향 연구

가. Freezing & Thawing

시료속에 존재하는 꽃가루와 수용성 황색소를 꽃잎 조직에서 제거하고 효과적으로 carthamin을 추출하기 위해서 동량의 파쇄된 잇꽃을 -196 ℃ 액체 질소, -70 ℃ defreezer 그리고 -20 ℃ 냉동고에서 각각 24 시간 freezing시켰다. 그리고 나서 동결된 시료를 4 ℃, 25 ℃, 50 ℃로 thawing하여 다량의 물로 세척하여 0.5 M의 sodium carbonate로 녹여 40 %의 acetic acid로 acidification하여 521 ㎚에서 흡광도를 측정하여 본 결과, -196 ℃에서 freezing하고 4 ℃에서 thawing한 시료로 부터 가장 높은 4.4 ㎎/㎖의 carthamin이 추출되어 carthamin의 추출에 적합한 freezing과 thawing의 조건임을 알 수 있었다(Fig. 3-1). 또한 -196 ℃을 유지하기위해 액체질소를 밀폐용기에 담아 4 ℃ cold room에서 보관하며 실험을 수행하였다. Freezing과 thawing의 반복 횟수에 따른 carthamin의 추출조건을 검토해 본 결과 논문 원고의 Fig.3-2에서 알 수 있듯이 2 회 반복하였을 때 가장 carthamin의 추출량이 많았고 반복횟수가 증가할수록 carthamin의 추출정도가 감소하는 것을 알 수 있었다. 이것은 carthamin이 온도

조건에 불안정하여 조직 밖으로 용출된 carthamin이 파괴되어 일어나는 현상으로 생각되었다.

나. Sonication

Sonicator를 이용하여 30±5 kHz의 초음파로 잇꽃조직내의 carthamin을 추출하여 각각의 온도와 시간에 따른 추출조건을 알아보았다. 각각의 시료를 0 ℃, 20 ℃ 그리고 50 ℃의 온도조건에서 20 분간 sonication하여 carthamin의 추출량을 흡광도로 측정한 결과 0 ℃에서 5 분간 sonication 하였을 때 가장 좋은 추출 조건으로 나타났다(Fig. 3-3). 또한 30분이상 sonication을 하였을때는 carthamin의 추출량이 감소하는 것으로 관찰되었는데 이것은 초음파에 의한 진동에 의해 carthamin구조가 변형되고 온도의 상승으로 carthamin이 파괴되기 때문으로 생각된다. 따라서 이러한 불안정한 carthamin의 특성에 유의하여 sonication 시 chromogenic inducer인 hydrogen peroxide를 첨가하여 잇꽃조직에서 부터 용출되는 carthamin의 안정성을 높일 수 있는 조건을 알아보았다. Hydrogen peroxide의 농도를 0 1.0 M로 변화시켜 0 ℃에서 5 분간 sonication 하였다. 그 결과, 1 M의 hydrogen peroxide 농도에서는 첨가하지 않은 시료에 비하여 carthamin이 약 50 % 이상 안정적으로 추출되었다(Fig. 3-4).

3. 색소 추출 용매의 선정 연구

잇꽃의 조직에 존재하는 carthamin은 수용액상에서는 잘 용해되지 않지만 알칼리성용액에 용해되는 특징을 가지고 있다. 여러 가지 알칼리성용액 중에서 가능성이 높은 Na_2CO_3와 K_2CO_3를 이용하여 잇꽃에서부터 carthamin의 추출조건을 검토하였다. 각각의 용액 0.5 M에 동량의 시료를 첨가하여 상온에서 1 시간 동안 충분히 혼합하여 시료로부터 추출된 carthamin량을 흡광도로 521 ㎚에서 측정한 결과 0.5 M의 Na_2CO_3의 알칼리성용액을 이용한 시료에서는 carthamin의 추출이 K_2CO_3를 이용한 시료에서 보다 약 2.5 배 이상 효과적이었다(Table 3-1). 또한, Na_2CO_3의 농도에 따른 carthamin 추출에 미치는 영향을 알아보기 위해 Na_2CO_3의 농도를 0.01 M 1 M의 범위에서 조사한 결과, Fig. 3-5에서와 같이

0.5 M의 Na2CO3 농도에서 가장 많은 carthamin이 추출되었다.

Table 3-1. Effect of different treatment on carthamin extraction and formation.

Treatment		Absorbance (521 ㎚)
Alkali extraction	Acidification	
0.5 M Na2CO3	Acetic acid	0.775
	Citric acid	0.227
0.5 M K2CO3	Acetic acid	0.553
	Citric acid	0.181

4. 추출 촉매에 의한 추출 반응의 기초 연구

잇꽃의 조직으로부터 알칼리용액에 용해된 carthamin은 낮은 pH에서는 안정하지만 높은 pH에서는 불안정한 특징을 갖고있다. 그러므로 산성용액을 처리하여 carthamin을 낮은 pH의 조건으로 전환시켜주는 단계가 매우 중요하다. Carthamin은 이러한 acidification을 통하여 안정적인 홍색을 갖게된다. Acetic acid, citric acid, hydrochloric acid 그리고 sulfuric acid를 동일한 농도로 처리하여 carthamin을 acidification한 결과 Table 3-2에서와 같이 acetic acid를 처리한 시료에서 가장 높은 량의 carthamin이 생성되었다. 또한 acetic acid를 40 100 %로 처리하여 acetic acid의 농도에 따른 carthamin 생성을 조사해 본 결과 40 %의 acetic acid를 첨가한 경우에 월등히 높은 carthamin의 생성을 확인할 수 있었다(Fig. 3-6). Carthamin이 용해되어 있는 알칼리용액에 산성용액을 가하여 충분히 섞어준 후 4 ℃에서 8-12시간 정도 보관하면 carthamin이 결정으로 침전된다. 이러한 침전물에서 염을 제거하기 위하여 여러 가지 용매를 이용하여 carthamin의 추출에 적합한 용매를 선정하였다. Fig. 7에서와 같이 methanol(100 %), methanol : acetone(50 : 50 %), acetone(100 %), distilled water(100 %), metanol : water(70 : 30 %) 그리고

ethanol(100 %)를 사용하여 각각의 용매에 carthamin pellet 0.1g을 충분히 용해시키고 15,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 용매에 용해되지 않은 침전물을 제거하고 상등액을 취하여 521 ㎚에서 흡광도로 carthamin의 량을 측정하였다. 그 결과, methanol과 water를 70 : 30으로 혼합한 용매가 잇꽃 carthamin의 추출에 적합함을 알 수 있었다. 또한 순수한 methanol의 경우에도 거의 비슷한 량의 carthamin이 추출되었다. 그러나 100 % water에서는 약 30 분이내에 carthamin이 분해되어 황색으로 변색되어 carthamin이 수용액상에서는 불안정함을 알 수 있었다.

Table 3-2. Effect of acid solvent type on carthamin formation

Acid type (3N)	Absorbance (521 ㎚)
Acetic acid	0.392
Citric acid	0.259
Hydrochloric acid	0.360
Sulfuric acid	0.167

5. 추출 반응기 및 공정 연구

실험실 규모(~1L 정도)의 추출 반응기를 이용하여 carthamin 추출 반응기의 운영 조건 최적화와 공정 연구를 수행하였다. 4 ℃에 보관된 잇꽃을 mixer로 10 분간 파쇄하고 과량의 물로 꽃가루와 수용성 황색소를 제거하고 -196 ℃에서 freezing하고 4 ℃에서 thawing을 2회 반복하였다. 1 M의 hydrogen peroxide 용액에서 0 ℃에서 10 분간 sonication하고 0.5 M의 Na_2CO_3와 40 %의 acetic acid로 alkali extraction과 acidification하여 carthamin pellet을 얻었다. 그리고 pellet을 70 % methanol로 처리하여 염을 제거한 후 용액을 30 ℃에서 농축하여 521 ㎚에서 흡광도를 측정하여 carthamin의 량을 측정하였다. 상기와 같은 최적화된 조건을 통하여 100 g의 잇꽃으로부터 약 2.5 g의 부분 정제된 carthamin을 생산할 수 있었다. 이것은 기존의 방법에 비하여 수율이 약 35 % 정도 증가된

것이며 최적화 추출반응 및 공정에 의해 잇꽃으로 부터 효율적으로 홍색소 carthamin을 대량 추출할 수 있음을 알 수 있었다.

