

최 종
연구보고서

한국전통 구황식물로부터 항균 및
면역강화능을 갖는 물질탐색 및 이용

Isolation and Identification of
Antimicrobials & Immunodulating Compounds
from Korean Tradional Relief farming
Plants and Application to Processed
Foodstuffs

숙명여자대학교

농림부



제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “한국전통구황식물로부터 항균 및 면역강화능을 갖는 물질탐색 및 이용에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2000 . 11 . 4 .

주관연구기관명 : 숙명여자대학교

총괄연구책임자 : 한 영 실

제1세부과제책임자 : 한 영 실

제2세부과제책임자 : 김 현 숙

위탁연구기관명 : 환공식품공업주식회사

위탁연구책임자 : 최 덕 자

요 약 문

I. 제 목

한국전통구황식물로부터 항균 및 면역강화능을 갖는 물질탐색 및 이용

II. 연구개발의 목적 및 중요성

최근 식품산업의 급격한 발전과 식품의 국제화, 가공식품화, 인스턴트화로 식품의 저장기간을 연장하고 상품가치를 높이기 위해 식품보존제의 사용이 증가하고 있다. 하지만 대부분의 식품보존제는 화학적 합성품으로 그 안전성이 문제가 되고 근래에 합성원료의 유해성이 밝혀짐에 따라 천연물에 대한 소비자의 요구가 높아지고 있어 천연첨가제의 개발에 많은 노력이 기울여지고 있다. 미국이나 유럽 등의 대학 및 산업체 등 여러 연구기관에서는 이러한 추세에 맞추어 인체에 유해성이 없고 안전한 천연식품첨가제의 개발에 대한 많은 연구가 이루어지고 있다. 또한 국제무역기구체제(WTO)의 출범으로 전세계가 무한 경쟁시대에 돌입하고 있어 우리 농업도 이제 고부가가치가 있는 작물을 재배하여 국가적인 자원확보 및 농업 경쟁력 향상 방안을 수립해야 할 것이다. 특히 우수한 유용작물의 개발 또는 선별이 필요하다. 따라서 천연자원인 구황식물로부터 항균 및 식품보존, 그리고 면역강화등에 활성을 갖는 신기능물질을 추출, 분리생산하고 이를 실제 가공식품 생산에 적용하여 그 효과를 탐색하는 일은 농가소득 향상뿐만 아니라 세계시장에서 우리 농산물의 경쟁력을 높이기 위해 매우 중요한 일이다.

우리 나라에서는 藥食同源의 食관념속에 다양한 식물을 식품 활용자

원으로써 이용하여왔다. 구황식물이란 본래는 자연재해나 전란 등의 인위적 재해로 굶주린 백성을 구하기 위한 구호식품이었으나 최근 다양한 생리활성기능이 밝혀짐으로써 식품소재로서 그 의의가 크게 부각되고 있다.

최근 우리 나라에서도 새로운 분석 기기들의 이용으로 천연물 성분에 대한 관심이 고조되어 일부 생약재 및 식물에 대한 연구가 보고되고 있으나 구황식물로부터 이들 생리기능활성 성분의 규명 등에 대해서는 미흡한 실정이므로 이에 대한 과학적 연구가 절실하다고 본다.

따라서 본 연구에서는 우리 나라 산과 들에서 자생하는 전통 구황식물중 지금까지 연구되지 않거나 연구가 미비한 식물에 대하여 생리활성 기능을 갖는 우수한 대상을 선발하여 추출한 후 *in vitro* 실험으로 생리활성을 검증하고 다시 용매분획법으로 분획하고 이들 획분의 항균과 면역강화능 효과등을 *in vivo*에서 다시 검정하였다. 이를 토대로 가장 효과적인 획분을 *in vivo*의 동물실험을 통해 생리활성을 구명하고 food model system에의 응용을 통해 효과를 검정한 다음, 이들 유효획분을 다시 칼럼크로마토그래피로 분리, 정제, GC/MS, NMR 등의 기기적인 방법으로 동정하였다. 또한 이들 식물을 그자체로, 추출물 그리고 분리, 확인된 활성성분을 food model과 실제 식품제조에 적용하여 그 효능을 분석하고 아울러 첨가식품의 이화학적, 관능적, 기계적 특성을 검토하였다. 우리의 전통 구황식물을 대상으로 이러한 활성물질의 탐색과 이를 이용한 기능성 식품 개발은 구황식물과 같은 전통작물이 갖는 기능성을 입증하고 그를 이용한 식품개발을 추진함으로써 식품의 기능성 입증을 통한 부가가치 향상뿐만 아니라 국제화속에 우리의 농업문화와 음식문화의 우수성을 제시하는 등의 큰 의의를 갖는다고 본다.

III. 연구개발 내용 및 범위

- 한국전통구황식물의 선별 및 생리활성성분의 추출, 분획
 - 한국전통구황식물 추출물을 대상으로 항균 및 면역강화능 비교 실험 대상 선별
 - *in vitro* 실험을 통한 항균 및 면역강화능 효과를 갖는 생리활성 성분분획의 검증
 - 인공합성보존제와 구황식물 추출물의 항균활성 효과의 비교검토
- 생리활성 유효물질의 분리 및 구황식물 첨가제품의 보존효과 실험
 - 생리활성 유효성분의 분리
 - 항균성을 보유한 생리활성성분의 단일물질로의 분리
 - *in vitro* 실험을 통한 면역능 향상 효과를 갖는 생리기능 특성 검색
 - 구황식물 첨가량에 따른 저장성 검토
- 유효물질의 구조 규명 및 효과 측정
 - 생리활성물질의 동정 및 신물질의 효과측정
 - 항균활성물질의 혼합 및 상승효과 검토
 - 생리활성물질의 면역세포조절인자 분비능 확인
- 신물질의 food model 적용 및 동물실험을 통한 생리활성성분의 평가
 - 항균성 물질 첨가 식품의 저장기간 연장확인
 - 구황식물을 첨가한 기능성 제품의 제반 특성 검토

- in vivo 동물실험을 통한 생리활성 성분의 평가

IV. 연구개발결과 및 활용방안

연구결과

● 제1세부과제

한국 전통 구황식물로부터 식품부패미생물에 대한 항균성물질의 탐색 및 개발

닭의 장풀을 비롯한 35종의 한국 전통 구황식물을 대상으로 식품부패 미생물에 대한 항균 효과를 측정하였다.

이들 중 높은 항균력을 보인 민들레, 질경이, 백작약, 목단피 등을 유효 물질 분리 위한 식물로 선발하였다. 이들 식물들은 식품의 변질 및 부패균인 gram 양성균 *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* 그리고 gram 음성균인 *E. coli*와 *Vibrio parahaemolyticus*에 대해 항균성을 보임을 확인하였다. 용매분획에서는 민들레의 ethylacetate 분획물은 1,000 $\mu\text{g}/\text{disc}$ 농도에서 5종의 모든 공시균주에 대하여 clear zone을 형성하여 가장 높은 항균력을 보였다. 질경이의 경우 ethylacetate층은 1,000 $\mu\text{g}/\text{disc}$ 농도에서 실험한 모든 균주에 대하여 clear zone을 나타내어 항균력을 보였다.

백작약의 methanol 추출물은 1,500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 *B. subtilis*, *S. aureus*, *V. parahaemolyticus*의 증식을 100% 억제하였으며 *E. coli*와 *L. monocytogenes* 같은 농도에서 각각 65.93%와 83.27%의 억제 효과를 보였다. 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서는 *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *V. parahaemolyticus*의 증식을 완전히 억제하였다.

현재 사용되고 있는 식품보존제와의 항균력을 비교하기 위해 sodium propionate를 1, 2, 3, 5%의 농도로 sorbic acid를 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25%의 농도로 항균력을 검색한 결과 sodium propionate의 경우 5% 농도에서 sorbic acid는 0.25%의 농도에서 모든 공시균주들의 증식

이 100% 억제되었다.

민들레와 질경이를 각각 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 혼합, 항균력을 살펴본 결과 *S. aureus*는 98% 억제되었고 *B. subtilis*, *E. coli*는 94%와 91.3% 억제되었다.

백작약과 목단피를 혼합하여 항균효과를 살펴본 결과 백작약과 목단피를 각각 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 혼합 첨가하였을 때 *B. subtilis*는 89.82%의 증식 억제 효과를 보였고, *S. aureus*, *E. coli*는 92.07%와 93.67%의 증식 억제율을 나타내었고 같은 농도에서 *L. monocytogenes*와 *V. parahaemolyticus*의 경우는 96.84%와 92.83%의 억제효과가 나타났다.

민들레와 질경이를 동량으로 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 첨가하여 각 공시균주에 대하여 항균력을 살펴본 결과 뚜렷한 억제효과가 없었다. 백작약과 목단피를 각각 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 혼합, 첨가하였을 때 *B. subtilis*는 89.82%의 증식 억제 효과를 보였고 *S. aureus*와 *E. coli*는 92.07%와 93.67%의 증식 억제율을 나타내었고 같은 농도에서 *L. monocytogenes*와 *V. parahaemolyticus*의 경우에는 96.84%와 92.83%의 억제 효과가 나타났다.

가공 식품에의 이용 가능성을 보기 위하여 민들레와 질경이를 가루로 내어 각각 0, 1, 3, 5%씩 첨가한 국수와 떡의 식품 보존 효과를 실험하였다. 민들레 첨가 국수는 첨가하지 않은 국수에 비하여 미생물의 증식이 현저히 낮았으며 특히 5%를 첨가군에서는 24시간까지 미생물이 자라지 않았다. 민들레 첨가 떡도 대조군에 비하여 미생물의 증식이 적었고, 그 효과는 첨가량이 많을수록 컸다. 질경이 첨가 국수도 대조군에 비하여 미생물 억제 효과가 컸으며 질경이 첨가 떡도 동일한 효과를 보여 민들레와 질경이 첨가가 국수와 떡의 저장성 연장에 효과적임을 알 수 있었다. 백작약과 목단피 3%와 5% 첨가 국수는 48시간까지 미생물의 증식을 보이지 않은 반면 무첨가군은 저장 48시간부터 미생물의 집락이 급격하게 증가하였다. 백작약과 목단피 첨가떡의 경우 백작약 첨가 떡

은 1, 3, 5% 첨가시 48시간까지 미생물의 증식이 일어나지 않았고, 목단피 3%와 5% 첨가 떡은 72시간 까지 미생물의 증식이 일어나지 않았다. 합성보존제 첨가시 국수는 sorbic acid 0.05%, 0.1% sodium propionate 0.1%와 0.2% 첨가군은 48시간까지 미생물의 증식이 일어나지 않았으나 이후부터는 조금씩 완만한 증가현상을 보였다. 무첨가군은 96시간부터 부패수준에 이르러 240시간 저장 후 10^7 CFU/g 수준에 도달하였으나 합성보존제 첨가군은 240시간 저장 후에도 10^4 CFU/g 수준을 유지하였다.

관능검사를 통해 민들레, 질경이, 백작약, 목단피 첨가 제품의 색, 향, 조직감, 기호도 등의 식품 모델의 관능적 특성을 검사하였다.

민들레 첨가 국수는 3% 첨가군이 색과 촉촉한 정도가 가장 좋게 평가되었고 색, 향, 씹힘성 및 전체적인 품질에서 높은 점수를 얻었다 ($p < 0.05$).

질경이 첨가 국수는 1% 첨가군이 색, 씹힘성과 전반적인 품질이 우수하게 나타났고($p < 0.05$) 5% 첨가군은 기호도가 낮았다. 떡은 모든 항목에서 3% 첨가군이 우수하게 평가되었다($p < 0.05$).

백작약을 첨가 국수와 떡은 3% 첨가군이 색, 씹힘성, 그리고 전반적인 품질에 대해 기호도가 높게 나타났고 5% 첨가군은 낮았다.

목단피 첨가 국수 3% 첨가군이 색, 씹힘성 및 전반적인 품질에 대해 기호도가 높게 나타났고($p < 0.05$) 5% 첨가군은 목단피 특유의 향으로 인해 낮은 점수를 보였다.

항균 물질을 분리하기 위해 민들레, 질경이, 백작약 그리고 목단피 methanol 추출물을 n-hexane, chloroform, ethylacetate, n-butanol 및 물로 계통 분획하였다. 농축한 분획물의 항균력을 paper disc법으로 측정, 가장 높은 항균력을 보인 ethylacetate 분획물을 silicagel column chromatography와 HPLC를 실시하여 단일 물질로 분리하였다. 분리된 물질을 GC/MS 및 NMR로 동정한 결과 민들레로부터는 benzoic acid와

hexamine이 규명되었으며 질경이로부터는 hexadecanoic acid가 항균성 물질로 규명되었다. 백작약으로부터는 Cetyl alcohol과 methyl N-amyl ketone이, 목단피로부터는 isobutyl isopentanoate가 규명되었다. 이들의 식품부패 미생물에 대한 항균효과는 합성보존제인 sodium propionate와 sorbic acid에 비해 훨씬 우수하였다.

● 제2세부과제

한국전통구황식물로부터 면역능을 갖는 기능성 생리활성물질의 탐색 및 면역활성증강효과규명

생체 방어 능력을 증강시킬 수 있는 식품 소재 개발에 대한 연구의 일환으로, 자연계에 널리 분포하고 식용이나 약용으로 이용되고 있는 17가지 한국 전통구황식물의 면역증강효과를 살펴본 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 메탄올 추출물의 비장세포 증식능에 대한 효과 : 선정된 17가지 한국 전통 구황식물 중, 질경이, 어성초, 백작약, 속단, 민들레는 비장세포 증식효과가 있는 것으로 나타났다.
2. 메탄올 추출물의 복강대식세포에 의한 cytokine 분비능 : 속단, 방아, 참취는 IL-1 β 분비능, 닭의장풀, 속단, 참취, 달래는 IL-6 분비능을, 닭의장풀, 어성초, 전호, 참취, 쇠비름은 TNF- α 분비능을 각각 증진시켰다.
3. 계통별 추출물의 면역증강효과 (in vitro): 민들레와 질경이는 에틸아세테이트층 및 물층에서 비장세포 증식능을 향상시켰으며, cytokine 분비능에서는 유의적인 효과가 관찰되지 않았다. 속단은 에틸아세테이트, 부탄올, 물층에서 면역증강효과를 보였다. 백작약은 다른 시료에 비해 면역증강효과가 가장 뛰어났는데, 부탄올층과 물층에서의 효과가 특히 우수했다. 어성초는 클로로포름, 에틸아세테이트, 물층에서 면역증강효과를 보였다. 쇠비름은 모든 층에서 면

역증강효과가 나타났지만, 그 정도는 비교적 미미하였다. 참취는 에틸아세테이트, 부탄올, 물층에서 면역증강효과를 보였다.

4. 각 시료의 열수추출물 첨가 식이에 의한 면역증강효과 (in vivo) : 주로 활성을 보였던 물층을 마우스에게 2주간 경구투여한 결과에 의하면, 백작약은 500mg/kg b.w. 과 1000mg/kg b.w. 투여군에서, 어성초는 100mg/kg b.w. 과 1000mg/kg b.w. 투여군에서의 cytokine 분비능이 상승되었다. 참취는 500mg/kg b.w. 투여군에서의 cytokine 분비능 및 비장세포증식능이 상승하였다. 속단은 모든 투여군에서의 cytokine 분비능 및 비장세포증식능이 상승하였다. 쇠비름은 IL-6 분비능만 약간 상승하였을 뿐이다.

결론적으로, 백작약, 어성초, 참취는 비교적 극성이 높은 용매에 녹아나는 부분에 면역증강효과가 있는 물질이 함유되어있는 것으로 판단된다. 따라서, 앞으로 이들 면역 활성 증진 물질을 순수 분리 및 동정하는 연구가 계속적으로 이루어져야 할 것으로 보이고, 이는 식품소재개발에 있어서 중요한 기초자료가 될 것으로 보인다.

- 위탁과제

한국전통구황식물로부터 기능성 식품개발 및 응용연구

대표적 식품의 부패 및 병원성 미생물인 *Bacillus subtilis* KCTC 1021, *Escherichia coli* KCTC 2441, *Staphylococcus aureus* KCTC 1916, *Listeria monocytogenes* KCTC 3569, *Vibrio parahaemolyticus* KCTC 2471 등의 실험균주를 대상으로 항균효과를 살펴보기 위하여 육두구 (Nutmeg, *Myristica fragrans* Houtt.), 백작약(芍藥, Jakyak, *Paeonia japonica*) 그리고 목단피(*paeonia suffruticosa*)를 건조시켜 분쇄 후 메탄올로 추출하여 항균력을 검토하였다.

육두구 추출물은 500 μ g/ml의 농도에서 *S. aureus*의 증식을 완전히 저해하였으며, *E. coli*와 *V. parahaemolyticus*는 2000 μ g/ml의 농도에서, *V. parahaemolyticus*는 2000 μ g/ml에서 100% 항균력을 보였다.

백작약 추출물의 저해효과는 *B. subtilis*는 1000 μ g/ml의 농도에서, *S. aureus*와 *V. parahaemolyticus*는 1500 μ g/ml에서 100% 항균력을 보였다. *E. coli*는 2000 μ g/ml의 농도에서 100% 증식이 억제되었다.

목단피 methanol 추출물도 1,500 μ g/ml 농도에서 *B. subtilis*, *L. monocytogenes* 및 *V. parahaemolyticus*의 증식을 완전히 억제하였고, *S. aureus*는 2,000 μ g/ml의 농도에서부터 식품 부패 미생물의 증식을 완전히 억제하였으며 *E. coli*는 2,000 μ g/ml의 농도에서 91.6% 억제되었다.

항균력을 나타낸 메탄올 추출물로부터 분획한 분획물의 활성을 측정한 결과 육두구 추출물은 chloroform층과 ethylacetate층에서 실험균주 4종에 대해 높은 항균력을 나타냈으며, *n*-buthanol 층은 *Vibrio*

*parahaemolyticus*에 대해 가장 높은 항균력을 나타내었다. 백작약과 목단피 에탄올 추출물로부터 분획한 분획물의 활성에서는 ethylacetate층이 가장 강한 항균력을 보였다.

실제 식품에의 이용을 검토하고자 육두구와 백작약 에탄올 추출물을 0.25, 0.5, 0.75, 1% 첨가 어묵을 제조한 후 수분, 단백질, 지방 및 회분 등 일반성분조성을 측정하였다. 육두구 추출물 첨가 어묵의 수분은 첨가량이 증가할수록 높았다. 조지방 함량 또한 수분과 같은 경향을 보여 추출물의 첨가가 증가할수록 높아짐을 알 수 있었다. 이는 육두구의 추출물인 essential oil의 첨가에 의한 것으로 사료된다. 그러나 단백질은 첨가량에 따라 낮은 값을 나타내었다. 조회분의 경우 첨가량이 증가할수록 높아지는 경향을 보였으며 첨가군은 무첨가군에 비해 유의적으로 높은 함량을 나타내었다.

백작약 추출물 첨가 어묵의 수분함량은 유의적으로 낮았다. 0.75%와 1% 첨가시 조회분 함량이 유의적으로 높았다.

육두구, 백작약 그리고 목단피 추출물 첨가 어묵의 저장성을 검토한 결과 10℃ 저장 시 무첨가군은 저장 6일 후에 총균수가 1.0×10^6 CFU/g 수준에 도달하였으나, 육두구 추출물 0.25%와 0.5% 첨가군은 저장 12일 후에 그리고 0.75와 1% 첨가시는 저장 15일 후에 총균수가 10^6 CFU/g 수준에 도달하여 식품의 부패시기가 9~12일 연장되는 것으로 나타났다. 백작약 추출물 0.25와 0.5% 첨가군은 저장 9일째에 10^6 CFU/g 수준에 도달하였다. 0.75%와 1% 첨가 어묵은 15일 저장 시 10^5 CFU/g 수준에 도달하였다. 목단피 추출물 첨가 어묵은 0.25% 첨가군은 12일 저장 후에 10^6 CFU/g 수준에 도달하였으며 0.5% 첨가군은 15일 후 10^6 CFU/g 수준이었

다. 목단피 추출물 0.75%와 1% 첨가 어묵은 저장 15일 이후에도 10^4 CFU/g 수준을 유지하였다. 따라서 육두구, 백작약 및 목단피 추출물 첨가 어묵이 무첨가군에 비하여 저장 효과가 우수한 것으로 나타났다.

색도에 있어서는 명도 L값은 추출물이 첨가할수록 감소하는 경향을 보였으며 저장기간에 따른 유의적 차이는 없었다($p < 0.05$). 적색도 a값은 육두구의 경우 첨가량에 따라 유의적으로 증가하였으며 저장기간이 지날수록 유의적으로 감소하는 경향을 보였다($p < 0.05$). 백작약의 경우는 첨가량에 따라 유의적으로 증가하였으며 저장기간에 따라 유의적으로 감소하였다. 황색도 b값은 추출물 첨가량이 증가할수록 유의적으로 증가하였으며 저장기간이 지남에 따라 유의적으로 감소하였다($p < 0.05$). 관능검사 결과 맛에 있어서 첨가군이 무첨가군에 비해 유의적으로 높게 나타났으며, 색, 향, 수분, 단단한 정도, 쫄깃한 정도, 삼킨 후의 느낌에 있어서는 농도별로 유의적 차이가 나타나지 않았다. 0.5% 첨가군이 가장 유의적으로 전반적인 선호도가 높게 나타났다.

연구개발결과의 활용방안

- 항균과 면역기능향상 기능을 갖는 구황식물을 이용한 기능성식품 신소재 개발
- 구황식물의 기능성성분 추출, 분리를 통해 항균제와 면역기능 강화제 등의 의약품개발기술에 기초자료 제공
- 향후 designer food 등 각종 질병의 예방과 치료식품개발 자료로 응

용

생리활성 물질의 효과 검증을 통해 고부가 가치를 가진 기능성 소재
개발로 기능성식품, 건강보조식품 및 성인병치료제에 활용

SUMMARY

(영문요약문)

I. Title of Research

Isolation and Identification of Antimicrobials &
Immunomodulating Compounds from Korean Traditional
Relief Farming Plants and Application to Processed
Foodstuffs

II. Purpose and Importance of Research

Use of food preservatives is being increased recently in order to prolong the storage period of foods and to raise the value of products as the result of rapid developments in the food industry, globalization of foods, processed foods and instant foods. However, most food preservatives have problems with their safety due to their chemical synthesis and more efforts are being poured into the development of natural food additives since the demand for natural material from consumers is rising as the harmful effects of synthetic material is being revealed recently. Accordingly, a lot of research on the development of natural food additives that are safe and not harmful to the human body has been accomplished at several R&D institutes, universities and industrial companies in USA and Europe, etc. It is now time for Korean agriculture to establish ways to secure national natural

resources and to improve agricultural competitiveness by cultivating plants of high value-addition since the whole world is getting into the age of unlimited competition with the advent of the WTO. It is especially necessary to develop and choose excellent useful plants. Therefore, the development of overall technologies that extract, separate and produce new functional material effective in antibiotics, food preservation and immunity boosting, etc. for hardy plants, natural resources and distributing these to farming households will make contribution to the enhancement of competitiveness by improving the earnings of farmers.

In Korea, diverse plants have been used as foods stuff resources from the food philosophy that medicine and foods are from the same source. Hardy plants were originally rescue foods for saving hungry people from natural disasters and artificial famines. But, the significance has been greatly raised as food material with diverse physiologically active functions are being revealed recently and they prepare for a broad foundation for the support of the food processing industry and new products.

Research on some herbal medicines and plants has been reported as attention to natural material contents is being heightened even in Korea due to the use of new analytical devices. But, scientific research is said to be more urgent than ever before since there

has been little research for the extraction of such contents of physiologically active functions from hardy plants.

Therefore, in this study, we try to develop new material and turn them into products of functional foods through the following steps:

1. After selecting and extracting excellent plants that have physiologically active functions among hitherto scarcely or insufficiency studied traditional hardy plants that are growing wild in the mountains or fields in Korea, verify the physiologically active functions with in vitro experiments.
2. Divide this again with solvent dividing method and search for physiological activeness of most effective lot through in vivo animal experiment based on the results of assessing the antibiotic and immune strengthening effects of these lots.
3. Estimate the effect through the application to the food model system and separate and refine the effective lots again with column chromatography.
4. Refine them dynamically again with such analytical methods such as GC/MS and NMR, etc.

Extraction of these new materials from search targeted traditional

hardy plants and developments of functional food materials testifies to the functionality that traditional plants have in common. By implementing food development using these, it shows the big significance such as representing the excellence of Korean agricultural culture and food culture amid globalization as well as improving value-addition through proving the functionality of foods.

III. The contents and category of research

- Selection of traditional hardy plants and extraction & division of physiologically active elements
- Selection of comparative test objects for antibiotic and immune strengthening among extracts from Korean traditional hardy plants
- Examination of physiologically active elements that have functions of antibiotic and immune strengthening through *in vitro* experiments
- Comparative review of antibiotic active effects of artificial synthetic preservatives and extracts of hardy plants

- Separation of physiologically active effective materials and preservation effect experiment of hardy plants-added products
- Separation of physiologically active effective materials
- Separation of physiologically active effective material

- possessing antibiotic property into single material
- Search for characteristics of physiological function that always have immune improving effects through *in vitro* experiment
 - Review of preservation according to the amount of hardy plants additives
-
- Close examination of structure of effective material and estimation of the effect
 - Estimation of status of physiologically active material and the effect of new material
 - Review of mixing and synergy effects of antibiotic active material
 - Confirmation of discharging function of immune cell control factors of physiologically active material
-
- Appraisal of physiologically active elements through application of new material in food model and animal experiments
 - Confirm food model with added antibiotic material and storage period extension
 - Review characteristics of functional products with added hardy plants
 - Estimation of physiologically active elements through *in vivo* animals

IV. Results of research

The research on "Isolation and Identification of Antimicrobials & Immunomodulating Compounds from Korean Traditional Relief farming Plants and Application to Processed Food Stuffs" consists of two detailed tasks and one assigned task. Study results by each detailed task is hereby summarized:

- The 1st research subject

Isolation and Identification of Antimicrobial Compounds from Korean Traditional Relief Farming Plants and their Effect when added to Processed Foodstuffs

In the present study, the following experiments were performed in order to investigate antibiotic substances in vegetables which are easily obtainable natural resources in Korea, and to develop new natural preservatives.

In the present study, methanol extracts of dandelions (*Taraxacum platycarpum* D.), plantains (*Plantago asiatica* L.), Jakyak (*Paeonia japonica* var. *pilosa* NAKAI) and the bark of Mokdan (*Paeonia suffruticosa* ANDR) were tested in the liquid medium dilution method to examine their antibiotic affects with respect to five experimental bacteria which make foodstuffs decompose and are pathogenic microorganisms: *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Esherchia coli*, and *Vibrio parahaemolyticus*.

The results of the experiments showed that the methanol extract

of dandelions suppressed the growth of *S. aureus* 100% at a concentration of 2,000 $\mu\text{g/ml}$, suppressed the growth of *L. monocytogenes* 98.43%, and suppressed the growth of *B. subtilis* and *V. parahaemolyticus* more than 97%. The methanol extract of plantains also suppressed the growth of *B. subtilis*, *L. monocytogenes*, and *V. parahaemolyticus* 100% at the concentration of 2,000 $\mu\text{g/ml}$, as well as the growth of *S. aureus* and *E. coli* at the same concentration more than 90%. The methanol extract of Jakyak (*Paeonia japonica* var. *pilosa* NAKAI) suppressed the growth of *B. subtilis*, *S. aureus*, *V. parahaemolyticus* 100% at a concentration of 1,500 $\mu\text{g/ml}$, suppressed the growth of *L. monocytogenes* 65.93%, and *E. coli* 83.27%. At a concentration of 2,000 $\mu\text{g/ml}$, suppressed 100%. The methanol extract of the Mokdan (*Paeonia suffruticosa* ANDR) suppressed the growth of *B. subtilis*, *L. monocytogenes* and *V. parahaemolyticus* 100% at the concentration of 1,500 $\mu\text{g/ml}$. The growth of *S. aureus* and *E. coli* suppressed 100% at the concentration of 2,000 $\mu\text{g/ml}$.

Further, antibiotic effects on five experimental bacteria were tested with 1%, 2%, 3%, and 5% of sodium propionate, and 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 and 0.25% of sorbic acid which was an artificial synthetic preservative, for its blank test. The suppression effects were increased as the concentrations of the sodium propionate solution were increased, but the growth of bacteria was not completely suppressed even at 3% concentration except for *V. parahaemolyticus*. Sodium propionate and sorbic acid completely

suppressed the growth of bacteria at 5% and 0.25% respectively. Dandelions and plantains showing antibiotic effects were mixed at the equivalent concentration of 1,000 $\mu\text{g/ml}$ to examine their antibiotic effects. The mixture suppressed the growth of *S. aureus* 98%, and showed 94% and 91.3% suppression effects against *B. subtilis* and *E. coli*, respectively.

The mixture of Jakyak and Mokdan suppressed the growth of *B. subtilis* 89.82%, and showed 96.84% and 92.83% suppression effects against *L. monocytogenes* and *V. parahaemolyticus*, respectively.

For the purpose of using dandelions and plantains showing antibiotic effects for foods solutions of 0%, 1%, 3%, and 5% each of dandelions and plantains were added to noodles and rice cakes to test food preservation effects. The noodles to which dandelions were added showed less growth of microorganisms compared to the control groups, where the group to which 5% was added did not show the growth of microorganisms even up to 24 hours. The groups of the rice cakes to which dandelions were added showed less growth of microorganisms compared to the control groups, and the effects in suppressing microorganisms were shown to be greater as the added concentrations were increased. The groups of noodles to which plantains were added also showed the growth of microorganisms as the time for preservation became longer, but the effects were greater when plantains were added compared to the control groups. The results were the same in case of plantains added to rice cakes. This showed that the noodles

and rice cakes to which dandelions and plantains were added had higher preservation effects compared to control groups.

The noodles to which Jakyak and Mokdan were added, 3% and 5% added group did not show the growth of microorganisms even up to 48 hours. The groups of the rice cakes to which Jakyak and Mokdan showed the growth of microorganisms as the preservation became longer to the control groups.

Further tests of the functional properties of foods were made by adding dandelions and plantains. For the noodles to which dandelions were added, the 3%-added group was most superior in terms of color and moistness, and the 1%-added group gained the highest grade in terms of chewability and overall quality. For rice cakes to which dandelions were added, the 3%-added group was evaluated to be the favorite. For the noodles to which plantains were added, the 1%-added group was favorable in terms of color, chewability, and overall quality, while the 5%-added group showed a low liking generally. For the rice cakes to which plantains were added, the 3%-added group was evaluated to be most superior as the case of adding dandelions.

For the noodles and rice cakes to which Jakyak and Mokdan were added, the 3% added group were evaluated to be the favorite.

Foods to which dandelions and plantains were added also showed preservation effects. In order to study antibiotic substances, the systematic fraction of dandelions plantains, Jakyak and Mokdan

with hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol, and water was performed for their separation and refining. Antibiotic properties of concentrated fractional substances were measured with the paper disc method. The results showed that the ethyl acetate fractions formed a growth hindrance ring against five decomposition microorganisms and had the highest antibiotic activities.

The fractional substances showing high antibiotic activities were separated by the silica gel column chromatography and TLC method, and ethyl acetate fractions of dandelions were separated into 13 fractions and were subject to antibiotic experiments. The results showed that ethyl acetate fractions no. 4, 5, and 6 had the highest antibiotic effects. These were mixed again, re-separated, and five 2nd fractions were obtained. Among them, no. 2 2nd fraction had the highest antibiotic effects, which was then separated into six 3rd fractions. These were tested by the paper disc method. The results showed that no. 3 3rd fraction had the highest antibiotic activities and formed the largest clear zone.

The ethyl acetate fractions of plantains were also separated into eight fractions in the same way. Among them, no. 2 and no. 3 fractions showing the highest antibiotic activities were mixed, re-separated, and seven 2nd fractions were obtained. No. 4 and no. 6 2nd fractions had superior antibiotic effects. These were again separated in the same method, and separated into four 3rd fractions. It was shown that no. 4 3rd fraction had the highest

effects of suppressing the growth of five food decomposition microorganisms. No. 3 3rd fraction of dandelions and no. 4 3rd fraction of plantains having the most superior antibiotic activities were separated by HPLC and were analyzed by NMR, and GC-MS. Antibiotic substances of dandelions included benzoic acid, and hexamine, plantains included hexadecanoic acid. Jakyak included cetyl alcohol and methyl N-amyl ketone and Mokdan included isobutyl isopentanoate.

● The 2nd research subject

Evaluation of immunomodulative function from Korean traditional relief farming plants

Many investigations for searching the functional substances from natural medicinal plants are going on recently. This study was performed to investigate the immunomodulative effect of extracts from 17 wild plants. These wild plants have long been used as medical herbs and are investigated for biological activities such as antimicrobial, antioxidants and antitumor activity.

1. Methanol extracts and mouse splenocytes proliferation : Mouse splenocytes proliferative function was enhanced by the supplementation of *Phlomis umbrosa* TURCZ., *Houttuynia cordata* THUNB., *Paeonia japonica*, *Taraxacum platycarpum* DAHLST., and *Plantago asiatica* L. methanol extracts.

2. Methanol extracts and cytokine production by mouse peritoneal macrophages : IL-1 β production was increased with the presence of *Phlomis umbrosa* TURCZ, *Agastache rugosa* KUNTZ and *Portulaca oleracea* L. methanol extracts. Higher level of IL-6 was produced with the presence of *Phlomis umbrosa* TURCZ, *Portulaca oleracea* L. and *Commelina communis* L. methanol extracts. *Commelina communis* L. *Houttuynia cordata* THUNB., *Anthriscus sylvestris* HOFFM., *Aster scaber* THUNB. and *Portulaca oleracea* L methanol extracts enhanced the production of TNF- α .

3. Solvent fractions and immunomodulative effect : *Taraxacum platycarpum* DAHLST and *Plantago asiatica* L. showed high splenocytes proliferation in ethylacetate and aqueous fraction. Ethylacetate, butanol, and aqueous fractions of *Phlomis umbrosa* TURCZ modulated the immune function in the positive level. *Paeonia japonica*, the most effective plant, showed immunomodulative effect in butanol and aqueous fractions. Chloroform, ethylacetate and aqueous fractions of *Houttuynia cordata* THUNB enhanced the splenocyte proliferation and cytokine production. The overall function was also enhanced in the presence of *Aster scaber* THUNB 's ethylacetate, butanol, and aqueous fractions.

4. Animal diet study : Aqueous fractions of selected five plants

were orally administrated every other day for 2 weeks. In the case of *Paeonia japonica*, cytokine production was increased at 500mg/kg b.w. and 1000mg/kg b.w. supplementation groups. The 100mg/kg b.w. and 1000mg/kg b.w. supplementation of *Houttuynia cordata* T_{HUNB} was enough to enhance the production of cytokine. Mouse splenocyte proliferation and cytokine production were enhanced with the supplementation of 500mg/kg b.w. of *Aster scaber* T_{HUNB} aqueous fraction.

The results of this study suggested that *Paeonia japonica*, *Houttuynia cordata* T_{HUNB}, and *Aster scaber* T_{HUNB} contain immunoactivating agents, which are soluble in the polar solvents. Further studies on the identification of stimulative components, mechanism by which the immunomodulating activity may exert, and the clinical effects of these wild plants application are need to be conducted.

● Assigned Tasks

Development and application study of functional foods from Korean Relief farming Plants

Jakyak (*Paeonia Japonica* var. *pilosa* NAKAI), Mokdan (*Paeonia Suffruticosa* ANDR), Nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt.) were dried, pulverized, and extracted with methanol in order to study the antibiotic effect on experimental bacteria such as *Bacillus subtilis* KCTC 1021, *Escherichia coli* KCTC 2441, *Staphylococcus aureus* KCTC 1916, *Listeria monocytogenes* KCTC 3569, *Vibrio parahemolyticus* KCTC 2471, etc. which are typical agents for food decomposition and pathogenic microorganisms.

The extract of Jakyak suppressed the growth of *B. subtilis* completely (100%) at the concentration of 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and showed 100% antibiotic power against *S. aureus* and *V. parahaemolyticus* at the concentration of 1,500 g/ml . The extract suppressed the growth of *E. coli* completely (100%) at the concentration of 2,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

The extract of Nutmeg suppressed the growth of *S. aureus* completely (100%) at the concentration of 500 g/ml , and showed 100% antibiotic power against *E. coli* and *V. parahaemolyticus* at the concentration of 2,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

The extract of Mokdan suppressed the growth of *B. subtilis*, *L. monocytogenes* and *V. parahaemolyticus* completely at the concentration of 1,500 $\mu\text{l}/\text{ml}$, and *S. aureus* at 2,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The growth of *E. coli* suppressed 91.6% at the concentration of 2,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

It was shown from the result of measurement of activation of the material obtained from the methanol extract, the chloroform and

ethylacetate layers of the extract of Nutmeg showed a high antibiotic power on the four experimental bacteria. The ethylacetate layer of the extract of Jakyak and Mokdan showed the highest antibiotic power.

In order to review their usability to the actual food, a fish jelly was manufactured by adding the ethanol extract of Nutmeg, Jakyak and Mokdan. Its physicochemical, physical, and taste characteristics were studied. The moisture content of the group with the extract added was shown to be significantly high. In the measurement of colors, the luminosity L was shown to be decreased as the amount of the extract added was increased, but there were no change according to the length of storage. The red color a value increased as the amount of extracted Nutmeg was increased, and was shown to decrease as the time of storage was increased ($p < 0.05$). That for Jakyak was increased as the amount of the extract added was increased, but was decreased as the time of storage was decreased. The yellow color b value was increased as the amount of the extract added was increased, but was decreased as the time of storage was increased ($p < 0.05$). There was no difference in pH immediately after the manufacture between the groups to which the extract was added and the groups to which no extract was added, but pH was decreased for the group to which no extract was added as the time of storage was increased ($p < 0.05$). The moisture activity was 93-95% RH which was a proper value for the growth of microorganisms.

At the storage temperature of 30°C, the total number of bacteria for the group with no extract added reached the 1.2×10^6 CFU/g

level in just 24 hours, but that for the group with the extract of Nutmeg added reached the 10^6 CFU/g level after 36-60 hours showing that the time of decomposition of the food was extended by 12-36 hours. The total number of bacteria reached the 10^6 CFU/g level in the fish jelly with the extract of Jakyak added after the storage for 36 hours. In the meantime, at the storage temperature of 10°C , the total number of bacteria of the group with no extract added reached the 1.0×10^6 CFU/g level 3 days after the storage, while that of the group with the extract of Nutmeg added reached the 10^6 CFU/g level after 12-15 days showing that the time of decomposition of the food was extended by 9-12 days. The total number of bacteria for the group with the extract of Jakyak added reached the 10^6 CFU/g level 9-15 days after the storage. The total number of bacteria for the group with the extract of Mokdan added reached the 10^4 CFU/g level 15 days after the storage.

According to the result of the taste test, the taste of the group with the extract added was evaluated to be better compared to that of the group with no extract added. And there was no significant difference according to the concentration with respect to the color, flavor, moisture, hardness, texture, and feeling after swallowing. The overall preference for the group with 0.5% extract added was shown to be higher ($p < 0.05$).

According to the result of the above experiments, it was shown that the addition of the extract of Nutmeg, Jakyak and Mokdan improved the moisture retaining power in the manufacture of the fish jelly, and extended the length of storage demonstrating its usability as a natural food preservative.

V. Application plan of research results

1. Application Plan

- Separation of Antibiotic material
- Application test to food model - Compare the degree of preservation between Hardy Plants and food added with synthetic preservatives
- Test synergy effect of antibiotic power due to extracts mixing
- Test physical functions of foods model due to Hardy Plants addition

2. Make public through technical journals and mass media

- Contributr to well-known scientific journal(7 papers).
- Presentation on international and domestic conferences or meetings(26 proceeding).
- Submit to various company bulletins.

CONTENTS

Presentation note	1
Abstract(in Korean)	2
Summary(in English)	15
Contents(in English)	32
Contents(in Korean)	34

Isolation and Identification of Antimicrobial Compounds from Korean Traditional Relief Farming Plants and their Effect when Added to Processed Foodstuffs

Contents	36
Chapter 1. Introduction	38
Chapter 2. The contents and category of research . .	42
Chapter 3. Results of study	62
Chapter 4. Reference	141

Evaluatin of Immunomodulative function from Korean Traditional Relief Farming Plants

Contents	156
Chapter 1. Introduction	157
Chapter 2. The contents and category of research . .	159
Chapter 3. Results of study	167
Chapter 4. Reference	204

Development and application study of functional foods from Korean Relief farming Plants

Contents	207
Chapter 1. Introduction	209
Chapter 2. The contents and category of research . .	215
Chapter 3. Results of study	229
Chapter 4. Reference	254
Acheivement of study and contribution	261
Application plan of research results	265

목 차

제 출 문	1
요 약	2
영문요약	15
영문목차	32
목 차	34

한국전통구황식물로부터 식품부패미생물에 대한 항균성물질의 탐색 및 개발

목 차	36
제 1 장 서 론	38
제 2 장 연구개발의 내용 및 범위	41
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과	62
제 4 장 참고문헌	141

한국전통구황식물로부터 면역능을 갖는 기능성 생리활성물질의 탐색 및 면역활성증강효과 규명

목 차	156
제 1 장 서 론	157
제 2 장 연구개발의 내용 및 범위	159
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과	167
제 4 장 참고문헌	204

한국전통구황식물로부터 기능성식품 개발 및 응용연구

목 차	207
제 1 장 서 론	209
제 2 장 연구개발의 내용 및 범위	215
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과	229
제 4 장 참고문헌	254
연구개발 목표 달성도 및 대외 기여도	261
연구개발 결과의 활용계획	265

한국전통구황식물로부터 식품부패미생물에 대한 항균성 물질의 탐색 및 개발

제 1 장 서 론	38
제 2 장 연구개발의 내용 및 범위	41
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과	62
제 1 절 한국전통구황식물 추출물의 식품부패미생물에 대한 항균성 검색과 농도별 및 분획별 항균성	62
제 2 절 합성식품보존제의 식품부패미생물에 대한 항균성 검색	77
제 3 절 구황식물 첨가에 의한 식품보존효과	79
1. 민들레 첨가 국수와 떡의 저장안정성	79
2. 질경이 첨가 국수와 떡의 저장안정성	83
3. 백작약 첨가 국수와 떡의 저장안정성	85
4. 목단피 첨가 국수와 떡의 저장안정성	87
제 4 절 구황식물 추출물 혼합물의 항균성	89
제 5 절 구황식물 첨가 식품모델의 관능검사	92
1. 민들레 첨가 국수와 떡의 관능검사	92

2. 질경이 첨가 국수와 떡의 관능검사	94
3. 백작약 첨가 국수와 떡의 관능검사	96
4. 목단피 첨가 국수와 떡의 관능검사	98
제 6 절 민들레로부터 항균활성물질의 분리 및 구조동정 . . .	100
제 7 절 질경이로부터 항균활성물질의 분리 및 구조동정 . . .	109
제 8 절 백작약으로부터 항균활성물질의 분리 및 구조동정 . .	117
제 9 절 목단피로부터 항균활성물질의 분리 및 구조동정 . . .	126
제 10 절 분리 동정된 화합물의 항균성	133
제 11 절 분리 동정된 화합물 혼합물의 항균성	133
제 4 장 참고문헌	141

한국전통구황식물로부터 식품부패미생물에 대한 항균성 물질의 탐색 및 개발

제 1 장 서 론

최근 식품 소비 패턴의 변화와 외식의 증가 등으로 식생활이 다양화 되고 고급화 및 편의화를 추구함에 따라 가공 식품과 인스턴트 식품의 생산 및 소비가 증가하고 있다. 특히, 식품의 부패와 변질을 방지하고 식품의 저장과 유통 기간을 연장하기 위해 식품 보존제의 사용이 늘고 있다.

현재 식품에 사용이 허가된 식품 보존제로는 sorbic acid, benzoic acid, butyl-p-hydrobenzoate 등의 화학 합성품들이 있다. 이들 식품 보존제들은 사용 기준이 설정되어 있으나 체내에 계속 축적될 경우에는 위장 장애나 발암 및 돌연 변이 유발과 같은 부작용을 초래할 우려가 있으므로 소비자들은 이들 화학 합성품의 사용을 기피하고 인체에 해가 없는 대체 보존제를 요구하게 되었다. 따라서 천연물로부터 식품 보존제를 개발하려는 많은 연구가 진행되고 있다. 음식에 맛과 향을 주고 예로부터 저장성에 도움을 주어 왔던 향신료의 일종인 계피, 정향의 정유 성분인 cinnamic aldehyde, eugol에 대한 항균성이 보고되었다. 우리나라 전통 향신료로 추어탕 등에 사용되는 산초의 hexadecanoic acid도 식품을 오염시키는 균주들의 증식을 억제하는 효과가 있는 것으로 보고되었다. 또한 고추, 양파, 겨자 등도 미생물 증식 억제 효과가 있는 것으로 보고되었다. 여등은 녹차, 오롱차 및 홍차 추출물에 대한

항균 효과를 보고하였고, 박등은 김치의 발효 중 생성되는 젖산균에 대해 보고하였으며 젖산균이 생성하는 bacteriocin에 대한 항균성도 보고되었다. 최근 우리나라에서도 천연 자원물에 들어 있는 특정 성분에 대한 연구가 많아져서 강낭콩 잎에서 정제한 키틴 분해 효소와 항생 물질에 대한 항균 활성 뿐 아니라 키토산과 오징어 먹즙, 불가사리와 같은 수산 미이용 자원에 대한 항균 효과도 보고되고 있다. 또한 야산에 널리 있어 구하기 쉬운 야생 식물이면서 한약재와 같은 약용 식물로 사용되어 온 쑥, 방기, 감초 및 단삼 등에 대한 항균력도 보고되고 있다. 이들 구황식물 중 특히 민들레는 전국의 산과 들, 길가에서 흔히 자라는 국화과의 여러해살이 풀로 안질방이, 무스들레, 포공영, 지정, 금잠초 등으로 불리운다. 3~4월에 풀잎 사이로 꽃대가 올라 오고, 4~5월에 노란색의 꽃을 피우며 예로부터 어린 순과 뿌리를 캐어 나물이나 국, 영양 강장식으로 식용하여 왔다. Taraxasterol, choline, sterol, inulin, pectin 등의 성분이 들어 있으며 한방 및 민간에서 포공영, 지정이라 하여 건위, 강장, 이뇨, 해열, 천식, 거담 등의 효과가 인정되었고 완하, 창종, 정종, 치창, 종기, 결핵, 해열, 최유, 황달, 간질, 부인병 등에 사용하여 왔다. 유럽에서도 민들레를 귀중한 약초로 인정하여 변비, 류마티스, 노이로제, 야맹증 등에 이용하고 프랑스와 이탈리아에서는 채소나 샐러드로 이용하며 꽃과 잎은 목욕 재료로 이용하고 있다.

질경이는 질경이과에 속한 다년생 초본 식물로 들이나 길가에서 쉽게 볼 수 있다. 동속 식물로 털질경이, 개질경이, 왕질경이가 있고 6~7월에 꽃이 피며 심하게 짓밟혀도, 가뭄속이나 뜨거운 햇볕 아래에서도 잘 견디는 힘이 있다. 질경이라는 명칭 이외에도 길경이, 빼부장, 뱀조개, 배짱이, 차전초, 대차전, 야지채, 길장구씨, 뱀조개씨 등으로 불리었

다. 우리나라에서는 질경이의 부드러운 잎과 줄기를 나물로 먹었고 즙을 내어 열매와 고기와 기름을 섞어 고추장에 무쳐서도 먹었으며 밀가루를 섞어 떡을 만들어 먹기도 하였다. 한방에서는 진해, 소염, 이뇨, 안질, 강심, 임질, 심장염, 태록, 난산, 출혈, 해열, 지사, 요혈, 금창, 종독 등에 사용하였으며 안적질, 소변, 통리, 변비 등에 약효가 인정되어 왔다. 질경이는 무기질과 단백질, 비타민류 및 소당류 등이 많으며 특히 전초에는 물에 풀리는 다당류가 많아서 항염증 작용과 상피화 촉진 작용에 관여하는 것으로 알려져 있다. 전초와 플라타긴은 동물 실험을 통해 호흡 중추에 작용하여 호흡을 느리고 깊게 하는 것으로 보고되었다.

백작약(*paeonia japonica* var. *pilosa* Nakai)은 미나리아재비과에 속하는 여러해살이풀로서 길고 살찐 뿌리를 가지고 있으며 줄기는 곧게 서고 60cm안팎의 높이로 한방에서 진통, 해열, 조혈, 지한등의 효능을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 가을에 굴취하여 외피를 제거하고 끓는 물에 가볍게 데친 다음 햇볕에 말려 쓰기에 앞서 잘게 썰는데 때로는 썬 것을 불에 볶아서 쓰기도 한다. 주로 봄에 어린잎을 나물로 해 먹는데 쓰고 신맛이 있으므로 데쳐서 잘 우려야만 먹을 수 있다. 실지에 있어서는 드물게 나는 풀이므로 이것만 가지고 나물로 하기는 어렵고 다른 풀과 주로 함께 섞어서 먹는다. 뿌리에 안식향산과 asparagin 등을 함유하고 있으며 한방에서는 진통, 해열, 진경, 이뇨, 조혈(調血), 지한(止汗)등의 목적으로 사용되고 있다.

목단(*paeonia suffruticosa* ANDR)은 미나리아재비과에 속하는 키 작은 낙엽활엽수이며 크게 자라면 2m 정도의 높이에 이르면서 여러개의 굽은 가지를 치며 잎은 깃털꼴로 갈라지고 잎 가장자리는 밋밋하고 뒷면은 흰빛을 띠면서 약간의 잔털이 있다. 목단의 뿌리껍질을 주로 약재로 쓰

는데 봄 또는 가을에 굴취하여 속의 딱딱한 부분을 제거한 다음 햇볕에 말린다. 한방에서는 해열, 진통, 소염, 진경(鎮慶), 통경(通經)등의 효능이 있으며 어혈을 풀어주기도 한다고 알려져 있으며 주로 1회에 2-4g 씩 물에 달이거나 가루로 빵아 복용한다.

이처럼 예로부터 나물이나 국으로 식용하고 민간에서 질병을 치료하는 한약재로 사용해 온 민들레, 질경이, 백작약과 목단피를 methanol 및 여러 용매로 추출하여 식품 부패 미생물에 대한 항균력을 검색하고, 그 항균 물질을 분리, 정제하여 구조 분석을 하여 천연 식품 보존제로서의 이용 가능성을 검토하였다. 또한 이들을 분말, 추출물 그리고 이들로부터 분리, 동정된 화합물을 식품모델에 적용시켜 미생물학적, 관능적 특성을 검토함으로써 실제 식품가공시 이용가능성을 탐색하였다.

제 2 장 연구개발의 내용 및 범위

제 1 절 실험재료

1. 실험재료

가. 시료

본 실험에 사용한 35종의 구황식물은 1997년에 채취하여 건조된 것을 경동시장에서 구입하거나 직접 채취하여 음건하여 마쇄한 후 사용하였다. 특히 민들레(*Taraxacum platycarpum* D.)는 1997년 4~5월에 걸쳐 서울 근교에서 직접 채취하여 수세 후 동결 건조하여 분쇄기로 가루를 내어 사용하였다. 질경이(*Plantago asiatica* L.)는 1997년 6월에 강원도 원통에서 채취하여 건조시킨 것을 서울 경동 시장에서 구입하여 분쇄하여 실험하였고 백작약은 1997년 경상북도 의성에서, 목단피는 경상북도 상주에서 채취하여 건조시킨 것을 서울 경동시장에서 구입하여 blender(FM-680w, HANIL Co., Won Joo, Korea)로 분쇄하여 제분하여 폴리에틸렌백에 넣어 -40°C Deep freezer에 보관하면서 사용하였다.

