

633, 12
L 2936

GOVP 12010438

최 종
연구보고서

한국산 감잎으로부터 생리활성물질탐색 및 고기능성 음료개발에 관한 연구

Studies on Investigation into Biologically Activated
Substances from Korean Persimmon Leaves and
Developing High Function Beverages

연구기관

주관연구기관 : 영남대학교

협동연구기관 : 경산대학교

농 립 부



제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “한국산 감잎으로부터 생리활성물질탐색 및 고기능성 음료개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

1999. 12. .

주관연구기관명 : 영남대학교

총괄연구책임자 : 최 청

연 구 원 : 우 희 섭

연 구 원 : 손 준 호

연 구 원 : 박 무 희

연 구 원 : 최 희 진

연 구 원 : 조 국 영

연 구 원 : 배 두 경

협동연구기관명 : 경산대학교

협동연구책임자 : 배 만 중

협동연구책임자 : 안 봉 전

요 약 문

I. 제 목

한국산 감잎으로부터 생리활성물질탐색 및 고기능성 음료개발에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 중요성

1. 연구개발의 목적

차는 동양에서 처음으로 인류에게 알려진 녹차와 홍차의 건강증진 효과에 대해서는 오래 전부터 폭넓게 인식되어 왔으나, 최근에서야 그 효과를 뒷받침하는 연구들이 진행되고 있다. 그러나, 확실히 차의 생화학적 작용에 대한 이해와 차나무 *Camellia sinensis*에 존재하는 polyphenol류에 대한 연구가 깊게 진전됨에 따라서, 차의 규칙적인 섭취가 만성질환의 예방 및 건강증진에 도움을 줄 것이라고 하는 생각이 더욱 더 확고하게 되었다. 이와 관련하여 감잎은 녹차 이상으로 다양한 생리활성물질을 함유하고 있는 것으로 추정되며 감나무의 학명은 Diospyros로 Dios는 신이란 뜻이고 Pyros는 곡물이란 뜻으로 서양에서도 과실의 신이라 할 만큼 훌륭한 식품으로 여겨왔다. 감은 우리나라, 중국, 일본 등 동양권에 주로 성장하는 과일나무로써 특히 우리조상들은 밤, 대추와 함께 삼실과의 하나로 우리생활속에 깊이 뿌리 내려져 오고 있다.

감잎차에 대한 효능은 동의보감과 본초강목의 고문에 밝혀진 바와 같이 심장 및 신장병 등의 순환기 질환에 효능이 있을 뿐만 아니라 위궤양, 십이지장 및 당뇨병 등 만성질환에도 유효하며 심폐를 윤택하고 갈증을 그치게 하며 주독을 풀고 습장하여 설사를 멎게 한다고 한다.

따라서 본 연구의 목적은 한국산 감잎의 구성성분의 화학구조를 밝히

고, 그 생리 활성 기능을 확인함으로써 민간요법이나 한약에서 알려진 임상결과를 뒷받침하고 우리고유차의 명성을 알리며, 제약, 화장품 산업의 원료로 제공한다. 또한 고기능성 감잎음료의 생산 및 제품공정을 개발하기 위하여 제조시설 및 경제성을 분석하여 표준화된 음료개발로 국민 건강증진과 농가소득 신규사업으로 크게 기여할 것이다.

2. 연구개발의 중요성

1) 기술적 측면

- 우리고유 전통차의 산업화로 인한 노하우 함양
- 생리 활성물질 분석 기술 증진
- 감잎에 함유된 새로운 물질 규명
- 품종, 지역, 기후, 토양에 따른 감잎의 성분 차별화 지식 습득
- 생리기능 실험에 의한 대사경로 규명
- 한국산 전통 감잎차의 고기능성 구명 및 대량 생산 기술확립

2) 산업적 측면

- 감잎차는 이미 잘 알려진 녹차의 생리기능보다 우수하다는 것을 보여 주므로 세계속의 우리 고유차로 인정받을 계기를 마련
- 감잎의 구성성분을 확실히 규명함으로써 이 성분을 이용한 또다른 용도로써의 산업화에 기여
- 감잎을 이용한 민간에서의 약리효과는 체계적인 근거가 미흡하여 아직 알려지지 않은 생리기능을 밝히고 쉽고 간단하게 접할 수 있는 음료개발로 농가소득에 기여
- 감잎의 폐자원을 이용함으로써 농가소득 증대와 수출로 국익 선양

3) 사회, 문화적 측면

- 현대인의 성인병에 대처 할 수 있고 친근하게, 쉽게 접할 수 있는 성인병 예방음료로서의 효과에 기대

- 젊은 여성들의 피부미용에 좋다는 결론을 규명함으로써 우리 고유차의 확산과 외래 음료보다 우수함을 인식 시키는데 기여
- 감잎에 함유된 성분이 충치 및 구강 질환예방에 관한 효과입증으로 국민 구강보건에 기여 할 뿐만 아니라 민족의식 고취에 기여

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구의 주요내용은 감잎으로부터 생리활성물질의 분리 및 화학구조 결정, 생리활성물질의 검증 및 고기능성 감잎차 음료개발 등의 세가지 연구분야로 구성하였으며 각 연구분야별 연구개발 내용 및 범위는 다음과 같다.

1차년도

제 1 세부과제 : 생리활성물질의 분리

- 1) 감잎의 아세톤 추출물의 분리
- 2) 효소저해 활성 측정
- 3) Thiolysis에 의한 thiolether유도체 형성 및 정제
- 4) 저해물질의 부분정제, 흡광도 분포측정
- 5) TLC에 의한 polyphenol류 동정
- 6) 생리활성 물질의 분리 및 정제

제 2 세부과제 : 생리활성 물질의 면역기능

- 1) 시료투여 및 면역유발과정
- 2) 복강내 침출세포 조제, 비장 세포 조제, Thymus cell 부유액 조제
- 3) 세포성 면역시험
- 4) Macrophage계 세포활성능
- 5) 알러지 관련시험

제 3 세부과제 : 생리활성물질의 화학구조 결정

- 1) 품종별 감잎의 성분분석
- 2) 생리활성 물질의 물리 및 화학적 성질
- 3) 분리정제 물질의 효소저해 실험

2차년도

제 4 세부과제 : 생리활성물질의 중금속 제거 효과

- 1) 실험동물 사육 및 중금속의 투여방법
- 2) 실험동물에서 각종 장기의 채취
- 3) 각종 장기의 카드뮴 및 납의 함량 분석
- 4) 변의 카드뮴 및 납의 함량 분석
- 5) 체내 중금속의 흡수율 및 보유율

제 5 세부과제 : 생리활성물질의 항균, 항산화 및 항암효과

- 1) 항균효과시험
- 2) 생리활성 물질의 항산화 효과
- 3) Sarcoma 180에 의한 항암 실험

제 6 세부과제 : 고기능성 감잎차 음료 개발

- 1) 고기능성 감잎차 음료 제조
- 2) 제품의 화학적 분석
- 3) 제품의 안정성

3차년도

**제 7 세부과제 : 고기능성 감잎차 음료의 향기성분 및 관능검사에 의한
품질평가**

- 1) 제품의 향기 분리

- 2) 제품의 향기성분 동정
- 3) 관능검사에 의한 품질평가

제 8 세부과제 : 생리활성물질의 지질대사에 미치는 영향

- 1) 혈장 및 간장에서의 지질 분석
- 2) 분변에서의 지질 분석
- 3) Total protein 및 albumin 정량

제 9 세부과제 : 고기능성 감잎차 음료의 생산 및 제품공정개발

- 1) 표준 제품의 공정개발
- 2) 공정 기술개발 및 현장적용 시험
- 3) 포장연구 및 경제성 분석

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발결과

1) 생리활성 물질의 분리

감잎으로부터 60%의 아세톤을 가해 추출한 용액을 동결건조시켜 농도별로 조제하고 glucosyltransferase, tyrosinase, xanthine oxidase 및 angiotensin converting enzyme(ACE)의 효소저해를 갖는 생리활성물질을 Sephadex G-50으로 gel filtration한 결과 효소저해 활성물질로 생각되어지는 화합물은 polyphenol 이라 추정하게 되어 polyphenol류 분리방법에 의해 단일 물질을 분리하였다.

Sephadex LH-20, MCI-gel 및 Bondapak C₁₈ column에 의하여 F-1, F-2, F-3의 fraction으로 분획한 후 F-1 fraction에서 compound 1~4까지 4종류의 화합물, F-2 fraction에서는 compounds 5, 6화합물, F-3 fraction에서 compound 7, 8, 9화합물을 순수정제하여 재결정하였다.

이러한 결과는 분리된 화합물이 flavan-3-ol 골격을 기본으로하는 축합형 탄닌으로 반응색으로 붉은 정도와 선명도를 보아 화합물 B환에

hydroxyl기가 1개가 더 결합하고 있거나 다른 부위에 gallate가 함유한 화학구조로 추정되었다. 이와 같은 방법으로 식품신소재로써 한국산 감잎으로부터 생리활성물질을 분리하는 획기적인 해결방안을 제시할 수 있었다.

2) 생리활성물질의 면역기능

감잎의 polyphenol 화합물이 면역기능에 미치는 영향에 관한 실험에서는 감잎으로부터 분리된 polyphenol 화합물 I, II 및 III에 대하여 항체 생산능을 실험한 결과 대조군에 비하여 시료를 투여한 군에서 항체생산이 증가하였다. 또한 면역기능을 담당하는 기관인 비장에 관한 세포증식능을 실험한 결과 대조군에 비하여 시료를 투여한 모든 군에서 비장세포가 증가하였으며, 시료의 농도가 증가할수록 세포증식도 증가되는 경향을 나타내었다. Rosette 형성, Candida에 대한 탐식효과, Macrophage계 세포활성능 및 알레르기 저해효과에서 특히, fraction II와 III에서 높은 유의성을 갖는 저해효과를 나타내었다.

항원으로 면역시킨 후 시간의 경과에 따른 피부조직학적 변화를 관찰한 결과, 피부조직의 비만세포 분포에서도 대조군에 비하여 감잎 polyphenol 화합물 투여군에서 매우 적은 수가 확인되었다.

따라서 감잎의 polyphenol 성분은 실험동물에서 면역기능의 활성을 증가시킴으로서 강력한 면역기능을 발현할 것으로 예상된다.

3) 생리활성물질의 화학구조 결정

한국산 감잎을 청도반시, 상주등시 및 부유의 3품종으로부터 고기능성 감잎차 음료를 개발할 목적으로 유리당, 총 비타민 C, 유리 아미노산 등 차의 맛과 기능적 특성을 나타내는 성분변화를 조사하였다. 비타민 C의 함량은 개화기 초기부터 차차 증가하여 7월에 최고치를 나타내었으며, 부유단감이 7월을 기준으로 2,249 mg%로 가장 많았으며 3품종 모두 7월까지 차차 증가하다가 감소하였다. 감잎의 유리 아미노산의 종류는 3품종 모두 18개의 유리 아미노산이 검출되었다. 이상의 결과에서 감잎의

대부분의 성분들이 6월에서 7월 초순에 최고치를 나타냄으로 감잎을 이용한 감잎차 및 감잎을 이용한 고기능성 음료개발을 위해서 감잎의 적절한 채취 시기는 6월이라고 생각된다.

감잎으로부터 통풍치료, 미백효과, 고혈압 억제효과의 개발목적으로 9종의 flavan-3-ol 화합물을 분리하였고 기기분석에 의해 화학구조를 밝혔다. 각 화합물은 (+)-catechin, (+)-gallocatechin, procyanidin B-1, pyrocyanidin C-1, prodelpinidin B-3, gallocatechin-(4 α →8)-catechin 과 신물질인 procyanidin B-7-3-O-gallate, procyanidin C-1-3'-3''-3'''-O-trigallate, (-)-epigallocatechin-(4 β →8)-epigallocatechin-(4 β →8)-catechin 3종류를 발견하였다. 감잎으로부터 순수 분리한 polyphenol 류의 ACE 저해활성측정을 실험한 결과 procyanidin B-7-3-O-gallate는 100 μ M 농도에서 94%의 저해효과를 나타내었으며 epigallocatechin-(4 β →8)-epigallo-catechin-(4 β →8)-catechin, procyanidin C-1-3'-3''-3'''-O-trigallate는 각각 90.69, 80.90% 저해를 하였다. Xanthine oxidase 저해활성측정을 조사한 결과 procyanidin B-7-3-O-gallate와 procyanidin C-1-3'-3''-3'''-O-trigallate 즉, gallate가 붙은 호합물에서 100 μ M의 농도에서 66%와 63%의 강한 저해효과를 나타냈다. Tyrosinase 저해활성을 측정 한 결과는 procyanidin C-1-3'-3''-3'''-O-trigallate는 100 μ M에서 70%의 강한 저해효과를 나타냈으며, epigallocatechin-(4 β →8)-epigallo-catechin-(4 β →8)-catechin는 51%의 저해효과를 나타내었다.

따라서 감잎의 polyphenol 화합물의 신물질 3종류를 실험동물로 실험한 결과 혈압강하, 미백효과 및 통풍예방에 탁월한 효과를 나타내었으므로 현대인의 성인병 예방 치료의약품개발은 물론 성인병 예방의 효과가 기대된다.

4) 생리활성물질의 중금속 제거효과

감잎으로부터 polyphenol 화합물을 분리하여 중금속 제거효과에 관하여 동물실험을 통한 그 안전성 및 기능성을 검토하였다. 카드뮴을 단독

투여한 대조군 대하여 카드뮴에 감잎을 병합 투여한 F-1군과 F-2군 모두 식이섭취량은 1% 수준에서 유의적으로 감소하였고, 체중증가량은 카드뮴이 식이에 첨가됨으로써 실험동물의 성장에 영향을 주었다.

간, 신장 그리고 대퇴골의 카드뮴 함량을 분석한 결과 카드뮴을 단독 투여한 대조군에 대하여 F-1군과 F-2군 모두 1% 수준에서 유의적으로 감소하였으며, 간, 신장 및 대퇴골에서도 대조군에 대하여 현저하게 카드뮴의 함량이 감소하였다. 변의 카드뮴 함량을 분석한 결과 대조군에 대하여 F-1군과 F-2군 모두 1% 수준에서 유의적으로 증가하였으며, F-1군이 42% 그리고 F-2군은 54% 증가하였다.

따라서 감잎의 polyphenol 화합물이 카드뮴 제거효과가 탁월하였으므로 국민 보건에 기여할 것으로 생각된다.

5) 생리활성 물질의 항균, 항산화 및 항암효과

한국산 감잎으로부터 생리활성 물질을 분리하여 면역능 저하 또는 이상이 있는 경우나 당뇨병, 균 교대현상의 결과에서 볼 수 있는 *C. parapsilosis* 및 *C. albicans*에 대한 항균효과를 실험한 결과 대조군에 비하여 polyphenol 화합물 II 및 III에서 유의성이 인정되지 않는 범위에서 억제하였다. 감잎으로부터 polyphenol 화합물군을 분리 및 정제하여 항산화 효과에 관한 실험인 전자공여능 실험을 행한 결과 polyphenol 화합물군 I에서 가장 높은 전자공여능을 갖는 것으로 나타났고, 지방산화에 미치는 영향을 관찰하고자 면실유, 아몬드유 및 어유에 대한 감잎 polyphenol 화합물이 대조군에 비하여 모든 실험군이 항산화 효과가 높았다.

Sarcoma 180으로 유도된 마우스의 체중증가량에서는 대조군에 비해 시료 투여군에서 다소 낮은 경향을 보였으며, 수명연장 효과에서도 대조군에 비해 감잎 polyphenol 화합물 I은 37.3%, II는 70.4%를 비롯하여 fraction III에서는 42.9%의 수명연장 효과를 나타내었다. 그러므로 동물 실험에서 암예방효소계의 활성을 증가시킴으로써 강력한 암예방효과를 발현할 것으로 예상된다.

6) 고기능성 감잎 음료 개발

한국산 감잎을 이용하여 고 기능성 음료를 개발하기 위하여 추출시간 1.5~2.5시간, 추출온도 70~90℃ 및 에탄올농도 0~40% 세가지 조건을 요인변수로 하고 감잎의 몇가지 기능적 특성을 반응변수로 하여 중심합성계획에 의한 반응표면분석법으로 감잎의 추출조건을 최적화 하였고 최적추출조건을 확립한 후 이를 바탕으로 고 기능성 감잎 음료를 개발하였다.

감잎 추출물의 가용성 고형분 함량, 탁도, 수용성 탄닌 함량, 전자공여능, xanthine oxidase 저해율, ACE 저해율 등을 모두 만족시키는 추출조건을 예측하여 보았을 때 추출시간 2시간, 추출온도 78~81℃, 에탄올 농도 33~35%로 나타났다.

최적 추출조건에 의한 감잎 음료 개발에 관한 관능검사 실험에서는 추출물의 농도 10%가 감잎의 향과 맛의 정도가 가장 적당한 것으로 나타났다. 당의 농도는 4.5%, 적정향료와 과즙첨가 시험에서는 사과향이 감나무 잎과 가장 잘 어울리는 것으로 판단되었고 사과과즙 첨가량은 15%가 가장 적당한 것으로 판단되었다.

7) 고기능성 감잎음료의 향기성분 및 관능검사에 의한 품질평가

감잎음료를 제조하여 5℃에서 보관하면서 시료를 채취하여 gas chromatography(GC)와 gas chromatography-mass spectrum(GC-MS)을 이용하여 향기성분의 원인 물질을 분리, 동정하였고 관능검사를 실시하여 음료의 품질을 평가하였다.

감잎의 향기성분의 동정은 GC-MS의 전자충격 ion화법과 화학 ion화법으로 분석된 massspectrum 분석 결과, 감잎의 향기성분으로 (E)-hexenal 등을 포함한 17종과 음료에서는 7종의 주된 peak를 잡을 수 있었다. 감잎의 주된 향기 성분으로는 (E)-2-hexenal 59.6%로 그 함량이 가장 많았고, α -farnesene, hexanal, butylated hydroxytoluene 순으로 많았다. 음료의 주성분은 2,4-dimethyl-1H-imidazole, 3,7-dimethyl-1,6-octadien-3-ol, (S)-4-trimethyl- α, α -3-cyclohexene-1-methanol로 주로 방향족성과 hydrocarbone alcohol이 주류를 이루고 있었다.

고기능성 감잎음료의 관능검사에 의한 품질평가에서 지역과 연령별 관능검사 결과, 지역에 따른 유의적인 차이가 없었으며 연령에 따라서는 10대를 제외하고는 유의적인 차이가 없이 좋은 반응을 보였다.

8) 생리활성물질의 지질대사에 미치는 영향

한국산 감잎으로부터 polyphenol 화합물군을 분리 및 정제하여 5주간 고지방 식이를 한 후, 혈장 및 간장에서의 지질대사에 미치는 영향을 분석한 결과 혈장에서는 polyphenol 화합물군 II에서 총지질, 총콜레스테롤이 유의성 있게 감소하였다. 또한 간장에서는 총지질, 중성지질이 대조군에 비해서 유의성 있는 결과가 나타났다. 5주 동안 고지방 식이를 한 후 분변을 채취하여 총지질, 총콜레스테롤 및 중성지질을 측정된 결과 감잎에서 추출한 polyphenol 화합물 군이 고지방식이 만을 섭취 시킨 대조군에 비해 다소 감소되는 경향을 보였다. 감잎 화합물군을 섭취시킨 후 총단백질과 알부민 함량을 측정된 결과 대조군과 실험군에서 유의성 있는 차이는 나타나지 않았다.

9) 고기능성 감잎음료의 생산 및 제품공정개발

고기능성 감잎음료의 생산 및 제품공정을 개발하기 위하여 감잎 캔음료 제조시설, 생산자동공정 및 경제성 분석을 하였다. 감잎음료의 제조 배합비율은 관능검사를 실시한 결과, 감잎추출물 10.0%, 설탕 4.5%, 구연산 나트륨 0.05%, 사과향 0.05%, 사과주스 15.0% 및 비타민 C 0.05% 일 때 가장 우수하였으므로 이것을 배합조에 섞어 최종 pH가 3.5~4.0이 되도록 하여 이를 40~50℃로 예열 및 탈기시틴다음 고압증기로 살균한 후 냉각 포장한다. 고기능성 감잎차음료의 포장은 이용면에서의 편리성, 판매촉진효과 및 장기간 저장등을 고려할 때 캔으로 포장한 제품이 제일 좋은 것으로 판단되었다.

감잎차의 경제성 분석은 감잎원료를 음지에 건조한 후 절단하여 가열수에서 35%의 에탄올로 추출한 다음 제품에 대하여 소비되는 비용을 계산하고 적정이익을 얻고져 판매가격을 추정하였다.

감임음료의 생산량은 원료기준으로 1일 30kg, 가공수율은 감잎을 에탄올 추출 후 에탄올을 제거하고 원료액이 2°Brix(20 l/kg)가 되도록 보정한다. 작업시간은 1일 8시간이며 주 44시간 근무, 감잎음료가공 기간은 6월부터 8월까지 3개월, 감잎의 원료가격은 500원/kg으로 설정하였다. 가공조건은 첨가물을 가하여 가공하였을 때 1일 순수익은 1,405,673원 이었다. 분석에 사용된 자료가운데 고정투자비, 포장재료 및 유틸리티 단가 등 공장의 시설여건과 포장단위 또한 정부에서 고시하는 가격의 변동 등으로 다소의 오차가 있을 것으로 생각된다.

2. 활용에 대한 건의

본 연구를 통하여 고부가가치의 기능성 감잎차 음료를 개발·생산함으로써 국민의 식생활개선과 보건향상에 기여할 수 있다. 본연구에 의하여 이루어진 기술은 농산물 및 농산물 폐자원을 활용하여 고부가가치의 감잎차 생산은 물론 감잎으로부터 분리정제한 polyphenol 화합물이 혈압상승 억제효과, 항암효과 및 면역기능의 활성을 증가시킴으로써 강력한 암 예방 효과를 발현할 것으로 예상됨으로 영세농업 지원전략에도 활용할 수 있다.

산·학·연의 관련 전문인력을 유기적으로 연결하여 전문 기술인력의 양성과 연구수행 중에 수집한 고급정보와 기술은 국내 감잎 관련분야 정보의 데이터베이스로 활용할 수 있다. 3년간의 기반 연구가 완료되었으므로 기업체와 협동연구로 대량생산을 위한 산업화에 대한 연구를 수행할 예정이다. 또한 상기의 생리적 효능이 있는 감잎차 음료제조기술을 산업체에 이전하여 제품화 할 수 있도록 기술지원을 하여 상품화 할 수 있다.

기능성 식품신소재로써 뿐만아니라 고기능성 감잎음료를 발명특허를 제출함으로써 산업재산권 확보를 할 계획이며 감잎의 생리활성물질의 우수성을 적극적으로 홍보해야 할 것이다.

SUMMARY

I . Title

Studies on Investigation into Biologically Activated Substances from Korean Persimmon leaves and Developing High Function Beverages

II. Objectives and Significance

There was much understanding of the health improvement effects of green tea and black tea that had originally been known to man in the Orient; not until very recently have the studies of proving those effects been under way. However, with the better understanding of the biochemical action of tea and with the further studies if polyphenol existing in *Camellia sinensis* in progress, the theory have been established that the regular intake of tea could be conducive to improvement in health and the prevention of chronic diseases. With regard to this, persimmon leaves are thought to contain even much more kinds of physiologically activated substances than green tea.

The scientific name of persimmon trees is Diospyros, a compound of the word 'Dios' meaning a god and the word 'Pyros' meaning grain, so that in the occident persimmons have also been considered as quality food that can deserve the name of the god of fruit. They grow usually in the oriental regions such as China, Japan, and Korea, and especially in Korea have been regarded as one of the three primary fruits including jujubes and chestnuts. Indeed, they have had a significant meaning in the Korea's life since the beginning of history.

Persimmon tea is good for the chronic diseases like ulcer, duodenitis, or diabetes as well as the diseases related to the

circulatory organs like heart or kidney diseases, the improvement of heart-lung function, the appeasement of thirst, the mollification of alcoholic poisoning, the stopping of diarrhea by moistening the intestines, all of which are also described in the archaic writings, *Ponchogangmok* and *Donguibogam*. Thus the purpose of this study are to back up the clinical results proven in folk remedies and herbal medicine, to elevate the image of our traditional tea throughout the world, and to provide persimmon tea for cosmetical industries by analyzing the chemical structure of the components of Korean persimmon tea and by establishing its biologically activated function. Furthermore, the other purposes are to develop the production and process of persimmon tea through the analysis of the manufacturing facilities and the economical efficiency and ultimately to contribute to the national health improvement and to serve as a brand-new agribusiness as well as a sound income source.

III. Results and Proposal for Future Application

1. Results

1) The isolation of biologically activated substances

The lyophilization of the solution extracted from 60 percent of acetone applied to persimmon leaves, the compounding process in accordance with the solution's concentration, and the gel filtration through Sephadex G-50 of biologically activated substances obstructing enzyme action, such as glucosyltransferase, tyrosinase, xanthine oxidase, and angiotensin converting enzyme (ACE) led to the assumption that polyphenol was the compound serving as biologically

activated substances obstructing enzyme action. Thus monosubstances were separated by the same means of polyphenol separation on the basis of that assumption.

Four kinds of compounds, compound 1, 2, 3, and 4, from F-1 fraction, compounds 5 and 6 from F-2 fraction, and compounds 7, 8, and 9 from F-3 fraction were purified and re-crystallized after those compounds were fractionated as three fractions, F-1, F-2, and F-3.

It drew the deduction that judging from the degree of red color and definition of the compounds during the reaction period the separated compounds was tannin, a condensate, on the basis of the frame flavon-3-ol, having either of the chemical structures, one more hydroxyl added to compound B, or gallate added to the other parts. Finally these means brought an epoch-making solution to separating biologically activated substances from Korean persimmon leaves.

2) Immunofunction of biologically activated substances

This study was conducted to investigate immunofunctional activity of the polyphenol fractions isolated from persimmon leaves. In the experimental of rosette forming cell, the results showed that all the polyphenol fractions enhance the cell count compared with the control group. The phagocytic activity of peritoneal macrophage on mice was significantly increased by the polyphenol fractions of persimmon leaves compared with that of the control group. Especially polyphenol fraction II and III showed highly significant effect on rosette forming cell, phagocytic activity and allergy inhibition.

Allergic contact dermatitis is a common skin disease resulting from specific immunologic sensitization due to topically applied allergens. Here the contact hypersensitivity was assayed and abdominal skin morphological changes including mast cells were examined. The

number of mast cells was significantly decreased in the sample groups than the control group.

3) Analysis of chemical structure of biologically activated substances

A functional and taste related composition was determined to investigate the possibilities of developing a high functional beverage from Chungdo Bansi, Sangju Dungsil and Buyu during growth. Moisture content decreased continuously from 77.9% to 80.1% at the beginning of May during growth. Crude protein and fat contents in the three species gradually increased according to growth until August. There were four sorts of free sugar components which were sucrose, glucose, fructose and raffinose in the three species. Buyu's sucrose content was each 1378, 143 times higher than Chungdo Bansi and Sangju Dungsil by the standard of July. Vitamin C content in the three species gradually increased from the flowering time and was the highest content in July. The sorts of free amino acids in persimmon leaves were detected eighteen free amino acids in all three species. As a result, the materials of persimmon leaves exhibited the highest component from June to July and Buyu of them excelled in a lot of composition.

Xanthine oxidase involved in purine metabolism oxidizes hypoxanthine to xanthine and xanthine to uric acid. In the continuous study for natural compound, nine flavan-3-ols have been isolated from the persimmon leaves. The structures of (+)-catechin, (+)-gallocatechin, procyanidin B-1, pyrocyanidin C-1, prodelphinidin B-3, gallocatechin-(4 α →8)-catechin, procyanidin B-7-3-O-gallate, procyanidin C-1-3'-3''-3'''-O-trigallate and (-)-epigallocatechin-(4 β →8)-epigallocatechin-(4 β →8)-catechin were established by NMR and

their inhibitory effect on xanthine oxidase activity was investigated.

Procyanidin B-7-3-O-gallate, (-)-epigallocatechin-(4 β →8)-epigallocatechin-(4 β →8)-catechin and procyanidin C-1-3'-3''-3'''-O-trigallate showed 94%, 90.69%, 80.90% inhibition at 100 μ M and inhibited on the angiotensin converting enzyme respectively. Procyanidin B-7-3-O-gallate and procyanidin C-1-3'-3''-3'''-O-trigallate showed 66%, 63% inhibition at 100 μ M and inhibited on the xanthine oxidase competitively. Procyanidin C-1-3'-3''-3'''-O-trigallate showed 70% inhibition at 100 μ M and inhibited on the tyrosinase competitively.

4) Effect of removing a heavy metal of biologically activated substances

In order to inspect safety and function regarding effect of removing a heavy metal of polyphenol compound separated from persimmon leaves, animal test was done. Group F-1 and F-2 are treated with cadmium and polyphenol compound. A control is just treated with camium. The food intake of group F-1 and F-2 considerably decreased within 1% level. Cadmium addition influenced within increase that caused from a rat growth, but food efficiency ratio(FER) wasn't shown any considerable difference in F-1 and F-2, as compared to the control.

Cadmium content of liver, kidney and femur considerably decreased within 1% level in F-1 and F-2, compared to the control, cadmium content of liver decreased 25% in F-1, 28% in F-2 also decreased 22% and 25% in kidney. In femur, that decreased 53% in F-1 and 59% in F-2. The test of cadmium content in feces indicate that the content considerably increased within 1% level in both group F-1 and F-2, as compared to the control(42% in F-1, 54% in F-2).

5) Effect of anti-bacterial and anti-oxidative

This study was conducted to investigate anti-bacterial on *Candida parapsilosis* and *Candida albicans* of the polyphenol fraction isolated from persimmon leaves. The results showed slightly lower in polyphenol fraction II and III groups as compared with the control group. Electron donating ability of the polyphenol compounds by TBARS(thiobarbituric acid reactive substance) was the highest the polyphenol fraction III.

The anti-oxidative activity of the polyphenol fraction I, II and III on cottenseed, linseed and fish oils were higher than that of the control group. Antitumor effects of polyphenol fractions from persimmon leaves were studied by using sarcoma 180. The body weight of the mice implanted mice sarcoma 180 was slightly lower in polyphenol fraction I, II and III groups as compared with the control group. The life prolongatin effects of the polyphenol fraction I, II and III were 37.3%, 70.4% and 42.9% respectively when polyphenol fraction I, II and III wer intraperitoneally injected to the mice. This results indicated that polyphenol fractions showed the strongest anti-tumor.

6) The development of high function persimmon leaf beverages

The efforts were made to develop high function persimmon tea after the time of extraction(1.5~2.5hrs), the temperature of extraction (70~90°C), and the concentration of ethanol were taken as three primary variables, several functional characteristics of persimmon tea were taken as reaction variables, the conditions of extraction was best fitted by using surface reaction analysis through the center synthesis plan, and the optimal conditions of extraction were established.

The conditions of extraction assumed to meet the content of the soluble solidity of extract, the turbidity, the content of water-soluble tannin, electron donating ability, and the rate of obstruction of XOase and ACE were that the extraction time was two hours, the extraction temperature 75~81℃, and the ethanol concentration 33~35%. Each of the reaction variables assumed before the experiment was almost equivalent to the results drawn from extraction experiments repeatedly conducted three times at the arbitrary optimal point (the extraction time of 2 hours, the extraction temperature of 80℃, the ethanol concentration of 34%) to prove the reliability of regression formulae.

The result of organic function test for the development of persimmon beverages under the optimal extraction conditions showed that when the concentration of extracts was 10%, the aroma and flavor of persimmon leaves was best; the concentration of sugar was 4.5%. The result of the experiment to find out the appropriate level of spice and fruit juice to add showed that the aroma of apples was best-matched to persimmon leaves and the most appropriate amount of apple juice to add was 15%.

7) The quality appraisal through the aroma ingredients and the organic function test of high fuction persimmon leaves

The sound substance of aroma ingredients by means of gas chromatography(GC) and gas chromatography-mass spectrum(GC-MS) was analyzed and the quality appraisal was made by means of the organic function test after the extraction of the sampler of persimmon beverages that was preserved at 5℃.

The result of the analysis of massspectrum analyzed with electroshock ionization of GC-MS and chemical ionization revealed

that persimmon leaves consisted of 17 kinds of aroma ingredients including (E)-hexenal and the persimmon beverages 7 main kinds of aroma ingredients. Of the main aroma ingredients of quality appraisal persimmon leaves, the content of (E)-2-hexenal that amounted to 59.6% was the first largest, a farnesene the second largest, hexenal the third largest, butylated hydroxy toluene the fourth largest. The main ingredients of beverages were 2,4-dimethyl-1H-imidazole, 3,7-dimethyl-1, 6-octadien-3-ol, (S)-4-trimethyl- α , δ -3-cyclohexene-methanol, all of which contained hydrocarbon alcohol aromatic.

The result of the quality appraisal of high function persimmon leaf beverages through the organoleptic function test conducted by regional groups and by age groups revealed that there was no significant difference related to regions and also no significant difference related to age but the teens, which came to the conclusion that the reaction of subjects was quite satisfactory.

8) Effect of lipid metabolism on biologically activated substances

This study was conducted to investigate the effects of the polyphenol fraction isolated from persimmon leaves on the reduction of fat accumulation in rats fed on high fat diet for 5 weeks. It was to examine metabolism by analyzing biochemically the fat composition in serum, liver and feces. It was shown that the levels of total lipid and total cholesterol in serum was remarkably reduced in polyphenol fraction II as compared with the control group. The liver was that the levels of total lipid and triglyceride was significantly lower than the control group.

The contents of total lipid, total cholesterol and triglyceride in feces were tended to be slightly increase polyphenol fraction compounds compared to control group. In the total protein and albumin, all

experimental groups were lower compared to control group, which were not significant.

9) The production and the development of the goods process of high function persimmon leaf beverages

The production facilities, the automatic process of production, and economical efficiency were analyzed to develop the production and goods process of high function persimmon leaf beverages. The combination of ingredients of persimmon beverages on the basis of the results of organic function test consisted of 10.0% of persimmon leaves extract, 4.5% of sugar, 0.05% of sodium citric acid, 0.05% of apple aroma, 15.0% of apple juice, and 0.05% of vitamin C, all of which were preheated under the condition in which the final pH was kept between 3.5 and 4.0, sterilized by high pressure steam, and finally wrapped.

As far as the wrapping of the persimmon beverages was concerned, the canned goods proved the best, considering the convenience for use, the sales promotion effect, and the long period of preservation. The analysis of the economical efficiency of persimmon tea to get reasonable profit was made by calculating the manufacturing cost and by estimating the consumer price after drying the raw materials of persimmon leaves in the shade, cutting, extracting from heated water by 35% of ethanol.

Under the condition in which raw material combined with additions was processed. Of all the data used for the analysis, the facilities conditions of factories, such as the fixed amount invested, the wrapping material, and the unit price of thought to have some error due to the fluctuation of price announced by the government.

2. Proposal for future application

The development and production of functional persimmon leaf beverages through this study of high value added can contribute to the betterment of the national eating habits and the improvement of the national health. The technology acquired by this study can be used as part of the strategies for supporting farmers who have gone through financial difficulty by producing the persimmon tea of high value-added through the reusing process of waste resources as well as by extracting polyphenol, a compound isolated refined from persimmon leaves which is believed to keep blood pressure from going up, to be anti-cancer, and to increase immuno-competence.

Technical experts can be trained by organically connecting groups of educational-industrial-research institutional professions. The significant information and technology acquired during the study period can be used as the database for the fields related to domestic persimmon leaves. Now that three year key study was final finished, not only is the educational-industrial study of industrialization for massproduction supposed to begin but also it is supposed to initiate industrial organizations of persimmon tea beverages having biological effects mentioned earlier with the purpose of manufacturing profitable persimmon tea beverages.

The industrial property right is to be secured by applying for both patents on high function persimmon tea beverages as well as brand-new functional food material.

Furthermore, much demand for to be made by actively publicizing the superiority of the biologically activated substances of persimmon leaves and by processing persimmon leaves as materials for medicine and food.

CONTENTS

Chapter 1 Introduction	38
Section 1 Objective and scope of this study	38
Section 2 Background of this research	43
Section 3 References	44
Chapter 2 Isolation of biologically activated substances	47
Section 1 Objective and scope	47
Section 2 Methods	48
1. Materials	48
2. Isolation of acetone extract of persimmon leaf	48
3. Inhibition of enzyme activity	48
1) Glucosyltransferase	48
2) Tyrosinase	49
3) Xanthine oxidase	49
4) Angiotensin converting enzyme(ACE)	50
4. Isolation and thiolysis of the derivatives	50
5. Desulfurization	50
6. Isolation of fraction by Sephadex G-50	50
7. UV-spectrum of acetone extract of persimmon leaf	51
8. Identification of polyphenol compound by TLC	51
9. Isolation of biologically activated substances	51
1) Isolation of polyphenol by Sephadex LH-20	51
2) Isolation of polyphenol by MCI-gel CHP 20P	52
3) Isolation of polyphenol by Octadecyl silica gel(ODS)	52

4) Toyoperal HW 40(TSK gel)	52
Section 3 Results and discussion	52
Section 4 Conclusions	64
Section 5 References	65
Chapter 3 Immunofunction of biologically activated substances	67
Section 1 Objective and scope	67
Section 2 Methods	68
1. Materials and animals	68
2. Sample administration and procedure of antigen challenge	68
3. Preparation of peritoneal exudative cells	68
4. Preparation of spleen cells	69
5. Preparation of thymus cell	69
6. Cell mediated immunity tests	69
1) Plague forming cell	69
2) Rosette forming cell	70
3) Antibody production	70
7. Cell activation of macrophage	70
1) Phagocytic activity	70
8. Allergy tests	70
1) Preparation of antigen	70
2) PCA(Passive cutaneous anaphylaxis) test	71
3) Histamine on blood	71
Section 3 Results and discussion	71
Section 4 Conclusions	83
Section 5 References	83

Section 2	Methods	125
1.	Preparation of sample	125
2.	Materials and animals	126
3.	Composition of basal diet and dosage of heavy metal	126
4.	Determination of food intake and body weight	128
5.	Food efficiency ratio	128
6.	Picking of liver, kidney and femur in experimental rats	128
7.	Picking of fecal	128
8.	Cadmium contents of liver, kidney and femur	128
9.	Cadmium contents of fecal	129
10.	Statistical analysis	129
Section 3	Results and discussion	129
Section 4	Conclusions	134
Section 5	References	134
Chapter 6	Effect of antibacterial and antioxidation of biologically activated substances	139
Section 1	Objective and scope	139
Section 2	Methods	140
1.	Anti-bacterial test	140
2.	Effect of antioxidative of biologically activated substances	140
1)	Preparation of Oil emulsion	140
2)	Determination of absorbance	140
3)	Browning intensity	140
4)	Electron donating ability	140
5)	Antioxidative	141

4) Free sugar	171
5) Nucleotide	172
6) Vitamin C	172
3. Stability test of product	173
1) pH	173
2) Free sugar	173
3) Vitamin C	173
4) Organic acid	173
4. Determination of browning index	173
Section 3 Results and discussion	174
Section 4 Conclusions	203
Section 5 References	204
Chapter 8 Identified of flavours and quality assessment of	206
high functional beverage with persimmon leaf	
Section 1 Objective and scope	206
Section 2 Methods	206
1. Isolation of flavours	206
2. Identified of flavours	208
3. Quality assessment	208
Section 3 Results and discussion	209
Section 4 Conclusions	213
Section 5 References	213
Chapter 9 Effect of lipid metabolism of biologically activated	216
substances	

Section 1 Objective and scope	216
Section 2 Methods	217
1. Preparation of sample	217
2. Animals and basal diet	217
3. Picking of liver, kidney and femur in experimental rats	219
4. Lipid analysis on serum	219
1) Total lipids	219
2) Total cholesterol	219
3) Triglyceride	219
4) HDL-cholesterol	220
5) LDL-cholesterol	220
5. Assay of total protein and albumin	220
6. Lipid analysis on liver and femur	220
7. Statistical analysis	221
Section 3 Results and discussion	221
Section 4 Conclusions	235
Section 5 References	235
Chapter 10 Production of high functional beverage with persimmon ...	238
leaf and process development of product	
Section 1 Objective and scope	238
Section 2 Methods	238
1. Process development of product	239
2. Study of package and economic analysis	239
Section 3 Results and discussion	239

Section 4	Conclusions	253
Section 5	References	253

목 차

제 1 장 서 론		38
제1절 연구개발의 목적과 범위		38
제2절 연구배경		43
제3절 참고문헌		44
제 2 장 생리활성물질의 분리		47
제1절 연구개발의 목적과 범위		47
제2절 연구개발의 방법		48
1. 공시재료		48
2. 감잎 아세톤 추출물의 분리		48
3. 효소 저해활성 측정		48
1) Glucosyltransferase		48
2) Tyrosinase		49
3) Xanthine oxidase		49
4) Angiotensin converting enzyme(ACE)		50
4. Thiolysis에 의한 thiolether 유도체 형성 및 정제		50
5. 탈유환원 반응		50
6. 저해물질의 부분정제		50
7. 흡광 분포도 측정		51
8. TLC에 의한 polyphenol류의 동정		51
9. 생리 활성물질의 분리 및 정제		51
1) Sephadex LH-20에 의한 정제		51
2) MCI-gel CHP 20P에 의한 정제		52
3) Octadecyl silica gel(ODS)에 의한 분리		52

4) Toyoperal HW 40(TSK gel)	52
제3절 연구개발의 결과 및 고찰	52
제4절 결 론	64
제5절 참고문헌	65
제 3 장 생리활성물질의 면역기능	67
제1절 연구개발의 목적과 범위	67
제2절 연구개발의 방법	68
1. 공시재료 및 실험동물	68
2. 시료투여 및 면역 유발과정	68
3. 복강내 침출세포(Peritoneal exudative cells, PEC) 조제	68
4. 비장세포(Spleen cells) 조제	69
5. Thymus cell 부유액 조제	69
6. 세포성 면역실험	69
1) Plague forming cell(PFC) 측정	69
2) 비장세포의 Rosette forming cell(RFC)의 검출	70
3) 항체 생산능 측정	70
7. Macrophage계 세포 활성능	70
1) 탐식능 측정	70
8. 알레르기 관련 실험	70
1) 알레르기 항원 조제	70
2) PCA(Passive cutaneous anaphylaxis) 실험	71
3) 혈중 histamine 측정	71
제3절 연구개발의 결과 및 고찰	71
제4절 결 론	83
제5절 참고문헌	83

제 4 장 생리활성물질의 화학구조 결정	86
제1절 연구개발의 목적과 범위	86
제2절 연구개발의 방법	86
1. 품종별 감잎의 성분분석	86
1) 일반분석	86
2) 탄닌	87
3) Caffeine	87
4) 유리당	88
5) 유리 아미노산	88
6) 핵산	89
7) 비타민 C	90
8) 비휘발성 유기산	90
2. 생리활성물질의 물리 및 화학적 성질	91
1) Melting point 및 $[\alpha]_D$	91
2) Infrared spectrum(IR)에 의한 구조 해석	91
3) Nuclear magnetic resonance(NMR)에 의한 구조 해석	91
4) Mass spectrum에 의한 분자량 측정	91
5) 원소 분석	92
3. 분리 정제 물질의 효소저해 실험	92
제3절 연구개발의 결과 및 고찰	92
제4절 결 론	120
제5절 참고문헌	121
제 5 장 생리활성물질의 중금속 제거 효과	124
제1절 연구개발의 목적과 범위	124
제2절 연구개발의 방법	125

1. 시료추출	125
2. 실험동물 사육	126
3. 식이조성 및 증금속 투여	126
4. 식이섭취량 및 체중측정	128
5. 식이효율	128
6. 실험동물에서 각종 장기의 채취	128
7. 변의 채취	128
8. 각종 장기의 카드뮴 함량 분석	128
9. 변의 카드뮴 함량 분석	129
10. 통계처리	129
제3절 연구개발의 결과 및 고찰	129
제4절 결 론	134
제5절 참고문헌	134
제 6 장 생리활성물질의 항균 및 항산화 효과	139
제1절 연구개발의 목적과 범위	139
제2절 연구개발의 방법	140
1. 항균성 시험	140
2. 생리활성물질의 항산화 효과	140
1) Oil emulsion 제조	140
2) 추출물의 흡광도	140
3) 추출물의 갈색도	140
4) 전자공여능	140
5) 항산화 측정	141
6) 세포증식능(MTT)	141
3. 생리활성물질의 항암실험	142

1) 실험동물	142
2) Sarcoma 180 세포 배양	142
3) Sarcoma 180의 복수암 유발	142
4) 시료 투여	143
5) 체중증가량 측정	143
6) 비장 장기중량 측정	143
7) 수명연장 측정	143
8) 암세포 증식억제 측정	144
제3절 연구개발의 결과 및 고찰	145
제4절 결 론	162
제5절 참고문헌	162
제 7 장 고기능성 감잎차 음료 개발	165
제1절 연구개발의 목적과 범위	165
제2절 연구개발의 방법	165
1. 고기능성 감잎차 음료 제조	165
1) 추출조건 최적화를 위한 실험계획	165
2) 추출물의 품질특성 및 기능성 평가	168
3) 관능검사를 통한 음료 제조	169
2. 제품의 화학적 분석	170
1) 일반분석	170
2) 탄닌	170
3) Caffeine	171
4) 유리당	171
5) 핵산	172
6) 비타민 C	172

3. 제품의 안정성 실험	173
1) pH의 영향	173
2) 당류의 영향	173
3) 비타민 C의 영향	173
4) 유기산의 영향	173
4. 갈변도의 측정	173
제3절 연구개발의 결과 및 고찰	174
제4절 결 론	203
제5절 참고문헌	204
제 8 장 고기능성 김잎차 음료의 향기성분 및 관능검사에 의한 품질평가	206
제1절 연구개발의 목적과 범위	206
제2절 연구개발의 방법	206
1. 향기성분의 분리	206
2. 향기성분의 동정	208
3. 관능검사에 의한 제품의 기호도	208
제3절 연구개발의 결과 및 고찰	209
제4절 결 론	213
제5절 참고문헌	213
제 9 장 생리활성물질의 지질대사에 미치는 영향	216
제1절 연구개발의 목적과 범위	216
제2절 연구개발의 방법	217
1. 시료추출	217
2. 실험동물 및 식이	217
3. 혈장, 간장, 지방조직 및 분변 채취	219

4. 혈장중의 지질분석	219
1) 총 지질	219
2) 총 콜레스테롤	219
3) Triglyceride	219
4) HDL-콜레스테롤	220
5) LDL-콜레스테롤	220
5. 총단백질 및 알부민 정량	220
6. 간장 및 분변중에서 각종 지질정량	220
7. 유의성 검정	221
제3절 연구개발의 결과 및 고찰	221
제4절 결 론	235
제5절 참고문헌	235
제 10 장 고기능성 감잎차 음료의 생산 및 제품공정개발	238
제1절 연구개발의 목적과 범위	238
제2절 연구개발의 방법	238
1. 제품의 공정개발 및 현장적용 시험	239
2. 포장연구 및 경제적 분석	239
제3절 연구개발의 결과 및 고찰	239
제4절 결 론	253
제5절 참고문헌	253

제 1 장 서 론

제1절 연구개발의 목적과 범위

차는 동양에서 처음으로 인류에게 알려졌다. 녹차와 홍차의 건강증진 효과에 대해서는 오래전부터 폭넓게 인식되어 왔으나, 최근에서야 그 효과를 뒷받침하는 연구들이 진행되고 있다. 그러나, 확실히, 차의 생화학적 작용에 대한 이해와 차나무 *Camellia sinensis*에 존재하는 polyphenol류에 대한 연구가 깊게 진전됨에 따라서, 차의 규칙적인 섭취가 만성질환의 예방 및 건강증진에 도움을 줄 것이라고 하는 생각이 더욱 더 확고하게 되었다. 이와 관련 감잎은 녹차 이상으로 다양한 생리활성물질을 함유하고 있는 것으로 추정되며 감나무의 학명은 Diospyros로 Dios는 신이란 뜻이고 Pyros는 곡물이란 뜻으로 서양에서도 과실의 신이라 할 만큼 훌륭한 식품으로 여겨왔다. 감나무는 우리나라, 중국, 일본 등 동양권에만 성장하는 식품으로 특히 우리조상들은 밤, 대추와 함께 삼실과(三實果)의 하나로 우리 생활 속에 깊이 뿌리 내려져 오고 있다.

감은 중국에서 기원전 126~118년에 감에 대한 기록이 있고 山海經(기원전 400~250년)에도 기록이 있다. 우리나라에서는 고려 명종때(1138년) 고용에 대한 기록을 찾아 볼수 있고 조선 성종때(1470년)에는 건포, 수정포 등의 기록이 있어 고려때 부터 시작된 것으로 추측된다.

감의 재배 면적 및 생산량은 1990년도 재배면적 13,581(ha)에 95,758톤을 생산하였으나, 98년에는 30,031(ha)에 260,671톤을 생산하여 약 270배로 증가하였다(Table 1).

감나무는 「향약집성방」에서 속전시유칠절(俗傳柿有七絶)이라 하여, 일곱가지 덕을 일컫는데 수명이 길고, 녹음이 짙고, 새가 집을 짓지 않으며, 벌레가 없고, 단풍이 아름답고, 열매가 좋고, 낙엽이 거름이 된다고 하여 버릴것이 없는 좋은 나무라 예찬했다.

「동의보감」에서는 “심폐를 윤택하고 갈증을 그치게 하며 담음(痰飲)

과 주독을 풀고 습장(濕腸)하여 설사를 멎게 한다”고 말하고 있다.

Table 1. 우리나라의 연도별 감의 생산면적 및 생산량

년 도	감		증가비
	재배면적(ha)	생산량(t)	생산량(t)
1990	13,581	95,758	0
1991	15,076	109,722	14.6
1992	17,584	155,111	41.4
1993	19,719	116,070	25.2
1994	22,440	167,471	44.3
1995	25,009	194,585	16.2
1996	27,210	210,766	8.3
1997	28,812	239,570	13.7
1998	30,031	260,671	8.8

*주 : 농림부통계연보('99)

감은 예로부터 부위에 따라 이름을 달리 하고 있는데 생감의 껍질을 베끼고 말린 것을 백시(白柿), 표면에 나오는 흰가루를 시상(柿霜)이라 하여 우리 한방에서 이용된 민간 약제로 중요한 역할을 하였다. 감잎은 예로부터 널리 알려져 온 민간약제로써 다량의 비타민 C(어린 잎에는 최고 1200mg%)를 함유하고 있으며 수분 3.2%, 단백질 14.4%, 지질 6.9%, 당질 54.5%, 섬유질 11.6%, 회분 9.4%, 탄닌 4.2%, 카페인, 콜린, 플라보노이드, 배당체, 유기산, 큐마린 등 다양한 화합물이 함유되어 있으며 고혈압 억제 작용, 이뇨작용, 당뇨, 내출혈, 면역기능 증진 동맥경화, 심장병, 태아의 골격형성, 각기병, 폐기종 등 성인병에 탁월한 효과가 인정되고 있으며 특히 여성들의 피부미용과 항균작용 등이 있음이 밝혀지고 있다. 그러므로, 우리고유의 감잎차로서 다양한 생리활성 효과는 체계적으로 검증하고 그 화학 구성성분을 밝히고 그 생리활성을 확인함으로써 민간 요법이나 한약에서 알려진 임상결과를 뒷받침하고 우리고유의 감잎차

의 명성을 알리며 제약, 화장품 산업의 원료로 제공한다. 또한 고기능성 감잎음료의 생산 및 제품의 공정을 개발하기 위하여 제조시설 및 경제성을 분석하여 새로운 고기능성 음료개발로 폐자원의 이용 및 농가소득 증대, 그리고 국민 보건 증진에 일조 하리라 확신한다.

각 세부과제별 연구내용 및 범위는 다음과 같다.

제 1 세부과제 : 생리활성물질의 분리

1.1 감잎의 아세톤 추출물의 분리

1.2 효소저해 활성 측정

1.2.1 Glucosyltransferase, tyrosinase, xanthine oxidase, angiotensin converting enzyme 저해측정

1.3 Thiolysis에 의한 thioether유도체 형성 및 정제

1.4 탈유환원 반응

1.5 저해물질의 부분정제

1.6 흡광도 분포 측정

1.7 TLC에 의한 polyphenol류 동정

1.8 생리활성 물질의 분리 및 정제

제 2 세부과제 : 생리활성 물질의 면역기능

2.1 동물실험

2.2 시료투여 및 면역유발과정

2.3 복강내 침출세포 조제

2.4 비장 세포 조제

2.5 Thymus cell 부유액 조제

2.6 세포성 면역시험

2.7 Macrophage계 세포활성능

2.8 알러지 관련시험

제 3 세부과제 : 생리활성물질의 화학구조 결정

3.1 품종별 감잎의 성분분석

3.1.1 일반분석, 탄닌, caffeine, 유리당, 유리아미노산, 핵산 및 비타민 C 정량

3.2 생리활성 물질의 물리 및 화학적 성질

3.2.1 Melting point 측정, $[\alpha]_D$ 측정, Infrared spectrum에 의한 구조해석, nuclear magnetic resonance(NMR)에 의한 구조해석, mass spectrum에 의한 분자량 결정, 원소 분석

3.3 분리정제 물질의 효소저해 실험

제 4 세부과제 : 생리활성물질의 중금속 제거효과

4.1 실험동물 사육

4.2 중금속의 투여방법

4.3 실험동물에서 각종 장기의 채취

4.4 각종 장기의 카드뮴 및 납의 함량 분석

4.5 변의 카드뮴 및 납의 함량 분석

4.6 체내 중금속의 흡수율 및 보유율

제 5 세부과제 : 생리활성 물질의 항균, 항산화 및 항암효과

5.1 항균 효과 시험

5.2 생리활성 물질의 항산화 작용

5.2.1 생리활성 물질의 항산화 작용, MTT assay

5.3 Sarcoma 180에 의한 항암 실험

제 6 세부과제 : 고기능성 감잎차 음료개발

6.1 고기능성 감잎차 음료 제조

6.2 제품의 화학적 분석

6.2.1 일반분석, 탄닌, caffeine, 유리당, 핵산 및 비타민 C 정량

6.3 제품의 안정성

6.3.1 pH, 당류, 비타민 C 및 유기산의 영향

6.4 갈변도 측정

제 7 세부과제 : 고기능성 감잎차 음료의 향미성분 및 관능검사에 의한 품질평가

7.1 제품의 향기 분석

7.1.1 향기 성분의 분리

7.1.2 향기 성분의 동정

7.2 관능검사에 의한 품질평가

제 8 세부과제 : 생리활성물질의 지질대사에 미치는 영향

8.1 혈장 및 간장에서의 지질 분석

8.1.1 총 지질, 총 콜레스테롤 및 triglyceride 측정

8.1.2 HDL-콜레스테롤 및 LDL-콜레스테롤 측정

8.2 분변에서의 지질 분석

8.2.1 총 지질, 총 콜레스테롤 및 triglyceride 측정

8.2.2 HDL-콜레스테롤 및 LDL-콜레스테롤 측정

8.3 Total protein 및 albumin 정량

제 9 세부과제 : 고기능성 감잎차 음료의 생산 및 제품공정개발

9.1 제품의 공정개발

9.1.1 원료의 전처리 공정

9.1.2 표준제품 생산공정 확립

9.2 공정 기술개발 및 현장적용 시험

9.2.1 감잎 캔 음료의 제조시설

9.2.2 생산자동공정

9.3 포장연구 및 경제적 분석

제2절 연구배경

감나무(*Diospyrus Kaki* L. Folium)는 우리나라 중부 이남에서 잘자라는 과실수중의 하나로 열매인 감은 독특한 맛을 가진 과실로서 이용되고 감나무잎은 감잎차의 원료로서 오래전부터 민간에서 이용되고 있다.

감잎에 대한 임상학적 약리작용과 효능은 동의보감과 본초강목 등의 여러 고문헌에 잘 나타나 있지만 감잎의 성분과 그 효과에 관한 연구는 최근에 이루어지고 있다. 감잎에 대한 국내외의 연구동향은 감잎의 성분^{1,2)}, 감잎차의 제조방법³⁾, 향기성분⁴⁾, 조리방법에 따른 비타민 C의 변화⁵⁾, 특별한 생리적 기능을 갖는 생리활성 물질에 관한 연구⁶⁾ 등이 있다. 감잎은 고혈압, 동맥경화, 심장병 등의 성인병과 위궤양, 십이지장궤양, 당뇨병 등의 만성질환에도 효과가 있다고 하며, 암예방 효과가 있다고 알려진 비타민 A, C, D 및 엽로소를 풍부하게 함유하고 있으며, 그 외 비타민 B₁, 판토텐산, 엽산의 함유량도 많아 감잎차의 경우 성인병 예방을 위한 좋은 식품으로 권장되고 있다⁶⁾.

과실 및 감잎의 짙은 맛 성분인 탄닌은 여러 가지 생물학적 활성과 함께 뱀독소 및 박테리아 독소를 해독하는 작용⁷⁾, 면역기능 부활작용, 활성산소 유리기 소거작용⁸⁾ 등이 알려져 항암성이 기대되며, 감잎으로부터 분리한 플라보노이드가 종양세포의 증식을 억제한다고 알려져 있다⁹⁾.

