

최 종  
연구보고서

## 산수유를 이용한 기능성 가공식품 개발

Development of Functional Food Products  
Using *Corni fructus*

연구기관  
순천대학교

농림부

## 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “산수유를 이용한 기능성 가공식품 개발”에 관한 연구과제의 최종보고서로 제출합니다.

2003년 8월 10일

주관연구기관명 : 순천대학교

총괄연구책임자 : 조 영 숙

세부연구책임자 : 조 영 숙

세부연구책임자 : 박 정 로

세부연구책임자 : 서 권 일

연 구 원 : 박 석 규

위탁연구기관명 : KT&G

위탁연구책임자 : 이 중 원



# 요 약 문

## I. 제목

산수유를 이용한 기능성 가공식품 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

생약 산수유는 산수유의 익은 열매로부터 씨를 뽑아내고 햇볕에 말린 것을 말하며, 예로부터 중요한 한약제로 사용되어 왔다. 산수유는 그 맛은 시고 성질은 약간 따뜻하며, 간경, 신경에 좋으며, 이뇨작용, 혈압강하작용, 단백질의 소화를 돕는 작용, 항암작용, 항균작용 등이 있다고 동의학에서는 말하고 있다.

산수유는 전라도, 경기도, 충청도 일부 지역에 생산되나 전남 구례 산동에서 연간 약 30톤을 생산하여 국내 총 생산의 60% 이상을 차지하고 있다. 산동산 산수유는 색깔이 곱고 육질이 두터우며 그 약리효능이 우수하여 국내외에서 최고급품으로 인정받아 일본, 대만, 홍콩 등으로 산동 산수유만이 수출되고 있다. 이에 구례군은 산수유를 특품사업으로 지정하여 산수유차 등을 개발하여 명품으로 육성하고자 노력하고 있으나 연구 및 홍보부족 등으로 인하여 판매가 저조한 실정이다.

산수유에 대한 연구로는 산수유 열매의 화학성분과 건조에 따른 과육분리의 특성, 건조방법에 따른 산수유의 영양성분, 산수유의 신맛 성분, 산수유 종자의 독성과 렉틴 성분에 대한 연구가 있으나 산수유 가공품 개발과 산수유를 이용한 기능성 식품에 대한 연구는 거의 없는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 항산화, 항당뇨, 고지혈증 예방 효과, 면역활성 및 항암 등과 같은 다양한 생리기능성을 탐색하고, 발효주, 발효음료, 음료 및 차 등 다양한 산수유 제품을 개발하고자 하였다.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

#### 1) 산수유를 이용한 약용 발효주 및 발효음료 개발

- ① 산수유 가공적성 향상을 위한 원료 전처리방법 확립
- ② 발효주 제조를 위한 최적 효모균주 선정
- ③ 산수유와 발효성 당을 이용한 발효주 개발
- ④ 산수유와 쌀을 이용한 발효곡주 개발
- ⑤ 발효음료 제조방법 확립
- ⑥ 개발된 제품의 숙성 중 주요성분 조사 및 시제품 생산

#### 2) 산수유 및 개발 제품의 생리기능성 탐색

- ① 산수유의 항산화 활성, 항당뇨 활성 및 고지혈증 억제 효과를 *in vitro* 또는 *in vivo*에서 확인
- ② 추출 용매별, 분획별 활성 검색
- ③ 제품에 대한 생리활성 검증

#### 3) 산수유를 이용한 기능성 음료 및 차의 개발

- ① 추출 용매에 따른 산수유 추출액의 이화학적 특성 조사
- ② 기능성분을 다량 함유한 추출물의 제조 조건 확립
- ③ 면역활성 물질의 분리
- ③ 음료 및 차의 제조 방법 확립
- ⑤ 추출액 및 제품에 대한 면역활성 검색

#### 4) 산수유 개발 식품의 대량 생산 및 품질특성 조사

- ① 산수유의 떫은맛 및 신맛 감소 연구
- ② 산수유 추출물 및 발효원액을 이용한 액상·고상제품 제조공정 및 개발
- ⑤ 시제품의 개발 및 품질 특성 조사

#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

##### 1. 연구개발 결과

산수유 원료는 저온에서 자연 건조물과 그 분말 형태가 산수유주의 색도 면에서 중요하였으며, 산수유주의 산미과 삼미를 줄이기 위해서는 초기 당과 산수유의 비율을 약 6~9의 비율로 조절하거나 산수유를 황국곰팡이를 이용한 반고체 제국법으로 전처리하면 약간 저감화 효과가 나타났다. 산수유 알코올 발효를 위한 공시 효모는 균체증식율, 에탄올 생성량 및 발효성당의 이용률에서 *Saccharomyces* sp. KOFRI 013 균주가 가장 적합하였다.

산수유 수확시기는 완숙과가 색깔이나 미생물 발효에 필요한 발효성 당 및 신맛이나 쓴맛의 문제에서 유리하였으며, 과숙과도 냉해를 받지 않은 것은 문제가 없었다. 산수유와 물의 배합비율은 5 : 1이나 7 : 1로 할 때가 전체적으로 유리하였고, 알코올 발효성당은 과당과 물엿 20% 내외가 비교적 좋았으며, 꿀은 약간 생성량이 낮았지만 기호적인 면으로는 양호하였다.

최적 발효온도는 20~25℃범위로 10~20일 이내로서, 알코올 함량은 최대 13.5% 이하로 비교적 높은 알코올 함량을 나타내었다. 산수유주의 알코올 농도가 13%내외이므로 15℃ 저온숙성은 야생 산 생성균의 증식으로 인하여 시큼한 맛과 냄새가 나타나서 5℃ 숙성이 관능평가 점수에서 우수하였다.

산수유 첨가량은 대체로 6~10% 범위가 양호하였으며, 알코올 생성량은 7.2~7.6%, 잔존 총당은 7.02~7.23%로 나타났고, 종합적인 기호도에서도 산수유 첨가량이 6~10% 농도가 비교적 양호하였다. 누룩양은 대체로 4% 범위가 양호하였고, 알코올 생성량은 8.02%, 잔존 총당은 6.92%로 나타났으며, 종합적인 기호도에서도 가장 양호하였다. 또한 최적 발효숙성 기간은 25℃에서 주발효 6일과 10℃에서 숙성기간 60일 내외가 적당한 것으로 판단되었다.

중국균으로 황국균이 당화력이 가장 우수하였으며, 발효성당의 함량으로 효모에 의한 알코올 생성력도 우수하여, 상대적으로 잔존하는 당질의 함량이 낮았다. 백국균과 홍국균은 중국 제조기간이 매우 길고, 당질 분해효소력이 다소 낮아서, 알코올 생성을 위한 발효성 당이 적어 알코올 생성력이 약하였다. 한편 백국균은 고미나 산미가 약

하지만, 종합적인 맛은 황국이나 홍국균보다 떨어졌다. 산수유 첨가량은 알코올 함량과 종합적인 기호도를 통하여 대체로 6~10%가 적당하였으며, 덧술의 최적 숙성기간은 40~60일 부근이 양호하였다.

산수유 식초 제조용으로 *Acetobacter* sp. KOFRI B-104를 공시균주로 선발하였으며, 그 최적 발효조건은 초기산도 1.5~2%(w/v), 초기 알코올 농도 7~8%, 배양온도 30℃가 적합하였다. 산수유 초산발효에 부족한 부영양원의 첨가는 그 발효율을 향상시켰고, 산수유 식초 제조에서 산수유 추출물 농도는 6%가 양호하였으며, 환원당과 유리당을 포함한 총당은 그 소모율이 매우 낮은 경향을 나타내었다.

산수유 추출액 첨가 농도가 높을수록 초산발효는 약간 지연되어 그 수득율도 조금씩 낮았고, 대체로 추출액 6%까지는 양호하였는데, 특히 부영양원을 첨가하면 초산생성량이 상당히 상승되어 초산발효 수율이 높게 나타났다. 부영양원 첨가구에서는 무첨가구에 비하여 잔류 알코올 함량이 적었으며, 산수유의 추출물 농도가 높을수록 잔류 알코올 함량이 많았다. 산수유 추출액 2~10%를 첨가한 실험구는 총산 함량이 최소 5% 이상을 나타내었으며, 초산 생성량은 3.97%에서 5.25%였고, 산수유 추출액 8% 와 10%의 첨가는 초산 생성량이 각각 4.16% 및 3.97%로 비교적 낮았다.

산수유 식초의 초기 색차계 색도 L, a 및 b 값이 크게 감소하거나 증가하지는 않았으며, 산수유 추출액의 농도에 따라 비례적으로 증감하는 형태로 나타났고, 고형분 함량은 감식초에 비하여 낮지만 다른 시판 과일식초에 비해서 높았다. 산수유 추출액 4~6%를 첨가하여 제조한 산수유 양조식초가 신맛과 쓴맛을 고려한 음료로서 식초 맛, 색깔, 냄새를 포함한 종합적인 관능평가에서 우수한 것으로 나타났다.

산수유를 기능성 음료 및 차를 개발하기 위하여 산수유 추출물에 대한 이화학적 특성 및 향암 및 면역활성과 같은 기능성을 측정하여 최적의 산수유 추출물 제조조건을 확립하고, 산수유의 생리활성 성분을 분리하였으며, 최종 생산된 제품에 대한 기능성을 조사하였다.

산수유의 물추출시 색도중 황색도와 적색도는 추출시간이 길수록 높게 나타나는 경향이었고, 탁도는 8시간 동안 물추출하는 것이 높게 나타났으며, 당도 역시 8시간이 높게 나타났다. 관능검사의 색깔, 신맛, 단맛, 떫은 맛, 냄새는 대체로 8시간과 10시간

이 좋게 나타났으나, 종합적인 맛은 2시간이 가장 높게 나타났다. 그러나 최종 음료 제조시 조미공정이 수반될 것을 감안하면 8시간 추출이 적합할 것으로 생각된다.

산수유의 신맛 및 떫은맛을 감소시키기 위하여 당류,  $\beta$ -싸이크로텍스트린, 스위트메이트 및 향료를 첨가효과를 살펴보았다. 산수유 extract 1% 수용액에 정백당 및 과당을 0~20%까지 농도 별로 첨가하여 신맛, 떫은맛, 단맛, 전체적인 기호도, pH 및  $^{\circ}\text{Bx}$ 를 조사한 결과 농도가 증가함에 따라 신맛, 떫은 맛, 단맛이 관능적 면에서 품질이 개선되었으며, 전체적인 기호면에서 15% 농도가 가장 양호한 것으로 판단되었다.

$\beta$ -싸이크로텍스트린을 0~2.0%까지 농도 별로 첨가하였을 때 농도가 증가함에 따라 신맛 및 떫은맛이 개선되었으나 정백당 및 과당을 첨가한 시험구 보다 관능적 면에서 떨어지는 경향이었다.

기능성 소재인 스위트메이트를 0~2.0%까지 농도 별로 첨가하여 신맛, 떫은맛을 조사한 결과는 농도가 증가함에 따라 신맛 및 떫은맛이 개선되었으나 정백당, 과당 및 싸이크로텍스트린을 첨가한 시험구보다 관능적 면에서 떨어지는 경향이었다. 그러나 상기의 소재들은 신맛 및 떫은맛에 관능적으로 우수하였으나 기타 다른 맛, 특히 이 미, 이취 등의 맛은 개선시키지는 못했으나 스위트메이트는 이러한 맛을 개선시켜 주는 것으로 나타났다.

Masking flavor 5종을 향료전문업체로부터 구입하여 0~0.14%까지 농도별로 첨가하여 신맛, 떫은맛을 조사한 결과 농도가 증가함에 따라 신맛 및 떫은맛이 개선되었으나 향 종류에 따라 큰 차이를 보였다. 5종의 masking flavor 중에서 M.S 1998-0-69와 M.S SF-474A가 가장 좋은 것으로 나타났다.

산수유 extract제품의 개발방향을 설정하기 위한 기초자료로 국내 및 일본지역에 유통되고 있는 식품성 음료 중 판매량이 비교적 많은 제품을 수집하여 pH와 당도 등에 대해서 조사하였다. 국내지역 음료에 대한 조사결과로서 수집된 음료를 생약함유제품, 기능성제품, 과즙제품, 탄산제품으로 구분하여 조사한 결과, 생약함유음료는 pH 3.5 1~4.0, 당도 10.01~15.0 사이의 제품이 많았고, 단맛과 쓴맛이 많은 것으로 나타났다. 기능성 음료는 pH 3.01~3.5, 당도 10.01~15.0 사이의 제품이 많았고, 신맛과 단맛이 많은 것으로 조사되었다. 전체적으로 pH 3.01~3.5, 당도 10.01~15.0 사이의 제품이



가장 많았다. 단맛과 쓴맛이 많은 이유는 생약자체의 고유의 쓴맛이 강하기 때문에 이것을 보완하기 위하여 당 함량을 많이 첨가한 것으로 사료된다. 따라서 산수유제품은 이런 단점을 보완하기 위하여 상기에서 실험된 향과 당의 최적 첨가농도로 선정하여 제품을 개발하였다.

산수유 유사한 제품으로서 산수유와 경쟁이 예상되는 것으로 조사된 영비천 등 3종의 제품을 구입하여 품질특성과 관련 자료를 조사한 결과 판매량이 가장 높은 제품은 영비천 이었으며 로얄디, 운지천, 맥생의 순이었고 음용경험율도 마찬가지로였다. 주 음용 연령층의 경우 40대, 30대이었고 그 외의 제품은 50대, 40대이었으며, 20대의 비율이 가장 낮은 것으로 조사되었다. 향취미 선호도도 영비천이 가장 높은 것으로 조사되었다.

시중에 유통되고 있는 음료제품의 품질특성과 관련자료 등을 참고로 하여 산수유제품의 개발방향으로는 pH와 당도를 낮추어 신선 청량감을 증가시키고 쓴맛과 신맛을 감소시키며 30대, 40대의 중, 장, 노년층의 대상으로 하여 이들의 기호성 및 기능성이 잘 조화된 당류, 비타민 등을 첨가하여 건강기능성식품에 적합한 개발방향 등을 설정하였다.

음료제품의 배합성분 및 비율선정에 있어 기능성 및 기호성이 우수한 소재로서, 감미제로서는 산수유 고유의 쓴맛과 신맛을 감소시킬 수 있는 상기의 결과를 근거로 과당 및 설탕을 선정하였고, 기능성 당으로서는 트레할로스, 기능성 소재로서 피로회복과 뇌기능 활성화, 신진대사촉진의 기능이 있는 타우린, 지구력 증강, 장쇄지방산의 에너지대사 등에 효능효과가 있는 L-카르니틴 등을 사용하였으며, 이러한 기능성과 기호성면에서 우수한 소재와 옛부터 강장, 정력 등에 효능효과가 탁월한 산수유 추출물을 이용하여 신선 청량감과 기호성을 함유한 배합성분 및 배합비율을 달리하여 다양한 시제품을 제조한 다음 순위시험법으로 관능평가를 실시하여 최종배합성분 및 비율을 선정하여 제품의 대량생산 및 상품화에 적합한 제조공정 및 방법을 설정하였다.

휴대편의성을 갖춘 고부가가치 제품으로서 산수유 extract를 이용하여 차류와 soft capsule 제품을 개발하였다. 차류 제품개발에 있어서 부형제로서는 물성, 작업성 및 관능적 면에서 양호한 무수결정포도당을 선정하였고, Vit-C는 0.6%의 농도로 배합하여 배합비율과 대량생산 및 상품화에 적합한 제조공정을 설정하였다.

수분 30% 함유된 산수유 extract에 연질캡슐 제품에 필요한 콩기름, 팜유, 레시틴을 농도별로 첨가하여 작업성을 고려하여 주약과 기제의 배합비율을 먼저 선정하고, 젤라틴, 글리시린, 청색1호, 황색5호, 적색40호의 성분을 농도별로 첨가하여 작업성과 물성 등을 검토하여 최종배합성분과 비율 및 상품화에 적합한 제조공정을 설정하였다.

산수유 extract를 이용하여 제조된 드링크제품, 차류 제품 및 soft capsule 제품에 대하여 장기저장품질안정 조사를 실온, 고온(37℃), 저온(5℃)에서 각 6 개월 간 보관하면서 성장, 향취미, 관능적 특성, 대장균군, 생균수, 붕해도, 용해성 등을 조사한 결과 모든 조사항목에서 4개월 현재 안정한 것으로 조사되었다.

DPPH free radical removal 측정을 통하여 산수유 methanol 추출물과 chloroform, ethyl acetate, butanol 및 water fraction의 수소공여능을 측정하였다. 대조구로 사용한 BHT의 경우 27 $\mu$ g에서 50% 소거(RD<sub>50</sub>)를 나타내었고, 산수유 methanol 추출물은 450 $\mu$ g에서 RD<sub>50</sub>를 보였다. Methanol 추출물의 subfraction 중에서는 ethyl acetate fraction이 가장 강한 free radical 소거 활성을 보여 RD<sub>50</sub>가 85 $\mu$ g이었으며, 그 다음으로 butanol fraction 310 $\mu$ g, chloroform fraction 490 $\mu$ g 순이었다. Water fraction은 825 $\mu$ g의 RD<sub>50</sub>를 보여 free radical 소거 활성이 가장 낮았다. 산수유 제품 제조에 사용된 농축액의 경우도 농도 의존적으로 DPPH radical 소거능을 보였으나, 산수유 methanol 추출물에 비하여 비교적 낮은 활성을 보였다.

산수유 추출물의 linoleic acid autoxidation에 대한 항산화력은 산수유 추출물을 첨가하지 않은 대조구에 비하여 증류수 및 70%, 90%, 100% ethanol 추출물에서 과산화물가가 다소 낮게 나타났으며, 특히 90%, 100% ethanol 추출물 첨가시에 과산화물가가 가장 낮게 나타났다. 산수유 ethanol 추출물 subfraction의 항산화력은 chloroform, ethyl acetate 및 butanol subfraction 모두 대조구에 비하여 다소 낮은 과산화물가를 나타내었으며, 특히 ethyl acetate fraction이 가장 낮은 과산화물가를 나타내었다. 산수유 추출물의 chloroform fraction으로부터 분리한 ursolic acid도 100 $\mu$ g/ml의 농도에서 linoleic acid autoxidation을 현저히 낮추었다.

산수유 추출물의 지질과산화 억제효과를 흰쥐의 liver homogenate를 사용하여 *in vitro*로 관찰하였다. 흰쥐의 간장을 적출하여 phosphate buffer로 균질화한 다음 균질액에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 FeSO<sub>4</sub>를 첨가하여 지질 과산화를 촉진시키는 model system에서 산수유

추출물의 지질 과산화 억제효과를 관찰하였다.  $H_2O_2$ 와  $FeSO_4$ 에 의한 지질과산화는 산수유 추출물을 첨가하여 반응시킬 때 현저히 감소되는 것을 확인하였으며, 산수유 추출물의 첨가량이 많을수록 항산화 효과는 더 컸다. Methanol 추출물 subfraction의 liver homogenate에 대한 항산화 활성은 ethyl acetate fraction이 가장 높았다.

Streptozotocin 투여에 의하여 고혈당이 유발된 흰쥐에 있어 산수유의 항 당뇨 효능을 검색하였다. 당뇨군은 정상 대조군에 비하여 다음, 다식, 다뇨 등 전형적인 당뇨병 증상을 보였으나, 현저한 다음 다식에도 불구하고 정상 쥐에 비하여 체중 증가가 매우 낮았다. 당뇨 발병에 따른 다음, 다식, 다뇨, 체중 감소 현상은 산수유 methanol 추출물과 subfraction의 경구 투여에 의하여 상당량 개선되었으며, subfraction 중 chloroform fraction이 가장 활성이 높았다.

산수유 섭취 또는 산수유 methanol 추출물과 subfraction의 경구 투여는 혈당을 다소 낮추었으며, subfraction 중에서는 chloroform fraction 투여 군이 가장 낮은 혈당치를 보였다.

Streptozotocin 처리로 유발된 당뇨 대조군은 정상 대조군에 비해 현저히 높은 GOT, GPT 값을 보였으며, 산수유 methanol 추출물과 subfraction 투여는 혈장 GOT, GPT 값을 현저히 낮추었다. Subfraction 중에서는 butanol fraction 투여 군이 가장 낮은 GOT, GPT 값을 보였다.

Streptozotocin에 의한 당뇨 쥐는 정상 쥐에 비하여 혈장 총 cholesterol의 농도와 LDL-cholesterol 농도가 높은 반면 HDL-cholesterol 농도가 낮아 동맥경화지수가 현저히 높았다. 혈장 cholesterol과 더불어 triglyceride 함량도 당뇨군이 정상군에 비하여 높았으나, 혈장 phospholipids 함량은 당뇨에 의한 영향이 거의 없었다. 산수유 methanol 추출물과 subfraction 투여는 당뇨로 인해 발생하는 고지혈증을 다소 완화시켰으며, subfraction 중에서는 ethyl acetate fraction 투여 군이 가장 활성이 높았다.

당뇨 쥐는 정상 쥐에 비하여 간 cholesterol과 triglyceride 함량이 현저히 높아 지방간 현상을 보였으나, phospholipids 함량은 별 차이가 없었다. 산수유 methanol 추출물과 subfraction 투여는 당뇨로 인한 지방간 현상을 다소 완화시켰으며, subfraction 중에서는 ethyl acetate fraction 투여 군이 가장 높은 활성을 보였다.

버터와 콜레스테롤이 함유된 고지혈증 유발 식이에 산수유 분말을 첨가하거나 산수유 methanol 추출물과 subfraction을 경구투여하여 산수유의 고지혈증 억제효과를 살펴 보았다. 버터와 콜레스테롤이 함유된 고지혈증 유발 식이군(control군)은 콜레스테롤을 함유하지 않은 옥수수유가 사용된 basal군에 비하여 혈장 총 cholesterol 함량과 LDL-cholesterol을 증가시키고 HDL-cholesterol을 감소시켜 동맥경화 지수를 높였다. 고지혈증 유발 식이를 하면서 산수유 methanol 추출물과 subfraction이 경구 투여된 흰쥐는 고지혈증 유발 식이 control군에 비하여 혈장 총 cholesterol과 HDL-cholesterol 함량이 다소 높고 LDL-cholesterol 함량이 낮아 동맥경화 유발지수(AI)가 감소하였다. Subfraction 투여군들 중 ethyl acetate 투여군이 고지혈증 개선 효과가 가장 우수하였다.

혈장 triglyceride 농도는 cholesterol 식이에 의하여 현저히 증가하였으며, 산수유 분말 섭취 또는 산수유 methanol 추출물 및 ethyl acetate fraction 경구투여에 의하여 상당부분 감소하였다. 반면, 인지질 농도는 cholesterol 식이와 산수유 추출물 및 subfraction 투여에 의하여 큰 영향을 받지 않았다

간장의 cholesterol과 triglyceride 함량은 cholesterol 식이에 의하여 현저히 증가되었다. 산수유 분말 섭취 또는 methanol 추출물과 subfraction의 경구투여는 간장 cholesterol과 triglyceride 함량을 다소 감소시켰으며, subfraction 중 ethyl acetate fraction이 가장 활성이 강한 것으로 나타났다

생쥐 비장세포에 산수유 추출물을  $1\mu\text{g/ml}$ ,  $10\mu\text{g/ml}$ ,  $100\mu\text{g/ml}$  농도로 첨가시, 대조구에 비하여 실험군에서는 거의 비장세포의 증식을 확인 할 수 없었으나, 70% ethanol 산수유 추출물에서는 비장세포의 증식 효과가 높게 나타났고, 산수유 추출물과 ConA 또는 LPS를 함께 처리시 물추출물에서는 비장세포의 증식이 억제되었으나, ethanol 추출물에서는 비장세포 증식효과가 나타났다.

산수유를 증류수 및 ethanol을 70%, 90%, 100% 추출하여  $10\mu\text{g/ml}$ ,  $100\mu\text{g/ml}$ ,  $1000\mu\text{g/ml}$  농도로 암세포에 처리하였을 때 인체 폐암세포주(A549) 및 인체 유방암세포주(MCF-7)에서 무처리 대조구에 비하여 각 추출물의  $1000\mu\text{g/ml}$ 농도에서 암세포 성장을 억제하였다.

산수유로부터 생리활성 물질을 분리하기 산수유메탄올 추출물을 용매를 극성 증가 순에 따라 분획한 결과 hexane과 chloroform분획에서 세포독성이 크게 나타났으므로 이들 용매추출물을 column chromatography하여 compound-1과 2의 활성 물질을 각각 분리하였다. 이중 compound-2를 ursolic acid로 구조 동정을 하였다. 분리화합물을 암세포에 처리한 결과 compound-1의 경우는 10 $\mu$ g/mL농도에서 A549, MCF-7 및 인체 전골수성 백혈병 세포주(HL-60)에 대하여 대조군에 비해 41.66%, 17.74% 및 33.71%의 암세포 성장 억제 효과를 각각 나타내었고, compound-2는 A549에서는 9.25%, MCF-7에서는 8.92%, HL-60에서는 23.61%의 세포독성 효과를 각각 나타내었다.

분리화합물을 A549와 MCF-7세포에 처리하여 40시간 후 광학현미경으로 관찰한 결과 핵의 응축과 더불어 사멸한 세포가 배양용기에서 떨어져 배지에 부유하는 것을 관찰할 수 있었다.

개발된 산수유 제품 3종을 A-549 암세포주에 1, 10, 100 및 1000 $\mu$ g/ml의 농도로 처리한 결과 3종 모두 농도 의존적으로 암세포 성장을 억제하였다.

이들을 생쥐 비장세포에 같은 농도로 처리한 결과 대조구에 비하여 1 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml 및 100 $\mu$ g/ml 농도에서 비장세포의 증식을 유도하였으나, 1000 $\mu$ g/ml 농도에서는 오히려 증식을 억제하였다.

## 2. 활용에 대한 건의

본 과제에서 산수유 기능성에 대한 연구는 산수유 및 개발 제품에 대한 기능성 탐색 정도에 불과하였으므로, 이 결과를 근거로 하여 산수유에 대한 더욱 진보적인 기능성 연구가 필요할 것으로 생각된다.

아울러 본 연구진행과정 및 결과는 오미자, 구기자 같이 산수유와 비슷한 열매에 그대로 적용 가능하리라 사료된다.

본 연구결과는 특허출원하고, 술, 음료 및 차의 제품생산라인을 갖춘 기업체에 기술을 이전하여 산업화가 가능하리라 생각된다.

## SUMMARY

I. Title : Development of Functional Food Products Using *Corni fructus*

II. The Goal and Rationale of the Research Project

*Corni fructus* is the pulp of the ripe fruit of *Cornus officinalis* Sieb. et. Zucc., which belongs to family of Cornaceae. After collected in the late fall, the fruit is baked over slow fire or scalded slightly in boiling water, and then dried in the sun or baked dry for use after removal of the fruit stone.

*Corni fructus* is slightly warm and non-toxic in property, and sour and astringent in flavor. It has been known to nourish the liver and kidney, and induce astringency to arrest incessant excessive loss of the body fluid. It has been used to cure dizziness and tinnitus, pains due to lassitude of the loins and knees, impotence and seminal emission, frequent urination, metrorrhagia and leucorrhea, prostration syndrome, and, inner fever and diabetes

It is produced about 30 tons a year in Sandong, Gurae in Jeollanamdo, which comprises about 60% of total production in Korea. *Corni fructus* produced in Sandong has renown for its high quality due to good-looking color, thick flesh of fruit and high in pharmaceutical efficacy. Therefore, the city government of Gurae has made efforts to develop *Corni fructus* products to raise as principal products of the locality. However, the market of the products is sluggish due to lacks of research and publicity.

Researches on chemical compositions of the fruit of *Cornus officinalis*, isolation of flesh of fruit by drying, nutritional components, sour principles, toxicity and lectin of the fruit stone have been reported. However, very little studies have been reported on the processing of functional food product of *Corni fructus*.

The present studies, therefore, were carried out to screen the physiological functions of *Corni fructus* and to develop various types of food products using the *Corni fructus*.

### III. Contents and Scope of the Project

1. Development of wine and fermented drink product using *Corni fructus*
  - 1) Establishment of a pretreatment process to improve the physicochemical properties of *Corni fructus*
  - 2) Search for an optimum species of yeast for brewing a *Corni fructus* wine
  - 3) Development of a wine using *Corni fructus* and fermentable carbohydrates
  - 4) Development of a wine using *Corni fructus* and rice
  - 5) Establishment of an optimum processing condition for a drink product of fermented *Corni fructus*
  - 6) Examine the changes in the chemical composition during fermentation
  - 7) Preparation of sample products
  
2. Physiological functions of *Corni fructus* and its food product
  - 1) *In vitro* or *in vivo* screening of antioxidant, antidiabetic and hypolipidemic activities of *Corni fructus*
  - 2) Screening of the physiological functions of solvent fractions
  - 3) Physiological functions of *Corni fructus* food product
  
3. Development of functional drink and tea product of *Corni fructus*
  - 1) To examine the effects of extraction medium on the physicochemical properties of the *Corni fructus* extract
  - 2) Establishment of an extraction condition
  - 3) Isolation of immunofunctional component

- 4) Establishment of the processing conditions for drink and tea product of *Corni fructus*
  - 5) Measurement of immunostimulating functions of extracts and food products of *Corni fructus*
4. Mass production of *Corni fructus* products and quality evaluation
- 1) Search for methods of reducing astringency and sourness of *Corni fructus*
  - 2) Establishment of the processing conditions for liquid and solid type food products of *Corni fructus*
  - 3) Preparation of sample products and quality evaluations of the products

#### IV. Results and Suggestions for Application of the Results

##### 1. Results

For the production of high quality wine with *Corni fructus*, the quality of raw *Corni fructus* was important in the point of color, low temperature natural drying and granule condition. Although fully ripened fruit was advantageous to immature one in color, fermentable sugar contents, sourness and astringency, the over-ripened fruit also can be used for the production of wine if it was not frozen on the tree.

The sourness and astringency of *Corni fructus* could be reduced by adjusting the initial ratio of sugar to *Corni fructus* to 6~9. The sourness and astringency could also be controlled some by pretreatment of *Corni fructus* with semisolid *Koji* cake using *Aspergillus oryze*.

For the alcohol fermentation of *Corni fructus*, *Saccharomyces* sp. KOFRI 013 was selected as a proper yeast species, being judged with proliferation, production of



ethanol and utilization of fermentable sugars. The ratio of *Corni fructus* to water was preferable in 5:1 or 7:1. As a fermentable sugar source, fructose and molasses were the proper ingredient at a concentration of 20%. Although alcohol production was slightly low, bee honey could also be used the fermentable sugar source as long as the taste is concerned.

The optimum temperature for the fermentation was found to be 20~25°C. The maximum alcohol concentration was 13.5% when fermented for 10~20 days. Fermentation at 5°C obtained high scores in sensory evaluation, while fermentation at 15°C produced sour taste and smell due to proliferation of acid producing bacteria.

To brew *Corni fructus-Nuruk* wine, the proper amount of *Corni fructus* and *Nuruck* were 6~10% and 4%, respectively. The alcohol production was 7.2~7.6%, and the unfermented total sugar content was 7.02~7.23%. Six days of main fermentation at 25°C followed by 60 days of ripening at 10°C was found to be optimum for the production of *Corni fructus-Nuruk* wine.

A *Koji* wine was produced using *Corni fructus*. As a yellowish *Koji*, *Aspergillus oryzae* was most efficient in digestion of polysaccharides to simple sugars which can be fermentable. Whitish *Koji* (*Rhizopus oligosporus*) and redish *Koji* had disadvantages of taking longer time to prepare *Koji* starter cake and low in amylase activity which results in low content of fermentable sugars, and consequently low in alcohol production. Whitish *Koji* produced less of bitter taste and sour taste, while overall acceptability was lower than yellowish *Koji* and redish *Koji* (*Monascus anka*). The adequate amount of *Corni fructus* added was 6~10% considering the production of alcohol and overall acceptability. The optimum fermentation of mash was found to be 40~60 days.

For the production of *Corni fructus* vinegar *Acetobacter* sp. KOFRI B-104 was selected as the starter bacteria. Optimum conditions for the fermentation

were 1.5~2% (w/v) of initial acidity, 7~8% of initial alcohol concentration and incubation temperature of 30°C. The addition of supplementary nutrients for the acetic acid producing fermentation of *Corni fructus* enhances the rate of fermentation. In the process of *Corni fructus* vinegar production, the appropriate amount of *Corni fructus* extract to be added was found to be 6%, while the use of reducing sugars and total sugar including free sugar were very low.

Acetic acid production rate was lowered as the amount of *Corni fructus* extract added were increased. However, the production of acetic acid was significantly increased by the addition of supplementary nutrients. The addition of supplementary nutrients also lowered the residual alcohol content in the final product of vinegar. When the *Corni fructus* extract was used at a level of 2~10%, total acidity of the product was no less than 5% and the acetic acid content of 3.97~5.25%. When the level of *Corni fructus* extract was increased to 8% and 10%, the acetic acid contents were decreased to 4.16% and 3.97%, respectively.

The color values of L, a and b were not changed significantly during fermentation, while the values were changed with the amount of *Corni fructus* extract used. Solid matter content of the *Corni fructus* vinegar was higher than that of commercial fruit vinegars, while lower than persimmon vinegar.

To obtain basic information for development of functional beverage and tea product using *Corni fructus*, physicochemical and functional characteristics of *Corni fructus* extracts were investigated. When *Corni fructus* was extracted with water at 80°C, turbidity and sweetness were highest with 8 or 10 hours of extraction. Yellowness and redness values of the extract were higher as the extraction time longer, but the lightness was not. Sensory evaluation of the extract showed that color, sourness, sweetness, astringency and flavor were generally highest with 8 or 10 hours of extraction. However, the overall acceptancy value was highest with 2 hours of extraction. According to above

results, 8 hours of extraction was suggested to be adequate for the extraction.

Reduction of sourness and astringency of *Corni fructus* were investigated with addition of sugars,  $\beta$ -cyclodextrin, sweetmate and various spices. When sucrose and fructose were added to 1% solution of *Corni fructus* extract at a concentration of 0-20%, the sensory scores of sourness, astringency and sweetness were improved as the concentration of the sugars increased, obtaining highest score of overall acceptability at a concentration of 15%.

When  $\beta$ -cyclodextrin is added, the sourness and astringency were improved as the concentration of the  $\beta$ -cyclodextrin increased. However, the other sensory parameters were inferior to those added with sucrose or fructose. The sourness and astringency were improved also by sweetmate. but the other sensory parameters were inferior to those added with sucrose, fructose or  $\beta$ -cyclodextrin.

Masking flavors were also effective in reducing the sourness and astringency of the *Corni fructus* extract. Among the 5 commercial masking flavors tested in the present study, M.S 1998-0-69 and M.S SF-474A were the best in reducing the sourness and astringency.

To establish the direction and strategy to develop *Corni fructus* drink product, commercial drink products of domestic and Japan in popular were collected and characterized. Domestic drink products were categorized into 4 types, products containing herb medicine, functional products, fruit juice products and carbonated drinks. Many of the drink products containing herb medicine had pH of 3.51~4.0, sweetness of 10.01~15.0 and taste of sweetness and bitterness. The functional drink products had pH of 3.01~3.5, sweetness of 10.01~15.0 and taste of sourness and sweetness.

Among the potential competing products to the *Corni fructus* drink product to be developed in the present study, the most popular 4 products were found to be "Youg-Bi-Cheon", "Royal-D", "Un-Ji-Cheon", and "Maek-Saeng" in

order. The age groups of the major consumers of the most popular 4 drink products were age groups of 40's and 30's.

From the informations on quality characteristics of commercial drink products and other informations, the direction of designing *Corni fructus* drink product was determined to be low in pH and sweetness to give freshness and to reduce bitter and sour tastes. The product is also to be added with sugars and vitamins to suit for the taste of the major target consumer groups of 30's and 40's as a health food.

For the formulation of *Corni fructus* drink product, sucrose and fructose was selected as sweeteners to reduce sour and astringent taste of *Corni fructus*. Several functional ingredients, such as trehalose, taurine and L-carnitine were also used to suit for the public taste. Manufacturing process was established to be suitable for mass production and production on a commercial scale.

Tea and soft capsule type products of *Corni fructus* high in added value were developed under consideration of conveniency. For the formulation of tea product anhydrous glucose was used as a sweetener because it was satisfactory in textural behavior, easiness of working and sensory properties. For the capsule type product of *Corni fructus*, soybean oil, palm oil, lecithin, gelatin, glycerin, Blue No 1, Yellow No 5 and Red No 40 were used. Manufacturing processes of tea and capsule type product were established to be suitable for mass production and production on a commercial scale.

The *Corni fructus* products of drink, tea and soft capsule type were tested for quality. The appearance of the product, flavor, sensory characteristics, *E. coli*, viable cell count, disruption and solubility are satisfactory for 4 months of storage at low temperature (5°C), room temperature and high temperature (37°C).

Hydrogen donating activities of the methanol extract of *Corni fructus* and chloroform, ethyl acetate, butanol and water subfractions of the methanol extract

were studied by measuring the removal of DPPH free radical. The methanol extract showed a dose of 50% removal (RD<sub>50</sub>) of 450 $\mu$ g, while BHT, a reference antioxidant, showed the RD<sub>50</sub> of 27 $\mu$ g. Among the subfractions ethyl acetate fraction had the highest activity of DPPH radical removal showing RD<sub>50</sub> of 85 $\mu$ g, followed by butanol fraction of 310 $\mu$ g, chloroform fraction of 490 $\mu$ g. The concentrate of *Corni fructus* extract used for drink type and solid type food product also showed a dose dependent activity of DPPH radical removal.

Antioxidant activity of *Corni fructus* extract against linoleic acid autoxidation was observed in water extract and 70%, 90% and 100% ethanol extract. Among the subfractions of ethanol extract, ethyl acetate soluble fraction had the highest activity of antioxidant against linoleic acid. Ursolic acid isolated from the chloroform soluble fraction of *Corni fructus* ethanol extract also inhibited the autoxidation of linoleic acid at a concentration of 100 $\mu$ g/ml.

In an *in vitro* model system of lipid peroxidation using liver homogenate, in which lipid peroxidation is induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and FeSO<sub>4</sub>, methanol extract of *Corni fructus* significantly inhibited the lipid peroxidation in a dose-dependent manner. Among the subfractions of methanol extract, ethyl acetate soluble fraction showed the most potent antioxidant activity in the liver homogenate.

Antidiabetic functions of *Corni fructus* were investigated in hyperglycemic rats treated with streptozotocin. The streptozotocin-treated rats showed symptoms of polydipsia, polyphasia and polyuria, typical symptoms of severe diabetes. The diabetic rats had very low weight gain despite the polyphasia. The symptoms of polydipsia, polyphasia, polyuria and low growth, as well as hyperglycemia were improved by oral treatment of the methanol extract of *Corni fructus* and subfractions of the methanol extract. Among the subfractions of methanol extract, chloroform soluble fraction was most effective for improving the diabetic symptoms.

The streptozotocin-induced diabetic rats had significantly higher values of plasma GOT and GPT than normal rats, which was lowered by oral treatment of the methanol extract of *Corni fructus* and subfractions of the methanol extract. Among the subfractions, butanol soluble fraction was most effective in lowering the plasma levels of GOT and GPT.

The diabetic rats had higher levels of plasma total cholesterol and LDL-cholesterol and lower level of HDL-cholesterol, consequently higher value of atherogenic index than the normal rats. The diabetic rats had also higher level of plasma triglyceride than the normal rats. The hyperlipidemia in diabetic rats was improved some by feeding *Corni fructus* or by oral administration of the methanol extract and subfractions of the methanol extract. The anti-hyperlipidemic effect of *Corni fructus* was found to be highest in the ethyl acetate soluble fraction.

The diabetes induced by streptozotocin came with fatty liver characterized by elevated level of liver cholesterol and triglycerides. The high level of liver lipids were lowered some by feeding *Corni fructus* or by oral administration of the methanol extract and subfractions of the methanol extract. The lipotropic effects of *Corni fructus* was found to be highest in the ethyl acetate soluble fraction.

Hypolipidemic functions of *Corni fructus* were investigated in rats fed with an atherogenic diet containing butter and cholesterol. The rats fed atherogenic diet had higher levels of plasma total cholesterol and LDL-cholesterol and lower level of HDL-cholesterol, consequently higher value of atherogenic index than the normal rats. The rats fed the atherogenic diet had also higher level of plasma triglyceride and liver lipids than the rats fed corn oil diet. The hyperlipidemia and fatty liver in rats fed atherogenic diet were improved some by feeding *Corni fructus* or by oral administration of the methanol extract and subfractions of the methanol extract. The anti-hyperlipidemic and lipotropic effects of *Corni fructus* were found to be highest in the ethyl acetate soluble

fraction of methanol extract.

Extracts of distilled water, 70%, 90% and 100% ethanol were tested for the enhancement of immune function. When the extracts were added to culture medium of mouse spleen cell at concentrations of 1  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$  and 100  $\mu\text{g/ml}$ , only the 70% ethanol extract was observed to enhance proliferation of mouse spleen cell. When ConA or LPS was added to spleen cell culture medium along with the extracts, water extract inhibited the growth of cell, while ethanol extract stimulated the growth of spleen cell.

When the *Corni fructus* extracts of distilled water, 70%, 90% and 100% ethanol were tested for the growth of cancer cell at concentrations of 10  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$  and 1000  $\mu\text{g/ml}$ , the extracts suppressed growth of A549, a human lung cancer cell line, and MCF-7, a human breast cancer cell line, at a concentration of 1000  $\mu\text{g/ml}$ .

To isolate active compounds of anti-cancer function, the methanol extract of *Corni fructus* was fractionated sequentially with hexane, chloroform, ethyl acetate, n-butanol and water. The hexane soluble fraction and chloroform soluble fraction showed cytotoxic activities against A549, a human lung cancer cell line, and MCF-7, a human breast cancer cell line in a dose dependent manner, while the other fractions didn't. The hexane fraction and chloroform fraction were subjected to silica gel column chromatography repeatedly. From the column chromatography of the fractions, two active compounds, compound 1 and 2, were isolated. Of the two active compounds, the compound 2 was identified to be ursolic acid according to the structural information of IR, mass spectroscopy and NMR.

Cytotoxic effects of the compounds isolated from hexane and chloroform fractions on cancer cells were investigated *in vitro*. The compound 1, a substance isolated from the hexane fraction, at a concentration of 10  $\mu\text{g/ml}$ , showed

cytotoxicity of 41.66% against A549, 17.74% against MCF-7, and 33.71% against HL-60. The compound 2, isolated from the chloroform fraction showed 9.25%, 8.92% and 23.61% cytotoxicity against the human cancer cell lines of A549, MCF-7 and HL-60, respectively, at a concentration of 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Marked morphological changes in cancer cells were observed with the substances. Nuclei were shrunk and the cells were observed to be detached from the plate when the cancer cell lines of A549 and MCF-7 were treated with the isolated compounds.

## 2. Suggestions for Application of the Results

The investigation of basic and processing technology for manufacturing functional food products of *Corni fructus* has been successfully carried out. The processing technology developed in the present study may be applied directly to other fruit type herbal medicine, such as *Schisandrae fructus* and *Lycii fructus*.

