

천연물과 기능성 육제품

김 수 민

(경산대학교)

천연물과 기능성 육제품

김수민
경산대학교 생명자원공학부

I. 서 론

우리가 섭취해온 식품은 생명유지를 위한 중요한 역할을 감당하여 왔으나 공업화 및 기계화로 인한 생활의 변화로 인해 영양적인 기능보다는 미각, 후각, 시각적인 기호적 기능들을 선호하게 되었다. 그러나, 최근에는 식품의 섭취로 생명활동을 위한 조절기능인 생체방어, 질병의 방지와 회복, 신체리듬의 조절, 노화억제 등의 기능들이 대두되고 있다. 또한, 국민들의 건강에 대한 관심이 증가함에 따라 건강 지향적인 식품개발이 활발히 진행되고 있으며, 기호식품에 있어서도 건강유지를 위한 기능성 제품이 상품화되고 있다.

기능성 식품은 안전한 천연물을 이용하여 특별한 기능이 강화되어 식품 자체와 생체 내에서 그 기능이 발현되도록 만든 식품으로 이 분야에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히, 항산화제는 산화에 의해서 일어나는 식품의 냄새나 풍미의 변화, 유지의 산패, 그리고 식품의 변색을 방지하거나 지연시킬 수 있는 기능을 가진 화합물을 총칭하며 인공합성품을 비롯하여 동식물체 내에서도 이러한 기능을 갖고 있는 물질이 많이 밝혀지고 있다. 그러나, 대부분의 천연 항산화제들은 나무, 줄기, 뿌리, 잎, 꽃 등의 식물체에 대부분 존재하며 이들은 주로 폴리페놀물질로 알려져 있다. 현재 천연으로부터 산화반응 및 radical의 반응성을 억제할 수 있는 항산화 물질을 찾는 연구가 활발히 이루어지고 있으며(1,2), 일부는 상품화되고 있는 실정이다.

식품의 가공, 저장 및 조리 중 식품성분들의 상호반응으로 식품의 저장성과 기호성 향상을 목적으로 첨가되는 식품첨가물이 식품성분과의 반응에 의하여 돌연변이를 유발시키거나 발암작용을 갖는 유전독성물질의 생성이 식품의 안전성 측면에서 중요한 문제로 대두되고 있다(3). 그 대표적인 예로 육제품이나 수산가공품 등에 발색제로 첨가되는 질산염이나 아질산염은 육색의 발색 및 안정화 뿐만 아니라, *Clostridium botulinum*에 대한 정균작용, 육제품의 풍미 향상, 산패취 발생감소 등을 개선하는데 중요한 역할을 하나 식품 및 생체내의 잔존 아질산염은 그 자체가 독성을 나타내며 일정농도 이상 섭취하게 되면 혈액 중에 hemoglobin이 산화되어 methemoglobin을 형성하여 메트헤모글로빈증 등 각종 중독을 일으키며, 단백질 식품이나 의약품 및 잔류농약 등에 함유되어 있는 2급 및 3급 아민류와 반응하여 발암성 니트로사민을 생성하는 것으로 알려져 있다. 이에 nitrite는 온도, 산성 pH 또는 ascorbate 존재하에 염지액이나 염지육에서 감소한다는 보고 등이 있으나, 실제적으로 육제품에 적용하여 nitrite 소거

작용을 검토한 연구는 미비한 실정이다.

국내의 농·수산가공업체들로부터 배출되는 게껍질, 감귤껍질, 참깨박 등 폐자원의 효율적인 이용을 위하여 여러 가지 연구들을 한 결과 이들 폐자원으로부터 유용성분들을 얻을 수 있었다. 갑각류에서 얻어지는 chitosan은 dietary fiber로서 가능성이 검토되었으며, 이것이 hypolipidemic, hypocholesterolemic activity가 있다는 것이 보고되었다(4,5). 또한, 감귤류에 존재하는 플라보노이드는 항알러지성, 항염성, 항바이러스성, 항암성 등의 활성을 갖고 있으며, 한국산 조생종 감귤의 과육과 과피에 존재하는 플라보노이드 성분인 naringin은 항균작용, hesperidin은 혈압저하효과를 나타내며, 이들은 과육보다 과피에 더 많이 함유되어 있다고 보고되어 있다. 참깨의 부산물인 참깨박은 유지의 산패와 생체내 산화물을 방지하는 항산화 기능뿐만 아니라 콜레스테롤 강화작용, 화학적 유발 유발암 예방효과, 피부미용 및 노화 방지 등의 다양한 생리기능들이 밝혀져 있고 팽이버섯, 마늘, 녹차, allspice, 하수오, 오미자, 은행, 솔잎 등의 식물체의 유용한 기능들에 대한 많은 연구들이 이루어져 있다.

이미 많은 기능들이 알려진 식물체를 가지고 free radical 반응 및 지방산화 억제에 미치는 영향과 니트로사민 생성의 직접적인 영향인자인 아질산염에 대한 천연물의 분해효과를 검토하여 건강 지향적인 기능성 육제품 개발에 대한 연구가 필요하다.

II. 천연물 산업의 기술 분야

식물 성분 중 이차대사물, 즉 천연물(natural products, natural substances, natural constituents)을 활용하여 유용성 즉 효능과 기능을 바탕으로 상품을 개발하면 높은 부가가치를 창출할 수 있다. 유용천연물 생산품의 유형을 분류하면 대략 다음과 같다.(6,7)

- 천연약물(natural medicines)
- 기능성 식품/건강식품/건강보조식품-여러 명칭이 있으나 그 기능은 동일하다(functional food/health food/nutraceuticals/dietary supplements)
- 천연색소(natural coloring agents; dyes)
- 천연향료(natural fragrant)
- 천연살충제-농약(natural insecticides-pesticides)
- 기능성 화장품(functional cosmetics)

이들 제품의 특성은 다품종, 소량, 고부가가치이며 높은 천연물과학적 기술력(효능, 안전성, 품질과 성분 추출 기술)이 요구되고 물질특허나 용도특허를 획득할 수 있다. 천연물산업(Natural Products Industry)은 이차대사물을 활용하여 위에 열거한 제품을 생산하는 산업분야이며 바이오테크 산업(biotech industry)분야에서 중요한 위치를 차지하고 있다. 최근에는 미국을 비롯하여 유럽, 호주 등 선진 각국에서 보완 및 대체의학(complementary and alternative medicine)에 관한 대중적 관심과 국가 차원의 연구개발 정책을 수립하여 지원이 확대되면서 천연물산업이 빠른 속도로 성장하고 있다.

천연물산업의 핵심 요소기술 분야는 4가지로 요약된다. 또한, 4가지 분야의 핵심기술이 종합적으로 상호 연계를 갖추면서 활용되어야 한다. 이를 요약하면 다음과 같다.

1) 천연물 정보화 기술(Natural Products Informatics): 모든 연구 초기 단계부터 요구되는 것이 문헌검색과 평가이다. 천연물산업에 필요한 정보는 매우 광범위하고 다양하다. 식품 자원과 생산, 전통적 사용 방법과 전통약물, 현대적 효능평가 즉 약리학, 식품영양학, 독성학, 천연물 성분의 추출 및 화학구조 결정 등 기술적 분야가 여러 학문분야에 걸쳐 있기 때문에 종합과학(multidiscipline)적 성격을 띠고 있다. 이러한 특성상 특정 전문 부분에서 체계적인 정보 수집과 평가 능력이 요구되며 이를 전산화하는 콘텐츠(contents)기술로 데이터베이스 구축을 이룩하여야 한다. 세계적으로 활용되는 정보 콘텐츠는 Napralert, TradiMed, Cochran 등이 있으며 여타 자료는 참고자료를 참조하기를 추천한다.

2) 효능 및 안전성 평가 기술(Screening and Safety Assessment): 효능 평가를 통하여 이차 대사물 성분의 기능성을 밝혀 용도특허를 획득할 수 있으며 제품의 성격이 정해진다. 아울러 안전성 평가를 통하여 독성에 관한 자료를 확보하여야만 제품화 및 등록을 할 수 있다. 여기에는 풍부한 기술적 경험과 규제기관의 요구사항을 검토할 수 있는 능력이 요구됨으로 높은 기술 수준을 갖춘 고급 기술인력이 필요하다.

3) 자원(Resources): 재배 육종을 통한 생산력을 높이는 기술과 배양기술을 이용하여 이차대사물을 생산하는 기술 및 유전자 조작을 통하여 생산하는 기술을 포함한다. 일차대사물을 생산하기 위하여 광대한 면적이나 적절한 기후 조건이 전제되지 않기 때문에 자원 국가가 아니더라도 기술력이 충분하면 가능하다. 특히 합성화학 기술을 활용하여 이차 대사물 성분을 대량 합성할 수도 있다.

4) 성분 추출 및 구조 규명 기술(Natural Products Chemistry): 유용천연물 제품의 규격화 및 품질 관리를 위하여 기준이 되는 성분을 추출하여 순수 분리하고 화학구조를 결정하는 것이 천연물화학 기술이다. 만약 유효 성분이 과거에 발표되지 않은 성분인 경우 신물질로 물질특허도 획득할 수 있다.

이상의 4가지 분야의 기술이 핵심이 되며 주변 기술로는 제품화 및 규제 분야의 법률전문가들이 필요하다. 대부분의 천연물산업 제품은 규제기관의 생산허가와 등록이 요구되기 때문이다.

