제주특산 흑오미자 재배 및 대량증식기술과 특수성분 및 천연음료개발

Development of natural beverage and a special components and, methods of mass production and cultivation technique of Schisandra nigra as special-product of Cheju

주관연구기관	임업연구원
연구책임자	이갑연
발행년월	1999-10
주관부처	농림부
사업관리기관	농림부
NDSL URL	http://www.ndsl.kr/ndsl/search/detail/report/reportSearchResultDetail.do?cn=TRKO201100002403
IP/ID	14.49.138.138
이용시간	2017/11/03 09:34:20

최 종
연구보고서

제주특산 흑오미자 재배 및 대량증식기술과 특수성분 및 천연음료개발

Development of natural beverage and a special components and, methods of mass production and cultivation technique of *Schisandra nigra* as special-product of Cheju

산림청 임업연구원 제주임업시험장

농 림 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 "제주특산 흑오미자 재배 및 대량증식기술과 특수성분 및 천연음료개발"의 최종보고서로 제출합니다.

1999. 10. .

주관연구기관명 : 임업연구원
총괄연구책임자 : 이 갑 연
연 구 원 : 김 찬 수
연 구 원 : 강 영 제
연 구 원 : 이 임 균
연 구 원 : 정 은 주
협동연구기관명 : 순천대학교
협동연구책임자 : 정 재 성
협동연구책임자 : 신 수 철
협동연구책임자 : 김 학 진

요 약 문

Ⅰ. 제 목

제주특산 흑오미자 재배 및 대량증식기술과 특수성분 및 천연음료개발

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 중요성

흑오미자는 오미자과에 속하는 낙엽활엽덩굴식물로서 우리나라에서는 제주도에만 자생하는 특산 수종이다. 흑오미자의 열매는 식용으로 주로 이용되고 있으나 열매의 약용효과 및 식용가치가 인정되고 지역 특산화에 따른 관광상품으로 가치가 있어 자생지의 산촌주민들에 의한 무분별한 남획으로 자생지가 급격히 파괴되고 있는 실정이다. 따라서 흑오미자의 유전자원을 보존하고 농산촌 주민의 소득증대 및 경제성 있는 재배작목으로서 발굴 보급하기 위하여 무엇보다 먼저 다양한 흑오미자 유전자원을 탐색 및 보존하는 일이 선행되어야 할 것이며, 그와 함께 다양한 용도 개발과 더불어 그에 알맞은 주요형질에 대한 신품종 육성이 이루어져야 할 것이다.

본 연구의 기술적측면의 필요성은 1) 열매의 다결실 및 대립형질의 우량개체의 선발에 의한 품종육성 2) 육성된 품종들의 재배방법의 개발과, 3) DNA에 기초를 둔 분자적 방법을 이용하여 정확한 종간 또는 품종간 동정, 4) 독특한 생물활성물질의 탐색, 5) 우리나라 국민의 독특한 기호성을 충족하는 전통음료의 개발, 6) 가공품개발 및 수출상품으로서 개발이 시급한 실정이다. 경제 산업적 측면으로 흑오미자는 우리나라 뿐만 아니라 일본 중국 등에서도 이용되고 있으나 흑오미자의 생산지는 국한되어 있어 이 식물의 재배지를 확대시킴으로서 농가의 소득향상에도 기여하게 될 것이다.

또한 사회·문화적 측면으로 국민들에게 기능성 또는 건강보조식품으로서자생식물을 이용한 가공품의 생산으로 소비자의 기호성을 충족시켜 국민의 식문화 향상과 약리작용으로 국민건강에 기여할 수 있고, 고유 천연음료로 수출상품으로 개발한다면 위축된 농민의식의 고양에도 기여할 수 있을 것이다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 흑오미자의 재배기술 및 품종개발, 품종동정, 음료개발 및 특수성분을 구명하고자 하였다.

1. 재배기술 및 품종개발분야

재배기술 및 품종개발분야에서는 흑오미자 자생지 식물군집 구조분석 및 우량개체 선발을 위하여 자생지 입지환경, 식생을 조사하여 구조 분석하여 흑오미자의 자생 환경요인을 구명하였으며, 흑오미자 형태적 특성(잎의 형태, 기공, 목부해부학적 관찰, 선발개체의 열매특성), 생리적 특성(지역간 개화결실, 잎의 엽록소 함량), 동위효소분석에 의한 집단간 유전변이를 조사하여 다결실 및 대립형질의 품종을 선발 육성하고, 종자, 삽목, 접목 및 조직배양을 통한 대량증식기술을 개발하고, 증식된 개체들 파골라를 이용한 재배법을 개발하고자 하였다.

2. RAPD에 의한 품종탐색

본 연구는 RAPD 분석을 통해 궁극적으로, 흑오미자의 우량품종을 손쉽고 정확하게 동정할 수 있는 genetic marker를 개발하고자 하였다. 이를 위해 다음과 같은 실험순서에 의해 연구를 진행하였다.

첫째, 식물에서 DNA의 분리시에는 식물의 종류, 잎의 성숙정도 등에 따라 얻어지는 DNA의 순도 및 yield의 차이가 PCR의 결과에 큰 영향을 주기 때문에, 먼저 흑오미자의 잎으로부터 genomic DNA를 추출하는 방법을 확립하였다.

둘째, PCR은 template DNA, Mg^{2+}, *Taq* DNA polymerase, dNTP의 농도, annealing 온도 및 cycle의 수에 따라 band pattern에 차이가 있기 때문에 RAPD를 위한 최적의 조건을 확립하여 재현성을 검증하였다.

셋째, 식물체의 조직배양은 종에 따라 사용되는 생장조절물질의 양에 차이가 있기 때문에 오미자의 조직배양을 위한 배양기술을 확립하기 위해 동아로부터 Callus

및 식물체 재분화가 가능한 배양조건을 확립하였다.

넷째, 흑오미자의 품종특이적 marker를 선발하여 이들 marker의 유용성을 검토하였고, 특이적인 marker들을 cloning하여 품종 동정 kit로의 제조가능성을 탐색하였다.

3. 성분분석 분야

오미자와 흑오미자 열매를 대상으로 열매 및 줄기에 내생하는 일반성분 및 생물활성성분의 검색, 두 종의 열매의 건조물과 비건조물의 일반성분 및 생물활성성분을 정량적으로 비교검토하고, 음료로 개발된 상품에 대한 성분분석하여 맛에 관여하는 유기산, 유리당, 유리아미노산을, 오미자의 향과 우릴 때의 향에 관여하는 citral을 중심으로 하는 정유성분을, 건조 및 저장 중 갈변에 관여하는 total phenol과 phenolic acid를, 저장이나 우릴 때 악취(산패취)에 관여한다고 인정되는 지질과 유리지방산을, 주된 약리성분으로 보고되어 있는 lignan 화합물인 schizandrin, 정유성분 등의 오미자 및 흑오미자에 함유된 성분 및 기능성 물질 탐색에 대한 종합적인 연구를 수행하였다.

4. 천연음료 개발분야

천연음료로서 흑오미자를 이용하기위해 신상품개발을 위하여 원료의 종류별, 생원료의 종류별로 시험제품을 생산하는 기술과 생산성향상기술을 개발하고, 추출용매에 따른 추출물의 수율과 맛성분과 관련 성분의 분석을 하였고, 제품의 기호성(색, 맛)의 연구 및 기호성이 조화된 제품을 개발하고, 제품의 저장을 개선하기 위한 연구를 수행하였다.

Ⅳ. 연구 개발 결과 및 활용에 대한 건의

A. 연구개발결과

1. 재배기술 및 품종개발분야

예로부터 약용, 식용으로 가치가 인정된 흑오미자를 무분별한 채취에 의한 자생지의 보존과 농산촌의 소득작목으로 개발하기 위하여 연구를 실행한 결과 흑오미자의 자생지는 해발고 600 1,350m 범위 내에 주로 북향, 북서향 및 남서향을 중심으로 비교적 습도가 많고 35。이하의 완만한 경사를 갖는 산록부에 위치하고 있다. 소나무, 졸참나무, 때죽나무등이 우점하고 있는 낙엽활엽수림대의 2차림에 분포하며, 400㎡당 3 39본이 출연하였다. 연평균 강우량은 약 3,000 3,094 mm 정도였으며, 연평균 기온은 8.8 10.5℃ 이지만 해발 상승에 따라 0.6℃씩 감소하므로 흑오미자의 최저 극한기온은 1,300m지점을 기준으로 할 때 -7℃이하로 내려가지 않아야 생육이 가능하리라고 생각한다. 열매형질이 우수한 개체를 50본 선발하였다. 흑오미자는 5월부터 개화하기 시작하여 6월에 대부분 개화한다. 수꽃은 암꽃에 비하여 수가 많으며, 자웅동주에서도 1:6.3으로 수꽃의 비율이 높다. 화서당 개화수는 19.2 19.8개이다. 본당 착과량은 최고 106.2개로 결실하였으며, 송이당 착과수는 집단간 9.3 11.1개로 큰 차이가 없었다. 과실중량은 0.99g, ℓ당 과실수는 722 795개였다. 증식법 개발을 위하여 삽목, 접목 및 조직배양을 실시한 결과 IBA 500ppm에서 80%가 발근하였으며, 접목 활착율은 63 92%로 클론간 차이는 있었으나 양호하였다. 동아를 이용하여 조직배양한 결과 WPM 배지에 BAP와 GA_3를 각각 1.0㎎/ℓ처리하여 줄기를 유도할 수 있었으며, BAP 3.0㎎/ℓ를 첨가하였을 때 평균 3개의 다경줄기를 유도할 수 있었다. 신품종육성을 위하여 종자를 채취하여 전처리 및 변온저장을 통하여 발아율을 높일 수 있었다. 증식된 품종은 조기개화결실을 유도하고, 관리상 경제적 효율을 위하여 파골라를 이용하여 재배하고 있으며, 지역에

따른 적응성을 검증하기 위해 충청지방에 식재하여 시험재배중에 있으며, 시범 농가에 200본을 보급하여 파골라를 이용한 재배중에 있다. 우수한 품종의 선발하여 인공적인 증식법을 이용하면 자생지의 훼손을 막을 수 있으며, 농가에 새로운 소득 작목으로 보급할 수 있을 것으로 생각된다. 또 조직배양법이 이용되면 생물반응기 등 첨단방법을 통하여 대량증식이 가능해지며, 새로운 품종개발을 위한 생물공학적 방법을 적용할 수 있을 것으로 기대된다.

2. RAPD에 의한 품종탐색분야

식물체로부터 genomic DNA를 분리하는 방법은 일반적으로 많이 사용되고 있는 Roggers와 Bendish 등의 방법 (1988), Dellaporta의 방법 (1983)과 비교하였을 때 genomic DNA의 추출양이 많았고, 또한 어린 싹에서 뿐만 아니라 성숙한 잎에서도 DNA의 추출이 용이하였다. 따라서 이 방법은 엽육조직이 두꺼운 목본 식물의 성엽에 적용 가능하리라 생각된다.

제주도에 자생하는 흑오미자는 대부분 암그루와 수그루이며, 자웅동주 세 개체가 존재함이 확인되었다. RAPD와 southern hybridization를 통해 최종적으로 얻어진 marker로는 OPA-17 primer에 의한 수그루 특이적인 770 bp, OPB-03 primer에 의해 생성되는 암그루 특이적인 749 bp, 자웅동주에 특이적인 OPB-9의 609 bp, OPF-16의 1,100 bp, 자웅동주인 흑오미자 51번에 특이적인 OPA-17의 580 bp를 얻었다. 이 marker들의 염기서열을 결정한 후, 품종 동정으로의 활용을 위해 primer를 제조하였다. 이 primer들을 이용하여 수그루, 암그루, 자웅동주를 동정해 낼 수 있었다. 이는 흑오미자의 유묘시기 조기에 이들을 구별할 수 있을 뿐만 아니라 우량형질의 genetic marker로 사용할 수 있을 것이다. 특히 수그루와 암그루에 특이적인 marker들이 식물의 성분화에 관련되어 있을 것으로 생각되어, 식물에서 성의 진화 메카니즘을 밝히는데 큰 기여를 하게 될 것으로 기대된다. 또한 이 유전자들의 생산성과 관련여부를 확인하고, 식물로의 형질전환에 대한 연구를 하게 된다면 생산성 향상에 기여할 뿐만 아니라, 타 작물에도 적용할 수 있어 육종학의 발달에 큰 기여를 할 수 있으리라 사료된다.

3. 성분분석분야

오미자와 흑오미자의열매에 함유된 일반성분 및 생물활성물질을 분석한 결과느 다음과 같다.

오미자와 흑오미자에 함유된 유리당의 종류는 비슷하였으나, 오미자의 경우에는 sucrose의 함량 1.13%로 0.02%인 흑오미자에 비해 상당히 많았고, 흑오미자의 경우에는 fructose와 glucose의 함량이 3.71%, 2.51%로 1.83%, 1.05%인 오미자보다 월등히 높았다.

오미자, 흑오미자 모두 malic acid의 함량이 47,684 ppm, 38,691 ppm으로 가장 높았고, 그 다음이 citric acid로서 11,939 ppm, 3,330 ppm 이였다. 흑오미자의 경우에는 malonic acid와 maleic acid의 함량이 각각 2.8 ppm, 2.3 ppm으로서 0.3 ppm, trace인 오미자 보다 높게 나타났다.

오미자의 총유리아미노산 함량은 722 mg% 였고 총구성아미노산은 7,577 mg%였으며, 흑오미자의 경우는 각각 202 mg%, 5,596 mg%로 오미자에 아미노산 함량이 더 높았으나 lysine만은 흑오미자에서 300 mg%으로 오미자의 288 mg%보다 높게 나타났다. 두종의 식물체에 주로 함유되어 있는 아미노산은 glutamic acid, aspartic acid, threonine, valine 그리고 Leucine이었다.

총페놀함량은 오미자의 경우는 1.275%, 흑오미자의 경우는 1.560%로 흑오미자의 함량이 더 높았다. 오미자, 흑오미자에 가장 많이 함유되어 있는 페놀화합물은 chlorogenic acid로 각각 1,276 ppm, 802 ppm였으며, gentisic acid의 경우는 오미자에 69 ppm, 흑오미자에는 136 ppm으로 흑오미자에서 높게 나타났고 ferulic acid는 오미자에 187 ppm, 흑오미자에 23 ppm으로 오미자에서 더 높게 나타났다. 그외 존재하는 페놀화합물로는 cinnamic acid, caffeic acid, coumalic acid 등이었다.

총지질함량은 오미자의 145 mg/g보다 흑오미자에서 160 mg/g으로 더 높았으며 주로 중성지질이었다. 구성지방산 중 불포화지방산은 오미자, 흑오미자 모두

linoleic acid가 21,765 ppm, 45,584 ppm으로 가장 많이 함유되어 있었고, 포화지방산으로는 palmitic acid가 3,974 ppm, 10,872 ppm으로 가장 많이 함유되어 있었다. 그외 다량 함유되어 있는 지방산은 포화지방산인 capric acid 였다.

오미자, 흑오미자의 정유성분의 종류는 오미자에서 훨씬 다양한 성분이 검출되었으며, 특히 오미자에서는 비점이 낮은 정유성분이 상당수 검출되었다. 주로 함유되어 있는 성분으로는 오미자에는 α-ylangene, α,β-elemene, β-himachalene, γ-selinene 그리고 widdrene 등의 성분이 주로 발견되었으며, 흑오미자에서는 caryophyllene, calarene, cubebene, acoradiene 그리고 β-himachalene 등의 성분이 발견되어 오미자와 흑오미자의 정유성분 조성에는 차이가 있었다.

총안토시안색소의 함량은 오미자는 86.54mg%였으며, 흑오미자는 138.75mg%로 흑오미자의 함량이 오미자의 거의 2배 수준이었다. 오미자에 함유된 색소는 peonidin-3-monoglucoside와 peonidin-3,5-diglucoside으로 추측되며, 흑오미자의 안토시안색소는 delphinidin-3-monoglucoside와 malvidin-3- monoglucoside으로 추측된다.

오미자에는 schizandrin이 0.11%/100g(건중) 함유되어 있었으며, 흑오미자에도 대단히 유사한 물질이 함유되어 있었으며 그 함량은 0.13%/100g(건중)였다.

4. 천연음료개발분야

흑오미자를 원료로 하여 천연음료를 제조하는데 원료의 가공 특성 조사 검토하기 위하여 제주도 특산 흑오미자와 한국산 생오미자, 건조오미자, 중국산 건조오미자. 흑오미자 건조된 줄기를 원료로 제품의 가공 적성을 조사하였다.

가공 적성의 가장 중요한 기준으로 적색도(적색색소)를 이용하였는데 왜냐하면 맛성분(신맛, 단맛)과 함량은 조정이 가능하나 색소는 문제가 있으며 색소가 중요한 음료이기 때문이다. 수율, 적색도, 신맛, 단맛 등 가공 특성은 흑오미자가 가장 좋았다. 추출조건으로 80℃에서 4시간 또는 60℃에서 6시간 추출 방법이 좋

았으며 적색도는 흑오미자가 한국산 오미자 5 6배, 중국산 오미자 보다는 그 이상 수율이 높았다. 신맛은 흑오미자가 적었고 단맛은 비슷하였다. 신맛과 pH는 한국산 오미자나 중국산 오미자보다 적은 함량, 그리고 높게 나타났으나 색소의 변화에 영향을 미치지 않을 정도의 충분한 함량을 함유하였다. 흑오미자 나무줄기를 원료로 하여 즙액을 추출하여 음료제조에 이용할 수 있는 양의 색소를 함유하고 있다.

각 원료별, 특히 흑오미자 추출액의 음료 제조중 저장성을 조사하여 추출액 원료특성을 조사 검토하였다. 원료로서 추출액의 저장성을 조사한 결과 냉장온도 4℃ 내외에서 7주동안 저장하는 동안 색도, 투명도, 산도, 당도, 그리고 변색의 영향 없이 안정한 상태의 결과를 나타내었다

음료제품을 제조하여 제품음료를 21주간 저장하면서 상품성의 영향 요소들을 조사하였다. 포장방법은 광선을 차단하는 포장법으로 알루미늄팩을 이용하는 방법을 선택하였다. 흑오미자나 오미자의 적색의 퇴색이나 적갈색으로 변색이 광선의 영향으로 나타나기 때문이다. 알루미늄팩포장제품은 저온 진탕 살균방법으로 냉장 저장하면 저장성이 좋아 20주이상(약 5개월) 충분한 유통기간을 확보할 수 있는 결과를 나타내었다. 특히 퇴색과 변색의 방지를 위하여 항산화제 (isoascorbic acid)를 사용하여 조사한 결과는 20주 저장 기간동안 첨가하지 않은 제품과 비슷하게 안정한 상태를 보였다. 흑오미자의 추출액과 오미자 추출액을 적당한 비율로 배합하면 색도 뿐만아니라 맛과 향의 가공적성을 상승시킬수 있는 재료로서도 좋은 것으로 나타났다.

B. 연구개발결과활용에 대한 건의

지금까지 야생상태인 제주 특산인 흑오미자의 우수성을 확인하고, 우량품종을 육성하였으며, 재배기술 및 대량증식 방법을 개발하므로서 농산촌의 새로운 소득작목으로서 활용이 가능하도록 하였다. 따라서 본 과제에서 새롭게 육성된 경제성이 높은 것으로 판단되는

신품종에 대히서는 지속적으로 증식하고 대량보급 체계 및 종묘 생산원을 조성하여 생산현장에 조속히 보급할 수 있도록 해야할 것으로 판단된다. 또한 우량 품종의 증식기술은 다양한 매체를 통하여 확산시켜 재배농가가 자체적으로 기술을 활용할 수 있도록 하는 것이 효율적이라고 판단된다.

RAPD법에 의한 품종탐색의 연구결과는 흑오미자의 유묘시기 조기에 이들을 구별할 수 있을 뿐만 아니라 우량형질의 genetic marker로 사용할 수 있을 것이다. 특히 수그루와 암그루에 특이적인 marker들이 식물의 성분화에 관련되어 있을 것으로 생각되어, 식물에서 성의 진화 메카니즘을 밝히는데 큰 기여를 하게 될 것으로 기대된다. 또한 이 유전자들의 생산성과 관련여부를 확인하고, 식물로의 형질전환에 대한 연구를 하게 된다면 생산성 향상에 기여할 뿐만 아니라, 타 작물에도 적용할 수 있어 육종학의 발달에 기여를 할 수 있으리라 판단된다.

흑오미자 천연음료를 제품화 할수 있는 모든 조건을 검토하였으므로 제품 생산에 있어 가장 효율적인 방법을 선택적으로 이용할 수 있고, 흑오미자 천연음료의 상품성 개선을 위하여 추출 즙액을 활용할 수 있으며, 천연과즙음료의 생산에 가공특성, 제품의 상품성 개선에 필요한 요인들의 조사검토에 활용할 수 있다고 생각된다.

오미자·흑오미자에 대한 화학적인 자료가 검토되어 있으므로, 현재 제품화되어 있거나 신제품을 개발하려는 산업체에 화학적인 자료로 제공되어 개발된 제품에 대해서는 보완을 그리고 신제품을 개발하려는 산업체에는 올바른 가공공정을 수립 가능하게 하여, 국제경쟁력이 강한 새로운 제품개발에 기여할 수 있을 것이며, 또, 이들 식물을 이용한 약재, 다류, 소프트 드링크, 쥬우스, 농축엑기스 등의 제품에 대한 국민들의 올바른 인식확립을 위한 기초자료로 사용될 수 있으리라 기대된다.

<학술기여>

이상의 연구결과는 7건의 학회투고 및 발표를 하였다.

① RAPD를 이용한 흑오미자의 자웅동주 및 자웅이주 식물의 유용 marker의 선발(한국 식물조직배양학회지 25(4) 1998.12.)

② 흑오미자 천연음료 제품을 위한 연구(한국자원식물학회지 12(1) 1998.12.)

③ 오미자와 흑오미자의 색소성분분석 (한국자원식물학회지 12(1) 1998.12.)

④ 제주산 흑오미자의 기내 다경줄기 유도 (한국임학회 하계학술발표회 1999. 6.)

⑤ Sex specific marker of *Schisandra nigra* (생물과학협회 추계학술대회 1999. 10.)

⑥ 오미자 · 흑오미자의 성분분석 (한국식물자원학회지 투고중 1999.12.)

⑦ 오미자 · 흑오미자의 생리활성물질 검색(한국농화학회지 투고중 2000. 3.)

이와 관련하여 3편의 학위논문을 발표하였다.

① 흑오미자(Schisandra nigra Max.)의 생리생태, 번식 및 유전변이에 관한 연구 (강원대학교 임학과 박사학위논문 1998. 2.)

② 흑오미자의 성특이적 DNA marker 개발 (순천대학교 생물학과 박사학위논문 2000, 8. 예정)

③ 흑오미자 천연음료 가공적성연구(순천대학교 식품공학과 석사학위논문 1999. 2.)

SUMMARY

1. *Schisandra nigra* is a special use species used as a medical and edible fruit. In addition, it is an endemic species which has a unique habitat at the altitude of 600 1,400m in Cheju island. At present, *Schisandra nigra* is confronted with a crisis due to a sudden increase of demand and imprudent destruction of a rare species. Thus, this study was conducted to find 1)multiplication method and genetic variation, 2)ecophysiological characteristics of the natural habitat of *Schisandra nigra* and 3)detection and preservation of genetic resources and upbringing for a superior description.

1.1. *S. nigra* scatteringly grow at 750 1,200m in the western part, at 600 1,100m in the northern part and at 650 1,400m in the southern part. The geographical distribution of *S. nigra* is the secondary forest of broad leaved trees that are mainly composed of *Piuus densiflora*, *Quercus serrata*, *Styrax japonica*, *Lindera erythrocarpa* and *Carpinus laxiflora*. The density of a main distribution sector of *S. nigra* appears in the range of 3 39 individuals in each 20×20m plot.

1.2. It was investigated that morphological characteristics on xylem fibers, vessel elements, stomata, and a leaf character of *S. nigra*, *S. chinensis*, *Kadsura japonica*. The results of morphological characteristics were significant at 5% levels within the species and within the individuals as a male, a female and monecious.

1.3. Blooming and fruition of the natural habitat of *S. nigra* were significant

by a region. The most superior region was Youngsil in the western part and Kwaneumsa in the northern part. However, Sanghyo in the southern part was lower than the other regions in the survival rates of a female flower and a quantity of a attached fruit. Fruit charcteristics of selected *S. nigra* individuals were averaging at 1.1cm in length, and 741 per liter and 10.3 per cluster in the number of fruits.

1.4. In seed production, the seed germination of the cold moist stratification treatment and the storage in the open ground treatment was the highest in the secondary year(over 93%). In the seed storage and storage pretreatment, the seed current-year germination rate was the highest in the treatment stored at the cold and moist place for 4 mon손 after immersed in GA_3 1,000ppm solution during 12 hours.

In cutting reproduction, IBA 500ppm treatment(rooting rate over 80%) showed the higher rate than the other treatments, and the rooting rate by the cutting period was the highest in July(juvenile cutting).

In a grafting reproduction of selected individuals, it indicated a slight difference among individuals, but percents of the graft union was averaging at over 83%.

To propagate the selected individuals by tissue culture, the winter buds were used as a material. Because they were grown in the field, the materials were contaminated after the culture in spite of the surface sterilization. Bus from the two-years-old twigs showed good growth. WPM medium was better than MS and GA_3 was very effective to differentiate shoots from the buds.

1.5. The distribution and frequency of allele to 4 isozymes among 3 populations of *Schisandra nigra* natural habitat showed a polymorphism in *Idh*, *Mdh*-2, *Mnr*, and *Pgi*-2 among 6 loci, except *Mdh*-1, *Pgi*-1. All allele(*Idh*, *Mdh*-2, *Pgi*-1, *Mdh*-1, and *Mnr*) except *Pgi*-2, also showed the highest main allele.

2. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) analysis and southern hybridization were conducted to *S. nigra* plants in order to select the specific markers for monoecious and dioecious individuals. RAPD results using one hundred eighty random 10-mer primers revealed that *S. nigra* had a different banding patern from *S. chinensis* and *Kadsura japonica*. When DNA isolated from leaves of monoecious and dioecious plants were used as PCR template, only six primers, OPA-17, OPA-19, OPB-03, OPB-09, OPB-16 and OPF-16, showed polymorphic band patterns. No variation in banding profiles within male or female individuals was observed when these six primers were used whereas three monoecious plants(No 6, No 41, No 51) showed different banding patterns one another.

2.1 One primer, OPA-17, yielded DNA fragment of 770 bp, which was detected in male plants but not in any of the female plants tested. By contrast, a 749 bp DNA fragment was amplified in female plants by primer OPB-03, which did not amplified with male DNA samples. We also found three DNA fragments, 609 bp, 1115 bp and 580 bp, which were detected in monoecious but not in male and female plants with primers OPB-09, OPF-16, OPB-03, respectively.

2.2. To verify the specificity of isolated RAPD markers, southern blot hybridization was performed with male, female and monoecious plants DNA. Potential sex-specific RAPD products were isolated from agarose gel and cloned into the pGEM-T Easy vector. Cloned fragments were digested with *Eco*RI and used as probes in southern hybridization analysis of genomic DNA.

2.3. DNAs isolated from male and female plants were separately digested with *Eco*RI, *Bam*HI and *Hin*dIII. When the male and female DNAs were allowed to hybridize with theses probes, the 770 bp male probe yielded some bands specific to male plants whereas the 749 bp female probe resulted in single band only for DNA samples from female plants. The 609 bp of monoecious probe hybridized specifically with DNA from three monoecious plants (6, 41, 51), whereas 1,115 bp probe hybridized specifically with DNA from two monoecious plants (41, 51). The 530 bp of monoecious probe hybridized specifically with only one monoecious plant DNA (51). Three monoecious-specific probes did not hybridized with male and female DNA.

2.4. Five RAPD markers found to be sex-specific were sequenced and the homology searches of the data banks were carried out. The sequences did not include long open reading frames and they exhibited no significant similarity to previous reported sequences. Five set of PCR primers were synthesized based on the nucelotide sequences of the cloned fragment, named male 1, female 1, mono 2-1, mono 2-2 and mono 3 and used for the identification of dioecious and monoecious plants by PCR analysis. These primer sets amplified 460 bp, 436 bp, 411 bp, 684 bp and 207 bp of DNA fragments, respectively. With the designated male and female primer sets, we could identify the sex of dioecious plants. The primer mono 2-1 amplified expected size for all three monoecious plants, whereas mono 2-2 gave a PCR product with two monoecious plants, No. 41 and 51. However, mono 3 primer produced expected 207 bp fragment with only one monoecious plant of No. 51. All monoecious specific primers did not amplify any bands for male or female plants.

2.5. With these primer sets we could easily and rapidly distinguish male, female or monoecious plant within the *S. nigra* population. These results indicate that the five primer sets could be used as genetic markers for the early discrimination of dioecious and monoecious individuals of *S. nigra*.

3. The results from the determination of content of components and biological active substances in *S. chinensis* and *S. nigra* are as follows.

3.1. The contents of free sugar in *S. chinensis* and *S. nigra* was examined. In the *S. chinensis*, content of sucrose was about 1.13%, and there only a few amount of glucose and fructose. But in the *S. nigra*, content of fructose and glucose was 3.71% and 2.51%, respectively, and only a few amount of sucrose.

3.2. In case of organic acid, *S. chinensis* and *S. nigra* contained the higher percentage of malic acid and citric acid than the others. The contents of malic acid and citric acid in *S. chinensis* was 47,684 and 11,939 ppm/dry weight 100g, and in *S. nigra* was 38,691 and 3,330 ppm/dry weight 100g, respectively.

3.3. Contents of amino acid in *S. chinensis* was higher than that of *S. nigra*. But, content of lysine and arginine in *S. nigra* was higher than that of *S. chinenesis*.

3.4. The contents of total phenolic compounds in *S. chinensis* and *S. nigra* was 1.275% and 1.560%, respectively. The predominating phenolic acid was cinnamic acid, gentisic acid, coumalic acid, chlorogenic acid and ferulic acid.

3.5. Contents of crude lipids in *S. chinensis* and *S. nigra*. was 145.5mg/g and 160.5mg/g, respectively. Most of fatty acid in lipids was oleic acid, linoleic acid and linolenic acid as a unsaturated fatty acid, and palmitic acid as a saturated fatty acid.

3.6. In case of essential oils, The predominating components in *S. chinensis* was α-ylangene, α,β-elemene, β-himachalene, γ-selinene and widdrene, *S. nigra* was caryophyllene, calarene, cubebene, acoradiene and β-himachalene.

3.7. Contents of total anthocyan pigment in *S. chinensis* and *S. nigra* was 86.54 and 138.75mg%, respectively. Antocyanin, as a aglycone of anthocyan, was supposed to peonidin-3-glycoside in *S. chinensis* and supposed to malvidin-3-glycoside, petunidin-3-glycoside, delphinidin-3- glycoside in *S. nigra*.

3.8. Schizandrin, as a biological active substance, was detected in the extract of *S. chinensis*. Schizandrin-like substance was detected in the extract of *S. nigra.*

4.1. The rate of extract yield from *S. nigra* was best when extracted for 4 hrs. at 80℃. And we found the possibility that extract from dried stems of *S. nigra* could be used as material for beverage.

4.2. Among Hunter values, both a and b value of the extract from *S. nigra* was much higher than that of *S. chinensis*. As red color was deeper, the extract from *S. nigra* was found to be good in desired process of material to manufacture deep-colored beverage.

4.3. L value, one of Hunter value, and absorbance at 520 nm of the extract from *S. nigra* was low for fresh material, but high for dried material.
4.4. The pH of the extract from *S. nigra* was 0.1-0.2 higher than that of *S. chinensis*. Although the pH of the extract from *S. nigra* was somewhat low when extracted by water, the pH range was to be able to maintain the stability of color the range like *S. chinensis*.

4.5. The sugar content of the extract of *S. nigra* was lower than that of *S. chinensis*, but the difference was insignificant.

4.6. Hunter value a and b of the extract of *S. nigra* extracted for 6hrs. at 60℃ by water was six times higher and 1.5 times higher than that extracted for 24hrs. at room temperature by water. The color of the extract did not vary when stored in cold for 7 weeks. Hunter value L and absorbance at 520nm was measured by storing at low temperature to investigate the lightness of the extract. Until 4 weeks we found the turbidity increased as L value decreased and absorbance increased. But it seemed to be temporary and little worth consideration because L value and absorbance increased after 5 weeks.

4.7. Total polyphenol of the extract of *S. nigra* decreased during storing period for all samples. Therefore, long-term storage could be the primary factors for browning and altered taste.

4.8. pH of the extract of *S. nigra* decreased but acidity increased during storing period. Therefore, the taste and red color did not change, keeping stability.

4.9. Sugar content of the extract of *S. nigra* did not change at all samples during storing period. For this reason, the quality did not deteriorate easily during storage.

4.10. Beverage products extracted by water, 3% ethanol and aqueous solution from *S. nigra* were stored in cold for 14 weeks and 21 weeks, respectively. Red color was the best for 3% ethanol aqueous solution product at 80℃, the decrease of which was insignificant during storage. Red color of the extract from dried *S. chinensis* was 1/4 - 1/5 as much as *S. nigra*, which decreased significantly during storage. When we investigated the stability of red color by adding erythobic acid as antioxidant, it seemed to be effective in spite of a small quantity.

4.11. Lightness of the extract of *S. nigra* was higher than that of *S. chinensis*. Lightness was the highest in the extract of dried *S. chinensis*. These results was considered not to be due to turbidity difference but to inverse proportion to the amount of red color. We confirmed the results by measuring absorbance at 520 nm.

4.12. The content of total polyphenol as a barometer of oxidized browning was measured during storage. Total polyphenol content of *S. nigra* and *S. chinensis* decreased a little until 14 weeks, but much after 21weeks. On the contrary, total polyphenol content of dried *S. chinensis* decreased very much after 14 weeks, which indicated the possibility to be browned. Total polyphenol content of product added by antioxidant decreased a liitle until 20 weeks.

4.13. There was no difference in sugar content between *S.nigra* and *S. chinensis*. As sugar content of dried *S. chinensis* was less half than that of *S. nigra*, it seemed that dried *S. chinensis* was not proper to raw material for beverage. Sugar content of extracted product increased during storage, which was considered to be due to altered composition of sugar.

4.14. The acidity of product, which have effects on sour and pH, was the highest for dried *S. chinensis*, in order of *S. chinensis* and *S. nigra*. The acidity of *S. nigra* was 1/3 - 1/4 as much as *S. chinensis*. The acidity decreased alittle during storage. Antioxidant had no effect on acidity.

4.15. pH of the extract product of *S. nigra* ranged fro0m 3.0 to 3.5, and that of *S. chinensis* and dried *S. chinensis* rengted from 2.5 to 2.9. pH had no effect on commercial quality of the product. Adding antioxidant was effective to keep pH from decrease.

4.16. The quality of product, adjusting similar red color and having 6% of sugar content by adding sugar, was investigated. Red color of *S. nigra* product was 6 times higher than that of dried *S. chinensis*, thus less sour and fairly sweet.

CONTENTS

목 차

제 1 장 서 론

제1절 연구개발의 목적과 범위

흑오미자는 오미자과에 속하는 낙엽활엽덩굴식물로서 우리나라에서는 제주도에만 자생하는 특산 수종이다. 흑오미자의 열매는 식용으로 주로 이용되고 있으나 열매의 약용효과 및 식용가치가 인정되고 지역 특산화에 따른 관광상품으로 가치가 있어 자생지의 산촌주민들에 의한 무분별한 남획으로 자생지가 급격히 파괴되고 있는 실정이다. 따라서 흑오미자의 유전자원을 보존하고 농산촌 주민의 소득증대 및 경제성 있는 재배작목으로서 발굴 보급하기 위하여 무엇보다 먼저 다양한 흑오미자 유전자원을 탐색 및 보존하는 일이 선행되어야 할 것이며, 그와 함께 다양한 용도 개발과 더불어 그에 알맞은 주요형질에 대한 신품종 육성이 이루어져야 할 것이다.

본 연구의 기술적측면의 필요성은 1) 열매의 다결실 및 대립형질의 우량개체의 선발에 의한 품종육성 2) 육성된 품종들의 재배방법의 개발과, 3) DNA에 기초를 둔 분자적 방법을 이용하여 정확한 종간 또는 품종간 동정, 4) 독특한 생물활성물질의 탐색, 5) 우리나라 국민의 독특한 기호성을 충족하는 전통음료의 개발, 6) 가공품개발 및 수출상품으로서 개발이 시급한 실정이다. 경제 산업적 측면으로 흑오미자는 우리나라 뿐만 아니라 일본 중국 등에서도 이용되고 있으나 흑오미자의 생산지는 국한되어 있어 이 식물의 재배지를 확대시킴으로서 농가의 소득향상에도 기여하게 될 것이다.

또한 사회 · 문화적 측면으로 국민들에게 기능성 또는 건강보조식품으로서자생식물을 이용한 가공품의 생산으로 소비자의 기호성을 충족시켜 국민의 식문화 향상과 약리작용으로 국민건강에 기여할 수 있고, 고유 천연음료로 수출상품으로 개발한다면 위축된 농민의식의 고양에도 기여할 수 있을 것이다.

본 연구는 흑오미자의 재배기술 및 품종개발, 품종동정, 음료개발 및 특수

성분을 구명하고자 하였다. 재배기술 및 품종개발을 위하여 흑오미자 자생지의 여러 환경요인을 조사하여 흑오미자의 생육환경을 구명하고, 이로부터 다결실 및 대립형질의 품종을 선발 육성하고, 종자, 삽목, 접목 및 조직배양을 통한 대량증식기술을 개발하고자 하였다. 우량품종의 쉽고 정확하게 동정을 위해 RAPD법을 통하여 genetic marker를 개발하고자 하였다.

천연음료로서 흑오미자를 이용하기위해 신상품개발을 위하여 원료의 종류별, 생원료의 종류별로 시험제품을 생산하는 기술과 생산성향상기술을 개발하고, 제품의 기호성(색, 맛)의 연구 및 기호성이 조화된 제품을 개발하고, 제품의 저장을 개선하기 위한 연구를 수행하였다.

또한 오미자와 흑오미자의 열매 및 줄기에 내생하는 일반성분 및 생물활성성분의 검색, 두 종의 열매의 건조물과 비건조물의 일반성분 및 생물활성성분을 정량적으로 비교검토하고, 음료로 개발된 상품에 대한 성분분석하여 가공공정에서의 문제점을 해결하고자 하였다.

List of Tables

List of Figures

Chapter 4

Chapter 5

제 2 장 재배기술 개발 및 품종보급분야

제1절 서 설

흑오미자는 한라산에 자생하는 덩굴성 식물로서 열매는 주로 약용·식용으로 이용되고 있다. 따라서 지역 특산화에 따른 관광상품으로 개발할 가치가 있다. 그러나 산촌주민들에 의한 무작위한 남획으로 자생지가 급격히 파괴되고 있는 실정이다. 흑오미자는 개체수가 적을 뿐만 아니라 천연분포가 한정되어 있어 소득작목으로 개발하기 위해서는 먼저 생육환경, 생육상황 및 개화결실상황 등에 대한 연구가 필요하며, 이를 대량으로 증식보급하기 위한 방법의 연구가 선행되어야한다. 또한 생산된 개체에 대하여 한라산이 아닌 지역에 적응성을 검토하고, 보다 효율적인 재배방법을 구명할 필요가 있다.

따라서 소득작목으로서 흑오미자를 개발하기 위하여 자생지의 생육환경, 생육상황, 증식방법 및 재배방법에 관한 연구를 수행하였다.

제2절 연구수행방법

1. 흑오미자 자생지 식물군집 구조분석 및 우량개체 선발

한라산에서 흑오미자의 자생지를 구분하여 분포밀도가 양호한 5개 집단을 선발하고 집단별 생육환경, 생육상황 및 개화결실의 특성을 조사하였다.

1) 조사구의 설정

조사지는 흑오미자가 자생하는 제주도 한라산의 상효, 영실 및 관음사지역을 선정하였다. 흑오미자 분포지를 외형적인 상관(Physiognomy)을 기준으로 하는 상층임관형에 따라서 구분하고, 이들 지역에서 비교적 인위적 간섭이 적고 흑오미자의 보존이 잘 된 임분을 선정한 다음, 20m×20m (400㎡)의 조사구(plot)을 설치하였다. 조사구는 상효지역 5개소, 영실지역 5개소, 그리고 관음사지역 4개소로 총 14개소이다.

2) 자생지 입지환경조사

흑오미자 자생지의 생육환경을 구명하기 위하여 자생지의 위도, 경도 및 해발고, 방위(aspect), 관계적 위치(relative location), 지표형태(local topography), 경사(slope), 토심(soil depth), 토양습도(soil moisture) 등을 조사하였다. 위도, 경도 및 해발고는 Global Positioning System을 이용하여 단독측정법으로 측정하였다. 이들 지역의 입지 조건은 산록, 산복, 산정으로 구분하고, 지표형태는 凹面지역(concave), 凸面지역(convex), 평지(smooth) 등으로 구분하였다. 토심은 심(60cm이상), 중(31 60cm), 천(30cm이하)으로 구분하고, 토양습도는 적, 건, 습으로 구분하여 조사하였다. 흑오미자 자생지의 기상 자료는 중앙기상청 기상자료를 통하여 최근 20년간의 자료를 요약하였다.

3) 식생조사 및 구조분석

조사구의 식생조사는 1995년 10월과 1996년 12월, 1월에 현지답사를 통하여 조사되었다. 각 조사구는 상층(8m이상), 중층(2 8m), 하층(2m이하)으로 구분하여 각 층위별로 임관의 울폐도를 조사하였다. 임관의 상층과 중층에 출현한 모든 목본식물에 대하여 개체수, 수고 및 흉고직경을 조사하고, 하층에 대해서는 출현한 수종별로 개체수와 피도를 조사하였다. 또한 조사구내의 흑오미자 군락에 대해서는 개체수와 흑오미자가 착생하고 있는 수목의 수종, 수고, DBH, 수관폭 등을 조사하였다.

각 조사구의 식생조사 결과 얻어진 자료는 다음 식(1)에 의해 조사구별로 각 종의 합성치(Xij)를 구하였으며, 이것으로 각 조사구에 따른 종의 조성을 나타내는 vegetational data matrix를 작성하였다.

$$Xij = (dij + Dij) / 2 \quad \text{———————} \quad 식(1)$$

Xij : j 조사구에서 종 i 의 합성치

dij : 상대밀도

Dij : 상대피도

그리고 이 vegetational data matrix를 가지고 cluster 분석을 실시하였으며, 분석프로그램은 Ludwig 와 Reynolds가 제작한 statistical ecology basic program을이용하였다. 조사구간의 거리는 percent dissimilarity (PD)를 적용하였다. 그리고 각 조사구를 cluster분석 결과에 따라서 유형별로 구분하였다. 각 군락의 식생조사 결과로 얻어진 자료에 의하여 구성수종의 상대적인 중요도를 측정하는 척도로써 Curtis 와 Mckintosh의 방법으로 층위별 상대우점치(importance value, IV)를 식(2)와 같이 산출하였다. 상・하층의 개체크기를 고려한 평균상대우점치 (mean importance value, MIV)는 식(6)과 같이 계산하였다.

$$IV = (RD + RC + RF) / 3 \quad \text{———— 식(2)}$$

IV : 층위별 상대우점치
RD : 상대밀도
RC : 상대피도
RF : 상대빈도

$$RD = \frac{\text{어떤 종의 총 개체수}}{\text{전체 종의 총 개체수}} \times 100(\%) \quad \text{———— 식(3)}$$

$$RC = \frac{\text{어떤 종의 흉고단면적}}{\text{전체 종의 흉고단면적}} \times 100(\%) \quad \text{———— 식(4)}$$

$$RF = \frac{\text{어떤 종의 출현빈도}}{\text{전체 종의 출현빈도의 합}} \times 100(\%) \quad \text{———— 식(5)}$$

$$\text{평균상대우점치}(MIV) = ((\text{상층}IV \times 3)+(\text{중층}IV \times 2)+(\text{하층}IV \times 1)) / 6 \quad \text{— 식(6)}$$

종 구성상태의 다양도인 종다양도는 Shannon의 종다양도(H')를 적용하였고, 종다양도의 최대가능치를 나타내는 최대 종다양도(Maximum H')는 H'max = log S(S는 종수)를 사용하였다. 산림내 구성종간의 개체수 분배정도, 즉 균재도(J')는 J' = H' / H'max의 식을 이용하였으며, 우점도는 1 - J'를 사용하였다.

$$H' = -\sum p_i \log p_i \quad \text{———— 식(7)}$$

(단, p_i는 어떤 종의 개체수 대 전체종의 총 개체수의 비)

각 군락형에 따라 흑오미자와 주요 구성종에 대한 분포형을 분석하기 위하여 Brower 와 Zar의 방법에 따라 Morista's index를 이용하여 분석하였다.

$$\text{Morista index} = n\frac{\sum X^2 - N}{N(N-1)} \text{ ——— 식(8)}$$

(단, n은 조사구수, N은 대상종의 총개체수, X는 대상종의 조사구별개체수)

그리고 조사구내에 출현한 수종중 상대적으로 빈도가 높은 주요 수종에 대하여 각 수종간 상관성을 분석하였다. 분석방법은 Ludwig와 Reynolds의 방법에 따라 Pearson의 상관계수와 Spearman의 순위상관계수를 이용하였다.

2. 흑오미자 형태적 특성 조사

1) 잎의 형태

잎은 7월말에 영실, 관음사 2개 집단과 상효집단을 해발고별로 지역별 20개체씩 흑오미자 암그루, 숫그루, 자웅동주개체 및 오미자, 남오미자에 대해서는 제주임업시험장 클론보존원에 식재된 나무에서 줄기의 중간부분의 성엽을 각 개체별 20매씩 총 106개체 2,120매를 채취하여 조사하였다. 잎의 길이는 엽정과 엽저를 잇는 최대길이를 측정하여 cm로 나타내었고, 잎의 좌측과 우측의 최대폭을 측정하여 cm로 나타내었다. 잎의 길이를 잎의 폭으로 나누어 수치를 나타내었다. 엽병의 길이를 측정하여 cm로 나타내었다. 엽병의 직경을 버어니어 캘리퍼스로 측정하여 cm로 나타내었다.

2) 기공

성숙하고 건전한 잎을 채취한 후 즉시 F.A.A. 액(Formalin 5 : Acetic acid 5 : 70% Ethyl alchhol 90)에 고정시킨 후 증류수로 2 3회 세척하고 잎의 표면을 핀셋으로 얇게 벗겨 Acete-carmin 용액으로 10분간 염색하고 70%의 ethyl alcohol로 탈색한 후 glycerin으로 임시 프레파라아트를 제작하여 광학현미경으로 관찰하고 기공의 형태와 크기 등을 조사하였다.

3) 목부 해부학적 관찰

목부 해부학적 특성을 구명하기 위해서 수종별 원줄기를 채취한 후 10%의 포르말린 용액에 고정시켰다. 그리고 재료를 증류수로 세척하여 2 3cm 길이로

작은 시편을 만들어 Schurze액으로 5 7일간 해리시킨 다음 증류수로 세척하고 safranin으로 10분간 염색한 후 70%의 ethyl alcohol로 탈색하고 glycerin으로 임시 프레파라아트를 제작하여 광학현미경에서 micrometer로 도관요소와 섬유의 길이와 폭을 측정하였다.

3. 흑오미자 생리적 특성 조사

1) 지역간 개화특성

흑오미자 자생지의 관음사집단, 영실집단, 성판악집단, 상효집단 등 4개 집단으로 구분, 각 집단에서 조사목 10본 씩을 선발하여 조사목당 암꽃 10개씩을 선정하여 개화후 10일 간격으로 잔존 꽃을 조사하였다.

2) 지역간 결실특성

개화특성 조사구에서 개화후 10일 간격으로 잔존 꽃을 조사함과 동시에 각 화서당 열매의 잔존수를 조사하였다.

4. 유전변이조사

1) 동위효소분석에 의한 집단간 변이

(1) 시료채취

흑오미자 천연집단의 유전변이 분석을 위하여 한라산 자생지중 밀도가 높은 관음사, 상효, 영실 3개 집단을 선정하였으며, 각 집단별로 30개체 이상으로부터 동위효소 분석용 시료를 채취하였다. 선발목 가운데는 1가화인 개체와 2가화인 개체가 모두 포함되어 있으며, 혈연적으로 근연관계에 있는 개체가 선발되지 않도록 하기 위해 개체간 거리를 50m이상 유지하였다. 동위효소분석은 각 개체로부터 채취한 4 5개의 유엽을 이용하여 실시하였다.

(2) 동위효소추출

냉장고에 보관된 시료로부터 동위효소를 추출하기 위해 유엽조직을 약 500mg 정도 유발에 넣고 액체질소를 첨가한 다음 유봉으로 분쇄하였다. 액체질소가 증발한 직후 extraction buffer로 시료를 완전히 분쇄한 후 15,000

rpm으로 5분간 원심분리하여 상등액을 채취, 전기영동을 실시하였다. Gel buffer와 tray buffer는 Conkle과 Adams의 방법에 따라 조제하였고, gel은 12% starch(Sigma)로 조제하였다. Buffer와 starch의 혼합액을 잘 섞은 다음 중탕시켜 starch를 녹인 후 전자레인지에서 완전히 용해시켜 gel mold에 부어 실온에서 냉각시켜 gel을 조제하였다.

조제된 gel의 한쪽을 0.5cm 정도 자른 후 시료로부터 추출액을 여과지 조각에 흡수시켜 gel의 절단된 부위에 삽입시키고 잘려진 gel의 조각을 부착시켜 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 끝난 gel을 여러 조각으로 자른 후 미리 조제된 염색액에 침전시켜 염색을 실시하였다.

표 1.1. Gel과 tray에 이용된 Buffer의 조성

System	Gel Buffer	Tray Buffer
A Formulation	Tris citrate(pH 8.3) Trizma base --------- 62.0g Citric acid ----------- 14.6g Distilled water -------- 10.0ℓ Dissolve the chemicals and check the pH. Store at room temperature	Lithium borate(pH 8.3) Lithium hydroxide---- 12.0g Boric acid---------- 118.9g Distilled water------ 10.0ℓ Dissolve the chemicals and check the pH. Store at room temperature
Procedure	To use, add 75ml of the lithium borate buffer to 765ml of the tris citrate gel buffer to make the required 750ml	Use as it is
C Formulation	Tris citrate(pH 6.2) Trizma base 162g Citric acid 108.9g Distilled water 3.0ℓ Dissolve the chemicals and titrate to pH 6.2 with 4N NaOH. Store in the refrigerater	Same as gel buffer Same as buffer
Procedure	To use, mix 16ml of the buffer with 734ml of distilled water.	Mix 250ml of the buffer with 750ml distilled water.

표 1.2. **염색법**

System	Stain buffer	Tray buffer system used	Stain components
IDH (Isocitric dehydrogenase)	75ml 0.2M Tris HCl	C	DL-Isocitric acid 200mg NADP 10mg MTT 5mg 1% $MgCl_2$ Solution 1mg
MDH (Malic dehydrogenase)	75ml 0.05M Tris HCl pH 8.0	C	Malic acid solution 5ml (134.1g DL-malic acid, 80g NaOH, adjust to pH 7.0 with about nase of 4N NaOH NAD 1ml NBT 1ml PMS 0.5ml
MNR (Menadione reductase)	75ml 0.05M Tris HCl pH 7.0	A	NADH 25mg Menadione 20mg NBT 1mg
PGI (Phosphoglucose isomerase)	75ml 0.05M Tris HCl pH 8.0	A	D-fructose-6 phosphate 25mg 1% $MgCl_2$ Solution 1ml NADP 1ml NBT 1ml PMS 0.5ml G6PDH 20 units

유전분석에 조사된 효소는 aconitase (ACO, E.C. 4.2.1.3), glutamate dehydrogenase (GDH, E.C.1.4..3), glutamate-oxaloacetate transaminase (GOT, E.C.2.6.1.1), isocitric dehydrogenase(IDH, E.C. 1.1.1.42), leucine aminopeptidase(LAP, E.C.3.4.11.1), menadion reductase(MNR, E.C. 1.6.99.2), malate dehydrogenase(MDH, E.C. 1.1.1.37), 6-phosphogluconate dehydro-genase(6PG, E.C. 1.1.1.44), phosphoglucose isomerase(PGI, E.C.5.3.1.9), phosphoglucomutase(PGM, E.C. 2.7.5.1), shikimate -dehydrogenase(SKDH, E.C. 1.1.1.25)의 11개 였다. 이 가운데 GDH, GOT는 효소활성이 없었으며, ACO, LAP, 6PG, PGM는 효소활성은 있었으나 정색밴드가 너무 흐리거나 불안정하여 유전분석에서는 제외시켰다. 결국 본 연구에서 유전분석에 사용된 최종 효소는 IDH, MDH, MNR, PGI의 4개였으며, 6개 유전자좌(*Idh*, *Mdh-1*, *Mdh-2*, *Mnr*, *Pgi-1*, *Pgi-2*)에 대한 유전자형을 조사하였다. 각 동위효소별 유전양식은 인공교배된 차대가 없었기 때문에 직접 추정할 수는 없었으나, 다른 수종으로부터 보고된 자료 및 효소의 기능과 생화학적 구조를 고려하여 간접적으로 추정하였다. 각 유전자좌에서의 개체별 유전자형 빈도를 토대로 유전자좌당 평균 대립유전자수(A/L), 다형적 유전자좌의 비율(P), 평균 이형접합도의 관측치(H_o)와 기대치(H_e)를 구하였으며, 관찰된 유전자형 빈도와 Hardy-Weinberg 평형빈도와의 일치여부는 Levene의 수정에 의한 X^2-test에 의해 판정하였다. 이때 cell size가 5이하일 때는 빈도수가 작은 유전자형끼리 합쳐서 분석하였다. 아울러 Fisher의 exact-test도 실시하였는데, X^2-test 및 exact-test 모두에서 통계적 유의성을 보이는 경우에만 Hardy- Weinberg 평형상태로부터 이탈하는 것으로 간주하였다. 또 흑오미자 집단의 유전적 구조를 추정하기 위해서 Wright의 F 통계치를 구하였으며, Nei의 유전적 거리를 구한후 UPGMA법에 의한 유집분석을 실시하였다. 이상의 모든 분석은 PC용 BIOSYS-1 program을 이용하여 실시하였다.

5. 흑오미자의 대량증식 및 재배기술개발

1) 종자번식

실생 번식에 유효한 종자 저장법을 구명하기 위하여, 냉장저장(4℃), 냉장습사저장(4℃), 노천매장, 상온저장의 4가지 저장법별 발아시험을 하였다. 발아율 시험에 사용한 종자는 1995년 9월 20일부터 1995년 10월 5일에 채취한 종자이며, 각 저장방법별 저장기간은 5개월간이다. 발아율 조사를 위한 파종상은 구내포지에 설치하였다. 시험을 위한 파종은 1996년 3월에 각 저장방법별로 300립씩 파종하였으며, 발아율은 당년도 발아율과 2년차 발아율로 구분하여 조사하였다.

2년 발아종자로 알려져 있는 흑오미자의 당년도 발아율을 높이는 방법을 구명하고자 저장 전처리방법과 저장방법이 서로 다른 종자의 발아시험을 하였다. 저장 전처리 시험은 H_2O_2 10%, GA_3 1,000ppm, BAP 1,000ppm, 계면활성제인 Tween 30%, alcohol 30%액 처리로 5종류로써, 12시간씩 침지처리 하였다. 저장 전처리를 끝마친 종자는 노천매장, 상온저장(25℃), 냉장습사저장(4℃), 습사변온저장으로 4가지의 서로 다른 저장법으로 4개월(120일) 저장하였다. 습사변온저장은 저온저장(4℃)과 상온저장(25℃)을 7일간격으로 반복하여 처리하였다. 발아시험은 구내포지에서 실시하였다. 각각의 시험구별로 150립이며(50립×3반복), 파종 후 60일에 발아율을 조사하였다.

2) 삽목증식

(1) 발근촉진제 및 삽목시기별 삽목

제주도 북제주군 애월읍 한라산 900 m지역의 흑오미자 천연분포지에서 삽수를 채취하여 시기별 IBA 농도별 삽목을 실시하였으며, 발근촉진제의 효과를 조사하기 위하여 IBA, NAA, IAA를 농도별로 처리하였다. 삽목상은 나무판재를 이용하여 길이 20cm, 폭 1.3m, 깊이 20cm의 상을 처리한 후 버미큘라이트, 펄라이트, 피트모스를 혼합하여 사용하였고 삽수의 길이는 줄기 중앙부를 10cm길이로 조제하였다. 발근촉진제는 기부 3cm정도 잠기도록 30분간 처리하고 5cm 정도의 깊이로 삽목하였다. 삽목상은 관수시설을 이용하여 상대습도를 높게 유지하였으며, 직사광선의 차단과 급격한 온도의 상승을 방지하기 위하여 55% 차광되는 차광막을 설치하였다. 발근율은 삽목 3개월 후 굴취하여 뿌리가 1개 이상 나온 것을 발근한 개체로 간주하였다. 발근율은 삽수 본수에 대한 발근본수의 비율로 하였다.

(2) 모수령별 삽목

삽수의 모수령이 삽목 발근에 미치는 영향을 조사하기 위하여 모수의 수령에 따라 삽수를 채취하였다. 삽수를 채취한 모수의 수령은 1, 5, 10 및 15년생으로 삽수는 줄기의 중앙부를 조제하여 삽목하였다. 삽목상은 버미큘라이트, 펄라

이트, 피트모스를 1:1:1(v/v)로 혼합하여 사용하였고, IBA는 500 ㎎/ℓ의 농도를 적용하였다.

(3) 삽수채취부위 및 배양토별 삽목

삽수채취 부위 및 배양토가 黑五味子 삽목 발근에 미치는 영향을 조사하기 위하여 줄기를 채취한 후 삽수를 줄기의 상부, 중앙부, 하부로 구분하여 조제하여 삽목하였다. 삽목상은 VPER(vermiculite + perlite), VPEA(vermiculite + peatmoss), VPPL(vermiculite+peatmoss+perilite)를 1:1:1(v/v)로 혼합한 처리구와 일반 토양을 사용한 비교구로 구분하였다. 생장조절 물질은 IBA 500㎎/ℓ를 적용하였다.

(4) 선발 개체별 삽목발근력 차이 조사

선발 개체별 삽목발근력 차이를 조사하기 위하여 우량개체로 선발된 제주 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 15, 16, 20호등 14본에 대하여 7월 12일에 삽수를 채취하여 삽목하였다. 삽목상은 버미큘라이트, 펄라이트, 피트모스를 1:1:1(v/v) 혼합하여 사용하였고, IBA는 500㎎/ℓ의 농도를 적용하였다.

3) 접목증식

흑오미자의 우량선발개체의 무성증식을 위해 2월에 1년생 삽수를 채취하여 이끼에 싸서 냉장고에 4℃로 보관한 후 3년생 흑오미자 대목에 숙지 접목을 실시한 60일 후 접목 활착율을 조사하였다.

4) 조직배양에 의한 증식

구내에 유지되어 있는 클론의 동아를 이용하여 기내대량증식법을 구명하였다. 재료는 자웅동주 개체인 제주 6호와 41호, 암그루인 8호, 14호, 22호 및 27를 대상으로 하였다. 식물의 생장이 정지하고 동아가 형성되는 시기인 11월부터 전년에 형성된 가지와 당년에 형성된 가지를 구분 채취하여 표면소독을 한 후 기내에 배양하였다. 표면소독은 Tween 20을 넣어 수돗물로 흔들어 씻어준 후 2%

의 NaClO에 침지하여 20분간 소독하고, 0.2%의 $HgCl_2$ 에 10분간 소독한 후 멸균수로 4번 헹군다. 물기를 제거한 후 소지부분을 95%의 EtOH를 이용하여 화염소독한다. 표면소독된 동아는 수피와 아린을 제거한 후 두가지 배지와 4가지 호르몬으로 조합된 배지에 치상하여 오염과 개엽 및 줄기 유도율을 조사하였다.
BAP와 TDZ를 농도별로 처리하여 다경줄기를 유도하였으며, BAP와 GA_3를 조합한 배지에서 줄기 유도 및 줄기의 길이를 생장시켰다.

5) 재배법 개발

덩굴성 식물인 흑오미자의 특성을 고려하여 개화 결실 후 열매의 수확등을 용이하게 할 수 있는 재배방법을 구명하고자 다른 종류의 과수에 이용되고 있는 파골라설치를 이용하여 흑오미자의 재배법을 개발하였다.

제3절 연구수행내용 및 결과

1. 연구내용

1) 흑오미자 자생지 식물군집 구조분석 및 우량개체 선발

(1) 자생지 입지환경조사

(2) 식생조사 및 구조분석

(3) 대립다결실 우량개체 선발

2) 흑오미자 형태적 특성 조사

(1) 잎의 형태

(2) 기공

(3) 목부 해부학적 관찰

(4) 선발개체 열매특성

3) 흑오미자 생리적 특성 조사

(1) 지역간 개화특성

(2) 지역간 결실특성

4) 유전변이조사

(1) 동위효소분석에 의한 집단간 변이

① 대립유전자 빈도 및 분포

② 유전적 다양도

③ Wright의 F 분석 및 유전자형 분석

④ Nei의 유전적 거리 및 유집분석

5) 흑오미자의 대량증식 및 재배기술개발

(1) 실생번식

(2) 삽목증식

① 발근촉진제 및 삽목시기별 삽목

② 모수령별 삽목

③ 삽수채취부위 및 배양토별 삽목

④ 선발 개체별 삽목발근력 차이 조사

(3) 접목증식

(4) 조직배양에 의한 증식

(5) 재배법 개발

2. 연구결과

1) 흑오미자 자생지 식물군집 구조분석 및 우량개체 선발

(1) 자생지 입지환경조사

흑오미자는 자웅이주식물로서 한라산에 자생하는 특산종으로 해발 780 910 m, 경사도 5° 30° 의 완경사지인 산중복에 토양의 심도는 중 이상, 비교적 적윤지에 자생하고 있다(표 1.3).

표 1.3. 흑오미자 천연분포지 입지환경

집 단	해발고 (m)	경 사 (。)	방 위	위 치	토 양	
					토심	습도
영 실 1	840 860	5 10	SW	산복	중	적
영 실 2	870 890	5 10	SW	산복	중	적
관음사 1	770 790	5 20	E	산복	중	적
상 효 1	880 910	10 30	NE NW	산복	중	적
성 판 1	780 800	5 30	SE	산복	중	적

흑오미자의 분포는 해발고 600 1,350m 범위 내에 주로 북향, 북서향 및 남서향을 중심으로 비교적 습도가 많고 35。이하의 완만한 경사를 갖는 산록부에 위치하고 있다. 이 지역의 모암은 현무암과 퇴적암으로 구성되어 있으며, 토양은 부식토가 많은 미사질 양토를 이루고 있다. 조사지역의 연평균 강우량은 약 3,000 3,094 mm 정도였으며, 연평균 기온은 8.8 10.5℃ 이지만 해발 상승에 따라 0.6℃씩 감소하므로 흑오미자의 최저 극한기온은 1,300m지점을 기준으로 할

때 -7℃이하로 내려가지 않아야 생육이 가능하리라고 생각한다.

표 1.4.는 흑오미자 조사지의 토양 이화학적 특성을 나타낸 것으로 토양산도는 pH 4.36 5.28의 범위이고, 토양의 보비력을 나타내는 양이온 치환용량(C.E.C.)이 평균 16.7±3.83(10.21 22.74)me/100mg으로 국내 산림토양의 평균치 11.34 me/100mg 보다 비교적 높은 값을 나타내고 있다.