최근 들어 감잎으로부터 분리한 여러 flavonoid들이 체내에서 angiotensin converting enzymes의 활성을 억제시키는 효과가 있음이 보고되었으며¹⁰⁾, 우리나라에서의 연구로서는 감잎의 haxane 분획¹¹⁾ 및 tannin성분¹²⁾이 *Salmonella typhimurium* TA 100에서 항돌연변이 효과가 있음과 감잎의 tannin이 악성종양에 대한 억제 효과가 있음¹³⁾이 보고되고 있다.

100g중에 함유된 비타민 C의 함량을 보면 녹차는 280mg인데 비해 감잎에는 500~1,000mg이나 함유되어 있다. 발암에 대한 비타민 C의 작용은 N-nitroso화합물들의 전구체들과 여러 가지 암유발 물질들과의 상호반응에 의해 암의 형성을 막는 작용, 종양 촉진제의 대사를 방해하는 작용, 세포의 면역성을 증가시키는 작용 및 발암물질들의 형성을 억제하는

작용에 의한다고 한다¹⁴⁾. 최근에는 녹차나 홍차에서 떫은 맛을 내는 탄닌의 일종인 catechin 성분이 쥐실험을 통해 항암효과와 콜레스테롤 억제 효과가 있음이 밝혀졌다¹⁵⁻¹⁷⁾. 감잎의 탄닌은 여러 가지 축합형 탄닌의 혼합물로 그 중 (-)-epicatechin, (+)-catechin, phloroglucinol은 nitrite scavenger로 작용하여¹⁸⁾ 위암의 원인이 될 수 있는 nitrosamine의 생성을 억제하며, 감잎의 탄닌은 catechin, catechin-3-gallate, gallicocatechin, gallicocatechin-3-gallate가 1 : 1 : 2 : 2의 비율로 이루어져 있고¹⁹⁾, 그 외 알려지지 않은 말단잔기와 proanthocyanidin group에 속하는 것으로 구성되어 있으므로 감잎의 여러 가지 약리 작용과 더불어 항암효과도 예상된다 하겠다.

그러므로 본 연구에서는 감잎으로부터 다양한 생리활성 물질을 탐색하고 분리하여 그 화합물의 화학적 구조를 밝히고 그 생리 활성 기능을 확인함으로써 민간요법이나 한약에서 알려진 임상결과를 뒷받침하고 우리 고유의 명성을 알리며, 제약, 화장품 산업의 원료로 제공한다. 또한 고기능성 감잎음료의 생산 및 제품공정을 개발하기 위하여 제조시설 및 경제성을 분석하여 표준화된 음료개발로 국민 건강증진과 농가소득 신규사업으로 크게 기여할 것이다.

제3절 참고문헌

1. 김진구, 김광수: 시엽성분에 관한 연구. 상주산업대학교 논문집, 21, 95(1982)
2. Chung, S.H., Moon, K.D., Kim, J.K., Seong, J.H. and Sohn, T.H.: Change of chemical components in persimmon leaves during growth for processing persimmon leaves tea(in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, **26**(2), 141-146 (1994)
3. 차원섭, 김광수: 시엽차 제조방법이 제품의 품질에 미치는 영향. 상주 농업전문대학 논문집, 23, 109(1984)

4. Choi, S.H.: The aroma components of duchung tea and persimmon leaf tes(in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, 22(4), 405-410 (1990)
5. 박재옥, 김행자: 조리방법에 따른 감나무잎차의 ascorbic acid 함량에 관하여. *대한가정학회지*, 17, 31(1976)
6. 江蘇新醫院編: 中藥大辭典. 上海科學技術出版社, 15-27(1978)
7. Okonogi, T., Hattori, Z., Ogiso, A. and Mitsui, S.: Detoxification by persimmon tannin of snake venoms and bacterial toxins. *Toxicon.*, 17, 524(1970)
8. Uchida, S., Ohta, H., Niwa, M., Mori, A., Nonaka, G., Nishioka, I. and Ozaki, M.: Prolongation of life span of stroke-prone spontaneously hypertensive rats(SHRSP) ingesting persimmon tannin. *Chem. Pharm. Bull.*, 38, 1049(1990)
9. Nose, K.: Inhibition by flavonoids of RNA synthesis in permeable WI-38 cells and of transcription by RNA polymerase II. *Biochem. Pharm.*, 33, 3823(1984)
10. Rameda, K., Takaku, T., Okuda, H. and Kimura, Y.: Inhibitory effects of various flavonoids isolated from leaves of persimmon on angiotensin converting enzymes activity. *J. Natl. Products*, 50, 68(1989)
11. Moon, S.H., Kim, J.O., Rhee, S.H., Park, K.Y., Kim, K.H. and Rhew, T.H.: Antimutagenic effects and compounds identified from hexane fraction of persimmon leaves. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 22, 307(1993)
12. Moon, S.H., Kim, J.O. and Rhee, S.H.: Antimutagenic Effects and Compounds Identified from Hexane Fraction of Persimmon Leaves. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 22(3), 307-312(1993)
13. Kim, B.G., Rhew, T.H., Choe, E.S., Chung, H.Y., Park, K.Y. and Rhee, S.H.: Effect of selected persimmon leaf components against

- sarcoma 180 induced tumor in mice. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 22, 334(1993)
14. Glatthaar, B.E., Homig, D.H. and Moser, U.: The role of ascorbic acid in carcinogenesis. Hoffmann-La Roche Co., Ltd., Swizerland(1987)
 15. Hirose, M., Hoshiya, T., Takahashi, S., Hara, Y. and Ito, N.: Inhibition of carcinogenesis by green tea catechin in rats. Proceedings of the International Symposium on Tea Science (Japan), 210(1991)
 16. Ikeda, I., Imasato, Y., Sasaki, S., Nakayama, M., Nagano, H., Takeo, T., Yayabe, F. and Sugano, M.: Tea catechins decrease micellar solubility and intestinal absorption of cholesterol in rats. Proceedings of the International Symposium on Tea Science(Japan), 215(1995)
 17. Muramatsu, K., Sugiyama, K., Amano, S., Nakashima, J. and Saeki, S.: Effect of green tea on cholesterol metabolism in rats. Proceedings of the International Symposium on Tea Science (Japan), 220(1995)
 18. Choi, J.S., Park, S.H. and Choi, J.H.: Nitrite scavenging effect by flavonoids and its structure effect relationship. *Arch. Pharm. Res.*, 12, 26(1989)
 19. Matsuo, T. and Ito, S.: The chemical structure of kaki-tannin from immature fruit of the persimmon(*Diospyros kaki* L.). *Agric. Biol. Chem.*, 42, 1637(1978)

제 2 장 한국산 감잎의 생리활성물질의 분리

제1절 연구개발의 목적과 범위

감잎은 민간에서 애용되어왔던 전통차로써 풍부한 무기질 및 비타민C를 함유하고 있다^{1,3)}. 최근의 연구에서 과일 및 잎에서 flavonoid성분을 분리하여 고혈압의 원인이 되고 있는 angiotensin converting enzyme를 저해한다는 보고가 있으며⁴⁾ 미성숙 과일로부터 감탄닌을 분리하여 화학구조를 밝혀 감의 성분에 따라 화학구조가 다르다는 것을 입증한 바 있다⁵⁾. Funayama 등⁶⁾은 감잎의 탄닌 화합물이 고혈압에 대한 영향을 살펴 본 결과 gallate를 함유한 탄닌 화합물들이 혈압 상승 억제 효과있음을 입증하였고 Uchida 등⁷⁾은 감잎 탄닌을 고혈압유발 시킨 rat에 주입시켜 생명의 연장을 검토하였다.

Osawa 등⁸⁾은 천연 항산화제의 구조적 설명과 분석에서 flavn-3-ol화합물의 hydroxyl기가 지방산화과정중 free radical의 증가를 억제하여 우수한 항산화제라고 증명하였고 역시 Uchida 등⁹⁾도 축합형 탄닌이 활성 탄소의 free radical억제 효과가 있다고 보고하였다. Hashimoto 등¹⁰⁾은 축합형탄닌 분리 기술을 설명하고 순수 분리된 화합물이 스트레스로 유발된 위산과 peptide 활성기능에 영향을 끼침을 보고 한바 있다. 안 등^{11,12)}은 flavan-3-ol화합물들을 Sephadex LH-20, MCI-gel, Fuji-gel 등으로 분리하여 xanthine oxidase, glucosyltransferase 저해제임을 확인 통풍, 충치 예방물질로 효과가 입증하였다.

이와 같이 감잎에 주성분으로 존재하는 축합형 탄닌들이 다수가 존재하며 생리 활성도 매우 다양하리라 생각되어진다. 그러므로 본 연구는 한국산 감잎 속의 생리활성물질의 분리기술을 정착시키고 그 기능을 확인하고자 하였다.

제2절 연구개발의 방법

1. 공시재료

본 실험에 사용된 감잎은 상주 및 청도에서 재배하는 감나무인 청도 반시, 창녕부유, 상주등시의 3품종에서 1996년 5월부터 9월까지 경시적으로 두번째 내지 세번째 잎을 채취하였다. 채취한 감잎은 표면의 이물질 제거 후 polyethylene film에 넣어 냉동고에 보관하면서 사용하였다.

2. 감잎 아세톤 추출물의 분리

건조된 감잎 10kg, 60% acetone을 가하여 실온에서 24시간 추출한 후 원심분리(1,690×g, 30min)하여 상징액과 침전물을 얻었고 이 침전물은 다시 60% acetone을 가하고 위와같은 추출 과정을 4회 반복하였다. 각각의 상징액을 모아 농축 여과하여 chlorophyll을 제거하고 2ℓ의 농축물로 만든 후 acetone 추출물로서 분획을 위한 시료로 하였다.

3. 효소 저해활성 측정

1) Glucosyltransferase(Gtase)

Glucosyltransferase 저해 활성 측정은 일본 동경대학 Endo 등¹³⁾의 방법에 따라 행하였다. 즉 시료용액 0.18ml, 기질 (sucrose-NaN₃) 0.8 ml Gtase 0.02ml를 혼합하여 1ml로 한 후 37℃에서 16시간 반응시켜 그 상징액을 버리고 증류수 3ml를 가해 ultrasonicator로 균질화 한 다음 550nm에서 흡광도를 측정한 후 다음 식에 따라 % 저해율로서 구하였다.

$$\text{저해율(\%)} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

여기서 A는 대조구에서 형성된 부착성의 불용성 glucan의 O.D. 550 값이며 B는 감잎 동결 건조된 acetone추출물을 첨가함으로 저해된 부착성의 불용성 glucan O.D. 550 값이다. sucrose 12.5g, sodium azide 0.25g을 1ℓ의 0.062M potassium phosphate buffer(pH6.5)에 혼합하여 조제하며 glucosyltransferase는 일본 합동 주정에서 구입한 원액의 15배 희석액을 실험에 사용하였다.

2) Tyrosinase

Tyrosinase 활성저해 측정 방법은 tyrosinase의 작용과 생성되는 dopachrome을 비색법에 의해 측정하는 Yagi 등³⁾의 방법에 따라 행하였다. Mushroom tyrosinase를 90unit/ml 0.5ml, 기질로서 DOPA 0.5ml, buffer 1ml의 혼합액에 시료용액 1ml을 첨가 25℃, 2분간 반응시켜 475nm에서 측정하고 dopachrome의 변화를 저해 값으로 환산하였다.

3) Xanthine Oxidase

Xanthine oxidase 활성저해 측정법은 Stirpe와 Corte의 방법¹⁴⁾에 준하여 측정하였다. 즉 반응구는 0.1M potassium phosphate buffer(pH7.5)에 xanthine 2mM을 녹인 기질액 1mM에 효소액 0.1ml와 탄닌용액 0.1mM를 가하고 대조구에는 탄닌대신 증류수를 0.1ml첨가하여 37℃에서 5분간 반응시키고 20% trichloroacetic acid(TCA) 1ml를 가하여 반응을 종료시키고 원심분리하여 단백질을 제거한 후 반응액 중에 생성된 uric acid를 흡광도 292nm에서 측정하여 다음식으로 저해율을 구하였다.

$$\text{저해율(\%)} = 1 - \frac{\text{반응구의 uric acid 생성량}}{\text{대조구의 uric acid 생성량}} \times 100$$

4) Angiotensin converting enzyme(ACE)

ACE저해효과 측정은 Cushman 등¹⁵⁾의 방법에 의하여 행하였다. 즉, 반응구는 0.3M NaCl을 함유하는 0.1M potassium phosphate buffer(pH3.8)에 기질(Hippuryl-L-histidyl-L-leucine ; HHL) 2.5mM을 녹인액 0.15ml, ACE 0.1ml와 탄닌용액 0.1ml를 혼합하며, 대조구는 탄닌 대신 증류수 0.1ml를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시키고 1N-HCl 35ml 첨가로 반응을 중지시킨 뒤 3ml의 EtOAc를 첨가한 후 EtOAc 층으로부터 용매를 증류시킨 잔사를 2ml의 증류수를 첨가하여 추출된 hippuric acid를 흡광도 280nm에서 측정하였다.

4. Thiolysis 의한 thiolether 유도체 형성 및 정제

시료 10~20mg을 ethanol 5~25ml에 용해하여 acetic acid 1~5ml, benzylmercaptan 을 2~6ml 첨가한 후 100°C에서 반응하고 그 반응액을 농축하였다. 농축액을 Sephadex LH-20 에 의해 1차 분리하고 완전히 순수물질로 분리 될 때까지 반복 정제하였다. 이 때 용출 용매 60% methanol 및 ethanol을 사용하였으며 용출속도는 1ml/min로 용출하였다.

5. 탈류환원 반응

시료 5~10mg을 acetic acid : ethanol (1 : 9, v/v) 혼합액에 용해한 후 Raney nickel 을 가하여 실온에서 1시간 방치하였다. 반응 종료 후 침전된 Raney nickel 생성물을 여과한 후 감압 농축하고 용출용매 ethanol 을 사용 Sephadex LH-20 column으로 정제하였다.

6. 저해물질의 부분정제

아세톤 추출물을 동결건조하여 얻은 350mg을 Sephadex G-50 column(2.5×20.0cm)에 의해 분획하였다. 용출액은 증류수를 사용하고 용출 속도는 1ml/min로 tube당 3ml을 취하여 glucosyltransferase, xanthine oxidase, ACE 및 tyrosinase 저해활성 실험을 한 후 동결건

조 시켰다. 이와 동시에 Sephadex LH-20 column (2.5×500cm)에도 아세톤 추출물에서 동결건조된 350mg을 loading하여 분획하고 유출용매는 물과 methanol을 사용하며 유출 속도는 0.8ml/min로 3ml씩 취하여 저해실험을 한 후 분획별로 동결건조하였다.

7. 흡광 분포도 측정

감잎 분획물 50mg에 5ml을 첨가하고 2시간 동안 shaking, 추출한 후 원심 분리 (1,690×g, 30min) 한 다음 이과정을 3회 반복하여 얻은 상정액을 UV/Vis spectrophotometer로 200~400nm파장에서 최대 흡광도 분포를 조사하였다.

8. TLC에 의한 polyphenol류의 동정

Column에 의해 분리된 용출액을 cellulose 및 silica gel thin layer chromatography (TLC ; 5.0×5.0cm)에 2~10회씩 spotting하고 cellulose TLC는 2% acetic acid, silica gel TLC는 benzen ; ethylformic acid ; formic acid (1 : 7 : 1, 1 : 7 : 2, 2 : 5 : 1, V/V/V)의 용매로 전개한 다음 전개정도를 자외선에서 확인하였다. Cellulose 와 silica TLC상에서 FeCl₃에 의해 청색으로 발색되는 물질은 가수분해형 polyphenol로 동정하며 silica TLC에서 FeCl₃에 비하여 청색으로, anisaldehyde에 의해 갈색으로 발색되는 물질은 축합형 polyphenol로 분류하였다.

9. 생리 활성물질의 분리 및 정제

1) Sephadex LH-20에 의한 정제

시료의 양에 따라 column을 선정하여 흡착성의 성질에 의해 분리하였다. 유출용매는 normal phase type으로서 EtOH→H₂O→Acetone 및 60% methanol, 60→80% methanol과 reverse phase는 H₂O→MeOH→Acetone의 순으로 유출시켜 TLC상에서 polyphenol유무 및 종류를 확인하여 pooling하고 농축 건조하였다.

2) MCI-gel CHP 20P에 의한 정제

MCI-gel은 다공성 polystyren gel로서 흡착성을 이용하며 용출용매는 일반적인 reverse phase type인 H₂O→MeOH로 용출하고 polyphenol유무는 TLC 상에서 확인하였다.

3) Octadecyl silica gel(ODS)에 의한 분리

알칼리화 된 silica gel로서 본 실험은 Bondapak C₁₈, Fuji-gel로서 본 실험에서는 Bondapak C₁₈, Prep-PAK 500/C₁₈, Fuji-gel ODS G3, Cosmosil 75 C₁₈-OPN을 주로 사용하였고 추출 용매로서는 H₂O→MeOH type을 사용하였다.

4) Toyoperal HW 40(TSK gel)

친수성 vinylpolymer로서 본 실험에서는 30~60 μ m 입자 크기의 fine 을 사용하였고 용출용매로서는 H₂O→MeOH, H₂O→Acetone type을 병행하였다.

제3절 연구개발의 결과 및 고찰

1. 감잎의 아세톤 추출물의 분리

건조된 감잎 10kg을 Fig. 1과 같이 60% acetone을 가하여 실온에서 24시간 추출한 후 원심분리 (1,690×g, 30min) 하여 상징액과 침전물을 얻었고 이 침전물은 다시 60% acetone 을 가하고 위와같은 추출 과정을 4회 반복하였다. 각각의 상징액을 모아 농축 여과하여 chlorophyll 을 제거하고 2ℓ의 농축물로 만든 후 acetone 추출물로서 분획하였다.

2. 아세톤 추출물에 의한 효소저해 작용

감잎 10kg에서 60%의 아세톤을 가해 추출한 용액을 동결건조시켜 농도별로 조제하고 glucosyltransferase(Table 1) 및 tyrosinase(Table 2)저

해효과를 관찰한 바, glucosyltransferase저해는 1.8×10^{-2} mg/ml에서 16.72%의 저해를 시작으로 1.8×10^{-1} mg/ml에서 82.86%, 0.8mg/ml에서 거의 완벽한 저해가 관찰되었다. Tyrosinase는 0.8mg/ml에서 21.65%의 저해를 보여주었다. 일반적으로 phenol 유래의 화합물과 단백질과의 결합은 quinone류와 단백질의 활성부위와의 공유결합에 의한 비가역적 반응으로 단백질과 침전반응을 일으켜 효소 불활성화를 일으키는 것으로 추측된다.

Table 1. Effect of acetone extract of persimmon leaf on the GTase activity

concentration (mg/ml)	Persimmon	
	Absorbance (550nm)	Inhibition (%)
Control	1.447	-
1.8	0.014	99.03
0.8	0.0123	99.00
1.8×10^{-1}	0.248	82.86
1.8×10^{-2}	1.201	16.72
1.8×10^{-3}	1.454	-

Table 2. Effect of acetone extract of persimmon leaf on the tyrosinase activity

	Control	Persimmon
Concentration (mg/ml)	-	0.8
Absorbance (A-B)	0.871	-
(C-D)	-	0.63
Inhibition(%)	-	21.65

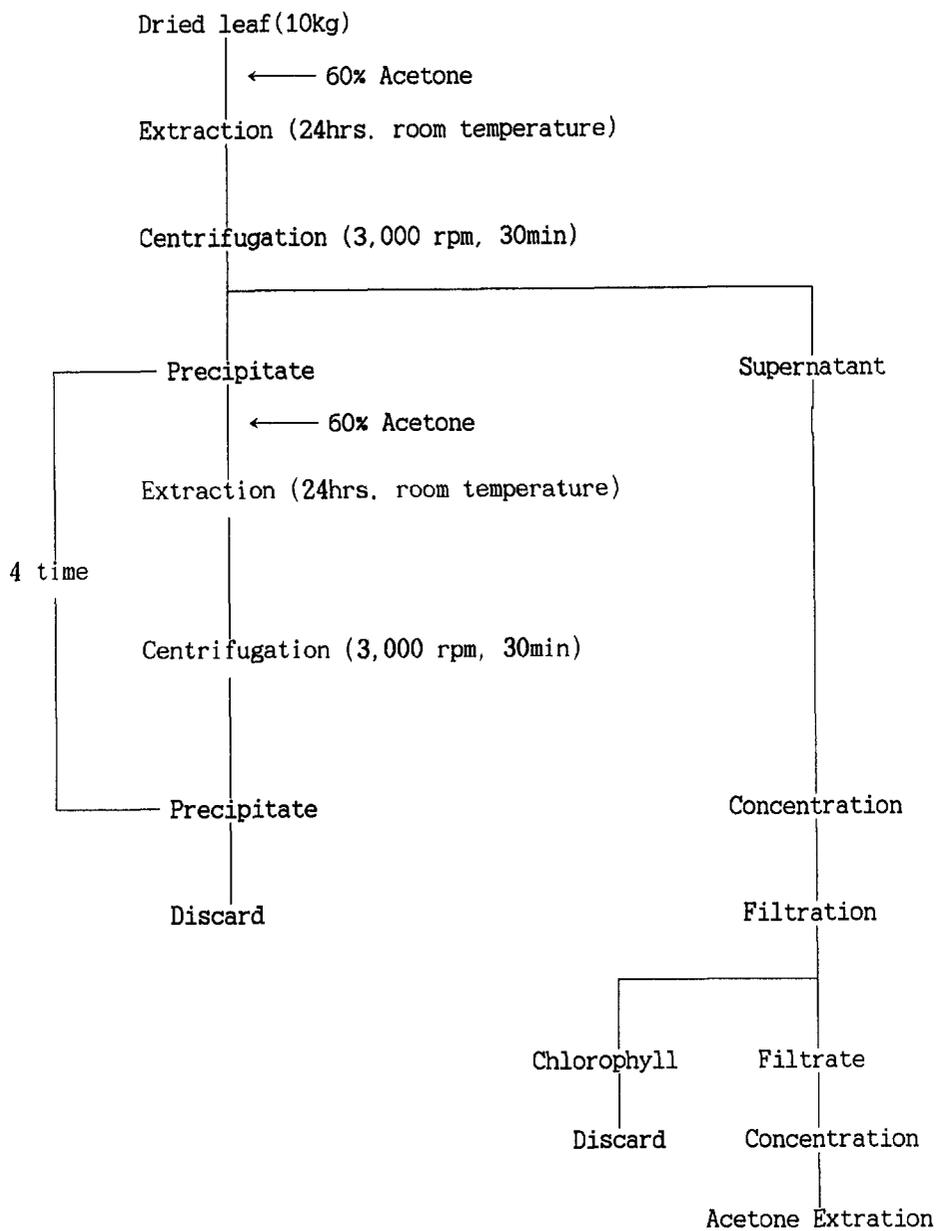


Fig. 1. A procedure for extraction of dried persimmon leaf.

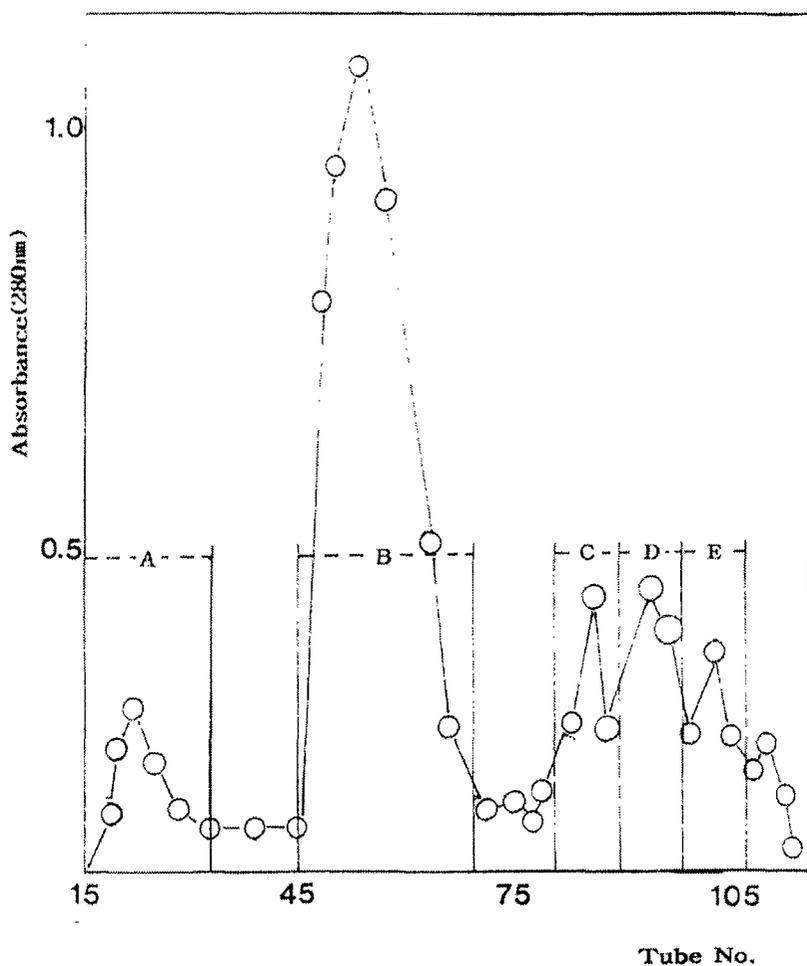


Fig. 2. Elution profile of acetone extract of persimmon leaf by Sephadex G-50

Colume : 2.5×20.0cm, Flow rate : 1.0 ml/min

Elution solvent : H₂O

3. 저해물질의 부분정제에 관한 수율

감잎의 acetone농축물을 동결건조하여 Sephadex G-50으로 gel filtration한 결과 A, B, C, D, E의 5부분으로 분획되었고(Fig.2) 각각의 yield(%)는 A : 54.14%, B : 29.26%, C : 4.6%, D : 8.06%, E : 3.91%였다(Table 3). 280nm에서 흡광도를 갖는 물질 중 80%이상이 용출되었으나 회수율은 12.4%로 매우 낮은 수율을 보여주었다.

Table 3. The yield of fraction by Sephadex G-50 of acetone extract of persimmon leaf

	Fraction				
	A	B	C	D	E
Weight(mg)	23.5	12.7	2	3.5	1.7
Yield(%)	54.14	29.26	4.6	8.06	3.91

4. 부분정제에 의한 효소저해효과

Glucosyltransferase에 대한 저해 활성을 조사한 결과 A 와 B 분획물에서 각각 93, 50%의 저해가 관찰되었고(Table 4), tyrosinase저해도 A, B 분획물에서 25, 36%의 저해 효과가 관찰된 바 280nm에서 최대흡광치를 갖는 물질 중 분자량이 높고, gel에 잘 용출되는 물질로 추정된다(Table 4, 5).

5. 흡광분포 측정과 proteinase k 처리에 의한 효소영향

감잎의 Sephadex G-50분획물에서 효소저해활성이 강한 A, B fraction을 흡광분포도를 조사한 결과 각각 240~280nm에서 최대 흡광치를 나타내었다(Fig. 3). 이런 최대 흡광치를 갖는 물질로는 DNA, protein 및 phenol ring을 함유한 물질로 추정되었으나 proteinase K, 가열처리에 의해 전혀 glucosyltransferase, tyrosinase 저해 영향에 변화가 없었다(Table 6, 7, 8, 9).

이러한 결과로 효소저해 영향을 끼치는 물질로 감잎 화합물은 protein이나 DNA가 아닐 가능성을 시사하여 비이온성수지로 polyphenol성분을 함유한 식물체를 분리시 특정한 분획물내 효소저해가 높다는 보고도 있다.

Table 4. Effect of Sephadex G-50 fraction of acetone extract from persimmon leaf on the Gtase activity

	Fraction					
	Control	A	B	C	D	E
Concentration(mg/ml)	-	1	1	1	1	1
Absorbance(550nm)	1.423	0.087	0.703	1.181	1.23	1.21
Inhibition(%)	-	93.32	50.59	17.06	13.35	13

Table 5. Effect of Sephadex G-50 fraction of acetone extract from persimmon leaf on the tyrosinase activity

	Fraction					
	Control	A	B	C	D	E
Concentration(mg/ml)	-	1	1	1	1	1
Absorbance						
(A-B)	0.83	-	-	-	-	-
(C-D)	-	0.51	0.5	0.85	0.89	0.87
Inhibition(%)	-	38.55	39.75	-	-	-

Sephadex와 같은 gel filtration 할시 약용식물은 두 개 이상의 chromatogram을 심었고, 첫 peak내 물질은 phenol류와 다른 화합물이 결합 형태로 존재 할 가능성이 높다는 보고도 있다.

이런 보고를 종합해 보면 감잎내 효소저해 활성물질은 phenol성 화합물일 가능성을 보여주고 있다.

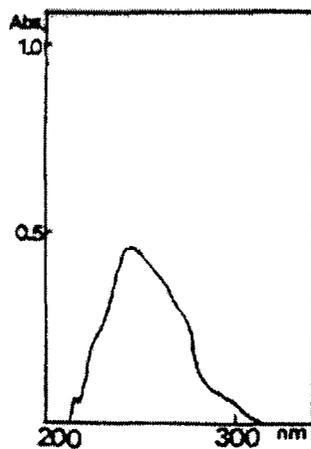


Fig. 3. UV-Spectrum of butanol fraction of acetone extract of persimmon leaf

Table 6. Effect of proteinase K treatment of Sephadex G-50 fractions on the Gtase activity

	Persimmon			
	Control	A	B	C
Concentration (mg/ml)	-	1	1	1
Absorbance (550nm)	1.27	0.12	0.54	1.17
Inhibition(%)	-	90.5	57.4	7.8

Table 7. Effect of hydrolysate of Sephadex G-50 fractions on the Gtase activity

	Control	Persimmon		
		A	B	C
Concentration (mg/ml)	-	1	1	1
Absorbance (550nm)	1.27	1.18	1.28	1.24
Inhibition(%)	-	7.08	-	2.1

Table 8. Effect of proteinase K treatment of Sephadex G-50 fractions on the tyrosinase activity

	Control	Persimmon	
		A	B
Concentration (mg/ml)	-	1	1
Absorbance (A-B)	0.9	-	-
(C-D)	-	0.57	0.59
Inhibition(%)	-	36.4	34.4

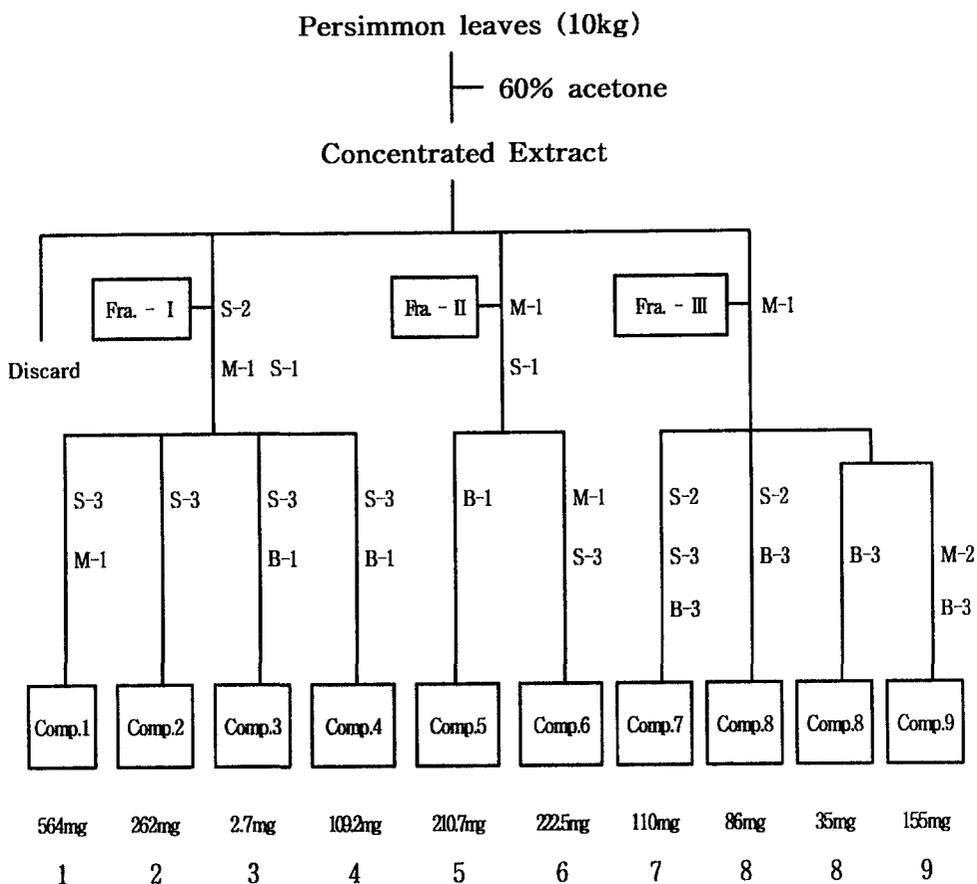
Table 9. Effect of hydrolysate of Sephadex G-50 fractions on the tyrosinase activity

	Control	Persimmon	
		A	B
Concentration (mg/ml)	-	1	1
Absorbance (A-B)	0.9	-	-
(C-D)	-	0.88	0.92
Inhibition(%)	-	-	-

6. 생리활성물질의 분리, 정제 및 TLC에 의한 동정

감잎추출물의 성상과 Sephadex G-50에 의한 분획결과 효소저해 활성 물질로 생각되어지는 화합물은 polyphenol류라 추정하게 되었으므로, Fig. 4와 같이 polyphenol류 분리방법에 의해 단일 물질을 분리하였다. F-1, F-2, F-3의 fraction으로 분획 한 후 F-1 fraction에서 compound 1~4까지 4종류의 화합물이, F-2 fraction에서는 compounds 5, 6화합물을 순수정제하여 재결정시켰다. 각 compound을 TLC상에서 확인한 결과 polyphenol화합물이라 추정되는 monomer가 2종류, dimer가 3종류, trimer가 1종류로 확인되었고 FeCl₃와 anisaldehyde 총액으로 spray시킨 결과 각각 청색과 갈색반응을 나타내었으므로 proanthocyanidin계통으로 추정하게 되었다. 실험에서 Sephadex LH-20 gel에 H₂O와 methanol 혼합용액의 농도 변화를 용출한 결과 methanol 30%에서 흡착성이 약한 proanthocyanidin류가 보이기 시작하여 90% methanol에서 거의 모든 화합물이 용출되는 것으로 확인되었다. Ethanol용액에서는 monomer, dimer, trimer순으로 용출되었고, MCI-gel, Bondapak C₁₈, column에서는 methanol 40%이내에서 용출되는 것이 확인되었다.

그리고 F-3 fraction에서는 compound 7, 8, 9화합물을 순수정제하여 재결정시켰다. TLC상에서 재결정화 된 화합물은 대체로 하층에 전개되어 있음을 확인하였다. 반응 색깔에 있어서 anisaldehyde-H₂SO₄ 정색반응시 붉은색이 강한 선명함을 보여 주었고 FeCl₃ 용액에서는 청색반응을 관찰할 수 있었다. Sephadex LH-20에 메탄올 : 증류수 (0:1→1:0) 용출용매를 사용할 때 이 화합물은 약 60% 메탄올 용액에서 용출되었다. 이러한 결과는 분리된 화합물이 flavan-3-ol 골격을 기본으로하는 축합형 탄닌으로 추정되며 반응색으로 붉은 정도와 선명도를 보아 화합물 B환에 hydroxyl기가 1개가 더 결합하고 있거나 다른 부위에 gallate가 함유한 화학구조로 추정되었다. 용출속도에서 결과를 비교해 보면 정제된 화합물은 겔의 흡착정도로 보아 procyanidin(proanthocyanidin)계통으로 추정하게 되었고 분자량은 dimeric 이상에서 다른 화합물이 결합되어 있음을 확인 할 수 있었다.



Gel	Solvent
M : MCI gel CHP-20	1. MeOH → H ₂ O (0:1 → 1:0)
S : Sephadex LH-20	2. EtOH → Water (5% → 40%)
B : Bondapak C ₁₈	3. MeOH (60%)

Fig.4. A procedure for isolation of polyphenol from persimmon leaf

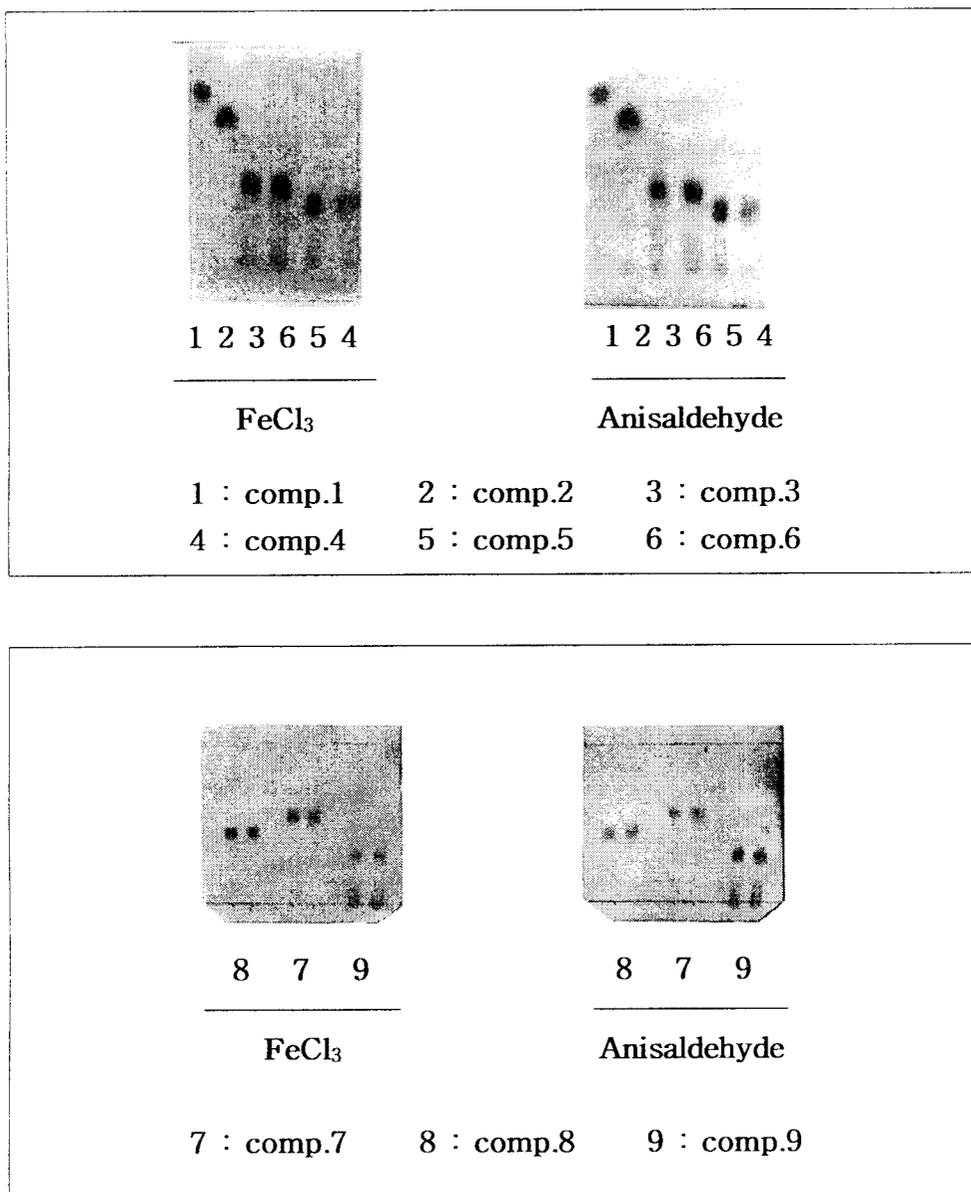


Fig. 5. Thin layer chromatogram of polyphenols isolated from the persimmon leaf.

Solvent ; benzene : ethylformic acid : formic acid(1 : 7 : 1, v / v / v)

제4절 결 론

감잎 10kg에서 60%의 아세톤을 가해 추출한 용액을 동결건조시켜 농도별로 조제하고 glucosyltransferase 및 tyrosinase 저해효과를 관찰한 바, glucosyltransferase 저해는 $1.8 \times 10^2 \text{mg/ml}$ 에서 16.72%의 저해를 시작으로 $1.8 \times 10^1 \text{mg/ml}$ 에서 82.86%, 0.8mg/ml 에서 거의 완벽한 저해가 관찰되었다. Tyrosinase는 0.8mg/ml 에서 21.65%의 저해를 보여주었다. 감잎의 acetone 농축물을 동결건조하여 Sephadex G-50으로 gel filtration 한 결과 A, B, C, D, E의 5부분으로 분획하였고 각각의 yield(%)는 A:54.14%, B:29.26%, C:4.6%, D:8.06%, E:3.91%였다. 280nm에서 흡광도를 갖는 물질 중 80%이상이 용출되었으나 회수율은 12.4%로 매우 낮은 수율을 보여주었다.

감잎추출물의 성상과 Sephadex G-50에 의한 분획결과 효소저해 활성 물질로 생각되어지는 화합물은 polyphenol류라 추정하게 되었으므로, polyphenol류 분리방법에 의해 단일 물질을 분리하였다. F-1, F-2, F-3의 fraction으로 분획한 후 F-1 fraction에서 compound 1~4까지 4종류의 화합물이, F-2 fraction에서는 compounds 5, 6화합물을 순수정제하여 재결정시켰다. 각 compound를 TLC상에서 확인한 결과 polyphenol화합물이라 추정되는 monomer가 2종류, dimer가 3종류, trimer가 1종류로 확인되었고 FeCl_3 와 anisaldehyde 총액으로 spray시킨 결과 각각 청색과 갈색반응을 나타내었으므로 proanthocyanidin계통으로 추정하게 되었다. 실험에서 Sephadex LH-20 gel에 H_2O 와 methanol 혼합용액의 농도 변화를 용출한 결과 methanol 30%에서 흡착성이 약한 proanthocyanidin류가 보이기 시작하여 90% methanol에서 거의 모든 화합물이 용출되는 것으로 확인되었다. Ethanol용액에서는 monomer, dimer, trimer순으로 용출되었고, MCI-gel, Bondapak C_{18} , column에서는 methanol 40%이내에서 용출되는 것이 확인되었다.

그리고 F-3 fraction에서는 compound 7, 8, 9화합물을 순수정제하여 재결정시켰다. Sephadex LH-20에 메탄올 : 증류수 (0:1→1:0) 용출용매

를 사용할 때 이 화합물은 약 60% 메탄올 용액에서 용출되었다. 이러한 결과는 분리된 화합물이 flavan-3-ol 골격을 기본으로하는 축합형 탄닌으로 추정되며 반응색으로 붉은 정도와 선명도를 보아 화합물 B환에 hydroxyl기가 1개가 더 결합하고 있거나 다른 부위에 gallate가 함유한 화학구조로 추정되었다. 용출속도에서 결과를 비교해 보면 정제된 화합물은 겔의 흡착정도로 보아 procyanidin(proanthocyanidin)계통으로 추정하게 되었고 분자량은 dimeric 이상에서 다른 화합물이 다른 화합물이 결합되어 있음을 확인할 수 있었다.

제5절 참고문헌

1. Sherwin, E.R: Oxidation and antioxidants in fat and oil processing. J. Am. Oil Chem. Soc., 55, 809(1978)
2. Cutler, R.G.: In: Free radicals in Biology, Vol. 6, p. 371. Pryor, W.A.(ed.). Academic Press, Orlando(1984)
3. Yagi, K.: Lipid peroxides and human disease. Chem. Phys. Lipids., 45, 337(1987)
4. Kameda, K., Takaku, T., Okuda, H. and Kimura, Y.: Inhibitory effects of various flavonoids isolated from leaves of persimmon on angiotensin-converting enzyme activity. J. Natural Products, 50, 680(1978)
5. Matsuo, T. and Ito, S.: The chemical structure of kaki tannin from immature fruit of the persimmon (*Diospyros kaki* L.). Agric. Biol. Chem., 42, 1637(1978)
6. Funayama, S. and Hikino, H.: Hypotensive principles of *Diospyros kaki* leaves. Chem. Pharm. Bull., 27, 2865(1979)
7. Uchida, S., Ohta, H., Niwa, M., Mori, A., Nonaka, G., Nishioka, I. and Ozaki, M.: Prolongation of life span of stroke-prone

- spontaneously hypertensive rats(SHRSP) ingesting persimmon tannin. *Chem. Pharm. Bull.*, 38, 1049(1990)
8. Osawa, T. and Namiki, M.: A novel type of antioxidant isolated from leaf wax of *Eucalyptus leaves*. *Agric. Biol. Chem.*, 45, 735(1981)
 9. Uchida, S., Edamatsu, R., Hiramatsu, M., Mori, A., Nonaka, G.Y., Nishioka, I., Niwa, M. and Ozaki, M.: Condensed tannins scavenge active oxygen free radicals. *Med. Sci. Res.* 15: 831(1987)
 10. Hashimoto, F., Nonaka, G, and Nishioka, I.: Novel Chalcan-flavan Dimers, Assamicans A, B and C and a New Flavan-3-ol and Proanthocyanidins from the Fresh Leaves of *Camollia sinensis* L. *Chem. Pharm. Bull.* 37(1), 77(1989)
 11. 안봉전, 김원주, 최장윤, 권익부, 최청: 우롱차로부터 Xanthine Oxidase 저해물질의 분리 및 구조, *한국식품과학회지*, 24(6), 558(1992)
 12. 안봉전, 최장윤, 권익부, 니시오 카이트슈, 최청: Jack Fruit 잎으로부터 glucosyl transferase inhibitor 물질분리 및 구조, *한국생화학회지*, 25(4), 347(1992)
 13. Endo, T., Tanaka, O. and Shibata, S.: *Syotakagaku Zasshi*, 25(1), 28(1971)
 14. Stirpe, F. and Corte, E. D.: The regulation of rat liver xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.*, 244, 3855(1969)
 15. Cushman, D.W. and Ondetti, M.A.: Inhibitors of angiotensin converting enzyme for treatment of hypertension. *Biochem. Pharmacology*, 29, 1871-1877(1980)

제 3 장 한국산 감잎으로부터 생리활성 물질의 면역기능

제1절 연구개발의 목적과 범위

최근에 많이 음용 되고 있는 차는 기호품에 속하는 식품으로, 전세계적으로 소비되고 있는 가장 일반적인 음료 중의 하나로, 보통 건조차로서 250만 톤 정도가 생산되고 있으며, 차에 대한 연구가 활발히 진행되면서, 우리나라 고유의 전통차로부터 생리활성 물질을 검증하고자 하는 노력들이 시도되고있다.

감나무는 우리나라 중부 이남에서 잘 자라고, 열매인 감은 한국, 중국, 일본이 그 원산지로서 우리 나라와 일본에서 가장 널리 재배되고 있는 과실로서 경제성이 높아 재배면적과 생산량이 최근에 급격히 증가하고 있는 추세이며, 국내에서 대량으로 생산되는 청과물 중의 하나로 해마다 422만톤 이상이 생산되고 있다.

감잎에 관한 국내외 연구로는 감잎의 일반성분 분석, 감잎차의 향기성분 분석, 감잎의 열수추출물과 tannin의 돌연변이 억제효과, 충치예방효과 등이 보고되고 있다^{1,4)}. 또한, Kameda 등⁵⁾은 감잎에서 분리된 flavonoid가 고혈압의 원인이 되고 있는 angiotensin converting enzyme 활성의 저해작용을 갖는다고 하였으며, Okonogi 등⁶⁾은 tannin이 뱀독소 및 박테리아 독소의 해독작용, 면역 기능 부활작용 등이 있는 것으로 보고하고 있다.

본 연구는 우리 나라 고유의 감잎 차에 대한 다양한 생리활성 효과를 검증하여 기능성 식품으로서의 과학적 근거를 제시하고자 한국산 감잎으로부터 생리활성 물질로 검증된 polyphenol 화합물을 분리 및 정제하여, 면역기능 즉, 항체 생산능, 로젯트 형성능과 탐식작용 및 면역세포 활성화 등에 미치는 영향을 관찰하였다.

제2절 연구개발의 방법

1. 공시재료 및 실험동물

본 실험에 사용된 감잎은 상주 및 청도에서 재배하는 감나무인 청도 반시, 상주등시 및 창령부유의 3품종에서 1996년 5월부터 9월까지 경시적으로 두번째 내지 세번째 잎을 채취하였다. 채취한 감잎은 표면의 이물질 제거 후 polyethylene film에 넣어 냉동고에 보관하면서 사용하였다. BALB/c, Wister rats 및 Sprague-Dawley를 국립 보건원 안전 연구원으로부터 분양 받아 7~10주된 것을 사용하였다.

2. 시료투여 및 면역 유발과정

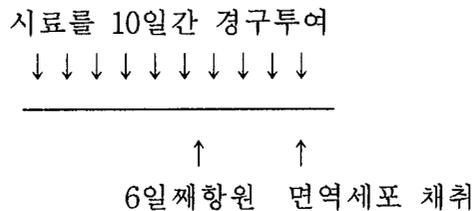


Fig. 1. A scheme of sample administration and immune induction.

항원에는 SRBC를 사용한다. SRBC를 PBS로 3회 세척 후 면역응답을 행할 경우에는 최종적으로 1×10^9 cell/ml이 되도록 조제한 SRBC 0.1ml를 mouse 꼬리 정맥에 주사로 면역시킨 후 4일째 thymus, spleen 및 림프구를 적출해서 면역세포 부유액을 만들었다.

3. 복강내 침출세포(Peritoneal exudative cells, PEC) 조제

Mouse의 복강에 주사기를 이용하여 PBS를 주입하고 잘 마사지 한 후, 복강세포를 채취하였다. 채취한 세포부유액을 500g에서 10분간 원

심분리하여 상정액을 제거하고 RPMI 1640으로 3회 세척(500g, 10min) 하여 세포수를 조정하였다⁷⁾.

4. 비장세포(Spleen cells) 조제

Mouse의 복부를 절개하여 비장을 적출한 후, 분절하여 세포부유액으로 만들어 500g에서 10분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 상정액을 제거하고 적혈구를 용해하기 위하여 0.83% ammonium chloride tris(ACT) buffer(pH 7.2)로 처리한 다음에 RPMI 1640으로 3회세척하고, 500g에서 10분간 원심분리하여 세포수를 조정하였다. 세포수 조정은 PEC와 spleen cells을 trypan blue로 염색한 후, 혈구계산반(hemacytometer)을 사용하여 현미경 상에서 생세포수를 측정하여 사용하였다⁸⁾.

5. Thymus cell 부유액 조제

Thymus cell 부유액 조제는 spleen cell 부유액 조제방법에 준하였다.

6. 세포성 면역실험

1) Plaque forming cell(PFC) 측정

항체 생산세포의 검색은 Cunningham 방법⁹⁾에 의하며, 약물투여는 10일간 행하고 6일째에 SRBC를 1×10^9 cells/ml이 되도록 조정하여 mouse의 복강에 0.2ml 주사하였다.

4일 후 비장을 적출하여 세포부유액으로 만들어 3회 세척 후, 1×10^6 cell/ml이 되도록 조정한 spleen cells $200 \mu\text{l}$ 와 10% SRBC $36 \mu\text{l}$, complement $21 \mu\text{l}$ 그리고 5% FCS-HBSS액 $143 \mu\text{l}$ 를 혼합하여, 제작한 Cunningham chamber에 넣어 37°C incubator에서 1시간 배양하면 항체생산세포 주위에 적혈구가 용해된 투명한 용혈반(plaque)이 생성된다. 이때의 용혈반수를 세어 항체생산 세포수를 산정하였다.

2) 비장세포의 Rosette forming cell(RFC)의 검출

비장세포의 Rosette형성세포의 검사는 method in immunology¹⁰⁾에서 기술한 방법에 따라 행한다. 즉, 비장세포 부유액(2×10^7 cell/ml) 200 μ l와 1% SRBC 부유액 200 μ l를 시험관에 넣고 혼합하여 1700rpm에서 원심분리한 후, 이것을 다시 부유시켜 혈구계산반에 주입하여 RFC를 검경 관찰한다. 현미경상에서 비장세포에 SRBC가 3개 이상 부착한 세포를 RFC로 판정하여 다음 공식에 준하여 계산하였다.

$$\text{RFC per } \mu\text{l in rosette mixture} / \text{Viability} \times 10 = \text{RFC}/10^6 \text{ viable nucleated cells}$$

3) 항체 생산능 측정

임파세포 부유상징액 중의 항체 측정은 Engvall 등의 방법에 의한다. IgG 표준품 및 희석한 부유상징액 50 μ l씩 넣고 실온에서 1시간 배양한다. 2nd 항체는 Rb α Ig- $\text{\textcircled{P}}$ 로 실온에서 1시간 배양한 후 OPD (0-phenyenediamine dihydrochloride) 발색시키고 2M H₂SO₄로 발색 정지한 다음 ELISA-leader로 측정하였다.

7. Macrophage계 세포 활성능

1) 탐식능 측정

탐식능 측정은 小松 등¹¹⁾의 방법에 따라 행한다. CP부유액 (8×10^3 cell/ml) 50 μ l와 식세포 부유액(8×10^4 cell/ml) 50 μ l, 그리고 5% 동계 mouse 혈청 100 μ l를 V-bottomed microtitre tray에 주입하여 CO₂ incubator (37°C, 5% CO₂)에서 3시간 배양하였다.

배양 후 그중 50 μ l를 취해서 Sabouraud's dextrose agar에 옮겨 35°C에서 2일간 배양하여 살아있는 CP colony수를 세어 식세포에 의해 탐식된 CP의 생균수를 표시 하였다.

8. 알레르기 관련 실험

1) 알레르기 항원 조제

Egg albumin을 알레르기 항원으로 사용한다. 즉, 2mg/ml 농도의 항원용액과 동량의 complete 즉 fraund's adjuvant를 혼합해서 유화용 주사기를 사용하여 유화한 것을 마우스 좌우 대퇴부에 100 μ l씩 피하 주사한다. 최초 면역 후 2주 간격으로 총 3회 면역하고, 1주, 3주 및 5주째에 3일 동안 각각의 약물을 투여한 다음 채혈해서 PCA 실험과 혈 중 histamine을 측정하였다.

2) PCA(Passive cutaneous anaphylaxis) 실험

PCA측정은 Permi 등¹²⁾의 방법에 준한다. 항혈청의 2배 단계희석액 0.1ml를 미리 24시간 후에 egg-albumin + 1% Evans blue dye/ml를 꼬리 정맥주사해서 PCA에 의해서 생성된 푸른 반점을 직경 5mm 이상인 것을 양성으로 판정하여 측정하였다.

3) 혈중 histamine 측정

Histamine 측정은 小松¹³⁾의 방법에 따라 시행한다. 헤파린이 처리된 시험관에 채혈한 혈액 0.5ml를 혼합해서 미리 준비한 1N HCl 1.0ml를 넣고 혼합 원심분리 하였다. 상정액은 BuOH-chloroform 용매로 추출한 다음 0.2% O-Phthal aldehyde(OPT) 발광제로 발광한 것을 fluorometric spectrophoto meter(Act. 360nm, Fluo. 440nm)에서 측정하였다.

제3절 연구개발의 결과 및 고찰

1. 감잎 추출물의 탐식작용에 미치는 영향

감잎 polyphenol 화합물을 7일간 마우스 복강에 투여한 후 비장을 적출하여 얻은 비장 세포 부유액에 대하여 *C. parapsilosis*(CP)와 *C. albicans*(CA)에 대한 탐식작용에 대한 실험의 결과는 Fig. 2, 3과 같다.

CP에 대한 탐식능은 대조군(24.6 ± 0.34)에 비해 polyphenol 화합물 II

는(72.6±6.4)와 Ⅲ(82.3±1.4)은 candidacidal 효과가 현저하였으나, polyphenol 화합물 I (26.4±4.7)은 유의성을 나타내지는 않았다. 또한 CA에 대한 약물 투여군에 있어서의 탐식능은 대조군이 127.8±7.3(27.8%)인데 비해 polyphenol 화합물 I 은 108±3.5(70%, p<0.05), II 는 83.3±11.2(76.8%) 및 Ⅲ은 25±5.9(93%, P<0.01)로 모든 시료 투여군에서 탐식작용이 높은 것으로 나타났다.

*Candida*는 *Aspergillus*, *actinomyses* 등과 같은 비병원성 상재 진균으로서 건강인에게는 병원성을 나타내지 않지만 신생아, 면역결핍증 환자, 면역억제 요법을 받은 사람, 백혈병이나 악성 임파종의 환자 등 숙주의 면역능 저하 또는 이상이 있는 경우나 당뇨병, 균 교대현상의 결과에서 가끔 심한 감염을 초래한다. 그 중에서도 *Candida*로 인한 감염이 가장 자주 확인되고 구강 점막외의 기관, 위장관 점막, 피부나 손톱, 발톱 등을 침범하며, 나아가서는 폐를 침범하는 것으로 알려져 있으며, 이들의 주된 원인이 *C. albicans*로, 그 외에도 *C. parapsilosis*와 *C. tropicalis*로 나타나 있다¹⁴⁾.

이러한 candidiasis의 원인이 되는 *C. albicans*와 *C. parapsilosis*에 대하여 감잎 polyphenol 화합물 I, II 및 Ⅲ에 대한 탐식능을 확인하기 위하여, 7일간 약물을 투여한 후 비장과 복강에 존재하는 대식세포 부유액을 조제하여 이들에 대한 탐식능을 확인한 결과 모든 실험군에서 대조군에 비하여 유의성 있는 탐식작용이 확인되어, 대식세포의 탐식작용을 증가시킴을 확인할 수 있었다.

