

최 중
연구보고서

맹종죽의 생리활성을 이용한 죽엽차 및 죽순음료 제조 연구

Application to production of tea and beverage using
the bamboo(*Phyllostachys edulis*) leaf and shoot
with biological activity

2001. 11

맹종죽의 항균, 항돌연변이 및 항암 활성에 관한 연구

Studies on antimicrobial, antimutagenic and anticancer activity of
Phyllostachys edulis

맹종죽의 항보체 및 활성산소 제거활성에 관한 연구

Studies on anticomplementary and reactive oxygen scavenging
activities of *Phyllostachys edulis*

죽엽차 및 죽순음료의 제조

Preparation of tea and beverage from *Phyllostachys edulis*

고 려 대 학 교

(농협대학)

(경남하청농협)

농 림 부

최 종 보 고 서

1999년도 농림기술개발사업에 의하여 완료한 맹종죽의 생리활성을 이용한 죽엽차
및 죽순음료의 제조 연구에 관한 연구의 최종보고서를 별첨과 같이 제출합니다.

첨부 : 1. 최종보고서 10부

2. 최종보고서 디스켓 1매

2001년 11월 일

주관연구기관 고려대학교

총괄연구책임자 황 한 준 (인)

주관연구기관장 총 장 직 인

농 립 부 장 관 귀 하

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “맹종죽의 생리활성을 이용한 죽엽차 및 죽순음료의 제조 연구”
과제의 최종보고서로 제출합니다.

2001년 11월 일

주관연구기관명: 고려대학교

총괄연구책임자: 황한준

세부연구책임자: 성하진

연 구 원: 신순영

연 구 원: 권미향

협동연구기관명: 농협대학

협동연구책임자: 조원대

참여기업명: 경남하청농협

요 약 문

I. 제 목

맹종죽의 생리활성을 이용한 죽엽차 및 죽순음료의 제조 연구

II. 연구개발의 목적 및 중요성

(1)제 1 세부과제 : 맹종죽의 향균 및 항암, 항돌연변이 활성화에 관한 연구

현재 농산물 시장의 개방에 따라 해외 농산물에 대한 현명한 대처 방안이 강구되어야 하며 국내생산 농산물의 유용물질을 꾸준히 탐색·개발하여, 가공품목의 다양화와 지속적인 고품질 제품생산으로 수입상품과의 차별성을 부각시켜 경쟁하는 것이 절대적으로 필요한 시점에 있다. 본 연구팀에서는 동의보감, 증약대사전 등 관련문헌을 토대로 약 3~4년전부터 지속적으로 맹종죽에 관한 생리활성 탐색 연구를 수행해오면서 죽엽의 우수한 향균활성을 이용한 맹종죽 죽엽차와 죽순의 항암활성, 항보체활성 등으로 기능성음료 개발의 가능성을 잠정 확인하였고, 이로부터 국내산 맹종죽의 우수성을 입증시킬 수 있는 생리활성 물질의 개발과 이를 통한 죽엽차 및 죽순음료의 개발은 수입산 죽순과의 시장경쟁력 및 국내 농가 경제에 있어서도 중요한 부분이라 할 수 있다.

매년 맹종죽 죽순의 생산량은 크게 감소하는데 반해 그 수입량은 매년 증가하는 추세에 있다. 99년 한 해만 해도 1,930 ton 정도이며, 2000년 7월 까지 1,130 ton 정도가 수입되었다. 95년에는 수입량의 60%가 중국산이었으나 현재는 수입의 거의 전량이 중국산으로 가격경쟁에 크게 밀리고있다. 국내의 생산능력도 크게 감소하여 연간 2,000~3,000 ton으로 추정되는 죽순의 소비량을 감당하지 못하고 있다. 또한 최근 중국산 수입 식품의 안전성문제가 심각한 사회문제로 대두되고있어 국내산 죽순의 경쟁력을 높여 생산량을 증가시키기 위한 노력이 절실히 필요하다.

맹종죽 추출물의 항균 활성에 대해서는 일본에서 처음으로 그램 양성균에 대해 강한 항균활성을 나타내며, 기타 세균에 서도 광범위한 항균작용을 갖고 있음이 확인 된바 있으며 본연구팀에서도 맹종죽으로부터 병원성 미생물과 식품 부패미생물, 충치균을 포함한 여러 균주를 대상으로 시험한 결과 항세균 활성이 우수할 뿐만 아니라 항균범 위도 매우 넓다는 것을 확인 했으며, 곰팡이와 효모에 대한 저해 활성도 우수한 결과를 얻은바 있다. 이러한 맹종죽 죽엽 추출물의 항균 활성이 차로 제조하였을 때에도 유지된다면 인체 건강유지에는 물론 치아 건강과 수많은 미생물이 상재하는 구강위생 에 크게 기여할것이므로 맹종죽 죽엽차는 에티켓 음료로서 고급 브랜드화 할 수 있을 것이며, 통조림 제조시의 포자형성균에 대해서도 효과가 있을것이고, 죽엽으로만든 죽은 고혈압과 노화방지에도 효험이 있음이 알려져 있고 죽엽을 이용한 차의 제조에 대해서도 이미 동의보감에 기록되어 활용한바 있으며, 국내 식품공전에도 차의 제조 원료로의 제한 대상으로 규정하고 있지 않아, 차제조 원료로서의 적합성에 문제는 없 을 것이다.

맹종죽 죽순의 일반 성분분석 결과는 건조물중의 총식이섬유의 함량이 높아 장의 운 동기능 촉진, 변비 해소 및 숙변제거등에 효과가 있을것으로 인정이 되고 있으며, 죽순의 무기질 성분에는 K, P, Ca의 함량이 높고, Zn이 상당히 높은 함유량을 보여 생식기능 활성화에 상당한 영향을 줄것으로 기대하고 있으며, 근래에는 이러한 이유 에서인지 죽순이 스테미너 음식으로 알려져 있고, 항암작용이 있음이 보고된 바 있으 며, 그 밖에도 맹종죽에는 tyrosine 함량이 특히 높는데 이는 식물의 조절 호르몬인 auxine의 일종인 indol-acetate의 전구체로 알려져 있으며 이는 $\cdot O_2$ radical이나 $\cdot NO$ radical의 scavenger로서의 활성이 판명되어 있다.

(2) 제 2 세부과제 : 맹종죽의 항보체 및 활성산소 제거활성에 관한 연구

본 연구는 맹종죽의 죽엽 및 죽순 소재로부터 활성산소 소거능이 우수한 항산화성 성분과 보체계를 활성화하는 항보체 성분을 분리 정제하고 구조를 결정하고 이러한 성분을 이용한 기능성 식품의 제조에 관한 연구를 수행하는 것을 목적으로 하였다. 맹종죽엽으로부터 3종의 신규 활성산소 소거활성의 항산화성분을 분리하였다. 즉 맹종죽엽의 70% 환류추출획분으로부터 순차적으로 분획된 부탄올 추출물이 DPPH 수소공 여능과 활성산소 소거활성 및 쥐 간 마이크로솜의 지질과산화 저해활성의 시험에서

가장 우수한 활성을 나타내었으므로 상기추출물을 증류수에 용해하여 흡착성 HP-20컬럼, 극성 실리카겔 컬럼, LH-20 겔여과컬럼, ODS 역상컬럼 크로마토그래피의 4 단계의 컬럼크로마토그래피 정제단계와 상기 컬럼 정제 활성획분을 메탄올에 용해한 후 최종적으로 순상 및 역상의 박층크로마토그래피 및 HPLC를 이용하여 최종적으로 항산화활성이 강한 3종의 클로로젠산 메틸 에테르계 화합물을 정제 하였다. 이들 화합물들을 각종 기기분석 즉 HR-FABMS, IR, UV, NMR, HMBC, optical density 등을 이용하여 구조를 분석하였다. 화합물 1은 3-O-(3'-methylcaffeoyl) quinnic acid, 화합물 2는 5-caffeoyl-4-methylquinic acid로 화합물 3은 3-O-caffeoyl-1-methylquinic acid로 결정되었으며 이 중 화합물 2와 3은 신규화합물로 확인되었다. 신규화합물 2와 3은 DPPH 유리라디칼 소거활성 (IC_{50} : 8.8, 6.9 μ M) 뿐만 아니라 지질과산화 저해활성 (IC_{50} : 19.2, 14.6 μ M)에서 동족의 화합물들인 chlorogenic acid, caffeic acid 및 ferulic acid들보다 2-4배 높은 활성을 보였다. 3종의 화합물 중 화합물 1은 가장 낮은 DPPH 유리 라디칼 소거 및 지질과산화 저해활성 (IC_{50} : 16.0, 29.8 μ M)을 나타내었다. 상기 맹종죽엽의 항산화성 화합물은 잔틴/잔틴 옥시다제 계에서 발생하는 활성산소를 직접적으로 소거함과 동시에 잔틴옥시다제 효소에 대한 저해활성도 동시에 나타내었다. 이들의 활성산소 소거능 (IC_{50} : 1, 4.3; 2, 2.8; 3, 1.2 μ M)은 아스코르브산 (56.0 μ M)과 α -토코페롤 (>100 μ M) 및 다른 항산화성 화합물보다 월등히 높은 활성을 나타내었다. 또한 활성이 가장 우수한 화합물 3은 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) 유도된 HL-60 cell에서 활성산소의 발생을 상당히 (36%) 저해하였다.

죽순의 열수추출물로부터 면역계의 중요부위를 담당하는 보체계의 활성능을 조사하였으며 수용성 다당류 획분에서 보체계 활성화 다당류를 정제 하였다. 70% 에탄올 환류추출 잔사에 대하여 열수추출로 얻어진 획분을 에탄올 및 아세톤 침전과 투석등을 통하여 고분자 다당류 획분을 얻었으며 다시 수용성 및 불용성 다당류로 분획하여 항보체 활성을 측정된 결과 60% 이상의 비교적 높은 활성을 나타내었으므로, 이들 획분에 대하여 활성 다당류의 정제에 우선하여 화학적 조성과 구성당 분석을 행하였다. 수용성 다당류인 BS-WS는 전당함량이 84.8%, 단백질이 9.6%로 존재하였으며, 전당에서 산성당이 72.8%로 높게 함유되어 있었다. 불용성 다당류 BS-WI는 거의 대부분 탄수화물로 (98.2%)로 존재하였으며, 대부분 중성당 (91.6%)로 구성되어 있었다. 이들

다당류 획분의 중성당 구성당 분석 결과 BS-WS는 arbinose : xylose : mannose : galactose : glucose 가 2.09 : 0.88 : 0.89 : 1.90 : 4.46 의 비율로 함유되어 있었고, BS-WI는 arbinose : xylose : mannose : galactose : glucose 가 0.12 : 2.21 : 8.23 : 0.45 : 0.35 의 비율로 구성되어 있었으며, rhamnose 와 fucose 는 함유되어 있지 않았다. 특히 glucose 함량이 높은 수용성 다당류 획분인 BS-WS 획분으로부터 수용성 보체계 활성화 β -glucan을 얻고자 α -amylase 및 β -amylase를 처리하고 비소화획분을 DEAE-Topearl 650 C 이온교환 크로마토그래피 및 Sephacryl S-300 겔여과 크로마토그래피를 이용하여 보체계 활성화 β -glucan 획분인 BS-WS-TIa-1를 수득하였다. 상기획분을 SEC-MALLS (multi-angle-laser-light-scattering)를 이용하여 정제한 결과 분자량이 약 85000 Da인 BS-WS-TIa-1A와 약 18000 Da인 BS-WS-TIa-1B 및 약 11000 Da인 BS-WS-TIa-1C를 최종적으로 분리 할 수 있었다. 세 획분에 대하여 항보체 활성을 측정된 결과 분자량 크기가 가장 큰 BS-WS-TIa-1A가 가장 높은 활성을 나타내었으며, 분자량크기가 상대적으로 작은 BS-WS-TIa-1B 및 BS-WS-TIa-1C는 낮은 항보체 활성을 나타내었다. BS-WS-TIa-1A에 대하여 methylation 분석 및 NMR을 이용하여 구조 분석을 실시한 결과 주로 β -1,4- 및 β -1,3-당쇄로 구성된 수용성 β -glucan으로 확인되었다.

따라서, 맹종죽 죽엽 및 죽순을 이용하여 기능성 차 및 음료의 시제품을 제작하고 죽엽제품에서는 활성산소 및 유리라디칼 소거활성과 지질과산화억제 활성과 함께 α -glucosidase 저해활성을 조사하였으며, 죽순제품에서는 항보체활성을 조사하였다.

따라서 본 연구팀은 맹종죽의 우월성을 확보하여 생리활성 뿐만 아니라 죽순의 발효 음료로써의 이용가능성도 검토하고 수입산에 경쟁력 있는 제품을 생산하기 위해 죽엽 및 죽순의 항돌연변이원성, 항암성, 항보체활성 및 활성산소제거활성을 탐색하고자 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

가. 연구개발 내용

- 죽엽 및 죽순 추출물의 다양한 생리활성 탐색
(항세균, 항진균, 항돌연변이, 항암, 항보체 및 활성산소제거 활성 등의 탐색)
- 우수 생리활성 추출물의 활용성 검토
- 죽엽차 및 죽순음료 제조 및 공정 확립
- 제조된 죽엽차와 죽순음료의 관능검사 및 생리활성 확인
- 죽엽차, 죽순음료 또는 2종 복합 기능성 음료의 신개발 상품 창출

나. 연구개발 범위

- 죽엽 추출물의 항미생물 활성 탐색 및 항균물질의 분리·정제
- 죽엽 추출물의 구강위생 등 활용성 검토
- 죽엽차와 죽순음료의 제조 및 *in vitro*에서 검토된 생리활성 변화 측정
- 죽엽과 죽순 추출물의 항돌연변이 및 항암 활성 탐색
- 죽엽과 죽순 추출물의 항보체 및 활성산소제거 활성 탐색
- 죽엽차 및 죽순음료 제조 및 공정 확립
- 관능검사에 의한 죽엽차, 죽순음료 또는 2종 복합 기능성 음료의 신개발 상품 창출
- 외국산 원료에 대한 국내산 죽순의 우수성 검토

SUMMARY

We investigated the application to tea and beverage using biological activities of bamboo (*Phyllostachys edulis*). The antimicrobial, anticancer, antimutagenic, anticomplementary and reactive oxygen scavenging activities were studied in detail.

Phyllostachys edulis leaf was extracted with 4 kinds of organic solvents, ethanol, methanol, ethyl acetate and diethyl ether, and was checked the antimicrobial activities by agar diffusion method. Diethyl ether extract showed a remarkable antimicrobial activities against all of test organisms, bacteria, yeasts and mold, with over 20 mm of inhibition zone. The antimicrobial activity by acidic fraction and phenolic fraction had strong antifungal activities to 4 strains of yeasts and 2 strains mold. The antimicrobial activity of acidic fraction and phenolic fraction were confirmed by dilution test. The growth of *E. coli* 0157:H7 was inhibited at 500 ppm while the growth of *B. anthracis* at 100 ppm by acidic fraction. From these results, the phenolic and acidic fraction play an important role for antimicrobial activity, and the antimicrobial substance seems to be one of phenolic compounds. The result of TLC analysis, R_f value of the purified antimicrobial substance was 0.52 (hexane/ ethyl acetate=3/2, v/v). The UV spectrum of the antimicrobial substance showed max at 254 nm dissolved in methanol. It suggested that structure of the antimicrobial homoannular diene. The ¹H-NMR spectrum of the purified antimicrobial substance was determined by high-resolution NMR spectrometer. Singlet at 8.51 and 1.71 ppm which were estimated to the aromatic protons and OH proton, doublet at 1.42 ppm and quartet at 5.45 ppm which were estimated to the CH₃ protons and CH- proton, and have the same coupling constant that assumed by coupling. = 1.42(d, J= 5.4 HZ, 3H), 1.71(S, 1H), 5.45(q, J= 5.4HZ, 1H), 8.51(s, 1H) (Fig. 7). ¹³C-NMR spectrum showed signal at = 18.00, 102.99, 138.58, 178.35 and which were CH₃, -CH-, =C-, -CO-. From the results of analysis, the antimicrobial substance was regarded as benzoquinone derivatives and it is different 2,6-dimethoxy-*p*-benzoquinone which was reported the Antimicrobial substance of *P. heterocycla* var. Pubescens.

The PEL extracted with ethyl acetate, diethyl ether and ethanol showed anticancer positive effect. The treatment of PEL extract to the MDA-MB-231 and

Hepalcl7 cell are strong inhibitory effect up to 90% viability in comparison to the control. PLC /PRF /5 and Hep3B up to 60 % inhibitory effect. The PEL extracted with ethyl acetate, ethanol, and diethyl ether showed positive inhibitory effect to the antimutagenic assay. That showed antimutagenicities toward sodium azide, N-methyl-N'-nitro -N-nitroso guanidine(MNNG) and dextin in *Salmonella typhimurium* TA-98, TA-100 and TA-1535. The PEL's inhibitory effect increased 20% to 70% as the concentrations added. However ,the diethyl ether extract showed 50~70% inhibitory effect irrespective of its test strains. In case of PES, that also showed anticancer positive effect against extracted with organic solvents. Among these extracts, ethyl acetate and ether extracts were showed good effect. The ethyl acetate and diethyl ether extracts had a high inhibitory effect. The PES extract to the MDA-MB-231, Hep3B, PLC /PRF /5 and Hepalcl7 cells were showed good inhibitory effect 60% to 80% viability in comparison to the control. The PES extracted with ethyl acetate and ether showed positive inhibitory effect to the antimutagenic assay similarly PEL. The PES's inhibitory effect increased 30% to 98% at *Salmonella typhimurium* TA-100. Particularly, The ethylacetate extract very excellent compare with other solvents. Accordingly, the PEL and PES extracted with ethyl acetate were showed strong activity to not only anticancer but also antimutagenic assay. We conclude therefore That the PEL and PES were potential to be used as favorable material for the functional food ,due to the various bioactive properties.

One known and two novel antioxidant compounds have been isolated from bamboo *Phyllostachys edulis*. The butanol-soluble extract of the bamboo leaves was found to have a significant antioxidant activity, as measured by scavenging the stable 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical and the superoxide anion radical (O_2^-) in the xanthine/xanthine oxidase assay system. Antioxidant activity-directed fractionation of the extract led to the isolation and characterization of three structural isomeric chlorogenic acid derivatives: 3-O-(3-methylcaffeoyl) quinic acid (**1**), 5-O-caffeoyl-4-methylquinic acid (**2**), 3-O-caffeoyl-1-methylquinic acid (**3**). Compounds **2** and **3** were isolated and characterized for the first time from the natural products. In the DPPH scavenging assay as well as in the iron-induced rat microsomal lipid peroxidation system, the compound **2** (IC₅₀: 8.8 and 19.2 μ M) and **3** (6.9 and 14.6 μ M) showed about 2-4 times higher antioxidant activity than those of

chlorogenic acid (12.3 and 28.3 μM) and other related hydroxycinnamates such as caffeic acid (13.7 and 25.5 μM) and ferulic acid (36.5 and 56.9 μM). Among the three compounds, compound **1** yielded the weakest antioxidant activity, and the DPPH scavenging and lipid peroxidation inhibitory activity (IC₅₀: 16.0 and 29.8 μM) was lower than those of chlorogenic and caffeic acids. All the three compounds exhibited both superoxide scavenging activities and inhibitory effects on xanthine oxidase. Their superoxide anion (O_2^-) scavenging activities (IC₅₀: **1**, 4.3 μM ; **2**, 2.8 μM ; and **3**, 1.2 μM) were markedly stronger than those of ascorbic acid (56.0 M), α -tocopherol (>100 μM), and other test compounds, although their inhibition effects on xanthine oxidase may contribute to the potent scavenging activity. α -Tocopherol exerted a significant inhibitory effect (65.5% of the control) on superoxide generation in 12-*O*-tetra-decanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced human promyelocytic leukemia HL-60 cells, and compound **3** showed moderate activity (36.0%). On the other hand, other compounds including **1**, **2**, chlorogenic acid, and other antioxidants were weakly active (24.8 - 10.1%) in the suppression of superoxide generation

Anti-complementary soluble β -glucan was isolated from the water extracts of shoots of bamboo *Phyllostachys edulis*. A high molecular-weight water-soluble fraction (BS-WS) obtained by the ethanol precipitation of hot water extractss of the residue from the 70% ethanol reflux showed 62% anti-complementary activity for complement consumption hemolysis. The BS-WS consisted of 64.8% carbohydrate (w/w), 32.4% protein (w/w) and 21.2% uronic acid (w/w), plus 58% of the anti-complementary activity decreased by periodate oxidation and 22% by protease digestion, suggesting that the sugar and protein moieties are essential for this activity. Neutral fraction (BS-WS-TI) in the DEAE-Toyopearl ion exchange chromatography of BS-WS, which activated the complement system and were almost solely composed of solely D-glucose and 38% of β -glucan. Souble anti-complementary β -glucan fraction, BS-WS-TIa isolation was achieved by repeated digestion with α - and β -amylase, which was composed of 88.1% β -glucan. BS-WS-TIa-1A with anti-complementary activity were isolated from the BS-WS-TIa using Sephacryl S-300 and MALLS. According to an SEC-MALLS, the BS-WS-TIa-1A was found to be nearly homogeneous with the molecular mass of 75 KDa, and showed 86.3% ITCH₅₀ (inhibition against the total complement hemolysis of deionized water as the control) and 81% IACH₅₀ (inhibition against the

alternative complement hemolysis of deionized water as the control) at a concentration of 1mg/ml. This β -glucan consisted of 96.1% glucose with β -(1,4) and β -(1,3) glycosidic linkages.

Therefore, the functional tea and can beverage using bamboo leaves and shoots were produced and the antioxidative and anticomplementary activities were tested.

CONTENTS

Cover Letter	i
Summary(Korean)	ii
Summary(English)	vii
CONTENTS(English)	xi
CONTENTS(Korean)	xvi
Part I. Introduction	1
Chapter 1. The purpose for reserch and development	1
Chapter 2. The need for reserch and development : Economic and industrial aspect	2
Chapter 3. The need for reserch and development : Technical aspect	2
Chapter 4. The need for reserch and development : Social and cultural aspect	3
Part II. Studies on antimicrobial, anticancer and antimutagenic activity of <i>Phyllostachys edulis</i>	4
Chapter 1. Introduction	4
Chapter 2. Materials and methods	5
1. Materials	5
2. Methods	6
A. Preparation of extracts	6
B. Measure of antimicrobial activity	7
(1) Paper disc method(Agar diffusion test, ADT)	7
(2) Dilution test	8
(3) MIC(Minimal inhibitory concentration)의 측정	8
(4) Bioautography	8

C. Inhibitory effect of GTase(Glucosyltransferase)	8
D. Decrease of halitosis	9
E. Effect of anticancer activity	9
F. Effect of antimutagenic activity	10
G. Purification of antimicrobial substances	10
(1) Silica gel 60 column chromatography	11
(2) Preparative thin layer chromatography	11
Chapter 3. Results	12
1. Studies on antimicrobial, anticancerous and antimutagenic activity of <i>Phyllostachys edulis</i>	12
A. Screening of antimicrobial activity with various organic solvents	12
B. Inhibitory effect of GTase and decrease of halitosis	17
C. Effect of anticancer activity	19
D. Effect of antimutagenic activity	30
E. Purification of antimicrobial substances of <i>Phyllostachys edulis</i> leaves	32
(1) Silica gel 60 column chromatography	32
(2) Preparative thin layer chromatography	33
(3) Absorption of UV spectrum	33
(4) NMR spectrum	33
F. Purification of anticancer substances of <i>Phyllostachys edulis</i> shoots	36
G. Bioactive properties of <i>Phyllostachys edulis</i> products	36
H. Compare with China products	41
Part III : Studies on anticomplementary and reactive oxygen scavenging activities of <i>Phyllostachys edulis</i>	46
Chapter 1. Introduction	46
Chapter 2. Studies on antioxidant and reactive oxygen scavenging activities of <i>Phyllostachys edulis</i> leaves	50
1. Materials and Methods	50
A. Materials	50
B. Extraction	51
C. Purification of antioxidant compounds	51

D. DPPH scavenging activity	52
E. Rat microsome lipid peroxidation inhibitory activity	52
F. Reactive oxygen scavenging activity using xanthine oxidase (XOD)/xanthine system	53
G. Inhibition assay of reactive oxygen generation	53
H. ESR	53
I. Structural determination of active compound	54
2. Results	54
A. Screening of reactive oxygen scavenging activity of the extracts from <i>Phyllostachys edulis</i> leaves	54
B. Comparison of antioxidative activities between the bamboo extracts	62
C. Extraction and organic solvent preparative fractionation	64
D. Purification of antioxidant compounds from the butanol extracts	65
E. Structural analysis of purified compounds	66
F. Antioxidant capacity of the purified compounds	71
G. Comparison of antioxidant capacity between the purified compounds and known antioxidant compounds	71
Chapter 3. Studies on anticomplementary polysaccharide of <i>Phyllostachys edulis</i> shoot	74
1. Materials and Methods	74
A. Materials	74
B. Extraction and fractionation of <i>Phyllostachys edulis</i> shoot	74
C. Anticomplementary activity assay	74
D. DPPH scavenging activity	75
E. Reactive oxygen scavenging activity	75
F. Rat microsome lipid peroxidation inhibitory activity	75
G. General and sugar composition analysis of polysaccharide	76
H. Purification of anticomplementary β -glucan	76
I. Glycosidic linkage analysis of β -glucan	77
J. Immunoelectrophoresis	77
2. Results	77
A. Extraction condition and preparation of the bamboo shoot extracts	77
B. Antioxidative activity of the bamboo shoot extracts	80
C. Anticomplementary activity of the bamboo shoot extracts	81

D. General and sugar composition analysis of the bamboo shoot extracts	83
E. Purification of anticomplementary polysaccharide	84
F. Chemical composition and activity of the active compounds	88
G. Structural ananalysis of β -glucan from bamboo shoot	90
Chapter 4. Activity of bamboo products	94
Part IV. Preparation of tea and beverage in <i>Phyllostachys edulis</i>	97
A. Composition in leaf of <i>Phyllostachys edulis</i>	97
B. Steamed tea in leaf of <i>Phyllostachys edulis</i>	97
C. Infusion tea in leaf of <i>Phyllostachys edulis</i>	98
D. Powder and granule tea in leaf of <i>Phyllostachys edulis</i>	101
E. Orb in leaf of <i>Phyllostachys edulis</i>	105
F. Beverage in sprout of <i>Phyllostachys edulis</i>	108

목 차

제 출 문	i
요 약 문	ii
SUMMARY	vii
CONTENTS	xi
목 차	xvi
제 1 장 서 론	1
제 1 절 연구 개발의 목적과 범위	1
제 2 절 경제·산업적 측면에서의 연구 개발의 필요성	2
제 3 절 기술적인 측면에서의 연구개발의 필요성	2
제 4 절 사회·문화적 측면에서의 연구개발의 필요성	3
제 2 장 맹종죽의 항균, 항돌연변이 및 항암 활성에 관한 연구	4
제 1 절 서 설	4
제 2 절 재료 및 방법	5
제 1 항 재 료	5
제 2 항 실험방법	6
가. 죽엽추출물의 제조	6
나. 항균활성의 측정	7
(1) Paper disc method(Agar diffusion test, ADT)	7
(2) Dilution test	8
(3) MIC(Minimal inhibitory concentration)의 측정	8
(4) Bioautography	8
다. GTase(Glucosyltransferase) 저해효과의 측정	8
라. 구취 감소효과측정	9
마. 항암활성 시험	9
바. 항돌연변이 활성의 측정	10
사. 활성물질의 분리 및 정제	10

(1) Silica gel 60 column chromatography에 의한 분리	11
(2) Preparative thin layer chromatography에 의한 분리	11
제 3 절 결 과	12
제 1 항 멥종죽의 향균 및 항암, 항돌연변이 활성에 관한 연구	12
가. 각종 유기용매 추출물로부터의 향균활성 검색	12
나. GTase 저해효과 및 구취감소효과	17
다. 항암활성의 측정	19
라. 항돌연변이활성의 측정	30
마. 향균물질의 분리·정제 및 구조분석	32
(1) Silica gel 60 column chromatography에 의한 분리	32
(2) Preparative thin layer chromatography에 의한 분리	33
(3) UV spectrum에 의한 흡수특성 조사	33
(4) NMR spectrum에 의한 분석	33
바. 죽순의 항암활성 물질에 대한 분리	36
사. 제조된 차 및 음료의 생리활성	36
아. 외국산 죽순과 국내산 죽순의 비교	41
제 3 장 : 멥종죽의 항보체 및 활성산소 제거활성에 관한 연구	46
제 1 절 서 설	46
제 2 절 멥종죽 엽으로부터 항산화성 활성산소 소거활성 물질에 관한 연구	50
제 1 항 재료 및 실험방법	50
가. 재료	50
나. 추출	51
다. 항산화성분의 정제	51
라. DPPH 전자공여능 (electron donating ability) 측정	52
마. Rat microsome 지질과산화 저해활성 측정	52
바. Xanthin oxidase (XOD)/Xanthin 계를 이용한 활성산소 소거능 조사	53
사. 활성산소 생성 저해활성	53
아. ESR	53
자. 활성물질의 구조분석	54
제 2 항 결과	54
가. 멥종죽엽 추출물의 활성산소 제거활성 탐색	54

나. 죽엽 추출물들의 생리활성 비교	62
다. 활성획분의 대량추출 및 유기용매 분획	64
라. 부탄올 획분으로부터 항산화활성 물질의 정제	65
마. 활성물질의 구조분석	66
바. 정제화합물의 항산화활성 조사	71
사. 맹종죽 정제 화합물들과 기존 항산화성분과의 항산화활성 비교	71
제3절 맹종죽 죽순으로부터 항보체 활성 성분에 관한 연구	74
제 1 항 재료 및 실험방법	74
가. 재료	74
나. 맹종죽 죽순의 추출 및 분획	74
다. 항보체활성 측정	74
라. DPPH 유리라디칼 소거능 측정	75
마. Superoxide anion 소거능 측정	75
바. 지질과산화 저해화성 측정	75
사. 다당류의 일반 분석 및 구성당 분석	76
아. 항보체 활성 β -glucan의 정제	76
자. 다당류의 당쇄결합 분석	77
차. C3 활성화 조사를 위한 면역전기영동]	77
제 2항 결과	77
가. 활성조사를 위한 맹종죽 죽순의 추출물 제조 및 추출조건 확립	77
나. 죽순 추출물 획분들의 항산화 활성 탐색	80
다. 죽순 추출물 획분들의 항보체 활성 탐색	81
라. 죽순 다당류 획분의 화학적 조성 및 구성당 분석	83
마. 죽순의 수용성 다당류 획분으로부터 항보체성분의 정제	84
바. 죽순 항보체 활성 다당류 획분들의 화학적 조성과 항보체 활성	88
사. 죽순에서 분리된 수용성 β -glucan의 구조분석	90
제 4절 죽순 및 죽엽 제품내 활성 조사	94
제 4 장 죽엽차 및 죽순음료의 제조	97
가. 죽엽의 일반성분 분석	97
나. 죽엽 증숙차의 제조	97
다. 죽엽 침출차의 제조	98
라. 죽엽 분말차 및 과립차의 제조	101

마. 죽엽환의 제조	105
바. 음료 제조	108

제 1 장 서 론

제 1 절 연구 개발의 목적과 범위

맹종죽은 우리나라에서 경남 거제도 하청면 일대에서 주로 생산되며 경지면적 150ha를 차지 하므로써 국내 죽순 생산량의 90%를 점하고 있으며, 농가 소득 및 지역 경제 활성화에 큰 기여를 했으며 대일 수출 품목으로서 국가 경제에도 상당한 기여를 한 작목이다. 죽순의 생산량 감소된 원인을 살펴보면 1970년대에는 죽순 생체를 가공하여 전량 일본에 수출하였을 정도였으나 1980년대 초에 중국과 일본의 무역개시 이래 값싼 중국 죽순이 대수출을 시작하면서 국내 가공업자들이 죽순 가공을 포기하기 시작했고, 1989~1992년 에는 생산된 죽순의 판로가 없어 썩혀 버리는 사례가 발생하고 TV등 언론매체를 통해 보도되면서 생산량도 줄고 가격이 폭락하였다. 1990년대에 들어와서는 1983년까지 1500여톤을 생산하던 죽순생산량은 농산물시장 개방 아래 수입산에 밀려 1994년의 1500톤에서 매년 감소하였고, 1998년도엔 600톤으로 60%정도가 감소하였으며, 1999년과 2000년도에는 생산량이 각각 400톤과 390톤으로 상당한 양이 감소되었다. IMF로 인한 소비 격감으로 1988년에는 약 600톤을 생산하여 그중 492톤을 수매하여 가공한 실정이며 이 지역 농가의 주된 소득원 이기도한 죽순 가공은 1994년에 7억 5000만원이던 연간 순이익이 현재 9500만원에 불과하여 농가 소득에 심대한 타격을 주고 있으며, 이로 인해 농민들은 더 이상 죽순을 생산하지 않으려는 경향이다. 매년 맹종죽 죽순의 생산량은 크게 감소하는데 반해 그 수입량은 매년 증가하는 추세에 있다. 1999년 한해만 해도 1930톤 정도이며, 2000년 7월까지 1130톤 정도가 수입되었다. 1995년에는 수입량의 60%가 중국산이었으나 현재는 수입의 거의 전량이 중국산으로 가격경쟁에 크게 밀리고 있다. 국내의 생산 능력도 크게 감소하여 연간 2000~3000톤으로 추정되는 죽순의 소비량을 감당하지 못하고 있다. 또한 최근 중국산 수입 식품의 안전성 문제가 심각한 사회 문제로 대두되고 있어 국내산 죽순의 경쟁력을 높여 생산량을 증가시키기 위한 노력이 절실히 필요하다.

이상과 같이 보고되었거나 아직 알려져 있지 않은 맹종죽 죽엽 및 죽순의 약리 작용을 집중적으로 탐색하여 아직 명확히 알려지지 않은 생리활성을 찾아내고 이를 이용하여 기능성 차와 음료제조의 가능성을 시도 하므로써 2000톤 이상의 연간 생산능력을 지닌 국내 맹종죽의 부가가치성을 높여 값싼 중국 및 태국산에 의해 사장되기 직전인 우리나라 맹종죽의 경쟁성을 회복하여 WTO 체제에 대응하고자 한다.

제 2 절 경제·산업적 측면에서의 연구 개발의 필요성

죽순 가공의 유일한 방법인 통조림 생산·판매는 수입산에 비해 가격 경쟁력이 약하여 WTO 시장개방 이후 국내 죽순 생산량의 80% 이상을 차지하고 있는 경남 거제 지역의 농가 소득에 엄청난 손실을 가져왔고, 조속한 시일 내에 돌파구를 찾지 못하면 국내 맹종죽 산업은 사장될 위기에 처해 있어 죽엽 및 죽순의 고 부가가치화를 통한 수입산과의 차별화를 통한 경쟁력 제고만이 이 지역 농가경제 향상을 위해서 필요할 뿐만 아니라 현시점에서 국내 농산물이 안고 있는 문제점을 해결할 가장 효과적인 대안이다. 21 세기의 식품산업은 생리활성이 강조되거나 강화된 식품에 대한 요구가 크게 증가할것이 확실한 데, 죽순의 경우에도 가격경쟁력 약세가 지속될 것인 바, 1차 식재로서 보다는 2차 가공하여 양파의 4배, 양배추의 2배정도 풍부한 칼슘, 철분, 인과 같은 무기질과 변비와 장기능 활성화에 좋은 풍부한 식이섬유 등 건강식품으로 개발한다면 재배농가 소득증대 및 지역경제 활성화에 기여할 수 있을 것이다.

제 3 절 기술적인 측면에서의 연구개발의 필요성

죽엽의 항균활성에 대해서는 일부 연구자들에 의해서 단편적으로 보고된 바 있으나 심도있는 연구는 진행된 바 없으며, 죽엽을 이용한 식품가공은 죽엽청주 등 주류에서 이용되고 있는 것으로 알려져 있으나 차의 제조에 대해서는 시도된 바 없다. 죽엽의 항균활성을 증치 및 구취 소취에 활용한다면 좋은 건강식품이 될 것으로 확신하며 죽순은 어린 식물이기 때문에 대사활성이 왕성하고, 급속한 갈변을 유발하며 수분유출로 인한 생체손실이 야기되어 신선상태의 보존이 불가능하여 수확 직후 즉각적인 열

처리에 의한 통조림 가공형태가 유일한 유통 및 가공방법이었으나, 현재 수입품과의 가격경쟁력을 잃고 고사 직전에 놓여있는 실정이므로, 즉석에서 먹을 수 있는 신제품 개발이 절실하다. 죽순의 우수한 영양성분, 미량성분 및 풍부한 식이섬유와 한방에서 알려진 이노작용 등 여러 약리작용은 음료제조를 통해 건강식품으로 개발 가능성이 있다고 보며, 또한 아직 알려져 있지 않은 여러 생리활성 등이 규명이 되면 이 지역 특산품으로서 개발할 가치가 있다.

제 4 절 사회·문화적 측면에서의 연구개발의 필요성

조상들이 피와 땀, 혼이 배어있는 대나무밭을 자손세대가 지키지 못하고 후손에게 천덕꾸러기 대밭을 물려줄 수 없다는 이 지역 농민들의 바람이 간절하며 WTO 체제에서의 난관 극복의 돌파구가 될 수 있을 것으로 확신하다. 예 선비들의 곧은 성품, 속이 비어 마음을 비운 듯 청렴하고 늘 푸르른 모습을 보이고 있는 대나무를 노래한 윤선도는 우리 민족의 대나무에 대한 각별한 애정을 잘 나타냈다고 보며 이제 맹종죽의 농림 자원을 이용하여 자긍심과 경제적 富를 사회가 부여해야 할 것이다.

제 2 장 맹종죽의 향균 및 항암, 항돌연변이 활성에 관한 연구

제 1 절 서 설

우리나라에는 왕대(*Phyllostachys bambusoides*), 솜대(*Phyllostachys nigra* var. *henonis*), 맹종죽(*Phyllostachys edulis*)의 3대 죽종이 주류를 이루며, 주로 남부지방에서 재배되고 있다. 왕대와 솜대는 물리적 특성을 이용한 기구 제조에 주로 이용되나, 맹종죽은 이에 적절치 않고, 그의 죽순이 식용 또는 약용으로 이용되고 있어 죽순대라고도 한다. 맹종죽은 예로부터 구토, 소염, 유산, 발한, 증풍 등에 대한 치료제로 이용되어 왔고, 그 외에 항산화성, 항균성을 나타내는 물질이 포함되어 있어 일본에서는 옛부터 죽물통, 고기를 포장하는 죽순의 잎, 송어초밥(스시)을 포장하는 잎, 조릿대 엽, 조릿대 경단 등 식품에도 이용되어 왔다. 대나무는 생장이 빨라서 식재후 4~5년이면 수확을 할 수 있고 죽순은 식용으로, 대는 죽세공품, 건축용재, 펄프용재 등 그용도가 다양하다. 맹종죽은 벼과의 목본성 식물로 관상용, 약용 및 식용자원으로 이용되며, 특히 구토 소염, 유산, 발한, 증풍 등에 대한 치료제로 이용되어 왔다. 이러한 맹종죽의 추출물은 세균류와 진균류에 광범위한 항균효과를 나타내고 있으며, 열안정성이 높고 rat에서 급성독성이 인정되지 않은 것으로 보고되었다. 맹종죽의 향균 성분은 Quinone 유도체인 것으로 알려져 있으며, 대나무와 유사한 조릿대의 향균물질로 알려진 guaiacol, phenol, 4-vinylphenol 등의 페놀성 성분과 acetic acid, phenylacetic acid, propionic acid 등의 유기산류와는 다른 것으로 보고 되어있다.