표 1.4. 흑오미자 천연림 조사구 토양의 화학적 특성

조사구	유기물 함량 (%)	전질소 함량 (%)	pH	양이온 함량(me/100g)					P_2O_5
				K^+	Na^+	Ca^{++}	Mg^{++}	C.E.C	
상효 1	22.51	0.61	4.93	0.20	0.16	0.16	0.34	15.74	3.05
2	23.58	1.00	4.37	0.38	0.24	0.40	0.90	12.15	1.30
3	21.27	0.85	5.14	0.26	0.19	0.40	0.50	12.57	0.30
4	25.08	1.33	4.97	0.46	0.33	2.30	1.50	10.21	1.80
5	27.21	0.69	4.92	0.16	0.24	0.30	0.30	13.32	2.02
영실 6	24.86	0.53	5.02	0.35	0.25	2.33	1.48	17.61	2.46
7	24.18	0.96	4.79	0.47	1.43	6.14	0.31	22.19	4.07
8	23.82	0.99	5.28	0.31	0.83	1.40	0.80	16.07	0.30
9	24.51	0.92	4.81	0.42	1.23	3.25	0.56	19.82	3.12
10	22.48	0.61	4.53	0.38	0.33	2.52	0.85	18.22	2.07
관음사 11	23.51	1.27	4.90	0.44	0.98	1.70	1.00	19.21	2.40
12	19.27	1.14	4.90	0.35	1.32	0.80	0.60	20.23	1.70
13	15.45	0.68	5.04	0.38	1.43	7.78	3.68	22.74	2.21
14	21.83	0.81	4.58	0.37	0.19	1.00	0.88	16.74	1.88

(2) 식생조사 및 구조분석

자생지에 대한 식생조사 결과 소나무, 졸참나무, 때죽나무, 서어나무등이 우점하고 있는 낙엽활엽수림대의 2차림에 주로 분포하고 있었으며 흑오미자의 밀도는 자생지의 단위면적(400㎡)당 평균 3 39본이 출현하고 있었다(표 1.5.).

표 1.5. 군락 구조별 흑오미자 출현 개체수

군 락 명	조사구수	plot 내 흑오미자개체수 (No./400㎡)	
		평 균	범 위
계	14		
Ⅰ. 소나무 - 졸참나무군락	1	13	13 13
Ⅱ. 소나무 - 때죽나무군락			
a. 소나무 - 때죽나무군집	3	39	26 49
b. 때죽나무 - 비목나무군집	3	32	16 48
c. 때죽나무 - 작살나무군집	3	12	6 20
Ⅲ. 소나무 - 서어나무군락			
a. 소나무 - 서어나무군집	2	6	4 - 7
b. 서어나무 - 굴거리군집	2	3	4 - 2

수종간의 상관관계에 있어서는 서어나무와 굴거리나무, 당단풍 및 주목나무: 산벚나무와 층층나무: 산딸나무와 사람주나무 및 노린재나무 등의 수종간에는 높은 정의 상관이 인정되었고, 때죽나무와 서어나무 및 노린재나무: 소나무와 산딸나무, 덜꿩나무 및 작살나무: 비목나무와 굴거리, 노린재 및 당단풍 등의 수종간에는 높은 부의 상관이 인정되었다. 그리고 흑오미자와 높은 정의 상관을 나타낸 것은 층층나무, 고로쇠나무, 산벚나무 및 소나무 등이었으며, 부의 상관을 나타낸 수종은 덜꿩나무, 노린재나무, 산딸나무 등으로 나타났다. 또한 Spearman의 순위상관에 있어서는 윤노리나무와 서어나무 및 주목: 사람주나무와 작살나무 및 산딸나무 등의 수종간에는 정의 상관이 그리고 주목과 작살나무: 작살나무와 소나무: 때죽나무와 당단풍: 서어나무와 고로쇠나무: 소나무와 작살나무 등의 수종간에는 負의 상관이 인정되었다. 또 순위상관에서 흑오미자와 높은 정의 상관을 갖는 수종은 때죽나무, 비목나무, 말채나무, 고로쇠나무 등으로 나타났으며, 부의 상관을 나타내는 수종은 노린재나무, 꽝꽝나무, 당단풍나무, 굴거리로 나타났다.

이러한 결과는 흑오미자가 주로 착생하는 수종들인 때죽나무, 소나무, 비목나무, 산벚나무, 산딸나무 등의 출현 순서와 거의 일치하고 있다. 이것은

흑오미자는 소나무와 산벚나무의 수종들과 그리고 때죽나무를 비롯한 고로쇠나무, 비목나무, 말채나무 등의 수종들간에 매우 높은 친화력을 가지고 있기 때문에 동질적인 지위를 이루고 있는 것으로 판단되고, 반면 흑오미자와 꽝꽝나무, 노린재나무, 당단풍, 굴거리 등의 수종간에는 이질적인 지위를 가지고 있는 것으로 생각된다.

한라산에서 흑오미자의 자생지를 지역별로 구분하여 분포밀도가 양호한 5개 집단을 선발하고 집단별 생육상황 및 과실 특성을 조사한 결과 본당 착과량은 관음사2 집단이 106.2개로 가장 많이 결실하엿으며, 송이당 착과수는 집단간 9.3 11.1개로 큰 차이가 없었다. 과실중량은 관음사2 집단이 0.99g 으로 가장 양호하였으며 ℓ당 과실수에 있어서도 영실2 집단이 795개인데 비하여 관음사1 및 관음사2 집단은 각각 722개와 727개로서 대립과실임을 알수 있었다(표 1.6.).

표 1.6. 흑오미자 선발집단의 생육상황 및 과실특성

집 단	본수 (본)	해발고 (m)	근원경 (cm)	착과량 (송이)	송이당 착과수 (립)	과실 중량 (g)	과실 장경 (cm)	ℓ 당 과실수 (립)
계	50	770-890	2.32	70.2	10.0	0.83	1.12	740
영실 1	27	850-890	2.13	64.7	10.4	0.82	1.12	735
영실 2	6	850-870	2.55	70.3	9.8	0.75	1.09	795
영실 ♂	5	850-860	2.76	-	-	-	-	-
관음사 1	5	770-790	2.34	63.8	11.1	0.99	1.19	722
관음사 2	5	770-780	2.70	106.2	9.3	0.84	1.11	727
관음사♂	2	850-870	2.75	-	-	-	-	-

3) 대립 다결실 우량개체선발

흑오미자의 열매는 우리나라에 자라고 있는 오미자와 남오미자와는 열매의 색과 형태가 다르다(그림 1.1). 흑오미자의 열매는 차와 음료등 그 용도로 볼 때 가장 중요한 것은 과실생산성 우수품종의 육종에 있다. 따라서 과실이 대립이고 개화결실 특성이 대량생산에 적합한 품종을 선발하는 것은 본 과제 중에서도 가

장 중요한 분야라고 할 수 있다(그림 1.2). 그러나 흑오미자는 제주도가 유일한 자생지로서 특산종이며, 분포범위가 넓지 않고 자생하고 있는 개체수도 타 수종에 비하여 현저히 적은 편이다. 그러므로 이 수종에 대한 연구가 거의 전무한 실정이며 우수품종의 선발기준 또한 제시된 바 없다. 그러므로 본 과제에서는 앞에서 설명한 바와 같이 천연분포지의 입지환경 및 분포지 조사, 선발집단의 생육상황 및 과실특성, 자생지에서의 개화결실특성 및 집단별 개화결실특성, 그리고 유전형질조사등 다양한 조사 결과를 참고하여 대립다결실 우량개체 후보목을 선발하였다. 금후 계속적인 관찰과 조사를 통하여 보급 가능한 우량품종을 선발하고자 하였다(표 1.7).

그림 1.1. 흑오미자 자생지 및 오미자류 열매비교
A : 남오미자 B : 오미자 C: 흑오미자

그림 1.2. 흑오미자 자생지 및 대립다결실열매개체선발
A : 자생지, B : 대립다결실열매, C : 수피

표 1.7. 흑오미자 선발목의 생육상황 및 과실특성

개 체 번 호	해발고 (m)	근원경 (cm)	본 량 착과량 (송이)	송이당 착과수 (개)	과 실 형 질	
					과립중 (g)	장경 (cm)
영실 1-1	880	2.6	16	11.2	0.62	1.03
“ 2	890	1.8	15	11.2	0.65	1.02
“ 3	890	3.0	23	9.2	0.78	1.10
“ 4	880	1.5	20	10.2	0.74	1.10
“ 13	890	2.9	63	9.0	0.53	0.92
영실 2-5	850	1.5	102	11.8	0.69	0.98
“ 6	850	2.5	135	18.6	0.86	1.10
“ 7	850	1.2	4	10.0	0.60	1.03
“ 8	850	2.5	66	9.6	0.84	1.14
“ 9	850	1.2	11	8.8	0.56	0.94
“ 10	850	2.6	6	10.0	0.59	0.95
“ 11	850	2.0	28	12.0	0.62	0.97
“ 12	850	1.5	9	8.8	0.67	1.01
“ 14	860	1.6	4	8.0	0.72	1.11
“ 15	850	1.5	5	9.6	0.56	0.99
“ 16	850	1.5	16	9.6	0.54	0.99
“ 17	850	2.0	15	11.8	0.61	1.01
“ 18	850	2.0	80	14.2	0.62	1.03
“ 19	850	2.2	8	9.0	0.73	1.11
“ 20	860	1.5	52	8.4	0.49	0.94
“ 21	850	1.9	16	11.4	0.67	1.08
“ 22	850	2.1	6	11.2	0.57	0.99
“ 23	850	1.7	28	11.4	0.65	1.04
“ 24	850	1.8	10	12.6	0.74	1.06
“ 25	850	1.5	47	9.4	0.57	0.99
“ 26	850	2.3	16	12.8	0.60	0.93
“ 27	860	1.3	5	8.8	0.50	0.83
관음사 28	790	2.4	62	12.0	0.67	1.00
“ 29	790	2.3	17	10.8	0.71	1.00
“ 30	780	1.8	18	8.6	0.66	1.07

2) 흑오미자 형태적 특성조사

(1) 잎 특성

잎의 길이에 있어서는 남오미자가 가장 길고 다음이 오미자, 흑오미자의 순으로 나타났다. 잎의 폭은 오미자와 흑오미자가 남오미자보다 넓은 경향을 보여 흑오미자는 남오미자나 오미자보다 전체적으로는 둥근 달걀모양을 보였다. 흑오미자내 성별로 비교하면 숫그루가 잎이 길고 넓으며, 다음이 자웅동주개체가 중간형태이고 암그루가 가장 작은 형태를 보였다.

엽병길이는 흑오미자가 오미자와 남오미자보다 거의 2배 정도 길었으며, 엽병 두께는 남오미자가 다른 오미자에 비해 굵게 나타났다. 흑오미자 성별 개체간에는 큰 차이를 보이지 않았지만 숫그루의 잎이 보편적으로 크게 나타났다. 지역간의 엽특성을 조사한 결과는 Table 1.8 및 1.9와 같으며, 상효, 영실, 관음사지역간에 잎의 길이와 크기에서는 큰 차이를 보이지 않았다.

표 1.8. 해발고에 따른 잎의 형태적 특성

해발고 (m)	잎		엽병	
	길이	폭	길이	두께
600	5.11±0.70	3.34±0.48	1.91±0.56	0.12±0.02
900	5.16±1.01	3.23±0.60	1.51±0.53	0.12±0.02
1100	5.23±0.71	3.37±0.53	1.81±0.45	0.12±0.01
1300	5.30±0.85	3.29±0.62	1.78±0.54	0.11±0.01
Total	5.20±0.83	3.31±0.55	1.75±0.54	0.12±0.01

엽병길이에서는 지역간에 변이를 보여 상효지역의 경우, 엽병장이 관음사나 영실지역에 비해 짧은 경향이었으며, 지역내에서는 관음사지역은 변이폭이 좁았으나 영실과 상효지역은 지역내에서 많은 변이를 보였다. 또한 상효지역의 경우, 해발 600, 900, 1,100, 1,300 m의 해발고별 엽특성을 조사한 바, 잎의 크기와 폭에

서는 지역간 특성과 마찬가지로 많은 변이를 보이지 않았으나 해발이 높아짐에 따라 엽장과 폭이 커지는 경향을 보였으며, 엽병길이는 짧아지는 경향을 보였다.

해발 900 m의 경우는 잎의 크기에 있어 변이폭이 크고 엽병도 가장 짧은 경향이었는데, 이 지역의 흑오미자 생육지가 부분별로 소개된 불규칙한 상층식생에 기인된 것으로 생각된다.

표 1.9. 자연집단내 흑오미자의 잎의 형태적 특성

집 단	잎		엽 병	
	길 이	폭	길 이	직 경
관음사	5.17±0.76	3.31±0.53	1.82±0.36	0.12±0.01
영실	5.18±0.76	3.30±0.52	1.78±0.44	0.11±0.01
상효	5.20±0.87	3.29±0.56	1.66±0.51	0.12±0.01
계	5.18±0.80	3.34±0.54	1.75±0.45	0.11±0.01

본 연구에서는 동일장소에 동일조건으로 생육하고 있는 시료를 채취하여 조사하였는 바, 여러 가지 환경에 따른 차이를 배제시켰지만 수종간에는 각 수종마다 생육환경이 다르기 때문에 약간의 차이는 있을 것으로 생각된다. 이러한 형태적인 특성들은 유전적 특성, 환경적 특성, 기상조건, 지위, 비배관리등에 따라 차이가 있다는 보고가 많이 있었으며, 지역간 품종 및 수종간에 동일조건 상태의 비교만 가능하였다고 볼 수 있다.

2) 기공

기공의 형태는 개체발생에 의거한 분류방식에 의하면 공시수종 모두 기본적으로 Perigenous형이었다. 기공의 길이는 오미자가 79.90 ㎛였으며, 남오미자가 75.20 ㎛으로 비슷하였으나 흑오미자는 92.50 110.75 ㎛였으며, 집단간에 다소 차이가 있었다. 기공의 폭도 길이와 유사한 경향이었다. 단위면적당 기공의 밀도는 남오미자가 694.38/㎟개로서 가장 높은 밀도를 보였고 오미자는 395.33개, 흑

오미자는 204 314개로서 다소 낮은 밀도로 분포하였다. 흑오미자 기공의 길이와 폭, 밀도는 4개의 집단간에 다소 차이가 있었으며, 이러한 결과는 생육지의 온도, 습도, 광도 등의 기후조건과 수령의 차이에 기인한 것으로 판단되며 차후 연구 검토가 요구된다.

표 1.10. 오미자류의 기공형질변이

수 종	기공길이(㎛)	기공폭(㎛)	길이/폭	밀 도(㎟)
S. chinensis	79.90±0.351	44.20±0.264	1.939	39.533±4.048
S. nigra ♀	97.50±0.543	63.50±0.812	1.535	31.400±2.472
S. nigra 41	105.88±0.960	58.75±0.244	1.857	20.435±2.635
S. nigra 6	110.75±1.325	64.25±0.504	1.724	23.115±2.207
S. nigra ♂	92.50±0.598	57.75±0.717	1.602	25.714±2.358
Kadsura japonica	76.20±0.268	42.40±0.504	1.797	69.438±4.527

3) 목부섬유와 도관요소

오미자와 흑오미자의 4개 집단, 그리고 남오미자의 가지에서 추출한 목섬유와 도관요소의 길이와 폭의 측정결과는 다음에 나타냈다. 섬유의 길이는 오미자가 752 ㎛로서 가장 짧았으며, 남오미자가 820 ㎛였으며, 흑오미자가 862 947 ㎛로서 가장 길었고 목섬유의 폭도 유사한 결과를 보였다. 흑오미자 집단간 길이와 직경도 10%의 변이가 있었다. 그리고 도관요소의 길이는 섬유장과 유사한 결과로서 흑오미자가 가장 길고 다음이 남오미자, 오미자의 순으로 길었으며, 직경도 비슷한 경향이었다. 이상의 연구결과 오미자속 3수종간 목섬유와 도관요소의 길이와 직경의 크기는 종간 식별인자로서 활용할 수 있을 것으로 판단되며, 특히 집단간의 변이에 대해서는 자생지의 기후인자와 수령, 재료의 채취부위에 따라 오차가 발생할 수 있기 때문에 보다 구체적인 연구가 수행되어야 할 것으로 판단된다.

표 1.11. 오미자류의 도관요소 및 목부섬유의 형질변이

수　　종	도관길이(㎛)	도관직경(㎛)	섬 유 장(㎛)	섬유직경(㎛)
S. chinensis	510.80± 8.685	64.84±1.282	75.200±12.092	17.20±0.220
S. nigra ♀	702.67±14.431	64.90±1.474	90.333±18.023	21.97±0.381
S. nigra 41	690.00±13.646	71.92±1.393	86.267±16.671	21.50±0.163
S. nigra 6	732.00±12.629	146.66±3.060	94.700±21.011	22.47±0.334
S. nigra ♂	574.33±11.789	91.13±2.310	68.033±19.907	21.87±0.307
Kadsura japonica	680.00±12.628	76.47±2.261	82.000±17.928	20.60±0.178

이상의 결과 오미자속 3 수종간 목섬유와 도관요소의 특성은 종간 식별인자로서 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

2) 흑오미자 생리적 특성조사

(1) 지역간 개화특성

흑오미자는 자웅이주로서 암꽃과 숫꽃의 외부형태적으로 차이가 있다. 숫꽃은 화병이 짧고, 크기가 작으며, 오각형의 화분낭(pollen sac)이 하나 있고, 암꽃은 화병이 굵고 길며, 꽃의 크기가 크며, 여러개의 stigmata가 모여 있으며, 후에 각각의 stigmata가 하나의 열매가 되며, 암꽃 한 개가 한 개의 송이가 된다(그림 1.3). 그러나 천연집단에서는 암꽃과 숫꽃이 함께 피는 자웅동주가 존재하며, 관음사지역에서 3그루의 자웅동주개체를 발견하였다. 흑오미자의 개화 특성을 구명하기 위하여 관음사내의 파골라를 설치한 곳에서 암·수 개체당 3개의 가지, 자웅이주개체의 3개의 가지 총 9개 가지를 선택하여 개화의 특성을 조사하였다. 조사시기는 꽃이 피기 시작하는 6월 초순부터 3일 간격으로 조사였다. 조사항목은 형성된 꽃의 수, 그 중 개화된 꽃의 수, 시간의 경과에 따라 탈락된 꽃의 수(화병까지 완전히 탈락)를 각기 개체마다 조사하여, 개화된 꽃의 착화율을 조사하였다.

가지에 달렸던 꽃은 개화되는데는 약 15일 정도가 걸리며, 그 15일간 대부분의 숫꽃은 탈락하는 것을 볼 수 있었다(그림 1.4). 실제적으로 한 개의 숫꽃이 피어 있는 기간은 2 3일 정도이며, 이에 비해 암꽃의 개화기간은 긴 것을 알 수 있었다. 대체로 숫꽃이 암꽃보다 일찍 개화하고 먼저 탈락하였다. 두 성의 꽃이 모두 개화된 상태로 존재하는 기간은 약 10일 정도였다(그림 1.5). 자웅동주의 성비는 암꽃 : 숫꽃의 비율이 1: 6.3으로 암꽃보다는 숫꽃이 많았으며, 암꽃의 개화시기와 숫꽃의 개화시기에는 많은 차이가 있는 것으로 보였다. 외부의 형태학적으로 비교해보았을 때 암·수 꽃의 차이는 우선 화병의 길이에 있다. 암꽃의 화병은 굵고 긴 반면에 숫꽃의 화병의 길이는 짧고, 가는 것이 보통이다.

표 1.12. 흑오미자의 화병의 길이생장

	구 분	6월 5일	6월 9일	6월 14일	6월 17일
화병의 길이 (cm)	♀	-	5.35±1.44	5.49±1.52	5.59±1.56
	♂	-	3.00±0.48	3.02±0.49	3.06±0.62
	자웅동주 ♀	7.04±0.43	7.08±0.57	7.21±0.64	7.52±0.49
	♂	3.35±0.62	3.50±0.81	3.76±1.75	-

- 측정하지 않았음

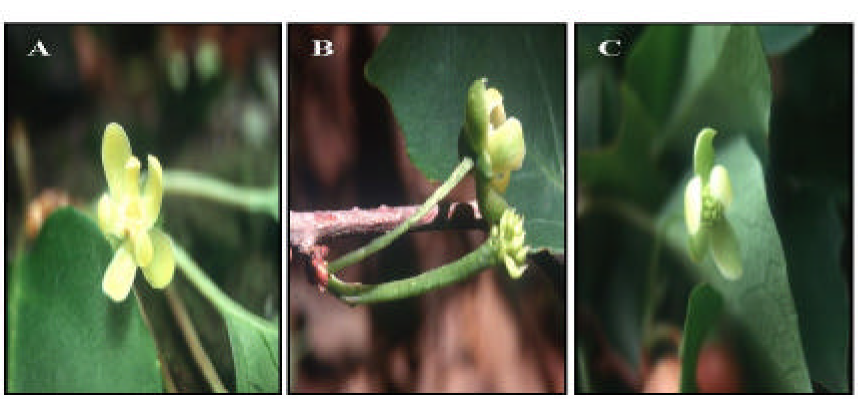


그림 1.3. 흑오미자의 꽃(A: 수꽃, B: 자웅동주, C: 암꽃)

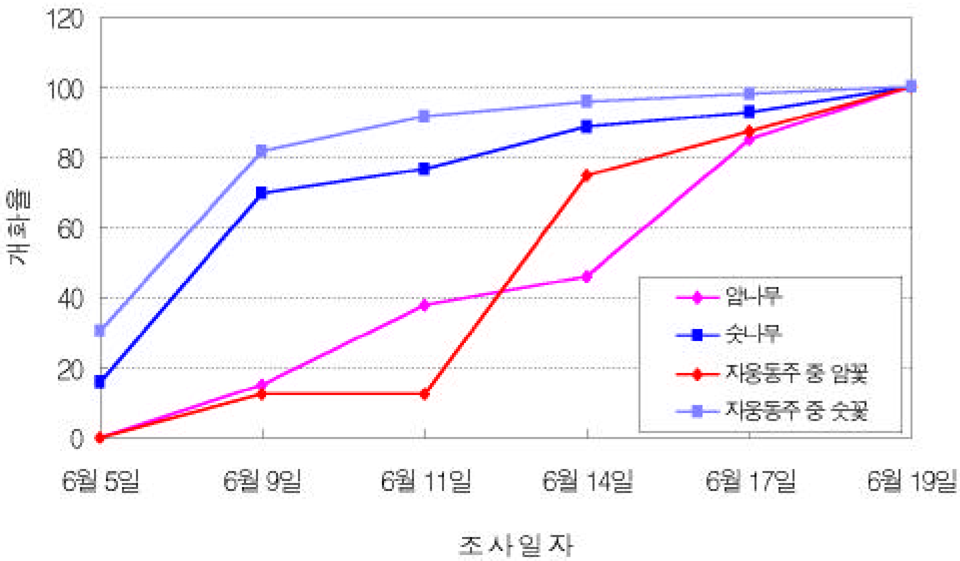


그림 1.4. 흑오미자 선발개체의 시간에 따른 개화율변화

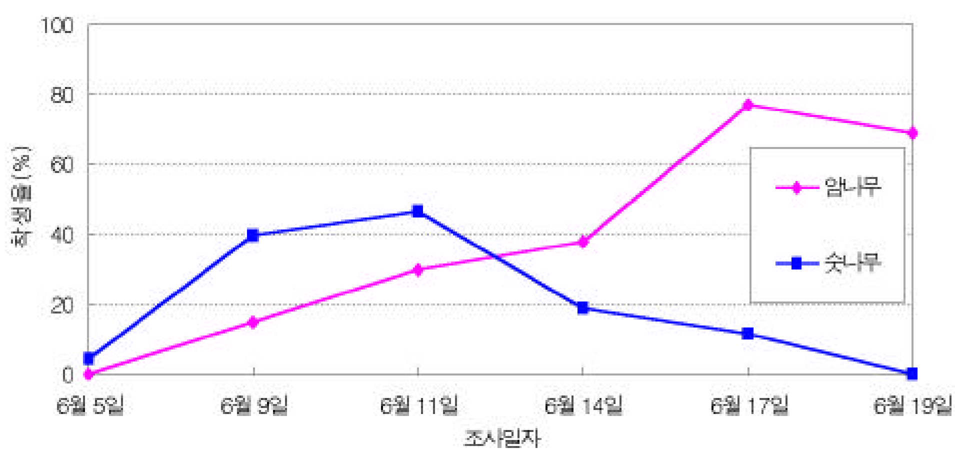


그림 1.5. 흑오미자 개화기 화기의 착생율 변화

(2) 지역간 결실특성

흑오미자의 개화결실 특성을 구명하기 위하여 천연자생지에서 선발된 우량개체중 5개체를 선정하여 화서당 개화수, 송이당 착과수, 본당 착과량을 조사한 결과 화서당 개화수는 평균 21.2개, 송이당 착과수는 평균 14.4개로 나타나 개화수 대비 결실수인 착과율은 68.0%였다. 또한 조사 대상 개체의 본당 착과량은 평균 905g이었다(표 1.13).

표 1.13. 천연자생지에서 개화결실 특성

개체 번호	해발고 (m)	근원경 (cm)	화서당개화수 (개)	송이당착과수 (개)	착과율 (%)	본당착과율 (g)
1	850	2.5	20.8	12.8	62	710
2	850	2.5	24.5	18.6	76	2,159
3	890	2.9	20.1	14.2	71	744
4	850	2.0	20.8	14.2	68	704
5	850	2.0	19.6	12.0	61	208
평 균		2.4	21.2	14.4	68	905

또한 한라산을 기준으로 4개 방위별로 선발된 4집단에 대해서 집단에 따른 개화결실 특성을 구명하기 위하여 화서당 개화수 및 송이당 착과수 등을 조사한 결과 영실, 관음사, 상효, 성판악 집단이 모두 화서당 개화수는 19.22 19.82개로 차이가 없었으나, 송이당 착과수에 있어서는 1.8 10.5개로 매우 차이가 크게 나타났다. 그 중 관음사 집단은 송이당 착과수가 10.5개로서 착과율이 54%로 나타나 다른 집단들에 비하여 현저히 양호하였다(표 1.14). 이와같은 결과로 볼 때 자생지의 생태적, 기상적, 토양적인 요인을 종합조사하여 분석한다면 착과율을 지배하는 요인이 구명될 것으로 보이며, 이와 같은 결과는 흑오미자 재배적지 구명과 재배환경조절방법구명에 매우 유용할 것으로 생각된다.

표 1.14. 흑오미자 선발집단별 개화 결실특성

집 단	해발고(m)	화서당개화수 (개)	송이당착과수 (개)	착과율(%)
영 실	850-890	19.32	8.9	46
관음사	770-790	19.51	10.5	54
상 효	550-800	19.22	1.8	9
성판악	650-750	19.82	6.5	33
평 균	550-750	19.50	6.9	36

4. 유전변이 조사

1) 동위효소분석에 의한 집단간 변이

(1) 대립유전자 빈도 및 분포

조사된 6개의 유전자좌 가운데 *Mdh-1*과 *Pgi-1*을 제외한 모든 유전자좌에서 2개 이상의 대립유전자가 관측되어 4개 유전자좌에서 다형성을 나타냈다(표 1.15). *Pgi-2*를 제외한 모든 유전자좌에서 동일한 대립유전자가 그 빈도가 가장 높은 주대립유전자로 나타났으며, *Pgi*-2의 경우 영실과 상효집단 모두 3개의 대립유전자가 관측되었으나 관음사집단의 경우 2개의 대립유전자만이 나타났으며, 다른 두 집단에서는 대립유전자 *b*가 주대립유전자인데 반해서 관음사집단의 경우 대립유전자 *a*가 주대립유전자인 것으로 나타나 다른 집단들과는 차이를 나타냈다.

유전자좌 *Idh-1*의 경우 영실집단에서만 대립유전자 *a*가 0.033의 빈도로 나타났으며, 유전자좌 *Mdh-2*의 경우 영실과 관음사집단에서는 3개의 대립유전자가 나타난 반면, 상효집단의 경우 1개의 대립유전자만이 관측되었다.

표 1.15. 흑오미자 자생집단의 6개 대립유전자좌

	Population				Population		
Locus	1	2	3	Locus	1	2	3
Idh				*Mdh-1*			
(N)	30	30	30	(N)	30	30	30
a	.033	.000	.000	a	1.000	1.000	1.000
b	.967	1.000	1.000				
Mdh-2				*Mnr*			
(N)	30	30	30	(N)	30	30	30
a	.083	.000	.133	a	.783	.833	.983
b	.883	1.000	.850	b	.217	.167	.017
c	.033	.000	.017				
Pgi-1				*Pgi-2*			
(N)	30	30	30	(N)	30	30	30
a	1.000	1.000	1.000	a	.250	.283	.617
				b	.683	.667	.383
				c	.067	.050	.000

N:조사개체수, 1: Youngsil(영실) 2: Sanghyo(상효); 3: Kwaneumsa(관음사)

(2) 유전적 다양도

흑오미자 집단이 보유하고 있는 유전변이량을 추정한 결과는 표 1. 26과 같다. 유전자좌당 평균 대립유전자수는 1.7개, 95% 및 99%수준에서의 다형적 유전자좌의 비율은 38.9%와 50.0%, 평균 이형접합도의 관측치와 기대치는 각각 0.141과 0.147로 나타났다.

여러 식물종들은 다양한 생태학적, 생활사적 특성들 가운데 지리적 분포 특성과 교배·번식 특성이 유전변이량과 유전구조를 결정짓는데 가장 큰 영향을 미치며 종 수준에서는 지리적 분포 특성이, 집단 수준에서는 교배·번식 특성이 보다 중요하다. 흑오미자 집단의 경우 96개 활엽수종에서 보고된 평균 유전변이량(A/L=1.68; P=45.1%; H_e=0.143: Hamrick et al., 1992)과 비교해 볼 때 유사한 정도의 변이를 보유하고 있는 것으로 나타났으며, 지리적 분포 범위가 국소적(endemic: A/L=1.48; P=26.3%; H_e=0.056)인 수종들과 비

교할 때 다소 많은 유전변이를 보유하고 있는 것으로 나타났다. 반면에 유성 및 무성생식을 하는 수종(P =67.7%, A/L =2.15, H_e=0.251) 및 동물의 배변을 통해 종자 분산이 이루어 지는 수종(A/L =1.90; P =60.3%; H_e=0.208)들과 비교할 때는 다소 낮은 값을 보였다. 또 지리적으로 광범위하게 분포하고 있는 국내의 다른 수종들과 비교할 때 변이량은 적은 것으로 나타났으며, 흑오미자와 같이 지리적 분포범위가 매우 한정적인 모감주나무와 비교해 볼 때는 유전변이량이 많은 것으로 나타났다.

표 1.16. 흑오미자의 유전적 다양도

Population	A/L	P_{95}	P_{98}	H_0	H_e
Youngsil	2.0	50.0	66.7	.172	.183
	(.4)			(.077)	(.080)
Sanghyo	1.5	33.3	33.3	.111	.127
	(.3)			(.070)	(.084)
	1.7	33.3	50.0	.139	.130
	(.3)			(.087)	(.082)
Mean	1.7	38.9	50.0	.141	.147

Note: A/L, number of alleles per locus; P_{95}, percentage of polymorphic loci at 95% level; P_{99}, percentage of polymorphic loci at 99% level; H_o, observed heterozygosity; H_e, Nei's unbiased expected heterozygosity

일반적으로 분포구역이 매우 제한되어 있거나 멸종위기에 처한 식물종들은 유전변이량이 매우 적게 나타난다. 앞에 살펴보았듯이 흑오미자 역시 분포구역이 넓고 연속적인 수종에 비해서는 유전변이가 적었으나 분포구역이 매우 제한되어 있고 국소적인 수종들과 비교했을 때는 다소 많은 유전변이를 보유하고 있는 것으로 나타났다. 이는 흑오미자의 경우 유·무성 생식에 의해 번식될 수 있기 때문인 것으로 생각된다. 일반적으로 식물은 유성생식에 의해서만 번식되는 종보다 유·무성 생식에 의해 번식되는 종의 유전변이가

높은 것으로 알려져 있다. 이는 환경조건의 악화 등으로 인해 유성생식이 불가능할 경우 무성생식에 의해 개체수를 증식함으로서 일정 수준의 집단크기를 유지할 수 있으며, 현재의 집단이 보유하고 있는 유전변이가 다양할 경우 다음 세대에서도 이를 일정하게 유지할 수 있도록 하는 기작이 될 수 있기 때문이다.

흑오미자가 일정 수준의 유전변이를 유지할 수 있었던 또 다른 원인으로는 흑오미자의 화기특성을 들 수 있다. 즉 흑오미자의 경우 자웅이주이기 때문에 자웅이주에서는 자배가 일어날 수 없으며, 결국 근친교배를 어느 정도 방지하기 위한 진화적 메카니즘이 작용하여 일정 수준의 유전적 다양도를 유지해 올 수 있었던 것으로 추정된다. 그러나, 이에 대한 좀 더 명확한 추정을 위해서는 앞으로 교배양식에 관한 정밀한 조사가 실시되어져야 할 것이다. 세번째로 흑오미자의 경우 종자전파가 주로 새(鳥)에 의해서 이루어지는데, 이같은 특성은 서로 격리된 집단 사이에 유전자 교류를 원활히 시켜줌으로서 유전자 부동 등의 효과로 인한 유전변이의 감소를 어느 정도 상쇄시킬 수 있는 기능을 해 온 것으로 추정된다.

흑오미자의 경우, 분포구역이 넓고 연속적이면서 흑오미자와 유사한 교배, 번식 특성을 보이는 다른 수종에 비해서는 유전변이가 상대적으로 적은 것으로 나타났다. 이같은 결과는 흑오미자가 나름대로 일정 수준의 유전변이를 유지하기 위한 진화과정을 거쳤지만 자생지 내 흑오미子의 밀도가 높지 않고 자웅이주이기 때문에 환경조건이 열악할 경우 실생묘보다는 영양증식에 의한 갱신이 이루어질 가능성이 높다.

또한 앞서 기술하였듯이 종자전파가 새에 의해 이루어지고 집단 사이에 여러 산재목들이 존재하여 징검다리 역할을 해주기 때문에 집단간 유전자 교류가 어느 정도 원활이 이루어질 수 있다고 생각되나 유전적 부동에 의한 유전변이 감소의 효과도 완전히 배제할 수는 없다고 생각된다.

(3) Wright의 F 분석 및 유전자형 분석

Wright의 F분석 결과 F_{IS} 및 F_{IT}값 모두 0에 가까운 값을 보여줌으로서 흑오미자 집단의 경우 Hardy-Weinberg 평형상태에 근접해 있음을 알 수 있었다(표). 이는 각 집단별로 각 유전자좌에서 관찰된 유전자형 빈도와 Hardy-Weinberg 평형 빈도와의 일치여부를 검정한 결과에서도 잘 나타나고 있는데, 모든 집단 모든 유전자좌에서 각 유전자형 빈도는 Hardy-Weinberg 평형상태를 벗어나고 있지 않는 것으로 나타났다. 이로부터 흑오미자 집단의 경우 자웅동주와 자웅이주가 같이 나타나고 유·무성 번식을 모두 따르는 등 복잡한 교배구조 및 번식특성을 가지고 있음에도 불구하고 Hardy-Weinberg 평형상태를 유지시켜 주기 위한 진화적 메카니즘이 작용하고 있는 것으로 추정되었다. 결국 흑오미자의 경우 그 교배양식에 관한 자세한 연구는 이루어진 바가 없으나 근친교배의 영향은 크게 받지 않고 있는 것으로 추정되었으며, 만일 근친교배 구조를 따르더라도 근친교배에 의한 동형접합체의 증가를 상쇄시켜 주기 위한 진화과정이 작용되어 온 것으로 추정된다. 아울러 이같은 진화작용은 앞서 살펴 보았듯이 흑오미자 집단이 일정 수준의 유전변이를 유지할 수 있도록 하는데 일조를 해 온 것으로 추정된다. 그러나 이 부분에 대해서는 앞으로 보다 자세한 연구가 요망된다.

표 1.17. 흑오미자 자연집단의 Wright의 F 분석 및 유전자형 분석

Locus	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}
Idh	-.034	-.011	.022
Mdh-2	.009	.054	.045
Mnr	-.231	-.154	.063
Pgi-2	.150	.227	.091
Mean	.025	.097	.074

흑오미자의 경우 전체 유전변이 가운데 집단간 차이는 7.4% (F_{ST}=0.074), 나머지 92.6%는 집단내 개체간 차이로부터 기인한 것으로 추정되었다. 이는 일반 목본식물들과 비교할 때 비슷한 값이었으며, 흑오미자와 같이 지리적 분포 범위가 매우 좁거나(G_{ST}=0.124) 국소적(G_{ST}=0.141)인 다른 수종들과 비교해 볼 때는 집단간 분화의 정도가 작음을 알 수 있었다. 이는 앞서 살펴보았듯이 흑오미자의 경우 주로 새에 의해 종자전파가 이루어지고 분포지를 중심으로 산재되어 있는 개체목들이 집단간 유전적 교류를 원활하게 해 줄 수 있는 징검다리 역할을 해 줌으로서 비슷한 지리적 분포 pattern을 갖는 다른 수종들에 비해서 집단간 유전적 분화가 작은 것으로 추정된다.

(4) Nei의 유전적 거리 및 유집분석

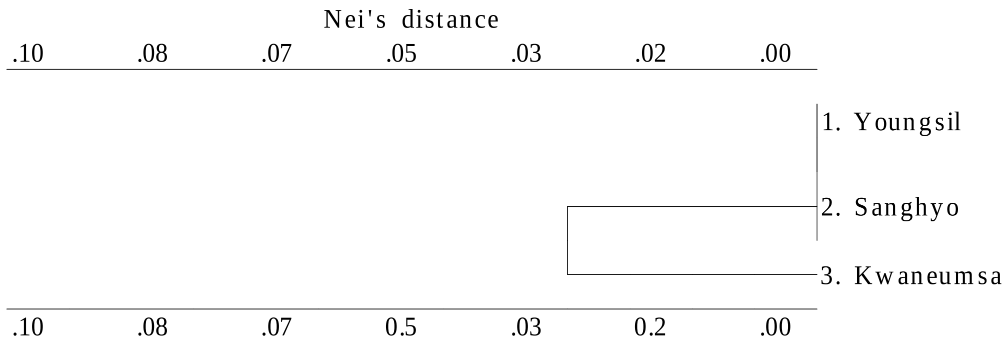
Nei의 유전적 거리(D) 및 유전적 동일도(I)를 구한 결과는 표 과 같다. 평균거리와 동일도는 각각 0.018과 0.983으로 나타나 앞서 F_{ST}분석과 마찬가지로 집단간 유전적 분화의 정도는 작은 것으로 나타났다.

표 1.18.흑오미자 자연집단의 Nei의 유전적 거리

Population	1	2	3
Youngsil	*****	.000	.028
Sanghyo	1.000	*****	.025
Kwaneumsa	.972	.976	*****

위에서 구한 유전적 거리를 이용하여 UPGMA법에 의한 유집분석을 실시한 결과는 그림 1.6과 같다. 분석결과 영실과 상효집단이 묶인 뒤 관음사집단이 묶였는데, 앞서 살펴보았듯이 관음사집단의 경우 유전자좌 *Pgi-2*에서 다른 집단들과는 상이한 유전자형 빈도 및 대립유전자 빈도를 보임으로서 이

같은 결과가 유도된 것으로 추정된다. 결과적으로 영실이나 상효집단에 비해서 관음사집단의 유전적 구조가 보다 이질적인 것으로 추정되었는데 이같은 원인의 정확한 추정을 위해서는 미세환경하에서의 각 유전자좌별 반응기작 등에 대한 보다 자세한 연구가 요망된다.



Cophenetic correlation = .994

그림 1.6. Nei 유전적 거리에 의한 유집분석

5. 흑오미자의 증식 및 재배법 개발

1) 종자증식

다양한 변이개체를 유도하여 신품종을 지속적으로 선발하기 위해서는 종자발아 특성을 구명할 필요가 있다. 1995년 9월 20일부터 1995년 10월 5일까지 자생지에서 채취한 종자를 果肉을 제거한 후 증류수로 비중 정선한 것을 공시재료로 이용하였다. 처리내용은 4℃ 냉장저장, 4℃냉장습사저장, 노천매장, 상온저장등 4개 처리로 처리기간은 5개월간 처리하여 포지에 300립씩 파종하여 당년발아율과 2년차 발아율을 조사한 표 1.19와 같았다.

표 1.19. 흑오미자 발아특성

처　　리	파 종 량(립)	발 근 율	
		당 년(%)	2 년 차(%)
냉 장 저 장	300	0	61
냉장습사저장	300	9	95
노 천 매 장	300	8	93
상 온 저 장	300	0	38

파종 당년도의 발아율은 극히 저조하였지만 발아가 개시된 처리구는 냉장습사저장과 노천매장처리구에서 8 9% 발아되었으며, 냉장저장 및 비교처리한 상온저장처리구는 전혀 발아가 되지 않았다. 2년차 발아율에 있어서도 냉장습사처리구와 노천매장처리구가 93 95%로 양호한 발아율을 나타낸 반면 냉장저장 및 비교구인 상온저장처리구에서는 38 61%로 냉장습사처리구와 노천매장처리구에 비해 저조한 발아율을 보였다. 흑오미자 종자발아는 습도가 유지된 상태로 변온처리함과 아울러 지베렐린 처리 등 좀 더 적극적인 처리가 필요하다고 생각되어, H_2O_2 10%, GA_3 1,000ppm, BAP 1,000ppm, 계면활성제 TWEEN과 Alcohol 30%액에 각 처리별로 12시간 침적처리한 후, 노천매장, 25℃ 습사상온저장, 4℃ 냉장습사저장, 습사변온저장으로 4℃ 7일, 25℃ 7일 반복처리로서 5개 전처리×4개 저장방법으로 처리한 후, 포지에 파종하여 60일 후 발아율을 조사하였다.

각 처리별 발아촉진 효과를 보면 종자전처리에서 GA_3 1,000ppm처리구가 15 29%로 가장 우수하였으며, 종자저장별로는 냉장습사저장과 변온처리구가 가장 우수하였다. 냉장습사저장구의 GA_3 처리가 가장 우수하였으나 29%에 불과한 저조한 발아율을 보였으나 종자 전처리 없이 냉장습사한 경우, 당년발아율이 9%에 불과하였다. 그러므로 본 시험에서 흑오미자의 종자발아에 지베렐린 처리효과가 무처리에 비해 3배 이상 효과가 있었으므로 Hartman과 Kester의 종자발아에 지베렐린 처리효과가 있다는 보고와 같은 경향을 보였으며, 변온처리구도 다른 종자처리구에 비해 양호한 결과를 보였다.

이상의 결과를 종합해 보면 흑오미자 종자는 생리적·기계적 장애의 2중 휴면성을 가지고 있어 2년만에 발아를 하나 지베렐린 처리와 냉장습사 및 변온처리로 당년발아촉진이 가능하다고 생각되어 진다.

가을에 성숙한 종자를 채취하여 냉장저장, 노천매장등 4가지 처리로 5개월간 처리한 후 파종한 바 냉장습사저장과 노천매장처리구에서 각각 95%와 93%의 우수한 발아율을 보였다(표 1.20).

표 1.20. 전처리에 따른 흑오미자 종자의 발아율

처 리		파종수(립)	발아수(본)	발아율(%)
저장처리	전처리			
4 개월 냉장습사저장	H_2O_2	150	20	13
	GA_3	150	44	29
	TWEEN	150	28	19
	Alcohol	150	0	0
	BAP	150	0	0
2개월 상온저장 + 3개월 냉장습사저장	H_2O_2	150	16	4
	GA_3	150	38	14
	TWEEN	150	32	10
	Alcohol	150	11	4
	BAP	150	5	2
4 개월 습사상온저장	H_2O_2	150	16	3
	GA_3	150	22	7
	TWEEN	150	15	5
	Alcohol	150	7	3
	BAP	150	0	0
4 개월 노천매장	H_2O_2	150	14	4
	GA_3	150	26	10
	TWEEN	150	18	6
	Alcohol	150	5	2
	BAP	150	0	0
24개월 냉장습사저장		150	33	14
4 개월 기건저장		150	0	0

2) 삽목증식

(1) 발근촉진제 및 시기별 효과

발근촉진제에 따른 평균삽목 발근율은 IBA 69%, NAA 55%, IAA 52%, 무처리구 52%순으로 나타나 IBA가 가장 좋은 결과를 보였고 NAA 50 ㎎/ℓ 처리구가 30%로 가장 저조한 발근율을 보였다. 발근촉진제 처리에 따라 삽목발근된 뿌리수 및 뿌리길이는 IBA처리구가 평균 6.6개, 6.1 cm로 가장 좋은 결과를 보였으며, 비교구가 뿌리수 47개, IAA처리구가 뿌리길이 5.1 cm로 가장 저조한 결과를 보였다.

표 1.21. 흑오미자 삽목시 생장조절물질의 효과

처리 (㎎/ℓ)	삽목수 (본)	발근수 (본)	발근율 (%)	뿌리수 (개)	뿌리길이 (cm)
IBA 50	60	34	57	5.7	6.4
100	60	46	77	6.6	6.2
500	60	48	80	6.4	6.1
1000	60	37	62	7.6	5.8
Mean	60	41	69	6.6	6.1
NAA 50	60	18	30	4.8	5.2
100	60	38	63	5.4	5.3
500	60	46	77	5.9	6.2
1000	60	29	48	6.1	5.6
Mean	60	33	55	5.6	5.6
IAA 50	60	24	40	4.8	5.4
100	60	29	48	4.6	5.9
500	60	38	63	4.9	4.9
1000	60	34	57	4.3	4.2
Mean	60	31	62	4.7	5.1
대조구	60	31	52	4.7	5.8

삽목시기 및 농도별 효과는 7월 10일 IBA 500 ㎎/ℓ 처리구에서 80%의 발근율을 보여 가장 좋은 효과를 보였으며, 8월 24일 발근촉진제가 처리되지 않은 무처리구에서 48%가 발근되어 가장 저조한 결과를 보였다. 또한 시기별 효과는 7월 10일 처리구가 평균 73%로 가장 좋은 결과를 보였고 8월 24일 처리구가 63%로 저조한 결과를 보여 삽수가 완전히 경화되는 8월 후반기

삽목이나 3월의 숙지삽목 보다는 녹지삽목이 좋은 결과를 보였다. 이러한 결과를 종합하면 삽수 채취시기는 삽수가 경화되지 않은 7월 초순에 채취하여 IBA 500 ㎎/ℓ를 처리하여 삽목하였을 경우가 가장 효과적일 것으로 생각된다.

Table 1.22. 삽목시기 및 IBA 농도별 효과

처 리	3월 20일	6월 10일	8월 1일	8월 24일
IBA 50ppm	57	63	68	55
100	77	78	78	77
500	80	83	78	78
1000	62	80	58	57
대조구	52	60	57	48
평균	66	73	67	63

또한 IBA 농도별 효과는 시기에 관계없이 500mg/ℓ의 농도로 처리 할 때 가장 좋은 결과를 보였으며 고농도나 저농도의 경우에는 다소 발근율이 감소하였다. 이러한 결과로 볼 때 흑오미자 삽목에 있어서는 삽목 시기 및 발근촉진물질의 농도에 따른 삽목 발근 효과가 나타나는 것으로 생각되었다. 흑오미자의 경우는 강우량이 많은 지역에서 주로 분포하며 수분 함량이 높은 곳에서도 잘 생장하는 습성 때문에 적절한 보습 조건 및 통기성이 유지되는 배양토에서 생장조절 물질을 처리하면 높은 발근율을 나타낼 것으로 생각 된다.

(2) 모수령 효과

모수령에 따른 삽목 발근율은 63 88%로 모수령의 증가에 따른 삽목 발근율이 감소하는 경향을 보였다. 뿌리수와 뿌리길이, 묘고에서는 뿌리길이, 묘고에서는 뿌리수 5.9 9.6개, 뿌리길이 5.8 7.3 cm, 묘고 6.1 9.0 cm로 모수령에 따라 유의적인 차이가 인정 되었다. 그러나 직경에 있어서는 차이가 없었다. 일반적인 수목의 삽목 발근력은 수령이 높아질수록 현저히 낮아 진다는 결과가 발표되고 있으며, Kim과 Nam은 주목의 삽목시험에서 모수령이 5, 10, 20년으로 증가함에 따라 발근율이 각각 85.7%, 81.7%, 62.4%로 감소한다고 하였으며

Yim은 리기다소나무의 경우 1, 2, 10, 20년으로 증가함에 따라 각각 84%, 43%, 28%, 15%로 급속히 감소한다는 결과와는 다소 상이한 결과로 흑오미자의 경우 15년생의 경우에도 63%가 발근되어 흑오미자는 비교적 유시성이 높은 수종이기 때문으로 생각된다.

표 1.23. 삽모시 모수령의 효과

모수령	삽목수 (본)	발근수 (본)	발근율 (%)	뿌리수 (개)	뿌리길이 (cm)	길이 (cm)	직경 (mm)
1	60	53	88	9.6	7.3	9.0	1.2
5	60	49	82	8.1	6.9	7.5	1.3
10	60	45	75	7.3	6.2	7.4	1.2
15	60	38	63	5.9	5.8	6.1	1.2
평균	60	46	77	7.7	6.6	7.5	1.2
F-값			15.90^{**}	12.78^{**}	9.30^{**}	9.42^{**}	0.97^{NS}

** : significant at 1% level

NS : Non significant at 1 or 5% level

(3) 삽수채취 부위 및 배양토 효과

삽수 채취 부위에 따른 발근율은 줄기상부에서 60%, 줄기중앙부에서 67%, 줄기하부에서 50%가 발근되어 삽수채취 부위에 따라 줄기중앙부가 가장 좋은 결과를 보였다. 또한 생존된 개체의 뿌리수, 뿌리길이, 묘고 및 직경에 있어서도 뿌리수 5.0 7.4개, 뿌리길이 5.7 6.7cm, 묘고 5.7 7.0cm 및 직경 1.0 2.1mm로 삽수위치에 따라 유의적인 차이가 인정 되었다.

표 1. 24. **삽수채취 부위 효과**

줄기 위치	삽목수 (본)	발근수	발근율 (%)	뿌리수 (개)	뿌리길이 (cm)	묘고 (cm)	직경 (mm)
상단부	60	36	60	7.1	6.4	6.8	1.9
중간부	60	40	67	7.4	6.7	7.0	2.0
하단부	60	30	50	5.0	5.7	5.7	2.1
평균	60	35	59	6.5	6.3	6.5	2.0
F-값			4.618**	89.36**	13.80**	27.40**	6.89**

** : significant at 1% level

NS : Non significant at 1 or 5% level

이러한 결과는 Kummerow**의 라디에타소나무 삽수 채취 부위에 따른 삽목시험 결과에서 수관중앙부에서 채취한 삽수가 삽목 발근율이 가장 좋았다는 연구결과와 정의 낙엽송의 삽목시험에서 삽수채취 부위에 따른 발근율 차이는 크게 나타나지 않았으나 수관 중앙부**, **수관 하층부**, **수관상층부 순으로 발근되었다는 결과와** Farrar and Grace**의** *Pinus monticola* **삽목시험에서 수관의 상부지 보다 하부지가 발근능력이 우수하며**, **정아지 보다 맹아지가 우수한 발근율을 보였다는 결과와 유사한 결과를 보여 덩굴성 식물인 흑오미자의 경우도 줄기에서 채취한 삽수로 신초발생후 녹지의 정화과정 따른 삽수의 위치 효과가 다르게 나타난 것으로 생각 된다**.

배양토가 삽목발근에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 21**과 같이 처리구에 따라** VPPL **처리구가** 68%**가 발근되어 가장 좋은 결과를 보였으며**, **비교구가** 38%**로 가장 저조한 결과를 보여 처리구간 유의적인 차이가 인정 되었다**. **또한 생존된 개체의 뿌리수**, **뿌리길이**, **묘고 직경에 있어서는 뿌리수** 6.2 7.0**개**, **뿌리길이** 6.0 6.5cm, **묘고** 6.4 6.7cm **및 직경** 2.0 2.1 mm**로 나타나 배양토에 따라 통계적으로 유의적인 차이는 인정 되지 않았다**.

표 1.25. 삽목시 배양토 효과

처리구	삽목수 (본)	발근수 (본)	발근율 (%)	뿌리수 (개)	뿌리길이 (cm)
대조구	60	23	38	6.2	6.0
VPER	60	38	63	6.6	6.5
VPEA	60	39	65	6.3	6.2
VPPL	60	41	68	7.0	6.3
평균	60	35	59	6.5	6.3
F-값			17.31**	0.868NS	0.826NS

*VPER:vermiculite+perlite 1:1(v/v), VPEA:vermiculite+peatmoss 1:1 (v/v), VPPL:vermiculite+peatmoss+perlite 1:1(v/v), ** : significant at 1% level, NS : Non significant at 1 or 5% level

삽수채취 부위와의 관계는 발근수, 뿌리수, 뿌리길이, 묘고 와는 높은 부의 상관 관계가 인정되었으며, 배양토는 발근수와는 높은 정의 상관관계가 있었으나 다른 요인과는 상관 관계가 없었다.

이러한 결과로 볼 때 삽수채취 부위에 따라 발근율, 발근수, 뿌리수, 뿌리길이 등이 변화한다는 것을 알 수 있었으며, 배양토의 경우는 발근율에 많은 영향을 미치나 그 밖의 요인에서는 영향을 미치지 않는 것으로 생각 된다.

(4) 선발 개체간 발근력의 차이

선발 개체간의 발근율은 40 85%로 대단히 큰 차이를 나타내고 있다. 이중 제주 2, 9, 25호가 80% 가 발근되어 가장 좋은 결과를 보였으며, 제주 10호가 40%의 발근율을 보여 가장 저조한 결과를 보였다. 또한 뿌리수 5.0 7.6개, 뿌리길이는 5.4 7.4cm로 선발 개체간에 차이를 보였다.

이러한 결과는 선발 개체간의 수령에 따른 유시성 차이와 생육 환경에 의한 차이로 생각되어지나 개체간 발근력의 차이는 생육 환경에 의한 결과와 다른 발근 물질의 차이에서 오는 것으로 추정된다는 결과로 볼 때 금후 유시성과 생육 환경 등의 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

Table 1.26. 선발 개체간 발근력의 차이

클론명	삽목수 (본)	발근수 (본)	발근율 (%)	뿌리수 (개)	뿌리길이 (cm)
제주 1	20	15	75	6.4	7.4
제주 2	20	17	85	5.8	6.8
제주 3	20	11	55	6.2	6.9
제주 4	20	13	65	7.6	6.6
제주 5	20	16	80	5.2	5.4
제주 6	20	9	45	6.4	6.6
제주 7	20	12	60	5.2	6.3
제주 8	20	14	70	5.0	5.8
제주 9	20	17	85	7.3	6.8
제주 10	20	8	40	6.6	6.4
제주 13	20	13	65	6.2	7.6
제주 15	20	17	85	5.8	7.8
제주 16	20	15	75	6.2	6.4
제주 20	20	10	50	5.6	6.8
평 균	20	13	67	6.1	6.7

3) 접목증식

선발된 우량개체 중 30클론에 대하여 종자 및 접·삽수를 공급할 수 있는 기반조성을 목적으로 접목을 실시한 결과 클론간 활착율은 63 92% 범위의 변이를 보였다(표 1.27). 이 결과는 개체간의 변이라기보다는 접수의 생장 및 보관상태에 기인된 결과로 보여지나 평균 83%의 양호한 활착율을 보여 접목에 의한 증식 및 개화결실 촉진에는 문제가 없을 것으로 판단된다.

표 1.27. 우량선발개체 접목활착율

클론명	접목수 (본)	활착수 (본)	활착율 (%)	클론명	접목수 (본)	활착수 (본)	활착율 (%)
제주 1	24	20	83	제주30	24	15	63
2	24	17	71	31	24	18	75
3	24	22	92	32	26	17	65
4	24	21	88	33	18	13	72
5	24	20	83	34	25	19	76
6	24	22	92	35	30	18	60
7	24	21	88	36	20	10	50
8	24	18	75	37	22	12	55
9	24	20	83	38	26	15	58
10	24	18	75	39	24	20	83
12	24	23	72	40	24	18	75
13	24	22	92	41	24	18	75
14	24	21	88	42	22	14	64
15	24	28	75	43	22	17	77
19	24	16	73	46	24	14	70
20	24	20	83	47	26	20	83
22	24	16	73	48	28	11	42
28	24	17	72	49	24	18	64
30	24	15	63	50	26	17	71
				계	983	702	71

4) 조직배양에 의한 대량증식법 개발

구내에 유지되어 있는 클론의 동아를 이용하여 기내대량증식법을 구명하였다. 재료는 자웅동주 개체인 제주 6호와 41호, 암그루인 8호, 14호, 22호 및 27를 대상으로 하였다.

(1) 배양 정착단계

식물의 생장이 정지하고 동아가 형서되는 시기인 11월부터 전년에 형성된 가지와 당년에 형성된 가지를 구분 채취하여 표면소독을 한 후 기내에 배양하였다.

표면소독은 Tween 20을 넣어 수돗물로 흔들어 씻어준 후 2%의 NaClO에 침지하여 20분간 소독하고, 0.2%의 $HgCl_2$ 에 10분간 소독한 후 멸균수로 4번 헹군다. 물기를 제거한 후 소지부분을 95%의 EtOH를 이용하여 화염소독한다. 표면소독된 동아는 수피와 아린을 제거한 후 두가지 배지와 4가지 호르몬으로 조합된 배지에 치상하여 오염과 개엽 및 줄기 유도율을 조사하였다.

표 1.28. 클론별 전년지와 당년지의 초대배양시 오염율

클 론	전년지		당년지	
	치상점수	오염율(%)	치상점수	오염율(%)
제주 6 호	291	47.8	356	23.9
제주 8 호	80	51.2	72	19.4
제주 14 호	61	47.5	59	35.5
제주 22 호	174	54.0	160	25
제주 27 호	40	67.5	56	21.4
제주 41 호	39	56.4	24	20.8
평 균	114.2	54.1	121.2	24.3

야외에서 채취한 시료는 주변의 오염원에 노출되어 있기 때문에 기내배양을 시작하는 단계에서 오염으로 인한 피해가 심각하다. 오염율은 클론에 따른 차이는 의미가 없으나 전년지와 당년지를 비교한 결과 같은 방법으로 소독하였으나 전년지에서 채취한 시료는 높은 오염율(54.1%)을 나타낸 반면 당년지는 24.4%로 오염율이 낮아 당년지를 이용하는 것이 더 효과적이었다.
오염이 되지 않는 동아는 모든 배지에서 개엽하였으나 배지에 따라 개엽한 잎의 수와 생중량에 차이가 있었다.

표 1.29. 배지 및 호르몬의 조합에 의한 개엽한 잎의 수(제주 6 호)

배지 및 호르몬 (㎎/ℓ)	전 년 지	당 년 지
WPM 무첨가	4.4 ± 1.0	3.9 ± 1.2
BAP 1.0	2.9 ± 0.9	2.7 ± 1.0
GA_3 1.0	3.2 ± 1.5	3.8 ± 1.4
BAP 1.0+GA_3 1.0	3.2 ± 0.7	2.9 ± 0.9
MS 무첨가	3.5 ± 1.5	3.8 ± 1.3
BAP 1.0	2.8 ± 1.1	1.9 ± 0.8
GA_3 1.0	2.8 ± 1.1	2.7 ± 1.1
BAP 1.0+GA_3 1.0	2.7 ± 0.8	2.2 ± 0.8

대부분의 배지에서 개엽한 잎의 평균적인 수는 2 4개였으며, 배지간의 차이는 크지 않았다. 또한 전년지와 당년지간의 차이도 없었다. 그러나 잎의 수와는 달리 생중량은 호르몬의 조합에 따라 다른 경향을 보였다. 이는 잎의 크기가 다르다는 것을 의미함과 동시에 호르몬이 생장에 영향을 미쳤다는 증거이다.
배지 및 호르몬의 조합에 따른 생장량의 차이는 다음과 같다.

표 1.30. 배지 및 호르몬의 조합에 의한 생중량(제주 6 호)

배지 및 호르몬(㎎/ℓ)	전 년 지	당 년 지
WPM 무첨가	76.2 ± 21.1	74.6 ± 22.9
BAP 1.0	100.5 ± 37.6	80.9 ± 26.6
GA_3 1.0	80.4 ± 36.0	97.7 ± 20.7
BAP 1.0+GA_3 1.0	120.6 ± 57.4	91.9 ± 31.1
MS 무첨가	75.3 ± 38.1	82.2 ± 27.7
BAP 1.0	98.3 ± 39.5	82.0 ± 31.2
GA_3 1.0	88.0 ± 32.9	87.1 ± 40.4
BAP 1.0+GA_3 1.0	126.0 ± 45.7	82.4 ± 37.4

BAP 1.0㎎/ℓ 또는 BAP와 GA_3가 혼용처리된 조합에서 생중량이 높았으며 WPM과 MS 배지모두 공통으로 나타났고, 호르몬이 첨가되지 않았을때에는 생중량이 낮은 것을 알 수 있다. 대부분의 배지에서 개엽 후에 잎의 크기 생장을 하였는데 이후의 기내에서 다경줄기를 유도하기 위해서는 줄기의 형성도 뒤따라야 한다.

표 1.31. 개엽유도시 줄기형성율(%)

배지 및 호르몬(㎎/ℓ)		전 년 지	당 년 지
WPM	무첨가	0	0
	BAP 1.0	9.1	0
	GA_3 1.0	55.6	19.4
	BAP 1.0+GA_3 1.0	23.1	4.0
MS	무첨가	0	0
	BAP 1.0	0	0
	GA_3 1.0	35.7	14.3
	BAP 1.0+GA_3 1.0	11.8	0

개엽한 가운데 줄기가 형성되는 호르몬의 조건은 GA_3가 단독으로 처리되었을 때 또는 GA_3와 BAP가 혼용처리되었을 때였으며 호르몬이 첨가되지 않은 경우에는 개엽은 되었지만 줄기는 형성되지 않았다. 동아에서 줄기가 형성되기 위해서는 GA_3가 필수적인 것으로 판단된다. BAP가 단독으로 처리된 경우에도 줄기의 형성율은 낮았다. WPM과 MS 배지를 비교할 때 WPM 배지에서 줄기 형성율이 높았다. 전년지와 당년지를 비교하였을 때 당년지보다는 전년지의 동아에서 줄기 형성율이 높게 나타났다.

동아에서 유래된 식물체로부터 다경줄기를 유도하기 위하여 싸이토키닌 두 종류를 농도별로 처리한 결과 BAP 2.0㎎/ℓ와 TDZ 0.05 0.1㎎ℓ에서 평균 3개의 줄기가 형성되었다. 그러나 줄기의 길이가 매우 짧아 GA_3를 처리하여 길이를 생장시킬 필요가 있었다.

표 1.32. 싸이토키닌 농도에 따른 줄기 생중량, 줄기 유도율 및 줄기 길이

배 지	생 중 량	유도된 줄기 수	유도된 줄기길이
BAP 0.5	264.8 ± 165.3	1.1 ± 1.1	10.6 ± 5.9
BAP 1.0	243.5 ± 113.3	2.1 ± 1.9	8.0 ± 3.6
BAP 2.0	277.8 ± 154.6	3.0 ± 2.5	7.3 ± 3.0
BAP 3.0	267.6 ± 59.4	2.3 ± 2.3	7.5 ± 3.8
BAP 5.0	315.6 ± 140.9	1.9 ± 1.7	9.4 ± 5.5
TDZ 0.05	349.7 ± 185.2	2.8 ± 2.9	7.4 ± 3.3
TDZ 0.1	302.2 ± 146.1	2.0 ± 1.8	7.9 ± 3.9
TDZ 1.0	296.3 ± 169.4	2.8 ± 2.5	7.4 ± 3.9

BAP와 GA_3를 동시에 처리한 경우 BAP 또는 GA_3를 단독으로 처리한 경우보다 줄기 유도율이 높아졌으며, 클론에 따라 차이는 있었으나 대부분 GA_3의 농도가 BAP보다 높은 경우에 줄기 유도율이 높아지는 경향을 보였으며, 생중량을 조사한 결과 GA_3 3.0㎎/ℓ와 BAP 2.0㎎/ℓ가 첨가된 배지에서 가장 높게 나타났다 (표 1.32.).

표 1.33. 배지의 조합에 따른 줄기의 생중량

배 지	생 중 량
BAP 1.0 + GA_3 1.0	218.9 ± 89.1
BAP 1.0 + GA_3 2.0	159.5 ± 72.3
BAP 1.0 + GA_3 3.0	217.5 ± 74.7
BAP 2.0 + GA_3 1.0	194.3 ± 107.5
BAP 2.0 + GA_3 2.0	251.8 ± 126.2
BAP 2.0 + GA_3 3.0	153.9 ± 77.8
BAP 3.0 + GA_3 1.0	169.3 ± 68.6
BAP 3.0 + GA_3 2.0	258.3 ± 92.1
BAP 3.0 + GA_3 3.0	172.3 ± 123.4

종자번식, 접목과 삽목에 의한 증식 및 조직배양과 같은 방법을 통하여 대량증식을 수행하였으며, 이에 의해 흑오미자의 묘목을 양성하고 있다(그림 1.7).