6. 공정의 회분식 및 연속식 운영방법의 연구

1 차 년도에서 개발된 홍화의 추출방법은 회분식 방법으로 공정의 수가 3 개 이상이 되어 연속식 운영을 위한 공정 개발이 까다로운 것으로 사료되었다. 따라서 2 차년도에서는 회분식 및 연속식 운영이 가능한 초임계 추출 방법을 검토하였다. 홍화 색소의 초임계 추출장치는 Fig. 3-8(A)와 같으며 연속식 운영도 가능하게 되어 있다. 이 장치는 고압에 견딜 수 있도록 20,000 psi 용 연결장치를 사용하였고 연결관의 재질은 고압용 스테인레스 강으로 되어 있다. 이산화 탄소를 사용하는 동안 이산화탄소를 실린더로 부터 일정한 압력으로 압축기에 공급하여 주기 위해 고압 압력 조절기가 실린더 입구에 연결이 되어 있다. 보조용매의 공급은 최대 6000 psi까지 조업이 가능한 HPLC 펌프를 사용하였고 3 구 밸브를 이용하여 장치와 연결하였다. 추출될 시료를 넣는 반응기는 내경 0.5 인치, 외경 1 인치, 길이 20 인치, 부피 64 인치로 최대 조업 압력 15,000 psi인 제품을 이용하였고 항온조 내에 연결하여 추출작업 동안 추출기의 온도를 유지하였다. 추출기에서 배출되는 고압의 이산화탄소는 미세조절밸브를 이용하여 급격한 압력하강을 방지하였다. 배출되는 이산화탄소의 정량은 wet gas meter를 이용하였으며 배출되는 추출물은 저온항온 수조내에 존재하는 포집장치를 이용하여 수집하였다. 초임계 추출시 영향을 주는 인자에 대한 연구를 진행하기 위해 모든 조건은 동일하게 하고 압력, 온도, 입자의 크기 등의 영향 인자만을 변화시켜 주어 추출경향을 살펴보았다. 홍화의 초임계 추출은 시료 30 g 을 이용하여 압력은 3000 psi - 5000 psi의 범위에서, 반응시간은 30 분, 1 시간, 2 시간 등의 범위에서, 이산화탄소의 유량은 900-1200 mL/hr으로 조정하여 회분식 및 연속식으로 실험을 수행하였다. 재래식 추출방법에 대한 연구결과에 의하면 홍색소 carthamin의 추출은 온도가 낮을수록 유리하게 나타났으므로 35℃ - 40℃의 범위에서 실험을 수행하였다. 그러나 상기의 여러 가지 조건에서 초임계 추출을 시도한 결과 carthamin은 거의 추출되지 않았다. 이것은

carthamin이 이산화탄소에서의 용해도가 매우 낮아 초임계 추출이 어려운 것으로 사료된다. 따라서 극성 보조용매인 methanol, ethanol, acetone 등을 이용하여 앞에 언급한 압력, 온도, 이산화탄소의 유속을 변화시키면서 초임계 추출 실험을 수행하였다. 극성보조용매인 methanol과 ethanol을 이용한 경우 이산화탄소만을 이용해서 추출한 경우와 비슷하게 홍화의 carthamin은 거의 추출되지 않았다. 반면에 acetone의 경우에는 미량으로 추출되는 것으로 나타났다(Fig. 3-8(B) 참조). Acetone의 함량을 증가시키고 초임계 추출시간을 증가시켜 5 시간 수행하여도 홍색소 carthamin의 추출 수율은 크게 증가되지 않았다.

7. 추출색소의 농축 및 정제 연구

홍화를 알카리로 추출해서 얻은 저순도 색소 혼합물을 column chromatography에 의해 대량 농축 및 정제하는 방법을 연구하였다. Carthamin을 선택적으로 흡착하는 cellulose를 column에 그대로 충진하여 chromatography에 이용해 본 결과 유출액의 흐름이 불균형해지고 색소추출액의 대량 농축이 어렵게 되었다(Fig. 3-9(A) 참조). 따라서 유출액의 흐름을 개선하기 위해 cellulose를 Ca-alginate bead에 고정화시킨 후 색소 추출액으로부터 carthamin을 대량 농축 및 정제하였다. Fig. 3-9(B)는 황색소와 섞여 있는 carthamin이 column내의 bead에 포집되어 있는 것을 보여주며 Fig. 3-9(C)는 3 시간 정도의 chromatography 조업으로 홍색소 carthamin을 선택적으로 bead안에 분리 농축시킨 것을 보여준다. 그리고 column chromatography의 조업 변수인 bead의 크기는 3 ㎜ 정도, cellulose의 농도는 35 g의 경우가 가장 좋은 것으로 나타났다(Fig. 3-10). 그리고 Ca-alginate의 농도는 1%, 2%, 3%의 범위에서는 비슷한 것으로 나타났다(Fig. 3-11). 홍화의 색소추출을 위해 상기와 같이 column chromatography의 이용 가능성을 확인하였으며 분리(separation) 조업의 최적화 연구를 성공적으로 수행하였다. 이러한 분리기술은 식이성 화이바나 싸이클로덱스트린과 같은 무독성 생분해성 고분자를 이용하여 미립자를 만들고 이 입자내에 홍색소 carthamin을 포집시킨 후 carthamin의 불안전성을 극복하면서 식품에 이용 가능한 기술로 발전시킬 수도 있다고 생각한다.

8. 종합공정 시스템의 설계 및 제작

종합공정 시스템의 구성을 위해 추출반응기(5 L)를 제작하였다. 그리고 추출용 각종 교반기를 설계 및 제작하여(Fig. 3-12(A)) 교반기의 형태에 따른 유체의 혼합 정도를 확인하였다. 유체의 혼합(mixing)에는 Fig. 3-12(B)에 나타난 것과 같은 교반기 형태가 가장 좋은 것으로 나타났다. 그리고 Fig. 3-12(B)에서 알 수 있듯이 baffle이 없는 형태의 추출반응기에서는 vortex가 심하게 나타나 혼합이 잘 되지 않는 것을 알 수 있었으며 baffle (2개)의 설치를 통해 vortex 현상을 감소시킬 수 있었다 (Fig. 3-12(C)). 이러한 시스템은 홍화의 색소 추출을 위한 반응기로서 색소 생산 시스템의 scale-up 연구를 위해 활용할 수 있게 되었다.

9. 색소 생산 공정의 실용성 및 경제성 재평가

잇꽃으로부터 황색소의 추출공정은 명신화성과 같은 회사에서 실용화하여 현재 황색소의 대량 생산에 적용하고 있어 경제성이 있는 것으로 판단된다. 그러나 잇꽃 적색소 추출공정의 경우에는 현재까지의 연구결과를 가지고 실용성 및 경제성을 언급하기에는 미흡하다고 생각된다. 그렇지만 식용 천연 색소의 국제 시장의 크기, 우리나라에서의 천연 색소의 수입 의존도 등을 감안해 볼 때 적절한 공정이 확립되면 경제적 생산이 가능할 것으로 판단된다.

10. 색소생산 시스템의 scale-up 연구 및 pilot plant 설계 기초연구

3 차년도에서는 상기 연구결과를 토대로 추출반응기 시스템을 5ℓ 및 35ℓ로 scale-up시킨 추출반응기를 이용하여 색소생산 연구를 수행하였다. 본 연구에서는 특히 온도와 반응시간의 변화에 따른 추출수율을 검토하고 scale-up된 반응기에서의 확인실험도 수행하였다. 실험에 사용된 5ℓ 및 35ℓ 추출반응기는 stainless steel로 제작되었으며 2 개의 baffle과 온도 controller가 장착되

어 있다. 반응기의 교반기는 anchor type이며 교반속도는 300 rpm이었다. 그리고 5ℓ 및 35ℓ실험에서도 잇꽃시료에 대한 증류수 첨가량의 비(ratio)는 소규모 튜브형 반응기에서와 동일하게 하였다. 먼저 온도와 반응시간의 변화에 다른 추출수율을 검토한 결과는 다음과 같다(Fig. 3-13). 추출 수율을 조사하기 위해서 조직이 충분히 파쇄된 잇꽃 시료를 증류수에 넣어 완전히 섞이도록 20 초간 vortexing을 해 준 후 각각 40℃, 50℃, 60℃, 70℃, 80℃로 조절한 후 30 분, 1 시간, 2 시간, 4 시간 동안 반응을 시켰다. 황색소는 온도가 40℃에서 60℃, 70℃로 상승함에 따라서 증가하다가 80℃에서는 크게 감소하는 것으로 나타났다. 황색소의 추출 수율은 70℃에서 30 분간 반응시킨 경우가 가장 높게 나타났다. 이 조건에서 흡광도는 0.83으로 같은 조건의 40℃에서의 값에 비해 61 %나 향상된 것을 나타낸다. 그러나 70℃에서 반응시간이 30 분이상으로 증가되면 추출 수율이 크게 감소하였다. 아울러 잇꽃의 황색소 분리시 회수한 원심분리의 침전물을 이용하여 온도와 시간 변화에 따른 홍색소 추출량의 변화를 조사하였다(Fig. 3-14). 홍색소는 온도가 40℃에서 80℃ 로 상승함에 따라 크게 감소하는 것으로 나타났다. 홍색소의 경우 40℃에서 4 시간 반응시킨 경우가 가장 높은 수율을 나타냈다. 이 조건에서 흡광도는 0.92로 같은 조건의 50℃에서의 값에 비해 150%나 향상된 것을 나타낸다. 이 결과는 홍색소가 황색소와는 달리 40℃ 이상의 온도에 매우 불안정하다는 것을 보여준다. 아울러 소규모의 튜브형 반응기에서 최적화된 조업조건을 scale-up된 반응기에 적용하였을 때 추출수율을 같은 수준으로 재현할 수 있는지를 중점적으로 검토하였다. Fig. 3-15은 소규모 튜브형 반응기(대조구)와 5ℓ 및 35ℓ의 반응기에서 온도 및 반응시간은 70℃, 30 분으로 추출실험을 수행하여 황색소와 홍색소의 생산량을 비교한 것이다. 이 결과에서 알 수 있듯이 scale-up된 반응기에서 추출실험을 수행하더라도 소규모 반응기에서 최적화한 조건에서 얻은 값보다 약간 더 많거나 같은 수준으로 추출되는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 이러한 scale-up된 추출반응기에서의 실험결과는 pilot plant 설계의 기초연구에 응용할 수 있다고 사료된다.