Ⅲ. 천연항산화제 연구방향

1. 활성산소가 지방산화에 미치는 영향

항산화제의 역할은 크게 금속이온의 착염화 기능, enzyme (superoxide dismutase) 활성과 enzyme 유사활성 물질에 의한 free radical 포집력으로 radical 반응을 종결시키는 기능으로 분류되고 있다(8-12). 지금까지 알려진 것으로 인간이 섭취하는 산소의 95% 이상이 수소이온과 세포의 대사과정에서 생기는 전자를 받아 가장 안전한 물질인 물로 전환된다(Fig. 1). 이때 산소는 4개의 전자를 받아 물 두 분자가 되는 것이다. 그러나, 섭취된 산소의 3% 정도는 전자를 4개까지 받지 못하고 불안정한 상태에 머물게 된다. 따라서 이들은 더 안전한 화합물인 물이 되기 위해 주위의 물질로부터 전자를 뺏으려는 성질을 강하게 띠게 되며, 이러한 산소를 활성산소 또는 유해산소라 한다.

원래 사람의 체내에서는 항상 산소를 소비하는 과정에서 또는 에너지 소비가 심할 때 활성산소가 다

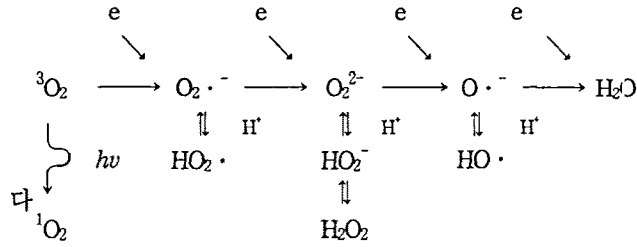


Fig. 1. Scheme to illustrate the formation of reactive oxygen species (shown in bold type) from the stable triplet oxygen, ${}^3\text{O}_2$.

량으로 발생하는데, 이를 소거하는 방어계가 존재하고 백혈구에 의한 살균작용에서와 같이 활성산소를 생체방어기구에도 이용하고 있다. 그래서 젊을 때에는 산소장해를 받는 것보다도 방어계에 의한 회복기능이 더 월등히 작용하기 때문에 병에 걸리지 않지만 나이가 먹어감에 따라 회복기능이 저하하여 질병을 일으킨다고 한다(13).

활성산소(유해산소)는 생체계나 식품 중에 존재하는 불포화지방산을 다량 함유한 지질을 쉽게 산화시켜 hydroperoxide 등을 생성하며, 생체내에서 DNA에 손상을 일으켜 발암 및 돌연변이 등의 세포기능 장애를 유발시킨다. 또한 활성산소는 동맥경화 및 노화 등에도 관여하며, 식품의 품질을 저하시킨다고 알려져 있다. 활성산소종과 radical은 주로 불포화 지방산이 많이 분포하는 생체막 부위를 공격하여 lipid radical을 형성하고 이어 연쇄 산화반응을 일으켜 막 손상을 초래하며, 산화촉진제인 Fe^{2+} 이나 heme 단백질과 결합할 경우 산화는 더욱 촉진된다. Superoxide radical 반응은 세포의 구성요소에 매우 유해한 작용을 하며, 여러 가지 질병을 유발시켜 세포의 변이, 발암, 조직손상과 노화에 관여한다. 활성산소의 유해성에 대한 생체방어 체계로서는 superoxide dismutase(SOD), catalase, glutathion 등이 있어 유해 산소종을 분해시켜 안정된 물까지 전환시켜 산소상해에 대한 방어 기능을 한다고 알려져 있다. 최근에는 식품분야에서 효소는 아니지만 활성산소의 반응성을 감소 또는 무력화할 수 있는 물질의 발굴과 이용에 관한 연구가 커다란 관심이 되고 있다. 유지의 지방산화에서 알 수 있듯이 어느 산화방지제가 모든 종류의 유지류에 같은 산화방지 효과를 나타내지는 못하듯이 특정 물질이 생체의 산화반응 또는 radical 반응 전반에 걸쳐 반응성을 억제하지는 못한다. 즉, 활성산소의 종류나 radical source에 따라 또한 반응기작에 따라 반응성을 억제할 수 있는 항산화 물질이 다르며 이러한 항산화 물질에 대한 체계적인 연구가 필요하다고 생각한다.

2. O₂의 종류가 지방산화에 미치는 영향

유지의 산화에 의한 산패는 크게 free radical chain reaction에 의한 자동산화와 lipoxygenase 등에 의한 효소적 산화로 만들어진 일중항산소(singlet oxygen)가 불포화지방산과 반응하여 생성된 nonconjugated diene 화합물에 의한 산패로 구분할 수 있다. 이러한 유지 산패에 대한 항산화 연구로는 팜유, 돈지, 참기름, 어유, 대두유, 면실유, 우지 등에 관한 연구가 이루어져 있다. 지방의 산화방지에 사용되는 항산화제로는 항산화성이 강하고 가격이 저렴한 butyl hydroxy anisol이나 butyl hydroxy toluene 등이 있으나, 인체에 미치는 독성이 크기 때문에 사용이 제한되고 있다. 따라서, 항산화력이 높고 보다 더 안

전한 항산화제를 개발하고자 하는 연구가 활발히 진행되어 왔다(14). 지금까지 연구 보고된 천연 항산화 성분으로는 tocopherol, sesamol, flavonoid, phenol 유도체, oryzanol 등이 있으나 유지 산화방지 효과는 항산화성분의 이화학적 성질과 유지의 종류에 따라 많은 영향을 받는 것으로 보고되고 있다. 천연 항산화제로서 이용성이 넓은 tocopherol은 실용적이나 식물성 유지에는 효과가 낮으며, linoleic acid 보다는 oleic acid에 효과적인 것으로 알려져 있다(15). 인체에 무독하며 항산화력이 강한 천연 항산화제를 검색하기 위한 연구결과로 향신료 추출물, 차잎 추출물, 생약제 등이 tocopherol과 병행하여 유지식품의 가공, 저장에 이용되고 있으나 식품의 색이 변하거나 냄새가 강하고 가격이 비싼 결점을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 지방산화를 예방하는 주요한 방법으로는 free radical terminator에 의한 phenolic 항산화제 이룰테면, butylated hydroxytoluene (BHT), butylated hydroxyanisole(BHA), tertiary- butylhydroxyquinone(TBHQ) 그리고, α -tocopherol를 첨가하거나, 금속이온 봉쇄작용을 위해 EDTA, citric acid, phosphate를 이용할 수 있으며 환경적인 요인에는 ascorbate 를 이용할 수 있다. 또한, 물리적 조건과 포장조건 등을 달리하여 지방산화를 막을 수 있다(16). 기능성 육제품의 개발을 위해서는 육제품의 지질과 가장 상호 호환성이 높으며 지질 산패 억제능이 강한 항산화제에 대한 연구가 필요하다고 생각한다.

3. 고기 자체가 지방산화에 미치는 영향

지방산화는 육제품에 있어서 풍미, 색, 조직 그리고 영양가 등의 품질 저하를 일으키며, 지방산화로 형성된 여러 종류의 산화물은 세포와 동물계에서 질병을 일으키는 원인으로 작용한다. 지방 산화속도에 영향을 미치는 인자로서 지방산 조성, 금속성 촉매제, 산소분압, 온도, 광선 등이 연구되고 있다. 특히, 근육에 존재하는 미오글로빈은 그 존재형태에 따라 자유라디칼의 형성을 촉매함으로써 지방산화를 가속화시킨다고 알려져 있다(16). Lie와 Watt(17)는 미오글로빈에 의한 산화촉매 기능은 신선육에서 두드러진다고 하였고, Green과 Prince(18)는 가열 등에 의하여 미오글로빈이 변성되면 철 이온과 불포화 지방산이 쉽게 반응하는데, non-heme iron과는 달리 산화형(Fe^{3+})일 때보다 강력한 산화촉매작용을 한다고 하였다. Liwis 와 Willis(19), Kunsman(20) 등은 헴 화합물의 산화촉진작용은 불포화지방산에 비해 상대적으로 낮은 비율로 존재할 때 뚜렷하였고, 반면 높은 비율로 존재할 경우에는 지방산화를 촉진하기보다는 오히려 억제한다고 하였다. Yoon(21) 등은 미오글로빈을 첨가하였을 때 triglyceride

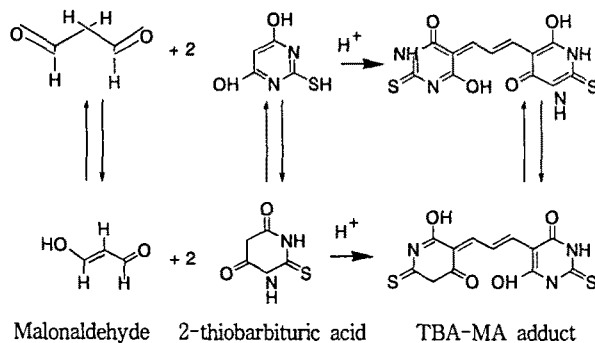


Fig. 2. Adduct formation between malonaldehyde and the 2-thio-barbituric acid reagent.

분자종의 안정성은 분자종의 이중결합수가 같은 경우는 구성지방산의 불포화도가 낮을수록 높았다고 보고하였는데, 이들에 대한 반응기작이 정확히 알려져 있지 않다. 이러한 육에 대한 항산화 연구는 고농도의 α -tocopherol은 육색 개선, carbonyl 화합물 형성 지연과 drip의 감소효과를 나타내었다고 보고하였으며 α -Tocopherol의 함량이 돼지근육조직의 지방 안정성을 측정하는 요인이 된다. 지방산화를 억제하는 carnosine(β -alanyl-L-histidine)은 척추동물의 골격근에 dipeptide 형태로 존재하고, carnosine synthetase에 의해 β -alanine과 L-histidine으로부터 합성된다. 지방산화도의 측정방법인 2-thiobarbituric acid(TBA) 시험은 Kohn과 Liversedge가 meat의 산화정도를 평가시 제일 먼저 사용하였으며, 동물조직을 호기성 배양에서 TBA와 함께 반응할 때 핑크색 화합물로 발색되는 것을 관찰하였다. 지방 중 불포화지방산의 자동산화과정 동안 지방산화의 2차산물인 malonaldehyde(MA)가 발생하며, 이는 높은 반응성을 가지고 있고, 다른 식품요소에 결합된 상태로 존재한다. 식품의 산/열처리시 MA의 결합력을 약하게 하며, MA는 Fig. 2와 같이 TBA시약과 반응하는 주된 물질이며, 분홍색을 더는 발색 물질은 532 nm가 최대 흡수 파장이다. 532 nm에서 흡수되는 분홍색 색소산물 들은 MA, 2, 4-alkadienals 그리고, 2-alkenals 등이다.

