

발효쪽 추출물의 생리적 기능과 염색특성(제1보)

한 신 영 · 최 석 철

부산대학교 의류학과

A Study on the Physiological Effects and Dyeing Properties of the Extract of Fermented(Part I)

Shin-Young Han · Suk-Chul Choi

Dept. of Clothing and Textiles, Graduate School, Pusan National University
(1999. 8. 5 접수)

Abstract

The purpose of this study was to investigate the antimicrobial activity, antimutagenic and anticancer effects and dyeing properties of the fermented indigo extract. The physiological effects of natural color extracts from colorant plants(gardenia, beet and indigo) were studied. The methanol extract of indigo showed an inhibitory effect on the growth of *E. coli* and *Staph. aureus*, and also showed a strong antimicrobial effect on *Trich. mentagrophytes* compared to others. The methanol extract of indigo showed antimutagenic activities against aflatoxin B₁(AFB₁) in the Ames test using *Salmonella typhimurium* TA 100. The proliferation of Clone M-3 mouse melanoma cells and A431 human epidermoid carcinoma cells was inhibited by the methanol extract of indigo. So we decided to use natural indigo for dyeing the fabrics because of those effects.

Dried indigo leaves were fermented at various temperatures and the fermented indigo was reduced by using alkaline(NaOH, Ca(OH)₂) and glucose to dye the fabrics. The values of K/S of fermented indigo showed the highest value when it was fermented at 30°C. The indigo fermented at 30°C had the greatest number of total bacterial counts and we identified one of the main microorganisms as *Aspergillus niger*. This microorganism was responsible for the indigo fermentation and accelerated indigo fermentation. So it can be supposed to reduce the fermentation period of indigo by inoculating *Aspergillus niger* into the indigo leaves at 30°C.

Key words: antimicrobial activity, antimutagenic activity, anticancer activity, drie leaves, fermented indigo; 항균작용, 항돌연변이 작용, 항암작용, 건조쪽, 발효쪽.

I. 서 론

자연계에는 항균작용을 나타내는 등 식물 또는

미생물 등이 많이 있는데, 이들 중에는 색소와 함께 여러 가지 형태의 자기 방어수단으로서의 항균기능을 갖는 것도 있다¹⁾. 사람들은 약초를 몸에 지니고 다니기도 했는데 이는 약초에 있는 약물성분이 병원

균을 퇴치시켜 인체를 질병이나 고통으로부터 보호하기 때문이었다²⁾. 이렇게 천연물에 존재하는 항균성은 오래전부터 알려져 왔고 최근에는 이들이 인체의 기생성 진균류의 성장 억제에 관련되어 있다는 연구가 활발히 이루어지고 있다^{3, 4)}. 우리는 이런 천연물에서 염료를 취해왔고 이러한 천연염료는 한방에서도 여러 가지 약용으로 쓰여지고 있으며 壽衣나 經文의 보관 및 식용으로도 쓰여지고 있다^{5~10)}.

최근에는 위생적이고 쾌적한 의생활을 추구함에 따라 의복 착용중 섬유에 번식하는 미생물을 억제, 살균하고 위생적인 상태를 유지하도록 항균방취가공을 실시한 섬유제품이 나오고 있으며^{13, 14)}, 섬유제품에 처리되어 있는 항균제의 효과에 관한 연구 및 항균방취가공을 실시한 섬유제품의 평가방법에 관한 이론도 보고되고 있다^{14~17)}. 그러나, 대부분의 항균제는 안전성이 문제가 되므로 인체에 무해한 천연 항균성 물질을 개발하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. 이렇듯 천연물에 대한 소비자의 요구가 높아지고 천연물로부터 분리된 색소의 생리 기능적 물질의 개발이 요구되는 가운데, 여러 가지 천연색소 시료 가운데 치자황, 치자청, 비트레드 에탄올추출물 및 쪽 메탄올추출물의 부패미생물에 대한 항균효과, Ames test를 통한 항돌연변이 효과, MTT assay를 통한 *in vitro* 항암효과를 살펴보았다. 그리고 이들 색소중 우수한 생리적 기능을 가진 색소를 찾아 이를 염색에 이용하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 천연색소