11.색소생산의 최적 종합공정 도출 및 천연색소 생산 산업화 기초연구

3 차년도에서는 상기 연구 결과를 토대로 색소생산의 최적 종합공정도출 및 천연색소 산업화 기초연구를 수행하였다. 따라서 공정형태로서 용매 추출공정과 초임계 추출공정을 비교하여 최적공정 도출을 위한 방안을 수립하려고 하였다. 초임계 추출장치는 고압에 견딜 수 있도록 20,000 psi인 제품을 사용하며 연결관의 재질은 고압용 스테인레스 강으로 되어 있다. 이산화 탄소를 사용하는 동안 이산화탄소를 실린더로 부터 일정한 압력으로 압축기에 공급하여 주기 위해 고압 압력 조절기가 실린더 입구에 연결되어 있다. 보조용매의 공급은 최대 6000 psi까지 조업이 가능한 HPLC 펌프를 사용하고 3 구 밸브를 이용하여 장치와 연결되어 있다. 추출될 시료를 넣는 반응기는 내경 0.5 인치, 외경 1 인치, 길이 20 인치, 부피 64 인치로 최대 조업 압력 15,000 psi 인 제품을 이용하고 항온조 내에 연결하여 추출작업 동안 추출기의 온도를 유지한다. 추출기에서 배출되는 고압의 이산화탄소는 미세조절밸브를 이용하여 급격한 압력하강을 방지하며 배출되는 이산화탄소의 정량은 wet gas meter를 이용하고 배출되는 추출물은 저온항온 수조내에 존재하는 포집장치를 이용하여 수집하게 되어있다. 용매 추출공정은 상기항에 기술된 것과 같이 scale-up 되어도 비교적 좋은 결과를 나타내고 있다. 그렇지만 초임계 추출공정은 환경친화적인 공정이므로 가능하다면 새로운 공정의 개발을 위해 검토할 필요가 많다고 생각된다. 2 차년도에 수행한 홍화의 적색소 추출에 초임계 추출공정을 적용했을 때 적합하지 않다고 평가되었지만, 3차년도에서 수행한 실험결과에 근거하여 볼 때, 홍화 황색소의 추출에는 매우 긍정적인 것으로 나타났다. 홍화 황색소의 초임계 추출은 홍화시료 10 g을 이용하여 수행하였다. 온도의 영향을 보기 위해 4000 psi에서 온도를 40, 50, 60, 70, 80℃로 변화시키면서 황색소의 농도를 측정하였다. Fig. 3-16는 일정 압력하에 각각 온도에서 추출된 황색소의 농도를 그래프로 나타낸 것이다. 온도가 증가함에 따라 추출량이 증가하다가 60℃에서 최대값을 나타내고 그 이후로는 감소하는 경향을 보인다. 압력의 영향을 살펴보기 위하

여 60℃에서 압력을 2000, 3000, 4000, 5000 psi로 변화시키면서 황색소의 농도를 측정하였다. 각각의 압력에서의 추출량의 변화는 Fig. 3-17에 그래프로 나타내었다. 그래프에서 보는 것처럼 압력이 증가함에 따라 급격히 증가하다가 4000 psi에서 최대값을 나타내고 5000 psi에서는 감소하고 있다. 이것은 등온조건에서 압력이 증가함에 따라 밀도가 증가하고 그에 따라 용해력이 증가하기 때문이다. 아울러 초임계 이산화탄소 추출시 보조용매, 수분함량 등의 영향도 조사하였다. 보조용매는 비극성의 성질을 갖는 초임계 이산화탄소의 단점을 보완해 주기 위해 사용된다. 즉 비교적 용해력이 약한 초임계 이산화탄소에 유기용매를 첨가함으로써 용해력을 증가시켜 주는 역할을 한다. 주로 알콜류가 많이 사용되나 본 실험에서는 홍화 황색소가 물에 잘 녹는 성질을 이용해서 물을 보조용매로 사용하였다. 60℃, 4000 psig에서 초임계 이산화탄소와 보조용매의 농도비를 달리했을 때의 추출량의 변화를 Fig. 18에 나타내었다. 약 6 - 10 wt%의 보조용매를 사용하였을 때 추출 수율이 가장 높게 나타났고 그 이상의 농도비를 사용했을 때는 감소하는 경향을 보였다. 보조용매 실험에서는 60℃, 4000 psig에서 10 wt%의 물을 사용하였을 때 최대값을 보였다. 이 경우의 흡광도는 0.88이었으며 같은 조건에서 보조용매를 사용하지 않았을 경우보다 수율이 11.4% 증가하였다. 그리고 수분함량이 초임계 추출에 미치는 영향을 살펴보기 위해 시료의 수분함량을 달리 하면서 이상의 실험에서 얻은 최적조건에서 황색소의 추출 실험을 수행하였다. 이때 얻은 추출량의 변화를 Fig. 3-19에 나타내었다. 시료의 수분함량이 낮을수록 추출효율이 높아짐을 알 수 있다. 초임계 유체를 이용하여 최적조건에서 홍화로부터 황색소 추출시 수율이 용매추출 공정에 비해 6%나 증가 하였으므로 이 추출공정은 최적 시스템으로 생각되며 이와 관련된 연구결과는 천연색소 생산의 산업화의 기초 자료로서 이용할 수 있다고 평가된다.

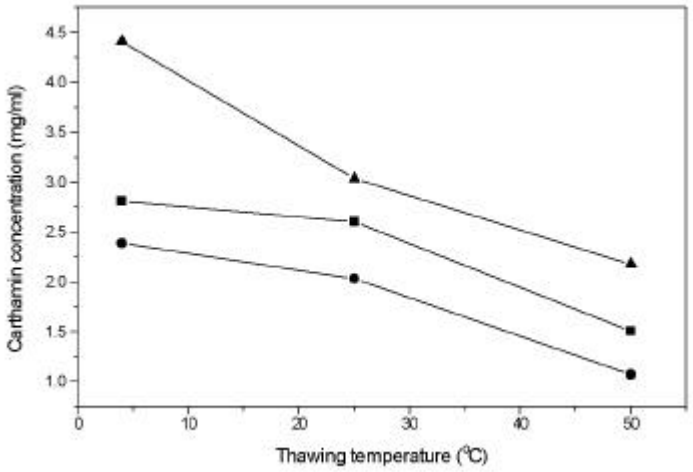


Fig. 3-1. The effect of freezing and thawing on carthamin extraction.

(▼ : -196℃; ● : -70℃ ; ■ : -20℃)

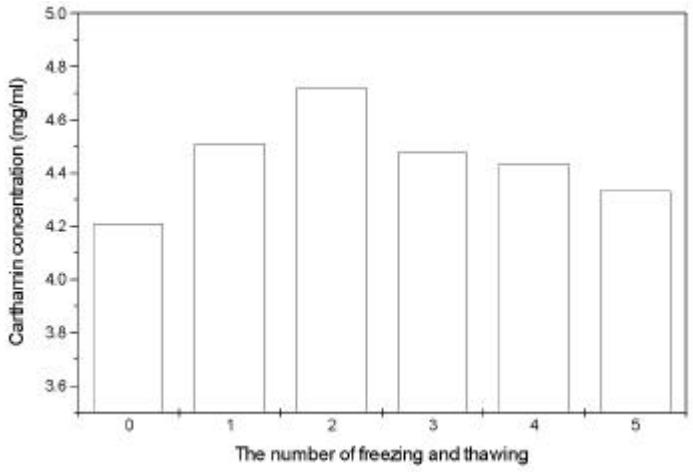


Fig. 3-2. The effect of repeated freezing and thawing on carthamin extraction.

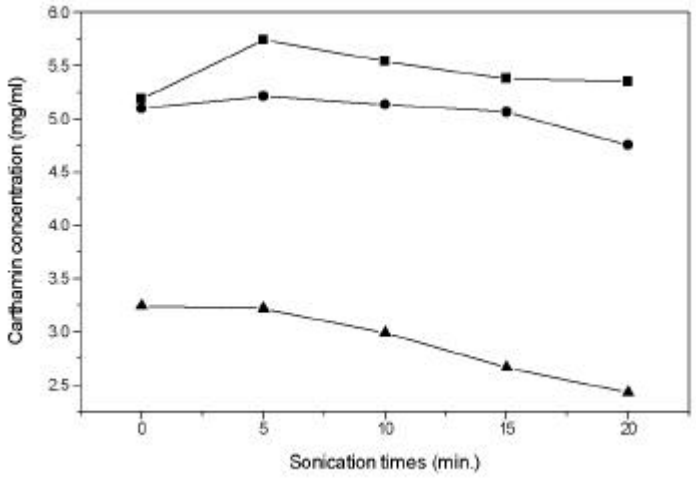


Fig. 3-3. Effect of sonication on carthamin extraction.

(■ : 0℃; ● : 20℃; ▼ : 50℃)

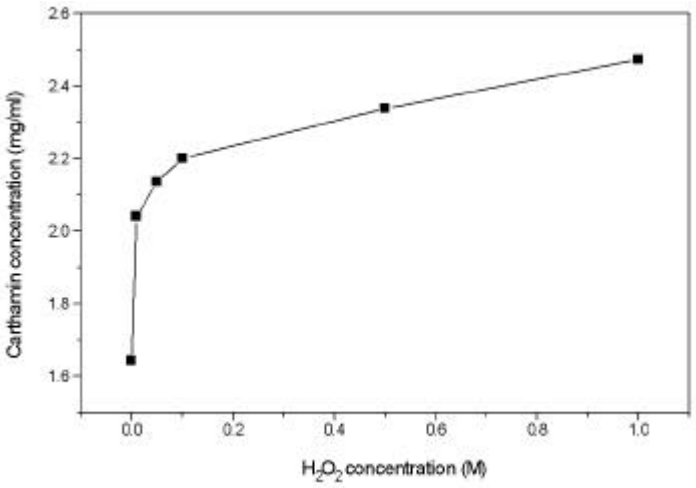


Fig. 3-4. Effect of H2O2 on carthamin extraction during 5 min sonication at 0℃.