2. 감잎 추출물의 용혈반 형성에 미치는 영향

용혈반 형성은 면양의 적혈구로 면역시킨 마우스의 비장세포를 cunningham chamber에 면양적혈구와 보체를 혼합하여 배양하게 되면, 항체생산 세포는 면역 글로부린을 방출하게 되며, 방출된 면역글로부린은 주위의 적혈구에 결합하게 된다. 여기에 보체가 결합하면 항체가 붙은 적혈구는 용해되고, 적혈구가 없어진 plaque가 각 항체생산세포를 감싸고 있게 된다. 이러한 원리를 이용하여, 면양적혈구로 면역시킨 마우스에

감염으로부터 추출·분리된 polyphenol 화합물을 마우스 복강에 10일간 투여한 후, 마우스 복강 상재성 마크로파지와 비장을 적출하여 이들이 항체생성에 미치는 영향을 실험한 결과는 Fig. 4에서 보는 것과 같이, 대조군에 비하여 농도가 높은 열수 추출물의 투여군과 메탄올추출물 및 아세톤추출물 투여군에서 다소 높은 항체생산능력을 증가시켰으며, 생성된 항체에 의해서 항원인 SRBC를 파괴하여 많은 용혈반을 형성하는 것으로 나타났다.

비장세포 부유액에서의 항체생성능은 대조군(49 ± 4.5)에 비하여 실험군인 polyphenol 화합물 I은 86 ± 11.6 으로 유의성을 나타내었으며, polyphenol 화합물 II(92 ± 11.2)와 III(112 ± 7.3)는 매우 높은 유의성($p < 0.01$)을 나타내어 실험군 모두가 생리식염수만을 단독 투여한 대조군보다 항체생성능이 뛰어난 것으로 나타났다. 또한, 복강상재성 마크로파지로부터 용혈반 형성능을 실험한 결과, 비장과 비슷한 경향으로, 대조군(61 ± 0.6)보다 polyphenol 화합물 I(65 ± 1.7), II(71 ± 1.2) 및 III(95 ± 5.2) 모두에서 유의성($p < 0.05$, $p < 0.01$)을 나타내었으며, 특히 polyphenol 화합물 II와 III에서 높은 유의수준을 나타내었다.

생체 있어서 면역기능을 담당하는 비장세포는 림프구, 마크로파지, 백혈구 등으로 이루어져 있으며, 마우스에 있어서의 비장세포는 35%가 T 세포, 대략 40%가 B 세포이며, 약 25%가 백혈구와 마크로파지로 구성되어 있다. 또한, 방어기능을 갖는 대식세포는 외부로부터 감염 등의 자극을 받게되면 활성화 되어 탐식작용, phagocytosis, lysozyme, cytoplasmic granule, PGF2 생성, 항균작용 및 항종양작용 등의 역할을 담당하게된다¹⁵⁾. 이러한 기능을 갖는 비장세포와 복강 마크로파지로부터 세포 부유액을 조제하여 항체생산능을 실험한 결과 감염으로부터 분리·정제된 polyphenol 화합물 I, II 및 III을 투여한 실험군에서 대조군에 비하여 항체생산이 증가된 것은 Okonogi 등⁶⁾이 보고한 감 탄닌이 면역기능을 부활시키는 작용을 한다는 보고와 유사한 경향을 나타내고 있다.

3. 감잎추출물의 rosette 형성에 미치는 영향

사람의 림프구를 결정하는 방법으로 T 림프구에 관하여서는 4℃에서 면양 적혈구와의 자연적 rosette 형성 방법이 가장 널리 이용되고 있으며, 이러한 원리를 이용하여, 마우스에 면양적혈구로 면역시킨 뒤, 10일간 약물을 투여한 후, 비장과 복강 마크로파지를 분리하여 세포 부유액을 조제하였다. 이들에 면양적혈구를 혼합시켜 재부유 한 후 rosette 형성을 관찰한 결과는 Fig. 5와 같다.

즉, 대조군은 비장세포 10^6 당 53 ± 0.0 개의 rosette를 형성하였으며, 실험군인 I은 58 ± 17.3 , II는 56 ± 2.9 로 대조군에 비해 유의성은 나타내지 않았으나, polyphenol 화합물 III은 62 ± 5.2 로 유의성($p < 0.05$)을 나타내었다. 한편, 감잎으로부터 추출·분리된 polyphenol 화합물을 10일간 복강 투여한 후 복강마크로파지에 대한 rosette 형성을 실험한 결과, 대조군이 24.3 ± 2.8 인데 비해 polyphenol 화합물 I은 60 ± 8.9 , II는 79 ± 9.6 및 III은 78.3 ± 5.2 로 실험군 모두에서 높은 유의수준($p < 0.01$)을 나타내었다.

Wybran 등¹⁶⁾과 Minowata 등¹⁷⁾은 말초 혈액의 림프구 중 면양의 적혈구와 작용하여 rosette를 형성할 수 있는 능력이 있는 림프구가 T 림프구라고 추측하였고, 말초혈액에서 림프구를 분리하여 면양적혈구에 작용시켜 rosette를 형성하는 림프구를 계측하므로써 혈액 중의 T림프구의 수적 변동을 측정할 수 있다고 보고하였다. 이러한 보고에서 볼 때 대조군에 비해 감잎 polyphenol 화합물들을 투여한 비장과 복강 마크로파지에서 rosette 형성 세포가 증가된 것은 이들 시료들이 T 세포 생성능이 높은 것으로 사료된다.

4. 감잎추출물의 세포증식에 미치는 영향

면역기능을 갖는 장기 중의 하나인 비장세포에 대한 세포 증식능을 확인하기 위하여, 비장세포 부유액에 감잎에서 분리한 polyphenol 화합물 I, II 및 III을 농도별로 첨가하였다. 각각의 시료를 첨가한 후 배양 시간별에 따른 세포증식능을 실험한 결과는 다음과 같다(Fig. 6, 7, 8.).

비장세포 부유액 2×10^5 cells/mL에 polyphenol 화합물을 농도별(10 mg/mL, 1mg/mL, 0.1 mg/mL과 0.01 mg/mL)로 첨가하여 배양한 결과, 실험군 모두에서 농도 의존적으로 세포가 증식되는 것으로 관찰되었으며, 대조군에 비하여 유의성을 나타내었다. 비장세포와 각각의 시료를 혼합하여 24시간, 48시간 및 72시간을 배양한 결과, 대조군에 비해, 실험군은 배양시간이 경과할 수록 비장세포의 증식이 높은 것으로 관찰되었다. 정등은 녹차로부터 분리된 epicatechin 3-O-Gallate에 대하여 세포증식을 실험한 결과 시료의 농도가 증가함에 따라 세포수가 유의성 있게 증가하였다고 보고하고 있어, 감잎에서 분리·정제된 폴리페놀 화합물 I, II 및 III 모두가 비장세포에 대하여 세포증식이 유도된 본 실험의 결과와 유사한 경향을 보였다.

5. 감잎 추출물의 수동피부아나필락시스 저해 효과

마우스의 좌우 대퇴부에 Freund's complete adjuvant와 ovalbumin을 혼합한 항원으로 1차, 2차 및 3차에 걸쳐서 면역시킨 뒤, 각각의 면역 유발 후 폴리페놀 화합물 I, II 및 III을 3일간 복강 투여한 후, 말초 혈액으로부터 혈청을 분리하여 항혈청을 제조하였다. 분리된 항혈청을 2배씩 희석($2^1 \sim 2^6$)하여, rat의 등 부위에 피내주사하여 감작시킨 후 3시간이 경과한 후 ovalbumin과 evans blue dye를 말초 정맥에 투여하였다. 정맥에 투여한 뒤 3~5시간이 경과한 후 rat의 등부위에 누출된 색소의 직경이 5mm 이상인 것을 양성으로 판정하여 PCA 반응을 실험한 결과는 Table 1.과 같다.

1차 항원을 투여한 PCA 반응의 결과에서는 대조군이 160인 반면, 실험군인 감잎 polyphenol fraction I은 80, II와 III은 40에서 반응을 나타내었으며, 2차 항원과 3차 항원으로 감작시킨 후 대조군은 320 및 160으로 나타났다. 그러나, 모든 시료 투여군에서는 수신피내 아나필락시스 반응이 매우 감소되었으며, 약물 투여군 중 fraction III이 가장 높은 효과가 있는 것으로 나타나 감잎에서 정제된 polyphenol 화합물들이 PCA를 저감화 시키는데 효과가 있는 것으로 나타났다.

수동피부 아나필락시스는 천식질환의 주된 원인으로 생각되는 I형 알레르기 반응으로 인하여 발생하는 것으로, Kiyoshi 등¹⁸⁾은 녹차, 우롱차 및 홍차를 150~300 mg/kg을 경구투여 했을 때 수동피부 아나필락시스 실험을 행한 결과 대조군에 비하여 매우 유의성 있는 감소 효과가 인정되었다고 보고하였다. 또한, 녹차, 오롱차 및 홍차 추출물로부터 (-)-epigallocatechin(EGC), (-)-epigallocatechin-3-gallate(EGCg) 및 (-)-epicatechin-3-gallate(ECg)을 분리·정제하여 rat 당 100 mg/kg을 투여한 결과 PCA에 대한 억제율이 매우 높은 것으로 보고하여, 녹차, 우롱차 및 홍차에 있어서의 PCA 저해효과는 이들의 주된 화합물들인 (+)-epigallocatechin, (+)-epigallocatechin-3-gallate를 비롯하여 (+)-epicatechin-3-gallate에 의한 것으로 보고하였다.

An 등¹⁹⁾의 보고에 의하면 한국산 감잎에는 (+)-gallocatechin, gallo-catechin-(4 α →8)-catechin과 prodelpinnidin B-3이, Tomoaki 등²⁰⁾은 감에는 catechin, catechin-3-gallate, gallocatechin 및 gallocatechin-3-gallate 등의 구조로 구성되어 있음을 보고한 것으로 볼 때, 수동 피부 아나필락시스 반응의 저감화는 감잎의 polyphenol 화합물에 의한 것이라 사료된다. 이러한 천연물인 감잎이 수동피부 아나필락시스 반응을 격감시키고 있는 결과는 최근 알레르기 질환의 치료제로서 탈감작요법이 이루어지고 있으나, 알레르기 유발물질의 다양성, 극심한 부작용과 고도의 치료비 등으로 치료의 한계가 극히 제한되어 있어서, 이에 대한 효율적이고 부작용이 없는 대체제에 대한 개발이 요구되고 있는 실정으로써²¹⁾, 감잎의 polyphenol 화합물이 유용하리라 사료된다.

6. 감잎 추출물의 히스타민 억제 효과

감잎의 polyphenol 화합물을 1차, 2차 및 3차 항원으로 감작된 마우스의 복강에 3일간 연속 투여한 후 말초정맥으로부터 혈액을 채취하여 혈중 histamine 함량을 실험한 결과는 Fig. 9와 같다.

혈중 histamine 함량 중 시료와 항원으로 감작시키지 않은 정상군에서의 histamine 함량은 $5.6 \pm 0.34 \mu\text{g/mL}$ 이었으며, 1차 항원투여 후의 대조

군은 $5.4 \pm 0.27 \mu\text{g/mL}$ 로 정상군과 비슷한 경향을 나타내었으나, 감잎 polyphenol 화합물 II은 $2.0 \pm 0.7 \mu\text{g/mL}$ 와 III은 $1.5 \pm 0.6 \mu\text{g/mL}$ 으로 정상군 보다 혈중 histamine 유리가 억제된 것으로 나타났으나, fraction I은 $5.7 \pm 0.3 \mu\text{g/mL}$ 으로 대조군과 차이를 보이지 않았다. 2차 항원으로 감작한 후의 대조군에서의 histamine 함량은 $11.5 \pm 4.69 \mu\text{g/mL}$ 로 시료를 투여한 모든 군에서는 fraction I은 $4.01 \pm 1.53 \mu\text{g/mL}$, II는 $1.84 \pm 1.0 \mu\text{g/mL}$, III은 $3.85 \pm 2.03 \mu\text{g/mL}$ 으로 나타나 높은 유의성($p < 0.01$) 있는 억제 효과가 관찰되었으며, 3차 항원으로 감작된 경우에서도 유사한 경향을 보였다. 즉 대조군은 $7.26 \pm 2.7 \mu\text{g/mL}$ 인 반면 polyphenol fraction I은 $3.84 \pm 0.23 \mu\text{g/mL}$, II는 $1.8 \pm 0.08 \mu\text{g/mL}$ 및 III은 $1.42 \pm 0.05 \mu\text{g/mL}$ 로 나타났으며, 약물 투여군 중 fraction III이 가장 낮은 함량을 보였으며, 실험 전반에 걸쳐 감잎 polyphenol 화합물을 투여한 모든 군에서 혈중으로 유리되는 histamine 함량이 적은 것으로 나타났다.

히스타민은 혈관확장 작용과 평활근 수축작용을 가지고 있는 혈관작용성 amine으로, 여러조직에 널리분포되어 있으며, 비만세포에 고농도로 포함되어 있어서, 즉시형 과민증의 전형적인 혈관병변을 발생시켜 심마진이나 발적반응을 유발 시키는 물질로 알려져 있다²²⁾.

Maeda 등²³⁾은 차 추출액의 비만세포 histamine 유리억제 활성에 관한 보고에서 compound 48/80으로 유도된 비만세포로부터의 histamine 유리에서 모든 차 추출물이 histamine 유리억제 효과를 나타내었으며, 추출물의 억제능이 phenolic 화합물에 의한 것이라고 보고하고 있어, 대조군에 비하여 모든 실험군에서 혈중으로 유리되는 히스타민이 유의성 있게 감소되는 경향을 보인 본 실험결과와 유사한 경향을 나타내었다.

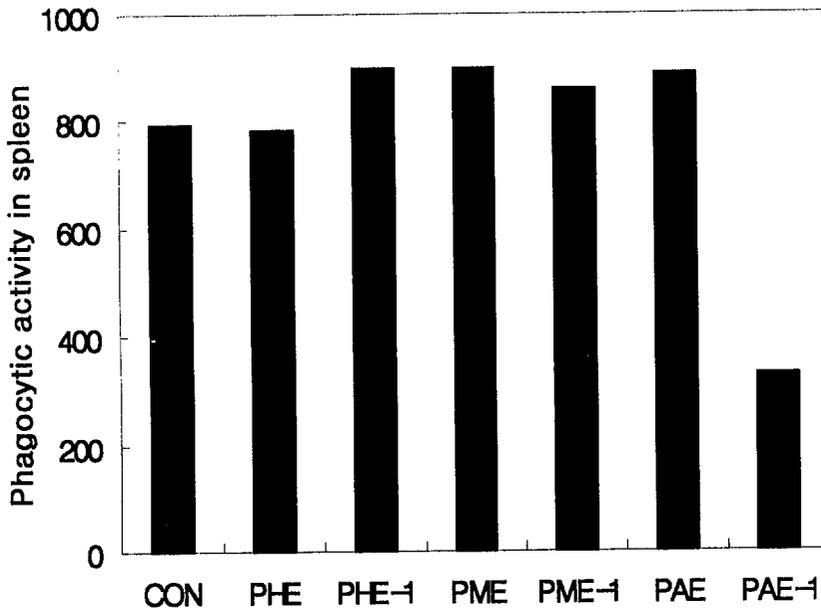


Fig. 2. Effect of persimmon leaves hot water extract, methanol extract and acetone extract on phagocytic activity of spleen cells.

Extracts of persimmon leaves were orally given to mice for 7 days and phagocytic activity of spleen cell was examined.

CON : Control(0.2ml saline/mouse)

PHE : Persimmon leaves hot water extract(0.5mg/ml)

PHE-1 : Persimmon leaves hot water extract(0.05mg/ml)

PME : Persimmon leaves methanol extract(0.5mg/ml)

PME-1 : Persimmon leaves methanol extract(0.05mg/ml)

PAE : Persimmon leaves acetone extract(0.5mg/ml)

PAE-1 : Persimmon leaves acetone extract(0.05mg/ml)

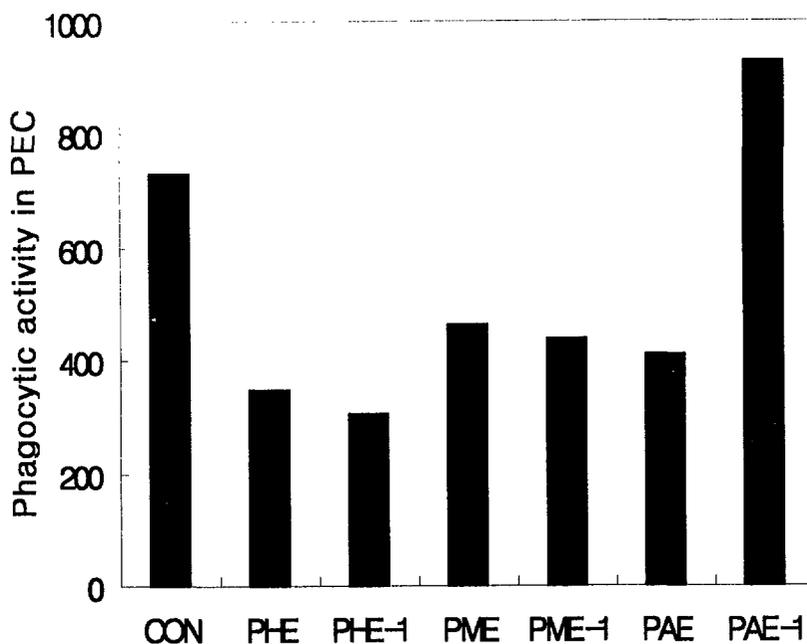


Fig. 3. Effect of persimmon leaves hot water extract, methanol extract and acetone extract on phagocytic activity of peritoneal exudate cells.

Extracts of persimmon leaves were orally given to mice for 7 days and phagocytic activity of spleen cell was examined.

CON : Control(0.2ml saline/mouse)

PHE : Persimmon leaves hot water extract(0.5mg/ml)

PHE-1 : Persimmon leaves hot water extract(0.05mg/ml)

PME : Persimmon leaves methanol extract(0.5mg/ml)

PME-1 : Persimmon leaves methanol extract(0.05mg/ml)

PAE : Persimmon leaves acetone extract(0.5mg/ml)

PAE-1 : Persimmon leaves acetone extract(0.05mg/ml)

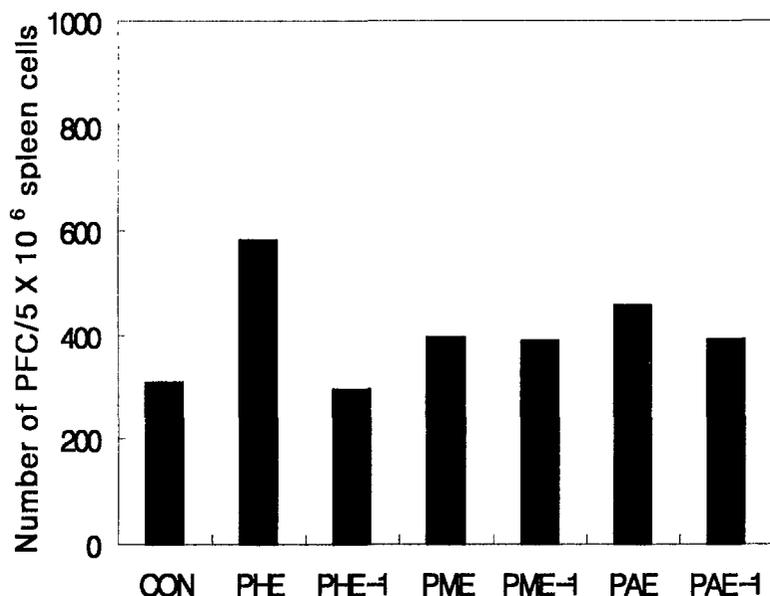


Fig. 4. Effect of persimmon leaves hot water extract, methanol extract and acetone extract by hemolytic plaque forming cell assay.

BALB/C mice were orally given extracts of persimmon leaves for 10 days.

The mice were immunized with 0.2ml SRBC(1×10^9 cells/ml) 4 days before assay.

CON : Control(0.2ml saline/mouse)

PHE : Persimmon leaves hot water extract(0.5mg/ml)

PHE-1 : Persimmon leaves hot water extract(0.05mg/ml)

PME : Persimmon leaves methanol extract(0.5mg/ml)

PME-1 : Persimmon leaves methanol extract(0.05mg/ml)

PAE : Persimmon leaves acetone extract(0.5mg/ml)

PAE-1 : Persimmon leaves acetone extract(0.05mg/ml)

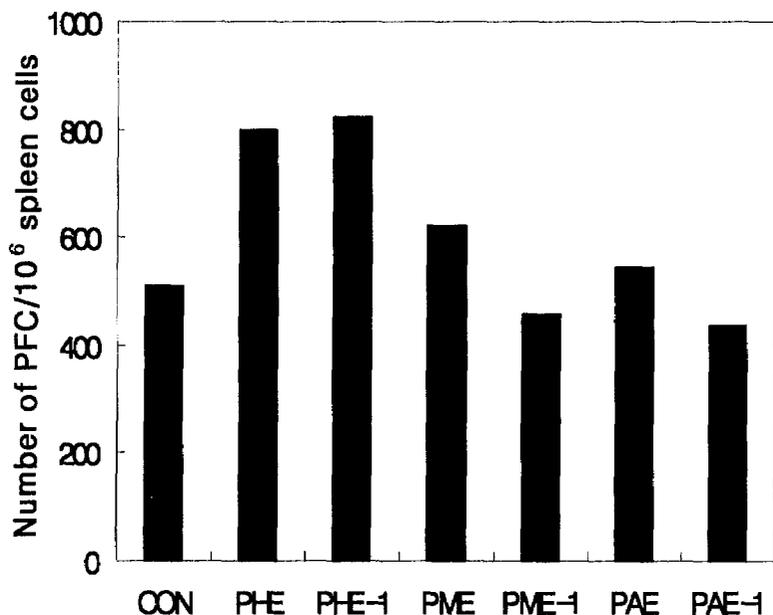


Fig. 5. Effect of persimmon leaves hot water extract, methanol extract and acetone extract on rosette forming cells.

BALB/C mice were orally given extracts of persimmon leaves for 10 days.

The mice were immunized with 0.2ml SRBC(1×10^9 cells/ml) 4 days before assay.

CON : Control(0.2ml saline/mouse)

PHE : Persimmon leaves hot water extract(0.5mg/ml)

PHE-1 : Persimmon leaves hot water extract(0.05mg/ml)

PME : Persimmon leaves methanol extract(0.5mg/ml)

PME-1 : Persimmon leaves methanol extract(0.05mg/ml)

PAE : Persimmon leaves acetone extract(0.5mg/ml)

PAE-1 : Persimmon leaves acetone extract(0.05mg/ml)

Table 1. Activity of spleen cells in a culture medium containing hot water extract, methanol extract and acetone extract from persimmon leaves.

Dose(mg/ml)	Harvest of culture supernatant	
	24hr	48hr
CON	0.19	0.12
PHE		
0.1	0.16	0.12
1	0.29	0.16
5	0.53	0.41
10	0.72	0.67
PME		
0.1	0.14	0.19
1	0.34	0.17
5	0.90	0.34
10	2.11	0.70
PAE		
0.1	0.12	0.25
1	0.28	0.16
5	0.41	0.35
10	0.91	0.45

Spleen cells from BALB/C mice were cultured at 5×10^6 cells/ml in 0.2ml microcultures. The extracts were added to the well at 0.1mg/ml, 1mg/ml, 5mg/ml, 10mg/ml and incubated for 24hrs (48hrs).

CON : Control

PHE : Persimmon leaves hot water extract

PME : Persimmon leaves methanol extract

PAE : Persimmon leaves acetone extract

제4절 결 론

한국산 감잎으로부터 polyphenol 화합물을 분리하여, 감잎의 기능성 식품으로서의 근거를 제시하고자, 면역기능의 활성화에 관하여 동물 실험을 하였다. 감잎의 polyphenol 화합물이 면역기능에 미치는 영향에 관한 실험에서는 감잎으로부터 분리된 polyphenol 화합물 I, II 및 III에 대하여 항체생산능을 실험한 결과 대조군에 비하여 시료를 투여한 군에서 항체생산이 증가되었으며, 특히 폴리페놀 화합물 II와 III에서 높은 유의성을 나타내었다. Rosette 형성의 결과에서도 감잎의 polyphenol 화합물 II와 III을 투여한 군에서 분리된 비장과 복강 상재성 마크로파지에서 rosette 형성능이 높은 것으로 나타났다. *Candida*에 대한 시료의 탐식능을 관찰한 결과, 대조군에 비하여 fraction I은 70%, II는 76.8% 및 III은 93%의 탐식능의 효과를 나타내었다.

감잎으로부터 polyphenol 화합물 군을 분리하여, 알레르기 저해효과를 실험한 결과 수신피내아나필락시스 반응에서 대조군에 비하여 모든 군에서 유의하게 격감되었으며, 3차에 걸친 항원투여 기간 동안 이러한 경향은 계속되었다. 항원 투여 후 혈중의 히스타민을 측정된 결과는 거의 정상군($5.6 \pm 0.34 \mu\text{g/mL}$)에 가깝게 혈중 히스타민 함량을 낮추는 역할을 하였다. 알레르기 반응의 제IV형에 관한 실험으로 접촉성 과민반응을 실험한 결과 항원의 종류를 달리하여도 대조군에 비하여 각각의 시료 투여군 특히, fraction II와 III에서 유의성 있는 저해효과를 나타내었다.

제5절 참고문헌

1. 김진구, 김광수: 茶葉成分에 관한 研究, 상주산업대학교 논문집, 21집, 95(1982)
2. Choi, S.H.: The aroma components of Duchung tea and Persimmon

- leaf tea. *Korean J. Food SCI. TECHNOL.*, 22(4), 405(1990)
3. Moon, S.H., Kim, J.O., Rhee, S.H., Park, K.Y., Kim, K.H. and Rhew, T.H.: Antimutagenic effects and compounds identified from hexane fraction of persimmon leaves. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 22, 334(1993)
 4. An, B.J, Bae, M.J. and Choi, C.: Chemical structures and Isolation of Glucosyltransferase Inhibitor from the Leaves of Korean Persimmon. *Food Science and Biotechnology*. 7(1), (1998)
 5. Kameda, K., Takaku, T., Okuda, H. and Kimura, Y.: Inhibitory effects of various flavonoids isolated from leaves of persimmon on angiotensin converting enzyme activity. *T. Natl. Products*. 50, 680(1987)
 6. Okonogi, T., Hatton, Z., Ogiso, A. and Mitsui, S.: Detoxification by persimmon tannin of snake venomes and bacterial toxins. *Toxicon*, 17, 525(1970)
 7. 臓原大美, 淀井滴可: 免疫研究法 ハントブック, P 6-7. 中外醫學士 (1992)
 8. Garvey, J.S.: *Method in Immunology*, W. A. Benjamin, Inc. p. 445-446(1980)
 9. Cunningham, A.J. and Szemberg, A.: Further improvements in the plaque technique for detecting single antibody-forming cell. *Immunology*, 14, 599(1968)
 10. Garvey, J.S.: *Method in Immunology*, W. A. Benjamin Inc. 449-488(1994)
 11. Komatsu, Y., Ono, N. and Abe, A.: 食食能品の測定法能. 炎症, 4(4), 379(1984)
 12. Permi, A. and Mota, Io.: The production of Ig E and Ig G antibodies in guinea pigs immunized with antigen and bacterial lipopolysaccharide *Immunology*, 25, 259-305(1973)
 13. 小松道侯: 気管支喘息における Histamineに関する研究, アレルギー, 27(2),

67-74(1978)

14. 서순봉, 김기홍, 박용준: 진균학. 대학서림, p. 67-88(1994)
15. 織田梅次, 狩野添一, 多田富雄, 木林 一郎, 免疫學用語辭典, 最新醫學士, 381(1991)
16. Wybran, J., carr, M.C. and Fudenberg, H.H.: The human rosette forming cell as a maker of a population of thymus-derived cells. *J. Clin. Invest.*, 51, 2537(1972)
17. Minowata, T., Ohmuma, T. and Moore, G.E.: Brief communication rosette forming human lymphoid cell lines. I. Establishment and evidence for oring of thymus-derived lymphocytes. *J. Nat. Cancer Inst.*, 49, 891(1972)
18. Kiyoshi, S.: Anti-allergic effects of tea. *Food Science and Industry*. 28, 4(1995)
19. An, B.J., Bae, M.J. and Choi, C.: Chemical structure and isolation of glucosyltransferase inhibitor from the leaves pf Korean Persimmon., *Food Science and Biotechnology*. 7(1), (1998)
20. Tomoaki, M. and Saburo, I.: The chemical structure of kakitannin from immature fruit of the persimmon(*Diospyros kaki* L). *Agric. Biol. Chem.*, 42(9), 1637(1978)
21. Lee, J.H., shin, S.J., Shin, Y.M., Song, W.J. and Lee, H.K.: Inhibitory effect of *Euonymus alatus* on the chicken gamma globulin and platelet activating factor- induced anaphylaxis in mice. *Korean J. Immunol.*, 18, 105(1996)
22. 織田梅次, 狩野添一, 多田富雄, 木林 一郎, 免疫學用語辭典, 最新醫學士, 191-192(1991)
23. Maeda, Y., Yamamoto, M., Masui, T., Sugiyama, K., Yokota, M., Nakagomi, K., Tanaka, H., Takahashi, I. and Kobayashi, T.: Inhibitory effect of tea extracts on histamone release from mast cells, 食衛生, 30(4), 295 (1989)

제 4 장 생리활성물질의 화학구조 결정

제1절 연구개발의 목적과 범위

감잎속에 다량으로 함유되고 있는 생리 활성물질로 추정되는 탄닌화합물들은 축합형, 가수분해형으로 구분되고 있고¹⁾ 극단적으로 복잡한 혼합물로서 분리 및 구조해석이 매우 어려운 것이 현실이다^{2,3)}. 그러나 최근 새로운 분리기술 개발로 점점 새로운 화학적 구조가 밝혀지고 있는데 탄닌을 두 group의 화학적 성질에 기인하여 결정하고 두 성질을 동시에 동반하는 복합체의 구조를 띤 것도 있다⁴⁻⁶⁾. 이런 화합물의 구조 확인을 위해선 우선 순수 분리가 매우 중요하며 Sephadex LH-20 dextran gel과 reverse-phase 즉, 고 다공성 polystyren ODS 등의 chromatography로 분리 가능해 졌으며⁵⁾ 유동성 저분자의 polyphenol 화합물과 구조적 isomer 분리에 매우 효과가 높다⁷⁾. 이러한 근거로 구조적 설명은 화학적 의미에 근거를 두어 감잎으로부터 분리한 생리활성의 물질을 고명하기 위하여 $[\alpha]_D$, melting point, 원소 분석과 고분해 $^1\text{H}_1$, ^{13}C spectroscopy, FT-MS의 기기 데이터 분석으로 화학 구조를 결정하였다⁸⁻¹⁰⁾. 또한 한국산 감잎으로부터 감잎차 음료를 제조하기 위한 기초자료를 얻고자 감잎의 품종별 성장에 따른 유리당, 비타민 C, 유기산 및 유리아미노산의 성분변화를 조사하였고 ACE, xanthin oxidase 및 tyrosinase의 활성저해효과를 규명하였다.

제2절 연구개발의 방법

1. 품종별 감잎의 성분분석

1) 일반성분

감잎의 일반 성분 분석은 5월부터 9월까지 매월 10일에 채취하여

AOAC¹¹⁾에 준하여 실시하였다. 수분함량은 105°C 건조법, 조단백 함량은 micro-Kjeldal법, 조지방 함량은 Soxhlet법, 조회분 함량은 500°C 직접 회분법을 사용하여 측정하였다. 조섬유는 원료를 1.25 % H₂SO₄와 1.25% KOH로 분해해서 건조 및 회화시켜 정량하였다.

2) 탄닌 정량

감잎 20 g에 70% acetone 200 ml를 실온에서 4 일동안 침출을 2 반복하고 다시 1 일 침출을 2 회 반복하여 추출 여과한 다음 rotary evaporator로 농축하여 100 ml의 증류수를 가하여 초고속 원심분리기로 15,200×g에서 15 분 동안 원심분리를 3 회 실시하여 수용성 성분만을 분리, 동결 건조하였다. 동결 건조한 시료에 증류수 10 ml가하여 2 ml를 Sephadax LH-20가 충전된 컬럼에 300 ml의 증류수를 통과시켜서 색소 물질을 제거한 다음 10%, 40%, 70% methanol을 각 300 ml씩 통과시켜서 이를 완전 농축하여 탄닌 이동상으로 3 ml 정용하여 0.45 μm membrane filter로 여과하여 Sep-pak C₁₈ cartridge에 통과시켜 색소와 고분자 물질을 제거한 다음 HPLC로 분석하였다(Table 1).

Table 1. The operating conditions of HPLC for tannin analysis

Items	Conditions
Instrument	Shimadzu LC-10 system
Column	Shim-pack ODS(M) 300 × 7.80 nm.
Detector	254 nm
Mobil phase	CH ₃ CN : H ₂ O = 1 : 4 (oxalic acid 400 mg/ℓ)
Flow rate	0.75 ml/min.
Injection volumn	20 μl

3) Caffeine 정량

감잎 20 g에 80% methanol 200 ml를 실온에서 4 일 동안 침출을 2 회

반복하고 다시 1 일 침출을 2 회 반복하여 이를 추출, 여과하여 rotary evaporator로 약 150 ml 정도로 감압 농축하였다. 상기의 농축물을 분액 여과기에 넣어서 3 배 chloroform을 가하여 아래층을 분리하여 완전히 농축한 후 0.45 μm membrane filter로 여과하여 Sep-pak C₁₈ cartridge에 통과시켜 색소와 고분자 물질을 제거한 다음 HPLC로 분석하였다(Table 2).

Table 2. The operating conditions of HPLC for caffeine analysis

Items	Conditions
Instrument	Shimadzu LC-10 system
Column	μ -Bondapack C ₁₈ 3.9 \times 300 nm.
Detector	254 nm
Mobil phase	Methanol : H ₂ O : acetic acid = 30 : 70 : 3
Flow rate	0.8 ml/min.
Injection volumn	20 μl

4) 유리당 정량

시료 20 g을 마쇄하여 80% ethanol 200 ml를 80°C의 수조관에서 2 시간 3 번 반복하여 추출, 여과하여 초고속 원심분리기로 15,200 \times g에서 15 분 동안 원심분리하였다. 원심분리한 상정액을 rotary evaporator로 감압 건조한 뒤 0.45 μm membrane filter로 여과하여 Sep-pak C₁₈ cartridge에 통과시켜 색소와 고분자 물질을 제거한 다음 HPLC로 분석하였다 (Table 3).

5) 유리 아미노산 정량

감입 20 g에 80% ethanol 200 ml를 80°C의 수조관에서 2 시간 동안 3 회 반복하여 추출, 여과한 다음 초고속 원심분리기로 15,200 \times g에서 15 분 동안 원심분리하였다. 그 상정액을 rotary evaporator로 감압 농축한 후 Amberlite RI-120(양이온 교환수지)가 충전된 컬럼에 통과시켜 아미

노산을 흡착시킨 뒤 5% NH₄OH 용액으로 용출시켜 이를 감압 농축한 후 0.2 N sodium citrate buffer (pH 2.2)를 2 ml가하여 0.45 μ m membrane filter 로 여과한 다음 아미노산 자동분석기로 분석하였다 (Table 4).

Table 3. The operating conditions of HPLC for sugar analysis

Items	Conditions
Instrument	Young In HPLC 9500 system
Column	REZEX RPM Monosaccharide 30 \times 7.80 nm.
Detector	RID - 6A
Column temp.	75 $^{\circ}$ C
Mobil phase	H ₂ O
Flow rate	0.5 ml/min.
Injection volume	20 μ l

Table 4. Specification and operating conditions of amino acid analyzer

Items	Conditions
Instrument	Biochem 20 amino acid analyzer
Column length	4.6 nm \times 250 nm
Wave length	440 nm, 570 nm
Column temp.	35 $^{\circ}$ C - 74 $^{\circ}$ C - 80 $^{\circ}$ C - 37 $^{\circ}$ C
Buffer solution	pH 3.2 - pH 4.25 - pH 6.45 sodium citrate
Flow rate	Buffer 35 ml/hr, ninhydrin 25 ml/hr.
Injection volume	20 μ l

6) 핵산 정량

핵산의 정량은 감잎 3g을 마쇄한 후 정 등¹²⁾의 방법에 준하여 핵산관련물질 추출한 후 Table 5와 같은 조건에서 HPLC로 분석하였다.

Table 5. The operating conditions for the analysis of nucleotides and their related compounds in persimmon leaf tea by HPLC.

Items	Condions
Insterument	Waters Model 201
Sample NO.	Standard, product.
Sample size	10-15 μ l
Column	μ -bondapak C ₁₈
Column temp.	Room temp.
Detector wavelength	UV 254nm
Mobile phase	0.1M(NH ₄) ₂ HPO ₄
Flow rate	1.0ml/min
Chart speed	0.5cm/min
Sensitivity	0.15-0.20 AUFS

7) 비타민 C 정량

5 g의 감잎을 6% metaphosphoric acid 100 ml에 마쇄하여 암실에서 2 시간 동안 침출한 후 0.45 μ m menbrane filter로 여과하여 Sep-pak C₁₈ catridge에 통과시켜 색소와 고분자 물질을 제거한 다음 HPLC로 분석하였다 (Table 6).

Table 6. The operating conditions of HPLC for ascorbic acid analysis

Items	Conditions
Insterument	Shimadzu LC-10 system
Column	μ -Bondapack C ₁₈ 3.9 × 300 nm.
Detector	254 nm
Mobil phase	Methanol : 0.002 M NH ₄ OH + H ₂ O 300 ml (adjusted to pH 2.4 with 1% formic acid)
Flow rate	0.8 ml/min.
Injetion volumn	20 μ l

2. 생리 활성 물질의 물리 및 화학적 성질

1) Melting point 및 $[\alpha]_D$

용해점은 시료 1~2mg을 취하여 미량용점 측정장치를 이용하여 측정하며 $[\alpha]_D$ 는 시료 2~5mg을 acetone 및 methanol에 용해하여 polarimeter (JASCO, DIP-370)에 의해 측정 한다.

$$[\alpha]_D = \frac{100 \times A}{C \times l} (^\circ)$$

A : 선광각
C : 1 ml 속에 함유된 시료양
l : 측정 cell의 크기

2) Infrared Spectrum (IR)에 의한 구조 해석

IR spectrum은 할로젠화 알칼리 정제법을 이용한다. 순수 분리된 시료 1mg을 KBr 100mg 분말과 잘 섞어 배합하고 압력을 가해 가압정제를 만들어 측정하였다. 표준물로서는 시료가 들어 있지 않은 KBr 분말을 가압정제하여 측정한다.

3) Nuclear magnetic resonance (NMR)에 의한 구조 해석

NMR spectrum 은 FT 방법 (Pulse Fourier transform method) 을 이용하여 순수정제물 7-10mg을 측정 용매 acetone -D₆ -D₂ O에 5-20% (W/V) 비율로 용해시키고 TMS[tetramethylsilane : (CH₃)₄Si]를 기준 물질로 하여 PMR (100, 270MHz) 과 CMR(25.05, 67.80MHz) 을 병행하여 측정한다.

4) Mass spectrum에 의한 분자량 측정

고체 시료 1mg 감압상태 (10⁻⁶~10⁻⁸mmHg)에 가열(100~300℃) 기화시켜 측정하는 negative ion FAB-mass spectrum 을 이용하여 측정한다. 이때 측정 용매로서는 acetone/glycerol (50 : 50, v/v) 를 사용하여 측정하

며 측정 조건에서 이온원의 가속가압을 2~3kV, 이온화의 전압은 22~28eV 이었고 시료 온도는 100~250℃에서 질량분석을 한다.

5) 원소 분석

분석 시료 소량 (0.3~1mg)을 취해 48시간 감압건조하여 완전히 수분을 제거하고 자동 원소분석기로 시료에 함유된 C 및 H의 양을 분석하였으며, 0는 분자량을 기준으로 계산치에 의해 환산한다.

3. 분리 정제 물질의 효소저해 실험

감나무 및 잎으로부터 분리하여 구조가 결정된 단일 물질을 10mM 과 1mM 농도로 조제하여 일반적인 tyrosinase, xanthine oxidase 및 ACE 저해실험 방법에 의해 저해활성을 측정한다.

제3절 연구개발의 결과 및 고찰

1. 품종별 감잎의 성분분석

1) 일반성분

감잎의 성장에 따른 성분의 변화는 Table 7에서 보는 바 같이 3 품종의 초기의 수분 함량은 77.9~80.1%였으며 성장함에 따라 감소하는 경향을 나타내었다. 3 품종 모두 수분의 함량은 비슷하였으며 8 월에 그 함량이 약간 증가하는 것은 장마철이 영향이라 생각된다. 회분 함량은 청도반시, 상주동시, 창녕부유의 3 품종에서 차차 증가하여 7 월에 최고치를 나타내었다가 8 월에 감소하는 것은 수분 함량의 증가에 따라서 회분 함량이 감소한다는 정 등¹²⁾의 보고와 비슷하였다. 조단백과 조지방의 함량은 성장함에 따라 차차 증가하여 8 월에 최고치를 나타낸 후 감소하는 경향을 나타내었다. 이와 같이 조지방의 함량이 8월에 최고치를 나타낸 결과는 이 때 색소의 생성이 최고에 달한다는 Naoko 등¹³⁾의 보고와 일치하였다. 조지방 및 조단백질이 9월에 그 함량이 감소하는 것은 당으로 분해하여 열매로 이행된 것으로 사료된다.

Table 7. Changes of proximate composition of persimmon leaves during growth

	Picking month	Constituent(%)				
		Moisture	Ash	Crude fiber	Crude fat	Crude protein
Chungdo Bansi	5	77.98	1.21	3.16	1.18	21.30
	6	69.34	1.94	4.51	1.75	21.20
	7	69.69	3.78	5.91	2.05	19.20
	8	70.39	2.82	6.92	3.50	28.04
	9	64.19	3.3	6.33	2.13	19.35
Sangju Dungsi	5	78.56	1.32	2.99	1.19	19.07
	6	67.49	2.05	4.09	1.32	21.33
	7	66.78	4.27	5.74	1.75	17.42
	8	69.13	2.65	6.88	6.37	25.09
	9	65.04	3.39	6.27	1.38	23.41
Chang -young Buyu	5	80.17	1.48	2.94	1.82	19.64
	6	72.71	3.39	4.02	1.32	19.32
	7	70.38	4.3	5.69	1.75	24.26
	8	68.38	3.04	6.85	6.37	22.04
	9	64.57	3.29	6.32	1.37	23.47

2) 탄닌의 정량

감잎의 성장별 탄닌 함량의 변화는 Table 8과 같다 그 함량의 변화는 점차 증가하여 8월부터 차차 감소하였고 상주동시의 탄닌함량이 높았으며 창녕부유가 제일 낮았다.

Table 8. Changes of tannin in persimmon leaves during growth(mg%)

Picking month	Chung Do Bansi	Sang Ju Bansi	Chang Nyung Buyujong
5	1.43	1.62	1.54
6	2.05	2.26	2.13
7	2.12	2.30	2.07
8	1.62	2.12	1.92
9	1.36	1.86	0.92

탄닌은 차엽중에 다량으로 존재하는데 품종, 차잎의 채취시기 및 차잎의 숙성에 따라 현저한 차이를 나타내며 홍차나 녹차 등의 품질에 깊이 관여한다는 것은 오래전부터 알려진 사실이다. Nagashima 등¹⁴⁾은 탄닌은 차맛의 주체를 이루며 색 및 향에 깊이 관여하는 중요한 성분이나 양이 지나치게 많아지면 깊은 감칠맛이 적고 뚝은 맛이 강하여 풍미가 떨어진다고 하였다.

3) Caffeine 정량

감잎의 성장 중 caffeine 함량의 변화는 Table 9와 같이 6월에 청도반시, 상주동시 및 창녕부유의 함량은 8.64, 9.03 및 14.86 mg%로서 창녕부유의 caffeine 함량이 월등히 높았고 3품종 모두 증가하였다가 7월부터 차차 감소하였다. 창녕부유에서 caffeine 함량은 6월을 기준으로 하였을

때 청도반시, 상주등시보다 각각 1.72배, 1.65배 높았고 정¹²⁾ 등이 보고한 감잎의 caffeine 함량보다 3품종 모두 낮았다. 9월의 청도반시 및 상주등시의 caffeine 함량은 검출되지 않았다.

Table 9. Changes of ascorbic acid in persimmon leaves during growth(mg%)

Picking month	Chungdo Bansi	Sangju Dungsì	Changyoun Buyu
5	1.20	1.59	5.00
6	8.64	9.03	14.86
7	2.27	2.21	3.44
8	1.49	0.69	2.03
9	-	-	0.05

4) 유리당의 정량

감잎의 성장 중 유리당 함량의 변화를 조사한 결과는 Table 10과 같이 3품종 모두 sucrose, glucose, fructose, raffinose의 4종류로 나타났다. Raffinose의 함량은 6월부터 생성되었으나 그 함량이 매우 적었다. 이와 같은 결과로 정 등¹²⁾이 보고한 것과 유사하였으며 녹차의 경우와 달리 stachynose는 존재하지 않았다. Sucrose의 함량은 5월에 3품종 모두 검출되지 않았고 9월에 그 함량이 급격히 증가하였다. 창녕 부유의 sucrose의 함량은 9월을 기준으로 청도반시 및 상주등시보다 각각 455배, 659배로 그 함량이 많았으며 glucose, fructose 및 raffinose의 함량도 창녕부유가 청도반시와 상주등시보다 함량이 훨씬 많았다. 이러한 결과로 창녕부유가 단감이라는 점에서 당의 함량이 다른 품종보다 함량이 많은 것으로 생각된다.

Table 10. Changes of free sugar in persimmon leaves during growth(%)

	Picking month	Sucrose	Glucose	Fructose	Raffinose
Chungdo Bansi	5	-	0.16	0.16	-
	6	0.18	0.11	0.12	trace
	7	0.16	0.12	0.13	trace
	8	0.13	0.09	0.08	0.09
	9	0.37	0.11	0.12	0.08
Sangju Dungsi	5	-	0.12	0.11	-
	6	0.18	0.08	0.09	trace
	7	0.20	0.12	0.13	trace
	8	0.16	0.12	0.10	0.09
	9	0.25	0.07	0.07	0.08
Chang -young Buyu	5	-	54.94	53.07	-
	6	43.37	76.63	63.72	trace
	7	82.61	45.36	41.58	trace
	8	7.84	42.30	35.89	0.18
	9	164.82	51.91	54.86	0.56

5) 유리아미노산

한국산 감잎의 성장에 따른 유리 아미노산 함량의 변화는 Table 11, 12 및 13과 같다. 감잎의 성장에 따른 3품종 모두 총 18종의 유리 아미노산이 검출되었으며 6월에 유리 아미노산의 함량이 가장 많았고 그 이후부터 차차 감소하는 경향을 나타내었다.

청도반시(Table 11)의 유리 아미노산 함량은 5월을 기준으로 lysine, glutamic acid 및 leucine의 함량은 각각 0.84, 0.78, 및 0.64 mg%로서 다른 품종에 비하여 제일 낮았다. 상주등시(Table 12)의 아미노산 함량은 5월을 기준으로 하였을 때 cystine, methionine 및 asparagine 함량은 각각 1.29, 1.24, 및 1.06mg%로서 특이한 것은 다른 품종에 비하여 황을 함유하는 아미노산이 많았다.

창녕부유(Table 13)의 아미노산함량의 변화는 대체로 6월까지 증가하다가 그 이후 감소하는 경향을 나타냈으며 6월을 기준으로 glutamic acid, leucine 및 aspartic acid의 함량은 각각 3.20, 2.29, 및 2.28mg%로써 다른 품종보다 대체로 유리 아미노산 함량이 월등히 높았다. 차엽 중의 아미노산의 맛과 향의 형성에 깊이 관여한다는 것이 이미 많은 연구에서 검토되었는데 정 등¹²⁾은 아미노산의 조성이 차의 품질에 깊은 관계가 있음을 지적하였다.

본 실험에서 감잎차에 좋은 맛을 나타낸다는 glutamic acid나 aspartic acid 및 lysine이 많을 뿐만 아니라 필수아미노산을 비롯한 기타 아미노산도 골고루 함유되어 있어 맛에 직접적으로 관여하고 또 영양학적인 측면, 고기능성 음료 개발에 있어서도 중요하리라 생각된다.

Table 11. Change of free amino acid in Chungdo Bansi's persimmon leaves during growth(mg%)

Amino acid	Picking month				
	5	6	7	8	9
Aspartic acid	0.24	0.36	0.16	0.12	0.08
Threonine	0.30	0.21	0.18	0.08	0.60
Serine	0.21	0.27	0.13	0.13	0.03
Asparagine	0.51	0.35	0.24	0.20	0.20
Glutamic acid	0.78	0.92	0.50	0.20	0.18
Proline	0.24	0.36	0.35	0.11	0.10
Glycine	0.32	0.24	0.24	0.11	0.09
Alanine	0.58	0.33	0.53	0.17	0.06
Valine	0.51	1.80	0.24	0.12	0.08
Cystine	0.60	0.67	0.61	0.47	0.35
Methionine	0.34	0.36	0.24	0.15	0.08
Isoleucine	0.41	0.78	0.43	0.33	0.06
Leucine	0.64	0.67	0.54	0.18	0.12
Tyrosine	0.46	0.60	0.13	0.03	0.02
Phenylalaine	0.48	0.67	0.23	0.23	0.39
Lysine	0.84	0.27	0.68	0.68	0.36
Histidine	0.19	0.06	0.13	0.13	0.33
Arginine	0.55	0.83	0.39	0.39	0.30
Total	8.20	9.75	5.95	3.83	3.43

Table 12. Change of free amino acid in Sangju Dungsì's persimmon leaves during growth(mg%)

Amino acid	Picking month				
	5	6	7	8	9
Aspartic acid	0.36	0.68	0.41	0.29	0.17
Threonine	0.28	0.32	0.16	0.11	0.10
Serine	0.87	0.54	0.26	0.18	0.03
Asparagine	1.06	0.80	0.11	0.29	0.17
Glutamic acid	0.45	1.40	0.69	0.32	0.20
Proline	0.32	0.28	0.21	0.07	0.07
Glycine	0.24	0.15	0.06	0.68	0.10
Alanine	0.41	0.61	0.47	0.13	0.07
Valine	0.41	0.76	0.32	0.18	0.04
Cystine	1.29	1.80	1.07	0.50	0.67
Methionine	1.24	0.18	0.06	0.06	0.10
Isoleucine	0.56	0.32	0.30	0.29	0.17
Leucine	0.78	0.67	0.44	0.18	0.07
Tyrosine	0.34	0.51	0.27	0.20	0.16
Phenylalaine	0.32	0.47	0.22	0.15	0.24
Lysine	0.41	0.56	0.21	0.12	0.26
Histidine	0.18	0.35	0.23	0.11	0.32
Arginine	0.36	0.86	0.74	0.6	0.54
Total	8.88	11.26	6.23	3.29	3.48

Table 13. Change of free amino acid in Changyoun Buyu's persimmon leaves during growth(mg%)

Amino acid	Picking month				
	5	6	7	8	9
Aspartic acid	0.68	1.31	0.34	0.08	0.04
Threonine	1.33	1.71	0.33	0.24	0.15
Serine	0.94	1.20	0.71	0.30	0.21
Asparagine	1.94	2.28	0.42	0.29	0.18
Glutamic acid	1.70	3.20	0.91	0.36	0.24
Proline	0.87	1.10	0.68	0.54	0.61
Glycine	0.34	0.45	0.30	0.15	0.12
Alanine	1.45	1.71	0.95	0.29	0.14
Valine	1.64	1.84	0.87	0.36	0.20
Cystine	0.08	0.93	0.39	0.21	0.26
Methionine	0.56	0.94	0.35	0.42	0.18
Isoleucine	0.86	0.67	0.21	0.24	0.15
Leucine	1.83	2.29	0.81	0.36	0.34
Tyrosine	0.63	1.10	1.01	0.86	0.30
Phenylalaine	0.71	0.86	0.64	0.50	0.43
Lysine	1.86	2.08	0.83	0.18	0.34
Histidine	0.94	0.93	0.19	0.19	0.15
Arginine	1.35	1.69	0.82	0.63	0.36
Total	20.43	26.29	10.83	6.20	4.40

6) 핵산의 함량

감잎의 성장별 핵산관련물질의 변화는 Table 14와 같으며 그 함량은 CMP가 월등히 많으며 다음으로는 Hydroxanthin, UMP, GMP, IMP, AMP순이었으며 품종간 차이는 있었으나 성장이 진행됨에 따라 그 함량은 증가하다가 8월부터 감소하였다.

Table 14. The contents of nucleotides and their related compounds in the persimmon leaves by HPLC($\mu\text{mol}/100\text{g}$)

	Picking month	Nucleotide					Hypo-xanthine
		CMP	UMP	GMP	IMP	AMP	
Chung Do Bansi	5	107.4	59.2	55.4	53.2	47.6	61.4
	6	112.6	67.4	57.2	60.3	61.7	68.9
	7	120.8	68.5	62.6	71.4	69.8	74.4
	8	108.4	59.4	56.2	62.3	58.2	70.2
	9	106.1	48.2	48.3	52.4	40.6	61.4
Sang Ju Bansi	5	114.9	57.8	64.3	47.8	50.7	71.1
	6	126.5	62.5	70.7	50.4	53.2	78.8
	7	130.7	70.3	79.6	63.5	64.9	82.4
	8	112.6	60.4	69.4	56.2	54.2	71.6
	9	102.8	58.2	58.2	48.4	46.2	68.2
Chang Nyung Buyujong	5	110.6	60.4	72.4	54.4	55.6	69.1
	6	124.4	65.8	82.6	62.7	62.4	72.4
	7	128.6	71.7	85.4	71.9	72.3	76.8
	8	100.6	66.4	72.4	62.5	66.4	70.2
	9	96.8	58.2	69.2	58.4	56.2	59.4

핵산관련 물질은 식품의 정미성분으로서 중요한 구실을 한다는 사실이 알려진 이 후 각종 식품 중 이 물질에 대한 관심이 고조되었으며 기호 식품인 차류도 예외는 아니었다. 國中¹⁵⁾은 식물조직에서 분리된 5'-nucleotide류 중 가장 강한 풍미향상 효과를 가진 것은 GMP이며, AMP는 풍미에 별로 영향을 미치지 않으나 glutamic acid와 공존할 때는 풍미향상능을 가진다고 하였다. 과일과 채소류에 존재하는 5'-nucleotides는 당질과 유기산대사에 필수적인 중간대사물로서 존재한다는 것이 밝혀져 있다¹⁶⁾.

7) 비타민 C의 정량

한국산 감잎의 비타민 C의 함량의 변화는 Table 15와 같이 3품종 모두 7월까지 증가하다가 감소하였다. 이와 같은 결과는 정 등¹²⁾과 Matsuo와 Ito¹⁷⁾의 보고한 결과와 유사하였다. 청도반시와 상주동시의 비타민 C의 함량은 개화기부터 차차 증가하여 7월에 각각 1801.1 mg%, 1679.5 mg% 이었다. 이와 같은 결과는 박 등¹⁸⁾이 보고한 것 보다도 훨씬 그 함량이 많았으며 창녕부유는 2249.2 mg% 으로 그 함량이 다른 품종에 비하여 가장 높았다. 감잎차의 상품성은 비타민 C의 함량이 다른 차에 비하여 월등히 높다고 하는 것에서 그 중요성을 더할 수 있다고 하겠다.

8) 비휘발성 유기산 함량의 변화

감잎 성장 중 비휘발성 유기산 함량의 변화는 Table 16에서와 같이 감잎의 비휘발성 유기산은 galacturonic acid, malic acid, oxalic acid의 3종류가 동정되었다. 청도반시, 상주동시 및 창녕부유의 galacturonic acid의 함량은 5월에서 7월로 차차 그 함량이 감소하다가 8월에는 410.51, 560.1, 710.3 mg%로 나타내었으나 9월에는 감소하였다. Malic acid의 함량은 청도반시에서는 감잎의 성장에 따라 8월까지 차차 증가하다가 9월에는 검출되지 않았으나 상주동시와 청도부유에서는 6월부터 검출되었으나 차차 감소하여 8월에는 나타나지 않았다. Oxalic acid는 3품종 모두 6, 7

월에 검출되었으나 8월 이후는 생성되지 않았다.