천연색소의 시료로서는 치자황, 치자청, 비트(beet), 건조쪽풀을 사용하였는데 이들 물질 중 치자황색소, 치자 청색소, 비트레드는 생시료를 동결건조시켜 분말화한 후 시료 중량의 10배의 70%에탄올을 첨가하고, 60~70°C의 수욕조에서 3~4시간 동안 시료를 추출하였는데 이 과정을 3회 반복한 후 여기에서 얻은 70%에탄올 추출물을 회전식 진공 농축기(Buchi 011 & Switzerland)로 농축하여 에탄올을 완전히 제거하여 사용하였다. 건조쪽풀은 쪽을 동결 건조한 다음 분말화하여 시료중량의 10배의 메탄올

을 첨가하고 상온에서 8시간 교반을 3회 반복하였다. 여기에서 얻은 메탄올추출물을 회전식 진공 농축기로 45°C에서 농축한 후 농축액을 원액으로 하고 dimethyl sulfoxide(DMSO)용액에 녹여 항균, 항돌연변이 및 *in vitro* 항암 실험에 사용하였다.

2. 항균성 측정

1) 시험균

균주는 한국과학기술연구원 유전공학 연구소 유전자은행(Korean Collection for Type Cultures)로부터 분양을 받아 사용하였다. 세균류는 피부습진, 내의 악취의 원인균인 *Staphylococcus aureus* KCTC 1928(*Staph. aureus*)과 乳幼兒의 피부보호와 악취의 원인균인 *Escherichia coli* KCTC 1039(*E. coli*)을 사용하였고, 사상균은 무좀의 원인균인 *Trichophyton mentagrophytes* KCTC 6316(*Trich. mentagrophytes*)을 사용하였다.

2) 배지^{24~27)}

균주는 소정 온도(°C)에서 12시간 배양하여 50% glycerol을 1:1로 혼합하여 -75°C에서 보관하면서 사용하였다. 세균류에 대해서는 Nutrient 액체배지 및 고체배지, 사상균에 대해서는 Sabrouaud 액체배지 및 고체배지를 항균실험용 배지로 사용하였다(Table 1).

3) 시험균액의 조정

Table 1에 나타난 Nutrient와 Sabrouaud 액체배지 10ml에 균주 100 μ l를 접종하여 세균은 18~24시간, 곰팡이는 7일간 배양하는 것을 3회 반복하여 균주를 활성화시킨 후, 배지에 적절하게 희석하여 OD₆₀₀(Optical density)를 0.1로 조정하여 실험에 사용하였다.

4) 항균력 시험

항균력을 액체배지희석법으로 측정하였다^{26, 27)}. 즉, 균(2.5 $\times 10^7$ CFU/ml) 100 μ l를 액체 배지(10ml)가 들어 있는 시험관에 접종하고 적당한 농도의 색소추출물을 100 μ l첨가하여 Table 1과 같은 조건에서 세균류는 37°C에서 24시간, 곰팡이는 30°C에서 7일간 정치배양시킨 후, Spectrophotometer를 사용하여 600nm에서 흡광도로 증식도를 측정하였다.

Table 1. Culture media for test strains

Media	Bacteria ¹ (Nutrient)		Mold ² (Sabouraud)	
Stock culture medium	Peptone	10g	Peptone	10g
	Beef extract	5g	Glucose	40g
	Sodium chloride	5g	Agar	20g
	Agar	20g	Distilled water	1l
	Distilled water	1l		
Liquid medium	Peptone	10g	Peptone	10g
	Beef extract	5g	Glucose	40g
	Sodium chloride	5g	Distilled water	1l
	Distilled water	1l		

¹ *Staph. aureus* and *E. coli*

² *Trich. mentagrophytes*

3. *In vitro* 항돌연변이 및 항암 실험

치자황, 치자청, 비트레드, 건조쪽, 발효쪽 추출물의 항돌연변이성 및 *in vitro* 항암효과를 살펴보기 위하여, Ames 돌연변이 유발 실험계와 MTT assay 실험계를 이용하여 검토하였다.

