

최 종  
연구보고서

생명공학기술을 이용한 바로 먹는 기능성  
발효두부의 개발 및 상품화

Commercialization and Development of Direct Edible  
Functional Fermented Tofu Using Bio-technology

연구 기관  
순천대학교

농 립 부

## 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “생명공학기술을 이용한 바로 먹는 기능성 발효두부의 개발 및 상품화에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2006 년 05 월 24 일

주관연구기관명 : 순천대학교

총괄연구책임자 : 서 권 일

세부연구책임자 : 서 권 일

세부연구책임자 : 이 성 태

연 구 원 : 박 석 규

협동연구기관명 : 진주산업대학교

연 구 원 : 남 상 해

# 요 약 문

## I. 제 목

생명공학기술을 이용한 바로 먹는 기능성 발효두부의 개발 및 상품화

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

콩은 필수아미노산이 균형 있게 배합되어 단백질을 40% 정도 함유하고 다른 식물성 단백질에서 부족 되기 쉬운 lysine이 많으며, 지방뿐만 아니라 올리고당, isoflavone, saponin 및 섬유질 등과 같은 기능성 성분 등이 많이 함유되어 있어 영양 생리적으로 매우 우수한 식품으로 인정되고 있는데, 이러한 콩으로 만든 식품 중에 대표적인 것이 대두의 단백질을 침전시켜 응고하여 만드는 두부가공식품이라 할 수 있다. 이러한 두부는 단백질, 지질, 탄수화물들이 함유되어 있는 고단백 식품일 뿐만 아니라 생리활성기능을 수행하는 물질들이 함유되어 있음이 밝혀졌으며, 이러한 생리활성 물질들은 질병의 방지와 회복 및 노화방지 기능을 갖는 물질이기 때문에 그 중요성이 더욱 강조되고 있는 실정이다. 그러나 이와 같은 연구는 주로 미국을 비롯한 일본 등의 선진국에서 진행되어 왔으며, 우리나라에서는 두부에 대한 생리활성에 관한 연구에 대하여서는 체계적인 연구가 진행되지 못하고 있는 실정이다. 또한 두부는 증자콩의 수용성 단백질을 응고하여 압축시킨 가공식품으로 콩 발효식품인 된장 등에 비하여 콩 단백질의 소화흡수율이 비교적 낮으며, 수분함량이 많고 지방산의 불포화도가 높아 지방질의 산패 및 미생물에 의한 변질이 쉽게 일어나는 등 장기적인유통에 따른 저장성에 문제점이 있다.

따라서 본 연구에서는 향산화, 항당뇨, 항암 및 면역증진의 기능성 효과를 가지는 고품질 기능성 발효두부를 개발하고, 이들의 저장성 향상을 모색하였다.

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

- 1) 홍국균, 흑국균 및 버섯 균사체로 발효시킨 발효두부 조건 확립
  - ① 유기산을 응고제로 사용한 검정콩 두부의 제조 조건 확립
  - ② 향산화 성분 강화 기능성 두부 제조조건 확립
  - ③ 홍국균과 흑국균 및 버섯 균사체를 발효제로 사용한 발효두부 조건 확립
  
- 2) 홍국균, 흑국균 및 버섯 균사체로 발효 시킨 검정콩 발효두부의 향산화·항당뇨 활성
  - ① 향산화 효과 측정
  - ② 항당뇨 효과 측정
  
- 3) 홍국균, 흑국균 및 버섯 균사체로 발효시킨 검정콩 발효두부의 항암·면역 활성 측정
  - ① 고기능성 함유 천연물 및 버섯 균사체의 탐색
  - ② 발효두부의 항암 및 면역활성 측정
  - ③ *In vivo* 항암효과 측정
  
- 4) 순물과 비지를 감소시킨 발효 두부의 제조공정 개선 방안
  - ① 순물을 줄이는 콩두부의 제조조건 확립
  - ② 효소처리를 한 비지액을 활용하는 콩두부의 제조조건 확립
  
- 5) 박테리옌 및 유산균을 활용한 유산균 발효두부의 저장성 증진 방안
  - ① 고 박테리옌 생산 균주인 *Bacillus sp.* HS-25 의 배양액 조건 최적
  - ② 박테리옌과 유산균을 첨가 조건별 유산균 발효두부의 저장성 확인
  - ③ 항균활성이 증진된 기능성 발효두부의 관능평가

#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

##### 가. 연구개발 결과

유기산 응고제를 이용하여 두부를 제조한 결과 기존의 응고제를 사용한 두부보다 저장성이 우수하였다. 홍국균 및 흑국균을 이용하여 발효두부를 제조한 결과 MEA 배지가 발효두부 제조를 위한 최적배지인 것으로 조사되었으며, 두부의 발효기간은 7일 정도가 적당한 것을 확인하였다. 상황, 동충하초, 아가리쿠스, 큰느타리 1·2호, 수한 및 춘추느타리 와 같은 버섯 균사체 추출물 및 배양액에 항산화 활성을 측정한 결과 수한, 큰느타리 1호, 상황버섯 및 동충하초 균사체 배양액에서 약한 항산화 효과를 나타내었다. 버섯 균사체 추출액 및 배양액은 A549 암세포에 대하여 농도 의존적으로 그 성장을 억제하였고, 마우스 비장세포의 증식을 유도하였으며, 그 중 큰느타리 버섯 1호와 수한 버섯 균사체의 추출액 및 배양액의 활성이 다른 버섯 균사체에 비하여 그 활성이 높게 나타났다. 실험한 버섯 균사체 배양액(10배 희석액)은 대조군에 비해 대식세포의 IL-6, TNF- $\alpha$  생산량을 유의하게 증가시키는 것으로 나타났으며, 특히 큰느타리버섯 1호 및 수한 배양액은 IL-6의 분비량을 최대로 증가시켰으며, 수한 배양액은 TNF- $\alpha$ 의 분비량도 증가시키는 것을 확인하였다. 또한 균사체 추출물(100 $\mu$ g/ml)은 대조군에 비해 대식세포의 IL-6 생산량을 유의하게 증가시키는 것으로 나타났으며, 특히 고려상황균사체 추출물을 첨가하였을 경우에 IL-6의 분비량이 최대로 증가하였다. TNF- $\alpha$  생산량은 고려 상황과 수한 균사체 추출물에서 최대로 증가하였다. 새송이 및 동충하초를 이용한 발효두부 제조 시 적당한 배지로는 PD broth배지인 것을 확인하였으며, 발효두부 제조를 위한 최적 발효기간은 7일 정도가 적당하였다. 홍국균, 흑국균 및 버섯 균사체를 이용하여 제조한 발효두부의 생리기능성을 측정한 결과 새송이 및 동충하초를 이용한 발효두부 추출물이 홍국균과 흑국균을 이용하여 제조한 발효두부 추출물보다 항산화 및 암세포 성장 억제 효과가 더 높았으며, 그 활성은 메탄올 추출물이 물추출물보다 더 강하게 나타났다. 발효두부 추출물들은 농도 의존적으로 비장세포의 증식을 유도하였으며, *M. anka* 황두부 메탄올 추출물과 *Asp. awamorii* 흑두부 메탄올 추출물은 대조군에 비해 IL-2 분비량을 증가시켰으며, *M. anka* 황두부 메탄올 추출물과 동충하초 흑두부 물 추출물은 대조군에 비해 IFN- $\gamma$  분비량을 증가시켰다. 또한 발효두부 추출물은 대식세포 일산화질소 생성은 유도 하지 못하였으나, 대식세포의 사이토카인 생산은 유도 하는 것으로 나타났다. 마우스 복강에

암세포(S-180)를 이식한 후 새송이 버섯 균사체 발효흑두부 메탄올 추출물을 100, 200 mg/kg/day 농도로 처리한 결과 실험군에서는 그 체중이 대조군에 비하여 모두 체중이 낮게 나타났으며, 수명연장효과가 나타남을 확인하였다. Streptozotocin로 당뇨를 유발시킨 마우스에 새송이 버섯 균사체 발효흑두부 메탄올 추출물을 500mg/kg/day 농도로 처리한 결과 대조군에 비하여 혈당을 감소시키는 것을 확인하였다. *B. subtilis* HS-25 및 유산균을 배양용액에 두부를 침지한 결과 대조구 및 *B. subtilis* HS-25배양액에 침지한 두부는 저장 3일째부터 이취가 발생하였으나, 유산균의 배양액에 침지한 두부는 7일이 지나도 두부에 아무런 변화가 일어나지 않아 유산균 배양액에 침지한 두부의 저장성이 우수함을 확인하였다. 발효 흑두부보다 발효 황두부가 질감, 견고성 및 탄성 등이 우수한 것으로 나타났으며, 발효 시킨 균주에 따라서는 질감, 견고성 및 탄성 등이 비슷한 값을 나타내었다. 풍미는 버섯의 균사로 발효시킨 두부가 우수하였으며 이취도 전혀 없는 것으로 나타났다. 발효두부의 색상은 *A. awamori*로 발효시킨 두부의 선호도가 낮은 값을 나타내었고, 나머지 두부는 거의 비슷한 값을 나타내었다. 종합적인 선호도는 동충하초 및 새송이 버섯으로 발효시킨 두부가 우수한 것으로 나타났다.

## SUMMARY

The soybean tofu coagulated with citric acid was higher than the soybean coagulated with  $\text{CaCl}_2$  in the shelf-life. The optimal medium for fermented soybean tobu using *Monaskas anka*, *Monaskas pilosus* and *Asp. awamorii* was MEA medium, and the optimal fermentation period was 7 days. The biological activities of the mycelium extracts and liquid culture such as *Phellinus linteus*, *Agaricus blazei murill*, *Paecilomyces japonica*, *Pleurotus eryngii* I · II and *pleurotus ostreatus* were investigated. The mycelium liquid culture of *pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii* I, *Phellinus linteus* and *Paecilomyces japonica* among the tested samples showed a slight antioxidant activities. The mycelium extracts and liquid culture inhibited the proliferation of A549 cancer cells in a dose-dependent manner after treatment of 24 hrs, and induced the proliferation of spleen cells. The mycelium extracts and liquid culture of *Pleurotus eryngii* I, *pleurotus ostreatus* had higher activities than others. The liquid culture( $\times 10$  dilution) of mushroom mycelium increased IL-6, TNF- $\alpha$  synthesis of RAW264.7. Specially, the liquid culture of *Pleurotus eryngii* I, *pleurotus ostreatus* more increased the production of IL-6, *pleurotus ostreatus* also more increased the production of TNF- $\alpha$  than other samples. The mycelium extracts(100 ug/ml) were increased IL-6 when compared with the control. Specially, the product of IL-6 was the highest in the mycelium extract of *Phellinus linteus*. TNF- $\alpha$  synthesis was the highest in the mycelium extracts of *Phellinus linteus* and *pleurotus ostreatus*. The optimal medium for fermented soybean tobu using *Phellinus eryngii* and *Phellinus linteus* was PD broth medium, the optimal fermentation period was 7 days. The antioxidant and antitumor activities on the extracts of fermented tofu using *Phellinus linteus*, *Pleurotus eryngii* were higher than those of fermented tofu using *Monaskas anka*, *Monaskas pilosus* and *Asp. awamorii*, and their activities of the methanol extracts were higher than those of water extracts. The extracts of fermented soybean tofu induced the proliferation of spleen cells in a dose-dependent manner, the methanol extracts of fermented soybean tofu using *M.*

*anka* and fermented black bean tofu using *Asp. awamorii* increased IL-2 production.. The methanol extracts of fermented soybean tofu using *M. anka* and fermented tofu using *Phellinus linteus* increased IFN- $\gamma$  production. Also the extract of fermented tofu did not induce the induction of NO production, but the products of cytokines in RAW264.7 were induced. Sarcoma-180 bearing mice treated with the methanol extracts of fermented black soybean tofu using *Pleurotus eryngii* at 100 and 200 mg/kg/day were decreased body weights. Hyperglycemic mice treated with the methanol extracts of fermented black soybean tofu using *Pleurotus eryngii* at 500mg/kg/day were decreased the level of blood glucose. When tofu were immersed in the medium of *B. subtilis* HS-25 and Latobacilli, the tofu treated with the medium of *B. subtilis* HS-25 and control tofu were detected off-flavor 3 days later but the tofu treated with the medium of Latobacilli was not detected. The values of all the tofu in color were similar, but the value of the fermented black bean tofu using *A. awamori* was lower than that of others. The value of *Paaecilomyces japonica* and *Pleurotus erungii* mycelia in over all eating quality was the highest among the tested samples.



# CONTENTS

Chapter 1. Summary of Research .....	12
Session 1. Objectives .....	12
Session 2. Necessity .....	13
Session 3. Scope .....	14
Chapter 2. International and Domestic Technology Status .....	15
Chapter 3. Methods and Results .....	17
Session 1. Determination of preparation condition of fermented tofu using <i>Monascus anka</i> and <i>Aspergillus awamorii</i> .....	17
1. Materials and methods .....	17
2. Results and Discussions .....	24
Session 2. Determination of preparation condition fermented tofu using mushroom mycelium .....	36
1. Materials and methods .....	36
2. Results and Discussions .....	38
Session 3. Functional properties of fermented tofu using <i>Monascus anka</i> , <i>Aspergillus awamorii</i> and mycelium .....	51
1. Materials and methods .....	51
2. Results and Discussions .....	54
Session 4. Improvements of manufacturing processes and shelf life using the fermented tofu decreased by-products of tofu .....	85
1. Materials and methods .....	85
2. Results and Discussions .....	89
Chapter 4. Achievement and Contribution to related fields .....	99

Chapter 5. Application of results .....	100
Chapter 6. Information collected from overseas .....	101
Chapter 7. References .....	102

# 목 차

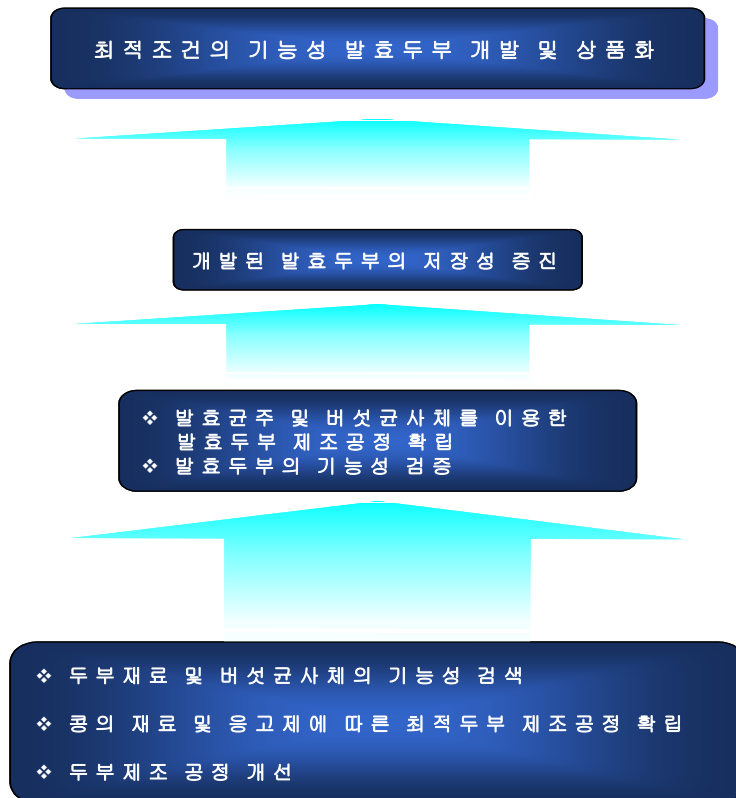
제 1장 연구개발과제의 개요 .....	12
제 1절 연구개발 목적 .....	12
제 2절 연구개발 필요성 .....	13
제 3절 연구개발 범위 .....	14
제 2장 국내·외 기술개발 현황 .....	15
제 3장 연구 개발수행 내용 및 결과 .....	17
제 1 절 홍국균과 흑국균을 이용한 발효두부의 제조조건 확립 .....	17
1. 재료 및 방법 .....	17
2. 결과 및 고찰 .....	24
제 2절 버섯 균사체를 이용한 발효두부의 제조조건 확립 .....	36
1. 재료 및 방법 .....	36
2. 결과 및 고찰 .....	38
제 3절 홍국균과 흑국균 및 버섯 균사체로 발효시킨 발효두부의 기능성 검증 .....	51
1. 재료 및 방법 .....	51
2. 결과 및 고찰 .....	54
제 4절 두부 부산물을 감소시킨 기능성 발효두부의 공정 개선 및 저장성 증진 .....	85
1. 재료 및 방법 .....	85
2. 결과 및 고찰 .....	89
제 4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	99

제 5장 연구개발결과의 활용 계획 .....	100
제 6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	101
제 7장 참고문헌 .....	102

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

### 제 1 절 연구개발 목적

본 연구에서는 일반두부의 제조공정을 개선하여 환경오염의 문제를 해결하고, 두부의 큰 문제 점 중에 하나인 장기 저장성의 문제를 해결하며, 항균성을 기본으로 가지면서 항산화, 항당뇨, 항암 및 면역증진 등의 기능성 효과를 가지는 고품질 기능성 발효두부를 아래와 같이 연구 개발하고자 하였다.



## 제 2 절 연구개발 필요성

### 1. 기술적 측면

- 가. 두부 침지액에 소금, 보존료나 초산의 첨가 및 pH 조절 등 침지액을 이용한 방법과 두부 자체에 유기산의 첨가나 저온살균 또는 microwave처리 보존료 및 실효성에서 의문점 및 문제성이 제기됨
- 나. 두부생산 기업과 연계하여 산업적으로 생산성 타진
- 다. 발효촉진 미생물과 부첨가제 및 버섯 자실체 발생 촉진물질에 대한 연구 필요함
- 라. 효율적인 공급을 위한 저장환경 조건 등의 연구 필요함

### 2. 경제·산업적 측면

- 가. 성인병 예방을 위한 콩 가공식품의 시장 호황 및 소비촉진을 권장 할 수 있음
- 나. 현재 정부정책은 쌀에서 콩을 포함한 다 작물로의 재배 전환을 추진하고 있으며, 이에 따른 콩 유래 가능성 식품소재 산업의 확대발전이 필요함
- 다. 개발된 관련 기술을 통하여 바이오 신소재로서 유산균 및 약용식물을 이용한 “바로 먹는 발효 생두부”의 개발에 새로운 수요 창출 및 관련 기업 활성화 가능함
- 라. 소비자의 기호에 따른 다양한 제품의 기술개발 확보 가능함

### 3. 사회·문화적 측면

- 가. 콩 및 콩발효·가공식품의 중요성에 대한 확산과 생산 및 소비증대를 통한 식생활 개선 필요함
- 나. 식생활 변화에 따른 노인성 질환 예방을 통한 사회 기회비용 및 의료비 경감
- 다. 명확한 효능을 갖는 기능성 소재의 개발로 관련 산업의 과학화 유도를 필요
- 라. 급속한 고령화 사회로의 진입 추세로 보면 암을 비롯한 각종 노인성 질병의 유발됨

### 제 3절 연구개발 내용 및 범위

구 분	연구개발목표	연구개발 내용 및 범위
1차년도 (2004)	홍국균, 흑국균으로 이용한 「항산화·항당뇨-검정콩 발효두부」의 제조 조건 확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 유기산을 응고제로 사용한 검정콩 두부의 제조조건 확립</li> <li>○ 홍국균과 흑국균을 발효제로 사용한 발효두부 제조조건 확립</li> <li>○ 항산화 및 항당뇨 성분 강화 기능성두부 제조 조건 확립</li> </ul>
	버섯 균사체를 이용한 「항암·면역증진-버섯 발효두부」의 제조 조건 확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 고 기능성 함유 버섯 균사체의 탐색</li> <li>○ 최적 항암 및 면역활성을 위한 발효두부의 제조조건 확립</li> </ul>
	순물과 비지를 감소시킨 「발효두부의 제조공정 개선」 방안	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 순물을 줄이는 콩두부의 제조조건 확립</li> <li>○ 효소처리를 한 비지액을 활용하는 콩두부의 제조조건 확립</li> </ul>
2차년도 (2005)	홍국균과 흑국균으로 발효시킨 「검정콩 발효두부의 항산화 및 항당뇨」 활성 측정	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 버섯 균사체를 이용한 발효두부의 제조 조건 최적화</li> <li>○ 항산화 효과 측정</li> <li>○ 항당뇨 효과 측정</li> </ul>
	버섯 균사체를 이용한 「버섯 발효두부의 항암 및 면역」 활성 측정	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 항암효과 측정</li> <li>○ 면역활성 측정</li> </ul>
	박테리오신 및 유산균을 활용한 「유산균 발효두부의 저장성 증진」 방안	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 고 박테리오신 생산 균주인 <i>Bacillus</i> sp. HS-25 의 배양액 조건 최적화</li> <li>○ 박테리오신과 유산균을 첨가 조건별 유산균 발효두부의 저장성 확인</li> <li>○ 항균활성이 증진된 기능성 발효두부의 관능평가</li> </ul>

## 제 2 장 국내·외 기술개발 현황

### 1. 국내의 기술 개발 현황

- 국내에서의 두부의 관한 연구로는 주로 두부 품질에 영향을 미치는 여러 가지 영향요인과 두부의 저장성에 영향을 미치는 응고제의 종류, 열처리 조건 등에 대하여 검토한 바 있음
  - 두부의 저장성을 증대 시키 위하여 전 등은 두부의 허브를 첨가하여 두부의 품질 특성 조사
  - 김 등은 김정콩 종피를 두부에 첨가하여 색소, 텍스처 및 관능검사 등을 검토
  - 한 등은 두부의 제조공정을 최적화 하기위하여 대두유 농도, 수침시간, 대두유 가열 온도 응고제의 종류 등 요인을 선별하여 두부의 품질의 기호도의 최적조건을 확립
- 대두발효식품에 관한 연구로는 박 등이 식물성 Sufu를 제조하기 위하여 우수한 균주 선발 발효 조건에 대한 연구를 수행하였음
- 김 등은 두유에 우유를 혼합하여 *Actinomucor elegans*를 이용하여 발효 시킨 후 품질 특성을 조사
- 대두유에 젖산균과 응고제를 이용하여 치즈를 생성한 후 최적의 응고조건을 찾 고자 하였음
- 대두 단백질은 용해도, 점도, 점착력, 아미노산 조성 등 여러 가지 성질이 우유단백 질과 유사하므로 이를 이용하여 치즈와 유사한 고형식품을 제조하고자 하는 연구가 지금까지 많이 수행되어져 왔음



## 2. 국외의 기술 개발 현황

- 대두단백을 이용한 발효식품은 아시아 지역을 중심으로 제품이 다양하게 개발되고 있으며, 각 국별로 전통적인 제조 방법으로 토대로 하여 과학적으로 기능성을 입증하기 위한 노력들이 시도 되고 있음
  - 중국, 대만: Tobuyo 및 Sufu
  - 인도네시아: Temphe 및 Takoan
  - 필리핀: Tahuri
  - 태국: Tau hu yee
  - 일본: Tofuyo
- Sufu는 콩 치즈로 제조방법이 간편할 뿐만 아니라 영양가 및 풍미가 우리나라 기호에 비교적 맞는 중국의 대두 발효식품이다 이것은 두부에 곰팡이를 번식시켜 분비되는 효소인 trypsin 과 pepsin에 의해 대두단백질의 주성분인 globulin 과 albumin 이 점차적으로 가수분해를 일으켜 peptide 및 아미노산으로 분해되어 숙성이 진행됨에 따라 치즈와 유사한 두부의 부드러운 조직과 풍미 및 우수한 소화율을 갖게 됨
- Temphe 는 인도네시아의 가정에서 제조되어온 오랜 전통의 발효 식품으로 물에 담구어 콩껍질을 벗겨 낸 후 콩을 30분 동안 삶은 후 탈수, 건조 및 냉각시킨 후 *Rhizopus oligosporus* 또는 *Actinomucor elegans* 와 함께 혼합하여 성형하여 항온에서 1-2일 동안 발효시켜 제품화한 것으로, 조미나 향신료로 사용되는 기존의 대두 발효식품과는 달리 주로 주식이나 육대용품으로 이용됨.
- 또한 일본의 tofuyo는 두부를 건조시킨 후 *Monascus sp.* 또는 *Aspergillus sp.* 의 국균을 찢살에 생육시켜 만든 koli 와 증류주 등을 섞은 침지액에 첨가하여 숙성시킨 것으로 감미가 있고 부드러운 크림 형태의 두부 발효식품

## 제 3 장 연구 개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 홍국균과 흑국균을 이용한 발효두부 제조 조건 확립

#### 1. 재료 및 방법

##### 가. 유기산 응고제를 이용한 두부 제조 조건 확립

###### 1) 재료

본 실험에 사용된 대두는 2003년에 전남 순천 지방에서 수확한 것을 사용하였고, 두부제조에 응고제로 사용한  $\text{CaCl}_2$  및 citric acid는 Junsei Chemical Co.(Tokyo, Japan)의 특급 제품을 사용하였다.