Table 15. Changes of ascorbic acid in persimmon leaves during growth(mg%)

Picking month	Chungdo Bansi	Sangju Dungsì	Changyoun Buyu
5	1100.0	1503.2	1909.2
6	1530.2	1564.1	2174.3
7	1801.1	1679.5	2249.2
8	1200.4	1050.1	1979.4
9	742.3	1009.3	1654.0

Table 16. Changes of nonvolatile organic acid in persimmon leaves during growth(mg%)

	Picking month	Galacturonic acid	Malic acid	Oxalic acid
Chungdo Bansi	5	201.29	0.74	-
	6	201.06	0.75	0.96
	7	207.02	0.78	13.98
	8	410.51	0.21	-
	9	263.28	-	-
Sangju Dungsi	5	325.08	-	-
	6	348.15	9.7	12.08
	7	74.51	0.84	25.58
	8	560.17	-	-
	9	219.80	-	-
Chang -young Buyu	5	223.73	-	-
	6	236.88	5.60	23.43
	7	268.96	1.02	31.20
	8	710.34	-	-
	9	212.53	-	-

2. 생리활성 물질의 물리 및 화학적 성질

1) 기지물질의 구조결정

① Compound 1 ((+)-catechin)

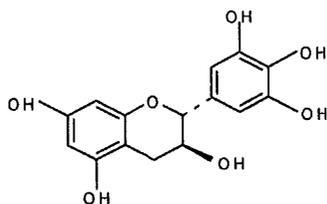


무색침상형(H₂O)으로 mp. 172~175℃이고 선광도는 $[\alpha]_D^{24}$ 9.4° (C=1.0, acetone)이었다. 원소분석에서 C, 62.06%, H, 4.86%, O, 33.7% 인 C₁₅H₁₄O₆의 분자식으로 구성되어 있으며, Negative FAB-MS에서 m/z ; 289[M-H] 분자량을 얻었다. IR spectrum에서 IR(KBr)cm⁻¹ : 3400의 OH가 1620, 1580에서 C=C의 signal이 관찰되었고 이런 PMR, CMR은 일반적인 catechol 유래의 spectrum으로서 이 물질의 확실한 귀속으로 본 실험의 물질 동정에 기본을 설정하였다. 즉, CMR 및 PMR spectrum에 의하면 지방족(aliphatic) 영역의 2.54ppm(dd, J=16, 9Hz) 및 2.92ppm(dd, J=16Hz, 5Hz)의 signal은 그 분열형태 배열에 의해 chemical shift로부터 C-링의 C-4 위치에 1H분의 귀속이 가능하였다. 4.01ppm(dd, J=9.8, 5Hz) 및 4.57ppm(d, J=8Hz)의 signal도 각각의 분열 형태로부터 C-링의 H-3, H-2에 귀속시켰으며 이런 귀속은 COSY spectrum의 결과로 더욱 명확하게 되었다. 그러므로 compound 3은 (+)-catechin으로 동정하였다.

Table 17. Mechanical data compound 1, (+)-Catechin

Type	Colorless needles
FAB-MS (m/z)	[289]
Polarity	$[\alpha]_D^{25} : +9.4^\circ$ (C=1.0, acetone)
¹ H-NMR (acetone-d ₆ -D ₂ O)	2.52(1H, dd, J=16.8Hz, 4-H)
	2.94(1H, d, J=16.6Hz, 4-H)
	4.02(1H, m, 3-H)
	4.57(1H, d, J=8Hz, 2-H)
	5.90(1H, d, J=2Hz, 6-H)
	6.06(1H, d, J=2Hz, 8-H)
	6.75(1H, dd, J=8, 2Hz, B-ring 6-H)
	6.92(1H, d, J=2Hz, 6-H)
8.04(1H, d, J=8Hz, B-ring 5-H)	

② Compound 2 ((+)-Galocatechin)



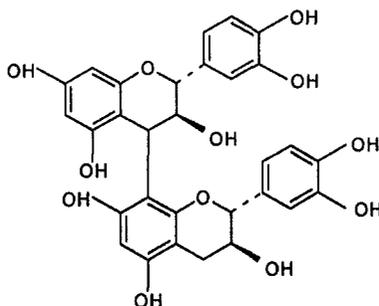
무색침상형(H₂O)로서 mp. 172~175°C, 선광도는 $[\alpha]_D^{24} 12.4^\circ$ (C=1.0, acetone)이며, anisaldehyde-H₂SO₄에 갈색과 FeCl₃에 청색 반응을 하였다. 분자량은 Negative FAB-MS에서 m/z ; 306[M-H]⁻으로 catechin 보다 산소 한 분자에 해당하는 양이 첨가되어 있음을 시사하였고 PMR 비교시에도 catechin은 6.922ppm에서 doublet의 2'-H, 6.48ppm에서 2', 6'-H에 해당하는 두 개의 proton이 singlet로 존재함이 확인된 바 이것

은 galloyl기를 시사하였다. 그러므로 compound 2는 (+)-gallocatechin임이 확인되었다.

Table 18. Mechanical data compound 2, (+)-Gallocatechin

Type	Colorless needles(H ₂ O)
FAB-MS (m/z)	[306] ⁻
Polarity	[α] _D ²⁵ :+12.4 °(C=1.0, acetone)
¹ H-NMR (acetone-d ₆ -D ₂ O)	2.49(1H, dd, J=8.16Hz, 4-H) 2.91(1H, dd, J=6, 16Hz, 4-H) 3.98(1H, m, 3-H) 4.48(1H, d, J=8Hz, 2-H) 5.87, 6.03(each 1H, d, J=2Hz, 6,8-H) 6.48(2H, s, 2', 6'-H)

③ Compound 3 (Procyanidin B-1)



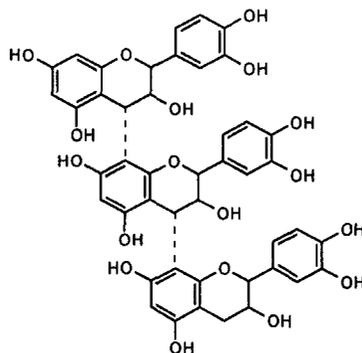
염갈색 무정형 분말로서 [α]_D²⁴ + 40.2° (C=1.0, acetone)로서 Negative FAB-MS에 의해 분자량은 m/z ; 577[M-H]⁻을 얻었으며 anisaldehyde-H₂SO₄ 용액에서 갈색 반응을 보였다. PMR에서 flavan 골격에 해당하는 5.08, 5.16, 5.20, 5.25ppm에서 H-2에 해당하는 signal이 형성되어 있음이

관찰되었기에 분리된 상부의 물질은 (-)-epicatechin-4 β -benzylthioether로 동정하였다. CMR spectrum은 29.2, 37.8ppm의 C-4', 4와 66.2, 70.1, 76.2, 81.8ppm에서 각각 C-3', 3, 2, 2'의 귀속이 확인되었고 PMR에서 Table 19와 같은 signal을 얻었으므로 이 화합물은 epicatechin-(4 β →8)-catechin으로 결합된 procyanidin B-1로 동정하였다.

Table 19. Mechanical data compound 3, Procyanidin B-1

Type	A amorphous powder
FAB-MS (m/z)	[577] ⁻
Polarity	[α] _D ²⁰ ; +40.2 °(C=1.0, acetone)
¹ H-NMR (acetone-d ₆ -D ₂ O)	2.58(1H, dd, J=16, 8Hz, 4'-H) 2.83(1H, dd, J=16, 6Hz, 4'-H) 3.98(1H, brs, 3-H) 4.10(1H, m, 3'-H) 4.68(1H, brs, 4-H) 4.76(1H, m, 2'-H) 5.08(1H, brs, 2-H) 5.94(1H, d, J=2Hz, 6-H) 5.97(1H, S, 6'-H) 6.03(1H, d, J=2Hz, 8-H) 6.62-7.08(6H in total, m, B, B'-H)

④ Compound 4 (Procyanidin C-1)

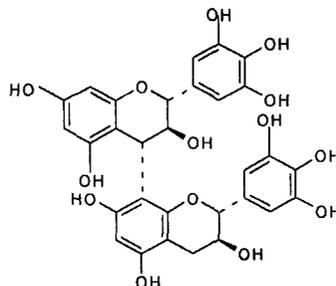


염갈색의 무정형분말로서 $[\alpha]_D^{25} + 75.5$ (C=1.0, acetone)으로 anisaldehyde- H_2SO_4 용액에서 procyanidin 특색인 갈색 반응을 띄었다. Negative FAB-MS에 의해 compound 4는 m/z ; 865[M-H] 분자량을 얻었다. Compound 4의 PMR에서 상단 부위에 해당하는 H-4의 결합 정수가 적으므로 β 형임이 밝혀졌다. PMR분석에 의해 signal의 값은 Table 20과 같았으며, compound 4는 epicatechin-(4 β →8)-epicatechin-(4 β →8)-epicatechin으로 결합된 procyanidin C-1로 동정하였다.

Table 20. Mechanical data compound 4, Procyanidin C-1

Type	A amorphous powder
Polarity	$[\alpha]_D^{25} ; +75.5$ (C=1.0, acetone)
FAB-MS (m/z)	[865]
¹ H-NMR (acetone-d ₆ -D ₂ O)	2.64-2.96(2H, m, 4''-H) 4.12(2H, brs, 3, 3'-H) 4.36(1H, brs, 3''-H) 4.82(2H, s, 4, 4'-H) 5.04, 5.12, 5.20(each 1H, s, 2, 2', 2''-H) 5.90-6.20(4H in total, m, A-ring H) 6.60-7.30(9H in total, m, B-ring H)

⑤ Compound 5 (Prodelphinidin B-3)

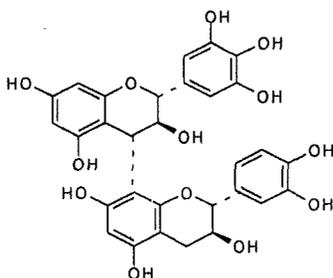


염갈색의 무정형으로 선광도는 $[\alpha]_D^{24} - 157.6^\circ$ (C=1.0, acetone) 이었고 anisaldehyde-H₂SO₄에서 갈색 반응을 나타내었으며 Negative FAB-MS에서 m/z ; 609[M-H] 의 분자량을 얻었다. PMR spectrum은 Table 21과 같으며, 이 물질은 4-H의 coupling constant가 크므로 α 로 결합되어 있음이 확인되었다. 그러므로 compound 5는 gallocatechin-(4 α →8)-gallocatechin인 prodelphinidin B-3으로 동정하였다.

Table 21. Mechanical data compound 5, Prodelphinidin B-3

Type	A amorphous powder
FAB-MS (m/z)	[609]
Polarity	$[\alpha]_D^{24} ; -157.6^\circ$ (C=1.0, acetone)
¹ H-NMR (acetone-d ₆ -D ₂ O)	2.58(1H, dd, J=7, 15Hz, 4'-H)
	2.94(1H, dd, J=5, 15Hz, 4'-H)
	4.25-4.67(3H, m, 2, 4, 2'-H)
	5.78-6.14(3H in total, m, 6, 8, 6'-H)
	6.19, 6.41, 6.58, 6.62(4H in total, B, B'-H)

⑥ Compound 6 (Gallocatechin-(4 α →8)-catechin)



염갈색의 무정형으로 선광도는 $[\alpha]_D^{24} - 196.8^\circ$ (C=1.0, acetone)이

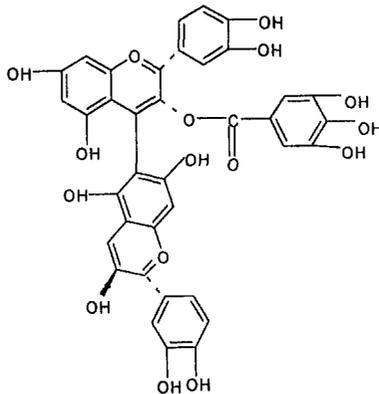
었으며, anisaldehyde-H₂SO₄용액에서 적갈색 반응을 하였다. PMR spectrum은 Table 22와 같으며, 상부에 해당하는 4-H의 coupling constant가 크므로 본 화합물은 gallocatechin-(4 α →8)-catechin으로 동정하였다.

Table 22. Mechanical data compound 6, Gallocatechin-(4 α →8)-catechin

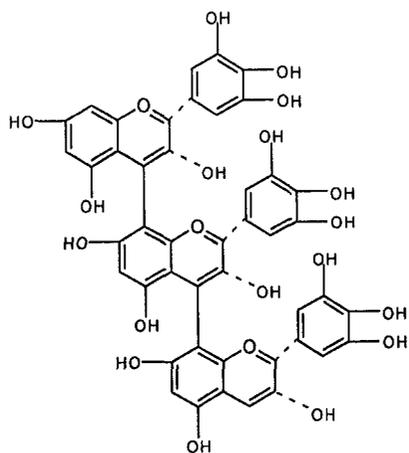
Type	A amorphous powder
Polarity	$[\alpha]_D^{20}$; -196.8 °(C=1.0, acetone)
¹ H-NMR (acetone-d ₆ -D ₂ O)	2.40-3.00(2H, m, 4-H)
	4.01-4.76(5H in total, m, 2, 3, 4, 2', 3'-H)
	5.76-6.33(3H in total, m, A-ring H)
	6.46-7.28(5H in total, m, B-ring H)

2) 신규 화합물의 구조결정

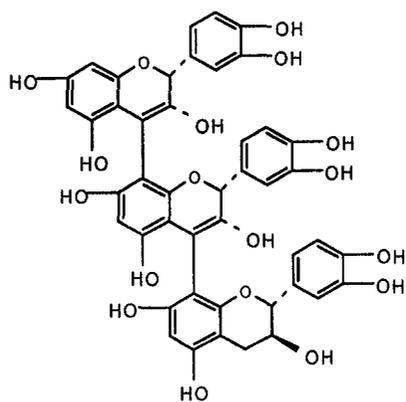
① Compound 7 (Procyanidin B-7-3-O-gallate)



② Compound 8 (Procyanidin C-1-3' , 3'' , 3''' -O-trigallate)



③ Compound 9 ((-)-epigallocatechin-(4 β →8)-epigallocatechin-(4 β →8)-catechin)



Compound I -a-1, II-a-1, II-b, II-c-1 [(-)-epicatechin-3-O-gallate]

colorless needles, $[\alpha]_D^{29}$: -13.9° (C=1.0, acetone),

$^1\text{H-NMR}$ (acetone- d_6 + D_2O) δ : 2.79(1H, dd, J=17, 3Hz, 4-H), 3.09(1H, dd, J=17, 4Hz, 4-H), 5.15(1H, brs, 2-H), 5.56(1H, m, 3-H), 6.38, 6.08(each 1H, d, J=2Hz, 6, 8-H), 6.65(2H, s, 2', 6'-H), 7.00, 7.23(each 2H, s, G-H), 7.06(1H, d, J=2Hz, 2'-H), $^{13}\text{C-NMR}$ (acetone- d_6 + D_2O) δ : 26.6(4-C), 69.1(3-C), 78.2(2-C), 101.6, 103.6(6,8-H), 104.5(4a-C), 106.6(2',6'-C), 109.9, 110.3(2xG, 2,6-C), 133.1(4'-C), 139.0, 139.8(each G, 4-C), 145.7, 146.0(3',5'-C, 2xG, 3,5-C), 151.5, 156.7, 157.5(5,7,8a-C), 165.2, 166.6(each COO)

Compound I -b, III-b [(+)-catechin]

colorless needles(H_2O), $[\alpha]_D^{29}$: +91.5° (C=0.7, acetone),

IR : 3300(OH), 1620(arom. C=C),

$^1\text{H-NMR}$ (acetone- d_6 + D_2O) δ : 2.54(1H, dd, J=16, 8Hz, 4-H), 2.92(1H, dd, J=16, 6Hz, 4-H), 4.01(1H, m, 3-H), 4.57(1H, d, J=8Hz, 2-H), 5.87(1H, d, J=2Hz, 6-H), 6.04(1H, d, J=2Hz, 6-H), 6.76(1H, dd J=8, 2Hz, 6'-H), 6.82(1H, d, J=8Hz, 5'-H), 6.92(1H, d, J=2Hz, 2'-H)

Compound I - c [procyanidin B-7]

colorless needles, $[\alpha]_D^{21}$: +47.8° (C=1.0, acetone),

$^1\text{H-NMR}$ (acetone- d_6 + D_2O) δ : 2.46(1H, dd, J=8, 16Hz, 4'-H), 2.86(1H, dd, J=8, 16Hz, 4'-H), 3.95(1H, m, 3'-H), 4.80(1H, s, 3-H), 4.52(1H, d, J=8Hz, 2'-H), 4.64(1H, s, 4-H), 4.96(1H, s, 2-H), 6.00-6.15(3H in total, m, A-ring H), 6.70-7.04(6H in total, m, B-ring H)

Compound I -d, II-d-1 [gallate]

colorless needles(H_2O), mp 266-268°C, IR $\nu_{\text{max}}^{\text{kBr}}$ cm^{-1} :3400(OH),

1710(COOH), $^1\text{H-NMR}$ (acetone- d_6 + D_2O) δ : 7.20(2H, s, galloyl)

Compound II-d-1 [procyanidin B-2]

colorless powder, $[\alpha]_D^{20}$: +34.9° (C=1.0, acetone),

$^1\text{H-NMR}$ (acetone- d_6 + D_2O) δ : 2.62-3.08(2H, m, 4'-H), 4.00(1H, s, 3-H), 4.31(1H, br s, 3'-H), 4.75(1H, s, 4-H), 4.96(1H, s, 2'-H), 5.12(1H, s, 2-H), 5.80-6.20(3H in total, m, A-ring H), 6.60-7.20(6H in total, m, B-ring H)

Compound II-d-1 [procyanidin C-1]

colorless powder, $[\alpha]_D^{25}$: +75.5° (C=1.0, acetone),

$^1\text{H-NMR}$ (acetone- d_6 + D_2O) δ : 2.64-2.96(2H, m, 4''-H), 4.12(2H, br s, 3,3'-H), 4.36(2H, br s, 3''-H), 4.82(2H, s, 4,4'-H), 5.04, 5.12, 5.20(each 1H, s, 2,2',2''-H), 5.90-6.20(4H in total, m, A-ring H), 6.60-7.30(9H in total, m, B-ring H)

Compound III-a-1 [prodelphinidin B-1]

colorless powder, $[\alpha]_D^{21}$: -64.4° (C=1.2, acetone),

$^1\text{H-NMR}$ (acetone- d_6 + D_2O) δ : 2.80-3.24(2H, m, 4-H), 4.40(1H, m, 3-H), 4.87(1H, brs, 4-H), 5.17(2H, brs, 2,2'-H), 5.60(1H, m, 3'-H), 5.96-6.10(3H in total, m, 6,8,6'-H), 6.52, 6.70(each 2H, B,B'-H)

기기분석 결과에 의해 화합물 I-a-1는 무색 침상형으로 $[\alpha]_D^{29}$: -13.9° 를 얻었고 $^1\text{H-NMR}$ 에 의하면 aliphatic 영역에 의한 2.90 (dd, J=18, 3Hz), 및 3.10(dd, J=18, 4Hz) signal은 분열 양상에서 chemical shift값이 C환의 C-4 proton임이 확인되었다. 더욱이 5.07(brs) 및 5.55(m)의 signal의 분열상도 C환의 2-H, 3-H의 귀속임을 알았다. Aromatic영역에서도 6.63(brs)의 분열 양상은 각각 catechol환(B환) 6'-H, 5'-H 및 2'-H에 귀속시켰다. 또한 6.05(brs)의 $^1\text{H-NMR}$ signal은 분열형태로 보아 각각 A환의 6-H, 8-H의 귀속이 결정되었고 7.03(s)은 singlet로 2H분의 gallate를 시사하는 것으로 보아 이 화합물은

(-)-epicatechin-3-O-gallate으로 동정하였다. 화합물 II-a-1, II-b, II-c-1도 동일한 화합물로 확인되었다. 화합물 I-b은 무색 침상형으로 $[\alpha]_D^{29}$: +94°를 얻었고 IR에서 3250(OH), 1610, 1520(aromatic c=c) 확인되었다. $^1\text{H-NMR}$ 의하면 aliphatic 영역에 의한 2.52(dd, J=16, 8Hz) 및 2.94(d, J=16, 6Hz) signal은 분열양상에 있어서 chemical shift값이 C환의 C-4 proton임이 확인되었다. 더욱이 4.02(ddd, J=9, 8, 5Hz) 및 4.57(d, J=8Hz)의 signal은 분열상도 C환의 3-H, 2-H의 귀속임을 알았다. Aromatic영역에서도 6.75(dd, J=8, 2Hz), 6.82(d, J=8Hz) 및 6.92(d, J=2Hz)의 분열 양상은 ABX-type 시사하므로 각각 catechol환(B환) 6'-H, 5'-H, 및 2'-H에 귀속시켰다. 또한 5.09 및 6.06의 $^1\text{H-NMR}$ signal은 각각 J=2Hz의 doublet로 A환의 6-H, 8-H의 귀속이 결정되어 (+)-catechin으로 동정되었다.

화합물 III-b도 $^1\text{H-NMR}$ 에서 I-b과 signal이 일치하므로 (+)-catechin이었다. 화합물 I을 tannase로 반응시 화합물 I-c와 I-d로 분리되었고, compound I-d는 IR에서 3400의 hydroxyl, 1710의 carboxyl기가 확인되었으며 $^1\text{H-NMR}$ 에서도 7.02 ppm에서 2H의 siglet의 galloyl기가 확인되므로 gallate였다. 화합물 II-d-2도 역시 $^1\text{H-NMR}$ signal이 일치하였다. 이러한 결과를 종합하여 볼 때 compound ①은 (-)-epicatechin-3-O-gallate와 (+)-catechin로 결합된 procyanindin B-7-3-O-gallate였다. 화합물 ②는 완전 thiolysis에 의해 compound II-a와 II-b를 2 : 1 mole 비율로 얻었고 compound II-a를 탈유황반응시 화합물 II-a-1를 얻을 수가 있었다. 이 화합물은 앞에서 확인된 바 있는 화합물 I-a-1과 일치하였다. (-)-epicatechin-3-O-gallate로 동정하게 되었다. 부분 thiolysis 및 tannase 처리시 화합물 II-c-1은 $^1\text{H-NMR}$ 에서 (-)-epicatechin-3-O-gallate와 일치하였다. 화합물 II-d-2의 tannase 처리에 의해 화합물 II-d-1과 화합물 II-d-2를 무색 결정형으로 얻었다. 화합물 II-d-2는 gallate화합물이었다. 이러한 결과를 볼 때 화합물 II는 procyanindin-C-1-3', 3'', 3'''-O-trigallate로 동정되었다. 화합물 ③은 부분 thiolysis에서 compound III-a와 compound III-b를 얻을 수 있

있고 화합물Ⅲ-a 를 탈유환원반응시 화합물 Ⅲ-a-1로 이 화합물은 안
등이 감나무잎에서 충치예방물질분리에서 이미 밝혀진 procyanidin
B-2로 확인되었다. 화합물 Ⅱ-b는 1H-NMR에서 (+)-catechin으로 동정
된 바 화합물 ③은 epigallocatechin-(4β→8)-epigallocatechin-(4β→
8)-catechin으로 확인되었다.

3. 분리정제 물질(신규화합물)의 효소저해 실험

1) Angiotensin converting enzyme(ACE)

감잎으로부터 순수 분리한 polyphenol류의 ACE 저해활성측정을 실험
한 결과는 Fig. 1 과 같다. Procyanidin B-7-3-O-gallate는 100 μM농
도에서 94%의 저해효과를 나타내었으며 epigallocatechin-(4β→8)-epiga
llocatechin-(4β→8)-catechin, procyanidin C-1-3',3'',3'''-O-trigallate는
각각 90.69, 80.90% 저해를 하였다. 이러한 결과로 감잎의 지속적인 섭취
는 고혈압의 억제에 효과가 있을 것이라 생각된다.

2) Xanthine oxidase(XOase)

감잎으로부터 순수 분리한 polyphenol류의 XOase 저해활성측정을 조사
한 결과는 Fig. 2와 같다. Procyanidin B-7-3-O-gallate와 procyanidinC-
1-3',3'', 3'''-O-trigallate 즉, gallate가 붙은 화합물에서 100 μM의 농
도에서 66%와 63%의 강한 저해효과를 나타냈으며 현재, 통풍 예방약으
로 판매되고 있는 allopurnol 성분보다 효과가 강한 것으로 확인되고 있
다.

3) Tyrosinase

감잎으로부터 순수 분리한 polyphenol류의 tyrosinase 저해활성을 측정
한 결과는 Fig. 3과 같다. Procyanidin C-1-3',3'',3'''-O-trigallate는 100
μM에서 70%의 강한 제해효과를 나타냈으며 epigallocatechin-(4β→
8)-epigallo- catechin-(4β→8)-catechin는 51%의 저해효과를 나타내었
다. 이러한 효과는 화장품의 미백재료로 사용되고 있는 kojic acid,

albumin보다 우수하였으며 여성들의 미에 관심을 줄 수 있는 기능성 화장품의 식품 소재로 가능성이 높다 할 수 있다.

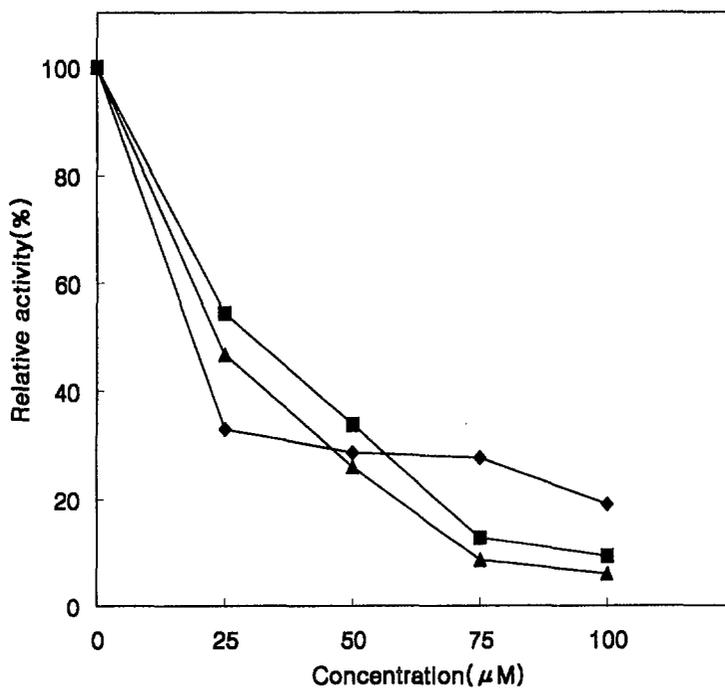


Fig. 1. Effect of polyphenols isolated from persimmon leaves on the tyrosinase

- ◆ : Procyanidin C-1-3',3'',3'''-O-trigallate
- : Epigallocatechin-(4β→8)-epigallocatechin-(4β→8)-catechin
- ▲ : Procyanidin B-7-3-O-gallate

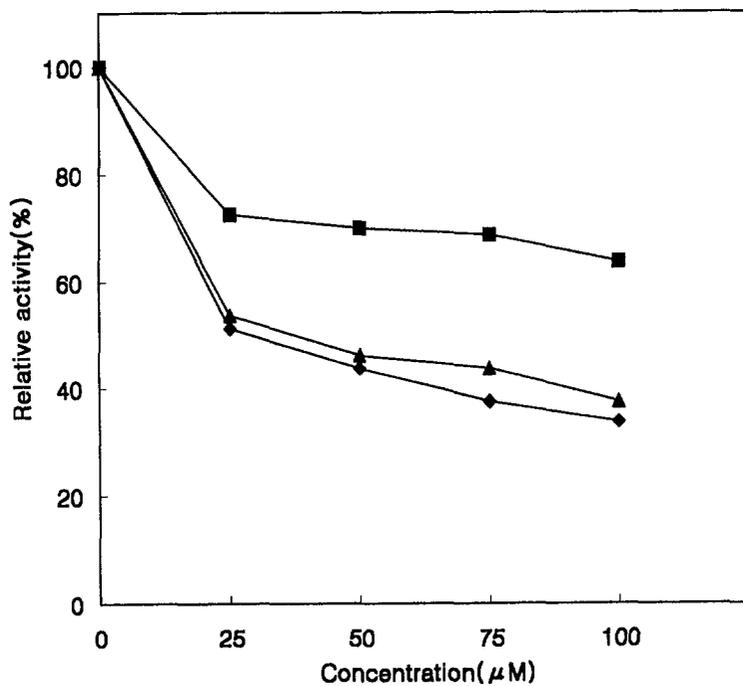


Fig. 2. Effect of polyphenols isolated from persimmon leaves on the xanthine oxidase

- ◆ : Procyanidin C-1-3',3'',3'''-O-trigallate
- : Epigallocatechin-(4β→8)-epigallocatechin-(4β→8)-catechin
- ▲ : Procyanidin B-7-3-O-gallate

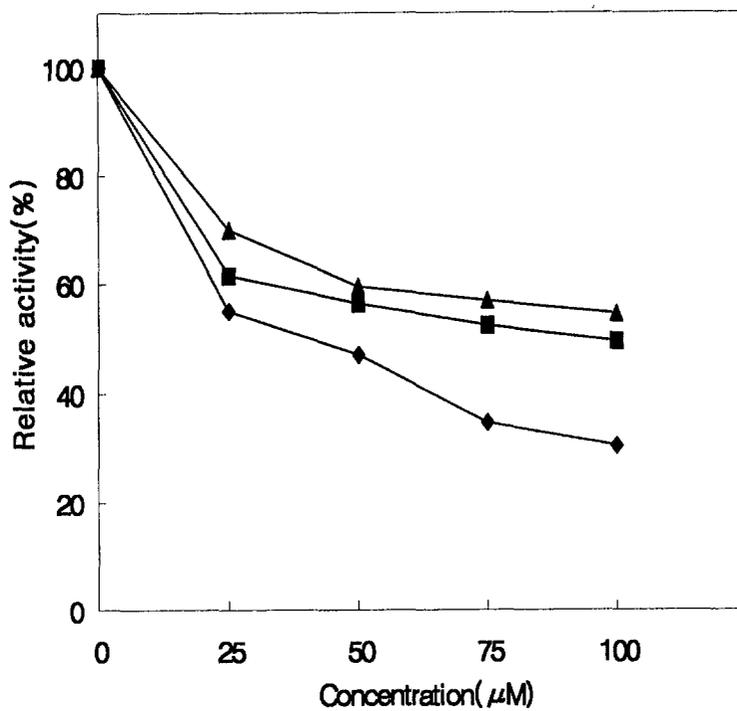


Fig. 3. Effect of polyphenols isolated from persimmon leaves on the angiotensin converting enzyme

- ◆ : Procyanidin C-1-3',3'',3'''-O-trigallate
- : Epiallocatechin-(4β→8)-epigallocatechin-(4β→8)-catechin
- ▲ : Procyanidin B-7-3-O-gallate

제4절 결 론

한국산 감잎을 청도반시, 상주동시 및 부유의 3품종으로부터 고기능성 감잎차 음료를 개발할 목적으로 유리당, 총 비타민 C, 유리 아미노산 등 차의 맛과 기능적 특성을 나타내는 성분변화를 조사하였다. 3품종의 수분함량은 5월에 77.9~80.1%였으며 성장함에 따라 차차 감소하였고 조단백 및 조지방의 함량은 성장함에 따라서 차차증가하여 8월에 최고치를 나타내었다가 감소하는 경향을 나타내었다. 유리당의 함량변화는 3품종 모두 sucrose, glucose, fructose, raffinose의 4종류를 검출하였고 부유품종의 sucrose 함량은 7월을 기준으로 청도반시, 상주동시보다 각각 1378 및 143배로 그 함량이 매우 높았다. 비타민 C의 함량은 개화기 초기부터 차차 증가하여 7월에 최고치를 나타내었다. 부유단감이 7월을 기준으로 2249 mg%로 가장 많았으며 3품종 모두 7월까지 차차 증가하다가 감소하였다. 감잎의 유리 아미노산의 종류는 3품종 모두 18개의 유리 아미노산이 검출되었다. 이상의 결과에서 감잎의 대부분의 성분들이 6월에서 7월 초순에 최고치를 나타냄으로 감잎을 이용한 감잎차 및 감잎을 이용한 고기능성 음료개발을 위해서 감잎의 적절한 채취 시기는 6월이라고 생각된다.

감잎으로부터 통풍치료, 미백효과, 고혈압 억제효과 등의 개발목적으로 9종의 flavan-3-ol 화합물을 분리하였고 기기분석에 의해 화학구조를 밝혔다. 각 화합물은 (+)-catechin, (+)-gallicocatechin, procyanidin B-1, pyrocyanidin C-1, prodelpinidin B-3, gallicocatechin-(4 α →8)-catechin 과 신물질인 procyanidin B-7-3-O-gallate, procyanidin C-1-3'-3''-3'''-O-trigallate, (-)-epigallicocatechin-(4 β →8)-epigallicocatechin-(4 β →8)-catechin 이었다. 감잎으로부터 순수 분리한 polyphenol류의 ACE 저해활성측정을 실험한 결과 procyanidin B-7-3-O-gallate는 100 μ M 농도에서 94%의 저해효과를 나타내었으며 epigallicocatechin-(4 β →8)-epigallicocatechin-(4 β →8)-catechin, procyanidin C-1-3'-3''-3'''-O-trigallate는 각각 90.69, 80.90% 저해를 하였다.

Xanthine oxidase 저해활성측정을 조사한 결과 procyanidin B-7-3-O-gallate와 procyanidin C-1-3'-3''-3'''-O-trigallate 즉, gallate가 붙은 호합물에서 100 μ M의 농도에서 66%와 63%의 강한 저해효과를 나타냈다. Tyrosinase 저해활성을 측정한 결과는 procyanidin C-1-3'-3''-3'''-O-trigallate는 100 μ M에서 70%의 강한 저해효과를 나타냈으며, epigallocatechin-(4 β →8)-epigallo-catechin-(4 β →8)-catechin는 51%의 저해효과를 나타내었다.

제5절 참고문헌

1. Storch, J. and Ferber, E.: Detergent-Amplified Chemiluminescence of Lucigenin for Determination of Superoxide Anion Production by NADH Oxide and Xanthine Oxidase. *Analytical Biochemistry*, 169, 262(1988)
2. Ezaki, N., Nonaka, G. and Nishioka, I.: Pharmacological Studies on *Linderae umbellatae*, *Plant Media*, 43, 69(1983)
3. Nonaka, G., Nishioka, I., Bodner, A.J. and Lee, K.H.: Anti-AIDS Agents, 2 : Inhibitory Effects of Tannin on HIV-Revers Transcriptase and HIV Replication in H9 Lymphocyte cells. *Journal of Natural Product*, 53(3), 587(1990)
4. Sakanak, S., Kim. M. and Yamamoto, T.: Antibacterial Substances in Japanes Green Tea Extract agaist *Streptococcus mutans*, a Cariogenic Bacterium. *Agric. Biol. Chem.*, 53(9), 2307(1989)
5. Nonak, G.: Isolation and Structure elucidation of Tannins. *Pure & Appl. Chem.*, 61(3), 357(1989)
6. Hashimoto, F., Nonaka, G. and Nishioka, I.: Isolation of Four New Acylated Flavam-3-ols from Oolong Tea. *Chem, Pharm, Bull.* 35(2), 611(1987)

7. Wani, M.C., Taylor, H.L. and Wall M.E.: The Isolation and Structure of Taxol, from *Taxus brevifolia*, J. of the American Chemical Society, 2325(1971)
8. Haslam, F.: Galloyl ester in the Aceraceae. *Phytochemistry*, 4, 495(1965)
9. Okauda, T., Yoshida, T. and Hattano, T.: Ellagitannins as active constituents of medicinal Plants. *Plant medica*, 55, 117(502)
10. Morimoto, Y., Nonaka, G. and Nishioka, I.: Isolation and Structure of Novel bi- and triflavonoids from the leaves of *Cassia fistula* L. *Chem. Pharm. Bull.*, 38, 717(1988)
11. A. O. A. C.: Official Methods of Analysis, 14th ed., Washington D.C. (1984)
12. Joung, S.Y., Lee, S.J., Sung, N.J., Jo, J.S. and Kang, S.K.: The chemical composition of persimmon(*Diospyros Kaki, Thumb*) leaf tea. *J. Korean Soc. Food Nut.*, 24, 720-726(1995)
13. Naoko, S. and Keiko, I.: The relationship between Vitamin C and polyphenol content in persimmon leaves(in Japanese). *J. Japanese Society of Nutrition and Food Science*, 44, 213-219(1991)
14. Nagashima, Z., Nakagawa, M., Tokumura, H. and Toriumi, Y.: Free amino acids in tea IV. Quantitative changes in the manufacture of black tea and green tea. *J. Agr. Chem. Soc.*, 31, 169(1951)
15. 國中明: 核酸關聯物質の呈味作用に関する研究. *日本農藝化學會誌*, 34, 489(1960)
16. 瀧野慶則, 今川弘, 央戸和未: 茶のヌクレオチドに関する研究. *日食工誌*, 23, 138(1976)
17. Matsuo, T. and Ito, S.: The chemical structure of kaki tannin from immature fruit of the persimmon(*Diospyros kaki L.*)(in Japanese). *Agric. Biol. Chem.*, 42, 1637-1639(1978)

18. Park, Y.J., Kang, M.H., Kim, J.I., Park, O.J., Lee, M.S. and Jang, H.D.: Changes of Vitamin C and superoxide dismutase(SOD)-like activity of persimmon leaf tea by processing method and extraction condition (in Korean). *Korean J. Food Sci Technol.*, 27, 281-285(1995)

제 5 장 생리활성물질의 중금속 제거 효과

제1절 연구개발의 목적과 범위

최근 우리나라는 환경오염이 심화되어 우리가 상용하는 음료수나 식품에도 중금속의 오염이 크게 우려되고 있다. 일단 체내에 들어온 중금속은 쉽게 배설되지 않아 생물학적 반감기도 대단히 길므로 나이가 들수록 그 축적량은 증가하게 된다. 이들 중금속이 체내에 축적되었을 때에는 체중감소, 빈혈, 장기의 생화학 및 형태학적 변화, 뇌 손상 등의 중독 현상을 일으키게 된다. 이들 중금속이 체내에 축적되었을 때에는 체중감소, 빈혈, 장기의 생화학 및 형태학적 변화, 뇌손상 등의 중독 현상을 일으키게 된다. 또한 이들 중금속은 Ca, Fe, Zn, Se 등의 필수 무기 원소와 장내 흡수 단계에서 경쟁적으로 작용하여 조직내 함량을 감소시킨다는 보고가 있다^{1, 3)}. 한편 카드뮴이나 납과 같은 유해성 중금속의 중독을 식생활 측면에서 해결하고자 하는 연구가 국내외에서 수행되고 있다. 즉 단백질, 칼슘, 지방, 섬유질 등의 식이인자들이 체내 중금속 대사에 영향을 미쳐 그 분포와 배설을 변화시키는 것으로 보고된 바 있으며^{4, 5)} 그 밖에 2,3-dimercaptosuccinic acid, EDTA와 BAL(2,3-dimercaptopropanol)이 chelating agent로 작용해 중금속의 배설을 증가시키고 체내 중금속 함량을 감소시킨다는 보고가 발표되었다^{6, 8)}. 한편 감나무잎을 열수침출한 음료를 음용하게 되면 인체 내에서 중금속 이온을 흡착함으로써 중금속에 대한 해독 작용을 기대할 수 있을 것으로 예상된다.

현대사회는 산업 발달에 따른 인구의 도시집중으로 인하여 공단지역의 폐수와 자동차 매연 등에 의한 환경오염 문제가 갈수록 심화되고 있으며, 특히 카드뮴, 납, 수은 등과 같은 중금속의 피해가 심각한 문제로 대두되고 있다⁹⁾. 카드뮴은 우리 생활주변에 널리 존재하며 식수와 식품을 통해 경구적으로 또는 대기중에서의 피부를 통한 체내 침투가 자연스럽게 이루어지며, 생물학적 반감기도 18~33년 정도로 매우 긴 것으로 보고되고 있다. FAO/WHO 설정 1일 카드뮴의 섭취기준을 보면 0.95~1.19

$\mu\text{g}/\text{kg b.w./day}$, $57\sim 71\mu\text{g}/\text{person /day}$ 으로 사람 체내 흡수율은 3~8%로 아주 낮으며, 식품에서 섭취된 것의 대부분은 대변으로 배설되고, 약 $10\mu\text{g}/\text{L}$ 정도는 뇨로 배설된다고 보고되었다¹⁰⁾. 우리나라에서는 카드뮴의 전국적인 식이섭취량에 대한 보고가 아직 없으나 1980~1990년 사이 지역별 카드뮴 섭취실태 조사에 따르면 1인당 평균 $55\sim 84\mu\text{g}/\text{day}$ 로 카드뮴 섭취가 허용한계에 도달한 것으로 나타나고 있다. 1950 년대에 일본에서 Itai-Itai 병이 발생하면서^{11,12)} 그 원인이 수질오염에 의한 카드뮴 중독이라는 것이 밝혀졌고, 카드뮴은 노출되는 양¹³⁾, 폭로기간¹⁴⁾ 및 체내 침입경로 등^{15,16)}에 따라서 다양한 독성을 나타내는 것으로 보고되고 있다. 체중감소, 빈혈, 간과 신장 등의 기능과 조직 형태학적 변화, 고혈압, 골연화증, 단백뇨 및 중추신경계 이상과 내분비 장애 등을 유발하며, 최근에는 미량의 카드뮴에 만성적으로 노출시킨 동물에서 고환조직 손상, 생식 독 작용 및 발암작용이 보고된 바 있다^{15,17-19)}

카드뮴 중독으로부터 발병될 수 있는 질병을 예방하고, 이를 해독화하려는 연구가 진행되면서 식이를 통한 해독연구가 많이 수행되어 왔으며, 식이섬유 뿐만 아니라 양파, 마늘 및 녹차, 감잎과 같은 식물체로부터 중금속을 제거하려는 연구가 활발하게 진행되고 있다²⁰⁻²⁸⁾. 감잎의 중금속 제거효과에 대해서는 임²⁸⁾과 권 등²⁹⁾의 보고에서처럼 *in vitro*상에서도 다른 물질들과 비교해 볼 때 중금속의 제거율이 높은 편이라는 것을 알 수 있었다.

본 실험에서는 감잎으로부터 분리한 생리활성물질이 중금속 제거효과가 있음을 설명하여 감잎을 이용한 차나 음료의 보급에 기초 자료로 이용하고자 동물실험을 통한 그 안전성과 기능성을 검토하였다.

제2절 연구개발의 방법

1. 시료추출

건조된 감잎 10 kg을 추출 탱크에서 60% 아세톤에 침지하여 상온에서 24 시간 방치한 후 원심 분리하여 상징액을 취하였다. 침전물은 다시

위와 같은 조작을 4회 반복하여 상정액을 모아 감압 농축하여 아세톤을 증발시킨 후 수용성 성분만을 회수하기 위하여 증류수로 용해하였다. 용해한 후 여과하여 클로로필을 제거한 다음, 여액을 회수하여 분리용 시료로 사용하였다.

시료의 분리는 분리용 column인 Sephadex LH-20 (12 × 120 cm)에 60% 아세톤으로부터 농축된 2.5 L의 분리용 시료를 loading하고, 전개용매로는 메탄올을 사용하여 메탄올:증류수(0:1 → 1:0)로 전개하면서, fraction collector에 100 mL씩 분리시킨 후, thin layer chromatography (TLC; 5.0 × 5.0 cm) 상에서 반응색과 R_f 값에 따라 폴리페놀 화합물을 분류하고 fraction을 분리하여 동결건조시킨 것을 fraction I을 F-I군, fraction II를 F-II군으로 하여 냉동 보관하면서 실험재료로 사용하였다.

2. 실험동물 사육

실험동물은 Sprague-Dawley계 수컷 32마리를 표준식으로 10일간 적응시킨 후 실험직전 평균 체중이 143 ± 18 g인 것을 난괴법으로 8마리씩 4군으로 Table 1과 같이 나누어 stainless steal cage에서 사육하였고, 실험종료 3일전부터는 변의 채취를 위하여 실험군 당 2마리씩 metabolic cage에 나누어서 사육하였다.

Cage, 식이그릇, 물병 등 모든 기구는 중금속의 오염을 방지하기 위하여 0.4% ethylenediamine tetraacetic acid(EDTA) 용액으로 세척한 다음 탈이온 증류수로 헹구고 건조시킨 후 사용하였다.

3. 식이조성 및 중금속 투여

동물의 식이는 Table 2와 같이 조성하였으며, 중금속 투여는 Table 1과 같이 경구투여 하였다. 즉, 대조군은 기본식이를 공급하면서, 실험군과 동일한 조건을 주기 위하여 생리식염수를 0.5 mL 경구투여 하였으며, 실험군 1은 동결건조시켜 분말화 한 감잎의 분리물질을 10 mM, 실험군 2는 감잎 분리물질을 25 mM로 조제하여 매일 일정한 시간에 0.5 mL씩 경구 투여하였다³⁰⁾.

Table 1. Experimental design

Experimental group	Cd(ppm Cd/Kg diet)	Polyphenols
Normal ¹⁾	-	saline
Control ²⁾	50 ppm	saline
F-1 ³⁾	50 ppm	10 mM
F-2 ⁴⁾	50 ppm	25 mM

¹⁾ Normal : basal diet + saline 0.5 mL

²⁾ Control : basal diet + 50 ppm Cd + saline 0.5 mL

³⁾ F-1 : basal diet + 50 ppm Cd + 10 mM polyphenols 0.5 mL

⁴⁾ F-2 : basal diet + 50 ppm Cd + 25 mM polyphenols 0.5 mL

Table 2. Composition of basal diet (g/Kg diet)

Ingredients	Amount
Corn starch ¹⁾	668
Casein ²⁾	180
DL-methionine ³⁾	2
Corn oil ⁴⁾	50
Mineral mix. ⁵⁾	40
Vitamin mix. ⁶⁾	10
Cellulose ⁷⁾	50
Kcal/g	3.85

¹⁾ Pung Jin Chem. Co.

²⁾ Lactic Casein, New Zealand Dairy Board, Willington, N.Z.

³⁾ Sigma Chem. Co.

⁴⁾ Dong Bang Oil Co.

⁵⁾ Mineral mix.⁶¹⁾ : g per 100g ; CaCO₃ 30.0 g, CaHPO₄ 7.5 g, K₂HPO₄ 32.2 g, NaCl 16.7 g, MgSO₄ · 7H₂O 10.2 g, ferric citrate 2.75 g, MnSO₄ 0.51 g, KI 70 mg, CaCl₂ · 2H₂O 35 mg, ZnCl₂ 25 mg, CoCl₂ · 5H₂O 5mg, (NH₄)₂Mo7O₂ · 4H₂O 5 mg

⁶⁾ Vitamin mix.⁶¹⁾ : g per 1Kg ; Thiamin-HCl 20 mg, riboflavin 20 mg, pyridoxine 20 mg, nicotinic acid 90 mg, d-calcium pantothenate 60 mg, biotin 1 mg, menadione 45 mg, vitamin B₁₂ 20 mg, retinyl acetate 2,000 IU, cholecalciferol 1,000 IU, choline 1.5 g, inositol 0.1 g, p-amino benzoic acid 0.1 g, vitamin C 0.9 g

⁷⁾ Sigma Chem. Co.

4. 식이섭취량 및 체중측정

식이 섭취량은 매일 그리고 체중 증가량은 3일 간격으로 일정한 시간에 측정하였다.

5. 식이효율(Food Efficiency Ratio)

식이 효율은 전 체중 증가량을 같은 시간동안의 식이섭취량으로 나누어 줌으로써 측정하였다.

$$\text{식이효율} = \frac{\text{전 체중 증가량(g)}}{\text{전 식이 섭취량(g)}}$$

6. 실험동물에서 각종 장기의 채취

4주 동안 사육한 실험동물의 혈액과 장기를 채취하기 위해 실험종료 12 시간 전부터 절식시키고 ethyl ether로 마취시켜 해부한 뒤 간장, 신장 및 대퇴골은 생리식염수로 씻어내고 무게를 측정한 후 -40 °C에서 보관하며 분석시료로 이용하였다. 장기 채취에 사용한 모든 기구는 중금속 오염을 방지하기 위하여 0.4% EDTA 용액으로 처리 후 사용하였다.

7. 변의 채취

변은 희생하기 3일전부터 채취하여 젖은 상태로 -40 °C로 냉동 보관하여 분석시료로 이용하였다.

8. 각종 장기의 카드뮴 함량 분석

냉동 보관하였던 간과 신장은 습식분해법으로 카드뮴 함량을 분석하였는데 우선 일정량을 취하여 HNO₃:HClO₄(v/v, 2:1) 2 mL를 가한 후 75 °C까지 가열하여 완전히 녹인 후 즉시 냉각한 다음 탈이온 증류수로 final volume을 20 mL로 맞춘 후 분석시료로 이용하였다. 대퇴골은 105 °C의 건조오븐에서 항량이 될 때까지 건조시킨 후 600 °C 머플 전기로에

서 24 시간 동안 회화시켜 시료의 일정량을 취해 위와 같은 방법으로 분해한 후 분석시료를 AAS(atomic absorption spectrophotometer)를 이용하여 카드뮴의 농도를 228.8 nm에서 측정하였다.

9. 변의 카드뮴 함량 분석

변의 카드뮴 함량 측정도 대퇴골의 카드뮴 분석과 동일한 방법으로 분석시료를 만든 후 분석에 사용하였다.

10. 통계처리

실험결과는 통계 처리하여 평균치 \pm 표준편차로 나타내었으며, 각 실험군 간의 유의성 검정은 $p < 0.01$ (1%), $p < 0.05$ (5%) 수준에서 student's t-test를 이용하여 나타내었다.

제3절 연구개발의 결과 및 고찰

1. 식이섭취량, 체중 변화 및 식이효율

식을 통하여 투여한 카드뮴의 농도는 음용수 수질기준의 5,000 배인 50 ppm이었다^{25,26)}. 식이섭취량은 Table 3에서 보는 것처럼 카드뮴만 단독 투여한 대조군이 정상군과 비교할 때 감소하는 경향을 보였고, 카드뮴에 감잎 분획물을 병합 투여한 F-1, F-2군 모두에 있어서의 식이 섭취량은 1% 수준에서 유의적으로 감소하였다.

동물 발육상태의 종합결과라고 볼 수 있는 체중 증가량에 있어서도 Fig. 1에서 보는 것처럼 카드뮴을 투여하지 않은 정상군은 아주 좋은 성장을 보였으나 카드뮴만 단독 투여한 대조군과 감잎 분획물을 병합 투여한 F-1, F-2군 모두 체중의 증가가 크게 나타나지 않았다.

식이효율에 있어서는 카드뮴을 단독 투여한 군과 투여하지 않은 군 사이에서 유의적인 차이는 나타나지 않았으나 카드뮴을 단독 투여한 군에

서의 식이효율이 카드뮴을 투여하지 않은 정상군과 감잎분획물을 병합 투여한 군보다는 낮은 식이효율을 보였다. 이는 노 등³²⁾의 카드뮴의 공급으로 체내 영양소의 흡수 및 대사에 변화가 생겨 식이효율이 감소됨으로써 체중 증가 속도의 감소 현상이 보였다는 보고와 비슷하며, 최 등²⁵⁾과 이 등²⁶⁾의 카드뮴을 투여한 군과 투여하지 않은 군간의 성장과 식이효율에 있어서도 차이가 나타났다. 이러한 결과들에서 카드뮴 공급이 실험동물의 성장에 영향을 끼친다고 볼 수 있겠다.

Table 3. Food intake, food efficiency ratio of experimental rats

Group	Food intake(g/day)	FER
Normal	16.42±2.65	0.160±0.02
Control	15.84±2.35	0.067±0.03
F-1	14.40±2.46**	0.077±0.03
F-2	13.43±2.75**	0.080±0.04

Values are Mean ± S.D.(n=4)

** Significantly different from control group at p<0.01

P-value was determined by student's t-test

Experimental conditions are as given in Table 1.

2. 간, 신장, 대퇴골의 카드뮴 함량 분석

간, 신장 및 대퇴골 중의 카드뮴 함량은 Table 4에서 나타내었다. 간에서의 카드뮴 함량은 카드뮴만 단독 투여한 대조군에 대하여 감잎 분획물을 병합 투여한 F-1, F-2군 모두 1% 수준에서 유의적으로 감소하였다. 정상군에서는 카드뮴의 축적이 거의 없었으나, 카드뮴만 투여한 대조군에 대하여 10 mM의 감잎 분획물을 투여한 F-1군은 25%, 25 mM을 투여한 F-2군은 28%씩 감소하였다. 신장에서도 간에서처럼 카드뮴만 단독 투여한 대조군에 비하여 감잎 분획물을 병합 투여한 F-1, F-2군

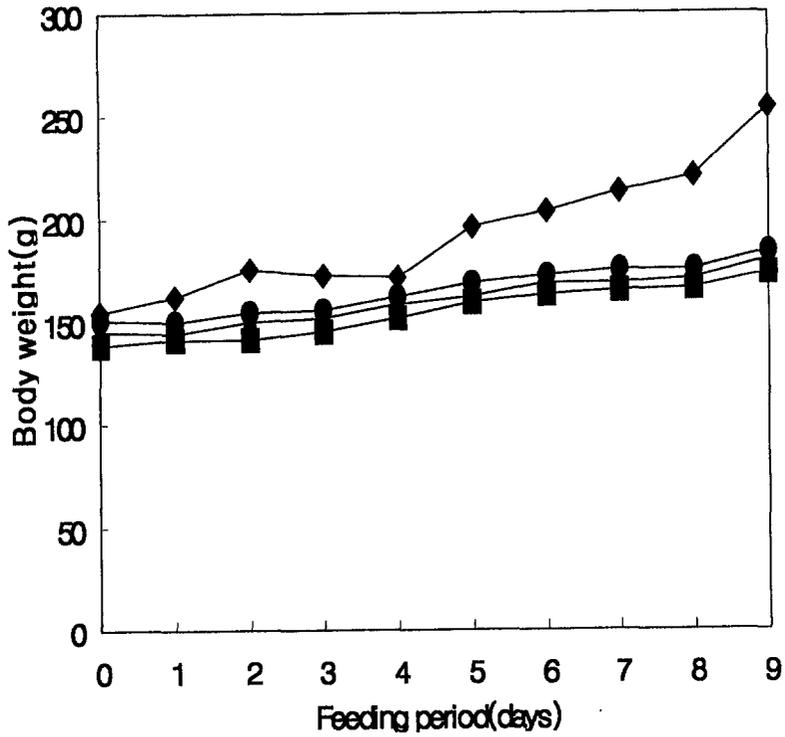


Fig. 1. Change of body weight in experimental rats.

- ◆ Normal : basal diet + saline 0.5 mL
- Control : basal diet + 50 ppm Cd + saline 0.5 mL
- ▲ F-1 : basal diet + 50 ppm Cd + 10 mM polyphenols 0.5 mL
- F-2 : basal diet + 50 ppm Cd + 25 mM polyphenols 0.5 mL

모두 1% 수준에서 유의적으로 감소하였다. 정상군에서는 카드뮴의 축적을 거의 볼 수 없었으나 카드뮴만 투여한 대조군에 비하여 F-1군이 22%, F-2군은 25%씩 카드뮴 함량이 감소하였다. 대퇴골에서도 간과 신장처럼 1% 수준에서 유의적으로 감소하였고, F-1군이 53%, F-2군은 59%로 감소됨을 관찰할 수 있었다. 위의 결과는 최 등²⁶⁾의 녹차 음용에 의하여 실험동물의 각 표적장기에서 중금속의 축적량이 감소하였다는 결과와 비슷하며, 탄닌 성분중의 하나인 카테킨이 많은 차일수록 카드뮴 축적량이 감소하는 경향을 보였다는 이 등²⁷⁾의 보고와 tannic acid가 실험동물의 카드뮴 독성을 감소시켰다는 김 등³²⁾의 보고와 비슷하다. 그리고 간장에서 금은화 추출물의 투여량이 증가함에 따라, 구성성분의 대부분이 페놀산(caffeic acid, chlorogenic acid 및 tannic acid)인 금은화 추출물에 의한 카드뮴의 해독 경감률이 증가하였다는 백 등³⁴⁾의 보고에서처럼 카드뮴과 같은 중금속 흡수 과정에서 polyphenol 성분과 중금속이 불용성 금속염을 형성하여 장내 흡수를 방해, 배설함으로써 중금속을 제거하는 해독작용에 관여한다고 생각할 수 있겠다.

Table 4. Cadmium contents in liver, kidney and femur of experimental rats

Group	Liver	Kidney	Femur
Normal	0.04±0.02	0.04±0.01	0.02±0.02
Control	9.69±0.81	7.95±0.35	0.49±0.03
F- I	7.28±0.22**	6.24±0.17**	0.23±0.03**
F- II	6.96±0.18**	5.96±0.18**	0.20±0.03**

Values are Mean ± S.D.(n=4)

** Significantly different from control group at p<0.01

P-value was determined by student's t-test.

Experimental conditions are as given in Table 1.

3. 변의 카드뮴 함량 분석

변을 통한 카드뮴의 배설량은 Table 5에서 나타내었다. 카드뮴의 주요 배설 경로라고 할 수 있는 변에서는 카드뮴만 투여한 대조군에 대하여 감잎 분획물인 F-1, F-2군 모두 1% 수준에서 유의적으로 증가하였는데, F-1군이 42%, F-2군이 54% 정도 카드뮴의 배설이 증가됨을 관찰할 수 있었다. 이 등³⁵⁾의 갈근을 납과 함께 투여했을 때 납만 투여한 군보다 50%이상의 납이 배설되었다는 보고와 이 등²⁷⁾의 보고에서 변 중 카드뮴의 농도가 유의적으로 증가되어 두 배 이상의 카드뮴을 배설하였다는 결과와도 비슷한데, 변에서도 역시 polyphenol 성분이 카드뮴과 착화합물을 형성하여 장내 흡수를 저해함으로써 배설이 증가되었다고 볼 수 있겠다.

Table 5. Fecal excretion of cadmium in experimental rats

Group	Feces
Normal	2.61 ± 0.18
Control	124.70 ± 11.74
F- I	213.32 ± 17.71**
F- II	267.79 ± 18.98**

Values are Mean ± S.D.(n=4)

** Significantly different from control group at p<0.01

P-value was determined by student's t-test.

Experimental conditions are as given in Table 1.