1) Ames 돌연변이 유발 실험²⁸⁻³¹⁾

(1) 균주

Salmonella typhimurium LT-2의 histidine 영양 요구성인 *Salmonella typhimurium* TA100은 미국 캘리포니아 대학의 B.N. Ames 박사로부터 제공 받아 실험에 사용하였다. 그리고 이들 실험균주들은 새로운 frozen permanent가 준비되었을 때나 매 실험직전 histidine 요구성, deep rough(rfa) 돌연변이, uvrB 돌연변이, R factor 등의 유전형질을 확인하여 사용하였다.

(2) 돌연변이유발원/발암원

간접 돌연변이원 (indirect mutagen)으로는 aflatoxin B1(AFB1, Sigma Chemical Co., USA)은 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹여서 실험에 사용하였다.

(3) 항돌연변이 실험

본 실험에서 주로 이용하였던 preincubation test는 S9 mix 0.5ml, 하룻밤 배양된 균주($1 \sim 2 \times 10^9$ cells/ml) 0.1ml, 희석된 시료(50 μ l)와 돌연변이 유발 물질(50 μ l)을 ice bath에 담긴 cap tube에 넣고 가볍게 vortex시킨 후 37°C에서 30분간 예비배양하였다.

45°C의 top agar 2ml씩을 각 tube에 붓고 3초간 vortex하여 minimal glucose agar plate에 도포하고 37°C에서 48시간 배양한 후 복귀돌연변이 숫자를 계수하였다. 한편 실험에 사용된 시료와 돌연변이유발물질의 농도는 예비실험(dose response 및 독성실험)을 통하여 결정하였다.

그리고 돌연변이 억제율(inhibition rate)은 아래 식에 의해 계산하였다.

$$\text{Inhibition rate(\%)} = 100 \times \frac{(a-b)}{(a-c)}$$

여기서 a는 돌연변이원에 의해 유도된 복귀돌연변이의 수, b는 시료를 처리하였을 때의 복귀돌연변이의 수이며, c는 돌연변이원과 시료가 없을 경우의 자연 복귀돌연변이의 수이다.

4. *In vitro*에서의 항암 실험

1) 암세포 배양

(1) 사용시약 및 기기

세포배양을 위해 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM), fetal calf calf serum(FCS), 0.05% trypsin-0.02% EDTA 그리고 100units/ml penicillin-streptomycin을 GIBCO사(USA)로부터 구입하여 사용하였다. 세포배양은 CO₂ incubator (Sanyo, model MCO96, Japan)를 사용하였다.

(2) 실험에 사용된 세포주

암세포인 Clone M-3 마우스 멜라노마(clone M-3 mouse melanoma)와 A431 인체유표피암세포(人體類表皮 癌細胞, A-431 human epidermoid

carcinoma cell), 정상세포인 3T3-L1 배아섬유아세포(胚芽纖維芽細胞, 3T3-L1 embryo fibroblast cell)는 한국 세포주 은행(서울의대)으로부터 분양받아 배양하면서 실험에 사용하였다.

(3) 암세포 배양

Clone M-3, A-431 세포는 100units/ml의 penicillin-streptomycin과 각각 15%, 10%의 FCS가 함유된 DMEM을 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양된 각각의 암세포는 일주일에 2~3회 refeeding하고 6~7일 만에 PBS로 세척한 후 0.05% trypsin-0.02% EDTA로 부착된 세포를 분리하여 원심분리한 후 집적된 암세포에 배지를 넣고 피펫으로 암세포가 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 75ml cell culture flask에 5ml씩 일정수 분할하여 주입하고 계속 6~7일마다 계대배양하면서 실험에 사용하였다. 계대배양시 각각의 passage number를 기록하였고 passage number가 10회 이상일 때는 새로운 암세포를 액체질소 탱크로 부터 꺼내어 다시 배양하여 실험하였다.