Table 1. 구황식물 목록

구황식물명	학 명
닭의장풀	<i>Commelina communis</i> L.
전호	<i>Anthriscus sylverstris</i> HOFFM.
속단	<i>Phlomis umbrosa</i> TURCZ
어성초	<i>Houttuynia cordata</i> THUNB.
박하	<i>Mentha canadensis</i>

Table 1. Continued

구황식물명	학 명
차조기	<i>Perilla frutescens</i>
방아	<i>Agastache rugosa</i> KUNTZ
백작약	<i>Paeonia japonica</i> var. <i>pilosa</i> NAKAI
당귀	<i>Angelica gigas</i> NAKAI
쇠비름	<i>Portulaca oleracea</i> L.
민들레	<i>Taraxacum platycarpum</i> DAHLST
질경이	<i>Plantago asiatica</i> L.
참취	<i>Aster scaber</i> THUNB
달래	<i>Allium monanthum</i> MAX
참나물	<i>Spuriopinella bracycarpa</i> KITAGAWA
원추리	<i>Hemerocallis fulva</i> L.
씀바귀	<i>Ixeris dentata</i> NAKAI
대황	<i>Rheum undulatum</i> Linné
독활	<i>Aralia cordata</i> Thunberg
맥문동	<i>Liriope muscari</i> BALL
목단피	<i>Paeonia suffouticosa</i> ANDR
삼백초	<i>Saururus loureiri</i> DECAIS
소목	<i>Oinus densiflora</i> SIEB et Zucc

Table 1. Continued

구황식물명	학 명
업나무	<i>Kalopanax pictum</i> var. <i>typicum</i> NAKAI
오배자	<i>Rhus javanica</i> L.
육두구	<i>Myristica fragrans</i> HOUTT
백작약	<i>Paeonia japonica pilosa</i> NAKAI
황금	<i>Scutellaria baicalensis</i> GEORG
천근	<i>Ligustricum wallichii</i> Franch
하고초	<i>Rheum coreanum</i> NAKAI
오매	<i>Prunus mume</i> STEE et ZUCC
복신	<i>Acer ginnala</i> Maximowicz
세신	
백복령	
원시초	

나. 공시균주 및 배지

본 연구에 사용한 균주는 자연계에 널리 분포하여 식품을 변질시키는 *Bacillus subtilis* KCTC 1021, 저온에서도 생육하여 냉동, 냉장 식품에서 오염의 원인이 되는 *Listeria monocytogenes* KCCM 40307, gram 양성 균으로서 enterotoxin을 생성하여 식중독의 원인이 되는 *Staphylococcus aureus* KCTC 1916, gram 음성균으로 오염의 지표균이면서 부패세균인 *Escherichia coli* KCTC 2441, 그리고 호염성 균으로 장염의 원인균이며 식중독을 일으키는 *Vibrio parahaemolyticus* KCTC 2471을 한국과학기술원 생명 공학 연구소에서 분양 받아 사용하였다. 배지는 *B. subtilis*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* 그리고 *E. coli*는

(tryptic soy broth(Difco)와 nutrient agar(Difco)를 사용하였고 *V. parahaemolyticus*는 위와 같은 배지에 NaCl을 3% 첨가하여 사용하였다.

다. 시약

추출 및 column chromatography용 용매는 시약용 1급 methanol, *n*-hexane, chloroform, ethylacetate, *n*-butanol을 사용하였고, silica gel은 Merk사의 column chromatography(70-230 mesh ASTM)용을, thin layer chromatography(TLC) plate는 Merk사의 1.05715, 25 DC-Platten kiesel gel 60을 구입하여 사용하였다.

라. 합성 식품 보존제

합성 식품 보존제는 sodium propionate(Yakuri Pure Chemicals Co. Ltd)와 sorbic acid(Junsei Chemical Co., Ltd)를 사용하였다.

마. 기타

밀가루는 대한 제분제품을 사용하고 소금은 꽃소금을, 쌀은 김포산 일 반미를 사용하였다.

제 2 절 실험 방법

1. 추출 방법

분말화한 구황식물을 Figure 1과 같이 methanol을 가하여 80℃ 수욕상에서 환류 냉각하면서 3시간 3회 반복 추출하여 여과한 후 rotary evaporator(EYELA N-1N, Japan)로 60℃에서 감압 농축하여 메탄올 추출물을 얻었다. 민들레(18 kg)는 592.79 g, 질경이(11 kg)는 695.47 g의 methanol 추출물을 얻었다.

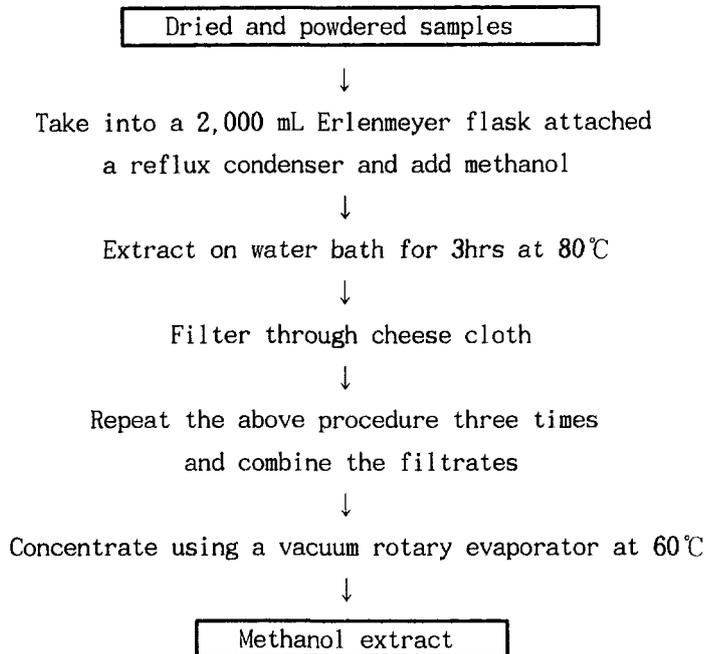


Figure 1. Extraction of antimicrobial substances from wild plants using methanol as a solvent.

2. methanol 추출물 및 분획별 항균성 검색

본 연구에 사용된 5종의 공시균주는 모두 사면 배지에 계대 배양하여 사용하였다. 항균성 검색 배지로서 *B. subtilis*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*와 *E. coli*의 경우에는 TS broth(Tryptic Soy broth)와 agar를 사용하였고 *V. parahaemolyticus*는 TS broth와 agar에 3% NaCl을 첨가하여 사용하였다. 구황식물 추출물의 항균성은 액체 배지 희석법으로 수행하였다. 즉, 사면 배지에 배양한 균주를 1백금이 취해 TS broth 10

mL가 든 시험관에 접종하고 37°C에서 8시간 배양하여 10⁹ colony forming unit(CFU/mL)가 되도록 10배 단위로 조정된 후 5 mL의 TS broth에 50 μL씩 접종하였다. TS broth에는 균주를 접종하기 전에 methanol 추출물을 500~2,000 μg/mL 첨가하였다. 접종된 TS broth는 37°C incubator에서 24시간 배양한 후 Figure 2와 같이 분광광도계를 사용하여 660 nm에서 흡광도 (optical density)를 측정하여 항균력을 다음식¹²⁵⁾에 의하여 산출하였다. 이때 blank는 각 시료를 농도별로 첨가한 것으로 하였다.

% Inhibitory effect

$$= \frac{[(\text{control} - \text{control blank}) - (\text{treatment} - \text{treatment blank})] \times 100}{(\text{control} - \text{control blank})}$$

Dissolve 1 g of extract in methanol(10 mL)

↓

Transfer to each liquid media at various concentration

↓

Inoculate 100 μL of suspension of the test microorganisms

↓

Shake vigorously

↓

Incubate for 24hrs at 37°C

↓

Measure the optical density at 660 nm

Figure 2. Procedure for assay of antimicrobial activity of methanol extracts from wild plants

methanol 추출물을 증류수에 현탁한 후 Figure 3과 같이 hexane을 가하여 분획한 후 여과, 감압 농축하여 추출물 147.3 g을 얻었다. 이와 같은 방법으로 chloroform, ethylacetate, *n*-butanol 및 물로 극성이 낮은 용매에서 극성이 높은 용매로 순차적으로 계통 분획하여 chloroform 추출물 11.18 g, ethylacetate 추출물 6.31 g, butanol 추출물 40.28 g 그리고 물 추출물 306.30 g을 얻었다.

질경이의 용매별 계통 분획도 민들레와 동일한 방법으로 하여 *n*-hexane 추출물 93.27 g, chloroform 추출물 8.26 g, ethylacetate 추출물 31.08 g, *n*-butanol 추출물 133.77 g 그리고 물 추출물 323.72 g을 얻었으며 추출 과정은 Figure 4와 같다.

methanol 추출물을 증류수에 현탁한 후 Figure 5와 같이 hexane을 가하여 분획한 후 여과, 감압 농축하여 추출물 517 g을 얻었다. 이와 같은 방법으로 낮은 용매에서 극성이 높은 용매로 순차적으로 계통 분획하여 chloroform 추출물 170 g, ethylacetate 추출물 120.7 g, butanol 추출물 954.9 g 그리고 물 추출물 670.7 g을 얻었다.

목단피의 용매별 계통 분획도 백작약과 동일한 방법으로 하여 *n*-hexane 추출물 93.7 g, chloroform 추출물 37 g, ethylacetate 추출물 273.6 g, *n*-butanol 추출물 282 g 그리고 물 추출물 644.7 g을 얻었으며 추출 과정은 Figure 6과 같다.

계통 분획 추출물의 항균성 검색은 paper disc법으로 하였다. 즉, nutrient agar를 멸균 후 직경 9 cm인 petri-dish에 15 mL씩 분주하여 clean bench에서 하룻밤 건조시키고 그 위에 각 공시균주의 배양액 100 μ L를 구부린 유리 막대(spreaders)로 도말하였다. 민들레, 질경이, 백작약과 목단피의 용매 분획별 추출물을 5% 용액으로 만든 후 추출물의 농도를 500~2,000 μ g/disc로 하여 멸균된 disc(직경 8 mm, Toyo

Seisakusho Co.)에 흡수, 건조시켜 균주가 도달된 plate 표면에 올려 놓은 후 37°C incubator에서 24시간 배양하여 disc 주위에 생성된 clear zone의 직경(mm)으로 항균 활성을 측정하였다.

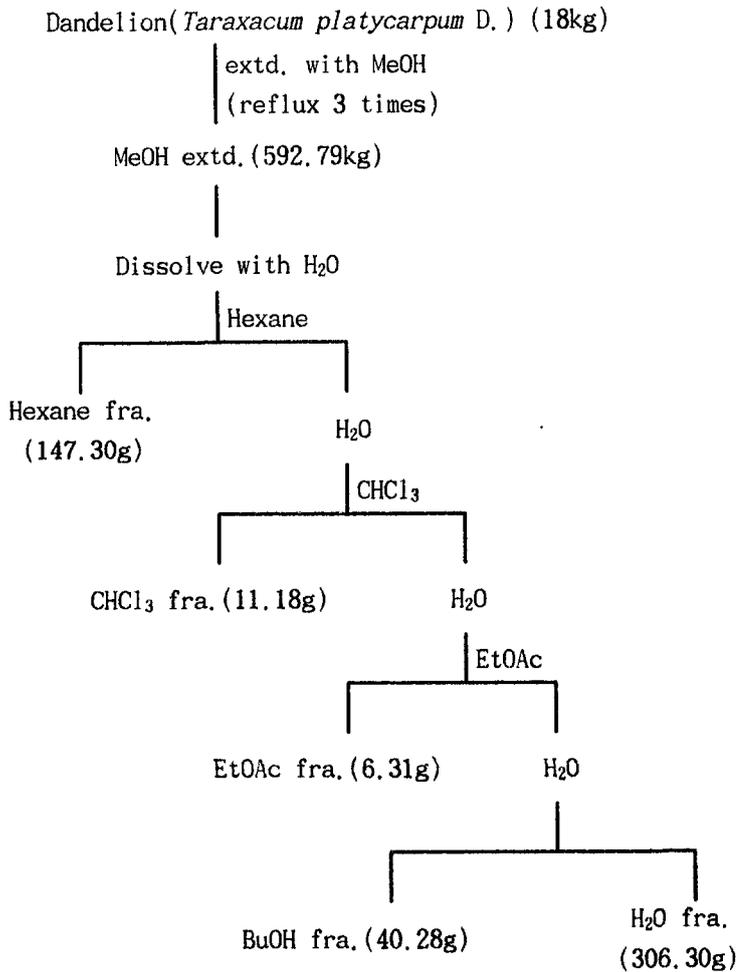


Figure 3. Fractionation of the methanol extract from Dandelion

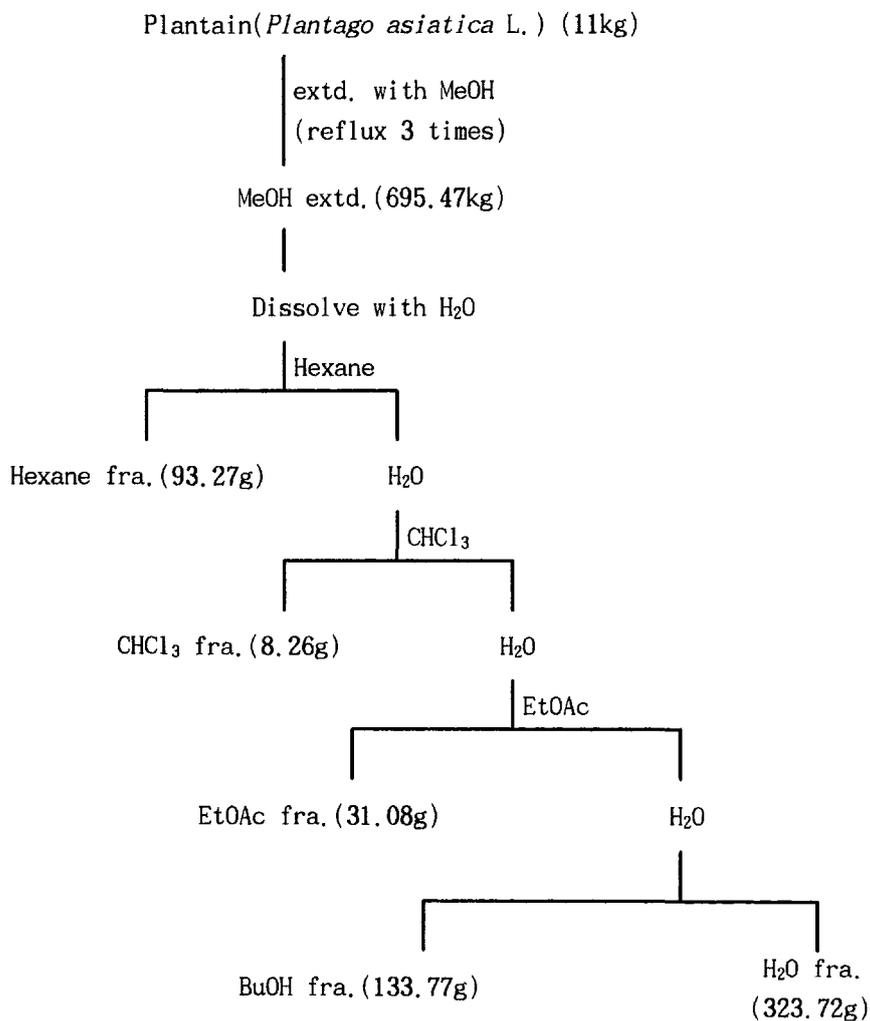


Figure 4. Fractionation of the methanol extract from plantain.

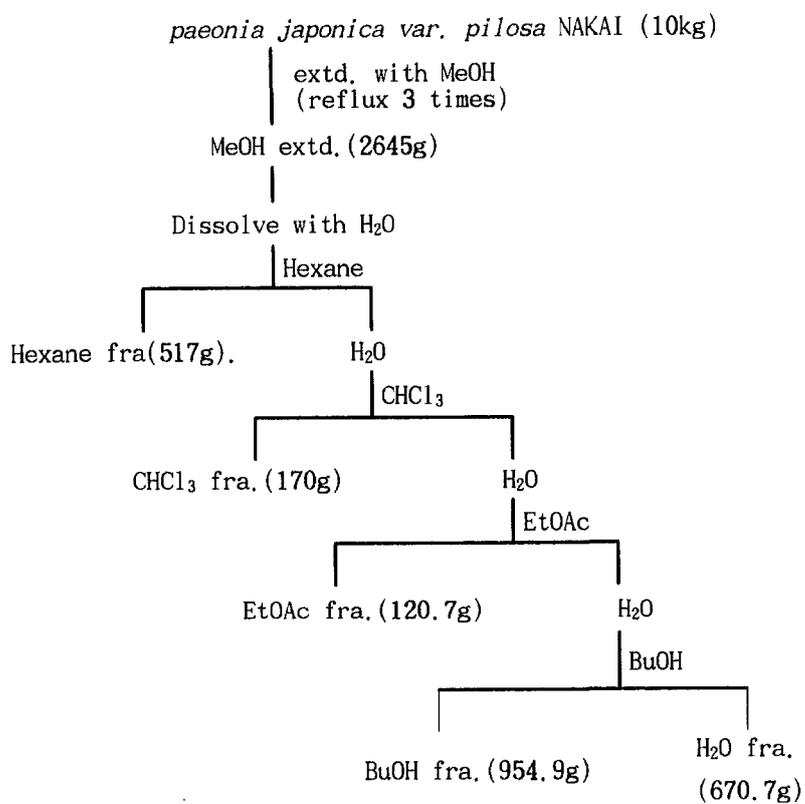


Fig 5. Fractionation procedure of the methanol extract from *paeonia japonica* var. *pilosa* NAKAI

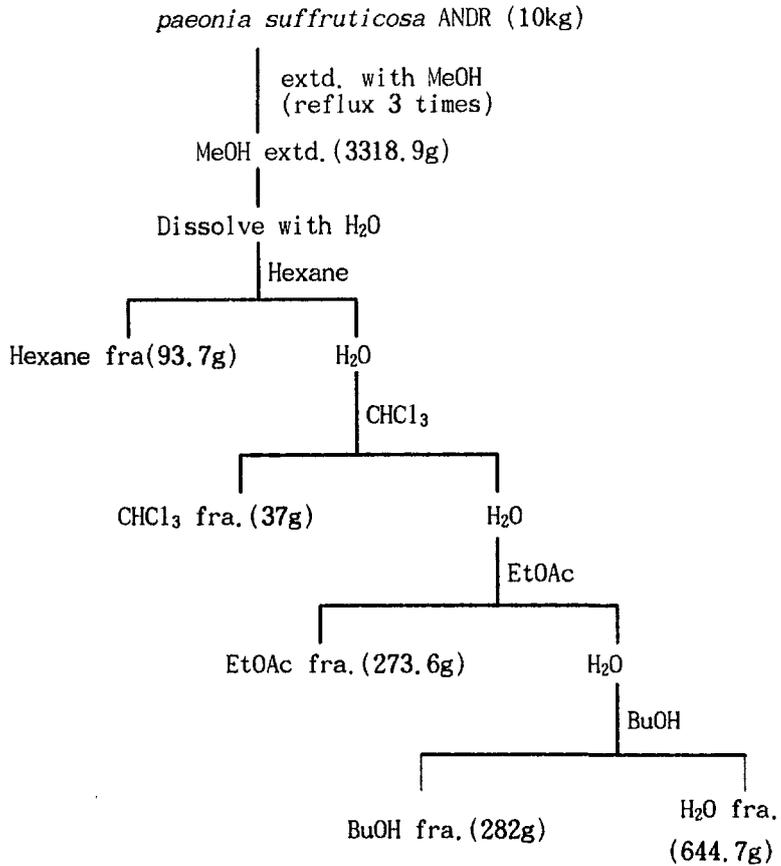


Fig. 6. Fractionation procedure of the methanol extract from *paeonia suffruticosa* ANDR.

3. 합성 식품 보존제의 항균성 검색

인체에 대한 독성이 낮아 우리나라에서도 실제 식품 보존제로 사용되고 있는 sodium propionate를 1, 2, 3, 5%의 농도로, sorbic acid는

0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25%의 농도로 TS broth에 첨가하여 *B. subtilis*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* 및 *E. coli*에 대한 항균성을 검색하였다. 또한, TS broth에 3% NaCl을 첨가하여 *V. parahaemolyticus*에 대한 항균성을 살펴보았다.

4. 추출물 혼합물의 항균력

민들레와 질경이, 백작약과 목단피의 methanol 추출물을 함께 사용하였을 때 기대되는 항균 효과를 측정하기 위하여 각 추출물을 1,000 µg/mL의 농도로 서로 혼합하여 5가지 공시균주를 접종한 TS broth에 첨가하여 그 억제 효과를 실험하였다.

5. 식품 보존 효과

민들레, 질경이, 백작약과 목단피를 식품에 이용하는 방안을 모색하고자 각각을 첨가하여 국수와 떡을 제조하고 식품 보존 효과를 측정하였다. Table 2와 같은 분량으로 구황식물을 첨가한 국수를 Figure 7의 순서로 제조하였고, 동일한 방법으로 구황식물을 첨가한 떡을 Table 3과 같은 분량으로 Figure 8의 방법에 따라 각각 제조하여 18°C의 incubator에 보관하면서 저장 기간에 따른 총균수를 측정하였다(제조 직후, 24, 48, 72시간). 제조한 국수와 떡의 총균수 측정은 Speck의 방법¹²⁷⁾에 따라 Figure 9와 같은 방법으로 시료를 멸균된 0.9% NaCl 용액으로 일정한 비율로 희석하고 표준 한천 평판 배지에 도말하여 37°C에서 24시간 배양한 후 나타난 집락의 수를 계수하여 측정하였다.

Table 2. Formulas for the addition of powder of wild plants to noodle preparations

Ingredient	Amount of powder (%)			
	0	1	3	5
Flour	200 g	198 g	194 g	190 g
Wild plants	0 g	2 g	6 g	10 g
Salt	10 g	10 g	10 g	10 g
Water(40°C)	90 mL	90 mL	90 mL	90 mL

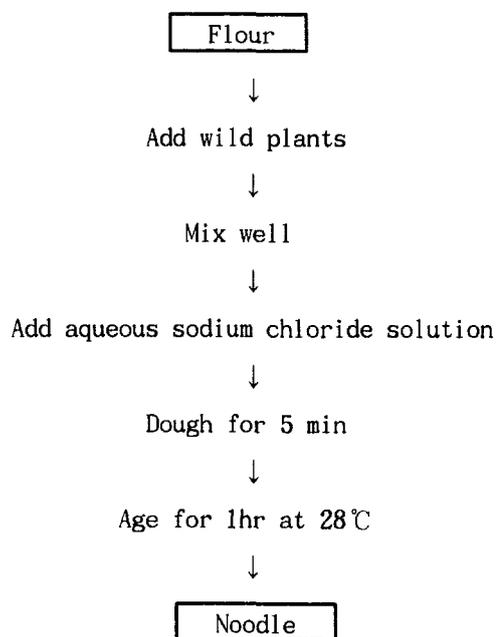


Figure 7. Preparation of noodle added with powder of wild plants

Table 3. Formulas for the addition of powder of wild plants
in to rice cake preparations

Ingredient	Amount of powder (%)			
	0	1	3	5
Rice Flour	200 g	198 g	194 g	190 g
Wild plants	0 g	2 g	6 g	10 g
Sugar	20 g	20 g	20 g	20 g
Salt	1 g	1 g	1 g	1 g
Water	20 mL	20 mL	20 mL	20 mL

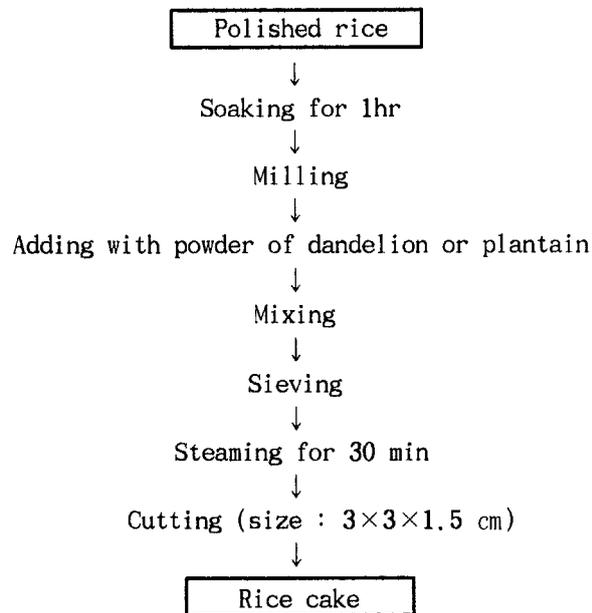


Figure 8. Preparation of rice cake added with powder of
wild plants

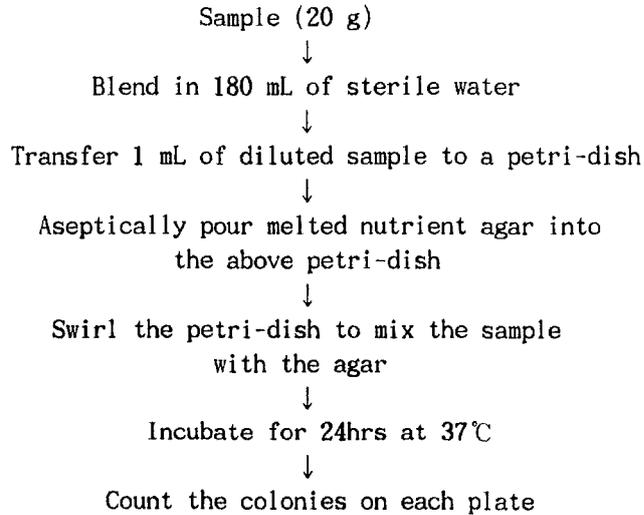


Figure 9. Procedure for viable plate count.

6. 합성 보존제 첨가 식품의 보존효과

인체에 대한 독성이 낮아 우리나라에서도 실제 식품 보존제로 사용이 허가된 sodium propionate를 0.1, 0.2 %의 농도로, sorbic acid는 0.05, 0.1 %의 농도로 첨가하여 국수와 떡을 제조하고 식품 보존 효과를 측정하였다. 실험방법은 위와 동일하게 하였다.

7. 규명된 물질 첨가 식품의 보존효과

민들레, 질경이, 백작약과 목단피로부터 실험을 통해 규명된 물질중 항균성 검색에서 우수한 효과를 보이는 물질을 떡과 국수에 첨가하여 국수와 떡을 제조하고 식품 보존 효과를 측정하였다. 실험방법은 위와 동일하게 하였다.

8. 식품 모델의 관능 검사

민들레, 질경이, 백작약과 목단피를 첨가한 국수와 떡의 관능적 특성에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 숙명여자대학교 식품영양학과 대학원생 5명을 선정하여 이들에게 식품 model 시료를 이용하여 훈련을 시킨 뒤 관능 검사를 실시하였다. 국수는 제조하여 끓는 물에서 5분간 끓여 식힌 후에 떡은 제조 후 일정한 크기로 자른 후에 동일한 그릇에 시료를 담아서 제공하였다. 평가 항목은 색(color), 향기(flavor), 씹힘성(Chewiness), 촉촉한 정도(moistness), 전반적인 품질(overall quality)에 대하여 7점법으로 평가하였다.

9. 통계 분석

관능 검사 결과는 SAS package로 통계 처리하였으며 시료간의 유의적 검증은 ANOVA test와 Duncan's multiple range test를 실시하여 분석하였다.

10. 항균성 물질의 분리 및 동정

용매의 계통 분획 추출물에서 ethylacetate 추출물이 가장 항균 활성이 높았다. 따라서 이들 ethylacetate 추출물은 silica gel에 소량의 CH_2Cl_2 : MeOH = 15 : 1을 가하여 coating 시키고 CH_2Cl_2 : MeOH = 15 : 1 로 slurry를 만들어 column(7 cm × 1.2 m)에 충전하여 (CH_2Cl_2 : MeOH = 15 : 1) - MeOH 용매계로 methanol 농도를 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 100%까지 step-wise 방법으로 용출 분획하고 thin layer chromatography(TLC)로 각 분획물을 전개시켜 민들레의 경우는 13개, 질경이의 경우는 8개의 1st fraction을 얻었다. 백작약과 목단피 ethylacetate 분획물은 silica gel에 소량의 ethylacetate

: Hexane = 1 : 1을 가하여 coating 시키고 ethylacetate : Hexane = 1 : 1 로 slurry를 만들어 column(7 cm × 1.2 m)에 충전하여 (ethylacetate : Hexane = 1 : 1) - MeOH 용매계로 methanol 농도를 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 100%까지 step-wise 방법으로 용출 분획하고 thin layer chromatography(TLC)로 각 분획물을 전개시켜 백작약의 경우는 11개, 목단피의 경우는 3개의 1st fraction을 얻었다.

민들레의 경우 13개의 1st fraction은 다시 5종의 공시균주를 이용하여 항균성이 높게 나타난 4, 5, 6번째 1st fraction을 모아 silica gel column chromatography(5 cm × 75 cm)와 TLC로 각 분획물을 전개시켜 5개의 2nd fraction을 얻었다. 5개의 2nd fraction을 다시 5개의 공시균주로 항균성을 검색하여 활성이 가장 높게 나타난 2nd fraction 2를 재차 silica gel column chromatography(2.5 cm × 60 cm)와 TLC를 이용하여 6개의 3rd fraction으로 분리하였다.

질경이의 경우 8개의 1st fraction은 각각 5종의 공시균주를 이용하여 항균성이 높게 나타난 2, 3번째 1st fraction을 모아 silica gel column chromatography(5 cm × 75 cm)를 하여 7개의 2nd fraction을 얻었다. 7개의 2nd fraction을 다시 5개의 공시균주로 항균성을 검색하여 활성이 높게 나타난 2nd fraction 4와 6을 합쳐서 재차 chromatography(2.5 cm × 60 cm)와 TLC를 하여 4개의 3rd fraction을 분리하였다.

백작약의 경우 11개의 1st fraction은 다시 5종의 공시균주를 이용하여 항균성이 높게 나타난 3, 4, 5번째 1st fraction을 모아 silica gel column chromatography(5 cm × 75 cm)와 TLC로 각 분획물을 전개시켜 5개의 2nd fraction을 얻었다. 5개의 2nd fraction을 다시 5개의 공시

균주로 항균성을 검색하여 활성이 가장 높게 나타난 2nd fraction 3를 얻었다.

목단피의 경우 3개의 1st fraction은 각각 5종의 공시균주를 이용하여 항균성이 높게 나타난 1, 2번째 1st fraction을 모아 silica gel column chromatography(5 cm × 75 cm)를 하여 3개의 2nd fraction을 얻었다. 3개의 2nd fraction을 다시 5개의 공시균주로 항균성을 검색하여 활성이 높게 나타난 2nd fraction 1을 얻었다.

항균성이 높게 나타난 물질은 HPLC로 먼저 분리한 후 ¹H-NMR, GC-MS로 분석하여 물질을 규명하고자 하였다.

가. HPLC

항균력이 나타난 민들레 ethylacetate 분획의 3rd fraction 3과 질경이의 ethylacetate 분획의 3rd fraction 4, 백작약 ethylacetate 분획 2nd fraction 3과 목단피 2nd fraction 1을 Table 4, 5의 조건으로 HPLC를 사용하여 분석하였다.

Table 4. Operating conditions of HPLC for analysis of antimicrobial compounds from dandelion and plantain

Requester	Condition
Instrument	Waters Associates
Column	μ -C ₁₈ bondapak
Eluent	Water Water : Acetonitrile (9 : 1)
Wave length	254 nm
Detector	Waters 441
Injection volume	25 μ L

Table 5. Operating conditions of HPLC for analysis of antimicrobial compounds from mokdan(*paeonia japonica* var. *pilosa* NAKAI) and jakyak(*paeonia suffruticosa* ANDR)

Requester	Condition
Instrument	Waters Associates
Column	μ -C ₁₈ bondapak
Eluent	Water
	Water : Acetonitrile (8 : 2)
Wave length	254 nm
Detector	Waters 441
Injection volume	25 μ L

나. NMR

Proton nuclear magnetic resonance spectrophotometer(¹H-NMR) spectrum은 Bruker AMX-500 MHz NMR로 온도 303K 조건에서 측정하였다. 화학적 이동은 내부 표준 물질로 tetramethylsilane(TMS)을 사용하여 parts per million(ppm)단위로 나타내었다.

다. GC-MS

Mass spectrum(MS)은 Hewlett-Packard 6890 Gas Chromatography와 연결된 Hewlett-Packard 5973 MSD를 사용하였다. 분석조건은 Table 6과 같다. Column은 HP-5SM column(30 m × 0.25 mm × 0.25 μ m)이었으며 column 온도는 40℃에서 2분 유지시킨후 10℃/min으로 승온하여 320℃, 1 min 조건으로 분석하였다. Injector 온도는 250℃였고, detector 온도는 300℃였으며 ion source temperature는 250℃였으며 electron energy는 70 eV였다. Carrier gas는 He(1.0 mL/min)을 사용하였다.

Table 6. Operating conditions of GC/MS for analysis of anti microbial compounds from dandelion and plantain

Requester	Condition
Instrument	Hewlett-Packard 6890 GC Hewlett-Packard 5973 MSD
EI condition	Electron energy : 70 eV Source Temperature : 250°C Trap Current : 300 μ A
Column	HP-5SM (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m)
Injector Temp.	250°C
Detector Temp.	300°C
Column Temp.	10°C/min 40°C(2 min) \longrightarrow 320°C, 1 min
Carrier Gas	He(1.0 mL/min)

11. 규명된 물질의 항균성 검색

민들레, 질경이, 백작약과 목단피로부터 규명된 물질인 benzoic acid, hexadenoic acid, cetyl alcohol, isoveleric acid isobutyl ester, methyl N-amyl ketone(TCI-GR Co., Ltd)의 항균효과를 측정하기 위해 500, 1000, 1500, 2000 μ g/ml의 농도로 5가지 공시균주를 접종한 TS broth에 첨가하여 억제효과를 실험하였다.

12. 규명된 물질 혼합물의 항균력

민들레, 질경이, 백작약과 목단피로부터 규명된 물질을 함께 사용하였을 때 기대되는 항균효과를 측정하기 위해 각 물질을 1,000 μ g/mL의 농도로 서로 혼합하여 5가지 공시균주를 접종한 TS broth에 첨가하여 그 억제 효과를 실험하였다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 한국전통구황식물 추출물의 식품부패미생물에 대한 항균성 검색과 농도별 및 분획별 항균성

1. 한국전통구황식물추출물의 농도별 항균성

35종의 구황식물을 methanol로 추출하여 1000과 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 씩 첨가하여 식품 부패 미생물의 증식 억제 효과를 검색한 결과는 Table 7과 같다. 이들 구황식물중 민들레의 methanol 추출물은 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 *S. aureus*의 증식을 100% 억제하였으며 *L. monocytogenes*와 *V. parahaemolyticus*도 같은 농도에서 각각 98.43%와 97.00%의 억제 효과를 보였다. 또한 *B. subtilis*는 2,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 97% 이상의 증식 억제 효과를 보였고, G(-) 균주인 *E. coli*는 다른 균주에 비하여 증식 억제 효과는 약하지만 같은 2,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 94% 증식 억제 효과를 나타내었다. 질경이의 methanol 추출물도 2,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 *B. subtilis*, *L. monocytogenes* 및 *V. parahaemolyticus*의 증식을 완전히 억제하였고, *S. aureus*는 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서부터 식품 부패 미생물의 증식을 90% 이상 억제하였으며 *E. coli*는 2,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 90.5% 억제되었다. 일반적으로 G(-) bacteria보다 G(+) bacteria에 대하여 정유 성분들이 민감하게 반응하여 항균력이 훨씬 높다고 보고되었으나 본 실험에서는 G(-) 균주인 *V. parahaemolyticus* 균주의 증식에도 추출물이 민감하게 반응하는 경향을 보여주었다. 따라서 김의 연구에 의하면 산초의 methanol 추출물이 G(+) 균주보다 G(-) 균주인 *E. coli*가 민감하게 반응하였다고 보고하였고, 김등의 연구를 보면 carvacrol

을 비롯한 8종의 정유 성분들은 G(-) 균주인 *Vibrio vulnificus*에 가장 민감한 효과를 보인 반면, G(+) 균주인 *L. monocytogenes*에 대하여 가장 큰 저항성을 보여 균주의 증식 억제 효과는 균주의 형태에 의해 영향을 받는다고 확인하기는 어렵다고 하겠다.

백작약의 methanol 추출물은 2000 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *V. parahaemolyticus*의 증식을 100% 억제하였으며 *L. monocytogenes*도 같은 농도에서 73.39%의 억제 효과를 보였다. 목단피의 methanol 추출물도 1,500 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 *B. subtilis*, *L. monocytogenes* 및 *V. parahaemolyticus*의 증식을 완전히 억제하였고, *S. aureus*는 2,000 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서부터 식품 부패 미생물의 증식을 완전히 억제하였으며 *E. coli*는 2,000 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 91.6% 억제되었다. 또한 어성초를 대상으로 항균력을 측정된 김 등의 연구에서는 8 mm paper disc로 clear zone의 직경을 측정하였는데 대부분의 공시균주에 대하여 0.25~0.75 g/mL의 MIC를 보여 본 실험의 민들레나 질경이가 더 높은 항균력을 나타내었다. 그리고 봉선화로 실험을 한 강 등의 연구를 살펴보면 methanol 추출물에서는 항균 효과가 없었지만 ether 획분에서는 *S. aureus*에 대하여 0.3125 mg/mL 이상의 농도에서, *B. subtilis*에 대하여는 0.1563 mg/mL 이상의 농도에서 항균 효과를 보였고, 한 등의 연구에서는 *L. monocytogenes*의 증식 억제를 위하여 털진득찰 추출물 2,000 ppm의 농도를 사용한 것으로 보고되었다. 뿐만 아니라 유백피의 항균 효과도 물과 methanol 추출물의 경우 *S. aureus*, *B. subtilis* 및 *Streptococcus faecalis*와 같은 균주에 대하여 50 mg/mL 이상의 농도에서 균주의 증식을 억제하여 본 실험의 민들레, 질경이, 백작약과 목단피가 더 낮은 농도에서 항균 효과를 보여 주었다고 하겠다.

Table 7. Antimicrobial activity of the extract from wild plants on the growth of bacteria

sample name	Conc. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Antimicrobial activity(%)				
		<i>B. subtilis</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>E. coli</i>
닭의장풀	1000	100	100	87.24	100	80.76
	2000	100	100	95.89	100	100
전 호	1000	100	72.52	98.25	-	20.06
	2000	100	72.89	100	38.51	19.04
속 단	1000	100	75.21	24.17	62.49	20.07
	2000	100	84.02	100	93.18	23.39
약모밀	1000	77.17	86.16	10.72	61.88	29.52
	2000	100	88.63	76.74	88.66	29.98
박 하	1000	62.08	79.55	42.12	-	10.96
	2000	100	89.36	70.64	51.64	21.55
차조기	1000	100	71.05	100	-	24.24
	2000	100	72.56	100	19.02	22.82
방 아	1000	32.15	58.55	46.87	86.70	14.40
	2000	100	84.28	84.66	95.31	25.61
참 취	1000	31.01	59.88	1.19	100	31.12
	2000	100	96.19	44.16	100	44.19
당 귀	1000	100	79.02	86.70	44.21	16.33
	2000	100	85.73	97.98	86.03	25.31
쇠비름	1000	49.63	73.15	1.57	71.87	16.39
	2000	100	95.13	78.45	100	32.20

Table 7 Continued

sample name	Conc. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Antimicrobial activity(%)				
		<i>B. subtilis</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>E. coli</i>
달래	1000	-	-	-	-	-
	2000	40.04	-	-	-	-
참나물	1000	-	-	-	-	-
	2000	-	-	-	-	-
원추리	1000	-	-	-	-	-
	2000	-	-	-	53.47	-
씀바귀	1000	-	-	-	-	-
	2000	-	-	-	-	-
민들레	1000	5.10	-	99.15	88.00	43.00
	2000	97.88	98.43	100	97.00	94.00
질경이	1000	91.14	89.48	90.36	96.0	65.46
	2000	100	99.50	98.67	100	90.50
대황	1000	78.13	51.35	74.65	52.32	-
	2000	90.00	100.00	90.63	97.55	55.91
독활	1000	100	-	70.74	25.01	26.70
	2000	100	90.42	100	46.05	85.90
맥문동	1000	-	-	-	4.63	9.83
	2000	-	11.49	-	11.52	11.23
목단피	1000	89.21	100	-	99.33	61.68
	2000	100	100	100	100	91.60
삼백초	1000	-	-	-	33.89	2.27
	2000	-	-	-	100	6.78
소목	1000	99.59	68.19	100	98.94	100
	2000	100	100	100	99.80	100

Table 7 Continued

sample name	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Antimicrobial activity(%)				
		<i>B. subtilis</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>E. coli</i>
엄나무	1000	19.42	25.40	4.25	19.29	18.34
	2000	85.80	32.46	22.25	70.96	32.23
오배자	1000	100	100	100	100	100
	2000	100	100	100	100	100
육두구	1000	33.96	52.12	100	51.26	53.74
	2000	85.83	79.21	100	100	100
백작약	1000	100	51.13	98.1	97.05	41.68
	2000	100	73.39	100	100	100
황금	1000	-	7.33	-	58.49	10.94
	2000	43.44	35.84	18.29	97.72	36.01
원시초	1000	-	12.48	-	15.62	55.59
	2000	16.77	66.34	11.10	31.05	70.84
하고초	1000	-	10.23	-	37.64	25.11
	2000	-	15.11	-	50.12	39.29
오매	1000	-	12.08	-	44.51	7.86
	2000	45.38	63.17	46.15	78.67	21.05
세신	1000	32.05	30.24	18.16	71.15	24.76
	2000	100	67.54	42.17	100	53.88
복신	1000	23.87	-	-	10.25	6.36
	2000	51.38	21.78	-	63.25	19.18
백복령	1000	9.58	-	-	8.84	-
	2000	52.71	3.33	-	56.66	-
천근	1000	86.25	33.32	67.19	72.32	-
	2000	100	72.56	86.26	100	-

2. 한국전통구황식물추출물의 분획별 항균성

가. 민들레 추출물의 분획별 항균성

5종의 공시균주에 대하여 항균성을 나타낸 민들레 methanol 추출물은 항균성 물질을 분리할 목적으로 *n*-hexane, chloroform, ethylacetate, *n*-butanol 및 물 순으로 점차 극성을 높여서 분획하여 항균성을 검색한 결과를 Table 8에 나타내었다. 민들레의 ethylacetate 분획 추출물은 가장 낮은 농도인 500 $\mu\text{g}/\text{disc}$ 의 농도에서 식품 부패 미생물 5종 모두에 대하여 clear zone을 형성하여 항균력을 나타내었다. 특히 *S. aureus* 균에 대해서는 11 mm 이상의 clear zone을 나타내었으며 2,000 $\mu\text{g}/\text{disc}$ 농도에서 *L. monocytogenes*, *E. coli* 및 *V. parahaemolyticus*는 각각 11.5, 12 및 13.5 mm의 clear zone을 형성하였다. 민들레의 ethylacetate 분획은 *S. aureus*와 *V. parahaemolyticus*에 대하여 항균 활성이 컸다. 또한, chloroform 분획도 *E. coli*를 제외한 균주들에서는 clear zone을 형성하였으며 2,000 $\mu\text{g}/\text{disc}$ 농도에서는 12 mm 이상의 clear zone을 형성하여 강한 항균 활성을 보였다. 그러므로 민들레의 항균 효과를 추출 용매별로 살펴보면 ethylacetate 층이 가장 우수하고 그 다음이 chloroform 층이며 *n*-butanol 그리고 *n*-hexane과 물층의 순으로 활성이 낮았다. 남 등은 산국의 chloroform 분획물이 *B. subtilis*와 *V. parahaemolyticus*에 대하여 항균 효과를 갖는다고 하였고, 강은 갯을 ethanol로 추출한 것을 용매 분획 후 항균력을 실험한 결과 세균의 경우에는 젖산균을 제외한 G(+) 균주와 G(-) 균주 모두 ethylacetate와 *n*-butanol 분획에서 증7식 억제 효과가 나타났고, 효모의 경우에는 ethylacetate, *n*-butanol 및 물 분획물에서 9~10 mm의 clear zone이 나타나서 갯 ethanol 추출물의 항균성 물질은 특정 용매에만 용해되지 않고 다른 용매에도 용해되는 복합적인 성분이

라고 보고하였다. 김 등은 산초의 methanol 추출물은 *B. subtilis*, *S. aureus*와 *E. coli*에 대하여 1,000 µg/mL 농도에서 완전히 증식을 억제하였고, 이 등은 느릅 뿌리의 chloroform 분획에서 항균 효과를 보였다고 하였으며, 신 등은 국내에서 재배되는 약용 식물의 추출물을 가지고 *L. monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *S. aureus*, *Pseudomonas fluorescens* 및 *Leuconostoc mesenteroides*에 대한 항균력을 살펴본 결과 각 균주에 대하여 가자육 분획물들은 균일하게 항균 효과가 보였고, 금앵자와 소목은 ethylacetate 분획물에서 뚜렷한 항균 효과를 보였다고 보고하였다.

따라서, 민들레도 각 분획별로 약간의 항균성을 보이는 것으로 보아 각 용매 분획시 용매에 따라 항균성 물질이 용해되어 나타나는 것으로 생각되어 항균 물질은 단일 성분이기보다 여러 성분이 혼합되어 있는 것으로 생각된다.

나. 질경이 추출물의 분획별 항균성

질경이를 methanol로 추출한 것을 *n*-hexane, chloroform, ethylacetate, *n*-butanol 및 물 순으로 비극성에서 극성으로 용매를 바꾸어 순차적으로 분획하여 paper disc법으로 항균성을 검색한 결과는 Table 9와 같다. 질경이의 ethylacetate 분획물은 공시균주 5종 모두에 대하여 clear zone을 나타내었고, 그 중에서 *B. subtilis*, *E. coli* 및 *V. parahaemolyticus*에 대해서 2,000 µg/disc 농도에서 11.5, 13 및 14 mm의 clear zone을 나타내었다. 질경이의 *n*-hexane 층은 *V. parahaemolyticus*에 대해서만 항균 활성을 보여 500 µg/disc 농도에서 9 mm의 clear zone이 나타났고, chloroform 분획물은 *S. aureus*에 대하여 모든 농도에서 10 mm 이상의 clear zone을 형성하였으며 *L.*

*monocytogenes*에 대하여 1,000 $\mu\text{g}/\text{disc}$ 농도에서 10 mm 이상의 clear zone을 형성하였지만 *B. subtilis*와 *E. coli*에 대해서는 clear zone이 형성되지 않았다. 따라서 질경이 추출물의 용매 분획별 항균성은 ethylacetate 분획이 가장 우수하고 chloroform, *n*-hexane, *n*-butanol 및 물 순으로 나타났다. 솔잎으로 항균 활성을 연구한 국 등에 따르면 솔잎의 ethylacetate 추출물에 항미생물 활성이 집중되어 있어 용매 분획하여 수용액, 중성 및 산성 분획으로 분리하여 *Streptococcus mutans*를 비롯하여 13종의 미생물에 대하여 항균성을 검정한 결과 대부분 산성 획분에서 13 mm 이상의 clear zone을 형성하여 항균성이 인정되었다. 그리고 장 등은 산국, 감국 및 쑥갓을 대상으로 용매 분획을 한 결과 각 식물체의 chloroform 분획물이 *B. subtilis*와 *V. parahaemolyticus*를 비롯한 균주들에 대해 강한 활성을 보인 반면 *n*-hexane 분획과 물 분획물은 활성이 약한 것으로 보고하였다. 또, 박 등은 돌산갓을 methanol로 추출하여 chloroform, ethylacetate, *n*-butanol 및 물 순으로 용매 분획하여 ethylacetate 및 물 층이 다른 분획물에 비하여 항균력이 우수하다고 하였다. 홍 등은 유백피의 *n*-butanol 분획에서 *B. subtilis*에 대하여 강한 항균성이 있다고 보고하였다.

이와 같이 여러 연구를 통해 항균 실험의 재료들은 각각 잘 용해되는 용매에 따라 항균 물질이 추출되어 활성을 보이는 것으로 여겨지며 그러므로 질경이의 경우도 항균 물질이 여러 용매에 조금씩 용해되어 식품 부패 미생물들에 대한 항균력을 각각 다르게 나타내며 특히, 질경이의 항균 물질은 주로 ethylacetate 분획에서 모든 균주들에 대한 clear zone을 형성하는 것으로 보아 항균 물질은 ethylacetate에 잘 용해되는 물질이고 극성에 가까운 물질일 것으로 생각된다.

Table 8. Antimicrobial activity of various solvent fractions from methanol extract of dandelion on the growth of bacteria

Fr. No	Conc ($\mu\text{g}/\text{disc}$)	Clear zone on plate (mm)				
		<i>B.</i> <i>subtilis</i>	<i>L. mono-</i> <i>cytogenes</i>	<i>S.</i> <i>aureus</i>	<i>E.</i> <i>coli</i>	<i>V. para</i> <i>haemolyticus</i>
Hexane	500	nd ¹⁾	nd	nd	nd	nd
	1,000	nd	nd	nd	nd	nd
	1,500	nd	nd	nd	nd	nd
	2,000	nd	nd	nd	nd	nd
CH ₃ Cl	500	nd	nd	nd	nd	10
	1,000	10	9.5	11.5	nd	12
	1,500	11	11.5	11.5	nd	14
	2,000	12.5	12	13	nd	15
EtoAc	500	8.5	9	11	10.5	8.5
	1,000	10	11	12	11	11
	1,500	11	11.5	13	11.5	13
	2,000	11	11.5	13.5	12	13.5
BuOH	500	nd	nd	nd	nd	nd
	1,000	nd	nd	8.5	nd	nd
	1,500	nd	nd	9	nd	nd
	2,000	nd	10	10	nd	9.5
Water	500	nd	nd	nd	nd	nd
	1,000	nd	nd	nd	nd	nd
	1,500	nd	nd	nd	nd	nd
	2,000	nd	nd	nd	nd	nd

1) - : not detected

Table 9. Antimicrobial activity of various solvent fractions from methanol extract of plantain on the growth of bacteria

Fr. No	Conc ($\mu\text{g}/\text{disc}$)	clear zone on plate (mm)				
		<i>B. subtilis</i>	<i>L. mono-cytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>V. parahae-molyticus</i>
Hexane	500	nd ¹⁾	nd	nd	nd	9
	1,000	nd	nd	nd	nd	10
	1,500	nd	nd	nd	nd	10.5
	2,000	nd	nd	nd	nd	11
CH ₃ Cl	500	nd	9.5	10.2	nd	nd
	1,000	nd	10.5	12	nd	10
	1,500	nd	11.5	13	nd	12
	2,000	nd	12	13	nd	13
EtOAc	500	8.5	nd	nd	9	8.5
	1,000	9.2	9	8.5	11	11
	1,500	10.5	9.5	10	11	12.5
	2,000	11.5	10.5	10	13	14
BuOH	500	nd	nd	nd	nd	nd
	1,000	nd	nd	nd	nd	nd
	1,500	nd	nd	nd	nd	nd
	2,000	nd	nd	nd	w ²⁾	w
Water	500	nd	nd	nd	nd	nd
	1,000	nd	nd	nd	nd	nd
	1,500	nd	nd	nd	nd	nd
	2,000	nd	nd	nd	nd	nd

1) nd : not detected 2) w : weak clear zone

다. 백작약 추출물의 분획별 항균성

5종의 공시균주에 대하여 항균성을 나타낸 민들레 methanol 추출물은 항균성 물질을 분리할 목적으로 *n*-hexane, chloroform, ethylacetate, *n*-butanol 및 물 순으로 점차 극성을 높여서 분획하여

항균성을 검색한 결과를 Table 10에 나타내었다. 백작약의 ethylacetate 분획 추출물은 낮은 농도인 1000 $\mu\text{g}/\text{disc}$ 의 농도에서 식품 부패 미생물 5종 모두에 대하여 clear zone을 형성하여 항균력을 나타내었다. 특히 *S. aureus*, *B. subtilis*, *V. parahaemolyticus*, *E. coli*균에 대해서는 가장 낮은 농도인 500 $\mu\text{g}/\text{disc}$ 에서 clear zone을 나타내었으며 또한 2,000 $\mu\text{g}/\text{disc}$ 농도에서 *L. monocytogenes*, *E. coli* 및 *V. parahaemolyticus*는 각각 13, 15, 13 mm의 clear zone을 형성하였다. 또한, chloroform 분획도 *B. subtilis*균에 대해서는 1500 $\mu\text{g}/\text{disc}$ 농도에서 clear zone을 형성하였다. 그러므로 백작약의 항균 효과를 추출 용매별로 살펴보면 ethylacetate 층이 가장 우수하고 그 다음이 chloroform 층의 순으로 나타났다. 남동¹⁴⁾은 산국의 chloroform 분획물이 *B. subtilis*와 *V. parahaemolyticus*에 대하여 항균 효과를 갖는다고 하였고, 김 등은 산초의 methanol 추출물은 *B. subtilis*, *S. aureus*와 *E. coli*에 대하여 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 완전히 증식을 억제하였고, 이 등은 느릅 뿌리의 chloroform 분획에서 항균 효과를 보였다고 하였다. 따라서, 백작약도 Ethylacetate 와 chloroform 분획별로 약간의 항균성을 보이는 것으로 보아 각 용매 분획시 용매에 따라 항균성 물질이 용해되어 나타나는 것으로 생각되어 항균 물질은 단일 성분이기보다 여러 성분이 혼합되어 있는 것으로 생각된다.