제4절 결 론

감염으로부터 polyphenol 화합물을 분리하여 중금속 제거효과에 관하여 동물실험을 통한 그 안전성 및 기능성을 검토하였다.

카드뮴을 단독 투여한 대조군 대하여 카드뮴에 감염을 병합 투여한 F-1군과 F-2군 모두 식이섭취량은 1% 수준에서 유의적으로 감소하였고, 체중증가량은 카드뮴이 식이에 첨가됨으로써 실험동물의 성장에 영향을 끼쳤으며, 식이효율은 카드뮴 단독 투여군에 대하여 F-1군과 F-2군 모두에서 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 간, 신장 그리고 대퇴골의 카드뮴 함량을 분석한 결과 카드뮴을 단독 투여한 대조군에 대하여 F-1군과 F-2군 모두 1% 수준에서 유의적으로 감소하였으며, 간에서는 F-1군이 25%, F-2군은 28%씩 감소하였고, 신장에서는 F-1군이 22%, F-2군이 25%씩 감소하였으며, 대퇴골에 있어서의 카드뮴은 F-1군이 53%, F-2군은 59% 감소하였다. 변의 카드뮴 함량을 분석한 결과 대조군에 대하여 F-1군과 F-2군 모두 1% 수준에서 유의적으로 증가하였으며, F-1군이 42%, 그리고 F-2군은 54% 증가하였다.

제5절 참고문헌

1. Michel, H.H. and Smith, J.L.: Effect of vitamin D and low dietary calcium on lead uptake and retention in rats. *J. Nutr.*, 111, 694(1981)
2. Nordberg, M.: General aspects of cadmium: transport, uptake and metabolism by the kidney. *Environ. Health Persp.*, 54, 13(1984)
3. Washko, P.W. and Cousins, R.J.: Role of dietary calcium and calcium binding protein in cadmium toxicity in rats. *J. Nutr.*, 107, 920(1979)

4. 이해영, 김미경: 식이내 cadmium과 단백질 수준이 흰쥐의 체내 단백질 대사 및 cadmium 중독에 미치는 영향. 한국영양학회지, 21, 27(1988)
5. 김미경, 이해영: 납 중독된 흰 쥐에서 식이 단백질 수준 및 체독기간에 따른 체독효과 비교연구. 한국영양학회지, 22, 185(1989)
6. Smith, D.R. and Fiegal, A.R.: Stable isotopic tracers of lead mobilized by DMSA chelation in in low lead-exposed rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 116, 85(1992)
7. Cantilena, L.R. and Klassen, C.D.: Decreased effectiveness of chelation therapy with time after acute cadmium poisoning. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 63, 173(1982)
8. Kapor, S.C., Wielopolski, L., Graziano, J.H. and Lolocono, N.: Influence of 2,3-dimercaptosuccinic acid on gastrointestinal lead absorption and whole body lead retention. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 97, 525(1989)
9. Anderson, O., Nielsen, J.D., Norberg, G.F.: Factors affecting the international uptake. In : Nordberg, G.F., Herber, R.F.M., Alssio, L., Eds. : Cadmium in health environment toxicity and carcinogenicity. *IARC Scientific Publication Lyon*, 118, 173-187(1992)
10. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives WHO Tech. Rep Ser., 505, 20-24(1972)
11. Cherian, M.G., Goyer, R. A. and Valberg, L.S.: Gastrointestinal absorption and organ distribution of oral cadmium chloride and cadmium metallothionein in mice. *J. Toxicol. Environ. Health*, 4, 861-868(1978)
12. Sendelbach, L.E. and Klaassen, C.D.: Kidney synthesizes less metallothionein than liver in response to cadmium chloride and cadmium-metallothionein. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 92, 95-102(1988)
13. Goyer, R.A.: Toxic effects of metals. In: Klaassen, C.D. Amdur,

- M.O. and Doull. J(eds.). Casarett and Doull's Toxicology, 5th Ed., Macmillian Publishing Co., New York, 699-702(1996)
14. Hammond, P.B. and Foulkes, E.C.: Metal ion toxicity in man and animals. In: Siegel, H.(ed.). Metal ions in Biological Systems, vol.20, Marcel Dekker, New York, 177-182(1994)
 15. Page, A.I. and Chang, A.C.: Cadmium, Springer-Verlag. Berlin Heidelberg, 33-75(1986)
 16. Tsuchuja, K.: Causation of ouch-ouch disease. Part II. Epidemiology and evaluation. *Kejo J. Med.*, 18, 195-211(1969)
 17. Itokawa, Y.: Bone change in experimental chronic cadmium poisoning, radiological and biochemical approaches. *Arch. Environ. Health*, 26(5), 241-244(1973)
 18. Dudley, R.E., Svovoda, D.J. and Klaassen, C.D.: Acute exposure to cadmium causes severe liver injury in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 65, 302-313(1982)
 19. Faeder, E.J., Chanet, S.O. and King, L.C.: Biochemical and ultrastructural changes in livers of cadmium treated rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 39, 473-487(1977)
 20. Lee, H.J. and Kim, M.K.: Retarding effect of dietary fibers isolated from persimmon peels and jujubes on in vitro glucose, bile acid and cadmium transport(in Korean). *Korean J. Nutrition*, 31(4), 809-822(1998)
 21. Lee, S.R. Lee, K.S.: A suppressive effect of dietary fiber on in vitro absorption of lead (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, 21(1), 63-67(1989)
 22. Kim, P.G.: Effects of garlic oil(diallyl disulfide)/vitamin A(retinol acetate) on heat shock protein induction in cadmium treated rats(in Korean). *J. Fd Hyg. Safety*, 13(2), 171-187(1998)
 23. Lee, J.S., Park, K.O. and Lee, J.M.: A study on the effects of

- radix menispermis* extracts against cadmium chloride sub-chronic toxicity in rats(in Korean). *Korean J. Toxicol.* 12(1), 59-68(1996)
24. Kim, U.S., Lee, C.H., Kim, S.J., Lee, J.D., Moon, K.H. and Baek, S.H.: Effect of the *aloe arborescens* added-diet on the cadmium toxicity in rat(in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, 27(4), 555-563(1995)
 25. Choi, S.I., Lee, J.H. and Lee, S.R.: Effect of green tea beverage on the removal of cadmium and lead by membrane filtration(in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, 26(6), 740-744(1994)
 26. Choi, S.I., Lee, J.H. and Lee S.R.: Effect of green tea beverage for the removal of cadmium and lead by animal experiments(in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, 26(6), 745-749(1994)
 27. Lee, S.J., Kim, M.J. and Yoon, Y.H.: Effects of Korean green tea, oolong tea and black tea beverage on the removal of cadmium and antioxidative detoxification in cadmium administered rats. *Bulletin of the 3th International Symposium on Green Tea*, 21-38(1994).
 28. Lim, S.I.: Investigation of Korean green tea, oolong tea, persimmon leaves tea and barley tea on the removal heavy metal ions. M.S. Thesis, Yeungnam Univ. Kyungsan, Korea(1994).
 29. Kwon, E.Y., Kim, M.K. and Jeon, M.H.: Adsorptivities of Cu(II) and Pb(II) ions in water by persimmon leaves. *Bulletin of Environmental Sciences, Research Institute for Environmental Sciences Hanyang Univ., Seoul, Korea*, 14, 3-8(1993)
 30. American Institute of Nutrition(AIN): Report of the American Institute for Nutrition Ad Hoc Committee on Standards for Nutritional Studies. *J. Nutr.*, 107, 1340-1349(1977)
 31. Ganje, T.J. and Page, A.L.: Rapid acid dissolution of plant tissue for cadmium determination by atomic absorption spectrophotometry.

- At. Absorpt, Newsl.*, 13, 131(1974)
32. Rho, J.H., Han, C.K., Lee, N.H. and Chung, Y.K.: Effect of pork as a protein source on cadmium toxicity in rats(in Korean). *Korean J. Anim. Sci.*, 39(5), 605-616(1997)
 33. Kim, P.G., Ahn, R.M. and Hwang, S.H.: The effects of tannic acid to the cadmium on mouse(in Korean). *J. Fd Hyg. Safety*, 13(2), 87-93(1998)
 34. Baek, S.H., Kim, H.J., Kim, Y.O., Kwak, J.S., Lee, J.S., Park, K.O., Han, D.S. and You, I.S.: Development of antitoxic agents from Korean medicinal plants. Part 6.-Effects of methanol fraction of *Lonicerae flos* on the accumulation of cadmium in spleen-(in Korean). *Korean J. Toxicol.*, 12(1), 35-39(1996)
 35. Lee, J.S., Kim, M.J. and Park, E.M.: Effects of extract of *Pueraria radix* on hematological properties and lead level of the tissues of the Pb-administered rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 26(3), 488-493(1997)

제 6 장 한국산 감잎으로부터 생리활성물질의 항균, 항산화 및 항암효과

제1절 연구개발의 목적과 범위

최근에 와서 소비자들의 생활양식과 가치관의 다양화로 인하여 식품의 기호적인 면이 강조되면서 이로 인한 부작용 즉, 신경계, 세포분화계, 면역 및 생체방어계의 이상이 초래되고 있다. 또한 영양과잉과 의료기술 등의 발달로 사회의 고령화와 식사내용의 변화로 성인병 및 만성질환 또는 스트레스 등이 증가되고 있다. 식품의 기능을 영양소와 기호성분만이 아니라, 식품 중에 함유되어 있는 다양한 생리활성 물질을 섭취함으로써, 생체의 면역계, 호르몬계, 신경계, 순환기계 및 소화기계 등의 작용을 조절하고, 건강의 유지와 회복에 직접 관여하는 물질을 찾고자 하는 노력들이 진행되고 있다^{1, 2)}.

본 연구는 이러한 문제점들을 해결하기 위하여, 한국산 감잎으로부터 polyphenol 화합물들을 분리 및 정제하여, 항산화 효능 즉, 면실유, 아마인유 미 어유에 대한 TBARS(thiobarbituric acid reactive substances) 효과, 전자공여능 및 갈변도와 흡광도의 변화 등을 실험하고, *Candida parapsilosis*와 *Candida albicans*에 대한 항균효과 및 sarcoma 180에 대한 항암효과 등을 실험하였다.

이러한 실험들을 통하여 우리나라 고유의 전통차로 이용되어 온 한국산 감잎으로부터 분리 및 정제한 생리활성 물질의 우수성을 검증함으로써, 현재 의약품에 이용되고 있는 화학합성물질들이 갖는 부작용을 최소화시킬 수 있는 새로운 치료제로서의 개발을 목적으로 하며, 아울러 감나무의 부산물이라고 할 수 있는 감잎을 이용하여 과학적이고 체계적인 검증을 통하여 기능성 식품으로서의 부가가치를 높이고자 함을 그 목적으로 하였다.

제2절 연구개발의 방법

1. 항균성 시험

감잎 추출물의 항균성 시험은 시험관에 차 추출물(동결건조 시킨 1, 2 및 3차 차 추출물을 동량 혼합)을 각각 농도 별로 Mueller Hinton broth에 첨가한 다음, 배양된 *Bacillus subtilis* 균주를 $10^4 \sim 10^5$ / ml되게 접종하여 35℃에서 48시간 배양하면서 균의 증식여부를 육안적으로 판별하여 균의 증식 억제에 필요한 최소억제농도(minimal inhibitory concentration, MIC)로서 항균성을 살펴 본다.

2. 생리활성물질의 항산화 효과

1) Oil emulsion 제조

Oil emulsion은 사용하기 전에 만들고 1M maleic acid buffer(8 mL)를 pH 6.5로 보정한 다음, Tween-20을 50 μ l 첨가하고, 0.5 mL 정도의 아마인유를 첨가하여 혼합하였다. 15분간 교반 한 후 약 0.4 g KOH 2~3조각을 넣고 혼합한 후 5N HCl을 이용하여 pH 6.5로 조정하여 사용하였다.

2) 추출물의 흡광도 측정

항산화성 물질로 알려진 화합물, protein, aromatic amine 및 phenol의 용출 정도를 확인하기 위하여 spectrophotometer를 사용하여 280nm에서 흡광도를 측정하였다³⁾.

3) 추출물의 갈색도 측정

감잎으로부터 분리된 추출물들의 갈색화 반응 생성물질의 농도를 나타내는 갈색도는 440nm에서 spectrophotometer를 이용하여 측정하였다⁴⁾.

4) 전자공여능 측정

전자공여능은 Blois의 방법⁵⁾을 변형하여 측정하였다. 각 시료 2 mL에 2×10^{-4} M DPPH 1.0mL를 넣고 교반 한 후 30분 동안 방치한 다음

spectrophotometer를 사용하여 517nm에서 흡광도를 측정하였으며, 전자공여능의 계산법은 다음과 같다.

$$100 - [(시료첨가구의 흡광도/무첨가군의 흡광도) \times 100]$$

5) 항산화 측정

TBARS(thiobarbituric acid reactive substances)는 Buege 등⁶⁾의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 1 mL 반응혼합물이 채워진 시험관을 37°C water bath에서 1시간 반응시킨 후 반응이 종료되면, 50 μ l BHT(butylated hydroxytoluene) 7.2%를 시료에 가하여 산화반응을 정지시켰다.

정지시킨 반응 혼합물에 2 mL TCA/TBA 시약을 가하여 혼합한 후, 15분간 가열시키고, 냉각한 뒤 2,000 \times g에서 10분간 원심 분리하였다. 상등액을 531nm에서 흡광도를 측정하였으며, 공시료는 증류수를 이용하였고, TBARS 값은 반응 혼합물 mL에 대해서 mg malondialdehyde (MDA)로 표시하였다.

6) 세포증식능(MTT) 측정

(1) 세포부유액 조제

세포부유액 조제는 BALB/c 마우스로부터 비장을 적출하여, RPMI 1640을 이용하여 단세포 부유액을 만들었다. 비장세포 부유액 중에 함유되어 있는 적혈구를 용혈 시키기 위하여, 0.83% ammonium chloride tris buffer(pH 7.2)를 이용하여 부유시킨 후, 실온에서 3~5분간 정치시켜 용혈 시킨 것을 RPMI 1640으로 120 \times g에서 5분간 3회 세척하여 비장세포 부유액을 조제하였다.

세포 부유액을 hemocytometer로 측정하여, RPMI 1640 배지(10% FCS 함유 RPMI 1640에 2mM L-glutamine, 50 μ m 2-mercaptoethanol)로 5 \times 10⁶ cells/ mL이 되게 조정하여 실험에 사용하였다.

(2) 세포증식능 측정

RPMI 1640 배지가 첨가된 비장세포 부유액(5×10^6 cells/mL)을 96 well plate에 $100 \mu\text{l}$ 씩(5×10^5 cells) 분주한 뒤, fraction I, II 및 III을 mL당 0.01 mg, 0.1 mg, 1 mg 및 10 mg으로 조제한 것을 $100 \mu\text{l}$ 씩 가해서, 최종적으로 $200 \mu\text{l}$ 가 되게하였다. 이것을 24시간, 48시간 및 72시간 동안 37°C , 5% CO_2 incubator에서 배양하였으며, 각 시간별로 배양된 용액에 Cell Titer96[®] AQueous 용액을 각각 $20 \mu\text{l}$ 씩 첨가한 후 37°C , 5% CO_2 incubator에서 3시간 배양한 후 ELISA reader를 이용하여 490nm에서 흡광도를 측정하였다⁷⁾.

3. 생리활성물질의 항암실험

1) 실험동물

본 실험에 사용한 동물은 무균적으로 사육된 ICR계 마우스를 체중 $25 \pm 3\text{g}$ 에 속한것을 분양 받아 사용하였으며, 사료는 일반사료(삼양사)로 물과 함께 충분한 양을 공급하였다. 사육실의 온도는 $20 \pm 3^\circ\text{C}$ 를 유지하였으며, 12시간 간격의 light-dark cycle을 유지하였다.

2) Sarcoma 180 세포 배양

Sarcoma-180(KCLB 40066)은 서울대학교 세포주 은행에서 분양 받은 것을 fetal calf serum이 10% 첨가된 RPMI 1640 배지에서 *in vitro* 계대 배양하였다. 즉, S-180을 배양 용기에서 배양 한 후 배양액은 버리고 배양용기에 새로운 RPMI 1640(10% FCS) 배지 6 mL를 넣고 멸균된 파스퇴르 피펫으로 강하게 부유시켜 배양용기 바닥에 붙은 암세포를 떨어 뜨려 현탁 시켰다. 이 현탁액을 10% FCS가 함유된 RPMI 1640 배지에 접종(2×10^3 cells/mL)한 후 37°C , 5% CO_2 incubator에서 배양하면서 3~4 일 마다 계대 하여 사용하였다⁸⁻¹⁰⁾.

3) Sarcoma 180의 복수암 유발

*In vitro*에서 계대 중인 S-180 세포를 회수하여 $400 \times \text{g}$ 에서 3분간 원심분리하여 종양 세포의 침전물을 분리하였다. 분리된 세포 침전물은

RPMI 1640으로 부유시켜 재차 원심분리 하여 세포수가 1×10^7 cells/mL이 되도록 종양세포 부유액을 만들었다. 이와 같이 회석한 S-180 세포액 0.1 mL(1×10^6 cells/mL)를 ICR 마우스의 복강에 주사하여 복수암을 유발하였다(Fig. 1)¹¹⁾.

4) 시료 투여

S-180으로 유도된 복수암에 대한 시료의 투여는 감잎으로부터 분리된 fraction I, II 및 III을 멸균된 생리식염수를 이용하여 조제하였으며, 마우스 kg당 10 mg을 투여량으로 하였으며, 대조군은 멸균된 생리식염수 시료 투여군과 함께 복강에 12일간 연속적으로 투여하였다.

5) 체중증가량 측정

S-180을 이용하여 ICR 마우스에 복수암을 유발시킨 후 각각의 시료를 멸균 생리 식염수에 현탁하여 마우스의 복강에 투여하였으며, 암 세포의 접종일로부터 21일간 마우스의 체중을 매 3일 간격으로 측정하여 체중 변화를 관찰하였다.

6) 비장 장기중량 측정

실험동물을 각 군당 7마리씩으로 하여 시료 투여군과 대조군으로 나누어 시료투여군은 시료를, 대조군은 생리 식염수를 10일간 연속으로 마우스의 복강내에 투여하고 투여 최종일로부터 35일째 되는 날 마우스를 경골탈골법에 의하여 치사시키고 체중을 측정한 후, 비장을 척출하여 비장의 무게를 측정하여 체중에 대한 비장의 비율을 계산하였다¹²⁾.

7) 수명연장 측정

실험동물을 각 군당 7마리씩으로 나누어, S-180 세포 부유액을 1 mL(1×10^6 cells/mL)를 마우스 복강 내에 이식한 뒤 24시간 후부터 10일간 연속으로 시료를 복강으로 투여하고 35일 까지의 생존여부를 관찰하여 평균 수명일을 계산하여 수명 연장 백분율(Prolongation

ratio, P.R. ; %)로 다음과 같이 계산하였다¹³⁾.

$$\text{Prolongation rate(T/C, \%)} = \left[\frac{\text{Mean survival days of treated mice}}{\text{Mean survival days of control mice}} \right] \times 100$$

8) 암세포 증식억제 측정

암세포를 24 well plate에 2×10^4 cells/mL이 되도록 seeding 하고 24시간 배양한 후 세포가 plate에 부착되면 배양액을 버리고 5% FCS와 시료 추출물이 함유된 새로운 배양액(RPMI 1640)으로 이틀에 한 번씩 교체하면서 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양 6일 후에 증식된 세포를 PBS로 세척한 뒤 trypsin-EDTA 용액으로 분리하여 각 세포수를 hemocytometer로 측정하여 대조군과 비교하여 암세포 증식 억제 효과를 관찰하였다^{14, 15)}.

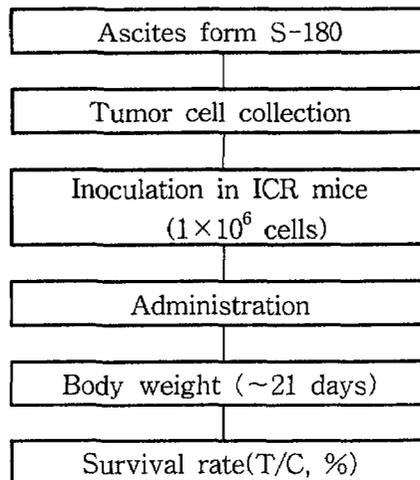


Fig. 1. The assay procedure for determining the effect of polyphenol fraction I, II and III from persimmon leaves on antitumor activity.

제3절 연구개발의 결과 및 고찰

1. 생리활성 물질의 항균효과

한국산 감잎으로부터 폴리페놀 화합물을 분리 및 정제하여 *Candida parapsilosis*(이하; CP)와 *Candida albicans*(이하; CA)에 대하여 항균효과를 실험한 결과, 대조군에 비하여 각각의 CP와 CA균에 각각의 시료를 첨가하여 배양한 경우, 대조군에 비하여 매우 유의성 있는 항균 효과가 있는 것으로 나타났다.

Table 1. Effect of polyphenol fraction from persimmon leaves on the growth of *Candida parapsilosis* in culture broth.

Groups	<i>Candida parapsilosis</i>
CON	1.06×10^6 ^b
I	3.82×10^5
II	1.40×10^4
III	8.70×10^3

CON : Non added sample

I : Polyphenol fraction I from persimmon leaves(5mg/mL)

II : Polyphenol fraction I from persimmon leaves(50mg/mL)

III : Polyphenol fraction I from persimmon leaves(500mg/mL)

Table 2. Effect of polyphenol fraction from persimmon leaves on the growth of *Candida albicans* in culture broth.

Groups	<i>Candida albicans</i>
CON	3.89×10^6 ^b
I	1.63×10^5
II	8.33×10^4
III	2.10×10^4

CON : Non added sample

I : Polyphenol fraction I from persimmon leaves(5mg/mL)

II : Polyphenol fraction I from persimmon leaves(50mg/mL)

III : Polyphenol fraction I from persimmon leaves(500mg/mL)

2. 생리활성 물질의 항산화 작용

1) 추출물의 흡광도 및 갈변도 측정

항산화 물질로 알려진 phenol, aromatic amine 및 단백질 등의 흡수가 일어나는 280nm에서의 흡광도 측정에서는 감잎 fraction I, II 및 III의 각각의 시료간에 유의성이 확인되었으며, 특히 fraction II에서 가장 높은 흡광도 값을 나타내었다(Fig. 2). 또한, 항산화 물질로 알려진 화합물들의 용출정도를 확인하기 위하여 감잎으로부터 분리 및 정제한 polyphenol 화합물 I, II 및 III에 대한 갈변도를 420nm에서 흡광도를 측정한 결과 polyphenol 화합물 I, II 및 III 중에서 fraction II가 가장 높은 갈변도를 나타내었다(Fig. 3).

이러한 결과는 최 등¹⁶⁾과 Son 등¹⁷⁾에 의하면, maillard 반응 생성물도 항산화 작용을 나타낸다고 보고하고 있다. 이러한 보고에서 볼 때, 감잎에서도 방향족 화합물 및 갈변물질이 존재하는 것으로 나타나 이들도 항산화 작용이 있는 것으로 추정된다고 하겠다.

2) 전자공여능에 미치는 영향

감잎으로부터 polyphenol 화합물을 분리 및 정제한 각 시료에 대한 전자공여 효과로서 시료의 환원력을 측정한 결과는 Fig. 4와 같다. 각 시료의 DPPH(α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl)에 대한 전자공여능은 감잎 polyphenol 화합물 I은 61.2%, fraction II는 58.3% 및 III은 49.1%로 시료에 있어서의 전자공여능은 fraction I이 가장 높은 것으로 나타났으며, 이러한 결과는 Kang 등¹⁸⁾에 의하면 각 시료에 페놀 화합물이 존재하여 페놀성 항산화제로 작용하는 것이라고 보고하고 있다. 이러한 전자공여능 시험은 지질과산화와의 연쇄반응에 관여하는 산화성 활성 free radical에 전자를 공여하여 산화를 억제시키는 척도가 되므로¹⁶⁾, 감잎에서의 전자공여능은 감잎의 polyphenol 화합물들이 산화성 free radical과 반응함으로써 항산화제로서 작용할 수 있을 것으로 사료된다.

3) 지방산화에 미치는 영향

감잎으로부터 분리 및 정제된 polyphenol 화합물들이 cotten seed oil, linseed oil 및 fish oil에 있어서 항산화성에 미치는 영향을 실험한 결과는 다음과 같다. 면실유에 있어서는 대조군이 0.21 ± 0.006 mg MDA/L인 반면 감잎 폴리페놀 화합물 I은 0.11 ± 0.008 mg MDA/L, II는 0.084 ± 0.009 mg MDA/L이었으며 III은 0.082 ± 0.003 mg MDA/L으로 대조군에 비하여 높은 유의성($P < 0.01$)을 나타내었다(Fig. 5). 아마인유(Fig. 6)와 fish oil(Fig. 7)에서의 항산화 실험에서는 면실유와 유사한 경향으로 대조군에서는 각각 0.224 ± 0.009 mg MDA/L, 0.326 ± 0.009 mg MDA/L이었으나, fraction I은 0.124 ± 0.006 mg MDA/L($p < 0.05$), 0.172 ± 0.001 mg MDA/L ($p < 0.01$)로 항산화작용이 있는 것으로 나타났으며, fraction II에서는 0.092 ± 0.007 mg MDA/L($p < 0.01$), 0.102 ± 0.001 mg MDA/L($p < 0.01$)로 나타났다. 또한 fraction III은 아마인유에 대한 항산화는 0.092 ± 0.006 mg MDA/L($p < 0.01$), fish oil에서는 0.1 ± 0.003 mg MDA/L로 나타나 오일의 종류에 대하여 감잎의 폴리페놀 화합물들이 매우 높은 항산화력을 갖는 것으로 나타났다.

이러한 결과는 정¹⁹⁾과 Terada 등²⁰⁾이 감잎에 존재하는 카테킨류의 함량조사에서 감잎에는 (+)-catechin(C), (-)-epicatechin(EC), (-)-epigallocatechin(EGC), (-)-epigallocatechin-3-O-gallate(EGCG), (-)-epigallocatechin(EGC), (-)-epicatechingallate(ECG) 등의 순으로 함유되어 있다고 보고하고 있어, 녹차와 유사한 경향으로 감잎에서도 항산화력의 주된 원인이 polyphenol 화합물이라는 것을 확인할 수 있었다.

이러한 결과는 천연물 중의 하나라고 할 수 있는 감잎에서의 항산화력은, 최근 합성 항산화제가 갖고 있는 부작용 즉, 간비대, 간장 중 microsomal enzyme activity의 증가, 체내 흡수물질의 일부가 독성물 혹은 발암성을 유발할 수 있는 등의 문제점^{21, 22)}을 개선할 수 있을 것으로 기대된다.

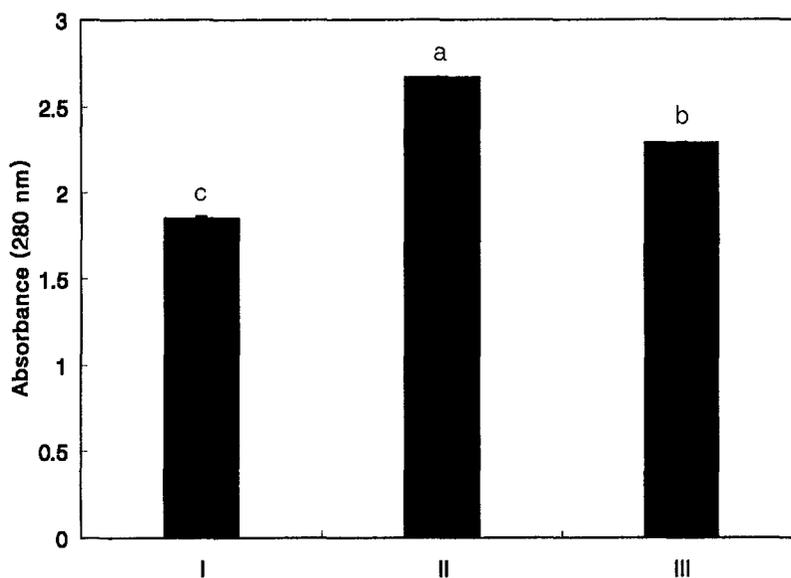


Fig. 2. Absorbance of polyphenol fraction I, II and III from persimmon leaves at 280nm

I : Polyphenol fraction I extracted from persimmon leaves

II : Polyphenol fraction II extracted from persimmon leaves

III : Polyphenol fraction III extracted from persimmon leaves

a~c Means in the same column bearing different superscript are different($p < 0.05$)

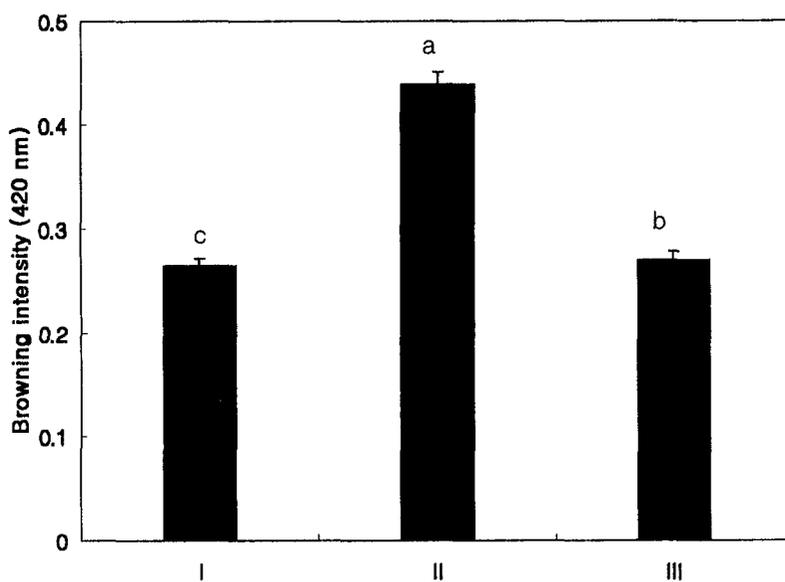


Fig. 3. Browning intensity of polyphenol fraction I, II and III from persimmon leaves

I : Polyphenol fraction I extracted from persimmon leaves

II : Polyphenol fraction II extracted from persimmon leaves

III : Polyphenol fraction III extracted from persimmon leaves

a~c Means in the same column bearing different superscript are different(p<0.05)

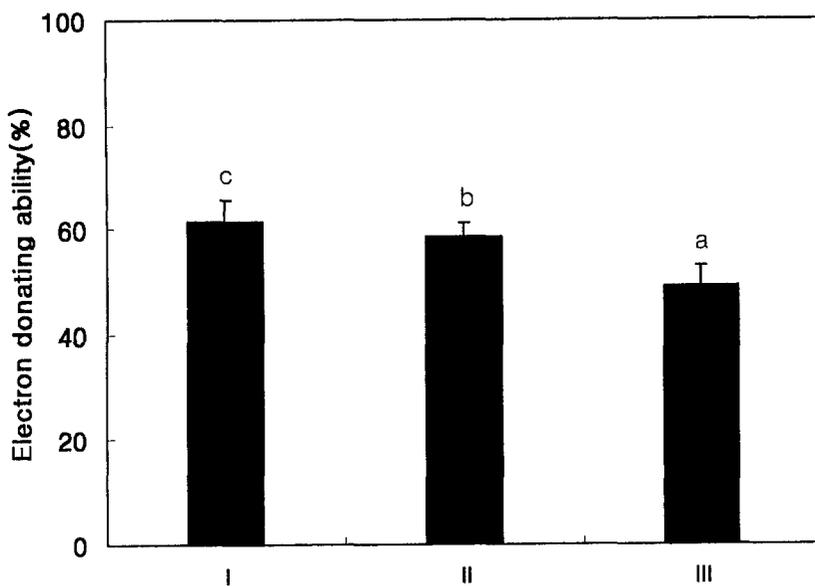


Fig. 4. Electron donating ability of polyphenol fraction I, II and III from persimmon leaves.

I, II and III are the same as described in Table 1

^{a-c} Means in the same column bearing different superscript are different ($p < 0.05$)

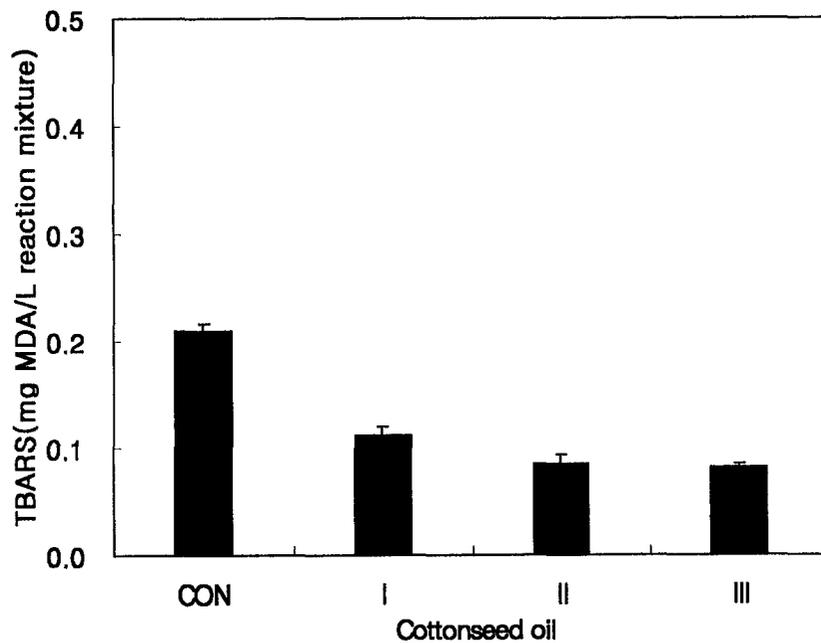


Fig. 5. Effect of lipid oxidation on polyphenol fraction I, II and III from persimmon leaves by cottonseed oil.

CON : Only cottonseed oil

I : Polyphenol fraction I extracted from persimmon leaves with cottonseed oil emulsion

II : Polyphenol fraction II extracted from persimmon leaves with cottonseed oil emulsion

III : Polyphenol fraction III extracted from persimmon leaves with cottonseed oil emulsion

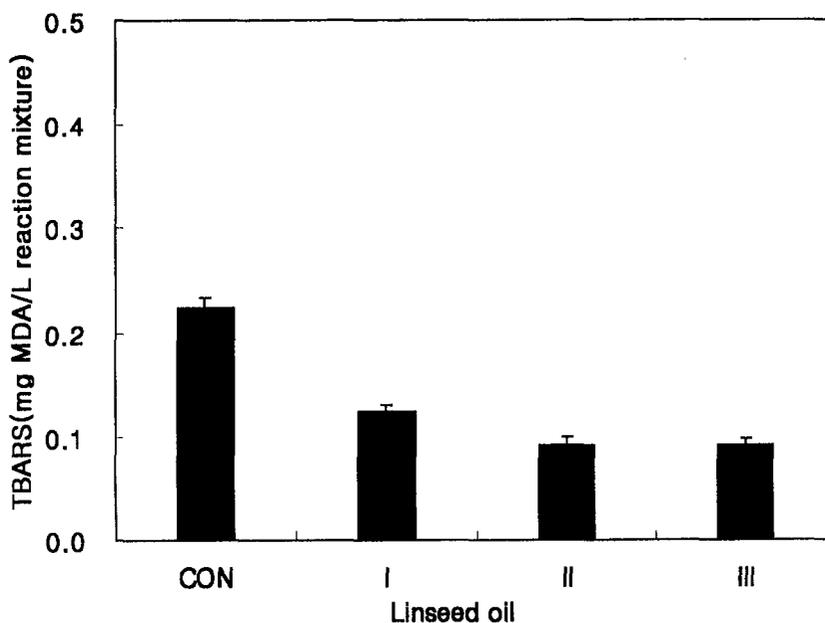


Fig. 6. Effect of lipid oxidation on polyphenol fraction I, II and III from persimmon leaves by linseed oil

CON : Only linseed oil

I : Polyphenol fraction I extracted from persimmon leaves with linseed oil emulsion

II : Polyphenol fraction II extracted from persimmon leaves with linseed oil emulsion

III : Polyphenol fraction III extracted from persimmon leaves with linseed oil emulsion

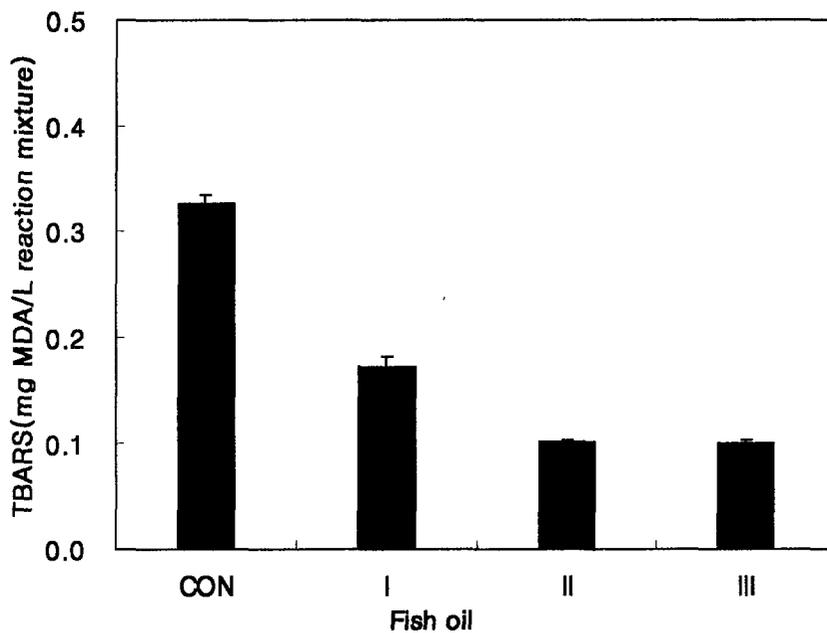


Fig. 7. Effect of lipid oxidation on polyphenol fraction I, II and III from persimmon leaves by fish oil

CON : Only fish oil

I : Polyphenol fraction I extracted from persimmon leaves with fish oil emulsion

II : Polyphenol fraction II extracted from persimmon leaves with fish oil emulsion

III : Polyphenol fraction III extracted from persimmon leaves with fish oil emulsion

4) 세포증식(MTT assay)에 미치는 영향

① 세포증식에 미치는 영향

면역기능을 갖는 장기 중의 하나인 비장세포에 대한 세포 증식능을 확인하기 위하여, 비장세포 부유액에 감잎에서 분리한 polyphenol 화합물 I, II 및 III을 농도별로 첨가하였다. 각각의 시료를 첨가한 후 배양 시간별에 따른 세포증식능을 실험한 결과는 다음과 같다(Fig. 8, 9, 10).

비장세포 부유액 2×10^5 cells/mL에 polyphenol 화합물을 농도별(10 mg/mL, 1mg/mL, 0.1 mg/mL과 0.01 mg/mL)로 첨가하여 배양한 결과, 실험군 모두에서 농도 의존적으로 세포가 증식되는 것으로 관찰되었으며, 대조군에 비하여 유의성을 나타내었다. 비장세포와 각각의 시료를 혼합하여 24시간, 48시간 및 72시간을 배양한 결과, 대조군에 비해, 실험군은 배양시간이 경과할 수록 비장세포의 증식이 높은 것으로 관찰되었다.

정 등²³⁾은 녹차로부터 분리된 epicatechin 3-O-Gallate에 대하여 세포 증식을 실험한 결과 시료의 농도가 증가함에 따라 세포수가 유의성 있게 증가하였다고 보고하고 있어, 감잎에서 분리·정제된 polyphenol 화합물 I, II 및 III 모두가 비장세포에 대하여 세포증식이 유도된 본 실험의 결과와 유사한 경향을 보였다.

3. Sarcoma 180에 의한 항암 효과

1) 비장장기 중량의 변화

면역장기 중의 하나인 비장을 적출하여 비장의 체중에 대한 중량 변화를 측정된 결과, 대조군의 경우 0.35%였으나, 감잎의 polyphenol 화합물 I은 0.48%, II는 0.38%였으며, III은 0.55%로 대조군보다 증가된 경향을 나타내었으며, 특히 fraction III에서 가장 높은 비율을 나타내었다(Table 3).

Moon 등²⁴⁾이 실험한 sarcoma 180 세포를 이용한 감잎의 항암효과에 대한 실험에도 대조군에 비하여 감잎 분획물을 투여한 군에서 비장이 다소 증가되었다는 보고와 유사한 경향을 나타내었으며, 이러한 결과는 비장은 적혈구, 백혈구, 림프구 및 대식세포 등과 같은 면역계와 관련된 세포들로 구성되어 있어서 대조군에 비하여 시료 투여 군에서의 비장 장기

의 증량이 높은 것은 이러한 면역세포들이 증가된 때문으로 추정된다고 보고하고 있다.

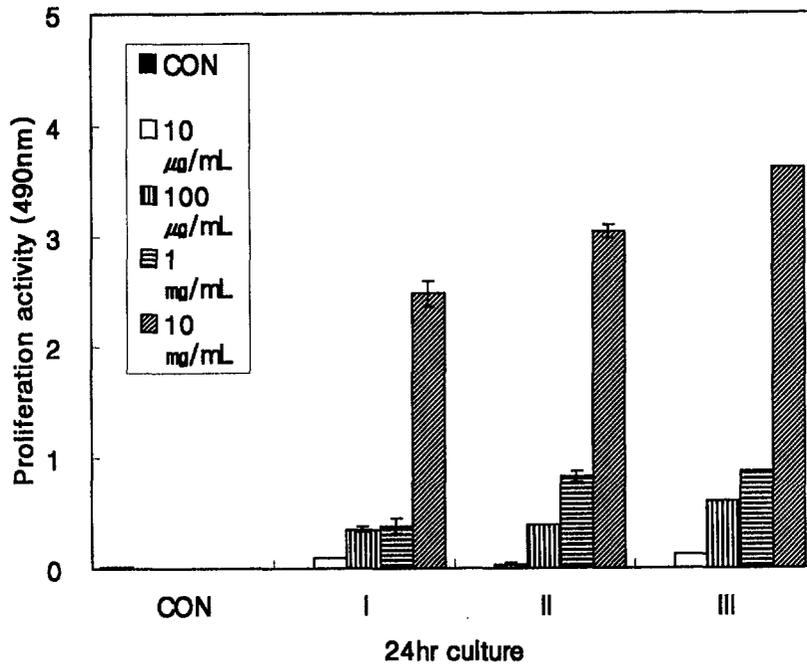


Fig. 8. Proliferation activity of spleen cells on polyphenol fraction I , II and III from persimmon leaves at 24hr culture.

Proliferation activity was determined by ELISA leader(490nm)

CON : Control fraction

I : Polyphenol fraction I from persimmon leaves

II : Polyphenol fraction II from persimmon leaves

III : Polyphenol fraction III from persimmon leaves

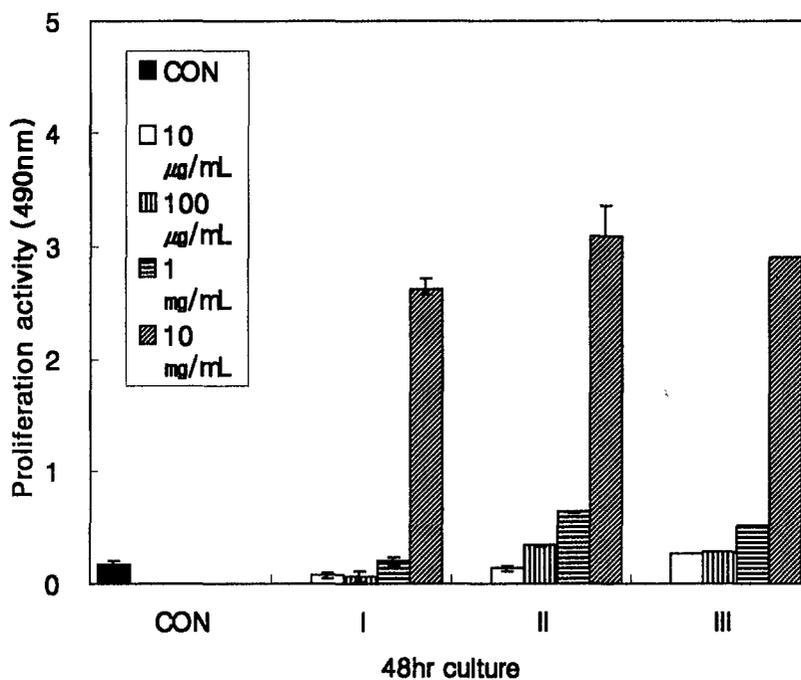


Fig. 9. Proliferation activity of spleen cells on polyphenol fraction I , II and III from persimmon leaves at 48hr culture.

Proliferation activity was determined by ELISA leader(490nm)

CON : Control fraction

I : Polyphenol fraction I from persimmon leaves

II : Polyphenol fraction II from persimmon leaves

III : Polyphenol fraction III from persimmon leaves

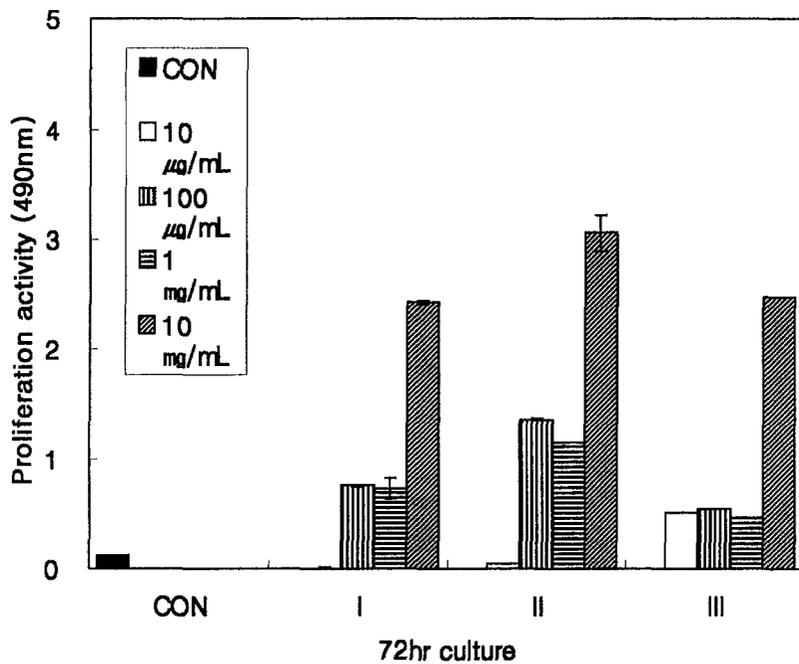


Fig. 10. Proliferation activity of spleen cells on polyphenol fraction I , II and III from persimmon leaves at 72hr culture.

Proliferation activity was determined by ELISA leader(490nm)

CON : Control fraction

I : Polyphenol fraction I from persimmon leaves

II : Polyphenol fraction II from persimmon leaves

III : Polyphenol fraction III from persimmon leaves

Table 3. Effects of polyphenol fraction I, II and III from persimmon leaves on life span of BALB/c mice

Group	Dose(mg/kg)	Survival time(day)	Prolongation rate(%)
CON		14.2 ± 2.5	
I	0.2	19.5 ± 1.7*	37.3
II	0.2	24.2 ± 1.2***	70.4
III	0.2	20.3 ± 2.5***	42.9

BALB/c mice were i.p. saline and polyphenol fraction I, II and III extracted from persimmon leaves for 10 days

Values are mean ± S. D. of 7 mice

Significantly different compared with the control group

P-values was determined by t-test

CON, I, II, III are the same as described in Fig. 8.

2) 복수암의 체중 증가량의 변화

Sarcoma 180으로 마우스의 복수암을 유발시킨 후 각각의 시료를 14일간 복강으로 투여하면서 3일에 한번씩 21일간의 체중 증가량을 관찰한 결과는 Fig. 11.과 같다. Sarcoma 180으로 복수암을 유발을 확인하기 위하여 3일 간격으로 체중을 측정하였을 때, 대조군은 복수암 유발 3일 후부터 체중이 증가하기 시작하여, 몸무게 측정 종료일 까지 계속하여 증가하는 것을 확인하였으나, 감잎 polyphenol 화합물을 복강으로 투여한 감잎 polyphenol 화합물 II는 시료 투여후 9일이 경과하면서 체중이 감소되는 경향을 나타내었다. 또한 fraction II 및 III은 18일이 지나면서 체중이 감소하기 시작하여, 측정 최종일에는 모든 시료군이 대조군에 비해 몸무게가 저하되는 경향을 나타내었다.

동물의 체중 증가의 원인으로는 투여한 암 세포가 증가함에 따라 복수가 생성된 데 기인될 수 있을 뿐 아니라, 동물의 자연 성장으로 인한 결과라고도 볼 수 있다고 보고한 Son 등²⁵⁾의 보고에서 볼 때, 본 실험에서는 사용한 동물의 체중이 25 g 이상의 성숙한 흰쥐를 사용하였으므로,

실험의 결과 대조군에 비하여 각각의 시료를 복강으로 투여한 군에서의 체중 감소는 감잎의 polyphenol 화합물 I, II와 III의 작용 때문으로 사료된다.

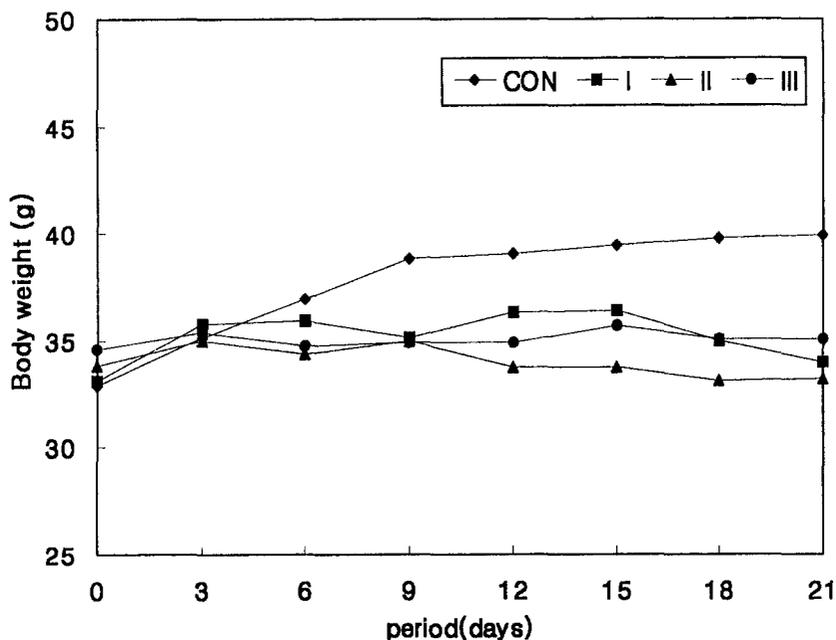


Fig. 11. Effect of intraperitoneally injected of the polyphenol fraction I, II and III on the increase of body weight in sarcoma 180 induced ICR mice.

CON : Intraperitoneal administration with physiological saline in mice

I : Intraperitoneal administration with polyphenol fraction I extracted from persimmon leaves

II : Intraperitoneal administration with polyphenol fraction II extracted from persimmon leaves

III : Intraperitoneal administration with polyphenol fraction III extracted from persimmon leaves

3) 수명연장 효과에 미치는 영향

감잎으로부터 분리 및 정제된 polyphenol 화합물이 BALB/c 마우스의 sarcoma 180으로 유도된 복수암에 대한 수명연장 효과를 실험한 결과는 Table 5와 같다. 마우스에 복수암을 유발시킨 후 감잎 polyphenol 화합물 I, II 및 III을 10일간 연속으로 복강 투여하여 35일간 생존 여부를 관찰한 결과 대조군에서는 14.2일이었으나, fraction I은 19.5일, II는 24.2일과 III은 20.3일로 polyphenol 화합물 II를 투여한 군에서 가장 생존율이 높게 나타났다.

이러한 수명 연장 효과는 체중 증가량의 경향과 일치하는 것으로서, 특히 감잎의 수명연장효과에서 가장 생존율이 높았던 fraction II는 체중 증가량에서도 대조군에 비해 가장 낮은 수치를 나타내어 시료 투여로 인한 복수 암의 진전율이 가장 낮은 것으로 관찰되었다. 이는 고혈압 쥐에 감 탄닌을 장기간 투여하였을 때 수명이 연장되었다는 Uchida 등²⁶⁾의 보고와 유사한 경향을 나타내었다.

Table 4. Body weight, spleen weight and spleen index of mice injected with polyphenol fraction I, II and III from persimmon leaves

Group	Body weight(g)	Spleen weight(g)	Spleen Index(%)
CON	19.4 ± 0.34	0.067 ± 0.007	0.35
I	19.9 ± 0.87	0.083 ± 0.017	0.48
II	21.5 ± 0.52	0.078 ± 0.003	0.38
III	21.7 ± 1.48	0.12 ± 0.012	0.55*

BALB/c mice were intraperitoneal injected with saline and polyphenol fraction I, II and III extracted from persimmon leaves for 7days

Values are mean ± S. D. of 7 mice

Significantly different compared with the control group

P-value was determined by t-test

* : p<0.05

CON, I, II, III are the same as described in Table 1.

Table 5. Effects of polyphenol fraction I, II and III from persimmon leaves on life span of BALB/c mice

Group	Dose (mg/kg)	Survival time (day)	Prolongation rate (%)
CON		14.2 ± 2.5	
I	0.2	19.5 ± 1.7*	37.3
II	0.2	24.2 ± 1.2**	70.4
III	0.2	20.3 ± 2.5**	42.9

BALB/c mice were intraperitoneal injected with saline and polyphenol fraction I, II and III extracted from persimmon leaves for 10 days

Values are mean ± S. D. of 7 mice

Significantly different compared with the control group

P-value was determined by t-test

* : p<0.05, ** : p<0.01

CON, I, II, III are the same as described in Table 1.

제4절 결 론

한국산 감잎으로부터 생리활성 물질을 분리하여 면역능 저하 또는 이상이 있는 경우나 당뇨병, 균 교대현상의 결과에서 볼 수 있는 *C. parapsilosis* 및 *C. albicans*에 대한 항균효과를 실험한 결과 대조군에 비하여 폴리페놀 화합물 II 및 III에서 유의성이 인정되지 않는 범위에서 억제시키는 것으로 나타났다.

한국산 감잎으로부터 polyphenol 화합물군을 분리 및 정제하여 항산화 효과에 관한 실험인 전자공여능 실험을 행한 결과 각각의 시료간에 유의성이 나타났으며, polyphenol 화합물군 I에서 가장 높은 전자공여능을 갖는 것으로 나타났다. 또한 지방산화에 미치는 영향을 관찰하고자 면실유, 아마인유 및 어유에 대한 감잎 polyphenol 화합물의 항산화 효과는 대조군에 비하여 모든 실험군에서 항산화 효과가 높았다.

