

664.06  
L293L

최 종  
연구보고서

농가 소득 증대를 위한 생물변환 고부가가치

식용색소 소재 개발

Development of value-added Natural Food Colorants  
by Biotransformation for the Augmentation  
of Farmer's Income

경희대학교

농 립 부



제1세부과제 : 홍화(잇꽃)색소성분의 생물변환 기술개발  
Development of a bioconversion technique for the pigments  
of petals of safflower (*Carthamus tinctorius*)

제2세부과제 : 생물변환에 의한 치자 청색소 개발  
Development of blue pigments from Gardenia  
by bioconversion techniques

제3세부과제 : 생물변환 천연식용색소 생산공정 기술개발  
Development of production processes for the natural  
pigments by bioconversion techniques

협동연구과제 : 생물변환 천연식용색소 식품 활용기술 개발  
Development of utilization of natural food colorants  
by bioconversion techniques

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “농가소득 증대를 위한 생물변환 고부가가치 식용색소 소재 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2000. 10. .

주관연구기관명 : 경희대학교

총괄연구책임자 : 한 태 룡

연 구 원 : 백 영 숙

연 구 원 : 정 인 식

협동연구기관명 : 충남대학교

협동연구책임자 : 윤 혜 현

# 요 약 문

## I. 제 목

농가소득 증대를 위한 생물변환 고부가가치 식용색소 소재 개발

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

색소는 천연 또는 합성색소가 있으며 식품, 화장품 및 의류염색용으로 사용되고 있다. 합성색소는 착색률이 높고 안정하며 가격이 저렴하여 광범위하게 사용되어 왔으나 대부분이 발암성을 갖는 등 유독하여 사용이 제한되고 있다. 우리나라에서는 전통적으로 100여가지 재배 또는 야생식물로부터 식용 또는 염색용으로 색소를 얻어 왔으나 합성색소의 등장으로 전통색소 생산의 맥이 거의 끊어지고 있다. 최근 급격한 소득증가로 색소의 안전성에 대한 인식이 새로워지고 있으며 우리나라 고유의 격조있는 색조에 대한 욕구가 증대되고 있고, 많은 천연색소는 살균, 항염 등 생리활성이 있으며 안전하여 식품 및 화장품용으로 큰 잠재적 수요가 있다. 우리나라에서 현재 허용된 식용천연색소는 cochineal(연지충) 적색소, 비트레드, 심황색소, 홍국황색소 및 적색소, 홍화 황색소 및 적색소, 치자 황색소, 청색소, 및 적색소등이 있다. 세계적으로 식용색소 및 염료의 매출액은 약 80 억불이며 우리나라에서는 연간 1 억불 이상 전량 수입에 의존하고 있다. 식용천연색소의 세계시장은 현재 약 2 억불 이상이므로 우리나라에서는 약 300억원이상의 수요가 있는것으로 추정되며 거의 대부분 완제품 형태로 수입되고 있다. 국내에서는 몇몇 중소기업에서 원료를 수입하여 식용천연색소를 생산 판매하고 있으나 생산된 색소의 품질이 조악하여 식품제조회사로부터 외면당하고 있다. 더구나 최근 색소원료의 국제가격이 급등하여 주요 적색소 원료인 cochineal의 경우 1995년 kg당 10불이하에서 1997년에는 100불 이상으로 10배이상 급상승하였다. 적색소의 경우 우리나라는 전통적으로 홍화(잇꽃)적색소가 식품, 화장품(연지), 및 의류염색용으로 사용되어 왔으나 아직도 제조기술이 개발되어 있지않다.

홍화에는 총 색소함량중 90%이상이 황색소 구성되어 있으며 가격이 훨씬 비싼 적색소는 소량 존재한다. 따라서 홍화 황색소를 적색소로 생물변환하는 기술을 개발하여 적색소 생산수율을 획기적으로 개선한다면 홍화재배를 장려하여 재배농가의 소득을 크게 증대시킬 수 있다. 홍화 황색소의 적색소로의 생물변환기술은 본 연구실에서 기초기술이 개발되어 있다. 치자에는 주로 황색소인 crocin등이 함유되어 있으며 청색소 및 적색소는 무색인 geniposide를 생물변환하여 생산하고 있으며, 치자 청색소 및 적색소는 안정성이 뛰어나 식품활용에 크게 유리하여 황색소에 비해 훨씬 고가이나 그 제조기술은 일본에서 개발하여 독점 생산하고 있다. 따라서 치자로부터 청색소 및 적색소를 생물변환하는 기술을 개발한다면 이들 색소의 수입대체효과는 물론 치자재배를 장려하여 농가 수입을 크게 증대시킬 수 있을 것으로 사료된다. 치자 청색소 및 적색소의 생물변환 기초기술은 본 연구실에 의해 개발되어 있다.

본과제에서는 홍화(잇꽃)색소성분의 생물변환 기술개발, 생물변환에 의한 치자 청색소 개발, 생물변환 천연식용색소 생산공정 기술개발 및 생물변환 천연식용색소 식품 활용기술 개발에 대하여 체계적인 연구를 수행하였다. 본 연구에서 수행한 색소성분에 대한 체계적인 연구와 생산공정의 연구 및 식품활용연구는 농가소득증대는 물론 식품, 화장품, 섬유제품 등의 품질향상과 국제 경쟁력 강화에 크게 기여할 것으로 생각된다.

### III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구과제 “농가소득 증대를 위한 생물변환 고부가가치 식용색소 소재 개발”은 1) 홍화(잇꽃)색소성분의 생물변환 기술개발, 2) 생물변환에 의한 치자 청색소 개발, 3) 생물변환 천연식용색소 생산공정 기술개발, 4) 생물변환 천연식용색소 식품 활용 기술 개발의 4개 세부과제로 구성되어 있으며 연구내용 및 범위는 다음과 같다.

- 홍화 색소성분 분리 및 생물변환 연구
- 생물변환 색소성분의 안정성 연구
- 치자 색소성분 분리 및 청색소 생물변환 연구
- 치자 청색소생산 연구
- 천연색소 추출공정 연구
- 생물변환 천연색소 생산 공정 연구

- 생물변환 천연색소의 모델식품 특성 연구
- 생물변환 천연색소의 식품활용 연구

#### IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

##### 1. 연구개발 결과

본 연구개발 과제 “농가 소득 증대를 위한 생물변환 고부가가치 식용색소 소재 개발”은 1) 홍화(잇꽃) 색소성분의 생물변환 기술개발, 2) 생물변환에 의한 치자 청색소 개발, 3) 생물변환 천연식용색소 생산공정 기술개발 및 4) 생물변환 천연식용색소 식품 활용기술개발의 4개 분야의 세부과제로 구성되어 있다. 1), 2)의 과제는 홍화와 치자의 색소 성분 분리 및 각 색소원의 생물변환연구를 수행하였으며, 3)의 과제는 천연색소의 추출공정과 생물변환 천연색소 생산 공정의 연구를 수행하였다. 마지막으로 4)의 과제는 생물변환 천연색소를 이용한 모델식품의 특성과 식품활용에 대한 연구를 수행하였다. 각 세부과제별 주요 연구 결과는 다음과 같다.

제1세부과제 “홍화(잇꽃) 색소성분의 생물변환 기술개발”에서는 홍화에서 두가지의 황색소인 Safflower yellow A와 precarthamin을 분리하고 NMR 분석등을 이용하여 구조를 동정하였으며, 홍화의 색소성분을 분리하여 물리화학적 특성을 조사하였다. 홍화 색소 성분의 생물변환과 생합성 연구에서는 적색소인 carthamin 생합성 효소를 분리하였고, 홍화 생육시기별, 부위별 생물변환 효소수율 연구를 수행하였다. 또한 홍화 생물변환 수율을 증대시키기 위하여 적색소 생합성 효소 활성의 최적 조건을 조사하였고, 생물변환 색소성분의 안정성을 높이기 위하여 생체 고분자를 이용하여 연구를 수행하였다.

제2세부과제 “생물변환에 의한 치자 청색소 개발”에서는 치자(*Gardenia jasminoides*)에 존재하는 무색의 geniposide와 다른 여러 iridoid를 분리하여 동정하였다. Geniposide는  $\beta$ -glucosidase에 의해 가수분해되어 genipin으로 변환이 되는데 이렇게 얻어진 genipin에 여러 가지 아미노산과 반응시켜 다양한 청색소를 얻었으며, 생물변환 청색소를 분리하여 화학적 구조를 규명하였다. 또한 청색소 성분 생물변환 반응기작에 대한 연구를 수행하였으며, 청색소 성분의 물리화학적 특성을

연구하였다.

제3세부과제 “생물변환 천연식용색소 생산공정 기술개발”에서는 생물변환 천연 식물색소 생산 공정 기술개발과 관련되어 1차 년도에서는 식물체 시료조건의 추출반응에 미치는 영향연구, 색소 추출 용매의 선정연구, 선정 추출용매에 대한 추출반응 연구, 추출반응기 및 공정연구 등을 수행하였고 2차 년도에서는 공정의 운영방법 연구, 종합공정 시스템 연구, 식용색소 공정의 실용성 조사 및 경제성 재평가, 색소 생산 시스템의 scale-up 연구 등을 수행하였다.

협동연구과제 “생물 변환 천연 식용 색소의 식품활용 기술 개발”에서는 홍화 황색소와 청색소를 첨가한 기능성 음료의 안정성, 기호도 및 관능적 특성을 조사하였고, 홍화 적색소의 유화 식품 모델에서의 안정성을 연구하였다. 반 고형 식품 모델인 젤리에 황색소와 치자 청색소를 활용하여 관능적 최적 조건을 조사하고 저장 안정성을 연구하였다. 또한, 전통 한과류인 다식과 과편의 치자 청색소 및 홍화 황색소 첨가의 최적 조건을 각각 연구하고, 저장 안정성 및 관능적 특성을 연구하였다.

## 2. 활용에 대한 건의

본 연구에서 이루어진 연구결과의 일부는 산업현장에서 식용천연색소생산에 직접 이용될 수 있는 기술로서 활용이 가능하며 개발된 천연 식용색소를 이용한 식품 산업에서는 그 효용이 클 것이라고 생각된다. 다음의 추가적인 연구가 이루어진다면 보다 효율적인 천연식용색소 생산기술활용이 이루어 질 것으로 사료된다.

- 가) 홍화 적색소 생합성 효소의 대량발현기술 개발
- 나) 치자로부터 황색소, 청색소, 녹색소 및 적색소 변환기술 개발
- 다) 치자로부터 얻어진 다양한 색소원 활용기술 개발 (식품활용 등)
- 라) 천연색소 개발을 위한 생물변환 공정의 scale-up system 개발
- 마) 홍화 세포의 조직배양을 통한 생물변환 적색소의 개발
- 바) 생물변환 천연 색소의 기능성 음료 활용기술 개발
- 사) 전통한과의 생물변환 천연색소 활용을 통한 고부가가치 상품기술 개발



## SUMMARY

1. Development of a bioconversion technique for the pigments of the petals of safflower (*Carthamus tinctorius*).
  - 1) Isolation and identification of yellow pigments from petals of safflower and isolation of carthamin.
  - 2) Study on physicochemical properties and stabilities of pigments from the petals of safflower
  - 3) Investigation of optimal conditions of carthamin biosynthetic enzymes.
  - 4) Study on the biosynthesis of carthamin from the petals of safflower.
  
2. Development of blue pigments from Gardenia by bioconversion techniques.
  - 1) Isolation of geniposide and other iridoids from *Gardenia jasminoides*.
  - 2) Structure determination of geniposide and biotransformation of *Gardenia* blue pigments.
  - 3) Stability and functionality study of *Gardenia* blue pigments.
  - 4) Isolation, structural determination and characterization of the intermediates of *Gardenia* blue pigments.
  
3. Development of production processes for the natural pigments by bioconversion techniques.
  - 1) Study on pigment extraction from plant sources.
  - 2) Study on the reaction processes and extraction reactors.
  - 3) Study on the process operation and the system of integral processes.
  - 4) Evaluation of practicality and economics on the pigment production processes.
  - 5) Study on the scale up systems for the pigment production.

4. Development of utilization of natural food colorants by bioconversion techniques.

1) Sensory characteristics of model functional beverages containing bioconverted Gardenia blue and Safflower yellow pigments.

2) Effect of emulsion state on the physical properties of Carthamus red pigment.

3) Physicochemical characteristics of Dasik with bioconverted Gardenia blue pigments.

4) Effects of Safflower yellow on sensory characteristics of gellatin jelly and starch gel-Kwapyun.

## CONTENTS

Chap. 1. Introduction .....	10
Chap. 2. Development of a bioconversion technique for the pigments of petals of safflower ( <i>Carthamus tinctorius</i> ). .....	26
Chap. 3. Development of blue pigments from Gardenia by bioconversion techniques. ....	44
chap. 4. Development of production processes for the natural pigments by bioconversion techniques. ....	70
Chap. 5. Development of utilization of natural food colorants by bioconversion techniques. ....	94

# 목 차

제 1 장 서 론 .....	10
제1절 연구개발의 목적과 중요성 .....	10
제2절 연구개발의 내용 범위 .....	20
제3절 연구성과 .....	23
제 2 장 홍화(잇꽃) 색소성분의 생물변환 기술개발 분야 .....	26
제1절 서 설 .....	26
제2절 연구결과 .....	26
제 3 장 생물변환에 의한 치자 청색소개발 분야 .....	44
제1절 서 설 .....	44
제2절 연구결과 .....	44
제 4 장 생물변환 천연식용색소 생산공정 기술개발 분야 .....	70
제1절 서 설 .....	70
제2절 연구결과 .....	70
제 5 장 생물변환 천연식용색소 식품활용 기술개발 분야 .....	94
제1절 서 설 .....	94
제2절 연구결과 .....	95

# 제 1 장 서 론

## 제 1 절 연구개발의 목적과 중요성

색소는 천연 또는 합성색소가 있으며 식품, 화장품 및 의류염색용으로 사용되고 있다. 합성색소는 착색률이 높고 안정하며 가격이 저렴하여 광범위하게 사용되어 왔으나 대부분이 발암성을 갖는 등 유독하여 사용이 제한되고 있다. 우리나라에서는 전통적으로 100여가지 재배 또는 야생식물로부터 식용 또는 염색용으로 색소를 얻어 왔으나 합성색소의 등장으로 전통색소 생산의 맥이 거의 끊어지고 있다. 최근 급격한 소득증가로 색소의 안전성에 대한 인식이 새로워지고 있으며 우리나라 고유의 격조있는 색조에 대한 욕구가 증대되고 있고, 많은 천연색소는 살균, 항염 등 생리활성이 있으며 안전하여 식품 및 화장품용으로 큰 잠재적 수요가 있다. 우리나라에서 현재 허용된 식용천연색소는 cochineal(연지충) 적색소, 비트레드, 심황색소, 홍국 황색소 및 적색소, 홍화 황색소 및 적색소, 치자 황색소, 청색소, 및 적색소등이 있다. 세계적으로 식용색소 및 염료의 매출액은 약 80 억불이며 우리나라에서는 연간 1 억불 이상 전량 수입에 의존하고 있다. 식용천연색소의 세계시장은 현재 약 2 억불 이상이므로 우리나라에서는 약 300억원이상의 수요가 있는것으로 추정되며 거의 대부분 완제품 형태로 수입되고 있다. 국내에서는 몇몇 중소기업에서 원료를 수입하여 식용천연색소를 생산 판매하고 있으나 생산된 색소의 품질이 조악하여 식품제조 회사로부터 외면당하고 있다. 더구나 최근 색소원료의 국제가격이 급등하여 주요 적색소 원료인 cochineal의 경우 1995년 kg당 10불이하에서 1997년에는 100불 이상으로 10배이상 급상승하였다. 적색소의 경우 우리나라는 전통적으로 홍화(잇꽃)적색소가 식품, 화장품(연지), 및 의류염색용으로 사용되어 왔으나 아직도 제조기술이 개발되어 있지않다.

홍화에는 총 색소함량중 90%이상이 황색소 구성되어 있으며 가격이 훨씬 비싼 적색소는 소량 존재한다. 따라서 홍화 황색소를 적색소로 생물변환하는 기술을 개발하여 적색소 생산수율을 획기적으로 개선한다면 홍화재배를 장려하여 재배농가의 소득을 크게 증대시킬 수 있다. 홍화 황색소의 적색소로의 생물변환기술은 본 연구실

에서 기초기술이 개발되어 있다. 치자에는 주로 황색소인 crocin등이 함유되어 있으며 청색소 및 적색소는 무색인 geniposide를 생물변환하여 생산하고 있으며, 치자 청색소 및 적색소는 안정성이 뛰어나 식품활용에 크게 유리하여 황색소에 비해 훨씬 고가이나 그 제조기술은 일본에서 개발하여 독점 생산하고 있다. 따라서 치자로부터 청색소 및 적색소를 생물변환하는 기술을 개발한다면 이들 색소의 수입대체효과는 물론 치자재배를 장려하여 농가 수입을 크게 증대시킬 수 있을 것으로 사료된다. 치자 청색소 및 적색소의 생물변환 기초기술은 본 연구실에 의해 개발되어 있다.

## 1. 연구개발의 필요성

### 가. 기술적 측면

우리나라에서는 전통적으로 수많은 식물로부터 식용 및 의류염색용 색소를 얻어 왔으며 따라서 풍부한 색소자원이 있다. 천연식용색소자원으로는 황색소 자원이 가장 풍부하여 가격이 저렴하며 적색소 및 청색소 자원은 희귀하여 훨씬 고가이다. 적색소로 가장 많이 사용되는 것은 cochineal 에서 추출한 carmin 색소로 전량 수입에 의존하고 있으며 최근 수입가격이 10배이상 급등하였다. 우리나라에서 생산되어 주로 사용되어온 적색소로는 홍화(잇꽃)적색소인 carthamin이 있으며 효율적인 생산기술만 개발된다면 충분한 경제성이 있다고 생각된다. 홍화에는 총 색소함량중 90% 이상이 황색소 구성되어 있으며 부가가치가 훨씬 높은 적색소는 비교적 소량이 존재한다. 홍화 적색소 carthamin 은 황색소인 saflamin A, safflower yellow A, safflower yellow B 및 precarthamin 으로부터 생합성 될 것으로 여겨지고 있다(그림 1-1). 따라서 홍화 황색소를 적색소로 생물변환하는 기술을 개발하여 적색소 생산수율을 획기적으로 개선한다면 홍화색소의 부가가치를 높이게 되므로 홍화재배를 장려하여 재배농가의 소득을 크게 증대시킬 수 있다.

이러한 홍화 황색소의 적색소로의 생물변환기술은 본 연구실에서 기초기술이 이미 개발되어 있다. 치자는 우리나라에서 전통적으로 황색소원으로 활용되어 왔으며 식품 및 의류 염색용으로 오랫동안 이용되어 왔다. 서양에서는 천연식용 황색소로 주로 annato 와 saffron 을 이용하여 왔으나 최근 이들의 가격이 급상승하여 이를 대체할 천연색소자원 발굴이 시급히 요청되고 있는 추세이다. 지금까지 식용에 적합

한 천연 청색소원은 대단히 제한되어 있으며 따라서 천연청색소는 대단한 고부가가치 소재이다. 치자에는 황색소인 crocin이외에 청색소로 생물변환 가능한 geniposide가 대량 함유되어 있으며 일본에서는 이를 이용하여 청색소와 적색소를 생산하고 있다. 치자 청색소 및 적색소는 안정성이 뛰어나 식품활용에 널리 이용되고 있으나 이들은 일본에서 개발하여 독점 생산하고 있다. 따라서 치자로부터 청색소 및 적색소를 생물변환하는 기술을 개발한다면 이들 색소의 수입대체효과는 물론 치자를 대량 재배하여 재배농가의 소득을 크게 증대시킬 수 있다. 치자 청색소의 생물변환 기술은 국내에서 최초로 본 연구실에 의해 개발된 바 있다.

#### 나. 경제·산업적 측면

현재 색소 및 염료는 주로 유기합성법으로 생산되고 있고 세계시장 규모는 80 억불에 달하며 우리나라는 연간 약 1 억불 이상 수입하고 있다. 식용천연색소의 세계시장은 현재 약 2 억불 이상이며, 일본의 경우 1997년 약 500 억엔의 수요가 있었다. 우리나라에서는 1997년 약 300억원 정도의 식용천연 색소수요가 있는 것으로 추정되며 대부분을 수입에 의존하고 있다. 천연색소는 합성색소에 비해 유독하지 않으므로 청량음료, 과자, 유제품 및 육제품 등 식품용으로 큰 잠재적 수요가 있다. 천연색소는 안전성면에서 탁월할 뿐 아니라 살균, 항염 등 생리효과도 있으므로 화장품용으로도 큰 수요가 있다. 천연색소는 우아한 색조를 지니고 있을 뿐 아니라 전통적인 고유의 격조있는 색조에 대한 욕구가 증대됨에 따라 의류염색용으로의 사용이 크게 증대될 것이다. 따라서 우리나라 전통의 색소식물자원으로부터 천연색소를 염가로 대량생산 한다면 농가소득증대는 물론 식품, 화장품, 섬유제품 등의 품질향상과 국제 경쟁력 강화에 크게 기여할 것이다. 본 연구에서는 홍화 및 치자로부터 생물변환기술에 의해 고부가가치를 지닌 홍화 적색소와 치자 청색소 및 적색소를 고수율로 생산할 수 있게 하므로써 이들 작물을 대량재배하여 농가소득을 획기적으로 증대시키고자 한다.

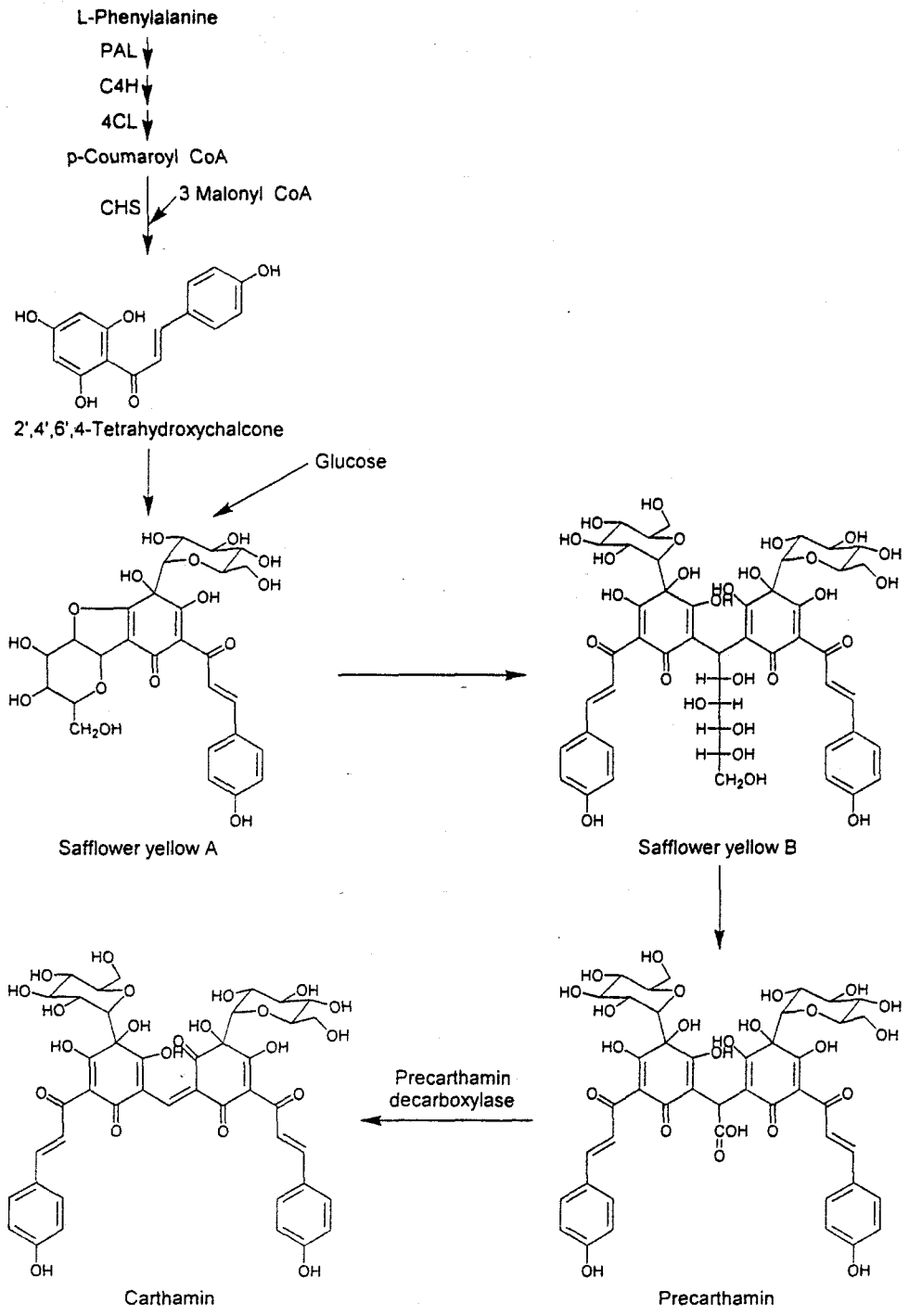


Fig. 1-1. Proposed biosynthetic pathway of carthamin



## 다. 사회·문화적 측면

경제성장에 따른 소득증대로 국민소비형태가 고급화되고 있다. 안전하고 고유의 격조있는 색조에 대한 인식이 높아짐에 따라 천연색소에 대한 사용욕구가 증대되고 있다. 그동안 생산 및 사용기법의 맥이 끊어지다시피 되고 있는 우리나라 고유의 전통을 되살리는 면에서도 천연식용색소의 과학화는 절실한 과제이다.

### 2. 국내외 관련기술의 현황과 문제점

합성색소는 이용이 편리하고 가격이 저렴하기 때문에 이제까지 많이 사용되어 왔으나 발암성 등 안정성에 문제가 있어 점차 사용이 제한되는 추세이다. 구미지역에서 천연색소 연구는 annato를 중심으로한 carotenoid계 색소, 포도 및 과일중심으로 추출된 anthocyanin 색소, beetroot에 대량함유된 betanin색소, 선인장에 서식하는 곤충인 cochineal에 대량 함유된 carmine 색소, 심황(turmeric)색소인 curcumin을 중심으로 활발히 진행되어 왔으며 다양한 제품이 제조되어 식품공업에 널리 사용되고 있다. 일본지역에서는 치자의 황색소 및 적색소, 지치의 적자색 색소인 shikonin, 홍화의 황색소 safflor 및 적색소 carthamin 등에 관하여 이루어져 왔으며, 이들 색소는 일본 Mitsui Chemical, Alpus 제약회사등에서 성공적으로 산업화되어 화장품 및 식품에 첨가 판매되고 있다. 우리나라에서는 천연식용색소를 전량 수입에 의존해 오고 있었으나 최근 명신화성(주)과 서도화학(주)를 중심으로 cochineal 적색소, 치자 및 홍화 황색소등을 생산, 판매하고 있다. 그러나 생산기술이 취약하여 다양한 색조를 가진 색소를 생산하지 못하고 있으며 생산된 색소도 색감과 순도가 조악하여 천연색소를 사용하는 식품회사에게 외면당하고 있다. 우리나라는 유사 이래 식물로부터 각종 염료를 생산하여 식용 및 의류염색으로 사용하여 왔으나 이에 대한 체계적이고 과학적인 연구가 거의 없어 이 분야의 현 기술 상태는 매우 취약하다. 특히 우리나라에서 대량 재배가 가능한 홍화 및 치자로부터 홍화 적색소와 치자 청색소 및 적색소의 제조기술은 대단히 취약하다. 전국적으로 일부 농가에서 수공업 형태로 천연색소를 추출하여 염색 및 식용으로 사용하고 있으나 색소

성분은 물론 공정상의 과학화에 관한 연구도 전혀 이루어지고 있지 않다. 천연색소는 생활수준의 향상과 함께 그 수요가 크게 신장될 것으로 예상되고 있으나 기술 집약적인 산물이므로 현재도 선진국에서만 독점 생산되고 있다.

본 연구진에서는 1995년부터 농특사업의 일환으로 국내에서 육종된 유색미(적미 또는 흑미)로부터 안토시아닌 색소를 분리동정하여(Yoon, H.-H., Paik, Y.-S., Kim, J.-B., and Hahn, T.-R. "Identification of Anthocyanins from Korean Pigmented Rice" *Agr. Chem. Biotech.*, 38, 581-583(1995)) 유색미 안토시아닌 색소 주성분이 cyanidine-3-glucoside 화학구조임을 규명하였다(Cho, M.-H., Paik, Y.-S., Yoon, H.-H., and Hahn, T.-R. "Chemical Structure of the Major Color Component from Korean Pigmented Rice" *Agr. Chem. Biotech.*, 39, 304-308(1996)). 분리된 안토시아닌 cyanidine-3-glucoside 의 열안정성을 여러조건의 pH에서 측정하였고(Cho, M.-H., Yoon, H.-H., and Hahn, T.-R. "Thermal Stability of the Major Color Component, Cyanidin 3-glucoside, from a Korean Pigmented Rice Variety in Aqueous Solution" *Agr. Chem. Biotech.*, 39, 245-248(1996)), 실제의 식품용용을 목적으로 유색미로부터 총 안토시아닌을 분리하여 물리화학적 안정성을 규명하였다(Yoon, J.-M., Cho, M.-H., Hahn, T.-R., Paik, Y.-S., and Yoon, H.-H. "Physicochemical Stability of Anthocyanins from Korean Pigmented Rice Variety as Natural Food Colorants" *Korean J. of Food Sci. and Tech.*, 29, 211-217(1997)). 유색미의 총안토시아닌의 식품용용시 안정성을 높이기 위해 copigmentation 효과를 측정하였다(Yoon, J.-M., Hahn, T.-R., and Yoon, H.-H. "Effect of Copigmentation on the Stability of Anthocyanins from Korean Pigmented Rice Variety" *Korean J. Food Sci. and Tech.*, 30, 733-738 (1998)).

홍화(잇꽃)의 적색소인 carthamin 을 효과적으로 분리정제하는 방법을 개발하였고 분리된 적색소 carthamin의 화학구조를 동정하였다(Kim, J.-B., Cho, M.-H., Hahn, T.-R., and Paik, Y.-S. "Efficient Purification and Chemical Structure Determination of Carthamin from *Carthamus tinctorius*" *Agr. Chem. Biotech.*, 39, 501-505(1996)). 분리정제된 carthamin 의 물리적 안정성을 여러조건의 pH 및 온도에서 측정하였다(Kim, J.-B. and Paik, Y.-S. "Stability of Carthamin from *Carthamus tinctorius* in Aqueous Solution : pH and Temperature Effect" *Ach.*

Pharmacol. Res., 20, 643-646(1997)). 홍화로부터 carthamin 을 대량추출 생산하는 방법을 연구하여 최적 조건을 확립하였고 (Hong, S.-H., Park, S.-H., Ma, S.-D., Paik, Y.-S., Hahn, T.-R., and Chung, I.-S. "Process Optimization for the Production of Natural Food Colors: 1. Extraction of Carthamin from Safflower(*Carthamus tinctorius* L.)" Food Eng. Progress, 1, 90-102 (1997)), 생산된 적색소를 식품에 직접 응용하기 위하여 여러가지 화학적 물리적 안정성을 규명하였다. 한편 홍화로부터 새로운 구조를 가진 적색소 및 오렌지 색소를 분리하여 화학구조를 규명중이며, 이 두 색소는 물리화학적으로 대단히 안정함을 알 수 있었다.

지치(자초)의 적자색소인 shikonin을 6종류 분리하여 그 화학구조를 동정하였고 분리된 각 shikonin 색소의 물리화학적 안정성을 규명하였다(Cho, M.-H., Paik, Y.-S., and Hahn, T.-R. "Physical Stability of Shikonin Derivatives from the Roots of *Lithospermum erythrorhizon* Cultivated in Korea" J. Agr. Food Chem., 47, 4117-4120(1999)). 한편 지치에서 새로운 shiconin 유도체를 분리하여 그 화학구조가 propionyl shikonin임을 규명하였다(Cho, M.-H., Paik, Y.-S., and Hahn, T.-R. "Propionylshikonin from the Roots of *Lithospermum erythrorhizon*" Arch. Pharm. Res., 22, 414-416(1999)). 또한 치자로부터 청색소를 생산하기 위해 jeniposide 를 분리정제하여, 청색소로 변환되는 조건을 검토하였다(Lee, J.-Y. and Paik, Y.-S. (1997) "Isolation and Transformation of geniposide from *Gardenia jasminoides*" Annual Meeting of Korean Chemical Society, Taegu, Korea, October 24-25.). 치자로부터 분리정제한 geniposide를 효소반응을 통하여 genipin을 생산하는 방법과, 각종 아미노산과 반응시켜 청색소를 생산하는 방법을 확립하였다(그림 1-2).