IV. 천연물을 이용한 기능성 축산 식품개발

1. 기능성 식품의 정의

기능성 식품은 식품에 물리적, 화학적, 생명공학적인 기법 등을 이용하여 식품성분이 가진 생체방어, 신체리듬의 조절, 질병의 방지와 회복 등에 관계하는 신체조절 기능을 생체에 대하여 충분히 발휘하도록 설계하여 가공된 식품으로 정의하고 있다. 이들은 functional food, pharma food, designer food, medical food, genetically engineered food 등으로 표현하며, 이들 용어의 의미는 일반적인 식품과는 다른 식품의 기능을 표시하기 위한 것으로 영양 보급적인 식품의 1차 기능, 향미·디자 등 관능적 만족감을 부여하는 식품의 2차적인 식품의 기능이 아니라 생명활동에 대한 고차원적 조절기능인 식품의 3차 기능을 특별히 강조한 식품이다(22).

2. 기능성 축산식품의 개발 배경

- 천연자원으로 부터 얻어진 유용성분의 이용방안 확대
- 질병의 예방과 치료를 요하는 기능성 식품의 개발요구
- 축산물의 기능성 강화로 인한 부가가치의 증진
- 급속한 산업화로 인한 가공식품의 소비증대에 따른 안전성 문제 해결

3. 기능성 축산식품의 개발현황

축산식품은 유사 이래 인간의 주요 식품자원으로 매우 유용하게 사용되어 왔으며 인체 기능의 정상적 유지 및 발달에 필수적인 영양소가 다량 함유되어 있어 중요한 식품소재로 인식되어 왔다. 최근 고

혈압, 동맥경화, 뇌졸중 등의 심혈관질환이나 암, 당뇨병 등의 성인병의 위험인자(risk factor)로 알려진 콜레스테롤, 포화지방의 함량이 축산식품에서 높다는 이유로 일부 계층에서는 이를 기피하는 경향을 나타내고 있다. 그러나 이들 소비자는 건강지향적 사고와 대중매체에 의한 건강 및 영양정보의 습득으로 다양하면서도 차별화된 고급 축산물에 대한 구매경향은 높은 것으로 파악되고 있다. 따라서 질병의 예방이나 치료에 효과적이면서 건강증진에 도움이 될 수 있는 부가가치가 높은 고급 축산물의 개발은 필연적인 것으로 보인다.

1) 지방함량이 낮고 근육단백질이 풍부한 meat 생산

지난 50여년 동안 축산식품의 생산, 가공 및 이용 분야에서 획기적인 기술개발이 이루어져 왔다. 즉 축산식품 자체의 조성을 변화시키고 적육 생성율과 효율성을 조절할 수 있는 생물활성이 있는 합성물의 제조가 바로 그것이다. 이와 같은 작용을 담당하는 합성물에는 somatotropin과 beta-adrenergic agonists의 두 가지가 있다. Somatotropin(ST)은 성장호르몬으로서 191개의 아미노산으로 구성되어 있으며 뇌하수체 전엽에서 합성, 분비되는 호르몬이다. 분자량은 21,500 dalton으로 두 개의 이황화 결합(disulfide bond)을 지니는데 이 호르몬의 생리활성을 결정하는 중요한 부분이다. 최근 ST는 recombinant porcine somatotropin으로 불리는 porcine somatotropin (PST)의 합성체가 생산되고 있다. 이들 ST는 천연적인 형태이든 합성된 형태이든 분자 구조상 유사하며 단지 일부 구조에 약간의 차이가 있을 뿐이다(23).

PST를 성장기 돼지에게 투여했을 때 자발적 사료섭취는 저하되고 일당증체량은 증가되었다. PST를 70~130 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 체중 농도로 투여하였을 때 일일 사료 섭취량은 약 0.44kg(14%) 감소, 일당증체량은 0.14kg(15%) 증가하였으며 이와 같은 성장률 향상은 단백질과 무기질 합성이 증가하고 체지방 축적이 감소되었기 때문으로 나타났다. 또한 PST는 간, 신장, 위장의 내장은 물론 골격근(skeletal muscle)의 성장을 촉진시키는 반면 피하지방, 복강, 골격근의 지방량은 감소시킨다. 돼지에서 체중 증가 및 도체 적육율(carass leanness)이 10~100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 체중 농도로 PST를 투여하였을 때 직선적 증가를 보였다(24).

2) 지방산 조성을 조절한 meat 생산

포화지방산이나 콜레스테롤 함량이 높은 축산물의 영양조성상의 문제점을 극복하기 위하여 축산물의 지방산 조성을 바꾸려는 시도가 계속적으로 진행되어 오고 있다. 문제가 되는 포화지방산은 lauric acid(C12:0), myristic acid(C14:0), palmitic acid(C16:0) 등으로 축산물 중에 분포도가 높은 palmitic acid를 stearic acid 혹은 다른 불포화지방산(oleic acid 등)으로 바꾸려는 연구가 이루어지고 있다. 고올레인산 식이 급여시 근육과 지방조직에 oleic acid 함량이 증가하고 palmitate 및 다른 포화지방산의 감소가 나타났다. 반면에 소의 경우 급여된 사료 중 불포화지방산은 소의 제 1위 미생물에 의하여 수소첨가(hydrogenation)작용이 일어나 포화지방산으로 변화되므로써 사료내 불포화지방산을 높이기 위한 또 다른 기술이 필요하다. Calcium alginate로 coating한 high oleic acid sunflower oil 급여시 지방조직에 큰 변화를 주지 못했으나 stearate가 크게 증가하고, palmitate는 감소하는 결과를 얻었다. 비록 원하는 oleic acid 함량의 증가는 달성하지 못했으나 오히려 stearate가 증가하므로써 또 다른 좋은 결과가 유도되었다. 왜냐하면 palmitate가 oleic acid로 전환되기 위하여 elongation과 desaturation의 두 단계가 필요하지만 stearic acid는 oleic acid로 쉽게 전환되므로써 대사상 잇점이 있게 되기 때문이다. 과거에는

Table 1. Characteristics of omega pork

Item	Control pork	Omega pork
Total omega fatty acid (%)	1.0	7.0
EPA	-	2.5
DPA	0.3	1.4
DHA	0.4	2.2
Cholesterol (mg/100g)	90	76
Arachidonic acid (%)	2.2	1.6
ω 6/ ω 3 ratio	16:1	3:1
SFA (%)	34.9	34.9

stearic acid가 혈액 중 cholesterol이나 triglyceride를 증가시키므로써 palmitate, lauric acid와 함께 인체에 유해한 물질로서 인식되어 왔으나 일련의 연구에서 밝혀진 바로는 stearic acid가 오히려 cholesterol을 감소시키거나 적어도 아무런 영향이 없는 중성적 효과(neutral effect)를 지닌 것으로 나타나(25), stearic acid가 풍부한 meat의 생산도 인체에 유익한 작용을 할 수 있을 것으로 기대된다.

돈육의 경우 분쇄 linseed를 5% 함유한 사료를 급여했을 때 무처리구에 비해 피하지방 및 근육내의 제한된 범위내에서 함량이 증가하였다(26). 이남형(27,28) 등은 ω -3 지방산 함량이 높고 콜레스테롤 함량이 적은 고기를 생산하기 위해 동·식물성 기름 중 linolenic acid와 EPA 함량이 높은 유지를 선정 실험한 결과 콜레스테롤 함량이 일반 돼지고기보다 16% 낮고 arachidonic acid(AA) 함량이 일반 돼지고기보다 27% 낮으며 ω 3: ω 6 지방산 비율이 높아진 돈육을 생산하였다(Table 1). 아마종실, 들깨, 밀, 조, 귀리, 어분, 소금, 항산화제 등을 첨가한 ω -3 지방산 강화 돈육 생산용 사료도 개발되었다(29). 이들 ω -3 지방산 강화육은 일부 회사에 의해 생산, 시판되고 있으며 가격은 일반육에 비해 약 20~30% 정도 비싸게 판매되고 있다.

3) 생리 활성 성분을 변화시킨 계란 생산

성인병의 위험인자(危險因子 : risk factor)로 작용하는 콜레스테롤 섭취를 줄이고 저칼로리, 저지방, 고섬유질 위주의 식생활을 지향하는 현대인의 식품 선호경향에 맞는 새로운 식품에 대한 개발 요구가 높아지고 있다. 계란의 콜레스테롤 함량을 낮추기 위한 방법에는 몇 가지가 있을 수 있다. 첫째는 사양학적 방법으로 계란에 물리, 화학적 처리를 하지 않고 사료의 성분을 변화시켜 주거나(30,31), 콜레스테롤의 흡수, 배설, 합성 과정을 저해시키는 약품을 산란계에 투여한다든가 혹은 닭의 품종이나 계통을 유전적으로 취사, 선택하거나 닭의 산란주기, 나이, 계란의 크기 등을 조절하므로써 저콜레스테롤 계란을 생산하는 것이다(Bogin, 1991). 약품에 의해 콜레스테롤 함량을 조절하는 방법은 가장 확실하지 마 이러한 약품(D-thyroxin, triparanol, azasterol, vanadium, diethyl-amino-ethylc(phenyl valerate) 사용 시 닭에 대한 부작용, 난중(卵重), 영양소 조성의 변화, 계란내 잔류물(undesirable residues) 및 원가 상승이 문제가 될 수 있다(32-34).

