

식물체유래 베타시아닌계 색소 및 기타 생리활성
물질을 이용한 장세척음료 개발

Development of functional beverage to improve
intestine by betacyanin and physiological molecules
from various plants

한국과학기술원

생물과학과

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “식물체유래 베타시아닌계 색소 및 기타 생리활성물질을 이용한 장세척음료개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2003 년 8 월 11 일

주 관 연 구 기 관 명 : 한국 과학 기술 원

총괄연구책임자 : 변 시 명

세부연구책임자 : 변 시 명

연 구 원 : 고 정 연

연 구 원 : 이 현 우

연 구 원 : 이 원 섭

연 구 원 : 박 지 혜

연 구 원 : 박 효 정

요 약 문

I. 제 목

식물체유래 베타시아닌계 색소 및 기타생리활성물질을 이용한 장세척 음료개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

우리나라의 주요 사망원인 중 결장암, 직장암, 항문암 등 소화기계통의 암 발생률은 당뇨병, 허혈성 심장질환과 함께 최근 10여 년 간 급격하게 증가한 질병중의 하나이다. 더구나 수년 전 만해도 서양과는 달리 우리나라는 대부분 맵거나 짠 자극적인 음식물 섭취의 원인으로 대장암보다 위암이 훨씬 많았으나 최근에는 서구화된 음식물 섭취, 인스턴트 식품의 대중화, 육류 섭취 증가 등으로 위암은 줄어들고 대장암, 변비 등 각종 급·만성 대장질환이 증가하고 있는 실정이다. 이와 같은 각종 대장질환들은 급성인 경우 치명적인 결과를 가져오기도 하고 만성인 경우 다른 합병증을 유발하거나 또는 여러 신체부위나 조직에 항상성을 깨거나 부담을 주어 전체적인 건강상의 부조화를 초래하여 생체리듬의 파괴, 컨디션의 저하 등으로 활력있는 생활을 할 수 없도록 막대한 영향을 미치기도 한다. 무엇보다도 소화기 계통의 질병은 다른 모든 신체부위에 미치는 영향이 크므로 정상활동을 증가시키는 의약품이나 건강식품에 관한 관심은 커졌지만 대장의 기능을 증진시키는 유산균음료나 식이섬유 함유 음료 외에는 마땅한 대책은 아직 없는 실정이다. 여기에 착안하여 이와 같은 산업 및 경제적 요구에 의해 식물체유래의 기호 식품과 기능성 음료의 개발, 그 중에서도 정장음료의 개발을 목표로 정장 효과가 있다고 알려진 베타시아닌 색소의 장세척 효과의 검증 및 생리활성 기능을 탐색

하여 물질생산과 학문적 체계를 갖추어 정장음료의 개발과 생물소재 산업화의 향상을 도모하고자 한다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 생리활성 기능이 있다고 알려진 식물체의 수집 및 생리 활성 Screening

○항산화활성 screening (free radical scavenging activity, lipid peroxidation inhibitory activity, nitrite scavenging activity, xanthine oxidase inhibition effect 등)

○항미생물 활성 (그람음성균과 그람양성균에 대한 antimicrobial activity test)

○항암활성 (Hep3B, HeLa 229, Cas KI, SNU-C2A, Detroit 551 세포주에 대한 cytotoxicity test)

○정장효과 screening (장내유익균주인 *Lactobacillus casei* 911 LC, *Streptococcus thermophilus* ST5, *Bifidobacterium longum*와 장내 유해 부패세균인 *Clostridium perfringens* 3269을 대상으로 장내 균총 간의 길항작용과 정장효과 조사)

○ 베타시아닌계 적색소의 정장효과 검증과 안정성 검토

2. 베타시아닌을 대량 생산하는 세포주의 확보 및 조직배양 조건의 최적화

- 식물체유래 천연적색소의 대량생산을 위한 배양시스템의 최적화 조건 확립 (배양배지, 배양기간, 당 농도, 빛의 영향, air volume의 영향, 배양용기의 영향 등 조사)
3. 식물체 추출물의 혼합병용시의 각종 생리활성 및 성장효과
 4. 성장효과가 있는 다당체의 정제와 구성당 조사
 - Polysaccharide의 추출과 정제 및 분자량 2,000 D이상의 다당류를 성장효과를 조사하여 가수분해한 다음 Bio-LC를 사용하여 중성당과 아미노당의 조성과 구성비를 확인
 5. 성장음료의 시제품개발 및 기호도 조사
 - 성장효과가 있는 식물체를 선발하여 그 추출물을 혼합하여 배합비를 정하고 향과 당도를 조정하여 첨가물을 배합하여 시제품을 제조한다.
 - 시제품 제조공정의 확립
 - 시제품의 보존과 유통 저장을 위해 시제품의 품질변화 요소 등을 검토한다.
 - 기호도를 조사하여 보다 선호도가 높은 기능성 성장음료를 개발한다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

1) 정장음료의 개발

일반에게 정장효과가 있는 것으로 알려진 여러 가지 식물체를 통해 생리활성을 검토하고 정장효과를 확인한 다음, 소비자의 기호도를 조사하여 정장음료를 개발

- 2) 정장효과가 뛰어난 polysaccharides의 구성당과 조성비를 확인
- 3) 식물체유래 천연적색소인 베타시아닌계 색소의 대량생산을 위한 배양 system 확립
- 4) 식물체 추출물들로부터 여러 가지 생리활성물질의 개발을 위한 기초자료 확보

2. 연구결과 활용에 대한 건의

- 1) 본 연구의 조직배양 시스템 확립기술은 우리나라 식품산업에서 식품첨가물로서의 식용 색소가 식물체 유래의 천연 적색소 대량생산을 가능하게 하는 것으로 관련기술을 다른 색소의 생산이나 다른 생리활성 물질을 개발하고 대량생산하는 데에 적용 연구가 요구된다.
- 2) 본 연구를 통해 확보된 식물체의 생리활성에 대한 연구정보를 활용하여 천연물에 의한 생리활성물질개발에 더한층 후속 연구가 필요하다.
- 3) 정장음료의 개발은 나날이 늘어가는 장질환 등 현대의 음식물 문화 및 시대조류에 의한 각종질병으로 이에 대한 대책은 미흡

하여 현재 유산균음료나 식이섬유 음료에만 국한된 정장음료를 더 한층 개발한 것으로 앞으로의 후속 연구가 더욱 필요하여 다양한 기호도와 식문화에도 잘 어울리는 선호도 높은 정장음료로 더욱 발전시켜야 할 것이다.

SUMMARY

1. Title of Reasearch

Development of intestinal improved beverage from plants and betacyanin pigment.

2. Purpose and Significance of the study

- A lot of effort has been made around the world to utilize naturally occurring substances as health promoting foods as well as antioxidants.
- Some of plant extracts showed a powerful protective effect on lipid peroxidation and electron donating ability in vitro test, induced nitrite scavenging activity and xanthine oxidase inhibitory effects in the test system, suggesting the presence of antioxidative and reducing agents powerful enough.
- This study was performed to observe cytotoxic effect of various plant extracts against cancer cell lines include

human hepato cellular carcinoma(Hep3B), human uterine adenocarcinoma (CasKI), (HeLa 229), human colon cancer cell (SNU-C2A), and human skin (Detroit 551) fibroblast using MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) assay.

- Growth and betacyanin production by hairy root culture of *Beta vulagris* L. in a bioreactor.
- The growth effect on harmful intestinal bacteria and lactic acid producing bacteria with complex mixture added red beet extract.
- Purpose of this project is to develop a functional beverage which is improved intestine.

3. The scope and content of Research

- Analysis of sugar composition of the polysaccharide and selection of raw plant materials for the functional beverage.
- Establishment of the method to produce the red pigment of betacyanin added to foods and drinks as additives using

instrumental culture system.

- Determination of blanching time to prevent browning, and development of a process to make functional beverage.
- Formulation for the functional beverage and sensory evaluation of the developed beverage.
- Determination of shelf life of the product stored at 10°C in the dark.

4. Results and recommendations for application

<Results>

1. Selection of raw material plants

- Red beet, onion, apple were selected as raw materials for the functional beverage because they have been the major produces polysaccharides, and their nutritive value appeals to consumer.
- Especially, radish are not palatable as a drinks component but it was selected because use of low-price commodity might contribute to reduction of a production cost. The

other materials for the functional beverage was honey, oligo-polysaccharides, sugar, vitamin C, citric acid etc. The price of red beet is high, but it provided a fashionably bright red color th the beverage. Especially, apple juice could mask a planty and earthy flavor like as sulfur of the beverage.

2. Determination of blanching time and development of a clarification method

○ When tissue of fruits and plants is collapsed, a browning reaction starts. this is a deteriorative reaction catalyzed by enzyme like as polyphenol oxidase. A frequently used treatment to inhibited browning was to inactivate the enzyme by heating. To determine a condition of blanching, raw materials plants were cut into cubes, heated in boiling water for 1-3 min. The browning enzyme activity was completely inactivated within 1 min. Lightness and redness of red beet nearly never changed forwards. These results indicated that one min was optimal to blanch raw materials.

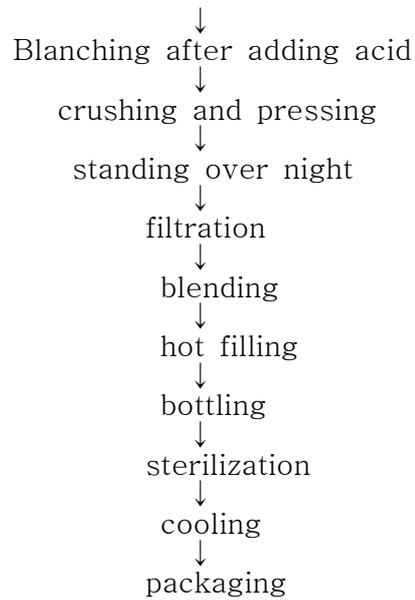
3. Formulation of the functional beverage and sensory evaluation

○ Through a sensory evaluation, our research staff and sensory panel determined that the most palatable mixing ration for the mixed functional beverage was red beet extract: apple extract: radish extract: onion extract = 42.5: 15.4: 30: 1.2 . To mask a planty and earthy flavor as like sulfur of the beverage, the apple juice of 15.4% and 0.2% apple flavor, 0.2% pine flavor added. Among apple, peach and grape juices tested, apple juice was the best choice because it imparted a relatively new flavor as compared to the products on current market. When the sensory score of the developed product in the aspects of color, flavor, sweetness, sourness and overall acceptability was compared to that of one the other product.. The developed indicated that a palatable and sellable functional drinks was developed in this project. The developed product D was fortified with ascorbic acid, citric acid

4. Process development

○ The following scheme is a flow sheet to manufacture the developed functional beverage.

selected raw materials
↓
separating and washing
↓
cutting



5. Stability of red color of betacyanin from red beet

- When the red beet juice was sterilized as pasteurization. To improve stability, addition of some antioxidants like ascorbic acid apparently contributed to the stabilization of the red pigment. Ascorbic acid was added to the functional drinks at a concentration of 0.2%.

6. Determination of shelf life of the developed beverage

- Intestine improved functional beverage was prepared and stored at 10°C in the dark to which 0.2% ascorbic acid was added, since the antioxidant stabilizes, and results in more

retention of the pigments during processing and storage. Periodical analysis of quality factors such as pH, soluble solid, total acidity, turbidity, formation of precipitates, and microbial contamination for 90 days showed that a shelf life of the functional developed juice is at least 3 months.

<Proposal for application results of this study>

- This culture system techniques of this study are to establish mass and rapid production of red pigment betacyanin. This technique can be applicable the other color product. Further study is required for this application.

- Further study must be conducted for the application of this developed functional beverage, such as commercial field test, study and establishing to improve function.

Contents

Chapter 1. Introduction	16
Chapter 2. Present of developed techniques of domestic and international.....	20
Chapter 3. Description of research	24
section 1. Introduction.....	24
section 2. Description and contents of research and methods	26
section 3. Results and recommendation.....	39
Chapter 4. Accomplishment of study	104
Chapter 5. Application of this research.....	105
Chapter 6. Reference	107

목 차

제 1 장	서론16
제 2 장	국내외 기술개발 현황20
	제1절 국내외 기술개발 현황과 문제점.....20	
	제2절 앞으로의 전망22
	제3절 기술도입의 타당성23
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과.....24	
	제1절 서설24
	제2절 연구개발 목표와 내용26
	제3절 실험결과 및 고찰39
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도104
제 5 장	연구개발결과의 활용계획105
제 6 장	참고문헌107
제 1 장	서론	

제1절. 연구개발의 필요성

우리의 식생활 문화와 식품산업의 발전단계를 살펴보면 기아문제를 해결해야만 했던 절대적 영양빈곤상태를 벗어나 칼로리 충족시대를 거치면서 필요한 영양소의 영양강화시대, 나아가서는 영양충족시대를 지나 이제는 과잉섭취시대를 지나오게 되었으며, 드디어 질 높은 식품으로 소식 (小食)이나 식이요법 등으로 건강을 유지하며 무병장수를 염원하는 영양조절시대를 살고 있다. 소득수준의 향상으로 1980년대 이후 건강에 대한 관심은 더욱 고조되었고 앞으로의 식품산업과 식품시장의 방향은 생체의 항상성 (homeostasis) 유지와 생리조절기능 즉 면역 증강 및 진정작용, 항 혈전기능, 혈압 및 콜레스테롤 저하기능, 정장작용, 항 산화기능, 노화억제기능, 항 종양활성 등을 갖는 기능성 식품의 시대로 가고 있다. 따라서 각종 농산물, 임산물 등 다양한 식물 자원 유래의 생리조절기능을 갖는 물질을 효율적으로 분리한 후 식품에 적용하여 새롭게 디자인 한 음료와 식품을 개발하여 소비자들에게 공급한다면 예방 의학적 차원에서 국민 건강의 유지 및 증진효과 뿐만 아니라 의식주 문화 측면에서도 다양한 기호에 맞춘 삶의 질 향상과 나아가서는 신제품 개발에 따른 영농업의 활성화와 영농업 종사자들의 소득수준의 향상으로 이어져 도시, 농촌간의 소득격차를 줄이고 새로운 식품산업 시장의 형성 등 경제적 파급효과의 창출과 함께 국민보건과 복지향상으로 이어지는 계기가 될 수 있다.

이와 같이 사회·문화적으로 건강을 추구하고 질병예방을 위한 사회전반에 걸친 교육 및 홍보 등으로 식품섭취와 자신의 건강상태에 알맞은 식이요법을 행하는 등 다방면으로 연구, 노력하는 분위기와 이에 대한 개인적 또는 사회적 요구에 따라 최근 식물체유래의 많은 기능성 기호음료들이 개발되고 있는 상황이다. 더구나 수년 전 만해도 서양과는 달리 우리나라는 대부분 맵거나 짠 자극적인 음식물 섭취의 원인으로 대장암 보다 위암이 훨씬 많았으나 최근에는 서구화된 음식물 섭취, 인스턴트식품의 대중화, 육류 섭취 증가 등으로 위암은 줄어들

고 대장암, 변비 등 각종 급·만성 대장질환이 증가하고 있는 실정이다. 이와 같은 각종 대장질환들은 급성인 경우 치명적인 결과를 가져오기도 하고 만성인 경우 다른 합병증을 유발하거나 또는 여러 신체부위나 조직에 항상성을 깨거나 부담을 주어 전체적인 건강상의 부조화를 초래하여 생체리듬의 파괴, 컨디션의 저하 등으로 활력 있는 생활을 할 수 없도록 막대한 영향을 미치기도 한다. 무엇보다도 소화기 계통의 질병은 다른 모든 신체부위에 미치는 영향이 크므로 정상 활동을 증가시키는 의약품이나 건강식품에 관한 관심은 커졌지만 대장의 기능을 증진시키는 유산균음료나 올리고당 함유 음료 외에는 마땅한 대책은 아직 없는 실정이다. 여기에 착안하여 이와 같은 산업 및 경제적 요구에 의해 식물체유래의 기호 식품과 기능성 음료의 개발, 그 중에서도 정장음료의 개발을 목표로 장세척 효과가 있다고 알려진 베타시아닌 색소의 장세척 효과의 검증 및 생리활성 기능을 탐색하여 물질생산과 학문적 체계를 갖추어 생물소재 산업화의 향상을 도모하고자 한다.

1. 연구개발의 필요성

가. 기술적 측면

식품에 첨가되는 화학합성 적색소는 특히 발암성이 알려지게 되어 첨가농도의 제한 등으로 엄격한 규제를 하고 있고 이로 인해 천연 적색소의 필요성이 더욱 부각되고 있다. 식품 천연색소중 적색 색소는 그 절실한 필요성에도 불구하고 그 source가 매우 제한되어 있으며 특히 베타시아닌은 red beet (남부유럽 원산지)에서만 소량 제조되고 있으며 대부분은 색상이 다른 안토시아닌만 생산되고 있는 실정이다. 이처럼 베타시아닌의 식물계에서의 분포는 대단히 특이적이며 안토시아닌과 베타시아닌의 존재는 서로 간에 배타적이고 양자가 한 식물에 존재하는 예는 아직 알려지지 않아 식물의 화학 분류 면에서도 중요하다.

본 실험실에서는 이처럼 중요한 베타시아닌 색소를 우리나라 전역에 걸쳐 자

생하는 맨드라미로부터 색소를 추출하여 베타시아닌 색소임을 밝힌 바 있고 이의 경제적 추출방법과 식품학적 안정성을 개발하여 특허를 취득한 바 있다(1985, Patent No. 33511, ROK). 이와 같은 기술적 바탕에 기초하여 국내에서 재배하고 있는 식물체 중에서 베타시아닌계 색소가 풍부한 red beet와 같은 식물체로부터 베타시아닌 함유 정장음료를 개발하는 것은 대장 질환이 만성화, 보편화되어 가는 우리나라 국민들의 보건향상을 위해서는 물론이고 정장효과가 있는 것으로 알려진 베타시아닌계 색소의 정장효과를 확인해야 할 필요가 있으며 정장음료 개발 기술을 확립하기 위해서도 이에 대한 연구가 필요하다.

나. 경제·산업적 측면

지금까지의 국내 연구로는 red beet로부터 장세척 음료인 메디쥬스를 개발하여 그 효과가 입증되어 국내시판과 함께 미국 등지로 수출도 하였으나 기호와 마케팅이 부진하여 국내에서조차 큰 호응을 얻지 못하고 제품이 사장되는 결과에 이르게 되었다. 이와 같은 국내연구와 개발에 기초하여 재료가 풍부한 한국산 맨드라미 또는 레드비트 등 각종 식물체로부터 베타시아닌계 색소 및 관련 유용물질을 추출하여 생리 활성 등을 검토하고 그 효능과 응용성을 개발하여 새로운 기호식품이나 장세척 기능을 가진 기능성 음료의 상품화, 생리활성물질이 첨가된 유제품의 개발 등을 추진하여 국내농업과 산업의 향상은 물론 국민 건강과 복지를 증진하고 나아가서는 외화수입의 소중한 역할을 할 수 있도록 첨단 연구 자료를 확보하고자 하였다.

다. 사회·문화적 측면

아무리 효능이 좋은 건강보조식품이 개발되어도 식생활 문화와 기호, 또한 사회적인 인식과 유행의 한계를 벗기 어려우므로 이러한 시대적 흐름과 기호를 조사하여 누구나 효능에 걸 맞는 기대와 함께 기호에도 부합하는 제품을 개발할

수 있도록 해야 할 것이다. 또한 현대의 식생활이 편리위주의 칼로리 높은 식품이 대부분이므로 이에 따른 변비나 각종 위장장애, 대장 기능 저하 등의 질병과 각종 증후군에 대비하여 반드시 우리나라에서 생산되는 재료를 사용한 정장음료의 개발이 시급하다.

제2장 국내의 기술개발 현황

1. 국내·외 관련기술의 현황과 문제점

생리활성물질과 그 응용분야의 선두주자로서 기능성 식품의 소재 개발 연구 및 산업화와 시장형성을 주도해 온 일본은 1984년 문부성 특정연구인 “식품 기능의 계통적 해석과 전개”를 그 효시로 기능성 식품의 소재개발 연구가 활발하게 진행되고 있다.

이러한 새로운 분야 형성에 가장 보수적인 미국의 경우에서도 1994년 Institute of Food Technologists (IFT)에서 발행하는 Food Technology에서 처음으로 생리활성물질의 하나로서 과채류 유래 fructooligosaccharides에 대한 총설이 실렸으며, 같은 해 미국 FDA는 「Dietary Supplement Act of 1994」에서 nutraceutical products를 “The Newly Created Product of Category of Dietary Supplements”로 분류한 바 있다. 1998년 6월 미국 Georgia주 Atlanta시에서 열린 IFT '98 Annual Meeting에서는 3개의 session (Session 4: Processing of Nutraceuticals/Functional Foods; Session 14: Developing Nutraceuticals for the New Millinium; Session40: Nutraceuticals-Functional Foods for Health)에 걸쳐서 생리활성물질의 생산, liquid-solid extraction을 이용한 식물유래 nutraceutical ingredients의 추출공정, phytochemicals, natural antioxidants, isoflavones 등의 원료물질 취급법, 추출, 분리 및 정제기술, alternative medicines로서의 nutraceuticals, nutra-ceutical/functional foods의 측면 등을 다루고 있다.

이와 같이 천연물의 식품신소재 이외에도 향후 더욱 심각해질 현대병, 고령화병을 예방하고 치료할 수 있는 생리, 약리활성 성분을 식용생물자원으로부터 분리하여 기능성 식품 또는 의약품 원료, 항산화 또는 노화예방의 화장품 개발 원료로 소재화 하기 위한 기초 자료를 확보하기 위하여 세계 각국의 경쟁은 더

욱 치열해져 가고 있다.

한편, 국내에서 개발된 메디쥬스는 장세척 효과가 입증되어 수출까지 하고 있지만 그 활성성분의 과학적 메카니즘 규명과 그에 대한 실험적, 학문적 연구 결과와 정보가 부족한 실정이다. 또한 그 원료의 원산지가 남부유럽이고 지금은 미국에서 주로 생산되는 작물로서, 식물자원이 다양한 우리나라에서 자생되거나 재배되고 있는 식물 가운데 산업화할 수 있는 천연물의 탐색은 부존자원이 부족한 우리의 실정에서 종 다양성의 확보와 함께 생물소재의 산업화에 국제적 우위를 차지할 수 있는 중요한 연구 자료가 된다.

본 연구개발과 관련이 있는 베타시아닌 색소와 각종 올리고당은 일반적으로 장세척 효과가 있는 것으로 알려져 있으나, 실제로는 베타시아닌 색소의 정장효과에 대한 정확한 연구보고는 거의 전무한 실정이다. 특히 베타시아닌 색소는 함질소 색소로서 식물자원이 제한적이고 식물계 분포가 특이적이며 안토시아닌과는 배타적으로 존재하고 일반적으로만 알려진 정장작용에 대하여는 관련된 연구보고가 거의 없으므로 베타시아닌 색소의 각종 생리활성에 대한 실질적인 연구가 반드시 이루어져야 하며 그 작용 메카니즘의 구명과 효율적 활용에 대한 학문적 연구 결과가 산업화에 더욱 절실하다. 각종 식물체 성분의 올리고당은 감미료로서의 기능뿐 아니라 장내 유익 세균의 생육 촉진효과가 있다고 보고되어 있으며 특정 유익 세균의 선택적 탄소원으로 사용된다. 장내 유익 세균들은 비타민 B군과 비타민 K등을 합성 공급하며 대사과정 중에 각종 유기산의 생성으로 부패균의 증식을 억제하는 길항작용과 장내 세균총의 정상화에 기여한다. 또한 장내 유익 세균들은 암모니아와 같은 장내 부패산물의 억제, 독성 아민류 등 발암물질을 분해하며 설사 및 변비개선 효과가 있다고 알려져 있으나 그에

대한 체계적인 연구가 반드시 필요하다.

본 실험실에서는 베타시아닌 색소에 대한 식품학적 안정성을 연구하여 특히 출원을 마친 바, 내용중 일부를 간단히 요약하면 다음과 같다. 한국산 맨드라미 꽃의 적색 색소인 베타시아닌 색소의 식품학적 안정성을 조사한 결과 이 적색 색소는 pH 4.0에서 가장 안정하였으며 열에 대한 분해 활성화 에너지 (E_a)는 17.55 kcal/mol 이었다. 일반적으로 당 화합물의 첨가는 0.1 M 농도에서 색소 분해 방지효과가 있었고, 식품 속에 존재하는 농도의 유기산, 금속이온 및 항산화제 들은 적색 색소의 분해를 심하게 일으키지 않음으로써, 이 적색 색소는 천연 식품 색소로서 이용될 가능성을 증명하였다.

이와 같은 연구 결과에 기초하여 우리나라 전역에 걸쳐 자생 또는 재배되고 있는 식물로서 주로 붉은 색을 띠는 꽃과 과실, 잎, 줄기, 뿌리 등을 수집하여 유효, 지표성분 및 각종 생리활성 물질들을 분리하고 탐색하여 효율적인 이용과 생물소재의 산업화에 유용한 자료를 확보하여야 하며, 아직 밝히지 못한 생리활성물질의 작용을 구명하는 연구가 절실히 요구되고 있다.