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

동물세포에 대한 시료의 세포독성(cytotoxicity)을 측정하기 위하여 MTT assay를 실시하였다. 동물세포를 96 well plate에 1×10⁴ cell/well이 되게 180μl 분주하고 인산생리식염수로 일정농도까지 희석한 시료를 20μl 첨가하여 37°C, 5% CO₂배양기에서 72시간 배양하였다. 여기에 인산생리식염수에 5mg/ml의 농도로 제조한 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 용액 20μl를 첨가하여 동배양조건에서 4시간 더 배양하였다. 이를 550×g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 제거하고, 각 well 당 DMSO 150μl를 가하여 30분간 교반한 후 ELISA reader(Bio-Tex Instruments Inc., USA)로 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

$$\text{Cytotoxicity}(\%) = \frac{\text{대조구의 흡광도} - \text{시료처리구의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}} \times 100$$

5. 쪽풀의 발효 및 색소 환원

1) 쪽풀의 발효

(1) 자연 발효를 이용한 쪽풀 발효

건조 쪽잎 30g에 증류수 30ml를 첨가하여 각각 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C에서 8일간 incubation시켰다. 발효기간동안 5ml의 증류수를 3~4회 첨가하고 고루 섞어주었다.

(2) Culture를 이용한 쪽풀 발효

온도에 따른 발효 과정에서 가장 많이 관여된 균을 총균수로 측정하여 주된 발효균을 분리하였다. 주요 발효균은 *Aspergillus niger*로 동정되었고 이를 접종하여 30°C에서 발효시켰다.

2) 색소 환원

발효쪽 30g(수분무게 포함)에 잿물(pH 10.5) 250ml, 수산화나트륨(NaOH) 0.5g, 포도당(glucose) 2.5g, 수산화칼슘(Ca(OH)₂) 5g, 증류수 500ml를 첨가하여 35°C에서 36시간 발효시켜 염액을 만들었다.

6. 총균수 측정⁶⁾

발효쪽 1g을 멸균된 증류수로 단계적으로 희석한 후 각 희석액 중 0.1ml씩을 미리 가열용해하여 45°C로 냉각한 PCA배지 15ml에 넣고 혼합한 후 petri dish에 평판은 만들고 30°C 조건에서 3일간 배양하여 나타난 colony의 수를 세어 총균수로 측정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 천연색소의 기능성

1) 항균성 실험

치자황, 치자청, 비트레드 색소의 에탄올 추출물 및 쪽풀색소의 메탄올 추출물의 항균성을 알아보기 위해 *Staph. aureus*, *E. coli* 및 *Trich. mentagrophytes*에 대한 성장억제 효과를 관찰한 결과는 Table 2와 Table 3과 같다. 여기서 OD값은 배지의 혼탁도(turbidity)를 나타내는 것으로 균주의 성장이 활발할수록 이 값이 커지게 된다. 표에서 알 수 있듯이 각 배지에 천연색소 시료를 첨가함으로써 OD값이 낮아짐을 볼 수 있다.

즉, OD값이 낮아진다는 것은 균주의 성장이 억제되었다는 것을 의미한다. *E. coli*와 *Staph. aureus*에 대해서는 모든 천연색소 추출물이 항균력을 보였고, 그 중 비트레드가 가장 높은 항균력을 나타냈지만 쪽추출물도 비트레드 다음으로 이들 세균에 대해서 항균력을 보였다. 한편, 무좀균인 *Trich. mentagrophytes*에 대해서는 쪽추출물이 45%의 가장 높은 활성을 보였다. Table 2와 Table 3으로부터 쪽추출물과 비트레드는 피부습진 및 내의 악취 원인균인 *Staph. aureus*, *E. coli*에 대해 항균효과가 있었으며 쪽추출물은 특히 무좀원인균인 *Trich. mentagrophytes*에 대해서 다른 색소보다 항균력이 뛰어나 쪽풀색소로 염색된 직물 또한 항균효과를

Table 2. Antimicrobial activity of various colorant plants on the growth of *E. coli* and *Staph. aureus*

Sample	OD _{600nm}	
	<i>E. coli</i>	<i>Staph. aureus</i>
Control	0.51	0.46
Gardenia yellow ¹	0.41(20) ³	0.36(22)
Gardenia blue ¹	0.43(16)	0.38(18)
Beet red ¹	0.31(40)	0.32(30)
Indigo blue ²	0.36(30)	0.38(20)

¹ Ethanol extract

² Methanol extract

³ The values in parantheses are the inhibition rates(%)

Table 3. Antimicrobial activity of various colorant plants on the growth of *Trich. mentagrophytes*

Sample	OD _{600nm}
Control	0.48
Gardenia yellow ¹	0.33(30) ³
Gardenia blue ¹	0.43(10)
Beet red ¹	0.31(35)
Indigo blue ²	0.26(45)

¹ Ethanol extract

² Methanol extract

³ The values in parantheses are the inhibition rates(%)

나타낼 가능성이 있음을 보여주었다.

