

발 간 등 록 번 호

11-1541000-001060-01

과제번호 308006-03

**삼(Hemp)의 효능을 이용한 LOHAS형 식품
및 포장제품 개발
(농림기술개발연구과제)**

(Development of LOHAS Foods and Packaging Products from Hemp)

삼 종실의 특성 및 기능성 연구 (제1세부)
삼 식품 소재 및 제품의 식품 안전성 연구(제2세부)
삼 종실을 이용한 식품중간소재, 제품 개발(제1협동)
삼 종실을 이용한 대중 소비형 음료, 두부 제품 개발(제2협동)
삼 섬유를 이용한 포장제품 개발(제3협동)

건국대학교

농 립 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 농림기술개발연구과제(세부과제 “삼(Hemp)의 효능을 이용한 LOHAS형 식품 및 포장제품 개발”)의 보고서로 제출합니다.

2011 년 11 월 30 일

주관연구기관명 : 건국대학교

주관연구책임자 : 김 은 수

세부연구책임자 : 이 경 호

연 구 원 : 오 승 은

연 구 원 : 최 양 규

연 구 원 : 조 경 상

협동연구기관명 : 공주대학교

협동연구책임자 : 류 기 형

협동연구기관명 : 한국식품연구원

협동연구책임자 : 박 용 곤

협동연구기관명 : 강원대학교

협동연구책임자 : 이 명 구

위탁연구기관명 : 순천향대학교

위탁연구책임자 : 이 미 영

위탁연구기관명 : 고려대학교

위탁연구책임자 : 이 성 준

요 약 문

I. 제 목

삼(Hemp)의 효능을 이용한 LOHAS형 식품 및 포장제품 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

○ 연구개발의 필요성

(가) 삼 종실은 불포화지방산인 올레산, 리놀산, 리놀렌산이 90% 차지하고 있으며 특히 면역작용에 역할을 하는 감마리놀렌산이 3% 포함되어 있어 고기능성 식품으로서 개발 시 우수한 식품원으로 기대됨

(나) 삼 종실의 구성 성분으로 미루어 보아, 당뇨치료 효과와 심장혈관질환의 예방 및 치료에 충분히 효과가 있을 것으로 예상되어 삼의 당뇨치료 및 고지혈증 치료효과가 과학적으로 입증되고 차별화된 삼 제품이 개발되면 큰 경쟁력을 가질 수 있을 것으로 기대됨

(다) 삼 섬유는 가장 오래전부터 사용해온 천연섬유의 하나로서 인장강도가 크고, 섬유의 길이가 가장 길며, 셀룰로오스의 함량이 매우 높고 리그닌의 함량은 매우 낮은 우수한 섬유소재임

(라) 비목재 섬유인 삼을 국내에서 재배하여 펄프를 제조한 후 용도에 적합한 drip mat지, 포장지와 같은 각종 고부가가치 특수기능지 제조 기술을 개발한다면 산림자원의 보호와 지구온난화를 방지 및 국내 제지산업 발전에 기여하며, 국내 비목재펄프 생산으로 목재펄프 수입대체 효과 및 삼 대량재배에 의한 농가소득에 기여할 것으로 기대됨

○ 연구개발의 목적

(가) 삼 종실의 특성 연구 및 LOHAS형 식품 개발

- ① 삼 종실 함유물질을 이용한 식품소재 개발
- ② 삼 종실로부터 유용 단백질 및 지방산 추출기술 확보
- ③ 삼 종실과 착유박을 이용한 breakfast cereal, energy bar, bakery 제품개발
- ④ 삼 종실을 이용한 대중 소비형 음료, 두부 제품 개발을 위한 핵심 원천기술을 확립하고 상품화를 위한 공정 모델 설정
- ⑤ *in vitro* 및 *in vivo* system을 이용하여 삼 종자 식품 소재와 삼 식품의 유효성 및 안전성 검증

(나) 삼 섬유 소재의 특성 연구 및 식품 포장 제품 개발

- ① 산림자원을 보호하기 위한 종이 원료의 대체자원으로 중요한 삼을 국내에서 재배하여 식품 포장 제품 관련 기술 개발

III. 연구개발 내용 및 범위

(가) 삼 종실의 특성 및 식품 안전성 연구

- ① 삼 종실의 유용 단백질 및 지방산 추출기술 확보
- ② 삼 종실과 삼 품종 간 단백질 프로파일 분석을 통한 유용단백질 발굴 및 분포 조사
- ③ 삼 종실 추출물의 지질대사조절 및 혈당조절 기능성 평가
- ④ 삼 종자의 수용성 및 지용성 추출물과 삼 식품소재의 유효성 및 안전성 연구

⑤ 실험동물을 이용한 삼 종실 추출물 및 삼 식품의 기능성 연구

(나) 삼의 효능과 기능성을 이용한 LOHAS형 식품의 개발

- ① 삼 종실원료의 정선, 파쇄, 가온, 압편, 증자 등의 착유 전처리단위조작에 대한 분석
- ② 압출성형공정변수 배럴온도, 수분함량, 스크루 회전속도, 사출구 등의 조절을 통하여 삼 종실의 착유수율 증대 및 품질향상을 위한 전처리공정과 삼 종실유 및 착유박의 분석과 중간소재화의 기술개발
- ③ 삼 종실의 탈피종실, whole meal, 탈지박분말, 분리단백질, 섬유소 등의 품질특성의 분석과 다양한 식품중간소재를 개발
- ④ 삼 종실 및 착유박 중간소재를 활용한 삼기능성 성분강화 breakfast cereal, energy bar, bakery 제품 개발
- ⑤ 물리, 효소적 처리를 통한 적정 추출조건 및 음료화를 위한 향미조절 기술, 음료의 살균, 저장 중 품질 안정화 기법을 개발하고, 대중 소비형 삼 종실 음료를 개발
- ⑥ 냉동분쇄 기법 등을 이용한 미분쇄 조건, 반응표면분석법을 이용한 농도 설정, 열처리시간, 단일 또는 혼합응고제를 이용한 최적 응고 조건, 천연 gelling agent와 탄수화물분해효소를 이용한 조직감 개선 연구를 통하여 대중 소비형 두부 제품을 개발
- ⑦ 종실로부터 최적 음료용 밀크 가공공정 설정 및 밀크 음료의 안정화 기술 개발
- ⑧ 종실 밀크 음료의 품질 개선, 제품 다양화 기술 개발 및 음료의 산업적 생산공정 분석
- ⑨ 종실 밀크 이용 두부 제조 적정 조건 설정 및 두부 조직감 개선과 저장성 검토

(다) 삼 섬유 소재를 이용한 식품포장제품 개발

- ① 삼 섬유의 화학성분을 분석하고 화학펄프화법과 기계펄프화법을 실시하여 용도에 따른 식품 포장 및 필터 소재용 펄프 제조
- ② 용도에 적합한 표백약품, 농도, 침가량 및 표백단에 관한 연구 실시
- ③ 펄핑과 표백 공정을 거친 펄프는 CSF(Canadian standard freeness)로 각각의 고해도를 조절하여 종이를 제조하고 물리적 특성 및 광학적 특성을 분석하여 drip mat지, 포장지와 같은 용도에 따라 최종 제품에 적합한 제조 조건 선정

IV. 연구개발결과

(가) 삼 종실의 특성 및 식품 안전성 연구

- ① 햄프종자의 구조적 분석 결과 자엽세포는 단백질과립과 지질과립이 가득 차 있었지만, 배축세포의 세포질에는 액포로 차있고, 이들 저장과립은 드물게 분포함
- ② GC-MS를 이용한 삼 종실 추출물의 성분 분석 결과 팔미트산, 오레익산 등의 여러 가지 지방산과 vitamin E 의 분체인 토코페롤, 콜레스테롤수치를 낮추는 것으로 알려진 캄페스테롤 등의 다양한 물질들이 검출
- ③ 산-염기 침전법과 크로마토그래피를 사용한 간편한 청삼 단백질 분리정제 공정 구축으로 생산성 향상 및 산업화 기반 기술 구축함
- ④ 삼 종실 내 발현된 전체 단백질 프로파일 분석 결과 1,102개의 단백질 스팟을 분리하였고, 그 결과를 생체 내 유용 단백질 및 항산화 관련 단백질 등의 기능성 유용 단백질을 도출함
- ⑤ 청삼 품종의 감별 마커를 제작하기 위해, 제천, 당진, 보성, 정선, 안동 지역의 삼 품종을 분석한 결과 *rbcL*, *THC synthase*, *fatty acid elongase 3-Ketoacyl-CoA syntahse gene (KCS)* 서열을 청삼을 감별하는 분자 마커 개발
- ⑥ Hexane, ethyl acetate 및 물을 이용하여 polarity 에 따른 순차적 추출을 수행한 결과 추출수율은 hexane 추출물이 30% 로 가장 높은 수율을 보였으며, ethyl acetate 및 물 추출물은 각각 0.36%

와 0.2% 로 수율이 hexane 추출에 비해 매우 낮았으며, 초음파 추출법은 추출수율은 20% 로 기존의 용매추출법으로 추출했을 경우보다 낮게 나타났으나, 추출시간은 많이 단축할 수 있었음

- ⑦ 삼중실의 다양한 세포주에서의 독성 조사 결과 쥐의 심근세포주인 H9C2 세포, 사람의 유방암 세포주인 MCF7 세포, 쥐의 난소 세포주인 CHO DHFR- 세포주는 삼중실유 처리에 의해 세포의 생존율에 변화가 나타나지 않았음
- ⑧ 동물세포 및 모델 동물에 대한 삼중실 추출물 처리 및 섭취실험결과 동물의 성장률 및 생식력 증진, 항암 효과, 비만억제 효과, 면역세포 이상증식 억제 효과 등이 관찰됨. 특히 초파리 성장률과 생식력을 증가하는 효능을 보였는데 이는 특히 삼중실내 비극성 성분에 의한 것으로 추정됨
- ⑨ 한편, 삼중실 hexane 추출물은 항암제인 독소루비신에 의한 세포사멸을 가중시켜 사람 폐암세포의 증식을 억제하는 항암 효과를 보였으며, A549 (폐암), HCT-15 (결장암), HepG2 (간암) 3종류의 암 세포주에서 시간이 경과함에 따라 세포 생존율이 유의하게 감소됨
- ⑩ 류마티스 환자 활막세포주의 이상증식 억제 효과를 보였는데, 이 과정에서 소포체 스트레스가 삼중실 추출물에 의한 세포 사멸을 유도하는 원인이며 CHOP 이 사멸 과정에서 주요한 역할을 하는 factor 로 작용함을 밝힘
- ⑪ 물 추출물을 투여한 실험군이 대조군에 비해 유의성 있게 체중 증가율을 감소시켜 물 추출물이 비만 예방 효과가 있음이 확인됨. Oil red O 로 염색한 후 병변의 크기를 분석한 결과 동맥경화 병변이 대조군 (물 투여군)에 비해 물 추출물을 투여한 실험군에서 유의성 ($p < 0.05$) 있게 감소하였으며, 물 추출물에 의해 동맥경화가 억제되는 것이 확인됨
- ⑫ 3T3L1 adipocyte 를 이용하여 삼중실 추출물이 포도당 흡수에 미치는 영향을 측정된 결과 25, 50 및 100 ug/mL 농도의 삼중실 추출물 처리군은 insulin에 비해 각각 86, 73 및 71%의 포도당 흡수도를 나타내었으며, insulin 처리군과 비교하였을 때 유의적인 흡수효과를 보임
- ⑬ HepG2 cell 에 삼중실 추출물 100 ug/mL 를 처리 후 지방산 흡수도를 측정된 결과, 100 ug/mL 농도의 삼중실 추출물 처리군은 대조군에 비해 지방산 흡수가 약 60% 정도 감소하였음
- ⑭ 아토피 유발 마우스 모델(BALB/c 마우스)에서 삼중실 추출물 (hexane)의 아토피 치료효과를 평가함. 이를 위해 삼중실의 hexane 추출물을 피부에 도포한 실험군과 olive oil 을 피부에 도포한 대조군 마우스에서 홍반, 출혈, 부종, 탈피, 짓무름, 건조를 관찰한 결과 아토피 치료 후 실험군과 대조군에서 유의한 차이는 관찰되지 않았으며, 아토피성 피부염의 대표적인 면역학적 지표인 IgE 수준을 측정하였으나 유의한 결과는 관찰되지 않았음

(나) 삼중실 식품 및 소재 개발

- ① 압출성형 조건 수분함량 (20, 25%), 배럴온도 (110, 130℃)이였으며, 수분함량 20%, 배럴온도 130℃에서 팽화율이 가장 높았으며 밀도, 파괴력, 탄성계수가 낮았음. 수분함량이 증가할수록 수분흡착지수가 증가하였으며 수분용해지수는 배럴온도 130℃에서 높은 경향을 나타냄. 압출성형 탈지 삼중실은 페이스트 점도 값이 낮게 나타났으며 DPPH 에 의한 전자공여능 값은 수분함량 20%, 배럴온도 130℃에서 항산화활성이 높게 나타남.
- ② 배럴온도 90, 100, 110℃, 수분함량 35%의 압출성형조건에서 압출성형 펠릿의 페이스트 점도 측정결과 삼중자 펠릿의 제조에 적합한 압출성형 배럴온도는 100-110℃인 것으로 판단됨. 삼중자 후레이크의 체적밀도는 0.24-0.43 g/mL 범위로 배럴온도가 증가함에 따라 감소하는 경향을 나타냄. 명도와 압착강도는 삼중자 첨가량이 증가함에 따라 크게 감소하는 경향을 나타냄. 배럴온도가 90℃에서 110℃로 증가함에 따라 수분용해지수는 감소하는 경향을 나타내었고 수분흡착지수는 증가하는 경향을 나타냄. 조직감 유지시간은 5.8-15.5 분 범위로 삼중자 첨가량의 증가에 따라 감소하였음. 관능검사 결과 전체적인 기호도는 삼중자 첨가량 20%일 때 가장 높은 값을 나타냄.
- ③ 탈지 삼중실과 전립 삼중실의 첨가량을 달리한 (0, 20, 30, 40%) 쌀가루를 압출성형하여 에너지

바 제조에 사용하였음. 삼종실 종류와 첨가량에 따른 이화학적, 항산화 특성을 연구하였음. 삼종실 첨가량이 증가할수록 압출성형 삼종실의 밀도는 증가하였음. 압출성형 삼종실의 수분흡착 지수는 대조군 (압출성형 쌀가루-삼종실 첨가량 0%)에 비하여 낮았음. 압출성형 전립 삼종실은 탈지 삼종실 보다 총 페놀, 플라보노이드 함량이 높았으며 전자공여능이 높게 나타남. 40% 전립 삼종실에서 76.95%로 가장 높은 항산화활성을 나타냄. 에너지바의 평행수분함량은 압출성형 삼종실의 첨가량이 증가할수록 낮은 값을 나타내었으며, 20% 전립 삼종실이 첨가된 에너지바가 색, 맛, 종합적인 기호도에서 높은 선호도를 보였음.

④ 삼종실을 이용한 음료 제품 개발

- 청삼종실의 블렌칭처리 유무, 종실 마쇄물의 여과조건, 종실 밀크의 열처리와 호모믹서처리 적용시기를 달리하여 제조한 밀크의 이화학적 특성을 분석하여 음료용 종실 밀크 제조공정을 설정하였다. 청삼종실을 끓는 물에서 5분간 블렌칭처리하고 8배의 정제수와 함께 마쇄하여 얻은 마쇄물을 여과(60, 140mesh)하고 100℃로 열처리한 다음 2차 여과(140mesh)한 것을 호모믹서로 처리하는 공정이 음료용 밀크로 가장 적합하였다.
- 청삼종실 밀크에 대한 균질 압력조건과 밀크내 단백질, 지방의 안정화를 위한 유화제 처리조건을 달리하여 제조한 종실 음료의 다양한 품질특성 분석을 통하여 저장 안정성이 보장되는 음료 제조공정을 설정하였다. 가온(70℃)시킨 종실 밀크액(60%)에 설탕 3.5%, 탄산수소나트륨 0.01%, 해바라기씨유 1.1%, 정제염 0.1%, 유화제 Step SS 0.3%와 S1670 0.5%를 첨가, 용해하고 교반(20분) 후 균질처리(400bar)한 다음 레토르트살균(120℃, 20분)한 음료가 가장 우수하였다.
- 청삼종실 음료의 제품 다양화를 위해 바닐라, 초코 향미를 부여하는 음료 배합비, 레토르트살균 전후 향미 변화, 저장 중 안정화 실험 결과를 통하여 바닐라, 바닐라와 초코향미가 혼합된 청삼종실 음료의 배합비를 확립하였다. 음료에 첨가된 각종 비타민(A, B₂, B₁₂, D₃)의 레토르트살균 후 잔존율을 분석하여 RDA 기준 일일 권장섭취량이 유지되는 초기 첨가량을 설정하여 비타민 강화 음료를 제조하였다.

⑤ 청삼종실의 탈피방법 및 탈피장치 개발

- 청삼종실의 껍질을 제거하고자 종실의 전처리공정(건조, 크기별 분류)과 종실을 분쇄할 경우 껍질을 반쪽으로 이등분함에 가장 적합한 맷돌의 형태, 간격, 회전수 등을 분석하여 종실 분쇄기를 제작하였다.
- 종실 분쇄물로부터 종실 너트를 효과적으로 분리하고자 체, 선별기, 공기분급기를 적용한 결과 원료 종실 내용물의 77%를 분리, 회수할 수 있었다.

⑥ 청삼종실을 이용한 두부 개발

- 청삼종실 밀크의 가열, 응고(65~95℃) 조건, 응고제의 사용 유무를 달리하여 제조한 두부의 이화학적, 관능적 특성을 분석하여 적정 두부 제조조건을 설정하였다. 응고제를 사용하지 않는 종실 두부는 탈피 청삼종실에 7배의 정제수를 가수하여 마쇄, 여과하여 얻은 밀크를 85℃에서 25분간 가열, 응고시키고 응고물을 압착, 성형하여 제조하였다.
- 위의 밀크에 초기 종실 중량대비 1.2%의 난백분말을 첨가하여 동일공정으로 제조한 두부는 부피가 증가하고 탄력성이 개선되었다. 또한 저장에 따른 두부의 품질특성을 분석한 결과 4℃, 7일 저장시 문제점이 없는 것으로 나타났다.
- 응고제를 사용하지 않는 전두부 제조는 종실 페이스트 제조에 적합한 가수량 비율과 페이스트의 가열, 응고온도에 따른 전두부 성상, 이화학적, 관능적 품질특성을 분석하여 설정하였다. 탈피종실에 2배의 정제수를 가수, 마쇄하여 제조한 페이스트를 성형용기에 담아 가열, 응고(85℃에서 50분) 시킨 전두부가 가장 우수하였다.

(다) 삼 섬유를 이용한 식품 포장 제품 개발

- ① 화학성분 분석 결과 삼 섬유의 주요 성분인 cellulose와 hemicellulose 그리고 lignin의 성분비는 약 61.9%, 17.1%, 3.3%로 목재(평균 50.0%, 25.0%, 25.0%)에 비해 cellulose의 함량이 높아 종이 자원으로써의 가치가 높고, lignin의 함량이 적기 때문에 표백 단계에서 lignin 제거를 위한 약품과 에너지의 사용량을 줄일 수 있어 경제적이고 친환경적이라고 할 수 있다.
- ② 대마의 조직 및 세포 구성의 특성을 검토한 결과, 수피부는 피층 유세포와 세포벽이 두꺼운 후박세포의 인피섬유가 존재하고 목질부에는 도관, 목부섬유, 방사조직 등으로 구성되어 있다. 고립관공과 방사복합관공이 존재하며, 분포형태는 방사공제 같지만 산공제에 가깝고 유세포는 단열방사 조직이며, 인피섬유의 길이는 약 4.4 mm, 폭은 약 30.5 μm 이며, 도관의 길이는 약 600.0 μm , 폭은 약 493.6 μm , 목부섬유의 길이는 약 1000 μm , 폭은 약 38.9 μm , 유세포의 크기는 약 50 μm , 폭은 약 26.4 μm 이다. 도관은 벽공이 매우 발달 되어 있으며, 목부섬유에서 벽공이 관찰되었다.
- ③ 삼 크라프트 펄핑 실험 결과 증해온도 170 $^{\circ}\text{C}$, 증해시간 80 min, AA 첨가량 18g/L, sulfidity 첨가량 22%에서 수율 51.63%, kappa값 4.53으로 최적의 크라프트 펄핑 조건을 확인할 수 있었다. 크라프트 펄핑을 실시한 삼 펄프를 목재펄프와 혼합하여 물리적 특성을 관찰한 결과 삼 펄프를 10% 투입하였을 때 인장강도와 파열강도가 가장 우수하였다.
- ④ 삼 소다 펄핑 실험 결과 액비 10:1, 증해온도 170 $^{\circ}\text{C}$, 증해시간 80 min, NaOH의 첨가량이 25%일 때 수율이 45.79%, kappa값 4.67로 최적의 소다 펄핑 조건을 확인할 수 있었다. 130 $^{\circ}\text{C}$ 이상의 온도에서는 증해온도와 증해시간이 수율과 탈리그닌에 큰 영향을 미치지 않았고, NaOH의 첨가량(10, 15, 20, 25%)이 증가함에 따라 카파값이 급격히 감소하였다. 저온화 펄핑은 증해온도를 100 $^{\circ}\text{C}$ 로 감소시키고, 증해시간(1, 3, 5, 7 hr)에 따른 수율의 변화는 거의 관찰되지 않았으나, NaOH 첨가량 5% 정도까지는 수율이 급격히 감소하였고 그 이상 첨가하면 수율이 서서히 감소하는 경향을 보였다. 100 $^{\circ}\text{C}$ 이하의 온도에서 삼 섬유의 구성성분의 분해가 많이 발생하는 것으로 관찰되었으므로 초기에 탈리그닌화와 추출물이 많이 제거됨을 알 수 있었다.
- ⑤ NaClO 농도(4, 6, 8, 10, 15, 20%)를 변화시켜 삼 펄프 표백 실험을 실시한 결과 NaClO 농도가 10% 될 때까지 수율의 변화는 거의 관찰할 수 없었으나 15%, 20% 투입 시 수율이 급격하게 감소하였으며 카파값의 변화는 거의 없었으므로 수율을 고려할 때 NaClO 적정농도는 4%임을 알 수 있었다.
- ⑥ 삼 소다 펄핑을 실시한 펄프를 사용하여 목재펄프와 혼합하여 수초지를 제작하였다. 실험 결과 삼 펄프를 10% 투입하였을 때 강도적 특성(인장강도, 파열강도, 인열강도)이 가장 우수하였다. 거칠음도, 불투명도, bulk는 삼 펄프의 투입비가 높아질수록 증가하였고 백색도는 삼 펄프의 투입비가 높아질수록 감소하는 경향을 보였다.
- ⑦ 3단 구조의 골판지로 hemp dripmat를 제조하였다. Top 층에만 삼 펄프가 10% 함유된 종이를 사용하였고 core와 bottom 층은 목재펄프를 사용하여 삼 펄프를 경제적으로 사용할 수 있도록 설계하였다. Top 층은 수분을 함유한 식품과 직접적으로 닿는 부분이므로 발수제(polyethylene 이 함유된 paraffin wax 계, 고형분 16~24%)를 표면처리하여 수분에 대한 저항성을 높이고, 캘린더 처리를 하여 거칠음도를 개선하고 삼 섬유가 식품에 묻어나와 품질을 손상시키는 것을 방지하였다.
- ⑧ Hemp 라벨지는 삼 섬유 고유의 질감과 색감을 살리기 위하여 표백을 실시하지 않았으며, 후가공 공정으로 AKD 사이즈제 1% 투입하여 내수성을 증가시키고 캘린더 처리를 하여 거칠음도를 개선하고 인쇄적성을 향상시켰다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

(가) 삼 종실의 특성 및 식품 안전성 연구

- ① 삼 종실의 유용 단백질 및 지방산 추출과 기능성 물질 분석에 따른 고부가가치 식품소재가 개발 될 것으로 기대됨
- ② 삼 종실 식품소재의 다양한 기능성이 발굴됨에 따라 이를 이용한 식품 개발 및 생산이 활성화 될 것으로 기대됨
- ③ 지질대사, 혈당, 노화, 퇴행성 뇌질환, 피부질환, 비만 등 다양한 질병에 미치는 효능 검증
- ④ 고부가가치 창출로 농가 소득 증대 및 건강식품 산업의 활성화
- ⑤ 다양한 세포주에서 삼 종실 오일 및 주요 성분의 세포 안전성 확인
- ⑥ 삼 종실 오일 및 주요 성분을 이용한 항암 효과, 류마티스 관절염 억제 효과, 염증 반응 억제 효능 검증
- ⑦ 삼 종실 오일 및 DHA에 의한 염증 반응 및 류마티스 관절염 억제 기전 연구
- ⑧ 삼 종실 내 발현된 전체 단백질 프로파일 분석 결과 1,102개의 단백질 스팟을 분리하였고, 그 결과를 바탕으로 생체내 유용 단백질 및 항산화 관련 단백질 등의 기능성 유용 단백질을 도출함으로써 삼종실 단백질의 기능성 식의약 원료로의 가능성 제고
- ⑨ 삼 종실의 다양한 단백질을 추출할 수 있는 분리/분석 기술을 확립하여 헴프 바이오산업분야의 바이오 프로세스 기술의 기반구축에 기여함
- ⑩ 삼 종실내 포함된 다양한 항산화 효소의 활성을 확인함으로써 삼종실 단백질의 항산화 식의약 제품 개발로의 가치 재평가

(나) 삼 종실의 효능과 기능성을 이용한 LOHAS형 식품 개발

- ① 삼 종자 식품중간소재의 개발로 다양한 삼 기능강화 식품의 제조가 가능
- ② 삼 식품중간소재, 완제품인 breakfast cereal, energy bar, bakery, 팥하스낵 제품개발로 스낵류의 새로운 시장의 확대 및 삼산업의 육성을 통한 삼 재배농가의 소득 증대
- ③ 국내산 삼 종실을 이용한 대중 소비형 음료, 두부 제품의 개발, 상품화로 삼 종실의 새로운 소비 창출과 부가가치 증대에 기여함은 물론 관련 분야의 핵심 원천기술 및 특허 축적
- ④ 청삼종실의 식품학적 특성과 milk제조공정 연구, 한국식품과학회 정기총회 및 학술대회 발표
- ⑤ 종자의 탈피방법 및 탈피장치(출원번호 10-2010-0102773)
- ⑥ 청삼종실 밀크의 제조방법 및 이를 함유하는 음료(출원번호 10-2010-0122092)
- ⑦ 2010 생명과학 이어달리기 홍보 부스 운영 및 종실 밀크 음료 전시, 시식회
- ⑧ 논문발표 및 투고: 가열조건에 따른 무응고제 청삼종실 두부의 이화학적 품질특성, 청삼종실 밀크의 품질 안정화 기술
- ⑨ 특허출원 분야 - 응고제를 사용하지 않는 청삼종실 커드 및 이의 제조방법

(다) 삼 섬유를 이용한 식품 포장 제품 개발

- ① 삼 줄기의 효율적인 활용 방안의 확대로 펄프화 방법 및 삼를 이용한 고부가가치 종이개발 기술력 향상
- ② 국내에서 재배한 작물을 이용한 비목재 펄프 생산 기술의 확립과 해외에서 수입하고 있는 펄프의 대체효과(펄프생산량 세계 25위, 종이소비량 세계 8위)가 기대되며 농가의 소득 향상 및 미래의 종이 원료 수급의 새로운 대안 마련
- ③ 에너지 소비량과 오염배출량이 현저히 적어 환경친화적인 공정에 의하여 미국, 유럽 등 선진국에서 목재 및 지류제품에 요구하는 'FSC' 인증 획득 가능
- ④ 삼 섬유를 이용한 drip mat지, 포장지 등 각종 고부가가치종이 제조 및 이와 관련된 특허 출원
- ⑤ 삼을 원료로 한 고부가가치 종이는 공장에서 시작품을 제조하여 제품 성능 분석, 개선방안 및 시장동향을 파악하여 소비자의 요구 조건을 충족시키는 제품 생산

SUMMARY

[Background and Purposes]

Hempseed, a rich source of proteins, polyunsaturated fatty acids (PUFAs) and phytosterols, has been recognized as a potential therapeutic food used for cardioprotection, preventing platelet aggregation, and improving atopic dermatitis. And the cell wall of hemp bast fiber is thick and rigid which are important properties for high strength applications such as wrapping paper, bank notes, and bibles. The purpose of this project is i) characterization of nutrition of hempseed and hemp bast fiber, ii) developing food product using hempseeds, and iii) the high value-added wrapping paper such as drip mat and label paper made of the bast fiber of industrial hemp cultivated in Korea as an alternative fiber.

[Results and Discussion]

Characterization of hempseed and hemp bast fiber

To investigate the hemp (*Cannabis sativa* cv. Chungsam) seed structure and ultrastructure of food reserves by light and electron microscopy, we examined the seed coat and embryo consisting of a hypocotyl-radicle axis and two cotyledons. The seed coat consisted of exotesta and endotesta. The collapsed outer layer of endotesta showed the unique reticulate structures. In cotyledon cells, protein and lipid bodies occupied most of cytoplasm. Protein bodies varied in diameter from 1.8 to 5.0 μm and possessed a protein matrix containing electron-dense globoid crystals. Numerous lipid bodies ranged from 0.8 to 3.0 μm in diameter were distributed around the protein bodies. During the early stages of breakdown, protein bodies rapidly changed their shape into the granular feature, however, lipid bodies were gradually degraded and fused each other. The degeneration process of protein bodies and lipid bodies of cotyledon cells might be correlated with the reports which hemp seeds rapidly lose their ability to germinate.

To characterize nutrient contents, we conducted the proteomic profiling of hempseed proteins from Cheungsam by using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry in this research. The protein profiles among hempseed varieties were also compared. Moreover, the proteins were categorized based on protein functions, including involvement in energy regulation, metabolism, stress response, cytoskeleton, unclassified, uncharacterized, binding function, and protein synthesis. Notably, edestin, a major hempseed protein from Cheungsam, was isolated by using acid precipitation and gel filtration chromatography. Cheungsam edestin was rich in essential amino acids and it has DPPH free radical scavenging activity. Taken together, Cheungsam hempseed protein isolate and edestin might be utilized as superior sources of antioxidative nutrients.

To develop DNA markers to discriminate efficiently cultivated Chungsam from other

cultivas cultivated in south provinces of Korea. Using nucleotide sequences of some genes such as ITS and *rbcL*, which are applied usually for the studies of plant taxonomy and phylogenetics, we were able to discriminate Chungsam from other cultivars. Furthermore, based on the sequences of THC synthase and KCS genes, which codes on enzyme participates in the biosynthesis of secondary metabolite and fatty acid respectively in hemp, we were also able to discriminate Chungsam efficiently.

Safety and functional analysis of hempseed using animal models and mamalian cells

In this study, we evaluated the developmental effects of the addition of hempseed meal (HSM) to the diet of *Drosophila*. Dietary HSM intake was shown to increase the body size of flies by increasing cell numbers, and also truncated the larval period without affecting survival rate or longevity. The oviposition of female flies was also increased by dietary HSM supplementation. Interestingly, the levels of sterols, which are precursors of ecdysone, a molting hormone, were found to be elevated in the larvae fed on HSM. Additionally, the hexane extracts of hempseed mimicked the effects of HSM on growth, developmental timing, and reproduction. These results indicate that the dietary intake of HSM accelerates both body growth and developmental rates in *Drosophila* via the stimulation of cell growth and ecdysone synthesis.

We also investigated the safety and efficacy of hempseed oil and its major ingredients using many cells such as human RA-derived synoviocytes, macrophages, cardiac muscle cells, lung cancer cells and breast cancer cells, etc. Treatment of hempseed oil and DHA inhibited growth of lung cancer cells, and combined treatment with an anti-cancer drug greatly increased cell death. The uncontrolled growth of RA-derived synoviocytes was greatly reduced by treatment of hempseed oil and DHA due to the induction of apoptosis and differentiation. In these cells, apoptosis was mediated by both the oxidative stress-dependent and CHOP-mediated pathways. Expression and secretion of inflammatory cytokines such as iNOS, IL-1 β and NO was reduced by treatment of hempseed oil or DHA in macrophages, and BiP was found to be involved in this step. Treatment of hempseed oil alone did not affect the viability of cardiac muscle cells (H9c2), breast cancer cells (MCF7), and ovary cells (CHO).

Further, we assessed the anti-obesity activity, antihyperlipidemic effect, anti-cancer activity and anti-atopic dermatitis effect by hempseed extract in mice models. Among them, antihyperlipidemic effect by the hexane extract of the hempseed was observed in B6.129P2-*Apoe*^{*tm1Unc*} mice. And anti-obesity activity by the water extract of the hempseed was observed in ICR mice. Any toxicological activities of hempseed extract were not observed in mice models.

We also tested the safety of hempseed oil through MTT assay and Ames test and investigated the effects of the oil on the uptake of fatty acid and insulin. The results

showed that hempseed oil may regulate the uptake of fatty acid and insulin leading to the improvement hyperlipidemia and diabetes.

Developing food product using hempseeds

This study was carried out to develop high-nutritious flakes, energy bar and bread from extruded hemp obtained by extrusion process. The influence of hemp seed type and level on physico-chemical and antioxidant properties was studied. Extruded conditions were 100 and 110°C barrel temperature at 35% moisture content for the pellets hemp seed for make hemp flakes. The highest overall quality was showed in flake added with 20% of hemp seed. The energy bar made with extruded rice-20% whole hemp had higher preference levels for parameters of color, taste and overall acceptability. The 5% extruded hemp-rice(EHR) flour was appropriated for hemp bread on account of showed higher specific volume, lower hardness and bigger air cell structures.