Sarcoma 180으로 유도된 마우스의 체중증가량에서는 대조군에 비해 시료 투여군에서 다소 낮은 경향을 보였으며, 수명연장 효과에서도 대조군에 비해 감잎 polyphenol 화합물 I은 37.3%, II는 70.4%를 비롯하여 fraction III에서는 42.9%의 수명연장 효과를 나타내었다

제5절 참고문헌

1. 위생교육교재, 사단법인 한국건강보조식품협회, 109(1996)
2. Wattenberg, L.W., Coccia, J.B. and Lam, L.K.T.: Inhibitory effects of phenolic compounds on kenzo [α] pyrene-induced neoplasia. *Canser Res*, 40, 2820(1980)
3. Kim, J.Y., Maeng, Y.S. and Lee, K.Y.: Antioxidative effects of soybean extracts by using various solvents. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 27(5), 635(1995)
4. Gomez, F., Mattinez, A. and Laencina: Prevention of oxidative

- browning during wine storage Food Research Internation, 28, 213 (1995)
5. Blois, M.S.: Antioxidant determination by the use of a stable free radical Nature, 4617, 1198(1958)
 6. Buege, J.A. and Aust, S.D.: Microsomal lipid peroxidation. Method in enzymol, 105, 302(1978)
 7. Kit Cell · titer · 96[®] AQuous One Solution Cell · Proliferation Assay Technical Bulletin, Promega
 8. Fischer, G.A. and Sartorell, A.G.: Development maintenance and assay of drug resistance. *Meth. Med. Res*, 10, 247(1964)
 9. Bladley, T.R. and Metcalf, C.: The growth mouse bone marrow cell in vitro. *Aust. Exp. Med. Su.*, 44, 287(1966)
 10. Goldberg, E., Nitowsky, H. and Colowick, S.: The role of glycolysis in the growth of tumor cells. *J. Biol. Chem.*, 24, 2791(1965)
 11. Bae, H.S., Baek, Y.J. and Yoon, Y.H.: Antitumor activity of *Lactobacillus casei*. against Sarcoma 180 and Lewis Carcinoma in mice. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 21(3), 247-255(1993)
 12. Ishitsuka, H., Miwa, A., Takenoto, K., Fukuoka, K., Itoga, A. and Maruyama, H.B.: Role of uridine phosphorylase for antitumor activity of 5'-deoxy-5-fluorouridine. *Gann.*, 71, 112(1980)
 13. Maeda, Y.Y. and Chihara, G.: The effect of neonatal thymectomy on the antitumor activity of lentinan, carboxymethyl pachymaran and zymosan and their effects on various immune responses. *Int. J. Cancer*, 11, 153(1993)
 14. Isove, N. N., Semm, J. S., Ill, J. E. and McCulloch, E. A.: Colony formation by normal and leukemic human marrow cells in culture. *Blood*, 37, 1(1971)
 15. Hayflicks, L. and Moorhead, P.: The serial cultivation of human diploid strains. *Exp. Cell Res.*, 25, 585(1961)
 16. 최홍식, 이창용: Melanoidin의 항산화성 및 항돌연변이원성. 한국영

- 양식량학회지, 22, 246(1993)
17. Son, J.Y. and Kim, D.H.: Effect of caffeic acid on the oxidant activity of maillard reaction products. *Food and Biotechnology*, 3, 144(1994)
 18. Kang, Y.H., Park, Y.K., Oh, S.R. and Moon, K.D.: Studies on the physiological functionality of pine needle and mugwort extracts. *Korean J. Food Sci, Technol.*, 27, 6, 978(1995)
 19. 정선화: 감잎차 제조를 위한 감잎의 성장시기별 함유 성분의 변화. 경북대 석사학위논문(1992)
 20. Terada, S., Maeda, Y., Masui, T., Suzuki, Y. and Ina, K.: Comparison of caffeine and catechin components in infusion of various tea(Green, Oolong and black tea) and tea drinks. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 34, 20(1987)
 21. Branen, A.L.: Toxicological and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *JAACS*, 52, 59(1975)
 22. Osawa, T. and Namiki, M.: A novel type of antioxidant isolated from leaf wax of Eucalyptus leaves. *Agric. Biol. Chem.*, 45, 735(1981)
 23. 정해영, 요꼬자와 다카코: 녹차로부터 분리된 Epicatechin3-O-gallate의 항노화 및 항돌연변이 기전에 관한 연구. *식품과 산업*, 46(1997)
 24. Moon, S.H., kim, k.H. and Park, K.Y.: Antitumor effect of persimmon leaves in vivo using Sarcoma-180 cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr*, 25(5), 865(1996)
 25. Son, H.S. and Hwang, W.I.: A study on the cytotoxic activity of garlic(*Allium Sativum*) extract against cancer cells. *Korean J Nutrition*, 23(2), 135(1990)
 26. Uchida, S., Ohta, H., Niwa, M., Mori, A., Nonaka, G., Nishioka, I. and Ozaki, M.: Prolongation of life span of stroke prone spontaneously hypertensive rat(SHRSP) ingesting persimmon tannin. *Chem. Pharm. Bull.*, 38, 1049(1990)

제 7 장 고기능성 감잎 음료 개발

제1절 연구개발의 목적과 범위

감잎에는 비타민 C를 비롯하여 비타민 A, D 및 엽록소가 많이 포함되어 있어 옛날부터 일반 가정에서 만들어져 감잎은 혈압강하, 지혈 및 기관지염 치료에 약효가 있다고 한다. 감잎에 관한 국내외의 연구로는 일반성분, 감잎차의 향기성분, 탄닌물질의 분포, 감잎차의 비타민 C, polyphenol 물질 및 영양성분에 관한 연구 등¹⁻⁷⁾이 있다.

감잎에 존재하는 탄닌은 감과실에 존재하는 탄닌과 동일하게 대부분 축합형 탄닌인 leucoanthocyanidin이며⁸⁾, 이외에 gallocatechin과 catechin이 존재하며 감과실에는 미량의 catechin이 함유되어 있는 것으로 보고¹⁵⁾되고 있다. Catechins는 축합형 탄닌의 전구체로써 그자체는 탄닌이 아니지만 축합형 탄닌의 특징적 성질을 모두 지닌다⁹⁾. 녹차의 경우에는 탄닌물질의 대부분이 catechins이며, 최근에는 이들의 기능성에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다¹¹⁻¹⁴⁾.

따라서 본 연구에서는 한국산 감잎을 이용하여 고기능성 음료를 개발할 목적으로 반응표면분석법(response surface methodology)을 이용하여 추출물 최적 추출 조건을 조사하였고, 감잎에 함유된 유리당, 총 비타민 C, 수용성 탄닌 및 catechins 등의 차의 맛과 기능적 특성을 나타내는 성분변화를 조사하고 이를 기초로 관능검사를 통한 고 기능성 감잎음료를 개발에 관한 실험을 수행하였다.

제2절 연구개발의 방법

1. 고기능성 감잎차 음료 제조

1) 추출조건 최적화를 위한 실험계획

열수추출 공정은 추출시간, 추출온도, 에탄올농도 등의 여러 변수에 따라 추출효율이 좌우될 수 있으므로, 본 실험에서는 추출물의 기능적 특성을 최대화 하는 최적조건을 설정하기 위해 반응 표면 분석(Response surface methodology, RSM)¹⁵⁾ program을 활용하였다. 본 computer program은 중심합성계획에 의해 설계된 실험 조건에 따라 모델 실험을 실시하고 여기에서 얻어지는 결과, 즉 추출물의 기능적 특성을 수치화하여 statistical analysis system(SAS) program에 대입함으로써 통계적으로 유의성이 있는 최적의 결과를 예측하였다. 추출조건인 실험변수로는 추출시간(X_1), 추출온도(X_2), 에탄올 농도(X_3)이었으며, 1차 예비실험을 통한 각 조건들은 -1, 0, 1 로서 3수준으로 부호화 하였고, 실험값은 Table 1에 나타내었다.

또 혼합조건인 품질특성에 관련된 반응(종속)변수(Y_n)로써는 추출수율(Y_1), 탁도(Y_2), 수용성 탄닌함량(Y_3), 전자공여능(Y_4), xanthine oxidase(Y_5) 및 angiotensin converting enzyme 저해율(Y_6)이었으며, 이들은 3회 반복 측정하여 그 평균값을 회귀분석에 사용하였다. Table 2에 나타난 독립변수는 중심합성계획에 따라 Table 2과 같이 16구로 설정하여 실험을 실시하였다. 이때 세 개의 독립변수와 종속변수에 대한 2차 회귀모형식은 다음과 같다.

$$Y_n = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2$$

여기서 Y 는 종속변수, X_1, X_2, X_3 는 독립(조건)변수, β_0 는 절편, β_n 는 회귀계수이다. 회귀분석에 의한 예측은 statistical analysis system(SAS) program을 이용하였고, 회귀분석 결과 임계점이 최대점이거나 최소점이 아니고 안장점일 경우에는 능선분석을 하여 최적점을 구하였으며, contour map과 3차원 반응표면 분석으로 최적 추출조건을 분석하였다.

Table 1. Levels of extraction conditions in experimental design

X _i	Extraction conditions	Level		
		-1	0	1
X ₁	Extraction time(hr)	1.5	2	2.5
X ₂	Extraction temp.(°C)	70	80	90
X ₃	Ethanol conc.(%)	0	20	40

Table 2. Central composite design by RSM computer program for optimization of extraction condition of Persimmon leaf

Treatment number	Extraction time(hr)	Extraction temp.(°C)	Ethanol conc.(%)
1	1.5(-1)	70(-1)	0(-1)
2	2.5(1)	70(-1)	0(-1)
3	1.5(-1)	90(1)	0(-1)
4	2.5(1)	90(1)	0(-1)
5	1.5(-1)	70(-1)	40(1)
6	2.5(1)	70(-1)	40(1)
7	1.5(-1)	90(1)	40(1)
8	2.5(1)	90(1)	40(1)
9	1.5(-1)	80(0)	20(0)
10	2.5(1)	80(0)	20(0)
11	2.0(0)	70(-1)	20(0)
12	2.0(0)	90(1)	20(0)
13	2.0(0)	80(0)	0(-1)
14	2.0(0)	80(0)	40(1)
15	2.0(0)	80(0)	20(0)
16	2.0(0)	80(0)	20(0)

2) 추출물의 품질특성 및 기능성 평가

① 가용성 감잎성분의 수율 측정

각 조건에서 얻어진 추출물의 가용성 성분 수율은 추출액 일정량을 취하여 105℃ 건조법으로 수분을 측정하여 고형분 함량을 계산하고 추출액 조제에 사용된 원료량(건물량)에 대한 백분율로서 고형분 수율을 나타내었다.¹⁶⁾

② 탁도 측정

탁도는 각 조건에서 얻어진 추출물을 일정량씩 취하여 650nm에서 투과도를 측정하여 증류수를 100% 기준으로 하여 비교치로 나타내었다.^{17,18)}

③ 수용성 탄닌함량 측정

수용성 탄닌의 정량은 AOAC에 준하여 정량하였다. 즉, 100배 희석한 시료용액 1ml에 Folin-Denis시약 5ml를 가하고 포화 Na₂CO₃ 용액 10ml를 가하여 혼합한 후 증류수로 최종 volume을 100ml로 맞춘 후 30분간 실온에서 방치하고 760nm에서 흡광도를 측정한 것을 미리 작성한 표준곡선의 흡광도 값과 비교하여 함량을 산출하였다.

④ 전자공여능 측정

각 추출물의 전자공여작용은 Blois의 방법¹⁹⁾을 변형하여 측정하였다. 각 시료 1mL에 2×10^{-4} M α, α' -diphenyl- β -picryl-hydrazyl(DPPH) 1.0 mL를 넣고 Vortex한 후 30 분 동안 방치한 다음 517nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{전자 공여능} = \left(100 - \frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}} \right) \times 100$$

⑤ Xanthine oxidase 저해

XOase 활성저해 측정은 0.1M potassium phosphate buffer(pH 7.5)에

xanthine oxidase 2mM을 녹인 기질액 1mL에 효소액 0.1ml와 탄닌용액 0.1ml를 가하고 대조구에는 탄닌 대신 증류수를 0.1ml 첨가하여 37 °C에서 5분간 반응시키고 20% trichloroacetic acid 1ml를 가하여 반응을 종료시키고 원심분리하여 단백질을 제거한 후 반응액 중에 생성된 uric acid를 흡광도 292nm에서 측정하여 다음 식으로 저해율(%)을 구하였다.

$$\text{저해율(\%)} = 1 - \frac{\text{반응구의 uric acid 생성량}}{\text{대조구의 uric acid 생성량}} \times 100$$

⑥ Angiotensin converting enzyme(ACE) 저해

ACE저해 효과 측정은 Cushman 등²⁰⁾의 방법을 변형하여 행하였다. 즉, 반응구는 0.3M NaCl을 함유하는 0.1M potassium phosphate buffer(pH 8.3)에 기질(Hippury-L-histidy-L-leucine ; HHL) 2.5mM 녹인 액 0.15ml, ACE 0.1ml와 각 추출시료 용액 0.1ml를 혼합하였으며, 대조구는 추출시료 대신 증류수 0.1ml를 첨가하여 37 °C에서 30 분간 반응시키고 1N HCl 0.35ml첨가로 반응을 중지시킨 뒤 3ml의 ethylacetate(EtOAc)를 첨가하였다. EtOAc층으로부터 용매를 증류시킨 잔사에 1ml의 증류수를 첨가하여 추출된 hippuric acid를 흡광도 228nm에서 측정한 후 다음 식에 따라 저해율을 구하였다.

$$\text{저해율(\%)} = 1 - \frac{\text{반응구의 hippuric acid 생성량}}{\text{대조구의 hippuric acid 생성량}} \times 100$$

3) 관능검사를 통한 음료제조

고기능성 감잎차 음료를 개발할 목적으로 관능검사를 실시한 결과 감잎 추출물의 농도, 당농도, 향료 및 과즙첨가 농도 등에 관한 관능검사를 차례로 실시하였다.

각각의 감잎차 음료에 대한 색깔, 향기, 종합적 기호도의 품질특성에

대하여 식미척도(hedonic scale)를 사용하여 매우좋다(5점), 좋다(4점), 보통이다(3점), 나쁘다(2점) 및 아주 나쁘다(1점)을 주도록 한 채점척도 시험법(scale scoring)을 이용한 식미검사를 실시하였고 성적 평균치들에 대하여 Duncan 다중검증법에 따라 통계처리하여 감잎차 음료의 처리 구간의 통계적인 유의성을 조사하였다.

2. 제품의 화학적 분석

1) 일반분석

수분함량은 105℃ 건조법, 조단백 함량은 micro-Kjeldal법, 조지방 함량은 Soxhlet법, 조회분 함량은 500℃ 직접 회분법을 사용하여 측정하였다. 조섬유는 원료를 1.25% H₂SO₄와 1.25% KOH로 분해해서 건조 및 회화시켜 정량 하였다.

2) 탄닌 정량

감잎차 10ml를 Sephadax LH-20가 충전된 컬럼에 70% methanol을 300ml통과시켜서 이를 완전 농축하여 탄닌 이동상으로 5ml 정용하여 0.45µm membrane filter로 여과하여 Sep-pak C₁₈ cartridge에 통과시켜 색소와 고분자 물질을 제거한 다음 HPLC로 분석하였다(Table 3).

Table 3. The operating conditions of HPLC for tannin analysis

Items	Conditions
Insterument	Shimadzu LC-10 system
Column	Shim-pack ODS(M) 300 × 7.80 nm.
Detector	254 nm
Mobil phase	CH ₃ CN : H ₂ O = 1 : 4 (oxalic acid 400 mg/ l)
Flow rate	0.75 ml/min.
Injetion volumn	20 µl

3) Caffeine 정량

감잎차 30ml에 분액깔대기에 넣어서 3 배 chloroform을 가하여 아래층을 분리하여 완전히 농축한 후 0.45 μm menbrane filter로 여과하여 Sep-pak C₁₈ catridge에 통과시켜 색소와 고분자 물질을 제거한 다음 HPLC로 분석하였다(Table 4).

Table 4. The operating conditions of HPLC for caffeine analysis.

Items	Conditions
Insterument	Shimadzu LC-10 system
Column	μ -Bondapack C ₁₈ 3.9 \times 300 nm.
Detector	254 nm
Mobile phase	Methanol : H ₂ O : acetic acid = 30 : 70 : 3
Flow rate	0.8 ml/min.
Injetion volumn	20 μl

4) 유리당의 정량

시료액을 0.45 μm menbrane filter로 여과하여 Sep-pak C₁₈ catridge에 통과시켜 색소와 고분자 물질을 제거한 다음 HPLC로 분석하였다(Table 5).

Table 5. The operating conditions of HPLC for sugar analysis

Items	Conditions
Insterument	Young In HPLC 9500 system
Column	REZEX RPM Monosaccharide 30 \times 7.80 nm.
Detector	RID - 6A
Column temp.	75 $^{\circ}\text{C}$
Mobil phase	H ₂ O
Flow rate	0.5 ml/min.
Injetion volumn	20 μl

5) 핵산 정량

감염차 20ml에 5 N KOH용액을 가하여 pH 6.5로 조절하여 100ml로 정용하고 30분간 방치 후 원심분리하여 상징액을 0.25 μ l membrane filter로 여과후 20 μ l를 HPLC에 주입하였다.

Table 6. The operation conditions of HPLC for hexane materials.

Items	Conditions
Insterument	Shimadzu LC-10 system
Column	μ -Bondapack C ₁₈ 3.9 \times 300 nm.
Detector	210 nm
Mobile phase	1 % triethylamin-H ₃ PO ₄ buffer(pH 6.5)
Flow rate	0.8 ml/min.
Injection volumn	20 μ l

6) 비타민 C의 정량

시료액을 0.45 μ m menbrane filter로 여과하여 Sep-pak C₁₈ catridge에 통과시켜 색소와 고분자 물질을 제거한 다음 HPLC로 분석하였다(Table 7).

Table 7. The operating conditions of HPLC for ascorbic acid analysis.

Items	Conditions
Insterument	Shimadzu LC-10 system
Column	μ -Bondapack C ₁₈ 3.9 \times 300 nm.
Detector	254 nm
Mobile phase	Methanol : H ₂ O = 85 : 15
Flow rate	0.8 ml/min.
Injection volumn	20 μ l

3. 제품의 안정성 실험

1) pH의 영향

pH는 시료 10ml를 취해 pH meter를 사용하여 일정간격을 두고 그 변화를 측정하였다.

2) 유리당의 영향

일정량의 시료 5ml에 양이온과 음이온 물질을 제거하기 위하여 Mixed resin TMD-8(1:1 mixture of strong cation and anion exchange resin, Sigma, U.S.A)을 가하여 5 °C 냉장고에서 1일간 방치한 후 이온교환수지를 제거하기 위하여 Whatman No.1 여과지 위에서 여과, 세척하였다. 이 액을 감압건고시키고 5ml 초순수로 정용하고 0.45 μ m membrane filter로 여과하여 Sep-pak C₁₈ cartridge에 통과시켜 색소와 고분자 물질을 제거한 다음 HPLC로 분석하였으며, 분석조건은 Table 4와 같다.

3) 비타민 C의 영향

일정량의 시료를 0.45 μ m membrane filter로 여과하여 Sep-pak C₁₈ cartridge에 통과시켜 색소와 고분자 물질을 제거한 다음 HPLC로 분석하였으며, 분석조건은 Table 5와 같다.

4) 비휘발성 유기산의 영향

일정량의 시료 4ml를 감압건고시키고 여기에 14% BF₃/methanol 용액 2ml를 가하여 80 °C에서 30분간 반응시켜 methylation시킨 후 여기에 포화 ammonium sulfate와 chloroform 4ml를 가하여 methyl ester층을 chloroform층으로 이행시키고, 소량의 무수 sodium sulfate를 가하여 탈수시킨 다음 0.5 μ L를 GC에 주입하여 분석하였고, 이때 분석조건은 Table 6과 같다.

4. 갈변도의 측정

감염음료의 외관적 품질을 나타내는 갈색도는 분광광도계(spectrophotometer,

420 nm)를 사용하여 흡광도로써 측정하였다.

제3절 연구개발의 결과 및 고찰

1. 추출물의 특성에 대한 추출조건의 영향

감잎에 대한 최적 추출조건을 알아보기 위하여 Table 2와 같은 실험 설계에 의해 각각의 조건으로 추출한 추출물의 특성을 측정한 결과는 Table 8과 같다. 이상의 실험결과를 이용하여 추출시간, 추출온도, 에탄올농도 등 세가지 조건($X_1 \sim X_3$)의 요인변수와 추출물의 특성인 가용성 고형분, 탁도, 수용성 탄닌함량, DPPH, XOase 저해, ACE 저해의 반응변수($Y_1 \sim Y_6$)에 대한 SAS program의 Taylor 2차 방정식을 나타낸 결과는 Table 10과 같다.

이같은 반응변수들의 2차 방정식과 반응표면 분석을 실행검토한 결과 DPPH와 XOase inhibition(%)에서는 정상점(stationary point)이 최대값을 나타냈으나, 이를 제외한 다른 반응변수는 안장점(saddle point)을 나타내어 최대값과 최소값을 알 수가 없었다. 그러므로 능선분석(ridge analysis)을 실행한 결과 Table 9와 같이 감잎은 추출시간(X_1)이 거의 일정하게 2시간내외에서 반응변수들이 최대값을 나타내었다. 따라서 3차원 반응표면에서는 X_1 즉, 추출시간을 고정시켜 최적조건을 구하기 위한 반응표면을 작성하였다.

Table 8. Soluble solid, turbidity, tannin contents, DPPH, XOase inhibition and ACE inhibition of extracts prepared with persimmon leaves for optimization of extraction condition by RSM program

Treatment number	Ext. time(hr)	Ext. temp.(°C)	Alcohol conc.(%)	Soluble solid(%)	Turbidity (%)	Soluble Tannin(%)	DPPH ¹⁾ (%)	XOase inhibition(%)	ACE inhibition(%)
1	1.5	70	0	14.8	20.9	2.59	50.3	13.09	26.7
2	2.5	70	0	14.7	17.4	1.41	32.9	13.42	38.3
3	1.5	90	0	14.9	21.4	1.93	38.1	9.31	37.1
4	2.5	90	0	15.3	19.2	1.88	48.0	10.47	40.1
5	1.5	70	40	17.8	8.6	4.78	79.8	44.52	43.5
6	2.5	70	40	18.0	8.3	3.82	85.8	55.48	51.6
7	1.5	90	40	16.4	7.5	4.11	89.0	59.41	59.7
8	2.5	90	40	17.0	7.1	4.97	88.7	64.11	54.2
9	1.5	80	20	17.4	10.2	5.16	84.4	67.59	72.4
10	2.5	80	20	17.9	10.2	5.18	89.2	61.37	51.4
11	2.0	70	20	16.5	15.4	4.54	84.0	61.86	56.1
12	2.0	90	20	15.3	17.4	3.45	86.1	60.72	45.0
13	2.0	80	0	16.1	20.1	2.39	66.9	23.57	30.7
14	2.0	80	40	17.6	6.5	5.10	90.1	77.58	64.7
15	2.0	80	20	17.7	11.7	4.54	88.4	68.92	62.9
16	2.0	80	20	18.1	11.6	3.52	89.5	66.25	68.6

¹⁾ Electron donating ability to α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl at 528nm

Table 9. Predicted levels for physiochemical characteristics and sensory score of extracts from persimmon leaf yielding optimum responses by analysis of ridge

Extraction conditions	Levels for optimum responses					
	Soluble solid(%)	Turbidity (%)	Soluble Tannin (mg%)	DPPH ¹⁾ (%)	XOase inhibition (%)	ACE inhibition (%)
Extraction time(hr)	2.37	1.96	1.54	2.18	2.24	1.55
Extraction temp.(°C)	78.78	85.11	78.45	83.40	83.84	81.97
Alcohol concentration(%)	32.92	2.89	27.44	37.36	35.70	27.71
Morphology	Saddle point	Saddle point	Saddle point	Maximum point	Maximum point	Saddle point

¹⁾ Electron donating ability to α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl at 528nm

Table 10. Taylor second equations calculated by RSM program for various response

Response	Taylor second equation	R ²	Significance
Soluble solid(%)	$Y_1 = -63.542414 - 7.618793X_1 + 2.163371X_2 + 0.239914X_3$ $+ 0.022500X_1X_2 + 0.006250X_1X_3 - 0.001938X_2X_3$ $+ 1.503448X_1^2 - 0.013741X_2^2 - 0.001060X_3^2$	0.9462	0.0036
Turbidity (%)	$Y_2 = 210.784138 + 36.807931X_1 - 5.728707X_2 - 0.249138X_3$ $+ 0.030000X_1X_2 + 0.062500X_1X_3 - 0.002875X_2X_3$ $- 10.434483X_1^2 + 0.035914X_2^2 + 0.001228X_3^2$	0.9855	0.0001
Soluble tannin (mg%)	$Y_3 = -22.619345 - 13.669328X_1 + 0.993642X_2 + 0.098495X_3$ $+ 0.073750X_1X_2 + 0.014125X_1X_3 + 0.000419X_2X_3$ $+ 1.806207X_1^2 - 0.007234X_2^2 - 0.002434X_3^2$	0.9229	0.0100
Electron donating ability(%)	$Y_4 = -418.696552 + 45.148276X_1 + 10.790828X_2 + 1.587552X_3$ $+ 0.525000X_1X_2 + 0.165000X_1X_3 + 0.005750X_2X_3$ $- 22.462069X_1^2 - 0.073655X_2^2 - 0.034789X_3^2$	0.9452	0.0038
XOase inhibition (%)	$Y_5 = -673.992724 + 108.499362X_1 + 15.053461X_2 + 1.298674X_3$ $- 0.135750X_1X_2 + 0.177125X_1X_3 + 0.018906X_2X_3$ $- 24.748966X_1^2 - 0.093772X_2^2 - 0.050231X_3^2$	0.9867	0.0001
ACE inhibition (%)	$Y_6 = -592.448966 + 7.274483X_1 + 15.449948X_2 + 1.647966X_3$ $- 0.555000X_1X_2 - 0.150000X_1X_3 + 0.004125X_2X_3$ $+ 9.841379X_1^2 - 0.088897X_2^2 - 0.029349X_3^2$	0.7827	0.1493

X₁ : Extract time(hr), X₂ : Extract temperature(°C),

X₃ : Ethanol concentration

1) 가용성 고형분 함량의 변화

추출조건에 따른 추출물의 가용성 고형분 함량에 대한 contour map과 3차원 반응표면은 Fig. 1과 같다. 가용성 고형분 함량에 대한 추출물의 회귀식에서 R^2 는 0.9462이고, 유의성은 0.0036으로서 1%이내의 유의수준에서 인정되었다(Table 9). 이때 예측된 정상점(stationary point)은 안장점(saddle point)이므로 능선분석(ridge analysis)을 실시하여 본 결과, 가용성 고형분의 최대값은 18.42%로 예측이 되었다. 추출조건별 가용성 고형분 함량 변화에 대한 contour map과 반응표면을 보면 에탄올의 농도가 높을수록, 추출온도가 낮을수록 가용성 고형분의 함량이 증가하는 경향이 나타났으며, 에탄올 농도 20% 이상, 추출온도 80°C 이하에서 높은 함량을 나타낸 것으로 나타났다.

2) 탁도의 변화

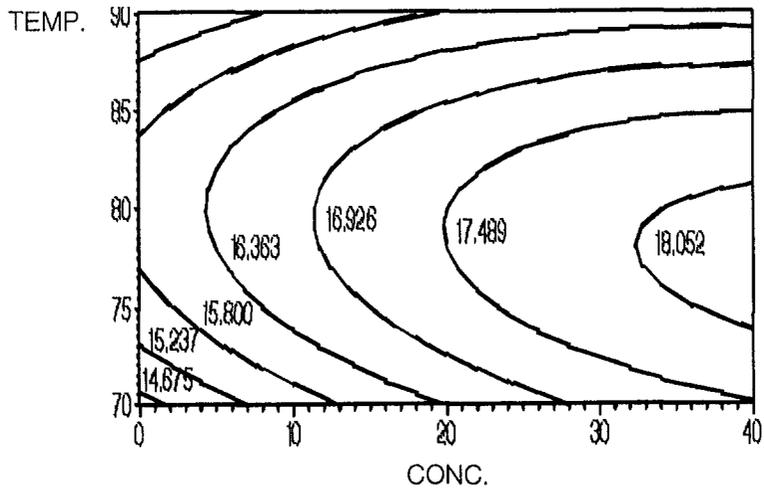
추출조건에 따른 추출물의 탁도 변화를 650 nm의 파장에서 투과도로 측정한 결과에 대한 contour map과 3차원 반응표면은 Fig. 2와 같다. 탁도에 대한 추출물의 회귀식의 R^2 는 0.9855이고, 유의성은 0.0001으로서 1%이내의 유의수준에서 인정되었다(Table 9). 이때 예측된 정상점(stationary point)은 안장점(saddle point)이므로 능선분석(ridge analysis)을 실시하여 본 결과, 투과도의 최대값은 19.37%로 예측이 되었다. 이때 추출조건은 에탄올의 농도 2.89%, 추출온도 85.11°C이었다. 추출조건별 탁도 변화에 대한 contour map과 반응표면을 보면 에탄올의 농도가 감소할수록, 추출온도가 높을수록 투과도가 증가하는 경향이 나타났다.

3) 수용성 탄닌 함량의 변화

추출조건에 따른 추출물의 수용성 탄닌 함량에 대한 contour map과 3차원 반응표면은 Fig. 3과 같다. 수용성 탄닌 함량에 대한 회귀식의 R^2 는 Table 9에 나타난 바와 같이 0.9229이고, 유의성은 0.0100으로서 1%이내의 유의수준에서 인정되었다. 이때 능선분석(ridge analysis)을 실시

하여 본 결과, 수용성 탄닌의 최대값은 5.31%로 예측이 되었다. 이때 추출조건은 에탄올의 농도 27.44%, 추출온도 78.45℃이었다. Contour map 과 반응표면을 보면 에탄올의 농도가 높을수록, 추출온도가 낮을수록 수용성 탄닌의 함량이 증가하는 경향이 나타났으며, 에탄올의 농도 30~35%, 추출온도 78~80℃ 범위에서 가장 높은 함량을 얻을 수 있을 것으로 예측되었다.

(A)



(B)

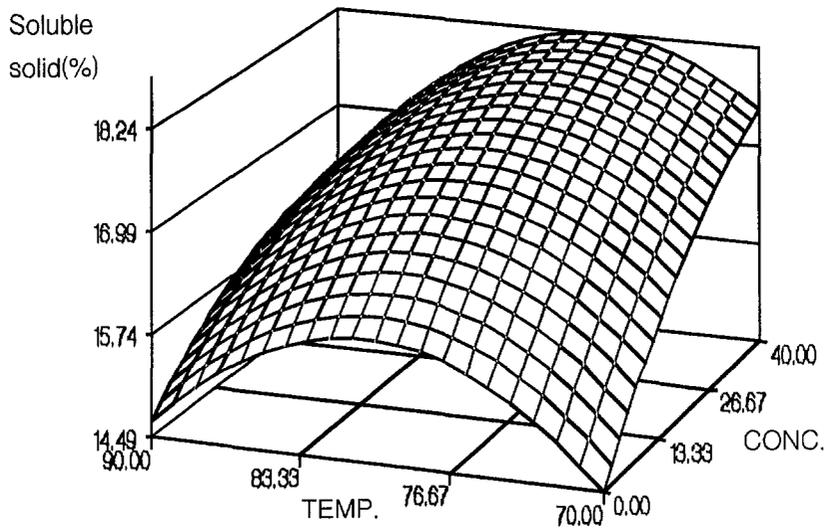
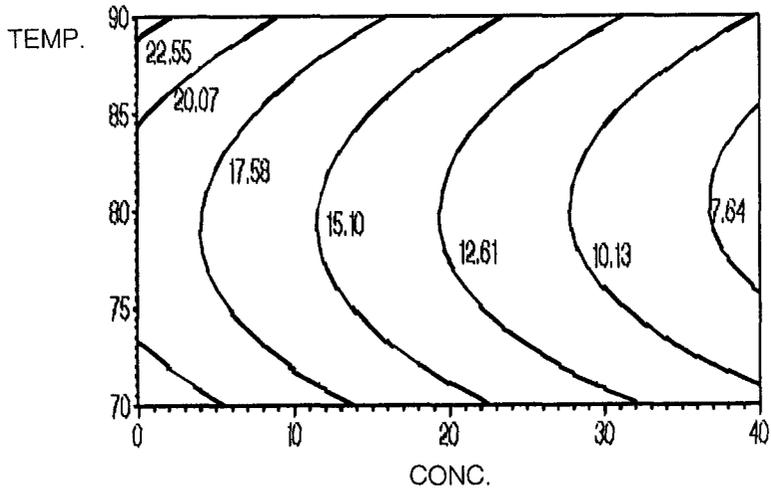


Fig. 1. Contour map(A) and response surface(B) for the effects of ethanol concentration and temperature on soluble solid contents of persimmon leaf extracts.

(A)



(B)

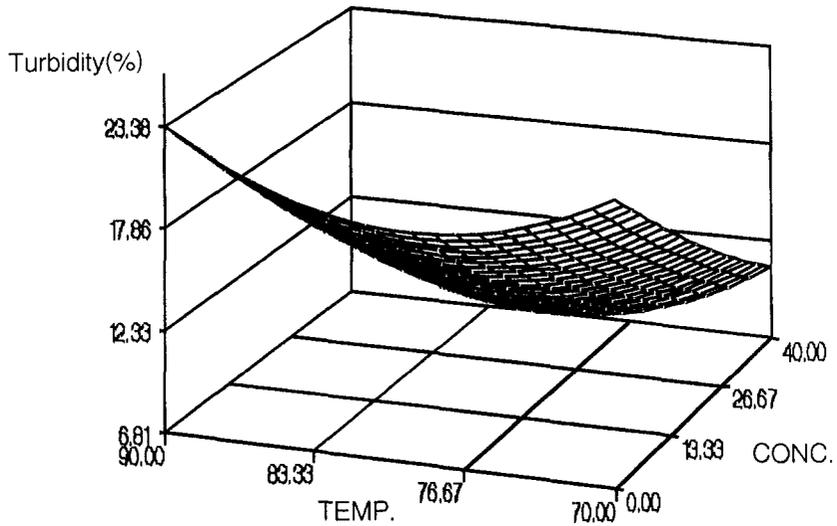
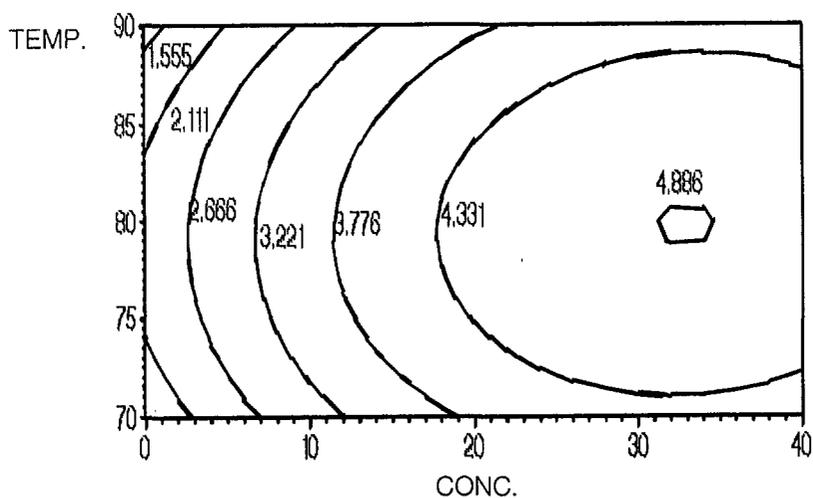


Fig. 2. Contour map(A) and response surface(B) for the effects of ethanol concentration and temperature on turbidity of persimmon leaf extracts

(A)



(B)

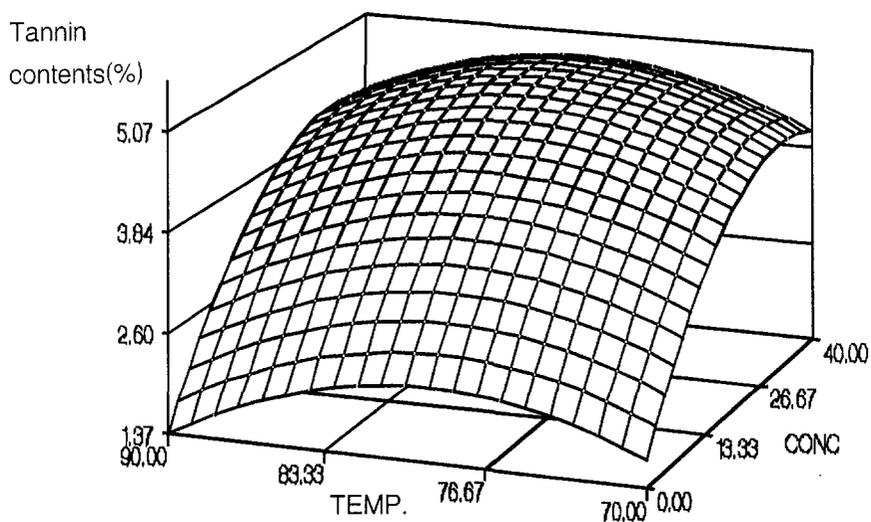


Fig. 3. Contour map(A) and response surface(B) for the effects of ethanol concentration and temperature on soluble tannin contents of persimmon leaf extracts

4) 전자공여능의 변화

DPPH(α, α' -diphenyl- β -picryl-hydrazyl)를 이용한 감잎 추출물의 전자공여능에 대한 contour map과 3차원 반응표면은 Fig. 4와 같다. 전자공여작용의 회귀식의 R^2 는 0.9452이고, 유의성은 0.0038으로서 1%이내의 유의수준에서 인정되었다(Table 9). 예측된 정상점(stationary point)은 최대점이고 이때 최대값은 98.17%로 예측되었으며, 이 예측치를 추출할 수 있는 조건(요인변수)들은 추출시간 2.18(hr), 추출온도 83.40°C, 에탄올 농도 37.36%이었다(Table 8).

전자공여작용에 대한 contour map과 반응표면을 보면 에탄올의 농도가 높을수록 증가하는 경향을 보였다. 이때 전자공여작용은 에탄올 농도가 25~40%, 추출온도 76~88°C에서 높은 나타났다.

5) Xanthine Oxidase 저해율의 변화

추출조건에 따른 추출물의 XOase의 저해율 변화는 Table 7에 나타내었고, 결과에 대한 contour map과 3차원 반응표면은 Fig. 5와 같다. XOase에 대한 회귀식의 R^2 는 0.9867이고, 유의성은 0.0001으로서 1%이내의 유의수준에서 인정되었다(Table 9). 이때 예측된 정상점(stationary point)은 최대점이고 이때 최대값은 75.39%이었고, 이때의 요인변수들의 값은 에탄올 농도 35.71%, 추출온도 83.84°C이었다(Table 10).

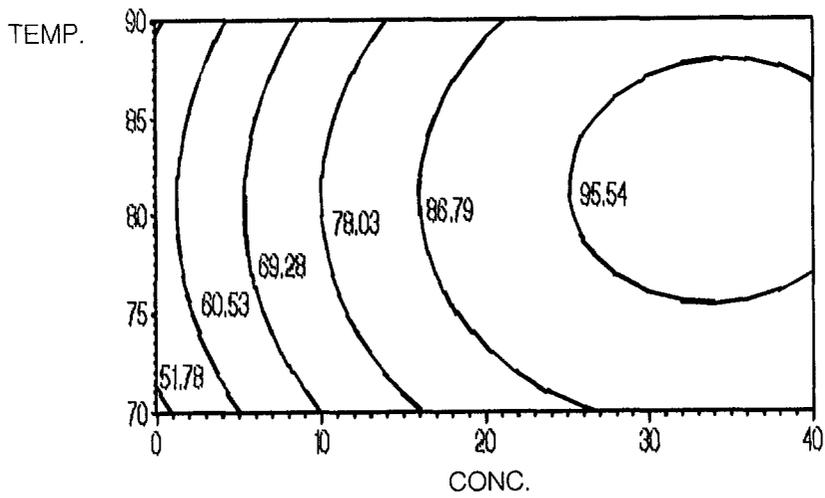
추출조건별 탁도 변화에 대한 contour map과 반응표면을 보면 에탄올의 농도가 증가할수록, 추출온도가 높을수록 XOase 저해율은 증가하는 경향이 나타났으며, 에탄올 농도 20% 이상, 추출온도 80°C 이상에서 높은 저해효과를 나타낸 것으로 나타났다.

6) ACE 저해율의 변화

추출조건에 따른 추출물의 ACE 저해율에 대한 변화는 Table 8에 나타내었고, 이들의 contour map과 3차원 반응표면은 Fig. 6과 같다. ACE 저해율에 대한 회귀식의 R^2 는 Table 9에서와 같이 0.7827이고, 유의성은 0.1493으로서 유의수준이 인정되지 않았다.

ACE 저해율의 contour map과 반응표면(Fig. 6)을 보면 ACE 저해율은 온도에는 거의 영향을 받지 않았고 에탄올의 농도에는 영향을 받았는데 용매농도 27%에서 최고치를 나타내었다.

(A)



(B)

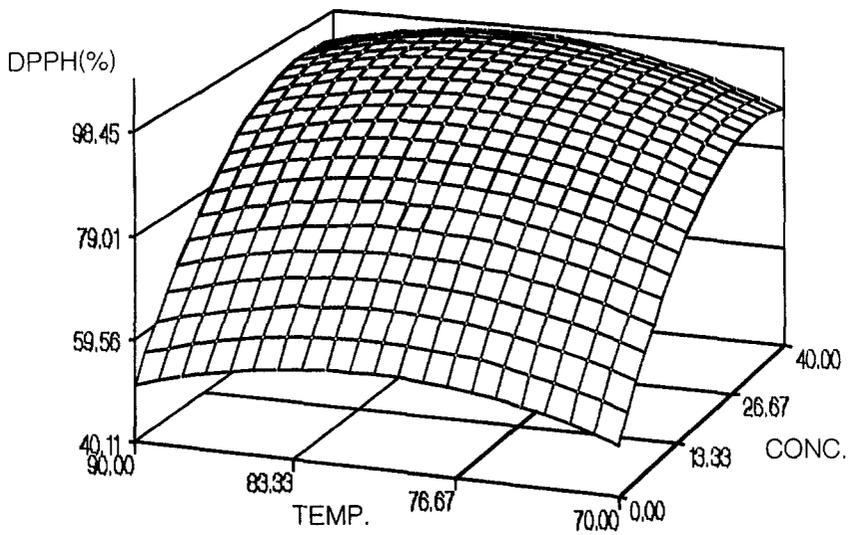
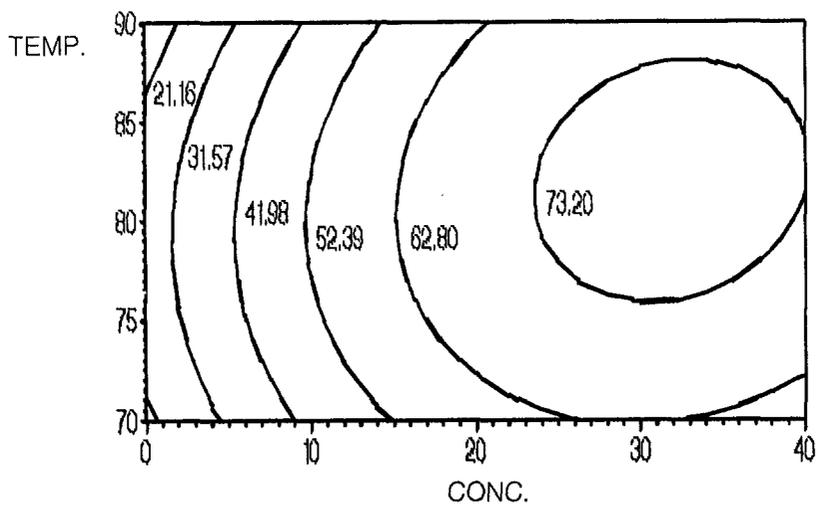


Fig. 4. Contour map(A) and response surface(B) for the effects of ethanol concentration and temperature on Electron donation ability of persimmon leaf extracts

(A)



(B)

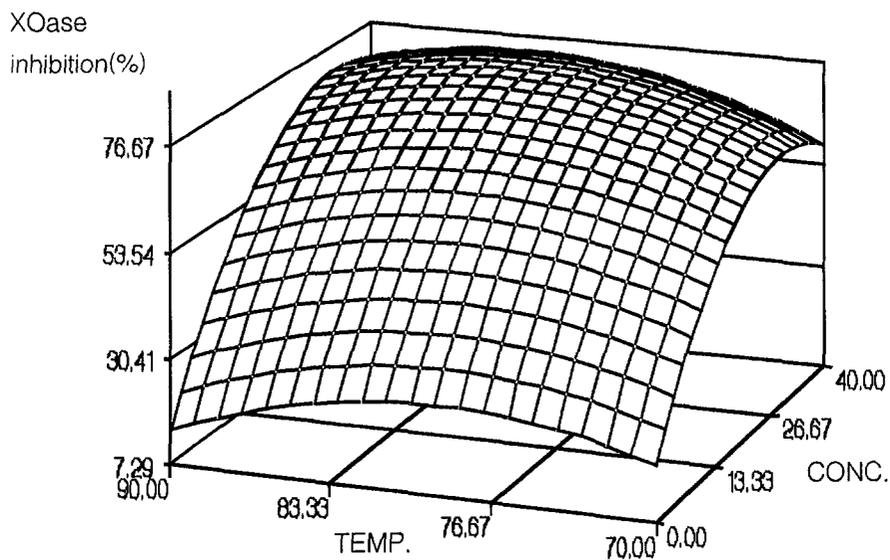
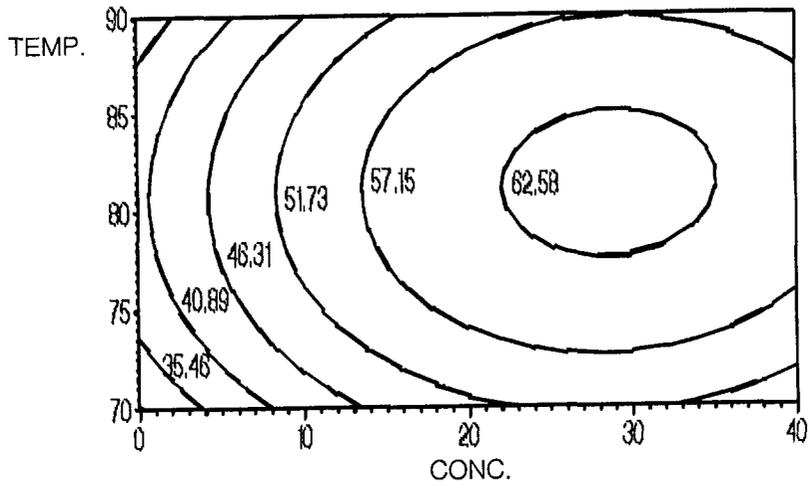


Fig. 5. Contour map(A) and response surface(B) for the effects of ethanol concentration and temperature on xanthine oxidase inhibition rate of persimmon leaf extracts

(A)



(B)

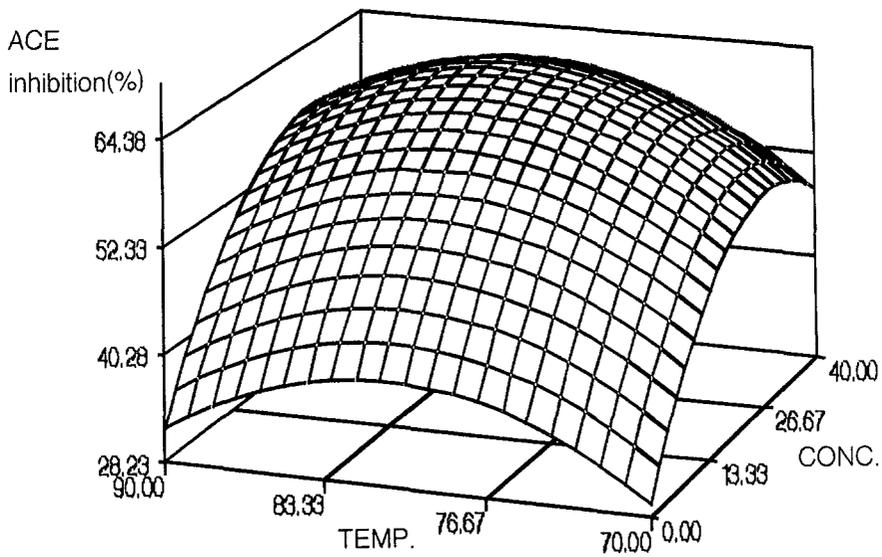


Fig. 6. Contour map(A) and response surface(B) for the effects of ethanol concentration and temperature on angiotensin converting enzyme inhibition rate of persimmon leaf extracts

2. 추출조건의 최적화

감잎 음료 제조를 위한 추출공정을 최적화하기 위하여 조건별 추출물의 가용성 고형분 함량, 추출물의 탁도, 수용성 탄닌의 함량, 전자공여작용, XOase 저해율 그리고 ACE 저해율에 대한 contour map을 superimposing하여 최적 추출조건 범위를 예측하였다. 추출에서 가장 영향이 작은 것으로 나타난 추출시간을 실험계획의 범위 즉, 2시간으로 고정하여 반응변수들의 추출특성을 반응표면 분석하였다. Fig. 7의 빗금친 부분에서 나타난 바와 같이 모든 반응변수를 공통으로 만족하는 전체적인 최적 추출조건 범위는 Table 11에서와 같이 추출온도 78~81℃, 에탄올 농도 33~35%로 나타났다.

따라서 감잎 음료 제조시 최적 추출조건으로 추출시간 2시간, 추출온도 80℃, 에탄올 농도 34%로 감나무 잎을 추출하는 것으로 결정하였다.

Table 11. The optimum extraction conditions for response variables yielding optimum responses by superimposing of contour maps

Extraction conditions	Range optimum conditions
Extraction time(hr)	2
Extraction temperature(℃)	78 ~ 81
Ethanol concentration(%)	33 ~ 35

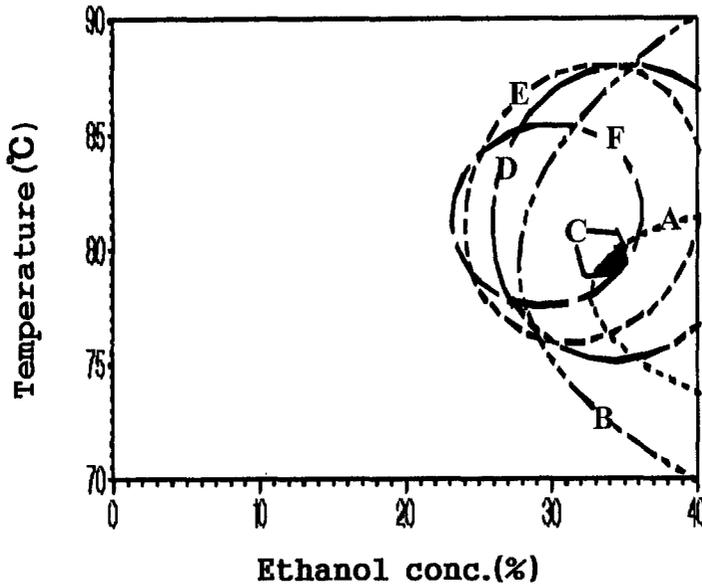


Fig. 7. Superimposed contour map for optimization of response variables in persimmon leaf extracts.

- | | |
|-------------------------|----------------------------------|
| (A) Soluble solid(%) | (B) Turbidity(%) |
| (C) Tannin contents(%) | (D) Electron donation ability(%) |
| (E) XOase inhibition(%) | (F) ACE inhibition(%) |

3. 관능검사를 통한 음료 제조

1) 감잎 추출물의 적정농도

음료제조를 위한 감잎추출물의 농도를 결정하기 위하여 감잎 추출액을 2.0 °Brix로 맞추어 음료제조에 실험에 사용하였고 감잎추출물의 짙은맛을 고려하여 추출물의 함량을 5%를 최소 함량으로 시작하여 10, 15, 20, 25%의 배합비로 제시하였고, 부재료로 1차 관능검사를 통하여 설정한 설탕 3.5%와 구연산의 신맛을 제거하기 위한 구연산 나트륨 0.05%, ascorbic acid 0.05% 그리고 구연산을 첨가하여 pH 4.0이하로 조절하여

관능평가를 실시하였다.

Table 12는 관능검사의 결과를 나타낸 것이다. 관능검사를 실시한 결과 색상을 제외하고 단맛, 떫은맛, 향 그리고 전반적인 기호도에서는 5% 수준에서 유의적인 차이를 보였다. 색상에서는 유의적인 차이는 보이지 않았으나 추출액의 농도 5%에서는 음료로 활용하기에는 색이 약간 옅게 나타나 농도가 약간 낮은 것 같았고 25%에서는 그 반대로 색이 많이 짙게 나타났다. 감잎음료의 맛을 가장 크게 좌우하는 떫은맛은 추출액의 농도가 10%이상으로 갈수록 너무 진하게 느껴져 관능요원들이 싫어하였다. 그리고 향은 5%에서는 거의 감잎의 은은한 냄새를 느낄수가 없었고 15%이상에서는 조금 진하게 느껴져 음료로 부적당하다고 판단되어졌다.

Table 12. Acceptability of persimmon leaf beverage depending on the amount of extracts

	A ¹⁾	B ²⁾	C ³⁾	D ⁴⁾	E ⁵⁾	Significance
Color	2.80 ^a	3.50 ^a	3.60 ^a	3.25 ^a	2.83 ^a	.268
Sweetness	2.80 ^{ab}	3.35 ^a	3.40 ^a	3.15 ^a	2.28 ^b	.051
Astringent taste	2.70 ^{ab}	3.20 ^a	3.00 ^{ab}	2.25 ^{bc}	1.75 ^c	.005
Flavor	2.60 ^b	3.05 ^{ab}	3.75 ^a	3.60 ^a	3.05 ^{ab}	.029
Overall	2.85 ^{bc}	3.68 ^a	3.22 ^{ab}	3.13 ^{ab}	2.25 ^{bc}	.005

¹⁾A : Extract 5%

²⁾B : Extract 10%

³⁾C : Extract 15%

⁴⁾D : Extract 20%

⁵⁾E : Extract 25%

In a row, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT

2) 적정 당농도 결정

일반음료 제조를 위한 당의 농도를 결정하기 위하여 이미 결정된 추출액의 농도 10%(2 °Brix)를 첨가하고 당의 농도를 최저 1.5%로 시작하여 2.5, 3.5, 4.5, 5.5%의 배합비로 제시하였고 나머지 부재료로 구연산 나트

를 0.05%, ascorbic acid 0.05% 그리고 구연산을 첨가하여 pH 4.0이하로 조절하여 관능평가를 실시하였다.

관능검사 결과 Table 13에 나타난 것과 같이 짙은맛과 향에서 유의적인 차이를 나타내지 않았는데 이는 추출액의 농도를 10%로 고정하였기 때문이라고 사료되어진다. 단맛은 3.5%이상의 농도에서는 유의적인 차이를 보이지 않았지만 음료의 짙은맛을 약간 완화시키는 것으로 느껴졌고 5.5%의 경우에는 조금 달게 느껴지는 것으로 판단되어 졌고 1.5%와 2.5%에서는 단맛이 약하여 관능요원들이 약간 싫어하였다. 따라서 모든 구에서 유의적인 차이를 보인 전반적인 기호도를 고려하여 볼 때 일반음료의 적정 당농도 4.5%가 가장 적합한 것으로 판단되어 졌다.

Table 13. Acceptability of persimmon leaf beverage depending on the amount of sugar

	A ¹⁾	B ²⁾	C ³⁾	D ⁴⁾	E ⁵⁾	Significance
Color	3.50 ^c	3.45 ^{bc}	3.35 ^{bc}	3.85 ^{ab}	4.15 ^a	.008
Sweetness	2.20 ^b	2.95 ^{ab}	3.90 ^a	3.65 ^a	3.85 ^a	.001
Astringent taste	2.35 ^a	2.55 ^a	2.80 ^a	2.90 ^a	2.70 ^a	.792
Flavor	3.15 ^a	3.15 ^a	3.25 ^a	3.40 ^a	3.50 ^a	.491
Overall	2.35 ^d	2.70 ^{cd}	3.05 ^{bc}	3.85 ^a	3.55 ^{ab}	.000

¹⁾A : Sugar 1.5%

²⁾B : Sugar 2.5%

³⁾C : Sugar 3.5%

⁴⁾D : Sugar 4.5%

⁵⁾E : Sugar 5.5%

In a row, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT

4) 향료 시험

시중에 판매되는 음료에 많이 사용되고 있는 향료를 이용하여 감잎의 은은한 향을 유지하면서 음료의 맛을 좀더 상승시키고자 여러종류의 향료를 이용하여 관능검사를 실시하였다. Fruit punch, tropical fruit,

yoghurt, creamsoda, drink, pear, lemon, apple, strawberry, jujube를 1차 예비실험을 통해 0.04%씩 각각 첨가하여 관능검사를 실시한 결과는 Table 14와 같다.

Flavor의 경우에 각군간 1%이내에서 유의적인 차이를 나타내었는데, 이중에 사과향과 딸기향을 첨가한 구에서 가장 좋은 반응을 보였다. 사과향과 딸기향을 첨가했을 경우 감잎 특유의 풀 냄새를 감소시키면서 은은한 감잎 향을 더욱더 느낄수 있었으며, 이들 향으로 인하여 떫은맛과 단맛에서도 상승효과를 보여 주었다. 향료 실험에서는 주로 과일종류의 향에서 좋은 반응을 보였으며 전반적인 기호도에서도 향에서 나타난 결과와 같이 1%이내의 수준에서 유의적인 차이를 나타내었고, 특히 사과향의 경우 관능요원들로부터 가장 좋은 반응을 보여 사과향 첨가시 감잎 음료로 가장 적합할 것으로 판단되었다.

Table 14. Acceptability of persimmon leaf beverage depending on the spices

	Color	Sweetness	Astringent taste	Overall
Fruit Punch	3.30 ^a	2.70 ^{cd}	2.70 ^{bc}	2.70 ^c
Tropical Fruit	3.40 ^a	2.40 ^d	2.40 ^c	2.50 ^c
Yoghurt	3.60 ^a	3.00 ^{bcd}	2.80 ^{bc}	2.90 ^{bc}
Creamsoda	3.40 ^a	2.90 ^{bcd}	2.80 ^{bc}	2.70 ^c
Drink	3.40 ^a	3.60 ^{ab}	3.50 ^{ab}	3.20 ^{bc}
Pear	3.80 ^a	3.40 ^{abc}	3.10 ^{abc}	3.60 ^{ab}
Lemon	3.70 ^a	3.50 ^{abc}	3.20 ^{abc}	3.70 ^{ab}
Apple	3.90 ^a	4.10 ^a	3.90 ^a	4.40 ^a
Strawberry	3.80 ^a	3.30 ^{bc}	3.30 ^{abc}	3.70 ^{ab}
Jujube	3.40 ^a	2.80 ^{bcd}	2.50 ^c	2.60 ^c
F value	1.099	3.981	2.815	5.655
Significance	.372	.000	.006	.000

In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT

5) 과즙 농도 시험

음료의 맛과 향을 향상시키기 위해 향료실험에서 가장 좋은 반응을 보인 사과향을 기초로 사과과즙을 첨가하기로 결정하였다. 사과과즙은 시판하는 100% 사과주스를 여과하여 사용하였고 농도를 2배 희석하여 음료에 6, 9, 12, 15, 18%로 첨가하여 관능검사를 실시하여 그 결과를 Table 15에 나타내었다.

