

최 종  
연구보고서

하수오를 이용한 고품질의  
가공제품개발 및 산화물 생성  
억제 규명

Development of high quality  
*Cynanchum wilfordii* Hemsley foods  
products and mechanistic elucidation  
of its antioxidant activity

연구 기관

농업협동조합중앙회

농 립 부

## 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “하수오를 이용한 고품질의 가공제품 개발 및 산화물 생성 억제 규명”과제의 최종보고서로 제출합니다.

2003년 9월 3일

주관연구기관명 : 농업협동조합중앙

총괄연구책임자 : 권 혜 순

연 구 원 : 최 경 근

김 성 구

김 영 균

협동연구기관명 : 서울대학교

협동연구책임자 : 지 근 역

연 구 원 : 김 혜 영

유 현 주

민 지 훈

협동연구기관명 : 숙명여자대학교

협동연구책임자 : 성 미 경

연 구 원 : 이 은 주

# 요 약 문

## I. 제 목

하수오를 이용한 고품질의 가공제품 개발 및 산화물 생성 억제 규명

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

하수오는 전래되어 내려오는 민간요법으로 이용되어 왔고 장기간 복용함으로써 효과를 거두게 되는 것으로 알려져 왔으며 지금까지는 식품의 부원료로 최소량만을 사용할 수 있었는데 2000년부터 식품의 주원료로 사용될 수 있도록 식품공전 개정이 이루어져 하수오를 이용한 다양한 가공제품의 개발이 기대되고 있다. 건강기능성 신소재에 동양의 한방소재를 이용하는 시장규모가 한국은 1999년의 경우 1994년보다 5배 성장한 반면 미국은 15배 성장하였고 소재의 종류 또한 한국은 22개 소재에서 25개 소재로 거의 성장이 없는 반면 미국은 78개 소재에서 900개 소재로 다양하게 급성장하였다. 따라서 우리의 약용식물인 하수오의 우수성을 세계에 알리고 더 이상 우리의 약용작물이 해외유출이 안되도록 보호하는 차원에서 하수오의 제품을 연구, 개발하고 우수한 성분들을 규명하는 것이 필요하다. 본 연구에서는 국내 어디서나 우리의 전통농산물의 건강제품을 손쉽게 즐길 수 있도록 영양, 건강 및 보존성을 고려한 제품화와 하수오의 항산화 효능을 시험관과 생체내에서 체계적으로 규명하여 부가가치가 높은 제품 개발에 목적을 두었다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

현재 하수오와 관련된 국내·외 문헌들을 조사하고 수집하여 주성분 및 특성, 생리적 효과 등을 알아보고 하수오를 기준으로 원료를 검토하여 적절한 제품과 제조공정을 조사하여 경제적이면서도 제품의 품질이 높고 상품화가 용이한 방법을 선정하였다.

하수오 가공제품의 원료선정 및 제조공정 실험은 주원료와 잘 어울리는 부원료를 선정하고 제조공정은 전처리공정, 건조실험, 분쇄공정 연구, 배합 및 혼합

공정, 살균 및 충전공정, 포장연구등을 통하여 최적의 제조방법을 선정하였다.

하수오 발효제품 개발은 하수오를 원료로 발효적성이 우수하고 풍미를 향상시킬 수 있는 *Bifidobacterium* 등의 유산균을 선발하여 발효 특성을 규명. 생리활성이 우수한 유산균을 전문적으로 스크리닝하고 기호성이 우수한 유산균을 이용한 기능성 발효식품을 개발하였다.

최종 우수한 시제품이 선정되면 최적의 제조공정을 확립하고 생산을 위한 layout을 설계하였고 또한 원재료비도 산정하였다.

백하수오는 예로부터 노화억제 효능을 가진 식물로 한약재 또는 식품으로 사용되어져 왔으나 그 효능과 관련한 그 과학적 검증은 매우 제한적으로 이루어져 왔다. 따라서 하수오가 소유한 노화억제 효능의 과학적 근거를 제공하기 위하여 하수오 및 그 추출물의 항산화능을 시험관내 실험에서 인체실험까지 단계적으로 수행하였다.

#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 연구에서 사용한 하수오는 백하수오(*Cynanchum wilfordii* Hemsley)로써 일반 성분 분석결과 수분 9.06%, 회분 3.07%, 조지방 1.91% 조단백질 21.01%였다. 하수오의 유리당 함량은 fructose 0.52%, glucose 0.78%, sucrose 13.30%, maltose 0.59%였으며 무기질 함량은 Mg 31.40 mg/L, Na 5.04 mg/L, K 263.0 mg/L, Ca 38.74 mg/L 였다. 이러한 하수오의 원료특성을 감안하여 환제품은 원료를 분쇄한 후 혼합하여 Roll반죽을 하고 장환 및 절환, 정환공정을 거쳐 건조한 후 성형을 위해 코팅을 하고 유통을 위해 송풍건조하여 하수오환을 제조하였으며 과립차는 원료를 다른 부재료와 혼합하여 과립공정을 거친 후 건조공정을 거쳤으며 침출차는 하수오원료를 절단, 건조하여 1, 2차 덩어리공정을 거쳐 체별, 혼합공정을 거쳐 제조하였다.

액상차는 하수오 추출물에 한방추출물, 한방향, 꿀, 구연산등을 넣어 혼합, 살균하여 제조하였으며 스프는 하수오원료를 분쇄하여 볶음공정을 거친후 건조된 다른 원료를 혼합하여 하수오환 및 스프를 제조하였다.

이러한 하수오 가공제품들은 제조공정을 확립하여 설계도를 작성하였으며 이 제품들 중 현재 하수오환 가공제품은 영주농협 가공공장에서 출시하여 판매하고 있다.

또한 하수오(*Cynanchum wilfordii* Hemsley) 추출물로부터 항산화 성분이 있는 생리활성물질 정제 및 구조 분석을 통하여 하수오의 생리활성물질이 flavonoid의 형태로서 C6-C3-C6의 dimeric 형태의 혼합물로 보이며 LC-MS 분석결과 분자량은 480내외인 것으로 나타났다.

기능성 식품으로서의 하수오 발효제품 개발 가능성을 조사하기 위하여, 유산균을 이용한 하수오 발효능을 조사하였으며, Fructooligosaccharide(FOS)와 sucralose를 첨가하여 관능성 개선도를 측정하였다. 발효 48 시간동안 하수오내의 유산균이 성장을 보였으며, 그 발효능은 발효시간동안 각각의 lactic acid, acetic acid, 생균수, pH 측정으로 평가하였다. *Lactobacillus casei* 911, *L.bulgaricus* KCTC 2182, *Lacidophilus* KCTC 3188, *Streptococcus thermophilus* th-3, *Bifidobacterium spp.* CH-2, CW-133, CW-155 균주가 하수오 발효시  $10^8$  CFU/ml 이상 측정되었으며, 특히 *Bifidobacterium spp.* CH-2의 acetic acid 생성능과 *Lactobacillus casei* 911, *Streptococcus thermophilus* th-3 의 lactic acid 생성능이 가장 높게 관측되었다. FOS를 첨가한 균은 bifidobacteria 발효시에는 peak time과 성장능이 어느정도 저하되었으며, *Lactobacillus* strains의 경우 역시 생육시간이 지연되었다.

관능평가는 발효된 하수오에 감미료를 첨가하여 측정하였으며, 발효된 하수오 100 %를 사용할 경우 기호도의 현저한 저하가 나타났다. 이를 개선하기 위하여 발효된 하수오와 발효되지 않은 하수오를 적절하게 희석하여 사용하였고, 신맛과 쓴맛을 개선하기 위해 sucralose를 첨가하여 관능도를 다시 측정하였다. 이 결과 신맛과 기호도가 현저하게 개선되었다. 이 실험결과는 하수오가 유산 발효 기능성 제품에 적합한 재료임을 제시해주고 있다.

하수오 추출물의 시험관 내 항산화능 측정 결과 추출물들은 사용농도에 의존적으로 항산화능이 유의적으로 증가하였으며 자외선 조사에 의한 지질과산화물 형성 역시 농도 의존적으로 억제되었으며, buthanol, chloroform, ethylacetate 추출물에 의한 지질과산화물 형성 억제율이 유의적으로 높게 나타났다. 세포를 이용한 실험결과 뇌신경조직 유사 세포에 하수오 추출물 첨가시 지질과산화물 양은 감소되고 체내 항산화시스템 중 일차방어 효소인 SOD의 활성과 단백질양이

증가되었다. 백하수오 추출물 중 전자공여능과 지질과산화 억제능이 좋은 ethylacetate 추출물과 식품으로의 가공이 쉬운 열수추출물을 정상식이 또는 고지방식이를 하는 쥐에게 격일로 6mg/100g b·w 농도로 6주간 경구투여 후 간과 뇌조직의 microsome을 분리하여 FeCl<sub>3</sub>-ascorbic acid로 산화시킨 후 TBARS를 측정된 결과 고지방식이군에서 ethylacetate추출물 투여군이 대조군에 비해 현저히 감소하였다. 한편 뇌조직에서는 일반식이군과 고지방식이군 모두에서 하수오 추출물을 투여한 군이 각각의 대조군에 비해 TBARS 생성량이 현저히 낮은 것으로 관찰되었다. 또한 백하수오 추출물의 안전성 여부 측정을 위해 13주간 추출물 투여하여 subchronic toxicity를 측정하였는데 단백질 대사지표, 간기능지표 수치가 모두 정상범위에 속하므로 독성이 없는 것으로 사료된다. 하수오 발효식품의 쥐 대장암 발생 억제효과와 인체 실험을 통한 하수오환의 항산화능을 평가하였다. 된 하수오 물추출물을 비피더스균으로 발효시킨 제품을 대장암을 유발시킨 쥐에게 섭취시킨 결과 추출물 일반식이군에서는 비피더스균 첨가식이군에서 과산화물량이 유의하게 감소하였고 고지방식이군에서는 하수오식이군, 하수오발효식이군에서 지질과산화물 형성이 유의적으로 억제되었다. 그리고 일반식이군과 고지방식이군 모두 하수오 열수추출물 투여군에서 대장암 지표인 ACF생성이 억제되었고 인체실험결과 double blinded, cross-over design의 인체실험에서 하루에 6g 하수오를 일주일간 건강한 성인여성에게 섭취시킨 후 혈장의 LDL을 분리시켜 Cu로 산화를 유도시켰을 때 하수오 섭취군에서 LDL 산화가 유의적으로 억제되는 것이 관찰되었다. 이상의 결과에 의하면 하수오는 동물 뿐 아니라 인체에서도 지질과산화를 억제하는 항산화 효능을 소유한 것으로 보이며 기능성 식품으로의 개발 가능성이 입증되었다.

본 연구결과는 우리의 전통산물인 하수오를 부가가치가 높은 가공제품 개발을 가능하게 하였고 항산화 성분을 분석하고 효능을 규명함으로써 하수오를 건강기능성식품으로써 과학적 근거를 제시하였다.

## SUMMARY

### (영문 요약문)

*Cynanchum wilfordii* Hemsley has been utilized in the Korean traditional remedies and the beneficial effects of *Cynanchum wilfordii* Hemsley has been manifested through the long-period of continuous use. *Cynanchum wilfordii* Hemsley was recently permitted to be used as a GRAS material by the revision of the Korean food regulations, whereas it had been only permitted as a minor food component before the revision of the regulation concerned. Therefore an active product development using *Cynanchum wilfordii* Hemsley will be expected.

The market value and the kinds of new functional food materials grew 5-fold and from 22 types to 25 types, respectively, from 1994 to 1999 and in Korea. On the other hand, there were 15-fold growth of market value and expansion of functional food materials from 78 to 900 during the same period in USA. Therefore it will be necessary to advocate the excellency of *Cynanchum wilfordii* Hemsley to abroad and protect our natural resources from being exploited by the foreign countries. In this context, it is important to do research on the functional components of *Cynanchum wilfordii* Hemsley and develop value-added *Cynanchum wilfordii* Hemsley products.

The root of *Cynanchum wilfordii* Hemsley (CWH) has been used as a herbal medicine in Asia and studied for its antioxidative capacity and prevention of constipation. The fermentation of CWH with probiotic lactic acid bacteria may improve its application as functional food and sensory value of the product. To investigate the possibility of developing lactic-fermented CWH as a functional food, we performed an optimization for the fermentation process to produce a fermented drink from CWH using

probiotic lactic-fermented CWH. For the fermentation, the microorganisms were grown in CWH extract for 48 hr. During various fermentation periods, changes in the contents of lactic acid, acetic acid, pH, and viable cell counts were measured. *Lactobacillus casei* , *Lactobacillus bulgaricus* , *Lactocillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* th-3, *Bifidobacterium* spp. CH-2, CW-133, CW-155 grew up to 10<sup>8</sup> CFU/ml in 7 %

CWH extract medium. Especially, *Bifidobacterium* spp. CH-2 showed high viability and *Lactobacillus casei*, *streptococcus thermophilus* th-3 showed high productivity of lactic acid and viability during fermentation. These results suggest that *Cynanchum wilfordii* *Hemsley* may be a suitable material for the production of lactic-fermented functional foods.

Antioxidants present in different plants are known to possess to retard aging process and to reduce cellular oxidative stresses. To acquire additional values, physiological activities of minor components in these plants require firm scientific evidences for their functions. *Cynanchum wilfordii* *Hemsley* has been used for centuries as a tonic nutraceutical in China and Korea. This plant has been known to possess an advantage of anti-aging effect. Overall objectives of this study were to allow additional values to *Cynanchum wilfordii* *Hemsley* as a supplier of functional food components, and to develop nutritionally and economically well designed health food products from *Cynanchum wilfordii* *Hemsley*. To achieve above objectives, the efficacy of *Cynanchum wilfordii* *Hemsley* as antioxidants was studied in a series of in vitro and in vitro investigations.

Water, ash, fat and protein contents of *Cynanchum wilfordii* *Hemsley* used in our study were 9.06%, 3.07%, 1.91%, and 21.01%, respectively. Reducing sugar contents of *Cynanchum wilfordii* *Hemsley* were 0.53% fructose, 0.78% glucose, 13.30% sucrose, and 0.59% maltose. Mineral contents were 31.40 mg/L Mg, 5.04mg/L Na, 263.0mg/L K, and 38.74mg/L Ca. With considerations of their physical and chemical characteristics, tablets, tea granules, tea bags, liquid concentrates, and soup base are developed. The



manufacturing procedure for these is established, and the products are in the market Youngju Nonghyup as the producer.

Powered sample of *Cynanchum wilfordii* Hemsley was fractioned using different organic solvents. Each fraction was tested for their in vitro electron-donating ability(EDA) and inhibitory activity against lipid peroxide formation. EDA of extracts was in order of ascorbate>chloroform extract>ethylacetate extract >buthanol extract. In PC 12 cells as a model of neuron cells, chloroform extract of *Cynanchum wilfordii* Hemsley reduced lipid peroxide formation, while the activity and protein levels of superoxide dismutase(SOD) were elevated. To identify antioxidant components from the chloroform extract of *Cynanchum wilfordii* Hemsley, LC-MS analysis was performed, and the C6-C3-C6 dimeric isomers(MW 480) are identified as possible antioxidants. We also determined the effect of extracts on ex vivo LDL oxidation induced by  $\text{Cu}^{2+}$  in rats fed control of high fat diet. Results indicated that LDL oxidation and tissue lipid peroxide were increased in groups fed high fat diet. However, rats fed the HF+extract showed a significantly lower levels of brain tissue lipid peroxide compared to those in the control rats. The subchronic toxicities of *Cynanchum wilfordii* Hemsley were measured to determine the likely toxicity for humans. Rats were gavaged with 3mg/100g bw/day, 5mg/100g bw/day (ethylacetate fraction) or 5mg/100g bw/ day(water fraction) for 13 wk. Results suggest that no observable toxic effect was found based on hematology and blood chemistry. In a following study, to examine the effects of fermented *Cynanchum wilfordii* Hemsley on colon carcinogenesis, male F344 rats were injected with AOM(15mg/kg bw) weekly for two weeks. Results showed that *Cynanchum wilfordii* Hemsley water extract suppresses the development of aberrant crypt foci, indicating *Cynanchum wilfordii* Hemsley is a possible preventive agent in early stage of colon carcinogenesis. However, fermented *Cynanchum wilfordii* Hemsley diet did not have significant effects. Finally, we performed a human intervention study using crossover design. Healthy

volunteers(n=17) were recruited. Subjects were randomly divided into 2 groups of 9 females and 8 females. One group of subjects consumed the *Cynanchum wilfordii Hemsley* for 7 days while the other group consumed the placebo. After one week of wash-out period, the 2 groups were switched for treatments. Results showed that *Cynanchum wilfordii Hemsley* supplementation significantly decreased LDL-oxidation comparison with the placebo supplementation.

In conclusion, *Cynanchum wilfordii Hemsley* is shown to possess antioxidative properties reducing lipid oxidation both in animals and humans. Also, *Cynanchum wilfordii Hemsley* did not possess possible subchronic toxicity implying it is a good candidate material for functional food development.

In this study we performed basic studies to assess antioxidative properties and improve beneficial functions of the *Cynanchum wilfordii Hemsley* which is one of the Korean traditional herbal medicines. Our present research results will provide sound scientific basis to develop *Cynanchum wilfordii Hemsley* as a functional food products.

# CONTENTS

## (영 문 목 차)

|  |    |
|--|----|
| Chapter 1. Introduction .....  | 1  |
| Paragraph 1. Technical aspects .....   | 1  |
| Paragraph 2. Industrial and economic aspects .....   | 4  |
| Paragraph 3. Social and cultural aspects .....   | 9  |
| <br>   |    |
| Chapter 2. State of international and domestic<br>technology Development .....   | 12 |
| Paragraph 1. The present condition of <i>Cynanchum</i><br><i>wilfordii</i> Hemsley .....   | 12 |
| Paragraph 2. Recent research result for available<br>component of <i>Cynanchum wilfordii</i><br>Hemsley .....                      | 14 |
| Paragraph 3. State of international technology<br>concerning fermentation product .....  | 15 |
| <br>   |    |
| Chapter 3. Research contents and results of<br>development of functional product using<br><i>Cynanchum wilfordii</i> Hemsley ..... | 18 |
| Paragraph 1. Study Contents: Efficacy study of<br><i>Cynanchum wilfordii</i> Hemsley and their<br>products as antioxidants .....   | 18 |
| Paragraph 2. Study Results: Efficacy study for<br><i>Cynanchum wilfordii</i> Hemsley and their<br>products as antioxidants .....   | 36 |

|  |     |
|--|-----|
| Paragraph 3. Purification and structural elucidation of physiologically active antioxidative components from <i>Cynanchum wilfordii</i> Hemsley extracts .....       | 62  |
| Paragraph 4. Analytical method of developing product by using <i>Cynanchum wilfordii</i> Hemsley .....   | 76  |
| Paragraph 5. National selection and and processing aptitude of developing product by using <i>Cynanchum wilfordii</i> Hemsley .....                                  | 81  |
| Paragraph 6. Consideration items for production in developing product by using <i>Cynanchum wilfordii</i> Hemsley .....  | 87  |
| Paragraph 7. Proessing layout of developing product by using <i>Cynanchum wilfordii</i> Hemsley .....  | 109 |
| Paragraph 8. Study Contents: Screening and identification of lactic acid bacteria for <i>Cynanchum wilfordii</i> Hemsley fermentation and process optimization ..... | 114 |
| Paragraph 9. Study Results: Research and development of <i>Cynanchum wilfordii</i> Hemsley fermented product using lactic acid bacteria .....                        | 123 |
| Chapter 4. Research achievements and contribution to other research fields .....   | 153 |

|   |     |
|---|-----|
| Chapter 5. Application plan of the results .....  | 159 |
| Chapter 6. Informations about foreign research trends<br>obtained during this project ..... | 161 |
| Chpater 7. References .....   | 163 |

# 목 차

|       |  |     |
|-------|--|-----|
| 제 1 장 | 연구개발과제의 개요 .....                                 | 1   |
| 1     | 기술적 측면 .....                                     | 1   |
| 2     | 경제·산업적 측면 .....                                  | 4   |
| 3     | 사회·문화적 측면 .....                                  | 9   |
| 제 2 장 | 국내의 기술개발 현황 .....                                | 12  |
| 1 절   | 하수오의 현황 .....                                    | 12  |
| 2 절   | 하수오의 유효성분과 관련된 최근의 연구결과 ..                       | 14  |
| 3 절   | 발효제품과 관련한 국외 기술개발 현황 .....                       | 15  |
| 제 3 장 | 연구개발수행 내용 및 결과 .....                             | 18  |
| 1 절   | 하수오 및 가공제품 향산화 효능규명 연구내용 ..                      | 18  |
| 2 절   | 하수오 및 가공제품 향산화 효능규명 연구결과 ..                      | 36  |
| 3 절   | 하수오 추출물로부터 향산화 성분이 있는 생리활<br>성물질 정제 및 구조분석 ..... | 62  |
| 4 절   | 하수오 가공제품의 분석방법 .....                             | 76  |
| 5 절   | 하수오 가공제품의 원료선정 및 제조공정 적성 ..                      | 81  |
| 6 절   | 하수오 가공제품의 생산을 위한 고려사항 .....                      | 87  |
| 7 절   | 하수오 가공제품 제조공정 설계도 .....                          | 109 |
| 8 절   | 하수오 유산균 발효제품 연구내용 .....                          | 114 |
| 9 절   | 하수오 유산균 발효제품 연구결과 .....                          | 123 |

|       |                                 |     |
|-------|---------------------------------|-----|
| 제 4 장 | 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....        | 153 |
| 제 5 장 | 연구개발결과의 활용계획 .....              | 159 |
| 제 6 장 | 연구개발과정에서의 수집한 해외과학기술정보<br>..... | 161 |
| 제 7 장 | 참고문헌 .....                      | 163 |

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 1. 기술적 측면

하수오는 전래되어 내려오는 민간요법으로 이용되어 왔고 장기간 복용함으로써 효과를 거두게 되는 것으로 알려져 왔으며 지금까지는 식품의 부원료로 최소량만을 사용할수 있었는데 2000년부터 식품의 주원료로 사용될수 있도록 식품공전 개정이 이루어져 하수오를 이용한 다양한 가공제품의 개발이 기대되고 있다.

건강기능성 신소재에 동양의 한방소재를 이용하는 시장규모가 한국은 1999년의 경우 1994년보다 5배 성장한 반면 미국은 15배 성장하였고 소재의 종류 또한 한국은 22개 소재에서 25개 소재로 거의 성장이 없는 반면 미국은 78개 소재에서 90개 소재로 다양하게 급성장하였다. 따라서 우리의 약용식물인 하수오의 우수성을 알리고 더 이상 우리의 약용작물이 해외유출이 안되도록 보호하는 차원에서 하수오의 제품을 연구, 개발하고 우수한 성분들을 규명하는 것이 필요하다.

약용식물의 건조기술과 여러가지 가공기술 즉, 분쇄기술, 가공혼합기술, 조미기술, 저장기술등의 적용으로 고품질의 하수오 가공제품을 개발하고 하수오의 정장작용과 기능성 유산균주와의 시너지 창출이 기대된다.

국내 어디서나 우리의 전통농산물의 건강제품을 손쉽게 즐길수 있도록 영양, 맛, 위생 및 보존성을 고려한 제품화가 필요하며 하수오의 항산화 효능을 시험관과 생체내에서 체계적으로 규명하여 부가가치가 높은 제품 개발이 필요하다.

최근 식품학, 영양학, 약학 등의 연구분야에서는 다양한 식물체 내에 존재하는 각종 화합물들이 소유한 생물학적 활성 평가가 이루어지고 있고 그 중에서도 항산화 활성에 관한 연구에 관심이 집중되어 있다. 그 중요한 원인은 생물체의 노화과정이 산화스트레스와 밀접한 관련을 가진다는 것이 밝혀지면서 이를 조절하는데 관여하는 천연화합물의 가치가 부각되고 있기 때문이다. 특히 동맥



경화증 및 암과 같은 만성퇴행성 질환의 발생원인으로 산화물의 생성이 지목되고 있어 이들이 갖는 의의는 매우 크다. 그러나 대부분의 식물체 내의 항산화제에 관한 연구는 시험관내 시험에서 그치는 경우가 많아 시험관내 실험결과를 동물 및 임상실험에 까지 확대시켜 그 응용가능성을 높이는 것이 적대적으로 필요하고 이때 사용되는 생체 내 지표자에 관한 연구 필요성도 증대되고 있다. 한편 이러한 물질을 개발하는 궁극적인 목표는 부가가치가 높은 상품을 개발하는데 있으므로 개발된 제품의 효능을 평가하는 것이 무엇보다 중요하다 할 수 있다.

변비개선효과가 있다고 알려진 천연 생약재로는 둥근자, 결명자, 노회, 대황, 망초, 센나엽, 마자인, 감수, 대극, 원화, 파두, 흑축, 이질풀, 물식자 나무, 느릅나무, 무화과나무, 하수오, 마디풀, 호장, 장군풀, 종대황, 금문대황, 자리공, 쇠비름, 피마자유, 알라파, 크스카라사그라다, 후랑굴라피, 말강남, 삼백초 및 차전자 등이다. 이중에 하수오(何首烏, *Cynanchum wilfordii* Hemsley)는 중국 당나라시대에 불로장수(不老長壽)의 약으로서 널리 이용되었던 전설적인 약물로 은조롱이라고도 하며 전국적으로 야생하고 뿌리는 굵은 고구마처럼 생겼으며 큰 것은 직경 20cm에서 40cm정도 된다. 꽃은 담녹색으로 눈에 띄지 않을 정도로 작다. 강장, 병후회복, 노인성 무기력증, 상습변비에 효과적인 것으로 알려져 있다. 그 성분으로는 Lecithin 및 Chrysophanol, Emodin 등의 Anthraquinone 유도체가 들어 있다. Lecithin은 신경조직, 혈구 및 기타세포를 구성하는 필수물질이다. Cholesterin의 간내 침적을 방지하고 동맥죽상경화를 경감시킨다. 부신피질호르몬과 유사한 작용이 있다. 또한 Anthraquinone류를 함유하기 때문에 설사작용이 있다. 또 결핵간균과 *Shigella flexneri* (이질간균)에 대하여 억제작용이 있다. 창옹(중기)의 치료에 현삼, 지화지정 등과 같이쓰고 혈허변비에 당귀, 화마인, 육종용과 같이 사용한다. 최근 중국에서 대머리 치료약이 개발되어 우리나라에서도 각광을 받고 있다. 이 대머리약에 하수오가 함유되어 있다. 人蔘首烏精(인삼과 하수오를 4:6의 비율)을 끓여서 먹으면 식욕부진, 신경쇠약, 건망증을 없애고, 오래동안 복용하면 근육이 튼튼해지고, 혈색이 좋아지고, 머리카락도 검어지고, 노화(老化)를 방지한다. 최근 재배면적 및 생산량이 증가 추세에 있으며 주산지는 경북 영주, 전남 여천 등이다. '98년 173ha의 재배면적에서 557톤이

생산되었다 (특용작물 생산실적 : 농림부).

하수오의 수출물량은 미미한 실정이며 수입은 '94년 27톤, '95년 5톤 정도가 되었다 (한국의약품 수출입 협회). 내수 시장에서의 소득은 연간 50만원/10a 내외이다 ('90, '91 농업경영 연구사업보고서 : 농촌진흥청). 현재의 하수오 소비 형태를 보면 대부분이 한약재로 별다른 가공 없이 이용되어 그 약효 및 기능성의 잠재력을 제대로 이용하지 못하는 실정이다. 이를 이용한 유산균 발효 식품을 개발한다면 유산균과 하수오의 각각의 정장효과를 극대화한 새로운 제품을 얻을 수 있을 것이다. 현재 정장제로 시판되고 있는 요구르트 및 발효음료는 소재의 한계성에 직면하고 있어 더 나은 기능성을 부여하기 위해서는 새로운 기능성 정장 소재를 선별하여 신소재에 적합한 발효균주를 선별하여야 하고 소재의 분자구조 및 그에 따른 균주의 효소 및 균주의 생리가 체계적으로 조사되어야 한다.

◆ 하수오를 이용한 발효제품의 개발에 따른 문제점과 해결방안

| 문 제 점                                       | 해결 방안  |
|---|--|
| 하수오의 물리 화학적 구조에 따른 유익균총의 선택적 증식 촉진 작용 이해 미비 | 균주에 따라 보유 효소와 세포막 운반 체계가 상이하므로 소재별 배양성이 우수한 균주 개발                  |
| 하수오 발효에 적합한 균주의 연구 미비                       | 한약재 발효에 적합한 균주를 한국인 장내에서 분리  |
| 생리 활성 및 기능성의 검증                             | 제품개발과 동물실험에 의한 변비 개선능 등의 <i>In Vivo</i> , <i>In Vitro</i> 평가 방법 개발 |
| 중균의 고농도 배양에 대한 기술적인 취약성                     | 생육 촉진 인자, 산화환원 전위 혐기배양 기술 개발                                       |
| 제품의 다양화, 질적·영양적 향상                          | 하수오를 이용한 관능적·기능적·약리적 향상을 노인 정장과 연계                                 |
| 개발기술의 실용화                                   | 대량 생산 시스템 검증을 위한 pilot system 검정 및 scale up 기술 개발                  |

본 연구개발은 한약재인 하수오를 주원료로 하여 산업체 적용이 용이하고 농산물의 부가가치를 높여주는 고품질의 하수오가공제품을 개발하고 또한 배양성이 우수한 새로운 균주를 선발, 이를 이용하여 우수한 기능성을 가진 새로운 발효제품을 개발함을 목적으로 한다.

개발제품에 들어간 하수오추출물의 항산화 효능을 규명하고 개발된 제품의 대장암 생성 억제능을 측정하였으며 인체실험을 통한 하수오의 항산화 효능을 규명함으로써 기능성 식품으로써 하수오가공제품의 과학적 근거를 제시하고자 한다.

## 2. 경제·산업적 측면

하수오를 재배하는 농가에서 부가가치를 높여 소득증대에 기여하기 위하여 고품질의 검정된 제품을 생산할 수 있도록 개발이 필요하고 현재 하수오를 단

지 건재로써 판매함으로써 남은 자투리등은 폐기되어 생산성이 없고 수익사업이 되지 못하므로 하급품의 부가가치를 높여 농민의 소득증대에 기여하고 버리는 잉여농산물의 활용의 적절성을 꾀할수 있을 것이다. 또한 순수 국산 농산물의 가공이용으로 농산물 생산농가의 소득증가를 가져올뿐 아니라 우리 전통 건강식품의 소비를 촉진시키고 한국의 국산농산물의 산업화로 우리식품을 세계에 널리 알리고 국내 및 해외수출이 가능하여 수출촉진이 기대되고 국산농산물의 이용을 극대화하기 위하여 소비자의 기호에 맞추어 현대적으로 상품화함으로써 우리의 전통식품을 계승하고 소비를 증가시켜 이익을 극대화 할 수 있다.

하수오는 최근 재배 면적 및 생산량이 증가 추세에 있으며 주산지는 경북 영주, 전남 여천 등이다. 98년 173ha의 재배면적에서 557톤이 생산되었다(표 참조). 최근까지 하수오는 식품의 주원료로는 사용하지 못하고 첨가물의 형태로 사용하도록 규정되어 왔으나 그 규제가 풀려 식품의 주원료로 사용이 가능하게 되었다. 이에 따라 하수오를 주원료로 하는 가공제품의 개발에 따른 새로운 가치 창출이 가능하게 되었다.

표 1. 하수오 재배 면적 및 생산량 (전국)

| 연도       | 92  | 93  | 94  | 95  | 96 | 97  | 98  |
|----------|-----|-----|-----|-----|----|-----|-----|
| 재배면적(ha) | 70  | 114 | 153 | 134 |    | 206 | 173 |
| 생산량(M/T) | 228 | 393 | 404 | 128 |    | 679 | 557 |

자료 : 특용작물 생산실적 (농림부)

표 2. 주요 주산지 시군별 재배 면적 (단위 : ha)

| 구분 | 계    | 영주   | 여천   | 진천  | 영풍  | 화순  | 광양  | 기타  |
|----|------|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|
| 90 | 50.3 | 23.0 | 13.6 | 3.3 | 3.0 | 1.3 | 1.1 | 5.0 |

자료 : 특용작물 업무편람 (93, 농협중앙회)

표 3. 주요 도별 생산량 (95)

| 구 분      | 계   | 경북  | 강원  | 전북  | 충북  | 전남  |
|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 농가수(호)   | 576 | 544 | 10  | 9   | 8   | 5   |
| 전체면적(ha) | 134 | 120 | 1   | 2   | 5   | 5   |
| 수확면적(ha) | 128 | 116 | 1   | 2   | 4   | 5   |
| 단 수 (kg) | 313 | 303 | 400 | 350 | 180 | 520 |
| 생산량(M/T) | 400 | 352 | 4   | 7   | 11  | 26  |

자료 : 특용작물 생산실적 (96, 농림부)

경제 발달 및 소득 수준의 향상에 따라서 국민들은 건강 지향적인 상품에 많은 관심을 갖게 되고 기능성 식품에 대한 요구성이 증가되고 있다. 또한 노령화 사회가 다가옴에 따라 노인층이 새로운 구매력을 가진 집단으로 대두되고 이들의 주 관심사는 건강추구이기 때문에 이들을 대상으로 하는 한약재 발효 식품은 큰 시장성을 가진다고 할 수 있다. 따라서 유산균 관련 제품은 계속적으로 수요가 늘어갈 것으로 예측되며 앞으로의 전망은 자연발효식품보다는 우량종균을 이용한 조절발효식품으로 건강에 대한 위험 인자를 함유하는 제품보다는 생리기능이 우수하고 건강 지향적 발효식품으로 소비자의 선택이 두드러지게 될 것으로 예상된다. 당 연구팀에 의하여 예비적으로 하수오에 대한 발효능을 조사한 결과 한국인 유래의 비피더스균종 발효능이 우수한 균을 선발 할 수 있었다. 현재 발효유와 발효 식품 이외의 정장 유산균 국내 시장 현황은 다음과 같다. 이들 제품은 대부분이 생리활성 유산균들은 배양하고 분말화하여 캡슐화한 형태의 제재로서 원래 균주 자체가 보유한 생리활성 이외의 기능성을 기대하기는 힘들다. 따라서 이들의 기능성을 더 강화시킨 하수오 발효제품의 개발은 큰 의미가 있다고 할 수 있다.

표 4. 유산균 정장제 국내 시장 현황 (출처 : PharmaMedic Korea)

| 제 품     | 업 체    | 규격  | 단 가 | 96년도 생산 실적<br>(백만원) |
|---------|--------|-----|-----|---------------------|
| 락토리스    | 동광제약   | 1캡셀 | 96  | 5,500               |
| 동화 락토올  | 동화약품공업 | //  | 221 | 10,000              |
| 락스티날    | 한영제약   | //  | 177 | 8,000               |
| 락스틴     | 한올제약   | //  | 189 | 800                 |
| 락티      | 환인제약   | //  | 198 | 1,000               |
| 비오딘 에스  | 대우약품   | //  | 172 | 1,500               |
| 비오플 에스  | 한국화장품  | //  | 170 | 8,000               |
| 올리비올 에스 | 코오롱 제약 | //  | 170 | 6,000               |
| 올리비올    | //     | //  | 140 | 7,000               |
| 벤투룩스    | 동구약품   | 1g  | 142 | 5,000               |
| 누크베비산   | 보령제약   | //  | 50  | 6,000               |
| 메디락 에스  | 한미약품   | //  | 161 | 9,000               |
| 바이리스정   | 제일제당   | 1정  | 64  | 7,000               |
| 락토메드정   | 일동제약   | //  | 39  | 6,000               |
| 비오티스 정  | 동성제약   | //  | 6   | 4,000               |
| 합계 :    |        |     |     | 84,800              |

· 국내 정장제 총 매출 규모 : 약 840억원

기존의 발효제품은 주로 우유에 치중되어왔다. 그 동안의 노하우나 기술 등이 유제품 발효에 적합하도록 개발되어왔기 때문에 다른 소재의 발효시에는 색이나 풍미등의 관능적인 측면의 개선을 위해서 새로운 공정의 개발이 필요하다. 본 연구자는 그동안 노인성 정장 제품의 개발등에 과채류를 소재로 한 발효제품의 개발에 관한 연구 경험이 축적되어 있고 이러한 기술을 응용하면 관능적인 문제점을 해결한 기능성이 우수한 약재 발효 식품을 개발할 수 있을 것이다. 노령화 사회의 도래와 노인 층의 건강 지향적 구입 패턴에 비추어 볼 때 생

리활성 유산균을 상품화하는 것은 우리 나라의 제품 판매전략에 있어서 매우 중요하다고 할 수 있고 BIFIDUS 균을 비롯한 유산균 이용식품에 대한 수요가 계속 증가할 것으로 예견하는 것은 다음과 같은 사항에 근거를 두고 있다.

1. 한국인의 식생활 양식이 점차 서구화되면서 부위별 암발생률중 대장암이 1995년 현재 4위로 부상하였고(비교 ; 1975년, 10위) 향후 급속히 증가가 예상되며 또한, 과민성 대장 증세(설사와 변비의 교대증 수반)를 호소하는 사람이 약 300만명으로 추정된다.
2. 점차 노령화 사회에 접어들면서 변비 등의 기능적 장애, 장내 부패의 심화등이 노인의 중대한 위험 인자가 되고 있다.
3. 식품의 안전성 문제가 국내외적인 관심으로 부각되는 시점에서 식품 보존료의 대체, 축산 농가의 항생제 남용을 막기 위한 사료 첨가제용 생균제로서의 유산균의 필요성이 증가되고 있다.

우리나라의 국민 총 소비 지출에 대한 실버산업 시장 비율은 1996년에 7.1%에서 2010년에는 11.5%로 증가할 것으로 예측되나 현재 국내의 실버 산업은 매우 열악하여 관련 제품을 수입에 의존하고 있는 실정이다. - 따라서 앞으로 우리나라의 주도적인 노력으로 관련제품의 국산화가 적극 추진되어야 한다.

표 5. 실버 산업 시장 규모 예측 ( 단위 : 십억원 ) (한국보건사회 연구원)

| 구분                | 1996    | 2000    | 2010    |
|-------------------|---------|---------|---------|
| 국민 총 소비 지출 (A)    | 145,689 | 189,167 | 318,865 |
| 실버 시장 산업 규모 (B)   | 10,465  | 15,752  | 36,866  |
| 실버 산업 시장 비율 (B/A) | 7.1%    | 8.3%    | 11.5%   |

현재 국내의 건강 식품이 연간 7,500억원 시장이고 유산균 발효유 시장은 8,000억원임을 고려 할 때 생약제 발효 정장 식품부분에서 1,000억원 이상의 시장이 형성될 것으로 예상된다. 따라서 본 연구에서는 향후 실버산업의 잠재력을 인식하고 노인 질병의 주요 원인으로 작용하는 장내 세균의 독성 물질 생산을 감소시킬 수 있는 정장 유익균과 식품소재를 결합하여 새로운 유형의 정장 식

품을 개발한다. 특히, 개발의 이익이 농산물 소재를 공급하는 농민과 생산자의 수입에 연계되는 효과도 가져올 수 있다.

### 3. 사회·문화적 측면

하수오와 같은 품질 높은 국내 농산물 이용으로 국내 농가의 농산물 생산에 자부심을 진작시켜 농업분야의 활성화가 기대되고 과학적인 농산물을 이용한 제품의 개발 및 보급을 통하여 소비자와 생산자간의 신뢰의 구축을 통한 정직한 유통 질서를 기반으로 건전 사회 건설에 이바지 할 것이다.

우리 농산물을 원료로한 국민의 건강과 영양을 생각하여 제조함으로써 한국전통의 건강식품의 세계화에 이바지 하며 새로운 천연식물의 분리와 효과 규명으로 만성퇴행성 질환의 발생을 조절할수 있다.

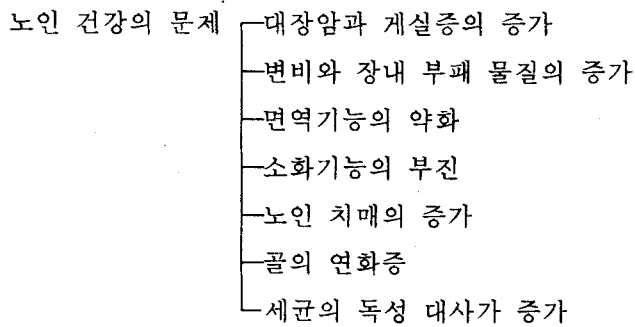
발효유는 서양의 문화 식품이며 우리나라의 자연 발효 식품들은 현재 과학화 과정을 거치고 있으나 본 연구 목표와 같이 한약재를 정장 식품으로 개발하는 명확한 목표를 설정함으로써 우리의 자생적인 정장 식품 문화를 효율적으로 정착시킬 수 있을 것이다. 또한 하수오를 통한 약재 발효식품의 개발공정을 개발하면 또다른 약재를 발효하는데 즉각 응용할 수 있을 것이다.

각 나라와 민족은 고유한 식문화, 체질, 생활 환경이 조성되어 있고 그에 따라 각 민족에 적합한 장내균총이 형성된다. 따라서 최근에는 선발단계에서부터 한국적 원료에 적합하고 한국인으로부터 분리되고 한국인의 기호성에 맞는 특성을 가지는 생리활성이 큰 종균을 선발하는 연구가 결실을 맺고 있다. 이를 더 발전시켜 한국인의 건강에 기여할 수 있는 우리 고유의 약재를 이용한 기능성 발효 제품의 개발은 당면 과제이다. 발효식품은 한국의 식품 중에서 중요한 비중을 차지하고 있으며 발효기술이 일찍 한국에서 발달되었지만 선진화하는 데에는 일본보다 늦었기 때문에 세계 시장에서는 그



지위가 약하고 오히려 일본의 발효식품이 한국을 점점 잠식하여 가고 식문화의 예측이 우려되는 상황이다. 노령화 사회에 따라 실버 산업의 중요성이 부각됨에 따라 농산물을 소재로 한 노인용 정장 제품 개발은 농가 및 생산자 단체의 소득과 연계 시킬수 있다는 장점도 있다.