We also developed hemp seed beverages in the present studies. The optimal process condition for hemp seed milk was established through analyzing physico-chemical properties of the products that were obtained through examining various conditions of blanching, filtering, heating and homo-mixing treatments. Various qualitative properties, which were obtained by differentiating applied pressures and emulsification conditions, of hemp seed milk were investigated to guarantee storage stability of the product. The best result was obtained by heating hemp seed milk (60%) at 70°C followed by adding 3.5% sugar, sodium bicarbonate 0.01%, sunflower seed oil 1.1%, salt 0.1%, emulsifier (Step SS 0.3% and S1670 0.5%). The mixture was, then, stirred for 20 min, homogenized for another 20 min and retorted 120°C for 20 min. For diversification of hemp seed milk products, final compositions of the products were established by diversifying added amounts of vanilla and chocolate flavors and analysing changes in flavors before and after retorting and, finally, examining stability during storage. Vitamin fortified beverages that contained vitamins of more than their RDA were also processed after analyzing residual amounts of initially added vitamins (A, B₂, B₁₂, D₃) after retorting.

To peel off hemp seeds, we developed optimal de-hulling process and device. De-hulling device was manufactured to peel off hemp seeds with easiness. To achieve this purpose, various conditions of pre-treatments (drying and sorting by sizes) and different types of mill that should be used for bisecting hemp seeds for crushing them were considered. Nuts of crushed hemp seeds were effectively separated (77%) by applying sieve, air classifying system to the mill device.

We also developed hemp seed tofu. The optimal processing condition for hemp seed tofu was established by sensoric analysis and physico-chemical properties of products that were processed by various heating and coagulating (65-95°C) conditions. When a

coagulant was not applied, hemp seed tofu was processed by adding distilled water with 7 times the weight of de-hulled hemp seeds followed by grinding and filtering of hemp seed mash, coagulating by heating at 85°C for 25 min, pressing and molding. Hemp seed tofu with improved volume and elasticity was produced by the identical procedure with previous one except addition of egg white protein that was added to 1.2% of de-hulled hemp seed weight. When the product was stored at 4°C for 7 days and analysed for qualitative properties, no storage defect was observed. The optimal process condition for whole hemp seed tofu that was produced without help of coagulants was established by analysing volumes of water added, heating temperature, physical appearance, physico-chemical properties and sensoric results. According to the analysis, the best whole hemp seed tofu was produced by adding 2x of DW followed by grinding, molding, heating and coagulating at 85°C for 50 min.

Developing the high value-added wrapping paper made of the bast fiber of industrial hemp

The interest in alternative sources of wood fiber is increasing because population and economic growth lead to consumption of wood cellulose-based products. The cell wall of hemp bast fiber is thick and rigid which are important properties for high strength applications such as wrapping paper, bank notes, and bibles. High value-added wrapping paper such as drip mat and label paper were made using the bast fiber of industrial hemp cultivated in Korea as an alternative of wood.

Morphological characteristics of industrial hemp fiber were investigated using a light microscope for providing fundamental data in effective utilization of it as a raw material for papermaking resource. Phelom of hemp is composed of cortical parenchyma cell and bast fiber with thick cell wall while xylem is composed of vessel, wood fiber and ray parenchyma cells. Parenchyma cells in xylem and pit parenchyma cells have different size completely and shape. For bast fiber, the average length is about 4.4 mm and the is 30.5 μm : for vessel element, 600.0 μm in length and 493.6 μm in width; for wood fiber, 1,000 μm and 38.9 μm ; for parenchyma cell 50 μm and 26.4 μm . Alkaline pulping process (25% NaOH, 170°C and 80 min.) of the industrial hemp bast which is environmentally safe and economically feasible was adopted to produce the high strength fiber with 45.79% yield and kappa number of 4.67. Handsheets were made varying the mixing ratio of wood to hemp pulp to find the optimum condition for making drip mat and label paper. As the amount of hemp pulp increases opacity, bulkiness and roughness were found to increase, while brightness was found to decrease. 10% of hemp was enough to increase the tensile strength, bursting strength, and tearing strength significantly which are very important properties in drip mat paper.

Unbleached 3-layer corrugated drip mat paper consisting of top linerboard made of

hemp fiber and fluted corrugated sheet and bottom linerboard made of wood pulp was made in order to save the unit cost production. Unbleached label paper for the Korean traditional wine of the premium grade was made to impart the characteristic texture and colors of hemp followed by sizing and calendaring treatments. Especially top layer which contacts with food directly was treated with water-resistance chemicals such as paraffin which contains small amount of polyethylene. Additional post treatment such as sizing and calendaring of label paper increased smoothness and printability which are indispensable for printing of paper.

CONTENTS

◆ ABSTRACT	-----	I
◆ SUMMARY IN ENGLISH	-----	VII
CHAPTER 1	INTRODUCTION	----- 1
CHAPTER 2	BACKGROUND	----- 7
CHAPTER 3	RESULTS	----- 11
	I. CHARACTERIZATION OF HEMPSEED AND STUDY ON THE SAFETY OF HEMP FOOD	
	CHARACTERIZATION OF HEMPSEED AND DEVELOPMENT OF DNA MARKERS	----- 11
	SAFETY AND FUNCTIONAL ANALYSIS OF HEMPSEED	----- 54
	DEVELOPING FOOD PRODUCTS USING HEMPSEEDS	----- 89
	II. DEVELOPMENT OF HEMP FOOD AND WRAPPING PAPER	
	DEVELOPMENT OF FLAKES, ENERGY BAR AND BREAD FROM EXTRUDED HEMP	----- 89
	DEVELOPMENT OF HEMP SEED MILK AND TOFU	----- 123
	DEVELOPING THE HIGH VALUE-ADDED WRAPPING PAPER MADE OF THE BAST FIBER OF INDUSTRIAL HEMP	----- 240
CHAPTER 4	CONTRIBUTIONS TO THE RESEARCH FIELD	----- 259
CHAPTER 5	APPLICATION OF THE RESULTS	----- 274
CHAPTER 6	REFERENCES	----- 275

목 차

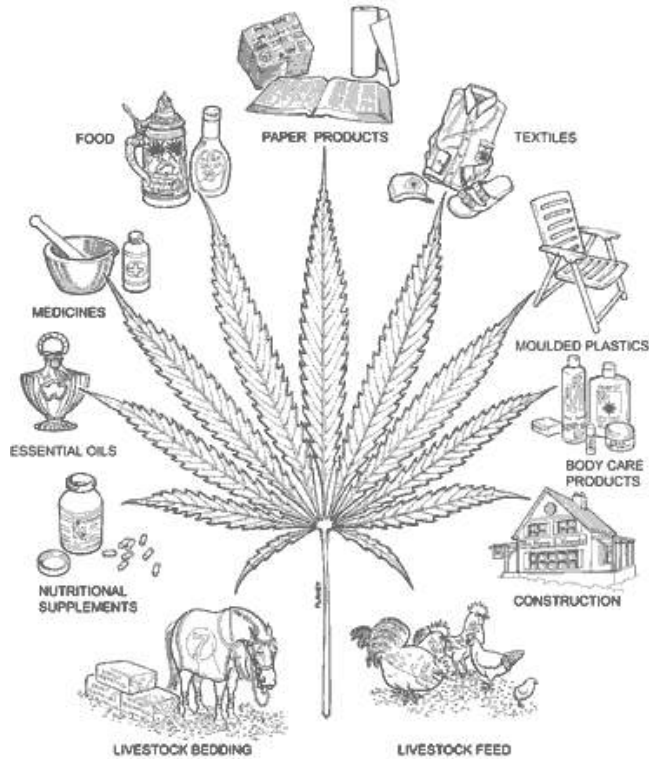
◆ 요 약 문	I
◆ 영 문 요 약 문	VII
제 1 장 연구개발 과제의 개요	1
제 2 장 국내외 기술개발 현황	7
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과	11
I. 삼중실의 특성 및 식품 안전성 연구 (제 1, 2 세부 및 제 1, 2 위탁연구)	
삼중실의 특성 분석 및 분자 마커의 개발	11
삼중실의 식품 안정성 및 효능 연구	54
II. 삼중실 식품 및 포장제품 개발 (제 1, 2, 3 협동연구)	
삼중실 식품 개발	89
삼중실 중간소재 및 제품 개발	89
청삼중실을 이용한 음료, 두부 제품 개발	123
삼 포장 제품 개발	240
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	259
제 5 장 연구개발 성과활용 계획	274
제 6 장 참고문헌	275

제 1 장 연구개발과제의 개요

1. 연구개발 대상 기술의 경제적·산업적 중요성 및 연구개발의 필요성

<산업화 소재로서의 삼의 가치>

- 삼은 제지, 건축용 재료, 화장품 및 기능성식품의 원료로 이용되고 있는데, 이러한 삼 관련 산업은 미국에서 이미 750여개의 업체가 성황을 이루고 있고 캐나다는 10년 전부터 시작해 100개 업체가 시장에 진출한 상태임.
- 미국의 삼 관련 제품의 매출규모는 2006년 기준 3,000만달러로 전년 대비 26%의 큰 성장률을 보였으며, 기능성식품 및 화장품 등이 주요 제품으로 판매되고 있음.
- 우리나라는 삼을 단순히 섬유용 재료로만 이용하고 있는 실정이며 선진국과 같이 삼을 고부가가치 창출이 가능한 화장품 및 기능성식품으로의 활용이 저조한 실정임.
- 최근 LOHAS 생활패턴의 확산으로 유기식품과 같은 친환경제품에 대한 요구가 커지는 추세로 삼은 재배기간이 짧고 병충해에 대한 저항력이 강하여 친환경 작물로 재배가 용이하기 때문에 향후 삼 관련 시장은 꾸준히 성장할 것으로 전망됨.
- 미국에서 판매되고 있는 삼 제품들은 대부분 캐나다 및 유럽에서 수입되고 있는데 최근 그 수입 규모가 급격히 증가하고 있어 삼에 대해 엄격한 규제 정책에도 불구하고 삼 관련 사업에 대해 새롭게 인식하고 있는 추세임.
- 삼 종실의 우수한 단백질 조성을 이용한 건강 증진 식품 소재 및 식품을 개발함으로써 건강 식품 시장의 확대가 가능하며 현대인의 식습관의 결과 질병 유발 가능성이 있는 기존의 식품을 대체할 필요가 있음.
- 환경 친화적 삼 경작으로 인한 환경오염의 방지가 가능하고, 고부가가치 상품의 생산에 따른 삼 경작 농가의 소득 증대를 기대할 수 있음.
- 단백질 주 공급원인 콩은 트립신 억제제를 가지고 있어 소화 흡수를 저해하고 필수 아미노산을 모두 포함하고 있지 않음.
- 반면 삼 종실은 트립신 억제제를 포함하고 있지 않으며 9종의 필수 아미노산을 포함한 총 20종의 아미노산을 포함하고 있음. 또한 유익한 필수지방산 - EFAs, 감마리놀렌산 (Omega 6) Gamma Linolenic acid (GLA) - 을 함유하고 있으면서도 포화지방산은 함유하지 않은 유일한 종자식물이기 때문에 콩보다 식품적인 면에서 월등히 우수함.



<그림 1> 삼의 산업적 이용 현황

다양한 용도의 식품포장재 개발이 가능하며, 식품 포장재의 시제품 개발을 위해서는 안전성 시험이 필수적임.

<식품 소재로서의 삼 종실 활용 필요성>

- 삼 종실의 단백질에는 다량의 필수지방산이 포함되어 있고, tocopherols 및 vitamin E complex 등 여러 가지 비타민A,B,C,D, 및 E가 함유되어 있으며, 불포화지방산 함량은 39%로 매우 높음. 특히 어린이 발육에 필수적인 Arginine과 Histidin과 같은 아미노산이 다량 포함되어 있어 어린이/노약자 및 환자의 영양식으로도 개발 필요성이 높음.
- 삼 종실은 불포화지방산인 올레산, 리놀산, 리놀렌산이 90% 차지하고 있으며 특히 면역작용에 역할을 하는 감마리놀렌산이 3% 포함되어 있어 고기능성 식품으로서 개발 시 우수한 식품원으로 기대됨.
- 이들 불포화지방산은 혈액 내 총 콜레스테롤, LDL 콜레스테롤 또는 중성지방 농도를 감소시키거나 혈관 보호 작용을 통하여 심혈관계 질환을 예방하는 것으로 널리 알려져 있음. 또한, 혈당 감소 또는 인슐린 민감성을 증진시킴으로써 제2형 당뇨병의 예방 및 치료에 효과를 나타냄.
- 높은 불포화지방산 함량 때문에 삼 종실유는 이미 선진국에서 기능성식품으로 판매되고 있음. 그러나 삼의 생리활성에 대한 과학적으로 체계적인 연구가 이루어 지지 않았고 특히 우

○ 국내에서는 단순히 섬유질로만 이용하고 있지만 미국, 일본, 유럽의 선진국에서는 삼을 건축, 제지, 의약품, 식품, 화장품, 대체에너지 등 다양한 산업에 이용. 특히 식품에서의 이용은 유럽에서는 과자류, 맥주, 아이스크림을 만들고 일본에서는 삼 국수, 삼 오일, 삼 씨앗, 너트, 두부, 빵, 두유 등을 만들어 먹고 미국에서는 삼 오일 햄버거까지 시판되고 있음.

○ 삼 종실로부터 채취한 삼 오일에는 양질의 불포화지방산이 다량 함유되어 피부질환 치료 및 노화 방지에 좋은 효과가 있는 것으로 알려지고 있으나 과학적으로 입증된 데이터는 전무한 실정임.

○ 삼 섬유는 항균, 탈취, 방충효과가 뛰어난 것으로 알려져 있어 이를 이용하여

Hemp products

Segment	Current \$ sales	Year Ago \$ sales	Dollar %Change
Hemp Products	\$30,802,356	\$24,468,466	26%

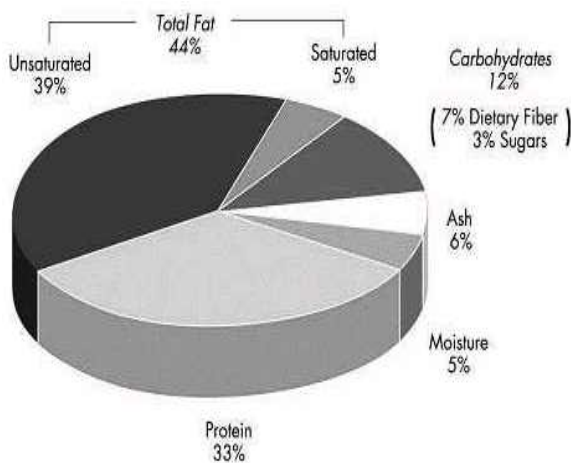
Conventional FDM (excluding Wal-Mart)			
Department	Current \$ sales	Year Ago \$ sales	Dollar %Change Rank (\$ Sales)
BODY CARE			42.4% 1
FROZEN & REFRIGERATED			21.4% 2
GROCERY			140.7% 3
VITAMINS & SUPPLEMENTS			904.8% 4
Total FDM	\$4,868,734	\$3,264,984	49%

Natural Supermarkets (>\$2MM)			
Department	Current \$ sales	Year Ago \$ sales	Dollar %Change Rank (\$ Sales)
BODY CARE			21.2% 1
GROCERY			14.8% 2
VITAMINS & SUPPLEMENTS			67.7% 3
FROZEN & REFRIGERATED			7.3% 4
GENERAL MERCHANDISE			4.5% 5
REFRIGERATED			408.3% 6
Total Natural Channel	\$25,933,622	\$21,203,482	22%

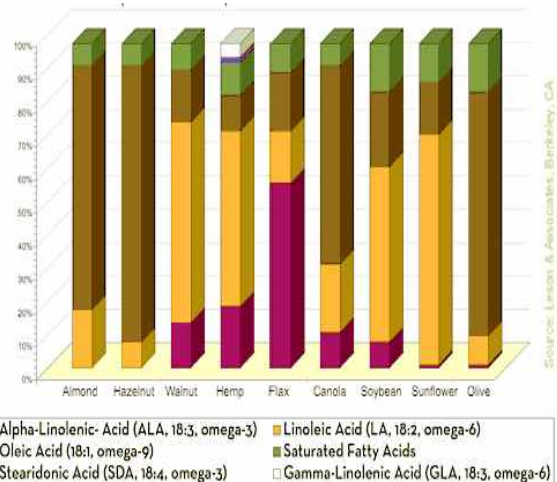
Source: SPINScan Natural and Conventional Channels, Total US, 52 Weeks ending 12/30/06

<그림 2> 삼의 산업적 이용 통계

식품중간소재 개발 및 삼 종실의 기능성을 함유한 breakfast cereal, energy bar, bakery 제품 등 LOHAS 식품의 개발이 시급한 실정임.



<그림 3> 삼 종실의 구성 성분



<그림 4> 종실 및 종실유의 지방산 조성

○ 국내의 스낵류 시장은 약 7000~7500억 원으로 예상되고 있으며, 전체 제과시장 중 26%를 차지하고 미국의 경우 영양소 강화 시리얼시장은 2003년도 55억 달러, 2004년도 78억 달러를 기록하였고 에너지바 역시 30억 달러이상의 시장규모를 갖고 있음. 삼 종실함유 breakfast cereal, energy bar, bakery 제품 등의 개발로 우리나라 스낵류 시장이 점차 확장될 것으로 판단됨.

○ 삼 종실의 구성 성분으로 미루어 보아, 이는 당뇨치료 효과와 심장혈관질환의 예방 및 치료에 충분히 효과가 있을 것으로 사료됨. 따라서 삼의 당뇨치료 및 고지혈증 치료효과가 과학적으로 입증되고 차별화된 삼 제품이 개발되면 큰 경쟁력을 가질 수 있을 것으로 사료됨.

<식품 포장 제품 원료로서의 삼 섬유 활용 가능성>

- 삼섬유는 가장 오래전부터 사용해온 천연섬유의 하나로서 인장강도가 크고, 섬유의 길이가 가장 길며, 셀룰로오스의 함량이 매우 높고 리그닌의 함량은 매우 낮은 우수한 섬유소재임.
- 삼섬유는 과거에는 직물, 밧줄, 끈 등의 원료로 사용되었으나 현재는, 기능성의 특수제지, 건축용 단열재, 자동차 내장재 그리고 생물복합소재와 같은 고부가가치의 non-woven 제품의 원료로 사용되고 있음.
- 유럽과 북미의 울창했던 침엽수 원시림이 종이 제조와 다른 산업의 이용에 의하여 상당 부분 파괴되었기 때문에 원료 대부분을 산림 자원에 의존하는 제지산업은 원료 수급이 점점 어려워질 것으로 전망되고 있음.
- 현재 전 세계의 종이와 판지의 소비량은 연간 320,000천 톤이며 2010년에는 연간 400,000천 톤으로 증가될 것으로 예상되고 있음. 특히 아시아 지역에서는 현재의 산림자원으로 종이의 원료를 충족시키기에는 매우 부족한 실정이고 한번 파괴된 원시림들을 복구하기 위해서는 막대한 환경 비용과 시간이 필요하기 때문에 목재펄프를 대체하기 위한 비목재 펄프에 대한 관심이 점차 커지고 있음.
- 삼의 외피 층인 bark는 삼 무계의 30~40% 차지하고 섬유장이 길기 때문에 강도가 우수한 종이를 제조할 수 있으며 목재에 비해 헥타르 당 섬유 생산 수율이 3~4배 더 높은 이점이 있음.
- 일반적으로 침엽수의 리그닌 함량이 25~30% 이고 활엽수의 리그닌 함량이 20~25%인 반면에 삼 bark는 2~4% 정도로 매우 낮기 때문에 목재의 펄프 제조보다 적은 약품 (1/7 이하의 황산 사용)과 증해시간 및 에너지가 필요하기 때문에 생산비가 절감됨. 또한 섬유의 주성분을 이루는 α -셀룰로오스의 함량이 목재의 경우 40~45%이지만 삼은 65~75% 정도로 매우 높기 때문에 펄프 수율이 상대적으로 훨씬 우수함.
- 미국과 일본에서는 각각 1950년과 1980년부터 산림자원의 보호와 비목재 자원을 이용한 양질의 종이 생산을 위해 정부가 중심이 되어 정책적으로 연구를 수행하였으며 미국의 폐지 회수율(recycling rate of post-consumer wastepaper)을 높이기 위한(현재 50%) 대통령의 EO(Executive order)와 같이, 비목재 섬유가 일정 비율 이상 함유된 종이의 구입을 지시하면 이 분야의 수요는 급성장 할 것으로 예측하고 있음. 또한 일본의 경우 **비목재 펄프를 5% 이상 사용한 제품에 “비목재지 마크”**를 부착하여 시중에 유통하고 있음.
- 본 연구에서는 산림자원의 보호와 지구온난화를 방지하고자 목재펄프의 대체 자원으로 비목재 섬유인 삼을 국내에서 재배하여 펄프를 제조한 후 용도에 적합한 tea bag지, drip mat지, 포장지, 필터용지, 과수봉지 등의 각종 고부가가치 특수기능지 제조 기술을 개발하여 국내 제지산업의 발전에 기여하며, 국내 비목재펄프 생산으로 목재펄프 수입대체 효과

및 삼 대량재배에 의한 농가소득에 기여하고자 함.

<삼의 과학적 효능 분석의 필요성>

- 삼의 건강 기능성에 대한 체계적 연구결과를 확보하면 국내산 삼의 우수성을 입증하여 소비촉진을 위한 홍보/마케팅 자료로 이용할 수 있으며 이를 위해서는 삼 종실 단백질의 유용성 분석 및 이를 이용한 식품의 유효성 검증이 필수적임.
- WTO 체제 및 FTA 협정에 따른 국제적인 무한 경쟁시대에 국내 작물의 품질 경쟁력 제고를 위해서는 유효성·안전성 확보가 가장 중요함. 국민소득 20,000 달러 시대의 우리나라 국민의 생활 패턴에 부합하기 위해서도 우수한 건강기능 소재의 생산은 필요한 연구 분야로서 기초 및 응용연구가 더욱 활발히 이루어져야 함.
- 2004년 1월부터 전면 시행된 건강기능식품법의 시행에 따라 건강기능식품 시장이 더욱 빠르게 성숙하고 있음 (2008년 4조원 시장규모 예상). 자생 삼제품의 유효성과 안전성 데이터를 확보하여 제품화 하면 시장성 있는 제품 개발이 가능할 것으로 기대됨.

<삼의 특성 분석의 필요성>

- 삼 섬유는 항균성 및 다양한 기능성을 가진 것으로 알려져 있어 이를 이용한 포장제품의 개발에 이용 할 수 있음. 과거에는 보다 많은 섬유를 생산하거나 보다 긴 섬유를 제공 할 수 있는 삼품종이 우수한 품종으로 평가되었으나 현재는 특수한 기능을 갖는 제품의 생산에 적합한 특성을 갖고 있는 섬유(fibre)를 제공할 수 있는 삼품종이 요구되고 있음.
- 포장제품 섬유소재에 적합한 인피섬유(bast fibre)를 제공 할 수 있는 삼품종을 탐색하기 위해, 섬유를 섬유세포의 형태학적 특징과 물리적 특성을 연계해 평가할 수 있는 방법이 개발되어야 하며, 각 품종으로부터 섬유의 특성을 결정하는 세포벽 구성성분의 생합성에 관련된 유전자원도 함께 확보되어야 함.

<자성종자 확립의 필요성>

- 삼은 암수딴그루 식물이고 바람에 의해 꽃가루가 매개되는 풍매화로서 암·수 성이 동물과 비슷하게 꽃가루의 성 염색체인 X, Y에 의해 결정되므로 암그루와 수그루의 성비가 1:1임.
- 수그루는 꽃이 피어 꽃가루를 비산시킨 후 말라죽기 때문에 섬유 생산용으로만 이용할 수 있지만 암그루는 섬유 뿐만 아니라 종자, CBD(cannabidiol) 등 의약품 수지와 정유를 생산할 수 있으므로 암그루만 선택적으로 재배하는 것이 삼의 경제적 가치를 높이는 중요한 기술임.

- 암그루만 선택적으로 재배하는 방법으로 종자에 X선을 쬐어 암그루 비율을 증가시키거나 암그루를 삽목법으로 번식하는 방법 등이 제안되었음. 최근에 DNA marker를 이용하여 성을 조기에 판별하는 기술을 개발되었으나 이 방법은 비용이 많이 소요되므로 실용적인 방법이 아님.
- 1982년 Mohan은 삼 암그루에 STS(Silverthiosulphate)를 처리하여 수정 능력이 있는 수꽃 발생을 유도하였으나 일반 암꽃과의 개화기가 일치하지 않아 성 전환된 꽃가루가 수정된 종자를 얻지 못함.
- 2002년 목포시험장에서는 후대에 100% 암그루가 나오는 삼 자성종자 생산기술을 개발하였으나 단일 및 장일 처리 시설이 완비된 온실 내에서 실시할 수 있는 기술이기 때문에 생산비가 많이 소요됨.
- 그러므로 자성종자 생산비를 절감하려면 단일 및 장일 처리 시설이 아닌 노지에서 대량으로 생산하는 기술이 필요함.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 세계적 수준

개념정립 단계		기업화 단계	○	기술 안정화 단계	
---------	--	--------	---	-----------	--

○ 유럽에서는 21세기 들어서 삼의 용도를 변형한 다양한 삼 산업이 활발하게 일어남. 2000년대에 들어서 삼은 섬유산업, 펄프, 제지 산업, 건축산업, 자동차산업, 바이오플라스틱산업, 의약품산업, 식품산업 등에 다양하게 사용되고 있음. 특히 목재타일에 삼을 일정량 섞어 재질의 질감과 견고성을 향상시킨다든지 삼 섬유를 이용한 의류품이 생산되고 있음. 목질부인 속대는 건축용 하드보드, 제지원료로 사용하고 종실은 각종 과자류, 맥주, 아이스크림을 만들고 종실유로는 비누, 샴푸 등을 만들며 수지는 의약품 원료로 이용

○ 미국에서는 식물용 이외에도 종이의 생산, 음식의 재료, 의약품의 원료, 페인트의 원료, 플라스틱의 원료, 화장품 등으로 매우 폭넓은 활용도를 가지고 있음. 특히 삼의 함유물을 이용하여 암 치료용의 의약품개발은 물론 AIDS 예방용 의약품개발도 진행 중이며 삼 비누와 샴푸를 상품화하였고 삼 오일 햄버거까지 시판되고 있음

○ 일본의 유기농 매장에선 삼 국수, 삼 오일, 삼 종실이 판매되며 특히 종실은 껍질을 벗겨 너트로 만들거나 껍질을 통째로 볶은 것, 갈아서 만든 것 등 다양한 종류가 있는데 이것들로 는 두부, 빵, 두유 등을 제조하며 도쿄에는 삼으로만 만든 음식을 판매하는 레스토랑도 있음. 일본에서는 디젤엔진을 단 버스에 경유대신 삼 종실오일로 만든 "바이오디젤연료"를 넣고 달리는 삼 자동차로 일본을 횡단함. 바이오디젤은 산성비의 원인이 되는 유황산화물을 발생시키지 않고, 또 인체에 나쁜 영향을 미치는 매연도 석유에서 나오는 경유의 3분의 1에 지나지 않음

○ 삼식품은 현재 주로 캐나다와 핀란드에서 생산이 이루어지고 있음. 캐나다에서는 3,300 hr의 재배면적에서 삼이 생산되어 주로 식품과 화장품에 이용되고 있음. 특히 종실단백질과 종실오일로부터 삼식품의 기초소재와 다양한 삼화장품의 생산이 이루어지고 있으며, 대부분 미국으로 수출되고 있는데, 2004년에 식품 1,200만불, 화장품 3,600만불의 수출실적이 있으며 점차 증가하는 추세임.

○ 삼 섬유 제품은 현재 주로 유럽에서 생산되고 있으며 사용용도는 매우 다양함. 독일은 자동차내, 외장재로, 프랑스는 펄프, 제지 및 건축자재로, 스위스는 바이오플라스틱 소재로, 이태리는 의류의 섬유소재로 특성화를 추진하고 있음. 독일에서는 삼 섬유의 인장강도를 이용하여 차체의 중량을 3분의 1로 감소시켜 연료 소비를 감소시키고 반복충격 강도는 10배가 향상된 차량을 개발함

○ 인간에게 유용한 삼을 개발하기 위해서 조직배양과 아그로박테리움을 이용한 형질전환 방

법을 통해 삼 연구가 진행됨. 1995년 '사카모토' 등에 의해 옹성 염색체 연관된 2개의 RAPD 마커를 개발한 바 있었고, 1999년에는 '만돌리노' 등에 의해 옹성 특이적 RAPD 마커를 SCAR(Sequence-Characterized Amplified Region) 마커로 전환시킨 예도 있음.

○ 2001년 'Flachowsky' 등은 옹성에서만 확인되는 몇 개의 AFLP 마커를 보고한 바 있었고, 독일 'Martin-Luther' 대학과 북한 '세포 유전자 공학 센터'의 공동 연구진은 삼의 성염색체 연관 분자 SSR 마커를 개발함.

2. 국내 수준

개념정립 단계	○	기업화 단계		기술 안정화 단계	
---------	---	--------	--	-----------	--

○ 우리 나라는 삼산업에 관한 개념과 인식이 거의 되어있지 않은 초기단계이지만 삼의 재배 역사가 길고 또한 삼에 대한 전통기술이 있기 때문에 이에 대한 의지와 노력이 수반된다면 단시간내에 세계 수준에 진입할 뿐 아니라 세계적인 상품개발로서 세계 시장을 선도할 수 있는 무한한 가능성을 갖고 있음

○ 삼 유전자원의 지방산 조성과 감마리놀렌산의 함량에 대한 연구가 이루어졌으며 식품으로의 활용연구는 거의 이루어 지지 않고 있는 실정임

○ 농촌진흥청 작물과학원 목포시험장에서 육성한 저 마약형 청삼을 충남 당진군에서 재배하고 있으며 종실에서 오일을 재래식 방법을 활용하여 착유공정의 분석과 전처리를 통한 착유수율의 향상과 착유박의 식품중간 소재화기술은 개발되어 있지 않음

○ 삼 종실의 기름, 단백질, 섬유 등 기능성 성분에 대한 과학적 근거 마련이 시급한 실정이며 삼 종실을 이용한 다양한 식품개발이 절실함.

○ 국내에서는 삼 암그루 성 전환에 의한 자성종자 생산기술 개발하여 특허 등록함. 우리나라의 삼 채종재배 면적은 적지만 충남 당진군에서는 이 기술을 이용하여 생산된 자성종자로 채종재배하고 있음. 기술이 개발된 이듬해인 2003년에는 100평 정도의 소규모로 재배하였지만 자성종자의 장점을 인식하여 2007년 현재 8ha를 재배하고 있으므로 현재 국내의 자성종자 생산과 이를 이용한 채종재배 기술 수준은 기술 안정화 단계임

○ 1960년대까지 삼은 국민의 주된 섬유원료로서 재배기술 연구, 병해충 방제연구 및 수확된 삼의 정련에 관한 연구 등 거의 모든 분야에서 연구가 수행됨. 그러나 1972년에 삼관리법이 제정되며 값싼 합성 섬유의 유통이 늘면서 삼재배가 현저히 감소하였고 90년대 이후는 더욱 급격한 감소추세임.

○ 바이오벤처회사인 삼테크는 미생물을 이용하여 고순도 삼 섬유와 플라스틱, 나일론 섬유

등의 생산기술을 개발함. 삼 플라스틱은 내구성이 뛰어나고 무게가 기존 플라스틱 제품보다 40%나 가벼워서 다양한 산업용 소재로 쓰일 수 있음.

- 삼 산업에 매진하고 있는 기업체인 헴프리 코리아는 고온보다 오랫동안 찜질을 할 수 있고 그로 인해 노폐물 배출량이 훨씬 높은 삼 찜질방을 선보였고 혈액순환과 관절염·아토피 등 현대인들의 질병에도 효과가 있는 삼 양말 및 속옷 등을 판매하고 있음.
- 우리나라는 생산과 소비규모가 크지 않아 삼시장이 보호될 가능성이 거의 없어 외국에 비해 경쟁력이 떨어지는 1, 2차 산업 분야인 줄기 및 종자용 삼 채배와 가공은 가급적 유보하고 삼산업의 새로운 분야인 지식산업과 3차 산업 분야를 선점해야 할 것임

3. 국내·외의 연구현황

- 삼 종실은 콩과 옥수수에는 없는 9종의 필수 아미노산을 포함한 총 20종의 아미노산 및 비타민 A, B, C, D, E, 미네랄 등을 포함하고 있음 (Hullar *et al.*, 1999).
- 삼 종실유와 올리브유를 비교하여 삼 종실유가 올리브유에 비해 항산화작용이 뛰어나고 Vitamin E가 포함되어 있으며, 안정성이 뛰어나 피부에 오래 남아 있으므로 건조증이나 이와 유사한 증상이 있는 피부에 효과가 있음을 제시 (Sapino S *et al.*, 2005).
- Industrial hemp bast fiber의 lignin과 lipid의 화학적 특성은 양질의 펄프 제지를 생산하는데 사용됨 (Gutiérrez A *et al.*, 2006)
- 아토피 환자에 대한 hemp seed oil 과 oliv oil의 식이요법 비교 결과, hemp seed oil이 환자의 증상을 완화시켜줌을 보여주었으며 이는 hemp seed oil 이 많고 풍부한 omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs)를 함유하고 있기 때문임. (Harvima I *et al.*, 2005)
- 화학펄프 화법과 표백법 그리고 수초지물성에 관한 연구가 수행중임.
- 핀란드에서는 14개의 삼 품종에 대한 각각의 섬유 특성을 분석, 파악하고 비교하여 산업용 삼품종 선택 및 신제품 육성에 박차를 가하고 있음.
- 삼 종실의 지방산 조성을 분석하여 삼 종실 지방산 중 일부는 체내에서 콜레스테롤의 수치를 저하시켜 성인병 예방에 대해 연구보고됨.
- 국내에서는 2006년에 한국헴프과학연구소 (KHI)가 설립되어 국내 유일의 삼 전문 연구기관으로 삼연구에 박차를 가하고 있음. 특히 삼 종실 추출물을 이용하여 피부질환 치료 효과 및 비만 예방 효과를 전문적으로 연구하는 팀은 본 연구팀을 제외하고는 없는 실정임. 최근에 삼 연고를 이용하여 아토피 치료 효과에 대한 연구를 진행하고 있음.