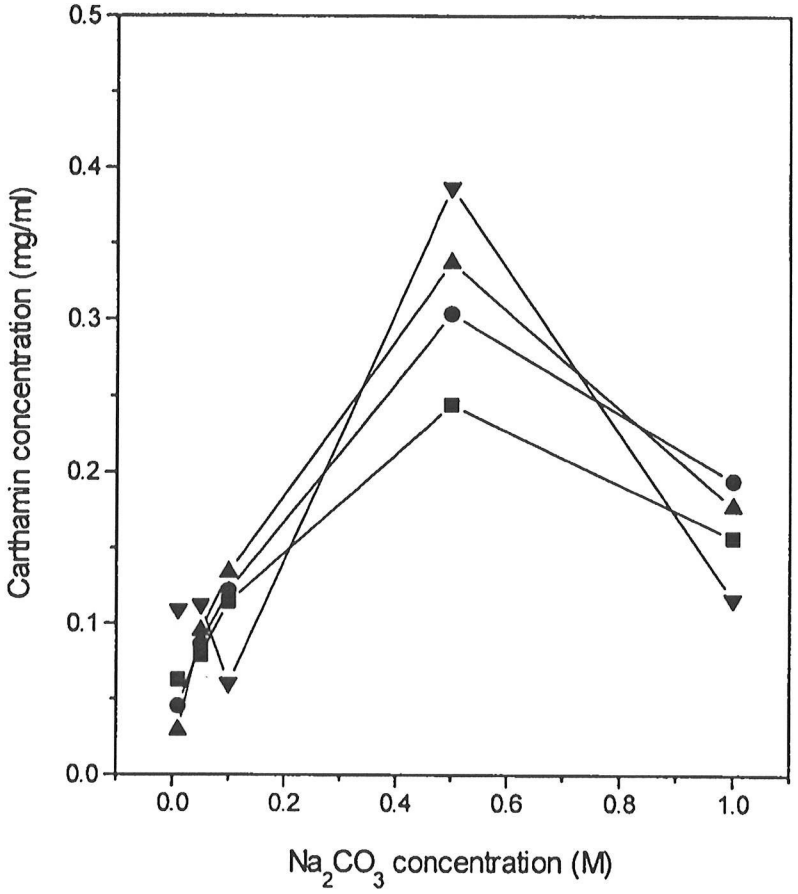


Fig. 3-5. The effect of Na_2CO_3 on carthamin extraction.

(■ : 100% acetic acid, ● : 80% acetic acid,

▲ : 60% acetic acid, ◆ : 40% acetic acid)

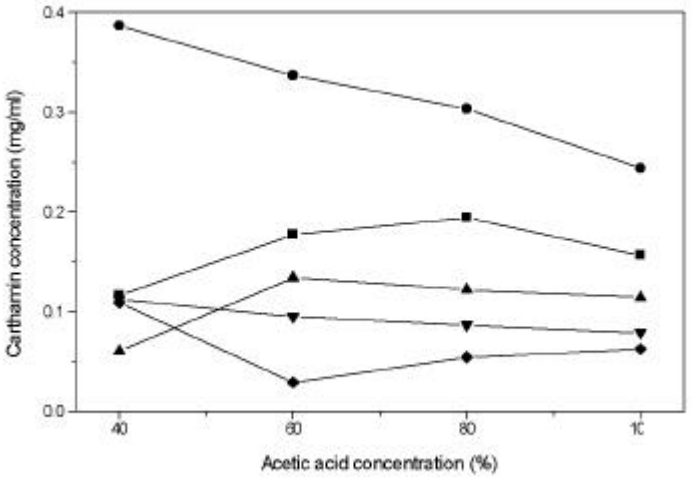


Fig. 3-6. The effect of acetic acid on carthamin formation.
(Na_2CO_3 conc. ■ : 1 M; ● : 0.5 M; ▼ : 0.1 M; ▲ : 0.05 M; ◆ : 0.01 M)

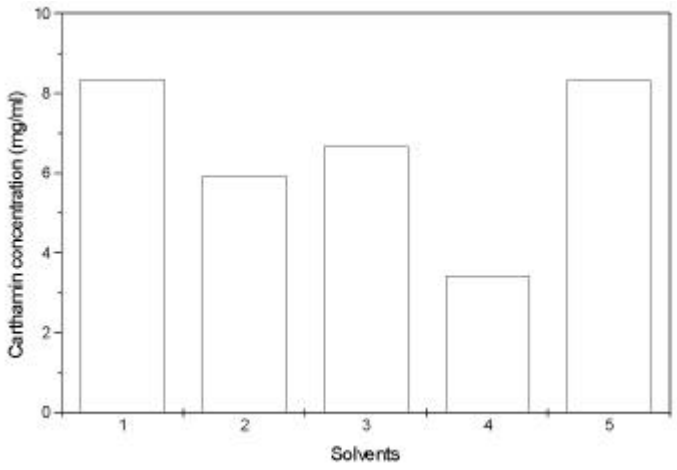


Fig. 3-7. The effect of solvent type on dissolvation of the carthamin pellet.
1. Methanol (100%); 2. Methanol : Aceton (50% : 50%); 3. Aceton (100%); 4. Water; 5. Methanol : Water (70% : 30%)

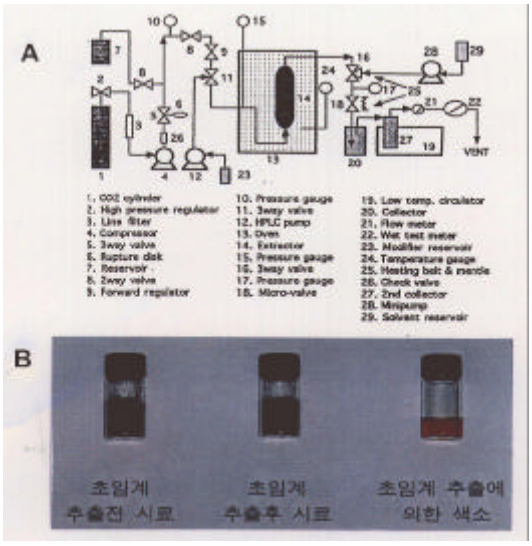


Fig. 3-8. Schematic diagram of supercritical extraction system (A) and Photograph of feed and extractant (B).

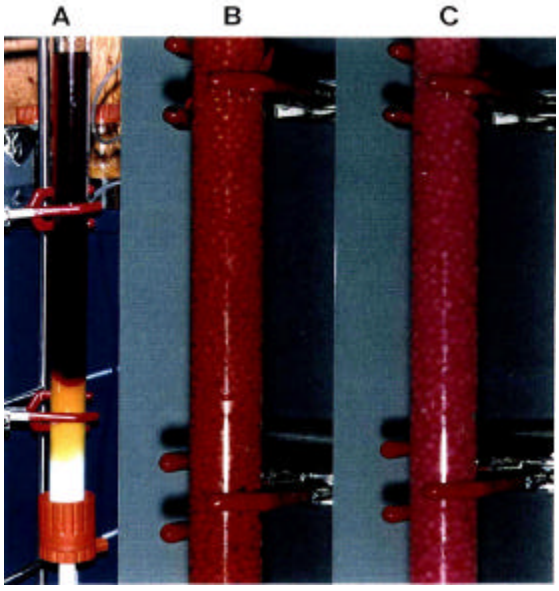


Fig. 3-9. Separation and concentration of carthamin using columns packed with free (A) and immobilized (B, C) cellulose.

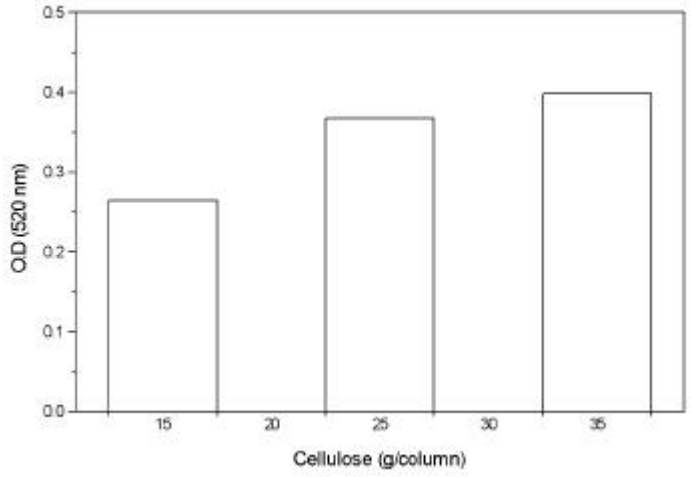


Fig. 3-10. Effect of Ca-alginate content on carthamin separation.

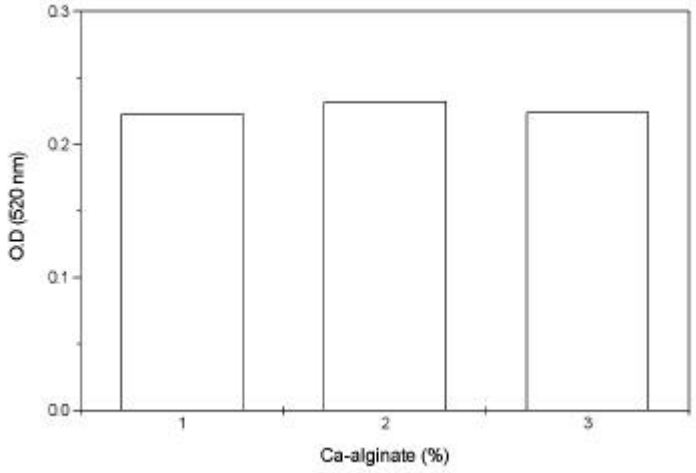


Fig. 3-11. The effect of Ca-alginate content on carthamin separation.