Quinone은 벤젠유도체로 수소원자 두 개가 산소원자 두 개로 치환된 화합물로 일반적으로 담황색에서 거의 흑색에 가까운 색을 나타내는 천연 색소로 1200개 이상의 유도체가 알려져있다. 물질의 분포범위가 넓어 고등식물의 껍질, 목부, 뿌리, 잎에 다양하게 존재하고 있다. Quinone류는 acetate-malonate 경로를 거쳐서 생합성되는 것도 있고, shikimate-mevalonate 경로를 거쳐 생합성되는 것도 있다. 일반적으로 benzoquinone, naphthoquinone, anthraquinone, isoprenoid quinone의 네가지로 분류하고 있다. 앞의 세가지는 일반적으로 수산화되어 있으며 phenol의 성질을 가진

다. 식물체 내에서는 당과 결합하여 배당체로 존재하거나 때로 중합체로 존재한다. Naphthoquinone류 및 anthraquinone류는 항균작용이나 사하 작용이 있는 화합물이 많으며, vitamin K는 naphthoquinone 이다. Isoprenoid quinone은 세포의 호흡과 관련된 ubiquinone, 광합성과 관련된 plastoquinone 등을 들수 있다. 이들 quinone 류와 유도체들의 항균효과에 관해 Brewer등은 polyporic acid, atromentin, oosporein, bovinone, cochliodinopoly의 진균류에 대한 항균효과를, Tabata M.등은 echinone, echinofuran, shikonin등의 quinone의 항균효과를, Nishina A.등은 p-benzoquinone 및 그 유도체의 항균효과에 대해 보고하고 있다.

이러한 배경에 의해 본 연구에서는 맹종죽을 천연 항균제의 개발 및 항암, 항돌연변이 활성물질 소재로 이용하기 위하여 맹종죽 잎과 죽순 추출물의 항균효과 및 항암, 항돌연변이 활성을 탐색하고, 활성이 확인된 분획의 분리를 통하여 생리활성 물질의 기능성 식품으로의 이용 가능성에 대해 검토 하였다.

제 2 절 재 료 및 방 법

제 1 항 재 료

죽엽은 경남 거제시 하청에서 자생하는 맹종죽의 잎을 채취하였다. 채취한 잎은 100℃의 증기로 10분간 blanching하여 동결건조 하였다. 건조된 잎은 분말상태로 분쇄하여 -72℃의 온도에서 저장하며 사용하였다. 죽순 역시 거제시에서 직접 수확한 맹종죽의 죽순을 동결상태로 운반하여 죽엽과 같은 과정으로 전처리 한후 사용하였다.

시험 미생물은 일반적인 식품 부패 미생물 및 식중독 미생물, 구강 미생물을 사용하였으며, 변이원성 실험에 사용된 균주는 화학물질에 대한 투과성을 높이기 위하여 세포벽의 구성성분인 lopolysaccharide의 합성이 결여되고 DNA회복계 유전자가 결실되어 실험에 적합하도록 만들어진 *Salmonella typhimurium* 균주를 사용하였다.

세포주는 일반적으로 사용되는 암세포인 Hep 3B(human, hepatocellula carcinoma), PLC/PRF/5(liver hepatoma), HepG2(liver hepatoblastoma), HepalC1C7(liver)

,MDA(human breast, adenocarcinoma)등을 사용하였다.

본 실험에 사용된 배지는 대부분 Difco사 제품이며, 그 외의 시약은 1급이상의 제품을 사용하였고, 항암 활성 시험에 사용되는 RPMI-1640, MEM(minimal essential medium)과 fatal bovine serum(FBS)은 Gibco사로부터 구입하였고, penicillin 및 streptomycin은 sigma사에서 구입하였고, 변이원성 시험에 사용된 mutagen인 sodium azide 및 N-methyl-N'-nitro-N-nitroso guanidine (MNNG)등도 sigma사에서 구입하여 사용하였다.

제 2 항 실험방법

가. 죽엽추출물의 제조

(1) 용매별 추출물의 제조

죽엽 건조분말의 중량에 10배의 용매를 첨가하여 상온에서 12시간 동안 교반하며 3회 추출하였다. 추출물은 filtration(Whatman No. 1) 및 rotary evaporator로 용매를 제거하고 적정 농도로 희석하여 사용하였다.

(2) 죽엽추출물의 분획

Diethyl ether로 추출한 죽엽추출물을 아래 Fig. 1의 과정을 거쳐 acidic, basic, neutral, phenolic fraction으로 각각 분획화 하였다.

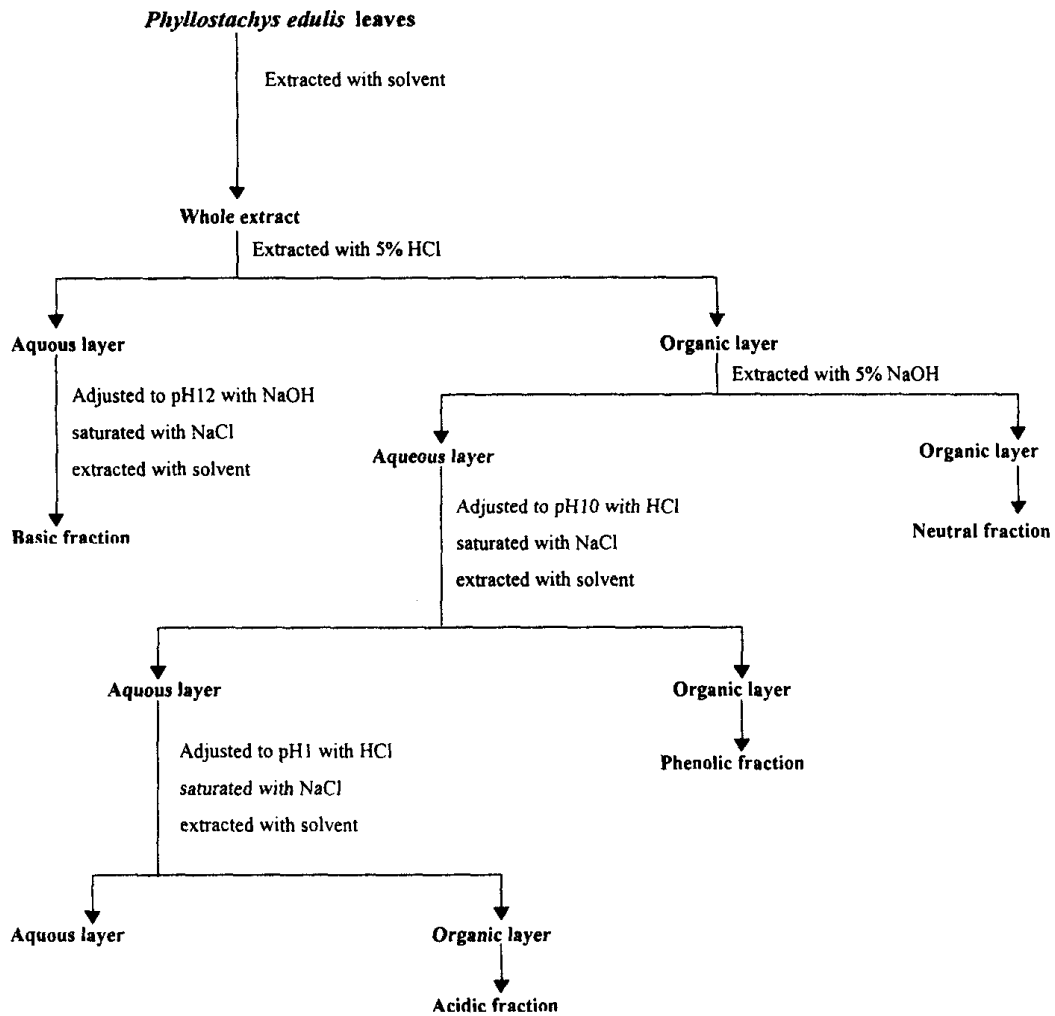


Fig. 1. Fractionation of the diethyl ether extract of *Phyllostachys edulis* leaves

나. 항균활성의 측정

(1) Paper disc method(Agar diffusion test, ADT)

각각의 용매로 추출한 추출물은 적정농도로 제조하여 paper disc에 0.01~0.05 ml 을 주입하고, 시험미생물을 도말한 배지위에 올려놓아 배양하였다. 일반 bacteria의 경우 12시간에서 24시간 사이에 저해환이 형성되면 항균활성이 있는 것으로 판단하였으며, yeast의 경우는 24시간에서 36시간, mould의 경우 48시간에서 72시간 사이에 저해환이 형성되면 활성이 있는 것으로 보았다. 일반 bacteria는 hard agar를 사용하였으며, 구강 미생물은 brain heart infusion agar, yeast는 YM agar, mould는

potato dextrose agar를 사용하여 배양하였다.

(2) Dilution test

삼각플라스크에 nutrient broth 30 ml과 항균시험액을 각각 0.1, 0.5, 1.0 ml씩 분주하고 시험미생물의 균수를 10^5 /ml 수준으로 희석하여 0.1 ml 접종한다. 37°C에서 진탕배양하며 시간별로 1 ml씩 취해서 640 nm에서 흡광도를 측정한다. 시험미생물의 성장속도가 대조구보다 낮을 경우 항균활성이 있는 것으로 판정한다.

(3) MIC(Minimal inhibitory concentration)의 측정

MIC는 Bioscreen C를 이용하여 흡광도 값을 측정하고, 대조구와 비교하여 흡광도 값이 낮으면 항균활성이 있는 것으로 판단하였다. Honeycomb well에 배지와 각 농도 별로 제조한 추출물 그리고 inoculum을 100 μ l씩 첨가하여 전체 용량은 300 μ l로 하였다. 대조구는 추출물 대신 추출용매를 첨가하였다. 37°C에서 18시간동안 배양하며 3시간 간격으로 흡광도를 측정하였고, 대조구보다 흡광도가 낮은 것을 저해 활성이 있는 것으로 판단 하였다.

(4) Bioautography

TLC로 전개한 항균추출물을 petri dish에 넣고 시험미생물을 접종한 hard agar 20 ml 붓는다. 37°C에서 배양한 후 0.02% tetrazolium red로 발색시켜 관찰한다.

다. GTase(Glucosyltransferase) 저해효과의 측정

(1) Crude GTase의 수집

Streptococcus mutans KCTC 3065를 37°C, 150 rpm으로 18시간 배양하여 배양액을 centrifuge(at 7,000 xg, for 20 min)한다. 상등액을 ammonium sulfate로 침전시키고 침전된 단백질은 centrifuge(at 11,000 xg, for 60 min)하여 5 mM KPB에 현탁시켜 사용하였다.

(2) 추출물의 GTase 저해효과 측정

Sucrose 30 mg과 crude GTase, 추출시험액을 각 농도별로 첨가하고 0.02% sodium azid를 포함하는 0.05 M KPB(pH 6.5)로 최종 volume을 3 ml로 맞추어준다. 이를 37°C에서 30°의 각도로 유지하며 16시간 incubation한다. 형성된 glucan은 centrifuge(at 2,500 rpm, for 10 min)하여 수거하고, sonication하여 550 nm에서 흡광도를 측정한다. 흡광도가 대조구보다 낮은 것을 저해활성이 있는 것으로 판단하였다.

라. 구취 감소효과측정

구취는 휘발성 황화합물(Volatile sulfur compounds: VSC)인 hydrogen sulfide와 methyl mercaptan을 측정하여 구취의 정도를 판단하는 halimeter를 이용하여 측정하였다. 인위적으로 구취를 유발하기 위하여 마늘즙액을 섭취한 후 구취를 측정하고, 추출물로 가글을 한다. 이 후 3분, 8분, 13분 후 구취를 측정하여 감소효과를 측정하였다.

마. 항암활성 시험

(1) 세포주 선별

세포주는 Hep 3B(human, hepatocellula carcinoma), PLC/PRF/5(liver hepatoma), HepG2(liver hepatoblastoma), Hepa1C1C7(liver), MDA(human breast, adenocarcinoma)을 사용하였다.

(2) 세포배양 및 항암활성의 측정

1) MTT assay

배지는 MEM(Minimum essential medium)을 사용하였고, 37°C의 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 추출 시험액은 맹종죽 죽엽의 유기용매 및 열수 추출물을 사용하였으며, 유기용매 추출물은 유기용매를 제거한 후 DMSO에 녹여 사용하였다. 배양된 cell을 trypsin 처리하여 10⁴cells/well로 seeding하여, cell이 어느 정도 부착된 후 상층액을 걷어내고 맹종죽의 유기용매 및 열수 추출물을 농도별로 주입하고 37°C CO₂ incubator에서 incubation한다. 배양 상층액을 제거한 후 MTT(3-(4,5-

dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)를 넣어 incubation 한 후 DMSO를 넣고 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

2) SRB assay

96 well plate에 적정 세포농도로 부유된 100 μ l의 배지를 가한후 plate를 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 존재하에서 24시간 배양한다. 배양후 검색 시료를 PBS로 희석하여 10배용액으로 만들어 각 well에 첨가한후 plate를 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 존재하에서 48시간 배양한다. 배양후 부착성 세포에 50 μ l의 차가운 50% TCA 용액을 천천히 가한다. TCA가 바닥에 가라 앉도록 잠시 기다린후 조심스럽게 냉장고로 옮겨 1시간 동안 고정 시킨다음 증류수로 5회 세척하여 dry oven에서 말린다. 건조된 well에 1% acetic acid에 녹인 0.4% SRB 용액 100 μ l를 가하여 30분이상 염색한 다음 1% acetic acid로 5회 세척하여 건조 시킨다. 건조후 150 μ l의 10mM unbuffered Tris(alkaline pH)용액을 각 well에 가해 SRB dye를 잘녹여낸 다음 microplate reader로 490~540nm 범위내에서 OD를 측정한다.

바. 항돌연변이 활성의 측정

Salmonella typhimurium TA-98, TA-100, TA-1535 균주들의 histidine요구성 시험을 통하여 hitidine 요구성을 확인하였다. 0.1 M L-histidine 0.1 ml가 가해진 Spizizen 평판배지와 가해지지 않은 평판배지에 접종한 후 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양하였다. *S. typhimurium* 균주의 복귀 돌연변이 유발 시험은 돌연변이 유발원으로 sodium azide 및 MNNG, ICR-191, dexton등을 사용하였고, 시험 샘플은 농도별로 제조하여 사용하였다. 시험액을 농도별로 준비하고, top agar를 제조하여 각각 10ml의 0.5mM histidine, 0.5ml biotin solution을 100ml의 top agar에 주입한다. 시험액과 S9 mix를 top agar에 주입한후 균현탁액을 0.1ml 가하여 minimal glucose agar에 균일하게 부어 37 $^{\circ}$ C에서 48시간동안 배양하여 생성된 colony를 관찰하였다.

사. 활성물질의 분리 및 정제

맹종죽염 diethyl ether로 추출하여 항균물질을 분리하였다. 각 정제과정은 아래 Fig. 2에 나타냈다. 정제과정 중 항균활성은 bioautography를 이용하여 측정하였다.

(1) Silica gel 60 column chromatography에 의한 분리

맹종죽의 diethylether 추출물을 hexane으로 평형화 시킨 silicagel 60 column에 주입하여 흡착 시킨후 ethylacetate의 비율을 높여가며 (hexane : ethylacetate = 1:0, 50:1, 20:1, 10:1, 5:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 0:1) 용출하여 극성도에 따라 10개의 분획으로 나누었다. 이를 이차원으로 TLC를 전개하여 bioautography로 활성을 확인하였다.

(2) Preparative thin layer chromatography에 의한 분리

Silica gel 60 column chromatography에 의해 분리된 활성분획을 전개용매 hexane : ethylacetate = 2 : 1의 조건에서 1차 silicagel 60 TLC를 실시하였다. 이를 3:2의 비율로 2차 TLC를 실시하여 항균 물질을 분리하였으며, 분리된 항균물질은 TLC로 단일 분획임을 확인 하였다.

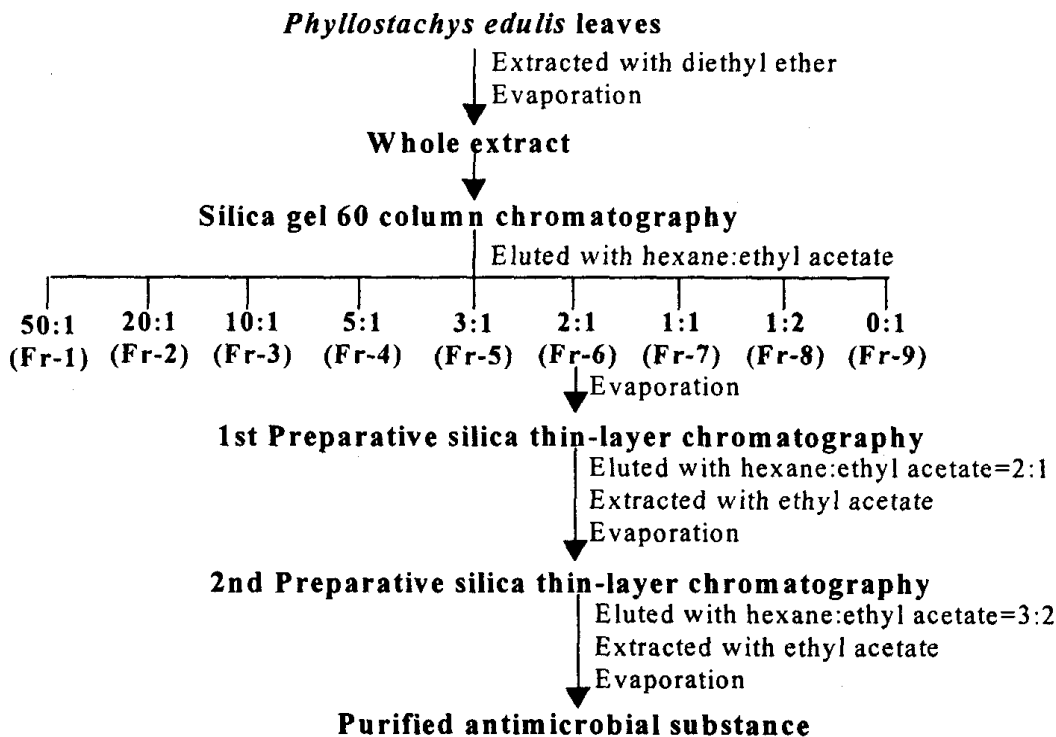


Fig. 2. Isolation of antimicrobial substance from *Phyllostachys edulis*

제 3 절 결 과

제 1 항 맹종죽의 항균 및 항암, 항돌연변이 활성에 관한 연구

가. 각종 유기용매 추출물로부터의 항균활성 검색

각 용매별로 추출하여 활성을 검토한 결과 ethanol 추출물의 경우 활성을 나타내지 않았으며, methanol 과 ethylacetate 추출물에서는 일부 미생물에 미약한 활성을 나타냈다. Diethyl ether 추출물은 모든 미생물에 강한 항균활성을 나타내었으며, 특히 효모와 곰팡이에 강한 활성을 가지고 있었다.(Table 1, Fig. 3) 차 제조에 초점을 맞춘 온수추출물은 세균에 대해서만 활성을 나타내었으며, 특히 충치를 유발하는 *St. mutans*에 좋은 효과를 나타내어 충치감소효과가 기대된다.(Table 2) ADT결과 온수추출물에 대하여 활성이 나타난 시험미생물의 MIC를 측정하였다. *St. mutans*와 *Sal. typhimurium*, *L. monocytogenes*, *F. nucleatm*만이 저농도에서 생육저해효과를 나타냈으며, 나머지 세균과 효모는 고농도에서도 전혀 저해효과가 없거나 아주 미약하였다.(Table 3)Diethyl ether로 추출하여 분획한 각 fraction은 세균에 대해 acidic fraction(AF)과 phenolic fraction(PF)이 유사한 활성을 보였고, neutral fraction(NF)과 basic fraction(BF)은 거의 활성을 나타내지 않았다.(Table 5) DT의 결과에서도 AF와 PF 모두 500 ppm과 1,000 ppm에서 미생물의 생육을 완전히 억제하였으며, PF는 100 ppm의 농도에서도 생육을 억제하였다.(Fig. 4, 5) 반면 효모와 곰팡이의 경우 PF에서 강한 활성을 나타내어 항균물질의 주요구성물질은 phenolic compound인 것을 알 수 있었다. 죽순의 경우 곰팡이류와 효모류에서는 활성을 보이지 않았으며, 세균류의 경우에서도 죽엽에 비해 항균력이 상당히 약하였고, 항균범위도 *Bacillus*속에 국한되는 결과를 보였다.(Table 4)

Table 1. Antimicrobial activity of *Phyllostachys edulis* leaves extracted with organic solvent

Test microorganism	Activity			
	EtOH	MeOH	EtOAc	Et ₂ O
Bacteri				
a				
<i>Bacillus cereus</i>	-	NT	NT	++++
<i>Bacillus subtilis</i>	-	+	+	++++
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	NT	NT	++++
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	-	+	++++
<i>Streptococcus mutans</i>	-	-	-	++
Yeast				
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	++++
<i>Debariomyces hansenii</i>	-	-	-	++++
<i>Pichia anomala</i>	-	-	-	++++
<i>Pichia capsulata</i>	-	-	-	++++
Mould				
<i>Aspergillus nidulans</i>	-	-	-	++++
<i>Aspergillus flavus</i>	-	-	-	++++
<i>Penicillium citrinum</i>	-	-	-	++++
<i>Penicillium expansum</i>	-	-	-	++++

clear zone diameter: mm paper disc diameter: 6 mm NT: not tested
 -: no activity +: 6~10 mm ++: 10~15 mm +++: 15~20 mm ++++: 20 mm <
 EtOH: ethanol MeOH: methanol EtOAc: ethyl acetate Et₂O: diethyl ether

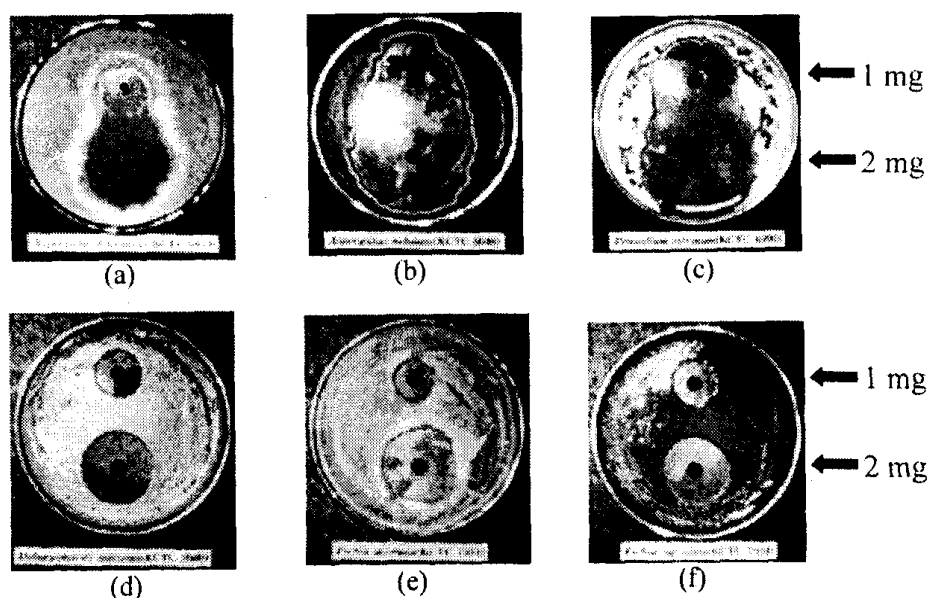


Fig. 3. Antimicrobial activity of extract by Et₂O against various microorganisms (a) *Aspergillus toxicarius* (b) *Aspergillus nidulans* (c) *Penicillium citrinum* (d) *Debaryomyces hansenii* (e) *Pichia anomala* (f) *Pichia capsulata*

Table 2. Antimicrobial activity of *Phyllostachys edulis* leaves extracted with hot water

Test microorganism	Activity	Test microorganism	Activity
Bacteria		Bacteria	
<i>Bacillus cereus</i>	+	<i>Eikenella corrodens</i>	+
<i>Bacillus subtilis</i>	+	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	+
<i>Enterobacter aerogenes</i>	+	<i>Neisseria denitrificans</i>	+
<i>Enterococcus faecium</i>	+	Yeast	
<i>Escherichia coli</i>	+	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	+	<i>Debariomyces hansenii</i>	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+	<i>Pichia anomala</i>	-
<i>Salmonella choleraesuis</i>	+	<i>Pichia capsulata</i>	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	+	Mould	
<i>Salmonella typhimurium</i>	+	<i>Aspergillus nidulans</i>	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	<i>Aspergillus flavus</i>	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	+	<i>Penicillium citrinum</i>	-
<i>Streptococcus mutans</i> ¹⁾	++	<i>Penicillium expansum</i>	-
<i>Streptococcus mutans</i> ²⁾	++		

clear zone diameter: mm paper disc diameter: 6 mm

-: no activity +: 6~10 mm ++: 10~15 mm ¹⁾: KTC 3065 ²⁾: KTC 3283

Table 3. MIC value of *Phyllostachys edulis* leaves extracted with hot water

Test microorganism	MIC value(mg/ml)
<i>Listeria monocytogenes</i>	10
<i>Salmonella typhimurium</i>	7
<i>Streptococcus mutans</i> (KCTC 3065)	<1.8
<i>Streptococcus mutans</i> (KCTC 3283)	<1.8
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	9

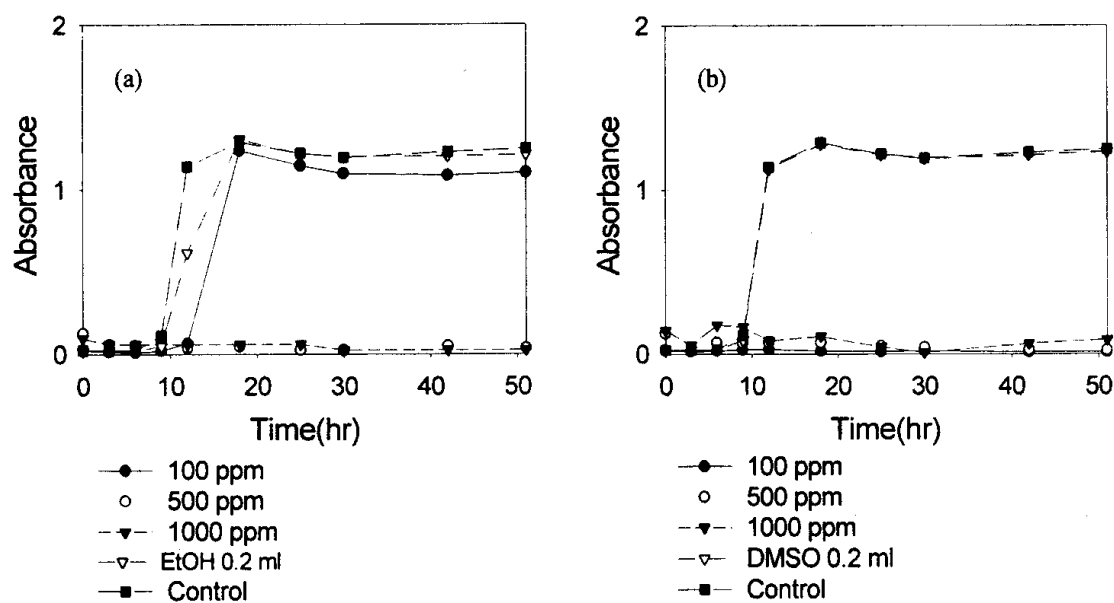


Fig. 4. Effect of acidic (a) and phenolic (b) fraction of extract by Et2O on growth of *Escherichia coli* 0157:H7

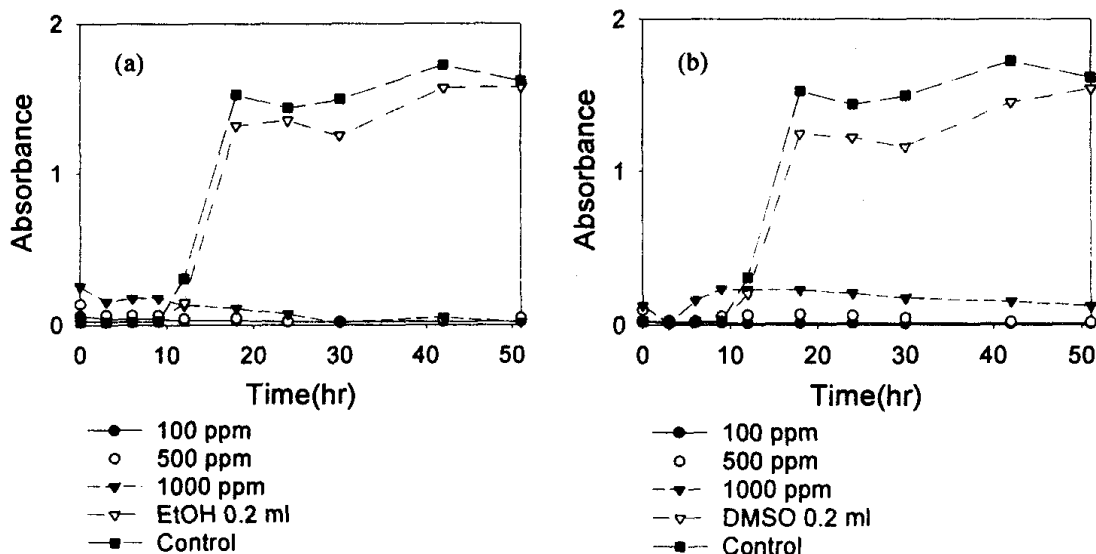


Fig. 5. Effect of acidic (a) and phenolic (b) fraction of extract by Et₂O on growth of *Bacillus anthracis*

Table 4. Antimicrobial activity of *Phyllostachys edulis* shoot extract with various solvents

Test microorganism	Solvents			
	EtOH	EtOAc	Et ₂ O	Hot water
<i>Bacillus anthracis</i>	++	++	++	+
<i>Bacillus subtilis</i>	+	++	++	-
<i>Bacillus cereus</i>	+	+	+	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecium</i>	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> 0157:H7	-	-	-	-
<i>Shigella dysenteriae</i>	+	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-
<i>Salmonella choleraesuis</i>	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	+	-	-	-

clearzone diameter: mm paper disc diameter: 6 mm

-: no activity +: 6~10 mm ++: 10~15 mm +++: 15~20 mm ++++: 20 mm <

Table 5. Antimicrobial activity of different fraction of extract by diethylether

Test microorganism	Activity			
	acidic fraction	basic fraction	neutral fraction	phenolic fraction
Bacteria				
<i>Bacillus anthracis</i>	+++	++	-	+++
<i>Bacillus subtilis</i>	++	-	-	+
<i>Bacillus cereus</i>	++	-	-	+
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecium</i>	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> 0157:H7	-	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	++	-	-	++
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	++	-	-	++
<i>Yersinia enterocolitica</i>	++	-	++	-
Yeast				
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	++	-	-	+++
<i>Debariomyces hansenii</i>	++	-	-	++++
<i>Pichia anomala</i>	++	-	-	++++
<i>Pichia capsulata</i>	++	-	-	+++
Mould				
<i>Aspergillus nidulans</i>	-	-	-	++++
<i>Penicillium citrinum</i>	-	-	-	++++

clearzone diameter: mm paper disc diameter: 6 mm

-: no activity +: 6~10 mm ++: 10~15 mm +++: 15~20 mm ++++: 20 mm <

나. GTase 저해효과 및 구취감소효과

온수, ethanol, methanol 추출물을 비교해본 결과 즉엽 methanol 추출물이 가장 좋은 효과를 보였으며, (Fig. 6(a)) 1,000 ppm에서 약 90% 이상이 저해되었고 활성의 1/2을 저해하는 IC₅₀의 농도는 약 400 ppm 인 것으로 나타났다. (Fig. 6(b))

온수 추출물의 구취감소효과 측정 결과 15분 후 약 40% 정도의 감소효과가 있는 것으로 나타났으며, 시중에 시판되는 일반 구강청정제와 비교해본 결과 그 효과가 비슷하거나 우수한 것으로 나타나 구강위생용품으로 이용할 수 있을 것으로 기대된다. (Fig. 7)

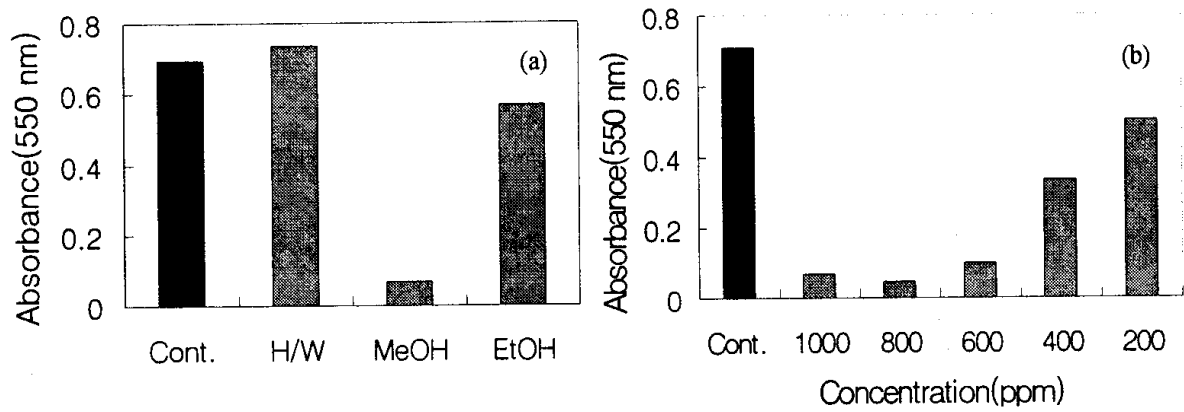


Fig. 6. GTase inhibitory effect of *Phyllostachys edulis* leaves extract
 (a) different solvent extract(1.000 ppm)
 (b) methanol extract

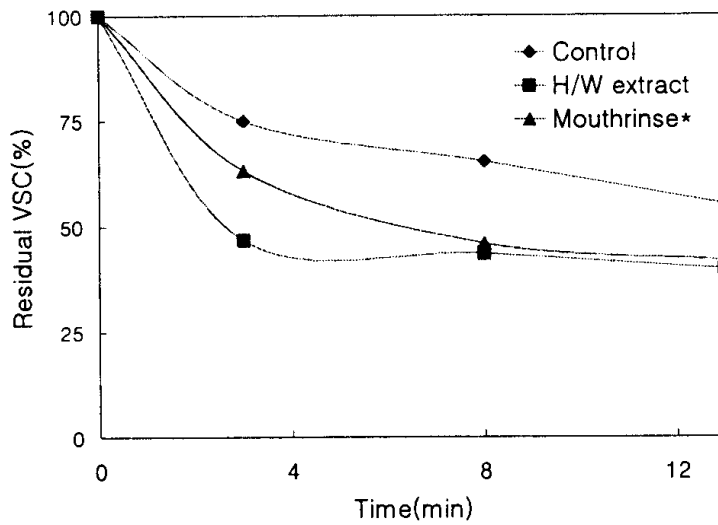


Fig. 7. Malodor reduction effect of *Phyllostachys edulis* leaves hot water extract

다. 항암활성의 측정

아래의 Fig. 8 에서 볼 수 있듯이 맹종죽의 유기용매 추출물 모두에서 항암 활성을 나타냈으며, 그중에서 ethylacetate와 ethanol 추출물이 활성이 좋았고, 특히 MDA-MB-231의 cell line에 대해 90%정도의 탁월한 효과를 나타내었으며, 그밖에 Hep1c1c7 cell에서도 우수한 효과를 보였으며 PLC/PRF/5 cell 및 Hep3B cell에서도 60%정도의 긍정적인 효과를 나타내었다.(fig.9~fig.12) 그에 반해 열수 추출물에 대해서는 효과가 유기용매 추출물에 비해 미약하게 나타났다. 죽순의 경우 죽엽과 유사한 정도의 항암 활성을 보였는데, 특히 diethylether와 ethylacetate 추출물이 우수한 활성을 보였고 cell line에 따라 60~80% 정도의 고른 활성을 보였다.(fig.13~fig.18) 두가지의 방법으로 항암 활성을 검색한결과 유기용매별 추출물과 cell line에 따라 약간의 차이는 있지만 SRB assay에서도 MTT assay와 유사한 경향의 결과를 나타내었다.

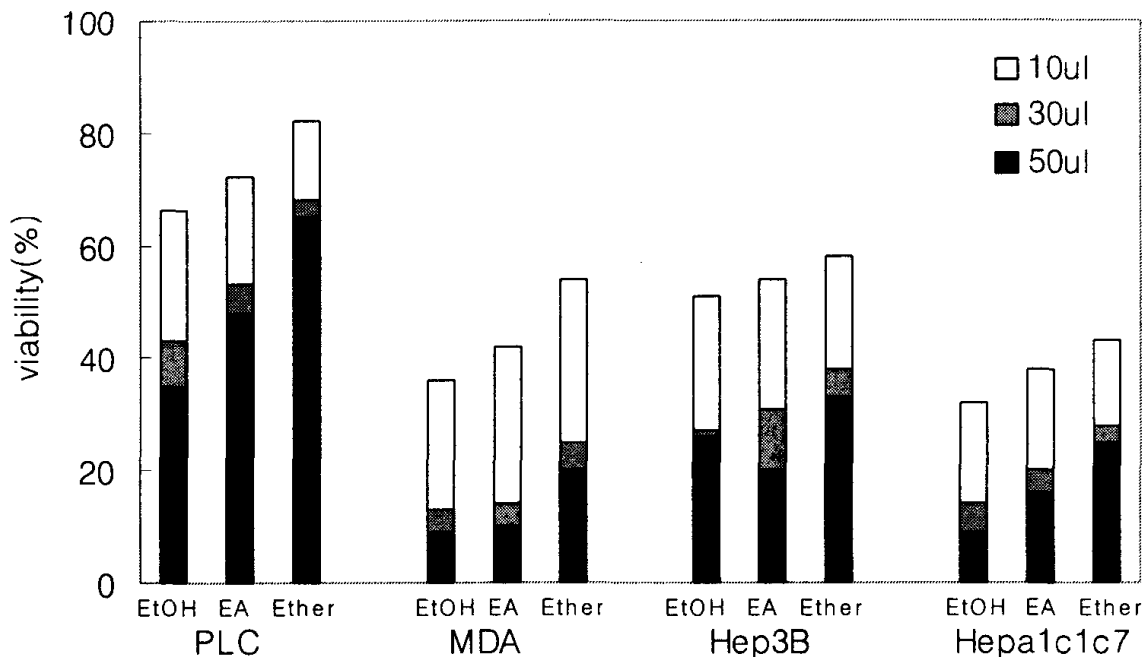


Fig.8. Dose-response anticancer activity of *Phyllostachys edulis* leaves extract tested by MTT assay. Significant inhibition was showed at 30 μ l of extract added, respectively.