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
Netherlands Wageningen Agricultural University	화학펄프화법과 표백법 및 수초지 물성에 관한 연구	실험실상의 연구 진행이 이루어졌으며 본격적인 산업화를 위한 준비 단계
University of Minnesota	삼 산업용도 적용에 관한 연구	"
Hungary Budapest Technical University	활성 알칼리 및 황화도의 차이에 의한 연구	"
핀란드, Plant production research, Agricultural Research Center of Finland(MTT)	핀란드에서 확보하고 있는 14개의 삼 품종에 대한 각각의 섬유 특성 파악 및 비교	산업용 삼품종 선택 및 신제품육종
University of Veterinary Science, Budapest, Hungary	hemp를 비롯한 다양한 곡물을 동물에 먹인 후 energy 상태를 조사	실험실상의 연구 진행이 이루어졌으며 본격적인 산업화를 위한 준비 단계
Università degli Studi di Torino	hemp seed oil과 oliv oil을 비교하여 hemp seed oil이 oliv oil에 비해 항산화작용이 뛰어나고 Vitamin E가 포함되어 있으며, 안정성이 뛰어나 피부에 오래 남아 있으므로 건조증이나 이와 유사한 증상이 있는 피부에 효과가 있음을 제시	실험실상의 연구 진행이 이루어졌으며 본격적인 산업화를 위한 준비 단계
Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología	hemp bast fiber의 화학적 특성은 양질의 paper pulps를 만드는데 사용됨	실험실상의 연구 진행이 이루어졌으며 본격적인 산업화를 위한 준비 단계
University of Kuopio	hemp oil seed와 oliv oil을 아토피 환자에게 식이요법 처리 비교 결과 hemp seed oil이 더 효과가 있음을 보여줌	실험실상의 연구 진행이 이루어졌으며 본격적인 산업화를 위한 준비 단계
농촌진흥청 작물과학원 목포시험장	단일 시설내에서 암그루 재배 → 암그루 성 전환 → 자성종자 생산	특허 제 0496027호
중국남경농업대학	삼 탈지박의 아미노산 조성특성, 시험관내에서의 삼 단백질의 소화특성을 검토	삼 종실에서 단백질을 분리해 내는 방법으로 활용 (2007)
충북대학교 임산공학과	삼 섬유를 이용한 한지제조	무

<그림 5> 국 내외의 삼 연구현황

I . 삼 종실의 특성 및 식품 안전성 연구 (제 1, 2 세부 및 제 1, 2 위탁연구)

1. 삼 종실의 특성 분석 및 분자 마커의 개발
2. 삼 종실의 식품 안정성 및 효능 연구

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

1. 세부수행 연구결과

I. 삼 종실의 특성 분석 및 분자 마커의 개발

(1) 삼 종실의 세포, 조직학적 특성 분석

헴프종자는 다른 식물의 종자에 비해 유용성이 크고 다양한 산업분야의 소재로서 효용성이 높기 때문에 기본적인 연구수행의 필요성은 매우 크다. 본 연구는 이러한 기대에 부응하기 위해 광학 및 전자현미경을 이용하여 헴프종자의 외부형태 및 저장 물질의 구조적 특성을 밝히고자 하였다.

(가) 종자 외부형태 관찰

① 실험 방법

청삼 (*Cannabis sativa* cv. Chungsam) 종자를 2시간 동안 실온에서 전고정 (25 mM sodium phosphate buffer, 2% glutaraldehyde)하였다. 이들을 동일한 sodium phosphate buffer로 5분씩 3회 세척한 후, 2% osmium tetroxide로 1시간 동안 후고정한 뒤에 5분씩 3회 증류수를 이용하여 세척하였다. 주사전자현미경 (Scanning Electron Microscope) 관찰을 위해서 50, 70, 80, 90, 95, 100, 100% 농도상승순 ethanol 로 1시간씩 탈수한 후 isoamylacetate 에 보존한 뒤, 임계점건조기 (Bioradical E3000)에서 liquid CO₂ 에 의한 임계점건조 (critical point drying, CPD)과정을 거쳐 조직을 건조시켰다. stub 에 고정시킨 조직은 JFC 1110E ion coater (JEOL)를 이용하여 10분간 gold coating 한 후, S-3500N SEM (Hitachi)으로 관찰하였다.

② 실험 결과



Figure 1. 청삼 (*Cannabis sativa* cv. Chungsam) 종자를 해부현미경으로 관찰한 사진

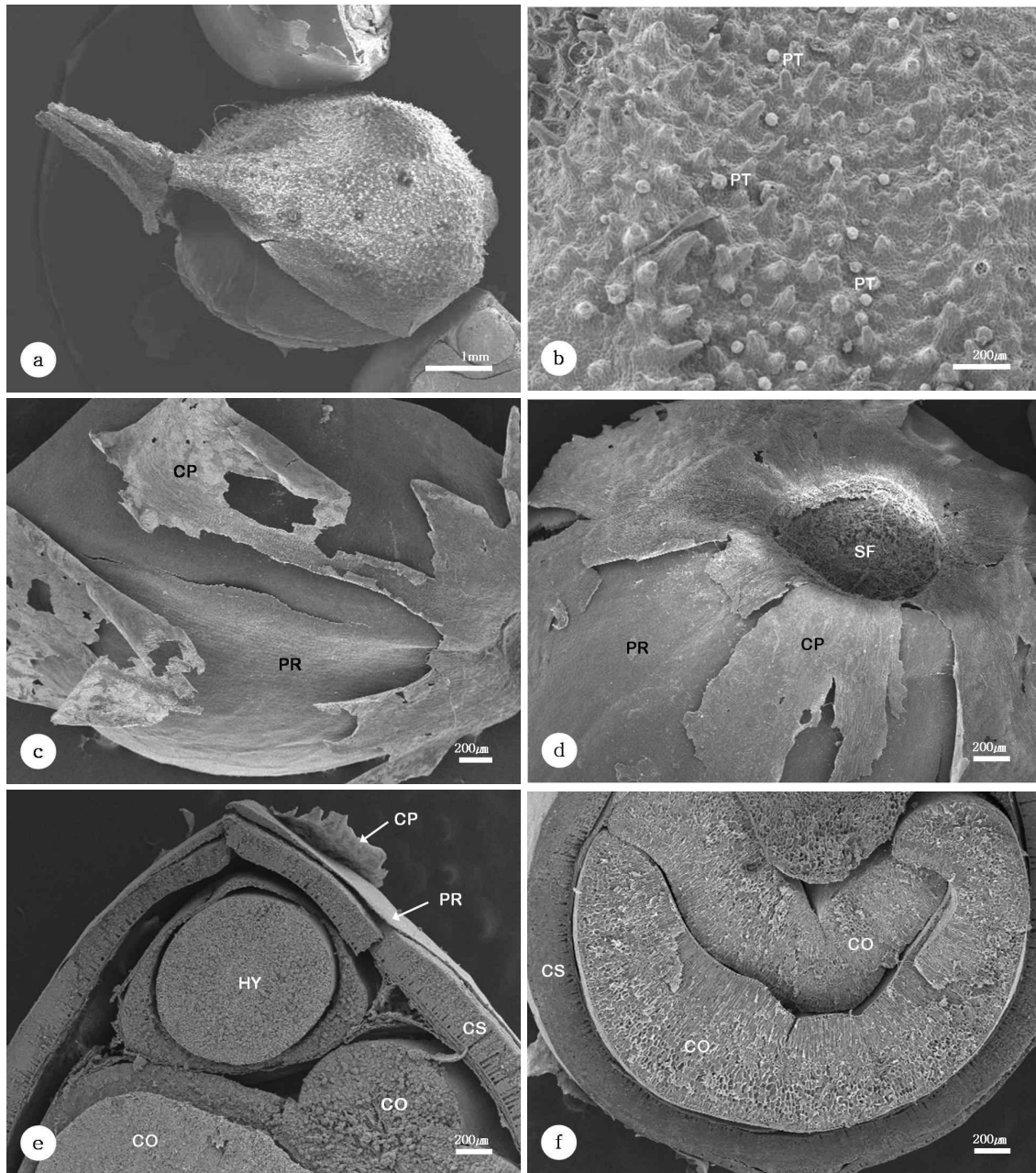


Figure 2. 청삼 (*Cannabis sativa* cv. Chungsam) 종자를 주사전자현미경 (SEM)으로 관찰한 사진

a. 외부 표면에 비분비모와 분비모로 덮여있는 포엽, b. 확대한 포엽 사진 / peltate glandular trichomes (PT), c. 과피와 각두 / cupule (CP) and pericarp (PR), d. 과피 기부에 함몰된 과경의 부착흔적과 융합되어 있는 각두 / fused cupules (CP) scar of a fruit stalk (SF), e. 종자의 횡단면 윗부분 / hypocotyl- radicle (HY), cotyledons (CO), exotesta (XT), pericarp (PR), cupules (CP), f. 종자의 횡단면 아랫부분 / cotyledons (CO), exotesta (XT).

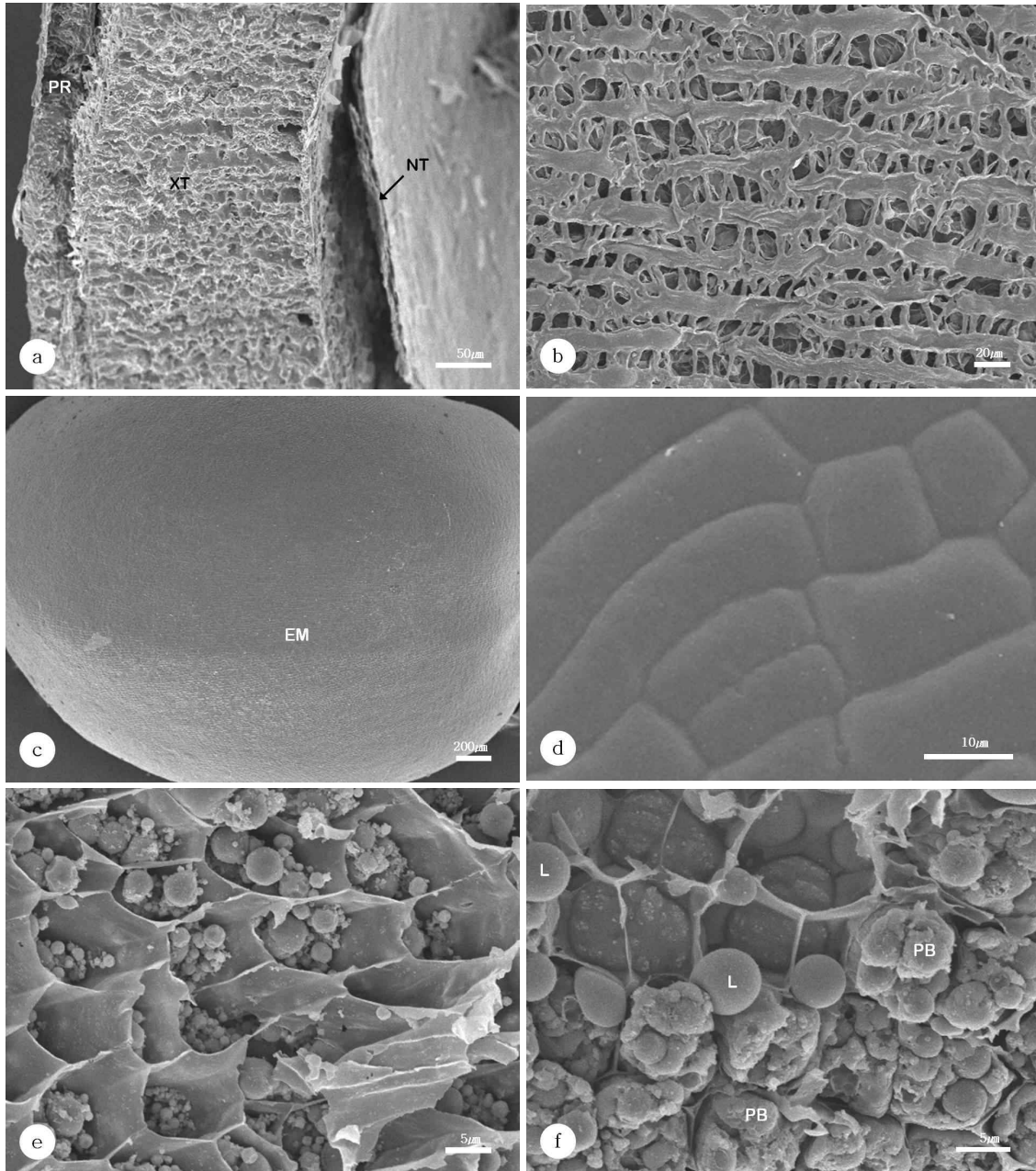


Figure 3. 청삼 (*Cannabis sativa* cv. Chungsam) 종자를 주사전자현미경 (SEM)으로 관찰한 사진

a. 외종피와 내종피 / exotesta (XT), inner endotesta (NT), b. 망상 구조의 내종피, c. 종자에서 분리된 배의 표면 / embryo (EM), d. 확대 관찰한 배의 표면을 이루는 세포, e. 다수의 과립이 분포하는 자엽세포, f. 자엽세포 내의 지질과립과 단백질 과립 / protein bodies (PB), lipid bodies (L).

헴프의 열매는 식물학적으로 견과 (nut)에 속하지만, 외형적으로 종자처럼 보이기 때문에 관습적으로 열매를 종자로 통칭한다. 열매의 가장 바깥 부분은 포엽 (bract)이 싸고 있는데, 한쪽 일부분은 열려서 외부로 노출되며 가느다란 관상의 돌출 구조를 이루고 있었다(Fig. 2a). 포엽의 바깥 표면은 많은 비분비모 (non-glandular trichome)와 분비모

(glandular trichome)로 덮혀 있었으며, 분비모들은 유병분비모 (stalked glandular trichome)와 무병분비모 (sessile glandular trichome)의 2가지 유형으로 구분되었다(Fig. 2b). 열매의 길이는 보통 2-6 mm, 직경은 2-4 mm의 크기를 갖는데, 포엽이 벗겨진 열매의 바깥 껍질인 과피 (pericarp)는 목화된 각두 (cupule)에 의해 부분적으로 덮혀 있었다 (Fig. 2c). 과피의 바깥에 위치한 과편상의 각두는 과경의 부착흔적인 함몰된 기부쪽에서 모두 융합되어 있었다 (Fig. 2d). 과피의 아래쪽에는 두껍고 단단한 종피 (seed coat)가 종자 내부의 배 (embryo)를 보호하고 있었다. 종피는 두껍고 단단하게 목화된 외종피 (exotesta)와 얇은 막상의 내종피 (endotesta)로 구성되어 있었다 (Fig. 2e). 종피의 안쪽에는 2장의 자엽과 하배축-유근 (hypocotyl-radicle) 주축을 이루는 U자형의 배가 종자 내부 전체를 차지하였다 (Fig. 2f). 외종피는 목화되고 신장된 파상의 세포들로 구성되어 있었다 (Fig. 3a). 그러나, 내종피는 얇은 망상구조를 지니는 외부의 막과 배와 직접 맞닿고 있는 내부의 막 등 2개의 층으로 구성되어 있었다 (Fig. 3b). 배는 막상의 내종피를 제거하면 표면이 매끄러워 쉽게 분리되었다 (Fig. 3c).

헴프종자는 얇은 갈색의 과피가 종피에 밀착되어 있기 때문에 열매가 아닌 종자로서 잘못 인식되어 왔다. 종자를 둘러싸는 종피는 과피 아래의 단단한 외종피와 육안으로 관찰할 때 녹색을 띠는 막상의 내종피로 구성되어 있다. 실제 종피로서의 기능은 진한 갈색을 나타내고 긴 장방형의 세포들로 치밀하게 구성된 외종피가 담당하는 것으로 사료된다. 밝은 녹색의 내종피는 Fig. 3c와 같이 독특한 망상구조를 이루며 수많은 공극을 지니고 있어서 투과성을 극대화시키고 있는데, 이러한 구조는 배를 보호하는 동시에 흡수된 물과 산소를 배에 원활하게 공급하기 위한 방안이라고 사료된다.

배의 표면은 크기가 다른 장방형의 세포들로 구성되어 있었다 (Fig. 3d). 자엽세포 (cotyledon cell)에는 구형의 단백질과립 (protein body)과 지질과립 (lipid body)이 다수 분포하고 있었다. 지질과립은 표면이 매끈한 구형이었지만, 단백질과립은 표면이 불규칙한 형태로 관찰되었다 (Fig. 3e, f).

(나) 종자의 저장물질

① 실험 방법

㉠ 광학현미경

청삼 (*Cannabis sativa* cv. Chungsam) 종자를 FAA (formalin-acetic acid-ethanol)에 넣어 상온에서 12시간 고정하였다. 고정된 시료는 70, 80, 90, 95, 100, 100% ethanol에 각각 1시간씩 농도 상승순으로 탈수한 후 AX (ethanol :xylene=1: 1), Xylene, PX I (paraffin :xylene=1: 2), PX II (paraffin :xylene=2: 1)을 거쳐 hard paraffin (MP 56~58°C)으로 포매하였다. 포매된 시료는 rotary microtome (Leica 820, Wetzlar, Germany)으로 7 μm의 절편을 제작하였으며, slide glass 에 신전한 뒤 dryer 에서 48시간 건조시켰다.

각각의 시료를 deparaffin 시킨 다음, Basic Fuchsin, Brilliant Blue R, Sudan III, IV, Sudan black B, Nile blue, Schiff reagent 를 비롯한 여러 염료로 단백질을 선택적으로 염색하고 Canada balsam 으로 mounting 한 후 24시간 실온에서 건조시켰다. 제작된 영구조직표본을 광학현미경 (BH-2, Olympus, Tokyo, Japan)으로 관찰·촬영하고, Image analyser를 통해 분석하였다.

㉔ 투과전자현미경

청삼 (*Cannabis sativa* cv. Chungsam) 종자를 해부현미경하에서 분리하여 두께 1×1 mm 로 자르고, 2시간 동안 실온에서 전고정 (25 mM sodium phosphate buffer, 2% glutaraldehyde)하였다. 이들을 동일한 sodium phosphate buffer 로 5분 씩 3회 세척한 후, 2% osmium tetroxide 로 1시간 동안 후고정한 뒤에 5분 씩 3회 증류수를 이용하여 세척하였다. 투과전자현미경 (Transmission Electron Microscope) 관찰을 위해서는 고정이 끝난 시료를 ethanol 50, 70, 80, 90, 95, 100, 100% 농도 상승순으로 1시간 씩 탈수한 뒤, Spurr 혼합액에 포매하고 Reichert-Ultracut S ultramicrotome (Leica) 으로 semi-section 하여 부위를 확인한 후 은색절편을 200-mesh grid 에 수집하였다. 이후 절편조직을 uranyl acetate 와 lead citrate 로 이중염색 시켜 LEO-912AB TEM (LEO) 으로 관찰하였다.

㉕ 실험 결과

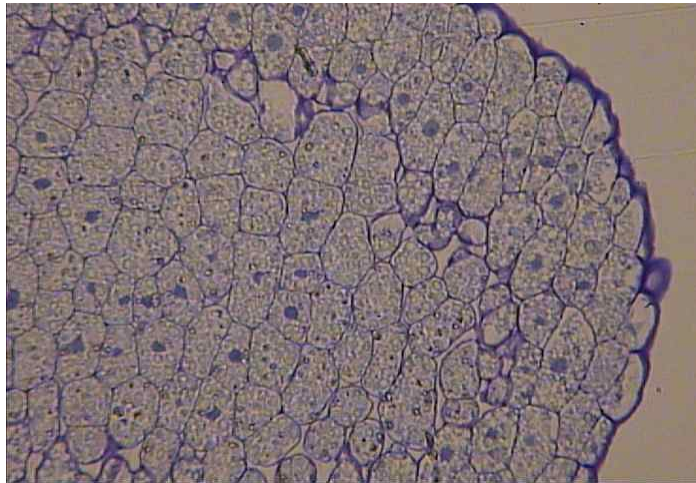


Figure 4. Basic Fuchsin, Rosaniline, 2-Propanol chloride 로 구성된 multiple dye 로 염색하여 관찰한 삼 자엽조직의 LM 사진

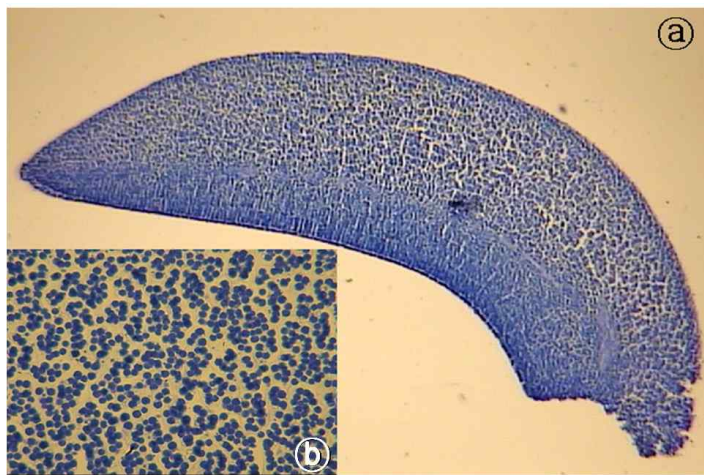


Figure 5. Brilliant Blue R. 로 염색한 삼 종실의 LM 사진

전체 종실 ㉔ × 40,
확대된 배유조직 ㉕ × 400

단백질 과립을 선택적으로 염색시켜 관찰한 결과, Basic Fuchsin 염색을 통해 단백질 과립이 세포내에 다수 분포하고 있음을 알 수 있었다 (Fig. 4). 또한 Brilliant Blue R 로 염색한 전체 배유 사진에서 배유 조직의 외각과 내부 세포의 배열과 단백질체 분포에 차이가 나는 것을 볼

수 있었다 (Fig. 5).



Figure 6. squash method 를 사용하여 Sudan III로 histochemical staining 시킨 삼 종실의 사진. (x400)

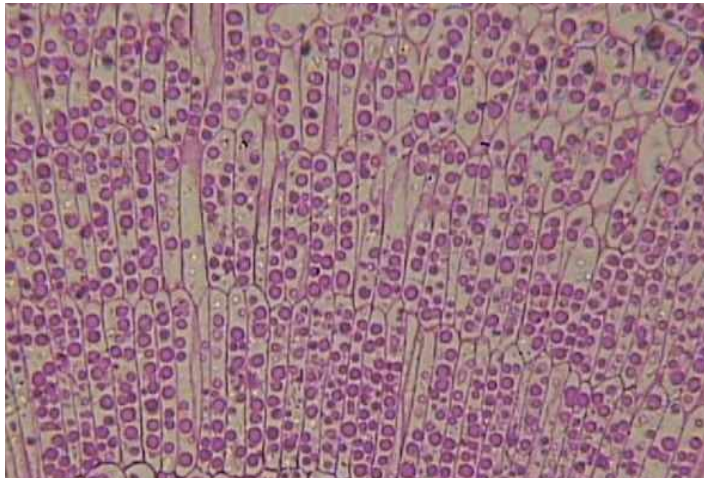


Figure 7. 0.7 μ m로 semi-section 한 Spurr 절편을 mutiple stain solution 으로 염색한 사진. (x400)

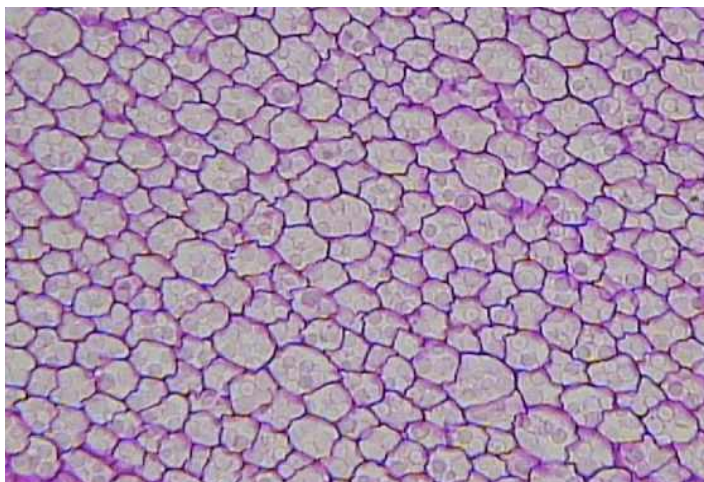


Figure 8. 종자의 자엽조직을 PAS (periodic acid - schiffs reagent) 염색한 사진. (x400)

종자에 함유된 저장 과립을 분석하기 위해 시도한 sudanIII 염색에서 오렌지색으로 염색된 지질 과립을 볼 수 있었으며, 오렌지 색으로 염색되지 않은 나머지는 단백질과립이다 (Fig. 6). 탄수화물을 확인하기 위한 PAS staining 에서는 저장 물질에 특이적으로 염색 되지는 않았다 (Fig. 8).

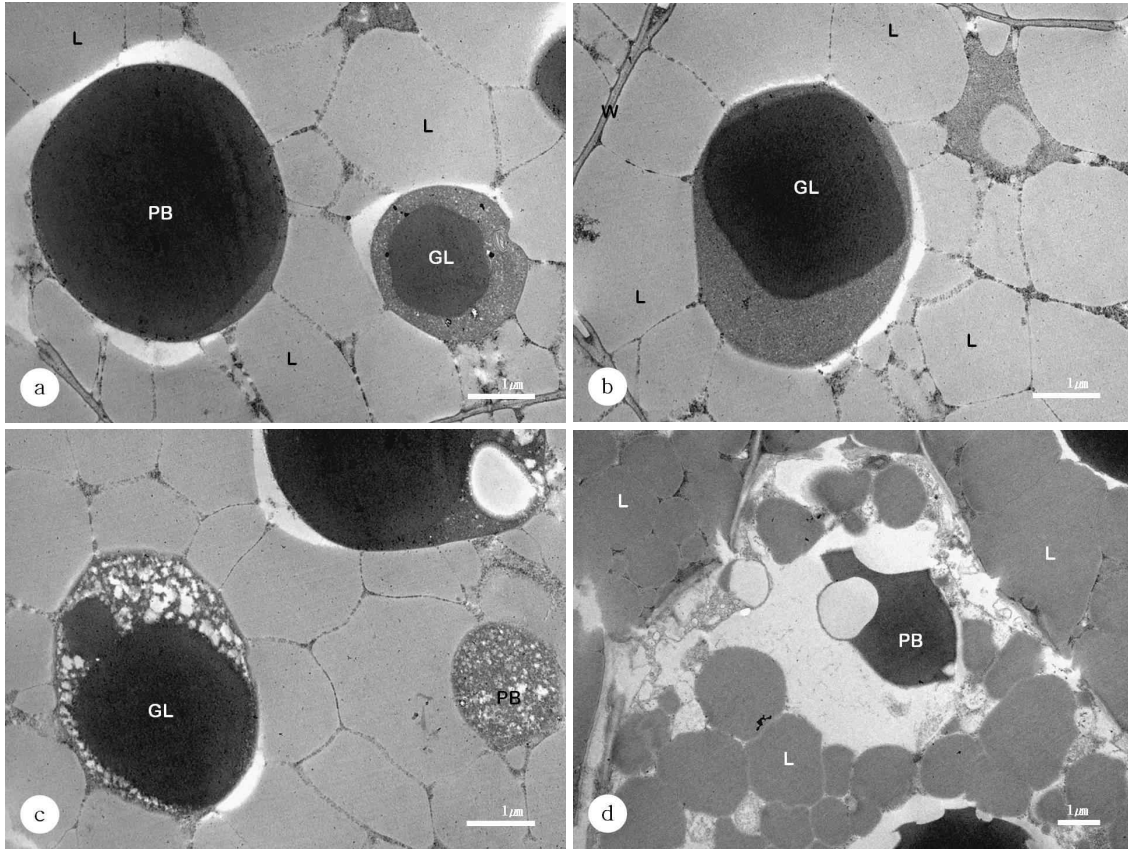


Figure 9. 청삼 (*Cannabis sativa* cv. Chungsam) 종자의 자엽조직을 투과전자현미경 (TEM)으로 관찰한 사진

a. 전자 밀도가 다른 두 개의 단백질 과립 / protein bodies (PB), globoid crystal (GL), b. globoid crystal 구조를 가진 단백질 과립과 단백질 과립 주변을 둘러싸고 있는 지질 과립 / globoid crystal (GL), lipid bodies (L), c. 주변 부위부터 분해되는 양상을 보이는 단백질 과립, d. 액포를 형성하는 단백질 과립의 분해와 지질 과립의 분해 과정

헴프종자의 자엽세포는 단백질과립과 지질과립이 가득 차 있었지만, 배측세포의 세포질에는 액포로 차있고, 이들 저장과립은 드물게 분포하였다. 단백질과립은 자엽세포 전체에 모두 분포하면서, 세포 면적의 약 20%를 차지하고 있었다. 단백질과립은 1.8-5.0 μm 크기로서 구형 또는 타원형을 이루었는데 중앙 부위의 전자밀도가 높은 globoid crystal 구조와 전자밀도가 낮은 이질적인 주변부위로 구성되어 있었다. globoid crystal 구조의 내부는 격자상을 이루고 있는 경우가 대부분 이었다 (Fig. 9a-d). *Pisum*속과 같이 대부분의 식물 종자에서는 globoid crystal 이 일부 단백질과립에서만 관찰되지만 (Lott et al., 1984), 헴프종자는 모든 단백질과립에서 이 구조가 관찰되었다. 또한, 헴프종자에서는 단백질과립 내에 phytoferritin 과립이 전혀 관찰되지 않았다 (Prego et al., 1998). 때때로 Fig. 9a, b 처럼 단백질과립 간에도 matrix 의 크기와 성상에 차이를 갖는 경우도 있었는데, 이런 형태적 차이는 이들이 지닌 단백질의 종류와 분해 양상과 상관관계가 있을 것으로 추측된다. 단백질과립의 주변 세포질에는 0.8-3.0 μm 크기의 지질과립이 분포하였다. 식물세포내의 지질을 포함하는 과립은 oil body, oil droplet, lipid body, spherosome, oleosome 등으로 다양하게 지칭되는데, 이들은 주로 세포소기관인 지질과립에 저장된다

(Huang, 1992). 지질과립은 종자세포 내에서와 추출된 상태에서 구형의 형태를 갖는다. 그러나 성숙한 많은 종자의 세포에서는 주변의 압력에 의해 다소 다른 형태를 지니기도 한다. 지질과립은 0.2-2.5 μm 크기를 갖지만 영양적, 환경적인 요인에 의해서 크기가 달라진다. 또한 같은 종에 있어서도 조직의 종류에 따라 그 속에 포함된 지질과립의 크기가 다소 차이를 갖지만 기본적인 구조는 매우 유사하다고 알려져 있다 (Tzen et al., 1993). 일반적으로 성숙한 종자의 지질과립 표면은 인지질 단일층이 둘러싸고 있어서 친수성을 나타낸다. 이러한 지질과립은 세포 안에서나 또는 이들 과립을 세포로부터 분리해 내어도 매우 안정적이며 응집되지 않는다 (Huang, 1992). 헴프종자의 지질과립도 배유세포내에서 단백질과립과 밀착하고 있고 서로 응집되는 양상은 나타내지 않았는데, 이 두 가지 저장과립 표면은 모두 친수성 분자들이 포함되어 있다고 사료된다. 종자의 저장기간이 경과되면서 단백질과립은 점차 과립의 주변부위부터 분해되는 양상이 나타났다 (Fig. 9c). 단백질과립의 분해가 일어난 뒤 지질과립도 부정형의 형태를 이루는 분해현상을 나타내었고, 결국 단백질과립과 함께 점차 액포를 형성하였다 (Fig. 9d). 헴프종자는 채종 이후 대부분의 저장과립들이 분해과정에 들어가기 시작한다. 특히 단백질과립은 빠르게 분해되기 시작하여 그 형태와 구조를 소실하지만 지질과립은 단백질 과립만큼 분해과정이 빠르지 않다. 이러한 사실은 종자의 저장과립인 지질과립, 단백질과립, 탄수화물과립 등의 합성과 분해과정은 서로 독립적으로 이루어지며 과립간 상관관계가 크지 않다는 타 연구결과와 일치하는 것이다 (Finkelstein & Somerville, 1990; Borek et al., 2009). 많은 식물들은 종자가 성숙할 때, 수분소실이 일어나 배의 생리활성을 낮추거나 휴면상태에 들어가도록 한다. 완두종자도 자엽의 내부 세포로부터 외부 세포 쪽으로 점차적인 수분소실이 일어나고 전분과립이 축적됨으로써 종자성숙이 이루어진다 (Garczarska et al., 2008). 헴프종자는 채종 첫해의 발아율이 가장 높고 그 이후 점차 감소하여 채종 후 2년부터는 전혀 발아하지 않는다고 보고되었다 (Bocsa & Karus, 1998), 본 연구의 결과에서 나타난 것과 같이 단백질과립의 급격한 소실과 점진적인 지질과립의 소실현상은 채종 이후 2년까지 계속적으로 일어나는 현상으로서 이들 저장과립이 발아에 직접 영향을 미치는 것으로 판단되었다.