홍화로부터 황색소를 적색소로 생물변환하기 위해 관련효소를 부분적으로 분리정제하여 그 특성을 규명하였다(Cho, M.-H. and Hahn, T.-R.(1998) "Purification and Characterization of a Biosynthetic Enzyme for Carthamin from the Petals of Safflower (*Carthamus tinctorius* L.)" Annual Meeting of Korean Agricultural Society, Taegu, Korea, May 29-30). 홍화의 황색소인 precarthamin을 분리한 효소와 반응시켜 적색소를 얻었으며, 효소에 의해 합성된 색소가 홍화의 적색소인 carthamin임을 확인 하였다(그림 1-3). 따라서 홍화와 치자의 생물변환 기본기술은 본 연구진에

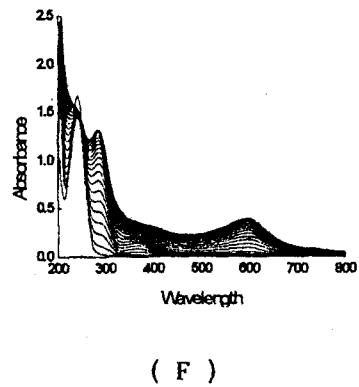
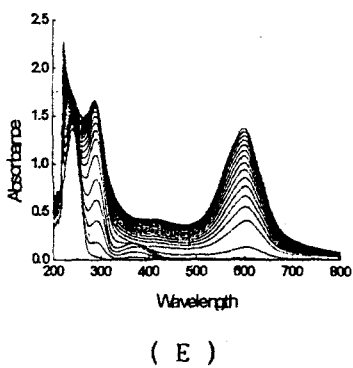
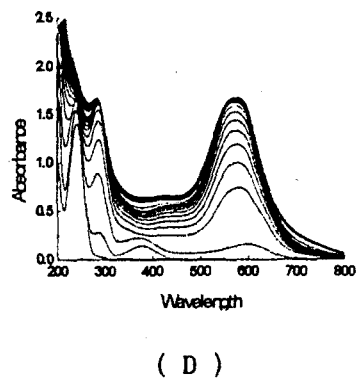
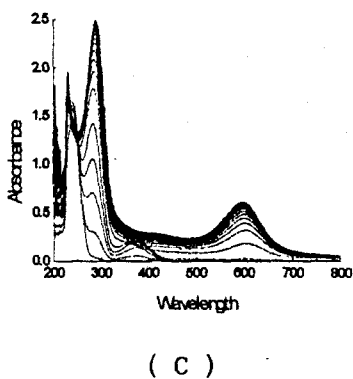
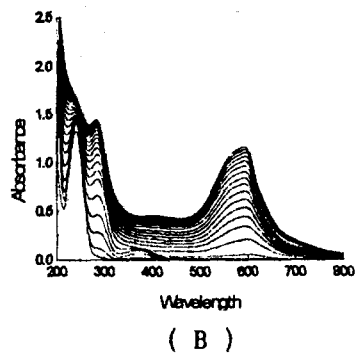
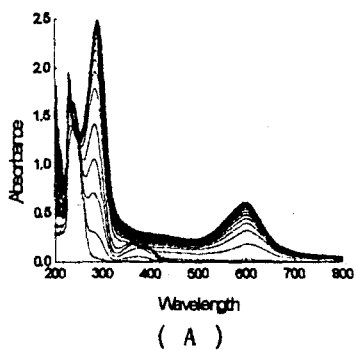


Fig. 1-2. UV/Vis spectra for the formation of blue pigment from genipin with amino acids in 100mM phosphate buffer, pH 7.0 at 70°C. (Scanning interval : 5min) (A) Glycine, (B) Alanine, (C) Histidine, (D) Lysine, (E) Phenylalanine, (F) Glutamate

의해 이미 확보된 상태이며 앞으로 본 연구를 수행한다면 고부가가치 색소소재 개발 기술이 확보될 것으로 생각된다.

### 3. 앞으로의 전망

합성색소는 이용이 편리하고 가격이 저렴하기 때문에 이제까지 많이 사용되어 왔으나 발암성 등 안정성에 문제가 있어 식용으로서의 사용이 제한되는 추세이다. 미국, 일본 및 캐나다 등 선진국에서도 식물세포 배양에 의한 천연색소 생산에 많은 연구를 수행해 왔으나 최근 들어 재배농법의 발달 등으로 농업재배 및 직접추출에 의한 천연색소 생산 공정의 경제성이 재고되면서 새로운 색소 작물의 탐색과 직접 추출 공정개발에 주력할 것으로 사료된다. 천연색소의 생합성 경로가 밝혀짐에 따라 고부가가치의 생물변환이 가능하게 되어 색소 재배작물의 경제성이 제고되고 있다. 치자 청색소와 적색소같이 무색의 천연물을 아미노산 또는 펩티드류와 반응시켜 고부가가치를 지닌 식용색소로 변환시킬 수 있게됨에 따라 우리나라 남해안지방에 치자를 대량재배하여 UR대응 경제작물로 육성가능하다.

### 4. 기술도입의 타당성

식용천연색소 소재의 생물변환 및 생산공정기술은 기술도입이 불가능함.

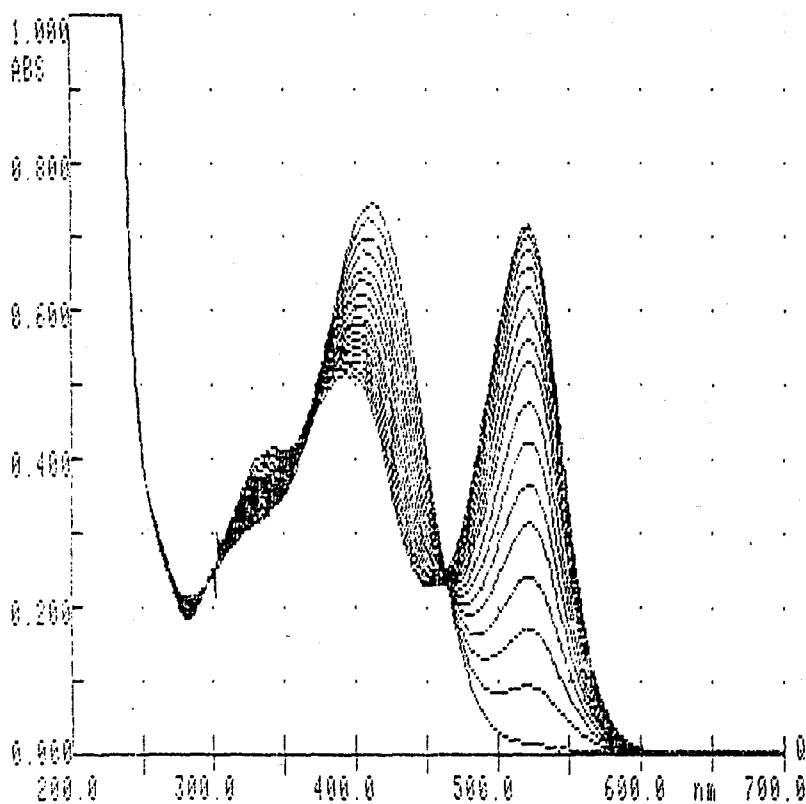


Fig. 1-3. UV/Vis spectral changes of enzymatic conversion of precarthemin to carthamin. Carthamin was produced from precarthemin by the purified enzyme from the yellow petals of safflower in 50 mM citrate buffer, pH 5.0.

## 제 2 절 연구개발의 내용과 범위

### 1. 총괄 목표 및 내용

구 분	연구개발목표	연구개발 내용 및 범위
1차년도 (1998)	기술개발 초기단계 : 천연색소 생물변환 연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 1세부 : 홍화 색소성분분리 및 생물변환연구</li> <li>· 2세부 : 치자 색소성분 분리 및 청색소 생물 변환 연구</li> <li>· 3세부 : 천연색소 추출공정 연구</li> <li>· 협 동 : 생물변환 천연색소의 모델식품 특성 연구</li> </ul>
2차년도 (1999)	기술개발 단계 : 생물변환 천연색소 기술개발연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 1세부 : 생물변환 색소성분의 안정성 연구</li> <li>· 2세부 : 치자 청색소생산 연구</li> <li>· 3세부 : 생물변환 천연색소 생산 공정 연구</li> <li>· 협 동 : 생물변환 천연색소의 식품활용 연구</li> </ul>

## 2. 과제별 목표 및 내용

### 가) 제1세부과제 : 홍화(잇꽃) 색소성분의 생물변환 기술개발

구 분	연구 개발 목표	연구 개발 내용 및 범위
1차년도 (1998)	홍화 색소성분 분리 및 생물변환 연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 홍화 황색소 분리동정 및 적색소의 분리</li> <li>· 홍화 색소성분의 물리화학적 특성연구</li> <li>· 홍화 색소성분의 생물변환 연구</li> <li>· 홍화 색소성분의 생합성 연구</li> </ul>
2차년도 (1999)	생물변환 색소성분의 안정성 연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 홍화 색소성분의 물리화학적 안정성 연구</li> <li>· 홍화 생육시기별, 부위별 생물변환 효소수율 연구</li> <li>· 홍화 적색소 생물변환 수율증대 연구</li> <li>· 생물변환 색소성분의 안정성 연구</li> </ul>

### 나) 제2세부과제 : 생물변환에 의한 치자 청색소 개발

구 분	연구 개발 목표	연구 개발 내용 및 범위
1차년도 (1998)	치자 색소성분 분리 및 청색소 생물변환 기초연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 치자 색소성분 및 iridoid 화합물의 분리</li> <li>· 치자 색소성분의 구조동정</li> <li>· 생물변환에 의한 치자 청색소생산 연구</li> <li>· 치자 청색소의 안정성 및 기능성 연구</li> </ul>
2차년도 (1999)	치자 청색소생산 연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 치자 청색소 생물변환 반응기작 연구</li> <li>· 치자 청색소의 분리 및 화학구조 규명</li> <li>· 분리된 청색소 성분의 물리화학적 특성연구</li> </ul>



다) 제3세부과제 : 생물변환 천연식용색소 생산공정 기술개발

구 분	연구개발목표	연구개발 내용 및 범위
1차년도 (1998)	홍화 및 치자색소 추출공정 연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 식물체 시료조건의 추출반응에 미치는 영향 연구</li> <li>· 색소추출용매의 선정연구</li> <li>· 선정추출 용매에 의한 추출반응의 연구</li> <li>· 추출 반응기 및 공정 연구</li> </ul>
2차년도 (1999)	생물변환 천연색소 생산 공정 연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 공정의 운영 방법 연구</li> <li>· 종합공정 시스템 연구</li> <li>· 색소생산 공정의 실용성 조사</li> <li>· 식용색소 경제성 재평가</li> <li>· 색소생산 시스템의 Scale-up연구</li> </ul>

라) 협동과제 : 생물변환 천연 식용색소 식품 활용기술 개발

구 분	연구개발목표	연구개발 내용 및 범위
1차년도 (1998)	생물변환 천연색소의 모델식품 특성 연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 홍화 황색소, 적색소의 모델 식품에서의 관능 특성 연구</li> <li>· 치자 청색소의 모델식품에서의 관능 특성 연구</li> </ul>
2차년도 (1999)	생물변환 천연색소의 식품활용 연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 홍화 황색소의 기능성 음료 제조 연구</li> <li>· 치자 청색소의 제과류 첨가 활용 연구</li> <li>· 홍화색소들의 한과류 첨가 활용 연구</li> </ul>

### 제 3 절 연구성과

본 연구개발 과제 “농가소득 증대를 위한 생물변환 고부가가치 식용색소 소재 개발”은 1) 홍화(잇꽃) 색소성분의 생물변환 기술 개발 2) 생물변환에 의한 치자 청색소 개발 3) 생물변환 천연식용색소 생산공정 기술 개발 4) 생물변환 천연 식용색소 식품 활용기술 개발의 4개분야 세부과제로 구성되어 있다. 본 과제는 2년간 당초 계획한 연구내용을 성공적으로 수행하여 7편의 연구논문(해외학술지 3편)을 학술지에 발표하였고 18편의 논문을 학술대회에서 발표하였다. 각종 학술지 및 학술대회에 발표한 연구결과는 다음과 같다.

#### 학술지 발표 논문

- 1) Man-Ho Cho, Young-Sook Paik, and Tea-Ryong Hahn (2000) “Enzymatic Conversion of Precarthamin to Carthamin by Purified Enzyme from the Yellow Petals of Safflower” J. Arg. Food Chem., 48, 3917-3921.
- 2) Man-Ho Cho and Tea-Ryong Hahn (2000) “Purification and Characterization of Precarthamin Decarboxylase from the Yellow Petals of *Carthamus tinctorius* L.” Arch. Biochem. Biophys. (in press)
- 3) Lee, C.-M., Hahn, T.-R., and Paik, Y.-S. (2000) “Physical stabilities of the blue pigments formed from geniposide of Gardenia fruits : Effects of pH, temperature and light” J. Arg. Food Chem. (in press)
- 4) 박성길, 조만호, 이윤형, 한태룡, 정인식 (2000) “Geniposide로부터 Genipin으로 생변환을 위한  $\beta$ -Glucosidase의 고정화” 한국산업식품공학회지, (in press)
- 5) 이승룡, 장규섭, 이석건, 윤혜현, 한태룡 (2000) “유화조건이 홍화 적색소의 물성에 미치는 영향”, 농업과학연구, 27(1), 54-62.
- 6) 추수진, 정미옥, 조일경, 윤혜현 (1999) “홍화 황색소를 이용한 모델음료의 특성” 충남생활과학연구지, 12, 87-97.
- 7) 홍성현, 박성길, 이종민, 한태룡, 백영숙, 정인식 (1999) “생물변환 천연식용색소 생산공정기술개발 : I. 홍화 황색소의 안정성에 미치는 pH 및 온도의 영향” 생명자원과학연구원 연구논문집, 20, 4-7.

학술회의 발표논문 :

- 1) Man-Ho Cho, Eun-Hye Shin, Young-Sook Paik and Tae-Ryong Hahn (1998) " Purification of Carthamin Synthesizing Enzyme from Yellow Petals of Safflower and Enzymatic Synthesis of Carthamin" 한국농화학회, May 29.
- 2) Man-Ho Cho, Young-Sook Paik and Tae-Ryong Hahn (1998) "Biochemical Properties of a Carthamin Synthesizing Enzyme from Yellow Petals of *Carthamus tinctorius*" 한국생화학회, Oct. 15.
- 3) Man-Ho Cho and Tae-Ryong Hahn (1999) "Purification and Characterization of Precarthamin Decarboxylase from the Yellow Petals of *Carthamus tinctorius*" 한국농화학회, May 20.
- 4) Man-Ho Cho and Tae-Ryong Hahn (1999) "Characterization and chemical modification of precarthamin decarboxylase from yellow petals of *Carthamus tinctorius*" 6th IUBMB conference, Oct. 10.
- 5) 박지은, 백영숙 (1999) "Iridoids from *Gardenia Jasminoides*" 83rd Annual meeting of the chemical society, KyungHee Univ., Suwon, Korea, April 23-24.
- 6) 이창민, 백영숙 (1999) "Stability of blue pigments transformed from Gardenia Fruit : pH, temperature and light effect" 83rd Annual meeting of the chemical society, KyungHee Univ., Suwon, Korea, April 23-24.
- 7) 이창민, 백영숙 (2000) "Red pigments transformed from Gardenia Fruits" 85th Annual meeting of the chemical society, KookMin Univ., Seoul, Korea, April 21-22.
- 8) 박지은, 백영숙 (2000) "Isolation and chemical identification of reaction intermediates for Gardenia blue pigments" 85th Annual meeting of the chemical society, KookMin Univ., Seoul, Korea, April 21-22.
- 9) 마상동, 이종민, 박성길, 홍성현, 한태룡, 정인식 (1999) "생물변환 색소 생산 공정개발 : I. 홍화 황색소 추출 및 안정성 연구" 춘계 식품관련학회, 서울, June 5.
- 10) 박성길, 조만호, 한태룡, 백영숙, 정인식 (1999) "생물변환 색소생산 공정개발 : II. 생변환에 의한 치자색소 생산연구" 춘계 식품관련학회, 서울, June 5.

- 11) Sung-Gil Park and In Sik Chung (1999) "Biotransformation Process for the Production of Pigments" The 4th China-Korea Regional Biotechnology Symposium, Myongji University, Yong-In, Korea, August 18.
- 12) Sung-Gil Park, Man-Ho Cho, Tae-Ryong Hahn, Young-Sook Baik and In Sik Chung (1999) "Enzyme mediated bio-transformation process : II. Bio-transformation process of the natural pigment from the *Gardenia jasminoid* and *Carthamus tinctorius*." Young Asian Biochemical Engineer's Community, PuKyung University, Pusan, Korea, August 21.
- 13) Sung-Gil Park, Man-Ho Cho, Tae-Ryong Hahn, Young-Sook Baik and In-Sik Chung (1999) "Production of Pigments by Biotransformation Process" 농업 생물신소재 연구센터 연례 심포지움, 수원, August 28.
- 14) 윤혜현, 조형미, 최성연, 최순희, 한태룡 (2000) "홍화황색소를 첨가한 젤라틴 젤리의 관능특성", 1999년 봄 정기 식품관련학회-식품과학회, 서울, 한국, August 5.
- 15) 윤혜현, 정미옥, 조일경, 추수진, 한태룡 (2000) "홍화황색소를 첨가한 모델 음료의 특성", 1999년 봄 정기 식품관련학회-한국식품영양과학회, 서울, 한국, August 5.
- 16) 윤혜현, 정미옥, 조일경, 추수진, 한태룡 (2000) "치자청색소를 첨가한 모델 음료의 특성", 1999년 한국식품과학회 추계 학술발표회, 서울, 한국, Oct. 30.
- 17) 조형미, 최성연, 최순희, 한태룡, 윤혜현 (2000) "치자 청색소를 첨가한 녹말 다식의 특성", 1999년 한국식품영양과학회 추계학술발표회, 창원, 한국, Dec. 20.
- 18) 추수진, 윤혜현, 한태룡 (2000) "홍화 황색소 첨가 과편의 관능적 특성", 2000년 식품연합학술발표대회, 서울, 한국, Dec. 4.

## 제 2 장 홍화(잇꽃) 색소성분의 생물변환 기술 개발

### 제 1 절 서 설

홍화 꽃잎의 총 색소함량 중 90% 이상이 황색소로 구성되어 있으며 황색소보다 희소가치가 있는 적색소는 소량 존재한다. 홍화 적색소인 carthamin은 safflower yellow A, B와 precarthamin으로부터 합성 될것으로 생각되어지며 중요 생합성 효소를 분리하여 활용할 수 있도록 개발한다면 적색소 생산에 획기적인 성장이 있을것으로 생각된다. 이와 더불어 홍화재배를 장려한다면 재배농가의 소득을 크게 증대시킬 수 있을것이다. 본 연구에서는 홍화 색소성분을 분리하여 동정하고 얻어진 각 색소성분의 물리화학적 특성을 연구하였으며, 적색소 생합성에 관여하는 효소를 분리 정제하여 특성을 조사하고 효소 수율 증대를 위한 연구를 수행하였다.

### 제 2 절 연구결과

#### 1. 홍화 색소성분 분리 및 생물변환 연구

##### 가. 홍화 황색소의 분리 동정

홍화로부터 두가지의 황색소를 분리하고 NMR 분석등을 이용하여 구조를 동정하였다.

##### 1) Safflower yellow A

홍화 꽃잎(50 g)을 MeOH:H<sub>2</sub>O(3:1, 240 ml)로 추출한 후 감압농축한 후, 농축액을 Sephadex LH-20 column에 가하고 MeOH:H<sub>2</sub>O(3:1)로 용출하였다. 용출액을 감압농축한 후 preparative TLC를 이용하여 분리하고, 다시 preparative HPLC를 이용하여 분리하였다. 분리된 색소는 NMR을 이용하여 구조를 분석하였다. <sup>1</sup>H NMR spectrum 분석을

통해 분리한 색소는 하나의 chalcone moiety와 두 개의 glucose가 결합되어 있음을 알 수 있었고,  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum과 HMQC spectrum을 분석한 결과 분리한 색소는 safflower yellow A로 동정되었다(Fig. 2-1).

## 2) Precarthamin

홍화의 노란 꽃잎(200 g)을 MeOH(1.5 l)로 24시간 추출하여 여과한 후 1% TFA-acetone(400 ml)으로 추출한다. 추출액을 감압농축한 후 Sephadex LH-20 column에 가하고, 20 - 80%  $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$ (1% TFA 포함)로 용출하였다. Sephadex LH-20 column 분획을 감압농축한 후 preparative HPLC를 이용하여 분리하였다.  $^1\text{H}$  NMR spectrum 분석을 통해 분리한 색소는 두 개의 chalcone moiety와 두 개의 glucose가 결합되어 있음을 알 수 있었고 또한 하나의 carboxyl group이 존재함을 알 수 있었다.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum, HMQC spectrum, HMBC spectrum을 분석한 결과 분리한 색소는 precarthamin으로 결정되었다(Fig. 2-2).

### 나. 홍화 적색소의 분리

홍화 꽃잎을 증류수로 24시간 처리하여 수용성 황색소를 제거하고 공기중에서 건조하였다. 건조한 꽃잎을 분쇄한 후 0.1M  $\text{K}_2\text{CO}_3$  용액으로 추출하고, 여과지로 걸러 추출액을 얻은 후 적정량의 0.5M citric acid를 첨가하고 냉장고에서 12시간 보관한 후 원심분리하였다. 침전된 색소를 MeOH로 녹인 후 감압농축하고 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행하여 홍화 적색소 carthamin을 분리하였다.

### 다. 홍화 색소성분의 물리화학적 특성

분리한 홍화 적색소 carthamin은 최대흡수파장이 251nm와 516nm 이며, molar extinction coefficient는  $5.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  이었다(표 2-1). 또한 황색소 precarthamin과 safflower yellow A의 최대 흡수 파장 및 molar extinction coefficient는 아래 표와 같다.

표 2-1. 홍화 색소성분의 최대흡수파장( $\lambda_{max}$ ) 및 molar extinction coefficient ( $\epsilon$ ).

색 소	최대흡수파장 ( $\lambda_{max}$ , nm)	molar extinction coefficient (at $\lambda_{vismax}$ , $M^{-1}cm^{-1}$ )
Carthamin	251, 516	$5.3 \times 10^4$
Precarthamin	238, 406	$5.9 \times 10^4$
Safflower yellow A	225, 402	-

#### 라. 홍화 색소성분의 생물변환 연구

홍화 황색소 precarthamin을 홍화의 노란 꽃잎으로부터 분리한 효소와 50 mM citrate buffer, pH 5.0 조건에서 1시간 동안 반응한 후, 반응액을 butanol로 분획하여 적색소를 얻었다. 얻어진 적색소는 TLC상에서 carthamin과 동일한 이동성을 나타내었으며, HPLC에서도 동일한 retention time을 보였다. 또한 효소반응에 의해 얻어진 적색소는 홍화 꽃잎으로부터 분리한 carthamin과 동일한 UV/Vis spectrum을 보였다(그림 2-3). 따라서 효소반응에 의해 얻어진 적색소가 carthamin임을 확인할 수 있었다. 또한 홍화 유묘의 단백질 분획도 황색소 precarthamin을 적색소 carthamin으로 변환시키는 활성을 가지고 있음을 확인하였다.

#### 마. 홍화색소성분의 생합성 연구

홍화에는 safflower yellow A, B, safflomin A, B, C, precarthamin 등의 황색소와 적색소인 carthamin이 함유되어 있다. 황색소들은 색소생합성 과정의 중간 산물로 생각되며, 생합성의 마지막 단계는 황색소인 precarthamin이 적색소인 carthamin으로 전환되는 과정이라고 생각된다. 본 연구에서는 홍화 꽃잎에서의 색소 생합성의 마지막단계인 carthamin의 합성에 관여하는 효소를 분리하였다.

홍화의 노란꽃잎을 50mM Tris buffer (pH 7.5)로 추출하고, 추출액을 ammonium sulfate 분획, DEAE Sepharose, Bio-Gel A-0.5m, Macro-Prep Ceramic

Hydroxyapatite column chromatography를 수행하여 적색소 carthamin 생합성 효소를 분리하였다(Fig. 2-4). 홍화의 노란꽃잎으로부터 분리한 carthamin 생합성 효소의 분자량은 SDS PAGE상에서 33,000으로 결정되었다.

## 2. 생물변환 색소성분의 안정성 연구

### 가. 홍화 색소 성분의 물리화학적 안정성 연구

홍화의 꽃잎에는 황색소인 safflower yellow A, safflower yellow B등이 존재하며, 각 성분을 분리하기 위하여 노란꽃잎(200 g)을 MeOH(1.5 l)로 24시간 추출하여 여과한 후 1% TFA-acetone(400 ml)으로 추출한다. 추출액을 감압농축한 후 Sephadex LH-20 column에 가하고, 20 - 80% CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O(1% TFA 포함)로 용출하였다. Sepadex LH-20 column 분획을 감압농축한 후 preparative HPLC를 이용하여 분리하였다. 분리된 색소 성분을 pH 2 (50mM phosphate buffer), pH 7 (50mM MOPS buffer), pH 10 (50mM CAPS buffer)의 조건에서 열안정성을 조사하였다. 90℃, 80℃, 70℃의 온도 조건에서 3분 간격으로 두 황색소 성분의 최대 파장에서 흡광도를 측정하여 반응속도와 반감기를 구하였으며(표 2-2), 이들 결과로부터 활성화 에너지를 도출하였다(표 2-3).



표 2-2. 홍화 황색소 성분의 분해속도상수와 반감기

	Temp. (°C)	Rate constant ( $s^{-1}$ , $\times 10^{-9}$ )			Half-life(h)		
		pH2	pH7	pH10	pH2	pH7	pH10
pre-carthamin	90	14.9	4.58	18.7	1.29	4.20	1.03
	80	7.72	2.77	8.35	2.50	6.96	2.31
	70	4.18	1.61	7.12	4.60	12.0	2.71
safflower yellow A	90	4.76	3.13	4.97	4.04	6.14	3.88
	80	1.07	2.08	2.28	18.0	9.24	8.43
	70	0.32	1.72	1.23	59.6	11.2	15.7

표 2-3. 홍화 황색소 성분의 활성화 에너지.

	Activation Energy ( $kcal\ mol^{-1}$ )		
	pH 2	pH 7	pH 10
Precarthamin	14.82	12.26	11.10
Safflower yellow A	30.67	14.24	21.15

#### 나. 홍화 생육시기별, 부위별 생물변환 효소수율 연구

홍화는 3월 말에 파종하면, 약 3개월의 생육기간을 거쳐 6월 말에 개화한다. 홍화의 생육기간 동안 2주 간격으로 시료를 채취하여 적색소 생합성 효소의 활성을 측정하였다. 생육시기별로 채취한 홍화 시료 1 g을 3 ml의 50 mM Tris buffer(pH 7.5)로 추출한 후 원심분리하여 상층액을 얻었다. 얻어진 상층액을 pH 5.0의 citrate 완충용액에서 precarthamin과 반응시켜 적색소 생합성 활성을 측정하였다. 적색소 생합성 효소의 활성은 생육초기에는 낮게 나타나다가 10 주 이후에 최대치를 나타내었다 (Fig. 2-5). 파종 후 약 12주가 지난 홍화의 미성숙 꽃잎, 잎, 줄기, 뿌리 각각 1 g을 3 ml의 50 mM Tris buffer(pH 7.5)로 추출한 후 원심분리하여 상층액을 얻었다. 홍화의 부위별로 얻어진 효소 추출액을 pH 5.0의 citrate 완충용액에서 precarthamin과 반응시켜 적색소 생합성 활성을 측정하였다. 적색소 생합성 효소의 활성은 미성숙 꽃잎과 잎에서 높게 나타났으며, 줄기에서는 거의 활성이 없었다 (Fig. 2-6).

#### 다. 홍화 생물변환 수율 증대 연구

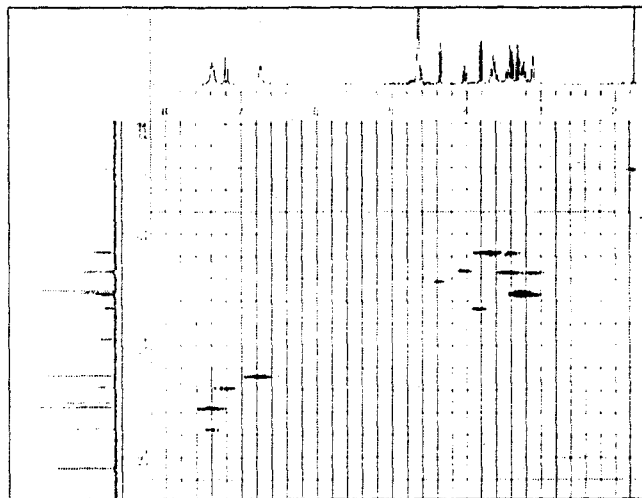
생물변환에 의한 적색소의 수율을 높이는 연구의 일환으로, 적색소 생합성 효소 활성의 최적조건을 조사하였다. 효소반응의 적정 pH는 pH 5.0이었으며, pH 8.0 근처에서도 약간의 활성을 보였다(Fig 2-7). 효소반응의 온도에 대한 조건을 조사한 결과 적색소 생합성 효소는 30℃에서 최대 활성을 나타내었다(Fig. 2-8). 효소의 열안정성을 조사한 결과, 효소의 활성은 50℃ 이상에서 10분간 열처리하였을 때 급격히 감소하였다(Fig 2-9). 분리한 효소의 precarthamin에 대한 포화곡선은 효소반응이 Michaelis-Menten kinetics를 따름을 보여주었으며(Fig. 2-10), 적색소 생합성 효소의  $K_M$ 과  $V_{max}$ 는 각각 164  $\mu$ M과 29.2 nmol/min 이었다.

#### 라. 생물변환 색소성분의 안정성 연구

홍화 황색소로부터 생물변환으로 얻어진 적색소의 안정성을 높이기 위해

dextran, gum, alginate, CM-cellulose 등 다양한 생체 고분자를 이용하여 연구를 수행하였다. 적색소와 생체고분자를 혼합한 시료의 열 안정성을 30℃에서 조사한 결과 생체고분자를 포함한 시료의 경우 전반적인 흡광도가 증가하였으며 적색소의 안정성도 대체적으로 증가하는 경향을 보였다. 또한 조사한 다섯 가지의 생체고분자 중 CM-cellulose의 경우가 가장 적색소의 안정성을 높여주는 것으로 나타났다(Fig. 2-11).

A



B

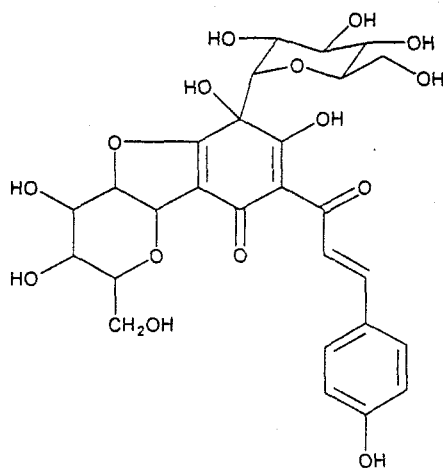
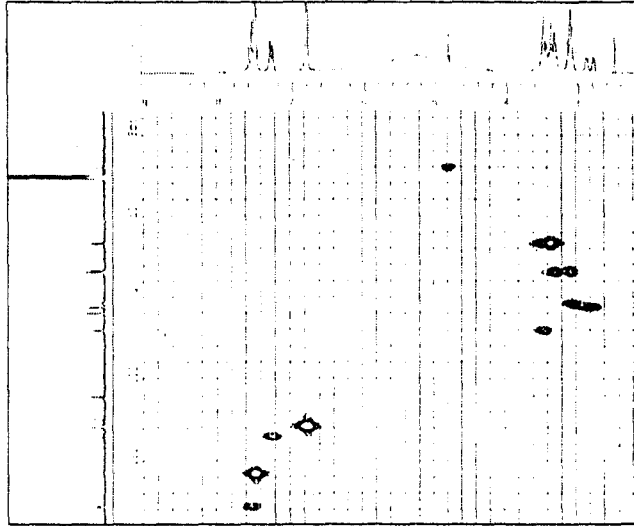


Fig. 2-1. HMQC spectrum (A) and chemical structure of safflower yellow A.