2. 앞으로 전망

식용 생물자원으로부터 생리·약리 활성성분을 분리하여 기능성 식품 또는 의약품의 원료로 소재화 하는 천연물 과학의 중점적 수행 분야는 순환기 계통의 고혈압 억제제 및 항혈전제, 면역계의 항보체, macrophage, 장관면역 활성화제, 산화적 손상조절제의 활성 산소 소거제 및 노화 억제제 등으로 분류할 수 있으며 식품 신소재학은 Medical food 의 개발로 질병 치료효과의 상승작용과 입원

환자에게는 중요한 식이요법의 제공과 함께 예방 의학적 차원에서도 중요한 지원재료가 된다.

또한 이 Medical food 시장은 미국에서만 연간 약 10억불 이상의 규모이며 점차 확대 되어가고 있고 세계적으로는 엄청난 정도의 규모임을 알 수 있다. 이와 같은 차원에서 장세척 음료의 개발은 그 중 한 분야에 불과하지만 시대적 요구이며 그 잠재력 또한 클 것임을 예측할 수 있다.

3. 기술도입의 타당성

Medical food 또는 의약품의 개발 소재는 나라마다 차이가 있으며, 장내 서식하는 유산균이나 신체적 조건도 다르므로 우리 고유의 식물자원 개발과 우리나라에서 자생, 또는 재배되는 식물로서 우리나라 보건 상황에 맞는 건강식품의 개발이 더욱 절실하다. 동양인 체질과 우리 식생활에 알맞는 질병의 예방과 치료가 가능하게 되므로 국민보건에 이바지하게 될 것이다. 그러므로 기술도입보다는 국내의 자원 개발과 기술을 더욱 향상시켜 축적된 기술로 수많은 특허권과 경제적 가치를 창출시키는 것이 합당하다. 또한 외국의 현재기술 또한 우리의 기술수준과 비교하여 뚜렷한 차이를 보이지 않으므로 기술도입의 필요성이 없다고 본다.

제3장. 연구개발 수행 내용 및 결과

제1절 서 설

최근 경제가 발전하고 삶이 물질적으로 풍요로워지면서 건강이 삶의 질을 결정하는 가장 중요한 요인이라는 인식이 선진국을 중심으로 확산되었다. 우리나라뿐만 아니라 전 세계가 건강에 관한 관심의 증가로 건강식품이 주목받고 있으며 이러한 소비자들의 욕구에 부응하여 다양한 건강식품이 이미 시장에서 유통되고 있다. 현재 우리나라에서 건강식품과 관련해서 사용되고 있는 건강식품, 건강보조식품, 뉴트라슈티컬 등 다양한 용어들로 사용되고 있으며 농업혁명과 식품의 생산, 가공, 저장방법의 발달 및 분배과정의 개선으로 많은 사람들이 다양한 식품을 쉽게 접할 수 있게 되었다. 신기술의 급격한 발전과 함께 빠르게 진행되고 있는 식품산업의 발전은 식생활의 변화를 가져오고 영양학의 연구는 괴혈병, 각기병, 펠라그라병, 안구건조증, 구루병 등과 같이 영양의 결핍으로 인해 발생하는 질병의 감소에 기여하였고 전염성질환이 크게 줄어들었다. 이에 따라 최근에는 심혈관 질환이나 암과 같은 비전염성 질병이 사망의 주요 원인질환으로 증가하고 있다. 우리나라의 주요 사망원인 중 결장암, 직장암, 항문암 등 소화기계통의 암 발생률은 당뇨병, 허혈성 심장질환과 함께 최근 10여년간 급격하게 증가한 질병중의 하나이다. 비전염성 질병에 대한 연구 결과 영양소의 불균형이 동맥경화성 심혈관병, 암, 고혈압 관련 질병 등의 만성질환 발생을 유발한다는 사실이 밝혀졌고 이에 따라 영양연구는 충분한 영양의 섭취보다는 적절한 영양의 섭취로 연구의 초점이 맞추어져 진행되어야 할 것이다. 이러한 방향으로 연구가 진행되면서 식품내의 여러 가지 성분들이 지금까지 알려진 단순한 영양학적인 효과 이상의 건강증진효과를 보인다는 사실이 밝혀지고 있다.¹⁾ 예를 들어 Duthie 등은 항산화작용을 하는 성분을 적게 섭취하면 심혈관 질환에 걸릴 위험이 높아진다는 것을 증명하여 발표하였다²⁾. 이와 같이 많은 연구결과가 발표됨에 따라 인스턴트식품보다 채소와 과일 등 천연식품의 섭취를 권장하고 기능이 강화된 기능성 식품이나 건강증진식품 등이 쏟아져 나오게 되었다. 우리나라의 경우 건강보조식품은 신체의 육체적, 생리적 측면에서 유용성을 기대하여

섭취할 목적으로 식품소재에 함유된 성분을 그대로 원료로 하거나 이들에 들어 있는 특정성분을 분리 또는 추출, 농축, 정제, 혼합 등의 방법으로 제조 가공한 식품을 말하는데 식용의 식물체나 식품에 통상 함유되어 있는 성분 중 인체에 좋은 부분을 활용한 것이다. 앞으로의 식품산업과 식품시장의 방향은 생체의 항상성 (homeostasis) 유지와 생리조절기능 즉 면역 증강 및 진정작용, 항 혈전 기능, 혈압 및 콜레스테롤 저하기능, 정장작용, 항 산화기능, 노화억제기능, 항 종양활성 등을 갖는 기능성 식품의 시대로 가고 있다. 따라서 각종 농산물, 임산물 등 다양한 식량 자원 유래의 생리조절기능을 갖는 물질을 효율적으로 개발하여 특히 장세척음료를 분리한 후 식품에 적용하여 새롭게 디자인 한 음료와 식품을 개발하여 소비자들에게 공급한다면 예방 의학적 차원에서 국민 건강의 유지 및 증진효과 뿐만 아니라 의식주 문화 측면에서도 다양한 기호에 맞춘 삶의 질 향상과 나아가서는 신제품 개발에 따른 영농업의 활성화와 영농업 종사자들의 소득수준의 향상으로 이어져 도시, 농촌간의 소득격차를 줄이고 새로운 식품산업 시장의 형성 등 경제적 파급효과의 창출과 함께 국민보건과 복지향상으로 이어지는 계기가 될 수 있다. 이와 같은 산업 경제적 요구에 의해 기호 식품과 기능성 음료의 개발을 목표로, 장세척 효과가 있다고 알려진 베타시아닌계 색소의 장세척 효과의 검증 및 기타 생리활성 기능의 탐색과 물질생산의 기술을 확보하고 학문적 체계로 생물소재 산업화의 향상을 이룩하는데 그 연구목적이 있다.

제2절 연구개발 목표와 내용

1. 연구개발 목표와 내용

우리나라에서 재배에 성공한 한국산 맨드라미와 red beet 등 각종 식물 자원으로부터 베타시아닌계 색소와 생리활성 물질의 분리 제조 및 활성 탐색으로 장세척용 고 기능성 음료와 기호식품의 개발을 목표로 여러 가지 생리 활성을 검증한 후 장세척 기능을 탐색하고 유효성분을 분리 정제 확인한다. 또한 항암성인 합성 적색소의 대체제로 식물체 유래의 천연 적색소를 개발하여 안전성 확보 및 국내 식물자원의 부가가치를 향상시키는데 도움이 되고자 한다. 아울러 식이요법 및 건강식품으로서의 과학적 근거 및 이용성을 증대시킨다.

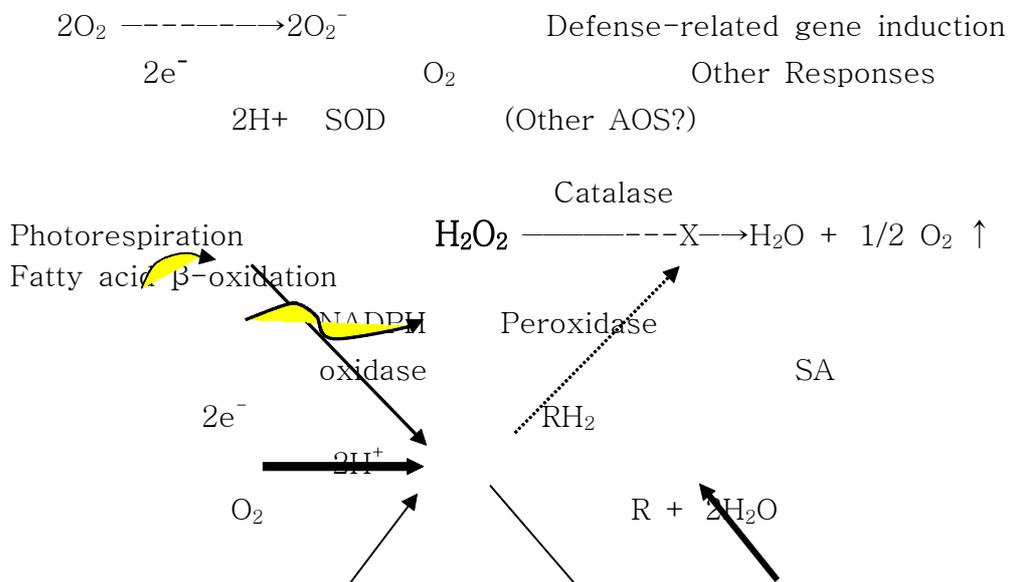


Fig. 1. Metabolism of hydrogen peroxide in plants. Two major sources of H₂O₂ are photorespiration and β-oxidation of fatty acids.

Red beet와 맨드라미의 적색소는 주성분이 베타시아닌계 색소로써 본 연구개발과 관련이 있는 베타시아닌 색소와 각종 올리고당은 일반적으로 장세척 효과가 있는 것으로 알려져 있으나, 실제로는 베타시아닌 색소의 정장효과에 대한 정확한 연구보고는 거의 전무한 실정이다.

특히 베타시아닌 색소는 합질소 색소로서 식물자원이 제한적이고 식물계 분포가 특이적이며 안토시아닌과는 베타적으로 존재하고 일반적으로만 알려진 정상작용에 대하여는 관련된 연구보고가 거의 없으므로 베타시아닌 색소의 각종 생리활성에 대한 실질적인 연구가 반드시 이루어져야 하며 그 작용 메카니즘의 구명과 효율적 활용에 대한 학문적 연구 결과가 산업화에 더욱 절실하다. 각종 식물체 성분의 올리고당은 감미료로서의 기능뿐 아니라 장내 유익 세균의 생육 촉진 효과가 있다고 보고되어 있으며 특정 유익 세균의 선택적 탄소원으로 사용된다. 장내 유익 세균들은 비타민 B군과 비타민 K등을 합성 공급하며 대사과정 중에

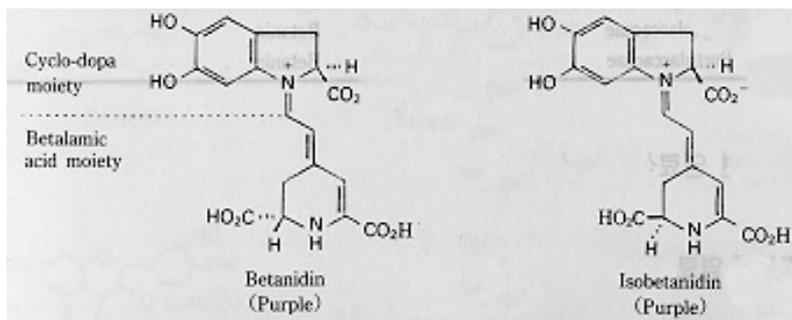


Fig. 2. Red and yellow pigment of betalains system. betacyanine, betaxanthine

각종 유기산의 생성으로 부패균의 증식을 억제하는 길항작용과 장내 세균총의 정상화에 기여한다. 또한 장내 유익 세균들은 암모니아와 같은 장내 부패산물의 억제, 독성 아민류 등 발암물질을 분해하며 설사 및 변비개선의 효과가 있다고 알려져 있으나 그에 대한 체계적인 연구가 반드시 필요하다. 이와 같은 연구 결

과에 기초하여 우리나라 전역에 걸쳐 자생 또는 재배되고 있는 식물로서 주로 붉은 색을 띠는 꽃과 과실, 잎, 줄기, 뿌리 등을 수집하여 유효, 지표성분 및 각종 생리활성 물질들을 분리하고 탐색하여 식물체의 효율적인 이용과 베타시아닌계 색소의 정장효과를 실험적으로 증명하고 식물체 추출물의 항산화활성 등 생리활성을 확인하여 정장효과가 있는 식물체를 선정하여 장세척음료의 개발과 생리활성물질소재의 산업화에 유용한 자료를 확보하고자 한다.

Betalains계 색소군은 구조적으로 유사한 베타시아닌류(betacyanins)와 베타크산틴류(betaxanthins)의 총칭이다. 베타시아닌류의 가장 대표적인 aglycone은 붉은색의 베타니딘(betanidin) 15와 betaxanthine류로서는 황색색소인 인디카크산틴(indicaxanthin) 16이 잘 알려져 있다. Betalains계 색소군은 대체로 불안정하여 산이나 알칼리에 쉽게 분해된다.

2. 연구방법

가. 실험재료

Table 1. List of plants used for various experiments

본 실험에 사용한 조사대상 식물체는 오래 전부터 전해 내려오는 한의서 및 고서 등을 문헌조사하고, 전국 각지로부터 자생하고 있는 식물체의 수집과 산지별, 생육시기별 가장 적당한 수확시기에 맞추어 베타시아닌계 색소를 풍부하게 지닌 red beet와 맨드라미로부터 색소만을 추출하거나 식물체 자체를 이용 가능한 부위를 선별하여 추출한 다음 장세척 효과를 측정, 비교 분석하였고 그밖에 시중

Table 1. List of plants used for various experiments

에서 유통되고 있는 각종 산채류 및 한약재로서 약 40여종을 문헌에 근거하여 대상 시료로 정한 다음 이 물질을 제거하고 세척한 후 본 실험에 사용하였다.

나. 실험방법

Local name	Scientific name	Plant part
동굴레	<i>Polygonatum odoratum</i> var.	root
헛개나무	<i>Hovenia dulcis</i> Thunb	leaf, twig, berries.
씀바귀	<i>Ixeris dentata</i>	root, leaf
맨드라미	<i>Celosia cristata</i> L.	flower
시호	<i>Bupleurum falcatum</i>	eggplant, twig
석곡	<i>Dendrobium moniliforme</i>	leaf, twig
냉이	<i>Capsella bursa-pastoris</i>	leaf, root, whole plant
도라지	<i>Platycodon grandiflorum</i>	root
마	<i>Dioscorea batatas</i> Decaisne.	root
익모초	<i>Leonurus sibiricus</i> L.	leaf, twig, whole plant
홍화	<i>Carthamus tinctorius</i>	flower, seed
레드비트	<i>Beta vulgaris</i> var.	leaf, root
가지	<i>Solanum melongena</i>	fruit
지황	<i>Rehmannia glutinosa</i>	root
양파	<i>Allium cepa</i>	subterranean stem
머위	<i>Petasites japonicus</i>	leaf
당근	<i>Daucus carota</i> var. <i>sativa</i>	root
죽순	<i>Phyllostachys bambusoides</i> Sieb.	bamboo shoots
적송	<i>Pinus densiflora</i>	pine needle, needle shoots
리기다송	<i>Pinus rigida</i>	pine needle, needle shoots
잣나무	<i>Pinus koraiensis</i>	pine needle, needle shoots
해송	<i>Pinus thunbergii</i>	pine needle, needle shoots
겨우살이	<i>Viscum album</i> var. <i>coloratum</i>	leaf, twig
함초	<i>Salicornia herbacea</i>	whole plant
화살나무	<i>Euonymus alatus</i>	branch
솔이끼	<i>Polytrichum commune</i>	whole plant
부처손	<i>Selaginella tamariscina</i>	whole plant
용설란	<i>Agave americana</i>	water tissue
복분자	<i>Rubus coreanus</i>	fruit
고추냉이	<i>Wasabia koreana</i>	whole plant
동충하초	<i>Cordyceps sphecocephala</i>	whole plant
덴드로비움	<i>Dendrobium. thyrsiflorum</i>	leaf, twig
무우	<i>Raphanus sativus</i>	root
토사자	<i>Cuscuta japonica</i> Chois	seed
인진호	<i>Artemis iaiwayomogi</i> Kitamuta	leaf, twig
삼백초	<i>Saururus chinensis</i>	leaf
결명자	<i>Cassia tora</i> L.	seed

1) 생육환경 조사 및 다량재배 개발

자생지 환경요인을 조사하고 맨드라미, red beet, 채송화, 패랭이, 홍텐구 버섯등 적색소를 갖는 식물을 확보하고 부위별로 꽃, 잎, 줄기, 뿌리, 종자, 영양기관을 분리한 다음 실험을 위한 시료로 확보한다. 생육 시기별로는 봄 (4-5월), 여름 (7-8월)등 계절에 따른 수확시기를 조사하여 다량 재배의 개발을 위한 자료로 활용한다.

2) 활성성분의 추출

계통적 용매 추출법 즉 유전율 (誘電率)이 적은 용매로부터 순차추출 (Ether, chloroform, ethanol, H₂O의 순서)하여 예비실험을 한 다음 추출 분획 연구는 식물 부위, 생육시기별 성분구성 및 농도변이 등의 실험적 자료를 확보하였다. 유용한 식물체 부위를 얻어 2배량의 정제수를 사용하여 4시간 동안 100℃의 열수로 감압 추출하여 열수 추출물로부터 필요한 농도를 얻어 생리활성실험에 사용하였다.

3) 생리활성실험

(1) 항산화 활성

활성산소 중 (Reactive oxygen species, ROS)은 생체 내에서 singlet oxygen을 함유하고 있는 물질들을 총괄하는 것으로 호르몬, 성장인자, 분화인자, neuro-transmitter와 같은 외부자극인자가 특정 세포의막에 존재하는 수용체에 결합하여 세포의 내부로 그들의 특이한 요소들을 전달하여 gene expression, cell proliferation, cell differentiation, secretion, cell motility, neurotransmission 등의 생리반응을 유도하는 세포의 신호전달물질로서 작용하기도 하지만 높은 농도에서는 세포의 산화손상을 유발하게 된다. 동물 세포 내에서는 미토콘드리아의 정상적인 전자전달과정에서 superoxide anion 등의 ROS가 생성되며, 소모되는 총 산소량의 약 2% 정도가 물로 환원되지 못하고

불충분하게 환원되어 ROS가 형성된다. 식물체내에서는 이렇게 형성된 H₂O₂가 식물의 병원균에 대한 defence mechanism을 유도하기도 한다.

활성 산소 종의 발생원인을 살펴보면 각종 스트레스, 즉 병원균이나 병충해 같은 biotic stress, 극심한 온도변화, 건조, 제초제 등의 abiotic stress, 오존, 산성비, 대기 공해물질 같은 xenobiotic stress등에 의해 catecholamine계통의 hormone, steroid hormone이 분비되고 앞으로 닥칠지 모르는 스트레스에 대비하여 생체 내 에너지 대사가 증진되고 산소 소모량이 증가하게 되어 에너지 대사 과정중 불완전하게 산소가 환원될 때 ROS가 발생되며 이로 인해 단백질이나 지질 분해 등 세포 내 거대분자를 산화시키고 DNA 합성억제, 광합성 억제, 엽록체 파괴 등 강한 산화적 손상으로 세포가 사멸하고 그 손상은 축적되어 노화, 각종 퇴행성 질환을 일으키게 된다. 또한 활성산소 종은 약물대사 효소반응(xanthine oxydase, cytochrome P450) 상에서도 발생하며, 활성산소와 항산화 방어계 간의 균형이 깨질 때, 순간적 과량의 활성산소 발생, 또는 만성적 활성산소 발생 등으로 세포 내 활성산소의 농도가 높아지면서 세포가 손상을 입게 되는 것이다.

① Electron donating ability (EDA)측정

산화성의 활성 free radical에 전자를 공여하여 산화를 억제시키는 척도인 전자 공여능을 측정하는 방법으로 Blois (1981)의 방법에 준하여 시행하였으며 비교물질로는 합성 항산화제인 BHT (butylated hydroxytoluene)과 천연 항산화제인 *α*-tocopherol을 사용하였다. 각 식물체의 용매 추출물 2 ml에 2×10^{-4} M DPPH 1 ml를 첨가하고 vortex 한 다음 실온에서 30 분간 놓아둔 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 free radical이 소거되면 흡광도가 감소된다.

$$\text{EDA} (\%) = 100 - [(\text{시료첨가구의 흡광도} / \text{무 첨가구의 흡광도}) \times 100]$$

② Nitrite-scavenging ability 측정

아질산염은 그 자체가 독성을 나타내어 일정 농도 이상 섭취하게 되면 혈액 중의 hemoglobin이 산화되어 methemoglobin을 형성하여 methemoglobin증과 같은 각종 중독증상을 일으키는 것으로 알려져 있다. 또한 단백질 식품이나 의약품 및 잔류농약 등에 존재하는 2급 및 3급 아민 등의 아민류와 반응하여 nitrosamine을 생성하는 것으로 보고되고 있는데 이들 니트로사민은 동물실험

$$N (\%) = (1 - \frac{A - C}{B}) \times 100$$

N : 아질산염 소거율

A : 1mM NaNO₂ 용액에 시료를 첨가하여 1시간 방치시킨 후의 흡광도

B : NaNO₂ 용액의 흡광도

C : 시료자체의 흡광도

결과 대부분이 발암성을 나타내는 물질로 밝혀짐으로서 주목을 끌게 되었다. 아질산염 소거능은 Kato와 김 등 (1987)의 방법에 의거하여 1 mM NaNO₂ 용액 1 ml + 0.2 ml 용매 추출물을 넣은 후 0.2 N 구연산 완충액을 사용하여 반응 용액의 pH를 3.0으로 조정하여 반응용액이 최종 부피를 10 ml로 하였다. 이 용액을 37°C에서 1시간 반응시킨 후 각 반응액을 1 ml씩 취하여 2% 초산용액 5 ml를 첨가한 다음 Griess 시약 (30% 초산으로 각각 조제한 1% sulfanilic acid 와 1% naphthylamine을 1:1로 사용직전에 조제) 0.4 ml를 가하여 잘 혼합한 다음 실온에서 15분간 방치시킨 후 520 nm에서 흡광도를 측정하여 잔존하는 아질산량을 산출하였다.

③ 지질산화 억제활성 측정

지질의 과산화물 생성 억제효과를 측정하기 위하여 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0)과 ethanol을 4:1로 혼합한 용매에 linoleic acid를 0.03 M이 되도록 첨가하여 기질용액으로 한 다음, 이 기질용액 5 ml에 0.1 M 인산 완충액 (pH 7.0) 4.8 ml와 1%의 각 시료추출액 0.2 ml를 첨가하고 40℃ 항온기에서 진탕하며 경시적으로 TBA 값을 측정하였다. 즉 일정 시간마다 반응용액 2 ml를 취하여 단백질을 침전을 위해서 35% trichloroacetic acid 0.25 ml를 첨가하고, 지방질의 산화 생성물인 MDA (malondialdehyde)와 복합체를 형성하는 발색제로 0.75% thiobarbituric acid 0.5 ml를 첨가하여 30초간 vortex하고 100℃에서 15분간 반응시킨 후 냉각시키고 acetic acid 0.25 ml과 chloroform 0.5 ml를 가하고 진탕하여 3,000 rpm에서 5분 동안 원심분리한 다음 상정액의 흡광도를 532 nm에서 측정하였다.

④ Xanthine oxidase inhibition activity

Xanthine oxidase (XOD)는 생체 내 purine대사에 관여하는 효소로써 xanthine 또는 hypoxanthine으로부터 요산을 생성하여 혈장 내 요산의 농도가 증가되면 낮은 용해성으로 인해 골절에 축적, 통증을 유발하는 고 단백 질환인 “통풍”에 걸리게 된다. 고로 단백질의 과잉섭취는 다량의 요산생성을 증대시키게 된다. 통풍치료에 사용되는 약물로써 hypoxanthine 유사체인 allopurinol과 alloxanthine은 xanthine oxidase에 강하게 결합, 요산생성 최종단계에 작용하여 효소활성을 저해하여 urate의 생성이 억제되는 것이다. Xanthine oxidase 저해활성의 측정을 위해서는 0.1 mM xanthine 0.5 ml에 50 mM 인산 완충액 (pH 7.5) 0.3 ml을 넣고 각 용매 추출물의 농도를 달리하여 0.1 ml (예, ext. 10 μ l + buffer 90 μ l)를 넣고 위의 완충액에 50배 희석한 xanthine oxidase를 가하여 37℃에서 3분간 반응시킨 후 20% TCA 100 μ l로 반응을 중단시킨

다음 생성된 urate의 흡광도를 293 nm에서 측정하였다.