5) 파골라 재배방법 구명

우수 품종이 개발보급 되었을 경우 개화결실을 조기에 유도하고 관리상의 경제적 효율성을 제고하기 위하여 파골라 재배방법을 시험중이며, 이를 위하여 자생지 현지에 18㎡규모 1개소, 36㎡규모 1개소를 설치하였으며, 시험장내 포지 상태에서의 파골라 재배방법을 구명하기 위하여 170㎡규모의 파골라를 설치하여 25클론 86본의 흑오미자 접목묘를 이식하였다(그림 1.8).
1997년 이식한 접목묘에서 1999년 4월 개화가 시작되었다(표 1.34).
개화율은 전체 식재본수에 26.4%로 나타났으며, 숫꽃이 327개, 암꽃이 248개로 숫꽃의 양이 더 많았으며, 자연상태에서 6.3:1인데 비해 숫꽃의 비율이 적었다.

표 1.34. 파골라 재배 개체의 개화율

식재본수 (본)	개화본수 (본)	개화율 (%)	개화수	
			암꽃	숫꽃
125	33	26.4	327	248

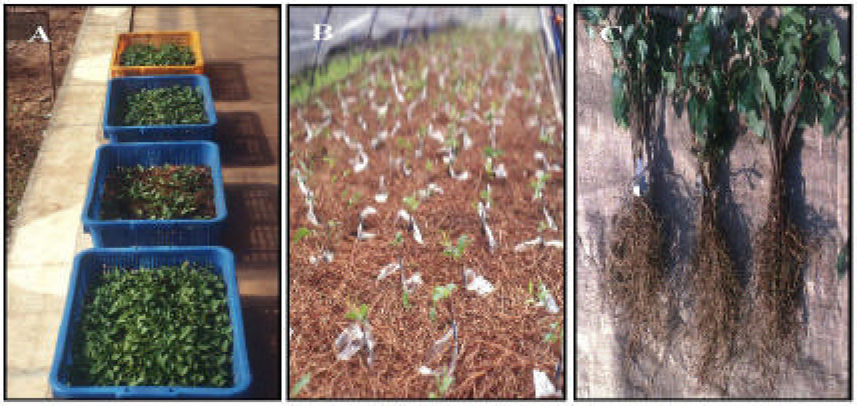


그림 1.7. 흑오미자 증식(A : 파종, B : 접목 C : 삽목)

그림 1.8. Pergola를 이용한 재배법 개발

제 4 절 결 론

약용, 식용으로 가치가 인정된 흑오미자를 무분별한 채취에 의한 자생지의 보존과 농산촌의 소득작목으로 개발하기 위하여 연구를 실행한 결과 흑오미자의 자생지는 해발고 600 1,350m 범위 내에 주로 북향, 북서향 및 남서향을 중심으로 비교적 습도가 많고 35。이하의 완만한 경사를 갖는 산록부에 위치하고 있다. 소나무, 졸참나무, 때죽나무등이 우점하고 있는 낙엽활엽수림대의 2차림에 분포하며, 400㎡당 3 39본이 출연하였다. 연평균 강우량은 약 3,000 3,094 mm 정도였으며, 연평균 기온은 8.8 10.5℃ 이지만 해발 상승에 따라 0.6℃씩 감소하므로 흑오미자의 최저 극한기온은 1,300m지점을 기준으로 할 때 -7℃이하로 내려가지 않아야 생육이 가능하리라고 생각한다. 열매형질이 우수한 개체를 50본 선발하였다. 흑오미자는 5월부터 개화하기 시작하여 6월에 대부분 개화한다. 수꽃은 암꽃에 비하여 수가 많으며, 자웅동주에서도 1:6.3으로 수꽃의 비율이 높다. 화서당 개화수는 19.2 19.8개이다. 본당 착과량은 최고 106.2개로 결실하였으며, 송이당 착과수는 집단간 9.3 11.1개로 큰 차이가 없었다. 과실중량은 0.99g, ℓ당 과실수는 722 795개였다. 증식법 개발을 위하여 삽목, 접목 및 조직배양을 실시한 결과 IBA 500ppm에서 80%가 발근하였으며, 접목 활착율은 63 92%로 클론간 차이는 있었으나 양호하였다. 동아를 이용하여 조직배양한 결과 WPM 배지에 BAP와 GA_3를 각각 1.0 ㎎/ℓ처리하여 줄기를 유도할 수 있었으며, BAP 3.0㎎/ℓ를 첨가하였을 때 평균 3개의 다경줄기를 유도할 수 있었다. 신품종육성을 위하여 종자를 채취하여 전처리 및 변온저장을 통하여 발아율을 높일 수 있었다. 증식된 품종은 조기개화결실을 유도하고, 관리상 경제적 효율을 위하여 파골라를 이용하여 재배하고 있으며, 지역에 따른 적응성을 검증하기 위해 충청지방에 식재하여 시험재배중에 있으며, 시범 농가에 200본을 보급하여 파골라를 이용한 재배중에 있다. 우수한 품종의 선발하여 인공적인 증식법을 이용하면 자생지의 훼손을 막을 수 있으며, 농가에 새로운 소득작목으로 보급할 수 있을 것으로 생각된다. 또 조직배양법이 이용되면 생물반응기 등 첨단방법을 통하여 대량증식이 가능해지며, 새로운 품종개발을 위한 생물공학적 방법을 적용할 수 있을 것으로 기대된다.

제 3 장 RAPD에 의한 품종탐색분야

제1절 서 설

본 연구는 RAPD 분석을 통해 궁극적으로, 흑오미자의 우량품종을 손쉽고 정확하게 동정할 수 있는 genetic marker를 개발하고자 하였다. 이를 위해 다음과 같은 실험순서에 의해 연구를 진행하였다.

첫째, 식물에서 DNA의 분리시에는 식물의 종류, 잎의 성숙정도 등에 따라 얻어지는 DNA의 순도 및 yield의 차이가 PCR의 결과에 큰 영향을 주기 때문에, 먼저 흑오미자의 잎으로부터 genomic DNA를 추출하는 방법을 확립하였다.

둘째, PCR은 template DNA, Mg^{2+}, *Taq* DNA polymerase, dNTP의 농도, annealing 온도 및 cycle의 수에 따라 band pattern에 차이가 있기 때문에 RAPD를 위한 최적의 조건을 확립하여 재현성을 검증하였다.

셋째, 식물체의 조직배양은 종에 따라 사용되는 생장조절물질의 양에 차이가 있기 때문에 오미자의 조직배양을 위한 배양기술을 확립하기 위해 동아로부터 Callus 및 식물체 재분화가 가능한 배양조건을 확립하였다.

넷째, 혹오미자의 품종특이적 marker를 선발하여 이들 marker의 유용성을 검토하였고, 특이적인 marker들을 cloning하여 품종 동정 kit로의 제조가능성을 탐색하였다.

제2절 연구수행방법

1. 식물재료

본 실험에 사용한 재료는 제주에서 채집된 개체들로 *Schisandra*속 19개체로 흑오미자 자웅동주 3개체 (6호, 41호, 51호), 수그루 8개체 (46, 45번, 47번, 48번,

49번, 50번, 52번, 53번), 암그루 7개체 (29번, 32번, 33번, 42번, 44번, 54번, 55번)와 오미자 1개체 및 남오미자인 *Kadsura japonica*의 잎을 재료로 사용하였다.

2. Genomic DNA의 분리 및 정제

액체질소로 냉동시킨 뒤 막자사발로 분쇄시킨 500 mg의 엽육조직에 시료의 10배량의 차가운 isolation buffer [10% polyethylene glycol 6000, 0.35 M sorbitol, 0.1 M Tris (pH 8.0), 0.5% spermidine, 0.5% spermine, 0.5% β-mercaptoethanol]를 넣고 잘 교반한 후, 원심분리 (4℃, 15,000 rpm, 10분)하여 침전물을 얻었다. 이 침전물에 5배량의 lysis buffer [0.35 M sorbitol, 0.1 M Tris (pH 8.0), 0.5% spermidine, 0.5% spermine, 0.5% β-mercapto -ethanol]와 1/10 배량의 10% sarcosine을 첨가하고, 실온에서 10분간 반응시킨 후, 2배의 CTAB 용액 [2% cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), 0.1 M Tris (pH 9.5), 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, 0.5% β-mercaptoethanol]을 넣고, 65℃에서 10분간 반응시켰다. 여기에 동량의 chloroform (chloroform:isoamylalchol = 24:1)을 첨가한 후 원심분리 (25℃, 15,000 rpm, 10분)하여 상층액을 얻었으며, 동량의 isopropanol을 넣어 핵산을 침전시켰다. 침전된 DNA를 pipet으로 조심스럽게 빨아들여 차가운 99.9% ethanol이 들어있는 tube로 옮겨 원심분리한 다음, 상층액을 제거하고 차가운 70 80% ethanol 1 ㎖을 첨가하여, 다시 원심분리하였다. 얻어진 침전물을 건조시킨 다음, 건조된 침전물을 200 ㎕의 TE buffer [10 mM Tris (pH 8.0), 1 mM EDTA]로 녹인 후, 동량의 phenol:chloroform (1:1)으로 처리하고 원심분리(25℃, 15,000 rpm, 10분)하여 상층액을 얻었다. 이 상층액에 isopropanol을 넣어 침전물을 얻어내고, 99.9% ethanol 1 ㎖을 첨가하여 원심분리 (4℃, 15,000 rpm, 10분)하였다. 상층액을 버리고 얻어진 침전물에 다시 70% ethanol을 처리하여 원심분리 (4℃, 15,000 rpm, 10분)한 후 침전물을 건조시켰다. 건조시킨 DNA는 TE buffer [10 mM Tris (pH 8.0), 1 mM EDTA]로 녹일 경우

EDTA가 PCR buffer의 Mg^{2+}의 농도에 영향을 미칠 수 있으므로 적당량의 증류수에 녹였다. 얻어진 DNA 양은 Hoefer사의 DNA fluorometer (TKO-100)을 이용하여 측정하였다.

3. Random primers

PCR에 사용된 Primer는 Operon Technologies, Inc.로부터 구입한 random primer OPA kit (20 primers), OPB kit (20 primers), OPC kit (20 primers), OPD kit (20 primers), OPE kit (20 primers), OPF kit (20 primers), OPG kit (20 primers) , OPH kit (20 primers), OPI kit (20 primers)의 총 180개의 primer를 사용하였다.

4. PCR의 조건

가. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

PCR반응액은 20 ng의 template DNA, 25 pmole의 primer (decanucleotide), 각 200 μM의 deoxyribonucleic acid, 1.5 mM의 $MgCl_2$, 1/10의 10 × PCR buffer [100 mM Tris-HCl, 25 mM $MgCl_2$, 500 mM KCl (pH 8.3)], 1.25 unit의 *Taq* DNA polymerase (Takara)를 포함하는 25 ㎕의 반응액을 PCR에 사용하였다. Perkin Elmer사의 GeneAmp PCR system 2400을 사용하여 94℃에서 5분간 초기 denaturation을 행한 뒤, 94℃에서 30초간 denaturation, 37℃에서 30초간 annealing, 72℃에서 30초간 extension과정을 45회 반복하였다. 마지막으로 72℃에서 5분동안 반응을 시켰다. 얻어진 PCR 산물은 1% agarose gel에서 전기영동 한 후 ethidium bromide로 염색하여 결과를 얻었다.

나. 특이적 marker의 품종 동정을 위한 PCR

PCR 반응액의 조성은 상기와 같은 농도로 사용하였다. 94℃에서 5분간 초기

denaturation을 행한 뒤, 94℃에서 30초간 denaturation, 55℃에서 30초간 annealing, 72℃에서 30초간 extension과정을 30회 반복하였다. 마지막으로 72℃에서 5분동안 반응을 시켰다. 얻어진 PCR 산물은 1.2% agarose gel에서 전기영동 한 후 ethidium bromide로 염색하여 결과를 얻었다.

5. Agarose gel로부터 DNA의 추출

RAPD를 통해 DNA를 증폭시킨 후, 수그루 및 암그루 특이적인 marker로 예상되는 band를 agarose gel로부터 추출해 내기 위해서 GENECLEAN kit (Bio101)을 사용하였다. 원하는 부위의 gel을 잘라내어 3배 부피의 NaI용액을 넣고, 45 55℃ 항온수조에서 5분간 반응시켰다. 5 μℓ의 glassmilk를 넣어 잘 혼합한 후, 얼음에 5분간 반응시켰다. 이것을 원심분리 (15,000 rpm, 5초)하여 얻어진 침전물에 200 μℓ의 New wash (New concentrate 14 mℓ, H_2O 280 mℓ, 99.9% ethyl alcohol 310 mℓ)로 3번 세척하였다. 침전물에 TE buffer를 넣어 잘 섞어 45 55℃에서 3분간 처리한 후 원심분리 (15,000 rpm, 3분)하여 상층액을 취하였다. 얻어진 DNA sample의 정량은 Hoefer사의 DNA fluorometer (TKO-100)를 이용하였다.

6. 특이적 marker의 cloning

얻어진 수그루, 암그루 및 자웅동주에 특이적인 marker로 예상되는 band를 추출하여, pGEM-T Easy Vector System (Promega 사)을 이용하여 cloning하였다. 이때 insert와 vector의 몰비를 3:1로 조절하여 첨가하였다. 적당량의 DNA에 1 μℓ의 T4 DNA ligase 10×buffer, pGEM-T easy vector (50 ng, 그림 2-1) 1 μℓ, T4 DNA ligase (3 Weiss units/μℓ)를 넣고, 멸균증류수로 최종 부피를 10 μℓ로 조절하였다. 반응액은 4℃ 항온수조에서 16시간 24시간 동안 반응시켰다. ligation이 끝난 후 50 μℓ의 competent cell을 반응액에 넣어 조심스럽게 잘 섞은

후, 얼음에 20분간 방치하였다. 이 용액을 42℃ 항온수조에서 45 50초 동안 열처리 한 뒤, 즉시 얼음으로 옮겼다. 여기에 950 ㎕의 SOC medium [0.5% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) tryptone, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 20 mM $MgSO_4$, 20 mM glucose]을 넣어 잘 섞은 후, 37℃ 진탕배양기에서 1시간 30분 동안 배양하였다. 이 배양액은 ampicillin (50 ㎍/㎖), 20 ㎕의 X-gal (50 ㎎/㎖ in dimethylformamide), 100 ㎕의 IPTG (100 mM)이 첨가된 LB (tryptone 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 5 g, 1 M NaOH 1 ㎖/ℓ) 배지에 도말하고 37℃ 배양기에서 16 24시간 배양하였다. 생성된 흰색 colony를 선발하여 이들의 plasmid DNA를 추출한 후 제한효소 *Eco*RⅠ으로 절단하여 전기영동을 통해 특이적은 marker의 삽입여부를 확인하였다.

7. callus의 대량증식을 위한 배지의 조성 조사

채취된 흑오미자의 동아를 70% 에탄올에 30초간 처리하고 2% sodium hypochlorite 용액에서 15분간 표면살균한 후 무균상자에서 생장점 주위의 엽원기를 채취하였다. 채취된 엽원기를 생장조절물질 (NAA, BA)이 혼용조합된 MS, WPM, GD배지로부터 callus를 유도하였다.

8. Plasmid DNA의 추출

가. Cloning된 plasmid DNA의 추출

Cloning 된 colony를 ampicillin (50 ㎍/㎕)이 첨가된 LB 배지에 접종하여 37℃의 진탕배양기에서 saturation시킨 후, Wizard™ Minipreps DNA Purification System (Promega)을 이용하여 plasmid DNA를 분리하였다. 배양액을 1.5 ㎖의 eppendorff tube에 옮겨 15,000 rpm, 1분간 원심분리한 뒤 침전물에 cell resuspension solution (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM EDTA, 100 ㎍/㎖)을 넣어 현탁시킨 후, 200 ㎕의 cell lysis solution을 넣어 현탁액이 투명해질 때까지

조심스럽게 섞었다. 여기에 200 ㎕의 neutralization solution을 넣어 여러번 섞어 준 후 15,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상층액을 취하여 1 ㎖ 의 Wizard™ Minipreps DNA

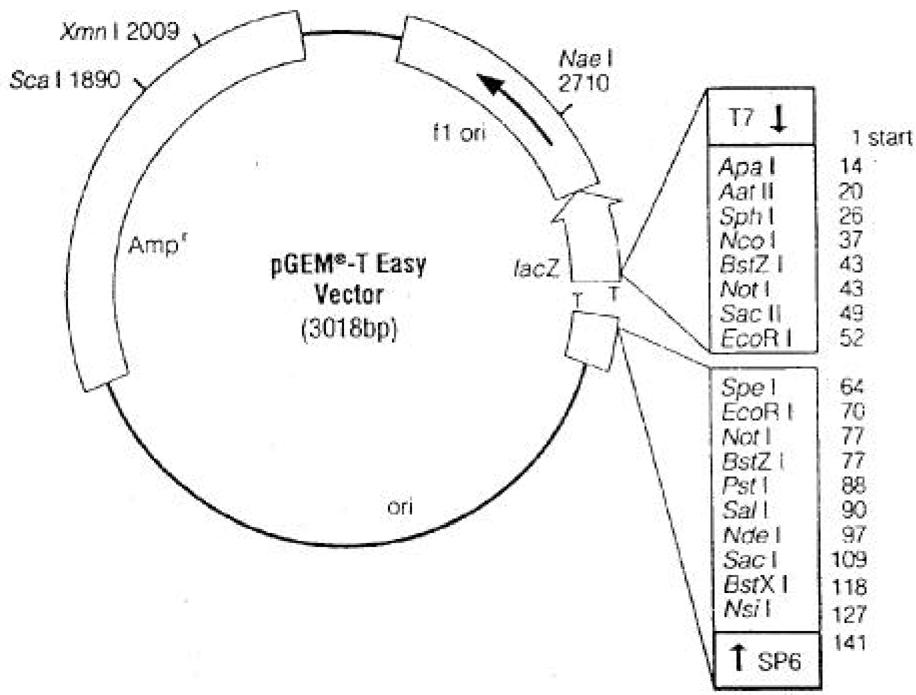


그림 2.1. pGEM-T easy vector의 유전자 지도.

pGEM-T vector는 pGEM-5zf(+) DNA를 *Eco*RV로 자른 후, 양 끝 말단에 thymidine을 붙여서 만들었다. 이들 3'-T overhang은 PCR 산물의 ligation 효율을 증가시킨다. purification resin을 넣어 잘 섞은 후, 이 resin/DNA 혼합액을 Wizard™ minicolumn으로 elution하여 순수한 DNA를 얻었다. 여기에 2 ㎖의 column wash solution으로 세척한 후, 4℃, 15,000 rpm에서 2분간 원심분리 하여 상온에서 30분 정도 말렸다. 60℃의 멸균증류수 20 ㎕를 넣어 DNA를 녹인 후

4℃, 15,000 rpm, 2분간 원심분리하여 DNA를 얻어냈다.

나. Sequencing을 위한 plasmid의 추출

Cloning 된 colony를 ampicillin (50 ㎍/㎕)이 첨가된 2 ㎖의 LB 배지에 접종하여 37℃의 진탕배양기에서 saturation시킨 후 500 ㎖의 LB배지에 접종하여 overnignt 배양하였다. 배양액을 centrifuge tube에 옮겨 얼음에 5분간 방치한 후, 4℃, 7,000rpm, 5분간 원심분리하였다. 얻어진 침전물에 18㎖의 TEG 용액 (50 mM glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl, pH 8.0)을 넣어 현탁시켰다. 용액 I (lysozyme 10 ㎎ / TEG ㎖) 2 ㎖을 첨가하여 잘 섞은 다음, 실온에서 10분간 반응시켰다. 40 ㎖의 용액 II (0.2 N NaOH, 1% SDS)를 넣고 조심스럽게 섞은 후, 얼음에 10분간 두었다. 여기에 30 ㎖의 3 M potassium acetate (pH 5.5) 용액을 넣은 후, 얼음에서 15분간 방치하여 4℃, 8,000 rpm, 5분간 원심분리하였다. 얻어진 상층액을 세 겹의 거즈(cheese cloth)로 걸러 새로운 tube에 옮겨 60 ㎖의 차가운 isopropanol을 첨가한 후 혼합하여, deep freezer (-70℃)에 30분간 넣어 두었다. 4℃, 12,000 rpm, 15분간 원심분리한 후 침전물을 실온에서 10분 동안 건조시켜 4.3 ㎖의 멸균 증류수를 첨가하여 녹였다. 여기에 4.8 g의 CsCl, 0.5 ㎖의 EtBr (10 ㎎/㎖)을 넣고 조심스럽게 녹인 후, 4℃. 12,000 rpm에서 15분간 원심분리하였다. 얻어진 상층액을 18 gage의 주사바늘을 이용하여 초원심분리 tube에 옮겨 밀봉한 후, 초원심분리기 (Beckman)를 이용하여, 20℃, 50,000 rpm, 17시간동안 원심분리하였다. 원심분리 후 21 gage의 주사바늘을 tube의 위쪽에 꽂은 다음, 18 gage 주사바늘을 이용하여 조심스럽게 plasmid DNA를 뽑아 내어 새로운 tube에 옮긴 후, 20배의 SSC에 포화된 isopropanol을 이용하여 EtBr을 제거하였다. 얻어진 용액을 투석막에 넣어 밀봉한 후, TE buffer [10 mM Tris (pH 8.0), 1 mM EDTA]용액을 이용하여 투석시켜 순수한 DNA를 얻었다. 얻어진 DNA는 에탄올 침전을 통해 농축시킨 후 sequencing에 이용하였다.

9. 제한효소 처리

제한효소들은 Boehringer Mannheim사에서 구입하여 사용하였다. DNA를 TE buffer에 녹인 후 제한효소를 넣고 37℃에서 1 3시간 반응시켰다. 이것을 65 80℃에서 10분간 두어 반응을 정지시키고, 1/6 부피에 해당하는 반응 정지용액 (50% glycerol, 0.1 M EDTA, 0.025% bromophenol blue, 0.025% xylene cyanol)을 넣은 후 반응 결과를 전기영동으로 확인하였다.

10. Southern hybridization

얻어진 수그루, 암그루 및 자웅동주에 특이적인 marker의 특이성을 확인하기 위해 southern hybridization을 수행하였다. 사용할 probe는 recombinant plasmid DNA 를 추출하여 *Eco*RⅠ으로 처리한 후 Gene clean kit를 통해 agarose gel로부터 분리하였다. 얻어진 DNA 절편을 DIG DNA labelling and detection kit (Boehringer Mannheim Co.)로 labeling하여 probe를 제조하였다. 이렇게 만들어진 probe DNA를 15 ㎕의 멸균수에 녹인 뒤 95℃에서 10분간 끓인 다음 얼음에 3분간 처리하였다. 2 ㎕의 hexanucleotide mixture, 2 ㎕ dNTP labelling mixture, 1 ㎕의 Klenow enzyme (100 U/㎕)을 첨가하여 37℃에서 60분간 반응시켰다. 여기에 2 ㎕의 0.2 M EDTA (pH 8.0), 2.5 ㎕ 4 M LiCl, 75 ㎕의 차가운 ethyl alcohol을 첨가하여 잘 혼합한 후 -70℃에서 30분간 방치하였다. 원심분리 (4℃, 15,000 rpm, 15분)하여 얻어진 침전물을 50 ㎕의 70% ethyl alcohol로 세척한 후 다시 원심분리하여 얻어진 DNA를 진공건조하였다. 얻어진 DNA를 50 ㎕의 TE buffer에 녹여 probe로 사용하였다.

전기영동이 끝난 agarose gel을 gel이 잠길 정도의 denaturation solution (1.5 M NaCl, 0.5 N NaOH)에 넣고 실온에서 45분 동안 조심스럽게 흔들었다. Gel을 증류수로 세척한 후, neutralization solution [1 M Tris (pH 8.0), 1.5 M NaCl]으로 45분간 세척하였다. 반응시키는 동안 Nylone membrane (Boehringer

Mannheim)을 증류수에 적셨다가 10× SSC (1.5 M NaCl, 0.15 M Na-Citrate, pH 7.0)에 10분간 담궈두었다. Gel을 뒤집어서 그 위에 nylone membrane을 두고, 위에 2× SSC (0.3 M NaCl, 30 mM Na-Citrate)에 적신 paper를 올려 놓았다. 여기에 10 ㎝ 높이의 paper towel을 놓고 유리판을 둔 다음 그 위에 약 500 g 정도의 책으로 눌러 8시간 이상 두었다. DNA를 transfer시킨 후. 5× SSC (0.75 M NaCl, 75 mM Na-Citrate) 용액에 membrane을 실온에서 5분동안 담궈둔 후, 실온에서 30분 이상 건조시켰다. 80℃의 건조기에서 1 2시간 동안 방치하였다.

DNA 고정이 끝난 membrane을 비닐주머니에 20 ㎖의 prehybridization 용액 [5× SSC, 0.02% (w/v) SDS, 0.1% (w/v) N-lauroylsarcosine, 1% blocking reagent]와 함께 넣고 봉합하였다. 이 비닐 주머니를 68℃에서 30분 동안 반응시킨 후 미리 준비해 두었던 probe DNA (5-25 ng/㎖)를 넣고 68℃에서 16시간 반응시켰다. 반응이 끝난 Nylon-membrane을 실온에서 Solution Ⅰ (2× SSC, 0.1% SDS)으로 5분간 두 번씩 세척한 후, 68℃에서 Solution Ⅱ (0.1× SSC, 0.1% SDS)로 15분간 두 번씩 세척하였다. Washing buffer (0.1 M maleic acid, 0.15 M NaCl, pH 7.5, 0.3% Tween 20)으로 1 5분간 세척한 후 blocking solution (0.1 M maleic acid, 0.15 M NaCl, 1/10 10X blocking solution)에 넣어 30분간 배양하였다. 20 ㎖의 blocking solution에 antibody solution을 75 mU/buffer로 희석하여 반응시켰다. 100 ㎖의 washing buffer로 15분간 2번 세척한 후, 20 ㎖의 detection buffer (0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 50 mM $MgCl_2$, pH 9.5)로 2 5분간 반응시켰다. Membrane을 hybridization bag위에 놓고 20방울의 CSPD ready-to- use solution을 떨어뜨린 후, 기포가 생기지 않게 조심스럽게 위쪽을 덮어 실온에서 5분간 배양하였다. 용액을 제거한 후, 가장자리를 밀봉한 다음 37℃에서 5 15분간 배양하였고, X-ray film에 노출시켰다.

11. 염기서열의 결정 및 Primer 제조

4 ㎍의 DNA에 18 ㎕의 멸균 증류수를 넣고, 2 ㎕의 2M NaOH, 2 mM EDTA 를 넣은 후, 실온에서 5분간 반응시켰다. 여기에 75 ㎕의 99.9% ethylalcohol을 넣어 잘 섞은 후, -70℃에 10분간 두었다. 4℃, 14,000 rpm에서 10분간 원심분리 한 후 침전물에 20 ㎕의 차가운 70% ethylalcohol을 넣고 1분간 원심분리하였다. 침전물은 진공건조하여 18 ㎕의 멸균 증류수에 녹여 사용하였다. ALF-Express automatic sequencer (Pharmacia Biotech)를 이용하여 sequencing을 하였다.

얻어진 sequence의 homology를 조사하기 위해 http://www.nebi.nlm.nih.gov/BLAST/의 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) program을 이용하였고, 특이적인 marker로서의 활용을 위한 Primer의 제조를 위해 인터넷의 Primer3 Input (http://www.genome.wi.mit.edu) site에서, primer로 사용 가능한 염기서열을 알아내어, (주) 바이오니아사에 의뢰하여 primer들을 만들어 냈다.

제3절 연구수행내용 및 결과

1. 식물체로부터 genomic DNA 추출 방법의 확립

CTAB (cetyltrimethylammonium bromide)와 spermine-spermidine을 이용하여 식물체로부터 genomic DNA를 추출한 결과 엽육조직 1 g에서 평균 1.6 mg의 genomic DNA를 분리하였다. 이 방법은 일반적으로 많이 사용하고 있는 CTAB 방법 (Rogers and Bendish, 1988)과 Dellaporta의 방법에 비해 genomic DNA의 추출양이 많았고, 또한 어린 싹에서 뿐만 아니라 성숙한 잎에서도 DNA의 추출이 용이하였을 뿐만 아니라, DNA의 순도도 높았다. 이러한 결과는 엽육조직이 두꺼운 목본 식물의 성엽에서도 genomic DNA의 추출이 가능하다는 것을 보여주었다.

2. PCR의 최적조건 확립

식물에서 RAPD marker를 얻기 위한 PCR의 조건에서 가장 중요한 것은 annealing 단계의 온도로, 보통 36℃에서 55℃까지의 온도가 이용되고 있다 (Wiliams 등, 1990; Hu and Quiros, 1991; Demeke 등, 1992; Kim 등, 1997).
특히, 목본류의 식물의 경우에는, 90% 이상이 RAPD를 통한 marker를 얻기 위한 annealing 온도로 36℃ (Koller 등, 1993; Adams 등, 1993)나, 37℃(Bellamy 등, 1996; Lee 등, 1995)를 이용하였다. 본 실험에서는 denaturation 94℃, extension 72℃로 일정하게 유지하고, annealing 온도를 37℃, 42℃, 50℃로 다양하게 하여 PCR을 수행한 결과, 37℃의 온도에서 가장 많고 뚜렷한 band pattern을 얻을 수 있었다.

적정의 cycle수를 결정하기 위해 37℃의 annealing 온도를 이용하여, 30cycle, 35cycle, 40cycle, 45cycle을 수행한 결과, 45cycle에서 더 좋은 결과를 얻어낼 수 있었다.

PCR에 이용되는 DNA의 농도에 다른 band pattern 변화여부를 확인하기 위해

10 ng, 15 ng, 20 ng, 30 ng, 50 ng, 100 ng의 DNA를 첨가하여 PCR을 수행한 결과, 10 ng, 15 ng에서는 band의 수가 적게 나타났고, 100 ng일 때는 비특이적인 band 또는 smear 한 band pattern이 나타났다. 노간주나무 (Adams 등, 1993, 사과나무 (Koller 등, 1993), 소나무 (Lee 등, 1995)에서 처럼 30 ng의 DNA를 이용하였을 때 다양하고 뚜렷한 band pattern을 얻을 수 있었다.

결과적으로 최적의 PCR 조건은 annealing 37℃, 45cycles에서, DNA의 농도는 30 ng/25 ㎕에서 얻을 수 있었으며, 모든 실험은 3회 반복하여 재현성을 검증하였다.

3. 품종간, 개체간 및 지리적 분포에 따른 변이 조사

본 실험에 사용한 primer는 10-mer로 구성 된 OPA kit (20 primers), OPB kit (20 primers), OPC kit (20 primers), OPD kit (20 primers), OPE kit (20 primers), OPF kit (20 primers), OPG (20 primers), OPH kit (20 primers), OPI kit (20 primers)의 총 180개의 primer를 사용하였다.

2종의 오미자속 식물과 1종의 남오미자를 RAPD 분석한 결과는 다음과 같다. 그림 2-2의 경우, 180개의 primer 중에서 9가지의 primer에 대한 결과만 제시하였으나, 180개의 모든 primer에 대해서 흑오미자, 오미자, 남오미자의 3종의 식물은 서로 다른 band pattern을 보여주었다. 예를 들면 OPD-15 primer에서 자웅동주 흑오미자는 800 bp, 오미자는 2,500 bp, 남오미자는 1,900 bp에서 서로 다른 특이적인 band가 검출되었다. 또한 상기의 9개의 primer의 경우 식별 가능한 band가 모두 128개 검출되었으며, 1종의 식물당 평균 10개의 band pattern을 보여 주었다. 대부분의 band pattern은 150-3,000 bp 사이에 존재하였다. 이상의 결과를 살펴보면 국내에서 자생 또는 재배하고 있는 흑오미자, 오미자, 남오미자는 외형적으로는 비슷하지만 유전적인 유연관계는 다소 먼 것으로 생각할 수 있었다.

또한 흑오미자는 지리적 분포에 따라서는 자웅동주, 수그루, 암그루내에 변이를 나타내지 않는 것은 우리나라에 존재하는 흑오미자의 자생지가 제주도에만 국한되어 있기 때문에 개체들 사이에서의 변이가 적은 것으로 사료된다.

4. 품종특이적 marker의 선발

흑오미자중에서 자웅동주, 암그루, 수그루의 3품종을 180개의 primer를 사용하여 RAPD로 분석한 결과, 174개의 primer는 자웅동주, 암그루, 수그루에서 primer 종류에 따라 전부 동일한 형태의 band pattern을 보여주었다 (그림 2.3). 그러나 6종류의 random primer (표 2.1)에 대하여는 polymorphic한 band pattern을 보여 각 품종에 대한 특이적인 band가 검출되었다 (그림 2.4, 그림 2.5).

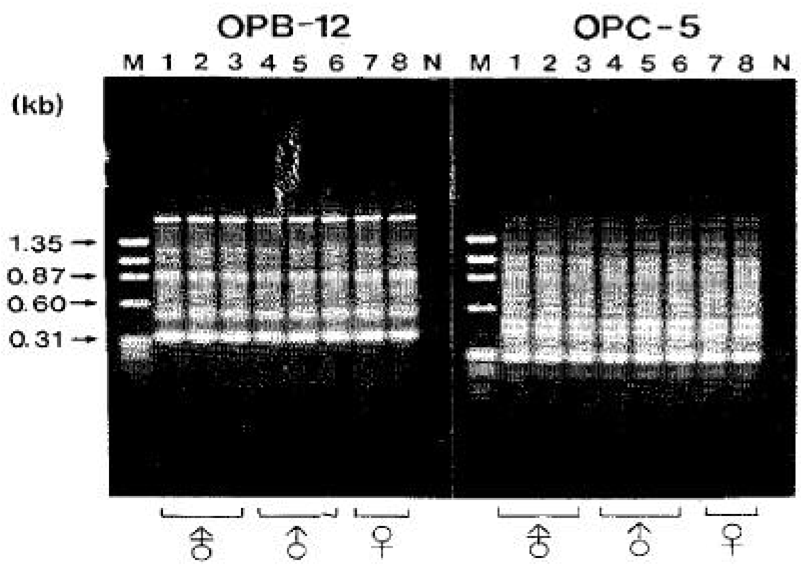


그림 2.2. Primer OPB-12와 OPC-5를 이용한 PCR 산물. Lane M: size marker, *Hae*III로 자른 ΦX174 DNA; lane 1-3: 흑오미자 자웅동주 6, 41, 51; lane 4-6: 흑오미자 수그루 46, 52, 53; lane 7-8: 흑오미자 암그루 42, 54; N: 음성 대조.

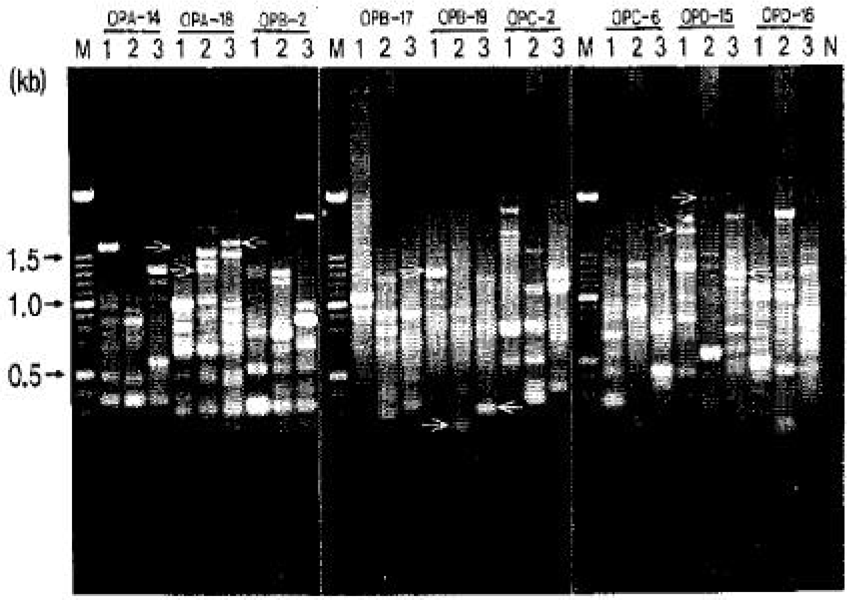


그림 2.3. 다양한 Primer를 이용한 PCR 산물. Lane M: size marker 100 bp ladder; lane 1: **흑오미자** 6; lane 2: **오미자**; lane 3: **남오미자**; lane N: **음성 대조**; **화살표는 세 품종사이의 특이적인** band**를 나타낸다**.

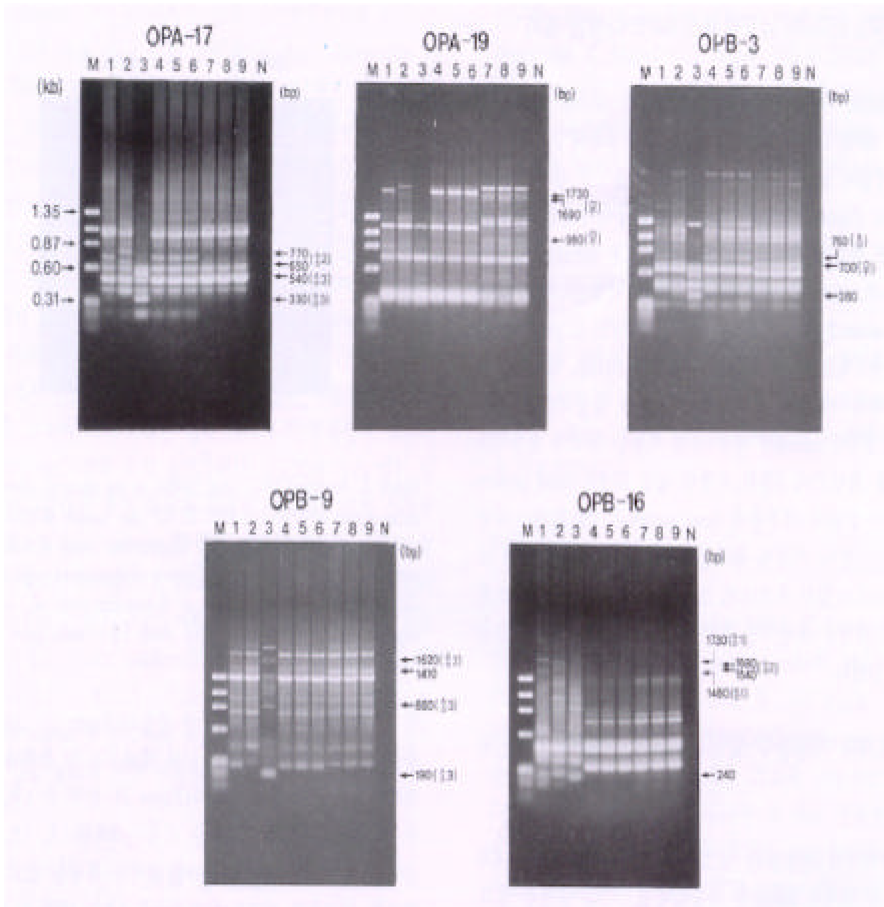


그림 2.4. Pimer OPA-17, OPA-19, OPB-03, OPB-9, OPB-16를 이용한 PCR 산물. Lane M: *Hae*III로 자른 ΦX174 DNA; lane 1-3: **흑오미자 자웅동주** 6, 41, 51; lane 4-6: **흑오미자 수그루** 46, 52, 53; lane 7-8: **흑오미자 암그루** 42, 52, 54; lane N: **음성 대조**

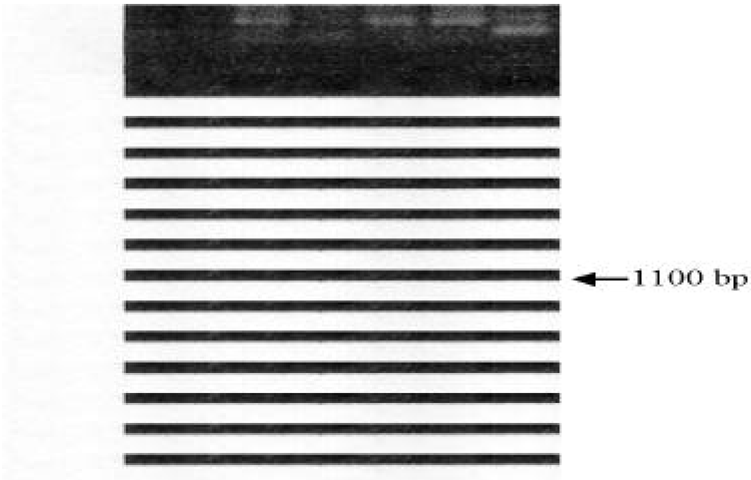


그림 2.5. OPF-16**을 이용하여 증폭된** PCR **산물**.

Lane M: λDNA**를** *Eco*RⅠ**과** *Hin*dⅢ**로 절단한** DNA; lane 1: **흑오미자 자웅동주** 6; lane 2: **흑오미자 자웅동주** 41; lane 3: **흑오미자 자웅동주** 51; lane 4: **흑오미자 수그루** 42; lane 5: **흑오미자 암그루** 46

표 2.1. RAPD**에 사용된** primer**의 염기서열**

Primer number	Nucleotide sequence (5' to 3')	GC content(%)
OPA-17	G A C C G C T T G T	60
OPA-19	C A A A C G T C G G	60
OPB-03	C A T C C C C C T G	70
OPB-09	T G G G G G A C T C	70
OPB-16	T T T G C C C G G A	60
OPF-16	G G A G T A C T G G	60

대표적인 수그루 특이적인 marker로는 OPA-17의 770 bp, OPB-03의 1360 bp, 암그루 특이적인 marker로는 OPB-03의 980 bp, OPA-19의 1,300 bp, 자웅동주인 흑오미자 6의 marker로는 OPA-17의 1,340 bp, 흑오미자 41의 marker로는 OPB-09의 609 bp, OPF-16의 1,115 bp, 흑오미자 51의 marker로는 OPA-17의 580 bp를 둘 수 있다 (그림 2.4, 그림 2.5).

위의 6개의 primer에 대해 모두 87개의 식별 가능한 band가 증폭되었으며, 한 개의 primer당 평균 14.5개의 band가 검출되었다. 대부분의 band는 200-2,000 bp 사이에 존재하였다. 이상의 결과를 살펴보면 자웅동주 식물체가 수그루, 암그루와는 다르게 개체간에 서로 다른 band pattern을 보이는 것은 수그루 또는 암그루로부터 어떠한 원인에 의해 변이가 발생되었다고 생각된다. 왜냐하면 흑오미자 6호는 OPA-17 primer의 경우 680 bp에서 암그루에 없는 수그루 특이적인 band를 갖고 있으며, 흑오미자 41호는 OPA-19 primer에서 수그루에 없고 암그루에만 있는 2개의 band pattern (1,200 bp, 1,350 bp)를 갖고 있다. 또한 흑오미자 51를 제외하고 6호, 41호는 수그루, 암그루의 대부분의 band를 포함하고 있기 때문에 진화적인 관점으로 볼 때 수그루 또는 암그루에 비해서 나중에 분화된 변이 개체일 가능성이 크다고 볼 수 있다.

이들의 품종간 phylogenic relation을 규명하기 위한 cluster 분석은 그림 2.3에서와 같이 180개의 primer 중 174개의 primer에서 monomorphic한 형태의 band pattern을 보여주어 의미가 없을 것으로 사료되어 생략하였다.

5. 특이적 marker의 cloning

RAPD의 결과로 genetic marker로의 사용가능한 band를 GENECLEAN kit로 정제하여 pGEM-T Easy vector system을 이용하여 cloning하였다

수그루 특이적인 marker로는 OPA-17의 789 bp (그림 2.6), OPB-03의 1,360 bp (그림 2.7), 암그루 특이적인 marker로는 OPB-03의 749 bp (그림 2.8),

OPA-19의 1,300 bp (그림 2.9), 자웅동주인 흑오미자 6의 marker로는 OPA-17의 1,340 bp (그림 2.10), 흑오미자 41의 marker로는 OPB-09의 609bp (그림 2.11), OPF-16의 1,115 bp (그림 2.12), 흑오미자 51의 marker로는 OPA-17의 580 bp (그림 2.13)를 cloning하였다.

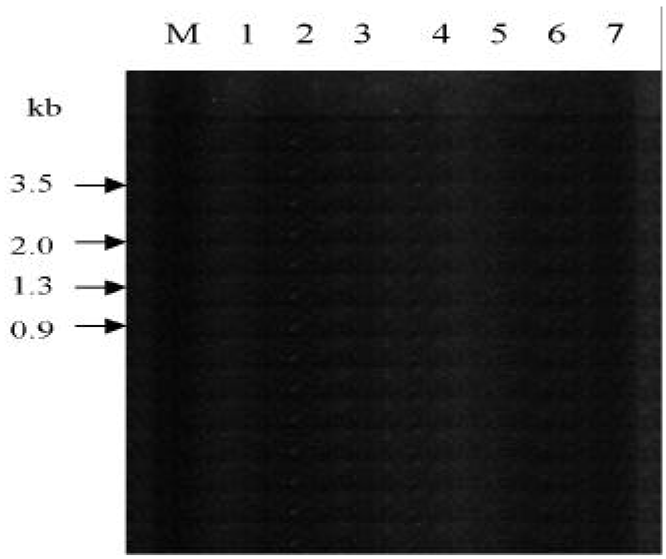


그림 2.6. 흑오미자 수그루에 특이적인 DNA와 OPA-17을 이용한 PCR 산물. Lane M, λ DNA를 *Hind*Ⅲ-*Eco*RⅠ으로 절단한 DNA; lane 1-3: 흑오미자 수그루 42, 52, 53; lane 4-6: 암그루 46, 54, 55. lane 7: *Eco*RⅠ으로 자른 재조합된 plasmid DNA

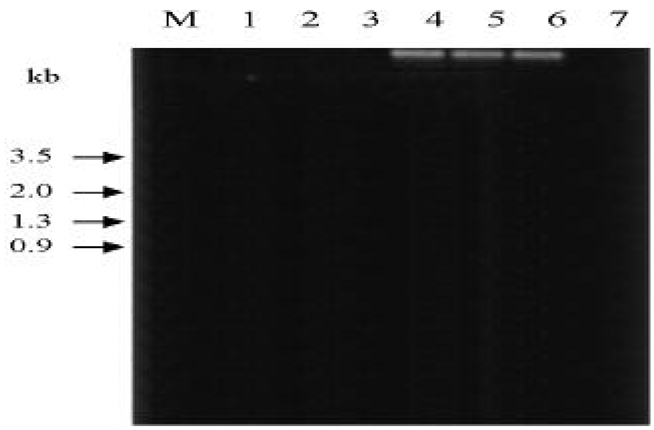


그림 2.7. **흑오미자 수그루에 특이적인** DNA**와** OPB-03**을 이용한** PCR **산물**. Lane M: λ DNA**를** *Hind*III-*Eco*R I **으로 절단한** DNA; lane 1-3, **흑오미자 수그루** 42, 52, 53; lane 4-6, **암그루** 46, 54, 55; lane 7, *Eco*R I **으로 자른 재조합된** plasmid DNA.

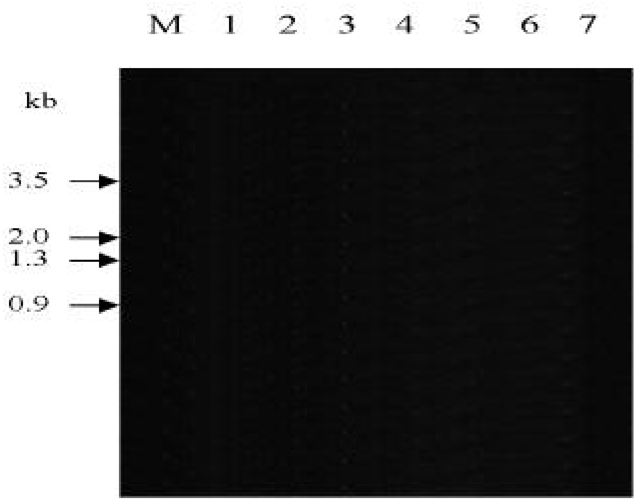


그림 2.8. **흑오미자 암그루에 특이적인** DNA**와** OPB-03**을 이용한** PCR **산물** Lane M: λ DNA**를** *Hind*III-*Eco*R I **으로 절단한** DNA; lane 1-3, **흑오미자 수그루** 42, 52, 53; lane 4-6: **암그루** 46, 54, 55; lane 7: *Eco*R I **으로 자른 재조합된** plasmid DNA

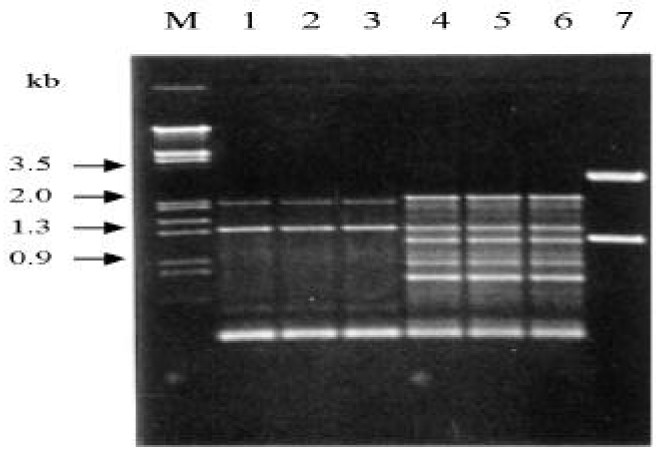


그림 2.9. **흑오미자 암그루에 특이적인** DNA**와** OPA-19**을 이용한** PCR **산물**. Lane M: λ DNA**를** *Hind*Ⅲ-*Eco*RⅠ**으로 절단한** DNA; lane 1-3: **흑오미자 수그루** 42, 52, 53; lane 4-6: **암그루** 46, 54, 55; lane 7: *Eco*RⅠ**으로 자른 재조합된** plasmid DNA

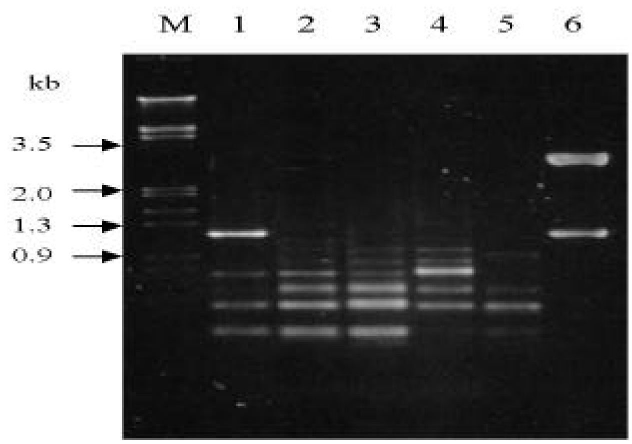


그림 2.10. **흑오미자 자웅동주** 6**번에 특이적인** DNA**와** OPA-17**의** PCR **산물**. Lane M: λ DNA**를** *Hind*Ⅲ-*Eco*RⅠ**으로 절단한** DNA; lane 1-3: **흑오미자 자웅동주** 6, 41, 51; lane 4, **수그루** 46; lane 5: **암그루** 42; lane 6: *Eco*RⅠ**으로 자른 재조합된** plasmid DNA

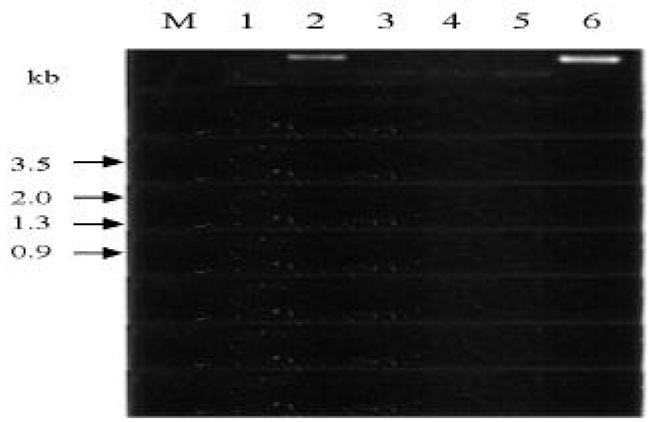


그림 2.11. **흑오미자 자웅동주** 41**번에 특이적인** DNA**와** OPB-09**의** PCR **산물**. Lane M: **λ** DNA**를** *Hind*III-*Eco*R I **으로 절단한** DNA; lane 1-3: **흑오미자 자웅동주** 6, 41, 51; lane 4: **수그루** 46; lane 5: **암그루** 42; lane 6: *Eco*R I **으로 자른 재조합된** plasmid DNA

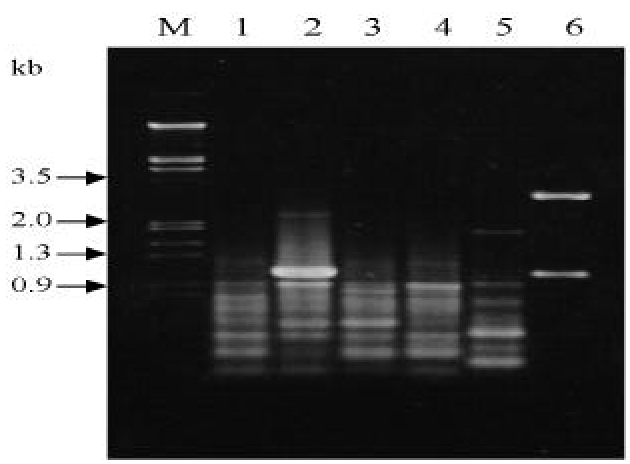


그림 2.12. **흑오미자 자웅동주** 41**번에 특이적인** DNA**와** OPF-16**의** PCR **산물.** Lane M: **λ** DNA**를** *Hind*III-*Eco*R I **으로 절단한** DNA; lane 1-3: **흑오미자 자웅동주** 6, 41, 51; lane 4: **수그루** 46; lane 5: **암그루** 42; lane 6: *Eco*R I **으로 자른 재조합된** plasmid DNA

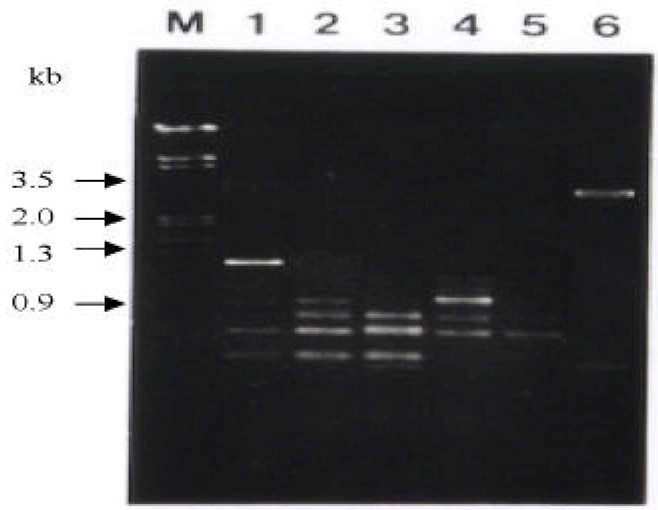


그림 2.13. 흑오미자 자웅동주 51번에 특이적인 DNA와 OPA-17의 PCR 산물. Lane M: λ DNA를 *Hind*Ⅲ-*EcoR* Ⅰ으로 절단한 DNA; lane 1-3: 흑오미자 자웅동주 6, 41, 51; lane 4: 수그루 46; lane 5: 암그루 42; lane 6: *EcoR* Ⅰ으로 자른 재조합된 plasmid DNA

6. 선발된 marker의 유용성 검토

RAPD를 통해 얻어진 marker들의 흑오미자 자웅동주, 수그루 및 암그루 내에서의 homology를 확인하기 위해 southern hybridization을 수행하였다. 특이적인 marker가 cloning된 재조합 plasmid를 추출하고, *Eco*R Ⅰ으로 처리하여 probe로 사용하였다.

수그루 특이적인 marker인 OPA-17의 789 bp의 DNA를 이용하여 hybridization한 결과, 그림 2.14와 같이 수그루에서만 특이적인 band가 검출되어 수그루에 대한 genetic marker로의 사용 가능성을 확인하였으며, 더 나아가 성 특이적인 marker로의 사용 가능성을 시사하였다. 그러나 OPB-03의 1,360 bp의 DNA를 probe로 이용한 경우에는 그림 2.15와 같이 암그루에서도 검출되어 marker로 사용이 불가능한 것으로 확인되었다.

암그루 특이적인 marker를 확인하기 위해 OPB-03의 749 bp를 probe로 이용한 경우, 암그루에만 특이적으로 검출되어, genetic marker로 사용 가능한 것이 확인되었다 (그림 2.16).

자웅동주인 흑오미자 6의 marker로는 OPA-17의 1,340 bp를 이용한 hybridization 결과, 자웅동주, 암그루, 수그루 모두에서 검출되어 marker로 사용이 불가능함이 확인되었다 (data not shown). 흑오미자 41의 RAPD marker 중 OPB-09의 600 bp는 수그루와 암그루에서 검출되지 않은 반면 모든 자웅동주에서만 검출되어 자웅동주의 genetic marker로의 사용 가능성이 확인되었다 (그림 2.17). OPF-16의 1,100 bp의 DNA를 probe로 이용한 경우에는 흑오미자 41호와 51호에서만 검출되었다 (그림 2.18). 흑오미자 51의 genetic marker로의 사용 여부를 확인하기 위해 OPA-17의 580 bp를 probe로 이용하여 hybridization한 결과, 그림 2.19에서와 같이 51호에만 특이적임을 확인할 수 있었다.

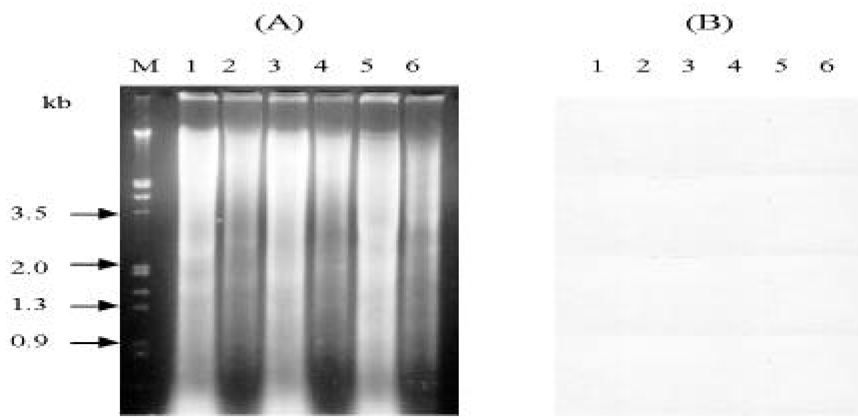


그림 2.14. OPA-17를 이용한 PCR에서 얻은 흑오미자의 수그루에 특이적인 marker를 probe로 이용한 southern hybridization.
Lane M: λ DNA를 *Hind*Ⅲ-*Eco*RⅠ으로 절단한 DNA; lane 1-3: 흑오미자 수그루 46, 52, 53; lane 4-6: 흑오미자 암그루 42, 54, 55; (A)는 흑오미자 DNA를 *Hind*Ⅲ로 절단한 후, 0.8% agarose에 전기영동한 사진; (B)는 southern hybridization에 의해 검출된 X-ray film의 사진

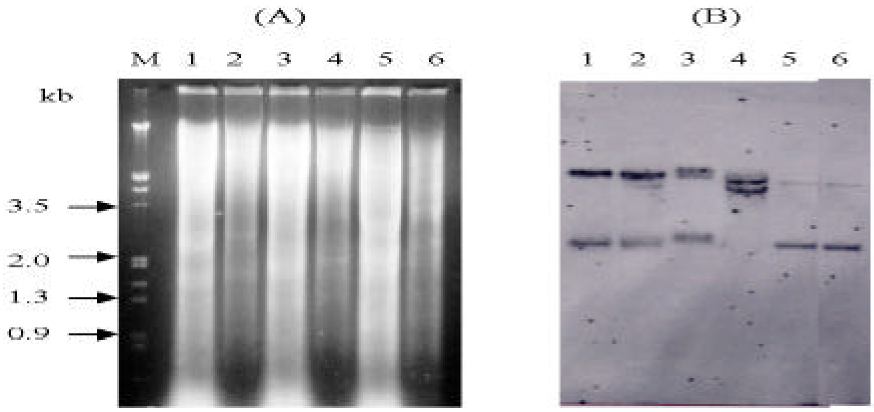


그림 2.15. OPB-03**를 이용한** PCR**에서 얻은 흑오미자의 수그루에 특이적인** marker**를** probe**로 이용한** southern hybridization.
Lane M: λ DNA**를** *Hin*dIII-*Eco*R I **으로 절단한** DNA; lane 1-3: **흑오미자 수그루** 46, 52, 53; lane 4-6: **흑오미자 암그루** 42, 54, 55; (A)**는 흑오미자** DNA**를** *Hin*dIII**로 절단한 후**, 0.8% agarose gel**에서 전기영동한 사진**; (B)**는** southern hybridization**에 의해 검출된** X-ray film**의 사진**.