본 연구에서는 그 동안 소외되었으나 곧 상당한 구매력 행사를 할 수 있는 노인 계층의 문제 해결을 위하여 노인용 정장 식품이라는 뚜렷한 연구 목표를 설정하였다. 이와 같은 본 연구의 새로운 시도는 실질적이고 진지한 산, 학, 연 공동 체계를 구축하였기 때문에 가시적 성과를 거둘 수 있을 것이다. 고령화 사회에서는 노인층의 삶의 질의 향상 문제가 크게 증대하며 특히 노인병을 가진 노인 인구가 증가하여 노인 건강에 대한 요구가 크게 증가한다.



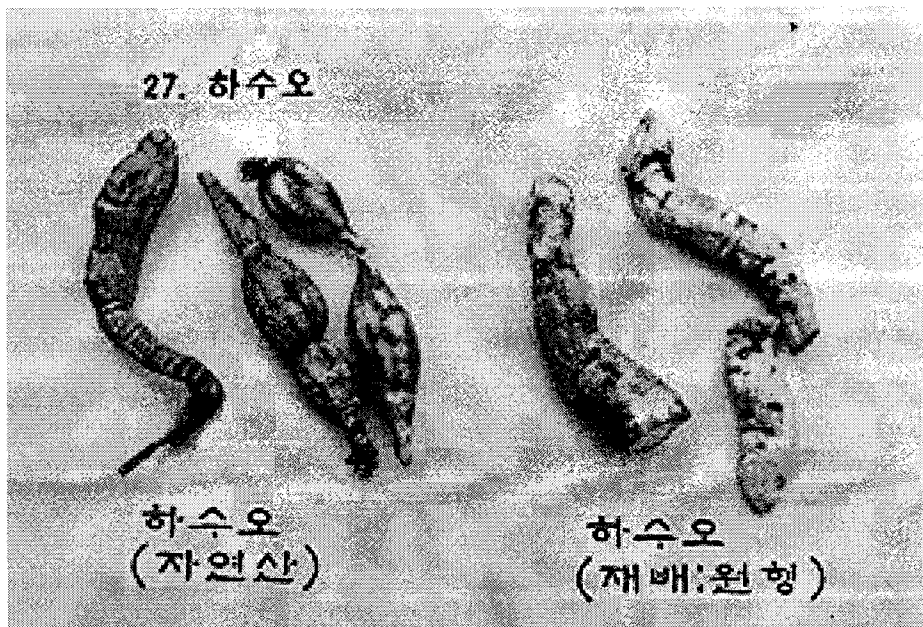
대부분의 노인은 반 건강 상태에 있으므로 노인용 정장 식품은 기능성 식품의 대표적 적응 분야이다. BIFIDUS 및 유산균을 이용하는 현재의 발효유는 서양의 문화와 원료에 적합하게 발전된 것으로서 우리나라는 우리의 문화·풍토에 알맞게 발전시켜 나아가기 위한 연구 노력이 요망되고 있다. WTO 체제 하에서 농산물 시장 개방으로 농가의 심리적인 충격과 국내 농산물 시장에 미치는 영향을 최소화 할 수 있는 국내 농산물 가공에의 연구가 필요. 현재 당근, 유자, 양파, 밤 등의 과채류 등 생과 수요는 포화에 이르러 있고 생산량의 기복이 심하여 이를 위한 가공 제품의 육성이 시급히 요청된다. 향후 과일생산이 예상되는 하수오에 대한 가공연구로 새로운 형태의 시장 형성이 시급하다.

국내농업의 장기적인 발전을 위하여는 가격 경쟁력과 함께 품질의 경쟁력을 향상시켜야 하나 농업자원의 부존여건이 불리한 우리의 입장에서는 특히 품질경쟁력을 제고하여 수입농산물에 대하여 국내 농산물의 차별화를 도모해야 하는 시대적인 요청이 따르고 있다. 국내산 농산물을 고도의 기술과 자본집약적인 가공식품으로 전환함으로써 수입산 농산물 및 가공식품에 대한 제품차별화를 도모해야 할 필요성이 야기되고 있다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 1 절 하수오의 현황

1. 하수오가 지금까지는 식품의 주원료가 아닌 부원료로서 최소량만을 사용할 수 있게끔 되어있는 식품위생법 때문에 식품가공에 커다란 제약을 받아왔으며 하수오의 가공제품은 단순한 건조, 분말 형태로 제조되었으나 먹기에 불편하고 기호성이 떨어져 손쉽게 소비자들이 구매하기가 어렵고 하급품의 경우는 가공방법이 개발되지 않아 거래가 이루어지지 않아 농민의 소득에 큰 걱정거리가 되고 있다.



## 2. 하수오의 생산 및 소비

하수오는 적하수오, 백하수오, 나도하수오등이 있으나 우리나라 에서는 적하수오와 백하수오만 재배되며 특히 백하수오를 많이 재배하고 있다. 백하수오는 박주가리과에 속하는 여러해 살이 덩이식물인 큰 초롱의 비대근으로 우리나라가 원산지로서 전국 각지에 분포하고 있으며 재배는 토심이 깊고 유기물 함량이 많으면서 배수가 잘되는 약간 건조한 양토 또는 사질양토가 좋다. 최근 재배면적 및 생산량이 증가추세에 있으며 주산지는 경북 영주, 전남 여천등이다. '98년 173 ha의 재배면적에서 557톤이 생산되었으며 수출물량은 미미한 실정이며 수입은 '94년 27톤, '95년 5톤 정도였다.

## 3. 하수오의 성분분석

현재까지 알려진 하수오의 주요성분은 총질소 1.1%, 전분 45.2%, 조지방 3.1%, 무기물 4.5%, 레시틴 3.7%, 안트라 퀴논 유도체 1.1%, Chrysoophanol, Hyperim등이다.

영주지역에서 주로 재배되며 이곳 주민들은 뿌리를 이용하여 술을 담아 애용하여 왔으며 분말로 제조된 차나 죽을 장기 복용하고 있다.

## 4. 민간약재로써 하수오의 이용

하수오의 대표적인 효능으로 알려지고 있는 것은 혈청 콜레스테롤 감소효과, 동맥경화억제작용, 항바이러스성, 스테로이드호르몬 유사활성, 항산화활성 등이다. 이 중 가장 활발히 연구가 진행된 영역은 콜레스테롤 저하효과이다.

다수의 연구에서  $\beta$ -sitosterol을 포함한 식물성스테롤은 콜레스테롤 대사시 콜레스테롤과 경쟁적으로 작용하여 혈 중 콜레스테롤을 낮추는 효과가 있는 것으로 보고된 바 있으며 lecithine은 동맥경화증 예방효과를 나타내게 된다. 항바이러스성 및 스테로이드호르몬 유사활성을 나타내는 유효성분 규명에 관한 연구는 아직 진행된 바 없으나 한의학에서는 오랜 동안 사용해 온 것으로 알려져 있다. 특히 그 이름에서 알 수 있듯이 하수오는 노화억제와 관련된 기능을 가지고 있는 것으로 보이나 그 정확한 과학적 근거는 제시된 바 없다.

## 5. 하수오 유효성분의 화학적 특징

하수오에 함유된 약효성분은 중량의 약 1.1% 정도로 보고되어 있으며 그 종류로는 anthraquinone 화합물 중 emodin, physcion 등과 식물성스테롤  $\beta$ -sitosterol 과 배당체 화합물인 stilbene glycoside류, lecithine 등이 있다. 뿌리를 95% 에탄올로 추출한 다음 ether와 물로 처리하면 ether 층에서 anthraquinone 화합물과  $\beta$ -sitosterol이 검출되고 물층에서 배당체가 분리되었다. 뿌리의 stilbene은 phenol ring을 함유하고 있어 전자공여능이 우수할 것으로 판단된다.

## 2 절 하수오의 유효성분과 관련된 최근의 연구결과

### 1. 항암성

Anthraquinone 유도체로 대표적인 emodin은 하수오 추출물 중에서도 함유된 것으로 보고되었고 세포분열 및 분화와 관련되며 암세포분열시 그 활성이 증가되는 것으로 알려진 casein kinase II의 활성을 낮추는 것으로 보고되었다. 암조직을 가진 쥐를 이용해 또다른 anthraquinone 유도체인 aloin을 투여한 경우 암의 진전에 따른 각 종 효소활성변화가 유의하게 개선되는 것으로 나타났다. Chang 등의 연구에서는 하수오 조추출물이 암세포 성장에 중요한 역할을 하는 protein-tyrosin kinase을 활성을 억제하는 것으로 보고하였다. 특히 emodin은 종양유전자인 Src- Her-2/neu와 ras-oncogene의 발현을 효과적으로 억제하였다.

### 2. 항산화 활성

하수오의 ethyl acetate 추출물은 쥐의 심장에 유도된 ischemia-reperfusion 손상을 억제하는 것으로 나타났다. 이러한 효과는 시료가 체내 항산화계에 관여하는 glutathion 수준을 유지해주기 때문인 것으로 보고되었다. 한편 aloin은 쥐의 brain cortex 과산화를 억제하였고 또다른 anthraquinone인 emodin과 alizarin은 쥐의 심장 mitochondria내에서 유도된 지질과산화를 효과적으로 저해하였다. 특히 개개의 anthracene은 그 활성에 현격한 차이를

나타내었는데 anthraquinone nucleus의 탄소고리에 위치한 두 개의 hydroxyl기가 ortho 또는 meta인 경우 활성이 높았다. 최근 Ip 등은 사염화탄소로 유도된 쥐 간 손상을 억제하고 시험관내에서 생성된 ferric-heme 산화물을 결합하는 것으로 나타났다.

### 3. 독성 및 임상응용

하수오에서 약효를 내는 것으로 나타난 각 종 anthracene은 우리가 일상적으로 섭취하는 채소에도 분포하고 있다. 순수한 anthraquinone을 분리한 경우 emodin은 genotoxicity를 보였으나 총 채소추출물에서는 독성을 나타내지 않았다. Muller 등의 연구에서는 emodin이 rksdmlmicrome에 존재하는 cytochrome P450 효소에 의해 활성화된 후 독성물질로 전환된다고 보고하였다. 위에서 언급한 대로 식물체에서 추출한 각 종 anthraquinone은 여러 가지 기전을 통해 항암효과를 나타내고 있어 임상적으로 사용되고 있다. 그러나 일부 화합물에 의한 독성효과가 보고되어 있으므로 각 화합물의 구조와 활성화에 관한 연구 및 독성을 나타내는 dose등에 관한 연구가 보다 체계적으로 이루어져야 할 것으로 보인다. 지금까지 한의학에서는 하수오를 심각한 독성이 없는 물질로 분류해 왔다.

## 3 절 발효제품과 관련한 국외 기술개발 현황

*Bifidobacterium*에 대한 생리적인 효능 연구는 학문적으로는 많이 이루어졌다. 그러나 상업용 균주에 대한 기술적인 측면은 기업 기밀로 이루어졌다. 실제로 미국의 Miles Lab에서는 내산성, 내담즙성 (Miles Analecta 자료) *Bifidobacterium* 균주 BBL을 상업화하여 판매하고 있으나, 생존률이 높지 않은 단점이 있다. 최근(1994) 덴마크는 혈청 콜레스테롤 저하 작용이 있는 소련의 Causido 균주를 분양받아 Gaio (*Enterococcus faecium*)라는 제품을 개발하여 선풍적인 인기를 얻어 넘치는 수요를 충족하기 위한 공장 시설을 확충하고 있으며 세계 각국에 수출 계약을 맺고 있다(Danish Dairy

Board). 같이 현재의 유산균 시장에서는 생존성과 기능성이 높은 유산균이 절대적으로 유리한 고지를 점유하고 있다. 하지만 *Enterococcus faecium*의 안전성에 대한 의문이 제기되고 있는 점에 미루어 볼 때 국내에서는 *Bifidobacterium*과 *Lactobacillus*의 생리기능강화 쪽으로 상품화하는 것이 유리하다.

◆ 종균개발 : 서구에서는 주로 유제품 생산을 위한 발효기술이 개발되어 왔는데 독일의 SBI와 Wiesby, 미국의 Marshall, 일본의 Morinaga, 덴마크의 Chr.Hansen 등은 *Bifidobacterium* 및 유산균의 종균 배양 공정을 철저한 기밀 사항으로 유지하고 있다. 왜냐하면, 종균 배양 기술은 유산균 산업의 핵심적인 부문이기 때문이다. 세계적인 유산종균 개발 현황은 다음과 같다.

| 제 조 회 사         | 개 발 방 향   |
|-----------------|---|
| MD Foods(덴마크)   | 콜레스테롤 저하 능력 보유 균주인 <i>Enterococcus faecium</i> 균주를 이용한 Gaio 상품 개발   |
| Morinaga(일본)    | <i>Bifidobacterium</i> 에 초점을 맞추고 내산성, 내담즙성 종균을 개발하여 유제품 등 다양한 제품에 응용  |
| Marshall(미국)    | 미국의 유산균 종균 전문 생산 업체로서 Probiotic Culture 개발  |
| Chr.Hansen(덴마크) | 유산균 회사 중에서 연륜이 가장 높고 보유 균주가 다양.<br>유제품 종균, 내산성 및 내담즙성 종균, 각종 제품의 풍미 조절용 종균 등의 다양한 유산균 조합 가능.<br>균주의 고농도 배양 및 동결 건조 기술 우위 확보 |

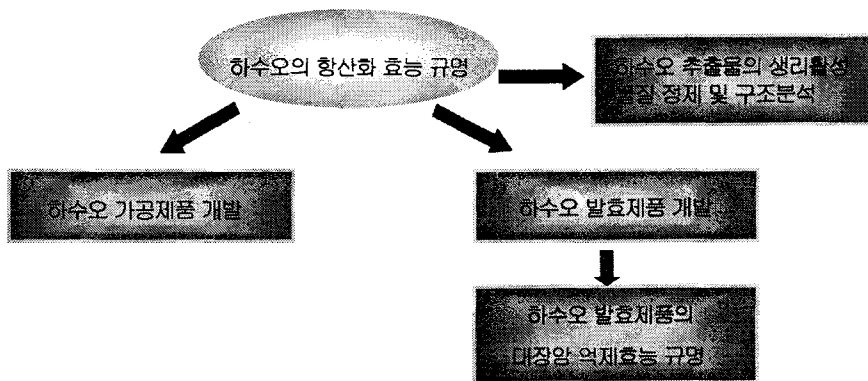
우유이외의 곡류등 전분질 식품을 재료로 한 젖산발효식품에 관한 연구는 매우 제한적으로 수행되어 왔다. 아프리카 지역에서 옥수수를 이용한 Ogi.

KoKo, Kenkey , Uji 및 카사바를 원료로 한 Fufu, Gari등에 관한 기술이 있으나 상업화 되지 않았고 그 이외의 지역에서는 최근에야 비로소 관련 연구가 수행되기 시작했다. 하지만 한약재를 이용한 발효식품에 관한 연구는 전무한 상황이다.

노인의 면역능 감소를 높게 유지시켜 줄 필요성이 요구되어지고 있기 때문에 BIFIDUS균의 면역 부활 작용에 대한 관심이 높아지고 있다. BIFIDUS균은 다른 항원에 대한 항체 생산의 촉진 작용, 임파구의 B세포를 분열, 증식, 촉진하여 마크로파지를 비특이적으로 활성화하고 보체를 활성화시켜 면역능을 증가시켜주는 Probiotic Effect를 가지고 있다. 이러한 BIFIDUS의 면역 부활능에 대한 연구는 일본 및 유럽에서 활발하게 진행되고 있으며 특히 최근에 일본의 동경대학과 생명과학연구소에서는 비피더스균의 일종의 면역능을 강화하는데 높은 효과가 있는 것을 발견하고 그 원인이 되는 물질을 확인하여 면역학적 측면에서 BIFIDUS균의 효능 및 이용 가치를 입증했다.



## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과



### 1 절 하수오 및 하수오가공제품 항산화 효능규명 연구 내용

#### 1. 다양한 실험모델을 이용한 하수오 추출물의 항산화 효능 규명

##### 가. 하수오의 시험관 내 항산화능 측정

##### 1) DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl) radical 소거능 측정

전자 공여능 측정은 Blios의 방법(1958)에 준하여 DPPH에 대한 전자공여능(EDA : electron donating ability)을 측정하여 환원력을 계산하였다. DPPH 라디칼은 자신이 가지고 있는 odd electron으로 인해 쉽게 전자를 받아들이는 성질을 가지고 있어 여러 항산화물질과 반응하여 전자를 받게되면 짝은 자색의 DPPH가 점점 없어지게 된다. 즉, DPPH 20mg을 에탄올150ml에 녹여 DPPH용

액을 만든 후 이 용액 0.5ml에 시료 용액을 0.5ml씩 가하여 517nm에서 30분동안 흡광도 변화를 측정하여 대조군에 대한 흡광도 차이로 전자공여능(EDA)을 계산하였다.

$$\text{EDA}(\%) = (1 - \text{sample Abs.}/\text{control Abs.}) \times 100$$

## 2) TBA법을 이용한 지질과산화 측정

과산화 지질 형성 억제능은 기질로서 linoleic acid를 사용하여 thiobarbituric acid reactive substance(TBARS) 생성 저해효과를 측정하여 평가하였다. SDS(0.8% w/v)에 linoleic acid를 0.1%(w/v)가 되도록 분산시킨 기질용액 0.8ml에 50mM Tris buffer 1.0ml, 0.1mM EDTA 0.1ml과 시료용액 0.1ml을 혼합하여 자외선 램프로 90분동안 과산화지질 형성을 유도한 후 0.44M TCA 0.5ml과 0.8%(w/v) TBA 0.5ml을 가하여 100°C에서 15분간 발색시켜 532nm에서 흡광도를 측정하였으며 다음과 같이 과산화지질 형성 억제능을 계산하였다.

$$\text{Inhibition}(\%) = (1 - \text{sample Abs.}/\text{control Abs.}) \times 100$$

## 나. PC 12 cell에서의 MnSOD activity 측정 및 단백질량 측정(Western blot)

SOD는 반응성이 큰 superoxide anion(O<sub>2</sub><sup>•-</sup>)을 O<sub>2</sub>와 hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)로 전환시키는 반응에서 촉매작용을 하는 항산화 효소이다.



### 1) Cell culture (PC12) and treatment

PC-12cell은 서울의대 한국 세포주 은행에서 분양받아 10%(v/v) heat-inactivated horse serum 과 5% fetal bovin serum, 그리고 100unit/ml penicillin- streptomycin을 함유한 DMEM 배지를 이용하여 5% CO<sub>2</sub> / 95% Air 인 incubator에서 37°C로 배양하였음. 5×10<sup>5</sup>세포를 분주하여 24시간 배양 후 0.5mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 30분간 첨가하여 산화스트레스를 주고 100ppm 하수오 추출물과 30ppm α-tocopherol를 첨가하여 48시간 배양 후 PBS에 수집하여 MnSOD activity와 단백질 정량을 위해 30초 간격으로 2분간 파쇄한 후 10,000g, 5min

에서 원심분리하여 상층액을 분리하였다. 총 protein 함량은 Bradford 방법에 준하여 측정하였다.

## 2) MDA 측정

세포의 지질과산화물은 Yagi(1982)법을 수정하여 측정하였다. 즉, 세포 분쇄액 200 $\mu$ l에 3M의 trichloroacetic acid 3ml을 가하여 산화를 정지시키고 0.34M thiobarbituric acid 0.5ml을 넣고 100 $^{\circ}$ C에서 15분간 반응시킨 후 얼음에서 냉각시켰다. 2093 $\times$ g에서 15분간 원심분리 후 그 상층액의 흡광도를 532nm에서 측정하였다.

## 3) MnSOD activity 측정

호기적 조건일 때 xanthine oxidase와 xanthine에 의해 발생한  $O_2^{\cdot -}$ 가 ferricytochrom c와 반응하는데 이때 SOD에 의해 cytochrome c환원이 억제되었고 또한 xanthine oxidase의 양은 SOD가 들어있지 않을 때 O.D가 0.025/min가 되도록 매 실험마다 조절하였다. MnSOD 활성은 Flohe 방법을 이용하여 측정하였다. 즉 CuZnSOD activity를 저해하기 위하여 5mM NaCN에서 45분간 preincubation을 한 후 potassium phosphate buffer(pH 7.8)에 효소원을 첨가하고 spectrophotometer 550nm에서 측정하였다. cytochrom C의 환원을 50% 억제하는 SOD량을 1Unit으로 하여 분당 활성정도를 나타내었다.

## 4) MnSOD protein 양 측정

Western-blotting을 위해 분쇄된 세포내의 단백질을 SDS-PAGE를 이용해 분리하였다. 즉 30 $\mu$ g단백질을 10% SDS와 9.3%DTT를 포함한 6x buffer에 섞어 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 가열한 후 Laemli의 방법에 의해 만들어진 12.5% polyacrylamide gel에서 분리하였다. 분리된 단백질을 tris-glycine-methanol buffer에서 nitrocellulose membrane으로 옮기고 3% nonfat dry milk, 0.05% Tween-20, Tris-buffered saline을 함유한 blocking 용액에 1시간 동안 처리하고 1:330으로 희석한 rabbit anti-MnSOD serum(Upstate)을 함유한 용액에서 2시간 동안 반응시켰다. Membrane을 15분 3번 wash 한 후 1:1500으로 희석한 goat anti-rabbit IgG HRP(horse radish peroxidase) labelled antibody와 상온에

서 1시간 30분동안 반응시킨 후 Enhanced ChemiLuminescence detection kit(Amersham)를 이용하여 측정하였다.

#### 다. HepG2 cell에서의 산화에 의한 DNA damage 억제능 측정- Comet assay

라디칼에 의한 유전적 손상은 발암원들이 대사과정 중 활성화과정을 통하여 자유라디칼을 발생시키면서 친전자성으로 작용하여 지질과산화물을 촉진시킴과 동시에 친핵성의 DNA와 같은 거대분자와 용이하게 공유결합을 하기 때문인 것으로 해석되고 있다. 개개의 세포수준에서 DNA손상을 눈으로 직접 확인할 수 있는 comet assay는 Singh(1988)의 방법을 수정하여 시행하였다.

##### 1) Cell culture (HepG2) and treatment

HepG2 cell은 서울의대 한국 세포주 은행에서 분양받아 10%(v/v) heat-inactivated fetal bovin serum과 100unit/ml penicillin-streptomycin을 함유한 DMEM 배지를 이용하여 5% CO<sub>2</sub> / 95% Air인 incubator에서 37°C로 배양함. 세포를 분주하여 24시간 배양한 후 300ppm 하수오추출물과 30ppm  $\alpha$ -tocopherol를 50  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 2시간 처리 후 DNA damage를 측정하였다.

##### 2) DNA strand break (Comet assay)

세포생존율은 MTT assay를 이용해 측정하였다. 산화스트레스에 의한 DNA strand breaks는 Singh등의 방법을 이용하였다. 즉 처리된 세포를 0.5% agarose gel에 분산하여 유리슬라이드에 얹어 고정시킨 후 세포단백질을 제거하고 DNA를 노출시키기 위해 lysis 용액으로 배양하였다. 슬라이드를 25V, 300mA, 30min 전기영동한 후 Tris buffer(0.4M, pH 7.5)로 중화시킨 후 EtBr로 염색한 다음 형광현미경으로 관찰하였다. 그리고 Komet 3.1 software를 이용하여 tail length와 Tail Moment(TM)을 측정하였다.

Tail length는 전기영동시 DNA가 외부로 노출된 tail 형태의 길이를 측정한 것이고 TM은 tail 내의 DNA content를 나타내는 parameter이다.

##### 가) Slide preparation

Fully frosted slide에 0.5% normal melting agarose(in  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  free PBS, at  $50^{\circ}\text{C}$ )  $100\mu\text{l}$ 를 펴고 즉시 No.1 coverslip으로 덮어 agarose를 굳혔다.  $100\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ 로 처리된 세포는 0.5% low melting point agarose와 섞었다. 위의 coverslip을 제거한 후 부유액을 떨어뜨리고 coverslip을 사용하였다. Gel을 굳히기 위해 5분간 flat tray(ice-cold)에 방치한 후 coverslip을 제거하여 0.5% low melting point agarose  $75\mu\text{l}$ ( $37^{\circ}\text{C}$ )를 펴 바르고  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 방치하였다.

#### 나) Lysis

$4^{\circ}\text{C}$  lysis solution( $2.5\text{M}$  NaCl,  $100\text{mM}$   $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ,  $10\text{mM}$  Tris(pH10), 1% sodium sarcosinate, 1% Triton X-100)에서 1시간 동안 담구어 놓았다.

#### 다) Alkaline treatment & electrophoresis

slide를 horizontal gel electrophoresis tank에 사이가 벌어지지 않게 넣었다. Tank에 신선한 전기영동 buffer( $1\text{mM}$   $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ,  $300\text{mM}$  NaOH)를  $0.25\text{cm}$  두께 넣어 20분간 방치한 후 17V, 300mA로 40분간 작동시켰다,

#### 라) Neutralization & staining

slide를 tank에서 꺼내어 Tris buffer( $0.4\text{M}$ , pH 7.5)에 5분동안 3번 담귀 알칼리 상태를 중화시켰다. 중화가 끝난 slide는 분석전에 EtBr(Ethidium Bromide,  $20\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) $50\mu\text{l}$ 로 염색하고 coverslip으로 덮었다.

#### 마) Comet scoring

염색된 slide를 형광현미경( $\times 400$ , Ex:510-560nm, DM:575nm, BA:590nm Nikon Biohot II)과 이미지 분석 프로그램(KOMET 3.1; Kinetic Imaging LTd, UK)를 통해 sample당 50개의 세포를 선택하여 DNA손상정도를 tail moment 및 tail length로 분석하였다.

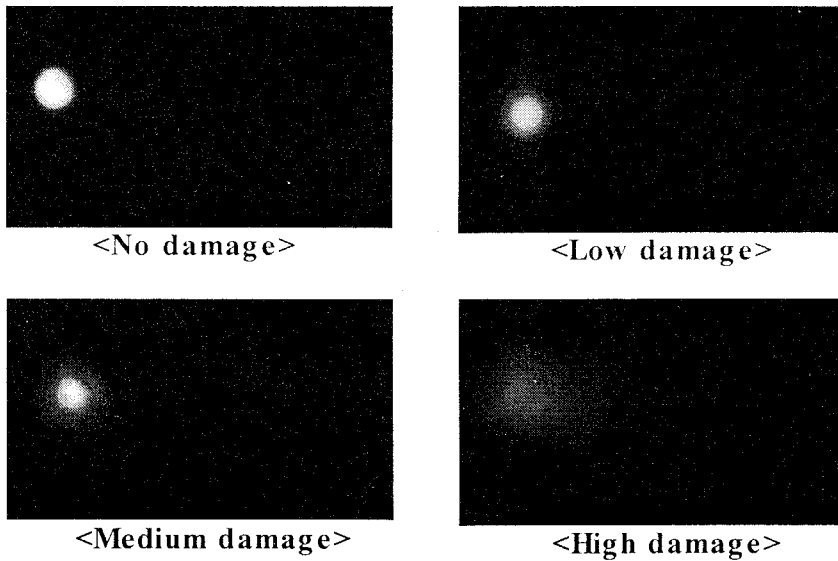
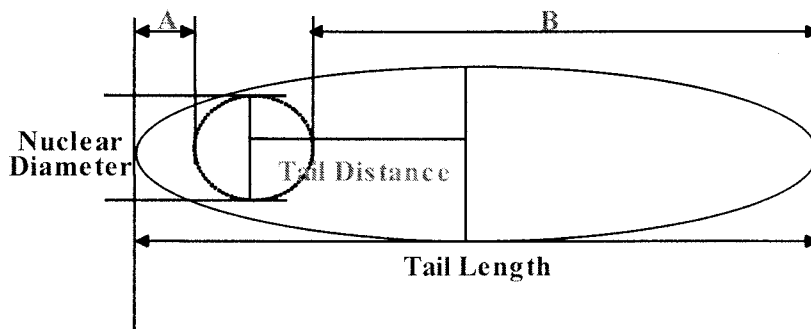


Figure 1. Image of comets obtained by single-cell gel electrophoresis representing different degrees of DNA damage



$A+B = \text{DNA migration}$

$\text{Tail moment} = \text{Tail distance} \times \% \text{DNA in tail}$

$\text{Tail length} = \text{Center position of tail} - \text{Center position of head}$

Figure 2. The definition of parameter of comet assay

라. In vivo 항산화능 검증을 위한 pilot study

하수오의 ethylacetate 추출물을 농도별로 투여하여 섭취량, 체중증가 등을 측정하여 차년도 동물실험을 위한 투여량을 결정하였다.

2. In vivo model을 이용한 하수오 추출물의 항산화 효능 및 안전성 규명

가. 동물실험을 이용한 항산화 효능 측정

1) 실험동물과 식이조성

실험동물은 5주령의 수컷 Sprague-Dawley rat을 대상으로 2주간 적응시킨 후 20% 고지방식으로 산화스트레스를 유발시켜 6주간 실험식을 하였다. 각 실험군의 동물 수는 11-12마리로 하였으며 일반식이군(C), 고지방식이군(HF), 일반식이+ethylacetate추출물 경구 투여군(C+EA), 일반식이+water 추출물 투여군(C+W), 고지방식이군+ethylacetate 추출물 투여군(HF+EA), 고지방식이+water추출물 투여군(HF+W)으로 총 6군으로 구성하였다. 지질과산화를 유도하기 위한 고지방식이군은 AIN-76 diet를 기초로 하여 식이내 지방함량을 20%가 되게 하였음. Nutrient density를 고려해 일반식이와 열량당 섭취하는 기타 영양소의 양을 동일하게 하였다. 사육식의 온도는  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ , 습도는  $50\pm 5\%$ 로 유지하였고, 조명은 12시간 간격으로 주야를 구분하였다. 실험기간동안 식이와 물은 자유로 섭취하도록 하였고, 추출물의 경구투여는 ethylacetate추출물은 6mg/100g bw, water추출물은 10mg/100g bw농도로 하여 격일 간격으로 투여하였다. 그리고 추출물을 투여하지 않은 대조군에는 saline을 투여하였다. 체중은 일주일간격으로 측정하고 식이섭취는 격일로 측정하였다.

Table 6. Food composition

| Ingredients     | Control diet | High fat diet |
|-----------------|--------------|---------------|
| Casein          | 20.0         | 24.0          |
| Corn starch     | 15.0         | 10.0          |
| Sucrose         | 50.0         | 34.0          |
| Corn oil        | 5.0          | 20.0          |
| Cellulose       | 5.0          | 6.0           |
| DL-methionine   | 0.3          | 0.36          |
| Mineral mix     | 3.5          | 4.2           |
| Vitamin mix     | 1.0          | 1.2           |
| Cholin chloride | 0.2          | 0.24          |
| Total           | 100.0        | 100.0         |

2) 혈액 및 간과 뇌 조직의 처리

실험식이 최종 급여 후 12시간 이상 절식시킨 다음 마취시켜 희생시켰다. 혈액은 heart puncture로 채취하여 heparine tube에 넣고 2093×g에서 15분간 원심 분리하여 혈장을 분리하였고 간은 탈혈, 세척 후 -80℃에서 보관하였다.

3) 간과 뇌조직의 microsome분리

조직을 10mM Tris-HCl, 250mM sucrose, 1mM EDTA, pH 7.4인 buffer 2ml/g에서 homogenizer로 마쇄하여 500g에서 5분간 원심분리함. 상층액을 15,000×g에서 15분간 원심분리하고 그 상층액을 100,000×g에서 60분간 원심분리하여 microsome을 얻은 후 5mM Tris maleate, 150mM KCl, pH 7.4로 washing하여 EDTA를 제거하였다.

4) Microsome의 지질과산화물 측정

Microsome은 단백질이 0.5mg~1mg이 되도록 PBS로 희석시킨 후 100 μM ascorbic acid를 섞어 총 volume이 465 μl가 되도록 하였다. 시료를 vortexing한 후 공기가 잘 통하는 adhesive film으로 덮어 37℃, 60분간 incubation시켰다. 1% butylated toluene/ethanol, 3M trichloroacetic acid, 90mM thiobarbituric acid/75mM NaOH 첨가 후 80℃에서 1시간 incubation하였다. 얼음에 식혀 원심



분리 한 후 그 상층액은 535nm에서 흡광도를 측정하였다. 단백질 함량은 Bio-rad protein assay kit을 이용하여 Bradford(1976)방법에 의해 정량하였다. 표준물질로 TEP (1,1,3,3-tetraethoxypropane)를 사용하였고, 지질과산화물 수준은 nmol MDA/mg protein으로 나타내었다.

#### 5) 혈장의 LDL분리

혈장에서 density gradient ultracentrifugation 방법에 의해 LDL을 분리하였다.

#### 6) Oxi-LDL의 과산화 지질 측정

분리한 LDL 25 $\mu$ g을 10mM PBS(pH7.4)로 희석시켜 10 $\mu$ l 0.25mM CuSO<sub>4</sub>를 24 시간 동안 첨가하여 산화를 유도한 후 과산화지질의 측정은 위와 동일한 방법으로 실시하였다.

### 나. Subchronic toxicity 측정

#### 1) 실험동물과 식이조성

실험동물은 5주령의 수컷, 암컷 Sprague-Dawley rat을 대상으로 2주간 적응시킨 후 기간은 13주간 실시하였다. 각 실험군의 동물수는 암, 수 각각 10-11마리로 하였으며 체중에 따라 일반식이군(C), 일반식이+ethylacetate추출물(6g/100g bw)투여군(EA1), ethylacetate추출물(10mg/100g bw)투여군(EA2), water추출물투여군(10mh/100g bw)(W)의 총4군으로 구성하였다. 실험기간동안 식이와 물은 자유로 섭취하도록 하였고, 추출물의 경구 투여는 격일간격으로 투여하였고 대조군에는 saline을 투여하였다. 체중과 식이섭취량은 일주일마다 측정하였다.

#### 2) 혈액 및 장기분리

실험식이 최종급여 12시간 이상 절식시킨 다음 희생시켰다. 혈액은 heart puncture로 채취하여 각각의 용도에 맞게 EDTA, sodium citrate, gel, fluoride tube에 옮긴 후 원심분리하여 혈장과 혈청을 분리하였다.

#### 3) Parameter

가) 장기무게 측정

Brain, lungs, heart, liver, spleen, adrenal gland, kidneys, testes(paired organ 은 함께 측정)의 무게를 측정하였다.

나) Blood biochemistry

White blood cell ( $10^2/\mu\ell$ ), red blood cell(RBC) ( $10^4/\mu\ell$ ), hemoglobin(Hb)(g/dl), hematocrit(Ht)(%), eosinophils(%), basophils(%), lymphocytes(%), monocytes (%), reticulocytes(%), Prothrombin time, activate partial thromboplastin time (APTT), total protein(TP)(g/dl), albumin(Alb)(g/dl), the alb:globulin ratio (A/G), glucose(Glc) (mg/dl), total cholesterol(TC)(mg/dl), blood urea nitrogen(BUN)(mg/dl),creatinin(CRN) (mg/dl), sodium(Na) (mEQ/l),chloride(Cl)(mEQ/l),potassium(K)(mEQ/l),calcium(CA)(mg/dl),phosphorus (P)(mg/dl), aspartate aminotransferase(AST)(IU/l), alanineamino trans-ferase(ALT)(IU/l), alkaline phosphatase(ALP) (IU/l) 및 serum 5'-nucleotidase측정

3. 개발된 제품의 대장암 생성 억제능 측정 및 인체실험을 통해 하수오의 항산화 효능 규명

가. 하수오 제품 섭취에 의한 동물 대장암 억제 효과

1) Experiment design

비피더스균을 이용하여 발효시킨 하수오 제품의 대장암 형성 억제능을 평가하기 위해 수컷 4~5주령의 F344 rat을 일반식이군(C), 일반식이+하수오 추출물 첨가군(C+CWH), 일반식이+하수오 발효 첨가군(C+CWHB), 일반식이+비피더스균 첨가군(C+B), 고지방식이군(HF), 고지방식이+하수오 추출물 첨가군(HF+CWH), 고지방식이+하수오 발효 첨가군(HF+CWHB), 고지방식이+비피더스균 첨가군(HF+B)으로 각 12마리씩 분배하였다.. 발효된 하수오와 비피더스균(RD 25)은 (주)비피도에서 제공받았으며 비피더스균 1일 섭취량이  $5 \times 10^8$ 이 되

도록 하였다. 물과 사료는 자유급식으로 하였고 격일간격으로 식이섭취량을 측정하고 일주일에 한번씩 체중증가량을 측정하였다. 실험식은 AIN-76을 기초로 한 일반식이 nutrient density가 고려된 고지방식을 이용 하였다. 실험식이 2주 후에 일주일 간격으로 발암원인 AOM(Azoxymethane)을 15mg/kg i.p 로 투여하였다. 첫 번째 AOM 투여 후 12주 후에 12시간 절식시킨 다음 희생시켰다.

Table 7. The composition of diet

(g)

| Ingredients     | Control diet |         |       |         | High fat diet |         |       |         |
|-----------------|--------------|---------|-------|---------|---------------|---------|-------|---------|
|                 | C            | CWH     | CWHB  | B       | HF            | CWH     | CWHB  | B       |
| Casein          | 20.0         | 20.0    | 20.0  | 20.0    | 24.0          | 24.0    | 24.0  | 24.0    |
| Corn starch     | 15.0         | 15.0    | 15.0  | 15.0    | 10.0          | 10.0    | 10.0  | 10.0    |
| Sucrose         | 50.0         | 49.9068 | 49.9  | 49.9892 | 34.0          | 33.9068 | 33.9  | 33.9892 |
| Corn oil        | 5.0          | 5.0     | 5.0   | 5.0     | 20.0          | 20.0    | 20.0  | 20.0    |
| Cellulose       | 5.0          | 5.0     | 5.0   | 5.0     | 6.0           | 6.0     | 6.0   | 6.0     |
| DL-methionine   | 0.03         | 0.3     | 0.3   | 0.3     | 0.36          | 0.36    | 0.36  | 0.36    |
| Mineral mix     | 3.5          | 3.5     | 3.5   | 3.5     | 4.2           | 4.2     | 4.2   | 4.2     |
| Vitamin mix     | 1.0          | 1.0     | 1.0   | 1.0     | 1.2           | 1.2     | 1.2   | 1.2     |
| Cholin chloride | 2.0          | 2.0     | 2.0   | 2.0     | 0.24          | 0.24    | 0.24  | 0.24    |
| 하수오추출물          | 0.0          | 0.0932  | 0.0   | 0.0     | 0.0           | 0.0932  | 0.0   | 0.0     |
| 하수오발효           | 0.0          | 0.0     | 1.0   | 0.0     | 0.0           | 0.0     | 1.0   | 0.0     |
| <i>Bifidus</i>  | 0.0          | 0.0     | 1.0   | 0.0108  | 0.0           | 0.0     | 0.0   | 0.0108  |
| Total           | 100.0        | 100.0   | 100.0 | 100.0   | 100.0         | 100.0   | 100.0 | 100.0   |

## 2) 조직과 혈장 분리

혈액은 heart puncture로 취하여 heparine tube에 넣고 2093×g에서 15분간 원심분리하여 혈장을 분리하였고 간은 간문맥에서 saline을 이용하여 탈혈시키고

filter paper에서 물기를 제거시킨 후  $-80^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다.

### 3) 간조직의 malondialdehyde(MDA)측정

간 조직 중의 malonaldehyde는 Uchiyama와 Mihara(1978)의 방법에 따라 측정하였다. 혈액을 제거한 간 절편을 phosphate buffer(pH7.4)와 함께 homogenizer로 충분히 마쇄하여 10% homogenate를 만들었다. 이 중  $500\mu\text{l}$ 의 homogenate를 취하여 screw cap tube에 넣고 1% phosphoric acid 3ml과 0.6% TBA solution 1ml을 첨가한 다음 잘 혼합하여  $100^{\circ}\text{C}$  water bath에서 45분간 반응시킨 후 바로 냉각하였다. 냉각한 tube에 n-butanol 4ml을 가하여 잘 섞고  $1500\times\text{g}$ 에서 10분간 원심분리 한 뒤 상층액(butanol 층)을 취하여 532nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 TEP(1,1,3,3-tetraethoxypropane)를 사용하였고, 지질과산화물 수준은 nmol MDA/mg protein으로 나타내었다.

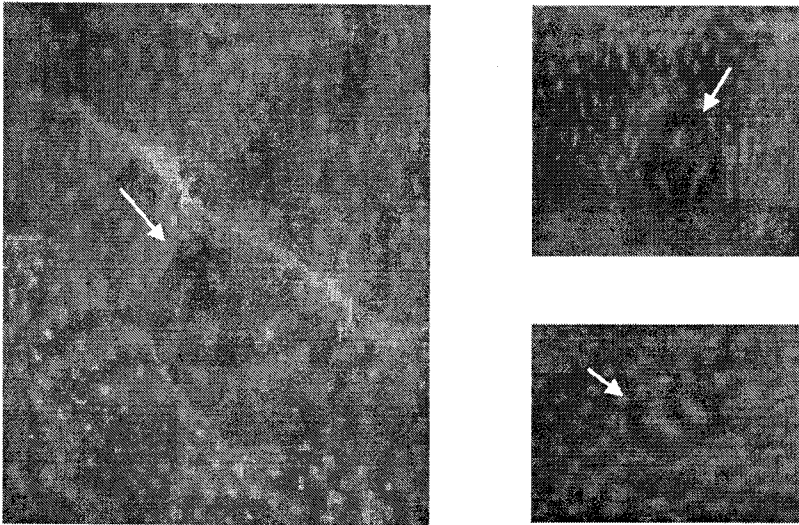
### 4) 혈장의 malondialdehyde(MDA)측정

혈장 중의 malonaldehyde는 Yagi법(1976)에 따라 정량하였다. 이를 위해 혈장  $100\mu\text{l}$ 을 screw cap tube에 넣고 1/12N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  4ml과 10% phosphotungstic acid 0.5ml을 혼합하여 잘 섞은 다음 실온에서 5분간 방치한 후  $2093\times\text{g}$ 에서 원심분리시켜 침전물을 얻었다. 여기에 다시 1/12N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2ml과 10% phosphotungstic acid 0.3ml을 가하여 혼합하고 실온에서 5분간 방치한 후  $2093\times\text{g}$ 에서 10분간 원심분리 시켰다. 이 침전물에 증류수 2ml과 0.67% TBA용액 1ml을 가하여  $95^{\circ}\text{C}$  water bath에서 1시간 동안 반응시킨 후 바로 냉각하였다. 냉각한 tube에 n-butanol 5ml을 가하여 진탕시켜  $2093\times\text{g}$ 에서 15분간 원심분리한 뒤 상층액을 fluorometer로 Ex 515nm, Em 553nm에서 측정하였다. 표준물질로 TEP(1,1,3,3-tetra-ethoxypropane)를 사용하였고, 지질과산화물 수준은 nmol MDA/ml로 나타내었다.