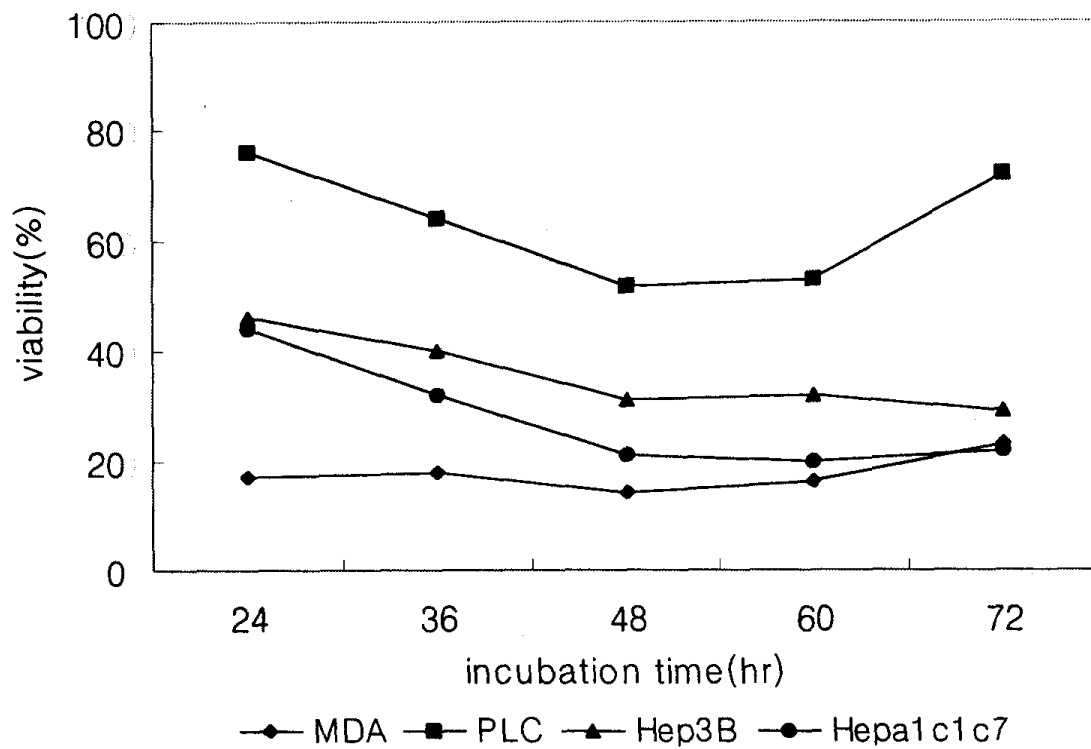
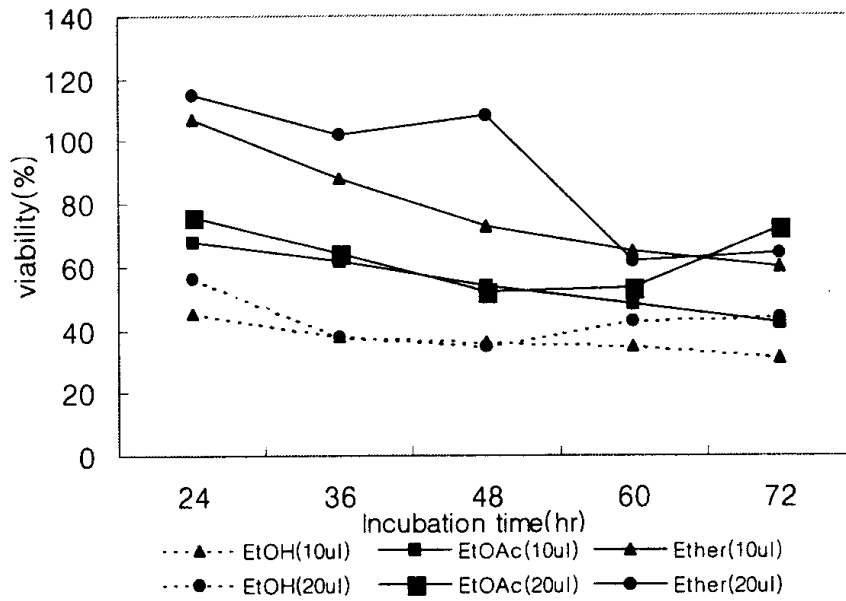


Fig.9. Growth curve of anticancer activity of *Phyllostachys edulis* leaves extract. Solvent used EtOAc. MDA, Hep3B and Hepa1c1c7 cells were good effect

(A)



(B)

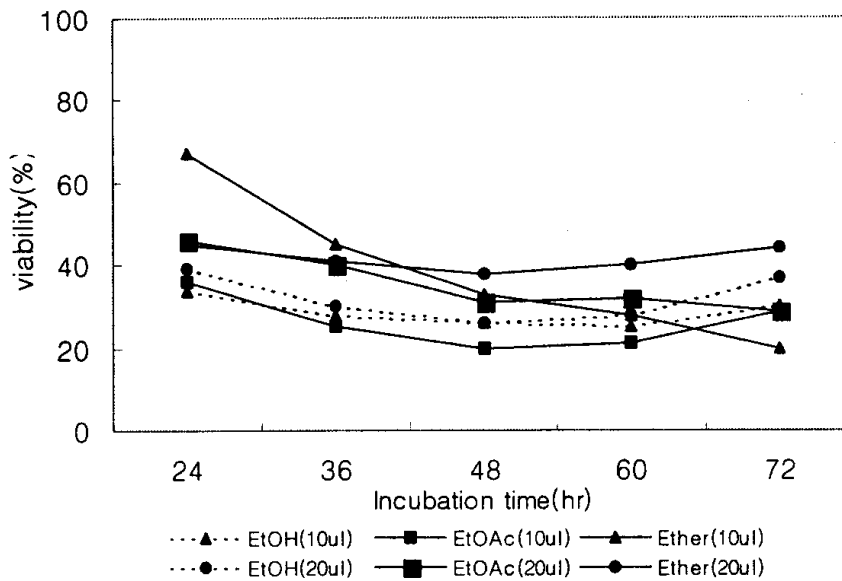
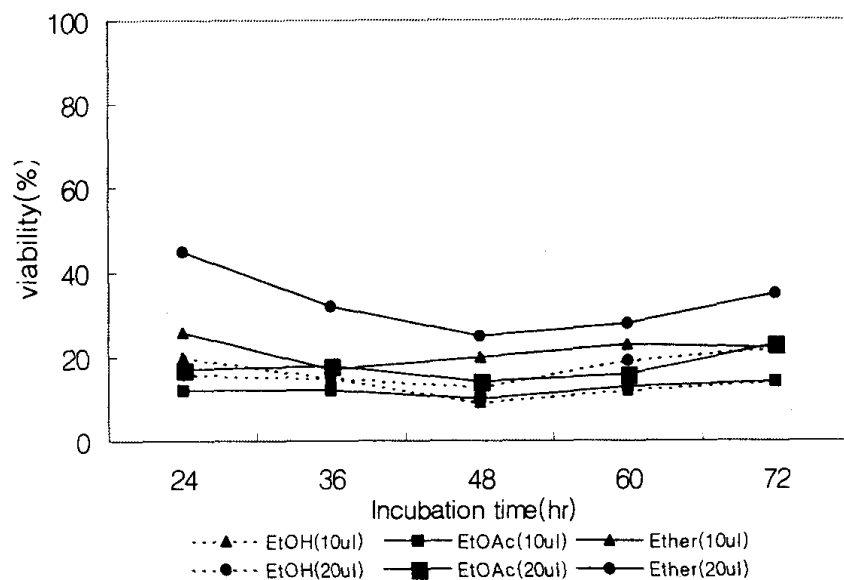


Fig. 10. Growth curve of human liver cancer cells tested by MTT assay. (A) PLC/PRF/5 cells, (B) Hep3B cells. Ethanol extracts were good effect against PLC/PRF/5 cells.

(A)



(B)

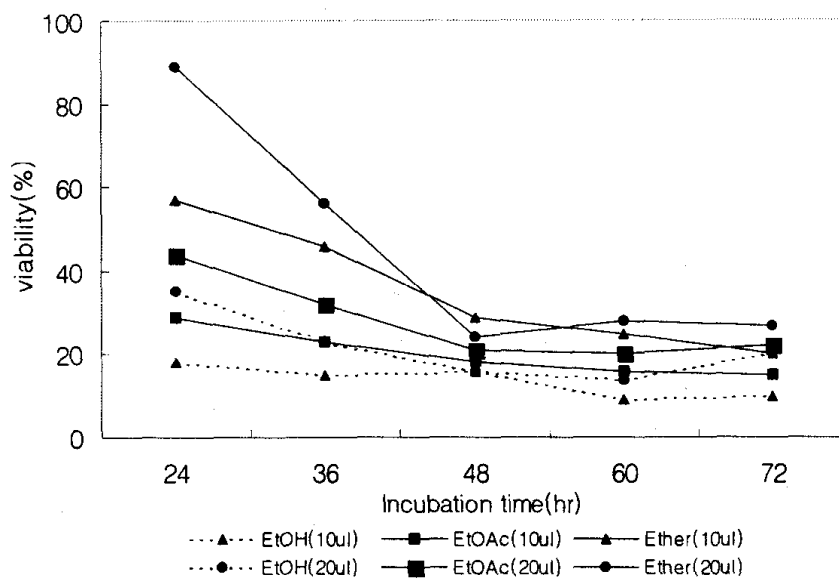


Fig. 11. Growth curve of human breast cancer cells (A) MDA-MB-231 and mouse liver cancer cells (B) Hepalclc7 cells tested by MTT assay. Ethanol and ethyl acetate extracts were good effect against both cells.

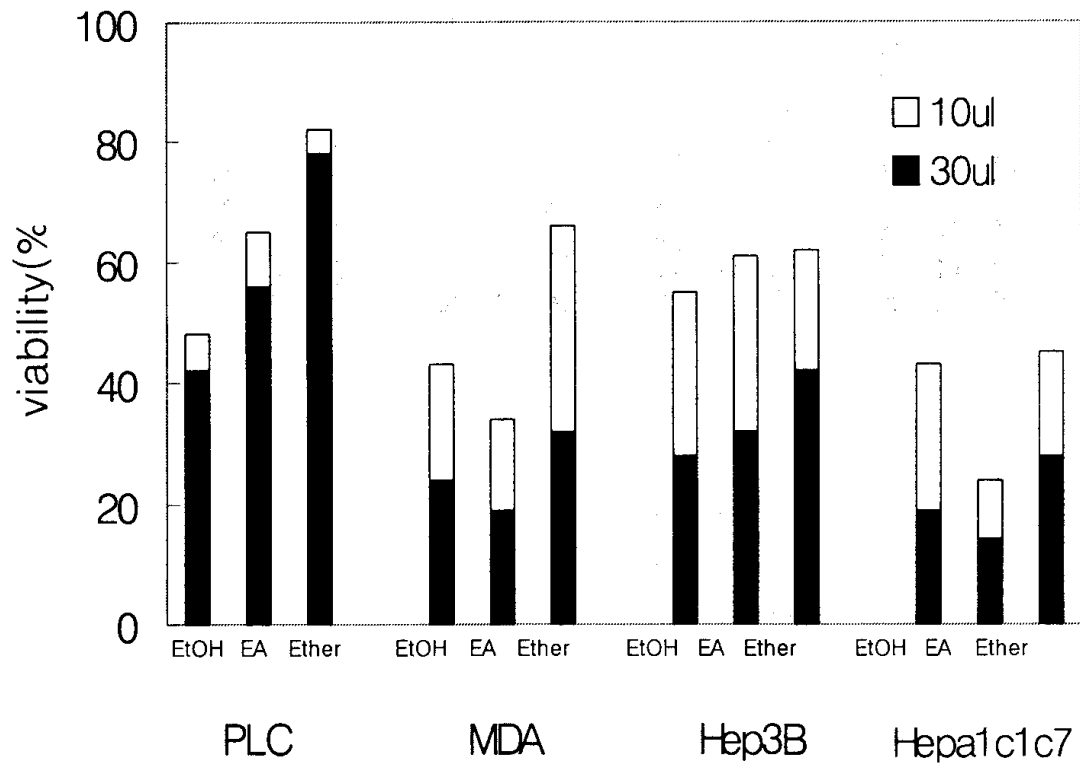


Fig. 12. Dose-response anticancer activity of *Phyllostachys edulis* leaves extract tested SRB assay. Significant inhibition was showed at 30 μ l of extract added, respectively.

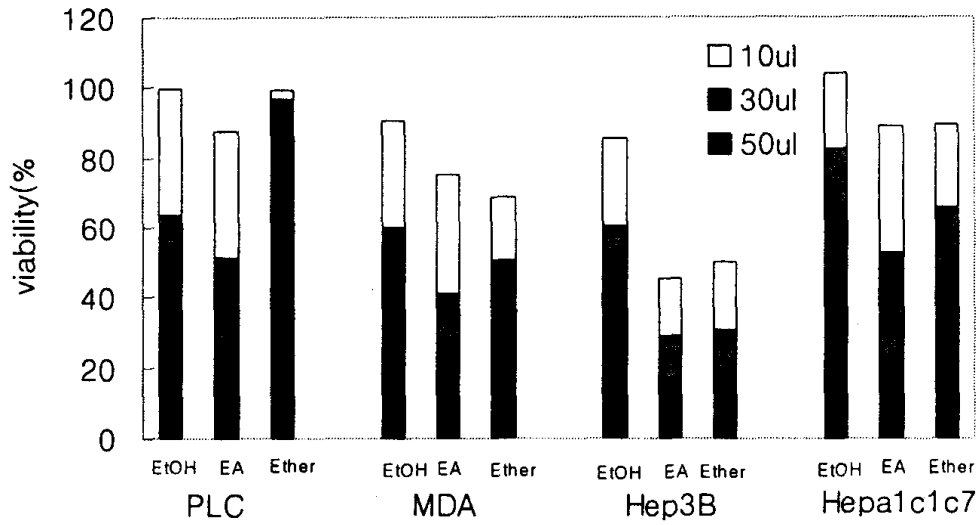


Fig. 13. Dose-response anticancer activity of *Phyllostachys edulis* shoots extract tested by MTT assay. These were increased as the adding concentrations added, respectively.

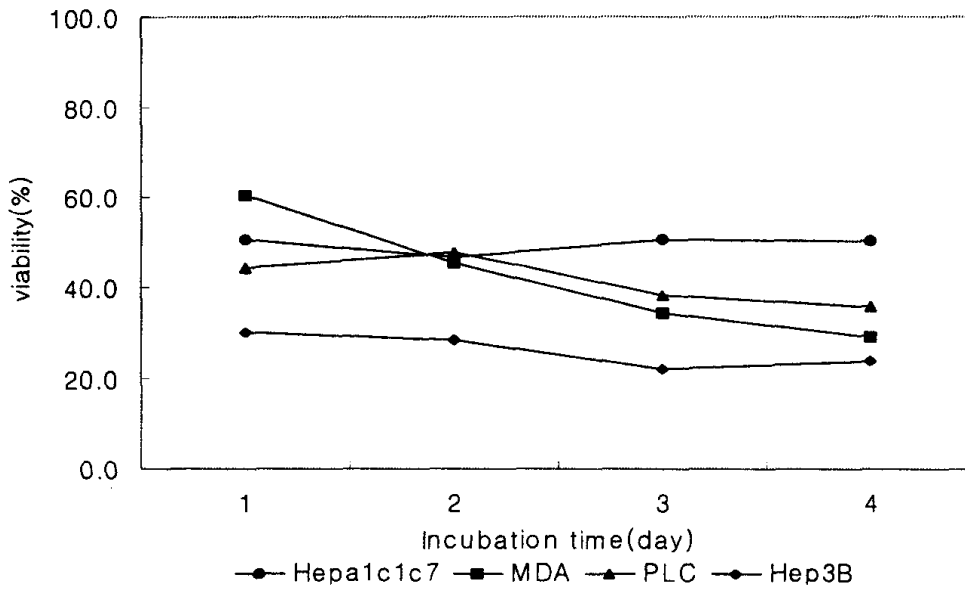
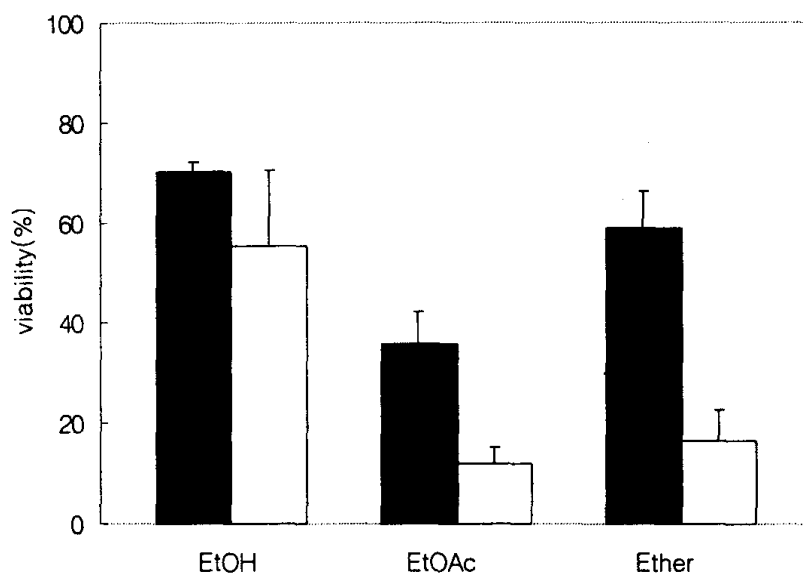


Fig. 14. Growth curve of anticancer activity of *Phyllostachys edulis* shoots extract. Hepa1c1c7 cells were good effect irrespective of its incubation time.

(A)



(B)

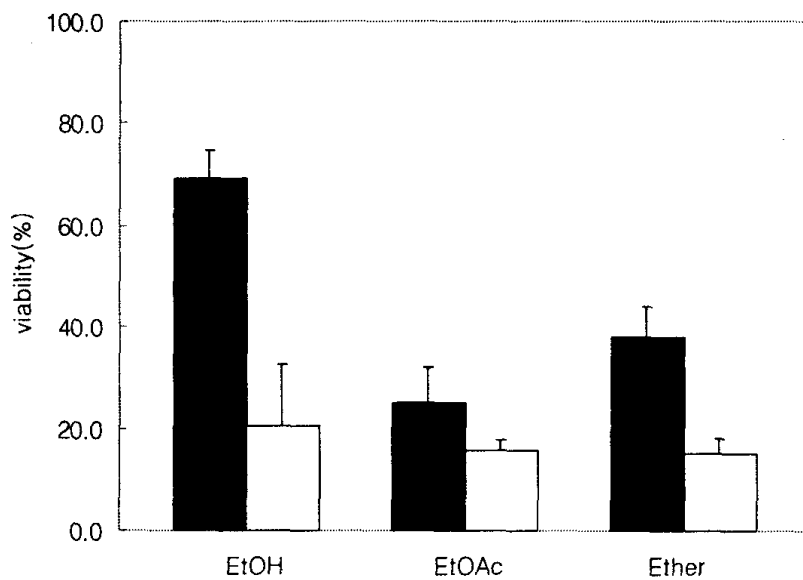
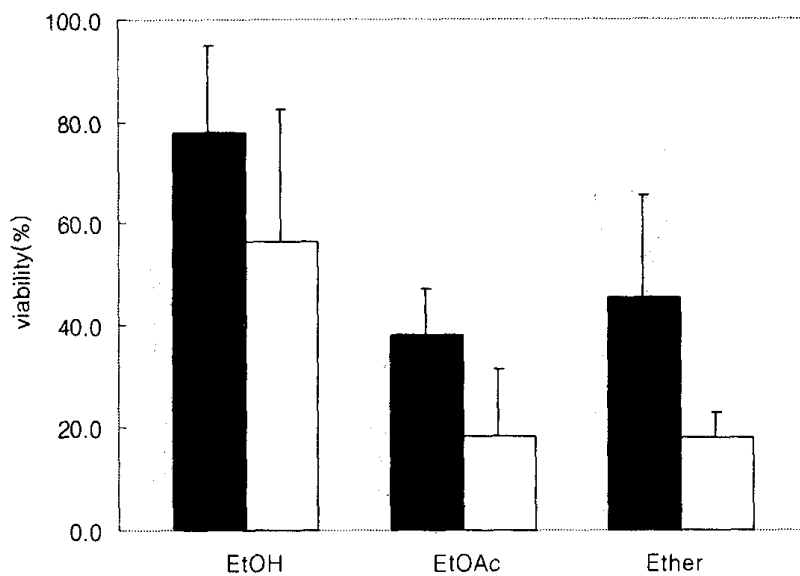


Fig.15. Anticancer activity of *Phyllostachys edulis* shoots extract tested by SRB assay. (A) PLC/PRF/5 cells, (B) Hep3B cells. Ethyl acetate and diethyl ether were showed good effect. 10 μ l 30 μ l

(A)



(B)

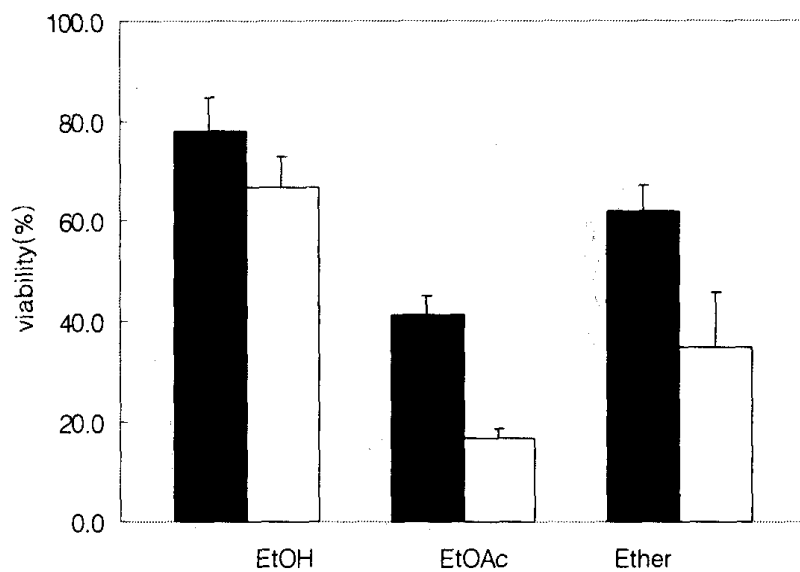
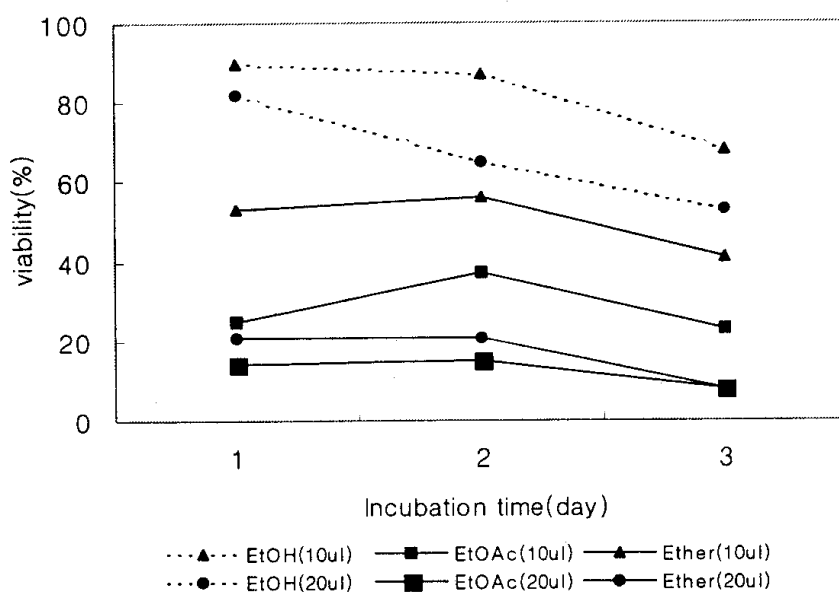


Fig.16. Anticancer activity of *Phyllostachys edulis* shoots extract tested by SRB assay. (A) MDA-MB-231 cells, (B) Hepalcl7 cells. Ethyl acetate and diethyl ether were showed good effect. 10µl 30µl

(A)



(B)

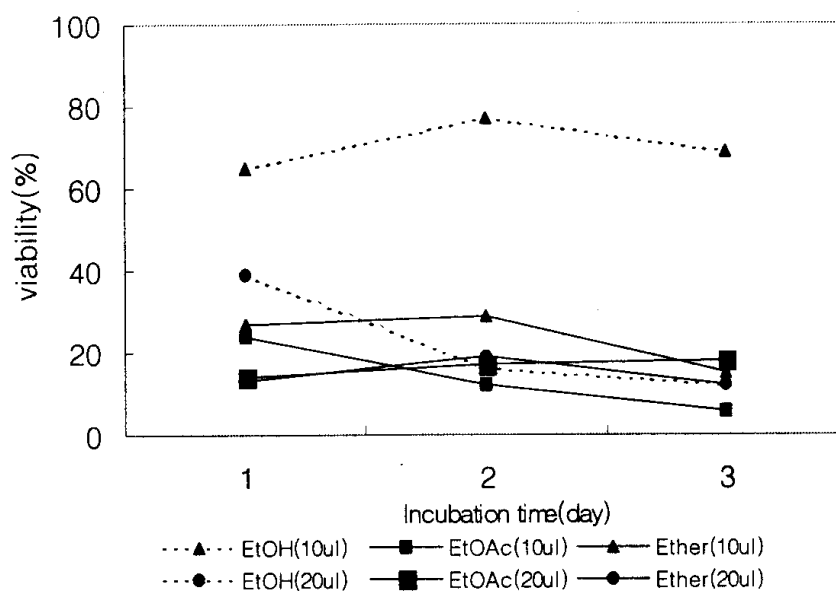
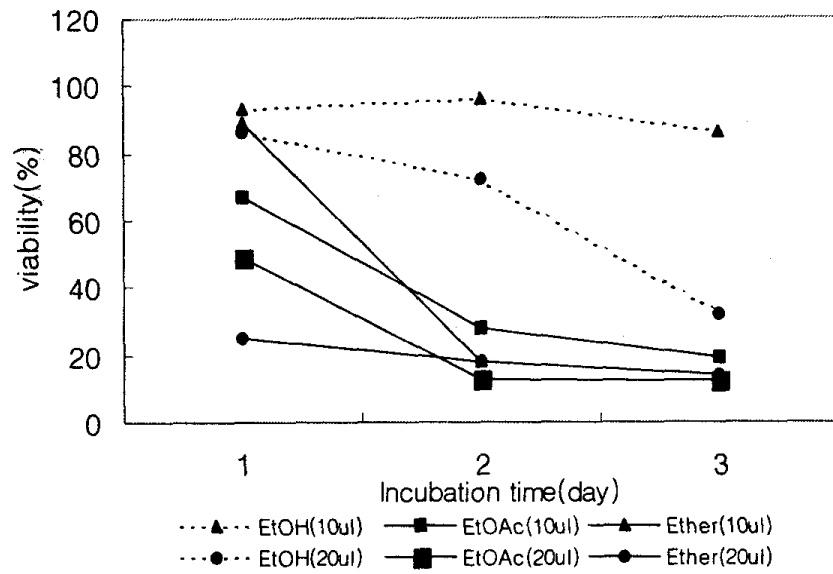


Fig. 17. Growth curve of human liver cancer cells tested by MTT assay. (A) PLC/PRF/5 cells, (B) Hep3B cells. Ethyl acetate and ether extracts were good effect against both cells.

(A)



(B)

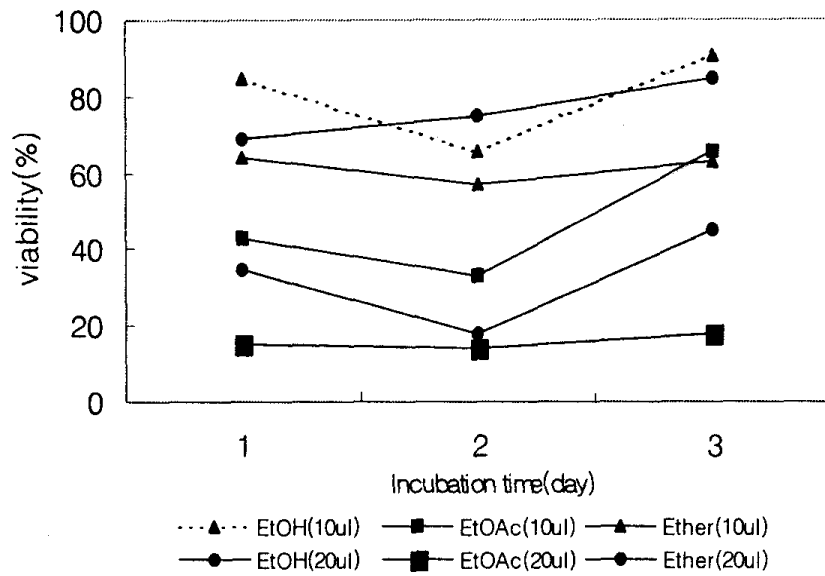


Fig. 18. Growth curve of cancer cells tested by MTT assay.
(A)MDA-MB-231 cells, (B) Hepalclc7 cells. Ethyl acetate and ether extracts were good effect against both cells.

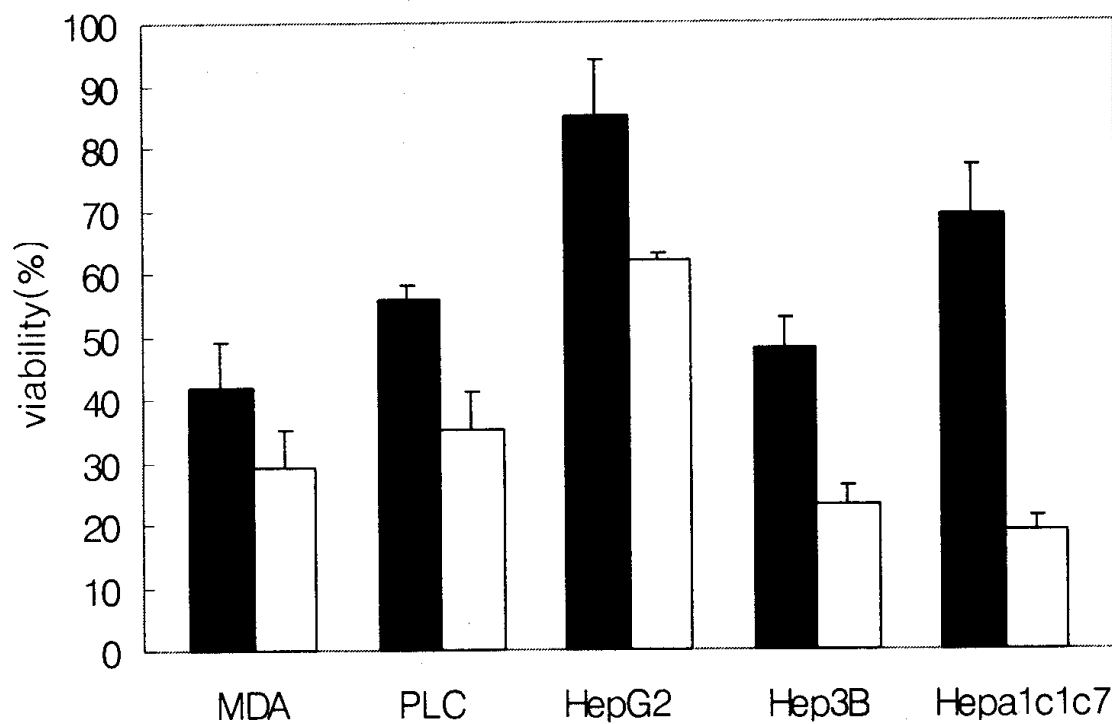


Fig. 19. Anticancer activity of *Phyllostachys edulis* shoots extracted with hot water against cancer cell. Hep3B and Hepa1c1c7 cells were showed good effect at 20 μ l of extract added, respectively.

10 μ l
 20 μ l

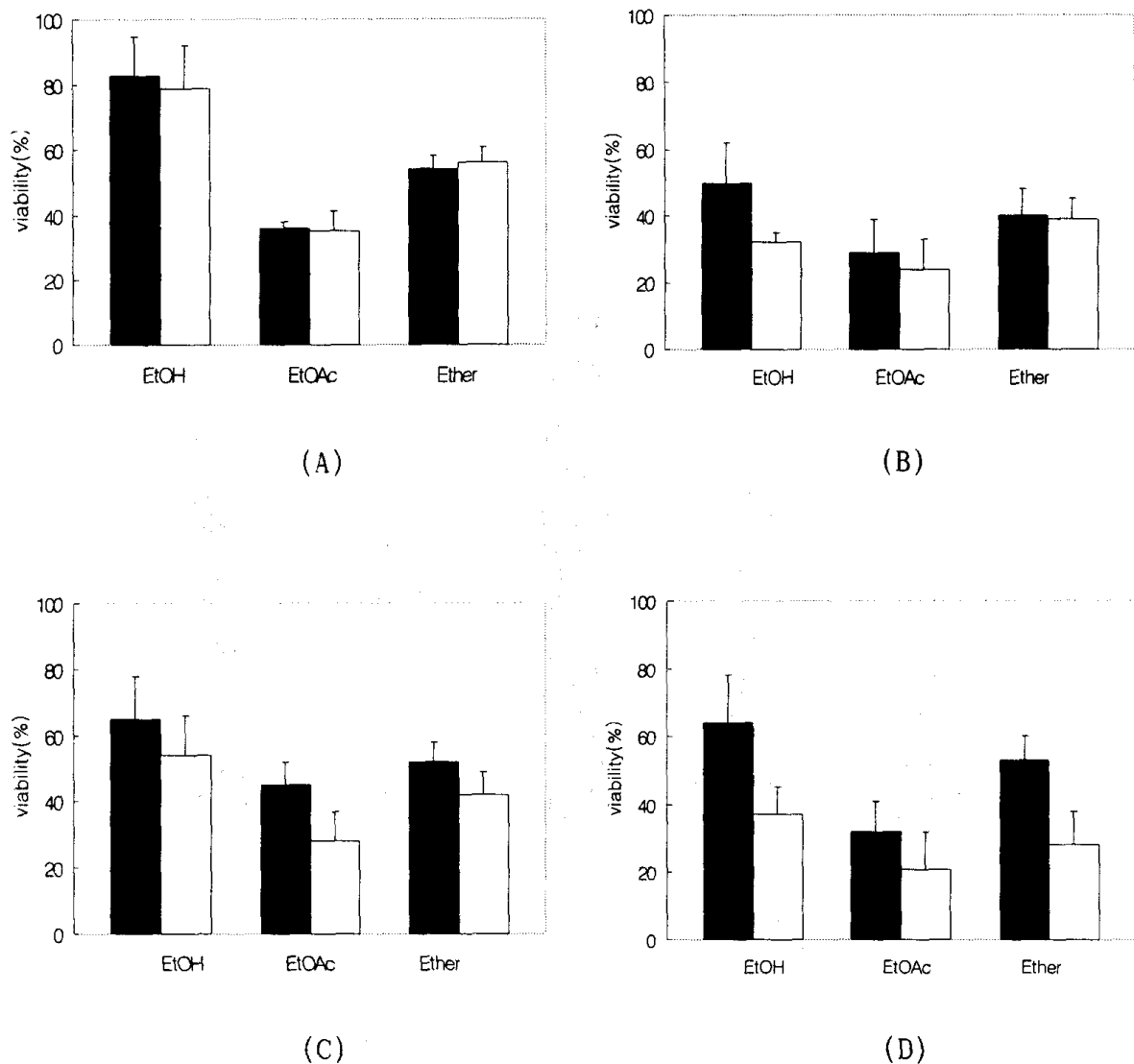


Fig. 20. Anticancer activity of *Phyllostachys edulis* canned shoots extracted with organic solvent against cancer cell. (A) PLC/PRF/5, (B) Hep3B, (C) MDA-MB-231 and (D) Hepalcl7 cells. Ethyl acetate extract were showed good effect, respectively. 10 μ l 20 μ l

라. 항돌연변이활성의 측정

항돌연변이 활성 실험에 가장 적합한 균주로 *Salmonella typhimurium* TA-100를 선발 하였으며 그 외에 TA-98 및 TA-1535 균주를 시험 균주로 선택하였다. Histidin 요구 성이 확인된 *S. typhimurium* 균주를 가지고 mutagen으로 알려진 sodium azide 및 dexton, MNNG등을 사용하여 항돌연변이 활성 여부에 관한 실험을 진행한 결과 아래

table. 5에서 볼 수 있듯이 죽엽의 경우 diethylether 추출물이 50~70% 정도로 활성이 좋았고 나머지의 경우에는 농도에 따라 20~70% 정도의 활성을 보였다. (table 7) 죽순의 경우 ethylacetate와 diethylether 추출물이 우수한 활성을 나타내었는데, 특히 ethylacetate추출물의 경우 농도에 따라 30~98%의 매우 우수한 항돌연변이 활성을 나타내었다. (table 8)

Table 6. Antimutagenic effect of *Phyllostachys edulis* leaves extract.

Strains	Number of His+ revertants induced by mutagens/plate				
	Control	EtOAc	EtOH	Ether	Green tea (po. control)
TA-1535	1324 ± 128	680 ± 49	624 ± 35	516 ± 32	560 ± 45
TA-98	762 ± 78	426 ± 23	618 ± 38	250 ± 18	366 ± 36
TA-100	1688 ± 144	1024 ± 116	1248 ± 129	880 ± 44	960 ± 72

mutagen used Na-azide and extracts added 0.1ml.

the values are duplicates

Table 7. Dose-response antimutagenic effect of *Phyllostachys edulis* leaves extract on the mutagenicity induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitroso guanidine

Strains	Dose (μl /plate)	Number of His+ revertants induced by mutagens/plate			
		Control	EtOAc	EtOH	Ether
TA-100	50	1238 ± 82	940 ± 39	1207 ± 112	693 ± 27
	100		804 ± 46	891 ± 76	718 ± 42
TA-1535	50	982 ± 56	520 ± 50	451 ± 38	373 ± 56
	100		482 ± 24	479 ± 63	256 ± 74

the values are duplicates

Table 8. Antimutagenic activity of *Phyllostachys edulis* shoots extract.