###### 2) 유기산을 응고제로 사용한 두부 제조

###### 가) 제조 공정

원료콩 (노랑콩, 검정콩)의 이물질을 제거하고 깨끗이 수세한 다음 18-20℃의 물에 12시간 동안 수침시킨 후 불려진 콩을 세척하여 원료콩의 10배량에 상당하는 물을 가하면서 blender로 5분정도 마쇄하였다. 얻어진 마쇄액을 100℃에서 5분간 가열한 뒤 목면자루로 여과하였다. 여과된 두유를 85℃로 냉각시킨 뒤 응고제 ( $\text{CaCl}_2$ , Citric acid)를 각각 두유량의 0.2%씩 첨가시켜 20분간 방치하였으며 응고된 각각의 두부를 두부 성형기(8×10×10cm)에 부어 압착 성형하여 제조하였다(Fig 1-1).

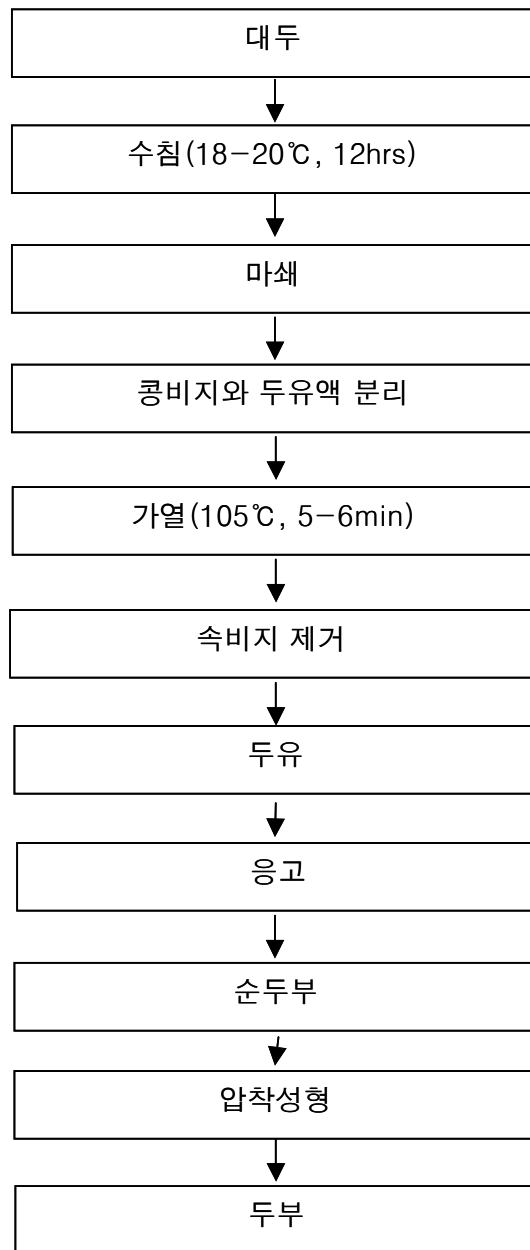


Fig. 1-1. Schematic diagram for soybean Tofu procession.

#### 나) 이화학적 특성 조사

유기산 응고제를 이용한 두부의 저장성 증대를 알아보기 위하여 이화학적 특성 및 저장성 에 관해서 아래와 같이 실행하였다

##### (1) 일반 성분

기존의 응고제 와 유기산을 응고제로 사용하여 제조한 두부의 일반성분은 A.O.A.C 표준시험방법에 따라 105℃ 상압가열건조법, 조단백질은 micro-Kjeldahl법으로 측정하였다.

##### (2) pH 및 산도의 측정

제조한 두부의 pH는 시료 10g에 증류수 40 mL를 가하여 homogenizer로 마쇄하고 여과한 후, 그 액의 일부를 취하여 pH meter로 측정하였다. 적정산도는 두부 마쇄여액 20 mL를 취하여 pH 8.3이 될 때 까지의 소비량을 측정하여 lactic acid 으로 환산하였다

##### (3) 환원당 및 총당

두부의 환원당 함량은 시료 5g 에 증류수 100mL를 가하여 homogenizer로 마쇄하여 500 mL로 정용한 다음 2,000 rpm에서 2시간 교반한 후 Sep-pack C18로 색소 및 단백질성분을 제거하고 0.45 uM membrane filter로 여과하여 미리 작성한 표준 곡선내에 포함되는 흡광도 범위 내에서 DNS방법으로 측정하여 정량한 다음 glucose 양으로 계산하였으며, 총당은 시료를 가수분해 시킨 다음 중화하고 단백질을 제거한 후 여과하여 DNS법으로 정량 하였다.

##### (4) 아미노태 질소

아미노태 질소( $\text{NH}_2\text{-N}$ )의 함량은 는 Formol 값에서 암모니아태 질소를 빼 값으로 Formol 값은 Formol 적정법으로 계산하여 나타내었다. 즉 시료 5g을 250 mL 비이커에 넣고 증류수 100 mL를 가하여 1시간 동안 교반하여 충분히 혼합한 후 0.1 N NaOH 용액으로 pH 8.4 까지 적정한 후 중성포르말린 용액 20 mL를 가한 다음 다시 pH가 떨어지면 0.1 N NaOH 용액으로 pH 8.4까지 적정하여 다음 식 으로 계산하였다.

$$\text{NH}_2\text{-N(\%)} = \frac{(A-B) \times 1.4 \times F \times 100}{\text{Sample (g)}}$$

A: 0.1 N NaOH 용액의 시료 적정량(mL)

B: 0.1 N NaOH 용액의 공시험 적정량(mL)

F: 0.1 N NaOH 용액의 factor

#### (5) 생균수 측정

두부의 일반 세균수는 시료를 PCA(plate count agar) 배지에 접종하여 37°C 항온기에서 24시간 배양 후 형성된 colony를 계측하였다.

#### 나. 기능성 두부 제조를 위한 소재의 기능성 검색

##### 1) 시료 조제

솔잎, 검정깨, 흑미, 인삼, 노랑콩잎, 검정콩잎 등을 10g 에 100% methanol을 첨가하여 80°C에서 6시간동안 3회 추출한 후 원심 분리하여 동결건조를 하여 본 실험에 사용하였다.

##### 2) 수소공여능

1,1'-diphenyl-2-picrylhydrazine(DPPH)의 환원성을 이용하여 516nm에서 UV/Vis-spectrophotometer 로 항산화 효과를 측정하였다

##### 3) 암세포 성장억제 효과

Monolayer로 자란 암세포주를 0.25% trypsin-EDTA 용액으로 처리하여 최종 세포가  $2 \times 10^5$  cells/mL 되도록 희석하여 24 well plate에 seeding 한 다음 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 preincubation 하였다. 여기에 sample을 농도별로 첨가

일정시간 후 세포증식 정도를 SRB 방법에 의하여 측정하였다.

#### 4) 면역 활성화

##### 가) 비장세포 증식

비장세포의 증식 측정은 Cell Titer 96<sup>®</sup> Aqueous One Solution Cell proliferation Assay (Promega, Madison, WI, USA)를 사용하였으며, 각각 배양된 배양액 100 $\mu$ l에 Cell Titer 용액 15 $\mu$ l씩 첨가하여 4-8시간동안 배양한 다음 Microplate Reader(Titertek Multiscan Plus, Finland)를 사용하여 490nm에서 O.D.값을 측정하였다.

##### 나) 사이토카인 분비량 측정

비장세포 또는 대식세포주(RAW264.7)가 분비하는 IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-6, TNF- $\alpha$  농도 측정은 ELISA법을 이용하여 결정하였다. 즉, flat-bottomed micro well plate에 goat anti-mouse cytokine 항체(1차 항체)를 coating buffer를 이용하여 4 $^{\circ}$ C에서 overnight incubation한 후, 3% BSA용액으로 2시간 동안 상온에서 blocking하였다. 실험에서 채취한 배양 상층액을, 이 plate에 각각 넣어서, 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 incubation시킨 후, biotinylated anti-cytokine 항체(2차 항체)를 첨가하였다. 그리고 avidin-conjugated alkaline phosphate를 적당량 가하고, 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 incubation시키고, 기질로 *p*-nitrophenyl phosphate를 넣은 후 Microplate Reader(Titertek Multiscan Plus, Finland)를 사용하여 410nm와 450nm에서 흡광도 값으로 측정하여 나타내었다. 이 때 각 사이토카인의 측정 한계는 10 pg/ml이었다.

##### 다) 일산화질소 측정

안정된 일산화질소(nitric oxide) 산화물인 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>(Nitrite)는 Greiss 반응을 이용하여 측정하였다. 대식세포주에 시료의 추출물을 농도별로 첨가하여 2일간 배양한 다음 배양 상층액을 회수하여 96-well plate에 100  $\mu$ L씩 넣고 Greiss 시약(0.1% N-1-naphthyl-1-ethylendiamine in H<sub>2</sub>O : 1% sulfanilamide in 5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)을 동량 첨가하여 10분간 반응시킨 후, Microplate Reader(Titertek Multiscan Plus, Finland)로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite의 농도는 sodium nitrite를 이용하여 64  $\mu$ M에서 0.5  $\mu$ M까지 2배씩 희석하여 얻은 표준곡선과 비교하여 계산하였다.

다. 홍국균 및 흑국균을 이용한 발효두부의 제조조건 확립

1) 재료

발효두부 제조를 위한 두부는 2004년 가을에 순천지역의 농가에서 수확한 흑대두 및 황대두로 직접 가정에서 제조한 흑두부 및 황두부를 구입하여 사용하였으며, 두부의 발효를 위한 발효균주는 *Monaskas anka* 12002, *M. pilosus* 11845 및 *Aspergillus awamori* IFO 42335을 한국종균협회에서 분양받아 사용하였다.

2) 배지 및 균주의 배양

발효두부제조를 위한 모든 곰팡이 보존은 PDA(potato dextrose agar)평판배지에 30℃, 6일 동안 배양하여 5℃이하의 냉장보관하면서 2주일 이내에 액체배양을 위한 starter로 사용하였다. *Monaskas anka* 12002 및 *M. pilosus* 11845의 액체배양은 malt extract 2%, glucose 2%, peptone 0.1%로 구성된 MEA배지를 사용하여 30℃, 120rpm으로 7일 동안 배양하여 pellet가 형성되었을 때 마그네틱스티르로 pellet를 완전히 분쇄하여 사용하였다. *Aspergillus awamori* IFO 4033은 PDA평판배지에 멸균증류수 10mL를 부어 포자현탁액을 제조한 다음 발효두부 제조를 위한 종균으로 사용하였다

3) 발효두부 제조

발효두부는 Fig. 1-2와 같이 두부를 적당한 크기로 세절(흑두부 : 1.5×1.5×5cm, 황두부 : 1×1×5.5cm)한 후 스텐레스 용기(22×16×6cm)에 담아 125℃, 15분 동안 멸균시킨 다음, 미리 배양하여 pellet를 과채한 *Monaskas* sp. 및 버섯의 배양용액에 두부조각을 침지시키는 방법으로 종균을 접종하였다. 종균을 접종한 두부는 30℃ 항온기에 옮겨 7일 동안 배양하면서 곰팡이 및 버섯의 균사가 두부의 표면을 완전히 피복하도록 생육시켜 발효두부를 제조하였다. 발효가 종료된 발효두부는 즉시 동결 건조시켜 분쇄한 후 생리활성 측정시료로 사용하였다.

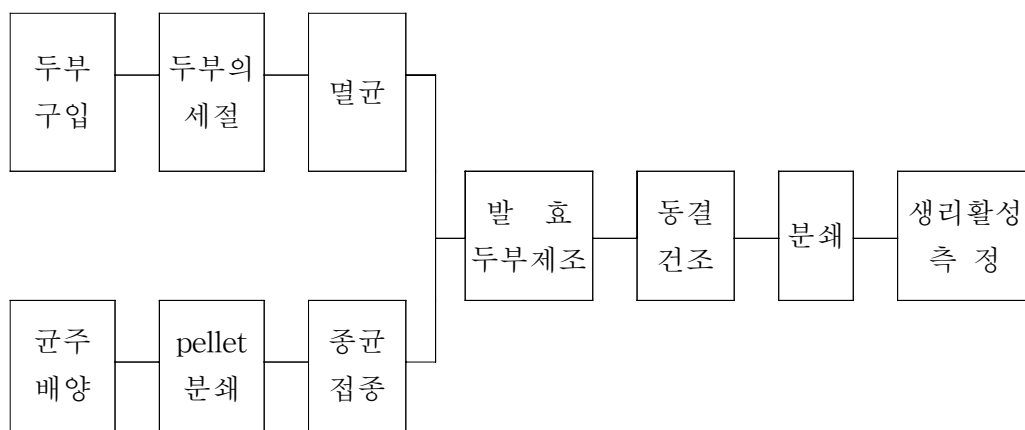


Fig. 1-2. Schematic diagram for fermented Tofu procession.



## 2. 결과 및 고찰

### 가. 두부의 이화학적 특성

#### 1) 두부의 일반성분 함량

두부의 저장성 증대를 조사하기 위하여 응고제로  $\text{CaCl}_2$ 와 Citric acid을 이용하여 제조한 두부의 이화학적 특성을 측정한 결과는 Table 1-1과 같다. 즉 수분은 거의 차이가 없었으며, 조단백질함량은 citric acid 시험구에서 약간 높음을 확인하였다. 환원당 및 총당은 응고제로 citric acid를 사용한 시험구에서는 환원당이 1.29%, 총당은 2.94% 이었으며,  $\text{CaCl}_2$ 로 사용한 시험구(Reducing sugar: 1.25%, Total sugar: 2.87%)에서도 비슷한 결과를 나타내었다 또한 아미노태 질소 함량은 응고제로  $\text{CaCl}_2$ 로 사용한 시험구가 292 mg%로 citric acid로 사용한 두부(286mg%)보다 높았다.

Table 1-1. Proximate composition of tofu prepared with different coagulants

(unit : %)

Properties	Coagulants	
	$\text{CaCl}_2$	Citric acid
Moisture	70.2±0.6	71.4±0.1
Crude protein	7.45±0.1	7.49±0.3
Total sugar	2.87±0.2	2.94±0.4
Reducing sugar	1.25±0.2	1.29±0.2
Amino nitrogen	292±0.3	286±0.3

## 2) pH 및 적정 산도

응고제를 달리한 두부에 대한 pH 및 적정산도에 대한 결과는 Fig 1-3과 같다. pH는 citric acid로 제조한 두부가 (5.39) CaCl<sub>2</sub>(6.05)로 제조한 두부보다 낮았으며, 적정산도 결과도 citric acid로 제조한 두부(8.64%)가 높음을 확인 할 수 있었다(CaCl<sub>2</sub>: 4.36%).

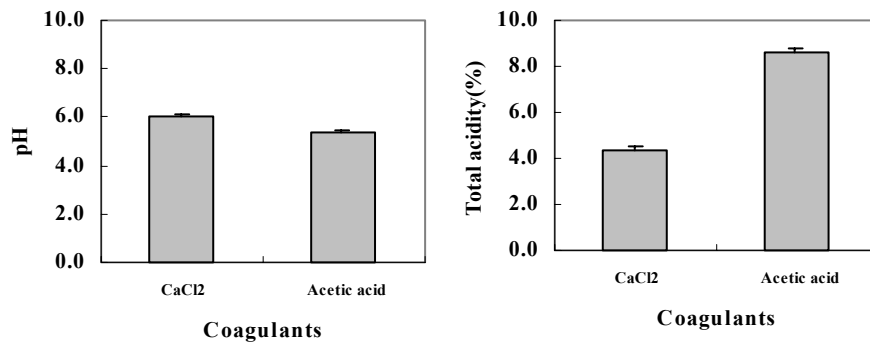


Fig. 1-3. pH and total acidity of soybean tofu prepared with differen coagulants.

### 3) 저장중의 세균수 측정

응고제를 달리하여 제조한 두부의 저장기간에 따른 세균수의 변화는 Fig. 1-4 와 같다. 이들에 대하여 4일 동안 저장하면서 세균수를 측정한 결과 CaCl<sub>2</sub> 응고제 구에서는 초기에  $1.9 \times 10^3$  cells/ml 이었으며, citric acid 구에서는  $2.3 \times 10^3$  cells/ml 으 로 CaCl<sub>2</sub> 구보다 낮았고 저장기간에 따라 세균수가 증가하였으나 응고제 citric acid로 제조한 두부의 저장성이 더 우수한 것을 확인하였다.

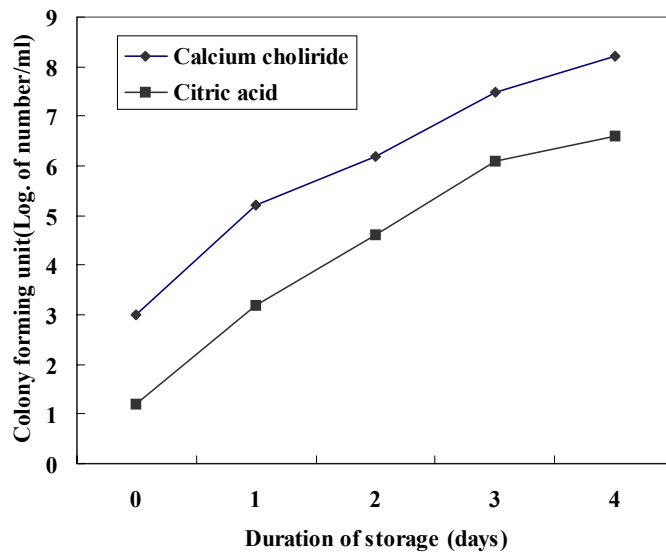


Fig. 1-4. Changes in the viable colony count of the soybean tofu with different coagulants during preservation at  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ .

나. 기능성 두부 제조를 위한 소재의 기능성 검색

1) 수소공여능

기능성 발효두부의 제조조건을 표준화하기 위하여 천연 식품 중 기능성 성분이 함유되어 있는 인삼, 솔잎, 흑미, 검정깨, 검정콩잎, 노랑콩잎 등을 선별하여 수소공여능을 통하여 기능성 두부의 제조에 첨가 재료로서 적합지에 대하여 조사하였다. 수소공여능을 측정할 결과 농도 1000  $\mu\text{g/mL}$ 에서 솔잎(60.23%), 흑미(52.9%), 검정콩잎(23.85%) 순으로 항산화 효과를 나타내었다(Fig 1-5).

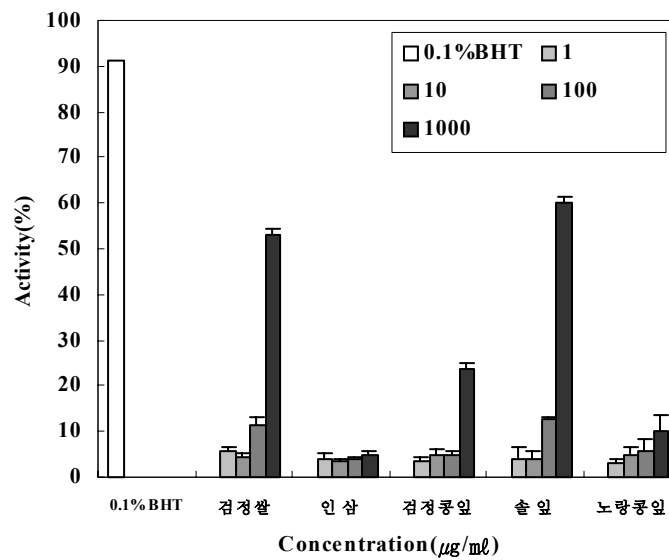


Fig. 1-5. Hydrogen donating activities effects of various samples.

2) 암세포 성장 억제 효과

인체 폐암세포주인 A549에 각 추출물의 농도 1, 10, 100, 500 ug/mL 첨가하여 암세포 성장 억제효과를 알아본 결과(Fig 1-6) 이들 모두 농도 의존적으로 암세포 억제효과를 보였다. 이들 추출물 중 솔잎 추출물이 암세포 성장 억제 효과가 가장 우수하였다.(농도 500 ug/mL- 솔잎: 18.3%, 검정콩:43.5%, 노랑콩: 65.1%, 검정쌀: 63.4%, 인삼: 85%)

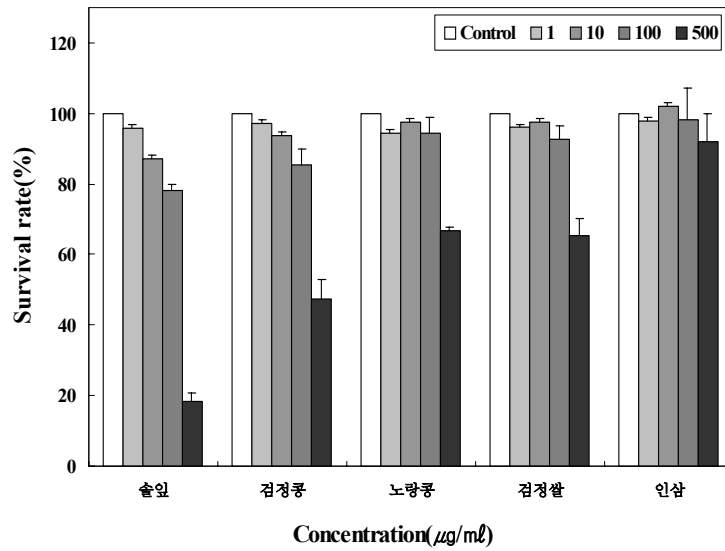


Fig. 1-6. Effects of various samples on the proliferation of A549 cell lines by SRB assay.