The acquired basic information and processing skills are suggested to be transferred to any demanding companies which have processing lines of wine, drink and tea, or to be industrialized through establishing processing plants in the local area.





# CONTENTS

Chapter 1. Introduction .....	29
Chapter 2. Domestic and International Trends .....	31
Chapter 3. Research Contents and Results .....	33
1. Development of <i>Corni fructus</i> wines .....	33
2. Development of fermented drink products using <i>Corni fructus</i> .....	59
3. Development of drink products using <i>Corni fructus</i> .....	73
4. Development of tea and soft capsule product using <i>Corni fructus</i> .....	95
5. Antioxidant activities of <i>Corni fructus</i> .....	103
6. Antidiabetic functions of <i>Corni fructus</i> .....	111
7. Hypolipidemic and lipotropic activities of <i>Corni fructus</i> .....	123
8. Immunostimulatory functions of <i>Corni fructus</i> .....	133
9. Anticancer functions of <i>Corni fructus</i> .....	141
Chapter 4. Degrees of Achieving the Research Goals and Contribution to the Related Fields .....	173
Chapter 5. Plans for the Utilization of Results .....	175
Chapter 6. Scientific and Technological Informations Collected during the Study .....	177
Chapter 7. References .....	179



## 목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요 .....	29
제 2 장	국내외 기술개발 현황 .....	31
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과 .....	33
제 1 절	산수유를 이용한 약용 발효주 개발 .....	33
1.	재료 및 방법 .....	33
2.	결과 및 고찰 .....	41
제 2 절	산수유를 이용한 발효음료 개발 .....	59
1.	재료 및 방법 .....	59
2.	결과 및 고찰 .....	62
제 3 절	산수유를 이용한 음료 개발 .....	73
1.	재료 및 방법 .....	73
2.	결과 및 고찰 .....	75
제 4 절	산수유를 이용한 차와 캡슐제품의 개발 .....	95
1.	재료 및 방법 .....	95
2.	내용 및 결과 .....	96
제 5 절	항 산화 활성 .....	103
1.	재료 및 방법 .....	103
2.	결과 및 고찰 .....	105
제 6 절	항 당뇨 활성 .....	111
1.	재료 및 방법 .....	111
2.	결과 및 고찰 .....	113
제 7 절	고지혈증 개선 효과 .....	123
1.	재료 및 방법 .....	123
2.	결과 및 고찰 .....	124

제 8 절	산수유 추출물 및 제품의 면역 활성 .....	133
1.	재료 및 방법 .....	133
2.	결과 및 고찰 .....	134
제 9 절	산수유 추출물 및 제품의 항암 활성 .....	141
1.	재료 및 방법 .....	141
2.	결과 및 고찰 .....	143
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	173
제 5 장	연구개발결과의 활용계획 .....	175
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	177
제 7 장	참고문헌 .....	179

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

산수유는 층층나무과에 속한 낙엽활목이며, 약용수로 전국에 식재하고 있으며, 중국으로부터 도입된 것으로 알려져 왔으나 최근의 조사에 의하면 우리나라에서 자랐던 토종나무라고 학자들이 밝히고 있다. 생약 산수유는 가을에 익은 산수유의 열매를 따서 씨를 뽑아내고 햇볕에 말린 것을 말하며, 예로부터 중요한 한약제로 사용되어 왔다. 산수유는 그 맛은 시고 성질은 약간 따뜻하며, 간경, 신경에 좋으며, 이뇨작용, 혈압강화작용, 단백질의 소화를 돕는 작용, 항암작용, 항균작용 등이 있다고 동의학에서는 말하고 있다.

산수유는 중국과 일본에서 생산되지만, 우리나라에서는 전라도, 경기도, 충청도 일부 지역에 생산되나 전남 구례 산동에서 연간 약 30톤을 생산하여 국내 총 생산의 60% 이상을 차지하고 있다. 산동산 산수유는 자연 환경과 토질 기후가 적합하여 색깔이 곱고 육질이 두터우며 그 약리효능이 우수하여 국내외에서 최고급품으로 인정받아 일본, 대만, 홍콩 등으로 산동 산수유만이 수출되고 있다. 이에 구례군은 산수유를 특산물사업으로 지정하여 산수유차 등을 개발하여 명품으로 육성하고자 노력하고 있으나 연구 및 홍보부족 등으로 인하여 판매가 저조한 실정이다.

산수유에 대한 연구로는 산수유 열매의 화학성분과 건조에 따른 과육분리의 특성, 건조방법에 따른 산수유의 영양성분, 산수유의 신맛 성분, 산수유 종자의 독성과 렉틴 성분에 대한 연구가 있으나 산수유 가공품 개발과 산수유를 이용한 기능성 식품에 대한 연구는 거의 없는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 산수유를 이용하여 기호성을 가지면서도 산수유의 생리활성 효능을 갖는 기능성 식품을 개발하기 위하여 산수유에 대한 항당뇨, 항산화, 고지혈증 예방 효과, 항암 및 면역활성 등과 같은 다양한 생리기능성을 탐색하였고, 이들 생리활성 성분을 분리하였으며, 또한 이들 활성 성분을 함유한 발효주, 차 및 음료를 개발하였으며, 아울러 이들 제품에 대한 기능성을 조사하였다.



## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

산수유에 대한 연구로는 산수유 열매의 화학성분과 건조에 따른 과육분리의 특성, 건조방법에 따른 산수유의 영양성분, 산수유의 신맛 성분, 산수유 종자의 독성과 렉틴 성분에 대한 연구가 있으나 산수유 가공품 개발과 산수유를 이용한 기능성 식품에 대한 연구는 거의 없는 실정이다.

이에 관련하여 본 연구자들은 산수유의 기능성에 대하여 기초적인 실험을 행하여 왔으며, 그중 일부는 학회에 투고한 바 있다. 또한 각종 기능성 식품을 개발하여 특허를 출원하였으며, 그 중 일부는 현재 국내에서 성공적으로 유통되고 있을 뿐만 아니라 미국, 일본 등 해외에도 수출되고 있다.

본 연구가 성공적으로 수행된다면 지리산 서남부쪽에 위치한 지리산 온천랜드, 구례 화엄사 및 천은사 등을 포함한 관광 및 휴양 명소와 연계하여 산수유고장 관광 토속상품으로 개발될 수 있으며, 또한 국내 및 국제특허가 가능하므로 외화획득에도 한 몫을 담당할 수 있으리라 기대된다.





## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 산수유를 이용한 약용 발효주 개발

#### 1. 재료 및 방법

##### 1) 재료

##### 가. 재료의 이용형태

산수유 발효주를 제조하는데 있어서 산수유 재료의 가공적성을 파악하기 위하여 그 재료를 5 가지 형태인 ①세절 생과 ②자연건조물 ③자연 건조분말 ④열풍 건조분말 ⑤착즙액을 제조하였다.

##### 나. 산미와 삼미를 줄이기 위한 처리

산수유는 재료 그 자체가 신맛과 떫은맛이 강하여 발효 전후나 숙성과정 전후에 적당하게 맛의 조절이 필요하다. 즉 ①산미를 줄이는 방법은 보당에 의하여 당산비(sugar/acid ratio)를 높이는 방법을 사용하였으며, ②떫은맛을 줄이는 방법은 당산비 조절이나 알코올 발효에 의한 산수유 중의 수용성 탄닌을 불용성 탄닌으로 전환시켜 부분적인 해결점을 모색하였다.

##### 다. 산수유 발효주 제조를 위한 최적 효모균주의 선정

산수유는 신맛과 떫은맛이 강한 특징을 갖고 있으나, 자체 발효성 당을 많이 함유하고 있다. 또한 산수유 표면에 존재하는 야생 자연효모는 알코올 발효력이 낮고, 기타 부산물(저급알코올, 퓨젤유, 카르보닐화합물류 등)을 많이 생성하는 특징이 있기 때문에 산수유 발효에 적합한 최적 발효균주를 선발할 필요성이 있다. 최종 산수유 발효균주의 선정은 본 연구자들이 확보하고 있는 알코올 발효력이 높은 균주(KOFRI)와 기존의 한국미생물보존센터(KCTC), 유전자은행(KCCM)과 미국균주보관협회(ATCC) 및 일본식품종합연구소(NFRI)에서 분양받은 것을 포함하여 총 17균주를 대상으로 최적 균주를 선발하였다(Table 3.1.1).

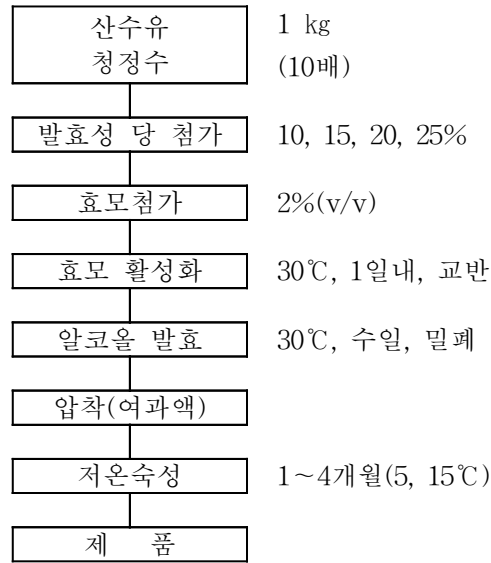
Table 3.1.1. List of alcohol-fermenting yeast strain used in development of *Corni fructus* - fermented wine

Yeasts	Characteristics	Remarks
<i>Saccharomyces bayanus</i> KCCM 11568	Brewery yeast	
<i>Saccharomyces formosensis</i> (Sake 1, Japan)	Brewery yeast	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 13668	Sake, wine yeast	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 56478	Red wine yeast	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IFO 2346	Sake, wine yeast	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KCCM 11354	Wine yeast	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KCCM 11306	Sake yeast	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KCCM 12028	Brewery yeast	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KCCM 11215	<i>Yakju</i> yeast	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KCCM 12632	Brewery yeast (coagulant)	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 26603	Brewery yeast (coagulant)	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NFRI 3002	Sake yeast	
<i>Saccharomyces sake</i> NFRI 2013	Sake yeast	
<i>Saccharomyces</i> sp. KOFRI Y-013	Brewery yeast	Isolated strain
<i>Saccharomyces</i> sp. KOFRI Y-121	Brewery yeast	Isolated strain
<i>Saccharomyces uvarum</i> ATCC 26602	Brewery yeast	
<i>Saccharomyces uvarum</i> KCCM 12244	Brewery yeast	

## 2) 발효성 당을 이용한 산수유 발효주(이하, 산수유 당발효주)의 제조

### 가. 제조공정

산수유 1 kg에 청정수를 10배 가량 첨가하고, 발효성 당을 10, 15, 20, 25%를 첨가한 다음, 효모 전배양액을 2%(v/v)를 가하여 2일간 20℃에서 발효덧을 5~6회/1일 교반시켜 최대한 효모를 증식시킨 다음, 그 이후는 밀폐성 알코올 발효를 행하였다. 발효 후 고형물을 압착·여과하여 제거한 후, 120일간 5℃와 15℃에서 저온숙성을 행하였다.



나. “산수유 당발효주” 제조를 위한 산수유 수확시기 결정

전남 구례군 산동면 야산에서 생육하는 육질이 두텁고 색깔이 고운 양질의 산수유를 시기별로 채취하였다. 즉 산수유의 만개일을 기준으로 1차(미숙과), 2차(완숙과), 3차(과숙과) 시기별로 채취하여 “산수유 당발효주”의 제조에 적합한 최적의 수확시기를 결정하였다.

다. 산수유와 물의 배합비율 결정

산수유와 물의 배합비율을 1 : 3, 1 : 5, 1 : 7, 1 : 9(w/w)로 하고 발효성 당을 15%(w/v)첨가한 다음, 산수유 알코올 발효에 적합한 우수한 우량효모( $1.5 \times 10^6$  세포 / mL)를 접종하여 30℃에서 2~3일간 발효 덧을 5~6회 교반(1일 이내)시켜 최대한 효모를 활성화 및 알코올 발효시킨 후, 저온숙성시킨 다음, 여과시켜 그 여과액을 분석 시료로 사용하였다.

라. 보당의 종류 및 적정 농도 결정

발효할 때 첨가하는 당은 꿀, 설탕, 과당, 과일즙을 이용하였으며, 보당의 적정농도는 산수유를 기준으로 각 시료 당 10, 15, 20, 25%(w/v)을 첨가한 후, 알코올 발효 우

량효모( $1.5 \times 10^6$  세포/mL)를 접종하여 (다) 항과 동일하게 처리하여 여과시킨 여과액을 분석시료로 사용하였다.

마. 최적 발효온도 및 기간 결정

최적의 산수유와 물의 적정 배합비율, 첨가하는 당과 적정 농도에서 15, 20, 25, 30℃에서 2~3일 발효시킨 다음, 저온에서 30일~120일간 숙성시킨 후, 여과시킨 그 여과액을 분석시료로 사용하였다.

바. 최적 숙성기간 결정

최적 발효조건에서 완성된 산수유 발효주를 저온(5℃, 15℃)에서 30, 60, 90, 120일 숙성시킨 “산수유 당발효주”를 분석시료로 사용하였다.

3) 누룩 발효제와 산수유를 이용한 발효곡주(이하, **산수유 누룩곡주**)의 제조

누룩을 발효제로 사용하면 산수유 발효곡주에 방향성이 매우 좋을 것으로 판단되며, 전통 민속주를 제조하는 방법으로서 최적화 공정이 확립되면, 농민들이나 영농조합법인 단체에서 “산수유 누룩곡주”를 제조하는데 있어서 쉽게 사용할 것으로 판단된다.

가. 산수유 첨가량(배합비율) 결정

덧밥(원료미)과 밀술(누룩, 곡자)의 합한 양(20.5kg)에 대하여 산수유를 2, 6, 10, 14%(w/v) 농도로 첨가하여 고르게 섞은 다음, 주모를 0.5L를 첨가하여 밀술로 담근다.

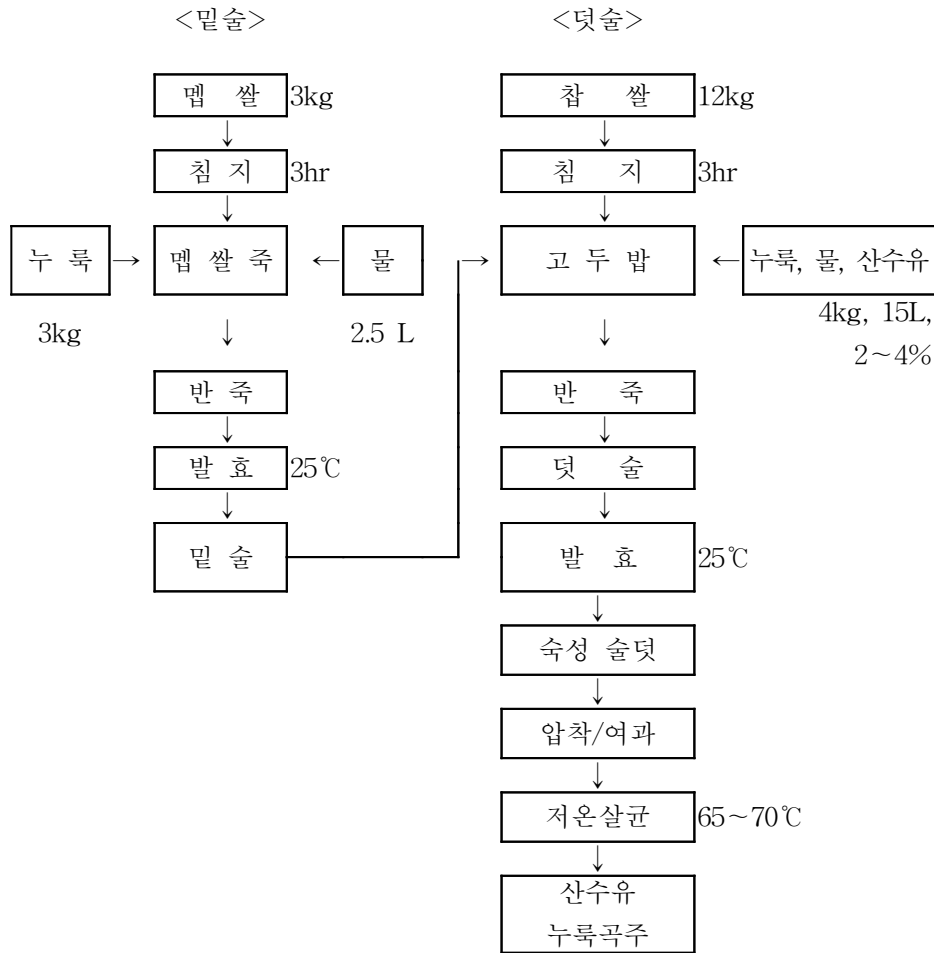
나. 누룩의 사용량 결정

덧밥에 대하여 누룩을 2, 4, 6, 8%(w/v) 농도로 첨가하여 고르게 섞은 다음, 주모를 0.5L를 첨가하여 밀술로 담근다.

다. 최적 발효기간 결정

최적 담금 배합비율에서 25℃에서 주발효 기간(1, 3, 6, 9일)과 저온에서 후발효 기간 혹은 숙성기간(30, 60, 90일)으로 하였다.

라. 누룩을 발효제로 사용하는 “산수유 누룩곡주”의 제조공정



4) 중국 발효제와 산수유를 이용한 발효 곡주(이하, **산수유 중국곡주**)의 제조 산수유 발효주의 품질관리와 자동화를 이루어 산업화 적용에 유리한 중국이용 방법을 활용하고자 하였다. 산수유 발효주는 깊고 진한 맛이 적고, 방향성이 약한 결점이 있으므로 찹쌀을 이용한 “산수유 중국곡주”를 제조하였다.

#### 가. 중국의 종류

찹쌀을 가수분해하여 발효성 당류를 생산할 수 있는 3 가지의 amylase 고 생산균 주의 종균 입국을 제조하여 전분질 분해효소의 공급원으로 이용하였다(Table 3.1.2).

Table 3.1.2. Characteristics of starch - hydrolyzing *koji* used in development of *Corni fructus* - fermented wine

Koji	Genus	Characteristics
Yellowish	<i>Aspergillus oryzae</i> KOFRI M-12	Yellowish pigment, potent $\alpha$ -amylase and glucoamylase activity
Whitish	<i>Rhizopus oligosporus</i> KOFRI M-37	Non pigment, $\alpha$ -amylase and $\beta$ -amylase activity
Redish	<i>Monascus anka</i> KOFRI M-43	Redish pigment $\alpha$ -amylase and glucoamylase activity

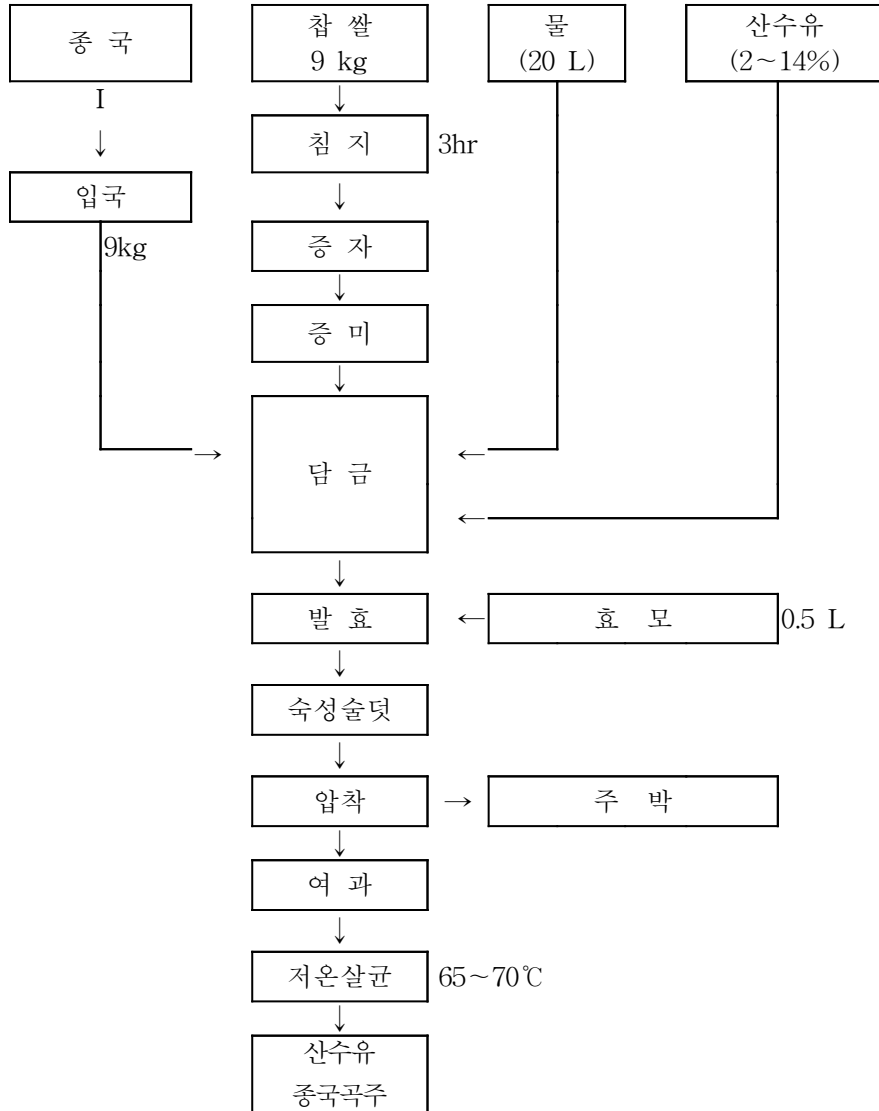
#### 나. 산수유 첨가량(배합비율)

덧밥(원료미)과 입국을 합한 양(20 kg)에 대하여 산수유를 2, 6, 10, 14%(w/v)농도로 첨가하여 고르게 섞은 다음, 주모 0.5L를 첨가하여 입국과 함께 밀술로 담갔다.

#### 다. 최적 발효기간 결정

최적 담금 배합비율에서 25℃에서 주발효 기간(1, 3, 6, 9일)과 저온에서 후발효 기간 혹은 숙성기간(20, 40, 60일)을 결정하였다.

라. 종국을 발효제로 사용하는 “산수유 중국곡주”의 제조공정





## 5) 산수유 발효주의 이화학적 분석 및 관능검사

### 가. 일반성분

산수유의 수확시기별로 수분, 조단백질, 조지방, 섬유질 및 조회분은 상법에 준하여 분석하였다.

### 나. pH 및 총산도

pH는 산수유주의 발효 여과액의 일부를 취하여 유리전극 pH meter(Fisher, U.S.A.)로 측정하였으며, 총산도는 발효 여과액 20 mL를 취하여 pH 8.3이 될 때까지 소비되는 0.1N NaOH의 양(mL)을 malic acid로 환산하여 나타내었다.

### 다. 당질 측정

당질 정량은 시료를 산 가수분해하거나 혹은 발효액 1 mL를 취하여 미리 작성한 표준 곡선내에 포함되는 흡광도 범위로 적당히 희석한 후, 여과하여 DNS법으로 정량하여 glucose로 환산하여 표시하였다.

### 라. 잔류 알코올 분석

초산발효가 끝난 후 시료 중의 ethyl alcohol 함량은 시료 100 mL에 증류수 30 mL를 가하여 상압 증류한 후, 그 유액 100 mL를 취하였다. 그 유액을 주정계로 주정도수를 측정하고, 온도계로 품온을 측정하여 주정 온도 보정표에 의하여 용량 %를 구하였다. 유액에 휘발성 유기산이 존재할 수 있으므로 시료를 먼저 1N NaOH로 중화시킨 다음, 주정도를 측정하였다.

### 마. 색도 측정

색도는 색도계(Chromameter, Model CR-200, CT-210, Minolta Co., Japan)에 의하여 L(백색도), a(적색도), b(황색도)값을 각각 5회 반복 측정하였으며, 이때 사용한 표준 백색판의 L, a, b값은 각각 89.2, 0.921 및 0.78이었다.

#### 바. 안토시안 측정

안토시안색소 함량의 측정은 발효액을 10 mL(W)를 여과하여 200 mL로 정용하여 535 nm에서 흡광도(OD)를 측정하여, 다음 식에 의하여 총 안토시안의 함량을 계산하였다.

$$\text{총 안토시안(mg\%)} = \text{OD} \times (200/W) \times 100 \times (1/65.1)$$

#### 사. 산 생성균 계수

산생성 세균균의 생균수 측정은 무균적으로 시료를 멸균 생리식염수로 3단계 희석법에 따라 희석한 다음, 산생성균용 배지(ATCC 1019 / LBS medium)를 이용하여 평균 도말하고 30±1℃에서 2~5일간 배양한 후 나타난 colony수를 측정하였다.

#### 아. 관능검사

산수유 발효주의 관능적 품질평가는 훈련된 남녀 관능검사원 10명을 선정하여 관능검사 방법을 충분히 숙지시킨 후, 관능검사를 실시하였다. 즉 관능적 품질평가는 색깔, 맛 혹은 신맛과 쓴맛, 종합적인 맛으로 평가하였고, 각 시료 모두 5점 척도법으로 측정하였다.

## 2. 결과 및 고찰

### 1) 산수유 발효주의 가공적성을 향상시키기 위한 원료의 전처리

#### 가. 재료의 이용형태

산수유 발효주를 제조함에 있어서 산수유 재료의 가공적성을 파악하기 위하여 산수유의 과육을 5가지로 형태로 제조하였다. 즉 ① 세절 생과, ② 자연건조물 ③ 자연 건조분말 ④ 열풍 건조분말 ⑤ 착즙액을 이용하는 방법에 대한 타당성을 검토한 결과는 Table 3.1.3과 같다.

산수유의 재료 가공적성을 파악하기 위하여 산수유의 5가지의 기본적 품질특성을 조사한 결과, 세절한 생과는 수분 74.82%, 당질 17.36%, 산도 2.34% 및 안토시안 78.93 mg%를 나타냈으며, 이를 기준으로 낮은 온도에서 자연 건조한 것과 그 분말은 산수유주의 제

조에서 색깔면으로 이용하기에 아주 유리하였으며, 생과는 저장성 문제로 보관성이 낮아서 실제적인 산업적 이용도는 낮은 것으로 판단되었다. 한편 열풍 건조분말은 건조과정에서 산수유중의 안토시아닌 파괴 및 변색현상이 일어나므로, 문제는 있었지만 산업적인 대량처리에는 적당한 것으로 판단되었다. 또한 생과 산수유의 착즙액을 이용하는 것은 그 착즙율이 매우 낮았다.

Table 3.1.3. Quality properties of *Corni fructus* flesh prepared by different process

Type	Hunter color			Moisture (%)	Sugar(%)	Acidity (%)	Anthocyanin(mg%)
	L	a	b				
Sliced fresh fruit	26.72	14.79	5.82	74.82	17.36	2.34	78.93
Dry fruit (Natural)	24.40	8.56	3.86	17.89	58.23	4.38	173.21
Dry powder (Natural)	33.84	22.36	11.88	18.64	59.01	4.41	169.83
Dry powder (Heat)	22.43	15.73	12.21	16.23	58.03	4.10	153.90
Fresh extract	46.47	4.96	6.43	94.21	8.82	2.23	38.41

#### 나. 산미과 삼미를 줄이기 위한 처리

산수유는 재료자체가 신맛(산미)과 떫은맛(삼미)이 강하여 발효 전후나 숙성과정 전후에 적당하게 조절할 필요가 있다. 즉 ① 산미를 줄이는 방법은 보당에 의하여 당산비(sugar/acid ratio)를 높이는 방법을 선택하였으며 ② 산수유중의 떫은맛을 줄이는 방법은 수용성 탄닌을 불용성 탄닌으로 전환하여 해결하고자, 산수유 재료에 에탄올, 탄산가스 및 제국처리와 같은 탈삼처리에 의한 결과는 Table 3.1.4 와 같다.

산미나 삼미를 줄이기 위하여 초기 당과 산수유의 비율을 약 6~9의 비율로 조절하면 약간 이들의 관능적 강도(산미, 삼미)를 감소시킬 수 있어서 종합적인 기호도를 약간 증가시킬 수 있었다. 또한 에탄올, 탄산가스 및 제국처리에 의한 방법에서 탄산가스와 에탄올 처리는 효과가 낮았으나, 산수유를 유용곰팡이를 이용한 반고체 배양법으로 전처리하면 산미와 삼미를 감소시키는데 부분적인 효과가 있었다.

Table 3.1.4. Sensory evaluation of *Corni fructus* flesh treated with some processes for inhibition of sour and bitter taste

Sensory evaluation	Sugar/ <i>Corni fructus</i> ratio			Inhibition of bitter taste		
	3	6	9	Ethanol	CO <sub>2</sub>	<i>Koji</i> making
Sour	+++	++	+	+++	+++	++
Bitter	+++	++	++	++	+++	++
Overall-eating quality	+	++	+++	++	+	+++

⊗ Sour & bitter(intensity)

## 2) 산수유 발효주 제조를 위한 최적 효모균주 선정

산수유는 신맛과 떼은맛이 강한 특징을 갖고 있으며, 그러나 자체 발효성 당을 많이 함유하고 있다. 산수유의 표면에 존재하는 야생 자연효모는 알코올 발효력이 낮고 기타 부산물(저급알코올, 퓨젤유, 카르보닐화합물류 등)을 많이 생성하는 특징이 있기 때문에 산수유 발효에 적합한 최적 발효균주를 선발할 필요성이 있다. 최종 산수유 발효균주의 선정은 본 연구자들이 확보하고 있는 알코올 발효력이 높은 균주(KOFRI)와 한국미생물보존센터(KCTC), 유전자은행(KCCM)과 미국균주보관협회(ATCC) 및 일본총합연구소(NFRI)에서 분양받은 것을 포함하여 총 17개 효모균을 대상으로 최적 균주를 선발한 결과는 Table 3.1.5와 같다. 산수유 추출물에 보당한 다음, 17가지의 효모에 대한 균체 증식율, 에탄올 생성량 및 발효성 당의 이용률을 조사한 결과 (Table 3.1.5), 대부분의 효모는 산수유 추출물의 저농도에서는 균체 증식과 알코올 생성에 문제가 없었으나, 고농도 산수유 추출액에서는 다소 문제가 있었다. 공시균주로서 조사한 균주 중에서 산수유 발효주 균주로는 현재 한국전통발효식품연구소에서 분리 보관중인 *Saccharomyces* sp. KOFRI Y-013 균주가 가장 적합한 것으로 나타났다.

Table 3.1.5. Growth, ethanol and residual sugar contents of ethanol-producing yeasts used in this study

Strains	Characteristics	Growth (OD)	EtOH (%)	Sugar (%)
<i>S. bayanus</i> KCCM 11568	Brewery yeast	0.743	12.8	2.6
<i>S. formosensis</i> (Sake 1, Japan)	Brewery yeast	0.631	12.6	2.5
<i>S. cerevisiae</i> ATCC 13668	Sake, wine yeast	0.568	10.5	3.4
<i>S. cerevisiae</i> ATCC 56478	Red wine yeast	0.783	11.1	2.9
<i>S. cerevisiae</i> IFO 2346	Sake, wine yeast	0.688	10.3	3.7
<i>S. cerevisiae</i> KCCM 11354	Wine yeast	0.632	10.8	3.6
<i>S. cerevisiae</i> KCCM 11306	Sake yeast	0.674	9.4	4.1
<i>S. cerevisiae</i> KCCM 12028	Brewery yeast	0.569	8.5	4.5
<i>S. cerevisiae</i> KCCM 11215	<i>Yakju</i> yeast	0.783	11.6	2.8
<i>S. cerevisiae</i> KCCM 12632	Brewery yeast (coagulant)	0.341	9.9	4.0
<i>S. cerevisiae</i> ATCC 26603	Brewery yeast (coagulant)	0.437	10.3	3.9
<i>S. cerevisiae</i> NFRI 3002	Sake yeast	0.790	12.1	2.7
<i>S. sake</i> NFRI 2013	Sake yeast	0.682	11.8	2.8
<i>Saccharomyces</i> sp. KOFRI Y-013	Brewery yeast	0.827	13.8	1.9
<i>S. cerevisiae</i> KOFRI Y-121	Brewery yeast	0.797	12.5	2.6
<i>S. uvarum</i> ATCC 26602	Brewery yeast	0.789	12.2	2.8
<i>S. uvarum</i> KCCM 12244	Brewery yeast	0.782	12.7	2.6

### 3) 산수유와 발효성 당을 이용한 “산수유 당발효주”의 제조

#### 가. 발효주 제조를 위한 적정 산수유 수확시기 결정

전남 구례군 산동면 야산에서 생육하는 육질이 두텁고 색깔이 고운 양질의 산수유를 시기별로 채취하였다. 즉, 산수유 과육의 숙도를 기준으로 1차(미숙과), 2차(완숙과), 3차시기(과숙과, 동해를 입기 전)별로 채취하여 “산수유 당발효주”의 제조에 가장 적합한 최적의 수확시기를 결정한 결과는 Table 3.1.6과 같다. 산수유 제조에 적합한 산수유 수확시기는 완숙과가 색깔이 양호하였고, 미생물 발효에 필요한 발효성 당 및 신맛

이나 쓴맛의 문제에서 다소 유리하였으며, 그러나 과숙과도 냉해를 받지 않은 것은 큰 문제가 없었다(Table 3.1.7). 그러나 과숙과는 색상에서 안토시아닌 색소를 많이 함유하고 있어 그 이용에는 유리하였지만, 어두운 붉은 빛깔을 나타내었다.

Table 3.1.6. Changes in proximate components of *Corni fructus* flesh (%)

Sample	Moisture	Crude protein	Crude lipid	Crude fiber	Crude ash
Immature	77.01	1.12	1.44	4.06	1.62
Mature	74.90	1.13	1.57	3.64	1.68
Overmature	72.21	1.27	1.73	3.51	1.73

Table 3.1.7. Changes in Hunter color, acidity, taste and their components of *Corni fructus* flesh

Sample	Sour	Astringent	Hunter color			Sugar (%)	Acidity (%)	Anthocyanin (mg%)
			L	a	b			
Immature	+++	++	32.18	11.95	6.62	12.48	2.89	62.72
Mature	++	+++	27.08	14.65	5.86	17.35	2.84	75.65
Overmature	++	+++	21.38	15.23	5.81	18.69	2.21	78.21

#### 나. 산수유와 물의 배합비율 결정

산수유와 물의 배합비율을 1 : 3, 1 : 5, 1 : 7, 1 : 9로 하고 발효성 당을 15%(w/v)첨가한 다음, 알코올 발효의 우량효모( $1.5 \times 10^6$ 세포/mL)를 접종하여 30℃에서 2일간, 발효덧을 1일 5~6회 교반시켜 최대한 효모를 증식시킨 다음, 그 이후부터 혐기적 상태를 유지하기 위하여 밀폐시켜서 20℃에서 알코올 발효시킨 후, 그 여과액을 분석한 결과는 Table 3.1.8과 같다. Table에서 나타난 바와 같이 산수유 발효주 제조에서 산수유와 물의 배합비율은 1 : 5나 1 : 7로 할 때가 전체적으로 유리할 것으로 판단되었다.

Table 3.1.8. Changes in quality properties of *Corni fructus* - fermented sugar wine prepared by different formulation ratio of raw material to H<sub>2</sub>O

Ratio (Raw material/ H <sub>2</sub> O)	pH	Acidity (%)	Sugar (%)	EtOH (%)	Hunter color			Sensory score		
					L	a	b	Sour	Astrin- gent	Overall -eating taste
1 : 3	3.8	0.57	3.77	13.4	52.12	16.32	20.63	3.2	2.8	3.8
1 : 5	3.9	0.48	3.73	13.8	53.87	16.29	20.76	3.0	2.7	4.2
1 : 7	4.1	0.43	3.40	13.2	53.90	16.05	20.81	2.6	2.3	3.6
1 : 9	4.3	0.39	3.22	12.3	54.21	15.91	20.94	2.5	2.0	3.2

#### 다. 발효공정에서 보당의 종류 및 적정 농도 결정

발효공정에서 첨가하는 당은 꿀, 백설탕, 과당, 물엿 및 사과즙액을 각각 15%(w/v) 첨가하거나 농축사과 과일즙을 이용하여 산수유주의 발효성 당으로서 적합성을 조사한 결과는 Table 3.1.9와 같다. 알코올 생성량으로는 과당과 물엿이 우수하였으며, 꿀은 약간 생성량이 낮았다. 색도는 당 종류에 따라 큰 차이는 없었지만, 종합적인 관능 점수는 꿀과 물엿이 좋았다. 이후의 실험은 가격적인 면이나 알코올 생성량으로 보아 물엿을 대상으로 실험을 실시하였다.

한편, 보당의 적정농도는 산수유를 기준으로 꿀을 10, 15, 20, 25%(w/v)을 첨가한 후, 알코올 발효 우량효모( $1.5 \times 10^6$ 세포/mL)를 접종하여 20℃에서 발효하고 여과시킨 여과액을 분석한 결과는 Table 3.1.10과 같다. 당 농도별 발효 후 산수유주의 품질특성은 pH와 산도는 큰 차이가 없었으며, 잔존하는 총당은 2.8~5.1%범위로 상당한 양을 알코올로 전환시키고, 또한 일부는 균체 증식에 활용하므로 잔존당류의 함량이 비교적 낮은 편이었다.

Table 3.1.9. Changes in quality properties of *Corni fructus* - fermented sugar wine prepared by different sugars as carbon sources of yeast

Sugars	pH	Acidity (%)	Sugar (%)	EtOH (%)	Hunter color			Sensory score		
					L	a	b	Sour	Astringent	Overall -eating taste
Honey	3.79	0.40	3.79	12.1	53.16	16.43	21.58	2.7	2.1	4.0
Sucrose	3.80	0.39	3.82	13.3	53.62	15.97	20.81	2.4	2.9	3.5
Fructose	3.72	0.42	3.63	13.9	53.69	16.10	20.83	2.2	2.8	3.7
Molasses	3.75	0.39	3.71	13.7	53.05	16.28	21.96	3.0	2.2	3.9
Apple ext.	3.58	0.46	4.25	11.2	52.87	16.19	21.49	3.2	1.9	3.6

⊠ Sugar content, 15%(w/v)

Concentrated apple extract(3 times of original material)

알코올 함량은 당 농도가 높을수록 약간씩 증가하였는데, 대체로 20%내외가 적당한 것으로 판단되었다. 명도와 황색도는 별 차이가 없었으나, 적색도는 약간씩 증가하는 경향이였다. 산미나 고미의 강도는 당 농도가 증가될수록 약간씩 증가하는 감소하였는데, 20% 정도의 보당이 종합적인 기호도에서 양호한 것으로 나타났다.

Table 3.1.10. Changes in quality properties of *Corni fructus* - fermented sugar wine prepared by different concentration of molasses as carbon sources of yeast

Conc. of sugars (%)	pH	Acidity (%)	Sugar (%)	EtOH (%)	Hunter color			Sensory score		
					L	a	b	Sour	Astringent	Overall -eating taste
10	3.84	0.45	2.81	10.8	54.33	15.98	20.83	3.8	2.6	2.9
15	3.85	0.43	3.40	12.3	54.29	16.17	20.80	3.3	2.3	3.1
20	3.87	0.47	3.73	13.9	53.90	16.24	20.79	2.3	2.1	3.8
25	3.85	0.46	5.13	14.20	53.84	16.35	20.80	2.0	1.9	3.6



라. 최적 발효온도 및 발효기간의 설정

최적의 산수유와 물의 적정 배합비율, 첨가하는 당과 적정 농도에서 15, 20, 25, 30℃에서 10~60일간 발효시켜 여과시킨 여과액을 분석한 결과는 Fig.3.1.1~3.1.69~12와 같다. 발효온도 및 기간에 따른 산수유주의 총산도는 Fig. 3.1.1과 같다. 산수유주의 발효기간에 따라 산도는 증가하는 경향이었으며, 15℃와 나머지 온도대 사이에는 약간의 산도 차이가 있었으며, 각각의 온도대 내에서는 대체로 20~30일 이후는 큰 차이가 없었다. 대체적으로 높은 발효 온도대 보다는 25℃범위 내외의 온도로서 발효시킨 다음, 저온 숙성시키는 것이 적절할 것으로 판단되었다.

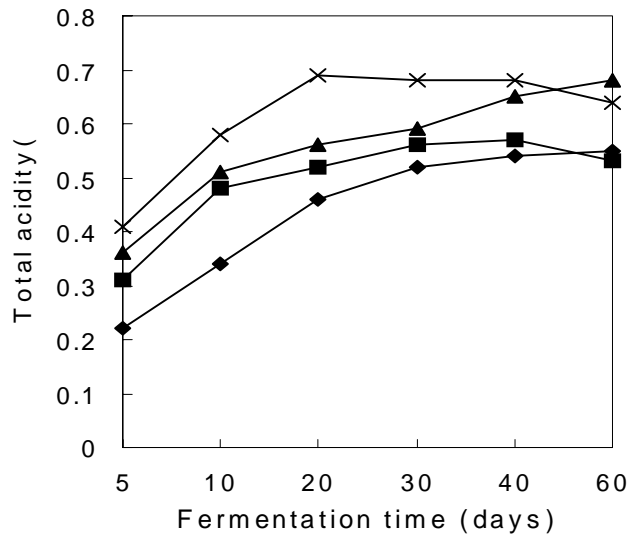


Fig. 3.1.1. Changes in total acidity of *Corni fructus* - fermented sugar wine prepared with different temperature of fermentation and aging period.

◆ : 15℃, ■ : 20℃, ▲ : 25℃, × : 30℃

그리고, 발효온도 및 기간에 따른 산수유 발효주의 알코올 함량은 Fig. 3.1.2와 같다. 각 온도도별 산수유 발효주의 알코올 함량은 최대 13.5% 이하로 비교적 높은 알코올 함량을 나타내었으며, 전체적으로 발효 기간도 20일 전후가 적절한 것으로 판단

되었다. 높은 온도대는 이취와 초산발효가 진행될 확률이 높으므로 오히려 20℃가 적절한 것으로 생각된다. 또한, 발효온도 및 기간에 따른 산수유주의 색차계 색도 a값(적색도)은 Fig. 3.1.3과 같다. 각 온도별 산수유주의 색차계 색도 a값은 발효기간 중 4.4~6.30범위로서 산수유주의 안토시아닌 색소 유출속도와 파괴 혹은 변색되는 속도의 차이에서 나타나는 것으로 예측되지만, 20~30일 이후로는 약간씩 감소되는 경향이있다., 전체적으로 보면 발효 기간도 개시후 20~30일 전후가 적절한 것으로 판단되었다. 물론 온도대가 높으면 추출되는 속도는 높을 수 있겠지만, 오히려 발효과정에서 변색되는 안토시아닌의 함량이 약간 많은 것으로 나타났다.