Strains	Doses (ug/plate)	Number of His+ revertants induced by mutagens/plate				
		EtOAc	(S9)	Ether	(S9)	control
TA-98	0.5	8	11	14	25	37
	1.0	3	15	15	22	67
	1.5	17	25	9	12	36
	2.0	54	13	13	20	85
TA-100	0.5	58	40	496	467	864
	1.0	116	100	680	536	1136
	1.5	232	- ^a	832	1020	1408
	2.0	32	-	760	632	1600
TA-1535	0.5	2	NT ^b	106	NT	238
	1.0	39	NT	60	NT	220
	1.5	3	NT	120	NT	170
	2.0	12	NT	140	NT	185

S9 : response of S9 mix

mutagen : Na-azide and dexton were used

a : not detected

b : not tested

마. 항균물질의 분리·정제 및 구조분석

(1) Silica gel 60 column chromatography에 의한 분리

맹종죽의 diethylether 추출물을 hexane으로 평형화 시킨 silicagel 60 column에 주입하여 흡착 시킨후 ethylacetate의 비율을 높여가며 (hexane : ethylacetate = 1:0, 50:1, 20:1, 10:1, 5:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 0:1) 용출하여 극성도에 따라 10개의 분획으로 나누었다. 이를 이차원으로 TLC를 전개하여 bioautography로 활성을 확인한 결과 hexane : ethylacetate = 2 : 1(Fr-7)에서 항균활성이 나타났다.

(2) Preparative thin layer chromatography에 의한 분리

Silica gel 60 column chromatography에 의해 분리된 활성분획을 전개용매 hexane : ethylacetate = 2 : 1의 조건에서 1차 silicagel 60 TLC를 실시하였다. 이를 3:2의 비율로 2차 TLC를 실시하여 항균 물질을 분리하였으며, 분리된 항균물질은 TLC로 단일 분획임을 확인 하였다. Hexane : ethylacetate = 3 : 2의 전개 조건에서 Rf 값은 0.52를 나타냈고 bioautography로 항균활성을 확인하였다.

(3) UV spectrum에 의한 흡수특성 조사

유기화합물의 분자내에 자외선 및 가시광선 영역의 전자기파를 흡수하는 관능기 즉, 이중결합을 가지는 C=C, C=O, N=O등을 발색단(chromophere)이라하며, 이들은 고유의 최대 흡수 파장을 가지고 있다. 분리한 항균물질의 흡수 특성은 254nm에서 최대 흡수를 나타냄으로써 이물질이 homoannular diene 구조를 가진 화합물로 추측되었다.(fig. 22)

(4) NMR spectrum에 의한 분석

$^1\text{H-NMR}$ spectrum은 분리 시료를 CDCl_3 에 녹여 분석한 결과 $\delta=1.42(\text{d}, J=5.4 \text{ Hz}, 3\text{H}), 5.45(\text{q}, J=5.4\text{Hz}, 1\text{H}), 1.71(\text{s}, \text{broad}), 8.51(\text{s}, 1\text{H})$ 의 signal을 관찰하였다. $\delta=1.42$ 와 5.45 의 signal은 alkyl group의 수소로 같은 coupling constant(J) 값을 나타내 서로 couple을 이루고 있음을 알수 있었다. 1.71 의 signal은 alkyl group 내의 -OH group의 수소로 추측되어 D_2O 를 첨가하여 다시 $^1\text{H-NMR}$ 을 측정하였을 때 $\delta=1.71$ 의 signal이 사라진 것으로 -OH group의 수소임을 확인할 수 있었다. 8.51 의 signal은 방향족의 수소로 추측된다. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum의 결과 $\delta=18.01, 102.99, 138.58, 178.35$ 의 signal을 관찰하였다. $\delta=18.00$ 은 alkyl group의 탄소로 추측되며, 102.99 는 -OH group이 결합된 alkyl group의 탄소로 추측된다. 138.58 은 quinone group이 결합한 탄소, 178.35 은 benzen ring 내의 탄소로 보여진다. HMQC의 결과로는 $^1\text{H-NMR}$ 의 $\delta=1.42(\text{doublet})$ 수소는 $^{13}\text{C-NMR}$ 의 $\delta=18.01$ 탄소에 결합되어 있고, $^1\text{H-NMR}$ 의 $5.45(\text{quartet})$ 수소는 $^{13}\text{C-NMR}$ 의 102.99 탄소와 결합되어 있는 것을 확인하였다. 상기의 결과들로 볼 때 항균 물질은 benzoquinone의 기본 골격과 -OH group을 포함한

alkyl group이 결합된 benzoquinone 유도체로, 정확한 구조의 결정을 위해선 분자량의 분석과 기능기의 분석이 뒤따라야 할 것이다. (fig. 23~24)

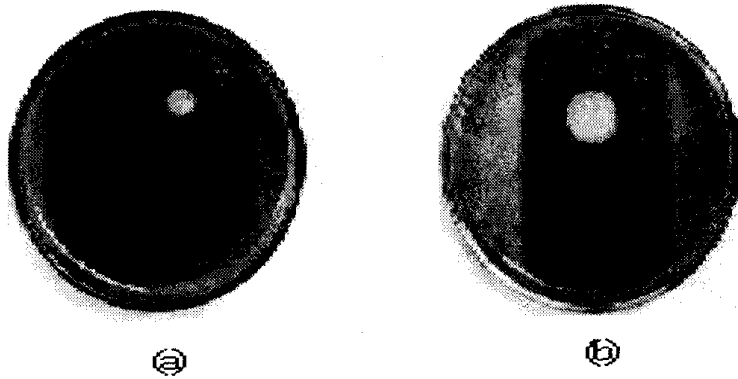


Fig. 21. Bioautography of antimicrobial substance
 (a) bioautography of Fr-6
 (b) bioautography of purified antimicrobial substance

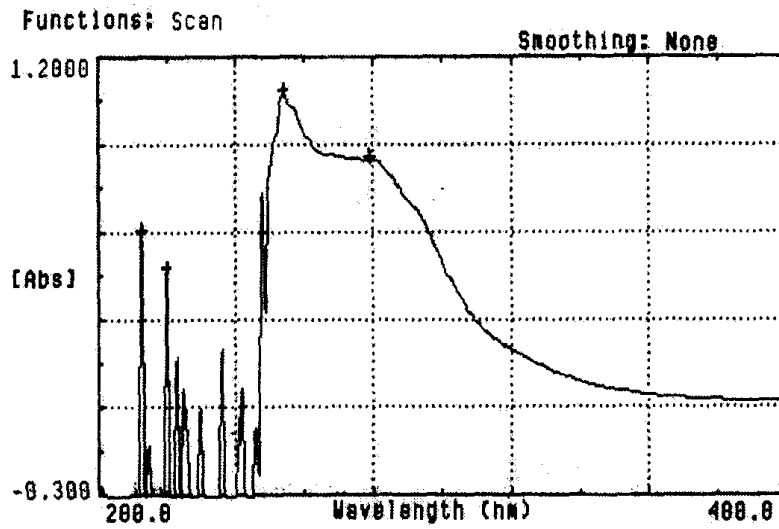


Fig. 22. UV spectrum of the antimicrobial substance from *Phyllostachys edulis*
 The antimicrobial substance dissolved in ethyl acetate recorded on Beckman DU 650 spectrophotometer at a scan speed of 1200 nm/min.

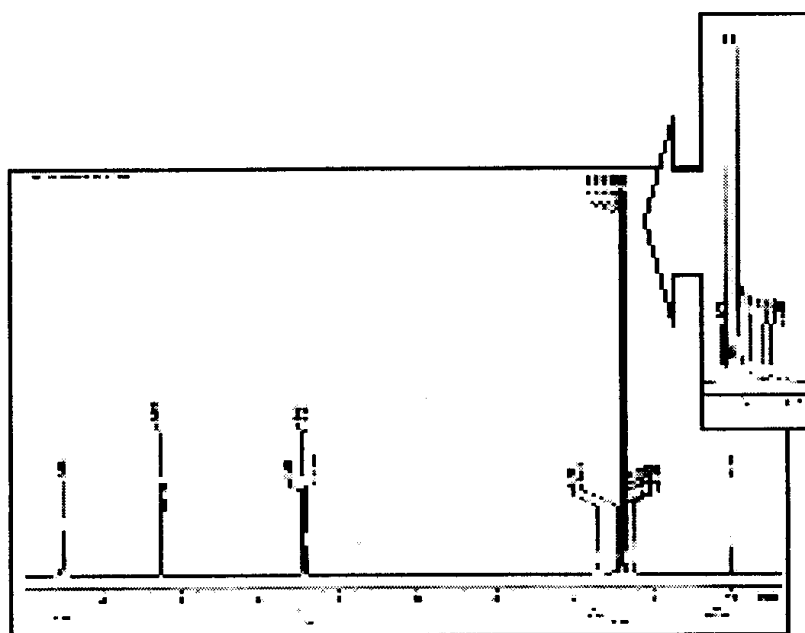


Fig. 23. ^1H -NMR spectrum of the antimicrobial substance
The antimicrobial substance dissolved in CDCl_3 and recorded on high resolution NMR spectrometer.

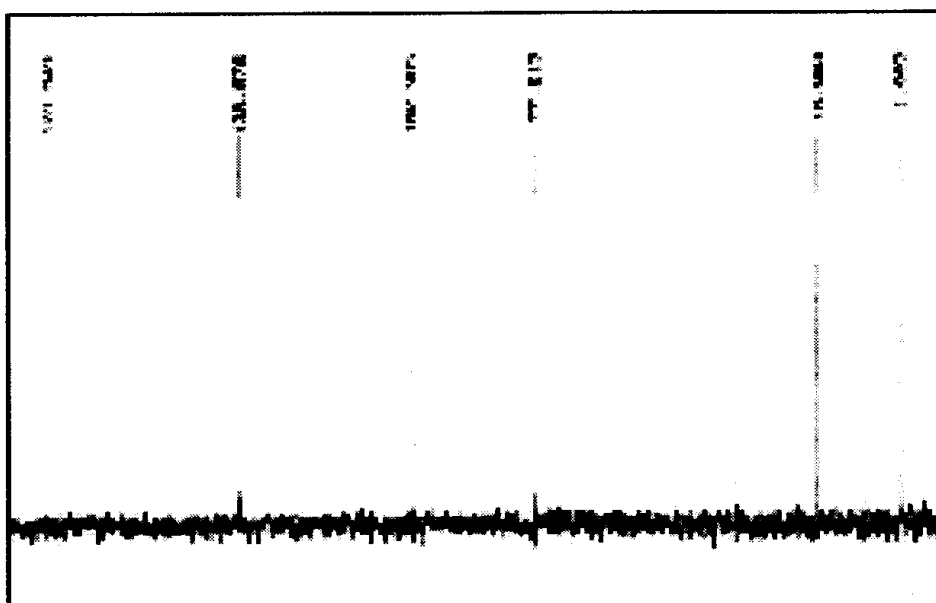


Fig. 24. ^{13}C -NMR spectrum of the antimicrobial substance
The antimicrobial substance dissolved in CDCl_3 and recorded on high resolution NMR spectrometer.

바. 죽순의 항암활성 물질에 대한 분리

맹종죽 죽순의 유기용매 추출물중 활성이 좋았던 ethyl acetate 추출물에 대해 항암활성물질의 분리·정제를 실시 하였다. Silicagel 60 column chromatography를 Chloroform으로 평형화 시킨후 1차로 hexane 및 chloroform으로 elution 시킨후 Chloroform과 methanol을 사용하여 1:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9, 0:1의 용매 조건으로 1L씩 용출 시킨후 농축하여 활성을 확인한후 다시 TLC를 실시하였다. TLC상에서 diethylether와 chloroform 1:2의 조건에서 Rf value 0.18, 0.25, 0.52, 0.68의 네가지 물질을 분리하였으며 이 물질들에 대해 Prep. TLC를 실시한후 용매에 녹여 농축하여 MTT assay로 각물질에 대한 항암활성을 검토 하였다. 결과 Rf value 0.25에서 나타나는 물질이 항암활성을 지닌 물질임을 확인할수 있었다.

Table 9. Anticancer activity of purified *Phyllostachys edulis* shoot

	A	B	C	D
Rf value	0.18	0.25	0.52	0.68
Inhibition of viability(%)	74.7	17.9	74.3	90.2

사. 제조된 차의 생리활성

제조방법과 채취시기가 다른 4종류의 차를 사용하였다. 제조된 차의 온수추출물의 항균효과는 Table 8에 나타냈다. A와 C는 하지 무렵에 채취한 새순이며, B와 D는 다자란 성숙한 잎이다. 각 시료가 항균활성의 정도에는 큰 차이를 보이지 않았으나 차로 제조하기 전과는 다소 차이를 나타내었다. 진균류에는 역시 활성을 나타내지는 않았다. GTase 저해효과는 제조된 차의 methanol 추출물로 측정된 결과 4가지 중 B와 D 시료의 500 ppm에서 저해효과를 나타냈다. (Fig. 25) B의 경우 13%의 D는 48% 정도의 저해 정도를 나타내 시료 D가 가장 효과가 좋은 것으로 판단된다. 구취감소효과는 A, B, C, D 모두 큰 차이는 없었으며 차로 제조하기 전보다 효과는 증가한 것으로 나타났다. (Fig. 26) 시판하는 구강청정제와 비교하여 보아도 구취감소효과는 뛰어난 것으로 판단된다.

맹종죽엽을 가공하여 만든 죽엽차를 대상으로 죽엽의 실험에서 활성이 좋았던 두 가지의 용매를 사용하여 항돌연변이 활성 시험을 진행하였다. A, B, C 그리고 D를 시험한 결과 죽엽 자체일 때보다 월등한 항돌연변이 활성을 보였으며 ethyl acetate 분획보다는 ethanol 분획이 네 가지 중에서는 D의 경우가 가장 활성이 좋은 것으로 나타났다. (Fig. 26)

항암활성에 있어서 죽엽차의 경우 MDA-MB-231 cell에서 40~60%정도의 억제활성을 보였으며(fig.27) 죽순음료 농축액의 경우 전반적으로 30 μ l 이상의 농도에서 Hep3B 및 Hepalclc7, MDA-MB-231 cell에서 40~25%까지 성장을 저해하는 항암활성 효과를 나타내었다. (fig.28)

Table 10. Antimicrobial activity of *Phyllostachys edulis* leaves tea extracted with hot water

Test microorganism	Activity			
	A	B	C	D
Bacteria				
<i>Bacillus anthracis</i>	13.5	12.0	13.0	12.0
<i>Bacillus subtilis</i>	8.0	9.0	8.0	9.0
<i>Bacillus cereus</i>	9.5	10.0	9.0	10.0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	(7.0)	(7.0)	(7.0)	(7.0)
<i>Enterococcus faecium</i>	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	6.5	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	-	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	8.5	8.5	8.0	8.0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(8.0)	(8.5)	(7.0)	(8.0)
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	-	-	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	-	-	-	-
<i>Shigella dysenteriae</i>	12.0	11.0	12.0	12.5
<i>Staphylococcus aureus</i>	8.0	7.0	8.0	7.0
<i>Yersinia enterocolitica</i>	7.5	8.0	7.0	7.0
<i>Eikenella corrodens</i>	7.0	7.5	7.0	7.5
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	7.5	7.0	7.0	7.0
<i>Neisseria denitrificans</i>	7.5	8.0	8.0	7.5
<i>Streptococcus mutans</i> ¹⁾	-	-	-	-
<i>Streptococcus mutans</i> ²⁾	-	-	-	-
Yeast				
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	-
<i>Debariomyces hansenii</i>	-	-	-	-
<i>Pichia anomala</i>	-	-	-	-
<i>Pichia capsulata</i>	-	-	-	-
Mould				
<i>Aspergillus nidulans</i>	-	-	-	-
<i>Aspergillus flavus</i>	-	-	-	-
<i>Penicillium expansum</i>	-	-	-	-
<i>Penicillium citrinum</i>	-	-	-	-

Paper disc diameter : 6 mm Clear zone diameter : mm () : unclear zone

- : no activity ¹⁾ : KCTC 3065 ²⁾ : KCTC 3283

A : steam 10 min, 150°C 20min B : steam 10 min, 150°C 20min

C : 180°C 10min D : 180°C 10min

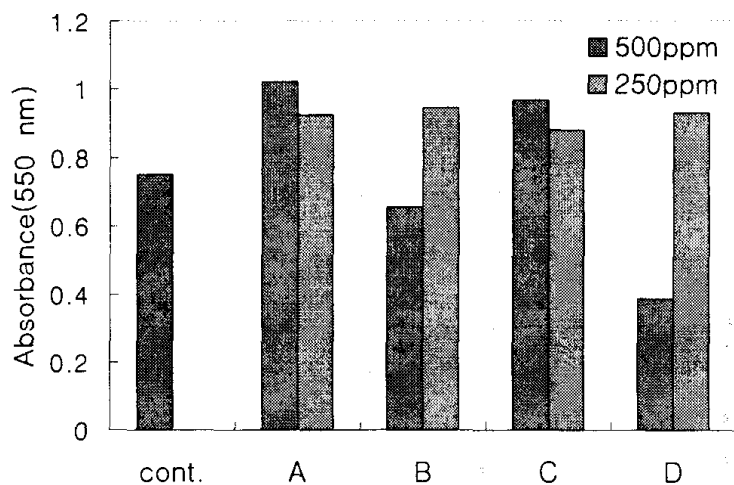


Fig. 25. GTase inhibitory effect of *Phyllostachys edulis* leaves extracted with methanol A : steam 10 min, 150°C 20min B : steam 10 min, 150°C 20min C : 180°C 10min D : 180°C 10min

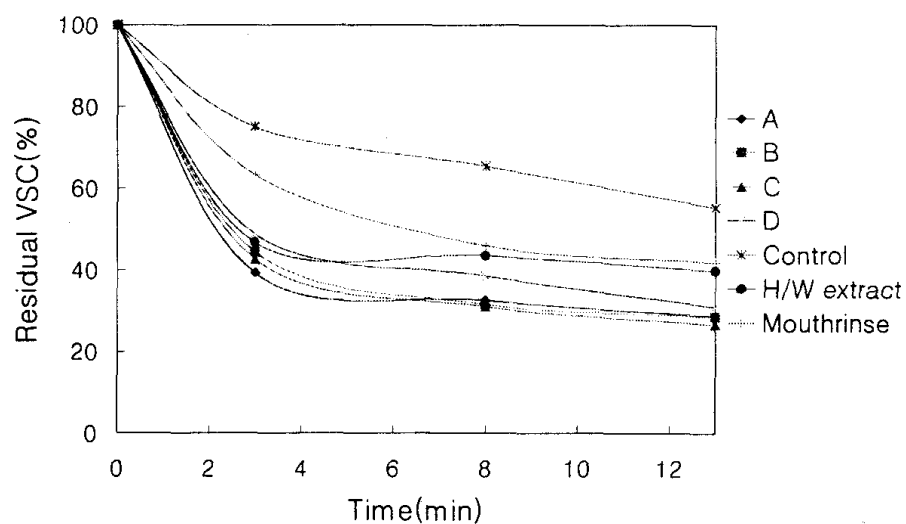


Fig. 26. Malodor reduction effect of *Phyllostachys edulis* leaves tea extracted with hot water

A : steam 10 min, 150°C 20min B : steam 10 min, 150°C 20min
 C : 180°C 10min D : 180°C 10min

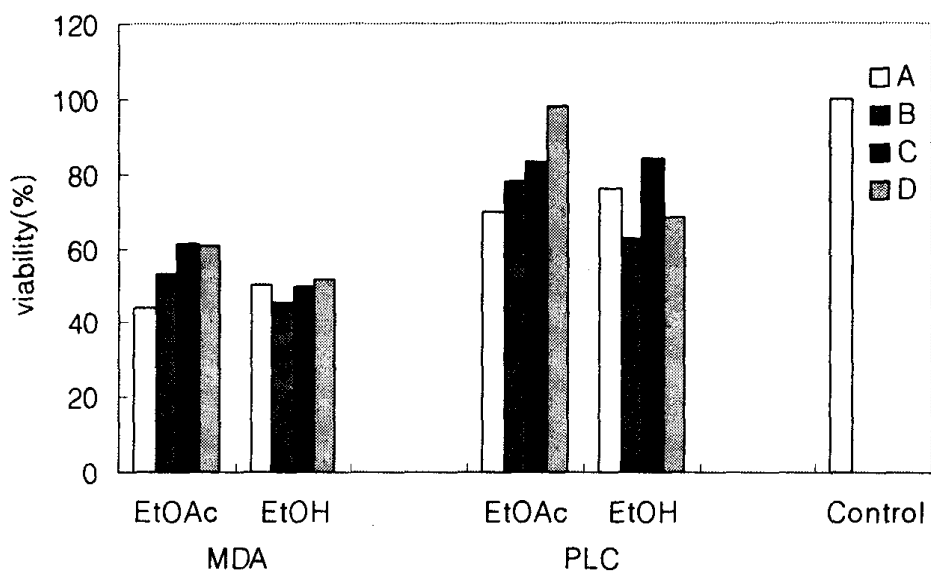


Fig. 27. Anticancer activity of *Phyllostachys edulis* leaves tea extract against cancer cell tested by MTT assay. (A-new bone leaves, steam 10min, 150°C 20min./ B-leaves, steam, 10min, 150°C 20min. /C- sprouted leaves, 180 °C 10min/ D-leaves, 180°C 10min). MDA cells were showed positive effect both organic solvent.

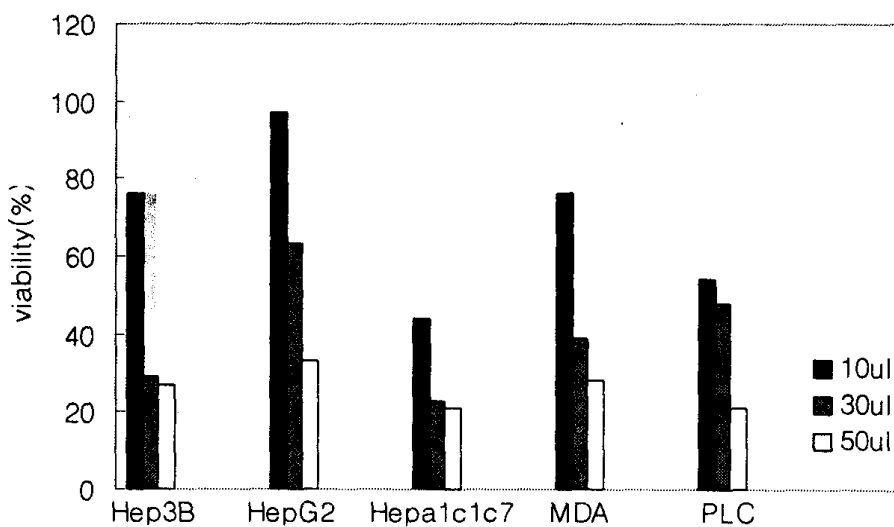


Fig. 28. Anticancer activity of concentrated drink of *Phyllostachys edulis* shoots extract against cancer cell tested by MTT assay.

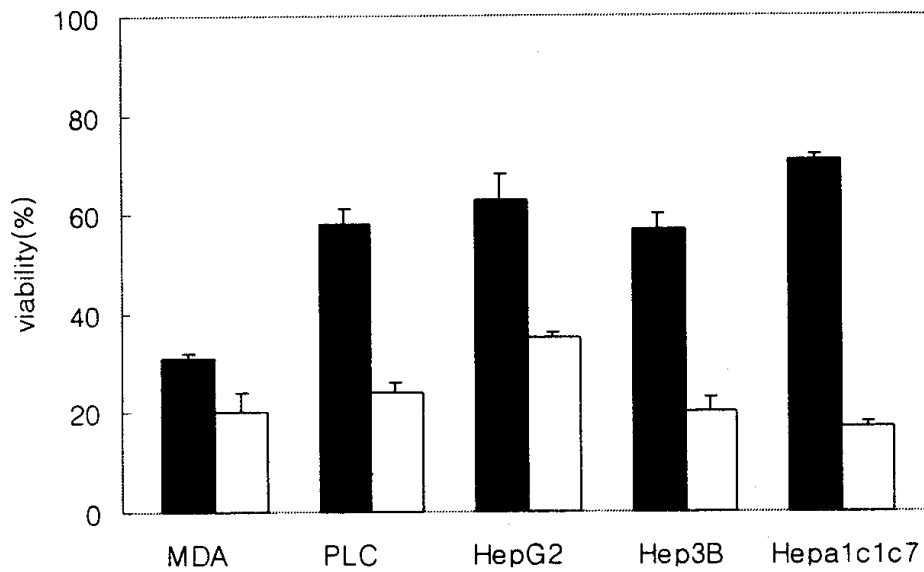


Fig. 29. Anticancer activity of *Phyllostachys edulis* leaves extract against cancer cell. Significant inhibition was showed at 30 μ l of extract added, respectively. 10 μ l 30 μ l

아. 외국산 죽순과 국내산 죽순의 비교

중국산 2개사 제품과 국내산 죽순과의 항암 및 항돌연변이 활성을 비교해본 결과 항암활성의 경우 국내산은 농도에 따라 60~80%정도의 우수한 효과를 보인 반면 중국산의 경우는 40% 정도에 미치는 효과만을 나타내었다. (fig. 30~32) 항돌연변이 활성에 있어서는 40%에도 못미치는 35%정도의 미약한 활성이 수입산에서 나타난 반면 국내산 죽순에서는 그 농도에 따라 90%까지 활성이 우수하게 나타났다. (fig. 33)

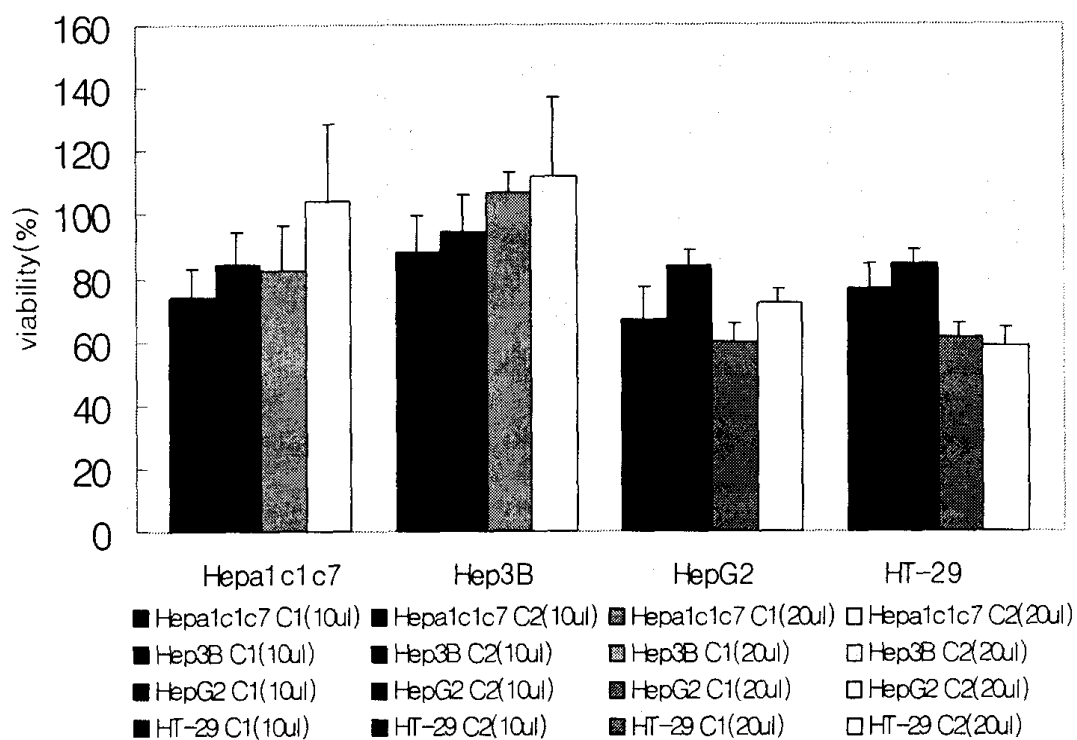
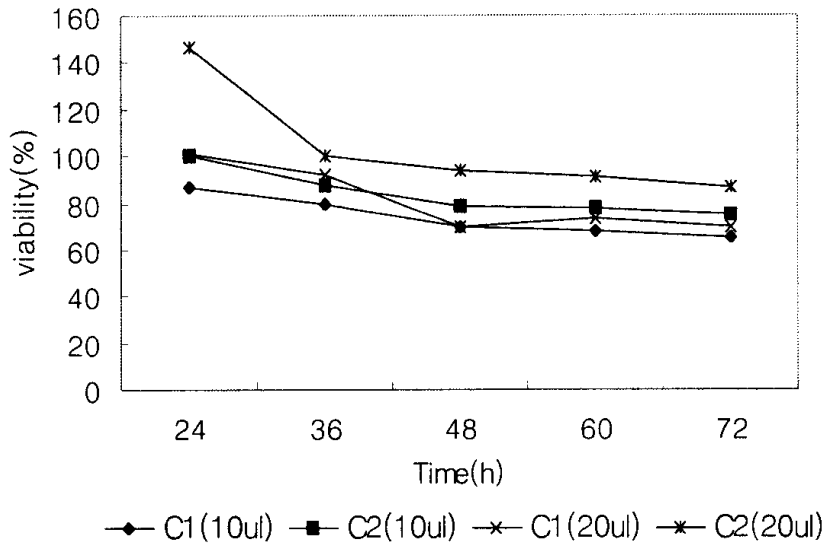


Fig. 30. Anticancer activity of bamboo shoot which is imported from China
C1 and C2 are different company product.

(A)



(B)

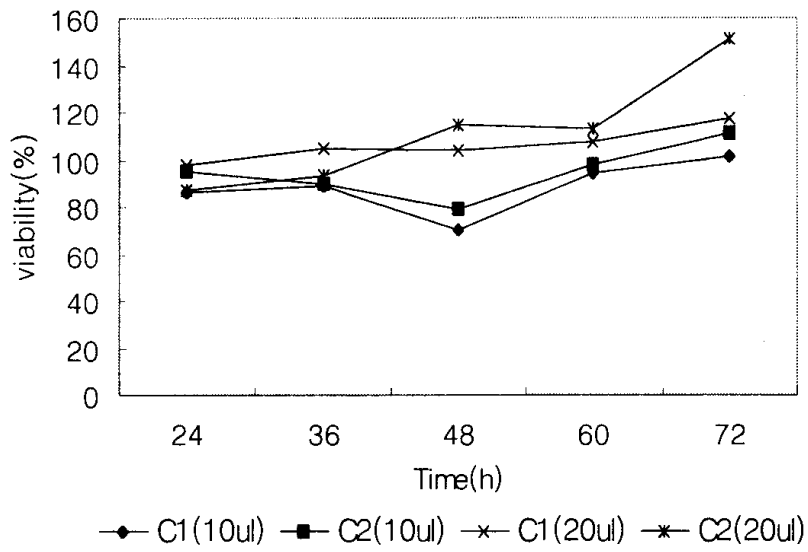
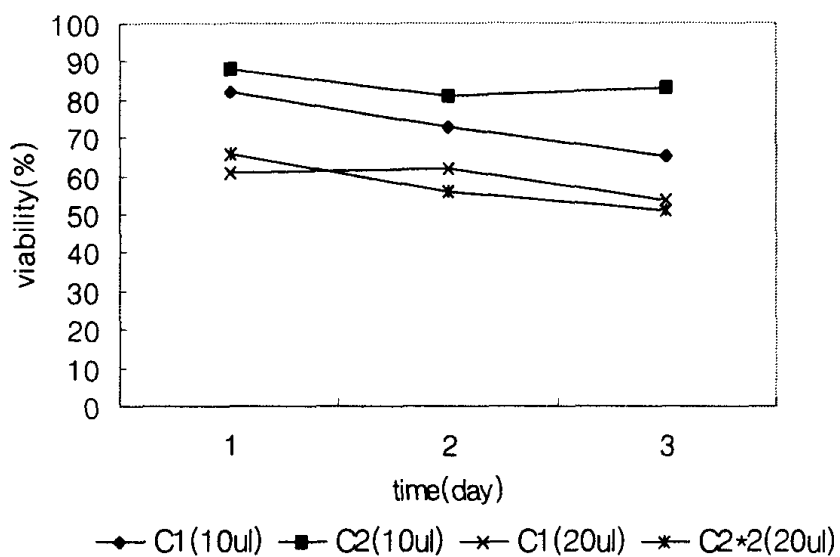


Fig. 31. Growth curve of mouse and human liver cancer cells tested by MTT assay. (A) Hepalcl7 cells, (B) Hep3B cells.

(A)



(B)

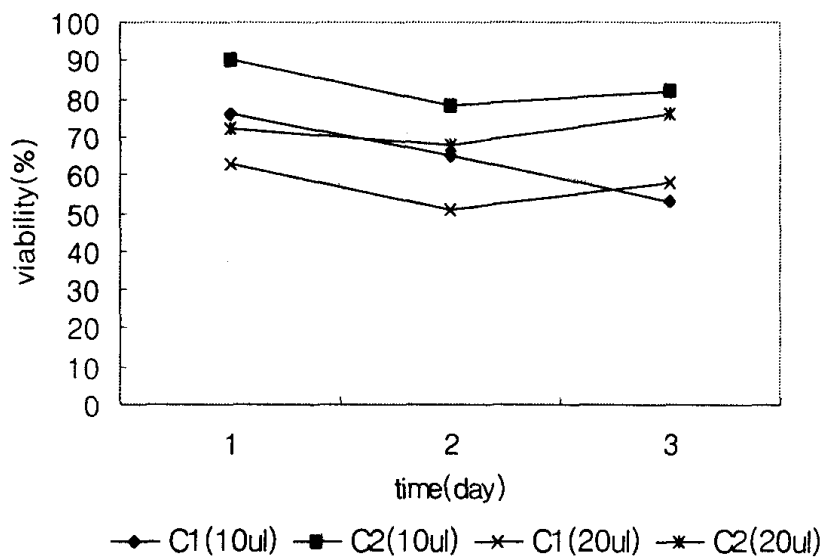


Fig. 32. Growth curve of human colon cancer cells and liver cancer cells tested by MTT assay. (A) HT-29 cells, (B) HepG2 cells.

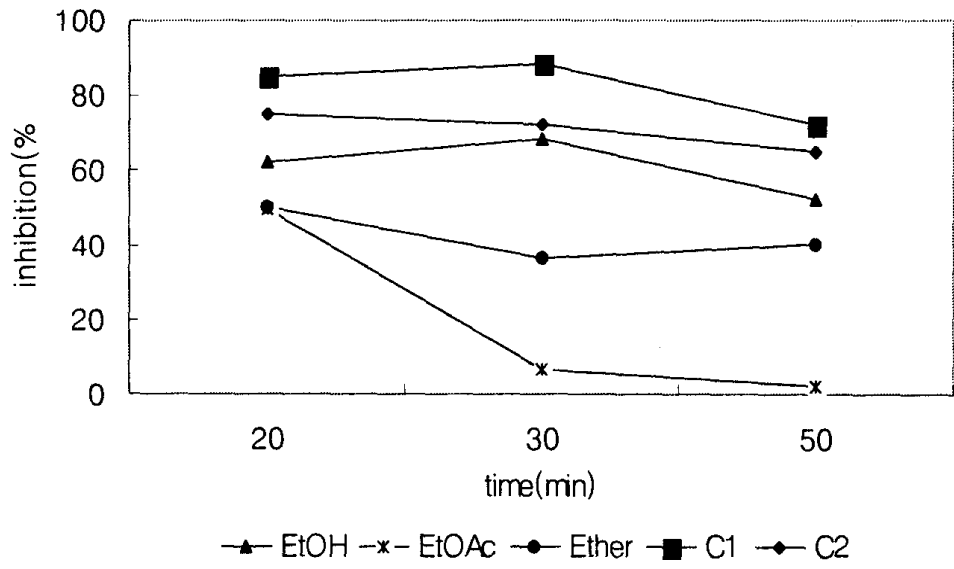


Fig. 33. Comparison of antimutagenic activity of China between Korean product which follows in reaction time. Test strain used *Salmonella typhimurium* TA-100 and mutagen used sodium azide

제 3 장 : 맹종죽의 항산화 및 활성산소 제거활성에 관한 연구

제 1절 서 설

대나무는 아열대 및 온대지방까지 널리 분포하며, 특히 아시아의 계절풍지대에 흔히 자생하는 벼과에 속하는 상록교목으로, 우리나라에는 왕대, 솜대, 맹종죽의 3대 죽종이 주류를 이루고 있으며 주로 남부지방에서 재배되고 있다. 왕대와 솜대는 식용보다는 가구제조등에 주로 이용된다. 맹종죽(孟宗竹)은 일본에서는 직경이 약 20cm 정도가 되는 것이 있을 정도로 대나무 중에서 가장 굵어질 수 있는 것으로, 가구제조에도 이용되나 죽순이 굵고, 먹을 수 있기 때문에 식용죽(食用竹)이라고 흔히 부르고, 죽순과 목재에 이용되는 부분 이외인 맹종죽엽은 모두 폐기되고 있는 실정이다. 또한 맹종죽은 예로부터 구토, 소염, 유산, 발한, 증품 등에 대한 치료제로 이용되어 왔고(동의보감, 중약대사전) 그외에 항균성을 나타내는 물질이 함유되어 있어 일본에서는 옛부터 죽물통으로 이용하였고, 우리나라에서도 고기, 경단등을 포장하는 식품의 보관에 이용되어 왔다.

종래 맹종죽을 비롯한 대나무의 생리활성 물질 연구는 대부분 항균활성 중심으로 국내 및 일본에서 보고 되어왔다. 이미 대나무 잎에서 항균성 물질인 2,6-디메틸벤조퀴논과 벤조산이 일본 연구자에 의하여 밝혀져 있다. 국내의 경우 아직, 물질의 규명단계에 접근한 연구 보다 죽엽의 용매 추출물에 대하여 항균활성의 조사와 죽순의 일반 성분 분석에 관한 보고 등 매우 제한된 연구가 보고되었다. 또한, 대나무의 죽간(竹桿), 죽엽(竹葉) 또는 이들의 혼합물로부터 추출한 대나무추출액을 이용하여 육류재료의 이취를 제거하고 육류의 맛을 증진시킬 수 있는 육류제품 가공방법(대한민국 공개번호 제 98-082956호), 단순히 죽엽가루나 죽엽추출물(대나무의 종이

나 서식지 불분명)을 식품에 첨가하여 식품의 품질향상을 기하는 국내특허 (대한민국 공개번호 제2000-074538)들이 존재하나, 주로 폐기되고 있는 맹종족의 엽부위 및 죽순 부위에서 활성산소 소거활성 성분의 항보체 활성성분의 분리에 관한 연구는 시도된 바 없다.