### 3) 면역 활성화

#### 가) 비장세포 증식능

생쥐의 비장에서 분리한 세포에 각 시료 추출물을 농도별로 첨가하고 48시간 배양한 다음 비장세포의 증식 정도를 측정하였다. 그 결과 검정콩잎과 검정쌀 추출물을 첨가하였을 경우에 농도 의존적으로 비장세포의 증식 반응이 증가하였다(Table 1-2). 즉 시료 추출물을 첨가하지 않은 대조군( $0.716 \pm 0.019$ ,  $0.655 \pm 0.001$ )에 비해  $100 \mu\text{g/ml}$ 을 첨가한 실험군( $0.881 \pm 0.040$ ,  $0.822 \pm 0.017$ )에서 최고로 증가하는 것으로 나타났다. 솔잎과 인삼 추출물을 첨가하였을 경우에는 대조군( $0.775 \pm 0.012$ ,  $0.818 \pm 0.015$ )에 비해  $10 \mu\text{g/ml}$ 을 첨가한 실험군( $0.962 \pm 0.028$ ,  $0.846 \pm 0.101$ )에서 최고로 증가하였지만,  $100 \mu\text{g/ml}$ 을 첨가한 실험군( $0.444 \pm 0.028$ ,  $0.691 \pm 0.076$ )에서는 오히려 대조군보다 증식반응이 낮게 나타났다. 즉 고농도에서는 오히려 세포독성을 나타내는 것으로 생각된다. 그리고 노랑콩잎 추출물을 첨가하였을 경우에는 대조군에 비해 유의한 증식반응이 나타나지 않았다.

Table 1-2. Effect of various samples on the growth of spleen cells

Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Growth(O. D. at 490 nm)				
	솔잎	검정콩잎	노랑콩잎	인삼	검정쌀
0	$0.775 \pm 0.012$	$0.716 \pm 0.019$	$0.642 \pm 0.031$	$0.818 \pm 0.015$	$0.655 \pm 0.001$
1	$0.740 \pm 0.055$	$0.711 \pm 0.035$	$0.635 \pm 0.008$	$0.785 \pm 0.041$	$0.701 \pm 0.018$
10	$0.962 \pm 0.028$	$0.749 \pm 0.050$	$0.641 \pm 0.035$	$0.846 \pm 0.101$	$0.700 \pm 0.057$
100	$0.444 \pm 0.028$	$0.881 \pm 0.040$	$0.650 \pm 0.047$	$0.691 \pm 0.076$	$0.822 \pm 0.017$

나) 비장세포 사이토카인 생산 유도

각 시료 추출물(100 $\mu$ g/ml)을 첨가하여 24시간 배양한 다음에 상층액을 분리하여 어떤 종류의 사이토카인이 분비되는지 ELISA 방법으로 측정하였다. 그 결과 각 시료 추출물은 다양한 종류의 사이토카인의 분비량을 증가시키는 것으로 나타났다(Table 1-3). 즉 대조군에 비해 IL-2의 분비량을 유의하게 증가시키는 시료는 관찰되지 않았지만, 노랑콩잎 추출물(272 $\pm$ 2)은 대조군(35 $\pm$ 2)에 비해 IFN- $\gamma$  분비량을 유의하게 증가시키는 것으로 나타났다. 그리고 모든 시료는 대조군에 비해 IL-6와 TNF- $\alpha$  분비량을 유의하게 증가시키는 것으로 나타났다. 특히 시료 중에서 노랑콩잎은 대조군에 비해 비장세포의 IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-6, TNF- $\alpha$  분비량을 모두 증가시켰다.

Table 1-3. Effect of various samples on the cytokine production of spleen cells

Concentration (100 $\mu$ g/ml)	Cytokines(pg/ml)			
	IL-2	IFN- $\gamma$	IL-6	TNF- $\alpha$
Control	70 $\pm$ 49	35 $\pm$ 2	<10	193 $\pm$ 35
솔잎	35 $\pm$ 0	34 $\pm$ 14	17 $\pm$ 0	278 $\pm$ 32
검정콩잎	15 $\pm$ 14	12 $\pm$ 7	234 $\pm$ 7	756 $\pm$ 25
노랑콩잎	75 $\pm$ 14	272 $\pm$ 2	349 $\pm$ 0	1286 $\pm$ 120
인삼	75 $\pm$ 0	12 $\pm$ 2	53 $\pm$ 61	746 $\pm$ 2
검정쌀	70 $\pm$ 7	<10	23 $\pm$ 15	226 $\pm$ 7

다) 대식세포 일산화질소 생산 유도

대식세포주(RAW264.7)에 시료 추출물을 농도별로 처리하여 48시간 배양한 후 배양액 중 대식세포가 생산한 NO가 산화된 형태인  $\text{NO}_2^-$  농도를 측정하였다(Table 1-4). 그 결과 시료를 첨가하였을 경우에 대조군에 비해 대식세포의 일산화질소 생산을 유의하게 증가시키지는 않는 것으로 나타났다. 시료 중에서 검정콩잎 추출물 ( $0.439 \pm 0.09$ )이 대조군( $0.091 \pm 0.09$ )에 비해 대식세포의 일산화질소 생산을 약간 증가시켰다.

Table 1-4. Effect of various samples on the nitric oxide production of macrophage cell line(RAW264.7)

Concentration ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	NO( $\mu\text{M}$ )				
	솔잎	검정콩잎	노랑콩잎	인삼	검정쌀
0	$0.091 \pm 0.009$	$0.091 \pm 0.009$	$0.069 \pm 0.009$	$0.091 \pm 0.009$	$0.091 \pm 0.009$
10	$0.039 \pm 0.009$	$0.026 \pm 0.000$	$0.083 \pm 0.003$	$0.017 \pm 0.003$	$0.157 \pm 0.004$
100	$0.113 \pm 0.006$	$0.439 \pm 0.009$	$0.178 \pm 0.009$	$0.039 \pm 0.003$	$0.200 \pm 0.001$



라) 대식세포 IL-6, TNF- $\alpha$  생산 유도

분비되는 사이토카인의 종류를 알아보기 위하여 대식세포주에 각 시료 추출물을 첨가하여 24시간 배양한 후 상층액을 회수하여 상층액에 포함된 사이토카인의 분비량을 측정하였다(Table 1-5). 그 결과 모든 시료가 대조군에 비해 IL-6와 TNF- $\alpha$  분비량을 증가시키는 것으로 나타났다. 특히 솔잎 추출물(12515 $\pm$ 388)과 인삼 추출물(30008 $\pm$ 1007)은 대조군(<10)에 비해 다량의 IL-6 분비량을 유도하였다. 그리고 각 시료의 종류와 농도에 따라 대조군(1.6 $\pm$ 0.0)에 비해 최고 약 37배 까지 TNF- $\alpha$  분비량을 증가시키는 것으로 나타났다.

Table 1-5. Effect of various samples on the cytokine production of macrophage cell line(RAW264.7)

	Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Cytokines	
		IL-6(pg/ml)	TNF- $\alpha$ (ng/ml)
Control		<10	1.6 $\pm$ 0.0
솔잎	10	12515 $\pm$ 388	59.5 $\pm$ 0.8
	100	695 $\pm$ 22	31.7 $\pm$ 3.8
검정콩잎	10	22 $\pm$ 0	11.3 $\pm$ 1.3
	100	144 $\pm$ 14	39.1 $\pm$ 0.2
노랑콩잎	10	10 $\pm$ 5	7.2 $\pm$ 0.0
	100	<10	10.1 $\pm$ 0.0
인삼	10	<10	5.0 $\pm$ 0.2
	100	30008 $\pm$ 1007	1.3 $\pm$ 0.0
검정쌀	10	1623 $\pm$ 72	43.6 $\pm$ 0.7
	100	34 $\pm$ 10	14.9 $\pm$ 0.0

다. 홍국균 및 흑국균을 이용한 발효두부의 제조

1) 발효두부의 제조 조건 검색

*Monaskas anka* 및 *Monaskas pilosus* 곰팡이의 생육을 위한 최적배지를 검토하기 위하여 PDA배지 및 MEA배지를 비롯한 여러 종류의 평판배지에 대하여 곰팡이의 생육정도를 관찰한 결과는 Fig. 1-6과 같다. 두 곰팡이는 MEA배지에서 붉은 색소를 분비하면서 왕성하게 생육하였으며, *M. pilosus* 보다 *M. anka*가 붉은 색소를 더 많이 분비하였다. 이상의 결과로 발효두부제조를 위하여 *Monaskas anka* 및 *Monaskas pilosus* 곰팡이의 배지로는 MEA배지를 사용하였다.

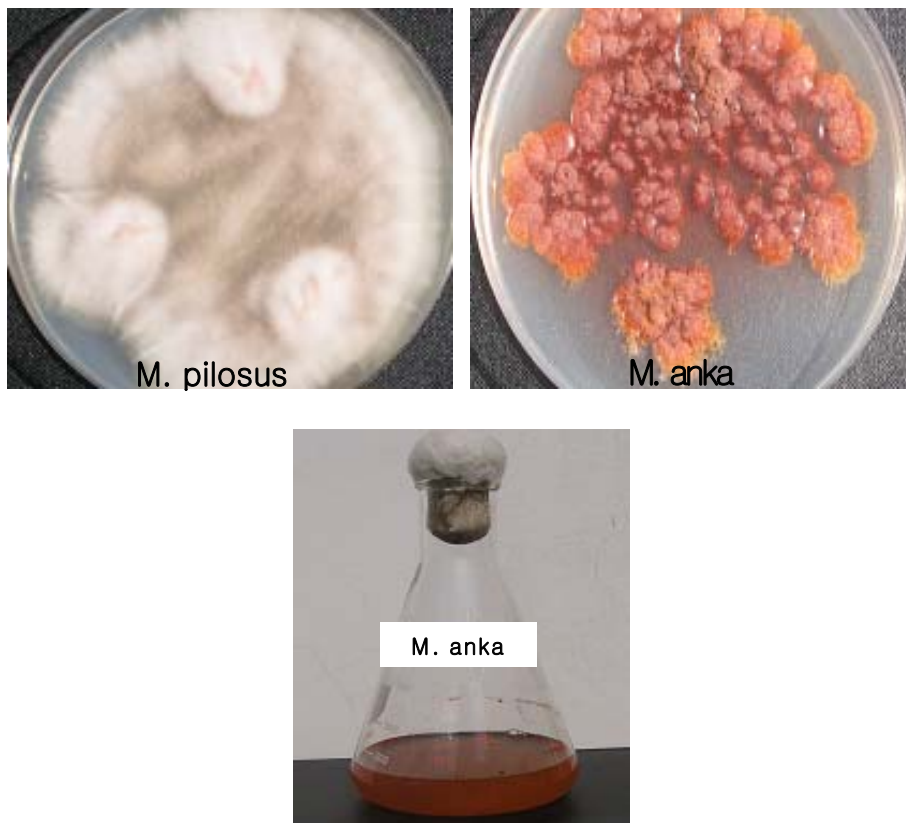
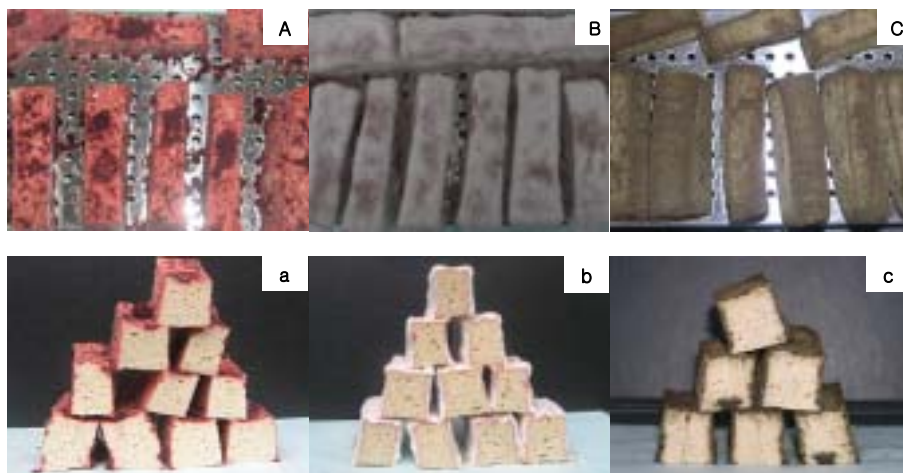


Fig. 1-6. *Monaskas* sp의 생육상태

## 2) 발효두부의 제조 조건 확립

*M. anka*, *M. pilosus*, *A. awaori* 배양용액 및 포자현탁액을 황두부 및 흑두부에 접종한 후 30℃의 항온기에서 7일 동안 배양하여 제조한 발효두부의 성상은 Fig. 1-7, 1-8 과 같다. *M. anka*는 균사의 성장 특성상 두부의 표면에서 곰팡이 균사의 성장은 잘 관찰할 수는 없었지만 배양 2일째부터 붉은색소의 생성이 관찰되기 시작하였으며, *A. awamori*의 포자를 접종한 황두부 및 흑두부의 표면에서는 곰팡이의 검은 포자가 접종 3일 이후부터 나타나기 시작하여 배양 4일째에는 두부표면의 전체가 검은 색을 띄었다. 그리고 *M. pilosus* 를 접종한 두부에서는 배양 2일째부터 흰색의 균사가 성장하기 시작하여 배양 5일째부터는 두부표면 전체가 솜털모양의 균사 덩어리로 뒤덮였다. 이와 같이 균사가 뒤덮인 상태(배양 7일째 두부)의 황두부 및 흑두부를 수직으로 절단하여 두부내부로의 균사 침투정도를 관찰한 결과 균주의 종류에 따라 약간의 차이는 있었지만 두부표면으로부터 약 3~5mm 정도의 깊이까지만 곰팡이가 두부내부로 침투하여 성장하는 것을 관찰 할 수 있었다. 그리고 이 상태에서 배양 10일째까지 계속 배양하여 보았지만 곰팡이가 두부내부로의 침투는 더 일어나지 않고 오히려 부분적으로 다른 세균 등에 의한 오염이 발생하여 발효두부 제조를 위한 두부의 발효 기간은 7일 정도가 적당한 것으로 판단되었다.



.Fig. 1-7. Fermented yellow soybean curd using various useful molds.  
 A and a : *M. anka*, B and b : *M. pilosus*, C and c : *A. awamori*.

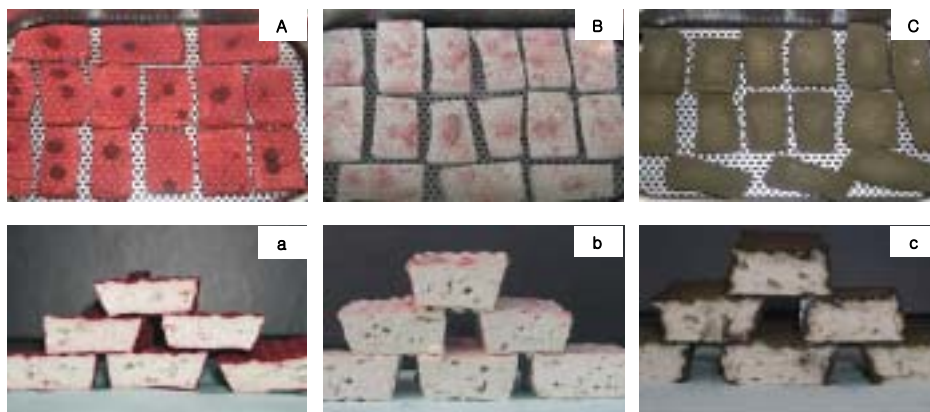


Fig. 1-8. Fermented black soybean curd using various molds.  
 A and a : *M. anka*, B and b : *M. pilosus*, C and c : *A. awamori*.

## 제 2 절 버섯 균사체를 이용한 발효두부의 제조 조건 확립

### 1. 재료 및 방법

#### 가. 버섯 균사체의 기능성 검색

##### 1) 시료 조제

동결 건조한 버섯 균사체 발효두부를 잘게 부순 다음 메탄올 및 증류수를 첨가하여 각각 60, 100℃에서 9시간 동안 열수추출한 후 여과액을 evaporator로 농축하여 0.45 uM membrane filter로 여과하여 본 실험의 생리활성 시료로 사용하였다.

##### 2) 수소 공여능

제 1절의 홍국균과 흑국균을 이용한 발효두부 제조 조건 확립 실험 방법에 따라 실행하였다.

##### 3) 암세포 성장억제 효과

제 1절의 홍국균과 흑국균을 이용한 발효두부 제조 조건 확립 실험 방법에 따라 실행하였다.

##### 4) 면역 활성화

###### 가) 비장세포 증식

제 1절의 홍국균과 흑국균을 이용한 발효두부 제조 조건 확립 실험 방법에 따라 실행하였다.

###### 나) 사이토카인 분비량 측정

제 1절의 홍국균과 흑국균을 이용한 발효두부 제조 조건 확립 실험 방법에 따라 실행하였다.

###### 다) 일산화질소 측정

제 1절의 홍국균과 흑국균을 이용한 발효두부 제조 조건 확립 실험 방법에 따라 실행하였다..

나. 버섯 균사체를 이용한 발효 두부 제조 조건 확립

1) 새송이 및 동충하초 균사체의 배양 조건 확립

가) 재료

발효두부 제조를 위한 두부는 2004년 가을에 순천지역의 농가에서 수확한 흑대두 및 황대두로 직접 가정에서 제조한 흑두부 및 황두부를 구입하여 사용하였으며, 두부의 발효를 위한 버섯 균사체 동충하초 및 새송이버섯(큰느타리)은 경남농업기술원에서 분양받아 사용하였다.

나) 배지 및 균주의 배양

발효두부 제조를 위한 버섯균주의 보존은 PDA(potato dextrose agar)평판배지에 30℃, 6일 동안 배양하여 5℃이하의 냉장보관하면서 2주일 이내에 액체배양을 위한 starter로 사용하였다. 동충하초 및 새송이버섯의 액체배양은 PDB(potato dextrose broth)배지를 사용하여 30℃, 120rpm으로 7일 동안 배양하여 pellet가 형성되었을 때 마그네틱스틱으로 pellet를 완전히 분쇄하여 사용하였다.

다) 발효두부의 제조

버섯 균사체를 이용한 발효두부도 제 Fig. 1-1 과 같이 두부를 적당한 크기로 세절(흑두부 : 1.5×1.5×5cm, 황두부 : 1×1×5.5cm)한 후 스텐레스 용기(22×16×6cm)에 담아 125℃, 15분 동안 멸균시킨 다음, 미리 배양하여 pellet를 마쇄한 버섯의 배양용액에 두부조각을 침지시키는 방법으로 종균을 접종하였다. 종균을 접종한 두부는 30℃ 항온기에 옮겨 7일 동안 배양하면서 버섯의 균사가 두부의 표면을 완전히 피복하도록 생육시켜 발효두부를 제조하였다. 발효가 종료된 발효두부는 즉시 동결 건조시켜 분쇄한 후 생리활성 측정시료로 사용하였다.

## 2 결과 및 고찰

### 가. 버섯 균사체의 기능성 검색

#### 1) 수소공여능

기능성 발효두부의 제조조건을 표준화하기 위하여 버섯 균사체 배양액이 발효두부의 첨가 재료로 적절한지에 대하여 유리라디칼에 대한 소거능을 알아본 결과는 Table 2-1과 같다. 즉 버섯 균사체 배양액을 5, 10, 20, 35  $\mu\text{l/ml}$  첨가 시 항산화제인 BHT에 비하여 항산화 효과를 나타내지 않았으나 농도 35  $\mu\text{l/ml}$  에서 수한(20.2 $\pm$ 0.47%), 큰느타리 1호(19.25 $\pm$ 1.05%), 상황버섯 균사체(17.98 $\pm$ 1.98%) 순으로 약간의 항산화 효과를 나타내었다.

Table 2-1. Hydrogen-donating activities effects of liquid culture from various mushroom mycelia

Sample	Concentration( $\mu\text{l/ml}$ )			
	5	10	20	35
BHT				93.38 $\pm$ 0.12
동충하초	0.79 $\pm$ 2.15	1.21 $\pm$ 0.96	12.27 $\pm$ 0.35	17.22 $\pm$ 0.51
고려상황	0.85 $\pm$ 0.23	1.00 $\pm$ 0.09	13.84 $\pm$ 0.60	17.98 $\pm$ 1.98
아가리쿠스	0.94 $\pm$ 1.05	1.44 $\pm$ 0.70	7.98 $\pm$ 0.91	11.78 $\pm$ 0.84
큰느타리1호	0.82 $\pm$ 0.42	3.53 $\pm$ 1.09	14.15 $\pm$ 0.64	19.25 $\pm$ 1.05
큰느타리2호	0.63 $\pm$ 0.65	2.98 $\pm$ 0.66	13.91 $\pm$ 0.96	16.90 $\pm$ 1.35
수한	3.07 $\pm$ 1.63	5.39 $\pm$ 0.63	16.53 $\pm$ 1.34	20.20 $\pm$ 0.47
춘추느타리	0.57 $\pm$ 0.43	1.16 $\pm$ 0.43	9.55 $\pm$ 0.37	13.26 $\pm$ 0.79

2) 암세포 성장 억제효과

상황버섯 균사체의 6종으로부터 분리한 배양액 및 균사체로부터 추출한 조다당체를 인체폐암 세포주 A549 에 처리하여 48시간 배양한 후 암세포 성장 억제 효과를 측정 한 결과는 Table 2-2와 같다. 즉 버섯 균사체 배양액 및 균사체 추출물은 농도 의존적으로 암세포의 성장을 억제하는 것을 확인하였다. 배양액 100 ul를 첨가한 경우 무처리 군에 비하여 춘추 및 수환을 제외하고 나머지 배양액은 거의 50% 이하의 암세포의 성장을 억제하였다. 한편 균사체로부터 추출한 조다당체는 배양액 보다는 암세포 성장 억제효과가 낮았으나, 배양액에서 암세포 성장이 우수한 실험군과 비슷한 경향을 나타냄을 알 수 있었다.