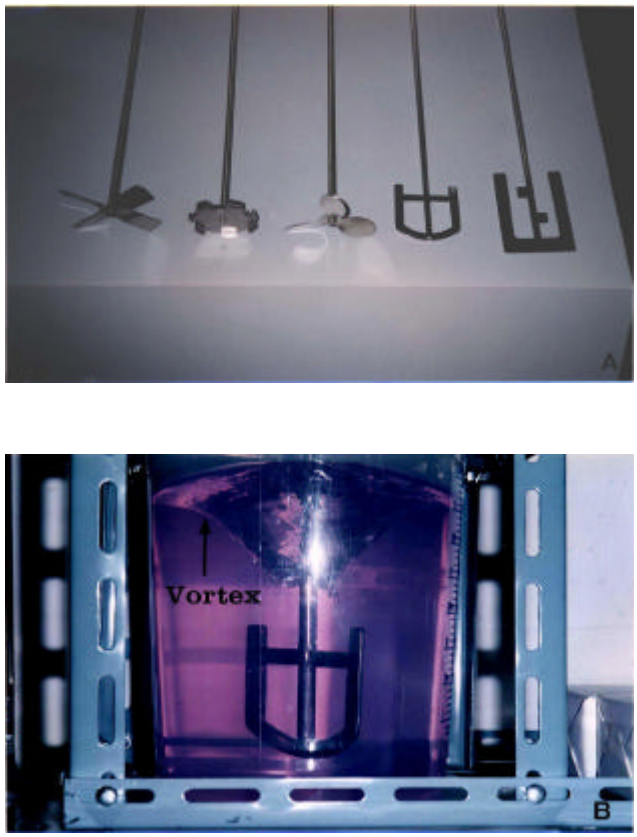


Fig. 3-12. **교반기의 형태와** mixing **연구**

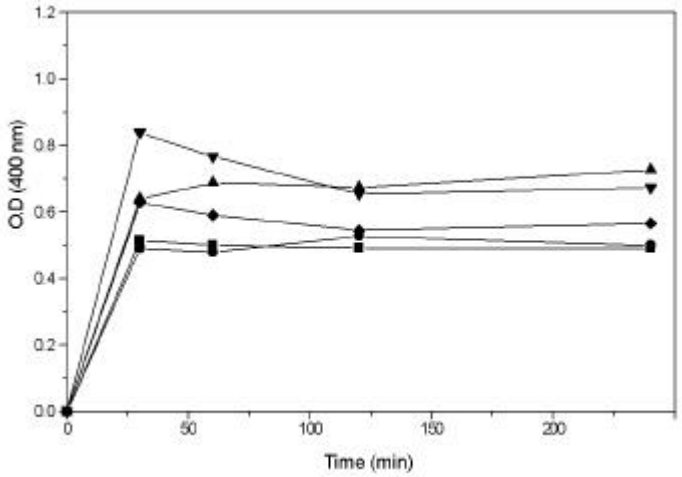


Fig. 3-13. Effect of temperature on the extraction of yellow pigments from *C. tinctorius L.* (■: 40℃; ●: 50℃; ▼: 60℃; ▲: 70℃; ◆: 80℃)

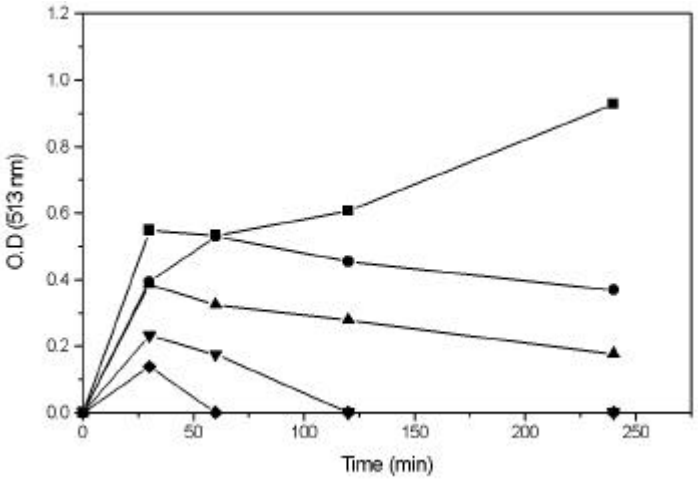


Fig. 3-14. Effect of temperature on the extraction of red pigments from *C. tinctorius L.* (■: 40℃; ● : 50℃; ▼: 60℃; ▲: 70℃; ◆: 80℃)

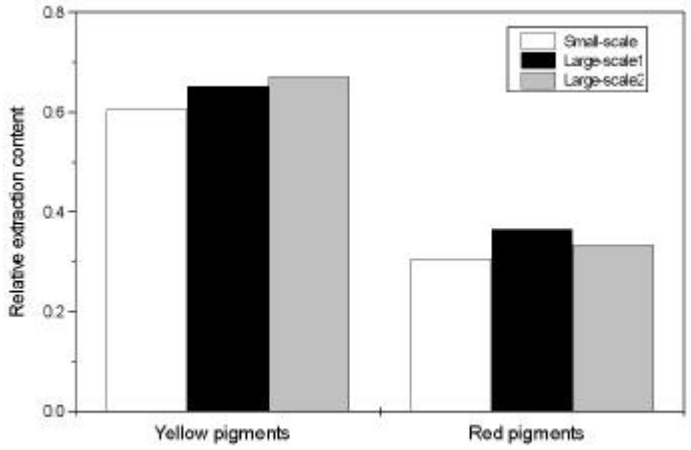


Fig. 3-15. Extraction of yellow and red pigments in large-scale reactors.

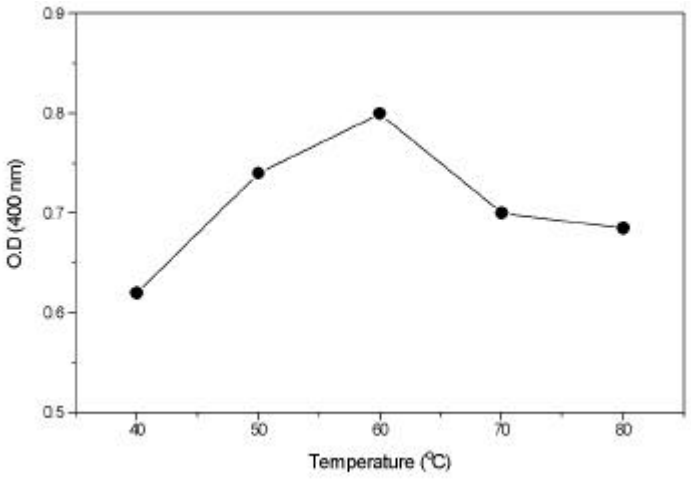


Fig. 3-16. Effect of temperature on SFE of safflower yellow pigments at 4,000 psi.

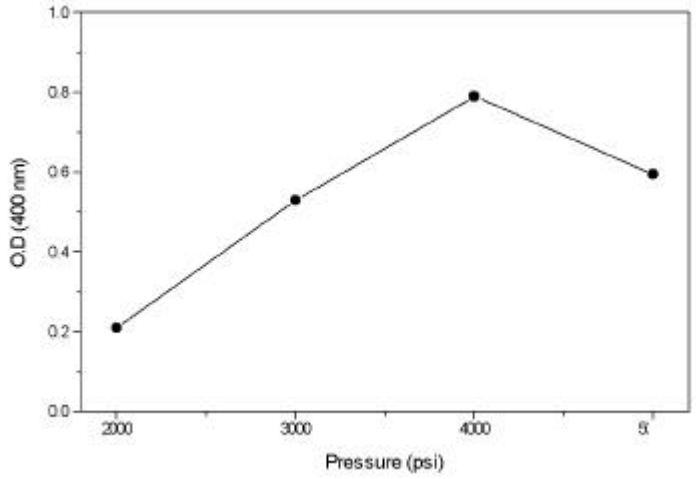


Fig. 3-17. Effect of pressure on SFE of safflower pigments at 60℃.

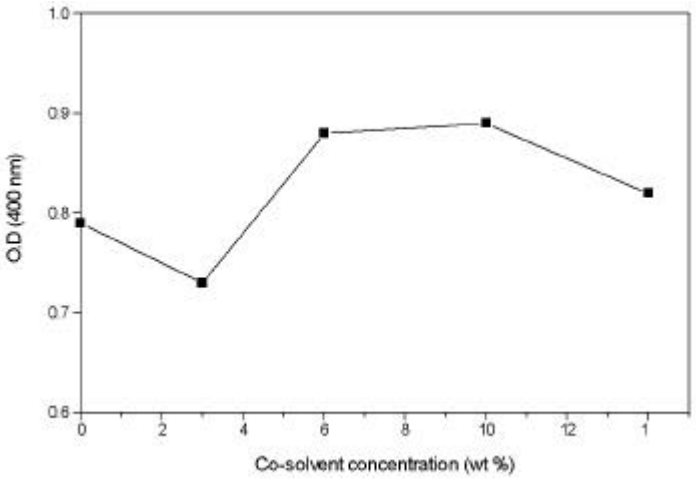


Fig. 3-18. Effect of co-solvent on SFE of safflower yellow pigments at 60℃ and 4,000 psi.

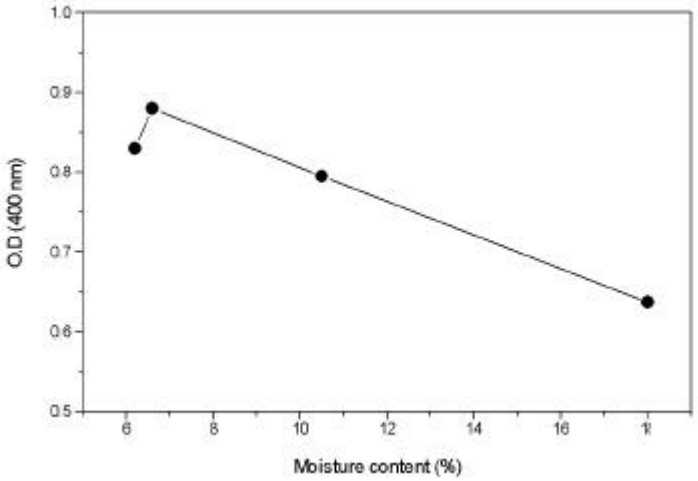


Fig. 3-19. Effect of moisture content on SFE of safflower yellow pigments at 60℃ and 4,000 psi.