인간을 포함한 모든 호기성 생물체는 산소(O_2)를 이용하여 에너지 대사를 진행하며 생존하고 있다. 그러나, 생체내 산소가 각종 물리적, 화학적, 생물학적인 스트레스를 받으면 수퍼옥사이드 음이온 라디칼(superoxide anion radical, $\cdot O_2^-$), 과산화수소(H_2O_2), 히드록시 라디칼(hydroxyl radical, $\cdot OH$) 등의 유해한 활성산소종(active oxygen species)으로 변하여 인체에 치명적인 생리적 장애를 일으키고 심할 경우는 질병을 유발하고 생명을 잃게 한다. 특히 세포가 나이가 들어감에 따라 자유라디칼 및 활성산소종에 의한 유해작용이 계속적으로 누적될 경우 발암, 동맥경화, 심장질환 및 피부노화 등 연령증가에 따른 여러 성인병과 관련된 질환은 물론 전반적인 세포의 노화를 야기하여 인간의 질병발생과 노화의 원인으로 제시되고 있다. 따라서 최근 노화와 성인병 질환의 원인으로 밝혀진 프리라디칼 및 활성산소종을 조절할 수 있는 물질로 알려진 항산화제의 개발연구가 활발히 진행되어 수퍼옥사이드 디스뮤타아제(superoxide dismutase), 퍼옥시다아제(oxidase), 카탈라아제(catalase), 글루타티온 퍼옥시다아제(glutathione peroxidase) 등의 항산화효소와 토코페롤(tocopherol), 아스코베이트(ascorbate), 카로테노이드(carotenoid), 글루타티온(glutathione) 등의 천연물 유래의 저분자 항산화 물질에 대한 많은 연구가 이루어지고 있으며, 2,6'-디-테르트-부틸-4-히드록시톨루엔(2,6'-di-tert-butyl-4-hydroxytoluene, BHT), 2,6'-디-테르트-부틸-4-히드록시안isol(2,6-di-tert-butyl-4-hydroxyanisole, BHA) 등의 합성 항산화제가 많이 개발되어 의약품과 식품분야에서 이용되고 있다. 상기 합성항산화제인 부틸히드록시아니솔(BHA)과 부틸히드록시톨루엔(BHT)은 항산화력은 비교적 우수하나 인체독성문제로 사용량과 용도가 엄격하게 제한되어 있다. 따라서 천연물로부터 항산화활성이 높으며,

인체의 해가 없는 항산화제를 찾고자 하는 시도가 활발히 진행중이다. 그 예로 녹차 잎의 카테킨 계열 화합물, 당근의 베타 카로틴 계열 화합물이 잘 알려져 있으며, 국내의 경우 본 연구자들에 의하여 냉이로부터 분리한 플라본계열의 항산화성 물질등이 연구되었으나 상업화 되지는 못하였다.

면역계(immune system)는 크게 innate immunity와 adaptive immunity로 분류되는데 innate immunity는 macrophage에 의한 탐식작용(phagocytosis), 보체계(complement system) 활성화의 부경로(alternative pathway)에 의해 주도되는 선천적 면역 반응이다. Adaptive immunity는 innate immune system을 통과한 pathogen에 대한 면역 반응으로 다시 체액성 면역(humoral immunity)과 세포성 면역(cellular immunity)으로 분류되는데 체액성 면역은 B cell에서 생성되는 항체에 의한 혈액 내 반응으로 여기에 보체계 활성화의 고전적 경로(classical pathway)가 관여하며, 세포성 면역은 Tc(cytotoxic T cell)와 T_H1(helper T cell)에 macrophage가 항원을 presentation하면서 일어나는 생체 내 tissue에서의 면역 반응이다. 이처럼 보체계와 macrophage는 체액성 면역, 세포성 면역에 모두 관여하는 면역계의 주요 인자로 macrophage 등의 탐식세포(phagocytic cell)에는 보체계 활성화 과정에서 생긴 분해 산물이 결합하는 complement receptor(CR)가 존재하는데 이는 보체계가 macrophage와 같은 주요 면역계 세포들의 면역 반응에 직접적으로 관여하고 있음을 의미한다. 실제로 pathogen의 opsonization과 염증세포의 염증부위로의 집적 등은 보체와 macrophage가 함께 관여하는 면역작용으로 알려져 있다. 보체(complement)는 1900년대 초기에 또기 Ehrlich에 의하여 명명되었는데 외부로부터 유입된 병원체에 항체의 결합 후 즉각적으로 흡착하여 병원체 등의 세포막을 파괴시킴으로써 살균효과를 나타내는 현상에서 항체보조인자의 의미로 붙여진 용어라 하겠다. 보체계는 1980년대 중반에 마지막으로 발견된 보체의 조절단백질들을 포함하면 약 20여종의 혈중 순환 단백질들로 구성되어 있으며 체액성 면역의 효과적 연결을 수행하여 외부감염 병원체 등을 항체의 존재 또는 비존재하에 비특이적으로 제거하는 생체의 주요방어기구이

다. 보체계의 다음의 몇가지 생물학적인 기능을 이해하면 보체가 단순히 항체보조인 자로서가 아닌 인체의 주요 면역응답에 직접적으로 관여하고 있음을 시사한다. 첫째로 보체는 이미 언급한 바와 같이 세균과 바이러스등 미생물의 감염시 이를 용균시킴으로써 숙주를 방어하는 기능을 수행하게 된다. 이 기능은 외부물질(항원)과 항체와의 상호결합 후에 일어나며, 감염에 대한 방어기작의 효율화를 기한다고 할 수 있다. 또한 보체는 항체의 관여없이 일부 미생물 세포표면 다당류에 의하여 활성화되기도 하는데, 이과정은 면역화이전의 숙주에 대한 중요한 생체방어기구로서 평가될 수 있다. 둘째로 인체의 중요 면역세포들인 lymphocyte, macrophage 등에 보체계 활성화 분해산물들의 receptor들이 존재하는 것은 보체계(complement system)가 주요면역담당 세포들의 면역반응에 직접적으로 관여하고 있음을 의미한다. 셋째, 보체 활성화에 의해 생성되는 주요 보체 분해산물들(C3a, C4a, C5a)이 백혈구의 화학주화능(chemotaxis)과 basophil, mast cell의 분화 및 호르몬과 유사한 생물활성을 나타내며, 면역응답의 장소에서 보체 분해산물인 C4b와 C3b는 항원을 점착시킨 후 호중구, NK세포, macrophage 등에 존재하는 receptor를 매개로하여 신속·정확하게 제거시키는 opsonin으로 작용하기도 한다. 넷째, 보체 성분중 일부가 결손된 유전적 질환자나 저영양상태로 보체가 낮은 환자의 경우 자기면역질환과 기타 면역질환의 발병율이 높은 사실에서 보체계가 인체의 건강유지에 필수적임을 시사한다. 항보체활성(anti-complementary)은 보체를 활성화하는 능력을 언급하는 용어으로써 Mayer등의 보체용혈법을 기초로하여 일본의 동양의학종합대학 부속 북리연구소 산전(山田)연구실의 공동연구에 의하여 개발되었다. 즉 항보체활성이란 Mayer의 방법에 준한 정상인의 혈청중의 보체를 IgM으로 감작화시킨 면양의 적혈구를 이용하여 시료에 의한 보체 활성화를 보체소비량으로 환산하여 *in vitro*에서 비교적 간단히 측정할 수 있는 방법이다. 항종양성 다당류들의 보체계활성화와의 높은 상관성에 착안하여 천연에 존재하는 다양한 고등식물 특히 전통약재와 식물체(食物體)를 대상으로 비교적 bioassay가 용이한 항보체활성의 검색을 통하여 식품기원의 새로운 면역조절제의 개발을 위한 집

중적인 연구가 1980년대 부터 일본 Kitasato(北里) 연구소의 Yamada그룹과 Koryitsu 약학대학의 Tomoda그룹에 의해 활발히 연구되어 왔다. 이 들의 연구에서 항보체활성 물질의 본체를 확인한 결과 역시 다당류나 단백질이 결합된 단백질들이 대부분을 차지하였다. 이 중에서 특히 당귀, 쑥, 차전자, 자근, 인삼엽, 울금 등에서 분리된 보체계 활성화 다당들은 비교적 자세히 연구되어 많은 논문들이 발표되었다. 국내의 경우 1980년 후반부터 본 연구진들이 속해 있는 고려대학교 생물공학연구소에서 다년간 국내산 한약재, 산채류 및 기타 식품재료들을 대상으로 항보체 활성을 광범위하게 검색하였으며 시호, 대복피, 고추, 고사리, 계피 등에서 항보체활성 다당류들을 분리한 바 있다.

본 연구에서는 맹종죽의 죽엽 추출물로부터 활성산소 소거능이 우수한 항산화 성분과 죽순 추출물로부터 항보체 활성이 우수한 다당류를 정제하고 구조를 결정하였으며, 기능성 차와 음료로 제조시의 제품내 생리활성을 검토하였다.

제 2절 맹종죽 엽으로부터 항산화성 활성산소 소거활성 물질에 관한 연구

제 1 항 재료 및 실험방법

가. 재료

본 연구에 사용된 맹종죽의 죽엽은 대한민국 남해안 거제도 하청면 일대에 서식하는 맹종죽으로부터 채취하여, 음건, 파쇄 및 동결건조를 거쳐 냉동고에 보관하면서 실험에 이용하였다.

나. 추출

상기 맹종죽엽 건조분말 500 g을 5 L 부피의 원형 바닥 플라스크에 넣고 3 L의 70% 에탄올을 가하여 $80 \pm 2^\circ\text{C}$ 에서 6 시간 환류추출의 과정을 3회 내지 4회 반복 실시하여 약 10 L의 추출액을 수득하였다. Fig. 1의 방법대로 분배 용매 분획을 실시한 결과 핵산획분, 클로로포름획분, 에틸아세테이트획분, 부탄올획분, 최종수층획분을 각각 15.2 g, 6.9 g, 2.1 g, 9.3 g, 16.1 g씩 얻었다.

다. 향산화성분의 정제

n-부탄올 획분 (9.3 g)을 50 mL 알칼리수 (pH 10)에 용해시켜 흡착성 디아이온 HP-20 레진이 충전된 첫 번째 컬럼 (4 x 28 cm) 상단부위에 흡착시킨 후 30% 메탄올로 용출시킨 활성획분 2.2 g을 극성 실리카겔이 충전된 두 번째 컬럼 (5 x 12 cm)에서 메탄올을 농도구배로 증가시킨 클로로포름 용매를 이용하여 용출시켰다. 그리고 상기 활성획분을 감압건조 후 1 mL의 메탄올에 용해하고, 저분자용 겔여과 세파덱스 (Sephadex) LH-20이 충전된 세 번째 컬럼 (2 x 95 cm)에 도입하여 95% 메탄올을 유속 0.2 mL/분 으로 하여 4 mL 씩 분획하였다. 상기과정의 활성획분 (48번 - 60번 튜브)들을 혼합농축하여 소수성 옥타데실실란 (ODS)이 충전된 네 번째 컬럼 (1.5 x 8.5 cm)에 도입시키고 30 ~ 70% 메탄올의 농도구배로 유속 0.1 mL/min 하에 2 mL 씩 분획하여 강력한 향산화성 활성획분 (10번 - 18번 튜브) 357 mg을 수득하였다. 활성획분을 소량의 메탄올에 용해시켜 극성 실리카겔이 도포된 박층크로마토그래피 플레이트 (20 x 20 cm)에 점적한 후, n-부탄올 : 메탄올 : 물 = 4 : 1 : 2로 구성된 이동용매를 이용하여 전개하고 활성띠 부분을 긁어 취하였다. 이 성분을 소수성 역상플레이트 (20 x 10 cm)에 재점적하여 Rf 0.3 위치의 최종 정제된 맹종죽엽 향산화조성물 108 mg을 획득하였다. 상기에서 얻어진 향산화조성물 70 mg을 10mL의 HPLC 용 메탄올에 용해한 후 0.2 μm 시료용 필터에 통과시킨 것을 안정화된 고속액체크로마토그래피를 이용하여 향산화성 단일물질을 분리하고자 하였다. 고속액체크로마토그래피는

미국 워터스사 (Waters Co) 시머트리프렙 컬럼 (SymmertryPrep, 7 μ m, 21. x 150 mm) 을 장착한 워터스사 (Waters Co) 모델 2690 얼라이언스 (allience) 시리즈를 사용하였고, 아세토니트릴과 1%의 트리플루오산 (TFA)를 함유하는 3차 증류수를 17 대 83의 비율로 혼합, 탈기한 이동상 용매를 1.5 mL/분 의 유속으로 흐르게 하여 분석하였으며, 워터스 996 포토디오드어레이 (photodiode array, PDA) 검출기 (detector)로 물질의 자외선흡광패턴과 두 파장영역 (254 및 300 nm)의 흡수도를 이용하여 화합물들을 순수분획한 결과 머무름시간 16 분의 화합물 1 (7.0 mg)과 머무름시간 20분의 화합물 2 (5.2 mg) 및 머무름시간 28분의 화합물 3 (8.5 mg)를 수득할 수 있었다.

라. DPPH 전자공여능 (electron donating ability) 측정

전자 (수소)공여능 측정은 Blis의 방법에 준하여 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH)을 이용하여 측정하였다. 즉 DPPH 20 mg을 ethanol 150 mL에 녹여 DPPH 용액을 만든 후 이 용액 0.5 ml에 methanol에 녹인 죽엽 추출물들을 100 μ g/mL 또는 500 μ g/mL의 농도로 첨가하고 즉시 5초 동안 진탕한 후 10 - 30분 후 동안, 517 nm에서 시료를 가하지 않은 대조군에 대한 흡광도 감소를 수소공여능 활성으로 나타내었다.

마. Rat microsome 지질과산화 저해활성 측정

지질과산화 저해활성 측정은 적출된 흰쥐 간세포를 초원심분리 (77000g, 60분, Hitachi RP 30) 하여 얻어진 마이크로솜을 지질원으로 하여 Fe^{2+} /아스코르베이트 계에 의한 지질과산화를 유도하고 생성된 말론디알데히드 (malonaldehyde, MDA)를 티오바비트린산 (thiobarbituric acid, TBA)과 반응시켜 시료에 의해 감소된 MDA양을 정량 환산하였다. 시험관에 시료가 함유된 간 마이크로솜 용액 200 μ L 와 소듐도데실설펜염 (sodium dodesyl sulfate, SDS) 용액 225 μ L를 가하고 5초간 진탕혼합한 후, 20%의 아세트산, 75 μ L의 증류수, 1.2% TBA 용액 1 mL 씩 가하여 30분간 수욕상에서 가온 하였다. 실온에서 30분 냉각 후에 3000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상등액을

532 nm에서 흡광도를 측정하여 시료를 첨가하지 않은 대조군에 대한 지질 과산화 저해활성(%)을 구하였다.

바. Xanthin oxidase (XOD)/Xanthin 계를 이용한 활성산소 소거능 조사

50mM Potassium phosphate buffer (pH 7.5) 에 16% Triton X-100^R (Sigma), 1mM EDTA를 가하여 혼합 후 150 μ l 의 1.2mM Neotetrazolium chloride (Sigma) 와 xanthin oxidase (Boehringer Mannheim : 1U/mg)와 증류수를 가한 반응액에 시료및 대조군 용액 (100 μ l), 100 μ l 의 1mM Hypoxanthin (Sigma)을 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 30분 간 반응시켜 각각 반응액들의 흡광도 (540nm)를 조사하였다.

사. 활성산소 생성 저해활성

Miller 등의 방법에 따라 HL-60 cell에서 TPA 유도에 의한 활성산소 발생과정의 저해를 조사하였다. 10% FBS가 함유된 RPMI 배지에 5x10⁵ cell/mL의 농도로 접종하여 1.25% DMSO를 가하여 37 $^{\circ}$ C에서 CO₂ 배양기에 4일간 전배양한 후 PBS (pH 7.4)로 세척하고 1 x 10⁶ cell/mL로 분산시켜 시험 화합물들을 DMSO에 용해하여 (5 μ L) 처리하고 PBS로 세포를 다시 세척하였다. 프리라디컬 형성은 8 μ M TPA을 첨가하여 유도하였으며, 100 μ M의 시료와 cytochrome C (160 μ M)를 첨가하고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 배양후에 cytochrome C의 환원을 515 nm에서 ELISA reader로 측정하여 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 활성산소 생성저해 활성을 계산하였다.

아. ESR

유리라디컬의 소거기능을 직접적으로 확인하고자 전자스핀공명 분광기 (electrospin resonance, ESR)를 이용하여 안정한 유리라디컬 화합물인 1,1-디페닐-2-피크릴 하이드라질 (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl, DPPH) 용액에 본 발명에서의 화합물과 알파-토코페롤을 가하여 라디컬 소거여부를 직접 측정하였다. 전자스핀공명 분광기

(Bruker model ESP-300s ESR, Silberstreifen, Germany)의 측정조건은 25°C, 10 mW의 microwave power, 41.9s sweep time, microwave frequency 9.78 GHz로 하였고 200 μ M의 DPPH와 0.1 mM의 시료들을 사용하였다.

자. 활성물질의 구조분석

활성화합물의 자외선 최대 흡수대를 측정하기 위하여 각 시료를 메탄올에 1mg/mL의 농도를 용해시켜 자외선-가시광선 분광기(시마주(Shimadzu)사, UV-2401)를 이용하여 190-500nm 영역내에서 측정하였다. 시약첨가에 따른 자외선 흡수대의 변화를 관찰하기 위하여 AlCl₃, NaOH, NaOAc 등을 사용하였다. 적외선 흡수 영역을 조사하고자 각 화합물 2-3 mg을 포타슘브로마이드 (KBr)와 함께 잘 혼합 후 직경 0.5 cm의 디스크로 만들어 적외선 분광기 (Jasco FTIR-430)에서 최대 IR 흡광도를 측정하였다. 화합물의 분자량 결정은 전자포말이온화 (ESI) 질량분석기 (Micromass Quattro II)와 고해석능 펄스 질량분석기 (JMS-700 Mstation mass spectrometer)를 이용하여 글라이세롤 매트릭스로 하여 하이 레조루션(High resolution) MS를 측정하였다. 핵자기공명 (NMR)분석은 순수 정제 화합물 들 (5-7 mg)을 완전 건조하여 CD₃OD (0.5 mL)에 용해한 후 5 mm NMR 튜브에 주입하고 브루커 모델 기종 (Bruker AMX-500)으로 NMR분석 하였으며, ¹H-NMR은 500MHz로, ¹³C-NMR은 125MHz로 각각 측정하였다. 기타 용점측정은 DSC 2010기종을, 광학활성측정은 AUTOPOL III 편광기 (polarimeter)를 이용하였다.

제 2항 결과

가. 맹종죽엽 추출물의 활성산소 제거활성 탐색

활성산소는 반응성이 매우 강하여 이들에 의해 야기되는 free radical 반응은 지질을 포함하는 세포의 주요부분들을 파괴 또는 노화시킨다. 따라서 반응성 산소 대 사물에 의해 생체내 free radical 반응을 억제시키는 항산화물질은 노화관련 질환을

예방하는 목적으로 이용할 수 있으므로 본 과제에서는 1차적으로 죽엽 추출물들을 대상으로 활성산소 소거능과 항산화활성을 여러가지 방법을 이용하여 측정한 결과들을 나타내었다. (Fig. 2, Fig. 4, Fig. 5, Fig. 6, Fig. 7) Fig. 1에서 조제된 맹종죽엽의 추출물들을 1mg/mL의 농도로 하여 TBA가에 의한 지질과산화 저해활성을 측정한 결과 (Fig. 3), 수추출물에서는 거의 활성이 나타나지 않았고 70% 에탄올 환류 추출물 (82.3 ± 1.3) > 에틸아세테이트 획분 (80.29 ± 0.65) > chloroform 획분 (55.9 ± 4.44)의 순으로 높은 활성을 나타내었다.

수소공여능 측정에 사용된 DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl)는 안정한 유리 라디칼로서 그것의 odd electron으로 인해 517 nm 부근에서 흡수 극대를 나타내며, 수소(전자)를 받으면 흡광도가 감소하며, 일단 환원되면 다시 산화되기 어렵게 된다. 따라서 맹종죽 추출물들이 이 라디칼을 환원시키는 능력이 크다면 높은 항산화 활성과 활성산소 및 유리 라디칼의 제거활성을 기대할 수 있으며, 실제 DPPH 라디칼에 대한 소거능과 활성산소 소거효과 간의 상관관계가 보고된 바 있다. 맹종죽 추출물들 (0.5mg/mL)의 수소공여능을 10분과 30분간 반응시간 차이에 따라 각각 측정한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 지질과산화저해활성 (Fig. 3)과는 달리 butanol 획분에서 가장 활성이 높았으며 (87.88 ± 0.26 , 87.00 ± 0.59), 70% 에탄올 추출물 (72.22 ± 0.60 , 71.84 ± 0.36)과 에틸아세테이트 획분 (82.25 ± 0.51 , 84.96 ± 0.19)에서도 높은 활성을 나타내었으나 수추출물의 경우 활성은 미미하였다. 활성이 높은 4가지 획분들에 대하여 농도별 (500, 250, 100 μ g/mL)로 DPPH free radical 소거능의 차이를 비교 실험한 결과 (Table 2), 시료농도의 감소에 따라 활성이 다소 감소하였으나, BL-IV (에틸아세테이트 획분)과 BL-V (butanol 획분)에서는 100 μ g/mL의 농도에서도 50% 이상의 (82.06 ± 0.84 , 66.2 ± 1.88) 높은 활성을 나타내었다. 그러나 반응시간에 따른 활성은 큰 차이가 없었다 (Fig. 4). 이는 반응계의 빠른속도와 안정성으로 볼 수 있어 시료들을 단시간에 screening 하는 항산화물질의 탐색에 용이하게 이용할 수 있을것이다.

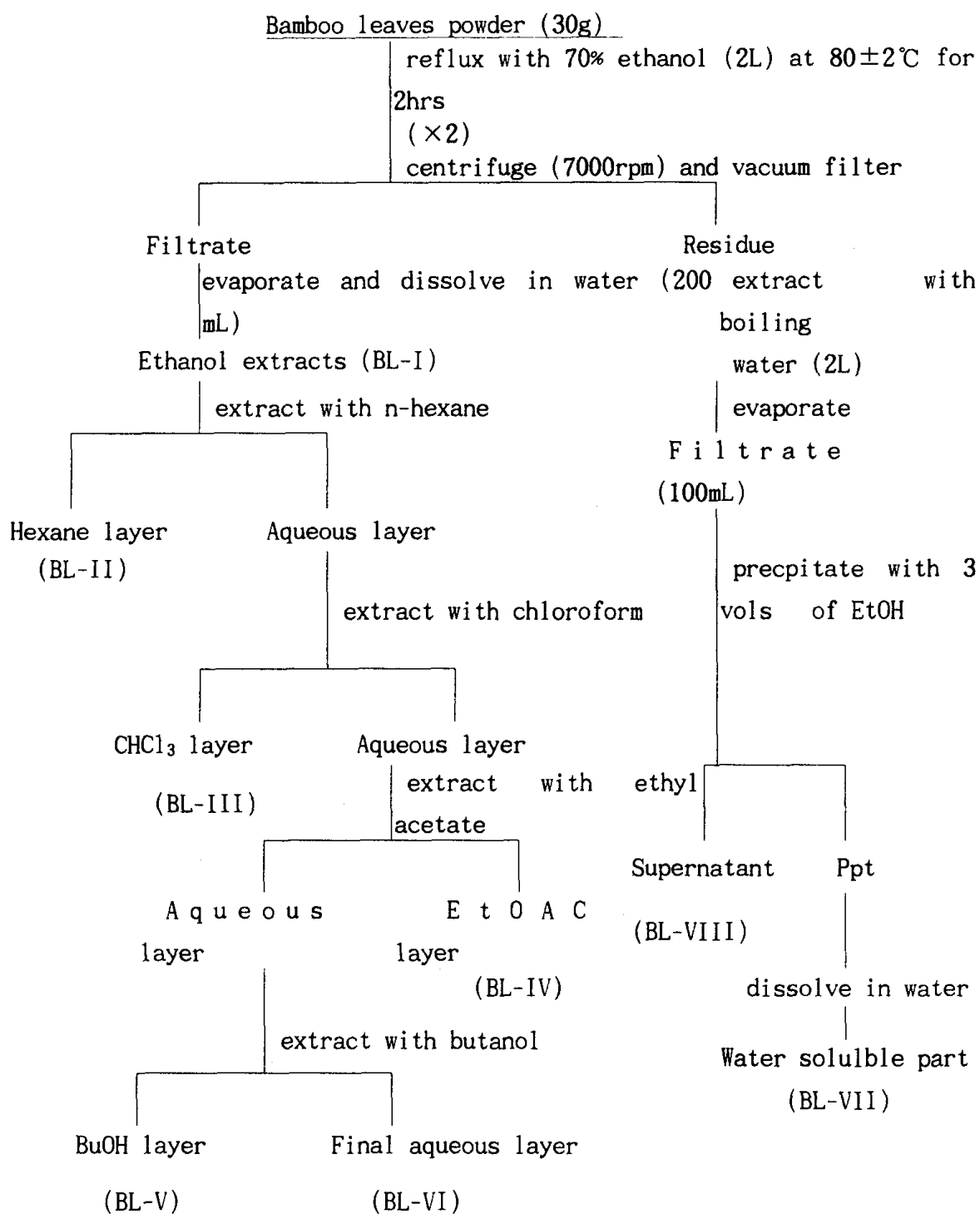


Fig. 1. Flow diagram for the extraction and fractionation of *Phyllostachys edulis* leaves.

Table 1. Yield of each fractions prepared from the extraction process of *Phyllostachys edulis* leaves

Fraction	Yield (g)
BL-I (70% EtOH reflux extracts)	54.62
BL-II (Hexane extracts of BL-I)	15.20
BL-III (CHCl ₃ extracts of BL-I)	6.98
BL-IV (EtOAc extracts of BL-I)	2.01
BL-V (BuOH extracts of BL-I)	9.25
BL-VI (Aqueous layer of BL-I)	16.08
BL-VII (Water soluble of EtOH ppt)	1.72
BL-VIII (EtOH supernatant of water extracts)	1.68

Table 2. Electron donating ability the selected extracts from the Bamboo leaves

Sample conc. ($\mu\text{g/mL}$)	DPPH free radical scavenging activity (%)			
	BL-I	BL-IV	BL-V	BL-VI
500	80.23 \pm 0.84	89.35 \pm 0.08	91.17 \pm 0.20	76.38 \pm 1.55
250	60.47 \pm 0.33	88.74 \pm 0.37	86.08 \pm 1.1	53.96 \pm 0.61
100	27.4 \pm 6.5	82.06 \pm 0.65	66.2 \pm 1.88	11.19 \pm 5.36

Each value is mean \pm standard deviation of triplicate determination.

BL-I: 70% Ethanol reflux extracts, BL-IV: Ethylacetate layer of BL-I

BL-V: Butanol layer of BL-I, BL-VI: Final aqueous layer of BL-I

Table 3. Nitrite scavenging ability of *Phyllostachys edulis* leaves extracts

Nitrite scavenging activity (%)						
	BL-I	BL-IV	BL-V	BL-VI	BL-VII	BL-VIII
pH 1.2	45.3±1.3	80.4±0.4	50.4±5.6	31.9±5.7	17.14±7.6	9.94±2.8
pH 4.2	31.4±4.2	48.0±0.9	34.4±1.6	20.2±0.1	18.5±1.6	7.4±4.6

Each value is mean±standard deviation of triplicate determination.

BL-I: 70% Ethanol reflux extracts, BL-IV: Ethylacetate layer of BL-I

BL-V: Butanol layer of BL-I, BL-VI: Final aqueous layer of BL-I

BL-VI: Ethanol precipitates of water extract, BL-VII: Ethanol supernatant of water extract

Table. 4. Anti-complementary and Free radical scavenging activity of the BL fractions

	BL-I	BL-II	BL-III	BL-IV	BL-V	BL-VI	BL-VII	BL-VIII
ITCH ₅₀ (%)	+	+	++	++	+	-	-	
XOD/Xanthin	++	+	++	+++	++	-	+	+
DPPH	++	++	++	++	+++	-	+	+
Microsome	+	+	+	++	+++	-	-	+

* IC₅₀ value : +++ < 200 µg/mL, ++ < 1mg/mL, + < 5mg/mL

Nitrosamine은 생체내 산화효소군에 의하여 alkonium ion (RCH²⁺)을 생성하는데 alkonium ion은 DNA을 알킬화합으로써 발암성을 나타낸다. 이의 생성인자가 아질산염이기 때문에 제거하는 것이 바람직하며 일반적으로 환원력이 큰 항산화성물질들이 아질산염소거능을 발휘하는 것으로 알려져 있으므로 맹종죽엽의 추출물들에 대하여서 nitrite scavenging activity를 pH1.2와 pH4.2의 조건에서 조사하였다. Table 3의 결과에서 특히 pH 1.2의 조건에서 BL-IV (80.4±0.4), BL-V (50.4±5.6)가 활성이 높았으며 수추출물의 경우 역시 활성이 거의 나타나지 않았고, pH 4.2에서는 상대적으로 낮은 소거율 (50-10%)을 나타내었다.

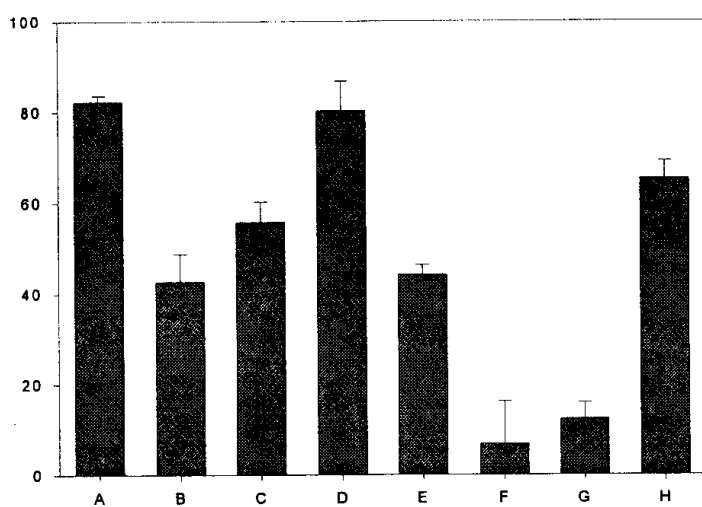


Fig. 2. Antioxidant activity of the extracts from *Phyllostachys edulis* leaves

- A: 70% Ethanol reflux extracts
- B: Hexane or petroleum layre
- C: Chloroform layer
- D: Ethylacetate layer
- E: Final aqueous layer
- G: Ethanol precipiate of water extracts
- H: Ethanol supernatant of water extracts

활성이 높았던 4가지 획분 (BL-I, BL-IV, BL-V, BL-VI)을 pH 1.2의 반응조건에서 0.5, 0.25, 0.1mg/mL의 농도로 첨가하여 아질산염의 소거효과를 조사하였다 (Fig. 5). 모든 획분에서 농도증가에 따라 활성도 증가하는 것으로 나타났다. 또한 반응시간경과에 따른 BL-IV에 의한 아질산염 소거효과를 pH 1.2 와 pH 4.2에서 측정하여 Fig. 6과 Fig. 7에 각각 나타내었다. pH 1.2의 산성조건하에서는 유도기간으로 생각되는 30분 이후부터 아질산염 소거효과가 증가하였으며 특히 농도가 증가할수록 뚜렷하였으나 반응 2.5시간 이후부터 활성이 약간 감소하는 현상을 보였다. pH 4.2의 조건에서는 유도기간이 현저히 증가되어 반응 2시간 이후부터 5-20% 정도의 낮은 소거활성을 나타내었다. 항산화활성 assay 방법에 따라 맹종죽엽 추출물들의 활성의 크기가 일치하는 않는 점은 적어도 2가지 이상의 활성물질들이 죽엽에 존재하는 것으로 판단되어지며, 각각의 물질들이 서로 다른 기작으로 활성산소를 소거할 가능성이 높다

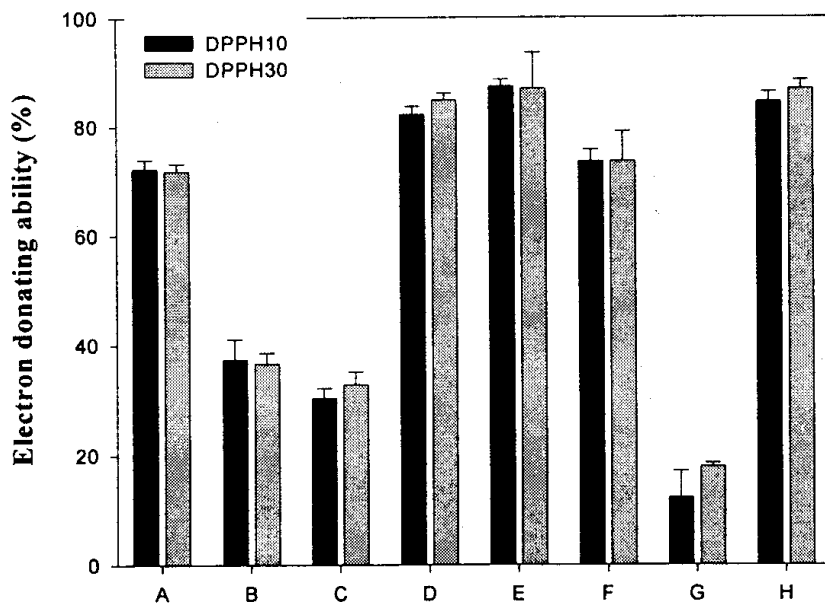


Fig. 4. Electron donating effect of *Phyllostachys edulis* leaves extracts.

Each sample(0.5mg/mL) was reacted with 2×10^{-4} M 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl for 10min or 30min.

- A: 70% Ethanol reflux extracts
- B: Hexane layer of A
- C: Chloroform layer of A
- D: Ethylacetate layer of A
- E: Butanol layer layer of A
- F: Final aqueous layer of A
- G: Ethanol precipitate of water extracts
- H: Ethanol supernatant of water extracts

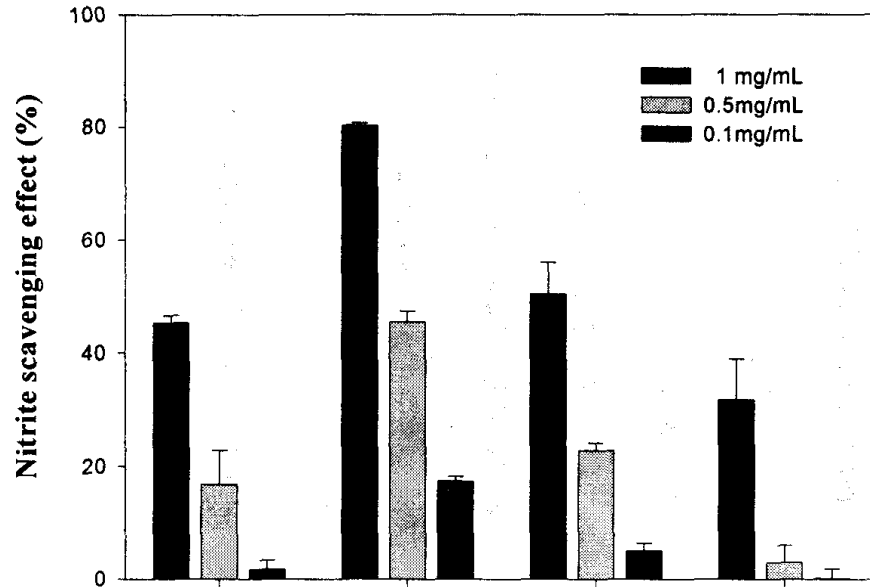


Fig. 5. Nitrite scavenging effect of the leaves of *Phyllostachys edulis* under pH 1.2

Each concentration of the sample was incubated with 2ml of 2mM sodium nitrite at 37°C.

BL-I: 70% ethanol reflux extracts

BL-IV: Ethylacetate layer of BL-I

BL-V: Butanol layer of BL-I

BL-VI: Final aqueous layer of BL-I

나. 죽엽 추출물들의 생리활성 비교

Fig. 1에서 조제된 8개의 획분에서 보체 저해활성 및 활성산소 소거능을 비교한 결과 (Table 4), 보체 저해활성은 BL-III, BL-IV 획분에서, DPPH 프리라디칼 소거능 및 rat microsome 과산화지질 저해활성은 BL-V 획분에서 우수하였다. 따라서 활성과 수율면에서 유리한 BL-III 획분과 BL-V 획분을 정제시료로 선택하였다.

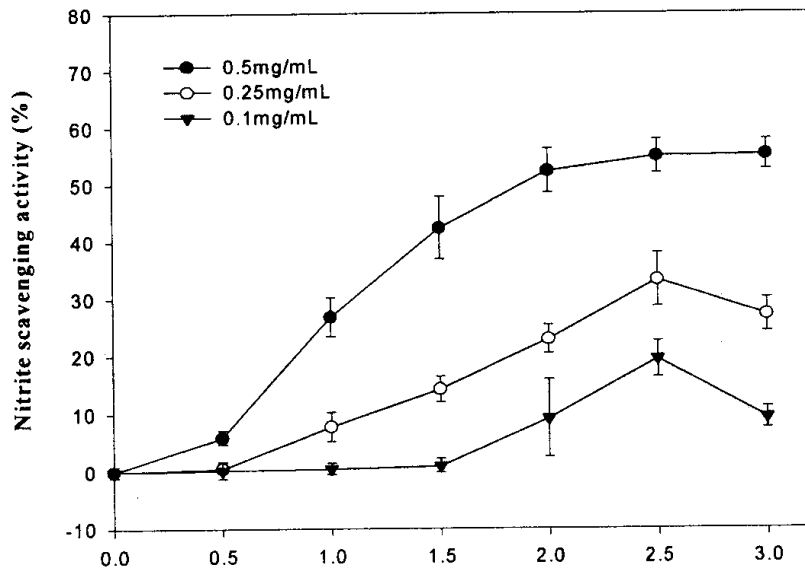


Fig. 6. Time-course nitrite scavenging effect of BL-IV fraction from *Phyllostachys edulis* leaves under pH 1.2. Each sample was incubated with 2ml of 2 mM sodium nitrite at 37°C.