Table 10. Antimicrobial activity of solvent fractions from methanol extract of *paeonia japonica* var. *pilosa* NAKAI on the growth of various microorganisms

Solvent Fra.	Conc. ($\mu\text{g}/\text{disc}$)	Clear zone(mm)				
		<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>E. coli</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
Methanol	500	9	1)	-	9	-
	1000	11	10	10	10	10
	1500	12	11	11	11	12
	2000	13	12	12	13	15
Hexane	500	-	-	-	-	-
	1000	-	-	-	-	-
	1500	-	-	-	-	-
	2000	-	-	-	-	-
Chloroform	500	-	-	-	-	-
	1000	-	-	-	-	-
	1500	8.5	-	-	-	-
	2000	9	-	-	-	-
Ethyl acetate	500	9	8.5	-	12	10
	1000	10	10	11	13	11
	1500	11	11	12	14	12
	2000	12	12	13	15	13
Butanol	500	-	-	-	-	-
	1000	-	-	-	-	-
	1500	-	-	-	-	-
	2000	-	-	-	-	-
Water	500	-	-	-	-	-
	1000	-	-	-	-	-
	1500	-	-	-	-	-
	2000	-	-	-	-	-

1)-: no activity

라. 목단피 추출물의 분획별 항균성

목단피를 methanol로 추출한 것을 *n*-hexane, chloroform, ethylacetate, *n*-butanol 및 물 순으로 비극성에서 극성으로 용매를 바꾸어 순차적으로 분획하여 paper disc법으로 항균성을 검색한 결과는 Table 11과 같다. 목단피의 ethylacetate, hexane, chloroform, butanol 분획물은 공시균주 5종 모두에 대하여 clear zone을 나타내었고, 그 중에서 hexane층은 *B. subtilis*, *E. coli* 에 대하여 2,000 μg /disc 농도에서 13, 12.5 mm의 clear zone을 나타내었다. chloroform층은 *B. subtilis*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* 및 *V. parahaemolyticus* 에 대해서 2,000 μg /disc 농도에서 16, 15, 15 및 15 mm의 clear zone을 나타내었다. ethylacetate층은 *L. monocytogenes*, *E. coli* 및 *V. parahaemolyticus*에 대해서 2,000 μg /disc 농도에서 13, 15, 13mm의 clear zone을 나타내었고 butanol층은 *B. subtilis*, *E. coli* 에 대해서 2,000 μg /disc 농도에서 각각 14mm의 clear zone을 나타내었다. 마지막으로 물층에서는 *S. aureus*에 대해서만 2000 μg /disc 농도에서 15 mm의 clear zone이 형성되고 *B. subtilis*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *V. parahaemolyticus* 에 대해서는 clear zone이 형성되지 않았다. 따라서 목단피 추출물의 용매 분획별 항균성은 ethylacetate 분획이 가장 우수하고 chloroform, *n*-hexane, *n*-butanol 및 물 순으로 나타났다. 솔잎으로 항균 활성을 연구한 국 등에 따르면 솔잎의 ethylacetate 추출물에 항미생물 활성이 집중되어 있어 용매 분획하여 수용액, 중성 및 산성 분획으로 분리하여 *Streptococcus mutans*를 비롯하여 13종의 미생물에 대하여 항균성을 검정한 결과 대부분 산성 획분에서 13 mm 이상의 clear zone을 형성하여 항균성이 인정되었다. 그리고 장 등은 산국, 감국 및 쪽갓을 대상으로 용매 분획을 한 결과 각 식물체의 chloroform

분획물이 *B. subtilis*와 *V. parahaemolyticus*를 비롯한 균주들에 대해 강한 활성을 보인 반면 *n*-hexane 분획과 물 분획물은 활성이 약한 것으로 보고하였다. 또, 박 등은 돌산갓을 methanol로 추출하여 chloroform, ethylacetate, *n*-butanol 및 물 순으로 용매 분획하여 ethylacetate 및 물 층이 다른 분획물에 비하여 항균력이 우수하다고 하였다. 홍 등은 유백피의 *n*-butanol 분획에서 *B. subtilis*에 대하여 강한 항균성이 있다고 보고하였다. 이와 같이 여러 연구를 통해 항균 실험의 재료들은 각각 잘 용해되는 용매에 따라 항균 물질이 추출되어 활성을 보이는 것으로 여겨지며 그러므로 목단피의 경우도 항균 물질이 여러 용매에 조금씩 용해되어 식품 부패 미생물들에 대한 항균력을 각각 다르게 나타내며 특히, 목단피의 항균 물질은 주로 ethylacetate 분획에서 모든 균주들에 대해 광범위한 clear zone을 형성하는 것으로 보아 항균 물질은 ethylacetate에 잘 용해되는 물질이고 극성에 가까운 물질일 것으로 생각된다.

Table 11. Antimicrobial activity of solvent fractions from methanol extract of *paeonia suffruticosa* ANDR on the growth of various microorganisms

Solvent Fra.	Conc. ($\mu\text{g}/\text{disc}$)	Clear zone(mm)				
		<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>E. coli</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
Methanol	500	10	8.1	8.5	8.5	- ¹⁾
	1000	11	8.5	10	10	10.5
	1500	12	9	12	11	11
	2000	14	10	14	13	12
Hexane	500	10	8.5	8.5	8.5	-
	1000	11	9.0	10	11	-
	1500	12	10	11	12	-
	2000	13	12	12	12.5	10
Chloroform	500	11	10	9	8.5	10
	1000	12	13	10	10	12
	1500	15	14	12	11	14
	2000	16	15	15	12	15
Ethyl acetate	500	10	10	12	11	10
	1000	11	11	14	12	12
	1500	12	12	17	12.5	13
	2000	14	13	18	13	15
Butanol	500	11	8.5	-	10	-
	1000	12	10	-	11	-
	1500	13	12	9	12	11
	2000	14	13	10	14	13
Water	500	-	10	-	-	-
	1000	-	11	-	-	-
	1500	-	13	-	-	-
	2000	-	15	-	-	-

1)-: no activity

제 2 절 합성식품보존제의 식품부패미생물에 대한 항균성검색

실제 우리 나라에서 식품보존제로 사용되고 있는 sodium propionate를 1, 2, 3, 5%의 농도로 TS broth와 3% NaCl을 첨가한 TS broth에 첨가하여 5종의 식품 부패 미생물에 대한 항균력을 Figure 10에 나타내었다. Sodium propionate를 1% 첨가한 군에서는 *B. subtilis*와 *L. monocytogenes*를 각각 80.97%와 72.71%의 증식 억제 효과를 보였고 *V. parahaemolyticus*는 3% 농도에서 100% 증식이 억제되었으며, 같은 농도에서 *S. aureus*와 *E. coli*는 79.16%와 55.16%로 증식이 억제되었다. 그러나 모든 공시균주들은 5% 농도로 첨가했을 때 균주의 증식이 완전히 억제되었다.

Propionic acid는 *Propionibacterium fredenreichii* sp. *shermanii*균주에 의해 Swiss cheese에서 자연 생기는 것으로 주로 곰팡이를 억제하고 yeast나 G(-) bacteria를 억제하는 효과가 있다. Propionate는 propionic acid의 유도체로 식품의 가공과정에서는 Na염이나 Ca염으로 사용이 되며 GRAS status로 전세계에서 허용되고 있다. 특히, propionic acid는 빵과 과자에 생기는 미생물을 억제하는 작용이 있어 제과, 제빵 제품들에서 소비되는 모든 화학 보존제중 75%를 차지하고 있다. 또한 각종 미생물에 의한 이차적 발효를 억제하는 효과가 뛰어나고 자연에 존재하는 지방산들과 같이 인체 내에서 쉽게 대사되어 그 독성 효과가 적다.

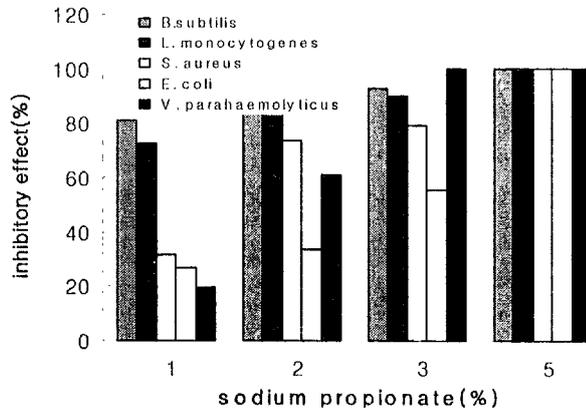


Figure 11. Antimicrobial activity of sodium propionate against food spoilage bacteria.

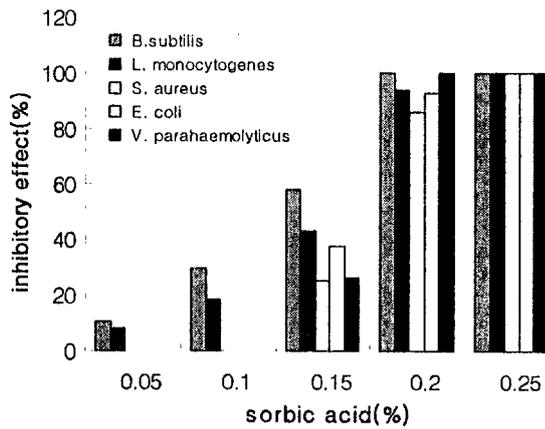


Figure 12. Antimicrobial activity of sorbic acid against food spoilage bacteria.

제 3 절 구황식물 첨가에 의한 식품 보존 효과

1. 민들레 첨가 국수와 떡의 저장 안정성

가. 민들레 첨가 국수의 저장 안정성

민들레를 식품에 첨가하여 실제 식품에 대한 이용을 살펴보기 위하여 분쇄한 민들레를 0, 1, 3, 5% 첨가한 국수를 제조하여 0, 24, 48, 72시간 동안 18℃의 incubator에서 저장하면서 총균수를 측정된 결과는 Table 12와 같다. 민들레를 첨가한 국수의 제조 직후의 총균수는 대조군과 1% 첨가군에서 각각 8.7×10^2 CFU/g과 2.7×10^2 CFU/g으로 관찰되었고 5%를 첨가한 군에서는 제조직후 뿐만 아니라 24시간이 경과한 후에도 미생물의 증식이 보이지 않았다. 그러나, 국수의 저장 기간이 연장됨에 따라 총균수는 증가하여 72시간 저장 이후에는 대조군의 총균수는 4.1×10^4 CFU/g이었고 1%, 3% 및 5% 첨가군에서는 각각 2.0×10^4 , 1.8×10^4 CFU/g 및 1.3×10^4 CFU/g으로 민들레가 첨가된 국수가 대조군에 비하여 미생물의 증식이 더 적음을 알 수 있었다. 더구나 대조군의 경우는 초기부터 일정한 속도로 부패가 진행되었으나 민들레를 첨가한 군에서는 그 부패의 속도가 느림을 볼 수 있고 그 중에서도 민들레를 5% 첨가한 군에서는 48시간이 되어서 미생물의 집락을 형성하는 것으로 미루어 민들레가 국수에 첨가될 때 초기 부패를 억제하여 대조군에 비하여 저장 시간을 연장해 주는 것으로 생각된다. 이는 빵에 정향을 0.75% 첨가하여 24시간까지도 콜로니가 형성되지 않았다고 보고하였으며 정향의 정유 및 항균 효과에 대한 연구 보고도 있다. 그리고 본 실험에서도 시간이 경과되면서 총균수가 증가한 것은 미생물의 증식이 민들레의 항균 물질의 억제 효과를 극복하는 것으로 생각되며 이는 *Aspergillus parasiticus*에 대한 anethole과 eugenol을 대상으로 증식 억제 효과를 연구한 Karapinar의 연구 결과와 유사하다고 하겠다.

A
(민들레)



B
(질경이)



C
(백작약)



D
(목단피)



구황식물첨가 국수 제품 사진
(사진 왼쪽부터 0%, 1%, 3%, 5% 첨가)

E
(민들레)



F
(질경이)



G
(백작약)



H
(목단피)



구황식물첨가 떡 제품 사진
(사진 왼쪽부터 0%, 1%, 3%, 5% 첨가)

Table 12. Effect of dandelion on the total bacteria count in noodle during storage at 18°C

Storage Time (hrs)	Amount of dandelion added (%)			
	0	1	3	5
0	8.7×10^2	2.7×10^2	0	0
24	6.5×10^3	5.0×10^2	3.0×10^2	0
48	1.0×10^4	6.4×10^3	1.2×10^3	1.1×10^3
72	4.1×10^4	2.0×10^4	1.8×10^4	1.3×10^4

나. 민들레 첨가 떡의 저장 안정성

민들레를 0, 1, 3, 5%씩 첨가하여 떡을 제조한 후 0, 24, 48, 72시간 동안 18°C의 incubator에 보관하면서 총균수를 살펴본 결과는 Table 13과 같다. 처음 떡을 제조한 직후의 총균수를 보면 대조군은 3.2×10^2 CFU/g이었고 시간이 지날수록 총균수의 증가는 완만하였지만 2일 경과 후에는 1.5×10^4 CFU/g이 되었고 특히 민들레를 많이 첨가한 5% 군에서는 미생물의 수가 적어 3일이 지나도 7.0×10^2 CFU/g을 보여 1일 경과 후에 대조군에서 생긴 미생물의 집락의 수보다 더 적었다. 또한 3% 첨가군이 그 다음으로 균의 증식이 적어 2일이 지난 후 미생물의 수는 2.0×10^2 CFU/g으로 이는 민들레 1% 첨가군의 1일 경과 후 측정된 총균수와 같아서 민들레가 많이 첨가된 군의 미생물의 증식이 느리게 진행됨을 볼 수 있었다. 그리하여 3일이 지난 후 대조군과 1, 3, 5% 첨가군의 총균수를 보면 7.0×10^4 , 4.0×10^4 , 1.7×10^3 CFU/g 및 7.0×10^2 CFU/g를 보였다. 또한 민들레를 첨가한 떡은 3일이 지나도 민들레 특유의 냄새가 났지만 대조군에서는 약간 쉰내가 났었다. 한편 계피를 빵에 첨가하여 보존 효과를 관찰한 이의 연구를 보면 계피를 첨가한 빵이 대

조균에 비하여 미생물의 증식이 적었다고 보고하여 본 실험의 결과와 유사한 경향을 보였는데 그 이유는 계피 정유의 휘발성 성분인 cinnamaldehyde에 의한 것으로 보고하였다.

Table 13. Effect of dandelion on the total bacteria count in rice cake during storage at 18°C

Storage Time (hrs)	Amount of dandelion added (%)			
	0	1	3	5
0	3.2×10^2	4.0×10^1	0	0
24	2.0×10^3	2.0×10^2	5.0×10^1	1.0×10^1
48	1.5×10^4	1.4×10^4	2.0×10^2	1.0×10^2
72	7.0×10^4	4.0×10^4	1.7×10^3	7.0×10^2

2. 질경이 첨가 국수와 떡의 저장 안정성

가. 질경이 첨가 국수의 저장 안정성

질경이 분말을 0, 1, 3, 5%씩 첨가한 국수를 만들어 0, 24, 48, 72시간 동안 18°C의 incubator에서 보관하면서 살펴 본 총균수의 변화는 Table 14와 같다. 제조 직후 대조군은 9.7×10^2 CFU/g를 나타낸 반면 1, 3, 5% 첨가군은 각각 3.8×10^2 , 2.0×10^2 , 1.0×10^2 CFU/g을 나타내어 더 적은 증식을 하였을 뿐 아니라 3일이 경과한 후에도 대조군의 총균수가 가장 많았다. 그리고 질경이를 1% 첨가한 것과 대조군의 총균수의 변화는 시간이 지날수록 증가하는 것을 볼 수 있고 질경이를 5% 첨가한 국수에서는 제조 후 1일이 경과할 때까지 그 변화가 적다가 2일 이후부터 미생물의 증식을 보였다. 더구나 질경이를 5% 첨가한 군은 3일 후에 총균수가 1.3×10^4 CFU/g을 나타내어 대조군의 2일 경과 후에 생긴 미생

물의 수보다도 더 적어서 미생물 증식을 억제하는 효과가 대조군에 비하여 높음을 알 수 있다. 김은 파래를 농도별로 묵에 첨가시 식품 보존의 효과를 관찰하여 보고하였고, 안 등은 두부, 어묵, 막걸리의 부패균을 분리하여 식용 식물 추출물에 의한 항균 효과가 뚜렷이 있음을 밝혔는데 이러한 결과로 미루어 식용 식물의 일종인 질경이를 가공 식품에 첨가시 식품 보존에 영향을 미칠것으로 생각된다.

Table 14. Effect of plantain on the total bacteria count in noodle during storage at 18°C

Storage Time (hrs)	Amount of plantain added (%)			
	0	1	3	5
0	9.7×10^2	3.8×10^2	2.0×10^2	1.0×10^2
24	3.0×10^3	4.0×10^3	2.0×10^3	7.0×10^2
48	6.0×10^4	2.0×10^4	1.9×10^4	2.0×10^3
72	8.1×10^5	6.0×10^5	3.2×10^4	1.3×10^4

나. 질경이 첨가 떡의 저장 안정성

질경이를 0, 1, 3, 5%씩 첨가하여 떡을 제조한 후 0, 24, 48, 72시간 동안 18°C의 incubator에 보관하면서 총균수를 살펴본 결과는 Table 15와 같다. 처음 떡을 제조한 직후의 총균수를 보면 대조군은 3.2×10^2 CFU/g이었고 시간이 지날수록 총균수의 증가는 계속되었지만 그 증가 속도는 질경이를 첨가한 군에 비하여 미생물의 증식이 많았다. 그리하여 3일이 지난후 대조군과 1, 3, 5% 첨가군의 총균수를 보면 7.0×10^4 , 3.0×10^4 , 1.0×10^3 CFU/g 과 1.0×10^3 CFU/g으로 나타났으며 질경이를

첨가하지 않은 대조군과 1, 3, 5%씩 첨가한 군의 순으로 총균수가 많아서 질경이를 많이 첨가할수록 보존 효과가 더 우수하게 나타났다. 그리고 김²¹⁾은 쑥과 산초를 0, 1, 3, 5%씩 첨가하여 설기를 제조하여 총균수를 실험하였는데 48시간 저장 후 대조군에서는 곰팡내가 나기 시작하였으나 쑥 첨가 군에서는 곰팡내가 나지 않아 떡의 부패를 지연시킨다고 주장하였다. 마찬가지로 식용 식물의 하나인 질경이를 떡에 첨가함으로써 무첨가군인 대조군에 비하여 떡의 보존 효과에 향상을 줄 수 있으리라 생각된다.

Table 15. Effect of plantain on the total bacteria count in rice cake during storage at 18°C

Storage Time (hrs)	Amount of plantain added (%)			
	0	1	3	5
0	3.2×10^2	1.0×10^2	0	0
24	2.0×10^3	4.0×10^2	1.0×10^2	4.0×10^1
48	1.5×10^4	4.0×10^3	2.0×10^2	2.0×10^3
72	7.0×10^4	3.0×10^4	1.0×10^3	1.0×10^3

3. 백작약 첨가 국수와 떡의 저장 안정성

가. 백작약 첨가 국수의 저장 안정성

백작약 분말을 0, 1, 3, 5%씩 첨가한 국수를 만들어 0, 24, 48, 72시간 동안 18°C의 incubator에서 보관하면서 살펴 본 총균수의 변화는 Figure 13과 같다. 제조 직후 대조군은 10^2 CFU/g를 나타낸 반면 1, 3, 5% 첨가군은 10^1 CFU/g을 나타내어 더 적은 증식을 하였을 뿐 아니라 3

일이 경과한 후에도 대조군의 총균수가 가장 많았다. 그리고 대조군의 총균수는 24시간 이후 급격한 미생물 증식을 보였으나 백작약 첨가군은 48시간까지 초기의 총균수를 유지하고 있음을 보여 백작약의 첨가로 미생물의 증식이 상당히 지연되는 것으로 나타났다. 1% 첨가군은 3일 이후 지날수록 증가하는 것을 볼 수 있고 3%와 5% 첨가한 국수에서는 제조 후 4일이 경과할 때까지 총균수가 10^3 CFU/g 수준에 도달하였다.

백작약(국수)

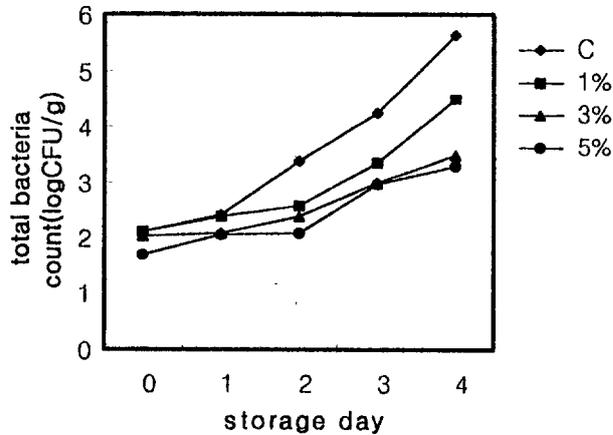


Figure 13. Effect of jakyak(*paeonia japonica* var. *pilosa* NAKAI) on the total bacteria count in noodle during storage at 18°C

나. 백작약 첨가 떡의 저장 안정성

백작약을 0, 1, 3, 5%씩 첨가하여 떡을 제조한 후 0, 24, 48, 72시간 동안 18°C의 incubator에 보관하면서 총균수를 살펴본 결과는 Figure

14와 같다. 처음 떡을 제조한 직후의 총균수를 보면 대조군은 10^2 CFU/g 이었으나 저장 2일 이후 급격한 미생물의 증식을 보여 4일 저장 후에는 10^6 CFU/g 수준에 도달하였다. 반면 백작약 첨가군은 2일까지 미생물의 증식을 보이지 않았고 4일 저장 후에도 1, 3, 5% 첨가군 각각 10^4 , 10^3 CFU/g 수준으로 약간 미생물의 증식이 일어났다. 백작약의 첨가량이 많아질수록 보존 효과가 더 우수하게 나타났다.

백작약(떡)

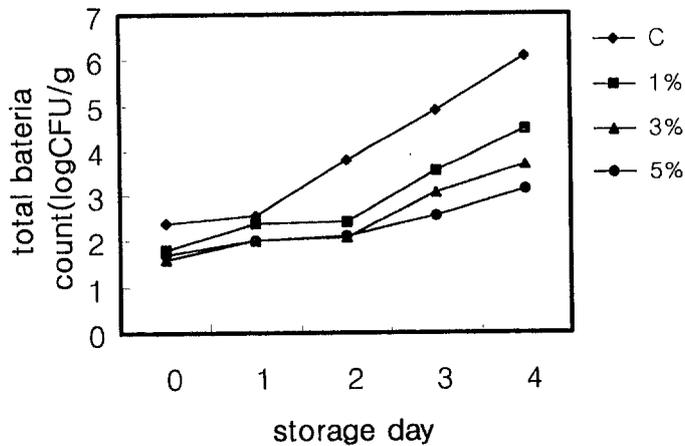


Figure 14. Effect of jakyak(*paeonia japonica* var. *pilosa* NAKAI) on the total bacteria count in rice cake during storage at 18°C

4. 목단피 첨가 국수와 떡의 저장 안정성

가. 목단피 첨가 국수의 저장 안정성

목단피 분말을 0, 1, 3, 5%씩 첨가한 국수를 만들어 0, 24, 48, 72시간 동안 18℃의 incubator에서 보관하면서 살펴 본 총균수의 변화는 Figure 15와 같다. 목단피 첨가국수는 대조군과 1% 첨가군은 미생물의 증식이 비슷한 경향을 보였다. 그러나 3%와 5% 첨가군은 제조 직후부터 저장 4일까지 미생물의 증식이 거의 일어나지 않은 것으로 보아 목단피 첨가로 식품의 저장성 향상을 기대할 수 있으리라 생각한다.

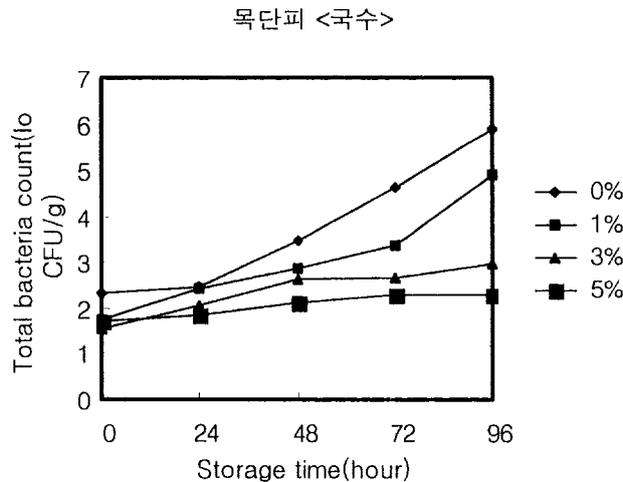


Figure 15. Effect of mokdan(*paeonia suffruticosa* ANDR) on the total bacteria count in noodle during storage at 18℃

나. 목단피 첨가 떡의 저장 안정성

목단피를 0, 1, 3, 5%씩 첨가하여 떡을 제조한 후 0, 24, 48, 72시간 동안 18℃의 incubator에 보관하면서 총균수를 살펴본 결과는 Figure 16과 같다. 국수의 제조시 목단피를 첨가한 결과와 마찬가지로 대조군

과 목단피 1% 첨가군은 비슷한 경향을 보여 미생물의 증식이 급격한 변화를 보인 반면 목단피 3%와 5% 첨가 떡은 미생물의 증식이 일어나지 않다가 72시간 이후에 약간 미생물의 증식이 있음을 보였다. 하지만 총균수가 초기에 10^1 CFU/g에서 4일 저장 이후에 10^2 CFU/g 수준에 도달하여 식품의 저장기간 연장효과를 기대할 수 있으리라고 본다.

목단피 <떡>

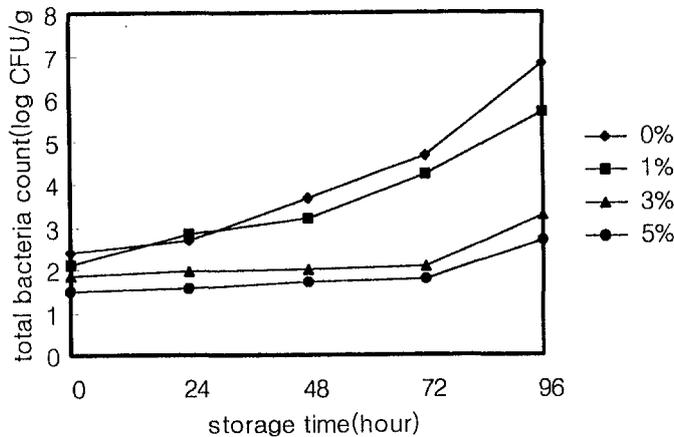


Figure 16. Effect of *paeonia suffruticosa* ANDR on the total bacteria count in rice cake during storage at 18°C

제 4 절 구황식물 추출물 혼합물의 향균성

1. 민들레와 질경이 추출물 혼합물의 향균력

민들레와 질경이를 혼합하여 향균효과를 살펴본 결과는 Table 16과

같다. 민들레와 질경이를 각각 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 첨가하였을 때 *B. subtilis*는 94%의 증식 억제 효과를 보였고 *S. aureus*와 *E. coli*는 98%와 91.3%의 증식 억제율을 나타내었다. 한편, 같은 농도에서 *L. monocytogenes*와 *V. parahaemolyticus*의 경우에는 57~60% 정도의 억제 효과가 나타났다. 그리고 민들레와 질경이를 합한 2,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도는 모든 균주에 있어서 민들레나 질경이 단독인 2,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서의 항균력보다 더 높지 않았다. 이것은 민들레나 질경이의 methanol 추출물은 항균 효과에 대하여 서로 길항하는 물질이 있기 때문이라고 생각된다. 따라서 효과적인 항균 작용을 위해서는 민들레와 질경이를 혼합하여 사용하기 보다 각각 사용하는 것이 낫다고 생각된다. 이⁷⁾의 실험에서는 계피와 정향을 각각 200 ppm씩 동량으로 혼합하여 항균력을 살펴본 결과 *B. subtilis*에만 상승 효과가 나타났고 *S. aureus*, *E. coli* 및 *Lactobacillus acidophilus*에 대하여 59~96.4%의 억제 효과를 나타내었다.

Table 16. Antimicrobial activity of the combined extract from dandelion and plantain

Extract Conc ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Inhibitory effect (%)				
	<i>B. subtilis</i>	<i>L. monocytogene</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
Dandelion 1000	94.00	60.26	98.00	91.30	57.00
+ Plantain 1000					
Dandelion 1000	5.10	- ¹⁾	99.15	43.00	88.00
2000	97.88	98.43	00.00	94.00	97.00
Plantain 1000	91.14	89.48	90.36	65.46	96.04
2000	100.00	99.50	98.67	90.50	100.00

1) - : no activity

2. 백작약과 목단피 추출물 혼합물의 항균력

백작약과 목단피를 혼합하여 항균효과를 살펴본 결과는 Table 17과 같다. 백작약과 목단피를 각각 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 혼합 첨가하였을 때 *B. subtilis*는 89.82%의 증식 억제 효과를 보였고 *S. aureus*와 *E. coli*는 92.07%와 93.67%의 증식 억제율을 나타내었고 같은 농도에서 *L. monocytogenes*와 *V. parahaemolyticus*의 경우에는 96.84%와 92.83%의 억제 효과가 나타났다. *B. subtilis*, *S. aureus*, *V. parahaemolyticus*의 경우 같은 혼합농도에서 백작약, 목단피 단독인 2,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서보다 항균력이 높지 않았는데 이것은 백작약과 목단피의 methanol 추출물이 이들 균주에 대하여 항균 효과에 대한 길항물질이 있기 때문이라고 생각된다. 따라서 효과적인 항균 작용을 위해서는 이들 균주에 대해서는 백작약과 목단피를 혼합하여 사용하기 보다 각각 사용하는 것이 낫다고 생각된다. 이의 실험에서는 계피와 정향을 각각 200 ppm씩 동량으로 혼합하여 항균력을 살펴본 결과 *B. subtilis*에만 상승 효과가 나타났고 *S. aureus*, *E. coli* 및 *Lactobacillus acidophilus*에 대하여 59~96.4%의 억제 효과를 나타내었다.

Table 17. Antimicrobial activity of combined extract from jakyak and mokdan against of food spoilage microorganism

sample name	Conc. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Antimicrobial activity(%)				
		<i>B. subtilis</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>E. coli</i>
<i>jakyak</i> + <i>mokdan</i>	1000					
	+	89.82	96.84	92.07	92.83	93.67
<i>jakyak</i>	1000	100.00	51.13	98.10	97.05	41.68
	2000	100.00	73.39	100.00	100.00	100.00
<i>mokdan</i>	1000	89.21	100.00	- ¹⁾	99.33	61.68
	2000	100.00	100.00	100.00	100.00	91.60

1)-: no activity

제 5 절 구황식물 첨가 식품모델의 관능검사

1. 민들레를 첨가 국수와 떡의 관능검사

가. 민들레 첨가 국수의 관능검사

민들레를 0, 1, 3, 5%씩 첨가한 국수를 제조하여 관능 검사를 실시한 결과는 Table 18과 같다. 관능검사 결과 색과 촉촉한 정도의 경우 민들레를 3% 첨가한 군의 점수가 가장 높았으며 유의적인 차이는 없었다 ($P < 0.05$). 또한, 씹힘성의 경우 민들레를 첨가한 것이 대조군에 비하여 더 우수한 것으로 나타났으며 각 군마다 유의적인 차이 ($P < 0.05$)를 보여 민들레를 첨가한 국수가 첨가하지 않은 것 보다 씹힘성에 영향을 주는

것으로 생각되지만 5% 첨가군의 점수가 낮은 것으로 미루어 씹힘성에 적합한 민들레의 양은 1~3%인 것으로 생각된다. 또한 전반적인 품질은 민들레 1% 첨가군이 가장 좋은 것으로 나타났고 유의적인 차이는 없었다 ($P<0.05$). 그리하여 민들레가 많이 첨가될수록 색이 짙어지고 민들레 특유의 냄새로 인하여 5% 첨가군은 선호도가 낮은 것으로 생각되며 국수를 만들 때는 민들레를 1~3% 첨가시키는 것이 가장 적합한 것으로 생각된다.

Table 18. Sensory evaluation of dandelion noodle

Item	Amount of dandelion added (%)			
	0	1	3	5
Color	4.0±0.00 ^{a*}	4.2±1.64 ^a	4.6±2.07 ^a	3.2±2.17 ^a
Flavor	4.0±0.00 ^a	3.8±1.30 ^a	3.6±1.34 ^a	2.6±1.52 ^a
Chewiness	3.6±0.55 ^c	5.8±1.10 ^a	4.6±0.55 ^b	2.2±0.45 ^d
Moistness	4.0±0.00 ^a	4.6±1.52 ^a	5.0±1.73 ^a	4.2±1.79 ^a
Overall quality	4.0±0.00 ^a	4.6±1.52 ^a	4.0±2.0 ^a	3.0±1.41 ^a

* Means with different letters(a, b) within a row are significantly different from each other at $P<0.05$.

나. 민들레 첨가 떡의 관능검사

민들레를 0, 1, 3, 5%씩 첨가한 떡을 제조하여 관능 검사를 실시한 결과는 Table 19와 같다. 떡의 경우는 국수와 달리 촉촉한 정도를 제외한 모든 항목에서 유의적인 차이를 보였다($P<0.05$). 색과 씹힘성의 경우 대조군과 3% 첨가군에서 유의적인 차이($P<0.05$)를 보였으며 향의 경우는 대조군과 민들레를 첨가한 군 사이에 뚜렷한 차이를 보여 민들레를 첨가한 떡의 향이 더 좋은 기호를 나타내었다.

이처럼 떡의 색이나 향에서 대조군보다 3% 첨가군이 우수한 것으로 미루어 예로 부터 우리나라의 전통적인 떡에 여러 가지 재료를 섞어서 먹어 왔던 습관으로 인하여 무첨가군 보다는 떡에 민들레를 3% 정도 첨가하여 색과 향을 짙게 한 것이 더 기호도가 높은 것으로 생각된다. 또한 전반적인 품질의 경우도 민들레를 1, 3% 첨가한 군과 대조군과 5% 첨가한 군 사이에 유의적인 차이를($P<0.05$) 보여 떡에는 민들레를 첨가하지 않는 것 보다 첨가하되 그 양은 1~3% 정도 첨가하는 것이 바람직한 것으로 생각된다.

Table 19. Sensory evaluation of dandelion rice cake

Item	Amount of dandelion added (%)			
	0	1	3	5
Color	4.2±0.45 ^{b*}	5.2±0.45 ^{ab}	5.8±1.30 ^a	4.6±1.34 ^{ab}
Flavor	4.2±0.45 ^b	5.2±0.45 ^a	5.6±0.55 ^a	5.0±1.00 ^a
Chewiness	4.0±0.71 ^b	5.0±1.22 ^{ab}	6.2±1.10 ^a	5.2±1.48 ^{ab}
Moistness	4.0±0.00 ^a	5.2±0.45 ^a	5.2±1.30 ^a	4.0±1.00 ^a
Overall quality	4.2±0.45 ^b	5.4±0.55 ^a	6.2±0.84 ^a	3.4±0.89 ^b

* Means with different letters(a, b) within a row are significantly different from each other at $P<0.05$.

2. 질경이 첨가 국수와 떡의 관능검사

가. 질경이 첨가 국수의 관능검사

질경이를 0, 1, 3, 5% 농도로 첨가한 국수를 제조하여 국수에 대한 관능적인 특성을 조사한 결과는 Table 20과 같다. 색과 향 및 촉촉한 정도는 유의적인 차이($P<0.05$)를 보이지 않았지만 씹힘성의 경우 질경이 1, 3% 첨가군과 대조군, 5% 첨가군 사이에는 유의적인 차이를 보였다

(P<0.05). 또한 색과 향은 민들레의 경우와 마찬가지로 첨가량이 많은 5% 첨가군은 질경이 특유의 짙은 색과 강한 질경이의 향으로 인해 점수가 낮아 국수의 기호에 적합하지 않은 것으로 보였다. 반면에 3% 첨가군은 색과 향 뿐만 아니라 촉촉한 정도도 가장 우수한 것으로 나타났으며 씹힘성의 경우는 대조군과 질경이를 3, 5% 첨가한 군 사이에 유의적인 차이를 보였고(P<0.05) 전반적인 품질의 경우에는 질경이 1% 첨가군이 높은 점수를 나타내었고 5% 첨가군과는 유의적인 차이를 보였다(P<0.05). 따라서 질경이를 국수에 첨가하여 만들 경우에 1 또는 3% 정도 질경이를 첨가하는 것이 바람직한 것으로 생각된다.

Table 20. Sensory evaluation of plantain noodle

Item	Amount of plantain added (%)			
	0	1	3	5
Color	4.0±0.00 ^{ax}	4.8±1.64 ^a	4.6±2.07 ^a	2.8±1.64 ^a
Flavor	4.0±0.00 ^a	3.8±1.30 ^a	4.0±1.58 ^a	2.8±1.48 ^a
Chewiness	3.6±0.55 ^b	5.6±0.89 ^a	4.8±0.45 ^a	2.2±0.45 ^c
Moistness	4.0±0.00 ^a	4.4±1.34 ^a	4.8±1.79 ^a	3.8±1.79 ^a
Overall quality	4.0±0.00 ^a	4.6±1.52 ^a	4.4±1.95 ^a	2.2±0.45 ^b

* Means with different letters(a, b) within a row are significantly different from each other at P<0.05.

나. 질경이 첨가 떡의 관능검사

질경이를 0, 1, 3, 5% 농도로 첨가한 떡을 제조하여 떡에 대한 전반적인 특성을 조사한 결과는 Table 21과 같다. 모든 항목에 대하여 대조군과 질경이를 첨가한 군 사이에는 유의적인 차이를 보였다(P<0.05). 색과 향의 경우에는 3% 첨가군의 점수가 가장 높았으며 대조군과 3% 첨가

군 사이에는 유의적인 차이(P<0.05)를 보였다. 또한 씹힘성의 경우에는 대조군과 질경이 첨가군 사이에 차이를 보였으며 촉촉한 정도도 대조군과 1, 3% 첨가군 사이에 차이를 보였다(P<0.05). 전반적인 품질은 3% 첨가군의 점수가 가장 높았으며 대조군의 점수가 가장 낮아서 떡에는 질경이를 첨가하는 것이 좋으며 기호면에 있어 3% 첨가가 좋다고 생각된다.

Table 21. Sensory evaluation of plantain rice cake

Item	Amount of plantain added (%)			
	0	1	3	5
Color	4.0±0.00 ^{b*}	4.6±1.10 ^{ab}	6.0±0.00 ^a	3.8±1.79 ^b
Flavor	4.0±0.00 ^c	4.6±1.14 ^{bc}	5.6±0.55 ^a	5.2±0.45 ^{ab}
Chewiness	4.0±0.00 ^c	5.4±0.55 ^b	6.6±0.55 ^a	4.4±1.52 ^{bc}
Moistness	3.0±0.45 ^b	5.0±0.00 ^a	5.4±0.90 ^a	3.2±1.10 ^b
Overall quality	3.8±0.45 ^b	5.6±0.55 ^a	6.6±0.55 ^a	4.2±1.79 ^b

* Means with different letters(a, b) within a row are significantly different from each other at P<0.05.

3. 백작약 첨가 국수와 떡의 관능검사

가. 백작약 첨가 국수의 관능검사

백작약을 0, 1, 3, 5% 농도로 첨가한 국수를 제조하여 국수에 대한 관능적인 특성을 조사한 결과는 Table 22와 같다. 색은 백작약을 첨가한 군이 대조군에 비해 유의적으로 높은 점수를 얻었다(P<0.05). 향은 백작약 첨가군이 대조군보다 유의적으로 훨씬 높은 점수를 나타냈으며 반면 씹힘성은 백작약을 첨가할수록 높은 값을 보였다. 촉촉한 정도는 대

조균에 비하여 낮은 점수를 나타냈다. 전반적인 바람직한 정도는 1% 첨가군과 3% 첨가군이 높게 나타났다. 따라서 백작약을 첨가하여 국수를 제조할 때 1% 또는 3% 정도 백작약을 첨가하는 것이 바람직한 것으로 생각된다.

Table 22. Sensory evaluation of jakyak in noodle

Item	Amount of jakyak added (%)			
	0	1	3	5
Color	3.8±0.00 ^{ca}	4.6±0.46 ^b	5.8±0.71 ^a	6.6±1.46 ^a
Flavor	3.8±0.00 ^b	6.6±0.07 ^a	5.6±0.58 ^{ab}	4.6±1.81 ^b
Chewiness	3.8±0.45 ^c	4.6±0.98 ^b	5.8±0.27 ^b	7.0±0.45 ^a
Moistness	7.0±0.23 ^a	6.8±0.32 ^b	5.0±0.79 ^b	4.0±1.09 ^c
Overall quality	4.0±0.27 ^b	6.0±0.72 ^a	5.8±0.95 ^a	5.6±0.45 ^b

* Means with different letters(a, b) within a row are significantly different from each other at P<0.05.

나. 백작약 첨가 떡의 관능검사

백작약을 0, 1, 3, 5% 농도로 첨가한 떡을 제조하여 떡에 대한 전반적인 특성을 조사한 결과는 Table 23과 같다. 색의 경우에 대조군과 백작약을 첨가한 떡의 경우에 3% 첨가군의 점수가 가장 높았으며 향은 1% 첨가까지는 대조군과 유의적인 차이를 보이지 않았다. 또한 씹힘성의 경우에는 대조군과 백작약 첨가군 사이에 유의적인 차이가 없었고 촉촉한 정도는 오히려 3%와 5% 첨가군이 유의적으로 더 크게 나타났다 (P<0.05). 전반적인 바람직한 정도는 3% 첨가까지 대조군과 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 백작약을 3% 첨가함으로써 떡의 관능적 특성을 개선시킬 수 있으리라고 생각된다.

Table 23. Sensory evaluation of jakyak rice cake

Item	Amount of jakyak added (%)			
	0	1	3	5
Color	5.0±0.07 ^{ab}	5.4±1.00 ^{ab}	5.6±1.00 ^a	4.4±0.93 ^b
Flavor	4.6±0.60 ^a	4.4±1.04 ^a	3.2±1.25 ^b	2.6±0.54 ^b
Chewiness	4.2±0.72 ^a	4.6±0.35 ^a	4.4±0.95 ^a	4.4±1.02 ^a
Moistness	3.8±0.54 ^c	4.8±0.09 ^b	5.6±0.90 ^a	6.2±1.17 ^a
Overall quality	5.0±0.58 ^a	5.4±0.55 ^a	5.2±0.35 ^a	3.2±1.29 ^b

* Means with different letters(a, b) within a row are significantly different from each other at P<0.05.

4. 목단피 첨가 국수와 떡의 관능검사

가. 목단피 첨가 국수의 관능검사

목단피를 0, 1, 3, 5% 농도로 첨가한 국수를 제조하여 국수에 대한 관능적인 특성을 조사한 결과는 Table 24와 같다. 색과 향은 목단피를 첨가한 군이 대조군에 비해 유의적으로 높은 점수를 얻었다(P<0.05). 씹힘성은 목단피를 첨가함으로써 질긴 것으로 나타났다. 촉촉한 정도는 1% 첨가군까지 대조군과 유의적인 차이를 나타내지 않았으며 전반적인 바람직한 정도는 목단피 첨가군이 대조군에 비해 유의적으로 높게 나타났다.

나. 목단피 첨가 떡의 관능검사

목단피를 0, 1, 3, 5% 농도로 첨가한 떡을 제조하여 떡에 대한 전반적인 특성을 조사한 결과는 Table 25와 같다.

Table 24. Sensory evaluation of mokdan in noodle

Item	Amount of mokdan added (%)			
	0	1	3	5
Color	4.8±0.00 ^{a*}	5.6±0.46 ^b	5.8±0.71 ^b	6.6±1.46 ^a
Flavor	4.8±0.00 ^b	6.6±0.07 ^a	6.3±0.58 ^a	4.6±1.81 ^b
Chewiness	3.8±0.45 ^c	4.6±0.98 ^b	5.8±0.27 ^a	6.0±0.45 ^a
Moistness	6.7±1.23 ^a	6.8±0.32 ^a	5.2±0.79 ^b	4.3±1.05 ^c
Overall quality	4.0±1.27 ^b	6.0±0.72 ^a	5.8±0.95 ^a	5.6±0.43 ^a

* Means with different letters(a, b) within a row are significantly different from each other at P<0.05.

Table 25. Sensory evaluation of mokdan rice cake

Item	Amount of mokdan added (%)			
	0	1	3	5
Color	5.0±0.07 ^{b*}	5.2±1.00 ^a	5.3±1.00 ^a	4.9±0.93 ^b
Flavor	4.6±0.35 ^a	4.4±1.04 ^a	3.7±1.25 ^b	3.6±0.54 ^b
Chewiness	4.2±0.72 ^b	4.7±0.25 ^a	4.8±0.95 ^a	5.0±0.22 ^a
Moistness	3.8±0.54 ^c	4.9±0.90 ^b	5.6±0.79 ^a	6.1±0.71 ^a
Overall quality	5.0±0.58 ^a	5.5±0.55 ^a	5.3±0.53 ^a	4.2±1.03 ^b

* Means with different letters(a, b) within a row are significantly different from each other at P<0.05.

색의 경우에 대조군과 목단피를 첨가한 떡의 경우에 3% 첨가군의 점수가 가장 높았으며 향은 1% 첨가까지는 대조군과 유의적인 차이를 보이지 않았다. 또한 씹힘성의 경우에는 목단피를 첨가함에 따라 점수가 높

게 나타났으며 축축한 정도는 오히려 3%와 5% 첨가군이 유의적으로 더 크게 나타났다($P < 0.05$). 전반적인 바람직한 정도는 3% 첨가까지 대조군과 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 목단피를 3% 첨가함으로 떡의 관능적 특성을 개선시킬 수 있으리라고 생각된다.

제 6 절 민들레로부터 항균활성물질의 분리 및 구조동정

1. Ethylacetate 분획으로부터 항균활성물질의 분리

Ethylacetate 추출물을 silica gel colum chromatography(7cm × 1.2 cm)한 후 thin layer chromatography(TLC)를 실시하여 13개의 분획을 얻었고 그에 대한 항균성은 Table 26과 같다.

각 fraction의 농도가 1000 $\mu\text{g}/\text{disc}$ 가 되도록 paper disc에 첨가한 후 5종의 공시균주를 대상으로 항균력을 검색하였다. 13개의 fraction 중 fra. 4, fra. 5 및 fra. 6이 모든 공시균주에 대하여 clear zone을 11~18.5 mm을 형성하여 항균성이 우수하게 나타났다. 1000 $\mu\text{g}/\text{disc}$ 농도에서 *B. subtilis*의 경우 fra. 4, fra. 5 및 fra. 6 모두 12 mm의 clear zone을 형성하였다. *L. monocytogenes*의 경우 fra. 6이 18.5 mm의 clear zone을 형성하여 강한 항균력을 보였고, *S. aureus* 경우도 같은 농도에서 fra. 4, fra. 5 및 fra. 6이 각각 13.5, 16 및 18 mm의 clear zone을 나타내었다.

Table 26. Antimicrobial activity of ethylacetate fractions from Dandelion at the concentration of 1000 $\mu\text{g}/\text{disc}$

Fr. No	Clear zone on plate (mm)				
	<i>B. subtilis</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
1	nd ¹⁾	nd	nd	nd	nd
2	nd	nd	nd	nd	nd
3	nd	nd	nd	nd	nd
4	12	13	13.5	11	14
5	12	15	16	12	14
6	12	18.5	18	11.5	16.5
7	10	12	15	nd	15
8	10	11	nd	nd	10
9	10	nd	9	nd	9.5
10	11	nd	9	nd	11
11	nd	nd	nd	nd	w ²⁾
12	9	nd	9.5	nd	9
13	nd	nd	10	nd	nd

1) nd : not detected

2) w : weak clear zone

또한 *E. coli*는 fra. 5가 12 mm의 clear zone을 보였고, *V. parahaemolyticus*는 fra. 4와 fra. 5가 14 mm로 같은 크기의 clear zone을 보였다. 따라서 어떤 fraction 보다 높은 항균력을 보인 fra. 4, fra. 5 및 fra. 6을 합쳐서 다시 silica gel column chromatography (5 cm × 75 cm)와 TLC plate를 이용하여 5개의 분획을 얻어 내었다. 5개의 분획에 대한 항균성 실험을 한 결과는 Table 27과 같다. *B. subtilis*의 경우 2nd fra. 2, 3 및 2nd fra. 5가 10 mm의 크기로 동일한 clear zone을 형성하였고, *L. monocytogenes*는 500 µg/disc 농도에서 2nd fra. 2가 20 mm를, *S. aureus*는 2nd fra. 3이 20 mm의 clear zone을 형성하였고, *V. parahaemolyticus* 균주는 2nd fra. 2가 17 mm로 가장 큰 clear zone을 보였으며 2nd fra. 5도 12 mm의 clear zone을 형성하여 항균력을 보였다. G(-) 균주인 *E. coli*는 clear zone의 크기가 2nd fra. 2와 3이 각각 9.5 mm로 나타났고, 2nd fra. 1은 모든 균주에 대한 clear zone을 형성하지 않아 항균 활성이 나타나지 않았다. 항균력이 가장 우수한 2nd fra. 2를 다시 silica gel column chromatography (2.5cm × 60cm)와 TLC를 이용하여 6개의 분획으로 분리하였다. 분리된 6개의 분획 중 3rd fra. 3의 항균성이 우수하였으며 그 결과를 Table 28에 나타내었다. 모든 5종의 식품 부패 미생물에 대하여 clear zone을 형성한 3rd fra. 3은 250 µg/disc 농도에서 *E. coli*를 제외하고 4종의 공시균주에 대하여 14 mm 이상의 clear zone을 보였고, 특히 *B. subtilis*는 15 mm의 clear zone을 형성하였으며 *E. coli*에 대해서는 9.8 mm의 clear zone을 형성하여 가장 항균 활성이 높았다.

이상의 결과를 볼 때 민들레 ethylacetate 추출물은 *B. subtilis*, *S. aureus*와 *V. parahaemolyticus*에 대하여 항균 활성이 뛰어난 것을 볼 수 있었으며 1차 분획 추출물이나 2차, 3차 분획 추출물들이 clear zone을

형성하는데 큰 차이가 없는 것으로 미루어 항균성에 관여하는 물질은 단일 성분의 물질이라기 보다 여러 성분들이 혼합된 복합 물질로 존재하는 것으로 생각되며 이들 여러 fraction들을 조합하면 훨씬 더 높은 항균 효과를 내리라고 생각된다.

Table 27. Antimicrobial activity of the second ethylacetate fractions from dandelion at the concentration of 500 $\mu\text{g}/\text{disc}$

Fr. No	Clear zone on plate (mm)				
	<i>B. subtilis</i>	<i>L. mono-cytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>V. para-haemolyticus</i>
1	nd ¹⁾	nd	nd	nd	nd
2	10	20	19.5	9.5	17
3	10	18.5	20	9.5	15.5
4	nd	16	19	nd	13
5	10	15	18	9	12

1) nd : not detected

Table 28. Antimicrobial activity of the third ethylacetate fractions from dandelion at the concentration of 250 µg/disc

Fr. No	Clear zone on plate (mm)				
	<i>B. subtilis</i>	<i>L. mono-cytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>V. para-haemolyticus</i>
1	nd ¹⁾	nd	w	nd	nd
2	11	15	13.5	nd	16.5
3	15	14.5	14.3	9.8	14.5
4	11	11.5	12	w	13
5	12	11	13	nd	12
6	w ²⁾	nd	13	nd	11

- 1) nd : not detected
 2) w : weak clear zone

2. 민들레로부터 항균활성 물질의 구조동정

민들레의 methanol 추출물로부터 각 용매별로 계통 분획하여 분리한 ethylacetate 분획으로부터 silica gel column chromatography와 TLC를 하여 항균성을 보인 3rd fra. 3의 성분을 알아 보기 위하여 HPLC로 Figure 17과 같이 분리하여 peak I, II, III에 대한 compound를 ¹H-NMR과 GC-MS로 분석하였다. 그 결과 peak I에서는 항균성과 관련된 물질은 없었고 다만 ethylene glycol이 있는 것으로 추정되었다.

가. Peak II 화합물의 구조 결정

분리된 peak II를 ¹H-NMR(CDC1₃, 500 MHz, TMS)를 측정 한 결과는

Figure 18과 같이 δ 7.47(2H, t, $J=7.4$ Hz, H-3, 5), 7.61(1H, t, $J=7.4$ Hz, H-4), 8.13(2H, d, $J=7.4$ Hz, H, 2, 6), 11.68(1H, brs, -OH)에서 proton이 관찰되었으며 GC-MS(m/z)를 분석한 결과는 Figure 19와 같이 molecular ion (M^+)이 m/z 122에서 관찰되었다. 따라서 민들레로부터 분리한 peak II에서는 benzoic acid로 동정하였다.

Benzoic acid는 광택이 있는 작은 엽상 또는 침상의 결정으로 cinnamon, cloves, plums, cranberries 등에 존재하는 천연 유기산으로 Salkowski에 의하여 항균력에 대한 연구가 보고되었다. 또한 benzoic acid는 이미 과일이나 채소류 즙 및 탄산 음료등의 식품에 보존제로 사용이 되고 있으며 술잎으로부터 국 등이 분리한 바 있고 미생물에 대한 정균 작용과 살균 작용을 가지며 pH 4 이하에서는 저농도로 미생물의 증식을 억제하지만 pH 5.5 이상에서는 그 효과가 격감하는 것으로 알려져 있다.