Table 2-2. Effect of crude polysaccharide of mycelium and liquid culture from various mushroom mycelium on proliferation A549 cell line by SRB

Conditions	Survivor rate(%)							
	Control	동충하초	고려상황	아가리쿠스	큰느타리 버섯 1호	큰느타리 버섯 2호	수환	춘추 느타리버섯
0	100							
배양액	30	93.31 ± 0.95	96.22 ± 2.71	95.12 ± 4.25	98.18 ± 0.11	98.28 ± 3.05	97.57 ± 6.33	99.22 ± 2.47
	50	89.52 ± 5.65	66.71 ± 5.59	89.45 ± 1.20	87.91 ± 1.62	88.54 ± 2.79	88.41 ± 4.19	90.96 ± 5.60
	100	44.77 ± 4.92	21.47 ± 0.07	47.88 ± 7.30	42.28 ± 7.72	42.67 ± 4.33	69.50 ± 0.57	75.73 ± 1.12
0	100							
균사체	30	85.28 ± 1.85	81.66 ± 8.12	85.65 ± 8.04	80.68 ± 0.84	80.24 ± 1.59	93.89 ± 6.50	95.02 ± 1.37
	50	59.04 ± 9.00	57.44 ± 8.34	70.66 ± 9.94	71.17 ± 6.44	70.74 ± 5.58	88.15 ± 9.09	84.00 ± 6.54
	100	53.00 ± 6.99	54.75 ± 3.51	62.93 ± 3.89	63.57 ± 4.37	65.94 ± 6.94	71.24 ± 5.28	77.84 ± 5.41



### 3) 면역 활성화

#### 가) 비장세포 증식능

모두 7가지 종류의 버섯의 균사체를 배양하여 배양액과 균사체 추출물을 얻어 실험에 사용하였다. 균사체 배양액은 10배, 30배, 100배 희석하여 사용하였고, 균사체 추출물은 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도를 사용하였다. 먼저 균사체 배양액을 비장세포에 첨가하고 48시간 배양 후에 증식반응을 측정하였다(Table 2-3). 그 결과 7가지 배양액 모두 농도 의존적으로 비장세포의 증식반응을 증가시키는 것으로 나타났다. 특히 대조군(0.523 $\pm$ 0.01)에 비해 큰느타리버섯 1호(1.267 $\pm$ 0.07)와 수한(1.290 $\pm$ 0.01) 배양액을 10배 희석하여 첨가하였을 경우에 최대 증식반응이 나타났다. 그리고 균사체 추출물을 첨가하였을 경우에도 7가지 모두 농도 의존적으로 비장세포의 증식반응을 증가시키는 것으로 나타났다. 특히 대조군(0.538 $\pm$ 0.04)에 비해 큰느타리버섯 1호(0.813 $\pm$ 0.02)와 수한(0.737 $\pm$ 0.03) 추출물을 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  첨가하였을 경우에 최대 증식반응이 나타났다. 즉 7가지 종류의 버섯 중에서 큰느타리버섯 1호와 수한의 배양액과 균사체 추출물이 모두 비장세포의 증식반응을 최대로 증가시켰다.

Table 2-3. Effect of crude polysaccharide of mycelium and liquid culture from various mushroom mycelium on the growth of spleen cells

Conditions	Growth(O. D. at 405nm)							
	동충하초	고려상황	아가리쿠스	큰느타리 버섯 1호	큰느타리 버섯 2호	수한	훈추 느타리버섯	
0	0.523±0.01	0.523±0.01	0.523±0.01	0.523±0.01	0.523±0.01	0.523±0.01	0.523±0.01	
배양액 (dilution)	100	0.682±0.00	0.795±0.01	0.754±0.02	0.825±0.11	0.771±0.02	0.954±0.05	0.756±0.02
	30	0.828±0.09	0.948±0.02	0.910±0.01	1.036±0.11	0.975±0.03	1.178±0.00	0.895±0.04
	10	0.848±0.09	1.112±0.02	1.063±0.00	1.267±0.07	1.160±0.01	1.290±0.01	0.958±0.03
0	0.538±0.04	0.538±0.04	0.538±0.04	0.538±0.04	0.538±0.04	0.538±0.04	0.538±0.04	
균사체 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	1	0.543±0.01	0.592±0.02	0.909±0.01	0.588±0.02	0.570±0.01	0.623±0.02	0.606±0.05
	10	0.590±0.03	0.611±0.02	0.701±0.03	0.663±0.02	0.609±0.01	0.632±0.02	0.642±0.04
	100	0.638±0.03	0.723±0.03	0.707±0.02	0.813±0.02	0.690±0.01	0.737±0.03	0.708±0.01

나) 버섯 배양액과 균사체의 비장세포 IL-2, IFN- $\gamma$  생산 유도

비장세포의 최대 증식반응을 유도하는 배양액(10배 희석액)과 균사체 추출물(100 $\mu$ g/ml)을 첨가하여 비장세포가 생산하는 IL-2와 IFN- $\gamma$ 의 분비량을 측정하였다. 즉 비장세포에 시료를 첨가하고 24시간 배양한 다음 배양 상층액에 포함된 IL-2와 IFN- $\gamma$ 의 양을 측정하였다(Table 2-4, 2-5). 그 결과 7가지 시료의 배양액과 균사체 추출물 모두 비장세포의 IL-2와 IFN- $\gamma$  생산을 유의하게 증가시키지 않았다. 즉 대조군에 비해 약간 증가하거나 오히려 적은 것으로 나타났다.

Table 2-4. Effect of crude polysaccharide of mycelium and liquid culture from various mushroom mycelium on the IL-2 production of spleen cells

Conditions	IL-2(pg/ml)							
	동충하초	고려상황	아가리쿠스	큰느타리 버섯 1호	큰느타리 버섯 2호	수한	춘추 느타리버섯	
Control	22.0 $\pm$ 7.0	22.0 $\pm$ 7.0	22.0 $\pm$ 7.0	22.0 $\pm$ 7.0	22.0 $\pm$ 7.0	22.0 $\pm$ 7.0	22.0 $\pm$ 7.0	
배양액 (dilution) $\times 10$	29.5 $\pm$ 3.5	27.0 $\pm$ 7.0	37.0 $\pm$ 21.2	19.5 $\pm$ 3.5	<10	<10	<10	
균사체 ( $\mu$ g/ml)	100	<10	22.0 $\pm$ 7.0	<10	<10	<10	19.5 $\pm$ 3.5	

Table 2-5. Effect of crude polysaccharide of mycelium and liquid culture from various mushroom mycelium on the IFN- $\gamma$  production of spleen cells

Conditions	IFN- $\gamma$ (pg/ml)						
	동충하초	고려상황	아가리쿠스	큰느타리 버섯 1호	큰느타리 버섯 2호	수한	춘추 느타리버섯
Control	368.0±0.0	368.0±0.0	368.0±0.0	368.0±0.0	368.0±0.0	368.0±0.0	368.0±0.0
배양액 (dilution)	×10 88.0±70.7	413.0±35.3	33.0±7.0	93.0±77.7	28.0±56.5	88.0±14.1	23.0±7.0
균사체 ( $\mu\text{g/ml}$ )	100 18.0±42.4	<10	<10	<10	73.0±49.5	<10	<10

다) 버섯 배양액과 균사체의 대식세포 일산화질소 생산 유도

대식세포의 일산화질소 생산에 미치는 효과를 알아보기 위하여 7가지 시료를 첨가하고 48시간 배양 후에 배양 상층액에 포함된 일산화질소의 양을 측정하였다 (Table 2-6). 그 결과 동충하초 배양액을 제외한 나머지 시료의 배양액을 첨가하였을 경우에 대조군에 비해 유의하게 대식세포의 일산화질소 생산을 증가시키는 것으로 나타났다. 즉 대부분 10배 희석액 보다 100배 희석액을 첨가하였을 경우에 더 많은 일산화질소를 생산하였다. 동충하초, 큰느타리버섯 2호, 춘추느타리버섯 균사체 추출물을 첨가하였을 경우에는 일산화질소 생산이 유도되지 않았지만 고려상황, 큰느타리버섯 1호, 수한은  $100\mu\text{g/ml}$  농도, 아가리쿠스는  $1\mu\text{g/ml}$  농도에서 대식세포의 일산화질소 생산을 유도하는 것으로 나타났다.

Table 2-6. Effect of crude polysaccharide of mycelium and liquid culture from various mushroom mycelium on the nitric oxide production of macrophage cell line(RAW264.7)

Conditions	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (μM)							
	동충하초	고려상황	아가리쿠스	큰느타리 버섯 1호	큰느타리 버섯 2호	수한	춘추 느타리버 섯	
0	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	
배양액 (dilution)	100	<0.5	0.88±0.14	2.09±0.04	4.49±0.00	3.25±0.56	2.26±0.21	1.99±0.25
	30	<0.5	1.50±0.18	1.79±0.18	2.61±0.56	1.10±0.04	1.72±0.07	1.42±0.00
	10	<0.5	1.15±0.11	0.51±0.18	1.87±0.21	1.57±0.00	3.15±0.00	<0.5
0	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	
균사체 (μg/ml)	1	<0.5	<0.5	4.96±0.95	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
	10	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
	100	<0.5	0.95±0.11	<0.5	2.68±0.74	<0.5	0.18±0.28	<0.5

라) 버섯 배양액과 균사체의 대식세포 IL-6, TNF- $\alpha$  생산 유도

대식세포의 IL-6, TNF- $\alpha$  생산에 미치는 효과를 알아보기 위하여 7가지 시료를 첨가하고 24시간 배양 후에 배양 상층액에 포함된 IL-6와 TNF- $\alpha$ 의 양을 ELISA로 측정하였다(Table 2-7, 2-8). 시료의 배양액(10배 희석액)을 첨가하였을 경우에 7가지 모두 대조군( $0.40 \pm 0.01$ )에 비해 대식세포의 IL-6 생산량을 유의하게 증가시키는 것으로 나타났다. 특히 큰느타리버섯 1호( $21.80 \pm 0.41$ )와 수한( $53.88 \pm 1.27$ ) 배양액을 첨가하였을 경우에 IL-6의 분비량이 최대로 증가하였다. 그리고 균사체 추출물( $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ )을 첨가하였을 경우에도 춘추느타리버섯을 제외한 나머지 시료 모두 대조군( $0.40 \pm 0.01$ )에 비해 대식세포의 IL-6 생산량을 유의하게 증가시키는 것으로 나타났다. 특히 고려상황( $7.84 \pm 0.21$ ) 균사체 추출물을 첨가하였을 경우에 IL-6의 분비량이 최대로 증가하였다. 시료의 배양액(10배 희석액)을 첨가하였을 경우에 7가지 모두 대조군( $10.50 \pm 0.58$ )에 비해 대식세포의 TNF- $\alpha$  생산량을 유의하게 증가시키는 것으로 나타났다. 특히 수한( $51.89 \pm 1.34$ ) 배양액을 첨가하였을 경우에 TNF- $\alpha$ 의 분비량이 최대로 증가하였다. 그리고 균사체 추출물( $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ )을 첨가하였을 경우에도 모든 시료가 대조군에 비해 대식세포의 TNF- $\alpha$  생산량을 유의하게 증가시키는 것으로 나타났다. 특히 고려상황( $32.79 \pm 0.07$ )과 수한( $30.64 \pm 1.56$ ) 균사체 추출물을 첨가하였을 경우에 TNF- $\alpha$ 의 분비량이 최대로 증가하였다.

Table 2-7. Effect of crude polysaccharide of mycelium and liquid culture from various mushroom mycelium on the IL-6 production of macrophage cell line(RAW264.7)

Conditions	IL-6(ng/ml)							
	동충하초	고려상황	아가리쿠스	큰느타리 버섯 1호	큰느타리 버섯 2호	수한	춘추 느타리버섯	
Control	0.40±0.01	0.40±0.01	0.40±0.01	0.40±0.01	0.40±0.01	0.40±0.01	0.40±0.01	
배양액 (dilution) ×10	0.90±0.01	6.00±0.09	11.01±0.18	21.80±0.41	2.11±0.04	53.88±1.27	0.70±0.01	
균사체 (μg/ml)	100	0.49±0.03	7.84±0.21	0.79±0.03	4.41±0.07	1.57±0.06	3.59±0.07	0.42±0.04

Table 2-8. Effect of crude polysaccharide of mycelium and liquid culture from various mushroom mycelium on the TNF-α production of macrophages(RAW264.7)

Conditions	TNF-α (ng/ml)							
	동충하초	고려상황	아가리쿠스	큰느타리 버섯 1호	큰느타리 버섯 2호	수한	춘추 느타리버섯	
Control	10.50±0.58	10.50±0.58	10.50±0.58	10.50±0.58	10.50±0.58	10.50±0.58	10.50±0.58	
배양액 (dilution) ×10	16.66±0.26	38.74±1.98	38.49±1.49	39.64±0.71	22.05±0.14	51.89±1.34	15.33±0.21	
균사체 (μg/ml)	100	14.28±0.38	32.79±0.07	16.15±0.38	25.64±1.98	17.96±0.30	30.64±1.56	16.91±0.33



나. 버섯 균사체를 이용한 발효두부 제조 조건 확립

1) 발효두부의 제조 조건 검색

새송이 및 동충하초의 생육을 위한 최적배지를 검토하기 위하여 PDA배지 및 MEA배지를 비롯한 여러 종류의 평판배지에 대하여 균사체의 생육정도를 관찰하여 Fig. 2-1에 나타내었다. 즉 새송이버섯 및 동충하초의 배지로는 PDA평판배지 및 PD broth가 적당한 것으로 나타났다. 발효두부제조를 위하여 새송이 및 동충하초 버섯의 생육을 위한 배지로는 PD broth배지를 사용하였다.

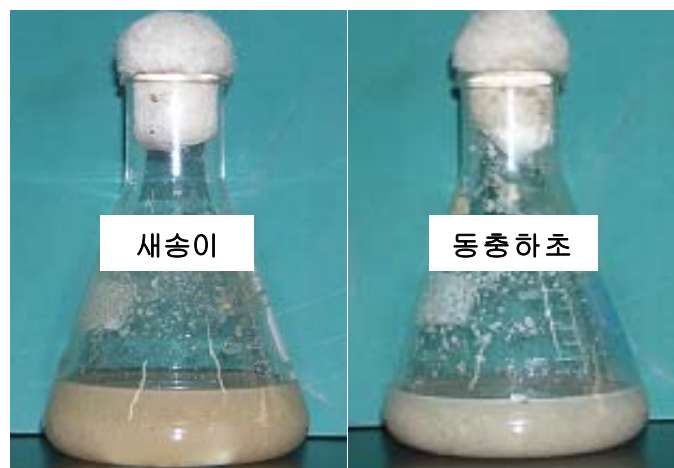


Fig. 2-1. 새송이 및 동충하초 버섯의 생육상태.

## 2) 버섯균사체를 함유한 발효두부의 제조

새송이 및 동충하초의 배양용액 및 포자현탁액을 황두부 및 흑두부에 접종한 후 30℃의 항온기에서 7일 동안 배양하여 제조한 발효두부의 성상을 Fig. 2-2 및 2-3에 나타내었다. 새송이 및 동충하초를 접종한 두부에서는 배양 2일째부터 흰색의 균사가 성장하기 시작하여 배양 5일째부터는 두부표면 전체가 솜털모양의 균사 덩어리로 뒤덮였다. 이와 같이 균사가 뒤덮인 상태(배양 7일째 두부)의 황두부 및 흑두부를 수직으로 절단하여 두부내부로의 균사 침투정도를 관찰한 결과 균주의 종류에 따라 약간의 차이는 있었지만 두부표면으로부터 약 3~5mm 정도의 깊이까지만 새송이 및 동충하초 버섯의 균사가 두부내부로 침투하여 성장하는 것을 관찰 할 수 있었다. 그리고 이 상태에서 배양 10일째까지 계속 배양하여 보았지만 버섯의 균사가 두부내부로의 침투는 더 일어나지 않고 오히려 부분적으로 다른 세균 등에 의한 오염이 발생하여 발효두부 제조를 위한 두부의 발효기간은 7일 정도가 적당한 것으로 판단되었다.

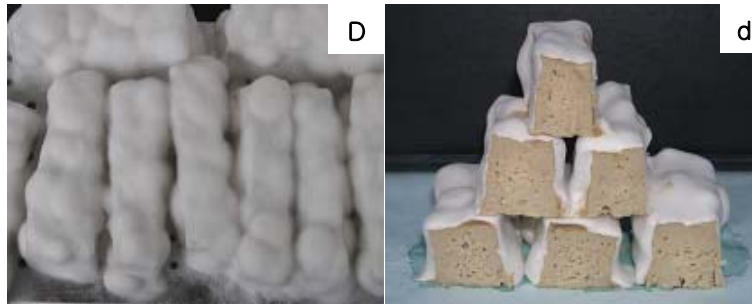


Fig 2-2. 동충하초 버섯종균으로 제조한 발효 황두부.

D and d : 동충하초

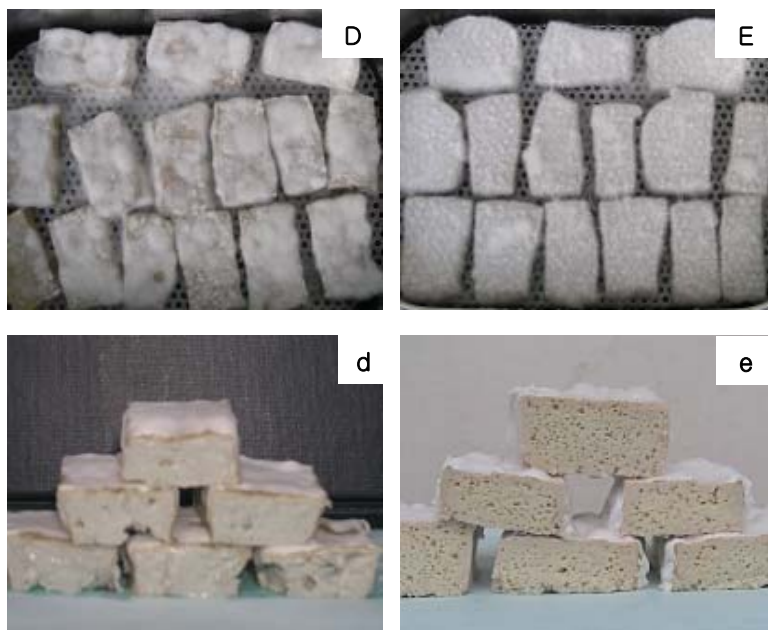


Fig. 2-3. 새송이 및 동충하초 버섯종균으로 제조한 발효 흑두부.

D and d : 새송이, E and e : 동충하초

## 제 3 절 홍국균, 흑국균 및 버섯 균사체로 제조한 발효두부의 기능성 검증

### 1. 재료 및 방법

#### 가. 개발된 발효두부의 기능성 검색

##### 1) 시료 조제

동결 건조한 홍국균, 흑국균 및 버섯 균사체 발효두부를 잘게 부순 다음 메탄올 및 증류수를 첨가하여 각각 60, 100℃에서 9시간 동안 열수추출한 후 여과액을 evaporator로 농축하여 0.45 uM membrane filter로 여과하여 본 실험의 생리활성 시료로 사용하였다.

##### 2) 수소 공여능

제 1절의 홍국균과 흑국균을 이용한 발효두부 제조 조건 확립 실험 방법에 따라 실행하였다.

##### 3) 암세포 성장 억제효과

제 1절의 홍국균과 흑국균을 이용한 발효두부 제조 조건 확립 실험 방법에 따라 .SRB 방법에 의하여 측정하였다.

##### 4) 면역활성

#### 가) 실험동물

실험에 사용한 생쥐(C57BL/6)는 대한실험동물센터(충북 음성군)에서 생후 6주 된 암컷을 구입하여 실험동물 사육실에서 폴리카보네이트 사육상자(18×20 cm)당 6 개체의 밀도를 유지하며 사육하였다. 이들 생쥐는 실험하는 동안 실온에서 물과 사료를 충분히 공급하고, 낮과 밤의 주기를 12시간씩 조절하면서 가능한 스트레스를 받지 않도록 사육하였다.

나) 사용 시약

세포배양에 필요한 배지 RPMI 1640와 배지에 첨가하는 항생제 (antibiotic-antimycotic), FCS(fetal calf serum)는 Gibco BRL(USA) 제품을 사용하였으며, 2-mercaptoethanol(2-ME), sodium bicarbonate( $\text{NaHCO}_3$ ), sulfanilamide, N-1-naphthyl-1-ethylendiamine는 Sigma(St. Louis. Mo, USA) 제품을 사용하였다. 또한 세포증식을 측정하는데 사용한 시약 Cell Titer 96<sup>®</sup> Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay은 Promega(Madison, WI, USA) 제품을 사용하였고, cytokine(IL-1 $\beta$ , IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , GM-CSF) 분비량 측정에 사용한 각 사이토카인에 대한 특이항체는 Pharmingen(San Diego, California, USA) 제품을 사용하였다.

다) 비장세포 분리

면역세포의 증식에 미치는 효과를 측정하기 위하여 생쥐의 비장세포를 이용하였다. 먼저 생쥐의 비장을 분리한 다음, 핀셋이나 메쉬를 이용하여 잘게 부수고, 비장세포의 부유액을 RPMI 1640 배양액으로 3회 세척한 다음,  $5 \times 10^6$  cells/ml 농도가 되게 희석한 후 96 well plate에 well당  $100 \mu\text{l}$ 씩 첨가하였다. 이때 추출물을 농도별 첨가하여  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  배양기에서 48시간 배양하였다. 그리고 Cell Titer 96 용액 (Promega, Madison, WI, USA)을 이용하여 세포증식을 측정하였다.

라) 비장세포 증식 측정법

제 1절의 홍국균과 흑국균을 이용한 발효두부 제조 조건 확립 실험 방법에 따라 실행하였다.

마) 사이토카인 분비량 측정

비장세포 또는 대식세포주(RAW264.7)가 분비하는 IL-1 $\beta$ , IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , GM-CSF 농도 측정은 제 1절의 홍국균과 흑국균을 이용한 발효두부 제조 조건 확립 실험 방법에 따라 실행하였다.

바) 일산화질소 측정

제 1절의 홍국균과 흑국균을 이용한 발효두부 제조 조건 확립 실험 방법에 따라 실행하였다.

나. 버섯 균사체로 제조한 발효두부의 항암 및 항당뇨 효과

1) Sarcoma-180 cell을 이용한 항암효과

가) 실험동물

실험에 사용할 동물은  $22\pm 2g$ 의 3주령인 수컷 ICR mouse를 일반사료와 물을 자유로이 제공하면서 2주 이상 사육실에서 적응시켰다. 이때 사육실 온도는  $22\pm 2^{\circ}C$ , 습도는 50%로 조절하고, 조명은 12시간 간격의 light-and-dark cycle로 유지하였다. Normal군, 대조군, 시료 처리군 등을 10마리씩 1군으로 분류하여 사용하였다.

나) 복수암세포의 배양 및 유발

실험에 사용한 생쥐 복수형 sarcoma-180 세포는 한국세포주은행에서 분양 받아 1주일 간격 으로 계대배양 하여 사용하였다. 즉 생쥐의 복강 내에서 1주일간 배양된 sarcoma-180 세포를 복수와 함께 취하여 PBS로 원심분리(1,200rpm, 10min,  $4^{\circ}C$ )하여 분리한 세포를 PBS 이용하여 3회 원심분리 하여 세척한 후 sarcoma-180 세포만을 취하여  $1\times 10^6$  cells/ml 농도로 조절하여 0.1ml씩 ICR mouse에 복강 투여하여 복수암을 유발하였다.

다) 수명 연장실험

복수암을 유발시킨 24시간 후부터 7일간 연속적으로 시료를 복강에 투여하여, 체중변화량을 조사하고, 30일까지 마우스의 생존율을(survival rates)을 관찰하였다.