(2) 삼 종실의 단백질 프로파일 분석을 통한 기능성 단백질 발굴

(가) 삼종실의 아미노산 분석

① 실험 방법

껍질을 완전히 제거한 청삼 종자 1 g 을 균질화한 후, trichloroacetic acid 침전, methanol 침전, ether 처리의 세 가지 방법으로 단백질 침전을 얻은 후 단백질 정량을 실시하였다. 그 결과에 따라 가장 단백질 수득률이 높은 방법을 선택하여 향후 단백질 추출에 사용하고자 하였다. 그리고 삼종실 단백질을 대상으로 아미노산 조성 분석을 실시하였다.

② 실험 결과

삼종실 1 g 에서 trichloroacetic acid 로 침전하였을 때 8.99 mg, ether로 처리하였을 때 4.09 mg, 그리고 methanol로 침전하였을 때 8.53 mg 의 단백질이 용출되었다 (data not shown). 그 결과 가장 많은 단백질이 용출되는 방법은 trichloroacetic acid (TCA) 침전법임을 알 수 있었다. TCA 침전법으로 분리한 단백질의 아미노산 조성분석 결과는 아래의 표와 같다 (Table 1).

Table 1. 삼 종실의 아미노산 조성분석

Amino acid	Hemp seed (%)
Alanine	7.37
Arginine	2.73
Aspartic acid	8.76
Cystine	2.98
Glutamic acid	16.82
Glycine	16.51
Histidine	3.45
Isoleucine	3.22
Leucine	6.02
Lysine	5.28
Methionine	0.55
Phenylalanine	2.93
Proline	5.05
Serine	7.63
Threonine	3.94
Tryptophan	1.40
Tyrosine	0.11
Valine	5.25
Total	100

(나) 삼종실의 항산화효소 활성 염색

① 실험 방법

삼 종실에 유용 항산화효소가 있는지 확인하기 위해 in situ antioxidant staining 을 실시하였다.

② 실험 결과

Catalase 는 3 개의 동위효소인 CAT1, CAT2, CAT3 로 구성 되어있었고, superoxide dismutase 는 SOD1, SOD2, SOD3, SOD4, SOD5 인 5 개의 동위효소로 구성되어 있었다. Ascorbate peroxidase 는 4 개의 동위효소인 APX1, APX2, APX3, APX4 로 구성되어 있었으며 glutathione reductase 는 3 개의 동위효소인 GR1, GR2, GR3 로 그리고 glutathione peroxidase 도 3 개의 동위효소인 GPX1, GPX2, GPX3 로 구성되어 있음을 확인할 수 있었다 (Fig. 10).

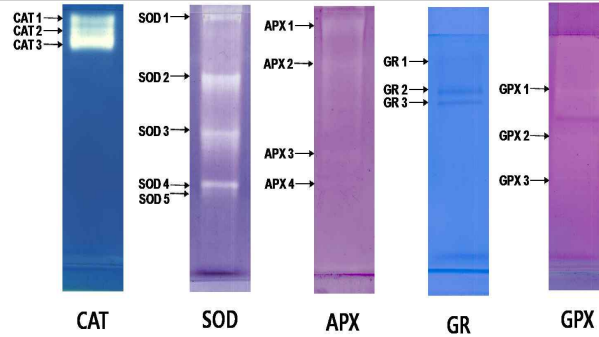


Figure 10. 삼종실의 유용 항산화효소 확인을 위한 in situ antioxidant staining

(다) 삼종실의 이차원 전기영동

① 실험 방법

1차원 전기영동으로 단백질의 등전점에 따라 총 단백질을 고정시키고 SDS-PAGE gel에 strip gel을 얹은 후 marker가 주입된 paper를 올려 2차원 전기영동을 실시하였다. 그리고 colloidal comassie brilliant blue G250 staining 용액에 2차원 전기영동을 실시한 gel을 넣어 염색하였다. 이차원 전기영동 맵을 표준화하여 in-gel digestion 방법으로 스팟을 분리한 후, MS/MS 질량분석법으로 단백질 스팟의 질량을 분석하고 데이터베이스 검색을 통해 유사하거나 일치하는 단백질을 찾아서 분석하고 동정하였다.

② 실험 결과

단백체 기술을 사용하여 전체 단백질 발현을 확인하기 위해 이차원 전기영동을 실시한 결과, trichloroacetic acid 로 침전시킨 삼종실 단백질에서 총 1,102 개의 단백질 스팟을 분리하였다. 그리고 필요에 따라 ether 처리와 methanol 로 침전시킨 삼종실 단백질을 이차원 전기영동 한 다음 분해능이 우수한 구역을 선별하여 단백질 스팟을 분리하였다 (Fig. 11). 총 170 개의 단백질을 동정한 결과, 스팟 37 번인 acetyl-CoA ligase, putative transketolase 1인 스팟 52, 53 번, 스팟 60, 61 번 putative leukotriene-A4 hydrolase 와 NADP-dependent leukotriene B4, 12-hydroxydehydrogenase 인 스팟 168 번 등의 지방 합성과 관련한 효소가 발현함을 확인할 수 있었다. 그리고 스팟 41 번인 SODCP_MEDSA Superoxide dismutase [Cu-Zn], chloroplastic, GSH-dependent dehydroascorbate reductase 1인 스팟 120 번, dehydroascorbate reductase 인 스팟 121, 123 번, 스팟 122 번인 Mn-superoxide dismutase, 그리고 스팟 137 번인 cytosolic CuZn-superoxide dismutase 등의 항산화 효소가 발현하였다 (Table 2).

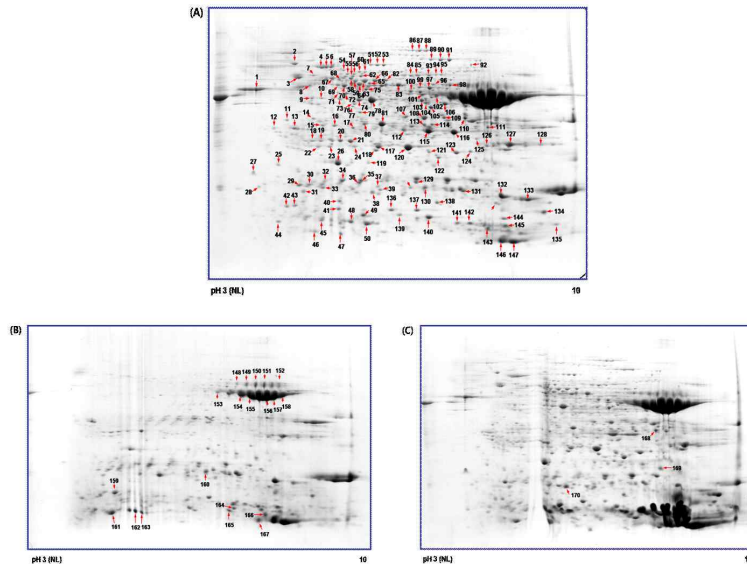


Figure 11. 다양한 침전법에 의해 추출된 청삼 종실 전체 단백질의 이차원 전기영동
 A. Trichloroacetic acid 침전을 통한 삼 종실 단백질, B. Ether 처리를 통한 삼 종실 단백질,
 C. Methanol 침전을 통한 삼 종실 단백질

Table 2. 청삼 종실에 존재하는 단백질

No	Identified protein	Accession	Score	Cov %	MW
1	ribose-1,5-bisphosphate carboxylase large subunit	5725127	78.28	14.38	51637.1
2	heat shock protein 70-like protein	115305876	20.24	13.04	12538.8
3	putative chaperonin 60 alpha subunit	29367489	20.25	14.70	23241.2
4	heat shock protein 70	56554972	108.32	20.96	70952.2
5	heat shock protein 70	56554972	78.32	17.10	70952.2
6	heat shock protein 70	56554972	88.34	21.57	70952.2
7	AF377946_9 3,4-dihydroxy-2-butanone kinase	21321784	20.19	3.65	60041.1
8	vacuolar ATP synthase subunit B	213401317	10.21	3.10	52913.2
9	L Chain L, X-Ray Structures Of Fragments From Binding And Nonbinding Versions Of A Humanized Anti-Cd18 Antibody: Structural Indications Of The Key Role Of Vh Residues 59 To 65	515288	20.27	17.76	23438.5
10	eukaryotic initiation factor 4A	303844	38.24	15.74	46902.0
11	AF300705_1 beta-actin	10304437	30.22	18.35	41840.8
12	elongation factor 1 beta	218161	10.23	7.60	23758.1
13	aspartic protease	1030715	10.16	1.80	54111.0
14	hypothetical protein (Os05g0573700)	115465569	30.34	9.30	62337.8
15	hypothetical protein (Os08g0327400)	115475922	20.30	6.93	39106.1
16	hypothetical protein (Os01g0978100)	115442595	30.26	8.90	41761.7
17	OASTL	123229678	20.20	16.00	20641.0
18	sorting nexin-41	213406539	10.11	2.40	70507.0
19	aspartic protease	1030715	20.16	7.30	54111.0
20	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	145617261	30.31	24.02	21524.4
21	aspartic protease	1030715	20.23	7.30	54111.0
22	hypothetical protein (Os09g0535000)	115480367	60.25	9.54	32372.7
23	hypothetical protein (Os09g0535000)	115480367	50.24	9.54	32372.7
24	heat shock protein 70	33088803	8.22	8.60	20845.0
25	hypothetical protein (Os11g0660500)	115486523	28.16	17.30	18934.5
26	putative UDP-glucose:salicylic acid glucosyltransferase	50725330	10.12	3.00	49487.5
27	AC079128_9 Unknown protein	14028985	10.19	1.80	123270.7

28	AF300705_1 beta-actin	10304437	20.20	7.70	41840.8
29	hypothetical protein (Os05g0295100)	115463019	8.15	2.60	76070.9
30	hypothetical protein	52353589	8.12	5.40	41692.5
31	ubiquitin-like protein SMT3	55859483	10.17	13.20	8728.2
32	hypothetical protein (Os02g0761900)	115448841	10.17	6.55	18038.3
33	hypothetical protein (Os02g0761900)	115448841	10.17	6.50	18038.3
34	hypothetical protein Bind_0268	182677266	10.15	9.00	15464.7
35	hypothetical protein (Os06g0237100)	115467294	4.13	4.30	22909.0
36	retrotransposon protein, putative, unclassified	62734762	8.13	2.10	64992.3
37	acetyl-CoA ligase	213406327	10.12	1.50	72569.2
38	HSP11 18.1 kDa class I heat shock protein	123554	40.16	27.30	16457.3
39	AF300705_1 beta-actin	10304437	50.21	19.15	41840.8
40	erythrocyte membrane protein 1-like	53792587	10.15	19.80	9549.2
41	SODCP_MEDSA Superoxide dismutase [Cu-Zn], chloroplastic	12230569	30.32	13.86	20812.7
42	whi5 domain-containing protein	213409441	10.13	4.50	39794.2
43	hypothetical protein (Os02g0192700)	115444771	10.20	8.89	23165.1
44	profilin 1	82412211	20.21	17.60	14061.0
45	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	145617261	20.20	14.20	21524.4
46	hypothetical protein (Os02g0192700)	115444771	10.19	8.90	23165.1
47	AF300705_1 beta-actin	10304437	10.20	4.30	41840.8
48	AF300705_1 beta-actin	10304437	20.22	7.70	41840.8
49	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	145617261	30.29	24.00	21524.4
50	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	145617261	30.29	24.02	21524.4
51	AF300705_1 beta-actin	10304437	20.22	8.00	41840.8
52	putative transketolase 1	55296168	30.14	3.80	68836.5
53	putative transketolase 1	55296168	30.14	3.80	68836.5
54	Putative heat shock 70 KD protein, mitochondrial precursor	27476086	30.27	4.30	70403.5
55	hypothetical protein (Os01g0817700)	115440691	40.25	6.26	60752.1
56	hypothetical protein Bind_0268	182677266	10.12	9.00	15464.7
57	hypothetical protein (Os08g0559600)	115477815	30.28	7.60	63609.5
58	hypothetical protein (Os06g0114000)	115466004	94.31	18.64	64046.1
59	hypothetical protein (Os03g0256400)	115451995	30.14	7.40	61016.3
60	putative leukotriene-A4 hydrolase	71534918	10.17	6.40	17859.9
61	putative leukotriene-A4 hydrolase	71534918	10.17	6.40	17859.9
62	hypothetical protein (Os08g0559600)	115477815	60.33	14.81	63609.5
63	actin	12697516	10.21	5.90	30032.2
64	Leucine aminopeptidase 2, chloroplastic	75261364	48.27	9.70	61780.0
65	Leucine aminopeptidase 2, chloroplastic	75261364	38.23	7.00	61780.0
66	hypothetical protein OsJ_013271	125589438	10.12	9.70	13669.1
67	hypothetical protein (Os10g0462900)	115482382	118.27	26.13	60812.1
68	hypothetical protein (Os10g0462900)	115482382	138.28	29.79	60812.1
69	putative alanine aminotransferase	33146868	10.15	1.90	53258.9
70	putative alanine aminotransferase	33146868	10.17	1.90	53258.9
71	hypothetical protein (Os09g0553200)	115480571	50.29	12.80	51650.3
72	hypothetical protein (Os09g0553200)	115480571	50.26	11.90	51650.3
73	actin	122891666	10.19	29.17	7727.9
74	AF300705_1 beta-actin	10304437	20.23	12.80	41840.8
75	actin	12697516	10.22	5.90	30032.2
76	Isocitrate dehydrogenase [NADP], chloroplastic	2497259	60.24	14.55	48352.8
77	glutamine synthetase	2073448	40.33	12.36	39136.7
78	AF300705_1 beta-actin	10304437	20.21	7.71	41840.8
79	AF300705_1 beta-actin	10304437	30.22	14.40	41840.8
80	AF300705_1 beta-actin	10304437	50.22	23.40	41840.8
81	putative glyoxalase	50252391	20.24	9.31	32165.4
82	actin	12697516	10.22	5.90	30032.2
83	Putative enolase (2-phospho-D-glycerate hydrolyase)	22655764	36.26	16.36	45912.4
84	Pyrraline-5-carboxylate dehydrogenase	48525720	10.16	17.00	11152.7
85	methionine synthase	50727380	10.21	8.70	20805.7
86	Putative aconitate hydratase	75225211	68.26	9.60	98020.7
87	Putative aconitate hydratase	75225211	60.18	7.46	98020.7
88	AF300705_1 beta-actin	10304437	20.20	12.77	41840.8

89	methionine synthase	50727380	20.22	13.04	20805.7
90	methionine synthase	50727380	10.22	8.70	20805.7
91	methionine synthase	50727380	30.23	16.85	20805.7
92	transmembrane GTPase fzo1	213401119	10.15	2.26	86026.3
93	methionine synthase	50727380	20.21	12.50	20805.7
94	aminoimidazolecarboximide ribonucleotide transformylase/inosine monophosphate cyclohydrolase	71535007	10.29	9.74	21577.7
95	methionine synthase	50727380	20.23	13.04	20805.7
96	phosphoglucose isomerase (Pgi-b)	639686	20.19	4.05	62380.3
97	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase large subunit	5725127	50.26	9.87	51637.1
98	phosphoglucose isomerase (Pgi-b)	639686	40.21	8.60	62380.3
99	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase large subunit	5725127	40.25	8.15	51637.1
100	phosphogluconate dehydrogenase	166361905	10.20	6.58	17126.1
101	AF300705_1 beta-actin	10304437	40.22	20.50	41840.8
102	actin	12697516	10.21	5.90	30032.2
103	alcohol dehydrogenase	51587338	50.21	10.53	41069.6
104	chaperone protein DnaK	182677129	10.25	2.69	67567.3
105	heat shock protein 70	56554972	68.25	11.56	70952.2
106	heat shock protein 70	33088803	18.28	16.58	20845.0
107	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	11133373	40.23	13.60	35524.3
108	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	145617261	40.28	27.45	21524.4
109	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	145617261	40.32	27.45	21524.4
110	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	145617261	40.29	27.40	21524.4
111	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	145617261	10.15	7.40	21524.4
112	putative glyoxalase	50252391	10.24	5.50	32165.4
113	hypothetical protein Bind_0268	182677266	10.11	9.00	15464.7
114	hypothetical protein (Os01g0190000)	115435008	10.11	3.60	36516.8
115	putative glyoxalase	50252391	10.21	5.50	32165.4
116	putative glyoxalase 1	50252391	18.24	9.31	32165.4
117	hypothetical protein (Os01g0841600)	115440977	10.30	8.20	27256.2
118	hypothetical protein Bind_0268	182677266	10.12	9.00	15464.7
119	putative glyoxalase 1	50252391	10.14	5.50	32165.4
120	GSH-dependent dehydroascorbate reductase 1	6939839	8.14	3.80	23541.2
121	dehydroascorbate reductase	66732627	10.13	3.10	29082.1
122	Mn-superoxide dismutase	33521626	10.19	4.50	26889.9
123	dehydroascorbate reductase	66732627	10.13	3.10	29082.1
124	GTP-binding nuclear protein Ran1A	1710007	38.21	20.57	23772.0
125	alpha 4 subunit of 20S proteasome	9186906	40.25	22.18	27084.1
126	AC092548_2 putative receptor kinase-like protein	20279444	2.19	5.30	39498.8
127	putative transmembrane trafficking protein	51535942	8.13	6.60	23657.5
128	OSJNBa0074B10.9	38346259	10.14	0.80	190472.4
129	hypothetical protein (Os02g0770000)	115448935	10.24	6.90	26257.2
130	putative reverse transcriptase	34015265	10.16	0.90	180091.8
131	ubiquitin/ribosomal 27a	61741081	10.17	11.30	16172.8
132	phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide-transferase	182677682	10.11	4.70	38673.8
133	hypothetical protein (Os02g0121300)	115443875	10.19	8.10	18349.1
134	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	145617261	40.25	19.10	21524.4
135	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	145617261	20.21	14.20	21524.4
136	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	145617261	20.20	14.22	21524.4
137	cytosolic CuZn-superoxide dismutase	32441511	20.22	13.20	15104.5
138	AF300705_1 beta-actin	10304437	30.23	13.83	41840.8
139	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	145617261	30.19	24.00	21524.4
140	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	145617261	50.33	30.90	21524.4
141	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	14567261	30.29	24.00	21524.4
142	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	14567261	30.34	24.00	21524.4
143	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	14567261	20.31	16.70	21524.4
144	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	14567261	30.29	24.00	21524.4
145	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	145617261	10.31	9.80	21524.4
146	putative chloroplast phosphoglycerate kinase	46981258	20.20	9.35	32368.4
147	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	145617261	10.24	9.80	21524.4

148	hypothetical protein (Os05g0295100)	115463019	8.11	2.60	76070.9
149	hypothetical protein (Os05g0156700)	115462199	10.15	2.40	67070.8
150	hypothetical protein (Os05g0156700)	115462199	10.16	2.40	62070.8
151	leucine-rich repeat-containing protein sog2	213401663	10.12	1.70	96568.7
152	hypothetical protein (Os02g0439200)	115445925	10.15	1.70	80694.5
153	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	145617261	20.19	14.22	21524.4
154	Protein of unknown function (DUF1263), putative	62733286	10.20	5.60	36628.0
155	Protein of unknown function (DFU1263), putative	62733286	8.19	5.60	36628.0
156	tryptophan decarboxylase	51090246	10.12	3.38	57085.2
157	Glutathione gamma-glutamylcysteinyltransferase 1	122208907	10.10	3.00	55483.9
158	putative circumsporozoite protein	24796769	4.11	6.30	38969.4
159	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	145617261	20.20	14.20	21524.4
160	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	145617261	20.31	16.67	21524.4
161	hypothetical protein Bind_3195	182680098	10.12	4.20	35149.5
162	hypothetical protein OsL_20006	218196820	10.15	12.40	17691.0
163	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	145617261	20.29	16.70	21524.4
164	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	145617261	20.24	14.20	21524.4
165	putative membrane related protein CP5	34393225	10.14	4.60	44314.3
166	MxaD	192360187	10.12	0.50	285344.8
167	leucine-rich repeat-containing protein sog2	213401663	10.11	1.70	96568.7
168	NADP-dependent leukotriene B4 12-hydroxydehydrogenase	213405185	10.10	3.40	38832.3
169	Hrq1p	213405281	8.14	2.00	119805.0
170	18.1 kDa class I heat shock protein	123554	40.23	27.27	16457.3

(3) 단백질 기술을 통한 삼 종자 variate간 발현 단백질 비교 및 동정

(가) 청삼과 보성 종실 내의 단백질 프로파일 비교

① 실험 방법

완전히 껍질을 제거한 보성 종실과 청삼종실 1 g 씩을 각각 균질화 시킨 다음, trichloroacetic acid 침전방법으로 약 10 mg 의 단백질 침전을 얻었다. 동일한 양의 보성 종실 단백질과 청삼 종실 단백질의 발현프로파일을 비교하기 위하여 일차원 SDS-PAGE 를 통해 전체단백질을 분리하여 패턴을 비교하였다. 또한 PAS (periodic acid-Schiff) 당단백질 염색을 통하여 당단백질의 패턴도 비교 해보았다.

② 실험 결과

두 종류의 삼 종실은 전체 단백질 패턴도 다를 뿐만 아니라 당 단백질의 발현 패턴도 서로 다른 것으로 나타났다. 약 36 kDa 부근에서 보성 종실의 당 단백질 밴드가 나타난 반면 청삼 종실에서는 밴드가 나타나지 않았고, 약 28 kDa 부근의 청삼 종실에서 당단백질 밴드를 확인할 수 있었지만 보성 종실에서는 당 단백질 띠가 없었다 (Fig. 12).

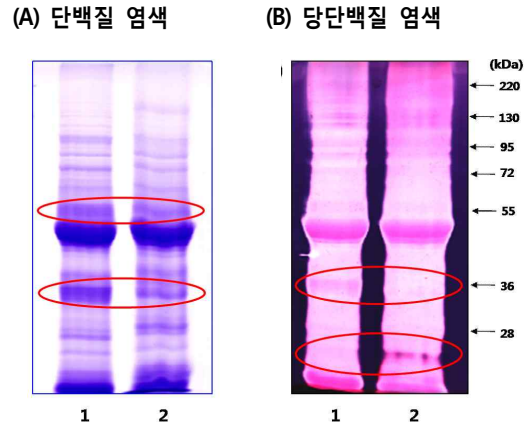


Figure 12. 청삼과 보성 헴프 종실내 단백질 프로파일 비교

Lane 1: 보성 종실 단백질, Lane 2: 청삼 종실 단백질

(나) 단백질체 기술을 통한 삼 종자 variate간 발현 단백질 비교 및 동정

① 실험 방법

1차원 전기영동으로 단백질의 등전점에 따라 총 단백질을 고정시키고 SDS-PAGE gel 에 strip gel 을 얹은 후 marker 가 주입된 paper 를 올려 2차원 전기영동을 실시하였다. 그리고 colloidal comassie brilliant blue G250 staining 용액에 2차원 전기영동을 실시한 gel을 넣어 염색하였다. 이차원 전기영동 맵을 표준화하여 in-gel digestion 방법으로 스팟을 분리한 후, MS/MS 질량분석법으로 질량분석을 실시하였고 데이터베이스 검색을 통해서 유사하거나 일치하는 단백질을 찾아서 비교 분석하였다.

② 실험 결과

단백체 기술을 사용하여 전체 단백질 발현을 확인하기 위해 이차원 전기영동을 실시한 결과, trichloroacetic acid 로 침전시킨 보성 종실 단백질에서는 총 722 개의 단백질을, 청삼 종실 단백질에서는 총 695 개의 단백질 스팟을 분리할 수 있었다 (Fig. 13, Table 3, 4). 보성 종실 단백질과 청삼 종실 단백질을 비교했을 때 두 variate 간에 동일하게 발현되는 26 종의 단백질을 동정하고 확인할 수 있었다 (Table 5). 공통으로 발현되는 단백질 중 enoyl-ACP reductase (보성 종실: 스팟 65 번, 청삼 종실: 스팟 15 번)는 식물에서 fatty acid synthetase (FAS) type II system의 촉매 효소로 색소체 내 de novo fatty acid 생합성에 관여하는 단백질이다.

Transketolase (보성 종실: 스팟 12, 13 번, 청삼 종실: 스팟 52, 53 번)는 phenylpropanoid metabolism (Ery4P) nucleotide synthesis (pentose phosphates), carbohydrate synthesis (fructose-6-phosphate [Fru6P]) 과 glycolysis (glyceraldehyde-3-phosphate) 에 관여하여 호흡기 대사, 아미노산과 지방 합성을 유도한다. 또한 calvin cycle 에 필요한 효소로 알

려져 있다.

보성 종실의 경우 스팟 74, 83 번인 OSIGBa0131L05.2 가 가장 많이 발현되었으며, 84 번인 Os02g0280500과 91 번인 Triosephosphate isomerase, 70 번인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, 52 번인 Phosphoglycerate kinase, 그리고 61 번인 alcohol dehydrogenase homolous가 다른 단백질에 비해 많이 발현되었다.

청삼 종실에서 분리한 단백질 중 발현이 가장 많이 된 단백질은 146 번인 putative chloroplast phosphoglycerate kinase 였으며, 147 번인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 이 그 다음으로 많이 발현되었다. 그리고 120 번인 GSH-dependent dehydroascorbate reductase 1, 78 번인 beta-actin, 127 번인 putative transmembrane trafficking protein, 115 번인 putative glyoxalase, 116 번 putative glyoxalase 1, 132 번인 phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide-transferase, 81 번인 putative glyoxalase 그리고 26 번인 putative UDP-glucose:salicylic acid glucosyltransferase 이 다른 단백질에 비해 많이 발현되었다.

보성 종실과 청삼 종실의 전체 단백질을 비교, 분석한 결과 청삼 종실에서만 발현하는 특이 단백질 5 개를 발굴할 수 있었다. Transmembrane trafficking protein (분자량: 23 kDa, 스팟 127 번)과 phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide-transferase (분자량: 38 kDa, 스팟 132 번), peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (분자량: 18 kDa, 스팟 133 번), 그리고 chloroplast phosphoglycerate kinase (분자량: 32 kDa, 스팟 146 번), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (분자량: 21 kDa, 스팟 147 번)로 이 단백질들은 pH 8-10 사이에서 발현되며, 보성 종실에서는 발현되지 않는 것을 확인할 수 있었다.

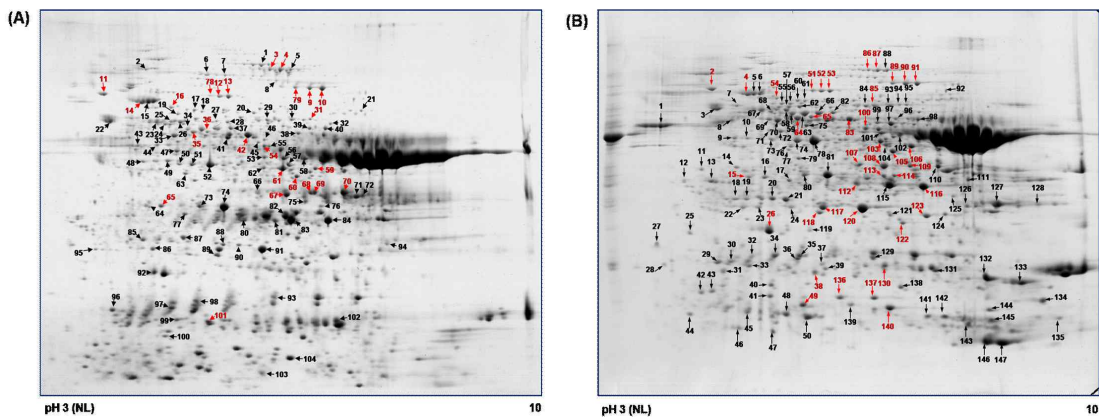


Figure 13. 보성 종실과 청삼 종실 전체 단백질의 이차원 전기영동

A. 보성 종실 단백질, B. 청삼 종실 단백질

(붉은색 화살표: 보성 종실과 청삼 종실 단백질에서 공통으로 발현된 단백질)

Table 3. 보성 종실에서 발현되는 단백질

Spot No.	Identified protein	Accession No.	Score	Cov%	MW
1	ATP-dependent chaperone ClpB	182677816	10.20	1.50	95651.6
2	Os03g0151800	113547458	20.20	2.60	89687.8

3	Aconitate hydratase, cytoplasmic	113547369	18.19	2.90	106235.1
4	putative Aconitate hydratase	40253814	30.16	4.60	98020.7
5	Aconitate hydratase, cytoplasmic	113547369	20.13	2.90	106235.1
6	Os02g0181900	113535627	10.18	1.20	103184.3
7	ATP-dependent chaperone ClpB	182677816	10.19	1.50	95651.6
8	ATP-binding protease component ClpA	192361782	8.12	1.60	84534.0
9	Os12g0624000	113649821	80.24	12.70	84665.1
10	Os12g0624000	113649821	70.35	9.40	84665.1
11	heat shock protein 70-like protein	115305876	10.16	12.20	12538.8
12	Os04g0266900	113563906	10.18	1.70	77647.6
13	Os04g0266900	113563906	10.14	1.70	77647.6
14	heat shock protein 70	56554972	48.32	13.10	70952.2
15	Glutamine synthetase	1169931	10.21	8.70	39445.7
16	70kDa heat shock protein	113547208	30.29	7.10	72564.9
17	adenylate cyclase, class I	192362009	8.14	1.40	74074.8
18	predicted protein	213404530	10.12	5.20	28517.4
19	Putative phosphoglycerate mutase	113534156	20.19	3.90	60752.1
20	AF455812_1 phosphoglucomutase	17981609	10.15	2.20	62948.8
21	Os09g0446800	113631543	10.11	1.60	75518.7
22	DNA repair protein rad5	213408989	10.16	1.60	95662.3
23	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	145617261	30.29	24.00	21524.4
24	Os03g0143400	113547409	40.22	8.10	61007.2
25	T-complex protein 1 subunit epsilon	1729864	10.18	1.90	58996.7
26	Os06g0114000	113594641	70.32	18.30	64084.9
27	Os04g0650800	113565665	10.20	3.43	63964.5
28	Putative enoyl-ACP reductase	113630985	20.30	8.10	39020.4
29	hypothetical protein OsI_020065	125553123	10.18	2.00	60874.7
30	methionine synthase	50727380	10.21	8.70	20805.7
31	methionine synthase	50727380	10.16	8.70	20805.7
32	chaperonin-containing T-complex eta subunit Cct7	213406679	10.18	2.10	60765.4
33	alcohol dehydrogenase	51587338	10.19	2.60	41069.9
34	myo-inositol-1-phosphate synthases	139478073	10.14	3.10	56499.0
35	Leucine aminopeptidase 2, chloroplastic	113537910	10.17	3.80	33185.9
36	Leucine aminopeptidase 2, chloroplastic	113537910	10.17	3.80	33185.9
37	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	145617261	10.29	9.80	21524.4
38	Dihydrolipoyl dehydrogenase	113532449	20.11	4.20	52642.7
39	Mitochondrial aldehyde dehydrogenase ALDH2a	113537541	20.21	3.80	58902.7
40	Mitochondrial aldehyde dehydrogenase ALDH2a	113537541	10.21	2.40	58902.7
41	Adenosylhomocysteinase	1710838	60.18	12.20	53117.0
42	Enolase	113548027	20.25	9.00	47972.3
43	Elongation factor 1-alpha	20137974	20.17	4.10	50020.2
44	Elongation factor 1-alpha	20137974	20.16	4.10	50020.2
45	F1-ATPase alpha subunit	3272606	40.24	10.70	44983.9
46	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	113645134	10.13	2.00	54299.4
47	UDP-glucose pyrophosphorylase	113632112	38.28	10.20	51681.9
48	eukaryotic initiation factor 4A	12381900	20.23	5.80	46931.4
49	beta-actin	10304437	20.22	7.70	41840.8
50	translational elongation factor Tu	17225494	10.20	2.60	50413.4
51	mitochondrial distribution and morphology protein	213407544	10.13	3.40	65451.9
52	Phosphoglycerate kinase	113596357	30.23	12.00	42278.6
53	homeobox transcription factor Hox7-like protein	33146880	10.14	2.40	79176.3
54	phosphogluconate dehydrogenase	166361905	10.16	6.60	17126.1
55	Histidinol dehydrogenase, chloroplastic	113532037	10.17	2.70	50565.8
56	Putative 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase I, chloroplast	113595093	10.19	4.70	49049.5
57	Isocitrate dehydrogenase [NADP], chloroplastic	2497259	20.21	4.80	48352.8
58	Os05g0152900	113578226	8.14	5.60	40677.7
59	heat shock protein 70	56554972	18.21	2.60	70952.2
60	heat shock protein 70	56554972	38.24	7.20	70952.2
61	alcohol dehydrogenase homologous	1401037	10.18	5.50	41308.2