2) 천연색소 추출물의 항돌연변이 효과

Ames 실험의 이용균주들 중 *Salmonella typhimurium* TA100을 이용하여 색소 추출물의 돌연변이억제 실험을 수행하였다. 먼저 색소추출물이 돌연변이원성이 있는가의 여부를 알기 위해서 S9 mixture를 이용하여 간접돌연변이원으로 실험에 적용하여 본 결과는 Table 4에 나타낸 바와 같다. 다른 천연색소 추출물과 비교해 볼 때, 특히 쪽추출물은 다른 색소보다 약 2배의 항돌연변이 활성이 있어 발암물질에 의해 유도될 수 있는 돌연변이 유발의 억제 기능도 우수한 것으로 사료된다.

3) MTT assay를 이용한 in vitro에서의 항암효과

(1) 정상세포에 대한 효과

천연색소추출물이 정상세포에 대해 어떤 효과를 나타내는지 알아보기 위해 정상세포인 3T3-L1 fibroblast cell을 이용하여 MTT assay하여 세포독성효과를 검토하였다. Table 5에서 OD값은 세포 배양액의 MTT 처리후 색깔의 농도를 나타내는 수치로 정상세포의 성장 정도를 의미한다. 천연색소시료를 첨가했을 때 OD값의 변화가 거의 없는 것으로 보아 천연색소는 정상세포의 성장에 독성을 나타내지 않는다고 결론내릴 수 있어 암세포에 처리할 시료농도로는 정상세포의 성장에 크게 영향을 끼치지 않을 것으로 생각된다.

(2) Clone M-3 mouse melanoma cell에 대한 효과

천연 쪽풀을 염료로 사용했을 때의 *in vitro* 항암효과를 검토하기 위해 본 실험에서는 Clone M-3 마우스 멜라노마 세포주를 이용하여 천연색소 추출물에 대한 MTT assay를 실시하였다. Table 6에서 OD값은 세포 배양액의 MTT 처리후 색깔의 농도를 나타내는 수치로 암세포의 성장 정도를 의미하며, 천연색소시료를 첨가하였을 때 OD값의 변화로 천연색소의 암세포에 대한 저해효과를 검토할 수 있다. Clone M-3 마우스 멜라노마 암세포에 대한 천연색소 추출물의 저해효과는 10 μ g/assay 첨가시 다른 시료는 효과가 없었지만, 쪽풀색소 추출물은 38%의 저해 효과를 보였고, 20 μ g/assay 투여시 다른 천연색소 추출물이 낮은 저해효과를 보였지만 쪽추출물은 43%의 높은 억제 효과를 보였다. OD값

Table 4. Effect of extracts from colorant plants on the mutagenicity induced by aflatoxin B₁(AFB₁, 0.75µg/plate) in Salmonella typhimurium TA100

Treatment	Revertant plants/plate (level of extract, mg/plate)	
	1,25	2,5
Spontaneous	100±11	
Control(AFB ₁)	904±55	
AFB ₁ + Gardenia yellow ¹	651±18(31) ³	564±19(42)
+ Gardenia blue ¹	667±13(29)	627±11(34)
+ Beet red ¹	653±17(31)	627±13(34)
+ Indigo blue	445±13(57)	390±17(64)

¹ Ethnanol extract

² Methanol extract

³ The values in parantheses are the inhibition rates(%)

Table 5. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) assay of the extracts(µg/assay) from colorant plants against 3T3-L1 embryo fibroblast cells

Sample	OD ₅₄₀	
	10µg	20µg
Control	0.69±0.02	0.77±0.02
Gardenia yellow ¹	0.71±0.01(0) ³	0.80±0.04(0)
Gardenia blue ¹	0.92±0.02(0)	0.83±0.01(0)
Beet red ¹	0.69±0.01(0)	0.77±0.01(0)
Indigo blue ²	0.63±0.01(8)	0.66±0.01(14)

¹ Ethnanol extract

² Methanol extract

³ The values in parantheses are the inhibition rates(%)

이 급격히 낮아지는 것으로 보아 쪽추출물은 다른 색소 추출물보다 mouse melanoma cell에 대해 현저한 암세포 증식 억제 효과를 나타내어 이 색소를 염료로 사용할시 피부 melanoma cell에 대해 항암 효과가 있을 가능성이 있는 것으로 나타났다.