2) 항당뇨 효과

가) 실험동물

실험동물은 ICR mouse(6주령, ♂)를 3-4일 예비 사육하여 적응(온도: $24^{\circ}C$ , 습도:60%, 12시간 명암 주기) 시킨 후 실험에 사용하였다. 실험동물은 streptozotocin(65 mg/kg)을 복강에 투여하여 고혈당을 유발시킨 다음 대조군과 실험군으로 나누어 사육하며 혈당 변화를 측정하였다. 예비 사육 및 실험사육기간 중 물과 사료는 자유로이 섭취시켰다.

#### 나) Streptozotocin에 의한 당뇨 유발 및 시료 투여

Streptozotocin 투여 14시간 전부터 실험동물들을 절식시킨 후, 0.1M citrate buffer(pH 4.2)에 용해시킨 streptozotocin을 1회 (65 mg/kg) 복강에 주사하여 실험적으로 당뇨병을 유발하였으며, 새송이 흑대두 methanol 추출물 500 mg/kg을 당뇨유발 확인 후 6일 동안 1회/day 복강에 투여하였다. 당뇨의 확인은 Accucheck Go 혈당측정기를 이용하여 혈당 농도가 150 mg/day이 이상인 것을 당뇨병이 유발된 것으로 간주하여 실험에 사용하였다.

#### 다) 혈당측정

혈당은 측정하기 12시간 전에 절식 시키고, 일정한 시간에 꼬리 정맥에서 채취한 혈액을 가지고 blood glucose sensor(AccuCheck Go)로 측정하였다. sample 투여 후 일주일 동안 2일 간격으로 혈당을 측정하였다.

## 2. 결과 및 고찰

### 가. 개발된 발효두부의 기능성 검색

#### 1) 수소 공여능

홍국균과 흑국균 발효두부의 메탄올 추출물에 대한 항산화 효과를 측정하기 위하여 이들 추출물을 50-1000 ug/ml의 농도로 처리하여 수소공여능을 측정한 결과는 Table 3-2에서 보는 바와 같이 황두부 및 흑두부 메탄올 추출물은 거의 항산화 효과 나타나지 않았으나, 황두부 발효두부보다 흑두부 발효두부에서 약간의 항산화 효과를 나타내었다. 또한 버섯 균사체를 이용한 발효 황두부 메탄올 및 물 추출물에 대한 항산화 효과를 측정한 결과는 Table 3-2와 같다. 이들 버섯 발효두부를 50~1000 ug/ml의 농도로 처리하여 수소공여능을 측정한 결과, 홍국균과 흑국균을 이용한 발효두부보다 항산화 효과를 나타내었으며(Table 3-3), 농도 의존적으로 항산화 효과를 나타내었다. 또한 황두부와 흑두부 발효두부에서 비슷한 효과를 나타내었으며, 1000 ug/ml 농도에서 새송이, 동충하초 발효두부의 황, 흑 메탄올 추출물에서는 각각 40.22, 42.97, 39.39 및 41.33 %의 항산화 효과를 나타내었으며, 새송이, 동충하초 황,

흑 두부 물추출물 1000 ug/ml 농도로 처리하였을 때 각각 35.56, 32.39, 37.98 및 38.29 %로 메탄을 추출물에 비하여 항산화 효과가 더 낮음을 확인하였다. 반면에 홍국균과 흑국균 및 버섯 균사체를 이용한 발효두부의 배양액을 10, 30, 100 및 300  $\mu$ l/ml 농도로 처리하여 항산화 효과를 알아본 결과 모두 항산화 활성이 나타나지 않음을 확인 할 수 있었다(Table 3-1).



Table 3-1. Hydrogen-donating activities effects of liquid culture of by useful molds and mycelia

Sample	Concentration( $\mu\text{l}/\text{ml}$ )				
	10	30	100	300	1000
BHT					98.21±0.01
<i>M.anka</i>	5.60±1.43	5.98±2.30	13.96±1.19	15.6±2.16	
<i>M.pilosus</i>	3.51±0.57	4.65±4.97	8.26±2.16	10.16±1.19	
<i>Asp.awamorii</i>	1.99±2.30	5.03±3.66	5.41±1.43	9.02±1.43	
동충하초	1.61±4.98	3.70±4.98	3.51±8.28	4.46±3.14	
새송이	-4.27±6.09	-3.70±2.16	1.80±3.02	2.56±5.93	

Table 3-2. Hydrogen-donating activities effects of methanol extracts of soybean tofu fermented by a useful molds

Sample	Concentration(ug/ml)					
	50	100	200	400	800	1000
BHT						94.02±0.57
(황)M.anka	0.72±3.64	1.39±7.66	0	5.28±2.40	2.17±7.51	7.00±2.99
(황)Asp.awamorii	0	1.72±11.23	0.11±5.10	3.28±4.21	2.61±1.70	8.06±3.99
(황)M.pilosus	0	0	0	0	7.83±1.21	6.33±18.73
(흑)M.anka	6.06±3.64	7.15±7.66	12.17±0.58	11.40±2.40	13.26±7.51	15.93±2.99
(흑)Asp.awamorii	6.82±0.79	8.13±11.23	13.89±5.10	14.46±4.21	16.97±1.70	17.37±3.99
(흑)M.pilosus	6.24±10.24	7.36±6.33	10.82±1.89	11.04±2.08	13.71±1.21	14.15±18.73

Table 3-3. Hydrogen-donating activities effects of each extracts of soybean tofu fermented by *Paecilomyces japonica* and *Pleurotus eryngii* mycelia

Sample	Concentration(ug/ml)					
	50	100	200	400	800	1000
BHT						94.02±0.57
(황)새송이 (MeOH)	18.22±1.00	22.89±2.21	27.22±1.15	30.89±3.56	33.56±2.29	40.22±6.31
(황)새송이 (D.W)	15.90±1.09	20.11±2.65	23.87±5.35	26.77±1.43	30.88±2.47	35.66±3.38
(황)동충하초 (MeOH)	18.55±1.15	20.72±1.89	28.78±0.79	30.21±2.10	32.98±3.02	39.39±1.36
(황)동충하초 (D.W)	16.98±1.86	19.67±1.36	25.66±0.44	27.06±3.07	29.28±4.37	32.39±3.72
(흑)새송이 (MeOH)	20.66±6.31	26.88±2.29	29.78±3.56	33.44±1.15	36.88±2.21	42.97±1.00
(흑)새송이 (D.W)	18.73±3.38	24.98±2.47	29.44±1.43	31.67±5.35	33.89±2.65	37.98±1.09
(흑)동충하초 (MeOH)	20.11±1.36	28.98±3.02	30.21±2.10	33.56±0.79	35.78±1.89	41.43±1.15
(흑)동충하초 (D.W)	18.30±4.37	24.53±3.72	27.94±3.07	29.78±0.44	33.33±1.36	38.29±1.86

## 2) 항암효과

### 가) 발효두부 배양액에 대한 암세포 성장 억제효과

홍국균, 흑국균 및 버섯 균사체 발효두부의 배양액에 대한 A549(human lung cancer cell), SW480(human colon cancer cell) 2종의 암세포주에 대한 성장 억제 효과를 측정된 결과는 Table 3-4~3-7과 같다. 즉 이들 발효배양액을 10, 30, 50 및 100  $\mu\text{l}/\text{ml}$ 의 농도로 처리하여 시간별(24hr, 48hr, 72hr)로 암세포의 성장 억제 효과를 측정된 결과 농도와 시간에 의존하여 암세포의 성장을 억제함을 확인할 수 있었다. 특히 A549, SW480 암세포에서는 *Asp. awamorii* 배양액 100  $\mu\text{l}/\text{ml}$  농도로 72시간 처리 시 각각 14.62, 3.85 % 성장률을 나타내 다른 배양액 보다 높은 암세포 성장을 억제함을 알 수 있었다. 새송이 및 동충하초 배양액을 대한 A549(human lung cancer cell line) 과 SW480(human colon cancer) 2 종의 암세포주에 농도 10-100  $\mu\text{l}/\text{mL}$  로 처리하여 24, 48, 72hr 처리하여 암세포의 성장을 측정된 결과는 Table 과 같다. 즉 새송이 배양액 100  $\mu\text{l} /\text{mL}$ 을 A549암세포에 처리 시 82.54%(24hr), 56.06%(48hr) 및 54.50%(72hr) 의 암세포 성장을 억제하였으며, 동충하초를 똑같은 농도를 처리하여 측정된 결과 72.49(24hr), 31.52%(48hr) 및 11.91%(72hr)의 성장을 억제함을 확인하였다. 또한 이들 추출물을 SW480 세포주에 처리 시 A549 세포주의 효과와 유사한 결과를 나타내었다.

Table 3-4. Effects of liquid culture of molds on A549 cell lines by SRB assay

	Concentration ( $\mu\text{l}/\text{ml}$ )	Survival rate(%)		
		24hr	48hr	72hr
<i>M.anka</i>	Control	100	100	100
	10	102.09 $\pm$ 3.66	79.87 $\pm$ 9.87	73.95 $\pm$ 8.68
	30	97.53 $\pm$ 4.27	78.51 $\pm$ 6.26	74.23 $\pm$ 1.44
	50	86.34 $\pm$ 6.93	80.91 $\pm$ 5.77	76.36 $\pm$ 3.07
	100	64.52 $\pm$ 5.76	51.89 $\pm$ 4.45	33.14 $\pm$ 1.19
<i>M.pilosus</i>	Control	100	100	100
	10	114.42 $\pm$ 4.00	90.46 $\pm$ 4.04	87.84 $\pm$ 7.89
	30	108.16 $\pm$ 4.42	86.61 $\pm$ 1.82	79.20 $\pm$ 0.46
	50	97.72 $\pm$ 4.55	81.40 $\pm$ 5.02	66.79 $\pm$ 4.31
	100	87.10 $\pm$ 4.00	51.64 $\pm$ 3.64	31.23 $\pm$ 2.85
<i>Asp.awamorii</i>	Control	100	100	100
	10	101.71 $\pm$ 10.07	96.23 $\pm$ 4.69	83.83 $\pm$ 2.58
	30	98.48 $\pm$ 2.00	90.30 $\pm$ 3.54	81.63 $\pm$ 7.95
	50	89.94 $\pm$ 3.43	71.53 $\pm$ 6.86	55.27 $\pm$ 1.62
	100	68.88 $\pm$ 4.84	36.73 $\pm$ 4.53	14.62 $\pm$ 2.71

Table 3-5. Effects of liquid culture of molds on SW480 cell lines by SRB assay

	Concentration ( $\mu\text{l}/\text{ml}$ )	Survival rate(%)		
		24hr	48hr	72hr
<i>M.anka</i>	Control	100	100	100
	10	90.42 $\pm$ 2.85	87.42 $\pm$ 5.66	83.00 $\pm$ 2.82
	30	80.81 $\pm$ 3.73	77.75 $\pm$ 1.36	77.57 $\pm$ 0.93
	50	75.57 $\pm$ 3.18	70.45 $\pm$ 4.56	64.24 $\pm$ 4.84
	100	52.82 $\pm$ 4.24	28.09 $\pm$ 3.24	18.31 $\pm$ 4.39
<i>M.pilosus</i>	Control	100	100	100
	10	93.42 $\pm$ 0.84	92.36 $\pm$ 4.09	85.93 $\pm$ 3.13
	30	91.52 $\pm$ 4.18	89.66 $\pm$ 7.42	82.09 $\pm$ 1.06
	50	84.94 $\pm$ 2.73	80.34 $\pm$ 4.74	78.03 $\pm$ 2.65
	100	54.82 $\pm$ 0.97	43.15 $\pm$ 6.19	28.89 $\pm$ 3.56
<i>Asp.awamorii</i>	Control	100	100	100
	10	98.89 $\pm$ 4.19	98.76 $\pm$ 8.60	85.99 $\pm$ 6.37
	30	88.51 $\pm$ 5.51	97.87 $\pm$ 1.59	77.06 $\pm$ 3.40
	50	84.50 $\pm$ 3.19	70.00 $\pm$ 8.66	56.22 $\pm$ 8.83
	100	35.64 $\pm$ 4.06	33.71 $\pm$ 7.29	3.85 $\pm$ 0.39

Table 3-6. Effects of liquid culture of *Paecilomyces japonica* and *Pleurotus eryngii* mycelia on A549 cell lines by SRB assay

	Concentration ( $\mu\text{l/ml}$ )	Survival rate(%)		
		24hr	48hr	72hr
동충하초	Control	100	100	100
	10	107.59 $\pm$ 5.53	93.67 $\pm$ 7.95	83.15 $\pm$ 5.09
	30	103.42 $\pm$ 3.99	88.13 $\pm$ 7.32	81.79 $\pm$ 3.96
	50	93.17 $\pm$ 3.01	79.87 $\pm$ 4.64	63.98 $\pm$ 5.35
	100	72.49 $\pm$ 0.33	31.52 $\pm$ 1.84	11.91 $\pm$ 4.99
새송이	Control	100	100	100
	1	106.64 $\pm$ 7.98	97.84 $\pm$ 8.27	92.96 $\pm$ 7.62
	30	100.95 $\pm$ 6.27	89.58 $\pm$ 3.16	84.29 $\pm$ 5.57
	100	96.40 $\pm$ 7.77	80.03 $\pm$ 6.76	81.17 $\pm$ 5.43
	300	82.54 $\pm$ 5.13	56.06 $\pm$ 4.09	54.50 $\pm$ 1.58

Table 3-7. Effects of liquid culture of *Paecilomyces japonica* and *Pleurotus eryngii* mycelia on SW480 cell lines by SRB assay

	Concentration ( $\mu\text{l/ml}$ )	Survival rate(%)		
		24hr	48hr	72hr
동충하초	Control	100	100	100
	1	97.99 $\pm$ 3.73	96.85 $\pm$ 6.13	96.10 $\pm$ 2.68
	30	93.98 $\pm$ 3.39	90.45 $\pm$ 5.74	77.80 $\pm$ 0.10
	100	94.65 $\pm$ 6.61	67.42 $\pm$ 4.72	54.58 $\pm$ 7.12
	300	35.64 $\pm$ 4.69	38.32 $\pm$ 6.65	12.33 $\pm$ 1.42
새송이	Control	100	100	100
	1	92.97 $\pm$ 8.12	92.25 $\pm$ 6.59	90.68 $\pm$ 8.30
	30	86.95 $\pm$ 8.21	84.16 $\pm$ 8.62	79.78 $\pm$ 5.99
	100	70.87 $\pm$ 5.85	67.42 $\pm$ 4.41	67.01 $\pm$ 8.23
	300	46.91 $\pm$ 6.70	23.60 $\pm$ 5.61	14.70 $\pm$ 0.39

나) 발효두부 추출물의 암세포 성장 억제 효과

홍국균 및 흑국균을 이용하여 발효시킨 흑두부와 황두부의 methanol 추출물 및 새송이 및 동충하초 균사체를 이용한 발효두부(황대두, 흑대두)로부터 추출한 메탄올 및 물 추출물의 A549(human lung cancer cell), SW480(human colon cancer cell) 2종의 암세포주에 대한 성장 억제 효과를 측정된 결과는 Table 3-8~3-11 과 같다. 그 결과 홍국균 및 흑국균 발효두부 메탄올 추출물을 1, 10, 100 및 500 ug/ml의 농도로 처리하여 시간별(24hr, 48hr, 72hr)로 암세포의 성장 억제 효과를 측정된 결과 농도와 시간에 의존하여 암세포의 성장을 억제함을 확인할 수 있었다. A549 및 SW480 암세포의 성장 억제 효과는 홍국균 및 흑국균 발효 황두부 와 발효 흑두부에서 비슷한 효과를 나타내었으며, 100 ug/ml 농도 이상에서는 50% 이상의 암세포 성장을 억제하였다. 그리고 버섯 균사체 추출물들을 0, 1, 10, 100 및 500 ug/mL 농도로 처리하여 24, 48 및 72시간 배양한 후 암세포 성장억제효과를 측정된 결과 새송이 및 동충하초 균사체를 이용한 발효두부(황대두 및 흑대두)로부터 추출한 물 추출물에 비하여 메탄올 추출물에서 암세포 성장 억제효과를 더 높음을 알 수 있었다. 새송이 발효두부 메탄올 추출물을 농도 100 ug/mL, 에서 24, 48 및 72 시간 동안 배양하여 측정된 결과 발효황두부에서는 각각 70.91%, 65.75% 및 53.69 % 암세포 성장을 억제함을 확인하였으며, 발효흑두부에서도 각각 64.66%, 52.15% 및 51.53% 암세포 성장을 억제함을 확인하였으며, 동충하초를 이용한 황두부 메탄올 추출물 100 ug/mL 농도를 처리하여 시간별(24, 48 및 72hr)로 암세포 성장을 측정된 결과 각각 68.53%, 58.26% 및 64%의 암세포 성장을 억제함을 알 수 있었으며, 흑두부에서는 각각 92.57%, 57.82% 및 48.31%의 성장을 억제함을 알 수 있었다. 또한 이들 추출물이 인체 대장암 세포주인 SW480에 대한 암세포 성장 억제효과를 알아본 결과 물 추출물에 비하여 메탄올 추출물에서 그 효과가 더 높음을 확인할 수 있었으며, 폐암세포주 A549 세포에서의 결과와 유사한 경향을 나타냄을 확인 하였다.

Table 3-8. Effects of methanol extracts of soybean tofu fermented by various useful molds on A549 cell lines by SRB assay

		Concentration	Survival rate (%)		
		( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	24hr	48hr	72hr
발효 황두부	<i>M.anka</i>	Control	100	100	100
		1	100.59±3.94	93.15±6.08	85.64±6.82
		10	100.16±7.51	78.97±6.43	70.22±1.94
		100	45.38±6.15	21.13±3.91	22.26±7.64
		500	0.59±0.48	0.56±0.32	0.41±4.22
	<i>M.pilosus</i>	Control	100	100	100
		1	82.29±5.68	70.28±4.76	65.83±5.57
		10	70.52±3.52	75.80±2.12	72.11±5.03
		100	24.89±7.39	15.78±5.42	10.34±0.59
		500	1.64±0.55	1.64±7.47	10.41±1.94
	<i>Asp.aswamorii</i>	Control	100	100	100
		1	90.28±3,95	82.31±2,64	73.84±4,91
10		80.93±4,07	81.27±0,73	72.11±3,40	
100		50.67±5,89	45.55±2,06	34.13±1,67	
500		4.32±0,32	1.53±0,24	0.14±3,75	
발효 흑두부	<i>M.anka</i>	Control	100	100	100
		1	99.38±6.38	86.09±4.32	85.66±1.12
		10	90.34±4.33	81.34±3.85	80.30±1.04
		100	47.15±7.11	27.39±3.36	17.23±3.78
		500	8.15±1.27	4.55±1.97	3.06±0.24
	<i>M.pilosus</i>	Control	100	100	100
		1	89.08±4.34	85.17±2.77	84.17±0.90
		10	77.47±2.57	74.95±2.29	71.16±2.48
		100	27.23±2.22	16.45±4.13	12.06±2.44
		500	6.07±1.13	4.92±0.53	1.33±0.51
	<i>Asp.aswamorii</i>	Control	100	100	100
		1	93.93±6.78	77.38±2.53	70.23±2.78
10		85.83±2.22	76.38±2.96	69.97±2.34	
100		47.07±6.15	43.45±1.80	30.18±0.53	
500		9.04±0.88	1.41±7.59	0.69±0.42	



Table 3-9. Effects of methanol extracts of soybean tofu fermented by various useful molds on SW480 cell lines by SRB assay

		Concentration ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Survival rate (%)		
			24hr	48hr	72hr
발효황두부	<i>M.anka</i>	Control	100	100	100
		1	100.25±2.68	99.56±1.03	86.77±7.94
		10	98.32±6.02	81.17±5.88	71.36±2.04
		100	33.17±9.52	28.88±5.03	22.23±1.67
		500	9.82±5.13	5.88±0.46	1.16±0.76
	<i>M.pilosus</i>	Control	100	100	100
		1	100.26±9.42	82.06±3.41	68.07±2.92
		10	77.26±2.31	76.19±8.24	70.36±3.02
		100	28.49±9.06	23.95±2.90	18.72±3.44
		500	3.52±2.77	1.57±0.80	0.24±0.50
	<i>Asp.aswamorii</i>	Control	100	100	100
		1	91.74±7.70	83.30±1.55	76.42±6.06
		10	84.70±8.89	80.42±2.31	74.46±8.16
		100	56.84±4.82	41.93±2.49	27.79±9.41
		500	5.74±7.16	2.48±0.74	1.88±0.17
	발효흑두부	<i>M.anka</i>	Control	100	100
1			91.73±4.70	87.11±2.37	73.59±4.76
10			89.47±9.12	81.36±4.60	74.86±4.15
100			30.83±7.25	21.74±3.37	18.444±6.38
500			7.81±4.51	3.58±2.54	2.49±0.58
<i>M.pilosus</i>		Control	100	100	100
		1	97.30±9.29	82.44±2.21	79.86±6.83
		10	79.59±5.10	74.16±3.10	72.38±8.71
		100	22.68±4.22	12.48±2.40	9.70±0.61
		500	6.35±8.11	4.94±1.60	2.87±0.48
<i>Asp.aswamorii</i>		Control	100	100	100
		1	97.20±10.77	76.92±0.95	73.38±4.23
		10	87.91±8.48	70.51±2.51	68.43±8.85
		100	43.64±7.56	42.77±1.48	24.69±2.42
		500	10.17±7.56	4.18±2.48	1.07±3.22

Table 3-10. Effects of extracts of soybean tofu fermented by *Paecilomyces japonica* and *Pleurotus eryngii* mycelia on A549 cell lines by SRB assay

		Concentration	Survival rate(%)			
		( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	24hr	48hr	72hr	
		Control	100	100	100	
발효 황두부	동충하초 (MeOH)	1	98.14±6.74	90.02±5.84	73.80±4.90	
		10	83.36±7.79	79.67±6.09	72.03±3.40	
		100	48.53±2.33	38.26±5.28	24.00±1.62	
		500	6.07±2.07	4.38±3.75	0.35±0.43	
			Control	100	100	100
	동충하초 (D.W)	1	100.64±6.47	89.77±7.47	79.82±5.61	
		10	99.45±7.32	72.85±2.53	65.13±5.05	
		100	96.74±2.88	72.53±2.65	59.29±0.52	
		500	92.41±5.05	69.00±2.38	51.63±1.48	
			Control	100	100	100
	새송이 (MeOH)	1	81.20±1.51	64.87±5.10	61.47±6.48	
		10	73.69±8.51	70.77±4.73	63.89±9.33	
		100	40.91±7.04	35.75±5.82	23.69±7.75	
		500	5.98±7.84	3.00±2.78	1.71±0.04	
			Control	100	100	100
	새송이 (D.W)	1	100.91±7.42	96.77±2.61	85.51±6.78	
		10	99.48±7.92	89.25±3.37	75.38±5.18	
		100	95.59±8.37	82.20±5.34	85.28±7.68	
		500	90.02±1.42	62.22±5.21	64.58±4.20	
			Control	100	100	100
발효 흑두부	동충하초 (MeOH)	1	96.81±2.38	67.80±5.47	57.18±2.22	
		10	85.23±4.24	52.49±0.96	42.26±1.76	
		100	42.57±1.80	27.82±2.95	18.31±0.51	
		500	4.41±3.81	1.80±0.49	0.89±2.07	
			Control	100	100	100
	동충하초 (D.W)	1	100.79±5.57	85.95±0.92	95.79±1.07	
		10	99.21±14.40	96.89±7.19	96.62±0.83	
		100	96.30±4.19	82.59±14.28	75.93±11.67	
		500	94.67±1.50	67.63±6.70	72.12±3.69	
			Control	100	100	100
	새송이 (MeOH)	1	93.74±2.52	59.41±3.63	59.42±3.53	
		10	79.31±1.64	49.70±4.40	38.09±1.69	
		100	34.66±1.08	29.15±3.89	17.53±2.39	
		500	2.39±2.45	1.67±0.91	0.82±0.59	
			Control	100	100	100
	새송이 (D.W)	1	100.44±3.81	92.91±5.17	93.86±2.44	
		10	99.13±5.95	89.18±2.28	94.10±1.02	
		100	98.13±3.45	71.29±5.62	72.16±1.29	
		500	93.23±5.40	65.49±1.00	62.81±2.09	