두번째 방법은 산란계에 기술적으로 물리, 화학적 처리를 실시하여 콜레스테롤을 저하시키는 방법이 다. 계란의 콜레스테롤을 제거하기 위한 기술적 처리 방법에는 흡착제나 효소를 이용하거나(35) 초임계

Table 2. Characteristics of omega egg

Item	Control egg	Omega egg
Total omega fatty acid (%)	1.74 ± 0.39	7.21 ± 0.54
LNA	1.25 ± 0.09	2.82 ± 0.46
DPA	0.13 ± 0.03	0.49 ± 0.11
DHA	1.36 ± 0.30	3.90 ± 0.59
Cholesterol (mg/g of yolk)	14.19 ± 0.64	12.61 ± 0.94
Arachidonic acid (%)	3.63 ± 0.40	2.15 ± 0.21
ω 6/ω 3 ratio	9.84	2.17
SFA (%)	38.44 ± 2.43	37.41 ± 1.95

추출법이나 용매 추출법을 이용하여 콜레스테롤을 제거하는 방법이 있다(36). 그러나 이런 방법으로 콜레스테롤 함량을 낮추는 것은 기술적 측면에서 여러 가지 제한 사항이 많고 제거율 또한 낮은 편이라 보편적으로 활용되지 못하고 있는 실정이다. 한편 국내외에서 ω -3 지방산을 강화시킨 계란이 캐나다, 일본 및 우리나라에서도 시판, 관심을 끌고 있다(37). ω -3 지방산 강화란의 장점은 콜레스테롤 함량의 저하보다는 고농도의 ω -3 지방산의 작용으로 인해 혈액 중 콜레스테롤 상승 등을 억제시키는데 있다.

한찬규(38) 등은 콜레스테롤 함량은 낮추고 ω -3 지방산을 강화시킨 계란을 개발하고자 사료에 ω -3 지방산 함량이 높은 어유, 들깨유, 아마인유(linseed oil)와 ω -6 지방산 함량이 높은 레시틴(lecithin)을 적정 비율로 혼합한 기름을 지방원으로 기존 산란계 배합사료에 첨가하여 실험한 결과 일반란에 비해 콜레스테롤 함량은 약 10% 감소되고 난황의 omega-3 계열 지방산은 3~5배 증가된 계란을 생산하였다. 즉 저 콜레스테롤 및 ω -3 지방산 강화 계란은 동·식물성 기름을 적절히 혼합하여 지방의 이용율을 향상시키는 동시에 사료내 불포화지방산/포화지방산(PUFA/SFA)비율이 1:1~1.5:1 정도되게 조절하므로서 콜레스테롤 함량을 감소시키고 생체내 기능 활성화에 유용한 ω -3 계열 지방산 함량을 증가시켜 준 것이다. 이러한 특수란은 생체 생리활성의 지표로 인식되고 있는 혈중 중성지방, 콜레스테롤 함량 및 수축기 혈압(systolic blood pressure)에 대한 동물실험 결과에서도 유의한 효과를 나타냈다(Table 2).

4) 저 콜레스테롤 및 오메가-3 지방산 강화 우유 생산

우유의 콜레스테롤 함량(11mg/100g)은 타 축산식품에 비해 높은 편이 아니나 우유를 가공한 유제품(버터, 치즈) 생산시 우유 중의 지방산 조성이나 콜레스테롤 함량이 제품의 소비 및 선호도에 대단히 큰 영향을 미치게 되므로 이들 성분의 조절은 중요한 의미를 갖는다. 우유의 콜레스테롤을 제거하기 위한 기술로서 물리적 방법으로는 우선 콜레스테롤과 유사한 분자구조를 갖는 베타-사이클로덱스트린(beta-cyclodextrin : beta-CD)을 이용하여 콜레스테롤을 흡착시켜 제거하는 방법을 들 수 있으며 초임계 가스 추출법(supercritical fluid extraction) 및 steam stripping법을 이용할 수가 있는데 전자는 초임계 상태에 있는 가스를 이용, 혼합물로부터 특정성분을 분리 추출하는 법으로서 고압을 가하면 용출물의 증기압이 상승하여 용매인 가스밀도가 증가하게 된다. 이 때 용매-용질간의 상호작용을 이용하여 분리하게 된다. 보통 이 방법을 사용할 때 콜레스테롤 제거수율은 약 85% 정도였으며 콜레스테롤의 완전 제거는 어렵다. 한편 미국의 Omega Source社가 개발한 steam stripping법은 진공하에서 공기를 흡입시

켜 220~230℃에서 콜레스테롤을 증류하는 것으로 제거수율은 약 95% 정도로 보고하고 있으며 Omega Source社에서는 이 방법에 의해 콜레스테롤이 제거된 버터유를 1일 120kg정도 생산하고 있다고 한다. 그러나 이 방법을 사용할 때 문제점은 풍미가 저하될 가능성이 있어 이의 보완이 요구된다. 생물학적 방법은 미생물의 작용으로 콜레스테롤을 분해하거나 타 물질로 변화시키는 방법으로 사용 가능한 미생물로는 eubacteria, *Rhodococcus equi* N23, Nordica 등이 있다(39).

V. 천연물 첨가에 의한 육제품 개발

1. Nitrite함량이 감소된 소시지 개발

1) 보수력의 변화

천연물 첨가 소시지의 보수력의 변화는 저장기간의 경과함에 따라 30℃ 저장에 비하여 10℃ 저장이 서서히 감소하였으며, 대부분 59~43%의 좁은 폭으로 감소하였다. 그러나, 오미자와 ascorbic acid 첨가구는 52~33%로 다소 큰 폭으로 감소하는 현상을 나타내었다. 이는 Fig. 3에서 보는 바와 같이 pH가 등전점인 5.0~5.1에 가까울수록 ⊕전하를 가진 활성기의 수와 ⊖전하를 가진 활성기의 수가 동일하게 되어 서로간에 잡아당기게 됨으로, net charge는 0에 가깝게 된다. 그러므로, 물분자와 결합할 수 있는 단백질 분자 중의 활성기 수가 대단히 적어지고 결과적으로 보수력이 저하된 것으로 사료된다.

2) 지방산화에 미치는 영향

저장기간에 따른 소시지의 TBARS값의 변화는 10℃ 저장의 경우 저장 0일째 대조구 0.13 MDA ppm에 비하여 천연물 첨가구인 chitosan 0.11 MDA ppm, sesamol 0.12 MDA ppm, 감귤껍질 0.11 MDA ppm, 오미자 0.12 MDA ppm으로 다소 낮은 값을 나타내었으며, 저장기간이 경과할수록

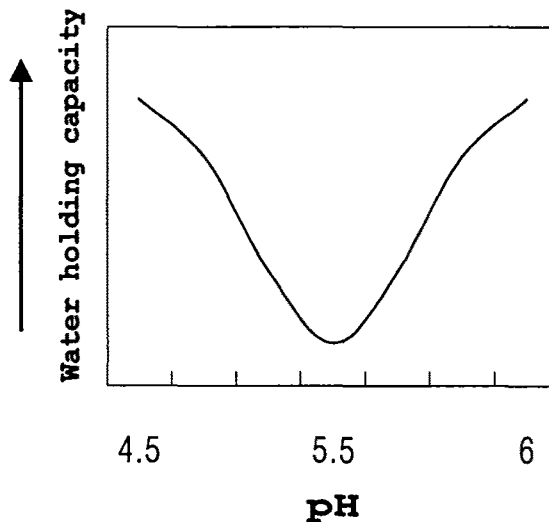


Fig. 3. Effect of pH on water holding capacity.

TBARS 값은 서서히 증가하였다. 30 °C 저장의 경우도 저장 10 일째까지 서서히 TBARS 값이 증가하였으나, 저장 20 일째부터는 급격히 증가하였다. 10 °C 저장과 30 °C 저장 모두 대조구에 비하여 천연물 첨가구가 다소 낮은 TBARS 값을 나타내었으나, 유의성은 인정되지 않았다($P>0.05$). 또한, 저장성 비교를 위한 potassium sorbate 첨가구는 대조구와 천연물 첨가구에 비하여 낮은 TBARS 값을 나타내었으나, 유의성은 인정되지 않았다. 이는 Han과 Park(40)의 지방함량 20 % 에 potassium sorbate 0.28 % 첨가한 소시지는 저장기간별 대조구와 저장 2 주째부터 지방산화 정도에 차이를 나타내며, 유의성이 인정된다는 보고와는 부분적으로 일치하지 않았다. 이러한 원인은 소시지 제조시 첨가되는 향신료의 차이와 이의 작용에 의한 것으로 사료된다.

3) 색차 및 소시지 단면의 변화

온도별 저장기간에 따른 lightness의 변화는 10 °C 저장인 경우 저장 20 일째부터 lightness가 감소하였으며, 30 °C 저장은 저장 5 일째부터 lightness의 감소를 나타내어 소시지 밝기는 10 °C 저장보다 30 °C 저장시 빨리 감소함을 나타내었다. 또한, 각 처리구별 유의성은 인정되지 않았다($P>0.05$). Redness는 lightness와 달리 10 °C와 30 °C 저장 모두 저장 10 일째까지 증가하다가 감소하는 경향을 나타내었다. 이 결과 저장기간에 따른 색차의 변화는 저장기간이 경과함에 따라 lightness는 감소하며, redness는 증가하다가 다시 감소한다는 Kim(41) 등과 Park(42) 등의 보고와 일치하였다. 특히, 오미자와 ascorbic acid 첨가구의 redness가 대조구와 다른 첨가구들에 비하여 높은 값을 나타내었다. 이는 저장기간동안 10 °C 보다는 30 °C가 붉은색을 나타내었으며, 그 중에서도 오미자와 ascorbic acid 첨가구가 다른 첨가구에 비하여 높은 붉은색을 나타내어 소시지 색은 오미자와 ascorbic acid 첨가구가 우수하였다.