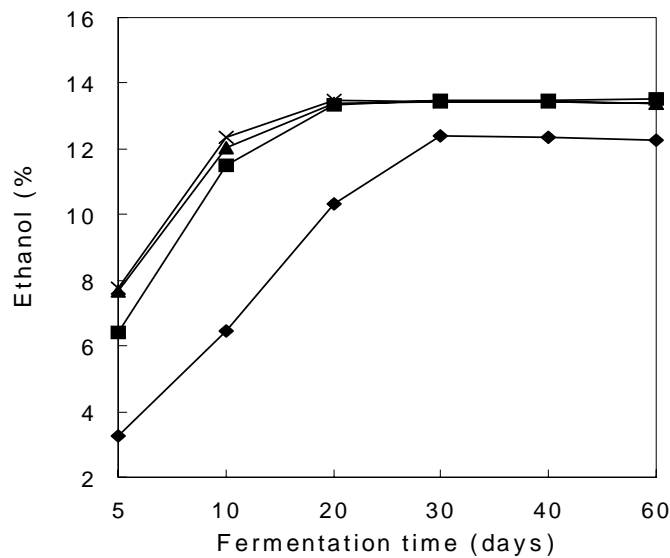


Fig. 3.1.2. Changes in ethanol contents of *Corni fructus* - fermented sugar wine prepared with different temperature of fermentation and aging period.  
 -◆- : 15℃, -■- : 20℃, -▲- : 25℃, -×- : 30℃

앞서의 산수유주 제조의 결과들로부터 대체로 20~30일 전후로 이화학적인 지표가 양호하므로 10, 20, 40일 발효후의 맛, 색깔, 종합적인 기호도를 산수유주의 알코올 발효온도별로 조사한 결과는 Fig. 3.1.4~3.1.6과 같다. 대체로 맛(산미, 삼미)과 색깔 및 종합적인 기호도는 산수유주 발효 20일 전후가 매우 좋았으며, 시간이 경과할수록 이 상취가 발생되고 색깔이 검붉은 색으로 변환되는 현상을 나타내었다.

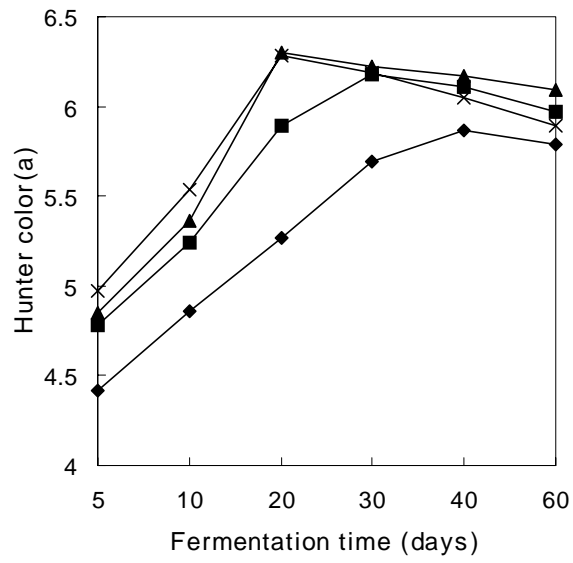


Fig. 3.1.3. Changes in Hunter color (a) value of *Corni fructus* - fermented sugar wine prepared with different temperature of fermentation and aging period.

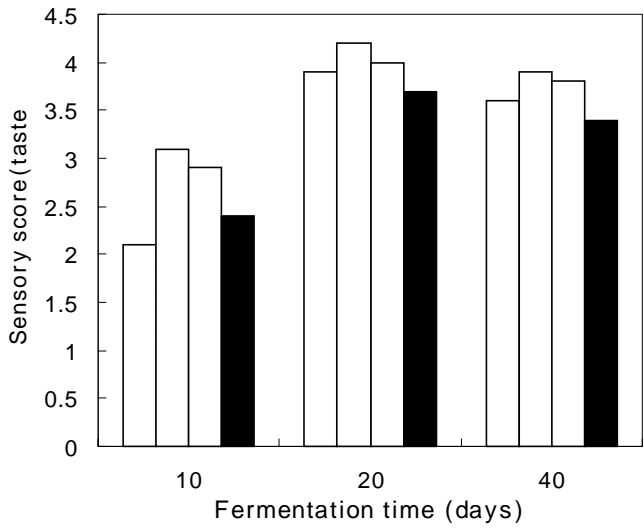


Fig. 3.1.4. Changes in sensory score(taste) of *Corni fructus* - fermented sugar wine prepared with different temperature of fermentation and aging period.

□ 15°C, ▨ 20°C, ▩ 25°C, ■ : 30°C

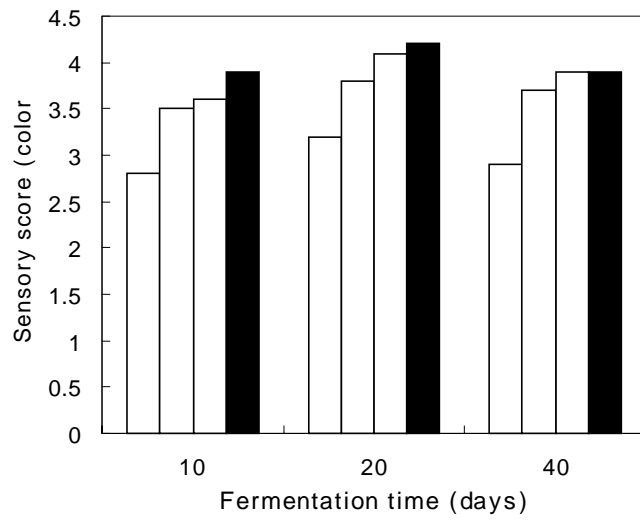


Fig. 3.1.5. Changes in total acidity of *Corni fructus* – fermented sugar wine prepared with different temperature of fermentation and aging period.

□ 15°C, ▨ 20°C, ▩ 25°C, ■ : 30°C

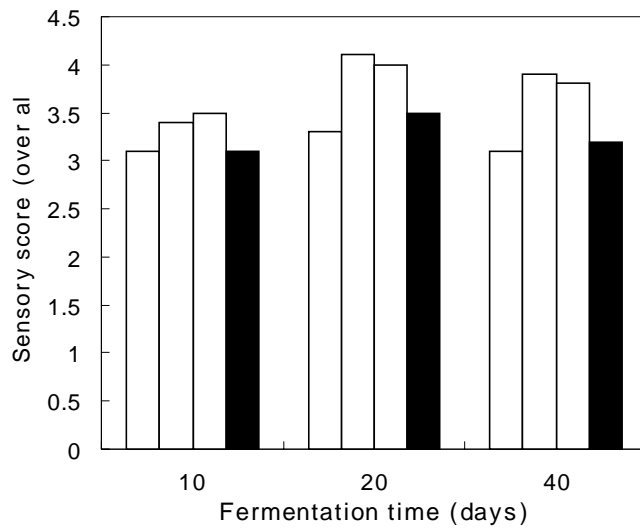


Fig. 3.1.6. Changes in sensory score(overall eating quality) of *Corni fructus* – fermented sugar wine prepared with different temperature of fermentation and aging period.

□ 15°C, ▨ 20°C, ▩ 25°C, ■ : 30°C

#### 마. 최적 숙성기간 결정

최적 발효조건에서 완성된 산수유 발효주를 저온 숙성(5℃, 15℃)하에 30, 60, 90, 120일간 숙성시켜 발효주를 분석한 결과는 Table 3.1.11과 같다. 알코올 발효 후 고형물을 여과시킨 여과액의 색차계 명도(L)는 5℃가 저장숙성이 15℃에 비하여 효과적이었으며, 30일 저장에서 전자는 53.16, 후자는 52.96으로서 약간의 차이는 있었으나, 시간이 경과할수록 비슷한 감소하는 패턴은 비슷한 경향이었다. 적색도(a)는 명도와 마찬가지로 시간이 경과할수록 감소하는 경향이었으나, 황색도(b)는 변화가 없거나 약간 증가하는 경향이었다. 대체로 산수유의 저온저장은 15℃는 5℃보다 감소의 폭이 크게 나타나서, 가능하면 5℃부근의 낮은 온도에서 저장하는 것이 효과적일 것으로 판단된다.

맛은 주로 신맛과 쓴맛을 중심으로 평가하였으며, 대체로 저장기간이 길어질수록 평가치가 감소하는 경향으로서, 이는 산수유주의 알코올 농도가 13%내외로 인하여 저장온도 15℃는 5℃에 비하여 저온숙성 중 야생 산 생성균이 증식으로 인하여 시큼한 맛과 냄새로 오히려 좋지 않은 경향이었다. 색깔도 색차계 색도와 유사한 경향으로 감소하는 경향이었으며, 온도가 높은 15℃가 낮은 관능적 평가점수를 얻었고, 종합적인 관능평가로 보면, 5℃ 저장이 15℃저장보다 우수하였다. 알코올 농도는 약간의 감소하였지만, 큰 차이는 없었고, 산수유주의 장기저장에 따른 약간의 침전물이 형성되는 문제점이 있었는데, 이는 여과 및 제정 과정에서 앞으로 해결하여야 할 부분으로 판단된다. 알코올 발효직후에 잔존하는 안토시안 색소를 기준으로 저온 저장 중에 잔존 색소량을 보면, 저장기간이 길어질수록 감소하였으며, 15℃가 그 폭이 크게 나타났다.

#### 2) 누룩 발효제와 산수유를 이용한 발효 곡주 개발

누룩을 발효제로 사용하면 산수유 발효곡주에 쓴맛과 방향성이 좋을 것으로 판단되며, 산수유의 기능성과 그 색소를 이용한 산수유 발효 곡주를 제조하기 위하여 산수유와 누룩 사용량 및 발효기간 중의 경시적인 품질변화를 기본적으로 조사하였다.

Table 3.1.11. Changes in quality properties of *Corni fructus* - fermented sugar wine during fermentation and aging period at low temperature

Aging day	Hunter color			Sensory score			EtOH (%)	PPt	AOB	RPP	
	L	a	b	Taste	Color	Over-all eating					
30	5°C	53.16	16.18	20.72	3.7	3.6	3.9	13.46	-	-	97.3
	15°C	52.96	16.15	20.71	3.5	3.6	3.8	13.31	-	-	95.6
60	5°C	52.29	16.14	20.71	3.8	3.5	4.0	13.41	-	-	95.1
	15°C	50.02	15.93	20.72	3.6	3.4	3.6	13.27	+	1.3	93.4
90	5°C	51.76	16.10	20.74	3.7	3.5	3.9	13.38	+	-	93.8
	15°C	49.58	15.47	20.73	3.4	3.2	3.3	13.23	++	1.8	91.9
120	5°C	51.65	16.03	20.75	3.5	3.4	3.8	13.34	+	0.2	91.8
	15°C	47.12	15.02	20.78	3.2	3.0	3.1	13.18	++	2.0	89.4

PPt, Precipitate / broth 10 mL ; AOB,  $\times 10^2$  CFU/mL) ; RPP, Residual pigment(%) after 2~3 days of fermentation

#### 가. 산수유 첨가량(배합비율) 결정

덧밥(원료미)과 밀술(누룩, 곡자)의 합한 양(20.5kg)에 대하여 산수유를 2, 4, 6, 10, 14%(w/v) 농도로 첨가하여 고르게 섞은 다음, 주모를 0.5L를 첨가하여 밀술로 담근 결과는 Table 3.1.12와 같다. Table에 나타난 바와 같이 산수유 첨가량은 대체로 6~10% 범위가 양호하였으며, 알코올 생성량은 7.2~7.6%, 잔존 총당은 7.02~7.23%로 나타났고, 종합적인 기호도에서도 산수유 첨가량이 6~10%가 비교적 양호하였다. 산수유 첨가량이 많아지면 산수유 발효곡주의 색택이나 향은 좋아지는데, 최종 발효곡주에 산미나 고미는 강하게 나타나는 문제점이 있었다.

Table 3.1.12. Changes in quality properties of *Corni fructus* - fermented *Nuruk* wine prepared with different concentration of *Corni fructus* flesh

<i>C. fructus</i> powder (%)	pH	Acidity (%)	Sugar (%)	EtOH (%)	Hunter color			Sensory score		
					L	a	b	Sour	Astrin- gent	Overall eating quality
2	3.88	0.44	6.72	8.42	58.25	13.12	22.43	2.3	1.8	3.2
6	3.83	0.49	7.02	7.61	57.92	13.29	22.25	2.5	2.1	3.7
10	3.79	0.53	7.23	7.21	57.08	13.42	22.09	2.9	2.4	3.9
14	3.74	0.59	7.45	6.46	56.32	14.05	21.87	3.0	2.9	3.3

나. 누룩의 사용량 결정

덧밥에 대하여 누룩을 2, 4, 6, 8%(w/v) 농도로 첨가하여 고르게 섞은 다음, 주모를 0.5 L를 첨가하여 밀술로 담근 결과는 Table 3.1.13과 같다. Table에 나타낸 바와 같이 누룩양은 대체로 4% 범위가 양호하였으며, 알코올 생성량은 8.02%, 잔존 총당은 6.92%로 나타났고, 종합적인 기호도에서 가장 양호하였다. 누룩량이 많아지면 산미나 고미는 감소하지만, 산수유 발효곡주에 누룩 냄새가 강하게 나타나고 단맛이 크게 나타나는 문제점이 있었다.

Table 3.1.13. Changes in quality properties of *Corni fructus* - fermented *Nuruk* wine prepared with different concentration of *Nuruk* cake

<i>Nuruk</i> (%)	pH	Acidity (%)	Sugar (%)	EtOH (%)	Hunter color			Sensory score		
					L	a	b	Sour	Sour	Overall eating quality
2	3.84	0.51	8.73	7.36	57.67	13.45	21.79	2.8	2.4	3.9
4	3.75	0.56	6.92	8.02	57.35	13.36	22.23	2.5	2.1	4.1
6	3.70	0.61	5.56	9.15	57.02	13.24	22.58	2.1	1.5	3.5
8	3.65	0.69	5.17	9.80	56.37	13.14	22.78	1.9	1.1	3.3

다. 최적 발효기간 결정

최적 담금 배합비율에서 26~28℃에서 주발효 기간(1, 3, 6, 9일)과 10℃에서 후발효 기간 혹은 숙성기간(30, 60, 90일)을 결정한 결과는 Table 3.1.14와 같다. Table에 나타난 바와 같이 최적 숙성기간은 60일 내외가 적당한 것으로 판단되었다.

Table 3.1.14. Changes in quality properties of *Corni fructus* - fermented *Nuruk* wine during different fermentation and aging period

Fermen- ting & Aging day	pH	Acidity (%)	Sugar (%)	EtOH (%)	Hunter color			Sensory score			
					L	a	b	Sour	Astrin- gent	Overall eating quality	
1st	1	5.73	0.17	24.86	0.54	60.65	11.85	21.93	-	-	-
	3	3.89	0.38	20.17	3.87	59.71	11.90	22.10	-	-	-
	6	3.84	0.46	14.84	5.89	58.79	12.34	22.28	-	-	-
	9	3.81	0.49	8.86	7.86	58.65	12.86	22.32	-	-	-
2nd	30	3.75	0.56	7.04	8.87	57.34	13.26	22.55	2.4	2.1	3.9
	60	3.73	0.62	6.85	9.25	57.18	13.28	22.57	2.4	1.9	4.3
	90	3.69	0.63	5.32	9.31	57.09	13.29	22.59	2.5	1.7	4.1

1st period, fermentation day ; 2nd, aging day

3) 중국 발효제와 산수유를 이용한 발효 곡주 개발

산수유 발효주의 품질관리와 자동화를 이루어 산업화 적용에 유리한 중국이용 방법을 활용하고자 하였으며, “산수유 당발효주”는 깊고 진한 맛이 적고, 방향성이 약한 결점이 있으므로 찹쌀을 이용한 “산수유 중국곡주”의 기초적인 제조조건을 조사하였



가. 중국의 종류

찰쌀을 가수분해하여 발효성 당류를 생산할 수 있는 3가지의 amylase 고생산균주를 종균으로 이용하여 입국을 제조하여 전분질 분해효소의 공급원으로 이용하여 산수유 중국곡주를 제조하여 그 품질특성을 조사한 결과는 Table 3.1.15와 같다. Table에 나타난 바와 같이 황국균은 당화력이 우수하여, 효모에 의한 알코올 생성력이 우수하였으며, 상대적으로 잔존하는 당질의 함량이 낮았다. 백국균과 홍국균은 황국균에 비하여 중국 제조기간이 매우 길고, 당질 분해효소력이 다소 낮아서, 알코올 생성을 위한 발효성 당이 적어 알코올 생성력이 약하였다. 백국균은 고미나 산미가 약하지만 종합적인 맛은 황국이나 홍국균보다 떨어졌다. 또한 홍국균은 최근 그 자체의 기능성 때문에 중국균으로 다양하게 응용하고자 많은 연구가 진행되고 있는데, 황국균에 비하여 산미가 약하여 좋지만, 색소 자체가 나타내는 쓴맛으로 종합적인 기호도는 약간 낮았다.

Table 3.1.15. Changes in quality properties of *Corni fructus* - fermented *Koji* wine prepared with different *Koji* molds

<i>Koji</i>	pH	Acidity (%)	Sugar (%)	EtOH (%)	Hunter color			Sensory score		
					L	a	b	Sour	Astringent	Overall eating quality
A	3.55	0.68	5.18	10.75	57.43	12.84	23.39	2.5	1.5	3.9
B	4.24	0.43	9.78	6.43	58.92	11.24	23.12	1.0	1.2	3.1
C	3.92	0.51	7.32	8.89	49.34	13.43	22.95	1.9	1.8	3.6

A, *Aspergillus oryzae* ; B, *Rhizopus oligosporus* ; C, *Monascus anka*

나. 산수유 첨가량(배합비율)

덧밥(원료미)과 입국의 합한 양(20kg)에 대하여 산수유를 2, 6, 10, 14%(w/v)농도로 첨가하여 고르게 섞은 다음, 주모 0.5 L를 첨가하여 입국과 함께 밑술로 담근 결과는 Table 3.1.16과 같다. Table에 나타난 바와 같이 산수유 첨가량은 알코올 함량과 종합적인 기호도를 통하여 대체로 6~10%가 적당한 것으로 판단된다.

다. 최적 발효기간 결정

최적 담금 배합비율에서 25℃에서 주발효 기간(1, 3, 6, 9일)과 10℃에서 후발효 기간(20, 40, 60일)과정에서 덧술의 품질특성 변화를 조사한 결과는 Table 3.1.17과 같다. Table에 나타난 바와 같이 대체로 덧술의 숙성기간은 40~60일 부근이 적합한 것으로 나타났으며, 그 이상은 알코올 생성량이 감소하는 경향을 나타내었다.

Table 3.1.16. Changes in quality properties of *Corni fructus* - fermented *Koji* wine prepared with different concentration of *Corni fructus* flesh

<i>Corni fructus</i> (%)	pH	Acidity (%)	Sugar (%)	EtOH (%)	Hunter color			Sensory score		
					L	a	b	Sour	Astringent	Overall eating quality
2	3.88	0.44	1.75	13.17	58.48	11.03	23.45	2.3	0.6	3.1
6	3.83	0.49	2.88	12.32	58.23	12.34	23.23	2.5	0.9	3.8
10	3.68	0.64	4.92	10.79	58.09	12.81	23.17	2.7	1.3	4.2
14	3.74	0.59	6.12	10.05	57.67	13.68	22.82	3.0	1.7	3.4

Table 3.1.17. Changes in quality properties of *Corni fructus* - fermented *Koji* wine during different fermentation and aging period

1st period, fermentation day ; 2nd, aging day

Fermenting & aging day	pH	Acidity (%)	Sugar (%)	EtOH (%)	Hunter color			Sensory color			
					L	a	b	Sour	Astringent	Overall eating quality	
1st	1	5.82	0.26	19.96	2.54	62.13	2.02	1.93	-	-	-
	3	3.75	0.43	15.72	6.87	61.02	2.23	2.24	-	-	-
	6	3.73	0.51	9.57	9.89	60.12	2.58	2.69	-	-	-
	9	3.71	0.58	8.86	9.98	58.90	2.64	2.81	-	-	-
2nd	20	3.67	0.61	5.32	10.43	58.38	3.76	3.04	2.5	1.6	3.5
	40	3.65	0.68	4.85	11.25	58.23	2.87	3.23	2.7	1.3	4.6
	60	3.62	0.69	4.65	11.09	57.09	3.83	3.31	2.7	1.2	4.5



## 제 2 절 산수유를 이용한 발효음료 개발

### 1. 재료 및 방법

#### 1) 실험재료

산수유 양조식초 제조에 사용한 시료는 2002년도 전남 구례군 산동면에 소재한 유기 재배농장에서 생산하는 농약과 화학비료를 전혀 사용하지 않은 유기농산물 산수유로 향이 독특하고 신선도가 높은 산수유로 씨앗을 제거한 것을 사용하였다.

#### 2) 공시균주

재래적인 식초제조법이나 당질로부터 알코올 발효와 초산발효를 거치는 단행 복발효법을 이용하지 않고, 주정과 초산균 스타트인 종초를 일정한 농도로 첨가한 후 초산 발효시키는 속성 단발효 식초를 제조하였는데, 그 사용된 초산균주는 한국중균협회에서 분양받은 *Acetobacter aceti* KCCM 12654, *Acetobacter aceti* KCCM 12655 및 *Acetobacter aceti* IFO 3281 균주와 과일·채소로부터 분리한 *Acetobacter* sp. KOFRI B-104와 *Acetobacter* sp. KOFRI B-425를 한국전통발효식품연구소에서 분양 받은 것을 포함하여 총 5개의 시험균주 중에서 최종 선정하였다.

#### 3) 배지

초산균 배양을 위한 액체배지는 증류수 1리터에 대하여 glucose 0.5%, glycerin 1%, yeast extract 0.5%, ethanol 5%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.02%, acetic acid 1%였으며, 고체배지는 증류수 1리터에 대하여 glucose 3%, yeast extract 0.5%,  $CaCO_3$  1%, ethanol 3%, agar 1.5%로서 autoclave에서 121°C, 15분간 살균하여 사용하였다.

#### 4) 균주선발

산수유 양조식초에 적합한 균주의 선발은 무균상태로 멸균된 액체배지에 ethanol을 7%(v/v) 농도로 첨가한 후 전배양한 5종의 초산균주를 30°C, 150 rpm으로 200시간 진탕배양하여 초산발효시킨 다음, 산수유 추출액에 균체 증식이나 초산 생성율이 높은 초산 생성 균주를 선발하여, 산수유 양조식초 제조에서 최종 공시균주의 종균으로 사용하였다.

#### 5) 종초제조

초산균 액체배지를 멸균한 후 ethanol을 전체 용량의 6% 농도로 희석하여 무균적으로 첨가한 다음, 최종 선정된 초산균을 액체배지에 1~2백금이 접종하고 30℃, 150 rpm으로 120시간 진탕배양하여 초산균이 최대로 활성화된 것을 초산발효를 위한 종초로 사용하였다.

#### 6) 초산균주의 최적 발효조건

초산 균주의 최적 발효조건을 찾기 위하여 초기산도 1~3%, 알코올 농도 5~9% 및 발효온도 20~40℃로 각각 조절한 후 산도의 변화를 조사하였다.

#### 7) 잔류 알코올 측정

초산발효가 끝난 후 시료 중의 ethyl alcohol 함량은 시료 100 mL에 증류수 30 mL를 가하여 상압 증류한 후, 그 유액 100 mL를 취하였다. 그 유액을 주정계로 주정도수를 측정하고, 온도계로 품온을 측정하여 주정 온도 보정표에 의하여 용량 %를 구하였다. 유액에 휘발성 유기산이 존재할 수 있으므로 시료를 먼저 1N NaOH로 중화시킨 다음, 주정도를 측정하였다.

#### 8) 이화학적 성분 분석

##### 가. 탁도 측정

탁도의 측정은 시료 용액을 5배 희석하여 spectrophotometer를 사용하여 660 nm에서 흡광도를 측정하였다.

##### 나. 총산

총산도는 적정산도로서 산수유 양조식초 20 mL를 취하여 pH 8.3이 될 때까지 소요되는 0.1N NaOH용액의 소비 양(mL)을 초산으로 환산하였다.

#### 다. 유기산 분석

산수유 양조식초의 원액을 원심분리(8,000 rpm, 10 min)하여 얻은 상정액 중 일부를 0.45  $\mu\text{m}$  membrane filter와 Sep-pak C<sub>18</sub> cartridge에 통과시킨 후 HPLC로 분석하였으며 (Table 3.2.1), 유기산 각각의 농도는 malic, succinic, citric, acetic acid 표준물질로 검량선을 작성하여 환산하였다.

Table 3.2.1. Operating conditions of HPLC for analyzing of organic acids of *Corni fructus* - fermented wines

Items	Conditions
Instrument	Shimadzu SPD 10A
Column	$\mu$ -Bondapak C <sub>18</sub> ( 3.9 mm i.d. × 30 cm)
Solvent	0.5% KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Flow rate	1 mL / min
Detector	UV / Vis 214 nm
Chart speed	0.5 cm / min
Inject volume	5 $\mu\text{l}$

#### 라. 색차계 색도

산수유 양조식초를 색채 색차계(Chroma Meter CR-200, MINOLTA)의 측정대에 고르게 담은 후, L(lightness), a(redness) 및 b(yellowness)값을 각각 5회 반복 측정하였으며, 이때 사용한 표준 백색판의 L, a, b값은 각각 89.2, 0.921 및 0.78이었다.

#### 마. 당류

총당은 산분해법으로 실시하였으며, 환원당은 산수유 양조식초 5 mL를 증류수로 50배 희석한 후 균질화시킨 다음, 여과한 여액 1 mL를 취하여 DNS법으로 측정하였고, 그 함량은 glucose 양으로 나타내었다. 유리당은 산수유 양조식초의 원액을 원심분리(8,000 rpm, 10 min)하여 얻은 상정액 중 일부를 0.45  $\mu\text{m}$  membrane filter와 Sep-pak C<sub>18</sub> cartridge에 통과시킨 후 HPLC로 분석하였으며(Table 3.2.2), 유리당 각각의 농도는 glucose, fructose 및 sucrose 표준물질로 검량선을 작성하여 환산하였다.

Table 3.2.2. Operating conditions of HPLC for analyzing of free sugars of *Corni fructus* - fermented wines

Items	Conditions
Instrument	Waters associate HPLC(U6K injector)
Column	Carbohydrate( 3.9 mm i.d. × 30 cm)
Solvent	Acetonitrile : water (78 : 22, v/v)
Flow rate	1.5 mL / min
Detector	M 410 RI
Chart speed	0.25 cm / min
Inject volume	5 $\mu$ l

#### 바. 관능검사

산수유 양조식초의 관능검사는 훈련된 패널원 5명을 통하여 발효된 각각의 산수유 양조식초에 대하여 실시하였으며, 그 평가 항목은 색깔, 신맛, 쓴맛, 냄새 및 종합적인 기호도에 대하여 실시하였다. 평가방법은 5점 기호도 혹은 강도 채점법(+ 매우 싫다, ++ 약간 싫다, +++ 약간 좋다, ++++ 좋다, 아주 좋다 +++++)을 이용하였다.

## 2. 결과 및 고찰

### 1) 균주선발

산수유 추출액을 이용한 음료용의 식초를 제조하고자 초산 생성력이 우수한 균주를 선발하기 위하여 여러 종류에 대한 균주를 검색하여 1차 선발된 5종의 초산균주를 전 배양하여 그 배양액을 발효 액체배지에서 210시간 초산발효를 실시한 결과는 Fig. 3.2.1과 같다. 총산의 함량은 양조식초의 품질을 나타내는 지표로서 특히 초산 함량은 가장 중요한 항목이다. 즉 식품공전상의 양조식초에 함유된 총산의 함량은 초산을 비롯한 전체 유기산의 함량을 나타내는 것으로 그 기준에 따르면 총산도는 4.0~20%으로 규정하고 있다. 본 연구의 Fig.에서 보는 바와 같이 전체적으로 대부분의 시험균주는 발효초기 60~90시간까지는 초산 생성이 점진적으로 증가되었으나 그 이후부터 더

속 빠르게 증가하였으며 150시간까지가 급속하게 유기산을 생성시켰다. 본 실험에 사용된 5가지의 초산 생성 균주는 초기에서는 상호 유사한 증가 패턴을 나타내다가 발효 120시간 이후부터 한국전통발효식품연구소에서 과일·채소로부터 분리하여 보관중인 C균주(*Acetobacter* sp. KOFRI B-104)가 다른 균주에 비하여 총산도가 증가하는 폭이 크게 나타났으며, 최종적으로 산수유를 이용한 양조식초 발효를 위한 공시균주로 최종 선정하였다.

## 2) 균주의 최적 발효조건

### 가. 초기산도의 영향

초산발효를 시작할 때에 초산균은 초기 산도가 아주 중요한데, 대부분 초산발효는 발효액 자체에 존재하는 주변 자연환경 유래의 야생 잡균의 오염방지와 초산균의 생육에 적합한 pH의 조절을 위하여 발효용 배지에 초산을 가하여야 하는데, 초기 총산도를 1~3% 범위로 조절하여 발효 숙성기간별로 총 산도의 변화를 조사한 결과는 Fig. 3.2.2와 같다.

Fig.에서 보는 바와 같이 초기산도가 2.5%와 3%인 발효액은 산도가 너무 높아 pH가 많이 감소하므로 초산 균주의 성장속도가 지연될 수 있고, 또한 산수유는 안토시아닌 색소를 포함한 천연색소를 많이 함유하고 있으므로, 가능하면 처리공정에서 강한 열 살균을 피해야 제품의 색도와 향이 그대로 많이 유지된다. 그러나 초기 산도가 너무 낮으면, 산수유를 이용한 양조식초 제조할 때에는 원래 재료에서 유래되는 잡균의 오염 염려가 있으므로 각별한 주의를 요한다. 따라서 초산 균주의 성장에 저해를 받지 않고 잡균의 오염도가 낮을 수 있는 초기산도 1.5%~2.0%가 대체로 산수유를 이용한 초산발효의 조건으로 양호한 것으로 사료된다. 매실주박을 포함한 과일식초의 제조에서는 최적 초기 산도는 1.5~2%라고 보고하였고, 감식초에서는 1%내외로 비교적 낮은 값을 유지하는 것이 가장 좋았다고 하였다. 그러나 식초공정에서 초기산도가 높아지면 초산균의 성장에서 유도기간이 길어지므로 오히려 식초 제조공정이 길어지고 재 오염의 가능성 많으므로 1.5~2.5%가 가장 적당하다는 보고도 있다.



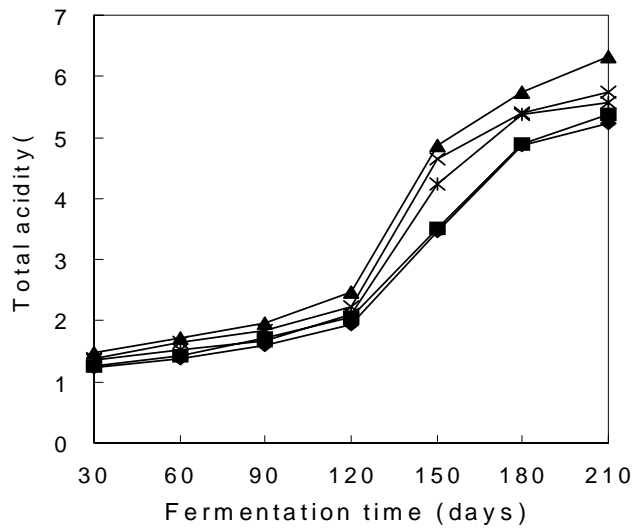


Fig. 3.2.1 Changes in total acidity of *Corni fructus* vinegar prepared with different acetic acid bacteria during fermentation

- ◆ : *Acetobacter aceti* KCCM 12654 ; ■ : *Acetobacter aceti* KCCM 12655
- ▲ : *Acetobacter* sp. KOFRI B-104 ; × : *Acetobacter* sp. KOFRI B-425
- ✱ : *Acetobacter aceti* IFO 3281

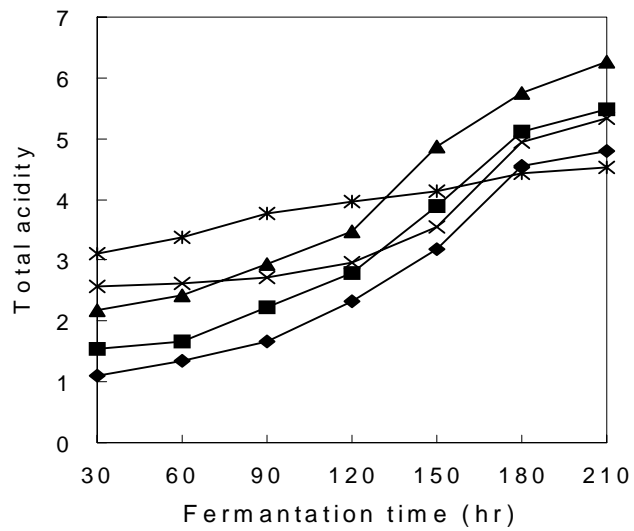


Fig. 3.2.2. Changes in total acidity of *Corni fructus* vinegar prepared with different initial pH during fermentation.

- ◆ : pH 1 ; ■ : pH 1.5 ; ▲ : pH 2 ; × : pH 2.5 ; ✱ : pH 3

### 나. 알코올 농도의 영향

산수유 양조식초 제조에서는 숙성 단발효방식을 이용하려면, 초기 알코올 농도를 적절하게 조절하여야 하므로, 초기 발효액을 주정 원액(95%)을 희석하여 최종적으로 5~9% 범위로 조절하여 주는데, 본 실험에서 초기 알코올 농도를 조절하여 산수유를 이용한 초산발효에서 총산도의 변화를 조사한 결과는 Fig. 3.2.3과 같다. 대체로 포도당 1g은 알코올 및 초산으로 전환 수득율이 각각 0.51g과 0.67g 정도로서, 초산 발효 중에 생성된 초산은 발효 균주에 의한 과도한 산화작용과 휘발성 유기산으로 일부가 손실될 수 있는데, 이런 점을 고려하면 초산의 수득율은 알코올 대비하여 1 : 1(w/w) 정도로 볼 수가 있다. 산수유 양조식초에서는 알코올 함량이 5~6%는 손실량과 자체 알코올 함량이 적어서 초산으로 전환되는 수율이 감소되는 농도이며, 알코올 9% 농도는 고농도 알코올과 산수유 일부 성분들이 초산균의 성장억제를 나타내어 초기 발효 기간이 길어지게 되므로 적당한 알코올 농도는 대체로 7% 내외라고 생각되었다.

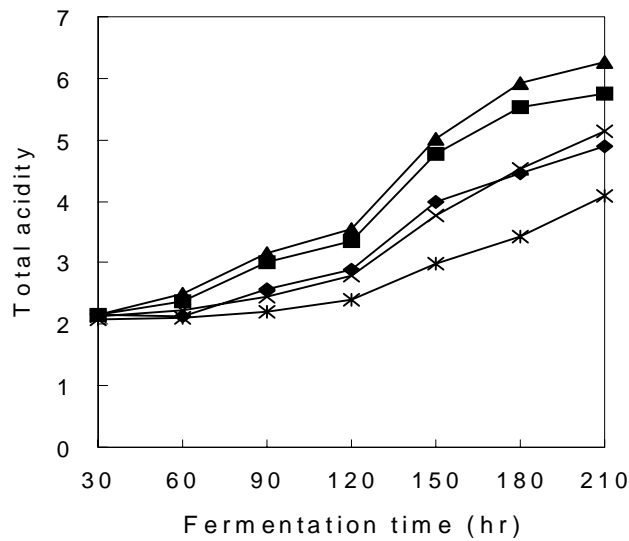


Fig. 3.2.3. Changes in total acidity of *Corni fructus* vinegar prepared with different initial ethanol concentration during fermentation.

◆ : 5% ; ■ : 6% ; ▲ : 7% ; × : 8% ; ✱ : 9%

매실주박을 포함한 과일 양조식초 제조에서는 대체로 4~8% 범위라고 보고되어 있으나, 식초산 발효는 대체로 4%가 가장 좋으며, 알코올 농도가 8~9%이상으로 상승되면 발효 초산균주가 생육저해를 받아 초산의 수득량이 떨어진다는 보고가 많이 있다.

#### 다. 온도의 영향

공시균주 초산균을 이용한 초산발효에서 발효온도에 따른 총 산도의 변화를 살펴본 결과는 Fig. 3.2.4와 같다. Fig.에서 보는 바와 같이 산수유 양조식초의 최적온도는 30℃ 정도가 적당한 것으로 판단되며, 이보다 낮은 배양온도 20℃과 25℃는 초산균의 증식시간이 길어지는 경향을 나타내었으나, 35℃이상에서는 발효온도에 의한 알코올 손실과 초산균의 최적 성장 온도보다 높기 때문에 초산 균체의 증식속도가 완만하여 초산 수득률이 낮은 것으로 생각된다. 이러한 결과는 다른 보고자들의 초산균의 최적 발효온도인 30℃~35℃와 유사하였다.

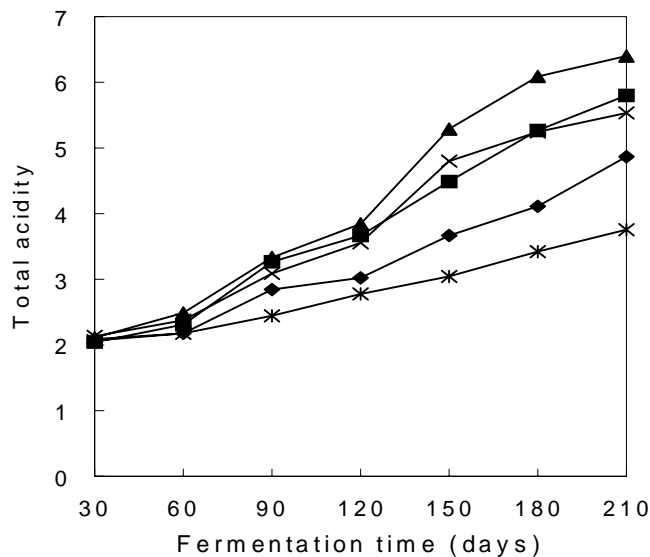


Fig. 3.2.4. Changes in total acidity of *Corni fructus* vinegar prepared with different culture temperature during fermentation.

◆ : 20℃ ; ■ : 25℃ ; ▲ : 30℃ ; × : 35℃ ; ✱ : 40℃

### 3) 산수유 양조식초의 이화학적 변화

#### 가. 산수유 추출액 첨가 농도에 따른 잔류 알코올

산수유 추출액을 농도별로 첨가하여 최종 초산발효가 종료된 산수유주 양조식초의 잔류 알코올 함량을 조사한 결과는 Fig. 3.2.5와 같다. 잔류 알코올은 최종 초산 발효가 종료된 후에 잔존하고 있는 알코올 함량으로써, 잔존 알코올 함량이 높을 경우 발효가 불완전하게 진행된 것으로 판단할 수 있으며, 식품공전상의 경우, 식초류 제조에서 잔존 알코올 기준 함량은 1.0 %이하로 되어 있으며, 그 이상은 알코올류 제품으로 취급된다. Fig.에서 나타난 바와 같이 산수유 추출액 첨가 초산발효에서 부영양원을 첨가할 경우의 첨가구는 부영양원 무첨가구에 비하여 잔류 알코올 함량이 상당히 적었는데, 산수유의 추출물 농도가 높을수록 잔류 알코올 함량이 많았다.

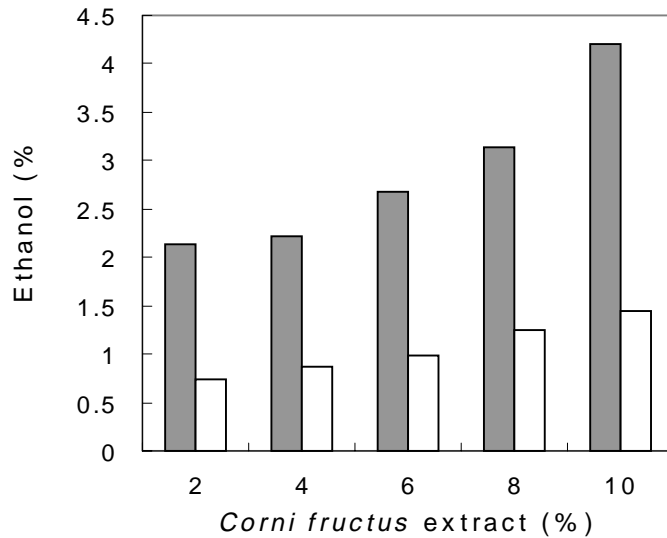


Fig. 3.2.5. Changes in residual ethanol contents of *Corni fructus* vinegar prepared with different concentration of *Corni fructus* extract.

■ : No addition ; □ : Addition

#### 나. 총산 및 유기산 함량

산수유 추출액에 부영양원을 첨가하여 초산발효를 행한 경우, 산수유 추출액 농도별로 첨가하여 초산발효를 행하여 제조한 산수유 양조식초의 총산 및 유기산 함량은 Fig. 3.2.6과 같다. Fig.에서 나타난 바와 같이 산수유 추출액 농도 2, 4, 6, 8 및 10%를 첨가한 실험구에서는 총산 함량이 최소 5% 이상을 나타내었으며, 초산 생성량은 3.97%에서 5.25%였다. 그러나 산수유 추출액을 8% 및 10%를 넣은 실험구는 초산 생성량이 각각 4.16% 및 3.97%로 비교적 낮았다.

#### 다. 환원당 및 총당 함량

산수유 추출액에 부영양원을 첨가하여 초산발효를 행한 경우, 산수유 추출액의 첨가 농도별로 제조한 최종 산수유 양조식초의 환원당 및 총당 함량은 Fig. 3.2.7과 같다. Fig.에서 나타난 바와 같이 초기 환원당 및 총당 함량이 크게 감소하지는 않았으며, 대체로 추출물의 농도에 비례하여 많았으며, 알코올 발효효모에 의한 공정이 없기 때문에 초산균의 배양액 중에 포함된 환원당 및 총당의 소모율은 매우 낮은 경향을 나타내었다.

#### 라. 유리당 함량

산수유 추출액에 부영양원을 첨가하여 초산발효를 행한 경우, 산수유 추출액 첨가 농도별로 제조한 최종 산수유 양조식초의 유리당 함량은 Fig. 3.2.8과 같다. Fig.에서 나타난 바와 같이 초기 유리당 함량이 크게 감소하지는 않았으며, 대부분 농도별로 비례적으로 많았으며, 효모에 의한 알코올 발효과정이 생략되어 유리당 소모율이 매우 낮은 경향을 나타내었다.

#### 마. 색차계 색도

산수유 추출물에 부영양원을 첨가하여 초산발효를 행한 산수유 추출액 첨가 농도별로 제조한 산수유 양조식초의 색차계 색도는 Fig. 3.2.9와 같다. Fig.에서 나타난 바와 같이 초기 색차계 색도 L, a 및 b 값이 크게 감소하거나 증가하지는 않았으며, 대부분 L값은 농도별로 비례적으로 약간씩 감소하였으며, a와 b값은 약간씩 증가하는 형태로 나타났다.