62	alcohol dehydrogenase	51587338	30.18	7.90	41069.6
63	glutamine synthetase	2073448	10.25	4.50	39136.7
64	Os02g0280500	113536088	10.21	19.50	8982.0
65	Putative enoyl-ACP reductase	113630985	10.30	4.90	39020.4
66	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	145617261	30.29	24.00	21524.4
67	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	11133373	30.22	11.10	35524.3
68	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	145617261	10.24	6.90	21524.4
69	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	145617261	30.27	24.00	21524.4
70	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	145617261	20.26	14.20	21524.4
71	malate dehydrogenase precursor	2827080	20.23	6.70	35832.0
72	malate dehydrogenase precursor	2827080	10.22	3.50	35832.0
73	Os02g0280500	113536088	10.24	19.50	8982.0
74	OSIGBa0131L05.2	116310725	10.16	0.80	194362.0
75	Os02g0704800	113537393	10.16	3.30	39896.9
76	Fructose-bisphosphate aldolase	113531388	10.18	3.40	41993.8
77	Enolase	113548027	10.25	4.90	47972.3
78	actin	12697516	13.20	7.30	30032.2
79	methionine synthase	50727380	15.34	10.23	20805.7
80	Os05g0152900	113578226	10.13	5.60	40677.7
81	Hrq1p	213405281	10.14	2.00	119805.0
82	Putative enoyl-ACP reductase	113623526	10.34	7.50	39130.4
83	OSIGBa0131L05.2	116310725	10.16	0.80	194362.0
84	Os02g0280500	113536088	10.21	19.50	8982.0
85	Serine carboxypeptidase-like	113611170	20.26	5.73	57351.5
86	Triosephosphate isomerase	113632010	30.21	9.20	32392.7
87	hypothetical protein Bind_0268	182677266	10.12	9.00	15464.7
88	Proteasome subunit alpha type-4-1	113594993	10.12	3.60	27043.6
89	Triosephosphate isomerase	113632010	10.19	4.30	32392.7
90	Proteasome subunit alpha type-6	113547633	10.17	3.90	27573.2
91	Triosephosphate isomerase	113534299	10.27	8.20	27273.2
92	hypothetical protein Bind_0268	112677266	10.14	9.00	15464.7
93	nucleolar RNA-binding Nop10p-like protein	47847676	10.13	8.90	28468.3
94	OS05g0152900	113578226	10.14	5.60	40677.7
95	proteasome subunit alpha type-5-B	213408599	30.23	13.40	27455.8
96	Hrq1p	213405281	8.12	2.00	119805.0
97	glucose-regulated protein	213402569	10.12	1.40	73014.5
98	Os05g0152900	113578226	8.12	5.60	40677.7
99	LMW heat shock protein	169801	10.23	9.09	17334.4
100	Retrotransposon protein, putative, Ty1-copia subclass, expressed	113549341	10.15	5.10	20375.3
101	18.1 kDa class I heat shock protein	123554	40.15	27.30	16457.3
102	Os05g0152900	113578226	10.13	5.60	40677.7
103	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	58580826	10.14	2.70	36116.1
104	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	119434402	28.23	10.98	36567.7

Table 4. 청삼 종실에서 발현되는 단백질

No.	Identified protein	Accession No.	Score	Cov %	MW
1	ribose-1,5-bisphosphate carboxylase large subunit	5725127	78.28	14.38	51637.1
2	heat shock protein 70-like protein	115305876	20.24	13.04	12538.8
3	putative chaperonin 60 alpha subunit	29367489	20.25	14.70	23241.2
4	heat shock protein 70	56554972	108.32	20.96	70952.2
5	heat shock protein 70	56554972	78.32	17.10	70952.2
6	heat shock protein 70	56554972	88.34	21.57	70952.2
7	3,4-dihydroxy-2-butanone kinase	21321784	20.19	3.65	60041.1
8	vacuolar ATP synthase subunit B	213401317	10.21	3.10	52913.2
9	Chain L, X-Ray Structures Of Fragments From Binding And Nonbinding Versions Of A Humanized Anti-Cd18 Antibody: Structural Indications Of The Key Role Of Vh	515288	20.27	17.76	23438.5

Residues 59 To 65					
10	eukaryotic initiation factor 4A	303844	38.24	15.74	46902.0
11	beta-actin	10304437	30.22	18.35	41840.8
12	elongation factor 1 beta'	218161	10.23	7.60	23758.1
13	aspartic protease	1030715	10.16	1.80	54111.0
14	Ketol-acid reductoisomerase	115465569	30.34	9.30	62337.8
15	Putative enoyl-ACP reductase	115475922	20.30	6.93	39106.1
16	Cysteine synthase	115442595	30.26	8.90	41761.7
17	OASTL	123229678	20.20	16.00	20641.0
18	sorting nexin-41	213406539	10.11	2.40	70507.0
19	aspartic protease	1030715	20.16	7.30	54111.0
20	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	145617261	30.31	24.02	21524.4
21	aspartic protease	1030715	20.23	7.30	54111.0
22	Triosephosphate isomerase	115480367	60.25	9.54	32372.7
23	Triosephosphate isomerase	115480367	50.24	9.54	32372.7
24	heat shock protein 70	33088803	8.22	8.60	20845.0
25	Translationally-controlled tumor protein homolog	115486523	28.16	17.30	18934.5
26	putative UDP-glucose:salicylic acid glucosyltransferase	50725330	10.12	3.00	49487.5
27	F-box domain containing protein, expressed	14028985	10.19	1.80	123270.7
28	beta-actin	10304437	20.20	7.70	41840.8
29	Os05g0295100	115463019	8.15	2.60	76070.9
30	hypothetical protein	52353589	8.12	5.40	41692.5
31	ubiquitin-like protein SMT3	55859483	10.17	13.20	8728.2
32	Os02g0761900	115448841	10.17	6.55	18038.3
33	Os02g0761900	115448841	10.17	6.50	18038.3
34	hypothetical protein Bind_0268	182677266	10.15	9.00	15464.7
35	Os06g0237100	115467294	4.13	4.30	22909.0
36	retrotransposon protein, putative, unclassified	62734762	8.13	2.10	64992.3
37	acetyl-CoA ligase	213406327	10.12	1.50	72569.2
38	HSP11 18.1 kDa class I heat shock protein	123554	40.16	27.30	16457.3
39	beta-actin	10304437	50.21	19.15	41840.8
40	erythrocyte membrane protein 1-like	53792587	10.15	19.80	9549.2
41	SODCP_MEDSA Superoxide dismutase [Cu-Zn], chloroplastic	12230569	30.32	13.86	20812.7
42	whi5 domain-containing protein	213409441	10.13	4.50	39794.2
43	Peroxiredoxin-2E-2, chloroplastic	115444771	10.20	8.89	23165.1
44	profilin 1	82412211	20.21	17.60	14061.0
45	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	145617261	20.20	14.20	21524.4
46	Peroxiredoxin-2E-2, chloroplastic	115444771	10.19	8.90	23165.1
47	beta-actin	10304437	10.20	4.30	41840.8
48	beta-actin	10304437	20.22	7.70	41840.8
49	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	145617261	30.29	24.00	21524.4
50	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	145617261	30.29	24.02	21524.4
51	beta-actin	10304437	20.22	8.00	41840.8
51	actin	12697516	10.20	5.90	30032.2
52	putative transketolase 1	55296168	30.14	3.80	68836.5
53	putative transketolase 1	55296168	30.14	3.80	68836.5
54	Putative heat shock 70 KD protein, mitochondrial precursor	27476086	30.27	4.30	70403.5
55	Os01g0817700	115440691	40.25	6.26	60752.1
56	hypothetical protein Bind_0268	182677266	10.12	9.00	15464.7
57	Os08g0559600	115477815	30.28	7.60	63609.5
58	Os06g0114000	115466004	94.31	18.64	64046.1
59	Os03g0256400	115451995	30.14	7.40	61016.3
60	putative leukotriene-A4 hydrolase	71534918	10.17	6.40	17859.9
61	putative leukotriene-A4 hydrolase	71534918	10.17	6.40	17859.9
62	Os08g0559600	115477815	60.33	14.81	63609.5
63	actin	12697516	10.21	5.90	30032.2
64	Leucine aminopeptidase 2, chloroplastic	75261364	48.27	9.70	61780.0
65	Leucine aminopeptidase 2, chloroplastic	75261364	38.23	7.00	61780.0

66	hypothetical protein OsJ_013271	125589438	10.12	9.70	13669.1
67	Os10g0462900	115482382	118.27	26.13	60812.1
68	Os10g0462900	115482382	138.28	29.79	60812.1
69	putative alanine aminotransferase	33146868	10.15	1.90	53258.9
70	putative alanine aminotransferase	33146868	10.17	1.90	53258.9
71	Os09g0553200	115480571	50.29	12.80	51650.3
72	Os09g0553200	115480571	50.26	11.90	51650.3
73	actin	122891666	10.19	29.17	7727.9
74	beta-actin	10304437	20.23	12.80	41840.8
75	actin	12697516	10.22	5.90	30032.2
76	Isocitrate dehydrogenase [NADP], chloroplastic	2497259	60.24	14.55	48352.8
77	glutamine synthetase	2073448	40.33	12.36	39136.7
78	beta-actin	10304437	20.21	7.71	41840.8
79	beta-actin	10304437	30.22	14.40	41840.8
80	beta-actin	10304437	50.22	23.40	41840.8
81	putative glyoxalase	50252391	20.24	9.31	32165.4
82	actin	12697516	10.22	5.90	30032.2
83	Putative enolase (2-phospho-D-glycerate hydrolyase)	22655764	36.26	16.36	45912.4
84	Pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	48525720	10.16	17.00	11152.7
84	putative aldehyde dehydrogenase	47900421	40.19	9.16	56365.1
85	methionine synthase	50727380	10.21	8.70	20805.7
86	Putative aconitate hydratase	75225211	68.26	9.60	98020.7
87	Putative aconitate hydratase	75225211	60.18	7.46	98020.7
88	beta-actin	10304437	20.20	12.77	41840.8
89	methionine synthase	50727380	20.22	13.04	20805.7
90	methionine synthase	50727380	10.22	8.70	20805.7
91	methionine synthase	50727380	30.23	16.85	20805.7
92	transmembrane GTPase fzo1	213401119	10.15	2.26	86026.3
93	methionine synthase	50727380	20.21	12.50	20805.7
94	aminoimidazolecarboximide ribonucleotide transformylase/inosine monophosphate cyclohydrolase	71535007	10.29	9.74	21577.7
95	methionine synthase	50727380	20.23	13.04	20805.7
96	phosphoglucose isomerase (Pgi-b)	639686	20.19	4.05	62380.3
97	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase large subunit	5725127	50.26	9.87	51637.1
98	phosphoglucose isomerase (Pgi-b)	639686	40.21	8.60	62380.3
99	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase large subunit	5725127	40.25	8.15	51637.1
100	phosphogluconate dehydrogenase	166361905	10.20	6.58	17126.1
101	beta-actin	10304437	40.22	20.50	41840.8
102	actin	12697516	10.21	5.90	30032.2
103	alcohol dehydrogenase	51587338	50.21	10.53	41069.6
104	chaperone protein DnaK	182677129	10.25	2.69	67567.3
105	heat shock protein 70	56554972	68.25	11.56	70952.2
106	heat shock protein 70	33088803	18.28	16.58	20845.0
107	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	11133373	40.23	13.60	35524.3
108	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	145617261	40.28	27.45	21524.4
109	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	145617261	40.32	27.45	21524.4
110	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	145617261	40.29	27.40	21524.4
111	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	145617261	10.15	7.40	21524.4
112	putative glyoxalase	50252391	10.24	5.50	32165.4
113	hypothetical protein Bind_0268	182677266	10.11	9.00	15464.7
114	Os01g0190000	115435008	10.11	3.60	36516.8
115	putative glyoxalase	50252391	10.21	5.50	32165.4
116	putative glyoxalase 1	50252391	18.24	9.31	32165.4
117	Triosephosphate isomerase	115440977	10.30	8.20	27256.2
118	hypothetical protein Bind_0268	182677266	10.12	9.00	15464.7
119	putative glyoxalase 1	50252391	10.14	5.50	32165.4
120	GSH-dependent dehydroascorbate reductase 1	6939839	8.14	3.80	23541.2
121	dehydroascorbate reductase	66732627	10.13	3.10	29082.1
122	Mn-superoxide dismutase	33521626	10.19	4.50	26889.9
123	dehydroascorbate reductase	66732627	10.13	3.10	29082.1

124	GTP-binding nuclear protein Ran1A	1710007	38.21	20.57	23772.0
125	alpha 4 subunit of 20S proteasome	9186906	40.25	22.18	27084.1
126	AC092548_2 putative receptor kinase-like protein	20279444	2.19	5.30	39498.8
127	putative transmembrane trafficking protein	51535942	8.13	6.60	23657.5
128	OSJNBa0074B10.9	38346259	10.14	0.80	190472.4
129	Proteasome subunit beta type	115448935	10.24	6.90	26257.2
130	putative reverse transcriptase	34015265	10.16	0.90	180091.8
131	ubiquitin/ribosomal 27a	61741081	10.17	11.30	16172.8
132	phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide-transferase	182677682	10.11	4.70	38673.8
133	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	115443875	10.19	8.10	18349.1
134	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	145617261	40.25	19.10	21524.4
135	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	145617261	20.21	14.20	21524.4
136	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	145617261	20.20	14.22	21524.4
137	cytosolic CuZn-superoxide dismutase	32441511	20.22	13.20	15104.5
138	beta-actin	10304437	30.23	13.83	41840.8
139	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	145617261	30.19	24.00	21524.4
140	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	145617261	50.33	30.90	21524.4
141	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	145617261	30.29	24.00	21524.4
142	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	145617261	30.34	24.00	21524.4
143	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	145617261	20.31	16.70	21524.4
144	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	145617261	30.29	24.00	21524.4
145	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	145617261	10.31	9.80	21524.4
146	putative chloroplast phosphoglycerate kinase	46981258	20.20	9.35	32368.4
147	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	145617261	10.24	9.80	21524.4

Table 5. 보성 종실과 청삼 종실에서 공통적으로 발현되는 단백질

보성 종자 Spot No.	Identified protein	청삼 종자 Spot No.
3	Putative aconitate hydratase	86
4	Putative aconitate hydratase	87
11	heat shock protein 70-like protein	2
14	heat shock protein 70	4
65	Putative enoyl-ACP reductase	15
86	putative UDP-glucose:salicylic acid glucosyltransferase	26
92	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	49
78	actin	51
12	putative transketolase 1	52
13	putative transketolase 1	53
16	Putative heat shock 70 KD protein, mitochondrial precursor	54
35	Leucine aminopeptidase 2, chloroplastic	64
36	Leucine aminopeptidase 2, chloroplastic	65
42	Putative enolase (2-phospho-D-glycerate hydrolyase)	83
31	methionine synthase	85
79	methionine synthase	89
9	methionine synthase	90
10	methionine synthase	91
54	phosphogluconate dehydrogenase	100
61	alcohol dehydrogenase	103
60	heat shock protein 70	105
59	heat shock protein 70	106
67	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	107
68,69	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	108
70	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	109
101	18.1 kDa class I heat shock protein	38

(4) 기능성 유용 단백질 분리

(가) 청삼 종실의 성분분석

① 실험 방법

껍질이 제거된 청삼종실 100 g 에 포함된 총 단백질, 조지방, 포화지방산, 불포화지방산과 리놀레산, 리놀렌산의 함량을 조사하였다.

② 실험 결과

청삼 종실의 총 단백질, 조지방, 포화지방산, 불포화지방산, 필수지방산인 리놀레산과 리놀렌산의 함량을 조사하였다 (Table 6). 본 실험에서 청삼 종실의 경우, 단백질과 지방의 함량은 각각 32.02% 와 32.52% 로 높은 함량을 가지고 있었다. 그리고 포화지방산과 불포화지방산 함량은 각각 3.65 g 과 28.87 g 으로 불포화 지방산이 전체 지방산의 약 88% 를 차지하는 것으로 나타났다. 또한 청삼 종실에는 두 가지의 필수지방산인 리놀레산 (18:2 omega-6)과 리놀렌산 (18:3 omega-3)이 풍부하게 존재할 뿐만 아니라 그 비율이 3:1 로 영양학적으로 이상적인 비율로 존재하고 있음이 밝혀졌다.

Table 6. 청삼 종실의 성분분석

Constituents	Cheungsam Hempseed
Crude protein	32.02%
Crude fat	32.52%
Saturated fatty acid	3.65 g/100 g
Unsaturated fatty acid	28.87 g/100 g
Linoleic acid	180.52 mg/g
Linolenic acid	59.03 mg/g

(나) 청삼 종실 단백질의 아미노산 조성분석

① 실험 방법

껍질이 제거된 청삼종실 100 g 에 포함된 단백질의 아미노산 조성을 분석하기 위해서 단백질을 6 N HCl로 110℃에서 24시간 가수분해한 후, automatic amino acid analyzer를 통해 분석하였다.

② 실험 결과

청삼 종실 100 g 당 포함된 단백질의 아미노산 조성을 분석한 결과, 청삼 종실에는 다른 삼종실에서 알려진 것과 유사하게 glutamic acid, aspartic acid, serine, arginine 등과 같은 아미노산이 풍부한 것으로 나타났다. 그리고 필수 아미노산인 isoleucine, leucine, lysine, threonine, valine, phenylalanine, histidine과 methionine이 풍부한 것으로 나타났다 (Table 7).

Table 7. 청삼 종실의 아미노산 조성분석

Amino acids	mg/100 g hempseed
Isoleucine*	1168.83
Leucine*	2029.29
Lysine*	1053.81
Methionine*	475.87
Cysteine	95.85
Tyrosine	691.13
Phenylalanine*	1369.67
Threonine*	1113.71
Valine*	1450.23
Histidine*	887.01
Tryptophan	318.17
Aspartic acid	3271.25
Glutamic acid	6273.65
Serine	1602.9
Glycine	1402.41
Arginine*	3470.47
Alanine	1375.59
Proline	1229

Asparagine, Glutamine : N.D

Essential amino acids are indicated by asterisk*

(다) Hempseed protein isolate (HPI) 분리 및 단백질 분석

① 실험 방법

Hempseed protein isolate (HPI)를 분리하기 위해서 껍질이 제거된 청삼 1 g 을 액체질소를 가하여 분쇄하였다. 100 ml의 3차 증류수를 넣고 혼합한 후, 1 N NaOH 를 가하여 pH 10.0 이 되게 하고 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 8,000 g 에서 30 분간 원심분리한 후, 상층액을 새 tube 로 옮긴 다음, 4℃에서 1 N HCl 로 pH 5.0 로 만든 후, 6,500 g 에서 25 분간 원심분리한 후 침전을 얻었다. 얻어진 침전은 미리 차갑게 한 3차 증류수에 녹인 후 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) 에 다시 투석하여 사용하였다. 분

리된 청삼 유래 단백질은 Bradford 방법으로 정량하였다.

② 실험 결과

본 실험에서 청삼종실 1 g에 포함된 총 단백질 양은 293.95 mg 이었고, 산-염기 침전법을 통해 분리된 hempseed protein isolate (HPI) 의 단백질 양은 144.35 mg 이었다. 따라서 청삼 종실 1 g 에 포함된 단백질 294.95 mg 으로부터 144.35 mg 의 HPI를 분리하였으므로 산-염기 침전법은 50% 에 가까운 수득율을 나타내었다 (Table 8).

Table 8. Hempseed protein isolate (HPI) 분리

Process	Total protein concentration (mg)
Crude Cheungsam Hempseed extract	293.95
Acid-Base Precipitation	144.35
Yield of Hempseed Protein Isolate	49.1%

(라) Hempseed protein isolate (HPI)의 SDS-PAGE 를 이용한 분석과 당단백질 염색

① 실험방법

SDS-PAGE 는 Laemmli 의 방법을 이용하여 12.5% separating gel 과 5% stacking gel 을 사용하여 수행하였다. 청삼 종실로부터 분리한 HPI 단백질 시료는 Bradford 방법으로 단백질을 정량하였고, 환원제인 β -mercaptoethanol (2-ME)이 첨가된 것과 첨가되지 않는 sample buffer 와 섞은 후 끓는 물에서 5분간 열 변성을 유도한 후, 전기영동을 실시하였다. 전기영동 후 gel 은 0.25% Coomassie brilliant blue R-250 염색시약으로 염색을 한 후 탈색하여 각각의 subunit band 를 확인하고 각각의 이동거리를 측정하여 마커 단백질과의 상대적인 이동거리를 계산하여 분자량을 정하였다. 또한 당 단백질 염색을 위해서 전기영동이 끝난 gel 은 25% isopropanol, 10% acetic acid 용액에 넣어 세척한 후 0.2% periodic acid 용액으로 45분간 반응시켰다. 3차 증류수로 세척한 후, 미리 제조해둔 Schiff's reagent 와 4°C 에서 45분간 반응시켰다. 10% acetic acid solution 으로 탈색시켜서, 분홍색으로 염색이 되어 나타난 당 단백질을 확인하였다.

② 실험 결과

청삼종실에서 분리된 HPI의 단백질의 구조적 특성을 알아보기 위해서 환원제인 β -mercaptoethanol 이 있는 조건과 없는 조건에서 SDS-PAGE 전기영동을 수행하였다. 그 결과, Fig. 14A 에서 환원 조건에서는 약 36.4 kDa, 20.4 kDa 그리고 18.3 kDa 의 분자량을 갖는 세 개의 단백질이 확인이 되었고, 비환원상태에서 약 52.5 kDa 의 분자량을 갖는

하나의 단백질 밴드가 나타났다. 이러한 결과는 단백질 사이에 이황화 결합을 하고 있음을 보여주는 것이며, 최근 보고된 연구결과에서 대부분의 삼 중질 단백질에는 36 kDa의 단백질 밴드가 거의 동일하게 존재하여 소단위체를 구성하나 나머지 소단위체는 약 20 kDa과 18 kDa의 두 개의 단백질 밴드가 heterogenous 하게 구성한다고 알려져 있다. 청삼 종실로부터 분리된 HPI의 단백질이 당단백질인지 확인하기 위해서 환원조건과 비환원조건의 HPI를 이용하여 SDS-PAGE 전기영동을 수행하였다. 그리고 fuchsin reagent를 이용해 당단백질만은 확인한 결과, Fig. 14B에서 알 수 있듯이 청삼 종실에서 분리한 HPI는 환원제인 β -mercaptoethanol이 있는 환원 조건과 β -mercaptoethanol이 없는 비환원상태에서 주요 단백질이 당염색 되었다. 따라서 청삼에서 분리된 HPI를 구성하는 단백질 구조에 당이 포함되어 있음을 확인할 수 있었다.

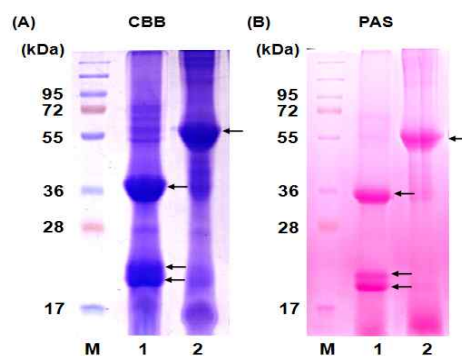


Figure 14. 환원조건과 비환원조건에서의 청삼 HPI의 구조적 특징비교

A. Coomassie brilliant blue R250 (CBB) staining, B. periodic acid-Schiff (PAS) staining,
M: Molecular weight markers, 1: reduced condition, 2: unreduced condition

(마) Hempseed protein isolate (HPI)의 용해도 측정

① 실험방법

산-염기 침전법을 통해 청삼 종실로부터 분리한 HPI 단백질의 용해도를 측정하기 위해서 Tomotake의 방법을 변형 사용하였다. 0.01 M phosphate buffer (pH 2-10)에 1%의 HPI가 포함되도록 준비하고, 용해되는 총 단백질 양을 측정하기 위해서 0.1 N NaOH 용액에도 1%의 HPI를 첨가하였다. 각 단백질 시료는 1시간 동안 상온에서 반응시킨 후에 8,000 g에서 30분 동안 원심분리 하였다. Filter paper를 이용하여 filter 한 후, Bradford법을 이용하여 용해된 단백질의 양을 정량하였다. 단백질 solubility (%)는 $\{(\text{컨트롤 단백질의 함량} / \text{단백질 시료 단백질 함량}) * 100\}$ 으로 계산하였다.

② 실험 결과

다양한 pH에서 청삼종실에서 분리된 HPI의 용해도를 측정한 결과, 산-염기 침전법을

통해 청삼 종실에서 분리된 HPI 는 pH 4.0 와 pH 8.0 사이에서 최소한의 용해도를 나타내었다. 그러나 pH 4.0 이하와 pH 8.0 이상의 극 산성 또는 극 염기성 조건에서 HPI 의 용해도가 증가하여 pH 10.0 이상의 pH 에서 용해도는 약 90% 이상이었다. 따라서 청삼 종실에서 분리 된 HPI 는 알칼리조건에서 잘 녹는 단백질임을 알 수 있었다 (Fig. 15).

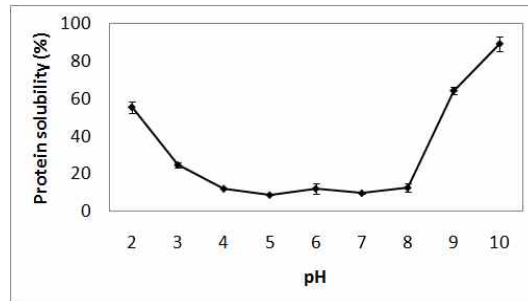


Figure 15. 청삼 HPI (hempseed protein isolate)의 용해도 측정

(바) Hempseed protetin isolate (HPI)의 항산화력 측정

① 실험 방법

청삼종실에서 분리한 HPI 의 DPPH 자유 라디칼 소거효과를 측정하기 위해서 2 ml 의 단백질 시료와 2 ml 의 0.2 mM DPPH 용액을 혼합한 후 실온에서 30분간 암반응 시켰다. 흡광도는 517 nm 에서 측정하였으며 blank 는 시료 대신에 물을 첨가하여 같은 방법으로 측정하였다. 소거되는 활성은 blank와 시료사이의 517 nm 에서 흡광도의 감소로 계산하였다. IC₅₀ value 는 처음 radical 의 50% 소거하는데 필요한 농도로 정의 하였다.

② 실험 결과

청삼 종실에서 분리한 HPI 의 DPPH free radical 소거능을 측정한 결과, 1.5 mg 을 첨가하였을 때, DPPH free radical 을 50% 억제하는 IC₅₀ 의 활성을 나타내었다. 그리고 이러한 활성은 HPI 의 농도에 의존하여 증가하였다 (Fig. 16).

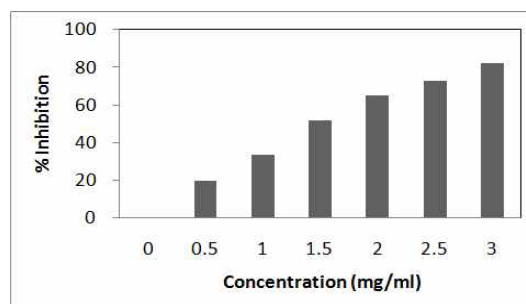


Figure 16. 청삼 종실에서 분리한 HPI (hempseed protein isolate)의 항산화력

(사) 청삼 edestin의 분리 정제

① 실험방법

산-염기 침전법을 통해서 청삼 종실로 부터 분리한 HPI 에서 edestin 을 분리하기 위해서 HPI 를 투석막에 넣은 후, 10 mM Tris buffer (pH 10.0) 으로 투석하였다. 그리고 10 mM Tris buffer (pH 10.0) 로 평형화 시킨 Sephacryl S-300 이 들어간 gel-filtration column에 투석한 HPI를 주입하고 edestin 을 분리하였다. 그리고 정제된 청삼 edestin 의 native 분자량을 확인하기 위해서 표준 단백질도 같은 방법으로 분리한 후, plot 을 통해 분자량을 결정하였다.

② 실험 결과

청삼 HPI 로 부터 Sephacryl S-300 gel-filtration column chromatography 를 통해 edestin을 분리하고 Bradford 법을 이용하여 각 분획별 단백질을 정량한 결과, 청삼 crude extract, 청삼 HPI, edestin 의 총 단백질 양은 각각 239.95 mg, 144.35 mg, 142.9 mg 이었다. 따라서 산 염기 침전법과 겔 여과 크로마토그래피법으로 분리 정제된 청삼 edestin 의 수율은 48.6% 이었다.

겔-여과 크로마토그래피를 통해 분리 정제된 청삼 edestin 의 native 분자량을 표준 마커와의 plot 을 통해 결정하였다. 정제과정에서 가장 major 한 25번 fraction 의 분자량을 측정하기 위해 기존에 알려진 표준 단백질 마커들과 비교한 결과 edestin 의 native 분자량이 약 300 kDa 이었다 (Fig. 17).

Table 9. 청삼 edestin 의 분리정제

Purification step	Total protein (mg)	Yield (%)
Crude extract	293.95	100
Acid-Base Precipitation	144.35	49.1
Gel-filtration	142.9	48.6

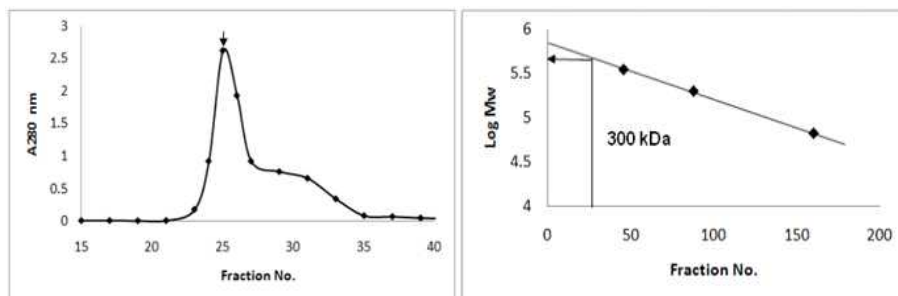


Figure 17. 청삼 edestin 의 native 분자량 결정

(아) 청삼 종실의 정제단계별 SDS-PAGE를 이용한 분석

① 실험 방법

SDS-PAGE 는 Laemmli 의 방법을 이용하여 12.5% separating gel과 5% stacking gel 을 사용하였다. 단백질 시료는 bradford 방법으로 정량하고, 환원제인 β -mercaptoethanol (2-ME) 이 첨가된 것과 첨가되지 않는 sample buffer 와 섞은 후 끓는 물에서 5 분간 열 변성을 유도한 후에 전기영동 하였다. 전기영동 후 gel 은 0.25% coomassie brilliant blue R-250 염색시약으로 염색을 한 후 탈색하여 각각의 subunit band 를 확인하였다. 또한 당 단백질 염색을 위해서 전기영동이 끝난 gel 은 25% isopropanol, 10% acetic acid 용액에 넣어 세척한 후 0.2% periodic acid 용액으로 45 분간 반응시켰다. 3 차 증류수로 세척한 후, 미리 제조해둔 Schiff's reagent와 4°C 에서 45 분간 반응시켰다. 10% acetic acid solution 으로 탈색시켜서, 분홍색으로 염색이 되어 나타난 당단백질을 확인하였다.

② 실험 결과

청삼 종실로부터 산-염기 침전법과 겔 여과 크로마토그래피를 이용한 분리 정제과정을 통해 얻어진 단백질을 SDS-PAGE 전기영동을 통해 구조적 특징을 비교하였다. 환원제인 β -mercaptoethanol 이 있는 환원조건에서 분리된 청삼 edestin 시료에서 주요 subunit 인 acidic subunit (AS) 과 basic subunit (BS) 으로 알려진 2개의 단백질 (Fig. 18A) 을 확인할 수 있었다. β -mercaptoethanol이 없는 조건에서는 52.5 kDa 의 비환원상태의 edestin (Fig. 18B) 이 깨끗하게 분리정제 된 것을 확인할 수 있었다. 또한 당 염색을 통해 분리 정제된 청삼 edestin 의 구성 subunit 이 당단백질임을 확인할 수 있었다.

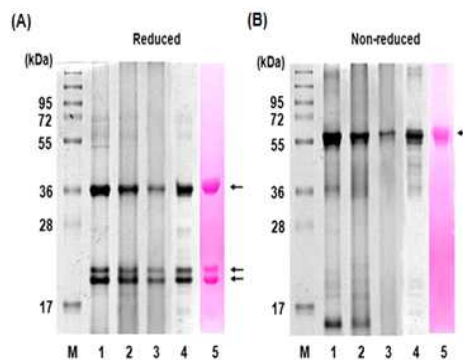


Figure 18. 청삼 종실의 정제단계별 단백질 프로파일 비교

A. 환원형의 edestin, B. 비환원형의 edestin, M: Molecular weight markers, 1: Crude extract, 2: Acid precipitates, 3: Purified edestin through gel filtration, 4: Commercial edestin (MP Biomedicals), 5: Carbohydrate staining for purified edestin by periodic acid-Schiff staining

(자) 청삼 edestin subunit의 분자량 결정

① 실험 방법

SDS-PAGE 는 Laemmli 의 방법을 이용하여 12.5% separating gel 과 5% stacking gel 을 사용하였다. 단백질 시료는 bradford 방법으로 정량하고, 환원제인 β -mercaptoethanol (2-ME)이 첨가된 것과 첨가되지 않는 sample buffer 와 섞은 후 끓는 물에서 5분간 열 변성을 유도한 후에 전기영동 하였다. 전기영동 후 gel 은 0.25% coomassie brilliant blue R-250 염색시약으로 염색을 한 후 탈색하여 각각의 subunit band 를 확인하고 각각의 이동 거리를 측정하여 마커 단백질과의 상대적인 이동거리를 계산하고 분자량을 결정하였다.