대조구와 오미자 첨가 소시지의 단면을 비교한 결과, 대조구의 단면은 매끄럽고 평탄한 반면, 오미자 첨가 소시지는 표면이 거칠고 pH의 감소에 따른 보수력의 저하로 단면이 대조구에 비하여 수축되어 표면적이 작게 나타나 제품성이 저하됨을 나타내었다. 따라서, 오미자 첨가 소시지는 항산화성과 아질산염 소거작용은 우수하나 조직감이 저하되기 때문에 소시지 제조시 첨가 농도를 0.5 % 이하로 낮추는 것이 바람직하다고 사료된다.

저장온도별 소시지의 단면은 전반적으로 10 °C 저장보다는 30 °C 저장이 더 붉은 색을 나타내었으며, 대조구와 천연물 첨가 소시지의 단면 비교에서 오미자와 ascorbic acid 첨가 소시지의 단면적은 전반적으로 대조구와 유사한 경향이였다.

4) 관능검사

소시지를 10 °C와 30 °C에서 저장하면서 저장기간동안 색, 향, 조직감 그리고 맛을 기호도 검사법(5점법)으로 평가한 결과 저장기간이 경과함에 따라 색, 향, 조직감 그리고, 맛은 감소하는 경향이였으며, 10 °C 보다는 30 °C 저장이 큰 폭으로 감소하였다. 10 °C 저장의 경우 색, 향, 조직감 그리고 맛은 저장 40 일까지 관능평가가 3점 이상이었으며, 30 °C 저장은 저장 20 일까지로 나타났다. 즉, 저장기간은 10 °C는 40일 이상, 30 °C는 20 일까지가 저장이 가능함을 확인하였다. 또한, 전반적으로 대조구와 첨가구의 비교에서는 큰 차이를 나타내지 않았으나, 오미자와 ascorbic acid 첨가구는 보수력의 저하로 조직감과 맛에서 약간 낮은 값을 나타내었다.

2. Nitrite 함량이 소시지 저장성 및 인체에 미치는 영향

아질산염은 B.C. 13세기경 중국에서 암염을 이용 육 보존제로 사용하였고, 로마에서는 소시지 가공에 염과 질산염을 첨가하였다. 고대로부터 현재에 이르기까지 염지방법에 별다른 변화 없이 수 십세기 동안 질산염과 아질산염의 첨가가 사용되어 왔으며, 오늘날 사용되고 있는 방법도 오래전부터 연구되어 1890년대에 이미 학문적으로 체계화되고 염지육에 대한 기작도 밝혀졌으며, Polenske(43)는 염지로 첨가되는 질산염은 세균의 작용을 받아 아질산염으로 전환되어 염지효과를 나타낸다고 하였으며, Anonymous 는 암염이나 질산염을 첨가한 육제품에서 아질산염의 축적을 확인하였다(44).

염지육의 육색발달은 아질산염의 작용에 의해서 일어나고, 질산염에 의해서는 성립되지 않으며, 아질산염 없이 질산염만을 가지고 염지한 육제품은 갈색으로 발색되나, 아질산염을 첨가하여 염지한 육제품은 더욱 좋은 육색으로 발색된다. Haldane에 의하면 육색발달은 육색소와 nitric oxide의 결합으로 이루어진다고 하였고, Kerr 등은 육 100 lbs당 아질산염 1/4 once 첨가로 가능하다고 하였다. 또한, Hoagland(45)는 염을 첨가한 육에서 질산염 대신 아질산염 대체가 이상적이라고 하였다.

한국인의 일일 질산염(NO_3) 섭취량이 WHO의 질산염 일일섭취허용량인 ADI (Acceptable Daily Intake) 219 mg /60 kg 보다 1.77배 내지 3.37배나 많고, 일일 NO_3 섭취량의 90.6~95.1%를 채소를 통해 섭취한다는 보고(48)가 알려진 후 채소내 NO_3 함량, 허용기준치 및 일일 섭취량 등에 대한 관심이 고조되고 있다.

성인의 경우 유아와는 달리 NO_3 섭취가 청색증을 야기하지는 않으나, 오줌으로 배설되는 85% 이외의 NO_3 는 구강타액으로 재분비 되고, 이중 15~25%가 아질산(NO_2)으로 환원되어 위액 분비시 강산성 조건하에서 NO_2 가로 전환되어 amine류와 결합하면 nitrosoamine을 생성할 수 있다.

Maugh(49)는 “한달에 핫도그를 12개 이상 먹는 아이는 핫도그를 먹지 않는 아이에 비해 백혈병에 걸릴 확률이 9배 높다”는 보고와 혈관 확장 기능에 대한 복용량은 0.03~0.12 g인데 비하여 1g을 섭취하게 되면 사망한다고 하였다. 이러한 아질산염의 위해성에 대해 미국에서는 1990년대 초부터 USDA (미농무성)에 의해 엄격히 규제되어 왔으며, 최고허용기준은 156 ppm(1/4 oz or 7.09 g/100 lb of meat)으로 정하고, 실제적으로는 120 ppm이나 그 이하로 사용하며, 환원제(ascorbate, erythorbate)와 같이 염지공정에 사용하도록 규제하고 있다.

한편, nitrite의 항산화효과는 산화촉진제로서 작용하는 생육의 heme 성분을 nitrosomyoglobin으로 변형 고착시키기 때문인 것으로 추정하고 있다. 또한, 생육은 cytochrome C의 잔제로 가열한 육제품보다 산패가 지연되기도 한다. Nitrite가 지방의 산패를 억제하는 항산화제로 작용하고 200 ppm 첨가된 nitrite는 500 ppm 첨가된 nitrite와 큰 차이를 보이지 않으며, 제조 14일 후 ham의 TBA 값이 0.7 정도로 나타났고, salt만 첨가한 ham의 TBA 값이 2.0 보다 훨씬 낮은 TBA 값을 나타내고 있다고 하였다. 이것은 nitrite의 적정량 첨가가 항산화제인 BHT나 citric acid 보다 유의성 있는 항산화효과를 나타냄을 시사하는 것이다.

Nitrite는 온도, 산성 pH 또는 ascorbate 존재하에 염지액이나 염지육에서는 감소한다. Ando(50)는 ascorbate 존재하에 ferrous와 ferric iron은 시험용액에서 nitrite의 감소를 증가시켰다.

액체배양에서 clostridial 성장에 관한 nitrite의 억제효과는 Fe^{2+} , Fe^{3+} 염과 황함유화합물의 첨가로 증가하였다. Clostridial 성장억제에 요구되는 최종농도는 0.1~0.2 mM Fe^{2+} , 0.04~0.29 mM nitrite와 1~

10 mM cysteine이다. Van Roon(51)은 [Fe-S-NO]복합물은 조리육제품에서 clostridial 성장억제 작용이 있는 것으로 추측하였다.

아질산염은 미오글로빈을 화학적으로 안정한 니트로소 미오글로빈으로 변화시키고 아질산염에서 환원된 nitric oxide가 효과적인 자유라디칼의 수용체로 이용하여 지방산화를 억제시킨다고 하였다. 그러나, 아질산염은 저농도에서 Fe^{2+} 또는 $Fe^{2+} + EDTA$ 등과 공존시 지질산화속도를 현저하게 감소시켜 산화억제제로서 적합하나, 고농도(25 mg/Kg meat)에서는 prooxidant의 작용을 나타낸다고 하였다.

반면, 식염(NaCl)은 산화를 촉진시키는 작용을 가지고 있고, Huffman(52) 등은 육제품의 저장시간에 따른 TBA값의 증가속도가 식염의 첨가농도에 비례한다고 보고하였다. 이러한 작용에 대하여 anion (Cl^-)이 미오글로빈을 메트미오글로빈(met-Mb)으로 산화되는 반응을 촉진시키기 때문에 지방산화가 가속화되는 것이라고 추측하였다.

3. Nitrosamine 생성기작 및 억제방안

Nitrosamine은 1956년에 Magee와 Barnes(53)가 N-nitrosodimethylamine의 발암성을 보고한 이래로 많은 종류의 nitrosamine의 발암성이 입증되었고, 그중에서도 N-methyl- N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)은 경구투여로 쥐나 개에 위암을 일으킨다고 알려지고 있으며, 생체내의 산화효소군에 의하여 활성화되어 alkonium ion(RCH_2^+)을 생성하는데, 이것이 DNA를 alkyl 화합으로써 발암성을 나타낸다고 하였다. 이러한 nitrosamine의 생성을 억제하는 것으로는 ascorbic acid, tannic acid 유도체 및 sorbic acid, tocopherol 등이 효과가 있는 것으로 밝혀지고 있으며, 식품성분간 반응생성물인 melanoidin의 nitrosamine 생성억제 효과도 보고되고 있다(54). 이 melanoidin의 아질산염 분해능은 melanoidin 분자중의 NH_2 기와 HNO_2 와의 직접반응 및 melanoidin에 의하여 HNO_2 가 NO와 HNO_3 등으로 변환하기 때문이라고 보고되고 있다.

식품에서 nitrosamine이 생성될 가능성이 높은 제품은 식육 및 어육제품, 우유 및 우유제품, 맥주 등이다. 지금까지 연구결과에 의하면 식육 및 어육제품에서는 N-nitrosopyrrolidine(NPYR), N-nitrosothiazolidine(NTHZ)이 가장 많이 검출되었고, N-nitrosodimethylamine(NDMA), N-nitrosopiperidine(NPIP), N-nitroso-morpholine(NMOR)이 미량 검출되었다. 식육제품중의 nitrosamine은 아질산염의 첨가량, 어육의 혼합비율, 육질과 지방질의 비율, 염지액 중의 억제제의 존재, 제조방법, 조리방법, 식육의 두께, 조리온도 및 시간, 수분함량에 따라 생성량이 다르다고 보고하였다.