A



B

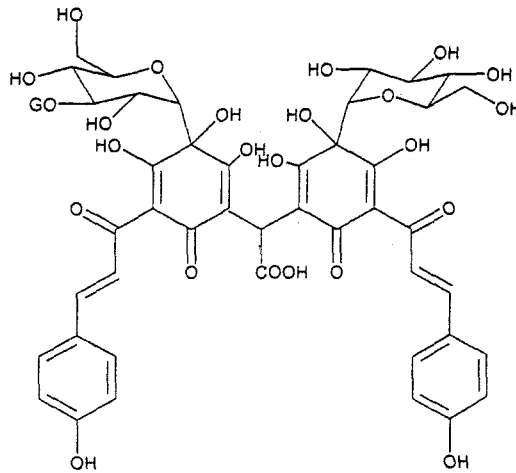


Fig. 2-2. HMQC spectrum (A) and chemical structure of precarthamin.

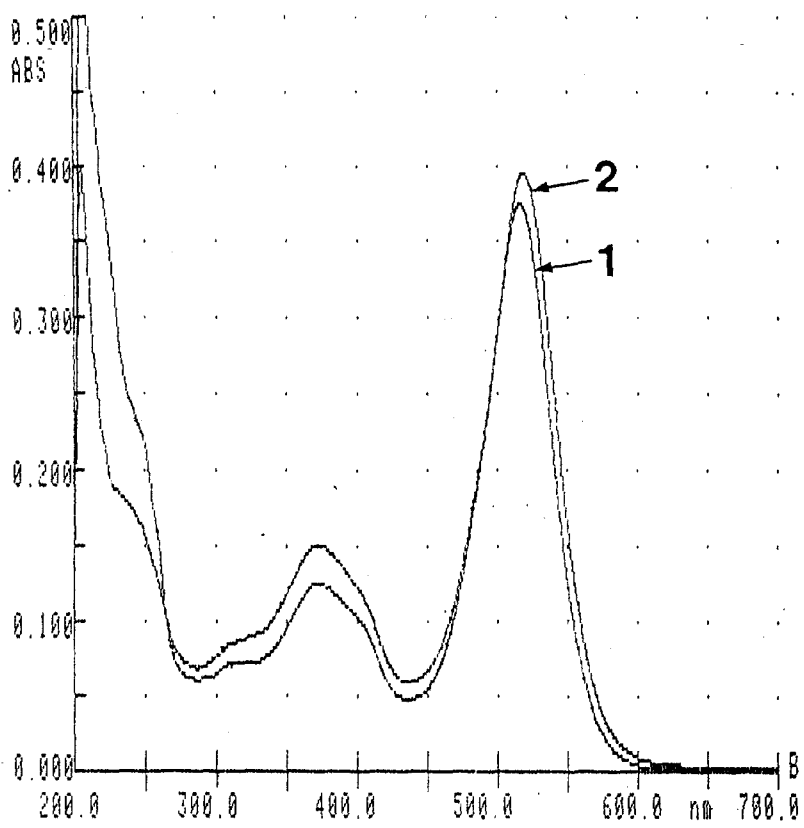


Fig. 2-3. UV/Vis spectra of the enzymatically converted (1) and authentic (2) carthamins in MeOH.

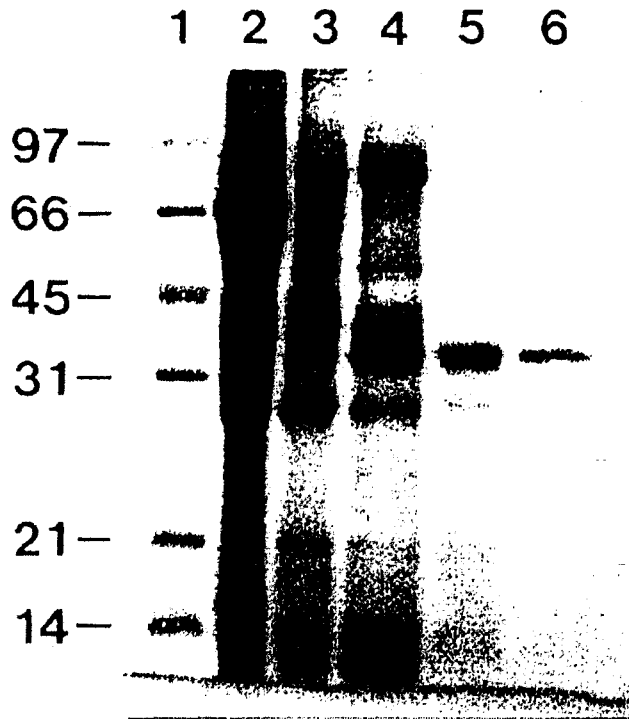


Fig. 2-4. SDS PAGE of the samples from each purification step. An arrow indicates a carthamin synthesizing enzyme.

- 1 : Size marker
- 2 : 2nd ammonium sulfate fractionation
- 3 : DEAE Sepharose column chromatography
- 4 : 1st Macro-Prep Ceramic Hydroxyapatite column chromatography
- 5 : Bio-Gel A-0.5m column chromatography
- 6 : 2nd Macro-Prep Ceramic Hydroxyapatite column chromatography

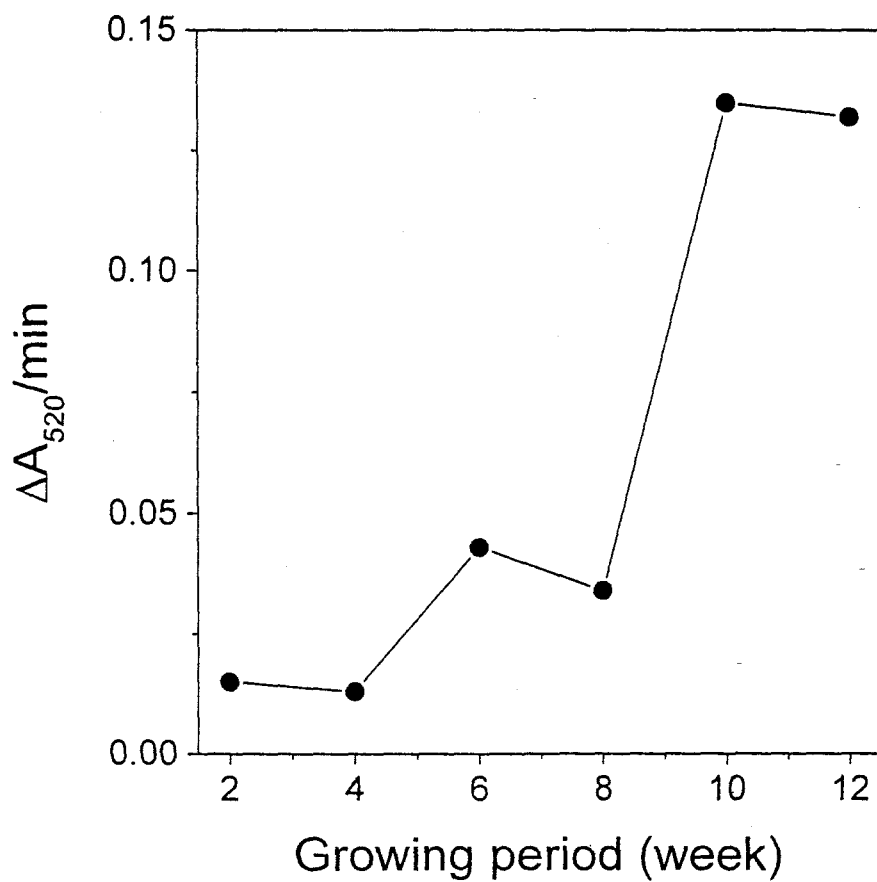


Fig. 2-5. Carthamin forming activity of protein preparations obtained from safflower leaves at various growing period.



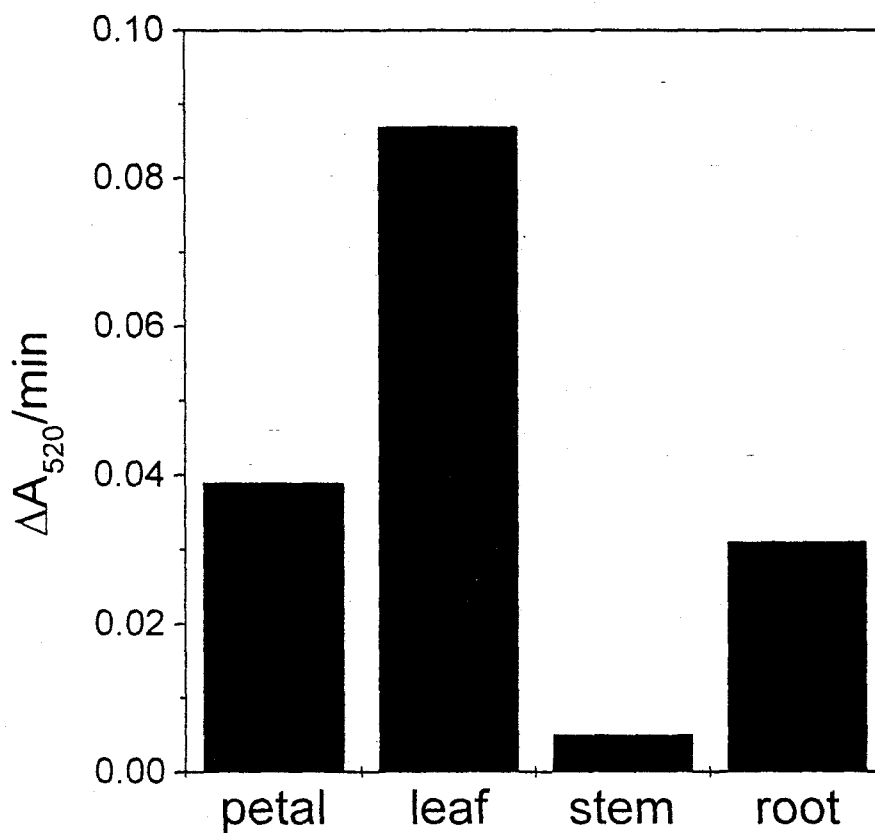


Fig. 2-6. Carthamin forming activity of protein preparations obtained from the various tissues of safflower.

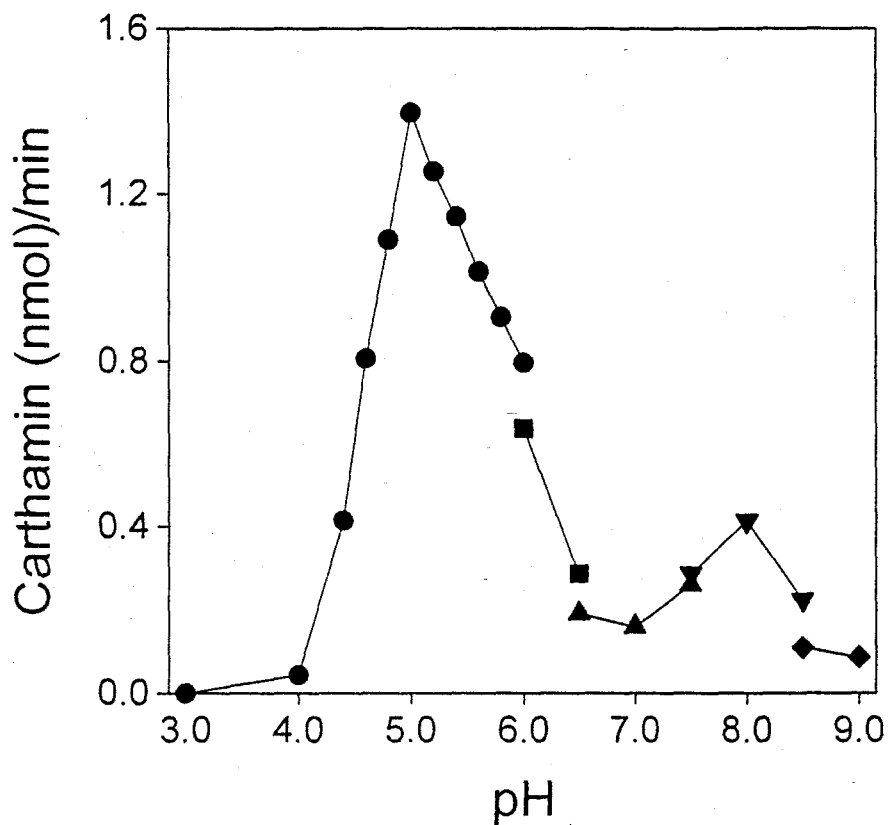


Fig. 2-7. Effect of pH on the enzyme activity. The enzyme activity was measured at pH ranges from 3.0 to 9.0. Buffers used were 50 mM citrate (pH 3.0 - 6.0), 50 mM Maleate (pH 6.0 - 6.5), 50 mM sodium phosphate (pH 6.5 - 7.5), 50 mM Tris (pH 7.5 - 8.5), and 50 mM CHES (pH 8.5 - 9.0).

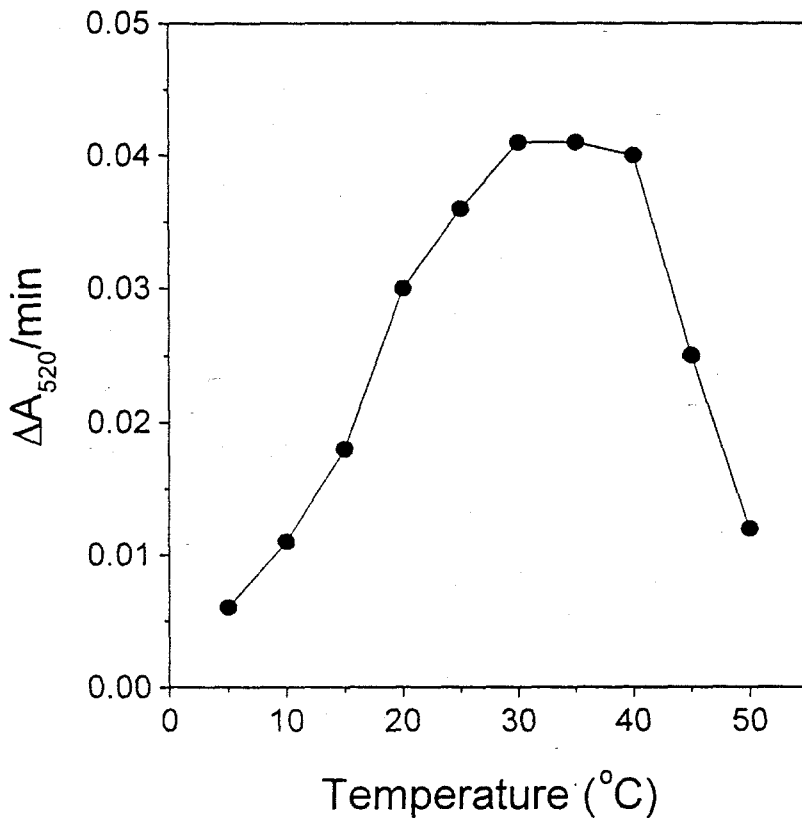


Fig. 2-8. Effect of heat on the enzyme activity. The enzyme reactions were performed at various temperatures (5 C - 50 C). The reaction temperatures were adjusted by temperature controlled water circulation bath.

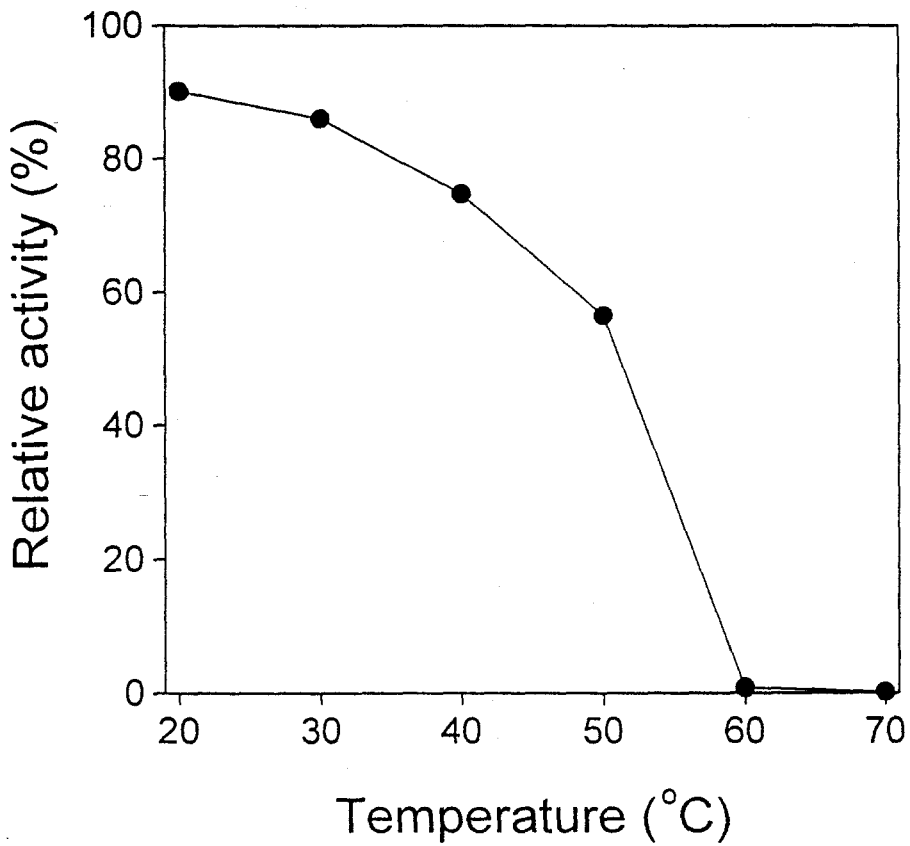


Fig. 2-9. Heat stability of the enzyme. The enzyme was preincubated for 10 min at various temperatures and the activity was measured at 25 °C. The enzyme activity was sharply decreased at temperatures higher than 50 °C.

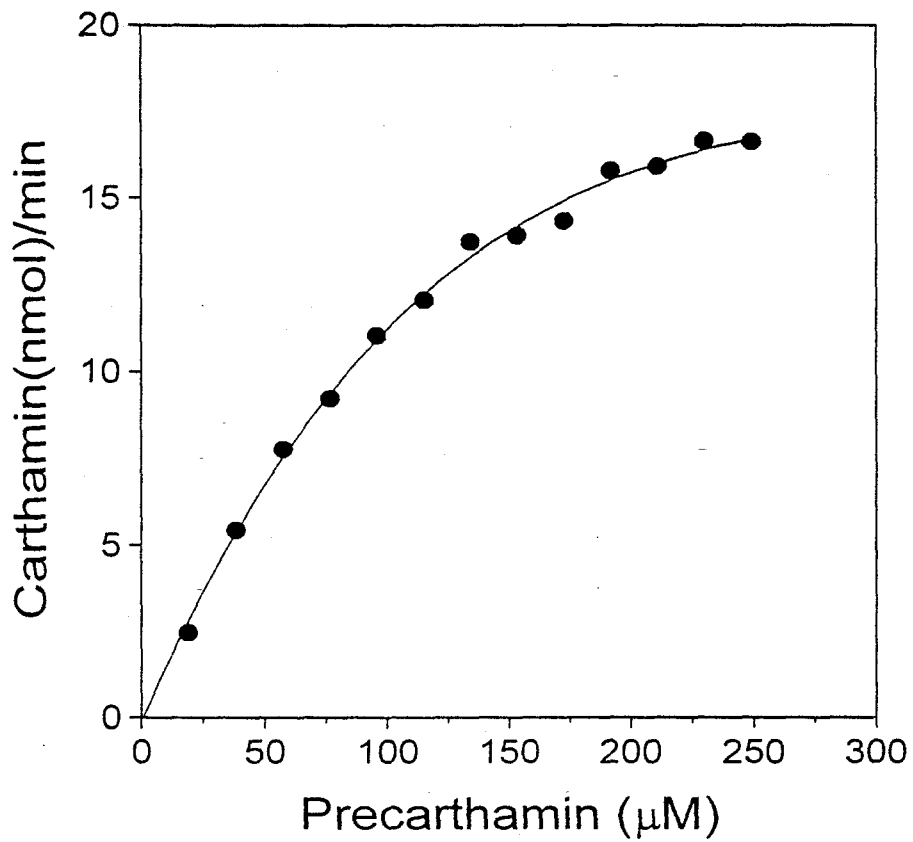


Fig. 2-10. Effect of substrate (precarthamin) concentration on the enzyme activity.

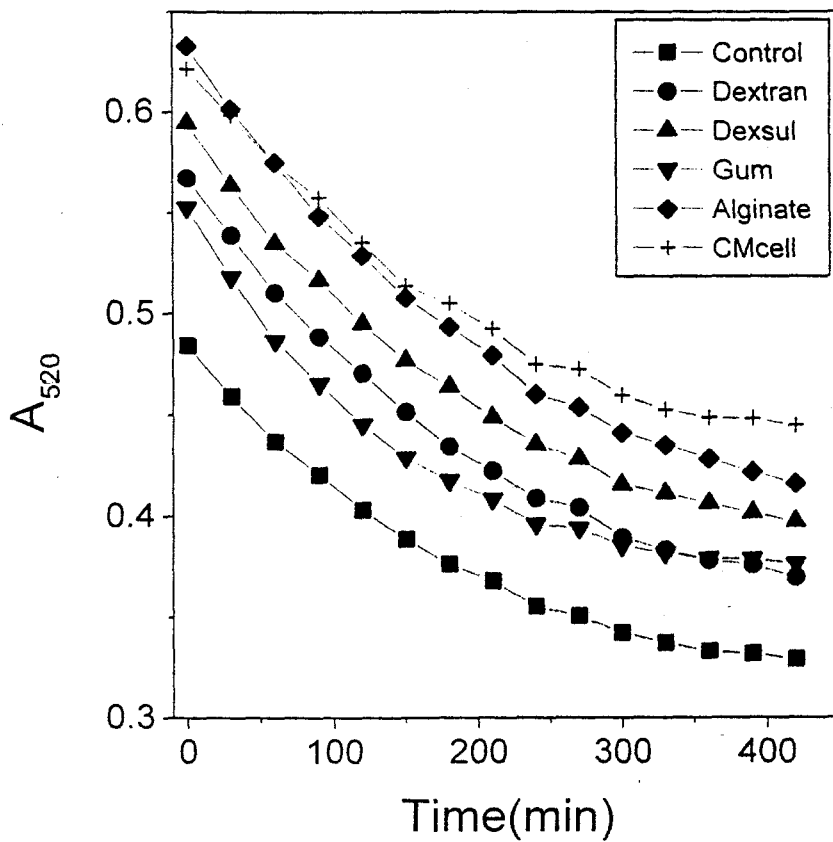


Fig. 2-11. Thermal degradation of carthamin with various biopolymer at 30°C.  
 Control: no biopolymer, Dexsul: dextran sulfate, CMcell: CM-cellulose

# 제 3 장 생물 변환에 의한 치자 청색소 개발

## 제 1 절 서 설

“생물변환에 의한 치자 청색소 개발”에서는 치자(*Gardenia jasminoides*)에 존재하는 무색의 geniposide와 다른 여러 iridoid를 분리하여 동정하였다. Geniposide는  $\beta$ -glucosidase에 의해 가수분해되어 genipin으로 변환이 되는데 이렇게 얻어진 genipin에 여러 가지 아미노산과 반응시켜 다양한 청색소를 얻었으며, 생물변환 청색소를 분리하여 화학적 구조를 규명하였다. 또한 청색소 성분생물변환 반응기작에 대한 연구를 수행하였으며, 청색소 성분의 물리화학적 특성을 연구하였다.

## 제 2 절 연구결과

### 1. 치자 색소성분 분리 및 청색소 생물 변환 기초 연구

#### 가. 치자 색소 성분 및 iridoid 화합물의 분리

치자 열매 50g을 분쇄기로 파쇄한 후 chloroform 400ml로 한 시간씩 4회 추출하여 지방성분을 제거한 residue에 MeOH 400ml로 한 시간씩 4회 추출하여 여액을 감압 농축하였다. 농축물을 charcoal에 흡착시켜 증류수 및 10% EtOH로 씻어 당 성분을 제거한 다음 MeOH로 용출하여 glycoside 분획을 얻었다. Glycoside 분획으로부터 silica gel column chromatography ( $\text{CHCl}_3$  : MeOH = 7 : 3)를 이용하여 0.96g(수득률 1.86%)의 geniposide를 얻었으며, Geniposide 외에 네 종류의 iridoid 화합물과 iridoid계 화합물이 아닌 성분을 분리하였다 (그림 3-1).

#### 나. 치자 색소성분의 구조동정

Geniposide는 iridoid 골격에 당이 붙어있는 구조로 TLC( $\text{CHCl}_3$  : EtOH = 7 : 3) 상에서  $R_f$  값이 0.59이었으며 녹는점은 163-164°C이었다. Geniposide는 UV/Vis spectrum에서 최대흡수파장이 237nm(MeOH)의 값을 나타내었으며 IR,  $^1\text{H-NMR}$  및  $^{13}\text{C-NMR}$  spectra와 함께 그림 2-2에 정리하였다. 또한 TLC( $\text{CHCl}_3$  : EtOH = 7 : 3) 상에서 iridoids 화합물인 네 종류( $R_f$  값은 각각 0.42, 0.33, 0.28, 0.26)의 화합물을 확인하여 prep TLC를 통하여 분리하였다 (그림 3-1). 분리한 화합물은 UV/Vis, IR, NMR spectrophotometer 등을 이용하여 화학구조를 결정하였고, iridoid계 화합물이 아닌 성분은 silica gel column chromatography ( $\text{CHCl}_3$  : MeOH = 7 : 3)를 통해 분리하였다 (그림 3-3, 3-4, 3-5, 3-6, 3-7).

#### 다. 생물변환에 의한 치자 청색소 생산 연구

치자로부터 얻은 geniposide (acetate buffer pH 5.0)에  $\beta$ -glucosidase를 가하여 가수분해하였다.  $\beta$ -glucosidase를 이용한 geniposide의 가수분해 과정에서의 효율을 찾아보기 위하여  $\beta$ -glucosidase의 양 및 시간에 따른 genipin의 생성속도를 TLC 및 UV/Vis spectra로 확인하였는데 그림 3-8은  $\beta$ -glucosidase의 양을 변화시킬 때 생겨나는 genipin을 나타내고 있다. 가수분해된 시료를 diethyl ether로 분획하여 genipin을 분리하였다. Genipin의 녹는점은 119-120.5°C이었고 UV/Vis spectrum은 최대흡수파장이 240nm(MeOH)이었는데 genipin의 IR,  $^1\text{H-NMR}$  및  $^{13}\text{C-NMR}$  spectra와 함께 그림 3-9에 나타내었다. Genipin(phosphate buffer, pH 7.0)에 여러 가지 아미노산을 첨가하여 본 결과 청색소의 생성이 가장 많거나 (glycine, lycine), 선명한 청색을 내는 (phenylalanine) 아미노산을 각각 첨가하여 70°C에서 5시간 반응시켜 청색소를 얻었다.

#### 라. 치자 청색소의 안정성 및 기능성 연구

변환된 치자 청색소의 안정성을 조사하기 위하여 60°C, 70°C, 80°C, 90°C 온도 범위 및 pH 5.0 (acetate buffer), pH 7.0 (phosphate buffer), pH 9.0 (CHES buffer) 조건에서 청색소의 흡광도 변화를 조사하였다. 즉 glycine과 반응한 청색소



의 경우 580nm에서, lysine 및 phenylalanine과 반응한 청색소의 경우 590nm에서 시간에 따른 흡광도의 변화를 측정하였다 (그림 3-10, 3-11, 3-12). 그리고 다른 아미노산과 반응하여 생성된 청색소의 온도, pH, 시간에 따른 흡광도 변화율은 표 3-1에 정리하였다. 치자 청색소의 수용액에서의 용해도 및 분산도는 높음을 확인할 수 있었다.

## 2. 치자 청색소 생산 연구

### 가. 치자 청색소 생물변환 반응기작 연구

치자로부터 분리한 geniposide를 acetate 완충용액(pH 5.0)에 녹이고  $\beta$ -glucosidase로 가수분해하여 genipin을 얻었다. Genipin은 여러 종류의 아미노산과 반응하여 다양한 색깔을 지니는 치자 청색소를 생성하는데, 그 반응기작은 거의 알려져 있지 않다 (그림 3-13). 본 연구에서는 phosphate 완충용액(pH 7.0)에 녹인 genipin을 가장 단순한 구조의 primary amine인 methylamine과 반응시켜 생성되는 중간생성물을 조사하여 치자 청색소의 생물변환 반응기작을 연구하였다.

### 나. 치자 청색소의 분리 및 화학구조 규명

청색소의 생물변환 과정의 중간산물들을 분리하고 동정하기 위하여 genipin과 40% methylamine을 phosphate 완충용액 (pH 7.0)에 가하고 70°C에서 5시간 동안 반응시켜 치자 청색소를 제조하였다. 생성된 청색소는 Bio-Gel P-II(fraction range : 200-2600) column chromatography를 이용하여 증류수로 용리하였는데, 2ml씩의 분획을 UV/Vis spectrometer로 290nm 및 585nm에서 측정한 후 분획별로 모아 각각 GM1, GM2, GM3, GM4 및 GM5로 명명하였다 (그림 3-14). 이들의 UV/Vis (그림 2-15), IR, mass,  $^1\text{H-NMR}$  및  $^{13}\text{C-NMR}$  spectra를 통하여 청색소 및 중간생성물의 화학구조 규명을 시도하였다 (그림 3-16, 3-17, 3-18, 3-19, 3-20). GM1의 경우 분자량이 2600-6000 사이의 화합물인 것으로 추정할 수 있었고, GM5의 경우 genipin의 hemiacetal 위치에 있는 산소가 methylamine의 질소로 치환된 화합물인 것을 확인할 수 있었다.

### 다. 분리된 청색소 성분의 물리화학적 특성 연구

청색소 생성 과정을 규명하고자 Bio-Gel P-II column chromatography를 통해 분리한 성분을 methylamine과 반응시켜 보았다. Polymer로 추정되는 GM1을 제외한 GM2, GM3, GM4, GM5를 pH7.0 (phosphate buffer)조건 및 70℃온도에서 30분간 청색소의 변화를 조사하였다. GM2 (최대 흡수 파장 : 256nm), GM3, GM4 (최대 흡수 파장 : 270nm)의 경우 청색소의 흡광도 변화가 거의 없지만 GM5 (최대 흡수 파장 : 292nm)의 경우 뚜렷한 청색소의 흡광도 변화를 보이는 것으로 보아 중간 생성물임을 확인할 수 있었다 (그림 3-1).

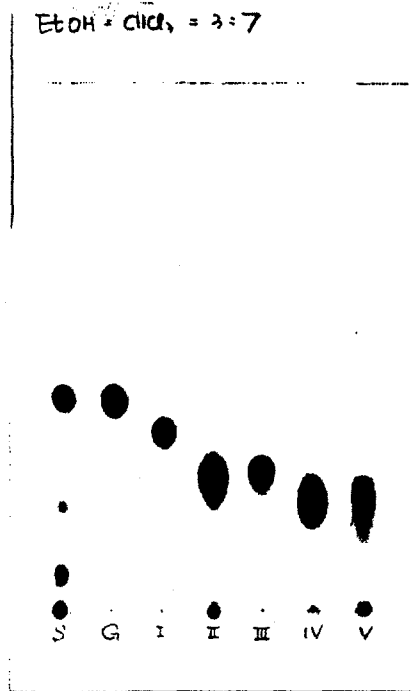


그림 3-1. 치자로부터 분리한 다섯 가지 iridoid 화합물과 picrocrocinic acid의 TLC chromatogram.