### 5) 대장조직의 ACF측정

ACF측정을 위해 준비된 대장 조직을 petri dish에서 두 장의 filter paper사이에 놓고 10% buffered formalin으로 고정시켰다. 평평하게 고정시키기 위해

microscope slide를 filter paper위에 올려 놓는다. 24시간 고정 후 대장을 3등분 하여 크기로 잘라 petridish에 0.2% methylen blue/saline solution을 넣고 5-15분간 방치하였다. Microscope slide에 mucosal을 위로 향하게 놓은 후 광학현미경( $\times 40$ )으로 관찰하여 ACF수를 세었다. ACF는 염색이 된 조직에서 진한 파란색으로 염색된 부위로 구별하였다.



## 2. 하수오 섭취에 의한 인체내 항산화지표 변화 연구

### 1) 연구대상자 및 연구기간

본 연구의 대상자들은 약물치료를 받지 않은 외견상 건강한 성인여성으로 숙명여자대학교 학부와 대학원에 재학 중인 학생 중 실험에 동의한 대상자들로 구성하였다. 17명의 대상자들은 2003년 6월 3일부터 6월 24까지 실험식이를 섭취하였으며 실험종료시까지 탈락자 없이 모두 완료하였다. 인체실험은 placebo-control cross-over design(Figure)을 이용하여 실시하였다.

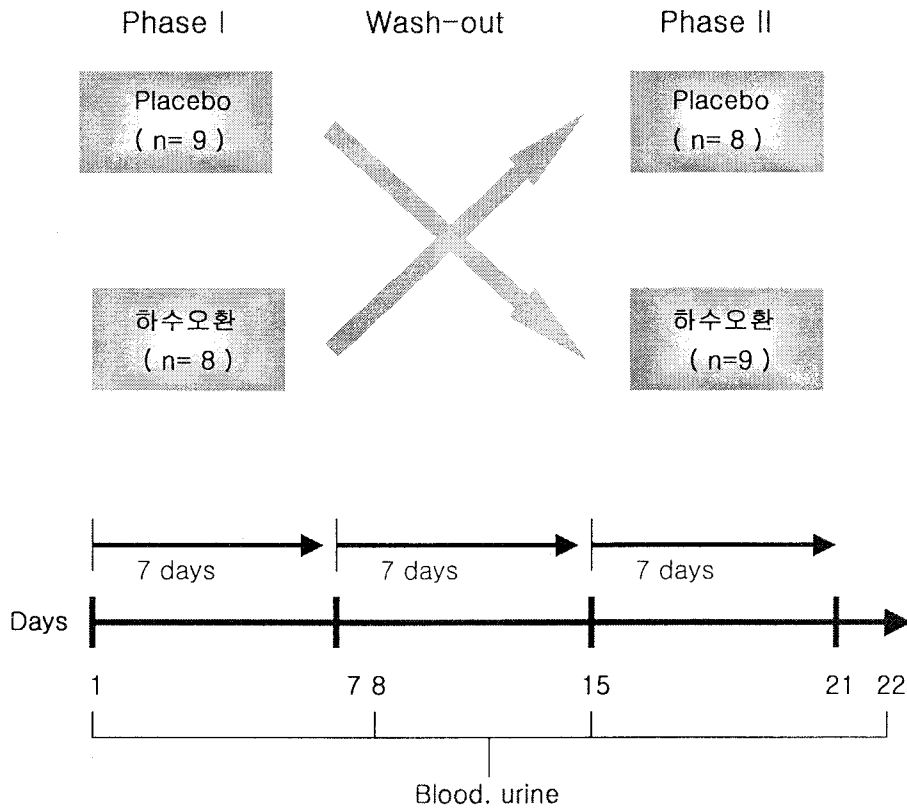


Figure 3. Experimental design

가) 신체계측

신장은 맨발로 직립 자세를 취하게 하고 귀와 눈이 수평이 되게하여 측정하였고, 체중은 가벼운 옷을 입은 상태에서 정확하게 측정하였다. 이 계측치로부터 체질량 지수(BMI:body mass index)를 계산하였다.

$$\text{BMI}(\text{Body Mass Index}) = \frac{\text{체중(Kg)}}{[\text{신장(m)}^2]}$$

나) 식이제공

실험대상자들에게 일주일씩 총 2주일간 하루 세끼와 간식을 제공하였고 그 사이 일주일의 wash out기간을 두었다. 식이의 열량은  $2238.3 \pm 120.9 \text{kcal}$ 였고, 탄/단/지의 비율은 52.1:21.3: 26.6으로 지방의 비율을 일반식사에 비해 높게 제공함으로써 고지방 식이시 하수오의 항산화능을 측정하고자 하였다. 그리고 하수오

보충은 환의 형태로 매일 6g씩 제공하였으며 placebo로는 옥수수수환을 동량으로 섭취하도록 하였다.

Table 8. The composition of diet

| 6/3                                  | 6/4                                | 6/5                                     | 6/6              |
|--------------------------------------|------------------------------------|---|------------------|
| <b>Breakfast</b>                     | <b>Breakfast</b>                   | <b>Breakfast</b>                        | <b>Breakfast</b> |
| 불고기 샌드위치<br>크림스프                     | 핫케익(버터시럽)<br>감자·베이컨                | 치킨 샌드위치<br>우유                           | 불고기치즈 우유<br>샌드위치 |
| <b>Lunch</b>                         | <b>Lunch</b>                       | <b>Lunch</b>                            | <b>Lunch</b>     |
| 쌀밥<br>육개장<br>쇠고기 완자전<br>배추김치         | 쌀밥<br>배추된장국<br>닭갈비<br>갈비구이<br>배추김치 | 완두콩밥<br>콩나물국<br>마파두부<br>돼지고기 강정<br>배추김치 | 햄버거<br>콜라        |
| <b>Dinner</b>                        | <b>Dinner</b>                      | <b>Dinner</b>                           | <b>Dinner</b>    |
| 호박된장찌개<br>쌀밥<br>돼지불고기<br>닭튀김<br>배추김치 | 오무라이스<br>햄부침<br>배추김치               | 짜장면<br>탕수육<br>단무지                       | 피자<br>콜라         |
| <b>Snack</b>                         | <b>Snack</b>                       | <b>Snack</b>                            | <b>Snack</b>     |
| 팝콘 콜라<br>포테이토                        | 참외<br>생크림 케익                       | 슈크림<br>수박                               | 도우넛              |
| 6/7                                  | 6/8                                | 6/9                                     |                  |
| <b>Breakfast</b>                     | <b>Breakfast</b>                   | <b>Breakfast</b>                        |                  |
| 크로와상<br>샐러드<br>우유                    | 샌드위치<br>우유                         | 불고기 샌드위치<br>우유                          |                  |
| <b>Lunch</b>                         | <b>Lunch</b>                       | <b>Lunch</b>                            |                  |
| 쌀밥 배추김치<br>크림스프<br>함박스테이크<br>양배추샐러드  | 돈까스 정식<br>쌀밥<br>각두기<br>계란말이        | 김치볶음밥                                   |                  |
| <b>Dinner</b>                        | <b>Dinner</b>                      | <b>Dinner</b>                           |                  |
| 볶음밥<br>쇠고기 오븐구이<br>배추김치              | 설렁탕<br>쌀밥<br>배추김치                  | 치즈오븐 스파게티                               |                  |
| <b>Snack</b>                         | <b>Snack</b>                       | <b>Snack</b>                            |                  |
| 식빵튀김                                 | 약과                                 | 치즈스틱                                    |                  |



| 6/18              | 6/19   | 6/20                                    | 6/21   |
|-------------------|--|---|--|
| <b>Breakfast</b>  | <b>Breakfast</b>                             | <b>Breakfast</b>                        | <b>Breakfast</b>                                 |
| 햄과 달걀 샌드위치<br>우유  | 핫케익(버터시럽)<br>우유                              | 옥수수 피자빵<br>우유<br>바나나 1/3조각              | 감자구이<br>(버터, 모짜렐라 치즈)<br>스크램블드 에그<br>(베이컨)<br>우유 |
| <b>Lunch</b>      | <b>Lunch</b>                                 | <b>Lunch</b>                            | <b>Lunch</b>                                     |
| 돈까스 정식            | 오무라이스  | 흑미밥<br>된장국<br>감자볶음<br>삼겹살(참기름장)<br>배추김치 | 짜장밥<br>달걀실과국<br>생선크로켓<br>단무지 채무침<br>배추김치         |
| <b>Dinner</b>     | <b>Dinner</b>                                | <b>Dinner</b>                           | <b>Dinner</b>                                    |
| 크림 스파게티           | 육개장<br>쌀밥<br>달걀조림                            | 햄버거<br>콜라                               | 햄버거<br>콜라  |
| <b>Snack</b>      | <b>Snack</b>                                 | <b>Snack</b>                            | <b>Snack</b>                                     |
| 슈크림               | 치킨   | 치즈스틱 3조각                                | 생크림 케익   |
| 6/22              | 6/23   | 6/24                                    |  |
| <b>Breakfast</b>  | <b>Breakfast</b>                             | <b>Breakfast</b>                        |  |
| 불고기 샌드위치<br>우유    | 감자구이(버터,치즈)<br>베이컨 구이<br>스크램블드 에그<br>우유      | 옥수수 피자빵<br>우유                           |  |
| <b>Lunch</b>      | <b>Lunch</b>                                 | <b>Lunch</b>                            |  |
| 설렁탕<br>쌀밥<br>배추김치 | 돈사태보쌈<br>현미쌀밥<br>다시마 장국<br>배추김치              | 해물버섯덮밥<br>콩나물국<br>새우까스<br>배추김치          |  |
| <b>Dinner</b>     | <b>Dinner</b>                                | <b>Dinner</b>                           |  |
| 피자<br>콜라          | 오징어굴소 볶음<br>쌀밥<br>순두부국<br>부추전<br>햄냉채<br>배추김치 | 쌀밥<br>무맑은국<br>배추김치<br>달걀말이<br>스팸부침      |  |
| <b>Snack</b>      | <b>Snack</b>                                 | <b>Snack</b>                            |  |
| 초콜렛               | 치킨   | 슈크림                                     |  |

Table 9. Estimated daily intake of energy, carbohydrate, protein and lipid for diet

| Diet               |                            |
|--------------------|----------------------------|
| Total energy(kcal) | 2238.3 ± 120.9             |
| Protein(g)         | 118.8 ± 17.5 (21.3±3.4 %E) |
| Fat(g)             | 66.1± 3.2 (26.6±1.4 %E)    |
| Carbohydrate(g)    | 292.3 ± 37.8 (52.1±4.9 %E) |

### 2) 혈액 채취 및 처리

혈액은 12시간 공복 후 정맥에서 20ml 채혈하여 2093×g에서 15분간 원심분리하여 혈장을 분리하여 분석시까지 -80℃에서 보관하였다.

### 3) 혈장의 지질과산화(MDA) 측정

혈장 중의 malondialdehyde는 Yagi법(1976)에 따라 정량하였다. 이를 위해 혈장 100 $\mu$ l을 screw cap tube에 넣고 1/12N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4ml과 10% phosphotungstic acid 0.5ml을 혼합하여 잘 섞은 다음 실온에서 5분간 방치한 후 2093×g에서 원심분리시켜 침전물을 얻었다. 여기에 다시 1/12N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2ml과 10% phosphotungstic acid 0.3ml을 가하여 혼합하고 실온에서 5분간 방치한 후 2093×g에서 10분간 원심분리 시켰다. 이 침전물에 증류수 2ml과 0.67% TBA용액 1ml을 가하여 95℃ water bath에서 1시간 동안 반응시킨 후 바로 냉각하였다. 냉각한 tube에 n-butanol 5ml을 가하여 진탕시켜 2093×g에서 15분간 원심분리한 뒤 상층액을 fluorometer로 Ex 515nm, Em 553nm에서 측정하였다. 표준물질로 TEP(1,1,3,3-tetraethoxypropane)를 사용하였고, 지질과산화물 수준은 nmol MDA/mg protein으로 나타내었다.

### 3) LDL분리 및 LDL oxidation 측정

Density gradient ultracentrifugation 방법에 의해 혈장에서 LDL을 분리하였다. 분리한 LDL 25 $\mu$ g을 10mM PBS(pH7.4)로 희석시켜 10 $\mu$ l 0.25mM CuSO<sub>4</sub>를 24시간 동안 첨가하여 산화를 유도한 후 총 volume이 465 $\mu$ l가 되도록 하여

vortexing 후 공기가 잘 통하는 adhesive film으로 덮어 37°C, 60분간 incubation시켰다. 1% butylated toluene/ethanol, 3M trichloroacetic acid, 90mM thiobarbituric acid/ 75mM NaOH 첨가 후 80°C에서 1시간 incubation하였다. 얼음에 식혀 원심분리 한 후 그 상층액은 535nm에서 흡광도를 측정하였다. 단백질 함량은 Bio-rad protein assay kit을 이용하여 Bradford(1976)방법에 의해 정량하였다. 표준물질로 TEP (1,1,3,3-tetraethoxypropane)를 사용하였고, 지질과산화물 수준은 nmol MDA/mg LDL으로 나타내었다.

## 2절 하수오 및 하수오가공제품 항산화 효능규명 연구결과

### 1. 다양한 실험모델을 이용한 하수오 추출물의 항산화 효능 규명

#### 가. 하수오의 시험관 내 항산화능 측정

##### 1) 재료 및 추출

하수오 powder는 경북 영주시 소재 영주농협으로부터 제공받아 먼저 soxhlet을 이용하여 hexane으로 조지방을 제거한 후 ethylacetate, ethanol 또는 methanol로 추출하였으며, 이중 methanol 추출물은 분액깔대기를 이용하여 buthanol과 chloroform으로 분획하였다. 물 추출물은 열수추출방법으로 준비하였고, 모든 용매 추출물은 추출 후 감압농축하여 동결건조 후 본 실험에 사용하였다. 각 분획의 수율은 아래와 같았다.

(%)

| Water | Methanol | Ethanol | Ethylacetate | Chloroform | Buthanol |
|-------|----------|---------|--------------|------------|----------|
| 25.8  | 16.5     | 4.7     | 1.6          | 1.6        | 2.3      |

### 2) 전자 공여능 측정

본 연구결과 DPPH에 대한 전자공여능은 ascorbate>chloroform> ethyl-acetate>butanol 순으로 나타났으며, 하수오 추출물들은 사용농도에 의존적으로 대조군에 비해 그 항산화능이 유의적으로 증가하였다(p<0.01).

Table 10. Electron donating abilities(EDA) of *Cynanchum wilfordii* Hemsley extracts and ascorbate to DPPH radicals

| conc.<br>(mg/ml) | EDA(%)                       |                              |                              |                              |                              |                              |                              |
|------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
|                  | Ascorbate                    | Ethyl-acetate                | Methanol                     | Ethanol                      | Water                        | Butanol                      | Chloroform                   |
| 0                |                              |                              |                              |                              |                              |                              |                              |
|                  | 0 <sup>z</sup>               |                              |                              |                              |                              |                              |                              |
| 1.0              | 94.36<br>±0.07 <sup>xa</sup> | 70.13<br>±3.08 <sup>wc</sup> | 38.31<br>±1.67 <sup>xd</sup> | 37.13<br>±2.43 <sup>xd</sup> | 12.95<br>±1.62 <sup>xe</sup> | 68.07<br>±1.55 <sup>wc</sup> | 82.39<br>±1.09 <sup>wb</sup> |
| 0.5              | 94.27<br>±0.09 <sup>xa</sup> | 44.86<br>±3.55 <sup>xc</sup> | 17.34<br>±3.66 <sup>yd</sup> | 18.79<br>±4.61 <sup>yd</sup> | 6.40<br>±1.52 <sup>yc</sup>  | 44.88<br>±3.39 <sup>xc</sup> | 53.29<br>±1.23 <sup>xb</sup> |
| 0.1              | 94.17<br>±0.15 <sup>xa</sup> | 15.82<br>±3.44 <sup>yb</sup> | 4.23<br>±1.02 <sup>zd</sup>  | 1.84<br>±0.69 <sup>zd</sup>  | 1.15<br>±1.07 <sup>zd</sup>  | 11.51<br>±2.80 <sup>yc</sup> | 16.81<br>±2.16 <sup>yb</sup> |

· Means with different letters(a, b, c, d, e) within a row are significantly different from each other at p<0.01 as determined by Duncan's multiple range test

· Means with different letters(w, x, y, z) within a column are significantly different from each other at p<0.01 as determined by Duncan's multiple range test

### 3) 자외선 조사에 대한 과산화지질 형성 억제능 측정

자외선 조사에 의한 지질과산화물 형성은 농도에 의존적으로 억제되는 것을 볼

수 있었으며, 하수오의 용매별 추출물 중 butanol, chloroform, ethylacetate 추출물은 다른 용매 추출물보다 지질과산화물 형성 억제율이 유의적으로 높게 나타났다( $p < 0.01$ ).

Table 11. Inhibition(%) of lipid peroxidation by U.V. radiation of *Cynanchum wilfordii* Hemsley extracts and ascorbate.

| Conc.<br>(mg/ml) | Inhibition(%)                |                               |                              |                              |                              |                              |                               |
|------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
|                  | Ascorbate                    | Ethyl-<br>acetat              | Methanol                     | Ethanol                      | Water                        | Butanol                      | Chloroform                    |
| 0                |                              |                               |                              | 0 <sup>z</sup>               |                              |                              |                               |
| 1.0              | 62.77<br>±0.87 <sup>xa</sup> | 58.72<br>±0.72 <sup>wa</sup>  | 45.23<br>±2.81 <sup>wb</sup> | 39.49<br>±3.96 <sup>wc</sup> | 12.86<br>±5.27 <sup>yd</sup> | 59.70<br>±0.89 <sup>xa</sup> | 59.65<br>±0.60 <sup>wa</sup>  |
| 0.5              | 62.06<br>±0.60 <sup>xa</sup> | 47.02<br>±4.39 <sup>xc</sup>  | 31.81<br>±3.71 <sup>xd</sup> | 24.95<br>±2.91 <sup>xe</sup> | 9.21<br>±2.24 <sup>yzf</sup> | 53.83<br>±2.12 <sup>xb</sup> | 54.85<br>±0.96 <sup>xb</sup>  |
| 0.1              | 54.89<br>±3.42 <sup>ya</sup> | 15.57<br>±1.52 <sup>yed</sup> | 17.97<br>±2.24 <sup>yc</sup> | 7.84<br>±2.23 <sup>yef</sup> | 3.04<br>±1.63 <sup>zf</sup>  | 23.40<br>±3.76 <sup>yb</sup> | 11.03<br>±1.08 <sup>yde</sup> |

· Means with different letters(a, b, c, d, e) within a row are significantly different from each other at  $p < 0.01$  as determined by Duncan's multiple range test

· Means with different letters(w, x, y, z) within a column are significantly different from each other at  $p < 0.01$  as determined by Duncan's multiple range test

## 나. MnSOD activity 측정 및 단백질량 측정(Western blot)

### 1) MDA 측정

세포의 지질과산화물은 Yagi(1982)법을 수정하여 측정하였다. 하수오 추출물에 의한 지질과산화물 생성은  $\alpha$ -tocopherol > buthanol > chloroform > water 순으로 억제되었다.

Table 12. Effect of *Cynanchum wilfordii* Hemesley on Malondialdehyde formation in PC 12 pheochromocytoma

( nmole MDA/mg protein )

| Control       | Buthanol      | Chloroform       | Water         | Ethylacetate  | $\alpha$ -tocopherol |
|---------------|---------------|------------------|---------------|---------------|----------------------|
| 264.58        | 199.81        | 211.36           | 240.45        | 228.86        | 151.64               |
| $\pm 49.93^a$ | $\pm 11.38^a$ | $\pm 42.61^{ab}$ | $\pm 42.90^a$ | $\pm 24.38^a$ | $\pm 61.83^b$        |

· Values are mean  $\pm$  S.D.

· Means with different letter(a,b) within a column are significantly different from each other at  $p < 0.05$  as determined by Duncan's multiple range test

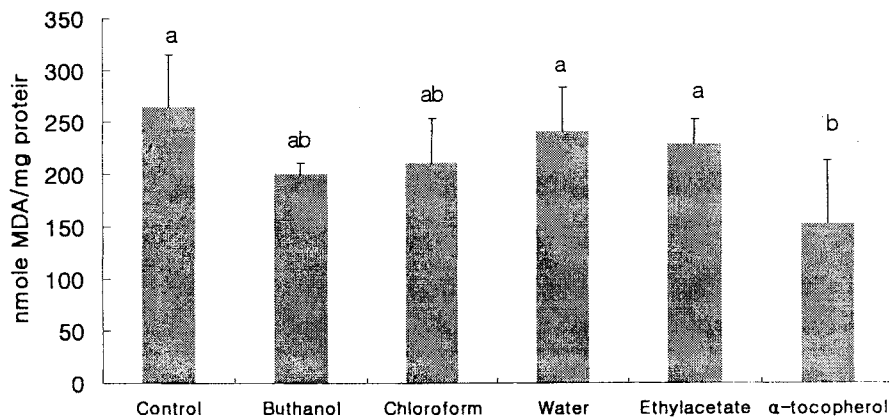


Figure 4. Effect of *Cynanchum wilfordii* Hemesley of malondialdehyde formation in PC 12 pheochromocytoma

## 2) MnSOD activity 측정

그 효과는 Chloroform > water >  $\alpha$ -tocopherol > ethylacetate > control의 순이었으며 이러한 MnSOD activity 증가에 의해 지질과산화물 생성이 억제된 것으로 보여진다.

Table 13. Effect of *Cynanchum wilfordii* Hemeseley on MnSOD activity in PC 12 pheochromocytoma

| (U/mg protein) |                 |              |                  |                 |                      |
|----------------|-----------------|--------------|------------------|-----------------|----------------------|
| Control        | Buthanol        | Chloroform   | Water            | Ethylacetate    | $\alpha$ -tocopherol |
| 29.64          | 33.57           | 46.58        | 44.58            | 34.84           | 41.10                |
| $\pm 5.30^b$   | $\pm 5.64^{ab}$ | $\pm 7.88^a$ | $\pm 13.97^{ab}$ | $\pm 4.87^{ab}$ | $\pm 5.26^{ab}$      |

· Values are mean  $\pm$  S.D.

· Means with different letter(a,b) within a column are significantly different from each other at  $p < 0.05$  as determined by Duncan's multiple range test

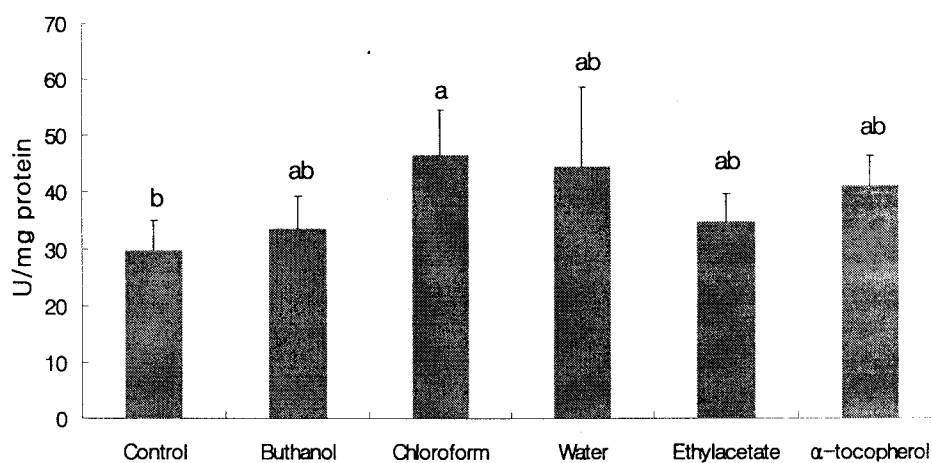


Figure 5. Effect of *Cynanchum wilfordii* Hemeseley on MnSOD activity in PC 12 pheochromocytoma

### 3) MnSOD protein 량 측정(Western blot)

SOD 단백질량은 산화스트레스가 가해진 경우 감소하는 것으로 나타났으나 하수오 추출물이 첨가된 경우 그 감소량이 다소 저하되었으나 큰 차이는 보이지 않았음.  $\alpha$ -tocopherol이 존재하는 경우는 산화스트레스를 전혀 가하지 않은 경우와 유사한 단백질량을 나타냄. 본 연구 결과 하수오 추출물은 SOD의 단백질량을 증가시키는 것에는 크게 기여하지 않는 것으로 사료됨.

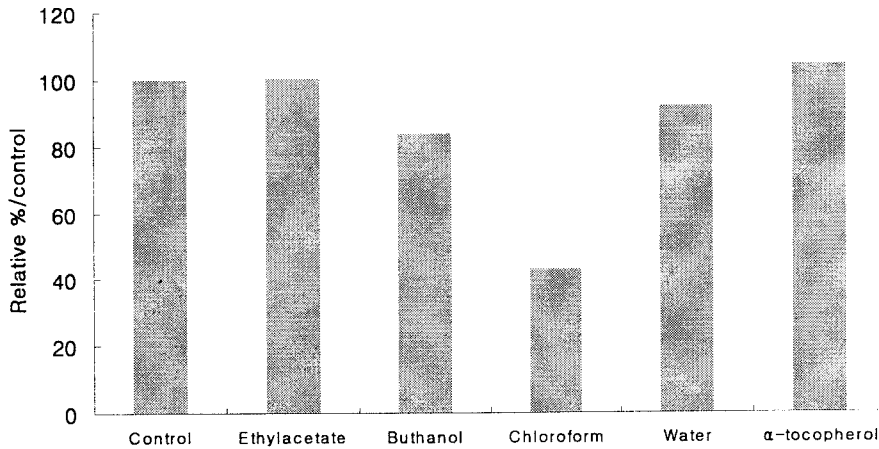
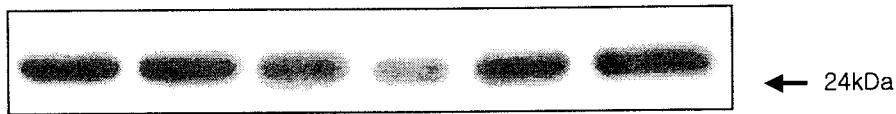


Figure 6. Effect of *Cynanchum wilfordii* Hemeseley on MnSOD protein expression in PC 12 pheochromocyte



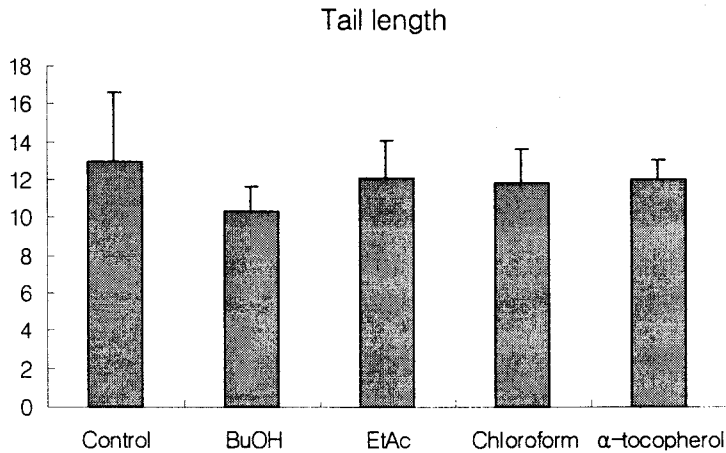
다. 산화에 의한 DNA damage 억제능 측정- Comet assay

DNA damage 정도는 대조군에 비하여 하수오 BuOH, Chloroform extract와  $\alpha$ -tocopherol 처리시 감소되는 경향은 보였으나 유의적인 차이를 보이지는 않았다. 모든 군의 세포생존율은 70%이상이었다.

Table 14. Effect of *Cynanchum Wilfordii Hemsley* on DNA damage in HepG2 cell

|             | P-Control        | Buthanol extract | Ethylacetate extract | Chloroform extract | $\alpha$ -tocopherol |
|-------------|------------------|------------------|----------------------|--------------------|----------------------|
| Tail length | 12.91 $\pm$ 3.74 | 10.33 $\pm$ 1.27 | 12.13 $\pm$ 1.94     | 11.81 $\pm$ 1.75   | 11.96 $\pm$ 1.09     |
| TM          | 2.84 $\pm$ 0.90  | 2.35 $\pm$ 0.91  | 2.86 $\pm$ 0.74      | 2.41 $\pm$ 1.07    | 2.31 $\pm$ 0.78      |

· Not significance



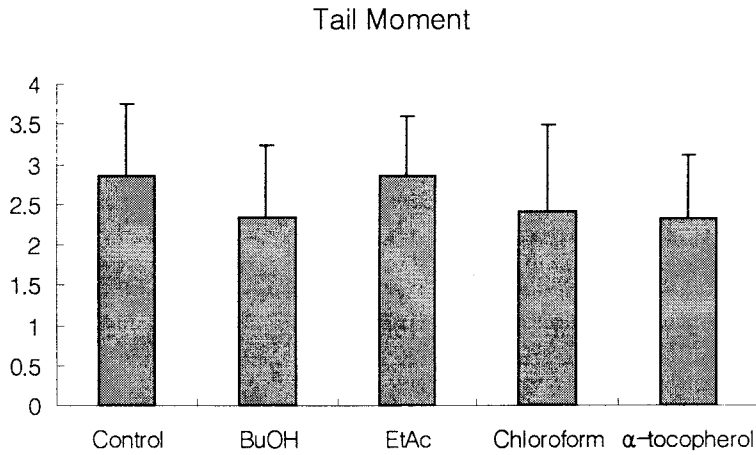


Figure 6. Effect of *Cynanchum Wilfordii Hemsley* on DNA damage in HepG2 cell

라. In vivo 항산화능 검증을 위한 pilot study

Ethylacetate fraction을 gavage 농도, 100mg, 250mg, 500mg/Kg body weight 을 격일간 2주일간 투여시 250mg에서 식이섭취량 감소를 보였으며 500mg/Kg 에서는 식이섭취량 감소와 체중감소, 자연사를 일으킴. 반면, 100mg/Kg body weight에서는 식이섭취량 감소 및 체중감소를 보이지 않았다.

2. In vivo model을 이용한 하수오 추출물의 항산화 효능 및 안전성 규명

가. 하수오 추출물의 항산화 효능

Table 15. Body weight gain, average food intakes, liver weight and brain weight of experimental animals

| group | body weight gain(g)       | food intakes (g/day)   | liver weight (g)       | brain weight (g)     |
|-------|---------------------------|------------------------|------------------------|----------------------|
| C+EA  | 155.72±39.65 <sup>a</sup> | 21.5±0.9 <sup>c</sup>  | 14.5±2.3 <sup>a</sup>  | 1.3±0.3 <sup>b</sup> |
| C+W   | 167.58±75.21 <sup>a</sup> | 23.3±0.2 <sup>ab</sup> | 12.5±1.4 <sup>b</sup>  | 1.4±0.1 <sup>b</sup> |
| C     | 168.36±31.16 <sup>a</sup> | 23.4±0.3 <sup>a</sup>  | 12.2±1.3 <sup>b</sup>  | 1.6±0.1 <sup>a</sup> |
| HF+EA | 178.08±30.49 <sup>a</sup> | 20.2±1.0 <sup>d</sup>  | 13.4±2.4 <sup>ab</sup> | 1.6±0.1 <sup>a</sup> |
| HF+W  | 182.18±31.83 <sup>a</sup> | 22.4±0.8 <sup>b</sup>  | 12.6±1.3 <sup>b</sup>  | 1.6±0.2 <sup>a</sup> |
| HF    | 179.16±30.12 <sup>a</sup> | 20.5±2.1 <sup>d</sup>  | 12.0±1.3 <sup>b</sup>  | 1.7±0.1 <sup>a</sup> |

· Means with different letters(a,b,c) within a column are significantly from each other at p<0.05 as determined by Duncan's multiple range test.

· C+EA: control diet supplemented with ethylacetate fraction C+W: control diet supplemented with water fraction C: control diet HF+EA: high fat diet supplemented with ethylacetate fraction HF+W: high fat diet supplemented with water fraction HF: high fat control diet

### 1) 체중증가량

일반식이군에 비해 고지방 식이군의 체중증가량이 크고 ethylacetate추출물 경우 다소 적은 경향을 보였으며 유의적인 차이는 나타나지 않았다.

### 2) 식이섭취량

고지방식이군이 일반식이군에 비해 적게 섭취하는 경향을 보였고 일반식이를 섭취한 경우 ethylacetate추출물 투여군이 대조군에 비해 식이섭취량이 유의적으로 적었다. 고지방식이군에서는 물추출물군의 식이섭취량이 유의하게 많았다.

### 3) 간과 뇌무게

간무게는 ethylacetate추출물 투여군이 다른 군에 비해 유의적으로 많았고 뇌무게는 일반식이를 섭취하고 하수오 ethylacetate 또는 물추출물을 투여한 군에서 적게 나타났다.

4) 간과 뇌조직의 microsome의 과산화지질 형성

Table 16. Effect of *Cynanchum wilfordii* Hemsley extract on liver malondialdehyde(MDA) formation in rats

| Group | nmol/mg protein |
|-------|-----------------|
| C     | 30.1 ± 8.2      |
| C+EA  | 28.9 ± 6.7      |
| C+W   | 30.1 ± 9.7      |
| HF    | 37.1 ± 11.0     |
| HF+EA | 29.7 ± 8.2      |
| HF+W  | 34.1 ± 6.7      |

· Not significance

· C+EA: control diet supplemented with ethylacetate fraction

C+W: control diet supplemented with water fraction C: control diet

HF+EA: high fat diet supplemented with ethylacetate fraction

HF+W: high fat diet supplemented with water fraction

HF: high fat control diet

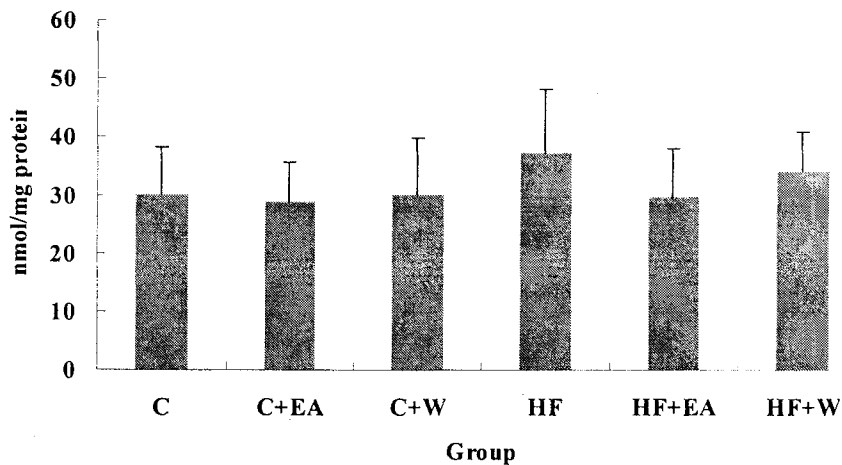


Figure 7. Effect of *Cynanchum wilfordii* Hemsley extract on liver malondialdehyde(MDA) formation in rats

Table 17. Effect of *Cynanchum wilfordii* Hemsley extract on brain malondialdehyde(MDA) formation in rats

| Group | nmol/mg protein        |
|-------|------------------------|
| C     | 39.1±9.4 <sup>a</sup>  |
| C+EA  | 37.3±8.7 <sup>ab</sup> |
| C+W   | 37.2±6.6 <sup>ab</sup> |
| HF    | 34.6±6.6 <sup>ab</sup> |
| HF+EA | 29.7±8.1 <sup>bc</sup> |
| HF+W  | 24.5±11.0 <sup>c</sup> |

- Means with different letters(a,b,c) within a column are significantly from each other at p<0.05 as determined by Duncan's multiple range test
- C+EA: control diet supplemented with ethylacetate fraction
- C+W: control diet supplemented with water fraction
- C: control diet supplemented with saline
- HF+EA: high fat diet supplemented with ethylacetate fraction
- HF+W: high fat diet supplemented with water fraction
- HF: high fat diet supplemented with saline

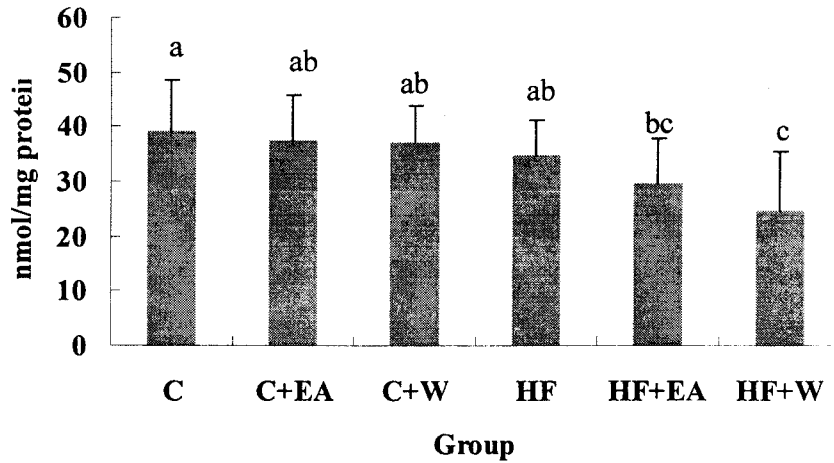


Figure 8. Effect of *Cynanchum wilfordii* Hemsley extract on brain malondialdehyde(MDA) formation in rats

5) Oxidized-LDL의 과산화 지질 형성

Table 18. Effect of *Cynanchum wilfordii* Hemsley on LDL susceptibility to copper-induced oxidation in rats

| Group | nmol/mg protein |
|-------|-----------------|
| C     | 30.1 ± 8.2      |
| C+EA  | 28.9 ± 6.7      |
| C+W   | 30.1 ± 9.7      |
| HF    | 37.1 ± 11.0     |
| HF+EA | 29.7 ± 8.2      |
| HF+W  | 34.1 ± 6.7      |

∗ Not significance

∗ C+EA: control diet supplemented with ethylacetate fraction

C+W: control diet supplemented with water fraction C: control diet

HF+EA: high fat diet supplemented with ethylacetate fraction

HF+W: high fat diet supplemented with water fraction HF: high fat control diet

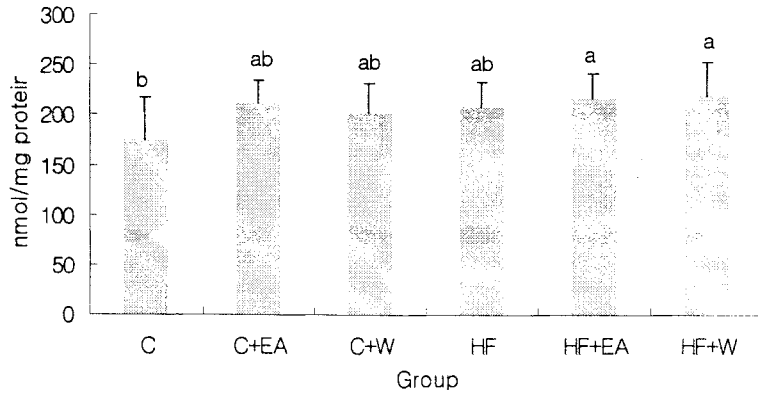


Figure 9. Effect of *Cynanchum wilfordii* Hemsley extract on LDL susceptibility to copper-induced oxidation in rats

간조직 microsome의 과산화지질 측정 결과, 일반식이 섭취군의 경우는 에틸아세테이트 투여군이 다소 낮아지는 경향을 보였고 고지방식이군에서는 ethylacetate추출물 투여군과 물추출물 투여군 모두에서 낮아지는 경향을 보였으나 유의적인 차이는 보이지는 않았다. 뇌조직은 일반식이군과 고지방식이군 모두에서 에틸아세테이트, 물추출물 투여에 의하여 지질과산화 형성이 낮아졌고 고지방식이 시에는 통계적 유의성이 관찰되었다. 혈장 LDL을  $\text{CuSO}_4$ 에 의해 산화시킨 후 과산화지질을 측정된 결과, 고지방식이군과 일반식이군 모두에서 추출물 투여에 의한 유의적인 차이가 관찰되지 않았다.

☞ 동물 체내에서는 in vitro 실험에서 관찰되었던 현저한 항산화효능이 관찰되지는 않았으나 하수오 추출물 투여는 조직 내의 과산화물을 감소시키는 경향이 있음이 증명되었고 특히 뇌조직에서의 효과가 좋은 것으로 판단되었다. 하수오 추출물은 혈장지질 산화를 억제하는 효과는 미약한 것으로 나타났다.

#### 나. Subchronic toxicity

##### 1) 체중증가와 식이섭취량

수컷의 경우는 유의적인 차이는 보이지 않았으나 ethylacetate 추출물 투여군의 체중증가량이 낮은 경향을 보였고 암컷은 ethylacetate 추출물 투여시 농도에 따라 유의한 체중증가량 감소를 보였다. 암, 수컷의 경우 모두에서 ethylacetate 10mg/ 100g bw 투여시 식이섭취량이 유의적으로 낮았다.

☞ 고농도의 하수오 ethylacetate 추출물은 식이섭취량의 감소를 초래하고 이는 체중감소를 유도하는 것으로 보인다.