(2) 정상효과

장내 세균들의 생육에 영향을 미치는 생리활성 물질의 탐색을 위하여 혐기성 배양조건 및 배양방법의 확립하고 제품개발에 활용하기 위한 기초적 데이터의 확보를 위해 사용된 균주는 장내 유익균주와 유해균주로 크게 두가지 군으로 분류하여 실험하였다. 장내 유익 균주로는 *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus thermophilus*을 사용하였고 *E. coli* MC1061와 장내 유해세균으로 *Clostridium perfringens* 3269을 사용하여 장내 세균총의 길항작용을 조사하였다. 배지는 유산균 배지 MRS, BL 또는 LB나 RCM 같은 적합한 배지를 사용하였고 anaerobic culture system으로 배양하였다. 장내 세균들의 생육에 끼친 영향은 paper-disc method와 turbidity 측정법, 생균수 측정법 등을 사용하였다.

(3) 항 미생물 활성

부패 및 병원성 미생물에 의한 피해는 여러 분야에 걸쳐서 심각한 문제로 대두되고 있는 현재 새로운 항균성 물질의 개발과 국내자생식물의 성분연구는 그 중요성을 더하고 있다. 미생물에 의하여 일어나는 식품의 부패 및 변질, 각종 질병의 감염, 신종 바이러스의 출현 등 직면하고 있는 문제의 해결을 위하여 더욱 더 많은 연구가 필요하게 되었다. 특히 식물은 매우 다양한 유용성분을 함유하고 있으며 미생물에 대한 자기방어 수단으로 항균성 물질을 생산한다고 알려져 있어 식물자원을 대상으로 항 미생물 활성물질의 탐색과 그 기작에 대한 연구의 일환으로 그 가능성 및 기능에 대한 기초를 얻고자 하였다. 항 미생물 활성측정에 사용한 균주와 배지는 다음 표 2와 같다.

Table 2. List of strains and media for antimicrobial test

Strains	Media
<i>Escherichia coli</i> MC 1061	Luria Bertany agar and broth
<i>Bacillus subtilis</i> B104	Luria Bertany agar and broth
<i>Acinetobacter lwoffii</i> PO8	Nutrient agar and broth
<i>Chromobacterium lividum</i> PI4	Nutrient agar and broth
<i>Agrobacterium rhizogenes</i> KCTC 2473	Luria Bertany agar and broth
<i>Agrobacterium rhizogenes</i> KCTC 2743	Luria Bertany agar and broth

항균성 시험은 멸균된 각각의 생육배지를 petridish에 15 ml씩 분주하여 응고시키고, 증충용 배지를 각각 5 ml씩 시험관에 분주하여 멸균한 후 50℃ 수욕상에 보관하면서 전배양한 각종 시험균액을 무균적으로 첨가하여 잘 혼합한 다음 증충용 배지 위에 분주하여 2중의 평판배지를 만들었다. 각종 식물체 추출물들을 멸균된 paper disk에 일정량씩 흡수시킨 후 시험용 평판배지 표면에 올려 놓은 다음 30℃ incubater에서 24-48 시간동안 배양한 다음 disk 주변의 clear zone (mm)을 측정하여 항균력을 검색하였다.

(4) 암세포주에 대한 세포독성

과학 기술이 발달에도 불구하고 암의 발생률과 암에 의한 사망률은 해마다 증가하고 있는 실정으로 많은 연구기관에서 천연자원으로부터의 항암성 물질에 대한 분리 및 동정에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히 암 치료에 사용되고 있는 항암제는 alkyl화 물질, 대사 길항물질, 항생물질 등이 이용되고 있는데 생체내의 암세포뿐만 아니라 정상세포 및 다른 감염증에 대한 면역을 약하게

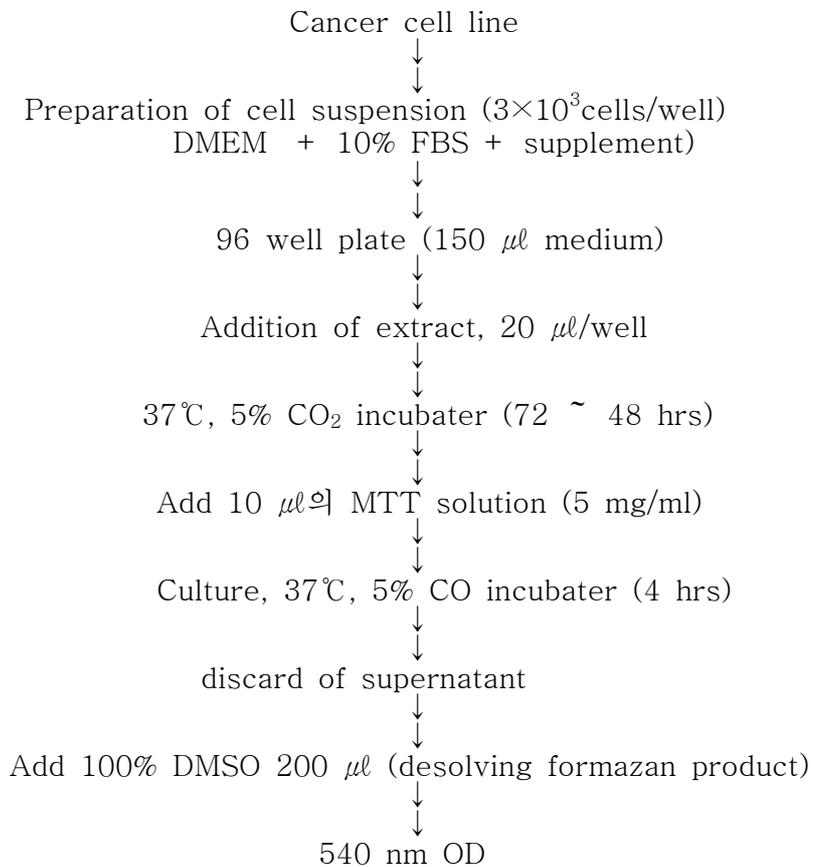


Fig. 3. Flow chart of cytotoxicity test

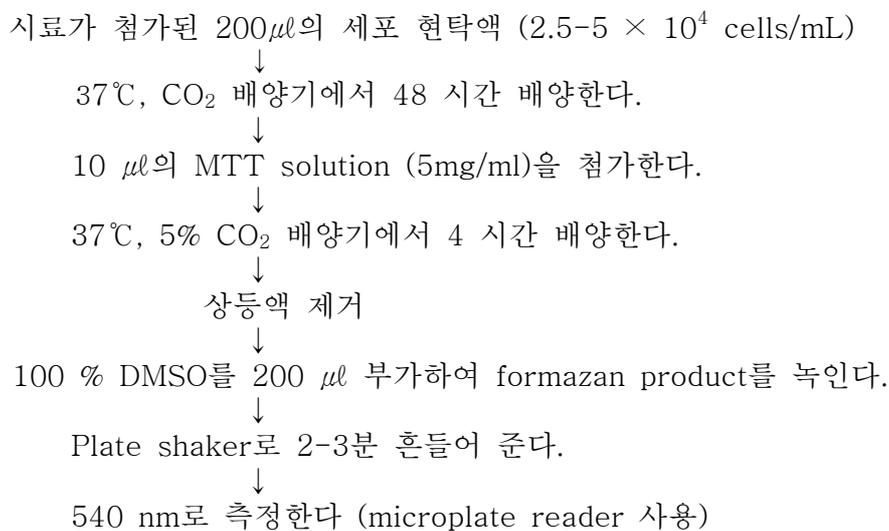
하는 부작용을 일으킨다. 따라서 면역 기능을 높여주고 암세포에만 선택적으로 작용하는 천연항암제를 식물자원으로부터 얻고자 하는 목적으로 유망한 식물들로부터 항암성 물질에 대한 screening을 실시하여 천연항암제 개발에 대한 기초연구 자료를 확보하고자 하였다.

암세포의 증식 억제 효과의 측정은 살아있는 세포 수 즉 세포 생존률을 직접 측정하는 대신 염색시약 [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetra

zoliumbromide, MTT]를 이용하여 간접적으로 살아있는 세포가 mitochondrial dehydrogenase가 황색의 수용성인 MTT를 불용성의 보라색 crystal물질인 formazan으로 변화시키는 성질을 이용한 방법을 사용하였다.

MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay

* Procedures (MTT assay에 있어서 고착세포의 경우)



황색의 수용성인 MTT를 살아있는 세포의 mitochondrial dehydrogenase가 MTT를 감소시키면서 불용성의 암청색 (혹은 보라색)의 formazon으로 변화시키는 성질을 이용한 방법으로 viability, proliferation 그리고 activation을 측정한다.

4. 조직 배양시스템

식물체의 2차 대사산물의 생산을 위해 Bioreactor를 이용하여 세포배양 (cell culture)을 하기도 하지만 이는 뿌리배양보다 생산량이 적으므로 *Agrobacterium rhizogenes* A4 strain 미생물을 이용하여 형질 전환함으로써 뿌리를 유도하여 모상근 (hairy root)을 생물반응기에 접종하고 배양하여 원하는 베타시아닌계 색소를 단기간에 대량 생산할 수 있는 최적의 조직배양 시스템을 확립코자 하였다.

1) 재료의 소독과 접종

식물의 조직을 3-4cm 크기로 정리하여 에탄올 70% 용액에서 30초간 침지하여 소독하고 멸균수로 2-3 회 세척한 다음 다시 1.0% NaOCl (차아염소산)용액에서 15분 간 침지하여 살균한 다음 다시 멸균수로 2-3 회 세척하여 멸균된 여지 위에서 물기를 완전히 제거한 다음 0.3-0.5 cm 크기로 절편을 만든다. *Agrobacterium rhizogenes* A4 strain 미생물을 24-48시간 배양한 균주 배양액에 자엽 절편을 적신 다음 MS배지 위에서 3일 정도 배양한다. *Agrobacterium rhizogenes* A4 strain 의 engineered Ti plasmid (*rol C* gene inserted)가 식물 조직 절편에 transformation 되면 항생제가 첨가된 배지에서 hairy root (모상근)을 내게 된다. 유도된 모상근을 액체배지에 접종하여 배양하면서 배양 최적조건 및 베타시아닌 색소 생산 최적 조건을 조사하였다.

2) 배지

식물의 조직이나 기관을 기내라는 특수한 환경에서 생장 증식시키기 위해서 인공영양체인 배지를 잘 만들어 사용하여야 하는데 영양분의 요구양은 식물의 종류에 따라 또는 배양조직이나 기관의 종류에 따라 크게 달라질 수 있다. 그동안 식물에 대한 조직배양 기술과 식물이나 조직에 알맞는 배지가 개발되었다. 1962년 Murashige와 Skoog에 의해 식물조직배양을 위한 MS 배지가 만들어졌

다. MS배지는 무기염류와 비타민류 그리고 에너지원을 균형있게 배합한 배지로써 지금까지 가장 널리 쓰이고 있다. 배지조성은 고등식물의 9종류 다량 필수원소 (C, H, O, N, S, P, K, Mg, Ca)와 7종류의 미량 필수원소(Fe, Mn, Cu, Zn, B, Mo, I, Ni)을 필요로 하며 그 외 식물의 극미량 필수원소와 비타민류, 에너지원을 또는 성장조정제와 첨가물(한천, 당류 등) 각각 식물에 적합하게 조제하여 배양의 최적조건을 확립하였다.

제3절. 실험결과 및 고찰

1. 식물체의 생리활성 screening의 대상식물의 선발

가. 항산화활성

자생지 환경요인을 조사하고 생육 시기별로는 봄 (4-5월), 여름 (7-8월)등 계절에 따른 수확시기를 조사하여 부위별로 꽃, 잎, 줄기, 뿌리, 종자, 영양기관을 분리한 다음 실험을 위한 시료로 준비하였다.

1) DPPH free radical scavenging activity

선정된 식물이외에 전통의서, 민간구전, 학술지 등을 기초로 활성이 있는 Table 3. Electron donating ability of extracts obtained from various plants Table 3. Electron donating ability of extracts obtained from various plants

것으로 여겨지는 식물체를 수집하여 항산화활성을 측정된 결과를 표3에 나타내었다. 각 식물체 추출물들은 열수 추출하여 동결건조 시킨 후 1000 ppm 농도로 제조하여 사용하였다. DPPH는 비교적 안정한 radical을 갖는 물질로 항산화

활성이 있는 물질과 만나면 radical이 소거되어 탈색되는 점을 이용하여 항산화

Local name	Scientific name	DPPH free radical scavenging activity	
		OD at 517 nm	activity(%)
대조구	a-tocopherol	0.759	53.1
둥굴레	<i>Polygonatum odoratum var.</i>	1.503	7.1
헛개나무	<i>Hovenia dulcis Thunb</i>	0.707	56.3
씀바귀	<i>Ixeris dentata</i>	1.403	13.3
맨드라미	<i>Celosia cristata L.</i>	1.534	5.2
시호	<i>Bupleurum falcatum</i>	0.636	60.7
석곡	<i>Dendrobium moniliforme</i>	1.217	26.8
냉이	<i>Capsella bursa-pastoris</i>	1.238	23.5
도라지	<i>Platycodon grandiflorum</i>	1.369	15.4
마	<i>Dioscorea batatas Decaisne.</i>	1.362	15.8
익모초	<i>Leonurus sibiricus L.</i>	0.835	48.4
홍화	<i>Carthamus tinctorius</i>	1.395	13.8
레드비트	<i>Beta vulgaris var.</i>	1.320	18.4
가지	<i>Solanum melongena</i>	0.778	51.9
지황	<i>Rehmannia glutinosa</i>	1.490	7.9
양파	<i>Allium cepa</i>	1.443	10.8
머위	<i>Petasites japonicus</i>	1.057	34.7
당근	<i>Daucus carota var. sativa</i>	1.474	8.9
죽순	<i>Phyllostachys bambusoides Sieb.</i>	1.535	5.1
적송	<i>Pinus densiflora</i>	1.076	33.5
리기다송	<i>Pinus rigida</i>	1.430	11.6
잣나무	<i>Pinus koraiensis</i>	1.445	10.7
해송	<i>Pinus thunbergii</i>	1.055	34.8
겨우살이	<i>Viscum album var. coloratum</i>	1.137	29.7
함초	<i>Salicornia herbacea</i>	0.869	45.8
화살나무	<i>Euonymus alatus</i>	1.427	11.8
솔이끼	<i>Polytrichum commune</i>	0.320	80.2
부처손	<i>Selaginella tamariscina</i>	1.490	7.9

Local name	Scientific name	DPPH free radical scavenging activity	
		OD at 517nm	activity(%)
용설란	<i>Agave americana</i>	0.621	61.6
복분자	<i>Rubus coreanus</i>	0.447	72.4
고추냉이	<i>Wasabia koreana</i>	1.300	19.6
동충하초	<i>Cordyceps sphecocephala</i>	0.949	41.3
덴드로비움	<i>Dendrobium. thyrsiflorum</i>	1.323	18.2
무우	<i>Raphanus sativus</i>	1.437	11.2
토사자	<i>Cuscuta japonica Chois</i>	1.063	34.3
인진호	<i>Artemis iaiwayomogi Kitamuta</i>	0.715	55.8
삼백초	<i>Saururus chinensis</i>	0.481	70.3
결명자	<i>Cassia tora L.</i>	1.448	10.5

활성을 검정하였다. 복분자는 72.4%의 높은 radical 소거활성을 나타내었고 이어서 삼백초가 70.3%, 용설란 61.6%, 시호 60.7%, 그리고 헛개나무가 56.3%, 인진호 55.8%, 함초가 45.8%의 활성을 보여주었다.

또한 인진호는 기호식품에 적용하기에는 특이하고 강력한 냄새를 가지고 있어 다소 무리가 있을 것으로 여겨진다. 한편 다른 연구자들의 보고에 의하면 일반적으로 flavonoid 또는 tannin 화합물은 항산화활성을 나타내는 것으로 잘 알려져 있다. 국내 산림자원 중 쉽게 얻을 수 있는 솔잎의 약리작용에 대해 Park (1984)의 한의서와 간장질환, 비뇨 생식기계 질환, 위장질환, 신경계질환, 순환기계질환, 피부질환등에 효과가 있다고 Kang 등 (1995)에 의해 보고되어 있고 그 외에 단백질, 지방, 인, 철, 효소, 정유 (식물성 휘발유, 테르펜계열) 미네랄, 비타민 C가 함유되어 있으며 체내의 노폐물을 배출시켜 신진 대사를 활발하게 하는 성분들이 함유되어 있다고 joungeung (1995)에 의해 알려져 있다. 이와 같은 결과를 토대로 하여 radical 소거활성이 우수한 식물체 추출물과 베타시아닌

계 색소와의 혼합병용효과를 따로 조사하였다.

Local name	Scientific name	Nitrite scavenging activity	
		OD at 520 nm	Activity(%)
석곡	<i>Dendrobium moniliforme</i>	0.571	14.2
냉이	<i>Capsella bursa-pastoris</i>	0.551	13.7
도라지	<i>Platycodon grandiflorum</i>	0.520	21.8
마	<i>Dioscorea batatas Decaisne.</i>	0.571	14.2
익모초	<i>Leonurus sibiricus L.</i>	0.644	3.1
홍화	<i>Carthamus tinctorius</i>	0.495	25.6
레드비트	<i>Beta vulgaris var.</i>	0.591	11.2
가지	<i>Solanum melongena</i>	0.619	6.8
지황	<i>Rehmannia glutinosa</i>	0.591	11.1
양파	<i>Allium cepa</i>	0.531	20.2
머위	<i>Petasites japonicus</i>	0.565	15.1
당근	<i>Daucus carota var. sativa</i>	0.534	19.7
죽순	<i>Phyllostachys bambusoides Sieb.</i>	0.608	8.5
적송	<i>Pinus densiflora</i>	0.539	19.0
리기다송	<i>Pinus rigida</i>	0.627	5.7
잣나무	<i>Pinus koraiensis</i>	0.621	6.6
해송	<i>Pinus thunbergii</i>	0.531	20.2
겨우살이	<i>Viscum album var. coloratum</i>	0.559	21.3
함초	<i>Salicornia herbacea</i>	0.451	32.2
화살나무	<i>Euonymus alatus</i>	0.416	37.4
솔이끼	<i>Polytrichum commune</i>	0.173	73.9
부처손	<i>Selaginella tamariscina</i>	0.475	28.5
용설란	<i>Agave americana</i>	0.453	31.9
복분자	<i>Rubus coreanus</i>	0.442	33.6
고추냉이	<i>Wasabia koreana</i>	0.529	20.4
동충하초	<i>Cordyceps sphecocephala</i>	0.595	22.7
덴드로비움	<i>Dendrobium. thyrsoiflorum</i>	0.518	12.8
무우	<i>Raphanus sativus</i>	0.589	11.4
토사자	<i>Cuscuta japonica Chois</i>	0.506	23.9
인진호	<i>Artemis iaiwayomogi Kitamuta</i>	0.392	41.1
삼백초	<i>Saururus chinensis</i>	0.449	32.5
결명자	<i>Cassia tora L.</i>	0.571	14.1

2) Nitrite scavenging activity

수집된 식물체 추출물로부터 아질산염 소거활성을 측정한 결과, 표4에서 보여주는 바와 같이 화살나무와 헛개나무에서 각각 37.4%, 35.8%의 높은 활성을 보였고 복분자 33.6%, 삼백초 32.5%, 함초 32.2%, 토사자와 지황도 각각 20% 이상의 비교적 높은 활성을 나타내었다. 한편 Normington 등 (1986)은 오얏에서 아질산염 소거인자인 3-hydroxy-2-pyrone을 분리한 바 있으며 ascorbic acid는 천연성분 가운데 아질산염 소거능이 뛰어난 것으로 알려져 있다. 특히,

Table 4. Nitrite scavenging activity of various plant extracts

Local name	Scientific name	Nitrite scavenging activity	
		OD at 520 nm	Activity(%)
대조구	Resorcinol	0.427	35.8
등굴레	<i>Polygonatum odoratum var.</i>	0.522	21.5
헛개나무	<i>Hovenia dulcis Thunb</i>	0.427	35.8
씀바귀	<i>Ixeris dentata</i>	0.503	24.2
맨드라미	<i>Celosia cristata L.</i>	0.528	20.6
시호	<i>Bupleurum falcatum</i>	0.519	21.9

Table 4. Nitrite scavenging activity of various plant extracts

Table 5. Lipid peroxidation inhibition activity of various plant extracts

Table 5. Lipid peroxidation inhibition activity of various plant extracts

Kang 등 (1996)은 phenolic acids 가운데 gentisic acid 와 gallic acid 6 mM 용액의 경우 사람의 위내 pH와 유사한 pH 1.2에서 아질산염 소거율이 82%와

42%를 나타낸다고 하였으며 pH 3.0에서는 소거율이 훨씬 줄어 들고 pH 6.0에서는 소거능이 소실된다고 보고하였다. 이외에도 phenolic acids들은 pH 6.0에

Local name	Scientific name	Scientific name	Decrease of MDA, TBA value (%) after 4 hours
대정솔	<i>Selaginella tamariscina</i>		10.5
양철근	a-tocopherol		25.2
농철근	<i>Agave americana</i>		11.7
뚝풀레	<i>Polygonatum odoratum</i> var.		13.07
북풀레	<i>Rubus coreanus</i>		13.8
햇깨내뽕	<i>Horselia doctria</i> Thunb		12.47
좁혀초	<i>Cordyceps sphecocephala</i>		14.92
뽕하초	<i>Ixeris dentata</i>		11.2
넝쿨라비움	<i>Dendrobium thyrsoiflorum</i>		10.2
넝쿨라비움	<i>Celosia cristata</i> L.		8.2
무우	<i>Raphanus sativus</i>		13.7
삼차자	<i>Bupleurum falcatum</i>		11.2
삼차자	<i>Cuscuta japonica</i> Choisy		13.1
선권호	<i>Dendrobium waiponifolium</i> Kitamura		13.2
삼배초	<i>Saprellum buhsiaensis</i>		14.38
결목자	<i>Gassia tora</i> L.		6.8
마	<i>Platycodon grandiflorum</i>		10.8
	<i>Dioscorea batatas</i> Decaisne.		8.3
익모초	<i>Leonurus sibiricus</i> L.		2.4
홍화	<i>Carthamus tinctorius</i>		12.1
레드비트	<i>Beta vulgaris</i> var.		5.9
가지	<i>Solanum melongena</i>		4.5
지황	<i>Rehmannia glutinosa</i>		8.3
양파	<i>Allium cepa</i>		9.2
머위	<i>Petasites japonicus</i>		11.8
당근	<i>Daucus carota</i> var. <i>sativa</i>		6.5
죽순	<i>Phyllostachys bambusoides</i> Sieb.		10.9
적송	<i>Pinus densiflora</i>		13.2
리기다송	<i>Pinus rigida</i>		13.2
잣나무	<i>Pinus koraiensis</i>		9.2
해송	<i>Pinus thunbergii</i>		12.8
겨우살이	<i>Viscum album</i> var. <i>coloratum</i>		11.4
함초	<i>Salicornia herbacea</i>		18.2
화살나무	<i>Euonymus alatus</i>		18.5
솔이끼	<i>Polytrichum commune</i>		30.6

서는 아질산염 소거작용이 급격히 감소하여 소거능이 거의 없는 것으로 나타났다고 보고한 바 있다.

3) Lipid peroxidation inhibitory activity

산화적 스트레스를 일으키는 hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$)는 Fenton 반응으로 알려진 과산화수소와 산화제일철 사이의 반응 결과 생성되며 생체 내에서 생성되는 강력한 유해 활성산소로서 탈 수소 반응을 통해서 매우 쉽게 지방질의 산화를 유발하게 된다. Malondialdehyde (MDA)는 유지 산화과정에서 생성되는 2차 산화 생성물이며, 식품학적으로 이 MDA는 유지 함유식품의 산패도 및 저장성을 측정하는 지표로 이용될 수 있으며 Minotti 등(1987)은 생물학적으로는 노화와 깊은 관련이 있다고 발표하였다. 한편 Osawa 등 (1992)과 Lee 등 (1990), Shamberger 등 (1977)은 돌연변이성과의 연관성을 발표하였고, Addis (1986)은 발암성과 지질과산화의 관련성을 논의한 바 있다. MDA의 정량분석법은 식품의 산패, 또는 산화방지제의 산화방지 효과를 측정할 수 있는 방법이며, 생물학적으로 MDA는 그 독성발현 가능성 때문에 중요하게 인식되고 있다.

지방의 산화에는 효소적 산화와 가수분해적 산화가 있으며 대부분의 경우 두 가지 형태의 산화가 모두발생하게 되고, 지방 산화 시에 많은 산화 생성물이 발생하는데 aldehyde, 과산화물, 과산화수소, 그리고 지방 알콜 등은 사람을 비롯한 모든 생물체에 잠재적인 독성 물질이 된다. 지질의 과산화 저해효과를 비교할 수 있는 방법의 하나로 사용되는 MDA 측정방법은 기질의 자동산화가 진행됨에 따라 기질 중에 형성된 2차 산화 생성물을 단독 정량하는 화학적인 분석방법으로 본 실험에서는 기질로써 linoleic acid를 사용하였다. 결과는 표5에 나타내었으며 솔이끼의 경우 자동산화보다 MDA-TBA value를 약 30.6% 정도 감소시켰으며 함초 18.2%, 화살나무 18.5%, 곰보배추 23.9% 정도 과산화지질 생성을 저해하였다.