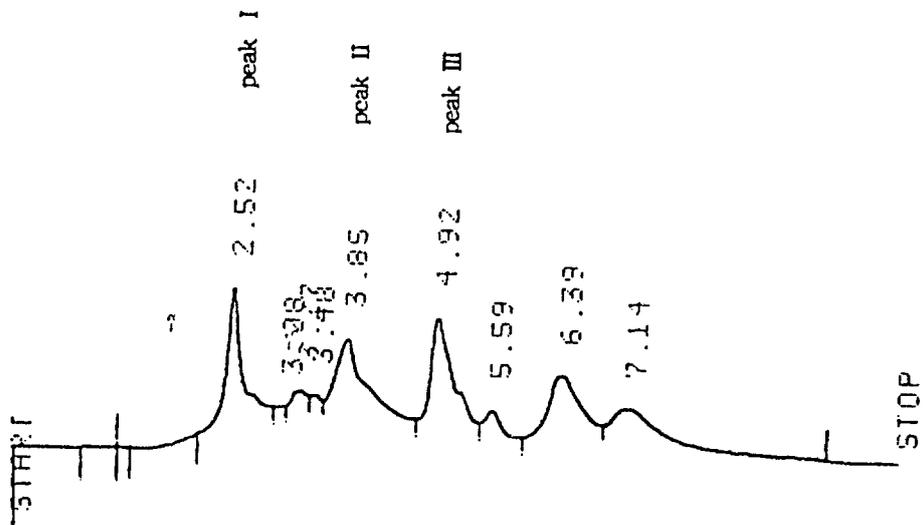


Figure 17. HPLC spectrum of 3rd fra. 3 of ethylacetate fraction from dandelion.

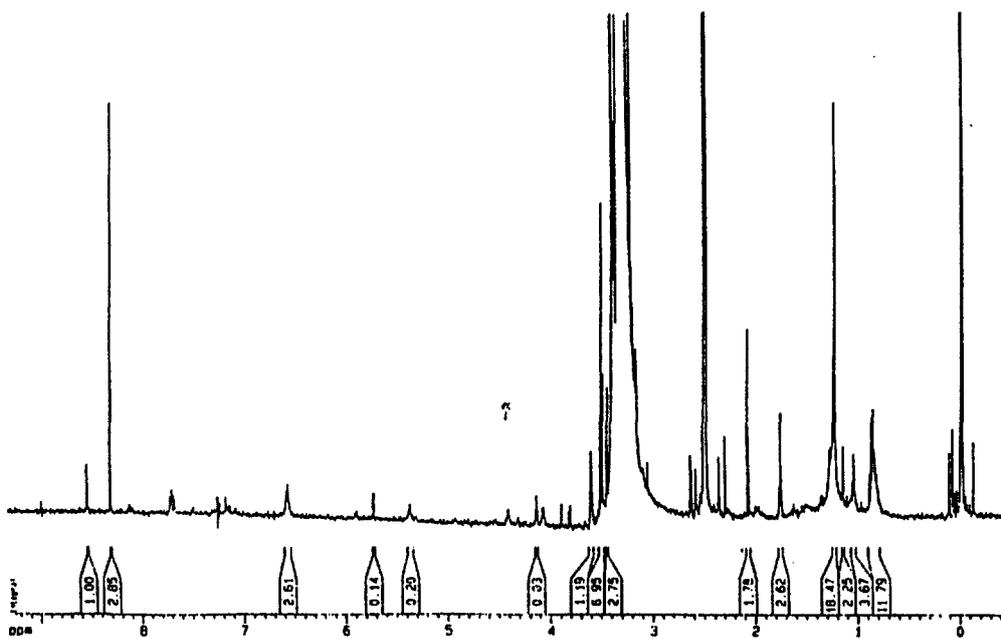


Figure 18. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz) spectrum of antimicrobial compound in peak II from dandelion.

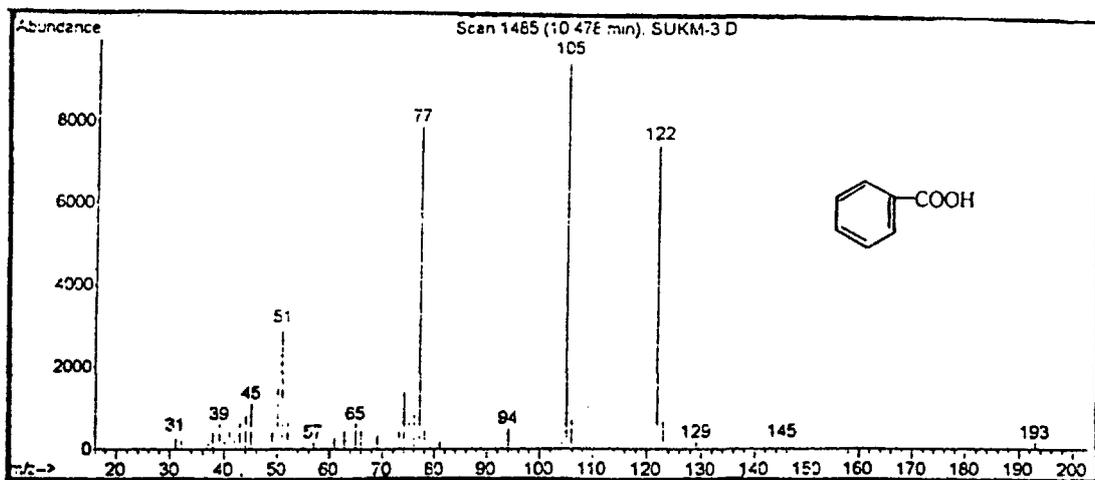


Figure 19. GC-MS spectrum of antimicrobial compound in peak II from dandelion.

나. Peak III 화합물의 구조 결정

분리된 화합물을 $^1\text{H-NMR}$ 로 분석한 결과는 Aldrich NMR Spectrum 문헌의 그것과 일치하고 GC-MS에서는 molecular ion (M^+)이 m/z 140에서 나타나 hexamine으로 추정되었다. 이것은 냄새가 없고 과립이나 가루 또는 결정 형태로 존재할 수 있으며 낮은 온도에서 휘발하는 성질을 가지고 있을 뿐 아니라 비뇨기 질환에 항균 치료를 위한 물질로 사용되는 것으로 알려져 있다.

제 7 절 질경이로부터 항균활성 물질의 분리 및 동정

1. Ethylacetate 분획으로부터 항균활성물질의 분리

질경이의 ethylacetate 추출물 92.7 g을 silica gel column chromatography와 TLC를 하여 8개의 분획을 얻었다. 이들 8개의 분획에 대하여 5종의 식품 부패 미생물에 대한 항균성을 검색한 결과는 Table 28과 같다. 8개의 분획 중 fra. 2은 1,000 $\mu\text{g}/\text{disc}$ 농도에서 공시균주에 대하여 clear zone을 형성하였으며 특히, *L. monocytogenes*, *S. aureus* 및 *V. parahaemolyticus*는 각각 20, 16 및 15.5 mm로 항균 효과가 뛰어났고, fra. 3도 *B. subtilis*를 제외한 모든 균주에 대하여 항균 활성을 보였다. 이와 같이 높은 항균성을 나타낸 fra. 2와 fra. 3을 모아 다시 silica gel column chromatography와 TLC를 병행하여 7개의 2nd fraction을 얻었다. 이들 2nd fraction의 항균 활성의 결과는 Table 29와 같다. 즉, 500 $\mu\text{g}/\text{disc}$ 농도에서 모든 균주에 대하여 활성을 나타낸 것은 2nd fra. 4와 2nd fra. 6으로 *L. monocytogenes*와 *V. parahaemolyticus*에 대한 항균 효과가 컸다. 특히 2nd fra. 4의 경우

모든 균주에 대하여 clear zone이 12 mm 이상 나타났고, *L. monocytogenes*의 경우는 20 mm의 clear zone을 형성하였고, *E. coli*와 *B. subtilis*에 대해서도 13.5와 12 mm의 clear zone을 형성하였다. 뿐만 아니라 2nd fra. 6도 *S. aureus*와 *V. parahaemolyticus*에 대하여 각각 13.5와 16 mm의 clear zone을 형성하면서 모든 균주에 대하여 11 mm 이상의 clear zone을 보여 항균 활성을 볼 수 있었다. 따라서, 2nd fra. 4와 6을 합쳐서 다시 동일한 방법을 통해 분리하여 4개의 3rd fraction으로 분리하였다. 이들의 항균성은 paper disc법으로 검색한 결과는 Table 30과 같다. 질경이의 3rd fraction 중 모든 공시균주에 대하여 항균력을 나타낸 것은 3rd fra. 4였으며 3rd fra. 2와 3rd fra. 3은 *S. aureus*에 대해서만 clear zone을 나타내었다. 그리고 3rd fra. 4의 경우 250 µg/disc 농도에서 *B. subtilis*, *S. aureus* 및 *E. coli*는 10 mm의 clear zone을 형성하였고, *L. monocytogenes*와 *V. parahaemolyticus*의 경우에는 11 mm의 clear zone을 각각 형성하여 가장 항균 활성이 높았다.

2. 질경이로부터 항균활성물질의 구조동정

질경이로부터 용매 분획하여 silica gel column chromatography로 분리한 후 항균 활성이 가장 높게 나타난 3rd fra. 4를 HPLC로 분획하여 Figure 20과 같이 peak IV, V, VI을 얻어서 ¹H-NMR 및 GC-MS를 통하여 질경이의 항균 물질을 동정하였다. 각각의 peak 마다 포함되어 있는 항균성 물질에는 차이가 있었으며 peak V와 peak VI에서는 항균성과 관련된 물질이 없는 것으로 나타났다. 따라서 항균 물질이 나타난 peak IV에 대하여 분석한 결과는 다음 Figure 21, 22와 같다.

Table 28. Antimicrobial activity of ethylacetate fractions from plantain at the concentration of 1,000 $\mu\text{g}/\text{disc}$

Fr. No	Clear zone on plate (mm)				
	<i>B. subtilis</i>	<i>L. mono-cytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>V. para-haemolyticus</i>
1	nd ¹⁾	nd	nd	9	nd
2	11	20	16	13	15.5
3	nd	10.5	12	10	9
4	nd	nd	11	11.5	nd
5	nd	nd	w ²⁾	11	10
6	nd	nd	nd	9	10
7	nd	nd	9	11	9
8	nd	nd	nd	nd	nd

1) nd : not detected

2) w : weak clear zone

Table 29. Antimicrobial activity of the second ethylacetate fractions from plantain at the concentration of 500 µg/disc.

Fr. No	Clear zone on plate (mm)				
	<i>B. subtilis</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
1	nd ¹⁾	nd	nd	nd	nd
2	nd	nd	nd	nd	nd
3	nd	19	14	nd	17
4	12	20	15	13.5	17.5
5	11.5	18	12.5	nd	15.5
6	12	18.5	13.5	11	16
7	nd	12	11	nd	15.5

1) nd : not detected

Table 30. Antimicrobial activity of the third ethylacetate fractions from plantain at the concentration of 250 µg/disc

Fr. No	Clear zone on plate (mm)				
	<i>B. subtilis</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
1	nd ¹⁾	nd	nd	nd	nd
2	nd	nd	10	w ²⁾	nd
3	nd	nd	9.5	w	nd
4	10	11	10	10	11

1) nd : not detected 2) w : weak clear zone

가. Peak IV 화합물의 구조 결정

Figure 21과 같이 peak IV를 $^1\text{H-NMR}$ 를 측정한 결과 δ 2.34(2H, triplet, $J=7.5$ Hz), 1.63(2H, triplet, $J=7.2$ Hz), δ 1.25(24H, singlet) 그리고 0.90(3H, triplet, $J=6.8$ Hz)에서 proton이 관찰되었고, GC-MS(m/z)에서는 Figure 22와 같이 molecular ion(M^+)이 m/z 256에서 나타나서 hexadecanoic acid로 추정되었다.

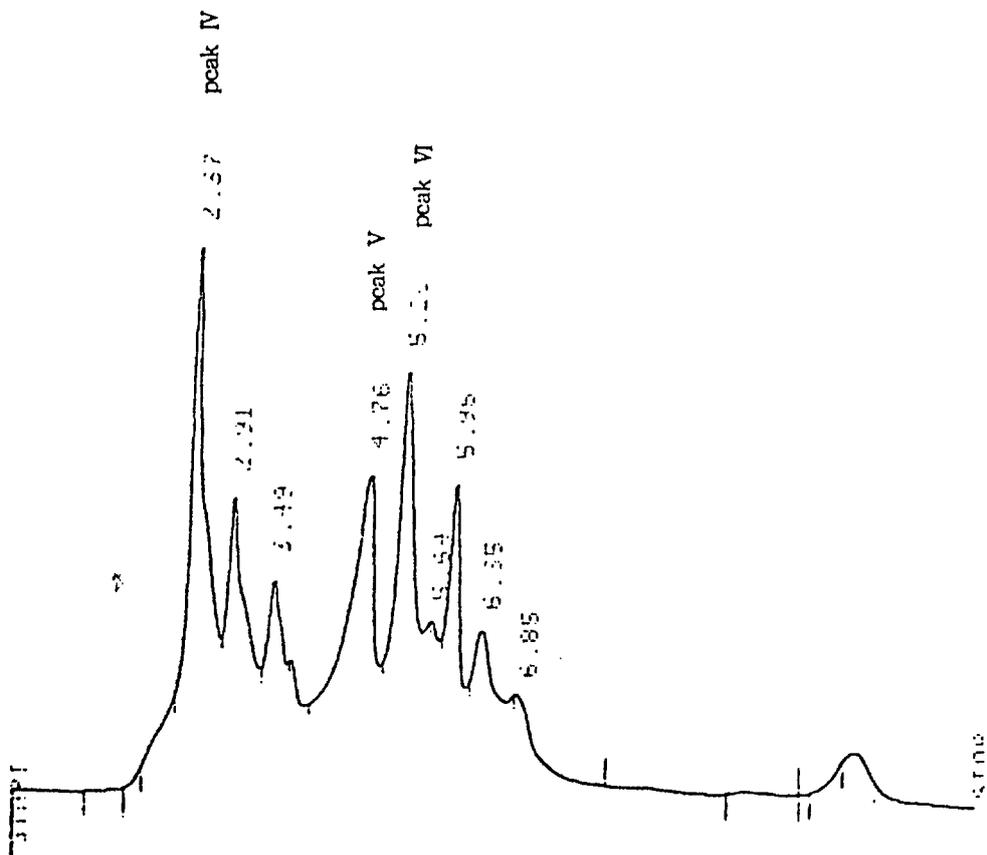


Figure 20. HPLC spectrum of 3rd fra. 4 of ethylacetate fraction from plantain.

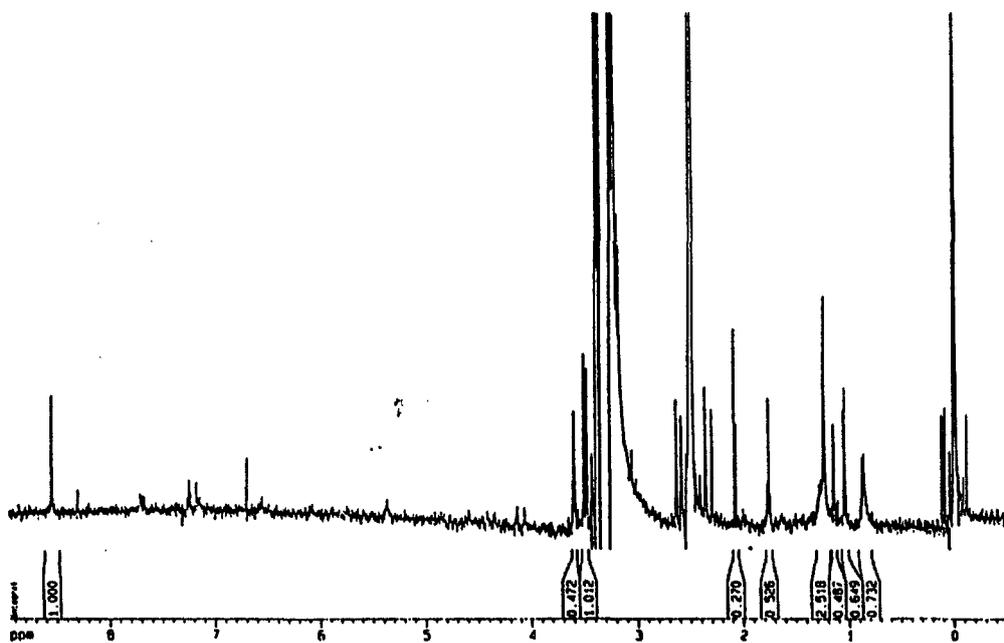


Figure 21. ¹H-NMR(500 MHz) spectrum of antimicrobial compound in peak IV from plantain.

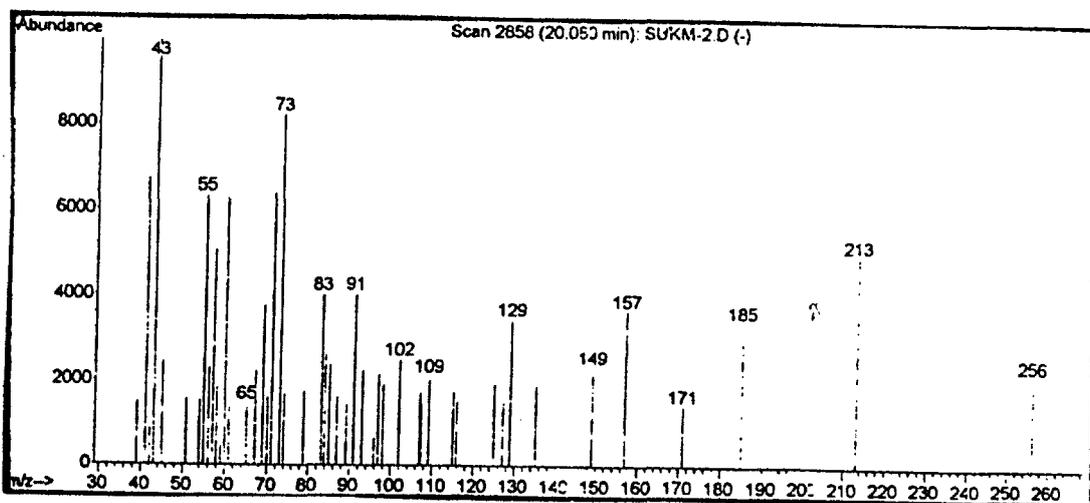


Figure 22. GC-MS spectrum of antimicrobial compound in peak IV from plantain.

제 8 절 백작약으로부터 항균활성 물질의 분리 및 구조동정

1. Ethylacetate 분획으로부터 항균활성물질의 분리

Ethylacetate 추출물을 silica gel column chromatography(7 cm × 1.2 cm)한 후 thin layer chromatography(TLC)를 실시하여 11개의 분획을 얻었고 그에 대한 항균성은 Table 31과 같다. 각 fraction의 농도가 1000 µg/disc가 되도록 paper disc에 첨가한 후 5종의 공시균주를 대상으로 항균력을 검색하였다. 11개의 fraction 중 fra. 3, fra. 4 및 fra. 5이 모든 공시균주에 대하여 clear zone을 10~28 mm을 형성하여 항균성이 우수하게 나타났다. 1000 µg/disc 농도에서 *B. subtilis*의 경우 fra. 3, fra. 4 및 fra. 5가 각각 14, 10, 13.5 mm의 clear zone을 형성하였고, *L. monocytogenes*의 경우 fra. 3과 fra. 4에서 28, 27 mm의 clear zone을 형성하여 강한 항균력을 보였고, *S. aureus* 경우도 같은 농도에서 fra. 3과 fra. 5가 각각 12, 13 mm의 clear zone을 나타내었다. 또한 *E. coli*는 fra. 3이 16 mm의 clear zone을 보였고, *V. parahaemolyticus*는 fra. 3과 fra. 5가 각각 22, 15mm 크기의 clear zone을 보였다. 따라서 어떤 fraction 보다 높은 항균력을 보인 fra. 3, fra. 4 및 fra. 5을 합쳐서 다시 silica gel column chromatography (5 cm × 75 cm)와 TLC plate를 이용하여 5개의 분획을 얻어 내었다. 5개의 분획에 대한 항균성 실험을 한 결과는 Table 32와 같다.

*B. subtilis*의 경우 1000 µg/disc 농도에서 2nd fra. 2, 3, 및 2nd fra. 4가 각각 18, 17, 16 mm 크기의 clear zone을 형성하였고, *L. monocytogenes*는 250 µg/disc 농도에서 2nd fra. 3이 21 mm를, *S. aureus*는 2nd fra. 3이 13 mm의 clear zone을 형성하였고, *V.*

parahaemolyticus 균주는 2nd fra. 4가 14 mm로 가장 큰 clear zone을 보였다.

G(-) 균주인 *E. coli*의 경우 clear zone의 크기가 2nd fra. 4가 11 mm로 나타났고, 2nd fra. 1은 250 $\mu\text{g}/\text{disc}$ 농도에서는 *V. parahaemolyticus*를 제외한 모든 균주에서는 항균 활성이 나타나지 않았다.

이상의 결과를 볼 때 백작약 ethylacetate 추출물은 *B. subtilis*, *S. aureus*와 *V. parahaemolyticus*, *L. monocytogenes*에 대하여 항균 활성이 뛰어난 것을 볼 수 있었으며 1차 분획 추출물이나 2차 분획 추출물들이 clear zone을 형성하는데 큰 차이가 없는 것으로 미루어 항균성에 관여하는 물질은 단일 성분의 물질이라기 보다 여러 성분들이 혼합된 복합 물질로 존재하는 것으로 생각된다.

Table 31. Antimicrobial activity of the first ethylacetate fractions from methanol extract of *paeonia japonica* var. *pilosa* NAKAI on the growth of various microorganisms

Fra. No.	Conc. ($\mu\text{g}/\text{disc}$)	Clear zone(mm)				
		<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>E. coli</i>
1	250	- ¹⁾	-	-	8.5	-
	500	-	-	-	9	-
	750	-	-	-	9.5	-
	1000	-	-	-	10	8.5
2	250	8.5	-	13	13	10
	500	9.5	-	15	16	12
	750	10	-	18	18	13
	1000	10.5	-	23	20	14
3	250	10	8.5	13	12	11
	500	12	10	18	15	13
	750	13	11	22	20	15
	1000	14	12	28	22	16
4	250	8.5	8.5	10	10	8.5
	500	9	9	12	11.5	10
	750	9.5	9.5	18	12	11
	1000	10	10	27	14	12
5	250	12	11	8.5	12	11
	500	12.5	11.5	9	13	11.5
	750	13	12	11	14	12
	1000	13.5	13	13	15	12.5
6	250	10	-	8.5	12	10.5
	500	12	-	11.5	13	11
	750	14	-	12	14	12
	1000	14.5	-	14	15	12.5

7	250	-	-	8.5	9	9
	500	8.5	8.5	10	10.5	10
	750	9	9	10.5	11	10.5
	1000	10	10	11	12	11
8	250	9	8.5	-	10	10.5
	500	10	11.5	9	11	11
	750	11	12	11	11.5	12
	1000	12	15	12.5	12	13
9	250	8	-	11.5	9	-
	500	8.5	-	13	10	8.5
	750	9	8.5	15	10.5	9
	1000	10	9	16	11	10
10	250	8.5	9	-	9	9.5
	500	9.5	10	9	9.5	11
	750	10	10.5	9.5	10	11.5
	1000	10.5	11	10	12	12
11	250	8.5	-	9	-	-
	500	11	-	10	-	-
	750	11.5	-	13	8.5	-
	1000	12	8.5	14	9	8.5

1)-: not detected

Table 32. Antimicrobial activity of the second ethylacetate fractions from methanol extract of *paeonia japonica* var. *pilosa* NAKAI on the growth of various microorganisms

2nd Fraction No.	Conc. (μ g/disc)	Clear zone(mm)				
		<i>B.</i> <i>subtilis</i>	<i>S.</i> <i>aureus</i>	<i>L.</i> <i>monocyto</i> <i>genes</i>	<i>V.</i> <i>parahaemo</i> <i>lyticus</i>	<i>E. coli</i>
1	250	- ¹⁾	-	-	9.0	-
	500	-	8.5	-	10.0	9.5
	750	11.0	10.0	8.5	11.5	10.0
	1000	12.0	11.0	9.0	13.0	11.0
2	250	11.0	11.0	16.0	11.0	9.0
	500	12.0	13.0	20.5	16.0	12.0
	750	14.0	17.5	29.0	17.0	16.0
	1000	18.0	26.0	31.0	19.0	18.0
3	250	10.5	13.0	21.0	13.0	8.5
	500	11.0	15.0	28.0	15.0	12.0
	750	15.0	20.0	30.0	18.0	16.0
	1000	17.0	23.0	35.0	21.0	18.0
4	250	-	10.0	17.0	14.0	11.0
	500	13.0	14.0	18.0	17.5	14.0
	750	15.5	18.0	25.0	18.0	15.0
	1000	16.0	19.0	29.0	20.0	21.0
5	250	10.0	10.5	12.0	11.0	11.0
	500	11.0	11.0	16.0	12.0	12.0
	750	12.0	12.0	17.0	14.0	13.0
	1000	13.0	12.5	18.0	16.0	14.0

1)-: not detected

2. 백작약으로부터 항균활성물질의 구조동정

백작약의 methanol 추출물로부터 각 용매별로 계통 분획하여 분리한 ethylacetate 분획으로부터 silica gel column chromatography와 TLC를

하여 항균성을 보인 2nd fra. 3의 성분을 알아 보기 위하여 HPLC로 Figure 23과 같이 분리하여 peak I, II, III, IV, V에 대한 compound를 GC-MS로 분석하였다. GC-MSD(m/z)를 분석한 결과는 Figure 24와 같이 molecular ion(m^+)이 peak III에서 242로 관찰되어 peak III에서는 Cetyl alcohol이, peak V에는 molecular ion(m^+)이 114로 관찰되어 methyl N-amyl ketone이 있는 것으로 추정되었다.

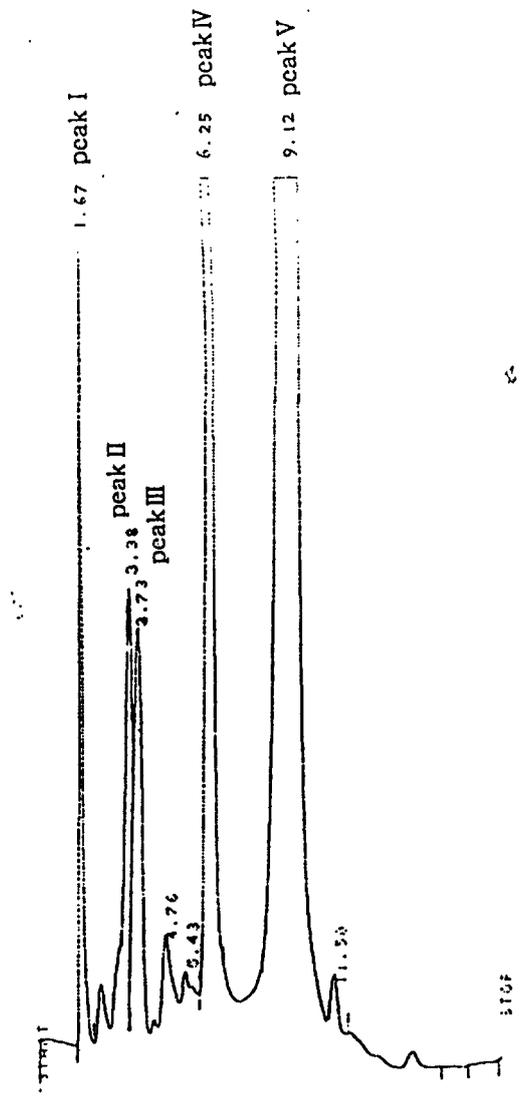


Figure 23. HPLC spectrum of 2nd fra. 3 of ethylacetate fraction from jakyak.

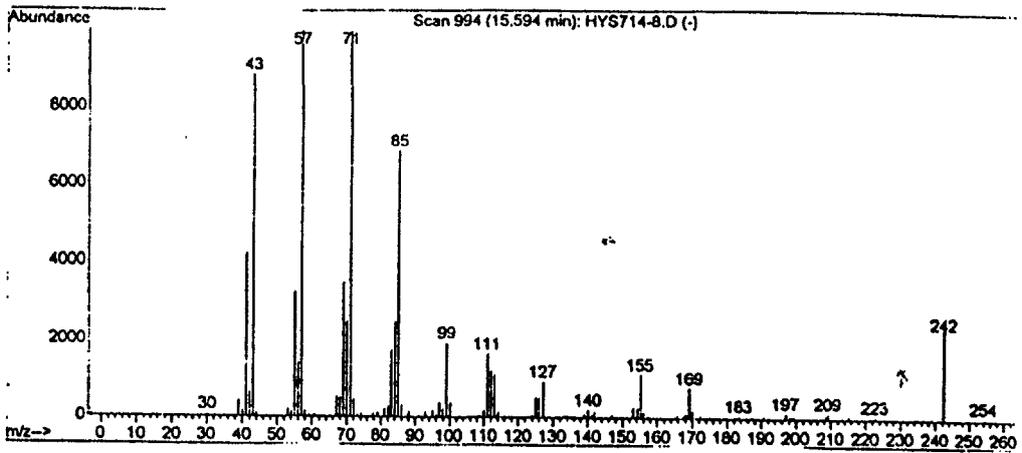


Figure 24. GC-MS spectrum of antimicrobial compound in peak III from jakyak.

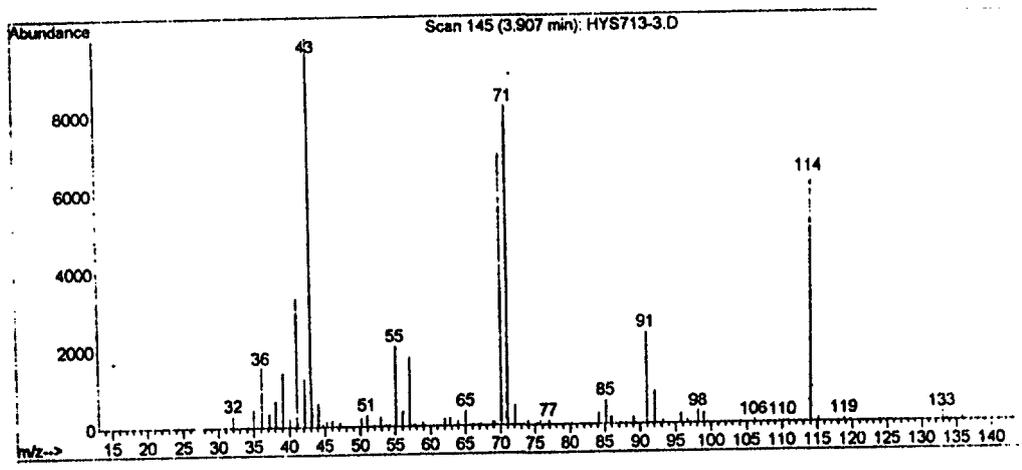


Figure 25. GC-MS spectrum of antimicrobial compound in peak V from jakyak.

제 9 절 목단피로부터 항균활성물질의 분리 및 구조동정

1. Ethylacetate 분획으로부터 항균활성물질의 분리

목단피의 ethylacetate 추출물 44.327 g을 silica gel column chromatography와 TLC 를 하여 3개의 분획을 얻었다. 이들 3개의 분획에 대하여 5종의 식품 부패 미생물에 대한 항균성을 검색한 결과는 Table 33과 같다. 3개의 분획 중 fra. 1은 250 $\mu\text{g}/\text{disc}$ 농도에서 공시균주에 대하여 clear zone을 형성하였으며 특히, *B. subtilis*, *S. aureus* 및 *V. parahaemolyticus*는 각각 12, 12 및 13 mm로 항균 효과가 뛰어났고, fra. 2도 모든 균주에 대하여 뛰어난 항균 활성을 보여 250 $\mu\text{g}/\text{disc}$ 농도에서 *L. monocytogenes* 및 *V. parahaemolyticus*에 대해 각각 12.5, 13 mm clear zone을 형성하였다. 이와 같이 높은 항균성을 나타낸 fra. 1과 fra. 2를 모아 다시 silica gel column chromatography와 TLC를 병행하여 3개의 2nd fraction을 얻었다. 이들 2nd fraction의 항균 활성의 결과는 Table 34와 같다. 즉, 250 $\mu\text{g}/\text{disc}$ 농도에서 모든 균주에 대하여 활성을 나타낸 것은 2nd fra. 1과 2nd fra. 2로 *B. subtilis* 와 *V. parahaemolyticus*에 대한 항균 효과가 컸다. 특히 2nd fra. 1의 경우 모든 균주에 대하여 clear zone이 11 mm 이상 나타났고, *B. subtilis*의 경우는 16 mm의 clear zone을 형성하였고, *V. parahaemolyticus*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*에 대해서도 14, 12, 12mm의 clear zone을 형성하였다.

Table 33. Antimicrobial activity of the first ethylacetate fractions from methanol extract of mokdan(*paonia suffruticosa* ANDR) on the growth of various microorganisms

Fraction No.	Conc. ($\mu\text{g}/\text{disc}$)	Clear zone(mm)				
		<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>E. coli</i>
1	250	12.0	12.0	10.0	13.0	12.0
	500	13.0	13.0	12.0	15.5	13.0
	750	14.0	14.0	17.0	18.0	14.5
	1000	16.0	15.0	20.0	20.0	16.5
2	250	10.5	12.0	12.5	13.0	11.0
	500	11.0	13.5	16.0	14.5	12.0
	750	12.0	14.0	19.0	15.5	13.0
	1000	13.0	15.0	21.0	16.5	14.0
3	250	-	8.5	-	-	-
	500	8.5	9.0	9.5	10.0	-
	750	9.0	10.0	11.0	11.0	-
	1000	10.0	11.0	12.0	12.0	8.5

1)-: not detected

Table 34. Antimicrobial activity of the second ethylacetate fractions from methanol extract of mokdan(*paeonia suffruticosa* ANDR) on the growth of various microorganisms

2nd Fraction (μg/disc) No.	Conc.	Clear zone(mm)				
		<i>B.</i> <i>subtilis</i>	<i>S.</i> <i>aureus</i>	<i>L.</i> <i>monocy</i> <i>togenes</i>	<i>V.</i> <i>parahaemo</i> <i>lyticus</i>	<i>E. coli</i>
1	250	16.0	12.0	12.0	14.0	11.0
	500	21.0	13.0	15.0	16.0	12.0
	750	23.0	14.0	17.0	17.0	13.0
	1000	25.0	16.0	18.0	19.0	14.0
2	250	15.0	11.0	10.0	11.0	10.0
	500	16.0	11.5	12.0	13.0	12.0
	750	18.0	12.0	13.0	14.0	12.5
	1000	19.0	13.0	14.0	15.0	13.0
3	250	10.0	9.0	-	10.5	9.0
	500	14.0	9.5	-	12.0	10.5
	750	15.0	10.0	-	13.0	11.0
	1000	16.0	11.0	8.5	14.0	12.0

1)-: not detected

2. 목단피로부터 항균활성물질의 구조동정

목단피로부터 용매 분획하여 silica gel column chromatography로 분리한 후 항균 활성이 가장 높게 나타난 2nd fra. 1을 HPLC로 분취하여 Figure 26과 같이 peak VI, VII, VIII, IX, X를 얻어서 GC-MS를 통하여

목단피의 향균 물질을 동정하였다. 각각의 peak 마다 포함되어 있는 향균성 물질에는 차이가 있었으며 향균 물질이 나타난 peak IX에 대하여 분석한 결과는 다음 Figure 27과 같다. GC-MSD(m/z)를 분석한 결과 molecular ion(m^+)이 peak IX에서 158로 관찰되어 peak IX에서는 isobutyl isopentanoate가 있는 것으로 추정되었다.

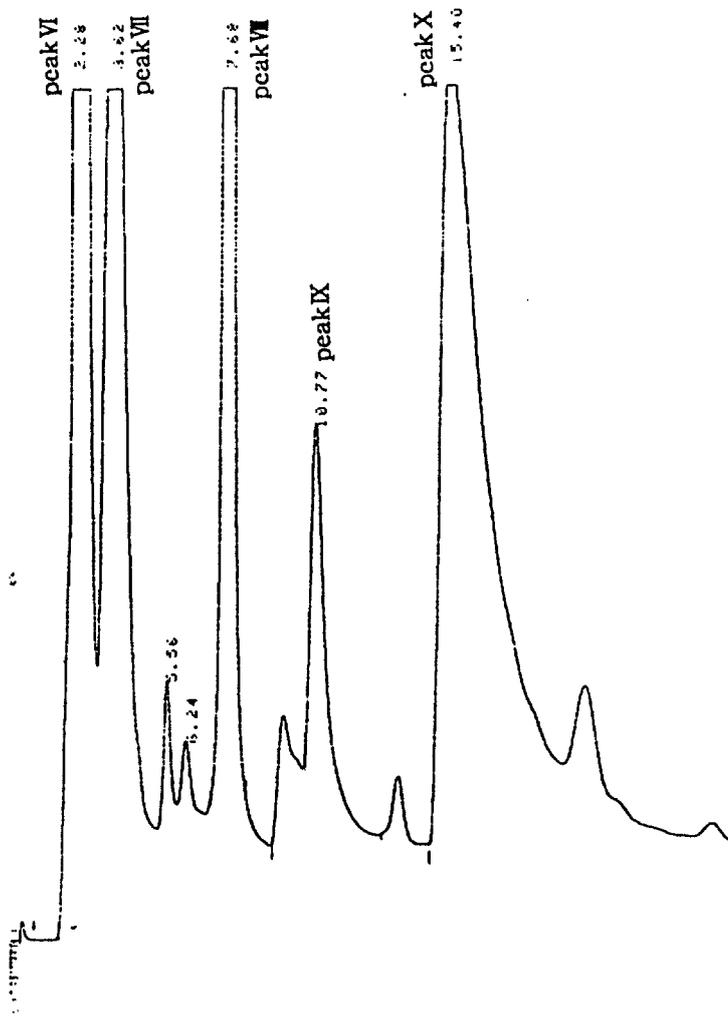


Figure 26. HPLC spectrum of 2nd fra. 1 of ethylacetate fraction from mokdan.

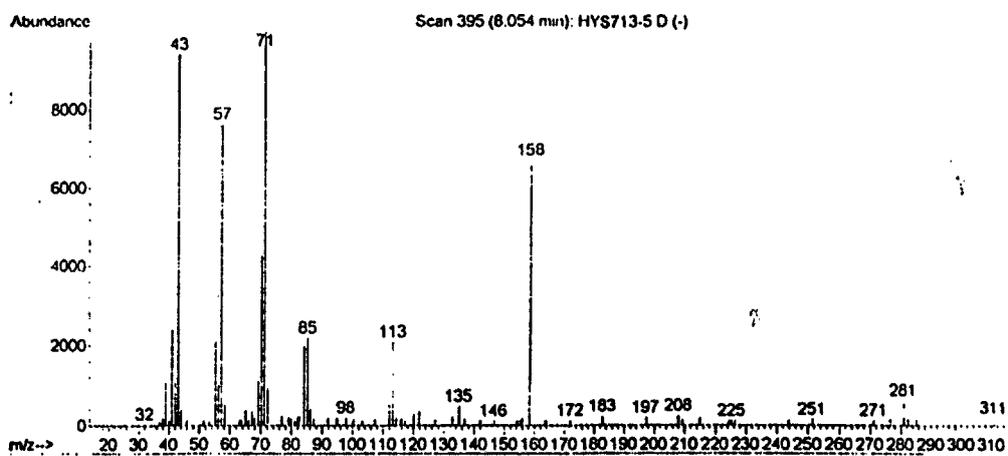


Figure 27. GC-MS spectrum of antimicrobial compound
in peak IX from mokdan.

지금까지 연구된 바에 의하면 탄소수가 12~18의 중급 지방산들은 항균 효과를 가진다는 보고가 있으며 특히 정균 작용에 대한 보고가 있다. 특히, 지방산들의 항균력은 지방산의 비헤리 분자가 세균의 세포내로 침투하여 물질 이동과 함께 oxidative phosphorylation system을 저해하기 때문이라고 하였다. 또한 지방산은 막에서 수송을 방해하여 미생물의 영양 손실을 야기하기에 항균 효과를 낸다는 보고도 있다. 그리고 Lindsay에 따르면 불포화 지방산이 산화되면 free radical이 세포막의 특정 site를 공격하기에 미생물에 대한 억제 작용을 나타낸다고 하였다. 또한 김의 연구에서는 산초로부터 hexadecanoic acid를 항균 물질로 보고하였고, 쑥으로부터는 coumarin을 항균성 물질로 동정하였고, 송 등은 청미래 덩굴의 뿌리로부터 항균력과 관련된 물질은 페놀성 화합물이라고 보고하였고 안 등은 고삼으로부터 항균력과 관련이 있는 것이 flavone 화합물의 일종이라고 보고하였다.

본 연구결과를 통하여 민들레와 질경이가 항균 활성을 보이는 것은 바로 민들레의 benzoic acid와 hexamine과 같은 물질들 때문이고 질경이의 경우는 hexadecanoic acid가 영향을 주는 것으로 생각되어지며 이외에도 여러 물질들이 민들레와 질경이에 혼합적으로 존재하여 영향을 주는 것으로 생각되어진다.

백작약과 목단피가 항균 활성을 보이는 것은 바로 백작약의 Cetyl alcohol과 methyl N-amyI ketone과 같은 물질들 때문이고 목단피의 경우는 isobutyl isopentanoate 가 영향을 주는 것으로 생각되며 이외에도 여러 물질들이 백작약과 목단피에 혼합적으로 영향을 주는 것으로 생각되어진다.

제 10 절 분리 동정된 화합물의 항균성

민들레, 질경이, 백작약, 목단피로 분리 동정된 cetyl alcohol, methyl amyl ketone, isobutyl isopentanoate, benzoic acid, palmitic acid 화합물의 항균성은 Table 35와 같다. cetyl alcohol은 5종의 공시균에 대하여 항균성을 나타내지 않았고 isobutyl isopentanoate와 benzoic acid가 강한 항균력을 보여 목단피와 민들레의 항균력은 이들 화합물에 의하여 활성을 보이는 것으로 생각된다. 백작약의 경우 methyl amyl ketone이 다양한 균주에 대한 항균력을 보였고, 질경이의 경우 palmitic acid가 *V. parahaemolyticus*에 대한 항균력을 보였다.

제 11 절 분리 동정된 화합물 혼합물의 항균성 검색

분리 동정된 화합물을 서로 혼합하여 상승효과를 검토하였다(Table 36~45). cetyl alcohol은 *B. subtilis*를 500 μ g/ml에서 항균력을 보이지 않았고 isobutyl isopentanoate는 48.36% 저해하였으나 서로 혼합하였을 때 *B. subtilis*가 93.08% 저해되어 상승효과를 보였다. methyl amyl ketone과 isobutyl isopentanoate는 *B. subtilis*를 각각 9.33%와 48.46% 저해하였는데 이들을 혼합하였을 때 *B. subtilis*가 100% 저해되어 상승효과를 나타냈다. cetyl alcohol은 *V. parahaemolyticus*를 500 μ g/ml에서 항균력을 보이지 않았고 palmitic acid는 1.77% 저해하였으나 혼합하였을 때 56.36% 저해하여 상승효과를 보였다. 또한 methyl amyl ketone과 benzoic acid 혼합시 *E. coli*에 대하여 상승효과를 보였다. methyl amyl ketone과 palmitic acid와의 혼합으로 *V. parahaemolyticus*에 대하여 상승효과를 나타냈다.

Table 35. Antimicrobial activity of the on the growth of various microorganisms.

sample name	Conc. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Antimicrobial activity(%)				
		<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>E. coli</i>
cetyl alcohol (1)	500	- ¹⁾	-	-	-	-
	1000	-	-	-	-	-
	1500	-	-	-	29.29	-
	2000	-	-	-	43.84	-
methyl amyl ketone (2)	500	6.45	-	-	61.14	-
	1000	9.33	11.42	-	70.09	-
	1500	37.56	44.29	22.42	100.00	-
	2000	73.78	100.00	59.10	100.00	10.35
isobutyl isopentanoate (3)	500	31.57	9.44	41.56	100.00	77.38
	1000	48.36	100.00	100.00	100.00	90.13
	1500	79.77	100.00	100.00	100.00	92.42
	2000	100.00	100.00	100.00	100.00	94.35
benzoic acid (4)	500	9.44	20.36	26.10	9.53	2.08
	1000	100.00	78.88	39.78	70.31	23.90
	1500	100.00	100.00	94.34	100.00	78.71
	2000	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
palmitic acid (5)	500	-	-	-	9.53	-
	1000	-	-	-	70.31	-
	1500	-	-	-	100.00	-
	2000	-	-	-	100.00	-

1)-: not detected

isobutyl isopentanoate와 palmitic acid와 의 혼합으로 *B. subtilis* 에 대하여 상승효과를 보여 100% 저해하였다. benzoic acid와 palmitic acid와의 혼합으로 *E. coli*에 대하여 상승효과를 보였다.

Table 36. Antimicrobial activity of combined extract from 1+2 against of food spoilage microorganism

sample name	Conc. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Antimicrobial activity(%)				
		<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocyto genes</i>	<i>V. parahaemo lyticus</i>	<i>E. coli</i>
cetyl alcohol	1000					
+ methyl amyl ketone	1000	14.87	1)	3.16	21.30	-
cetyl alcohol	1000	-	-	-	-	-
	2000	-	-	-	43.84	-
methyl amyl ketone	1000	9.33	11.42	-	70.09	-
	2000	73.78	100.00	59.10	100.00	10.35

1)-: no activity

Table 37. Antimicrobial activity of combined extract from 1+3 against of food spoilage microorganism

sample name	Conc. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Antimicrobial activity(%)				
		<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocyto genes</i>	<i>V. parahaemo lyticus</i>	<i>E. coli</i>
cetyl alcohol	1000					
+ isobutyl isopentanoate	1000	93.08	97.67	96.43	57.99	100.00
cetyl alcohol	1000	-	-	-	-	-
	2000	-	-	-	43.84	-
isobutyl isopentanoate	1000	48.36	100.00	100.00	100.00	90.13
	2000	100.00	100.00	100.00	100.00	94.35

1)-: no activity

Table 38. Antimicrobial activity of combined extract from 2+3 against of food spoilage microorganism

sample name	Conc. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Antimicrobial activity(%)				
		<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>E. coli</i>
methy amy1 ketone	1000					
+	+	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
isobutyl isopentanoate	1000					
methy amy1 ketone	1000	9.33	11.42	-	70.09	-
	2000	73.78	100.00	59.10	100.00	10.35
isobutyl isopentanoate	1000	48.36	100.00	100.00	100.00	90.13
	2000	100.00	100.00	100.00	100.00	94.35

1)-: no activity

Table 39. Antimicrobial activity of combined extract from 1+4 against of food spoilage microorganism

sample name	Conc. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Antimicrobial activity(%)				
		<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>E. coli</i>
cetyl alcohol	1000					
+	+	44.60	7.17	21.84	69.38	24.16
benzoic acid	1000					
cetyl alcohol	1000	-	-	-	-	-
	2000	-	-	-	43.84	-
benzoic acid	1000	100.00	78.88	39.78	70.31	23.90
	2000	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

1)-: no activity

Table 40. Antimicrobial activity of combined extract from 1+5 against of food spoilage microorganism

sample name	Conc. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Antimicrobial activity(%)				
		<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>E. coli</i>
cetyl alcohol	1000					
+ palmitic acid	+	-	-	-	56.36	-
	1000					
cetyl alcohol	1000	-	-	-	-	-
	2000	-	-	-	43.84	-
palmitic acid	1000	-	-	-	11.77	-
	2000	-	-	-	15.00	-

1)-: no activity

Table 41. Antimicrobial activity of combined extract from 2+4 against of food spoilage microorganism

sample name	Conc. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Antimicrobial activity(%)				
		<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>E. coli</i>
methyl amyl ketone + benzoic acid	1000					
	+	100.00	48.57	72.53	100.00	83.99
	1000					
methyl amyl ketone	1000	9.33	11.42	-	70.09	-
	2000	73.78	100.00	59.10	100.00	10.35
benzoic acid	1000	100.00	78.88	39.78	70.31	23.90
	2000	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

1)-: no activity

Table 42. Antimicrobial activity of combined extract from 2+5 against of food spoilage microorganism

sample name	Conc. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Antimicrobial activity(%)				
		<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>E. coli</i>
methyl amyl ketone + palmitic acid	1000	10.79	-	-	100.00	10.19
methyl amyl ketone	1000	9.33	11.42	-	70.09	-
	2000	73.78	100.00	59.10	100.00	10.35
palmitic acid	1000	-	-	-	11.77	-
	2000	-	-	-	15.00	-

1)-: no activity

Table 43. Antimicrobial activity of combined extract from 3+5 against of food spoilage microorganism

sample name	Conc. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Antimicrobial activity(%)				
		<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>E. coli</i>
isobutyl isopentanoate + palmitic acid	1000	100.00	97.85	93.82	100.00	97.67
isobutyl isopentanoate	1000	48.36	100.00	100.00	100.00	90.13
	2000	100.00	100.00	100.00	100.00	94.35
palmitic acid	1000	-	-	-	11.77	-
	2000	-	-	-	15.00	-

1)-: no activity

Table 44. Antimicrobial activity of combined extract from 4+5 against of food spoilage microorganism

sample name	Conc. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Antimicrobial activity(%)				
		<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>E. coli</i>
benzoic acid	1000					
+	+	85.95	48.21	47.12	73.67	72.20
palmitic acid	1000					
benzoic acid	1000	100.00	78.88	39.78	70.31	23.90
	2000	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
palmitic acid	1000	-	-	-	11.77	-
	2000	-	-	-	15.00	-

1)-: no activity

Table 45. Antimicrobial activity of combined extract from 3+4 against of food spoilage microorganism

sample name	Conc. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Antimicrobial activity(%)				
		<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>E. coli</i>
isobutyl isopentanoate	1000					
+	+	100.00	100.00	100.00	37.28	100.00
benzoic acid	1000					
isobutyl isopentanoate	1000	48.36	100.00	100.00	100.00	90.13
	2000	100.00	100.00	100.00	100.00	94.35
benzoic acid	1000	100.00	78.88	39.78	70.31	23.90
	2000	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

1)-: no activity

이상의 결과로 볼 때 단일 화합물로는 항균력을 나타내지 않았으나 낮은 농도로 혼합하였을 때 항균력을 보이는 것으로 보아 이들 화합물들을 서로 혼합하여 사용할 때 낮은 농도로 상승효과를 기대할 수 있으리라고 본다.