제 4 절 천연식용색소의 식품활용 및 개발

1. 합성식용색소의 소비현황 및 문제점 조사

식용색소는 식품첨가물로서 식품에 사용되며, 우리나라의 식품첨가물에 대한 규제는 식품첨가물 공전에 명시되어 있다. 현재 사용이 허가된 것으로는 식용타르색소 8종류와 타르색소의 알루미늄레이크 색소 7종 및 베타카로틴, 수용성안나토, 철클로로필나트륨, 삼이산화철 등이 있으며, 1994년 3월 21일 이후로 고량색소, 락색소, 비트레드, 심황색소, 치자적색소, 치자청색소, 치자황색소, 포도과피추출색소, 홍국적색소, 홍국황색소, 홍화적색소, 홍화황색소 등의 12가지 색소제재가 추가로 허가되어 이용되고 있다. 최근에 허가된 식용색소의 대부분이 천연식물에서 생산된 것이 특징적이다. 미국의 경우에는 FAO/WHO의 식품첨가물위원회에 의해 심사되어 발간되는 식품첨가물 요람에 식품색소(Food colors)로 사용되는 물질들이 명시되어 있다. 허가된 식용색소의 종류가 우리나라보다 월등히 많고, 최근에 carmine, carotene, paprica extract등의 천연색소의 개발 및 허가가 증가된 것을 알 수 있다.

가공식품에 사용할 수 있는 색소첨가량은 제한되어 있으며 대부분의 천연색소들은 미국 식품의약품관리청(FAO)에 의해 허가과정이 불필요한 것으로 조사되었고, 또한 연구대상자원으로 선정된 유색미의 안토시아닌은 안정성이 이미 판명되었으며 홍화, 지치 및 치자는 전통적으로 오랜기간 식품에 이용되어 그 안전성이 입증되었다.

식품첨가물의 수출입 동향을 살펴보면, 수입은 증가하고 있는 반면 수출은 미약한 상태이다. 식용색소의 경우 1988년에 조사한 바에 의하면 2,686톤의 색소를 생산하였고, 21만 불의 수출도 이루어졌다. 1996년 현재 명신화성공업(주)과 (주)서도화학이 식용색소의 생산, 수입 및 판매의 주도를 이루며 약 14개 업체가 생산에 참여하는 것으로 조사되었고 천연색소의 생산액이 연간 약 120억원 이상인 것으로 추정되었다. 착색료 생산의 기술수준 현황자료에 의하면 1994년에 천연색소를 동남아에 소량 수출하였으며, 일부품목만에 국산화되었고 주요 적색색소원료는 거의 수입에 의존하고 있는 실정이다. 최근에 이르러 식품산업

의 대다수라고 할 정도로 매출면에서 앞서가고 있는 기능성식품의 제조에 식품첨가물의 사용은 급격히 증가하고 있으며, 수적으로나 양적으로 식용색소의 허가 품목 및 소비량도 해마다 증가하는 추세이다.

소비자들의 건강 식품에 대한 관심과 기호의 증대로 인해 돌연변이나 발암의 원인이 될 수도 있다는 연구보고가 계속되는 합성 화합물의 식품에의 첨가가 축소됨에 따라 생산가격이 높더라도 천연물을 이용한 색소 첨가제 개발 및 생산이 요구되고 있다.

2. 천연색소 활용 식품 조사

연구 중인 천연식용색소 원료는 유색미, 홍화, 지치 및 치자 등으로 전통적으로 식품에 사용되어 왔던 재료들로서 그 안전성이 입증된 것이다. 지금까지의 조사로 천연색소 첨가가 필요한 식품들은 음료(희석과채류음료, 건강음료, 식이섬유음료 등), 우유 가공식품(가공유, 아이스크림, 발효유 등). 젤리류 및 소오스류등이다. 안정성 연구가 완료된 유색미 색소의 경우 산성조건에서 적색색소로서 안정하므로 산성 기능성 음료와 발효식품을 활용식품으로 선정하였다.

3. 천연색소 안정성 및 보존성 연구

한국산 유색미에서 적색색소 (주로 cyanidin 3-glucoside)를 추출한 후 식품의 여러조건에서의 흡광도의 변화를 관찰하여 21일간 저장실험을 통해 보존·유통 및 저장과정에서의 색소 변화를 추적하였다. 유색미 안토시아닌 색소는 산성 pH 조건(pH 2.0, 3.0)에서 적색을 나타내었고 중성(pH 5.0)에서는 무색을, 염기성 조건(pH 9.0)에서는 청색을 나타내었다. 21일간 저장하였을 때 pH 2.0과 pH 3.0에서는 반감기가 각각 약 36일과 17일로 비교적 안정하였으나 중성과 염기성에서는 하루이내에 거의 분해되는 것을 발견하였다. 산성조건(pH 3.0)과 염기성 조건(pH 9.0)에서 열안정성을 조사한 결과 95℃에서의 반감기는 7.4시간(pH 3.0)과 0.17시간(pH 9.0), 75℃에서 23.6시간(pH 3.0), 0.57시간(pH 9.0), 50℃에서는 96.3시간(pH 3.), 1.7시간(pH 9.0)으로 산성조건에서 비교적 안정한

것으로 나타났다.

10가지 금속이온의 첨가로 안토시아닌의 흡광도가 높아졌으며 양이온의 1가, 2가, 3가로 갈수록 효과가 커지는 경향을 보였다. 금속이온 농도는 10mM보다 100mM 첨가시 더 높은 흡광도를 보였고, 10가지 이온 중에서 Al^{3+}가 가장 안토시아닌의 안정성과 보존성 증대에 효과적임을 나타내었다. 당류에 의해서는 안정성이 크게 증가되지 못하였으나 fructose첨가에 의해서는 색소 분해가 촉진됨을 알 수 있었다. 유기산 용액의 pH를 3.0으로 고정하여 몇가지 유기산에 대한 영향을 조사한 결과, citric acid의 경우가 가장 흡광도를 높여주었고, tartaric acid는 흡광도를 감소시킴을 알 수 있었다. 광도를 20,000 lux로 고정시키고 빛에 대한 영향을 조사한 결과, 반감기가 약 14시간으로 급격한 흡광도의 감소가 나타나서 저장시 빛을 차단하는 것이 효과적임을 알 수 있었다. 이상의 결과로 유색미 안토시아닌 색소는 산성조건에서 안정하며 유기산과 금속이온 첨가에 의해 저장안정성이 증가되어 과일음료, 탄산음료 및 발효식품에서 활용 가능한 천연색소원임을 시사하였다. (Joo-Mi Yoon, Man-Ho Cho, Tae-Ryong Hahn, Young-Sook Paik, and Hye-Hyun Yoon, "The physicochemical stability of anthocyanin pigments in Korean pigmented rice variety," Korean J. Food Sci. Tech., Vol.29, No.2, pp 211-217, 1997.)

4. 조리, 가공공정 중의 색소변화 연구

색소가 첨가된 음료의 가공공정 중의 색소 안정성을 조사하기 위하여, 음료의 model system을 디자인하여 각 model system의 구성성분에 따른 색소 변화 및 열처리와 광선 조사에 대한 색소 안정성을 연구하였다. 먼저 이화학적 안정성 연구가 끝난 유색미 안토시아닌 색소를 첨가한 음료 model system 가운데 pH를 3.0으로 맞추고, glucose, citric acid, Ca^{2+}를 첨가한 실험군이 가장 색소의 농색화 효과가 높았으며, 이러한 경향은 열처리 및 광선조사 후에도 유지되었다. 이러한model 음료의 결과를 바탕으로, 유색미 안토시아닌을 첨가한 음료를 제조하여 색소 변화 및 장기간(6개월)의 저장에 따른 색소 변화를 조사하였으며, 저장조건은 상온, 저온(5℃) 및 광선의 유무 등 4가지 조건이다. 저온의

암소에서 저장한 것이 가장 색소 변화가 적게 나타났다. 또한 유색미로 식혜를 제조하여 Hunter Colorimeter로 색 변화를 조사한 결과, 유색미가 많이 첨가된 실험군일수록 a value가 높았고, 반면 lightness 와 b value는 낮았다.

5. 식품에 대한 색소 첨가공정의 기초연구

음료식품의 색소는 안정성을 고려하여 첨가되어야 하므로, 본 연구에서는 안토시아닌 첨가 음료 제조 조건을 model system의 결과를 활용하여 산성조건에서 안토시아닌의 안정화 효과가 높은 citric acid, glucose와 칼슘이온을 첨가하고, pasteurization전에 안토시아닌을 제외한 성분들을 먼저 살균한 후, 색소를 첨가하여 장기간 보관에 따른 색 변화를 관찰하였다. 또한 안정화 효과가 뛰어난 copigments (tannic acid, chlorogenic acid, caffeic acid)를 첨가하여 안토시아닌의 안정성을 높이는 방법을 이용하여 음료의 보존성을 증가시켰다.