4) Xanthine oxidase inhibition effect

Xanthine oxidase (XOD)는 생체 내 purine 대사에 관여하는 효소로써

Local name	Scientific name	XOD inhibition effect (%)
대조구	benzoic acid	18.6
둥굴레	<i>Polygonatum odoratum var.</i>	16.8
헛개나무	<i>Hovenia dulcis Thunb</i>	16.9
씀바귀	<i>Ixeris dentata</i>	17.0
맨드라미	<i>Celosia cristata L.</i>	11.8
시호	<i>Bupleurum falcatum</i>	9.1
석곡	<i>Dendrobium moniliforme</i>	10.2
냉이	<i>Capsella bursa-pastoris</i>	8.2
도라지	<i>Platycodon grandiflorum</i>	7.3
마	<i>Dioscorea batatas Decaisne.</i>	6.8
익모초	<i>Leonurus sibiricus L.</i>	1.4
홍화	<i>Carthamus tinctorius</i>	4.6
레드비트	<i>Beta vulgaris var.</i>	5.1
가지	<i>Solanum melongena</i>	16.8
지황	<i>Rehmannia glutinosa</i>	1.1
양파	<i>Allium cepa</i>	17.8
머위	<i>Petasites japonicus</i>	8.1
당근	<i>Daucus carota var. sativa</i>	3.2
죽순	<i>Phyllostachys bambusoides Sieb.</i>	6.9
적송	<i>Pinus densiflora</i>	5.9
리기다송	<i>Pinus rigida</i>	2.4
잣나무	<i>Pinus koraiensis</i>	5.7
해송	<i>Pinus thunbergii</i>	6.3
겨우살이	<i>Viscum album var. coloratum</i>	11.2
함초	<i>Salicornia herbacea</i>	7.4
화살나무	<i>Euonymus alatus</i>	12.3
솔이끼	<i>Polytrichum commune</i>	24.3
부처손	<i>Selaginella tamariscina</i>	7.1

xanthine, hypoxanthine을 산화시켜 urate를 형성하여 골절의 통증을 가져오는 통풍을 일으키는 효소인데 이 효소를 저해할 목적으로 천연물에서 많은 연구가

Local name	Scientific name	XOD inhibition effect (%)
부처손	<i>Selaginella tamariscina</i>	7.1
용설란	<i>Agave americana</i>	4.8
복분자	<i>Rubus coreanus</i>	23.7
고추냉이	<i>Wasabia koreana</i>	17.1
동충하초	<i>Cordyceps sphecocephala</i>	11.5
덴드로비움	<i>Dendrobium. thyrsiflorum</i>	9.2
무우	<i>Raphanus sativus</i>	3.7
토사자	<i>Cuscuta japonica Chois</i>	14.3
인진호	<i>Artemis iaiwayomogi</i> <i>Kitamuta</i>	8.5
삼백초	<i>Saururus chinensis</i>	11.4
결명자	<i>Cassia tora L.</i>	2.3

진행되어 왔다. Hayashi 등(1988)은 식물계 내에 널리 존재하는 flavonoid류를 분리하고 xanthine oxidase 저해효과를 관찰한 결과 hydroxy기의 위치에 따라 저해능의 효과가 다르다는 것을 보고한 바 있다. 또한 Hatano 등 (1991)은

Table 6. Xanthine oxidase inhibition effect of several plant extracts

Table 6. Xanthine oxidase inhibition effect of several plant extracts

gallol기를 함유한 flavonoid 화합물이 XOD에 경쟁적으로 저해한다고 보고하였다. Noro 등 (1988)은 팔꽃나무의 꽃과 눈으로부터 분리된 genkwanin, luteolin이 XOD에 강한 저해효과가 있다고 보고하였다.

이에 단백질 과잉섭취에 의한 현대병의 하나인 통풍의 예방연구의 차원에서 효소 저해능을 갖는 식물체를 선별하기 위하여 1차년도에 이어 수십종의 식물체를 대상으로 xanthine oxidase inhibitory effects를 실험한 결과 저해효과를 나타낸 식물들을 표 6에 보여주고 있다. 솔이끼와 복분자는 24.3%와 23.7%의 높은 XOD 저해효과를 보여주고 있으며 헛개나무와 화살나무도 16.9%, 14.3%로 비교적 높게 나타났다. XOD와 xanthine, hypoxanthine 과 같은 기질과의 반응은 일반적으로 radical 형성반응으로 알려져 있다. Xanthine/ xanthine oxidase-cytochrome C 반응계에서 측정되는 superoxide anion radical에 대한 소거효과는 어떤 물질에 의해 반응 계 자체가 억제될 경우, xanthine oxidase의 활성이 저해되는 경우 그 물질의 실제 라디칼 소거효과보다 높은 활성으로 나타나게 된다. Xanthine oxidase를 억제하는 물질과 radical 소거능을 나타내는 물질들이 동일물질이라고 생각할 수 없으며, Hatano 등 (1989)은 효소의 저해활성과 radical 소거활성 사이의 상관관계는 찾을 수 없지만 xanthine oxidase를 강하게 저해하는 ellagic acid 와 같은 tannin 및 관련물질들이 라디칼 소거능도 공유한다고 한 바 있다.

이와 같이 천연물로부터 새로운 통풍치료제의 개발을 목적으로 각종 생리활성의 효과가 인정되고 우리와 쉽게 접할 수 있는 식물체의 생리활성물질에 대한 탐색과 작용 기작에 대한 연구가 절실하다. 각 추출물들은 식물체에 따라 XOD 활성 저해 효과가 매우 다르게 나타났으며 어떤 식물체는 오히려 효소의 활성을 증가시켜 주는 activater로 작용하기도 하므로 이에 대한 연구가 필요하다. 이와 같이 천연물로부터 새로운 통풍치료제의 개발을 목적으로 각종 생리활성의 효과가 인정되고 우리와 쉽게 접할 수 있는 식물체의 생리활성물질에 대한 탐색과 작용 기작에 대한 연구가 절실하다. 각 추출물들은 식물체에 따라 XOD 활성저해 효과가 매우 다르게 나타났으며 어떤 식물체는 오히려 효소의 활성을 증가시켜 주는 activater로 작용하기도 하므로 이에 대한 연구가 필요하다.

5) 향미생물 활성화

Local name	Strains				
	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>A. Iwoffii</i>	<i>C. lividans</i>	<i>A. rhizogenes</i>
	MC1061	B106	PO8	PI4	KCTC 2743
등굴레	-	-	-	-	-
헛개나무	-	+	-	-	-
씀바귀	+	-	-	+	+
맨드라미	-	-	-	-	-
시호	-	+	-	-	-
석곡	+++	-	+++	+++	+++
냉이	-	+	-	-	-
도라지	-	-	-	-	+
마	-	-	-	+	-
익모초	+	-	+	+	+
홍화	-	-	-	-	-
레드비트	++	+	+	+	-
가지	-	-	-	-	-
지황	+	-	-	-	-
양파	+	-	-	-	-
머위	+	+	-	-	-
당근	-	+	-	++	-
죽순	-	-	-	-	-
적송	+	+	++	+++	+
리기다송	-	++	-	-	-
잣나무	-	+	-	++	-
부처손	+	+	-	-	+

부패 및 병원성 미생물에 의한 피해는 여러 분야에서 직면하고 있는 심각한 문제이며 이러한 유해 미생물의 증식을 억제시키기 위한 항균제로는 주로 인공 합성품이 사용되고 있으나 경우에 따라 그 안전성이 문제로 제기되고 있다. 따라서 안전성에 문제가 없는 천연의 향미생물 활성물질의 개발이 요구됨에 따라

우리나라에서 자생하고 있는 식물자원을 대상으로 항미생물 활성물질을 찾으려

Local name	Strains				
	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>A. Iwoffii</i>	<i>C. lividans</i>	<i>A. rhizogenes</i>
	MC1061	B106	PO8	PI4	KCTC 2743
용설란	-	-	-	+	+
복분자	+	+	-	-	-
고추냉이	-	+	-	-	-
동충하초	+	+	+	-	+
덴드로비움	+	-	-	+	-
무우	-	-	-	-	-
토사자	+	-	-	-	+
인진호	+	++	+	-	-
삼백초	+	+	+	+	+
결명자	-	-	-	+	-

Table 7. Antimicrobial activity of the water extracts from several plants.

Growth zone diameter >20mm, ---, strong inhibition; 15-20mm, --, moderate inhibition; 5-14mm, -, weak inhibition; <4, N, no response, +, thick growth than surrounding, ++, more thick growth than surrounding.

Table 7. Antimicrobial activity of the water extracts from several plants.

Growth zone diameter >20mm, ---, strong inhibition; 15-20mm, --, moderate inhibition; 5-14mm, -, weak inhibition; <4, N, no response, +, thick growth than surrounding, ++, more thick growth than surrounding.

는 시도가 계속되어야 한다. 이러한 요구에 부응하여 우리도 항미생물 활성물질의 탐색을 시도하였다. 항미생물 활성의 검정은 그람양성과 그람음성세균 5종을 대상으로 Fisher의 paper disc (3MM, Whatman) 방법 (1985)으로 측정하였다.

식물체의 열수 추출물로 항미생물 활성을 측정 한 결과는 표 7에서 보여준 것과 같다. 표 7과 같이 석곡의 열수추출물은 그람양성 세균 *Bacillus subtilis* B106에 대해서는 항균력을 보이지 않았지만 그 외의 그람음성 세균 모두에 대하여는 강한 항균력을 나타내었다. 레드비트 역시 *Agrobacterim rhizogenes*KCTC 2743을 제외한 그람 양성세균과 음성세균에서 고른 항균력을 나타내었다. 소나무과 식물들은 주로 그람양성과 음성세균 모두에서 항균력을 보여주었다. 특히 적송과 해송은 비교적 강한 항균 활성을 나타내 앞으로 연구를 더욱 진행해야 할 것이다. 삼백초 역시 그람 양성과 그람음성 세균에서 모두 항균력을 나타내었다. 화살나무와 솔이끼도 좋은 항균력을 나타내어 항미생물 활성에 대한 후속의 연구가 있게 된다면 좋은 결과를 얻을 수 있을 것이다. 둥굴레, 가지, 지황 등의 식물체 추출물들은 그람 양성 균과 음성균 모두에서 항균활성을 나타내지 않았다. 죽순과 무의 열수 추출물 역시 그람양성과 그람음성 세균 모두에서 항균활성을 보여주지 않았다.

한편 data에서 보여주지 않았지만 둥굴레의 경우 날것 그대로 사용했을 때와 볶았을 때 같은 농도로 추출하여 실험한 결과는 매우 특이한 결과로써, 둥굴레 날것을 열수 추출했을 때는 그람양성균이나 그람음성균 모두에서 전혀 항균력을 발휘하지 못했으나 둥굴레 뿌리를 잘게 자른 뒤 풍건한 다음 배조했을 때 추출물의 항균력은 그람양성균과 그람음성균 모두에서 넓은 항균스펙트럼을 갖는 것으로 나타났다. 이는 다당류를 많이 함유하고 있는 둥굴레를 볶는 과정에서 열에 의한 화학적 변화와 함께 Maillard 반응과 같은 화학적 활성물질에 의한 변성이 일어나 미생물에 대한 항균력을 지니게 된 것으로 생각된다. 한편, Kuk 등 (1997)은 솔잎에서 항미생물 활성을 갖는 benzoic acid를 분리, 동정하여 발표한 바 있다.

6) 항암활성

생체 내에서 독성이나 부작용이 적을 것으로 생각되는 식품 중에서 돌연변이 유발 억제효과 항암 효과에 대한 연구는 계속 진행되고 있는 가운데 식물류

Local name	inhibition rate (%)				
	Hep 3B	Cas KI	HeLa 229	SNU-C ₂ A	Detroit 551
등굴레	20.1	N	N	2.1	N
헛개나무	22.8	30.4	47.8	8.4	12.8
씀바귀	17.1	20.1	15.7	22.8	6.7
맨드라미	N	15.2	10.2	12.7	N
시호	31.1	22.9	21.4	N	N
석곡	24.1	20.6	27.7	18.4	11.8
냉이	8.5	N	N	7.5	N
도라지	N	N	N	14.9	6.9
마	21.6	30.2	23.7	12.1	5.8
익모초	22.8	4.2	3.0	20.1	11.7
홍화	38.3	18.6	13.4	14.2	19.3
레드비트	22.1	15.1	20.0	31.8	21.0
가지	N	N	N	N	N
지황	N	N	N	4.8	N
양파	41.5	32.1	17.2	30.8	34.1
머위	N	N	N	17.1	N
당근	N	N	N	N	N
죽순	N	6.5	6.3	19.0	5.9
적송	34.1	12.7	15.9	20.7	N
리기다송	11.2	8.7	N	N	N
잣나무	34.2	10.7	20.1	N	N
해송	18.4	10.6	8.5	11.8	16.9
겨우살이	22.7	30.1	26.7	14.6	10.4
함초	7.4	11.8	8.3	31.5	20.1
화살나무	16.2	24.5	35.2	10.2	16.3
솔이끼	30.3	65.2	49.6	25.5	22.8
부처손	N	N	N	17.5	N

에 존재하는 항암 성분으로는 B-carotene, vitamin C 등의 비타민류, cystine, dietary fiber 류, polyphenol 류, indole 류, peroxidase, protease inhibitor,

Local name	inhibition rate (%)				
	Hep 3B	Cas KI	HeLa 229	SNU-C ₂ A	Detroit 551
용설란	N	N	N	20.4	32.9
복분자	27.5	58.7	32.6	30.1	27.4
고추냉이	N	N	N	N	N
동충하초	30.2	N	N	17.3	7.2
덴드로비움	10.2	14.1	8.9	10.9	15.1
무우	7.2	N	N	18.1	4.0
토사자	16.8	32.1	13.8	N	N
인진호	65.4	20.6	4.9	20.7	N
삼백초	58.5	34.8	9.7	N	N
결명자	N	N	N	10.3	N

식물 sterol 등이 보고되고 있다. 이에 따라 우리도 천연 식물자원으로부터 생리

Table 8. Growth inhibitory effect of water extracts from various plant plants on human cancer cell lines.

Table 8. Growth inhibitory effect of water extracts from various plant plants on human cancer cell lines.

활성 물질의 개발에 관한 연구의 일환으로 국내산 식물자원의 암세포에 대한 세포독성을 검색하였다.

암세포의 증식 억제 효과의 측정은 살아있는 세포 수 즉 세포 생존률을 직접 측정하는 대신 염색시약 [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT]를 이용하여 간접적으로 살아있는 세포가 mitochon-

drial dehydrogenase가 황색의 수용성인 MTT를 불용성의 보라색 crystal물질인 dark blue formazan으로 변화시키는 성질을 이용한 방법을 사용하였다. 항암활성의 탐색을 위한 결과는 table 8에 나타내었다.

MTT assay는 cell의 생육 및 분화를 측정하는 colorimetric assay로서 살아있는 cell의 미토콘드리아 내 dehydrogenase enzyme가 노란 수용성 물질인 식물체의 물 추출물을 시료로 0.22 μ m pore size membrane으로 filtering 한 다음, 간암세포인 Hep3B에 대하여 성장억제 효과를 조사한 결과 등굴레는 20.1%, Red beet 22.1%, 양파 41.5%의 성장억제 효과를 나타내었다. 또한 인진호에서 65.4%, 삼백초에서 58.5%로 높게 나타나 이들 식물에 대한 후속의 연구가 기대된다. 소나무과 식물체의 경우는 잣나무 34.2%, 리기다 11.2%, 적송 34.1%, 해송 18.4%의 성장억제효과를 보여주었다. 한편 자궁경부암 세포인 Cas KI 대한 성장 억제효과는 헛개나무와 국산 마에서 각각 30.4%, 30.2%의 성장억제효과를 보여 주었고, 소나무과 식물에서는 잣나무 10.7%, 리기다 8.7%, 적송 12.7%, 해송이 10.6%의 성장 억제효과를 나타내었다. 양파와 겨우살이에서 각각 32.1%, 30.1%의 암세포에 대한 세포독성을 나타내었다. 특별히 솔이끼와 복분자에서 자궁경부암 세포인 Cas KI에 대한 암세포 성장저해효과가 각각 65.2%, 58.7%로 높게 나타나 이들에 대한 깊이 있는 연구가 요구된다. HeLa 229에 대해서는 헛개나무가 47.8%, 화살나무 35.2%, 솔이끼 49.6%로 비교적 높은 암세포 독성을 나타내었다.

한편, Kim 등 (1998)은 적송(*Pinus densiflora*), 잣나무 (*Pinus koraiensis*), 리기다 (*Pinus rigida*), 해송 (*Pinus thunbergii*)의 솔잎 추출물 *in vitro* 계에서 암세포 성장 억제 효과를 조사하여 발표하였는데, 솔잎의 ethanol 추출물들은 농도가 증가함에 따라 폐암, 간암, 위암, 유방암 세포에 대한 성장억제율이 증가함을 보여 주었고 현미경의 관찰 하에서 암세포의 변화는 세포막의 경계가 흐트러지는 사멸 현상을 보였다고 보고하였다. 이와 같은 결과를 기초로 하여 식물

체의 diethylether 추출물과 ethanol 추출물의 세포성장 억제 효과를 탐색하여야 할 것이며 아울러 추출물의 농도를 높여 주었을 때 암세포에 대한 성장억제 효과는 더욱 증가할 것이다. 특히 우리 주변에서 쉽게 얻을 수 있는 솔잎의 암세포 성장억제효과는 비교적 높게 나타났으며 암 세포주에 대한 항암 활성 스펙트럼의 범위도 조사되어야 할 것이다.

대장암 세포주인 SNU-C₂A에 대해서는 red beet가 31.8%, 양파에서 30.8%, 복분자 30.1%의 성장저해효과를 나타내었다. 이들 물질들의 섭취는 대장암의 발병율을 저하시키는 것과는 상당한 연관이 있을 것으로 사료된다.

나. 정장효과

1) 정장효과

식물체 추출물이 혐기성 조건 하에서 자라는 장내세균 중에 장내 유익균주와 유해균주의 성장에 미치는 영향을 조사하였다. 미생물에 대한 생육효과는 몇 가지 방법으로 조사할 수 있는데, 가장 간단한 paper-disc method는 육안으로 바로 확인할 수 있다는 장점이 있지만 정량적 data를 얻을 수 없다는 단점이 있고 생균수 측정법은 비교적 정확하고 정량적 data를 얻을 수는 있지만 시간이 많이 소요되고 여러 단계를 거쳐야 된다는 단점이 있다. Turbidity 측정법은 생균수 측정법과 함께 응용한다면 간단하면서 비교적 정확한 정량적 data를 확보할 수 있다. 여기에서는 1차 년도와 같이 paper-disc 방법으로 각 식물체 추출물들을 장내세균에 대한 정장효과를 측정한 결과를 표9에 보여주었다. 맨드라미꽃의 주된 색소 성분인 베타시아닌의 장내세균에 대한 정장효과는 기대에 미치지 못하는 결과를 보였다. 그러나 식물체 시료의 각 제조된 농도가 1,000 ppm의 아주 낮은 농도로 제조된 점을 감안하면 추출물의 농도를 높임으로써 장내 유익세균의 생육촉진효과를 얻을 수 있을 것으로 사료된다. 베타시아닌계

색소를 많이 함유하고 있는 red beet는 정장효과가 있는 것으로 확인되며 등골레, 복분자, 솔이끼, 합초 등도 정장효과가 있어 앞으로 더욱 연구할 대상식물이

Local name	Intestinal bacteria strains			
	<i>Lactobacillus casei</i> 911	<i>Streptococcus thermophilus</i> ST 5	<i>Bifidobacterium longum</i> terium	<i>Clostridium perfringens</i> 3269
	LC	ST 5	longum	3269
<i>Polygonatum odoratum</i> var.	+	+	+	-
<i>Hovenia dulcis</i> Thunb	N	+	N	-
<i>Ixeris dentata</i>	N	N	+	-
<i>Celosia cristata</i> L.	N	+	N	N
<i>Bupleurum falcatum</i>	-	N	N	-
<i>Dendrobium moniliforme</i>	N	+	+	N
<i>Capsella bursa-pastoris</i>	N	N	N	-
<i>Platycodon grandiflorum</i>	+	+	N	-
<i>Dioscorea batatas</i> Decaisne.	+	+	N	N
<i>Leonurus sibiricus</i> L.	-	N	N	---
<i>Carthamus tinctorius</i>	+	+	+	-
<i>Beta vulgaris</i> var.	++	++	+	--
<i>Solanum melongena</i>	N	N	N	N
<i>Rehmannia glutinosa</i>	N	N	+	N
<i>Allium cepa</i>	+	+	N	-
<i>Petasites japonicus</i>	+	N	N	N
<i>Daucus carota</i> var. <i>sativa</i>	+	+	+	-
<i>Phyllostachys bambusoides</i> Sieb.	+	+	+	+
<i>Pinus densiflora</i>	N	N	-	-
<i>Pinus rigida</i>	N	N	N	N

다. 아울러 베타시아닌계 색소를 많이 함유한 맨드라미와 red beet를 중심으로 정장효과가 높게 나타난 식물체 추출물을 함께 병용한다면 정장효과는 더욱 높아질 것으로 여겨져 조사한 결과를 표 11에 나타내었다.

Table 9. The growth effect on harmful intestinal bacteria and lactic acid-producing bacteria by various plant extracts

Local name	Intestinal bacteria strains			
	<i>Lactobacillus casei</i> 911	<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Clostridium perfringens</i> 3269
	LC	ST 5		
<i>Pinus koraiensis</i>	N	+	N	-
<i>Pinus thunbergii</i>	+	N	+	-
<i>Viscum album var. coloratum</i>	N	+	N	N
<i>Salicornia herbacea</i>	N	+	+	-
<i>Euonymus alatus</i>	N	+	+	-
<i>Polytrichum commune</i>	+	++	+	-
<i>Selaginella tamariscina</i>	N	N	N	N
<i>Agave americana</i>	+	N	+	-
<i>Rubus coreanus</i>	+	+	++	-
<i>Wasabia koreana</i>	N	+	N	N
<i>Cordyceps sphecocephala</i>	++	+	+	-
<i>Dendrobium. thyrsoiflorum</i>	N	+	N	-
<i>Raphanus sativus</i>	++	+	+	-
<i>Cuscuta japonica Chois</i>	N	N	N	N
<i>Artemis iaiwayomogi Kitamuta</i>	-	N	-	-
<i>Saururus chinensis</i>	+	N	N	N
<i>Cassia tora L.</i>	N	N	N	N

^aThey were cultured on MRS broth agar at 37°C for 2 days in anaerobic jar. Growth zone diameter >20mm, ---, strong inhibition; 15-20mm, --, moderate inhibition; 5-14mm, -, weak inhibition; <4, N, no response, +, thick growth than surrounding, ++, more thick growth than surrounding.

Table 9. The growth effect on harmful intestinal bacteria and lactic acid-producing bacteria by various plant extracts

^aThey were cultured on MRS broth agar at 37°C for 2 days in anaerobic

jar. Growth zone diameter >20mm, ---, strong inhibition; 15-20mm, --, moderate inhibition; 5-14mm, -, weak inhibition; <4, N, no response, +, thick growth than surrounding, ++, more thick growth than surrounding.

이와 같은 결과에 의해 맨드라미색소와 red beet, 복분자, 무즙을 혼합하여 정장효과를 조사하여 밝히고 특히 무와 red beet의 경우 다당체가 정장효과에 중요한 역할을 하는 것으로 분자량 2,000 D 이상의 다당체를 얻어 정장효과를 검토하였다.

2) 베타시아닌계 색소의 정장효과

일반에게는 베타시아닌계 색소가 정장효과에 있는 것으로 알려져 있어 이를 확인하고자 색소를 다량 함유한 맨드라미꽃과 red beet로부터 붉은 색을 띠는 베타시아닌계 색소만을 따로 분리하여 정장효과를 조사하였다. 표10에 보여준

Material	Intestinal bacteria strain ^{a)}			
	<i>Lactobacillus casei</i> 911	<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Clostridium perfringens</i> 3269
	LC	ST5		
Cockcomb flower	N	+	N	N
Betacyanine from cockcomb flower	N	N	N	N
<i>Beta vulgaris var.</i>	++	+	+	--
Betacyanine from <i>Beta vulgaris var.</i>	N	N	N	N

바와 같이 베타시아닌계 색소의 정장효과는 기대와는 달리 거의 정장효과를 보이지 못하는 것으로 나타났다. Red beet의 경우 장내유익세균의 생육을 도와

Table 10. The growth effect on harmful intestinal bacteria and lactic acid-producing bacteria by betacyanine isolated from cockcomb flower and *Beta vulgaris* extracts

^{a)}They were cultured on MRS broth agar at 37°C for 2 days in anaerobic jar. Growth zone diameter >20mm, ---, strong inhibition; 15-20mm, --, moderate inhibition; 5-14mm, -, weak inhibition; <4, N, no response, +, thick growth than surrounding, ++, more thick growth than surrounding. 정장효과를 나타낸 것은 베타시아닌계 색소의 영향이 아니라 오히려 식물체가 함유하고 있는 풍부한 다당류의 영향으로 보여진다. 이와 같은 결과로 다시 red beet로부터 다당류만을 얻어 장내세균의 생육에 미치는 다당류의 효과를 조사하였다.