그 결과 색깔을 제외한 나머지 단맛, 떫은맛, 향에서 유의적인 차이를 나타내었으나, 12, 15, 18%의 농도에서는 단맛과 향에서 유의적인 차이를 나타내지 않았고 떫은맛에서도 15%와 18%는 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 그러나 18%에서는 사과향과 맛이 조금 진하게 느껴져 감잎의 은은한 향과 맛을 잘 느낄수 없었으며, 6%와 9%에서는 다른 농도에 비해 전반적인 기호도에서 유의적인 차이를 나타내었다. 따라서 사과과즙의 적정 농도를 15%로 하는 것이 감잎음료의 맛과 향에서 좋은 효과가 있을 것으로 사료되어 졌다.

Table 15. Acceptability of persimmon leaf beverage depending on the amount of apple juice

	A ¹⁾	B ²⁾	C ³⁾	D ⁴⁾	E ⁵⁾	Significance
Color	3.75 ^a	3.95 ^a	3.75 ^a	3.75 ^a	3.75 ^a	.869
Sweetness	3.00 ^b	3.00 ^b	3.80 ^a	4.00 ^a	3.85 ^a	.001
Astringent taste	3.00 ^b	3.00 ^b	3.50 ^{ab}	3.90 ^a	3.80 ^a	.016
Flavor	3.00 ^b	3.20 ^{ab}	3.90 ^a	3.90 ^a	3.80 ^a	.028
Overall	2.80 ^b	2.80 ^b	3.80 ^a	4.10 ^a	4.00 ^a	.000

¹⁾A : Apple juice(diluted) 6%

²⁾B : Apple juice(diluted) 9%

³⁾C : Apple juice(diluted) 12%

⁴⁾D : Apple juice(diluted) 15%

⁵⁾E : Apple juice(diluted) 18%

In a row, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT

6) 감잎 음료의 최적 배합비

위의 관능검사의 결과를 토대로 최적 배합비를 결정하였다. 감잎 음료의 배합비는 Table 16에 나타내었고, 최종 pH는 구연산을 0.05% 첨가하여 pH 4이하로 조정하였다.

Table 16. Optimum recipe of persimmon leaf beverage

Substrate	Contents(%)
Extract(2 Brix°)	10.00
Apple juice	15.00
Sugar	4.50
Citric acid	0.05
Sodium citrate	0.05
Ascorbic acid	0.05
Apple spice	0.04
Distilled water	70.31
Total	100.00

4. 제품의 화학적 분석

1) 일반분석

감잎음료의 일반 성분은 Table 17에서 보는 바 같이 수분 함량은 97.49%였으며 회분 함량은 0.11%이며 조단백과 조지방의 함량은 0.06%이었다.

Table 17. Proximate composition of persimmon leaves tea.

Constituent(%)				
Mositure	Ash	Crude fiber	Crude fat	Crude protein
97.49	0.11	0.049	0.033	0.06

2) 탄닌 함량

감잎 음료의 탄닌의 함량은 Table 18과 같다. HPLC에 의하여 procyanidin C-1-3',3'',3'''-O-trigallate 등 3 개의 탄닌 화합물을 분리 동정하였다. 탄닌은 잎 중에 다량으로 존재하여 품종, 채취의 시기 및 잎의 숙성에 따라서 현저한 차이를 나타냈으며 차 제조시 품질에 깊이 관여한다는 것은 오래 전부터 알려진 바 있다. 또한 탄닌은 항산화 효과, 고혈압, 충치예방물질로 효과가 입증된 바 있어 감잎 음료가 여러 가지 기능이 높은 음료라 사려된다.

Table 18. Content of tannin in persimmon leaf beverage(mg%).

No.	RT*	Compounds	Content
1.	2.77	Procyanidin C-1-3',3'',3'''-O-trigallate	0.15
2.	5.76	Epigallocatechin-(4 β →8)-epigallocatechin-(4 β →8)-catechin	0.25
3.	14.4	Procyanidin B-7-3-O-gallate	0.02

* RT : retention time

3) Caffeine 함량의 변화

감잎 음료의 caffeine 함량은 6.58 mg%로 나타났다. 신에 의한 녹차의 caffeine의 함량보다 적음이 나타났다. 차를 섭취하였을 때는 순수한 카페인을 과잉 섭취시 나타나는 정신불안, 불쾌감 등의 부작용이 일어나지 않고 훨씬 부드럽게 서서히 나타난다고 한다.(Table 19)

4) Vitamin C 함량

한국산 감잎 음료의 비타민 C는 63.00 mg%의 함량을 가짐을 알 수 있었다. 비타민 C의 함량이 양질의 녹차일수록 그 함량이 많다고 보고한 바 있고 우롱차의 비타민 C의 함량보다도 많은 함량을 나타내었다 (Table 19).

Table 19. Content of ascorbic acid and caffeine in persimmon leaf beverage(mg%).

	Ascorbic acid	Caffeine
Content	63.00	6.51

5) 유리당 함량

감잎음료의 유리당 함량은 Table 20과 같이 sucrose, glucose, fructose, raffinose의 4 종류로 나타났다. 감잎원료에서의 당함량과 비교 시 sucrose의 함량이 높게 나타난 것은 감잎차 음료제조시 4.5% sucrose 첨가했기 때문이라고 사려된다. 신에 의한 녹차의 총 유리당 함량보다 약간 낮았다.

Table 20. Content of sugar in persimmon leaves tea(%).

Sucrose	Glucose	Fructose	Raffinose	Total
8.33	0.94	1.46	0.04	10.77

6) 핵산함량

감잎음료의 핵산관련물질의 함량은 Table 21과 같으며 그 함량은 CMP, Hydroxanthin, UMP, IMP, AMP의 순이었으며 최 등이 보고한 핵산관련물질과 유사하였지만 그 함량은 매우 작게 나타났다.

Table 21. Content of unclesotides and their related compounds in persimmon leaf beverage(μ mol/100g)

	CMP	UMP	GMP	IMP	AMP	Hydroxanthin
Content	13.3	0.63	0.54	0.36	0.28	0.69

5. 제품의 안정성

1) pH의 영향

감잎 음료를 4°C와 25°C에서 30일간 저장하면서 그 변화를 살펴본 결과는 Fig. 8에 나타내었다. 음료 4°C 및 상온에서 경시적으로 pH는 감소하는 경향으로 나타났으나, 저장기일이 20일부터는 pH가 3.7부근에서 계속 유지되는 경향을 나타내었다. 4°C에서의 pH 변화는 3.82~3.72로 0.10 정도의 미미한 변화를 보였으며, 25°C에서는 3.82~3.71로 0.11정도의 변화폭을 보였다. pH의 변화 범위가 3.71~3.84 사이로 비교적 안정된 범위를 유지하였다.

2) 유리당의 변화

음료의 저장 중 유리당의 함량 변화를 측정한 결과는 Table 22와 같다. 감잎음료 검출된 유리당은 sucrose, glucose, fructose 그리고 raffinose로 나타났다. Sucrose의 경우 높은 함량을 나타내는 것은 설탕의 첨가량에 따른 것임을 알 수 있었다. 감잎 중 착녕부유종의 경우 최등의 보고에 따르면 감잎 자체가 가지고 있는 sucrose의 양이 다른 감잎에 비해 약 100~200배 정도 많다고 보고하고 있다. 전반적으로 4°C 저장중의 glucose와 fructose는 온도와 저장시간에 따라 큰 변화를 보이지 않았으나, 25°C 저장의 경우에는 조금씩 증가하는 경향을 나타내었고, sucrose의 경우에는 4°C, 25°C 모두 저장시간이 지남에 따라 조금씩 감소하는 경향을 보였다.

3) 비타민 C의 변화

각각의 음료를 30일간 저장하면서 비타민 C의 함량 변화를 본 결과는 Fig. 9와 같다. 저장 온도에 따른 변화를 살펴보면 4°C에서 저장했을 경우에 25°C에서보다 저하되는 함량의 폭이 조금 낮게 나타났으며, 저장 5~10일 사이에 비타민 C의 변화가 큰 것으로 나타났다. 일반적으로 비타민 C의 함량이 줄어드는 경향을 나타내었으며, 20일 이후부터는 감소의 폭이 줄어들었다. 이 결과는 이 등의 오렌지주스의 저장 중 비타민 C

의 함량변화와 유사한 경향을 나타내었고, 저장온도가 높을수록 감소율이 커다는 결과와도 일치하였다.

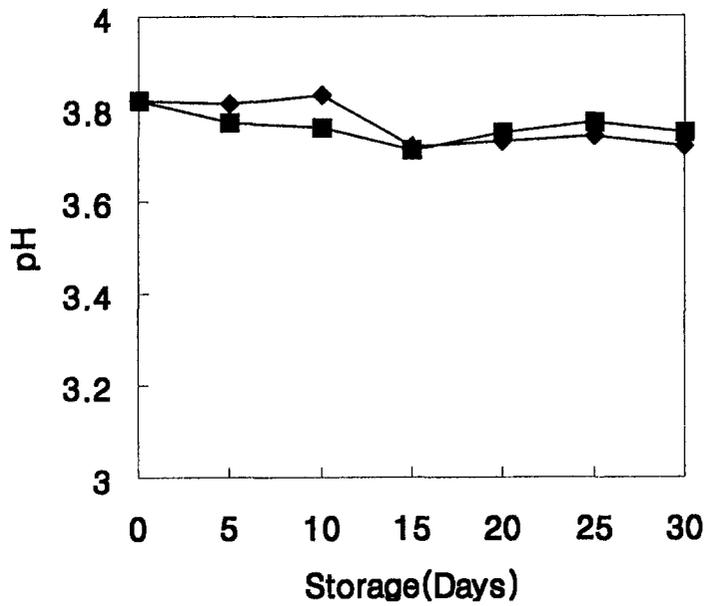


Fig. 8. pH changes in persimmon leaf beverage during storage at 4°C and 25°C

- ◆ - : Persimmon leaf beverage during storage at 4°C
- ■ - : Persimmon leaf beverage during storage at 25°C

Table 22. Changes in free sugar content in persimmon leaf beverage during storage at 4°C and 25°C

(unit : %)

	0	5	10	15	20	25	30
4°C Sucrose	8.33	8.12	8.13	7.79	7.77	7.80	7.70
4°C Glucose	0.94	0.95	0.93	0.93	0.92	0.94	0.90
4°C Fructose	1.46	1.48	1.50	1.42	1.34	1.38	1.40
4°C Raffinose	0.04	trace	trace	0.04	trace	trace	trace
4°C Total	10.77	10.55	10.56	10.18	10.03	10.12	10.00
25°C Sucrose	8.33	7.91	8.80	8.04	7.75	7.85	7.78
25°C Glucose	0.94	0.97	1.16	1.19	1.13	1.10	1.11
25°C Fructose	1.46	1.50	1.54	1.56	1.62	1.60	1.55
25°C Raffinose	0.04	0.02	trace	0.01	trace	trace	trace
25°C Total	10.77	10.40	11.50	10.80	10.50	10.55	10.44

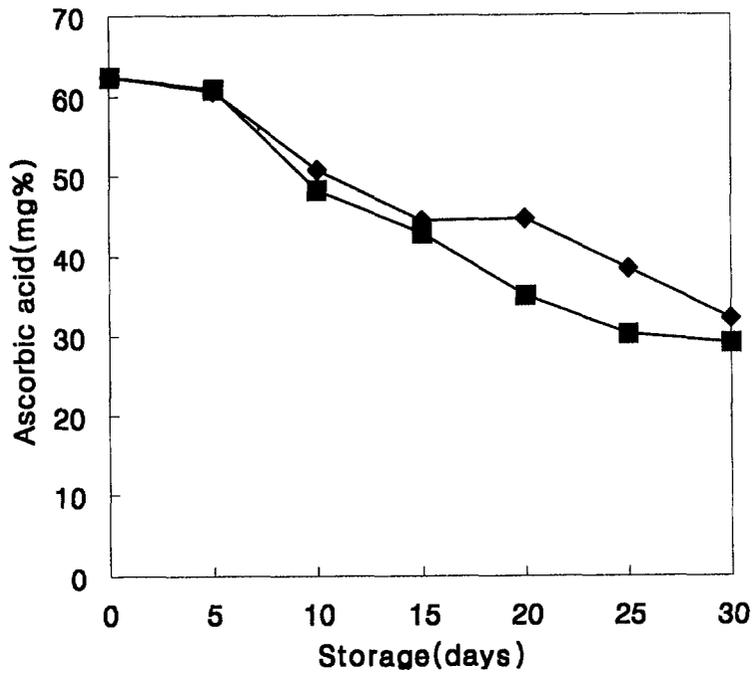


Fig. 9. Changes in ascorbic acid content in persimmon leaf beverage during storage at 4°C and 25°C

- ◆ - : Persimmon leaf beverage during storage at 4°C
- ■ - : Persimmon leaf beverage during storage at 25°C

4) 비휘발성 유기산의 변화

음료의 저장 중 비휘발성 유기산의 변화는 Table 23과 같다. 감나무 잎 음료에서 정량한 유기산은 oxalic acid, levulinic acid, malic acid, citric acid 4종으로 나타났으며, 이 중에서 levulinic acid의 함량이 가장 높았다. Oxalic acid, malic acid 및 citric acid는 대체적으로 그 함량이 줄어드는 것으로 나타났고, citric acid의 경우 저장 10~15일 사이에 변화폭이 가장 현저하였다. Levulinic acid는 maillard 반응의 중간대사산물로서 감나무 잎의 열수추출 과정중에 생성된 산으로 사료되어지며, 저장 중에 그 함량이 증가하는 것은 저장 중에 일어나는 갈변반응에 의한 것으로 판단된다.

6. 갈변도 측정

음료의 저장 중 갈변도를 측정한 결과는 Fig. 10과 같다. 4℃와 25℃로 저장했을 때 5일까지 갈색화 반응이 빠르게 진행되다가 그 이후로 서서히 반응이 진행되었고 25℃에서의 갈색화 정도가 4℃에서보다 증가함을 알 수 있었다. 이 결과는 도 등이 보고한 백삼 물추출물의 경우와 유사함을 알 수 있었고 시료용액내의 반응기질 또는 반응중간물질들이 존재하는 한 계속 진행될 것으로 생각된다.

Table 21. Changes in nonvolatile organic acid content in persimmon leaf beverage during storage at 4°C and 25°C

(unit : mg%)

		0	5	10	15	20	25	30
4°C	Oxalic acid	6.3	4.1	-	-	-	-	-
	Levulinic acid	471.5	692.7	539.7	248.5	325.4	314.3	296.3
	Malic acid	18.2	23.3	10.3	-	-	-	-
	Citric acid	54.6	56.8	45.8	34.2	30.2	23.8	21.2
	Total	550.6	776.9	595.8	282.7	355.6	338.1	317.5
25°C	Oxalic acid	6.3	1.3	-	-	-	-	-
	Levulinic acid	471.5	497.5	287.1	275.7	202.1	183.2	170.8
	Malic acid	18.2	7.6	1.0	-	-	-	-
	Citric acid	54.6	43.8	41.5	33.8	31.1	30.3	24.4
	Total	550.6	550.2	329.6	309.5	233.2	213.5	195.2

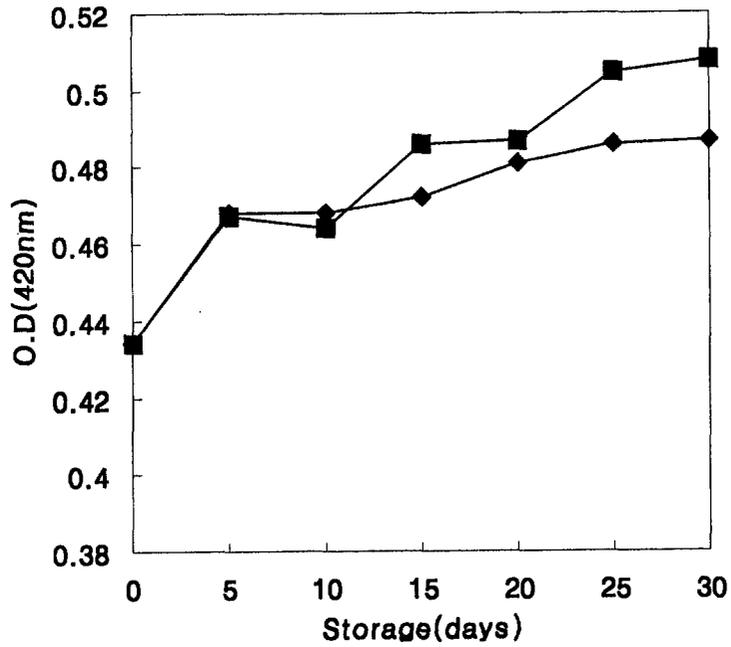


Fig. 10. Changes in browning index in persimmon leaf beverage and persimmon leaf carbonated drink during storage at 4°C and 25°C

- ◆ - : Persimmon leaf beverage during storage at 4°C
- ■ - : Persimmon leaf beverage during storage at 25°C

제4절 결 론

한국산 감잎을 이용하여 고 기능성 음료를 개발하기 위하여 추출시간 1.5~2.5시간, 추출온도 70~90℃ 및 에탄올농도 0~40% 등 세가지 조건을 요인변수로 하고 감잎의 몇가지 기능적 특성을 반응변수로 하여 중심합성계획에 의한 반응표면분석법으로 감잎의 추출조건을 최적화 하였고 최적추출조건을 확립한 후 이를 바탕으로 고 기능성 감잎 음료를 개발하였다. 추출물의 가용성 고형분 함량, 탁도, 수용성 탄닌 함량, 전자공여능, xanthine oxidase 저해율, angiotensin converting enzyme 저해율 등을 모두 만족시키는 추출조건을 예측하여 보았을 때 추출시간 2시간, 추출온도 78~81℃, 에탄올 농도 33~35%로 나타났다.

최적 추출조건에 의한 감잎 음료 개발에 관한 관능검사 실험에서는 추출물의 농도 10%가 감잎의 향과 맛의 정도가 가장 적당한 것으로 나타났으며, 당의 농도는 4.5%로 나타났고 적정향료와 과즙첨가 시험에서는 사과향이 감나무 잎과 가장 잘 어울리는 것으로 나타났고 사과과즙 첨가량은 15%가 가장 적당한 것으로 나타났다. 관능검사 결과를 바탕으로 감나무 잎 음료를 개발하여 4℃와 25℃에서 30일간 저장하면서 안정성을 검사한 결과 pH의 변화는 경시적으로 감소하는 경향을 나타내었으나, 3.82~3.72로 비교적 안정된 범위를 유지하였다. 유리당의 변화는 sucrose를 제외하고 glucose와 fructose는 저장온도와 시간에 따라 큰 변화를 보이지 않았다. 비타민 C의 변화를 살펴본 결과 4℃로 저장했을 때 25℃로 저장했을 때 보다 저하되는 함량의 폭이 조금 낮게 나타났다. 비휘발성 유기산은 oxalic acid, levulinic acid, malic acid 및 citric acid 4종으로 나타났고, 저장온도에 상관없이 levulinic acid는 저장 10일까지 증가하다가 그 이후로 감소하는 경향이었으며, 그 외는 전반적으로 조금씩 줄어드는 경향을 보였다. 그리고 음료의 갈색화반응 정도는 25℃로 저장했을때가 갈색화 정도가 조금 증가함을 알수 있었고 저장 5일까지 갈색화 반응이 빠르게 진행되다가 그 이후로 서서히 진행됨을 알 수 있었다.

제5절 참고문헌

1. Choi, S.H.: The aroma components of duchung tea and persimmon leaf tes(in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, 22(4), 405-410 (1990)
2. Sung, J.H.: The Natural removal of astringency in sweet persimmon fruit and the distribution of tannins abstance in leaf and fruit. Ph. D. Thesis, Kyungpook Univ., Taegu, Korea (1986)
3. 傍島善次, 石田雅士, 中尾公一, 荒木正勝: 花芽] 分化期前後における 葉内の窒素, 炭水化物ならびに核酸の消長について. 京都 府立大學學術報告, 農學, 23, 10(1971)
4. 志垣, 瞳, 平野恭子, 梶田武俊: 柿茶およびその浸出液中の L-アスコルビン酸の定量. 家庭學研究. 34(2), 1(1988)
5. 松尾友明, 川添裕子, 伊藤三郎: カキ葉, ガク, 幼果に含まれる ポリフェノールの經時的變化. 鹿大農學術報告, 31.1(1981)
6. 龜井正治, 神戸 保, 山口健二: グアバの 果實, 葉および柿の葉の營養成分含量について. 生活衛生, 29, 206(1985)
7. 伊藤三郎: カキタンニの化學的研究. 園藝試驗場研究 報告, 13(1), 1(1962)
8. Bate-Smith, E.C.: Phytochemistry of proanthocyanidins. *Phytochemistry*, 14, 1107(1975)
9. Joslyn, M.A.: Methods in food analysis. *Academic Press*, New York. p.701-711. 1970
10. Chichester, C.O., Mark, E.M. and Stewart, G.F.: Advances in food research. Volumn 17-The chemistry and biochemistry of tea and tea manufacture, *Academic Press*, New York and London. p.215-293, 1969
11. 原征彦, 松崎 敏, 中村耕三: 茶カテキンの抗腫瘍作用, 日榮食誌, 42(1), 39(1989)

12. 松崎妙子, 原 征彦: 茶葉カテキンノ類の抗酸化作用について, 日農化誌, 59(2), 129(1985)
13. 原 征彦, 外岡史子: 茶カテキンのラット血壓上昇に及ぼす抑制効果. 日榮食誌, 43(5), 345(1990)
14. 宇井美樹, 安田英之, 紫田柁樹, 掘田 博, 原利 男, 安田 環: 茶カテキン類の口臭抑制効果チューインガムへの應用. 日食工誌, 38(12), 11098(1991)
15. Myers, R.H.: Response Surface Methodology, *Allyn and Bacon Inc.*, Boston (1971)
16. Suh, C.S. and Chun, J.K.: Relationships among the Roasting Conditions, Colors and Extractable Solid Content of Roasted Barley. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 13(4), 334-339 (1981)
17. 김현구, 이부용: 인삼을 이용한 음료의 개발. 한국식품개발연구원 연구보고서 (1995)
18. 김현구, 이부용, 김영언: 버섯류의 부가가치 제고를 위한 가공식품의 개발. 한국식품개발연구원 연구보고서 (1997)
19. Blois, M.S.: Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*, 26, 1198 (1958)
20. Cushman, D.W. and Ondetti, M.A.: Inhibitors of angiotensin converting enzyme for treatment of hypertension. *Biochem. Pharmacology*, 29, 1871-1877 (1980)

제 8 장 고기능성 감잎 음료의 향기성분 및 관 능검사에 의한 품질평가

제1절 연구개발의 목적과 범위

감잎차의 임상학적 약리작용과 이에 대한 효능은 동의보감과 본초강목 등의 여러 고문헌에 밝혀진 바와 같이 심장 및 신장병 등의 순환기 질환에 효능이 있을 뿐만아니라 위궤양, 십이지장 및 당뇨병 등 만성질환에도 유효한 것으로 기록되어 있다. 이러한 기록으로 미루어 볼 때 우리 조상들은 기호식품 및 한방의약 측면에서 감잎을 매우 중요시 하여 왔으며 일상생활에서도 많이 애용되어 온 건강유지 식품이었다.

차는 제차 공정 중 차엽에 함유된 탄닌, 카페인, 아미노산 및 유리당 등의 성분간에 이화학적인 변화가 일어나며 이들 성분이 차의맛을 결정할 뿐만 아니라 향과 색의 형성에도 직접 관여하는 것으로 알려져 있다^{1,2)}. 이러한 시각에서 감잎차 향기성분에 관한 연구는 거의 찾아보기 힘들고 단지 감잎이 차로써 가치가 있다는 김과 김³⁾, 차와 김⁴⁾, 차엽의 제조에 관한 김의 보고⁵⁾가 있을 뿐이다. 그리고 감잎의 처리방법과 추출조건에 따른 비타민 C의 변화⁶⁾, 감잎의 정유성분⁷⁾, 화학성분^{8,9)}, 항암효과^{10,11)} 등의 보고는 있으나 감잎 음료의 향기성분에 관한 연구는 거의 없는 실정이다.

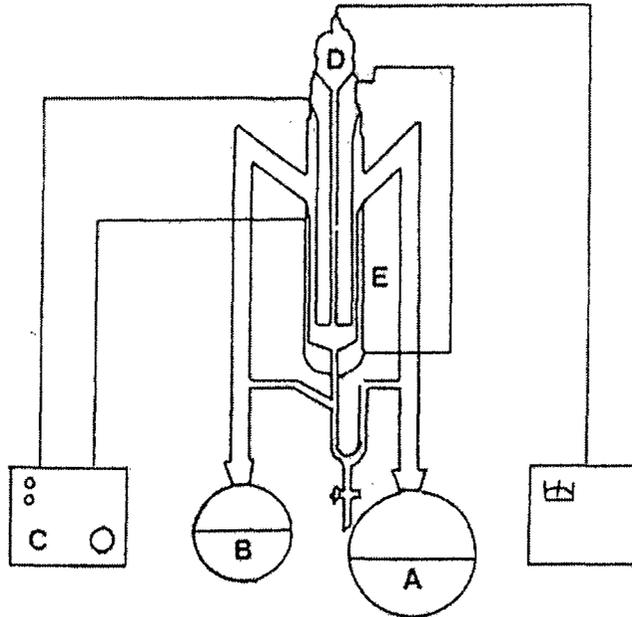
따라서 본 연구에서는 고기능성 감잎 음료의 향기성분을 분리·동정하고 관능검사를 통한 감잎차 음료의 품질을 평가, 검토하고자 한다.

제2절 연구개발의 방법

1. 향기성분의 분리

감잎 1kg에 증류수 100ml를 넣고 waring blender로 10분간 마쇄하여 이

를 분석용 시료로 사용하였고 감잎음료의 향기성분 분리에는 음료를 그대로 분석용 시료로 사용하였다. 향기성분의 추출은 Thoms 등¹²⁾의 방법에 따라 시료를 환저 flask(A)에 넣고 추출용매 ethyl ether를 flask(B)에 100ml를 첨가한다. 그리고 상단(D)에는 진공 pump를 사용하여 감압시키고 수욕조는 70℃를 초과하지 않는 상태에서 가온한다. 냉각관(E)곡의 순환냉매는 -3℃로 유지시키고 flask(B)의 용매는 항온수조에서 37℃로 NaSO Kudera-Danish 농축기로 질소기류 중에서 용매를 유거시켜 휘발성 성분을 얻는다.



A: Sample flask B: Solvent flask
 C: Circulating pump D: Vacuum pump
 E: Condenser

Fig. 5. Likens-Nickerson continuous distillation-extraction apparatus

2. 향기성분의 동정

향기성분의 동정은 gas chromatography-mass spectrometer(GC-MS)를 이용하여 분석한다. 이때 GC의 분석조건으로는 column은 0.2mm(I.d.)×50m, ultra-2 capillary column(0.11 μ m film, HP-5 fused silica)을 사용하여 carrier gas는 Helium을 30ml/min의 유속으로 통과시키며 ion source temp.는 250 $^{\circ}$ C이고 ionization voltage는 70eV(EI)으로 한다. Colum temp. 60 $^{\circ}$ C에서는 2 $^{\circ}$ C/min로 상승시키며 110 $^{\circ}$ C에서는 5 $^{\circ}$ C/min로 168 $^{\circ}$ C 5min isotherm, 10 $^{\circ}$ C/min로 상승시켜 300 $^{\circ}$ C에서는 10min동안 유지시킨다. GC-MS의 전자충격ion 화법과 화학ion 화법으로 분석된 mass spectrum을 Connell과 Jordan¹³⁾, Stenhagen 등¹⁴⁾ 및 Jening과 Shibamoto¹⁵⁾의 mass spectral data에 준하여 동정한다.

Table 1. Operating conditions of gas chromatography-mass spectrometer for the determination of flavours

Instrument : Hewlett-Packard 5988 MS
Column : Ultra-2 (HP-5), 50m × 0.2mm × 0.11 μ m
Inject temp. : 300 $^{\circ}$ C
Detector temp. : 320 $^{\circ}$ C
Carrier gas : Helium 30ml/min
Ion source temp. : 250 $^{\circ}$ C
Ionization voltage : 70eV(EI)
Column temp. : 60 $^{\circ}$ C(2 $^{\circ}$ C/min) - 110 $^{\circ}$ C(5 $^{\circ}$ C/min) - 168 $^{\circ}$ C(5min isotherm, 10 $^{\circ}$ C/min - 300 $^{\circ}$ C(10min)

3. 관능검사

각각의 감잎차 음료에 대한 색깔, 향기, 종합적 기호도의 품질특성에 대하여 식미척도(hedonic scale)를 사용하여 매우좋다(5점), 좋다(4점), 보통이다(3점), 나쁘다(2점) 및 아주 나쁘다(1점)을 주도록 한 채점척도 시험법(scale scoring)을 이용한 식미검사를 실시하였고 성적 평균치들에 대하여 Duncan 다중검증법에 따라 통계처리하여 이원배치 분산분석 및

초소유이차 검증^{16,17)}으로 분석하였다.

제3절 연구개발의 결과 및 고찰

1. 향기성분의 분리 및 동정

향기성분의 동정은 GC-MS의 전자충격 ion화법과 화학 ion화법으로 분석된 mass spectrum을 Cornu와 Massort¹³⁾, Stenhagen 등¹⁴⁾ 및 Jening과 Shibamoto¹⁵⁾의 mass spectral data에 준하여 동정한 결과는 Fig. 1과 Fig. 2와 같다. 감잎의 향기성분은 (E)-hexenal등을 포함한 17종(Table 2), 음료에서는 7종을 동정할 수 있었다(Table 3). 감잎의 주된 향기 성분으로는 (E)-2-hexenal이었으며, α -farnesene, hexanal, butylated hydroxytoluene 등이었으나 음료의 주성분은 2,4-dimethyl-1H-imidazole, 3,7-dimethyl-1,6-octadien-3-ol, (S)-4-trimethyl- α , α -3-cyclohexene-1-methanol로 주로 방향족성과 hydrocarbone alcohol이 주류를 이루고 있었다. 이는 음료제조시 첨가되는 당과 산에 의한 방향족 alcohol성으로의 변화로 사료된다.

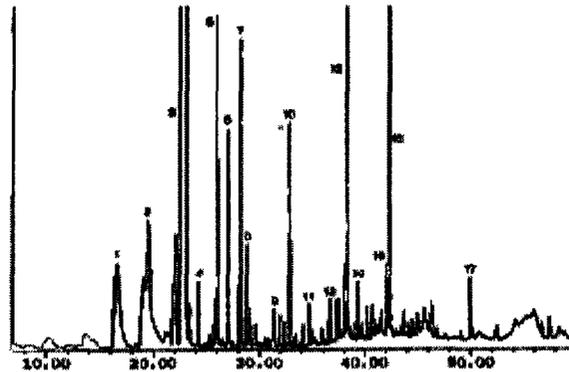


Fig 1. Gas chromatogram of volatile compounds obtained from persimmon leaf.

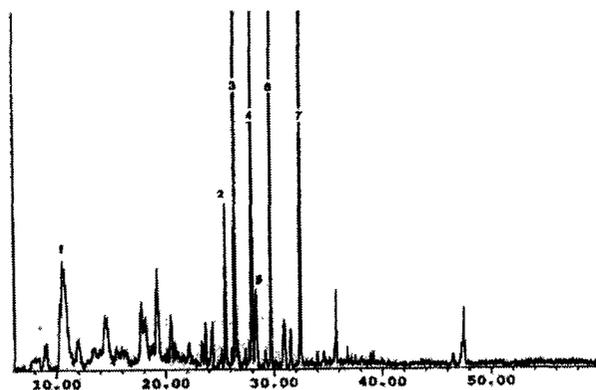


Fig 2. Gas chromatogram of volatile compounds obtained from persimmon leaf beverage.

Table 2. The aroma constituents identified from persimmon leaf

Peak No	Retention Time	Compounds	Area(%)
1	16.603	Hexanal	3.834
2	19.095	(Z)-3-hexenal	2.127
3	22.881	(E)-2-hexenal	59.669
4	24.254	hexyl ester acetic acid	0.389
5	26.000	(Z)-2-penten-1-ol	2.547
6	27.043	1-hexanol	1.543
7	28.198	(E)-3-hexen-1-ol	2.232
8	28.834	Tetradecane	0.735
9	31.439	2-Furancarboxaldehyde	0.659
10	32.875	3,7-dimethyl-1,6-octadien-3-ol	1.131
11	34.741	(E)-2-hexenyl ester butanoic acid	0.232
12	36.712	Benxeneacetaldehyde	0.462
13	38.301	α -farnesene	5.773
14	39.387	(Z)-4-tridecen-6-yne	0.423
15	42.097	Benzyl alcohol	0.546
16	42.316	Butylated hydroxytoluene	3.609
17	49.923	Eugenol	0.524

Table 3. The aroma constituents identified from persimmon leaf beverage

Peak No	Retention Time	Compounds	Area(%)
1	10.542	Trichloroethylene	0.276
2	25.489	cis- α, α -5-trimethyl-5-ethenyltetrahydro-2-furanmethanol	2.945
3	26.357	2,4-dimethyl-1H-imidazole	35.911
4	27.958	3,7-dimethyl-1,6-octadien-3-ol	31.236
5	28.292	trans-(-)-5-methyl-3-(1-methylethenyl)-cyclohexene	2.551
6	29.700	3,7-dimethyl-1,5,7-octatrien-3-ol	7.976
7	32.439	(S)- α, α -4-trimethyl-3-cyclohexene-1-methanol	19.105

2. 감잎음료의 관능검사

감잎음료의 기호도를 위한 관능검사를 실시하였다. 각 지역에 있는 대학교 4곳을 찾아가 10명을 선정하여 관능검사에 대한 평가요령을 설명한 후 관능검사를 실시하였고 연령에 따른 관능평가도 실시하였다. 지역에 따른 맛의 차이를 알아보기 위한 관능검사 결과는 Table 4와 같고 연령에 따른 맛의 차이는 Table 5와 같다.

그 결과 뽕은 맛에서 전라도 지역의 학생들이 약간의 유의적인 차이를 나타냈으나, 다른 맛과 향에서는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 그리고 전반적인 기호도에서도 충청도 지역의 학생들이 약간의 유의적인 차이를 보였으나 다른지역과 별다른 차이를 나타내지 않았다. 따라서 감잎음료의 지역에 따른 맛의 차이는 없는 것으로 나타났고, 맛의 정도도 비교적 좋은 것으로 나타났다. 그리고 연령에 따른 맛의 차이를 알아보기 위한 관능검사 결과, 10대에서 유의적인 차이를 나타내었는데 감잎의 뽕은 맛을 조금 싫어하는 것 같았고 전반적인 기호도에서도 다른 연령층에 비해 낮은 것으로 나타났다. 그러나 20대 이후로는 별다른 유의적인 차이를 나타내지 않았고 좋은 결과를 얻을수 있었다.

Table 12. Acceptability of persimmon leaf beverage depending on local difference

	Kungki-do	Kungsang-do	Joetra-do	Chuoncheong-do	Significance
Color	3.85 ^a	4.20 ^a	4.10 ^a	4.30 ^a	.168
Sweetness	3.60 ^a	3.55 ^a	3.60 ^a	3.60 ^a	.051
Astringent taste	3.30 ^a	3.20 ^a	3.00 ^{ab}	3.65 ^a	.015
Flavor	3.90 ^a	4.05 ^a	4.15 ^a	3.90 ^a	.229
Overall	3.85 ^a	4.05 ^a	4.00 ^a	3.65 ^{ab}	.085

In a row, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT

Table 12. Acceptability of persimmon leaf beverage depending on age

	10ages	20ages	30ages	40ages	Significance
Color	2.85 ^b	3.80 ^a	3.75 ^a	4.10 ^a	.068
Sweetness	3.20 ^b	3.65 ^a	3.40 ^{ab}	3.90 ^a	.085
Astringent taste	2.70 ^b	3.00 ^{ab}	3.30 ^{ab}	3.65 ^a	.115
Flavor	3.10 ^b	4.00 ^a	4.05 ^a	3.95 ^a	.009
Overall	2.85 ^b	3.95 ^a	3.65 ^{ab}	4.00 ^a	.045

In a row, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT

제4절 결 론

감잎음료를 제조하여 5°C에서 보관하면서 시료를 채취하여 gas chromatography와 gas chromatography - mass spectrum을 이용하여 향기성분의 원인 물질을 분석, 동정하였고 관능검사를 실시하여 음료의 품질을 평가하였다.

감잎의 향기성분의 동정은 GC-MS의 전자충격 ion화법과 화학 ion화법으로 분석된 mass spectrum 분석 결과, 감잎의 향기성분으로 (E)-hexenal 등을 포함한 17종과 음료에서는 7종의 주된 peak를 잡을 수 있었다. 감잎의 주된 향기 성분으로는 (E)-2-hexenal 59.6%로 그 함량이 가장 많았고, α -farnesene, hexanal, butylated hydroxytoluene 순으로 많았다. 음료의 주성분은 2,4-dimethyl-1H-imidazole, 3,7-dimethyl-1,6-octadien-3-ol, (S)-4-trimethyl- α, α -3-cyclohexene-1-methanol로 주로 방향족성과 hydrocarbone alcohol이 주류를 이루고 있었다.

고기능성 감잎음료의 관능검사에 의한 지역과 연령에 따른 관능적 차이를 조사한 결과, 지역에 따른 유의적인 차이가 없었으며 맛에 있어서 좋은 결과를 얻었고 연령에 따른 관능검사에서도 10대를 제외하고 20대 이후로는 유의적인 차이가 없이 좋은 반응을 보였다.

제5절 참고문헌

1. 高柳博次, 阿南豊正 : 茫茶製造工業における 茶葉の理化學性の變化, 茶業研究報告, 第 64號, 39(1986)
2. 김광수: 柿葉을 이용한 차제조에 관한 연구, 영주경상전문대학논문집, 4, 417(1983)
3. 차원섭, 김광수: 柿葉차의 제조방법이 제품의 품질에 미치는 영향, 상주농업전문대학논문집, 23, 109(1984)

4. 김창목, 최진호, 오성기: 차 제조중의 주요 성분의 화학적 변화, 한국영양식량학회지, 12, 99(1982)
5. Turkelson, V.T. and Richards, M.: Separation of the citric acid cycle acids by liquid chromatography. Anal.Chem., 50, 1420(1978)
6. 박윤수, 강명희, 김종익, 박옥진, 이미숙, 장해동: 감잎의 처리방법과 추출조건에 따른 감잎차의 비타민 C와 Superoxide Dismutase 유사 활성의 변화. 한국식품과학회지, 27(3), 281-285(1995)
7. 박상규, 강성국, 정희종: 뽕은 감잎의 정유성분이 김치발효에 미치는 영향. 한국산업미생물학회지, 22(2), 217-221(1994)
8. 정선영, 이수정, 성낙주, 조종수, 강신권: 감잎차의 화학성분. 한국영양식량학회지, 24(5), 720-726(1995)
9. 정선화, 문광덕, 김종국, 성종환, 손태화: 감잎차 제조를 위한 감잎의 성장시기별 함유성분변화. 한국식품과학회지, 20(2), 141-146(1994)
10. 문숙희, 김광혁, 박건영: Sarcoma-180세포를 이용한 *in vivo*에서 감잎의 항암효과. 한국식품영양과학회지, 25(5), 865-870(1996)
11. 문숙희, 박건영: 감잎 열수추출물 및 감잎 탄닌의 항돌연변이 효과. 한국영양식량학회지, 24, 880(1995)
12. Thoms, H.S., Robert A.F., Richard, M., Sue, B.E. and Roy, T.: Isolation of volatile components from a model system. J. Agric., 22, 93(1973)
13. Connell, D.W. and Jordan, R.A.: Composition and distinctive volatile flavor characteristics of essential oil from Australian grown ginger (*zingiber officinale*). J. Scie. Food Agric., 22, 93(1971)
14. Stenhagen, E., Abrahamsson, S. and McLafferty, E.W.: Registry of mass spectral data. Vol. 1,2, John Wiley and Sons, New York, 278(1974)
15. Jennings, W. and Shibamoto, T.: Qualitative analysis of flavor and fragrance volatiles by glass capillary gas chromatography.

Academic Press, New York, 115(1980)

16. Snedecor, G.W. and Corchran, W.G.: *Statistical methods*, 6th ed., Iowa State Univ. Press Ames. IA, 255(1977)
17. 남상주, 김광옥: 재료의 양과 감미료를 달리한 식혜의 관능적 특성. 한국식품과학회지, 21, 197(1989)

제 9 장 한국산 감잎으로부터 생리활성물질의 지질대사에 미치는 영향

제1절 연구개발의 목적과 범위

80년대 이후 한국인의 사망 원인으로 뇌혈관계 질환, 악성 종양, 고혈압 및 심장 질환 등이 높은 비중을 차지하고 있으며, 소아 성인병 또한 증가 추세에 있어 국민보건에 심각한 문제점으로 지적되고 있다. 이는 산업화와 경제적 수준이 향상됨에 따라 식생활 패턴이 고열량화, 고지방식 등 불균형한 식사 양상이 원인인 것으로 보고되고 있다¹⁾. 이러한 그릇된 식생활로 인해 발생하는 비만증의 발생 원인은 대부분 섭취한 열량이 체내에서 소비되지만 남은 부분이 지방으로 전환되어 체내의 여러 부분 특히, 피하 조직과 복강 내에 축적됨으로서 일어나는 현상으로, 이로 인한 고지혈증, 지방간, 동맥경화, 심맥질환, 고혈압 등의 합병증이 수반되고 있으며, 이러한 원인으로 김 등은 동물성 지방과 단백질 식이가 증가하고 섬유질 섭취량이 감소하고 있기 때문인 것으로 보고하고 있다²⁾.

성인병의 합병증을 개선하기 위한 많은 연구가 진행되면서, 고콜레스테롤 혈증과 같은 지질이상 대사를 개선하기 위한 작용 메카니즘으로, 콜레스테롤의 장내 흡수를 억제하는 분질, 콜레스테롤의 배설을 촉진하는 물질 또는 분해촉진제, 간장에서 콜레스테롤의 체내 생합성을 억제하는 물질 등으로 설명되고 있으며³⁻⁵⁾, 혈청 콜레스테롤 농도 및 지방대사에 영향을 미치는 인자로는 식이 중 지방, 콜레스테롤, 포화지방산과 불포화 지방산, 섬유질, 단백질, 총열량 및 폴리페놀 화합물 등이 보고되고 있다⁶⁻⁸⁾.

본 연구는 5주간 고지방식이를 섭취한 흰 쥐 한국산 감잎으로부터 폴리페놀 화합물을 분리 및 정제하여 지방축적 억제효과 및 대사에 미치는 영향을 검토하고자 하였다. 우리나라 고유의 전통차로 이용되어 온 한국산 감잎으로부터 분리 및 정제한 생리활성 물질의 우수성을 검증함으로써

써, 현재 성인병의 치료제들이 갖는 문제점들을 최소화 시킬 수 있는 새로운 치료제로서의 개발을 목적으로 하며, 감잎을 이용하여 과학적이고 체계적인 검증을 통하여 대체 의약품 개발을 위한 기초 자료로 이용하여 고부가가치를 높이고자 함을 그 목적으로 하였다.

제2절 연구개발의 방법

1. 시료추출

감잎 10 kg을 추출 탱크에서 60% 아세톤에 침지하여 상온에서 24 시간 방치한 후 원심 분리하여 상등액을 취했다. 침전물은 다시 위와 같은 조작을 4회 반복하여 상등액을 모아 감압 농축하여 아세톤을 증발시킨 후 수용성 성분만을 회수하기 위하여 증류수로 용해하였다. 용해한 후 여과하여 클로로필을 제거한 다음, 동결건조 과정을 거쳐 공시재료로 사용하였다.

2. 실험동물 및 식이

실험동물은 sprague-dawley종의 수컷(250±10g)을 일정한 사료로 2주 이상 사육실에서 적응시켰으며, 사육실 온도는 22±1℃, 명암은 12시간 주기(06:00 ~ 18:00)로 자동조절 장치를 부착하였다.

실험식이와 구성성분은 Table 1⁹⁾과 같으며, 실험 시이군은 각 군마다 5마리씩 4군으로 다음과 같이 나누었다. 즉, 정상군(이하; NOR), 대조군은 5% 고지방식이 투여군 (이하; CON), 5% 고지방식이 투여군과 25mM 감잎 polyphenol 추출물 투여군(이하; PRI) 및 5% 고지방식이 투여군과 50mM 감잎 polyphenol 추출물 투여군(이하; PRII)이며, 실험기간 동안 실험식이와 물은 제한 없이 섭취하도록 하였다. 식이섭취량은 매일 한번씩 일정한 시간에 잔량을 측정하였으며, 체중은 3일에 한번씩 동일한 시간에 측정하였다.

Table 1. The composition of experimental diets.

Ingredient	Groups			
	NOR	CON	PRI	PRII
Casein	20.00	20.00	20.00	20.00
Sucrose	10.00	10.00	10.00	10.00
Starch	57.65	37.15	37.15	37.15
Corn oil	5.00	-	-	-
Hydrogenated palm oil	-	15.00	15.00	15.00
Lard	-	10.00	10.00	10.00
Cellulose	2.50	2.50	2.50	2.50
Min. mix.	3.50	3.50	3.50	3.50
Vit. mix.	1.00	1.00	1.00	1.00
Choline chloride	0.20	0.20	0.20	0.20
DL-methionine	0.15	0.15	0.15	0.15
Sodium taurocholate	-	0.50	0.50	0.50
PRI	-	-	50mg/kg/day	-
PRII	-	-	-	50mg/kg/day

AIN-76^{TM26)}

1) NOR : Normal

CON : High fat diet(only 5% lard)

PRI : High fat diet + 25mM polyphenol fraction from persimmon leaves

PRII : High fat diet + 50mM polyphenol fraction from persimmon leaves

2) Mineral mixture(g/Kg)

CaHPO₄, 500g ; NaCl, 74g; K₃C₆H₅O₇H₂, 200g ; K₂SO₄, 52g ; MgO, 24g ; 44~48% Mn, 3.5g; 16~17% Fe, 6.0g ; 70% ZnO 1.6g ; 53~55% Cu, 0.3g ; KIO₃, 0.01g ; Na₂SeO₃5H₂O, 0.01g ; CrK(SO₄)₂12H₂O, 0.55g ; Sucrose, finally powder, to make 1,000g.

3) Vitamin mixture(g/Kg)

Vitamin HCl, 600mg ; Riboflavin, 600mg ; Pyridoxine HCl, 700mg ; Nicotinic acid, 3g ; D-Calcium pantothenic acid, 1.6g ; Folic acid, 200mg ; D-Biotine, 20mg ; Vitamin B12, 12.1mg ; Vitamine A, 400,000IU ; Vitamin E, 5,000IU ; Vitamin D₃ 2.5mg ; Vitamin K, 5.0mg ; Sucrose, finally powdered, to make 1,000g.

3. 혈장, 간장, 지방조직 및 분변 채취

5주간의 실험식이를 급여 후 16시간 절식시키고 에틸에테르로 마취시켜 개복하여 복부 대동맥으로부터 혈액을 채취하고한 다음 식이 종료 3일전부터 분변을 채취하여 동결건조기에 보관하면서 공시 재료로 사용하였다.

혈장을 얻기 위해서 채혈 즉시 1mg/100mL의 EDTA가 함유된 원심분리관에 넣어 냉장 조건 하에서 3,000rpm, 10분간 원심분리시켜 상등액의 혈장을 얻었다. 적출한 간장은 혈관속의 혈액을 제거하기 위해서 생리식염수로 세척하고 여과지로 수분을 제거한 후 지질 분석을 위한 공시재료로 하였다.

4. 혈장 중의 지질분석

1) 총지질의 분석

혈장 중 총지질 함량은 sulfo-phospho vanillin reaction을 원리로 한 Fring법에 의해서 지질을 진한 황산과 함께 가열한 후 vanillin과 인산을 가하여 나타나는 핑크색을 540nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다¹⁰⁾.

2) 총콜레스테롤의 분석

혈장 중 총콜레스테롤 정량에는 혈장에 cholesterol esterase (20.5kU/L) 및 cholesterol oxidase(10.7kU/L)은 분해효소와 NaOH (1.81g/L)를 촉매로 하여 phenol과 4-amino-antipyrine을 축합시켜서 생성되는 quinone 화합물의 적색을 500nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다¹¹⁾.

3) 중성지질 측정

혈장 중 triglyceride 정량에는 lipoproteinlipase, glycerokinase의 작용에 의하여 생성되는 L- α -glycerophosphate에 glycerophosphate oxidase 작용으로 H₂O₂가 생성된다. Phosphate oxidase는 H₂O₂ 존재 하에

4-aminoantipyrine과 N-ethyl-N-sulfopropyl-mtoudine를 축합산화 시켜 자색의 quinone형 색소를 생성하고, 이 색소를 흡광도 505nm에서 측정하였다¹²⁾.

4) HDL-콜레스테롤 측정

혈장에 dextran sodium sulfate, MgCl₂ 및 sodium phosphotungstate를 가하여, HDL 이외의 지단백질 (LDL, VLDL)은 불활성 복합체를 형성하여 침전하고 상층에는 HDL이 남는다. HDL 중의 에스테르형 콜레스테롤에 cholesterol esterase를 분해하여 유리형 콜레스테롤을 형성하게 하고 유리콜레스테롤은 cholesterol oxidase, peroxidase의 작용에 의해서 생성된 청색 quinone 화합물을 580nm에서 흡광도를 측정하였다¹³⁾.

5) LDL-콜레스테롤 측정

혈장에 dextran sodium sulfate, MgCl₂ 및 sodium phosphotungstate를 가하면, 지단백질 (LDL, VLDL)은 불활성 복합체를 형성하여 침전된다. Low density lipoprotein(LDL)은 헤파린-Ca 침전법으로 측정하였다¹⁴⁾.

5. 총단백질 및 알부민 정량

총단백질은 혈청에 알칼리성으로 구리이온을 작용시키면, 단백질은 착염을 형성하여 청자색을 나타내므로 이 착염에 의하여 생성된 청자색을 흡광도 540nm에서 측정하는 Biuret 법을 이용하였으며, 알부민은 pH 4.0 부근에서 B.C.G.와 반응하여 알부민에 비례하여 녹색을 나타내므로 이것을 흡광도 630nm에서 측정하였다^{15, 16)}.

6. 간장 및 분변 중에서 각종 지질정량

12시간 절식시킴 쥐에서 적출한 간장은 glass homogenizer를 사용하여 10배 량의 생리식염수로 마쇄 한 후 Folch 법¹⁷⁾에 의해 지질을 추출하였으며, 분변에서의 지방추출은 간장에서의 방법과 동일한 방법에 의하여 추출하였다.

7. 유의성 검증

각 실험 결과에 대한 통계처리는 t-test에 의하였으며, 실험치의 표현은 Mean \pm S.D.로 하였으며, p-value가 최대치 0.05 이하인 경우를 유의한 것으로 판정하였다.

제3절 연구개발의 결과

1. 혈청, 간장 및 분변 중 총지질 함량

혈청에서의 총지질 함량에 대한 결과는 Fig. 1, 2와 같다. 즉, 혈청 중 총지질은 대조군이 $250.5 \pm 3.1\text{mg/dL}$ 로, 고지방식이에 감잎의 폴리페놀 화합물을 10mM 투여한 군인 PRII군은 $160.7 \pm 1.0\text{mg/dL}$, 25mM을 투여한 군인 PRII군은 $196.1 \pm 2.4\text{mg/dL}$ 로 모두 대조군에 비해 유의성($p < 0.01$)이 관찰되어, 감잎의 polyphenol 화합물군이 혈청의 총지질 함량을 낮추는 것으로 나타났다. 간장 및 분변에서의 총지질 함량은 고지방 식이만을 급여시킨 대조군과 실험군과의 유의성은 나타나지 않았다.

이 등¹⁸⁾에 의하면, 하품녹차를 이용하여 간장에서의 총지질 저해효과를 실험한 결과 고지방식이를 급여시킨 대조군보다 고지방식이에 하품녹차를 급여시킨 실험군에서 유의적으로 감소된 경향을 나타낸 보고와 한국산 감잎으로부터 분리한 polyphenol 화합물이 총지질에 미치는 영향과 비교할 때 유사한 경향을 보이는 것으로 나타났다.

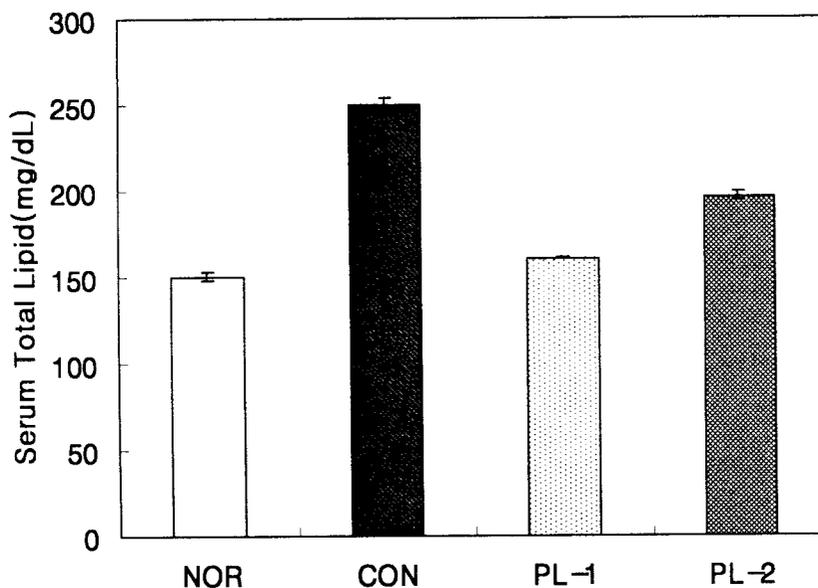


Fig. 1. Effect of polyphenol compound extracts from persimmon leaves on serum total lipid in rats fed high fat diet for 5 weeks.

Values represent Mean \pm S.D. of five rats per groups

P-values was determined by t-test

Statistically different between CON and PRI(PRII)

* : p < 0.05

NOR : Normal, CON : High fat diet(only 5% lard)

PRI : High fat diet + 25mM polyphenol fraction from persimmon leaves

PRII : High fat diet + 50mM polyphenol fraction from persimmon leaves

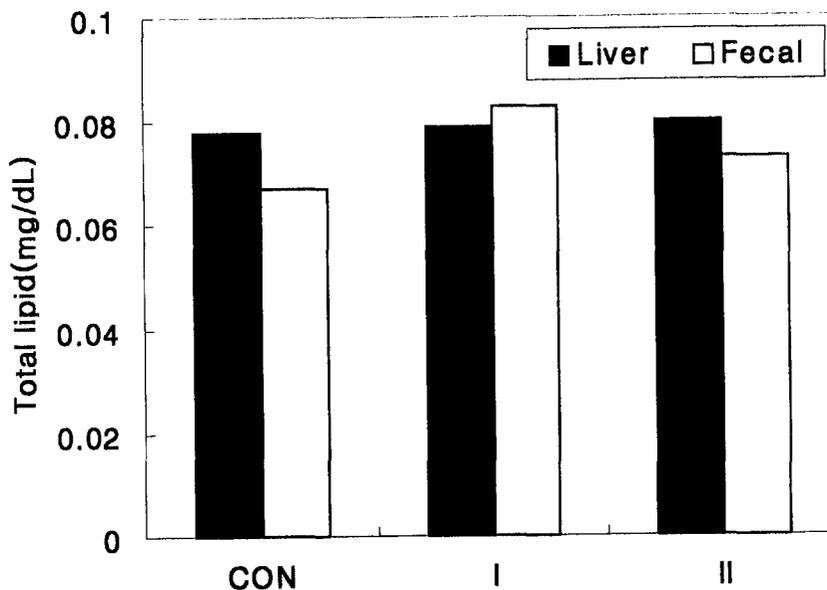


Fig. 2. Effect of polyphenol compound extracts from persimmon leaves on liver and fecal total lipid in rats fed high fat diet for 5 weeks.

Values represent Mean \pm S.D. of five rats per groups

P-values was determined by t-test

Statistically different between CON and PRI(PRII)

* : p < 0.05

NOR : Normal, CON : High fat diet(only 5% lard)

PRI : High fat diet + 25mM polyphenol fraction from persimmon leaves

PRII : High fat diet + 50mM polyphenol fraction from persimmon leaves

2. 혈청, 간장 및 분변 중 총콜레스테롤 함량

5주 동안 고지방 식이를 섭취한 흰 쥐에 있어서의 혈청 총콜레스테롤 함량은 Fig. 3, 4와 같다. 혈청 중 실험군인 PRI군 $79.5 \pm 1.4\text{mg/dL}$ ($p < 0.01$), PRII군 $86.5 \pm 1.6\text{mg/dL}$ ($p < 0.05$)로 대조군이 $90.6 \pm 0.8\text{mg/dL}$ 과 비교할 때, 유의성 있는 감소를 나타내어 콜레스테롤에 있어서 감잎의 polyphenol 화합물군이 억제효과가 있는 것으로 확인되었다.

또한 간장에서의 총콜레스테롤 함량은 대조군이 $206.8 \pm 45.4\text{mg/dL}$ 이었으며, 실험군 I 은 $148.7 \pm 17.3\text{mg/dL}$ ($p < 0.05$), 실험군 II 에서는 $94.5 \pm 2.8\text{mg/dL}$ ($p < 0.05$)으로 실험군 모두에서 유의성 있는 감소를 나타내었다.