6. 천연색소의 안정성 연구

선택한 천연색소들의 식품에서의 안정성을 조사하기 위하여, 시료 색소들에 대하여 온도, pH, 빛, 당, 유기산, 금속이온 등의 몇 가지 조건에서 흡광도의 변화를 측정하였다. 유색미 안토시아닌의 식품색소로서의 안정성 연구 결과는 식품과학회지(Vol.29, No2, 1997)에 발표하였다. 안토시아닌은 산성 조건에서 안정한 붉은 색을 나타내었다. 여러 가지 조건에서 안정성을 조사한 결과, 온도에 대해서는 전반적으로 안정하였으며 (색소분해 반감기가 95℃에서 7.4시간, 50℃에서 96.2시간), 빛에는 상당히 민감하여 20,000 lux의 빛을 조사하였을 때 14시간의 반감기를 나타냈다. 이것은 상온에서의 반감기인 17일과 비교하여 볼 때 빛은 안토시아닌 저장에 영향을 미칠 수 있는 중요한 요인이라고 생각된다. 또한 안토시아닌은 금속이온에 의해 농색화 효과를 볼 수 있었으며, 이러한 경향은 3가이온의 경우가 가장 뛰어났다. 당류에 의해서는 농색화 효과나 안정화 효과를 볼 수 없었으며 fructose의 경우에 색소의 높은 파괴효과를 볼 수 있었다. 유기산은 첨가시 낮은 pKa 때문에 전반적으로 pH를 낮추어 주는 역할을 하

여 안토시아닌이 더욱 농색화, 안정화 되도록 만드나, 식품에의 이용을 고려할 때 매우 낮은 pH는 적합치 않으므로 이를 감안하여 pH를 3.0으로 고정하여 유기산에 대한 안정성을 조사하였고, 그 결과 citric acid의 농색화 효과가 가장 뛰어 났다. 홍화의 적색소인 carthamin에 대한 안정성 조사 결과, pH 3 과 5에서는 붉은 색을, pH 7과 11 에서는 주황색을, pH 9 에서는 초기에는 주황색이었다가 빠르게 노랑 색으로 변화하는 것을 볼 수 있었다. Carthamin은 열 안정성이 낮아서 25℃에서 반감기가 12시간 이내로 나타나, 안정화시키는 방법에 대한 연구가 요구되었다. 본 실험에서는 고분자 다당류와의 상호작용이나, 소당류에 의한 encapsulation으로 안정화시키는 방법을 조사하였다. Carthamin은 금속이온이나, 당에 의한 농색화 효과나 안정화 효과는 나타나지 않았다.

7. 천연색소의 보존성 연구

식품색소로서 활용하기 위해서는 장기간의 식품 유통기간 안정된 색깔을 유지해야 하는데, 천연색소의 가장 큰 단점이 바로 낮은 안정성에 의한 짧은 보존성이라 하겠다. 시료 색소들의 식품조건에서의 보존성을 조사하기 위하여 여러 가지 조건에서 시료색소 분해의 반감기를 조사하였다. 유색미 안토시아닌의 경우 25℃에서 21일간 저장하면서 보존성을 조사하였다(첨부논문 참조). 유색미 안토시아닌의 보존성을 증가시키기 위하여, copigment를 첨가하는 방법을 모색하였으며, tannic acid를 첨가한 경우에 높은 초기 농색화 현상을 볼 수 있었으며 이 효과는 21일 저장 후에도 유지되었다. 홍화 carthamin의 보존성은 매우 낮아 25℃에서 하루 이내에 거의 분해되는 것으로 나타나, 보존성을 증진시키는 방법으로 starch, carboxy methyl cellulose(CMC), alginic acid, gum arabic 등의 고분자 다당류에 홍화 적색소를 흡착시키는 연구결과, CMC와 alginic acid의 첨가군의 경우에 반감기가 증가하였으며, 금속이온 첨가 결과 Al^{3+}이온 첨가군의 반감기가 대조군에 비해 pH3.0에서는 2.4배, pH 5.0에서는 4.2배 증가하였다.

8. 천연 색소가 첨가된 식품의 기호도 조사

유색미의 겨층에 함유된 안토시아닌 색소를 추출, 농축과정 없이 식품으로 활용하기 위해 유색미 식혜를 제조하여 대조군인 백미식혜와 관능평가로써 기호도를 조사하였다. 현재 국내에서 재배되고 있는 유색미는 품종에 따라 약간씩 차이가 있으므로, 그 중에서 대표적인 3종류의 유색미(수원415호, 익산427호, 수원432호)를 선정하였다. 백미와 3종류의 유색미를 100%, 75%, 50%, 25%의 혼합 비율로 하여 식혜를 제조하였다. 13종의 식혜를 관능 검사한 결과, 맛은 백미 식혜와 익산50 식혜(익산427호:백미=2:2), 익산25 식혜(익산427호:백미=1:3), 적미50 식혜(수원432호:백미=2:2), 적미25 식혜(수원432호:백미=1:3)사이에 유의적인 차이가 없어, 유색미 식혜가 대조군인 백미식혜에 상당하는 좋은 맛을 갖는다고 볼 수 있었다. 향미도 백미 식혜와 유색미 식혜사이에 유의적인 차이가 없었다. 색깔은 적미25 식혜(수원432호:백미=1:3)와 백미 식혜를 유의적으로($P<0.05$) 선호하는 경향을 보였다. 전체적인 기호도는 백미 식혜에서 유의적으로($P<0.05$) 높았으며, 유색미 식혜에서는 적미와 익산 유색미를 이용한 식혜에서 유의적으로 선호하는 경향을 나타내었다(Table 4-1).

9. 천연 색소의 식품중의 안정성 조사

유색미와 백미의 혼합 식혜를 6개월간 4℃에 저장한 결과, 이화학적 특성(Hunter value, 당도, 환원당량, pH, 적정산도)의 변화는 거의 없었다. 유색미와 백미의 혼합 식혜를 21일간 20±1℃에 저장한 결과에서도, 이화학적 특성(Hunter value, 당도, 환원당량, pH, 적정산도)의 변화는 거의 없었다. 이와 같은 냉장 저장과 상온 저장의 결과를 볼 때, 유색미 식혜는 살균처리 후 냉장온도에서는 6개월 이상, 상온에서는 3주 이상 성분이나, 색도의 변화 등의 품질 변화 없이 유통 저장 할 수 있는 것으로 생각된다.

10. 색소와 식품 성분과의 상호작용연구 및 항산화성 조사

유색미와 백미의 혼합 식혜를 13종류 제조하여, 각 혼합 식혜의 이화학적 특성(Hunter value, 당도, 환원당량, pH)을 당화 시간에 따라 조사하였다. 유색미의 혼합 비율이 증가함에 따라, Hunter value의 L값은 감소하고 a값(적색도)은 증가하였으나, b값은 거의 변화가 없었다(Figure 4-1, 4-2). 특히, 수원415호 혼합 식혜의 경우 적색소가 많이 용출되어 당화시간에 따라 a값이 급격히 증가하였다. 유색미 식혜는 백미 식혜보다 당화 속도가 느리게 나타나, 유색미 식혜의 환원당량과 당도는 백미 식혜보다 낮았다(Figure 4-3). 모든 종류의 식혜에서 pH는 당화 3-4 시간에서 약간 증가한 후 서서히 감소하였다.

유색미 식혜의 기능성을 조사하기 위하여 동결 건조한 유색미 식혜와 백미 식혜 가루를 methanol로 추출하여 polyphenolic compound 함량을 정량하였다. polyphenolic compound의 함량은 수원100 식혜(수원415호:백미=4:0)와 수원75 식혜(수원415호:백미=3:1)에서 182μg/mℓ, 177μg/mℓ로써 가장 높았고, 백미 식혜에서 87μg/mℓ로써 가장 낮았다. 익산 식혜와 적미 식혜의 polyphenolic compound의 함량은 100μg/mℓ 정도로써 거의 비슷하였다.

동결 건조한 유색미 식혜 가루와 이것의 methanol 추출물 및 동결 건조한 백미 식혜 가루와 이것의 methanol 추출물을 linoleic acid - water emulsion에 첨가하여 thiocyanate method와 TBA method에 의한 항산화 활성을 측정하였다. 항산화력의 활성을 Inhibition Ratio(I.R.)로 나타낼 경우, 측정 13일째 control의 흡광도 값을 기준으로 하여 시료들의 흡광도 값의 차이를 control과 비교하여 percent inhibition ratio로 나타내었다. 동결 건조한 식혜 가루의 항산화 활성을 thiocyanate method에 의해 검정한 경우, 수원 유색미식혜의 I.R.은 96.3%, 익산 식혜의 I.R.은 95.7%, 적미 식혜의 I.R.은 95.1%, 백미 식혜의 I.R.은 91.6%이며, 항산화 활성 비교를 위해 사용한 합성 항산화제인 BHA 첨가군의 경우 I.R.은 84.9%로 유색미 식혜의 항산화 활성이 BHA보다 월등히 뛰어남을 알 수 있었다 (Figure 4-4). 동결 건조한 식혜 가루의 methanol 추출물의 항산화 활성을 thiocyanate method에 의해 검정한 경우, 수원 식혜의 I.R.은 92.3%, 백미 식혜의 I.R.은 75.7%, BHA 첨가군은 84.9%로써 수원 식혜에서 항산