3) 다당류의 정장효과

Material	Intestinal bacteria strain ^{a)}			
	<i>Lactobacillus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Clostridium</i>
	casei 911 LC	thermophilus ST5	longum	perfringens 3269
Cockcomb flower	N	+	N	N
polysaccharides from cockcomb flower	+	++	+	-
<i>Beta vulgaris</i> var.	++	+	+	--
polysaccharides from <i>Beta vulgaris</i> var.	+++	++	+	--
Onion	+	+	N	-
polysaccharides from onion	++	+	+	--

Red beet와 무의 즙액 추출물로부터 에탄올 침전법 등으로 얻어진 당의 정장효과를 조사하기 위하여 식물체 추출물을 대조군으로 하고 분리한 다당류와의

Table 11. The growth effect on harmful intestinal bacteria and lactic acid-producing bacteria by polysaccharides isolated from cockcomb flower, onion and *Beta vulgaris* extracts

^{a)}They were cultured on MRS broth agar at 37°C for 2 days in anaerobic jar. Growth zone diameter >20mm, ---, strong inhibition; 15-20mm, --, moderate inhibition; 5-14mm, -, weak inhibition; <4, N, no response, +, thick growth than surrounding, ++, more thick growth than surrounding. 정장효과를 비교하였다. 즙액 추출물로부터 다당류를 얻기 위해 다음과 같은 과정을 거쳤다. Red beet와 무, 양파의 즙액 추출물을 각각 8,000×g에서 30분간 원심 분리하여 precipitate를 제거하고 그 상징액에 2배량의 99% ethanol로 다당류를 저온에서 침전시키고 다시 10,000×g에서 20분간 원심분리 한 다음 70% ethanol로 2회 세척하였다. 세척한 후 증류수에 녹여 투석한 다음 냉동 건조하였다. 이렇게 얻은 조다당류를 다시 증류수에 녹여 CPC (cetyl pyridinium chloride) 0.3% 농도의 양이온 세제로 침전시킨 후 침전물을 증류수에 녹여 투석하고 냉동 건조하였다. 이렇게 얻어진 조다당류를 같은 농도의 즙액 추출물과 비교하며 장내세균의 생육에 미치는 다당류의 효과를 비교 조사하여 표11에 나타내었다. 표 11에서 나타낸 바와 같이 다당류를 추출하여 장내세균의 생육에 미치는 영향을 조사한 결과는 식물체 전체 추출물보다 다당류만을 추출하여 같은 농도의 배지에서 배양했을 때 장내유익세균의 생육은 현저히 증가했으며 장내 유해세균의 일종인 *Clostridium perfringens* 3269의 생육은 감소시키는 효과가 뚜렷하게 나타났다. 이와 같은 결과는 다당류들이 장내 유익균주들의 생육을 위한 feeding에 유용하게 사용되며 이러한 장내 유익 균주의 생육이 장내유해세균에 대하여는 길항작용을 나타내어 생육을 억제하는 것으로 보여진다.

4)분자량에 따른 정장효과

Red beet와 무의 즙액 추출물로부터 에탄올 침전법 등으로 얻어진 당을 분자량 2,000 이하의 올리고당과 전체 다당류로 분리한 다음 정장효과를 비교하였다. 흡광도 660nm에서 0.5-0.6가 되도록 배양한 seed culture를 1% 접종하여 배양하였고 대조구는 배지에 별도로 당을 첨가하지 않고 비교군은 1,000 ppm 농도로 제조된 당을 배지에 20%되도록 첨가하였고 분자량에 따라 분리하지 않은 전체 polysaccharide를 같은 1,000 ppm 농도로 제조하여 20%가 되도록 첨가하여 3일간 배양한 후 생육에 미치는 영향을 660nm에서 흡광도를 측정하여 비교 조사하였다. 표 12에 나타낸 바와 같이 red beet와 무의 경우 M.W. 2,000 이하에서 정장효과는 125% 미만으로 나타나 대조구에 비해 그 영향이 그다지 큰 것은 아니며 M.W. 2,000이하의 다당류만 있는 것보다 M.W. 2,000 이상의 다당류와 분자량이 작은 올리고당이 포함된 전체 polysaccharides에서 정장효과가 더욱 우수한 것으로 나타났다. 그러나 장내 유익세균들이 분자량

		Relative growth rate (%)		
		<i>Lactobacillus casei</i> 911 LC	<i>Streptococcus thermophilus</i> ST5	<i>Bifidobacterium longum</i>
	control	100	100	100
Red beet	whole polysaccharide	173.4	162.4	163.3
	below M.W. 2,000	123.2	121.8	115.9
Radish	whole polysaccharide	162.2	156.8	152.3
	below M.W. 2,000	117.3	120.2	116.8

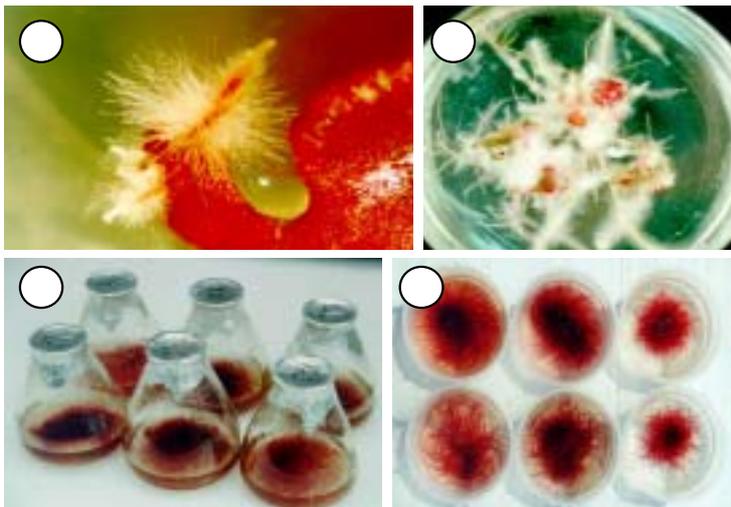
2,000 이상의 polysaccharides를 분해할 수 있는 다당류 분해효소를 가지고 있는 것으로 보여져 앞으로의 연구가 더욱 필요하다.

Table 12. The growth effect of molecular weight of polysaccharides on harmful intestinal bacteria and lactic acid-producing bacteria.

다. 모상근 배양에 의한 베타시아닌계 색소의 생산

1. Transformation

식물체 유래의 천연 적색소인 베타시아닌계 색소를 대량생산하기 위하여 조직 배양을 통한 배양조건의 검토 및 생산 공정을 최적화한 배양시스템을 확립하고자 하였다. 특히 Bioreactor를 이용한 2차 대사산물의 생산을 위해서는 세포 배양 (cell culture)의 경우 생산량이 적으며 뿌리 배양에 의한 생산은 생장이 빠



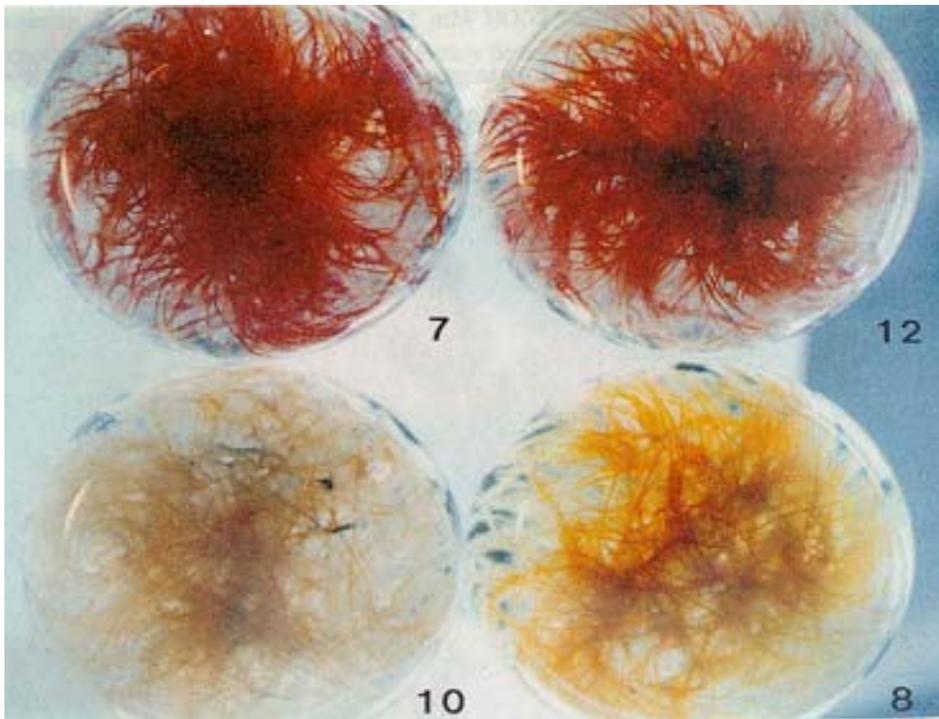
르고 생산량이 많다. 뿌리배양의 경우 식물 성장조절제 (plant growth regulator, hormone)를 이용한 뿌리유도로 부정근(adventitious root)을 배양할

수 있으나 최근에는 *Agrobacterium rhizogenes* strain 같은 미생물을 이용한

A B
C D

Fig. 3. Induction of hairy root by *Agrobacterium rhizogenes* .

형질전환으로 뿌리를 유도하여 모상근 (hairy root)을 배양하므로써 생산량을 많이 증가시킬 수 있게 되었다. 본 연구에서는 그림 3에서 보는 바와 같이 식물체 조직의 절편위에 *Agrobacterium rhizogenes* 균주를 co-culture 하여 뿌리 생성을 유도하는 *rol C* gene이 식물체 chromosome 내에 도입되도록 한 다

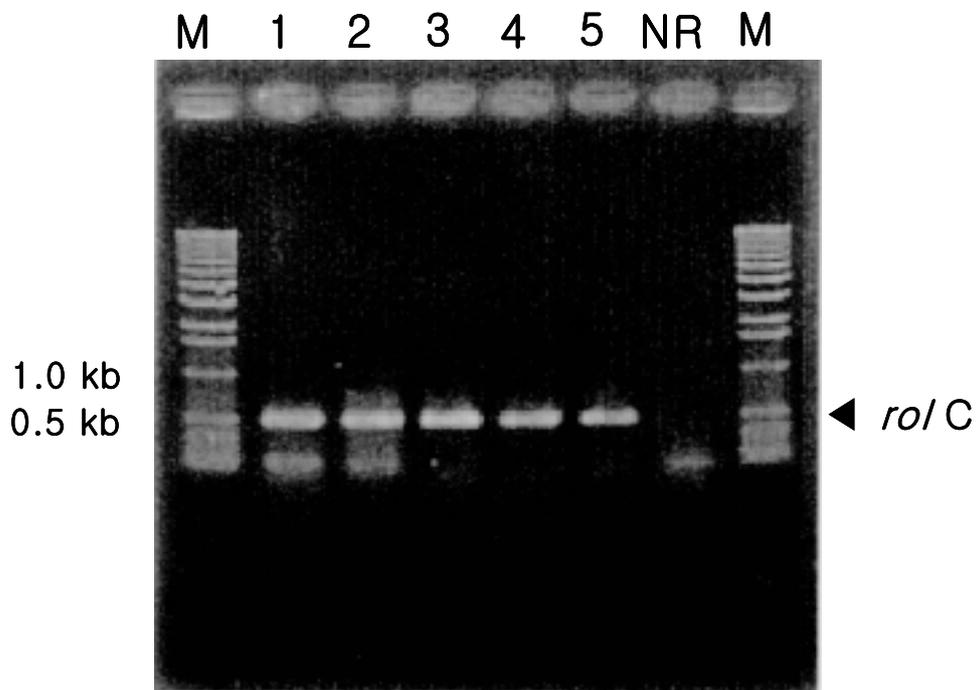


음 생성되는 hairy root를 얻어 MS liquid medium 에 배양하였다. 그림 3의 A 와 B는 solid MS medium 위에서 red beet의 leaf segment로부터 hairy root

를 유도한 것이며 C와 D는 1/4 MS liquid medium에서 배양하여 얻어진 모상근이다.

Fig.4. Defference of color strength and variety of betalain pigments on seleted hairy root shoot of red beet.

또한 *Beta vulgaris* L. 의 형질 전환된 leaf segment에서 싹트는 hairy root 중에 어떤 것을 선택하는가에 따라 그림 4에서 보여주는 바와 같이 적색소인 betacyanin 또는 적황색소인 betaxanthine 의 색소 생성비율이 달라지며 색소

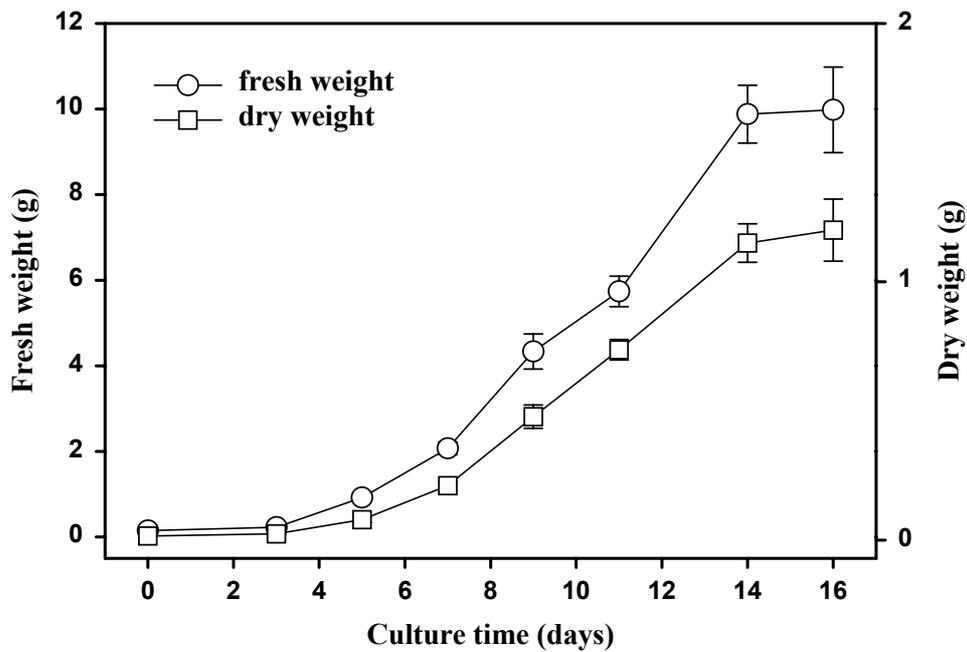


생산량도 달라지므로 색소의 생성을 위해 우수한 모상근 shoot를 선발하는 것이 무엇보다 중요하다고 보여진다. 그림 5는 *Agrobacterium rhizogenes* 의 *rol C*

gene을 red beet에 형질전환시켜 hairy root로부터 DNA를 추출한 다음 PCR 하여 *rol C* gene을 확인한 결과이다. lane 1에서 5까지는 형질 전환된 hairy root로부터 얻어진 DNA이며 약 0.5 kb 의 *rol C* gene을 확인할 수 있었다.

Fig. 5 Polymerase chain reaction analysis of the hairy roots transformed with *A. rhizogenes*. M, 1Kbp marker; lane 1-5, transgenic root; NR, normal root.

NR은 wild type의 red beet에서 얻은 DNA이므로 0.5 kb의 *rol C* gene에 해당하는 band를 발견할 수 없었다. 따라서 생물공학적인 기술을 이용한 모상근 대



량증식 및 betacyanin 생산 기술은 천연색소의 산업적 생산과 이용에 많은 기

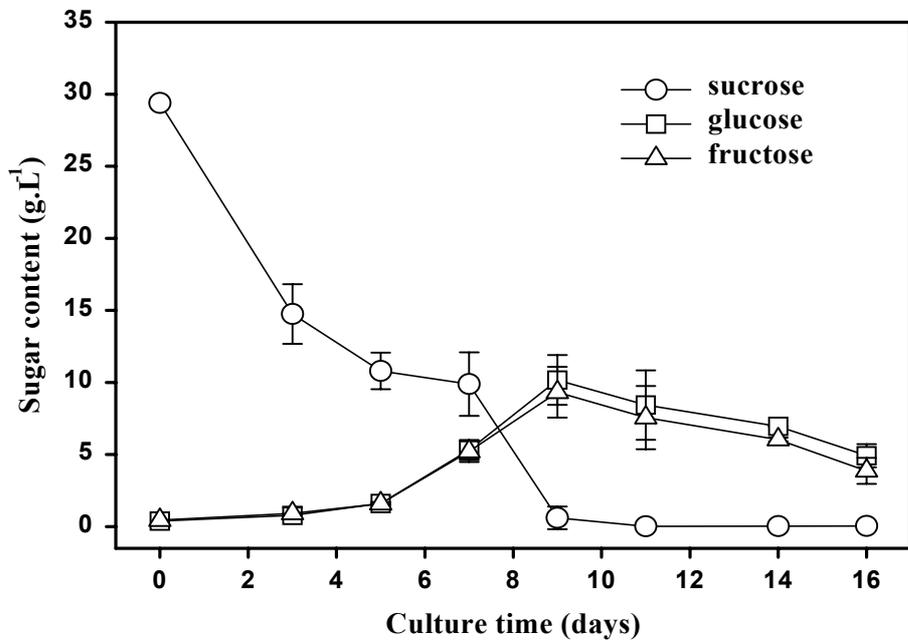
여를 하게 될 것이다.

2. 베타시아닌계 색소의 조직배양 시스템

1) 배양기간

배양기간에 따른 베타시아닌계 색소의 최적조건을 검토하기 위하여 20일까지

Fig. 6. Growth of red beet hairy roots in liquid culture. Bars represent means±S.E. of three replications.

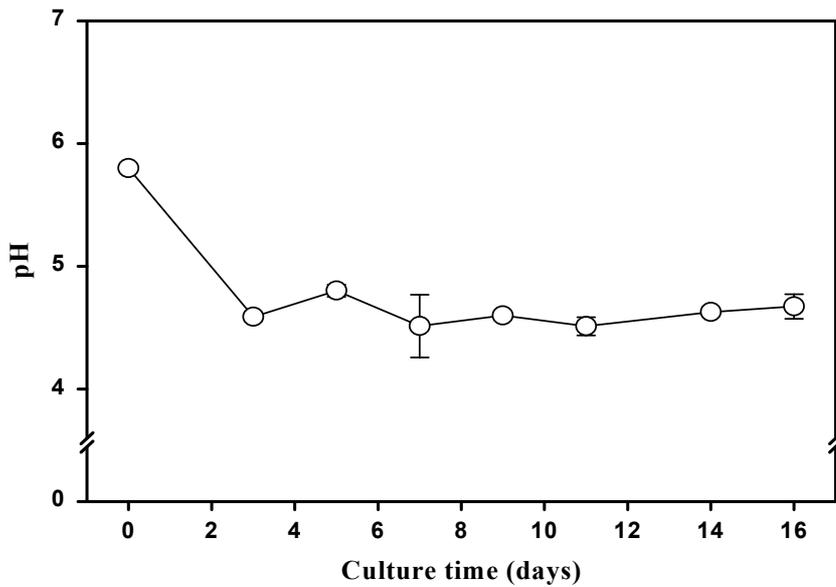


지 모상근 (hairy root)을 배양하면서 베타시아닌계 색소를 생산하는 모상근의 fresh weight 과 Dry weight을 조사하였다. 그림 6에서 보여주는 바와 같이 약

3일 간의 유도기간이 지난 후 모상근의 fresh weight은 서서히 증가하기 시작했으며 배양 7일 이후 부터 급격히 생산량이 증가되었다. 특히 11일 이후 모상근은 큰 폭으로 생산량이 증가되었다. 이후 14일을 지나면서 그 증가량이 서서히 완화된 배양 16일 이후 생산량은 오히려 감소하기 시작했다. 16일 이후 배양 배지의 영양이 고갈되면서 자가 소화가 진행되는 것으로 보여지며 배양기간은 최장 14일 정도까지가 가장 적합한 것으로 볼 수 있다.

Fig. 7. Sugar utilization by hairy roots of red beet in liquid culture. Bars represent means±S.E. of three replications

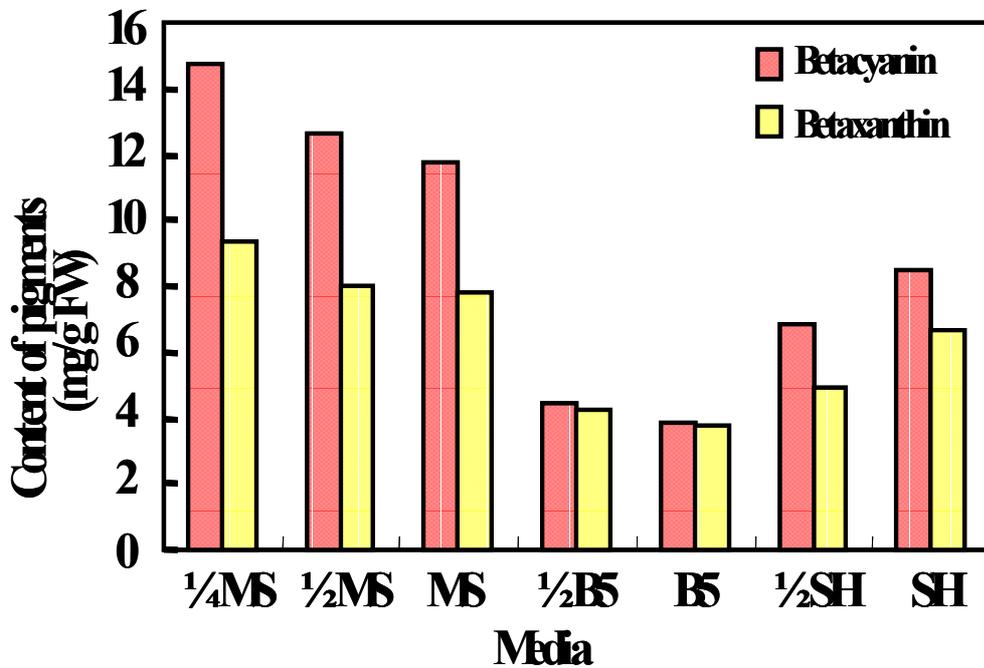
2) 배양기간 경과에 따른 배지내의 당 변화



배양초기 sucrose는 30g/1L 의 농도로 배양을 시작하였다. 배양을 시작한 3일 간의 유도기에는 sucrose가 많이 필요하므로 소비가 급격히 증가되면서 배

지 내 sucrose 농도가 급감하였다. 그림 7에서 보여주는 바와 같이 배양 후 9일이 지나면서 배지내의 sucrose의 양은 거의 고갈되며 배양 5일이 지나면서 glucose와 fructose가 많이 생성된다. 이후 배양9일까지 glucose와 fructose의 양이 각 12 g/L와 11 g/L까지 증가하다가 배지 내 sucrose양이 거의 고갈되는 9일 이후부터 서서히 감소하게 된다. 이는 모상근이 sucrose를 우선적으로 사용하다가 영양원이 고갈되면서 단당류인 glucose와 fructose를 사용하게 되는 것으로 보인다.

Fig. 8. Changes of pH in the medium during hairy root growth of red



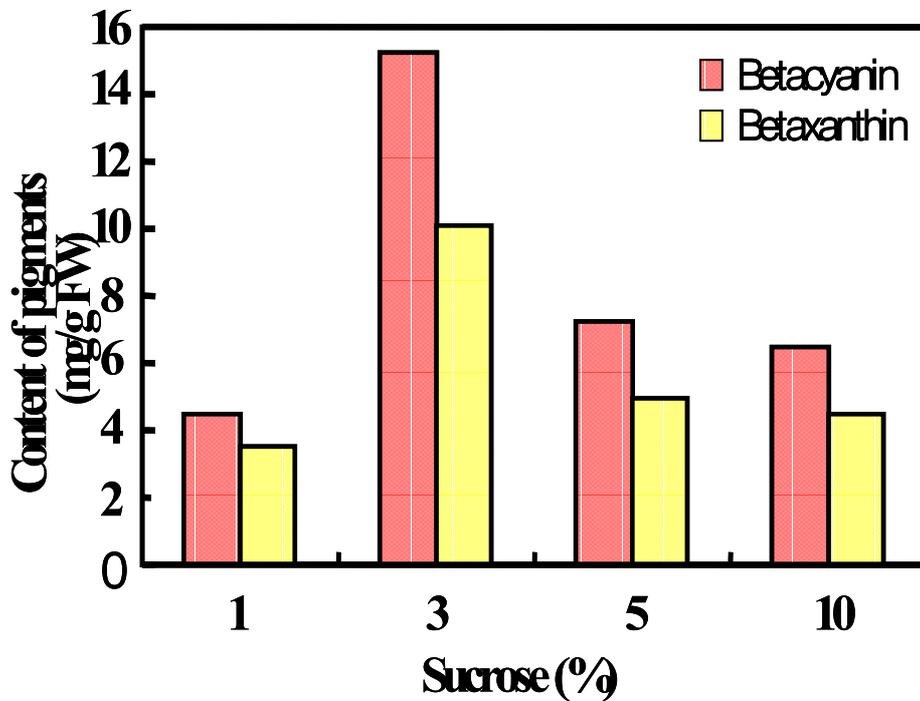
beet. Bars represent means±S.E. of three replications.