## 2) 장기무게

Table 19. Effect of *Cynanchum wilfordii* Hemsley extract on organ weight in male rats

(g)

|     | Heart             | Liver              | Stomach           | Brain             | Kidney            | spleen             | Adrenal gland       | Thymus               | Testes               | Lung                 |
|-----|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|---------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| EA1 | 1.24 <sup>a</sup> | 14.09 <sup>a</sup> | 2.23 <sup>a</sup> | 1.59 <sup>a</sup> | 2.88 <sup>a</sup> | 1.43 <sup>a</sup>  | 0.065 <sup>b</sup>  | 0.70027 <sup>a</sup> | 3.2750 <sup>ab</sup> | 2.1956 <sup>b</sup>  |
| EA2 | 1.25 <sup>a</sup> | 13.03 <sup>a</sup> | 2.09 <sup>a</sup> | 1.54 <sup>a</sup> | 2.85 <sup>a</sup> | 1.16 <sup>ab</sup> | 0.070 <sup>ab</sup> | 0.73260 <sup>a</sup> | 3.4835 <sup>a</sup>  | 2.3027 <sup>b</sup>  |
| W   | 1.41 <sup>a</sup> | 13.81 <sup>a</sup> | 1.95 <sup>a</sup> | 1.53 <sup>a</sup> | 2.86 <sup>a</sup> | 1.30 <sup>ab</sup> | 0.050 <sup>b</sup>  | 0.79327 <sup>a</sup> | 3.1437 <sup>b</sup>  | 2.3909 <sup>ab</sup> |
| C   | 1.29 <sup>a</sup> | 12.27 <sup>a</sup> | 2.04 <sup>a</sup> | 1.55 <sup>a</sup> | 2.96 <sup>a</sup> | 1.13 <sup>b</sup>  | 0.093 <sup>a</sup>  | 0.79160 <sup>a</sup> | 3.4307 <sup>ab</sup> | 2.6884 <sup>a</sup>  |

· Means with different letters(a,b,c) within a column are significantly from each other at  $p < 0.05$  as determined by Duncan's multiple range test.

· EA1: ethylacetate fraction gavaged at doses of 3mg/100g bw/day

EA2: ethylacetate fraction gavaged at doses of 5mg/100g bw/day

W: water fraction gavaged at doses of 5mg/100g bw/day

C: control



Table 20. Effect of *Cynanchum wilfordii* Hemsley extract on organ weight in female rat

(g)

|     | Heart               | Liver              | Stomach           | Brain             | Kidney            | Spleen             | Adrenal gland       | Thymus              | Ovary              | Lung               |
|-----|---------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|---------------------|---------------------|--------------------|--------------------|
| EA1 | 0.841 <sup>c</sup>  | 9.46 <sup>a</sup>  | 2.01 <sup>a</sup> | 1.60 <sup>a</sup> | 2.03 <sup>a</sup> | 1.059 <sup>a</sup> | 0.068 <sup>b</sup>  | 0.457 <sup>c</sup>  | 0.116 <sup>a</sup> | 1.747 <sup>a</sup> |
| EA2 | 1.048 <sup>a</sup>  | 8.56 <sup>ab</sup> | 2.03 <sup>a</sup> | 1.62 <sup>a</sup> | 1.89 <sup>a</sup> | 1.063 <sup>a</sup> | 0.087 <sup>a</sup>  | 0.858 <sup>a</sup>  | 0.108 <sup>a</sup> | 1.868 <sup>a</sup> |
| W   | 0.920 <sup>bc</sup> | 7.65 <sup>ab</sup> | 1.45 <sup>b</sup> | 1.50 <sup>a</sup> | 1.75 <sup>a</sup> | 0.912 <sup>a</sup> | 0.077 <sup>ab</sup> | 0.530 <sup>bc</sup> | 0.111 <sup>a</sup> | 1.953 <sup>a</sup> |
| C   | 0.953 <sup>ab</sup> | 7.33 <sup>b</sup>  | 1.47 <sup>b</sup> | 1.64 <sup>a</sup> | 1.84 <sup>a</sup> | 0.936 <sup>a</sup> | 0.063 <sup>b</sup>  | 0.578 <sup>b</sup>  | 0.112 <sup>a</sup> | 1.804 <sup>a</sup> |

· Means with different letters(a,b,c) within a column are significantly from each other at  $p < 0.05$  as determined by Duncan's multiple range test.

· EA1: ethylacetate fraction gavaged at doses of 3mg/100g bw/day

EA2: ethylacetate fraction gavaged at doses of 5mg/100g bw/day

W: water fraction gavaged at doses of 5mg/100g bw/day

C: control

수컷의 경우, spleen과 adrenal gland, testes, lung이 추출물 투여군의 무게가 유의적인 차이를 보였고 암컷은 heart, liver, stomach, adrenal gland, thymus가 유의적인 차이를 보였다.

### 3) Parameter

Clinical chemistry에서는, 수컷의 경우 하수오 추출물 투여군의 신장기능지표인 BUN수치가 대조군보다 유의하게 높았다. ALP, AST, ALT는 대조군과 유의적인 차이를 보이지 않았다. Glucose는 물추출물 투여군에서 유의적으로 높아졌다. 암컷의 경우 5'-nucleotidase는 고농도의 ethylacetate추출물 투여군에서 유의적으로 낮은 결과를 보였다. 한편, 수컷의 경우 하수오 추출물 투여군이 백혈구 수, 중성구, 림프구가 대조군에 비해 유의적으로 증가하였다. 암컷의 경우 고농도의 thylacetate추출물 투여군이 백혈구 수가 증가하였고 그 중 monocyte비율이 유의적으로 증가하였다.

☞ 하수오 추출물 투여시 위에서 제시한 지표들에 변화는 보였으나 단백질 대사 지표, 간기능지표 모두 정상범위에 속하므로 독성이 없는 것으로 사료된다.

Table 21. Haematology of SD rats fed *Cynanchum wilfordii* Hemsley extract for 13 week

| Items                      | Group                  |                       |                        |                        |
|----------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|
|                            | C                      | EA1                   | EA2                    | W                      |
| <b>Male</b>                |                        |                       |                        |                        |
| WBC ( $10^2/\mu\text{l}$ ) | 4.6±3.0 <sup>b</sup>   | 7.5±2.6 <sup>a</sup>  | 6.7±1.6 <sup>a</sup>   | 6.6±2.3 <sup>ab</sup>  |
| RBC ( $10^4/\mu\text{l}$ ) | 8.6±0.4 <sup>a</sup>   | 7.5±0.6 <sup>c</sup>  | 7.8±0.6 <sup>bc</sup>  | 8.1±0.5 <sup>b</sup>   |
| Hemoglobin (g/dl)          | 14.6±0.9 <sup>a</sup>  | 13.2±0.5 <sup>b</sup> | 13.7±0.9 <sup>b</sup>  | 14.3±0.4 <sup>a</sup>  |
| Hematocrit (%)             | 51.1±2.6 <sup>a</sup>  | 44.6±3.2 <sup>c</sup> | 47.1±2.2 <sup>b</sup>  | 49.4±1.8 <sup>a</sup>  |
| Neutrophil Stab.(%)        | 0                      | 0                     | 0                      | 0                      |
| Neutrophil Seg.(%)         | 28.1±7.8 <sup>a</sup>  | 20.1±4.5 <sup>b</sup> | 22.5±5.2 <sup>b</sup>  | 14.7±5.1 <sup>c</sup>  |
| Eosinophils (%)            | 1.0±1.7 <sup>a</sup>   | 2.1±1.9 <sup>a</sup>  | 2.1±2.2 <sup>a</sup>   | 0.8±0.9 <sup>a</sup>   |
| Basophils (%)              | 0                      | 0                     | 0                      | 0                      |
| Monocyte (%)               | 3.7±1.8 <sup>a</sup>   | 2.8±2.8 <sup>a</sup>  | 4.4±2.9 <sup>a</sup>   | 3.2±2.1 <sup>a</sup>   |
| Normo blast                | 0                      | 0                     | 0                      | 0                      |
| Blast (%)                  | 0                      | 0                     | 0                      | 0                      |
| Lymphocyte (%)             | 67.2±8.3 <sup>c</sup>  | 74.9±4.3 <sup>b</sup> | 71.0±5.0 <sup>bc</sup> | 81.3±6.1 <sup>a</sup>  |
| <b>Female</b>              |                        |                       |                        |                        |
| WBC ( $10^2/\mu\text{l}$ ) | 5.7±2.2 <sup>b</sup>   | 5.2±2.0 <sup>b</sup>  | 8.2±2.9 <sup>a</sup>   | 7.4±2.5 <sup>ab</sup>  |
| RBC ( $10^4/\mu\text{l}$ ) | 6.9±0.7 <sup>ab</sup>  | 6.2±0.5 <sup>b</sup>  | 7.0±1.3 <sup>a</sup>   | 7.0±0.3 <sup>b</sup>   |
| Hemoglobin (g/dl)          | 12.9±0.5 <sup>ab</sup> | 12.2±1.3 <sup>b</sup> | 14.1±2.5 <sup>a</sup>  | 13.4±0.5 <sup>ab</sup> |
| Hematocrit (%)             | 41.9±3.1 <sup>a</sup>  | 41.0±4.5 <sup>a</sup> | 41.7±6.4 <sup>a</sup>  | 43.6±2.0 <sup>a</sup>  |
| Neutrophil Stab.(%)        | 0                      | 0                     | 0                      | 0                      |
| Neutrophil Seg.(%)         | 26.2±7.2 <sup>ab</sup> | 29.8±8.8 <sup>a</sup> | 11.3±17.1 <sup>b</sup> | 23.2±8.0 <sup>ab</sup> |
| Eosinophils (%)            | 3.9±3.7 <sup>a</sup>   | 3.8±3.6 <sup>a</sup>  | 1.5±1.6 <sup>a</sup>   | 2.6±3.3 <sup>a</sup>   |
| Basophils (%)              | 0                      | 0                     | 0                      | 0                      |
| Monocyte (%0               | 2.3±1.0 <sup>b</sup>   | 3.6±1.2 <sup>b</sup>  | 14.7±6.7 <sup>a</sup>  | 3.8±2.1 <sup>b</sup>   |
| Normo blast                | 0                      | 0                     | 0                      | 0                      |
| Blast (%)                  | 0                      | 0                     | 0                      | 0                      |
| Lymphocyte (%)             | 67.6±7.1 <sup>a</sup>  | 62.9±8.3 <sup>a</sup> | 72.5±13.4 <sup>a</sup> | 70.4±9.9 <sup>a</sup>  |

· Means with different letters(a,b,c) within a column are significantly from each other at p<0.05 as determined by Duncan's multiple range test.

· EA1: ethylacetate fraction gavaged at doses of 3mg/100g bw/day

EA2: ethylacetate fraction gavaged at doses of 5mg/100g bw/day

W: water fraction gavaged at doses of 5mg/100g bw/day

C: control

Table 22. Clinical chemistry data of SD rats fed *Cynanchum Wilfordii* Hemsley extract for 13 weeks

| Items                | Group                      |                            |                            |                           |
|----------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|
|                      | C                          | EA1                        | EA2                        | W                         |
| <b>Male</b>          |                            |                            |                            |                           |
| TP(g/dl)             | 6.7 ± 0.3 <sup>ab</sup>    | 6.3 ± 0.5 <sup>b</sup>     | 6.5 ± 0.6 <sup>b</sup>     | 7.0 ± 0.4 <sup>a</sup>    |
| Albumin(g/dl)        | 3.0 ± 0.4 <sup>a</sup>     | 2.7 ± 0.2 <sup>b</sup>     | 2.8 ± 0.2 <sup>b</sup>     | 3.1 ± 0.2 <sup>a</sup>    |
| Globulin(g/dl)       | 3.6 ± 0.3 <sup>a</sup>     | 3.6 ± 0.3 <sup>a</sup>     | 3.6 ± 0.5 <sup>a</sup>     | 3.9 ± 0.4 <sup>a</sup>    |
| BUN(mg/dl)           | 16.2 ± 1.7 <sup>c</sup>    | 18.1 ± 1.8 <sup>b</sup>    | 18.5 ± 1.6 <sup>b</sup>    | 20.0 ± 1.4 <sup>a</sup>   |
| Creatinine(mg/dl)    | 0.60 ± 0 <sup>a</sup>      | 0.55 ± 0.05 <sup>b</sup>   | 0.55 ± 0.05 <sup>b</sup>   | 0.61 ± 0.03 <sup>a</sup>  |
| Na(mM)               | 148.6 ± 6.35 <sup>a</sup>  | 142.4 ± 7.8 <sup>b</sup>   | 142.1 ± 7.0 <sup>b</sup>   | 147.0 ± 4.3 <sup>ab</sup> |
| Ca(mg/dl)            | 9.8 ± 0.4 <sup>a</sup>     | 8.6 ± 0.5 <sup>b</sup>     | 9.3 ± 1.3 <sup>ab</sup>    | 9.1 ± 0.7 <sup>ab</sup>   |
| Cl(mM)               | 104.0 ± 4.0 <sup>a</sup>   | 104.5 ± 5.4 <sup>a</sup>   | 100.8 ± 6.5 <sup>a</sup>   | 103.5 ± 3.1 <sup>a</sup>  |
| Inorganic P(mg/dl)   | 6.8 ± 0.9 <sup>a</sup>     | 6.3 ± 0.8 <sup>a</sup>     | 6.8 ± 0.7 <sup>a</sup>     | 6.2 ± 0.4 <sup>a</sup>    |
| K(mM)                | 5.0 ± 0.5 <sup>ab</sup>    | 4.4 ± 0.5 <sup>b</sup>     | 5.1 ± 1.1 <sup>a</sup>     | 4.9 ± 0.4 <sup>ab</sup>   |
| ALP(U/L)             | 150.3 ± 37.9 <sup>a</sup>  | 170.6 ± 42.1 <sup>a</sup>  | 168.6 ± 33.9 <sup>a</sup>  | 144.3 ± 51.9 <sup>a</sup> |
| PTT(sec)             | 31.7 ± 8.5 <sup>a</sup>    | 27.6 ± 3.1 <sup>a</sup>    | 30.7 ± 5.4 <sup>a</sup>    | 33.0 ± 18.8 <sup>a</sup>  |
| SGOT(AST)(U/L)       | 125.6 ± 29.7 <sup>ab</sup> | 101.9 ± 14.7 <sup>b</sup>  | 134.3 ± 26.5 <sup>a</sup>  | 143.7 ± 48.2 <sup>a</sup> |
| SGPT(ALT)(U/L)       | 56.3 ± 12.5 <sup>a</sup>   | 58.9 ± 13.9 <sup>a</sup>   | 64.9 ± 13.3 <sup>a</sup>   | 58.6 ± 8.2 <sup>a</sup>   |
| Glucose(mg/dl)       | 123.7 ± 22.7 <sup>b</sup>  | 146.7 ± 31.6 <sup>ab</sup> | 140.6 ± 19.1 <sup>ab</sup> | 151.6 ± 23.5 <sup>a</sup> |
| Cholesterol(mg/dl)   | 46.0 ± 5.2 <sup>a</sup>    | 46.4 ± 9.3 <sup>a</sup>    | 49.3 ± 5.0 <sup>a</sup>    | 47.6 ± 3.9 <sup>a</sup>   |
| 5'-Nucleotidase(U/L) | 69.5 ± 57.9 <sup>a</sup>   | 53.3 ± 40.1 <sup>a</sup>   | 55.0 ± 57.9 <sup>a</sup>   | 41.7 ± 26.4 <sup>a</sup>  |
| <b>Female</b>        |                            |                            |                            |                           |
| TP(g/dl)             | 7.2 ± 0.3 <sup>b</sup>     | 6.6 ± 0.4 <sup>c</sup>     | 7.6 ± 0.3 <sup>a</sup>     | 7.4 ± 0.5 <sup>ab</sup>   |
| Albumin(g/dl)        | 3.5 ± 0.3 <sup>b</sup>     | 2.9 ± 0.2 <sup>c</sup>     | 3.8 ± 0.3 <sup>a</sup>     | 3.5 ± 0.4 <sup>b</sup>    |
| Globulin(g/dl)       | 3.7 ± 0.4 <sup>a</sup>     | 3.7 ± 0.4 <sup>a</sup>     | 3.8 ± 0.2 <sup>a</sup>     | 4.0 ± 0.3 <sup>a</sup>    |
| BUN(mg/dl)           | 22.0 ± 4.3 <sup>ab</sup>   | 23.2 ± 3.3 <sup>a</sup>    | 18.4 ± 2.3 <sup>c</sup>    | 19.8 ± 1.7 <sup>bc</sup>  |
| Creatinine(mg/dl)    | 0.69 ± 0.03 <sup>a</sup>   | 0.59 ± 0.04 <sup>b</sup>   | 0.66 ± 0.05 <sup>a</sup>   | 0.66 ± 0.05 <sup>a</sup>  |
| Na(mM)               | 145.3 ± 3.3 <sup>a</sup>   | 143.4 ± 2.2 <sup>a</sup>   | 137.9 ± 3.5 <sup>b</sup>   | 143.0 ± 4.7 <sup>a</sup>  |
| Ca(mg/dl)            | 9.7 ± 0.5 <sup>c</sup>     | 8.9 ± 0.4 <sup>d</sup>     | 10.9 ± 0.4 <sup>a</sup>    | 10.4 ± 0.6 <sup>b</sup>   |
| Cl(mM)               | 105.1 ± 2.1 <sup>a</sup>   | 103.0 ± 2.5 <sup>ab</sup>  | 102.7 ± 2.1 <sup>ab</sup>  | 101.6 ± 3.5 <sup>b</sup>  |
| Inorganic P(mg/dl)   | 4.9 ± 0.7 <sup>c</sup>     | 6.4 ± 1.1 <sup>b</sup>     | 7.6 ± 0.7 <sup>a</sup>     | 5.8 ± 0.7 <sup>b</sup>    |
| K(mM)                | 4.4 ± 0.5 <sup>b</sup>     | 5.1 ± 1.3 <sup>a</sup>     | 5.4 ± 0.6 <sup>a</sup>     | 4.2 ± 0.3 <sup>b</sup>    |
| ALP(U/L)             | 59.2 ± 13.6 <sup>b</sup>   | 181.8 ± 100.4 <sup>a</sup> | 105.3 ± 51.5 <sup>b</sup>  | 67.4 ± 25.6 <sup>b</sup>  |
| PTT(sec)             | 32.6 ± 7.2 <sup>a</sup>    | 38.3 ± 11.0 <sup>a</sup>   | 30.9 ± 7.8 <sup>a</sup>    | 32.8 ± 7.1 <sup>a</sup>   |
| SGOT(AST)(U/L)       | 129.8 ± 21.8 <sup>a</sup>  | 185.1 ± 92.7 <sup>a</sup>  | 141.9 ± 66.9 <sup>a</sup>  | 124.0 ± 45.1 <sup>a</sup> |
| SGPT(ALT)(U/L)       | 54.8 ± 7.7 <sup>ab</sup>   | 71.0 ± 22.0 <sup>a</sup>   | 47.6 ± 16.5 <sup>b</sup>   | 45.7 ± 18.3 <sup>b</sup>  |
| Glucose(mg/dl)       | 104.1 ± 20.3 <sup>a</sup>  | 97.7 ± 15.4 <sup>a</sup>   | 110.8 ± 18.6 <sup>a</sup>  | 95.7 ± 19.1 <sup>a</sup>  |
| Cholesterol(mg/dl)   | 60.1 ± 9.1 <sup>bc</sup>   | 25.4 ± 7.1 <sup>c</sup>    | 76.9 ± 8.7 <sup>a</sup>    | 61.6 ± 9.7 <sup>b</sup>   |
| 5'-Nucleotidase(U/L) | 84.3 ± 42.7 <sup>a</sup>   | 28.9 ± 20.7 <sup>bc</sup>  | 7.2 ± 4.1 <sup>c</sup>     | 44.8 ± 42.7 <sup>b</sup>  |

· Means with different letters(a,b,c) within a column are significantly from each other at p<0.05 as determined by Duncan's multiple range test.

· EA1: ethylacetate fraction gavaged at doses of 3mg/100g bw/day EA2: ethylacetate fraction gavaged at doses of 5mg/100g bw/day W: water fraction gavaged at doses of 5mg/100g bw/day C: control

### 3. 개발된 제품의 대장암 생성 억제능 측정 및 인체실험을 통해 하수오의 항산화 효능 규명

#### 가. 하수오 제품 섭취에 의한 동물 대장암 억제 효과

##### 1) 식이섭취량, 대장길이, 간무게

Table 23. Food intake, colon length and relative liver weight in experimental animals

| Group   | Food intake (g/day)        | Colon length (cm)         | Body weight (g) <sup>1)</sup> | Relative liver weight           |
|---------|----------------------------|---------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| C       | 24.40 ± 0.42 <sup>a</sup>  | 13.1 ± 1.17 <sup>a</sup>  | 346.1 ± 16.9 <sup>d</sup>     | 0.03018 ± 0.00218 <sup>u</sup>  |
| C+CWH   | 24.23 ± 0.61 <sup>a</sup>  | 12.1 ± 1.38 <sup>ab</sup> | 340.5 ± 17.7 <sup>d</sup>     | 0.03143 ± 0.00044 <sup>d</sup>  |
| C+CWHB  | 23.78 ± 0.40 <sup>ab</sup> | 11.2 ± 0.92 <sup>b</sup>  | 338.2 ± 16.3 <sup>d</sup>     | 0.02787 ± 0.00263 <sup>b</sup>  |
| C+B     | 23.44 ± 0.11 <sup>ab</sup> | 11.5 ± 1.55 <sup>b</sup>  | 349.9 ± 15.6 <sup>d</sup>     | 0.02766 ± 0.00324 <sup>b</sup>  |
| HF      | 18.50 ± 0.40 <sup>d</sup>  | 11.9 ± 1.49 <sup>ab</sup> | 364.1 ± 23.0 <sup>c</sup>     | 0.02461 ± 0.00233 <sup>c</sup>  |
| HF+CWH  | 21.64 ± 1.65 <sup>c</sup>  | 12.3 ± 1.69 <sup>ab</sup> | 382.7 ± 16.7 <sup>ab</sup>    | 0.02634 ± 0.00192 <sup>bc</sup> |
| HF+CWHB | 22.57 ± 0.60 <sup>bc</sup> | 11.9 ± 0.95 <sup>ab</sup> | 370.9 ± 12.4 <sup>bc</sup>    | 0.02729 ± 0.00223 <sup>b</sup>  |
| HF+B    | 21.65 ± 1.25 <sup>c</sup>  | 12.9 ± 2.10 <sup>a</sup>  | 386.5 ± 15.1 <sup>a</sup>     | 0.02662 ± 0.00181 <sup>bc</sup> |

· Means with different letters(a,b,c) within a column are significantly from each other at p<0.05 as determined by Duncan's multiple range test.

<sup>1)</sup> Body weight prior to sacrifice

2) 간과 혈장의 지질과산화 형성 억제능

간의 지질과산화물 측정결과 일반식이 대조군에 비해 고지방식이 대조군의 지질과산화물량이 감소하는 경향을 보였으나 유의차는 관찰되지 않았다. 일반식이 군에서는 비피더스균 첨가군에서 과산화물량이 유의하게 감소하였고 고지방식이 군에서는 하수오군, 하수오발효군에서 지질과산화물 형성이 유의적으로 억제되었다.

혈장의 경우는 일반식이 대조군과 고지방식이 대조군의 지질과산화물량에 차이가 없는 것으로 나타났고 시료첨가군의 효과가 관찰되지 않았다.

Table 24. Effect of *Cynanchum Wilfordii Hemsley* on liver and plasma MDA formation in rats

| Group   | MDA in liver<br>nmol/mg protein | MDA in plasma<br>nmol/ml  |
|---------|---------------------------------|---------------------------|
| C       | 81.9±16.6 <sup>ab</sup>         | 9.28±1.23 <sup>c</sup>    |
| C+CWH   | 87.81±12.0 <sup>ab</sup>        | 10.00±1.67 <sup>bc</sup>  |
| C+CWHB  | 90.7±11.2 <sup>a</sup>          | 10.60±2.02 <sup>abc</sup> |
| C+B     | 77.0±17.7 <sup>bc</sup>         | 10.20±1.31 <sup>abc</sup> |
| HF      | 74.9±11.4 <sup>bc</sup>         | 11.44±1.76 <sup>abc</sup> |
| HF+CWH  | 61.6±13.0 <sup>d</sup>          | 10.83±3.10 <sup>abc</sup> |
| HF+CWHB | 68.0±12.9 <sup>cd</sup>         | 12.22±2.32 <sup>ab</sup>  |
| HF+B    | 57.7±11.1 <sup>d</sup>          | 12.30±3.26 <sup>a</sup>   |

• Means with different letters(a,b,c,d) within a column are significantly from each other at p<0.05 as determined by Duncan's multiple range test.

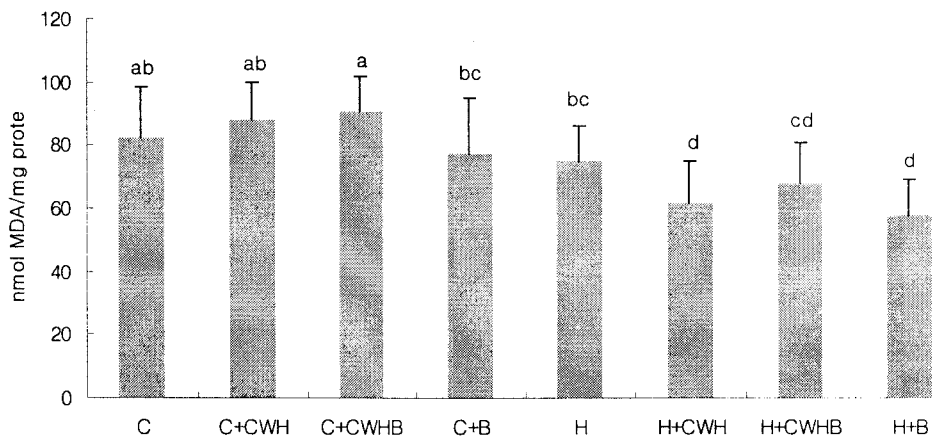


Figure 10. Effect of *Cynanchum Wilfordii Hemsley* on liver MDA formation in rats

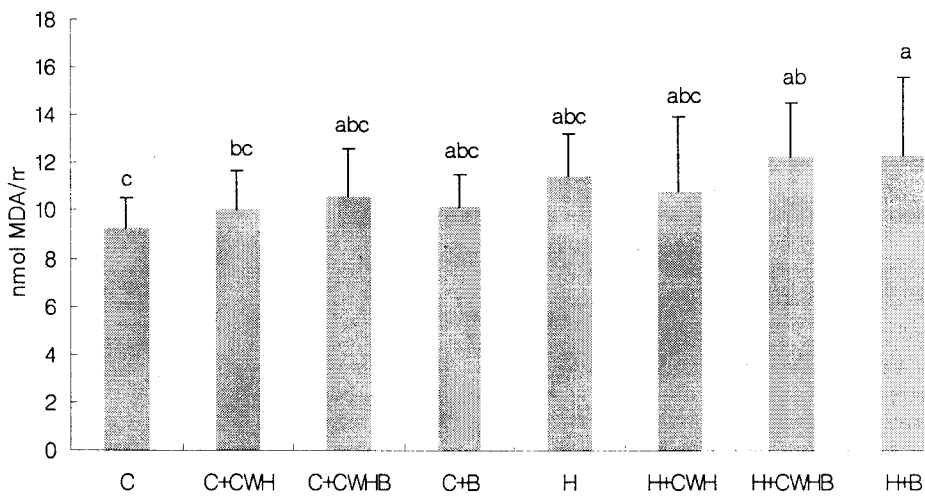


Figure 11. Effect of *Cynanchum Wilfordii Hemsley* on plasma MDA formation in rats

### 3) ACF형성 억제능

일반식이 대조군에 비해 고지방 식이 대조군의 경우 ACF와 AC수가 증가하는 경향을 보였고 일반식이군의 경우 하수오 추출물 첨가식이군에서 AC와 ACF 수 모두 유의적으로 감소되었다.

Table 25. Effect of *Cynanchum Wilfordii Hemsley* on AOM-induced ACF formation in rats

| Group   | ACF <sup>1)</sup> /colon  | AC <sup>2)</sup> /colon   | AC/ACF                  |
|---------|---------------------------|---------------------------|-------------------------|
| C       | 110.3±16.0 <sup>abc</sup> | 237.0±44.2 <sup>abc</sup> | 2.15±0.17 <sup>ab</sup> |
| C+CWH   | 73.2±14.6 <sup>d</sup>    | 149.3±31.5 <sup>d</sup>   | 2.02±0.23 <sup>b</sup>  |
| C+CWHB  | 99.8±16.4 <sup>bcd</sup>  | 208.0±34.5 <sup>bcd</sup> | 1.98±0.02 <sup>ab</sup> |
| C+B     | 82.8±24.8 <sup>cd</sup>   | 184.2±56.1 <sup>ab</sup>  | 2.21±0.07 <sup>ab</sup> |
| HF      | 135.0±19.2 <sup>a</sup>   | 290.5±68.3 <sup>a</sup>   | 2.16±0.27 <sup>ab</sup> |
| HF+CWH  | 109.6±30.9 <sup>abc</sup> | 245.6±78.5 <sup>abc</sup> | 2.27±0.26 <sup>ab</sup> |
| HF+CWHB | 120.3±16.5 <sup>ab</sup>  | 276.5±49.8 <sup>ab</sup>  | 2.34±0.12 <sup>ab</sup> |
| HF+B    | 125.8±7.9 <sup>ab</sup>   | 290.3±8.4 <sup>ab</sup>   | 2.34±0.09 <sup>a</sup>  |

Means with different letters(a,b,c) within a column are significantly from each other at p<0.05 as determined by Duncan's multiple range test.

<sup>1)</sup>ACF: Aberrant crypt foci

<sup>2)</sup> AC: Aberrant crypt



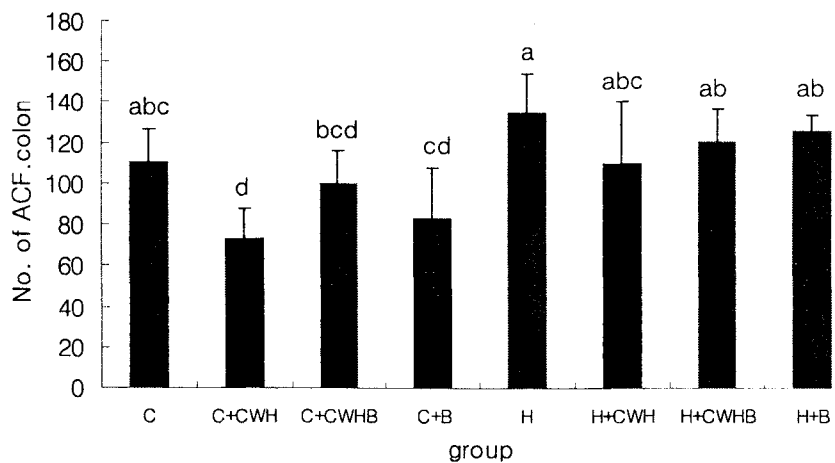


Figure 12. Effect of *Cynanchum Wilfordii Hemsley* on AOM-induced ACF formation in F344 rats.

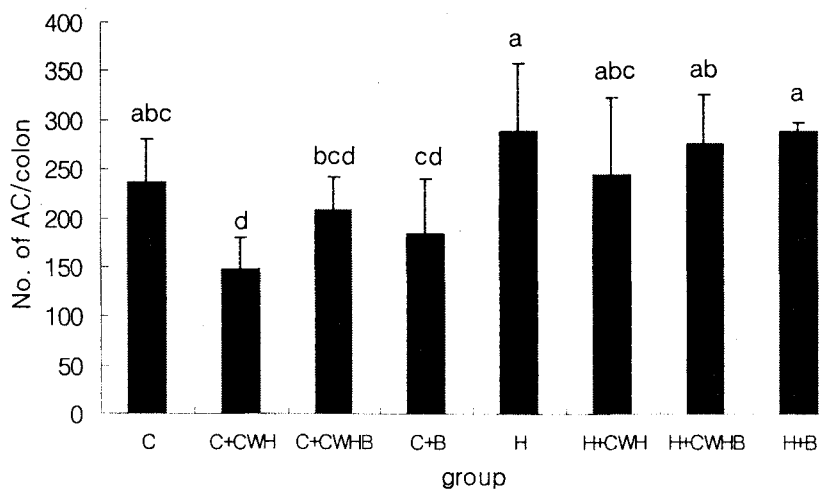


Figure 13. Effect of *Cynanchum Wilfordii Hemsley* on AOM-induced AC formation in F344 rats.

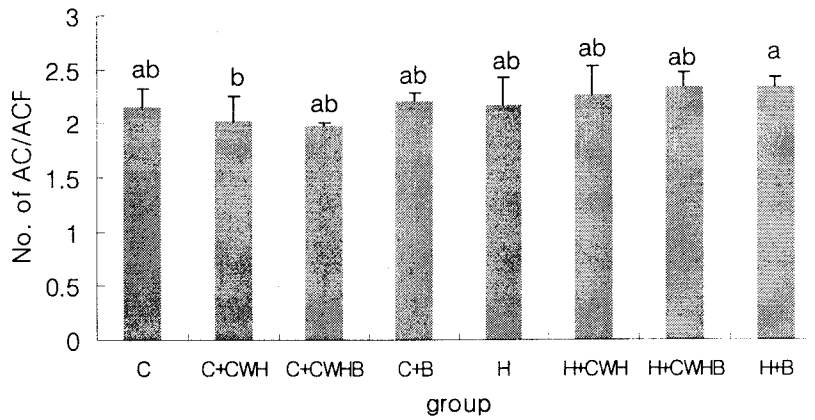


Figure 14. Effect of *Cynanchum Wilfordii Hemsley* on AOM-induced AC/ACF formation in F344 rats.

나. 하수오 섭취에 의한 인체내 항산화 지표 변화

1) 실험대상자들의 신체계측 결과

실험대상자들의 신체계측 결과 신장은 평균  $162.07 \pm 3.79\text{cm}$ 이었고 체중은  $51.17 \pm 11.34\text{kg}$ 이었다. 체질량지수(BMI)는  $20.47 \pm 2.11\text{kg/m}^2$ 로 정상범위인  $18.5\text{-}24.9\text{ kg/m}^2$ 에 속하였다.

Table 26. Anthropometric measurements of study subjects

| Subjects<br>(N=17)                   |                   |
|--------------------------------------|-------------------|
| Mean $\pm$ S.D.                      |                   |
| Height(cm)                           | $162.07 \pm 3.79$ |
| Weight(kg)                           | $51.17 \pm 11.34$ |
| BMI( $\text{kg/m}^2$ ) <sup>1)</sup> | $20.47 \pm 2.11$  |

<sup>1)</sup> BMI(Body Mass Index)=Body weight(kg)/ [Height(m)]<sup>2</sup>

2) 혈장의 과산화지질 형성 억제능

실험대상자들의 하수오 섭취에 의한 혈장내 과산화지질 억제능을 측정한 결과 하수오 섭취 전, 후 그리고 placebo에 의한 지질과산화물 형성 억제능의 차이를 보이지 않았다.

Table 27. Effect of *Cynanchum Wilfordii Hemsley* on plasma MDA formation in study subjects.

| Baseline   | 하수오        | Placebo   |
|------------|------------|-----------|
| 10.13±2.38 | 10.02±1.98 | 9.98±2.07 |

· Not significance

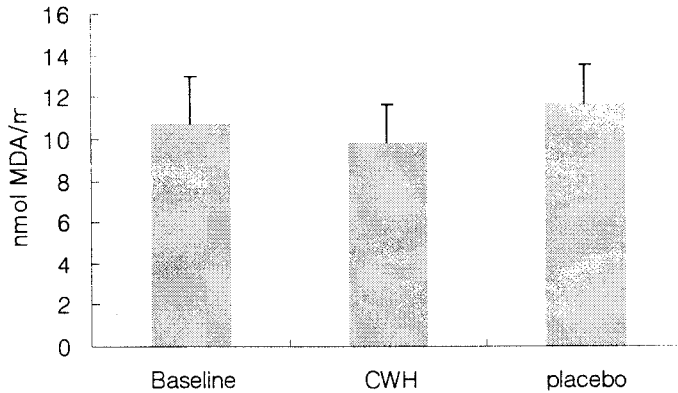


Figure 15. Effect of *Cynanchum Wilfordii Hemsley* on plasma MDA formation in study subjects.

3) LDL oxidation 억제능

실험대상자들의 LDL산화 억제능을 측정한 결과, group 1,2 모두 하수오 섭취시 placebo보다 LDL산화가 유의적으로 억제되었다.

Table 28. Effect of *Cynanchum wilfordii* Hemsley on LDL susceptibility to copper-induced oxidation in study subjects.

| Baseline                  | 하수오                       | Placebo                   |
|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 43.06 ± 2.18 <sup>a</sup> | 32.03 ± 1.64 <sup>c</sup> | 36.94 ± 5.11 <sup>b</sup> |

· Means with different letters(a,b,c) within a column are significantly from each other at p<0 as determined by Duncan's multiple range test.

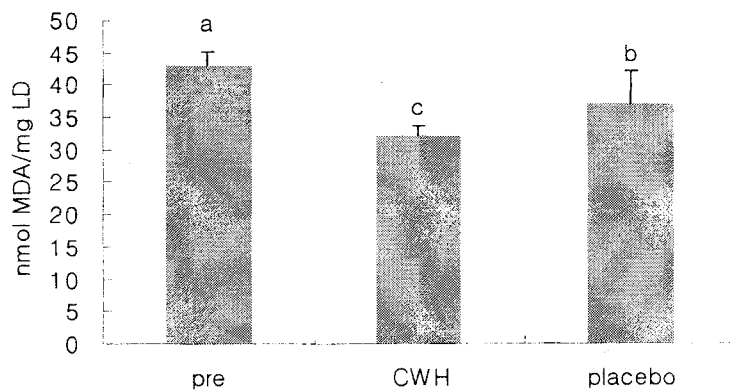
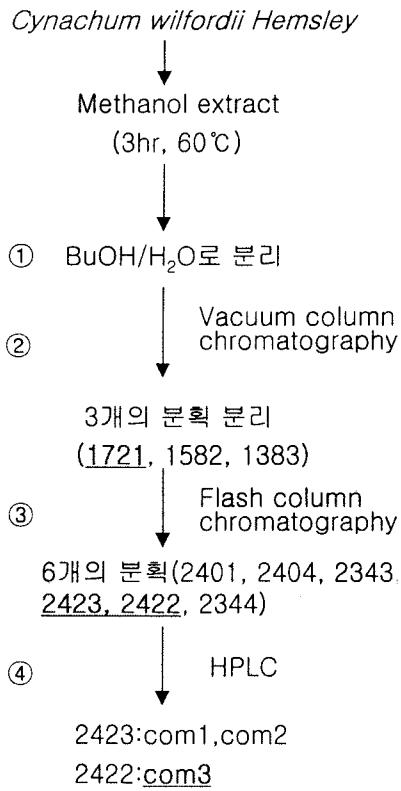


Figure 15. Effect of *Cynanchum wilfordii* Hemsley on LDL oxidation

### 3절 하수오(*Cynanchum wilfordii* Hemsley) 추출물로부터 항산화 성분이 있는 생리활성물질 정제 및 구조 분석

#### 1. 실험방법 및 내용

하수오분말(*Cynanchum wilfordii* Hemsley) 2.5kg를 methanol로 3시간 동안 60℃의 온도에서 추출하여, 630g의 추출물을 얻었고(수율 25%) 그 중 15g을 ethylacetate/ H<sub>2</sub>O 또는 n-Buthanol/H<sub>2</sub>O를 분리한 결과 후자에서 두 개의 layer로 분리되었다. 분리된 n-Buthanol 분획과 항산화 실험에 사용되었던 crude EtOAc 분획은 Co-TLC 상 동일한 compounds가 존재하므로, 본 실험실에서 분리된 n-BuOH fraction (5g)을 이용해 아래의 순서에 의거하여 항산화 활성을 스크리닝 하였다.



1) BuOH/H<sub>2</sub>O 분리



fraction 1 fraction 2 fraction 3

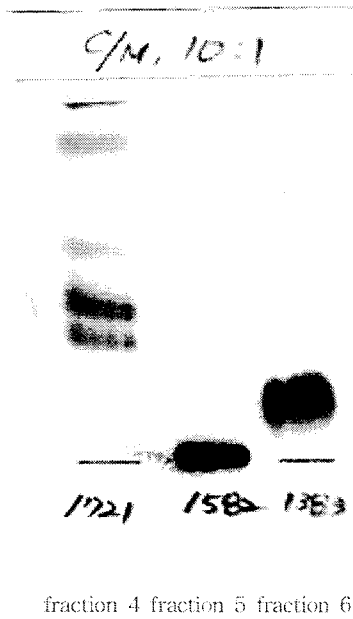
**Figure 16. Mobile phase—Chloroform/methanol, 10:1**

Frc.1 & Frc.2→crude ethylacetate, Frc.3→n-BuOH/H<sub>2</sub>O

2) Vacuum column chromatography

\* Vacuum Column Chromatography 조건

|                  |                                      |
|------------------|--------------------------------------|
| Stationary phase | Merck silica gel 60 (400mesh 이상) 45g |
| Mobile phase     | C/M,20:1→C/M,10:1→C/M,5:1→C/M,1:1    |
| Column size      | 11.0cm OD× 6cm                       |
| Total used time  | 1 hr.                                |



**Figure 17: Mobile phase-Chloroform/methanol, 10:1**

n-BuOH fraction을 vacuum chromatography를 시행하여 분획한 3개의 fractions (fraction 4, 5, 6) 이며, 1차 항산화 활성을 본 fractions이다.