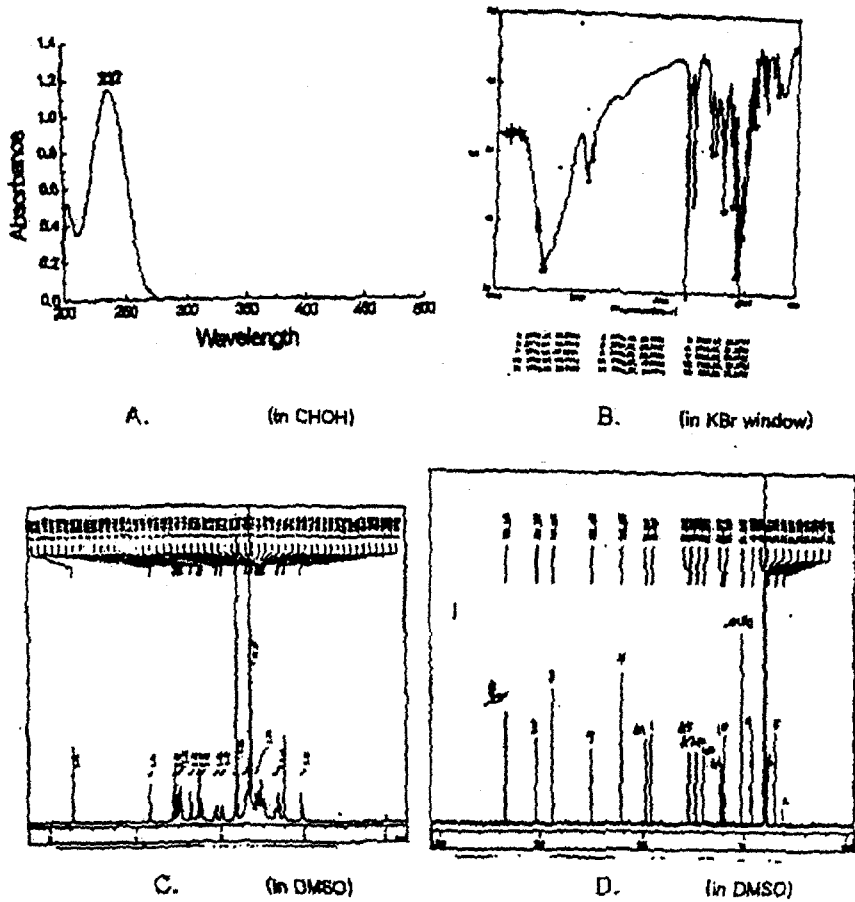
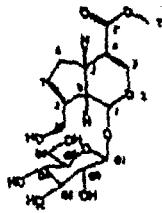


그림 3-2. 치자로부터 분리한 compound 1(geniposide)의 구조와 spectral data

A : UV/Vis spectrum

B : IR spectrum

C :  $^1\text{H}$ -NMR spectrum

D :  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum

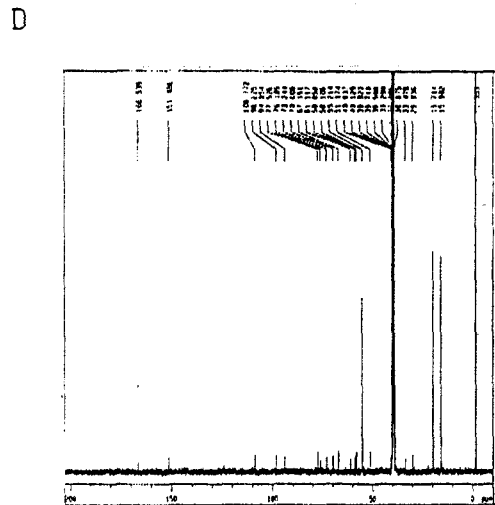
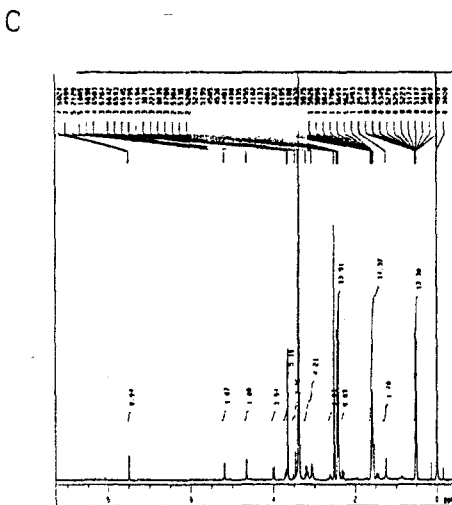
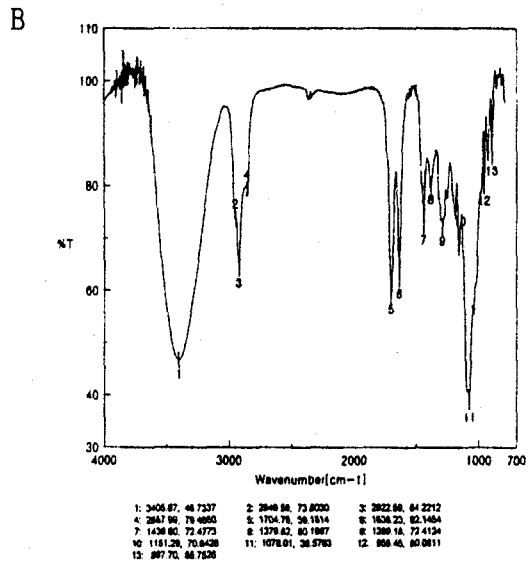
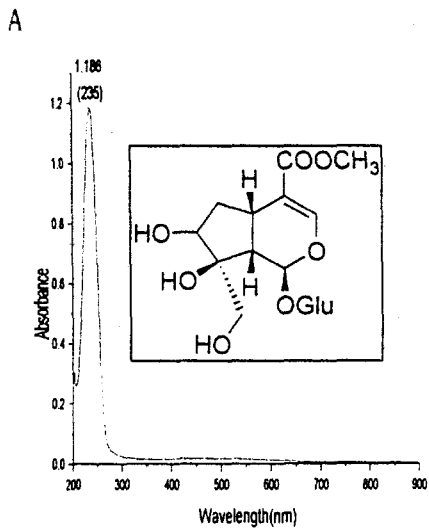


그림 3-3. 치자로부터 분리한 compound 2의 구조와 spectral data

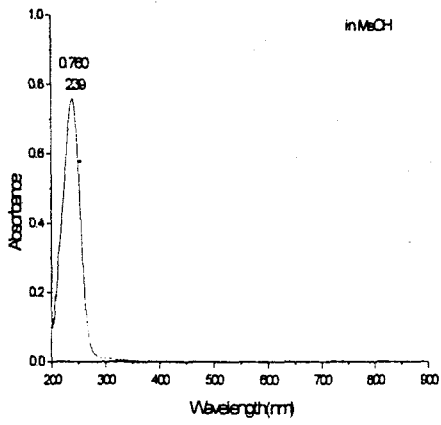
A : UV/Vis spectrum

B : IR spectrum

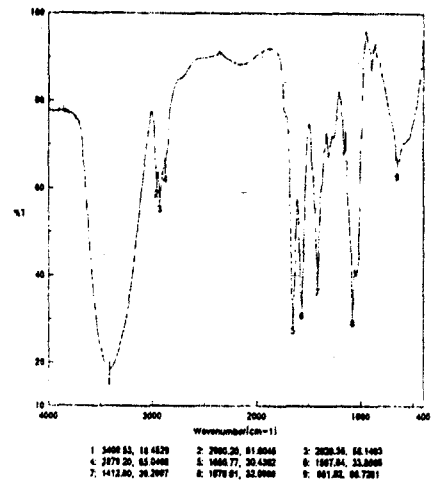
C : <sup>1</sup>H-NMR spectrum

D : <sup>13</sup>C-NMR spectrum

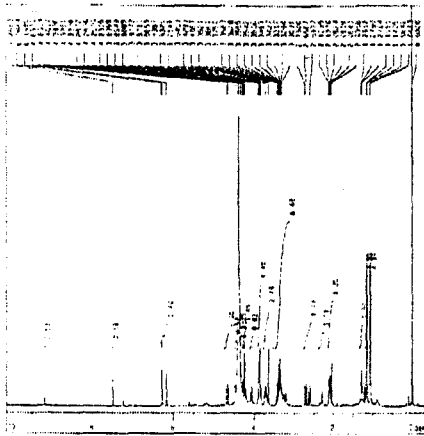
A



B



C



D

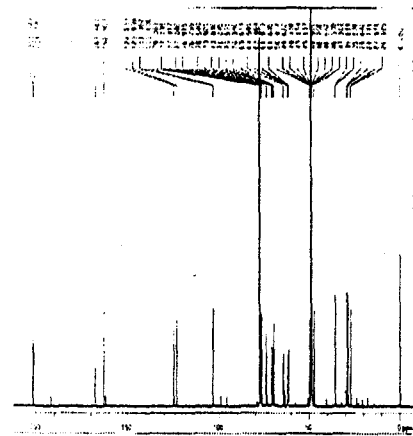


그림 3-4. 치자로부터 분리한 compound 3의 구조와 spectral data

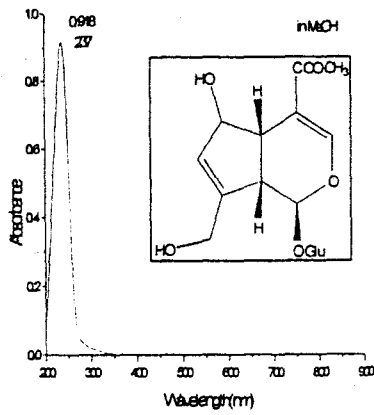
A : UV/Vis spectrum

B : IR spectrum

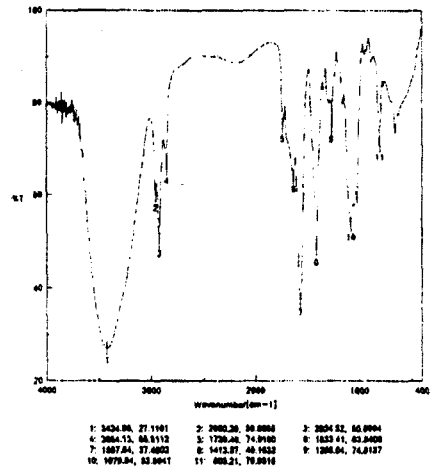
C : <sup>1</sup>H-NMR spectrum

D : <sup>13</sup>C-NMR spectrum

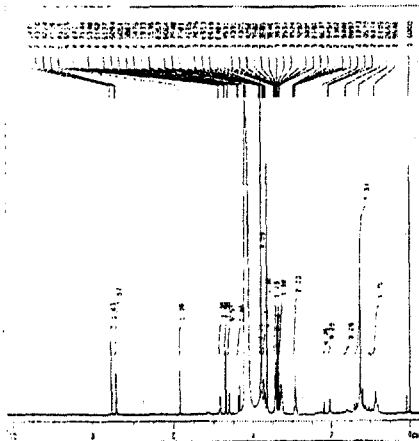
A



B



C



D

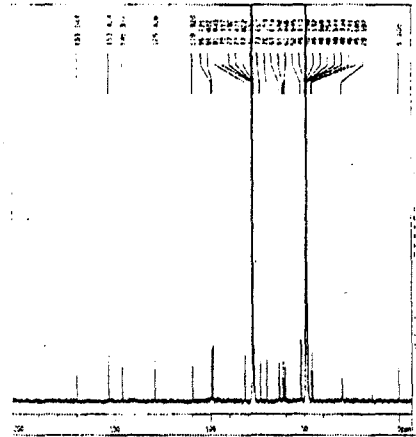


그림 3-5. 치자로부터 분리한 compound 4(feretoside)의 구조와 spectral data

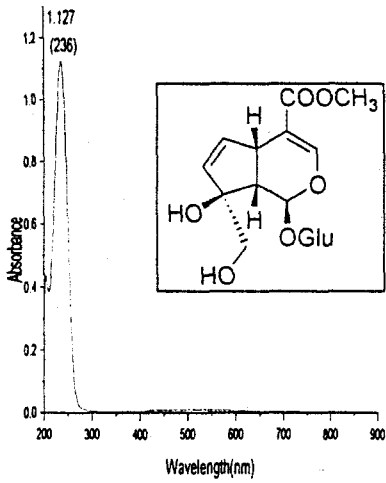
A : UV/Vis spectrum

B : IR spectrum

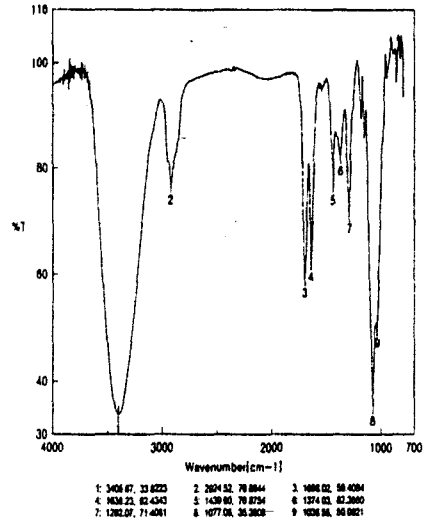
C : <sup>1</sup>H-NMR spectrum

D : <sup>13</sup>C-NMR spectrum

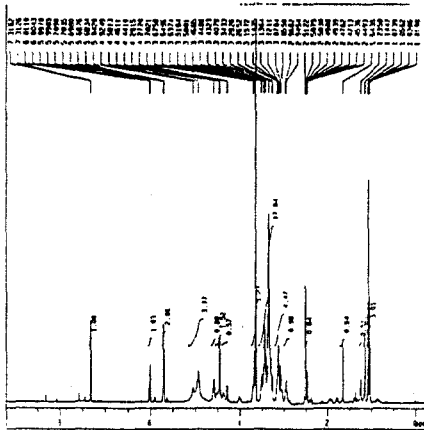
A



B



C



D

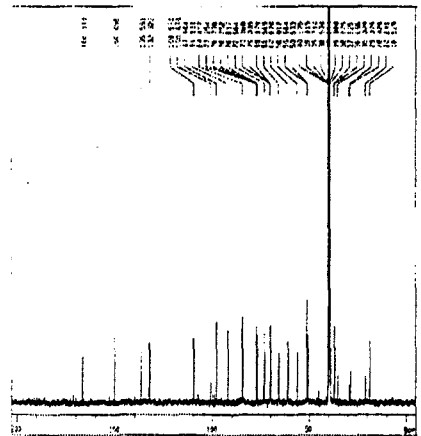


그림 3-6. 치자로부터 분리한 compound 5(gardenoside)의 구조와 spectral data

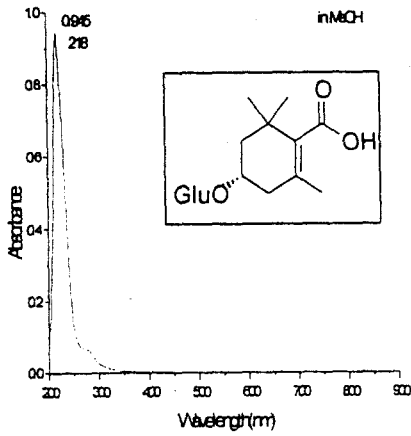
A : UV/Vis spectrum

B : IR spectrum

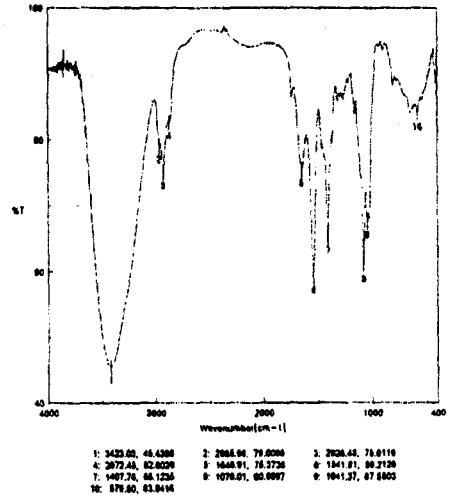
C : <sup>1</sup>H-NMR spectrum

D : <sup>13</sup>C-NMR spectrum

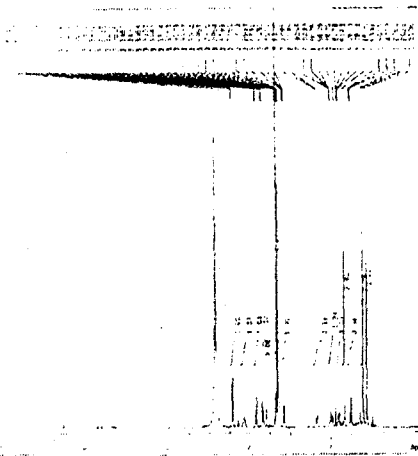
A



B



C



D

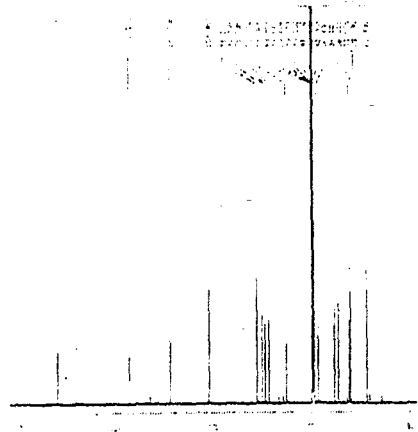


그림 3-7. 치자로부터 분리한 compound 6(picrocrocinic acid)의 구조와 spectral data

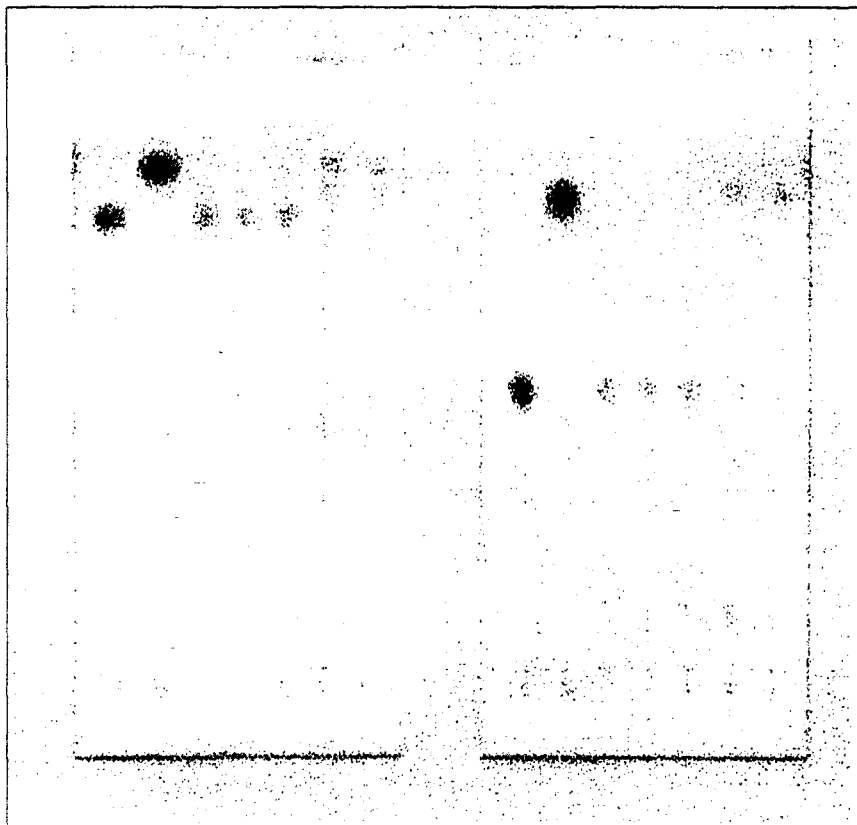
A : UV/Vis spectrum

B : IR spectrum

C : <sup>1</sup>H-NMR spectrum

D : <sup>13</sup>C-NMR spectrum





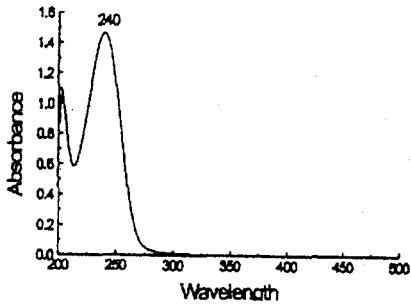
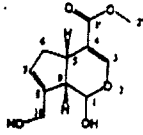
A

B

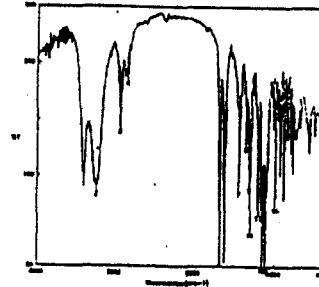
그림 3-8.  $\beta$ -glucosidase의 양에 따른 Genipin의 생성

A : EA:IPA:H<sub>2</sub>O=56:34:10

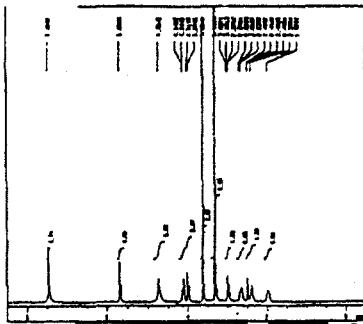
B : BuOH:Acetic acid:H<sub>2</sub>O=4:1:5



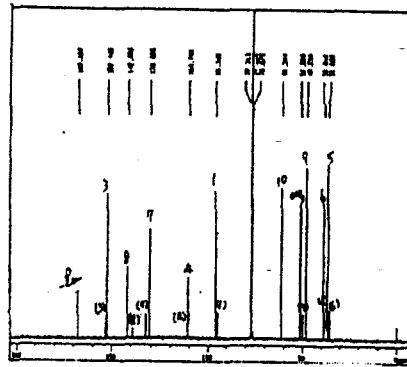
A. (in CHOH)



B. (in KBr window)



C. (in DMSO)



D. (in DMSO)

그림 3-9. Genipin의 구조와 spectral data

A : UV/Vis spectrum

B : IR spectrum

C :  $^1\text{H}$ -NMR spectrum

D :  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum

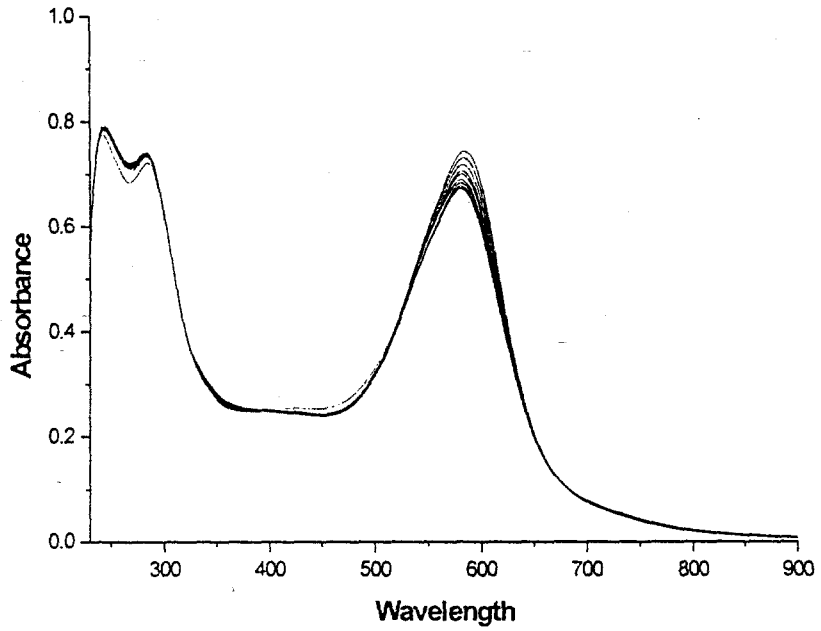


그림 3-10. UV/Vis spectral changes of the thermal degradation reactions of the blue pigments transformed from genipin and glycine in phosphate buffer (pH 7.0) at 70°C. The spectra were scanned with 30 min interval.

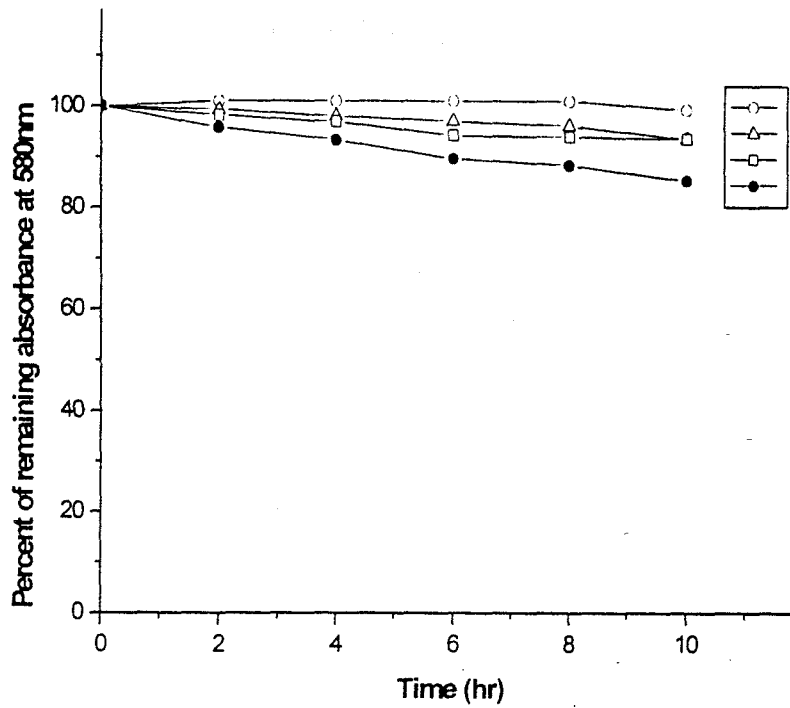


그림 3-11. Thermal stability of the blue pigments transformed from genipin and glycine in phosphate buffer (pH 7.0) at 580nm under 60-90°C temperature conditions. ○—○: 60°C, △—△: 70°C, □—□: 80°C, ●—●: 90°C.

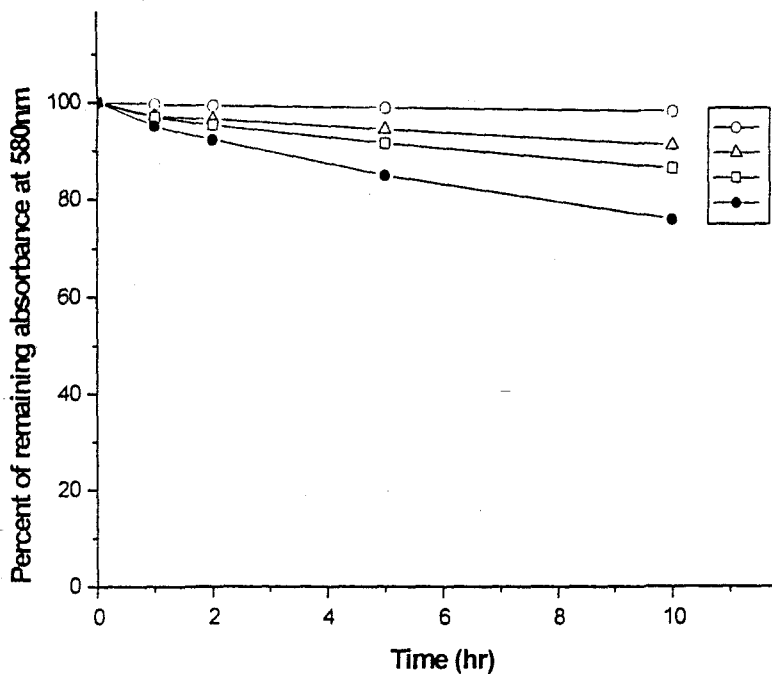


그림 3-12. Light stability of the blue pigments transformed from genipin and glycine in phosphate buffer (pH 7.0) at 580nm under 5,000-20,000 lux light intensity conditions. ○—○ : Al-foil, △—△ : 5,000 lux, □—□ : 10,000 lux, ●—● : 20,000 lux.

表 3-1. Thermal and light stability of the blue pigments at 580 nm under various pH, temperature conditions.

		pH 5.0				pH 7.0				pH 9.0			
	time	Temperature( °C )											
	(h)	60	70	80	90	60	70	80	90	60	70	80	90
Gly	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	2	99	94	90	89	101	99	98	96	102	102	102	101
	4	98	92	87	85	101	98	97	93	103	103	103	101
	6	97	92	84	82	101	97	94	90	104	104	102	98
	8	97	92	83	80	101	96	94	88	104	103	99	94
	10	97	90	81	78	99	94	94	85	105	103	99	93
Lys	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	2	101	99	100	87	102	101	99	98	103	103	105	105
	4	102	99	98	83	101	101	98	94	105	106	105	105
	6	102	99	98	81	101	102	97	91	107	108	105	103
	8	103	100	95	79	101	102	95	89	109	109	103	101
	10	104	100	95	79	102	101	94	85	110	108	102	102
Phe	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	2	98	94	91	89	100	99	97	96	100	99	99	98
	4	97	92	88	85	100	99	96	95	100	98	100	100
	6	96	92	86	83	99	98	95	91	99	98	102	98
	8	95	92	83	79	99	98	92	90	99	99	99	98
	10	95	88	83	79	99	96	92	87	100	97	99	96

表 3-1. Thermal and light stability of the blue pigments at 580 nm under various pH and light conditions(continued).

		pH 5.0				pH 7.0				pH 9.0			
	time	Lux											
	(h)	0	5000	10000	20000	0	5000	10000	20000	0	5000	10000	20000
Gly	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	1	100	93	96	94	100	97	97	95	100	98	97	95
	2	99	95	95	91	99	97	95	92	100	97	95	92
	5	99	93	91	84	99	94	92	85	100	95	90	82
	10	98	90	86	76	98	91	86	76	100	90	83	70
Lys	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	1	99	96	96	95	100	97	96	96	99	95	95	93
	2	98	95	95	92	99	95	94	93	98	94	92	89
	5	97	93	91	86	99	94	91	87	97	90	87	80
	10	96	91	87	78	97	91	87	80	96	87	70	67
Phe	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	1	99	95	91	90	99	98	96	91	99	96	94	91
	2	98	93	87	84	99	96	92	85	99	95	91	85
	5	97	91	79	69	98	95	86	71	98	89	83	69
	10	96	83	69	53	97	85	74	56	96	79	70	51

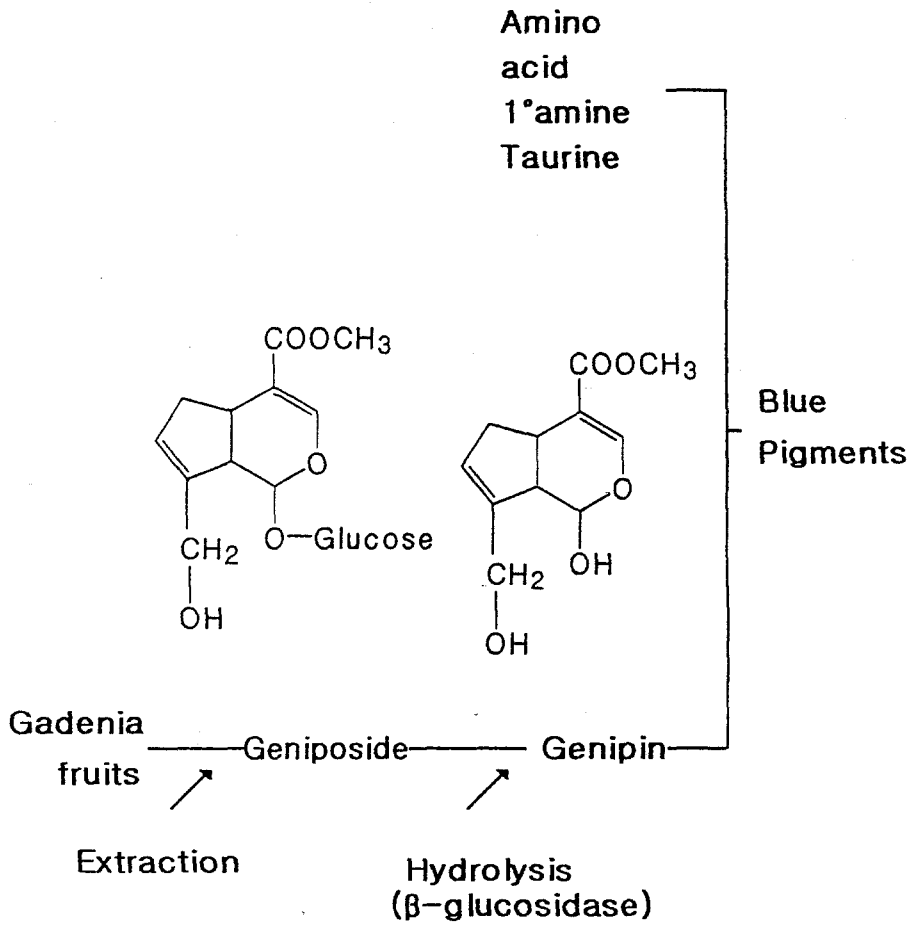


그림 3-13. Mechanism of blue pigments formation from gardenia fruits



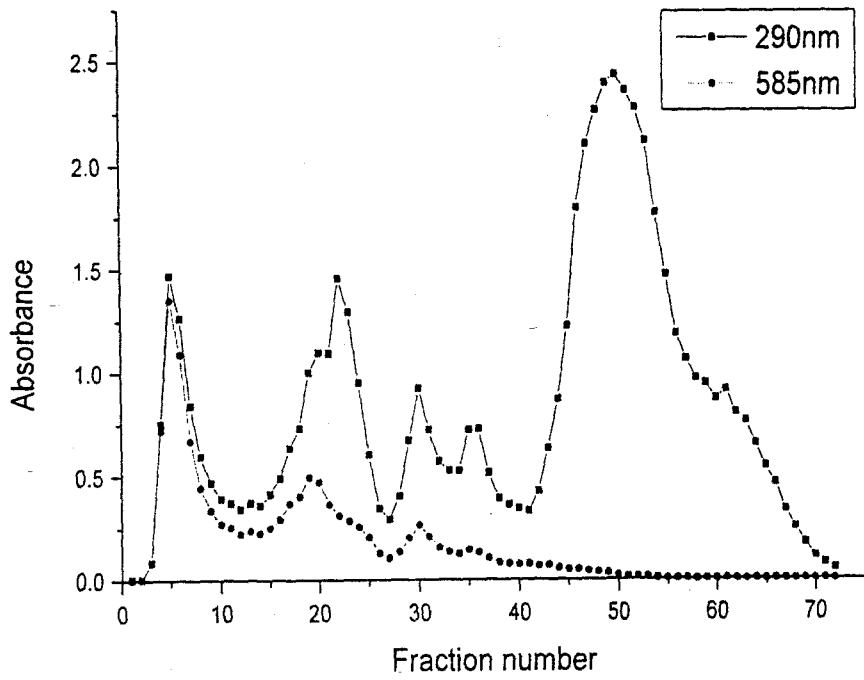
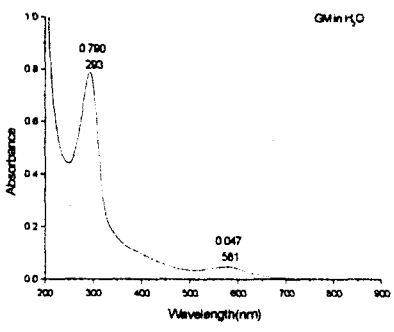
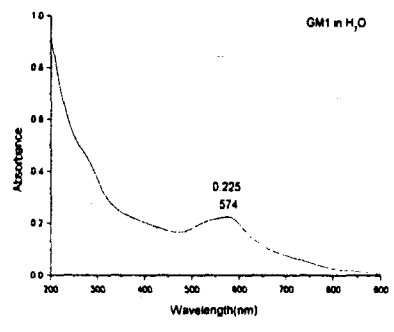