3) 배양기간 경과에 따른 배지 pH의 변화

배지 내 초기 pH를 5.8의 약산성에서 시작하여 배양 16일까지 조사한 결과

는 그림 8에서 보여주고 있다. 배양초기 3일 간의 pH는 급격히 낮아져 pH 4.5 까지 내려갔다가 이 후로는 약 pH 4.5에서 pH 4.8까지 pH가 거의 큰 변화를 보이지 않은 채 일정하게 유지되었다. 배양 11일 후부터는 약간의 상승이 서서히 보이기 시작하였지만 그 정도는 거의 미약하였다. 이와 같은 결과로 배지 내 pH를 5.8로 계속 보정하여 준다면 생산량을 증가시킬 수 있을 것으로 여겨진다.

Fig. 9 The effect of various media on betacyanin and betaxanthin production in the hairy roots of red beet (cultured for 14 days)



4) 배지에 따른 베타시아닌계 색소의 생산량 변화

Red beet의 모상근 배양에서 betacyanin 색소의 최적생산조건을 조사

하기 위하여 MS배지와 B5배지, SH배지를 각각 1/2, 또는 1/4로 희석하여 배양한 결과는 그림 9에 나타내었다. 대체로 red beet의 모상근 배양을 위해서는 B5, SH배지보다 MS배지가 효과적이었으며 특히 1/4 농도의 MS 배지에서 가장 높은 수율을 보여주었다.

5) 당 농도에 따른 베타시아닌 색소 생산

Fig. 10 The effect of sucrose concentration on betacyanin and betaxanthin production in the hairy roots of Red Beet (cultured for 14 days).

Red beet의 모상근을 배양하면 betalain계 적색소인 batacyanin과 적황색소인 betaxanthine이 생산되는데 모상근 배양의 최적조건을 조사하기 위하여 배지의 sucrose 농도를 1~10% 까지 첨가하여 배양한 결과는 그림 10에 나타내었다. Sucrose 3% 농도에서 betacyanin과 betaxanthine의 생산량이 모상근 1g의 fresh weight 당 15.3 mg과 10.4 mg의 색소를 얻을 수 있었다

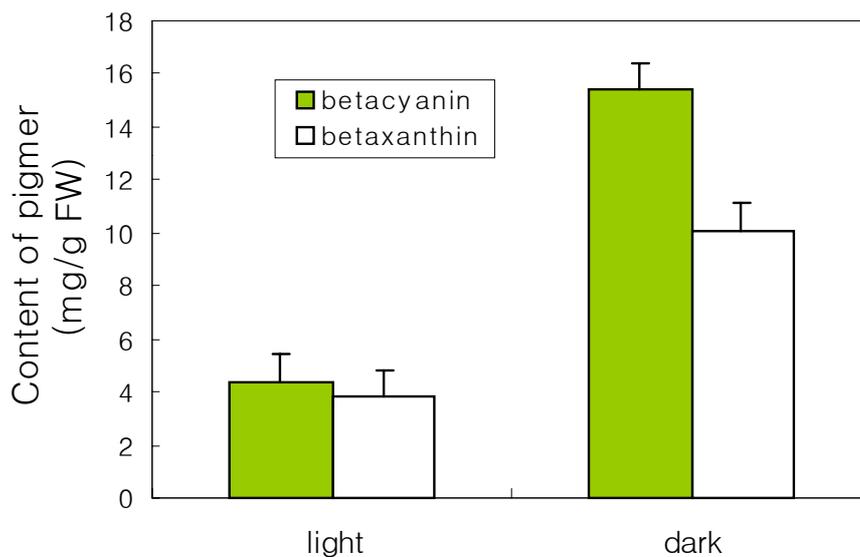
6) 베타시아닌계 색소 생산에 미치는 광(光)영향

그림 11에서는 red beet의 모상근을 배양할 때 암조건과 명조건을 주었을 때 betacyanin과 betaxanthin의 생산량을 조사하여 나타난 결과인데 betacyanin의 경우 암조건일 때가 빛을 주었을 때보다 3.5배 정도의 수율

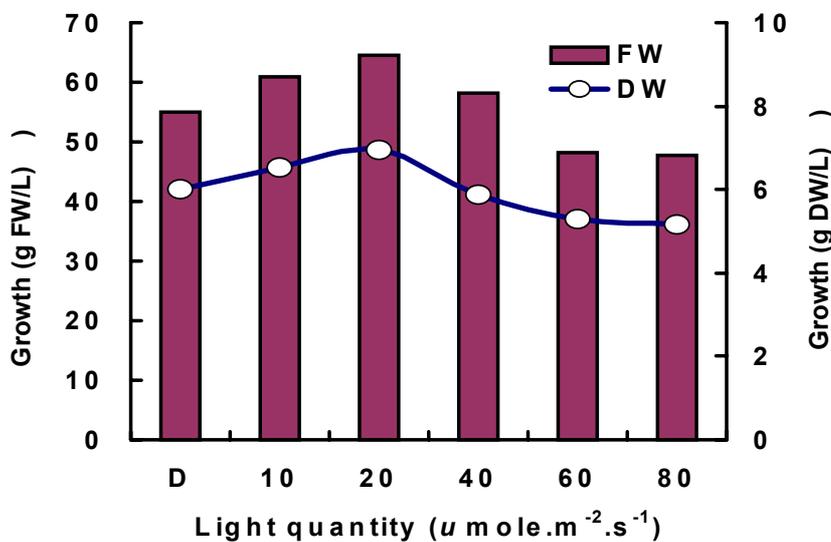
Fig. 11 The effect of light and darkness on betacyanin and betaxanthin production in hairy roots of red beet (cultured for 14 days).

을 얻을 수 있었다. Betaxanthin의 경우도 암조건일 때가 명조건일 경우보다 약 2.7배의 높은 수율을 얻을 수 있었다.

이러한 결과는 red beet 모상근 배양의 최적조건이 1/4 MS 액체배지에 3%의 sucrose 농도와 빛이 차단된 암조건에서 배양할 때이며 이러한 배양조건 하에서 betalain 계 색소의 수득률을 가장 높일 수 있다. 이와 같이 암조건하에서 색소 생산량이 높다는 결과를 토대로 미약한 빛의 양을 조절하여 주면서 색소생산량을 조사하여 본 결과는 그림 12에 나타내었다. 모상근의 cell growth는 $20 \mu\text{mole}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 의 빛을 주었을 때 liter당 약 64 g의 fresh weight을 얻을 수 있었다. 그러나 betacyanin 색소의 생산은 $60 \mu\text{mole}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 의 조건 하에서 색소 생산량이 제일 높았다. 이러한 조건의 광도는 사실 극히 미약한 빛이므로 전체적으로는 암조건에서 betacyanin 색소의 생산량이 높으며 $60 \mu\text{mole}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 의 조건을



넘어서면 생산량이 급격히 줄어들기 시작한다.



7) 베타시아닌계 색소생산에 미치는 공기의 영향

그림 13에서는 red beet 모상근 배양조 내의 공기의 양이 베타시아닌계 색소의 생산에 영향을 줄 수 있는지 액체배양 과정에서 공기의 영향을 조사하기 위하여 air volume을 1%부터 35%까지 다르게 조건을 주었을 때 얻어진 결과를 나타내었는데 20%에서 가장 높은 모상근 생체량을 얻을 수 있었으며 betacyanin 색소의 생산은 30%의 air volume을 유지했을 때 최대가 되었다.

Fig. 12 Effect of light quantity on growth and betacyanin production of *Beta vulgaris* L.

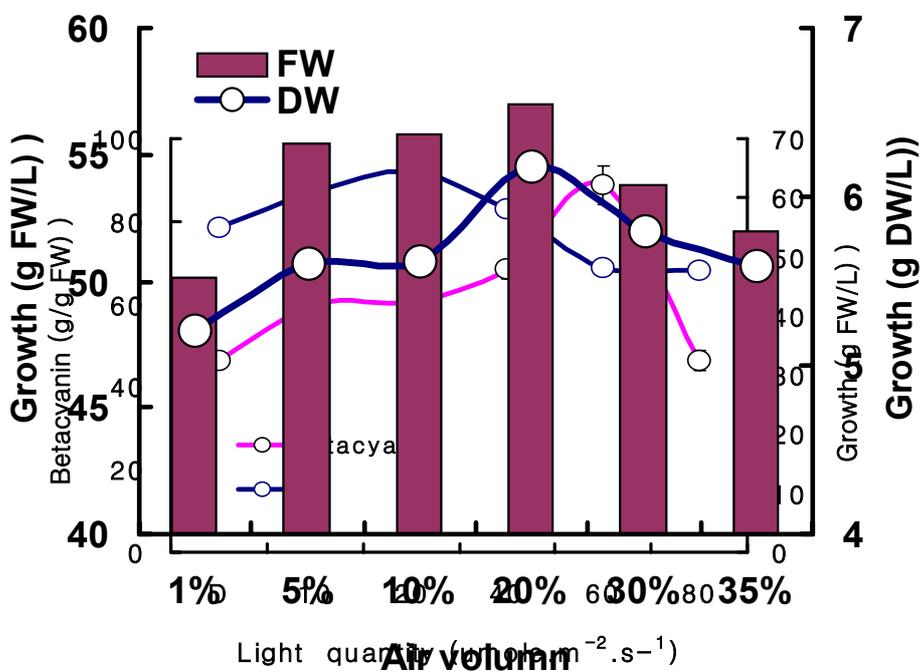
또한 betacyanin 생산에 적합한 배양기를 조사한 결과는 그림 14에 나타내었다. 가장 일반적으로 쓰이는 cone 타입의 배양기에서 최대의 수율을 얻을 수 있었다. Column 타입의 배양기는 좁고 길어서 20~20%의

air volume을 유지해야 수득률이 높아진다는 결과와 상관관계가 있을 것으로 사료된다

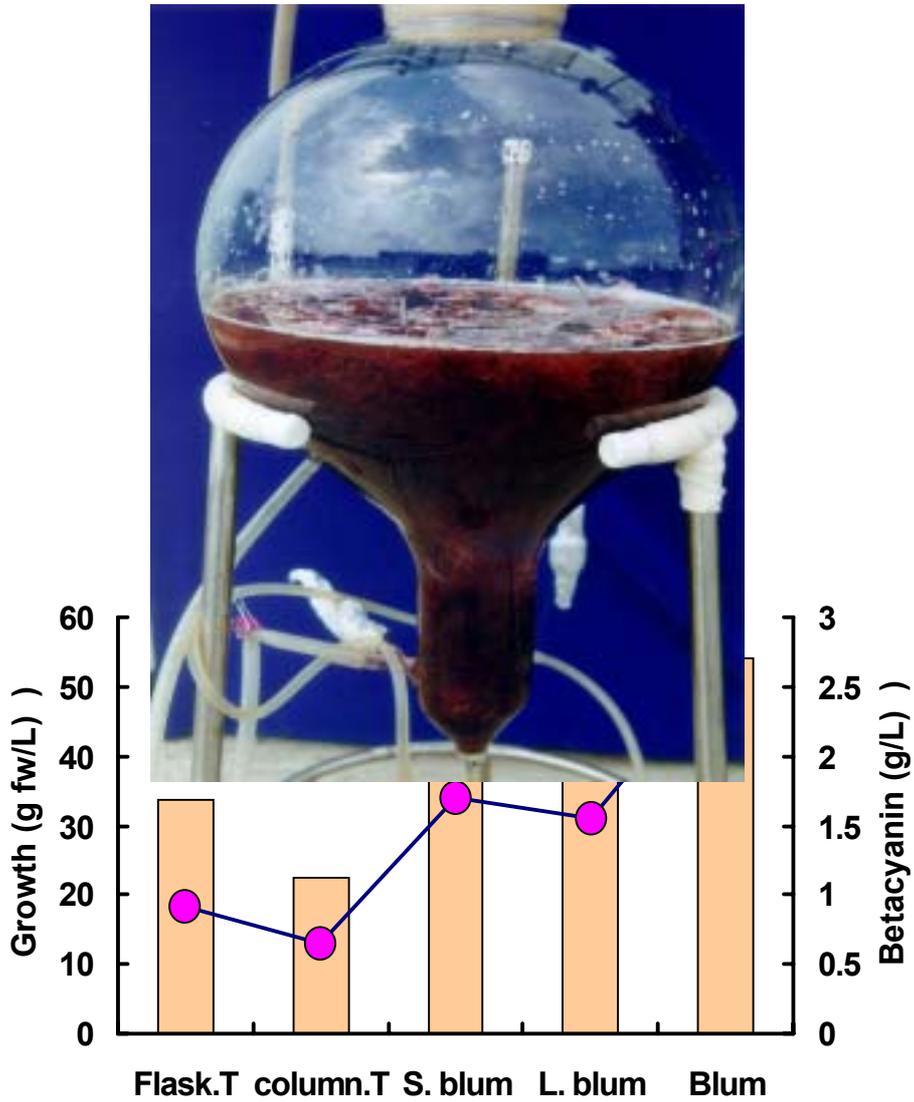
이와같이 red beet의 모상근 배양조건을 검토하여 betacyanin 색소를 최대로 얻기 위하여 cone 타입의 배양기인 20 L bioreactor 에 scale

Fig. 13 Effect of air volumn on growth and betacyanin production of *Beta vulgaris* L.

up 하여 $60 \mu\text{mole}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 의 비교적 어두운 조건 하에서 3%의 sucrose



가 포함된 1/4 MS 액체배지에 30% (v/v)의 air volume을 유지하며 15



일 간 배양한 결과는 그림 14에서 보여주고 있다. 이때 모상근은 생체량 120g을 생산하였으며 betacyanin의 함량은 생체 중 1 g당 12.7 mg을 얻을 수 있었다. 이와 같이 모상근 배양을 통하여 betacyanin 색소를 단기

간에 많이 생산할 수 있으며 정제단계를 단축하여 생산비용을 현저히 절약할 수 있게 되어 천연 적색소의 개발에 한층 단계를 높일 수 있게 되었다.

Fig. 14 Effect of reactor type on growth and betacyanin production of *Beta vulgaris* L.

Fig. 15 The Hairy roots cultured under dark conditions for 15 days using a 20 L air lift bioreactor

라. 혼합병용효과

지금까지의 연구 결과로는 일반에게 알려진 붉은 색의 베타시아닌계 색소의 성장효과가 알려진 바와 달리 거의 미약하여 베타시아닌계 색소를 주재료로 사용하여 성장효과를 갖는 음료를 개발하기에는 무리가 있으므로 이에 장내 유익균주의 생육을 향상시키는 올리고당과 고분자 다당류들을 많이 함유한 red beet와 여러 가지 식물들을 각각 혼합하여 함께 병용했을 때 항산화효과 및 성장효과 등이 어떻게 변화하는지 식물체 추출물의 혼합병용효과를 조사하였다. 이때, red beet와 각 식물체 추출물의 혼합비율은 각 항목의 생리활성측정을 위한 농도를 정할 때 1:1로 혼합하여 측정농도를 맞추어 주었다

1)DPPH free radical scavenging activity

앞선 실험 결과를 토대로 하여 radical 소거활성이 우수한 식물체 추출물과 베타시아닌계 색소와 올리고당과 고분자인 다당류를 다량 함유한 red beet와의 혼합병용효과를 조사하여 표13에 나타내었다. Free radical 소거활성이 뛰어난 식물체 중에서 헛개나무, 시호, 함초, 솔이끼, 용설란, 복분자와 활성은 그다지

높지 않았으나 저렴하고 구하기 쉬운 무를 대상시료로 선정한 다음 red beet 와 1:1로 혼합하여 radical 소거 활성을 측정한 결과를 표 13에 나타내었다.

Table 13. Comparison of electron donating ability of single reaction mixtures with complex reaction mixture

대부분의 식물체들이 red beet와 혼합 병용했을 때 radical 소거능이 다소 향상되는 경향을 보였으나 헛개나무와 함초는 activity가 다소 감소하는 경향을 보였다. 무의 경우는 단독으로 사용했을 때보다 red beet와 혼합 병용했을 때 radical 소거활성이 11.2%에서 18.2%로 향상되는 결과를 나타내었다.

2) Nitrite scavenging activity

아질산염 소거활성이 비교적 우수한 식물체 추출물과 red beet 추출물과의 혼합병용 효과를 시험한 결과는 표14에 나타내었다. 앞선 실험에서 얻어진 결과에 의하면 헛개나무, 함초, 화살나무, 솔이끼, 용설란, 복분자, 삼백초가 아질산

		Radical scavenging activity (%) of Reaction mixture	
		single mixture	complex mixture with red beet extract
Control	a-tocopherol	53.0	
	red beet	18.4	
	무	11.2	18.2
	헛개나무	56.3	53.1
	솔이끼	80.2	72.8
	함초	45.8	39.8
	용설란	61.6	63.4
	복분자	72.4	73.8
	시호	60.7	62.3

염 소거능이 우수한 것으로 나타나 이들 추출물에 red beet 추출물을 1:1로 혼합하여 같은 농도로 활성을 측정했을 때와 비교하였다.

Table 14. Comparison of nitrite scavenging activity of single reaction mixtures with complex reaction mixture

표 14에 의하면 각 식물체추출물의 아질산염 소거작용은 red beet와 혼합 병용했을 때 전체적으로 activity가 감소하는 경향을 나타내었다. 특히 아질산염 소거능이 73.9%까지 나타난 술이끼의 경우 52.1%로 감소하는 경향이 뚜렷했다. 다만 무의 경우는 소거능이 약간 증가하나 이는 오차범위 내에서의 증가이며 red beet와 혼합 병용했을 때 활성이 감소하지 않는 것으로 나타났다. 아질산염 소거작용만을 목표로 한다면 술이끼가 좋은 대상 식물이 될 것임이 명확하다. 여기서는 생리활성물질을 탐색하여 정장음료의 개발에 그 목표가 있으므로 앞선 실험결과에서 알 수 있듯이 올리고당과 고분자 다당류가 많이 함유된 red beet

Reaction mixture		Nitrite scavenging activity (%)	
		single mixture	complex mixture with red beet ext.
Control	Resorcinol	35.7	
	Red beet	11.2	
맨드라미	무우	11.4	12.1
	복분자	33.6	31.8
	헛개나무	35.8	32.5
	술이끼	73.9	52.1
	함초	32.2	20.4
	화살나무	37.4	28.5
	용설란	31.9	21.9
	삼백초	32.5	24.3

와 아질산염 소거능이 우수한 식물 추출물과 혼합 병용하여 그 가능성에 근접해

가고자 한다.

Table 15. Comparison of lipid peroxidation inhibitory activity of single reaction mixtures with complex reaction mixture

3) Lipid peroxidation inhibitory activity

위의 실험에서 얻어진 결과로써 과산화지질 생성 억제활성이 우수한 식물체를 선발하여 red beet 추출물과 혼합 병용하였을 때 그 차이를 표15에서 보여주고 있다. 헛개나무, 씬바귀, 함초, 화살나무, 솔이끼, 복분자, 인진호의 추출물을 red beet와 1:1로 혼합 병용하여 48시간동안 반응시간 경과후에 생성된 과산화 지질의 최종생성물인 malondialdehyde (MDA)를 측정하여 control과 비교하였을 MDA-TBA 값이 얼마나 감소했는지 그 결과를 확인하고자 하였다.

각 식물체 추출물의 지질산화억제 활성은 red beet와 혼합 병용했을 때 약간 감소하는 경향을 보였다. 무와 인진호 등은 혼합 병용했을 때에도 큰 차이가 없

		Decrease of MDA-TBA value (%) after 48 hours	
		single mixture	complex mixture with red beet extract
Control	a-tocopherol	25.2	
	red beet	5.9	
	무	13.7	13.5
	헛개나무	24.7	24.2
	솔이끼	30.6	24.7
	함초	18.5	14.1
	용설란	11.7	12.1
	복분자	15.8	15.2
	씬바귀	19.2	11.3
	인진호	15.3	15.0

었다. 인진호의 경우는 그 향미가 강하여 음료로 쓰기에는 다른 과채류의 향미

를 가려 부적합하며 개인에 따라 기호도 차이가 크게 나타나므로 많은 제약이 뒤따른다.

Reaction mixture		XOD inhibition effect (%)	
		single mixture	complex mixture with red beet ext.
Control	Benzoic acid	19.2	
	Red beet	5.1	
	무우	3.7	5.2
	복분자	23.7	21.2
	헛개나무	16.9	12.9
	솔이끼	24.3	17.5
	등굴레	16.8	15.1
	화살나무	12.3	8.7
	고추냉이	17.1	17.0
	양파	17.8	17.7

4) Xanthine oxidase inhibition effect

Xanthine oxidase 저해효과가 우수한 식물체 등굴레, 헛개나무, 썸바귀, 가지, 지황, 복분자, 토사자 추출물에 red beet를 1:1로 혼합 병용하여 XOD 저해효과를 측정된 결과는 표 16에 나타내었다. 솔이끼의 경우는 24.3%의 비교적 높은 XOD 저해활성을 갖고 있으나 red beet와 혼합 병용하였을 때 17.5%로 크게 감소하였다. 무는 저해효과가 3.7%에서 5.2%로 약간 증가했으며 고추냉이와 양파는 17.0%와 17.7%로 거의 변화가 없었다. XOD와 기질인 xanthine, hypoxanthine과의 반응은 일반적으로 radical 형성반응으로 알려져 있다. Xanthine/ xanthine oxidase-cytochrome C 반응계에서 측정되는 superoxide

anion radical에 대한 소거효과는 어떤 물질에 의해 반응계 자체가 억제될 경우, xanthine oxidase의 활성이 저해되는 경우 그 물질의 실제 라디칼 소거효과보다 높은 활성으로 나타나게 된다. Xanthine oxidase를 억제하는 물질과 radical 소

Reaction mixture	Intestinal bacteria strains ^a			
	<i>Lactobacillus casei</i> 911 LC	<i>Streptococcus thermophilus</i> ST5	<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Clostridium perfringens</i> 3269
등굴레	+	+	+	-
red beet 첨가	+	++	+	-
시호	-	N	N	-
red beet 첨가	+	+	+	-
익모초	-	N	N	---
red beet 첨가	N	N	+	---
죽순	+	+	+	+
red beet 첨가	++	++	+	-
용설란	+	N	+	-
red beet 첨가	++	++	++	-
무	++	+	+	-
red beet 첨가	+++	++	++	--
솔이끼	+	++	+	-
red beet 첨가	++	++	++	-
삼백초	+	N	N	N
red beet 첨가	+	+	+	-

Table 16. Comparison of xanthine oxidase inhibition effect of single reaction mixtures with complex reaction mixture

거능을 나타내는 물질들이 동일물질이라고 생각할 수 없으며, Hatano 등 (1989)

은 효소의 저해활성과 radical 소거활성 사이의 상관관계는 찾을 수 없지만 xanthine oxidase를 강하게 저해하는 ellagic acid 와 같은 tannin 및 관련물질들이 라디칼 소거능도 공유한다고 한 바 있다. 이와 같이 천연물로부터 새로운 통풍치료제의 개발을 목적으로 각종 생리활성의 효과가 인정되고 우리와 쉽게 접할 수 있는 식물체의 생리활성물질에 대한 탐색과 작용 기작에 대한 연구가 절실하다. 각 추출물들은 식물체에 따라 XOD 활성저해 효과가 매우 다르게 나타났으며 어떤 식물체는 오히려 효소의 활성을 증가시켜 주는 activater로 작용하기도 하므로 이에 대한 연구가 필요하다.

Table 17. The growth effect on harmful intestinal bacteria and lactic acid producing bacteria with complex mixture added red beet extract

^aThey were cultured on MRS broth agar at 37°C for 2 days in anaerobic jar. Growth zone diameter >20mm, ---, strong inhibition; 15-20mm, --, moderate inhibition; 5-14mm, -, weak inhibition; <4, N, no response, +, thick growth than surrounding, ++, more thick growth than surrounding.

5)정장효과

이미 실험한 결과를 바탕으로 장내 유익균주와 유해세균의 길항작용과 유익균주의 생육에 효과가 있는 식물체를 선발하여 red beet를 혼합하여 실험한 결과를 표 17에 나타내었다. 정장효과가 있다고 판단되는 식물체 중에서 장내유익균주와 유해세균의 길항작용을 나타내는 둥굴레, 시호, 익모초, 죽순, 용설란, 무, 삼백초, 솔이끼를 선발하여 red beet와 혼합하여 정장효과를 조사하였다. 대부분의 식물체 추출물과의 혼합병용효과는 red beet 추출물을 첨가 시 synergy effect를 보였다. 특히 무와의 혼합병용시 정장효과 및 장내 균총의 길항작용이

탁월했다. 이와 같은 결과로써 정장음료제조의 접근이 용이하게 진행될 수 있게 되었다. Red beet와 함께 무는 장에 유익한 유산균등의 feeding에 필요한 여러 가지 올리고당과 고분자 다당류들을 다량 함유하고 있어 정장음료 제조의 base로서 이용될 가능성을 주었다.