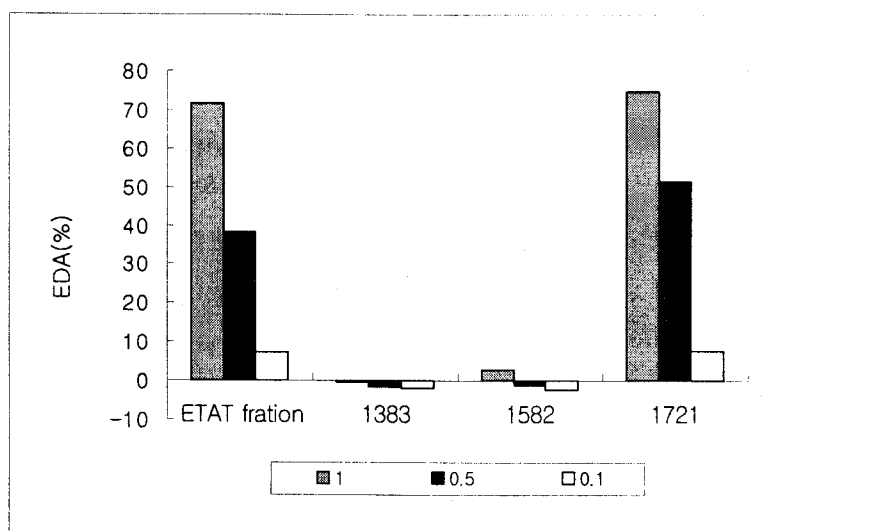
● 항산화 활성 결과

그림 2와 같이 3개의 분획으로 나눈 뒤, 항산화 실험 결과 분획 4(1721)이 활성이 높았다.



**Table 29. Electron donating abilities of *Cynanchum wilfordii* Hemsley to 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)radicals**

| Conc.<br>(mg/ml) | EDA(%)                     |                            |                            |                            |
|------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
|                  | ETAT                       | 1383                       | 1582                       | 1721(1461+1384)            |
| 1                | 71.47 ± 6.78 <sup>ax</sup> | -0.22 ± 3.90 <sup>ay</sup> | 2.83 ± 1.65 <sup>ay</sup>  | 74.73 ± 0.45 <sup>ax</sup> |
| 0.5              | 38.11 ± 1.41 <sup>by</sup> | -1.45 ± 1.48 <sup>az</sup> | -1.11 ± 4.74 <sup>bz</sup> | 51.48 ± 2.69 <sup>bx</sup> |
| 0.1              | 7.30 ± 1.66 <sup>cx</sup>  | -2.12 ± 1.58 <sup>ay</sup> | -2.55 ± 1.19 <sup>by</sup> | 7.78 ± 6.10 <sup>cx</sup>  |



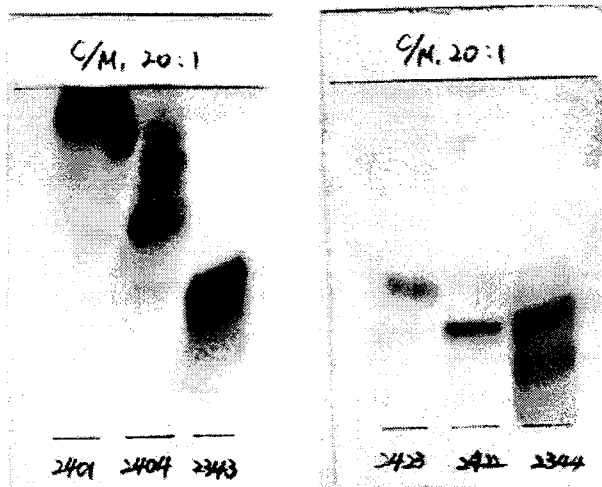
3) 분획4(1721)의 분리

분획4를 flash column chromatography를 이용하여 좀 더 세부적으로 분리하였다.

\* Flash column chromatography 조건

|                  |                                       |
|------------------|---------------------------------------|
| Stationary phase | Merck silica gel 60 (230-400mesh) 30g |
| Mobile phase     | C/M,20:1→C/M,1:1                      |
| Column size      | 4.0cmOD × 12cm                        |
| Total used time  | 2 hr.                                 |

● Chromatography 결과



fraction No.      1      2      3                      4      5      6

Figure 18. Mobile phase chloroform:methanol(20:1)

Figure 19. Mobile phase chloroform:methanol(20:1)

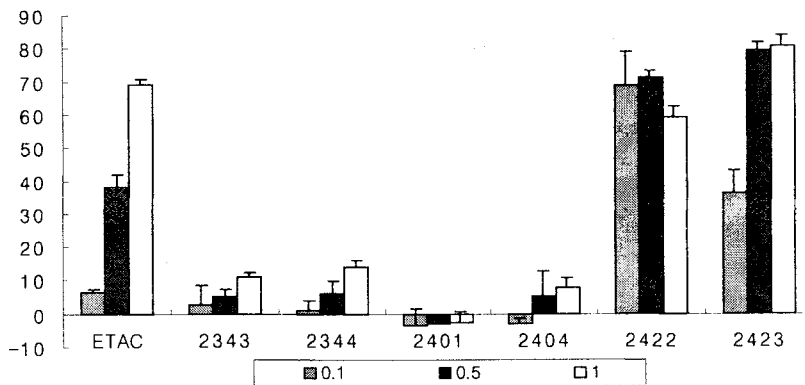
분획4는 약간의 oil성분이 섞여 있는 것으로 보였으며, 위와 같은 chromatography를 시행하여 다음과 같은 여섯 개의 subfractions으로 분획하였다. 그림3, 4 는 각각의 subfractions는 chloroform과 methanol 20:1로 섞어서 TLC를 찍은 결과이다.

● 항산화 활성 결과

분리된 6개 subfractions의 항산화실험 결과, fraction No.4(2423) 와 fraction No. 5(2422)의 활성이 높았다.

Table 30. Electron donating abilities of *Cynanchum wilfordii* Hemsley to 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)radicals

| Conc.<br>(mg/ml) | EDA(%)                       |                              |                              |                              |                              |                               |                              |
|------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
|                  | ETAC                         | 2343                         | 2344                         | 2401                         | 2404                         | 2422                          | 2423                         |
| 1                | 68.96<br>±1.90 <sup>ax</sup> | 10.87<br>±1.42 <sup>bx</sup> | 13.75<br>±2.19 <sup>bx</sup> | -2.68<br>±3.22 <sup>cx</sup> | 7.59<br>±3.13 <sup>dx</sup>  | 59.10<br>±3.24 <sup>ex</sup>  | 80.66<br>±3.05 <sup>fx</sup> |
| 0.5              | 38.31<br>±3.66 <sup>ay</sup> | 5.07<br>±2.04 <sup>by</sup>  | 6.18<br>±3.41 <sup>by</sup>  | -2.89<br>±2.45 <sup>cx</sup> | 5.14<br>±7.48 <sup>bx</sup>  | 70.96<br>±2.35 <sup>dy</sup>  | 79.18<br>±2.71 <sup>ex</sup> |
| 0.1              | 6.54<br>±0.85 <sup>az</sup>  | 2.80<br>±5.82 <sup>aby</sup> | 1.00<br>±2.82 <sup>abz</sup> | -3.47<br>±4.80 <sup>bx</sup> | -2.89<br>±1.55 <sup>by</sup> | 68.40<br>±10.64 <sup>cy</sup> | 35.95<br>±7.06 <sup>dy</sup> |



4) 분획 4와 분획 5의 분리

분획 4(2423)와 분획 5(2422)를 HPLC를 이용하여 다시 분리함. 이 두 분획을 각각 아래의 조건으로 최종적인 purification을 시행하여 분획 4에서 compound 1과 compound 2와 분획 5를 불순물 제거한 후, 순도 높은 compound 3을 얻어 총 3개의 compounds를 얻었다.

\* High pressure liquid chromatography 조건 (분획 4)

---

|                  |                             |
|------------------|-----------------------------|
| Stationary phase | Econosphere Silica 10 $\mu$ |
| Mobile phase     | DM/M,20:1                   |
| Column size      | 2.2cmOD $\times$ 25cm       |
| Total used time  | 1 hr.                       |

---

\* High pressure liquid chromatography 조건(분획 5)

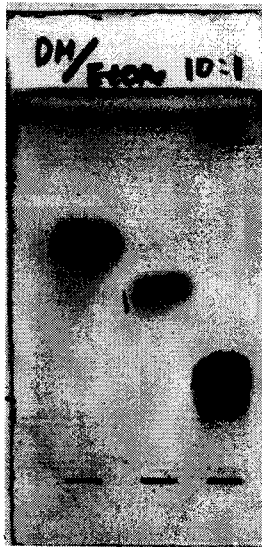
---

|                 |                                      |
|-----------------|--------------------------------------|
|                 | Econosphere C <sub>18</sub> 10 $\mu$ |
| Mobile phase    | M/W,2:1                              |
| Column size     | 2.2cmOD $\times$ 25cm                |
| Total used time | 1 hr.                                |

---

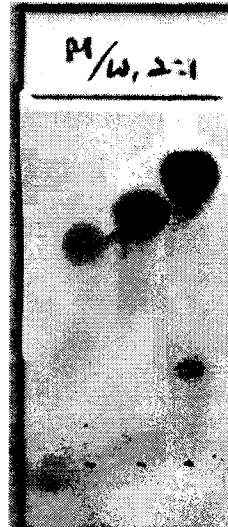
Stationary phase

● Chromatography 결과



com. 1 com. 2 com. 3

compound No. 1 2 3



com. 1 com. 2 com. 3

compound No. 1 2 3

Figure 20: Mobile phase(DM/EtOAc, 10:1)

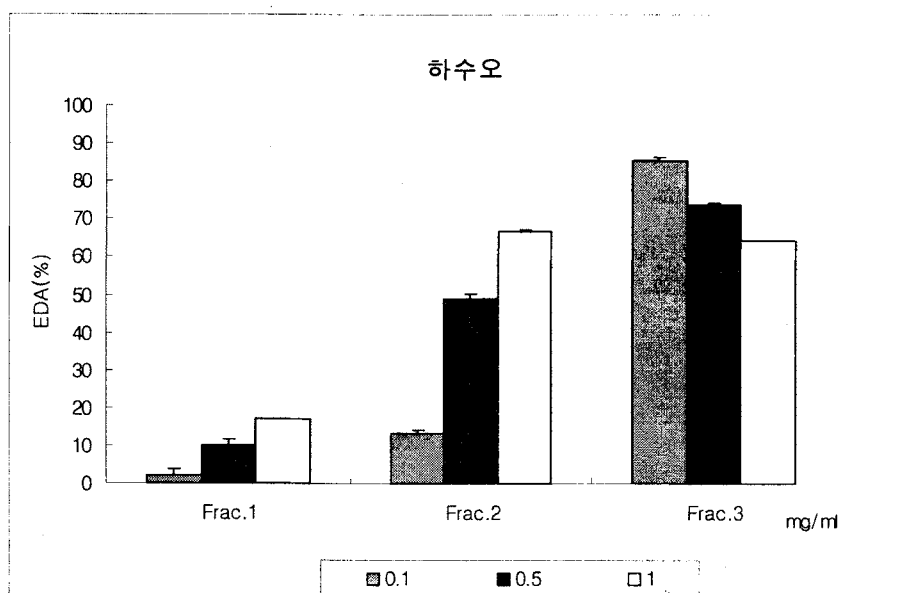
Figure 21: Mobile phase(MeOH/Water, 2:1)

●항산화 실험 결과

세 개의 compound의 항산화 실험결과 compound 3의 활성이 높은 것으로 나타났다.

Table 31. Electron donating abilities of *Cynanchum wilfordii* Hemsley to 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)radicals

|          | Com1       | Com2       | Com3       |
|----------|------------|------------|------------|
| 0.1mg/ml | 2.20±1.61  | 13.17±1.08 | 85.42±0.16 |
| 0.5mg/ml | 9.88±1.02  | 48.98±1.07 | 73.90±0.32 |
| 1.0mg/ml | 16.93±0.94 | 66.86±0.39 | 64.24±0.19 |



5) Compound 3의 구조분석

LC-MS분석

\* Instrument Parameters

|                              |      |      |                       |      |
|------------------------------|------|------|-----------------------|------|
| Ionization mode and Polarity | ES+  |      |                       |      |
| Capillary (kV)               | 3.20 | 3.27 | Cone (V)              | 20.0 |
| Extractor (V)                | 2.00 | 2.08 |                       |      |
| Source Temperature (°C)      | 120  | 119  | Cone Temperature (°C) | 20   |
|                              |      |      |                       | 20   |
| Desolvation Temperature (°C) | 300  | 297  |                       |      |
| Cone Gas Flow (L/Hr)         | 60   |      |                       |      |

\* Run method parameters

Waters Alliance 2695 HPLC Pump Initial Conditions

Solvents MEOH/H<sub>2</sub>O gradient (40.0- MeOH, 0.05TFA in H<sub>2</sub>O)

Flow (ml/min) 0.200 Stop Time (mins) 30.0

Column Temperature (°C) 35.0

Waters996 PDA

Start Wavelength (nm) 210.00 End Wavelength (nm) 600.00

Resolution (nm) 1.2 Sampling Rate (spectra/s) 1.000

Data type: Enhanced Mass

☞ 위 분석조건에서 compound 3은 20.8분에서 broad한 peak로 나타났고 이때의 m/z 는 480.6이었다.

\* <sup>1</sup>H- NMR 분석 (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

δ 7.615 (1H, d, J = 9.0 Hz), 6.77 (1H, d, J = 9.0 Hz), 6.63 (1H, d, J = 9.0 Hz)  
6.33 (1H, d, J = 9.0 Hz), 2.41 (3H, s), 2.02 (3H, s).

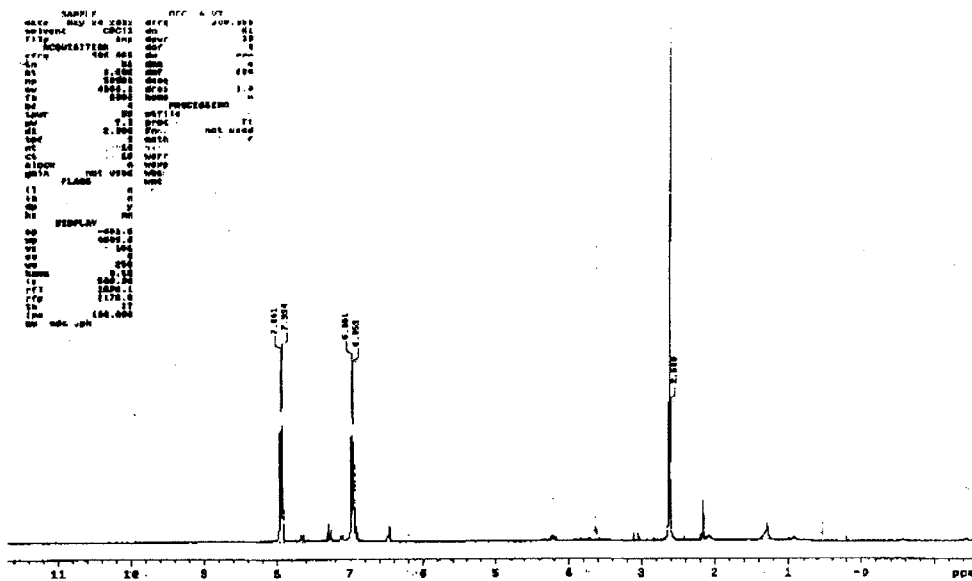


Figure 22. Compound 3의 <sup>1</sup>H NMR spectrum.



\*<sup>13</sup>C- NMR 분석 (75.5 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

δ 203.3, 1, 162.8, 162.6, 151.0, 147.9, 132.8, 126.6, 120.5, 119.2, 116.9, 113.2, 111.9, 107.7, 29.7, 25.2.

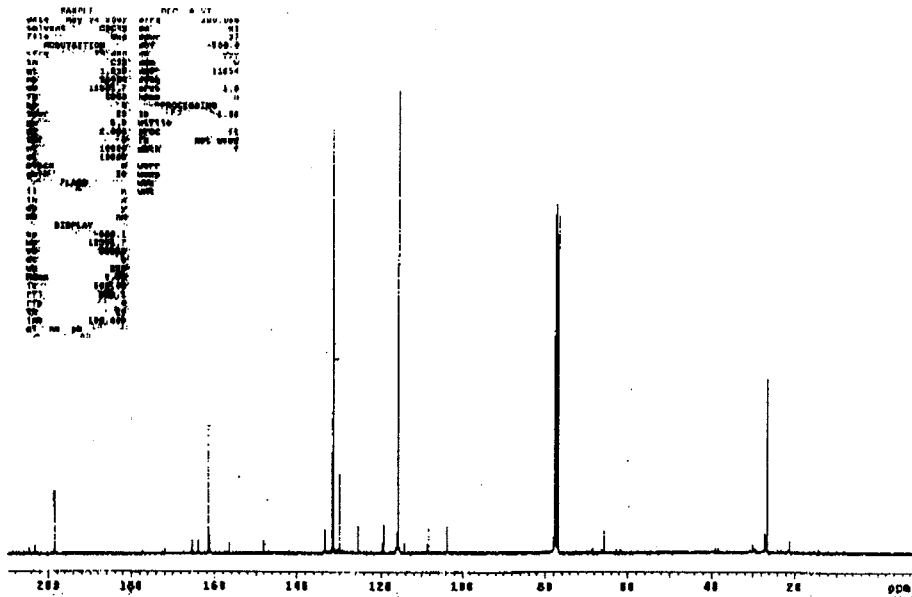


Figure 23. Compound 3의 <sup>13</sup>C NMR spectrum.

나. 결론

Compound 3 의 구조분석결과

· 이 물질은 TLC 상에서 단일 spot으로 보였으나, HPLC 분석 결과 순수한 물질 이 아닌 것으로 판단되었다.

·  $^1\text{H-NMR}$  (그림 1) 및  $^{13}\text{C-NMR}$  (그림 2)의 분석결과 매우 단순한 형태의 peak pattern을 보여 주었는데 이것은 flavonoid의 형태로서 C6-C3-C6의 dimeric 형태의 혼합물로 보이며 LC-MS분석결과 분자량은 480내외인 것으로 나타났다.

## 4 절 하수오 가공제품의 분석방법

### 1. 수 분

수분은 105℃ 상압가열 건조법에 의하여 측정하였다. 즉, 105±1 ℃로 조절된 건조기에 칭량용기를 넣고 가열하여 항량을 구한뒤, 시료 3 g을 정확히 달아 칭량용기에 취하여 105±1 ℃로 조절된 건조기에 넣고 3시간 동안 건조한 후 데시케이터에 넣어 방냉하여 무게를 달고 이조작을 2시간씩 3회 반복하여 항량을 구하였다. 이때 가열에 의하여 감소된 중량을 수분함량으로 간주하고 다음식에 의하여 계산하였다.

$$\text{시료의 수분 함량 (\%)} = \frac{\text{시료의 무게} - \text{건조시료의 무게}}{\text{시료의 무게}} \times 100$$

### 2. 조지방

조지방은 Soxhlet 추출법에 의하여 측정하였다. 즉, 시료를 원통여과지에 넣고 미리 105℃에서 항량된 수기용적의 2/3정도의 ether를 가하고 냉각관을 연결한뒤 90℃ 전기항온수조에서 약 10시간 동안 지방을 추출하였다. 추출이 모두 끝난후 잔존하는 ether를 끓는 water bath상에서 모두 휘발시킨 후 105℃ dry oven에서 약 1시간 건조한뒤 desiccator에서 30분 방냉하여 항량을 구한후 아래식에 따라 조지방 함량을 구하였다.

$$\text{시료의 지질 (\%)} = \frac{W_1 - W}{S} \times 100$$

W : 수기 flask의 항량

W<sub>1</sub> : 추출건조후의 전체무게

S : Sample의 중량 (g)

### 3. 조단백

단백질은 1983년 J. Kjeldahl이 제안한 Kjeldahl법에 의해 측정하였다. 즉, 잘 건조된 분해 flask에 2 g의 시료를 정확히 취한뒤 분해촉매재 2 g과 황산을 약 20 ml넣고 draft내에서 투명한 액체가 되도록 분해를 시킨후 분해가 끝나면 물 100 ml로 정용한다. 정용된 시료는 증류장치를 이용하여 증류한뒤 유출되어 나온 암모니아 (NH<sub>3</sub>)에 의하여 중화되고 남은 과잉의 0.1 N -H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 0.1 N-NaOH 표준용액으로 중화적정한다. 혼합지시약은 중화중점에서는 灰色이 되므로 이때 적정눈금 (V<sub>1</sub> : 소비 ml)를 측정하고 시료를 제외한 blank test 도 병행하여 계산하였다.

시료중의 질소량 N(mg) = 1.4 x (V<sub>0</sub>- V<sub>1</sub>) x F

$$\text{조단백질 (\%)} = \frac{0.0014008 \times (V_0 - V_1) \times D \times F \times D \times N}{S} \times 100$$

V<sub>0</sub> : Blank test의 0.1N NaOH 소비 ml수

V<sub>1</sub> : Sample의 0.1N NaOH 소비 ml수

F : 0.1 N NaOH 표준용액의 Factor

S : sample 채취량

D : 희석배수

N : 질소환산계수

### 4. 유리당

시료 10 g을 칭량하여 80 % ethanol 200 ml를 가한 다음 70℃ 수욕상에서 환류 냉각시키면서 1시간동안 3회 추출하였다. 추출액을 모아 3,000 rpm에서 30 분간 원심 분리시킨 다음 그 상정액을 취하여 감압농축 (Vaccume evaporator, EYELE) 한후 증류수 50 ml로 정용하고 10 % lead acetate 5ml와 3.2 %

sodium oxalate 5 ml를 넣어 단백질을 침전시켜 제거 하였다. 원심분리된 상층 액을 0.22 µl membrane filter로 여과한 다음 미리 활성화 시킨 Sep-pak C<sub>18</sub> (Waters Inc., USA) 통과시킨 다음 Table 6과 같은 조건으로 HPLC를 사용하여 측정하였으며 이때의 Standard curve는 아래와 같다.

Table 32. Instrument and working conditions for free sugar analysis by High-performance liquid chromatography

|                  |   |
|------------------|---|
| Instrument       | : Waters associates HPLC                          |
| Column           | : Carbohydrate Column, 300 mm x 7.8 mm            |
| Solvent          | : Acetonitrile : H <sub>2</sub> O (V/V%) = 83 :17 |
| Flow rate        | : 1.5 ml/ min                                     |
| Injection volume | : 10 µl   |
| Detector         | : Waters Differential Refractometer 410           |

#### 5. 표면 색도

각 시료의 표면색도는 색도계 (Chromameter, Model CR-200, Minolta, Japan)를 이용하여 3회 반복 측정하였으며 Hunter scale에 의한 명도 (L값), 적색도 (a값, + : 적색, - : 녹색), 황색도(b값, + : 황색, - : 청색)로 나타내었다. 이때 사용한 표준백색판의 L, a, b값은 각각 89.2, 0.921 및 0.78 이었다.

#### 6. 수분 활성도

수분활성도는 시료 약 20 g을 취하여 Aw기( Novasina Aw box)를 이용하여 측정하였다.

## 7. 미생물 검사

### 가. 일반세균수 측정

저장시료의 일반세균수는 Plate Count Agar(Difco, USA)를 사용하였다. 즉, 시료 10 g 을 멸균한 생리적 식염수 (0.85% NaCl) 90 ml에 넣고 충분히 혼합한 다음, 각 단계의 검체 희석액 1ml 씩을 petri dish에 취하여 PCA 한천배지 (50℃) 약 15ml를 무균적으로 분주한뒤 검체와 배지를 잘섞고 냉각응고시킨다. 동일배지 또는 보통한천배지를 3-5ml 가하여 중첩시킨뒤 35±1℃에서 20±2시간 배양한뒤 Colony의 수가 30-300개가 되는 배지를 선택하여 측정하였다. 이때 사용한 배지의 조성은 다음과 같다 (Table 33).

Table 33. The media compositions for determination of viable cell count and isolation of Total microorganisms

| Ingredients         | Amounts |
|---------------------|---------|
| Bacto Tryptone      | 5 g     |
| Bacto Yeast Extract | 25 g    |
| Bacto Dextrose      | 1 g     |
| Bacto Agar          | 15 g    |
| Distilled water     | 1 l     |
| pH                  | 7.0     |

### 나. 대장균군

대장균군은 데스옥시콜레이트 유당한천 배지법으로 데스옥시콜레이트유당 한천배지 (Desoxycholate Lactose Agar)를 사용하여 분리 배양하였다. 즉, 각 단계의 검체 희석액 1ml 씩을 petri dish에 취하여 데스옥시콜레이트 유당한천

배지(50℃) 약 15ml를 무균적으로 분주한뒤 검체와 배지를 잘섞고 냉각응고시킨다. 동일배지 또는 보통 한천배지를 3-5ml 가하여 증척시킨뒤 35±1℃에서 20±2시간 배양한뒤 암적색의 집락을 생성한경우에 측정한다. 이때의 배지조성은 Table 34 에 나타내었다.

Table 34 The media compositions for determination of viable cell count and isolation of total microorganisms

| Ingredients          | Amounts |
|----------------------|---------|
| Peptone              | 10.0 g  |
| Lactose              | 10.0 g  |
| Sodium chloride      | 5.0 g   |
| Sodium citrate       | 2.0 g   |
| Sodium desoxycholate | 15.0 g  |
| Agar                 | 15.0 g  |
| Neutral red          | 0.03 g  |
| Distilled water      | 1 l     |
| pH 7.3-7.5           |         |
| 1분간 Boiling          |         |

#### 다. 효모 및 곰팡이

효모와 곰팡이의 측정은 세균수 측정방법에 준하여 시험하였으며 배지는 potato dextrose agar (Difco co. USA)를 사용하였는데 이때 세균의 번식을 억제 하기 위하여 멸균한 10% tartaric acid를 첨가하여 pH를 3.5로 조정하였다. 균주는 25℃에서 5-7일간 배양한 후 발생한 집락수를 계산 하여 그 평균 집락수에 회석배수를 곱하여 진균수로 한다. 이때 사용한 배지의 조성은 다음과 같다 (Table 35).

Table 35. The media compositions for determination of viable cell count and isolation of Total microorganisms

| Ingredients                      | Amounts |
|----------------------------------|---------|
| Potato, Infusion from            | 200.0 g |
| Dextrose                         | 20.0 g  |
| Agar                             | 15.0 g  |
| D.W.                             | 1 l     |
| pH 5.6±2                         |         |
| 121℃, 15분간 멸균                    |         |
| 멸균된 10% 주석산을 가하여 pH를 3.5±0.1로 조정 |         |

## 5 절 하수오 가공제품의 원료선정 및 제조공정 적성

### 1. 하수오 원료 특성 조사 결과

본 연구에서 사용한 하수오는 백하수오(*Cynanchum wilfordii* Hemsley)로써 일 반성분 분석결과 수분 9.06%, 회분 3.07%, 조지방 1.91% 조단백질 21.01% 였 다. 하수오의 유리당 함량은 fructose 0.52%, glucose 0.78%, sucrose 13.30%, maltose 0.59% 였으며 무기질 함량은 Mg 31.40 mg/L, Na 5.04 mg/L, K 263.0 mg/L , Ca 38.74 mg/L 였다.

### 2. 하수오 가공제품 개발을 위한 원료선정 및 제조실험 결과



가. 하수오 가공시 추출 및 농축조건 확립

건재된 하수오를 환 및 과립차등의 가공시 사용하기 위하여 추출 및 농축조건을 다음과 같이 확립하였으며 이때 추출물의 Brix는 20으로 하였다. 즉 하수오:정제수 비율 = 1:5, 추출온도 85℃, 추출시간 10 hr으로 추출하여 진공박막원심농축기를 이용하여 Brix 20으로 농축하여 하수오가공에 사용하였다.

나. 다류제품 (과립차 및 침출차)

1) 원료선정 : 과립차는 황정추출물, 정제염, 구연산등을 넣어 원료를 혼합하여 과립화 하였으며 침출차는 현미를 볶아 하수오 원료와 혼합하여 제조하였다.

2) 제조공정은 과립차의 경우는 원료를 다른 부재료와 혼합하여 과립공정을 거친 후 건조공정을 거쳤으며 침출차는 하수오원료를 절단, 건조하여 1, 2차 덩음공정을 거쳐 체별, 혼합공정을 거쳐 제조하였다.

3) 제품의 특성을 알기위하여 일반분석 및 색도, 미생물실험을 실시하였다.

가) 일반분석실험

과립차 및 침출차의 수분, 회분, 조지방, 조단백질, 수분활성도의 값은 표 36과 같았다.

표 36. 과립차 및 침출차의 일반분석

| 항 목<br>시 료 | 단 위 (%) |      |       |         |                   |
|------------|---------|------|-------|---------|-------------------|
|            | 수 분     | 회 분  | 조 지 방 | 조 단 백 질 | 수 분 활 성 도<br>(Aw) |
| 과 립 차      | 2.79    | 1.62 | 0.15  | 0.68    | 0.34              |
| 침 출 차      | 4.77    | 2.40 | 0.83  | 15.72   | 0.36              |

나) 표면색도 실험 결과

표면색도 실험결과는 표37과 같다.

표 37. 과립차 및 침출차의 표면색도

| 시 료 \ 항 목 | L(명도)값 | a(적색도)값 | b(황색도)값 |
|-----------|--------|---------|---------|
| 과립차       | 85.86  | 4.2     | 17.16   |
| 침출차       | 64.37  | 5.9     | 19.65   |

다) 미생물 실험 결과

미생물실험은 일반세균, 대장균군, 효모 및 곰팡이를 측정하여 표 38와 같은 결과를 얻었다.

표 38. 과립차 및 침출차의 미생물 실험 결과

| 시 료 \ 항 목 | 일반세균                      | 대장균군 | 효모 및 곰팡이 |
|-----------|---------------------------|------|----------|
| 과립차       | 3x10 <sup>2</sup> CFU/g   | ND   | ND       |
| 침출차       | 1.6x10 <sup>2</sup> CFU/g | ND   | ND       |

ND : Not Detected

다. 환 및 스프제품

1) 원료선정 : 하수오환은 하수오추출물과 하수오분말에 당귀, 구기자, 벌꿀, 누에분말등을 넣어 원료를 분쇄, 혼합하여 3가지 형태의 환을 제조 하였다.

하수오 스프는 당근, 양파, 대파, 소맥분등을 넣어 원료를 분쇄하고 혼합하여 제조하였다.

2) 제조공정은 환제품은 원료를 분쇄한 후 혼합하여 Roll반죽을 하고 장환 및 절환, 정환공정을 거쳐 건조한 후 성형을 위해 코팅을 하고 유통을 위해 송풍건조하여 하수오환을 제조하였다.

3) 하수오스프는 하수오원료를 분쇄하여 볶음공정을 거친후 건조된 다른 원료를 혼합하여 하수오환 및 스프를 제조한 후 제품의 특성을 알기위하여 일반 분석 및 색도, 미생물실 험을 하였으며 그 결과는 아래표와 같다.

가) 일반분석 실험 결과

표 39. 환 및 스프의 일반분석 단위 (%)

| 항 목<br>시 료 | 수 분   | 회 분 | 조 지 방 | 조단백질  | 수분활성도<br>(Aw) |
|------------|-------|-----|-------|-------|---------------|
| 관우환        | 9.59  | 3.2 | 1.57  | 19.93 | 0.50          |
| 유비환        | 10.48 | 3.2 | 1.04  | 13.95 | 0.50          |
| 장비환        | 10.78 | 3.4 | 1.73  | 13.42 | 0.50          |
| 스프         | 2.63  | 6.3 | 3.46  | 10.54 | 0.15          |

나) 표면색도 실험 결과

환 및 스프의 표면색도 실험결과는 표 40과 같았다.

표 40. 환 및 스프의 표면색도

| 시 료 \ 항 목 | L(명도)값 | a(적색도)값 | b(황색도)값 |
|-----------|--------|---------|---------|
| 관우환       | 50.79  | 3.70    | 9.90    |
| 유비환       | 42.29  | 1.00    | 2.30    |
| 장비환       | 45.54  | 3.15    | 6.95    |
| 스프        | 82.29  | -1.19   | 19.05   |

다) 미생물 실험 결과

표 41. 환 및 스프의 미생물 실험

| 시 료 \ 항 목 | 일반세균                    | 대장균군 | 효모 및 곰팡이 |
|-----------|-------------------------|------|----------|
| 관우환       | 3x10 <sup>4</sup> CFU/g | ND   | ND       |
| 유비환       | 2x10 <sup>4</sup> CFU/g | ND   | ND       |
| 장비환       | 4x10 <sup>4</sup> CFU/g | ND   | ND       |
| 스프        | 7x10 <sup>3</sup> CFU/g | ND   | ND       |

ND : Not Detected

라. 액상차 제조를 위한 원료선정 및 가공공정 실험

### 1) 하수오추출물 제조

건재된 하수오를 열수 추출한 후 진공박막원심농축기를 이용하여 농축하여 한방추출물과 혼합, 살균하여 제조하였다. 즉 하수오 : 정제수 비율 = 1 : 9, 추출온도 85℃, 추출시간 7 hr으로 추출하여 진공박막원심농축기 이용하여 Brix 20으로 농축한 후 하수오와 잘 어울리는 한방추출물과 혼합하여 액상차를 제조하였다.

### 2) 액상차 배합비 결정 및 관능검사

액상차는 하수오 추출물에 한방추출물, 한방향, 꿀, 구연산등을 넣어 혼합, 살균하여 제조하였으며 액상차 배합비 결정은 하수오추출물 76%, 꿀 11%, 한방추출물 3.8%, 구연산 0.15%, 한방향 0.22%등이 관능검사시 가장 좋은 결과를 보여 주었다.

### 3) 액상차의 가공공정

\* 원료전처리 → 추출 → 여과 → 농축 → 원료혼합 → 계량 및 포장

## 마. 음료제품 개발을 위한 concept 설정 및 배합비 실험

### 1) 하수오의 추출 및 한방원료 복합 추출조건 설정

하수오 단독으로 추출하는 경우는 하수오 : 정제수의 비율을 1 : 9로 하여 추출하는 것이 관능검사시 우수하였고 한방원료를 혼합하여 복합추출을 하는 경우는 한방원료 : 정제수의 비율을 3 : 7로 하여 추출하는 것이 가장 좋았다. 추출온도는 90℃로 하고 추출시간은 Brix에 따라 3시간에서 5시간으로 추출하여 좋은 결과를 얻었다.

### 2) 하수오 한방음료 제품 제조

하수오를 이용한 추출음료 제품의 concept은 자양강장 및 허약 체질 개선효과가 있는 하수오와 한방원료를 혼합하여 만든 중장년층 건강음료로써 하수오

외에 구기자, 천궁, 두충, 당귀, 황기, 대추, 생강등을 배합하여 제조한 결과 우수한 하수오 추출음료가 제조 되었다.

3) 추출음료 가공공정

\* 원료전처리 → 정량 → 추출 → 여과 → 계량 및 포장 → 살균

4) 시제품의 이화학적 분석결과

\* pH : 4.51

\* Brix : 10.81 %

## 6 절 하수오 가공제품의 생산을 위한 고려사항

### 1. 제품별 Profile과 제조공정 및 원재료 비율

가. 관우환 Profile

| 관 우 환 Profile |  |            |
|---------------|--|------------|
| 분류            | 환(기타가공품)   |            |
| 제품 Concept    | 소백산록의 풍부한 유기물과 수분함량이 높은 토양에서 생산된 하수오와 그 추출액만을 이용하여 만든 제품으로 자양강장, 허약체질에 좋은 건강식품 |            |
| Target        | 장년층 이상   |            |
| 제품형태          | 환(환지름 5mm)   |            |
| 원재료           | 하수오분말, 하수오추출물(10 Brix)   |            |
| 가격/중량         | 4,790원/200g(원재료비) * 원료가격에 따라 유동적   |            |
| 내포장           | 재질   | 폴리스틸렌      |
|               | 규격   | 200g, 300g |
| BOX           | 재질   |            |
|               | 규격   |            |
| 유사제품          | 멸치다시마환, 누에환, 인진쑥환, 동충하초환   |            |
| 경쟁제품          |  |            |
| 권장유통기한        | 2년   |            |
| 먹는방법          | 1일, 2-3회 식·전후 관계없이 20환 정도 드십시오   |            |
| 주요공정          | 원료전처리→원료배합→Roll반죽기→장환기→절환기→정환 →건조→Coating→건조→포장                                |            |
| 사전원가          | 4,790원/200g  |            |

1) 관우환 제품 제조공정

| 공정         | 공정설명   |
|------------|--|
| 원료<br>분쇄   | 각 원료를 조분쇄 및 미분쇄하여 160-200 메쉬의 체를 통과하여 분쇄 원료를 준비한다.                               |
| ↓          |  |
| 혼합         | 미리 준비된 미분쇄 원료와 가공용 꿀등을 혼합하여 30-40분간 혼합한다.  |
| ↓          |  |
| Roll<br>반죽 | 혼합원료를 롤러반죽기에서 충분히 반죽시킨 다음 장환작업에 편리하게 성형한다.                                       |
| ↓          |  |
| 장환         | 장환기에서 유출시키는데 이때 압력을 고루 받도록 한다. 장환기에서 5mm크기로 압출한다                                 |
| ↓          |  |
| 절환         | 장환기에서 압출되어 나온 원료를 절환기의 roll사이를 조절하면서 절환한다.                                       |
| ↓          |  |
| 정환         | 절환된 환을 정환기에서 수분을 약간 Spray시키면서 정환기를 10분간 회전시키면서 정형시킨다.                            |
| ↓          |  |
| 건조         | 정환된 환원료를 건조기에서 60 ℃의 온도로 6시간 정도 건조시킨다.   |
| ↓          |  |
| 코팅         | 건조된 환을 당을 이용하여 코팅을 한다. 이때 환끼리 붙을수 있기 때문에 필요에 따라 대두유를 약간 스프레이 해준후 마지막으로 마무리 코팅한다. |
| ↓          |  |
| 송풍<br>건조   | 코팅된 환제품을 서늘한 곳에서 1-2시간 건조  |



2) 관우환 원료 배합비율

| 원료명                  | 투입량(%) | 배합비(%) | 단가(원/Kg) | 가격(원)     | 원료공급 |
|----------------------|--------|--------|----------|-----------|------|
| 하수오추출액               | 43.182 | 43.182 | 16,000   | 690,912   |      |
| 하수오분말                | 56.818 | 56.818 | 30,000   | 1,704,540 | 영주농협 |
|                      |        |        |          |           |      |
|                      |        |        |          |           |      |
|                      |        |        |          |           |      |
|                      |        |        |          |           |      |
|                      |        |        |          |           |      |
|                      |        |        |          |           |      |
|                      | 100    | 100    |          |           |      |
| 소 계                  |        |        |          | 2,395,452 |      |
| 포장단위별 원재료비(원/200g)   |        |        |          | 23,954    |      |
| 포장비                  |        |        |          | 4,790.8   |      |
| 노무비                  |        |        |          |           |      |
| 제조경비                 |        |        |          |           |      |
| 소계                   |        |        |          |           |      |
| 일반관리비 및 이익           |        |        |          |           |      |
| 포장단위별 원부 재료비(원/200g) |        |        |          | 4,790.8   |      |

나. 장비환 Profile

| 장 비 환 Profile |  |            |
|---------------|--|------------|
| 분류            | 환(기타가공품)   |            |
| 제품 Concept    | 신장과 간을 보하는 제품이지만 숙변제거 효과와 아침에 일어나면 몸을 상쾌하게 해 주는 제품으로 몸에 좋은 한약재를 주원료로 하여 제조 |            |
| Target        | 장년층 이상   |            |
| 제품형태          | 환(환지름 5mm)   |            |
| 원재료           | 하수오분말, 꿀, 하수오추출물(10 Brix), 당귀, 구기자, 토사자등                                   |            |
| 가격/중량         | 4,079원/200g(원재료비) * 원료가격에 따라 유동적   |            |
| 내포장           | 재질   | 폴리스틸렌      |
|               | 규격   | 200g, 300g |
| BOX           | 재질   |            |
|               | 규격   |            |
| 유사제품          | 멀치다시마환, 누에환, 인진쑥환, 동충하초환   |            |
| 경쟁제품          |  |            |
| 권장유통기한        | 2년   |            |
| 먹는방법          | 1일, 2-3회 식·전후 관계없이 20환 정도 드십시오   |            |
| 주요공정          | 원료전처리→원료배합→Roll반죽기→장환기→절환기→정환→건조→Coating→건조→포장                             |            |
| 사전원가          | 4,079원/200g  |            |

1) 장비환 제품 제조공정

| 공정원료분쇄  | 공정설명   |
|---------|--|
| 원료분쇄    | 각 원료를 조분쇄 및 미분쇄하여 160-200 메쉬의 체를 통과하여 분쇄 원료를 준비한다.   |
| ↓       |  |
| 혼합      | 미리 준비된 미분쇄 원료와 가공용 꿀등을 혼합하여 30-40분간 혼합한다.  |
| ↓       |  |
| Roll 반죽 | 혼합원료를 롤러반죽기에서 충분히 반죽시킨 다음 장환작업에 편리하게 성형한다.   |
| ↓       |  |
| 장환      | 장환기에서 유출시키는데 이때 압력을 고루 받도록 한다. 장환기에서 5mm크기로 압출한다   |
| ↓       |  |
| 절환      | 장환기에서 압출되어 나온 원료를 절환기의 roll사이를 조절하면서 절환한다.   |
| ↓       |  |
| 정환      | 절환된 환을 정환기에서 수분을 약간 Spray시키면서 정환기를 10분간 회전시키면서 정형시킨다.                                      |
| ↓       |  |
| 건조      | 정환된 환원료를 건조기에서 60 ℃의 온도로 6시간 정도 건조시킨다.   |
| ↓       |  |
| 코팅      | 건조된 환을 당을 이용하여 코팅을 한다. 이때 환끼리 붙을수 있기 때문에 필요에 따라 대두유를 약간 스프레이 해준후 마지막으로 천연수지성 물질로 마무리 코팅한다. |
| ↓       |  |
| 송풍 건조   | 코팅된 환제품을 서늘한 곳에서 1-2시간 건조  |
| ↓       |  |
| 포장      |  |