② 실험 결과

겔 여과 크로마토그래피를 통해 분리 정제된 청삼 edestin subunit 의 구조와 분자량을 결정하기 위해 환원제인 β -mercaptoethanol 이 있는 조건과 없는 조건에서 SDS-PAGE 전기영동하고, 기존에 알려진 분자량 마커의 plot 을 통해서 분자량을 측정하였다. 그 결과, 환원제가 없는 비 환원조건에서 청삼 유래 edestin 의 분자량은 약 56.7 kDa 이었다. 그리고 환원조건에서 edestin 단백질을 구성하는 주요 subunit 인 acidic subunit (AS) 과 2개의 basic subunit (BS) 로 분리되었는데 AS 소단위체 단백질의 분자량은 약 36.4 kDa 이었고, BS 소단위체의 분자량은 20.4 kDa 혹은 18.3 kDa 을 나타내었다 (Fig. 19).

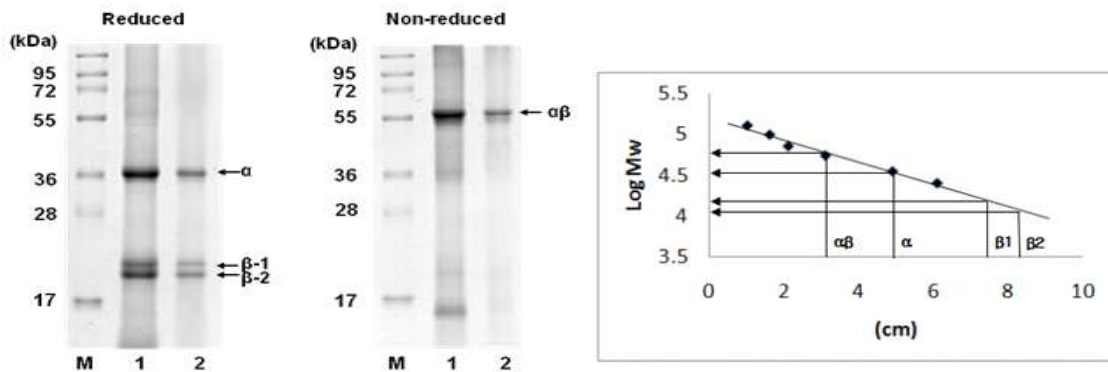


Figure 19. 청삼 edestin의 subunit 분자량 결정

(차) 청삼 종실 edestin의 구성 subunit 아미노산 조성분석

① 실험 방법

청삼 종실로부터 분리한 edestin 의 각 subunit 의 아미노산 조성을 조사하기 위해서 SDS-PAGE 전기영동 하였다. 전기영동이 끝난 후, gel 의 일부는 잘라서 0.25% coomassie brilliant blue R-250 염색시약으로 염색을 한 후 탈색하여 각각의 subunit

band를 확인하였다. 그리고 아미노산 조성분석에 이용할 염색하지 않은 gel 은 염색한 gel 과 비교하여 각 subunit 의 위치와 일치하는 곳을 찾아서 잘라낸 후 단백질을 용출하였다. 용출된 단백질을 시료는 desalting column 으로 SDS 와 salt 성분을 제거한 후 아미노산 조성을 분석하였다.

② 실험 결과

청삼 edestin을 구성하는 주요 subunit인 acidic subunit (α) 와 basic subunit (β)의 아미노산 조성을 분석한 결과, arginine, threonine, valine, methionine, isoleucine, leucine, 그리고 phenylalanine과 같은 필수아미노산이 풍부하였다 (Table 10).

Table 10. 청삼 edestin subunit의 아미노산 조성분석

Amino acids	Subunit		
	α	β -1	β -2
ASX ^b	174.52	78.06	118.99
GLX ^b	280.94	92.04	128.81
Serine	153.75	79.45	100.78
Arginine ^a	227.60	101.00	133.53
Threonine ^a	80.31	44.34	53.86
Alanine	132.88	102.02	125.48
Proline	644.23	582.66	506.28
Tyrosine	10.11	6.55	6.89
Valine ^a	100.57	69.11	74.12
Methionine ^a	27.95	18.84	35.97
Isoleucine ^a	90.96	43.55	67.01
Leucine ^a	129.74	72.12	107.94
Phenylalanine ^a	73.50	47.54	71.61
Cysteine	9.85	5.21	6.39
Total	2,136.91	1,342.49	1,537.66

^a Essential amino acid

^b ASX, GLX means the sum of asparagine & aspartic acid and glutamine & glutamic acid, respectively.

* Tryptophan was excluded from the analysis because it is destroyed by acid hydrolysis

** Gly, His and Lys were excluded in this report in order to prevent data errors found in gel eluted proteins due to the presence of Gly in SDS-PAGE buffer system.

(카) 청삼 종실 edestin의 구성 subunit의 N-terminal sequence 분석

① 실험 방법

청삼 edestin 을 구성하는 각 subunit 의 아미노산 서열분석을 위해서 SDS-PAGE 전기영동 겔 상에서 단백질을 용출시켰다. 전기영동을 마친 후 gel상의 단백질을 PVDF membrane 으로 80 V 에서 90분간 transfer 하였다. Transfer 후 PVDF membrane 을 coomassie brilliant blue R-250 염색시약으로 염색을 한 후 탈색하여 각각의 subunit band를 확인하고 해당 membrane을 잘라서 아미노산 서열을 분석하였다.

② 실험 결과

청삼 edestin의 구성 subunit인 acidic subunit (α)와 basic subunit (β)의 N-terminal sequence 를 분석한 결과, acidic subunit 의 N-terminus 는 Isoleucine-Serine-Arginine-Serine-Alanine-Valine-Tyrosine 순서로 구성되었고, Basic subunit-1 과 basic subunit-2 의 N-terminus 는 Glycine-Leucine-Glutamic acid-Glutamic acid-Threonine-Phenylalanin e-X 로 동일한 순서로 구성되어있음을 확인할 수 있었다 (Table 11).

Table 11. 청삼 edestin subunit의 N-terminal sequences

Edestin	N-terminal sequences
α -subunit	I-S-R-S-A-V-Y
β -subunit-1	G-L-E-E-T-F-X
β -subunit-2	G-L-E-E-T-F-X

X: Not detected

(타) 청삼 edestin의 항산화력 측정

① 실험 방법

청삼 종실에서 분리 정제한 edestin 의 항산화력을 측정하기 위하여 DPPH 자유 라디칼 소거효과를 측정하였다. 대조군으로는 상용화된 edestin (MP Biomedical)을 사용하였다. DPPH 자유 라디칼 소거효과를 비교하기 위해서 2 ml 의 단백질 시료와 2 ml 의 0.2 mM DPPH 용액을 혼합한 후 실온에서 30분간 암반응 시켰다. 흡광도는 517 nm에서 측정하였으며 blank 는 시료 대신에 물을 첨가하여 같은 방법으로 측정하여, 소거되는 활성을 blank 와 시료사이의 517 nm 에서 흡광도의 감소로 계산하였다. IC₅₀ value 는 처음 radical 의 50% 소거하는데 필요한 농도로 정의하였다.

② 실험 결과

청삼 유래 edestin 과 기존에 판매되고 있는 edestin 의 DPPH 자유라디칼 소거능을 측정하여 항산화력을 비교 평가한 결과, 청삼 유래 edestin 은 시중에 판매되고 있는 edestin 보다 약 2배 이상의 높은 자유라디칼 소거활성을 가지고 있었다. 또한 이러한 항산화 효능은 edestin 의 농도에 의존하여 증가하였다 (Fig. 20).

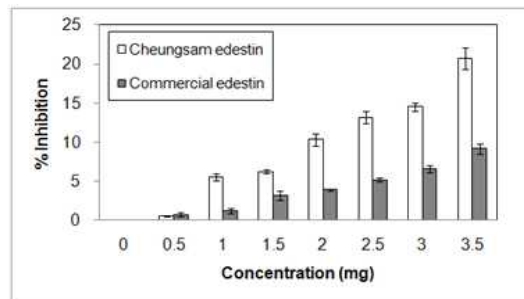


Figure 20. 청삼 edestin 의 항산화 효능

(5) 삼 종실 추출물의 성분분석

(가) GC-MS를 이용한 삼 종실 추출물의 성분분석

① 실험 방법

Direct injection 방법과 derivatization 두 가지 방법으로 실시하였다.

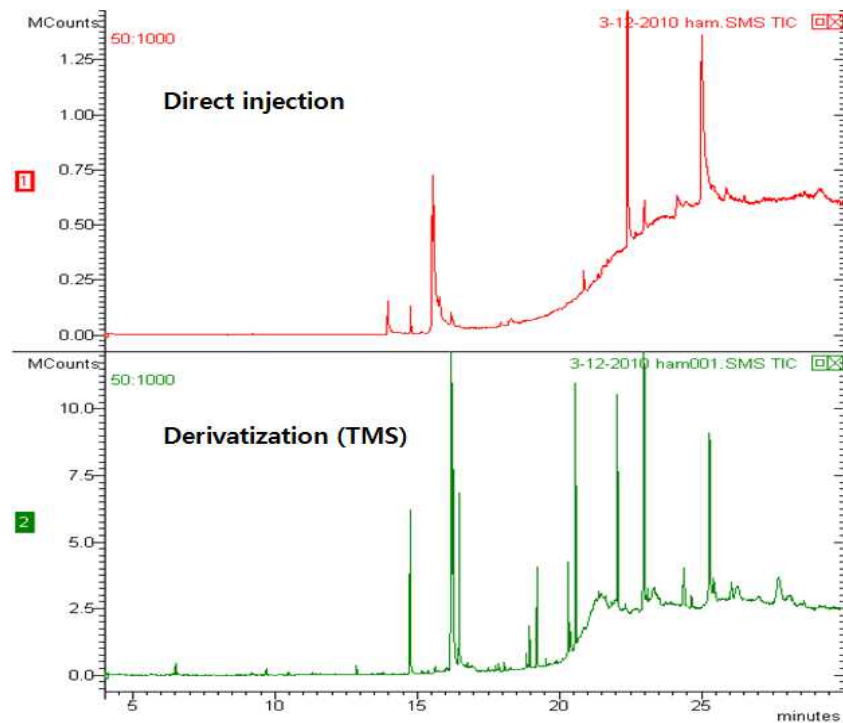


Figure 21. GC MS 를 이용한 삼추출물의 분석결과

② 실험 결과

Derivatization 방법의 결과를 분석한 결과 팔미트산, 올레익산 등의 여러 가지 지방산과 vitamin E 의 본체인 토코페롤, 콜레스테롤수치를 낮추는 것으로 알려진 캄페스테롤 등의 다양한 물질들이 성분으로 검출되었으며 이를 통해 삼 추출물이 다양한 건강 기능성 소재로 사용될 수 있음을 확인하였다. 자세한 결과는 Table 12 에 나타낸 바와 같다.

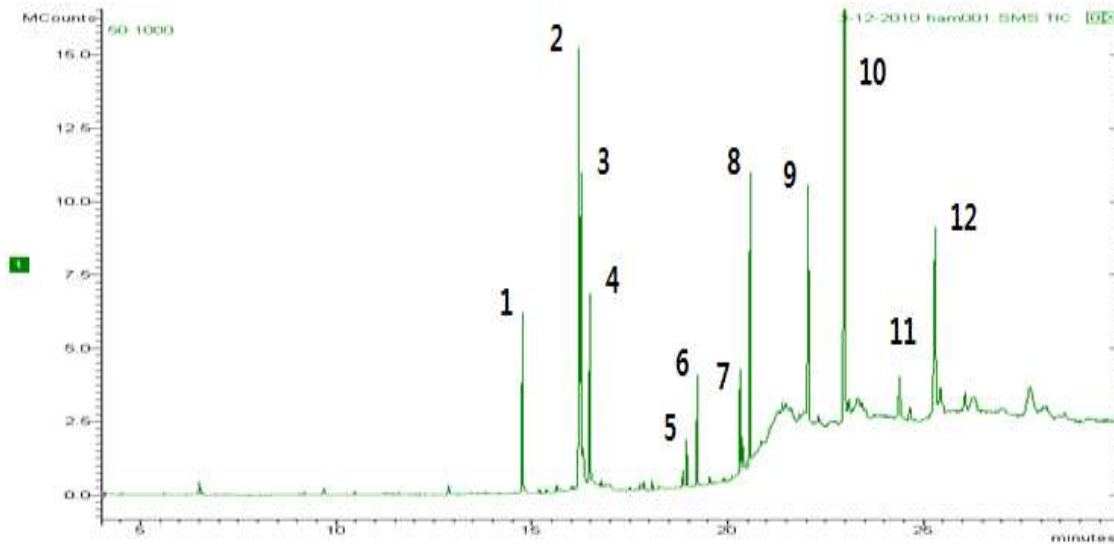


Figure 22. Derivatization 방법을 사용한 GC MS 삼추출물의 분석결과

Tabel 12. 삼추출물의 분석결과

peak No.	t_R (min)	fragmentation	Name	TMS
1	14.76	328, 313, 145, 129, 117, 95, 73, 55	Palmitic acid	X1
2	16.21	337, 262, 178, 149, 129, 121, 95, 81, 75	Linoleic acid	X1
3	16.25	354, 339, 145, 129, 117, 96, 73, 55	Oleic acid	X1
4	16.48	356, 342, 298, 185, 145, 129, 117, 95, 73	Stearic acid	X1
5	18.96	459, 387, 313, 218, 203, 191, 147, 129, 73	2-Monopalmitin	X2
6	19.21	459, 371, 239, 203, 147, 73	1-Monopalmitin	X2
7	20.32	487, 416, 342, 218, 203, 191, 147, 129, 73	2-Monostearin	X2
8	20.57	487, 399, 267, 203, 147, 129, 73	1-Monostearin	X2
9	22.05	488, 263, 222, 194, 73	β -Tocopherol	X1
10			N.I	
11	24.39	472, 382, 368, 343, 255, 213, 145, 129, 73	Campesterol	X1
12	25.29	486, 484, 396, 381, 357, 255, 129, 73	β -Sitosterol	X1

(6) 청삼 품종 감별을 위한 마커 개발

(가) 시료 수집

청삼 품종의 감별 마커를 제작하기 위해, 국내에서 삼 재배가 허가된 제천, 당진, 보성, 정선, 안동 지역으로부터 삼 품종을 수집하였다 (Fig. 23). 수집된 시료 중 청삼에 해당하는 시료는 당진에서 재배되는 시료로, 이후 CH 또는 CHUNGSAM 으로 표기하였으며, 제천과 보성 종실은 각각 JE 와 BO 로 표기하였다. 정선과 안동으로부터 수집된 시료는 JU 또는 SAM 으로 표기하였다.

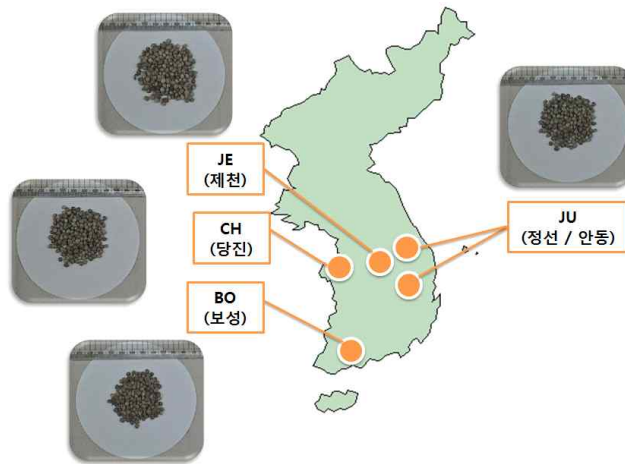


Figure. 23 국내 재배 삼 종실 수집 지역

(나) ITS (Internal transcribed spacer) 염기서열을 이용한 감별 마커 탐색 및 개발

① 실험 방법

국내 재배지역으로부터 수집된 삼 종실 100 mg 을 막자사발에 넣고 액체질소를 가해 미세하게 마쇄한 후, Nucleospin[®] PlantII kit (MACHEREY NAGEL GmbH & Co. KG, Germany)를 사용하여 DNA를 추출하였다.

추출한 DNA로 nuclear ribosomal DNA 의 ITS 부위를 증폭하기 위해 ITS1 (5'-TCCG-TAGGTGAACCTGCGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') primer 를 이용하였다. 증폭된 산물을 LaboPass[™] Gel kit (Cosmo, Korea) 로 정제한 후, pGEM T-easy vector I (Promega, Madison, WI, USA) 를 이용하여 sub-cloning 한 뒤, MacroGen (Seoul, Republic of Korea) 을 통해 염기 서열 분석을 진행하였다. 분석된 염기서열은 Bioedit v7.0.9 (<http://mbio.ncsu.edu/BioEdit/page2.html>) 프로그램을 이용하여 유연관계를 분석하였다.

② 실험 결과

ITS 부위는 식물의 종 내 혹은 종 간 감별에 널리 사용되는 유전자 부위이다. PCR 반응 결과, 694 bp 의 증폭 산물이 형성되었으며, 염기서열 분석 결과 삼 품종 간에는 ITS 염기서열에서의 차이가 없어 삼 종실 분류 마커로는 적합하지 않은 유전자 부위임을 확인하였다 (Fig. 24).



Figure 24. 삼 품종간 ITS 염기서열 비교 분석

(다) Chloroplast DNA 특정 유전자 부위 염기서열을 이용한 감별 마커 탐색 및 개발

① 실험 방법

추출한 DNA 로 chloroplast DNA 의 *trnL-F* 부위와 *rbcL*, *trnL* intron 부위를 증폭하기 위하여 Table. 13 과 같은 primer 를 이용하여 PCR 증폭하고, 증폭된 산물을 LaboPass™ Gel kit (Cosmo, Korea) 정제와 pGEM T-easy vector I (Promega, Madison, WI, USA) 를 이용한 sub-cloning 뒤, Macrogen (Seoul, Republic of Korea) 을 통해 염기서열 분석이 진행되었다. Bioedit v7.0.9 (<http://mbio.ncsu.edu/BioEdit/page2.html>) 프로그램을 이용하여 유연관계를 분석하였다.

Table 13. Chloroplast DNA 부위 증폭에 사용된 Primer

Primer name	Sequence (5'→3')	Reference
<i>trnL-F</i> C	CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG	Taberlet <i>et al.</i> (1991)
<i>trnF</i>	ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG	Taberlet <i>et al.</i> (1991)
<i>rbcL</i> 1F	ATG TCA CCA CAA ACA GAA AC	Wolfe and dePamphilis (1997)
<i>rbcL</i> 1352R	CAG CAA CTA GTT CAG GRC TCC	Wolfe and dePamphilis (1997)
<i>trnL</i> intron forward	CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG	Taberlet <i>et al.</i> (1991)
<i>trnL</i> intron reverse	GGG GAT AGA GGG ACT TGA AC	Taberlet <i>et al.</i> (1991)

② 실험 결과

trnL-F intergenic spacer PCR 반응 결과 354 bp 증폭 산물이 형성되었으며, 염기서열 분석결과 Fig. 25 에 제시된 바와 같이 제천을 제외한 다른 지역 수집 종실들은 동일한 염기서열을 보인 반면, 제천 (JE) 종실의 경우 뚜렷한 염기서열 차이를 나타내었다. 즉, *trnL-F* intergenic spacer 부위 염기서열을 이용하여 제천 (JE) 종실을 다른 지역의 종실들로부터 감별할 수 있음을 확인하였다.

rbcl (Fig. 26) PCR 반응으로 1355 bp 의 증폭산물이 형성되었으며, 염기서열 분석 결과 당진을 제외한 다른 지역에서 수집된 종실은 모두 동일한 서열을 나타냈으나, 청삼 (CH, 당진) 종실의 경우 611 bp 와 716 bp 두 군데 서열에 차이를 보여 청삼 종실을 감별하는 마커로 사용할 수 있는 가능성이 확인되었다.

trnL intron (Fig. 27) 분석결과 449 bp 의 증폭산물이 형성되었으며, 정선 시료를 제외한 다른 지역에서 수집된 시료들의 염기서열이 동일한 반면, 정선 (JU) 종실에서만 183 bp 부위에서 차이를 보여 다른 지역의 종실들로부터 정선 (JU) 종실을 감별해 낼 수 있음을 확인하였다.



Figure 25. 삼 품종 간 *trnL-F* intergenic spacer 염기서열 비교 분석

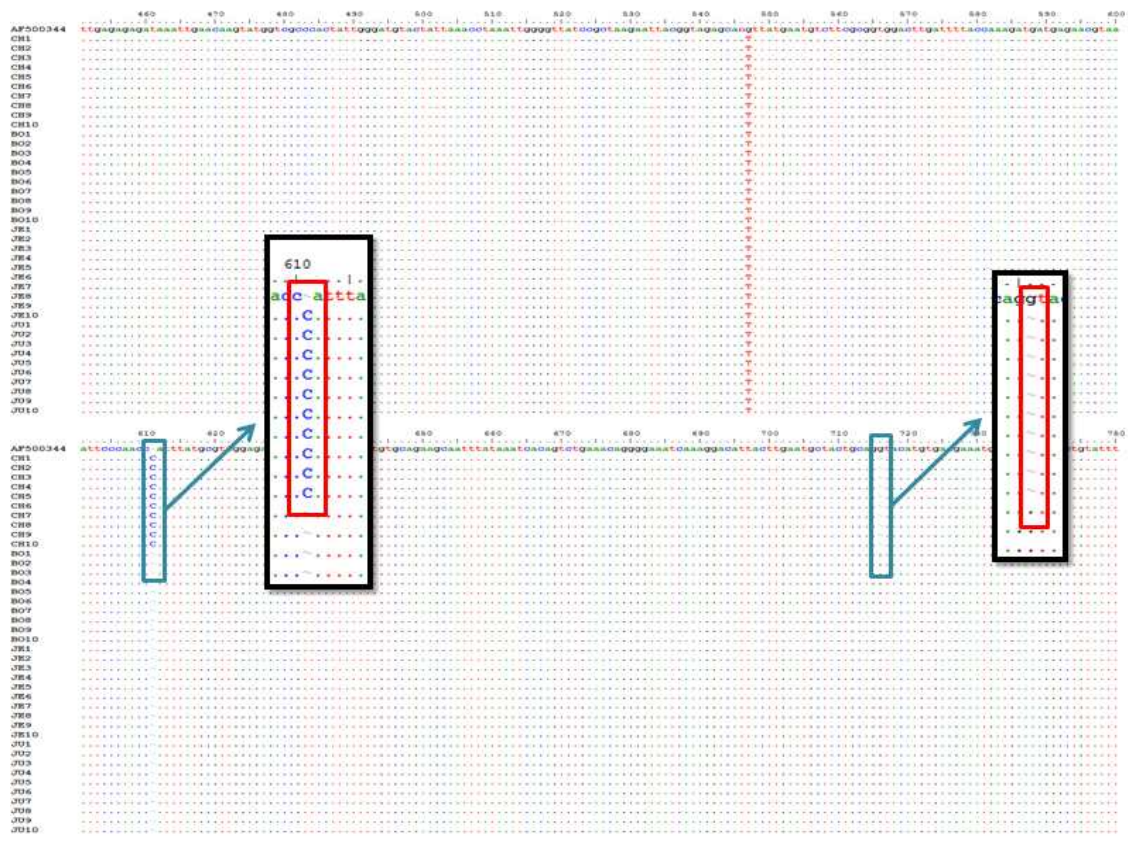


Figure 26. 삼 품종 간 *rbcL* 염기서열 비교 분석

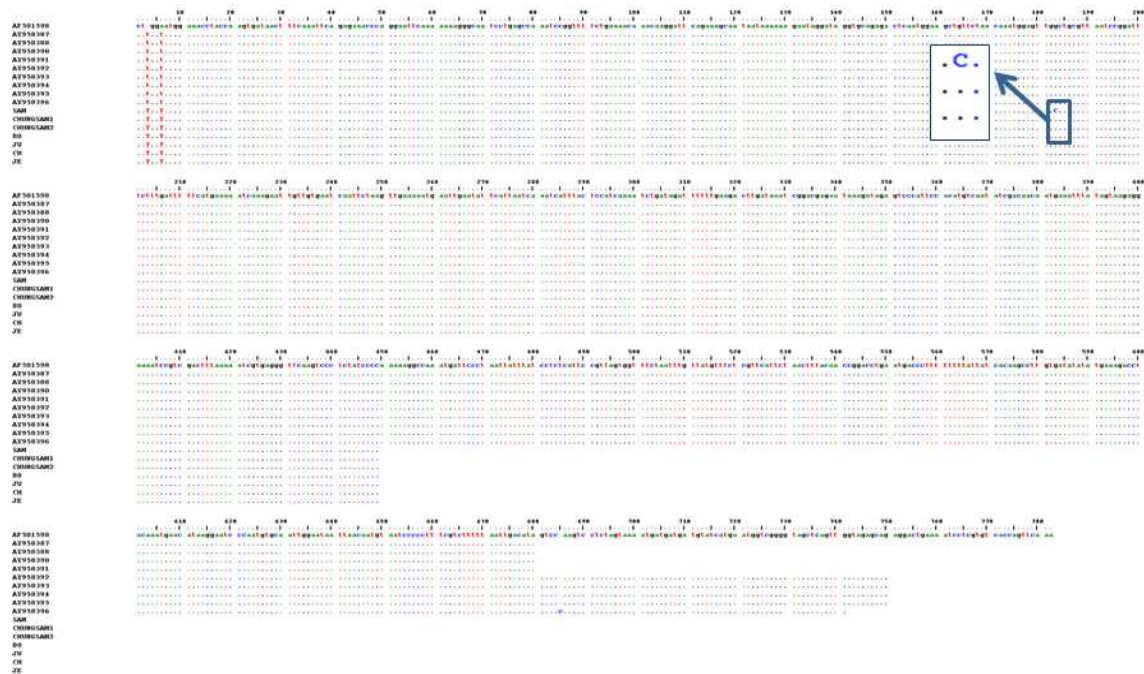


Figure 27. 삼 품종 간 *trnL* intron 염기서열 비교 분석

Figure 28. 삼 품종 간 THC synthase 염기서열 비교 분석

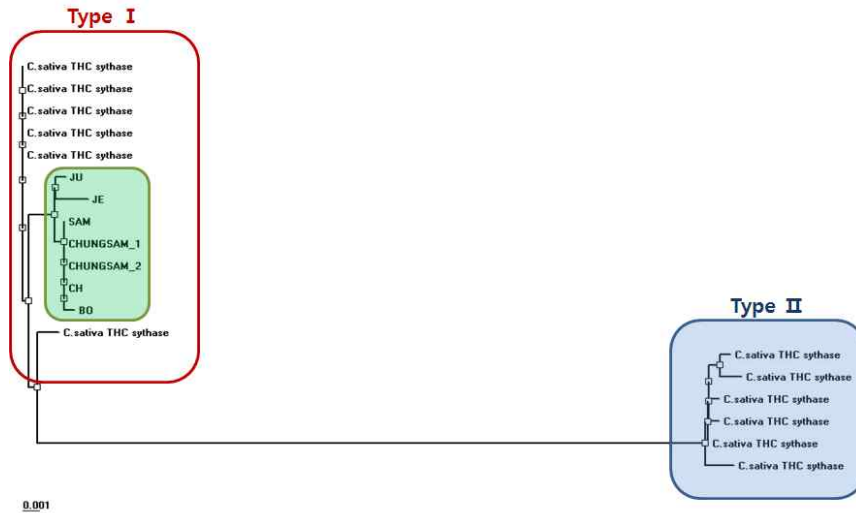


Figure 29. 삼 품종 간 THC synthase 염기서열 phylogenetic tree를 이용한 유연관계분석

(8) 품종 간 종실 지방산 (Fatty acid) 비교 분석

(가) 삼 종실의 지방산 (Fatty acid) 분리

① 실험 방법

당진, 보성, 제천, 정선에서 수집된 품종 종실 5 g을 취하여 곱게 갈아 원통형 여과지에 넣고 100 ml ether 와 Soxhlet 추출기를 이용하여 8 ~10 시간 동안 조지방 (crude fat)을 추출하였다. 추출된 조지방 (crude fat) 200 mg을 취하고 0.5N methanolic NaOH 7 ml을 첨가하여 100℃에서 10분간 반응시키고 30~40℃로 냉각하였다. 7 ml BF₃-methanol 을 첨가한 뒤 100℃에서 5분간 반응하여 Fatty acid 를 methylation 하였다. 반응 후 30~40℃ 로 냉각된 시료에 3ml Hexane 을 첨가 격렬히 진탕하여 methylation 된 fatty acid를 녹여낸 후, 포화 NaCl 용액을 첨가하여 Hexane 층을 분리해 낸 뒤, Sodium sulfate 를 이용하여 탈수하였다.

② 실험 결과

Soxhlet 추출법을 이용해 삼 종실의 조지방을 분리한 결과 평균적으로 청삼 (당진, CH) 종실에서는 2.25 g, 보성 (BO) 종실에서는 2.0 g, 정선 (JU) 종실에서는 2.23 g, 제천 종실로 부터는 2.2 g의 조지방이 분리하였다 (Fig. 30). 이는 추출 시료 무게 대비 40~45% 해당하는 것으로 삼 종실이 다량의 지질을 함유하고 있음을 확인하였다.

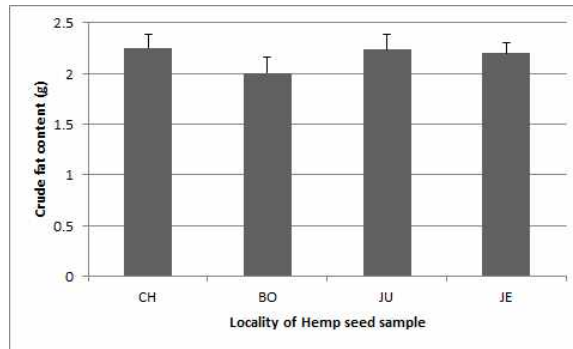


Figure 30. 삼 품종 조지방 (crude fat) 함량

(나) GC (Gas-chromatography)를 이용한 삼 종실의 지방산 (Fatty acid) 분석

① 실험 방법

Gas chromatography 를 이용하여 추출된 삼 종실의 지방산 분석을 하기 위해 carrier gas 헬륨 (He) 5 ml/min, 1/20 split ratio, 주입구 250℃, 검출부 260℃가 설정되었다. BF₃-methanol 을 이용하여 methylation 된 fatty acid 2 ul를 Gas chromatography에 주입한 후, 140℃에서 240℃ 까지 5℃/min 승온한 후, 240℃에서 15분간 유지하여 삼 종실의 지방산을 분석하였다. 삼 종실 지방산 분석에 사용된 column은 HP-INNOWA 를 이용하였다.

② 실험 결과

GC를 이용한 지방산 분석 결과 다른 유지종자에 비해 삼 종실에는 C16:0, C18:0~C18:3 가 주로 존재함을 확인 할 수 있었다 (Fig. 31). 또한, 일반적인 Hemp standard F.A.M.E. Mix 2 에는 없는 LCFA (long chain fatty acid, >C18:0) C22:2 와 VLCFA (very long chain fatty acid)로 예상되는 peak 들이 관찰됨을 확인하였다 (Fig. 31, 32). 국내 재배 삼 종실 간 fatty acid 함량을 비교해본 결과, C18:0~C18:3 지방산 함량에 차이가 있음을 확인하였다 (Fig. 32). C18:1 지방산의 경우, 다른 지역에 비해 정선 종실에서 함량이 높았으며, C18:2 와 C18:3 지방산은 보성 종실에서 그 함량이 가장 높게 나타났다. GC 분석을 위해 지방산 C11:0 을 내부 표지물질로 사용하였으며, Fig. 32 의 함량 그래프의 X1~X5 는 C18:0 이상의 지방산을 의미하는 것으로 GC-MS 를 통한 정확한 구조 분석을 진행할 예정이다.