그림 3-14. Elution profile of blue pigments using Bio-gel P-II column chromatography

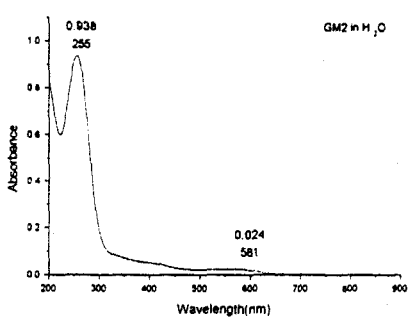
A



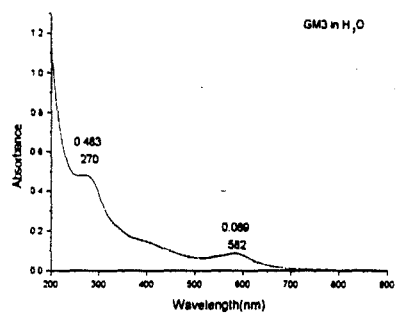
B



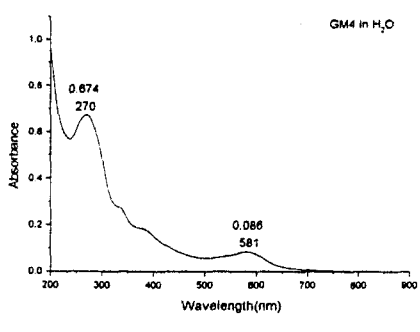
C



D



E



F

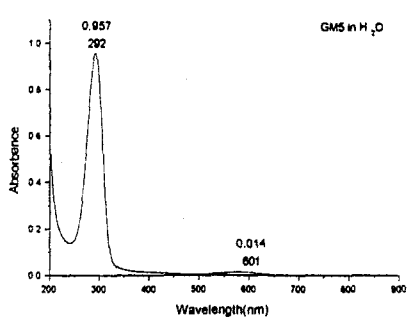


그림 3-15. UV/Vis spectra of

A : GM (whole fractions)

B : GM1 (frac.No. 4-8)

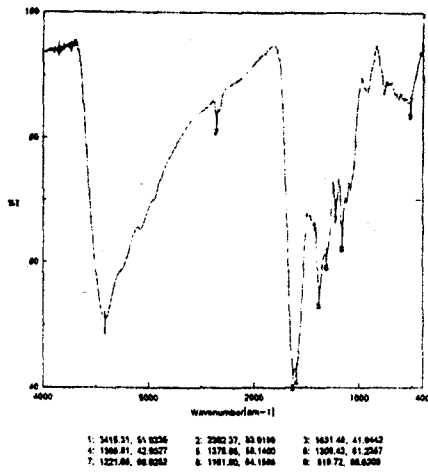
C : GM2 (frac.No. 17-25)

D : GM3 (frac.No. 29-32)

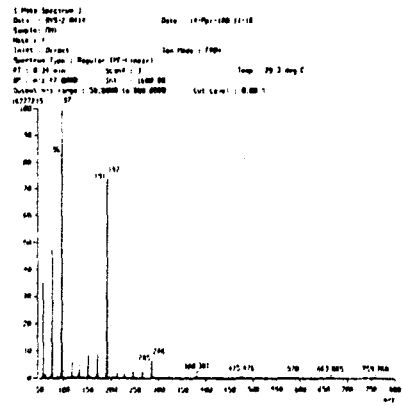
E : GM4 (frac.No. 34-37)

F : GM5 (frac.No. 44-57)

A



B



C

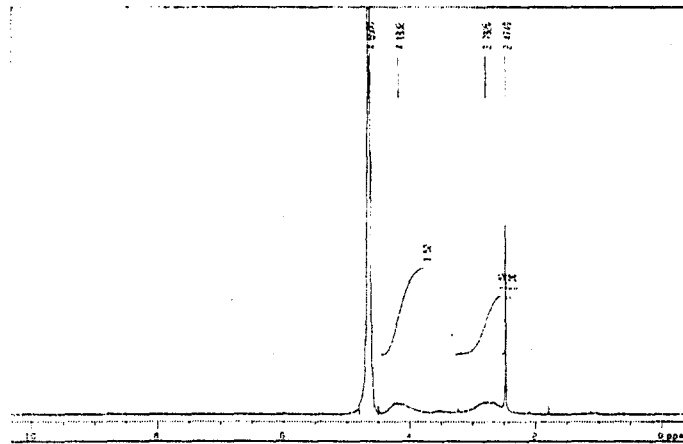


그림 3-16. IR, Ms,  $^1\text{H-NMR}$  spectra of GM1

A : IR, KBr

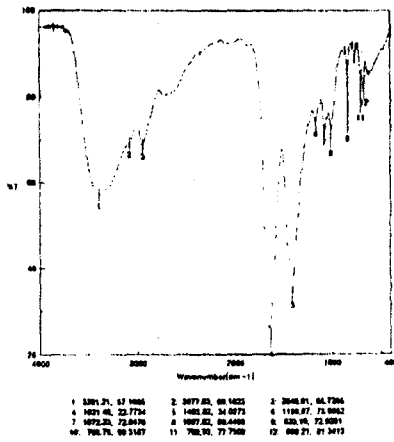
B : FABMs

C :  $^1\text{H-NMR}$ , in  $\text{D}_2\text{O}$

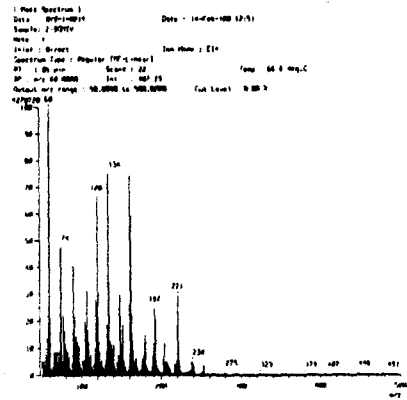




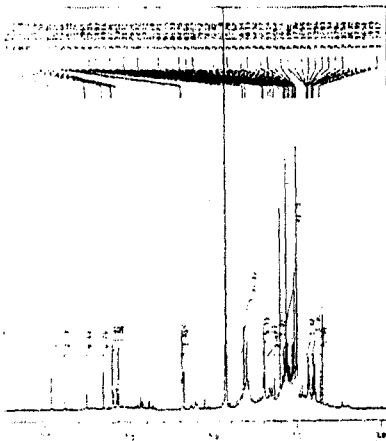
A



B



C



D

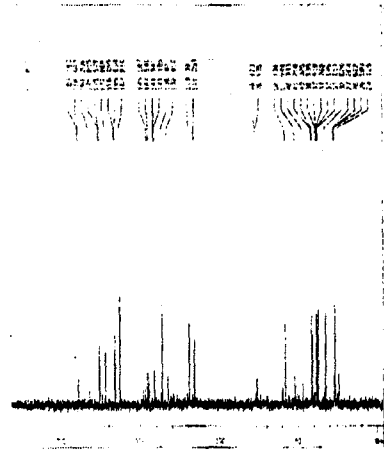


그림 3-19. IR, Ms,  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  spectra of GM4

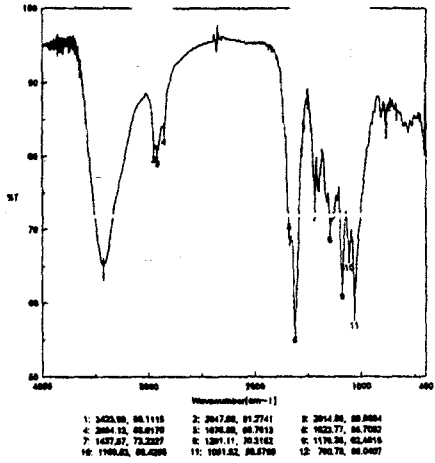
A : IR, KBr

B : EIMS

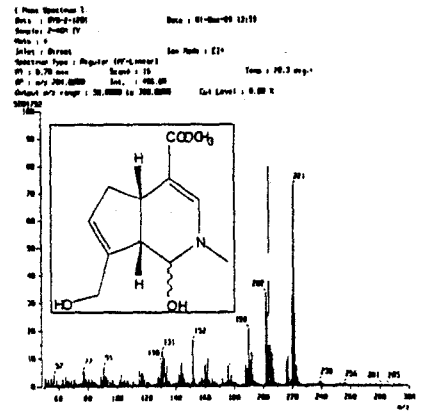
C :  $^1\text{H-NMR}$ , in  $\text{D}_2\text{O}$

D :  $^{13}\text{C-NMR}$ , in  $\text{D}_2\text{O}$

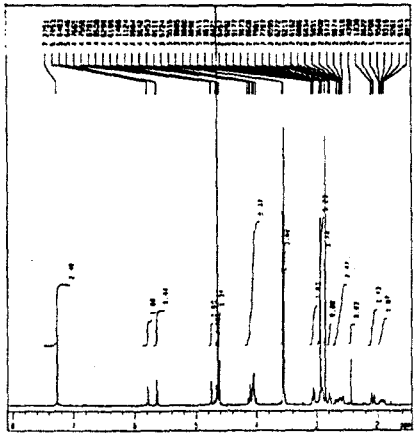
A



B



C



D

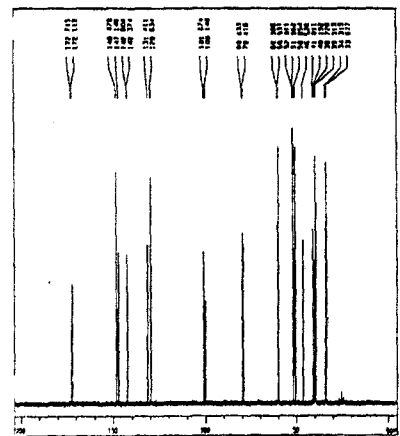


그림 3-20. IR, Ms, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR spectra of GM5

A : IR, KBr

B : EIMS

C : <sup>1</sup>H-NMR, in D<sub>2</sub>O

D : <sup>13</sup>C-NMR, in D<sub>2</sub>O

# 파 오 손 면



# 제 4 장 생물변환 천연식물색소 생산공정 기술 개발 분야

## 제 1 절 서 설

“농가소득 증대를 위한 생물변환 고부가가치 식용색소 소재 개발” 과제의 제 3 세부과제는 생물변환 천연 식물색소 생산 공정 기술개발과 관련되어 1차 년도에서는 (1) 식물체 시료조건의 추출반응에 미치는 영향연구, (2) 색소 추출 용매의 선정연구, (3) 선정 추출용매에 대한 추출반응 연구, (4) 추출반응기 및 공정연구 등을 수행하였고 2차 년도에서는 (1) 공정의 운영방법 연구, (2) 종합공정 시스템 연구, (3) 식용색소 공정의 실용성 조사 및 경제성 재평가, (4) 색소 생산 시스템의 scale-up 연구 등을 수행하였다.

## 제 2 절 연구결과

### 1. 홍화 및 치자색소 추출공정 연구

#### 가. 식물체 시료조건이 추출반응에 미치는 영향 및 색소 추출용매의 선정 연구

치자색소 추출반응 연구와 관련한 시료조건의 영향연구에서는 침지, 파쇄 등의 방법을 검토하였으며 시료의 크기에 따른 영향도 조사하였다(그림 4-1). 먼저 침지의 경우 건조된 시료와 물에서 침지시킨 시료를 비교한 결과 침지의 경우 건조된 시료보다 30%의 수율향상을 가져왔다. 시료의 파쇄에 따른 추출 효율의 영향을 알아보기 위해 파쇄한 시료와 파쇄하지 않은 시료의 추출 효율을 비교 조사한 결과 파쇄한 시료의 추출 효율이 77% 향상됨을 알수 있었다. 따라서 이후 추출에 관련하여 시료의 조건은 침지와 파쇄를 기본 조건으로 결정하였다. 색소추출용매의 선정연구에서는 여러 종류의 추출용매를 검토하여 적합한 용매를 선정하였다. 홍화 색소추출과 관련하여 precarthamin의 회수에는 홍화시료를 파쇄한 후 acetone과 sodium

hydroxide의 용매를 사용하는 것이 적합한 것으로 나타났다. 반면에 치자색소추출과 관련하여 geniposide의 회수에는 치자시료를 파쇄한 후 추출용매로서 chloroform과 methanol을 사용하는 것이 가장 적합함을 알 수 있었다.

#### 나. 선정용매에 의한 추출 및 변환반응 연구

4°C에서 냉장 보관된 홍화를 분쇄기로 10 분간 충분히 파쇄한 후 시료를 3 g 씩 4 개의 50 ml 튜브에 넣고 각각 20 ml의 증류수를 넣어 시료와 증류수가 완전히 섞이도록 20 초간 vortexing을 해 주었다. 그런 후 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C에서 30 분, 1 시간, 2 시간, 4 시간 동안 반응을 시킨 후 4°C에서 냉각시켰다. 냉각된 시료는 3000 rpm에서 10 분간 원심분리하여 침전물과 상층액을 분리한 후 상층액은 1/200으로 희석하여 황색소의 농도를 측정하였다. 그리고 홍화에서 추출한 황색소가 여러 pH에서 어떻게 변화하는지를 조사하였다. pH 3.0, 7.0와 같은 산성조건에서는 저장기간에 따라 흡광도가 느리게 변화하는데 반해서 pH 12.0 이상의 염기성 조건에서는 급격히 감소량을 보였다. 표 4-1에서 알 수 있듯이 pH가 3, 7, 12로 변함에 따라 속도상수는 40°C에서 6.2, 17.6, 27.4 ( $\times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ), 50°C에서 8.0, 19.5, 31.9 ( $\times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ), 60°C에서 22.6, 23.6, 36.5 ( $\times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ), 70°C에서 28.6, 28.7, 41.0 ( $\times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ )이었다. 각 pH 조건에서의 activation energy,  $E_a$ 는 pH 3에서 51.9 kJ/mol, pH 7에서 15.0 kJ/mol, pH 12에서 12.3 kJ/mol로 나타났다.

표 4-1. Rate constant(k) and half life( $t_{1/2}$ ) values of thermal degradation reactions of yellow pigment at different temperature and pH.

Temperature(°C)	Rate constant ( $\times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ )			Half-life (h)		
	pH 3	pH 7	pH 12	pH 3	pH 7	pH 12
40°C	6.2	17.6	27.4	112.1	39.3	25.3
50°C	8.0	19.5	31.9	86.6	35.5	21.7
60°C	22.6	23.6	36.5	30.7	29.4	19.0
70°C	28.6	28.7	41.0	24.3	24.1	16.9

홍화 적색소 carthamin 전구체인 precarthamin을 회수하기 위해 먼저 2 g의 홍화에 30% acetone 10 ml를 가하여 파쇄한 후 14,000 rpm에서 5 분간 원심분리하여 상층액을 취하였다. 다시 이 상층액에 trichloroacetic acid를 원료의 1/10로 처리하여 4℃에서 20 분간 반응시킨 후 14,000 rpm에서 5 분간 원심분리하여 침전물을 제거하였다. 그리고나서 5 M의 sodium hydroxide를 원료의 1/10로 첨가하여 중화시킨 후 precarthamin을 회수하였다.

아울러 청색소를 생산하기 위해 치자 50 g을 파쇄한 후 한 시간 정도 chloroform 500 ml에 담가두는 과정을 3 회 처리하고 methanol 500 ml로 한 시간씩 3 회 처리하여 geniposide 혼합물을 얻었다. 이 시료를 감압증류하여 methanol을 증발시키고 남아있는 황색소를 제거하기 위해 물에 녹여 charcoal에 흡착시켰다. 물과 10% ethanol로 수 회 washing하고 methanol로 추출한 후 다시 감압증류하여 methanol을 증발시켜 geniposide를 얻었다. 얻어진 geniposide를 acetate buffer에 녹인 후  $\beta$ -glucosidase를 처리하여 37℃에서 5 시간 동안 반응시켜 genipin을 형성한 후에 glycine을 처리하여 청색소로 변환시키는 반응 프로토콜을 확립하였다.

## 다. 추출반응기 및 공정연구

### 1) 반응기 및 공정구성을 위한 고정화 연구

청색소 생산 반응기를 제작하기 위해  $\beta$ -glucosidase를 CNBr-activated sepharose 4B resin 및 glutaraldehyde를 사용하여 고정화하여 색소를 변환하는 반응기 및 공정을 개발하였다 (그림 4-2). 그리고 고정화 효소와 자유효소의 특성상의 차이를 비교조사하여 고정화 효소의 반응성을 조사하는 연구를 수행하였다. 먼저 CNBr-activated sepharose 4B resin을 1 mM HCl에서 10 분간 swelling 시키고 여과하여 0.1 M acetate buffer (pH 5.0)로 세척한 다음 acetate buffer에 옮긴 후 glutaraldehyde를 10% 가하고 1 시간 상온에서 반응시킨 다음에 반응하지 않은 glutaraldehyde를 acetate buffer로 완전히 washing 한 후에 40 unit의 효소를 첨가하였고 다시 상온에서 1 시간, 4℃에서 12 시간 반응시켜 효소를 고정화시키는 프로토콜을 확립하였다. 그리고 고정화시킨 resin에 geniposide를 첨가하여 얻은 2

시간 분획에서 청색소가 생성됨을 확인할 수 있었다.

## 2) 반응기 및 공정연구

청색소 생산을 위해  $\beta$ -glucosidase를 matrix에 고정화 시킨후 고정화된 효소와 자유효소의 kinetics를 비교하기 위해 기질을 효소와 반응시켜 반응성을 살펴 보았다. 기질의 농도를 변화시켜 가면서 동일한 양의 효소와 반응시킨후 DNS method를 통하여 환원된 glucose의 양을 측정하여 standard glucose concentration curve와 비교하여 반응정도를 정량화하였다. 이렇게 해서 얻은 결과는 고정화된 효소의 경우  $K_m$  값이  $0.68 \times 10^4$  M로 나타났고 자유효소는  $0.81 \times 10^4$  M로 나타났다.  $V_m$  값의 경우 고정화한 효소의 경우  $3.23 \times 10^7$  M/min으로 나타났고 자유효소의 경우  $5.00 \times 10^7$  M/min으로 나타났다 (그림 4-3). 이들 값의 비교를 통해 효소를 고정화 하는 경우 주변의 미세환경에 의해 아주 적은 영향을 받는다는 것을 알 수 있었다. 효소를 고정화 하여 사용하는 경우 효소가 고정화 되어 반응성을 가지고 있는 기간 또한 중요하다. 따라서 고정화된 효소가 activity를 가지는 기간을 기질과의 반응횟수를 통하여 조사하였다. 이 조사에 따르면 고정화된 효소의 안정성은 기질과 효소를 10회 반응시킬 때 까지도 그 활성을 초기반응과 비교하여 50% 정도 유지함을 알 수 있었다 (그림 4-4).

## 2. 생물변환 천연색소생산 공정 연구

### 가. 공정의 운영방법 연구

생물변환 공정에 관련하여 유기식 운영방법은 부적합한 것으로 평가되어 회분식 운영방법에 대해 연구를 수행하였다. 먼저, carthamin 변환공정의 운영방법에 관련하여 precarthamin 추출공정 및 carthamin 변환효소의 추출공정을 연구하였다.

Precarthamin의 추출공정 연구에서는 홍화 잎으로부터 precarthamin의 효율적인 추출을 위해 황색의 홍화 꽃잎을 개화기(6월 말-7월 초)에 채취하여  $-70^\circ\text{C}$ 에서 보관하며 추출 실험을 수행하였다. precarthamin의 효율적인 추출에는 먼저 홍화를 30%

acetone에서 파쇄하여 찌꺼기를 버린 후 trichloroacetic acid를 처리하였다. 그리고 5M NaOH를 사용하여 추출액을 중화시켰다. 이렇게 해서 얻은 precarthamin은 분해를 방지하기 위해 4℃의 어두운 곳에서 보관하면서 사용하였다.

Carthamin 변환효소의 추출공정 연구에서는 precarthamin을 carthamin으로 변환시키는 효소를 얻기위해 먼저 홍화(250 g)를 4℃의 0.1 M, pH7.5의 tris buffer(400 ml)에서 충분히 파쇄 하였다. 파쇄 후에는 8,000 rpm에서 30분간 원심 분리하여 찌꺼기를 버리고 상층액은 ammonium sulfate 20-60%로 농축하여 8,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 pellet을 분리하였다. 이 pellet을 다시 20-50% ammonium sulfate로 농축하고, 원심분리하여 pellet을 분리하였다. 이렇게 분리한 효소의 salt를 sephadex G-25 column chromatography를 통해 제거하고 DEAE-sepharose를 이용한 ion exchange column chromatography를 통하여 대략의 불순물을 제거하였다. 효소의 activity는 추출해놓은 precarthamin과의 반응을 통해 spectrophotometer A<sub>520 nm</sub>에서 분당 흡광도의 변화로 측정하였다(그림 4-5).

치자청색소 생산공정의 운영방법 연구로서는 고정화 효소의 농도에 따른 고정화 효율을 검토하고 고정화시의 glutaraldehyde의 영향을 조사하였다.

먼저 CNBr-activated sepharose 4B resin(수지) 0.1 g에 대해 효소의 loading 농도를 1, 5, 10, 15, 20 U로 변화시킨 후 효소의 loading 농도가 고정화에 미치는 영향을 조사하였다(그림. 4-6). 효소의 loading 농도가 1 U에서 10 U로 증가되었을 때 고정화 효소의 activity가 크게 증가하는 것을 볼 수 있었다. 그러나 10 U에서 20 U까지 loading 농도를 증가시켜도 고정화 효소의 activity는 크게 변화하지 않았다. 첨가한 효소의 loading 농도가 1, 5 U에서 고정화된 효소의 효율은 5, 9.4%를 나타내었다. 첨가한 효소의 양이 10, 15, 20 U였을 경우에 고정화된 효소는 각각 12.5, 8.5, 7.7 %의 효율을 보여주었다. 따라서 CNBr-activated sepharose 4B resin (0.1 g)의 경우 10 U의 효소를 첨가하여 고정화하는 것이 효율적인 공정의 운영(고정화) 방법인 것으로 보여진다.

그리고, 고정화시 첨가하는 glutaraldehyde의 농도에 따른 고정화율을 조사하였다. 그림. 4-7은 glutaraldehyde의 농도가 10 %일 때의 activity를 100으로 정하고 나머지 농도는 이에 대한 상대적인 activity를 나타낸 것인데, glutaraldehyde의 농도 1, 5%에서는 10%에 비해 30.2, 62.8%로 비교적 낮게 나타났는데 반하여 15%의 농도

에서는 10% 농도에 비해 101.6%로 나타나 1.6% 증가하는데 그쳤다. 따라서 청색소 생산을 위한 효소의 고정화를 위해 첨가하는 glutaraldehyde의 농도는 10%를 첨가할 때 가장 효율적임을 알 수 있었다(그림 4-6).

## 나. 종합공정시스템 연구

### 1) 청색소 생산 공정 시스템 연구

청색소 생산공정 시스템연구와 관련하여 종합공정 시스템에서 고정화 효소의 교차결합의 안정성을 측정하였다. 본 실험에서는 처음 4개의 분획에서 상당히 많은 양의 단백질이 검출되었다(그림 4-8). 이것은 cross-linking되지 않은 효소들이 수지로부터 제거되어지는 것으로 보여진다. 그 이후의 분획에서는 단백질의 농도가 대부분 4-12  $\mu\text{g/ml}$  (6번, 11번 분획에서는 각각 41.8, 23.5  $\mu\text{g/ml}$ )사이의 값을 보여주었다.

고정화 효율 YI를

$$YI(\%) = \frac{IE(\text{mg})}{AE(\text{mg})} \times 100$$

YI = 고정화효율

IE = 고정화된 효소의 양

AE = 첨가한 효소의 양

으로 정의하면 초기 효소 loading 농도에 대한 21번 분획의 YI는 65%의 값을 보여준다. 그러나 실제 고정화되었다고 생각되어지는 5번 분획에 대한 21번 분획의 YI는 94%로 6%정도 감소하였다. 이것은 고정화 효소의 교차결합의 안정성이 매우 안정하다는 것을 보여준다.

그리고 종합공정 시스템에서 고정화 효소의 activity는 그림 4-8에서 보듯이 반응의 횟수가 증가함에 따라 감소하는데 이것을 U단위로 환산하면 초기 반응과 마지막 반응과의 차이는 약 0.04 U 였다. 이것은 20 ml의 기질을 반응시켰을 경우 0.04 U가 감소하는 매우 안정적인 결과를 보여주었다(그림 4-8).

## 2) 적색소 생산 공정 시스템 연구

종합공정 시스템을 구성하기 위해 적색소 변환효소를 청색소 변환효소의 경우에 서처럼CNBr-activated sepharose 4B resin 및 glutaraldehyde를 사용하여 고정화하여 색소를 변환하는 반응기 및 공정을 개발하였다(그림 4-9). 먼저 CNBr-activated sepharose 4B resin을 1 mM HCl에서 10 분간 swelling 시키고 여과하여 50 mM citric acid buffer (pH 5.0)로 세척한 다음 citric acid buffer에 옹긴 후 glutaraldehyde를 10% 가하고 1 시간 상온에서 반응시킨 다음에 반응하지 않은 glutaraldehyde를 citric acid buffer로 완전히 washing 한 후에 분리한 효소를 첨가하였고 다시 상온에서 1 시간, 4℃에서 12 시간 반응시켜 효소를 고정화시키는 프로토콜을 확립하였다. 그리고 고정화시킨 resin에 precarthamin를 첨가하여 5분간 반응시킨 분획에서 적색소가 생성됨을 확인할 수 있었다. 이렇게 해서 생성된 적색소가 carthamin인지를 확인하기 위해 TLC(n-butanol:acetic acid:water=4:1:5)의 전개를 수행하여 그 결과물이 carthamin임을 확인하였다(그림 4-10).

### 다. 식용색소 공정의 실용성 조사 및 경제성 재평가

치자 청색소 생산공정 시스템의 경우 국내의 일부 회사에서 실용화하여 현재 청색소의 대량생산에 적용하려고 하고 있어 경제성이 있는 것으로 판단된다. 그러나 잇꽃 적색소 생산공정 시스템의 경우에는 현재까지의 연구결과를 가지고 실용성 및 경제성을 언급하기에는 미흡하다고 생각된다. 그렇지만 식용 천연 색소의 국제 시장의 크기, 우리나라에서의 천연 색소의 수입 의존도 등을 감안해 볼 때 적절한 종합 공정시스템이 확립되면 경제적 생산이 가능할 것으로 판단된다.

### 라. 색소 생산 시스템의 SCALE-UP

#### 1) 치자 청색소 생산 시스템의 scale-up 연구

치자 청색소 생산을 위해 본 연구실에서 이미 확립한 효율적인 고정화 기법을 활용하여 scale-up 연구를 수행하였다. 실험실 규모의 0.5 ml 추출 변환 반응기를 5 ml로 10배 scale-up 하여 추출변환 반응기의 변화가 색소생산에 미치는 영향을 검토하였다. 먼저 CNBr-sepharose 4B resin(수지) 1 g에 대해 glutaraldehyde 10 %를 처리하고 효소의 loading 농도를 100 U로 증가시켜 효소를 고정화 시켰다. 그리고 acetate buffer로 충분히 세척한 후 미리 추출한 geniposide를 반응시켜 청색소의 생산 수율을 분광광도계를 이용하여 검토하였다. 그림 4-11은 small scale에서 생산된 청색소의 흡광도에 대하여 large scale에서 생산된 청색소의 흡광도를 상대적인 비율로 나타낸 그래프이다. 이 실험을 통해 large scale에서 청색소의 생산량이 small scale에서보다 약 160% 정도 청색소 생산수율의 증가를 보여주었다.

## 2) 홍화 적색소 생산 시스템의 scale up 연구

적색소 종합공정시스템 연구에서 구성한 시스템의 생변환 공정에서 정제한 효소의 고정화 공정에 의한 방식은 효소 정제시의 비용 및 labor-intensive 한 단점으로 인해 경제성이 적은 것으로 판단되어 기 구성한 종합공정 시스템을 개선하여 조직배양에서 확보한 callus를 생축대로 사용하는 방식을 개발하였으며 이의 scale-up 연구를 수행하였다.

경제적인 적색소의 생산을 위해 조직배양을 통한 홍화 callus를 파쇄하여 기질을 반응시키는 방법에 관한 연구를 수행하였다. 먼저 홍화씨를 NaOCl로 소독한 후 2월에 MS medium에 seedling하여 25℃, 광조건에서 발아시키고 이로부터 MS 2,4-D homone(2 mg/L) 조건에서 계대 배양하면서 callus를 유기시켰다(그림 4-12). 이들 callus를 파쇄하여 얻은 추출물과 기질인 precarthamin을 반응시켜 적색소가 생성됨을 볼 수 있었다. 이때의 반응성을 살펴보기위해 callus 추출물과 동량의 홍화 꽃잎에서 추출한 효소와의 반응성을 비교 검토하였다(그림 4-13).

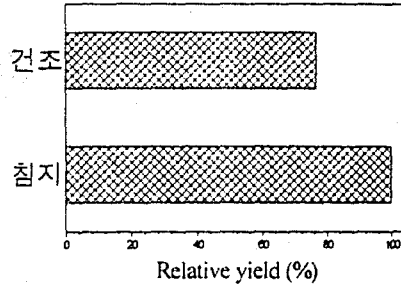
또한, 이때 만들어 지는 적색소가 carthamin 인지를 확인하기 위해 상온에서 일주일간 보관한 결과 carthamin은 분해되어 황색을 띠는데 반해 callus 추출물로부터 만들어진 적색소는 분해되지 않았다. 이는 carthamin과는 다르게 식물체의 oxidase로부터 만들어지는 적색소로 추정되어지고 있으며 carthamin은 아니지만 천연 적색



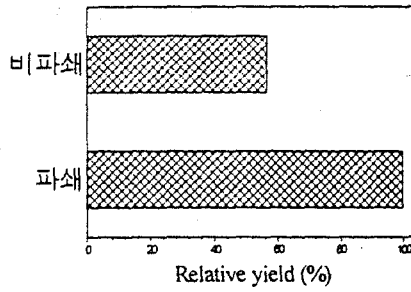
소만을 얻고자만 한다면 쉽게 분해되는 carthamin보다는 더욱 효과적으로 사용될 수 있을 뿐 아니라 산업체에서 생산과정에서도 경제적인 생산이 가능할 것으로 보인다. 조직배양을 통해 carthamin 변환 효소를 생산하는 연구에 관련하여 callus를 파쇄하지 않고 callus의 현탁 배양을 통해 carthamin을 생산하는 연구를 수행하였다. callus의 현탁배양액에 기질인 precarthamin을 첨가하여 배양한 결과 생세포에 의해 적색소가 생성됨을 알 수 있었다.