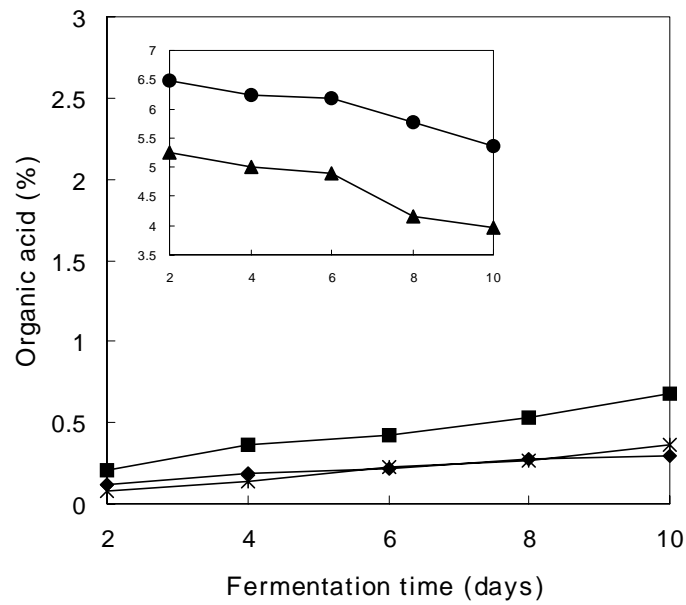


Fig. 3.2.6. Changes in organic acid contents of *Corni fructus* vinegar prepared with different concentration of *Corni fructus* extract.

● : Total acidity, ▲ : Aetic acid, ■ : Succinic acid, ◆ : Citric acid, ✕ : Malic acid

바. 가용성 고형분

산수유 추출액에 부영양원을 첨가하여 초산발효를 행한 경우, 산수유 추출액 첨가 농도별로 제조한 산수유 양조식초의 가용성 고형분의 농도는 Fig. 3.2.10과 같다. Fig. 에서 나타난 바와 같이 가용성 고형분은 산수유 양조식초에 함유된 수분을 제외한 고형분 물질의 함량으로써, 산수유 양조식초의 경우, 천연 산수유 추출액을 원료로 이용 하였지만, 감식초 및 사과식초 등에 비하여 고형분 함량이 비교적 낮았다.

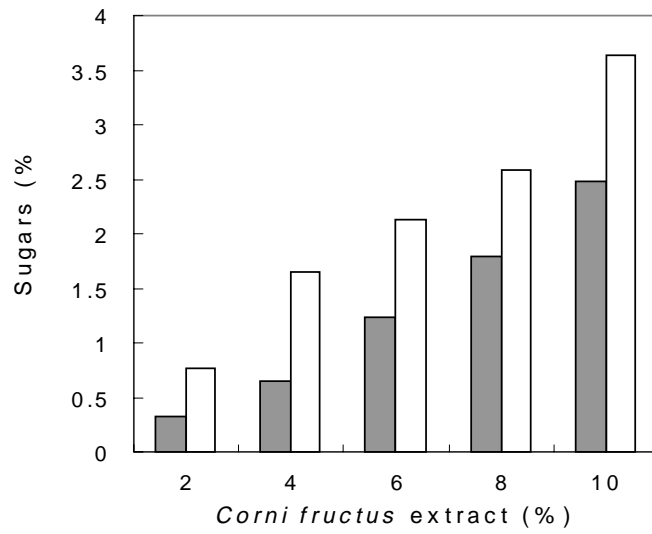


Fig. 3.2.7. Changes in reducing and total sugar contents of *Corni fructus* vinegar prepared with different concentration of *Corni fructus* extract.

■ : Reducing sugar ; □ : Total sugar

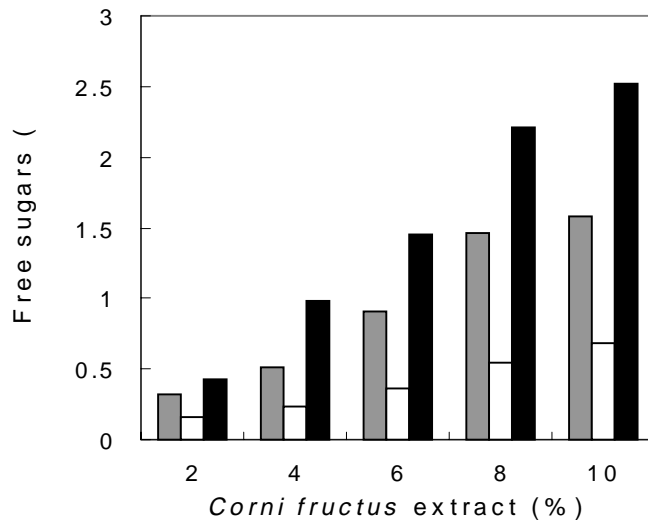


Fig. 3.2.8. Changes in free sugar contents of *Corni fructus* vinegar prepared with different concentration of *Corni fructus* extract.

■ : Glucose ; □ : Fructose ; ■ : Sucrose

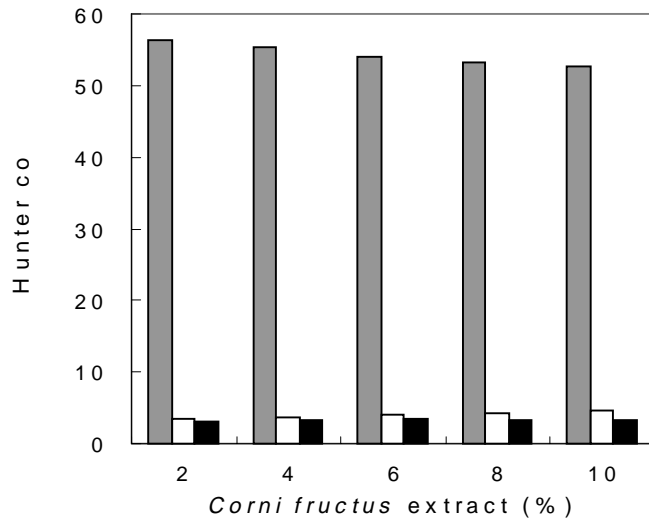


Fig. 3.2.9. Changes in Hunter color value of *Corni fructus* vinegar prepared with different concentration of *Corni fructus* extract.

■ , L ; □ , a ; ■ , b

#### 사. 관능평가

산수유 추출액 첨가 농도별로 제조한 산수유 양조식초를 5명을 대상으로 관능 검사를 실시한 결과는 Fig. 3.2.11과 같다. Fig.에서 나타난 바와 같이 관능검사는 신맛, 쓴맛, 색깔, 냄새 및 종합적인 기호도를 비교 분석한 결과로, 산수유 추출액의 농도별로 보면, 대체로 산수유 추출액 4~6%가 양호한 결과를 얻을 수 있었다. 그러나 동일 산수유 추출액 농도에서는 총산도가 높아지면 산수유 양조식초의 쓴맛이 감소는 하지만, 산수유 추출액의 농도가 높아지면 산수유의 함량이 높아지므로 쓴맛이 약간 높게 나타났다. 한편 실제적인 산수유 추출액의 그 자체는 약간 쓴맛이 문제가 되었지만, 산수유 양조식초의 전통 차로서 음용에서는 다른 기본적인 첨가물이 혼용되었으며, 특히 쓴맛 억압 첨가제를 이용하면 큰 문제는 없었다.



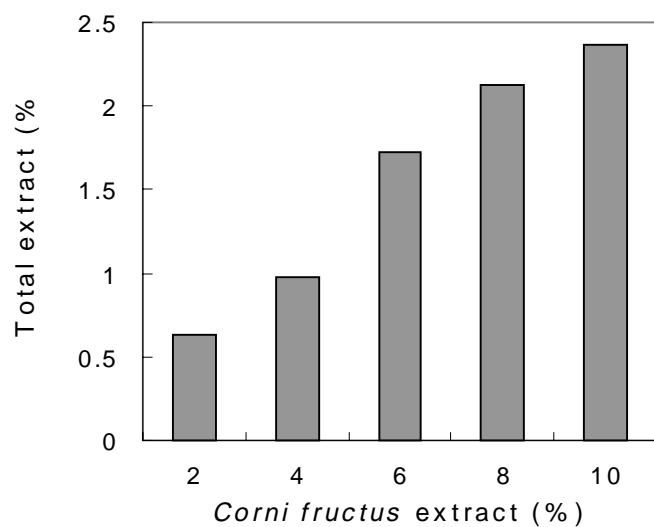


Fig. 3.2.10. Changes in soluble solid contents of *Corni fructus* vinegar prepared with different concentration of *Corni fructus* extract.

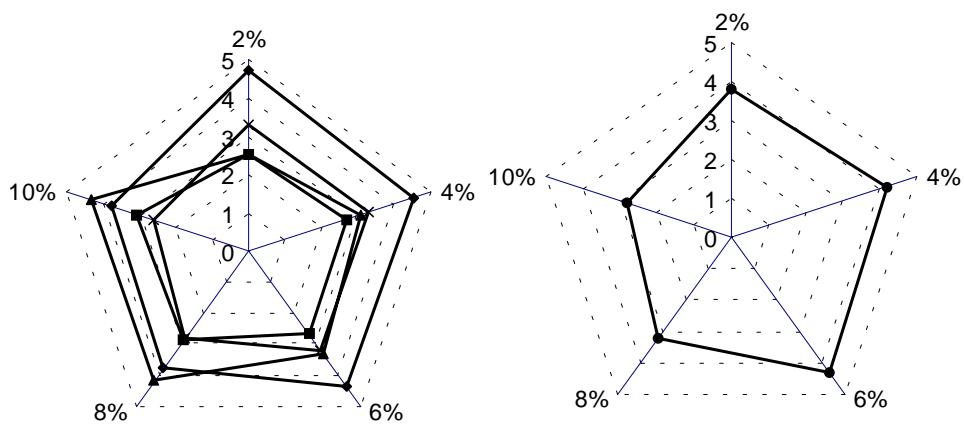


Fig. 3.2.11. Changes in sensory score of *Corni fructus* vinegar prepared with different concentration of *Corni fructus* extract.

◆, Sour ; ■, Astringent taste ; ▲, Color  
 ×, Odor , ●, Overall eating quality

## 제 3 절 산수유를 이용한 음료 개발

### 1. 재료 및 방법

#### 1) 실험 재료

산수유의 재료는 대형시장에서 유통되는 상등품의 산수유를 구입하여 실험재료로 사용하였다. 기타 재료는 식품첨가물 및 식품공전 기준에 적합한 소재를 선정하여 사용하였다.

#### 2) 추출용매에 따른 추출액의 이화학적 특성

##### 가. 열수 추출

산수유의 적정 열수추출 조건을 설정하기 위하여 산수유 100g에 증류수 50ml을 넣고 환류 냉각 추출장치를 이용하여 100℃에서 끓이면서 시간별로 가용성 고형분 함량을 측정하여 추출수율을 조사하였다.

##### 나. 에탄올 추출

열수추출과 같은 비율로 에탄올을 농도별로 가하여 환류 추출한 후 원심분리 하여 얻은 가용성 고형물에 대한 함량, 색도, 투과도 및 유리당 함량을 조사하였다.

##### 다. 색도

색도는 색차계(Chromameter, Model CR-200, CT-210, Minolta Co., Japan)로 명도(L값), 적색도(a값), 황색도(b값)를 각각 측정하였다.

##### 라. 탁도

탁도는 660nm에서 투과도로 측정하였다.

##### 마. 당도

당도는 휴대용 굴절 당도계를 이용하였다.

##### 바. pH 및 산도

pH는 시료 10g을 취하여 직접 pH meter(Orion : model 720A)로 측정하였으며, 적정산도는 시료 10g에 CO<sub>2</sub>를 구축한 증류수 40ml를 가하여 교반하면서 0.1N NaOH용

액으로 pH가 8.3이 될 때까지 적정하여 소비된 ml수를 적정산도로 표시하였다.

#### 사. 관능검사 및 결론

관능검사는 20명의 관능검사요원을 선정하여 맛, 색, 향, 선호도 등을 5점 법으로 측정하였다.

#### 3) 산수유 extract의 품질개선용(신맛, 떫은맛) 소재선정

- 당류 첨가에 의한 품질개선 : 정백당, 과당
- 싸이크로덱스트린 첨가에 의한 품질개선 :  $\beta$ -싸이크로덱스트린
- 기능성소재 첨가에 의한 품질개선 : 스위트메이트
- Masking flavor 첨가에 의한 품질개선 : Masking flavor 5종

#### 4) 산수유 extract 추출방법

원재료 산수유의 추출조건은 온도 85℃, 용매는 물, 추출회수는 1차, 2차는 10배, 3, 4차는 5배로 추출후 농축(수분함량 31.5% )하였다.

#### 5) 실험방법

상기의 추출조건으로 제조된 산수유 extract를 일일권장량 기준으로 계산하여 1% 수용액을 제조하여 사용하였다.

#### 6) 관능검사

관능검사방법은 9점 기호척도법으로 관능검사를 실시하여 QDA Fig.으로 나타내었다.

#### 7) 관련유사제품의 품질특성 및 마케팅 자료조사

산수유와 유사한 생약 드링크제품으로서 경쟁이 될 수 있는 제품을 구입하여 pH, 당도 등의 품질특성 및 마케팅 자료를 조사하였다.

#### 8) 제품의 개발방향

음료 및 고형제품의 품질특성을 비교 및 마케팅 자료조사, 최근 음료시장 동향 등을 참고하여 제품의 개발방향을 설정하였다.

#### 9) 음료제품의 배합성분 및 비율선정

산수유 extract물을 이용하여 신선 청량감과 기능성을 함유한 배합성분을 선별하였고, 배합비율을 달리하여 다양한 시제품을 제조한 다음 순위시험법으로 관능평가를 실시하여 우수구를 선정하여 최종배합성분 및 비율을 선정하였다.

#### 10) 제품의 제조공정 및 방법 설정

선정된 배합성분 및 비율, 작업적성, 관능적특성 등을 종합하여 상품화에 적합한 제조공정 및 방법을 설정하였다.

#### 11) 제품의 특성 및 품질안정성조사

선정된 제품의 배합성분 및 비율과 제조공정 및 방법에 따라 제조된 시제품에 대하여 산수유 함량, pH, 당도, 생균수, 대장균 군, 봉해도, 용해도 등을 조사하였다.

## 2. 결과 및 고찰

### 1) 추출용매에 따른 추출액의 이화학적 특성

#### 가. 추출 시간에 따른 산수유 물추출물의 고형분 함량

80℃에서 2~10시간 동안 2시간 간격으로 추출시간에 따른 산수유 1차 물추출물의 고형분 함량은 1차 물추출물의 고형분 함량은 추출시간이 시간이 길수록 많아 10시간 때에 가장 많았다.(Fig. 3.3.1) 그러나 2차 물추출물의 고형분 함량은 8시간 및 10시간이 같은 양으로 나타나 산수유의 물추출시 2차 추출이상을 감안한다면 추출시간을 8시간으로 하는 것이 좋을 것으로 판단된다(Fig. 3.3.2).

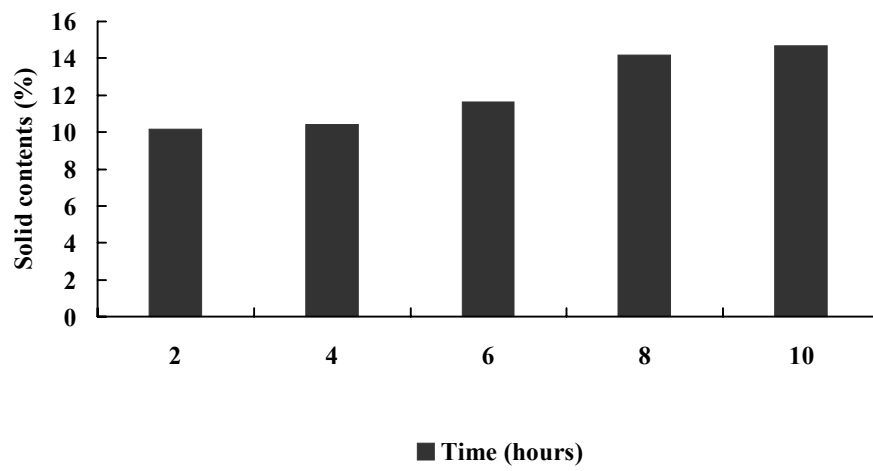


Fig. 3.3.1. Solid contents of *Corni fructus* extract at 80°C.

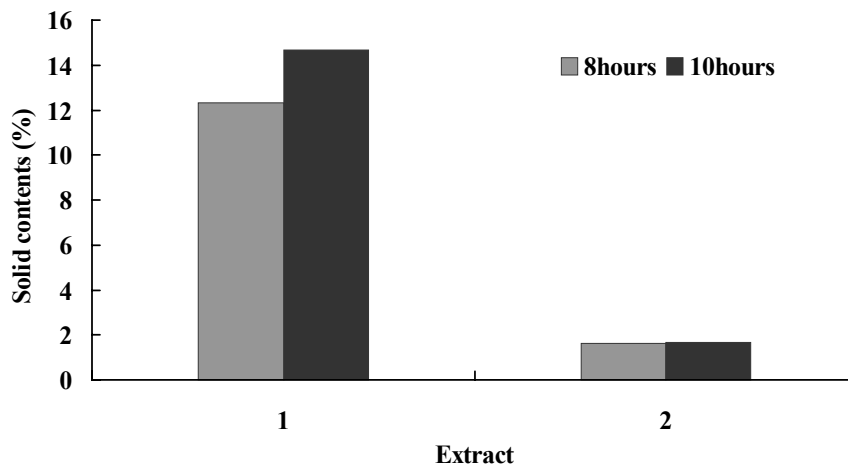


Fig. 3.3.2. Solid contents of *Corni fructus* extract at 80°C.

나. 추출 시간에 따른 산수유 물추출물의 색도

80℃에서 2~10시간 동안 2시간 간격으로 추출시간에 따른 산수유 물추출물의 색도는 명도는 크게 차이가 나지 않았으나, 황색도와 적색도는 추출시간이 길수록 높게 나타나는 경향이었으나 유의적인 차이를 나타내지는 못하였다(Table 3.3.1).

Table 3.3.1. Changes in color value of *Corni fructus* extracts

Time (hours)	Color		
	L	a	b
2	14.95±0.13	0.30±0.05	1.15±0.04
4	14.38±0.14	0.42±0.06	1.37±0.07
6	10.39±0.98	0.79±0.28	2.05±0.19
8	14.38±0.23	0.63±0.23	1.31±0.02
10	13.88±0.38	0.63±0.11	1.48±0.01

다. 추출 시간에 따른 산수유 물추출물의 탁도

80℃에서 2~10시간 동안 2시간 간격으로 추출시간에 따른 산수유 1차 물추출물의 탁도는 1차 물추출물의 고형분 함량은 추출시간이 길수록 많아 10시간 때에 가장 많았다(Fig. 3.3.3). 그러나 8 및 10시간 동안 산수유 3차 물추출시의 탁도는 큰 차이가 나타나지 않아 3차 추출시 까지 감안한다면 8시간 동안 물추출하는 것이 좋을 것으로 사료된다(Fig. 3.34).

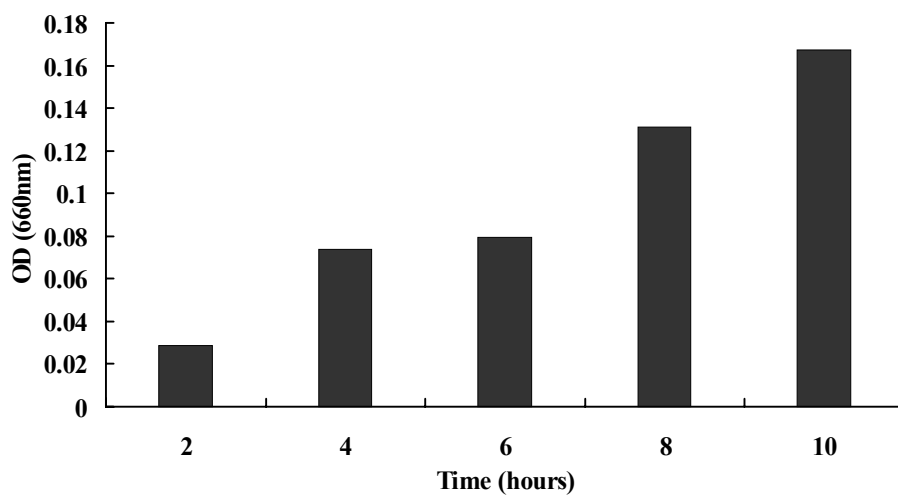


Fig. 3.3.3. Turbidities of *Corni fructus* extract at 80°C.

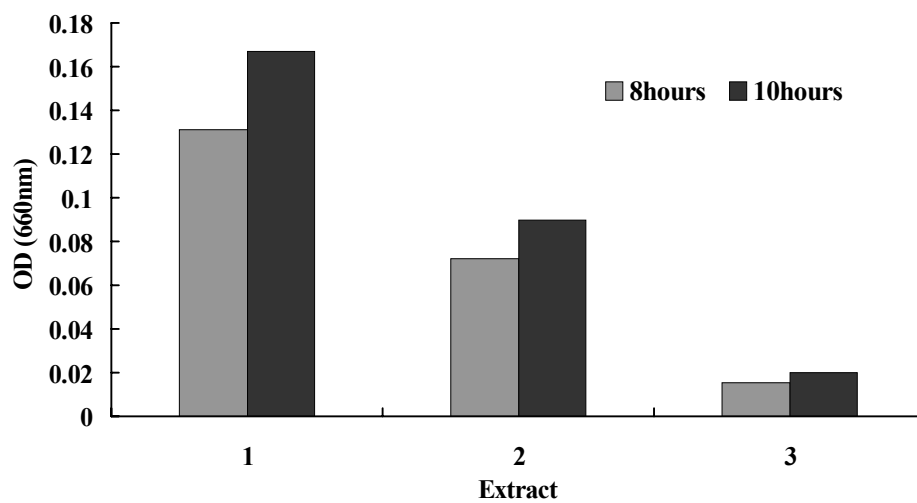


Fig. 3.3.4. Turbidities of *Corni fructus* extract at 80°C.

라. 추출 시간에 따른 산수유 물추출물의 당도

80℃에서 2~10시간 동안 2시간 간격으로 추출시간에 따른 산수유 1차 물추출물의 당도는 1차 물추출물의 고형분 함량은 추출시간이 시간 길수록 많아 10시간때에 가장 많았다(Fig. 3.3.5). 그러나 2차 추출시간은 8 및 10시간 물추출물이 거의 비슷하게 나타나 2차 추출시 까지 감안한다면 8시간 동안 물추출하는 것이 좋을 것으로 사료된다(Fig. 3.3.6).

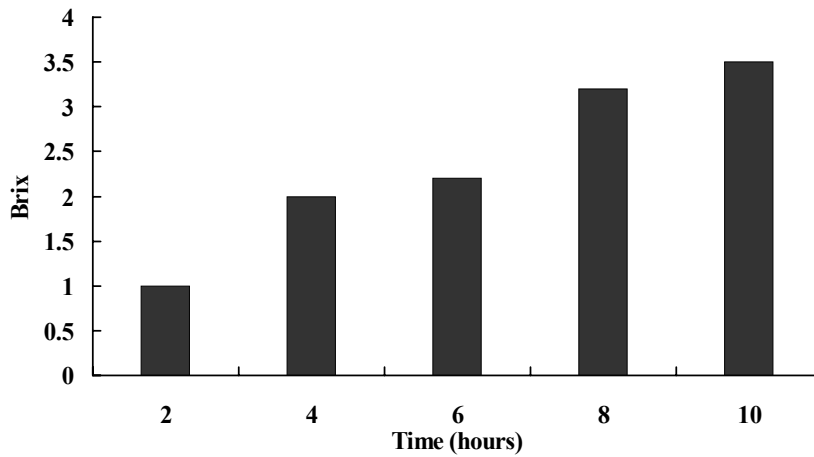


Fig. 3.3.5. Turbidity of *Corni fructus* extract at 80℃.

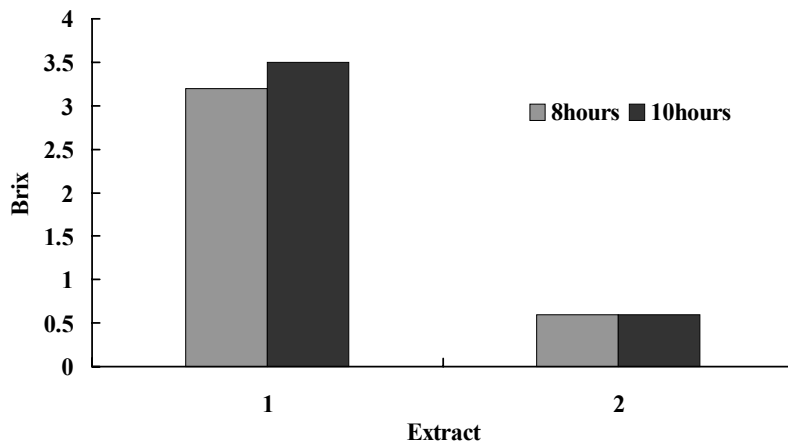


Fig. 3.3.6. Turbidity of *Corni fructus* extract at 80℃.



마. 추출 시간에 따른 산수유 물추출물의 관능검사

80℃에서 2~10시간 동안 2시간 간격으로 추출시간에 따른 산수유 1차 물추출물의 관능검사는 색깔, 신맛, 단맛, 떫은 맛, 냄새에서는 대체로 8시간 및 10시간이 높게 나타났으나, 종합적인 맛에서는 2시간이 가장 높게 나타났다.

그러나 최종 음료제조시 조미공정이 수반될 것이고, 상기의 실험결과를 감안한다면 8시간의 추출이 적합할 것으로 생각된다(Fig. 3.3.7).

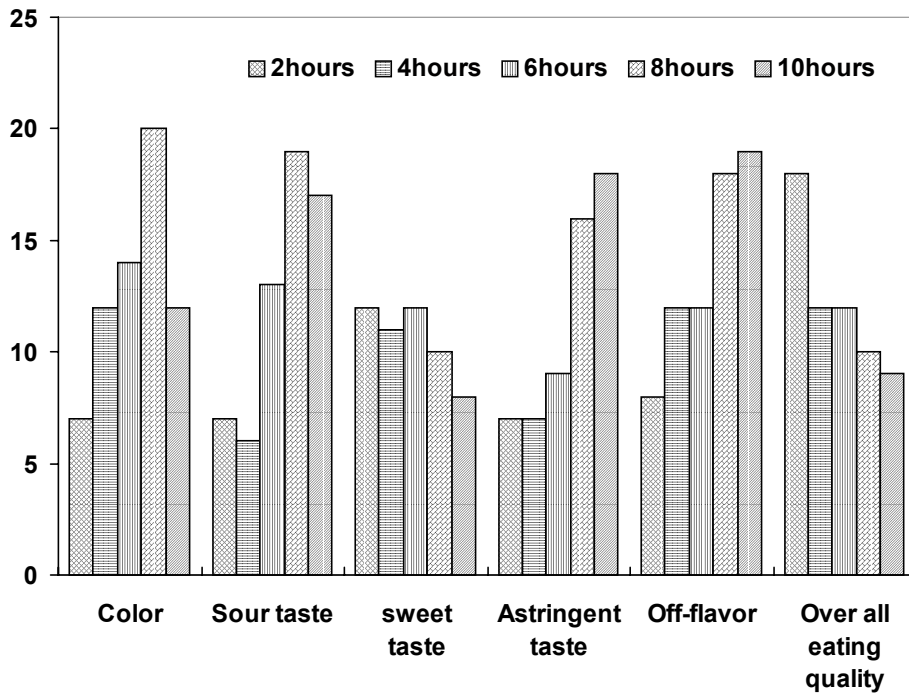


Fig . 3.3.7. Sensory scores of *Corni fructus* extract.

바. 에탄올 농도에 따른 산수유 추출물의 고형분 함량

80℃에서 50, 70 및 90%의 에탄올 용액으로 산수유를 환류추출한 결과 50, 70 및 90%의 농도순으로 탁도가 높게 나타났다(Fig. 3.3.8).

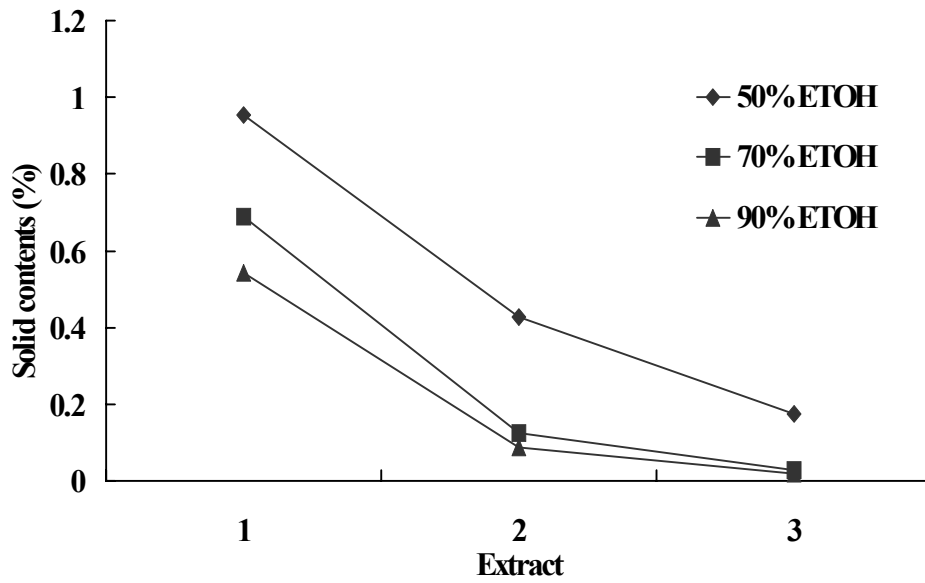


Fig . 3.3.8. Solid contents of *Corni fructus* ethanol extract at 80°C.

2) 산수유의 신맛 및 떫은맛 감소 연구

가. 당류 첨가에 의한 품질개선

산수유 extract를 일일권장량 기준으로 하여 제조된 1% 수용액에 정백당 및 과당을 0~20%까지 농도 별로 첨가하여 신맛, 떫은맛, 단맛, 전체적인 기호도, pH 및 °Bx를 조사한 결과는 Table 3.3.2, 3.3.3 및 Fig. 3.3.9, 3.3.10과 같다. 농도가 증가함에 따라 신맛, 떫은 맛, 단맛이 관능적 면에서 품질이 개선되었다. 따라서 전체적인 기호면 에서는 15% 농도가 가장 양호한 것으로 판단되었다.

Table 3.3.2. Sensory scores of *Corni fructus* extract supplemented with refined sugar

Conc.(%)	pH	° Bx	Sour	Astrin- gent	Sweet	Overall eating quality
No	3.0	1.0	0.3	0.5	1.0	1.0
5	2.94	8.0	2.5	3.7	3.5	4.6
10	2.97	10.0	5.6	5.8	4.8	6.7
15	2.99	14.6	7.6	7.0	7.5	8.5
20	3.02	17.8	8.0	8.1	8.7	7.3

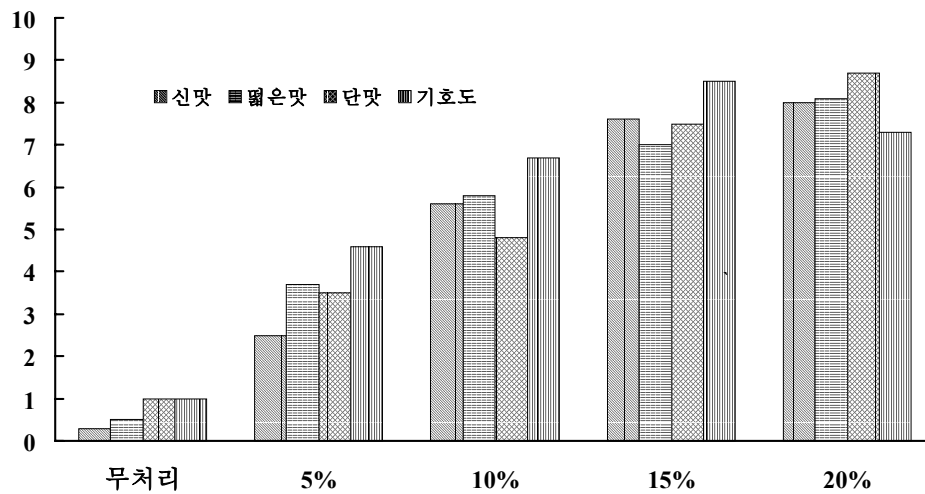


Fig. 3.3.9. Sensory score of *Corni fructus* extract supplemented with refined sugar

Table 3.3.3. Sensory scores of *Corni fructus* extract supplemented with fructose

Conc(%)	pH	。 Bx	Sour	Astrin- gent	Sweet	Overall eating quality
No	3.0	1.0	0.3	0.5	1.0	1.0
5	3.01	4.8	2.1	4.1	3.1	4.0
10	2.98	8.1	5.2	6.2	4.2	6.2
15	2.97	11.2	6.8	7.3	6.8	8.1
20	2.97	14.0	7.7	8.4	8.1	7.8

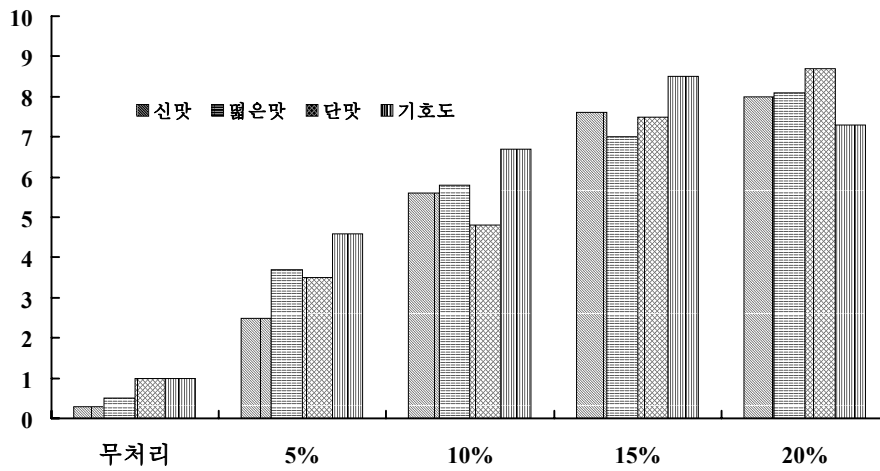


Fig. 3.3.10. Sensory scores of *Corni fructus* extract supplemented with fructose.

나. 싸이크로텍스트린 첨가에 의한 품질개선

$\beta$ -싸이크로텍스트린을 0~2.0%까지 농도 별로 첨가하여 신맛, 떫은맛, 조사한 결과는 Table 3.3.4와 같다. 농도가 증가함에 따라 신맛 및 떫은맛이 개선되었으나 정백당 및 과당을 첨가한 시험구 보다 관능적 면에서 떨어지는 경향이였다.

Table 3.3.4. Sensory score of *Corni fructus* extract supplemented with  $\beta$ -cyclodextrin

Conc(%)	pH	。 Bx	Sour	Astringent taste	Overall eating quality
No	3.0	1.0	0.3	0.5	1.0
0.5	2.99	1.2	1.8	2.1	2.4
1.0	3.00	1.8	2.5	3.5	3.5
1.5	3.00	2.0	4.7	4.9	5.1
2.0	3.01	2.8	6.5	6.8	6.7

다. 기능성소재 첨가에 의한 품질개선

기능성 소재인 스위트메이트를 0~2.0%까지 농도 별로 첨가하여 신맛, 떫은맛을 조사한 결과는 Table 3.3.5와 같다. 농도가 증가함에 따라 신맛 및 떫은맛이 개선되었으나 정백당, 과당 및 싸이크로덱스트린을 첨가한 시험구보다 관능적 면에서 떨어지는 경향이였다. 그러나 상기의 소재들은 신맛 및 떫은맛에 관능적으로 우수하였으나 기타 다른 맛, 특히 이미, 이취 등의 맛은 개선시키지는 못했으나 스위트메이트는 이러한 맛을 개선시켜 주는 것으로 나타났다. 따라서 액상제품 개발시 스위트메이트 소재를 소량 첨가하면 품질을 향상시킬 것으로 예상된다.

Table 3.3.5. Sensory scores of *Corni fructus* extract supplemented with sweetmate

Conc.(%)	pH	。 Bx	Sour	Astringent taste	Overall eating quality
No	3.0	1.0	0.3	0.5	1.0
0.5	3.03	1.2	1.5	2.5	2.1
1.0	3.00	1.8	2.1	3.9	3.4
1.5	3.00	2.0	4.2	5.5	4.9
2.0	2.99	2.8	5.9	7.1	6.2

라. Masking flavor 첨가에 의한 품질개선

Masking flavor 5종을 향료전문업체로부터 구입하여 0~0.14%까지 농도별로 첨가하여 신맛, 떫은맛을 조사한 결과는 Table 3.3.5와 같다. 농도가 증가함에 따라 신맛 및 떫은맛이 개선되었으나 향종류에 따라 큰 차이를 보였다. 5종의 masking flavor 중에서 M.S 1998-0-69와 M.S SF-474A가 가장 좋은 것으로 나타났다.

Table 3.3.6. Sensory scores of *Corni fructus* extract supplemented with masking flavor

a) M.S, SF-474A

Conc.(%)	Sour	Astringent taste	Overall acceptability
No	0.3	0.5	1.0
0.06	2.1	2.4	2.5
0.08	3.9	4.3	4.1
0.10	4.7	5.1	5.3
0.12	6.2	6.7	6.9
0.14	7.0	7.2	7.2

b) M.S, SH-1030

Conc.(%)	Sour	Astringent taste	Overall acceptability
No	0.3	0.5	1.0
0.06	0.8	1.1	1.4
0.08	1.8	2.1	2.0
0.10	2.5	2.7	2.8
0.12	3.2	3.5	3.6
0.14	4.1	4.4	4.3

c) M.S, 1998-0-68

Conc.(%)	Sour	Astringent taste	Overall acceptability
No	0.3	0.5	1.0
0.06	2.5	3.7	3.1
0.08	3.9	4.5	4.2
0.10	5.2	5.8	6.1
0.12	7.3	8.1	7.3
0.14	8.5	8.8	8.5

d) M.S, 1998-0-69

Conc.(%)	Sour	Astringent taste	Overall acceptability
No	0.3	0.5	1.0
0.06	1.1	1.5	1.9
0.08	2.1	2.4	2.5
0.10	3.1	3.3	3.0
0.12	4.9	4.6	4.4
0.14	5.8	5.9	6.2



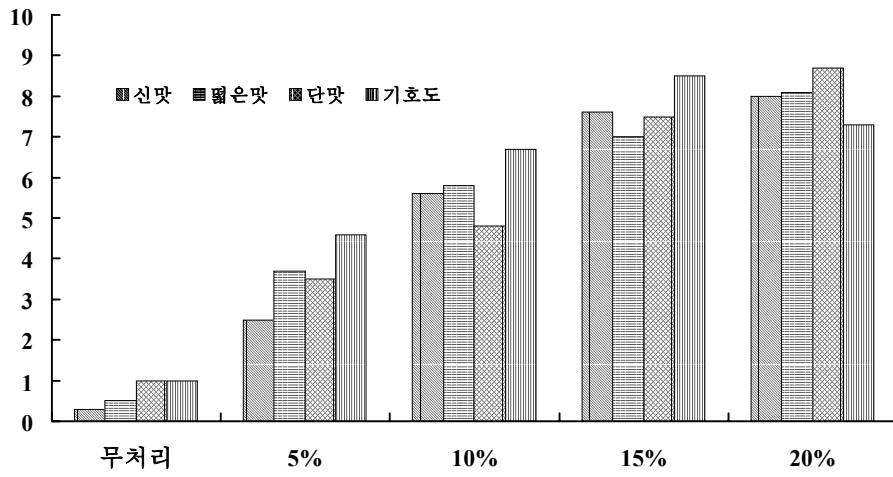


Fig. 3.3.11. Sensory scores of *Corni fructus* extract supplemented with masking flavors

3) 산수유 extract를 이용한 액상. 고상제품의 제조공정 및 제품개발

가. 국내음료의 품질특성조사

국내 및 일본지역에 유통되고 있는 식품성 음료 중 판매량이 비교적 많은 제품을 수집하여 pH와 당도 등에 대해서 조사하였다. Table 3.3.7은 국내지역 음료에 대한 조사 결과로서 수집된 음료를 생약함유제품, 기능성제품, 과즙제품, 탄산제품으로 구분하여 조사한 결과, 생약함유음료는 pH 3.51~4.0, 당도 10.01~15.0 사이의 제품이 많았고, 단맛과 쓴맛이 많은 것으로 나타났다. 기능성 음료는 pH 3.01~3.5, 당도 10.01~15.0 사이의 제품이 많았고, 신맛과 단맛이 많은 것으로 조사되었다. 전체적으로 pH 3.01~3.5, 당도 10.01~15.0 사이의 제품이 가장 많았다.(Table 3.3.8) 단맛과 쓴맛이 많은 이유는 생약자체의 고유의 쓴맛이 강하기 때문에 이것을 보완하기 위하여 당 함량을 많이 첨가한 것으로 사료된다. 따라서 산수유제품은 이런 단점을 보완하기 위하여 상기에서 실험된 향과 당의 최적 첨가농도로 선정하여 제품을 개발하였다.

Table 3.3.7. Annual amount of commercial drinks marketed in Korea

(Unit : 1,000 won)

Years	Annual amount
1998	792,892,000
1999	866,255,266
2000	975,659,728
2001	1,049,436,872

Table 3.3.8. Quality characteristics of drinks marketed in Korea

Items	Range	Drinks				
		Medicinal herb	Functional	Fruit	CO <sub>2</sub>	Total
pH	2.4~3.0	5.6	12.5	-	26.7	11.81
	3.01~3.5	22.2	62.5	90	46.7	49.0
	3.51~4.0	38.9	25.0	-	26.6	25.5
	4.01~4.5	33.3	-	10	-	13.7
°Bx	2.0~5.0	-	-	10	6.7	3.0
	5.01~10.0	-	12.5	20	60.0	23.5
	10.01~15.0	66.7	87.5	70	33.3	60.8
	15.01~18.0	22.2	-	-	-	7.8
	18.1~22.0	11.1	-	-	-	4.0

나. 산수유 유사제품의 품질특성 및 관련자료조사

산수유 유사한 제품으로서 산수유와 경쟁이 예상되는 것으로 조사된 영비천 등 3종의 제품을 구입하여 품질특성 등을 조사한 결과는 Table 3.3.9 와 같다. 판매량이 가장 높은 제품은 영비천 이었으며 로얄디, 운지천, 맥생의 순이었고 음용경험율도 마찬가지로였다. 주 음용 연령층의 경우 40대, 30대이었고 그 외의 제품은 50대, 40대이었고, 20대의 비율이 가장 낮은 것으로 조사되었다. 향취미 선호도도 영비천이 가장 높은 것으로 조사되었다.