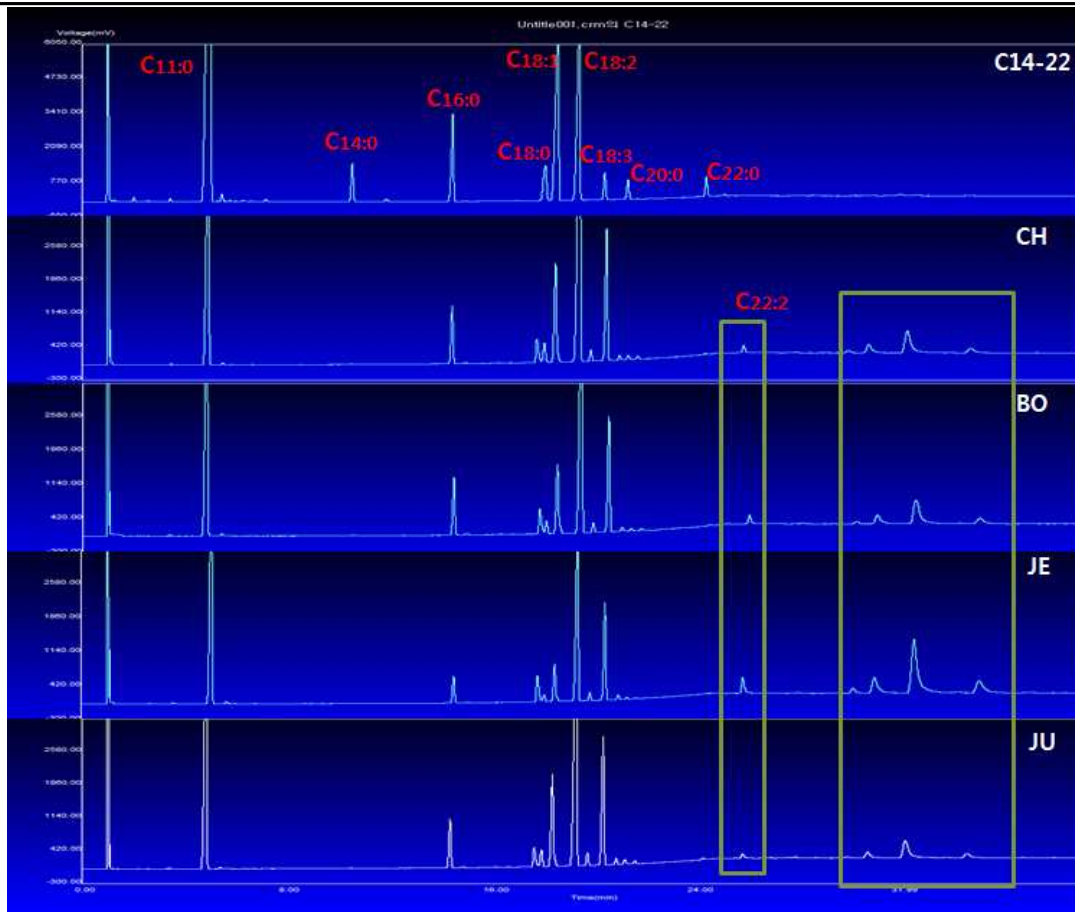


Figure 31. GC를 이용한 삼 품종 지방산 (Fatty acid) 분석

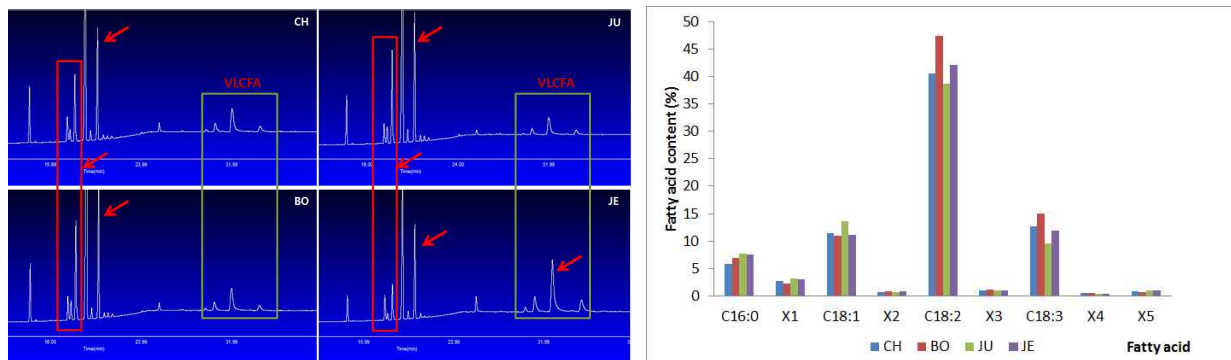


Figure 32. 삼 품종 지역간 지방산 (Fatty acid) 함량 비교

(다) 삼 종실의 지방산 (Fatty acid) elongase 분석

국내 재배 품종 간 함량의 차이를 보이는 삼 종실의 주요 Fatty acid 는 LCFA 로 이들 합성에 관여하는 Fatty acid elongase 와 관련된 서열을 비교하여 Fatty acid 함량의 차이와 연관성을 분석하고 기능 관련 분자마커로의 가능성을 알아보려고 하였다. 삼 (헴프)의 Fatty acid 관련 유전정보는 아직 밝혀진 바가 없기 때문에, NCBI

Genbank 등재된 Arabidopsis 와 같은 식물의 Fatty acid elongase 유전 정보를 수집. 분석 후, 이를 바탕으로 삼의 Fatty acid elongase 정보를 얻고자 하였다.

① 실험 방법

식물에서 LCFA 나 VLCFA 와 같이 지방산의 길이를 늘여주는 것을 촉진하는 것은 FAE1-KCSs 와 같은 elongase 들로 이들에 Arabidopsis 의 FAE1-KCS gene family 서열을 이용하여 프라이머를 제작, 추출된 햄프 (삼) 종실 DNA 를 이용 PCR 반응을 진행하였다. 또한, Arabidopsis 에서 VLCFA 를 합성하는데 관여하는 것으로 알려진 CER10 유전자 서열을 이용하여 프라이머를 제작, PCR 반응을 진행하였다. 증폭된 산물을 LaboPass™ Gel kit (Cosmo, Korea) 정제와 pGEM T-easy vector I (Promega, Madison, WI, USA) 를 이용한 sub-cloning 뒤, Macrogen (Seoul, Republic of Korea) 을 통해 염기서열 분석이 진행되었다. Bioedit v7.0.9 (<http://mbio.ncsu.edu/BioEdit/page2.html>) 프로그램을 이용하여 분석하였다.

② 실험 결과

Arabidopsis KCS 부위를 이용하여 프라이머를 제작 후 PCR 반응을 통해 약 1520 bp의 증폭 산물이 형성되었다. 염기서열 결과와 NCBI 등재 된 유전정보들과 비교 확인한 결과, Fatty acid elongase 3-Ketoacyl-CoA syntahse gene (KCS) 서열과 82~85% 일치하는 것으로 햄프 (삼) 종실의 putative KCS 유전자일 가능성을 확인하였다. 또한, 증폭된 햄프 (삼) 종실의 염기서열 비교 결과 7곳의 염기서열이 품종별로 차이가 있음을 확인하였다(Fig. 33). 따라서, 증폭된 KCS 서열이 삼 품종 특별히, 청산을 감별하는 분자 마커로 이용 가능함을 확인되었다.



Figure 33. 삼 품종 간 KCS (3-ketoacyl-CoA synthase) 염기서열 비교

(9) 삼종실의 유효성분 추출

(가) 유기용매 추출법

① 실험 방법

삼 종실을 파쇄하고 파쇄 된 종실을 hexane, ethyl acetate, 물로 추출하였다. 추출은 분쇄된 삼 종실에 용매를 첨가한 후 상온에서 24시간 교반하고 이것을 필터페이퍼로 필터링하였다. Hexane 으로 3회 추출한 후 남은 잔여물을 동결건조한 후 여기에 ethyl acetate를 첨가하여 3회 추출하였으며, 이렇게 추출한 후 남은 잔여물을 다시 동결건조하고 동일한 방법으로 물을 이용하여 3회 추출하였고 필터링하여 얻어진 추출물은 감압하에 증발시켜 용매 잔존량이 없도록 하였다.

② 실험 결과

Hexane, ethyl acetate 및 물을 이용하여 polarity 에 따른 순차적 추출을 수행한 결과 추출수율은 Hexane 추출물이 30% 로 가장 높은 수율을 보였으며, ethyl acetate 및 물 추출물은 각각 0.36% 와 0.2% 로 수율이 hexane 추출에 비해 매우 낮았다.

(나) 초음파 추출법

① 실험 방법

용매 추출법과 마찬가지로 분쇄한 삼 종실의 3배의 용매를 첨가한 후 3시간동안 초음파 추출을 하였다.

② 실험 결과

추출수율은 20% 로 기존의 용매추출법으로 추출했을 경우 30% 의 수율을 보임에 비해 낮게 나타났으나, 기존 추출법으로는 24시간 동안 3회 추출을 한 것과 비교하였을 때 추출시간은 많이 단축할 수 있었다.

II. 삼종실의 식품 안전성 및 효능 연구

(1) 초파리 모델을 이용한 삼종실 효능 연구

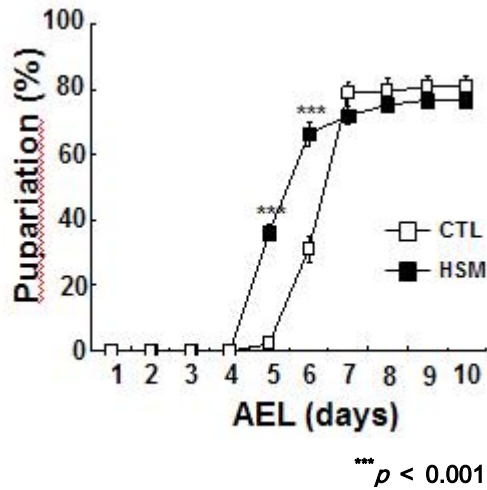


Figure 34. 삼종실 섭취가 초파리 성장 속도에 미치는 영향

(가) 삼종실 섭취에 의한 초파리 성장 속도 증가

삼종실 배지가 초파리 성장에 주는 영향을 확인하기 위해 일반 사육배지 (옥수수+콩)와 삼종실 사육배지 (옥수수+콩 전량을 삼종실 가루로 대체)에 동일한 개수의 초파리 알을 받은 후 각각의 배지에서 깨어나고 자란 애벌레가 용화 하는데 걸리는 시간을 측정하였다. 그 결과 일반 사육배지 (CTL) 에서 자란 초파리에 비해 삼종실 사육배지 (HSM, hempseed meal) 에서 자란 초파리의 용화 시기가 약 24시간 정도 앞당겨진 것을 확인하였다 (Fig. 34).

(나) 삼종실 섭취에 의한 초파리 성장률 증가

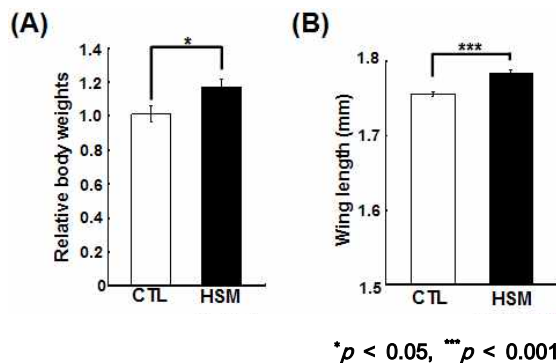


Figure 35. 삼종실 섭취가 초파리 성장에 미치는 영향

Fig. 35A. 삼종실 섭취 초파리와 비섭취 초파리의 몸무게 비교

Fig. 35B. 삼종실 섭취 초파리와 비섭취 초파리의 날개 길이 비교

이전에 알려진 연구에 따르면 애벌레 기간이 초파리의 성장을 결정하게 된다는 연구가 있어, 각각의 배지에서 기른 초파리 성체의 무게와 날개 길이를 비교 분석하여, 삼 중실 섭취가 초파리의 성장 정도에 미치는 영향을 알아보았다. 그 결과 예상과는 달리 애벌레 시기가 길었던 일반 배지에서 기른 초파리에 비해 애벌레 시기가 짧았던 삼 중실 사육배지에서 기른 초파리의 경우 무게와 날개 길이 모두 유의미하게 증가한 것을 확인하였다 (Fig. 35).

(다) 삼 중실 배지 섭취에 의한 초파리 생식력 증가

다음으로는 삼 중실의 섭취가 초파리 생식력에 주는 영향을 알아보기 위하여 각각의 배지에서 기른 초파리 암컷이 낳은 알 개수를 통해 생식력의 증감을 확인하였다. 그 결과 삼 중실 사육배지에서 기른 초파리 암컷이 낳은 알의 개수가 그렇지 않은 경우에 비해 약 1.2배 증가한 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 36). 이상을 통해 삼 중실 내의 특정 성분이 초파리의 성장을 보다 촉진시키고, 생식력을 증가시킨다는 결론을 내릴 수 있었다.

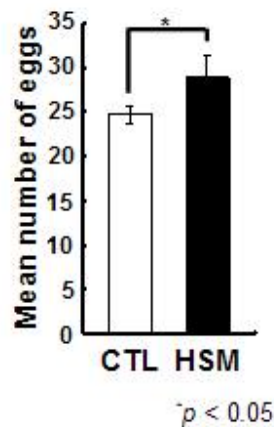


Figure 36. 삼 중실 섭취가 초파리 생식력에 미치는 영향

(라) 삼 중실 추출물을 이용한 삼 중실 내 유효 성분물질 분석

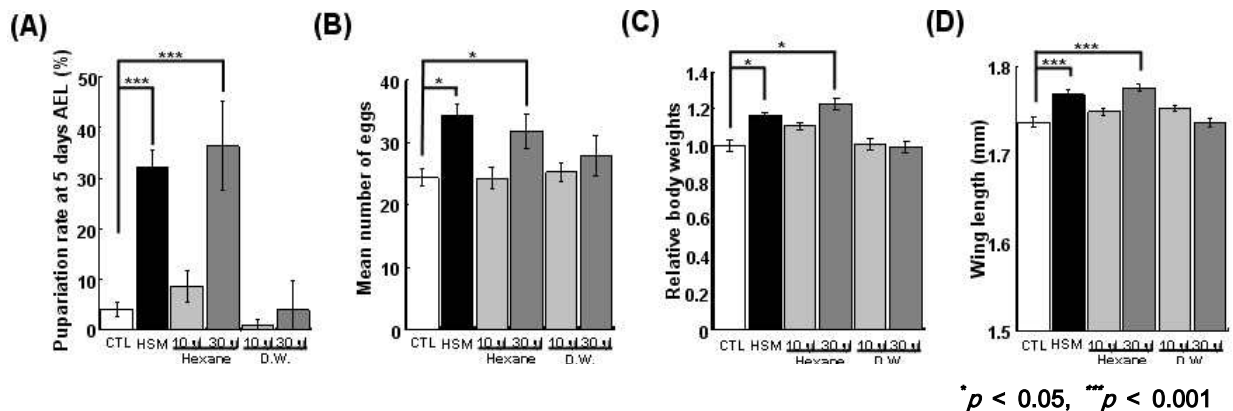


Figure 37. 극성, 비극성 삼 중실 추출물의 유효성 분석

- Fig. 37A. 비극성 삼 중실 추출물과 용화율 증가
- Fig. 37B. 비극성 삼 중실 추출물과 생식력 증가
- Fig. 37C. 비극성 삼 중실 추출물과 무게 증가
- Fig. 37D. 비극성 삼 중실 추출물과 날개 길이 증가

초파리의 성장과 생식력에 영향을 주는 삼 중실 내의 성분물질을 분석하기 위해, 분쇄한 삼 중실에 hexane (비극성)과 증류수 (극성)를 각각 가한 후 성질이 다른 추출물을 얻었다. 이 추출물을 일반 사육배지에 첨가하여 두 종류의 배지를 제작하였고, 제작한 배지에 초파리를 키우면서 각각의 성분 물질이 초파리의 성장과 생식력에 미치는 영향을 측정하였다. 그 결과, 비극성 hexane 추출물을 30 μ l 첨가한 배지에 초파리를 사육하였을 경우에 삼 중실 섭취에 의해 나타난 초파리 성장 및 생식력 증가 효과가 재현되는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 37). 따라서 삼 중실 내의 다양한 비극성 성분 (지질 등)이 초파리 성장에 유익한 것임을 알 수 있다.

(마) 삼 중실 배지에서의 초파리 수명 측정

삼 중실의 노화방지 효능을 분석하기 위해 초파리의 수명을 측정해보았다. 각각의 배지에서 태어나고 자란 수컷 초파리를 수집하여 각각의 배지에서 기르며 배지내의 모든 초파리가 죽을 때까지 걸리는 시일을 측정하였다. 그 결과 삼 중실의 섭취가 초파리의 수명에는 영향을 미치지 않음을 확인하였다 (Fig. 38).

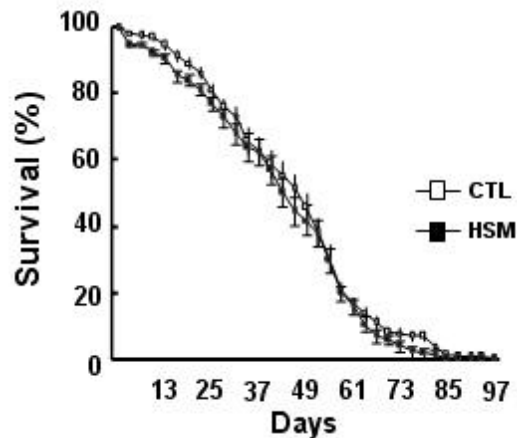


Figure 38. 삼 중실 섭취가 수명에 미치는 영향

(바) 삼 중실 배지에서의 파킨슨병 모델 초파리의 운동 능력 측정

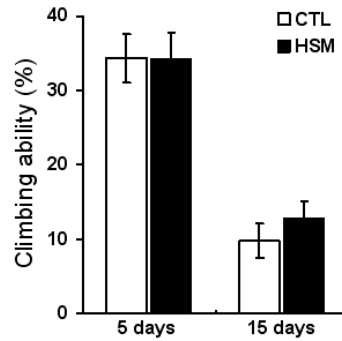


Figure 39. 삼 종실 섭취가 파킨슨병 모델 초파리의 운동 능력에 미치는 영향

여러 가지 뇌질환 모델 초파리를 이용하여 삼 종실 섭취가 퇴행성 뇌질환 모델 동물의 표현형에 미치는 영향을 알아보았다. 우선, 각각의 배지에서 사육한 파킨슨병 모델 초파리 수컷을 수집하여 climbing test 를 수행하였다. 이는 관병을 일정 높이 이상 기어오르는 능력을 측정하는 방법으로, 태어난지 5일과 15일 된 초파리를 이용하였다. 파킨슨병 모델 초파리는 인간 파킨슨병 환자와 마찬가지로 운동능력에 이상을 보이는데, 삼 종실 섭취가 파킨슨병 모델 초파리의 표현형 개선을 유발하진 않음을 보았다. 15일 짜 측정 결과를 보면 평균값은 증가하였으나 오차범위를 고려한 *t*-test 결과 유의미하지 않은 증가로 확인되었다 (Fig. 39).

(사) 삼 종실 배지에서의 헌팅턴 무도병 모델 초파리의 눈 표현형 관찰

다음으로는 헌팅턴 무도병에서의 효과를 알아보기 위해 초파리의 유용한 시스템인 UAS-GAL4 시스템을 이용하여 초파리의 눈에 특이적으로 헌팅턴 무도병의 특징인 과도한 글루타민의 생성과 축적을 유도하였다. 이렇게 제작 된 헌팅턴 무도병 모델 초파리를 각각의 배지에서 사육하였고, 자란지 3일 짜 되는 초파리의 암수를 구분하여 눈에서 보여지는 표현형을 관찰하였으나 유의미한 차이점을 발견할 수 없었다 (Fig. 40). 각각의 배지에서 더 긴 시간동안 사육한 초파리들 간에도 별다른 차이점은 없었다 (data not shown).

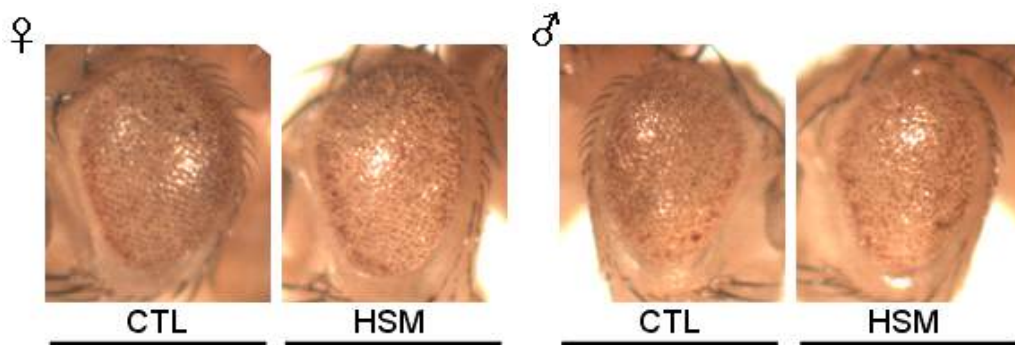


Figure 40. 삼 종실 섭취가 헌팅턴 무도병 모델 초파리의 눈 표현형에 미치는 영향

(아) 삼 종실 배지에서의 산화 스트레스 저항성 정도 측정

활성 산소종 (ROS, reactive oxygen species) 은 생명체의 대사 활동 시 필수적으로 수반되는 물질로, 저항성을 잃게 되면 산화 스트레스의 원인으로 작용하여 여러 가지 질병을 일으키는 원인이 된다. 초파리는 과산화수소 함유 배지를 이용해 산화 스트레스에 대한 저항성을 비교적 간단하게 측정할 수 있는 좋은 모델이기 때문에 이를 이용하여 삼종실 함유 배지가 산화 스트레스에 어떠한 영향을 미치는지 알아보았다. 각각의 배지에 과산화물을 방출하는 과산화수소를 전체 배지 중량의 3% 만큼 섞어준 후 일반 사육배지와 삼종실 함유 배지에 수컷 초파리를 10 마리씩 넣어 길러보았다. 실험은 배지 내의 모든 초파리가 죽을 때까지 진행되었고, 그 결과 삼종실 함유 배지에 과산화수소를 섞어준 배지에서 자란 초파리가 그렇지 않은 경우에 비해 현저히 오래 살아남는 것을 관찰하였다 (Fig. 41). 과산화수소 함유 배지에서 오래 살아남는 초파리가 산화 스트레스에 저항성이 있는 것으로 여겨지므로, 삼종실이 산화스트레스로부터의 저항성을 증진하는 데에 기여할 가능성을 확인할 수 있었다.

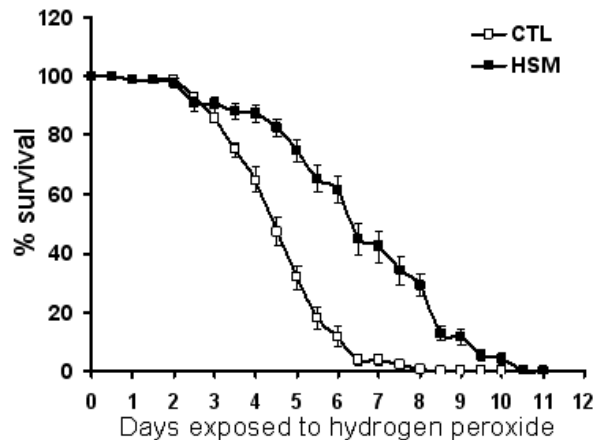


Figure 41. 삼종실 함유 배지가 산화 스트레스 저항성 정도에 미치는 영향

(자) 삼종실 추출물을 이용한 삼종실 내의 산화 스트레스 저항성에 기여하는 물질 분석

앞서 실험한 삼종실의 산화 스트레스 저항성 증진과 관련하여, 이러한 결과가 삼종실 내의 어떤 성분 물질에서 기인한 것인지 알아보기 위한 실험을 진행하였다. 앞서 추출한 두 종류의 삼종실 추출물을 각각 일반 사육배지에 첨가한 뒤 과산화물을 방출하는 과산화수소를 총 중량의 3% 가 되도록 섞어주었다. hexane 추출물을 30 µl 첨가한 3% 산화스트레스 배지에 초파리를 사육하였을 경우에 앞서 실험으로 확인하였던 삼종실에 의한 산화 스트레스 저항성 증진과 유사한 효과가 나타나는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 42). 반면에 증류수 추출물을 30 µl 첨가한 3% 산화스트레스 배지에 초파리를 사육하였을 경우, 대조군과 비교하여 유의미한 차이가 나지 않음을 확인할 수 있었다 (Fig. 43). 따라서 삼종실 내의 비극성 성분 (지질 등)이 삼종실이 가지는 산화 스트레스 저항성 증진에 기여하는 것임을 알 수 있었다.

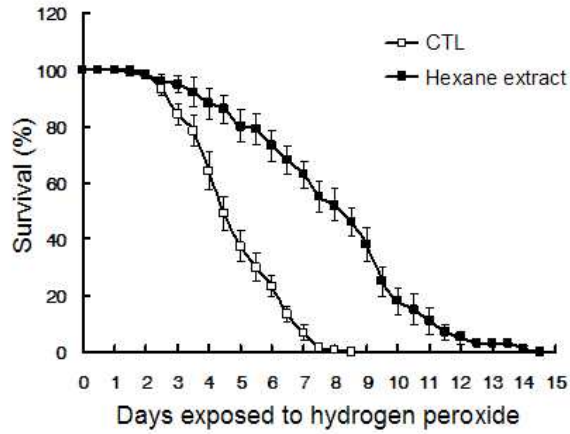


Figure 42. 비극성 삼 중질 함유물이 산화 스트레스 저항성 정도에 미치는 영향

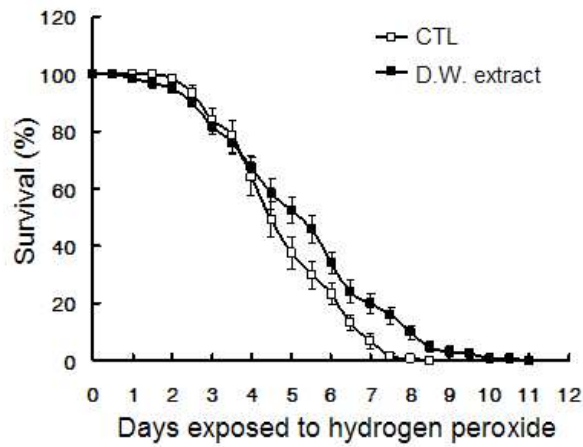
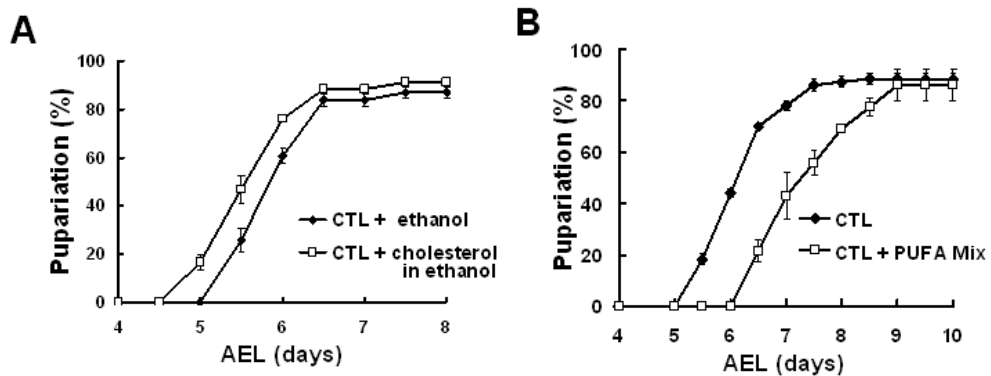


Figure 43. 극성 삼 중질 함유물이 산화 스트레스 저항성 정도에 미치는 영향

(차) 여러 가지 지방 성분 처리를 통한 삼 중질 내의 유효 성분 물질 분석



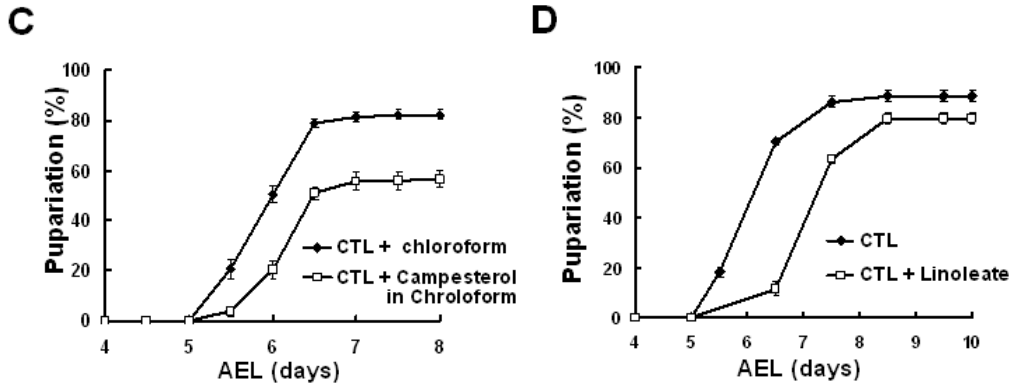


Figure 44. 삼 종실 내의 여러가지 지방 성분이 초파리 성장속도에 미치는 영향

Fig. 44A. Cholesterol 첨가와 용화율 증가

Fig. 44B. PUFA Mix 첨가와 용화율 감소

Fig. 44C. Campesterol 첨가와 용화율 감소

Fig. 44D. Linoleate 첨가와 용화율 감소

(카) 여러 가지 지방 성분 첨가에 따른 초파리 성장 속도 변화 측정

앞선 실험을 통해 삼 종실 추출물에 의한 초파리 용화 시기의 단축 (Fig. 44)이 삼 종실이 함유하고 있는 비극성 (지방 등) 성분에 의한 것 (Fig. 44A)임을 확인할 수 있었다. 이와 관련하여 삼 종실이 함유하고 있는 여러 지방 성분 중 실제로 초파리 성장 속도 증가에 기여하는 성분이 어떠한 것인지 알아보기 위해 총 4종류의 지방 성분을 각각 첨가한 배지에서 초파리를 기른 후 성장 속도를 측정하였다. 실험에 사용한 4가지 지방 성분은 모두 삼 종실에 풍부하다고 알려진 양질의 지방 성분 (sterol 계열, cholesterol; PUFA (polyunsaturated fatty acid), PUFA Mix 그리고 linoleate; phytosterol, campesterol) 으로서, 삼 종실 배지에 함유되어 있는 양을 각각 계산하여 일반 배지에 첨가한 후 사용하였다. 앞선 실험과 마찬가지로 각각의 배지에 동일한 개수의 알을 받은 후 깨어난 애벌레가 번데기가 되기까지의 용화 시간을 측정하였고, 그 결과 cholesterol 을 첨가하여 준 배지에서 기른 초파리의 성장 속도가 다소 증가한 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 44A). 반면에 PUFA Mix (Fig. 44B), Linoleate (Fig. 44D) 그리고 campesterol (Fig. 44C) 을 첨가한 배지에서 기른 초파리들의 경우에는 오히려 대조군에 비해 성장 속도가 감소하는 것을 확인하였다. 이는 삼 종실 배지에서의 초파리 성장 속도 증가에 cholesterol 이 매우 핵심적인 역할을 하는 물질이라는 것을 알 수 있는 결과이다. 그러나 더 흥미로운 사실은, 성장 속도의 증가 정도로 미루어 볼 때 (삼 종실 배지에 의한 효과가 cholesterol 만 첨가해준 배지에 의한 효과보다 훨씬 강함.) 초파리의 성장 속도를 조절하는 데에는 cholesterol 뿐 아니라 여러 인자들이 복합적으로 작용 할 것이라는 점이다. 이에 더하여 삼 종실에 풍부하다고 알려진 phytosterol 과 polyunsaturated fatty acid 를 각각 첨가하였을 경우 오히려 성장 속도가 느려진 결과는 이러한 물질들이 생체 내에서 cholesterol 과 경쟁적으로 작용할 가능성을 보여준다.

(타) 여러 가지 지방 성분 첨가에 따른 초파리 성장 정도 측정

다음으로, 서로 다른 지방 성분들이 초파리 성장에 미치는 영향을 알아보기 위해 앞선 실험에서 사용한 것과 동일한 각각의 지방 성분 첨가 배지에서 기른 초파리 성체의 무게와 날개 길이를 비교 분석하였다. 그 결과, cholesterol 을 첨가한 배지에서 기른 초파리가 일반 배지에서 기른 초파리에 비해 무게와 날개길이 모두 유의미하게 증가한 것을 확인하였다 (Fig. 45A, B). 반면에 PUFA Mix 와 linoleate 를 삼 종실 배지와 동일한 양만큼 첨가하여 준 일반 배지에서 기른 초파리의 경우, 유의미한 차이는 아니었으나 대조군에 비해 무게와 날개길이의 평균값 모두 다소 감소한 것을 확인할 수 있었다. 이상의 결과를 통해 성장 속도 변화에서와 마찬가지로 cholesterol 과 PUFA Mix, linoleate 가 생체 내에서 경쟁적으로 작용할 가능성을 제시할 수 있다.

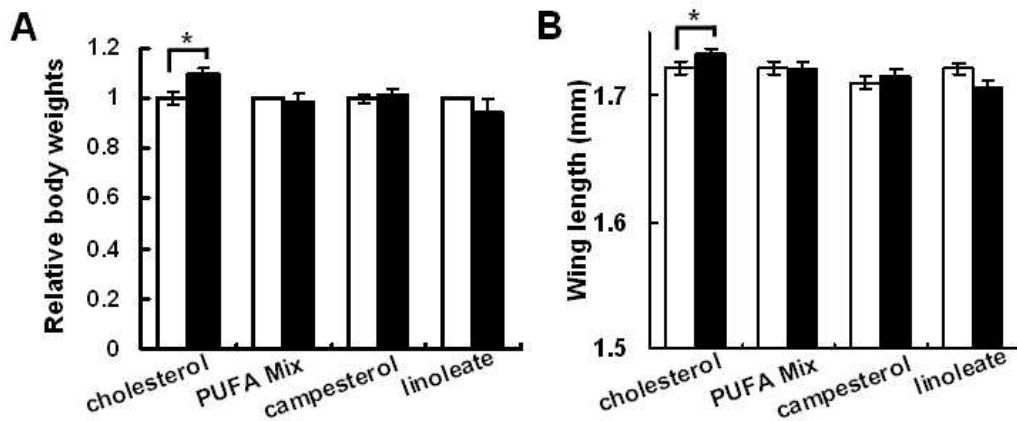


Figure 45. 삼 종실 내의 여러가지 지방 성분이 초파리 성장 정도에 미치는 영향

Fig. 45A. 여러 가지 지방 성분 첨가와 초파리 몸무게 변화 정도

Fig. 45B. 여러 가지 지방 성분 첨가가 초파리 날개 길이 변화 정도

(파) 삼 종실식품 배지에서 초파리의 성장 측정

삼 종실 배지의 섭취를 통한 효과가 삼 종실식품 배지에서도 재연되는지를 확인하기 위해, 일반 사육배지 와 삼 종실 식품 사육배지 (옥수수+콩 전량을 가공 된 삼 종실 식품용 가루로 대체)에서 각각 기른 초파리 애벌레의 용화 시간을 측정하였다. 일반 사육배지에서 자란 초파리에 비해 삼 종실 사육배지에서 자란 초파리의 용화 시기는 이전의 결과와 같이 약 하루 정도 앞당겨진 것을 확인할 수 있었으나, 가공 된 삼 종실 식품 배지 (D1; Defatted hemp, W1; Whole hemp) 에서 자란 초파리의 용화 시기는 더 늦춰진 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 46). 이는 삼 종실이 포함하고 있는 적절한 지방 성분이 초파리의 성장과 발달에 필수적인 역할을 하는 것임을 다시 한번 확인시켜주는 결과이다.