마. 고분자 다당류의 구성당 확인

1) 다당류의 정제

Red beet, 무, 양파의 착즙액을 9,000×g에서 30분간 원심분리하여 cell debris 등을 제거하고 그 상정액에 2배량의 99% ethanol을 첨가하여 다당류를 침전시키고 이를 다시 70%의 ethanol로 2회 세척한 후 증류수에 녹여 투석한 다음 냉동 건조하였다. 이렇게 하여 얻은 조다당류를 다시 증류수에 녹여 0.3% 농도의 양이온세제 CPC (cetyl pyridinium chloride)로 침전시킨 후 침전물을 다시 10%의 NaCl에 용해시켰다. 여기에 3배의 ethanol을 가하여 다당류를 침전시킨 후 침전물을 증류수에 녹여 투석하고 냉동건조하였다. 이때 사용된 투석막은 cellulose membrane으로 분자량 2,000 Dalton 으로서 분자량이 작은 올리고당보다 분자량이 큰 2,000 D이상의 고분자 다당류만을 얻어 그 구성당을 조사하였다.

2) 단당류의 조성

단당류의 조성을 확인하기 위해서는 고분자 다당류를 가수분해해야 하므로 먼저 동결건조한 다당류 1 mg을 1 ml의 물에 약 2시간 vortex 하여 suspend 시킨 다음 원심분리기로 원침시켜 상정액을 0.5 ml씩 2 fraction으로 나눈 다음 Neutral sugars를 확인하기 위해서는 microfuge tube에 0.5 ml를 넣고 2M

TFA (Trifluoroacetic acid, Sigma, T1647)을 200 μ l를 첨가한다. 이것을 100°C에서 4시간동안 incubation 한 다음 실온에서 cooling 한 후 SpeedVac에서 건조시켰다.

또한 Amino sugars를 확인하기 위해서는 microfuge tube에 glycoconjugate 0.5 ml을 넣은 다음 6 N HCl (Sigma, H0636) 200 μ l를 첨가하고 100°C에서 4시간 동안 incubation 시킨다. 꺼낸 후 실온에서 cooling 한 다음 SpeedVac에서 건조시킨 다음 LC분석을 위한 시료로 제조하였다. 분석 조건은 다음과 같다

<분석장비>

System : Bio-LC DX-300 (Dionex, Sunnyvale, CA, USA)
Detection : PED2 with intergrated amperometry
Data analysis : AI-450 on-line software
Column :CarboPac PA1 (4.5 × 250 mm, Dionex Sunnyvale, CA, USA) with CarboPac PA1 cartridge (4.5 × 50 mm)

<분석조건>

Mobile phase : 16 mM NaOH
Flow rate : 1.0 ml/min
Detector temperature : Room temperature
Injector temperature : Room temperature
Column temperature : Room temperature
Carrier gas : He, N₂

표 18에 나타낸 바와 같이 무와 red beet의 단당류 조성은 장내 유산균의 먹이가 되는 galactose의 함량이 각각 69.9%, 82.9%까지 높게 나타나 다른 식물체보다 정장효과가 탁월한 이유가 될 수 있다. 양파의 단당류 조성은 glucose가 92.3%가 가장 높은 비율을 차지하고 있으며 무와 red beet가 갖지 못한 생리활성 기능을 나타내므로 좋은 상승효과를 기대할 수 있다고 판단된다.

Table 18. Sugar composition of extracted polysaccharides.

* The data were presented as percentage of each monosaccharides.

Sugars \ Samples	Materials		
	Radish	Red beet	Onion
fucose	1.36	2.39	1.48
galactosamine	0.42	0.00	0.00
glucosamine	2.74	2.83	0.51
galactose	69.9	82.9	5.63
glucose	22.97	3.27	92.3
mannose	2.6	8.61	0.19

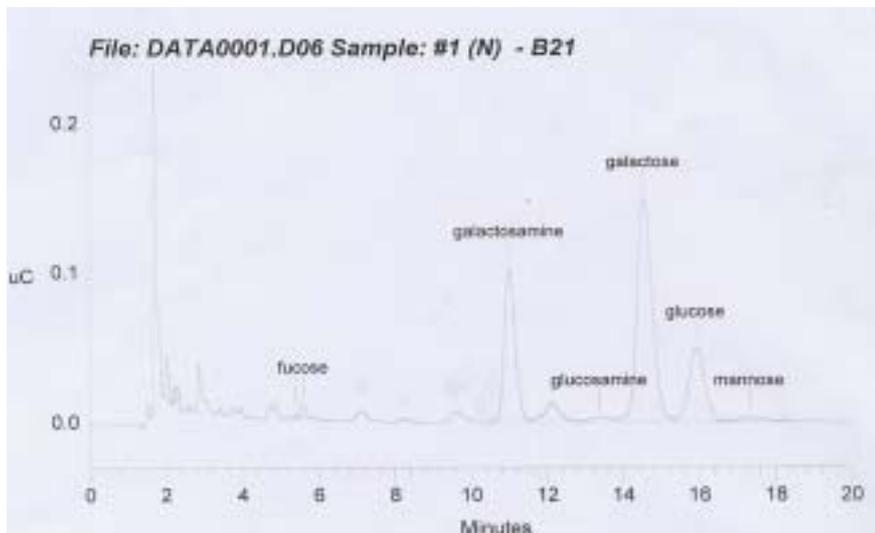


Fig. 16. LC analysis for monosaccharide composition of the neutral sugar from radish polysaccharide

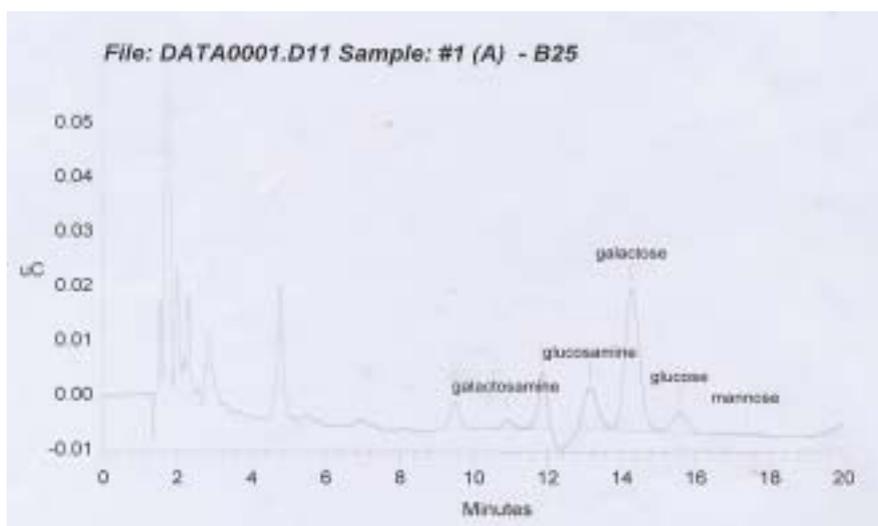


Fig. 17. LC analysis for monosaccharide composition of the amino sugar from radish polysaccharide

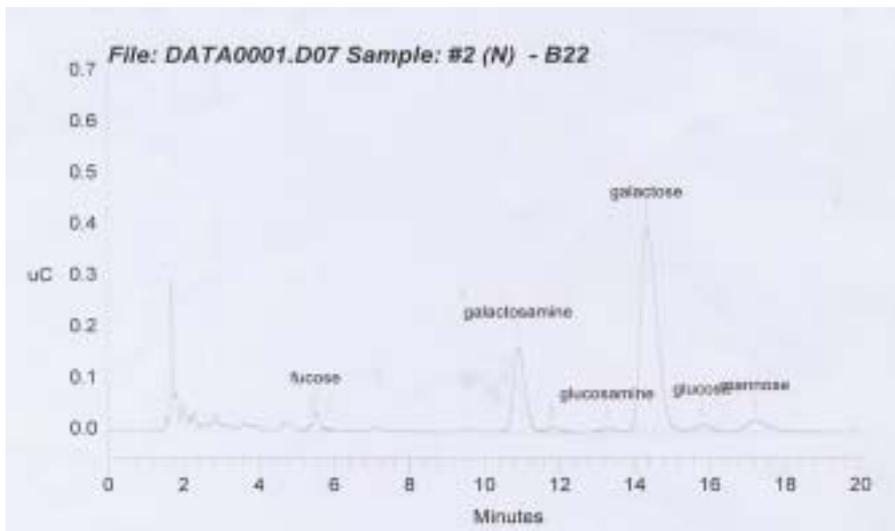


Fig. 18. LC analysis for monosaccharide composition of the neutral sugar from red beet polysaccharide

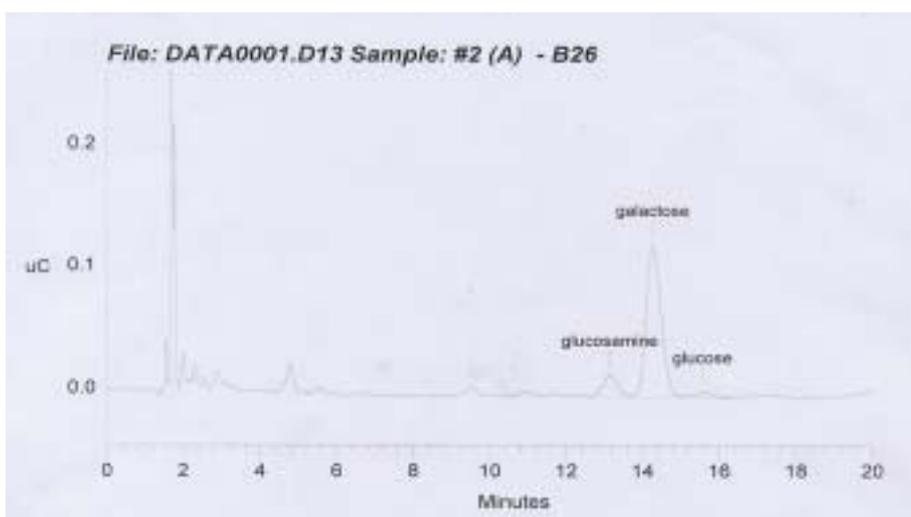


Fig. 19. LC analysis for monosaccharide composition of the amino sugar from red beet polysaccharide

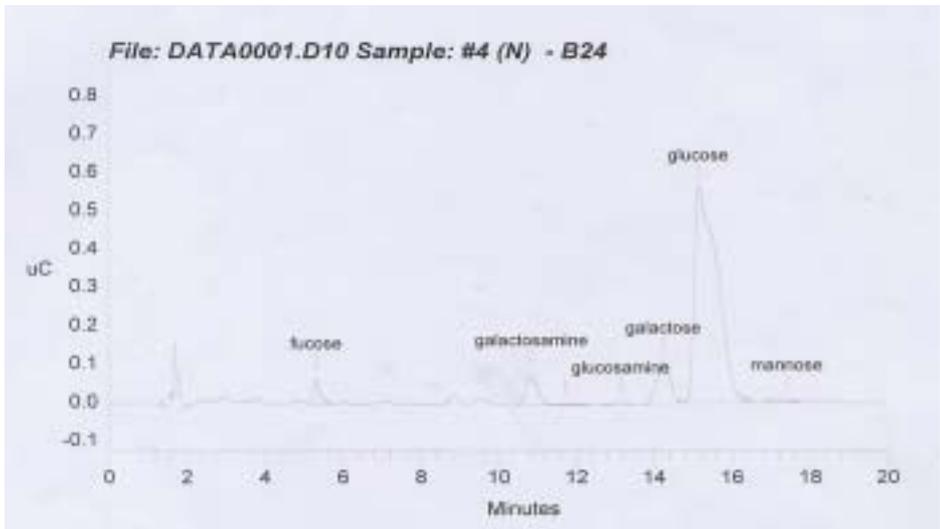


Fig. 20. LC analysis for monosaccharide composition of the neutral sugar from onion polysaccharide

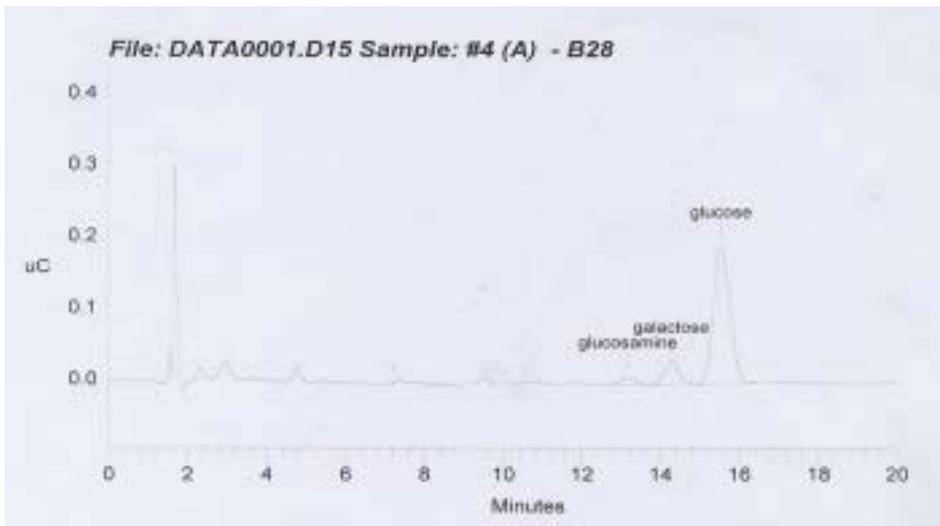


Fig. 21. LC analysis for monosaccharide composition of the neutral amino from onion polysaccharide

바. 정장음료의 제조

1) 재료의 선정

정장음료의 개발을 위하여 여러 가지 생리활성을 조사하고 현대인의 건강을 증진시킬 수 있는 좋은 재료들을 구하여 본 연구의 식물재료로 선정하였다. 등굴레, 시호, 죽순, 용설란 등 고려된 식물재료들이 있었지만 가격이 비싸거나 다소 구하기 힘든 재료는 배제하였다. 특히 인진호와 익모초 등은 몇가지 항목에서 좋은 생리활성을 나타내었으나 그 향이 독특하고 강하여 좋은 기호음료를 개발하는데는 장애가 되므로 제외시켰다. Red beet는 가격이 비싼 단점이 있지만 천연색소인 베타시아닌을 다량 함유하고 있어 제품의 인지도를 향상시킬 수 있는 정렬적인 선홍색을 띠고 있어 우수한 재료가 될 수 있어 선정하였다. Red beet는 또한 앞선 실험의 결과에서 알 수 있듯이 다량의 올리고당과 고분자 다당류의 보고이므로 정장효과가 탁월하므로 가장 기본적인 base로 정했다. 한편 무는 향미가 좋지 않아 개발제품의 향미를 개선하기 어려운 단점을 가지고 있으나 값이 매우 저렴하고 우리나라에서 사철 구하기 쉬운 재료이므로 제품원료의 단가를 낮추는데 도움이 될 것이므로 불가피하게 원료로 선정하였다. 본 연구에서 정장효과 및 기타생리활성을 검토한 결과 red beet와 무를 혼합병용했을 때 가장 synergy 효과가 나타났으며 특히 장내 유익균총과 유해세균 사이의 길항작용이 우수하고 정장효과가 상승적으로 나타나는 것을 확인하였다. 이렇게 기본으로 선정된 red beet와 무는 혼합병용효과를 검토하였을 때 상당히 synergy effect를 나타내었으므로 서로 잘 맞는 혼합재료가 될 수 있다. 여기에 향미의 개선을 위하여 사과주스와 복숭아주스등을 혼합하여 맛을 개선하여 새로운 정장음료를 제조하고자 하였다.

2) 재료의 전처리 방법

채소는 과일과 마찬가지로 세포구조가 파괴되어 외부의 산소에 노출되면 갈변이 시작된다. 이는 효소적 갈변이 대부분으로 외관상의 품질을 저하시키게 되므로 효소작용을 억제하기 위해 사과 주스는 데치기 작업등이 필요했다. 착즙액을 pasteurization 처리하는 방법으로 실험해 보았으나 제품의 안정된 공급과 일정한 품질유지를 위해 고온 압력추출기에서 처리하여 항상 일정한 색도와 품질을 유지하도록 하였다. 무 즙과 양과 즙은 이물질이 전혀 함유되지 않도록 하여 고온 압력추출기에서 추출하여 따로 준비해 두었다. 시제품 제조 시에는 항상 일정한 맛과 품질이 유지되도록 시판되는 농협 사과 주스를 사용하였다. 포도 주스와 복숭아 주스도 국내산 제품을 구입하여 사용하였다. Red beet는 그 자체에 betalain 색소를 파괴하는 효소를 지니고 있다고 알려져 효소의 불활성화를 위해 데치기 과정이 반드시 필요하다. 베타시아닌계 색소는 또한 열에 약하므로 다른 재료들과는 달리 고온의 압력추출기에서 추출하지 않고 주서기나 녹즙기 등으로 신선한 착즙액을 얻어 원심분리한 다음 pasteurization 방법으로 살균하여 냉암소에 보관하면서 사용하였다. Red beet의 베타시아닌 색소는 산소가 존재할 때 특히 불안정하므로 제품의 제조 공정에서 반드시 탈기과정이 필요하다. 또한 자외선과 같은 빛에서 색소가 파괴되어 맑은 선홍색이 검붉은 색으로 변하게 되므로 제품의 유통과정에서 빛을 차단할 수 있는 알미늄호일 파우치 또는 갈색병에 담아 냉장 유통하는 것이 바람직하다고 판단되었다. 한편 정장음료의 외관을 혼탁형에서 청징형으로 개발하기 위한 실험을 병행하였다.

3) 시제품 제조 및 기호도 판정

정장음료로써 시판품은 유제품 발효유 즉, 액상요구르트와 호상요구르트를 제외하면 거의 전무한 실정이므로 정장기능에 초점을 맞추고 시제품을 제조하고자 하였다. 무와 Red beet의 비율을 가장 먼저 조정하였고 제품의 맛과 기호도

Table 19. Proportion of confued materials into intestinal beverage

음료 번호	재료 및 함량 (%)	첨가물 (%)
A	무42.6, Red beet42.5, 복숭아2.8, 양파1.2	citric acid 0.2, 꿀 3.4, 올리고당2.7, 물엿 4.3, apple flavor 0.08, mint flavor 0.02q, 비타민C 0.2
B	무42.6, Red beet42.5, 포도2.8, 양파1.2	citric acid 0.2, 꿀 3.4, 올리고당2.7, 물엿 4.3, apple flavor 0.08, mint flavor 0.02q, 비타민C 0.2
C	무42.6, Red beet42.5, 사과2.8, 양파1.2	citric acid 0.2, 꿀 3.4, 올리고당2.7, 물엿 4.3, apple flavor 0.08, mint flavor 0.02q, 비타민C 0.2
D	무30, Red beet42.5, 사과 15.4, 양파 1.2	citric acid 0.2, 꿀2.3, 주정1, 올리고당2.7, 설탕4, 물엿0.4, apple flavor0.08, pine0.02, 비타민C 0.2
E	무25.5, Red beet35.5, 사과 26.9, 양파1.2	citric acid 0.2, 꿀2.3, 주정1, 올리고당2.7, 설탕4, 물엿0.4, ume flavor0.08, pine0.02, 비타민C 0.2

를 높이기 위해 풍미가 깊은 과일이면서 비교적 손쉽게 구할 수 있는 포도주스와 복숭아주스, 사과주스를 각각 일정비율로 첨가하였다. 여기에 혼합병용시 그다지 효과가 감소하지 않으면서 비교적 값싸고 구하기 쉬운 양파를 조금 첨가하기로 하였다. 양파는 특히 red beet와 무에 비하여 xanthine oxidase inhibition effect와 아질산염 소거활성이 약 2배 이상 높은 것으로 나타났으며 이들이 지니지 못한 생리활성이 기대되므로 적은 양을 첨가하고자 하였다. 무와 red beet의 양은 거의 비슷한 양이 되도록 하고 양파는 1.2%로 적은 양을

Table 20. 정장음료 5종의 기호도 조사를 위한 관능검사 서식

일시: 2003. . . .	성명;						
이 제품들은 정장음료의 시제품입니다. 맛, 향, 색, 음료로서의 전체적인 느낌을 종합하여 기호도를 표시하여 주시기 바랍니다.							
A _____							
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 16.6%;">형편없다</td> <td style="width: 16.6%;">약간 나쁘다</td> <td style="width: 16.6%;">보통이다</td> <td style="width: 16.6%;">약간좋다</td> <td style="width: 16.6%;">좋다</td> <td style="width: 16.6%;">아주 훌륭하다</td> </tr> </table>		형편없다	약간 나쁘다	보통이다	약간좋다	좋다	아주 훌륭하다
형편없다	약간 나쁘다	보통이다	약간좋다	좋다	아주 훌륭하다		
B _____							
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 16.6%;">형편없다</td> <td style="width: 16.6%;">약간 나쁘다</td> <td style="width: 16.6%;">보통이다</td> <td style="width: 16.6%;">약간좋다</td> <td style="width: 16.6%;">좋다</td> <td style="width: 16.6%;">아주 훌륭하다</td> </tr> </table>		형편없다	약간 나쁘다	보통이다	약간좋다	좋다	아주 훌륭하다
형편없다	약간 나쁘다	보통이다	약간좋다	좋다	아주 훌륭하다		
C _____							
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 16.6%;">형편없다</td> <td style="width: 16.6%;">약간 나쁘다</td> <td style="width: 16.6%;">보통이다</td> <td style="width: 16.6%;">약간좋다</td> <td style="width: 16.6%;">좋다</td> <td style="width: 16.6%;">아주 훌륭하다</td> </tr> </table>		형편없다	약간 나쁘다	보통이다	약간좋다	좋다	아주 훌륭하다
형편없다	약간 나쁘다	보통이다	약간좋다	좋다	아주 훌륭하다		
D _____							
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 16.6%;">형편없다</td> <td style="width: 16.6%;">약간 나쁘다</td> <td style="width: 16.6%;">보통이다</td> <td style="width: 16.6%;">약간좋다</td> <td style="width: 16.6%;">좋다</td> <td style="width: 16.6%;">아주 훌륭하다</td> </tr> </table>		형편없다	약간 나쁘다	보통이다	약간좋다	좋다	아주 훌륭하다
형편없다	약간 나쁘다	보통이다	약간좋다	좋다	아주 훌륭하다		
E _____							
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 16.6%;">형편없다</td> <td style="width: 16.6%;">약간 나쁘다</td> <td style="width: 16.6%;">보통이다</td> <td style="width: 16.6%;">약간좋다</td> <td style="width: 16.6%;">좋다</td> <td style="width: 16.6%;">아주 훌륭하다</td> </tr> </table>		형편없다	약간 나쁘다	보통이다	약간좋다	좋다	아주 훌륭하다
형편없다	약간 나쁘다	보통이다	약간좋다	좋다	아주 훌륭하다		
♥ 대단히 감사합니다 ♥							

첨가하여 특유의 맛과 냄새가 나지 않도록 조절하였으며 여기에 포도주스와 복숭아 주스, 사과주스를 각각 첨가하여 가장 잘 어울리는 맛을 고르고자 하였다. 본원의 연구원과 연구보조원 약 20명을 대상으로 기호도 조사를 실시한 결과 사과주스가 첨가된 제품이 가장 기호도가 높았으며 향후 실험에서는 사과주스의 비율을 높여 무의 특유의 풍미를 줄이고자 하였다. 표 19는 소비자의 기호도를 조사하기 위해 만들어진 시제품 재료 및 함량비를 나타낸 것이다. 표 20은 좀더 정확한 평가를 받고자 작성한 기호도 조사표이며 약 60명 (대학생:35명, 여자 대학원생 15명, 연구원 10명)을 대상으로 실시된 조사표이며 조사 결과는 표 21에 나타내었다. 무가 42.6% 첨가된 A, B, C는 무 특유의 향미가 강한 편이었고 뒷맛이 개운하지 않다는 평가가 일반적이었다. 포도주스와 복숭아주스는 전체적으로 조화롭지 못하다는 평가가 대부분이었다. 사과주스를 첨가했을 때 가장 조화로운 맛을 내는 것으로 나타나 무의 함량을 줄이고 예비실험을 통해

음료번호	평가						선호도 ranking
	형편없다	약간 나쁘다	보통이다	약간좋다	좋다	아주 훌륭하다	
A	8	14	25	10	3		4
B	12	19	24	4	1		5
C	1	9	31	15	4		3
D		5	28	17	7	3	1
E		6	30	18	4	2	2

표 21. 시제품의 종합적인 기호도 조사 결과표

* 기호도 검사원 수는 60명
 사과주스의 비율을 높여 신선하고 산뜻한 느낌의 음료가 되도록 조절해서 D와 E 음료에 대한 평가도 함께 하도록 했다. 전체적으로 조화롭고 맛으로 먹기에도 적합한 음료를 제조하고자 첨가물의 배합비율을 조절하여 기호도를 더욱 개선하고자 하였다. 주 재료의 향미가 그다지 좋지 않아 첨가물을 여러 가지로 조절하였는데 특히 무와 양파 특유의 향미는 상당히 감추기 힘들었다. 전체적인 조화를 깨지 않으면서 향기롭고 산뜻한 정장음료를 개발하기 위해 apple, ume, pine, mint, ginseng, 등의 향료를 고루 사용하였다. 한가지 향료만으로는 충분한 효과를 얻기 어려워 2가지 향을 복합적으로 사용하여 top note와 base note가 어울려 lasting이 오래도록 상쾌한 것을 찾고자 했다. Pine 과 mint는 대체로 top note가 강하고 lasting이 약하므로 apple과 같은 첫 맛이 부드럽고 오래도록 향기로운 것이 조화가 잘 되는 것으로 나타났다. 매실향인 ume는 다소 향미가 겹도는 것 같은 느낌이 들었다. 예비 실험으로는 apple 향과 pine 향이 가장 잘 어울리는 것으로 나타났다.