장유를 사용한 nitrosamine 생성억제효과는 주로 아미노산의 아질산염 소거작용에 기인한다고 밝혀져 있다. Guaiacol, resorcinol과 같은 페놀 화합물은 니트로소화 반응을 강력히 억제한다고 밝혀져 있다. 그리고, 천연물에 의한 아질산염소거작용에 대한 연구로는 해조추출물, 야채추출물, 한약재추출물, 유산균에 관한 보고가 있으며, Normington 등은 중국 오얏에서 분리한 3-hydroxy-2- pyranone이 아질산염을 분해하면서 니트로소화반응을 억제한다고 보고하였다.

어류에는 N-nitrosamine(NA)의 주요 전구 물질의 하나인 아민류가 상당량 함유되어 있어 아질산염과 반응할 경우 NA를 형성할 가능성이 높다. 어류중에서도 고등어, 꽂치 및 새우 중에 2급 아민이 많고, 특히 고등어 중에 존재하는 2급 아민은 니트로화가 용이한 dimethylamine (DMA)이 많은 양이 존재한다고 보고되어 있다. 어류 중에 DMA의 생성 요인에 대한 Amino(55) 등의 보고에 의하면 formaldehyde

가 많은 조직이나 기관에 DMA가 존재한다고 하였고, Yamada(56)는 TMAO가 cysteine에 의하여 환원되어 다량의 trimethylamine (TMA)이 생성되는데 이때 약간의 formaldehyde와 DMA가 생성된다는 보고를 근거로 DMA는 TMAO의 환원에 의해 생성된다는 것이 지배적인 학설이다.

해산 식품 중 NA에 관한 연구를 보면 Fong과 Chan(57)은 염건어 N-nitroso-dimethylamine (NDMA)의 생성 원인을 밝힌 결과 염장시 사용한 시판 소금 중에 존재하는 질산염이 염장 및 건조 중 오염된 미생물에 의해 환원되어 아질산염을 생성하고, 어육 중의 DMA와 반응하여 NDMA를 생성한다고 보고하였다.

Matsui(58) 등은 염건어의 조리방법에 따라 NDMA, N-nitrosodiethylamine(NDEA), N-nitrosopyrrolidine(NPYR)의 생성을 비교한 결과 동일한 시료를 가스레인지 및 전자레인지로 구운 결과 가스레인지로 구운 시료가 전자레인지로 구운 시료보다 이들 화합물의 생성이 현저히 높았고, 또 이것을 알루미늄박으로 포장하여 구울 경우 NA의 함량이 훨씬 낮게 검출되었는데, 이 같은 현상은 굽는 과정 중 연료의 연소로 인해 생성된 산화질소 유도체와 어패류 중에 존재하는 아민과 반응하여 높은 함량의 NA화합물을 생성하기 때문이라고 주장하였다. 이와 유사한 보고로서는 어패류를 천연가스나 프로판가스로 구울 때 많은 양의 NA가 생성된다는 Kawabata(59) 등의 연구도 있다.

고등어 염장중 휘발성 염기질소는 계속 증가하였으며, 열에 대한 NDMA는 전자레인지와 같은 간접적인 열원을 사용하여 조리한 경우보다 가스레인지, 연탄불과 같은 직접적인 열원으로 조리한 시료에서 그 증가폭이 높았다고 하였다.

VI. 기능성 식품의 평가방법

1. 기능성 식품의 효능평가

기능성 식품의 효능을 평가하기 위한 방법(60)은 수없이 많고 각 연구진이 새로운 평가방법을 개발하여 사용할 수 있다.

1) 화학 분석법

이 방법은 주어진 물질의 정량, 정성에도 용이하고 물질의 동정에도 다방면으로 응용되고 있다.

2) 효소 분석법

SOD 유사활성물질의 탐색을 위하여 사용했던 SOD 활성측정방법은 이미 설명한 바와 같다. 또 한 가지 예로서 미백식품을 개발하고자 할 때 tyrosinase저해제 탐색방법을 살펴보면, pH가 6.5로 유지된 완충용액에 tyrosine이나 L-dihydroxyphenylalanine과 ascorbic acid를 용해시키고 각각 280nm 또는 265nm에서 흡광도를 측정하면 tyrosinase활성을 측정할 수 있으며 이 반응계에 탐색하고자 하는 물질을 함께 첨가하여 효소의 활성을 많이 저해하는 물질을 찾아내면 이것이 곧 tyrosinase 저해제이다.

3) 미생물 이용법

영양학에서 단백질의 영양가치를 평가할 때는 mouse를 이용하여 PER(protein efficiency ratio)을 측정하여 결정한다., 그러나, 사람과 아미노산 요구 양상이 비슷한 protozoa인 *Tetrahymena pyriformis*를

이용하면 보다 신속하게 다량의 시료를 분석할 수 있다. 미백식품의 개발에서도 in vitro 분석 결과 저해 효과가 있는 물질은 임상실험 전에 melanine을 생합성하는 미생물인 *Saccharomyces bikiensis*를 이용하면 본격적인 임상실험 전에 다시 한차례 screening 과정을 거치므로 실험의 효율을 높일 수 있다. 이 방법은 저해제를 미생물 배양액에 첨가하여 효과를 판정할 수도 있고 저해제를 disc에 묻혀 agar가 함유된 고체배지 위에 올려놓은 후 disc 주변에 미생물이 자라지 않는 범위가 크게 나타나는 물질을 선별하는 방식으로 효과를 확인할 수도 있다.

4) 초파리 이용법

미생물의 대표로 *E.coli*를 꼽을 수 있고 실험동물의 대표로 rat나 mouse를 꼽을 수 있듯이 곤충 중에서는 초파리를 꼽을 수 있다. SOD 유사활성물질이 실제로 체내에서 산화를 억제하는지 여부를 알아보기 위하여 초파리 배지에 superoxide를 발생시키는 KO_2 , SOD 유사활성물질인 glutathion을 각각 첨가하고 초파리를 배양하면서 일정 시일이 지난 후 배양기 공간의 공기조성을 분석하였다. 산화가 많이 또는 빨리 일어난 초파리 배양구에서는 ethane과 pentane같은 산화 생성물의 함량이 높게 나타나므로 효과를 판정할 수 있다. 또한 초파리의 일생은 60~90일로 짧은 편이므로 초파리의 평균수명을 측정하여 SOD 유사활성물질이 노화나 생명유지에 미치는 효과를 평가할 수 있다. 본 연구진은 SOD 유사활성물질이 유해산소의 독성에 노출된 초파리의 수명을 연장시킬 수 있음을 확인한 바 있다.

5) 실험동물의 이용법

지구상의 대기 중 산소농도는 약 21%이고 나머지는 주로 질소이다. 그런데 대기 중 산소가 100%라면 생명체는 산소가 풍부하여 더 오래 살 것인가? 아니면 유해산소 상해로 인해 해를 입을 것인가? 흰 쥐를 산소로 100% 치환한 밀폐된 공간에서 사육하면 3일만에 50%는 죽고 나머지도 해부를 해 보면 복강부터 허파 위까지 물로 차있으며 장이나 혈액의 색이 검붉은 색이 되어 있다. 이처럼 산소의 유해작용은 엄청나며 일부 과학자들은 대기 중 산소농도가 18%가 되면 인류의 수명이 더 증가될 것이라고 주장하고 있다. 이 원리를 이용하여 실험쥐에 SOD 유사활성물질을 첨가하여 사육하고 대조구를 같이 사육한 후 adaptation기간을 거쳐 같은 시간에 산소가 100%로 치환된 공간으로 옮겨 1일간 사육한 후 깊은 수조에서 각 쥐를 강제수영시킨다. 이후 쥐의 기력이 다하여 익사하기 직전까지의 시간을 측정하면 SOD 유사활성물질이 산소상태에 대응하여 작용하는 효과를 분석할 수 있을 것이다. 그러나 본 연구진의 실험결과로는 각 쥐의 수영시간에 편차가 커서 좋은 결과를 얻지는 못하였다. 이 강제수영법은 원래 stamina식품 또는 소재의 개발에 적용되어 왔던 실험법이다.

6) Cell line 이용법

현재 각종 plant cell line이 필요한 물질의 생산이나 어떤 효능평가에 이용되고 있고 human cell line 중 3T3-L1선유아세포는 비만 또는 체중감량 연구에 임파구 T 또는 B Cell은 면역기능 부활 또는 항체 생성능력 실험에, human tumor cell은 항암제 검색 등에 이용되고 있다. 이 cell은 사람의 세포이기 때문에 어느 면에서는 실험동물을 사용할 때보다 더 임상실험에 접근된 결과를 얻을 수 있으나 배양이 쉽지 않고 cell line유지도 용이하지는 않아 적용하기 쉬운 방법으로 판단되지는 않는다.

7) 임상실험

사람을 대상으로한 실험은 하나밖에 없는 생명과도 연관되고 예기치 못한 부작용도 발생할 수 있으므로 최고의 안전성을 검토한 후 실행해야 한다. 또한 병약자도 요즈음은 암이나 AIDS처럼 죽음이 불가피할 경우에는 할 수 없이 실험대상으로 응하지만 중증이 아닐 경우에는 지원자가 별로 없어 실험이 곤란한 것도 사실이다. 여하튼 임상실험의 경우 식품업계에서는 흔히 실험의 편이를 위하여 개발제품만을 대상으로 효능을 평가하고 있으나 이는 의학적으로는 별의미를 지니지 못한다. 즉, 임상실험은 개발 제품과 placebo를 함께 평가하는 double-blind study이어야 한다. Double-blind 실험의 근본은 주어진 목적의 평가를 위하여 대상자를 두 군으로 나누어 한 실험구에는 개발제품을, 다른 실험구에는 placebo(위약)를 투여해야 하며 모든 대상자에게는 이 사실을 알려되 각자가 받은 시료는 진품인지 위약인지 모르게 해야 하며 실험주체도 누구에게 무엇을 주었는지 모르는 상태 아니 편견이 없도록 기억을 못하는 상태에서 평가하는 방법이다. 이럴 때만이 진정한 효과를 분석할 수 있다.