(3) A431 human epidermoid carcinoma cell에 대한 효과

Table 7은 A431 인체 유표피암 세포에 대한 천연 색소 추출물의 MTT assay에 의한 암세포 성장억제 효과를 나타낸 것이다. 10µg/assay 첨가 농도에서 모든 천연색소 추출물이 저해효과를 보이지 않

Table 6. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) assay of the extracts(µg/assay) from colorant plants against Clone M-3 mouse melanoma cells

Sample	OD ₅₄₀	
	10µg	20µg
Control	0.34±0.01	0.37±0.01
Gardenia yellow ¹	0.44±0.01(0) ³	0.32±0.01(13)
Gardenia blue ¹	0.43±0.02(0)	0.35±0.01(0)
Beet red ¹	0.34±0.01(0.1)	0.35±0.01(0)
Indigo blue ²	0.21±0.01(38)	0.66±0.01(14)

¹ Ethnanol extract

² Methanol extract

³ The values in parantheses are the inhibition rates(%)

았으나 20µg/assay 투여시 쪽추출물에서 28%의 억제 효과를 보였다. 따라서, Melanoma cell에 대한 억제 효과보다는 낮았지만 쪽추출물이 다른 시료보다는 효과가 있었다.

2. 쪽풀을 이용한 발효쪽 제조

1) 발효온도에 따른 발효쪽의 총균수

온도를 달리하여 발효시킨 8일째 발효쪽의 총균수를 측정한 결과 30°C에서 발효시킨 발효쪽이 3.3×10⁷ CFU/ml로 가장 많았고 60°C에서 발효시킨 쪽은 2.2×10⁷ CFU/ml로 가장 적었으며 높은 온도

Table 7. 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) assay of the extracts($\mu\text{g}/\text{assay}$) from colorant plants against A431 human epidermoid carcinoma cells

Sample	OD ₅₄₀	
	10 μg	20 μg
Control	0.77 \pm 0.01	0.90 \pm 0.05
Gardenia yellow ¹	0.81 \pm 0.01(0) ³	0.70 \pm 0.01(12)
Gardenia blue ¹	1.04 \pm 0.01(0)	0.98 \pm 0.01(0)
Beet red ¹	0.89 \pm 0.01(0)	0.87 \pm 0.03(4)
Indigo blue ²	0.84 \pm 0.01(0)	0.65 \pm 0.01(28)

¹ Ethnanol extract

² Methanol extract

³ The values in parantheses are the inhibition rates(%)

에서 발효시킴수록 총균수는 감소함을 관찰할 수 있었다(Fig. 1). 또한, 70°C에서 발효시킨 쪽에서는 균을 관찰할 수 없었다. 총균수가 가장 많았던 30°C에서 발효시킨 쪽에서 분리된 주요균을 현미경으로 관찰해 보았을 때, *Aspergillus* 속(屬)으로 나타났으며 이 균이 쪽풀 발효에 관여하는 주된 균인 것으로 보여 균동정을 시도하였다.

2) 발효 온도에 따른 염색 특성

가장 적절한 쪽풀 발효 온도를 찾기 위해 건조쪽풀에 수분을 가하여 30°C~70°C 각각 10°C 간격으로

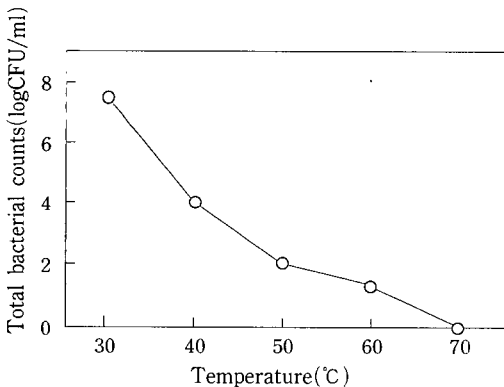


Fig. 1. Changes of total bacterial counts in indigo fermented at various temperatures.