이 두가지 향이 첨가되었을 때 채소 특유의 잡미를 잘 제거해 주었으며 제품의 상쾌감 또한 상당히 증가되는 것으로 조사되었다. 한편 mint 향은 특유의 휘산성의 화한 느낌이 강하여 깔끔하고 상쾌한 느낌은 상당히 증가되나 전체적인 조화를 이루는데는 그 향기가 너무 튀는 느낌이었다. 음료의 단맛도 설탕보다는 꿀과 물엿을 첨가했으며 장내유익세균의 feeding에 좋도록 올리고당을 약간 첨가해 주는 것으로 그 효과를 더욱 증진시키고자 하였다.

선호도 1, 2위의 시제품을 5가지 항목으로 다시 세분하여 1부터 7점까지 점수를 부여하여 조사한 결과는 표 23에 나타내었다. 음료의 색상은 red beet의 천연색소인 베타시아닌계 색소로부터 부여받은 것인데 너무 진한 선홍색보다 다소 맑은 듯한 선홍색의 시제품 E가 기호도가 약간 높았으며 향미는 매실향인 ume flavor보다 apple flavor가 훨씬 선호도가 높았다. 음식이나 음료의 선택은 거의

당도와 향미에서 결정되므로 시제품 D의 apple 향이 은은하면서 첫 맛을

정장음료의 기호도 검사

본 제품은 Red beet, 무, 사과, 양파 등을 주원료로 제조한 정장음료입니다. 개발품의 기호도를 조사하고자 하오니 아래의 항목을 평가하여 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7점 위치에 적합한 표기를 해주시기 바랍니다.

성명:

성별: 남, 여

- | | | | | | | | |
|-------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 1. 색 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| | <input type="checkbox"/> |
| | 아주 나쁘다 | | 그저 그렇다 | | | 매우 좋다 | |
| 2. 향미 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| | <input type="checkbox"/> |
| | 아주 나쁘다 | | 그저 그렇다 | | | 매우 좋다 | |
| 3. 단맛 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| | <input type="checkbox"/> |
| | 아주 나쁘다 | | 그저 그렇다 | | | 매우 좋다 | |
| 4. 신맛 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| | <input type="checkbox"/> |
| | 아주 나쁘다 | | 그저 그렇다 | | | 매우 좋다 | |
| 5. 종합적인 기호도 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| | <input type="checkbox"/> |
| | 아주 나쁘다 | | 그저 그렇다 | | | 매우 좋다 | |

♥대단히 감사합니다♥

표 22.. 정장음료 시제품의 기호도 조사를 위한 관능검사서식

	시제품 D	시제품 E
1. 색	4.2 ± 1.52*	4.6 ± 1.32*
2. 향미	5.1 ± 1.45*	3.3 ± 1.41*
3. 단맛	3.8 ± 1.20*	3.9 ± 1.30*
4. 신맛	4.6 ± 1.19*	4.7 ± 1.34*
5. 종합적인 기호도	4.7 ± 1.29*	4.5 ± 1.23*

표 23. 시제품의 기호도 조사 비교 결과

* 평균 ± 표준편차, 기호도 검사원 수는 60명

감미롭고 부드럽게 해주며 잡미를 제거하는 데도 효과적이었음을 확인할 수 있었다. 본 음료의 기능성을 높이기 위해 첨가된 양과는 특유의 황 냄새를 갖고 있는데 pine 향과 apple 향이 이를 비교적 잘 masking하여 주었다고 생각된다. 단맛에 있어서도 단 것을 덜 섭취하려는 현대인의 성향과 기호에 맞추기 위해 당도를 그다지 높지 않게 하였는데 막상 관능검사를 실시해보면 당도가 높은 것이 항상 더 맛이 있다고 응답하는 경우가 많았다. 여기서도 당도를 비교적 낮추고자 하였으므로 두 가지 시제품에 대한 당도의 선호도는 그리 높지 않게 나타났다고 여겨진다.

신맛에 대한 기호도는 비교적 괜찮게 나타났다. Red beet의 베타시아닌계 색소의 기간 경과에 따른 변색을 막기 위해 비타민 C를 0.2% 첨가해 주었는데 이때 신맛을 더욱 상쾌하게 해주는 효과가 있어 비교적 선호도가 우수하게 나타나 비타민C의 첨가는 일석이조의 효과를 얻었다고 볼 수 있다. 마지막 항목으로 종합적인 선호도를 조사한 결과는 시제품 D가 4.7점, 시제품 E가 4.5점을 받아

앞으로 선호도가 더욱 좋아질 수 있도록 시제품의 품질과 맛을 더욱 개선해야 할 것으로 여겨진다.

4) 정장음료 제조방법

- (1) Red beet, 양파, 무, 사과 (부사 품종)등을 각각 선별하여 이물질이 제거되도록 깨끗이 수세한다.
- (2) 위 재료들을 세절한다.
- (3) 양파, 무, 사과 등은 정제수나 기타 다른 물질이 혼입되지 않도록 하여 고온 압력 하에서 추출하여 각각 밀봉한다. 이들 고유의 풍미를 지닌 과채즙으로 제조하여 놓는다.
- (4) Red beet는 세절하여 녹즙기와 주서기를 이용해 착즙한다. 착즙액에 citric acid 0.2%, 비타민C 0.2%를 첨가해 녹인 다음 고형분을 하룻밤 침전시키고 다시 원침시킨다.
- (5) 이렇게 얻어진 Red beet 착즙액은 pasteurization 방법으로 살균하여 냉암소에 넣어둔다.
- (6) 각각 제조과정을 거쳐 만들어진 음료는 혼탁형과 청징형으로 구분하여 1, 2차 여과기를 통과시켜 여과한다.
- (7) 각각 제조된 단일 과채즙을 배합비율에 따라 혼합하고 제품의 맛과 향미를 더하기 위해 아래의 첨가물을 넣어 배합한다.
citric acid 0.2% 꿀 2.3%, 올리고당 2.7%, 설탕 4%, 물엿 0.4%, apple flavor 0.08%, pine flavor 0.02%, 비타민C 0.2%
- (8) 좀더 가볍고 맑은 정장음료의 개발을 위해서는 정제수를 12-20% 정도 일정량 첨가하여 수분 공급을 원활하게 해주어 정장효과를 도울 수도 있을 것으로 여겨진다.
- (9) 제조된 시제품 정장음료를 96℃에서 30초간 살균하고 알미늄호일 파우치

에 hot filling한다.

Table 24. Proportion of cofused materials for intestinal improving

원료	배합비 (%)	
	시제품 D	시제품 E
무 추출액	30	30
Red beet 착즙액	42.5	42.5
사과 추출액	15.4	15.4
양파 추출액	1.2	1.2
정제수	-	14
Citric acid	0.2	0.2
꿀	2.3	2.3
올리고 당	2.7	2.7
설탕	4	4
물엿	0.4	3.4
apple flavor	0.08	0.08
pine flavor	0.02	0.02
비타민 C	0.2	0.2

beverage

- (10) 파우치를 70℃에서 15분간 후살균하고 3단계로 냉각수를 분무하여 냉각한다. 가능한 단시간 내에 급냉시킨다.
- (11) 파우치 표면을 건조시키기 위해 건조한 air를 분사시켜준다.
- (12) 생산일자와 유효기간을 표기하고 제품으로 완성한다. 포장단위를 정하여 포장한 후 완료한다.
- (13) 생산제품을 일정한 기간에 따라 일정비율로 수거하여 미생물검사 및 품질 검사를 수행하여 합격품은 출고한다.

(14) 본 제품은 시장성 조사를 통해 경제성이 있다면 보건복지부로부터 품목허가를 받을 수 있다.



Fig. 22. Developed beverage of prototype product D and E

표 24의 두 가지 시제품의 차이점은 D는 정제수를 전혀 사용하지 않지만 D-1은 정제수를 14% 정도 사용하여 좀더 맑고 가벼운 느낌의 정장음료를 만들고자 하였으며 당도가 떨어지는 것을 막기 위해 물엿 3%를 더 보충해 주었다. D의 강렬하고 진한 붉은 색소의 음료는 관능검사 시 검사자의 취향에 따라 식욕을

돋는다거나 너무 자극적이거나 부담스럽다고 느껴 선호도가 크게 달라지기도 했다. 그러나 무엇보다도 이미지 광고를 통해 본 음료의 기능을 자세히 홍보하고 식물체에도 제한적으로 분포하는 귀하고 얻기 힘든 강렬한 천연 적색소를 오히려 강점으로 부각시킨다면 충분히 상품성이 있을 것으로 판단된다.

5) 제품의 품질관리

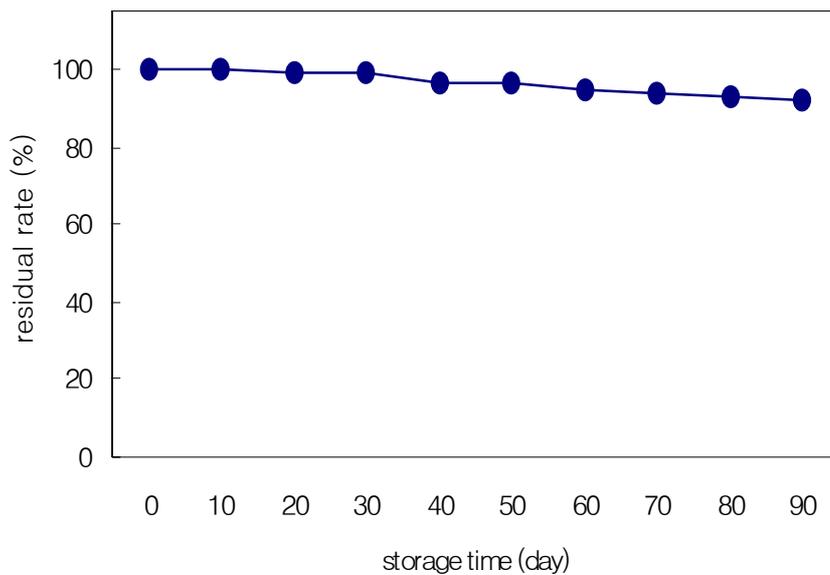
소비자의 기호가 다양화하고 여기에 맞추어 음료시장 또한 다변화하는 가운데 건강을 중요시하는 현대인의 요구에 따라 영양성분이 강화되거나 기능성이 부여된 건강음료가 계속적으로 개발되고 있다. 제품 또한 다양화되어 식이섬유, 칼슘, 아연, 셀레늄, 비타민C 등이 강화된 제품이 출시되고 갈아 만든 주스, 씹히는 맛, 알갱이가 있는 것, 툭툭 터지는 것, 캡슐, 등 식감을 드높이기 위한 연구와 노력이 더욱 요구되고 있다.

여러 가지 관능검사와 품질평가를 통해 시제품을 제조하고 이 제품을 관리하는데 저장기간이나 저장상태, 운반과정 등에 의해 품질요소의 변화가 발생할 수 있으므로 저장기간에 따라 색도, pH, Brix^o, 산도, 등이 어떻게 달라지는지 조사하였다.

(1)저장기간에 따른 색도의 변화

본 시제품의 독특한 천연 적색소는 매우 아름답고 식물체에도 그 분포가 흔하지 않아 희귀한 색소로 알려져 있지만 불안정하여 그 색도의 유지가 매우 중요하므로 색소의 안정성이 저장기간에 따라 어떻게 달라지는지 조사하였다. 베타시아닌은 betalain계 색소로서 betalain 색소에는 535 nm에서 최대 흡광도를 나타내는 붉은 색의 베타시아닌과 480 nm에서 흡광하는 황색소 betaxanthine 이 있다. 본 시제품의 이미지를 표현하는 붉은 색소는 베타시아닌계이므로 여기

서는 저장기간 동안 약 10일 간격으로 535 nm에서 흡광도를 측정하여 저장기간에 따른 색소의 안정성을 조사하였다. 용액의 색도를 535 nm에서 1.5가 되도록 증류수를 첨가하여 조정한 후 매회 sampling시 동량의 증류수로 조절한 다음 같은 조건으로 측정하였다. 그림 22에 보여준 결과에 의하면 저장기간 30일까지는 98%이상 남아 있다가 40일 경과되면 96%로 약간 감소하게 된다. 그 이후 저장기간 90일이 경과하게 되면 92%까지 유지된다. Red beet의 베타시아닌 색소의 불안정성을 감안한다면 이러한 결과는 상당히 고무적인 결과이며 90일 이후부터는 색도의 유지가 현저하게 감소하게 된다. 이런 결과에 의해 이 시제품은 cold system으로 유통해야 하며 shelf life는 90일을 넘지 않도록 해야 한다. 이때의 모든 보관과 운반 시스템은 반드시 cold chain system으로 이어져



야 한다.

Fig. 22 Residual rate of betacyanine according to the storage duration

in refrigerator.

(2) 저장 중 품질요소의 변화

만들어진 시제품은 저장 중에 여러 가지 품질요소가 변화할 수 있으므로 몇 가지 요소들을 조사해 보았다. 베타시아닌계 색소는 pH에 따라 색소의 안정성이 크게 바뀌므로 pH의 유지가 무엇보다 중요하며 당도를 측정해 봄으로써 맛과 품질유지가 일정하게 보존되는지를 함께 조사하였다. 90일 동안 산도와 650 nm에서 탁도의 변화를 측정하여 품질관리의 지표로써 함께 조사하였다. 품질요

	Storage duration (day)									
	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90
pH	4.0	4.0	4.1	4.0	4.0	3.9	3.9	3.9	4.0	4.0
°Brix	10.1	10.1	10.1	10.1	10.1	10.1	10.1	10.1	10.1	10.1
산도	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32
탁도 (A650nm)	0.85	0.85	0.84	0.87	0.86	0.85	0.85	0.83	0.85	0.85

Table 25. The changes of quality in the prototype product according to storage duration

* 중금속과 미생물: 식품공전의 규격에 적합

소의 변화를 측정한 결과는 표 25에 나타내었다. 당도와 pH의 변화가 없었으며 산도 역시 그대로 유지됨을 알 수있다. 탁도는 660 nm에서 흡광도를 측정하였

는데 만일 미생물에 오염되거나 다른 변화 요소가 있다면 탁도가 달라질 것이지만 본 시제품은 저장기일 90일 동안에 거의 변화가 없이 품질이 그대로 유지되는 것으로 보여진다.

(3) 품질관리를 위한 저장실험

이상의 결과에 따라 ascorbic acid 0.2%를 첨가하고 citric acid 0.2%를 첨가한 상태로 red beet와 무, 사과즙을 주원료로 제조된 정장음료의 냉장유통 및 품질관리를 위해 여러 가지 품질관리요소를 측정할 결과 저장기간 동안 식품공전의 미생물 검사 방법에 따라 분석한 결과 미생물은 검출되지 않았다. 또한 관능검사를 통한 소비자의 기호와 연구자들의 판단으로 향미와 효능이 모두 적합하여 본 제품은 약 90일 간의 냉장 유통 시스템으로 관리가 가능하다고 판단되었다. 침전물 발생이나 혼탁도를 판정하기 위하여 650 nm에서 흡광도를 측정하였으며 이 또한 저장과 유통기간 동안 아무런 문제가 없는 것으로 판단되었다. 냉장 유통제품으로서 유통기간 3개월은 제품의 보급과 판매에 충분한 시간이라 여겨진다. 여기에서 본 제품의 부가가치를 향상시키기 위해 본 제품에 beed 형이나 육각형의 Nata de coco 등을 첨가하여 주거나 조직감을 주는 캡슐형의 비타민C 등을 첨가하여 준다면 더 한층 부가가치를 높일 수 있으며 소비자의 기호도 더욱 다양화 할 수 있을 것으로 사료된다.

제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

연구개발 1차 년도에는 주로 식물체의 수집과 생리활성 screening에 중점을 두고 고대로부터 전해 내려오는 고의서, 한의서, 의약집, 구전하여 내려오는 식물체 가운데 정장효과가 있다고 알려진 식물체들을 구하여 그 생리활성을 탐색하고 정장효과 및 기타 생리활성을 조사하였다. 특히 정장효과가 있다고 일반에게 알려진 베타시아닌계 색소의 정장효과를 직접 확인하여 보았다. 확인 결과 베타시아닌계 색소 자체는 알려진 것과는 다르게 정장효과는 미약한 정도였다. 다만 베타시아닌계 색소를 함유하고 있는 red beet와 같은 식물체가 풍부하게 함유하고 있는 다당류들이 장내 유익균주들의 feeding에 영향을 미쳐 장내 유해세균과의 길항작용으로 장내 균총의 변화와 함께 부패가스 등이 발생하지 않아 장기능이 크게 개선되는 효과가 있는 것으로 판단되었다. 1차 년도의 연구목표는 제대로 수행되었고 이어서 2차년도의 연구목표는 식물체 유래의 천연 적색소인 베타시아닌계 색소를 대량 생산하는 세포주의 확보와조직배양 조건의 최적화 등을 연구목표로 하여 시행한 결과 hairy root의 유도로 배양조에서 베타시아닌 색소의 최적생산조건을 확립하였고 이에 따라 천연적색소의 개발과 산업화에 한 걸음 진보를 가져왔다. 3차년도의 목표는 정장효과의 효능검증과 정장음료의 시제품 개발로서 red beet와 무와 양파로부터 추출한 polysaccharides에서 정장효과를 확인하고 분자량 2,000 D이상의 크기를 얻어 구성당을 조사하였고 이들 식물체를 주재료로 하여 정장음료를 개발하였다. 이에 따른 관능검사와 품질관리 요소들을 조사하고 유통기한과 안정성등을 확립하였다. 이와같이 매년 세워진 계획에 따라 연도별 연구목표 및 평가 착안점에 입각하여 연구개발목표를 달성하였고 관련분야의 기술발전에의 기여도에서는 식품에 첨가하는 천연적색소의 개발 기술을 조직배양기술을 통해 확립했다는 것이다.

제5장 연구개발 결과의 활용계획

1. 추가연구의 필요성

정장음료의 개발을 위해 여러 가지 생리활성을 조사한 결과, 항암활성이나 항미생물 활성 등을 screening 할 때에 특별히 간암세포주 Hep3B, 자궁경부암세포주 HeLa 229, 대장암세포주 SNU-C2A등에 항암활성을 높게 나타내는 식물체 추출물에 대해서는 앞으로 후속의 연구가 더욱 기대되고 있다. 솔이끼의 XOD inhibition effect 등 여러 가지 생리활성에 대한 연구는 기대이상으로 높게 나타나 앞으로 더욱 연구가 진행되기를 기대하고 있다. 그 외에 antimicrobial test에서 그람양성세균과 그람음성세균 모두에 대해 넓은 항균스펙트럼을 가진 식물체 등을 대상으로 식품에 응용할 수 있는 방부제의 개발 등 그 연구방향이 많이 있다고 판단된다.

2. 타 연구에의 응용 및 기업화 추진방안

최근 인공감미료와 합성색소 등이 식단을 위협하고 있는 가운데 식물체 유래의 천연 적색소인 베타시아닌계 색소의 대량생산을 위한 배양시스템의 최적 조건을 확립한 것은 매우 고무적인 연구 결과로서 식품 첨가물 산업에 본 연구의 결과가 응용될 수 있을 것으로 판단된다. 이와 같은 기술을 바탕으로 색소산업의 혁신적인 변화와 생산기술을 확립하고 식품산업이 국민보건에 기여하게 되며 그 이외에도 부가가치를 창출할 수 있게 될 것으로 사료된다.

본 연구를 통하여 만들어진 정장음료 시제품은 현재로서 약 3개월 정도의

유통과 저장기간이 유효하며 cold chain system으로 유통되어야 함으로 사실상 운반과 저장경비가 많이 드는 단점이 있다. 고로 현재로서는 기존의 cold chain system을 가진 업체를 선정하는 것이 합리적일 것으로 본다. 그러나 고부가가치를 창출하기 위해서는 현재보다 한 단계 업그레이드 된 기호에 맞추어 음료의 조직감을 개선하거나 좀더 향미가 우수한 재료로 교체하는 것도 바람직하다고 볼 수 있다. 여기에 xylitol 이나 pectin, gum 등을 사용할 수 있으며 특히 Nata de Coco 등을 육각형이나 beed 형으로 제작하여 첨가한다면 좀더 기호를 다양하게 맞출 수 있어 산업화하는 데에 유리할 것으로 사료된다.

제6장 참고문헌

1. Bland, J.S. and Medcalf, D.G. Future Prospects for Functionnal Foods, pp. 537-551. In: Functional Foods: Designer Foods,Pharmafoods, Nutraceuticals,Goldberg, I.(eds.) Chapman & Hall, New York, USA (1994)
2. Duthie, G.G. and Brown. K.M. Reducing theRisk of Cardiovascular Disease, pp. 19-38. In: Functional Foods: Designer Foods,Pharmafoods, Nutraceuticals,Goldberg, I.(eds.) Chapman & Hall, New York, USA (1994)
3. Kook-Hee Kang, Kyung-Min Kim and Sun-Gyu Choi. Effects of the fructooligosaccharide intake on human fecal microflora and fecal properties. 1996. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **28**(4): 609-615
4. Okubo, T., Ishihara, N., Takahashi, H., Fujisawa, T., Kim, M., Yamamoto, T.and Mitsuoka, T., Effects of partially hydrolyzed guar gum intake on human intestinal microflora and its metabolism. *Biosci. Biotech. Biochem.* 1994. **58**(8): 1364
5. Seok-Hwan Cho, Ho-Joung Jeon, Yu-Kyung Han, Seong-Hun Yeon and Young-Joon Ahn. In vitro growth-inhibiting effects of leaf extracts from pinus species on human intestinal bacteria. *Agic. Chem. Biotechnol.* 1999. **42**(4): 202-204
6. Adams, J. P., von Elbe, J. H. and Admundson, C.H. 1976. Production

of a betacyanin concentration by fermentation of red beet juice with *Candida utilis*. *J. Food Sci.* **41**, 78

7. Kim, S., S. Kim, J. Lee, S. An, K. Kim, B. Hwang and H. Lee, 1998. Optimization of betacyanine production by red beet (*Beta vulgaris L.*) hairy root cultures. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**(5): 435-441

8. Masahiro, K., Y. Hitaka, T. Masahito and T. Setsuji. 1999. High-density culture of red beet hairy roots by considering medium flow condition in a bioreactor. *Chemical. Engineering Science* **54**, 3179-3186

9. Hirano, H., M. Sakuta, and A. Komamine. 1992. Inhibition by cytokinin of the accumulation of betacyanin in suspension cultures of *Phytolacca americana*. *Z. Pflanzenphysiol.* **110**, 135-145

10. Lee, K.A., S.Y. Lee, S.J. Woo, J.S. Jo, and S.M. Byun, 1992. Red pigments separated from flower of Cockscomb by agarose gel electrophoresis. *Foods and Biotechnology.* **1**(1): 58-62

11. Hirose, M., T. Yamakawa, T. Kodama and A. Komamine 1990. Accumulation of betacyanin in *Phytolacca americana* cells and of anthocyanin in vitis spl cells on relation to cell division in suspension cultures. *Plant Cell Physiol.* **31**, 267-271.

12. Masaaki S., T. Takagi and A. Komamine. 1986. Growth related accumulation of betacyanin in suspension cultures of *Phytolacca americana L.* *J. Plant Physiol.* **125**: 337-343

13. Steiner, U., W. Schliemann, H. Bohm, D. Strack. 1999. Tyrosinase involved in betalain biosynthesis of higher plants. *Planta* **208**, 114-124

14. Noe, W., C. Langebartels and H. U. Seitz 1980. Antocyanin accumulation and PAL activity in a suspension culture of *Daucus carota* L. *Planta* **149**, 283-287
15. Obata-Sasamoto, H. and A. Komamine. 1983. Effect of culture conditions on DOPA accumulation in a callus culture of *Daucus carota* L. *Planta* **149**, 283-287
16. Sakuta, M. and Komamine, A. 1987. Cell growth and accumulation of secondary metabolites. In "Cell culture and somatic cell genetics of plants" **4**, 97-114 (ed Constabel, F. and Vasil, I. K.), Academic press, San Diego
17. Sakuta, M. T., Takagi and Komamine, A. 1986. Growth related accumulation of betacyanin in suspension cultures of *Phytolacca americana* L. *J. Plant Physiol.* **125**, 337-343
18. Sakuta, M., Hirano, H. and A., Komamine. 1991. Stimulation by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid of betacyanin accumulation in suspension cultures of *Phytolacca americana* L. *J. Plant Physiol.* **83**, 154-158.
19. Schwartz, S. J. and von Elbe, J.H 1980. Quantitative determination of individual betacyanin pigments by high performance liquid chromatography. *J. Agri. Food. Chem.* **28**, 540
20. Schwartz S. J., Hildenbrand, B.E. and von Elbe. J. H. 1981. Comparison of spectrophotometric and HPLC methods to quantify betacyanins. *J. Food Sci.* **46**, 276

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.