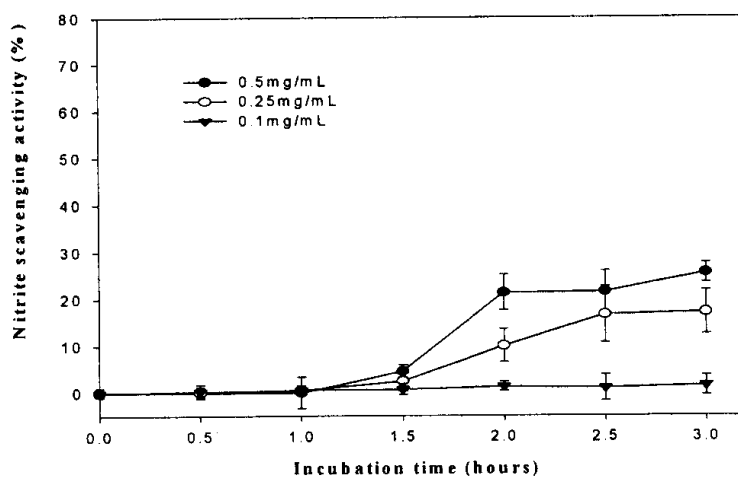


Fig. 7. Nitrite scavenging activity of the BL-V from *Phyllostachys edulis*

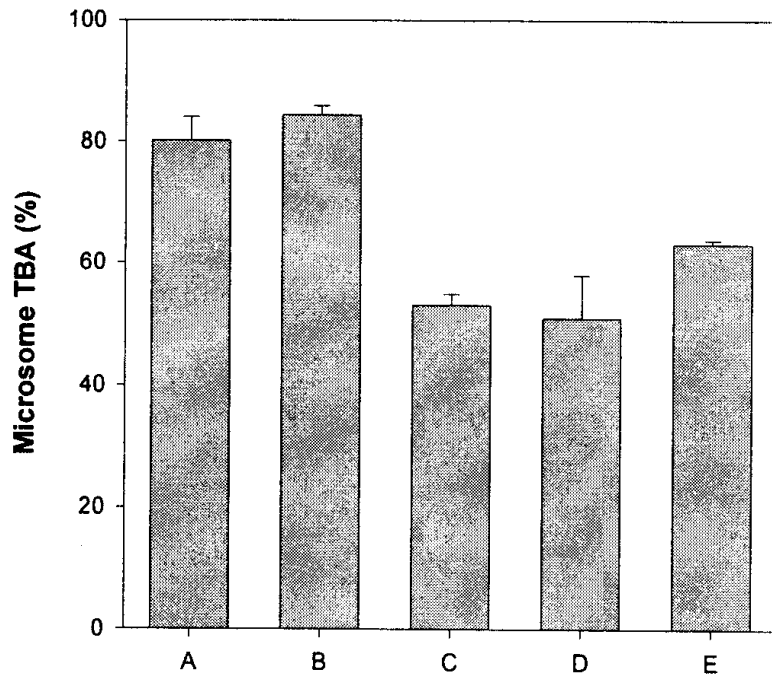


Fig. 8. Microsomal lipid peroxidation inhibitory activity of BL fractions
 A: BL-1, B: BL-II, C: BL-III, D: BL-IV, E: BL-V

다. 활성획분의 대량추출 및 유기용매 분획

맹종죽엽 건조분말 500 g을 5 L 부피의 원형 바닥 플라스크에 넣고 3 L의 70% 에탄올을 가하여 80±2℃에서 6 시간 환류추출의 과정을 3회 내지 4회 반복 실시하여 약 10 L의 추출액을 수득하였다. Fig. 1의 방법대로 분배 용매 분획을 실시한 결과 헥산획분, 클로로포름획분, 에틸아세테이트획분, 부탄올획분, 최종수층획분을 각각 15.2 g, 6.9 g, 2.1 g, 9.3 g, 16.1 g씩 얻었다. 각 획분 1 mg/mL에 대하여 항산화활성을 조사하였다. Fig. 9의 결과에서 예비실험과 동일하게 부탄올 획분이 다른 획분에 비하여 높은 DPPH 소거능, 활성산소 소거활성 및 지질 과산화저해활성을 나타내었다.

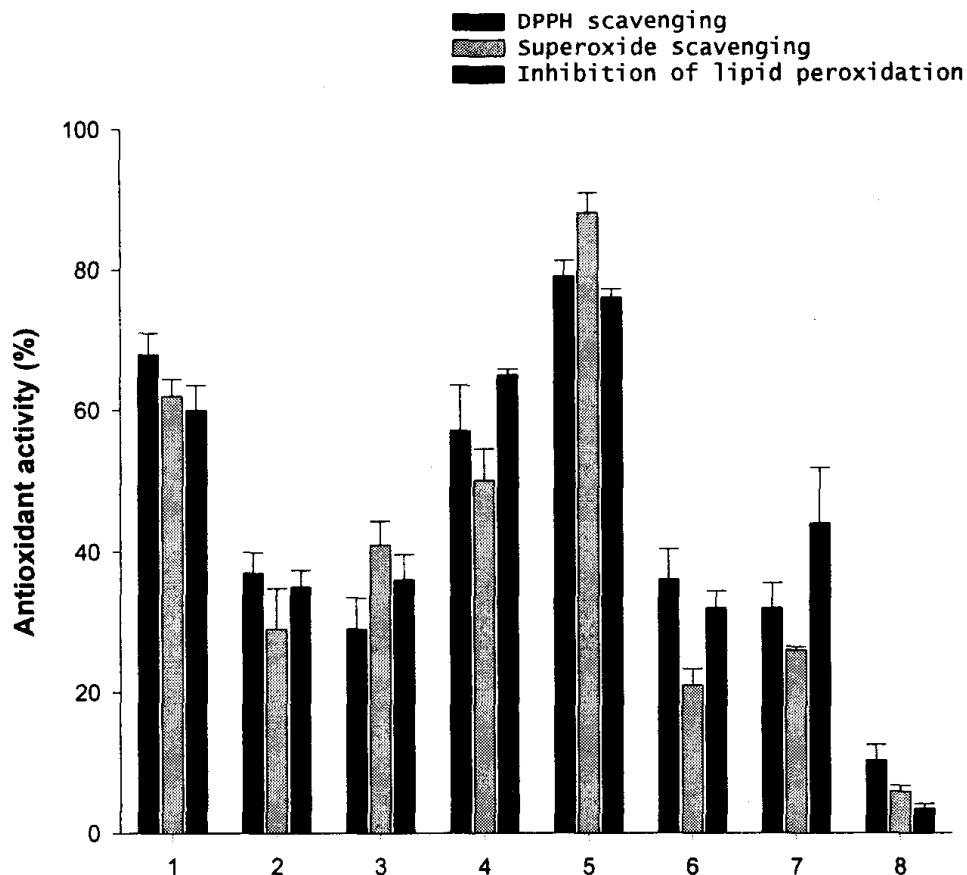


Fig. 9. Antioxidant activity of organic solvent-partitioned subfractions of 70% ethanolic extracts from *Phyllostachys edulis*. Experiments were carried out at 100 g/mL concentrations of samples as described in the text to materials and methods. Error bars represent standard deviations of mean ($n=3$). Columns 1 represent antioxidant activity of the 70% ethanolic extract; 2, of the hexane subfraction in the organic solvent partition; 3, the chloroform subfraction; 4, ethyl acetate subfraction; 5, *n*-butanol subfraction; 6, final aqueous layer. The *n*-butanol subfraction, 5 comprises compounds 1-3.

라. 부탄올 획분으로부터 항산화활성 물질의 정제

부탄올 획분에 대하여 용매제거, 동결건조한 수용성 갈색 분말을 증류수에 용해하여 흡착성 HP-20컬럼, 극성 실리카겔 컬럼, LH-20 겔여과컬럼, ODS 역상컬럼 크로마토그래피 의 4 단계 컬럼정제를 통해 수득된 항산화성이 우수한 수용성 미황색 분말을 얻

었다. 정제 활성획분을 메탄올에 용해한 후 최종적으로 순상 및 역상의 박층크로마토그래피를 순차적으로 실시하고 강력한 활성을 나타내는 분리밴드를 취하고 메탄올에 활성물질을 용출시켜 잔존의 용출액 내 실리카겔을 원심분리 및 여과를 통하여 제거한 후 농축, 동결건조한 수용성 유백색 분말을 HPLC 정제 시료로 이용하였다. 고속액체크로마토그래피는 미국 워터스사 (Waters Co) 시머트리프렙 컬럼 (SymmetryPrep, 7 μ m, 21. x 150 mm)을 장착한 워터스사 (Waters Co) 모델 2690 얼라이언스 (alliance) 시리즈를 사용하였고, 아세트니트릴과 1%의 트리플루오산 (TFA)를 함유하는 3차 증류수를 17 대 83의 비율로 혼합, 탈기한 이동상 용매를 1.5 mL/분 의 유속으로 흐르게 하여 분석하였으며, 워터스 996 포토디오드어레이 (photodiode array, PDA) 검출기 (detector)로 물질의 자외선흡광패턴과 두 파장영역 (254 및 300 nm)의 흡수도를 이용하여 화합물들을 순수분획하여 항산화활성을 조사한 결과 머무름시간 16 분의 화합물 1 (7.0 mg)과 머무름시간 20분의 화합물 2 (5.2 mg) 및 머무름시간 28분의 화합물 3 (8.5 mg)을 얻어 구조분석을 실시하였다 (Fig. 10, 11).

마. 활성물질의 구조분석

죽엽의 부탄올 획분으로부터 최종적으로 단리된 3종의 화합물들에 대하여 UV 흡수패턴 및 shift조사, 분자량분석, 적외선 흡수영역 및 용점의 조사, optical density, NMR 등의 기기분석을 이용하여 실시하였으며, 유사화합물들로 추정되는 물질과 비교하여 결정하였다. 이에 대한 결과는 아래와 같다.

Compound 1: pale yellow power (7.0 mg); $[\alpha]_{25D}$ 39.2 (ethanol, mp 195-197 °; UV max in MeOH (nm) 244sh, 299, 328; +NaOH 266sh, 310, +AlCl₃ 246sh, 300, 329; +AlCl₃ + HCl 245sh, 299, 328; +NaOAc 369; +NaH₃BO₃ 249sh, 305, 349; IR (KBr) max 3420, 3250, 1730, 1679, 1523, 144
TLC positive reaction with FeCl₃ and bromocresol green; ESI-MS, m/z 3 [M+H]⁺; FAB-MS m/z 369 [M+H]⁺, m/z 391 [M+Na]⁺; HR-FABMS (glycerol ma m/z 369.1185 [C₁₇H₂₀O₉ + H]⁺ ; 1H NMR (CD₃OD, 500 MHz) 7.57 (1H, 15. H-7), 7.04 (1H, d, 2.0Hz, H-2), 6.93 (1H, dd, 8.2Hz, 2.0Hz, H-6), 6.7

d, 8.4Hz, H-5), 6.28 (1H, d, 15.9Hz, H-8) 5.34-5.36 (1H, m, H-3), 4.0 (1H, m, H-5), 3.73 (OCH₃), 3.66 (1H, dd, 7.8Hz, 3.3Hz, H-4), 1.98-2.2 m, H-2, H-6); ¹³C NMR (CD₃OD, 125 MHz) 176.1 (COO⁻), 168.1 (C-9), 14 (C-3), 146.4 (C-7), 146.2 (C-4), 127.1 (C-6), 123.7 (C-1), 116.8 (C-5 (C-8), 114.7 (C-2), 75.8 (C-4), 73.8 (C-1), 72.6 (C-3), 67.3 (C-5), 5 (OCH₃), 39.8 (C-2), 36.1 (C-17)

Compound 2: white powder (5.2 mg); [α]_{25D} 47.2 (ethanol, c 0.2 200-201 °; UV max in MeOH (nm) 244sh, 296, 328; +NaOH 261sh, 308, 372 263sh, 306, 351; +AlCl₃ + HCl 244sh, 296, 328; +NaOAc 274, 334, 375; H₃BO₃ 252sh, 303, 348; IR (KBr) max 3433, 2950, 1735, 1680, 1631, 151 cm⁻¹; TLC positive reaction with FeCl₃ and bromocresol green; ESI-MS, [M+H]⁺; FAB-MS *m/z* 369 [M+H]⁺; *m/z* 391 [M+Na]⁺; HR-FABMS (glycerol ma *m/z* 369.1185 [C₁₇H₂₀O₉ + H]⁺; ¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz) 7.61 (1H, 15.9 H-7), 7.06 (1H, d, 2.0Hz, H-2), 6.95 (1H, dd, 8.2Hz, 2.0Hz, H-6), 6.7 d, 8.2Hz, H-5), 6.35 (1H, d, 15.9Hz, H-8) 4.23-4.30 (3H, m, H-3, 4, 5 (OCH₃), 1.99-2.21 (4H, m, H-2, H-6); ¹³C NMR (CD₃OD, 125 MHz) 176.5 168.9 (C-9), 149.5 (C-3), 146.9 (C-4), 146.8 (C-7), 127.9 (C-6), 123. 116.5 (C-5), 115.8 (C-8), 115.1 (C-2), 74.3 (C-4), 73.9 (C-1), 71.3 (C 70.6 (C-5), 52.9 (OCH₃), 40.8 (C-2), 36.4 (C-17)

Compound 3: white powder (8.5 mg); [α]_{25D} 16.9 (water, c 0.35) 202-203 °; UV max in MeOH (nm) 245sh, 300, 329; +NaOH 266sh, 310, 374 355; +AlCl₃ + HCl 245sh, 299, 328; +NaOAc 338, 377sh; +NaOAc + H₃BO₃ 306, 351; IR (KBr) max 3423, 2957, 1734, 1686, 1631, 1522, 1443 cm⁻¹; positive reaction with FeCl₃ and bromocresol green; ESI-MS, *m/z* 369 [FAB-MS *m/z* 369 [M+H]⁺; *m/z* 391 [M+Na]⁺; HR-FABMS (glycerol matrix), *m* 369.1185 [C₁₇H₂₀O₉ + H]⁺; ¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz) 7.51 (1H, 15.9Hz, 7.04 (1H, d, 2.0Hz, H-2), 6.94 (1H, dd, 8.2Hz, 2.0Hz, H-6), 6.77 (1H, 8.4Hz, H-5), 6.20 (1H, d, 15.9Hz, H-8) 5.26-5.30 (1H, m, H-3), 4.12-4 m, H-5), 3.71 (1H, dd, 7.5Hz, 3.1Hz, H-4), 3.70 (OCH₃), 1.93-2.23 (4H H-2, H-6); ¹³C NMR (CD₃OD, 125 MHz) 175.4 (COO⁻), 168.3 (C-9), 149.7 147.2 (C-4), 146.8 (C-7), 127.7 (C-6), 123.0 (C-1), 116.5 (C-5), 115. C-8), 75.8 (C-4), 72.6 (C-1), 72.1 (C-3), 70.3 (C-5), 53.0 (OCH₃), 38

(C-6), 37.8 (C-2).

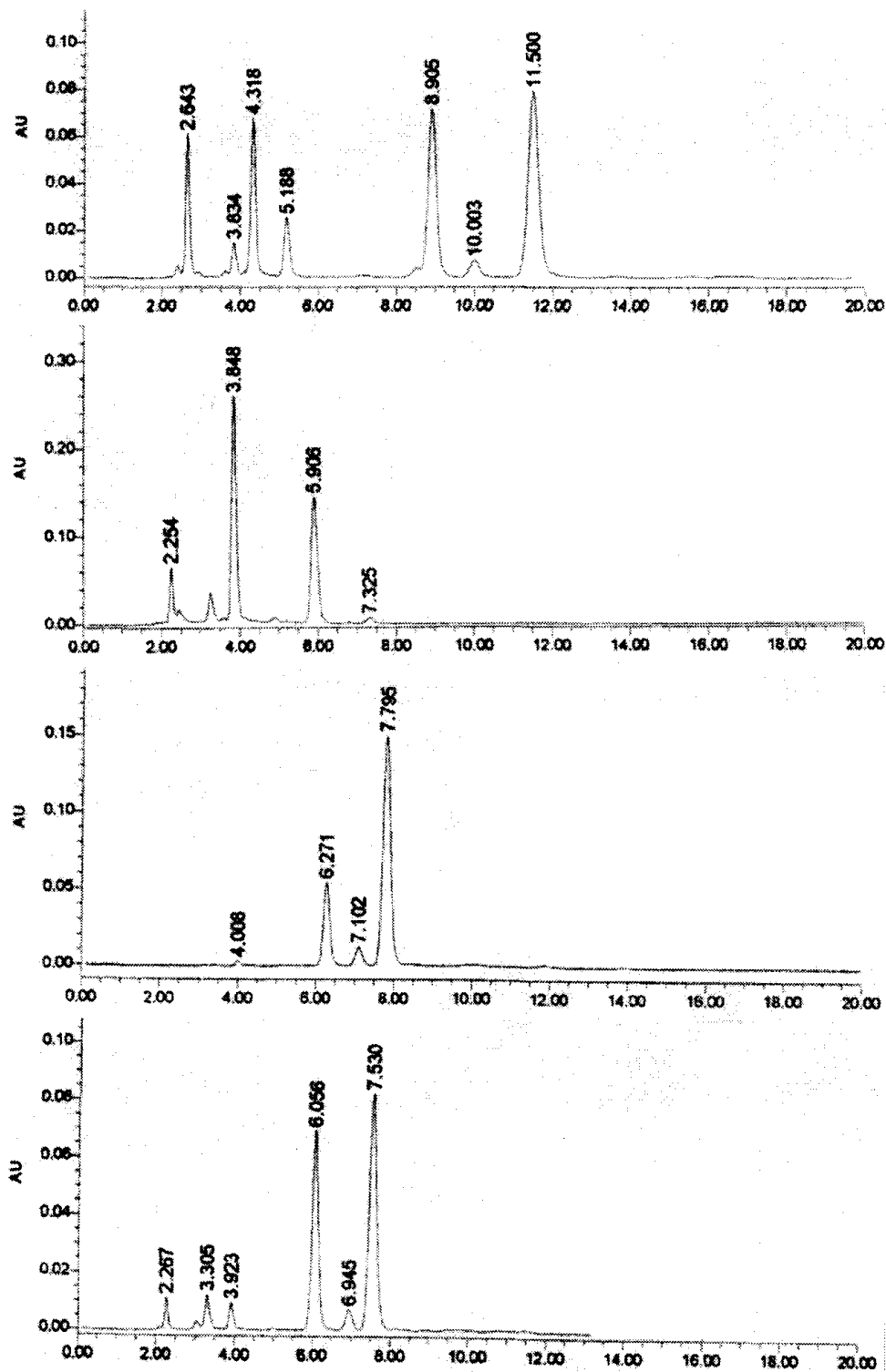


Fig. 10. HPLC profile of TLC isolates from fraction BL-V

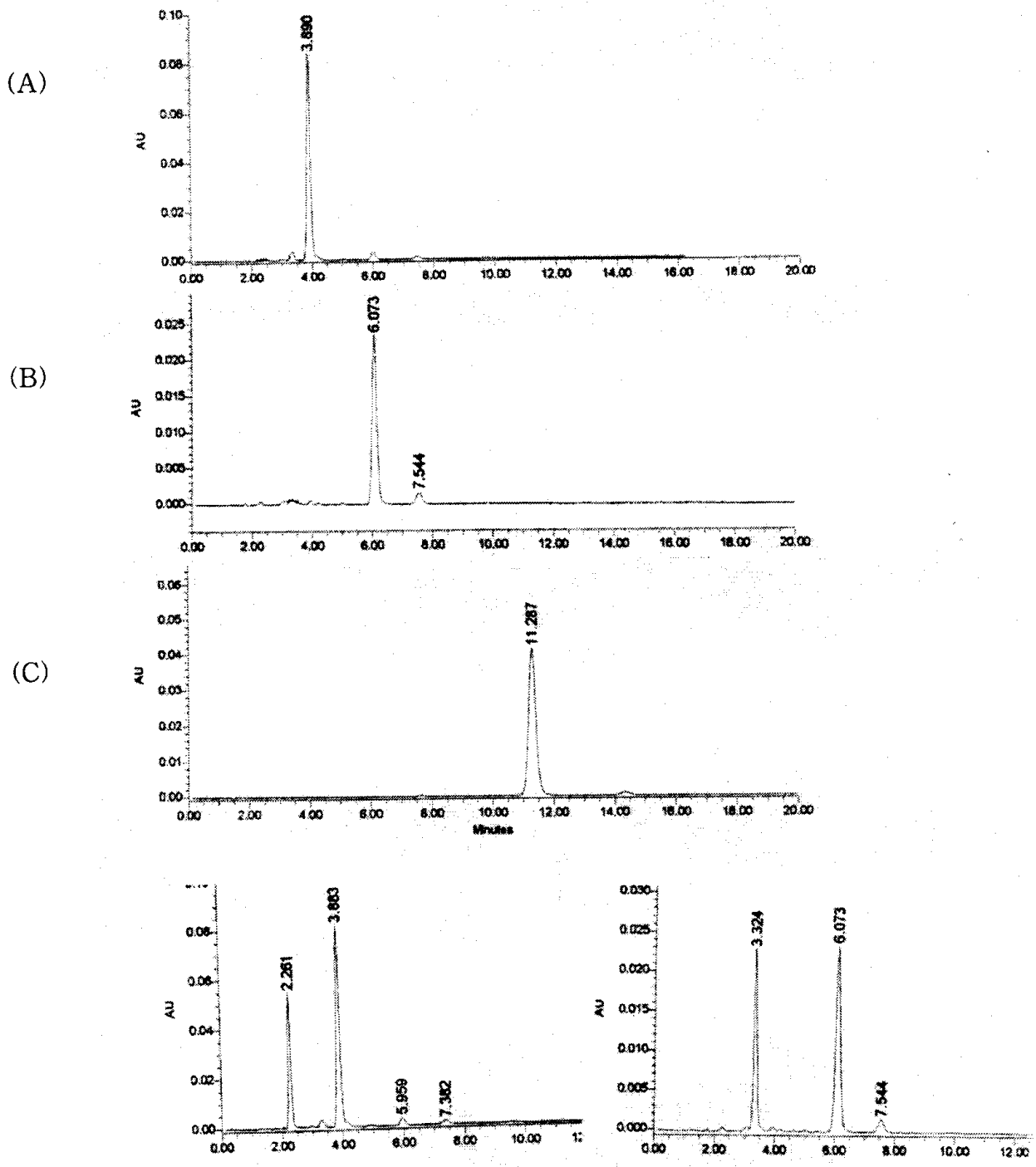
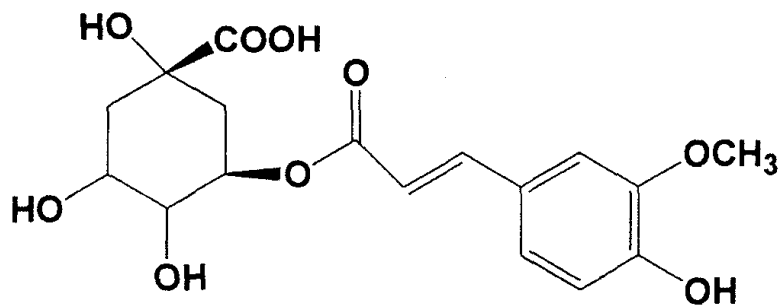
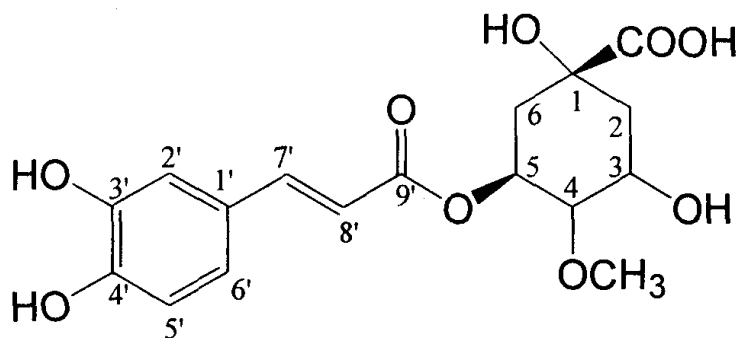


Fig. 11. HPLC isolation patterns of antioxidant active compounds from *Phyllostachys edulis* (A) compound 1 (B) compound 2 (C) compound 3 (D) isomers of compound 1 and 2

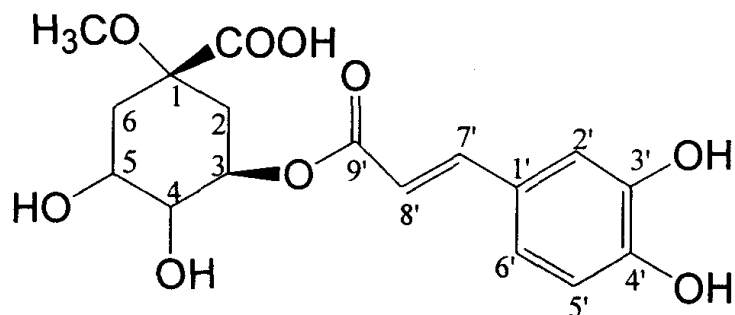
따라서 화합물 1은 화합물 1은 3-O-(3'-methylcaffeoyl) quinnic acid, 화합물 2는 5-caffeoyl-4-methylquinnic acid로 화합물 3은 3-O-caffeoyl-1-methylquinnic acid로 결정되었으며 (Fig. 12) 이 중 화합물 2와 3은 신규화합물로 확인되었다.



Compound 1: 3-O-(3'-methylcaffeoyl) quinnic acid



Compound 2: 5-caffeoyl-4-methylquinnic acid



Compound 3: 3-O-caffeoyl-1-methylquinnic acid

Fig. 12. Chemical structure of antioxidative chlorogenic acids derivatives 1-3

바. 정제화합물의 항산화활성 조사

최종 정제 화합물의 정제효율을 확인하기 위하여, 초기 70% 에탄올 추출물과 역상 TLC 화합물의 DPPH 유리라디컬소거활성, 활성산소 소거활성 및 지질과산화저해활성을 각각 측정하여 그 결과를 Table 5 에 나타내었다.

Table 5. 맹종죽엽 최종정제 획분과 에탄올추출물의 항산화활성 비교

항산화활성 (IC ₅₀ 값, µg)		
	70% 에탄올 환류추출 획분	박층크로마토그래피 정제 획분
DPPH 라디컬 소거활성	613.7	9.9
활성산소 소거활성	579.3	2.9
지질과산화 저해활성	645.6	19.5

Table 5에서 IC₅₀ 값의 의미는 50%의 활성을 일으키는 물질의 농도를 의미하는 것이므로 이 값이 낮을수록 항산화활성이 강함을 의미한다. 상기 표1에 나타낸 바와 같이, 맹종죽엽의 최종정제 추출물은 에탄올추출물 보다 DPPH 유리라디컬 소거활성은 약 62 배, 활성산소소거능은 약 200 배, 지질과산화저해활성은 약 33 배 증가된 것으로 나타났다.

사. 맹종죽 정제 화합물들과 기존 항산화성분과의 항산화활성 비교

맹종죽에서 단리한 3종의 항산화성 클로로제산 메틸 에테르 화합물들과 화학적으로 구조가 유사한 페놀산 성분들인 클로로제산, 카페인산, 페롤린산 및 항산화비타민인 토코페롤과 아스כול빈산 그리고 녹차의 항산화성분인 epigallocatechine들과 항산화활

성들을 비교하여 Table 6에 나타내었다. 특히 맹종죽엽의 항산화성분들을 강력한 활성산소 소거능 뿐만 아니라 유리라디컬의 소거기능과 다른 항산화성분들과 비교시 우수하였다. 직접적인 유리라디컬의 소거능을 관찰하기 위하여 ESR로 분석한 결과 3종의 화합물 모두 DPPH 유리라디컬을 완전히 소거하였으나 비교화합물로 사용된 토코페롤의 경우 완전히 소거되지 않음을 알 수 있었다 (Fig. 13).

Table 6. 맹종죽엽 정제 항산화조성물과 종래 항산화제들의 항산화활성 비교

항산화활성 (IC ₅₀ 값, μ M)			
	DPPH 라디컬 소거활성	활성산소 소거활성	지질과산화 저해활성
화합물 1	16.0	4.3	29.8
화합물 2	8.8	2.8	19.2
화합물 3	6.9	1.2	14.6
알파-토코페롤	>50	45.0	>50
비타민 C	25.3	>50	-
에피갈로카테킨	8.6	5.3	36.6
카페인산	13.7	5.1	13.7
클로로젠산	12.0	6.9	28.3
페롤린산	36.5	32.4	>50
BHT	>50	>50	19.2

Table 6에 나타난 바와 같이, 맹종죽엽 최종 정제 추출물은 비교된 종래의 천연항산화제 및 합성항산화제 보다 우수한 항산화활성을 나타내며, 특히 활성산소 소거능은 매우 강하였다. 일반적으로 화합물 3 > 화합물 2 > 화합물 1 의 순서로 활성이 강하였으며 특히 화합물 3는 가장 강한 활성을 나타내었다.

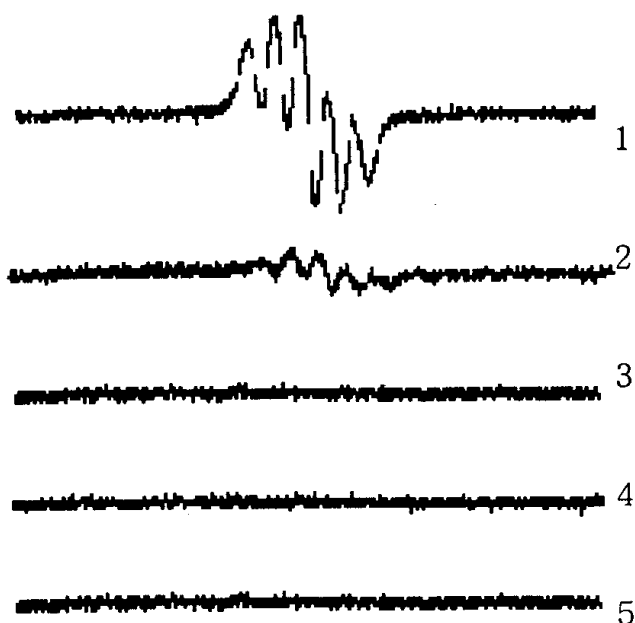


Fig. 13. EPR spectra of DPPH radical and the reaction of DPPH with compounds 1-3 and α -tocopherol. Spectra 1, 0.5 ml of 200 M 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) in ethanol solution; spectra 2, plus 0.1 mM tocopherol; spectra 3, plus 0.1 mM compound 1; spectra 4, plus 0.1 mM compound 2; spectra 5, plus 0.1 mM compound 3. The g-value of DPPH radical was calculated from the resonance field.

또한 본 연구에서의 항산화 활성이 맹종죽엽 추출물은 추출과정에서 고온과 강한 빛에서도 그 활성이 변하지 않으므로 열 및 빛에 대한 내성이 강하며, 물에도 잘 용해되므로 수용성 안정 화합물인 것을 알 수 있다.

따라서 본 연구로 맹종죽엽으로부터 항산화활성 특히 활성산소 소거기능이 뛰어난

천연항산화제를 추출하여 국내 농산물의 폐기부위를 고부가가치성 자원화 할 수 있으며, 본 연구의 맹종죽엽 항산화성분은 천연항산화제로서, 수용성이며 열 및 빛에 강하므로 이를 이용하여 노화 및 성인병 예방 및 치료용 의약조성물, 노화방지용 기능성식품, 기능성 화장품 등으로 응용할 수 있어 생물 의약분야 산업상 유용한 자료로 활용될 수 있을 것이다.

제3절 맹종죽 죽순으로부터 항보체 활성 성분에 관한 연구

제 1 항 재료 및 실험방법

가. 재료

본 연구에 사용된 맹종죽의 죽순은 대한민국 남해안 거제도 하청면 일대에 서식하는 맹종죽으로부터 채취하여, 음건, 파쇄 및 동결건조를 거쳐 냉동고에 보관하면서 실험에 이용하였다.

나. 맹종죽 죽순의 추출 및 분획

건조된 맹종죽 죽순의 분말 180g에 2L의 70%에탄올을 가하고 $80 \pm 2^\circ\text{C}$ 에서 2시간 2회 환류추출한 후 얻어진 추출물에 대하여 유기용매들의 극성도 차이에 따른 분획을 실시하였으며 (Fig. 13), 얻어진 분획물들은 동결건조하여 수율을 계산하였다 (Table 7).

다. 항보체활성 측정

항보체 활성은 NHS (normal human serum), GVB⁺⁺ (gelatin veronal buffered saline, pH 7.2)와 DIW에 용해한 시료 (1mg/mL)를 각각 50 μL 씩 혼합하여 37 $^\circ\text{C}$ 에서 30분간 반응시킨 후, 반응액에 GVB⁺⁺를 350 μL 씩 첨가하고, 이를 10배에서 160배까지 연속 희석

하였다. 여기에 750 μ L의 GVB⁺와 양의 감작 적혈구 (IgM-hemolysin-sensitized sheep erythrocyte, 10⁸ cells/mL)를 250 μ L씩 가하여 1시간 동안 반응시킨 후, PBS(phosphate buffered saline, pH 7.4)를 2.5mL씩 가하여 원심분리한 후 상등액의 흡광도를 412nm에서 측정하였다. 항보체 활성은 ITCH₅₀, 즉 총보체 용혈 저지율 (Inhibition of 50% Total Complement Hemolysis)로 나타내었다. 물에 불용인 유기용매 추출시료의 경우 5% DMSO용액에 용해시켜 측정하였다.

라. DPPH 유리라디칼 소거능 측정

전자 (수소)공여능 측정은 Bios의 방법에 준하여 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH)을 이용하여 측정하였다. 즉 DPPH 20 mg을 ethanol 150 mL에 녹여 DPPH 용액을 만든 후 이 용액 0.5 mL에 methanol에 녹인 죽엽 추출물들을 100 μ g/mL 또는 500 μ g/mL의 농도로 첨가하고 즉시 5초 동안 진탕한 후 10 - 30분 후 동안, 517 nm에서 시료를 가하지 않은 대조군에 대한 흡광도 감소를 수소공여능 활성으로 나타내었다.

마. Superoxide anion 소거능 측정

xanthin/xanthin oxidase 효소반응에 의한 superoxide (SO) 발생계를 이용하여 superoxide anion에 의한 cytochrome C 또는 nitroblue tetrazolim (NBT)의 산화에 의한 광흡수도 (530nm) 변화를 이용하여 측정하였다.

바. 지질과산화 저해화성 측정

적출된 마우스 간세포를 ultracentrifuge 하여 얻어진 microsome을 지질원으로 하여 Fe²⁺/ascorbate 계에 의한 lipid peroxidation 유도하고 생성된 MDA (malonaldehyde)를 TBA와 반응시켜 시료에 의해 감소된 MDA양을 정량화하였다. clean test tube에 시료가 함유된 간 microsome 용액 200 μ L 와 sodium dodecyl sulfate (SDS) solution 225 μ L를 가하고 5초간 vortex mixer로 혼합한후, 20%의 acetic acid, 75 μ L의 증류

수, 1.2% thiobarbituric acid 용액 1mL 씩 가하여 30분간 수욕상에서 boiling 하였다. 실온에서 30분 cooling한 후에 3000rpm에서 20분간 원심분리하여 상등액을 532nm에서 흡광도를 측정하여 시료를 첨가하지 않은 대조군에 대한 지질 과산화 저해활성(%)을 구하였다.

사. 다당류의 일반 분석 및 구성당 분석

총당 함량은 glucose를 표준물질로 하여 phenol-sulfuric acid법으로, 산성당 함량은 galacturonic acid를 표준물질로 하여 *m*-hydroxydiphenyl법으로, 단백질 함량은 bovine serum albumin을 표준물질로 하여 Lowry법으로 각각 정량하였다. 구성당 분석은 시료를 Jones 등의 방법⁽⁹⁾에 따라 2 M trifluoroacetic acid (TFA)로 121°C에서 1.5시간 가수분해한 후, sodium borohydride (NaBH₄)를 이용하여 alditol로 환원시킨 후, acetic anhydride (CH₃CO)₂O를 이용하여 각각 alditol acetate 유도체로 전환시켜 gas chromatography(GC)로 구성당을 분석하였다. GC의 분석은 3% OV-225 chromosorb WHP 100/120의 packed column이 장착된 Shimadzu GC 14A를 이용하고 최적 온도조건 (column temp. 205°C, injector temp. 230°C, detector temp. 230°C)에서 실시하였다. 구성당의 molar ratio는 각 peak들의 면적비와 구성당들의 alditol acetate 유도체의 분자량으로부터 계산하였다.

아. 항보체 활성 β-glucan의 정제

조다당 획분 (BS-WS)을 DEAE-Toyopearl 650C column (Cl⁻ form, 3.5 × 28.5 cm)에 흡착시킨 후 증류수로 세척하고 NaCl 농도를 증가시키면서 8개의 흡착획분 (BS-WS-TI →VIII)을 얻었다. 이 중 증류수에서 용출된 BS-WS-TI (300 mg)을 α 및 β-amylase를 처리하여 soluble β-glucan 이 88.1% 인 BS-WS-TIa 획분을 얻었다. 0.2M NaCl 용액으로 평형화된 Sephacryl S-300 (2.5 × 95 cm)에서 BS-WS-TIa를 분획하고 BS-WS-TIa-1, -2, -3 및 -4를 수득하여 활성을 측정한 결과 가장 고분자 획분인

BS-WS-TIa-1을 수득하여 SEC-MALLS (multi-angle-laser-light-scattering)를 이용하여 최종적으로 BS-WS-TIa-1A, B 및 C를 단리하여 분자량, 활성, 구성당 분석 및 당쇄 결합을 조사하였다. 모든 정제과정은 4°C에서 실시하였으며, 각획분들의 모니터링은 전당, 산성당, 단백질 함량과 항보체활성을 비교하였다.

자. 다당류의 당쇄결합 분석

BS-β-glucan의 당쇄결합을 조사하고자 DMSO에 1mg/mL의 농도로 용해시키고 질소 주입하에 carbarion 반응후에 iodomethane을 처리하여 permethylation 시켰다. 반응용매를 제거한 후에 2M TFA에 용해하여 121°C에서 2 시간 다당류를 가수분해시키고 난 후

sodium boronhydride (NaBH₄)를 이용하여 alditol로 환원시킨 후, acetic anhydride (CH₃CO)₂O를 이용하여 각각 methylated alditol acetate 유도체로 전환시켰다. 유도체는 Sep-Pak C₁₈ cartridge에 흡착시켜 분리하였으며, chloroform으로 용출하여 GC/MS 분석을 실시하였다. 분석조건은 SPB-1 capillary column과 온도프로그래밍을 이용하여 fragment ion을 분리하여 TIC 및 MS data를 얻어 당쇄결합을 분석하였다.