Table 3-11. Effects of extracts of soybean tofu fermented by *Paecilomyces japonica* and *Pleurotus eryngii* mycelia on SW480 cell lines by SRB assay

		Concentration	Survival rate(%)		
		( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	24hr	48hr	72hr
발효 황두부	동충하초 (MeOH)	Control	100	100	100
		1	99.34±6.74	89.02±5.84	70.80±1.88
		10	87.11±7.79	79.67±6.09	69.03±2.80
		100	45.23±2.33	38.34±5.28	26.00±1.59
		500	9.45±2.07	4.38±3.75	1.35±0.43
	동충하초 (D.W)	Control	100	100	100
		1	100.64±6.47	90.77±7.47	83.82±7.88
		10	100.45±7.32	82.85±2.53	70.13±0.77
		100	98.74±2.88	80.53±2.65	61.29±2.44
		500	94.41±5.05	74.00±2.38	54.63±4.33
	새송이 (MeOH)	Control	100	100	100
		1	81.20±1.51	64.87±5.10	61.47±6.48
		10	73.69±8.51	70.77±4.73	63.89±9.33
		100	40.91±7.04	35.75±5.82	23.69±7.75
		500	5.98±7.84	3.00±2.78	1.71±0.04
	새송이 (D.W)	Control	100	100	100
		1	99.89±7.42	97.99±2.61	87.98±6.78
		10	98.22±7.92	92.34±3.37	80.90±5.18
		100	98.34±8.37	84.44±5.34	83.28±7.68
		500	89.78±1.42	60.67±5.21	69.00±2.22
발효 흑두부	동충하초 (MeOH)	Control	100	100	100
		1	97.11±0.44	65.49±3.21	54.99±3.45
		10	87.98±3.33	50.76±1.78	40.92±0.56
		100	40.87±0.99	25.98±2.45	19.78±1.11
		500	5.89±4.55	1.11±0.67	1.09±3.33
	동충하초 (D.W)	Control	100	100	100
		1	100.79±5.57	97.88±3.45	90.79±0.98
		10	100.01±3.45	95.99±2.45	87.22±2.34
		100	96.23±2.45	82.45±2.22	80.45±1.24
		500	92.55±0.87	70.98±1.34	70.89±2.45
	새송이 (MeOH)	Control	100	100	100
		1	90.01±2.45	60.87±0.99	49.12±2.34
		10	76.12±3.55	46.12±3.21	38.99±0.98
		100	34.89±0.99	30.98±2.14	20.87±5.78
		500	3.12±1.34	1.11±1.56	0.78±2.44
	새송이 (D.W)	Control	100	100	100
		1	99.12±2.22	90.11±5.17	90.01±2.45
		10	98.76±3.45	89.99±1.87	84.34±4.56
		100	96.11±4.21	76.98±2.45	73.98±2.34
		500	94.23±2.23	68.98±0.00	67.09±3.45

### 3) 면역활성

#### 가) 비장세포 증식 유도

생쥐의 비장에서 분리한 세포에 각각 버섯 추출물을 농도별로 첨가하고 48시간 배양한 다음 비장세포의 증식 반응을 측정하였다. 그 결과 노란콩 또는 검정콩으로 만든 두부와 함께 배양한 황 및 흑대두 버섯추출물을 첨가하였을 경우에 농도 의존적으로 비장세포의 증식 반응이 증가하였다(Table 3-12, 3-13). 즉 버섯 추출물을 첨가하지 않은 대조군( $0.7 \pm 0.0$ )에 비해 추출물을 첨가한 실험군에서  $0.9 \pm 0.0$ 에서  $1.3 \pm 0.0$ 으로 비장세포의 증식 반응이 증가하는 것으로 나타났다. 그러나 실험에 사용한 추출물의 최대 농도인  $100 \mu\text{g/ml}$ 에서 *M. anka*, *Asp. awamorii*, *M. pilosus* 추출물을 첨가하였을 때는 대조군( $0.7 \pm 0.0$ )에 비해 오히려 감소하는 것으로 나타났다. 즉 이러한 경향은 노란콩이나 검정콩을 사용하였을 때 모두 동일하게 나타났다. 그리고 검정콩으로 만든 두부와 함께 배양한 동충하초의 메탄올 추출물의 경우에도 대조군 보다 감소하는 것으로 나타났다(Table 2). 이러한 결과는 고농도의 추출물에서 비장세포에 대한 독성에 의한 것으로 생각된다.

Table 3-12. Effect of soybean tofu fermented by useful molds and mycelia on the growth of spleen cells

Conc. ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Growth(O.D. at 490nm)							
	(-)	M.anka (황)MeOH	Asp.awamorii (황)MeOH	M.pilosus (황)MeOH	새송이 (황)MeOH	새송이 (황)D.W	동충하초 (황)MeOH	동충하초 (황)D.W
Control	0.7 $\pm$ 0.0							
samples 0.01		1.0 $\pm$ 0.0	1.0 $\pm$ 0.0	1.0 $\pm$ 0.0	1.1 $\pm$ 0.0	1.1 $\pm$ 0.0	1.1 $\pm$ 0.0	1.0 $\pm$ 0.0
0.1		1.0 $\pm$ 0.0	1.2 $\pm$ 0.0	1.1 $\pm$ 0.0	1.3 $\pm$ 0.0	1.2 $\pm$ 0.0	1.2 $\pm$ 0.0	1.1 $\pm$ 0.0
1		1.0 $\pm$ 0.0	1.2 $\pm$ 0.0	1.2 $\pm$ 0.0	1.2 $\pm$ 0.0	1.1 $\pm$ 0.0	1.3 $\pm$ 0.0	1.1 $\pm$ 0.0
10		1.1 $\pm$ 0.0	1.1 $\pm$ 0.0	1.1 $\pm$ 0.0	1.1 $\pm$ 0.0	1.2 $\pm$ 0.0	1.3 $\pm$ 0.0	1.1 $\pm$ 0.0
100		0.2 $\pm$ 0.0	0.3 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.0	1.3 $\pm$ 0.0	1.1 $\pm$ 0.0	1.1 $\pm$ 0.0	1.1 $\pm$ 0.1
LPS 10	1.5 $\pm$ 0.0							
$\alpha$ -CD3 0.01	1.2 $\pm$ 0.0							

Table 3-13. Effect of soybean tofu fermented by useful molds and mycelia on the growth of spleen cells

Conc. ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Growth(O.D. at 490nm)							
	(-)	M.anka (흑)MeOH	Asp.awamorii (흑)MeOH	M.pilosus (흑)MeOH	새송이 (흑)MeOH	새송이 (흑)D.W	동충하초 (흑)MeOH	동충하초 (흑)D.W
Control	0.7 $\pm$ 0.0							
samples 0.01		0.9 $\pm$ 0.0	1.0 $\pm$ 0.0	1.0 $\pm$ 0.0	1.1 $\pm$ 0.0	1.0 $\pm$ 0.0	1.2 $\pm$ 0.0	1.0 $\pm$ 0.0
0.1		1.1 $\pm$ 0.0	1.2 $\pm$ 0.0	1.2 $\pm$ 0.0	1.2 $\pm$ 0.0	1.2 $\pm$ 0.1	1.2 $\pm$ 0.0	0.9 $\pm$ 0.0
1		1.2 $\pm$ 0.0	1.3 $\pm$ 0.0	1.2 $\pm$ 0.0	1.3 $\pm$ 0.0	1.3 $\pm$ 0.0	1.1 $\pm$ 0.0	1.0 $\pm$ 0.0
10		1.2 $\pm$ 0.0	1.2 $\pm$ 0.0	1.4 $\pm$ 0.0	1.3 $\pm$ 0.0	1.2 $\pm$ 0.0	1.2 $\pm$ 0.0	1.0 $\pm$ 0.0
100		0.2 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.0	0.8 $\pm$ 0.0	1.3 $\pm$ 0.0	1.2 $\pm$ 0.0	1.1 $\pm$ 0.0
LPS 10	1.5 $\pm$ 0.0							
$\alpha$ -CD3 0.01	1.2 $\pm$ 0.0							

나) 비장세포 사이토카인 생산 유도

비장세포에 대한 독성이 없는 최대 농도의 버섯 추출물( $10\mu\text{g}/\text{ml}$ )을 첨가하여 24시간 배양한 다음에 상층액을 분리하여 어떤 종류의 사이토카인이 분비되는지 ELISA 방법으로 측정하였다. 그 결과 각 시료 추출물은 다양한 종류의 사이토카인의 분비량을 증가시키는 것으로 나타났다(Table 3-14~3-21). 먼저 대조군( $10.2\pm 0.0$ )에 비해 IL-2의 분비량을 유의하게 증가시키는 시료는 관찰되지 않았지만, *M. anka* 황대두 발효두부 메탄올 추출물( $16.7\pm 7.0$ )은 대조군에 비해 IL-2 분비량을 증가시키는 것으로 나타났다(Table 3-14). 그리고 *Asp. awamorii* 흑두부 발효두부메탄올 추출물( $15.2\pm 7.0$ )도 대조군에 비해 IL-2 분비량을 증가시키는 것으로 나타났다(Table 3-15). 모든 추출물은 대조군에 비해 IFN- $\gamma$  분비량을 유의하게 증가시키는 것으로 나타났다(Table 3-16, 3-17). 특히 *M. anka* 황대두 발효 메탄올 추출물( $69.2\pm 14.1$ )은 대조군( $16.0\pm 8.2$ )에 비해 IFN- $\gamma$  분비량을 유의하게 증가시키는 것으로 나타났다(Table 3-16). 또한 동충하초 흑대두 발효두부 물추출물( $106.7\pm 14.1$ )도 대조군( $16.0\pm 8.2$ )에 비해 IFN- $\gamma$  분비량을 유의하게 증가시키는 것으로 나타났다(Table 3-17). 그러나 모든 추출물은 대조군에 비해 IL-6와 TNF- $\alpha$  분비량을 유의하게 증가시키지는 못하는 것으로 나타났다(Table 3-18~3-21). 즉 모든 추출물은 대조군에 비해 비장세포의 IL-6와 TNF- $\alpha$  분비량을 증가시키지는 못하였다.

Table 3-14. Effect of soybean tofu fermented by useful molds and mycelia on the IL-2 production of spleen cells

Conditions	IL-2(pg/ml)							
	(-)	M.anka (황)MeOH	Asp.awamorii (황)MeOH	M.pilosus (황)MeOH	새송이 (황)MeOH	새송이 (황)D.W	동충하초 (황)MeOH	동충하초 (황)D.W
control	10.2±0.0							
samples (10μg/ml)		16.7±7.0	13.8±1.0	14.5±0.0	<10	11.0±1.0	14.5±6.0	<10
LPS (10μg/ml)	<10							
α-CD3 (0.01μg/ml)	616.7±13.1							

Table 3-15. Effect of soybean tofu fermented by useful molds and mycelia on the growth of spleen cells

Conditions	IL-2(pg/ml)							
	(-)	M.anka (흑)MeOH	Asp.awamorii (흑)MeOH	M.pilosus (흑)MeOH	새송이 (흑)MeOH	새송이 (흑)D.W	동충하초 (흑)MeOH	동충하초 (흑)D.W
control	10.2±0.0							
samples (10μg/ml)		<10	15.2±7.0	10.2±0.0	<10	<10	11.0±1.0	<10
LPS (10μg/ml)	<10							
α-CD3 (0.01μg/ml)	616.7±13.1							



Table 3-16. Effect of soybean tofu fermented by useful molds and mycelia on the IFN- $\gamma$  production of spleen cells

Conditions	IFN- $\gamma$ (pg/ml)							
	(-)	M.anka (황)MeOH	Asp.awamorii (황)MeOH	M.pilosus (황)MeOH	새송이 (황)MeOH	새송이 (황)D.W	동충하초 (황)MeOH	동충하초 (황)D.W
control	16.0±8.2							
samples (10 $\mu$ g/ml)		69.2±14.1	46.7±10.6	48.0±5.3	33.0±5.3	59.2±7.0	41.7±10.6	55.5±8.8
LPS (10 $\mu$ g/ml)	855.6±80.1							
$\alpha$ -CD3 (0.01 $\mu$ g/ml)	12987.6 ±80.6							

Table 3-17. Effect of soybean tofu fermented by useful molds and mycelia on the IFN- $\gamma$  production of spleen cells

Conditions	IFN- $\gamma$ (pg/ml)							
	(-)	M.anka (흑)MeOH	Asp.awamorii (흑)MeOH	M.pilosus (흑)MeOH	새송이 (흑)MeOH	새송이 (흑)D.W	동충하초 (흑)MeOH	동충하초 (흑)D.W
control	16.0±8.2							
samples (10 $\mu$ g/ml)		30.5±1.7	53.0±5.3	65.5±5.3	48.0±1.7	55.5±5.3	46.7±10.6	106.7±14.1
LPS (10 $\mu$ g/ml)	855.6 ±80.1							
$\alpha$ -CD3 (0.01 $\mu$ g/ml)	12987.6 ±80.6							

Table 3-18. Effect of soybean tofu fermented by useful molds and mycelia on the IL-6 production of spleen cells

Conditions	IL-6(pg/ml)							
	(-)	M.anka (황)MeOH	Asp.awamorii (황)MeOH	M.pilosus (황)MeOH	새송이 (황)MeOH	새송이 (황)D.W	동충하초 (황)MeOH	동충하초 (황)D.W
control	150.1±0.0							
samples (10μg/ml)		143.5±21.2	111.0±12.9	148.5±2.3	116.0±27.1	129.3±1.1	85.1±11.7	123.5±14.1
LPS (10μg/ml)	2266.5 ±106.0							
□-CD3 (0.01μg/ml)	1075.5±21.2							

Table 3-19. Effect of soybean tofu fermented by useful molds and mycelia on the IL-6 production of spleen cells

Conditions	IL-6(pg/ml)							
	(-)	M.anka (흑)MeOH	Asp.awamorii (흑)MeOH	M.pilosus (흑)MeOH	새송이 (흑)MeOH	새송이 (흑)D.W	동충하초 (흑)MeOH	동충하초 (흑)D.W
control	150.1±0.0							
samples (10μg/ml)		109.3±38.8	63.5±28.2	61.8±9.4	53.5±0.0	36.0±3.5	57.6±1.1	100.1±30.6
LPS (10μg/ml)	2266.5 ±106.0							
□-CD3 (0.01μg/ml)	1075.5 ±21.2							

Table 3-20. Effect of soybean tofu fermented by useful molds and mycelia on the TNF- $\alpha$  production of spleen cells

Concditions	TNF- $\alpha$ (pg/ml)							
	(-)	M.anka (황)MeOH	Asp.awamorii (황)MeOH	M.pilosus (황)MeOH	새송이 (황)MeOH	새송이 (황)D.W	동충하초 (황)MeOH	동충하초 (황)D.W
control	248.3±0.7							
samples (10 $\mu$ g/ml)		158.8±7.8	119.4±7.0	140.0±9.4	133.8±3.9	148.3±29.0	110.0±9.4	170.0±1.5
LPS (10 $\mu$ g/ml)	1006.6±4.7							
$\alpha$ -CD3 (0.01 $\mu$ g/ml)	625.0±68.3							

Table 3-21. Effect of soybean tofu fermented by useful molds and mycelia on the TNF- $\alpha$  production of spleen cells

Conditions	TNF- $\alpha$ (pg/ml)							
	(-)	M.anka (흑)MeOH	Asp.awamorii (흑)MeOH	M.pilosus (흑)MeOH	새송이 (흑)MeOH	새송이 (흑)D.W	동충하초 (흑)MeOH	동충하초 (흑)D.W
control	248.3±0.7							
samples (10 $\mu$ g/ml)		171.1±47.1	211.6±0.7	187.2±8.6	192.7±10.2	220.0±3.1	251.6±25.9	253.8±8.6
LPS (10 $\mu$ g/ml)	1006.6±4.7							
$\alpha$ -CD3 (0.01 $\mu$ g/ml)	625.0±68.3							

다) 대식세포 일산화질소 생산 유도

대식세포주(RAW264.7)에 버섯 추출물을 농도별로 처리하여 48시간 배양한 후 배양액 중 대식세포가 생산한 NO가 산화된 형태인 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 농도를 측정하였다. 그 결과 추출물을 첨가하였을 경우에 대조군에 비해 대식세포의 일산화질소 생산을 유의하게 증가시키지는 않는 것으로 나타났다(Table 3-22, 3-23). 즉 대조군에 비해 대부분의 추출물이 유의하게 일산화질소의 생산을 유도하지는 않았지만, 새송이 황대두 물추출물(5.3±0.3)의 경우에 시료 중에서 가장 많은 대식세포의 일산화질소 생산을 유도하였다.

Table 3-22. Effect of soybean tofu fermented by useful molds and mycelia on the nitric oxide production of RAW 264.7

Conc. ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ( $\mu\text{M}$ )							
	(-)	M.anka (황)MeOH	Asp.awamorii (황)MeOH	M.pilosus (황)MeOH	새송이 (황)MeOH	새송이 (황) D.W	동충하초 (황)MeOH	동충하초 (황)D.W
control	<0.5							
samples 0.01		<0.5	3.2±0.1	1.0±0.0	<0.5	0.9±0.1	5.1±1.4	<0.5
0.1		<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	4.7±0.9	<0.5
1		<0.5	1.7±0.2	<0.5	<0.5	1.2±0.4	<0.5	4.3±0.5
10		<0.5	0.6±0.0	1.5±0.2	1.4±0.1	5.3±0.3	<0.5	<0.5
100		1.3±0.2	2.2±0.1	<0.5	2.2±0.2	0.3±0.0	<0.5	<0.5
LPS 1	8.9±0.0							
10	10.6±0.5							

Table 3-23. Effect of soybean tofu fermented by useful molds and mycelia on the nitric oxide production of RAW 264.7

Conc. ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	$\text{NO}_2^-$ ( $\mu\text{M}$ )							
	(-)	M.anka (흑)MeOH	Asp.awamorii (흑)MeOH	M.pilosus (흑)MeOH	새송이 (흑)MeOH	새송이 (흑)D.W	동충하초 (흑)MeOH	동충하초 (흑)D.W
control	<0.5							
samples 0.01		<0.5	2.4 $\pm$ 0.2	1.3 $\pm$ 0.0	<0.5	3.3 $\pm$ 0.8	<0.5	3.1 $\pm$ 0.8
0.1		0.8 $\pm$ 0.5	0.6 $\pm$ 0.0	<0.5	<0.5	1.0 $\pm$ 0.0	<0.5	<0.5
1		1.4 $\pm$ 0.0	<0.5	<0.5	<0.5	2.7 $\pm$ 0.4	1.7 $\pm$ 0.1	<0.5
10		<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
100		<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	1.4 $\pm$ 0.1
LPS 1	8.9 $\pm$ 0.0							
10	10.6 $\pm$ 0.5							

라) 대식세포 사이토카인 생산 유도

각 발효두부 추출물에 의해 분비되는 대식세포의 사이토카인의 종류와 분비량을 알아보기 위하여 대식세포주에 일산화질소 생산을 최대로 유도하는 농도의 시료 추출물을 첨가하여 24시간 배양한 후 상층액을 회수하여 상층액에 포함된 사이토카인의 분비량을 측정하였다. 그 결과 모든 시료가 대조군에 비해 IL-6 분비량을 유의하게 증가시키는 것으로 나타났다(Table 3-24, 3-25). 특히 M. anka 황대두 메탄올 추출물(111,119.5±827.3)의 경우에 추출물 중에서 가장 많은 대식세포의 IL-6 분비량을 유도하였다(Table 3-24). 또한 새송이 흑대두 물추출물(17,149.5±254.5)의 경우에 추출물 중에서 가장 많은 대식세포의 IL-6 분비량을 유도하였다(Table 3-25). 또한 모든 시료가 대조군에 비해 TNF- $\alpha$  분비량을 유의하게 증가시키는 것으로 나타났다(Table 3-26, 3-27). 특히 새송이 황대두 물 추출물(39,487.5±1,856.1)의 경우에 추출물 중에서 가장 많은 대식세포의 TNF- $\alpha$  분비량을 유도하였다(Table 3-26). 또한 동충하초 흑대두 메탄올추출물(39,662.5±3,447.1)의 경우에 추출물 중에서 가장 많은 대식세포의 TNF- $\alpha$  분비량을 유도하였다(Table 3-27). 그러나 모든 추출물은 대조군에 비해 IL-1 $\beta$  분비량을 유의하게 증가시키지는 못하는 것으로 나타났다(Table 3-28, 3-29). 즉 모든 추출물은 대조군에 비해 대식세포의 IL-1 $\beta$  분비량을 증가시키지는 못하였지만 새송이 황, 흑대두 물 추출물(13.9±0.6, 16.1±1.2)의 경우에 가장 많은 IL-1 $\beta$  분비량을 증가시키는 것으로 나타났다. 대식세포가 분비하는 GM-CSF의 분비량은 새송이 흑대두 메탄올 추출물을 제외한 나머지 모든 추출물이 대조군보다 유의하게 증가시키는 것으로 나타났다(Table 3-30, 3-31). 특히 새송이 황, 흑대두 물 추출물(381.0±35.3, 174.5±3.5)의 경우에 가장 많은 GM-CSF 분비량을 증가시키는 것으로 나타났다.