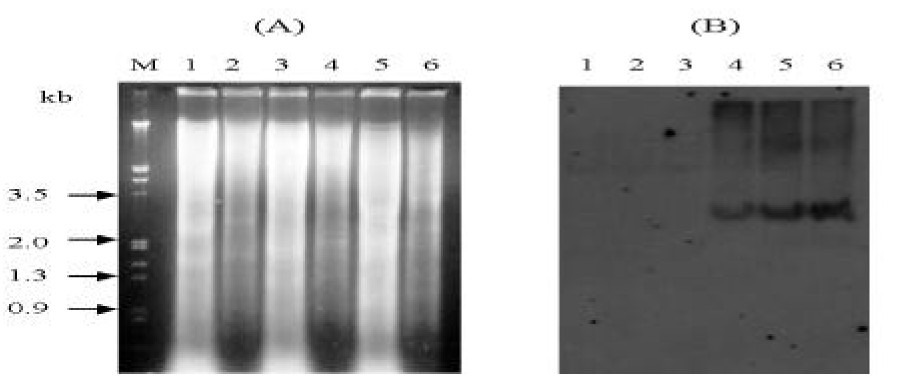


그림 2.16. OPB-03**을 이용한** PCR**에서 얻은 흑오미자의 암그루에 특이적인** marker**를** probe**로 이용한** southern hybridization.
Lane M; λ DNA**를** *Hin*dIII-*Eco*R I **으로 절단한** DNA; lane 1-3: **흑오미자 수그루** 46, 52, 53; lane 4-6: **흑오미자 암그루** 42, 54, 55; (A)**는 흑오미자** DNA**를** *Hin*dIII**로 절단한 후**, 0.8% agarose gel**에서 전기영동한 사진**; (B)**는** southern hybridization**에 의해 검출된** X-ray film**의 사진**

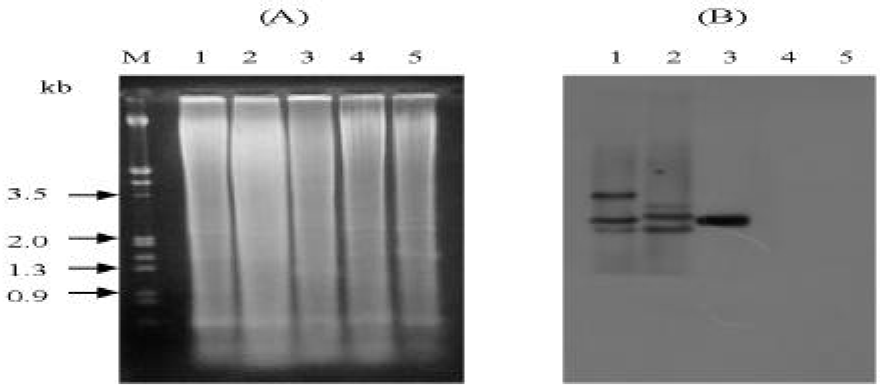


그림 2.17. OPB-09를 이용한 PCR에서 얻은 흑오미자 자웅동주 41에 특이적인 RAPD marker를 probe로 이용한 southern hybridization

Lane M: λ DNA를 *Hind*III-*Eco*RⅠ으로 절단한 DNA; lane 1: 자웅동주 6; lane 2: 자웅동주 41; lane 3: 자웅동주 51; lane 4: 수그루 46; lane 5: 암그루 42; (A)는 흑오미자 DNA를 *Eco*RⅠ로 절단한 후, 0.8% agarose gel에서 전기영동한 사진; (B)는 southern hybridization에 의해 검출된 X-ray film의 사진

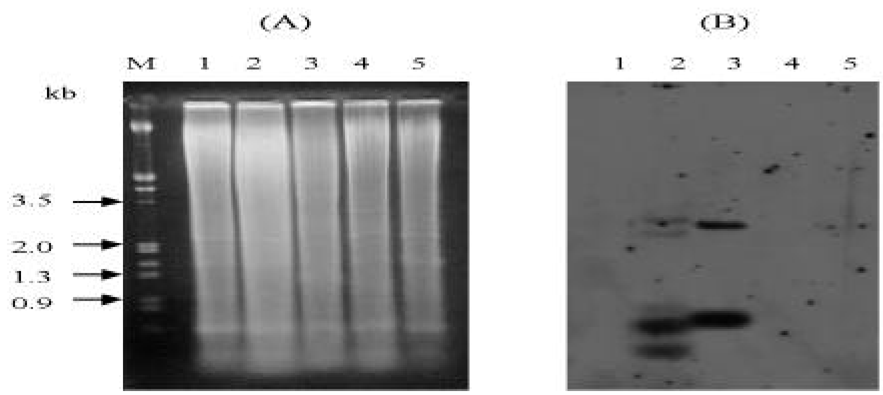


그림 2.18 OPF-16을 이용한 PCR에서 얻은 흑오미자 자웅동주 41에 특이적인 RAPD marker를 probe로 이용한 southern hybridization

Lane M: λ DNA를 *Hind*III-*Eco*RⅠ으로 절단한 DNA; lane 1: 자웅동주 6; lane 2: 자웅동주 41; lane 3: 자웅동주 51; lane 4: 수그루 46; lane 5: 암그루 42; (A)는 흑오미자 DNA를 *Eco*RⅠ로 절단한 후, 0.8% agarose gel에서 전기영동한 사진; (B)는 southern hybridization에 의해 검출된 X-ray film의 사진

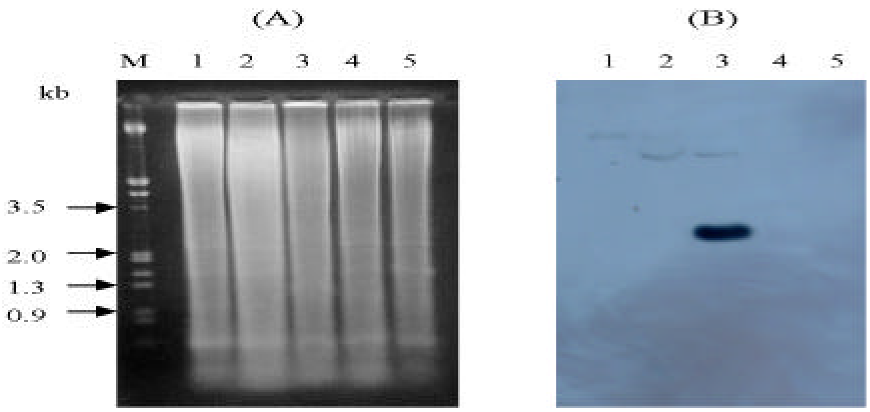


그림 2.19. OPA-17을 이용한 PCR에서 얻은 자웅동주인 흑오미자 41에 특이적인 RAPD marker를 probe로 이용한 southern hybridization.
Lane M: λ DNA를 *Hind*III-*Eco*RⅠ으로 절단한 DNA; lane 1: 자웅동주 6; lane 2: 자웅동주 41; lane 3: 자웅동주 51; lane 4: 수그루 46; lane 5: 암그루 42; (A)는 흑오미자 DNA를 *Eco*RⅠ로 절단한 후, 0.8% agarose gel에서 전기영동한 사진; (B)는 southern hybridization에 의해 검출된 X-ray film의 사진

7. 품종 동정 kit의 제조 가능성 탐색

1) 특이적 marker의 염기서열 결정

Southern hybridization 으로 수그루에 특이적인 것으로 확인된 DNA 절편의 염기서열을 결정한 결과를 그림 2.20에 나타내었다. 전체 789 bp의 염기서열에서는 open reading frame의 가능성을 발견할 수 없었다. 염기서열 데이터 베이스에서 homology를 검색한 결과 어떤 염기서열과의 상동성도 발견할 수 없었다. 암그루 특이적인 DNA의 경우에서도 염기서열을 결정하여 749 bp의 전체 염기서열을 알았으나, 수그루 특이적 DNA와 마찬가지로 ORF와 homology를 발견 할 수 없었다 (그림 2.21).

10 20 30 40 50 60 70 80

5' GACCGCTTCT TGTTGGAACT CTTTGGAATA ACCTAAGTCA GTGAGGTTAG ACTACTCTTG GCATTTACAT CAGCATGTGT

90 100 110 120 130 140 150 160

GTATAAGTTT CAGGAATTGA GTTCACCTCA TCCATCAATA TCACATGTAA ATTCATTCAT TATTTCTATT TATGTTCTCT

170 180 190 200 210 220 230 240

TATAATTATA TTAAGTATCT TACTGAAAAA ATCTCTATAA AATATTTGTA AGTATCCAAT ATTTGTTGAT TGTATTGTGT

250 260 270 280 290 300 310 320

TGAAATCAAA ATACTAAAAA ATTGTGTTAT CTAGTCAACG TGAGTCAATC TTCAGGTCCG TGATCAAAAT AGGCACGTAA

330 340 350 360 370 380 390 400

TGTCATCTAT TTCTAGTTTT GAGTCTTACA TACTATATTA GAGTATATTG GATTCATTTG GCATGTTGGT TTTTGGAATT

410 420 430 440 450 460 470 480

TTATCTCATA TTTAAAATTT TGAAAAATTG GTGCAAGGCA GTCGACCACT CACTTGCAAA TGGTAGAACA GTCATGGTGA

490 500 510 520 530 540 550 560

GCTTCGGTTT CCTAAGCATA AAAATAGGTT GTTATGTTGG TTTGGTCATT TGGAACTCAA GAGACCAAGT GACCCTTGCT

570 580 590 600 610 620 630 640

CCCCAACATT GGTAGGTTAC CTTCTTTGCT TCTTGTGTTC ACTTCCTTTC GCTCTTTTCA AGTTTTCGTG CTAGGGTTTC

650 660 670 680 690 700 710 720

TATTGATTTT CACTATTTCT ACCCTAGATT GTTTTTCATA GCTCCTCAAG CTTCTAAGAA GTCAAAGTCC TCTTCGGGTA

730 740 750 760 770 780

CCTATGATAC ATGCAAGTTT GTTGCCTTGC GTGTCAAGCT AGGCACAAAT AATATGATCA CAAGCGGTC 3'

그림 2.20. 수그루 특이적인 marker의 염기서열.

10 20 30 40 50 60 70 80

5' GGACTGCAGA CATCGATTAC ATAACGAAAA TCACCATAGA AACCTCTCTT TCTTATAGGC GTACAAAGAG GGTCCCATAG

90 100 110 120 130 140 150 160

ATCAGGATAT AGGTTGAGAA GCACTACGAA GGACTACCGG CAAAAGAGTA AATCATCGAT CGACTCAATT CTTTCCTATC

170 180 190 200 210 220 230 240

TTGGTCTAGA AAGAGAGGCG CTGAAGTAAC TGGCAATAGT GCAGAAAAAA GCTTTACCAT CAAGCCGCTT GCTTTTGTCT

250 260 270 280 290 300 310 320

CTGCCTTCTT TTGTGAGAAT TTATCGGTAC CGTACACCAC CTGAAGCGGA GTCGGAGCTT GTTGCCCTAT TCTTCACTGA

330 340 350 360 370 380 390 400

GCACAGTGGA CTGACTTTGC TTTGTATGAT TTTTCCTTGC CCAAGACTGA CATTTCGTTC GTTTGAGTGC ATGAACTGCT

410 420 430 440 450 460 470 480

GTGTTAAGTA TGTGTAAACT TAAAAATAAA AGTAGATGGT TGATGTTAGA GAAGTCCCTT CTATGATTCG TTACCGAATC

490 500 510 520 530 540 550 560

GTATGCCTTT GAGTTGTTTT GCTTTCACAA GACAAGGGGA TGTGCTCCCA TCCCTCCGGA GATCATAGGA AAGATGGAGT

570 580 590 600 610 620 630 640

GATTCTCCAT CTGGCTTCTA CCTATTTAAG AGAGTCGATA TTTCACTTTA AAGACAGCTC GTGGCCTAGC TACCAGATAG

650 660 670 680 690 700 710 720

AATACAGTCT TACCTGTCCT AGCTTGATAG AAACCTAGCT ACAAAAGCGA CTTCCCCCTG TTGAAAATAC CAGTGGAGAG

730 740

AGTAGCTGGT GTTGCTTACT CTGCAGTCC 3'

그림 2.21. 암그루 특이적인 marker의 염기서열.

자웅동주 41호의 RAPD marker로 확인된 RAPD marker 중 OPB-09의 609 bp의 염기서열은 그림 2.22, OPF-16의 1,115 bp의 염기서열은 그림 2.23과 같다. Southern hybridization 결과, 자웅동주에서만 혼성화가 되었던609 bp의 염기서열 역시 모든 frame에 stop codon이 존재하여 긴 ORF가 존재하지 않아 활성을 지닌 단백질을 생산하는 유전자는 아닐 것으로 생각된다. Homology 검색 결과 retroviral protease나 reverse transcriptase 등과 비슷한 것으로 보아 오래전에 삽입된 후 죽어버린 retroviral molecular fossil로 추측하였다.

Southern hybridization 결과 자웅동주 3호인 51번 개체에 특이적인 것으로 나타났던 580 bp의 염기서열은 그림 2.24와 같다.

```
           10         20         30         40         50         60         70         80
5' TCATCCCCCT GCCCTTTTCA AGCCTTCTTC TTCTCACATA AGATACACAT GCCTTAGACA ATTTTGGGAA GGCCAAAGCC
           90        100        110        120        130        140        150        160
   TTAGGCAAGT TTGGGAGGTT TTCTTCAGTT GGCACGAAAA CGGACCCGAA CGGCAGGATT TTTGAAACAT GAGCTTTTCA
          170        180        190        200        210        220        230        240
   TGAATTTTTC AGATTGGCCT TCGGCAATGG GTGGTTGGCC ATTTTGATGC TCCATTTATC GAACGGATCA TTTCAATTT
          250        260        270        280        290        300        310        320
   TTTGGGTGGT CCCTTTAGGA TTCATCAAGA ATAGTCCTCT TTTACGAAGA ACGAACCGAC CGACGGGTTT TTTCAAACTG
          330        340        350        360        370        380        390        400
   CATCTTTTTC TGAATTTTTT GAAGCATTGG ACTCCATGAG TGATTGGATC ATTTTGAAAT TTTCTACCCG TCGCCTGCCT
          410        420        430        440        450        460        470        480
   TATGCTTAAA GTGCTTCTCA TGCCTTAGCC AATTTTAGAG GCTTTTGACC ATGGACATGG AGTGCCTCAT GACTAAGCAA
          490        500        510        520        530        540        550        560
   ATTTTGGCC  CCAACAATGG GATTCAACAA CTTAAAAACA TTCTCCAAAA TTCTTTTAAG ATGAAAGATT TAGGAGCATT
          570        580        590        600
   AACTTATTTC TTGGACTTAG AGCTATATAT TGATACACCA GGGGGATGA  3'
```

그림 2.22. 흑오미자의 자웅동주에 특이적인 marker의 염기서열.

10 20 30 40 50 60 70 80

5' TGGACTGCAG ACTGGCCTAA TTCGCGCATA ATATAGTAGT CAACATTGTA TGATGCAGCA ACAAGGGCCA CTTGAGAGCT

90 100 110 120 130 140 150 160

TGAATCGTAA GCGCCATGAA GGTGTTGAAG GCGCTGTTCT TGGTATAGCA GTTTAGCTCG AAGTTCATCA AAGGTTAACG

170 180 190 200 210 220 230 240

ACGAATTATT GTTGGTGACC GTCCTGATAA AGGATTCATA TTCTTCAGGG AGTCCTGCCA GTGCATAGAT CACCATGTCT

250 260 270 280 290 300 310 320

TTAGAAGAAA GG글AGAGTT TATGGCTTCT AGGGAATTCC CAATGGACCG AAGATACGTT GCCATGGGTT GGATCCCTTT

330 340 350 360 370 380 390 400

TTCAAAGATT GAAATTTGAG TTGAGATGTA ACTCACGAGC AGTAGCCTGG TCTAAAAATC TTTTTTACAA GGCTAACCAA

410 420 430 440 450 460 470 480

AATATCACGA CAGGTTGTCA GTTCATGAAC CTCTTGAAGA ATCTCTTTTG TAAGAGTTGC ATTGATCCAT GATAGGAGGC

490 500 510 520 530 540 550 560

TTTGGTCTGT CCGAACCCAA GCCGAATATG CAGGGTTTTG TATGGCGTTG CCATTGGCAT AACAAATAAA CTGAGGAGGA

570 580 590 600 610 620 630 640

CTGGGAAACG TTCCGTCGAC AAAGCCCAGA AAAGAATTTC AGATTATAAT GTAGGAATTG GGATTTCAAA AGAAGATAAT

650 660 670 680 690 700 710 720

TGGTAGAGTC AAGTTTAAGG GAAACAAGAT GGGTGATGTT TGGTGTAACT ACCATAGGAT TGGGGGTCTC TTCCTGTCCT

730 740 750 760 770 780 790 800

GAAGAAGCAG GCATGAGGGA TTGATGAAGG AGAAGCCATA GTGTTGTCAA AGCAGCTTGG AATACTACAA TCAGAGGCTC

810 820 830 840 850 860 870 880

CATAGCTTTC CGTTTCTATC TATCATAAGC GGAAAGCGAC CAAAAAATCC CTCAAAGTGT GGAACAAGGC TAACTTCGGT

890 900 910 920 930 940 950 960

AAGAAGATGT TCGATGCAAG TGCTGTGGAA TGGAGAGAAA AGATAGGACA GAGAAGGAGA AAGAGTGAAG TTCTGGTCTT

970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040

TCTAC**TAGGT** **CCTCCTTTCG** **AGCCT**TCAGA TCAACTCGTT GGGGAACGAA TGTTCTGGTT GTATTCGAGC CCTCTACCGC

1 1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1115

TGGCTTTGCC TCGAAGCCGG TGGAAGGTTC AAAGCAATAA ACTCAGGCCTT CTTAACCTTC TCCATCTGCA GTCCA

그림 2.23. 자웅동주인 흑오미자 6호와 41호에 특이적인 염기서열.

10 20 30 40 50 60 70 80

5' TGACCGCTTG TGGTAAGAGA GATCCTTCGC AAGCCCTTTT CGCTTCGCTC AAGGGCGGAA GCTCAGGAGG ACATGCCCCG

90 100 110 120 130 140 150 160

TCCTTTTGAA TGACTTCTGG TTTTGCGCAA GCCCTGTATT TCTTTCGAAA ACCATATCAT TTTGTATTTG AGGGTGAAGC

170 180 190 200 210 220 230 240

CAACAGACTC CGCAGTTTTT TGCATTGCTA TGTTCTTACC **ACTCGTTCCC** **AGTTGAG**CGG ACCGCATGCC GCGTTCTTTG

250 260 270 280 290 300 310 320

AGCAACTGCA AACCTGTCAG CAAAAGCGCG CGGGCCAATC CCAGACGCTG ATATTGTGGA TGTGTCGCGA CGGGATCCGT

330 340 350 360 370 380 390 400

GTTTCCAATT TTGCTTTCTT CATTGACCGA GCAGATGCAA TTTGCGGCAA TGTTTCCGTC TGGTGCAACA GCGACCAGAT

410 420 430 440 450 460 470 480

CAAGAGACAG CTCATATTCA CTTGTGTTCA TGATGACGAG ACGATTTTCG GCCGTCATGT ATTCTGTGCC AAAGGCGGCG

490 500 510 520 530

CGATGCATCT TTGCAACTGC GTCTGCTTCT TCGGTCCCTA CAAGCGGTCA 3'

그림 2.24. 자웅동주인 흑오미자 51호에 특이적인 marker의 염기서열

2) 품종 동정을 위한 primer 제조

염기서열이 밝혀진 특이적인 DNA의 염기서열을 바탕으로 각각에 특이적인 PCR primer를 디자인하여 이 primer가 다른 자웅동주, 수그루, 암그루 개체들에도 적용되는지 여부를 확인하였다(표 2.3).

염기서열을 토대로 설계된 각 primer set를 사용하여 PCR을 행하였을 때 수그루는 460 bp, 암그루는 436 bp의 PCR산물이 예상되었다. 우선 수그루에 특이적일 것으로 생각되는 primer를 사용하여 southern hybridization에 사용되지 않았던 개체들 중 수그루 5개체, 암그루 5개체의 genomic DNA를 주형으로 PCR을 행하였다. 그 결과 수그루 primer는 수그루에서만 예상했던 460 bp의 PCR 산물을 증폭시켰다 (그림 2.25). 마찬가지로 암그루 primer는 암그루에 특이적으로 436 bp의 DNA를 증폭시켰다 (그림 2.26). 그러므로 이 primer들은 흑오미자의 암수를 구별하는 PCR marker로서 사용할 수 있을 것으로 사료된다.

표 2.3. 수그루 및 암그루 특이적인 primer의 염기서열

품 종	primer 명 명	primer의 염기서열	PCR product의 크기
수그루	male 1	F : 5'-GGAATTGAGTTCACCTCATC-3' R : 5'-CACTTGGTCTCTTGAGTTCC-3'	460 bp
암그루	female 1	F : 5'-CTTGTTGCCCTATTCTTCAC-3' R : 5'-AACACCAGCTACTCTCTCCA-3'	436 bp
자웅동주 41-1	mono 2-1	F : 5'-GCCATTTTGATGCTCCATTT -3 R : 5'-GTAGGGGGACCACATAGTT -3'	411 bp
자웅동주 41-2	mono 2-2	F : 5'-ATGGACCGAGATACGTT -3 R : 5'-TCCGAGCTTTCCTCCTGGAT -3'	684 bp
자웅동주 51호	mono 3	F : 5'-ACCACTCGTTCCCAGTTGAG -3 R : 5'-TCTTGATCTGGTCGCTGTTG -3'	207 bp

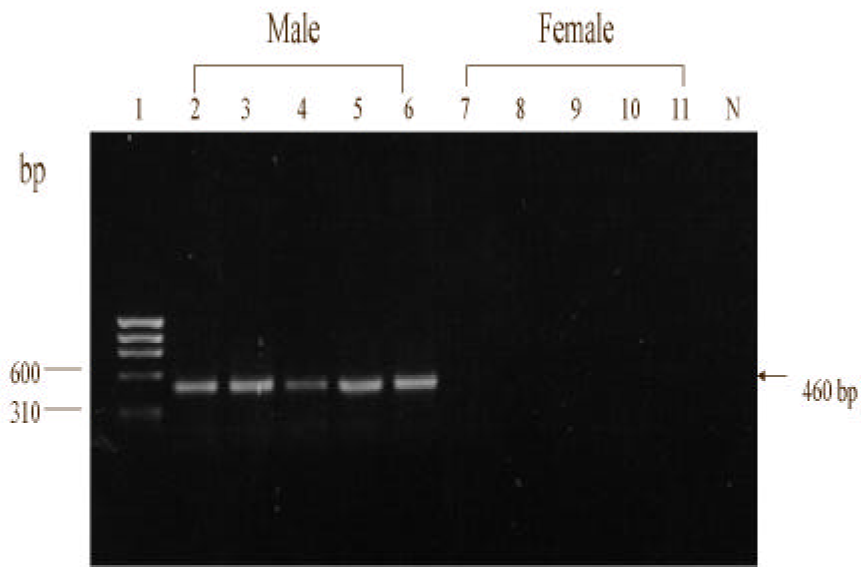


그림 2.25. 수그루 primer를 이용한 수그루와 암그루의 PCR 산물.

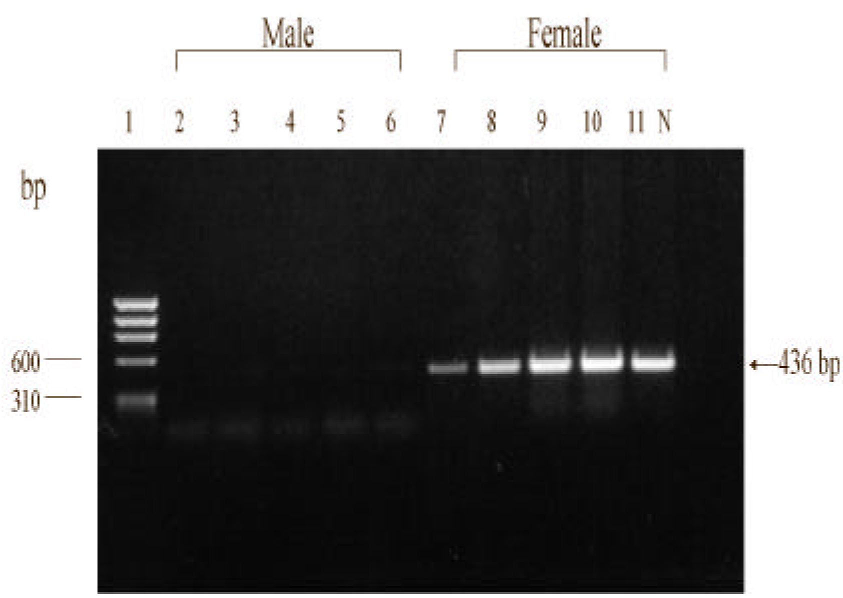


그림 2.26. Female primer를 이용한 수그루와 암그루의 PCR 산물.

수그루나 암그루는 개체간에 유전적 변이가 없이 안정된 상태를 유지하고 있기 때문에 수그루 및 암그루에서 나타난 특이적인 band는 암·수 개체를 유묘시기에 조기에 구별하는 genetic marker로 사용할 수 있으리라 기대된다. 이들 암·수 특이적 primer들이 자웅동주 개체들에는 어떻게 반응하는지 알기 위해 자웅동주 개체의 DNA를 주형으로 PCR을 행하였다 (그림 2.27). 앞서 언급한 것과 같이 제주도 자생지에서 자웅동주는 3개체만 발견되었다 (6, 41, 51호). PCR 결과 자웅동주인 흑오미자 6호과 41호에서는 암그루, 수그루 primer 모두에서 예상했던 크기의 PCR 산물을 확인할 수 있었으나 (그림 2.27, lane 1, 2), 51번 개체는 두 primer 모두에서 PCR 산물이 증폭되지 않았다 (그림 2.27, lane 3). 이러한 사실은 51번 자웅동주 개체가 다른 개체들과 다른 유전적 배경을 가졌음을 시사해 준다.

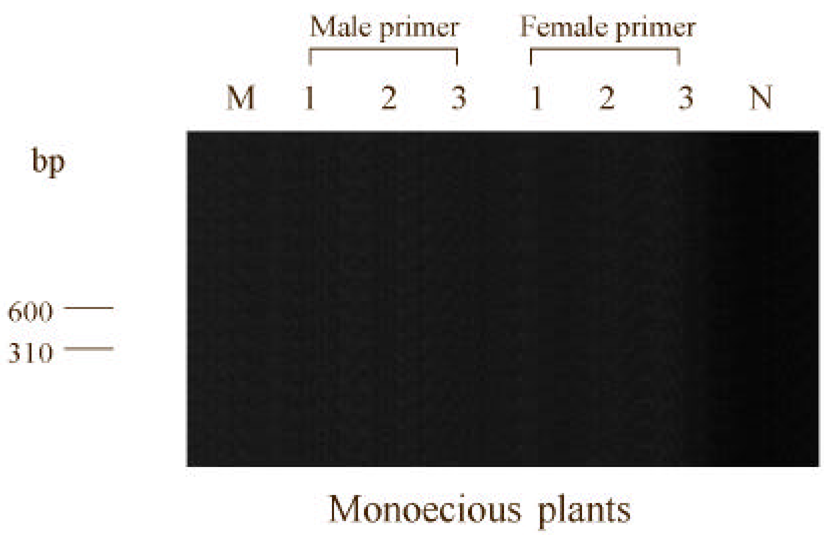


그림 2.27. Male 1 primer와 Female 1 primer를 이용한 자웅동주의 PCR 산물. Lane M: size marker, *Hae*Ⅲ로 자른 ΦX174 DNA; lane 1-3: 자웅동주 흑오미자 6, 41, 51호; lane N, 음성대조

자웅동주인 흑오미자 41의 RAPD marker 중 자웅동주인 흑오미자 6, 41, 51호 모두에서 검출되었던 609 bp의 염기서열에서 primer (mono2-1)를 제조하여 PCR을 한 결과 그림 2.28과 같이 수그루와 암그루에서는 검출되지 않은 684 bp의 band가 모든 자웅동주에서 검출되었다. Southern hybridization 결과, 자웅동주인 흑오미자 41, 51호에서 검출되었던 염기서열에서 primer를 만들어 PCR을 한 결과, 특이적인 884 bp의 band가 예상하였던 바와 같이 흑오미자 41, 51호에서만 검출되었다 (그림 2.29).

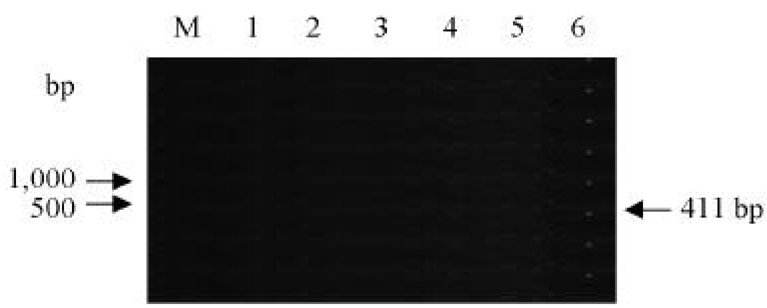


그림 2.28. Mono 2-1 primer를 이용한 흑오미자의 PCR 산물.

Lane M: size marker, 100 bp ladder; lane 1-3: 자웅동주 흑오미자 6, 41, 51호; lane 4-5:수그루 흑오미자 46, 암그루 흑오미자 42; lane 6: 음성대조

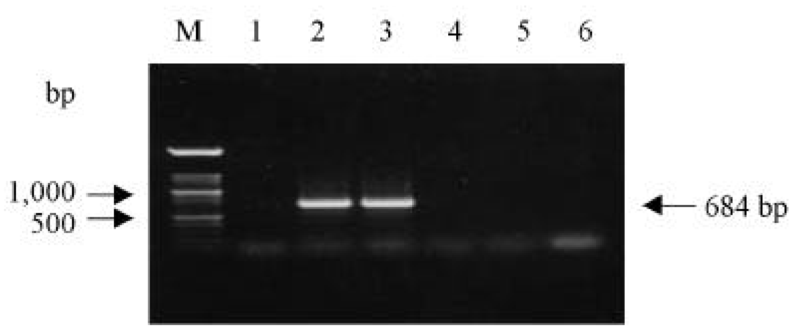


그림 2.29. Mono2-2 primer를 이용한 흑오미자의 PCR 산물.

Lane M: size marker, 100 bp ladder; lane 1-3: 자웅동주 흑오미자 6, 41, 51호; lane 4-5:수그루 흑오미자 46, 암그루 흑오미자 42; lane 6: 음성대조

자웅동주 3호인 흑오미자 51호 개체에 특이적인 primer에 대한 PCR 결과, 다른 자웅동주와 수그루, 암그루에서는 band가 나타나지 않았고, 51호 개체에서만 207 bp의 band가 검출되어 (그림 2.30) 흑오미자 51호의 genetic marker로의 사용이 가능할 것으로 사료된다.

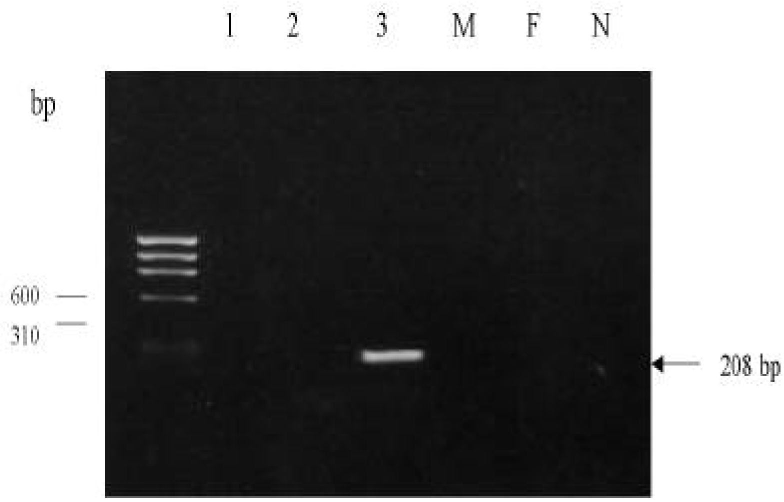


그림 2.30. Mono3 primer를 이용한 PCR 산물

Lane 1-3: 자웅동주인 흑오미자 6, 41, 51호; lane M: 수그루 흑오미자 46호; F: 암그루 흑오미자 42호; N: 음성대조

이상의 결과와 같이 RAPD와 southern hybridization를 통해 최종적으로 얻어진 genetic marker는 OPA-17 primer에 의한 수그루 특이적인 770 bp, OPB-03 primer에 의해 생성되는 암그루 특이적인 749 bp, 자웅동주에 특이적인 OPB-9의 600 bp, OPF-16의 1,100 bp, 자웅동주인 흑오미자 51번에 특이적인 OPA-17의 580 bp이다. 이 marker들의 염기서열을 결정한 후, 품종 동정으로의 활용을 위해 primer를 제조하였다. 수그루 특이적인 marker로부터 만들어낸 primer를 male 1 primer, 암그루 특이적인 marker로부터 만들어낸 경우는 female 1 primer로 명명

하였고, 자웅동주에 특이적인 primer들도 각각 mono2-1, mono2-2, mono3로 각각 명명하였다. 제조된 primer들을 이용하여 PCR을 수행한 결과, 예상한 바와 같이 male 1 primer는 수그루에서만 460 bp의 band가 검출되었고, female 1 primer는 암그루에서만 436 bp의 band를 얻을 수 있었다. 또한 자웅동주에 특이적인 marker를 이용하여 만든 mono 2-1 primer의 경우 암그루와 수그루에 나타나지 않는 411 bp의 band를 모든 자웅동주에서 검출할 수 있었다. mono2-2 primer의 경우에는 자웅동주 중에서도 41번과 51번에서만 특이적인 684 bp의 band가 검출되었다. 흑오미자 51번에 특이적인 marker의 염기서열에서 만들어낸 mono3 primer를 이용하여 PCR을 수행한 결과, 수그루, 암그루 뿐만 아니라 다른 자웅동주에서는 검출되지 않은 반면에 흑오미자 51번에서만 207 bp의 band가 검출되었다.

따라서 이들 primer set들을 이용하여 신속하고 간편하게 유묘시기에서의 조기 감별이 이루어질 수 있을 것으로 사료되며, 특히 mono2-1 primer을 이용하여 PCR을 수행할 경우 암그루에 비해 1주당 열매의 생산량이 약 1.5배 정도 높은 것으로 보고되어 있는 자웅동주의 빠른 감별이 이루어져 우량형질의 보존 및 생산성 향상에 기여를 하게 될 것으로 기대한다.

제 4 절 결 론

식물체로부터 genomic DNA를 분리하는 방법은 일반적으로 많이 사용되고 있는 Roggers와 Bendish 등의 방법 (1988), Dellaporta의 방법 (1983)과 비교하였을 때 genomic DNA의 추출양이 많았고, 또한 어린 싹에서 뿐만 아니라 성숙한 잎에서도 DNA의 추출이 용이하였다. 따라서 이 방법은 엽육조직이 두꺼운 목본 식물의 성엽에 적용 가능하리라 생각된다.

제주도에 자생하는 흑오미자는 대부분 암그루와 수그루이며, 자웅동주 세 개체가 존재함이 확인되었다. RAPD와 southern hybridization를 통해 최종적으로 얻어진 marker로는 OPA-17 primer에 의한 수그루 특이적인 770 bp, OPB-03 primer에 의해 생성되는 암그루 특이적인 749 bp, 자웅동주에 특이적인 OPB-9의 609 bp, OPF-16의 1,100 bp, 자웅동주인 흑오미자 51번에 특이적인 OPA-17의 580 bp를 얻었다. 이 marker들의 염기서열을 결정한 후, 품종 동정으로의 활용을 위해 primer를 제조하였다. 이 primer들을 이용하여 수그루, 암그루, 자웅동주를 동정해 낼 수 있었다. 이는 흑오미자의 유묘시기 조기에 이들을 구별할 수 있을 뿐만 아니라 우량형질의 genetic marker로 사용할 수 있을 것이다. 특히 수그루와 암그루에 특이적인 marker들이 식물의 성분화에 관련되어 있을 것으로 생각되어, 식물에서 성의 진화 메카니즘을 밝히는데 큰 기여를 하게 될 것으로 기대된다. 또한 이 유전자들의 생산성과 관련여부를 확인하고, 식물로의 형질전환에 대한 연구를 하게 된다면 생산성 향상에 기여할 뿐만 아니라, 타 작물에도 적용할 수 있어 육종학의 발달에 기여를 할 수 있으리라 판단된다.

제 4 장 성분분석분야

제1절 서 설

국내의 오미자에 대한 성분분석 및 약리작용에 대한 보고는 “재배 오미자의 anthocyanin과 그의 안정성”(1982, 양희천 등)에서 anthocyanin색소를 분리한 후, 색소 성분에 대해 pH, 당류 및 그 부산산물, Ascorbic acid, 유기산이 미치는 영향 등에 관한 보고가, “오미자 즙액의 조리 조건에 따른 성분 함량의 변화”(1986, 정현숙)에서 온도 및 시간에 따라 침지 조건을 달리한 오미자 즙액을 제조하여 Ascorbic acid, 유리당, 총산, anthocynin, tannin 함량 등을 조사한 보고가, “오미자 추출물이 Alloxan 負荷家兎의 혈청성분에 미치는 영향”(1987, 서화중)에서 오미자의 MeOH & ether 추출물을 이용하여 mouse의 혈당의 변화, 췌장의 조직검사 등을 조사한 보고가, “오미자의 부위별 총아미노산과 유리 아미노산 조성에 관한 연구”(1989, 이정숙 등), “구기자, 당귀, 오미자, 오갈피 추출물의 유리당, 유리아미노산, 유기산 및 타닌의 조성”(1990, 오상룡 등), “오미자 열매의 물추출물이 알콜대사에 미치는 효과”(1990, 이정숙 등)에서 오미자의 물추출물과 rats를 이용하여 혈중 alcohol농도 측정, 혈청분석, microsomal protein 정량, glycogen 정량, glucose-6-phosphate dehydrogenase의 활성도를 측정한 보고가, 그리고 “반응표면 방법에 의한 오미자 음료 제조의 최적화”(1992, 강규찬) 등의 보고가 있으나, 흑오미자의 성분분석에 대한 보고는 거의 전무한 상태이다.

국외의 오미자에 대한 성분분석 연구보고 중, 약리작용의 주성분으로 인정되는 생물활성성분에 관한 연구를 간단하게 살펴 보면, Schizandrin의 경우, 식물체로 부터 분리에 관한 보고는 Kochetkov, N.K. 등(1961), Chen, Y.-Y. 등(1978)이 있으며, 그 구조와 absolute configuration을 결정에 관한 보고는 Chizhov, O.S. 등(1961), Ikeya, Y. 등(1978, 1979, 1982), Liu, C.-S. 등(1978)이 있고, 그 합성에 관한 보고로는 Ben David Y. 등(1978), Ghera, E. 등(1978), Warshawsky, A.M. 등(1990)이 있다.

Gomisin A의 경우, 식물체로 부터 분리에 관한 보고는 Taguchi, H. 등(1975), Chen, Y.-Y. 등(1976)이 있으며, 구조동정에 관한 연구로는 Taguchi, H. 등(1977), Ikeya, Y. 등(1979)이 있고, 약리작용에 관한 연구로는 Nagai, H. 등(1989), Mizoguchi,

Y. 등(18991)이 있다. Gomisin D의 경우, 분리 및 구조결정에 관한 연구로는 Ikeya, Y. 등(1979)이 있으며, 약리작용에 관한 연구로는 Lian-niang 등(1985)이 있다. Gomisin F의 경우, 분리 및 구조결정에 관한 보고로 Ikeya, Y. 등(1979)이 있으며, 약리작용이나 합성에 관한 연구는 미진한 편이다.

Gomisin K1의 경우, 분리 및 구조결정과 생합성에 관한 보고로 Ikeya, Y. 등(1978, 1979, 1980)이 있고, 약리작용에 관한 연구로는 Suekawa, M. 등(1987)이 있다. Gomisin N 및 O의 경우, 분리 및 구조결정과 absolute configuration에 관한 보고로 Ikeya, Y. 등(1972, 1973, 1979, 1982)이 있다. Gomisin P의 경우, 식물체로 부터 분리에 관한 보고로는 Taguchi, K. 등(1975), Liu, C.-S. 등(1978), Ikeya, Y. 등(1979)이 있으며, 구조동정에 관한 연구로는 Ikeya, Y. 등(1980, 1981, 1982, 1983 등)이 있고, 약리작용에 관한 연구로는 Hikino, H. 등(1984)이 있다. Gomisin Q의 경우, 분리 및 구조동정에 관한 연구로는 Ikeya, Y. 등(1979, 1990)이 있으며, 약리작용에 관한 연구로는 Liu, C.-S. 등(1982)이 있다.

Sesquicarene의 경우, 식물체로 부터 분리 및 구조동정에 관한 연구로는 Ohta, Y. 등(1968), Bohlmann 등(1979)이 있으며, 합성에 관한 연구로는 Garbers, C.F. 등(1975), Kitatani, K. 등(1976), Uyehara 등(1985), Johnson, C.R. 등(1987)이 있다.

Bisabolene의 경우, 식물체로 부터 분리 및 구조결정에 관한 보고로는 Bohlmann 등(1974), Zdero, C. 등(1988)이 있으며, 합성에 관한 연구로는 Vig, O.P. 등(1979)이 있다.

Chamigrenal 및 Chamigrene의 경우, 분리 및 구조결정에 관한 연구로는 Ohta, Y. 등(1968), Ito, S. 등(1967)이 있으며, 합성에 관한 연구로는 Tanaka, A. 등(1967), Ireland, R.E. 등(1984), Martin, J.D. 등(1986)이 있다.

3-Copaene(=Ylangene)의 경우, 분리 및 구조결정에 관한 보고로는 Motl, O. 등(1962), Irie, T. 등(1964), Ohta, Y. 등(1969)이 있으며, 합성에 관한 보고로는 Corey, E.J. 등(1973), Wenkert, E.등(1992)이 있다.

국외의 흑오미자에 대한 연구보고를 살펴보면, Nigranoic acid의 경우는 Kikuchi, M 등(1972), Schizandronic acid의 경우는 Takahashi, K. 등(1975, 1976), Schizandrol의 경우는 Takahashi, K. 등(1976), Ayer, W.A. 등(1982)이 분리 및 구조동정에 관해 보

고하였고, 2-Tridecanone의 경우는 Allen, R.R. 등(1965), Regnier, F.E. 등(1968)이 분리 및 구조동정에 관해서, Majek, M. 등(1974), McDaniel, C.A. 등(1987)이 합성에 관해 보고한 바 있다.

이상의 연구보고를 종합하여 보면, 국내에서의 실시된 오미자에 대한 연구결과는 일반성분 및 유리당, 유기산, 유리아미노산 등에 대한 보고가 있으나, 약간에 지나지 않으며, 약리성분에 대한 분석은 매우 미비하고, 임상실험에 관한 보고 역시, 분리과정을 여러단계 거쳐 순도 높은 분리물질을 사용하기 보다는 분리과정을 1 2번 거친 후, 얻어진 추출물을 사용하여 실험을 실시하였기에, 단일물질에 의한 결과라기 보다는, 여러물질이 혼재된 혼합물에 의한 결과라고 보아야 할 것이므로 정확한 결과라고는 보기 어렵다. 게다가, 흑오미자에 대한 보고는 그나마, 전무한 상태이다.

국외에서 연구된 오미자에 대한 보고는 분리 및 구조동정, 그리고 약리성분을 이용한 임상실험에 대한 보고가 충분히 되어 있었으나, 주로 日本, 中國에서 자생하고 있는 오미자를 시료로 사용하였으며, 우리나라에서 자생하는 오미자를 시료로 연구를 실시한 경우는 거의 전무하였다. 또, 흑오미자에 대한 국외에서의 연구보고는 그다지 충분하다고는 할 수 없었고, 더구나, 오미자의 경우와 마찬가지로 주로 日本에서 자생하고 있는 흑오미자를 시료로 하였으며, 우리나라에서 자생하는 오미자를 시료로 연구를 실시한 예는 찾을 수가 없었다.

오미자의 다양한 생물활성 및 효능에도 불구하고, 오미자에 대한 국내의 연구는 색소의 주류를 이루는 anthocyan과 안정성에 관한 연구, 오미자의 五味에 관여하는 성분으로 유기산, 유리당, 유리아미노산에 대한 연구, 그리고 tannin, 무기질 등에 관한 연구, 오미자의 정유성분, 오미자 물추출물이 alcohol대사에 미치는 영향, 알코올 추출물이 alloxan 負荷家鬼의 혈청성분에 미치는 영향 등, 내용면에서 단편적인 보고가 주류를 이루고 있다. 따라서 상품화, 신제품 개발 및 소비자에게 올바른 인식을 심어 적절한 섭취를 하도록 하기 위한 내용, 즉, 건조, 저장 및 다류로 우리거나 제품화 했을 때 변색에 관여하는 phenol화합물과 저장 중 산패취의 원인이 되는 지질 및 유리지방산, 그리고 약리작용의 주성분으로 알려져 있는 lignan 화합물인 gomisin, schizandrin, 정유중에 다량 함유되어 있는 sesquicarene, bisabolene, chamigrene, ylangene 등의 생물활성성분에 관한 연구는 매우 미비하다. 더구나, 흑오미자에 대한 연구는 오미자에 비해 훨씬 미

비하여, 국내에서는 적절한 연구가 거의 이루어져 있지 않은 실정이다.

한편, 오미자는 주로 우리나라, 일본, 중국 등에서 자생하는 식물로서 약재, 다류, soft drink, 나물, 그리고 욕탕료 등 다양한 분야에서 직접, 간접적으로 사용되고 있으며, soft drink, 농축 extract로의 개발 가능성이 대단히 높다. 따라서, 현재 이들 식물을 재배하고 있거나 재배하고자 하는 의욕을 가진 농가가 상당수에 이르고, 생산된 오미자를 가공하여 제품을 생산하고 있거나 신제품을 생산하려는 산업체가 증가하고 있다는 점을 감안할 때, 오미자와 흑오미자가 생산하는 생물활성성분을 포함한 총괄적인 성분분석이 이루어 진다면, 오미자 관련 산업체에 기초적이고 총괄적인 DATA를 제공함으로써, 현재 생산중인 제품의 물리·화학적 보완은 물론, 신제품 개발에도 상당한 일익을 담당하게 될 것이며, 그에 따라 재배면적의 증가와 판매 route가 보장되어 다수농민의 참여로 재배면적의 증가와 농가의 소득향상에도 기여하게 될것이다.

또한, 오미자와 흑오미자는 현재 국민들에게 기능성식품, 건강보조식품으로 인식되어 그 수요가 점차 늘고 있음에도 불구하고, 국내에서는 아직까지 이들 식물에 대한 기초적이고 총괄적인 성분분석 DATA를 제공하지 못하고 있어, 재배자, 산업체는 보다 넓고 포괄적인 홍보에 어려움이 따르고, 일반국민의 경우는 올바른 인식부족으로 인해, 呼吸困難, 急性炎症, 高血壓症, 動脈硬化症 등에 과도한 섭취를 하여, 그에 따른 부작용이 일어나는 경우도 있다. 따라서 오미자와 흑오미자가 생산하는 성분과 생물활성성분에 대한 기초적이고 총괄적인 DATA를 제공함으로써 재배자, 산업체, 소비자에게 이들 식물의 약리작용과 약효에 대한 올바른 인식을 심어줌으로써 국민건강 증진에 일익을 담당하게 될것이다.

이러한 요구에 부응하기 위하여, 오미자와 흑오미자 열매를 대상으로, 맛에 관여하는 유기산, 유리당, 유리아미노산을, 오미자의 향과 우릴 때의 향에 관여하는 citral을 중심으로 하는 정유성분을, 건조 및 저장 중 갈변에 관여하는 total phenol과 phenolic acid를, 저장이나 우릴 때 악취(산패취)에 관여한다고 인정되는 지질과 유리지방산을, 주된 약리성분으로 보고되어 있는 lignan 화합물인 schizandrin, 정유성분 등의 오미자 및 흑오미자에 함유된 성분 및 기능성 물질 탐색에 대한 종합적인 연구를 수행하는 것이 이들 식물의 개발 및 이용을 위해 다른 어떤 사항보다도 선결되어야 할 것이다.

제2절 연구수행방법

1. 연구재료

오미자는 강원도 홍천군 남면 양더리에서 구입하여 사용하였고, 흑오미자는 임업연구원 제주임업시험장에서 분양받아 사용하였다.

2. 일반성분 분석

가. 유리당

1) 오미자, 흑오미자 건조 시료 10g씩을 정확히 평취하였다.

2) 시료를 80% EtOH 50ml와 함께 homogenizer(Nissei사, Ace homogenizer AM-11, Japan)로 마쇄한 다음, 80℃에서 2시간 추출한 후, Whatman No. 2여과지로 여과하고, 여액은 45℃에서 감압농축하여 소량 남았을 때 다시 증류수 50ml를 첨가하여 재 감압농축을 50ml가 남을 때까지 실시하여 EtOH를 완전히 제거하였다. 용매가 제거된 추출액에 대하여 그림 . 4-1.과 같은 방법으로 처리하였다.

3) 유리당 획분을 감압농축한 후 농축액을 C_{18} cartridge에 통과시켰다. 즉, C_{18} cartridge에 MeOH을 통과시키고 물로 세척하여 활성화시킨 다음,
농축액을 C_{18} cartridge에 통과시켜 색소성분 및 단백질을 제거하였다. 여과액은 질소가스로 농축하여 4ml로 정용하고, 그 중 1ml를 membrane filter(Millipore, 0.45μm, Waters사)로 여과하여 표 3.1.의 조건으로 고속액체크로마토그라피(이하 HPLC)를 행하여 정량하였다.

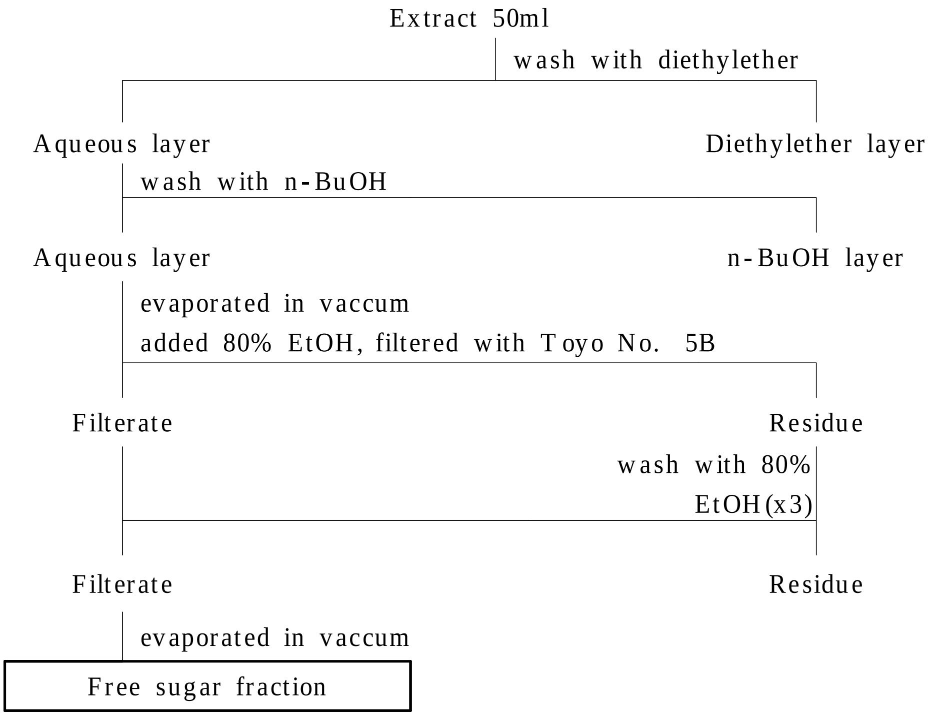


그림. 3.1. **오미자**, **흑오미자 열매로부터 유리당획분 분리과정**.

표 3.1. **유리당분석을 위한** HPLC**조건**

Instrument	Waters Associate
Column	Carbohydrate analysis(4mm x 30cm)
Solvent	Acetonitrile / Water (80:20, v/v)
Detector	Differential Refractometer(RI)
Flow rate	1.5ml/min
Injection Volume	20µl

나. 유기산

1) HPLC

가) **시료** 10g**을 증류수** 20ml**와 함께** homogenizer(Nissei**사**, Ace homogenizer AM-11, Japan)**로 마쇄하여 추출하고**, **추출액은 원심분리 후**, **상등액만을 취하였**

으며 이조작을 3회 반복하였다. 추출액은 동량의 수포화 ehter로 2회 세척한 다음, 수층을 감압농축하여 HPLC용 증류수 40ml로 정용하였다.

나) 그 중 일부를 취하여 C_{18} cartridge를 통과시킨 다음, 여액을 Membrane filter(0.45µm)로 여과하여 표 3.2.의 조건으로 HPLC를 실시하여 정량하였다.

표 3.2. 유기산분석을 위한 HPLC조건

Instrument	Waters Associate
Column	RSpak KC-811(4mm x 30cm)
Column Temp.	40 ℃
Solvent	0.1% H_3PO_4 in water
Detector	Differential Refractometer(RI)
Flow rate	1.0 ml/min
Injection Volume	20µl

2) 가스크로마토그라피(이하 GC)

가) 1) HPLC의 가)와 동일한 방법으로 추출하였으며, 증류수 10ml로 정용하였다.

나) 추출액를 감압농축하고 진공오븐에서 하룻밤 방치 후, 수분을 완전히 제거하여 BF_3/MeOH과 $CHCl_3$을 각각 2ml을 가하여 수욕상에서 60도로 25분간 반응시킨 후 포화 ammonium sulfate 4ml을 가하여 방치, $CHCl_3$을 회수하여 GC분석을 실시하였다.

다) 분석조건은 Hewlett packard 5890 seriesⅡ, 칼럼은 Ultra 2 (Crosslinked MethylSiliconGum, 25m x 0.32mm x 0.52μm film thickness, Hewlett Packard Co.), 검출기는 FID, 주입구온도 250℃, 검출기온도 270℃, 칼럼의 온도조건은 70℃에서 1분간 유지하고 분당 5℃씩 상승시켜 210℃까지 상승시키고 그 후 5분간 유지하였다.

다. 아미노산

1) 유리아미노산

가) 건조시료 10g에 증류수 100ml를 넣고 Homogenizer(Nissei사, Ace homogenizer AM-11, Japan)로 마쇄한 다음, 80℃에서 40분간 추출하였다.

나) 추출액에 25% TCA(Trichloroacetic acid) 용액을 동량 첨가하여, 1시간 동안 냉장고에 방치한 후, 원심분리(5,000xg)하였다.

다) 상층액에 동량의 ethylether를 가하여 잘 흔든 후 방치하여, TCA, 지방, 색소 등을 제거한 수용액을 다시 감압농축하고 총 50ml가 되게 0.2M Na-citrate 완충액(pH 2.2)으로 농축물을 녹인 다음 아미노산 자동분석기로 분석하였다.

2) 전아미노산 : 산가수분해법에 의해 실시

가) 건조시료 1g을 취하여 6N HCl 10ml를 넣고 110℃에서 24시간 가수분해시킨 다음, 여과하고 감압농축하였다.

나) 농축물을 0.2N sodium citrate buffer(pH2.2)로 녹여 10ml로 정용하고 아미노산 자동분석기로 분석하였으며 분석조건은 표 3.3.의 조건으로 실시하였다.

표 3.3. 아미노산 자동분석을 위한 분석 조건

Instrument	LKB 4150 ALPHA
Ion exchange resin	Ultrapac 11 cation exchange resin
Column Temp.	60℃
Buffer flow rate	45 ml/h
Ninhydrin flow rate	35 ml/h
Buffer pressure	22 bar
Ninhydrin pressure	16 bar
Reaction bath Temp.	130℃
pH range	3.2 10.0
Injection volume	40 ㎕

라. Phenol 화합물

1) Total phenol

가) Phenol성 물질이 phosphomolybdate와 반응하여 청색을 나타내는 원리를 이용한 Folin-Denis법에 따라 실시하였다.

나) Folin-Denis reagent : Sodium tungstate 25g, phosphomolybdate 5g, phosphoric acid 12.5ml를 물 188ml와 같이 2시간 동안 환류 냉각하면서 비등시킨 후 냉각하고, 물을 가하여 250ml로 하였다.

다) 비색정량

(1) 건조시료 10g을 정확히 평취하여 95% ethanol 40ml와 혼합 후, homogenizer (Nissei사, Ace homogenizer AM-11, Japan)로 3분간 추출하고 Whatman No. 3 여과지로 여과하였다(5배희석).

(2) 100ml mass flask에 증류수 80ml, 건조물 1g 상당량의 시료 추출액, Folin-Denis시약 2ml를 넣고 포화 탄산나트륨 5ml를 가한 뒤 증류수로 채워 100ml로 하였다.

(3) 잘 혼합하고 1시간 동안 정치시킨 다음, 660nm에서 흡광도를 3반복 측정하였다. 증류수를 넣어 blank test를 실시하고 0.1% 3.0% 농도범위의 tannic acid용액을 만들어 spectrophotometer(Schimadzu, spetrophotometer UV-120-02, Japan)로 흡광도를 측정하고, 작성된 standard curve로 부터 total phenol 함량을 tannic aicd로 환산하여 나타냈다.

2) 유리페놀산, 페놀산ester 및 불용성결합형 페놀산의 분석

가) 시료의 처리

(1) Krygier등의 방법에 따라 분석을 실시하였다.

(2) 즉, 시료를 Soxhlet추출기를 사용하여 diethylether로 12시간 환류 추출하여 지용성물질을 제거한 다음 풍건하고 30g씩을 정확히 평취하여 250ml의 70% EtOH : 70% acetone = 1 : 1(v/v) 혼합용매를 가한 뒤, sonicator로 5분간 처리하고 다시 3,000 rpm에서 30분간 원심분리시켜 상등액을 분리하였다.

(3) 이같은 조작을 5번 더 되풀이 실시하여 시료에 있는 유리페놀화합물들이 모두 추출되도록한 다음, 합친 상등액 1,250ml를 100ml까지 감압농축하고, 다시 증류수 100ml를 가하여 50ml가 될 때까지 감압농축한 후, 농축액을 유리페놀산 및 페놀산에스터의 분석용으로 이용하였다.

(4) 나머지 잔사로 불용성 결합형 페놀산의 정량을 실시하였다.

나) 유리페놀산

(1) 농축된 상액은 6N HCl로 pH 2로 조정한 다음, 부연침전물들을 분리하기 위하여 4,000rpm에서 30분간 원심분리시켰다.

(2) 맑은 상액은 분액여두를 이용하여 지방산이나 다른 오염된 유지물질을 제거하기 위하여 250ml의 hexane으로 5회 추출하였다.

(3) 수용액층에 대해 diethylether : ethylacetate = 1 : 1(v/v, 이하 DE/AE) 혼합용매로서 6회 추출하였으며 추출용매의 양은 수용액과 동량을 사용하였다.

(4) 추출한 DE/AE층을 합한뒤 anhydrous sodium sulfate로 탈수시키고 다시 30℃에서 감압농축하여 용매를 제거한 뒤, MeOH로 유리페놀산들을 추출하여 10ml로 정용하고, 질소가스를 충전시켜 냉장고에 보존하면서 다음 분석에 사용하였다.

다) 페놀산 Ester

(1) Sodium sulfate를 씻은 물과 유리페놀산 추출시 남은 수용액상 및 분리시킨 부연침전물들을 모두 합한 후,

(2) 이들을 가수분해하기 위해 4N NaOH 250ml를 가하고 질소가스하(질소가스 충진 후에 파라필름으로 밀봉하여)의 상온에서 4시간 동안 방치하였다.

(3) 여기에 다시 6N HCl을 가하여 pH 2로 조정한 뒤, 유지물질을 제거하기 위해 hexane으로 추출하고 나) 유리페놀산의 (3), (4)과정을 그대로 실시하였다.

라) 불용성 결합형 페놀산

(1) 남은 잔사{가)의 (4)}에 4N NaOH 250ml를 가하고 상온, 질소가스하에서 4시간 동안 가수분해시켰다.

(2) 그후, 다시 6N HCl을 가하여 pH 2로 조정하고 원심분리시킨 후, 상등액에 대해 hexane으로 추출하여 남은 수용액층에 대해 DE/AE 용매계로 추출하고, 감압농축하여 용매를 제거하고 남은 잔사를 MeOH로 추출한 후, 10ml로 정용하여 질소가스를 충전시켜 냉장고에 보관하면서 다음 분석에 사용하였다. 이상의 과정을 그림. 4-2.에 나타내었다.

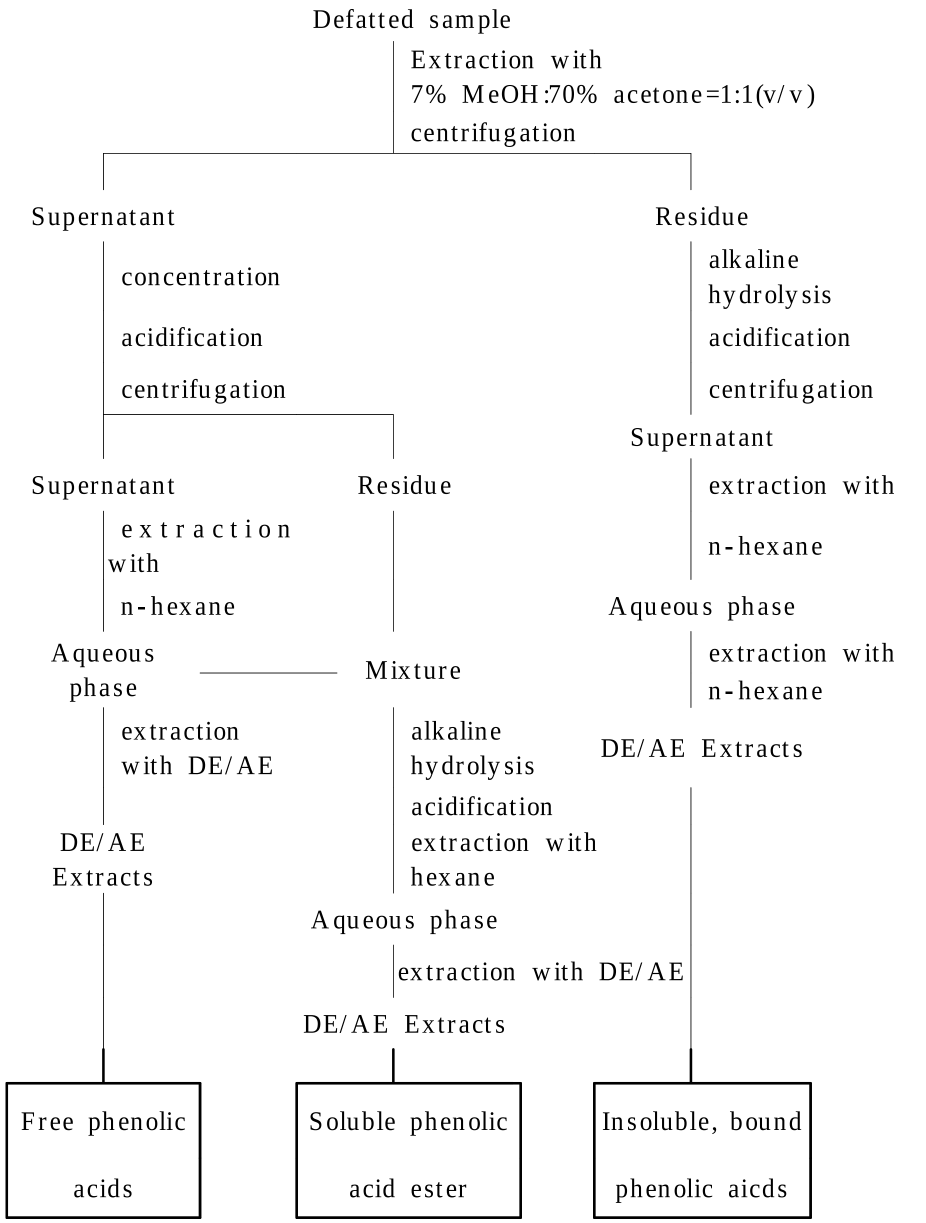


그림. 3.2. **오미자**, **흑오미자로부터 유리페놀산**, **페놀산에스터 및 불용성결합형 페놀산 분리과정**.

마) 박층크로마토그라피(이하 TLC)

(1) 10ml로 정용된 유리페놀산, 페놀산 Ester 및 불용성 결합형 페놀산획분에 대해 TLC를 실시하였다.

(2) Plate(silica gel F_{254}, Merck사, 0.25mm)에 표품(1mg/ml 농도)과 유리페놀산, 페놀산 Ester 및 불용성 결합형 페놀산획분을 적당량씩 spotting하여 toluene:ethylacetate:formic acid(5:4:1, v/v)용매계를 사용하여 전개하고 요오드증기 및 ferric chloride 5% 용액과 potassium ferricyanide 0.5% 용액을 1:1로 사용직전에 혼합한 용액을 분무하여 발색, 정성분석을 행하였다. 또한 이를 더욱 구명하고자 HPLC 및 GC를 실시하였다.

바) Phenol화합물의 HPLC

10ml로 정용된 유리페놀산, 페놀산 Ester 및 불용성 결합형 페놀산 획분 중 1ml를 membrane filter(Millipore, 0.45μm, Waters사)로 여과하고 표 3.4.의 조건으로 표품(1,000ppm)과 같이 HPLC를 행하여 정량분석을 실시하였다.

표 3.4. 페놀화합물 분석을 위한 HPLC조건

Instrument	Waters Associate
Column	μ BondaPak C_{18} (4mm x 30cm)
Solvent system	Solvent A ; 100% CH_3CN Solvent B ; Water : CH_3CN : CH_3COOH = 86 : 8 : 4(v/v)
Elution programming	0 - 10 min solvent A 1 % solvent B 99 % 10 - 50 min solvent A 60 % solvent B 40 % 50 - 55 min solvent A 60 % solvent B 40 % 55 - 60 min solvent A 1 % solvent B 99 %
Detector	UV 280 nm
Flow rate	1.5 ml/min

사) Phenol화합물의 GC

(1) 유도체화

시료(건조시료 2g상당량) 및 표품 2ml씩을 Vial에 취하여 질소가스로 완전

농축한 후, 다음 2가지 방법으로 유도체화를 실시하였다.

(2) N,O-bis(trimethylsilyl)acetamide를 이용한 유도체화

(가) N,O-bis(trimethylsilyl)acetamide 0.1ml를 시료가 농축되어 있는 Vial에 넣고 유도체화의 진행을 빨리하기 위하여 70℃에서 7시간 가열하였다.

(나) MeOH을 가하여 2ml로 정용한 다음, GC분석을 실시하였다.

(3) 14% BF_3-MeOH을 이용한 유도체화

(가) 14% BF_3-MeOH 1ml를 시료가 농축되어 있는 Vial에 넣고 2분간 비등시킨 다음, 이액을 100ml 분액여두에 옮긴 후,

(나) 포화 NaCl 20ml와 ethylether 10ml를 분액여두에 넣고 잘흔든 다음 방치하였다.

(다) Ethylether층을 취하여 질소가스로 농축하고 ethylether에 녹여 2ml로 정용한 다음 GC분석을 실시하였다.

(4) GC 분석조건은 표 3.5.와 같다.

표 3.5. 페놀화합물 분석을 위한 GC 조건

Instrument	Hewlett packard 5890 seriesⅡ
Column	Ultra 1(Crosslinked MethylSiliconGum, 25m x 0.32mm x 0.52μm film thickness, Hewlett Packard Co.)
Detector	FID
Carrier gas	N_2
Detector & Injector Temp.	300℃
Oven Temp.	초기 60℃(1분간 유지), 분당 10℃ 상승, 최종 300℃ (15분간 유지)

마. 지질

1) 지질성분 추출 및 정제

가) 건조시료 20g씩을 chloroform : MeOH : water = 2 : 1 : 1(v/v)의 용매계로 Bligh와 Dyer의 방법에 따라 총지질을 추출하였다.