제 4 장 참고문헌

1. 안은영, 신동화, 백남인, 오진아: 감초로부터 항균활성 물질의 분리 및 구조 동정. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 30(3), 680 (1998)
2. Stringer, D: Chilled food in the 1990s. *Food manufacture*, April, 39 (1990)
3. 김일환: 한국 식품 첨가물 생산 및 사용 현황과 국제적 동향. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 19(5), 519 (1990)
4. 식품위생관계법규: 지구문화사, 180 (1997)
5. 芝崎勳: 抗菌性 天然 添加物 開發の 現狀と 使用上 問題點. *New food industry*, 25, 28 (1986)
6. 신동화: 천연 항균성 물질의 연구 현황과 식품 가공에의 이용. *식품 과학과 산업*, 23(4), 68 (1990)
7. 이윤경: 계피와 정향에서 분리한 항균 활성 물질의 식품 부패 미생물 성장 억제효과. 숙명여자대학교 박사학위논문, 56 (1995)
8. Karapinar, M. and Aktug, S. E.: Inhibition of foodborne pathogens by eugenol, thymol, menthol and anethole. *Inter. J. Food Microbiol.*, 4, 161 (1987)
9. 김순임, 한영실: 산초로부터 항균성 화합물의 분리 및 동정. *Korean J. Soc. Food Sci.*, 13(1), February, 56 (1997)
10. 강신주, 이해성: 향신료의 항균작용에 관하여. 경북대학교 교육대학원 논문집, 8, 153 (1976)
11. 서권일, 박석규, 박정로, 김홍출, 최진상, 심기환: 겨자 가수 분해물의 항균성 변화. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 25(1), 129 (1996)
12. 강성구: 갖의 주 항균물질의 구조 분석. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 24(5), 702 (1995)

13. 여생규, 안철우, 김인수, 박영범, 박영호, 김선봉: 녹차, 오롱차 및 홍차 추출물의 항균효과. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 24(2), 293 (1995)
14. 박연희, 송현주: 김치에서 분리한 *Lactobacillus plantarum* Lp2의 항균작용. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 19(6), 637 (1991)
15. 김상교, 이상준, 백영진, 박연희: Bacteriocin을 생산하는 *Lactococcus* sp. HY 449의 분리와 항균특성. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 22(3), 259 (1994)
16. 김상교, 이상준, 백영진, 박연희: *Lactococcus* sp. HY 449가 생산하는 Bacteriocin의 *Lactobacillus fermentum* IFO 3023에 대한 억제 작용. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.*, 22(3), 266 (1994)
17. 박노동, 송경숙, 정인용: 강낭콩 잎에서 정제한 키틴 분해 효소의 항균 활성. *J. Korean Agric. Chem. Soc.*, 35(3), 191 (1992)
18. 원유정, 강희일, 이종욱, 정동효: 새로운 β -lactam계 항생물질 (YH-487)의 *in vitro* 항균 활성. *Agricultural Chemistry and Biotechnology*, 40(1), 23 (1997)
19. 김기은, 조문구: 천연 자원에서 추출한 키틴 함량과 키토산의 항균 활성. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.*, 22(6), 643 (1994)
20. 조순영, 유병진, 장미화, 이수정, 성낙주, 이용호: 수산 미이용 자원 중에 존재하는 항균성 물질의 검색. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 26(3), 261 (1994)
21. 김순임: 야생 식물의 첨가가 빵과 떡의 저장성 향상에 미치는 영향. 부경대학교 박사학위논문, 34 (1997)
22. 신동화, 한지숙, 김문숙: 방기 및 감초의 에탄올 추출물이 *L.*

- monocytogenes*의 증식 억제에 미치는 영향. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 26(5), 627 (1994)
23. 목종수, 김영목, 김신희, 장동석: 단삼 추출물의 항균 특성. *J. Fd Hyg. Safety*, 10(1), 23 (1995)
 24. 김태정: 약이 되는 야생초. 대원사, 16 (1991)
 25. 장준근: 암을 이기는 산나물 100선. (주)넥서스, 150 (1996)
 26. 육창수: 원색 한국 약용 식물도감. 아카데미서적, 552 (1989)
 27. 최영전: 산나물 재배와 이용법. 오성출판사, 252 (1991)
 28. 김태정: 우리가 정말 알아야 할 우리꽃 백가지. 현암사, 2 (1990)
 29. 홍석화: 한국의 토종 101가지. 웅진출판, 18 (1990)
 30. 최영전: 향과 약미, 향신료 식물백과. 오성출판사, 244 (1992)
 31. 원색 구황 식물 도감: 농촌진흥청 호남 시험장 (1998)
 32. 김일혁, 성환길: 약이 되는 풀과 나무. 중대출판사, 306 (1997)
 33. 장준근: 계절별로 보는 한국의 산야초. (주)넥서스, 267 (1996)
 34. 문관심: 약초의 성분과 이용. 일월서각, 560 (1991)
 35. 강인희: 한국식생활사. 삼영사, 57 (1979)
 36. 강인희, 이경복: 한국식생활풍속. 삼영사, 264 (1984)
 37. 정덕기: 한국 근대 농정사 연구. 형설출판사, 121 (1982)
 38. 김희선, 김숙희: 朝鮮 後期 飢饉 慢性化와 救荒食品 開發의 社會·經濟的 考察. *Korean J. Dietary Culture.*, 2(1), 82 (1987)
 39. 金春蓮: 救荒食品 調査研究 - 江原道 地方을 中心으로 -. 關大論文集 제11집(인문과학, 자연과학), 261 (1983)
 40. 이성우: 한국식경대전. 향문사, 405 (1981)
 41. 홍만선: 산림경제. 민족문화추진회, 고전국역총서 (1967)
 42. 신동화, 김문숙, 한지숙: 국내산 약용 식물 추출물에 대한 항균성

- 검색과 농도별 및 분획별 향균 특성. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 29(4), 808 (1997)
43. 김근영, 정동욱, 정희종: 어성초의 화학 성분 및 향미생물 활성. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 29(3), 400 (1997)
44. 장재권, 신용규, 이상호, 한은상, 이영춘: 저급지방산 모노글리세라이드와 아디핀산의 향균 작용에 관한 연구. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 29(5), 1038 (1997)
45. 김선재, 박근형: 부추의 향미생물 활성물질. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 28(3), 604 (1996)
46. Frank, M. R., Bernard, B. and Oktary, Y.: Chemical composition and fungitoxic properties to phytopathogenic fungi of essential oils of selected aromatic plants growing wild in Turkey. *J. Agric. Food Chem.*, 43, 2262 (1995)
47. Massaki, H. and Kubo, I.: Antibacterial agents from the Cashew *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae) Nut Shell Oil. *J. Agric. Food Chem.*, 39, 418 (1991)
48. Steven, F. V. and Gayland, F. S.: Antifungal activity of natural compounds against thiabendazole-resistant *Fusarium sambucinum* Strains. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 200 (1994)
49. 조성환, 서일권, 최종덕, 주인생: 수산물에 대한 grapefruit 종자 추출물의 향균 및 항산화 효과. *Bull Korean Fish. Soc.*, 23(4), 289 (1990)
50. 한지숙, 신동화, 윤세억, 김문숙: *Listeria monocytogenes*의 증식을 억제하는 식용 가능한 식물 추출물의 검색. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 26(5), 545 (1994)

51. 최종덕, 서일권, 조상환: Grapefruit 종자추출물의 항균성에 관한 연구. *Bull Korean Fish Soc.*, 23(4), 297 (1990)
52. 신동화, 한지숙, 안은숙: *Listeria monocytogenes*에 대한 천연 항균성 물질의 검색. *식품과학과 산업*, 26, 106 (1993)
53. 許才斗: 藥用作物の 利用과 今後の 製藥方向. 91輸入開放對策 70, 56 (1991)
54. 이정숙: 송엽과 송화의 성장에 따른 영양성분의 변화에 관한 연구. 한양대학교 석사학위논문, 35 (1980)
55. 황수진: 기능성 음료 개발. *식품과 위생*, 8, 56 (1995)
56. 국주희, 마승진, 박근형: 솔잎에서 향미생물 활성을 갖는 benzoic acid의 분리 및 동정. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 29(2), 204 (1997)
57. Freese, E., Sheu, C. W. and Gallier, S. E.: Function of lipophilic acids as antimicrobial food additives. *Nature*, 241, 321 (1973)
58. Fabian, F. W. and Graham, H. T.: Viability of thermophilic bacteria in the presence of varying concentration of acids, sodium chloride and sugars. *Food Technol*, 7, 212 (1953)
59. Cox, N. A., Mercuri, A. J., Juven, B. J., Thomson, J. E. and Chew, V.: Evaluation of succinic and heat to improve the microbiological quality of poultry meat. *J. Food Sci.*, 39, 985 (1974)
60. 국주희, 마승진, 박근형: 솔잎에서 향미생물 활성을 갖는 cinnamic acid의 분리 및 동정. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 29(4), 823 (1997)

61. Grove, O.: The preservative action of various spices and essential oils. Ann. Rept. Agr. and Hort. Reserch Sta., Long Ashton Bristol, England, 29 (1918)
62. 과학백과사전 출판사 편저: 약초의 성분과 이용. 일월서각, 서울, 216 (1994)
63. Okazaki, K. and Oshima, S.: Antibacterial activity of higher plant XXV: Antibacterial effect of essential oils VI. 藥學雜誌, 73, 690 (1953)
64. Ueda, S., Yamashita, H., Nakajima, M. and Kuwabara, Y.: Inhibition of microorganisms by spice extracts and flavoring compounds. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 29(2), 111 (1982)
65. Ueda, S., Yamashita, H. and Kuwabara, Y.: Inhibition of *Clostridium botulinum* and *Bacillus sp.* by spices and flavoring compounds. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 29(7), 389 (1982)
66. Larry, R. B. and David, A. G.: Antimicrobial occurring naturally in foods. *Food Technol.*, January, 134 (1989)
67. Kubo, I., Hisae, M. and Kubo, A.: Antibacteria activity of long-chain lcohols against *Streptococcus mutans*. *J. Agric. Food Chem.*, 41, 2447 (1993)
68. Kim, Y. S., Lee, J. H., Kim, M. N., Lee, W. G. and Kim, J. O.: Volatile flavor compounds from raw mugwort leaves and parched mugwort tea. *J. Korean Soc. Food Nutr*, 23, 261 (1994)
69. Farch, R. S., Daw, Z. Y. and Abo-Raya, S. H.: Influence of some spice essential oils on *Aspergillus parasticus* growth and production of aflatoxins in a synthetic medium. *J. Food Sci.*,

- 54, 74 (1989)
70. 김영숙, 김무남, 김정옥, 이종호: 쑥의 열수추출물과 주요 향기 성분이 세균의 생육에 미치는 영향. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 23(6), 994 (1994)
71. 안병용: 쑥으로부터 추출한 정유의 항균효과. *The Korean Journal of Food Hygiene*, 7(4), 157 (1992)
72. 이병완, 신동화: 식품 부패미생물의 증식을 억제하는 천연 항균성 물질의 검색. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 23(2), 200 (1991)
73. 이병완, 신동화: 식품 부패미생물에 대한 천연 항균성 물질의 농도별 및 분획별 항균 특성. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 23(2), 205 (1991)
74. 마승진, 고병섭, 박근형: 두릅수피에서 항미생물 활성을 갖는 3,4-dihydroxybenzoic acid의 분리. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 27(5), 807 (1995)
75. 마승진, 국주희, 고병섭, 박근형: 두릅수피에서 항미생물 활성을 갖는 3,4-dihydrocinnamic acid의 분리. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 28(3), 600 (1996)
76. 김선재, 박근형: 부추추출물의 김치발효 지연 및 관련 미생물 증식 억제. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 27(5), 813 (1995)
77. Al-Delaimy, K. S. and Ale, S. H.: Antibacterial action of vegetable extracts on the growth of pathogenic bacteria. *J. Sci. Food Agric.*, 21, 110 (1970)
78. 이진희, 조영, 황인경: 김치 부재료가 젖산균 생육에 미치는 영향. *Korean J. Soc. Food Sci.*, 11(5), 511 (1995)
79. 박옥연, 김영목, 김신희, 장동석: 상백피 추출물의 항균력 및 최적

- 추출 조건 검토. *J. Fd Hyg. Safety*, 10(3), 139 (1995)
80. 박옥연, 김신희, 김지희, 김용관, 장동석: 상백피 추출물로부터 향균성 물질의 분리 정제. *J. Fd Hyg. Safety*, 10(4), 225 (1995)
81. 정동욱, 정지흔: 영지의 항균성 물질에 관한 연구. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 24(6), 552 (1992)
82. Kurita, N., Miyaji, M., Kurane, R., Takahara, Y. and Ichimura, K.: Antifungal activity and molecular orbital energies of aldehyde compounds from oils of higher plants. *Biol. Chem.*, 43, 2365 (1979)
83. 강수철, 문영희: 봉선화의 항균활성성분과 항균력에 관한 연구. *Kor. J. Pharmacogn.*, 23(4), 240 (1992)
84. 김홍식, 조광현: 篇蓄 抽出物の 抗真菌作用에 관한 研究. *Kor. J. Mycol.*, 8(1), 1 (1980)
85. 박옥연, 장동석, 조학래: 한약재 추출물의 항균 효과. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 21(1), 91 (1992)
86. 목종수, 박옥연, 김영목, 장동석: 용매와 추출조건에 따른 단삼 추출물의 항균력. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 23(6), 1001 (1994)
87. Nakamura, S., Kato, A. and Kobayashi, K.: New antimicrobial characteristics of lysozyme dextran conjugate. *J. Agric. Food* 39, 647 (1991)
88. 김미정, 변명우, 장명숙: 대나무(신의대)잎의 생리활성 및 항균성 효과. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 25(1), 135 (1996)
89. 정대균, 유리나: 김치 발효미생물에 대한 대나무잎 추출물의 항균력. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 27(6), 1035 (1995)
90. Gray, M. L. and Killinger, A. H.: *Listeria monocytogenes* and

- listeria infections. *Bacterial. Rev.*, 3, 309 (1966)
91. Park, J. R. and Marth, E. H.: Listeriosis and *Listeria monocytogenes*. *Kor. J. Appl. Microbial. Bioeng.*, 17(6), 634 (1989)
92. 김성환, 김남재, 최재수, 박종철: 꾸지뽕나무 잎의 생리 활성 및 HPLC에 의한 성분의 정량. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 22(1), 68 (1993)
93. 박승우, 우철주, 정신교, 정기택: 환삼덩굴의 용매 분획별 항균성 및 항산화성. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 26(4), 464 (1994)
94. 차배천, 이해원, 최무영: Nut류의 항산화 및 항균 효과. *Kor. J. Pharmacogn.*, 29(1), 28 (1998)
95. 홍남두, 노영수, 김남재, 김진식: 楡白皮의 藥效研究. *Kor. J. Pharmacogn.*, 21(3), 217 (1990)
96. 藏多一哉: 海藻 抗生物質 海洋 生化學資源. 6章, 日本水産 學會 篇, 恒生社厚生閣, 東京, 80 (1979)
97. Mautner, H. G., Gardner, G. M. and Pratt, R.: Antibiotic activity of seaweed extracts-II. *Rhodomela larix*. *J. Am. Pharm. Assoc.*, 42, 294 (1953)
98. 齊藤要, 鮫島宗雄: 해조 성분의 항균성에 대하여. *농예화학회지*, 29, 427 (1956)
99. Glombitza, K. W., Rosener, H. V., Vilter, H. and Rauwald, H. W.: Antibiotica aus algen 8. Mitt. Phloroglucin aus vbraunalgen. *Planta Med.*, 24, 301 (1973)
100. 김세진: 파래로부터 식품 부패미생물에 대한 항균활성 물질의 분리, 동정 및 항균특성에 관한 연구. 숙명여자대학교 석사학위논문,

- 60 (1998)
101. 김수현, 임상빈, 고영환, 오창경, 오명철, 박제석: 추출 용매에 따른 풋 추출물의 수율 및 항균성 검정. *Bull Korean Fish Soc.*, 27(5), 462 (1994)
 102. 이향희, 마승진, 문제학, 박근형: 백두옹에서 향미생물 활성을 갖는 4-Hydroxy-3-methoxycinnamic acid와 3,4-Dihydroxycinnamic acid의 분리 및 동정. *Agricultural Chemistry and Biotechnology*, 41(2), 191 (1998)
 103. Budavari, S., O'Neil, M. J., Smith, A., Heckeman, P. E. and Kinneary, J. F.: *The Merck Index*. 12th, 5888 (1996)
 104. 장대식, 박기훈, 최상욱, 남상해, 양민석: 구절초 꽃의 항균성 물질. *Agricultural Chemistry and Biotechnology*, 40(1), 85 (1997)
 105. 양민석, 하영래, 남상해, 최상욱, 장대식: 국내 자생 식물의 항균 활성. *Agricultural Chemistry and Biotechnology*, 38(6), 584 (1995)
 106. 이용억, 김정균: 食用救荒植物의 利用(II). *明大論文集* 제9집, 667 (1976)
 107. 옥창수: 藥用植物資源의 開發方向. '91輸入開放對策 70, 49 (1991)
 108. 이용억, 김춘희, 김춘연: 나문재의 救荒食品으로서의 利用 價値에 관한 研究(I)-成分組成과 흰쥐에 대한 營養效果-. *明大論文集* 제10집, 699 (1977)
 109. 황진봉, 양미옥, 신현경: 약초 중의 일반성분 및 무기질 함량 조사. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 29(4), 671 (1997)
 110. 박종숙, 이원종: 산채류의 식이섬유 함량과 물리적 특성. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 23(1), 120 (1994)

111. 한복진, 이선화, 신현경: 산채류가 장내세균의 *In Vitro* 생육에 미치는 영향. *Korean J Nutrition*, 27(7), 717 (1994)
112. 최장경, 정옥화: 비름과 식물즙액에 의한 속의 감염 억제 효과. *한국식물보호학회지*, 23(3), 137 (1984)
113. 박종성, 甲元啓介, 西村正陽: 식물병원균에 대한 몇가지 저급지방산의 항균 특성. *한국식물병리학회지*, 2(2), 89 (1986)
114. 백수봉, 오연선: 토양병원균 *Pythium ultimum* 방제를 위한 항균성 약용 식물의 탐색. *Kor. J. Mycol.*, 18(2), 102 (1990)
115. 강삼식: 藥用植物 有效成分 研究現況과 今後展望. '91輸入開放對策, 70, 64 (1991)
116. Han, B. H., Park, M. H. and Han, Y. N.: Studies on the antioxidant components of Korean Ginseng(III). Identification of phenolic acids. *Arch. Pharm. Res*, 4, 53 (1981)
117. Ahn, B. Z. and Kim, S. I.: Antineoplastic natural products and the analogues IV. Panaxydol, the cytotoxic principle of *Panaxginseng* Root against L1210 cell. *Arch. Pharm. Res.*, 8, 283 (1985)
118. Kim, S. I., Kang, K. S., Kim, H. and Ahn, B. Z.: Panaxyne, a new cytotoxic polyene from *Panax ginseng* root against L1210 cell. *Kor. J. Pharmacogn.*, 20, 71 (1989).
119. Kim, S. I., Kang, K. S. and Lee, Y. H.: Panaxyne epoxide, a new cytotoxic polyene from *Panax ginseng* root against L1210 cells. *Arch. Pharm. Res.*, 12, 48 (1989)
120. Choi, J. S., Park, S. H. and Kim, I. S.: Studies on the active principles of wild vegetable on biotransformation of drug. *Kor.*

- J. Pharmacogn.*, 20, 117 (1989)
121. Han, Y. N., Noh, D. B. and Han, D. S.: Studies on the monoamine oxidase inhibitors of medicinal plants I. Isolation of MAO-B inhibitors from *Chrysanthemum indicum*. *Arch. Pharm. Res.*, 10, 142 (1987)
122. Kang, S. S., Kim, J. S., Kwak, W. J. and Kim, K. H.: Flavonoids from the leaves of *Gingko biloba*. *Kor. J. Pharmacogn.*, 21, 111 (1990)
123. 주현규: 산수유와 구기자를 이용한 국산 전통차 개발에 관한 연구. *Korean J. Dietary Culture.*, 3(4), 377 (1988)
124. 이철호, 김선영: 한국 전통음료에 관한 문헌적 고찰 I. 전통 음료의 종류와 제조방법. *Korean J. Dietary Culture*, 6(1), 43 (1991)
125. Klindworth, K. J., Davidson, D. M., Brekke, C. J., Brekke, A. L. and Branen, A. L.: Inhibition of *Clostridium perfringens* by butylated hydroxyanisole. *J. Food Sci.*, 44(2), 564 (1979)
126. 문범수: 식품첨가물. 수학사, 서울, 74 (1989)
127. Speck, M. L.: Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Am. Pub. Health, ASSOC., Washington, D. C., 62, 184 (1984)
128. Atras, R. M., Parks, L. C. and Brown, A. E.: Experimental microbiology. Determining numbers of microorganisms in a sample. Mosby-Year Book, Inc., 119 (1995)
129. Meilgaard, M., Civille, G. V. and Carr, B. T.: Sensory evaluation techniques. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 21 (1991)

130. SAS/STAT Guide for personal computers, SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, 60 (1987)
131. 이승욱: 통계학의 이해. 자유아카데미, 203 (1991)
132. Davidson, P. M. and Parish, M. E.: Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. *Food Technol.*, January, 148 (1989)
133. Farag, R. S., Daw, Z. Y., Hewidi, F. M. and El-Baroty, G. S. A.: Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. *J. Food Prot.*, 52, 665 (1989)
134. Lemos, T. L. G., Matos, F. J. A., Alencar, J. W., Craveiro, A. A., Clark, A. M. and McCheesney, J. D.: Antimicrobial activity of essential oils of Brazilian plants. *Phytother. Res.*, 4(2), 82 (1990).
135. Kim, J. M., Marshall M. R. and Wei, C. I.: Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. *J. Agric. Food Chem.*, 43, 2839 (1995)
136. 김동훈: 식품화학. 탐구당, 794 (1990)
137. Dziezak, J.D: Preservatives: Antimicrobial agents - A means toward product stability. *Food Technol.*, 41, 104 (1986)
138. Farag, R. S., Daw, Z. Y. and Abo-rya, S. H.: Influence of some spice essential oils on *A. paragiticus* growth and production of aflatoxins in a synthetic medium. *J. Food Science*, 54(1), 74 (1989)
139. 정창기, 박완규, 유익제, 박기문, 최춘언: 카레 향신료 정유 성분의 항균성. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 22(6), 716 (1990)

140. Karapinar, M.: Inhibitory effects of anethole and eugenol on the growth and toxin production of *Aspergillus parasiticus*. *Inter. J. Food Microbiol.*, 10, 193 (1993)
141. 안은숙, 김문숙, 신동화: 식용식물로부터 얻은 추출물의 두부, 어묵, 막걸리 변질균에 대한 항균성 검색. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 26(6), 733 (1994)
142. 남상해, 양민석: 산국추출물의 항균력. *Agricultural Chemistry and Biotechnology*, 38(3), 269 (1995)
143. 강성구: 갖의 항균 물질의 분리 및 항균성. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 24(5), 695 (1995)
144. 장대식, 남상해, 최상욱, 양민석: *Chrysanthemum*屬 식물의 항균성. *Agricultural Chemistry and Biotechnology*, 39(4), 315 (1996)
145. 박석규, 박정로, 이상원, 서권일, 강성구, 심기환: 돌산갓 전처리 추출물의 항균 활성 및 열 안정성. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 24(5), 707 (1995)
146. Fischer, J. R., Fletcher, D. L., Cox, N. A. and Bailey, J. S. : Microbiological properties of hard cooked eggs in a citric acid based preservative solution. *J. Food Prot.*, 48, 252 (1985)
147. 世貝, 直井, 岡田 : 食品衛生化學物質マニュアル. 中央法規出版, 19 (1985)
148. 문범수 : 식품위생학. 신광출판사, 390 (1997)
149. 장지현, 문범수, 김교창 : 식품위생학. 수학사, 252 (1995)
150. Pouchert, C. J., Campbell, J. R. : The Aldrich Library of NMR spectra, 78 (1979)
151. Jay, J. M. : Food preservation with chemicals. In "Modern Food

- Microbiology". 3rd ed., Van Nostrand Reinhold Co., New York, 257(1986)
152. Kabara, J. J. : Medium-chain fatty acids and esters. In "Antimicrobials in Foods". ed. Branen, A. L. and Davidson, P. M. Marcel Dekker, Inc., New York, 109 (1983)
153. Lindsay, R. C. : Food additives In "Food Chemistry". 2nd ed., Fenemma, O. R., Marcel Dekker, Inc., New York, 115 (1973)
154. 송종호, 권혁동, 이원구, 박인호 : 청미래덩굴 뿌리에서 추출한 순차 분획물의 항균 활성과 성분 분석. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 27(4), 574(1998)
155. 안은영, 신동화, 백남인, 오진아 : 고삼으로부터 항균활성 물질의 분리 및 구조 동정. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 30(3), 672 (1998)

한국전통구황식물로부터 면역능을 갖는 기능성
생리활성물질의 탐색 및 면역활성증강효과 규명

제 1 장 서 론	157
제 2 장 연구개발의 내용 및 범위	159
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과	167
제 1 절 구황식물의 메탄올 추출 및 계통별 추출물 획득	167
제 2 절 구황식물 추출물과 비장세포 증식능	169
1. 비장세포 증식능 관찰을 위한 조건 확립	169
2. 구황식물 추출물들의 세포독성 측정	169
3. 메탄올 추출물이 비장세포증식능에 미치는 영향 검색	172
4. 추출물의 분획별 첨가가 비장세포증식에 미치는 영향 검색	173
제 3 절 구황식물 메탄올 추출물과 cytokine 분비능	177
1. 추출물의 세포 독성	177
2. 메탄올 추출물의 in vitro 대식세포 활성 증진능 비교	179
3. 구황식물 분획별 추출물과 cytokine 분비능	185
제 4 장 참고문헌	204

제 1 장 서 론

구황식물은 식품으로 섭취할 뿐만 아니라, 경험적 지식의 축적을 바탕으로 그 약리적인 효능이 인지되어 약재로도 사용되어져 왔다. 이런 약리작용이 있는 구황식물의 효력에 대하여 경험적으로 알려진 바를 현대 과학적 방법을 통해 효능을 입증하려는 연구가 이루어지고 있는데, 특히 다양한 생리활성 기능에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 또한, 최근 급속한 노인 인구 증가로 인해 노인성 질환의 심각성이 대두되고 있으며, 만성 퇴행성 질병의 발생률이 증가하면서 질병 발생 후의 치료보다는 예방의 한 방법인 인체의 면역 기능을 강화시켜 질병에 대한 저항성을 높이는 것에 많은 관심이 모아지고 있다. 더욱이 매일 섭취함으로써 안전성이 확인되고 지속적인 효과를 기대할 수 있는 식품 소재들로부터 생체 방어 능력을 증강시킬 수 있는 식품 및 식품성분을 찾아내려는 연구가 활발히 진행되고 있고, 기능성 식품이라는 새로운 개념이 식품 산업에 강조되게 되었다. 본 연구에서는 생체 방어 능력을 증강시킬 수 있는 식품 소재 개발에 대한 연구의 일환으로, 자연계에 널리 분포하고 식용이나 약용으로 이용되고 있는 17가지 한국 전통구황식물의 면역증강효과를 살펴보았다.

우리나라에서 서식하는 백작약, 어성초, 쇠비름, 속단, 참취 등 17종의 구황식물을 채취 methanol 추출물을 이용하여, 마우스 비장세포 증식능 및 복강대식세포에 의한 cytokine(IL-1 β , IL-6, TNF- α) 분비능을 지표로 하여 면역증강능을 측정하였다. 이 중 면역증강효과를 보이는 구황식물의 methanol 추출액은 hexane, chloroform, ethylacetate, n-butanol, 증류수 등으로 순차적으로 계통분획하여 각

획분을 *in vitro* 세포실험에 이용하였다. *In vitro* 실험에서 면역증강 효과가 있는 것으로 판단된 백작약, 어성초, 쇠비름, 속단, 참취 등 5 가지 시료에 대해서는 *in vivo* 실험을 실시하여 실제 생체내에서의 면역증강효과를 측정하였다.

제 2 장 연구개발의 내용 및 범위

제 1 절 재료

1. 구황식물

실험에 사용되는 구황식물은 우리나라 전역에서 1997년 4월 ~ 9월에 채취하여 건조시킨 것과 1998년 3월 채취한 것을 서울 경동시장에서 구입하여 시료로 사용하였고, Table 1과 같다.

2. 실험동물

본 실험에 사용된 동물은 수컷 ICR mouse로서 생후 6주 내외, 체중 30g 내외의 것을 한국식품의약품 안전청으로부터 구입하였다. 실험에 사용하기 전까지 온도는 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도는 55-60%로 유지되며 light and dark cycle 이 12시간 단위로 조절되는 실험동물실에서 고형사료와 물을 자유급식하도록 하였다.

제 2 절 시료추출

우리나라에서 서식하는 백작약, 어성초, 쇠비름, 숙단, 참취 등 17종의 구황식물을 채취, 수세하여 이물질을 제거한 후 진공동결건조기에서 건조시켜 200mesh 이하가 되도록 마쇄한 후 95% methanol로 환류 냉각시키면서 80°C 수욕상에서 3시간씩 3회 반복 추출한 후 감압 농축하여 추출물을 얻었다. 이 중 면역증강효과를 보이는 구황식물의 methanol 추출액은 hexane, chloroform, ethylacetate, n-butanol, 증류수 등으로 순차적으로 계통분획하여 각 획분을 in vitro 세포실험에 이용하였다.

Table 1. 구황식물의 효능 및 주요성분

구황식물명	학 명	효 능	성 분	개화기
닭의장풀	<i>Commelina communis</i> L.	해열, 해독, 이뇨, 소종	flavonoid-Aobanin	6-9월
전호	<i>Anthriscus sylverstris</i> HOFFM.	해열, 거담, 진해, 진정	anthritine, α -pinene, d-limonene, isoanthritine	5-6월
속단	<i>Phlomis umbrosa</i> TURCZ	해열, 소종, 종기	unknown	5-6월
어성초	<i>Houttuynia cordata</i> THUNB.	해열, 소염, 해독	Myrcene, Quercitrin, Capric acid, Lauryaldehyde	7월
박하	<i>Mentha canadensis</i>	해열, 종기, 부스럼, 충혈	menthol, menthon, limonen	7-9월
차조기	<i>Perilla frutescens</i>	해열, 거담, 해독	perillaldehyde, limonene, cyanin, perilla ketone	8-9월
방아	<i>Agastache rugosa</i> KUNTZ	소화, 건위, 지사, 지토, 진통	estragole, α -pinene, p-methoxycinnamaldehyde,	8-10월
백작약	<i>Paeonia japonica</i> 1	진통, 해열, 진경, 조혈	안식향산, asparagin	5-6월
당귀	<i>Angelica gigas</i> NAKAI	보혈, 진정, 조경	각종 배당체	8-9월
쇠비름	<i>Portulaca oleracea</i> L.	해열, 이뇨, 소종	Dopamin, Noradrenarin	6월-가 을
민들레	<i>Taraxacum platycarpum</i> DAHLST	해열, 이뇨, 건위, 소염	taraxerol, lurein, 4-taraxasterol	4-6월
질경이	<i>Plantago asiatica</i> L.	잎, 씨-이뇨, 해열	plantaginin, aucubin	6-8월
참취	<i>Aster scaber</i> THUNB	진통, 해독, 혈액순환촉진	unknown	8-10월
달래	<i>Allium monanthum</i> MAX	보혈, 신경안정, 살균	마늘에 함유된 성분으로 추추	4월
참나물	<i>Spuriopinella</i> <i>bracycarpa</i> KITAGAWA	지혈, 대하, 해열, 고혈압	unkown	6-7월
원추리	<i>Hemerocallis fulva</i> L.	소종, 이뇨	arigine, adenin, cholin	6-7월
썩바귀	<i>Ixeris dentata</i> NAKAI	해열, 건위, 조혈	germanicum	5-7월

제 3 절 In vitro experiment

1. 마우스 비장세포 증식능

가. 마우스 비장세포의 분리 및 배양

ICR mouse를 경추 탈구법으로 희생시킨 뒤 비장을 무균적으로 적출하여 RPMI 용액으로 비장세포를 유리시키고, 200mesh stainless steel sieve를 통과시켜 세포 debris를 제거하였다. 이 세포 부유액을 50ml 원심관에 옮겨 4°C, 1,500rpm에서 10분간 원심 침전시켜 cell pellet을 얻은 후, RPMI로 원심세척한 다음 증류수와 Tris-buffered ammonium chloride(0.87% NH₄Cl, pH 7.2)에 현탁시켜 5분간 처리하여 적혈구를 제거하였다. RPMI로 2회 원심세척한 후, 모아진 비장세포를 10% FBS가 첨가된 RPMI 1640에 분산시켜 trypan blue로 염색한 후 hemacytometer를 사용하여 세포수를 측정하였다. 그 후, 5.0×10^6 cells/ml 농도로 비장세포를 재부유시켜서 96-well plate에 분주한 후 세포증식능 측정에 사용하였다.

나. 세포증식능 측정 - MTT assay법

마우스 비장세포의 증식능은 MTT assay를 이용하여 측정하였다. MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; Sigma; 5mg/ml in saline) assay는 세포독성(cytotoxicity) 뿐만 아니라, 생세포수(viability), 세포증식능(proliferation) 등을 측정하는데 자주 이용되며, 원리로는 생존세포의 미토콘드리아에 있는 탈수소효소(dehydrogenase enzyme)에 의해 수용성의 황색물질인 MTT용액이 비수용성의 질푸른 formazan으로 전환되므로 이 때 생성된 formazan의 양은 생존세포수에 정비례함을 이용한 것이다.

각 구황식물의 추출물을 1% DMSO(cell culture-용)용액에 0.1~

10mg/ml의 농도가 되도록 조제하고 96-well plate의 각각의 well에 10 μ l씩 가하여 최종농도가 1~1,000 μ g/ml이 되도록 하였다.

마우스 비장세포 조제법에 의해 만들어진 비장세포 현탁액을 1 \times 10⁶ cells/ml이 되도록 보정하여 96 well plate에 90 μ l/well을 가하였다. mitogen으로 각 well당 T 세포를 증식시키는 ConA 또는 B 세포를 증식시키는 LPS 또는 여러농도의 추출물들을 10 μ l씩 가한 후, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에 넣어 24시간 또는 48시간동안 배양하였다. 배양 후, 10 μ l의 MTT를 각 well에 가한 후 알루미늄 포일로 밀폐하여 4시간동안 incubation시켜서 formazan crystal 형성을 유도하였다. plate를 1000rpm에서 5분간 원심하여 상층을 조심스럽게 제거한 후, formazan crystal을 용해하기 위해 150 μ l의 DMSO를 가하여 20분간 흔들어서 완전 용해시킨 다음, microplate spectrophotometer를 이용하여 540nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 마우스 비장세포 증식능은 다음의 공식에 의해서 계산하였다.

$$Proliferation(\%) = \left(\frac{\text{sample의 흡광도}}{\text{control의 흡광도}} - 1 \right) \times 100$$

2. 마우스 복강 대식세포의 cytokine 분비능

가. 마우스 복강대식세포의 분리 및 배양

마우스 복강내에 4% thioglycollate(Sigma) 2ml를 주사하여 3일간 복강내에 대식세포가 모이게 한다. 주사 후 3일 뒤 경추탈골법으로 마우스를 희생시킨 후 복부를 열어서 RPMI-1640으로 복강을 세척한 후 4 $^{\circ}$ C에서 멸균처리된 시험관에 수집한다. 1,500 rpm에서 10분간 원심분리 시킨 후 대식세포의 cell pellet을 얻는다. 위에서 얻은 cell pellet을 Tris-buffered ammonium chloride(0.87% NH₄Cl, pH 7.2)에 현탁시켜 5분간 처리하여 적혈구를 제거한다. 적혈구를 제거

한 cell pellet을 4℃ 3,000rpm에서 10분간 원심세척한 후 fetal bovine serum(FBS) 10%를 함유하는 RPMI-1640에 부유시켜 96-well plate의 한 well(100 μ l)당 1 \times 10⁶cell/ml이 되도록 3회 반복하여 분주한다. 5% CO₂ incubator에서 2시간 배양한 후 배양액을 교환하여 배양용기 표면에 부착되지 않은 세포는 제거하고 부착된 대식세포만 실험에 사용하였다.

나. 추출물들의 세포독성 측정

대식세포에 대한 추출물의 세포 독성은 MTT assay를 이용하여 측정하였다. 결과는 대조군의 세포 생존율에 대한 백분율로 나타내었다. 즉, 96well plate에 1 \times 10⁶cell/ml의 복강대식세포를 분주하고 각 농도의 시료 추출물 10 μ l를 넣은 후 37℃, 5% CO₂ incubator에 넣어 48시간 동안 배양하였다. 배양한 각 well에 10 μ l의 MTT(5mg/ml in PBS)를 가한 후, 알루미늄 포일로 밀폐하여 4시간동안 incubation시켜서 formazan crystal 형성을 유도하였다. Plate를 1,000rpm에서 5분간 원심하여 상층을 조심스럽게 제거한 후, formazan crystal을 용해하기 위해 150 μ l/well의 DMSO를 가하여 20분간 흔들어 완전 용해시킨 다음, microplate spectrophotometer를 이용하여 540nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 이렇게 하여 얻어진 흡광도의 상대적인 값을 비교하여 세포독성을 측정하였다.

다. In vitro 대식세포 활성화 증진능 측정

추출물에 의해 활성화된 대식세포의 면역능의 측정은 각각의 구황 식물 추출물을 첨가한 마우스 대식세포 배양 상층액을 가지고 cytokine (TNF- α , IL-1 β , IL-6) 를 각각 측정하였다. 준비한 마우스 복강 대식

세포를 24well plate에 1×10^6 cell/ml씩 분주하고 각 농도의 시료 추출물 $100 \mu\text{l}$ 를 넣은 후 37°C , 5% CO_2 incubator에 넣어 48시간동안 배양하여, 배양 상층액을 분리하여 TNF- α , IL-1 β , IL-6 생성량을 측정하였다.

1) IL-1 β 의 생성량 측정

복강대식세포 배양액의 IL-1 β (interleukine-1 β) 함량은 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)를 통해 측정하였다. 즉, anti-mIL-1 β 단일 클론 항체가 코팅된 microtiter plate에 세포와 추출물을 첨가하여 배양시킨 배양액 $100 \mu\text{l}$ 와 mu IL-1 β antibody $25 \mu\text{l}$ 를 각 well에 넣고 acetate plate sealer로 plate를 덮어서 실온에서 3시간동안 배양한 후, mu IL-1 β conjugate를 $25 \mu\text{l}$ 씩 넣어서 30분간 실온에서 배양하였다. 배양한 plate를 세척용 완충용액으로 5회 세척하고나서 Streptavidin-Alkaline Phosphatase $50 \mu\text{l}$ 씩을 넣고 30분간 다시 배양한 후 다시 5회 세척한다. 각 well에 substrate solution을 $50 \mu\text{l}$ 씩 넣고 실온에서 20분간 발색반응을 시킨 후 Amplifier Solution을 $50 \mu\text{l}$ 씩 가해 반응을 정지시켰다. 반응 정지 후 5분 이내에 ELISA reader로 490nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 IL-1 β 로 작성한 표준 곡선을 이용하여 각 well 당 IL-1 β 농도를 계산하였다.

2) IL-6의 생성량 측정

복강대식세포 배양액의 IL-6(interleukin-6) 함량은 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)를 통해 측정하였다. 즉, anti-mIL-6 단일 클론 항체가 코팅된 microtiter plate에 세포와 추출물을 첨가하여 배양시킨 배양액 $100 \mu\text{l}$ 와 mu IL-6 antibody $25 \mu\text{l}$ 를

각 well에 넣고 acetate plate sealer로 plate를 덮어서 실온에서 3 시간동안 배양한 후, mu IL-6 conjugate를 25 μ l씩 넣어서 30분간 실온에서 배양하였다. 배양한 plate를 세척용 완충용액으로 5회 세척하고 나서 Streptavidin-Alkaline Phosphatase 50 μ l씩을 넣고 30분간 다시 배양한 후 다시 5회 세척한다. 각 well에 substrate solution을 50 μ l씩 넣고 실온에서 20분간 발색반응을 시킨 후 Amplifier Solution을 50 μ l씩 가해 반응을 정지시켰다. 반응 정지 후 5분이내에 ELISA reader로 490nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 IL-6로 작성한 표준 곡선을 이용하여 각 well 당 IL-6 농도를 계산하였다.

3) TNF- α 의 생성량 측정

복강대식세포 배양액의 TNF- α (tumor necrosis factor- α) 함량은 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)를 통해 측정하였다. 즉, anti-mTNF- α 단일 클론 항체가 코팅된 microtiter plate에 세포와 추출물을 첨가하여 배양시킨 배양액 100 μ l와 mu TNF- α antibody 25 μ l를 각 well에 넣고 acetate plate sealer로 plate를 덮어서 실온에서 3시간동안 배양한 후, mu TNF- α conjugate를 25 μ l씩 넣어서 30분간 실온에서 배양하였다. 배양한 plate를 세척용 완충용액으로 5회 세척하고 나서 Streptavidin-Alkaline Phosphatase 50 μ l씩을 넣고 30분간 다시 배양한 후 다시 5회 세척한다. 각 well에 substrate solution을 50 μ l씩 넣고 실온에서 20분간 발색반응을 시킨 후 Amplifier Solution을 50 μ l씩 가해 반응을 정지시켰다. 반응 정지 후 5분이내에 ELISA reader로 490nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 TNF- α 로 작성한 표준 곡선을 이용하여 각 well 당 TNF- α 농도를 계산하였다.

제 4 절 In vivo animal diet study

1. 구황식물의 선별 및 시료 처리

위에서 선별한 17종의 구황식물 중 면역증강효과가 보인 7가지 시료를 선정, 계통별 추출물을 이용하여 in vitro 실험을 실시하였고, 이 중 속단, 쇠비름, 어성초, 백작약, 참취 등 5가지 시료의 에탄올 및 열수 추출물을 이용하여 in vivo animal diet study를 실시하였다.

가. 에탄올 추출 및 열수추출

시료를 40℃에서 건조시킨 후 분쇄하여 일정량을 취한 후 에탄올 추출물과 열수추출물을 얻었다. 속단은 10배의 70% 에탄올을 용매로 80℃에서 3시간씩 3회 환류냉각시켜서 에탄올 추출물을 얻었다. 물층에서 강한 면역증강효과를 보인 백작약, 쇠비름, 어성초, 참취는 에탄올 추출물과 동일한 방법으로 하여 열수추출물을 얻었다. 이들 추출물을 여과하여 농축시켜 in vivo animal diet study에 이용하였다.

2. 식이의 경구투여

실험 동물은 6주령 ICR male mouse로 고형 배합사료로 일주일의 적응기간을 거친 후, 각 군당 6마리씩 선정하여 각 추출물 첨가군으로 나누었다. 속단, 백작약, 어성초, 쇠비름, 참취의 ethanol 추출물 및 열수 추출물은 생리식염수에 20, 100, 500, 1,000, 2,000mg/kg의 농도가 되도록 녹여서 투여하였다. 투여 기간 및 회수는 pilot study의 결과에 따라서 0.2ml씩 2주간 격일로 경구투여 하였고, 대조군은 생리식염수 0.2ml를 투여하였다. 마지막 투여 1일 후에 마우스를 희생시켜 비장세포 증식능과 마우스 복강대식세포 배양상층액에 의한 cytokine 분비능을 위와 동일하고 동일한 방법으로 실시하였다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 구황식물의 메탄올 추출 및 계통별 추출물 획득

우리나라에서 서식하는 닭의장풀, 전호, 속단, 어성초, 박하, 차조기, 방아, 백작약, 참취, 당귀, 쇠비름, 민들레, 질경이, 달래, 참나물, 원추리, 씀바귀의 17가지 구황식물을 구입, 수세하여 이물질 제거한 후 진공동결건조기에서 건조시켜 200mesh 이하가 되도록 마쇄하였다. 이것을 95%의 methanol로 가열 추출한 후 감압농축하여 각각의 methanol extract을 획득하였고, 건시료에 대한 methanol extract의 무게 비율(수율)은 Table 2 에 제시한 바와 같다.

Table 2. Yield of methanol extract from wild plants

sample name	Scientific name	Yield (%)
닭의장풀	<i>Commelina communis</i> L.	11.57%
전호	<i>Anthriscus sylverstris</i> HOFFM.	7.55%
속단	<i>Phlomis umbrosa</i> TURCZ	19.14%
어성초	<i>Houttuynia cordata</i> THUNB.	15.79%
박하	<i>Mentha canadensis</i> var. <i>piperascens</i> HARA	17.47%
차조기	<i>Perilla frutescens</i> var. <i>acuta</i> KUDO	12.46%
방아	<i>Agastache rugosa</i> KUNTZ	14.18%
백작약	<i>Paeonia japonica</i> var. <i>pilosa</i> NAKAI	15.05%
참취	<i>Aster scaber</i> THUNB	13.80%
당귀	<i>Angelica gigas</i> NAKAI	35.44%
쇠비름	<i>Portulaca oleracea</i> L.	18.11%
민들레	<i>Taraxacum platycarpum</i> DAHILST	11.35%
질경이	<i>Plantago asiatica</i> L.	14.20%
달래	<i>Allium monanthum</i> MAX	18.45%
참나물	<i>Spuriopinella bracycarpa</i> KITAGAWA	35.81%
원추리	<i>Hemerocallis fulva</i> L.	14.71%
씀바귀	<i>Ixeris dentata</i> NAKAI	19.08%

전호의 수율은 7.55%이고, 닭의장풀, 민들레, 차조기는 11.35%~12.46%, 원추리, 질경이, 달래, 씬바귀, 속단, 어성초, 박하, 방아, 백작약, 참취, 쇠비름은 13.8%~19.14%이고, 참나물과 당귀의 수율은 각각 35.81%, 35.44%로 가장 많이 추출되었다.

17가지 메탄올 추출물 중 비장세포 증식능이있는 것으로 보이는 질경이, 민들레, 어성초, 백작약, 속단과 이 외에 cytokine 분비능이 높았던 참취와 쇠비름을 추가적으로 선정하여, hexane, chloroform, ethylacetate, butanol, water를 이용, 극성이 낮은 용매에서 극성이 높은 용매로 순차적으로 계통분획하여 각 획분을 얻었다.

Table 3. Yield of solvent fractions from methanol extract of wild plants

	Methanol extract(g)	Hexane fraction(g)	chloroform fraction(g)	ethylacetate fraction(g)	butanol fraction(g)	water fraction(g)
질경이 (11kg)	695.47	93.72	8.26	31.08	133.76	323.72
민들레 (18kg)	593.00	147.30	11.2	6.31	40.30	306.30
어성초 (300g)	47.87	5.57	1.57	1.09	3.13	9.41
백작약 (300g)	67.78	2.23	0.19	2.92	9.63	18.94
속단 (300g)	38.28	0.36	1.47	0.74	11.29	29.84
쇠비름 (300g)	30.20	6.66	0.52	0.39	2.56	13.23
참취 (200g)	62.75	3.20	5.77	0.68	7.03	35.10

제 2 절 구황식물 추출물과 비장세포 증식능

1. 비장세포 증식능 관찰을 위한 조건 확립

마우스 비장세포를 24, 48, 72시간 배양하여 MTT assay로 생존곡선을 그려본 결과, 생존곡선이 24시간 배양시 가장 높았고 시간이 지날수록 감소하는 경향을 보였다. ConA 는 0.5, 1, 2, 5, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가수준에서, LPS는 1, 5, 10, 20, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가수준에서 배양시간별 증식능을 측정하였다. 24시간동안 배양한 군에서 증식능이 높게 나왔으나, 48시간동안 배양한 군의 경우 control에 비해 증식능이 월등히 상승하였다. ConA는 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가수준에서 높았으며, LPS는 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가 수준에서 높은 증식능을 보였다.

2. 구황식물 추출물들의 세포독성 측정

구황식물 메탄올 추출물의 세포 독성 결과는 그림 11-12와 같다. 질경이, 백작약, 속단, 민들레의 메탄올 추출물은 10-250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 세포독성을 보이지 않았고, 닭의장풀, 쇠비름, 어성초, 참나물, 박하, 씀바귀, 원추리, 달래 추출물을 10-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 첨가한 수준에서는 대조군과 비교시 세포 생존율이 90-100%를 나타내었다. 당귀, 차조기, 참취, 방아 추출물을 10, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 수준에서 첨가하였을 때에는 대조군과 비슷하였으나 농도에 의존하여 세포 생존율이 급격히 감소하였고, 전호 추출물은 10-1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 세포 생존율이 32.96-75.60%로 가장 낮은 생존율을 보였다. 모든 추출물은 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 첨가한 수준에서 세포 생존율이 20-60%로 나타났다. 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 농도에서는 세포 독성이 높게 나타났으므로 10-250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도 범위를 비장세포 증식능 조사에 이용하였다.

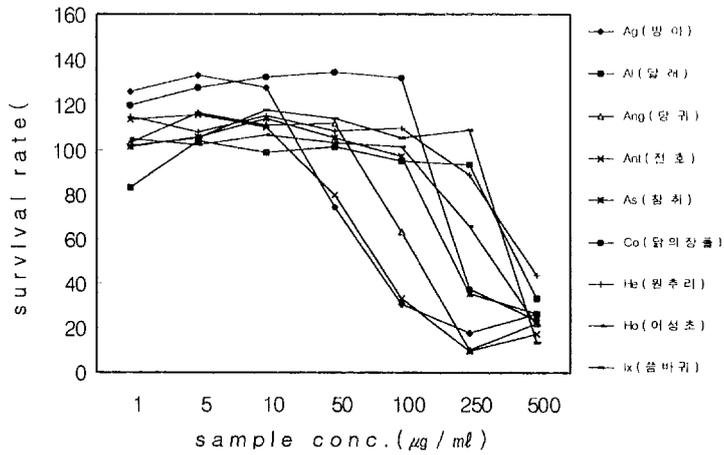
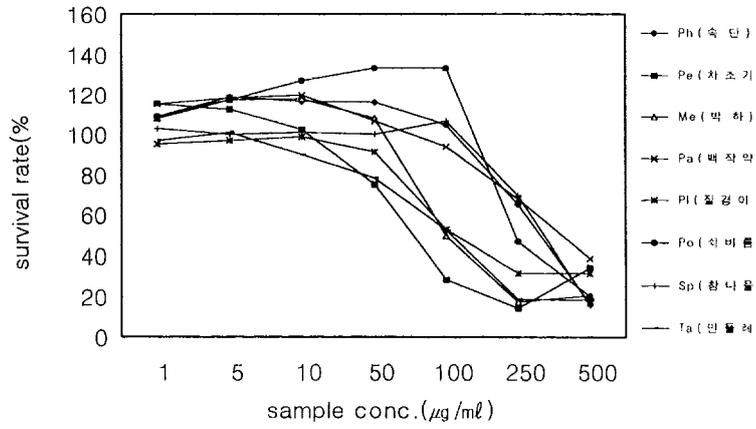


Fig. 1 Viability of MeOH extracts in mouse splenocyte

Table 4. Proliferation of splenocyte cultured with various concentrations of wild plant methanol extracts

Sample	Conc. ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Proliferation(%) ¹⁾						
		1	5	10	50	100	250	500
닭의장풀		1.202±0.04	1.276±0.07	1.323±0.12	1.346±0.03	1.321±0.19	0.374±0.020	0.232±0.02
전호		1.135±0.04	1.156±0.04	1.101±0.07	0.798±0.03	0.332±0.02	0.099±0.01	0.173±0.01
속단		1.090±0.08	1.189±0.03	1.164±0.01	1.164±0.06	1.046±0.03	0.647±0.08	0.161±0.03
어성초		1.049±0.02	1.026±0.04	1.070±0.05	1.033±0.06	1.015±0.06	0.659±0.07	0.211±0.01
박하		1.079±0.08	1.172±0.16	1.177±0.13	1.080±0.06	0.496±0.11	0.172±0.01	0.206±0.01
방아		1.259±0.09	1.333±0.07	1.276±0.09	0.745±0.07	0.305±0.05	0.180±0.01	0.264±0.04
차조기		1.153±0.10	1.124±0.04	1.023±0.03	0.750±0.06	0.282±0.03	0.140±0.01	0.338±0.04
백작약		1.151±0.04	1.183±0.01	1.198±0.01	1.066±0.01	0.936±0.04	0.675±0.03	0.386±0.03
참취		1.016±0.04	1.061±0.05	1.140±0.04	1.056±0.02	0.973±0.06	0.355±0.01	0.264±0.07
당귀		1.035±0.20	1.168±0.03	1.110±0.02	1.118±0.04	0.635±0.06	0.103±0.03	0.220±0.02
쇠비름		1.089±0.10	1.175±0.04	1.270±0.06	1.334±0.03	1.332±0.10	0.467±0.05	0.198±0.02
민들레		0.968±0.04	1.012±0.04	0.898±0.01	0.778±0.01	0.521±0.04	0.187±0.04	0.181±0.01
질경이		0.953±0.02	0.968±0.03	0.990±0.01	0.910±0.02	0.526±0.09	0.313±0.00	0.313±0.00
달래		0.834±0.51	1.041±0.01	0.991±0.02	1.016±0.01	0.954±0.05	0.936±0.10	0.332±0.23
참나물		1.028±0.04	1.001±0.02	1.011±0.06	1.001±0.06	1.065±0.01	0.695±0.07	0.154±0.02
원추리		1.151±0.11	1.081±0.06	1.154±0.04	1.086±0.01	1.097±0.03	0.889±0.08	0.437±0.24
씀비귀		1.021±0.04	1.056±0.02	1.178±0.01	1.140±0.07	1.054±0.03	1.090±0.06	0.138±0.11

$$1) \text{ Proliferation}(\%) = \frac{\text{mean of O.D.} \in \text{test wells}}{\text{mean of O.D.} \in \text{control wells}}$$

3. 메탄을 추출물이 비장세포증식에 미치는 영향 검색

구황식물 메탄올 추출물의 마우스 비장세포 증식에 미치는 영향을 MTT assay를 통해 살펴보았다. 본 실험에서 ConA($2\mu\text{g}/\text{ml}$)와 LPS($5\mu\text{g}/\text{ml}$) 첨가 배양시 세포증식능은 각각 48.19 ± 3.01 , $23.64 \pm 2.11\%$ 로 나타났다.

세포증식효과가 있는 추출물은 질경이, 민들레, 속단, 백작약, 어성초로 어성초를 제외한 추출물에서 $10\text{-}250\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 첨가 배양시 대조군에 비해 8-50% 높은 증식능을 보였으며, 어성초는 $10\text{-}100\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 7-14%의 증식능을 보였다. 특히 질경이는 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에 50% 이상의 증식 효과가 있었으며 이는 ConA와 LPS 첨가 배양보다 더 높은 세포증식효과를 나타내었다.

박하, 참나물, 쇠비름 메탄올 추출물은 대조군과 비교시 뚜렷한 차이는 없었으나 $10\text{-}100\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 2-9%의 증식능을 나타내었고, $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 각각 3.28, 9.54, 7.90%였다. 방아, 달래, 닭의장풀도 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 각각 5.17, 7.39, 9.08%의 증식능을 나타내다가 농도가 증가할수록 세포 증식이 억제되었다.

저농도($10, 50\mu\text{g}/\text{ml}$)에서는 대조군과 비슷한 증식을 보였으나 농도에 의존하여 세포증식억제의 효과가 강한 구황식물은 당귀, 차조기, 참취, 씀바귀, 원추리가 있었다. 특히 전호의 추출물은 -65.92~-25/40%로 모든 농도에서 강한 증식 억제를 보였다.