Table 3-24. Effect of soybean tofu fermented by useful molds and mycelia on the IL-6 production of RAW 264.7

		IL-6(pg/ml)						
Conditions	(-)	M.anka	Asp.awamorii	M.pilosus	새송이	새송이	동충하초	동충하초
		(황)MeOH	(황)MeOH	(황)MeOH	(황)MeOH	(황)D.W	(황)MeOH	(황)D.W
		100μg/ml	0.01μg/ml	10μg/ml	100μg/ml	10μg/ml	0.01μg/ml	1μg/ml
control	18.0±10.6							
samples		111119.5 ±827.3	7576.5 ±636.4	4006.5 ±106.0	7587.0 ±31.8	16248.0 ±141.4	17217.0 ±795.5	20299.5 ±2036.4
LPS (10μg/ml)	34884.0 ±678.8							

Table 3-25. Effect of soybean tofu fermented by useful molds and mycelia on the IL-6 production of RAW 264.7

		IL-6(pg/ml)						
Conditions	(-)	M.anka	Asp.awamorii	M.pilosus	새송이	새송이	동충하초	동충하초
		(흑)MeOH	(흑)MeOH	(흑)MeOH	(흑)MeOH	(흑)D.W	(흑)MeOH	(흑)D.W
		1μg/ml	0.01μg/ml	0.01μg/ml	0.01μg/ml	0.01μg/ml	1μg/ml	0.01μg/ml
control	18.0±10.6							
samples		6954.0 ±456.0	6916.5 ±890.9	3189.0 ±222.7	193.0±3.5	17149.5 ±254.5	14044.5 ±1527.3	7779.0 ±265.1
LPS (10μg/ml)	34884.0 ±678.8							

Table 3-26. Effect of soybean tofu fermented by useful molds and mycelia on the TNF- $\alpha$  production of RAW 264.7

Conditions	TNF- $\alpha$ (pg/ml)							
	(-)	M.anka (황)MeOH 100 $\mu$ g/ml	Asp.awamorii (황)MeOH 0.01 $\mu$ g/ml	M.pilosus (황)MeOH 10 $\mu$ g/ml	새송이 (황)MeOH 100 $\mu$ g/ml	새송이 (황)D.W 10 $\mu$ g/ml	동충하초 (황)MeOH 0.01 $\mu$ g/ml	동충하초 (황)D.W 1 $\mu$ g/ml
control	1993.7 $\pm$ 93.6							
samples		34162.5 $\pm$ 53.0	26250.0 $\pm$ 1060.6	19025.0 $\pm$ 212.1	34650.0 $\pm$ 1484.9	39487.5 $\pm$ 1856.1	30225.0 $\pm$ 636.4	36900.0 $\pm$ 1803.1
LPS (10 $\mu$ g/ml)	54975.0 $\pm$ 424.2							

Table 3-27. Effect of soybean tofu fermented by useful molds and mycelia on the TNF- $\alpha$  production of RAW 264.7

Conditions	TNF- $\alpha$ (pg/ml)							
	(-)	M.anka (흑)MeOH 1 $\mu$ g/ml	Asp.awamorii (흑)MeOH 0.01 $\mu$ g/ml	M.pilosus (흑)MeOH 0.01 $\mu$ g/ml	새송이 (흑)MeOH 0.01 $\mu$ g/ml	새송이 (흑)D.W 0.01 $\mu$ g/ml	동충하초 (흑)MeOH 1 $\mu$ g/ml	동충하초 (흑)D.W 0.01 $\mu$ g/ml
control	1993.7 $\pm$ 93.6							
samples		25612.5 $\pm$ 795.5	19925.0 $\pm$ 848.5	17300.0 $\pm$ 106.0	8336.2 $\pm$ 715.9	35512.5 $\pm$ 1962.2	39662.5 $\pm$ 3447.1	35437.5 $\pm$ 2386.4
LPS (10 $\mu$ g/ml)	54975.0 $\pm$ 795.5							



Table 3-28. Effect of soybean tofu fermented by useful molds and mycelia on the IL-1 $\beta$  production of RAW 264.7

Conditions	IL-1 $\beta$ (pg/ml)						
	M.anka (-) 100 $\mu$ g/ml	Asp.awamorii (황)MeOH 0.01 $\mu$ g/ml	M.pilosus (황)MeOH 10 $\mu$ g/ml	새송이 (황)MeOH 100 $\mu$ g/ml	새송이 (황)D.W 10 $\mu$ g/ml	동충하초 (황)MeOH 0.01 $\mu$ g/ml	동충하초 (황)D.W 1 $\mu$ g/ml
control	<7.8						
samples	<7.8	<7.8	<7.8	<7.8	13.9 $\pm$ 0.6	<7.8	8.4 $\pm$ 1.9
LPS (10 $\mu$ g/ml)	46.1 $\pm$ 1.2						

Table 3-29. Effect of soybean tofu fermented by useful molds and mycelia on the IL-1 $\beta$  production of RAW 264.7

Conditions	IL-1 $\beta$ (pg/ml)						
	M.anka (-) 1 $\mu$ g/ml	Asp.awamorii (흑)MeOH 0.01 $\mu$ g/ml	M.pilosus (흑)MeOH 0.01 $\mu$ g/ml	새송이 (흑)MeOH 0.01 $\mu$ g/ml	새송이 (흑)D.W 0.01 $\mu$ g/ml	동충하초 (흑)MeOH 1 $\mu$ g/ml	동충하초 (흑)D.W 0.01 $\mu$ g/ml
control	<7.8						
samples	<7.8	<7.8	<7.8	<7.8	16.1 $\pm$ 1.2	<7.8	<7.8
LPS (10 $\mu$ g/ml)	46.1 $\pm$ 1.2						

Table 3-30. Effect of soybean tofu fermented by useful molds and mycelia on the GM-CSF production of RAW 264.7

		GM-CSF(pg/ml)						
Conditions		M.anka	Asp.awamorii	M.pilosus	새송이	새송이	동충하초	동충하초
	(-)	(황)MeOH	(황)MeOH	(황)MeOH	(황)MeOH	(황)D.W	(황)MeOH	(황)D.W
		100 $\mu$ g/ml	0.01 $\mu$ g/ml	10 $\mu$ g/ml	100 $\mu$ g/ml	10 $\mu$ g/ml	0.01 $\mu$ g/ml	1 $\mu$ g/ml
control	<10							
samples		229.5 $\pm$ 31.8	62.0 $\pm$ 0.0	32.0 $\pm$ 0.0	154.5 $\pm$ 3.5	381.0 $\pm$ 35.3	97.0 $\pm$ 127.2	194.5 $\pm$ 17.6
LPS (10 $\mu$ g/ml)	859.5 $\pm$ 10.6							

Table 3-31. Effect of soybean tofu fermented by useful molds and mycelia on the GM-CSF production of RAW 264.7

		GM-CSF(pg/ml)						
Conditions		M.anka	Asp.awamorii	M.pilosus	새송이	새송이	동충하초	동충하초
	(-)	(흑)MeOH	(흑)MeOH	(흑)MeOH	(흑)MeOH	(흑)D.W	(흑)MeOH	(흑)D.W
		1 $\mu$ g/ml	0.01 $\mu$ g/ml	0.01 $\mu$ g/ml	0.01 $\mu$ g/ml	0.01 $\mu$ g/ml	1 $\mu$ g/ml	0.01 $\mu$ g/ml
control	<10							
samples		67.0 $\pm$ 7.0	39.5 $\pm$ 3.5	34.5 $\pm$ 24.7	<10	174.5 $\pm$ 3.5	109.5 $\pm$ 3.5	99.5 $\pm$ 17.6
LPS (10 $\mu$ g/ml)	859.5 $\pm$ 10.6							

나. 새송이 버섯 균사체로 제조한 검정콩 발효두부의 항암 및 항당뇨 효과

1) Sarcoma-180 cell을 이용한 항암효과

가) 복수암 유발 mouse의 체중 변화량

새송이 균사체를 이용하여 제조한 흑대두 발효두부 메탄올 추출물에 대한 복수암 유발 ICR mouse의 체중 변화량을 측정한 결과는 Fig 3-1과 같다. sarcoma 180 cell 접종 6일 후부터 정상 mouse의 체중 보다 증가하기 시작하여 11일에는 약 40g 정도로 정상 마우스의 체중 33g 보다 높게 나타났다. 반면에 새송이 발효두부 메탄올 추출물을 100, 200 mg/kg/day 농도로 처리한 실험군에서는 그 체중이 각각 31.5 및 30.2 g 으로 대조군에 비하여 모두 체중이 낮게 나타남을 확인 하였다.

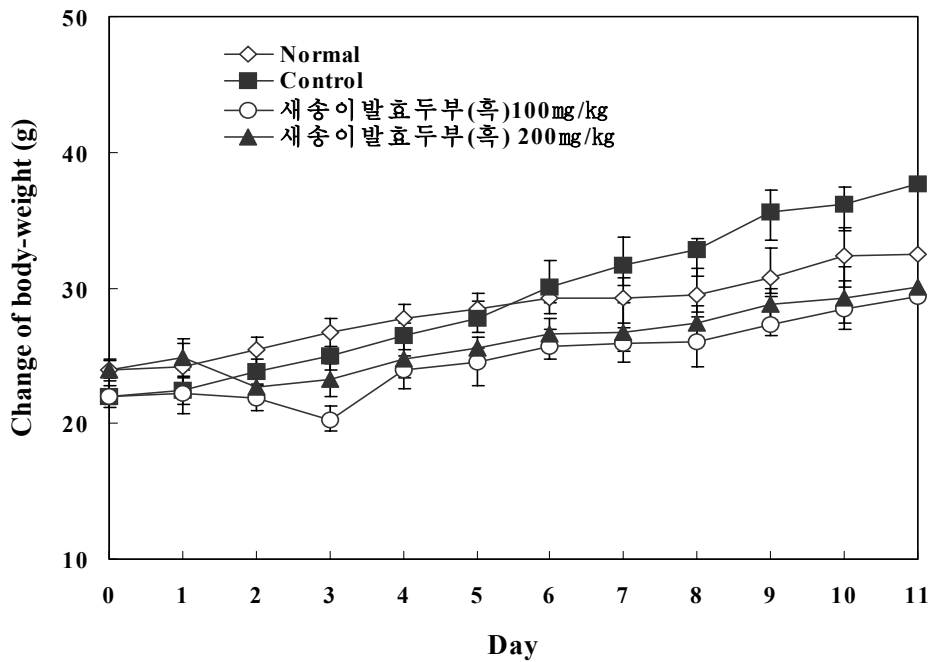


Fig 3-1. Effect of the soybean tofu fermented by *Pleurotus eryngii* mycelia on body weight in sarcoma-180 tumor bearing mice.

나) 복수암 유발 mouse의 수명연장 효과

새송이 발효두부 메탄올 추출물의 mouse에 대한 항암효과를 측정하기 위하여 ICR mouse의 복강에  $1 \times 10^6$  cells 농도로 sarcoma-180을 주입하여 복수암을 유발시킨 후 24시간 후, 새송이 발효두부 메탄올 추출물 농도를 100 및 200 mg/kg/day로 7일간 복강에 투여한 후 30일간 그 생존율을 조사한 결과는 Table 13과 같다. 시료를 처리하지 않은 복수암 유발 mouse 대조군은 21일에 모두 폐사하였으나, 새송이 발효두부 메탄올 추출물을 100 및 200 mg/kg/day 농도로 처리한 군에서는 30일 후에 각각 50 및 60 %의 높은 생존율을 나타내었다.

Table 3-32. Effect of methanol extract of soybean tofu fermented by *Pleurotus eryngii* mycelia on the survival rates in sarcoma-180 bearing mice

Sample	Dose(mg/kg)	Survival days	Survival rate(%)
Normal	-	30±0.0	100
Control	D.W	21.1±1.34	-
새송이 (후)발효두부 메탄올 추출물	100	24.7±3.56	50
	200	27.6±3.33	60

## 2) 항당뇨 검색

Streptozotocin 처리로 당뇨가 유발된 쥐에 일주일 동안 2일 간격으로 새송이 흑두부 메탄올 추출물을 복강 투여하여 혈당 변화를 측정한 결과는 Fig 3-2와 같다. 즉 6일 후 streptozotocin 처리로 유발된 대조군의 혈당치는 약 43mg/dl 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, streptozotocin 처리로 당뇨가 유발된 쥐에 새송이 흑두부 메탄올 추출물을 섭취시킨 군의 혈당 변화량은 약 22.8mg/dl 로 당뇨 대조군의 에 비하여 낮은 혈당치를 보였다.

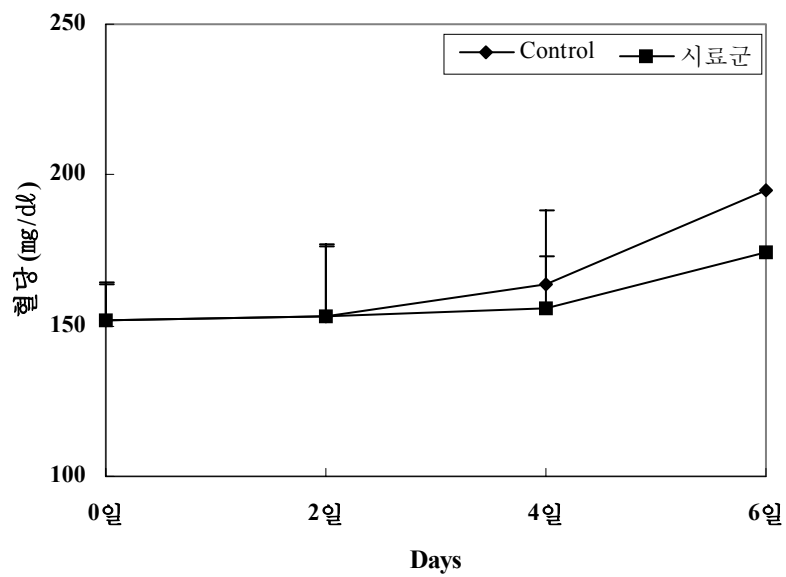


Fig. 3-2. Blood sugar changes of methanol extract of soybean tofu fermented by *Pleurotus eryngii* mycelia.

## 제 4절 순물 및 비지를 감소시킨 기능성 발효두부의 공정 개선 및 저장성 증진

### 1. 재료 및 방법

#### 가. 순물과 비지를 감소시킨 발효두부의 제조공정 개선 방안

##### 1) 순물을 줄이는 콩두부의 제조조건 확립

순물을 양을 최소화시키기 위하여 대두를 수돗물에서 12시간 침지한 후 Waring blender로 5분간 마쇄하여 원료콩 의 9배량의 물의 가해하고 100℃에서 5분간 가열한 후 여과포로 여과하여 비지를 제거하였다. 해조류는 수돗물에서 일정시간 침지한 후 원료의 50배 가수한 후 blender로 3분간 마쇄하여 펄프상으로 하여 두유의 10%(미역 5%, 다시마 5%)를 첨가하여 두부를 제조한 후 일반성분 및 관능검사를 통해 식품학적 특성을 조사하였다.

##### 2) 일반성분

일반 두부와 순물을 줄이기 위하여 미역 및 다시마를 첨가하여 제조한 두부의 일반성분은 A.O.A.C 표준시험방법에 따라 수분정량은 105℃ 상압가열건조법, 조단백질은 micro-Kjeldahl법, 무기성분 분석은 시료 1gdp 분해용액(HClO<sub>4</sub> : H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = 9: 2 : 5) 25 ml을 가하여 열판에서 무색으로 변할 때까지 가열 한후 분해 용액 100 ml로 정용하여 여과한 후 원자흡광분석기(Shimadzu AA 6501, JAPAN)로 분석하였다.

##### 3) 관능검사

일반두부, 미역첨가구, 미역+다시마 첨가구 및 다시마 첨가구 4군에 대한 관능검사는 훈련된 패널요원 20명을 통하여 평가하였으며, 이때 평가항목은 맛, 색, 조직감 3가지 항목에 대하여 평가하였고, 평가방법은 5점 척도법을 이용하였다.

나. 효소처리를 한 비지액을 활용하는 콩두부의 제조 조건 확립

1) 효소처리에 의한 콩두부의 제조

대두를 수돗물에서 12시간 침지한 후 blender로 5분간 마쇄하여 원료콩 의 9배량의 물의 가해하고 100℃에서 5분간 가열한 후 여과포로 여과하여 비지를 분리 하였다. 분리된 비지에 효소처리를 하여 두유를 85℃로 냉각시킨 뒤 응고제 citric acid를 두유량의 0.2% 첨가시켜 20분간 방치하였으며 응고된 각각의 두부를 두부 성형기 (8×10×10cm)에 부어 압착 성형하여 제조한 후 효소의 종류와 첨가량, 효소처리시간에 관해 조사하였다.

2) 효소에 의한 비지의 분해

두부를 제조할 때 비지의 양을 줄이고 두유의 양을 증가시키기 위하여 비지를 분해할 수 있는 효소로는 Cellulase (1.96unit/mg, C-1148 From *Aspergillus oryzae*), Pectinase (19unit/mg, P-4716 From *Aspergillus niger*), Hemicellulase (1.5unit/mg, H-2125 From *Aspergillus niger*) 및 Protease (0.6unit/mg, P-4032 From *Aspergillus oryzae*)를 Sigma로부터 구입하여 사용하였다. 두부를 제조할 때 발생하는 비지는 먼저 50℃의 dry oven에서 2일 동안 건조시켜 건조비지를 만든 다음, 100 mL의 삼각 플라스크에 증류수 24 mL와 비지 1 g 넣고 잘 혼합한 후 멸균시켜 사용하였다. 멸균된 비지에 미리 준비해둔 4종류의 효소를 Table 4-1 과 같이 5가지의 시험구로 조합하여 시료용액에 대하여 200unit/mL가 되도록 첨가하여 40℃에서 3시간동안 반응시켜 비지의 분해정도를 검토하였다. 대조구는 효소 대신에 증류수를 첨가하여 동일 조건으로 검토하였다. 분해한 비지는 여과지로 여과한 후 상압건조법에 따라 비지의 건조중량을 측정하여 비지의 분해정도를 백분율(%)로 나타내었다.

$$\text{비지의 분해율(\%)} = \frac{\text{분해전의 비지의 중량} - \text{분해 후 비지의 건조중량}}{\text{분해전의 비지의 중량}} \times 100$$

Table 4-1. 비지의 분해를 위하여 사용한 효소의 첨가량 및 효소의 조합

효소 시험구	Cellulase	Pectinase	Hemicellulase	Protease
A	-	-	2,500U	2,500U
B	-	1,660U	1,660U	1,660U
C	1,660U	1,660U	1,660U	-
D	1,660U	1,660U	-	1,660U
E	1,250U	1,250U	1,250U	1,250U



다. 박테리오신 및 유산균을 활용한 「유산균 발효두부의 저장성 증진」 방안

1) 고 박테리오신 생산 균주의 배양액 생산조건 최적화

가) 재료

항균미생물의 발효용액이 두부의 저장성에 미치는 영향을 검토하기 위한 균주로는 장류발효 미생물로서 항균성이 우수한 것으로 밝혀진 *Bacillus subtilis* HS-25는 한국 전통발효식품연구소로부터 분양받았으며, *Lactobacillus bulgaricus* KCTC-3635, *Lactobacillus acidophilus* KCTC-3168 및 *Lactobacillus reuteri* KFRI-00661의 유산균은 생명공학연구소 유전자은행으로부터 분양받아 사용하였다.

나) 배지 및 균주의 배양방법

두부의 저장성 검토를 위한 *Bacillus subtilis* HS-25의 배양은 soluble starch 1%, yeast extract 0.5%, peptone 0.5%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 로 구성된 배지(SY배지)를 사용하였고, 유산균은 MRS배지를 사용하여 배양하였다.

2) 박테리오신과 유산균 첨가 발효두부의 저장성 증진효과 확인

가) 발효두부의 저장성 확인

환경조건에 따른 두부의 저장성을 검토하기 위하여 항균미생물로 밝혀진 *Bacillus subtilis* HS-25와 유산균인 *Lactobacillus bulgaricus* KCTC-3635, *Lactobacillus acidophilus* KCTC-3168 및 *Lactobacillus reuteri* KFRI-00661의 각 전 배양용액을 본 배양 배지인 SY배지 및 MRS 액체배지에 각각 5%(V/V) 접종한 후, 35℃에서 24시간 배양한 다음 8,000×g로 원심 분리하여 얻은 상등액에 두부를 침지시켜 실온에 보존하면서 두부의 부패정도를 관능적으로 관찰하였다.

나) 발효두부의 물성 측정

텍스처는 두부를 1×1×1cm의 크기로 절단하여 Rheometer(Compac-100, Sun scientific Co., Japan)을 사용하여 견고성(hardness), 탄력성(springiness), 응집성(cohesiveness), 점착성(gumminess) 및 파쇄성(brittleness)을 측정하였다. 측정조건은 sample width, sample height 및 sample depth를 각각 20mm, sample moves 10mm,

table speed 60mm/min., probe diameter 10mm로 하였다.

다) 발효두부의 관능검사 측정

*M. anka*, *M. pilosus*, *A. awamori*, *A. awamori*, 동충하초 및 새송이 균주를 활용하여 제조한 발효두부의 관능검사 항목으로 물성, 견고성, 탄력성, 향, 냄새 및 색에 대해 20명의 관능검사요원을 선정하여 15일간 발효된 기능성 발효두부의 맛, 색, 향, 선호도 등을 5점법으로 측정하였다.

## 2. 결과 및 고찰

### 가. 순물을 줄이는 콩두부의 제조조건 확립

#### 가) 순물을 줄이는 두부 제조 공정

노랑콩을 수돗물에서 12시간 침지한 후 Waring blender로 5분간 마쇄하여 원료콩의 9배량의 물의 가해하고 100℃에서 5분간 가열한 후 여과포로 여과하여 비지를 제거한 후 순물을 줄이기 위해 해조류는 수돗물에서 일정시간 침지한 후 원료의 50배 가수한 후 blender로 3분간 마쇄하여 펄프상 으로 하여 두유의 10%(미역 5%, 다시마 5%)를 첨가하여 두부를 제조하였다(Fig 4-1).

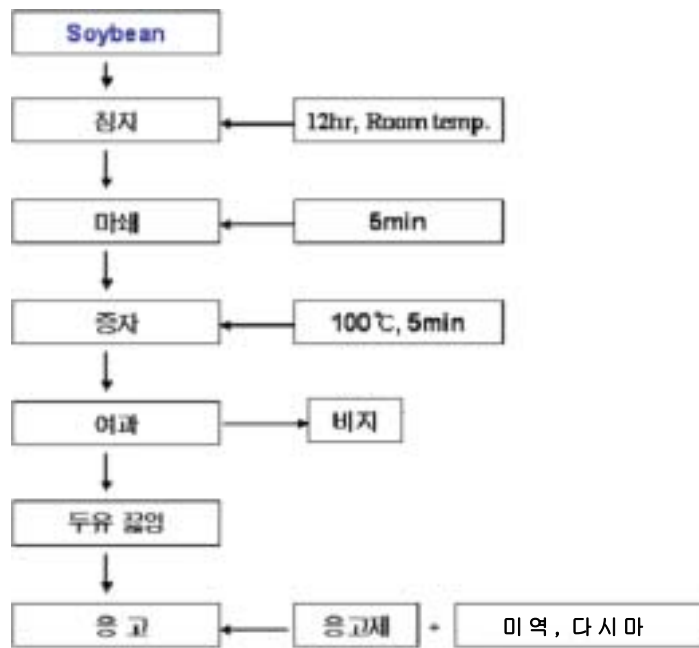


Fig. 4-1. 순물을 줄이기 위한 콩두부의 제조 공정.