나) 즉, 시료에 대하여 20배의 용매(1,000ml)를 넣어 homogenizer(Nissei사,

Ace homogenizer AM-11, Japan)로 파쇄하면서 섞고, 분액여두에 옮겨 때때로 흔들고 저어 주면서 48시간 동안 정치한 후, chloroform층 만을 분리하고 잔사에 다시 상기용매를 넣고 같은 조작을 되풀이하여 만 24시간 방치 후, chloroform층을 다시 분리하는 조작을 전 3회 반복 실시하였다.

다) Chloroform층을 감압농축하여 용매를 제거하고 진공 oven을 사용하여 감압하에서 24시간 건조 후, 질소가스를 충전하여 냉동보관하면서 다음 분석에 이용하였다.

2) 중성지질과 극성지질의 분리 및 정량

가) 정제한 지질은 Rouser의 방법으로 silicic acid 칼럼크로마토그라피(이하 SACC)에 의하여 중성지질, 당지질 그리고 인지질을 각각 분리하였다.

나) 즉, silicic acid(100 200 mesh, Sigma사, U.S.A)를 증류수로 씻어서 투명해질 때까지 콜로이드성 입자를 제거한 다음 MeOH로 세척하여 110℃ oven에서 24시간 건조하여 활성화시켰다.

다) 활성화시킨 silicic acid 30g을 chloroform으로 slurry를 만들어 기포가 혼입되지 않도록 column에 충진하고 chloroform으로 세척하였으며, 이때 세척량은 column 부피의 2배이상으로 하였다.(column size : 1.7 x 40 cm)

라) 정제한 지질을 소량의 chloroform에 녹여 column에 주입 후, chloroform (중성지질 획분), acetone(당지질 획분) 및 methanol(인지질 획분) 순서[27)]로 각각 용출분획하였다.

마) 얻어진 각획분에 대해 감압농축하여 용매를 제거한 후, 중량법에 의해 이들의 함량을 각각 계산하였다. 이상의 전 과정을 그림 3.3.에 나타냈다.

3) GC

가) 칼럼크로마토그라피에서 얻어진 각지질획분의 구성지방산을 확인하기 위하여 시료를 유도체화하여 GC(Hewlett Packard 5890 series II)분석을 실시하였으며 GC분석조건은 표 3.6.과 같다.

나) 유도체화

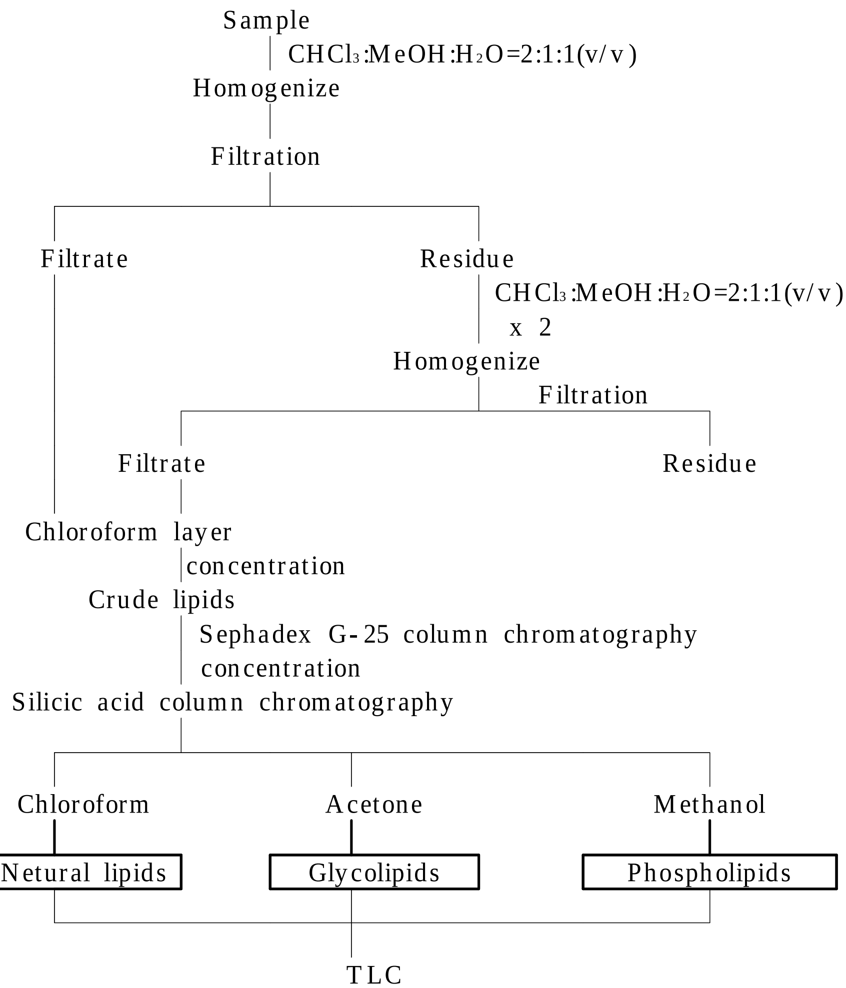


그림 3.3. 오미자·흑오미자 열매로부터 지질획분의 추출, 분리 및정제과정

표 3.6. 지방산분석을 위한 GC조건

Instrument	Hewlett packard 5890 seriesⅡ
Column	15% DEGS, glass, 3mm x 1m,
Detector	FID
Carrier gas	N_2
Detector & Injector Temp.	250℃
Oven Temp.	초기 80℃(2분간 유지), 분당 5℃ 상승, 최종 180℃ (38분간 유지)

(1) 지질 시료를 ethylether에 녹여 10ml로 정용한 다음 그중 2ml를 취 하여 질소가스로 완전 농축하고 0.5N NaOH in MeOH 용액 8ml를 가하여 100℃의 수조에서 완전히 용해될 때까지 가열(약 5분)한 후, 5ml의 14% BF_3-MeOH 용액을 가하고 2분간 비등시켰다.

(2) 충분히 포화시킨 NaCl용액 20ml를 flask에 가한 후, 전체 혼합물을 분액여두에 옮긴 다음, 20ml의 petroleum ehter(b.p 30 60℃)를 가하여 1분간 강하게 흔들고 방치한 후, 층이 갈라지면 수용액 부분은 버리고 ether층만을 50ml의 비이커에서 여과지(whatman No. 2)로 여과하여 취하고, 질소가스로 농축하였다.

(3) 농축액을 petroleum ehter에 녹여 전량 1ml로 하여(2배 농축) GC분석을 실시하였다. 지방산표품(500 ppm 농도)에 대하여 동일조작을 실시한 다음 정성 및 정량을 행하였다.

3. 정유성분

가. 추출

건조시료 50g씩을 수증기증류하여 얻어진 유상물질을 ethylether 50ml로 3회 용매추출하고 추출액은 질소가스로 농축한 후, ethylether를 사용하여 50ml로 정용한 다음 냉동고에 보관하면서 분석을 실시하였다.

나. GC/MS 분석

1) GC/MS(Hewlett packard Co., 5970 series Mass Selective Detector)분석을 실시하였다.

2) 조건 : column은 Ultra 2(Cross-Linked 5% Phenyl Methyl Silicone, 25m x 0.32mm x 0.52㎛ film), 검출기는 FID, 검출기 및 주입구온도는 300도, 주입량은 1㎕로 하였으며, Oven 온도는 초기온도 60℃에서 1분간 유지한 후, 분당 7℃씩 상승하여 100℃까지 승온한 다음 100℃에서 1분간 유지하고 또다시 분당 3℃씩 상승하여 160℃까지 승온한 후, 10분간 유지하고 분당 10℃씩 상승하여 280℃까지 상승한 다음 10분간 유지하였다.

4. 안토시안색소

가. 색소 추출

1) 정성분석용

가) Hayashi의 방법에 따라 오미자, 흑오미자 생시료 100g씩을 500ml의 1% HCl in MeOH용액과 함께 homogenizer로 마쇄한 다음, 냉암소에서 하루동안 추출한 후, Toyo No. 2여과지와 G_3 glass filter로 순차 여과하고 잔사에 다시 동용매계를 넣어 재추출, 여과하는 조작을 3회 반복하였다.

나) 추출여액은 감압농축하여 1% HCl in MeOH 100ml에 녹여 냉동고에 보관하면서 다음 실험을 실시하였다.

2) 분광학적 성질 측정용 : 생시료 10g씩을 칭량하여 0.01% HCl in MeOH용액과 0.01% HCl in EtOH용액 각각 20ml씩을 가하여 Sonicator로 1시간 처리후 3일간 방치한 다음, 여과하였다. 또, 440nm에서 흡광도를 측정하여 E_{440}/E_{MAX}비를 구하였다.

나. Anthocyan색소 확인

1) 색소액에 0.1N NaOH를 처리하여 색변화를 관찰하고 이 반응이 0.1N HCl에 의해 가역적인지를 확인하였다.

2) Anthocyanin의 정색반응

아래와 같은 시약을 사용하여 정색반응을 관찰하였다.

가) Aluminum chloride 시약 : $AlCl_3$ 5g을 ethanol 100ml에 녹여 사용하였다.

나) Ammonium molybdate 시약 : 수포화시킨 ammonium molybdate에 2N HCl을 사용하여 pH 2로 조정하여 사용하였다.

다) Lead acetate 시약 : 1g의 lead acetate를 75% ethanol 150ml에 녹여 사용하였다.

3) 분광학적 성질측정

Harborne의 방법에 의하여 Spectrophotometer를 사용하여 흡수극대를 측정하였고, 흡수극대파장의 이동은 5% $AlCl_3$의 ethanol 용액 3방울을 가한 후, 조사하였다.

4) Anthocyanin의 함량측정

Fuleki와 Francis 및 Philip의 방법에 따라 다음 식으로 계산하였다.

TAN in mgs per 100g = OD X DV X 100/SV X TEV/SW X $10/E^{1cm}_{1\%}$

OD = 흡광도, DV = 희석량, SV = 시료량, TEV = 총색소추출액, SW = 시료무게

$$E^{1cm}_{1\%} = \frac{\text{molar absorbance} \times 10}{\text{molecular weight}}$$

다. 색소의 분리

1) Amberite IRC-50 칼럼크로마토그라피

가) 수지의 전처리

색소 추출액 중의 유기산 및 당류를 제거하기 위하여 약양이온교환수지(Amberite IRC-50)를 이용한 칼럼크로마토그라피를 실시하였다.

수지를 5% HCl 500ml로 세척하여 H^+형으로 한 후, 증류수 500ml로 세척하고 또 0.1N NaOH 500ml로 세척한 후 증류수 500ml로 세척하였다.

수지의 재사용을 위하여 상기와 동일한 조작인 5% HCl 500ml로 세척하여 H^+형으로 한 후, 증류수 500ml로 세척하고 0.1N NaOH 500ml로 세척, 그리고 증류수 500ml로 세척한 다음 재사용하였다.

나) 색소와 유리당의 분리

(1) 색소추출액을 이온교환수지 칼럼에 charge(흑오미자, 오미자 100g 추출액 MeOH 100ml로 정용한 것 중 40ml를 charge)하고 증류수로 용출액이 무색이 될 때까지(800ml, 유리당 함유) 세척 후 0.3% HCl in EtOH로 역시 용출액이 무색이 될 때까지(500ml, 색소함유) 용출하였다.

(2) 증류수용출획분을 감압농축한 후, 농축액에 대해 다시 (1)의 조작을 반복, 총 3회 반복하여 색소의 회수량을 높였다.

(3) 유리당과 색소의 정확한 분리를 확인하기 위하여 Whatman No. 1 여과지를 이용한 종이크로마토그라피(이하 PC)를 실시하였으며, 가장 적당한 용매계를 선정하고자 표 3.7.과 같은 용매계를 사용하여 조사하였다.

표 3.7. 유리당과 색소의 분리용 PC용매계

	용 매 계	비 율	사용액
a	초산-물-농염산	15:82:3	혼합액
b	n-BuOH-초산-물	4:1:5	상층
c	개미산-농염산-물	5:2:3	혼합액
d	초산-물-농염산	30:10:3	혼합액
e	농염산-물	1:99	혼합액
f	EtOAc-개미산-물	80:15:15	혼합액
g	n-BuOH-pyridine-물	6:3:1	혼합액
h	n-BuOH-pyridine-물	6:3:3	혼합액
i	Benzene-초산-물	2:2:1	상층
j	Benzene-MeOH-초산	90:16:8	혼합액

다) PC용 당발색제

(1) Alkaline potassium permanganate : 2% Na_2CO_3를 함유한 1% $KMnO_4$용액을 분무하고 100℃에서 건조하면, 보라색을 배경으로 노란색 반점이 나타나며 갈색배경에 회색반점은 당알코올, 배당체, 환원 또는 비환원당의 경우이었다.

(2) $AgNO_3$ 0.1ml의 포화수용액에 acetone 20ml를 가하여 희석하고 $AgNO_3$가 녹을 때까지 증류수를 한방울씩 가하였다. 이용액을 paper에 분무하여 건조하

고 0.5M-NaOH in EtOH을 분무하였다. 환원성물질은 검은색 반점이 곧 나타나며(1분 정도), 비환원성물질은 약간 더 늦게 나타났다(5 10분 정도).

2) Aglycone의 분리

가) 산가수분해

(1) 색소의 aglycone에 결합된 당을 절단하기 위하여 유리당이 제거된 색소용액 4ml를 50ml의 삼각플라스크에 넣고 1N HCl 20ml를 가하여 30분간 환류가열하였다.

(2) Aglycone과 결합당의 분리

산가수분해시킨 색소분해액은 Amberite IRC-50 약이온교환수지를 이용하여 당은 증류수 300ml로, 그리고 aglycone은 0.3% HCl in EtOH 200ml로 용출분리하였으며, 각 용출액에 대해 표 4.7.에서 선정된 용매계로 PC (Whatman No. 1)를 실시하여 aglycone과 결합당의 분리정도를 확인하였다.

나) Aglycone의 분리정제

(1) Whatman No. 3MM여과지를 이용한 PC를 실시하였으며, aglycone을 분리정제하기 위한 가장 적당한 용매계를 선정하고자 표 3.8.과 같은 용매계를 사용하여 조사하였다.

(2) 오미자, 흑오미자의 aglycone획분을 Whatman No. 3MM 여과지 (20x20cm)에 각각 banding하여 초산/물/농염산(15:82:3) 용매계로 전개하고, 분리된 각 aglycone부분을 절취하여 1% HCl in MeOH 용매계를 가하여 하룻밤 방치 후, 추출, 여과하고 농축하였다.

표 3.8. Aglycone분리를 위한 PC 용매계

	용 매 계	비 율	사용액
A	n-BuOH/개미산/물	100:25:60	상층
B	n-BuOH/초산/물	4:1:5	상층
C	n-BuOH/2N HCl	1:1	상층
D	물/농염산	97:3	혼합액
E	개미산/농염산/물	5:2:3	혼합액
F	초산/물/농염산	15:82:3	혼합액
G	초산/물/농염산	30:10:3	혼합액
H	초산/물	2:98	혼합액
I	초산/물/농염산	5:1:5	혼합액
J	물/농염산	99:1	혼합액
K	EtOAc/개미산/물	80:15:15	혼합액
L	n-BuOH/농염산/물	7:2:5	상층
M	Acetone/10% 염산	1:1	혼합액
N	Benzene/초산/물	2:2:1	상층
O	Benzene/MeOH/물	90:16:8	혼합액
P	phenol/물	4:1	혼합액
Q	isoBuOH/초산/물	8:2:3	혼합액
R	n-BuOH/Pyridine/물	6:3:1	혼합액
S	Isoamylalcohol/농염산/물	21:5:4	상층
T	Isopropylalcohol/10% 염산	1:1	상층

라. 색소의 동정

1) 최대흡광도 측정

PC로 분리, 추출한 각 aglycone부위에 대하여 spectrophotometer (Hewlett packadr, HP 8453E UV-visible spectroscopy system)를 이용하여 최대흡광도를 측정하였다.

2) HPLC

Whatman No. 3MM여지를 이용한 PC로 분리, 추출한 각 aglycone부위에 대

해 HPLC를 표 3.9.의 조건으로 실시하였다.

표 3.9. 색소의 aglycone부위 분석을 위한 HPLC조건

Instrument	Waters Associate
Column	μBondaPak C_{18}(4mm x 30cm)
Solvent	개미산/물/MeOH(10:73:17)
Detector	546nm
Flow rate	1.0 ml/min
Injection Volume	10μl

5. 생물활성성분 : Schizandrin

가. 추출

1) 오미자, 흑오미자의 건조시료 150g씩을 Soxhlet추출기를 이용하여 ether로 8시간 추출한 후, 잔사를 다시 MeOH로 8시간 동안 환류추출하였다. 각 추출물은 감압농축하였다.

2) Ether추출물에 대해 수증기증류를 실시하여 정유성분을 제거하고, 수용액층을 ether로 추출하여 농축(Ether획분)하였다.

3) MeOH 추출물은 200ml의 증류수에 녹인 후, EtOAc 200ml로 3회 추출하여 농축하였다. 이 농축물을 MeOH 40ml에 녹인 후, celite 16g을 넣어 감압농축하면서 농축물을 celite에 흡착시켰다.

4) 따로 Celite 30g으로 column을 제작하고 3)의 Celite 흡착물을 column 상단에 charge한 다음 n-hexane 120ml, $CHCl_3$ 80ml, MeOH 120ml로 순차 용출분획하였다.

5) n-hexane용출구를 오미자, 흑오미자의 각 ether획분과 합하여 칼럼크로마토그라피를 실시하였다.

나. 실리카겔 크로마토그라피를 이용한 분리정제

1) 실리카겔 칼럼크로마토그라피

오미자, 흑오미자의 n-hexane용출구를 각각의 ether획분과 합한 후, Silica gel(70 250 mesh, merck사) 200g으로 hexane을 이용하여 slurry를 만든 후, column을 제작하고 표 3.10.의 용매조성으로 용출분획하였다.

표 3.10. 실리카겔 칼럼크로마토그라피에 사용된 용매조성

No.	용 매 계	사용량	No.	용 매 계	사용량
A	Hexane	500ml	G	Hexane-EtOAC(50:50)	500ml
B	Hexane-EtOAC(95:5)	"	H	100% EtOAC	"
C	Hexane-EtOAC(90:10)	"	I	EtOAC-MeOH(95:5)	"
D	Hexane-EtOAC(85:15)	"	J	EtOAC-MeOH(90:10)	"
E	Hexane-EtOAC(80:20)	"	K	EtOAc-MeOH(80:20)	"
F	Hexane-EtOAC(70:30)	"	L	100% MeOH	"

2) 재실리카겔 칼럼크로마토그라피

가) 실리카겔 칼럼크로마토그라피의 활성획분을 모아 농축하고 농축액에 대해 재실리카겔 칼럼크로마토그라피를 실시하였다.

나) Silica gel(70 250 mesh, merck사) 30g으로 n-hexane을 이용하여 slurry를 만든 후, column을 제작하고 표 4.11.의 용매조성으로 용출분획하였다.

표 3.11. 재실리카겔 칼럼크로마토그라피에 사용된 용매조성

No.	용 매 계	사용량	No.	용 매 계	사용량
가	n-hexane	200ml	아	Benzene-Acetone (50:50)	200ml
나	n-hexane-Benzene (1:1)	“	자	Benzene-Acetone (40:60)	“
다	Benzene	“	차	Benzene-Acetone (30:70)	“
라	Benzene-Acetone (90:10)	“	카	Benzene-Acetone (10:90)	“
마	Benzene-Acetone (80:20)	“	타	Acetone	“
바	Benzene-Acetone (70:30)	“	파	Acetone-MeOH (50:50)	“
사	Benzene-Acetone (60:40)	“	하	MeOH	“

다. Sephadex LH-20 칼럼크로마토그라피를 이용한 분리정제

1) 재실리카겔 칼럼크로마토그라피에서 얻어진 활성획분에 대해 Sephadex LH-20(25 100μ, Sigma사)을 이용한 칼럼크로마토그라피를 실시하였다.

2) MeOH-$CHCl_3$(1:2, v/v) 용매계로 하룻밤 팽윤시킨 후, 경사법에 의해 불순물을 제거하고 동용매계로 칼럼(부피 400ml)을 제작한 다음, 재실리카겔 칼럼크로마토그라피에서 얻어진 활성획분을 charge하고 동용매계로 용출하였으며, 80ml 씩 분취, 총 10개 획분으로 분획하였다.

라. 박층크로마토그라피를 이용한 검정

추출과정, 실리카겔 칼럼크로마토그라피, Sephadex LH-20 칼럼크로마토그라피에서 얻어진 각획분과 표품의 schizandrin(Wako사)을 함께 TLC(silica gel $60F_{254}$, merck사, 10x10cm)판에 spotting하여 TLC를 실시하여 생물활성물질의 존재여부를 확인하였으며, 용매계로는 benzene-acetone (9:1, v/v)과 n-hexane-acetone(7:3, v/v) 두용매계를 사용하여 검정하였다.

마. 박층크로마토그라피를 이용한 분리정제

1) Sephadex LH-20 칼럼크로마토그라피의 활성획분을 모아 농축한 후, TLC를 실시하여 분리정제하였다.

2) TLC plate(20x10cm)에 시료를 banding하고 n-hexane-acetone(7:3, v/v) 용매계를 사용하여 표품과 함께 전개 후, 표품과 같은 *Rf*치를 나타내는 부분을 절취하여 MeOH로 추출하였다.

3) 2)의 TLC 활성획분에 대해 2)와 동일한 방법으로 재TLC를 실시하였으며, 용매계는 benzene-acetone(9:1, v/v) 용매계를 사용하였다.

바. HPLC

재TLC의 활성획분을 membrane filter(Millipore, 0.45μm, Waters사)로 여과하여 표 3.12.의 조건으로 HPLC를 실시하였다.

표 3.12. **생물활성물질 분석을 위한** HPLC**조건**

Instrument	Waters Associate
Column	μBondaPak C_{18}(4mm x 30cm)
Solvent	acetonitrile/anf(50:50)
Detector	UV 254nm
Flow rate	1.0 ml/min
Injection Volume	10μl

제 3 절 연구수행내용 및 결과

1. 일 반 성 분

가. 유 리 당

1) 오미자·흑오미자 건조시료를 그림 3.1.과 같은 방법으로 전처리하고 HPLC를 실시한 결과는 표 3.13. 및 그림 3.4.와 같다.

표 3.13. 오미자와 흑오미자의 유리당 함량

(단위 : %)

시료	Ribose	Arabinose	Fructose	Glucose	Sucrose
오미자	0.04	-	1.83	1.05	1.13
흑오미자	0.08	0.01	3.71	2.51	0.02

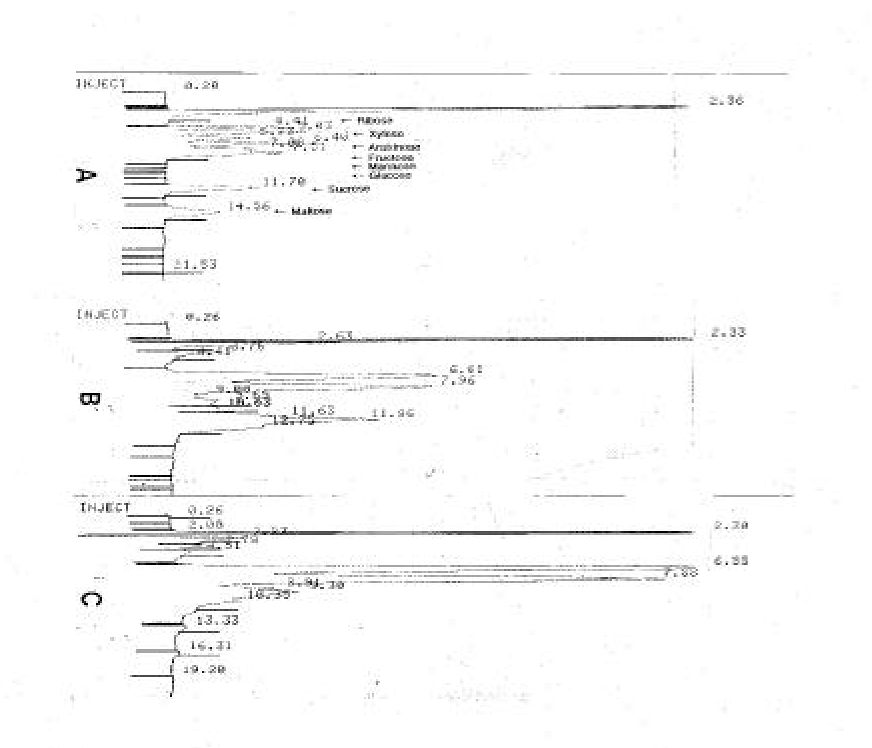


그림. 3.4. 오미자, 흑오미자의 HPLC에 의한 유리당 분석 크로마토그램.
A : 유리당 표품, B : 오미자, C : 흑오미자.

2) 표 3.13.에 나타난 바와 같이 오미자와 흑오미자에 함유된 유리당의 종류는 비슷하였으나, 오미자의 경우에는 sucrose의 함량이 흑오미자에 비해 상당히 많았고, 흑오미자의 경우에는 fructose와 glucose의 함량이 오미자보다 월등히 높았다. 흑오미자의 sucrose함량이 오미자에 비해 매우 낮다는 것은 설탕으로 인한 충치, 비만, 당뇨 등 때문에 sucrose함량이 높은 식품을 꺼려하는 현대인들의 기호에 부응하여 식품 및 가공품으로서의 흑오미자의 가치가 오미자보다 유리당 측면만 고려한다면 우수하다고 할 수 있다.

나. 유 기 산

1) HPLC 분석

가) 9종의 유기산표품(2% 용액)에 대해 HPLC를 실시한 결과는 표 3.14. 및 그림 3.5.와 같다.

표 3.14. 유기산표품의 HPLC분석 결과.

표 품	보유시간(분)	표 품	보유시간(분)
Glutamic acid	9.67	Tartaric acid	6.65
Malonic acid	7.34	Succinic acid	8.50
Lactic acid	8.76	Acetic acid	10.15
Levulinic acid	11.10	Malic acid	7.16
Pyroglutamic acid	12.05	Maleic acid	6.70

나) 오미자 및 흑오미자 시료를 전처리하여 HPLC를 실시한 결과는 표3.15. 및 그림 3.6.과 같다.

표 3.15. HPLC분석에 의한 오미자, 흑오미자의 유기산 함량

유기산명	오미자	흑오미자.
Citric acid	17.40 %	
Tartaric acid	4.68 %	
Maleic acid		4.94 %
Malic acid		14.20 %
Pyroglutamic acid	1.02 %	1.17 %

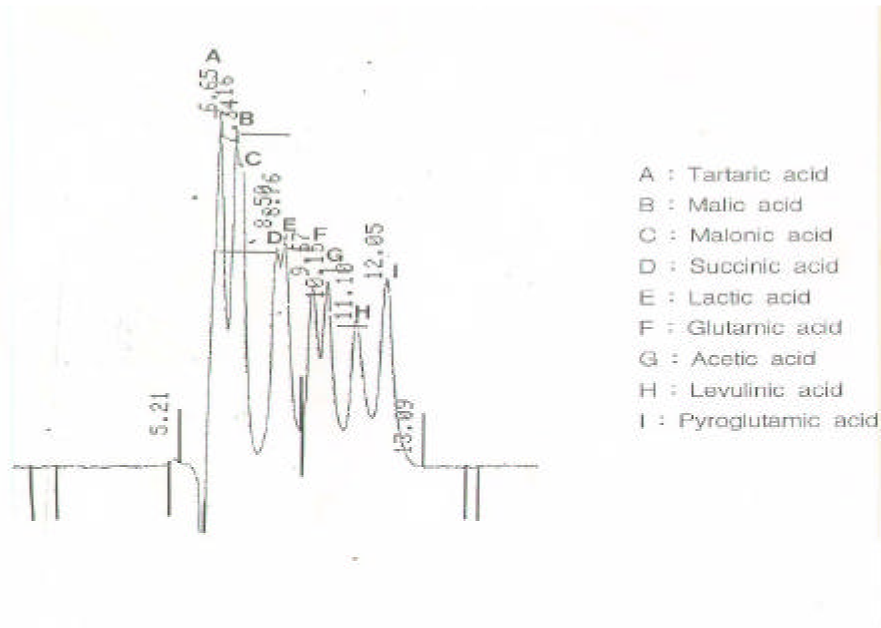


그림 3.5. **유기산 표품의** HPLC **크로마토그람**.

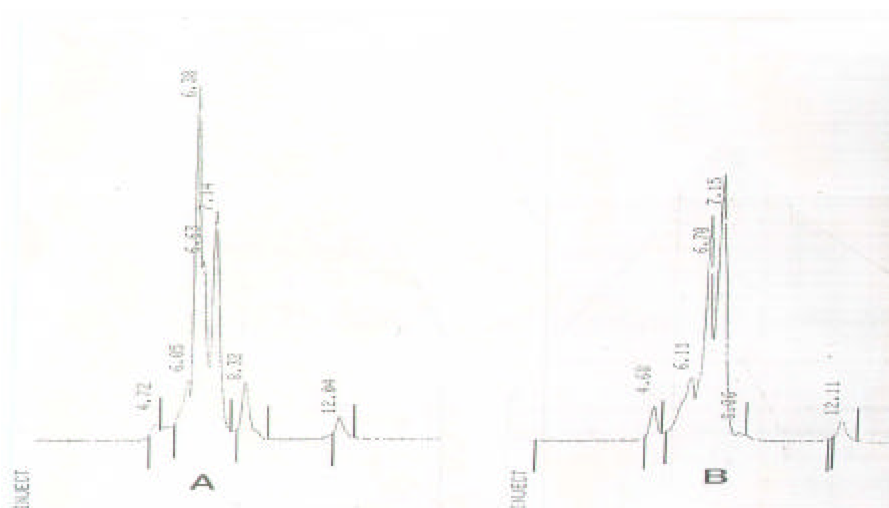


그림 3.6. **오미자**, **흑오미자의** HPLC**에 의한 유기산 분석 크로마토그람**.

A : **오미자**, B : **흑오미자**

다) 오미자에는 citric acid가 가장 많이 함유되어 있었으며, 그외에 tartaric acid와 pyroglutamic acid가 함유되어 있었다. 흑오미자에는 malic acid가 가장 많이 함유되어 있었고, 그외에 maleic acid와 pyroglutamic acid가 함유되어있어 표 3.15.에 나타난 바와 같이 두 식물체간의 유기산 조성에 상당한 차이가 있음을 알 수 있었다. 또, 그림 3.6.에 나타난 바와 같이 오미자의 경우에는 retention time(이하 Rt) 4.72, 6.05 그리고 8.32에서 peak가 인정되었는데 Rt 8.32는 succinic acid로 추측되며 그 함량은 3.41%였다. 흑오미자의 경우에도 Rt 4.68, 6.11 그리고 8.06에서 peak가 인정되었으며, 오미자의 Rt 4.72와 흑오미자의 Rt 4.68은 같은 물질로 판단되며, 오미자의 Rt 6.05와 흑오미자의 Rt 6.11 역시 같은 물질로 판단된다. 이상의 결과로 보아 오미자와 흑오미자 모두 적어도 6종이상의 유기산이 함유되어 있음을 추측할 수 있었다.

라) HPLC를 이용한 유기산 분석방법은 RI 검출기를 사용하므로 간섭물질의 영향이 크고 감도가 상당히 낮아 위에서 언급한 유기산 검출의 결과가 정확하다고 하기에는 어려움이 있고, 더욱이 유기산의 함량이 External법에 의한 것임에도 불구하고 그 함량이 너무 높아 더욱 정확한 결과를 얻고자 GC분석을 하여야만 하였다.

2) GC분석

가) 10종의 유기산표품(1,000ppm 용액)에 대해 유도체화를 실시하고 GC분석을 실시한 결과는 그림 3.7.과 같다.

나) Oxalic acid methylester는 Retention Time(이하 Rt) 8.43, malonic acid methylester는 Rt 11.84, fumaric acid methylester는 Rt 12.83, succinic acid methylester는 Rt 14.75, maleic acid methylester는 Rt 18.60, glutaric acid methylester는 Rt 28.88, malic acid methylester는 Rt 35.51, tartaric acid methylester는 39.00, citric acid methylester는 Rt 41.65, pyroglutamic acid methylester는 Rt 47.54에서 각각 peak가 나타나, malonic acid methylester와 fumaric acid methylester의 경우를 제외하고는 대단히 분리상태가 양호하였다.

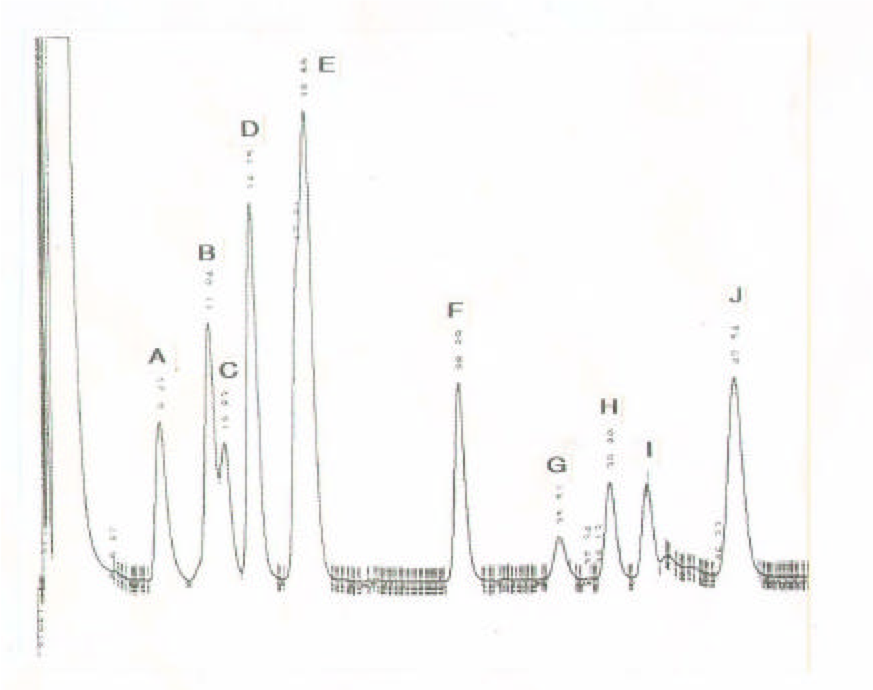


그림 3.7. **유기산표품의** GC**분석 크로마토그람**.

A : oxalic acid methylester, B : malonic acid methylester, C : fumaric acid methylester, D : succinic acid methylester, E : maleic acid methylester, F : glutaric acid methylester, G : malic acid methylester, H : tartaric acid methylester, I : citric acid methylester, J : pyroglutamic acid methylester.

다) **오미자 및 흑오미자 시료를 전처리하여** GC**를 실시한 결과는 표** 3.16. **및 그림** 3.8.**과 같다**.

표 3.16. GC분석에 의한 오미자, 흑오미자의 유기산 함량

유기산명	오미자	흑오미자.
Malonic acid	0.3 ppm	2.8 ppm
Sunnic acid	247.2 ppm	21.6 ppm
Maleic acid	-	2.3 ppm
Malic acid	47,684.4 ppm	38,691.1 ppm
Pyroglutamic acid	1,241 ppm	101 ppm
Glutaric acid	74.3 ppm	-
Citric acid	11,939.1 ppm	3,330.5 ppm

라) 표 3.16.에 나타난 바와 같이 오미자, 흑오미자의 유기산 조성은 HPLC분석결과와는 다르게 그 조성이 유사하게 나타났으며, malonic acid와 maleic acid의 경우를 제외하고는 오미자에서 그 함량이 높게 나타났다. 이는 오미자와 흑오미자의 열매의 상태를 감안한다면 어느정도 당연한 결과라고 생각한다. 오미자의 경우에는 과육이 많고 씨가 적음에 반해, 흑오미자의 경우는 과육은 적고 씨가 크기 때문이다. 따라서 당연히 씨와 과육을 분리하여 실험을 하여야 할 것으로 생각이 되나, 현재 이들 열매를 사용함에 있어 씨와 과육을 모두 함께 사용하고 있으므로 흑오미자내의 유기산 함량이 오미자에 비해 작다고 할 수밖에 없을 것이다.

다. 아미노산

1). 시료를 전처리하고 아미노산 자동분석기로 아미노산 표품을 분석한 결과는 그림 3.9.와 같고 오미자, 흑오미자시료의 유리 및 구성아미노산을 분석한 결과는 표 3.17.과 같다.

2) 흑오미자는 lysine의 경우만을 제외하고는 전부 오미자의 함량보다 낮았다. Lysine은 필수아미노산 중의 하나이며 식물체에 그 함량이 일반적으로 매우 낮아 식물성식품의 제한아미노산으로 알려져 있는 아미노산으로 두류를 제외하고는 그 함량이 300mg%를 넘어가는 식물성식품이 많지 않다. 따라서 흑오미

자에 동물성 식품에 다량 함유되어 있는 lysine의 함량이 350mg% 정도로 높다는것은 흑오미자가 식품으로서 상당히 가치가 높다는 것을 의미한다고 하겠다.

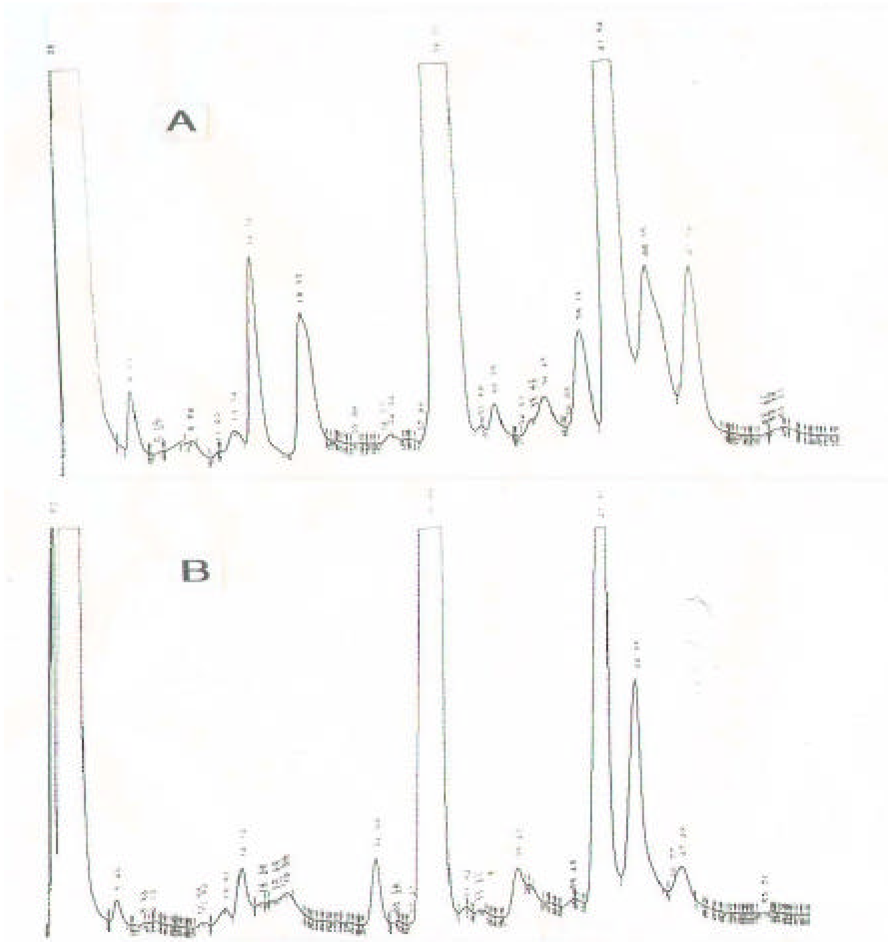


그림 3.8. 오미자, 흑오미자의 GC분석에 의한 유기산분석 크로마토그람.
A : 오미자, B : 흑오미자

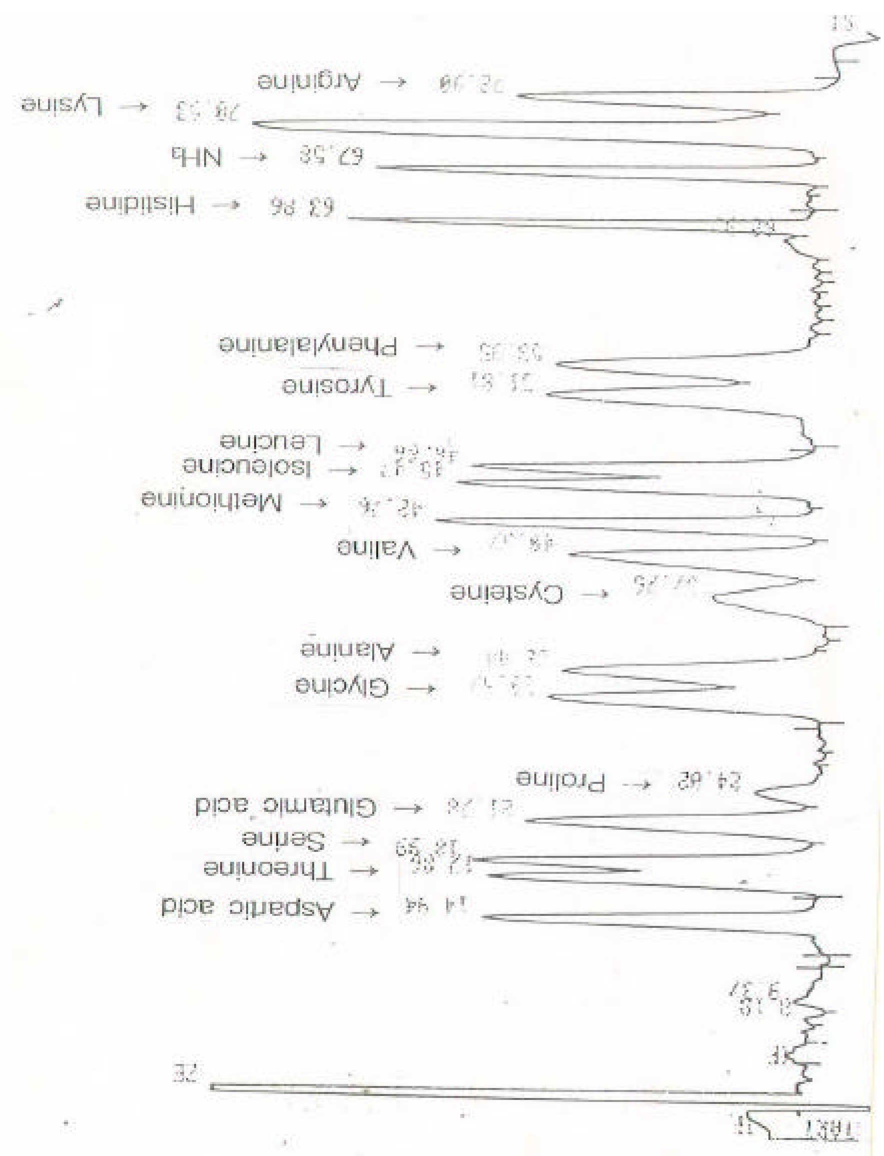


그림 3.9. **아미노산 자동분석기에 의한 아미노산표품의 크로마토그람**

표 3.17. 오미자, 흑오미자의 유리 및 구성아미노산의 함량

아미노산	오미자(mg%)		흑오미자(mg%)	
	유리아미노산	구성아미노산	유리아미노산	구성아미노산
Aspartic acid	52.23	422.76	11.80	366.97
Threonine	154.73	511.36	31.41	427.55
Serine	0.00	600.01	0.00	491.94
Glutamic acid	97.37	721.95	11.40	677.03
Proline	23.42	427.13	5.42	239.04
Glycine	14.70	502.92	4.54	379.14
Alanine	50.19	348.16	7.14	273.84
Cystine	0.00	211.75	12.79	15.93
Valine	34.48	638.41	16.10	426.77
Methionine	21.58	148.35	0.00	35.93
Isoleucine	24.26	469.02	0.00	358.68
Leucine	31.10	653.56	0.00	447.41
Tyrosine	12.07	316.80	13.69	139.95
Phenylalanine	12.75	390.08	0.00	214.07
Histidine	120.30	518.55	40.40	371.96
Lysine	22.37	288.74	47.72	300.17
Arginine	50.37	408.26	0.00	430.43
Total	721.94	7,577.79	202.42	5,596.84

라. 페놀화합물

1) 총페놀함량분석

Folin-Denis법에 따라 총페놀함량을 측정하고 그 함량을 tannic acid로 환산한 결과, 오미자의 경우는 1.275%, 흑오미자의 경우는 1.560%로 흑오미자의 함량이 더 높았다.

2) 페놀화합물의 TLC

가) 그림 3.2.의 방법에 의해 분획한 오미자 및 흑오미자의 유리페놀산, 페놀산 Ester 및 불용성결합형 페놀산획분에 대해 TLC를 실시한 결과는 표 3.18. 및 그림 3.10.과 같다.

표 3.18. 오미자, 흑오미자의 페놀화합물획분에 대한 TLC 결과.

시 료		CH	EP	CAT	TAN	PHC	CAF	GEFE	CI
오미자	유리페놀산	O	X	X	X	O	O	O	X
	페놀산 Ester	O	X	X	X	X	X	X	X
	불용성결합형페놀산	O	X	X	X	O	O	O	X
흑오미자	유리페놀산	O	X	X	X	O	X	O	X
	페놀산 Ester	O	X	X	X	X	X	X	X
	불용성결합형페놀산	O	X	X	X	O	O	O	X

* CH:chlorogenic acid, EP:epicatechin, CAT:catechin, TAN:tannic acid, PHC:phloroglucinol & coumalic acid, CAF:caffeic acid, GEFE:gentisic acid & Ferulic acid, CI:cinnamic acid, O:함유가능성이 높음, X:함유가능성이 낮음.

나) 표 3.18.과 그림 3.10.에 나타난 바와 같이 TLC 결과로 보아 오미자와 흑오미자에 함유되어 있는 페놀화합물의 조성은 상당히 유사하였다. 이에 대한 더욱 확실한 정보를 얻고자 GC 및 HPLC를 실시하였다.

3) 페놀화합물의 GC 및 HPLC분석

가) 페놀화합물 표품에 대해 HPLC를 실시한 결과는 그림 3.11. 및 표 3.19.에 그리고 GC분석을 실시한 결과는 그림 3.12. 및 표 3.20.과 같다. 그림들에 나타난 바와 같이 모두 양호한 분리를 나타내었다. 그러나, GC로 분석한 경우, 검출할 수 있는 화합물의 종류가 HPLC로 분석한 경우보다 종류가 적었다. 반면, HPLC로 분석할 경우, 용매는 농도구배법(gradient method)을 사용하여 공급하는데, 농도구배법을 사용할 경우 동일시료를 반복분석하는 경우에도 할 때마다 약간의 Rt차이가 나게되어 재현성이 GC보다 훨씬 떨어지는 단점이 있다.

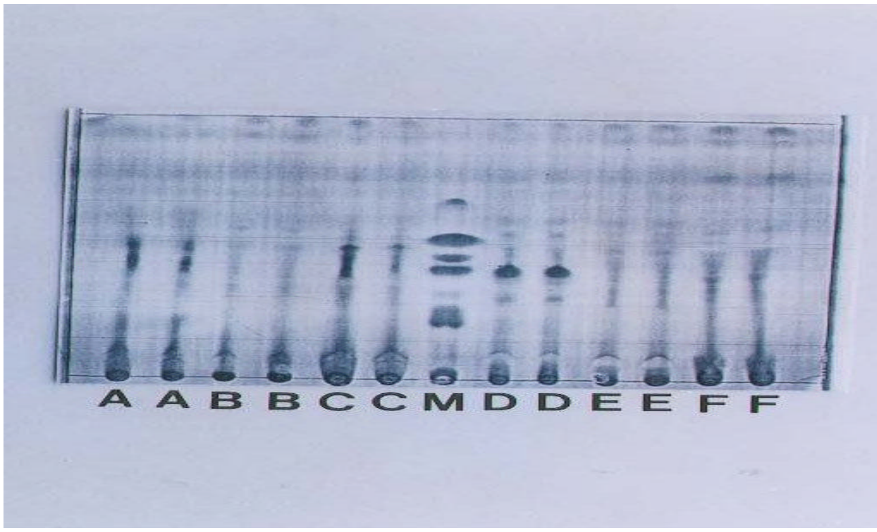


그림 3.10. **오미자, 흑오미자의 페놀화합물획분에 대한** TLC **크로마토그램**

A : **오미자의 유리페놀산획분**, B : **오미자의 페놀산에스터획분**, C : **오미자의 불용성결합형페놀산획분**, M : **페놀산표품 혼합물**, D : **흑오미자의 유리페놀산획분**, E : **흑오미자의 페놀산에스터획분**, F : **흑오미자의 불용성결합형페놀산획분**.

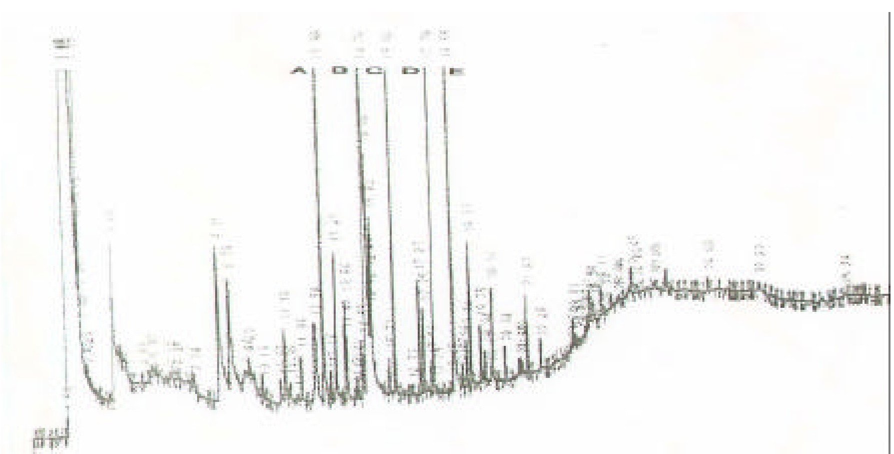


그림 4.11. **페놀화합물의** HPLC**분석 크로마토그램**.

A : phloroglucinol, B : coumalicacid and gentisic acid, C : chlorogenic acid, D : catechin, E : epicatechin, F : ferulic acid, G : tannic acid, H : cinnamic acid.

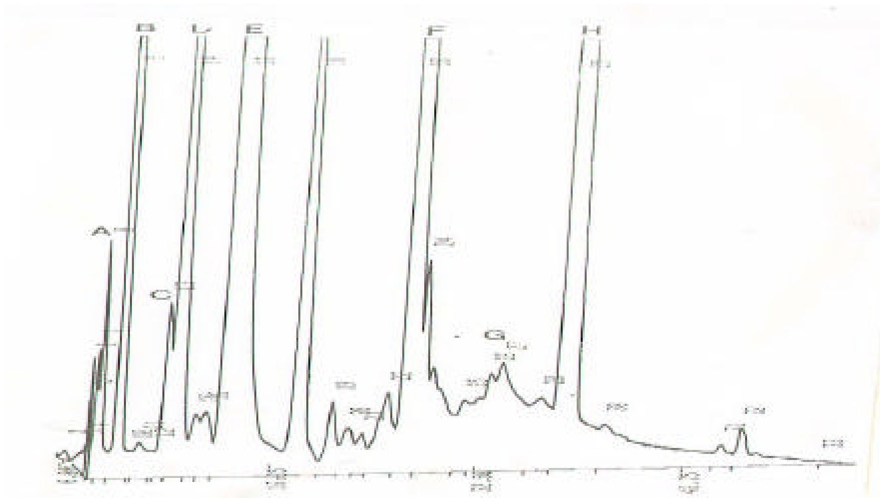


그림 3.12. 페놀화합물의 GC분석(BF_3/MeOH 유도체법) 크로마토그람

A : cinnamic acid, B : gentisic acid, C : coumalic acid, D : chlorogenic acid, E : ferulic acid.

표 3.19. 페놀화합물 표품의 HPLC분석 결과.

화합물명	Rt	화합물명	Rt
Phloroglucinol	3.215	Catechin	8.958
Coumalic acid	4.588	Epicatechin	13.175
Gentisic acid	4.588	Ferulic acid	27.001
Caffeic acid	6.408	Tannic acid	34.528
Chlorogenic acid	8.161	Cinnamic acid	39.555

표 3.20. 페놀화합물 표품의 GC분석 결과.

	Cinnanmic acid	Caffeic acid	Gentisic acid	Coumalic acid	Chlorogenic acid	Ferulic acid
Rt	12.90	14.42	14.76	15.98	17.70	18.55

* Caffeic acid는 N,O-bis(trimethyl silyl)acetamide로 유도체화하였을 때의 결과이며, 나머지는 14% BF_3-MeOH로 유도체화하였을 때의 결과이다.

나) 따라서 페놀화합물의 보다 정확한 정량분석을 위하여 GC와 HPLC방법을 실시하고 서로 보완하여 정성정량을 실시한 결과는 표 3.21.과 같다.

다) 표 3.21.에 나타난 바와 같이 cinnamic acid는 흑오미자보다 오미자에 더 다량 함유되어 있었으며, caffeic acid의 경우에는 오미자의 유리페놀산획분에서 그 존재가 다량 인정되고 그외의 획분에서는 인정되지 않았다. Gentisic acid는 오미자보다 흑오미자에 더 다량 함유되어 있었으며, coumalic acid의 경우는 흑오미자의 유리페놀산획분에서 그 존재가 인정되는 것이 오미자와는 다른점이었다. 그외 chlorogenic acid와 ferulic acid는 오미자에 흑오미자보다 더 다량 함유되어 있었다.

라) 표 3.21.의 결과와 표 3.18.의 결과를 검토하여 보면, epicatechin, catechin, phloroglucinol 그리고 tannic acid는 확실하게 그 존재가 인정되지 않으며, chlorogenic acid, gentisic acid, coumalic acid, ferulic acid의 존재는 확실시 되었다. 다만 cinnamic acid의 경우 TLC에서는 검출되지 않았으나 기기분석에서는 검출이 되었다.

표 3.21. 오미자와 흑오미자에 함유된 각 페놀화합물의 함량.

(단위 : ppm)

시 료		CI	CAF	GE	CO	CH	FE
오미자	유리페놀산	22.71	46.73	28.14	trace	234.08	25.20
	페놀산 Ester	trace	-	17.20	trace	305.15	15.172
	불용성결합형페놀산	33.00	trace	24.37	91.58	637.67	147.34
흑오미자	유리페놀산	1.84	-	96.76	58.44	167.71	9.36
	페놀산 Ester	trace	-	22.36	trace	357.97	4.06
	불용성결합형페놀산	8.44	trace	18.53	46.70	302.04	10.77

* CI : cinnamic acid, CAF : caffeic acid, GE : gentisic acid, CO : coumalic acid, CH : chlorogenic acid, FE : ferulic acid

마. 지 질

1) 지질함량

가) Bligh와 Dyer의 방법에 따라 지질을 추출하고 silicic acid 칼럼크로마토그라피에 의해 중성지질, 당지질 그리고 인지질로 분획하여 각 획분에 대하여 무게를 측정한 결과를 표 3.22.에 나타내었다.

표 3.22. 오미자와 흑오미자의 각 지질별 함량.

(unit : mg/g. dry weight)

	중성지질	당지질	인지질	합계
오 미 자	110.5	32.0	3.0	145.5
흑 오 미 자	120.7	35.8	4.0	160.5

나) 전체 지질획분 모두에서 흑오미자의 함량이 오미자보다 약 10% 정도 높게 나타났다. 이는 앞에서도 언급한 것처럼 흑오미자의 과육에 비해 씨가 차지하는 비율이 높기 때문인 것으로 생각된다. 이들 지질을 구성하고 있는 지방산의 종류를 알아보기 위하여 GC분석을 실시하였다.

2) 지방산의 GC

가) 유리지방산 표품 17종(500 ppm 농도)을 유도체화시키고 GC분석을 실시한 결과는 표 3.23. 및 그림 3.13.과 같다.

표 3.23. 지방산 표품의 GC분석 결과.

지방산명	Rt(min)	지방산명	Rt(min)
Caproic acid(C6:0)	2.08	Stearic acid(C18:0)	24.15
Caprylic acid(C8:0)	5.12	Linoleic acid(C18:2)	26.27
Capric acid(C10:0)	9.20	Linolenic acid(C18:3)	28.66
Lauric acid(C12:0)	13.31	Arachidic acid(C20:0)	29.33
Myristic acid(C14:0)	17.15	Eicosenoic acid(C20:1)	30.31
Myristoleic acid(C14:1)	18.08	Arachidonic acid(C20:4)	36.76
Palmitic acid(C16:0)	20.70	Behenic acid(C22:0)	38.80
Palmitoleic acid(C16:1)	21.36	Erucic acid(C22:1)	40.34
Oleic acid(C18:1)	24.83		

나) 오미자, 흑오미자의 중성지질, 당지질, 인지질을 구성하고 있는 지방산의 종류를 확인하기 위하여 시료를 검화시키고 유도체화하여 GC분석을 실시한 결과는 표 3.24. 및 그림 3.14.와 같다.

표 3.24. 오미자, 흑오미자 각지질획분의 구성지방산 종류와 함량

(단위 : ppm)

지방산명	A	B	C	D	E	F
Caprylic acid	50	14	3	169	25	2
Capric acid	1,795	14	9	2,178	29	5
Lauric acid	112	4	0.5	358	3	9
Myristic acid	1	0.5	0.5	8	10	16
Myristoleic acid	7	trace	14	3	6	trace
Palmitic acid	1,942	1,990	42	9,888	984	trace
Palmitoleic acid	trace	5	trace	trace	7	trace
Oleic acid	731	34	9	2,687	139	5
Linoleic acid	12,732	8,479	554	29,364	13,368	2,852
Linolenic acid	49	106	57	322	248	16
Eicosenoic acid	60	6	trace	131	3	2
Total	17,479	1,0652	689	45,108	14,822	2,907

A:오미자 중성지질획분, B:오미자 당지질획분, C:오미자 인지질획분
D:흑오미자 중성지질획분, E:흑오미자 당지질획분, F:흑오미자 인지질획분

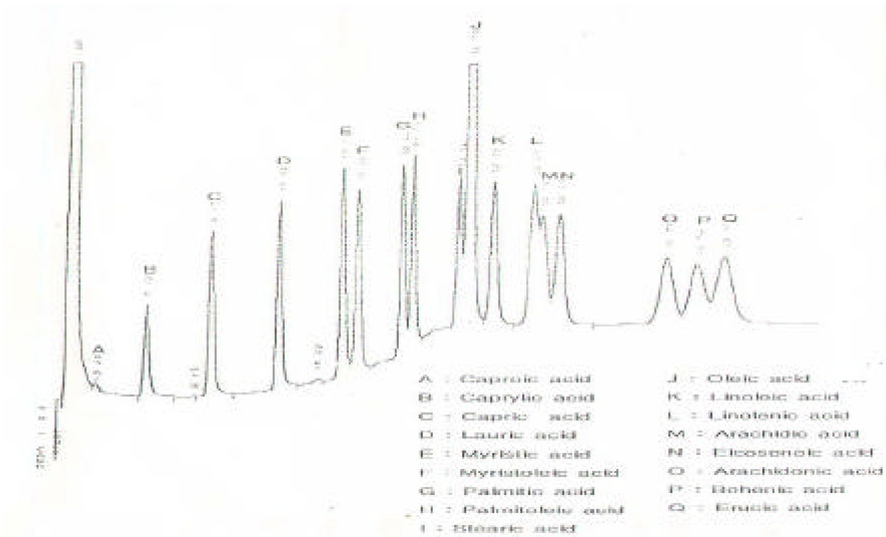


그림 3.13. **지방산표품의** GC**분석 크로마토그람**.

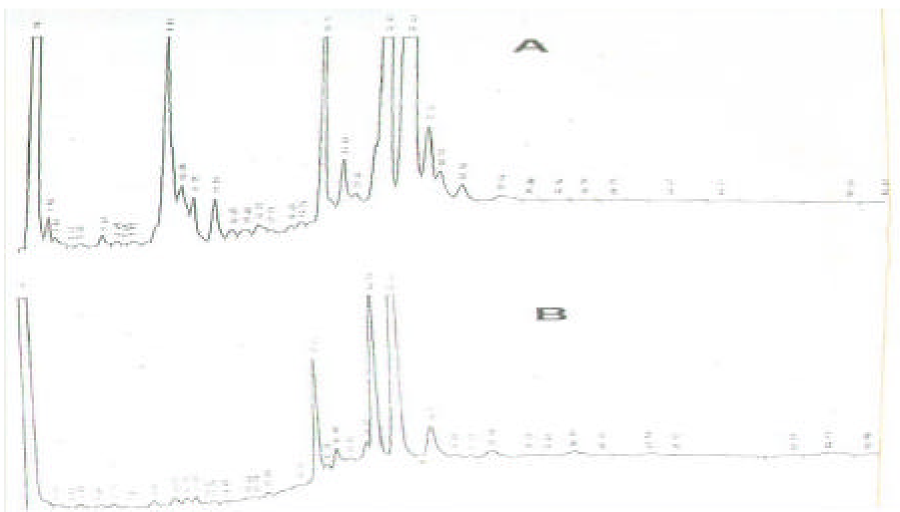


그림 3.14. **오미자, 흑오미자의 각지질획분별 구성지방산의** GC**크로마토그람**

A : **오미자 중성지질**, B : **오미자 당지질**

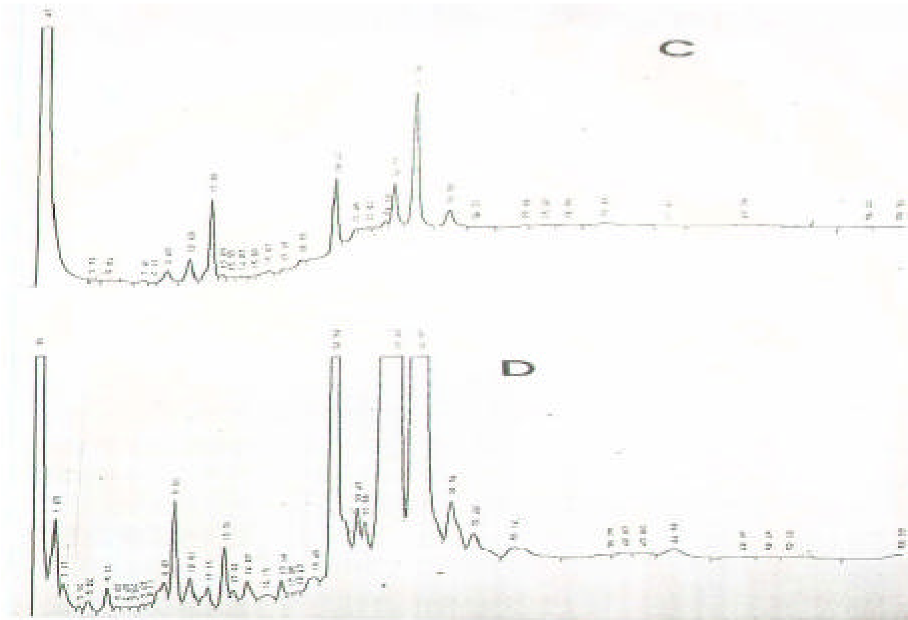


그림 3.14. 오미자, 흑오미자의 각지질획분별 구성지방산의 GC크로마토그람
C : 오미자 인지질, D : 흑오미자 중성지질

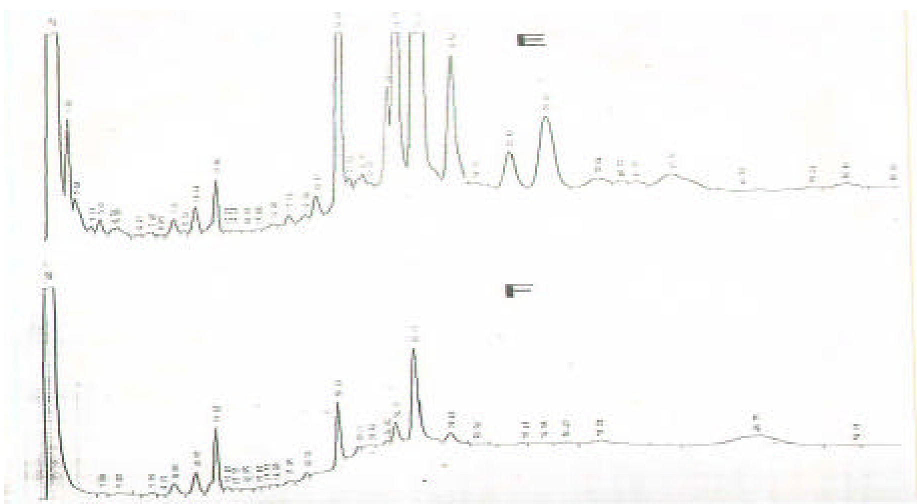


그림 3.14. 오미자, 흑오미자의 각지질획분별 구성지방산의 GC크로마토그람
E : 흑오미자 당지질, F : 흑오미자 인지질.