차. C3 활성화 조사를 위한 면역전기영동]

죽순 추출물의 보체용혈저해가 보체계 활성화로 인한 것인지 보체활성화의 억제로 인한 것인지 여부를 밝히기 위하여 시료를 처리한 NHS를 1차원 전기영동하고 anti-human C3 serum (goat developed, Sigma)에 대한 immunoblotting 면역전기영동을 통하여 확인하였다.

제 2항 결과

가. 활성조사를 위한 맹종죽 죽순의 추출물 제조 및 추출조건 확립

Fig. 13과 같이 동결건조된 맹족죽 죽순의 분말 (180g)을 5L의 70% 에탄올을 이용하

여 70±3°C에서 4시간 환류추출을 실시한 후, 여과 및 원심분리를 통하여, 얻어진 잔사에 대하여 동일한 방법으로 환류추출을 1회 더 실시하였다.

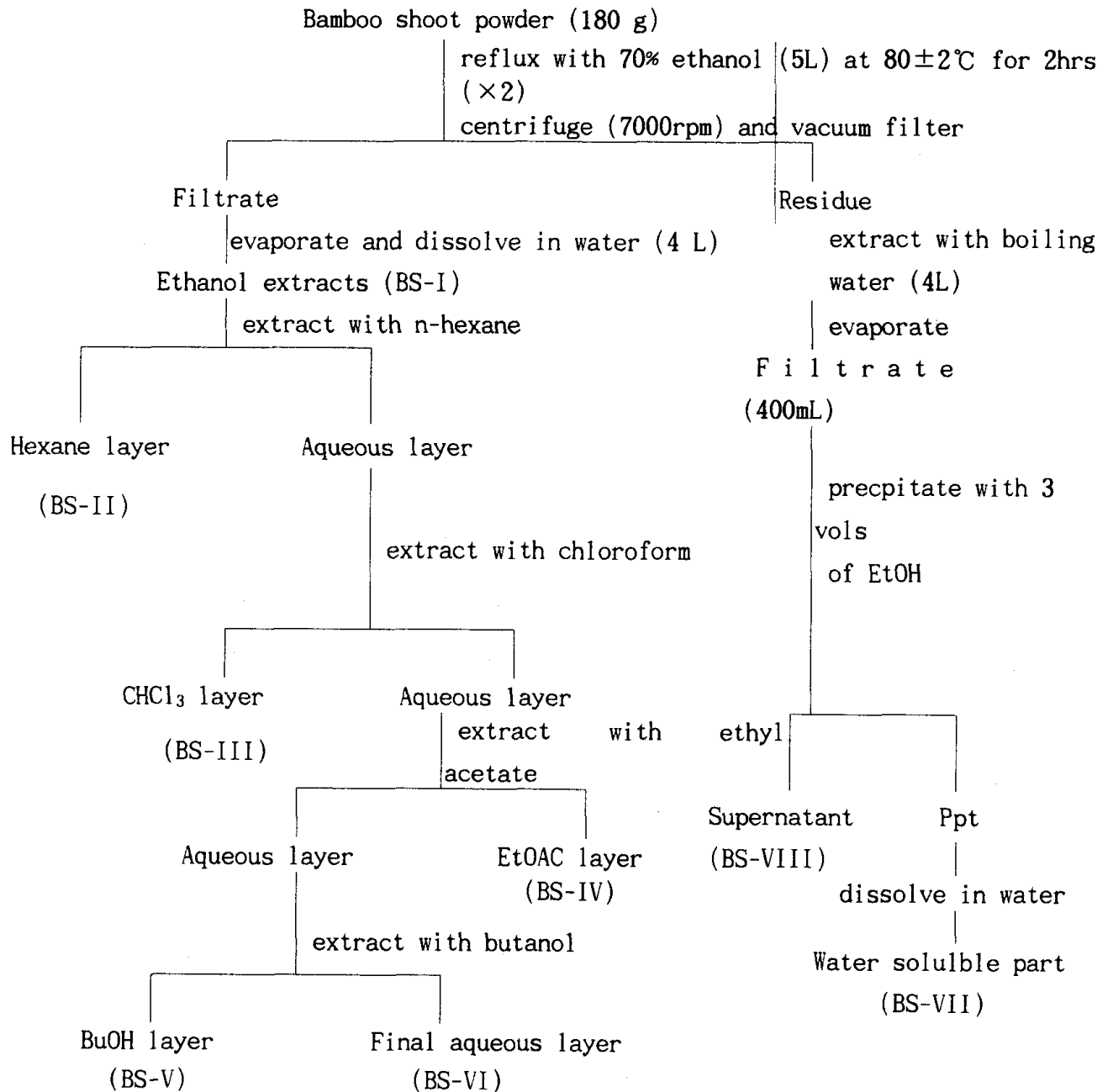


Fig. 13. Flow diagram for the extraction and fractionation of *Phyllostachys edulis* shoots.

1, 2회에 걸쳐 확보된 추출액을 감압농축하고 동결건조하여 얻어진 70% 에탄올 환류 추출 획분 (BS-1)은 약 29g 으로서 초기 죽순 분말 대비 약 16%의 수율을 보였다. BS-1을 약 4L의 증류수에 분산용해시켜 극성도 차이에 따라 Fig. 13과 같이 hexane, chloroform, ethylacetate, butanol 획분을 확보하였으며 죽엽의 용매 분획시와는 상당히 낮은 유기용매 추출도를 나타냄을 알 수 있었다. 아울러 BS-1 획분의 잔사에 대하여 열수추출을 행하였으며 얻어진 수추출물을 원심분리, 감압농축, 에탄올 침전을 이용하여 다당류획분을 확보하였다. 1차 연도의 죽엽의 추출결과와는 다르게 수추출 다당류 획분의 수율이 높았으므로, 이것을 다시 물에 대한 용해도에 따라 수용성 및 불용성 다당류로 분리하였으며, 각각의 획분에 대한 수율을 Table 7에 나타내었다.

Table 7. Yield of each fractions prepared from the extraction process of *Phyllostachys edulis* shoots

Fraction	Yield, % (g, weight of gain)
BS-I (70% EtOH reflux extracts)	16.06 (29.31)
BS-II (Hexane extracts of BS-I)	1.78 (3.20)
BS-III (CHCl ₃ extracts of BS-I)	1.00 (1.80)
BS-IV (EtOAC extracts of BS-I)	0.81 (1.45)
BS-V (BuOH extracts of BS-I)	3.42 (6.15)
BS-VI (Aqueous layer of BS-I)	4.93 (8.88)
BS-VII (Water soluble and insoluble fr. of EtOH ppt)	8.48 (15.26)
BS-VIII (EtOH supernatant of water extracts)	4.29 (7.72)

나. 죽순 추출물 획분들의 항산화 활성 탐색

죽순 추출물들의 항산화활성을 탐색하기 위하여 사용된 분석방법 들은 DPPH 유리라디칼 소거능, xanthin/xanthin oxidase 계에 의하여 발생된 활성산소들의 소거능, 쥐간내 microsomal lipid의 과산화저해활성, nitrite 소거능등 이었다. Fig. 2에 각 획분들의 항산화활성을 동일농도에서 측정하여 비교하여 나타내었다. 전반적으로 유리라디칼과 활성산소 소거능들이 죽엽 추출물에 비하여 낮은 활성을 나타내었으며, 각 활성간에 뚜렷한 상관성을 없었다 (Fig. 2). 비교적 활성이 높은 4가지 획분들에 대하여 농도별 (100, 500, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 DPPH free radical 소거능의 차이를 비교 실험한 결과 (Table 2), 시료농도의 감소에 따라 활성이 다소 감소하였으나, BS-IV (에틸아세테이트 획분)과 BS-V (butanol 획분)에서는 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서도 50% 이상의 (82.06 ± 0.84 , 66.2 ± 1.88) 높은 활성을 나타내었다. 그러나 반응시간에 따른 활성은 큰 차이가 없었다 (Fig. 4). 이는 반응계의 빠른속도와 안정성으로 볼 수 있어 시료들을 단시간에 screening 하는 항산화물질의 탐색에 용이하게 이용할 수 있을 것으로 알 수 있었다 (Fig. 4).

Table 8. Free radical scavenging activity of the selected extracts from the shoots of *Phyllostachys edulis*

Sample conc. ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	DPPH free radical scavenging activity (%)			
	BS-I	BS-IV	BS-V	BS-VI
500	60.23 ± 0.78	69.65 ± 0.58	71.38 ± 0.20	36.22 ± 1.05
250	27.47 ± 0.29	48.43 ± 0.42	56.16 ± 0.10	23.43 ± 0.61
100	14.43 ± 1.3	22.16 ± 0.18	36.20 ± 0.98	11.21 ± 0.76

Each value is mean \pm standard deviation of triplicate determination.

BS-I: 70% Ethanol reflux extracts, BS-IV: Ethylacetate layer of BS-I

BS-V: Butanol layer of BS-I, BL-VI: Final aqueous layer of BS-I

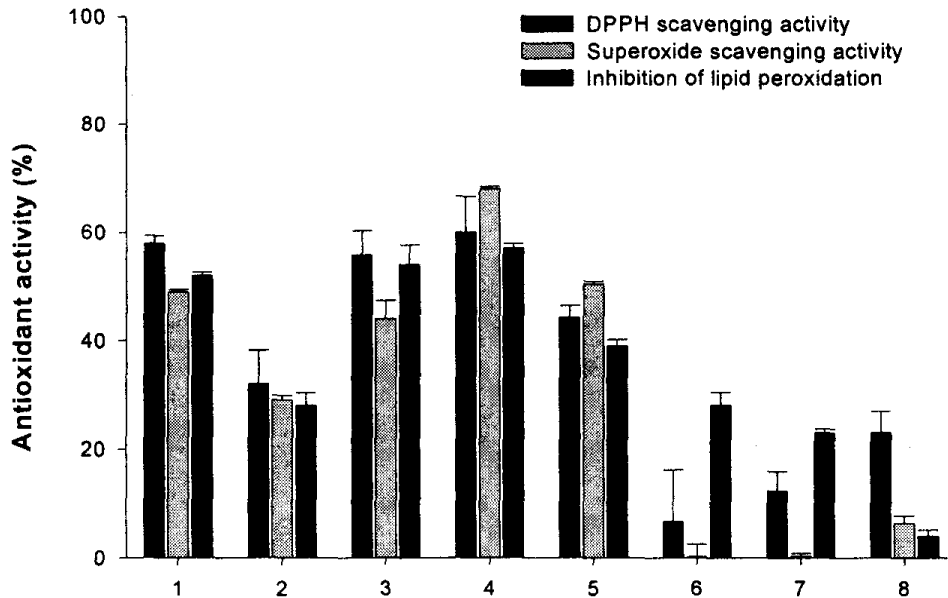


Fig. 14. Antioxidant activity of shoot extracts of bamboo *Phyllostachys edulis*. All samples were assayed at concentration of 1 mg/mL. 1, 70% EtOH reflux extracts; 2, hexane extracts of BS-I; 3, CHCl₃ extracts of BS-I; 4, EtOAc extracts of BS-I; 5, BuOH extracts of BS-I; 6, aqueous layer of BS-I; 7, water soluble and insoluble fr. of EtOH ppt; 8, EtOH supernatant of water extracts

다. 죽순 추출물 획분들의 항보체 활성 탐색

Fig. 1의 방법으로 조제된 맹종죽엽의 추출물들을 증류수 또는 5%의 DMSO에 1mg/mL의 농도로 용해시킨 후 Mayer 방법에 준하여 항보체활성을 측정하여 Fig. 3에 ITCH₅₀(%) 값으로 나타내었다. 1차년도 결과에서 죽엽의 수추출물은 항보체활성이 높지 않았으나 (28.40±0.83), 죽순 추출물의 경우, ethylacetate > water-soluble polysaccharide > water-insoluble polysaccharide 순서로 활성이 높았다. 항보체활

성이란 정상인의 혈청중에 존재하는 보체를 IgM으로 감작화시킨 면양의 적혈구를 이용하여 보체의 결합소비반응을 유도하였을 때 시료에 의한 보체소비 저해율을 의미한다. 따라서 본 반응계에서는 보체활성화의 저해시에도 양의 값으로 나타난다. 일반적으로 천연물의 수추출물에서 항보체활성이 높게 나타나면 보체계 활성화 다당류의 경우가 대부분이나, 이와 같이 유기용매 추출물에서 활성이 나타날 경우 보체계 활성화 작용이 알려져 있는 phytosterol 류이거나 보체계의 활성화를 억제하는 저해물질일 가능성이 높다고 하겠다. 죽순의 에틸아세테이트 추출물에 대하여 보체계의 활성화 여부를 확인하는 anti-C3 면역전기영동실험이 필요할 것으로 보이나 당초 계획대로 보체계 활성화 다당류의 존재 가능성이 높은 죽순의 수용성 및 불용성 다당류획분에 대하여 활성 다당류를 정제 하고자 한다.

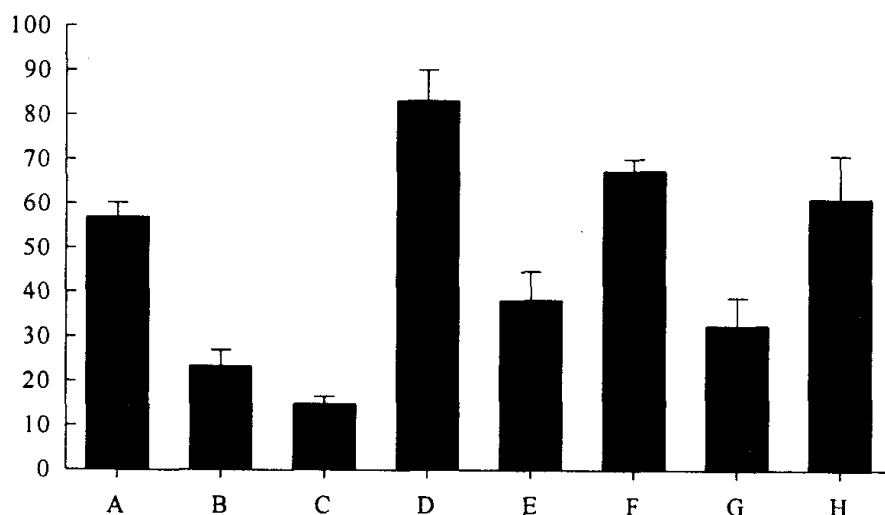


Fig. 15. Anticomplementary activity (%) of shoot extracts (1 mg/mL) of bamboo *Phyllostachys edulis*. A, 70% EtOH reflux extracts; B, hexane extracts of BS-I; C, CHCl₃ extracts of BS-I; D, EtOAc extracts of BS-I; E, BuOH extracts of BS-I; F, water soluble polysaccharide fr. of EtOH ppt; G, aqueous layer of BS-I; H, water insoluble polysaccharide fr. of EtOH ppt]]

라. 죽순 다당류 획분의 화학적 조성 및 구성당 분석

70% 에탄올 환류추출 잔사에 대하여 열수추출로 얻어진 획분을 에탄올 및 아세톤 침전과 투석등을 통하여 고분자 다당류 획분을 얻었으며 다시 수용성 및 불용성 다당류로 분획하여 항보체 활성을 측정한 결과 60% 이상의 비교적 높은 활성을 나타내었으므로, 이들 획분에 대하여 활성 다당류의 정제에 우선하여 화학적 조성과 구성당 분석을 행하였다. Table 3의 결과에서 수용성 다당류인 BS-WS는 전당함량이 64.8%, 단백질이 32.4%로 존재하였으며, 전당에서 산성당이 21.8% 함유되어 있었다. 불용성 다당류 BS-WI는 거의 대부분 탄수화물로 (98.2%)로 존재하였으며, 대부분 중성당 (91.6%)로 구성되어 있었다. 이들 다당류 획분의 중성당 구성당 분석 결과 (Table 4), BS-WS는 arbinose : xylose : mannose : galactose : glucose 가 2.09 : 0.88 : 0.89 : 1.90 : 4.46 의 비율로 함유되어 있었고, BS-WI는 arbinose : xylose : mannose : galactose : glucose 가 0.12 : 2.21 : 8.23 : 0.45 : 0.35 의 비율로 구성되어 있었으며, rhamnose 와 fucose 는 함유되어 있지 않았다.

Table 9. Chemical composition of BS-polysaccharide

	BSwater-soluble polysaccharide	BS water-insoluble polysaccharide
Total sugar (%)	64.8	95.4
Neutral sugar (%)	78.6	91.6
Uronic acid (%)	21.2	5.2
Protein (%)	32.4	-

Table 10. Neutral sugar composition of BS-polysaccharides

	BS-WS ^a	BS-WI ^b
Molar ratio		
Rhamnose	-	-
Fucose	-	-
Arabinose	2.09	0.12
Xylose	0.88	2.21
Mannose	0.89	8.23
Galactose	1.90	0.45
Glucose	4.46	0.35

^aBS water-soluble polysaccharide, ^bBS water-soluble polysaccharide; For the sugar composition analysis, polysaccharides were hydrolyzed with 2 M trifluoroacetic acid at 121°C for 1.5 h, and the resulting reducing sugars were converted into the corresponding alditol acetates, applied onto a Young Lin GC capillary column (OV-225 Uniport, 0.2 i.d. x 200 cm), and detected with a flame ionization detector (FID).

마. 죽순의 수용성 다당류 획분으로부터 항보체성분의 정제

조다당 획분 (BS-WS)을 DEAE-Toyopearl 650C column (Cl⁻ form, 3.5 × 28.5 cm)에 흡착시킨 후 증류수로 세척하고 NaCl 농도를 증가시키면서 8개의 흡착획분 (BS-WS-TI →VIII)을 얻었다 (Fig. 16). 이 중 증류수에서 용출된 BS-WS-TI (300 mg) 획분이 활성이 가장 높았다. 이 획분의 구성당 분석시 특히 glucose 함량이 높아 이 획분에 보체계 활성화 β-glucan의 존재가능성을 시사하여 β-glucan 함량을 조사한 결과 약 38% 함유되어 있었다. 따라서 이 획분으로부터 죽순 유래 수용성 β-glucan을 분리하기 위하여 BS-WS-TI를 적당한 완충용액에 용해시킨 후 α 및 β-amylase를 처리하여 soluble β-glucan 이 88.1% 인 BS-WS-TIa 획분을 얻었다.

0.2M NaCl 용액으로 평형화된 Sephacryl S-300 (2.5 × 95 cm)에서 BS-WS-TIa를 분획하고 BS-WS-TIa-1, -2, -3 및 -4를 수득하여 (Fig. 17) 활성을 측정한 결과 가장 고분자 획분인 BS-WS-TIa-1을 수득하여 SEC-MALLS (multi-angle-laser-light-scattering)를 이용하여 최종적으로 BS-WS-TIa-1A, B 및 C (Fig. 18)를 단리하여 분자량, 활성, 구성당 분석 및 당쇄결합을 조사하였다. 모든 정제과정은 4℃에서 실시하였으며, 각 획분들의 모니터링은 전당, 산성당, 단백질 함량과 항보체활성을 비교하였다 (Fig. 19).

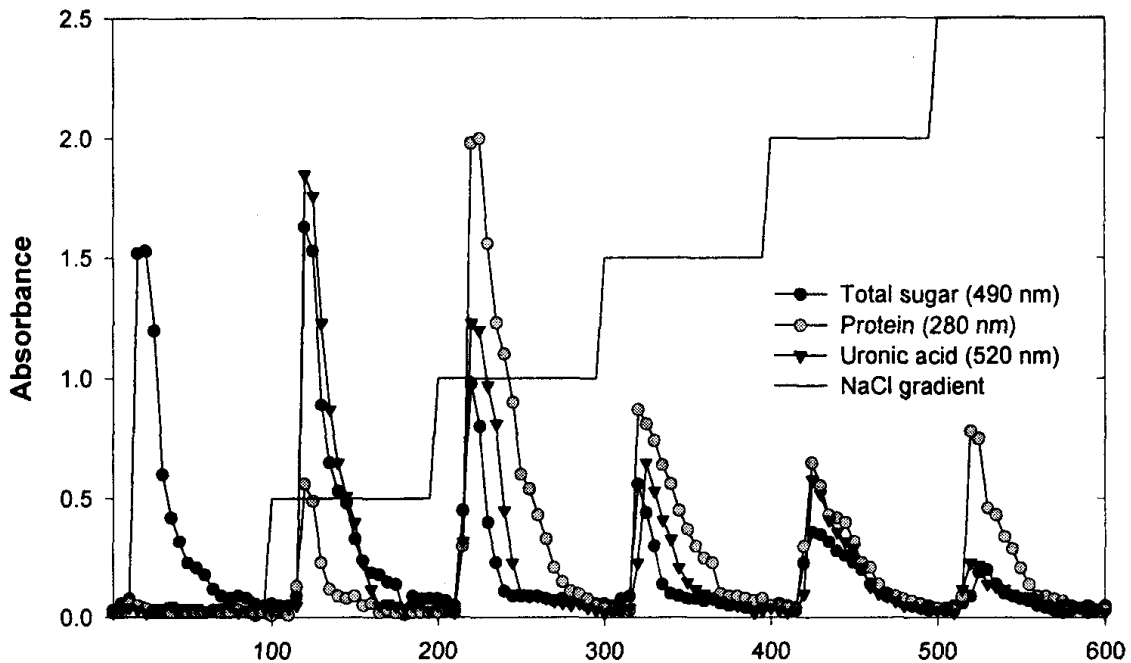


Fig. 16. DEAE-Toyopearl 650 C chromatography of BS-WS fraction

The water-soluble polysaccharide fraction (3g) was applied to a IEC column (40x5 cm) of DEAE-Toyopearl 650C and eluted with a step-wise gradient NaCl (0-0.5 M), and each fraction (7 mL) was collected and monitored by the contents of sugar and protein

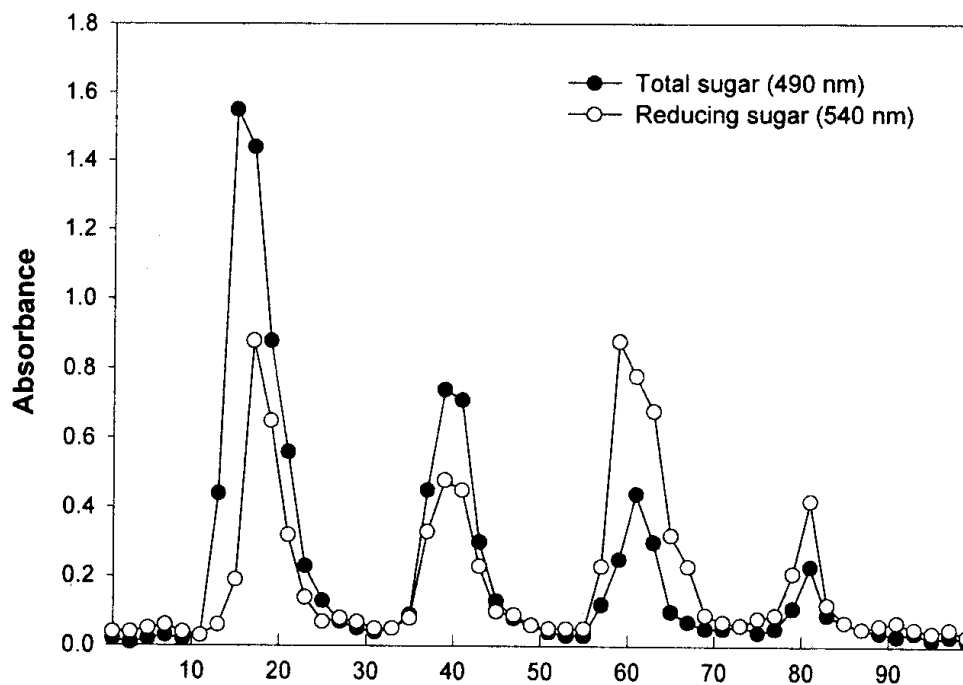


Fig. 17. Sephacryl S-300 chromatography of BS-WS-TIa fraction

The unbound fraction on DEAE-Topearl chromatograph was applied to a GPC column of Sephacryl S-300 (95 x 2.3 cm) and eluted with 0.2 M NaCl, and each fraction (7 mL) was collected and monitored by the content of total and reducing sugars.

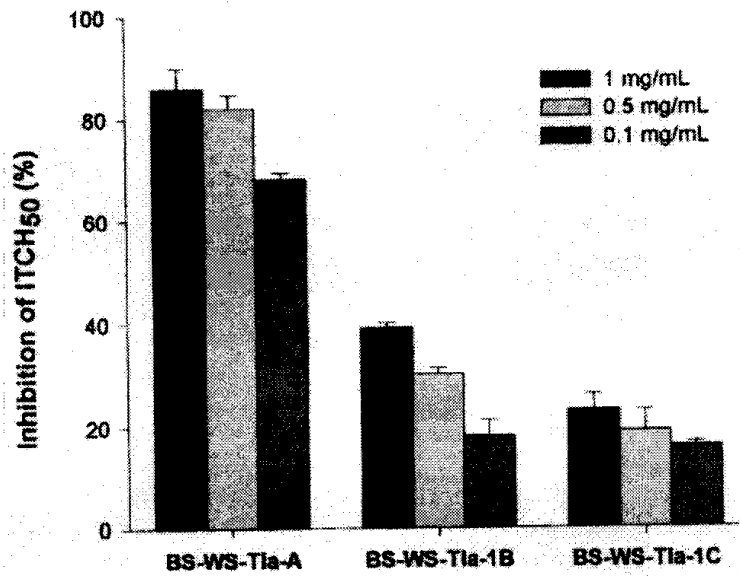
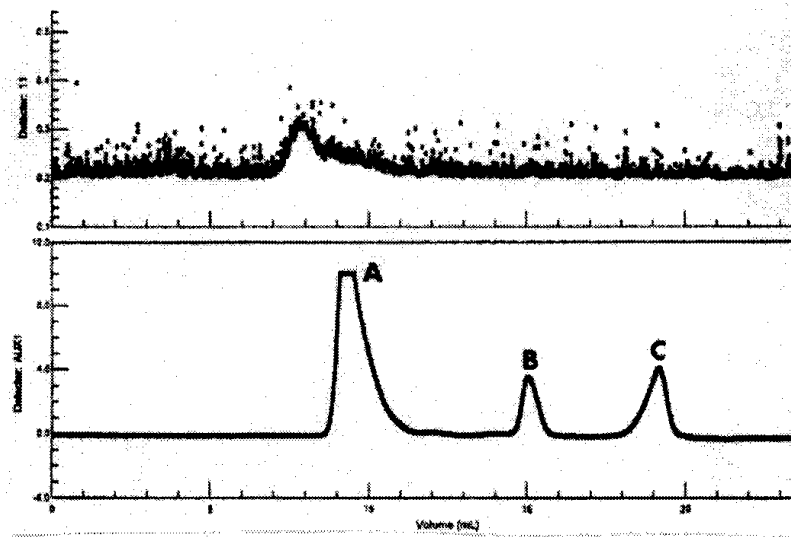


Fig. Anti-complementary activity of the subfractions of BS-WS-Tia-1 separated by SEC-MALLS

Fig. 18. Anticomplementary activity of the subfractions of BS-WS-Tia-1 separated by SEC-MALLS

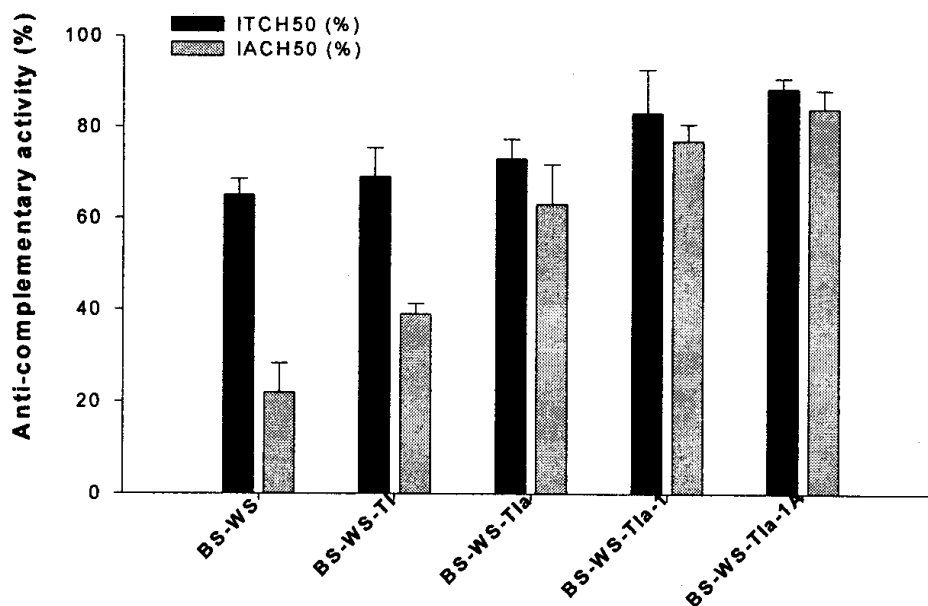


Fig. 19. Anticomplementary activity of each polysaccharide fraction obtained from the purification steps of *Phyllostachys edulis* shoot extracts. Anticomplementary activity was measured at a concentration of 1 mg/mL.

바. 죽순 항보체 활성 다당류 획분들의 화학적 조성과 항보체 활성

Glucose 함량이 높은 수용성 다당류 획분인 BS-WS 획분으로부터 수용성 보체계 활성화 β -glucan을 얻고자 α -amylase 및 β -amylase를 처리하고 비 소화획분을 DEAE-Topearl 650 C 이온교환 크로마토그래피 및 Sephacryl S-300 겔여과 크로마토그래피를 이용하여 보체계 활성화 β -glucan 획분인 BS-WS-TIa-1를 수득하였다. 상기획분을 SEC-MALLS (multi-angle-laser-light-scattering)를 이용하여 정제한 결과 분자량이 약 85000 Da인 BS-WS-TIa-1A와 약 18000 Da인 BS-WS-TIa-1B 및 약 11000 Da인 BS-WS-TIa-1C를 최종적으로 분리 할 수 있었다. 세 획분에 대하여 항보체 활성을 측정한 결과 분자량 크기가 가장 큰 BS-WS-TIa-1A가 가장 높은 활성을 나타내었으며, 분자량크기가 상대적으로 작은 BS-WS-TIa-1B 및 BS-WS-TIa-1C는 낮은 항보체활성을 나타내었다.

Table 11. Chemical composition of each active fraction obtained from the purification steps

	BS-WS	BS-WS-T1	BS-WS-T1a	BS-WS-T1a-1	BS-WS-T1a-1A
Total Carbohydrate (%)	64.8	89.3	93.5	95.6	98.7
Uronic acid (%)	21.2	-	-	-	-
Soluble β -glucan (%)	17.4	38.0	88.1	92.3	96.1
Protein (%)	32.4	2.6	1.0	-	-
Structural monosaccharide (%)					
Rhamnose	1.9	1.0	-	-	-
Fucose	0.1	-	-	-	-
Arabinose	2.3	1.3	0.6	-	-
Xylose	5.0	4.2	1.8	0.5	0.2
Mannose	1.2	0.5	0.9	0.2	-
Galactose	1.8	1.5	1.0	0.9	0.3
Glucose	17.5	18.2	21.7	30.9	33.4
Galacturonic acid	0.5	-	-	-	-
Glucuronic acid	12.5	-	-	-	-
Mannuronic acid	0.1	-	-	-	-

Table 11은 각 정제 단계에서의 주요획분에 대하여 탄수화물분석과 단백질 함량, β

-glucan 함량 및 구성당 조성을 조사하여 나타내었다. 초기에 BS-WS 획분에 17.4%의 수용성 β -glucan과 17.5 mol%의 glucose 함량이 정제 후의 BS-WS-T1a-1A에 96.1% 수용성 β -glucan과 33.4 mol%의 glucose로 구성되어 있었으며 정제과정에 따라 glucose 함량과 β -glucan 함량은 뚜렷이 증가하였으며, 초기 획분에 존재하던 단백질 및 xylose와 galacturonic acid 등은 거의 제거됨을 알 수 있다. 이들 획분들의 항보체활성을 전체경로와 부경로의 활성을 동시에 측정 비교하였을 때 항보체 활성 특히 부경로의 활성이 뚜렷하게 증가됨을 알 수 있었으며 (Fig. 19). 최종 정제 획분을 의 보체 활성화를 보체 성분중 중심경로의 성분이 되는 C3에 대한 개열 여부를 조사하고자 다당류를 보체와 Ca^{2+} 이온과 Mg^{2+} 이온의 존재조건을 달리한 완충액을 이용하여 각각 preincubation 한 후 anti-C3에 대하여 면역전기영동 한 결과 (Fig. 20) 대조군과 달리 죽순 다당류와 반응된 혈청 중의 C3 가 뚜렷하게 cleavage 됨을 확인할 수 있었고, 부경로 반응 조건에서도 역시 동일한 패턴을 보임으로써 죽순에서 분리한 β -glucan이 보체 부경로를 강하게 활성화 시킴을 알 수 있었다.

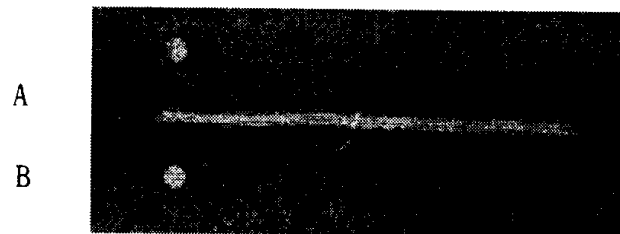


Fig. 20. Immuno-electrophoresis of C3 component treated by anticomplementary active BS- β -glucan A, NHS only B, Water-soluble BS- β -glucan, ES-BS-T1a-1A

사. 죽순에서 분리된 수용성 β -glucan의 구조분석

Fig. 18의 SEC-MALLS에서 분리되어진 죽순 β -glucan인 BS-WS-T1a-1A와 BS-WS-T1a-1A의 활성의 요소가 분자량의 크기외에 구조적 특성에 기인 할 수 있음을 예측하여 두

다당류의 당쇄결합 분석을 실시하였다. Fig. 21과 22 에서의 methylated polysaccharide들의 가수분해 후 acetylation한 구성당의 GC/MS pattern과 TIC를 비교 할 때 상당한 차이가 있음을 알 수 있었다. 각 다당류의 당쇄조성을 분석한 결과 BS-WS-T1a-1A는 주로 β -1,4- 및 β -1,3-당쇄로 구성되어 있었으며 BS-WS-T1a-1B의 경우 Terminal glucose의 함량이 BS-WS-T1a-1A에 비하여 높게 함유되어 있었으며, β -1,6 당쇄 및 기타 브랜치 residue도 혼재하여 있었으므로 이러한 구조적 특성이 항보체활성에 중요한 영향을 미치는 것으로 사료되었다. 또한 BS-WS-T1a-1A의 NMR 분석의 결과 (Fig. 23) 전형적인 β -anomer들의 H-1 signal들과 C-1 signal들이 관찰되었으며, 다당류내에 acetyl 잔기도 일부 존재함으로써 이들의 substitution의 특성도 활성화에 기여 할 수 있으리라 사료되었다.