홍화 세포의 현탁배양을 통한 홍화 적색소 생산 가능성을 조사하기 위해 scale-up 연구를 수행하였다. 이미 조직 배양에서 확보한 callus를 이용하여 callus를 50 ml 배양하여 반응기에 precarthamin과 함께 첨가하여 적색소의 생산수율을 검토하였다. 그리고, 250 ml로 5배 scale-up 시켜 반응기에서의 적색소 생산 수율을 검토한 결과 5배 scale up한 반응기에서 57%의 생산수율을 보였다. 이는 배지에 의해 적색소가 희석되었을 가능성에 비해 비교적 높은 수율을 나타내는 결과이다. 또한 본 연구에서는 동량의 배지에서 PCV의 변화에 의한 적색소 생산 수율의 변화를 조사하였다. 20% PCV에 대해 30% PCV의 현탁배양을 사용하였을 경우 적색소의 생산량은 1.16배 가량 증가함을 보여주었다(그림 4-14). 현탁배양을 통해 적색소를 생산하는 경우 초기 1시간 동안에는 적색소의 생산이 급격히 이루어 졌고 3시간째에는 가장 많은 적색소가 생성되었다. 이후의 시간에는 오히려 적색소가 감소하였는데 이는 생성된 적색소가 분해되면서 황색소로 변화하는 이유 때문으로 추정된다. 따라서 현탁배양을 통해 적색소를 생산하는 경우 반응시간은 3시간 이내가 가장 경제적인 것으로 생각된다.

이상에서와 같이 본 연구를 통해 제 3 세부과제에 대한 연구를 성공적으로 수행하였다. 홍화의 현탁배양에 의한 적색소의 생산의 경우에는 carthamin이라는 가능성을 가지고 있으나 좀더 보완의 실험이 필요할 것으로 생각된다.



침지 (수율 30%증가)



파쇄 (수율 77%증가)

그림 4-1. 시료조건에 따른 추출 수율의 변화

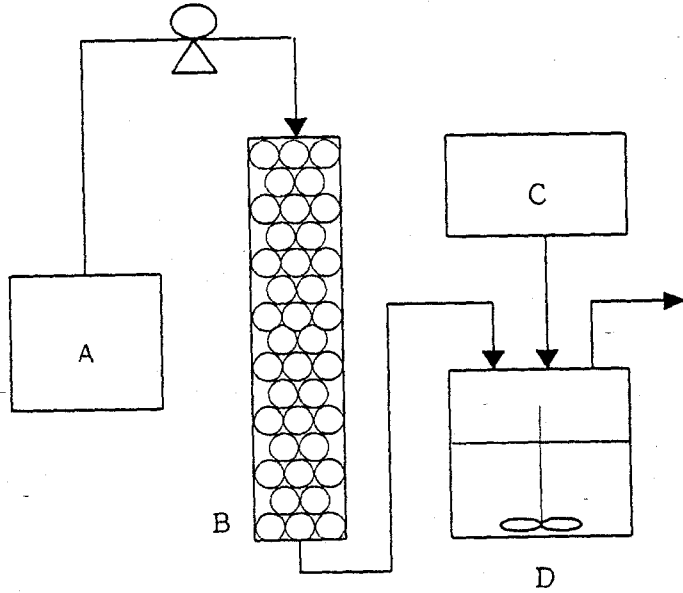


그림 4-2. 추출변환 반응기 및 공정 모식도

- |                      |                |
|----------------------|----------------|
| A : 추출 geniposide 탱크 | B : 고정화 효소 반응기 |
| C : 기질 탱크            | D : 추출변환 반응기   |

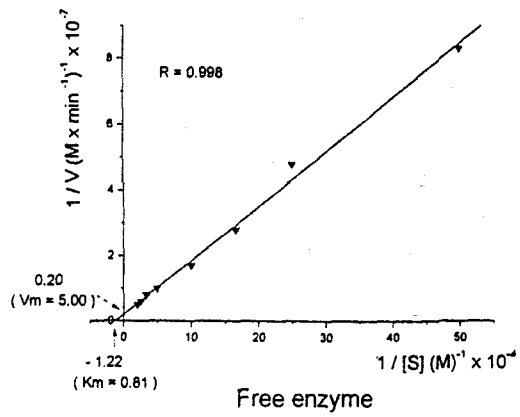
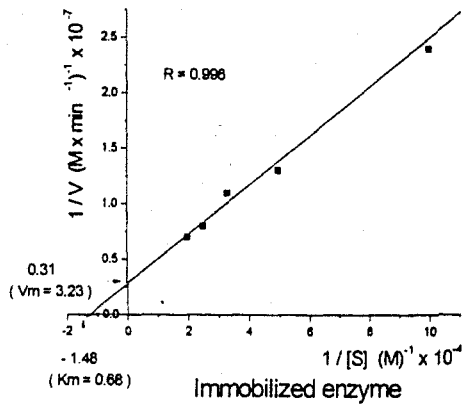


그림 4-3. 고정화 효소와 자유효소의 kinetics

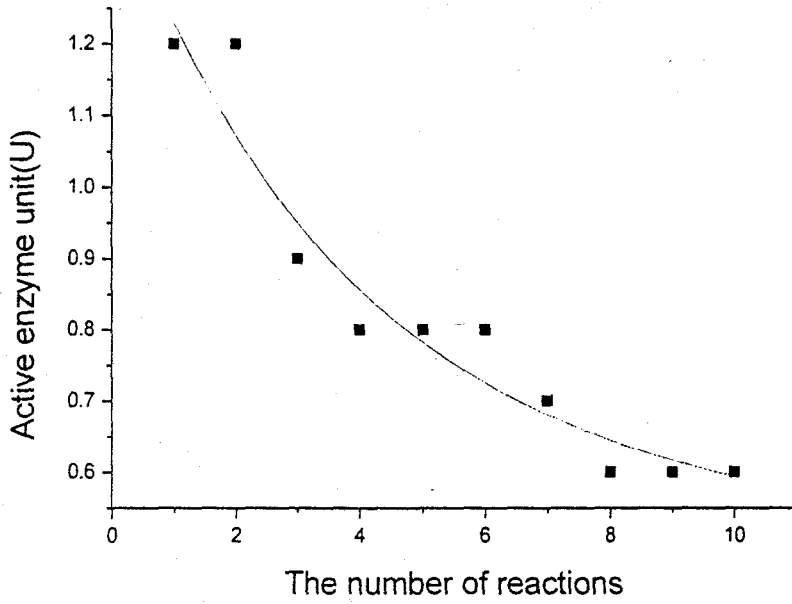


그림 4-4. 반응 횟수에 따른 고정화 효소의 activity 변화

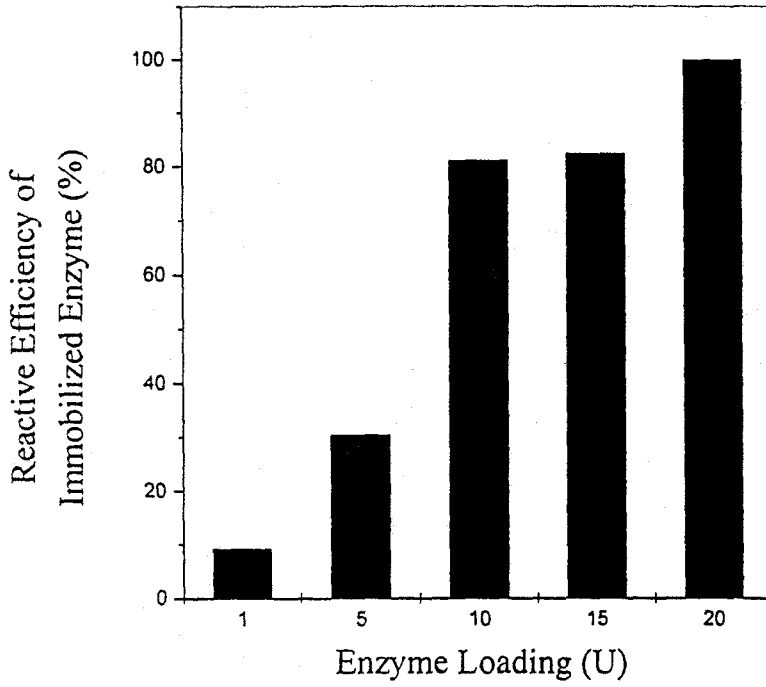


그림. 4-5. 효소의 loading 농도에 따른 고정화율의 변화

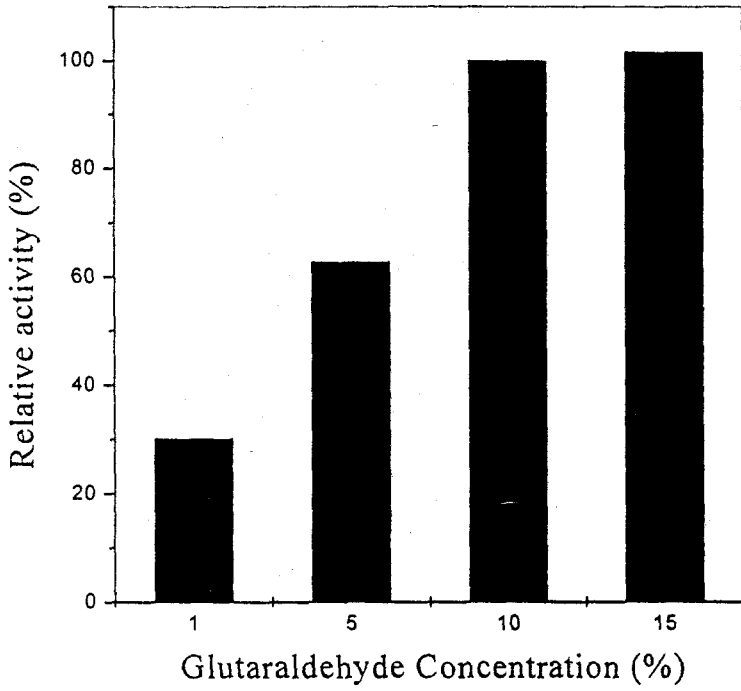


그림 4-6. glutaraldehyde 농도에 따른 고정화 효소의 activity

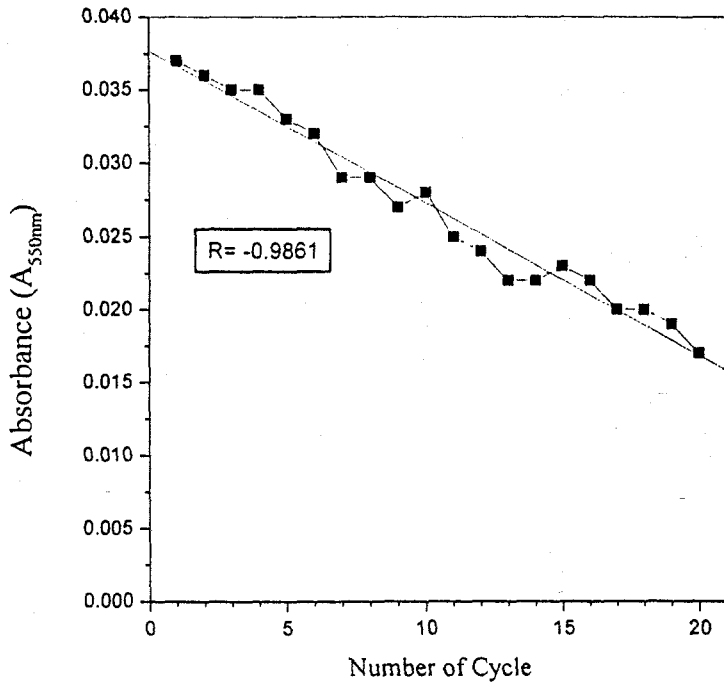


그림 4-7. 종합공정 시스템에서 고정화 효소 activity의 안정성



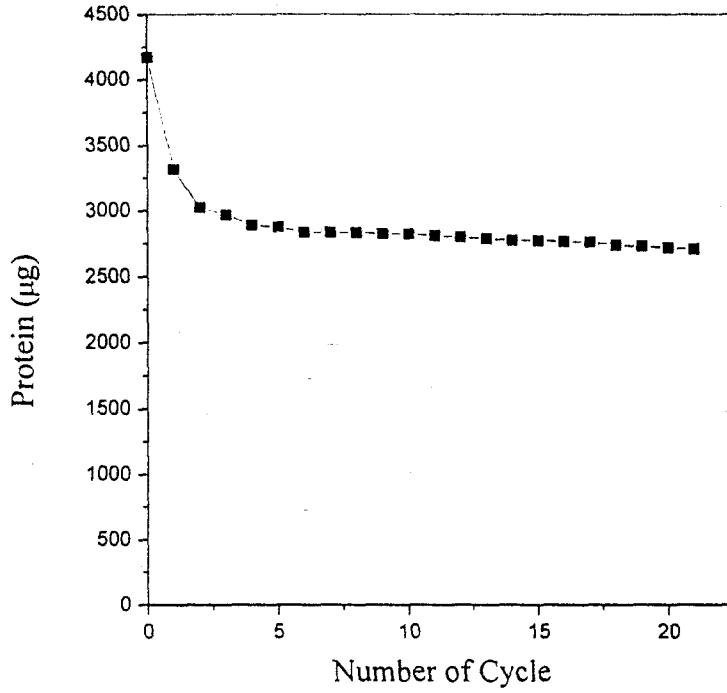


그림 4-8. 종합공정 시스템에서 고정화 효소의 cross linking의 안정성

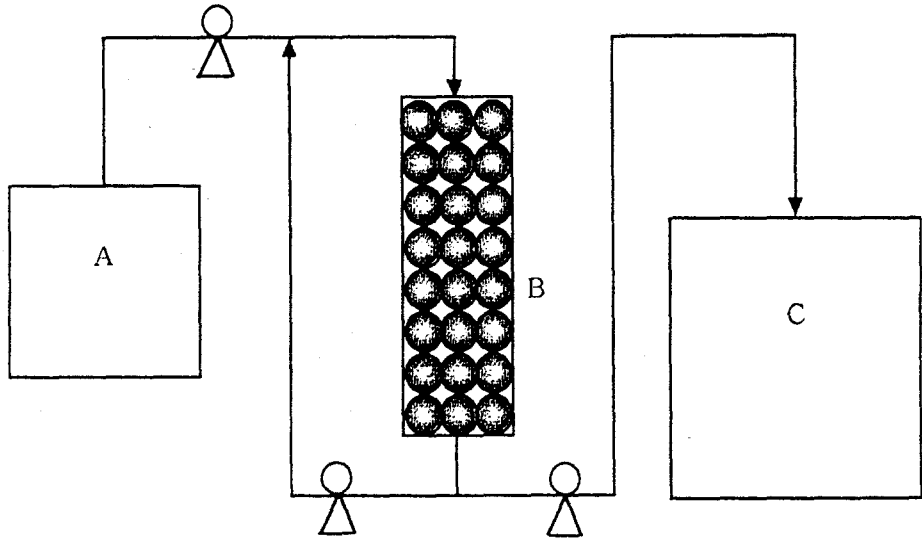


그림 4-9. 홍화로부터 적색소를 생산하기위한 생변환 공정 모식도

- A : 기질 탱크
- B : 효소 반응기
- C : 색소 저장 탱크

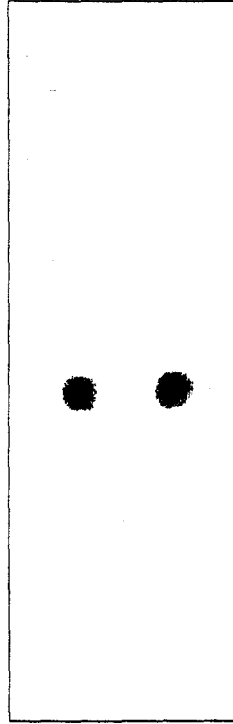


그림 4-10. 고정과 효소에 의해 변환된 적색소(좌)와 적색 홍화 꽃잎으로부터 얻은 carthamin(우)의 TLC 비교

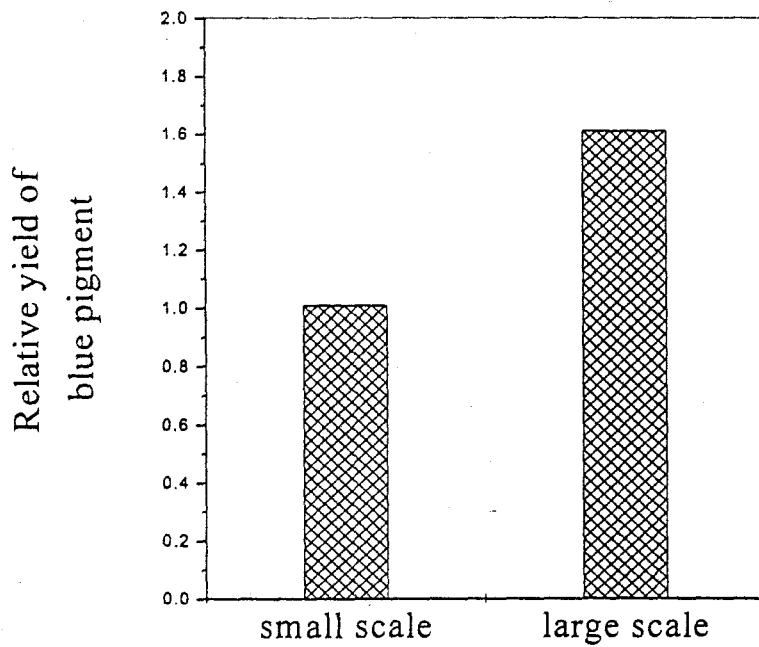


그림 4-11. 효소를 결합시키는 수지의 양에 의한 반응기의 scale-up 실험

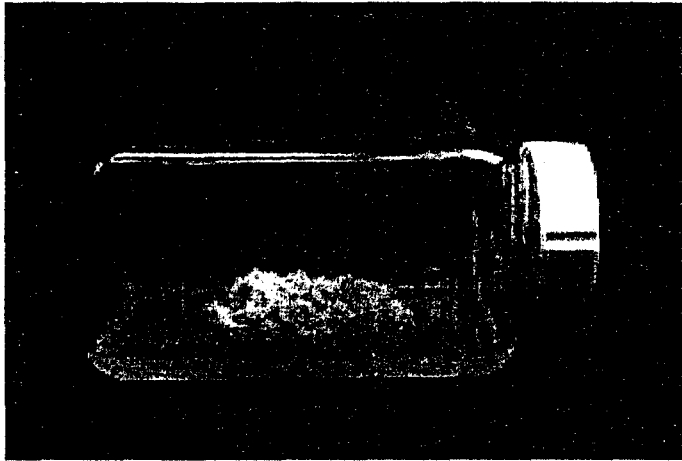


그림 4-12. 홍화씨를 발아시켜 얻은 callus. (조직 배양을 위해 MS 배지에 2,4-D를 2mg/l의 농도로 첨가하여 callus를 유기함.)

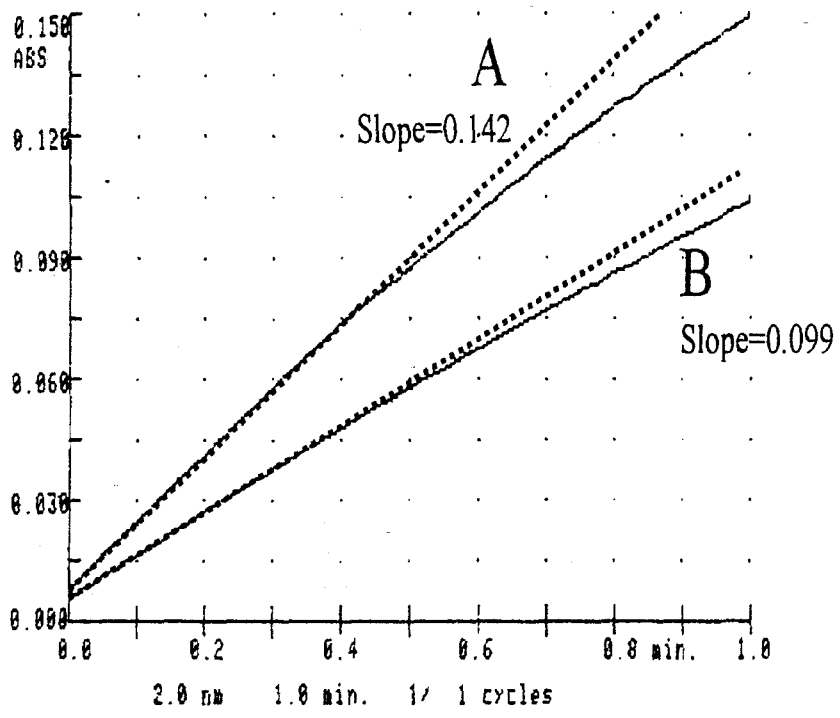


그림 4-13. 홍화에서 추출한 효소와 기질과의 반응속도(A)와 홍화 callus 파쇄액과 기질과의 반응속도(B)의 비교.

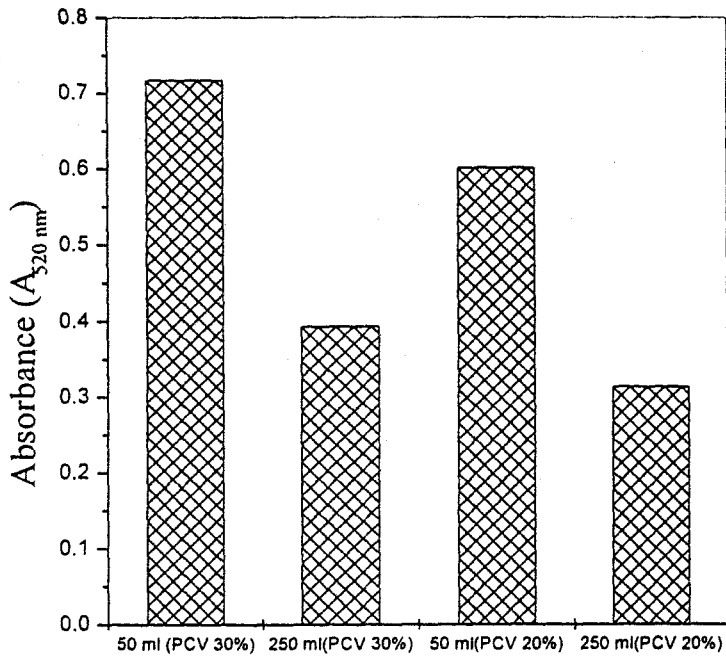


그림 4-14. 홍화 callus의 현탁배양의 scale up을 통한 홍화 적색소의 생산수율의 변화

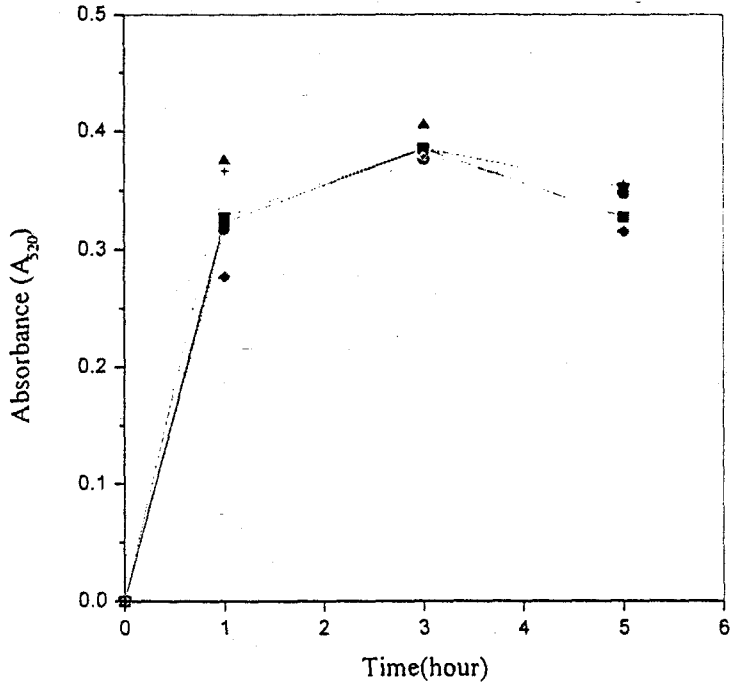


그림 4-15. 홍화 세포의 현탁배양을 통한 적색소의 생산에서 시간에 따른 적색소 수율의 변화.



# 제 5 장 생물변환 천연 식용색소의 식품활용 기술 개발

## 제 1 절 서 설

협동연구에서는 천연 착색료로서 생물 변환 생산된 홍화 황색소, 적색소 및 치자 청색소를 식품에 사용함으로써 인공착색료의 사용으로 인해 야기되는 안전성의 문제를 해소하고, 아울러 농가소득 증대에 기여할 수 있는 고부가가치를 창출해 낼 수 있는 방안을 모색하고자 기능성 음료, 유화(emulsion) 식품, 반고체 식품, 전통 한과 등에 시료천연색소들을 활용하는 연구를 수행하였다.

1차년도에는 연구목표인 1) 홍화 황색소, 적색소의 모델식품에서의 관능특성 연구 2) 치자 청색소의 모델식품에서의 관능특성 연구를 식품으로 음료모델과 유화상 모델, 그리고 젤라틴 젤리를 선정하여 색소 안정성 및 관능 특성을 조사하였다. 음료모델 실험으로 색소의 최적 첨가량과 이온, 당, 아미노산, 비타민 등의 첨가조건이 색소안정성과 관능적 특성에 미치는 영향을 조사하였고, 저장에 따른 색소 안정성을 조사하였다. 물에 잘 녹지 않는 홍화 적색소는 유화식품에 적용하기 위해, 여러 유화상에서의 안정성을 조사하였다. 또한, 젤리모델로서 반고체식품에서의 색소 안정성을 조사하였고, 색소첨가에 의한 젤리의 색과 물성 변화 및 이액 현상을 알아 보았다.

2차년도에는 생물변환 천연색소의 식품활용 연구를 위하여 1) 홍화 황색소를 첨가한 기능성 음료를 제조하여 각 첨가물에 따른 색 안정성과 저장성 그리고 관능 특성을 조사하였고, 2) 치자 청색소의 제과류 첨가 활용 연구로 생물변환 생산된 치자 청색소를 전통 과자인 다식에 첨가하여 색소의 활용성과 새로운 다식의 개발 가능성을 조사하고자 색소의 농도와 당의 종류를 달리하여 제조한 녹말다식의 특성을 조사하였다. 3) 홍화색소의 한과류 활용연구를 위해 홍화 황색소를 과편과 젤리에 활용하여 색, 질감, 맛 등의 관능적 특성을 조사하였으며, 저장 안정성과 기호 특성을 조사하였다.

## 제 2 절 연구결과

### 1. 생물 변환 식용 색소의 모델 식품 특성 연구

#### 가. 홍화 황색소, 적색소의 모델식품에서의 관능특성 연구

##### 1) 홍화황색소를 이용한 음료모델 안정성 연구

표준색소용액으로 최대흡광도가 약 1.0 인 표준용액(0.47mg/ml)을 제조하였고 UV/Vis spectrophotometer를 이용하여 홍화 황색소 용액의 최대흡수파장을 조사하였다. 음료 모델을 선정하기 위하여, 먼저 음료의 색에 대한 당 농도의 영향과 금속이온의 영향을 흡광도와 최대흡수파장의 변화로 측정하였고, 색차계로 Hunter value를 측정하였다. 당농도를 달리하여(11, 13, 15%) 모델음료를 제조한 결과 13%의 당농도에서 가장 색도가 증가하여 흡광도, b값 모두 최대치를 나타내었지만 다른 농도와 비교했을 때 유의적인 차이는 보이지 않아 모델음료의 당농도를 13%로 고정하였다. 0.01M의 여러 가지 금속이온들을 첨가하여 색소용액의 최대흡수파장, 흡광도 그리고 Hunter b value를 측정한 결과는 Table 1과 같다. 금속이온을 첨가 시 흡광도가 약간 증가하였고, Fe<sup>2+</sup>의 경우 자체의 황색으로 인해 흡광도가 현저히 증가했다. Hunter b 값은 금속이온의 이온가가 증가할수록 b 값이 감소하는 경향을 보여주고 있다. 이온의 혼합이 모델음료의 색도에 영향을 주는지를 알아보기 위하여 일반적인 이온음료에서 첨가한 것과 유사하게 이온들을 2개(Table 5-2)와 3개로 조합하여 특성을 조사한 결과, 2개씩 혼합하여 첨가한 경우에 최대흡수파장과 흡광도에서는 이온을 한가지씩 첨가한 경우와 마찬가지로 유의적인 차이를 보이지 않았고 b값에 있어서는 6개의 금속이온 중 Al<sup>3+</sup>가 첨가된 시료가 낮은 값을 나타내었다. 이온 3개씩 혼합하여 첨가한 경우에도 2개 혼합한 경우와 비슷한 결과를 나타내었다.

색소 농도를 결정하기 위해서 색소 농도와 첨가이온을 달리하여 관능검사를 한 결과, 색과 맛에 있어서는 색소농도 0.47mg/ml와 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>의 금속이온을 첨가한 시료를 가장 선호하였고, 전체적인 수용도는 색소농도 0.8mg/ml와 Na<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>의

금속이온을 첨가한 시료를 유의적으로(5% 수준) 가장 선호하였다(Table 5-3).

Table 5-1. Effect of metal ions on the max  $\lambda$ , Abs and Hunter b value of the model beverages with Safflower Yellow pigment

metal ions	max $\lambda$	abs	Hunter b
control	402.4	1.209	35.58
Na <sup>+</sup>	402.5	1.212	35.51
K <sup>+</sup>	402.4	1.197	35.49
Fe <sup>2+</sup>	378	1.348	35.71
Mg <sup>2+</sup>	402.5	1.2	35.05
Ca <sup>2+</sup>	402.6	1.191	34.93
Al <sup>3+</sup>	401.9	1.309	34.12

Table 5-2. Effect of combined metal ions on the max  $\lambda$ , abs and Hunter b value of the model beverages with Safflower Yellow pigment

		L	a	b	Max $\lambda$	abs
	K	96.80	-10.70	35.46	401.0	1.193
	Fe	95.48	-10.87	37.29	309.0	2.801
Na <sup>+</sup>	Mg	97.32	-10.88	35.22	401.0	1.180
	Ca	97.31	-11.00	35.50	402.0	1.196
	Al	97.65	-10.71	34.42	402.0	1.271
	Na	96.80	-10.7	35.46	401.0	1.193
	Fe	96.19	-10.83	36.54	306.0	2.525
K <sup>+</sup>	Mg	97.53	-11.14	35.23	401.0	1.159
	Ca	97.70	-11.45	35.53	401.0	1.182
	Al	97.57	-10.75	34.30	402.0	1.294
	Na	95.48	-10.87	37.29	309.0	2.677
	K	96.19	-10.83	36.54	306.0	2.781
Fe <sup>2+</sup>	Mg	96.03	-11.04	37.47	306.0	2.000
	Ca	95.75	-11.07	37.28	306.0	2.781
	Al	96.25	-10.69	36.32	302.0	2.000
	Na	97.32	-10.88	35.22	401.0	1.180
	K	97.53	-11.14	35.23	401.0	1.159
Mg <sup>2+</sup>	Fe	96.03	-11.04	37.47	306.0	2.677
	Ca	97.49	-11.28	35.42	402.0	1.950
	Al	97.56	-10.75	34.07	402.0	1.285
	Na	97.31	-11.00	35.50	402.0	1.196
	K	97.70	-11.45	35.53	401.0	1.182
Ca <sup>2+</sup>	Fe	95.75	-11.07	37.28	306.0	2.781
	Mg	97.49	-11.28	35.42	402.0	1.950
	Al	97.61	-10.98	34.34	402.0	1.283
	Na	97.65	-10.71	34.42	402.0	1.271
	K	97.57	-10.75	34.30	402.0	1.294
Al <sup>3+</sup>	Fe	96.25	-10.69	36.32	302.0	2.000
	Mg	97.56	-10.75	34.07	402.0	1.258
	Ca	97.61	-10.98	34.34	402.0	1.283

Table 5-3. Mean scores of sensory evaluation data of model beverages with Safflower Yellow pigments

samples <sup>1)</sup>	Characteristics <sup>2)</sup>			
	Color	Sweetness	Sourness	Overall acceptability
Control	6.825 <sup>ad</sup>	6.700 <sup>a</sup>	5.025 <sup>ad</sup>	6.525 <sup>ad</sup>
K1	4.700 <sup>abcd</sup>	6.180 <sup>ab</sup>	4.580 <sup>ab</sup>	5.440 <sup>ab</sup>
K2	7.160 <sup>a</sup>	6.140 <sup>abc</sup>	6.080 <sup>a</sup>	5.940 <sup>ab</sup>
K3	5.940 <sup>abcd</sup>	6.380 <sup>a</sup>	5.340 <sup>ab</sup>	5.480 <sup>ab</sup>
K4	5.680 <sup>abcd</sup>	6.520 <sup>a</sup>	5.740 <sup>a</sup>	6.480 <sup>ab</sup>
K5	4.140 <sup>cd</sup>	3.720 <sup>c</sup>	2.700 <sup>b</sup>	3.640 <sup>b</sup>
M1	3.820 <sup>d</sup>	6.340 <sup>a</sup>	3.880 <sup>ab</sup>	7.020 <sup>a</sup>
M2	6.720 <sup>abc</sup>	4.880 <sup>adc</sup>	4.300 <sup>ab</sup>	5.460 <sup>ab</sup>
M3	7.020 <sup>ab</sup>	6.080 <sup>abc</sup>	4.600 <sup>ab</sup>	7.020 <sup>a</sup>
M4	7.080 <sup>a</sup>	4.740 <sup>abc</sup>	5.040 <sup>ab</sup>	5.280 <sup>ab</sup>
M5	4.420 <sup>bcd</sup>	3.820 <sup>bc</sup>	3.460 <sup>ab</sup>	3.960 <sup>b</sup>

1) K : samples with Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>      M : samples with Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>  
 1 : samples with 0.1mg/ml concentration of Safflower Yellow pigment  
 2 : samples with 0.47mg/ml concentration of Safflower Yellow pigment  
 3 : samples with 0.8mg/ml concentration of Safflower Yellow pigment  
 4 : samples with 1.2mg/ml concentration of Safflower Yellow pigment  
 5 : samples with 2.0mg/ml concentration of Safflower Yellow pigment  
 C : control (sample with 0.47mg/ml concentration of Safflower Yellow pigment)

2) Sensory characteristics were rated on 10cm line scale scoring ; like extremely(10), dislike extremely(1)

Mean value from 5 replications

a)~c) means in the same line not followed by the same letter are significantly different(P<0.05)

## 2) 홍화 적색소의 유화상에서의 색 변화

유화모델로서 glycerin과 물, 대두유를 기본으로 하여 lecithin을 첨가한 유화상에 홍화 적색소를 넣어 다양한 저장조건에 따른 안정성을 조사하였다. 25℃ 암실 조건에서의 저장기간에 따른 색소조건별 색도변화에 있어서는 홍화적색소의 경우 glycerin을 base로 하였을 경우 L, a, b-value 모두 증가하는 경향을 나타내었고, 증류수를 base로 하였을 경우 약간 증가하였다. 반면에, soybean oil의 경우 색도변화에 그다지 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 그리고, lecithin 첨가유무에 따른 변화를 살펴본 결과에 있어서도 별다른 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다 (Table 5-6). 열악조건(40℃, 90% R.H)에서는 glycerin을 base로 하였을 경우 L-value는 감소하는 경향을 나타내었고, a-value의 경우 4 시간째 이후부터는 거의 변화를 보이지 않았으며, b-value의 경우 4 시간 후부터는 현저하게 증가하는 경향을 보이면서 그 이후 큰 변화를 보이지 않았다. Soybean oil의 경우 L-value에서는 변화를 보이지 않았고, a 및 b-value는 약간 증가하는 경향을 나타냈다. 그리고, lecithin첨가 유무에 따라 차이를 보였는데, lecithin첨가구의 경우 L, a 및 b-value의 별다른 변화를 보이지 않았고, lecithin무첨가구의 경우 L-value는 증가하는 경향을, a 및 b-value에 있어서는 감소하는 경향을 나타내었다(Table 5-7). 광조사(25℃, 5500Lux) 조건의 경우에 glycerin을 base로 하였을 경우 L-value는 감소하는 경향을 나타내었고, a 및 b-value의 경우 증가하는 경향을 보였는데, 특히 b-value의 앞에서 보인 두 가지의 조건에서와 마찬가지로 4 시간 이후에는 현저하게 증가하는 경향을 보이면서 그 이후 큰 변화를 보이지 않았다. 반면에, 증류수를 base로 하였을 경우 L-value는 증가하는 경향을 나타내었고, a 및 b-value는 감소하는 경향을 나타냈다. Soybean oil의 경우 lecithin첨가유무에 따라 큰 차이를 보였는데, lecithin첨가구의 경우 L 및 b-value는 증가하는 경향을, a-value는 현저하게 감소하는 경향을 보였지만, 무첨가구의 경우 L, a 및 b-value에 있어 그다지 큰 변화를 보이지 않았다.