다) GC분석 결과에 나타난 바와 같이 흑오미자에 지질함량이 더 높았으며, 불포화지방산 중에서 동맥경화증의 예방, 피부염 예방, 성장인자로 알려져 있는 oleic acid 그리고 필수지방산인 linoleic acid, linolenic acid의 경우에는 흑오미자가 오미자보다 2배 이상의 양이 함유되어 있는 것은 특이할 만한 사항으로 흑오미자의 지방산 조성이 상당히 우수함을 시사하여 주었다.

2. 정유성분

가. 동일조건으로 천일건조한 오미자, 흑오미자를 수증기증류하고, 얻어진 정유성분을 ethylether로 용매분획을 이용하여 추출, 농축하고 GC/MS분석을 실시한 결과는 그림 3.15.와 같으며, GC상의 peak를 MS로 분석한 결과는 오미자는 표 3.25. 및 그림 3.16. 그리고 흑오미자는 표 3.26. 및 그림 3.17.과 같다.

나. 정유성분은 주성분이 terpene류로서 특히 monoterpene과 sesquiterpene이 90% 이상을 차지하고 있으며, 예로부터 약리작용으로 인하여 민간요법 및 제약 그리고 방향을 가진 성분이 많아 향료산업에서 널리 사용되는 성분이다. 그러한 정유성분을 오미자, 흑오미자를 대상으로 분석한 결과, 그림 3.15.에 나타난 바와 같이 오미자에서 흑오미자보다 더 많은 성분이 검출되었고, 특히, 오미자는 흑오미자보다 비점이 낮은(R.T. 20분 이내 검출) 정유성분이 상당수 검출되었다.

다. 표 3.25.와 3.26.에 나타난 바와 같이 오미자에는 α-ylangene, α,β-elemene, β-himachalene, γ-selinene 그리고 widdrene 등의 성분이 주로 발견되었으며, 흑오미자에서는 caryophyllene, calarene, cubebene, acoradiene 그리고 β-himachalene 등의 성분이 발견되어 오미자와 흑오미자의 정유성분 조성에는 차이가 있음을 추측할 수 있었다.

라. 상기의 결과로만 본다면, 정유성분의 종류는 오미자에 훨씬 많은 양이 함유되어 있는 것이 확실시 되나, 수증기증류법 자체가 저비점화합물보다는 고비점화합물의 분석방법이므로 정확하게는 오미자의 정유성분 중 고비점화합물이 흑오미자의 것보다 훨씬 다양하다고 하는 것이 옳을 것이다.

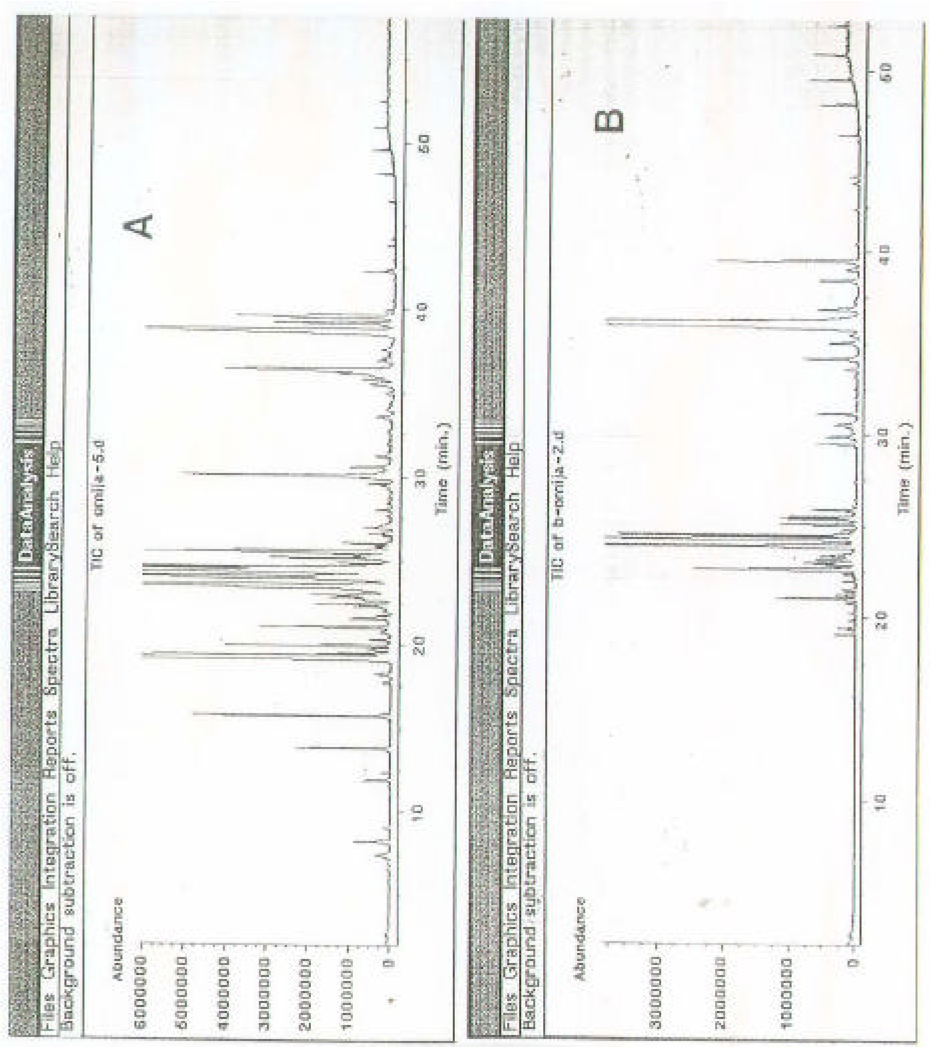


그림 3.15. **오미자, 흑오미자의 정유성분 분석** GC **크로마토그람**

A : **오미자**, B : **흑오미자**.

표 3.25. **오미자 정유성분의** GC/MS **분석결과**.

Rt	Compounds	%Sg
7.437	Benzene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-	0.42
8.211	γ-Terpinene	0.69
11.857	3-cyclohexen-1-ol, 4-methyl-1-(1-methylethyl)-	0.34
12.315	1-α-Tepineol	0.11
13.758	Methyl Thymylether	1.07
17.749	α-Terpinolene	0.12
18.263	5H-Inden-5-one ,octahydro-,trans-	0.30
19.296	α-Ylangene	13.19
19.473	α-Guaiene	0.78
19.707	1H-Pyrrole, 1-butyl-	0.40
19.944	(-)-β-Elemene	1.81
20.305	1,2-Naphthalenediol, 2-ethyl-1,2,3,4-tetrahydro-1-methyl-,ci	0.26
20.738	Tricyclo[2,2,1,02,6]heptane,1,7-dimethyl-7-(4-methyl-3-pente	0.11
21.052	α-Elemene	1.88
21.554	α-Longipinene	0.58
21.740	α-Terpinene	0.13
22.045	Longipinene	0.14
22.274	(+)-Aromadendrene	0.55
22.415	β-Farnesene	0.93
22.713	δ-Cadinene	0.54
22.828	Acoradiene	0.86
22.959	(-)-β-Acoradiene	0.19
23.478	γ-Selinene	7.23
23.768	β-Selinene	0.34
24.176	Naphthalene,1,2,3,4,4a,5,5,8a-octahydro-7-methyl-4-methylene	0.82

표 3.25. 계속

Rt	Compounds	%Sg
24.469	β-Himachalene	10.05
24.590	Widdrene	5.53
25.173	δ-Cadinene	1.52
25.286	6,10,11,11-Tetramethyl-Tricyclo[6,3,0,1E2,3] Undec-1(7)ene	0.57
25.761	α-Muurolene	0.16
25.835	α-Humulene	0.19
25.978	Quinoline, 2,6-dimethyl-	0.52
26.444	2-(5-Methyl-3-Isoxazoyl)-4-Acetyl-5 -Methylpyrrole	0.12
26.638	Nerolidol	0.28
27.943	2-(1',1'-Dideutero-Allyl)Aniline	0.23
29.910	Bicyclo[4,4,0]Dec-1-En,2-Isopropyl-5-Methyl-9-Methylene-	0.41
30.110	Cycloheptene,5-ethylidene-1-methyl-	4.22
30.587	T-Muurolol	0.75
33.591	(+)-Oxo-α-Ylangene	0.40
35.010	Azocine, 2-methoxy-8-methyl-	0.15
35.552	2,3,4-Trimethylbenzaldehyde	0.58
35.844	2-Vinyladamantane	0.63
36.112	(E)-And(z)-7-Methyl-5,7-Octadien-1-Ol	1.27
36.382	Cycloisolongifolene	4.54
36.877	2,2-Diisobutenyl-3-cyclohepten-1-one	0.32
37.158	2-Naphthalenecarboxylicacid,8-ethenyl-3,4,4a,5,6,7,8,8a-oct	0.22
37.584	4(1H)-Quinolinone, 3-methoxy-1-methyl-	0.29
38.709	Benzenemethanol,ar,ar,α-trimethyl-	8.15
39.149	δ-4-Carene	2.05
39.562	Phenol, ρ-(2-methylallyl)-	2.67
42.262	4-(2'-ethyl-5'-phenyl-pyrro-3'-yl)pyridine	0.25
46.429	Tetracosamethylcyclododecasiloxane	0.05
50.854	1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11,13,13,15,15-Hexadecamethyl-octasilo	0.10

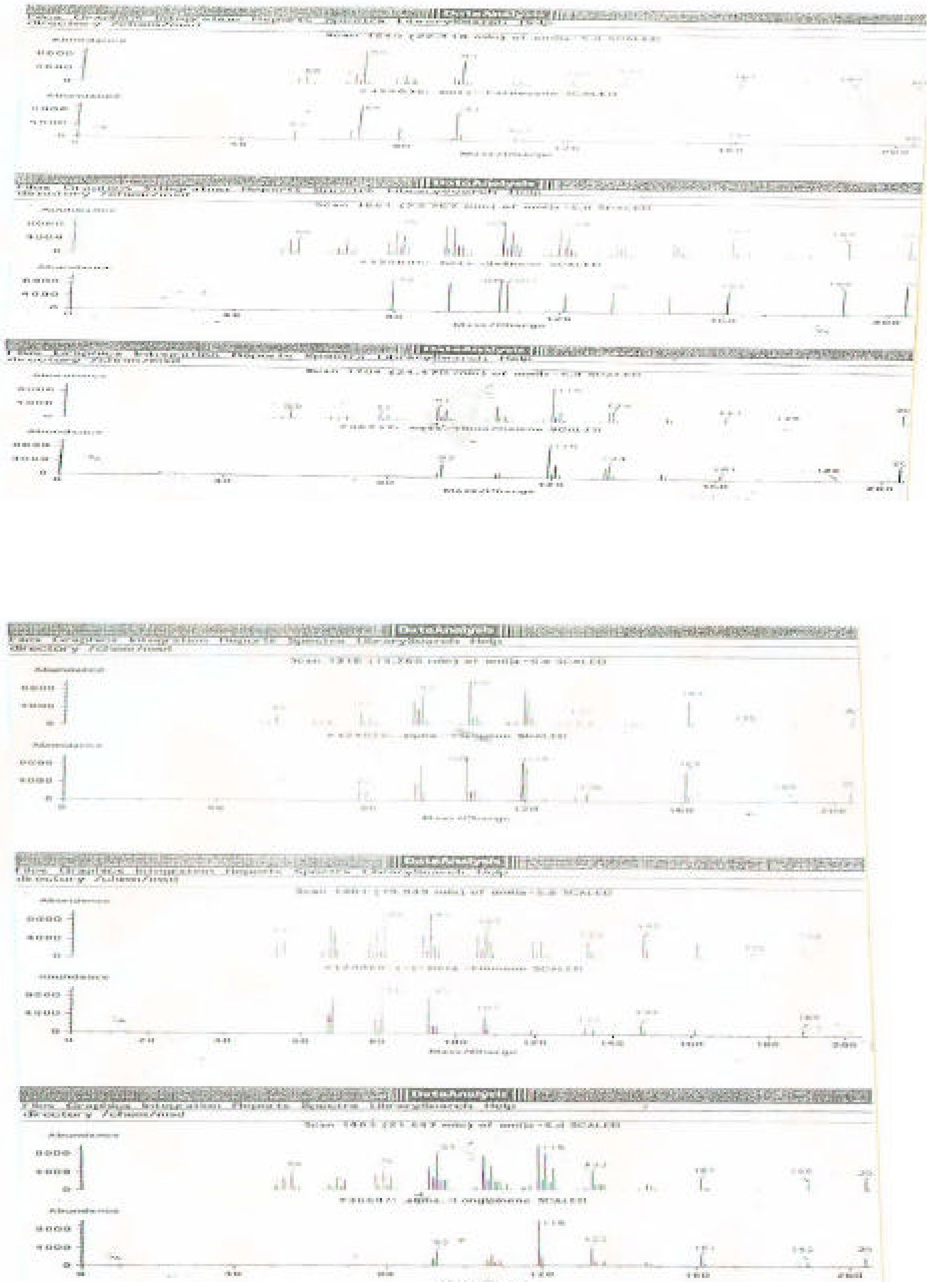


그림 316. 오미자 정유성분의 MS스펙트럼

표 3.26. **흑오미자 정유성분의** G/MS **분석결과**.

Rt	Compounds	%Sg
19.442	Selina-3,7(11)-diene	0.36
21.073	trans-Caryophyllene	1.65
21.255	1H-3a,7-Mrthanoazulene, 2,3,4,7,8,8a-hexahydro-3,6,8,8-tetram	0.51
21.542	α-Longipinene	0.31
22.028	Tricyclo[3,3,0,0E4,6]octan-3-one,6-methyl-	0.30
22.661	Calarene	3.58
22.767	β-Bisabolene	0.49
23.031	α-Cubebene	1.49
23.247	β-Chamigrene	0.96
23.385	Longipinene	1.56
23.955	(-)-β-Acoradiene	11.52
24.337	β-Himachalene	10.19
24.519	1,2,2-trimethyl-1-(ρ-tolyl)-cyclopentane	5.74
25.129	α-Copaene	1.74
25.390	α-Chamigrene	1.67
25.911	N-(ρ-tolyl)-acrylic acid amide	1.14
29.516	δ-Selinene	0.96
29.893	(+)-Isobicyclogermacrene	1.05
31.143	Caryophylla-2(12),6-dien-5-one	1.09
33.588	Cyclopentene,1,3-dimethyl-2-(1-methylethyl)-	0.52
35.024	Aristolone	1.08
36.152	2-Naphthalenecarboxylic acid, 8-ethenyl-3,4,4a,5,6,7,8,8a-oct	32.88
36.267	Benzene,1,4-dimethyl-2,5-bis(1-methylethyl)-	3.68
36.854	Tricyclo[3,2,1,0E2,8]Octan-7-one, 6-methyl-6-(2-methyl-2-prop	1.46
38.457	1,2,3,3a,5,6,6a,7-Octahydro-1,3a,6-trimethyl-4H-cyclopent[d]i	1.40
39.496	2H-1-Benzopyran, 3,4-dihydro-2-methyl-	4.35
46.430	Benzeneacetic acid, α,3,4-tris[(trimethylsilyl0oxy]-t	0.20
50.857	Tetracosamethylcyclododecasiloxane	0.40
52.420	1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11,13,13,15,15-hexadecamethyl-octasilo	0.28

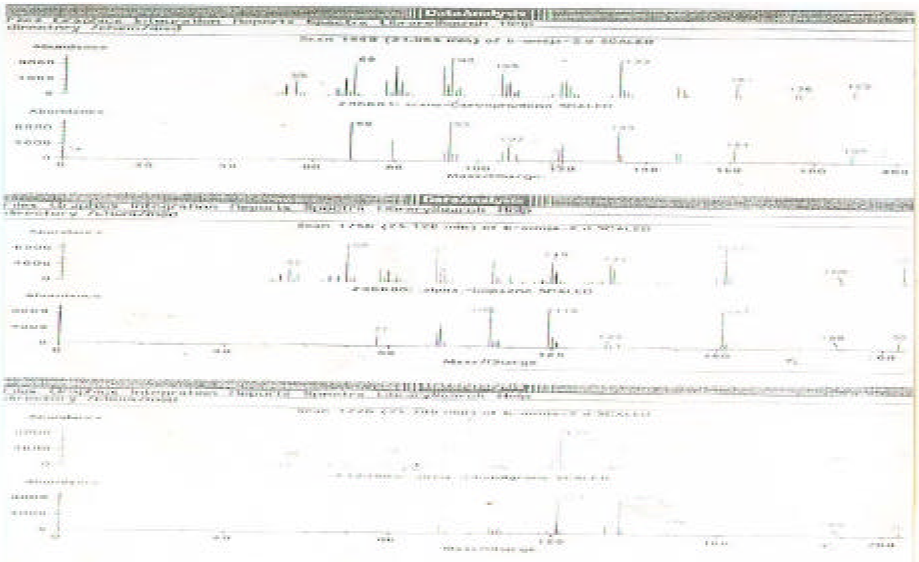


그림 3.17. 흑오미자 정유성분의 MS스펙트럼.

3. 안토시안색소

가. Anthocyan색소확인실험

1) 정색반응

가) 오미자, 흑오미자의 색소가 anthocyan인지 아닌지의 여부를 알아보기 위하여 정색반응을 실시하였으며 그 결과는 표 3.27.과 같다.

표 3.27. 오미자, 흑오미자 추출물에 시약을 첨가한 후의 정색반응.

시 료	원 색	0.1N NaOH	2N HCl	$AlCl_3$
오미자	선홍색	청 색	원색과 비슷	변화없음
흑오미자	자주색	군청색	원색과 비슷	보라색
시 료	Ammonium Molybdate	Vanillin 황산	Lead acetate	$FeCl_3$-$K_3Fe(CN)_6$
오미자	갈색	고동색	원액보다 연함	연한 갈색
흑오미자	보라	벽돌색	보라	선홍색

나) 오미자, 흑오미자의 색소추출액에 0.1N NaOH를 첨가한 결과, 색소추출액은 모두 청색으로 변하였고, 2N 염산을 첨가하자 원래의 색으로 복원되었다. 이는 다른 색소에서는 찾아볼 수 없는 안토시안색소만의 특징으로 오미자, 흑오미자에 함유되어 있는 색소는 안토시안계 색소임이 확인되었다. 또한, 이들 색소추출물은 헥산, 에테르, 클로로포름 등의 용매에는 전혀 녹지 않았으나, 물이나 알코올에는 상당히 잘 용해되어 안토시안계색소임을 더욱 확신하게 되었다.

다) Vanillin 황산, 즉 황산에 의한 안토시안색소의 정색반응은 황색이 강한 등색으로 나타난다. 표 4-27.에 나타난 바와 같이 오미자, 흑오미자 색소추출물의 정색반응은 안토시안 색소임을 확인시켜 주고 있다.

라) 안토시안의 배당체인 anthocyanin의 경우 그림 3.18.에 나타나 바와 같이 B고리에 두 개이상의 OH기를 가지고 있는 cyanidin, delphinidin, petunidin은 aluminium chloride시약, ammonium molybdate시약, lead acetate시약을 첨가하였을 때, 청색계통으로 변색하나, OH기 하나를 가지고 있는 pelagonidin, peonidin, malvidin 등은 색의 변화가 거의 없어 이러한 시약들에 의한 정색반응은 anthocyanin의 분류에 이용된다. 따라서 표 3.27.에 나타난 바와 같이 오미자의 경우에는 pelagonidin, peonidin, malvidin계 색소 중 어느 하나로, 그리고 흑오미자는 cyanidin, delphinidin, petunidin계 색소 중 어느 하나로 추정되었다.

2) 분광학적 성질

가) 오미자, 흑오미자 생시료를 0.01% HCl in MeOH과 0.01% HCl in EtOH로 추출하여 최대흡광도를 측정하고 5% 염화알루미늄용액 3방울을 가하여 최대흡광도를 측정하여 그 차이를 알아 본 결과는 표 3.28.과 같다.

표 3.28. 오미자, 흑오미자 색소추출액의 흡수 스펙트럼

시 료	흡수극대파장(nm)		염화알루미늄 첨가후 흡수극대의 이동(nm)
	0.01% HCl in MeOH	0.01% HCl in EtOH	
오 미 자	533	541	0
흑오미자	540	554	15

나) 표 3.28.의 결과에 의하면 오미자의 경우는 흡수극대파장이 533, 541nm이면서 염화알루미늄 첨가후 흡수극대의 이동이 전혀 나타나지 않았다. 이러한 특징은 주로 peonidin계 색소에서 나타나는 특징이며, 흑오미자의 경우는 흡수극대파장이 540, 554nm이면서 염화알루미늄 첨가후 흡수극대의 이동이 15nm 정도 장파장으로 이동하였다. 흡수극대 540, 554nm는 malvidin계 색소에서 나타나는 특징이나, malvidin계 색소는 염화알루미늄 첨가 후, 흡수극대의 이동이 일어나지 않는다. 한편, 흡수극대의 이동이 장파장쪽으로 일어나는 것으로는 cyanidin, petunidin, delphinidin계 색소가 있는데 이들 중에서 흑오미자의 흡수극대와 일치하는 색소는 delphinidin, petunidin이 가장 유력하였다. 또, E_{440}/E_{MAX}비는 오미자의 경우는 25.4, 흑오미자의 경우는 28.1로 3-glycoside 형태임을 알수 있었다.

따라서 분광학적 특성으로만 고찰한다면 오미자의 경우는 peonidin-3-glycoside계 색소로 추측되며, 흑오미자의 경우는 malvidin-3-glycoside, petunidin-3-glycoside, delphinidin-3-glycoside계 색소 3가지 중 어느 하나 혹은 둘, 아니면 3가지 모두일 가능성이 있을 것으로 추측된다.

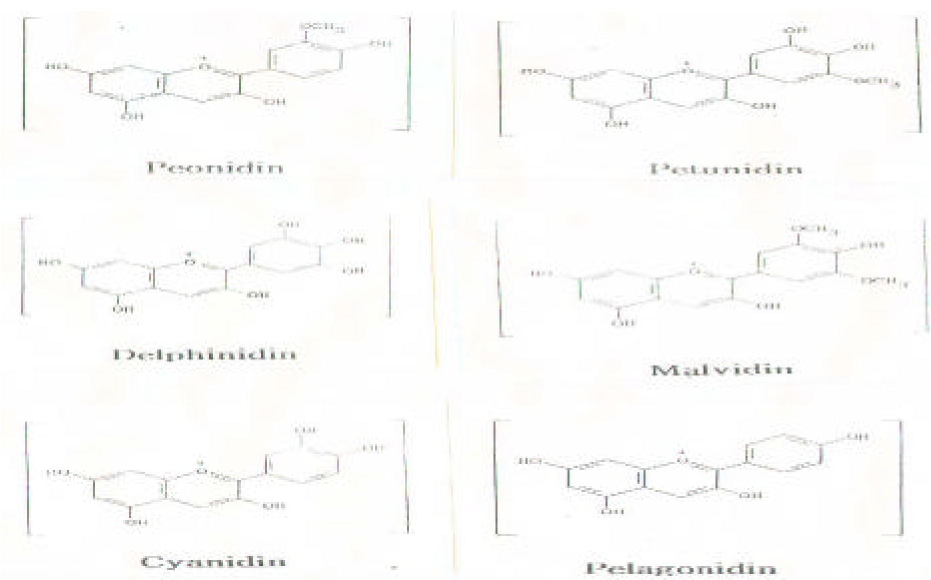


그림 3.18. Anthocyanin의 구조

3) 총안토시안색소의 함량측정

Fuleki와 Francis 및 Philip의 계산식에 의해 총안토시안색소의 함량을 계산한 결과, peonidin-3-glucoside로 환산하여 오미자는 86.54mg%였으며, 흑오미자는 138.75mg%로 흑오미자의 함량이 오미자의 거의 2배 수준이었다.

나. 안토시안색소의 분리정제

1) Amberite IRC-50 칼럼크로마토그라피

가) 색소 추출액 중의 유기산 및 당류를 제거하기 위하여 약양이온교환수지(Amberite IRC-50)를 이용한 칼럼크로마토그라피를 실시하였다.

나) 이온교환수지를 전처리하고 칼럼을 만든 후 색소추출액을 charge하고 물 그리고 0.3% HCl in EtOH 용매로 순차용출한 결과, 수지의 교환수지가 한정되어 당류만이 용출되어야 하는 물용출구에서 색소가 용출되어 물용출구를 농축하여 재실시하는 과정을 반복하여 0.3% HCl in EtOH 용매로 색소를 계속 회수하였다.

다) 한편, 안토시안색소는 표품이 없으므로 오미자, 흑오미자 색소확인에 대한 정보를 얻고자 포도, 가지, 딸기, 장미, 자두 등의 식물체를 동일조건으로 처리하여 당류를 제거하였다.

2) 유리당과 색소의 분리 확인

가) 물용출구와 0.3% HCl in EtOH 용출구에 색소와 당의 존재를 확인하기 위하여 표 3.7.에 나타난 PC용매계를 모두 사용하여 검토한 결과, n-BuOH/pyridine/물(6:3:1, v/v) 용매계가 가장 우수하였다.

나) n-BuOH/pyridine/물(6:3:1, v/v) 용매계를 사용하여 Whatman No. 1여지에 오미자, 흑오미자의 물용출구와 0.3% HCl in EtOH 용출구를 각각 spotting하고 전개하여 질산은을 이용한 발색제를 분무하여 당과 색소의 분리를 확인한 결과, 물용출구에서는 다량의 당과 미량의 색소가 분리되었고, 0.3% HCl in EtOH 용출구에서는 당의 존재가 인정되지 않아 확실한 유리당과 색소의 분리를 확인하였다.

다. 안토시안색소 확인

1) 결합당의 제거 및 확인

가) 안토시안 색소는 주로 6가지(그림 3.18.)의 aglycone(anthocyanin)에 당이 결합하여 다양한 색소를 구성하고 있다. 따라서 색소실험을 하기 위해서는 일단 anthocyanin에 결합된 당을 절단하고 분리하여 그 종류를 확인한 후, anthocyanin에 대한 확인실험을 하는 것이 일반적이다.

나) Anthocyanin에 결합된 당을 절단하기 위하여 산가수분해를 실시하고 가수분해액을 농축한 다음, Amberite IRC-50 칼럼크로마토그라피를 실시하여 당과 anthocyanin을 분리하였다. 분리된 당은 HPLC방법을 이용하여 확인한 결과, 오미자, 흑오미자에서 대부분 glucose만이 발견되어 오미자, 흑오미자에 결합된 당은 glucose임을 확인하였다. 동일한 과정을 포도, 가지, 딸기, 장미, 자두 등의 색소추출액에 대해서도 실시하였다.

2) PC

가) 결합된 당이 제거된 오미자, 흑오미자, 포도, 가지, 딸기, 장미, 자두의 anthocyanin용액을 Whatman No. 1여지에 spotting하고 표 3.8.에서 선정된 n-BuOH/초산/물(4:1:5, v/v, 상층부, 이하 BAW), 물/농염산/초산(82:15:3, v/v, 이하 WHA) 두용매계로 전개한 결과는 표 4-29.와 같다.

나) 오미자, 흑오미자 모두 2개의 반점이 나타나, 각각 2종의 anthocyanin이 함유되어 있었음을 추측할 수 있었으며, 오미자, 흑오미자 두식물체간의 anthocyanin조성이 상당히 다름을 알수 있었다. 또, 흑오미자의 anthocyanin 조성은 포도와 거의 유사하였고 오미자의 anthocyanin 조성은 장미, 자두와 유사하였다. 포도에 함유되어 있는 anthocyanin은 delphinidin, malvidin, petunidin 등이며, 자두에 함유되어 있는 anthocyanin은 peonidin, cyanidin 등이 함유되어 있다.

표 3.29. 각 식물체 anthocyanin의 PC 결과.

용매계	오미자	흑오미자	장미	자두	딸기	포도	가지
BAW	*Rf* 0.140 *Rf* 0.233	*Rf* 0.140 *Rf* 0.273	*Rf* 0.133	*Rf* 0.273	*Rf* 0.193 *Rf* 0.433	*Rf* 0.140 *Rf* 0.273	-
WHA	*Rf* 0.066 *Rf* 0.266	*Rf* 0.120 *Rf* 0.273	*Rf* 0.080 *Rf* 0.253 *Rf* 0.413	*Rf* 0.066 *Rf* 0.233 *Rf* 0.366	*Rf* 0.133 *Rf* 0.353	*Rf* 0.147 *Rf* 0.273	*Rf* 0.167 *Rf* 0.320 *Rf* 0.507

다) 상기 식물체의 anthocyanin 용액을 BAW로 전개한 경우 2시간내에 변색하였으나, WHA로 전개한 경우에는 전개 후에도 오랫동안 변색이 일어나지 않았으며, 표 3.29.에 나타난 바와 같이 분리능도 WHA가 훨씬 우수하여 이후 실험은 WHA를 사용하였다.

라) Anthocyanin의 분리

표 3.29.에 나타난 바와 같이 오미자, 흑오미자 모두 2종의 anthocyanin을 함유하고 있으므로 이들을 분리하고자 Whatman No. 3MM(20 X 20cm) 여과지에 상기 식물체의 anthocyanin 용액을 banding하고 WHA 용매계를 사용하여 전개한 결과, 오미자의 경우 *Rf* 0.080에서 적색band, *Rf* 0.266에서 역시 적색band가 나타났으며, 흑오미자의 경우는 *Rf* 0.060에서 보라색, *Rf* 0.130에서 적색band가 나타났다. 이들을 각각 *Rf*별로 절단하여 1% HCl in MeOH용액으로 추출하였다.

라. 안토시안색소의 동정

1) 분광학적 성질측정

가) 오미자의 *Rf* 0.080(이하 오-0.080), *Rf* 0.266(이하 오-0.266), 흑오미자의 *Rf* 0.060(이하 흑-0.060), *Rf* 0.130(이하 흑-0.130) 부분에 대해 최대흡수극대를 측정한 결과, 오-0.080은 535nm에서 오-0.266은 528nm(그림 3.19.)에 흑-0.060은 546nm(그림 3.19.)에서 흑-0.130은 538nm에서 나타났다.

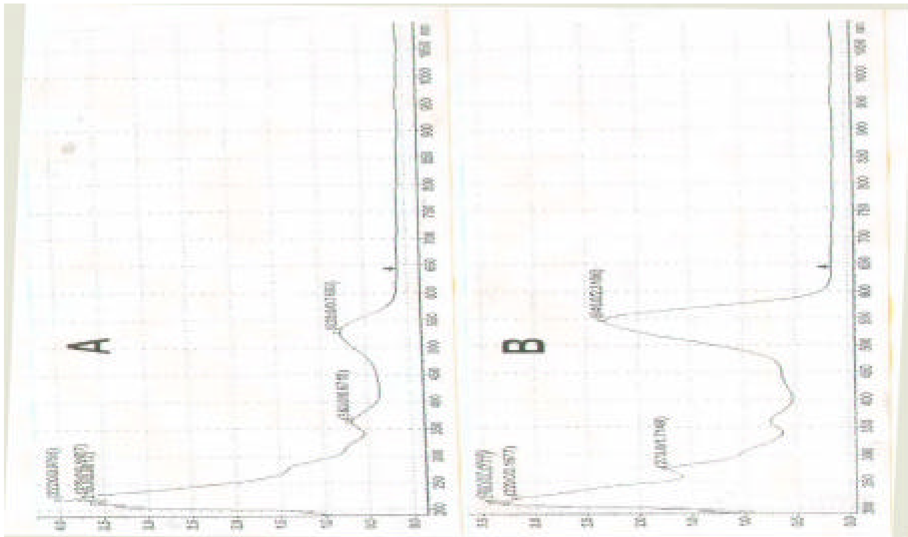


그림 3.19. 오-0.266(A)과 흑-0.060(B)의 최대흡수극대 스펙트럼

나) 최대흡수극대 측면에서만 고찰한다면 오-0.080은 cyanidin 혹은 peonidin으로, 오-0.266은 peonidin으로, 흑-0.060은 delphinidin으로, 흑-0.130은 malvidin으로 추측되었다.

2) 이상 색소실험의 결과를 고찰하여보면, 오미자의 안토시안색소는 PC상에서 나타난 반점이 2개이고 결합된 당이 glucose인 것으로 미루어 보아 peonidin-3-monoglucoside와 peonidin-3,5-diglucoside으로 시사되며, 흑오미자의 안토시안색소는 PC상에서 나타난 반점이 2개이고 결합된 당이 glucose인 것으로 미루어 보아 delphinidin-3-monoglucoside와 malvidin-3- monoglucoside으로 시사된다.

3) HPLC

가) 상기 4획분에 대해 표 4-9.의 조건으로 HPLC를 실시한 결과, 오-0.080은 Rt 4.032, Rt 13.042에서, 오-0.266은 Rt 4.432, Rt 12.037에서, 흑-0.060은 Rt 3.202, Rt 21.338에서, 흑-0.130은 Rt 4.673, Rt 24.093에서 peak가 나타났으나, 이들의 결과로 색소본체에 대한 정보를 얻는 것은 어려웠다. 다만, 오-0.080의 Rt

13.042는 장미의 주peak인 Rt 13.095와 유사하였고, 오-0.266의 Rt 12.037은 자두의 주peak인 Rt 12.282와 유사하였으며, 흑-0.060의 Rt 21.338은 포도의 주peak인 Rt 20.995와 유사하였고, 흑-0.130의 Rt 4.673은 포도의 주peak인 Rt 4.410과 유사하여 오미자의 색소가 장미나 자두와, 그리고 흑오미자의 색소가 포도와 매우 유사하다는 정보만을 얻을 수 있었다.

4. 생물활성물질 : Schiznadrin

가. 추출

오미자, 흑오미자시료를 ether로 환류추출 후 다시 MeOH로 추출하였다. Ether 추출용액은 농축 후 수증기증류를 실시하여 정유성분을 제거하고 수용액(수용액획분)에 대해 ether로 추출 농축(ether획분)하였다. 한편 MeOH 추출용액은 증류수에 녹인 후, ethylacetate로 추출 농축한 후 celite로 칼럼을 제작하여 시료를charge하고 n-hexane, chloroform, methanol로 순차용출분획하였다. 이러한 과정에서 얻어진 수용액획분, ether획분, n-hexane획분, chloroform획분, methanol획분에 대해 표품의 schizandrin과 같이 benzene/ acetone (9:1, v/v)과 n-hexane/acetone(7:3, v/v) 두용매계를 사용하여 TLC를 실시하고 요오드증기를 이용하여 발색하고 검정한 결과, 주로 ether획분과 n-hexane획분에서 활성물질의 존재가 인정되었고 chloroform획분에서는 약간의 활성물질의 존재가, 그리고 그 외의 획분에서는 활성물질의 존재가 인정되지 않았다. 따라서 ether획분과 n-hexane획분을 합하여 농축한 후, 크로마토그라피를 실시하여 분리정제하였다.

나. 크로마토그라피를 이용한 분리정제

1) 실리카겔 칼럼크로마토그라피를 이용한 분리정제

가) Silica gel을 n-hexane을 이용하여 칼럼을 제작하고 활성획분을 charge한 후 표 3.10.의 용매조성으로 용출분획하였다. 얻어진 12개 획분을 각각 농축하고 표품의 schizandrin과 같이 TLC를 실시하여 검정한 결과(오미자는 그림 3.20., 흑오미자는 그림 3.21.), G, H획분에서는 활성물질의 존재가 확실하게 인정되었으며, I, J획분에서는 약하게 인정되었다. 따라서 이들 G, H, I, J획분을 모두 모아

농축한 다음, 더욱 분리정제하고자 용출용매계를 바꾸어 재실리카겔 칼럼크로마토그라피를 실시하였다.

나) Silica gel을 n-hexane을 이용하여 칼럼을 제작하고 활성획분을 charge한 후 표 3.11.의 용매조성으로 용출분획하였다. 얻어진 14개 획분을 각각 농축하고 표품의 schizandrin과 같이 TLC를 실시하여 검정한 결과(오미자는 그림 3.22., 흑오미자는 그림 3.23.), 라, 마획분에서는 활성물질의 활성물질의 존재가 확실하게 인정되었다. 이들 획분을 모아 농축한 다음, 더욱 분리정제하고자 Sephadex LH-20 칼럼크로마토그라피를 실시하였다.

2) Sephadex LH-20 칼럼크로마토그라피를 이용한 분리정제

가) 재실리카겔 칼럼크로마토그라피의 활성획분 농축물에 대해 Sephadex LH-20 칼럼크로마토그라피를 실시하였다.

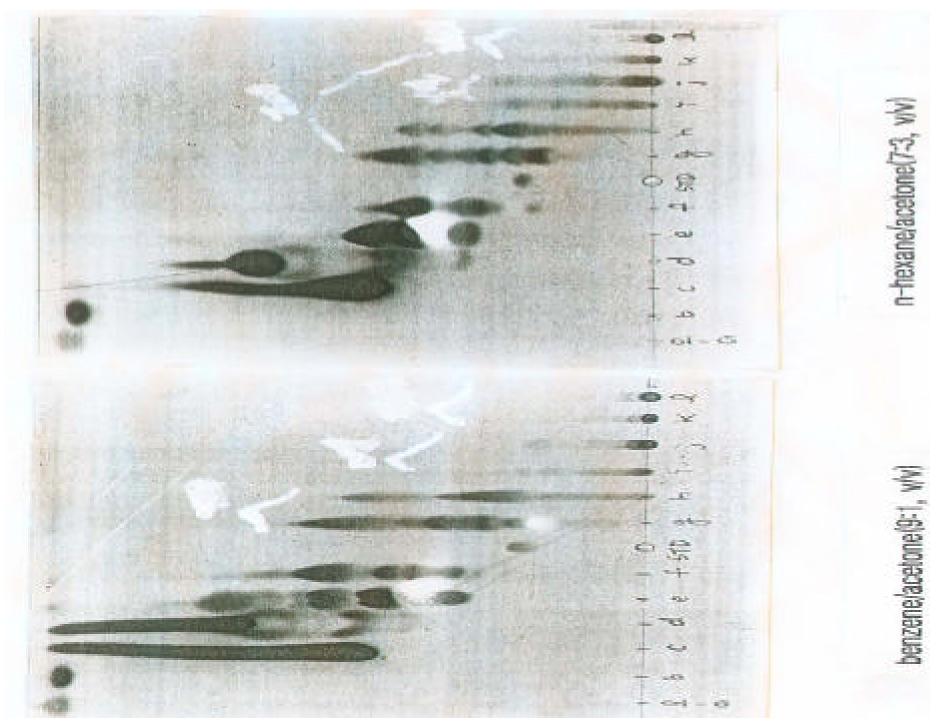


그림 3.20. 오미자 실리카겔 칼럼크로마토그라피 획분의 TLC 크로마토그람

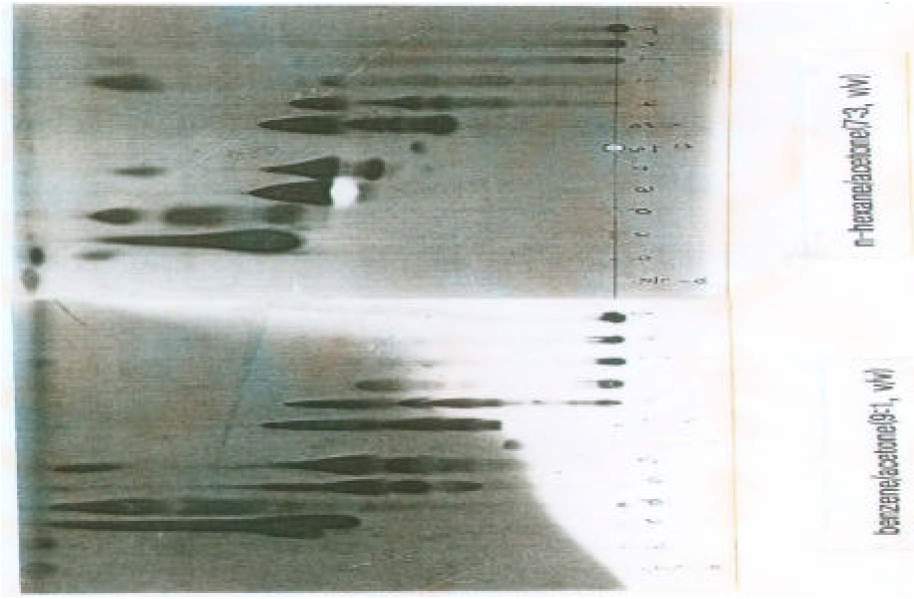


그림 3.21. **흑오미자 실리카겔 칼럼크로마토그라피 획분의** TLC **크로마토그람**

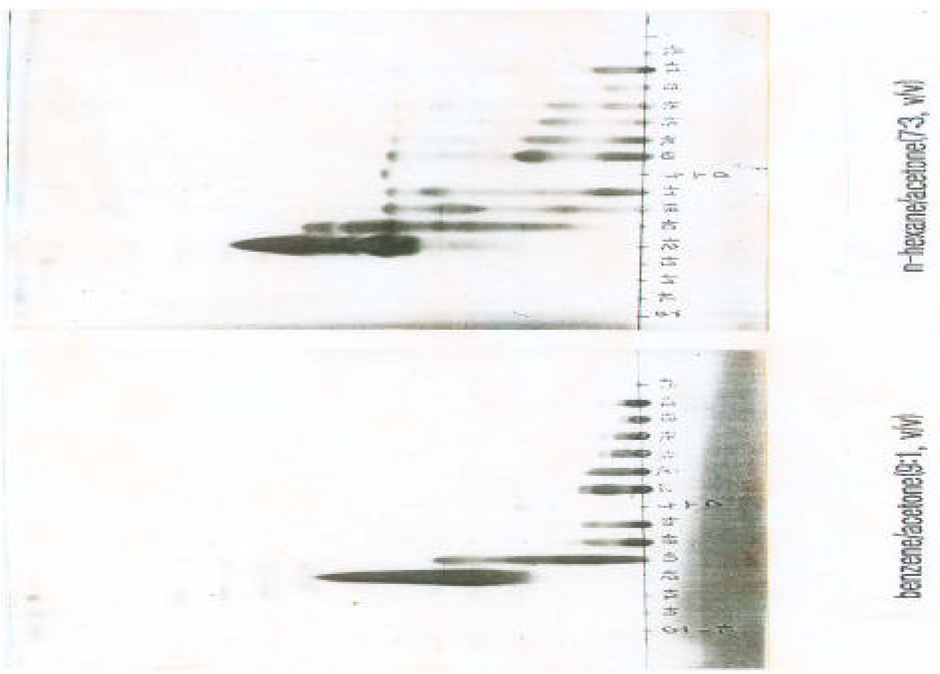


그림 3.22. **오미자 재실리카겔 칼럼크로마토그라피 획분의** TLC **크로마토그람**

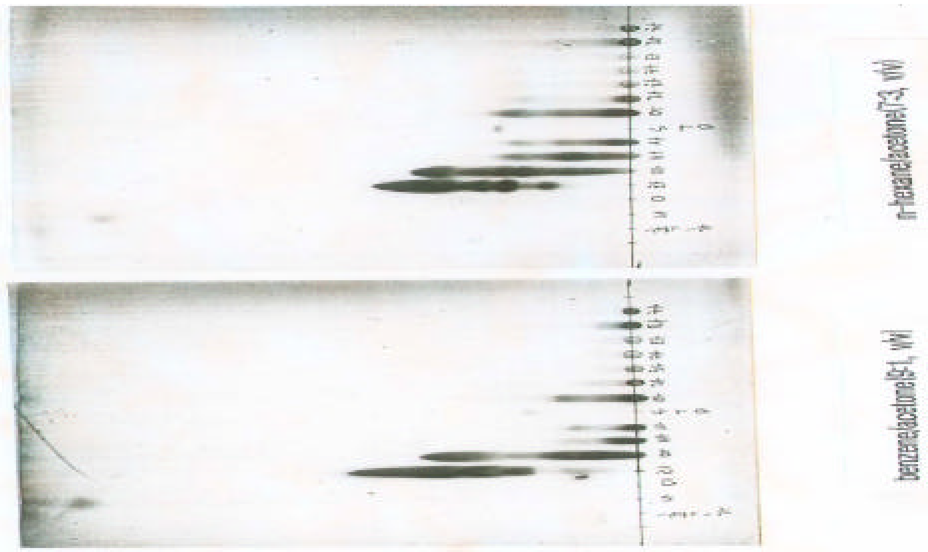


그림 3.23. 흑오미자 재실리카겔 칼럼크로마토그라피 획분의 TLC 크로마토그람

나) Sephadex LH-20 겔을 chloroform/MeOH(3:1, v/v) 용매계로 slurry를 만들어 칼럼을 제작하고 칼럼 상단에 시료를 흡착시킨 후, 동용매계로 용출하면서 80ml씩 총 10개로 분획하였다. 얻어진 10개 획분을 각각 농축하고 표품의 schizandrin과 같이 TLC를 실시하여 검정한 결과, 3, 4, 5번 획분(총부피에 대한 용출부피의 비 0.6 1.0)에서 활성물질의 존재가 인정되었다. 그러나, 충분히 분리정제가 되지 않았다고 판단되어 이를 더욱 분리정제하고자 박층크로마토그라피를 실시하였다.

3) 박층크로마토그라피를 이용한 분리정제

가) Sephadex LH-20 칼럼크로마토그라피에서 활성물질의 존재가 인정된 3, 4, 5번 획분을 모아 농축한 다음, TLC판에 농축물을 banding하고 n-hexane/acetone(7:3, v/v) 용매계를 사용하여 schizandrin표품과 함께 전개하고 schizandrin표품과 같은 *Rf*치를 나타내는 영역을 절취하여 MeOH로 4회 추출, 여과, 농축하였다.

나) TLC에서 얻어진 농축물에 대해 더욱 정제하고자 benzene/acetone (9:1, v/v) 용매계를 사용하여 앞의 가)와 같은 방법으로 전개, 절취, 추출, 여과, 농축하였다.

다. HPLC 분석

1) TLC에서 얻어진 활성획분을 membrane filter(Millipore, 0.45µm, Waters사)로 여과하여 표 3.12의 조건으로 HPLC를 실시한 결과, schizandrin 표품은 그림 3.24, 오미자는 그림 3.25, 흑오미자는 그림 3.26과 같다.

2) 그림 3.24.에 나타난 바와 같이 schizandrin 표품의 Rt은 9.210이었으며, 오미자 활성획분은 그림 3.25.에 나타난 것처럼 Rt 9.185에서 주peak가 나타났고, 그외 Rt 7.230, Rt 13.015, Rt 14.867에서 작은 peak가 나타났다. 흑오미자 활성획분은 그림 3.26.에 나타난 것처럼 Rt 9.155에서 주peak가 나타났고, 그외 Rt 13.210, Rt 13.715, Rt 14.905, Rt 15.880, Rt 17.982에서 작은 peak가 나타났다.

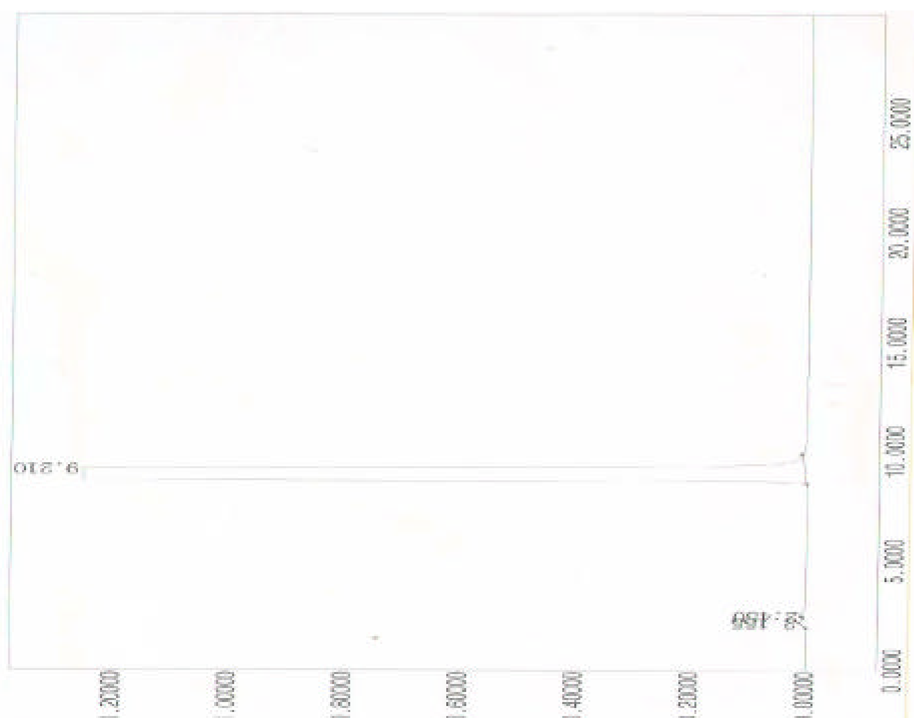


그림 3.24. Schizandrin 표품의 HPLC 크로마토그람

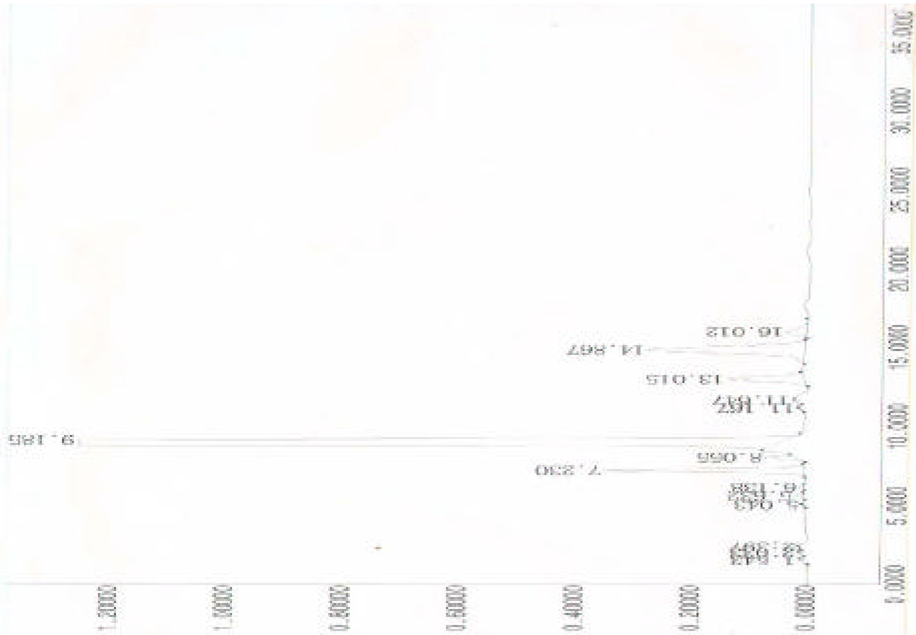


그림 3.25. **오미자 활성획분의** HPLC **분석 크로마토그람**.

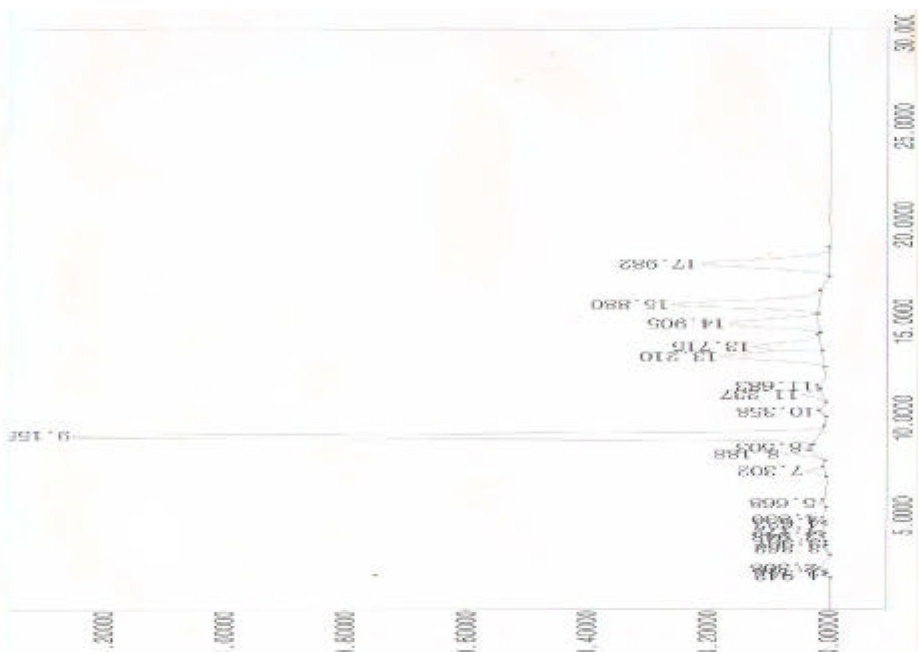


그림 3.26. **흑오미자 활성획분의** HPLC **분석 크로마토그람**.

3) 오미자 활성획분의 Rt 9.185과 흑오미자 활성획분의 Rt 9.155는 schizandrin 표품의 Rt 9.210과 매우 유사하여 이들 peak는 schizandrin태 물질일 가능성이 매우 높다고 판단된다. Schizandrin이 오미자에 함유되어 있다느 것은 기지의 사실이므로 위의 결과가 당연할 수 있겠으나, 현재까지의 결과로만 본다면 흑오미자내에도 schizandrin태 물질의 존재가 인정되는 것은 대단히 특이적인 사항으로 생각된다. 따라서 흑오미자내에는 schizandrin이 존재하거나 그렇지 않을 경우 적어도 schizandrin과 매우 유사한 물질이 존재할 가능성은 매우 높을 것이다.

4) 흑오미자의 활성획분에 대한 정확한 정보를 얻고자 LC/MS를 실시하고자 하였으나, 시료양이 너무 적어 현재 계속하여 분리정제를 실시하고 있다. 추후 전문학술지에 정확한 결과를 투고할 것이다.

제 4 절 결　론

오미자와 흑오미자의열매에 함유된 일반성분 및 생물활성물질을 분석한 결과느 다음과 같다.

오미자와 흑오미자에 함유된 유리당의 종류는 비슷하였으나, 오미자의 경우에는 sucrose의 함량 1.13%로 0.02%인 흑오미자에 비해 상당히 많았고, 흑오미자의 경우에는 fructose와 glucose의 함량이 3.71%, 2.51%로 1.83%, 1.05%인 오미자보다 월등히 높았다.

오미자, 흑오미자 모두 malic acid의 함량이 47,684 ppm, 38,691 ppm으로 가장 높았고, 그 다음이 citric acid로서 11,939 ppm, 3,330 ppm 이였다. 흑오미자의 경우에는 malonic acid와 maleic acid의 함량이 각각 2.8 ppm, 2.3 ppm으로서 0.3 ppm, trace인 오미자 보다 높게 나타났다.

오미자의 총유리아미노산 함량은 722 mg% 였고 총구성아미노산은 7,577 mg%였으며, 흑오미자의 경우는 각각 202 mg%, 5,596 mg%로 오미자에 아미노산 함량이 더 높았으나 lysine만은 흑오미자에서 300 mg%으로 오미자의 288 mg%보다 높게 나타났다. 두종의 식물체에 주로 함유되어 있는 아미노산은 glutamic acid, aspartic acid, threonine, valine 그리고 Leucine이었다.

총페놀함량은 오미자의 경우는 1.275%, 흑오미자의 경우는 1.560%로 흑오미자의 함량이 더 높았다. 오미자, 흑오미자에 가장 많이 함유되어 있는 페놀화합물은 chlorogenic acid로 각각 1,276 ppm, 802 ppm였으며, gentisic acid의 경우는 오미자에 69 ppm, 흑오미자에는 136 ppm으로 흑오미자에서 높게 나타났고 ferulic acid는 오미자에 187 ppm, 흑오미자에 23 ppm으로 오미자에서 더 높게 나타났다. 그외 존재하는 페놀화합물로는 cinnamic acid, caffeic acid, coumalic acid 등이었다.

총지질함량은 오미자의 145 mg/g보다 흑오미자에서 160 mg/g으로 더 높았으며 주로 중성지질이었다. 구성지방산 중 불포화지방산은 오미자, 흑오미자 모두 linoleic acid가 21,765 ppm, 45,584 ppm으로 가장 많이 함유되어 있었고, 포화지방산으로는 palmitic acid가 3,974 ppm, 10,872 ppm으로 가장 많이 함유되어 있

었다. 그외 다량 함유되어 있는 지방산은 포화지방산인 capric acid 였다.

오미자, 흑오미자의 정유성분의 종류는 오미자에서 훨씬 다양한 성분이 검출되었으며, 특히 오미자에서는 비점이 낮은 정유성분이 상당수 검출되었다. 주로 함유되어 있는 성분으로는 오미자에는 α-ylangene, α,β-elemene, β-himachalene, γ-selinene 그리고 widdrene 등의 성분이 주로 발견되었으며, 흑오미자에서는 caryophyllene, calarene, cubebene, acoradiene 그리고 β-himachalene 등의 성분이 발견되어 오미자와 흑오미자의 정유성분 조성에는 차이가 있었다.

총안토시안색소의 함량은 오미자는 86.54mg%였으며, 흑오미자는 138.75mg%로 흑오미자의 함량이 오미자의 거의 2배 수준이었다. 오미자에 함유된 색소는 peonidin-3-monoglucoside와 peonidin-3,5-diglucoside으로 추측되며, 흑오미자의 안토시안색소는 delphinidin-3-monoglucoside와 malvidin-3-monoglucoside으로 추측된다.

오미자에는 schizandrin이 0.11%/100g(건중) 함유되어 있었으며, 흑오미자에도 대단히 유사한 물질이 함유되어 있었으며 그 함량은 0.13%/100g(건중)였다.

제 5 장 천연음료개발분야

제1절 서 설

천연음료 관련 산업기술 수준의 향상을 위하여, 가공제품 관련기술 향상과 고급인력이 확보되면, 현재 생산되는 음료는 외국 제품들과 비슷하여 국내시장에서 경쟁을 해야하는 어려운 문제점의 해결 방법이 될 수 있다. 유용자원식물을 상품성이 높은 가공식품의 원료로 이용하면, 산림자원에 대한 관심 증대와 새로운 임산 소득 작목으로 개발되고 유용자원 식물들과 이들의 이용성을 개발하지 않으면 필요량을 외국에서 수입하는 등 우리의 식물자원이 소실되어 버릴 가능성이 많으며 비슷한 종류나 변종 등 근연식물의 이용성이 확대 될 수 있다. 장기저장제품과 이용성이 편리한 가공품의 생산으로 오미자의 부가가치를 높이고 제품의 다양화로 상품성을 향상시키고 유통의 편의성을 확보하여 생산부터 유통까지 package화로 농업을 2.5차 산업으로 끌어올릴 수 있다. 그리고, 원료 산지에 가공산업을 육성하여 농한기 유휴 노동력 활용으로 고용기회의 확대 및 창출이 가능하며, 가공산업의 현지 노동력 이용으로 농가소득 증대와 농외소득 증가도 가능하다. 생약 재료로 이용되는 오미자를 천연음료로 가공하여 건강음료로 개발함으로써 관련산업의 기술개발에 기여할 수 있으며, 건강음료 개발로 국내 음료 산업에 새로운 가능성과 수출상품의 개발로 연결하여 외화획득이 가능하다. 그런데, 현재 우리나라에서 오미자를 이용한 천연음료 생산제품 및 기술이 거의 전무한 상태이므로, 기초적인 생산기술부터 연구개발이 필요하고, 기술개발에 국가적인 적극적 자원이 요청되고 있다.

오미자의 경우는 예전부터 약재로 사용되어 왔으며, soft drink, 농축 extract 제품을 생산하고 있는 산업체가 전남 구례군 소재 (주)지리산식품 등 여러곳이고 신제품을 개발하려는 산업체의 수도 늘고있으며, 흑오미자의 경우는 약재로 소량 유통되고 있고, 제주도 정우식품을 포함하여 제품을 생산하고 있거나 신제품 생산에 관심을 가지고 있는 산업체도 늘고 있다고 한다. 전술한 상황과 세계적으로 오미자와 흑오미자의 생산국이 국한되어 있으며, 현재 이들 식물을 재배하고 있

거나 재배하고자 하는 의욕을 가진 농가가 상당수에 이르고, 생산된 오미자를 가공하여 제품을 생산하고 있거나 신제품을 생산하려는 산업체가 증가하고 있다는 점을 감안할 때, 신제품 개발에도 상당한 일익을 담당하게 될것이며, 그에 따라 재배면적의 증가와 판매 route가 보장되어 다. 수농민의 참여로 재배면적의 증가와 농가의 소득향상에도 기여하게 될것이다.

흑오미자를 이용한 가공품의 개발로 산업화된 고부가 가치 제품의 생산을 위한 선진국형 농업구조로 전환하면, 농산물 수입개방으로 인한 농업 생산 기반의 취약화와 붕괴 및 농촌인구 감소에 따른 농촌사회 공동화 현상과 파괴방지로, UR 협상 및 농수산물 수입 개방으로 인한 농촌보호하며, 다양한 가공품의 생산으로 소비자의 기호성을 충족시켜 상품성의 증대로 국민의 식문화 향상에 기여할 수 있고, 약리작용을 갖는 건강식품의 보급으로 국민건강에 기여할 수 있으며 우리의 고유한 음료로서 수출상품으로 개발하여 위축된 농민의식의 고양에 기여할 수 있다. 또한, 오미자・흑오미자에 대한 정보제공으로 산업체의 관심유도하며, 제품 수요증가로 인한 재배면증가와 판매route 확보로 농가소득의 향상에 도움이 되며, 건강식품 및 건강보조식품으로써 국민의 오미자・흑오미자에 대한 올바른 인식에 기여하여, 국민건강 증진에 일익담당할 수 있다.

국내에서 오미자의 이용은 건조제품을 한방의학계에서 한약재료로 사용되는 정도일 뿐이며, 이에 대한 연구도 매우 적은 편인데, 그에 대한 연구는 약리작용 연구로 서화중 등에 의한 오미자 추출물이 Alloxan 부하가토의 혈청성분에 미치는 영향이 있고, 이정숙등이 오미자 열매 추출물이 알콜대사에 미치는 효과를 연구하였고, 식품으로서 이용은 건조 오미자 및 분말이 오미자茶로 이용되며 가공제품으로 현재 무주 안성농협(전북)등 5~6개 회사가 생산하고 있으며 액상茶(정우식품)도 생산되고 있다. 천연, 전통음료로서 이용은 시작단계에 있어서 음료개발이 시도되고 있으며 이에 대한 연구가 시작되고 있다. 현재 생산되는 음료는 오미자 시시(해태음료), 오미자즙(지리산식품) 등인데 생산량은 매우 적은 편 이며 연구도 시작 단계에 있을 뿐만 아니라, 흑오미자에 대한 연구는 전무한 상태이다. 오미자 전통음료 개발을 위해서 식품개발 연구원 연구팀에 의해서 추출용매에 따른 추출물의 수율과 맛성분과 관련 성분의 분석을 하였고, 해태제과 식품

연구소 연구팀에 의해서 최적추출조건 및 첨가물 적정 배합비를 연구하였다. 이러한 연구는 기초단계이며 앞으로 기초연구부터 생산공정의 개발 연구까지 많은 연구가 수행되어야 할 것이다.

제2절 연구수행방법

1. 실험재료

가. 흑오미자 : 1996년부터 1998년까지 매년 10월 중순 11월 초순 제주도 한라산에서 채취한 생시료를 선별후 꼭지등을 제거하고, 냉동한 과실을 4등분이상 세절하여 시료로 사용하였다. .

나. 흑오미자줄기: 1996년 11월 초 제주도 한라산에서 채취하여 건조시켜 4℃(±1℃)로 냉장 보관하면서 절단 후 세절하여 시료로 사용하였다.

다. 오미자: 1997년 10월 중순 강원도 홍천군 남면에서 채취선별후 꼭지등을 제거하고 -18℃이하로 냉동한 과실을 4분이상 세절후 시료로 사용하였다.

라. 건조오미자: 1997년과 1999년 1월 전라북도 무주군 안성면 안성농협에서 1996년과 1998년 가을에 채취하여 건조한 재료를 구입하여 과실을 선별후 4℃로 냉장 저장하면서 시료로 사용하였다.