Table 3.3.9. Quality characteristics and consumer sensory evaluation of drinks marketed in Korea

품 목	pH	°Bx	주음용연령층	음용경험률	향취미 선호도
영비천	3.62	37.6	40>30>50>20	89%	13%
로얄디	3.50	14.2	50>40>30>20	80%	9%
운지천	3.65	7.2	40>50>30>20	31%	8%
맥 생	3.55	2.4	50>40>30>20	19%	12%

#### 4) 산수유 extract 제품의 개발방향

시중에 유통되고 있는 음료제품의 품질특성과 관련자료 등을 참고로 하여 산수유제품의 개발방향으로는 pH와 당도를 낮추어 신선 청량감을 증가시키고 쓴맛과 신맛을 감소시키며 30대, 40대의 중, 장, 노년층의 대상으로 하여 이들의 기호성 및 기능성이 잘 조화된 당류, 비타민 등을 첨가하여 건강기능성식품에 적합한 개발방향 등을 설정하였다.

#### 5) 음료제품의 배합성분 및 비율선정

기능성 및 기호성이 우수한 소재로서, 먼저 감미제로서는 산수유 고유의 쓴맛과 신맛을 감소시킬 수 있는 상기의 결과를 근거로 과당 및 설탕을 선정하였고, 기능성 당으로서는 트레할로스, 기능성 소재로서 피로회복과 뇌기능 활성화, 신진대사촉진의 기능이 있는 타우린, 지구력 증강, 장쇄지방산의 에너지대사 등에 효능효과가 있는 L-카르니틴 등을 사용하였으며, 이러한 기능성과 기호성면에서 우수한 소재와 옛부터 강장, 정력 등에 효능효과가 탁월한 산수유 추출물을 이용하여 신선 청량감과 기호성을 함유한 배합성분 및 배합비율을 달리하여 다양한 시제품을 제조한 다음 순위시험 방법으로 관능평가를 실시하여 우수구를 선정한 결과는 Table 3.3.10과 같이 최종배합성분 및 비율을 선정하였다.

Table 3.3.10. Formulation composition of *Corni fructus* drink

Components	Contents(g)	Remarks
<i>Corni fructus</i> extract	1.0	Moisture 31.5%, additive
Maltodextrin	0.3	
Refined sugar	6.57	
Fructose syrup	8.65	
Trehalose	0.20	
Taurin	0.10	
L-Carnitin	0.05	
Red powder	0.10	
Citric acid	0.20	
Vitamin C	0.01	
Flavor	0.10	<i>Corni fructus</i> -like flavor
Refined water	a small amount	
Total	100 mL	

6) 음료제품의 제조공정 및 방법 설정

제품의 대량생산 및 상품화에 적합한 제조공정 및 방법을 Table 3.3.11과 같이 설정하였다.

Table 3.3.11. Manufacturing process of *Corni fructus* drink

구 분	제 조 공 정	제 조 방 법 및 조 건
산수유 extract 제조	<p style="text-align: center;">                     산수유 칭량                      ↓                      세 척                      ↓                      최적조건으로 추출                      ↓                      냉 각                      ↓                      원심분리여과(8,000rpm, 0-5℃, 20분)                      ↓                      상 징 액                      ↓                      감압농축(70℃ 이하)                      ↓                      산수유 ext. 제조                 </p>	<p>-양질의 산수유를 칭량한 다음 정제수로 세척하여 흙이나 이물을 제거한 후 추출용기에 넣는다. 정제수를 1회 추출시에는 생약제 중량의 10배량, 2,3회에는 5배량을 가하고 80℃에서 4시간씩 3회 추출로 한다.</p> <p>-추출액을 모아서 냉각시킨 다음 원심분리 여과하여 상징액을 분리한다. 상징액을 70℃이하의 감압농축하여 수분함량이 31.5% 정도의 산수유ext를 제조한다.</p>
음료제조	<p style="text-align: center;">                     산수유 ext    당류, 기능성소재 등                      ↓                    ↓                      용 해                    용해                      ↓                    ↓                      혼 합                      ↓                      원심분리여과(8,000rpm,0-5℃,20분)                      ↓                      용적조정                      ↓                      HTST(93℃, 15초)                      ↓                      충 전                      ↓                      무살균(80℃, 15분)                      ↓                      포 장                      ↓                      검 사                      ↓                      제 품                 </p>	<p>-산수유extract 및 비타민, 기능성소재 및 부형제 성분을 개별용해하여 혼합한 다음 원심분리 및 필터 여과하여 상징액을 일정용량으로 조정한다.</p> <p>- 93℃에서 15초간 순간살균한 다음 100ml병에 담아 capping하고 80℃에서 15분간 후살균하고 포장하여 검사한 다음 제품으로 출하한다.</p>

7) 음료제품의 특성 조사

선정된 제품의 배합성분 및 비율과 제조공정 및 방법에 따라 제조된 시제품에 대하여 산수유 함량, pH, 당도, 생균수, 대장균 군 등을 조사하였다.

Table 3.3.12. Quality characteristics of *Corni fructus* drink

Items	Characteristics	Remarks
<i>Corni fructus</i> extract	1.0 g	Moisture 31.5%
Volume	100 mL	
Flavor	<i>Corni fructus</i> -like flavor	
pH	3.2	
°Bx	14.2	
Color	Bright red color	
Viable cell	0	
<i>E. coli</i> group	Negative	
Usage	100 mL/each time	

8) 제품의 품질 안정성 조사

산수유 extract를 이용하여 제조된 드링크제품에 대하여 장기저장품질안정 조사를 실온, 고온(37°C), 저온(5°C)에서 보관하면서 색상, 향취미, 관능적특성, 대장균군, 생균수 등을 조사한 결과 모든 조사항목에서 4개월 현재 안정한 것으로 조사되었다.

9) 결 론

산수유를 이용하여 복용의 편의성을 부여한 음료제품에 대해서 최종 배합성분 및 함량을 선정하였고, 상품화를 시키기 위해서 제조공정 및 방법을 선정하였다. 시제품의 특성과 제품의 유통과정시 발생할 수 있는 품질안정성을 조사하여 소비자의 욕구를 충족시키면서 우수한 효능을 가진 산수유 제품을 개발하였다.

## 제 4 절 산수유를 이용한 차와 캡슐제품의 개발

### 1. 재료 및 방법

#### 1) 실험 재료

산수유의 재료는 대형시장에서 유통되는 상등품의 산수유를 구입하여 실험재료로 사용하였다. 기타 재료는 식품첨가물 및 식품공전 기준에 적합한 소재를 선정하여 사용하였다.

#### 2) 고품제품의 배합성분 및 비율선정

산수유 extract를 이용하여 차류제품 제조시 이용될 수 있는 부형제 중 무수결정포도당, 전분, 유당 등을 농도별로 실험하여 작업성, 물성 등을 고려하여 부형제의 성분을 선정하였다. 또한 연질캡슐 제품 개발 시 필요한 팜유, 레시친, 젤라틴 및 색소 등을 종류별로 선정한 후 산수유 extract 일일 권장량 기준으로 배합성분을 설계하여 물성, 작업성 및 용해성 등을 고려하여 최종 배합성분 및 비율을 선정하였다.

#### 3) 제품의 제조공정 및 방법 설정

선정된 배합성분 및 비율, 작업적성, 관능적 특성 등을 종합하여 상품화에 적합한 제조공정 및 방법을 설정하였다.

#### 4) 제품의 특성 및 품질안정성조사

선정된 제품의 배합성분 및 비율과 제조공정 및 방법에 따라 제조된 시제품에 대하여 산수유 함량, pH, 당도, 생균수, 대장균 군, 봉해도, 용해도 등을 조사하였다.



## 2. 내용 및 결과

### 1) 차류제품의 배합성분 및 비율선정

산수유 extract를 이용하여 차류제품 개발에 선정된 부형제로서 무수결정포도당, 전분, 유당 등을 농도별로 첨가하여 시제품을 제조한 결과 무수결정포도당이 가장 양호하였다. 유당 등은 산수유 extract와 배합했을 때 무수결정포도당보다 작업성 및 과립형성이 잘되지 않아 유당 등은 배제시키고 무수결정포도당을 농도별로 첨가했을시 물성, 작업성 및 관능적 면에서 양호하였고, Vit-C는 0.6%의 농도로 배합하여 시제품을 개발하였다.

Table 3.4.1. Formulation composition of granular type product of *Corni fructus* flesh

Components	Contents (g)	Remarks
<i>Corni fructus</i> extract	0.50	Moisture (31.5%), additive
Anhydrous glucose	2.48	
Vitamin C	0.02	
Total	3.00	



### 3) 차류제품의 특성조사

선정된 배합성분 및 비율과 제조공정 및 방법에 따라 제조된 시제품에 대하여 차제품의 특성을 조사한 결과는 Table 3.4.3과 같다

Table 3.4.3. Quality characteristics of granular type product of *Corni fructus* flesh

Items	Characteristics	Remarks
<i>Corni fructus</i> extract	0.50g	Moisture 31.5%
Amount	3.0g	
Solubility	Strong	
Flavor	<i>Corni fructus</i> -like flavor	
Shape	Granular type	
Color	Bright brown	
Viable cell	0	
<i>E. coli</i> group	Negative	
Usage	3.0 g/each time	

### 4) Soft capsule 제품의 배합성분 및 비율선정

수분 30% 함유된 산수유 extract에 연질캡슐 제품에 필요한 콩기름, 팜유, 레시틴을 농도별로 첨가하여 작업성을 고려하여 주약과 기제의 배합비율을 먼저 선정하고, 젤라틴, 글리세린, 청색1호, 황색5호, 적색40호의 성분을 농도별로 첨가하여 작업성과 물성 등을 충분히 검토한 후 최종배합성분 및 비율을 선정하였다.

Table 3.4.4. Formulation composition of soft capsule product of *Corni fructus* flesh

Components	Contents(mg)	Remarks
<i>Corni fructus</i> extract	333.33	Moisture 31.5%
Soybean oil	70.48	Additive
Palm oil	173.81	
Lecithin(Soybean)	42.15	
Subtotal (1)	619.79	
(Film-forming agents)		
Gelatin	154.0	
Glycerin	60.0	
Methylparben	0.336	
Propylparben	0.144	
Ethylparben	0.816	Additive
Titanium dioxide	1.552	
Food coloring agent(Blue #1)	0.034	
Food coloring agent(Yellow #5)	0.025	
Food coloring agent(Red #40)	0.731	
Subtotal (2)	217.638	
Total	837.408	

5) Soft capsule 제품의 제조공정 및 방법설정

Soft capsule 제품제조시 작업성 및 물성등을 충분히 검토하여 상품화에 적합한 제조공정 및 방법을 Fig. 3.4.1과 같이 설정하였다.

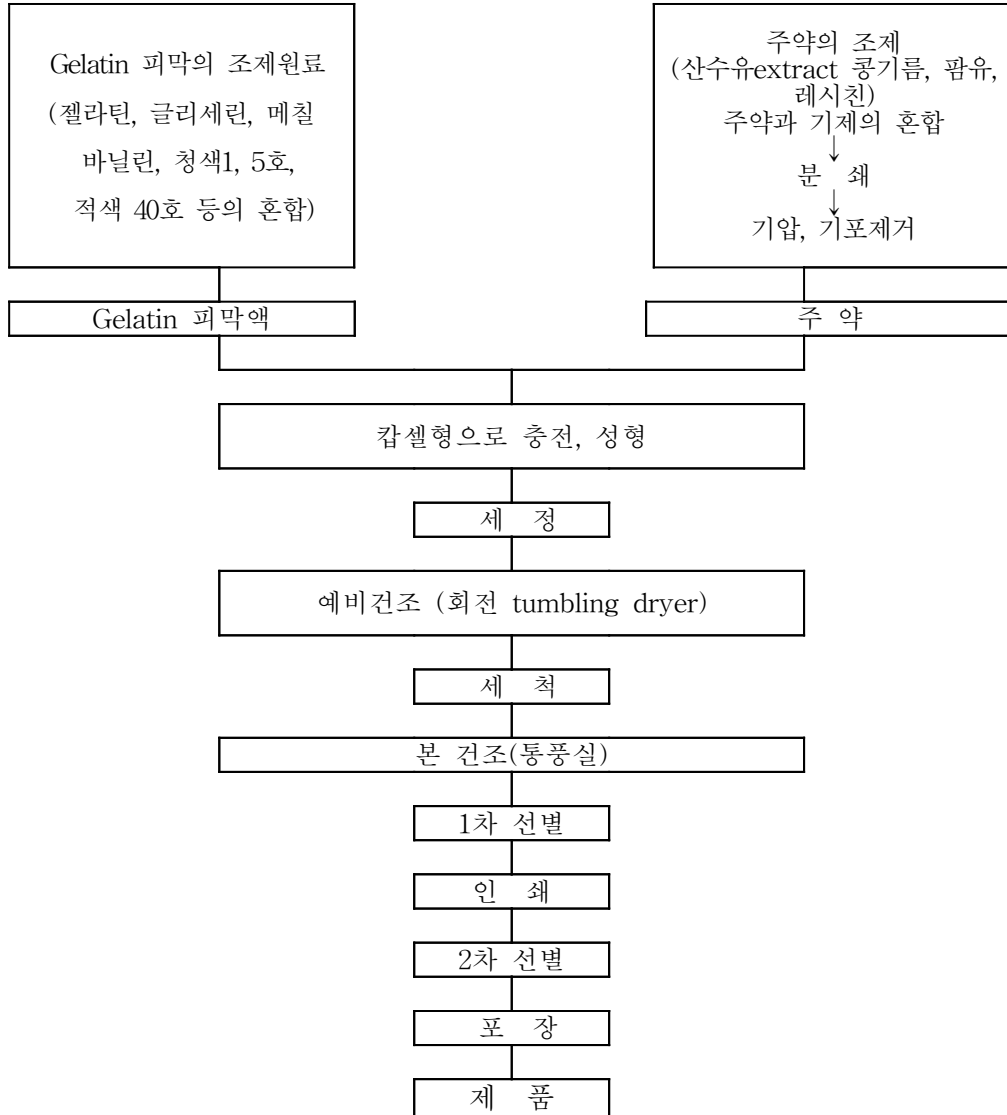


Fig. 3.4.1. Manufacturing process of soft capsule product of *Corni fructus* flesh.

6) Soft capsule 제품의 특성조사

최종적으로 선정된 배합성분 및 비율과 제조공정 및 방법에 따라 제조된 시제품에 대하여 Soft capsule 제품의 특성을 조사한 결과는 Table 3.4.5와 같다

Table 3.4.5. Quality characteristics of soft capsule product of *Corni fructus*

Items	Characteristics	Remarks
<i>Corni fructus</i> extract	333.33 mg	Moisture 31.5%
Material	Soft capsule	
Shape	Elliptical	
Color	Chocolate	
Breakdown	Within 20 min	
Weight	500mg	
Usage	3 cap./each time	
Vialble cell	0	
<i>E. coli</i> group	Negative	

7) 각제품의 품질안정성 조사

산수유 extract를 이용하여 제조된 드링크제품, 차류제품 및 Soft Cap.제품에 대하여 장기저장품질안정 조사를 실온, 고온(37℃), 저온(5℃)에서 각 6개월간 보관하면서 색상, 향취미, 관능적특성, 대장균군, 생균수, 분해도, 용해성 등을 조사한 결과 모든 조사항목에서 4개월 현재 안정한 것으로 조사되었다.

8) 결 론

산수유를 이용하여 다양한 기능성 건강식품을 개발하였다. 복용의 편의성 부여한 음료제품과 휴대편의 및 고부가가치 제품으로서는 차류와 soft capsule 제품에 대해서 최종 배합성분 및 함량을 선정하였고, 상품화를 시키기 위해서 제조공정 및 방법을 선정하였다. 각 시제품의 특성과 제품의 유통 과정시 발생될 수 있는 품질안정성을 조사하여 소비자의 욕구를 충족시키면서 우수한 효능을 가진 산수유 제품을 개발하였다.



## 제 5 절 항 산화 활성

### 1. 재료 및 방법

#### 1) 수소공여능 측정

산수유의 수소공여능은  $\alpha, \alpha'$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazine(DPPH)의 환원성을 이용하여 516nm에서 UV/Vis-spectrophotometer로 측정하였다. 즉 산수유 추출물 및 subfraction과 reference로 사용한 BHT의 농도를 0.1%로 만들어 시료 0.5ml와  $4 \times 10^{-4}$ M DPPH 용액 2.5ml를 vortex mixer로 혼합하여 실온에서 30분 방치한 다음 증류수에 대한 흡광도를 측정하였다. Blank는 시료대신 에탄올 0.5ml을 사용하였으며, 수소 공여능은 아래 공식에 따라 blank에 대한 시료의 흡광도 비율로 계산하였다.

$$\text{수소공여능} = \left( 1 - \frac{\text{시료의 흡광도}}{\text{Blank의 흡광도}} \right) \times 100$$

#### 2) Linoleic acid에 대한 항산화력 측정

산수유 추출물의 항산화 효과를 linoleic acid의 과산화물값(peroxide value, POV)을 측정하여 *in vitro*로 탐색하였다. 삼각플라스크에 linoleic acid 1g, ethanol 10ml 및 소정의 산수유 추출물을 첨가한 후 0.2M 인산완충용액 25ml을 가하여 37°C에서 일정 기간 저장한 다음 반응용액을 분액깔대기에 옮겨 chloroform 25ml를 가하여 2-3회 반복 추출하였다. Chloroform 추출액에 acetic acid 25ml과 포화 KI용액 1 ml를 가하여 암소에서 5분간 방치한 다음 증류수 50 ml을 가하여 1/100 N  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 용액으로 적정하였다.

#### 3) Liver homogenate을 이용한 *in vitro* 항산화 기능 측정

산수유 추출물의 지질과산화 억제효과를 흰쥐의 liver homogenate를 사용하여 *in vitro*로 관찰하였다. 흰쥐의 간장을 적출하여 phosphate buffer(pH 7.4)로 균질화한 다음 균질액에  $\text{H}_2\text{O}_2$ (1M)와  $\text{FeSO}_4$ (50mM) 및 산수유 추출물 0.05ml를 가하여 37°C에서



40분간 배양한 후 생성된 TBARS(thiobarbituric acid reactive substances)를 측정하였다.

#### 4) Methanol extract 추출 및 분획

산수유 methanol 추출물은 자연 건조 산수유 시료에 10 배 량의 methanol을 가하여 상온에서 24시간 3회 추출하여 감압농축하여 사용하였다. Methanol 추출물은 감압농축 후 Fig. 3.5.1과 같이 chloroform, ethyl acetate, n-butanol 및 물 층으로 계통분획하였다.

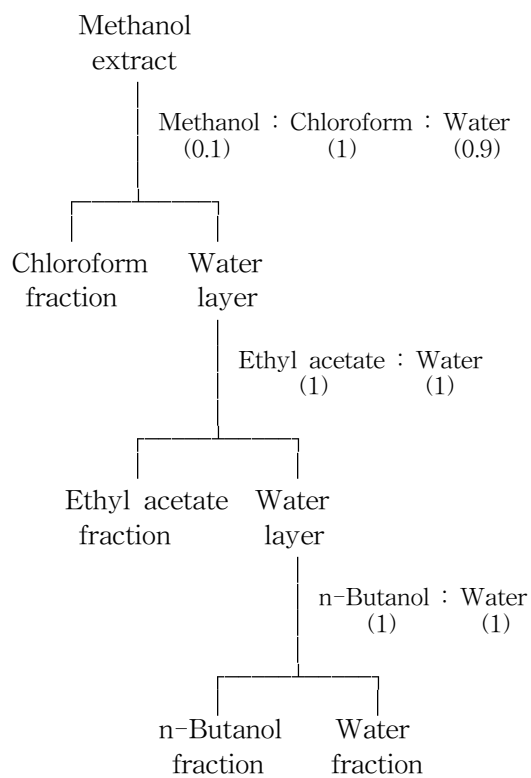


Fig. 3.5.1. Fractionation scheme of *Corni fructus* methanol extract

## 2. 결과 및 고찰

### 1) 산수유 추출물 및 subfraction의 수소공여능

DPPH free radical removal 측정을 통하여 산수유 methanol 추출물과 chloroform, ethyl acetate, butanol 및 water fraction의 수소공여능을 측정하여 Fig. 3.5.2에 요약하였다. 대조구로 사용한 BHT의 경우  $27\mu\text{g}$ 에서 50% 소거( $\text{RD}_{50}$ )를 나타내었고, 산수유 methanol 추출물은  $450\mu\text{g}$ 에서  $\text{RD}_{50}$ 를 보였다. Methanol 추출물의 subfraction 중에서는 ethyl acetate fraction이 가장 강한 free radical 소거 활성을 보여  $\text{RD}_{50}$ 가  $85\mu\text{g}$ 이었으며, 그 다음으로 butanol fraction  $310\mu\text{g}$ , chloroform fraction  $490\mu\text{g}$  순이었다. Water fraction은  $825\mu\text{g}$ 의  $\text{RD}_{50}$ 를 보여 free radical 소거 활성이 가장 낮았다.

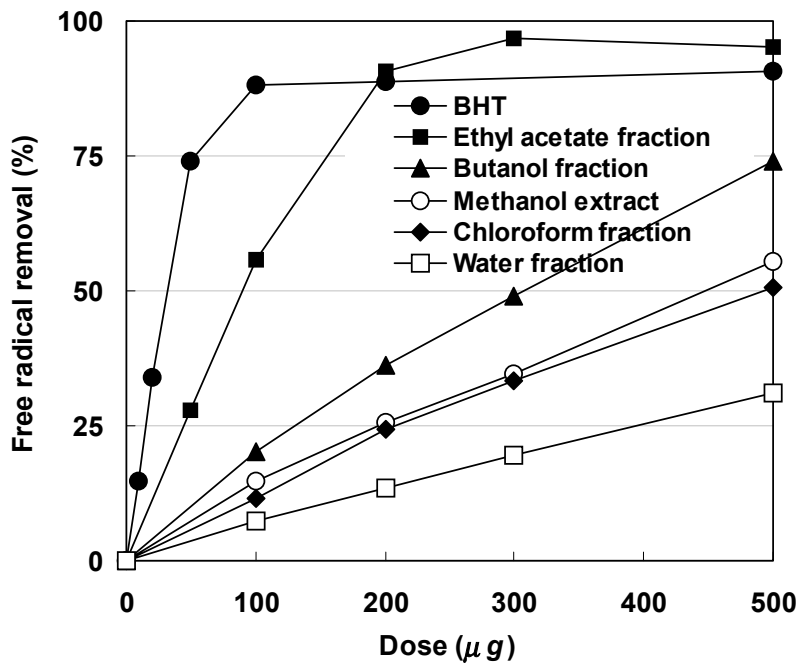


Fig. 3.5.2. *In vitro* removal of DPPH radical by *Corni fructus* methanol extract and subfractions

한편 음료, 차 및 캡슐형 산수유 제품 제조에 사용한 산수유 농축액의 수소 공여능을 위와 같은 방법에 의하여 측정한 결과 Fig. 3.5.3과 같다. 산수유 제품 제조에 사용된 농축액의 경우도 농도 의존적으로 DPPH radical 소거능을 보였으나, 산수유 methanol 추출물에 비하여 비교적 낮은 활성을 보였다.

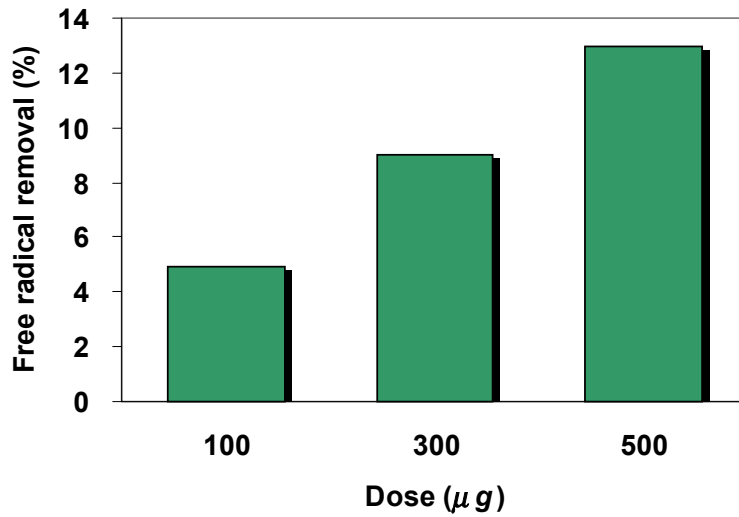


Fig. 3.5.3. *In vitro* removal of DPPH radical by *Corni fructus* extract used for drink and solid type product of *Corni fructus*

## 2) Linoleic acid에 대한 항산화력

산수유 추출물의 linoleic acid autoxidation에 대한 항산화력은 linoleic acid에 산수유 추출물을 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도로 첨가한 후 50 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2일간 저장 후 과산화물가를 측정하였다. 산수유 추출물을 첨가하지 않은 대조구에 비하여 증류수 및 70%, 90%, 100% ethanol 추출물에서 과산화물가가 다소 낮게 나타났으며, 특히 90%, 100% ethanol 추출물 첨가시에 과산화물가가 가장 낮게 나타났다 (Fig. 3.5.4).

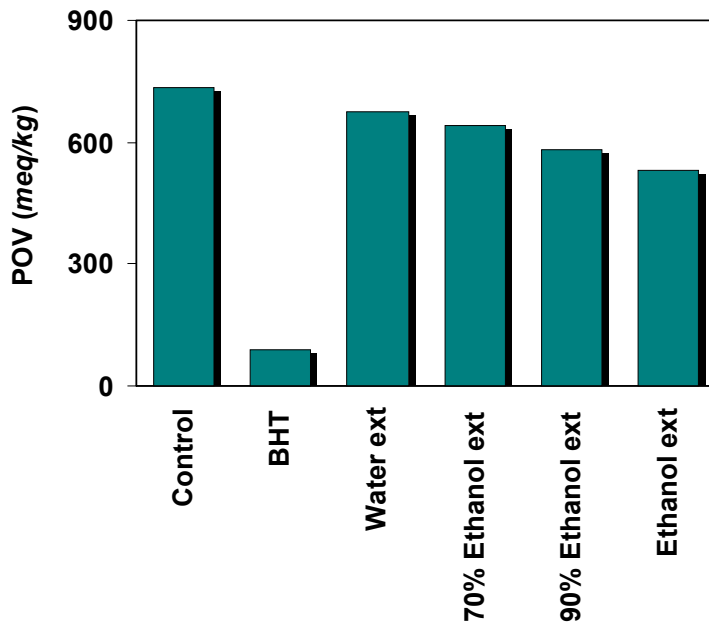


Fig. 3.5.4. Effects of extracts of *Corni fructus* with different solvents on autoxidation of linoleic acid

산수유 ethanol 추출물의 여러 용매 subfraction의 linoleic acid autoxidation에 대한 항산화력은 각 subfraction을 10 $\mu$ g/ml 농도로 첨가하여 50 $^{\circ}$ C에서 2일간 저장 후 과산화물가를 측정하였다. Chloroform, ethyl acetate 및 butanol subfraction 모두 대조구에 비하여 다소 낮은 과산화물가를 나타내었으며, 특히 ethyl acetate fraction이 가장 낮은 과산화물가를 나타내었다 (Fig. 3.5.5). 한편 water fraction은 오히려 과산화물가를 다소 증가시켰다.

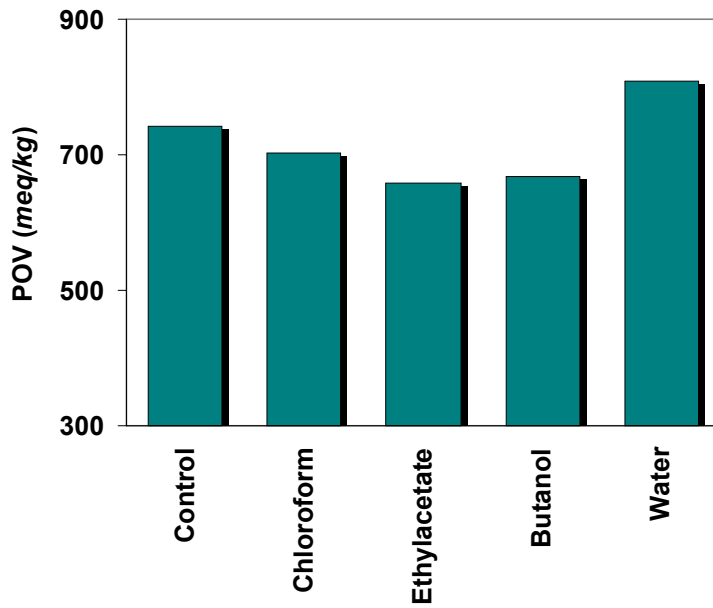


Fig 3.5.5. Effects of subfractions of ethanol extract of *Corni fructus* on peroxidation of linoleic acid

Fig. 3.5.6은 산수유 추출물의 chloroform fraction으로부터 분리한 ursolic acid의 linoleic acid autoxidation에 대한 항산화력을 측정 한 결과이다. Ursolic acid는 10 $\mu$ g/ml과 30 $\mu$ g/ml 농도에서는 linoleic acid의 과산화물가에 영향을 미치지 않았으나 100 $\mu$ g/ml의 농도에서는 과산화물가를 현저히 낮추었다.

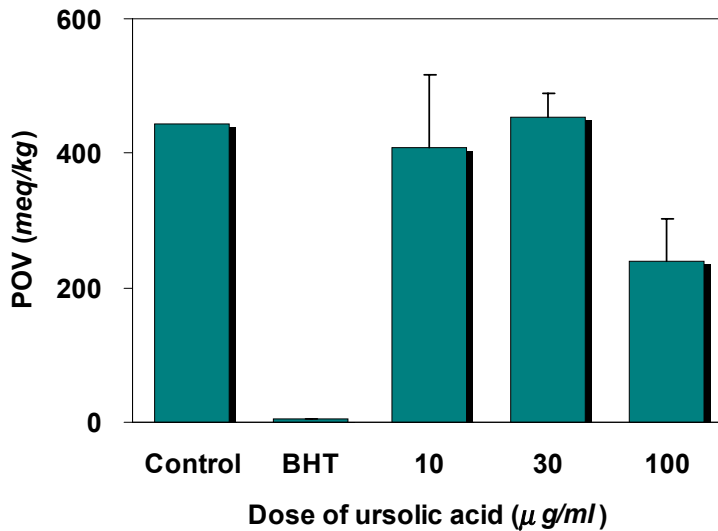


Fig 3.5.6. Effects of ursolic acid isolated from the chloroform fraction of *Corni fructus* on peroxidation of linoleic acid

### 3) Liver homogenate에 대한 *in vitro* 항산화 기능

산수유 추출물의 지질과산화 억제효과를 흰쥐의 liver homogenate를 사용하여 *in vitro*로 관찰하였다. 흰쥐의 간장을 적출하여 phosphate buffer로 균질화한 다음 균질액에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 FeSO<sub>4</sub>를 첨가하여 지질 과산화를 촉진시키는 model system에서 산수유 추출물의 지질 과산화 억제효과를 관찰하여 그 결과를 Table 3.5.1에 나타냈다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 FeSO<sub>4</sub>에 의한 지질과산화는 산수유 추출물을 첨가하여 반응시킬 때 현저히 감소되는 것을 확인하였으며, 산수유 추출물의 첨가량이 많을수록 항산화 효과는 더 컸다.

Methanol 추출물 subfraction의 liver homogenate에 대한 항산화 활성은 ethyl acetate fraction이 가장 높았다(Fig. 3.5.7).

Table 3.5.1. Effect of methanol extract of *Corni fructus* on lipid peroxidation in liver homogenate of rats (mmol TBARS/g)

	TBARS
Control	3.93 ± 0.53
Methanol extract 10 mg	2.78 ± 0.49
Methanol extract 100 mg	2.06 ± 0.44

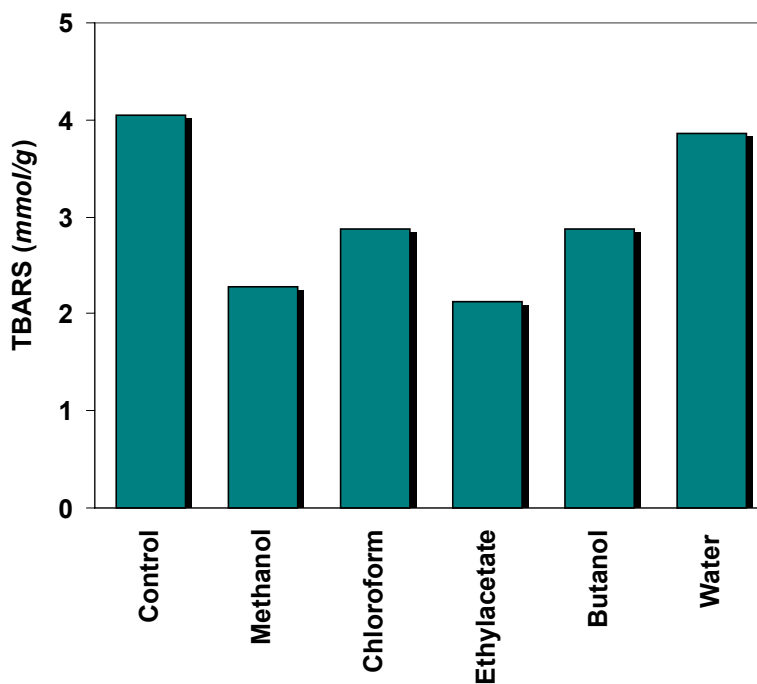


Fig 3.5.7. Effects of subfractions of methanol extract of *Corni fructus* on lipid peroxidation in liver homogenate of rats

## 제 6 절 항 당뇨 활성

### 1. 재료 및 방법

#### 1) 실험동물

실험동물은 Sprague-Dawley계 숫컷 흰쥐를 실험 전 일주일 이상 예비사육하여 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물은 일정한 조건(온도: 24±2℃, 습도: 60%, 명암: 12 시간 주기 조명)에서 stainless steel cage에 한 마리씩 사육하였다. 실험동물은 streptozotocin(50mg/kg 체중)을 복강에 투여하여 고혈당을 유발시킨 다음 대조군과 산수유군으로 나누어 사육하며 혈당 변화를 측정하였다. 예비사육 및 실험사육기간 중 물과 사료는 자유로이 섭취시키며, 사료는 매일 신선하게 공급하고 섭취량은 매일 기록하고, 체중은 1주일 간격으로 측정하였다. 식이조성은 Table 3.6.1과 같다

Table 3.6.1. Compositions of Experimental Diet (%)

Ingredient	Basal	<i>Corni fructus</i>
Sucrose	50	45
Starch	15	15
Casein	20	20
DL-Methionine	0.3	0.3
Soybean oil	5	5
Choline bitartrate	0.2	0.2
Mineral <sup>1</sup>	3.5	3.5
Vitamin <sup>2</sup>	1	1
Cellulose	5	5
<i>Corni fructus</i>	0	5
	100	100

<sup>1</sup>AIN76<sup>TM</sup> Mineral mix

<sup>2</sup>AIN76<sup>TM</sup> Vitamin mix



## 2) Streptozotocin에 의한 당뇨 유발

Streptozotocin 투여 16시간 전부터 실험동물을 절식시킨 후, 0.01M citrate buffer(pH 4.5)에 용해시킨 streptozotocin을 1회 (50mg/1kg 체중) 복강에 주사하여 실험적으로 당뇨병을 유발시켰다. 당뇨병의 확인은 Glucotrend<sup>®</sup> (Roche Diagnostics GmbH., Germany) 혈당측정기를 이용하여 혈당 농도가 300mg/dl 이상인 것을 당뇨병이 유발된 것으로 간주하여 실험에 사용하였다.

## 3) 혈당 및 지질 분석

혈당은 간이혈당측정스틱 또는 glucose oxidase방법에 따라 조제된 kit로 측정하고, 혈장 중성지질(Bucolo and David, 1973) 총 콜레스테롤(Allain *et al.*, 1974) 및 HDL-콜레스테롤(Burstein *et al.*, 1970)은 enzymatic colorimetry 방법을 이용한 kit로 각각 측정하였다.

## 2. 결과 및 고찰

### 1) 산수유의 항 당뇨 효능

#### 가. 사료 섭취량, 체중 증가 및 사료 효율

Streptozotocin을 투여하여 고혈당을 유발시킨 Sprague-Dawley계 흰쥐에 산수유를 섭취시켜 산수유의 당뇨병 억제 효능을 검색하였다. 당뇨유발 후 실험식이 2 주 동안의 사료 섭취량, 체중 증가량, 그리고 사료 효율을 Table 3.6.2에 나타내었다.

사료 섭취량은 정상 대조군과 당뇨 대조군 간에는 큰 차이를 보이지 않았으나, 산수유군은 사료섭취량이 낮았다. 산수유군에서 사료 섭취량이 낮은 것은 신맛 등 기호성의 차이에 의한 것이라 사료된다.

체중은 정상쥐에 있어서는 실험식이 2 주 동안 하루 평균 3.44g씩 증가하였으나 당뇨쥐는 하루 2.01~2.52g씩 감소하였다. 당뇨쥐의 체중 감소량은 당뇨 산수유군이 당뇨 대조군에 비하여 다소 작았다.

사료 효율은 정상 쥐에 비해 당뇨쥐들이 현저히 낮았으며, 당뇨 대조군과 당뇨 산수유군 사이에는 큰 차이를 보이지 않았다.

Table 3.6.2. Feed consumption, weight gain and feed efficiency ratio in rats fed experimental diets

Group <sup>1</sup>	Feed consumption (g/day)	Weight gain (g/day)	Food efficiency ratio
N	22.91±4.56	3.44±0.66	0.15±0.05
D	23.28±5.03	-2.52±1.15	-0.11±0.09
DCF	20.14±4.35	-2.01±0.99	-0.10±0.08

<sup>1</sup>Group abbreviations: N, normal; D, diabetic control; DCF, diabetic rats fed with *Corni fructus* diet.

본 실험에서 당뇨유발 후, 당뇨 실험군들의 현저한 체중감소는 streptozotocin으로 당뇨를 유발시킨 쥐의 성장률과 체중이 감소하였다는 Preston 등(1991)의 결과와 일치하였으며, 인슐린의 기능 저하로 세포 내 포도당 이용률이 감소하면서 간, 근육, 지방조직의 지방과 단백질이 부족한 에너지를 생산하는데 이용되었기 때문인 것으로 사료된다.

실험식이 기간 중 체중의 변화를 보면 Fig. 3.6.1에 나타난 바와 같이 정상대조군의 체중은 시간이 지남에 따라 차츰 증가하였으나, 당뇨군들의 체중은 모두 점차 감소하였다. 당뇨쥐의 체중감소는 식이 종류에 따라 큰 차이를 보이지는 않았으나, 당뇨 산수유군이 당뇨 대조군보다 체중감소량이 약간 적어 산수유 섭취가 당뇨쥐의 체중 감소 현상을 일부 막아주는 것으로 나타났다.

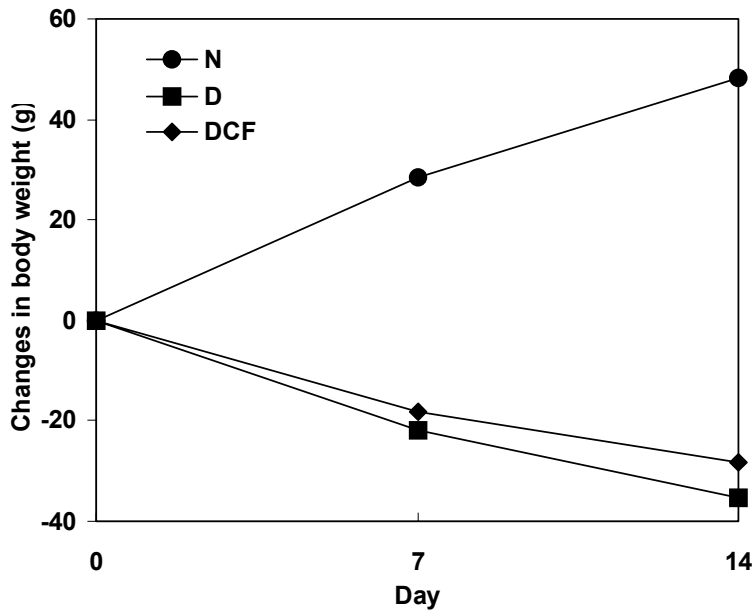


Fig. 3.6.1. Changes in body weight of rats under experimental diets.

Group abbreviations: N, normal; D, diabetic control; DCF, diabetic rats fed with *Corni fructus* diet.

#### 나. 혈당의 변화

실험식이 종료시의 혈당을 측정하여 Table 3.6.3에 나타내었다. 정상 대조군의 혈당치는 113.9mg/dl이었으며, streptozotocin 처리로 유발된 당뇨 대조군의 혈당치는 334.6mg/dl로 정상 대조군에 비해 현저히 높은 혈당치를 보였다.

Streptozotocin 처리에 의해 실험동물의 혈당이 증가하는 것은 streptozotocin 투여로 체내에 nitric oxide(NO<sup>·</sup>)가 생성되고, 생성된 nitric oxide가 superoxide anion(O<sub>2</sub><sup>·-</sup>)과 반응하여 peroxinitrite(ONOO<sup>-</sup>)을 생성하고(Matkovics *et al.*, 1998), peroxinitrite은 췌장 Langerhan's섬의 β-cell을 파괴하여 인슐린 결핍을 초래하므로 포도당에 대한 β-cell의 예민도를 저하시키는 역할을 한다. Peroxinitrite에 의한 인슐린 생성의 저하는 세포내 포도당 이용률을 저하시키고, 당신생을 촉진시켜 고혈당을 초래하게 되며, 고혈당은 결국 vascular oxidation 대사에 이상을 초래하여 유리기를 생성하게 되고, 생성된 유리기는 β-cell의 자동면역 기능을 파괴함으로써 고혈당이 정상화되지 못하고 계속 그 상태로 유지된다 (Kahn, 1985).

Streptozotocin 처리로 당뇨가 유발된 쥐에 산수유를 섭취시킨 결과 산수유군은 혈당이 256.2mg/dl로 당뇨 대조군의 334.6mg/dl에 비해 현저히 낮은 혈당치를 보였으나 정상위의 113.9mg/dl 보다는 매우 높은 값을 보였다.

Table 3.6.3. Plasma glucose concentration of diabetic rats fed experimental diets for 2 weeks<sup>1</sup>

Group	Glucose (mg/dl)
N	113.9±15.3
D	334.6±45.2
DCF	256.2±48.9

<sup>1</sup>Group abbreviations: N, normal; D, diabetic control; DCF, diabetic rats fed with *Corni fructus* diet.

2) 산수유 methanol 추출물 subfraction의 항 당뇨 효능

가. 사료 섭취량, 체중 증가, 사료 효율 및 음수량

Streptozotocin 투여에 의하여 고혈당이 유발된 Sprague-Dawley계 흰쥐에 있어 산수유 methanol extract와 subfraction의 항 당뇨 효능을 검색하였다. 당뇨유발 후 산수유 methanol extract와 subfraction을 경구 투여한 3 주 동안의 사료 섭취량, 체중 증가량, 사료 효율 및 음수량을 측정하여 Table 3.6.4에 정리하였다.