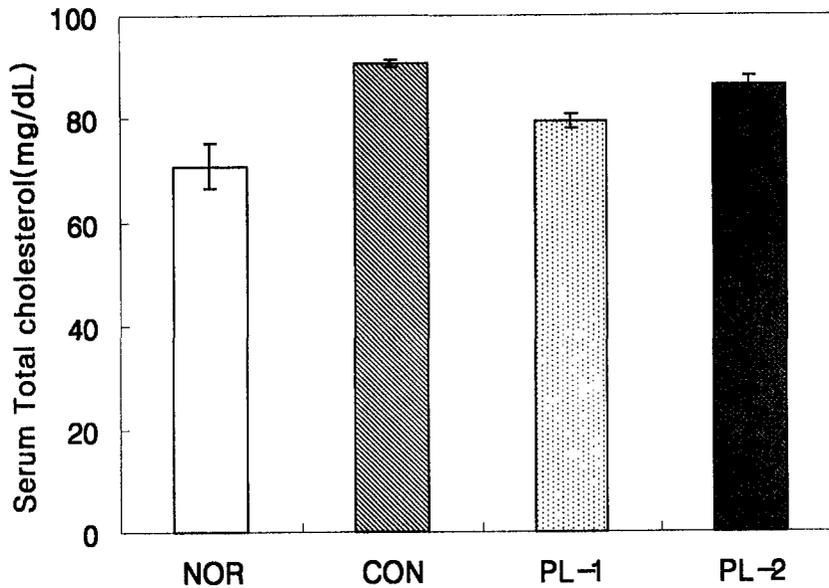


Fig. 3. Effect of polyphenol compound extracts from persimmon leaves on serum total cholesterol in rats fed high fat diet for 5 weeks.

Values represent Mean \pm S.D. of five rats per groups

P-values was determined by t-test

Statistically different between CON and PRI(PRII)

* : p < 0.05

NOR : Normal, CON : High fat diet(only 5% lard)

PRI : High fat diet + 25mM polyphenol fraction from persimmon leaves

PRII : High fat diet + 50mM polyphenol fraction from persimmon leaves

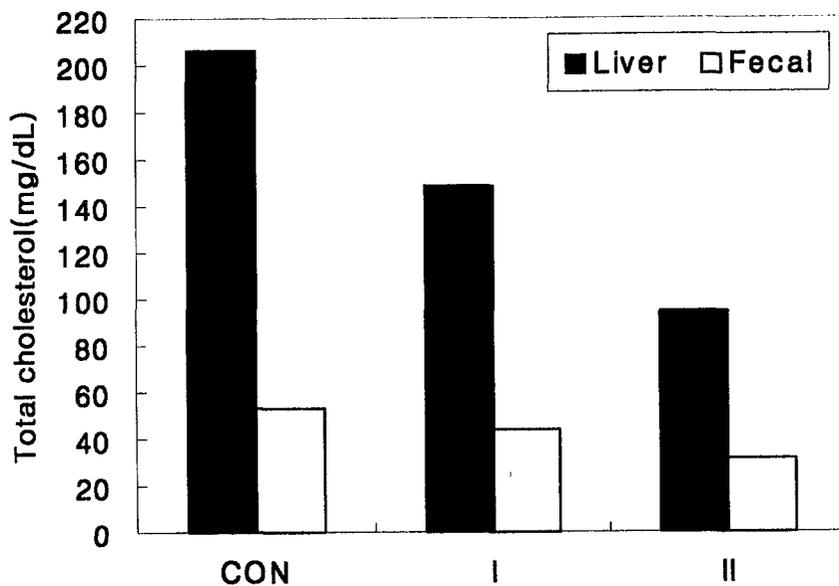


Fig. 4. Effect of polyphenol compound extracts from persimmon leaves on liver and fecal total cholesterol in rats fed high fat diet for 5 weeks.

Values represent Mean \pm S.D. of five rats per groups

P-values was determined by t-test

Statistically different between CON and PRI(PRII)

* : $p < 0.05$

NOR : Normal, CON : High fat diet(only 5% lard)

PRI : High fat diet + 25mM polyphenol fraction from persimmon leaves

PRII : High fat diet + 50mM polyphenol fraction from persimmon leaves

3. 혈청, 간장 및 분변 중 중성지질 함량 측정

한국산 감잎으로부터 분리·정제된 polyphenol 화합물군에 대한 중성지질을 측정된 결과 대조군에 비하여, 실험군 I에서는 $34.8 \pm 7 \text{mg/dL}$ ($p < 0.01$), 실험군 II에서는 $40.2 \pm 7.8 \text{mg/dL}$ ($p < 0.05$)으로 중성지질의 함량이 감소되었으며, 간에서는 polyphenol 화합물 II를 투여한 군에서 유의성($p < 0.05$) 있는 감소를 보였다(Fig. 5).

수종 잎식품 건조물을 이용한 지질대사의 효능을 보고한 강 등에 의하면, 감잎, 뽕잎 및 콩잎을 급여시킨 실험군 모두에서 중성지질이 감소되는 경향을 보였다고 밝혀¹⁹⁾, 본 실험의 결과인 감잎에서의 중성지질 억제효과와 유사한 경향을 나타내고 있으며, 이러한 원인으로 이들이 갖는 방향성분으로 인한 식이의 영향 때문일 것으로 추정하였다.

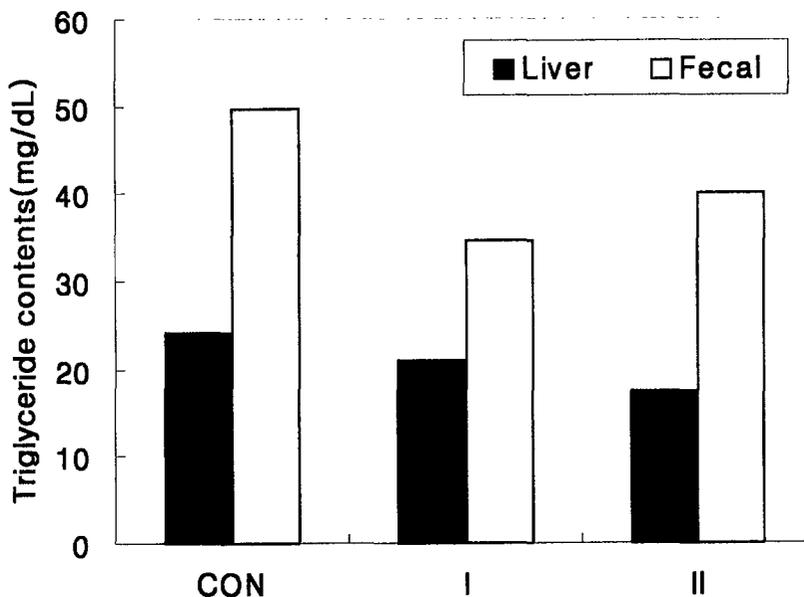


Fig. 5. Effect of polyphenol compound extracts from persimmon leaves on serum, liver and fecal triglyceride in rats fed high fat diet for 5 weeks.

Values represent Mean \pm S.D. of five rats per groups

P-values was determined by t-test

Statistically different between CON and PRI(PRII)

* : p <0.05

NOR : Normal, CON : High fat diet(only 5% lard)

PRI : High fat diet + 25mM polyphenol fraction from persimmon leaves

PRII : High fat diet + 50mM polyphenol fraction from persimmon leaves

4. 혈청, 간장 및 분변 중 HDL-cholesterol 함량 측정

혈청에서의 HDL-콜레스테롤은 Fig. 6, 7과 같다. 실험군인 PRI군 $36.5 \pm 5.1 \text{mg/dL}$, PRII군 $32.6 \pm 5.3 \text{mg/dL}$ 으로 대조군 $30.5 \pm 2.1 \text{mg/dL}$ 보다 다소 높은 경향을 나타내었고, PRII군 보다 PRI군이 유의성($p < 0.05$)이 있는 것으로 나타났다. 한편, 감잎 추출물 군을 섭취시킨 실험군 I 및 II군 모두에서 유의성($p < 0.05$) 있게 증가되는 것으로 나타났으며, 분변에서의 HDL-콜레스테롤 함량을 측정한 결과 대조군 보다 다소 증가되는 경향은 보였으나 유의성은 나타나지 않았다.

지질대사 억제 효과와 밀접한 관계가 있는 HDL-콜레스테롤의 함량을 측정한 보고에서 볼 때, 김 등²⁰⁾에 의하면 시료들이 갖는 수용성 및 불용성 식이섬유 등을 동시에 함유하고 있는 식품 자체가 고지혈증 및 동맥경화의 예방이나 치료에 효과가 있을 것으로 보고하고 있다.

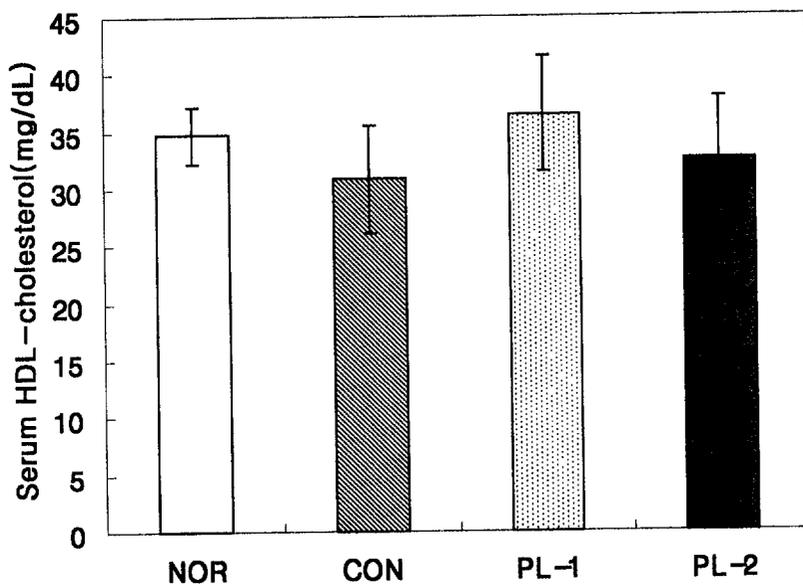


Fig. 6. Effect of polyphenol compound extracts from persimmon leaves on serum HDL-cholesterol in rats fed high fat diet for 5 weeks.

Values represent Mean \pm S.D. of five rats per groups

P-values was determined by t-test

Statistically different between CON and PRI(PRII)

* : $p < 0.05$

NOR : Normal, CON : High fat diet(only 5% lard)

PRI : High fat diet + 25mM polyphenol fraction from persimmon leaves

PRII : High fat diet + 50mM polyphenol fraction from persimmon leaves

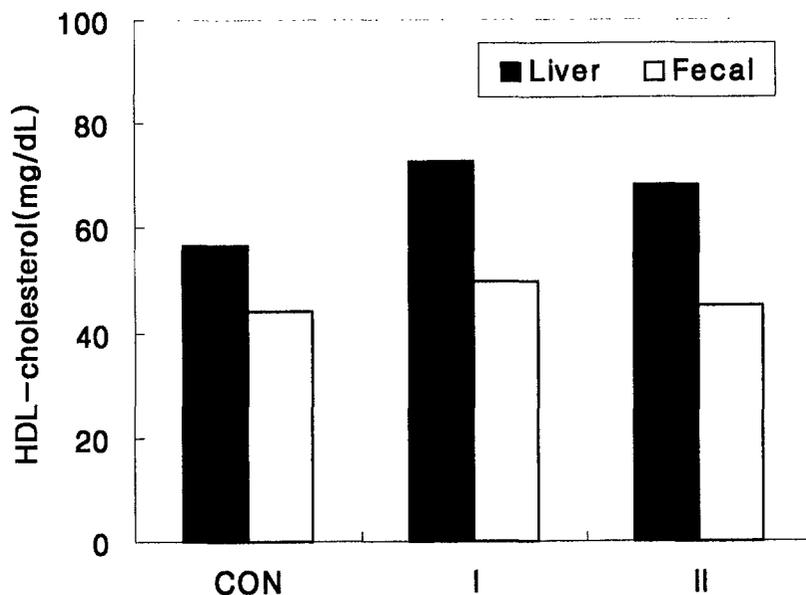


Fig. 7. Effect of polyphenol compound extracts from persimmon leaves on liver and fecal HDL-cholesterol in rats fed high fat diet for 5 weeks.

Values represent Mean \pm S.D. of five rats per groups

P-values was determined by t-test

Statistically different between CON and PRI(PRII)

* : $p < 0.05$

NOR : Normal, CON : High fat diet(only 5% lard)

PRI : High fat diet + 25mM polyphenol fraction from persimmon leaves

PRII : High fat diet + 50mM polyphenol fraction from persimmon leaves

5. 혈청, 간장 및 분변 중 LDL-cholesterol 함량 측정

혈청, 간장 및 분변에서의 LDL-콜레스테롤 함량을 측정한 결과 혈청에서는 대조군이 $65.0 \pm 27.6 \text{mg/dL}$ 이었으나, 폴리페놀 화합물 I 군은 $45.8 \pm 9.3 \text{mg/dL}$ 으로 LDL-콜레스테롤에 대하여 유의적($p < 0.05$)으로 감소되는 것으로 나타났으며, 폴리페놀 화합물 II에서는 $51.5 \pm 5.7 \text{mg/dL}$ 으로 대조군에 비해 다소 감소되는 경향을 보였으나 유의성은 인정되지 않았다(Fig. 8)

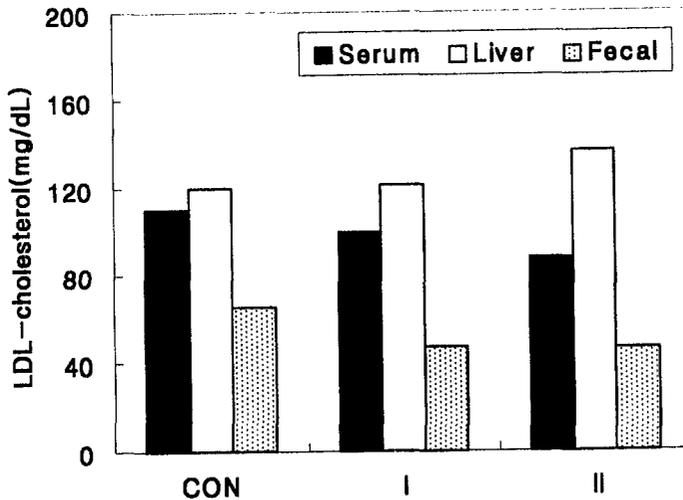


Fig. 8. Effect of polyphenol compound extracts from persimmon leaves on serum, liver and fecal LDL-cholesterol in rats fed high fat diet for 5 weeks.

Values represent Mean \pm S.D. of five rats per groups

P-values was determined by t-test

Statistically different between CON and PRI(PRII)

* : $p < 0.05$

NOR : Normal, CON : High fat diet(only 5% lard)

PRI : High fat diet + 25mM polyphenol fraction from persimmon leaves

PRII : High fat diet + 50mM polyphenol fraction from persimmon leaves

6. 혈청 중 총단백질과 알부민 함량

실험식이 급여 후 혈청 중의 총단백질과 알부민 함량은 실험군인 PRI 군($47.3 \pm 6.7 \text{g/dL}$)과 PRII 군($46.2 \pm 6.2 \text{g/dL}$)이 대조군($62.50 \pm 17.82 \text{g/dL}$)에 비하여 감소된 경향을 보였으며, 알부민을 측정된 결과 실험군 II를 경구 투여한 군에서 대조군과 비교할 때, 유의성 있는 감소를 보였다 (Fig. 9, 10).

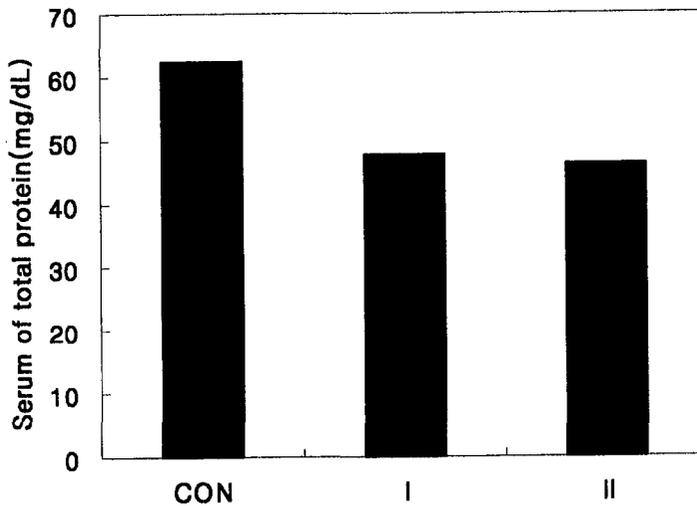


Fig. 9. Effect of polyphenol compound extracts from persimmon leaves on serum total protein in rats fed high fat diet for 5 weeks.

Values represent Mean \pm S.D. of five rats per groups

P-values was determined by t-test

Statistically different between CON and PRI(PRII)

* : $p < 0.05$

NOR : Normal, CON : High fat diet(only 5% lard)

PRI : High fat diet + 25mM polyphenol fraction from persimmon leaves

PRII : High fat diet + 50mM polyphenol fraction from persimmon leaves

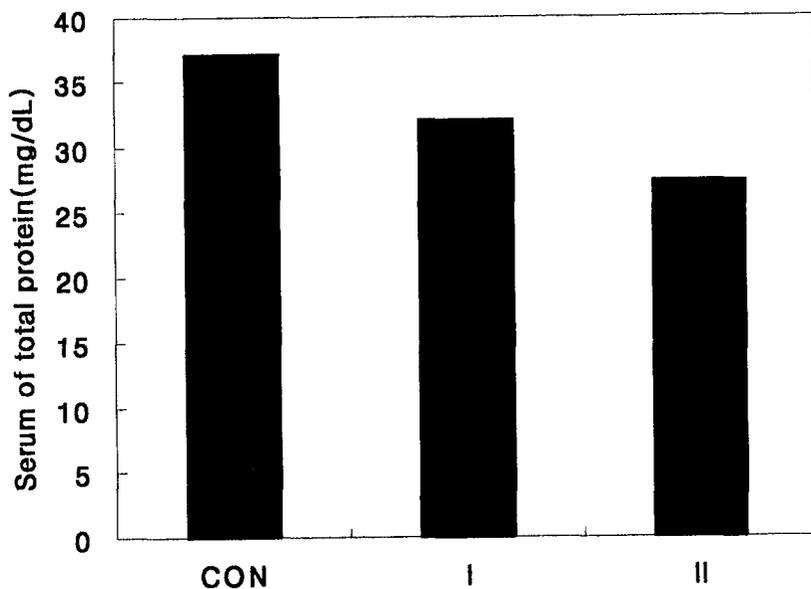


Fig. 10. Effect of polyphenol compound extracts from persimmon leaves on serum albumin in rats fed high fat diet for 5 weeks.

Values represent Mean \pm S.D. of five rats per groups

P-values was determined by t-test

Statistically different between CON and PRI(PRII)

* : p < 0.05

NOR : Normal, CON : High fat diet(only 5% lard)

PRI : High fat diet + 25mM polyphenol fraction from persimmon leaves

PRII : High fat diet + 50mM polyphenol fraction from persimmon leaves

제4절 결 론

한국산 감잎으로부터 polyphenol 화합물군을 분리 및 정제하여 5주간 고지방 식이를 한 후, 혈장 및 간장에서의 지질대사에 미치는 영향을 분석한 결과 혈장에서는 polyphenol 화합물군 II에서 총지질, 총콜레스테롤이 유의성 있게 감소하였다. 또한 간장에서는 총지질, 중성지질이 대조군에 비해서 유의성 있는 결과가 나타났다. 5주 동안 고지방 식이를 한 후 분변을 채취하여 총지질, 총콜레스테롤 및 중성지질을 측정된 결과 감잎에서 추출한 polyphenol 화합물 군이 고지방식이 만을 섭취 시킨 대조군에 비해 다소 감소되는 경향을 보였다. 감잎 화합물군을 섭취 시킨 후 총단백질과 알부민 함량을 측정된 결과 대조군과 실험군에서 유의성 있는 차이는 나타나지 않았다.

제5절 참고문헌

1. Carlson, L.A. and Bottiger, L.E.: Ischemic heart disease in relation to fasting values of plasma triglycerides and cholesterol, Stockhlohm prospective study, *Lancet.*, 1, 185(1972)
2. 김일순: 질병발생의 변화와 식습관. 대한의학협회지, 32(5), 474-481(1989)
3. 叛元史: コレステロールの代謝促進と排泄を高める藥物. 藥局., 42(12), 41-45(1991)
4. 구자현: 인삼 saponin이 실험적 동맥경화증 유발에 미치는 영향. *J. Hanyang Med. Coll.*, 3(2), 29-34(1992)
5. Pandak, W.M., Heuman, D.M., Hylemon, P.B. and Vlahcevic, Z.R.: Regulation of bile acid synthesis. IV. Interrektion between cholesterol and bile acid biosynthesis pathways. *J. Lip. Res.*, 32,

- 79-90(1990)
6. Beitez, D.C., Jacobson, N.L., Mcgilliard, A.D. and Veenhuizen, J.J.: Cholesterol transport and uptake in miniature swinefed vegetable and animal fats and proteins. *Lipids.*, 209(11), 735-742(1985)
 7. Chi, M.S., Koh, E.T. and Stewart, T.J.: Effects of garlic on lipid metabolism in tats fed cholesterol or lard. American institute of Nutrition Received for publication 15., June, 241-248(1982)
 8. 장남수: 바람직한 지방산 섭취형태. 한국영양학회지 춘계심포지움, 25(1993)
 9. Neves, L.B., Clifford, C. K., Kohler, G.O., De Fremery, D., Knuckles, B.E., Cheowtirakul, C., Miller, M.W., Weir, W.C. and Clifford, A.J.: Effects of dietary proteins from a variety of sources on plasma lipids and lipoproteins of rats. *J. Nutr.*, 110, 732-742(1980)
 10. Frings, C.S.: A colorimetric method for determination of total serum lipid based on the sulfophospho-vanillin reaction. *Am. J. Clin-Pathol.*, 53, 80-91(1970)
 11. 血清 總 Cholesterol 測定用 試藥: 榮研化學株式會社, 日本, 東京
 12. Cleantech TG-S: IATRON LAB., 日本, 東京
 13. HDL-C 555: 榮研化學, 日本, 東京
 14. LDL-C 556: 榮研化學, 日本, 東京
 15. Total Protein 測定用 試液: IATRON LAB., 日本, 東京
 16. Albumin 測定用 試液: IATRON LAB., 日本, 東京
 17. Folch, J., Lees, M. and Sloane-Stanley, G.H.: Simple method for the isolation and purification of total lipid fom animal tissues. *J. Bio. Chem.*, 226, 497(1957)
 18. Lee, S.H. and Lee, Y.S.: Effects of late-harvested green tea extract on the lipid metabolism and ca absorption in rats. *Korean Journal of Nutrition*, 31(6), 999-1005(1998)

19. Kang, J.O. and Kim, K.S.: The effect of dry edible leaves feeding on serum lipids of hypercholesterolemic rats. *J. Korean Soc. Food and Nutrition.*, 24(4), 502-509(1995)
20. Kim, J.H. and Wang, S.G.: Effects of mugwort, dried orange peel and duchung on lipid metabolism in hyperlipidemia rats. *Korean J. Nutrition.*, 30(8), 895-903(1997)

제 10 장 고기능성 감잎 음료의 생산 및 제품공정개발

제1절 연구개발의 목적과 범위

차는 세계에서 가장 널리 음용되는 음료이다. 차는 성인의 예방의학에 있어서 암과 심혈관계 질환, 혈압, 충치예방의 예방제로서 최근 많은 관심을 받아왔다. 차는 성인병 예방제로서 많은 장점을 가지고 있는데 그중 가장 중요한 점은 독성이 없기 때문에 일반 대중들이 쉽게 이용할 수 있다는 것이다. 따라서 최근 건강문제와 관련 녹차의 생산량과 가공사업이 급격히 발달하고 있다. 감잎은 예로부터 널리 알려져 온 민간 약제로서 다량의 비타민C를 함유하고 있으며, 단백질 14.4%, 지질 6.9%, 당질 54.5%, 섬유질 11.6%, 탄닌 4.2%, 카페인, 콜린, 플라보노이드, 배당체, 유기산, 큐마틴 등 다양한 화합물이 함유되어 있다.

본 연구결과 고혈압 억제작용, 면역기능 증진, 항암, 중금속 제거효과 및 항암효과 등 성인병에 탁월한 효과가 인정되고 있으며 특히 여성들의 피부미용과 통풍예방 및 혈압강하효과 등이 있음이 밝혀졌다. 그러므로 우리 고유의 차로서 다양한 생리활성 효과를 체계적으로 검증하고 화학구성성분을 밝혀 새로운 고기능성 음료개발을 함으로써 농가소득증대는 물론 국민 보건증진에 이바지 할 것이라고 생각된다.

본 연구에서는 감잎차의 새로운 고부가가치 대체 기능성 음료로 부상케 하는데 최종적인 목적이 있다. 감잎차 음료의 대중 소비단계가 실현되면 감잎의 공급량 및 품질등의 측면에서 한계에 직면할 것이므로 고기능성 감잎차음료의 생산 및 제품공정개발을 검토하였다.

제2절 연구개발의 방법

1. 제품의 공정기술 개발 및 현장적용 시험

제품의 공정기술을 개발하고 현장적용 시험을 하기 위하여 표준 제품의 시험생산을 하였고 원료의 전처리 공정, 표준제품의 생산을 위한 생산공정을 확립하기 위한 일련의 실험을 수행하였다.

2. 포장연구 및 경제성 분석

포장의 기능은 보호성, 편리성, 쾌적성에 있으므로 감잎음료 제조유통 과정에 있어서 특히 보호기능과 감잎음료 자체의 기능성을 강조한 포장 방법에 관하여 논한다. 경제적 분석은 감잎음료 제품으로 생산할 경우 제품에 대하여 소비되는 비용을 계산하고 적정이윤을 얻고져 판매가격을 추정하여 분석한다.

제3절 연구개발의 결과

1. 원료의 전처리 공정 확립

건조시킨 감잎에 35% 에탄올을 가하여 80℃로 2시간 추출한 후 원심 분리하여 상징액과 침전물을 얻었고 이 상징액을 모아 농축, 여과하여 최종 농도를 2 Brix로 맞추어 감잎 음료를 제조하였고 위와 같은 추출과정을 4회 반복하였다 (Fig. 1)

2. 표준제품의 생산을 위한 생산공정 확립

감잎으로부터 추출한 추출물을 10% 배합tank에 섞고, 설탕 4.5%, 사과즙 15%, 사과향 0.04%, 구연산 나트륨 0.05%를 넣고 최종 pH가 3.5가 되도록 citric acid로 보정하고, 이를 40~50℃로 예열 및 탈기시킨 다음 고압증기 살균하고, 35~40℃로 냉각하여 이를 포장한다(Fig. 2).

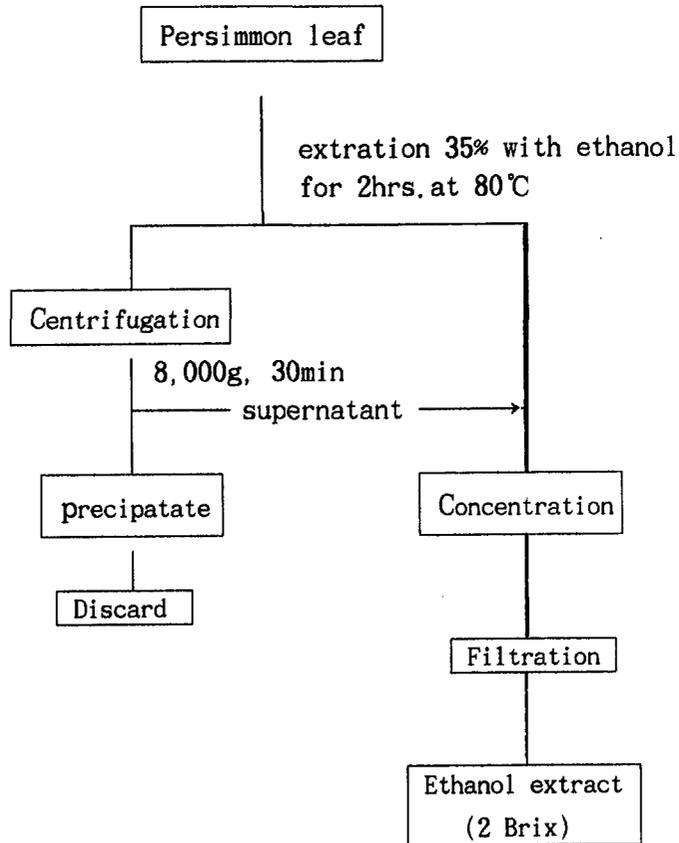


Fig. 1. Procedure for extraction of persimmon leaf

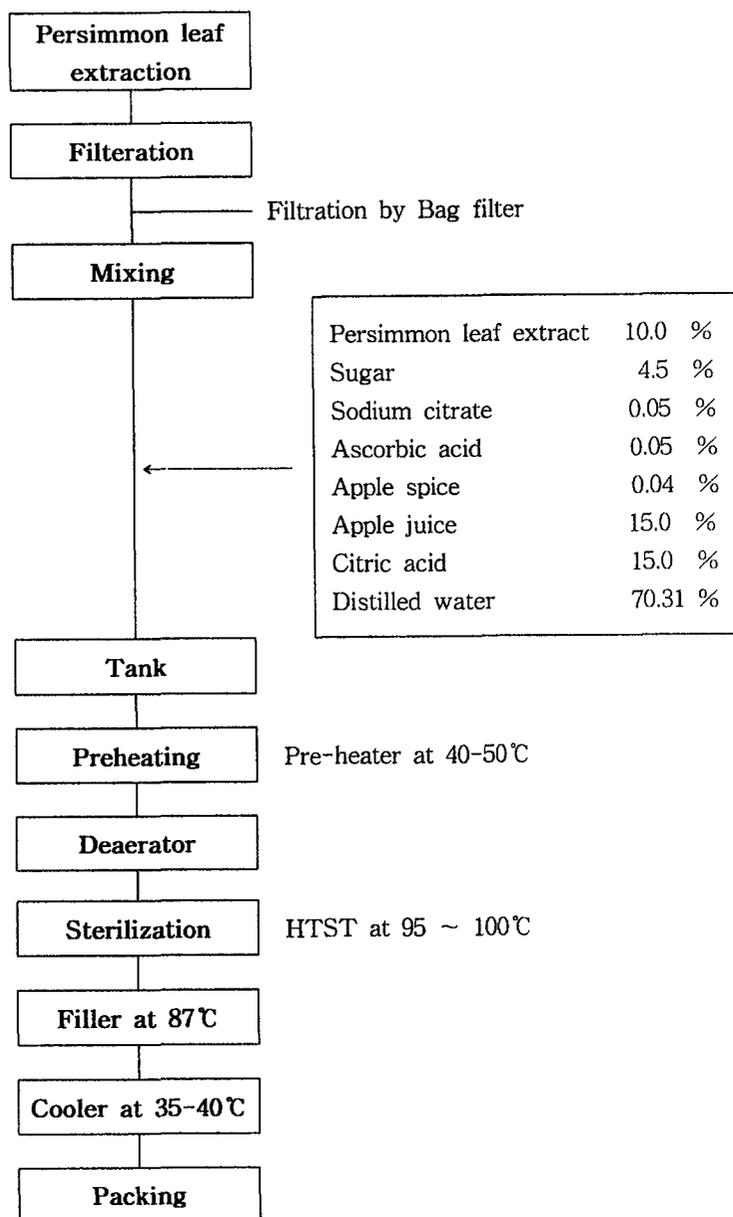


Fig. 2. Manufacturing procedure of persimmon leaf beverage

3. 감잎 캔 음료 제조 시설

앞의 감잎 제조 공정에 따라 제조 시설을 설치할 때 적당한 설비 배치를 고려하면 다음과 같은 배치도를 생각할 수 있다. 단 시설 현장의 상황에 따라 약간씩 다르게 배치될 수 있음을 밝혀둔다.

- 1) Semi auto depallerizer(반자동 캔 공급장치)
파렛트로 빈 캔을 공급하여 주면, 일정하게 배열하여 다음 단계인 캔 세척을 할 수 있도록 콘베어로 공급해 준다.
- 2) Empty can rinser(캔 세척기)
빈 캔을 노즐로 정제수를 공급하여 세척하는 장치이다.
- 3) Auto can filler(캔 충전기)
살균 처리된 제품을 충전헤드가 회전하면서 빈 캔에 내용물을 충전하는 장치이다.
- 4) Seamer(캔 뚜껑 덮개)
충진된 캔에 뚜껑을 덮어 밀봉하는 기계이다.
- 5) Jet printer(인쇄기)
충진된 캔에 제조일을 인쇄하는 기계이다.
- 6) Auto can cooler(자동 캔 냉각기)
충진된 캔을 냉각시켜 주는 장치이다.
- 7) Case packing conveyor(캔 상자 이송용 콘베어)
Can이 콘베어를 타고 가는 도중 포장용 box에 담을 수 있도록 이동하는 콘베어.
- 8) Can conveyor(캔 이송용 콘베어)
Can을 공급 → 냉각장치까지 연결해 주는 콘베어 장치
- 9) Mixing tank(혼합탱크 2000 ℓ)
추출된 내용물의 첨가제 등을 혼합하는 tank이다.
- 10) Mixing hopper(고속 혼합기)
원료에 설탕 등 분체의 물질을 쉽게 용해하여 혼합할 수 있도록 하는 장치이다.

11) Filter(여과기)

충진을 위해 살균기로 가기전 불순물을 걸러주는 장치이다.

12) H.T.S.T(저온 살균기)

충진하기 전의 내용물을 살균하여 주는 장치이다.

13) Sanitary piping/pump(위행배관/펌프)

추출 tank에서 충전기까지의 내용물을 이송하여 주는 위행배관 및 펌프이다.

14) Utility line(냉각수, 스팀, 상수 공급장치)

내용물 처리 및 can line의 상수배관 스팀공급 및 냉각수를 공급하는 배관.

※ 참고사항

반자동 캔 공급장치는 수동적으로 작업할 경우 수동 캔 공급장치로 대체 할 수 있습니다.

4. 생산자동공정

식품산업의 생산자동공정은 공장의 생산, 관리를 자동화하는 것으로 수주, 생산계획, 제조, 검사, 출하 과정을 일관하여 자동화하는 기술이며 궁극적으로 무인화할 수 있는데 목적을 두고 있다. 생산자동공정은 적용은 생산 비용의 절감, 질의 향상, delivery 개선이 이루어지도록 계획되어야 한다. 식품공장의 생산체계는 다음과 같은 각종 여러개의 부분으로 이루어져있다.

- | | |
|-------------|------------------------|
| 1. 사무자동화 부분 | 판매, 재무, 인사, 경영관리 |
| 2. 생산관리 부분 | 생산, 자재, 재고, 원가관리 |
| 3. 공정관리부분 | 품질, 수율, 진도의 관리, 실적관리 |
| 4. 공장자동화부분 | 저장, 운송, 계량, 제조, 가공, 포장 |

공장의 완전한 자동화는 이상의 모든 부분을 모두 자동화 할 경우에 해당된다. 물론 식품 공장의 성격이 충분히 고려되어 어느 부분이 다른 부분의 자동화보다 시급한 경우가 있을 수 있다. 일반적으로 로봇, 무인 반송차, 자동창고가 생산자동공정의 주요기술로 알려졌으며 자동차 및 전자, 기계공업 등에서는 위력을 발휘하고 있다. 그러나 물류 시스템의 자동화만으로는 공정을 자동화 할 수 없는 식품 가공, 제조과정에서는 공정 자체의 중요성을 강조하지 않을 수 없다. 왜냐하면 생산 수율, 품질 등이 공정내에서 결정되고 있기 때문이다.

공정의 자동화는 공장의 생산 체계에 큰 영향을 주지않고 개별적으로 이루어 질 수 있으며 생산 실적에서 축적된 기술이 자체적으로 적용될 수 있으므로 핵심적인 know-how를 축적할 수 있는 계기가 된다.

식품 생산자동공정은 공정의 안정화, 성력 및 성인화, 품질향상, 에너지절약 등을 통하여 생산성 향상을 목표로 하고 있기 때문에 생산에 관련되는 여러 생산요소들과의 상호 관계가 중요하며 Fig. 3은 각 system 간의 관계도이다.

자동화 시설의 대부분이 국산화되지 못하였을 뿐아니라 국외 제품의 선호도가 크고 자동화 시설의 시공만을 국내에서 감당하고 있는 실정이다. 뿐만아니라 운영기술의 도입료도 적지않게 지출되고 있으며 운영기술의 습득과 유지기술에도 적지않은 문제가 있었다. 그 결과 자동화 투자가 막대하게 소요되고 있어서 중소기업 규모의 식품공장에서는 자동화의 도입이 어려운 실정이다.

자동화 시설의 설치 이외에도 운영상의 문제가 많이 제기되고 있으며 운영기술은 식품 공정자체에 대한 물성, 반응과 자동화 시설에 대한 이해가 가능한 인재가 필요한데 이와 같은 기술인력의 양성이 시급한 문제로 부각되고 있다. 따라서 식품 관련 대학에서 자동화에 대한 교육과 연구가 보다 활발히 이루어져야 하겠으며 산업체에서도 자동화 기술요원의 조기 양성에 많은 노력이 있어야 할것이다.

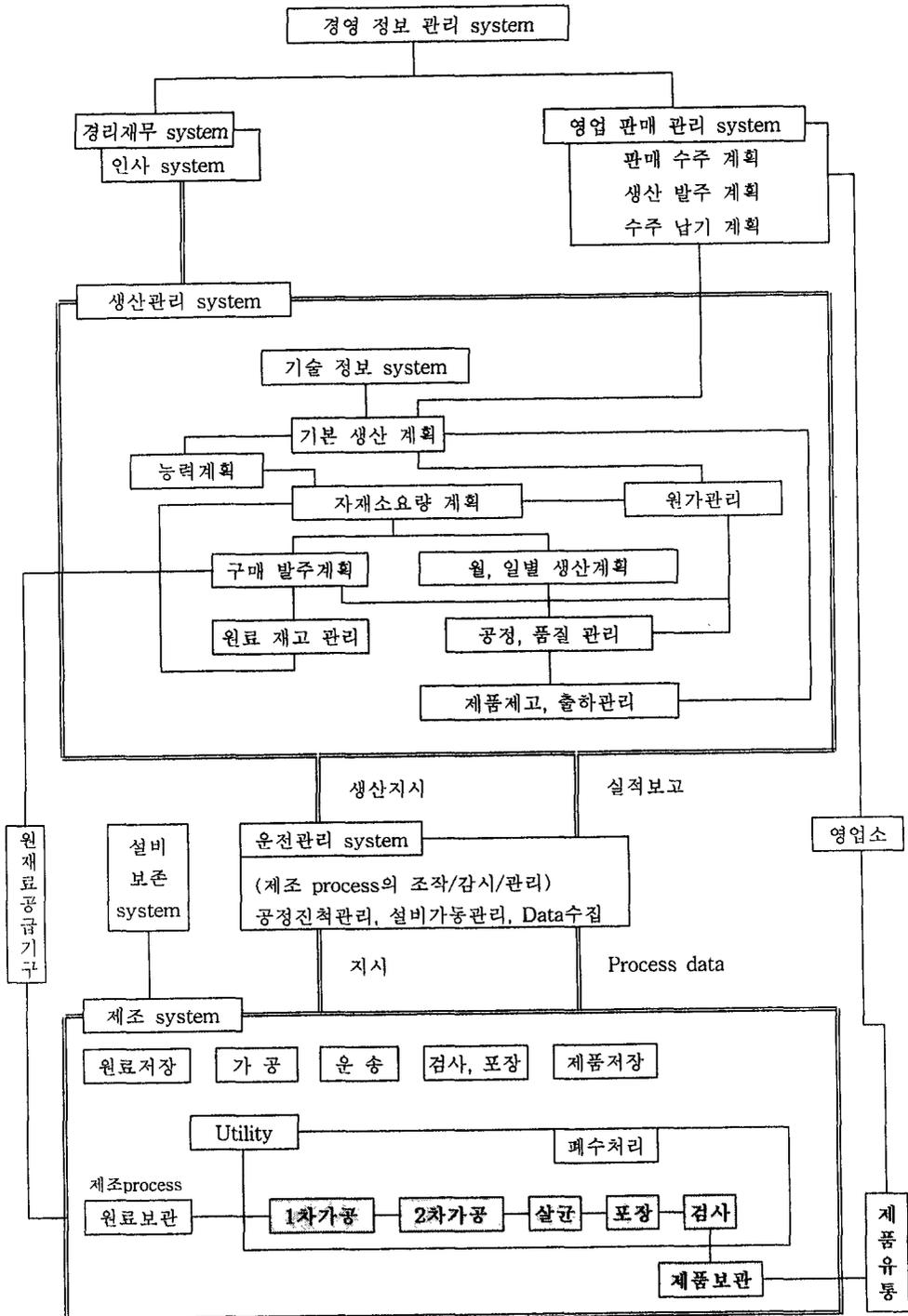


Fig. 3. 경영 정보 관리 관계도

5. 포장연구 및 경제성 분석

1) 포장연구

포장의 기능에는 크게 나누어 보호성, 편리성, 쾌적성이 있고, 식품포장에는, 식품의 제조, 유통 과정에 있어서 포장의 보호기능이 가장 중요하다. 제1의 기능인 보호성이란, 수송, 보존중에 일어날 미생물 오염, 부패나 온습도, 산소, 진동, 충격등의 환경조건에 의해 촉진되는 산화, 변색, 흡습, 파손 등의 여러 가지의 피해요인으로부터 내용물을 지키고, 품질저하를 방지하는 기능이다. 제2의 기능은 편리성인데, 식품등을 보존, 수송할 때에 옮기기 쉽게 한다든가, 소량씩 나누든가, 고루 섞는다든가, 혼동을 방지 한다든가, 이용할 때의 간편성을 향상시킴을 목적으로 하고 있다. 제3의 기능은 포장에다 사람의 관심을 끌 색채나 디자인을 해서 판매촉진 효과를 지니게 하거나, 청결감이나 청순함을 느끼게 한다든가 표시함으로써 내용 성분 등을 확실시 하기 위한 기능이다.

포장의 기능은 상기와 같지만 기능포장이라고 하는 용어도 곧잘 쓰여진다. 이것은 포장할 때에 무언가 특별한 기능을 기대하고 있다는 것이다. 일반적으로 식품은 저장, 유통 기간중에 품질이 저하하여 가끔 상품 가치를 잃게 되지만 이러한 때 식품의 품질을 보존하기 위해서 적절한 포장 재료를 사용한 포장이 행해진다. 이때 포장재료에 요구되는 기능은 기체투과성, 내열성, 강도의 이화학적 특성인데 이것들은 개개 식품의 성질, 품질보존기술, 유통 조건등에 적합한 것이 아니면 안된다. 또 편리성이나 쾌적성을 향상시키기 위해서 포장재료가 갖는 특별기능을 이용한 것도 아주 많다. 이러하듯이, 개개의 포장재료가 지닌 특별한 이화학적 특성을 잘 이용한 포장을 기능포장이라고 부르고 있다.

포장재료로서 요구되어지는 기능의 대부분은 포장의 기능에 적합한 것이어야 하고, 식품의 품질보존, 제품에 대한 기능성 부여때에 행해지는 각종 처리에도 적합하여야 한다. 식품을 포장하는 경우, 가장 중요한 기능은 보호성인데 포장재료에 필요한 기능은 ① 화학적, 물리적 안정성 ② 물리적 강도 ③ 차단성의 세가지 사항이다. 현재 개발되고 있는 대부분의

식품용 기능성 포장재료는 이 보호성에 관한 것이라고 말해도 좋다.

식품을 포장하는 경우, 포장재료는 화학적, 물리적으로 안정한 것이 아니면 안된다. 현재 사용되고 있는 대부분의 포장재료는 화학적으로 안정하므로 포장 재료로서 쓰여온 것인데 안전성의 점에서도 중요한 특성이 있다. 또, 보호성과 관련해서, 포장재료의 온도에 대한 안정성도 중요하겠지만, 특히 내열성은 식품의 살균, 재가열과 관련되어 대단히 중요한 특성이 되고 있다.

식품을 유통시킬 경우, 포장재료의 물리적 강도가 요구된다. 진동에 대해서는 내굴곡피로성, 내절강도, 내마모성, 충격에 대해서는 충격강도, 마찰강도, 짓뭉김에 대한 강도, 완충성 등 이 양자에 대한 인장강도, 편향강도등의 특성이 중요하다. 식품에 대한 보호성이라는 점에서는 포장재료가 지닌 차단성이 대단히 중요한 특성으로 되어 있다. 식품의 변질은 공기중의 산소, 수증기, 광선에 의해 촉진되는 수가 많은데 이 경우 포장재료의 기체 투과성, 특히 산소 차단성 및 광선(자외선) 차단성이 중요한 특성이 된다. 건조식품에서는 식품재료의 수증기 투과성이 문제시 되어 있고, 저온유통식품에서는 단열성이 관계되고 있다. 청과물의 경우에는 그 선도를 보존하기 위해서는 적당한 산소의 보급이 필요한데, 따라서 포장재료가 지닌 산소투과성이 중요하며, 식품의 풍미 보존에는 휘발성 물질의 차단성, 비흡착성이 중요하다.

고기능성 감잎차음료의 포장은 이용상의 편리함, 판매촉진 효과 및 장기간 저장 등을 고려하였을 때 캔으로 포장한 음료제품이 제일 좋을 것으로 판단된다.

2) 경제성 분석

감잎원료를 음지에서 건조한 후 절단하여 가열수에서 에탄올 추출한 후 감잎음료제품으로 생산할 경우 제품에 대하여 소요되는 비용을 계산하고, 적정 이윤을 얻고져 판매가격을 추정하였다. 분석에 사용된 자료가운데에는 고정 투자비와 포장재료 그리고 유틸리티 단가 등은 공장의 시설여건과 포장 단위 그리고 정부에서 고시하는 가격의 변동 항목이므

로 다소의 오차가 있다.

분석을 위한 가정은 다음과 같다.

- 생산량 : 원료기준으로 1일 30kg
- 가공 수율 : 에탄올 추출 후 에탄올을 제거하고 원료액이 2 °Brix가 되도록 보정 - 20 ℓ/kg
- 작업시간 : 1일 8시간이며 주 44시간 근무
- 감잎음료 가공기간 : 6월부터 8월(3개월)
- 감잎의 원료가격 : 500원/kg
- 가공조건 : 에탄올 추출 후 에탄올을 제거하고 첨가물을 가한 감잎차 음료로 가공한다.

(1) 감잎음료의 전처리 과정

가. 재료비 615,000원/일

- 직접재료비 : $30\text{kg}(\text{감잎}) \times 500\text{원/kg} = 15,000\text{원/일}$
 $100\text{ℓ}(\text{사과즙원액}) \times 3,000\text{원/리터} = 300,000\text{원/일}$
- 간접재료비(에탄올 추출) : $30\text{kg} \times 10,000\text{원}(\text{에탄올 } 4\text{ℓ})/\text{kg}$
 $= 300,000\text{원/일}$

나. 노무비 : 297,850원/일

- 직접노무비 : 185,000원/일
 - 기능공(남) : 1인 \times 30,000원/인 = 30,000원/일
 - 기능공(여) : 4인 \times 20,000원/인 = 80,000원/일
 - 보일러공(남) : 1인 \times 35,000원/인 = 35,000원/일
 - 기능공(반장) : 1인 \times 40,000원/인 = 40,000원/일
- 간접노무비 : 27,750원/일
 - 직접노무비의 15% : $185,000\text{원} \times 0.15 = 27,750\text{원/일}$

- 후생복지비 : 85,100원/일
 - (직접노무비 + 간접노무비)의 40% : 85,100원/일

- 다. Utility 비용 : 120,000원/일
 - 전기료 : 60,000원/일
 - 기계운전 소비전력비 : $40\text{kwh} \times 10\text{h} \times 120\text{원} = 48,000\text{원/일}$
 - 전등 및 기타소비량 : $10\text{kwh} \times 10\text{h} \times 120\text{원} = 12,000\text{원/일}$
 - 경유 : 60,000원/일
 - $100\text{리터} \times 600\text{원/리터} = 60,000\text{원/일}$

- 라. 운영비 중 고정비용 : 570,463원/일
 - 감가상각비 : 10,959원/일
 - 일일 감가상각비는 토지구입비와 건물비를 제외한 고정자본투자의 10%와 건물의 2%를 합하여 $1/365 : (30,000,000\text{원} \times 0.1 \times 1/365) + (50,000,000\text{원} \times 0.02 \times 1/365) = 10,959\text{원/일}$
 - 세금 및 보험료 : 1,644원/일
 - 고정자본투자의 2%/365 : $(30,000,000\text{원} \times 0.02 \times 1/365) = 1,644\text{원/일}$
 - 관리 유지비 : 4,110원/일
 - 고정자본투자의 5%/365 : $(30,000,000 \times 0.05 \times 1/365) = 4,110\text{원/일}$
 - 공장 관리직(인건비) : 275,000원/일
 - 공장장 : $1\text{인} \times 50,000\text{원/일} = 50,000\text{원/일}$
 - 생산부장 : $1\text{인} \times 45,000\text{원/일} = 45,000\text{원/일}$
 - 판매담당 : $1\text{인} \times 40,000\text{원/일} = 40,000\text{원/일}$
 - 구매담당 : $1\text{인} \times 35,000\text{원/일} = 35,000\text{원/일}$
 - 관리담당 : $1\text{인} \times 35,000\text{원/일} = 35,000\text{원/일}$
 - 서무담당 : $1\text{인} \times 30,000\text{원/일} = 30,000\text{원/일}$
 - 수위, 청소 : $2\text{인} \times 20,000\text{원/일} = 40,000\text{원/일}$

- 후생복리비 : 110,000원/일
 - 공장 관리직의 40% : $275,000\text{원/일} \times 0.4 = 110,000\text{원/일}$
- 판공비 및 기타비용 : 68,750원/일
 - 공장 관리직의 25% : $275,000\text{원/일} \times 0.25 = 68,750\text{원/일}$
- 운송비 : 100,000원/일
 - 원료운송 : 트럭한대 $\times 100,000\text{원/일} = 100,000\text{원}$

(2) 감잎음료의 수익성 분석

감잎음료를 전처리하여 첨가물을 첨가한 후 150ml 단위의 can으로 포장(8호관)하여 판매하는 것으로 가정하였다. 제품의 판매방법은 일반도매처에 직접 공급하는 방식으로 한다.

- 재료비 : 12,600,000원/일
 - 직접재료비 : 위의 전처리 과정에서 계산됨
 - 포장 및 간접재료비 : 12,600,000원/일
 - * 내포장(can, 인쇄 및 디자인비)
 - $600\text{ l} / \text{원료액}10\text{ml}(/150\text{ml}) \times 160\text{원/개} = 9,600,000\text{원}$
 - * 외포장(손잡이형 상자)
 - $600\text{ l} / \text{원료액}100\text{ml}(/1,500\text{ml}) \times 300\text{원/개} = 1,800,000\text{원}$
 - * 첨가물 및 기타재료비 : 1,200,000원/일
- 노무비 : 434,700원/일
 - 직접노무비 : 270,000원/일
 - * 기능공(남) : 1인 $\times 30,000\text{원/인} = 30,000\text{원}$
 - * 기능공(여) : 10인 $\times 20,000\text{원/인} = 200,000\text{원}$
 - * 기능공(반장) : 1인 $\times 40,000\text{원/인} = 40,000\text{원}$
 - * 보일러공(남) : 원료전처리 공정에서 계산됨
 - 간접노무비 : 40,500원/일
 - * 직접노무비의 15% : $270,000\text{원} \times 0.15 = 40,500\text{원}$

- 후생복지비 : 124,200원/일
 - * (직접노무비 + 간접노무비)의 40% : 124,200원
- Utility 비용 : 222,000원/일
 - 전기료 : 102,000원/일
 - * 기계운전 소비전력비 : $65\text{kwh} \times 10\text{h} \times 120\text{원} = 78,000\text{원}$
 - * 기타 소비전력 : $20\text{kwh} \times 10\text{h} \times 120\text{원} = 24,000\text{원}$
 - 경유 : 60,000원/일
 - * $200\text{리터} \times 600\text{원/리터} = 120,000\text{원}$
- 운영비 중 고정비용 : 797,199원/일
 - 감가상각비 : 65,753원/일
 - * 원료 주입기계 및 can 포장기를 전자동 기계(120,000,000원/대)를 설치할 경우로 계산한다.
 - $(250,000,000 \times 0.1 \times 1/365) - (50,000,000\text{원} \times 0.02 \times 1/365)$
 - = 65,753원/일
 - 세금 및 보험료 : 13,699원/일
 - * 고정자본투자의 2%/365 : $(250,000,000\text{원} \times 0.02 \times 1/365)$
 - = 13,699원/일
 - 관리 유지비 : 34,247원/일
 - * 고정자본투자의 5%/365 : $(250,000,000 \times 0.05 \times 1/365)$
 - = 34,247원/일
 - 공장 관리직 : 원료의 전처리 공정에서 계산됨
 - 후생 복지비 : 원료의 전처리 공정에서 계산됨
 - 판공비 및 기타비용 : 183,500원/일
 - 운송비 : 500,000원/일
- 일일 수입 명세서
 - 일일 지출비용
 - * 유동 비용 : 14,289,550원
 - 재료비 : $615,000\text{원} + 12,600,000\text{원} = 13,215,000\text{원}$

- 노무비 : 297,850원 + 434,700원 = 732,550원
- 유틸리티 : 120,000원 + 222,000원 = 342,000원
- * 고정 비용 : 1,367,662원
- 운영비 : 570,463원 + 797,199원 = 1,367,662원

총 지출비용 : 15,657,212원

- 일일 수입액
 - * 감앞음료 1can당(150ml) 300원으로 판매할 경우
 - 수입 : 60,000캔 × 300원/캔 = **18,000,000원/일**
 - 세금 납부전 이익 : 18,000,000원 - 15,657,212원
= 2,342,788원/일
 - 법인세 : 세금 납부전 이익의 40%
2,342,788원 × 0.4 = 937,115원/일
 - 순이익 : 2,342,788원 - 937,115원 = **1,405,673원/일**
- * 감앞음료 제품을 1캔당 260원으로 판매할 경우에 순이익이 없
는 것으로 계산되었다.

제4절 결 론

고기능성 감잎음료의 생산 및 제품공정을 개발하기 위하여 감잎 캔음료 제조시설, 생산자동공정 및 경제성 분석을 하였다. 감잎음료의 제조 배합비율은 관능검사를 실시한 결과, 감잎추출물 10.05%, 설탕 4.5%, 구연산 나트륨 0.05%, 사과향0.05%, 사과주스 15.0% 및 비타민 C 0.05%를 배합조에 섞어 최종 pH가 3.5~4.0이 되도록 하여 이를 40~50℃로 예열 및 탈기시킨다음 고압증기로 살균한 후 냉각 포장한다.

고기능성 감잎차음료의 포장은 이용면에서의 편리성, 판매촉진효과 및 장기간 저장등을 고려할 때 캔으로 포장한 제품이 제일 좋은 것으로 판단되었다. 감잎차의 경제성 분석은 감잎원료를 음지에 건조한 후 절단하여 가열수에서 35%의 에탄올로 추출한 다음 제품에 대하여 소비되는 비용을 계산하고 적정이윤을 얻고져 판매가격을 추정하였다. 분석에 사용된 자료가운데 고정투자비, 포장재료 및 유틸리티 단가 등 공장의 시설여건과 포장단위 또한 정부에서 고시하는 가격의 변동 등으로 다소의 오차가 있을 것으로 생각된다.

감잎음료의 생산량은 원료기준으로 1일 30kg, 가공수율은 감잎을 에탄올 추출 후 에탄올을 제거하고 원료액이 2° Brix (20 l/kg)가 되도록 보정한다. 작업시간은 1일 8시간이며 주 44시간 근무, 감잎음료가공 기간은 6월부터 8월까지 3개월, 감잎의 원료가격은 500원/kg으로 설정하였다. 가공조건은 첨가물을 가하여 가공하였을 때 1일 순수익은 1,405,673원 이었다.

제5절 참고문헌

1. Cochran, W.G. and Cox, G.M.: Experimental Design 2nd ed. John Wiley & Sons, International Edition, 439(1957)

2. McFarlane, I.: Automatic control of food manufacturing process. Applied Science Pub., (1983)
3. 최부돌, 전재근: Microcomputer 계측, 제어 system을 활용한 식품건조 중 자료의 수집과 제어. 한국식품과학회지, 19(3), 200(1987)
4. 최재용, 김공환, 전재근: Microcomputer system을 이용한 표고버섯의 감압건조 연구. 한국식품과학회지, 19(6), 550(1987)
5. 김영환, 전재근: 초음파 식품 여과 장치의 개발. 서울대학교 대학원, 석사학위 논문(1991)
6. 전정렬, 전재근: 농업생산 및 가공시설의 무인관리용 제어 시스템의 연구. 과학기술처 특정과제 보고서(1991)
7. 유인조, 전재근: 드럼형 스넥건조 공정의 자동화 요소. 서울대학교 대학원 석사논문(1991)
8. 박준경, 김정호: 2010년의 산업구조 전망. 한국개발연구, 17(1), 별책, 한국개발연구원, (1995)
9. 이정환, 조덕래, 조재환: 경제사회 발전과 농림수산업의 역할 변화. 한국농촌경제연구원, 연구보고 236, (1991)
10. 조덕래, 조재환: 주요 과실류의 수급 분석 및 전망. 한국농촌경제연구원, 연구보고 260, (1992)
11. J. Uffenbeck: Microcomputers and Microprocessors. Prentice Hall(1985)