8일간 incubation시켜 염색 온도에 따른 K/S값은 Fig. 2에 나타내었다. 그림에서 보는 바와 같이 면포의 경우는 30°C에서, 견포의 경우는 50°C에서 발효시킨 쪽에서 가장 높은 염착량을 보였다. 따라서, 30°C 및 50°C에서 건조쪽을 자연 발효시킴으로서 가장 많은 색소를 얻을수 있다고 생각된다. 쪽풀 발효에는 균들이 관여한다는 여러 가지 보고들이 있는데^{19~23)}, 30°C에서는 곰팡이가 가장 잘 자랄 수 있는 온도이고 50°C는 *Bacillus* 균들이 성장할 수 있는 최적 온도이므로 이러한 미생물들이 쪽풀 발효에 큰 영향을 주고 있다고 할 수 있다.

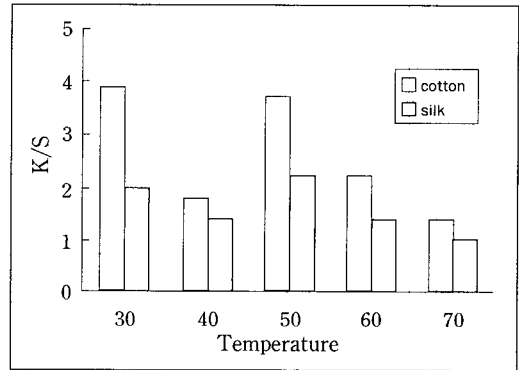


Fig. 2. K/S values of fabrics dyed five times with indigo fermented at various temperatures.

IV. 결론

천연색소의 항균, 항돌연변이 및 *in vitro* 항암효과를 screening하기위해 먼저 치자청, 치자황, 비트레드 에탄올추출물과 쪽 메탄올추출물로 항균실험을 하였고 Ames test 실험계에서 항돌연변이 효과를 검토하였으며 MTT assay 실험계에서 마우스 멜라노마, 인체 유표피암세포에 대한 세포독성효과도 살펴보았다. 그 가운데 특히 활성이 컸던 쪽풀을 발효시켜 발효쪽의 생리적 기능과 염색성 및 견뢰도를 검토하였는데, 먼저 쪽풀을 염색에 이용하기 위하여 30°C, 40°C, 50°C, 60°C 및 70°C로 온도를 달리하여 발효시켜 총균수 및 염착량을 측정하였다.

그중 염착량이 높고 총균수가 가장 많았던 30°C에서 발효된 발효쪽으로부터 주요균을 분리동정한 결과 *Aspergillus niger*인 것으로 확인되었고, 주된 발효 균인 *Aspergillus niger*를 접종시킴으로써 발효시간을 단축시켜 주고 높은 염착량을 얻을 수 있었다.

이 실험의 결과로부터 다음과 같은 결론을 내릴 수 있다.

1. 치자황, 치자청, 비트레드 색소의 에탄올 추출물 및 쪽색소의 메탄올 추출물로의 항균성 실험에 있어서 *E. coli*와 *S. aureus*에 대해서는 비트레드 색소에서 가장 강한 활성을 나타내었고, *Trich. mentagrophytes*에 대해서는 쪽추출물에서 가장 높은 활성을 보였다.

2. Ames 실험계를 이용한 천연색소 추출물의 항돌연변이 실험에서 천연색소 추출물 가운데 쪽추출물로부터 가장 높은 돌연변이 유발억제효과를 보였고, *in vitro* 항암 실험에서도 쪽추출물이 암세포 Clone M-3와 A431에 대해서 가장 높은 저해효과를 나타냈다.

3. 쪽풀 발효에 관여하는 주된 균은 *Aspergillus niger*로 동정되었고 이 균을 접종시킴으로서 발효시간을 단축시킬 수 있고 높은 염착량을 기대할 수 있었다.