당뇨군은 정상 대조군에 비하여 다음, 다식, 다뇨 등 전형적인 당뇨병 증상을 보였으나, 현저한 다음 다식에도 불구하고 정상 쥐에 비하여 체중 증가가 매우 낮았다. 당뇨 발병에 따른 다음, 다식, 다뇨, 체중 증가 감소 현상은 산수유 methanol 추출물과 subfraction의 경구 투여에 의하여 상당량 개선되었으며, subfraction 중 chloroform fraction이 가장 활성이 높았다.

Table 3.6.4. Effects of subfractions of *Corni fructus* methanol extract on feed consumption, weight gain, FER and water drinking in streptozotocin-induced diabetic rats<sup>1</sup>

Group	Feed consumption (g/day)	Weight gain (g/day)	FER	Water drinking (ml/day)
Normal	21.33 ± 1.34	4.27 ± 0.55	19.97 ± 1.53	31.8 ± 3.5
Diabetic control	32.84 ± 4.56	1.62 ± 0.59	5.09 ± 2.32	166.5 ± 48.4
Methanol extract	30.72 ± 9.74	2.40 ± 1.07	9.67 ± 7.22	150.0 ± 99.4
Chloroform fraction	27.96 ± 9.78	2.08 ± 0.96	8.14 ± 4.25	129.3 ± 94.2
Ethylacetate fraction	31.89 ± 8.34	2.41 ± 1.07	8.84 ± 6.35	150.6 ± 93.2
Butanol fraction	31.09 ± 7.54	2.33 ± 0.64	8.46 ± 5.30	149.0 ± 73.1
Water fraction	33.54 ± 8.52	1.97 ± 0.70	6.76 ± 4.91	179.3 ± 89.2

나. 장기 무게

간과 신장의 체중 대비 무게는 당뇨 쥐가 정상 쥐에 비하여 현저히 무거운 것으로 나타났으나, 심장과 비장의 무게는 당뇨 발병에 의하여 큰 영향을 받지 않았다(Table 3.6.5). 산수유 methanol 추출물과 subfraction의 투여는 장기 무게에 큰 영향을 주지 않았다.

Table 3.6.5. Effects of subfractions of *Corni fructus* methanol extract on the weights of liver, heart, kidney and spleen of diabetic rats<sup>1</sup>

Group	Liver	Heart	Kidney	Spleen
Normal	2.76 ± 0.16	0.30 ± 0.02	0.67 ± 0.04	0.20 ± 0.02
Diabetic control	3.95 ± 0.47	0.34 ± 0.02	1.03 ± 0.09	0.22 ± 0.02
Methanol extract	3.78 ± 0.88	0.33 ± 0.02	0.97 ± 0.18	0.19 ± 0.03
Chloroform fraction	3.63 ± 0.93	0.36 ± 0.05	0.91 ± 0.24	0.22 ± 0.02
Ethylacetate fraction	3.95 ± 0.60	0.33 ± 0.02	0.96 ± 0.15	0.19 ± 0.01
Butanol fraction	3.82 ± 0.44	0.32 ± 0.01	0.91 ± 0.13	0.21 ± 0.02
Water fraction	4.06 ± 0.83	0.34 ± 0.01	0.98 ± 0.15	0.21 ± 0.02

<sup>1</sup>(% body wt)

#### 다. 혈당의 변화

당뇨가 유발된 실험동물에 3 주 동안 산수유 methanol 추출물 및 subfraction을 경구 투여한 후 혈당의 변화를 측정하였다(Table 3.6.6). 정상 대조군의 혈당치는 123.0mg/dl 이었으며, streptozotocin 처리로 유발된 당뇨 대조군의 혈당치는 308.6mg/dl로 정상 대조군에 비해 현저히 높은 값을 보였다. 산수유 methanol 추출물과 subfraction 투여는 혈당을 다소 낮추었으며, subfraction 중에서는 chloroform fraction 투여 군이 가장 낮은 혈당치를 보였다.

Table 3.6.6. Effects of subfractions of *Corni fructus* methanol extract on plasma glucose level of diabetic rats<sup>1</sup>

Group	Glucose (g/dl)
Normal	123.0±28.61
Diabetic control	308.6±46.00
Methanol extract	264.9±35.23
Chloroform fraction	242.0±41.02
Ethylacetate fraction	266.2±39.37
Butanol fraction	260.5±44.63
Water fraction	309.9±48.21

라. GOT, GPT 값의 변화

Streptozotocin 처리로 유발된 당뇨 대조군의 혈장 GOT, GPT 값은 각각 143.9와 151.22로 정상 대조군의 46.97과 15.57에 비해 현저히 높은 값을 보였으며, 산수유 methanol 추출물과 subfraction 투여는 혈장 GOT, GPT 값을 현저히 낮추었다. Subfraction 중에서는 butanol fraction 투여 군이 가장 낮은 GOT, GPT 값을 보였다 (Table 3.6.7).

Table 3.6.7. Effects of subfractions of *Corni fructus* methanol extract on plasma GOT and GPT in rats treated with streptozotocin<sup>1</sup>

Group	GOT (Karmen/ml)	GPT (Karmen/ml)
Normal	46.97 ±5.79	15.57 ±3.05
Diabetic control	143.90 ±27.57	151.22 ±34.84
Methanol extract	85.57 ±17.73	65.98 ±13.12
Chloroform fraction	104.48 ±28.85	80.03 ±11.74
Ethylacetate fraction	106.82 ±22.05	89.53 ±17.49
Butanol fraction	73.20 ±18.75	56.14 ±12.82
Water fraction	102.28 ±28.57	92.63 ±19.33



마. 혈장 지질함량의 변화

Streptozotocin에 의한 당뇨 쥐는 정상 쥐에 비하여 혈장 총 cholesterol의 농도와 LDL-cholesterol 농도가 높은 반면 HDL-cholesterol 농도가 낮아 동맥경화지수가 현저히 높았다(Table 3.6.8). 혈장 cholesterol과 더불어 triglyceride 함량도 당뇨군이 정상군에 비하여 높았으나, 혈장 phospholipids 함량은 당뇨에 의한 영향이 거의 없었다(Table 3.6.9). 산수유 methanol 추출물과 subfraction 투여는 당뇨로 인해 발생하는 고지혈증을 다소 완화시켰으며, subfraction 중에서는 ethyl acetate fraction 투여 군이 가장 높은 활성을 보였다.

Table 3.6.8. Effects of *Corni fructus* on plasma total cholesterol, HDL-cholesterol and LDL-cholesterol in in rats treated with streptozotocin<sup>1</sup>

Group	TC (mg/dl)	HDLCH (mg/dl)	LDLCH (mg/dl)	AI
Normal	98.4±12.1	69.1±11.8	29.3±5.6	0.42±0.07
Diabetic control	128.8±23.9	55.1±10.3	73.7±13.2	1.34±0.24
Methanol extract	117.2±20.2	59.3±11.7	57.9±10.9	0.98±0.16
Chloroform fraction	120.5±25.1	57.1±10.5	63.4±11.4	1.10±0.19
Ethylacetate fraction	111.6±24.3	60.5±10.6	51.1±9.8	0.84±0.17
Butanol fraction	119.3±19.4	58.8±12.1	60.5±10.7	1.03±0.18
Water fraction	122.3±26.2	53.1±10.8	69.2±11.3	1.30±0.23

Abbreviations: TC; total cholesterol, HDLCH; HDL cholesterol, LDLCH; LDL cholesterol (total cholesterol-HDLCH), AI; atherogenic index (LDLCH/HDLCH).

Table 3.6.9. Effects of *Corni fructus* on plasma contents of triglyceride and phospholipid in rats treated with streptozotocin (mg/dl)

Group	Triglycerides	Phospholipids
Normal	149.1±20.3	191.3±23.8
Diabetic control	224.6±41.9	206.4±29.5
Methanol extract	189.3±21.6	201.7±27.1
Chloroform fraction	206.5±27.4	209.1±30.2
Ethylacetate fraction	178.2±23.9	195.0±27.4
Butanol fraction	212.5±31.2	198.4±25.0
Water fraction	228.2±33.4	202.6±29.3

바. 간 지질 함량

혈장 지질과 함께 간 지질 함량도 streptozotocin 당뇨에 의하여 영향을 받았다 (Table 3.6.10). 당뇨 쥐는 정상 쥐에 비하여 간 cholesterol과 triglyceride 함량이 현저히 높아 지방간 현상을 보였으나, phospholipids 함량은 별 차이가 없었다. 산수유 methanol 추출물과 subfraction 투여는 당뇨로 인한 지방간 현상을 다소 완화시켰으며, subfraction 중에서는 ethyl acetate fraction 투여 군이 가장 높은 활성을 보였다.

Table 3.6.10. Liver lipid contents of diabetic rats administered with the methanol extract and subfractions of *Corni fructus* (mg/g)

Group	Cholesterol	Triglycerides	Phospholipids
Normal	3.81±0.49	24.8±3.5	20.3±2.6
Diabetic control	9.15±1.02	51.6±7.9	24.1±3.8
Methanol extract	6.54±0.87	38.3±5.3	23.2±3.4
Chloroform fraction	8.82±0.91	48.5±7.5	23.9±3.2
Ethylacetate fraction	5.68±0.75	32.2±5.1	22.4±2.9
Butanol fraction	7.83±0.90	48.1±8.2	23.5±3.3
Water fraction	8.17±1.04	34.2±5.6	23.8±3.7



## 제 7 절 고지혈증 개선 효과

### 1. 재료 및 방법

#### 1) 실험동물

평균체중이 약 50g 되는 Sprague Dawley계 수컷 흰쥐를 기본식으로 1주일 간 예비사육하여 적응시킨 후 실험식이군으로(Table 3.7.1) 나누어 4주간 사육하였다. 실험사육 종료시의 채혈은 12 시간 절식시킨 뒤 실험동물을 에테르로 마취시켜 개복하여 심장으로부터 채혈하였다. 혈액은 EDTA (1 mg/ml)로 처리하여 1 시간 빙수 중에 방치시킨 후 500 x g에서 15분간 원심분리하여 혈장을 얻어 즉시 HDL-cholesterol을 측정한다 다음 -20℃에 보관하며 지질함량을 측정하였다. 간장은 혈액채취 후 즉시 적출하여 4℃ 0.9% 생리식염수로 씻은 다음 물기를 제거하여 무게를 측정한다 후 -20℃에 보관하며 지질함량을 측정하였다.

Table 3.7.1. Compositions of Experimental Diet (%)

Ingredient	Basal	Control	2%	5%
Sucrose	50	49	47	44
Starch	15	15	15	15
Casein	20	20	20	20
DL-Methionine	0.3	0.3	0.3	0.3
Soybean oil	5	1	1	1
Butter	0	4	4	4
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2	0.2
Mineral <sup>1</sup>	3.5	3.5	3.5	3.5
Vitamin <sup>2</sup>	1	1	1	1
Cellulose	5	5	5	5
Cholesterol	0	1	1	1
산수유	0	0	2	5
	100	100	100	100

<sup>1</sup>AIN76<sup>TM</sup> Mineral mix

<sup>2</sup>AIN76<sup>TM</sup> Vitamin mix

## 2) 지질성분의 분석

혈장 및 간장의 총 cholesterol, 유리 cholesterol, 중성지질 및 인지질 함량은 효소법에 의해 kit시약 (Eiken Chemical Co., LTD., Tokyo, Japan)으로 분석하였다. 혈장 high density lipoprotein (HDL)-cholesterol은 phosphotungstate-MgCl<sub>2</sub>에 의해 β-lipoprotein을 침전시킨 후 효소법으로 측정하였다.

## 2. 결과 및 고찰

### 1) 산수유의 고지혈증 개선 효과

#### 가. 식이 섭취량, 체중 증가, 식이효율, 간장 무게

산수유의 고지혈증 억제효과를 살펴보기 위하여 버터와 콜레스테롤이 함유된 고지혈증 유발 식이에 산수유 분말을 첨가하여 4 주간 사육하여 식이섭취량, 체중 증가, 식이 효율 및 간장 무게를 측정한 결과 Table 3.7.2와 같다.

Cholesterol 1%를 함유한 동맥경화 유발성 식이 대조군(control군)은 식이섭취량, 체중 증가 및 식이효율에 있어 cholesterol을 함유하지 않은 항 동맥경화성 식이군(basal군)과 크게 다르지 않았다. 산수유 2%와 5% 식이군은 그들의 대조군(control군)에 비하여 식이섭취량이 다소 감소하였으나 그에 따른 체중 증가량도 다소 감소하여 식이효율은 거의 차이가 없었다.

체중 대비로 본 간 중량은 cholesterol 함유 식이 섭취에 의하여 증가하였으나 식이 산수유 섭취에 의하여 감소되어 산수유 5% 섭취군은 basal군과 유사한 간 중량을 보였다.

Table 3.7.2. Food intake, weight gain, food efficiency ratio and liver weight of rats fed the experimental diets for 4 weeks<sup>1</sup>

Group	Food intake (g/day)	Weight gain (g/day)	FER <sup>2</sup>	Liver weight (g%)
Basal	16.4±0.4	6.46±0.15	0.39±0.02	4.34±0.21
Control	16.9±0.3	6.95±0.33	0.41±0.03	5.26±0.15
2%	16.1±0.5	6.33±0.27	0.39±0.01	4.84±0.24
5%	15.1±0.4	5.93±0.24	0.39±0.03	4.51±0.17

<sup>1</sup>Numbers are mean±SE, n=6.

<sup>2</sup>Abbreviation: FER; food efficiency ratio (weight gain/food intake)

#### 나. 혈장 cholesterol

버터와 콜레스테롤이 함유된 고지혈증 유발 식이군(control군)은 콜레스테롤을 함유하지 않은 옥수수유가 사용된 basal군에 비하여 혈장 free cholesterol은 차이를 보이지 않으면서 cholesteryl ester를 증가시켜 전체적으로 혈장 총 cholesterol 함량을 증가시켰다(Table 3.7.3). Cholesterol 식이는 또한 HDL-cholesterol을 감소시키는 반면 큰 폭의 LDL-cholesterol 상승을 가져와 LDL-cholesterol/HDL-cholesterol 비율로 표시되는 동맥경화 지수를 높였다(Table 3.7.4).

산수유 2% 섭취군은 control군에 비하여 혈장 총 cholesterol, free cholesterol 및 cholesteryl ester 함량에 있어서 큰 차이를 보이지 않았으나, 산수유 5% 군은 혈장 총 cholesterol 농도와 cholesteryl ester 함량을 감소시켰다(Table 3.7.3). 산수유 섭취에 의한 혈장 총 cholesterol의 감소는 주로 LDL-cholesterol의 감소에 의한 것이었으며, HDL-cholesterol은 control군과 유사한 값을 보였다(Table 3.7.4).

Table 3.7.3. Effects of *Corni fructus* on plasma contents of total cholesterol, free cholesterol and cholesteryl ester in rats<sup>1</sup>

Group	TC <sup>2</sup> (mg/dl)	FC (mg/dl)	CE (mg/dl)
Basal	89.2±3.1	15.3±3.2	73.9±3.8
Control	121.8±7.2	14.7±3.7	107.1±6.5
2%	111.7±6.7	14.2±2.9	97.5±5.1
5%	103.4±5.9	19.4±3.9	84.0±6.2

<sup>1</sup>Numbers are mean±SE, n=6.

<sup>2</sup>Abbreviation: TC; total cholesterol, FC; free cholesterol, CE; cholesteryl ester.

Table 3.7.4. Effects of *Corni fructus* on plasma HDL-cholesterol, LDL-cholesterol and atherogenic index in rats<sup>1</sup>

Group	HDLCH <sup>2</sup> (mg/dl)	LDLCH <sup>2</sup> (mg/dl)	AI <sup>2</sup>
Basal	60.2±2.8	29.0±2.3	0.48±0.11
Control	45.3±3.6	76.5±6.7	1.69±0.21
2%	41.1±3.8	70.6±6.2	1.72±0.18
5%	43.9±4.3	59.5±4.6	1.36±0.15

<sup>1</sup>Numbers are mean±SE, n=6.

<sup>2</sup>Abbreviation: HDLCH; HDL cholesterol, LDLCH; LDL cholesterol (total cholesterol-HDLCH), AI; atherosclerotic index (LDLCH/HDLCH).

다. 혈장 triglycerides와 phospholipids

Control 식이는 basal 식이에 비하여 혈장 cholesterol 뿐만 아니라 중성지질 농도도 크게 증가시킨(151.2 vs 246.3mg/dl) 반면, 인지질 농도에는 크게 영향을 미치지 않았으며, 산수유 식이는 혈장 중성지질 농도를 현저히 감소시켰다(Table 3.7.5).

Table 3.7.5. Effects of *Corni fructus* on plasma contents of triglyceride and phospholipid (mg/dl)<sup>1</sup>

Group	TG <sup>2</sup> (mg/dl)	PL <sup>2</sup> (mg/dl)
Basal	151.2±16.9	179.2±12.3
Control	246.3±21.5	195.6±15.2
2%	182.3±19.4	185.3±12.6
5%	192.7±18.7	195.7±18.8

<sup>1</sup>Numbers are mean±SE, n=6.

<sup>2</sup>Abbreviation: TG; triglyceride, PL; phospholipid.



라. 간 지질 함량의 변화

간장의 cholesterol과 중성지질 함량은 cholesterol 식이에 의하여 현저히 증가되었다 (Table 3.7.6). 산수유 식이는 cholesterol 섭취에 의한 간장의 cholesterol과 중성지질 함량의 증가를 다소 억제시키는 효과를 나타내었다.

Table 3.7.6. Liver lipid contents of rats fed the experimental diets  
(mg/g)<sup>1</sup>

Group	TC <sup>2</sup>	TG <sup>2</sup>	PL <sup>2</sup>
Basal	3.93±0.55	26.3±3.6	22.3±1.6
Control	10.12±0.67	44.2±5.9	23.4±1.8
2%	9.84±0.65	40.7±4.3	24.8±1.5
5%	8.56±0.77	36.3±3.9	23.9±1.7

<sup>1</sup>Numbers are mean±SE, n=6.

<sup>2</sup>Abbreviation: TC; total cholesterol, FC; free cholesterol, CE; cholesteryl ester, TG; triglyceride, PL; phospholipid.

2) Methanol 추출물과 subfraction의 고지혈증 개선 효과

가. 식이 섭취량, 체중 증가, 식이효율

산수유 methanol 추출물과 subfraction의 항 고지혈증 효과를 살펴보기 위하여 버터와 콜레스테롤이 함유된 고지혈증 유발 식이를 섭취하는 흰쥐에게 4 주간 산수유 methanol 추출물과 subfraction을 경구 투여하였다. Cholesterol을 함유한 동맥경화 유발성 식이 대조군(control군)은 식이섭취량, 체중 증가 및 식이효율에 있어 cholesterol을 함유하지 않은 항 동맥경화성 식이군(basal군)과 크게 다르지 않았으며, 산수유 methanol 추출물과 subfraction 경구투여도 식이섭취량, 체중 증가 및 식이효율에 영향을 미치지 않았다(Table 3.7.7).

Table 3.7.7. Food intake, weight gain and food efficiency ratio of rats treated with methanol extract or subfraction of *Corni fructus* for 4 weeks<sup>1</sup>

Group	Food intake (g/day)	Weight gain (g/day)	FER <sup>2</sup>
Basal	18.3±1.4	6.22±0.63	0.34±0.04
Control	19.6±1.2	6.98±0.61	0.36±0.05
Methanol extract	19.1±1.6	6.85±0.58	0.36±0.03
Chloroform fraction	18.9±1.5	6.70±0.74	0.35±0.03
Ethylacetate fraction	20.3±1.8	6.93±0.55	0.34±0.04
Butanol fraction	19.2±1.1	6.86±0.47	0.36±0.03
Water fraction	19.8±2.4	6.77±0.52	0.34±0.04

<sup>1</sup>Numbers are mean±SD, n=5.

<sup>2</sup>Abbreviation: FER; food efficiency ratio (weight gain/food intake)

나. 혈장 cholesterol의 변화

버터와 콜레스테롤이 함유된 고지혈증 유발 식이군(control군)은 콜레스테롤을 함유하지 않은 옥수수유가 사용된 basal군에 비하여 혈장 총 cholesterol 함량이 높았다. Cholesterol 식이는 또한 HDL-cholesterol을 다소 감소시키는 한편 큰 폭의 LDL-cholesterol의 상승을 가져와 LDL-cholesterol/HDL-cholesterol 비율로 표시되는 동맥경화 지수를 증가시켰다(Table 3.7.8).

고지혈증 유발 식이를 하면서 산수유 methanol 추출물과 subfraction이 경구 투여된 흰쥐는 고지혈증 유발 식이 control군에 비하여 혈장 총 cholesterol과 HDL-cholesterol 함량이 다소 높고 LDL-cholesterol 함량이 낮아 동맥경화 유발지수(AI)가 감소하였다. Subfraction 투여군들 중 ethyl acetate 투여군이 고지혈증 개선 효과가 가장 우수하였다(Table 3.7.8).

Table 3.7.8. Effects of *Corni fructus* on plasma contents of total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol and atherogenic index in rats<sup>1</sup>

Group	TC <sup>2</sup> (mg/dℓ)	HDLCH <sup>2</sup> (mg/dℓ)	LDLCH <sup>2</sup> (mg/dℓ)	AI <sup>2</sup>
Basal	91.3±10.6	59.8±5.3	31.5±2.3	0.53±0.08
Control	118.9±13.3	46.3±5.5	72.6±6.7	1.56±0.31
Methanol extract	102.4±11.5	51.2±5.8	51.2±6.2	1.00±0.19
Chloroform fraction	113.7±12.7	54.6±6.4	59.1±6.2	1.08±0.21
Ethylacetate fraction	99.6±10.1	53.4±7.1	46.2±6.2	0.86±0.18
Butanol fraction	107.3±11.8	49.5±5.7	57.8±6.2	1.17±0.25
Water fraction	120.5±12.4	52.1±7.4	68.4±4.6	1.31±0.27

<sup>1</sup>Numbers are mean±SD, n=5.

<sup>2</sup>Abbreviation: TC; total cholesterol, HDLCH; HDL cholesterol, LDLCH; LDL cholesterol (total cholesterol-HDLCH), AI; atherogenic index (LDLCH/HDLCH).

다. 혈장 triglycerides와 phospholipids의 변화

혈장 triglyceride 농도는 cholesterol 식이에 의하여 현저히 증가하였으며, 산수유 methanol 추출물 및 ethyl acetate fraction 경구투여에 의하여 상당부분 감소하였다. 반면, 인지질 농도는 cholesterol 식이와 산수유 추출물 및 subfraction 투여에 의하여 큰 영향을 받지 않았다(Table 3.7.9).

Table 3.7.9. Effects of *Corni fructus* on plasma contents of triglycerides and phospholipids

Group	Triglycerides (mg/dl)	Phospholipids (mg/dl)
Basal	156.4±19.1	183.5±16.5
Control	213.3±24.6	197.1±16.3
Methanol extract	177.6±18.9	188.6±14.6
Chloroform fraction	195.7±21.4	190.3±12.9
Ethylacetate fraction	172.4±19.7	187.3±15.9
Butanol fraction	204.5±22.3	195.2±14.4
Water fraction	202.7±21.5	198.4±18.2

<sup>1</sup>Numbers are mean±SD, n=5.

라. 간 지질 함량의 변화

간장의 cholesterol과 triglyceride 함량은 cholesterol 식이에 의하여 현저히 증가되었다. 산수유 methanol 추출물과 subfraction의 경구투여는 간장 cholesterol과 triglyceride 함량을 다소 감소시켰으며, subfraction 중 ethyl acetate fraction이 가장 활성이 강한 것으로 나타났다(Table 3.7.10).

Table 3.7.10. Liver lipid contents of rats administered with the methanol extract and subfractions of *Corni fructus* (mg/g)<sup>1</sup>

Group	Cholesterol	Triglycerides	Phospholipids
Basal	3.74±0.54	25.6±3.8	21.8±2.3
Control	8.60±0.85	46.3±6.2	25.0±2.0
Methanol extract	6.71±0.73	36.7±5.3	23.3±2.2
Chloroform fraction	8.06±0.97	40.1±5.1	23.8±2.4
Ethylacetate fraction	6.13±0.72	35.5±4.7	25.1±2.1
Butanol fraction	7.84±0.70	39.2±4.5	22.8±2.3
Water fraction	8.53±0.94	42.0±5.9	23.5±2.4

<sup>1</sup>Numbers are mean±SD, n=5.

## 제 8 절 산수유 추출물 및 제품의 면역 활성화

### 1. 재료 및 방법

#### 1) 실험동물

본실험에 사용된 생쥐(BALB/c, C57BL/6)는 대한실험동물센터(충북 음성군)에서 구입한 생후 8~12주된 암컷을 사용하였고, 실험 전 까지 고형사료와 1차 증류수를 공급하면서 사육실에서 사육하였다.

#### 2) Spleen 세포 분리

생쥐(BALB/c)를 경추탈골로 희생시킨 뒤 알콜로 소독하여 해부대에 올려놓고 오른쪽 옆구리쪽을 절개하여 spleen을 떼어내었다. spleen은 핀셋을 이용하여 single 세포로 만들고 4℃, 1200rpm에서 8분간 3번 원심 침전하는 방법으로 세척하고 마지막에 10%FCS RPMI1640배지로 희석하여 실험에 사용하였다.

#### 3) 면역세포 증식 측정

분리한 비장세포를 96well plate에 넣고 여기에 시료를 농도별로 넣어 배양한 다음 각 조건에 따른 증식정도를 측정하였다. 비장세포 증식측정은 배양 72시간 후, Cell titer 96<sup>®</sup>Aqueous One Solution Cell proliferation Assay를 사용하여 각각 배양된 배양액 100 $\mu$ l에 Cell titer 15 $\mu$ l씩 첨가하여 4~8시간 동안 배양한 다음 490nm에서 O.D 값을 측정하였다.

#### 4) 면역활성 물질의 분리

산수유 추출물 중 면역활성이 나타난 시료로부터 활성물질을 분리하였다. 1차적으로 활성이 나타난 추출물을 용매의 극성 증가 순에 따라 분획물을 제조한 후 2차적으로 활성이 나타난 분획물에 대하여 실리카겔 칼럼크로마토그래피를 실시하여 활성 물질을 분리한 후 이에 대하여 활성을 확인하였다.

## 2. 결과 및 고찰

### 1) 산수유 추출물의 면역활성

생쥐 비장세포의 증식에 미치는 산수유 추출물의 영향을 살펴보기 위하여, 비장세포에 산수유 추출물을  $1\mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $10\mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $100\mu\text{g}/\text{ml}$  농도로 첨가하였는데, 무처리 대조구에 비하여 실험군에서는 거의 비장세포의 증식을 확인 할 수 없었으나, 70% ethanol 산수유 추출물에서는 비장세포의 증식 효과가 높게 나타났다(Fig. 3.8.1).

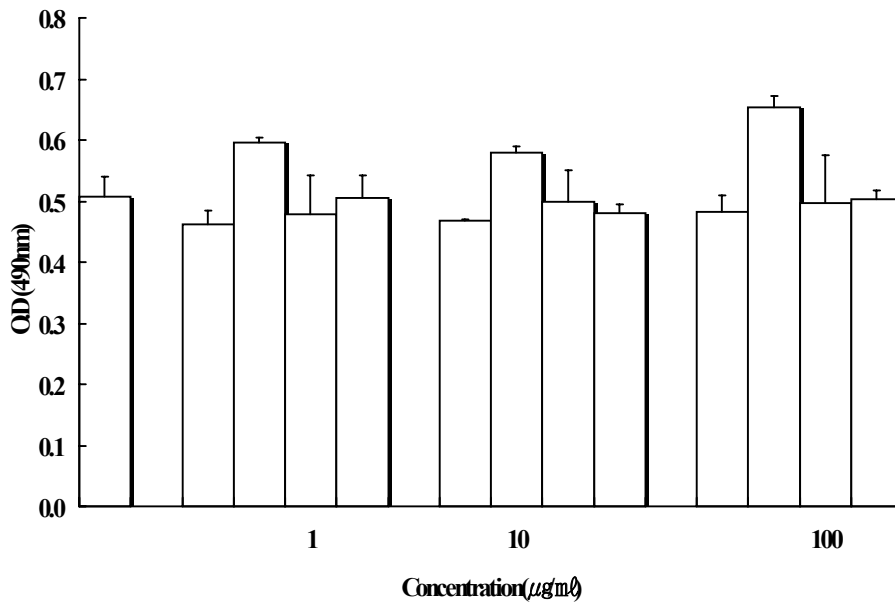


Fig. 3.8.1. Effect of extracts of *Corni Fructus* on mouse spleen cell proliferation.

□ : Control      ▨ : Water      ▤ : 70% ethanol  
 ▩ : 90% ethanol      ▧ : 100% ethanol

생쥐 비장세포의 증식에 미치는 산수유 추출물의 영향을 살펴보기 위하여 비장세포에 산수유 추출물 및 ConA를 첨가한 후 비장세포의 증식능을 측정된 결과 증류수 추출물에서는 비장세포의 증식이 억제 되었으나, ethanol 추출물에서는 비장세포 증식효과가 나타났다(Fig. 3.8.2).

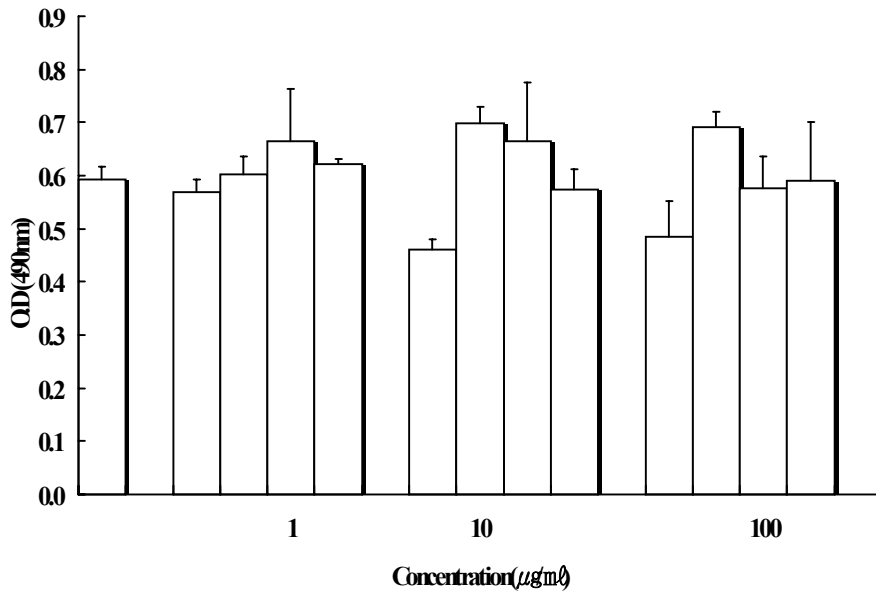


Fig. 3.8.2. Effect of extracts of *Corni Fructus* on mouse spleen cell proliferation with ConA.

□ : Control      ▨ : Water      ▤ : 70% ethanol  
 ▩ : 90% ethanol      ▧ : 100% ethanol



생쥐 비장세포의 증식에 미치는 산수유 분획물의 영향을 살펴보기 위하여 비장세포에 산수유 추출물 및 LPS를 첨가한 후 비장세포의 증식효과를 살펴보았다 (Fig. 3.8.3).

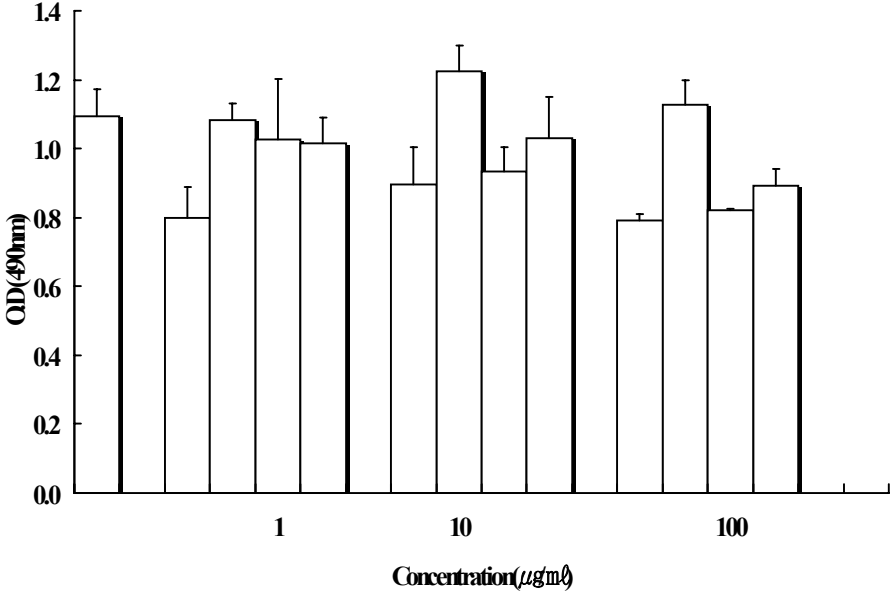


Fig. 3.8.3. Effect of extracts of Corni Fructus on mouse spleen cell proliferation with LPS.

□ : Control      ▨ : Water      ▤ : 70% ethanol  
 ▩ : 90% ethanol      ▧ : 100% ethanol

## 2) 산수유 제품의 면역활성

생쥐 비장세포에 미치는 산수유 음료 및 차의 영향을 살펴보기 위하여, 비장세포에 산수유 드링크 A, 산수유 드링크 B, 산수유 차 C  $1\mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $10\mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $100\mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $1000\mu\text{g}/\text{ml}$  농도로 첨가하였는데 무처리 대조구에 비하여 실험군에서는  $1\mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $10\mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $100\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 비장세포의 증식을 확인 할 수 있었으나,  $1000\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서는 오히려 증식을 억제하였다(Fig. 3.8.4).

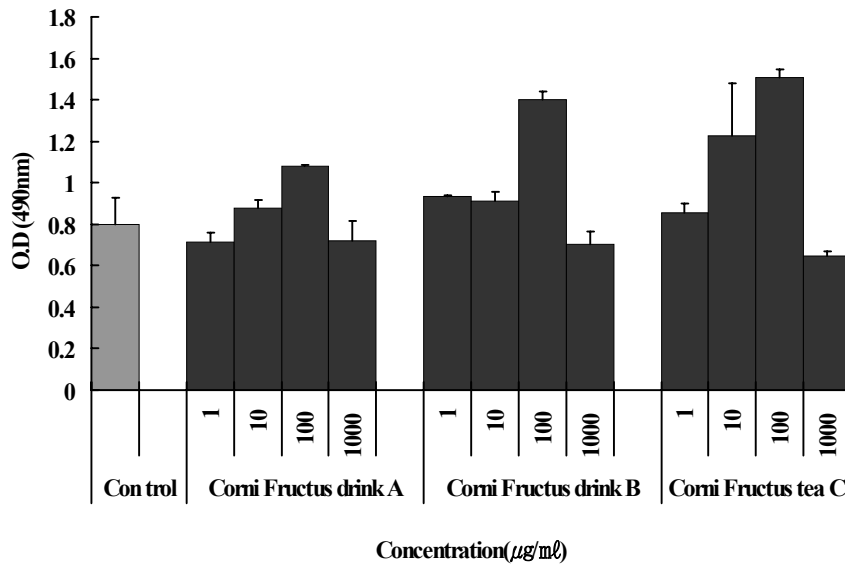


Fig. 3.8.4. Effect of sample on mouse spleen cell proliferation.

생쥐 비장세포의 증식에 미치는 Sample 추출물의 영향을 살펴보기 위하여 산수유 드링크 A, 산수유 드링크 B, 산수유 차 C 및 Con A를 첨가 한 후, 비장세포의 증식능을 측정 한 결과는 Fig. 34과 비슷한 결과를 나타내었다(Fig. 3.8.5).

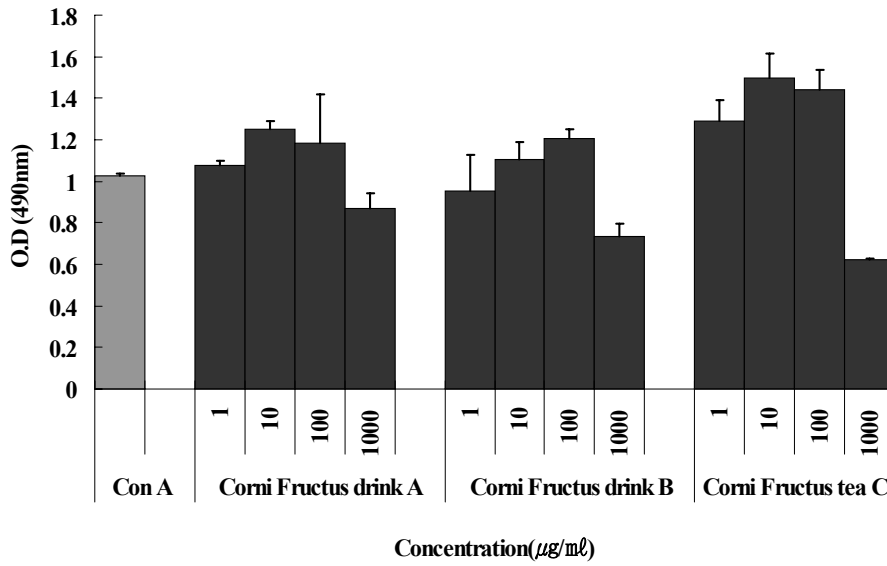


Fig. 3.8.5. Effect of sample on mouse spleen cell proliferation with Con A.

생쥐 비장세포의 증식에 미치는 Sample 추출물의 영향을 살펴보기 위하여 비장세포에 산수유 드링크 A, 산수유 드링크 B, 산수유 차 C 및 LPS를 첨가 한 후, 비장세포의 증식을 측정 한 결과는 산수유 드링크 A와 산수유 드링크 B에서는 비장세포의 증식을 확인 할 수 없었으나 산수유 차 C에서는 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 비장세포의 증식효과가 나타났다(Fig. 3.8.6).

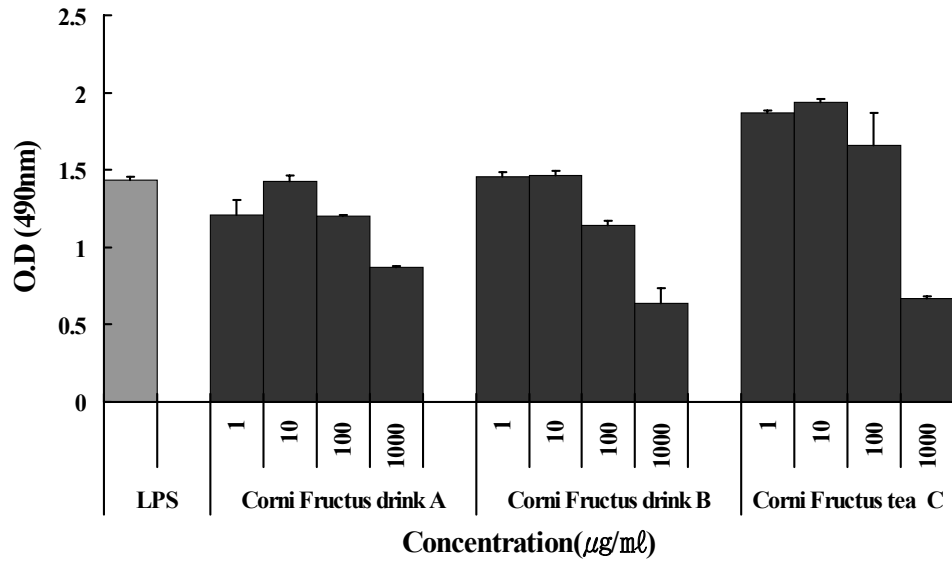


Fig. 3.8.6. Effect of sample on mouse spleen cell proliferation with LPS.



## 제 9 절 산수유 추출물 및 제품의 항암 활성

### 1. 재료 및 방법

#### 1) 암세포 배양

인체 고형암 세포주인 A549 (human lung carcinoma), MCF-7(human breast adenocarcinoma), HL-60(human promyelotic leukemia) 4종을 한국 세포주은행에서 분양받아 실험에 사용하였다. A549, MCF-7, HL-60 세포주들은 10%의 송아지 혈청 (fetal bovine serum)이 포함된 RPMI 1640 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 1주일에 1-2회 계대 배양하면서 실험에 사용하였다. 플라스크의 바닥에 부착되어 있는 세포를 떼어내는 데는 0.25% Trypsin- 3 mM EDTA 용액을 PBS로 10배 희석한 용액을 사용하였다.

#### 2) 암세포 성장 억제효과

세포증식 정도를 SRB assay법(Rubinstein *et al.*, 1990; Skenhan *et al.*, 1990)과 Cell titer 96<sup>®</sup> Aqueous One Solution Cell proliferation Assay(Promega, 2001)에 따라 측정하였다.

Monolayer로 배양중인 암세포주를 0.25% Trypsin-EDTA용액으로 처리하여 single cell로 만든 후 배양액으로 최종농도가 5x10<sup>4</sup>cells/mL개가 되도록 희석하여 48well plate에 각 well 당 450 $\mu$ l씩 seeding한 다음 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 preincubation하였다.

각 well의 배지를 aspiration하여 제거한 후, 서로 다른 농도로 준비한 시료가 포함된 배지를 50 $\mu$ l씩 각 well에 가하여 48시간 더 반응시켰다. 배양이 종료된 후, 50 $\mu$ l의 cold 50% TCA를 위에서부터 천천히 가해주고 TCA가 바닥에 가라앉도록 잠시 기다린 후 조심스럽게 냉장고로 옮겨 1시간동안 충분히 고정시키고 고정이 끝난 후에는 증류수로 5회 이상 세척하여 잘 건조시키고 나서 각 well 에 1% 빙초산에 녹인 0.4% SRB용액 100 mL을 가하여 상온에 30분이상 염색하였다. 염색이 끝난 후 1% 빙초산으로 5회 세척하여 잘 건조시키고 150 $\mu$ l의 10mM unbuffered Tris 용액으로 SRB dye를 잘 녹여내어 96-well plate용 microplate reader로 540nm에서 흡광도를 측정하

였다. 반면 부유세포인 경우는 시료처리 후 48시간 배양한 후 Cell titer 96<sup>®</sup> Aqueous One Solution(Nalgene<sup>®</sup>) 30 $\mu$ l를 첨가한 후 3시간 반응시킨 후 96-well plate 용 microplate reader에 옮겨 490nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 3) 암세포 형태의 관찰

광학현미경으로 세포를 관찰하기 위해 SRB정량 분석을 하기 전에 대조구와 실험군의 세포모양 변화를 inverted microscope로 관찰하고 사진을 촬영하였다.

### 4) 항암 활성 물질의 분리

산수유 추출물 중 항암 활성이 나타난 시료로부터 활성물질을 분리하였다. 1차적으로 활성이 나타난 추출물을 용매의 극성 증가순에 따라 분획물을 제조한 후 2차적으로 활성이 나타난 분획물에 대하여 실리카겔 칼럼그래피를 실시하여 활성 물질을 분리한 후 이에 대하여 활성을 확인하였다.