여기 소개한 몇 가지 방법에 각각의 목적에 맞는 실험방법을 택하고 개발하여 개발제품의 효능을 평가하고 긍정적인 결과를 얻는다면 이것이 진정한 의미에서 인체에서 효능이 발휘되는 기능성 식품의 개발이 될 것이다.

2. 천연물의 항산화성 및 항균성 평가방법

1) 항산화성 (TBARS 법)

Thiobarbituric acid reactive substances(TBARS)는 Buege와 Aust의 방법(61)에 따라 측정하였다. 1ml 반응 혼합물이 채워진 시험관을 37°C water bath에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝나자마자 50 μ l dibutylhydroxytoluene(BHT) 7.2%를 시료에 가하여 산화반응을 정지시켰다. 반응혼합물을 잘 섞은 다음 2ml TCA/TBA 시약을 가하고 다시 혼합 후 끓는 물에서 15분간 가열시켰다. 가열 후 찬물에서 식힌 후 2.000 \times g의 속도로 15분간 원심분리 시켰다. 상등액을 흡광도(HITACHI UV-2001) 531nm에서 측정하였고, 공시료는 시료대신에 증류수를 가하여 같은 방법으로 측정하였다. TBARS값은 ml 반응혼합물에 대해서 μ g malondialdehyde(MDA)로 표시하였다.

2) 아질산염 소거능 측정

아질산염 소거작용 측정은 Kato(62) 등의 방법으로 1mM NaNO₂용액 2ml에 각 시료 1ml를 가하고, 0.1N HCl(pH 1.2), 0.2M 구연산 완충액(pH 3.0, pH 6.0)으로 각각 pH 1.2, 3.0, 6.0으로 보정한 다음 반응 용액의 부피를 10ml로 하였다. 이 용액을 37°C에서 1시간 반응시킨 후 각 반응액 1ml를 취하여 2% 초산용액 2ml와 30% 초산용액으로 용해한 Griess reagent(1% sulfanilic acid : 1% naphthylamine = 1 : 1) 0.4ml를 가한 후 vortex하여 실온에서 15분간 방치 후 520nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 Griess reagent 대신 증류수를 가하여 측정하였으며, 아질산염 소거능은 $100 - [(시료첨가구의 흡광도 / 무첨가구의 흡광도) \times 100]$ 으로 나타내었다.

3) 전자공여능 측정

전자공여능은 Blois(63)의 방법을 변형하여 측정하였다. 각 시료 2ml에 2×10^{-4} M DPPH 1.0ml를 넣

고 vortex 한 후 30분 동안 방치한 다음 517nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 $100 - [(시료첨가구의 흡광도/무첨가구의 흡광도) \times 100]$ 으로 나타내었다.

4) SOD 유사활성능 측정

SOD 유사활성 측정은 Marklund와 Marklund의 방법(64)에 따라 각 사료 0.2ml에 pH 8.5로 보정한 tris-HCl buffer(50 mM tris [hydroxymethyl]aminomethane +10mM EDTA) 3ml와 7.2mM pyrogallol 0.2ml를 가하고 25°C에서 10분간 방치 후 1N HCl 1ml로 반응을 정지시킨 후 420nm에서 흡광도를 측정하여 $100 - [(시료첨가구의 흡광도/무첨가구의 흡광도) \times 100]$ 으로 나타내었다.

5) Iron 함량 측정(비헴철)

Nonheme iron(비헴철) 측정은 Ferrozine iron 분석방법(65)을 약간 수정하여 측정하였다. Total iron 분석을 위해서 1ml시료를 사용하였고, 여기에 2% ascorbic acid (w/v) 0.1ml를 가하여 혼합한 다음, 실온에서 5분간 반응시켰다. 반응 후 11.3% TCA(w/v) 1ml를 가하고 섞은 다음 반응물을 3,000×g에서 15분간 원심분리 시켰다. 상등액 2ml를 시험관에 옮기고 0.8ml의 10% ammonium acetate와 0.2ml의 ferrozine color reagent(75mg ferrozine + 75mg neocuproine + HCl 1 drop)를 가하여 섞은 다음 시료를 3,000×g에서 15분간 원심분리시킨 다음 5분 후 562nm에서 흡광도를 측정하였다. Ferrous iron(Fe^{2+}) 분석도 단지 0.1ml ascorbate 대신에 0.1ml TCA를 가한 후 위의 방법과 같이 측정하였다.

6) Ascorbic acid 측정

Ascorbic acid 측정은 Sikic(66) 등의 방법에 따라 시료를 10분 동안 10,000×g에서 원심분리 시키고, 상등액 0.5ml를 취하여 5% TCA 2ml로 단백질을 침전시켰다. 다시, 4°C에서 10분 동안 15,000×g에서 원심분리시키고, 상등액 0.5ml를 취하여 85% orthophosphoric acid 0.05ml, 8% α , α' -dipyridyl 0.05ml, 3% aqueous ferric chloride 0.05ml를 가한 후, 1시간 동안 ferrous dipyridyl chromophore 물질이 생성되도록 실온에 방치한 후 525nm에서 흡광도를 측정하였다.

7) 항균성 측정

천연물 추출물을 농도별로 0, 0.5, 1.0% 가한 tryptic soy broth(Difco, Co.)에 각 균주의 배양액을 배지 10mL당 20μL의 비율로 접종하여 균의 생육 최적온도에서 배양하면서 균의 증식을 생균수로 측정하여 colony forming unit(cfu/mL)로 표시하였다.

Ⅶ. 결 론

오늘날 현대인에게 육제품을 저장하는데 미치는 화학약품의 폐해는 날이 갈수록 심각해짐을 절실히 느끼게 된다. 육제품은 저장기간에 따라 변질, 변패되고 미생물이 발육하기 때문에 이를 방지하기 위해 식품보존제를 첨가하여 변질을 지연시키고 있으며, 일반적인 경우 식품보존제로서 화학약품인 보존제(potassium sorbate)를 사용함으로써 인체에 대한 유해성 야기를 논란하고 있다. 따라서, 인간의 건강증진을 위하여서는 자연적으로부터 얻어지는 천연물들과 질병을 치료할 수 있는 물질을 찾는 것

은 매우 중요한 과제이다. 따라서, 천연물들의 기능성 검토와 가공적성 검토를 통해서 유해성 논란이 되고 있는 식품첨가물들의 피해를 최소로 줄이는 것이 기능성 육제품의 개발 방향이 될 것이며 이에 대한 연구가 지속적으로 이루어져야 한다.

참고문헌

1. Kasuga, A., Aoyagi, Y. and Sugahara, T. : Antioxidants activities of edible plants. 日本食品工業學會誌, 35, 22 (1988)
2. Larson, R.A. : The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*, 27, 969 (1983)
3. Ahn, B.W., Lee, D.H., Yeo, S.G., Kang, J.H., Do, J.R., Kim, S.B. and Park, Y.H. : Inhibitory action of natural food components on the formation of carcinogenic nitrosamine. *Bull. Korean Fish Soc.*, 26, 289 (1993)
4. Nagyvary, J.J., Falk, J.D., Hill, M.L., Schmidt, M.L., Wilkins, A.K. and Bradbury, E.L. : The hypolipidemic activity of chitosan and other polysaccharides in rats. *Nutrition Reports Int.*, 20, 677 (1979)
5. Sugano, M., Fujikawa, T., Hiratsuji, Y., Nakashima, K., Fukuda, N. and Hasegawa, Y. : A novel use of chitosan as a hypocholesterolemic agent in rats. *A. Clin. Nutr.*, 33, 787 (1980)
6. 장일무: 전통동양의약 및 천연물문헌정보 검색, 한국의 천연물과학연구 p231 - 282, 서울대학교 출판부 (1996)
7. 장일무, 천연물산업의 국내 · 외 동향, 식품기술, Vol.13, 6. (2000)
8. Babizhayev, M.A., Seguin, M.C., Gueyne, J., Evstigneeva, R.P., Ageyeva, E.A. and Zheltukhina, G.A. : L - carnosine(β - alanyl - L - histidine) and carcinine (β - alanylhistamine) act as natural antioxidants with hydroxyl radical - scavenging and lipid - peroxidase activities. *Biochem. J.*, 304, 509 (1994)
9. Chan, W.K.M., Decker, E.A., Lee, J.B. and Butterfield, D.A. : EPR spin trapping studies of the hydroxyl radical scavenging activity of carnosine and related dipeptides. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 1407 (1994)
10. Dahl, A., Midden, W.R. and Hartman, P.E. : Some prevalent biomolecules as defenses against singlet oxygen damage. *Photochem. Photobiol.*, 47, 357 (1988)
11. Decker, E.A., Crum, A.D. and Calvert, J.T. : Differences in the antioxidant mechanism of carnosine in the presence of copper and iron. *J. Agric. Food Chem.*, 40, 756 (1992)
12. Kohen, R., Yamamoto, Y., Cundy, K.C. and Ames, B.N. : Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine, and anserine present in muscle and brain. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 85, 3175 (1988)
13. 이근임 : 활성산소가 관계하는 질환과 그 소거물질의 개발동향. *신기술*, 9, 15 (1995)
14. Hiroe, K. and Nobuji N. : Structure of a new antioxidative phenolic acid from oregano. *Agric. Biol. Chem.*, 53, 519 (1989)