마. 중국산 오미자: 1997년도 1월 초순 전라남도 순천시 시장에서 건조된 중국산 재료를 구입하여 역시 0-4℃로 냉장 저장하면서 시료로 사용하였다.

바. 흑오미자 추출물: 세절한 흑오미자 시료를 80℃로 4시간 40℃로 7시간 물과 25%에탄올로 추출하여 회전감압농축기로 농축시킨후 냉장 보관하면서 추출물 시료로 사용하였다.

사. 건조오미자 추출물: 건조한 96년산 오미자 시료를 흑오미자 추출물과 같은 조건으로 추출 농축시킨 후 냉장 보관하면서 추출물 시료로 사용하였다.

아. 중국산 오미자 추출물: 중국산 건조 오미자 시료를 흑오미자 추출물과 같은 조건으로 추출후 농축하여 냉장 보관하면서 추출물 시료로 사용하였다.

자. 흑오미자 나무 추출액: 건조한 흑오미자 나무 줄기 시료를 추출물 제조 시료와 같은 조건으로으 추출후 농축하여 냉장 보관하면서 추출물 시료로 사

용하였다.

2. 실험방법

가. 일반성분 분석

각 시료들의 수분, 조지방질, 회분은 A.O.A.C.방법에 따라 수분은 105℃건조법, 조지방질은 Soxhlet추출법, 회분은 회화로에서 600℃로 회화하여 측정하였다. 그리고 조단백질은 조단백질 측정장치(Auto kjeldhal system, Buchi, Switzerland)를 이용하였고, 조섬유질도 조섬유 측정장치(Fibertec system M 1017, Tecator, Switzerland)를 사용하여 측정하였으며 전체를 100으로 하여 탄수화물(가용성 무질소물의 함량)을 계산하여 구하였다.

나. 수율 분석

4가지 종류의 시료들로부터 2가지 추출용매를 사용하여 2가지 추출온도에서 4가지 방법의 추출시간동안 추출하였다.

1) 추출 용매 : 물, 20% ethanol수용액, 25% ethanol수용액으로 추출
2) 추출 온도 : 80℃ 와 40℃ 물중탕
3) 추출 시간 : 80℃ 물중탕에서 3, 4, 5시간과 40℃ 물중탕에서 7시간

가장 적합한 추출방법을 찾기 위하여 4종류의 시료 일정량을 취하여 물과 20% ethanol을 시료량의 5배를 채워 환류냉각기를 부착하고 80℃ 물중탕에서 3시간, 4시간, 5시간 추출한 후 1차 여과하고 잔사에 다시 동량의 추출용매로 1시간씩 동일온도로 3차 추출하여 여과한 여액을 모두 합하여 회전감압 농축기로 45 50℃에서 완전히 농축하고 데시케이터에서 30분 방냉한 후 추출물 (엑기스)을 평량하여 시료량에 대한 백분율로 수율을 측정하였고 40℃ 물중탕에서 7시간 추출한 실험방법도 동일한 방법으로 3차 추출하여 얻은 추출액을 모두 합하여 농축한 후 동일방법으로 수율을 측정하였다.

다. 색소 추출량 조사

4종류의 시료에서 2가지 추출용매를 사용하여 2가지 온도로 3, 4, 5, 7 시간

으로 3반복한 추출액 중 일정량을 취하여 색차계(Tokyo Denshoku Co. SP-80, Japan)로 측정하였으며 Hunter의 L값(명도), a값(적색도), b값(황색 도)으로 표시하였으며 동일 시료들을 spectrophotometer (UV/Visible Spectrophotome-ter, Pye Unicam, U.K.)로 최대흡광도를 나타내는 520nm에서 흡광도를 측정하여 색도를 비교하였다.

라. 총 폴리페놀 측정

각 재료의 추출액 시료 5ml를 취하여 100ml에 넣고 탄산나토륨 5ml과 Folin시약 2ml과 증류수를 가하여 100ml로 정용후 660nm에서 흡광도를 측정하였다. 함량의 계산은 catechol로 작성한 표준곡선에 의하여 정량하였다

마. 물성측정

각 종류의 시료에서 추출 용매, 추출 온도, 추출 시간을 달리한 다양한 추출방법으로 추출한 추출액의 일정량씩을 취하여 pH meter(Orion 720A, U. S. A)로 pH를 측정하였고 산도는 0.1N NaOH 적정법으로 (pH 8.3 종말점)으로 하였으며 당도는 굴절당도계(ATAGO, Japan)로 측정하였다.

바. 추출물의 기호성 영향인자들의 변화조사

흑오미자 2가지 추출용매(물과 25% 에탄올)를 사용하여 추출조건인 추출온도와 추출시간을 달리하여 추출한 추출물의 색도인 투명도, 적색도, 황색도와 흡광도, 총 폴리페놀의 변화를 측정하고 pH, 산도, 당도 변화를 측정하였다. 그래서 음료제품으로 가공하였을 때 제품의 색과 맛등 기호성에 미치는 영향을 예측하기 위하여 먼저 추출물 특성의 변화를 냉장온도 (4±1℃)로 저장하면서 조사하였다.

사. 천연 즙액제품의 상품성 영향인자들의 저장중 변화조사

시료중 흑오미자, 생오미자, 건조오미자를 물과 3%에탄올을 추출용매로 하여 60℃와 80℃에서 각각 4시간씩 추출하였다.

추출한 즙액을 절반으로 나누어 항산화제 isoascorbic acid(=erythorbic acid)를 0.025%되게 첨가하여 항산화제 첨가시료와 무첨가 시료로 나누어서 포장하였다. 포장은 140 150㎖씩 Al-pack에 주입하고 포장하여 80℃로 5 6분 살균 후 17℃까지 바로 냉각한 후 냉장저장(4±1℃)하면서 시료로 사용하였다. 냉장 저장하면서 저장중 상품성에 영향을 주는 색소의 안정성, 총 폴리페놀 함량, 적절한 단맛의 농도와 신맛과 어울리는 조화된 맛을 갖는 추출물을 조사하였고, 저장중 제품의 혼탁방지를 위해 명도 및 흡광도를 7일 간격으로 측정하여 상품의 유통중 변화를 조사하였다..

아. 천연즙액(추출물)제품의 기호성, 상품성, 저장성 조사

흑오미자, 생오미자, 건조오미자를 물과 3%에탄올 용매로 60℃에서 4시간 추출한 후 여과하고 여과한 즙액을 반으로 나누어서 설탕을 5%가 되도록 가하며 당을 첨가한 시료와 무가당 시료로 나누어 포장하였다. 포장은 Al-pack에 동일한 방법으로 하였고, 살균, 냉각도 같은 방법으로 냉장저장(4±1℃)하면서 시료로 사용하였다. 냉장 저장하면서 적색도가 동일하도록 희석 조절하면서 맛의 기호성, 적색외의 상품성, 저장성, 물성변화등을 조사하였다.

제 3 절 연구수행내용 및 결과

1. 흑오미자와 오미자의 일반성분

우리나라 제주도에서 자생하는 흑오미자와 오미자, 그리고 중국산 오미자, 흑오미자 나무줄기의 일반성분은 표 4.1.과 같다. 표에서와 같이 흑오미자는 생원료를 시료로 하였고 나머지는 건조오미자를 시료로 하였다. 그래서 참고로 수분을 제외한 건물량 비율을 나타내었다.

흑오미자는 생원료가 수분이 86.3%로 수분함량이 높은 과실류로 나타났다. 흑오미자는 오미자와 중국산 오미자에 비하여 조지방이 약간 낮은 함량을 나타냈고, 조섬유는 반대로 흑오미자에 많은 양이 함유되었다. 그리고 나머지 일반성분인 조단백질, 조회분, 가용성 무질소물은 비슷하여 함량의 차이가 거의 없다. 흑오미자 나무 줄기도 가공재료로서 성질을 조사하기 위하여 시료로 하였는데 조섬유가 약 50%이었고 탄수화물은 흑오미자에 비하여 오히려 다소 낮은 함량이었으며 조단백, 조지방, 조회분은 매우 적은량 함유되었다. 이 등이 보고한 오미자의 일반성분과 비교하면 조회분은 약간 높았으나 조지방, 조단백질은 낮은 함량을 나타내었는데 시료의 상태와 실험 방법 등의 차이에 기인하는 것으로 생각되었다. 오 등은 여러 가지 생약과 오미자의 일반성분을 보고하였는데 조단백, 조섬유는 흑오미자가 많고 조지방, 조회분은 낮게 함유된 결과를 나타냈다.

표 4.1. 흑오미자와 오미자의 일반성분

시 료	수 분	조단백질	조지방	조섬유	조 회분	탄수화물 (가용성 무질소물)
흑오미자 (생시료)	86.30	1.05 (7.66)	2.07 (15.11)	3.21 (23.43)	0.68 (4.96)	6.69 (48.83)
오 미 자 (건조)	19.17	6.23 (7.71)	16.04 (19.84)	15.22 (18.83)	3.85 (4.76)	39.49 (45.17)
중 국 산 오 미 자 (건조)	22.12	5.58 (7.16)	13.93 (17.89)	15.21 (19.53)	3.90 (5.01)	39.26 (50.41)
흑오미자 줄기 (건조)	10.41	0.84 (0.94)	1.57 (1.75)	44.11 (49.24)	2.60 (2.90)	40.47 (45.17)

※ ( )는 건물중 함량(%)

2. 흑오미자와 오미자의 수율

흑오미자의 음료 개발을 위하여 여러 가지 추출조건으로 즙액을 추출하여 그 수율을 조사하였는데 그 결과는 표 4.2.와 같다.

표 4.2. 흑오미자 및 줄기와 오미자의 수율 (중량 %)

추출온도	80℃						40℃	
추출시간	3시간		4시간		5시간		7시간	
시료 추출농도 (알콜%)	0	20	0	20	0	20	0	20
흑오미자(생시료)	9.32	9.68	9.52	10.08	9.40	9.16	8.31	8.40
오미자(건조)	45.63	39.25	47.04	39.12	47.48	45.45	38.44	35.02
중국산오미자(건조)	39.78	38.56	40.79	38.74	48.61	41.53	38.39	37.63
흑오미자줄기(건조)	12.02	12.13	13.99	15.07	14.31	13.19	9.79	9.45

흑오미자의 생시료는 추출용매로 물과 20%에탄올 수용액을 사용하여 80℃ 물중탕(3시간, 4시간, 5시간)과 40℃ 물중탕(7시간)에서 추출하였는데 80℃ 물중탕으로 3시간 추출하는 방법이 수율이 더 높아서 추출용매나 추출시간보다는 추출온도의 영향이 크게 미치는 것으로 나타났으며 높은 추출온도인 80℃에서 추출시간의 영향은 4시간이 가장 높은 수율을 나타내었다. 그리고 3시간 추출은 추출시간이 짧아 당연히 수율이 낮았으나 5시간 추출도 수율이 약간 적은 값을 보였는데 4시간 이상의 추출은 추출시간의 연장이 추출 수율을 높이는 조건이 되지 못하는 결과로 나타났다. 또한 추출용매로는 물보다는 20%에탄올 수용액이 약간 높은 수율을 나타내었는데 5시간 추출조건에서는 반대로 물로 추출한 추출물의 수율이 높은 것으로 나타났는데 적은 차이로 비슷한 결과를 보였다. 한국산 오미자와 중국산 오미자의 건조시료는 추출온도가 고온과 저온일 때 수율의 차이가 많아 고온 추출이 10%이상 높았다. 그리고 80℃물중탕 추출일 경우 4시간 추출하면 충분히 추출되는 결과를 보였으며 에탄올 수용액보다는 물로 추출한 방법이 수율이 상당히 높게 나타나 4시간 추출시료에서는 8 12%가 높아서 흑오미자 생시료와는 상반된 결과를 나타내었고, 중국산 건조 오미자가 수율이 1 3% 정도 높았다.

흑오미자 가공식품의 생산 원료의 확보를 증대시키고 자원의 이용성 개발을 위하여 흑오미자 나무줄기를 가공 중 제조 원료로 사용하여 적성을 조사하였는데 건조한 나무 줄기에서 추출한 추출물의 수율은 흑오미자 생시료보다 약간(3 5%)높게 나타났다. 역시 오미자 열매의 결과와 비슷하게 고온으로 추출하는 조건이 적합하였고, 80℃ 물중탕 추출에서 4시간 에탄올 수용액 추출방법이 적합한 추출조건으로 나타났다. 그리고 나무줄기의 시료에서 에탄올 수용액에 다양한 성분이 추출된 것으로 생각되어 물보다 에탄올 수용액이 좋은 방법이라 추측되었다. 수율을 기준으로 한 종합적인 추출조건으로는 저온보다는 약 80℃의 고온의 물중탕으로 4시간 추출하고 흑오미자 생시료와 건조 나무줄기는 20% 에탄올

수용액 추출 용매가 유리하였으며 건조된 오미자(한국산, 중국산)는 추출용매로 물을 사용하는 방법이 높은 수율을 얻는 방법으로 나타났으며 건조된 나무 줄기로 가공제품의 제조에 원료로 이용할 수 있는 재료로서 뿐만 아니라 증량제로서 충분히 사용될 수 있는 가치가 있는 것으로 생각되었다.

흑오미자에 대한 연구는 국내에서 전혀 없는 실정이며 오미자를 이용한 가공제품에 관한 연구도 거의 없어 비교가 어렵다. 강 등이 연구한 결과는 45% 알콜 농도의 용매로 90℃에서 3시간 추출하는 방법이 가장 양호한 수율을 나타내는 것으로 보고하여 약간의 차이를 나타내었는데 이것은 온도와 용매의 농도가 높아 시간이 단축되었다고 생각되었다.

3. 색소추출량 조사

1) 흑오미자와 오미자의 적색도(a값)

오미자는 일반가정에서 전통적으로 오미자 차 또는 진달래 색의 고운 즙액(추출액)을 우려내어 음료의 기본액으로 많이 애용될 만큼 그 색소를 이용하였다. 그래서 검은색에 가까운 흑오미자의 색도를 조사하기 위하여 추출액을 색차계로 a값, b값, L값을 측정하였는데 적색의 정도인 a값은 표 4.3.과 같다.

흑색에 가까운 색소는 추출액에서 대단히 진한 적색색소이었으며 추출조건에 따른 추출량은 높은 온도(80℃물중탕)의 추출이 낮은 온도(40℃물중탕)에서 장시간 추출하는 것보다 높았으며, 80℃물중탕에서 4시간 동안 추출한 결과 색소 물질이 충분히 추출되어 높은 a값을 나타내었고, 40℃물중탕에서는 7시간 이상 추출해야 색소물질이 충분히 추출되리라 생각되었다. 추출용매로는 20%에탄올 수용액이 물보다 색소 추출에 효과적이었다. 한국산 오미자와 중국산 오미자 건조시료는 추출온도의 차이보다는 추출시간이 길수록 a값이 증가하는 경향을 보여 추출량이 많은 것으로 나타나 80℃물중탕으로 5시간 추출보다 40℃ 7시간 추출량이 더 높은 a값을 나타내어 적합한 용매로 생각되었다. 이러한 결과는 건조시

료에서 건조중의 색소 물질의 변화 및 추출되는데 시간이 걸리는 것으로 생각되었다. 그리고 흑오미자 나무줄기의 건조시료는 흑오미자와 오미자의 a값보다 전체적으로 낮은 a값을 나타내었는데 육안으로 매우 묽은 적색임을 알 수 있었다.

표 4.3. 흑오미자와 오미자의 색도 (a 값)

추출온도	80℃						40℃	
추출시간	3시간		4시간		5시간		7시간	
시료 추출농도 (알콜%)	0	20	0	20	0	20	0	20
흑오미자(생시료)	47.57	67.62	65.97	70.05	60.81	68.62	60.07	63.44
오미자(건조시료)	26.75	27.53	28.63	27.65	27.97	29.34	32.48	35.70
중국산오미자(건조)	13.38	18.36	12.58	19.14	17.39	20.60	16.55	22.16
흑오미자줄기(건조)	3.44	11.02	5.52	10.65	7.18	12.06	0.22	2.53

줄기는 흑오미자와 비슷한 경향으로 높은 온도(80℃물중탕)에서 추출시간이 길수록 높은 a값을 나타내어 색소추출량이 많은 것으로 나타났으며 낮은 온도(40℃ 물중탕)추출에서는 a값이 적어 추출량이 적은 것으로 생각되었다. 추출용매로 20% 에탄올 수용액의 추출액이 높은 값을 나타내었다.

전체적으로 흑오미자 추출액의 a값은 한국산 오미자의 2배이상 높았고, 중국산 오미자는 한국산 오미자 추출액보다 a값이 낮아 추출액의 색소 함량이 적은 것으로 나타났으며, 흑오미자 나무줄기 추출액은 아주 a값이 낮아 색도가 낮은 적색을 나타내었다.

2) 흑오미자와 오미자의 황색도(b값)

흑오미자와 오미자 추출액은 농도가 묽어지면 적색이 엷어지면서 황색이 나타나는데 추출액의 황색도를 b값으로 나타내었는데 그 결과는 표 4.4.와 같다.

표 4.4. 흑오미자와 오미자의 색도 (b값)

추출온도 / 추출시간 / 시료 추출농도 (알콜%)	80℃						40℃	
	3시간		4시간		5시간		7시간	
	0	20	0	20	0	20	0	20
흑오미자(생시료)	30.26	56.64	58.92	41.04	68.41	56.14	34.68	50.87
오미자(건조)	32.33	32.69	31.83	32.90	31.87	48.04	22.46	19.02
중국산오미자(건조)	21.91	32.23	23.68	36.00	18.14	40.48	14.30	19.80
흑오미자줄기(건조)	40.91	55.08	47.59	55.90	53.40	59.62	35.19	54.24

흑오미자의 황색도를 나타내는 b값은 추출온도가 높은 (80℃, 물중탕)추출액에서 낮은 온도로 추출한 추출액보다 약간 높게 나타났는데 80℃에서 20%에탄올로 추출한 추출액은 매우 낮아서 40℃로 7시간 추출한 추출액보다 낮았다. 이러한 결과는 a값이 매우 높아 적색도가 강하여 상대적으로 황색도인 b값이 낮은 것으로 생각되었다. 그리고 5시간 물로 추출한 추출액이 b값이 매우 높았는데 a값이 낮아서 얻어진 결과로 생각되었다.

한국산 오미자와 중국산 오미자 추출액의 b값은 흑오미자와 비슷한 경향으로 높은 온도로 추출한 방법이 낮은 온도로 긴시간 추출한 추출액보다 높은 값을 나타내었고 높은 온도에서 5시간 추출한 방법이 더 높은 값을 나타냈다. 그리고 20%에탄올 용매로 추출한 방법이 물보다 추출액의 b값이 더 높은 경향을 보였다.

흑오미자 나무줄기의 추출액의 황색도인 b값도 흑오미자와 오미자 추출액의 b값과 같은 경향으로 높은 온도로 20%에탄올로 장시간 추출한 추출액의 b값이 높았다. 그리고 적색이 적어서 육안으로도 황색이 강하게 보였다.

전체적으로 황색색소 물질이 흑오미자와 흑오미자 나무줄기 추출액에 많이 함유되어 b값이 높은 것으로 생각되며 오미자와 중국산 오미자에는 소량 함유된 것으로 추측되었다.

4. 총폴리페놀 측정

1) 흑오미자와 오미자의 명도 (L 값)

흑오미자와 오미자, 흑오미자 줄기를 여러 가지 추출조건으로 추출한 추출액의 명도를 색차계의 L값으로 측정한 결과는 표 4.5.와 같다.

표 4.5. 흑오미자와 오미자의 명도(L값)

추출온도	80℃						40℃	
추출시간	3시간		4시간		5시간		7시간	
시료　추출농도 (알콜%)	0	20	0	20	0	20	0	20
흑오미자(생시료)	29.59	17.08	18.40	8.03	19.71	16.79	14.35	23.32
오미자(건조)	49.54	39.49	50.51	47.95	45.81	30.10	66.02	64.68
중국산오미자(건조)	71.58	65.08	68.19	45.13	63.85	50.35	76.92	69.66
흑오미자줄기(건조)	79.64	60.61	75.17	61.82	72.85	59.37	84.00	81.08

흑오미자 추출액의 L값(명도)은 80℃ 물중탕에서 4시간 추출액에서 특히 낮은 값을 나타낸 것을 제외하고는 높은 온도로 장시간 그리고 물보다는 20%에탄올

추출액의 값이 낮은 경향을 보였는데 이러한 결과는 즙액이 다량 추출된 추출액의 L값(명도)이 낮은 것으로 생각되는데 L값이 낮은 추출액의 수율이 높은 결과와도 일치하였다.

한국산 오미자와 중국산 오미자 추출액의 L값(명도)도 비슷한 결과로 높은 온도에서 20%에탄올 용매로 장시간 추출한 추출액에서 낮은 값을 나타내어 40℃로 7시간 추출액의 L값이 높았다. 그리고 흑오미자 나무줄기 추출액도 같은 경향이었으며 L값이 가장 높아 투명도가 높고 깨끗하게 보이는 추출액을 얻었으나 반대로 수율은 낮았다.

이러한 결과들로 추출액의 L값이 나타내는 명도로 추출조건을 추정해 보면 건조된 재료를 이용했을때는 높은 온도로 alcohol을 함유한 용매를 이용하여 장시간 추출하면 L값은 낮아지는 경향이었다.

2) 흑오미자와 오미자의 혼탁도 (OD 값)

4가지 재료에서 추출한 추출액의 색도(적색도)와 혼탁도를 추정하기 위하여 520nm에서 흡광도를 측정한 결과는 표 4.6.과 같다.

표 4.6. 흑오미자와 오미자의 혼탁도(OD)

추출온도	80℃						40℃	
추출시간	3시간		4시간		5시간		7시간	
시료　추출농도 (알콜%)	0	20	0	20	0	20	0	20
흑오미자(생시료)	1.71	4.54	4.52	7.52	3.90	4.60	4.52	2.70
오미자(건조)	1.26	1.19	1.32	1.34	1.43	1.81	0.93	0.94
중국산오미자(건조)	0.52	0.72	0.55	1.04	0.68	0.90	0.46	0.54
흑오미자줄기(건조)	0.26	0.52	0.36	0.57	0.43	0.66	0.19	0.25

흑오미자 추출액의 OD는 80℃물중탕으로 고온에서 20%에탄올 수용액으로 4시간 추출한 추출액이 매우 높고 3시간 동안 물로 추출한 추출액과 낮은 온도 7시간 추출한 20%에탄올 수용액에서 낮게 나타났는데 이 OD는 혼탁도와 색도를 동시에 반영된 수치로 추측되어 높은 경우는 적색이 진하고 혼탁도가 높은 상태이며 낮은 것은 적색도와 혼탁도가 낮은 것으로 나타났다. 추출용매는 20%에탄올 수용액이 물로 추출한 추출액보다 높았다. 그리고 한국산 오미자의 추출액이 더 높았는데 혼탁도 보다는 색도가 높은 결과로 생각되었다. 흑오미자 나무줄기의 OD는 모두 가장 낮았는데 전체적인 경향은 흑오미자와 오미자의 같은 결과를 나타냈다.

각 재료들 사이에는 흑오미자 추출물이 한국산 오미자 추출물보다 3배정도 높고 한국산 오미자는 중국산 보다 약 2배가 높았으며, 중국산 오미자는 흑오미자 줄기보다 약 2배가 높았는데 이러한 결과는 각 시료를 추출물의 적색도와 혼탁도에 일치되는 것으로 나타났다.

5. 물성측정

1) 흑오미자와 오미자의 pH

흑오미자와 오미자 그리고 흑오미자 나무줄기 추출물들의 신맛과 적색색소의 안정성에 영향을 미치는 pH를 측정하였는데 그 결과는 표 4.7과 같다.

흑오미자 추출물들의 pH는 3.39에서 3.62 범위로 나타났는데 높은 온도로 짧은 시간 추출한 추출물이 낮은 온도를 장시간 추출물보다도 낮은 값으로 높은 온도로 추출한 방법이 유기산들의 추출량이 많은 것으로 생각되며 20%에탄올 추출물보다도 물로 추출한 추출물이 더 낮아 pH에 영향을 주는 유기산들은 물로 더 많은 량이 추출되는 것으로 생각되었다. 한국산 오미자와 중국산 오미자 추출물의 pH도 같은 경향을 보여 40℃물중탕보다는 80℃물중탕에서 장시간 추출한 추출물의 pH가 낮아 유기산들은 역시 높은 온도로 장시간 물에 다량 추출되는 것

으로 나타났다. 흑오미자 나무줄기 추출물들은 물로 추출하였을때는 높은 온도로 장시간 추출한 추출물이 낮았으나 20%에탄올 수용액 추출물들은 모든 추출조건에서 비슷한 pH를 나타내었다. 이것은 나무줄기에는 pH에 영향을 주는 유기산의 함량이 적고 이들 추출조건으로 충분히 추출된 것으로 생각되었다.

표 4.7. 흑오미자와 오미자의 pH

추출온도	80℃						40℃	
추출시간	3시간		4시간		5시간		7시간	
시료 추출농도 (알콜%)	0	20	0	20	0	20	0	20
흑오미자(생시료)	3.42	3.62	3.41	3.48	3.39	3.57	3.45	3.57
오미자(건조)	3.32	3.49	3.26	3.44	3.13	3.46	3.26	3.41
중국산오미자(건조)	3.02	3.21	3.02	3.22	2.98	3.24	3.00	3.24
흑오미자줄기(건조)	5.36	5.63	5.32	5.54	5.29	5.56	5.49	5.55

각 재료들 추출물들의 pH는 중국산 오미자가 가장 낮아 유기산의 함량이 많아 신맛이 강한 것으로 나타났고 다음으로 한국산 오미자 그리고 흑오미자 추출물의 순으로 유기산의 함량은 흑오미자의 추출물이 적은양이 함유된 것으로 추측된다. 그리고 흑오미자 나무줄기는 이들 오미자 추출물보다 상당히 높은 pH를 나타내어 신맛도 적었다. 그리고 적색색소인 안토시아닌은 pH에 따라 여러 가지 색상을 나타내는데 이 등은 고구마 색소의 안정성에 관한 연구에서 pH 4.0 이하에서는 주로 적색을 나타내지만 그 이상에서는 엷은 자색이나 청색을 띤다고 하였고 윤 등은 유색이 안토시아닌 색소의 안정성에 관한 연구에서 pH 4.5 정도에서는 보라색을 띠며, pH 5.0 이상에서는 청색을 나타낸다고 하였는데 흑오미자와

오미자의 추출물들은 pH 3.6 이하로 안정한 적색을 나타내는 pH 범위이었으나 흑오미자 나무 줄기는 pH 5.3 이상으로 안정성이 낮을 것으로 생각되었다.

2) 흑오미자와 오미자의 당도

흑오미자 및 오미자 추출물들의 단맛에 영향을 줄수 있는 당도를 측정한 결과는 표 4.8.과 같다.

표 4.8. 흑오미자와 오미자의 당도 (%)

추출온도	80℃						40℃	
추출시간	3시간		4시간		5시간		7시간	
시료 추출농도 (알콜%)	0	20	0	20	0	20	0	20
흑오미자(생시료)	2.2	2.6	2.6	2.6	2.4	2.0	1.4	2.2
오미자(건조)	2.8	2.0	3.0	2.2	2.8	2.2	2.2	2.0
중국산오미자(건조)	1.6	2.0	1.8	2.0	2.2	2.0	1.6	2.0
흑오미자줄기(건조)	0.8	0.8	1.0	1.0	1.0	1.0	0.6	0.4

흑오미자 추출물의 당도는 높은 온도로 추출한 방법이 그리고 80℃물중탕에서는 4시간 추출물보다 높게 나타나 4시간 추출하면 당질들이 충분히 추출되지 않는 결과를 나타냈으며 추출용매는 20%에탄올 수용액 보다도 물로 추출한 방법이 적합한 방법으로 나타났다.

한국산 오미자와 중국산 오미자 추출물도 높은 온도에서 물로 추출하였을 때 높은 당도를 나타내었다. 그리고 흑오미자 나무 줄기는 당도가 낮은 수치를 나타내 당질이 적게 함유된 것으로 생각되었다.

재료들의 당도는 한국산 오미자가 가장 높게 나타났고, 흑오미자, 중국산 오미자, 흑오미자 나무줄기 순으로 한국산 오미자에 당질이 가장 많은 양이 함유된 것으로 나타났으나 흑오미자는 생시료이고 한국산 오미자는 건조시료이기 때문에 흑오미자의 당질함량이 한국산 오미자보다 적지 않을 것으로 생각된다.

오 등은 한국산 오미자의 당함량 2 3% 범위라고 하였는데 비슷한 결과를 나타냈으나 50%에탄올 추출물이 약간 더 많다고 하였는데 상이한 결과를 보였다. 또한 이 등도 오미자의 부위별 유리당 함량에 대한 연구 보고에서 과실에 약 3%정도 함유된 것으로 보고하여 본 연구와 비슷한 결과를 나타냈다.

6. 추출물의 기호성 영향인자들의 변화조사

1) 흑오미자 추출액의 적색도 (a값)의 변화

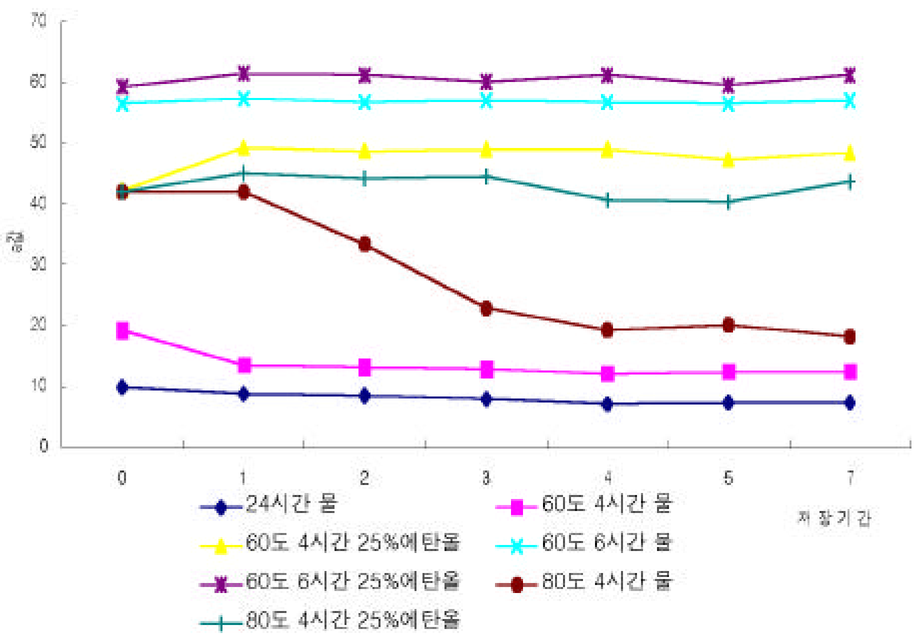


그림 4.1. 흑오미자로부터 추출조건에 따른 추출물의 적색도 (a값)의 변화

우리 나라에서는 전통적으로 오미자의 색소를 추출하여 식용 색소로 이용하여 왔다. 이러한 오미자와 비슷한 흑오미자도 색소를 이용하는 음료로 개발될 수 있는 가능성이 많으며 흑오미자 음료는 빨간 빛깔이 기호성과 상품성에 중요한 영향을 미치는 인자로 판단되어 용매, 온도, 시간을 달리하여 추출한 후 냉장저장하면서 색차계로 Hunter값인 a값(적색도)의 변화를 측정한 결과는 그림 4.1.과 같다.

추출조건에 따른 추출함량은 1차년도 원료에서 추출한 조건인 80℃에서 4시간 하였는데 이러한 조건 보다는 60℃에서 6시간 추출하는 것이 높았으며 동일 온도에서 같은 시간 추출할 경우는 25% 에탄올 수용액을 사용하는 것이 조금 높은 결과를 나타내었다. 그리고 물로 추출할 경우 60℃에서 4시간보다는 80℃에서 4시간 추출조건이 좋은 결과를 보였으며 25%에탄올 수용액으로 추출할 경우는 비슷한 결과를 나타냈다. 그리고 대조구로 실온(17 19℃)에서 24시간 추출한 시료에 비하여 가장 높은 추출량을 나타낸 60℃ 6시간 에탄올(25%) 추출액은 6배 이상의 적색도(a값)를 보였으며 같은 조건에서 물로 추출한 경우도 비슷한 결과를 보였고 7주 동안 저장 기간 중 변화가 거의 없어 안정한 상태의 조건으로 생각되었다. 그리고 80℃에서 4시간 물로 추출한 추출액의 a값은 저장하는 동안 a값이 저하되었고 80℃ 4시간 에탄올 추출물도 a값의 감소를 보여 추출온도가 높으면 저장 중 적색도가 낮아지는 것으로 나타났다. 추출 용매와 온도, 시간을 변화 요소로 하였는데 이것은 추출정도 뿐만 아니라 저장 중 안정성에 미치는 영향인자로서 관찰할 수 있을 것으로 생각되었다.

2) 흑오미자 추출액의 황색도 (b값)의 변화

전년도 실험 결과로 흑오미자와 오미자의 추출액은 농도가 묽어지면 투명도가 증가하고 적색이 엷어지면서 황색이 나타나는 것을 관찰하였다. 그래서 흑오미자 추출액을 냉장 저장하면서 황색도를 나타내는 Hunter값 조사한 결과를 그림 4.2.에서 나타내었다.

흑오미자 추출액의 b값(황색도)은 60℃에서 4시간 동안 물로 추출한 추출액이 높았으나 60℃ 4시간 25% 에탄올 추출액이 가장 높게 증가되어 일정한 값을 나타내었고 60℃ 6시간 물로 추출한 추출액이 다음으로 증가되어 저장 4주 후에 감소되었다가 다시 약간 증가되어 비슷한 값을 보였으며 80℃ 4시간 물로 추출한 추출액이 가장 낮고 약간 감소하는 경향을 보였다. 그리고 대조구로 사용한 실온에서 24시간 물로 추출한 시료는 오히려 상당히 높은 값을 나타내었다. 추출액 대부분 1주 후 증가를 보인 것은 즙액의 침전 현상으로 투명도가 증가되어 나타난 결과로 생각된다.

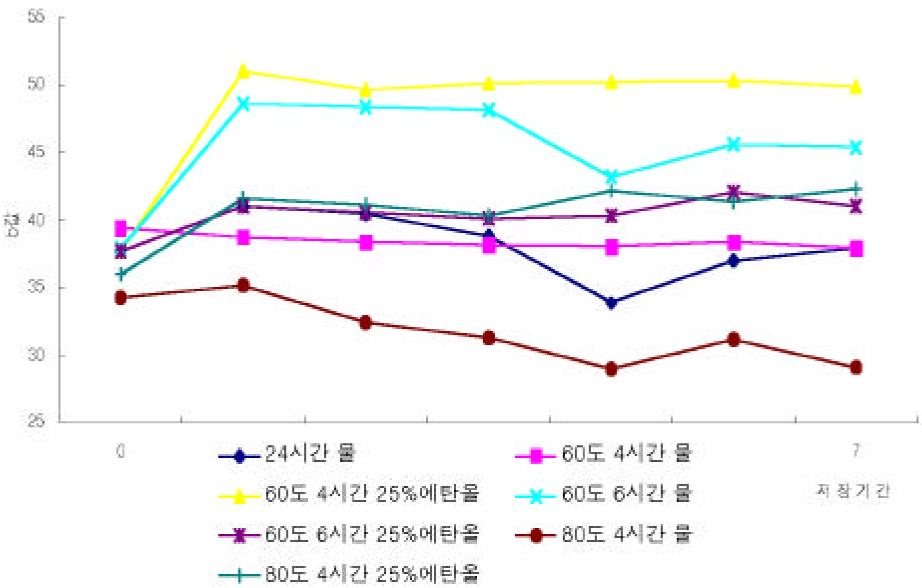


그림 4.2. 흑오미자로부터 추출조건에 의한 추출물의 황색도 (b값)의 변화

농도가 묽어져 투명도가 증가하거나 적색도가 낮아지면 b값은 증가되는 경향을 보였다. 특히 80℃ 4시간 물로 추출한 추출액, 60℃ 4시간, 60℃ 6시간 그리고 대조구 등 물로 추출한 추출액은 저장 4주째 감소를 나타내었는데 이러한 결과는 a값인 적색도의 증감 및 투명도 (L값)와 밀접한 관계가 있으며 또한 복합적인 관계에 따라 증감되는 것으로 생각된다.

3) 흑오미자 추출액의 명도 (L값)의 저장중 변화

흑오미자 추출액의 투명도를 조사하기 위하여 각각 추출 조건별로 추출한 추출액을 냉장 저장하면서 L값을 측정한 결과는 그림 4.3.과 같다. 그림 4.3.에서 볼 수 있듯이 명도인 L값이 가장 높은 시료는 실온에서 24시간 추출한 대조구이었는데 이러한 결과는 대조구의 추출액이 농도가 낮고 특히 적색도가 적은 값이기 때문인 것으로 생각되었다. 다음으로 투명도가 높은 추출액은 60℃ 4시간 물로 추출한 추출액이었다. 그리고 60℃ 6시간 에탄올로 추출한 추출액과 80℃ 4시간 에탄올로 추출된 추출액의 L값이 낮았는데 이러한 결과는 추출액의 적색도의 농도와 밀접한 관계를 갖는 것으로 나타났다. 이 명도인 L값의 저장 중 변화는 80℃ 4시간 에탄올 추출물 외에는 저장 4주 후 큰 감소를 나타내었는데 이것은 냉장 4주 후에 침전의 생성이 많아지는 것으로 생각되며 특히 추출용매로 물을 사용하는 경우에 이러한 현상이 현저하게 나타나는 것을 알 수 있다. 그러다 다시 투명도가 거의 원래의 정도로 되돌아가는 것으로 나타나 추출액을 4주정도 냉장하여 침전을 생성시켜 제거 후 제품화하면 투명도가 높은 제품을 얻을 수 있을 것으로 생각된다.

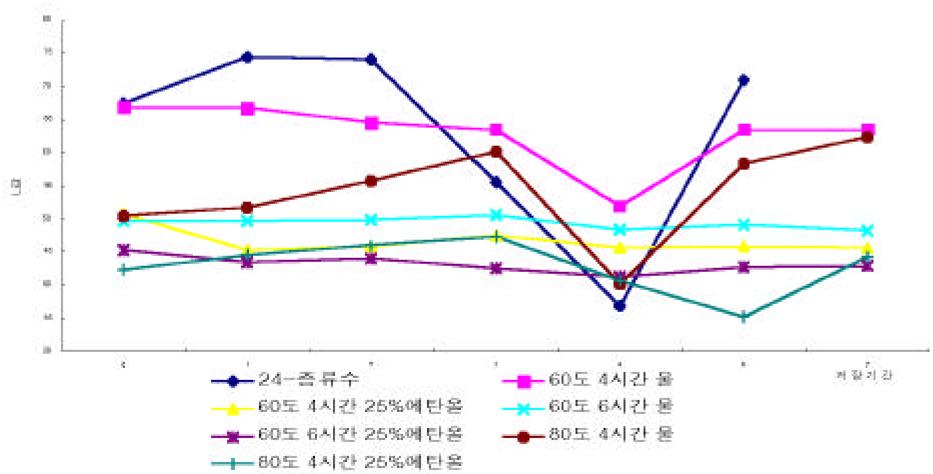


그림 4.3. 흑오미자로부터 추출조건에 따른 추출액의 명도(L값)의 변화

4) 흑오미자 추출액의 혼탁도 변화

각 실험 조건별로 추출한 흑오미자 추출액의 혼탁도를 측정하고 색도 특히 적색도와의 상관 관계를 추적할 수 있는 자료를 얻기 위하여 냉장 저장중의 520 nm에서 흡광도의 변화를 측정한 결과는 그림 4.4.와 같다.

흑오미자의 추출액의 흡광도(OD) 중 60℃ 6시간 25% 에탄올 수용액 추출조건의 흡광도가 가장 높았고, 60℃ 6시간 물 추출액이 다음으로 높았으며 낮은 흡광도를 나타내는 추출조건은 실온으로 24시간 추출한 대조구와 60℃ 4시간 물로 추출한 추출액이었다. 높은 흡광도를 나타내는 2가지 추출 조건의 추출액은 혼탁도 보다는 높은 적색도에 의한 것으로 판단되며 낮은 흡광도를 나타내는 현상도 비슷한 영향으로 생각되었다. 그리고 흡광도의 변화 과정에서 저장 4주째 거의 모든 추출조건 특히 물로 추출한 추출액이 상승하였는데 이러한 원인은 혼탁도의 증가로 추정된다. 대조구는 저장 3주째 많은 상승을 보여 혼탁현상이 빨리 나타나는 결과를 보였다. 이러한 결과는 명도와 적색도의 변화와 밀접한 영향을 갖는 것으로 나타났다. 그래서 적색 색소의 추출조건과 혼탁도와의 분리를 위해서 좀 더 실험이 이루어야 될 것으로 생각된다.

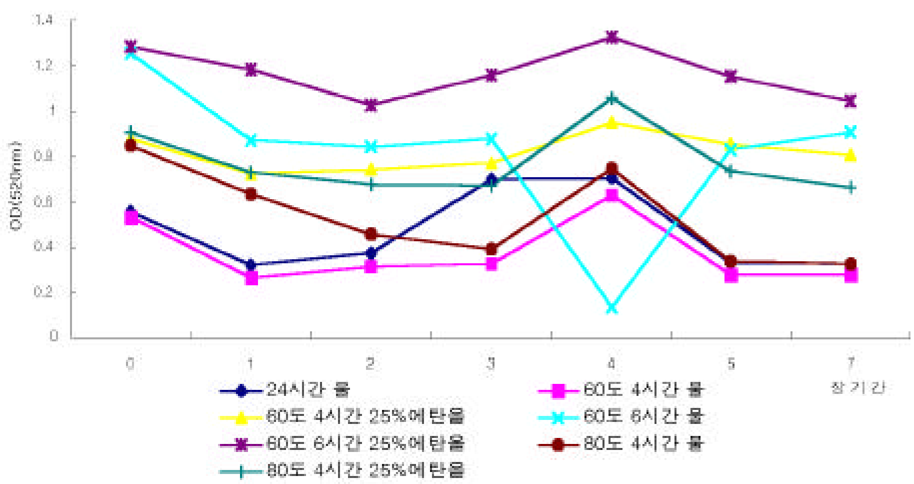


그림 4.4. 흑오미자로부터 추출조건에 따른 추출물의 흡광도 (OD)의 변화

5) **흑오미자 추출액의 총 폴리페놀(total polyphenol)의 변화**

폴리페놀(polyphenol)화합물은 식물체내에 널리 분포하여 지방이 많은 종자, 줄기, 잎 등에 모두 존재한다. 이 화합물은 식물체내 2차대사 산물의 가장 독특한 물질군중의 하나로 유리형 뿐만 아니라 다양한 결합형태로 존재하여 식품의 색과 향을 나타내고 음료의 수렴성을 갖는 쓴맛과 떫은 맛 성분으로서 가공제품의 저장기간과 안정성의 연장이나 단축에도 큰 영향을 준다. 그리고 최근에는 항산화 작용 및 약리작용도 밝혀지고 있다. 그래서 흑오미자 추출액의 어두운 흑갈색으로 변색과 쓴맛과 떫은맛으로 맛의 변화를 일으킬 수 있는 중요한 요소인자로 판단되어 냉장 저장 중 변화량을 조사한 결과는 그림 4.5.와 같다.

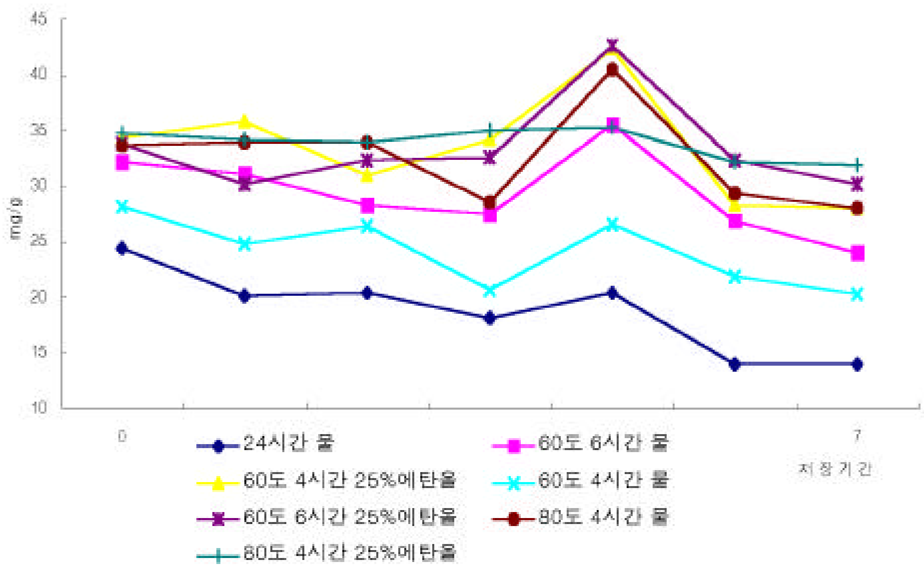


그림 4.5. 흑오미자 추출조건에 따른 추출액의 총 폴리페놀 함량의 변화

흑오미자 즙액의 추출조건별로는 실온에서 24시간 추출한 대조구와 60℃ 4시간 물로 추출한 추출액을 제외하고는 비슷하게 추출되었으며 물을 사용한 추출액보다는 25% 에탄올 수용액의 추출액에서 약간 높게 나타났다. 저장 중 변화는 저장 4주 후에 추출액 모두 값의 상승을 나타내었는데 이러한 현상은 4주 후에 혼

탁현상에 의한 흡광도의 증가로 판단되었고 전체적으로 모든 추출액에서 감소하는 현상을 나타내어 추출액의 색깔이 갈변화 되는 것을 예측할 수 있으며 떫은 맛이 증가될 수 있는 가능성을 보였다. 그리고 25% 에탄올 수용액 추출액이 물의 추출액보다 감소가 적게 나타났는데 에탄올이 산화효소의 억제나 산화반응을 억제하는데 기인하는 것으로 생각되었다. 그래서 장기간 유통으로 저장기간이 많이 필요한 제품은 폴리페놀의 산화로 일어나는 변색과 맛의 변화를 억제하기 위하여 항산화제를 첨가한 저장 중 연구가 필요할 것으로 생각된다.

6) 흑오미자 추출물의 pH 변화

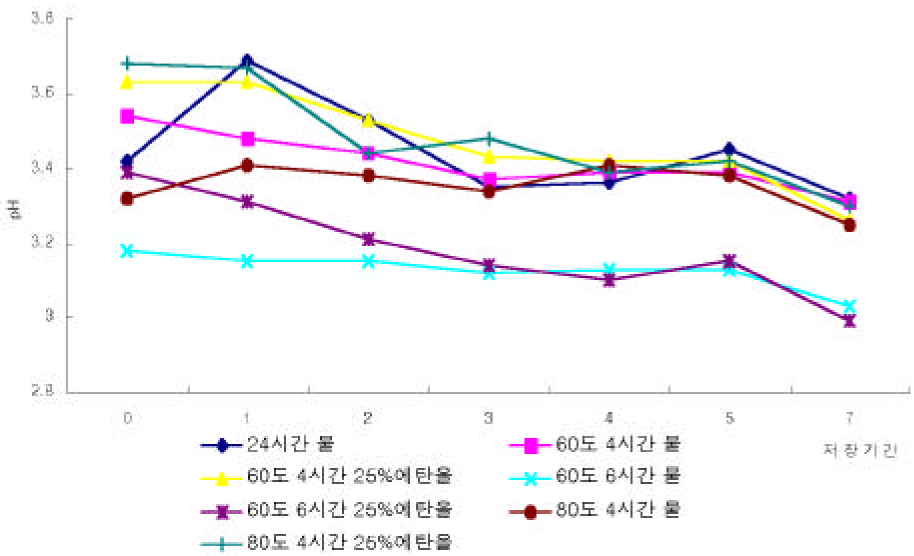


그림 4.6. 흑오미자로부터 추출조건에 따른 추출물의 pH의 변화

흑오미자 추출물의 pH는 추출액의 맛에 중요한 요소인 신맛뿐만 아니라 색소인 적색색소의 안정성에도 중요한 영향을 미치는 인자로 작용한다. 그래서 추출액의 냉장 저장중의 pH 변화를 측정한 결과는 그림 4.6.과 같다.

추출조건에 의한 흑오미자 추출액의 pH는 3.68에서 2.99사이를 나타내었는데 6

0℃ 6시간 25% 에탄올 수용액 추출액과 같은 조건의 물로 추출한 추출액이 낮았으며 나머지 조건으로 추출한 추출액의 pH 3.6에서 3.3사이의 비슷한 결과를 나타내었다. 특히 실온에서 24시간 추출한 대조구의 pH도 낮게 나타내었다. 이러한 결과는 추출온도나 추출용매 보다는 추출시간이 추출액의 pH값에 큰 영향을 미치는 것으로 판단된다. 그래서 실온에서 물로 추출한 대조구 마저도 추출시간이 길면 비슷한 pH값을 보이는 결과를 알 수 있었다. 그리고 추출액의 냉장 저장 중 pH는 적게 감소되는 것으로 나타나 신맛의 변화나 색소의 안정성을 저하시키지 않는 결과를 보였다. 흑오미자 추출액의 주요 색소인 적색 색소는 안토시아닌 계열 화합물로서 pH에 따라 변색되는데 pH 4.0이하에서는 안정성 있는 적색을 나타내는 것으로 알려져 있는데 이러한 연구에 의하면 추출액이 저장기간 중 변색되는 경우는 거의 없을 것으로 생각된다.

7) 흑오미자 추출액의 산도변화

오미자뿐 만 아니라 흑오미자의 가장 강렬하고 독특한 맛은 산뜻한 신맛으로 이들을 원료로 한 차와 음료의 대표적인 맛의 성분이 되고 있으며 몇 가지 구성 유기산들의 분석자료에 의해서도 검증되어 왔다. 그래서 흑오미자 추출액의 냉장 저장 중 신맛 변화의 자료로서 0.1N-NaOH를 이용한 적정산도를 측정하여 가장 다량 함유된 것으로 알려진 구연산 함량으로 표시한 결과는 그림 4.7.과 같다.

여러 가지 추출조건 중 60℃ 6시간 물과 25%에탄올 수용액으로 추출한 추출액의 산도가 가장 높아 많은 유기산이 추출되는 것으로 나타났고 에탄올 수용액에 의한 추출이 물에 의한 추출방법보다 소량 높게 나타났다. 그리고 실온으로 24시간 추출한 대조구와 80℃ 4시간 물로 추출한 추출액이 높게 나타나 물로서 장시간 추출하면 유기산은 충분히 추출되는 결과를 보였는데 이것은 pH의 변화를 조사한 결과와도 같은 경향을 나타내었다.

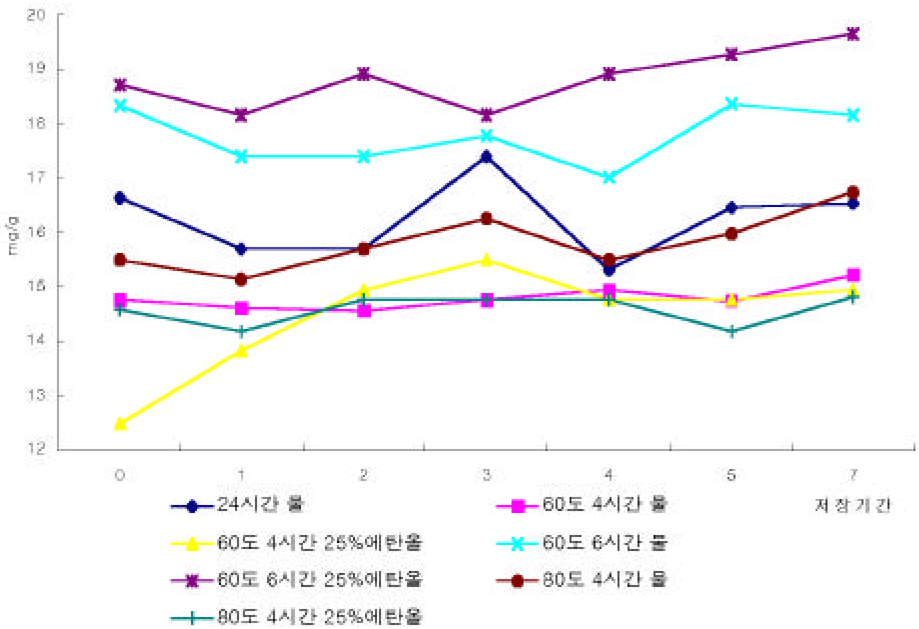


그림 4.7. 흑오미자로부터 추출조건에 따른 추출물의 산도변화

저장 중 적정산도에 의한 유기산함량은 약간 증가되는 현상으로 저장하는 동안 유기산의 감소나 소실은 일어나지 않는 결과를 나타내어 신맛의 감소나 색소의 변화가 일어나는 염려는 없는 것으로 생각되었다.

8) 흑오미자 추출액의 당도 변화

흑오미자 추출액의 강한 신맛 때문에 실제 미각적으로 단맛을 느끼는 것은 쉽지 않으나 맛성분에 중요한 요소의 하나인 단맛을 추출액의 냉장저장 중 당도 변화를 굴절 당도계로 측정한 결과는 그림 4.8.과 같다.

이 실험에서는 에탄올이 굴절률에 영향을 미치기 때문에 에탄올이 함유된 추출액은 당도가 아주 높게 측정되므로 에탄올을 감압 회전 농축기로 완전히 제거한 다음 같은 량의 증류수를 첨가하여 같은 농도로 조절후 당도를 측정하였다.

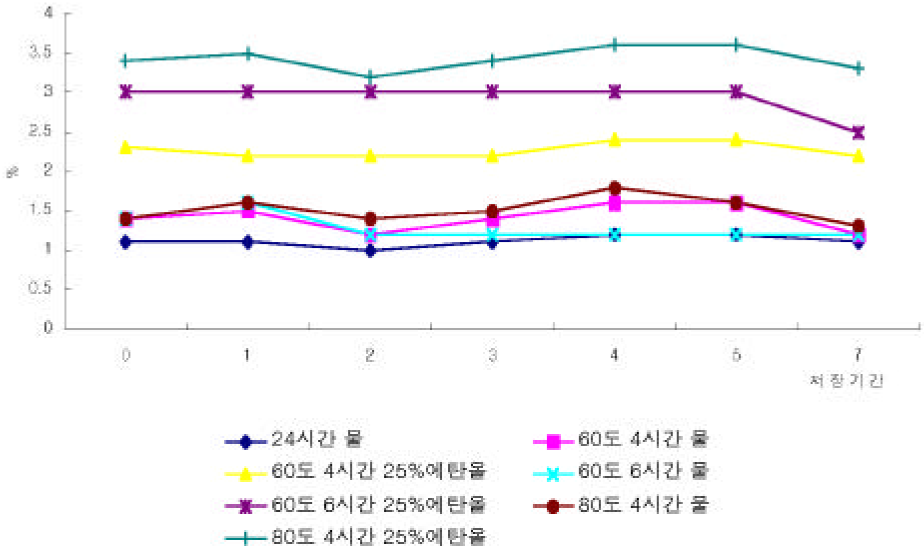


그림 4.8. 흑오미자로부터 추출조건에 따른 추출물의 당도의 변화

추출조건 중 80℃ 4시간 25% 에탄올 수용액 추출과 60℃ 6시간 에탄올 수용액 추출액이 높아 에탄올 수용액으로 추출한 방법이 당도가 높게 나타났고 물로 추출한 추출액은 모두 낮은 당도를 나타내었다. 25% 에탄올 수용액의 추출액은 당도 2.2에서 3.6사이를 나타내었고 물을 이용한 추출액은 당도 1.0 1.8사이를 나타내었는데 한국산 오미자의 당도가 2 3% 범위라는 보고와 비슷한 결과였다. 그리고 저장중의 변화는 거의 없는 것으로 나타나 냉장 저장하는 동안 발효나 변패는 없는 것으로 추정되며 음료 제조시 당을 첨가하여 조미할 경우에도 음료의 변패 원인이 되지는 않을 것으로 생각되었다.

7. 천연즙액제품의 상품성 영향인자들의 저장중 변화

1) 천연 음료 제품의 저장중 적색도(a값)

흑오미자와 비슷한 생오미자 그리고 건조오미자를 실험재료로 하여 추출, 여과 포장 살균하고 천연음료 제품을 제조하여 냉장유통을 기본으로 한 유통기간

에 따른 여러가지 기호성과 상품성의 변화를 비교 조사하고자 하여 각 시료들의 추출 조건부터 저장까지 영향을 3개월이상 측정하였는데 적색도인 a값의 변화는 표 4.9.와 같다.

표 4.9. 흑오미자와 오미자 및 건조오미자 음료제품의 저장중 a값의 변화

시료 \ 저장기간	추출조건	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	13	14	20	21
흑오미자 80℃	에탄올	52.6	51.6	52.0	51.4	51.8	51.6	53.1	51.8	50.9	51.2	51.8	51.5		
	물	49.3	48.2	49.0	48.5	49.3	48.4	50.2	48.7	48.8	48.6	48.8	48.3		
흑오미자 60℃	에탄올	46.1	45.4	45.7	45.6	46.3	45.6	48.4	45.7	46.2	45.8	46.5	46.4	45.6	46.8
	물	42.0	40.5	40.9	40.8	41.3	40.9	42.9	40.3	41.3	41.0	41.8	41.5	40.9	41.8
오미자 80℃	에탄올	40.2	39.8	39.4	39.3	39.3	39.6	40.2	39.4	40.1	39.4	39.2	39.2	38.9	40.9
	물	36.3	35.8	35.4	34.9	36.3	35.8	37.0	35.7	35.7	35.1	34.3	35.0	34.9	33.4
오미자 60℃	에탄올	41.8	41.4	41.3	41.2	41.8	41.8	42.5	41.6	42.0	41.6	41.7	41.2	42.9	42.8
	물	43.5	43.1	43.2	42.7	43.2	43.4	44.4	43.5	43.5	43.1	43.4	43.2	41.0	45.2
건조오미자 60℃	에탄올	11.8	11.8	11.9	11.9	7.0	8.2	8.7	7.8	8.2	7.9	8.3	8.2	6.1	5.9
	물	12.2	12.0	12.1	12.0	6.8	7.8	8.3	7.8	7.9	7.8	8.0	7.6	5.7	5.5

먼저 비슷한 재료들을 현재 이용하고 있는 상태를 비교하고, 추출온도, 용매별로 하였는데 추출온도는 앞의 실험에서 흑오미자 원료에만 적용하였으나, 오미자와 건조된 오미자 추출조건으로 적용이 필요하다고 생각되어 60℃와 80℃를 조사하였고 추출용매는 물과 제품으로 제조과정에서 희석되어 1%미만의 함량만 남아 있도록 에탄올 3%를 사용하였다.

적색도의 기준이 되는 a값은 오미자 음료의 기호성과 상품성에 영향을 주는 요소일 뿐만 아니라 제품의 제조후 저장 과정에서 상품의 가치를 평가하는 척도가 될 수 있을 정도로 중요한 영향인자로 작용한다. 원료의 종류별로는 흑오미자에서 적색색소가 다량 추출되었으며 생오미자에서도 적색색소가 흑오미자보다는

적지만 다량 추출되었는데 건조오미자는 1/4 1/5 정도의 색소만 추출되어 건조된 원료는 즙액제품의 가공 원료로는 재고되어야 할 상태인 것으로 판단되었다. 추출온도는 동일시간 4시간 추출할 경우 흑오미자는 80℃가 60℃보다 색소가 다량 추출된 것으로 나타났고, 오미자는 거의 차이가 없고 오히려 60℃가 약간 많아 낮은 온도로 추출한 제품의 상품성에 영향이 적다면 60℃추출이 상품성과 경제성에 더 적합한 추출온도로 생각되며 3%에탄올 첨가는 흑오미자 음료 제조에서 적용할 수 있는 방법으로 판단되었다. 그리고 저장성의 영향으로 21주간 냉장저장중 a값(색도)의 변화는 건조오미자 추출물 제품에서 감소가 있었고 다른 원료의 제품에서는 거의 없는 것으로 나타났다. 이러한 결과로 추출온도는 60℃이상이면 적당하고 추출용매는 물이나 3%에탄올 모두 사용할 수 있고 냉장저장하면 약 20주(5개월)까지 거의 변화가 없이 저장 유통할 수 있는 결과를 나타내었다. 건조한 원료를 이용하고 추출하는 것은 수율뿐만 아니라 색소의 추출량도 대단히 낮아 적합하지 못한 형태로 판단되었다.

2) 항산화제 첨가 음료 제품의 저장중 적색도(a값)

천연 음료제품의 기호성 및 상품성 영향 인자들의 산화적 변화를 방지하고 산화에 대한 영향이 적도록 특히 변색, 퇴색등을 방지하고 산화로 맛과 향기 성분의 파괴를 방지하는데 도움이 될 수 있도록 수용성 항산화제 erythorbic acid (iso ascorbic acid)를 0.025% 농도가 되도록 첨가하였는데 이 항산화제는 빛에 약하고 금속 ion으로 산화 분해 되므로 빛을 차단한 밀봉 포장용기 제품에서 이용되어야 하며 사용 기준량은 과일의 갈변방지나, 합성주의 혼탁과 풍미저하의 방지를 위해서 사용되는 첨가량으로 결정하였다. 항산화제를 첨가한 제품들의 저장중 a값의 변화를 조사한 결과는 표 4.10.과 같다.

표 4.10. 흑오미자와 오미자 및 건조오미자 음료 항산화제 첨가제품의 저장중 a값의 변화

시료 추출조건	저장기간	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	13	14	20
흑오미자 80℃	에탄올	50.9	50.8	51.2	51.7	51.8	50.9	51.0	52.7	53.9	50.8	51.2	50.1	
	물	47.2	47.4	47.4	48.0	48.0	46.6	46.2	47.7	48.4	45.9	46.1	45.8	
흑오미자 60℃	에탄올	44.9	44.3	45.0	43.8	44.5	43.8	43.0	45.0	45.3	43.5	44.1	42.7	38.8
	물	38.3	37.3	37.6	37.8	37.8	36.9	36.7	38.2	38.0	36.3	36.2	35.4	35.4
오미자 80℃	에탄올	36.2	36.2	36.4	36.5	36.6	35.5	35.0	36.6	37.2	35.2	32.6	34.5	35.2
	물	32.3	32.8	32.6	32.8	32.8	31.0	31.7	32.0	31.8	32.0	30.8	30.8	27.5
오미자 60℃	에탄올	40.2	38.0	38.3	38.9	38.6	38.5	37.8	37.4	39.4	38.2	32.9	37.5	37.8
	물	42.6	40.5	40.4	40.6	39.2	40.5	39.9	40.0	41.2	39.5	39.4	39.0	39.4
건조오미자 60℃	에탄올	11.8	10.0	9.8	10.5	6.8	6.6	5.8	6.8	5.8	5.8	6.2	5.7	6.4
	물	11.4	10.1	10.0	10.0	6.2	6.5	5.9	6.2	6.0	5.9	5.8	5.6	5.6

항산화제를 첨가한 즙액들의 a값이 항산화제를 첨가하지 않은 즙액의 a값이 2 5정도 감소한 것으로 나타났고 저장중에 a값의 변화는 없는 것으로 보였다. 건조된 오미자로부터 추출한 즙액은 색소의 추출량이 적어 a값이 아주 낮고 냉장 저장을 하여도 감소율이 상당히 높았다. 이러한 결과는 항산화제를 첨가하지 않은 시료들의 a값의 변화도 비슷한 결과를 나타내어 산화에 의한 감소로는 생각되지 않았다. 제품의 저장중 알루미늄 팩에 포장한 흑오미자 및 오미자 음료제품을 냉암소에 저장, 유통할 경우 20주(약 5개월)까지는 저장중 적색의 변색이나 퇴색은 나타나지 않았다.

이러한 결과로 낮은 pH로 일정한 산도 이상의 농도로 유기산이 존재하면 흑오미자와 오미자에서 추출된 적색색소는 냉암소에서 산화작용에 의해서 변색, 퇴색되지 않는 것으로 나타났다.

3) 천연 음료 제품의 저장중 황색도(b값)

흑오미자와 비슷한 오미자 그리고 건조시킨 오미자를 원료에서부터 즙액을 추출하고 여과 포장하여 살균후 냉장 저장중 황색도 b값의 변화를 매주 측정한 값은 표 4.11.과 같다.

흑오미자와 오미자 음료의 황색은 대단히 묽은 농도에서 적색이 낮을 때 주황색으로 되면서 육안으로 느낄 수 있으나 보통의 적색 빛깔의 즙액에서는 육안으로 느끼기 어려운 색소이다.