이상에서 면역증진능을 관찰하기 위한 지표로 비장세포증식능에 영향을 미치는 구황식물을 검색한 결과, 질경이, 어성초, 백작약, 속단, 민들레는 비장세포 증식효과가 있는 것으로 나타났고, 닭의장풀, 쇠비름, 참나물, 당귀, 박하, 차조기, 방아, 참취, 씀바귀, 달래, 원추리는 대조군과 비교시 비장세포 증식에 큰 차이를 보이지 않았으며, 전호는 세포증식 억제의 효과가 나타났다.

4. 추출물의 분획별 첨가가 비장세포증식에 미치는 영향 검색

가. 질경이 추출물의 분획별 비장세포증식능

질경이의 hexane 분획에서는 낮은 농도(1, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 첨가 배양시 대조군에 비해 1.55-7.83%의 증식능을 보였으나, 첨가 농도가 높아질수록 비장세포증식이 억제되었다. Chloroform, ethylacetate, butanol 분획에서는 1~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 대조군에 비해 2.19~15.29%의 증식능을 보였으나, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상의 농도에서는 증식의 효과가 나타나지 않았다. 다섯가지 용매 분획중 세포 증식효과가 있는 물 분획에서는 1~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 3.76~19.20%의 높은 증식능을 보였다. 10, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 수준으로 첨가 배양시 hexane, chloroform, ethylacetate, butanol, 물 순으로 그 비장세포증식능이 높아졌고, 100, 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서는 증식 억제효과가 감소되었다.

Table 5. Proliferation of mouse splenocytes cultured with various concentrations of *Plantago asiatica* L. in different fraction

Fraction	Conc. ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Proliferation(%) ¹⁾				
		1	10	50	100	250
Hexane		7.38 \pm 7.62	1.55 \pm 2.67	-0.52 \pm 0.76	-38.98 \pm 6.79	-83.23 \pm 0.39
Chloroform		15.29 \pm 5.62	12.28 \pm 0.64	2.19 \pm 2.30	-26.72 \pm 7.98	-71.22 \pm 5.41
Ethylacetate		3.43 \pm 3.45	11.88 \pm 2.59	4.76 \pm 4.92	-20.64 \pm 3.63	-39.33 \pm 2.60
Butanol		13.69 \pm 1.36	12.87 \pm 2.82	11.24 \pm 5.66	0.02 \pm 3.27	-20.84 \pm 1.58
H ₂ O		6.08 \pm 3.17	19.2 \pm 4.17	16.4 \pm 7.00	3.74 \pm 4.61	-1.15 \pm 3.65

나. 어성초 추출물의 분획별 비장세포증식능

어성초의 hexane 분획에서는 1-50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 대조군과 비교시 0.31-8.67%의 증식능을 보였다. 대조군과 비교시 chloroform 분획에서는 1-10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 3.89-4.67%, ethylacetate 분획은 1-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 첨가 수준에서 3.17-5.66%로 나타났다. Butanol 분획에서는 1-250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 모든 농도에서 1.98-6.94%로 세포증식억제는 없었다. 물 추출분획은 다른 추출분획에 비해 높은 세포증식을 보였는데 1-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 4.16-16.72%의 증식능을 나타내었다.

Table 6. Proliferation of mouse splenocytes cultured with various concentrations of *Houttuynia cordata* THUNB in different fraction

Fraction	Conc. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Proliferation(%)				
		1	10	50	100	250
Hexane		5.6 \pm 4.08	0.31 \pm 2.24	8.67 \pm 3.48	-12.89 \pm 4.72	-78.49 \pm 1.17
Chloroform		4.67 \pm 6.13	3.89 \pm 3.66	-23.75 \pm 7.10	-73.47 \pm 4.14	-77.59 \pm 0.92
Ethylacetate		5.56 \pm 2.58	4.61 \pm 5.05	3.17 \pm 7.41	-8.26 \pm 5.57	-29.92 \pm 2.84
Butanol		1.98 \pm 3.69	6.94 \pm 5.86	4.3 \pm 3.76	6.83 \pm 4.46	4.03 \pm 1.93
H ₂ O		13.29 \pm 1.91	19.72 \pm 3.6	4.16 \pm 3.86	8.98 \pm 5.08	-4.08 \pm 43.29

다. 백작약 추출물의 분획별 비장세포증식능

백작약의 hexane 분획에서는 1-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 대조군과 비교시 1.84-16.23%의 증식능을 보였고, chloroform 분획에서는 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 11.48%, 10-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 0.92-9.10%의 증식능이 나타났다. Ethylacetate 분획에서는 대조군과 비교시 1-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 첨

가 수준에서 1.88-13.27%로 나타났으며, butanol 추출분획에서는 1-250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 모든 농도에서 1.30-10.65%의 증식을 보였고, 물 추출분획도 1-250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 3.04-15.16%의 증식능을 나타내었다.

백작약의 추출물 분획별 비장세포증식능의 결과에서 알 수 있듯이 hexane과 물분획에서 세포증식의 효과가 있었다. 그리고 고농도(250 $\mu\text{g}/\text{ml}$)의 hexane, chloroform, ethylacetate 분획에서는 세포증식의 억제 효과가 나타났었다.

Table 7. Proliferation of mouse splenocytes cultured with various concentrations of *Paeonia japonica* var. pilosa NAKAI in different fraction

Fraction \ Conc. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Proliferation(%)				
	1	10	50	100	250
Hexane	4.99 \pm 4.87	1.84 \pm 9.86	16.23 \pm 5.50	12.01 \pm 1.63	-51.81 \pm 10.38
Chloroform	77.48 \pm 3.58	9.1 \pm 1.34	4.21 \pm 5.32	0.92 \pm 2.25	-42.34 \pm 3.16
Ethylacetate	9.96 \pm 1.13	8.91 \pm 5.37	13.27 \pm 1.94	1.88 \pm 2.51	-21.47 \pm 3.87
Butanol	1.3 \pm 1.30	8.08 \pm 1.33	10.65 \pm 2.49	4.4 \pm 4.36	6.15 \pm 1.43
H ₂ O	3.04 \pm 2.96	10.06 \pm 7.21	11.38 \pm 1.62	15.16 \pm 2.09	10.64 \pm 2.44

라. 속단 추출물의 분획별 비장세포증식능

속단의 5가지 용매 분획별 비장세포증식능을 비교시 butanol, 물 분획에서 높은 증식능을 보였는데, 1-250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 첨가 수준에서 각각 5.49-19.75%, 5.65-16.67%를 나타내었다. Hexane, chloroform, ethylacetate의 추출분획에서는 1-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 각각

3.08-9.06%, 1.26-8.56%, 3.81-11.73%를 나타냈으나, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 비장세포증식억제를 보였다.

Table 8. Proliferation of mouse splenocytes cultured with various concentrations of *Phlomis umbrosa* TURCZ in different fraction

Fraction \ Conc. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Proliferation(%)				
	1	10	50	100	250
Hexane	9.06 \pm 3.35	3.08 \pm 5.93	7.55 \pm 12.70	5.1 \pm 3.97	-77.94 \pm 0.94
Chloroform	3.58 \pm 9.25	1.26 \pm 4.22	5.23 \pm 2.19	8.52 \pm 1.85	-75.93 \pm 0.60
Ethylacetate	11.73 \pm 2.58	10.29 \pm 1.52	8.13 \pm 8.86	3.81 \pm 5.03	-35.98 \pm 1.52
Butanol	8.56 \pm 5.32	17.92 \pm 2.48	19.75 \pm 2.57	14.73 \pm 0.97	5.49 \pm 4.68
H ₂ O	11.03 \pm 6.42	16.67 \pm 4.32	13.37 \pm 4.55	14.57 \pm 0.79	5.65 \pm 4.06

마. 민들레 추출물의 분획별 비장세포증식능

민들레 추출분획별 비장세포증식에 대한 영향은 다음과 같다. 질경이, 어성초, 백작약, 속단 추출분획을 고농도(250 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 첨가 배양 시에는 세포증식억제의 경향을 보였으나, 민들레 추출분획에서는 다른 시료의 추출분획보다 세포증식억제의 경향을 보이지 않았다. 분획별 증식능을 살펴보면, 물분획에서 1-250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 첨가 배양시 1.63-13.45%로 다른 분획보다 높은 증식능을 나타내었다. Hexane 분획은 1-250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 0.57-6.56%, chloroform 분획은 1-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 1.72-8.70%의 증식을 보였다. Ethylacetate 분획은 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 12.09%의 증식능을 보였다. Butanol은 모든 농도에서 다른 분획보다 낮은 증식능을 나타내었다.

Table 9. Proliferation of mouse splenocytes cultured with various concentrations of *Taraxacum platycarupm* DAHLST in different fraction

Fraction \ Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Proliferation(%)				
	1	10	50	100	250
Hexane	2.35 \pm 3.38	3.59 \pm 0.23	1.69 \pm 0.34	6.56 \pm 3.31	0.57 \pm 0.53
Chloroform	1.72 \pm 3.79	8.32 \pm 4.63	8.7 \pm 4.29	2.88 \pm 4.49	-4.81 \pm 0.69
Ethylacetate	-1.6 \pm 0.34	12.09 \pm 1.04	6.01 \pm 3.79	2.77 \pm 2.33	4.14 \pm 1.42
Butanol	2.19 \pm 1.98	6.12 \pm 9.38	2.11 \pm 0.46	2.35 \pm 1.04	2.68 \pm 1.58
H ₂ O	12.17 \pm 4.17	13.45 \pm 7.79	4.11 \pm 3.04	2.46 \pm 3.58	1.63 \pm 1.24

제 3 절 구황식물 메탄올 추출물과 cytokine 분비능

1. 추출물의 세포 독성

본 실험에 사용된 각 시료의 세포 독성을 알아보기 위하여 in vitro 실험에 사용된 마우스 복강대식세포에 각 추출물을 농도별로 첨가해서 배양한 후 배양액의 세포 생존율을 MTT assay를 이용하여 측정하였다. 각 well 의 세포 생존율은 추출물을 첨가하지 않고 배양한 well의 흡광도에 대한 추출물을 첨가한 well의 퍼센트로 계산하였다. 추출물은 1, 10, 100, 500, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 제조하여 각 추출물의 농도에 따른 세포 독성의 변화를 관찰하였으며 결과는 아래 표에 나타난 바와 같다.

Table 10. Proliferation of mouse peritoneal macrophage cultured with various concentrations of wild plant methanol extracts

Sample	Conc. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Proliferation(%)				
		1	10	100	500	1000
방아		101.2	111.4	132.4	88.3	85.8
달래		87.9	81.9	57.2	53.1	18.7
당귀		98.9	94.5	89.7	17.7	0.0
전호		107.6	111.9	108.7	87.4	90.4
참취		124.6	127.2	144.9	44.5	29.0
닭의장풀		99.2	95.2	105.6	98.0	50.0
원추리		87.6	85.8	85.1	87.0	85.6
어성초		108.6	115.7	89.6	66.6	41.1
씀바귀		101.5	99.0	91.7	86.9	70.0
차조기		96.7	87.7	87.3	33.2	31.4
박하		98.5	98.0	96.5	84.0	87.8
백작약		110.2	127.8	129.6	103.2	81.3
속단		110.4	114.3	90.4	99.8	81.4
질경이		114.3	112.4	120.0	116.2	76.6
쇠비름		89.4	110.1	111.1	56.5	61.8
참나물		87.2	105.9	115.5	90.3	93.1
민들레		128	99.5	105.5	76.9	65.3

모든 sample은 1~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 85% 이상의 생존율을 보여 세포 독성이 나타나지 않았다. 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 달래(53.1%), 당귀(17.7%), 참취(44.5%), 차조기(33.2%)를 첨가한 경우 50% 이하의 생존율을 보여 독성이 있음을 알 수 있었고, 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 달래(18.7%), 당귀(0%), 참취(29%), 닭의장풀(50%), 어성초(41.1%), 차조기(31.4%)를 첨가한 경우 독성을 보였다.

따라서 대부분의 추출물이 독성을 보이지 않는 1~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도 범위를 대식세포 활성화 조사에 이용하였다.

2. 메탄올 추출물의 *in vitro* 대식세포 활성화 증진능 비교

가. IL-1 β 의 생성 증진능

IL-1 β 는 cytokine 중에서 가장 핵심이 되는 염증반응의 매개체로서 대식세포에서 가장 많이 생성되며, 특정한 염증자극을 받았을 때 그 반응의 결과로 생성된다. 본 실험에서 대식세포의 활성화에 대한 지표로 세포 배양액의 IL-1 β 의 함량을 측정하였다. 추출물을 첨가하지 않은 대조군은 0.82 \pm 0.21ng의 IL-1 β 를 생성하였고, mitogen인 LPS (Lipopolysaccharide)를 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가한 경우에는 2.19ng의 높은 농도의 IL-1 β 생성능을 보였다. 이에 비해 추출물을 첨가한 sample의 경우, LPS를 첨가했을 때보다는 낮은 생성능을 보였으나, 대부분의 sample에서 대조군보다는 높은 농도의 IL-1 β 를 생성하였다.

참취를 첨가한 경우 가장 높은 농도의 IL-1 β 를 생성하였는데, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 1.76ng, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 1.21ng을 생성하였다. 속단은 모든 농도에서 대조군보다 높은 농도의 IL-1 β 를 생성하였는데, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 1.59ng, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 1.41ng, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 0.87ng의 IL-1 β 를 생성하여, 추출물 농도에 반비례하는 경향을 보였다. 이에 반해, 방아, 전호, 참취, 닭의장풀, 박하 등은 농도에 비례하여 IL-1 β 를 생성하였는데, 이들은 각각 2가지 농도에서 대조군보다 높은 농도의 IL-1 β 를 생산하였다. 달래, 어성초, 씀바귀, 차조기, 질경이는 모든 농도에서 대조군보다 낮은 농도의 IL-1 β 를 생성하였다.

Table 11. Macrophage stimulating activity toward IL-1 β production in vitro

sample	IL-1 β production (ng/ml)	Concentration of extracts(μ g/ml)		
		1	10	100
방아		0.58 \pm 0.06	0.91 \pm 0.07	1.51 \pm 0.04
달래		0.10 \pm 0.01	0.45 \pm 0.04	0.50 \pm 0.02
당귀		1.44 \pm 0.09	0.88 \pm 0.06	1.02 \pm 0.12
전호		0.93 \pm 0.34	1.01 \pm 0.12	0.60 \pm 0.02
참취		0.36 \pm 0.05	1.21 \pm 0.37	1.76 \pm 0.41
닭의장풀		0.80 \pm 0.16	1.00 \pm 0.01	1.13 \pm 0.10
원추리		1.18 \pm 0.14	0.79 \pm 0.01	0.63 \pm 0.01
어성초		0.23 \pm 0.18	0.50 \pm 0.05	0.57 \pm 0.06
씀바귀		0.48 \pm 0.01	0.29 \pm 0.01	0.48 \pm 0.01
차조기		0.81 \pm 0.24	0.46 \pm 0.02	0.80 \pm 0.13
박하		0.80 \pm 0.13	1.02 \pm 0.25	1.16 \pm 0.38
백작약		0.47 \pm 0.03	0.39 \pm 0.06	0.45 \pm 0.10
속단		1.59 \pm 0.11	1.41 \pm 0.23	0.87 \pm 0.11
질경이		0.10 \pm 0.01	0.45 \pm 0.08	0.71 \pm 0.25
쇠비름		0.50 \pm 0.41	1.23 \pm 0.22	0.99 \pm 0.22
참나물		0.85 \pm 0.41	0.77 \pm 0.22	0.97 \pm 0.02
민들레		1.01 \pm 0.02	1.20 \pm 0.11	0.74 \pm 0.36
LPS (Lipopolysaccharide)			2.19 \pm 0.07	
Control		0.82 \pm 0.21		

Macrophages were incubated without(control) or with a stimulus (plant extracts) for 48h. The cytokine concentrations in duplicate culture supernatant were determined. LPS (lipopolysaccharide) was used as a positive control.

나. IL-6의 생성 증진능

IL-6는 IL-1 β , TNF- α 와 함께 복강 대식세포에서 분비되는 대표적인 cytokine으로, 항암효과가 있다. IL-6는 interferone-beta 2, B cell stimulatory factor type2 (BSF-2), hepatocyte stimulating factor로 알려져 있으며, 간장에서의 acute phase protein의 합성을 유도하고 조직 손상에 대한 발열반응을 초래한다. 그밖에도 B cell에서의 면역 글로블린 유리를 촉진시키고 thymocyte와 T세포의 분화에 관여한다. IL-6는 활성화된 대식세포 뿐 아니라 섬유아세포, 내피세포 등에서도 유리된다. 본 실험에서 대식세포의 활성화에 대한 지표로 세포 배양액의 IL-6의 함량을 측정하였다.

추출물을 첨가하지 않은 대조군은 1.07ng의 IL-6를 생성하였고, mitogen인 LPS (Lipopolysaccharide)를 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가한 경우에는 0.46ng의 IL-6를 생성하여 대조군에 비해 대식세포의 IL-6 분비를 자극하지 못하는 것으로 나타났다.

추출물을 첨가한 경우, 달래는 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 6.56ng을, 닭의 장풀은 5.15ng을, 숙단은 5ng을 생성하는 등 매우 높은 농도의 IL-6를 분비하는 것으로 나타났다. 차조기의 경우, 모든 농도에서 대조군보다 상당히 높은 농도의 IL-6를 분비하였는데, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 3.27ng을, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 3.18ng을, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 2.52ng을 생성하여 추출물의 농도에는 반비례하는 것으로 보였다. 그 외에 방아는 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (1.36ng)와 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (1.91ng)의 농도에서, 전호는 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (1.17ng)의 농도에서, 참취는 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (2.22ng)의 농도에서, 씬바귀는 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (3.81ng)에서, 쇠비름은 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (1.36ng)의 농도에서 각각 대조군보다 높은 농도의 IL-6를 분비하는 것으로 보였다.

Table 12. Macrophage stimulating activity toward IL-6
production in vitro

sample	IL-6 production (ng/ml)	Concentration of extracts($\mu\text{g/ml}$)		
		1	10	100
방아	1.36 ± 0.21	0.66 ± 0.06	1.91 ± 0.29	
달래	0.10 ± 0.01	6.56 ± 0.25	0.89 ± 0.02	
당귀	0.80 ± 0.01	0.44 ± 0.12	0.76 ± 0.01	
전호	1.17 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.58 ± 0.04	
참취	0.70 ± 0.01	2.22 ± 0.04	0.29 ± 0.01	
닭의장풀	0.26 ± 0.08	0.74 ± 0.05	5.15 ± 0.25	
원추리	0.63 ± 0.16	0.10 ± 0.01	0.10 ± 0.01	
어성초	0.10 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.22 ± 0.16	
씀바귀	0.82 ± 0.02	3.81 ± 0.39	0.94 ± 0.21	
차조기	3.27 ± 0.72	3.18 ± 0.03	2.52 ± 0.35	
박하	0.37 ± 0.04	0.99 ± 0.41	0.10 ± 0.01	
백작약	0.46 ± 0.12	0.16 ± 0.08	0.13 ± 0.17	
속단	5.00 ± 0.63	0.58 ± 0.46	0.64 ± 0.58	
질경이	0.19 ± 0.01	0.22 ± 0.17	0.21 ± 0.15	
쇠비름	0.52 ± 0.09	1.36 ± 0.14	0.78 ± 0.10	
참나물	0.52 ± 0.35	0.29 ± 0.14	0.36 ± 0.10	
민들레	0.48 ± 0.01	0.44 ± 0.13	0.31 ± 0.12	
LPS (Lipopolysaccharide)		0.46 ± 0.09		
Control	1.07 ± 0.16			

다. TNF- α 의 생성 증진능

TNF- α 는 tumor cell을 죽이는 대표적인 cytokine인데, tumor cell에는 cytotoxic하나, normal cell에는 cytotoxic하지 않다. 활성화된 대식세포에서 많이 분비되는데, 활성화된 대식세포는 TNF- α 외에도 많은 cytokine을 분비하여 조혈작용을 담당한다.

본 실험에서 대식세포의 활성화에 대한 지표로 세포 배양액의 TNF- α 의 함량을 측정하였다. 추출물을 첨가하지 않은 대조군은 1.32ng의 TNF- α 를 생성하였고, mitogen인 LPS (Lipopolysaccharide)를 10 μ g/ml 첨가한 경우에는 8.73ng의 TNF- α 를 생성하여 대조군에 비해 대식세포의 TNF- α 분비능을 상당히 많이 자극하는 것으로 나타났다. 전호를 1 μ g/ml 첨가했을 때 가장 높은 농도의 TNF- α (14.56ng)를 분비하여 LPS보다도 훨씬 높은 양의 TNF- α 를 분비함을 알 수 있었다. 달래, 전호, 참취, 닭의장풀, 박하, 쇠비름은 모든 농도에서 대조군보다 높은 농도의 TNF- α 를 분비하였는데, 달래를 제외한 모든 sample은 농도에 반비례하여 TNF- α 를 분비하였다. 방아는 10 μ g/ml 첨가했을 때는 5.3ng의 TNF- α 를, 100 μ g/ml 첨가했을 때는 7.05ng의 TNF- α 를 분비하였다. 어성초, 차조기, 참나물은 1 μ g/ml, 10 μ g/ml 첨가했을 때 대조군에 비해 높은 농도의 TNF- α 를 분비하는 경향을 보였는데, 어성초를 1 μ g/ml 첨가했을 때는 2.81ng, 10 μ g/ml 첨가했을 때는 1.38ng의 TNF- α 를 분비하였고, 차조기를 1 μ g/ml 첨가했을 때는 1.36ng, 10 μ g/ml 첨가했을 때는 2.17ng의 TNF- α 를 분비하였고, 참나물을 1 μ g/ml 첨가했을 때는 2.83ng, 10 μ g/ml 첨가했을 때는 1.72ng의 TNF- α 를 분비하였다. 반면, 당귀, 원추리, 씀바귀, 백작약, 숙단, 질경이, 민들레는 모든 농도에서 대조군보다 낮은 농도의 TNF- α 를 분비하는 것으로 보였다.

Table 13. Macrophage stimulating activity toward TNF- α production in vitro

sample TNF- α production (ng/ml)	Concentration of extracts(μ g/ml)		
	1	10	100
방아	1.07 \pm 0.01	5.30 \pm 0.16	7.05 \pm 0.05
달래	1.57 \pm 0.06	2.51 \pm 0.04	2.47 \pm 0.06
당귀	1.22 \pm 0.01	0.55 \pm 0.03	0.57 \pm 0.10
전호	3.41 \pm 0.30	4.84 \pm 0.22	14.56 \pm 0.65
참취	2.68 \pm 0.01	3.54 \pm 0.50	1.86 \pm 0.56
닭의장풀	1.64 \pm 0.15	1.28 \pm 0.26	4.03 \pm 0.90
원추리	0.71 \pm 0.21	0.93 \pm 0.23	1.13 \pm 0.29
어성초	1.50 \pm 0.14	1.38 \pm 0.11	2.81 \pm 0.41
씀바귀	0.52 \pm 0.02	1.24 \pm 0.41	0.68 \pm 0.11
차조기	1.32 \pm 0.30	2.17 \pm 0.42	1.36 \pm 0.10
박하	1.87 \pm 0.15	1.82 \pm 0.02	2.35 \pm 0.22
백작약	1.04 \pm 0.02	1.20 \pm 0.06	0.60 \pm 0.11
속단	0.71 \pm 0.17	0.94 \pm 0.38	0.64 \pm 0.04
질경이	0.46 \pm 0.05	1.04 \pm 0.20	0.17 \pm 0.10
쇠비름	4.85 \pm 0.34	3.77 \pm 0.30	2.85 \pm 0.58
참나물	0.28 \pm 0.26	1.72 \pm 0.38	2.83 \pm 0.66
민들레	0.67 \pm 0.14	1.04 \pm 1.04	0.92 \pm 0.30
LPS (Lipopolysaccharide)		8.73 \pm 0.12	
Control	1.32 \pm 0.17		

3. 구황식물 분획별 추출물과 cytokine 분비능

가. 분획별 추출물과 IL-1 β

1) 민들레의 분획별 추출물과 IL-1 β

Butanol, hexane 층에서는 거의 분비되지 않았고, Chloroform 층에서는 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 상당히 많은 양인 0.697ng/ml이 분비되었다. Ethylacetate 분획에서는 모든 농도에서 많은 양의 IL-1 β 가 분비되었다 (0.951ng/ml, 0.671ng/ml, 0.606ng/ml). 물층에서도 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 많은 양의 IL-1 β (0.763ng/ml)가 분비되었다.

2) 질경이의 분획별 추출물과 IL-1 β

질경이의 Hexane 분획에서는 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가 배양시 대조군 (0.197ng/ml)에 비해 유의적으로 많은 양의 IL-1 β (2.130ng/ml)을 분비했다. Chloroform 분획에서는 거의 분비되지 않았고, ethylacetate 분획에서는 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가시(1.233ng/ml), 그리고 물층에서는 10, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가시 IL-1 β 분비능이 향상되었다. 또한 butanol 층에서도 대조군에 비해 유의적으로 많은 양의 IL-1 β (6.051ng/ml)가 분비되었다.

3) 속단의 분획별 추출물과 IL-1 β

물층을 제외한 모든 분획에서 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도일 때 IL-1 β 이 대조군에 비해 많이 분비되었고, 특히 hexane층의 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가시 대조군에 비해 유의적으로 많은 양(2.256ng/ml)이 분비되었다.

4) 백작약의 분획별 추출물과 IL-1 β

Ethylacetate 층을 제외하고는 모든 분획, 모든 농도에서 대조군에 비해 많은 양의 IL-1 β 를 분비하여 면역증강효과가 있는 것으로 보

인다. 특히, hexane 층의 경우 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가시 유의적으로 많은 양 ($5.555\text{ng}/\text{ml}$)의 IL-1 β 를 분비하였다. Butanol층과 물층에서도 IL-1 β 분비능이 대조군보다 유의적으로 많이 향상되었다.

5) 어성초의 분획별 추출물과 IL-1 β

Chloroform 층과 물층에서는 모든 농도에서($1, 10, 100\mu\text{g}/\text{ml}$) 대조군에 비해 많은 양의 IL-1 β 를 분비했고, 특히 chloroform 층에서는 그 수치가 모두 유의적으로 높았다($5.184\text{ng}/\text{ml}, 3.629\text{ng}/\text{ml}, 2.675\text{ng}/\text{ml}$). Ethylacetate 층과 butanol 층에서는 $10, 100\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 IL-1 β 분비능이 향상되었으나, hexane 층에서는 효과가 없는 것으로 나타났다.

6) 참취의 분획별 추출물과 IL-1 β

Chloroform층($0.347\text{ng}/\text{ml}$)과 butanol층($0.211\text{ng}/\text{ml}$), 물층($0.213\text{ng}/\text{ml}$)를 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가했을 때 대조군($0.187\text{ng}/\text{ml}$)보다 많은 양의 IL-1 β 가 분비되었다.

7) 쇠비름의 분획별 추출물과 IL-1 β

거의 모든 층에서 같은 정도로 대조군($0.049\text{ng}/\text{ml}$)보다 많은 양이 분비되었는데, 그 중 hexane $10\mu\text{g}/\text{ml}$ ($0.21\text{ng}/\text{ml}$), chloroform과 ethylacetate는 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가시($0.213\text{ng}/\text{ml}, 0.206\text{ng}/\text{ml}$), 물층은 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가시($0.208\text{ng}/\text{ml}$)와 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가시($0.199\text{ng}/\text{ml}$) 특히 많이 분비되었다.

Table 14. Macrophage stimulating activity toward IL-1 β production
in vitro

Sample	Conc. ($\mu\text{g}/\text{ml}$) Fraction	IL-1 β (ng/ml)	
		10	100
참취	Methanol	0.138 \pm 0.022	0.183 \pm 0.015
	Chloroform	0.144 \pm 0.007	0.347 \pm 0.002
	Ethylacetate	0.154 \pm 0.018	0.178 \pm 0.007
	Butanol	0.153 \pm 0.002	0.211 \pm 0.023
	H ₂ O	0.191 \pm 0.010	0.213 \pm 0.013
Control		0.187 \pm 0.010	
LPS		0.212 \pm 0.010	
쇠비름	Methanol	0.156 \pm 0.102	0.001 \pm 0.001
	Hexane	0.210 \pm 0.001	0.158 \pm 0.006
	Chloroform	0.182 \pm 0.008	0.213 \pm 0.007
	Ethylacetate	0.173 \pm 0.030	0.206 \pm 0.189
	Butanol	0.157 \pm 0.006	0.168 \pm 0.010
	H ₂ O	0.208 \pm 0.014	0.199 \pm 0.015
Control		0.049 \pm 0.015	
LPS		0.497 \pm 0.056	

continued

Sample	Conc. ($\mu\text{g}/\text{ml}$) Fraction	IL-1 β (ng/ml)		
		1	10	100
민들레	Hexane	0.158 \pm 0.113	0.024 \pm 0.008	0.036 \pm 0.027
	Chloroform	0.360 \pm 0.449	0.092 \pm 0.117	0.697 \pm 0.104
	Ethylacetate	0.951 \pm 0.586	0.672 \pm 0.761	0.606 \pm 0.274
	Butanol	0.008 \pm 0.005	0.076 \pm 0.103	0.052 \pm 0.057
	H ₂ O	0.763 \pm 0.113	0.143 \pm 0.050	0.483 \pm 0.179

continued

Sample	Conc. ($\mu\text{g}/\text{m}\ell$)			
		1	10	100
	Fraction			
질경이	Hexane	0.677 ± 0.779	0.169 ± 0.057	$2.130 \pm 0.136^*$
	Chloroform	0.064 ± 0.048	0.114 ± 0.053	0.036 ± 0.018
	Ethylacetate	1.233 ± 0.216	0.180 ± 0.035	0.098 ± 0.053
	Butanol	1.334 ± 0.028	$6.051 \pm 0.547^*$	0.672 ± 0.691
	H ₂ O	0.143 ± 0.101	1.801 ± 1.582	1.624 ± 0.352
속단	Hexane	0.768 ± 0.045	$2.256 \pm 0.204^*$	0.185 ± 0.022
	Chloroform	0.686 ± 0.426	0.199 ± 0.073	0.046 ± 0.016
	Ethylacetate	0.900 ± 0.600	0.037 ± 0.002	0.053 ± 0.009
	Butanol	0.512 ± 0.286	0.014 ± 0.009	0.668 ± 0.331
	H ₂ O	0.178 ± 0.108	0.081 ± 0.039	0.217 ± 0.090
백작약	Hexane	1.733 ± 0.674	$5.555 \pm 3.470^*$	1.917 ± 0.922
	Chloroform	1.081 ± 0.836	1.366 ± 0.087	1.030 ± 0.060
	Ethylacetate	0.070 ± 0.065	0.056 ± 0.014	0.067 ± 0.002
	Butanol	$2.162 \pm 1.295^*$	$5.118 \pm 0.895^*$	$4.701 \pm 0.400^*$
	H ₂ O	$2.990 \pm 2.067^*$	$1.975 \pm 0.105^*$	0.687 ± 0.294
어성초	Hexane	0.045 ± 0.032	0.166 ± 0.107	0.030 ± 0.011
	Chloroform	$5.184 \pm 3.414^*$	$3.629 \pm 1.554^*$	$2.675 \pm 1.925^*$
	Ethylacetate	0.213 ± 0.251	0.426 ± 0.007	2.050 ± 0.022
	Butanol	0.074 ± 0.000	1.939 ± 1.777	0.789 ± 0.113
	H ₂ O	1.894 ± 0.518	0.694 ± 0.099	$3.101 \pm 0.379^*$
Control		0.197 ± 0.079		

나. 분획별 추출물과 IL-6

1) 민들레의 분획별 추출물과 IL-6

Hexane 층에서 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가시 $0.156\text{ng}/\text{ml}$, chloroform 층에서 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가시 $0.347\text{ng}/\text{ml}$ 을 분비했을 뿐, 다른 분획에서는 극소량만이 분비되었다.

2) 질경이의 분획별 추출물과 IL-6

Hexane 층에서는 고농도($100\mu\text{g}/\text{ml}$) 첨가시 $0.742\text{ng}/\text{ml}$ 의 IL-6를 분비하였다. Chloroform $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가시 유의적으로 많은 양인 $1.023\text{ng}/\text{ml}$ 을 분비하였다. Ethylacetate 분획은 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가시 $0.405\text{ng}/\text{ml}$ 을 분비했다.

3) 숙단의 분획별 추출물과 IL-6

$10\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 Chloroform층과 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 ethylacetate층을 첨가했을 때 유의적으로 많은 양($6.276\text{ng}/\text{ml}$, $2.802\text{ng}/\text{ml}$)의 IL-6가 분비되었다.

4) 백작약의 분획별 추출물과 IL-6

다른 구황식물에 비해 비교적 많은 양의 IL-6를 분비하였는데, 특히 chloroform 층에서는 1, 10, $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 각각 $7.337\text{ng}/\text{ml}$, $10.5\text{ng}/\text{ml}$, $9.916\text{ng}/\text{ml}$ 의 IL-6를 분비하였다. $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 ethylacetate층 첨가시와 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 물층 첨가시에도 유의적으로 많은 양($3.447\text{ng}/\text{ml}$, $4.333\text{ng}/\text{ml}$)의 IL-6를 분비하였다.

5) 어성초의 분획별 추출물과 IL-6

어성초의 각 분획별 경향을 보면, ethylacetate 분획에서는 각 농도별로 각각 $3.781\text{ng}/\text{ml}$, $9.135\text{ng}/\text{ml}$, $8.049\text{ng}/\text{ml}$ 의 IL-6를 분비하여 면역증강효과가 매우 큰 것으로 보이고, 물층과 chloroform 층의 경우, $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 첨가시 각각 $2.517\text{ng}/\text{ml}$, $3.152\text{ng}/\text{ml}$ 을 분비하였다.

6) 참취의 분획별 추출물과 IL-6

참취는 극성이 높은 ethylacetate, butanol, 물층에서 IL-6 분비능이 향상되었다(0.56ng/ml, 0.769ng/ml, 0.648ng/ml).

7) 쇠비름의 분획별 추출물과 IL-6

쇠비름 추출물은 거의 모든 층에서 control과 비슷한 정도의 IL-6를 분비했을 뿐, 분비능이 향상되지는 않았다.

Table 15. Macrophage stimulating activity toward IL-6 production in vitro

Sample	Fraction	Conc. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)		IL-6(ng/ml)	
		10	100	10	100
참취	Methanol	0.313 \pm 0.014	0.670 \pm 0.065		
	Chloroform	0.285 \pm 0.001	0.224 \pm 0.009		
	Ethylacetate	0.301 \pm 0.021	0.560 \pm 0.050		
	Butanol	0.344 \pm 0.029	0.769 \pm 0.023		
	H ₂ O	0.249 \pm 0.007	0.648 \pm 0.013		
Control		0.283 \pm 0.025			
LPS		0.309 \pm 0.037			
쇠비름	Hexane	0.048 \pm 0.001	0.024 \pm 0.006		
	Chloroform	0.042 \pm 0.003	0.031 \pm 0.003		
	Ethylacetate	0.047 \pm 0.002	0.036 \pm 0.001		
	Butanol	0.043 \pm 0.002	0.039 \pm 0.001		
	H ₂ O	0.046 \pm 0.002	0.057 \pm 0.001		
Control		0.048 \pm 0.005			
LPS		0.699 \pm 0.120			

continued

Sample	Conc. ($\mu\text{g}/\text{ml}$) Fraction	IL-6 (ng/ml)		
		10	10	100
민들레	Methanol			
	Hexane	0.156 \pm 0.102	0.001 \pm 0.001	0.007 \pm 0.001
	Chloroform	0.070 \pm 0.007	0.347 \pm 0.452	0.122 \pm 0.120
	Ethylacetate	0.056 \pm 0.044	0.005 \pm 0.003	0.073 \pm 0.055
	Butanol	0.043 \pm 0.005	0.001 \pm 0.001	0.011 \pm 0.005
	H ₂ O	0.049 \pm 0.019	0.001 \pm 0.000	0.010 \pm 0.009
질경이	Hexane	0.194 \pm 0.029	0.081 \pm 0.028	0.742 \pm 0.463
	Chloroform	0.508 \pm 0.688	0.276 \pm 0.347	1.203 \pm 1.354*
	Ethylacetate	0.133 \pm 0.145	0.405 \pm 0.189	0.029 \pm 0.008
	Butanol	0.117 \pm 0.047	0.069 \pm 0.065	0.126 \pm 0.175
	H ₂ O	0.020 \pm 0.023	0.094 \pm 0.000	0.099 \pm 0.093
속단	Hexane	0.145 \pm 0.129	0.362 \pm 0.282	0.419 \pm 0.342
	Chloroform	0.285 \pm 0.184	1.475 \pm 0.136	6.276 \pm 6.404*
	Ethylacetate	2.802 \pm 1.864*	0.041 \pm 0.025	0.067 \pm 0.010
	Butanol	0.053 \pm 0.063	0.006 \pm 0.002	0.028 \pm 0.026
	H ₂ O	0.207 \pm 0.138	0.247 \pm 0.314	0.027 \pm 0.030
백작약	Hexane	0.168 \pm 0.200	0.104 \pm 0.144	0.558 \pm 0.761
	Chloroform	7.337 \pm 2.494*	10.500 \pm 0.182*	9.916 \pm 0.172*
	Ethylacetate	3.447 \pm 1.096*	0.063 \pm 0.048	0.405 \pm 0.458
	Butanol	0.541 \pm 0.050	0.667 \pm 0.595	0.691 \pm 0.487
	H ₂ O	0.850 \pm 0.716	4.333 \pm 1.378*	1.952 \pm 1.763
어성초	Hexane	0.637 \pm 0.333	1.007 \pm 0.590	0.574 \pm 0.086
	Chloroform	2.517 \pm 1.512	0.060 \pm 0.035	0.665 \pm 0.334
	Ethylacetate	3.781 \pm 1.977*	9.135 \pm 1.990*	8.049 \pm 9.629*
	Butanol	0.051 \pm 0.055	0.018 \pm 0.006	2.657 \pm 3.748*
	H ₂ O	3.152 \pm 1.275*	0.782 \pm 0.510	0.588 \pm 0.694
Control		0.015 \pm 0.006		

다. 분획별 추출물과 TNF- α

1) 민들레의 분획별 추출물과 TNF- α

IL-6나 IL-1에 비해 많은 양의 TNF- α 를 분비했는데, 특히 ethylacetate 층에서는 각 농도에서 0.287ng/ml, 0.328ng/ml, 0.434ng/ml의 TNF- α 를 분비하였다. Chloroform 층에서도 각 농도에서 0.925ng/ml, 1.493ng/ml, 0.833ng/ml의 TNF- α 를 각각 분비하였다(대조군 0.214ng/ml).

2) 질경이의 분획별 추출물과 TNF- α

질경이는 hexane과 chloroform층에서 면역증강효과가 보였는데, hexane 10 μ g/ml 첨가시 0.287ng/ml, chloroform 10 μ g/ml 첨가시 0.657ng/ml로 대조군(0.323ng/ml)보다 많은 양의 TNF- α 를 분비하였다.

3) 숙단의 분획별 추출물과 TNF- α

Hexane 층에서는 10 μ g/ml 첨가시 0.538ng/ml로 가장 많은 양의 TNF- α 를 분비하였다. 그 외에 butanol층의 10 μ g/ml, 100 μ g/ml 첨가군에서도 대조군보다 많은 양(0.221ng/ml, 0.240ng/ml)의 TNF- α 를 분비하였다.

4) 백작약의 분획별 추출물과 TNF- α

Hexane 첨가시 10, 100 μ g/ml 농도에서 대조군보다 많은 양의 TNF- α 를 분비(0.303ng/ml, 0.411ng/ml)하였고, 물층과 butanol 층에서도 10 μ g/ml, 100 μ g/ml 첨가시 각각 0.259ng/ml, 0.857ng/ml, 0.238ng/ml, 0.586ng/ml의 TNF- α 를 분비하였으나, 유의적이지는 않았다.

5) 어성초의 분획별 추출물과 TNF- α

다른 시료에 비해 많은 양의 TNF- α 를 분비했는데, 10 μ g/ml 첨가시

butanol층을 제외한 모든 층에서 대조군보다 많은 양의 TNF- α 를 분비하였다. 특히, chloroform과 물층에서는 각각 5.577ng/ml, 3.924ng/ml의 TNF- α 를 분비하였고, 이들은 대조군보다 유의적으로 많은 양이다.

6) 참취의 분획별 추출물과 TNF- α

전체적으로 분비된 TNF- α 의 양이 적기는 하지만, 모두 대조군(0.037ng/ml) 보다는 많은 양을 분비했다.

7) 쇠비름의 분획별 추출물과 TNF- α

Chloroform 층에서 10 μ g/ml, 100 μ g/ml 첨가시 대조군(0.190ng/ml) 보다 상당히 많은 양(0.508ng/ml, 0.276ng/ml)의 TNF- α 을 분비하였다.

Table 16. Macrophage stimulating activity toward TNF- α production in vitro

Sample	Conc. (μ g/ml) Fraction	TNF- α (ng/ml)	
		10	100
참취	Methanol	0.042 \pm 0.007	0.088 \pm 0.003
	Chloroform	0.052 \pm 0.002	0.070 \pm 0.005
	Ethylacetate	0.059 \pm 0.003	0.084 \pm 0.003
	Butanol	0.057 \pm 0.003	0.082 \pm 0.009
	H ₂ O	0.056 \pm 0.004	0.086 \pm 0.004
Control		0.037 \pm 0.010	
LPS		0.066 \pm 0.005	
쇠비름	Hexane	0.194 \pm 0.029	0.081 \pm 0.028
	Chloroform	0.508 \pm 0.688	0.276 \pm 0.347
	Ethylacetate	0.133 \pm 0.145	0.405 \pm 0.189
	Butanol	0.117 \pm 0.047	0.069 \pm 0.065
	H ₂ O	0.020 \pm 0.023	0.094 \pm 0.000
Control		0.190 \pm 0.010	
LPS		0.323 \pm 0.021	

continued

Sample	Conc. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	TNF- α (ng/ml)		
		Fraction	1	10
민들레	Hexane	0.044 \pm 0.024	0.082 \pm 0.032	0.192 \pm 0.038
	Chloroform	0.925 \pm 1.194	1.493 \pm 1.502	0.833 \pm 0.480
	Ethylacetate	0.287 \pm 0.316	0.328 \pm 0.258	0.434 \pm 0.530
	Butanol	0.010 \pm 0.006	0.106 \pm 0.074	0.163 \pm 0.201
	H ₂ O	0.008 \pm 0.004	0.244 \pm 0.180	0.093 \pm 0.041
질경이	Hexane	0.213 \pm 0.082	0.287 \pm 0.240	0.102 \pm 0.055
	Chloroform	0.240 \pm 0.247	0.657 \pm 0.730	0.102 \pm 0.128
	Ethylacetate	0.128 \pm 0.139	0.137 \pm 0.008	0.036 \pm 0.015
	Butanol	0.185 \pm 0.027	0.172 \pm 0.054	0.154 \pm 0.107
	H ₂ O	0.191 \pm 0.163	0.249 \pm 0.210	0.105 \pm 0.133
속단	Hexane	0.095 \pm 0.078	0.538 \pm 0.372	0.196 \pm 0.061
	Chloroform	0.048 \pm 0.008	0.184 \pm 0.085	0.134 \pm 0.025
	Ethylacetate	0.051 \pm 0.004	0.111 \pm 0.129	0.049 \pm 0.038
	Butanol	0.173 \pm 0.223	0.221 \pm 0.223	0.240 \pm 0.323
	H ₂ O	0.141 \pm 0.052	0.062 \pm 0.003	0.211 \pm 0.086
백작약	Hexane	0.010 \pm 0.131	0.303 \pm 0.394	0.411 \pm 0.551
	Chloroform	0.046 \pm 0.028	0.117 \pm 0.010	0.196 \pm 0.057
	Ethylacetate	0.095 \pm 0.035	0.007 \pm 0.000	0.018 \pm 0.003
	Butanol	0.050 \pm 0.038	0.238 \pm 0.201	0.586 \pm 0.641
	H ₂ O	0.185 \pm 0.038	0.259 \pm 0.287	0.857 \pm 0.705
어성초	Hexane	0.313 \pm 0.417	0.469 \pm 0.602	0.122 \pm 0.127
	Chloroform	0.250 \pm 0.128	5.577 \pm 0.742*	0.407 \pm 0.301
	Ethylacetate	0.141 \pm 0.141	0.912 \pm 0.675	0.027 \pm 0.017
	Butanol	0.098 \pm 0.108	0.095 \pm 0.080	0.255 \pm 0.079
	H ₂ O	0.165 \pm 0.080	3.924 \pm 4.971*	0.032 \pm 0.001
Control		0.214 \pm 0.188		

제 4 절 In vivo animal diet study

1. 구황식물의 선별 및 시료 처리

위에서 선별한 17종의 구황식물 중 비장세포증식능을 향상시킨 민들레, 질경이, 숙단, 어성초, 백작약과 대식세포에 의한 cytokine 분비능을 향상시킨 쇠비름, 참취 등 7가지 시료를 선정, 계통별 추출물을 이용하여 in vitro 실험을 실시하였다. 그리고, 이 중 숙단, 어성초, 백작약, 쇠비름, 참취 등 5가지 시료는 그 활성능이 높은 것으로 보여, 이들 시료의 에탄올 및 열수추출물을 이용하여 in vivo animal diet study를 실시하였다. 특히, 어성초, 백작약, 쇠비름, 참취는 물층에서의 효과가 비교적 좋았으므로, 열수추출물을 이용하여 실험을 실시하였다.

가. 에탄올 추출 및 열수추출

시료를 40℃에서 건조시킨 후 분쇄하여 일정량을 취한 후 에탄올 추출물과 열수추출물을 얻었다. 숙단은 10배의 70% 에탄올을 용매로 80℃에서 3시간씩 3회 환류냉각시켜서 에탄올 추출물을 얻었다. 물층에서 강한 면역증강효과를 보인 백작약, 쇠비름, 어성초, 참취는 에탄올 추출물과 동일한 방법으로 하여 열수추출물을 얻었고, 이들 추출물을 여과, 농축시켜 in vivo animal diet study에 이용하였다.

2. 식이의 경구투여

실험 동물은 6주령 ICR male mouse로 고형 배합사료로 일주일의 적응기간을 거친 후, 각 군당 6마리씩 선정하여 각 추출물 첨가군으로 나누었다. 숙단, 백작약, 어성초, 쇠비름, 참취의 ethanol 추출물 및 열수 추출물은 생리식염수에 20~3,000mg/kg의 농도가 되도록 녹여서 pilot study를 한 결과, 적정 농도로 20, 100, 500, 1,000mg/kg로 결정하여 투여하였다. 투여기간 및 회수는 pilot study의 결과에 따라서 0.2ml씩 2주간 격일로 경구투여 하였고, 대조군은 생리식염수 0.2ml를 투여하였다. 마지막 투여 1일 후에 마우스를 희생시켜 마우스 비장세포 증식능 및 복강대식세포에 의한 cytokine (IL-1 β , IL-6, TNF- α) 분비능을 위와 동일하고 동일한 방법으로 측정하였다.

3. 각 시료별 식이섭취 효과

가. 백작약 추출물의 첨가 효과

백작약 열수 추출물 투여에 의한 비장세포 증식능을 보면, 모든 투여군에서 대조군보다 증식능이 높았다. 복강대식세포에 의한 cytokine 분비능을 살펴보면, IL-1 β 는 500mg/kg (0.184ng/ml), 1,000mg/kg (0.170ng/ml)군에서 대조군보다 많은 양이 분비되었다. IL-6와 TNF- α 도 500mg/kg, 1,000mg/kg 투여군에서 대조군보다 많이 분비되었다. ConA와 LPS 처리에 의한 영향을 살펴보면, ConA는 증식능을 그다지 많이 향상시키지 않았지만, LPS를 처리한 경우, cytokine 분비능이 월등히 상승되었음을 볼 수 있다. 특히, TNF- α 의 경우, 20배 이상이 분비되었다.

Table 17. Proliferation of splenocytes of mouse orally administered with different levels of *Paeonia japonica* var. *pilosa* NAKAI

백작약 Conc. (mg/kg b.w.)	Proliferation(%)		
	Control	+ConA	+LPS
Control	1.000 \pm 0.321	1.751 \pm 0.321	1.374 \pm 0.118
20	1.236\pm0.452	1.547 \pm 0.849	1.338 \pm 0.541
100	1.155\pm0.152	1.758\pm0.713	1.473\pm0.402
500	1.372\pm0.426	1.450 \pm 0.356	1.142 \pm 0.108
1000	1.189\pm0.342	1.278 \pm 0.414	1.229 \pm 0.274

Table 18. Cytokine production by activated peritoneal macrophage of mouse orally administered with different levels of *Paeonia japonica* var. *pilosa* NAKAI

백작약			+ConA	+LPS
sample conc. (mg/kg b.w.)				
IL-1 β (ng/ml)	Control	0.165 \pm 0.006	0.188 \pm 0.013	0.244 \pm 0.017
	100	0.156 \pm 0.012	0.089 \pm 0.013	0.758 \pm 0.006
	500	0.184 \pm 0.004	0.130 \pm 0.003	0.313 \pm 0.002
	1000	0.170 \pm 0.014	0.080 \pm 0.016	0.270 \pm 0.018
IL-6 (ng/ml)	Control	0.311 \pm 0.007	0.188 \pm 0.013	0.270 \pm 0.018
	100	0.309 \pm 0.001	0.089 \pm 0.013	0.273 \pm 0.001
	500	0.313 \pm 0.002	0.130 \pm 0.003	0.758 \pm 0.006
	1000	0.320 \pm 0.016	0.080 \pm 0.016	0.244 \pm 0.017
TNF- α (ng/ml)	Control	0.054 \pm 0.003	0.166 \pm 0.004	1.298 \pm 0.011
	100	0.055 \pm 0.004	0.089 \pm 0.023	1.193 \pm 0.014
	500	0.056 \pm 0.003	0.148 \pm 0.004	1.585 \pm 0.078
	1000	0.062 \pm 0.007	0.146 \pm 0.017	1.573 \pm 0.046

나. 쇠비름 추출물의 첨가 효과

쇠비름 열수 추출물 첨가에 의한 비장세포 증식능은 100mg/kg 투여군에서 ConA 처리시 29%정도 상승되었다. 복강 대식세포에 의한 cytokine 분비능은 IL-6에서만 상승효과를 보였다. IL-6를 살펴보면, 100mg/kg, 500mg/kg, 1000mg/kg 투여군(373ng/ml, 388ng/ml, 382ng/ml) 모두에서 대조군(0.051ng/ml)보다 월등히 상승했음을 볼 수 있었다. LPS 처리에 의한 분비능 상승효과는 쇠비름에서도 보였다.

Table 19. Proliferation of splenocytes of mouse orally administered with different levels of *Portulaca oleracea* L.

Conc. (mg/kg b. w.)	Proliferation(%)		
	Control	+ConA	+LPS
Control	1.000±0.350	1.309±0.195	1.717±0.437
20	1.012±0.241	1.249±0.276	1.511±0.136
100	0.853±0.327	1.594±0.770	1.796±0.896
500	0.805±0.256	1.074±0.225	1.617±0.351
1000	0.819±0.140	0.758±0.049	1.239±0.455

Table 20. Cytokine production by activated peritoneal macrophage of mouse orally administered with different levels of *Portulaca oleracea* L.

sample conc. (mg/kg b. w.)	Proliferation(%)			
	Control	+ConA	+LPS	
IL-1 β (ng/ml)	Control	0.329±0.004	0.466±0.004	0.589±0.011
	100	0.271±0.009	0.089±0.010	0.168±0.023
	500	0.242±0.006	0.168±0.001	0.285±0.000
	1000	0.237±0.001	0.176±0.005	0.264±0.008
IL-6 (ng/ml)	Control	0.051±0.004	0.466±0.004	0.589±0.011
	100	0.373±0.044	0.373±0.044	0.168±0.023
	500	0.388±0.051	0.168±0.077	0.285±0.000
	1000	0.382±0.045	0.176±0.005	0.264±0.008
TNF- α (ng/ml)	Control	0.233±0.010	0.380±0.002	0.433±0.131
	100	0.111±0.011	0.089±0.005	0.381±0.036
	500	0.094±0.004	0.197±0.002	0.197±0.002
	1000	0.051±0.004	0.131±0.005	0.407±0.021

다. 어성초 추출물의 첨가 효과

어성초 추출물 첨가식이시 비장세포 증식능은 20mg/kg, 100mg/kg 투여군에서 9-21%정도 증가하였다. 복강 대식세포에 의한 IL-1 β 분비는 대조군에 비해 투여군에서 모두 낮았고, IL-6는 대조군과 투여군이 거의 같은 수준으로 나타났다. TNF- α 는 100mg/kg 투여군(0.058ng/ml)과 1,000mg/kg 투여군(0.128ng/ml)에서 대조군(0.048ng/ml)보다 많이 분비되었다.

Table 21. Cytokine production by activated peritoneal macrophage of mouse orally administered with different levels of *Houttuynia cordata* THUNB.