15. Cort, W.M. : Antioxidant activity of tocopherols, and ascorbyl palmitate ascorbic acid and their mode of action. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 51, 321 (1974)
16. Love, J.D. : The role heme iron in the oxidation of lipid in red meat. *Food Technol.*, 37, 117 (1983)
17. Lie, H. and Watt, B.M. : Catalysis of lipid peroxidation in meat 3. Catalysis of oxidative rancidity in meats. *J. Food Sci.*, 35, 596 (1970)
18. Green, B.E. and Prince, I.G. : Oxidative induced color and flavor changes in meats. *J. Agric. Food Chem.*, 23, 164 (1975)
19. Lewis, S.E. and Willis, E.D. : Inhibition of autoxidation of unsaturated fatty acids by hematin protein. *Biochem. Biophys. Acta.*, 70, 336 (1963)
20. Kunsman, J.E., Field, R.A. and Kazantzis, D. : Lipid oxidation in mechanically deboned red meat. *J. Food Sci.*, 43, 1375 (1978)
21. Yoon, H.S., Kim, S.B. and Park, Y.H. : Oxidative characteristic of triglyceride molecular species in the presence of prooxidant. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 22, 7 (1990)
22. 권태완 : 식품의 3차 기능에 걸맞는 표현에 대하여. *식품과학과 산업*, 28, 64 - 67 (1995)
23. Bechtel, P. J. 1987. "Primer on somatotropins and their effects on finishing and lactating swine" . In: *Proceedings of the University of Illinois Pork Industry Conference*. 46 - 54, Champaign, IL: University of Illinois.
24. Etherton, T. D., J. P. Wiggins, C. M. Evock, C. S. Chung, J. F. Rebhun, P. E. Walton and N. C. Steele. 1987. Stimulation of pig growth performance by porcine growth hormone : Determination of the dose response relationship. *J. Anim. Sci.* 64:433 - 443.
25. Bonanome, A., and S. M. Grundy. 1988. Effect of dietary stearic acid on plasma cholesterol and lipoprotein levels. *N. Engl. J. Med.* 318:1244 - 1248.
26. Cunnane, S. C., P. A. Stitt, S. Ganguli and J. K. Armstrong. 1990. Raised omega - 3 fatty acid levels in pigs fed flax. *Canadian J. Anim. Sci.* 70(1):251 - 254.
27. 이남형, 윤철석, 한찬규 등. 1991. 저콜레스테롤 및 불포화지방산 함량이 높은 축산물 생산에 관한 연구(Ⅲ), 한국식품개발연구원 연구보고서(E 2100).
28. 이남형, 윤철석, 김홍만 등. 1992. ω - 3계 지방산 함량이 높고 콜레스테롤 함량이 적은 고기를 생산하기 위한 지방사료첨가제의 제조 방법. 대한민국특허청 특허공보. 공고번호 92 - 767.
29. 여영근. 1995. n - 3 지방산이 축적된 우유 및 유우용 사료조성물. 대한민국특허청 특허공보. 공고번호 95 - 6782.
30. Weiss, J. F., E. C. Naber, and R. M. Jonhson. 1967. Effect of dietary fat and D - tyroxine on the incorporation of acetate - 1 - ¹⁴C into egg yolk lipids. *J. Nutr.* 93:153 - 160.
31. Naber, E. C. 1976. *The cholesterol problem, the egg and lipid metabolism in the laying hen*, *Poult. Sci.* 55:14 - 30.
32. Singh, R. A., J. F. Weiss and E. C. Naber. 1972. Effect of azasterols on sterol metabolism in the laying hen. *Poult. Sci.* 51:449 - 457.
33. Keshavarz, L. 1976. The influence of turmeric and curcumin on cholesterol concentration of eggs and

- tissues. *Poult. Sci.* 55:1077 – 1083.
34. Hafez, Y. S. M. and F. H. Kratzer. 1976. The effect of pharmacological levels of dietary vanadium on the egg production, shell thickness and egg yolk cholesterol laying hens and conturnix. *Poult. Sci.* 5:923 – 926.
 35. Beitz, C., P. A. Hartman, H. W. Young, and A. Zaks. 1993. Use of enzyme to decrease cholesterol content of dairy products. Progress report to Wisconsin Milk Marketing Board.
 36. Bradley, R. L. 1989. Removal of cholesterol from milk fat using supercritical carbon dioxide. *J. Dairy Sci.* 72:2834 – 2840.
 37. Sim, J. S. 1994. Dietary guidelines and designer food concept in animal agriculture, 건국대학교 동물자원연구센터, 국제심포지움(제 5회), 113 – 145.
 38. 한찬규, 이남형, 윤칠석, 이복희, 성기승. 1994. 저콜레스테롤 계란 생산을 위한 사료 개발(II), 한국식품개발연구원 연구보고서(N1027 – 0478).
 39. 이복희, 유익중, 강통삼. 1993. 계란의 콜레스테롤 함량 조절 기술에 관한 고찰. *한국가금학회지* 20(4):217 – 231.
 40. Han, S.K. and Park, H.K.: A study on the preservation of meat products with water extracted propolis(WEP). *Korean J. Anim. Sci.*, 38(6), 605(1996)
 41. Kim, C.H., Ko, M.S., Lee, K.H., Park, W.M., Yoo, I.J. and Lee, C.H.: Changes of palatability traits of mold fermented sausage during ripening. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.*, 18(1), 57(1998)
 42. Park, W.M., Choi, W.H., Yoo, I.J., Ji, J.R. and Jeon, K.H.: Effects of mixed starter cultures on the physico-chemical properties of fermented sausages. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.*, 17(2), 91(1997)
 43. Polenske, E. : Ueber den verlust, welchen das rindfleisch und nährwerth durch das pökeln erleidet, sowie uber die veränderungen Saltpeterhaltiger pökellaken. *Arb. Kais. Gesundh.*, 7, 471 (1981)
 44. Anonymous : Nitrites, nitrosamines and cancer. *Lancet*, 2, 1071 (1968)
 45. Haldane, J. : The red color of salted meat. *J. Hygiene.*, 1, 115 (1901)
 46. Kerr, R.H., Marsh, T.N., Schroeder, W.F. and Boyer, E.A. : The use of sodium nitrite in the curing of meat. *J. Agr. Res.*, 33, 41 (1926)
 47. Hoagland, R. : Coloring matter of raw and cooked salted meats. *J. Agr. Res.*, 3, 211 (1914)
 48. 손상목 : 채소를 통한 일일 NO₃ 섭취량과 안전농산물 NO₃ 함량 허용기준 설정. *한국유기농업학회지*, 2, 45 (1995)
 49. Maugh, T.H. : Study links hot dogs, cancer. *Washington Post*, June, p.3 (1994)
 50. Ando, N. : Some compounds influencing color formation. Korl, B. and Tinbergen, J. (eds.), *Proc. Int. Symp. Nitrite Meat Prod. Pudoc., Wageningen, The Netherlands*, p.149(1974)
 51. Van Roon, P.S. : Inhibitors in cooked meat products. *Proceedings of the 1st International Symposium on Nitrite in Meat Products, Zeist, The Netherlands*, p.117 (1974)
 52. Huffman, D.L., Ly, A.M. and Cordray, J.C. : Effect of salt concentration on quality of restricted pork chop. *J. Food Sci.*, 46, 1563 (1981)

53. Magee, P.N. and Barnes, I.M. : The production of malignant primary hepatic tumours in the rat by feeding dimethylnitrosamine. *Br. J. Cancer.*, 10, 114 (1956)
54. Kato, H., Lee, I.E., Chuyen, N.V., Kim, S.B. and Hayase, F. : Inhibition of nitrosamine formation by nondialyzable melanoidins. *Agric. Biol. Chem.*, 51, 1333 (1987)
55. Amino, K., Yamada, K. and Bito, M. : Contents of formaldehyde and volatile amines in different tissues of gadoid fish. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish*, 29, 860 (1963)
56. Yamada, K. : Post - mortem breakdown of trimethylamine oxide in fishes and marine invertebrates. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish*, 34, 541 (1968)
57. Fong, Y.Y. and Chan, W.C. : Dimethylamine in Chinese marine salt fish. *Fd. Cosmet. Toxicol.*, 11, 841 (1973)
58. Matsui, M., Ohshima, H. and Kawabata, T. : Increase in the nitrosamine content of several fish products upon broiling. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish*, 46, 587 (1980)
59. Kawabata, T., Uibi, J., Matsui, M., Hamano, M. and Tokiwa, H. : Occurrence, formation and precursors of N - nitroso compounds in Japanese diet. In N - nitroso compounds, International Agency for Research on Cancer, *Sci. Pub. Lyon*, 31, 481 (1980)
60. 한국식품개발연구원: 생체산화를 억제할 수 있는 물질의 탐색, 효능평가기능성식품의 개발(1995)
61. Buege, J.A. and Aust, S.D.: Microsomal lipid peroxidation. *Method in enzymol*, 105, 302(1978)
62. Kato, H., Lee., Chuyen, N.V., Kim, S.B. and Hayase, F.: Inhibition of nitrosamine formation by nondialyzable melanoidins. *Agric. Biol.Chem.*, 51, 1333(1987)
63. Blois, M.S.: Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*, 26, 1198(1958)
64. Marklund, S. and Marklund, G.: Involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.*, 47, 468(1974)
65. Carter, P.: Spectrophotometric determination of serum iron at the submic - rogram level with a new reagent(ferrozine). *Anal. Biochem.*, 40, 450 (1971)
66. Sikic, B.I., Mimnaugh, E.G., Litterst, C.L., and Gram, T.E.: The effects of ascorbic acid deficiency and repletion on pulmonary, renal and hepatic drug metabolism in the guinea pig. *Arch. Biochem. and Biophys.* 179, 663(1977)