Table 5-6. 실온에서의 유화상 적색소의 색도변화 (25℃, 암실)

samples		storage time					
		0	1hr	2hr	4hr	8hr	
Glycerin+ Carthamin+ lecithin	Hunter value	L	29.24	27.73	27.11	11.23	11.55
		a	28.20	29.44	26.00	34.97	32.51
		b	10.99	9.06	10.00	43.19	43.46
		ΔE	43.02	42.34	37.79	58.28	57.09
D.W+ Carthamin+ lecithin	Hunter value	L	14.42	16.01	17.11	19.36	15.86
		a	35.27	34.19	34.06	31.88	32.76
		b	47.97	50.29	51.93	55.02	49.97
		ΔE	62.85	64.47	66.00	68.05	63.41
Soybean oil+ Carthamin	Hunter value	L	28.63	27.97	28.54	25.72	28.54
		a	33.31	30.80	28.35	32.49	28.35
		b	18.57	16.24	12.91	23.18	12.91
		ΔE	48.81	45.74	43.24	48.74	43.24
Soybean oil+Carthamin +lecithin	Hunter value	L	40.10	38.80	36.72	34.70	40.12
		a	14.09	16.71	12.64	14.97	12.65
		b	3.90	4.78	6.78	7.24	4.66
		ΔE	43.10	41.23	40.04	39.09	42.74

Table 5-7. 열악조건에서의 유화상 적색소의 색도변화 (40℃, 90% R.H)

samples		storage time					
		0	1hr	2hr	4hr	8hr	
Glycerin+ Carthamin+ lecithin	Hunter value	L	29.24	29.59	29.32	10.97	13.32
		a	28.20	27.62	27.79	34.11	34.21
		b	10.99	7.97	8.08	42.73	46.24
		ΔE	43.02	42.09	42.04	57.35	60.63
D.W+ Carthamin+ lecithin	Hunter value	L	14.42	17.16	16.99	17.06	19.63
		a	35.27	35.52	34.91	33.96	32.13
		b	47.97	52.10	51.79	51.84	55.43
		ΔE	62.85	66.93	66.31	65.86	68.58
Soybean oil+ Carthamin	Hunter value	L	28.63	27.14	28.82	31.38	30.41
		a	33.31	32.94	28.66	26.70	23.35
		b	18.57	20.78	14.55	13.94	14.78
		ΔE	48.81	48.66	44.20	44.45	42.08
Soybean oil+Carthamin +lecithin	Hunter value	L	40.10	35.81	37.59	40.46	39.93
		a	14.09	13.88	15.60	11.56	12.55
		b	3.90	5.26	4.62	5.66	5.02
		ΔE	43.10	39.27	41.45	42.90	42.59

### 3) 홍화 색소를 이용한 모델 젤리의 색도 안정성 및 관능특성 연구

젤라틴, 당, 수분의 최적 배합 조건은 당 15%, gelatin 5%, 물 80%로서, 색소 농도 변화에 따른 젤라틴 젤리의 색도검사 결과는 Fig. 5-1과 같다. 색소 함량이 증가함에 따라 L값과 a값은 감소, b값은 증가하는 경향을 보였다 또한, 색소 농도 변화에 따른 젤라틴 젤리의 TPA측정 결과는 Fig. 5-2와 같다. 색소 함량이 증가할수록 hardness는 큰 변화가 없었고, fracturability는 증가, adhesiveness는 증가하는 경향을 보였으며, gumminess와 chewiness는 색소함량이 증가할수록 약간의 증가 경향을 보였으나, 0.10%는 다른 시료보다 현저하게 높아 다른 시료보다 색소함량이 0.10%젤리가 씹힘성이 좋을 것으로 추측된다. 색소함량에 따른 젤리의 관능적 특성을 알아본 결과는 Table 5-4와 같다. 맛(taste)과 풍미(flavor)는 색소첨가에 의한 유의적인 차이는 보이지 않았고, 색(color)은 0.05%의 젤리가 유의적으로 선호도가 높게 나타났다( $p < 0.05$ ). 질감(texture)은 탄력성(elasticity)와 부서짐성(fracturability)의 두가지 모두 0.01%의 젤리가 가장 높은 값을 나타내었다. 전체적 선호도는 무첨가군과 0.02% 첨가군에 비해 0.1% 젤리가 가장 높은 선호도를 높게 나타내었다.

냉장과 상온에서 보관한 젤라틴 젤리의 저장기간에 따른 색, 텍스처, syneresis % 측정된 결과는 Fig. 5-3에서 8과 같다. 저장기간에 따라 L값은 냉장과 상온에서 모두 감소하는 경향을 보였다. 특히, 0.2%색소첨가군이 감소폭이 컸으며, 무첨가군은 감소폭이 가장 작았다. 저장온도에 따라서는 냉장보다 상온에서 저장한 것이 더 빠르게 감소하였으며, L값의 감소경향은 비슷했다. 즉, 시간이 지남에 따라서 젤리의 lightness가 감소하는 것으로 볼 수 있어서 보관 중에 빛을 투과시키지 않는 포장재질을 사용해야 할 것으로 추측된다. 저장기간에 따라 b값은 냉장과 상온에서 모두 증가하는 경향을 보였다. 젤리의 저장기간이 길어질수록 이액현상이 나타나는 것을 발견하여 3000rpm에서 20분간 원심분리함으로써 추출된 물을 측정하여 synerisis%를 조사한 결과 냉장과 상온에서 모두 0.2% 색소첨가군이 가장 현저하게 이액현상이 나타났으며, 무첨가군에서는 거의 나타나지 않았다. 그러나 냉장에서 보관한 젤리가 상온에서 보관한 젤리보다 증가폭이 작았다. 따라서 젤리의 이액현상을 막기 위해서는 냉장보관하는 것이 좋을 것으로 추측된다. 텍스처 측정결과, 저장기간이 증가할



수축 hardness는 상온에서는 감소하는 경향을 보였고, 냉장보관에서는 증가하는 경향을 보였는데, 이것은 냉장보관에서는 시간이 증가함에 따라서 젤리의 망상구조가 더 치밀해지기 때문인 것으로 추측된다. 또한, fracturability는 냉장과 상온에서 모두 증가하는 경향을 보였으나 증가의 폭은 냉장에서 더 컸다. 색소함량이 증가함에 따라서 fracturability는 증가하여, 0.2% 색소첨가군에서 가장 컸다. 저장기간에 따라 adhesiveness는 냉장보관에서는 감소, 상온에서는 증가하는 경향을 보였다. 색소함량이 증가함에 따라서 냉장보관에서는 0.2%색소첨가군이 3시간 후에 현저히 감소했으나, 상온에서는 별다른 차이를 보이지 않았다. 즉, 저장실험 결과 색소함량의 증가에 따라 이액 현상과 질감의 변화가 증가하였으며 특히 냉장 저장에서 더 빠른 변화를 보였다. 따라서 색과 전체적 기호도에서 높은 점수를 나타낸 0.05%의 색소 첨가를 관능적 특성과 저장 안정성을 만족시키는 최적조건으로 제안한다.

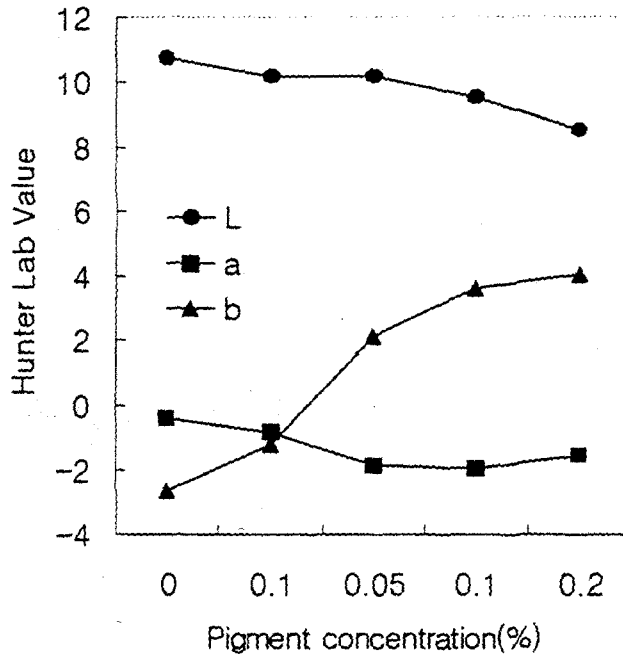


Fig. 5-1. Hunter L, a, b values for gelatin jelly with various concentration of Safflower yellow pigment.

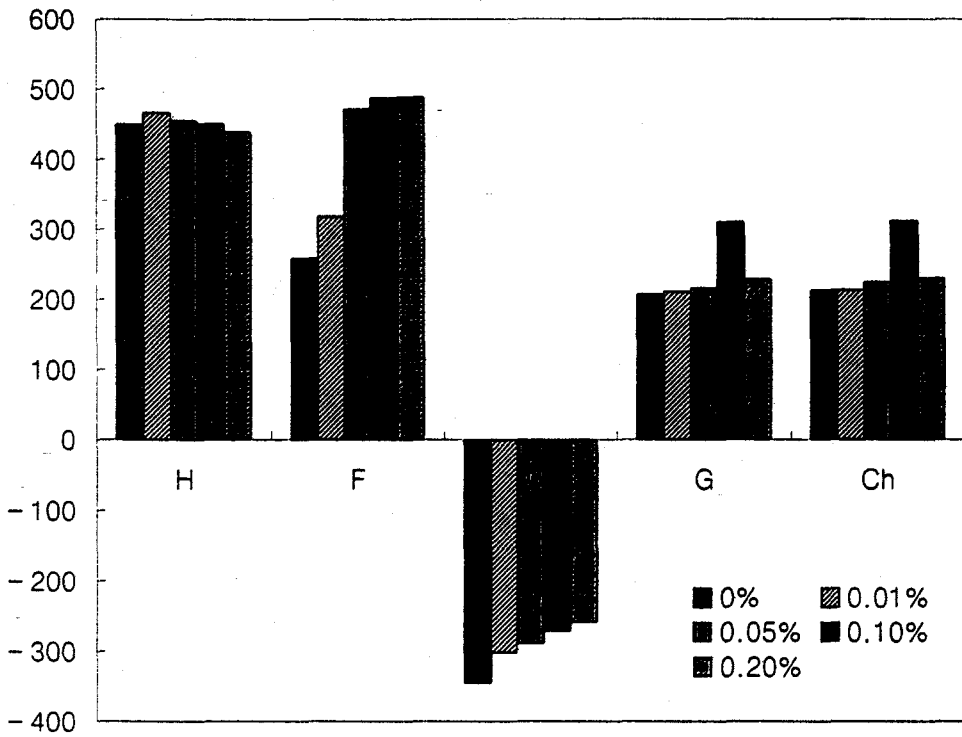


Fig 5-2. Texture properties for gelatin jelly with various concentration of Safflower yellow pigment (H: Hardness, F: Fracturability, A: Adhesiveness, G: Gumminess, Ch: Chewiness).

Table 5-4. Mean scores of sensory evaluation data for gelatin jelly with various concentration of Safflower yellow pigment

pigment (%)	Characteristics					
	Taste	Color	Flavor	Texture		Overall acceptability
				elasticit y	fracturabilit y	
0	4.1250 <sup>a</sup>	3.2250 <sup>d</sup>	3.7833 <sup>a</sup>	6.5667 <sup>ab</sup>	6.1083 <sup>ab</sup>	3.4250 <sup>d</sup>
0.01	4.5500 <sup>a</sup>	5.0250 <sup>bc</sup>	4.5583 <sup>a</sup>	6.6917 <sup>a</sup>	6.7333 <sup>a</sup>	4.8417 <sup>ab</sup>
0.05	4.9667 <sup>a</sup>	7.0083 <sup>a</sup>	3.7167 <sup>a</sup>	5.7833 <sup>ab</sup>	4.9917 <sup>bc</sup>	5.9583 <sup>a</sup>
0.1	5.4250 <sup>a</sup>	6.2083 <sup>ab</sup>	4.6750 <sup>a</sup>	5.0250 <sup>b</sup>	5.6250 <sup>abc</sup>	6.3500 <sup>a</sup>
0.2	4.2909 <sup>a</sup>	3.7727 <sup>ca</sup>	4.8091 <sup>a</sup>	3.1364 <sup>c</sup>	4.0727 <sup>c</sup>	4.1455 <sup>d</sup>
LSD	1.9438	1.7688	1.7120	1.6020	1.5653	1.7009

<sup>1)</sup>Sensory characteristics were rated on 5-point scale : like extremely(5), dislike extremely(1).  
Mean value from 12 replications

<sup>a-c</sup>, Means on the same line not followed by the same letter are significantly different (P<0.05)

LSD : Least Significant Difference

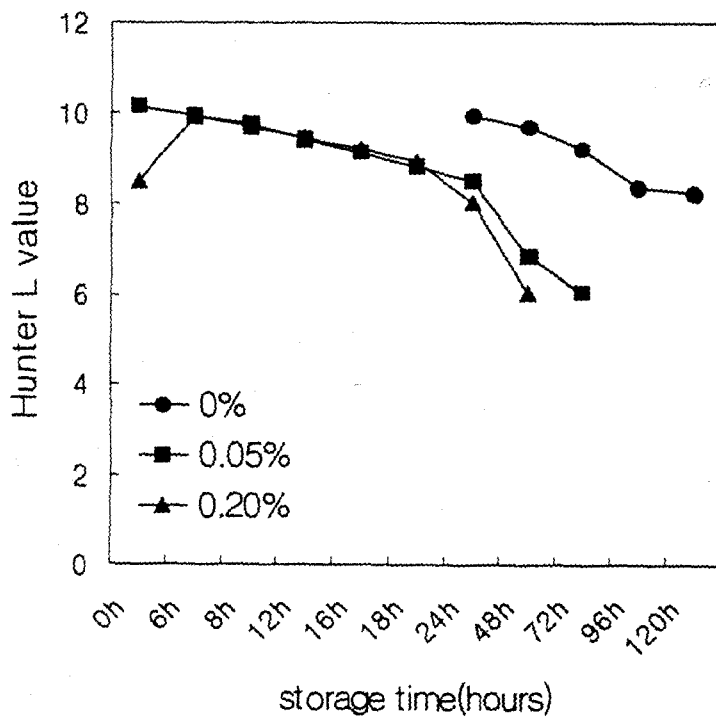


Fig. 5-3. Changes of Hunter L values for gelatin jelly with various concentration of Safflower yellow pigment stored at 22°C.

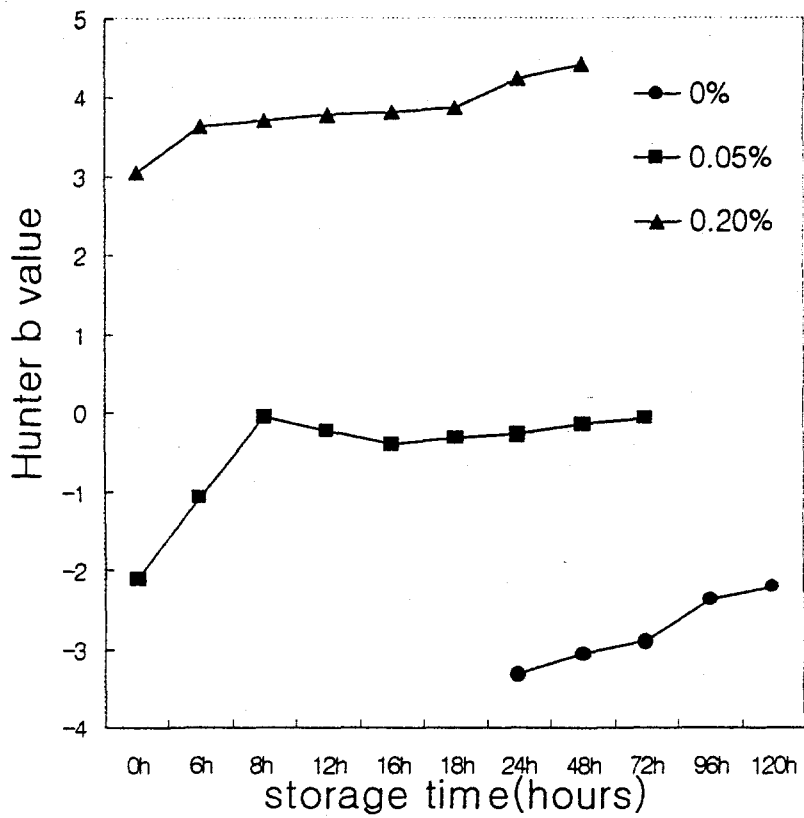


Fig. 5-4. Changes of Hunter b values for gelatin jelly with various concentration of Safflower yellow pigment stored at refrigerator.

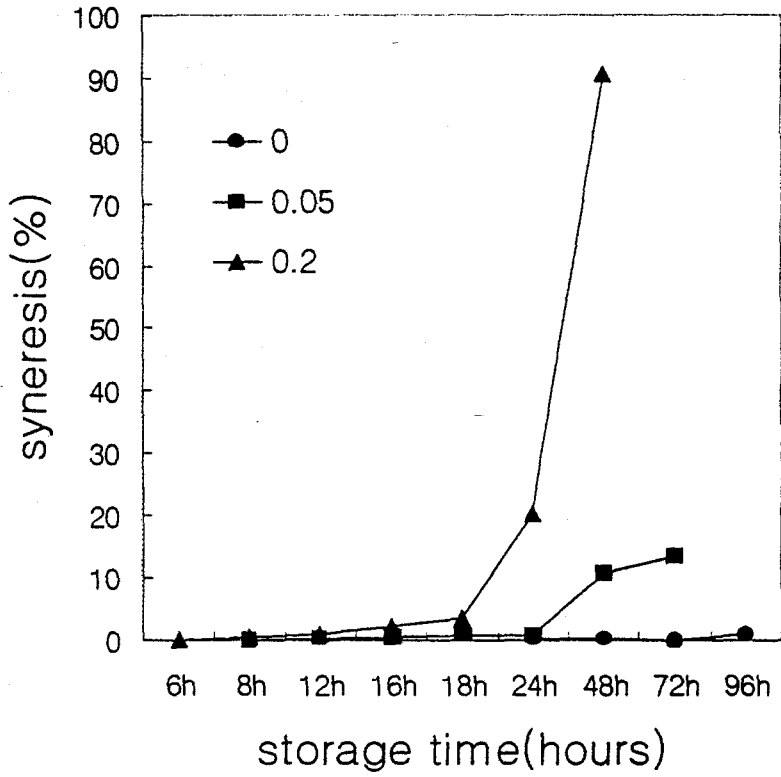


Fig 5-5. Syneresis percents for gelatin jelly with various concentration of Safflower yellow pigment stored at 22°C.

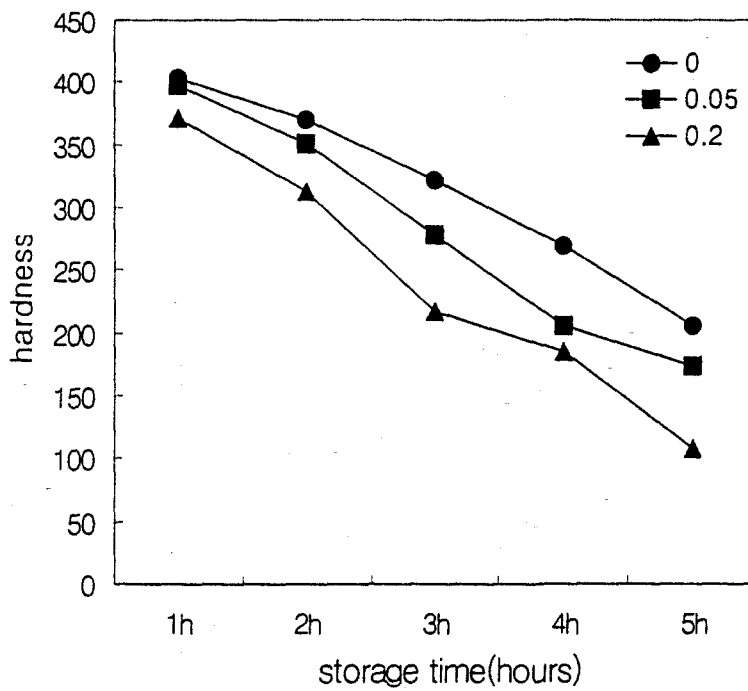


Fig. 5-6. Hardness of gelatin jellies with various concentration of Safflower yellow pigment stored at 22°C.



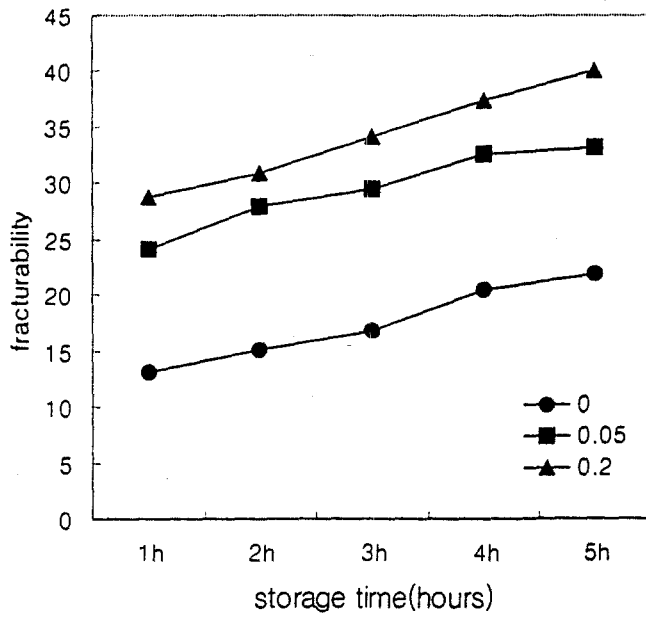


Fig. 5-7. Fracturability of gelatin jellies with various concentration of Safflower yellow pigment stored at 22°C.

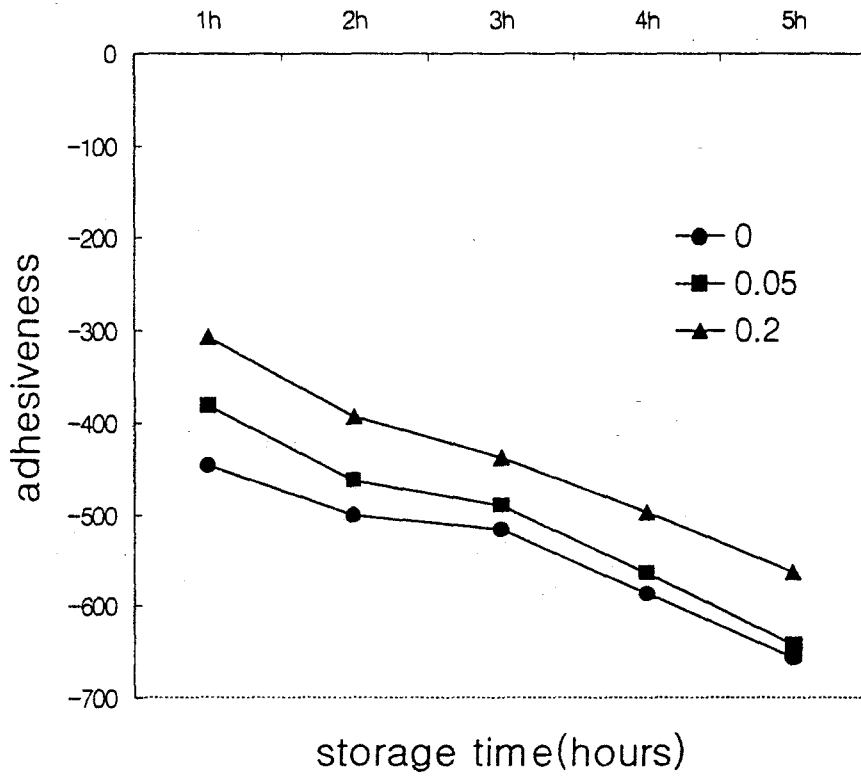


Fig. 5-8. Adhesiveness of gelatin jellies with various concentration of Safflower yellow pigment stored at 22°C.

## 나. 치자 청색소의 모델식품에서의 관능특성 연구

### 1) 치자 청색소의 음료 모델에서의 안정성 및 관능특성

색소농도가 다른 4가지 종류의 시료를 이용하여 흡광도를 조사한 결과, 각 색소 용액은 587nm의 최대 흡수파장에서 0.106, 0.292, 0.468, 0.755의 흡광도를 나타내었고, 4가지 색소용액으로 관능검사한 결과 흡광도가 0.292인 시료에 대해 가장 선호도가 높았다. 따라서 최대흡수파장 587nm에서 흡광도가 0.292인 색소용액을 모델 음료 색소 농도 조건으로 결정하였다. 치자 청색소를 pH 조건(3.0, 5.0, 9.0, 11.0)에서 25℃일 때 76일간 저장하면서 조사한 결과 pH가 증가할수록 흡광도와 b값이 큰 값을 나타내는 것으로 보아 치자 청색소는 산성일 때 보다는 알칼리성일 때 더 안정하다고 할 수 있다. (Fig. 5-9) 저장기간중 금속이온의 첨가에 의한 영향을 조사하기 위하여 색소용액에  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ 과 네가지 이온( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ )을 같이 첨가하여 저장하면서 관찰한 결과 이온종류에 따른 흡광도의 차이는 크게 나타나지 않았고 반면에 b값의 변화에서는  $\text{Al}^{3+}$ 의 경우 다른 종류의 금속이온에 비하여 b값이 크게 감소되어 안정성이 저하된 것을 알 수 있었다. (Fig. 5-10)

당의 종류에 따른 관능적 특성을 알아보기 위하여 pH3인 표준색소 용액에 sucrose, glucose, fructooligosaccharides, isomaltooligosaccharides를 첨가하여 관능검사를 한 결과 fructooligosaccharides, isomaltooligosaccharides만을 넣은 것은 관능적으로 선호도가 낮았지만 sucrose와 함께 넣었을 때 선호도가 높았다. 관능검사에서 유의적인 차이를 보였던 sucrose, glucose, sucrose + fructooligosaccharides, fructooligosaccharides를 첨가하여 저장한 결과 실험구 각각은 큰 차이를 보이지 않았다. 따라서 색소는 당에 따라 안정성에 변화를 보이지 않을 것으로 예상된다.

아미노산과 Vit C의 영향을 조사하기 위하여 필수 아미노산인 isoleucine과 threonine을 첨가한 결과 흡광도와 b값에서 큰 차이를 보이지 않아 아미노산의 첨가가 치자 청색소의 안정성에 영향을 준다고 볼 수는 없다. 반면에 Vit C를 첨가하였을 때에는 흡광도와 b값의 감소율이 커서 안정성에 크게 영향을 주는 것을 알 수 있었다(Fig 5-11).

당, 금속이온, 아미노산, Vit C 등 첨가물의 혼합방법에 따라 음료의 관능적 특성이 어떻게 변하는지를 알아보기 위하여 관능검사를 한 결과 색에 대해서는 sucrose와 amino acid를 첨가한 시료에 대해 가장 높은 선호도를 나타내었고 전체적인 수용도에서는 sucrose와 fructooligosaccharides를 함께 첨가한 것과 금속이온과 amino acid를 같이 첨가한 시료가 가장 높은 선호도를 나타내었다.