## 2. 결과 및 고찰

### 1) 암세포주 성장 억제 효과

산수유 추출물 첨가에 따른 암세포주 성장 억제 효과를 측정하기 위해 인체 폐암세포주인 A549에 산수유를 증류수 및 ethanol을 70%, 90%, 100% 추출하여 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도로 첨가하였을 때 인체 폐암세포주인 A549에서는 산수유 추출물을 첨가하지 않은 대조구에 비하여 각 추출물의 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에서 암세포 성장을 억제하였다(Fig. 3.9.1).

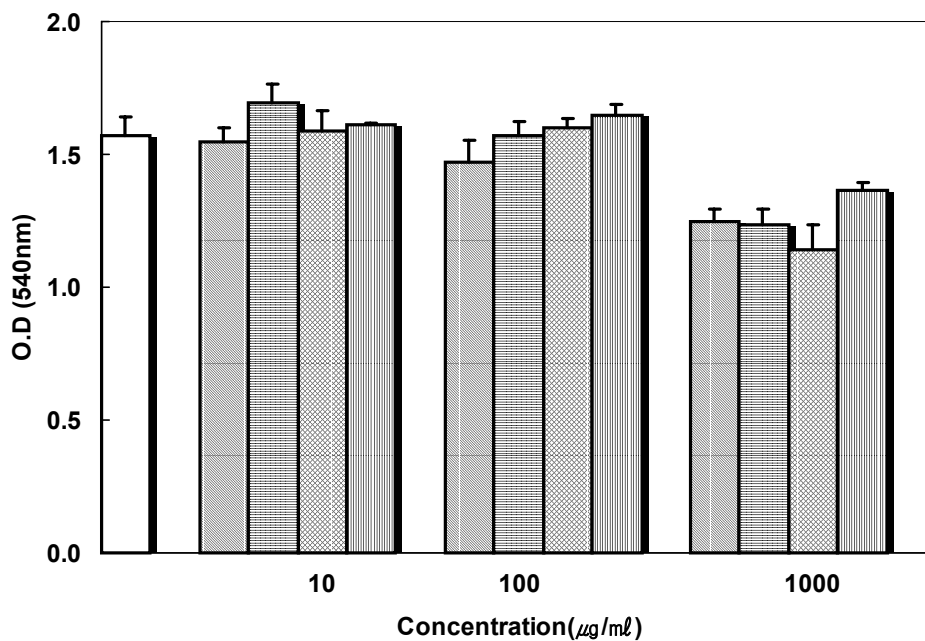


Fig. 3.9.1. Cell growth inhibition effects of extracts of *Corni Fructus* on A549.

□ : Control      ■ : BHT      ▨ : Water  
 ▤ : 70% ethanol      ▩ : 90% ethanol      ▧ : 100% ethanol



산수유 추출물 첨가에 따른 암세포주 성장 억제 효과를 측정하기 위해 인체 유방암 세포주인 MCF-7에 산수유를 증류수 및 ethanol을 70%, 90%, 100% 추출하여 10 $\mu$ g/ml, 100 $\mu$ g/ml, 1000 $\mu$ g/ml 농도로 첨가하였을 때 인체 유방암세포주인 MCF-7에서는 산수유 추출물을 첨가하지 않은 대조구에 비하여 대체적으로 암세포 성장을 억제하였다(Fig. 3.9.2).

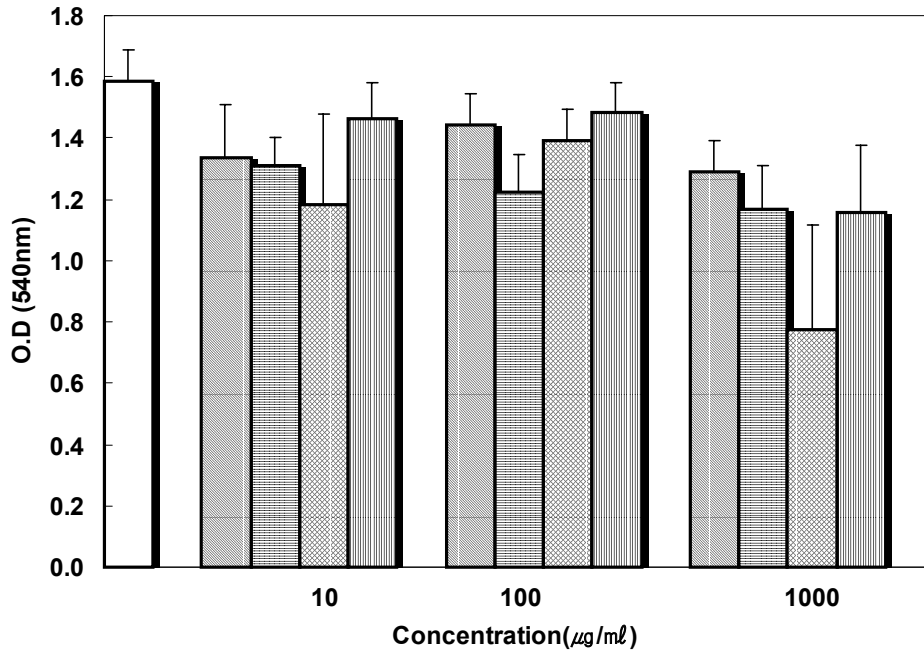


Fig. 3.9.2. Cell growth inhibition effects of extracts of *Corni Fructus* on MCF-7.

□ : Control      ■ : BHT      ▨ : Water  
 ▤ : 70% ethanol      ▩ : 90% ethanol      ▧ : 100% ethanol

## 2) 산수유로부터 항암 및 면역활성 물질의 분리

### 가. 추출 및 용매분획

항암 및 면역활성이 가장 좋은 추출용매를 확인하기 위해 거핵(去核)한 산수유 (*Corni fructus*) 약 2.5kg에 10배(w/v)량 정도의 methanol을 혼합하여 환류냉각관이 부착된 환저 플라스크에 넣고, 80℃ 수욕상에서 3시간 가열하여 2회 추출한 다음, 그 여액을 rotary evaporator로 감압 농축시킨 후 동결건조하여 methanol 조추출물 230g을 얻었다.

MeOH추출물은 용매의 극성을 증가시키는 계통분획법에 따라 다시 증류수 1L에 현탁시키고 hexane 1L씩 3회 분배 추출하여 Hexane분획 2.74g을 얻고, 잔여 수층에 chloroform 1L를 부어 상기와 같은 방법으로 3회 분배 추출하여 CHCl<sub>3</sub>분획 4.27g을 얻고, 이상과 같은 방법으로 EtOAc분획 12.83g, BuOH분획 25.39g, H<sub>2</sub>O분획 98.5g을 얻었다(Fig. 3.9.3). 각각의 분획물은 소량의 DMSO에 용해시킨 후, 실험용 배지로 원하는 농도만큼 희석하여 사용하였다 얻어진 각 용매 분획에 대하여 A549, MCF-7, 및 HL-60에 대한 세포독성을 시행한 결과를 토대로 하여 활성이 우수하게 나타나는 hexane과 chloroform가용분획 중의 활성성분을 대상으로 SiO<sub>2</sub> column chromatography등을 실시하여 분리 및 정제를 시도하였다.

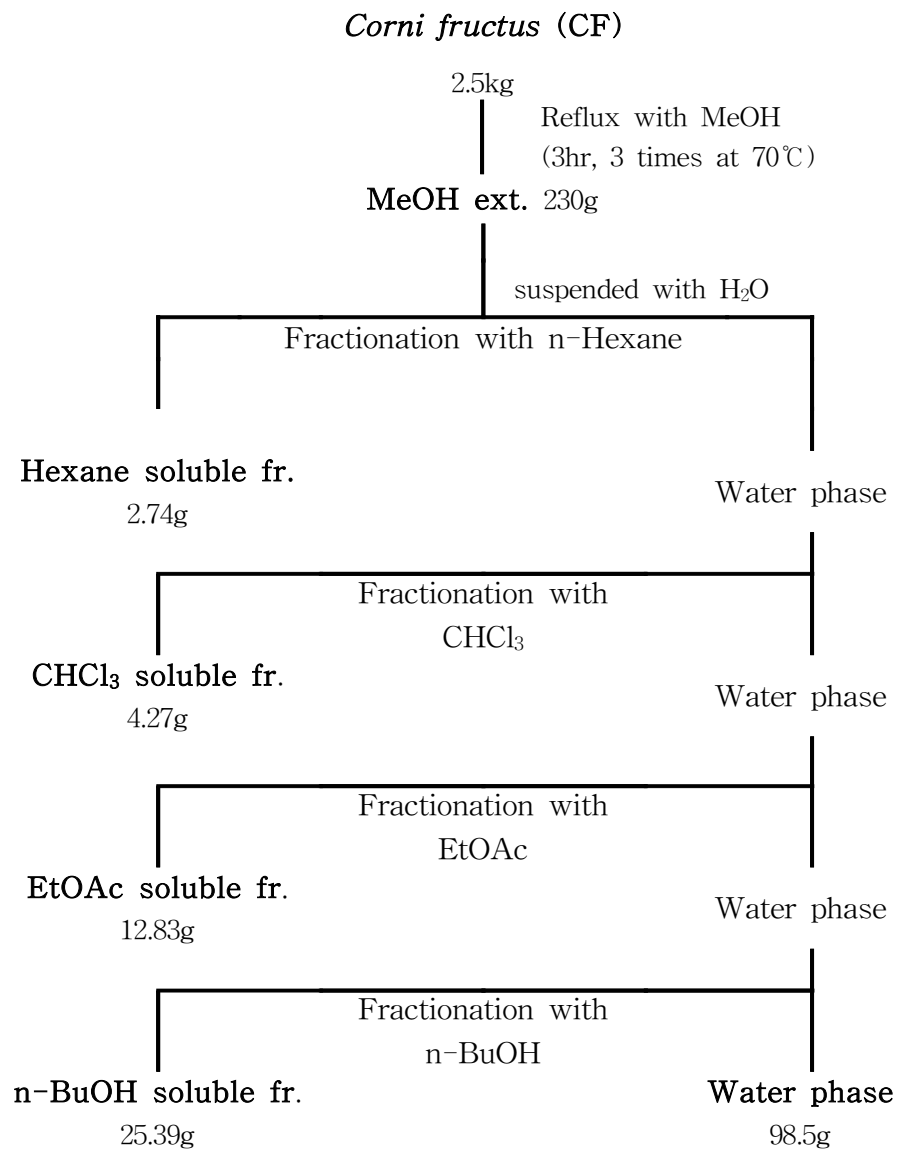


Fig. 3.9.3. Fractionation scheme of *Corni fructus* (CF).

#### 나. 분리 및 정제

항암활성과 수율이 높은 분획을 기준으로 Hexane 및  $\text{CHCl}_3$  분획으로부터 각 band에 해당되는 물질의 정제 및 분리를 시행 결과 2종의 화합물을 단리하였다.

##### ① Hexane 분획으로부터 분리 및 정제

산수유 메탄올 추출물을 순차 분획하여 얻은 각 분획물들의 세포독성을 측정 비교한 후, 활성이 강한 Hexane분획물로부터 유효성분을 검색할 목적으로 silicagel column chromatography를 행하였다. glass column (430mmx $\Phi$ 21mm) silica-gel (70~230mesh) 을 hexane slurry로 만들어 column에 충전하고 hexane 분획물 2.5 g을 silicagel에 흡착시키고, hexane : dichloromethane = 4:1의 용리액으로 chromatography를 실시하여 각 30~50mL씩 분취하고 4개의 fraction으로 나눈 다음, 각 분취 시료는 TLC에 의해 spot pattern을 UV로 확인하였으며 동일 spot으로 확인되면, 서로 합쳐 감압 농축한 후 상기의 방법으로 세포독성을 비교하고 fraction-2를 hexane /  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  / EtOAc = 20 / 4 / 1 (v/v), hexane /  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  = 0:1 / 7:1 / 5:1 (v/v)을 용리액으로 re-chromatography 를 실시하여 백색화합물 230 mg을 분리하였다 (Fig. 3.9.4).

TLC plate상에 전개된 전개용매는 chloroform-hexane (1:1,v/v)을 사용하였으며, 이 화합물은 UV (254nm,365nm)에서 관찰되지 않았으며 p-anisaldehyde- $\text{H}_2\text{SO}_4$ 를 분무하고 hot-plate상에서 1-2분간 가열하였을 때 진한 보라색과 녹색으로 발색되었다(Fig. 3.9.5).

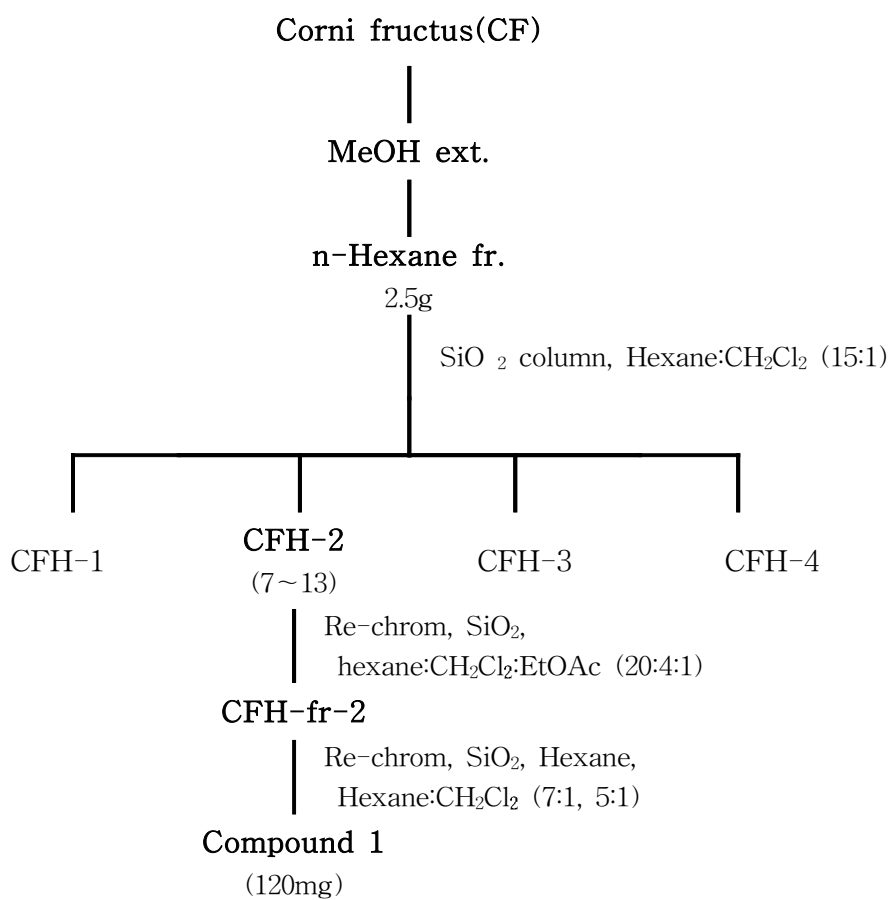


Fig. 3.9.4. Isolation flow diagram of compound 1 from n-hexane fraction of *Corni Fructus*.

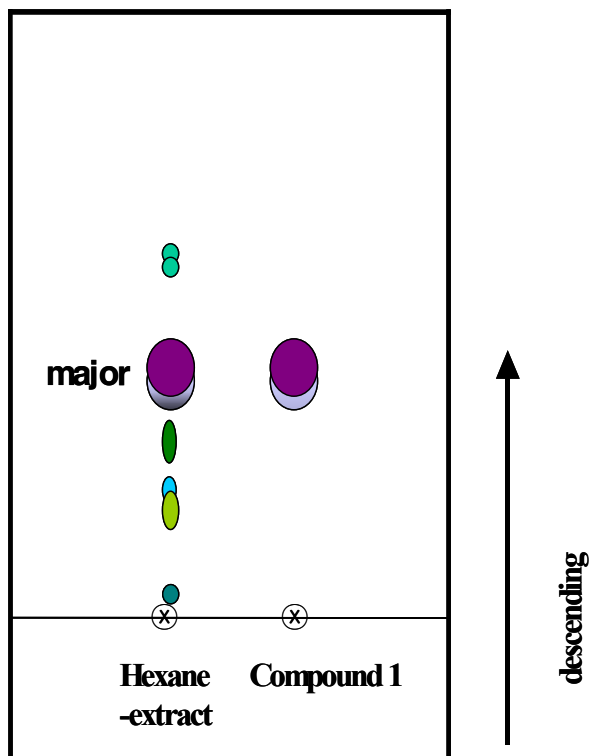


Fig. 3.9.5. Thin layer chromatogram of compound 1 isolated from hexane layer.

Development solvent; hexane-dimethylene chloride(1 : 1)

Detection; p-anisaldehyde

Rf=0.3~0.4

## ② Chloroform분획으로부터 분리 및 정제

산수유  $\text{CHCl}_3$ 층의 활성성분을 분리하기 위해 column chromatography를 실시하였다. chloroform분획 4.2g을 column (1.1cm×45.0cm) 에는 chloroform 으로 활성화한 silica gel(kiesegel 60, 230~400mesh)를 충전하여 ethylacetate : hexane(1:20→1:10→1:3)을 elution solvent로 하여 유속 1.5~2.0 mL/min로 용출시켰고, 10~50mL씩 분취하였다. 이를 6개의 분획(F1~6)으로 나누고 각 fraction에 대해 항암활성을 비교하고 활성이 나타난 fraction-4을 hexane : dichlorometane: metanol(15:15:1) 용리액으로 chromatography를 실시하여 각 30~50mL씩 분취하고 50개의 sufraction으로 나눈 뒤 TLC를 행하여 동일 spot으로 확인되는 subfraction-4를 다시 hexane : dichlorometane = 2:3의 용리액으로 re-chromatography 를 실시하여 백색 화합물 340 mg을 순수 분리하였다(Fig. 3.9.6).

산수유의  $\text{CHCl}_3$ 층으로부터 용리된 각 분취시료는 TLC에 점적하고 acetone : hexane(4:1)로 전개하고 TLC plate상에 전개된 spot pattern을 찾기 위해 UV lamp의 long wave(365nm)와 short wave(254nm)로 조사하여 검색하였고, 발색은  $\rho$ -anisaldehyde를 분무하고 가열하였을 때 진한 회색빛으로 발색되었다. PMA(phospho molybdic acid)로 발색시키면 검은색으로 나타났으며, 동일 spot으로 확인되면 서로 합쳐 감압 농축하여 NMR 및 MS분석용 시료로 사용하였다(Fig. 3.9.7).

Corni fructus(CF)

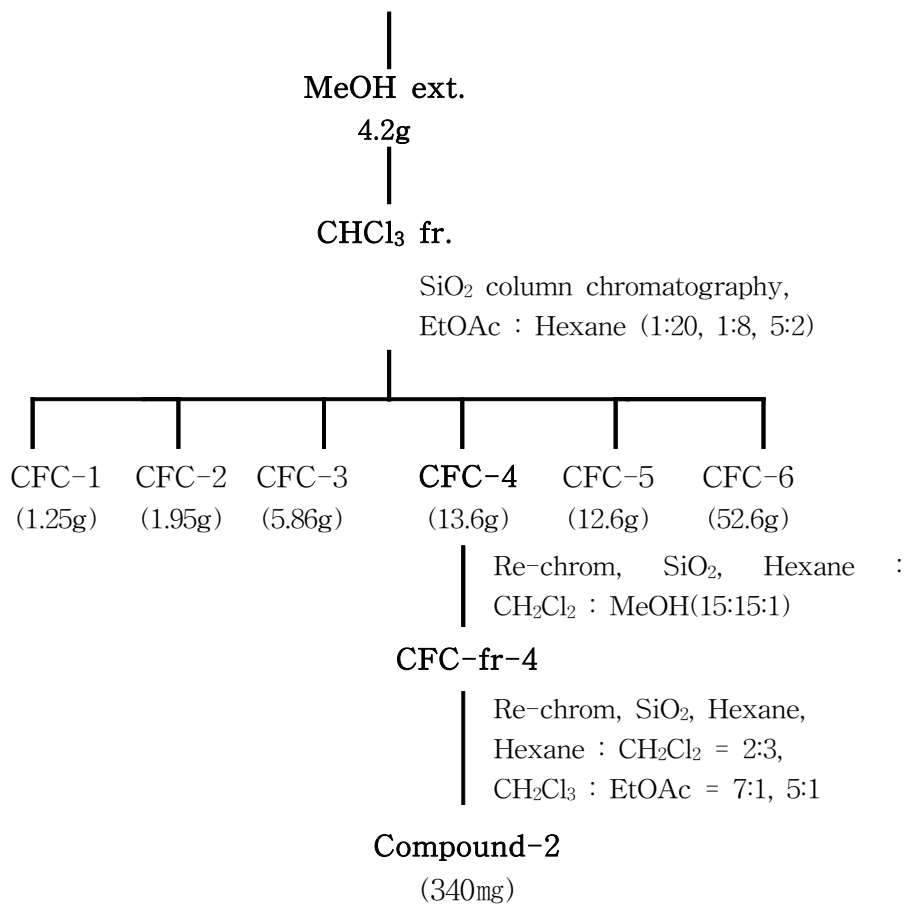
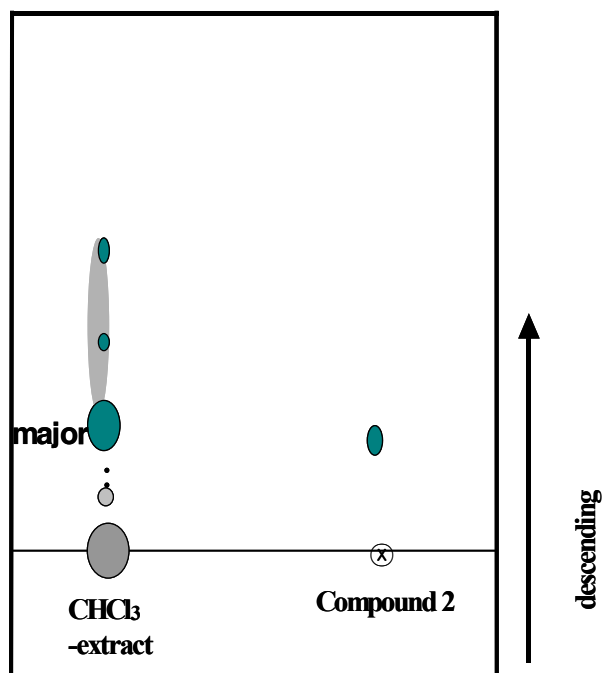


Fig. 3.9.6. Isolation flow diagram of compound 2 from  $\text{CHCl}_3$  fraction of *Corni Fructus*.





**B**

Fig. 3.9.7. Thin layer chromatogram of compounds isolated from chloroform layer.

Development solvent : hexane-acetone(4 : 1)

Detection : p-anisaldehyde

R<sub>f</sub> = 0.3~0.34

다. 정제된 물질의 성상

Chloroform분획층의 소획분 CFC-fr-4으로부터 분리한 Compound-2의 구조동정 조건은 다음과 같다.

M.P.=278~280°C, white powder

I.R.  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$  3427(-OH), 2935(-CH), 3225, 1700(-COOH),  
1663(-C=C), 1455(-CH<sub>2</sub> scissoring), 1378(-CH<sub>3</sub> bending)

Mass(m/z, relative identity %): 456[M<sup>+</sup>], 438(M<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O), 410(M<sup>+</sup>-HCOOH),  
248(100), 203, 189, 133

<sup>1</sup>H-NMR(500MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>N),  $\delta_{\text{H}}$ (ppm): 0.89(3H, s, H-25), 0.95(3H, d, J=6.20Hz, H-30), 1.00(3H, d, J=6.39Hz, H-29), 1.02(3H, s, H-24), 1.05(3H, s, H-26), 1.23(3H, s, H-27), 1.24(3H, s, H-23), 2.64(1H, d, J=11.29Hz, H-18), 3.46(1H, dd, J=4.0, 10.0Hz, H-3a), 5.49(1H, s, H-12)

<sup>13</sup>C-NMR(125.76MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>N),  $\delta_{\text{C}}$ (ppm): 15.70(C-26), 16.60(C-24), 17.48(C-25), 17.55(C-29), 18.81(C-6), 21.44(C-30), 23.65(C-16), 23.94(C-23), 24.94(C-2), 28.16(C-11), 28.71(C-21), 28.84(C-27), 31.10(C-15), 33.60(C-7), 37.31(C-10), 37.47(C-22), 39.10(C-20), 39.40(C-1), 39.43(C-19), 39.51(C-8), 40.00(C-4), 42.53(C-14), 48.07(C-9,17), 53.58(C-5), 55.85(C-18), 78.15(C-3, -OCH-), 125.68(C-12, C=C), 139.30(C-13, C=C), 179.91(C-28, COO)

#### 라. 산수유 용매분획물의 세포독성 및 면역활성

산수유의 methanol추출물의 solvent fraction에 대하여 A-549 폐암세포주와 MCF-7 유방암세포주에 세포독성실험을 수행하였다.

각각의 용매 분획물을 1, 10, 100, 500 $\mu$ g/mL(in DMSO)농도로 SRB법에 의해 세포 생존률을 측정된 결과를 Table 3.9.1에 나타내었다. A549에서는 산수유의 Hexane분획층에서 대조군에 비해 10 $\mu$ g/mL농도부터 45.7%로 유의성 있는 세포독성을 나타내었고, Chloroform분획에서도 10 $\mu$ g/mL의 농도부터 38.4%로 유의성 있는 세포독성을 나타내었고 500 $\mu$ g/mL에서는 71.0%로 강한 성장 억제효과를 나타내었다.

또한 MCF-7에서도 1, 10, 100, 500 $\mu$ g/mL농도에서 Hexane분획에서 30.5%, 38.9%, 41.4%, 75.8%의 높은 세포독성을 보였고, Chloroform분획에서 1 $\mu$ g/mL의 농도부터 38.4%로 유의한 성장억제효과를 나타내었고, 100, 500 $\mu$ g/mL농도에서 51.9%, 83.6%로 강한 성장억제효과 있음을 확인하였다(Fig. 3.9.8, 3.9.9).

그러나 각추출물은 대조군에 비하여 면역활성이 유의성있게 나타나지 않아 산수유 추출물의 면역활성은 여러가지 물질이 복합적으로 작용하여 나타나는 것으로 생각되며, 이부분은 차후에 더욱 연구되어야 할 것으로 사료된다.

이상에서 산수유 chloroform분획 및 hexane 분획층에서 A549 폐암세포와 MCF-7 유방암세포 모두에서 유의한 세포독성을 나타내어 silicagel column chromatography를 실시하여 세포독성물질을 분리하고자 하였다.

Table 3.9.1. Cytotoxic effect of solvent extracts of *Corni fructus* on A549 and MCF-7

Fraction	Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Cytotoxicity(%)	
		A-549	MCF-7
Hexane	1	38.2	30.5
	10	45.7	38.9
	100	47.3	40.4
	500	54.4	75.8
Chloroform	1	28.3	38.4
	10	38.4	35.3
	100	46.1	51.9
	500	71.0	83.6
EtOAc	1	-9.5	31.0
	10	-4.4	42.3
	100	4.2	25.2
	500	23.3	32.8
BuOH	1	22	12.6
	10	13.1	19.2
	100	11.4	43.3
	500	34.8	37.9
Water	1	6.8	48.5
	10	10.7	56.9
	100	19.1	57.4
	500	28.7	45.8

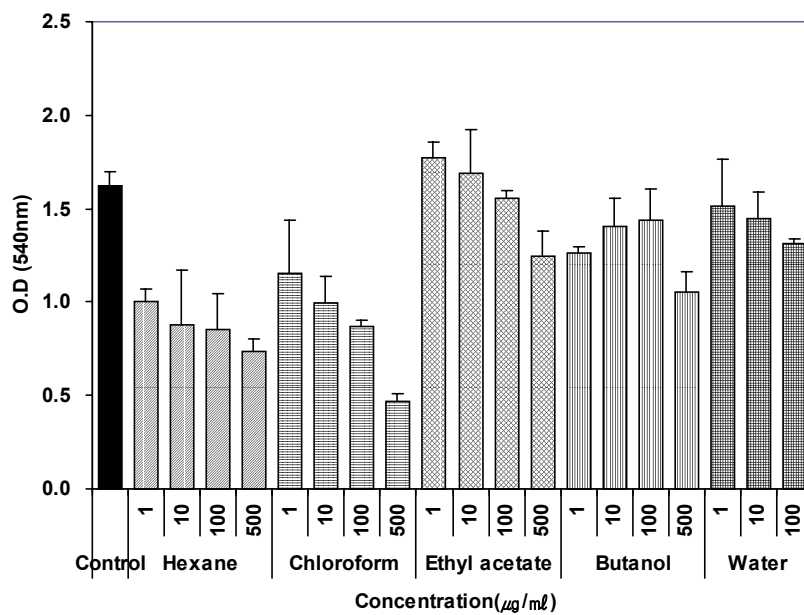


Fig. 3.9.8. Cytotoxicity of solvent extracts of *Corni fructus* on A549.

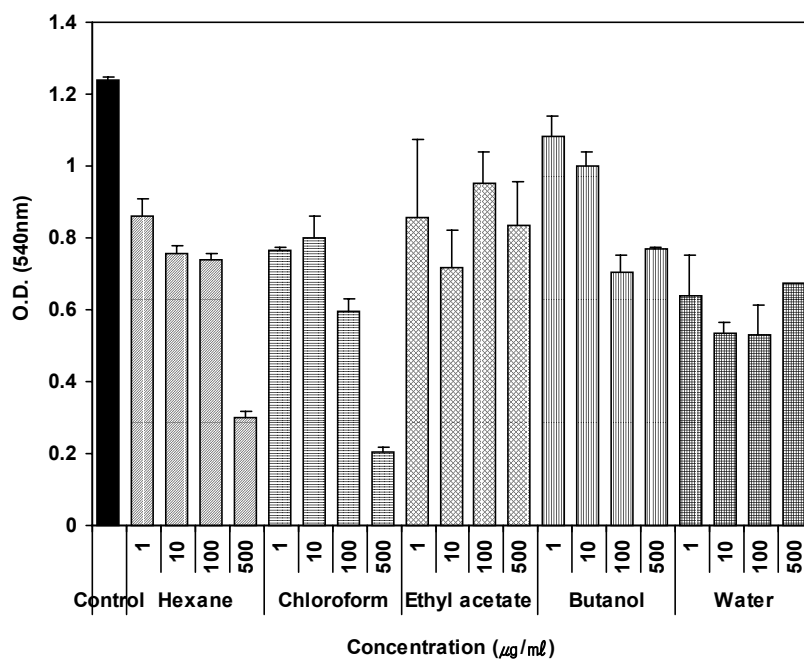


Fig. 3.9.9. Cytotoxicity of solvent extracts of *Corni fructus* on MCF-7.

마. 정제물질의 항암 효과

① 정제물질의 암세포주 성장억제효과

인체 폐암세포주(A549), 인체 유방암세포주(MCF-7) 및 인체 전골수성 백혈병세포주(HL-60)에 대하여 Hexane층에서 분리한 Compound-1은 A549에서 1, 10 $\mu$ g/mL농도에서 대조군에 비해 18.33%, 41.66%, MCF-7에서 15.32%, 17.74% 그리고 HL-60에서는 24.08%, 33.71%의 세포독성을 나타내었고, Chloroform층에서 분리한 Compound-2는 A549에서 10 $\mu$ g/mL농도에서 9.25%, MCF-7에서 10 $\mu$ g/mL농도에서 8.92% 그리고 HL-60에서는 23.61%의 암세포 성장억제효과를 나타내었다.(Fig. 3.9.10~3.9.15)

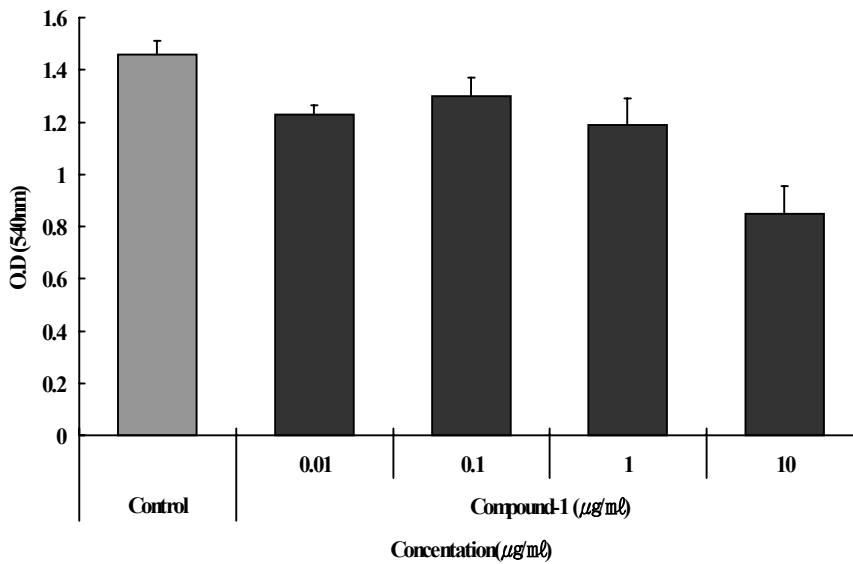


Fig. 3.9.10. Cytotoxicity of compound-1 on A549 cell line.

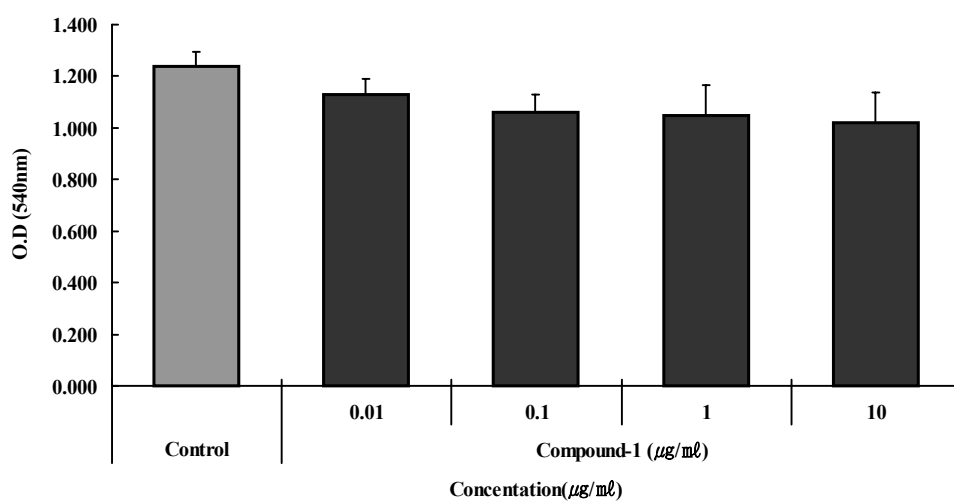


Fig. 3.9.11. Cytotoxicity of compound-1 on MCF-7 cell line.

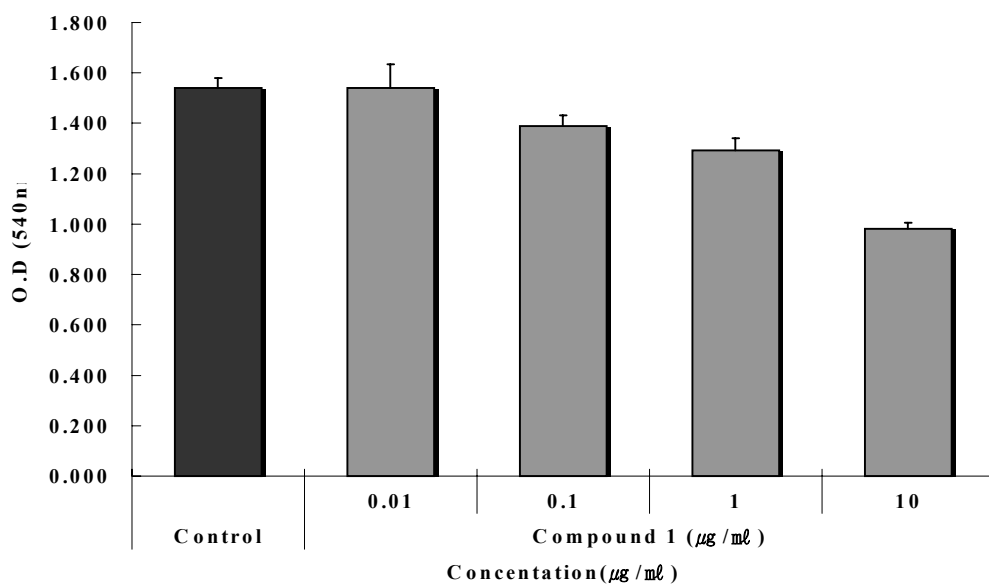


Fig. 3.9.12. Cytotoxicity of compound-1 on HL-60 cell lines.

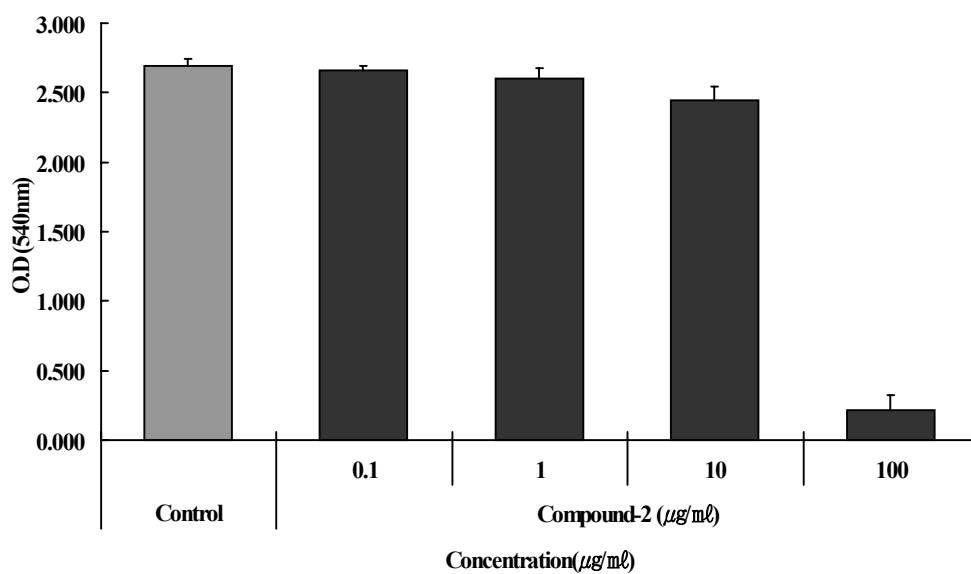


Fig. 3.9.13. Cytotoxicity of compound-2 on A549 cell lines.

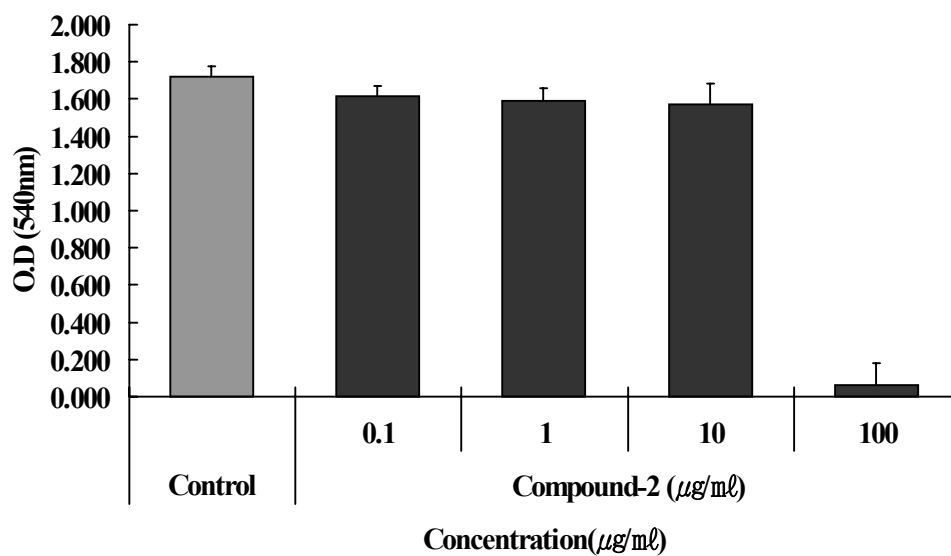


Fig. 3.9.14. Cytotoxicity of compound-2 on MCF-7 cell lines.



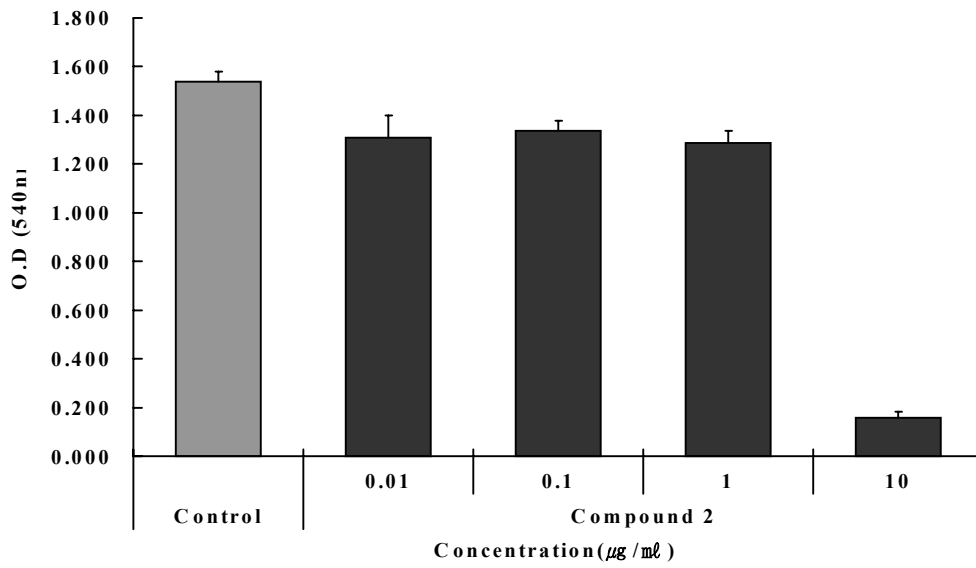


Fig. 3.9.15. Cytotoxicity of compound-2 on HL-60 cell lines.

② 정제물질의 처리에 따른 암세포의 형태변화

산수유 분획물로부터 분리한 화합물을 A549와 MCF-7세포에 농도별로 첨가하여 배양하여 광학현미경으로 관찰한 결과 Fig. 3.9.16 및 Fig. 3.9.17에 나타내었다.