2) 장비환 원료 배합비율

| 원료명                   | 투입량(%) | 배합비(%) | 단가(원/Kg) | 가격(원)     | 원료공급 |
|-----------------------|--------|--------|----------|-----------|------|
| 당귀                    | 7.299  | 7.299  | 20,000   | 145,980   |      |
| 하수오                   | 40.146 | 40.146 | 30,000   | 1,204,380 |      |
| 구기자                   | 7.299  | 7.299  | 30,000   | 218,970   |      |
| 토사자                   | 3.650  | 3.650  | 20,000   | 73,000    |      |
| 복령                    | 3.650  | 3.650  | 15,000   | 54,750    |      |
| 우슬                    | 3.650  | 3.650  | 10,000   | 36,500    |      |
| 하수오추출물                | 7.299  | 7.299  | 16,000   | 116,784   |      |
| 꿀                     | 27.007 | 27.007 | 7,000    | 189,049   |      |
|                       |        |        |          |           |      |
|                       | 100    | 100    |          | 2,039,413 |      |
| 소 계                   |        |        |          |           |      |
| kg당 원재료비 (원/kg)       |        |        |          |           |      |
| 포장단위별 원 재료비 (원/200g)  |        |        |          |           |      |
| 포장비                   |        |        |          |           |      |
| 노무비                   |        |        |          |           |      |
| 제조경비                  |        |        |          |           |      |
| 소계                    |        |        |          |           |      |
| 일반관리비 및 이익            |        |        |          |           |      |
| 포장단위별 원부 재료비 (원/200g) |        |        |          | 4,079     |      |

다. 유비환 Profile

| 유 비 환 Profile |   |            |
|---------------|---|------------|
| 분류            | 환(기타가공품)  |            |
| 제품 Concept    | 아미노산 성분으로 각광받는 동결건조 누에와 자양강장제로 알려진 하수오, 산약, 토사자, 오미자등의 한약재와 꿀을 첨가하여 씹어먹어도 되는 제품 |            |
| Target        | 장년층 이상  |            |
| 제품형태          | 환(환지름 5mm)  |            |
| 원재료           | 하수오분말, 건조누에, 꿀, 하수오추출물(10 Brix), 복분자, 오미자, 토사자, 숙지황등                            |            |
| 가격/중량         | 4,806원/200g(원재료비) * 원료가격에 따라 유동적  |            |
| 내포장           | 재질  | 폴리스틸렌      |
|               | 규격  | 200g, 300g |
| BOX           | 재질  |            |
|               | 규격  |            |
| 유사제품          | 멀치다시마환, 누에환, 인진쑥환, 동충하초환  |            |
| 경쟁제품          |   |            |
| 권장유통기한        | 2년  |            |
| 먹는방법          | 1일, 2-3회 식·전후 관계없이 20환 정도 드십시오  |            |
| 주요공정          | 원료전처리→원료배합→Roll반죽기→장환기→절환기→정환<br>→건조→Coating→건조→포장                              |            |
| 사전원가          | 4,806원/200g   |            |

1) 유비환 제품 제조공정

| 공정원     | 공정설명   |
|---------|--|
| 원료분쇄    | 각 원료를 조분쇄 및 미분쇄하여 160-200 메쉬의 체를 통과하여 분쇄 원료를 준비한다.   |
| ↓       |  |
| 혼합      | 미리 준비된 미분쇄 원료와 가공용 꿀등을 혼합하여 30-40분간 혼합한다.  |
| ↓       |  |
| Roll 반죽 | 혼합원료를 롤러반죽기에서 충분히 반죽시킨 다음 장환작업에 편리하게 성형한다.   |
| ↓       |  |
| 장환      | 장환기에서 유출시키는데 이때 압력을 고루 받도록 한다. 장환기에서 5mm크기로 압출한다   |
| ↓       |  |
| 절환      | 장환기에서 압출되어 나온 원료를 절환기의 roll사이를 조절하면서 절환한다.   |
| ↓       |  |
| 정환      | 절환된 환을 정환기에서 수분을 약간 Spray시키면서 정환기를 10분간 회전시키면서 정형시킨다.                                      |
| ↓       |  |
| 건조      | 정환된 환원료를 건조기에서 60 ℃의 온도로 6시간 정도 건조시킨다.   |
| ↓       |  |
| 코팅      | 건조된 환을 당을 이용하여 코팅을 한다. 이때 환끼리 붙을수 있기 때문에 필요에 따라 대두유를 약간 스프레이 해준후 마지막으로 천연수지성 물질로 마무리 코팅한다. |
| ↓       |  |
| 송풍 건조   | 코팅된 환제품을 서늘한 곳에서 1-2시간 건조  |
| ↓       |  |
| 포장      |  |

2) 유비환 원료배합비율

| 원료명                   | 투입량(%) | 배합비(%) | 단가(원/Kg) | 가격(원)     | 원료공급 |
|-----------------------|--------|--------|----------|-----------|------|
| 누에분말                  | 6.667  | 6.667  | 110,000  | 733,370   |      |
| 하수오                   | 28.0   | 28.0   | 30,000   | 840,000   |      |
| 오미자                   | 6.667  | 6.667  | 30,000   | 200,010   |      |
| 토사자                   | 3.333  | 3.333  | 20,000   | 66,660    |      |
| 복분자                   | 3.333  | 3.333  | 15,000   | 49,995    |      |
| 숙지황                   | 5.333  | 5.333  | 15,000   | 79,995    |      |
| 산약                    | 6.667  | 6.667  | 14,000   | 93,338    |      |
| 하수오추출물                | 6.667  | 6.667  | 16,000   | 106,672   |      |
| 꿀                     | 33.33  | 33.33  | 7,000    | 233,310   |      |
|                       | 100    | 100    |          |           |      |
| 소 계                   |        |        |          | 2,403,350 |      |
| kg당 원재료비 (원/kg)       |        |        |          | 24,034    |      |
| 포장단위별 원 재료비 (원/200g)  |        |        |          | 4,806.8   |      |
| 포장비                   |        |        |          |           |      |
| 노무비                   |        |        |          |           |      |
| 제조경비                  |        |        |          |           |      |
| 소계                    |        |        |          |           |      |
| 일반관리비 및 이익            |        |        |          |           |      |
| 포장단위별 원부 재료비 (원/200g) |        |        |          | 4,806.8   |      |

라. 하수오 과립차 Profile

| 하수오 과립차 Profile |   |                      |
|-----------------|---|----------------------|
| 분류              | 과립차 (고형추출차)                               |                      |
| 제품 Concept      | 하수오추출물과 한약재추출물 및 홍삼향을 접목시켜서 만든 대중적인 한방과립차 |                      |
| Target          | 장년층 이상                                    |                      |
| 제품형태            | 과립형태                                      |                      |
| 원재료             | 하수오추출물(20 Brix), 포도당, 황정추출물, 홍삼향등         |                      |
| 가격/중량           | 26원/8g(원재료비) * 원료가격에 따라 유동적               |                      |
| 내포장             | 재질  | PET/AL/PE            |
|                 | 규격  | 23 x 90              |
| BOX             | 재질  |                      |
|                 | 규격  | 160x1400x80mm (20EA) |
| 유사제품            | 쌍화차, 칩차, 유자차, 울무차, 오미자차, 대추차 등            |                      |
| 경쟁제품            | 쌍화차                                       |                      |
| 권장유통기한          | 2년  |                      |
| 먹는방법            | 과립차 1포에 더운물 80ml를 넣고 잘 저어서 드세요            |                      |
| 주요공정            | 원료전처리→원료배합→과립기→건조→입도조절→포장                 |                      |
| 사전원가            | 26원/8g(원재료비) * 원료 및 제조경비에 따라 유동적임         |                      |



1) 하수오과립차 제조공정

| 공정원료 혼합 | 공정 설명                                  |
|---------|--|
| 공정원료 혼합 | 하수오 농축액기스와 포도당, 부원료등을 혼합기에서 혼합한다.      |
| ↓       |  |
| 과립      | 과립기를 이용하여 과립화 시킨다.                     |
| ↓       |  |
| 건조      | 95℃에서 약 1시간 건조한다.<br>- 수분활성도(AW): 0.15 |
| ↓       |  |
| 선별      | 입도조절체를 이용하여 선별한다.                      |
| ↓       |  |
| 포장 1    | 삼면포장기를 이용하여 개당 8~9 g씩 포장한다.            |
| ↓       |  |
| 포장 2    | 날개 포장된 것을 박스에 20개씩 넣는다.                |

2) 과립차 원료 배합비율

| 원료명                 | 투입량(%) | 배합비(%) | 단가(원/Kg) | 가격(원)     | 원료공급 |
|---------------------|--------|--------|----------|-----------|------|
| 하수오추출액              | 6.126  | 6.126  | 30,000   | 183,780   |      |
| 함수포도당               | 91.896 | 91.896 | 1,000    | 91,896    |      |
| 정제염                 | 0.306  | 0.306  | 350      | 107.1     |      |
| 한방향 1               | 0.010  | 0.010  | 24,000   | 240       |      |
| 한방향 2               | 0.061  | 0.061  | 30,000   | 1,830     |      |
| 황정추출물               | 1.532  | 1.532  | 30,000   | 45,960    |      |
| 구연산                 | 0.068  | 0.068  | 2,300    | 156.4     |      |
|                     |        |        |          |           |      |
|                     |        |        |          |           |      |
|                     | 100    | 100    |          | 323,969.5 |      |
| 소 계                 |        |        |          | 323,969.5 |      |
| kg당 원재료비 (원/kg)     |        |        |          | 3,239     |      |
| 포장단위별 원 재료비 (원/8g)  |        |        |          | 26        |      |
| 포장비                 |        |        |          |           |      |
| 노무비                 |        |        |          |           |      |
| 제조경비                |        |        |          |           |      |
| 소계                  |        |        |          |           |      |
| 일반관리비 및 이익          |        |        |          |           |      |
| 포장단위별 원부 재료비 (원/8g) |        |        |          | 26        |      |

마. 하수오 현미침출차 Profile

| 하수오 현미침출차 Profile |  |                      |
|-------------------|--|----------------------|
| 분류                | 다류식품 (혼합침출차)   |                      |
| 제품 Concept        | 하수오와 볶음현미를 혼합하여 구수한 맛을 더한<br>기호성 침출차                     |                      |
| Target            | 장년층 이상   |                      |
| 제품형태              | 거칠은 분말형태   |                      |
| 원재료               | 하수오  |                      |
| 가격/중량             | 33원/1.5g(원재료비) * 원료가격에 따라 유동적                            |                      |
| 내포장               | 재질   | 티백포장                 |
|                   | 규격   | 50 x 60 mm           |
| BOX               | 재질   |                      |
|                   | 규격   | 160x1400x80mm (25EA) |
| 유사제품              | 녹차, 둥글레차, 동규자차등  |                      |
| 경쟁제품              | 둥글레차   |                      |
| 권장유통기한            | 2년   |                      |
| 먹는방법              | 온수(70~80℃) 100ml가 있는 컵에 1포를 넣고 2-3분<br>경과후 티백을 수회 흔들어 음용 |                      |
| 주요공정              | 원료전처리→증숙→건조→볶음→분쇄→입도조절 및<br>볶은현미 혼합→포장                   |                      |
| 사전원가              | 33원/1.5g(원재료비) * 원료 및 제조경비에 따라<br>유동적임                   |                      |

1) 하수오 현미침출차 제조공정

| 공정     | 공정 설명   |
|--------|---|
| 하수오 수확 | 하수오를 수확한 후 깨끗이 세척한다.                                  |
| ↓      |   |
| 절단     | 자동절단기를 이용하여 약 5-7cm가 되게 절단한다.                         |
| ↓      |   |
| 증숙     | 98℃에서 약 5분간 스팀처리 한다.                                  |
| ↓      |   |
| 건조     | 60℃의 열풍건조기에서 수분함량이 20-30%되게 한다.                       |
| ↓      |   |
| 1차 볶음  | 건조된 하수오를 볶음기에서 120℃, 10-15분간 볶는다. 수분함량 15±3%가 되게 볶는다. |
| ↓      |   |
| 2차 볶음  | 볶음기 온도 160-180℃에서 약 20분간 볶는다. 수분함량 5%이하가 되도록 한다.      |
| ↓      |   |
| 조분쇄    | 핀밀을 이용하여 거칠게 분쇄한다.                                    |
| ↓      |   |
| 체별     | 체별기를 이용하여 20-80메쉬 크기의 제품을 포장기로 이송한다.                  |
| ↓      |   |
| 혼합     | 볶은현미와 하수오를 일정비율(3:7)로 혼합한다.                           |
| ↓      |   |
| 포장     | 티백포장기를 이용하여 포장 제품화 한다.                                |

2) 하수오 현미 침출차

| 원료명                   | 투입량(%) | 배합비(%) | 단가(원/Kg) | 가격(원)     | 원료공급 |
|-----------------------|--------|--------|----------|-----------|------|
| 하수오                   | 70     | 70     | 30,000   | 2,100,000 | 영주농협 |
| 볶음현미                  | 30     | 30     | 3,000    | 90,000    |      |
|                       |        |        |          |           |      |
|                       |        |        |          |           |      |
|                       |        |        |          |           |      |
|                       |        |        |          |           |      |
|                       |        |        |          |           |      |
|                       |        |        |          |           |      |
|                       | 100    | 100    |          |           |      |
| 소 계                   |        |        |          | 2,190,000 |      |
| kg당 원재료비 (원/kg)       |        |        |          | 21,900    |      |
| 포장단위별 원 재료비 (원/1.5g)  |        |        |          | 33        |      |
| 포장비                   |        |        |          |           |      |
| 노무비                   |        |        |          |           |      |
| 제조경비                  |        |        |          |           |      |
| 소계                    |        |        |          |           |      |
| 일반관리비 및 이익            |        |        |          |           |      |
| 포장단위별 원부 재료비 (원/1.5g) |        |        |          | 33        |      |

바. 하수오 액상차 Profile

| 하수오 액상차 Profile |   |     |
|-----------------|---|-----|
| 분류              | 다류식품 (액상추출차)  |     |
| 제품 Concept      | 하수오추출물과 한방원료 및 꿀을 처방하여 만든 기호성 다류로 쌍화차를 선호하는 중장년층을 위한 액상차로 병포장을 하여 가정이나 사무실에서 쉽게 음용할수 있게 만든 제품 |     |
| Target          | 건강과 한방차를 선호하는 어른대상  |     |
| 제품형태            | 액상차   |     |
| 원재료             | 하수오추출물, 한방추출물, 쌍화추출물, 꿀등  |     |
| 가격/중량           | 7,329원/500g(원재료비) * 원료가격에 따라 유동적  |     |
| 내포장             | 재질  | 병포장 |
|                 | 규격  |     |
| BOX             | 재질  |     |
|                 | 규격  |     |
| 유사제품            | 구기자액상차  |     |
| 경쟁제품            |   |     |
| 권장유통기한          | 1년  |     |
| 먹는방법            | 끓는물 100ml에 액상차 2스푼을 넣고 잘 저어서 음용   |     |
| 주요공정            | 원료전처리→원료배합→살균→충진→포장   |     |
| 사전원가            | 7,329원/500g (원재료비)<br>* 원료 및 제조경비에 따라 유동적임  |     |

1) 하수오 액상차 제품 제조공정

| 공정      | 공정 설명   |
|---------|---|
| 원료 전처리  | 건조된 하수오 원료의 세척 및 이물질을 제거한다.                               |
| ↓       |   |
| 추출      | 하수오와 물을 1:9의 비율로 넣고 추출한다.                                 |
| ↓       |   |
| 여과      | 추출된 하수오 원료를 100메쉬체로 여과한다.                                 |
| ↓       |   |
| 농축      | 여과한 추출물을 진공박막원심농축기를 이용하여 농축한다. Brix가 20이 되도록 농축한다.        |
| ↓       |   |
| 원료 혼합   | 원료처방에 들어가는 생약추출물들을 정확히 계량하여 이중자켓 살균관에서 95℃, 20분간 혼합 살균한다. |
| ↓       |   |
| 계량 및 포장 | 액상 포장기를 이용하여 포장한다.  |

2) 하수오 액상차 원료배합 비율

| 원료명                   | 투입량(%) | 배합비(%) | 단가(원/Kg) | 가격(원)       | 원료공급 |
|-----------------------|--------|--------|----------|-------------|------|
| 하수오<br>추출액            | 76.336 | 76.336 | 16,000   | 1,221,376   |      |
| 정백당                   | 7.634  | 7.634  | 800      | 6,107.2     |      |
| 꿀                     | 11.450 | 11.450 | 7,000    | 80,150      |      |
| 한방추출물                 | 3.817  | 3.817  | 40,000   | 152,680     |      |
| 한방향22                 | 0.229  | 0.229  | 20,000   | 4,580       |      |
| 구연산                   | 0.153  | 0.153  | 2,300    | 351.9       |      |
| 카라기난                  | 0.382  | 0.382  | 1,500    | 573         |      |
|                       |        |        |          |             |      |
|                       |        |        |          |             |      |
|                       | 100    | 100    |          | 1,465,818.1 |      |
| 소 계                   |        |        |          | 1,465,818.1 |      |
| kg당 원재료비 (원/kg)       |        |        |          | 14,658      |      |
| 포장단위별 원 재료비 (원/500g)  |        |        |          | 7,329       |      |
| 포장비                   |        |        |          |             |      |
| 노무비                   |        |        |          |             |      |
| 제조경비                  |        |        |          |             |      |
| 소계                    |        |        |          |             |      |
| 일반관리비 및 이익            |        |        |          |             |      |
| 포장단위별 원부 재료비 (원/500g) |        |        |          | 7,329       |      |



사. 하수오 스프 Profile

| 하수오 스프 Profile |   |              |
|----------------|---|--------------|
| 분류             | 즉석건조식품                                  |              |
| 제품 Concept     | 수험생 및 노약자를 위한 인스턴트식 기능성 하수오 스프          |              |
| Target         | 수험생 및 노약자, 환자식                          |              |
| 제품형태           | 분말                                      |              |
| 원재료            | 하수오분말, 소맥분, 옥수수가루, 전분, 건조채소 등           |              |
| 가격/중량          | 418원/80g(원재료비) * 원료가격에 따라 유동적           |              |
| 내포장            | 재질                                      | PE/AL/PE/OPP |
|                | 규격                                      | 130x160 mm   |
| BOX            | 재질                                      |              |
|                | 규격                                      |              |
| 유사제품           | 야채스프, 소고기스프, 버섯스프 등                     |              |
| 경쟁제품           | 야채스프                                    |              |
| 권장유통기한         | 18개월                                    |              |
| 먹는방법           | 물 800ml와 스프 1포(80g)을 넣고 저으면서 끓인다.       |              |
| 주요공정           | 원료전처리→원료배합→볶음→건조→충진 및 포장                |              |
| 사전원가           | 418원/80g (원재료비)<br>* 원료 및 제조경비에 따라 유동적임 |              |

1) 하수오 스프제품 제조공정

| 공정원    | 공 정 설 명   |
|--------|---|
| 원료분쇄   | 각 원료를 조분쇄 및 미분쇄하여 160-200메쉬의 체를 통과하여 분쇄 원료를 준비한다.                                       |
| ↓      |   |
| 볶음     | 소맥분, 하수오, 쇼트닝을 넣고 185℃로 소맥분이 호화되도록 볶는다. 이때, 소맥분과 기름의 덩어리짐 현상이 없도록 분쇄한다.                 |
| ↓      |   |
| 건조원료처리 | 배합에 들어가는 파, 양파, 당근등의 원료를 열풍건조를 통하여 수분이 5% 이하가 되도록 건조시키고 장기보과니 용이하도록 별도의 살균처리를 한다.       |
| ↓      |   |
| 혼합     | 볶음 Needer를 이용하여 전처리된 원료들을 정확히 계량하여 넣고 40분간 혼합한다. 정제염과 정백당의 비중차로 인하여 혼합이 안되면 미분쇄하여 사용한다. |
| ↓      |   |
| 계량     | 자동 분말포장기를 이용하여 80g 씩 포장한다. 이때 건더기 내용물이 고루 혼입되도록 혼합해 준다.                                 |
| ↓      |   |
| 포장     | 포장된 원료는 10개 단위로 박스포장 한다.  |

2) 하수오 스프 원료배합 비율

| 원료명                  | 투입량(%) | 배합비(%) | 단가(원/Kg) | 가격(원)   | 원료공급 |
|----------------------|--------|--------|----------|---------|------|
| 하수오                  | 12.0   | 12.0   | 30,000   | 360,000 |      |
| 글루코스                 | 4.0    | 4.0    | 1,000    | 4,000   |      |
| 정제염                  | 4.1    | 4.1    | 350      | 1,435   |      |
| 건조당근                 | 1.0    | 1.0    | 6,000    | 6,000   |      |
| 건조대과                 | 0.8    | 0.8    | 8,500    | 6,800   |      |
| 건조양과                 | 2.0    | 2.0    | 6,000    | 12,000  |      |
| 백후추분                 | 0.3    | 0.3    | 50,000   | 15,000  |      |
| 소고기분                 | 1.0    | 1.0    | 7,000    | 7,000   |      |
| 쇼트닝                  | 6.5    | 6.5    | 4,500    | 29,250  |      |
| 옥수수분                 | 7.2    | 7.2    | 2,500    | 18,000  |      |
| 옥수수전분                | 5.0    | 5.0    | 550      | 2,750   |      |
| 소맥분                  | 44.0   | 44.0   | 550      | 24,200  |      |
| 분말유크림                | 6.5    | 6.5    | 4,500    | 29,250  |      |
| 정백당                  | 3.0    | 3.0    | 800      | 2,400   |      |
| 파슬리                  | 0.002  | 0.002  | 14,000   | 28      |      |
| MSG                  | 2.5    | 2.5    | 2,000    | 5,000   |      |
|                      | 100    | 100    |          |         |      |
| 소 계                  |        |        |          | 523,113 |      |
| kg당 원재료비 (원/kg)      |        |        |          | 5,231   |      |
| 포장단위별 원 재료비 (원/80g)  |        |        |          | 418     |      |
| 포장비                  |        |        |          |         |      |
| 노무비                  |        |        |          |         |      |
| 제조경비                 |        |        |          |         |      |
| 소계                   |        |        |          |         |      |
| 일반관리비 및 이익           |        |        |          |         |      |
| 포장단위별 원부 재료비 (원/80g) |        |        |          | 418     |      |

## 7 절 하수오 가공제품 제조공정 설계도

### 1. 가공제품 필요 설비

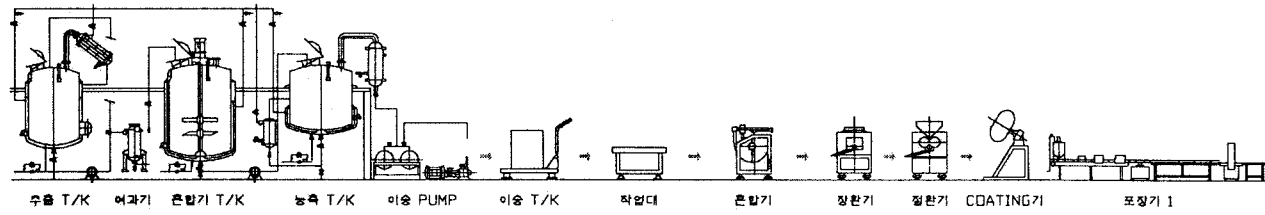
표 42. 하수오 가공제품 생산을 위한 설비

| 품명       | 규격       | 수량 | 용도             |
|----------|----------|----|----------------|
| 분쇄기      | 10마력     | 1  | 환제조 및<br>침출차용  |
| 반죽로라     | 3마력      | 1  | 환제조용           |
| 장환기      | 2마력      | 1  | 환제조용           |
| 절환기      | 0.5마력    | 1  | 환제조용           |
| 굴림통(당의펜) | 1마력      | 1  | 환제조용           |
| 건조기      | 6 KW     | 1  | 환제조 및<br>과립제조용 |
| 삼면포장기    | Eye-Mark | 1  | 과립포장용          |
| 과립기      | 12인치     | 1  | 과립차용           |
| 추출기      | 1톤       | 1  | 추출용            |
| 농축기      | 0.5톤     | 1  | 농축엑기스 제조       |

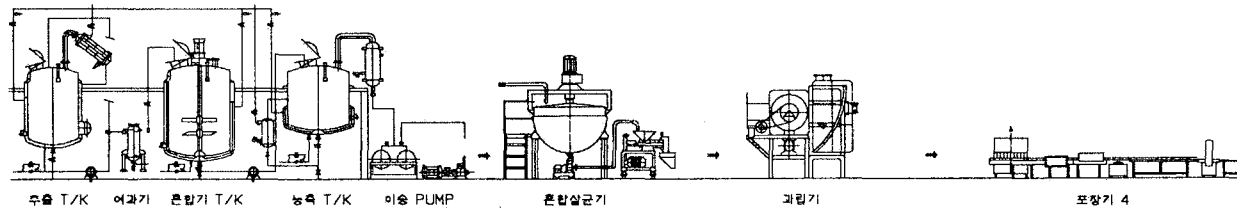
## 2. 각 제품별 제조공정 설계도

환, 과립차, 침출차, 액상차, 스프의 제조공정 설계도는 아래와 같으며 생산 가공공장 규모별 설비의 규격이 달라질수 있다.

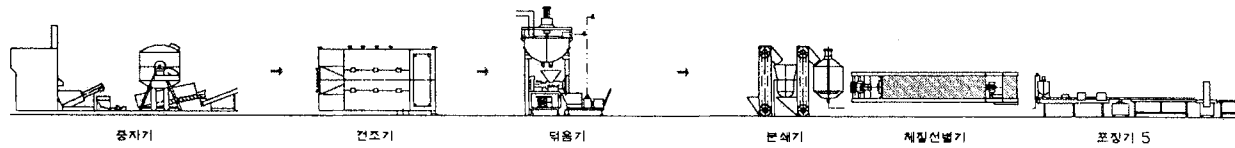
# 하수오환 제조공정



# 하수오과립차 제조공정



# 하수오염출차 제조공정





## 8 절 하수오 유산균 발효제품 연구내용

### 1. 유산균의 선정과 동정

#### 가. 발효용 하수오 배지의 개발 목적 및 방법

유산균은 일반적으로 다양한 성장인자를 필요로 하기 때문에 고가의 배지를 사용해야 되며, 배양 기간도 길어서 scale-up시 대형 발효조를 운영하기 위하여는 효율적인 배양법의 검정이 요구된다. 또한 기존에 하수오를 유산균을 이용하여 발효한 예가 없으므로 우선은 하수오를 기본 영양원으로 한 기본배지의 개발이 요구된다. 따라서 하수오를 그대로 발효해보는 경우와 이를 다양한 효소로 전처리하여 미생물이 이용하기 쉬운 형태로 전환하여 배지로 사용하는 등의 연구가 필요로 하였다.

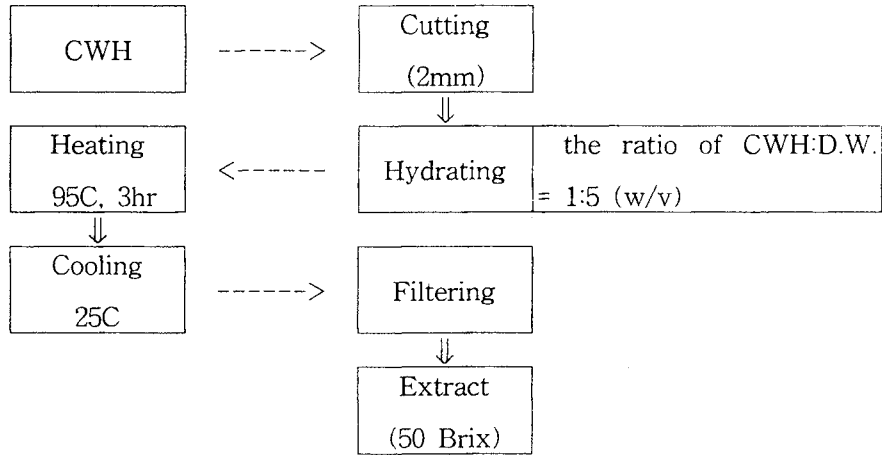
#### 나. 유산균 기본 배지

유산균 기본배지로는 MRS 와 BL medium이 사용되었다.

#### 다. 하수오 배지 조성

하수오는 영주농협에서 제공받았으며, 가루와 추출물 두 가지 형태로 이용되었다. 하수오 가루는 100~150mesh 정도로 분쇄후, 액체 배지로 만들었으며, 효소를 처리한 것과 효소를 처리하지 않은 두 가지 방법을 이용하였다. 가루상태의 하수오를 배지처리하는 방법은 다음과 같다 하수오 분말 50g과 1Liter 의 D.W. 를 혼합한 후, 10분동안 80℃ 에서 열탕처리 후 105℃에서 15분간 살균처리 한다. 하수오 추출물 제법은 Figure 24에 명시되어 있다. 추출물은 수분을 함유하고 있으므로, 분말상태보다 하수오 고체 함유량이 적으므로 하수오 배지 조성은 분말상태에서 5%, 추출물 상에서는 7% 를 기준으로 하였다.

Figure 24. Method of making fermented *Cynanchum wilfordii* Hemsley.



## 2. 내산성 내담즙성이 우수한 균주의 선발

정장용 유산균이 되기 위한 기본적인 조건으로 내산성과 내담즙성을 보유하여야 한다. 이러한 균주를 선발하기 위해서는 본 연구진이 보유하고 있는 균주를 대상으로 인공위액 (pH 2.0)과 인공담즙액 (Oxgal 0.5% (w/v))에 대하여 시간별로 생존성을 시험하여 생존성이 우수한 균주를 선발한다.

Bifidobacterium strains 는 건강한 한국인의 분변에서 최근에 분리된 균주를 이용하였다. Bifidobacteria는 혐기적 조건에서 배양되었으며, MRS와 BL medium 이 이용되었다. 세계의 Lactobacillus strains와 Streptococcus strain 이 MRS medium 을 기본 2배지로 하여 이용되었다.

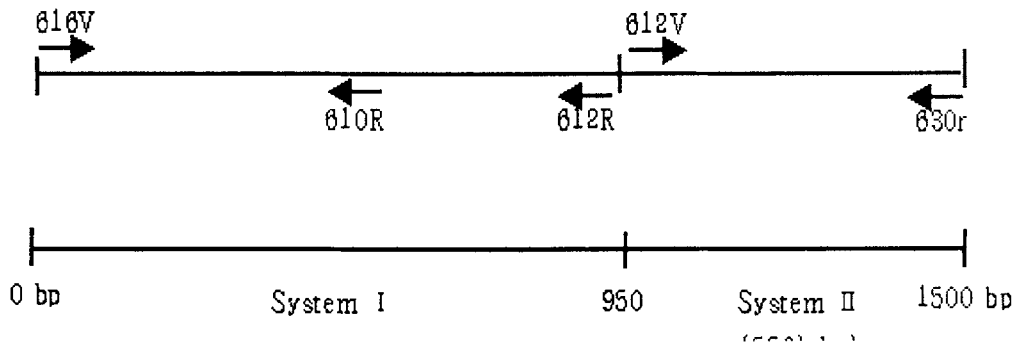
## 3. Bifidus와 유산균 Screening 및 16 S rRNA sequencing을 이용한 동정

Bifidus와 유산균의 분리 Origin은 한국사람의 분변으로 고정한다. 어린아이(4~6세)의 분변에서 발견되는 유산균이 가장 활성이 좋으므로 이를 기준으로 한 유산균을 확보한다. 사용되는 혐기성 배양은 Anaerobic Jar(BBL), Anaerobic Controlled Glove Box(Lab Line Instrument, Inc, U.S.A), Steel-Wool Method을 사용한다. Bifidobacterium과 유산균을 선택적으로 분리하여 배양 적합성 및 정장 기능성을 조사한다. 확보된 유산균은 실험실에서 냉동 건조시킨 후 냉동고에

서 vial상태로 보관한다. 선정된 균주는 종래의 당발효능에 의한 동정법보다 그 정확도가 훨씬 증가된 16S rRNA sequencing에 의하여 동정을 하였다.

#### 가. Primer 제작

16s rDNA sequence를 이용하여 균주를 동정하기 위해서 PCR primer를 제작한다. *Bifidobacterium*에 관한 일반적인 16s rDNA sequence는 GeneBank로부터 구하였다. 우선 두 가지의 system으로 나누어 sequencing을 시도하기로 하였는데 일반적으로 알려진 16s rDNA의 conserved region은 20, 950, 1500bp내외에서 존재한다고 알려졌다. 따라서 GeneBank에서 얻은 sequence를 서로 비교하여 공통되는 유전자의 sequence를 바탕으로 5가지 primer를 제작한다.



PCR primers : 610V, 612R, 612V, 630r II

Sequencing primers : 610R, 612R, 630r II

#### 나. PCR을 이용한 16S rDNA sequencing template 제작

먼저 PCR을 위한 template는 Genereleaser kit를 이용하여 얻는다. System I은 약 950 bp의 fragment를 가지는 부분으로써 616V와 612R의 PCR primer로

PCR을 수행하여 제작한다. System II는 약 550 bp 정도의 fragment로써 612V와 630r II의 PCR primer를 이용하여 제작한다. PCR을 수행한 후에 sequencing template로 이용할 수 있도록 전기영동을 수행하여 정확한 size의 DNA band를 gel extraction kit (QIAGEN, U.S.A.)를 사용하여 회수한다. gel extraction kit로 DNA를 회수 할 경우 PCR에 사용되었던 primer와 dNTP 등을 제거할 수 있어 sequencing 반응에 저해 요인을 제거 할 수 있다.

다. PCR program 작성

1) Program No. 1

가) Template DNA (System I, II) synthesis

나) Annealing Temperature : 46 °C

다) program cycle :

- (1) Denaturation step : 95 °C, 5 min
- (2) Denaturation step : 95 °C, 30 sec
- (3) Annealing step : 46 °C, 30 sec
- (4) Extension step : 72 °C, 1 min
- (5) Extension step : 72 °C, 10 min

\* (2), (3), (4)번 step은 30 cycle

2) Program No. 2

가) Sequencing PCR (System I, II)

나) Annealing Temperature : 45 °C

다) program cycle :

- (1) Denaturation step : 96 °C, 10 min
- (2) Annealing step : 45 °C, 5 sec
- (3) extension step : 60 °C, 4 min

\* (1), (2), (3)번 step이 25 cycle

#### 라. 16s rDNA sequence의 분석

분석 대상 균주인 GE54와 GE71(XQ29)에 대해서 얻어진 950 bp와 550 bp의 sequence는 World wide web(WWW)의 GeneBank에서 BlastN을 이용하여 다른 균주들의 16s rDNA sequence와 비교 분석한다. 이렇게 분석된 16s rDNA sequence는 GeneBank의 유전자 염기서열과 비교하여 상동성이 가장 높은 균을 동일한 균주로 판명하여 동정한다.

#### 4. 유산균에 의한 하수오 발효능과 관능성 연구

유산균 발효에 의하여 하수오 발효제품을 개발할 경우 발효능의 우수성뿐 아니라 발효 산물의 관능성도 제품화의 중요한 관건이 된다. 따라서 발효산물에 대한 균수의 측정, 산도의 측정, 관능성의 측정등이 이루어져야 한다.

#### 가. 발효종균 접종

*Bifidobacterium* spp. RD 63, RD133, RD155, *Lactobacillus casei*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* th-3 의 7 종을 선발하여 7 % 하수오 배지를 121 °C, 15 분 멸균시킨후 1 % 접종하여, 37 °C에서 24시간 배양시켰다. 배양 시기별 분석을 위하여 시간별로 배양시킨후 분석하였다.

#### 나. 하수오 배지에서 발효된 미생물의 활성 분석

##### 1) Cell viability assay

*Bifidobacterium* strains 는 MRS broth에서 1% 접종후 37°C, 20시간 혐기적인 상태에서 배양된 후 세포수를 관찰 하였다. 배양액을 PBS solution에 희석하여 배양후 그 세포 수를 측정하였다. 측정 시간은 배양직후, 6, 12, 24, 48시간마다 지속적으로 측정하였다. *Lactobacillus* 와 *Streptococcus* strains 는 호기상태에서 bifidus 와 같은 조건으로 접종, 배양 후 측정되었다.

##### 2) 발효시 생성된 lactic acid 와 acetic acid 분석

Acetic acid와 lactic acid는 HPLC 기기를 사용하여 분석하였으며, 샘플처리법

은 다음과 같다. 샘플을 각각 10배 희석 후 30분간 15000rpm에서 원심분리후 상등액만을 취하여 filtering 한 후 분석한다. 유기산 분석용 HPLC 조건은 다음과 같다(Table 43).

Table 43. Condition of HPLC for organic acids

|                    |   |
|--------------------|---|
| Instrument         | Young-Lin M 930 Solvent Delivery Pump<br>(Young-Lin Co., Korea) |
| Column             | Aminex HPX-87H column(7.8*300mm)                                |
| Mobile phase       | 0.025N H2SO4  |
| Flow rate          | 0.60ml/min  |
| Back Pressure/Temp | 61kg/cm <sup>2</sup> (866psi)/35℃                               |
| Detection          | UV@210nm  |
| Injection volume   | 20  |

#### 다. 관능평가

발효된 하수오 샘플을 각각의 그룹에 적용시켜 그 정도를 측정하였다. 10명의 훈련된 panel을 선택하여 반복적으로 발효된 하수오를 관능평가하여 측정하였다. Figure 2는 관능평가지 각 panel 에게 사용된 조사표이다. 관능평가에 사용된 척도는 색상, 단맛, 쓴맛, 신맛, 향미이다.

##### 1) 1차 관능평가

하수오 배지 7 %에 7 가지 균주를 발효시킨 그룹과 하수오 7 % + Fructooligosaccharide 1 % 첨가 배지에 7 가지 균주를 24 시간 37 ℃에서 발효시킨 그룹간의 관능평가 실시 후 최적 기호 균주를 선정하였다.

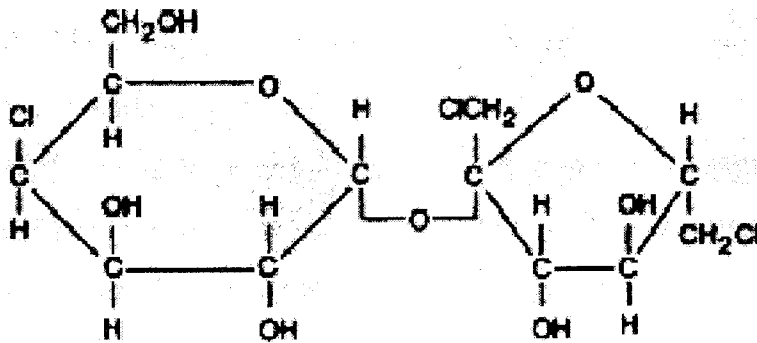
##### 2) 2차 관능평가

하수오 7% 배지에 *Bifidobacterium* spp.-RD63 균주를 24 시간 37 ℃에서 발효시킨후, sucralose, aspartame, acesulfame-K를 각각 0.01 %, 0.015 % 0.02 % 씩 filtering 후 첨가하여 관능평가를 실시 후 감미료 농도를 선정하였다.

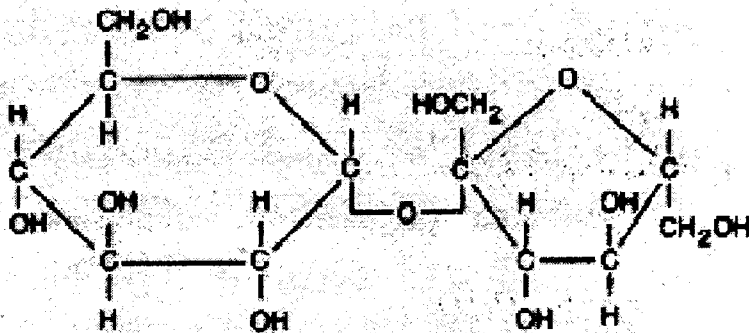
### 3) 관능성 증진목적으로 이용된 감미료

Fructo-oligosaccharide(FOS)와 sucralose는 삼양사에서 제공받았다. FOS는 다른 인공감미료와 비교시 매우 낮은 당도를 가지고 있으나, 젖산균 생육에 도움을 준다고 여러 실험에서 보고된 바 있다.

Sucralose는 sucrose에서 합성된 물질로 그 구조식이 매우 유사하다(Figure 25). 친수성으로 설탕에 비해 600배나 강한 당도를 가지고 있으며 상온에서 여러 해 동안 당도를 유지할 수 있을 만큼 안정성을 가지고 있다.



**Sucralose**



**Sucrose**

Figure 25. The structure of Sucrose and Sucralose; sucralose was made from sucrose that selectively substitutes three atoms of chlorine for three hydroxyl groups in the sucrose molecule.

라. 통계처리

통계처리는 One way ANOVA를 이용하여 계산하였으며, 이들 자료는 Duncan's multiple range test를 이용하여 비교하였다(SPSS, v.11.0).



Figure 26. Sheet of Sensory evaluation.

## Sensory Evaluation

2003. Sex Age

Please, check according to the points, after test the samples as follows:

|   |   |                   |
|---|---|-------------------|
| 7 | - | Like extremely    |
| 6 | - | Like very         |
| 5 | - | Like              |
| 4 | - | Be so-so          |
| 3 | - | Dislike           |
| 2 | - | Dislike very      |
| 1 | - | Dislike extremely |

| Samples | Color | Sweetness | Acidity | Bitterness | Odor | Taste |
|---------|-------|-----------|---------|------------|------|-------|
| 135     |       |           |         |            |      |       |
| 246     |       |           |         |            |      |       |
| 357     |       |           |         |            |      |       |
| 468     |       |           |         |            |      |       |
| 579     |       |           |         |            |      |       |
| 681     |       |           |         |            |      |       |

### 5. 하수오의 정상성 및 발효 적합성

하수오를 대상으로 정상 생리 평가를 실시하고 균주에 의한 발효 적합성을 검사한다. 제품화를 위한 초기 단계로서 하수오에서의 생육 특성을 규명하고 배양 조건을 확립한다. 동시에 미생물학적, 이화학적, 유변학적 특성 및 관능평가를 실시한다.