Table 4-1. Sensory evaluation of Sikhye with various rices

	맛	향미	색깔	밥알의 삭은 정도	전체적인 기호도
백미	a 5.39±1.50	a 4.94±1.26	a 5.89±1.45	ab 5.44±1.25	a 5.78±1.26
수원 100	d 3.00±1.41	c 3.50±1.38	cdef 3.50±2.20	g 2.72±1.81	e 2.94±1.73
수원 75	bcd 3.94±1.39	bc 3.72±1.74	def 3.17±1.76	defg 3.22±1.52	de 3.11±1.23
수원 50	bcd 3.89±1.32	abc 4.11±1.37	ef 2.89±0.68	bcde 4.33±1.33	cde 3.22±1.06
수원 25	bcd 4.06±1.51	abc 4.44±1.29	cdef 3.39±0.92	abcd 4.39±1.79	bcde 3.78±1.17
익산 100	cd 3.28±1.57	bc 3.83±1.43	ef 2.89±1.37	efg 3.17±1.47	de 3.11±1.13
익산 75	bc 4.11±1.37	c 3.50±0.99	f 2.72±1.36	cdefg 3.61±1.58	bcde 3.56±1.04
익산 50	ab 4.44±1.54	abc 4.17±0.92	def 3.11±1.49	cdef 3.94±1.59	bc 4.17±1.34
익산 25	ab 4.50±1.38	abc 4.39±1.34	bcd 4.06±1.39	a 5.50±1.38	b 4.28±1.45
적미 100	bc 4.28±1.71	abc 4.44±0.92	cde 3.94±1.26	fg 2.83±1.98	bcde 3.78±1.40
적미 75	bcd 4.00±1.50	abc 4.39±1.20	bc 4.28±1.45	fg 2.89±1.61	bcd 3.94±1.39
적미 50	ab 4.83±1.30	ab 4.56±1.10	bcd 4.06±1.31	cdefg 3.67±1.72	b 4.44±1.15
적미 25	ab 4.94±1.06	abc 4.39±1.50	ab 5.06±1.59	abc 4.67±1.46	b 4.50±1.47

화 활성이 강하게 나타났다(Figure 5). 동결 건조한 식혜 가루의 항산화 활성을 TEA method에 의해 검정한 경우, 수원 식혜의 I.R.은 95.4%, 익산 식혜의 I.R.은 95%, 적미 식혜의 I.R.은 95%, 백미 식혜의 I.R.은 94.1%로써 유색미 식혜와 백미 식혜사이에 항산화 활성의 차이는 거의 없었다. 동결 건조한 식혜 가루의 methanol 추출물의 항산화 활성을 TEA method에 의해 검정한 경우, 수원 식혜의 I.R.은 91%, 백미 식혜의 I.R.은 86%, BHA의 I.R.은 91.1%로써 수원 식혜에서 항산화 활성이 강하게 나타났다.

11. 색소 첨가 식품 제조 공정 시험 연구

유색미 식혜의 제조 공정은 색소의 추출, 농축, 정제 과정이 없이 유색미를 2회 세척하여 1.2배의 물에 1시간 동안 침지시키고 1Kg/㎠2 의 압력에서 10분간 증자한 후, 엿기름 추출액을 첨가하여(1:8) 당화시켰다(60℃). 엿기름 추출액은 엿기름를 갈아서 40㎜esh(425㎛)를 통과한 엿기름 가루를 40℃에서 3시간 동안 추출한 뒤, cheese cloth를 이용하여 착즙하여 제조하였다. 백미 식혜의 표준 당화시간인 4시간 후에도 유색미 식혜의 당화는 계속 진행되어 유색미 식혜는 6-7시간의 당화시간이 요구되었다(Figure 4-3). 당화가 완료된 식혜는 밥알을 건져 물에 헹구어 준비하고, 당화액은 유리 vial에 넣어 끓는 물에서 10분 동안 살균 처리하였다. 이와 같이 제조된 식혜를 관능검사와 상온 및 냉장저장 실험에 사용하였다.

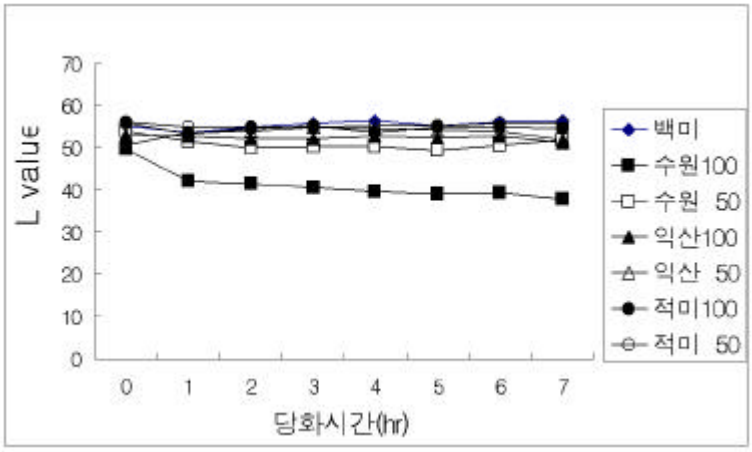


Figure 4-1. Color changes(L value) of Sikhye during saccarification

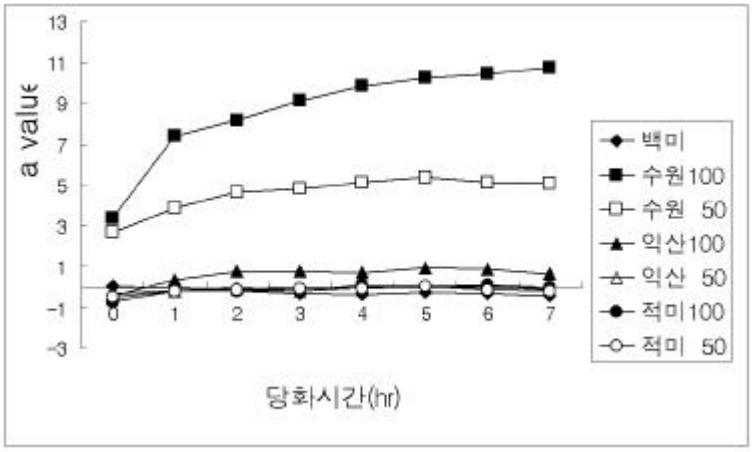


Figure 4-2. Color changes(a value) of Sikhye during saccarification

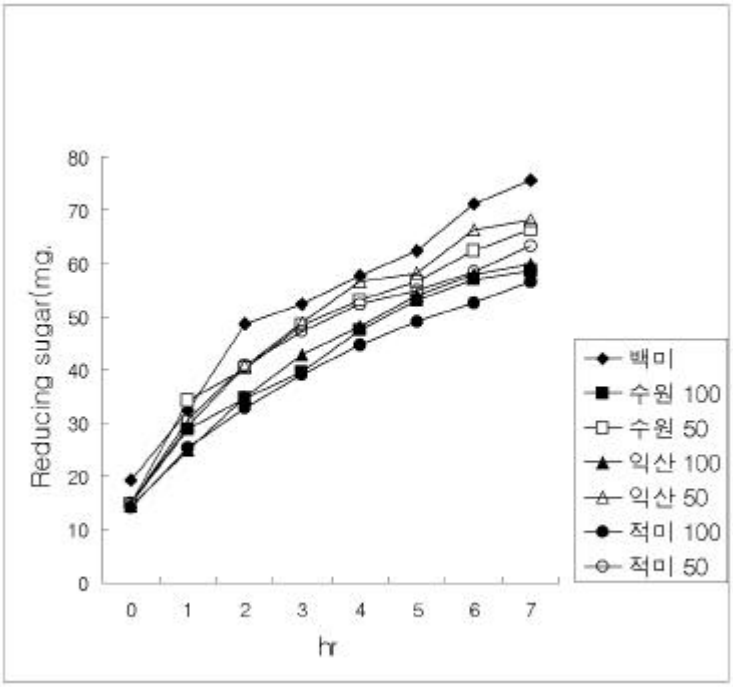


Figure 4-3. Changes in reducing sugars of Sikhye during saccarification

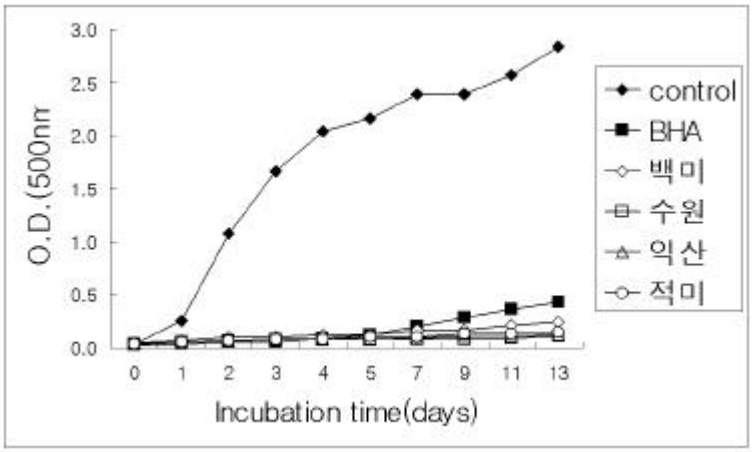


Figure 4-4. Antioxidative activity of freeze-dried Sikhye by thiocyanate method

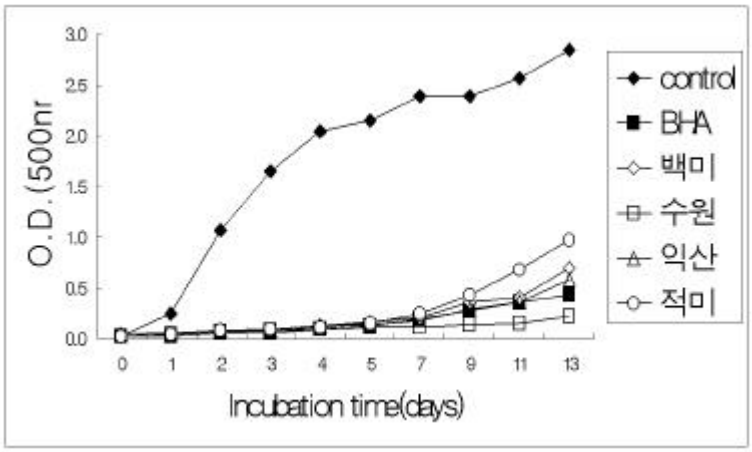


Figure 4-5. Antioxidative activity of methanol extract from Sikhye by thiocyanate method

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.

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

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