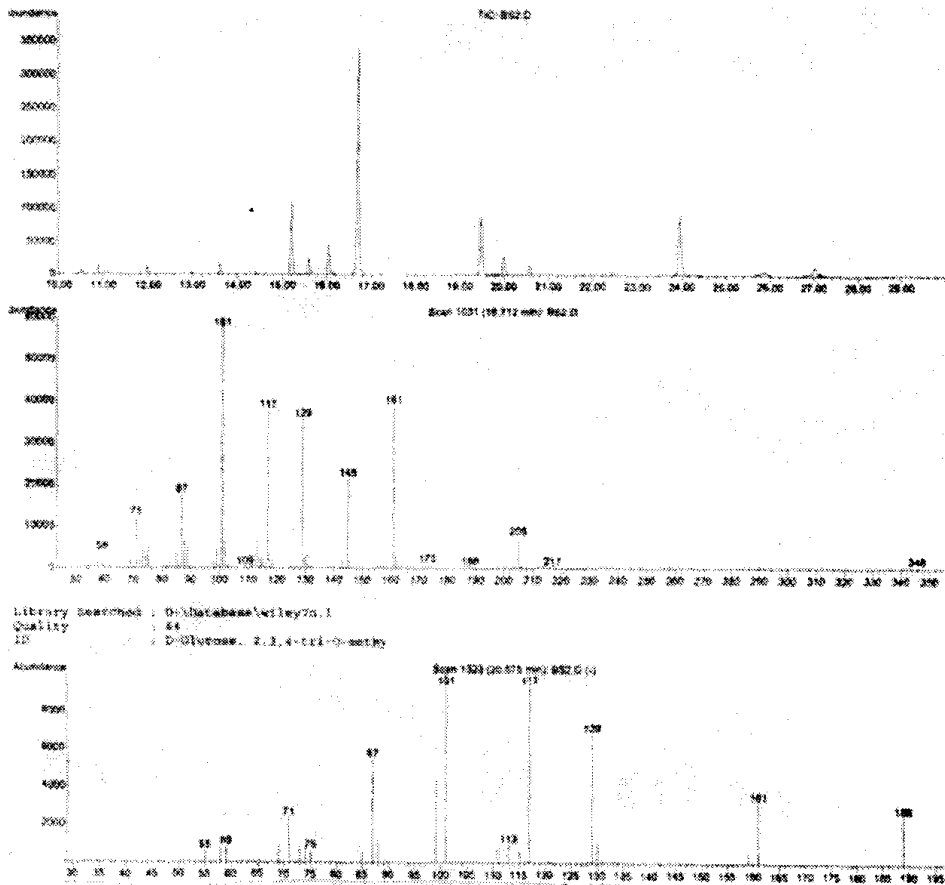


Fig. 21. TIC and GC/MS pattern of partially methylated BS-WS-T1a-1A

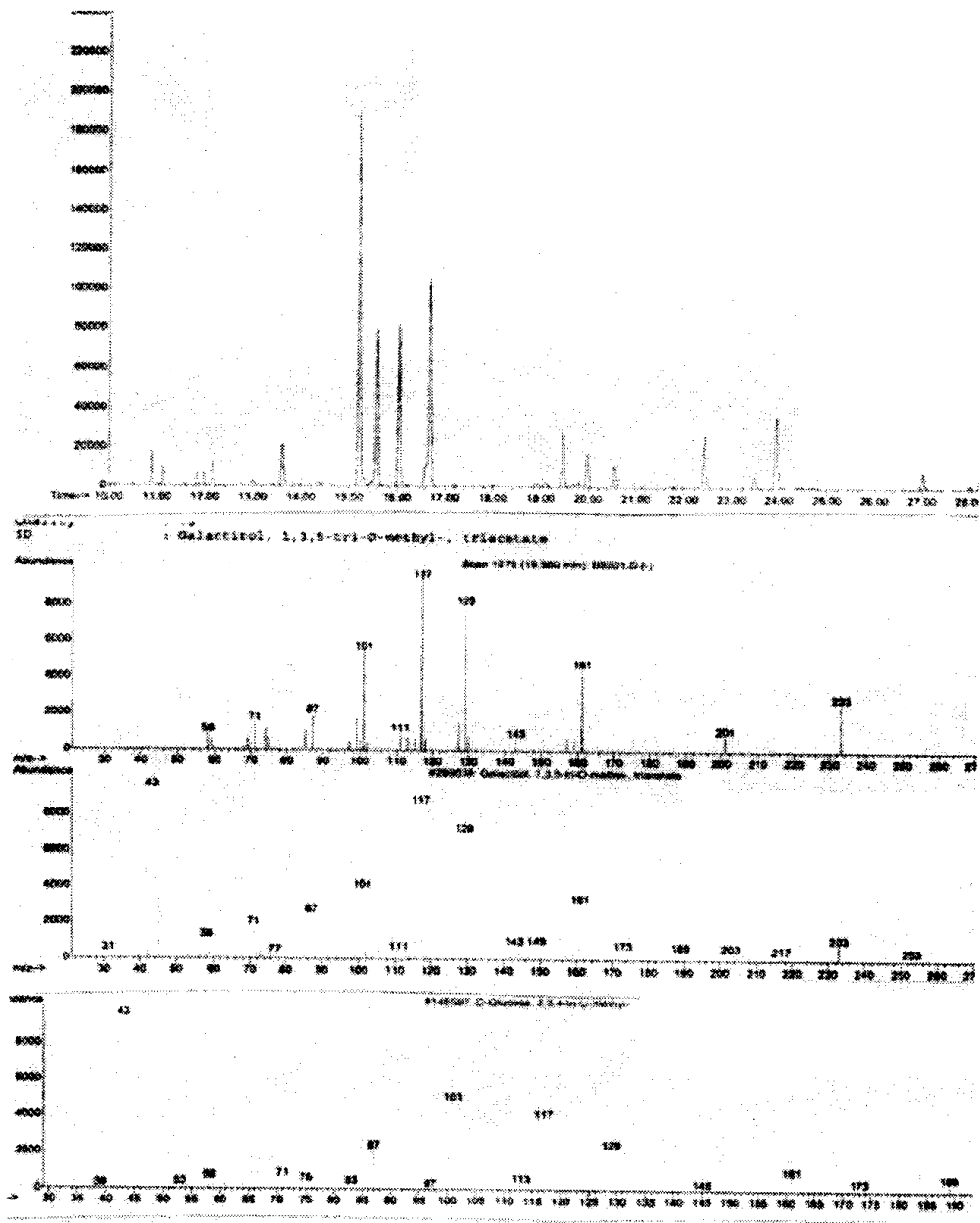


Fig. 22. TIC and GC/MS pattern of partially methylated BS-WS-T1a-1B

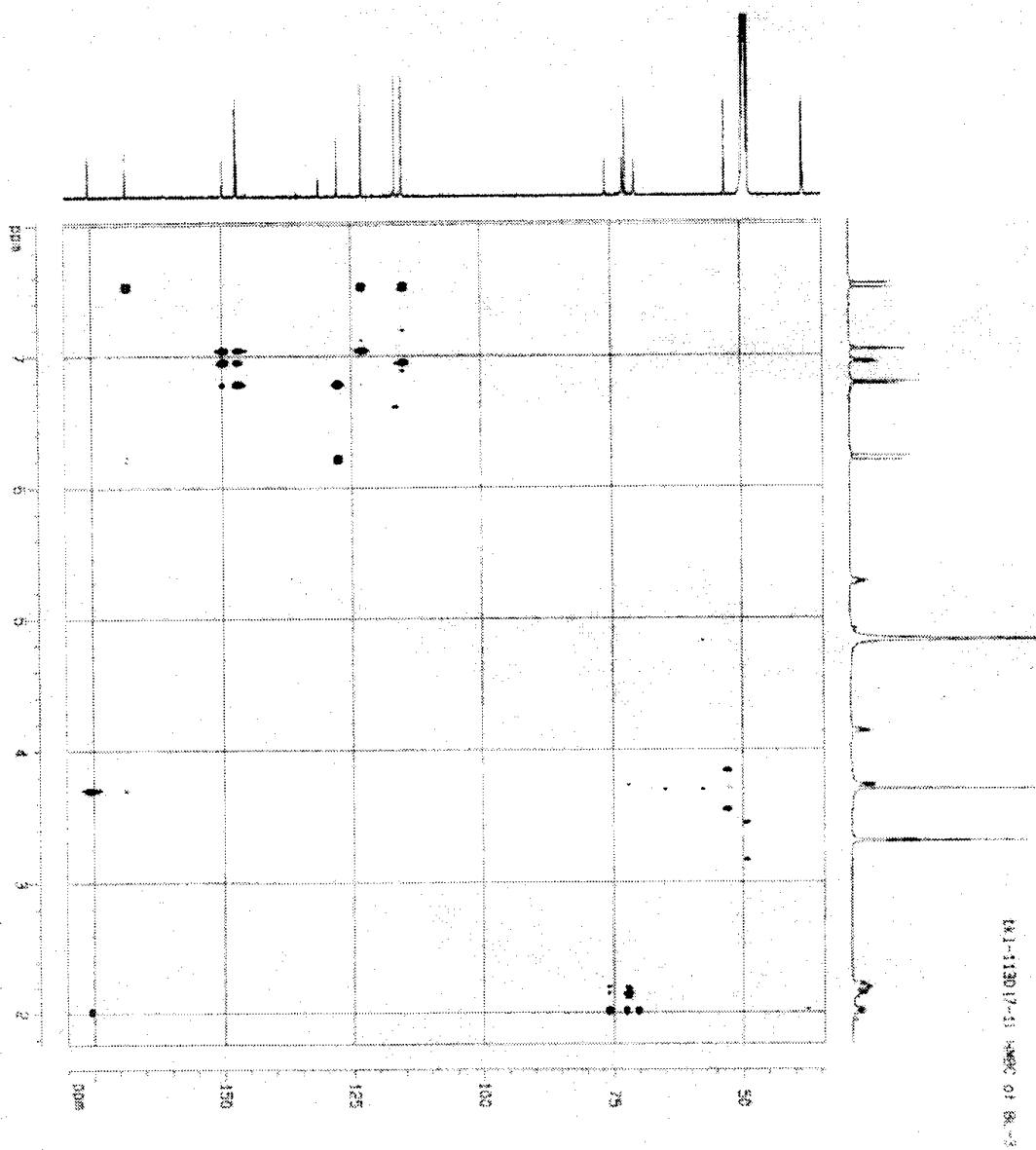


Fig. 23. HMBC pattern of partially methylated BS-WS-T1a-1A

제 4절 죽순 및 죽엽 제품내 활성 조사

표 1. 죽순 및 죽엽제품의 유리라디칼 소거활성

	유리 라디칼 소거능 (%)	
	N1	N2
죽엽차	26.8	43.8
죽순차	18.6	26.3
죽순원액	17.5	27.8
녹엽 혼합 죽엽차	51.0	59.3
등글레잎 혼합 죽엽차	22.1	31.7
죽순 캔 음료	10.8	13.2

※시료제조방법: N1, 차 티백의 경우 1 티백을 85℃의 100 mL의 물에 3분간 침출한액 죽순원액과 음료의 경우, 측정시 ×1의 양으로 측정함.

N2, 차티백의 경우 2 티백을 85℃의 100 mL의 물에 3분간 침출한 액 죽순원액과 음료의 경우, 측정시 ×2의 양으로 측정함.

표 2. 죽순 및 죽엽제품의 지질과산화 저해활성

	지질과산화 저해활성 (%)	
	N1	N2
죽엽차	52.7	63.6
죽순차	23.4	39.1
죽순원액	26.7	41.4
녹엽 혼합 죽엽차	77.0	79.2
등글레잎 혼합 죽엽차	43.8	57.8
죽순 캔 음료	0	0

※시료제조방법: N1, 차 티백의 경우 1티백을 85℃의 100 mL의 물에 3분간 침출한 액 죽순원액과 음료의 경우, 측정시 ×1의 양으로 측정함.

N2, 차티백의 경우 2 티백을 85℃의 100 mL의 물에 3분간 침출한 액 죽순원액과 음료의 경우, 측정시 ×2의 양으로 측정함.

표 3. 죽순 및 죽엽제품의 항보체 활성

	항보체활성 (ITCH ₅₀ , %)	
	N1	N2
죽엽차	43.9	45.6
죽순차	51.4	60.1
죽순원액	68.9	72.4
녹엽 혼합 죽엽차	54.7	63.8
등글레잎 혼합 죽엽차	33.8	36.5
죽순 캔 음료	21.6	22.3

※시료제조방법: N1, 차 티백의 경우 1티백을 85℃의 100 mL의 물에 3분간 침출한 액 죽순원액과 음료의 경우, 측정시 ×1의 양으로 측정함.

N2, 차티백의 경우 2 티백을 85℃의 100 mL의 물에 3분간 침출한 액 죽순원액과 음료의 경우, 측정시 ×2의 양으로 측정함.

표 4. 죽순 및 죽엽제품의 α-glucosidase 저해활성

	α-glucosidase 저해활성(%)	
	N1	N2
죽엽차	45.2	56.8
죽순차	36.3	42.0
죽순원액	39.8	52.4

※시료제조방법: N1, 차 티백의 경우 1티백을 85℃의 100 mL의 물에 3분간 침출한 액 죽순원액과 음료의 경우, 측정시 ×1의 양으로 측정함.

N2, 차티백의 경우 2 티백을 85℃의 100 mL의 물에 3분간 침출한 액 죽순원액과 음료의 경우, 측정시 ×2의 양으로 측정함.

표 5. 제품내 총페놀 및 β -glucan 함량

	함량 (mg/100 mL)	
	Total phenol	Soluble β -glucan
죽엽차	12.3	2.9
죽순차	25.0	5.8
죽순원액	12.1	39.2
녹차	110.6	0.9

티백시료 조제는 85℃의 물에 1 티백을 3분간 침출 후 분석에 사용하였고, 죽순원액을 그대로 사용하였음. 녹차 시료는 비교 분석 용으로 시중의 화개장터 녹차를 사용함.

[결과평가]

1. 죽엽차 제품에서 유리라디칼 소거 및 지질과산화저해 활성이 관찰 됨.
2. 죽순차 및 죽순원액의 경우 항산화활성은 죽엽차 제품보다 낮았으나 항보체 활성은 높게 나타남.
3. 죽엽 및 죽순 차제품과 죽순 원액에서 α -glucosidase 저해활성이 관찰됨.
4. 죽순 원액의 경우 주요 항보체활성 성분이 되는 수용성 β -glucan 함량이 현저하게 높았음.
5. 총 페놀함량은 죽순차 제품에서 높게 나타남.

[기대효과]

1. 죽엽을 이용한 노화억제효과가 기대되는 기능성 차 제품 및 화장품 개발
2. 죽순을 면역강화 및 체력보강이 기대되는 기능성 차 제품 개발
3. α -Glucosidase 저해활성은 식후 혈당의 급격한 상승을 억제할 수 있으므로 당뇨병 및 비만의 예방을 위한 기능성 식품으로 개발
4. 건강 보조제 죽순 β -glucan 의 개발

제 4 장 죽엽차 및 죽순음료의 제조

가. 죽엽의 일반성분 분석

죽엽의 일반성분 분석은 수분, 단백질, 탄수화물, 지방, 회분 분석을 실시하였으며, 결과는 Table 1에 나타내었다. 전체적으로 수분의 함량이 가장 높았으며, 탄수화물과 단백질, 회분 지방의 순으로 나타났다. 죽엽의 무기질은 냉동건조된 시료를 회화로에서 회화시켜 냉각한 다음 0.5N 질산용액에 용해하여 여과한 후 각 성분을 ICP-OES의 방법으로 분석하였다. 조사한 무기질성분 함량을 Table 2에 나타내었다. 죽엽에 특히 많이 함유되어 있는 무기질은 K, Ca, P이며 소량의 Se도 함유함을 알 수 있다.

Table 1. 죽엽의 일반 성분분석

	수분	단백질	탄수화물	지방	회분
함량(%)	47.5	7.2	38.6	0.13	6.6

Table 2. 죽엽의 무기질 성분

	마그네슘 (Mg)	칼슘 (Ca)	나트륨 (Na)	칼륨 (K)	인 (P)	아연 (Zn)	철 (Fe)	망간 (Mn)	셀레 늄 (Se)
함량 (mg/g)	15.113	41.311	3.885	226.68 0	47.260	0.362	0.607	9.804	0.088

나. 죽엽 증숙차의 제조

죽엽차는 증숙과정을 거친 것과 증숙과정을 거치지 않은 것으로 나누어 제조하였다. 증숙을 위해 찜통에서 약 15분간 처리하였으며, 덫음과정은 약 80-90℃에서 수분함량이 5%전후되게 한 후 20-80 메쉬정도로 분쇄하여 티백포장을 하였다. (그림. 7) 증숙하지 않은 경우의 색이 증숙을 한 것보다 색이 좋았으나 침출시 차의 색은 옅었으며 맛도 약했다.

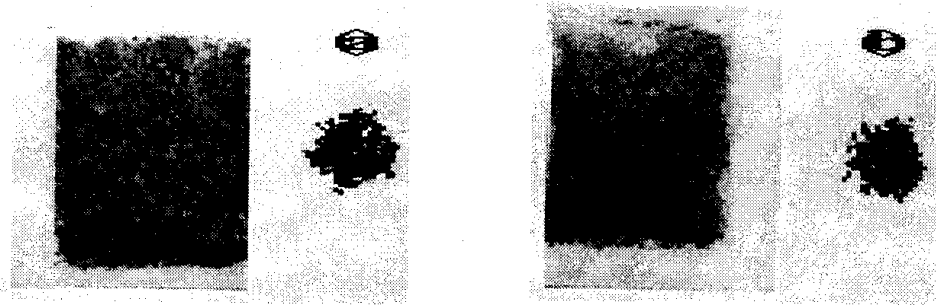


Fig. 7. 시제품으로 제조된 증숙 및 미증숙 죽엽차

(a) 증숙 죽엽차

(b) 미증숙 죽엽차

다. 죽엽 침출차의 제조

제조방법은 원료를 증숙한 후 남아있는 물기를 제거하기 위해 약 4시간 정도 상온 건조를 시키고, 150~180℃에서 20분 정도 볶음과정을 거친 후 20-80mesh 되게 분쇄하여 시료를 조제하였다. 이렇게 제조된 죽엽시료 1.5g정도를 티백에 넣어 죽엽 침출차를 제조하였다.

이 죽엽차를 온수(약 95℃) 100ml에서 침출시킨 후 향, 맛, 색택의 관능적 특성을 검토한 결과를 Table 3에 나타내었다. 관능검사 결과 향의 경우 성숙한 죽엽을 상온 건조한 원료 A가 가장 좋게 나타났으며, 맛은 상온 건조한 성숙한 죽엽과 하지에 채취한 죽엽 새순 B와는 비슷했으나 건조하지 않은 성숙한 죽엽 C와는 맛에서 많은 차이를 보였다. 색택에서는 B, C시료가 좋은 것으로 나타났으며, 종합 기호도면에서는 A시료가 B, C에 비해 기호도가 우수한 것으로 나타났다.

Table 3. 죽엽차의 관능검사 결과

시료 \ 항목	향	맛	색택	종합 기호도
A	3.4*	3.1	3.1	3.9
B	3.0	3.0	3.4	3.2
C	2.3	2.5	3.4	1.5

A : 성숙한 죽엽을 상온 건조시킨 것.

B : 하지 전후하여 채취한 죽엽 새순을 상온건조 시킨 것.

C : 성숙한 죽엽을 그대로 사용한 것.

* : 매우좋다(5), 좋다(4), 보통이다(3), 나쁘다(2), 매우나쁘다(1)

표3의 결과를 토대로 맛에 변화를 주기위해 기존 죽엽 100%사용외에 죽순과 녹차, 현미를 혼용하여 소비자에 맞는 혼합죽엽차를 제조하여 표4와같이 관능검사를 실시하였다. 그 결과 죽엽 50%에 녹차 25%와 현미 25%를 혼용하여 소비자들의 입맛에 맞게 제품화 하였다.

Table 4. 혼합죽엽차의 관능검사 결과

시료 \ 항목	향	맛	색택	종합 기호도
A	3.7*	4.3	3.2	3.73
B	3.8	4.2	3.1	3.7
C	2.8	2.9	3.1	2.93

A : 죽엽 50%, 녹차 25%, 현미 25%.

B : 죽엽 30%, 죽순 30%, 녹차 20%, 현미 20%.

C : 죽엽 50%, 죽순 50%.

* : 매우좋다(5), 좋다(4), 보통이다(3), 나쁘다(2), 매우나쁘다(1)

(1) 원료배합비

원료명	투입량(Kg)	배합비(%)
볶은 죽엽	7.5	50
녹 차	3.75	25
볶은 현미	3.75	25
소 계	15	100

(2) 제조공정

공정	공정 설명
죽엽수확	죽엽을 수확한 후 깨끗이 세척한다.
↓	
절단	자동 절단기를 이용하여 약 5-7cm가 되게 절단한다.
↓	
증숙	98℃에서 약 5분간 steam처리한다.
↓	
건조	40~60℃의 열풍건조기에서 4~8hr 건조하여 수분함량이 20-30%되게 한다.
↓	
1차 볶음	건조된 죽엽을 볶음기에서 120℃, 10~15분간 볶는다. 수분함량 15±3%가 되게 볶는다.
↓	
2차 볶음	볶음기 온도 160-180℃에서 약 20분간 볶는다. 수분함량 5% 이하가 되도록 한다.
↓	
조분쇄	핀밀을 이용하여 거칠게 분쇄한다.
↓	
체별	체별기를 이용하여 20~80mesh 크기의 제품을 포장기로 이송한다.
↓	
혼합	볶은현미와 녹차를 죽엽에 일정비율로 혼합한다.
↓	
포장	티백포장기를 이용하여 포장 제품화 한다.

라. 죽엽 분말차 및 과립차의 제조

분말차 제조를 위해 물로 가압 추출을 한 결과 추출액의 Brix농도가 1Brix 미만으로 매우 낮아 25Bx까지 농축한 후 부형제로 Dextrin을 혼합하여 분무건조기에서 분무하여 분말차를 제조하였다. 이 분말차 100%와 과립차와 혼합하는 제품, 과립차 100%제품으로 샘플을 제조하여 관능검사를 실시한 결과 과립차 100% 제품이 우수한 것으로 나타나 과립차가 인스턴트 차로 사용하기 좋은 것으로 사료되어 과립차로 대체하게 되었다. 과립차의 제조는 죽엽을 원료 1에 물 10의 비율로 가압추출(110 ℃에서 3시간)을 실시하였다. 죽엽 농축 추출물을 25Brix 정도로 농축후 배합비율을 약 5%정도, 포도당 80~90%정도, 부원료등을 혼합하여 과립기에서 과립화 시킨다. 다음에 95℃에서 약 1시간 건조후 입도 조절체를 이용하여 선별하고 포장기를 이용하여 개당 8~9g 씩 포장한다.

Table 5. 죽엽 고품추출차의 관능검사 결과

항목 시료	향	맛	용해성	종합 기호도
A	2.0*	1.5	0.5	1.33
B	2.8	2.6	2.0	2.46
C	4.2	3.8	4.8	4.26

A : 분무건조 분말차.

B : 분무건조. 분말차 20%, 과립차 80%

C : 과립차

* : 매우좋다(5), 좋다(4), 보통이다(3), 나쁘다(2), 매우나쁘다(1)

(1) 죽엽 분말차의 원료배합비

원료명	투입량(Kg)	배합비(%)	고형분(T/S)	비고
죽엽추출물(25%)	141.6	41.6%	35.4	
덱스트린 분말	141.6	41.6%	141.6	
정제수	57	16.8%	-	
소계	340.2			

(2) 죽엽과립차의 원료배합비

원료명	투입량(Kg)	배합비(%)
죽엽추출액(25BX)	27.5	5.48
함수결정포도당	460	91.66
정제염	0.35	0.07
죽엽향	1.5	0.3
Green tea Base	2.5	0.5
사과과즙	10	1.99
소계	501.85	100

(3) 죽엽 분무건조 분말차의 제조과정

공정	공정 설명
세척 및 절단	수확한 죽엽을 추출하기 좋은 크기로 절단한다
↓	
추출	죽엽1에 정제수 10의 비율로 가수 한 후 가압추출(110℃에서 3시간)한다
↓	
농축	추출액의 Bx가 1Bx미만으로 이것을 농축기를 이용하여 25Bx가 되게 진공농축한다.
↓	
혼합	위 공정에서 얻어지는 엑기스 농축액에 부용제로 덱스트린 (반드시 DE값이 10이하)을 죽엽엑기스 중량만큼을 가하여 10분간 믹서한다.
↓	
Spray Dry	위의 공정에서 얻은 혼합물이 45 ~ 47Bx° 가 되도록 부용제량을 조절한 다음 호모믹서기에서 혼합하고 분무건조기에서 열풍을 이용하여 인스탄트화 시킨다. 이때의 분무건조기 탱크안의 열풍온도는 105℃전후이다.
↓	
제품	

(4) 죽엽과립차 제조공정

공정	공정 설명
원료 혼합	죽엽농축액기스와 함수결정포도당, 부원료등을 혼합기에서 약 30분간 혼합한다.
↓	
과립	과립기를 이용하여 과립화 시킨다.
↓	
건조	95℃에서 약 1시간 건조한다. - 수분활성도(AW) : 0.15
↓	
선별	입도조절체를 이용하여 선별한다.
↓	
포장 I	삼면포장기를 이용하여 개당 8~9g씩 포장한다.
↓	
포장 II	날개 포장된 것을 Box에 20개씩 넣는다.

마. 죽엽환의 제조

죽엽의 유용성분의 활용도를 높이기 위해 죽엽을 환으로 제조하는 방법을 고려하였다. 40~60℃에서 4~8hr 건조시킨 죽엽을 160~200mesh 체를 통과하도록 핀밀을 이용하여 분쇄 후 가공용 꿀과 부원료등을 첨가하여 30~40분간 혼합한다. 혼합원료를 롤러 반죽기에서 충분히 반죽시킨 다음 장환 작업에 편리하게 성형한다. 장환기에서 5mm 크기로 압출하여 적당한 크기로 절환한다. 절환된 환을 정환기에서 수분을 분무시키면서 10분정도 회전 시켜서 정형시키고 건조기에서 60℃에서 6시간정도 건조시켜 꿀로 코팅후 송풍건조하여 제품화한다.

(1)원료 및 배합비

원료명	투입량(Kg)	배합비(%)
죽엽분말	500	38.50
죽엽 농축액(25 Brix)	200	15.4
죽순 분말	200	15.4
다시마	50	3.85
갈근	50	3.85
꿀	300	23
소 계	1300	100

(2)제조과정

공정	공정 설명
원료분쇄	각 원료를 조분쇄 및 미분쇄하여 160-200mesh의 체를 통과하여 분쇄 원료를 준비한다.
↓	
혼합	미리 준비된 분쇄 원료와 가공용 꿀등을 혼합하여 30~40분간 혼합한다.
↓	
Roll반죽	혼합원료를 롤러반죽기에서 충분히 반죽시킨 다음 장환작업에 편리하게 성형한다.
↓	
장 환	장환기에서 유출시키는데 이때 압력을 고무 받도록 한다. 장환기에서 5mm크기로 압출한다.
↓	
절 환	장환기를 통해 나온 원료를 절환기의 roll사이를 조절하면서 절환한다.
↓	
정 환	절환된 환을 정환기에서 수분을 약간 Spray시키면서 정환기를 10분간 회전시키면서 정형시킨다.
↓	
건 조	정환된 환원료를 건조기에서 60℃의 온도로 6시간정도 건조시킨다.
↓	
코팅	건조된 환을 당을 이용하여 코팅을 한다. 이때 환끼리 붙을 수 있기 때문에 필요에 따라 대두유를 약간 스프레이 해준 후 마지막으로 꿀로 마무리 코팅한다.
↓	
송풍 건조	코팅된 환제품을 서늘한 곳에서 1~2시간 건조
↓	
포장	

(3)죽엽 가공제품 필요설비

품명	규격	수량	단가		제조회사	용도
			상	중		
분쇄기	10마력	1	3,300,000	-	태광기계	환제조 및 침출차용
반죽로라	3마력	1	2,310,000	1,200,000	태광기계	환제조용
장환기	2마력	1	2,200,000	1,600,000	태광기계	환제조용
절환기	0.5마력	1	1,650,000	800,000	태광기계	환제조용
굴림통(당의팬)	1마력	1	1,100,000	600,000	태광기계	환제조용
건조기	6KW	1	1,980,000	-	태광기계	환제조 및 과립제조용
삼면포장기	Eye-Mark	1	6,500,000	6,000,000	해동기계	과립포장용
과립기	12인치	1	8,500,000	6,000,000	금강엔지니어	과립차용
추출기	1톤	1	80,000,000	45,000,000		민들레 추출용
농축기	0.5톤	1				

※ 상기 기계제조 업체들은 농협가공공장에 납품실적이 있던 업체와 연구소에서 알고 있는 업체들입니다. 추후 기계선정시 타사와의 사양 및 가격을 신중히 검토하여 기계를 선정하는 것이 좋을 것입니다.

바. 음료 제조

(1) 죽순 및 원재료 가공

1) 생 죽순 가공

죽순을 둘러싸고 있는 껍질부분을 제거한 후 가식부분의 죽순만을 선별하여 Blanching, 마쇄, 압착, 여과 순으로 가공한 후 음료원료용 죽순추출물을 얻은 결과, 여과에 의해 제거되지 않는 불고형분 성분의 침전과 죽순추출물을 정치시 계속적으로 발생하는 흰색 앙금의 수산으로 인하여 생 죽순을 직접 가공하여 음료원료로 사용하기에는 부적합한 결과를 나타내었다.

2) 열수 죽순추출

죽순을 흐르는 물에서 이물질이 없도록 3~4회 세척한 후 1cm×3cm×3cm크기로 절단한다. 절단한 죽순을 Dry oven에서 50℃로 24시간 건조한 후 회전볶음기로 150℃에서 2분간 볶아 죽순고유의 비린내와 풋내를 제거하고 뜨거운 물에서 추출이 용이하도록 죽순을 전처리 하였다.

전처리 한 죽순은 냉각콘덴서가 달린 추출기에서 정제수를 증량비(wt/wt)로 20배 가하여 열수(100℃)에서 가용성 고형분량이 추출평형에 도달하는 시점인 4시간으로 추출 하였다. 추출이 완료된 후 죽순추출물을 10℃이하로 냉각하여 150mesh체로 1차 통과한 후 1 μ m로 미세 여과하여 수산을 제거한 죽순추출물을 얻었다.

추출은 약 80%(건조죽순에 20배의 정제수를 가하여 추출 된 죽순추출물 양)의 수율을 나타내었으며 가용성 고형분량은 2.8Brix로 나타내었다.

3) 녹차추출

녹차에 80℃ 물을 증량비(wt/wt)로 200배 붓고 약 2분간 정치한 후 400mesh체로 여과하여 추출수율 95%(녹차에 200배의 정제수를 가하여 추출 된 녹차추출물 양), 가용성 고형분량 0.1Brix의 녹차추출물을 얻었다.

4) 치커리추출

볶은치커리에 끓은 물을 증량비(wt/wt)로 50배 붓고 약 3분간 정치한 후 400mesh 체로 여과하여 추출수율 약 90%(치커리에 50배의 정제수를 가하여 추출 된 치커리추출물양), 가용성 고형분량 0.5Brix의 치커리추출물을 얻었다,

(2) 죽순음료제조

1) 무가당 죽순 액상차

①적정 음용 농도 선정

무가당 죽순 액상차를 제조하기 위하여 2.8Brix의 가용성고형분량 죽순추출물을 이용하여 죽순추출물의 적정 음용 농도를 표 1과 같이 관능검사에 의해 결정하였다.

표 1. 죽순추출물의 적정 음용농도 선정을 위한 관능검사

시 료	죽순추출물의 가용성 고형분 농도(2.8Brix, %)
1	1
2	2
3	3
4	4
5	5

표 1과 같이 관능검사를 실시하여 분산 분석한 결과 향기의 경우 죽순추출물 (2.8Brix)2%와 3% 농도가 평균 3.2점으로 적당한 것으로 평가되었고, 1% 농도는 1.8점, 4%농도와 5% 농도는 각각 3.8점, 4.3점으로 강한 것으로 나타났다. 색의

경우 2% 농도가 4.1점으로 가장 좋은 것으로 나타났으며, 종합적 기호도의 경우도 2% 농도와 3% 농도에 서 각각 3.9점, 4.1점으로 좋은 것으로 나타났다. 위의 결과 들은 모두 95% 유의 수준에서 유의성을 갖고 있었으며 종합적으로 볼 때 죽순추출 물 한가지만 갖고는 죽순 액상차 제조 시 기호성이 결여되기 때문에 건강 이미지가 강한 녹차와 관능적으로 고소한 소재인 치커 리를 곁들여 죽순 액상차를 제조 할 시 표 2와 같이 관능검사를 실시한 결과 죽순 단독으 로 제조한 것보다는 녹차, 치 커리를 곁 들였을 때가 종합적인 기호도 4.2점으로 가장 좋 은 것으로 나타났다.

표 2. 죽순, 녹차, 치커리추출물 혼합물 선정을 위한 관능검사

시 료	추출물 배합비
1	죽순추출물(2.8° Bx) 3%
2	죽순추출물(2.8° Bx) 3% + 녹차추출물(0.1° Bx) 50%
3	죽순추출물(2.8° Bx) 3% + 녹차추출물(0.1° Bx) 50% + 치커리추출물(0.5° Bx)10%

관 능 검 사 표

(죽순추출물의 적정 음용농도 선정을 위한 관능검사)

제시된 죽순 액상차를 맛보시고 다음사항에 대해 점수로 기입해 주십시오

향기		색, 종합적 기호도	
점수	표현	점수	표현
1	매우 약하다	1	매우 나쁘다
2	약하다	2	나쁘다
3	적당하다	3	보통이다
4	강하다	4	좋다
5	매우 강하다	5	매우 좋다

(죽순, 녹차, 치커리추출물 혼합물 선정을 위한 관능검사)

제시된 죽순 액상차를 맛보시고 다음사항에 대해 점수로 기입해 주십시오

향기		색, 종합적 기호도	
점수	표현	점수	표현
1	매우 약하다	1	매우 나쁘다
2	약하다	2	나쁘다
3	적당하다	3	보통이다
4	강하다	4	좋다
5	매우 강하다	5	매우 좋다

② 무가당 죽순액상차 제조방법

혼합탱크(Mixing T/K)에 죽순추출물, 녹차추출물, 치커리추출물, 비타민-C, 정제수를 넣고 70rpm, 10분간 혼합한 후 UHT에서 120℃에서 15분 조건으로 죽순액상차를 살균한다. 살균한 액상차는 자동충전기에서 캔 또는 PET로 충전한 후 밀봉한다. 밀봉한 액상차는 자동냉각기에서 30℃±5℃로 냉각한다. 냉각한 제품은 걸포장한 후 완제품으로 한다

공정	공정 설명
원료 혼합	죽순, 녹차 및 치커리 추출물과 비타민 C, 정제수를 혼합기에 넣고 70rpm에서 10분정도 혼합한다.
↓	
살균	UHT 살균기로 120℃에서 15분간 살균한다.
↓	
충전	자동 충전기로 캔 또는 PET병에 충전 밀봉한다.
↓	
냉각	자동냉각기에서 30℃±5℃로 냉각한다.
↓	
제품	

2) 죽순 음료

① 죽순추출물 적정 음용 농도 선정

2.8Brix의 가용성고형분량 죽순추출물을 이용하여 죽순음료를 제조하기 위한 적정 음용 농도는 무가당 죽순액상차와는 달리 당, 산, 음용에 적합한 향료 등을 혼합하기 때문에 죽순 고유의 맛이 음료에 거부감을 느끼지 못하는 범위 내에서 표 3과 같이 관능검사에 의해 결정하였다. 관능검사에 필요한 적정 당, 산의 비율은 일반적으로 시판되고 있는 100ml병 드링크 제품류의 당산비인 50(당도 16° Bx, 산도 0.32)을 기준으로 하여 죽순추출물의 혼합농도별로 측정하였다.

표 3. 죽순추출물의 적정 음용농도 선정을 위한 관능검사

시 료	죽순추출물의 가용성 고형분 농도(2.8Brix, %)
1	5
2	6
3	7
4	8
5	9
6	10

(당도 16° Bx, 산도 0.32% : 당은 55%과당이 함유된 시판용 75Brix 고과당 , 산은 결정 구연산을 사용하였다)

표 3과 같이 관능검사를 실시하여 분산 분석한 결과 향기의 경우 죽순추출물 (2.8Brix)6%와 7% 농도가 평균 3.2점으로 음료에 혼합 사용이 가능한 것으로 평가되었고, 색상의 경우는 10%농도에서도 별 거부감이 없는 것으로 나타내었다. 9% 이상의 농도에서는 종합적인 기호도 평가 결과 4.2점으로 음료에 사용하기에는 거부감이 있는 것으로 나타났다.

②적정 당산 농도 및 원료 배합비 결정

2.8Brix의 가용성고형분량 죽순추출물은 표 3과 같이 관능검사를 실시하여 7%로 결정하였으며 당과 산 농도는 죽순추출물 7%(2.8Brix)농도를 기준으로 하여 고과당 17.5%, 구 연산 0.185% 농도를 관능검사를 통하여 선정하였다. 기타 재료는 죽순음료와 적합한 소재를 선별하여 적합한 농도를 결정하였으며 죽순음료에 혼합한 향은 죽순은 고유의 맛과 향이 다른 식물에 비하여 약하므로 혼합과일인 드링크향을 성원상사로부터 제공받아 실험을 하였다.

관 능 검 사 표

(죽순추출물의 적정 음용농도 선정을 위한 관능검사)

제시된 죽순음료를 맛보시고 다음사항에 대해 점수로 기입해 주십시오

향기		색, 종합적 기호도	
점수	표현	점수	표현
1	대단히 좋다	1	매우 좋다
2	약간 좋다	2	좋다
3	보통이다	3	보통이다
4	약간 나쁘다	4	나쁘다
5	매우 나쁘다	5	매우 나쁘다

관 능 검 사 표

(적정 단맛과 신맛농도 선정을 위한 관능검사)

주어진 시료는 죽순음료입니다. 순서대로 맛을 보시고 단맛과 새콤한 맛의 정도를 점수로 평가하여 주시기 바랍니다.

단맛		신맛	
점수	표현	점수	표현
1	매우 약하다	1	매우 약하다
2	약하다	2	약하다
3	적당하다	3	적당하다
4	강하다	4	강하다
5	매우 강하다	5	매우 강하다

②죽순음료 제조방법

혼합탱크(Mixing T/K)에 죽엽추출물과 정제수 일부를 넣고 액상과당, 벌꿀, 청징 농축사과과즙 및 기타 원재료를 정량 투입한 후 70rpm, 20분간 충분히 혼합한다.

죽순음료에 맞는 당산비 측정이 끝나면 드링크Essence를 정량 투입한 후 5분간 혼합한다. 혼합이 완료되면 HTST(95℃, 32초)법으로 음료원액을 살균한다. 살균한 원액은 자동충전기에서 병 또는 캔으로 충전한 후 밀봉한다. 밀봉한 음료는 자동냉각기에서 30℃±5℃로

냉각한다. 냉각한 제품은 겉포장 한 후 완제품으로 한다.

공정	공정 설명
원료 혼합	죽순추출물과 비타민 C, 정제수, 액상과당 등 기타 재료를 혼합기에 넣고 70rpm에서 20분정도 충분히 혼합한다. 다음에 드링크 향을 정량 투입 후 5분 정도 혼합한다.
↓	
살균	혼합원액을 HTST 살균기로 95℃에서 32초간 살균한다.
↓	
충전	자동 충전기로 캔 또는 소형병에 충전 밀봉한다.
↓	
냉각	자동냉각기에서 30℃±5℃로 냉각한다.
↓	
제품	

(3) 각각의 음료 원료 및 배합비

원재료명	배합비율(wt/wt, %)		비 고
	무가당 죽순액상차	죽순 음료	
죽순추출물(2.8Brix)	3	7	
녹차추출물(0.1Brix)	50	-	
치커리추출물(0.5Brix)	10	-	
청징농축사과과즙 (72Brix)	-	13.889	사과과즙 함량 10%
벌꿀	-	2	
액상과당(75Brix)	-	17.5	
구연산	-	0.185	결정
비타민-C	0.05	0.05	결정분말
비타민-B ₂	-	0.0009	결정분말
니코틴산 아미드	-	0.015	결정분말
드링크 향	-	0.13	성원상사 (SW-3021)
정제수	36.95	59.2301	
계	100	100	

(4) 죽순음료 제조설비(드링크 병 기준)

1) 죽순추출 및 볶음 장치

①. ROLL ROASTER(회전형 볶음기)

온도조절 가능한 회전형 드럼에 건조물을 공급하여 일정한 시간에 볶음을 하는 기계.

②. EXTRATOR(추출기)

콘덴서가 부착되어 향의 손실을 방지하고 건조물을 끓여 가용성 고형분을 추출하는 장치.

2) 죽순음료 제조장치

①. SEMI AUTO DEPALLETIZER(반자동 병 공급장치)

파렛트로 빈 병을 공급하여 주면, 일정하게 배열하여 다음 단계인 병 세척을 할 수 있도록 콘베어로 공급 함.

②. EMPTY BOTTLE RINSER(병 세척기)

빈 병을 노즐로 정제수를 공급하여 세척하는 장치.

③. MIXING TANK(혼합탱크)

추출된 내용물과 기타 재료를 혼합하는 탱크.

④. MIXING HOPPER(고속 혼합기)

원료에 분체의 물질을 쉽게 용해하여 혼합할 수 있도록 하는 장치.

- ⑤. BOTTLE CONVEYOR(병 이송용 콘베어)
병을 각 라인에 연결하여 주는 장치.

- ⑥. FILTER(여과기)
원료 혼합 후 또는 병에 충전 전에 이물질을 제거하는 장치.

- ⑦. UHT & HTST(연속식 살균기)
충전하기전의 내용물을 연속적으로 살균하는 장치.

- ⑧. AUTO BOTTLE FILLER(병 충전기)
살균 처리된 액을 충전헤드가 회전하면서 빈 병에 내용물을 충전하는 장치.

- ⑨. CAPPER(병 뚜껑 밀봉)
충전된 병에 뚜껑을 덮어 밀봉하는 기계.

- ⑩. AUTO BOTTLE COOLER(자동 병 냉각기)
충전된 병을 냉각시켜 주는 장치.

- ⑪. LABELLER(상표 부착기)
충전된 병에 상표를 부착하는 기계.

- ⑫. JET PRINTER(제조날짜 인쇄기)
충전된 병에 제조일자를 인쇄하는 장치.