## 9 절 하수오 유산균 발효제품 연구 결과

### 1. 내산성, 내담즙성이 강한 균주 선발

생리활성 유산균은 기본적으로 인체내에서 활성을 나타내기 위해서는 위산과 담즙에 대한 내성을 보유하여야 한다. 하수오 발효에 적합한 균주를 선발하기에 앞서서 인공위액과 인공 담즙액을 이용하여 본 연구진이 보유하고 있는 균주 library를 대상으로 내산성과 내담즙성을 시험하여 균주를 선발하였다. 그 결과 *Streptococcus thermophilus* 5균주, *Lactobacillus casei* 1균주, *Lb. acidophilus* 2균주, *Lb. bulgaricus* 1균주, *Bifidobacterium* 8균주를 일차 시험균주로 선정하여 이하 실험을 수행하였다.

### 2. 기본배지의 개발, 배양 특성연구

#### 가. 하수오 기본배지의 제조 과정

##### 1) 최적 농도

하수오 배지 조성도는 여러 다양한 농도중 비교적 낮은 3, 5, 7%를 기준으로 bifidus 균인 CH-2를 혐기적인 조건에서 37℃, 24시간 시험 배양하였다. CH-2는 하수오 배지에서 높은 성장율을 나타냈으며, 특히 5%의 하수오 분말이 함유된 배지에서 가장 높은 생균수가 측정되었다(Figure 26).

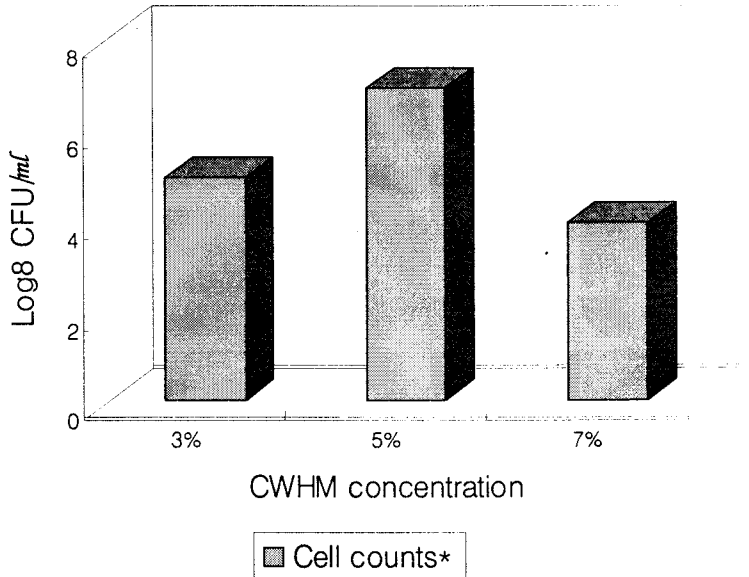


Fig 26. Viable cell counts of *Bifidobacterium* spp. CH-2 in *Cynanchum wilfordii* Hemsley medium

Cells were counted after incubation in CWHM at 37 °C for 24 hr.

CWHM was composed of CWH powder and deionized water.

## 2) 하수오 배지의 최적 조성

5% 하수오 분말 배지를 살균시 하수오내의 전분성질에 의해 응고현상이 발생되었다. 이를 방지하기 위하여 amylase, glucoamylase가 첨가되었다. 살균후 응고현상은 저하되었으나, 분말이 모두 용해되지 않기 때문에 항상 하수오 침전물이 발생하였다. 이러한 응고나 침전현상을 없애기 위해 하수오 분말 대신 미리 하수오를 열수추출한 추출물을 배지로 이용한 결과, 응고와 침전현상 모두 제거되었다. 단, 하수오 추출물은 수분을 함유한 관계로 분말시의 농도인 5%가 아닌 7%를 배지 농도 기준으로 지정하게 되었다. 하수오 분말 배지(효소 미첨가균, 첨가균)와 추출물 배지에서 여러 젖산균 배양시의 성장능은 다음과 같다 (Table 44).

Table 44. Viable cell counts of microorganisms during the growth in *Cynanchum wilfordii* Hemsley

|                               | Powder 1)           | Enzyme 2)           | Extract 3)          |
|-------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| CH-2                          | 4.2*10 <sup>8</sup> | 4.2*10 <sup>8</sup> | 3.5*10 <sup>8</sup> |
| CW-133                        | 2.5*10 <sup>8</sup> | 2.3*10 <sup>8</sup> | 1.2*10 <sup>8</sup> |
| CW-155                        | 3.0*10 <sup>8</sup> | 5.0*10 <sup>7</sup> | 1.5*10 <sup>8</sup> |
| <i>L.casei</i> 911            | 4.0*10 <sup>8</sup> | 5.0*10 <sup>8</sup> | 7.0*10 <sup>8</sup> |
| <i>L.bulgaricus</i> KCTC 2182 | 2.0*10 <sup>8</sup> | 5.0*10 <sup>8</sup> | 3.1*10 <sup>8</sup> |
| <i>Lacidophilus</i> KCTC 3188 | 3.0*10 <sup>8</sup> | 6.0*10 <sup>8</sup> | 2.7*10 <sup>8</sup> |
| <i>St.th.th-3</i>             | 2.0*10 <sup>8</sup> | 4.0*10 <sup>8</sup> | 4.6*10 <sup>8</sup> |

1) Media prepared from CWH powder

2) Media prepared from enzyme treated CWH powder

3) Media prepared from an extract of CWH.

위의 실험에서 선발된 균주를 대상으로 하수오에서의 배양 적성을 검토하기 위한 기본 배지를 다음과 같이 제조하였다. 본 배지는 하수오를 기본 base로 하여 효소의 전처리에 따라 다음과 같이 세가지 (Type 1, 2, 3)를 제조하였다. 하수오를 첨가한 배지를 곧바로 멸균할 경우 전분의 호화에 따른 겔화가 심하게 되어 유산균의 배양에 좋지 않은 결과를 가져오므로 이를 전분분해 효소인 amylase와 glucoamylase를 처리하여 전처리를 함으로써 이러한 문제를 해결할 수 있었다.

|                       |                                      |        |
|-----------------------|--------------------------------------|--------|
| 하수오 5g+<br>D.W. 100ml | 1) 80°C, 10min in Shaking water bath |        |
|                       | 2) add 0.02% amylase, glucoamylase   | Type 1 |
|                       | add 0.04%                            | Type 2 |
|                       | add 0.06%                            | Type 3 |
|                       | 3) 55°C, 2hr in shaking water bath   |        |
|                       | 4) 105°C, 5min autoclave             |        |

그리고 일차적으로 선발된 균주를 Lactobacilli MRS Broth 배지에 활성화 한 다음 아래의 배지에 접종하여 24시간동안 37°C에서 배양한 후 관능검사를 통해 배양 적성을 판단하였다. 각각 균주의 배양 특성에 대한 실험 결과 중 배양적성이 우수한 균주는 다음과 같다.

| 균주                               | 생균수    |            | 관능적 특성       |
|----------------------------------|--------|------------|--------------|
| <i>S. thermophilus</i> TH-116    | type 1 | 8.0 x 10E8 | 맛은 좋으나 향이 약함 |
|                                  | type 2 | 2.3 x 10E7 |              |
|                                  | type 3 | 3.0 x 10E7 |              |
| <i>Lb. acidophilus</i> KCTC 2182 | type 1 | 1.5 x 10E8 | 신맛이나 먹기는 괜찮음 |
|                                  | type 2 | 3.0 x 10E7 | 밋밋한 맛        |

|                             |        |            |                  |
|-----------------------------|--------|------------|------------------|
| <i>Bifidobacterium</i> GE49 | type 1 | 1.6 x 10E6 | 하수오 향이 강하고 맛이 좋음 |
|                             | type 2 | 2.7 x 10E6 | 약간 텁텁한 맛         |
|                             | type 3 | 1.0 x 10E7 | 약간 달고 신냄새        |
| GE54                        | type 1 | 1.9 x 10E7 | 약간 달고 인삼맛        |
|                             | type 2 | 1.3 x 10E7 | type 1보다 신맛      |
|                             | type 3 | 1.9 x 10E6 | 상한 맛             |
| GE157                       | type 1 | 4.0 x 10E7 | 약간 단맛            |
|                             | type 2 | -          |                  |
|                             | type 3 | -          |                  |

이상의 결과와 같이 배양시 관능성이 상대적으로 우수한 균주의 경우 (TH-116, KCTC2182, GE49, GE54, GE157)는 하수오 배지에서 생장이 약하였으며 반대로 생장이 우수한 균주의 경우 (GE63, GE133, GE155, *L. casei*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, TH-3, TH-20)는 관능성이 떨어지는 경향을 보였다. 따라서 배양이 우수한 균주의 경우는 상품화에서 분말형의 제품을 추구하여 맛은 기타 식품첨가물로서 개선해야 할 필요가 있으며 관능성이 우수한 균주의 경우는 액상형의 제품개발에 적합할 것으로 예상된다.

#### 나. 하수오 추출액을 이용한 배양적성 검토

하수오의 이용성을 증진시키기 위하여 하수오를 열수추출하여 배양에 적용하는 실험을 실시하였다.

|   |
|---|
| <p><b>하수오 Extract 제조 과정</b></p> <p>=&gt; 하수오 → → 열추출 → → 농축(고형분 30%) → → 부형제투입 (농축액 90%) 분쇄 여과 (Dextrin 10%) → → → 균질화 → → → 분무건조 → → → 하수오 Extract</p> |
|---|

위와 같은 과정을 거쳐서 제조한 하수오 extract를 첨가하여 다음과 같이 유산균 배양용 배지를 고안하였다.

### 하수오 Medium

Type 4 = 하수오 Extract 5g + D.W. 100ml -> Ascorbic acid 25 $\mu$ M/l로 조정  
(하수오 75% + Dextrin 25% = 하수오 Extract 로 하수오농도 3.75%로  
조정) -> 121 $^{\circ}$ C 15min Autoclave

Type 5 = 하수오 Extract 5g + D.W. 100ml + 올리고당/ Fructose 각각  
3.14%첨가-> Ascorbic acid 25 $\mu$ M/l로 조정 -> 121 $^{\circ}$ C, 15min autoclave

위의 배지에서는 GE63, GE133, GE155, *Lb. casei*, *Lb. bulgaricus* 3188, *L. acidophilus* 145, S. TH-3, S. TH-20 등이 약  $1.5 \times 10^7$  정도의 생육을 보일 뿐 대부분이 성장하지 못하였다. 그 이유는 열수 추출과정에서 배양에 필요한 성분이 소실 된 것으로 사료된다.

#### 2. 하수오 배지에서 배양시의 최적 균주 선정

한국인의 장에서 분리된 8종의 *Bifidobacterium* strains(CW-49, CW-50, CW-54, CH-2, CW-133, CW-155, CW-157, CW-168)와 *Lactobacillus* strains(*L.casei* 911, *L.bulgaricus* KCTC 3188, *L.acidophilus* KCTC 2182), 6종의 *Streptococcus* strains 를 하수오 배지에 접종하여 그 성장능을 측정하였다. 생균수는 접종후 48시간 배양하여 측정하였으며, *Bifidobacterium* strains 중에서는 CH-2, CW-133, CW-155, 3종이 24시간 배양후 108 cfu/ml 이상 도달하였다. 이중 특히 *Lactobacillus casei* 911과 *Bifidobacterium spp.* CH-2 가 다른 젖산균에 비해 하수오 배지에서 뛰어난 성장능을 나타내었다( Table 45).

하수오 배지에서의 세포 성장능은 MRS 배지에서 보다는 낮았지만 우유를 기초로 한 배지에 비해 높은 성장능을 나타내었다.

Table 45. Cell counts of various strains in *Cynanchum wilfordii* Hemsley

|                            |                                   | MRS medium           | CWH medium          |
|----------------------------|-----------------------------------|----------------------|---------------------|
| <u>Bifidobacterium sp.</u> | CW-49                             | 2.0*10 <sup>9</sup>  | 3.4*10 <sup>6</sup> |
|                            | CW-50                             | 1.0*10 <sup>9</sup>  | 4.0*10 <sup>7</sup> |
|                            | CW-54                             | 1.2*10 <sup>8</sup>  | 1.9*10 <sup>7</sup> |
|                            | CH-2                              | 2.3*10 <sup>9</sup>  | 1.1*10 <sup>9</sup> |
|                            | CW-133                            | 5.8*10 <sup>8</sup>  | 1.6*10 <sup>8</sup> |
|                            | CW-155                            | 2.1*10 <sup>9</sup>  | 3.9*10 <sup>8</sup> |
|                            | CW-157                            | 1.5*10 <sup>7</sup>  | 4.0*10 <sup>7</sup> |
|                            | CW-168                            | 1.0*10 <sup>8</sup>  | 1.0*10 <sup>7</sup> |
| <u>Lactobacillus sp.</u>   | <i>L.casei</i> 911                | 2.0*10 <sup>9</sup>  | 1.0*10 <sup>9</sup> |
|                            | <i>L.bulgaricus</i><br>KCTC 2182  | 5.8*10 <sup>8</sup>  | 3.0*10 <sup>8</sup> |
|                            | <i>L.acidophilus</i><br>KCTC 3188 | 5.0*10 <sup>9</sup>  | 1.5*10 <sup>8</sup> |
| <u>Streptococcus sp.</u>   | <i>St.thermophilus</i> A          | 3.0*10 <sup>8</sup>  | 1.1*10 <sup>8</sup> |
|                            | <i>St.thermophilus</i><br>B-01    | 7.0*10 <sup>8</sup>  | 7.8*10 <sup>8</sup> |
|                            | <i>St.thermophilus</i><br>th-3    | 1.0*10 <sup>9</sup>  | 8.0*10 <sup>8</sup> |
|                            | <i>St.thermophilus</i><br>th-11   | 66.0*10 <sup>8</sup> | 1.0*10 <sup>8</sup> |

\* Microorganisms were incubated in these medium at 37 °C for 24 hr.

### 3. 균주의 동정

본 실험에서는 분리된 균주인 GE54의 16s rDNA 염기분석을 하였다. System I 과 II의 DNA fragment는 아래 전기영동 사진과 같이 얻을 수 있었다.



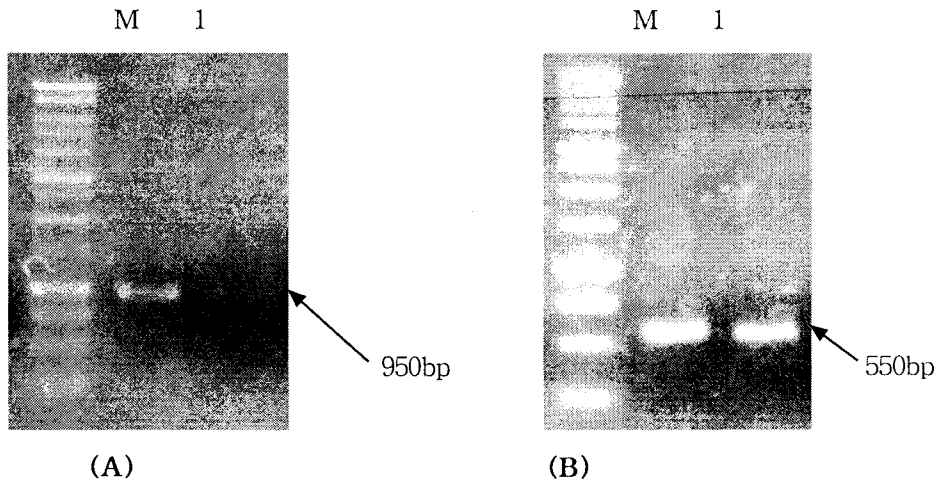


Fig 27. Electrophoretogram of PCR product of 16S rDNA of *Bifidobacterium* GE54

그림에서 (A)는 system I 에 대한 DNA band (950 bp)이고 (B)는 system II 에 대한 DNA band (550 bp)이다.

이 fragment를 gel extraction하여 sequencing reaction에 사용하였다. 그리고 primer는 system I 에 대해서는 610R과 612R의 primer를 사용하였고 System II 에 대해서는 630rII를 사용하였다. 각각의 얻은 sequencing 결과를 통해 GeneBank search를 해본 결과 다음과 같다.

가. GE 54

1) System I -1 (610R) :

가) *Bifidobacterium infantis* DNA for 16S ribosomal RNA,

Score = 890 bits (449), Expect = 0.0

Identities = 493/503 (98%), Gaps = 4/503 (0%)

나) *Bifidobacterium longum* 16S ribosomal RNA

Score = 880 bits (444), Expect = 0.0

Identities = 491/503 (97%), Gaps = 4/503 (0%)

2) System I -2 (621R) :

가) *Bifidobacterium infantis* DNA for 16S ribosomal RNA,

Score = 854 bits (431), Expect = 0.0

Identities = 440/443 (99%)

나) *Bifidobacterium longum* 16S ribosomal RNA

Score = 795 bits (401), Expect = 0.0

Identities = 436/445 (97%), Gaps = 3/445 (0%)

3) System II (630rII) :

가) *Bifidobacterium infantis* DNA for 16S ribosomal RNA

Score = 204 bits (103), Expect = 1e-50

Identities = 124/133 (93%)

나) *Bifidobacterium bifidum* KCTC 3202 16S rRNA gene

Score = 204 bits (103), Expect = 1e-50

Identities = 124/133 (93%)

나. 기존에 알려진 *Bifidobacterium longum*과 *Bifidobacterium infantis*간의 16s rDNA sequence의 비교자료

longum

-NTTTTGTGGAGGGTTCGATTC**CT**GGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATG

infantis

-----TTTGAT**CAT**GGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATG

\*\*\* \*\*

longum

CAAGTCGAACGGGATCCATC**AAG**CTT---GCTT-GGTGGT**GAG**AGTGGCGAACGGGTGAG

infantis

CAAGTCGAACGGGATCCATC**GGG**CTT---TGCTT-GGTGGT**GAG**AGTGGCGAACGGGTGAG

\*\*\*\*\* \*\*

longum

TAATGCGTGACCGACCTGCCCATACACCGGAATAGCTCCTGGAAACGGGTGGTAATGCC

infantis

TAATGCGTGACCGACCTGCCCATACACCGGAATAGCTCCTGGAAACGGGTGGTAATGCC

\*\*\*\*\*

longum

GGATGTTCCAGTTGATCGCATGGTCTTCTGGNGAAAGCNNTTCGCGGTATGGGATGGGGT

infantis

GGATGTTCCAGTTGATCGCATGGTCTTCTGGGAAAG--CTTTCGCGGTATGGGATGGGGT

\*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\*

longum

CGCGTCCTATCAGCTTGACGGNGGGTAACGGCCNACCGTGGCTTCGACGGGTAGCCGGC

infantis

CGCGTCCTATCAGCTTGACGGCGGGTAACGGCCACCGTGGCTTCGACGGGTAGCCGGC

\*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

longum

CTGAGAGGGCGACC--GGCCACATTGGGACTGAGATACGGCCNACTCCTACGGGAGGCA

infantis

CTGAGAGGGCGACC--GGCCACATTGGGACTGAGATACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCA

\*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

longum

GCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATG

infantis

GCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATG

\*\*\*\*\*

longum

GAGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTTATCGGGGAGCAAG-----CGAGAGT--

infantis

GAGGCCTTCGGGTTGTAACCTCTTTTATCGGGGAGCAAG-----CGTGAGT--

\*\*\*\*\* \*\*\*\*

longum

-GAGTTTACCCGTTGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTA

infantis

-GAGTTTACCCGTTGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTA

\*\*\*\*\*

longum

GGGTGCNAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGTAGGCGGTTTCGTCGCGTC

infantis

GGGTGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGTAGGCGGTTTCGTCGCGTC

\*\*\*\*\*

longum

CGGTGTGAAAGTCCATCGCTTAACGGTGGATCCGCGCCGGGTACGGGCGGGCTTGAGTGC

infantis

CGGTGTGAAAGTCCATCGCTTAACGGTGGATCCGCGCCGGGTACGGGCGGGCTTGAGTGC

\*\*\*\*\*

longum

GGTAGGGGAGACTGGAATTCGCGGTGTAACGGTGAATGTGTAGATATCGGGAAGAACAC

infantis

GGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTACGGTGAATGTGTAGATATCGGGAAGAACAC

\*\*\*\*\*

longum

CAATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCCGTTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGC

infantis

CAATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCCGTTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGC

\*\*\*\*\*

longum

GAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGGTGGATGCTGGATGTGGGGCC

infantis

GAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGGTGGATGCTGGATGTGGGGCC

\*\*\*\*\*

longum

NG-TTCCACGGGTTCCGTGTCGGAGCTAACGCGTTAAGCATCCCCTGGGGAGTACGGC

infantis

CG-TTCCACGGGTTCCGTGTCGGAGCTAACGCGTTAAGCATCCCCTGGGGAGTACGGC

\*

\*\*\*\*\*

longum

CGCAAGGCTAAACTCAAAGAAATTGACGGGGGCCNGCACAAGCGGCGGAGCATGCCGAT

infantis

CGCAAGGCTAAACTCAAAGAAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGCCGAT

\*\*\*\*\*

longum

TAATTCGATGNAACGCGAAGAACCTTACCTGGGCTTGACATGTTCCCGAC-GGTCGTAGA

infantis

TAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGCTTGACATGTTCCCGAC-GATCCAGA

\*\*\*\*\* \* \*\* \*\*

longum

GATACGGCNTCCCTTCGGGGCGGGTTCACAGGTGGNGCATGGTCGTCGTCAGCTCGTGTC

infantis

GATGGGTTTCCCTTCGGGGCGGGTTCACAGGTGGTGCATGGTCGTCGTCAGCTCGTGTC

\*\*\* \*\* \*\*\*\*\*

longum

GTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC-GCAA-CGAGCGCAACCCTCGCCCCGTGTTGCCAGCGG

infantis

GTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC-GCAA-CGAGCGCAACCCTCGCCCCGTGTTGCCAGCGG

\*\*\*\*\*

longum

AT-TATGCC--GGNAACTC---ACGGGNNACCGCC--GGGGTTAA--CTCGG--AGGAAG

infantis

AT-TGTGCC--GGGAACTC---ACGGGGGACCGCC--GGGGTTAA--CTCGG--AGGAAG

\*\* \* \*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

longum

GT---GGGGATGACGTC--AGATCATCATGCCCTTA-CGTCCAGGG-CTTCACG-CATG

infantis

GT---GGGGATGACGTC--AGATCATCATGCCCTTA-CGTCCAGGG-CTTCACG-CATG

\*\* \*\*\*\*\*

longum

CTACAATGGCCGG-TACAAC--GGGATGC-GACGCGGCGACGCGGAGCGG-ATCCCTGAA

infantis

CTACAATGGCCGG-TACAAC--GGGATGC-GACGCGGCGACGCGGAGCGG-ATCCCTGAA

\*\*\*\*\*

longum

AACCGTCTCAGTTCGG-ATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGGCGGAGTCGCT--

infantis

AACCGTCTCAGTTCGG-ATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGGCGGAGTCGCT--

\*\*\*\*\*

longum

AGTAATCGCGAATCAGCAACGTCGCGGTGAATGCGTCCCGGCCTTGTACACACCGCCC

infantis

AGTAATCGCGAATCAGCAACGTCGCGGTGAATGCGTCCCGGCCTTGTACACACCGCCC

\*\*\*\*\*

longum

GTCAAGNCATGAAAGTGGGCAGCACCCGAAGCCGGTGGCCTAACCCCT--TGTGGGANGG

infantis

GTCAAGTCATGAAAGTGGGCAGCACCCGAAGCCGGTGGCCTAACCCCT--TGTGGGATGG

\*\*\*\*\*

longum

AGCCGTCTAAGGTGAGGCTCGTGATTGGGAC-----

infantis

AGCCGTCTAAGGTGAGGCTCGTGATTGGGACTAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAA

\*\*\*\*\*

longum -----  
 infantis GGTGCGGCTGGATCACCTCCTTA

CLUSTAL X (1.81) multiple sequence alignment를 통해서 비교하여 본 결과 상당히 유사한 sequence임을 알 수 있었다. 그러므로 *B. longum* 과 *B. infantis* 은 16S rDNA sequence가 99% 이상 동일하기 때문에 아래의 당발효능 기준에 의해 추가적인 당 발효 test에 의하여 구별하는 것이 필요하다.

다. *longum* 과 *B. infantis*를 구별하기 위한 당 발효 test

기본 배지 : Modified MRS 배지

|                    | L-arabinose | Melezitose | Cellobiose |
|--------------------|-------------|------------|------------|
| <i>B. longum</i>   | -           | -          | +          |
| <i>B. infantis</i> | +           | +          | -          |

4. 하수오 배지에 *Bifidobacterium* strains 발효시의 생균수와 pH 변화도 측정

1차 시험배양시 좋은 성장능을 나타내어 선정된 3종의 bifidobacteria 를 활성화시킨후 하수오 액체 배지에 접종하여 배양시기별 변화도를 측정하였다. 배양 시간은 각각 0, 6, 12, 24, 48시간으로, 시간별로 pH 변화도와 생균수를 측정하였다.

Table 46에서 모든 균이 배양 6시간 후  $10^8$  cfu/ml 이상의 성장과 pH 5 이하의 변화도를 나타내었으며, 특히 CH-2 의 경우 12~24 배양시간중 가장 높은 세포 생성능을 나타냈다. Table 23는 Fructo-oligosaccharide(FOS)를 하수오 배지에 첨가한 후 발효시켜 각각의 변화도와 발효능을 측정하였다.

여러 실험에서 bifidobacteria에 FOS 첨가시 어느정도의 성장을 촉진시킨다고 보고된 바 있으나, 이 실험에서는 유의적인 증가를 나타내지 않았다.



Table 46. Total colony counts of *Bifidobacterium* and medium pH when grown in the *Cynanchum wilfordii* Hemsley 7 % extracts.

| Time (hr) | CH-2                |      | CW-133              |      | CW-155              |      |
|-----------|---------------------|------|---------------------|------|---------------------|------|
|           | Cell count (cfu/ml) | pH   | Cell count (cfu/ml) | pH   | Cell count (cfu/ml) | pH   |
| 0*        | 4.0*10 <sup>7</sup> | 6.60 | 6.0*10 <sup>6</sup> | 6.60 | 7.0*10 <sup>6</sup> | 6.60 |
| 6         | 4.0*10 <sup>8</sup> | 4.71 | 3.0*10 <sup>8</sup> | 4.98 | 2.0*10 <sup>8</sup> | 4.92 |
| 12        | 4.0*10 <sup>8</sup> | 4.43 | 4.0*10 <sup>8</sup> | 4.86 | 3.0*10 <sup>8</sup> | 4.62 |
| 24        | 7.0*10 <sup>8</sup> | 4.31 | 3.0*10 <sup>8</sup> | 4.84 | 4.0*10 <sup>8</sup> | 4.82 |
| 48        | 3.0*10 <sup>8</sup> | 4.22 | 2.0*10 <sup>8</sup> | 4.80 | 2.0*10 <sup>8</sup> | 4.81 |

\* 0 time is when 1 % activated *bifidobacterium* strain was inoculated to CWH medium.

Table 47. Total colony counts of *Bifidobacterium* and medium pH when grown in the *Cynanchum wilfordii* Hemsley 7 % extraction + 1 % Fructooligosaccharide

| Time (hr) | CH-2                |      | CW-133              |      | CW-155              |      |
|-----------|---------------------|------|---------------------|------|---------------------|------|
|           | Cell count (cfu/ml) | pH   | Cell count (cfu/ml) | pH   | Cell count (cfu/ml) | pH   |
| 0*        | 4.0*10 <sup>7</sup> | 6.65 | 6.0*10 <sup>6</sup> | 6.65 | 7.0*10 <sup>6</sup> | 6.65 |
| 6         | 2.0*10 <sup>8</sup> | 4.64 | 2.0*10 <sup>8</sup> | 4.98 | 2.0*10 <sup>8</sup> | 4.95 |
| 12        | 4.0*10 <sup>8</sup> | 4.55 | 4.0*10 <sup>8</sup> | 4.89 | 3.0*10 <sup>8</sup> | 4.86 |
| 24        | 6.0*10 <sup>8</sup> | 4.28 | 3.0*10 <sup>8</sup> | 4.85 | 2.0*10 <sup>8</sup> | 4.85 |
| 48        | 4.0*10 <sup>8</sup> | 4.20 | 3.0*10 <sup>8</sup> | 4.81 | 1.0*10 <sup>8</sup> | 4.85 |

\* 0 time is when 1 % activated *bifidobacterium* strain was inoculated to CWH medium.

## 5. 하수오 배지에 Bifidobacterium strain 발효시의 acetic acid와 lactic acid 변화도 측정

Figure 12~17에서는 bifidobacteria를 하수오 배지에 발효시 변화된 acetic acid와 lactic acid 양을 측정하여 나타내고 있다.

CH-2는 발효시기가 길어짐에 따라서 lactic acid가 증가되는 반면, acetic acid의 양은 감소되고 있음을 나타내고 있다(Figure 12). 이는 전형적인 bifidobacteria 발효활성과는 일치하지 않는데, 이는 CH-2가 다른 유산균에 비해 낮은 수준의 acetic acid를 생성하고 있음을 보여주고 있다. Figure 13은 하수오 배지에 Fructooligosaccharide 1% 첨가시의 발효 변화도를 나타내는데, 첨가하지 않은 균에 비해 lactic acid 생성량이 증가되었으며, acetic acid 양은 감소되었다. Figure 14과 15은 CW-133 균주를 하수오에 발효시 FOS 첨가균과 비첨가균의 변화도를 나타내고 있으며, CH-2 균주와는 다르게 acetic acid 생성량이 발효 시간에 따라 증가되고 있음을 나타내고 있다. Figure 16와 17은 CW-155 균주 발효시의 변화도를 나타내며, 발효 시간이 지남에 따라서 acetic acid와 lactic acid 생성량이 증가되고 있음을 나타낸다. 발효 48시간 후, acetic acid 생성량은 CW-155균주를 하수오에 접종시 가장 높았으며, lactic acid 생성량은 CH-2에서 발효시 가장 높게 나타났다. 이 실험에 의하면, Bifidobacterium strains를 하수오에 발효시 생성되는 주요 생성물은 lactic acid로 나타났다.

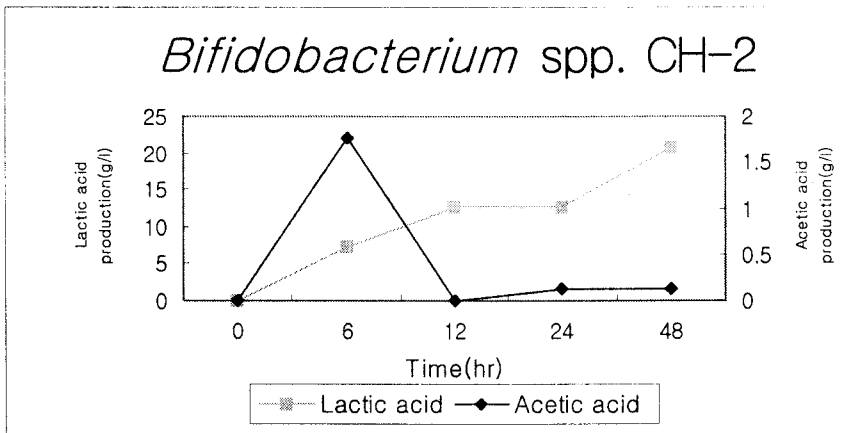


Figure 28. Lactic acid and acetic acid of the fermented *Cynanchum wilfordii* Hemsley medium by *Bifidobacterium* spp. CH-2.

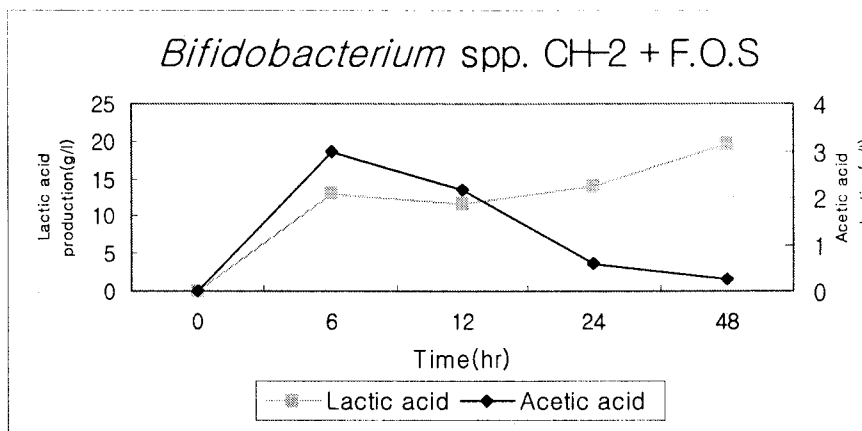


Figure 29. Lactic acid and acetic acid of the fermented *Cynanchum wilfordii* Hemsley medium with 1 % Fructooligosaccharide by *Bifidobacterium* spp. CH-2

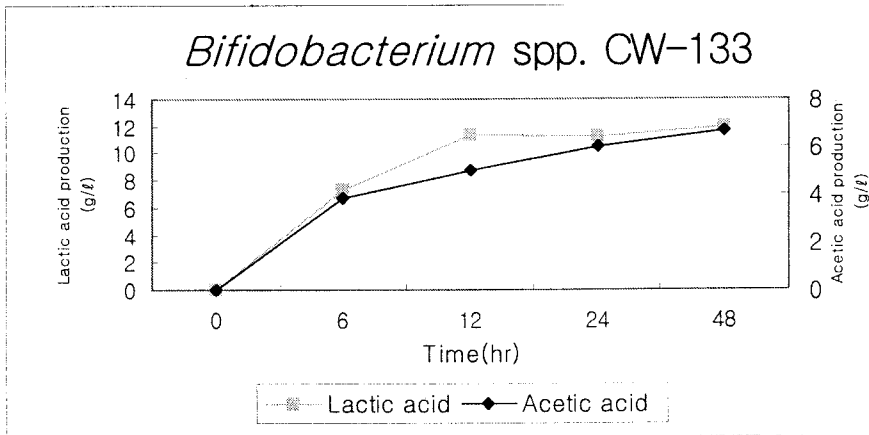


Figure 30. Lactic acid and acetic acid of the fermented *Cynanchum wilfordii* Hemsley medium by *Bifidobacterium* spp. CW-133

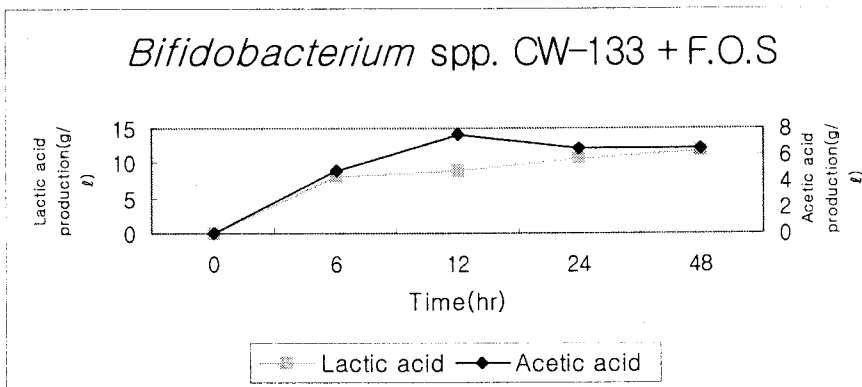


Figure 31. Lactic acid and acetic acid of the fermented *Cynanchum wilfordii* Hemsley medium with 1 % Fructooligosaccharide by *Bifidobacterium* spp. CW-133

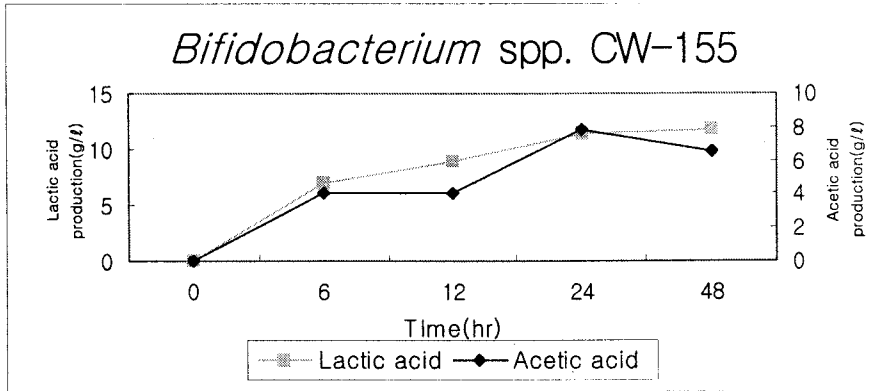


Figure 32. Lactic acid and acetic acid of the fermented *Cynanchum wilfordii* Hemsley medium by *Bifidobacterium* spp. CW-155

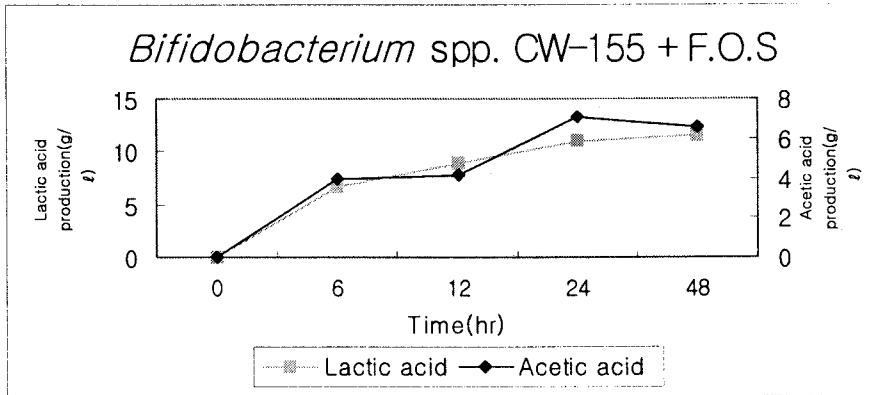


Figure 33. Lactic acid and acetic acid of the fermented *Cynanchum wilfordii* Hemsley medium with 1 % Fructooligosaccharide by *Bifidobacterium* spp. CW-155

6. 하수오 배지에 *Lactobacillus* strains, *Streptococcus thermophilus* 발효시의 acetic acid와 lactic acid 변화도 측정

하수오 배지에서의 이들 젖산균의 생육은 긍정적이었으나, FOS 활용도에서는

부정적인 성장을 나타내었다(Figure 18~25). *Lactobacillus casei* 911, *Lactobacillus bulgaricus* KCTC 2182, *Lactobacillus acidophilus* KCTC 3188, *Streptococcus thermophilus* th-3 균주를 하수오에 발효시킨 결과 긍정적인 세포증식이 나타났으며, pH 저하와 배양 48시간 이내에 12g/l 이상의 lactic acid를 생성하였다. 각각의 균주는 37°C, 호기적인 조건 하에서 0, 6, 12, 24, 48 배양시간을 정하여 측정하였다. 실험군 대부분의 최고 생육시간은 12~24시간으로 나타내었다. 하수오내에서 발효된 *Lactobacillus casei* 생균수는 108 cfu/ml 이상 증가되었으며(Figure 34), Figure 19에서는 이 균주의 peak time이 12시간에서 24시간으로 지연됨을 나타내었다. 이 균주의 경우 하수오배지내 FOS 첨가군보다 FOS 미첨가군에서의 발효능이 더 높게 나타났다. Figure 20과 21는 *Lactobacillus bulgaricus*가 하수오에서 발효된 결과를 보여주고 있다. *Lactobacillus acidophilus*의 최적 생육시간은 lactobacilli 중 가장늦은편인 24시간을 나타내고 있다. 특히 FOS 첨가군에서는 미첨가군의 peak time이 24시간인데 반해, 48시간 이후로 지연되었음을 보여주고 있다(Figure 22, 23). *Streptococcus thermophilus* th-3 는 하수오배지에서 발효시 좋은 성장능을 나타내고 있으며, FOS 첨가군에서 보다 더 높은 세포 증가율을 보이며, 최적 생육시간이 지연됨을 나타내고 있다(Figure 40, 41). 하수오 배지에서 FOS를첨가하여 발효능을 증가시키려 하였으나, 이 실험에서는 어느정도의 생육 시간의 지연을 나타내었으며, 유의적인 증가율을 보이진 않았다.

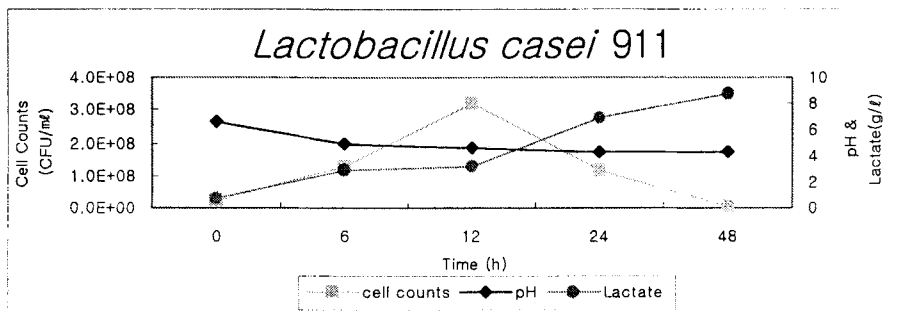


Figure 34. Total colony counts, lactic acid and pH of the fermented *Cynanchum wilfordii* Hemsley medium by *Lactobacillus casei* 911.