어성초			+ConA	+LPS
sample conc. (mg/kg b. w.)				
IL-1 β (ng/ml)	Control	0.628 \pm 0.005	1.000 \pm 0.015	1.008 \pm 0.008
	100	0.300 \pm 0.030	0.280 \pm 0.005	0.683 \pm 0.000
	500	0.274 \pm 0.031	0.222 \pm 0.002	0.380 \pm 0.017
	1000	0.321 \pm 0.007	0.234 \pm 0.005	0.260 \pm 0.019
IL-6 (ng/ml)	Control	0.007 \pm 0.000	0.007 \pm 0.000	0.007 \pm 0.000
	100	0.007 \pm 0.000	0.007 \pm 0.000	0.007 \pm 0.000
	500	0.007 \pm 0.000	0.007 \pm 0.000	0.007 \pm 0.000
	1000	0.007 \pm 0.000	1.000 \pm 0.000	0.007 \pm 0.000
TNF- α (ng/ml)	Control	0.048 \pm 0.004	0.228 \pm 0.001	0.794 \pm 0.059
	100	0.058 \pm 0.009	0.430 \pm 0.109	0.846 \pm 0.243
	500	0.017 \pm 0.003	0.116 \pm 0.019	0.498 \pm 0.207
	1000	0.128 \pm 0.005	0.526 \pm 0.006	0.872 \pm 0.439

Table 22. Proliferation of splenocytes of mouse orally administered with different levels of *Houttuynia cordata* THLNB.

Conc. (mg/kg b. w.)	Proliferation(%)		
	Control	+ConA	+LPS
Control	1.000±0.231	1.244±0.100	1.289±0.164
20	1.207±0.325	1.206±0.260	1.041±0.312
100	1.089±0.262	1.218±0.000	1.378±0.000
500	0.959±0.356	1.359±0.500	1.456±0.436
1000	0.974±0.285	1.045±0.213	1.114±0.351

라. 참취 추출물의 투여 효과

참취 열수추출물의 경구투여시 비장세포 증식능은 ConA를 처리한 500mg/kg 투여군에서 14%정도 상승했다. 복강대식세포에 의한 cytokine 분비능은 IL-1 β 에서 확실하게 나타났는데, 500mg/kg 투여군(0.194ng/ml)과 1000mg/kg 투여군(0.166ng/ml)에서 대조군(0.192ng/ml)보다 많은 양이 분비되었음을 볼 수 있다. IL-6는 LPS 처리시 500mg/ml의 농도에서 대조군(0.169ng/ml)보다 많은 양(0.175ng/ml)을 분비했다. TNF- α 도 LPS 처리시 500mg/kg 투여군에서 대조군(0.604ng/ml)보다 많은 양(0.747ng/ml)이 분비되었고, 1000mg/kg 투여군(0.632ng/ml)에서도 대조군보다 약간 많은 양이 분비되었다.

Table 23. Proliferation of splenocytes of mouse orally administered with different levels of Aster scaber THUNB

Conc. (mg/kg b.w.)	참취	Proliferation(%)		
		Control	+ConA	+LPS
Control		1.000±0.423	1.786±0.016	2.378±0.346
20		1.077±0.288	1.230±0.534	1.385±0.813
100		0.836±0.292	1.611±0.677	1.698±1.054
500		0.780±0.311	1.922±0.393	2.482±1.983
1000		0.716±0.190	1.212±0.641	1.179±0.601

Table 24. Cytokine production by activated peritoneal macrophage of mouse orally administered with different levels of Aster scaber THUNB

sample conc. (mg/kg b.w.)	참취			
			+ConA	+LPS
IL-1 β (ng/ml)	Control	0.192±0.011	0.100±0.001	0.169±0.005
	100	0.107±0.004	0.018±0.003	0.096±0.021
	500	0.194±0.001	0.092±0.011	0.175±0.017
	1000	0.166±0.001	0.080±0.010	0.126±0.019
IL-6 (ng/ml)	Control	0.208±0.005	0.100±0.001	0.169±0.005
	100	0.152±0.002	0.018±0.003	0.096±0.021
	500	0.175±0.013	0.092±0.011	0.175±0.017
	1000	0.167±0.032	0.080±0.010	0.126±0.019
TNF- α (ng/ml)	Control	0.050±0.005	0.127±0.006	0.604±0.016
	100	0.012±0.001	0.091±0.005	0.453±0.015
	500	0.018±0.002	0.106±0.002	0.747±0.036
	1000	0.028±0.001	0.094±0.007	0.632±0.015

마. 속단 추출물의 투여 효과

속단 에탄올 추출물의 경구투여시 비장세포 증식능은 1000mg/kg 투여시 8%정도 상승했다. 복강대식세포에 의한 cytokine 분비능은 100mg/kg, 500mg/kg, 1,000mg/kg 투여군에서 모두 대조군보다 많은 양의 IL-1 β , IL-6, TNF- α 를 각각 분비하였다. 그 중에서도 500mg/kg 투여군의 cytokine 분비능 상승효과가 가장 좋았다

Table 25. Cytokine production by activated peritoneal macrophage of mouse orally administered with different levels of *Phlomis umbrosa* Turcz

속단 sample conc. (mg/kg b. w.)			+LPS
IL-1 β (ng/ml)	Control	0.116 \pm 0.015	1.231 \pm 0.050
	100	0.158 \pm 0.002	1.153 \pm 0.088
	500	0.289 \pm 0.022	2.402 \pm 0.050
	1000	0.162 \pm 0.002	1.116 \pm 0.127
IL-6 (ng/ml)	Control	0.074 \pm 0.001	1.798 \pm 0.005
	100	0.189 \pm 0.001	1.798 \pm 0.005
	500	0.254 \pm 0.002	1.798 \pm 0.005
	1000	0.122 \pm 0.012	1.798 \pm 0.005
TNF- α (ng/ml)	Control	0	0.209 \pm 0.012
	100	0	0.109 \pm 0.017
	500	0	0.340 \pm 0.037
	1000	0	0.290 \pm 0.055

Table 26. Proliferation of splenocytes of mouse orally administered with different levels of *Phlomis umbrosa* TURCZ

Conc. (mg/kg b. w.)	Proliferation(%)		
	control	+ConA	+LPS
Control	1.000±0.002	1.507±0.006	1.649±0.016
20	1.148±0.003	1.137±0.007	0.788±0.008
100	1.601±0.006	1.186±0.007	0.936±0.005
500	1.589±0.003	1.129±0.009	0.810±0.004
1000	1.005±0.003	1.580±0.016	1.448±0.014

제 4 장 참고문헌

1. Koji Hase et al., Immunostimulating activity of Celosian, an antihepatotoxic polysaccharide isolated from *Celosia argentea*. *Planta Medica*, 63, p.216-219, 1997.
2. 한국의 천연물과학 연구, 서울대학교 천연물과학연구소, 1996.
3. Mishell, B.B. and Shiigi, S.M. (1980). *Selected methods in cellular immunology*. 1st ed. San Francisco, WH Freeman and Co., p4-27.
4. Doyle, a., Griffiths, J.B. and Newell, D.G. (1993). *Cell & Tissue culture: laboratory precedures*, John Wikky & Sons Ltd., U.K.
5. Mosmann, T.J. *Immunol. methods* 65, 55-64, 1983.
6. Titus, R.G., Sherry, B. and Cerami, A. : The involvement of TNF, IL-1 and IL-6 in the immune response to protozoan parasites Nonspecific defence. *Elsevier Science*, p.A17, 1991.
7. Stites, D.P. and Terr, a.I. : cytokines, Basic and clinical immunology. Seventh Edition, *Prentice-Hall International Inc.*, p.78, 1992.
8. Mei zhou et al., The effect of tert-butyl hydroperoxide on peritoneal macrophages and the protective effect of protein-bound polysaccharide administered intraperitoneally and orally. *American J. Chinese medicine*, Vol.26 Nos. 3-4, p.301-310, 1998.
9. Singh, V. K., Agarwal, T. S. and Gupta, B. M. Immunomodulatory activity of *Panax Gingseng* extract. *Proceedings of the 4th*

- International ginseng symposium* pp 225-232, 1984.
10. Siverstein, S and Unkeless, J. Innate immunity. *Curr Opin Immunol.* 3 : 47-57, 1991.
 11. Solomon Habtemariam. Cytotoxicity and Immuno suppressive activity of withanolides from *Discopodium penninervium*. *Planta Medica* 63, 15-17, 1997.
 12. Parry, O., Marks, J. A., Okwuasaba, F.K. The skeletal muscle relaxant action of *Portulaca oleracea* : role of potassium ions. *J. Ethnopharmacology.* 40, 187-194, 1993.
 13. Puhlmann, J., Zenk, M.H., Wagner, H. *Phytochemistry* 30, 1141-1145, 1991.
 14. Roesler, J., Emmendorffer, A., Steinmuller, C., Luetting, B., Wagner, H. and Matthes, M. L. L. Application of purified polysaccharide from cell cultures of the plant *Echinacea purpurea* to test subjects mediates activation of the phagocyte system. *Int. J. Immunopharmac.* 13 : 931-941, 1991.
 15. Rui Jin and Satonori Kurashige, Effect of Shi-ka-ron on cytokine production of lymphocytes in mice treated with cyclophosphamide. *America J. Chinese medicine*, Vol.24 No.1, p.37-44, 1996.
 16. Yongwen Zhang, Hiroaki Kiyohara, Tsukasa Matsumoto, and Haruki Yamada. Fractionation and chemical properties of immunomodulating polysaccharides from roots of *Dipsacus asperoides*. *Planta Medica* 63 : 393-399, 1997.
 17. Yamada, H. Structure and antitumor activity of an

- alkali-soluble polysaccharide from *Coedyceps ophioglossoides*.
Carbohydr. Res. 125 : 107-115, 1984.
18. Umezawa, I and K. Komiyama. Potentiation of the chemotherapeutic activity of antineoplastic agents by Juzen-taiho-to (TJ-48). In: kampo Medicine, Hosoya, E. and Y. Yamamura (eds). *Excerpta medica*, Tokyo, 320-327, 1998.
 19. Venkateswaran, P. S. et al., Effects of an extract from *Phyllanthus niruri* on hepatitis B and woodchuck hepatitis viruses : in vitro and in vivo studies. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 84 : 270, 1987.
 20. Saito. K., Nishijima. M., Ohno. N., Nagi. N., Yadomea. T. and Miyzaki. T. Activation of complement and Limulus coagulation systems by and alkali-soluble glucan isolated from *Omphalia lapidescences* and its less-branched derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* 40 : 1227-1230, 1992.
 21. Wang-chi Chen, Dou-mong Hau and Shiuh-sheng Lee. Effects of *Ganoderma lucidum* and krestin on cellular immunocompetence in γ -ray-irradiated mice. *American. J. chinese Medicine* 23(1) : 71-80, 1995.
 22. Weir, D. M. Handbook of experimental immunology. Vol 1&11 4th ed. Oxford, *Blackwell Scientific Publication*, London, 1986.
 23. 강병수 외, 본초학. 영림사, 1995.

한국전통구황식물로부터 기능성 식품 개발 및 응용연구

제 1 장 서 론	209
제 2 장 연구개발의 내용 및 범위	215
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과	229
제 1 절 한국전통구황식물 추출물의 식품부패미생물에 대한 항균성 검색과 농도별 및 분획별 항균성	229
제 2 절 한국전통구황식물 추출물 첨가 어묵의 이화학적 특성	235
1. 육두구, 백작약, 목단피 첨가 어묵의 일반성분변화	235
2. 육두구, 백작약, 목단피 첨가 어묵의 수분함량변화	239
3. 육두구, 백작약, 목단피 첨가 어묵의 색도변화	241
제 4 절 구황식물 추출물 첨가 어묵의 미생물학적 변화	246
1. 육두구 추출물 첨가 어묵의 미생물학적 변화	246
2. 백작약 추출물 첨가 어묵의 미생물학적 변화	246
3. 목단피 추출물 첨가 어묵의 미생물학적 변화	247
제 5 절 구황식물 추출물 첨가 어묵의 물성학적 특성	249

제 6 절 구황식물 추출물 첨가 어묵의 관능적 특성	250
1. 육두구 추출물 첨가 어묵의 관능적 특성	250
2. 백작약 추출물 첨가 어묵의 관능적 특성	252
3. 목단피 추출물 첨가 어묵의 관능적 특성	253
제 4 장 참고문헌	254

한국전통구황식물로부터 기능성 식품 개발 및 응용연구

제 1 장 서 론

오늘날 산업문명이 고도로 발달함에 따라 우리의 식생활도 급격히 변화되어 왔으며 식품위생은 식품의 유해 미생물에 의해 야기되는 건강장해, 즉 식중독과 관련하여 커다란 사회문제로서 그 중요성이 날로 증가되어 가고 있다. 최근 급격한 산업발달에 힘입어 제품의 고급화, 편의화 추세에 따라 냉동, 냉장식품들의 수요가 급격히 증가되고 있으나 이들 냉동, 냉장식품들의 온도가 유통, 저장 또는 소비과정에서 적절치 못하게 관리된다면 저온 미생물들의 증식에 의하여 부패 및 심각한 식중독 발생의 우려가 있다. 따라서 이와 같은 유해 미생물의 생육을 억제하고 식품의 저장기간을 연장하고자 각종 보존제를 사용하여 왔는데 대부분의 보존제는 화학적 합성품으로 그 안전성이 심각하게 대두되고 있다. 각종 부패성 및 병원성 미생물에 대한 강력한 살균력과 동시에 안전성을 가진 소독제의 개발이 진행되어 왔다. 그러나 현재까지 부패성 및 병원성 미생물의 증식을 억제하려는 의도 하에서 사용되고 있는 대부분의 화학 방부제는 안전한 첨가량 범위 내에서는 효과가 적고, 처리 효과가 있는 농도수준에서는 독성을 일으킬 가능성을 보여주고 있다. 그 결과 대부분의 소비자들은 합성첨가제를 이용한 식품의 사용을 꺼려하고 있다. 그러므로 안전성의 문제가 없는 천연 첨가제 물질의 개발과 이용은 각종 가공식품의 저장성 향상 및 저온식품의 안전성 확보

라는 면에서 필연적이라 하겠다. 이러한 점을 고려하여 볼 때, 이상적인 소독제란 미생물의 오염방지나 살균효과가 요구되는 여러 가지 광범위한 제품이나 분야에서의 처리효과와 아울러, 무독성 및 안전성이 확실히 입증될 수 있어야 하였다. 이러한 취지에서 천연추출물을 대상으로 연구가 진행되고 있는데 그 중 하나가 구황식물의 추출물이다.

지금까지 많은 연구자들이 천연항균제의 개발에 대한 연구를 꾸준히 해 온 결과 이러한 천연 항균물질들의 기작이 서서히 밝혀지고 있다. 현재까지 연구된 대부분의 천연항균성 물질은 동물 또는 식품체내에 함유되어 있는 특정 성분을 추출하여 이용되었으며 또한 단백질, 특정 효소, 유기산, 젖산균에 의해 분비되는 bacteriocin 등이 항균성을 나타내는 것으로 알려지고 있다.

천연물에 존재하는 항균성 물질에 대한 연구는 국내외에서 오래 전부터 시도되고 있다. 특히 국외에서는 천연 보존제 개발의 일환으로 많은 herbs와 spices를 소재로 한 항균성에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다. 구황식물을 추출하거나 그대로 식품에 첨가하여 항균성을 본 연구는 최근 우리나라에서도 매우 활발히 진행되고 있다. 구황식물인 질경이를 국수와 떡에 첨가하여 항균성을 본 결과 대조군에 비해 첨가군이 미생물의 집락이 적게 생겼으며, 총균수도 적었다.

Cinnamon을 구성하는 한 성분인 *o*-methoxycinnamaldehyde는 곰팡이가 생산하는 유독성 대사산물(mycotoxin)인 aflatoxin을 생산하는 *A. parasiticus*와 *A. flavus*의 성장을 저해하며, oregano, thyme, sassafras, sage, rosemary는 *V. parahaemolyticus*의 성장을 저해하며, clove, allspice, cumin, thyme, caraway, rosemary, sage도 *Aspergillus*속 곰팡이의 성장과 aflatoxin의 생산을 저해하였다.고 보고된 바 있다. 또한 oregano, rosemary, sage, thyme은 *Lactobacillus*

*plantarum*과 *Pediococcus acidilactici*의 성장과 산 생성을 저해하며, sage는 병원성 세균인 *S. aureus*, *B. cereus*, *Pseudomonas sp.*와 *S. typhimurium*의 성장도 저해하였다.고 알려져 있다. 그 밖의 coriander, nutmeg, pepper, mint, vanillin, savory, parsley도 항균성을 가지고 있음이 보고되었다.

구황식물인 치자, 구기자, 오미자, 황백, 자초 등도 항균력이 뛰어나 천연식품보존제로써의 이용가능성이 높다고 하였으며 황백을 첨가한 간장의 경우 방부효과를 보였고, 방기, 감초, 뽕나무, 고삼의 에탄올 추출물은 식중독을 유발하는 *Listeria monocytogenes*의 증식을 강하게 억제하고, 야생식물이면서 한약재와 같이 약용식물로 사용되어 온 쑥, 방기, 감초 및 단삼 등에 대한 항균력도 보고되었다. 또한 저온유통이 불가피하면서도 저장가능 기간이 짧은 두부, 어묵 및 막걸리의 보존성을 향상시키기 위해 이들의 부패에 관여하는 균주를 분리한 후 항균효과를 비교한 결과 황백, 정향, 오배자, 리기다, 백급, 적백작약의 에탄올 추출물이 확실한 항균 효과를 보였다고 하였다. 항미생물활성을 갖는 물질의 분리에 관한 연구로는 두릅수피에서 3,4-dihydroxybenzoic acid, 솔잎에서 benzoic acid를 분리하였다.

그 밖의 사철쑥, 지칭개, 뿌리뱅이, 꿀풀, 광대나물, 향나무, 상백피, 환삼덩굴, 쑥, 편축, 단삼에서 항균효과가 밝혀졌고, 대나무 잎의 ethyl acetate 추출물이 김치의 품질 저하 요인인 가스 발생 과다, 산미 과다, 연부현상의 원인균의 성장저해효과를 나타내었다.

이러한 구황식물 중에서 백작약(芍藥, Jakyak, *Paeonia japonica*)은 참백작약 및 동속(同屬) 근록식물(近緣植物)의 뿌리로서 매우 중요한 생약 중의 하나이다. 한방에서는 수렴완화(收斂緩和), 진경(鎮痙), 진통제(鎮痛劑)로서 사용되어 왔으며 계지가화균약탕(桂枝加菌藥湯)등으

로 사용되어져 왔다. 또한 백작약과에 속하는 여러해살이풀로 뿌리는 짧고 굵으며 줄기는 곧고 키는 60cm 정도이다. 잎은 어긋나고 잎자루는 길며 2회 삼출 겹잎으로 작은 잎은 알 모양이며 톱니는 없다. 꽃은 줄기 끝에 한 개씩 나며 5~6월에 흰 꽃이 핀다. 생약으로는 뿌리를 말린 것이며 생지는 산의 나무 그늘에서 자란다. 우리나라 전국에 분포되어 있으며 한방에서는 3월과 8월에 땅 속 줄기를 채취하여 햇볕에 말려 치조(治燥), 양혈제(涼血劑), 보혈(補血), 익비(益脾), 지통(止痛)에 사용하였다. 과실은 골돌과(蓇葖果)로서 1~3개이고 뿔 모양으로 홍색의 성숙치 않은 종자와 흑색의 성숙한 종자가 노출된다. 이종의 일종으로 잎 뒤에 강모가 약간 있는 것을 var. *typica* Makino라 하며 함북, 평남, 평북에 난다. 번식은 분근을 하거나 종자를 이용하였다. 약용으로 쓰이는 백작약은 미나리아제비과인 백작약의 뿌리를 말린 것, 또는 찢은 것을 말린 것으로 겉껍질을 제거한 것을 백작, 겉껍질을 제거하고 뜨거운 물에 데쳐서 말린 것을 적작이라고 하였다. 상품으로는 내부가 희고 손가락처럼 굵고 단단한 긴 봉상(棒狀)의 것이 좋다. 성분으로는 페오니플로린, 아르비 플로린, 안식향산, 탄닌 등이 있으며, 백작은 진통의 효과가 강하고 복통, 복만, 신체수족의 동통 등에 사용하였다. 적백작약은 이뇨, 산혈의 효과가 강하고 부인질환에 응용된다. 처방으로는 황금탕, 백작약감초부자탕, 소견중탕, 양혈평간산, 백작약감초탕 등에 쓰인다.

백작약감초탕은 혈청 estrogen의 농도를 증가시키며 난포의 성숙을 촉진시키는 것으로 관찰되었는데, 이는 백작약에 의한 것으로 사료되고 있다.

육두구(Nutmeg, *Myristica fragrans* Houtt.)는 육두구와 육두의 가종피(假種皮) 및 종피를 제외한 씨앗으로 가종피를 종피에서 제거하고 늘

려서 유두구화(일명 메이스)를 만든다. 겉면은 여린 갈색으로 계란모양이며, 가로로 자르면 속에 대라석과 같은 갈색무늬가 있고, 그 틈새에 있는 열매가 희게 크다. 성분으로는 정유성분과 고히지방을 함유하고 있고, 구풍, 흥분제, 향신료로서 사용된다. 이 육두구는 영국에서 Chaucer 시대에 잘 알려진 향신료 중 하나로 달콤하고 고소한 맛과 나무향을 내는 육두구는 음식에 넣거나 와인이나 우유술에 넣어졌다. 이런 현상은 육두구의 주요 구성요소에 의해 설명될 수 있다. 이 구성요소는 환각제와 비슷한 성질을 가져 많이 복용할 경우 환각현상이나 환영현상이 증가하였다. 이태리에서는 veal이나 치즈 또는 토매틀리니, 라비올리 또는 카넬로니 파스타의 시금치 스테핑에 첨가하였다. 중동에서는 양고기 찜에, 프랑스요리에서는 베카멜이나 빵소스에 첨가되어졌다.

한편 우리 나라에서는 수산물 가공식품의 이용은 국민의 소득 향상에 따라 단백질 공급원으로서의 역할에서 최근 색, 풍미를 개선한 기호식품으로 발전하고 있는 추세이다. 수산연제품의 하나인 어묵은 비교적 진보된 기술을 이용하여 제조된 가공식품으로서 다양한 어종을 원료육으로 사용할 수 있을 뿐만 아니라 간편식품으로서의 특징을 지니고 있다. 또한 도시 인구의 집중과 여성 취업의 증가 등으로 손쉽고 간편하게 조리할 수 있는 수산가공식품이 많이 생산되고 있는 실정이다. 이러한 어묵은 식품방부제의 사용이 전면 금지됨에 따라 재래식 방법으로 만든 어묵은 유통상 큰 어려움을 겪고 있다. 이러한 어묵의 보존성을 향상시키기 위해 미생물학적 측면의 연구가 활발히 진행되어 120℃에서 4분간 가열살균하여 상온유통하는 방법, 수분활성을 0.94 이하로 조절하여 상온유통하는 방법, 난백 lysozyme을 이용하는 방법 등이 연구되었다. 그러나 사용의 간편성 및 경제적 측면에서 potassium sorbate를

보존제로 사용하고 10℃이하의 저온에서 유통하는 방법이 가장 많이 이용되고 있다. 이렇게 현대는 미생물에 의한 식품의 부패나 변질을 방지하기 위하여 보존료를 사용하고 있으나 이 보존료에 대한 안전성이 문제되고 있다. 현재 연제품에 사용되고 있는 potassium sorbate는 비교적 독성이 없다고 알려져 있다. Potassium sorbate는 제품 1kg당 sorbic acid의 양으로서 2g이하까지 허용되고 있으나 젖산균과 嫌氣性 胞子形成種菌(혐기성포자형성종균)에는 거의 효과가 없으므로 이와 같은 부패균에 의한 선도 저하는 막을 수가 없다. 그러므로 인체에 안전하고 부패미생물을 제거할 수 있는 lysozyme을 이용하려는 시도가 있었으며 그 결과 어묵의 분리 세균 6종의 균은 발육이 억제되었다. 또 赤可 등은 수산 연제품에 난백 lysozyme 0.05%를 첨가하였을 때 sorbic acid를 0.1% 첨가한 것보다 방부효과가 우수하였다고 하였다.

수산물에 대한 항균성 및 항산화 효과로 grapefruit 종자추출물의 효과를 본 결과 대조군에 비해 시험군이 좋은 항균효과를 나타내었으며, 어묵에 알긴산을 첨가하였을 경우 저장기간이 대조군에 비해 2일에서 4일 정도 증가하는 것을 볼 수 있었다. 어묵에 키토산을 첨가 시에도 저장기간이 증가하는 경향을 보였다.

본 연구에서는 1994년에 68,058ton, 1995년 70,719ton으로 국민소득의 증가와 함께 앞으로 그 소비가 증가할 것으로 보이는 수산가공식품의 하나인 어묵에 육두구, 백작약 그리고 목단피 추출물을 첨가하여 저장안정성과 어묵의 이화학적, 물성학적, 관능적 특성을 살펴봄으로써 다양한 생리활성을 지닌 구황식물의 실제 식품에의 이용가능성을 검토해 보았다.

제 2 장 연구개발의 내용 및 범위

제 1 절 실험재료

1. Surimi

본 실험에 사용한 시료는 북양에서 어획한 명태(*Alasca pollack*)를 원료로 하여 선상에서 제조한 냉동고기플(10kg block, SA grade : sorbitol 4%, sucrose 4%, polyphosphate 0.2%)를 대림수산(주)에서 구입하여 사용하였다.

2. 구황식물

육두구, 백작약, 목단피는 1999년 7월에 동대문구 제기동에 위치한 경동시장에서 전라도 의성 廠의 건조된 것을 구입하여 blender(FM-680W, HANL Co., WonJoo, Korea)로 분쇄하여 제분한 것을 사용하였다. 제분한 시료는 polyethylene bag으로 포장하여 -40℃ Deep freezer에서 보관하면서 사용하였다.

3. NaCl

NaCl은 시약용 First grade을 사용하였다.

4. 사용균주 및 배지

본 연구에 사용한 균주는 자연계에 널리 분포하여 식품의 변질과 관련이 있는 *Bacillus subtilis* KCTC 1021, gram 음성균으로 오염의 지표균인 동시에 부패세균인 *Escherichia coli* KCTC 2441, gram 양성균으로서 enterotoxin을 생성하여 식중독의 원인이 되는 *Staphylococcus aureus*

KCTC 1916, 냉동식품 오염의 원인이 되는 *Listeria monocytogenes* KCTC 3569, 그리고 호염성 균으로 수산식품의 섭취에 의해 발생하는 장염의 원인 세균이며, 식중독을 유발하는 *Vibrio parahaemolyticus* KCTC 2471 을 선정하여 사용하였다. 배지는 *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*는 tryptic soy broth(TSB)와 nutrient agar(NA)를 사용하였고, *Vibrio parahaemolyticus*는 위와 같은 배지에 식염을 3% 첨가하여 사용하였고, *Listeria monocytogenes*는 Brain heart infusion(BHI)와 Brain heart infusion agar를 사용하였다.

5. 시약

추출용 용매는 시약용 First grade methanol, *n*-hexane, chloroform, ethylacetate, *n*-butanol을 사용하였다.

어묵에 첨가하기 위한 ethanol 추출물의 제조에서는 시약용 Special grade 99.9%의 ethanol을 사용하였다.

제 2 절 실험방법

1. 추출방법

분말화한 육두구, 백작약, 목단피를 Figure 1과 같이 methanol로 환류 냉각시키면서 80℃ 수욕상에서 3시간씩 3회 반복 추출한 후 감압농축으로 하여 메탄올 추출물을 얻었다.

어묵에 첨가하기 위한 ethanol 추출물도 Figure 1과 같은 방법으로 추출하였다.

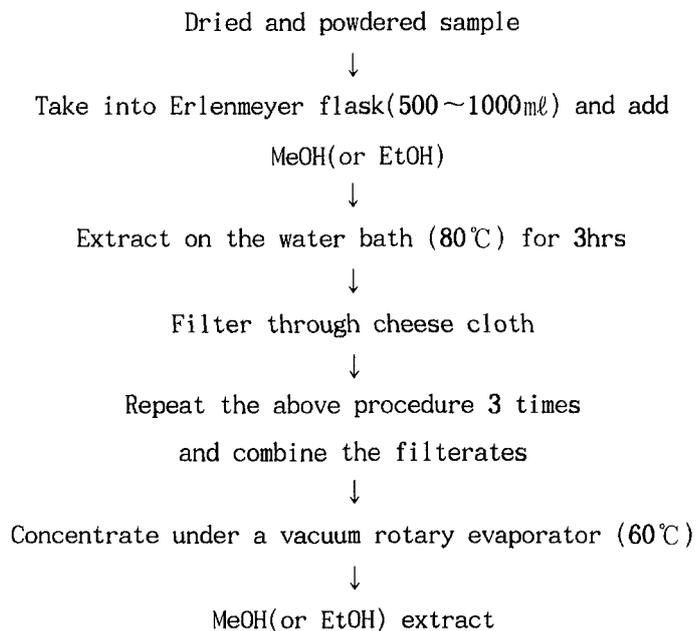


Figure 1. Extraction procedure of MeOH, EtOH extract

2. 구황식물 메탄올 추출물의 항균성 검색

육두구, 백작약, 목단피의 항균성을 액체배지희석법으로 검색하였다. *B. subtilis*, *E. coli*, *S. aureus* 3종의 실험균주를 사면배지에 계대배양 시키고, 균주를 1백금이 취해 TSB 10ml가 든 시험관에 접종하여 37°C에서 8시간 배양하여 10⁵ colony forming unit(CFU/ml)가 되도록 멸균 증류수로 10배 희석법으로 연속적으로 희석하여 조정한 후 0.1ml씩 접종하였다. 배지에 첨가되는 추출물의 최종 농도가 1000µg/ml가 되도록 추출물을 첨가한 후 균주를 0.1ml 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 후 분광광도계를 사용하여 660nm에서 optical density(O.D.)를 측정하였다. 저해력은 다음 식에 의해 산출하였다. 이때 blank는 각 시료를 1000µg/ml로 첨가하여 한 것으로 하였다.

% inhibitory effect =

$$\frac{(\text{control-control blank}) - (\text{treatment-treatment blank})}{(\text{control-control blank})} \times 100$$

3. 식품부패미생물에 대한 육두구, 백작약, 목단피 추출물의 항균성

본 연구에 사용된 5종의 실험균주는 모두 사면배지에 계대배양하면서 사용하였다. *B. subtilis*, *E. coli*, *S. aureus*는 TSB와 agar를 사용하였고, *V. parahaemolyticus*는 TSB와 agar에 3% 식염을 첨가하여 사용하였다. 사면배지에 배양한 균주를 1백금이 취해 TSB 10ml가 든 시험관에 접종하여 37°C에서 8시간 배양하여 사용하였고 항균성 시험은 Figure 2와 같은 액체배지희석법에 의해 실시하였다.

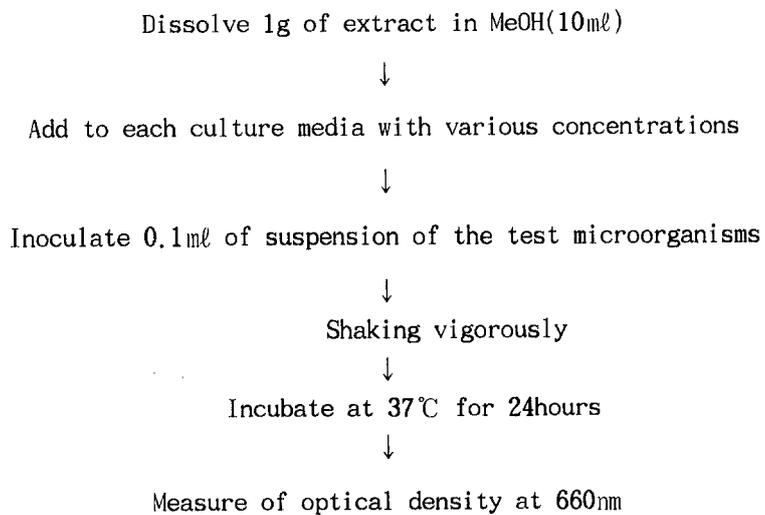


Figure 2. Antimicrobial activity assay

4. 추출물의 분획 및 용매분획별 항균성

메탄을 추출물을 증류수에 현탁한 후 Figure 3과 같이 *n*-hexane을 가하여 분획한 후 여과 감압 농축하여 추출물을 얻었다. 이와 같은 방법으로 chloroform, ethylacetate, *n*-butanol 및 물로 극성이 낮은 용매에서 극성이 높은 용매로 순차적으로 계통 분획하여 hexane 추출물, chloroform 추출물, ethylacetate 추출물, butanol 추출물, 그리고 물 추출물을 얻었다.

계통 분획 추출물의 항균성 검색은 paper disc법으로 하였으며, 시험용 평판 배지는 nutrient agar를 멸균 후, petridish에 15ml씩 분주하여 clean bench에서 하룻밤 건조시키고 37℃ 배양기에서 다시 하룻밤 건조시킨 후, 그 위에 각 균주의 배양액 100 μ l를 구부린 막대로 도말하였다. 각 용매분획별 추출물을 500~2000 μ g/disc의 농도로 멸균된 disc(직경 8mm, Toyo Seisakusho Co.)에 흡수, 건조시켜 균주가 도말된 plate 표면에 올려 놓은 후 37℃의 incubator에서 24시간 배양하여 disc 주위에 생성된 clear zone의 직경(mm)으로 항균활성을 측정하였다.

Nutmeg(*Myristica fragrans* Houtt), Jakyak(*Paeonia japonica* Nakai), mokdan(*paeonia suffruticosa* ANDR)

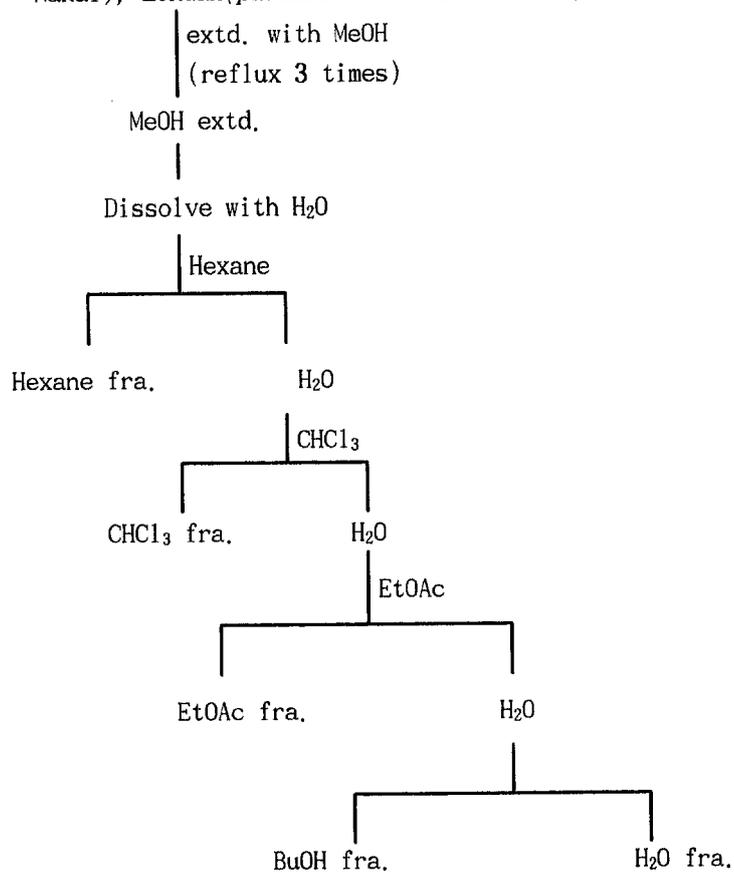


Figure 3. Solvent fractions from methanol extract of Nutmeg(*Myristica fragrans* Houtt.), Jakyak(*Paeonia japonica* Nakai) and mokdan(*paeonia suffruticosa* ANDR)

5. 구황식물 첨가에 의한 식품보존효과

육두구, 백작약, 목단피의 식품보존효과를 측정하기 위하여 분말화하여 50 mesh의 표준망체로 내린 육두구, 백작약, 목단피를 Figure 1과 같이 추출한 ethanol 추출물을 첨가한 어묵을 제조하여 10℃의 항온항습기에서 저장하면서 저장기간별 생균수를 측정하였다.

6. 구황식물 추출물 첨가 어묵 제조

일본의 냉동 연육 품질 검사기준에 예시된 방법에 따라 전분첨가어묵을 변형하여 제조하였다.

구황식물 추출물 첨가 어묵의 제조는 예비실험 결과에서 결정된 분량으로 Table 1과 같이 하였고 만드는 법은 Figure 3과 같다.

Table 1의 조성으로 배합되어 제조된 냉동 surimi를 5℃ 냉장고에서 자연해동 시킨 후 silent cutter (HOBART M-84145, HOBART Corporation, made in U.S.A.)에서 약 5분간 분쇄하여 육중량에 대해 2%의 식염을 첨가하여 고기갈이를 하였다. 다음에 육중량에 대해 이미 결정된 분량의 구황식물 추출물을 첨가하여 저온을 유지하면서 3분간 고기갈이를 하였다. 고기갈이를 마친 육은 즉시 수동식 육충전기(DICK D-73728 Esslingen Made in Germany, Typ TWF-12)로 직경 30mm의 cellulose casing film에 약 220g 정도씩 충전, 밀봉한 후 $90 \pm 3^\circ\text{C}$ 에서 20분간 열수처리하여 얼음물에 넣어 급냉시켰다.

Table 1. Formula for the addition of wild plants extract in surimi preparation

Ingredient	Treatment				
	0	0.25%	0.5%	0.75%	1%
Surimi(%)	98	97.75	97.5	97.25	97
Wild plant extract(%)	0	0.25	0.5	0.75	1
Salt(%)	2	2	2	2	2

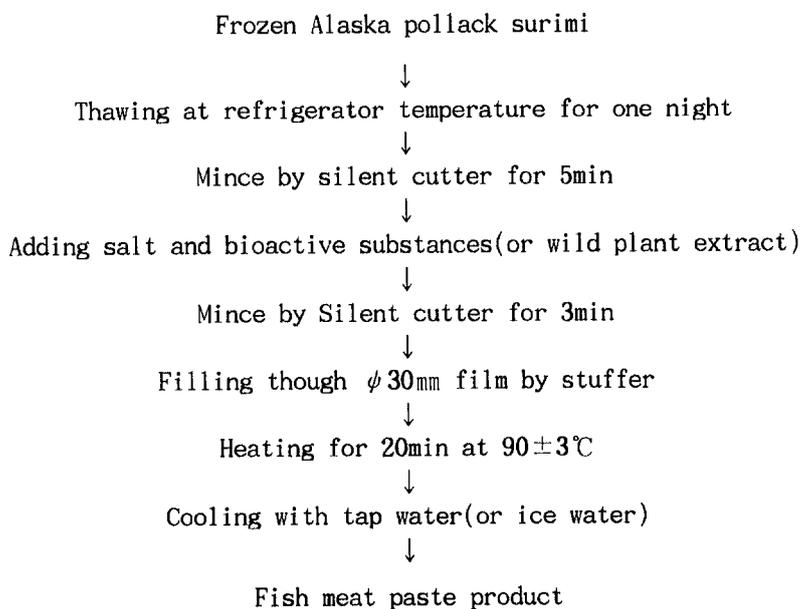


Figure 4. Preparation procedure for Surimi

7. 구황식물 추출물 첨가 어묵의 이화학적 특성

가. 수분정량법

A.O.A.C법으로 3회 반복 측정하고, 그 평균값을 사용하였다. 즉, 상압가열건조법으로 측정하였다.

각각 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1%로 첨가한 육두구, 백작약 어묵을 제조한 직후, 온도 10℃, 습도 60%의 항온항습기에서 저장하면서 0, 3, 6, 9, 12일 동안 동일한 방법으로 실험하였다.

나. 조단백질 함량

A.O.A.C법으로 3회 반복 측정하고, 그 평균값을 사용하였다. 즉, 조단백은 semi-micro kjeldahl 법으로 분석하였다. Digestion tube에 시료 1g당 셀레늄 2알, 황산 12ml을 넣은 후 420℃로 예열된 digester에서 30~60분간 분해한 후 충분히 식혀 KJELTEC 2200 ANALYZER를 이용하여 분석한 후 0.1N HCl로 적정하여 조단백량을 계산하였으며 위 실험을 3회 반복하였다.

다. 조지방 함량

A.O.A.C법으로 3회 반복 측정하고, 그 평균값을 사용하였다. 즉, 조지방은 soxhlet 추출법으로 분석하였다. 시료 2g씩을 측정하여 80℃에서 약 1시간 건조시킨 후 막자사발에 Na₂SO₄를 깔고 건조된 시료를 넣고 곱게 으켄 후 조지방 추출기(Soxtec Avanti 2050 Auto System, Part no 1000 7414, Tecator AB, Sewden)를 사용하여 조지방을 추출하였다. 용매는 ethyl ether를 사용하였으며 시료당 70ml씩 사용하였다.

추출 후 함량을 측정하여 조지방 함량을 계산하였다.

라. 조회분 함량

A. O. A. C법으로 3회 반복 측정하고, 그 평균값을 사용하였다. 즉, 조회분은 건식회화법으로 분석하였다. 시료 1g씩을 측정하여 회화로에서 600℃에서 3시간을 구운 후 방냉하여 항량이 나올때까지 측정하여 조회분의 함량을 계산하였다.

마. 색도

구황식물 첨가 어묵의 색도는 색도계(Colorimeter, CR-300, Minolta Co., Ltd, Osaka, Japan)를 이용하여 명도(L, lightness), 적색도(a, redness), 황색도(b, yellowness)를 10회 반복하여 측정하여 그 평균값을 사용하였다. 이때 표준 백판(standard plate)의 L값은 97.26, a값은 -0.07, b값은 +1.86이었다. 각각 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1%로 첨가한 육두구, 백작약, 목단피 어묵을 제조한 직후 온도 10℃, 습도 60%의 항온항습기에서 저장하면서 0, 3, 6, 9, 12일 동안 동일한 방법으로 실험하였다.

바. 구황식물 추출물 첨가 어묵의 미생물학적 변화

시료 30g에 0.9%의 멸균 생리식염수 9배량을 가하여 멸균한 homogenizer(SMT Co., Tokyo, Japan)를 저온유지하면서 4분간 마쇄한 다음, 10배 희석법으로 10^{-2} ~ 10^{-7} /ml까지 희석한 희석액 0.1ml를 미리 준비하여 멸균해 놓은 NA의 평판배지에 접종하였다. 총균수는 37℃의 배양기에서 24~48시간 배양시킨 후 생성된 plate의 colony를 colony counter로 계수하여 무첨가군과 구황식물 첨가군 간의 총균수를 비교하였다.

각각 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1%로 첨가한 육두구, 백작약 추출물 첨가

어묵을 제조한 직후 온도 10℃, 습도 60%의 항온항습기에서 0, 3, 6, 9, 12일 동안 저장하면서 동일한 방법으로 실험하였다.

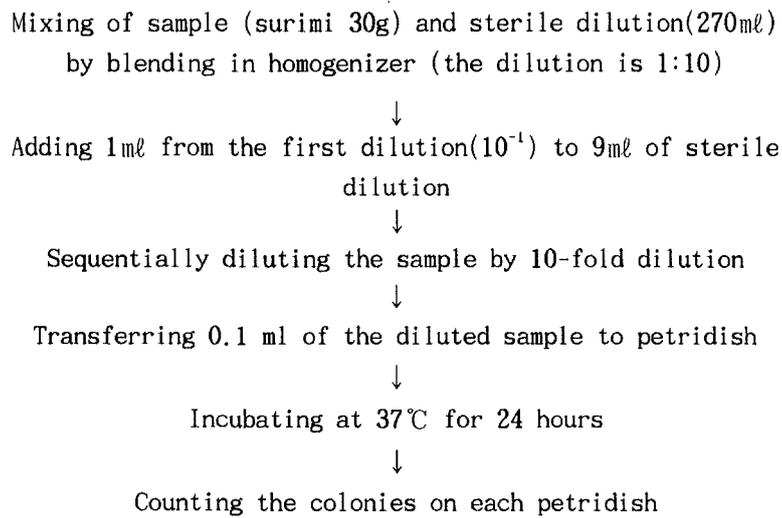


Figure 5. Total plate count procedure

사. 구황식물 첨가 어묵의 물성학적 특성

1) 절곡시험

岡田 등의 방법에 따라 시료제품을 3mm 두께, 직경 30mm로 잘라 이것을 두 겹으로 접고 그 상태를 5초간 유지한 후 형상의 변화를 5단계에 의한 평점으로 평가하였으며 그 평점기준은 다음과 같다.

5 : 4겹으로 접었을 때 균열이 생기지 않을 때

4 : 2겹으로 접었을 때 균열이 생기지 않지만 4겹으로 하면 균열이 생길 때

3. : 2겹으로 접었을 때 균열이 생기지 않지만 4겹으로 하면 분리될 때

2 : 2겹으로 접었을 때 균열이 생길 때

1 : 2겹으로 접었을 때 두 조각으로 분리될 때

각각 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1%로 첨가한 육두구, 백작약, 목단피 어묵을 제조한 직후 온도 10℃, 습도 60%의 항온항습기에서 저장하면서 0, 3, 6, 9, 12일 동안 동일한 방법으로 실험하였다.

아. 구황식물 첨가 어묵의 관능적 특성

육두구, 백작약, 목단피의 첨가가 어묵의 관능적 특성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 숙명여자대학교 식품영양학과 대학원생 5명을 선정하여, 이들에게 model 시료를 이용하여 훈련시킨 뒤 실험에 응하도록 하였다.

관능검사 시간은 오후 3시로 하였고, 시료는 모든 관능요원에게 직경 14cm의 동일한 흰색 플라스틱 접시에 담아 물과 함께 제공하였다.

각각 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1%로 첨가한 육두구, 백작약, 목단피 어묵

을 제조한 직후 동일한 방법으로 실험하였다.

평가내용은 색(color), 향(flavor), 맛(taste), 조직의 부드러운 정도(consistency), 촉촉한 정도(moistness), 조직의 쫄깃한 정도(cohesiveness), 삼킨 후의 느낌(after swallowing), 그리고 전반적인 바람직한 정도(overall quality)로 7점 채점법으로 평가하였으며, 7점으로 갈수록 선호하는 경향을 나타내도록 하였다.

자. 통계처리

색도, 구황식물 첨가 어묵의 관능적 특성과 수분변화도등의 이화학적 특성의 실험결과는 SAS package로 통계 처리하였으며, 시료간의 유의성 검증은 ANOVA test와 Duncan's multiple range test를 실시하였다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 한국전통구황식물 추출물의 식품부패미생물에 대한 항균성 검색과 농도별, 분획별 항균성

1. 구황식물 추출물의 식품부패미생물에 대한 항균성 검색

메탄올로 추출 농축하여 얻은 구황식물 메탄올 추출물을 500~2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 미생물 증식배지에 첨가하여 *B. subtilis*, *L. monocytogenes*, *V. paraheomolyticus*, *S. aureus*, *E. coli*와 같은 식품부패미생물의 증식억제효과를 검토한 결과는 Table 2와 같다.

육두구, 백작약, 목단피는 높은 항균력을 보였다. 육두구는 *S. aureus*를 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 완전히 저해하였으며, *E. coli*와 *V. parahaemolyticus*에 대하여 2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 항균력을 보였으며, 백작약의 저해효과는 *B. subtilis*에 대하여는 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서, *S. aureus*와 *V. parahaemolyticus*에 대하여는 1500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 100% 항균력을 보였다. 목단피는 *L. monocytogenes*와 *V. parahaemolyticus*에 대하여 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 완전히 저해하였고 *B. subtilis*에 대해서는 2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 완전히 저해하였다.

Table 2. Antimicrobial activity of methanol extract from wild plants against of food spoilage microorganisms

sample name	Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Antimicrobial activity(%)				
		<i>B. subtilis</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>V. parahae -molyticus</i>	<i>E. coli</i>
Nutmeg	500	24.79	40.32	100	35.14	31.72
	1000	33.96	52.12	100	51.26	53.74
	1500	58.54	63.62	100	79.51	64.52
	2000	85.83	79.21	100	100	100
Jakyak	500	59.52	43.75	-	27.26	19.47
	1000	100	51.13	98.1	97.06	41.68
	1500	100	65.93	100	100	83.27
	2000	100	73.39	100	100	100
mokdan	500	-	75.28	-	38.19	24.33
	1000	89.21	100	-	99.33	61.68
	1500	100	100	36.31	100	67.81
	2000	100	100	100	100	91.60

2. 구황식물 추출물의 식품부패미생물에 대한 분획별 항균성

건조시켜 분쇄하여 메탄올로 추출한 육두구, 백작약, 목단피 추출물이 실험균주에 대해 항균성이 있음을 보였으므로 항균성 물질을 분리하기 위해 메탄올 추출물을 *n*-hexane, chloroform, ethylacetate, *n*-butanol 및 물 순으로 계통 분획하여 실험균주에 대한 항균성을 paper disk법에 의해 검색한 결과는 Table 3, 4, 5와 같다.

육두구의 항균성은 특정 용매에만 한정되어 활성을 나타내지 않고 일부 다른 용매에서 활성을 보였는데 실험균주에 대해 chloroform과 ethylacetate, buthanol, hexane, methanol 분획의 추출물 전반에서 항균성을 나타내었다. 이 중 buthanol 추출물은 clear zone의 직경이 *V. parahaemolyticus*는 22.67mm 로 가장 컸고, 용매 분획 전반에서 메탄올 추출물에서와 같이 *S. aureus*에 대해 항균성이 매우 높았다. 육두구 추출물의 용매 분획별 항균성은 농도에 비례하여 높아짐을 볼 수 있었다. Chloroform에서는 *S. aureus*에서 2000 μ g/disk의 농도에서 12mm의 clear zone을 보였으며 그보다 낮은 농도에서도 높은 항균력을 나타내었다. 또한 *B. subtilis*, *V. parahaemolyticus*, *L. monocytogenes*에서도 clear zone을 형성하여 그 항균성을 보였으나 *E. coli*에 대해서는 항균성이 나타나지 않았다. 육두구 추출물의 물 층의 경우는 실험균주에 대해서 전혀 항균성을 보이지 않았으며, 육두구 추출물의 용매 분획 전반에 있어서 *E. coli*에 대한 항균성은 나타나지 않았다.

백작약의 항균성은 Methanol와 Ethylacetate의 특정 용매에만 한정되어 활성을 나타내었다. 이 중 Methanol 추출물은 clear zone의 직경이 *V. parahaemolyticus*는 15mm 로 가장 컸고, 실험 균주 전반에서 높은 항균력을 보였다. Ethylacetate 추출물에서는 *E. coli*에 대해 clear zone의 직경이 15mm를 보여 항균성이 매우 높았으며 모든 균주에 대해서도 높은 항균력을 나타내었다. 또한 농도가 높아짐에 따른 항균성의 증가가 나타났다. 이는 정 등이 보고한 백작약추출물의 항균성이 농도에 비례하였다는 보고와 일치하는 것으로 나타났다. 또한 백작약 추출물의 항균성은 육두구와는 달리 *E. coli*에서 항균성을 보였으며, water, hexane, buthanol 층의 경우는 실험균주에 대해서 전혀 항균성을 보이지 않았다.