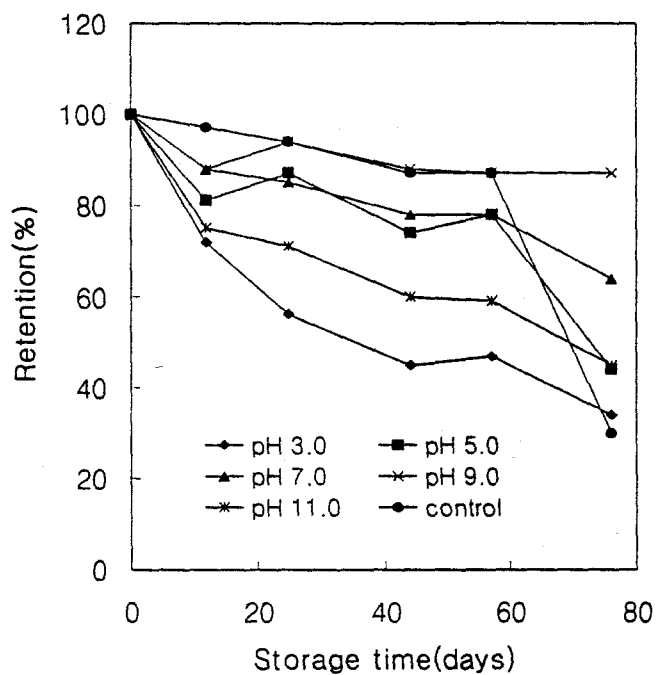


Fig 5-9. Effects of pH on the stability of Gardenia blue pigments at 25°C

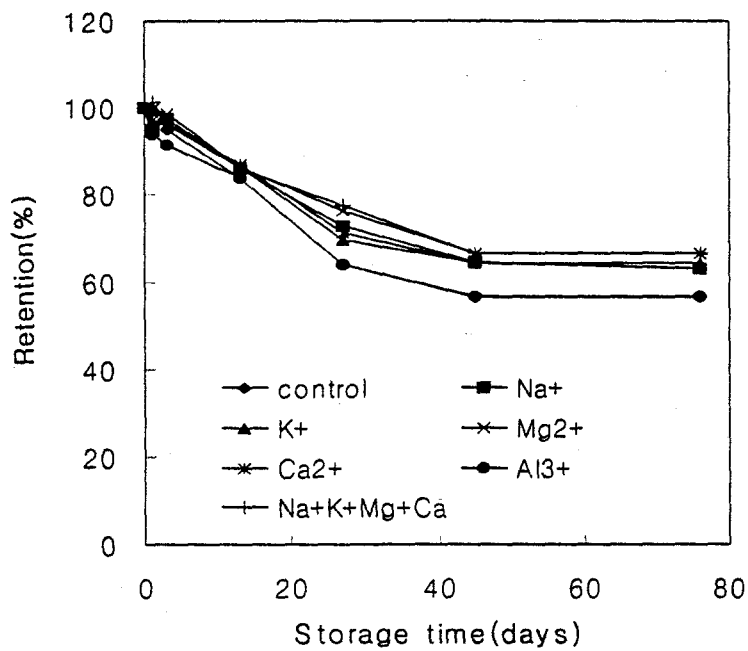


Fig 5-10. Effects of metal ions on the stability of Gardenia blue pigments at 25°C. Blue pigments preparations containing 13% sucrose on pH 3.0

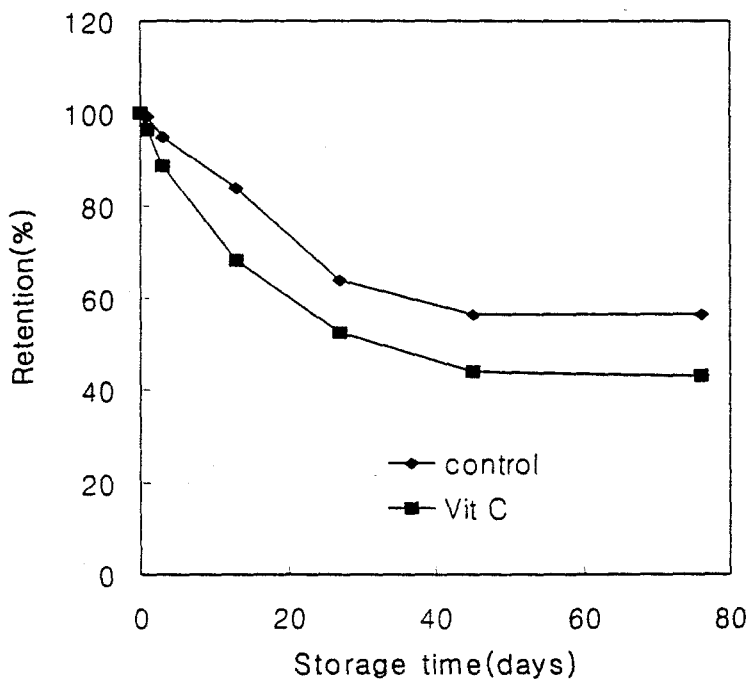


Fig 5-11. Effects of Vit C on the stability of Gardenia blue pigments at 25°C. Blue pigments preparations containing 13% sucrose on pH 3.0

## 2) 젤리 모델에서의 관능 특성 연구

색도의 경우 색소 첨가농도가 증가할수록 L-value는 0.01% 첨가군에서 감소했다가 차츰 증가하는 경향을 나타냈고, a-value의 경우 회색부근에서 별다른 변화를 보이지 않았으나, b-value의 경우 0.05% 첨가구 이후부터 크게 증가하는 경향을 나타내었다. 물성 측정 결과, hardness는 홍화 황색소에서와 마찬가지로 0.01% 첨가군에서 높은 값을 나타낸 반면, springiness, gumminess, chewiness등은 모든 첨가군에서 별다른 차이를 보이지 않았고, fracturability는 색소농도에 따라 증가하는 경향을 나타냈다(Fig. 5-12). 관능평가를 통해 젤라틴 5%, 설탕 15%, 증류수와 색소표준용액 80%의 배합조건을 가장 적합한 조건으로 선정하였다.



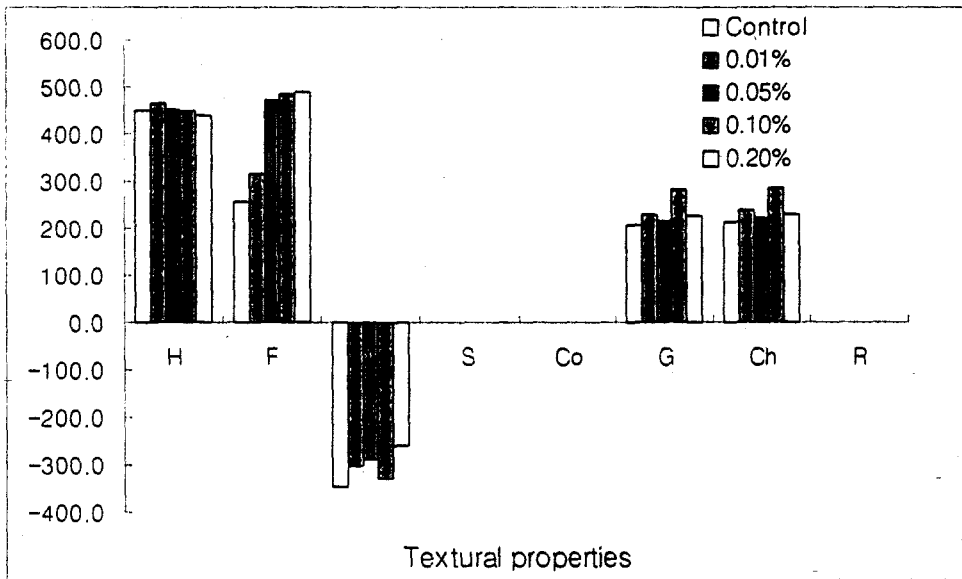


Fig. 5-12. Textural properties for gelatin jelly with various concentration of Gardenia pigment(H: Hardness, F: Fracturability, A: Adhesiveness, S: Springiness, Co: Cohesiveness, G: Gumminess, Ch: Chewiness, R: Resilience).

## 2. 생물변환 천연색소의 식품활용 연구

### 가. 홍화황색소를 이용한 기능성 음료 제조 연구

기능성 음료의 조건들을 Table 5와 같이 선정하여 색에 대한 안정성을 조사한 결과 Glucose, ascorbic acid는 b value와 흡광도를 증가시켰으나, amino acid는 감소시켰다. 18 종류의 기능성 음료에 대한 관능평가를 한 결과를 Table 5-6에 나타내었다. 색은 glucose, ascorbic acid를 첨가한 시료에 대해 가장 높은 점수를 나타내었으며, glucose와 metal ions를 첨가한 시료에 대해 가장 낮은 점수를 나타내었다. 즉, 홍화황색소를 이용하여 음료를 만들 경우, 일반적으로 많이 쓰이는 sucrose 대신 glucose를 사용하고, 첨가물로 ascorbic acid를 첨가한다면 관능적으로 우수한 색상의 음료를 만들 수 있을 것이다. 단맛과 신맛은 sucrose, amino acids, ascorbic acid를 첨가한 시료에 대해 가장 우수한 점수를 나타내었고, 첨가물을 넣지 않은 시료에 대해 가장 낮은 점수를 나타내었다. 전체적인 수용도는 glucose, amino acids, ascorbic acid를 첨가한 시료에 대해 가장 높은 점수를 나타내었다. 결과적으로 음료로써 가장 선호도가 좋은 시료는 glucose, amino acids, ascorbic acid를 첨가한 시료로써 이 시료는 color, sweetness, sourness 등 모든 항목에 대해 우수한 결과를 나타내어 음료로 최적화하기에 적당한 모델 시스템이라고 생각된다.

Table 5-5. Experimental composition of beverages with Safflower Yellow pigments

Sample	Sucrose	Glucose	Metal ions <sup>1)</sup>	Amino acids <sup>2)</sup>	Vit C
A	-	-	-	-	-
B	13	-	-	-	-
C	13	-	0.01	-	-
D	13	-	0.01	0.08	-
E	13	-	0.01	0.08	0.04
F	13	-	-	0.08	-
G	13	-	-	-	0.04
H	13	-	-	0.08	0.04
I	13	-	0.01	-	0.04
J	-	13	-	-	-
K	-	13	0.01	-	-
L	-	13	0.01	0.08	-
M	-	13	0.01	0.08	0.04
N	-	13	-	0.08	-
O	-	13	-	-	0.04
P	-	13	-	0.08	0.04
Q	-	13	0.01	-	0.04
R	6.5	6.5	0.01	0.08	0.04

Concentration of all additives is in g/100ml(except for metal ions: M)

<sup>1)</sup> Metal ions; Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>

<sup>2)</sup> Amino acids; L-Threonine, L-Isoleucine

Table 5-6. Mean scores of sensory evaluation data for beverages with Safflower Yellow pigments

samples <sup>1)</sup>	Characteristics			
	Color	Sweetness	Sourness	Overall acceptability
A	6.617 <sup>a</sup>	1.700 <sup>d</sup>	1.450 <sup>a</sup>	2.067 <sup>d</sup>
B	6.350 <sup>a</sup>	6.083 <sup>ab</sup>	5.050 <sup>a</sup>	6.300 <sup>a</sup>
C	5.683 <sup>a</sup>	4.683 <sup>ab</sup>	4.150 <sup>a</sup>	5.350 <sup>ab</sup>
D	5.333 <sup>a</sup>	3.917 <sup>ab</sup>	2.900 <sup>a</sup>	5.567 <sup>ab</sup>
E	6.117 <sup>a</sup>	4.467 <sup>ab</sup>	4.083 <sup>a</sup>	4.900 <sup>ab</sup>
F	5.567 <sup>a</sup>	3.767 <sup>ab</sup>	3.633 <sup>a</sup>	6.617 <sup>a</sup>
G	4.983 <sup>a</sup>	4.650 <sup>ab</sup>	5.200 <sup>a</sup>	6.033 <sup>a</sup>
H	6.383 <sup>a</sup>	6.633 <sup>a</sup>	5.850 <sup>a</sup>	6.683 <sup>ab</sup>
I	6.083 <sup>a</sup>	4.450 <sup>ab</sup>	4.033 <sup>a</sup>	4.867 <sup>ab</sup>
J	6.150 <sup>a</sup>	3.967 <sup>ab</sup>	4.983 <sup>a</sup>	5.250 <sup>ab</sup>
K	4.433 <sup>a</sup>	4.650 <sup>ab</sup>	3.883 <sup>a</sup>	4.333 <sup>ab</sup>
L	4.933 <sup>a</sup>	3.633 <sup>ab</sup>	3.800 <sup>a</sup>	4.583 <sup>ab</sup>
M	6.700 <sup>a</sup>	4.450 <sup>ab</sup>	4.667 <sup>a</sup>	4.067 <sup>ab</sup>
N	5.633 <sup>a</sup>	3.883 <sup>ab</sup>	4.200 <sup>a</sup>	4.350 <sup>ab</sup>
O	6.967 <sup>a</sup>	3.533 <sup>ab</sup>	3.950 <sup>a</sup>	5.350 <sup>ab</sup>
P	6.633 <sup>a</sup>	5.933 <sup>ab</sup>	5.250 <sup>a</sup>	6.767 <sup>a</sup>
Q	5.517 <sup>a</sup>	3.867 <sup>ab</sup>	3.867 <sup>a</sup>	4.217 <sup>ab</sup>
R	6.233 <sup>a</sup>	4.750 <sup>ab</sup>	5.400 <sup>a</sup>	6.233 <sup>a</sup>

1) Each composition of samples is shown in Table 5.

<sup>a-b</sup> means in the same line not followed by the same letter are not significantly different (P<0.05)

#### 나. 치자 청색소의 제과류 첨가 활용 연구

생물변환 생산된 치자 청색소를 전통 과자인 다식에 첨가하여 색소의 활용성과 새로운 다식의 개발 가능성을 조사하고자 색소의 농도와 당의 종류를 달리하여 제조한 녹말다식의 특성을 알아보았다. 치자 청색소는 95% ethanol로 추출한 후 charcoal에 흡착시켜 황색소를 제거하고 여과, 증류시켜 geniposide를 얻은 후  $\beta$ -glucosidase를 가해 가수분해시켜 당이 분리된 genipin을 얻고, 이 genipin에 glycine을 반응시켜 생물변환 치자 청색소를 제조하였다. 전통한과인 다식에 색소를 최적 조건으로 활용하기 위하여 색소의 농도(0, 0.01, 0.02, 0.04%)와 당의 종류(꿀, 프락토올리고당)를 달리하여 녹말다식을 제조하고 수분함량, 색, 텍스처를 관찰하고, 관능검사를 실시하였다.

다식의 색도는 Table 5-7에 나타낸 것처럼 꿀다식, 올리고당다식 모두에서 색소함량이 증가함에 따라 L값, b값 모두 유의적으로 감소하는 경향을 나타내었다. 특히 올리고당다식의 경우 꿀다식보다 명도는 높고 황색도는 낮은 결과를 나타내어 올리고당 사용 시 색을 더 열게 하는 현상을 나타내는 것으로 생각된다. 색소 0%일 때 꿀다식의 황색도가 올리고당다식보다 높게 나타났는데 이는 꿀 자체의 황색에 의한 것으로 생각된다.

Table 5-7. Hunter color values of Dasik with Gardenia blue pigments

Pigment (%)	L*		b	
	Honey-Dasik	Oligosugar-Dasik	Honey-Dasik	Oligosugar-Dasik
0	76.60±7.07 <sup>a</sup>	90.41±1.63 <sup>a</sup>	16.09±1.05 <sup>a</sup>	9.52±2.61 <sup>a</sup>
0.01	74.11±3.16 <sup>b</sup>	81.20±4.27 <sup>b</sup>	1.41±3.16 <sup>b</sup>	-0.35±2.00 <sup>b</sup>
0.02	66.46±6.36 <sup>c</sup>	73.37±6.55 <sup>c</sup>	-4.65±1.16 <sup>c</sup>	-4.72±1.55 <sup>c</sup>
0.04	61.24±1.12 <sup>d</sup>	70.42±2.63 <sup>d</sup>	-6.65±1.40 <sup>d</sup>	-6.53±1.90 <sup>d</sup>

<sup>a,b,c,d</sup>Means in columns with different superscripts letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).

Values represent mean  $\pm$  SE

\*L value : Degree of lightness(white +100  $\leftrightarrow$  0 black)

a value : Degree of redness(red +100  $\leftrightarrow$  -80 green)

b value : Degree of yellowness(yellow +70  $\leftrightarrow$  -80 blue)

당의 종류와 색소농도에 따른 다식의 texture 측정결과를 Table 5-8에 나타내었다. 두 가지 다식에서 모두 경도(hardness)는 색소농도가 증가할수록 유의적으로 증가하는 경향을 나타내었으며 올리고당다식보다 꿀다식의 경도가 더 높았다. 파쇄성(fracturability) 역시 색소농도가 증가할수록 그 값이 증가하였다. 검성(gumminess)과 씹힘성(chewiness)은 꿀다식에서는 색소농도가 증가할수록 커졌지만, 올리고당다식에서는 색소농도에 따라 유의적인 차이를 보이지 않았다. 꿀을 사용했을 때, 그리고 색소농도가 증가할수록 경도, 검성, 씹힘성 등이 증가하는 값을 나타내어 더 단단해지는 것으로 나타났다.

Table 5-8. Textural properties of Dasik with Gardenia blue pigments

	Pigment(%)	Hardness	Fracturability	Gumminess	Chewiness
	0	52.61±19.83 <sup>d</sup>	18.51±0.82 <sup>b</sup>	-9.64±0.43 <sup>d</sup>	-8.76±0.34 <sup>d</sup>
Honey	0.01	120.65±14.93 <sup>c</sup>	20.49±2.02 <sup>b</sup>	-1.92±0.78 <sup>c</sup>	-2.36±0.47 <sup>c</sup>
-Dasik	0.02	184.10±26.83 <sup>b</sup>	30.95±1.79 <sup>b</sup>	0.74±0.15 <sup>b</sup>	1.48±0.40 <sup>b</sup>
	0.04	228.14±21.56 <sup>a</sup>	132.76±36.34 <sup>a</sup>	3.18±0.31 <sup>a</sup>	3.45±0.45 <sup>a</sup>
	0	16.40±2.33 <sup>c</sup>	20.53±0.65 <sup>c</sup>	-0.02±0.00 <sup>a</sup>	-0.02±0.01 <sup>a</sup>
Oligosugar	0.01	19.99±0.95 <sup>b</sup>	24.28±2.32 <sup>b</sup>	-0.03±0.00 <sup>ab</sup>	-0.03±0.01 <sup>a</sup>
-dasik	0.02	22.25±1.71 <sup>b</sup>	26.12±0.34 <sup>ab</sup>	-0.05±0.01 <sup>b</sup>	-0.03±0.01 <sup>a</sup>
	0.04	76.01±3.45 <sup>a</sup>	28.15±1.07 <sup>a</sup>	-0.65±0.02 <sup>c</sup>	-0.17±0.03 <sup>b</sup>

<sup>a,b,c,d</sup> Means in columns with different superscripts letters are significantly different(p<0.05).

Values represent mean±SE

치자 청색소를 첨가한 꿀다식과 올리고당다식의 관능적 특성 결과는 Table 9와 10과 같다. 꿀다식, 올리고당다식 모두 4가지 농도에 따른 다식에서 모든 시료간에 유의적인 차이를 나타내지는 않았다. 대체적으로 색은 색소 0.04% 첨가한 시료를 가장 선호하였고 단맛도 가장 선호도가 좋았다. 향미는 꿀다식은 0.02%, 올리고당다식은 0.04%의 색소를 첨가한 다식을 선호하는 것으로 나타났다. 잡냄새에 대해서는 올리고당다식보다 꿀다식의 잡냄새를 강하게 평가했는데 이는 꿀 자체에서 나는 특이취 때문인 것으로 생각된다. 질감은 올리고당다식보다 꿀다식의 강도를 높게 평가했는데, 기계적 평가(TPA)에서도 꿀다식의 강도(hardness)가 올리고당다식의 강도보다 높게 나타난 것과 같은 결과이다. 그러나 TPA 결과에서는 색소농도의 증가에 따라

유의적으로 강도가 높아졌지만, 관능평가 결과에서는 색소농도간에 유의적인 질감변화는 나타나지 않았다. 전체적 수용도에 있어서는 꿀다식에서는 색소 0.04%의 다식, 올리고당다식에서는 색소 0.01%의 다식을 선호하였다. 전체적으로 색소를 0.04% 첨가한 시료를 색소 무첨가군에 비해 더 선호하는 것으로 나타나 차자 청색소를 0.04% 첨가한 새로운 청색다식의 개발 가능성을 보여주었다.

Table 5-9. Mean Scores of sensory evaluation data for Honey-Dasik with various concentrations of Gardenia blue pigments

Pigment(%)	0	0.01	0.02	0.04
Sensory description				
Color	5.90±0.31 <sup>p</sup>	5.88±0.73 <sup>b</sup>	3.62±0.54 <sup>a</sup>	6.13±0.53 <sup>b</sup>
Sweetness	5.79±0.16 <sup>a</sup>	5.85±1.45 <sup>a</sup>	6.23±1.84 <sup>a</sup>	7.10±3.16 <sup>a</sup>
Flavor	3.86±1.44 <sup>a</sup>	4.27±2.50 <sup>a</sup>	5.42±2.01 <sup>a</sup>	4.92±3.16 <sup>a</sup>
Unpleasant flavor	4.24±0.73 <sup>a</sup>	4.43±0.45 <sup>a</sup>	4.59±0.57 <sup>a</sup>	5.40±0.55 <sup>a</sup>
Texture	7.04±1.55 <sup>b</sup>	6.56±1.47 <sup>b</sup>	5.24±1.07 <sup>a</sup>	5.95±1.12 <sup>ab</sup>
Overall acceptability	6.17±0.46 <sup>b</sup>	5.29±0.61 <sup>ab</sup>	4.00±0.47 <sup>a</sup>	6.53±0.44 <sup>b</sup>

<sup>a, b, c, d</sup>Means with different superscript letters within the same row are significantly different(p<0.05).

Values represent mean±SE.

Table 5-10. Mean Scores of sensory evaluation data for Oligosugar-Dasik with various concentrations of Gardenia blue pigments

Pigment(%)	0	0.01	0.02	0.04
Sensory description				
Color	5.31±0.59 <sup>a</sup>	4.59±0.62 <sup>a</sup>	6.18±0.42 <sup>a</sup>	5.72±0.76 <sup>a</sup>
Sweetness	4.82±0.48 <sup>a</sup>	4.80±0.30 <sup>a</sup>	3.61±0.59 <sup>a</sup>	4.91±0.27 <sup>a</sup>
Flavor	4.29±0.81 <sup>a</sup>	4.72±0.81 <sup>a</sup>	4.23±0.56 <sup>a</sup>	5.88±0.38 <sup>a</sup>
Unpleasant flavor	3.87±0.62 <sup>a</sup>	2.13±0.34 <sup>a</sup>	3.50±0.55 <sup>a</sup>	3.58±0.73 <sup>a</sup>
Texture	5.51±0.63 <sup>a</sup>	5.57±0.41 <sup>a</sup>	4.32±0.64 <sup>a</sup>	5.51±0.31 <sup>a</sup>
Overall acceptability	4.95±0.59 <sup>a</sup>	5.16±0.69 <sup>a</sup>	3.81±0.50 <sup>a</sup>	5.05±0.65 <sup>a</sup>

<sup>a, b, c, d</sup>Means with different superscript letters within the same row are significantly different(p<0.05).

Values represent mean±SE.

#### 다. 홍화 색소의 한과류 활용연구

건조한 홍화꽃잎을 분쇄한 후 메탄올로 추출하고 감압농축하여 분말상태로 얻은 홍화 황색소를 녹두전분, 설탕, 꿀을 이용하여 만든 전통한과인 과편에 색소의 농도 별(0, 0.02, 0.05, 0.07, 0.1, 0.2%)로 첨가하여, 색도, 물성, 이액현상 및 관능적 특성을 조사하였다. 색소 함량이 증가할수록 Hunter L값은 감소하고 Hunter b값은 증가하는 경향을 나타내어 황색도가 진해지는 결과를 보였다(Fig. 5-13). 황색도(b 값)의 경우 전반적으로 냉장조건이 실온보다 약간 높은 값을 가지며 저장 기간동안 실온, 냉장 모두 각 농도마다 약간씩 증가하는 경향을 보였다(Fig. 5-14, 15). TPA 측정결과, hardness, gumminess, chewiness는 색소 함량이 증가함에 따라 유의적으로 감소하는 경향을 나타내었고, springness, cohesiveness는 시료간에 큰 차이를 보이지 않았다(Table 5-11). 과편의 저장기간이 길어질수록 이액현상이 발생하였는데, 색소 첨가량이 높을수록 이액정도가 높았고, 저장에 따라 그 차이도 커짐을 알 수 있었다. 나타났다. 실온의 경우 저장 3일까지는 색소 첨가에 의해 유의적인 차이를 보이지 않았고, 4일부터 무첨가군과 색소 첨가 시료들 사이에 유의적인 차이를 보였다(Fig. 5-16). 냉장저장의 경우 실온과 비슷한 경향을 보였으나 이액정도는 실온보다 크게 나타났다. 관능검사 결과, 색소 0.05%를 첨가한 과편이 색(color), 입속 느낌(feel in mouth)이 가장 우수하게 평가되었고, 0.02%를 첨가한 과편은 윤기가 가장 우수한 것으로 나타났다. 전체적 수용도는 색소 0.07% 첨가군을 유의적으로 선호하였다( $P < 0.05$ )(Table 5-12).



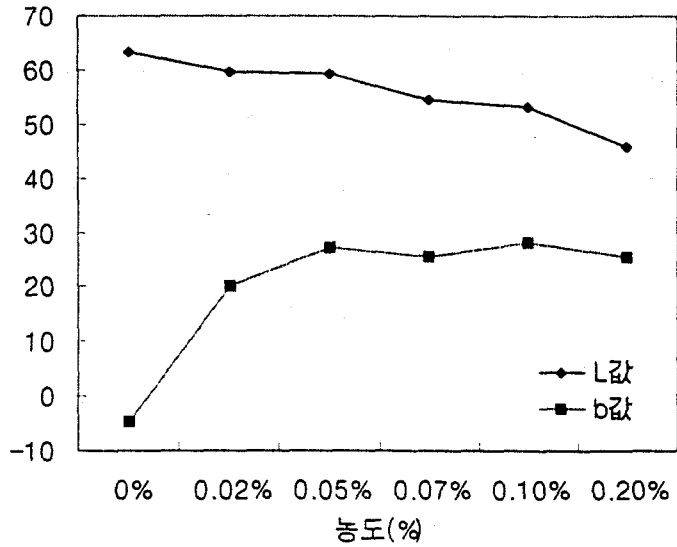


Fig. 5-13. Hunter L, b values for Kwapyun(Korean traditional dessert gel) with various concentration of Safflower yellow pigment.

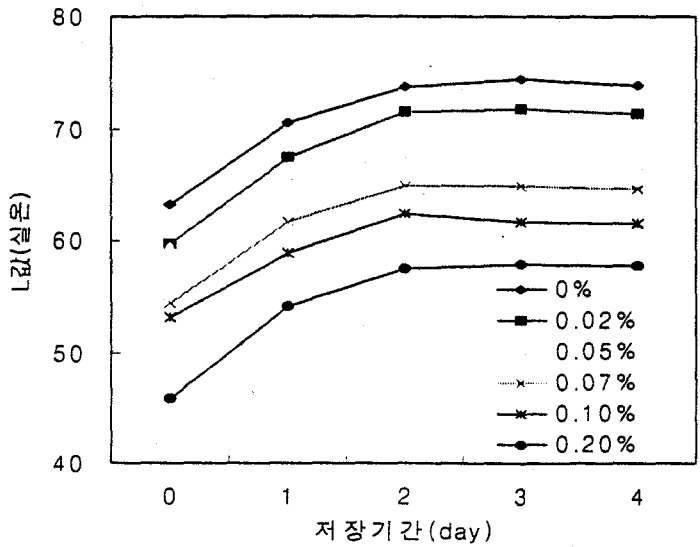


Fig. 5-14. Changes of Hunter L values for Kwapyun(Korean traditional dessert gel) with various concentration of Safflower yellow pigment stored at 22°C.

Table 5-11. Textural properties for Kwapyun(Korean traditional dessert gel) with various concentration of Safflower yellow pigment

pigment(%)	Hardness	Springness	Cohesiveness	Gumminess	Chewiness
0%	1361.81±3.76 <sup>c</sup>	0.97 <sup>a</sup>	0.45 <sup>a</sup>	608.14±20.01 <sup>c</sup>	587.91±4.33 <sup>c</sup>
0.02%	1181.19±40.97 <sup>bc</sup>	0.96 <sup>a</sup>	0.45 <sup>a</sup>	526.68±21.64 <sup>bc</sup>	507.40±18.96 <sup>bc</sup>
0.05%	909.97±173.18 <sup>ab</sup>	0.95 <sup>a</sup>	0.44 <sup>a</sup>	399.68±84.43 <sup>ab</sup>	382.45±85.30 <sup>ab</sup>
0.07%	874.17±139.67 <sup>ab</sup>	0.96 <sup>a</sup>	0.43 <sup>a</sup>	365.31±39.17 <sup>a</sup>	353.18±38.89 <sup>a</sup>
0.10%	891.25±77.69 <sup>ab</sup>	0.94 <sup>a</sup>	0.43 <sup>a</sup>	384.38±52.42 <sup>ab</sup>	364.96±54.99 <sup>ab</sup>
0.20%	605.80±55.14 <sup>a</sup>	0.94 <sup>a</sup>	0.44 <sup>a</sup>	266.25±26.33 <sup>a</sup>	252.43±24.64 <sup>a</sup>

<sup>a-c)</sup> Means on the same row not followed by the same letter are significantly different(p<0.5)

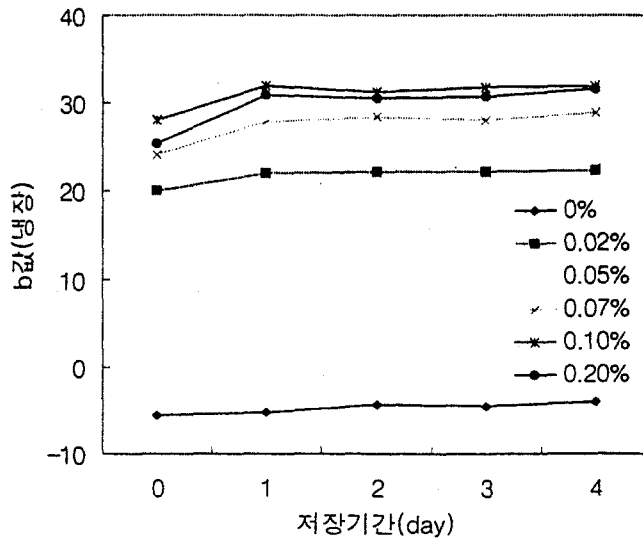


Fig. 5-15. Change of Hunter b values for Kwapyun(Korean traditional dessert gel) various concentration of Safflower yellow pigment stored at refrigerator.

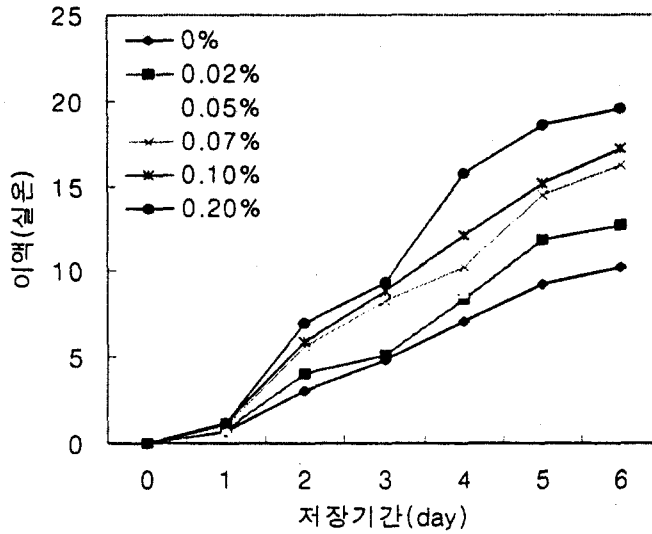


Fig. 5-16. Synerisis percents for Kwapyun with various concentration of Safflower yellow pigment stored at 22°C.

Table 5-12. Mean Scores of sensory evaluation data for Kwapyun(Korean traditional dessert gel) with various concentration of Safflower yellow pigment

Sensory description pigment(%)	color	lightness	feelinmouth	springness	shortness	acceptability
0%	4.46±0.81 <sup>b</sup>	5.03±0.74 <sup>b</sup>	4.41±0.59 <sup>ab</sup>	4.34±0.62 <sup>ab</sup>	4.63±0.60 <sup>abc</sup>	4.20±0.55 <sup>ab</sup>
0.02%	5.00±0.79 <sup>bc</sup>	7.07±0.65 <sup>c</sup>	4.10±0.56 <sup>a</sup>	5.55±0.71 <sup>bc</sup>	3.08±0.53 <sup>a</sup>	5.92±0.64 <sup>cd</sup>
0.05%	6.77±0.34 <sup>c</sup>	6.15±0.42 <sup>bc</sup>	5.89±0.48 <sup>b</sup>	5.00±0.36 <sup>ab</sup>	5.47±0.51 <sup>bc</sup>	5.73±0.57 <sup>bcd</sup>
0.07%	5.35±0.56 <sup>bc</sup>	5.00±0.46 <sup>b</sup>	5.30±0.63 <sup>ab</sup>	6.27±0.42 <sup>c</sup>	3.74±0.53 <sup>ab</sup>	6.35±0.45 <sup>d</sup>
0.10%	3.95±0.54 <sup>ab</sup>	4.54±0.57 <sup>b</sup>	5.51±0.43 <sup>ab</sup>	4.57±0.59 <sup>ab</sup>	5.24±0.74 <sup>bc</sup>	4.62±0.48 <sup>ab</sup>
0.20%	2.30±0.57 <sup>a</sup>	2.69±0.53 <sup>a</sup>	4.05±0.50 <sup>a</sup>	3.78±0.48 <sup>a</sup>	5.94±0.56 <sup>c</sup>	3.27±0.53 <sup>a</sup>

a-d) Means on the same row not followed by the same letter are significantly different(p<0.5)