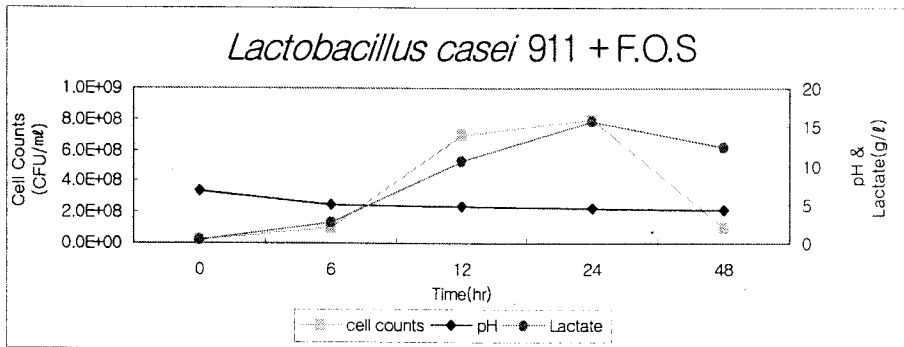


Figure 35. Total colony counts, lactic acid and pH of the fermented *Cynanchum wilfordii* Hemsley medium with 1 % Fructooligosaccharide by *Lacobacillus casei* 911.

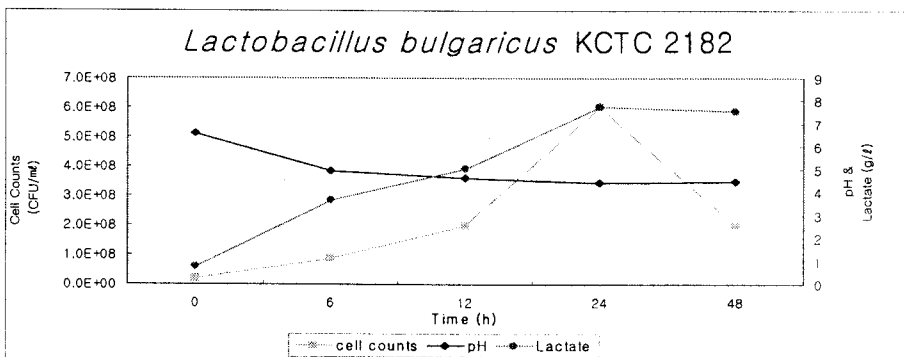


Figure 36. Total colony counts, lactic acid and pH of the fermented *Cynanchum wilfordii* Hemsley medium by *Lactobacillus bulgaricus* KCTC 2182.

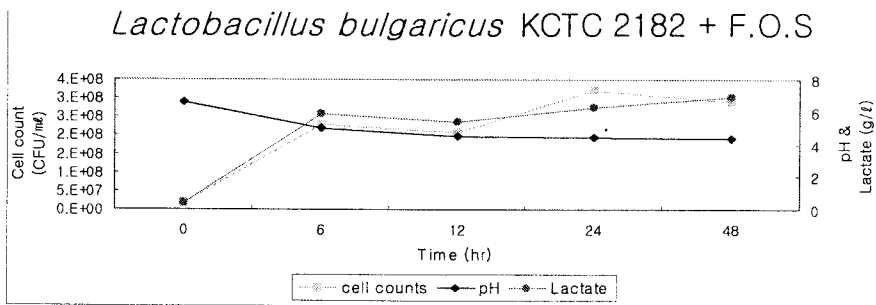


Figure 37. Total colony counts, lactic acid and pH of the fermented *Cynanchum wilfordii* Hemsley medium with 1 % Fructooligosaccharide by *Lactobacillus bulgaricus* KCTC 2182.

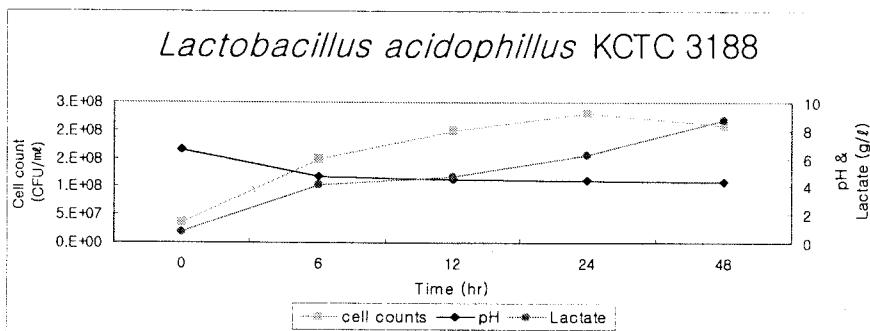


Figure 38. Total colony counts, lactic acid and pH of the fermented *Cynanchum wilfordii* Hemsley medium by *Lactobacillus acidophilus* KCTC 3188.



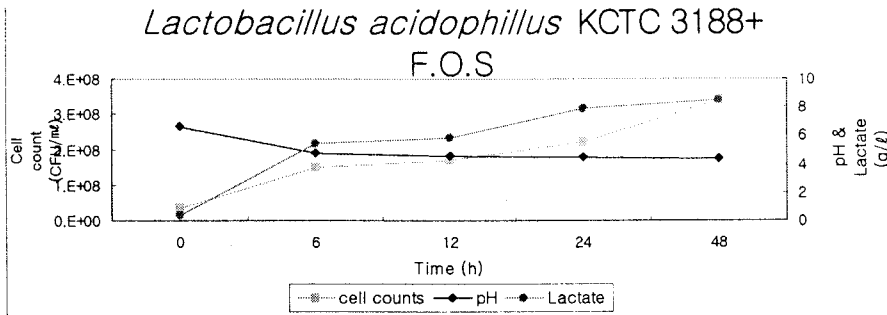


Figure 39. Total colony counts, lactic acid and pH of the fermented *Cynanchum wilfordii*Hemsley medium with 1 % Fructooligosaccharide CWH with FOS by *Lactobacillus acidophilus* KCTC 3188.

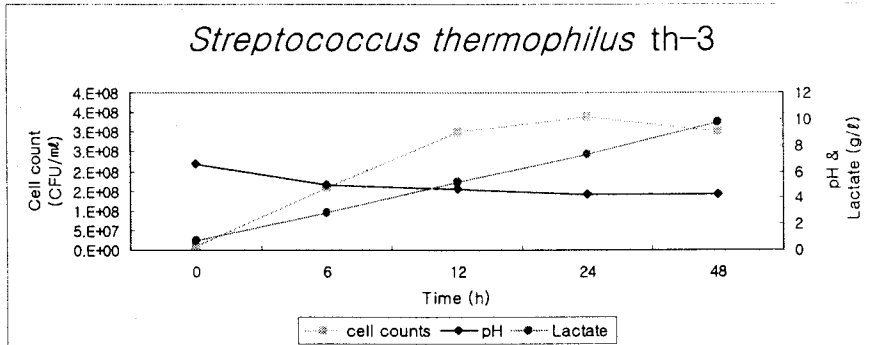


Figure 40. Total colony counts, lactic acid and pH of the fermented *Cynanchum wilfordii*Hemsley medium by *Streptococcus thermophilus* th-3.

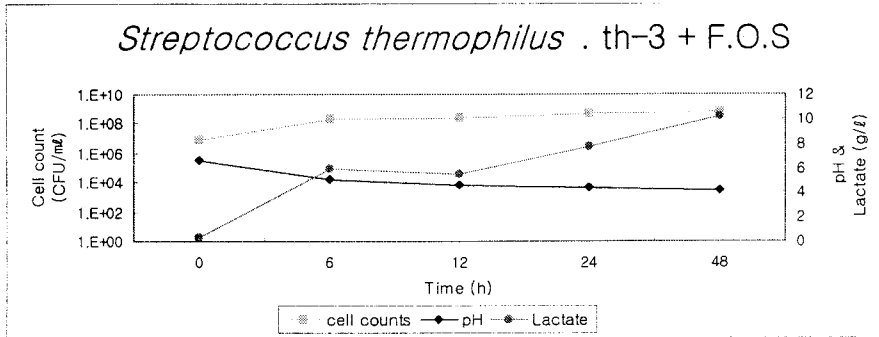


Figure 41. Total colony counts, lactic acid and pH of the fermented *Cynanchum wilfordii* Hemsley medium with 1 % Fructooligosaccharide by *Streptococcus thermophilus th-3*.

## 7. 관능평가

### 가. 하수오 발효시의 균주 중 최적 관능 균주 선정

하수오는 한약재로 본래 쓴맛을 지니고 있다. 결과적으로 젊은 세대에서는 어느정도 거부감을 가지게 한다. 하수오의 쓴맛을 감소시키기 위하여 감미료를 첨가하는 실험을 하였는데, 1차로 FOS를 대체 감미료로 지정하여, 관능증진과 젖산균의 성장 증진을 도모하고자 하였다. Table 24는 발효된 샘플의 관능평가를 실시하여 기호도가 좋은 균을 선정하고자 하였다. 하수오 발효시 FOS 첨가균보다 미첨가균에서 더 높은 점수를 받게 되었는데, 이는 FOS 첨가가 관능평가시 긍정적인 효과를 주지 못한다는 것을 나타내고 있다. 미리 실시된 균의 활성능 측정에서도 FOS 첨가균에서 유의적인 효과를 보이지 못하였다. 발효된 하수오의 쓴맛과 신맛을 제거하기 위해서는 6% 이상의 FOS를 첨가해야 하지만, 이는 배지의 점도를 증가시켜 젖산균의 생육을 오히려 저하시키는 요인을 발생시키게 된다. 김등(1994)의 실험에 의하면, FOS 첨가가 박테리아의 성장을 저해한다는 결과를 보고시킨 바 있다. 이러한 결과에 의하면 FOS는 발효된 하수오의 감미료로서는 적합하지 않다는 결론이 되었다. 발효된 하수오 샘플의 관능평가 결과, bifidobacteria 균주중에서는 CH-2가 제일 높은 점수를 얻었으며, 이외에도 *Lactobacillus casei*, *Streptococcus thermophilus th-3*등의 상업균주가 선발되었다. 이들 균주들은 관능평가에서 좋은 점수를 기록하였을 뿐 아니라, 하수오

배지에서의 발효능도 유의적인 증가를 나타내었다. 위의 두 상업균주들은 또한 상업 유산균발효제품에도 자주 사용되는 균주이다.

Table 48. Results of selecting taste among strains fermented *Cynanchum wilfordii* Hemsley medium

|                                     | Color    | Sweetness   | Acidity      | Bitterness   | Odor       | Taste          |
|-------------------------------------|----------|-------------|--------------|--------------|------------|----------------|
| P-Control                           | 4±1.41   | 3.3±1.63abc | 3.1±1.16abcd | 3.5±1.37abcd | 3.6±0.51ab | 3.2±1.74abc    |
| N-Control                           | 4.5±1.64 | 3.5±1.04ab  | 4.1±0.75a    | 4.5±0.54a    | 4.1±0.98a  | 3.3±1.03ab     |
| CH-2                                | 4.3±1.03 | 3.6±0.81a   | 2.83±0.75bcd | 3.5±1.04abc  | 4±0.63a    | 3.17±0.4abc    |
| CH-2 + FOS                          | 3.8±1.32 | 2.6±1.21abc | 2±0.89efg    | 2.5±1.37bcd  | 3.5±1.04ab | 2±0.63cde      |
| CW-133                              | 4.1±1.32 | 3.1±0.98abc | 3.3±0.51abc  | 2.8±1.47bcd  | 3.1±1.16ab | 2.63±1.13abcde |
| CW-133 + FOS                        | 4.6±1.5  | 3.4±0.49ab  | 3.9±0.8ab    | 3.8±0.75ab   | 3.8±0.75ab | 3.67±0.51a     |
| CW-155                              | 4±1.41   | 3.6±1.03a   | 3.33±0.81abc | 2.6±1.21bcd  | 3.6±0.81ab | 3±1.09abcde    |
| CW-155 + FOS                        | 4.3±0.51 | 2.8±0.75abc | 3.1±0.75abcd | 2.3±0.81bcd  | 3.5±0.54ab | 2.5±0.54abcde  |
| <i>L.casei</i> 911                  | 4.1±1.32 | 2.8±0.75abc | 2.8±0.75bcde | 2.6±0.81bcd  | 2.6±0.81b  | 2.9±0.49abcde  |
| <i>L.casei</i> 911+ FOS             | 4±1.41   | 2.3±1.03abc | 2.8±1.16bcde | 2.3±0.51cd   | 3.3±0.51ab | 2.3±0.81bcde   |
| <i>L.bulgaricus</i> KCTC 2182       | 4±1.26   | 2.5±0.83abc | 2.5±0.83cdef | 2.1±0.75cd   | 2.6±0.81b  | 1.8±0.44de     |
| <i>L.bulgaricus</i> KCTC 2182+ FOS  | 4.1±0.98 | 2.1±1.16bc  | 2.1±0.75defg | 2.3±0.81cd   | 3±1.09ab   | 2.3±0.81bcde   |
| <i>L.acidophilus</i> KCTC 3188      | 4.1±0.98 | 2±1.09c     | 1.6±0.81fg   | 2±1.26d      | 2.6±1.21ab | 1.7±0.75e      |
| <i>L.acidophilus</i> KCTC 3188+ FOS | 4.3±1.03 | 2.6±0.81abc | 2±0.63efg    | 2.6±1.36bcd  | 3.8±0.75ab | 3±1.02abcd     |
| <i>St.thermonphilusth</i> -3        | 4.3±1.03 | 2±1.09c     | 1.3±0.51g    | 2.1±1.16cd   | 3±1.09ab   | 2±0.89cde      |
| <i>St.thermonphilusth</i> -3 + FOS  | 4.1±0.98 | 2.8±0.98abc | 2.1±0.98defg | 3±0.89bcd    | 3±1.09ab   | 2.2±1.16bcde   |

P-control : Non-fermented CWH

N-control : Non-fermented CWH with 1% FOS

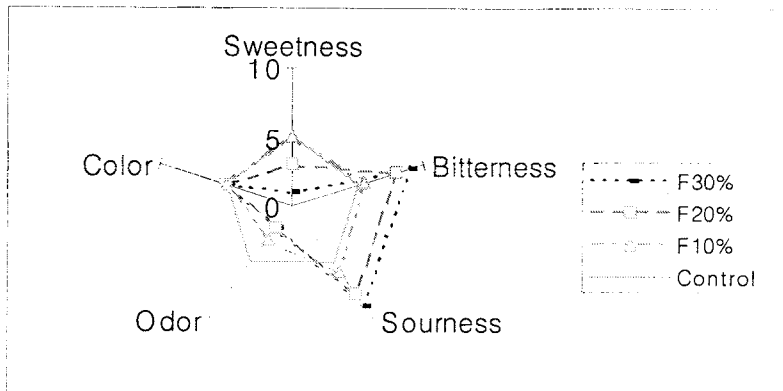
a~g ;Means± S.D. in the same column with different letters were significantly different by Duncan's multiple range test(p≤0.05).

## 2) 하수오 발효액의 최적 희석비율

1차 관능평가에 의해 하수오 발효액에 사용될 균주로 *Bifidobacterium spp.* Ch-2, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus thermophilus th*-3 이들3균주가 하수오 배지에서 좋은 발효능을 나타낸 7가지의 균주중에 선정되었다. 그러나 발효된 하수오는 쓴맛과 매우 강한 신맛을 가지고 있어서, 실험 panel 에게조차도 기본적인 거부감을 나타내게 하였다. 이러한 강한 거부감을 저하시키기 위하여

하수오 발효액의 비율을 희석시켜, 발효시 나타나는 특유의 신맛과 향을 저하시키고자 하였다. 또한 희석에 의해 저하된 유산균수는 동결건조를 통하여 제품에 최종 첨가하기로 하였으나, 발효액 자체에서 강한 발효능과 세포 생성능을 가지므로 발효액을 희석시에도 시판중인 유제품과의 유산균수 차이는 보이지 않았다. 발효된 하수오의 관능을 개선시키기 위하여 여러 비율에 걸쳐 희석하여 평가한 결과는 다음 Figure 26에서 보여주고 있다. 발효 하수오와 미발효 하수오액의 희석비율은 3:7에서 최적의 관능평가 점수를 나타내었으며, 4:6 이나 1:9에서는 발효 하수오 특유의 신맛과 쓴맛이 강하게 나타내었다. 그러나 3:7 희석비율은 발효액의 비율이 너무 낮으므로, 이보다는 높은 11:9로 최종 희석비율을 지정하였다. 희석비율 이외에도 하수오의 쓴맛을 감소시키기 위하여 여러 감미료를 첨가시킨 결과 설탕과 가장 유사한 sucralose 첨가시 신맛과 쓴맛이 가장 경감되었다. Table 25 에서는 희석된 발효 하수오액에 sucralose 첨가시의 개선된 관능도를 검사하고 있다. Sucralose 첨가비율은 상업 유산균 제품의 기준 당도인 4.5를 기준으로 하여 0.0125% 이하에서 관능 적성을 평가하였다. 발효 하수오액의 색상은 긍정적으로 나타났으며, 선호도는 다음과 같다.

Figure 42. Sensory test of the diluted-fermented CWHM



- 1) Control : CWHM
- 2) F10% : Fermented CWHM diluted with CWHM at the ratio of 3:7
- 3) F20% : Fermented CWHM diluted with CWHM at the ratio of 6:4
- 4) F30% : Fermented CWHM diluted with CWHM at the ratio of 9:1.

Table 49. Primary sensory test of the diluted-fermented or non-fermented *Cynanchum wilfordii* Hemsley medium with sucralose

| Sample       | Color      | Sweetness   | Acidity    | Bitterness | Odor     | Taste      |
|--------------|------------|-------------|------------|------------|----------|------------|
| P-control 1) | 5.0±0.81a  | 2.2±1.25c   | 3.5±1.73b  | 1.5±0.57c  | 3.7±0.57 | 2.2±1.50c  |
| N-control 2) | 3.5±0.57b  | 3.0±0.81bc  | 2.5±1.00b  | 1.7±0.57c  | 3.5±1.00 | 2.2±0.57c  |
| A 3)         | 4.0±0.81ab | 3.0±0.81bc  | 2.5±0.57b  | 2.2±0.57ab | 3.7±1.25 | 2.3±0.57c  |
| B 4)         | 4.0±0.81ab | 3.5±1.00abc | 2.5±1.00ab | 3.0±0.81b  | 3.5±1.00 | 2.8±0.95bc |
| C 5)         | 3.5±1.00b  | 4.2±0.50ab  | 3.7±1.25ab | 3.0±0.81b  | 4.0±1.41 | 3.8±0.95ab |
| D 6)         | 4.0±0.81ab | 4.5±0.57a   | 4.5±0.13a  | 4.0±0.95a  | 4.0±0.81 | 4.6±0.57a  |

- 1) P-control : Non-fermented CWHM
  - 2) N-Control : Fermented CWHM diluted with non-fermented CWHM at the ratio of 11:9
  - 3) A : Fermented CWHM diluted with non-fermented CWHM at the ratio of 11:9 in addition to sucralose 0.0025 %
  - 4) B : Fermented CWHM diluted with non-fermented CWHM at the ratio of 11:9 in addition to sucralose 0.005 %
  - 5) C : Fermented CWHM diluted with non-fermented CWHM at the ratio of 11:9 in addition to sucralose 0.0075 %
  - 6) D : Fermented CWHM diluted with CWHM at the ratio of 11:9 in addition to sucralose 0.01 %
- a~c: Means± S.D. in the same column with different letters were significantly different by Duncan's multiple range test ( $p \leq 0.05$ ).

### 3) 관능평가

앞의 2차례에 걸친 관능평가를 통하여 적정 균주와 희석 비율을 선정하였으며, 첨가시킬 감미료 역시 지정하였다. 이번 관능평가에서는 첨가 감미료의 정확한 비율을 지정하고자 관능 평가를 실시하였다. Table 26에서는 sucralose 0.01, 0.0125% 첨가시의 개선된 관능도를 측정하였으며, 이 결과 일반 상업 유제품의 당도보다는 유의적으로 낮은 0.01% sucralose 첨가시에 가장 높은 기호도를 나타내었다. 그러므로 발효 하수오 희석비율 11:9(발효액:미발효액) 와 미료인 sucralose 0.01% 첨가가 하수오 발효액의 관능성을 가장 높게 증진시켜

주었다. 이 첨가군은 단맛과 신맛, 그리고 최종 기호도에서 가장 높은 점수를 기록하였다. 당도와 향미는 유의적으로 긍정적이었으며, 신맛과 쓴맛은 유의적으로 부정적인 관능성을 보였다. 특히 신맛은 관능성을 유의적으로 가장 저하시켰다.

Table 50. Sensory test of the diluted-fermented or non-fermented *Cynanchum wilfordii* Hemsley medium with sucralose

|                     | Color      | Sweetness  | Acidity   | Bitterness | Odor     | Taste     |
|---------------------|------------|------------|-----------|------------|----------|-----------|
| Control1)           | 3.4±1.29b  | 2.5±1.213b | 3.5±1.73b | 1.7±0.57b  | 3.9±0.70 | 2.6±1.20b |
| Sucralose 0.01%2)   | 4.0±0.81ab | 4.5±0.57a  | 4.3±1.28a | 3.4±1.12a  | 3.7±1.19 | 4.6±0.80a |
| Sucralose 0.0125%3) | 4.6±0.80a  | 4.7±0.78a  | 4.5±1.12a | 3.4±1.29a  | 4.1±1.16 | 4.0±1.16a |

1) : Fermented CWHM diluted with CWHM at the ratio of 11:9

2) : Fermented CWHM diluted with CWHM at the ratio of 11:9 and added sucralose 0.01 %

3) : Fermented CWHM diluted with CWHM at the ratio of 11:9 and added sucralose 0.0125 %

a~b : Means± S.D. in the same column with different letters were significantly different by Duncan's multiple range test ( $p \leq 0.05$ ).

## 8. 제품제조공정

### 가. 제조공정

본 연구를 통해 얻어진 결과를 활용하여 제품을 제조할 수 있는 공정을 아래와 같이 완성하였다.

| 공정 | 내용                 | 기기    | 비고           |
|----|--------------------|-------|--------------|
| 선별 | 적정 하수오의 선별         |       |              |
| 분쇄 | 적정 크기로 분쇄          | 분쇄기   | 추출공정의 효율 증대  |
| 추출 | 하수오 추출             | 추출기   | 열수 추출        |
| 건조 | 열풍건조               | 열풍건조기 | 하수오 추출물의 분말화 |
| 발효 | 추출물의 멸균 및<br>유산균발효 | 발효기   | 종균배양 후 접종    |
| 혼합 | 발효액과 하수오의 혼합       | 발효기   |              |
| 가미 | Sucralose 첨가       | 발효기   |              |
| 충진 | 하수오 발효액의 충전        | 충진기   |              |
| 포장 | 포장                 | 포장기   | 병포장과 4면포장 가능 |

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 1. 하수오를 이용한 고품질의 가공제품 개발

#### 가. 하수오 원료특성

문헌상 나타난 하수오의 주요성분은 총질소 1.1%, 전분 45.2%, 조지방 3.1%, 무기물 4.5%, 레시틴 3.7%, 안트라 퀴논 유도체 1.1%. chrysoophanol, hyperim 등이었으며 하수오에 함유된 약효성분은 중량의 약 1.1%로 보고되어 있고 대표적인 효능으로는 혈청콜레스테롤 감소효과, 동맥경화 억제작용, 항바이러스성, 항산화활성등이 있는 것으로 조사되었음. 일반성분은 수분 9.06 %, 회분 3.07%, 조지방 1.91%, 조단백질 21.01%로 단백질 함량이 많이 함유되어 있었고 무기질은 칼륨, 칼슘함량이 높았으며 유리당은 지당의 함량이 높은 것으로 나타났고 이러한 하수오의 특성을 파악하여 연구개발 목표인 제품개발을 수행하였음.

#### 나. 과립차 및 침출차 개발을 위한 원료선정 및 제조방법 개발

과립차 및 침출차 개발을 위한 적절한 원료들을 선정하고 과립차는 원료를 혼합하여 과립화한후 건조하였으며 침출차는 원료를 건조한 후 덩어리공정을 거쳐 볶음현미를 혼합하여 제조하여 하수오를 원료로한 과립차 및 침출차의 제조방법을 개발 하였음

#### 다. 환 및 스프제조를 위한 원료소재 선정 및 배합비 결정

하수오를 주원료로한 당귀, 구기자, 벌꿀, 누에등의 원료소재를 선정하여 배합비를 결정하여 환제품을 3가지(관우환, 장비환, 유비환) 개발하였고 하수오 스프는 당근, 양파, 대파, 소맥분등을 선정, 관능검사 결과 가장 우수한 배합비를 결정하여 하수오 스프를 제조, 개발하여 목표를 달성하였음.

#### 라. 하수오를 이용한 액상차, 음료제품을 개발

액상차는 하수오 추출물에 한방추출물, 한방향, 꿀, 구연산등을 넣어 혼합, 살균하여 제조하였으며 하수오를 이용한 추출음료 제품의 concept은 자양강장 및 허약 체질 개선효과가 있는 하수오와 한방원료를 혼합하여 만든 중장년층 건강



음료로써 하수오 외에 구기자, 천궁, 두충, 당귀, 황기, 대추, 생강등을 배합하여 제조한 결과 우수한 하수오 추출음료가 제조되었다.

마. 하수오가 가진 항산화성 물질을 분리동정

하수오(*Cynanchum wilfordii* Hemsley) 추출물로부터 항산화 성분이 있는 생리 활성물질 정제 및 구조 분석을 통하여 하수오의 생리활성물질이 flavonoid의 형태로 서 C6-C3-C6의 dimeric 형태의 혼합물로 보이며 LC-MS분석결과 분자량은 480내외 인 것으로 나타났다.

바. 제조공정 확립

하수오 가공제품들은 제조공정을 확립하여 설계도를 작성하였으며 이 제품들중 현재 하수오환 가공제품을 영주농협에서 출시하여 판매하고 있다.

| 연구 개발 목표                      | 달성도   | 비고 |
|-------------------------------|-------|----|
| · 하수오 가공제품의 원료선정 및 제품 연구      | 100 % |    |
| · 개발제품의 가공공정 실험 및 적성 여부 검토    | 100 % |    |
| · 하수오 가공제품의 공장 시험을 위한 제조공정 확립 | 100 % |    |

사. 관련분야에 기여도

- 1) 하수오 가공제품의 개발로 하수오 원료농산물의 재배 증가와 부가가치의 증대로 농민의 소득증대가 기대되며 새로운 제품의 출시로 식품산업의 발전에 기여할 것이다.
- 2) 본 연구결과 개발된 하수오 가공제품은 상품화를 위하여 영주농협에 기술이전을 하여 하수오환 제품 3종이 출시되고 있다.



## 2. 하수오를 이용한 기능성 유산균 발효제품 개발

가. 하수오의 효과적인 발효를 위한 균주를 개발하기 위하여 인공위액 (pH 2.0)과 인공담즙액 (Oxgal 0.5% (w/v))에서의 내성을 평가하여 우수 균주를 선발하였고 다양한 배지 및 영양원 조건에서의 배양적성을 조사하여 최적화 하였으며 당 발효능과 16S rRNA 유전자 분석을 통하여 균주를 동정하였다. 이들 선발균주의 하수오 배지에서의 배양 적성을 평가하고 sucralose를 활용하여 발효제품의 기호도를 높일 수 있는 방안을 마련하였다. 또한 시제품에 대한 관능성을 평가하여 제품개발의 기초자료로 이용하였다. *Bifidobacterium*과 *Lactobacillus*등의 유산균 균주와의 혼합 배양은 발효도와 제품 품질 특징의 안정화를 위하여 발효 후 혼합하기로 하였다. 위의 결과들을 종합하여 시제품을 완성하였고 제품의 생산을 위한 lay-out을 작성하여 본 연구를 완성하였다.

| 연구 개발 목표                         | 달성도   | 비고 |
|----------------------------------|-------|----|
| · 하수오 발효용 유산균 선발 및 첨가배지의 배양적성    | 100 % |    |
| · 유산균 균주의 하수오에 대한 배양학적 특성 및 가공적성 | 100 % |    |
| · 발효균주 및 발효제품의 기호성 제고 및 품질 평가    | 100 % |    |

### 나. 관련분야에 기여도

최근 건강기능성 식품법이 발효되면서 기능성식품의 개발과 상품화에 대한 많은 연구들이 이루어지고 있으며 신규한 소재의 개발과 새로운 컨셉의 적용등이 필요한 시점이다. 본 연구결과는 한방소재로 알려져 있는 기존의 약재들을 발효의 기질로 편입시켜 새로운 형태의 발효 식품으로 개발할 수 있는 길을 제시하였다.

### 3. 하수오 및 하수오가공제품 항산화 효능 규명

가. 유효 분획 스크리닝을 위한 in vitro 실험모델을 이용해 하수오 추출물의 항산화효능을 규명

시험관내 실험을 통해 하수오 추출물의 전자공여능과 과산화지질 형성 억제능을 평가하고 세포수준에서의 항산화효소 활성과 단백질량, 그리고 DNA손상 억제능을 측정하였다.

나. In vivo model을 이용해 하수오 추출물의 항산화효능 및 안전성 규명

추출물 중 효과가 있었던 ethylacetate추출물과 가공식품으로 이용가능성이 높은 열수추출물을 쥐에게 경구투여하여 항산화능을 측정한 결과 뇌조직의 산화억제능과 안전성을 입증하였다.

다. 하수오 성분의 생체 내에서의 대장암 억제 효과 및 항산화능 평가

대장암을 유발시킨 쥐에게 하수오 열수추출물을 비피더스균으로 발효시킨 제품을 섭취시킨 결과 일반식이군에 비피더스균 첨가군과 고지방식이군에 하수오 추출물, 하수오발효를 첨가한 군에서 간조직의 지질과산화물 형성이 유의적으로 억제되었다. 또한 대장암 지표인 ACF는 추출물군에서 억제되어 하수오 열수추출물과 그 발효제품의 대장암 억제 가능성을 측정하였다.

라. 인체실험을 통한 하수오의 항산화효능 평가

건강한 성인여성의 하수오환 섭취로 인해 LDL 산화가 억제되었으므로 동맥경화 유발을 하수오가 감소시킬 수 있다는 가능성을 규명하였다.

마. 관련분야에 기여도

고부가가치를 지닌 기능성 식품을 개발하는데 필요한 기초자료를 제공하였으며 항산화능을 소유한 다른 식품소재 개발을 위한 실험모델을 제공하였다.

| 연구 개발 목표  | 달성도   | 비고 |
|---|-------|----|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>· 유효 분획 스크리닝을 위한 in vitro 실험모델을 이용해 하수오 추출물의 항산화 효능을 규명</li> </ul> | 100 % |    |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>· 동물모델을 이용한 하수오 추출물의 항산화 효능 및 안전성 연구</li> </ul>                    | 100 % |    |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>· 하수오 성분의 동물과 인체에서의 대장암 억제 효과와 항산화능 평가</li> </ul>                  | 100 % |    |

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

### 가. 활용분야

현재 농산물을 이용한 식품 가운데서 가장 발전하는 분야가 기능성 식품 부문이다. 본 연구에서는 하수오의 항산화 규명과 가공제품의 동물실험 및 인체실험을 통한 대장암 생성 억제능 측정과 항산화 효능규명으로 과학적 근거에 입각한 기능성식품의 개발이 가능하게 되었다.

또한 정장 능력을 갖는 균주와 생약재 신소재인 하수오를 이용한 정장 기능성 식품으로서 선도적인 위치를 확보하고, 또한 BIFIDUS균 제제와 유산균 제제 등의 생균 제제와 정장제, 동물 사료용 첨가제 등 의약 및 제약업으로의 활용 분야를 넓힐 수 있다.

### 나. 활용 방안

- 1) 본 연구에서 개발된 하수오가공제품을 상품화하여 판매하기 위하여 본 연구에 참여한 참여기업을 중심으로 제품을 생산하도록 하여 일반농가의 소득증대에 이바지 하고 고용 창출의 효과를 나타낼수 있도록 한다.
- 2) 하수오 가공제품은 국내뿐만 아니라 수출용으로 일본, 미국을 비롯한 유럽으로 우리의 식품을 알리고 외화획득을 위해 수출방안을 모색하고 또한 세계 식품전시회나 무역상담을 통해 상설전시회를 마련하여 수출의 다양화를 기할것이다.
- 3) 정장 능력을 갖는 균주와 생약재 신소재인 하수오를 이용한 정장 기능성 식품으로서 선도적인 위치를 확보하고, 또한 BIFIDUS균 제제와 유산균 제제 등의 생균 제제와 정장제, 동물 사료용 첨가제 등 의약 및 제약업으로의 활용 분야를 넓힐 수 있다.
- 4) 식물성소재로부터 항산화효능을 탐색하여 고부가가치를 지닌 기능성 식품을 개발하는데 필요한 기초자료를 제공하고 항산화능을 소유한 다른 식품소재 개발을 위한 실험모델을 제공한다.

다. 기업화 및 기술이전

본 개발 제품을 산업화하기 위하여 기술개발에 참여한 참여기업을 중심으로 양산화하고 이를 위하여 기술이전을 추진한다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보

1. 미국의 경우 NIH에서 국립 보완대체의학센터 (NCCAM)에 대한 예산이 지난 수년 (2001년 8910만 달러)사이 에 엄청나게 증가하였다. NCCAM에서는 다양한 생약원료에 대한 의학적 연구가 진행되고 있다. 이들을 이용한 보완요법을 포함한 생약의학에 대하여 다각도의 임상시험을 지원하고 있다. NIH의 보조식품 사무국 또한 전 미국의 식물학 연구센터의 학술연구소에 연구자금을 지원하고 있어 콩, 레드클로버, 블랙 코호쉬, 생강, 터메릭, 포도 폴리페놀, 녹차 등을 포함한 여러 생약들이 평가되고 있다. 그리고 생약 제조자들도 경험이 풍부한 미국의 임상 연구자들이 잘 고안된 무작위 대조 시험을 시행할 수 있도록 연구 기금을 지원하기 시작하였다. 이러한 경향은 미국 뿐 아니라 유럽, 일본 등 선진국에서 진행되고 있는 것이다.

2. 본 연구에서는 생리활성 물질의 항산화기능을 평가하기 위하여 다양한 시험 방법을 연구조사 하였고 본 실험에서 사용된 시험법 이외에 다음과 같은 과학 기술 정보를 수집하였다.

### ◆ Biomarkers of lipid oxidation

- Breath hydrocarbon: (n-6)지방산의 peroxidation에 의해 생성된 pentane 과 (n-3)지방산의 peroxidation에 의해 생성된 ethane을 측정함.
- F<sub>2</sub> isoprostane: arachidonic acid의 산소라디칼에 의한 peroxidation에 의해 생성된 것으로 순화되어 free형태로 소변으로 배출됨. 이 중 8-isoprostaglandin F<sub>2α</sub>이 산화손상의 지표로 가장 많이 사용됨.
- Ferrous xylenol orange(FOX) assay:  
Oxygen radical absorbance capacity(ORAC): 혈장의 산소라디칼 소거능을 측정함.

### ◆ Biomarker of DNA oxidation



- 8-OHdG : guanine의 C8이 산화되어 G가 T로 전환되는 것을 측정함.
- Autoantibodies to oxidized DNA : thymidine oxidation을 측정하는 것으로 5-hydroxymethyl-2'-deoxyuridine (HMdU)을 인식하는 혈청 autoantibodies를 측정함.

◆Protein oxidation

- Protein carbonyls: Alzheimer's disease, Parkinson's disease와 같은 질병과 관련됨.

## 제 7 장   참고문헌

1. 지형인, 이상인(편저), 대한약전외 한약(생약) 규격집 주해서, 한국메디칼인텍스사, p. 397
2. Huang KC, The pharmacology of Chinese herbs. CRC Press, pp. 101-103, 1993
3. Hamilton-Miller, J. 2000. Probiotics strain for credibility. Lancet 355:413-414.
4. Rial RD. 2000. The role of probiotics cultures in the control of gastrointestinal health. J Nutr 130:396-402.
5. Tannok GW. 1997. Probiotic properties of lactic-acid bacteria: Plenty of scope for fundamental R&D. TIBTECH 15:270-274.
6. Brassat D, Schiffrin EJ. 1997. The use of probiotics in reinforced mucosal defence mechanism. Trends Food Sci Technol 8:321-326.
7. Campieri M, Gionchetti P. 1999. Probiotics in inflammatory bowel disease: New insight to pathogenesis or a possible therapeutic alternative? Gastroenterology 116: 1246-1249.
8. Marteu P, Pochart P, Bouhnik Y, Goderel I, Bourlioux P, Rambaud JC. 1992. Effect of chronic ingestion of fermented dairy product containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* on metabolic activities on the colonic flora in humans. Am J Clin Nutr 52:685-688.
9. Fuller, R. 1989. A review: Probiotics in man and animals. J Appl

Bacteriol. 66:365-378.

10. Metchnikoff, Prolongation of Life, G.P. Putnams Sons, New York, N.Y. (1970)

11. Jose M Saavedra: Clinical applications of probiotic agents. Am J Clin Nutr., 73(Suppl), 1147s(2001).

12. Prasad, J., Gill, H., Smart, J., & Gopal, P.K.(1998) Selection and characterization of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* stains for use as probiotics. International Dairy Journal, 8, 993-1002.

13. Dunne, C., Murphy, L., Flyin, S., O Mahony, L., O Halloran, S., Feeney, M., Morrissey, E., Thorton, G., Fitzgerald, G., Daly, C., et al.(1999) Probiotics: From myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. Antoine van Leeuwenhoek, 76, 279-292.

14. Namba, T., The Encyclopedia of Wakan-Yaku with Color Pictures, Vol. 1. Hoikusha, Osakand 93, p.77

15. Han, D.S., *Korean Journal of Pharmacognosy*, 1973, 4, 83. Food Code. 2000.

16. Yeo, H.S., Kim J.W., A benzoquinone from *Cynanchum wilfordii*. Phytochemistry, Vol.46, No.6, pp.1103-1105, 1997

17. Mano Y., Nabessima S., Matsui C. and Ohkawa H. (1986) Production of Tropane alkaloids by hairy root cultures of *Scopolia japonica*. *Agric. Biol. Chem.*, 50(11):2515-2722.

18. Brassat D, Schiffrin EJ. 1997. The use of probiotics in reinforced mucosal defence mechanism. Trends Food Sci Technol 8:321-326.
19. Heller K.J., Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. Am J Clin Nutr. 73,374s(2001)
20. 강부현, 손화영, 하창수, 이현숙, 송시환. 1995. Sprague-Dawley 랫드의 혈액학 · 혈액생화학치의 자료분석. 한국실험동물학회지 11:141-145
21. Burkit MJ.(2001) A critical overview of the chemistry of copper-dependent low density lipoprotein oxidation: Role of lipid hydroperoxides,  $\alpha$ -tocopherol, thiols, and ceruloplasmin. Archives of Biochem. Biophys 394:117-135
22. Fremont L, Marie T.G., Marie P.F. and Linard A., 1998. Dietary flavonoids reduce lipid peroxidation in rats fed polyunsaturated or monounsaturated fat diets. J. Nutr.,128:1495-1502
23. Huang SS, Yeh SF, Hong CY. 1995. Effect of anthraquinone derivatives on lipid peroxidation in rat heart mitochondria: structure-activity relationship. Nat Prod 58:1365-71
24. Hagiwara A, Imai N, Ichihara T. Sano M, Tamano S, Aoki H, Yasuhara T, Koda T, Namamura M, Shirai T. 2003. Food and Chemical Toxicology 41:1157-1164
25. Hargrove RL, Etherton TD, Pearson TA, Harrison EH, Kris-Etherton PM.(2001) Low fat and high monounsaturated fat diets decreases human low density lipoprotein oxidative susceptibility in vitro. J Nutr 131:1758-1763
26. Jaspers,D.A., MasseyL.K., and Lloyd, O.L., 1984. Effect of consuming

yogurts prepared with three culture strains on human serum lipoproteins. J. Food Sci., 49 :1178-1181

27. Jacobson JS, Begg MD, Wang LW, Wang Q, Agarwal M, Norkus E, Singh VN, Young TL, Yang D, Regina MS. (2000) Effects of a 6-month vitamin intervention on DNA damage in heavy smokers. Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention 9:1303-1311

28. Kanki K, Nishikawa A, Fumio F, Yasuki K, Imazawa T, Umemura T, Hirose M. 2003. A 13-week subchronic toxicity of paprika color in F344 rats.(in press)

29. Kleinvelde, H.A., Heidi, L.M., Anton, F.H.S., and Pierre, N.M.D, 1992. Improved measurement of low-density-lipoprotein susceptibility to copper-induced oxidation :Application of a short procedure for isolating low-density lipoprotein. Clin. Chem., 38:2066-2072

30. Lu SC, Wu WH, Lee CA, Chou HF, Lee HR, Huang PC. (2000) LDL of Taiwanese vegetarians are less oxidizable than those of omnivores. J Nutr 130: 1591-1596

31. Mates JM. (2000) Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. Toxicology 153: 83-104

32. Muller P, Loft S.(2002) Oxidative DNA damage in human white blood cells in dietary antioxidant intervention studies. Am J Clin Nutr 76:303-310

33. Palmeiro NMS, Aleida CE, Ghedini PC, Goulart LS, Pereira MCF, Hurber S, da Silva JEP, Lopes S. 2003. Oral subchronic of aqueous crude extract of *Plantago australis* leaves. J Ethnopharmacology (in press)

34. Riso P, Pinder A, Santagelo A, Porrini M.(1999) Dose tomato consumption effectively increase the resistance of lymphocyte DNA to oxidative damage? *Am J Clin Nutr* 69:712-8
35. Scheibler P. 1997 Effects of aloin and some structure-related anthracene, anthracenone-containing extract of *polygonum multiflorum ex vivo*. *Pharmazie* 52:411-2
36. Woods J.A., Bilton R.F., and Young A.J., 1999. Beta-carotene enhances hydrogen peroxide-induced DNA damage in human hepatocellular HepG2 cells. *FEBS Lett.*, 449:255-258
37. Yim H, Lee YH, Lee CH, Lee SK. 1999. Emodin, an anthraquinone derivative isolated from the rhizomes of *Rheum palatum*, selectively inhibits the activity of casein kinase II as a competitive inhibitor. *Planta Med* 65:9-13
38. Zhang H, Wanwimolruk S, Covile PF, Scholfield JC, Haines SR, Suttie JM.2000. Toxicological evaluation of New Zealand deer velvet powder. Part I:acute and subchronic oral toxicity studies in rats.38:985-990