참 고 문 헌

- 野崎一彦, 天然物による食品の保存の現状と効果, 月刊ホフードケミカル, 2, 45(1986).
- 이상락·이영희·김인희·남정우, 천연염료를 이용한 염색물의 항균, 소취성에 관한 연구, 한국염색가공학회, 7, 4(1995).
- 김홍식·조광현, 편축 추출물의 항진균 작용에 관한 연구, 한국균학회지, 8, 1(1980).
- 이병완·신동화, 식품부패 미생물에 대한 천연 항균물질의 농도별 및 분획별 항균 특성, 한국식품과학회지, 23, 2(1991).
- Lee, C. H, Illustrated flora of Korea, 향문사(1985).
- 소황옥, 치자염의 염색과정이 염색견뢰도에 미치는 영향(I), 중대 논문집 제33집, 자연과학편(1990).
- 소황옥, 치자염의 염색과정이 염색견뢰도에 미치는 영향(II), 복식16호(1991, 5).
- 谷村顯雄, “天然着色料ハンドブック”, p. 101(1979).
- 하경남, “치자염에 대한 고찰”, 원광대학교 대학원 응용미술학과 석사논문(1987, 10).
- 김석진, “암예방 기능성 단무지 개발에 관한 연구”, 부산대학교 대학원 식품영양학과 이학석사논문(1998, 2).
- 田 勝利, 藍と からみた染料の歴史, 衣生活, 2(1991, 5)
- Krochmal, Anord and Connie, The Complete Illustrated Book of Dyes from Natural Sources, 66-67, Garden City, New York: Double Company Inc.(1974).
- 中島照夫, 抗菌防臭加工纖維製品の最近の動向と課題(上), 纖維科學, 33, 8(1991).
- 弓削治, 抗菌加工を施した纖維製品の效果試験方法について, 繊維消誌, 26, 4(1985).
- 弓削治, “抗菌防臭”, 纖維社, 大阪, 181-190(1990).
- 阪上未治, “人にやさしく纖維と加工”, 纖維社, 大阪, 90-143(1995).
- 中島照夫, 最近の抗菌防臭加工纖維製品の問題と對策, 染色工業, 37, 5(1989).
- 禹志亨, 쪽(蓼藍, 木藍, 大靑)의 傳統染色과 바이오테크놀로지의 응용(II), 의류기술 52호(1994).
- 高原義昌, 田 脩, 細菌による藍の工業的還元に関する研究一(第1報) 發酵建におけるの發過について, 醱酵工學雜誌, 38, 4(1960).
- 高原義昌, 田 脩, 細菌による藍の工業的還元に関する研究一(第2報) 發酵建に及ぼす諸因子の影響, 醱酵工學雜誌, 38, 4(1960).
- 高原義昌, 田 脩, 細菌による藍の工業的還元に関する研究一(제9보) 工業試驗(その1) 正藍建, 38, 9(1960).
- 高原義昌, 高崎義幸, 田 脩, 細菌による藍の工業的還元に関する研究一(第10報) 工業試驗(その2) 割建, 38, 9(1960).
- 高原義昌, 高崎義幸, 田 脩, 細菌による藍の工業的還元に関する研究一(第11報) 工業試驗(その3) ピニロエンの染色, 39, 2(1961).
- 강성구의 6명, 갖의 에탄올 추출물이 생물생육에 미

- 치는 영향. 한국영양식량학회지, 24, 2(1995).
25. 정대균 · 유리나, 김치발효미생물에 대한 대나무잎 추출물의 항균력, 한국식품과학회지, 27, 6(1995).
 26. 하정옥, "기능성 및 저염 김치 개발과 소금의 생리적 특성연구", 부산대학교 대학원 박사학위논문(1997).
 27. 정진순, "봉선화 추출물로부터 항균성 물질 분리 및 그 염색포의 항균성", 부산대학교 대학원 박사학위 논문(1997).
 28. Matsushima, T., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. and Sawamura, M. Factors modulating mutagenicity in microbial test, In "Short-term test, systems for detecting carcinogens". Norphth, K. H. and Garner, R. C. (eds.), Springer, Berling, p. 273(1980).
 29. Yahagi, T., Nagao, M., Sugimura, T., Funya, A. and Matsushima, T., Mutagenicity of purrolizidine alkaloids in the *Salmonella*/mammalian-microsome test. *Mutat. Res.*, 68, p. 211(1979).
 30. Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki, E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.*, 31, p. 347(1975).
 31. Maron, D. M. and Ames, B. N.: Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.*, 113, p. 173(1983).