황색도로 표시되는 b값은 80℃로 즙액을 추출한 경우는 흑오미자와 오미자가 비슷한 값으로 나타났고 60℃로 추출한 경우는 흑오미자보다 오미자가 더 높은 값으로 오미자에 더 많은 량이 함유된 것으로 나타났으며 3%에탄올보다 물로 추출할 경우에 더 높은 값을 보였다. 역시 건조된 원료를 사용할 경우 황색을 나타내는 b값도 적어서 적색(a값)과 비슷한 결과를 나타내었다. 건조된 오미자를 제외하고 흑오미자는 b값이 3 4정도 소량 증가하였고 오미자는 b값이 10이상 증가한 결과를 나타내었는데 이러한 결과는 황색색소의 증가라기 보다는 적색도가 약간 감소되면서 황색이 잘 나타나 b값이 증가된 것으로 생각되었다. 그래서 b값이 높았던 오미자 즙액에서 증가폭이 약간 높은 것으로 나타났다. 건조된 오미자 원료에서는 황색 색소의 b값이 역시 적었고 저장중 소량씩 감소되는 것으로 나타났다. 종합적인 결과로 b값과 a값 및 L값은 상호 복합적인 관계를 가지고 서로 영향을 주면서 증가와 감소를 나타내는 것으로 생각되었다.

표 4.11. 흑오미자와 오미자 및 건조오미자 음료 제품의 저장중 b값의 변화

시료 추출조건 \ 저장기간		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	13	14	20	21
흑오미자 80℃	에탄올	40.7	41.2	41.3	41.9	41.7	41.8	42.8	42.4	41.6	42.6	43.0	44.2		
	물	37.7	38.0	38.2	38.8	38.8	38.4	38.6	38.9	39.2	39.3	39.3	39.7		
흑오미자 60℃	에탄올	30.6	30.7	30.8	31.2	31.1	31.0	31.3	31.4	31.6	31.5	31.1	31.5	31.4	33.0
	물	29.8	29.7	29.9	30.3	30.3	30.3	30.4	29.3	30.7	30.7	30.5	30.8	30.8	32.2
오미자 80℃	에탄올	40.7	41.0	41.7	42.3	42.9	42.7	43.4	44.0	43.0	44.4	47.0	47.3	48.2	52.4
	물	30.6	30.6	30.6	30.8	31.6	31.1	31.6	31.9	32.5	32.6	32.0	33.8	34.8	39.3
오미자 60℃	에탄올	37.8	38.8	39.6	39.4	39.5	39.4	39.5	39.9	40.7	40.3	40.5	41.5	46.5	51.9
	물	42.2	43.4	43.4	44.0	44.1	44.5	44.1	44.0	44.7	44.9	44.9	45.1	45.0	56.5
건조오미자 60℃	에탄올	10.3	10.9	10.9	11.2	6.7	7.6	7.5	7.5	9.4	7.7	8.0	8.1	6.7	6.8
	물	9.9	10.4	10.4	10.7	6.4	7.2	7.4	7.3	9.5	7.6	7.6	6.7	6.4	6.3

4) 항산화제 첨가 음료 제품의 저장중 황색도 (b값)

동일 종류의 원료에 동일한 방법으로 추출, 여과하고 항산화제 erythorbic acid(iso ascorbic acid)를 첨가하여 포장, 살균한 제품을 냉장저장하면서 b값의 영향을 조사한 결과는 표 4.12.와 같다.

흑오미자와 오미자 모두 거의 변화가 없었는데 항산화제를 첨가하지 않은 제품보다 저장기간 동안 일정한 값을 나타내어 증감의 폭이 적었다. 그리고, 건조된 오미자 원료의 추출 음료제품에서 항산화제를 첨가 않은 제품보다 적은 값을 보였고 저장중 감소율도 적은 결과를 나타내었다. 이러한 결과는 적색도를 나타내는 a값의 결과와 비슷하며 erythorbic acid 자체가 a, b값에 영향을 주는 것인지 아니면 적색물질이나 황색물질의 항산화제에 대한 영향을 좀 더 깊이 연구할 필요가 있는 것으로 생각되었다.

표 4.12. 흑오미자와 오미자 및 건조오미자 음료 항산화제 첨가제품의 저장중 b값의 변화

시료	추출조건 \ 저장기간	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	13	14	20
흑오미자 80℃	에탄올	39.3	38.8	40.4	41.0	42.0	40.2	42.1	42.6	42.4	42.1	42.2	41.9	
	물	37.0	37.2	37.8	38.5	38.9	36.2	36.8	37.2	38.3	38.5	37.6		
흑오미자 60℃	에탄올	30.4	29.5	28.5	29.4	29.8	29.1	29.5	29.8	29.3	29.2	28.9	28.8	30.1
	물	30.3	30.0	30.4	30.6	30.7	30.4	31.0	31.1	30.3	30.7	30.1	30.4	30.0
오미자 80℃	에탄올	38.1	34.6	36.0	35.8	35.8	36.9	39.0	39.6	37.1	36.4	33.4	38.2	37.8
	물	29.0	27.9	28.6	28.9	28.4	29.3	30.3	30.2	31.0	28.6	30.7	30.0	29.0
오미자 60℃	에탄올	30.0	31.0	32.2	32.7	32.2	32.0	32.7	32.5	32.4	32.5	32.2	31.6	31.4
	물	35.0	36.5	37.0	36.6	36.2	36.3	36.6	36.2	35.8	35.4	34.6	35.7	34.6
건조오미자 60℃	에탄올	9.6	9.4	9.8	10.2	7.2	6.4	7.2	7.4	7.3	6.9	7.4	7.1	7.6
	물	9.4	9.7	9.6	10.1	6.9	6.5	6.9	7.3	7.0	7.2	7.5	7.6	7.6

5) 천연음료 제품의 명도(L값)

용액 또는 즙액의 L값(명도)은 용액이나 즙액의 색소의 농도와 투명도 2가지 요소의 영향을 동시에 조사할 수 있는 척도가 된다. 흑오미자와 오미자 및 건조오미자 음료의 L값은 적색도와 동시에 혼탁도의 영향을 받는다. 그래서 이 L값의 변화를 측정하여 a값(적색도)과 혼탁도의 복합적인 관계를 이해하고자 하였는데 원료의 종류와 추출온도에 따른 L값은 흑오미자를 80℃로 4시간 추출한 음료제품, 흑오미자 60℃로 4시간 추출한 제품, 오미자를 80℃와 60℃로 추출한 제품 건조한 오미자를 60℃로 4시간 추출한 제품의 순서대로 L값이 높아지는데 이러한 결과는 a값이 나타내는 적색도의 영향을 크게 받아 반대 경향을 나타내고 있으며 전체적으로 3%에탄올 추출물보다는 물로 추출한 제품이 L값이 더 높아 명도가 높은 것으로 나타났다.

명도가 높을수록 투명하고 깨끗한 제품으로 투명도의 상품성은 좋으나 적색도가 낮은 영향은 상품성에 좋지 않은 영향이 될 수 있다. 저장 기간중 건조오미자 추출 제품을 제외하고는 모든 실험 재료에서 소량 감소하였는데 이러한 결과를 나타내는 원인을 앞에서 언급한 2가지로 유출이 가능한데 적색도의 증가나 또는 혼탁도의 증가가 되는데 표 4.9의 적색도인 a값의 변화를 보면 적색도의 증가로 판단되며 혼탁도의 증가에 의한 영향은 아닌 것으로 생각되었다. 그리고 명도인 L값이 오히려 높아진 건조오미자 음료 제품도 a값이 약간 감소하고 있는데 이러한 결과는 합리적인 상호관계를 나타내고 있다(표 4.13).

표 4.13.흑오미자와 오미자 및 건조오미자 음료 제품의 저장중 L값의 변화

시료 (저장기간)	추출조건	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	13	14	20	21
흑오미자 80℃	에탄올	43.3	43.8	43.4	43.3	42.2	43.3	42.8	42.7	40.8	42.4	41.7	41.2		
	물	45.3	45.4	45.3	45.4	44.9	45.4	45.2	45.2	44.5	44.8	44.2	43.9		
흑오미자 60℃	에탄올	52.3	52.0	51.6	51.5	51.8	52.2	51.9	51.7	52.5	51.7	52.0	52.0	51.5	51.2
	물	54.8	55.2	55.2	55.1	54.9	54.8	53.7	54.7	55.1	54.6	54.5	53.9	54.1	52.2
오미자 80℃	에탄올	54.3	53.9	52.1	51.8	51.1	52.3	50.5	51.4	53.8	51.6	49.3	49.4	49.0	47.9
	물	62.8	62.1	60.5	60.3	62.9	61.9	61.1	60.8	60.9	59.8	58.6	57.6	57.3	54.8
오미자 60℃	에탄올	58.3	58.5	57.8	57.4	58.1	57.4	56.9	57.8	58.1	57.9	57.1	56.0	55.8	52.3
	물	59.3	59.5	58.9	57.9	58.5	57.9	59.5	59.8	59.4	58.5	58.6	58.0	56.0	55.6
건조오미자 60℃	에탄올	67.4	68.4	66.9	66.4	81.2	77.8	76.2	78.6	78.9	76.4	77.5	77.4	82.9	82.3
	물	77.6	78.0	77.5	76.3	86.2	83.9	81.1	83.9	83.0	83.2	83.0	82.6	87.8	87.8

6) 항산화제 첨가 음료 제품의 저장중 명도(L값)

원료의 종류별로 추출된 즙액에 항산화제를 첨가한 제품의 냉장저장중 L값의 변화를 조사한 결과는 표4.14.와 같다.

시료의 종류별로 L값(명도)의 변화는 항산화제를 첨가하지 않은 제품의 저장중 변화와 대단히 유사하여 흑오미자, 오미자, 건조오미자 순으로 L값이 높았으며 저장중 변화는 건조 오미자를 제외하고는 소량 L값이 감소되는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 표 3.10.의 적색도인 a값의 변화 영향이 커서 a값이 증가하면 L값이 감소하는 경향이고, 또한 b값이 감소하면 L값이 감소하는 상호 관계를 가지면서 변화되는 결과를 나타내었다. 그리고 혼탁해지면 L값이 증가되고 희석되면 낮아지는데 저장중 특별히 혼탁현상을 일으키는 결과는 없었다. 그리고 저장 기간중 증감의 비율은 항산화제를 첨가하지 않은 제품보다 더 적어서 항산화제 농도와 상온저장 및 냉장유통에서의 항산화제 영향이 더욱더 검토할만한 가치가 있는 것으로 생각되었다.

표 4.14.흑오미자와 오미자 및 건조오미자 음료 항산화제 첨가제품의 저장중 L값의 변화

저장기간 시료 추출조건		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	13	14	20
흑오미자	에탄올	45.2	45.0	44.5	45.1	43.9	41.4	43.2	42.8	40.2	43.2	41.6	40.4	
80°C	물	47.9	47.2	47.0	47.5	46.9	45.1	46.9	46.2	44.1	46.4	45.8	46.1	
흑오미자	에탄올	51.5	53.2	52.1	52.8	52.4	53.3	53.5	51.0	50.7	52.7	51.3	52.5	51.6
60°C	물	54.6	55.2	56.0	56.9	55.4	55.8	56.4	53.7	53.8	55.8	55.4	55.9	55.4
오미자	에탄올	54.6	56.8	55.1	55.6	54.9	52.8	53.4	51.0	53.6	53.9	53.4	50.5	52.4
80°C	물	62.9	64.5	63.6	63.6	63.4	61.5	60.6	60.9	60.9	61.3	58.3	61.5	71.9
오미자	에탄올	60.8	62.6	61.1	61.1	60.5	59.8	59.9	58.1	57.9	59.9	57.4	59.6	59.8
60°C	물	60.5	61.9	61.1	62.0	61.3	60.9	62.8	62.0	60.8	62.4	61.8	60.9	62.6
건조오미자	에탄올	68.9	66.8	66.9	70.9	73.7	75.2	78.0	79.1	78.4	79.1	76.6	79.9	79.3
60°C	물	79.6	79.1	79.5	79.9	80.5	80.7	85.4	84.8	84.4	85.9	84.9	84.6	85.9

7) 천연 음료 제품의 저장중 흡광도 (OD값)

흑오미자와 오미자 및 건조 오미자에서 추출한 즙액으로 음료 제품을 제조하여 냉장 저장중 흡광도의 변화를 520㎚에서 측정한 결과는 표 4.15.와 같다. 이 파장에서 흡광도의 측정은 추출액의 혼탁도를 추정할 뿐만아니라 적색도와의 상관 관계를 확인할 수 있는 간편한 방법이다.

흑오미자에서 추출한 음료 제품보다는 오미자 추출액의 음료 제품에서 흡광도가 약간 높게 나타났으며 오미자 60℃ 추출액 제품의 흡광도가 가장 높았으며 흑오미자 80℃ 추출액 제품과 오미자 80℃ 제품은 비슷하였고 건조오미자 60℃ 추출액 제품은 매우 낮은 흡광도를 나타내었다. 이러한 결과는 각각의 재료에서 추출된 음료 제품의 a값과 밀접한 관계가 있기 때문이다.
흑오미자, 오미자, 건조오미자 추출액의 최대 흡광도는 모두 520㎚로 나타나 이들 결과를 뒷받침하고 있다.

표 4.15. 흑오미자와 오미자 및 건조오미자 음료제품의 저장중 흡광도변화

시료 / 추출조건 \ 저장기간		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	13	14	20	21
흑오미자 80℃	에탄올	1.62	1.66	1.71	1.67	1.67	1.61	1.70	1.67	1.60	1.57	1.58	1.66	1.65	
	물	1.56	1.49	1.54	1.52	1.34	1.43	1.39	1.55	1.43	1.45	1.45	1.48	1.48	
흑오미자 60℃	에탄올	1.32	1.30	1.33	1.31	1.15	1.22	1.26	1.30	1.30	1.21	1.18	1.28	1.16	1.23
	물	1.13	1.12	1.12	1.09	1.13	1.07	1.10	1.16	1.06	1.08	1.11	1.09	1.03	1.05
오미자 80℃	에탄올	1.69	1.70	1.75	1.70	2.02	1.67	1.76	1.79	1.56	1.69	1.72	1.52	1.50	1.53
	물	1.25	1.26	1.26	1.28	1.09	1.18	1.23	1.30	1.26	1.21	1.30	1.16	1.29	1.18
오미자 60℃	에탄올	1.77	1.62	1.66	1.70	1.49	1.54	1.62	1.63	1.62	1.70	1.62	1.55	1.52	1.54
	물	1.82	1.74	1.90	1.87	1.86	1.75	1.86	1.87	1.83	1.91	1.78	1.66	1.63	1.66
건조오미자 60℃	에탄올	0.48	0.44	0.46	0.44	0.21	0.24	0.24	0.24	0.22	0.24	0.24	0.24	0.17	0.18
	물	0.38	0.37	0.38	0.24	0.18	0.19	0.20	0.20	0.19	0.19	0.20	0.23	0.14	0.14

이들 음료 제품의 냉장 저장중 흡광도의 변화는 a값의 감소율과 비슷하게 감소하였으며 건조오미자 추출액 음료 제품이 가장 큰 비율로 감소하였다. 이러한 감소원인이 저장기간 동안 제품의 혼탁화보다는 적색도의 변화로 생각되며 특히 20주, 21주째 저장 제품의 측정치에서 감소를 보여 장기간 저장은 적색의 변화 가능성이 나타났다.

8) 항산화제 첨가 음료 제품의 저장중 흡광도(OD 값)

원료별로 추출액에 항산화제를 첨가하여 만든 음료 제품을 냉장 저장하면서 흡광도의 변화를 조사한 결과는 표 4.16.과 같다.

표 4.16. 흑오미자와 오미자 및 건조오미자 음료 항산화제 첨가제품의 저장중 흡광도의 변화

시료 추출조건 \ 저장기간		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	13	14	20
흑오미자	에탄올	1.66	1.51	1.51	1.54	1.58	1.52	1.58	1.56	1.55	1.56	1.58	1.59	
80℃	물	1.36	1.40	1.39	1.39	1.46	1.42	1.40	1.36	1.40	1.33	1.40	1.40	
흑오미자	에탄올	1.25	1.20	1.22	1.24	1.28	1.21	1.24	1.16	1.18	1.12	1.19	1.18	1.29
60℃	물	1.03	1.07	1.02	1.00	1.06	1.02	1.02	1.06	1.02	0.98	1.03	0.94	1.05
오미자	에탄올	1.62	1.52	1.46	1.49	1.52	1.45	1.53	1.48	1.60	1.38	1.32	1.27	1.27
80℃	물	1.16	1.16	1.10	1.10	1.15	1.09	1.18	1.12	1.13	1.07	1.08	0.97	1.00
오미자	에탄올	1.62	1.49	1.46	1.49	1.51	1.43	1.49	1.38	1.40	1.34	1.37	1.32	1.28
60℃	물	1.74	1.66	1.64	1.61	1.65	1.57	1.69	1.49	1.55	1.38	1.42	1.33	1.32
건조오미자	에탄올	0.43	0.44	0.42	0.41	0.23	0.23	0.22	0.23	0.20	0.20	0.22	0.20	0.18
60℃	물	0.34	0.34	0.32	0.32	0.18	0.22	0.17	0.17	0.17	0.16	0.16	0.17	0.17

원료별 제품의 흡광도는 흑오미자와 오미자 80℃ 추출액 제품에서 비슷하였고 60℃ 4시간 물로 추출한 즙액의 제품은 오미자 추출액이 흡광도가 높게 나타났고 건조오미자 추출액 제품의 흡광도가 가장 낮게 나타난 것은 항산환제를 첨가하지 않은 제품의 흡광도와 비슷한 경향을 보였다. 20주까지 냉장 저장중 흡광도 변화는 소량 감소하였는데 그 감소율은 아주 적어서 제품이 장기간 저장, 유통된다면 항산화제 첨가 제품의 안정성이 좀 더 클 것으로 예측되었다.

9) 천연 음료 제품의 저장능 폴리페놀 함량

과즙액을 이용한 가공제품의 제조 과정이나 저장, 유통중 대표적인 변색 현상중의 하나로 갈변 현상이 있는데 갈변의 가장 큰 영향 인자로 폴리페놀(polyphenol) 화합물이 산화되어 중합체를 형성하면서 갈변 물질이 생성되어 일어나는 현상이다. 그리고 변색과 아울러 쓴맛과 떫은 맛으로 변화를 일으켜 가공제품의 상품성은 물론이며 저장 기간과 안정성의 장단에 많은 영향을 주는 물질이다. 그래서 각 재료의 추출액을 이용한 제품의 제조과정과 저장 기간중 갈변물질인 폴리페놀 함량 변화를 측정하였는데 그 결과는 표 4.17.과 같다.

원료의 종류에 따른 총 polyphenol의 추출된 함량은 흑오미자, 건조된 오미자, 오미자 순으로 높은 함량을 나타내어 갈변될 가능성도 같은 경향으로 나타나 흑오미자가 가장 높고 오미자가 가장 낮았다. 그러나 이들 시료의 총 polyphenol의 함량보다는 산화로 감소되는 정도가 갈변의 척도가 되고 있어 저장 기간중 총 polyphenol의 변화를 보면 냉장저장 14주까지는 흑오미자와 생오미자는 감소량이 매우 소량이었으나 건조된 오미자는 감소량이 많았으며 21주이상 냉장 저장으로는 모든 시료에서 감소량이 많아져 갈변 현상이 예측되어 20주 정도까지만 갈변 현상의 방지가 가능한 것으로 생각되었다. 그리고 건조된 오미자 추출 즙액 제품의 총 polyphenol 함량이 가장 감소량이 많아 상품성의 변화와 갈변의 가능성은 건조 원료를 이용한 제품에서 가장 크게 나타났다.

표 4.17. 흑오미자와 오미자 및 건조오미자 음료제품의 저장중 총 폴리페놀 함량 변화(㎎/ 100㎖)

저장기간 / 시료 추출조건		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	13	14	20	21
흑오미자	에탄올	72.8	73.5	74.2	73.5	67.0	67.6	72.5	63.8	70.4	68.2	67.8	67.1	64.9	
80℃	물	72.8	72.1	73.5	72.1	60.0	71.1	71.1	67.1	68.5	66.7	66.7	68.5		
흑오미자	에탄올	67.3	68.0	69.3	67.3	65.0	64.8	66.7	60.5	60.2	64.8	62.3	63.4	61.2	48.4
60℃	물	67.3	66.6	68.0	67.3	64.0	59.1	66.2	65.1	64.8	64.8	64.4	58.0	57.7	48.4
오미자	에탄올	57.7	56.6	59.8	58.7	55.2	55.3	56.4	54.6	56.3	56.9	54.4	54.9	54.9	43.6
80℃	물	57.1	55.5	57.7	57.1	50.4	51.8	55.8	52.4	54.7	55.0	49.5	53.6	49.5	45.3
오미자	에탄올	57.1	56.6	58.2	57.1	54.4	53.8	56.8	52.7	54.6	55.5	53.8	53.0	55.5	43.6
60℃	물	56.0	56.0	58.2	57.1	53.6	54.6	56.8	52.4	53.8	55.3	52.7	53.5	52.7	43.6
건조오미자	에탄올	66.0	67.6	67.6	68.0	59.6	61.8	61.2	59.0	58.4	58.1	59.1	56.8	55.2	43.2
60℃	물	64.0	68.4	66.0	64.4	58.4	56.1	60.0	59.6	58.1	57.8	57.8	57.1	56.4	41.2

10) 항산화제 첨가 음료 제품의 저장중 총 폴리페놀 함량

천연 음료 제품에서 항산화제의 중요한 역할은 쓴맛이나 떫은 맛의 생성을 억제하는 기호성의 향상 뿐만아니라 변색과 퇴색의 방지 역할로서 흑오미자와 오미자 음료 제품에서는 기본 색소인 적색의 퇴색이나 갈변 방지와 새로운 흑갈색 색소의 생성을 방지하여 기호성을 높히고 상품성의 저하를 방지하는 것이다. 그래서 재료에 항산화제 erythorbic acid를 첨가하여 갈변 원인 물질인 폴리페놀의 총량의 변화를 제품을 저장하면서 측정한 결과는 표 4.18.과 같다.

항산화제가 첨가된 음료 제품을 1주간 저장 후 총 폴리페놀 함량은 첨가하지 않은 제품보다 함량이 높게 나타났는데 이러한 결과는 산화작용으로 변화된 함량이 적기 때문이며 그래서 산화가 방지되는 것으로 생각되었다. 재료의 종류별로는 흑오미자의 음료 제품이 가장 높고 건조된 오미자와 오미자 순의 함량으로

검출되었는데 함량의 차이는 아주 적어서 거의 비슷하게 나타났다. 제품의 저장 기간중 총 폴리페놀의 함량 변화는 감소량이 매우 적어서 20주까지 저장하는 동안의 감소량이 항산화제를 첨가하지 않은 음료 제품에서는 14주까지 저장하였을 때 감소량과 비슷하였다. 그래서 이 항산화제는 폴리페놀의 산화 감소를 억제하는데 효과가 있으며 장기간 저온 유통이나 실온저장 및 유통 과정에서는 항산화제 첨가가 효과가 클 것으로 판단되었다.

표 4.18. 흑오미자와 오미자 및 건조오미자 음료제품의 항산화제 첨가제품의 저장중 총 pholyphenol 함량변화 (㎎/100㎖)

시료 추출조건 \ 저장기간		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	13	14	20
흑오미자	에탄올	74.9	72.8	73.9	70.0	72.4	73.4	71.6	69.4	70.7	70.5	72.6	69.8	
80℃	물	73.5	72.1	72.5	70.7	72.1	73.3	71.3	67.0	70.4	69.5	72.6	68.6	
흑오미자	에탄올	71.4	68.7	69.4	67.3	65.3	71.6	75.9	66.6	66.2	67.3	68.0	61.9	64.8
60℃	물	70.0	68.7	69.4	68.7	69.4	72.0	72.3	64.3	66.2	59.8	64.4	60.9	64.1
오미자	에탄올	59.3	58.7	58.7	57.1	55.7	61.4	61.5	55.5	58.1	55.4	57.5	55.3	54.4
80℃	물	58.7	56.6	57.6	55.4	53.3	60.9	61.1	53.2	55.7	54.3	55.3	53.6	51.8
오미자	에탄올	58.7	55.7	58.2	55.5	54.1	60.8	59.6	56.0	56.4	54.4	56.9	54.7	54.7
60℃	물	58.2	58.2	57.6	55.5	54.3	62.6	60.7	56.0	55.5	53.5	56.3	55.0	54.1
건조오미자	에탄올	69.2	67.6	69.6	67.8	67.8	67.9	69.2	66.8	63.3	65.5	61.5	60.1	59.8
60℃	물	67.6	66.8	66.0	67.2	66.6	66.6	68.4	65.1	60.6	64.5	60.5	59.9	60.1

11) 천연 음료 제품의 저장중 당도

흑오미자, 오미자 및 건조 오미자를 다양한 추출 방법에 의한 추출액 제품을 냉장 저장하면서 당도의 변화를 굴절당도계로 측정한 결과는 표 4.19.와 같다. 흑오미자 추출액 제품의 당도보다도 오미자 추출액 음료 제품의 당도가 높은 것

으로 나타났으며 오미자를 건조하여 약 4시간 추출한 즙액에는 당의 추출함량이 1/3정도로 감소하는 결과를 나타냈고 추출온도를 60℃와 80℃로 그리고 낮은 에탄올 수용액과 물로 추출할 경우 추출되는 함량의 차이는 거의 없는 것으로 나타났다.

표 4.19. 흑오미자와 오미자 및 건조오미자 음료제품의 저장중 당도 변화(%)

시료 (저장기간)	추출조건	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	13	14	20	21
흑오미자 80℃	에탄올	0.8	0.8	1.0	0.9	1.0	1.1	1.1	1.4	1.0	1.1	1.4	1.2		
	물	0.8	0.6	0.6	0.9	1.0	1.0	1.0	1.2	1.0	1.0	1.2	1.0		
흑오미자 60℃	에탄올	1.0	0.8	1.0	1.1	1.2	1.2	1.2	1.4	1.4	1.4	1.6	1.2	1.8	1.8
	물	0.8	0.6	0.8	0.9	1.0	1.0	1.1	1.2	1.1	1.1	1.4	1.2	1.4	1.4
오미자 80℃	에탄올	1.6	1.6	1.8	1.7	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	2.1	2.1	2.1	2.1	1.9
	물	1.1	1.0	1.1	1.4	1.3	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.7	1.6
오미자 60℃	에탄올	1.0	1.4	1.6	1.6	1.6	1.6	1.7	1.8	1.8	1.8	1.6	1.8	1.8	1.9
	물	1.4	1.4	1.6	1.6	1.6	1.6	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.9
건조오미자 60℃	에탄올	0.6	0.6	0.7	0.7	0.4	0.4	0.5	0.6	0.4	0.5	0.6	0.5	0.5	0.4
	물	0.5	0.5	0.6	0.7	0.3	0.3	0.4	0.4	0.4	0.4	0.5	0.4	0.4	0.4

그러나 추출액에 에탄올이 남아있으면 굴절률에 영향을 주어 높은 함량을 나타낼 가능성이 있지만 에탄올 농도가 아주 낮아 실질적으로 영향은 없는 것으로 생각되었다. 모든 시료 제품의 냉장 저장 과정중 소량씩 당의 함량이 증가되는 결과를 나타내었는데 이러한 결과는 당의 조성의 변화로 추측되며 함량이 실제로 증가되는 것으로는 생각되지 않았다. 그리고 저장중 감소현상이 관찰되지 않아서 저장중 변패되는 과정은 없는 것으로 생각되었고 이들 제품의 실질적 관능검사에 의하면 흑오미자가 가장 강한 단맛을 느끼도록 하며 오미자 추출액 제품

은 단맛을 약하게, 그리고 건조오미자 추출액 제품은 신맛만을 강하게 느낄 수 있게 하는데 이러한 관능현상은 신맛의 강약에 의해서 맛이 좌우되는 것을 알 수 있었다.

12) 항산화제 첨가 음료 제품의 저장중 당도

동일한 방법으로 제조한 시료의 추출액에 항산화제를 첨가하여 냉장 저장하면서 당도에 미치는 영향을 조사한 결과는 표 4.20.과 같다.

표 4.20. 흑오미자와 오미자 및 건조오미자 음료 항산화제 첨가 제품의 저장중 당도변화(%)

시료	추출조건 \ 저장기간	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	13	14	20
흑오미자 80℃	에탄올	0.8	0.8	0.8	1.1	1.2	1.0	1.0	1.2	1.0	1.2	1.2	1.2	
	물	0.8	0.8	1.0	1.0	1.0	0.8	1.0	1.2	1.0	1.0	1.0	1.4	
흑오미자 60℃	에탄올	1.0	1.0	1.4	1.1	1.3	1.0	1.4	1.4	1.4	1.6	1.8	1.8	2.0
	물	0.8	0.8	1.2	1.0	1.2	1.0	1.0	1.2	1.0	1.2	1.4	1.4	1.4
오미자 80℃	에탄올	1.8	1.6	1.8	1.7	1.8	1.8	1.9	1.9	1.9	1.9	2.1	2.1	2.1
	물	1.6	1.4	1.4	1.5	1.4	1.2	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.4
오미자 60℃	에탄올	1.6	1.4	1.6	1.6	1.8	1.6	1.8	1.9	1.8	1.9	1.9	1.9	1.9
	물	1.6	1.4	1.6	1.6	1.8	1.6	1.8	1.9	1.6	1.9	1.9	1.9	1.9
건조오미자 60℃	에탄올	0.8	0.7	0.8	0.8	0.5	0.4	0.5	0.5	0.4	0.5	0.6	0.6	0.4
	물	0.6	0.6	0.6	0.8	0.4	0.4	0.4	0.5	0.4	0.4	0.5	0.4	0.5

오미자의 추출액 제품의 당도가 높고 다음이 흑오미자 추출액 제품이며 건조오미자추출액 제품 의 당도가 높게 나타났다. 그러나 실제 관능적으로 흑오미자 음료 제품은 단맛이 있고 오미자 제품은 단맛보다는 신맛을 강하게 느끼게 한다.

이러한 현상은 오미자 추출액 제품의 강한 신맛 때문에 미각적으로 단맛을 잘 구별하여 느끼지 못하기 때문인 것으로 생각된다. 항산화제 첨가 제품의 당도가 전체적으로 약 0.1% 정도 높은 당도를 보이고 항산화제를 첨가하지 않은 즙액보다 짧은 저장기간부터 당도의 증가가 나타났다. 그래서 항산화제의 특이한 작용은 없으나, 당도의 증가가 1주정도 빠르며 다른 좋지 않은 영향은 있지 않는 것으로 결과가 나타났다.

13) 천연 음료 제품의 저장중 산도

흑오미자와 오미자의 맛성분으로서 가장 독특하고 자극적인 맛은 신맛으로서 이들을 원료로 한 차와 음료 제품의 기호성과 상품성의 중요한 요소이다. 이 신맛 변화의 자료로 총산의 함량을 조사하였는데 가장 다량으로 함유한 구연산의 함량으로 나타내어 음료제품의 저장중 변화를 측정한 결과는 표 4.21.과 같다.

원료의 종류에 따른 총산의 함량은 건조오미자 추출액에서 가장 높은 함량을 나타내었으며 다음으로 오미자 추출액에서, 그리고 흑오미자 추출액 제품은 총산의 함량이 가장 적어서 오미자의 1/3 1/6 정도만 함유된 것으로 나타났다. 그리고 3% 에탄올과 물의 추출용매에 의한 총산의 추출 함량은 차이가 거의 없었으며 추출온도에 의한 영향은 오미자 추출액은 거의 비슷하고 흑오미자 추출액에서는 차이가 있는 것으로 나타났다.

저장중 총산 함량의 변화는 저장기간이 20주이상 경과되면서 제품들중에 소량 감소하는 것으로 나타났으며 건조오미자 추출액에서 많은량이 감소되는 것으로 나타났는데 물과 에탄올 추출액 모두 저장 6주 이후부터 감소량이 많았다.

실제 관능적으로 음용했을때, 흑오미자는 당도에 비해서 총산의 함량이 적어 신맛이 적고 단맛이 강한 것처럼 느꼈으며 오미자 특히 건조오미자 추출액은 신맛이 대단히 강하여 당을 첨가해야만 음료로 이용될 수 있을 정도로 신맛이 강하였는데 총산의 함량은 이러한 결과를 뒷받침하고 있다.

표 4.21. **흑오미자와 오미자 및 건조오미자 음료 제품의 저장중 산도변화**

(mg/g)

시료 / 추출조건 \ 저장기간		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	13	14	20
흑오미자	에탄올	42.8	43.5	43.7	43.7	42.0	41.3	38.8	41.3	40.1	38.0	39.3	41.6	
80℃	물	42.2	43.5	42.8	43.7	40.9	40.4	37.7	39.4	41.1	39.1	40.5	40.6	
흑오미자	에탄올	23.3	22.9	21.4	23.6	23.3	22.7	22.7	22.1	23.4	21.3	21.3	22.3	
60℃	물	23.6	23.1	24.0	24.2	23.8	23.0	23.5	21.8	23.3	23.4	22.5	23.9	
오미자	에탄올	146.1	131.4	130.6	153.8	140.2	140.2	140.0	138.2	139.5	138.0	136.6	136.3	130.2
80℃	물	148.7	143.0	143.4	157.7	144.2	141.5	140.9	125.8	143.8	133.2	137.8	138.9	134.9
오미자	에탄올	122.6	138.2	137.4	142.6	125.4	123.0	128.8	129.1	129.1	127.1	142.6	129.8	120.9
60℃	물	115.8	118.6	109.6	122.7	113.6	109.0	112.9	115.5	110.4	110.0	1103.7	109.5	107.9
건조오미자	에탄올	151.5	150.6	151.8	145.7	145.6	123.5	123.2	121.8	107.0	116.2	123.6	123.6	113.5
60℃	물	147.3	143.8	150.1	149.6	151.5	123.5	126.8	114.9	119.4	120.9	123.6	125.6	116.0

14) **항산화제 첨가 음료 제품의 산도**

원료의 종류와 추출 조건을 달리하여 추출한 음료 제품에 항산화제를 첨가하여 냉장 저장중 총산의 함량 변화를 측정한 결과는 표 4.22.와 같다.

항산화제가 첨가되지 않은 추출액보다 총산의 함량이 적게 나타났으며 흑오미자의 추출액에는 소량이 함유되어 저장 기간중 감소량도 거의 없는 것으로 나타났으나 오미자 추출액은 항산화제가 첨가되지 않은 제품의 총산 함량 변화와 비슷한 경향을 보였으며, 건조오미자 추출액은 저장 5주후부터 감소량이 컸는데 20주까지 함량은 변화가 적어 안정된 경향을 나타내었다.

이러한 결과는 항산화제를 첨가하지 않은 음료 제품에서와 동일하였으며 장기간 냉장 저장에도 신맛의 감소나 pH에 영향을 크게 미치지 않아서 색소의 변화에도 영향은 적을 것으로 추측되었다. 그러나 항산화제 첨가가 총산의 함량에는 영향을 미치지는 않는 것으로 생각되었다.

표 4.22. 흑오미자와 오미자 및 건조오미자 음료에 항산화제 첨가제품의 저장중 산도 변화(㎎/g)

시료 추출조건 \ 저장기간		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	13	14	20
흑오미자 80℃	에탄올	45.7	44.7	43.9	44.8	43.4	42.3	43.4	42.4	42.7	45.8	44.2	43.4	44.5
	물	45.9	39.4	43.4	45.9	44.2	42.5	43.4	45.7	46.5	41.1	42.4	42.4	44.2
흑오미자 60℃	에탄올	24.2	22.9	25.2	28.7	24.4	24.1	23.0	23.1	25.1	22.9	24.1	25.6	
	물	24.5	25.9	27.8	27.9	25.2	25.8	21.9	22.3	27.0	26.1	24.1	24.7	
오미자 80℃	에탄올	148.5	133.7	145.4	149.4	138.6	141.3	137.8	137.7	141.2	138.6	125.0	139.5	135.3
	물	146.7	141.4	147.6	159.2	145.0	143.4	144.8	139.5	139.0	138.5	115.0	143.0	141.8
오미자 60℃	에탄올	139.8	131.1	140.8	139.8	127.4	131.0	135.0	130.6	131.1	125.7	116.9	133.0	141.8
	물	148.2	114.1	120.2	119.0	116.8	116.6	113.3	103.0	116.6	109.5	109.9	103.2	109.8
건조오미자 60℃	에탄올	148.3	136.0	150.4	153.7	124.3	125.5	121.7	121.8	123.7	123.2	114.5	127.6	128.9
	물	155.4	143.2	151.6	149.8	123.3	126.6	122.5	117.9	119.2	123.6	115.2	124.6	125.6

15) 천연 음료 제품의 저장중 pH

흑오미자, 오미자 및 건조된 오미자의 추출온도와 추출용매를 달리하여 추출액 제품을 냉장저장하면서 pH 변화를 측정한 결과 표 4.23과 같다.

이들 제품의 pH는 제품의 맛 기호성에 결정적 역할을 하는 신맛의 정도를 추측할 수 있는 중요한 기준이 될 뿐만 아니라 기본 색소인 적색색소의 안정성에도 절대적 영향을 주는 요소로서 기준이 되기 때문에 제품의 저장 유통중의 변화를 조사하면 이 기간중에 제품의 기호성과 상품성을 예측할 수 있는 간단하고 편리한 수단이 될 수 있다.

표 4.23. **흑오미자와 오미자 및 건조오미자 음료 제품의 저장중** pH**의 변화**

시료	저장기간 / 추출조건	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	13	14	20
흑오미자 80℃	**에탄올**	3.18	3.15	3.03	2.91	3.09	3.18	3.20	3.02	3.03	3.24	3.20	3.00	2.83
	물	3.21	3.17	3.10	2.97	3.12	3.05	3.30	3.07	3.06	3.21	3.08	2.93	2.85
흑오미자 60℃	**에탄올**	3.42	3.49	3.35	3.28	3.39	3.38	3.55	3.41	3.26	3.51	3.40	3.26	
	물	3.41	3.45	3.34	3.25	3.38	3.37	3.44	3.39	3.33	3.32	3.46	3.29	
오미자 80℃	**에탄올**	2.84	2.85	2.71	2.49	2.75	2.69	2.93	2.73	2.63	2.77	2.79	2.62	2.57
	물	2.71	2.78	2.65	2.48	2.69	2.67	2.92	2.58	2.52	2.72	2.75	2.48	2.54
오미자 60℃	**에탄올**	2.87	2.84	2.75	2.71	2.81	2.81	2.84	2.73	2.71	2.71	2.72	2.56	2.72
	물	2.72	2.88	2.73	2.55	2.76	2.73	2.85	2.71	2.72	2.85	2.95	2.54	2.60
건조오미자 60℃	**에탄올**	2.91	2.91	2.78	2.86	2.97	2.81	2.97	2.90	2.86	2.80	2.83	2.82	2.82
	물	2.80	2.87	2.72	2.88	2.84	2.75	2.81	2.78	2.84	2.80	2.80	2.79	2.75

흑오미자를 80℃**로 추출한 제품은** pH 2.83 3.21**이었고**, 60℃**의 추출액은** pH 3.26 pH 3.49**를 나타내었다**. **그리고 오미자는** pH 2.52 2.93 **과** pH 2.54 2.88 **이었으며 건조된 오미자 추출액 제품의** pH 2.75 2.97 **이었다**. **그래서 오미자와 건조된 오미자의 추출액의** pH**는 거의 비슷한 범위를 나타내었고 흑오미자 추출액의** pH**는 좀더 높은 경향을 보였는데 가장높은** pH **범위는 흑오미자를** 60℃**에서** 3% **에탄올로 추출한 즙액이었고 가장 낮은** pH**범위를 갖는 것은 오미자를** 80℃**에서 물로 추출한 제품이었으나 이들의 차이는 크게 나타나지는 않았다**. **그리고 냉장저장중** pH 0.2 0.4 **정도 저하되는 것으로 나타나 제품의 기호성인 신맛의 감소가 유발되거나 상품성인 적색색소가 변색되는** pH 4.0 **이상으로 되지않아 저장중 제품의 상품성의 저하에도 영향은 없을 것으로 추정되었다**.

16) 항산화제 첨가 음료 제품의 저장중 pH

각종 원료에서 방법별로 생산한 추출액에 항산화제(iso ascorbic acid)를 첨가하여 제품을 제조한 후 냉장 저장하면서 항산화제가 제품의 pH에 미치는 영향을 조사한 결과는 표 4.24.와 같다.

표 4.24. 흑오미자, 오미자 및 건조오미자음료의 항산화제첨가제품의 pH변화

시 료	추출조건 \ 저장기간	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	13	14	20
흑오미자	에탄올	3.05	3.06	2.96	3.06	3.15	3.06	3.14	3.06	3.01	2.73	3.16	3.09	2.80
80℃	물	2.96	3.01	2.96	3.10	3.07	3.05	3.12	2.97	2.47	2.77	3.13	3.20	2.80
흑오미자	에탄올	3.31	3.39	3.23	3.35	3.35	3.29	3.41	3.41	3.27	3.33	3.35	2.86	
60℃	물	3.29	3.30	3.23	3.31	3.33	3.26	3.38	3.30	3.24	3.20	3.32	2.82	
오미자	에탄올	2.72	2.78	2.64	2.80	2.76	2.76	2.83	2.70	2.64	2.59	2.69	2.71	2.65
80℃	물	2.68	2.70	2.57	2.52	2.71	2.70	2.88	2.69	2.64	2.53	2.59	2.67	2.54
오미자	에탄올	2.75	2.78	2.66	2.79	2.76	2.75	2.78	2.73	2.68	2.60	2.80	2.76	
60℃	물	2.65	2.68	2.61	2.51	2.69	2.74	2.83	2.73	2.66	2.66	2.79	2.72	
건조오미자	에탄올	2.81	2.92	2.73	2.98	2.72	2.77	2.97	2.84	2.79	2.70	2.74	2.69	
60℃	물	2.82	2.89	2.75	2.92	2.81	2.75	2.91	2.80	2.77	2.79	2.78	2.70	

항산화제 첨가 즙액의 제품들 중 흑오미자 음료의 pH는 2.80 3.20과 2.82 3.41 이었고 오미자 음료 제품은 pH 2.53 2.88과 2.66 2.80 그리고 건조오미자는 pH 2.69 2.97로 나타나 항산화제를 첨가하지 않은 제품과 비슷한 pH이었으나 범위가 약간 좁게 나타나 안정성에 바람직한 영향을 미치는 것으로 판단 되었다. 저장기간중 모든 제품에서 전체적으로 pH가 낮아지는 경향을 보여 신맛의 저하와 적색의 변색을 일으킬 수 있는 가능성은 적으나 항산화제 첨가가 이들 제품의 기호성과 상품성의 저하를 방지하는데 효과가 있는 것으로 추측되었다.

제 4 절 결 론

흑오미자를 원료로 하여 천연음료를 제조하는데 원료의 가공 특성 조사 검토하기 위하여 제주도 특산 흑오미자와 한국산 생오미자, 건조오미자, 중국산 건조오미자. 흑오미자 건조된 줄기를 원료로 제품의 가공 적성을 조사하였다.

가공 적성의 가장 중요한 기준으로 적색도(적색색소)를 이용하였는데 왜냐하면 맛성분(신맛, 단맛)과 함량은 조정이 가능하나 색소는 문제가 있으며 색소가 중요한 음료이기 때문이다. 수율, 적색도, 신맛, 단맛 등 가공 특성은 흑오미자가 가장 좋았다. 추출조건으로 80℃에서 4시간 또는 60℃에서 6시간 추출 방법이 좋았으며 적색도는 흑오미자가 한국산 오미자 5 6배, 중국산 오미자 보다는 그 이상 수율이 높았다. 신맛은 흑오미자가 적었고 단맛은 비슷하였다. 신맛과 pH는 한국산 오미자나 중국산 오미자보다 적은 함량, 그리고 높게 나타났으나 색소의 변화에 영향을 미치지 않을 정도의 충분한 함량을 함유하였다. 흑오미자 나무줄기를 원료로 하여 즙액을 추출하여 음료제조에 이용할 수 있는 양의 색소를 함유하고 있다.

각 원료별, 특히 흑오미자 추출액의 음료 제조중 저장성을 조사하여 추출액 원료특성을 조사 검토하였다. 원료로서 추출액의 저장성을 조사한 결과 냉장온도 4℃ 내외에서 7주동안 저장하는 동안 색도, 투명도, 산도, 당도, 그리고 변색의 영향 없이 안정한 상태의 결과를 나타내었다

음료제품을 제조하여 제품음료를 21주간 저장하면서 상품성의 영향 요소들을 조사하였다. 포장방법은 광선을 차단하는 포장법으로 알루미늄 팩을 이용하는 방법을 선택하였다. 흑오미자나 오미자의 적색의 퇴색이나 적갈색으로 변색이 광선의 영향으로 나타나기 때문이다. 알루미늄 팩포장제품은 저온 진탕 살균방법으로 냉장 저장하면 저장성이 좋아 20주이상(약 5개월) 충분한 유통기간을 확보할 수 있는 결과를 나타내었다. 특히 퇴색과 변색의 방지를 위하여 항산화제 (isoascorbic acid)를 사용하여 조사한 결과 20주 저장 기간동안 첨가하지 않은 제품과 비슷하게 안정상태를 보였다. 흑오미자의 추출액과 오미자 추출액을 적당한 비율로 배합하면 색도 뿐만아니라 맛과 향의 가공적성을 상승시킬수 있는 재료로서도 좋은 적성을 나타내었다.

제 6 장 참 고 문 헌

김경임 등 : 한국식품과학회지,5(3),178(1973)

김경임, 남주형, 권태완. 오미자의 일반성분, 유기산 및 anthocyanin 색소에 관하여. 한국식품과학회지. 5(3), 178(1973)

김동훈: 식품화학, 탐구당, 661(1988)

박인현, 이상래, 정태현: 신판 약초식물재배. 선진문화사, 서울, p.150(1985)

相駕徵夫: 中藥大辭典, 상해과학기술 출판사 (소화 60年), 小學館 p655,p867

上原敬二者: 樹木大圖設工, 有明書房 (소화 34年)p1- 1102

서화중, 이명렬, 황경숙: 한국영양식량학회지 16(4), 262(1987)

서화중, 황연숙: 한국식량영양학회지, 16(4), 262(1987)

신민교: 원색임상본초학, 남산당,241(1986)

양회천, 이종문, 송기방: 한국농화학회지. 25(1). 35(1982)

오상룡, 김성주, 민병용, 정동효: 한국식품과학회지, 22, 76(1990)

육창수외 공저: 한약의 생리성분, 임상응용: 계축출판사 (1982) p775

윤국병, 장준근: 몸에 좋은 산야초, 석오 출판사 (1989) p532

이미경, 임선욱, 박훈: Korean J. Ginseng Sci, 12, 164(1988)

이상인: 본초학, 개정증보판, 수서원, 172(1981)

이재열, 박진규, 이정숙, 고지훈, 김경영: 인삼연구보고서, 한국인삼연초연구소, 3(1985)

이정숙, 이성우 : 한국식문화학회지. 4(2).177(1989)

이정숙, 이미경, 이성우 : 한국식문화학회지, 4(2), 181(1989)

이정숙, 이성우: 한국식문화학회지, 4(3), 253(1989)

이정숙, **이성우**: **한국식문화학회지**, 5(2), 259(1990)

이창복: **대한식물도감**, **향문사**, 375(1982)

일본공정서협회: **일본약국방 해설서**, **제** 9**개정판**, **광천서점**, **동경** p.D-297 (1977)

일본공정저협회: **일본약국방 해설서 제** 11**개정판 광천서점**, **동경** p.D-232 (1986)

장영희, **박춘근**, **김동**: **약용작물학회지** 3: 35-39 (1995)

정보섭, **신민교**: **도선 향약**(**생약**)**대사전**(**식물편**), **영림사**(1990) p471

정사홍: **중대약대학보**, 5, 124(1961)

지형준, **이상인** : **대한약전외 한약**(**생약**)**규격집주해서**, **한국메디칼인덱스사**, p.527(1988)

한덕룡: **현대생약학 한국학습교재사** p. 332(1985)

戶田 靜男: **新抗酸化劑 五味子의 抗酸化能**. **月刊** 48, 32(1989)

A. Carveiro, S. Rodrigues, H. S. Andrade, J. A. Matod, W. Alencar, and I. L. Machado, J. Nat. Prod. 44, 602(1981)

A. E. Wright, S. A. Pomponi, O. J. McConnell, S. Kohmoto, and P. J. McCarthy, J. Nat. Prod., 50, 976(1987)

A. Karmen: J. Clin. Invest, 34: 126(1955)

B. Arrguin and J. Bonner, Arch. Pharm. 26:178(1950)

B. M. Howard and W. Fenical, Tetrabedron Lett., 1687(1975)

B. S. Bal, W. E. Childers, Jr. and H. W. Pinnick, Tetrabedron, 37: 20 91(1981)

B. Rudas : Nature, 211, 320(1966)

B. Beyermann, Nurnberg P., Weihe A., Mexier M., Epplen J. T., Theror. Appl. Genet. 83: 691-694(1992)

Bucher, T., Tedetzki, H.: Klin Wochenschr. 29, 615(1951)

B. F. Lessl, A. R. Rudolph, and A. C. Louie in: Etoposide - Current Stayus and New Developments. Ed, by B. F. Lessel, F. M. Muffia, and S. K. Carter, Academic Press, Orlando,1 (1984)

C. W. Books and M. M. Campbell, J. Cbem. Soc. D 630(1969)

C. Worth, B. 1991. Science. 251: 1030-1033.

J. Chen, O. Lamilkanra, C. J. Chang, and D. L. Hopkins, 1995. Appl. Environ. Microbiol. 61:1688 1690.

Clark, C. G. and Senior, J. R. : Gastroenterology. 55(6): 670(1968)

Clark, J. M., Switzer, R. L. : Experimental Biochemistry, W. H. Freeman and Sanfrancisco (1977)

D. A. Shirley, T. E. Harmon, and C. F. Cheeng, J. Organomet. Chem., 69: 327(1974)

D. Chattopadhyay and Sharma A. K., Feddes Report, 102: 29-55(1991)

D. F. Ewing ,Org, Magn. Reson., 12, 499(1979)

D. J. Jennedy, I. A. Selby, and R. H. Thomson, Phytochemistry, 27, 1761(1988)

D. J. Faulkner, Nat. Prod, Rep. ,1. 251(1984)

Dellaporta S. L. Calderon-Urrea A, 1993. Plant Cell 5: 1241-1251.

Devos, K. M. and M. D. Gale. 1992. Theor. Appl. Genet. 84: 567-572.

Donnison, I. S., Siroky, J., Vyskot, B., Saedler, H., and Grant, S. Genetics 144: 1891-1899(1996)

Durand, B., and Durand, R., 1991. Plant. Sci. 80: 49-65(1991)

E. Flaskaamp, G. Nonnenmacher, and O. Isaac, Z. Naturforscb., 36: 114(1981)

E. Klein and N. Schimidt, Dragoco Rep. (Engl. Ed) 203(1973)

E. Reitmaier and W. Voelter, Carbon-13 NMR Spectroscopy 3rd ed, VCH, Weinheim, 1983

F. Bohlamann, R. Zeisberg, and E. Klein, Org. Magn. Reson.,7: 426(1975).

F. Bohlmann, G. W. Ludwig, J. Jakupovic, R. M. King, and H. Robinson, Liebigs Ann. Chem., 228(1984)

F. J. McEnose and W. Fenical, Tetrabedron, 34: 1661(1978)

F. Kogl and A. G. Boer, Rec. Trav. Chem., 54: 779(1935)

Fujita, Y., Y. Hara, T. Ogino and C. Suga, Plant Cell Reports, 1: 59-60(1981)

Fukuka, S., Hosaka, K. and Kamijima, O. Jap. J. Genet. 67: 243 252(1992)

G. Combaut, L. Piovetti and J. M. Kornprobst, C. R. Acad. Sci. Paris, 299, Ser Ⅱ, 433(1984)

G. Metha and A. V. Reddy, Tetrabedron Lett., 2625(1979)

G. T. Castillo, J. Jakupovic, V. Castro, and R. M. King, Phytochemistry, 28:938(1989)

H. Felkin, Bull. Soc. Chem. Fr., 347(1951)

H. Itokawa, F. Hirayama, K. Funakoshi, and K. Takeda, Chem. Pharm. Bull., 33: 3488(1985)

H. M. Relles, J. Magn. Reson.,39: 481(1980)

H. P. Figeys and A. Dralants, Tetrabedron, 28: 3031(1972)

H. Saito, M. Yokoi, M. Aida, M. Kodama, T. Oda, and Y. Sato, Magn. Reson. Chem., 26: 155(1988)

H. Stahelin and A. Von Warrburg, Prog. Drug. Res. 33: 169(1989)

H. Takai, K. So, and Y. Sasaki, Cbem. Pbarm. Bull. 26: 1303(1978)

H. Hikino, Kiso, Y., and Ikeya, Y. Planta medica 50(3): 213(1984)

H. Nakai, I. Yakuo, and A. Kida : Planta Medica 55: 13(1989)

H. Hikino, Y. Kiso and Y. Ikeya : Planta Medica 50: 213(1984)

Hikino, H., Kios, Y., Taluchi, H. and Ikeya, Y.: Antihepatotoxic actions of lignoids from *S. chinensis* fruits. Planta Mes., 50(3): 213(1984)

I. H. Sanchez, C. Lemin and P. Joseph-Nathan, J. Org. Chem., 46: 4666(1981)

I. H. Sanchez, S. Mendoz, M. Calderon, M. I. larraza, and H. J. Flores, J. Org. Chem., 50: 5077 (1985)

I. Kitagawa, N. Yoshioka, C. Kamba, M. Yoshikawa, and Y. Hamamoto, Chem. Pbarm. Bull., 35: 928(1987)

Ikeya, Y. et al: Tetrahedron Letters, 17: 1359(1976)

Ikeya, Y., Kanatani, Hakojaki, M., Takuchi, H. and Mitsuhashi, H.: Chem. Pharm. Bull. 36(10): 3974(1988)

J. B. Lee and B. C. Uff, Q. Rev., Chem. Soc., 21: 429(1967)

J. Berlin, V. Wray, C. Mollenschott, and F. Sasse, J. Nat, Prod., 49: 435(1986)

J. Berlin, V. Wray, C. Mollenschott, V. Wray, F. Sasse, and G. Hofle, Planta Med., 54: 204(1988)

J. B. Harborne and C. A. Willianms ,in :The Biology and Chemistry of the Compositae Ed. by V. H. Heywood, J. B. Harborne, and B. L. Turner, Vol. 1, Academic Press, London, 503～537(1977)

J. D. Martin and J. Daris, in Marine Natural Products ed by P. J. Scheurer, Academic Press, New York, 125 173(1978)

J. Dale, D. Dule, and H. Mosher, J. Org. Chem., 54: 2543(1969)

J. E. Forrest, R. A. Heavock and T. P. Forrest, J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1: 205 (1974)

J. Hodgkin, J. Nature 344: 721-728(1990)

J. Hormaza, J. I., Dollo, L. and Polito, V. S., Theor. Appl. Genet. 89: 9-13(1994)

J. Hu and F. C. Quiros. Plant Cell Rep. 10: 505-511(1991)

J. M. Cardoso and G. Alcantara Sarabia, Comparacion Morfologica en al rata, de la flogosis inducidacon perezona y con carragenina en la articulacion de la rodilla.XVI Congreso Nacional de la Soc. Mexicana de Bioquimica, Taxco Gro, Mexico, Nov.123(1986)

J. J. M. Holthus, Pharm. Weekbl. Sci. Ed., 10: 101(1988)

J. P. Vigneron and I. Jacquet ,Tetrahedron Lett. 32: 939(1976)

J. P. Vigneron and V. Bloy, Tetrahedron Lett., 29: 2683(1979)

J. Tanaka and K. Adachi, J. Chem. Soc. Jpn. Ind. Chem 1505(1983)

J. Tsuji and Kiyotaka Ohno, Tetrabedron Lett, 3966(1965)

J. W. Lown, Acc. Chem. Res. 15: 381(1982)

K. A. Parker, D. M. Spero and K. A. Koziski, J. Org. Chem., 52: 183(1987)

K. Hosaka: J. Biochem., 89(6): 1199(1981)

K. L. Erickson : Marine Natural Products ed. Scheuer, Academic Press, New York, 131～257(1983)

K. S. Dhami amd H. B. Stothers, Can. J. Chem., 44: 2855(1966)

K. Yamaguchi, J. Pharm. Soc, Jpn., 62: 291(1942)

Kochetkov, N. K., Khorlin, A., Chizhou, O. S. and Sheichenko, V. I.: Tetrahedron letters, 20: 730(1961)

Kochetkov, N. K., Khorlin, A., Chizhou, O. S. and Sheichenko: Tetrahedron letters, 9 : 361(1962)

Kochetkov: N. K. et al :J. Gen. Chem (U.S.S.R), 31: 3454(1961)

Kochetkov: N. K. et al, Tetrahedron Letters, 730(1961)

Label-Hardenack, S., and Grant, S. R., 1997. Trends Plant Sci. 2: 130-136.

Lee, H. Y., Han, H. S., Lee, K. Y., Han S. S., Jung J. S., 1998. Kor. J. Plant Tissue Culture, 25(5):309-313.

Lieber, C. S., Teschke, R., Hasumura, Y., Decarli, L. M.: Federation Proceedings, 34(11): 2060(1975)

Lieber, C. S.: Amer. J. Grastrointerology, 74(4): 313(1980)

Lohr, G. W. and H. D.: Methods of Enzymatic analysis, Academic Press, N. Y. 636(1983)

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J. ,Farr, A. L. and Eandall, R. J.: J. Biol. Chem., 193: 265(1951)

M. Fujita, M. Nagai, and T. Inoue, Chem. Pharm. Bull., 30: 1151(1982)

M. Fujita, M. Yamada, S. Nakajima, K. Kawai, and M. Nagai, Chem. Pharm. Bull., 32: 2622(1984)

M. L. Oyarzun and J. A. Garbarino, Phytochemistry, 27 : 1121(1988)

M. Ojika, Y. Shizuri, and K. Yamada, Phytochemistry, 21: 2410(1982)

M. S. Morales-Rios and P. Joseph-Nathan, Magn, Reson. Chem., 25: 911(1987)

M. Suzuki, A. Furusaki, and E. Kurosawa, Tetrabedron, 35: 823(1979)

M. Suzuki, E. Kurosawa and A, Furusaki, Bull. Chem. Soc. Jpn., 61: 3371(1988)

M. Taniguchi and Y. Satomura, Agric. Biol, Chem., 36: 2169(1972)

Ma, H., 1994. Genes Dev. 8: 745-756.

Maeda, S., Takeda, S., Miyamoto, Y., Aburada, M. and Harada, M.: Japan J. Pharmacol., 38, 347(1985)

Marbach, E. P., Weil, M. H: Clin. Chem., 13: 314(1967)

Matsunaga S., Kawano S. and Kuroiwa T., Plant Cell Physiol. 38(4):

499-502(1997)

Mori, M., Hosaka, K., Umemura, Y. and Chukichi, K. Jpn. J. Genet. 68:167-174(1993)

Mulcahy, D. L., Weeden, N. F., Kesseli, R. and Carroll, S. B., Sex. Plant Reprod. 5: 86-88(1992)

N. Fusetani, M. Sugano, S. Matsunaga, and K. Hashimoto, Experientia, 43: 1234(1987)

N. Tanno and S. Tershima, Chem. Pharm. Bull., 31: 837(1983)

Nadlarni, G. D., Pestongamasp, K. N. and Deshpande, U. R.: Acta Pharmacol. et toxicol, 53: 92(1983)

Nagai, H., Yakuo, I. Aoki, M., Teshima, K., One, and Koda, A.: Planta medica, 55: 13(1989)

O. R. Gottlieb, Rev. Latinoam. Quim. 5: 1(1974)

O. Reniaud, P. Capdeville and M. Maumy, Tetrabedron Lett., 26: 3993(1985)

Ohta, U. and Htrose, Y.: Tetrahedron letters, 20: 2483(1968)

Ohta, Y.and Hirose, U.:Tetrahedron letters, 10: 1251(1968)

P. Capdeville and M. Maumy, Tetrabedron., 23,1573 ～1577 (1982)

P. G. Kadkade, Plant Sci, Lett., 25: 107(1982)

P. J. Clark and M. L. Slevin, Clin. Pharmacokinet., 12: 223(1987)

P. J. Pearce, D. H. Richards, and N. F. Scilly, J. Chem. Sox., Perkin Trans. 11: 655(1972)

Parker, J. S. and Clark, M. S. Plant Sci. 80: 79-92(1991)

Pietta, P., Mauri, P. and Rava, A, J. Chromatography, 365: 219(1986)

Poklis, A. and Mackel, M.A.: Clin, Chem., 28: 2125(1982)

R. A. Barrow and R. J. Capon, Aust, J. Cbem.,43: 985(1990)

R. B. Mane and G. S. Krishna Rao, Indian J. Chem. 12: 938(1974)

R. C. Fuson, R. Garetner, and D. H. Chadwick, J. Org. Chem., 13: 489(1948)

R. C. Jones and H. A. Shoule, J. Am. Chem. Soc., 67: 1034(1945)

R. Noyon, I. Tomino, Y. Tanimoto, and M. Nishizawa, J. Am. Chem. Soc., 106: 6709(1984)

Reitman, S., Frankel, S.: Amer. J. Clin. Pathol., 28: 56(1967)

Rozen, F, Etah: J. Biol. Chem, 234: 476(1956)

R. Gupta and K. L. Serthi in:Conservation of Tropical Plant Resources. Botanical Survey of INdia. Ed. by. S. K. Jain and K. L. Mehra, Howrash, New Delhi(1983)

S. Bano, M. S. Ali, and V. U. Ahmad, Planta Med., 53: 508(1987)

S. Zacchino and H. Badano, J. Nat. Prod., 51: 1261(1988)

Sakamoto, K., Koichiro S., Yoshibumi K., Hiroshi K. and Shinobu S., Plant Cell Physiol. 36(8): 1549-1554(1995)

Searcy, R. L.: Amer. J. Med. Tech., 33: 15(1967)

S. Kubo, Y. Ohkura and E. Hosoya: Planta Mes, 58: 490(1992)

Smith-kidlland, A., Blom, G. P., Svendsen, L., Bessesen, A. and Morland, J.: Acta Pharmacol et toxicol, 53: 113(1983)

Suekawa, M., Shiga, T., Sone, H. and Ikeya, Y.:Yakugaku Zasshi, 107(1987)

S. P. Forsey, D. Rajapaksa, N. J. Taylor, and A. C. Louie, in:"Etoposide (VP-16-213)-Current Status and New Developments. "Ed. by B. F. lssel, F. M. Muggia, and S. K. Currer, Academic Press, Orlamdo, 1984,

T. K. John and G. S. Krishna Rao, Indian J. Chem., 24: 35(1985)

T. M. Malinegre, Pharm, Weekbl., 110(28): 601(1975)

V. K. Haward and A. S. Rao, Tetrabedron, 21: 2953(1965)

Van Nigtevecht, G. Genetica 37: 281-306(1966)

Virk, P. S., B. V. Ford., M. T. Jackson, and H. John, Heredity, 74: 170 179.(1995)

Volicer, L. et al : Arch. int. Pharmacodyn, 163: 249(1966)

W. D. Dirrmann, W. Kirchoff and W. Stumpf, Liebis Ann. Chem. 681: 30(1965)

W. E. Huckabee : Clin. Invest., 37: 255(1958)

Waugh R., Powell W., 1992. TIBTECH. 10: 186-191.

Waunforth, H. B.: Experimental and Surgical technique in thd rat. Academic press(1980)

Westergaard, M. Adv. Genet. 9: 217-281(1958)

Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski and S. V. Tingey. Nucleic Acids Res 18: 6531 6535(1990)

Wrobleski, F., Ladue, J. S.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 90: 210 (1955)

Y. Fukuyama, K. Mizuta, Q. Winjuan and Waxiue : Planda Med. 501(1986)

Y. Mizoguchi, N. Kawada and H. Tsutsu: Planta Ied. 57: 320(1991)

Y. Shimizu, H. Mitsuhashi, and E. Caspi, Tetrabedron Lett.,4113(1966)

Y. Kiso, M. Tohkin and H. Taguchi: Planta Med. 331(1985)

Yu, L. X. and H. T. Nguyen, Theor. Appl. Genet, 87: 668 672(1994)

Zapotilk, F. T. et al: Farm.Zh. 31(3): 79(1976)