#### 나) 일반 성분

일반두부와 순물을 줄이기 위하여 해조류 중 미역, 다시마를 선택하여 3군으로 설정하여 제조한 두부의 일반성분을 조사한 결과는 Table 4-2, 4-3과 같다.

즉 대조구 일반두부의 수율은 250%이었으며, 미역 첨가구(270%), 미역 및 다시마 혼합구(269%) 다시마 첨가구(263%) 순으로 대조구에 비하여 수율이 증가함을 확인하였다. 또한 수분함량은 두부의 수율이 높았던 미역과 다시마 첨가구가 다소 높았으며, 조단백질 함량은 미역, 다시마 첨가구가 대조구에 비하여 높았다. 미역, 다시마 첨가두부의 무기물 함량은 대조구에 비하여 미역 첨가구에서는 Ca은 다시마 첨가구에서는 K, Na은 미역 다시마 첨가구에서 높게 나타났다.

Table 4-2. Proximate composition on tofu prepared from soybean milk and seaweeds

Seaweeds	Yield(g)	Moisture(%)	Protein
None	250 ±0.2	79.5 ±0.3	7.88 ±0.4
미역	270 ±0.3	82.3 ±0.1	8.65 ±0.5
다시마	262 ±0.1	81.2 ±0.3	8.34 ±0.5
미역 + 다시마	278 ±0.2	83.7 ±0.5	8.78 ±0.3

Table 4-3. Contents of minerals in on tofu prepared from soybean milk and seaweeds

(unit: %)

Seaweeds	Ca	K	Mg	Na
None	220±0.34	479±0.11	613±0.56	159±0.67
미역	225±0.23	844±0.90	589±0.33	164±0.23
다시마	216±0.22	924±0.32	654±0.23	162±0.21
미역 + 다시마	222±0.12	913±0.44	644±0.12	163±0.12

다) 관능검사

해조류 첨가두부를 맛, 색, 조직감 3가지 항목으로 관능 평가한 결과 대조구에 비하여 맛은 미역을 첨가한 구가 가장 좋았으며, 다시마와 미역과 다시마를 혼합구에서는 좋은 평가를 보이지 않았다. 색은 대조구에 비하여 대체적으로 양호한 것으로 평가되었다. 이는 해조류를 첨가하면 맛이 담백해지나 약간 냄새를 내기 때문인 것으로 사료된다. 조직감은 미역과 다시마를 첨가한 것이 양호하였다.

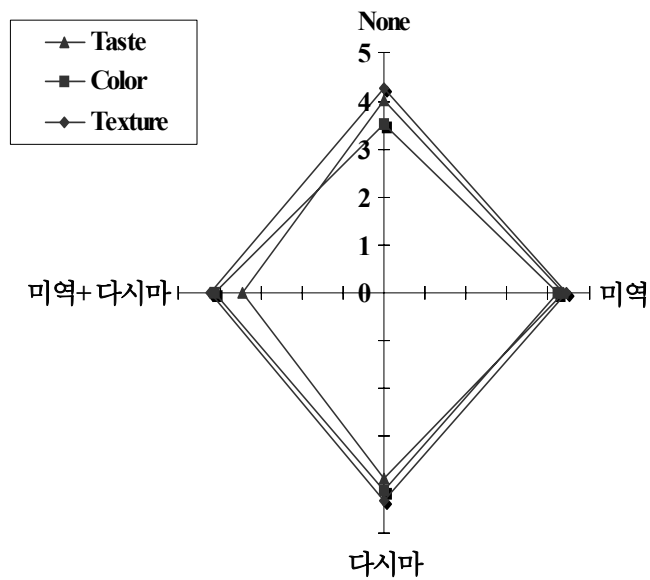


Fig. 4-2. Sensory of tofu prepared form soybean milk and added sea mustard.

나. 효소처리를 한 비지액을 활용하는 콩두부의 제조 조건 확립

가) 효소처리를 한 비지액을 활용하는 콩두부 제조 공정

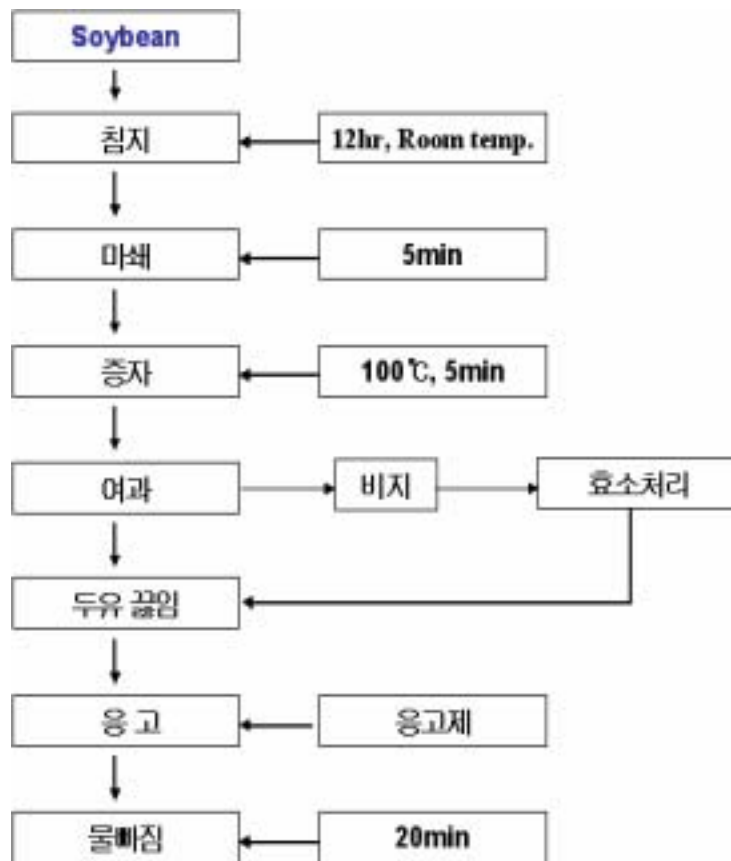


Fig. 4-3. 효소처리를 한 비지액을 활용하는 두부 제조 공정

나) 효소에 의한 두부비지의 분해

효소의 종류가 비지의 분해에 미치는 영향을 검토하여 Fig 4-4에 나타내었다. Cellulase, pectinase, hemicellulase 및 protease의 효소를 여러 조합으로 혼합하여 200 unit/mL로 첨가하고 비지의 분해정도를 검토한 결과 대조구에서는 비지의 분해가 거의 일어나지 않았지만 A 시험구에서는 약 40%, B 시험구는 약 30%, C와 D의 시험구는 약 15%, E 시험구는 10% 정도의 분해율을 나타내어 비지의 분해에는 hemicellulase 및 protease의 효소가 깊이 관여하고 있으며 또한 효소의 첨가량도 중요하다는 것을 알 수 있었다.

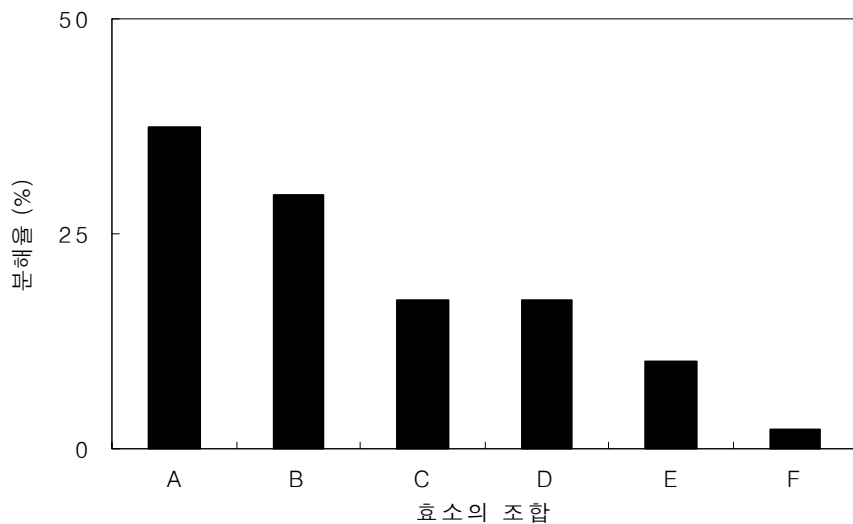


Fig. 4-4. 여러 종류의 효소가 비지의 분해에 미치는 영향.

A: hemicellulase + protease, B: pectinase + hemicellulase + protease,  
 C: Cellulase + pectinase + hemicellulase, D: Cellulase + pectinase + protease,  
 E: Cellulase + pectinase + hemicellulase + protease. F: 증류수



다. 박테리옌 및 유산균을 활용한 「유산균 발효두부의 저장성 증진」 방안

가) 항균 미생물에 의한 발효두부의 저장성

두부의 저장성을 검토할 목적으로 유산균인 *Lac. bulgaricus* KCTC-3635, *Lac. acidophilus* KCTC-3168, *Lac. reuteri* KFRI-00661 및 항균활성이 우수한 것으로 밝혀진 *B. subtilis* HS-25의 배양용액에 두부를 침지하여 실온에 방치하면서 두부의 부패정도를 관찰하여 Fig. 5 에 나타내었다. *B. subtilis* HS-25의 배양용액 및 대조구로 수돗물에 침지시켜 저장한 두부는 방치 2일 후부터 표면에 얇은 피막이 형성되면서 이취가 발생하기 시작하여 3일째부터는 역겨운 이취가 발생하여 침지한 두부가 심하게 부패되고 있음을 알 수 있었으나 유산균의 배양용액에 침지한 두부는 7일이 지나도 이취의 발생 및 피막의 형성도 없으면서 두부에 아무런 변화가 일어나지 않았다.

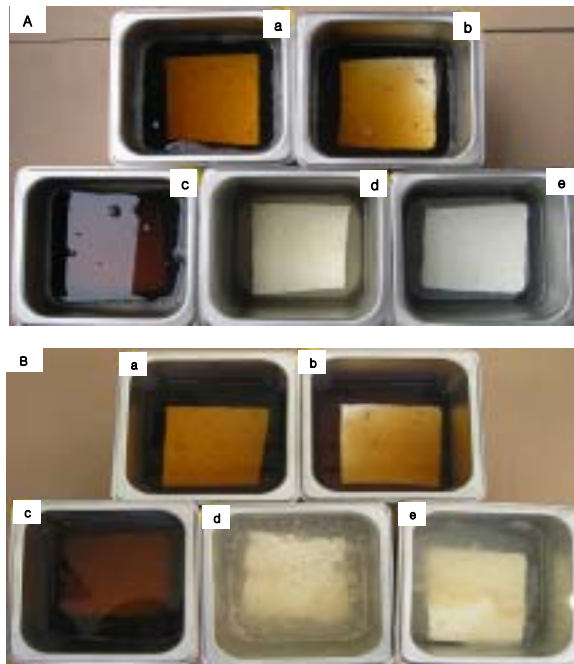


Fig. 4-5. 유산균 및 항균미생물이 두부의 저장성에 미치는 영향.

A ; 두부를 침지한 직후, B ; 두부를 3일 동안 침지

a; *Lac. bulgaricus* KCTC-3635, b; *Lac. acidophilus* KCTC-3168,

c; *Lac. reuteri* KFRI-00661, d; *B. subtilis* HS-25, e ; 수돗물

#### 나) 발효 두부의 관능검사

발효 황두부 및 흑두부에 대한 관능검사의 결과를 Table 4-4에 나타내었다. 두부의 종류에 따라서 살펴보면 발효 흑두부보다 발효 황두부가 질감, 견고성 및 탄성 등이 우수한 것으로 나타났으며, 발효시킨 균주에 따라서는 질감, 견고성 및 탄성 등이 *M. anka*, *M. pilosus* 및 *A. awamori*의 곰팡이로 발효시킨 황두부 및 흑두부는 거의 비슷한 값을 나타내었으나 버섯을 접종한 2 시험구에서는 상당히 높은 값을 나타내었다. 풍미는 버섯의 균사로 발효시킨 두부가 우수하였으며 이취도 전혀 없는 것으로 나타났다. 특히 동충하초의 균사로 발효시킨 두부는 향긋한 풍미로 인하여 두부 특유의 냄새가 전혀 없어 매우 높은 값을 나타내었다. 발효두부의 색상은 검은 포자로 뒤덮인 *A. awamori*로 발효시킨 두부의 선호도는 매우 낮은 값을 나타내었지만 그 외의 두부는 거의 비슷한 값을 나타내어 종합적인 선호도는 동충하초 및 새송이 버섯으로 발효시킨 두부가 우수한 것으로 나타났다.

Table 4-4. 여러 가지 균주를 달리한 발효 두부의 관능검사.

Tofu	Strains	Texture	Firmness	Elasticity	Flavor	Off-odor	Color	Overall
발효 황두부	<i>Control</i>	4.0	4.2	4.0	4.2	3.2	4.0	4.2
	<i>M. anka</i>	4.5	4.1	4.2	4.3	3.1	4.2	4.3
	<i>M. pilosus</i>	4.5	4.2	4.1	4.4	3.1	4.1	4.1
	A	4.4	4.2	4.2	4.0	3.7	2.5	2.6
	<i>awamori</i>	4.4	4.2	4.2	4.0	3.7	2.5	2.6
	동충하초	4.7	4.8	4.7	4.9	1.6	4.5	4.7
	새송이	4.7	4.8	4.7	4.7	1.8	4.5	4.8
발효 흑두부	<i>Control</i>	3.8	3.8	3.8	4.1	3.1	4.0	4.1
	<i>M. anka</i>	4.1	4.0	3.9	4.2	2.8	4.1	4.3
	<i>M. pilosus</i>	4.0	4.1	3.9	4.2	3.0	4.1	4.3
	A	4.2	4.1	3.8	4.0	4.0	2.6	2.5
	<i>awamori</i>	4.2	4.1	3.8	4.0	4.0	2.6	2.5
	동충하초	4.4	4.4	4.3	4.8	1.5	4.4	4.9
	새송이	4.4	4.4	4.2	4.7	1.6	4.5	4.9

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

연구목표	연구개발목표의 달성도	관련분야의 기술발전에의 기여도
홍국균, 흑국균 및 버섯 균사체를 이용하여 기능성 발효 제조 조건 확립	홍국균, 흑국균 및 버섯 균사체를 이용하여 발효두부의 제조 조건을 확립하였다.	홍국균과 흑국균 및 버섯 균사체를 이용하여 발효두부의 개발기술을 확립하였다.
홍국균, 흑국균 및 버섯 균사체로 발효시킨 검정콩 발효두부의 향산화 및 항당뇨 활성 측정	발효두부의 향산화 및 항당뇨 효과를 확인하였다.	발효두부에 대한 기능성을 구명하였다.
홍국균, 흑국균 및 버섯 균사체로 발효시킨 발효두부의 항암 및 면역 활성 측정	발효두부의 항암 및 면역활성을 확인하였다.	발효두부 추출물의 기능성을 구명하였다.
순물과 비지를 감소시키는 발효 두부의 제조공정 개선 방안 확립	해조류 첨가 및 효소처리에 의한 순물 및 비지를 감소시키는 제조 공정을 확립하였다.	순물과 비지를 감소시키는 발효두부의 제조 공정을 확립하였다.
박테리오신 및 유산균을 이용하여 유산균 발효두부의 저장성 증진	박테리오신 및 유산균 배양액 조건 확립 및 유산균 발효두부의 저장성 확인, 관능평가 등을 조사하였다	유산균 발효두부의 저장성 증진 방안을 확립하였다.

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

### 제 1절 연구개발 효과

#### 1. 기술적 측면

- 가. 콩의 성분을 모두 함유한 바로먹는 기능성 발효두부 제조 가능함을 기대된다.
- 나. 현재 시판되고 있는 두부의 저장성에 문제점 해결이 기대된다.
- 다. 발효두부의 식품학적 분석 및 다양한 생리 활성의 입증이 기대된다.
- 라. 농가보급형 발효두부 제조장치의 개발 가능할 것으로 기대된다.
- 마. 기능성이 강화된 검정콩 발효두부 개발 가능할 것으로 기대된다.

#### 2. 경제 · 산업적 측면

- 가. 벤처화하여 고기능성, 고부가가치 상품으로 활용
- 나. 가격 폭락 등 불안정한 농산물 가격 안정화 및 고부가성
- 라. 국내뿐만 아니라 수출상품으로 개발
- 마. 외국인 취향의 수출 가능한 이색 두부의 개발 가능
- 바. 생물공학기술에 의한 발효두부의 제조 및 대량생산을 위한 최적화공정 확립
- 사. 각 개발제품 제조기술의 국내 및 국제특허를 출원으로 선도기술 확보
- 아. 건강지향성 소비자 욕구에 부합한 기능성 강화 발효두부 개발로 농가소득 증대

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 가. 두부제조에 관한 국외문헌을 보면, 콩 품종에 따른 두부의 수득율과 품질을 조사
- ⇒ 5가지 품종의 미국산 대두와 일본산 대두로 두부를 제조한 결과 원료콩의 단백질 함량이 높을수록 두부의 단백질 함량은 증가하고, 가공과정 중 콩으로부터 단백질 추출율이 증가할수록 두부 수득율도 증가함
- 나. 일본산과 미국산 대두를 품종별로 콩의 이화학적 특성과 두부를 제조하여 품질 특성과 수율 조사
- ⇒ 제조된 두부에서 두부 고유의 맛과 texture를 갖고 있었으며, 두부 수율, 단백질 회수율과 두부의 경도, 또한 두부의 성분, 색상에서는 차이가 남
- 다. 국외 발효식품으로는 치즈, 버터, 요구르트 등 유제품을 통한 발효식품이 개발되고 있음
- 라. 주로 동남아시아 지역에 넓고 다양하게 분포되어 있으며, 중국이나 대만의 두부에 곱팡이를 번식시킨 후 이것을 술이나 된장 또는 간장 덩에 담가서 숙성시켜 치즈와 같은 감촉이 있고 풍미도 치즈와 비슷한 Sufu
- 마. 최근 인도네시아에서는 콩으로 발효시켜 띄운 후에 단자 모양으로 뭉친 것을 손으로 눌러서 납작하게 만들고 햇볕에 건조시킨 보존성이 있는 식품인 Taokoan, 필리핀의 Tahurik, 태국의 Tauhu yee, 일본의 Tofutyo 등이 그 대표적인 두부 발효 식품에 속한다.
- 바. 우리 나라에서는 대두를 이용한 치즈 제조에 관한 일부 단편적인 연구만이 있을 뿐 다양한 두부 발효식품에 대한 연구는 거의 미흡하고, 두부의 저장성을 높이기 위한 박테리오신 및 유산균을 이용한 저장성 연구는 전무한 실정이다.

## 제 7 장 참고문헌

1. Anthony, M. S., Burke, G. L., C. L. Jr and Clarkson, T. B. 1995, Does soyimprove coronary heart disease risk. *Circulation*. 91, 925-934.
2. Arjmandi, B. H., Alekel, L., Hollis, B. W. and Kukerja, S. C. 1995. Dietary soybean protein prevents bone loss in an ovariectomized rat model of osteoporosis. *J. Nutr.* 126, 161-166.
3. Boo-Yong Lee, Dong-Man Kim and Kil-Hwan Kim, Studies on the Processing Aptitude of the Korean Soybean Cultivars for Soybean Curd, 1990, *Kor J. Food Sci. Technol.* Vol. 22
4. Chung, C. Y. and Toyomizu, M. 1968, Studies on discoloration of fish products. V. mechanism of rusting in amino acid - reducing sugar - lipid system. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 34, 857-863.
5. Champagene, C. P., B. Aurouze and G. Goulet. 1991, Inhibition of undesirable gas production in Tofu. *J. Food Sci.* 42, 1448-1450.
6. Potter, S. M. 1995, An overview of proposed mechanisms for the hypocholesterolemic effect of soy. *J. Nutr.* 125, 606-610.
7. Kennedy, A. R. 1995, The evidence for soybean products as cancer preventive agents. *J. Nutr.* 125, 733-740.
8. Miskovsky, A. and M. B. Stone. 1987, Effect of chemical preservatives on storage and nutrient composition of soybean curd. *J. Food Sci.* 52, 1535-1537.
9. Wu, M. T. and D. K. Salunkhe. 1977, Extending shelf-life of fresh soybean curds by in-package microwave treatments. *J. Food Sci.* 56, 1600-1603.

10. Reddy, N. R. 1986. Legume-based fermented foods. CRC press, Inc., USA.
11. Wang, H. L. and Hesseltine, C. W. 1970, Sufu and Laochao. *J. Agr. Food Chemistry*. 18, 572-580.
12. Maarse, H. and Kepner, R. E. 1970, Changes in composition of volatile terpenes in douglas fir needles during maturation. *J. Agr. Food Chemistry*. 18, 1095-1097.
13. Sul, J.Y., Song, I.S., Chang, E.S., 1995, Metastatic potential of human colon cancer cell lines, LoVo and SW480. *J. Korean Cancer*. 27(2) 209-222
14. Kim, B.H., 2003, Anticancer activities of cytotoxic substances isolated from *cornus officinalis* sieb. et Zucc. Sunchon National University.
15. Dong Man Kim and Kil Hwan Kim, Removal of Water Soluble Solids from Soybean Curd Whey by Reverse Osmosis and Chemical Characteristics of the Retentate
16. Seong-Hee Seo and In-Kyeong Hwang, Ultrafiltration of Soybean Curd Whey for the Separation of Functional Components, 1997, *Kor J. Soc. Food Sci.* Vol. 13.
17. Kyung-Hyung Ku and Woo-Jung Kim, Status and Prospect of Soybean curd(Dubu) Industry in Korea, 1999, *Kor Soybean Digest*.
18. Ju-young Kim, Jun-Han Kim, Jong-Kuk Kim and Kwang-Deog Moon, Quality Attributes of Whole Soybean flour Tofu Affected by Coagulant and Theirs Concentration, 2000, *Kor J. Food Sci. Technol.* Vol. 32



19. Ji-Suk lim, Eun-Ja Cho, The physicochemical characteristics of silk-tofu added with medicinal herb powder preserved in kochujang and deonjang (Tofujang), 2005, *Kor J. Food Cookery Sci.* Vol. 21
  
20. Myung-Ryun Han, Ae-jung Kim, Kun-Sub Chung, Soo-jung Lee, and Myung-Hwan Kim, Development of Optimum Processing Conditions for Soybean Curd.
  
21. Yun-Kyoung Lee, Studies on Physicochemical Properties and Functional Components of Soybean Soading Water and Soybean-curd Whey. 1997
  
22. Ji-Young Jung, Eun-Ja Cho, The effect of Grren tea Powder levels on Storage Chracteristics of Tofu, 2002, *Kor J. Soc. Food Cookery Sci.* Vol. 18
  
23. Kie Hwan Chun, Byung Uong Kim, Tae Il Son and Young Tae Hahm, The Extension of Tofu Shelf-Life with Water-Soluble Degraded Chitosan as Immersion Sloution, , *Kor J. Food Sci. Technol.* 29 1997
  
24. Kang HI, Kim JY, Moon KD, Seo KI, Cho YS, Lee SD, Yee ST. Effect of the crude polysaccharide of *Pleurotus eryngii* on the activation of immune cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 33, 10

## 주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.