Fig. 3.9.16A와 Fig. 3.9.17A는 A-549 암주의 대조군으로서 세포증식에 있어 세포막을 유지하며 plate의 기벽에 부착되어 긴 세포모양을 유지하고 있으나, Compound-1, 2를 처리한 Fig. 3.9.16B와 Fig. 3.9.17B에서는 40시간 후에는 핵의 응축과 더불어 사멸한 세포가 배양용기에서 떨어져 배지에 부유하는 것을 관찰할 수 있었다. (Fig. 3.9.16, 3.9.17)

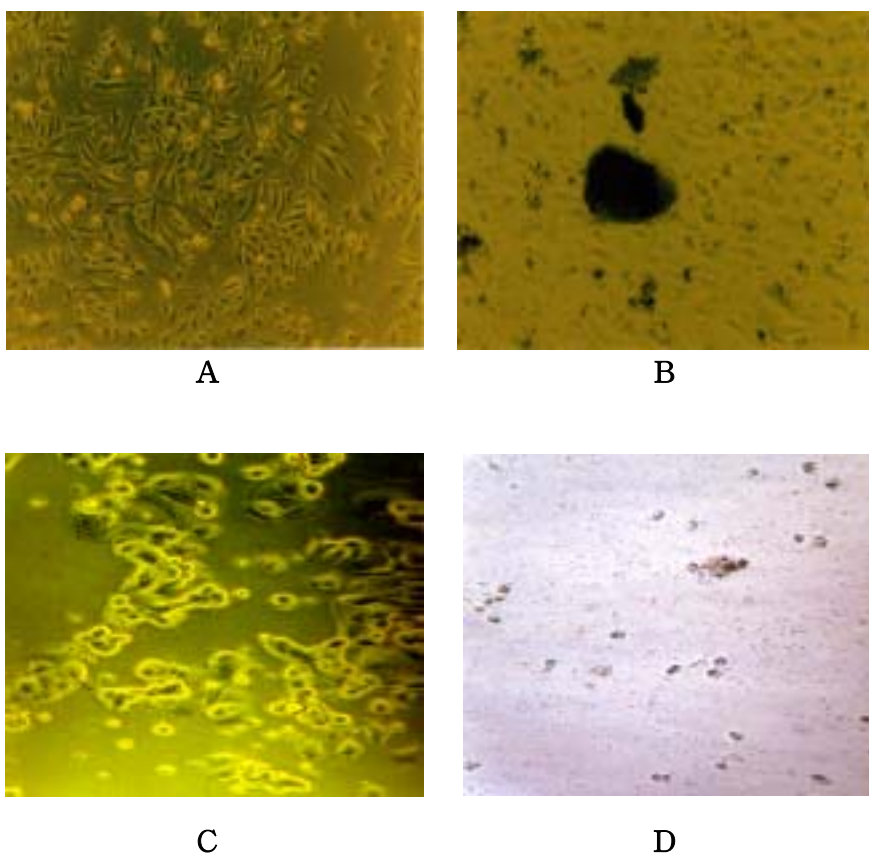


Fig. 3.9.16. Phase-contrast photomicrograph of A549 and MCF-7 cells cultured in the unmodified medium or compound-1(x200).

A: Non-treated control(A549).

B: A549 cells treated with 100µg/mL of Compound-1 for 42hrs.

C: Non-treated control(MCF-7).

D: MCF-7 cells treated with 100µg/mL of Compound-1 for 40hrs.

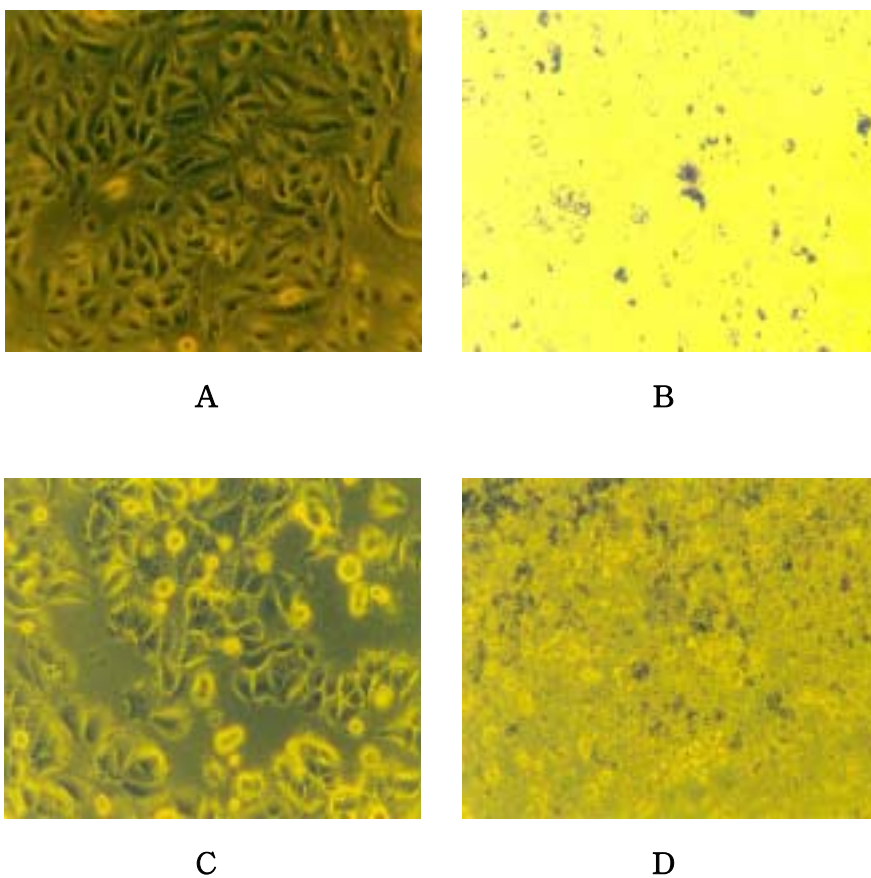


Fig. 3.9.17. Phase-contrast photomicrograph of A549 and MCF-7 cells cultured in the unmodified medium or compound-2 (x200).

A: Non-treated control(A549).

B: A549 cells treated with 10 $\mu$ g/mL of Compound-2 for 43hrs.

C: Non-treated control(MCF-7).

D: MCF-7 cells treated with 10 $\mu$ g/mL of Compound-2 for 40hrs.

#### 바. 항암 활성 물질의 구조 결정

산수유의  $\text{CHCl}_3$ 층에서 column chromatography로 분리한 획분(F1~6) 중 A-549, MCF-7세포에 독성효과가 가장 크게 나타난 F4 획분으로부터 활성성분을 re-chromatography를 실시하여 백색화합물을 분리하고, 이의 분광학적인 데이터 및 물리화학적인 성상을 검토하여 그 구조를 확인하였다. Compound-2은 lieberman-buchard reaction에 양성반응이고 TLC를 실시하였을 때 여러 가지 전개용 매에서 ursolic acid표준품과 동일한 Rf치를 확인하였다. IR spectrum은  $3427\text{ cm}^{-1}$ 에서 OH,  $1700(\text{C}=\text{O})$ ,  $2935(-\text{CH})$ ,  $1455(-\text{CH}_2\text{ Scissoring})$ ,  $1378(-\text{CH}_3\text{ Bending})$  에 기인하는 band가 관측되었고(Fig. 3.9.18), 한편 Mass spectrum에서 분자이온 peak가  $m/z$  456이고 retro-Diels Alder fragmentation에 의해 물분자가 탈리된  $m/z$  438, HCOOH가 탈리된 이온 peak가  $m/z$  410에서 나타났다. 또한 base peak인  $m/z$  248에서, COOH(45)가 탈리된 이온 peak가  $m/z$  203과 207에서의 peak가 확인되어 Compound-2는 분자량 456인 12-unsaturated ursane 계열의 triterpenoid임을 추정할 수 있었다(Fig. 3.9.19).

$^1\text{H-NMR}$ 에서 0.89, 0.95, 1.00, 1.02, 1.05, 1.23 및 1.24ppm에서 7개의 methyl signal과 2.64ppm에서 18-H doublet signal과 3.46ppm에서 3번 위치의 oxymethine 수소 및 5.49ppm에서 12번 위치의 methin proton signal을 확인하여 urs-12-en type의 구조임을 알 수 있었다(Fig. 3.9.20).

$^{13}\text{C-NMR}$ ( $\text{C}_6\text{D}_6\text{N}$ )spectrum에서는  $\delta$ 15.70, 16.60, 17.55, 21.44, 23.94 및 28.84ppm에서는 methyl carbon signal이 관찰되고,  $\delta$ 125.68, 139.30에 olefinic carbon signal,  $\delta$  179.91에 carboxyl carbon signal이  $\delta$ 78.15에 oxygen bearing carbon signal이 관찰되었다(Fig. 32). Deft 135. ( $\text{C}_6\text{D}_6\text{N}$ )spectrum에서는  $\delta$ 18.80, 23.65, 24.94, 28.16, 28.71, 31.10, 33.60, 37.47 및 39.40에서 9개의 carbon이 negative로 나타난 것으로 보아, 9개의 methylene group이 존재함을 알 수 있었다(Fig. 3.9.21).

이상의 각종 spectral data의 검토결과, Compound 2는 분자내에 double bond, -OCH- 및 carboxyl group을 각각 1개씩 갖고 있는 triterpenoid인 ursolic acid( $3\beta$ -hydroxyurs-12-ene-28-oic acid)로 확정짓고, 표준품과 각종 spectral data를 직접 비교하고 co-spot를 실시하여 확인하였다(Fig. 3.9.22, Table 3.9.2).

그러나 TLC 상에서 나타난 바와 같이(Fig. 3.9.23) 이 물질은 완전하게 순수한 화합물로 분리하기에 어려움이 있어 구조 동정을 하지 못하였으나, 주물질은 phenol화합물인 것으로 추정 된다.

Table 3.9.2.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ -NMR chemical shift of Compound-2 isolated from  $\text{CHCl}_3$  fraction of Corni fructus ( $\text{C}_6\text{D}_6\text{N}$ ) (ppm)

proton and carbon No.	Compound-2	
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
1		39.40
2		24.94
3	3.46(1H, dd, J=4.0,10.0Hz, H-3a)	78.15
4		40.00
5		53.58
6		18.81
7		33.60
8		39.51
9		48.07
10		37.31
11		28.16
12	5.49(1H, s, H-12)	125.68
13		139.30
14		42.53
15		31.30
16		23.65
17		48.07
18	2.64(1H, d, J=11.29Hz, H-18)	55.85
19		39.43
20		39.10
21		28.71
22		37.47
23	1.24(3H, s, H-23)	23.94
24	1.02(3H, s, H-24)	16.60
25	0.89(3H, s, H-25)	17.48
26	1.05(3H, s, H-26)	15.70
27	1.23(3H, s, H-27)	28.84
28		179.91
29	1.00(3H, d, J=6.39Hz, H-29)	17.55
30	0.95(3H, d, J=6.20Hz, H-30)	21.44

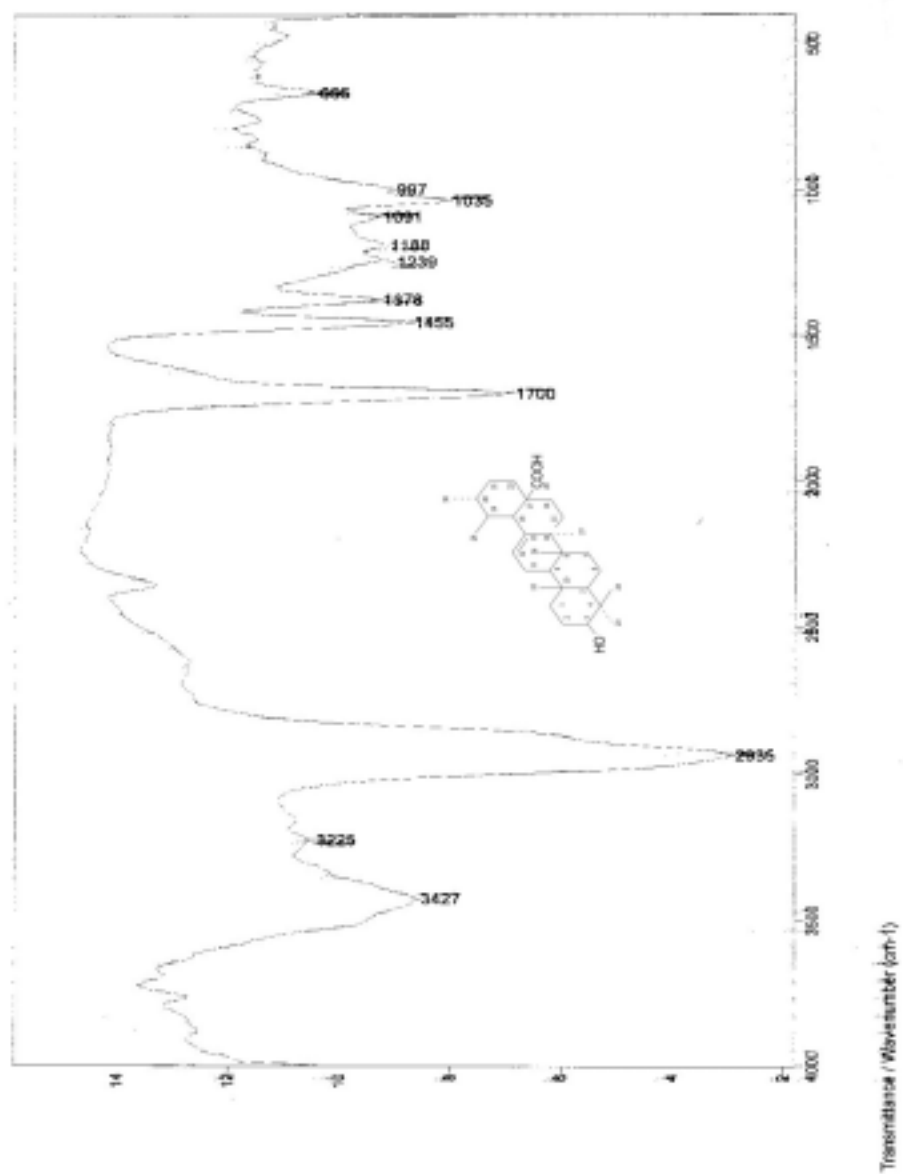


Fig. 3.9.18. IR spectrum of compound-2 isolated from  $\text{CHCl}_3$  fraction of *Corni fructus*

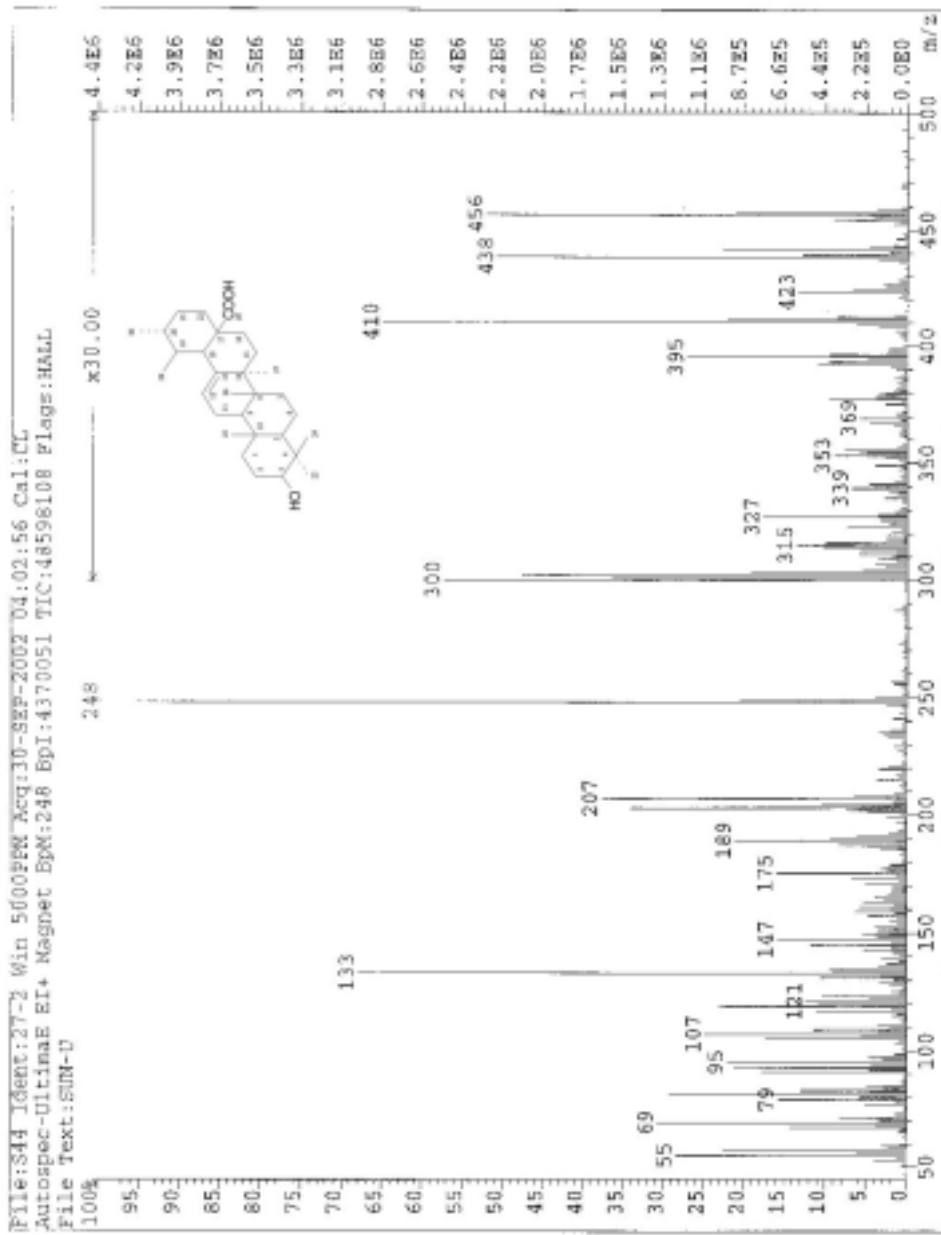


Fig. 3.9.19. Mass spectrum of compound-2 isolated from  $\text{CHCl}_3$  fraction of Corni fructus

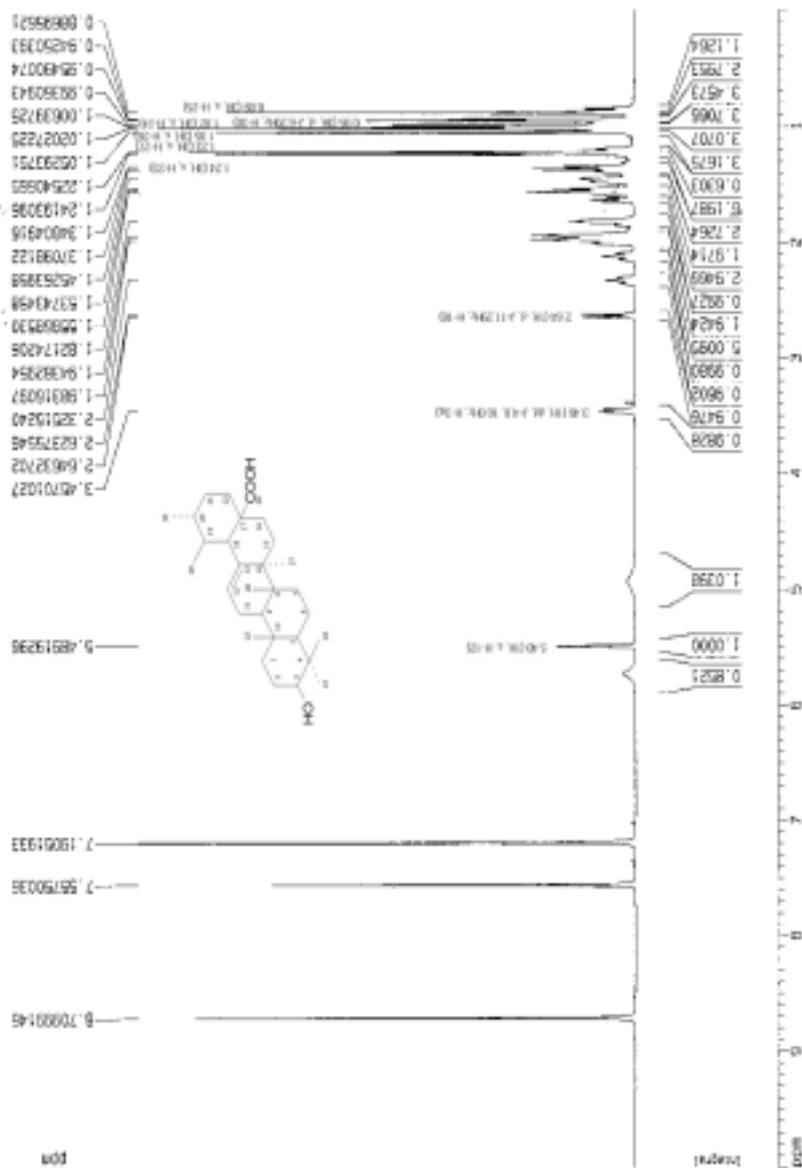


Fig. 3.9.20. <sup>1</sup>H-NMR spectrum of compound-2 isolated from CHCl<sub>3</sub> fraction of *Corni fructus*



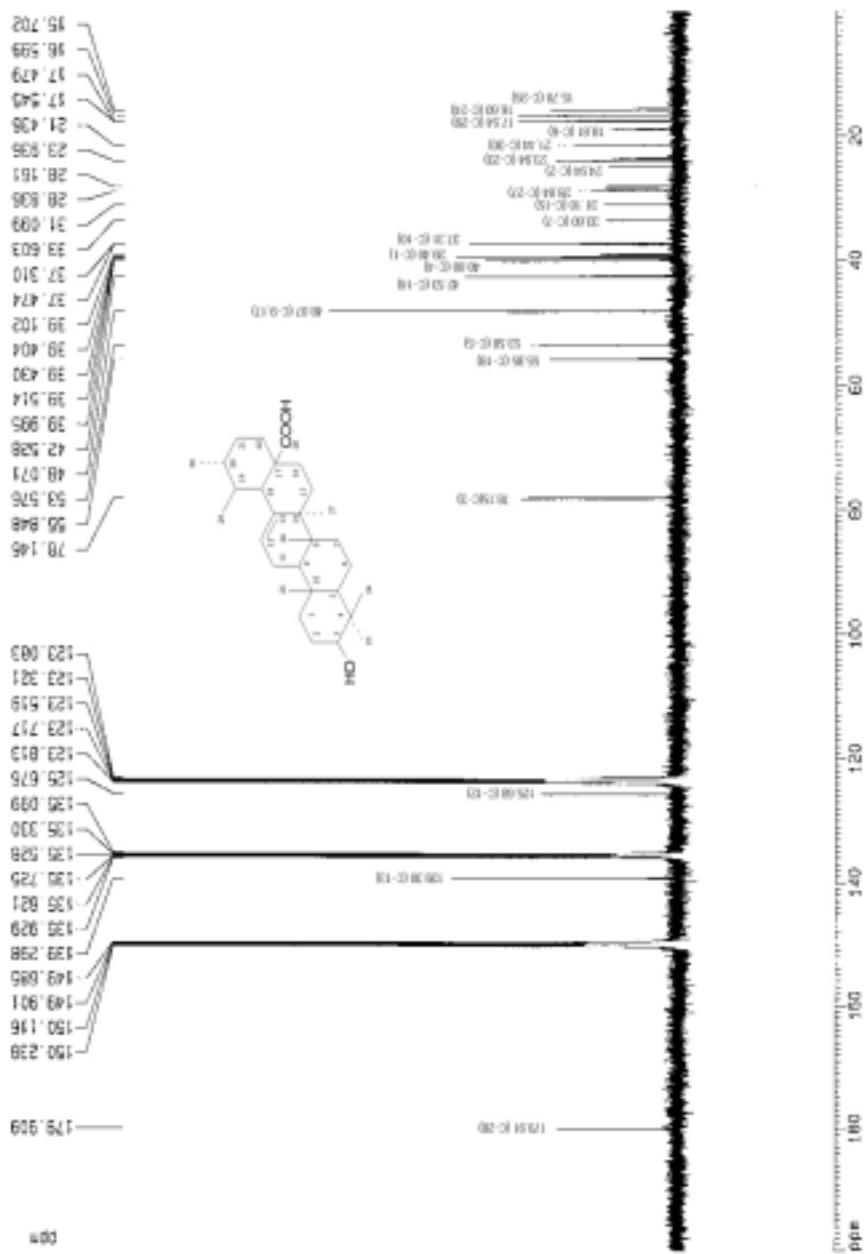


Fig. 3.9.21.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of compound-2 isolated from  $\text{CHCl}_3$  fraction of *Corni fructus*

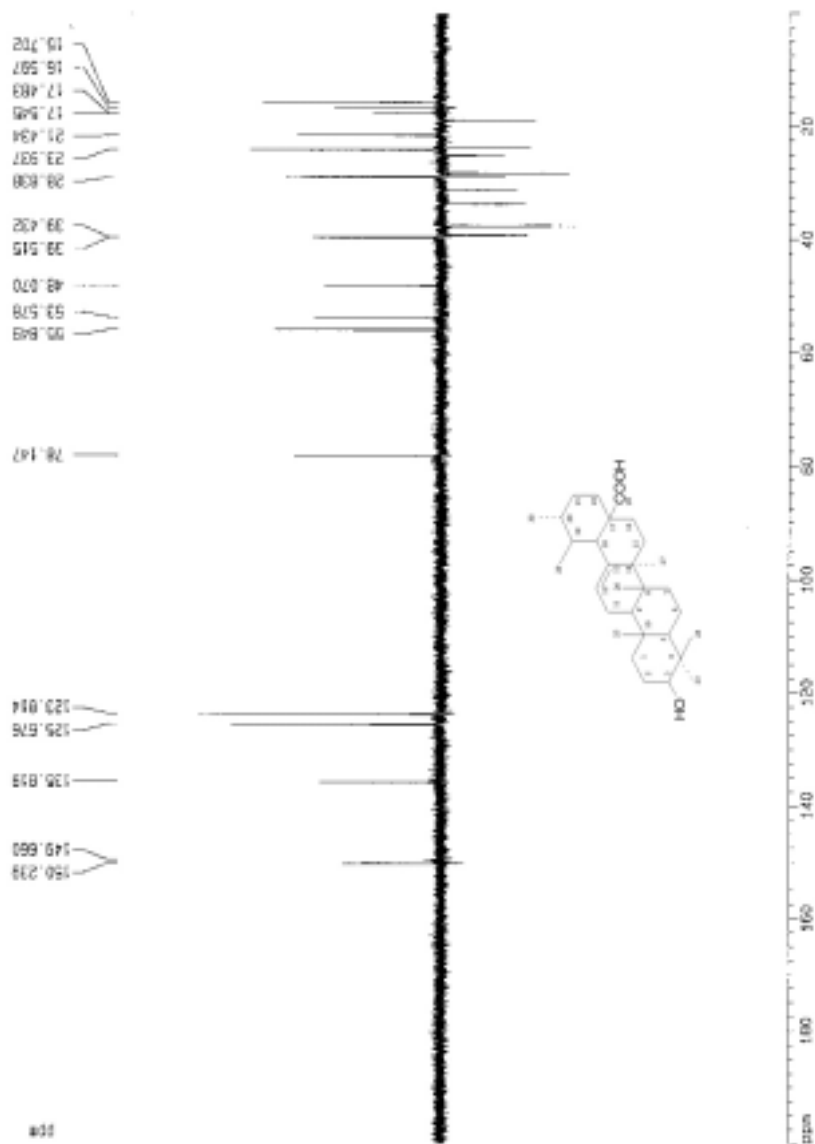


Fig. 3.9.22. DEPT 135° spectrum of compound-2 isolated from CHCl<sub>3</sub> fraction of *Corni fructus*

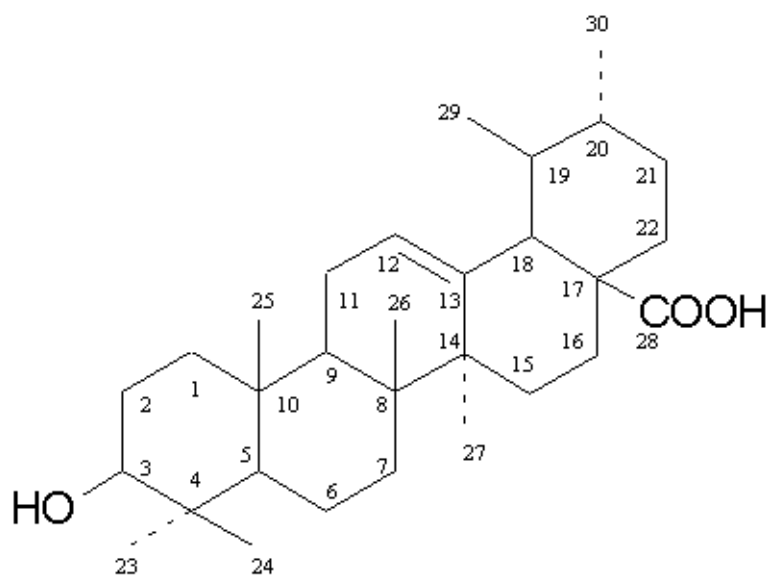


Fig. 3.9.23. The structure of the ursolic acid from *Corni fructus* extracts.

### 3) 산수유 제품의 암세포주 성장 억제효과

산수유차 3종의 첨가에 따른 암세포주 성장억제효과를 알아보기 위하여, 인체 폐암 세포주인 A-549에 산수유차 3종을 1, 10, 100 및 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하여 측정하였다. 그 결과, 대조구에 비해 산수유차를 첨가하였을 때, 산수유차 3종 모두 농도 의존적으로 암세포 성장을 억제하였으며, 특히 산수유차 B의 암세포주 성장 억제효과가 높게 나타났다(Fig. 3.9.24).

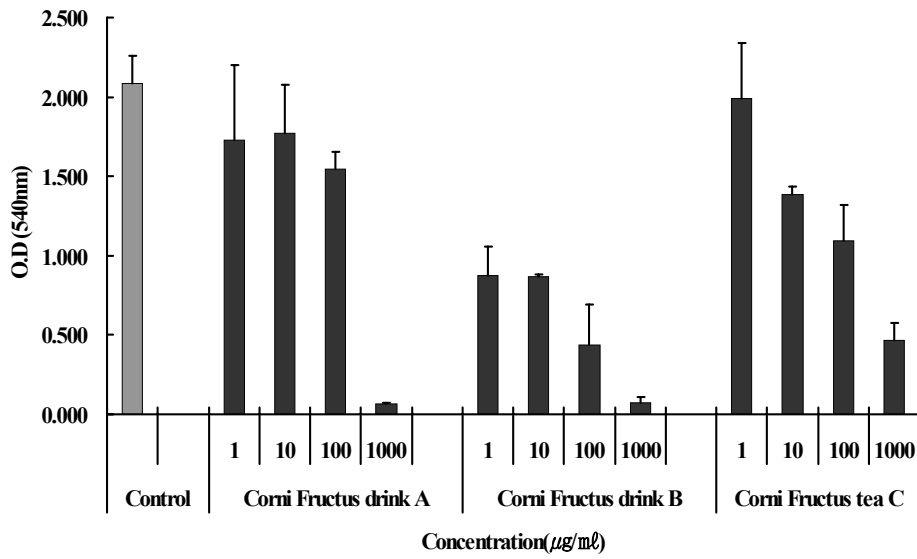


Fig 3.9.24. Cytotoxicity of solvent extracts of *Corni fructus* on A-549.



## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

연구 목표	연구개발목표의 달성도	관련분야의 기술발전 에의 기여도
산수유 발효주 개발을 위한 전처리 방법 확립 및 최적 효모균주 선정	산수유와 발효성 당을 이용하여 발효주를 개발하였다.	새로운 전통발효주의 개발기술을 확립하였다.
산수유 발효곡주 및 발효(식초)음료 개발	산수유와 쌀을 이용한 발효곡주 및 발효음료 제조 방법 확립하고, 확립된 제품의 숙성중 주요성분 조사하였다.	산수유 발효곡주 및 발효음료의 제조방법을 확립하였다.
산수유의 항당뇨, 항산화활성 및 고지혈증 억제 효과 탐색	동물실험을 통한 당뇨병 억제효과 확인하였고, 항산화 및 고지혈증 효과 확인하였다.	산수유에 대한 기능성을 구명하였다.
산수유 추출물 분획의 항당뇨, 항산화활성 및 고지혈증 억제 효과 검색	추출 용매별, 분획별 항당뇨, 항산화, 고지혈증을 검색하였다.	산수유 추출물의 분획별 기능성을 구명하였다.
산수유 음료 및 차의 제조에 대한 기초 실험	추출 용매에 따른 산수유 추출액의 이화학적 특성 조사하고, 향암 및 면역증강효과 확인하였다.	산수유 음료 및 차 개발에 대한 기초적인 자료 확립과 산수유의 기능성을 구명하였다.
산수유 제품의 대량생산을 위한 제조조건 설정	기능성분을 다량 함유한 추출물의 제조조건 확립하였다.	산수유 제품개발에 주재료인 원료추출조건을 확립하였다.
산수유 음료 및 차의 생산 및 품질 특성 검사	산수유 음료 및 차의 제조 방법 확립하고, 개발 제품에 대한 기능성을 조사하였다.	산수유 개발 제품에 대한 기능성을 구명하였다.
산수유 개발 제품의 대량 생산, 다양화 및 제품의 품질 특성 조사	시제품을 생산하고 제품의 품질 특성을 조사하였다.	산수유 제품 생산 기술을 확립하였다.



## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 과제에서 산수유 기능성에 대한 연구는 산수유 및 개발 제품에 대한 기능성 탐색 정도에 불과하였으므로, 이 결과를 근거로 하여 산수유에 대한 더욱 진보적인 기능성 연구가 필요할 것으로 생각된다.

아울러 본 연구진행과정 및 결과는 오미자, 구기자 같이 산수유와 비슷한 열매에 그대로 적용 가능하리라 사료된다.

본 연구결과는 특허출원하고, 술, 음료 및 차의 제품생산라인을 갖춘 기업체에 기술을 이전하여 산업화하는 방안을 모색하고 있다.





## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

산수유를 이용한 기능성 식품 개발에 관한 해외과학기술정보는 전무한 상태이나, 산수유에 함유한 ursolic acid의 항암 효과에 대한 연구 결과들이 보고되고 있다.



## 제 7 장 참고문헌

1. Allain, C. C., Poon, L. S., Chan, C. S. G., W. Richmond and Fu, P. C. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin. Chem.* **20**: 470-475, 1974
2. Bucolo G, David H. Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clin. Chem.* **19**: 476-482, 1973
3. Burstein, M., Scholnick, H. R. and Morfin, R.: Rapid method for the isolation of lipoproteins from human serum by precipitation with polyanions. *J. Lipid Res.* **11**: 583-595, 1970
4. Chung, H.R., Lee, J.Y., Kim, D.C. and Hwang, W.I., 1999, Synergistic effect of Panax ginseng and *Cinnamomum blume* mixture on the inhibition of cancer cell growth *in vitro*, *J. Ginseng Res.*, 23: 99-104.
5. Chung, S.R., Jeune, K.H., Park, S.Y. and Jang, S.J., 1993, Toxicity and Lectins Constituents from the Seed of *Cornus officinalis*, *Kor. J. Pharmacogn.*, 24(2) : 177-182.
6. Cohen, J.J., 1993, Apoptosis, *Immunology Today*, 14: 126-130.5. Dai, Y., Hang, B. and Huang, Z., 1992, Inhibition of Fructus corni on experimental inflammation, *Chung Kuo Chung Yao Ts Chih.*, 17: 307-309.
7. Folch, J., M. Lees and G.H.S. Stanley. 1957 A simplified method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497-509
8. Hahn, S.M., Russo, A., Cook, J.A. and Mitchell, J.B., 1999, A multidrug-resistant breast cancer cell line induced by weekly exposure to doxorubicin, *Int J Oncol.*, 14(2) 273-279.
9. Hatano, T., Ogawa, N., Kira, R., Yasuhara, T. and Okuda, T., 1989, Tannins of cornaceous plants I : cornusins A, B and C, dimeric monomeric and trimeric hydrolyzable tannins from *Cornus Officinalis*, and orientation of valoneoyl group in related tannins, *Chem. Pharm. Bull.*, 37: 2083-2090.
10. Hatano, T., Yasuhara, T., Abe., P. and Okuda, T., 1990, A galloylated monoterpene glucoside and a dimeric hydrolysable tannin from *Cornus officinalis*. *Phytochemistry*, 29(9): 2975-2978.

11. Hellen Jeng, Chao Mei Wu, Shuen-Jiing Su and Wen-Chang Chang, 1997, A Substance Isolated from *Cornus officinalis* Enhances the Motility of Human Sperm, *American Journal of Chinese Medicine*, Vol.XXV, Nos.: 3-4, 301-306.
12. Hwang, W.I., Cha, S. and Lee, S., 1980, Determination of antitumor effects of extracts from Korean medicinal plants on cancer cells(L5178Y), *Korean Biochem. J.*, 13: 25-29.
13. Kahn, C. R. The molecular mechanism of insulin action. *Ann. Rev. Med.* 36: 249-251, 1985
14. Kim, S.H., 1997, Apoptotic and antimetastatic effects of ursolic acid isolated from *Oldenlandia diffusae* Herba. College of Oriental Medicine, Taejon University. 5(2): 2, 25.
15. Kim, Y.H., 1999, Isolation of Constituents from the Fruits of *Cornus officinalis* Siebold, 14(1): 287-292.
16. Lee, C.K., Park, S. W., Chung, H.Y., Young, H.S., Suh, S.S. and Park, K.Y., 1991, Mechanism of Antitumor Effect of Ursolic Acid from *Eriobotrya Japonica*, *Journal of Korea Cancer Association*, 23(2): 206-210.
17. Lee, Y.C., Kim, Y.E., Lee, B.Y. and Kim, C.J., 1992, Chemical Compositions of Corni Fructus and Separating Properties of Its Flesh by drying *Korean J. Food Sci. Technol.*, 24(5): 447-450.
18. Lobert, S., Frankfurter, A. and Correia, J.J., 1998, Energetics of vinca alkaloid interactions with tubulin isotypes: implications for drug efficacy and toxicity, *Cell Motil Cytoskeleton*, 39(2): 107-121
19. Matkovics, B., Kotorman, M., Varga, I. S., Hai, D. Q., and Varga, C. Oxidative stress in experimental diabetes induced by streptozotocin. *Acta Physiol. Hung.* 85(1): 29-38, 1998
20. Miglietta, A., Bocca, C., Rampa, A., Bisi, A. and Gabriel, L., 1997, Geiparvarin and derivatives in combination with taxol: effect on microtubular organization in 3T3 fibroblasts, *Anticancer Drug Des.*, 12(8): 607-620.
21. Nakasima, M., Hideyuki Nakagawa, Kaoru Motoe, Ichiji Yamasita and S. Aoki. 1987, Changes in the composition of persimmon vinegar induced by *Acetobacter* sp. isolated from 'Sanja' persimmon fruits during the

fermentation. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*. 34(12), 818

22. Oda, T., Konno, T., Nagamitsu, A., Tabaru, K., Maeda, H. and Kitamura, N., 1997, Targeted vinblastine chemotherapy with two preparations of lipiodol contrast medium, *Anticancer Res.*, 17(5A): 3521-3529.
23. Okuda, T., Hatano, T., Ogawa, N., Kira, R. and Matsuda, M. 1984. Cornusiin A, a dimeric ellagitannin forming four tautomers, and accompanying new tannins in *Cornus officinalis*. *Chem. Pharm. Bull.* 32, 4662.
24. Olwer, Claus T, Klavawh, Margtt V, Eva W, Kjeld H., 1993, Effects on blood pressure, glucose, and lipid levels of highmonosaterated fat diet compared with a high-carbohydrate diet in NIDDM subjects. *Diabetes Care* 16, 1565
25. Park, C.G., Lim, D.K., Kook, Y.H., Cha, C.R. and Paik, C.G., 1990, *In vitro* chemsensitivity of doxorubicin on human cancer cell lines, *J. Kor. Cancer Assoc.*, 22:61.
26. Park, Y.K., Whang, W.K. and Kim, H.I., 1995, The Antidiabetic Effects of Extract from *Cornus officinalis* Seed. *Chung-Ang J. Pharm Sci.*, 9: 5-11.
27. Peng, Qiaoling., Wei, Zhihua and Lau, Benjamin, H.S., 1998, Medicinal Plants Research-Fructus corni Attenuates Oxidative Stress in Macrophages and Endothelial Cells, *American Journal of Chinese Medicine-Membership*, 26(3/4): 291-300.
28. Perchellet, E.M., Ladesich, J.B., Chen, Y., Sin, H.S., Hua, D.H., Kraft, S.L. and Perchellet, J.P., 1998, Antitumor activity of tricyclic pyrone analogs, a new synthetic class of microtubule de-stabilizing agents, in the murine EMT-6 mammary tumor cell line in vitro, *Anticancer Drugs*. 9(6): 565-576.
29. Pierce, G.B., Podesta, A. and Wells, R.S., 1983, Malignancy and differentiation; the role of the blastocyst in control colony formation, *CSH Conf. Cell Proliferation*, 10: 15-22.
30. Preston, A. M, Tome, J., Morales, J. J., Milan, L., Cuevas, A. A., Medina, J. and Santiago, J. A. Diabetic parameters 58 weeks after injection with streptozotocin in rats fed basal diet supplemented with fiber, mineral and vitamins. *Nutr. Res.* 11: 895-906, 1991
31. Promega protocol, 2001, Cell titer 96<sup>®</sup> Aqueous One Solution cell proliferation assay, Promega, USA.

32. 김명찬, 조기택, 심기환. 落果柿를 이용한 식초제조. *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 8(2), 103(1980)
33. 김미정. 건조방법에 따른 구기자와 산수유의 영양성분에 관한 비교 연구. 숙명여대, 석사학위논문(1993)
34. 김용택, 서권일, 정용진, 이용수, 심기환. 유자과즙을 이용한 식초제조. *동아시아식생활학회지.* 7(3), 301(1997)
35. 박영경, 황완균, 김일혁. 산수유 종자의 항당뇨 효과. *중앙대 약학논총.* 9, 5(1995)
36. 서권일, 이상원, 양기호. 산수유 추출물의 항균 및 항산화성. *한국농산물저장유통학회지.* 6(1), 99(1999)
37. 오영준. 배를 이용한 식초의 발효조건에 관한 연구. *한국영양식량학회지.* 21(4), 377(1992)
38. 이영철, 김영언, 이부용, 김철진. 산수유 열매의 화학성분과 건조에 따른 과육분리 특성. *한국식품과학회지.* 24(5), 447(1992)
39. 임숙자, 김영신. 등굴레분획물과 비타민 E 투여가 Streptozotocin 유발 당뇨 흰쥐의 혈당과 지질과산화에 미치는 영향. *한국영양학회지.* 31(9):1385(1998)
40. 정용진, 서권일, 김광수. 시판 및 속성 감식초의 이화학적 특성. *동아시아식생활학회지.* 6(3), 355(1996)
41. 정용진, 서권일, 신승렬, 서지형, 강미정, 김광수. 감과실 알코올 발효를 위한 효모의 분리. *동아시아식생활학회지.* 7(4), 538(1997)
42. 홍정화, 이기민, 허성호. 저온저장 중 품질이 저하된 단감을 이용한 식초의 제조. *J Kor Soc Food Nutr.* 25(1), 123(1996)

## 주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.