Table 3. Antimicrobial activity of solvent fractions from methanol extract of Nutmeg on the growth of various microorganisms

Solvent Fractions	Conc (µg/disk)	Clear zone(mm)				
		<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>L. monocytogenes</i>
Methanol	500	- ¹⁾	8	-	-	8
	1000	8	9	-	-	9
	1500	8	9	-	-	9
	2000	8	9	-	-	10
Hexane	500	-	8	-	-	-
	1000	-	8	-	-	-
	1500	-	9	-	-	10
	2000	-	9	-	9	10
Chloroform	500	8	10	-	-	9
	1000	10	11	-	9	10
	1500	11	12	-	10	10
	2000	11	12	-	11	11
Ethyl acetate	500	8	-	-	9	8
	1000	9	8	-	10	11
	1500	9	9	-	10	12
	2000	10	10	-	11	13
Butanol	500	-	-	-	11	-
	1000	-	9	-	12	-
	1500	-	10	-	14	-
	2000	-	12	-	23	-
Water	500	-	-	-	-	-
	1000	-	-	-	-	-
	1500	-	-	-	-	-
	2000	-	-	-	-	-

1) - : no activity

Table 4. Antimicrobial activity of solvent fractions from methanol extract of Jakyak on the growth of various microorganisms

Solvent Fractions	Conc ($\mu\text{g}/$ disk)	Clear zone(mm)				
		<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>L. monocytogenes</i>
Methanol	500	9	- ¹⁾	-	9	-
	1000	11	10	10	10	10
	1500	12	11	11	11	12
	2000	13	12	12	13	15
Hexane	500	-	-	-	-	-
	1000	-	-	-	-	-
	1500	-	-	-	-	-
	2000	-	-	-	-	-
Chloroform	500	-	-	-	-	-
	1000	-	-	-	-	-
	1500	9	-	-	-	-
	2000	9	-	-	-	-
Ethyl acetate	500	9	9	-	12	10
	1000	10	10	11	13	11
	1500	11	11	12	14	12
	2000	12	12	13	15	13
Butanol	500	-	-	-	-	-
	1000	-	-	-	-	-
	1500	-	-	-	-	-
	2000	-	-	-	-	-
Water	500	-	-	-	-	-
	1000	-	-	-	-	-
	1500	-	-	-	-	-
	2000	-	-	-	-	-

1) - : no activity

Table 5. Antimicrobial activity of solvent fractions from methanol extract of mokdan on the growth of various microorganisms

Solvent Fra.	Conc. ($\mu\text{g}/$ disk)	Clear zone(mm)				
		<i>B.</i> <i>subtilis</i>	<i>S.</i> <i>aureus</i>	<i>L.</i> <i>monocyto</i> <i>genes</i>	<i>E.</i> <i>coli</i>	<i>V.</i> <i>parahaemoly</i> <i>ticus</i>
Methanol	500	10	8.1	8.5	8.5	- ¹⁾
	1000	11	8.5	10	10	10.5
	1500	12	9	12	11	11
	2000	14	10	14	13	12
Hexane	500	10	8.5	8.5	8.5	-
	1000	11	9.0	10	11	-
	1500	12	10	11	12	-
	2000	13	12	12	12.5	10
Chloroform	500	11	10	9	8.5	10
	1000	12	13	10	10	12
	1500	15	14	12	11	14
	2000	16	15	15	12	15
Ethyl acetate	500	10	10	12	11	10
	1000	11	11	14	12	12
	1500	12	12	17	12.5	13
	2000	14	13	18	13	15
Butanol	500	11	8.5	-	10	-
	1000	12	10	-	11	-
	1500	13	12	9	12	11
	2000	14	13	10	14	13
Water	500	-	10	-	-	-
	1000	-	11	-	-	-
	1500	-	13	-	-	-
	2000	-	15	-	-	-

)-: no activity

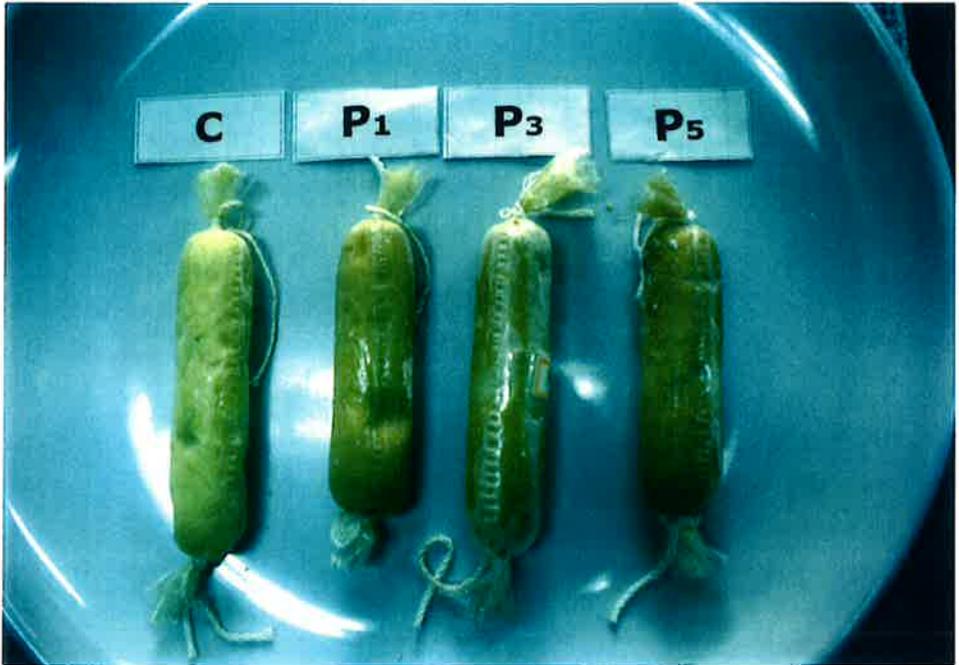
제 2 절 한국전통구황식물 추출물 첨가 어묵의 이화학적 특성

1. 육두구, 백작약, 목단피 추출물 어묵의 일반성분 분석

본 실험에 사용한 육두구, 백작약, 목단피 추출물 첨가 어묵의 일반성분을 분석한 결과는 Table 6과 같다.

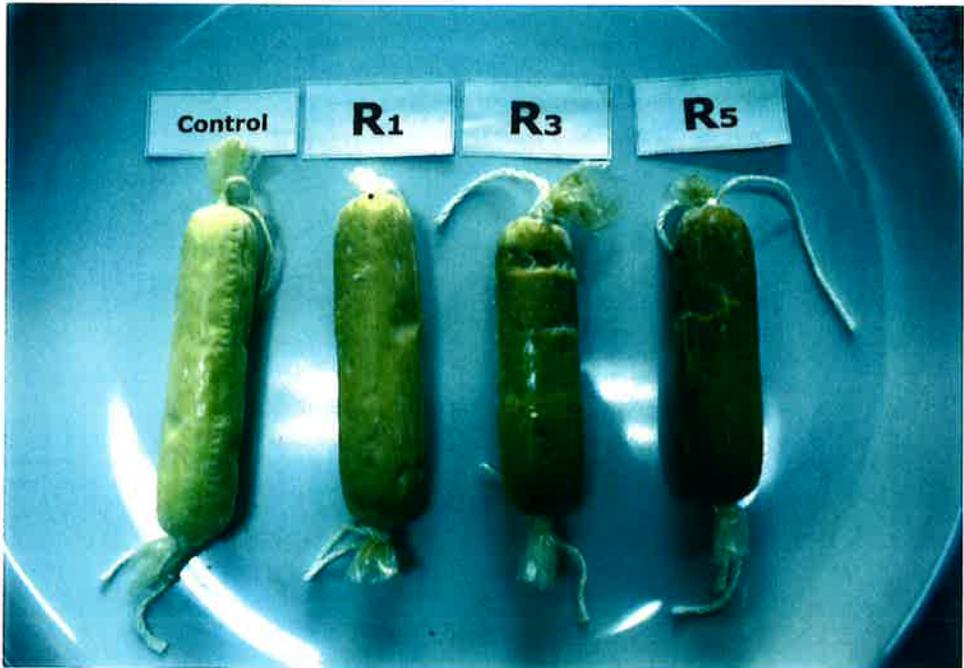
일반성분은 육두구 추출물 첨가 어묵의 경우 수분은 첨가량이 증가할수록 높았다. 특히 1% 첨가군에 있어서는 무첨가 군에 비해 유의적으로 높았음을 보여주었으며 1% 미만의 첨가군에 있어서는 무첨가군과 유의적 차이는 없었으나 수분함량은 높았다. 조지방 함량 또한 수분과 같은 경향을 보여 추출물의 첨가가 증가할수록 높아짐을 알 수 있었다. 특히 1% 첨가군에 있어서는 유의적 차이가 나타났다. 이는 육두구의 추출물인 essential oil의 첨가에 의한 것으로 사료된다. 그러나 단백질은 첨가량에 따라 낮은 값을 나타내었다. 조회분의 경우 첨가량이 증가할수록 높아지는 경향을 보였으며 첨가군은 무첨가군에 비해 유의적으로 높은 함량을 나타내었다.

백작약과 목단피 추출물 첨가 어묵의 일반성분에 대해서는 수분의 경우 모든 시료에 대해 수분함량의 경우에 있어서는 0.75% 첨가군의 경우 유의적으로 낮은 함량을 보여주었다. 조지방의 경우 육두구 첨가군에 비해 유의적으로 낮은 함량을 보여주었는데 이는 무첨가군과 비교하여 유의적 차이가 없는 것으로 백작약과 목단피가 육두구의 것과 다른 성분의 것임을 보여주었다. 단백질의 경우 첨가군은 무첨가군과 유의적 차이가 없었으나 조회분에 있어서만 첨가량이 증가함에 따라 0.75%와 1%에서 조회분 함량이 유의적으로 높은 것을 볼 수 있었다.



백작약 첨가 어묵 사진

(C: control, P1: 1% 첨가군,
P3 : 3% 첨가군 P5: 5% 첨가군)



목단피 첨가 어묵 사진
(C: control, R1: 1% 첨가군,
R3 : 3% 첨가군 R5: 5% 첨가군)

Table 6. Proximate compositions of the added wild plants extract surimi

(%)

Ingredient	Moisture	Crude fat	Crude protein	Crude ash
control	75.79±0.46 ^{1) b}	0.53±0.15 ^{bc}	23.11±0.34 ^a	1.63±0.06 ^b
nutmeg 0.25%	76.24±0.58 ^b	0.20±0.05 ^c	23.28±0.14 ^a	1.87±0.06 ^a
nutmeg 0.5%	76.26±0.15 ^b	0.28±0.16 ^c	23.02±0.26 ^a	1.90±0.10 ^a
nutmeg 0.75%	77.77±0.76 ^{ab}	0.33±0.10 ^c	21.52±0.76 ^{ab}	1.97±0.06 ^a
nutmeg 1%	78.82±0.90 ^a	1.02±0.13 ^a	20.04±0.40 ^{ab}	2.00±0.10 ^a
Jakyak 0.25%	77.53±0.29 ^{ab}	0.67±0.08 ^b	21.54±0.07 ^{ab}	1.67±0.06 ^b
Jakyak 0.5%	77.11±0.20 ^{ab}	0.35±0.10 ^c	22.34±0.24 ^a	1.77±0.06 ^{ab}
Jakyak 0.75%	75.67±0.10 ^b	0.47±0.08 ^c	23.65±0.23 ^a	1.83±0.06 ^a
Jakyak 1%	77.29±0.28 ^{ab}	0.48±0.08 ^c	21.88±1.16 ^{ab}	1.87±0.06 ^a
mokdan 0.25%	75.59±0.19 ^{ab}	0.47±0.09 ^b	21.74±0.27 ^{ab}	1.56±0.16 ^b
mokdan 0.5%	75.71±0.13 ^{ab}	0.35±0.10 ^c	22.54±0.27 ^a	1.65±0.16 ^{ab}
mokdan 0.75%	74.27±0.10 ^b	0.36±0.07 ^c	23.35±0.53 ^a	1.73±0.16 ^a
mokdan 1%	77.59±0.18 ^{ab}	0.38±0.08 ^c	21.78±0.76 ^{ab}	1.80±0.16 ^a

1) values are mean±S.D.

1)a~d Duncan's multiple range test for additional rate of extract. (row)

2. 백작약, 육두구, 목단피 첨가 어묵의 수분함량변화

저장기간동안에 어묵에 일어나는 물리적 변화를 중심으로 한 어육제품의 품질저하에 영향을 미치는 인자로는 첨가물의 농도, 저장기간, 저장 온도, 수분함량, pH 등이 포함된다. 이 중에서 수분함량의 변화를 살펴보면 다음과 같다.

육두구 추출물 첨가 어묵의 수분변화도를 살펴보면 Figure 6과 같다. 전체적인 시료의 수분함량은 76% 내외였으며 추출물을 1% 첨가군만이 78.8%로 유의적으로 높게 나타났다. 이들 어묵은 저장기간이 지날수록 점차적으로 수분의 감소경향을 나타냈다. 저장 6일까지는 1%, 0.75% 첨가군의 경우 유의적으로 높은 수분함량을 보였으나, 저장 6일에서 9일 사이에 1% 첨가군은 유의적으로 크게 수분의 함량이 급격히 줄어들었다. 백작약과 목단피 추출물 첨가 어묵의 경우도 같은 경향을 나타내었다. 첨가군은 무첨가군에 비해 비교적 높은 수분함량을 보였으며 저장기간이 지날수록 수분의 함량은 감소하는 경향을 보였다.

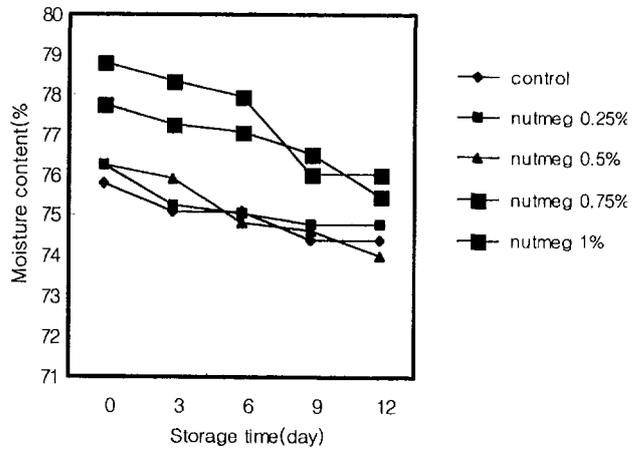


Figure 6. Changes in moisture content of Nutmeg surimi during storage at 10°C.

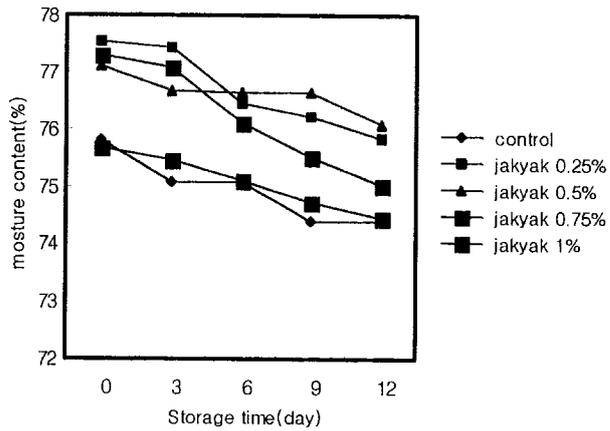


Figure 7. Changes in moisture content of Jakyak surimi during storage at 10°C.

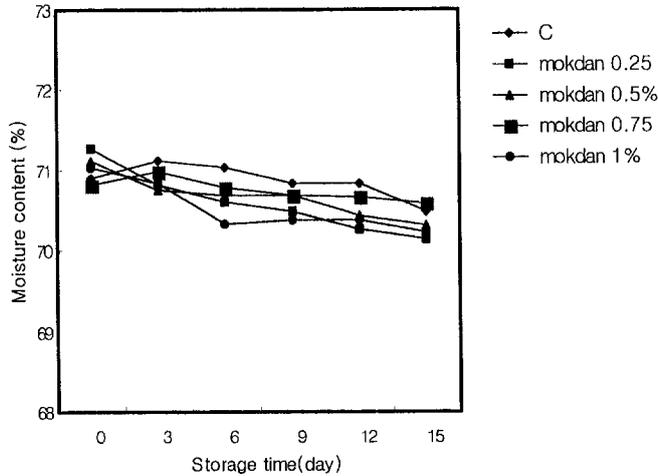


Figure 8. Changes in moisture content of mokdan surimi during storage at 10°C.

3. 백작약, 옥두구, 목단피 첨가어묵의 색도변화

0, 3, 6, 9, 12일동안 10°C 저온저장에 따른 옥두구, 백작약, 목단피 추출물 첨가 어묵의 색도의 변화는 Table 7~9와 같다.

어묵의 밝기를 나타내는 L값은 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1% 농도별로 첨가한 옥두구, 백작약, 목단피 추출물 첨가 어묵 모두 첨가량이 증가할수록 색이 진하여 명도가 낮아져서 유의적으로 감소하였다($p < 0.05$). 이는 어묵의 단면과 측면에서 같은 경향을 보였다.

적색도를 나타내는 a값은 옥두구 단면의 경우, 첨가량이 많을수록 유의적으로 낮은 음의 값을 나타내었으며 첨가량과 저장기간이 증가함에

따라 붉은색이 약해짐을 알 수 있었다($p < 0.05$). 측면의 경우 또한 저장기간이 길어질수록 유의적으로 값이 낮아지는 경향을 보였다. 노란색을 나타내는 b 값도 단면의 경우는 저장기간이 지남에 따라 낮아졌으며 측면도 낮아지는 것을 볼 수 있었다.

백작약의 L값의 단면과 측면 모두 저장기간이 지날수록 낮아지는 경향을 보였으며 a와 b값 모두 전체적으로 낮아져서 색의 명도가 낮아지고 붉은 색과 노란색이 점차 감소하는 것으로 보인다.

목단피의 L값은 첨가량이 증가할수록 유의적으로 낮아졌으며 저장기간이 길어짐과 함께 낮아졌다. 적색도를 나타내는 a값은 0.5%, 0.75%, 1% 첨가시 유의적인 차이를 나타내지 않았다. b값은 0.5% 첨가군이 가장 높았다.

L, a, b값 모두 옥두구, 백작약, 목단피 어묵을 0, 3, 6, 9, 12일간 저장하는 동안 유의적으로 차이가 있었다. 따라서 구황식물 추출물 첨가 어묵은 저장기간에 따라 색의 변화가 있는 것으로 평가되었다.

이는 저장기간이 지남에 따라 수분의 감소와 지방의 산패 등으로 인한 요인으로 인해 색의 변화가 생기는 것으로 사료된다.

Table 7. Changes in color values of Nutmeg surimi during storage at 10°C

Color value	Storage time (day)	Sample Additional rate(%)				
		0	0.25%	0.5%	0.75%	1%
L	0	81.56 ^a	79.77 ^c	80.1 ^c	80.77 ^b	80.68 ^b
	3	81.36 ^a	79.29 ^a	79.35 ^a	80.54 ^a	80.5 ^a
	6	81.22 ^a	78.31 ^b	79.29 ^b	80.32 ^a	80.22 ^a
	9	80.47 ^a	78.23 ^a	79.14 ^b	80.14 ^a	79.44 ^{ab}
	12	79.29 ^a	78.11 ^a	78.57 ^a	79.32 ^a	78.38 ^a
a	0	-2.46 ^a	-2.5 ^a	-2.63 ^b	-2.71 ^b	-2.76 ^b
	3	-2.66 ^a	-2.8 ^{ab}	-3.12 ^c	-2.96 ^b	-2.80 ^b
	6	-2.92 ^a	-2.84 ^a	-3.16 ^b	-3.09 ^b	-2.91 ^a
	6	-3.00 ^a	-2.89 ^a	-3.25 ^b	-3.09 ^a	-3.09 ^a
	12	-3.24 ^a	-3.16 ^a	-3.33 ^{ab}	-3.25 ^a	-3.23 ^a
b	0	3.81 ^d	4.98 ^c	4.45 ^c	5.51 ^b	6.51 ^a
	3	3.48 ^c	3.84 ^c	4.27 ^b	5.38 ^a	5.83 ^a
	6	3.05 ^c	3.83 ^b	3.88 ^b	5.09 ^a	5.05 ^a
	9	2.73 ^c	3.40 ^b	2.79 ^c	4.85 ^a	4.81 ^a
	12	2.51 ^c	3.18 ^b	2.78 ^{bc}	3.57 ^b	4.46 ^a

Means with the same letter are not significantly different($p < 0.05$).

1)a~d Duncan's multiple range test for additional rate of nutmeg extract. (row)

Table 8. Changes in color values of Jakyak surimi during storage at 10°C.

Color value	Storage time (day)	Sample Additional rate(%)				
		0	0.25%	0.5%	0.75%	1%
L	0	81.71 ^a	78.99 ^b	78.71 ^{ab}	79.72 ^{ab}	79.33 ^b
	3	81.22 ^a	78.49 ^{bc}	78.38 ^{ab}	79.32 ^{ab}	79.17 ^{ab}
	6	80.50 ^a	77.46 ^c	78.36 ^b	78.83 ^b	78.65 ^b
	9	79.89 ^a	76.15 ^b	76.71 ^b	78.35 ^b	77.22 ^c
	12	79.48 ^a	74.90 ^b	75.07 ^b	78.13 ^b	77.20 ^c
a	0	-1.35 ^d	-0.34 ^c	0.29 ^a	-1.94 ^d	-1.72 ^{cd}
	3	-1.51 ^e	-0.37 ^d	0.09 ^a	-2.54 ^d	-1.74 ^c
	6	-2.34 ^d	-0.54 ^c	-0.12 ^a	-2.65 ^d	-2.17 ^b
	6	-2.64 ^d	-1.50 ^c	-0.68 ^{cd}	-2.72 ^{bc}	-2.50 ^a
	12	-3.02 ^d	-1.69 ^c	-0.87 ^b	-2.82 ^b	-2.61 ^a
b	0	3.83 ^b	4.04 ^a	4.09 ^b	6.96 ^b	9.66 ^a
	3	4.77 ^b	4.93 ^b	5.41 ^c	6.75 ^b	7.40 ^a
	6	6.61 ^b	6.79 ^{ab}	7.27 ^b	6.43 ^a	6.06 ^a
	9	9.37 ^c	9.39 ^c	10.19 ^b	5.92 ^a	5.78 ^a
	12	11.34 ^c	11.54 ^c	12.00 ^b	5.70 ^a	5.35 ^a

Means with the same letter are not significantly different($p < 0.05$).

1) a~d Duncan's multiple range test for additional rate of Jakyak extract. (row)

Table 9. Changes in color values of mokdan surimi during storage at 10°C.

Color value	Storage time (day)	Sample Additional rate(%)				
		0	0.25%	0.5%	0.75%	1%
L	0	78.76 ^a	68.05 ^b	58.69 ^c	58.02 ^c	57.92 ^c
	3	79.92 ^a	67.88 ^b	60.19 ^c	56.56 ^d	52.57 ^d
	6	79.20 ^a	68.25 ^b	62.13 ^c	55.75 ^d	50.35 ^e
	9	77.04 ^a	68.13 ^b	60.31 ^c	55.00 ^d	50.01 ^e
	12	79.82 ^a	67.18 ^b	60.44 ^c	56.52 ^d	51.25 ^e
a	0	-1.47 ^c	2.99 ^b	4.33 ^a	4.53 ^a	4.72 ^a
	3	-1.47 ^c	2.98 ^b	4.32 ^a	4.65 ^a	4.91 ^a
	6	-1.39 ^c	3.30 ^b	4.34 ^a	4.78 ^a	4.99 ^a
	9	-1.40 ^c	3.24 ^b	3.94 ^b	4.33 ^a	4.87 ^a
	12	-1.43 ^c	3.29 ^b	4.05 ^{ab}	4.72 ^{ab}	5.12 ^a
b	0	12.05 ^c	12.69 ^b	13.67 ^a	12.66 ^b	12.62 ^b
	3	11.16 ^{bc}	11.53 ^c	13.22 ^a	12.09 ^b	12.04 ^b
	6	11.63 ^d	12.01 ^c	13.76 ^a	13.36 ^a	13.12 ^{ab}
	9	10.63 ^c	11.82 ^b	13.34 ^a	12.48 ^b	11.82 ^b
	12	11.97 ^c	12.67 ^b	13.53 ^a	13.31 ^a	13.75 ^a

Means with the same letter are not significantly different($p < 0.05$).

1)a~e Duncan's multiple range test for additional rate of mokdan extract. (row)

제 4 절 구황식물 추출물 첨가 어묵의 미생물학적 변화

1. 육두구 추출물 첨가 어묵의 미생물학적 변화

무첨가군의 경우 저장 3일째부터 총균수가 급격히 증가하여 저장 15일에서는 부패수준인 1.0×10^8 CFU/g 수준까지 올라갔으나 육두구 첨가군의 경우 첨가량이 증가할수록 총균수의 증가율은 감소하여 1% 첨가군의 경우 저장 15일이 지나서야 1.0×10^6 CFU/g 수준에 도달하였다.

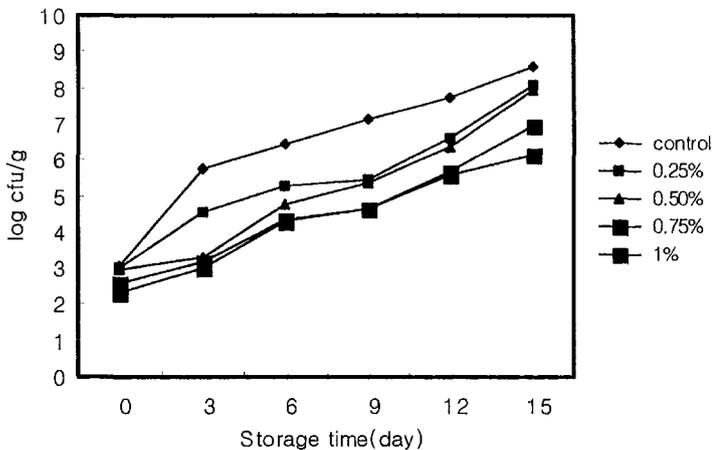


Figure 9. Effect of Nutmeg on the total plate count of surimi during storage at 10°C

2. 백작약 첨가 어묵의 미생물학적 변화

백작약 첨가 어묵은 저장 기간에 따른 총균수의 증가율은 매우 낮아 저장 12일이 지나서야 1.0×10^6 CFU/g 수준에 도달하였다. 1% 첨가군은

저장 15일이 되어서야 1.0×10^6 CFU/g 수준이 되었으나, 낮은 농도로 첨가한 균의 경우는 저장 12일에서 15일 사이에 급격히 증가하여 부패수준인 1.0×10^8 CFU/g 수준에 도달하는 것을 볼 수 있었다.

무첨가균은 초기 3일째에 급격한 증가를 한 후 꾸준히 그 총균수가 증가한 반면 추출물 첨가균은 미생물 군락 형성의 초기 증가율이 완만히 진행되다가 저장 12일에서 15일 사이에 미생물 증식 속도가 증가하였다.

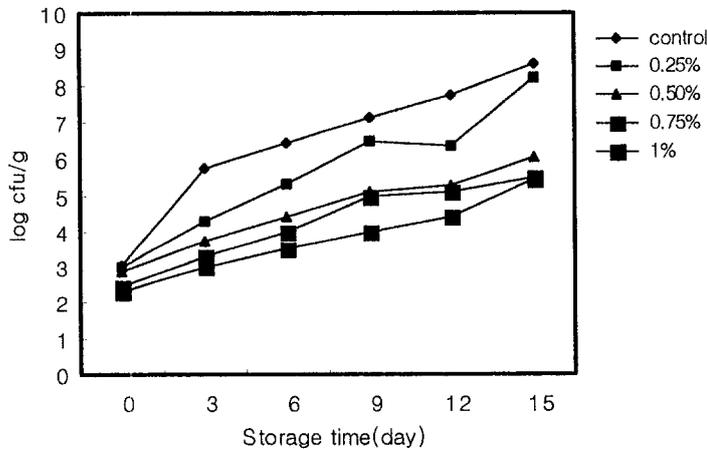


Figure 10. Effect of Jakyak on the total plate count of surimi during storage at 10°C

3. 목단피 첨가 어묵의 미생물학적 변화

목단피 첨가량에 따라 미생물의 증식 억제효과가 강하게 나타났다.

무첨가균은 저장 6일째에 목단피 첨가 어묵은 10^6 CFU/g 수준에 도달하였으나 목단피 0.25% 첨가균은 저장 9일째에, 0.75% 첨가균은 저장 15

일제에 그 수준에 도달하였으며 0.75%와 1% 첨가군은 15일이 경과하여도 10^3 CFU/g 수준에 머물러 미생물의 증식을 억제하는 강력한 활성을 보였다.

이상의 결과로 볼 때 구황식물 추출물의 첨가로 어묵의 저장기간을 3일에서 10일 정도 저장기간을 연장할 수 있으리라고 기대된다.

이는 Grapefruit 종자추출물이 수산물에 항균력을 나타내었다고 Rosemary 추출물이 청어 Fillet의 냉장 및 동결 저장시 저장 기간을 연장하였다는 연구결과와 같은 경향을 보이고 있다.

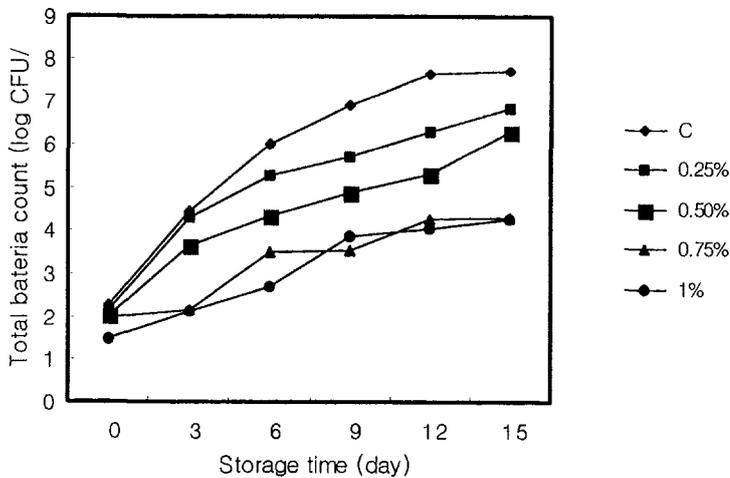


Figure 11. Effect of mokdan on the total plate count of surimi during storage at 10°C

제 5 절 구황식물 추출물 첨가 어묵의 물성학적 특성

1. 구황식물 추출물 첨가 어묵의 물성학적 특성 - 절곡시험

어묵의 유연성을 나타내는 절곡시험에서 모든 시료는 똑같은 상태를 나타내었다. 저장기간에 따른 유연성의 변화에 있어서 모든 시료들은 유연성의 감소가 나타나지 않았는데, 무첨가군과 옥두구 0.5%에서는 저장 12일에 유연성의 감소가 나타났다. 이는 수분의 감소로 인한 것으로 사료된다.

Table 10. Changes of folding test score of wild plant surimi during storage at 10°C.

Storage time (day)	0	3	6	9	12
control	5	5	5	5	4
Nutmeg 0.25%	5	5	5	5	5
Nutmeg 0.5%	5	5	5	5	4
Nutmeg 0.75%	5	5	5	5	5
Nutmeg 1%	5	5	5	5	5
Jakyak 0.25%	5	5	5	5	5
Jakyak 0.5%	5	5	5	5	5
Jakyak 0.75%	5	5	5	5	5
Jakyak 1%	5	5	5	5	5
mokdan 0.25%	5	5	5	5	5
mokdan 0.5%	5	5	5	5	5
mokdan 0.75%	5	5	5	5	5
mokdan 1%	5	5	5	5	5

제 6 절 구황식물 추출물 첨가 어묵의 관능적 특성

1. 육두구 추출물 첨가 어묵의 관능적 특성

육두구 추출물의 경우 향에 있어서 첨가군이 무첨가군에 비해 유의적으로 높은 기호도를 보였다. 이는 육두구 자체의 고유한 향이 어묵에서 나오는 생선의 비린내를 감지하지 못하게 하여 기호도를 높인 것으로 사료된다. 맛에 있어서 무첨가군에 비해 첨가군의 기호도는 첨가량이 낮은 경우 유의적으로 기호도가 높았으나 첨가량이 0.75%, 1%에 이르렀을 때는 그 기호도가 유의적으로 낮음을 볼 수 있었다. 이는 육두구의 특유의 맛이 강하여 추출물의 증가에 따른 육두구 특유의 자극적인 맛의 증가가 기호도를 낮춘 것으로 사료된다.

Hardness의 경우 0.25%에서 유의적으로 높은 결과를 나타냈으며 반면 Chewiness의 경우 낮은 결과는 나타내었다. Overall quality는 0.5% 첨가군이 가장 높게 나왔다. 이는 첨가량 증가에 따른 육두구의 자극적인 맛이 높은 농도의 첨가군의 기호도를 낮게 하고 낮은 농도의 첨가군은 생선 특유의 비린맛이 기호도를 낮게 하여 이와 같은 결과를 나타낸 것으로 사료된다.

Table 11. Sensary evaluation of Nutmeg surimi

Treatment Contents	Additional rate(%)				
	0	0.25	0.5	0.75	1
Flavor	4.6±0.55 ^{1) b}	4.8±1.10 ^b	5.2±1.10 ^{ab}	5.8±0.84 ^{ab}	6.2±0.84 ^a
Color	5.0±1.22 ^a	5.2±0.84 ^b	5.2±0.84 ^b	5.4±0.55 ^b	5.2±0.45 ^b
Taste	4.8±0.84 ^{ab}	5.2±1.10 ^a	5.4±1.14 ^a	4.0±1.73 ^{ab}	3.4±2.07 ^b
Moisture	5.6±0.89 ^a	5.2±0.84 ^b	5.6±1.14 ^b	5.6±1.14 ^b	5.4±1.14 ^b
Hardness	4.2±1.09 ^{ab}	4.6±0.55 ^a	4.4±1.14 ^{ab}	4.2±1.10 ^{ab}	4.2±1.10 ^{ab}
Elasticity	4.2±1.79 ^{ab}	5.2±0.45 ^a	5.0±0.71 ^a	4.8±1.48 ^{ab}	4.8±1.92 ^{ab}
Chewiness	3.4±1.14 ^{bc}	3.6±0.89 ^{bc}	4.0±1.22 ^{ab} c	4.6±1.52 ^{ab}	4.6±1.52 ^{ab}
Cohesive ness	5.0±1.22 ^a	5.4±0.55 ^b	5.4±1.14 ^b	5.4±1.52 ^b	5.4±1.52 ^b
Overall quality	4.6±0.55 ^b	5.2±0.84 ^b	6.4±0.89 ^a	5.4±0.89 ^b	4.6±0.89 ^b

1) a~c Duncan's multiple range test for additional rate of nutmeg extract. (row)

2. 백작약 추출물 첨가 어묵의 관능적 특성

백작약 추출물의 경우 수분에 있어서 첨가군이 무첨가군에 비해 높은 기호도를 보였다. 이는 작약 추출물 첨가로 인해 수분의 함량이 높게 나온 일반성분의 결과와 일치되는 경향을 보였다. 검성에 있어서도 첨가량이 증가할수록 무첨가군에 비해 유의적으로 높은 선호도를 볼 수 있었다. 전반적인 기호도는 옥두구 추출물 첨가 어묵과 같이 0.5% 첨가군이 유의적으로 높게 나타났다.

Table 12. Sensary evaluation of Jakyak surimi

Treatment	Additional rate(%)				
	0	0.25	0.5	0.75	1
Flavor	4.6±0.55 ^{1)b}	4.4±1.14 ^b	5.0±1.00 ^a	4.4±1.14 ^b	4.4±1.67 ^b
Color	5.0±1.22 ^b	5.0±1.41 ^b	5.4±1.14 ^a	4.6±1.67 ^b	4.8±1.79 ^b
Taste	4.8±0.84 ^a	5.4±1.52 ^a	5.0±1.87 ^a	4.4±2.07 ^b	4.0±2.00 ^b
Moisture	5.6±0.89 ^a	5.0±1.00 ^b	4.8±0.84 ^b	5.0±1.00 ^b	5.0±1.00 ^b
Hardaness	4.2±1.10 ^b	5.0±1.00	4.2±1.10 ^b	4.0±1.00 ^b	4.8±1.30 ^a
Elasticity	4.2±1.79 ^a	4.4±1.14	4.8±1.30 ^a	4.6±1.95 ^a	4.6±1.95 ^a
Chewiness	3.4±1.14 ^b	3.6±1.34 ^b	4.4±1.51 ^a	4.8±1.79 ^a	4.8±1.64 ^a
Cohesive ness	5.0±1.22 ^a	4.8±1.10 ^a	5.4±0.89 ^a	5.0±2.12 ^a	5.4±2.07 ^a
Overall quality	4.6±0.55 ^b	4.6±1.14 ^b	5.4±0.55 ^a	3.8±1.30 ^c	3.8±1.30 ^c

1)a~c Duncan's multiple range test for additional rate of Jakyak extract. (row)

3. 목단피 추출물 첨가 어묵의 관능적 특성

목단피 추출물 첨가 어묵은 0.5% 첨가까지는 향, 색, 맛에 있어서 무첨가군과 유의적인 차이를 나타내지 않았고, 경도에 있어서도 첨가군과 무첨가군간의 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 전반적인 바람직한 정도에 있어서는 0.5% 첨가군이 가장 높게 나타났다. 이상의 결과로 볼 때 목단피 추출물 첨가시 어묵의 관능적 특성에 있어서는 0.5% 첨가시 무첨가군과 차이가 나타나지 않아 식품가공에 이용시 바람직한 결과를 나타낼 수 있으리라 생각한다.

Table 13. Sensary evaluation of mokdan surimi

Treatment Contents	Additional rate(%)				
	0	0.25	0.5	0.75	1
Flavor	4.6±0.55 ^{1)a}	3.2±1.04 ^b	4.0±1.20 ^a	3.3±1.04 ^b	3.1±1.65 ^b
Color	5.0±1.22 ^a	5.0±1.41 ^a	5.4±1.14 ^a	4.8±1.62 ^b	4.6±1.79 ^b
Taste	4.8±0.84 ^{ab}	5.2±1.52 ^a	5.0±1.87 ^a	4.4±2.07 ^b	4.0±2.00 ^b
Moisture	5.6±0.89 ^a	4.9±1.10 ^b	4.8±1.02 ^b	5.0±1.10 ^{ab}	5.0±0.98 ^{ab}
Hardaness	4.2±1.10 ^a	4.9±1.20 ^a	4.3±1.10 ^a	4.2±1.00 ^a	4.9±1.20 ^a
Elasticity	4.2±1.79 ^b	4.3±1.21 ^b	4.9±1.34 ^a	4.7±1.95 ^a	4.8±1.90 ^a
Chewiness	3.4±1.14 ^b	3.4±1.24 ^b	4.5±1.53 ^a	4.6±1.53 ^a	4.8±1.04 ^a
Cohesive ness	5.0±1.22 ^{ab}	4.7±1.15 ^b	5.3±0.98 ^a	4.9±1.02 ^{ab}	5.2±1.57 ^a
Overall quality	4.6±0.55 ^b	4.6±1.14 ^b	5.3±0.55 ^a	3.7±1.10 ^c	3.9±1.30 ^c

1)a~c Duncan's multiple range test for additional rate of mokdan extract. (row)

제 4 장 참고문헌

- 1.Scott, V.N. : Safety consideration for new generation refrigerated foods. *Dairy Food Environ. Sanitation*, **8**, 58(1988)
- 2.Davidson, P.M. and Post, L.S. : Naturally occurring and miscellaneous food antimicrobials. In Antimicrobials in foods, Branen, A. L. and Davidson, P. M. (Ed.), Marcel Dekker, Inc., New York, p. 371(1983)
- 3.Lewis, R. J. : Their regulatory status their use by the food industry. In Food additives handbook, Robert W.D.(Ed.) Nostrand Reinhold, New York, p. 3-27(1989)
- 4.김건희, 오석태, 정해옥, 한영실 : 질경이 첨가가 국수와 떡의 저장성 향상에 미치는 영향. *한국식품과학회지* 15(1) pp. 68-72(1999)
- 5.Morozumi, S.: Isolation, purification, and antibiotic activity of *o*-methoxycinnamaldehyde from cinnamon. *Applied and Environmental Microbiology*, **36**, 577 (1978)
- 6.Bullerman, L.B.: Inhibition of aflatoxin production by cinnamon. *J. Food Science*, **39**, 1163 (1974)
- 7.Beuchat, L.R.: Sensitivity of *Vibrio parahaemolyticus* to spices and organic acids. *J. Food Science*, **41**, 899 (1976)
- 8.Shelef, L.A., Naglik, O.A. and Bogen, D.W.: Sensitivity of some common food-borne bacteria to the spices sage, rosemary, and allspice. *J. Food Science*, **45**, 1042 (1980)
- 9.Bullerman, L.B., Lieu, F.Y. and Sei, S.A.: Inhibition of growth and aflatoxin production by cinnamon and clove oils, cinnamic

- aldehyde and eugenol. *J. Food Science*, **42**, 1107 (1977)
10. Hitkoto, H., Morozumi, S., Wauke, T., Sakai, S. and Kurata, H.: Inhibitory effects of spices on growth and toxin production of toxigenic fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, **39**, 818 (1980)
 11. Patkar, K.L., Usha, C.M., Shetty, H.S., Paster, N. and Lacey, J.: Effect of spice essential oils on growth and aflatoxin B₁ production by *Aspergillus flavus*. *Letters in Applied Microbiology*, **17**, 49 (1993)
 12. Farag, R.S., Daw, Z.Y. and Abo-rya, S.H.: Influence of some spice essential oils on *Aspergillus parasiticus* growth and production of aflatoxins in a synthetic medium. *J. Food Science*, **54**, 74 (1989)
 13. Zaika, L.L., Kissinger, J.C. and Wasserman, A.E.: Inhibition of lactic acid bacteria by herbs. *J. Food Science*, **48**, 1455 (1983)
 14. Zaika, L.L. and Kissinger, J.C.: Inhibitory and stimulatory effects of oregano on *Lactobacillus Plantarum* and *Pediococcus Cerevisiae*. *J. Food Science*, **46**, 1205 (1981)
 15. Shelef, L.A., Jyothi, E.K. and Bulgareli, M.A.: Growth of enteropathogenic and spoilage bacteria in sage-containing broth and foods. *J. Food Science*, **49**, 737 (1984)
 16. Stecchini, M.L., Sarais, I. and Giavedoni, P.: Effect of essential oils on *Aeromonas Hydrophilia* in a culture medium and in cooked pork. *J. Food Protection*, **56**, 406 (1993)
 17. Sivropoulou, A., Kokkini, S., Lanaras, T. and Arsenakis, M.:

- Antimicrobial activity of mint essential oils. *J. Agricultural and Food Chemistry*, **43**, 2384 (1995)
18. Cerrutti, P. and Alzamora, S.M.: Inhibitory effects of vanillin on some food spoilage yeasts in laboratory media and fruit purées. *Int. J. Food Microbiology*, **29**, 379 (1996)
19. Conner, D.E. and Beuchat, L.R.: Effect of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts. *J. Food Science*, **49**, 429 (1984)
20. Manderfeld, M.N., Schafer, H.W., Davidson, P.M. and Zottola, E.A.: Isolation and identification of antimicrobial furocoumarins from parsley. *J. Food Protection*, **60**, 72 (1997)
21. 박옥연, 장동석, 조학래: 한약재 추출물의 항균효과 검색. *한국영양식량학회지*, **21**, 91 (1992))(박옥연, 장동석, 조학래: 자초추출물의 항균특성. *한국영양학회지*, **21**, 97 (1992)
22. 박수용, 김찬조: 생약재에 의한 식품보존에 관한 연구. *한국농화학회지*, **22**, 91 (1979)
23. 한지숙, 신동화: *Listeria monocytogenes*의 증식억제에 미치는 뽕나무 및 고삼 에탄올 추출물의 분획별 효과. *한국식품과학회지*, **26**, 539(1994)
24. 신동화, 한지숙, 김문숙: 방기 및 감초의 에탄올 추출물이 *Listeria monocytogenes*의 증식억제에 미치는 영향. *한국식품과학회지*, **26**, 627(1994)
25. 김순임: 야생식물의 첨가가 빵과 떡의 저장성 향상에 미치는 영향. *부경대학교 박사학위 논문*, **34** (1997)
26. 신동화, 한지숙, 김문숙: 방기 및 감초의 에탄올 추출물이 *L.*

- monocytogenes*의 증식 억제에 미치는 영향. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 26(5), 627(1994)
27. 목종수, 김영목, 김신희, 장동석: 단삼 추출물의 항균특성. *J. Fd Hyg. Safety*, 10(1), 23 (1995)
28. 안은숙, 김문숙, 신동화: 식용 식물로부터 얻은 추출물의 두부, 어묵, 막걸리 변질균에 대한 항균성 검색. *한국식품과학회지*, 26, 733 (1994)
29. 마승진, 고병섭, 박근형: 두릅수피에서 항미생물활성을 갖는 3,4-dihydroxybenzoic acid의 분리. *한국식품과학회지*, 27, 807 (1995)
30. 국주희, 마승진, 박근형: 솔잎에서 항미생물 활성을 갖는 benzoic acid의 분리 및 동정. *한국식품과학회지*, 29, 204 (1997)
31. 양민석, 하영래, 남상해, 최상욱, 장대식: 국내 자생식물의 항균활성. *한국농화학회지*, 38, 584 (1995)
32. 박옥연, 김신희, 김지희, 김용관, 장동석: 상백피 추출물로부터 항균성 물질의 분리 정제. *한국식품위생·안전성학회지*, 10, 225 (1995)
33. 박승우, 우철주, 정신교, 정기택: 환삼덩굴의 용매분획별 항균성 및 항산화성. *한국식품과학회지*, 26, 464 (1994)
34. 정병선, 이병구, 심선택, 이정근: 쑥씨 종의 정유성분이 미생물의 생육에 미치는 영향. *한국식문화학회지*, 4, 417 (1989)
35. 김홍식, 조광현: 편축 추출물의 항진균작용에 관한 연구. *한국균학회지*, 8, 1 (1980)
36. 목종수, 박옥연, 김영목, 장동석: 용매와 추출조건에 따른 단삼 추출물의 항균력. *한국영양식량학회지*, 23, 1001 (1994)
37. 김영숙, 김무남, 김정옥, 이종호: 쑥의 열수추출물과 주요 향기성분

- 이 세균의 생육에 미치는 영향. 한국영양식량학회지, 23, 994 (1994)
38. 정대균, 유리나: 김치 발효미생물에 대한 대나무잎 추출물의 항균력. 한국식품과학회지, 27, 1035 (1995)
39. 한국동식물도감 식물편(유용식물). 문교부. (1974)
40. 한국한방연구소 : 한국인의 한방 제 1권. 한국 壽石연구소(1993)
41. 김승희, 정기경, 강석연, 김태균, 김창옥, 문에리, 유경자, 이송득, 류항목 : 백작약감초탕이 미성숙 흰쥐에서 난포성숙 및 Estrogen 생성에 미치는 효과. 생약학회지. 28(3) p. 104-111(1997)
42. 조한옥, 권중호, 변명우, 이미경 : 감마선 조사에 의한 튀김어묵의 품질보존. 한국식품과학회지, 17, 474 (1985)
43. 李應昊, 吳光秀, 具在根, 朴香淑, 趙舞榮, 車庸準 : 레토르트파우치 식품의 가공 및 품질안정성에 관한 연구. 한국수산학회지. 17. 373 (1984)
44. 金東洙, 朴榮浩 : 包裝 어묵의 水分活性 低下에 미치는 食品添加物의 影響. 한국수산학회지, 14, 139 (1981)) (鄭惠敬, 金東洙, 千石祚, 朴榮浩 : 포장어묵의 수분활성 저하에 미치는 식품첨가물의 영향. 한국수산학회지, 16, 88 (1983)
45. 김영만, 이병호, 이상훈, 신일식, 이태식 : 난백 lysozyme 에 의한 연제품의 방부효과. 한국수산학회지, 21, 269(1988)
46. 김영만, 이병호, 이상훈, 신일식, 이태식 : 卵白 lysozyme에 의한 연제품의 방부 효과. 한국수산학회지 21(4) pp. 269-275 (1988)
47. 赤可景, 大野明 : 無包裝カマボコの保存性に對する卵白 リゾチーム의 効果. 農化 46, 177(1972)
48. 조성환, 서일원, 최종덕, 주인생 : 수산물에 대한 Grapefruit 종자 추출물의 항균 및 항산화효과. 한국수산학회지. 23(4), 289-296

- (1990)
51. 장동석, 조학래, 이현숙, 박미연, 임성미 : 알긴산 가수분해물을 이용한 어묵연제품용 천연식품보존료의 개발. 한국식품과학회지. 제 30권 제 4호, pp. 823-826, (1998)
 52. 조학래, 장동석, 이원동, 정은탁, 이은우 : 키토산 효소분해물을 이용한 어육연제품의 유통기간 연장. 한국식품과학회지. 제 30권, 제 4호, pp. 817-822, (1998)
 53. 농림수산통계연보, 1996
 54. A.O.A.C : Official methods of Analysis, 16th de., Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C., U.S.A. (1995)
 55. Speck, O.M.L. : Compendium of methods for the microbiological examination of foods. *Am. pub. Health. Assoc.*, Washington, D.C., p.62-83, 184-196(1984)
 56. 岡田總カマボコ足の形成の對する加熱條件の影響. 東海區水研報告 (1959)
 57. 김광옥, 이영춘 : 식품의 관능검사. 학연사, p.116-130(1996)
 58. 이종원, 최현집 : SAS를 이용한 통계분석. 박영사, p288-315(1996)
 59. 이윤경: 계피와 정향에서 분리한 항균 활성 물질의 식품부패 미생물 성장 억제 효과. 숙명여자대학교 박사학위 논문, 56 (1995)
 60. Influence of some spice essential oils on *A. paragiticus* growth and production of aflatoxins in a synthetic medium. *J. Food Science*, 54(1), 74 (1989)
 61. 정창기, 박완규, 유익제, 박기문, 최춘언: 카레향신료 정유성분의 향균성. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 22(6), 716(1990)
 62. 양승택·박상우 : Rosemary 추출물, α -Tocopherol 및 진공 포장

청어 Fillet의 냉장 및 동결 저장 중 품질에 미치는 영향. KOREAN J
FOOD SCI. TECHNOL. Vol.31, No.3, pp.697~704 (1999)

연구개발 목표 달성도 및 대외 기여도

1. 연구개발 목표 달성도

구 분	연구내용	연구달성도											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1차년도	○ 시료선정 및 추출, 균주배양 및 항균성 검색											
	○ 시료추출물의 분획 및 유효성분의 분리											
	○ 면역능향상효과를 갖는 생리활성물질의 검정을 위한 생체의 실험 pilot study											
	○ 인공합성 보존제와 구황식물 추출물의 항균활성효과의 비교검토											
	○ 추출물의 혼합사용시 상승효과 검토											
	○ 구황식물 첨가량에 따른 가공제품의 저장성 검토											

계획 달성

구 분	연구내용	연구달성도											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
2차년도	○ 2차 구황식물의 선별 —————											
	○ 구황식물 추출물첨가에 따른 가공제품의 저장성 검토 —————											
	○ 분획별 추출물의 항균 효과 검색 및 유효성분의 분리 —————											
	○ 항균능을 가진 생리활성성분의 NMR, GC/MS를 활용한 동정 및 구조결정 —————											
	○ 생체의 실험을 통한 면역능 향상효과를 갖는 생리기능 특성 검색 —————											
	○ 추출물 가공제품 부패 미생물의 생육억제효과 측정 —————											
	○ 제품화된 식품의 이화학적 특성 측정 및 관능 검사 —————											

계획 달성

	연구내용	연구달성도											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
3차년도	○ 추출물의 Food model system에의 응용											
	○ 생리활성성분의 구조동정											
	○ 항균활성물질혼합물의 상승효과 검토											
	○ 관능검사											
	○ 추출물의 생체내 면역능의 조절효과											
	○ 면역세포의 면역조절인자 분비능 확인											
	○ 생체내 동물실험을 통한 생리활성 성분의 평가											
	○ 제품화된 식품의 물성, 색도 측정											
	○ 적용 가능한 기능성 제품 모델 개발											
	○ 제품화를 위한 규격 및 공정 연구											

계획 달성

2. 대외 기여도

- 식품은 과거에는 맛과 열량공급이 주기능이었던 것에 비해 최근에는 질병예방을 위한 기능성이 중요시되며 식품중에 함유된 여러 가지의 비영양화합물들이 생체내에서 가지는 여러 가지 생리효과들이 연구의 대상이 되고 있다.
- 이에 우리 고유의 구황식물이 가지는 기능성을 밝혀내고 이를 이용

한 식품제조 기술을 개발함으로써 우리 고유의 산물에 대한 부가가치를 높일 수 있다.

구황식물의 영양학적 우수성이 입증되면 식품업계, 의업계 등의 지속적인 기술개발을 촉진함으로써 다양한 분야에서 소비를 극대화시킬 수 있을 것으로 기대된다.

- 본 연구를 통해 전 국토의 70%가 산으로 둘러싸인 우리나라의 무진장의 부존자원인 구황식물 중 항균과 면역강화능을 갖는 생리활성성분을 분리 하여 기능성 식품 개발의 기초자료를 제시하고 아울러 실제 가공 제품에 적용하여 보존성 향상을 입증함으로써 다양한 건강식품, 기능성 식품 및 의약품 개발의 가능성을 제시하였다.
- 최근 자연식에 대한 기호가 날로 높아지면서 각종 구황식물을 채취 또는 재배하여 식용으로 이용하는데 대한 관심이 높아지고 있다. 국민 소득 수준이 향상됨에 따라 과다한 동물성 식품의 섭취 등 식생활의 변화와 함께 농약 및 환경 오염에서 비롯한 공해 식품의 범람으로 무공해 건강식품으로서의 야생구황 식물에 대한 관심이 고조되고 있기 때문이다. 이에 이들 구황식물의 항균, 면역 기능 강화효과를 밝히고 이를 이용한 떡, 국수, 어묵류의 제품 제조하여 저장 안정성 및 관능적, 기계적 제품특성까지 검토함으로써 이들을 이용한 다양한 식품 개발의 응용 가능성을 제시하였다.

연구개발결과의 활용계획

- 본 연구를 통해 항균과 면역기능향상 기능을 갖는 구황식물로부터 기능성식품 신소재 개발에 응용
- 구황식물의 기능성성분 추출, 분리를 통해 항균제와 면역기능 강화제 등의 의약품개발기술에 기초자료 제공
- 향후 designer food 등 각종 질병의 예방과 치료식품개발 자료로 응용
- 생리활성 물질의 효과 검증을 통해 고부가 가치를 가진 기능성 소재 개발로 기능성식품, 건강보조식품 및 성인병치료제에 활용