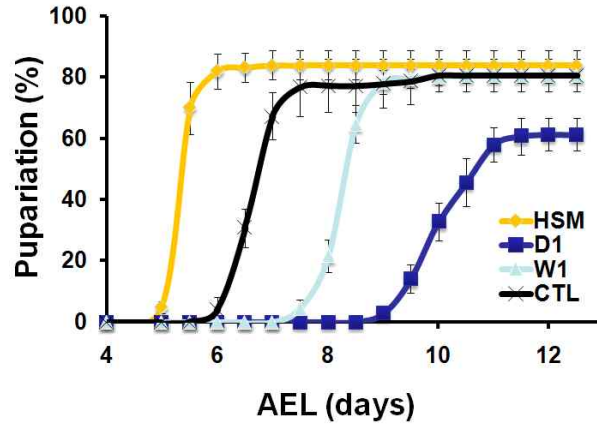


Figure 46. 가공된 삼 종실식품 섭취에 의한 초파리 용화율 변화 측정

(2) 삼 종실로부터 순수 분리된 추출물의 세포 안전성 연구

(가) 사람 폐암세포의 증식을 억제하는 항암 효과

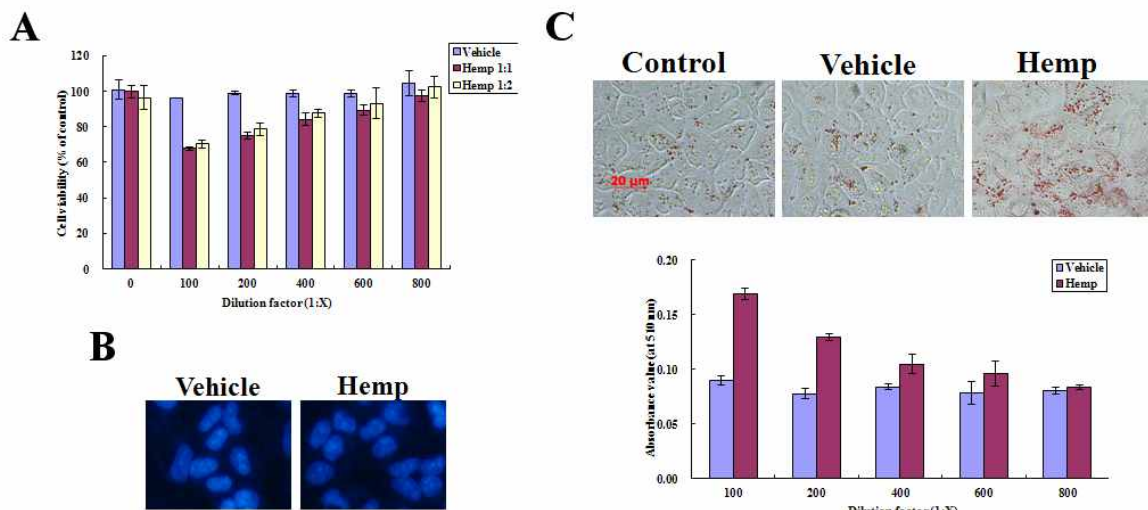


Figure 47. 삼 추출물에 의한 폐암 증식 억제 효과

A. CCK-8 assay, B. DAPI 염색법, C. Oil red O 염색법

Hemp seed oil 의 hexane 추출물의 항암효과를 알아보기 위해 유효성분을 에탄올을 통해 추출하고, 이 추출물을 사람의 폐암세포인 A549 세포에 처리함. 24시간 후, CCK-8 을 통해 hemp 추출물에 의해 A549 세포의 수가 감소하는 결과를 얻었고 (Fig. 47A), 세포 괴사 여부를 알아보기 위해 이러한 세포 감소가 apoptosis 를 통하는지 알아보기 위해 DAPI 염색법을 통해 염색체 응축 여부를 조사하였으나 응축이 일어나지 않아 세포수 감소는 apoptosis 를 통하지 않는다는 결론을 내림 (Fig. 47B). 이에 세포의 분화가 촉진되면 세포 증식이 저하된다는 보고에 착안하여 Oil red O 염색법을 통해 hemp seed oil 추출물이 A549 세포의 분화를 촉진한 것을 확인할 수 있음 (Fig. 47C). 이러한 결과는 hemp seed oil 이 암세포의 과다증식을 억제할 수 있는 항암효과를 가짐을 의미함.

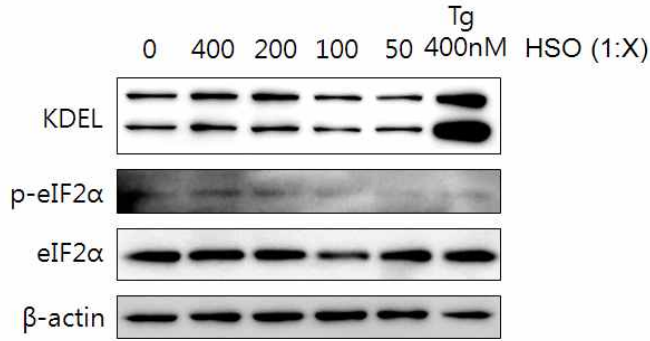


Figure 48. 삼 종실 추출물에 의한 소포체 스트레스 반응 변화

Hemp 추출물 처리 시 ER stress 반응 (UPR)의 변화를 알아보기 위해 hemp seed oil 추출물을 A549 세포에 처리하고 western blot 을 통해 UPR 타겟 유전자들의 발현을 확인해본 결과, UPR 타겟 유전자인 GRP78, GRP94 의 발현과 eIF2α 의 phosphorylation 이 대조군에 비해 감소한 것을 확인함 (Fig. 48). 이는 Hemp 추출물이 암세포에서 일반적으로 활성화되어 있는 UPR 반응을 억제하며 이러한 반응이 폐암세포의 증식 억제 효과와 연관되어 있음을 의미함. Hemp 추출물의 처리에 의해 A549 세포내 산화지질의 축적이 일어난다는 결과를 통해 hemp 추출물이 항암제인 독소루비신에 의한 세포사멸을 가중시켜줄 수 있는지 알아봄. A459 세포에 독소루비신을 처리하여 세포사멸이 일어남을 CCK-8 assay 와 PARP western 을 통해 확인하였음 (Fig. 49). Hemp 추출물에 의한 세포사멸 가중효과를 확인하기 위해 hemp 추출물을 3시간 전처리하고 독소루비신을 24시간 처리한 후 CCK-8 assay 를 통해 cell viability 를 측정 한 결과, hemp 추출물이 독소루비신에 의한 세포사멸을 가중시키는 결과를 얻었음 (Fig. 50).

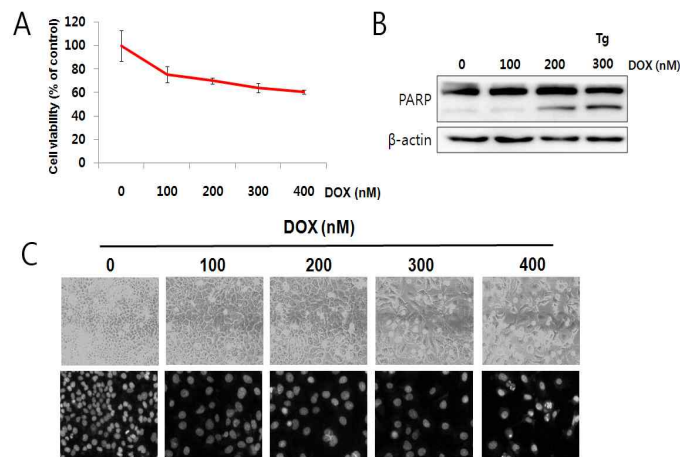


Figure 49. 독소루비신에 의한 폐암세포 사멸
A. CCK-8 assay, B. PARP cleavage, C. DAPI 염색

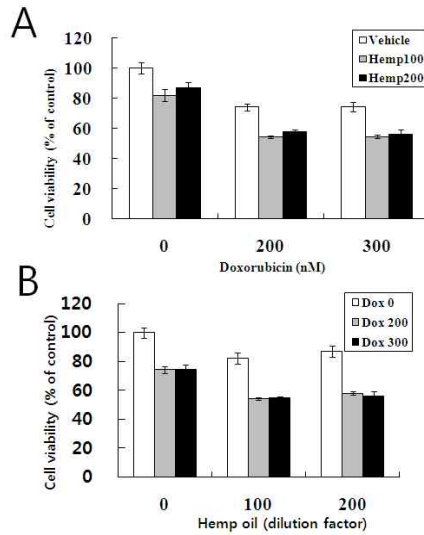


Figure 50. Hemp 추출물과 독소루비신의 동시 처리에 의한 세포사멸
A, B. Hemp 추출물 3시간 전처리하고 독소루비신 24시간 처리 후 세포 사멸 확인

Hemp 추출물의 세포사멸 가중효과가 hemp seed oil 의 유효성분인 DHA 에 의해 일어나는지 알아보기 위해 정제된 DHA 을 처리하고 세포사멸여부를 확인해 보았음. DHA 단독처리에 의해서는 hemp 추출물 처리와 같이 apoptosis 가 일어나지 않음을 확인함 (Fig. 51A, B). DHA를 농도별로 3시간 전처리하고 독소루비신을 처리한 경우에는 세포사멸이 가중됨을 확인함 (Fig 51C, D).

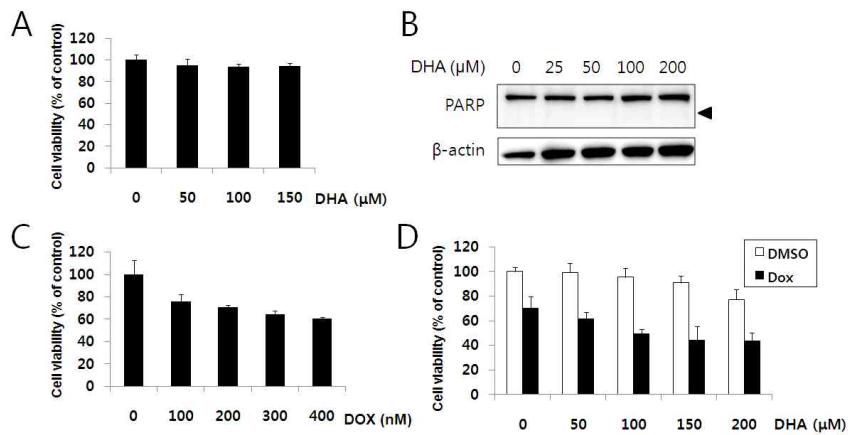


Figure 51. DHA와 독소루비신 처리에 의한 폐암세포 사멸 조사
A, C, D. CCK-8 assay, B. PARP western blot

(나) 류마티스 환자 활막세포주의 이상증식 억제 효과

① 삼 중실 추출물에 의한 활막세포주 이상증식 억제 효과

Hemp seed oil 의 hexane 추출물의 항류마티즘 효과를 알아보기 위해 유효성분을 에탄올을 통해 추출하고, 이 추출물을 류마티스 환자에서 유래된 MH7A 세포주에 처리함. 24시간 후 세포 생존율을 CCK-8 assay 로 측정된 결과, 삼 종실 추출물에 의해 활막세포의 이상증식이 억제되는 것을 확인함 (Fig. 52A). 이러한 세포 증식 억제 효과가 세포 사멸에 의해 유도되는 지 알아보기 위해 apoptosis marker 인 PARP cleavage 여부를 확인함. 삼 종실 추출물 2% 처리시간이 증가할수록 세포 사멸이 증가함을 알 수 있었음 (Fig. 52B). 또한, 삼 종실 추출물의 처리에 의해 핵 응축이 일어나는 것도 확인함 (Fig. 52C).

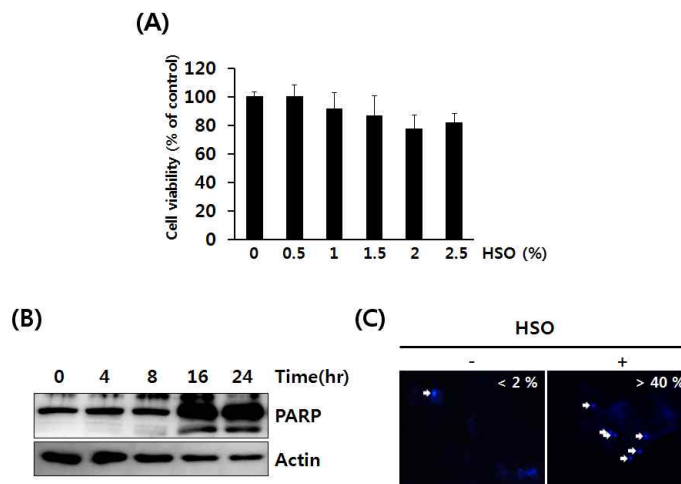


Figure 52. 삼 종실 추출물에 의한 류마티즘 억제 효과
A. CCK-8 assay, B. Western blot, C. DAPI 염색

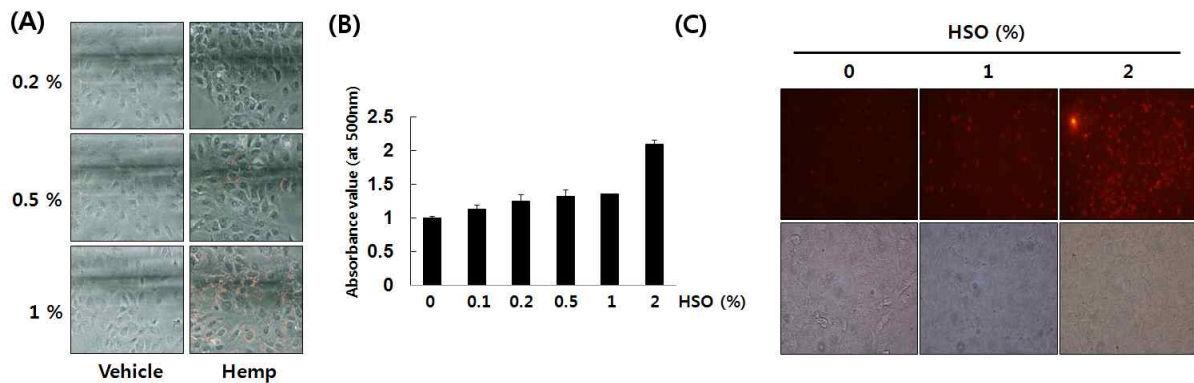


Figure 53. 삼 종실 추출물에 의한 세포 분화와 Endocytosis 여부 확인
A. Oil red O 염색법, B. 세포내 존재하는 Oil red O 정도, C. Dextran 염색

이러한 결과들은 삼 종실 추출물이 류마티스 환자의 활막세포의 이상 증식을 억제할 수 있다는 것을 의미함. 이에 세포의 분화가 촉진되면 세포 증식이 저하된다는 보고에 착안하여 Oil red O 염색법을 통해 hemp seed oil 추출물이 MH7A 세포의 분화를 촉진한

것을 확인할 수 있음 (Fig. 53A, B). 삼 중실 추출물의 활막 세포 이상 증식 억제 효과가 추출물이 세포내 유입되어 일어나는 지 알아보기 위해 texas red 로 labeling 된 Dextran 염색법을 통해 endocytosis 여부를 확인함. 실험결과, 삼 중실 추출 물의 처리 농도가 높아질수록 endocytosis 가 증가하는 것으로 보아 삼 중실 추출물이 MH7A 세포내로 유입 되어 작용함을 유추할 수 있었음 (Fig. 53C).

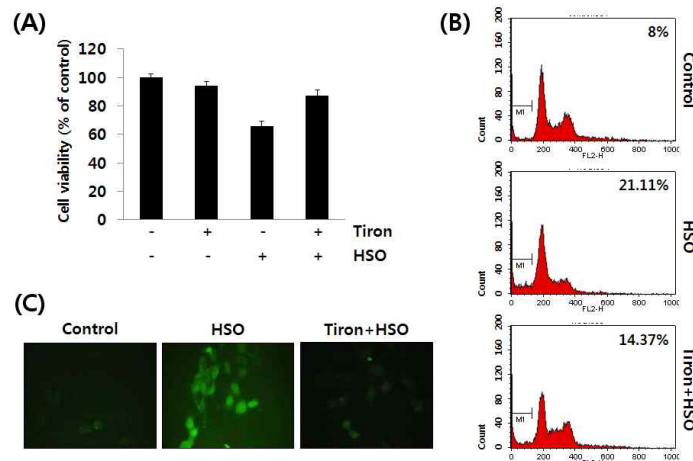


Figure 54. 삼 중실 추출물에 의한 산화스트레스 측정
A. CCK-8 assay, B. FACS를 통한 sub-G1기 조사, C. DCF-DA 염색

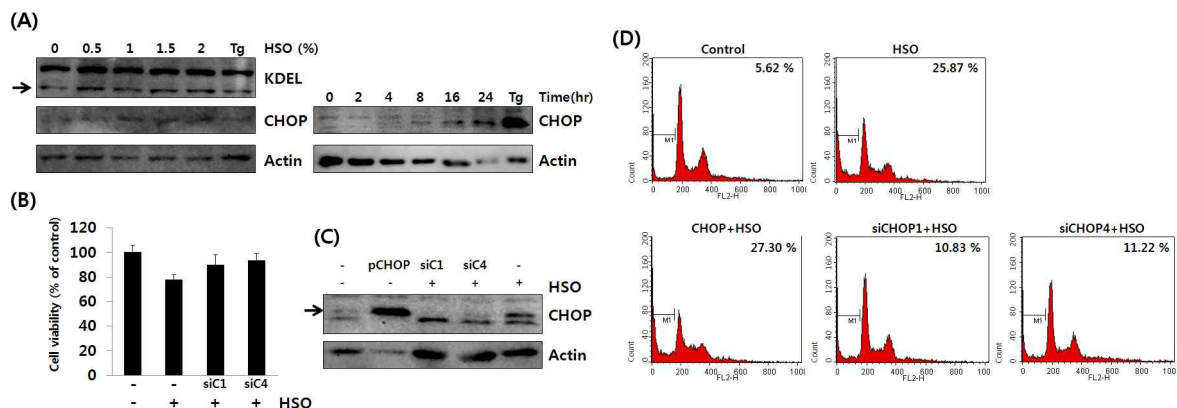


Figure 55. 삼 중실 추출물에 의한 소포체 스트레스 발생과 CHOP의 역할
A. C. western blot, B. CCK-8 assay, D. FACS

삼 중실 추출물의 세포내 유입과 축적에 의해 세포내 산화 스트레스가 증가하는 지 알아보기 위해 항산화제인 tiron 을 전처리하여 산화스트레스를 억제한 뒤, 삼 중실 추출물을 처리하고 CCK-8 assay 와 PI 염색후 FACS 를 통해 세포 생존율을 조사함. 삼 중실 추출물의 처리에 의해 감소되었던 세포 생존율이 항산화제인 tiron 전처리에 의해 복구되었으며, FACS analysis 실험에서도 sub-G1 population 역시 항산화제 전처리에 의해 감소되는 결과를 통해 삼 중실 추출물에 의한 세포 사멸은 산화스트레스에 의한 것임을 알 수 있었음 (Fig. 54).

삼 종실 추출물에 의해 MH7A 세포주에서 유발되는 산화 스트레스는 소포체 스트레스를 유발하는 원인으로 보고되기 때문에 실제로 삼 종실 추출물에 의해 소포체 스트레스가 유도되는 지 알아보기 위해 소포체 스트레스 마커인 GRP78, GRP94, CHOP 의 발현을 western blot을 통해 확인하였음. 삼 종실 추출물의 처리 농도와 시간이 증가할수록 GRP78, GRP94, CHOP 의 발현이 증가함 (Fig. 55A). 세포 사멸에 연관되어 있다고 보고되어 있는 CHOP 이 삼 종실 추출물의 세포사멸에 영향을 주는 지 알아보기 위해 CHOP specific siRNA oligos transfection 을 통해 CHOP 발현을 감소시킨 다음, 삼 종실 추출물을 24시간 처리하고 CCK-8 assay 를 통해 세포 생존율을 측정함. CHOP knock-down 에 의해 세포 사멸이 억제됨을 확인하였으며, PI 로 세포를 염색한 후 FACS 를 통해 sub-G1 population 을 분석하여 CHOP knock-down 이 세포 사멸을 억제함을 알 수 있었음 (Fig. 55B-D). 이는 소포체 스트레스가 삼 종실 추출물에 의한 세포 사멸을 유도하는 원인이며 CHOP 이 사멸 과정에서 주요한 역할을 하는 factor 로 작용한다는 결론을 내릴 수 있음.

② DHA에 의한 활막세포주 이상증식 억제 효과

삼 종실의 hexane 추출물에 함유되어 있는 오메가 3 지방산인 리놀렌산은 생체내 효소들에 의해 지질대사 과정을 거쳐 최종적으로 DHA 나 EPA 의 형태로 전환되어 세포에 영향을 줌. 따라서 실질적인 유효성분인 DHA 나 EPA 에 대한 세포수준의 연구는 삼 종실 hexane 추출물의 약리적 효과를 연구하는 데 중요한 과정임. 앞서 삼 종실 추출물을 류마티스 환자의 활막세포에서 유래된 세포주인 MH7A 세포주에 처리한 실험에서 우리는 삼 종실 추출물의 활막세포 이상증식 억제 효과를 밝혔음. 이러한 항류마티즘 효과에 대한 심도있는 메커니즘 연구를 위해 유효성분 중 하나인 DHA를 세포에 직접 처리하고 삼 종실 추출물과 같은 항류마티즘 효과를 가지는지를 밝히고 분자세포학적인 메커니즘 연구를 수행함.

DHA 를 농도별로 MH7A 세포주에 24시간 처리하고 CCK-8 assay를 통해 세포의 생존율을 측정한 결과 고농도의 DHA에서 세포주의 증식율이 억제되는 것을 확인함 (Fig. 56A). DAPI 염색과 apoptosis 마커인 PARP 와 Caspase 8의 cleavage 정도를 western blot으로 알아본 결과 DHA에 의한 세포의 증식 억제는 세포주의 apoptosis를 통해서 일어남을 알 수 있었음 (Fig. 56B, C).

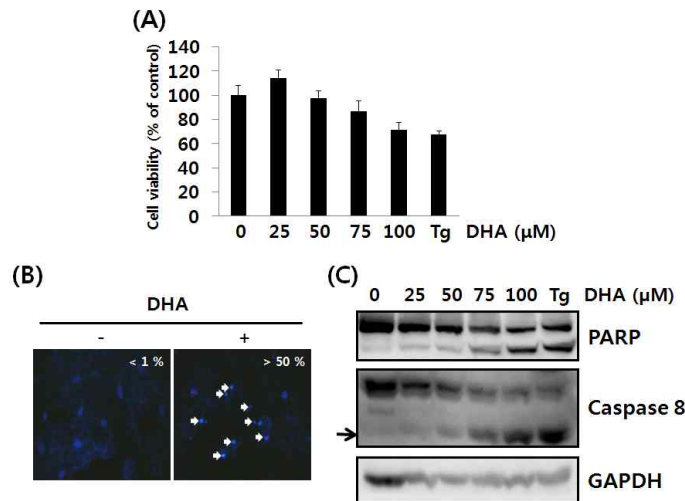


Figure 56. DHA에 의한 MH7A 세포주 사멸
A. CCK-8 assay, B. DAPI 염색법, C. Western blot

DHA 처리에 의해 유방암세포주가 Death receptor 5 (DR5) 와 Caspase 8 pathway 를 통해 세포사멸에 이르는 보고를 토대로 활막세포주인 MH7A 세포주에서의 DR5 의 발현정도를 western blot 으로 확인함. DHA 처리 농도와 시간이 증가할수록 DR5 의 발현정도가 증가하며 DR4 의 발현은 감소하는 것을 알 수 있었음 (Fig. 57).

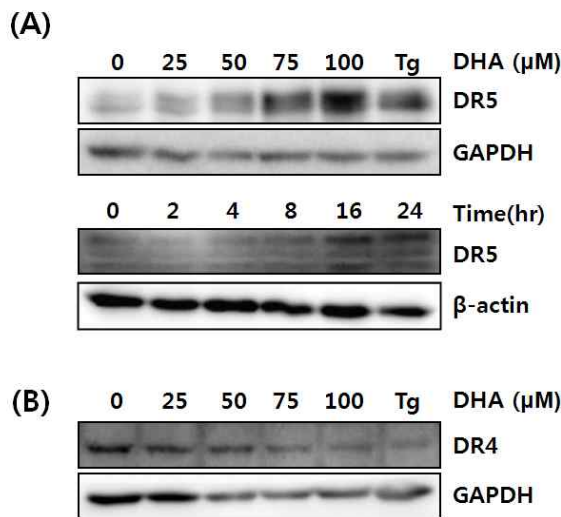


Figure 57. DHA에 의한 DR5와 DR4 발현 조사

DHA에 의한 세포 사멸 과정에 소포체 스트레스 반응이 영향을 주는 지 알아보기 위해 DHA를 MH7A 세포주에 처리하고 소포체 스트레스 마커들을 western blot 방법으로 확인함. DHA 처리 농도가 증가할수록 GRP78 (KDEL) 과 CHOP 의 발현이 증가됨 (Fig. 58A). CHOP은 PERK-eIF2α pathway 에 의해 조절이 되는 전사인자로 세포의 사멸에

연관되어 있다고 알려져 있음. DHA를 처리한 지 2 시간부터 eIF2 α 의 인산화정도가 증가하며, 하위 인자인 CHOP의 발현이 DHA 처리 4시간부터 증가하는 것을 확인함 (Fig. 58B). 이러한 결과는 DHA 처리가 MH7A 세포주에 소포체 스트레스를 유발하며 세포 사멸을 조절하는 것으로 알려진 CHOP을 통해 세포사멸을 유도함을 추측할 수 있음.

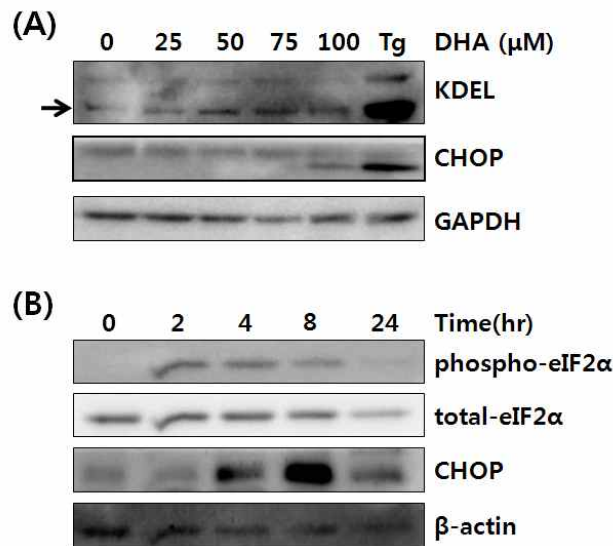


Figure 58. DHA에 의한 CHOP 발현 조사

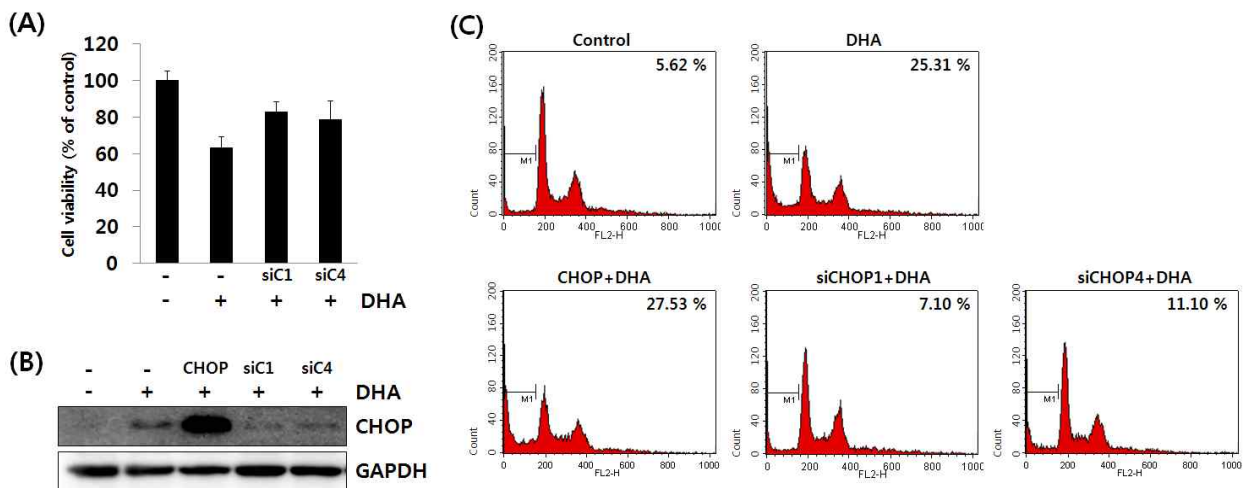


Figure 59. DHA에 의한 CHOP의 발현과 세포 사멸간의 관계 조사

A. CCK-8 assay, B. Western blot, C. PI 염색 후 FACS를 이용한 세포주기 분석

CHOP이 MH7A 세포주의 사멸을 실질적으로 조절하는지를 알아보기 위해 CHOP specific siRNA oligos transfection을 통해 CHOP 발현을 감소시킨 후 DHA를 처리하여 세포 반응을 알아봄. CCK-8 assay 결과, siRNA transfection을 통해 CHOP이 knock-down된 세포주는 DHA에 의한 세포 사멸을 억제하는 것으로 밝혀짐 (Fig. 59A,

B). PI 염색 후 FACS 를 통해 세포주기를 확인한 결과 세포사멸을 나타내는 표지인 sub-G1 population 이 CHOP knock-down 에 의해 감소되는 것을 확인함 (Fig. 59C).

DHA 에 의한 세포 사멸 유도가 삼 중실 추출물 처리와 같이 세포내 ROS 축적에 의해 유도되는 것인지 알아보기 위해 항산화제인 tiron 을 전처리하고 DHA 를 처리하여 CCK-8 assay 를 통해 세포 생존율을 알아보았음. Tiron 전처리에 의해 DHA 에 의한 세포 사멸 정도가 억제되는 것을 확인하였으며, DCF-DA 염색을 통해 DHA가 산화스트레스를 유도하고 있으며 tiron 이 항산화효과를 보이고 있음을 확인하였음 (Fig 60A, B). FACS 를 이용한 세포주기분석에서도 항산화제인 tiron 의 전처리가 sub-G1 population 의 감소를 가져오는 것을 확인하여 DHA 에 의한 세포사멸은 산화스트레스에 의한 것임을 알 수 있었음 (Fig 60C).

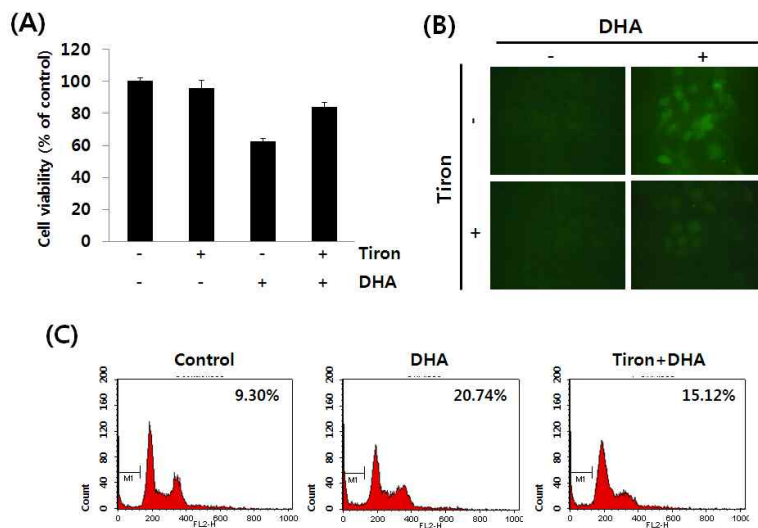


Figure 60. DHA에 의한 ROS 축적과 세포사멸 관계 조사

A. CCK-8 assay, B. DCF-DA 염색법, C. PI 염색 후 FACS를 이용한 세포주기분석

이러한 산화스트레스가 소포체스트레스를 유도하고 CHOP 의 발현을 증가시켜 결국 세포사멸을 유도했는지 알아보기 위해 항산화제인 tiron 을 전처리하고 DR5 와 CHOP 의 발현을 western blot 을 통해 알아보았음. tiron 전처리에 의해 산화 스트레스가 억제되었을 때 DHA처리에 의해 증가되었던 DR5 와 CHOP 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있었음.

이러한 결과를 종합해 볼 때, 삼 중실 추출물과 그 유효성분인 DHA 에 의한 산화스트레스는 MH7A 세포주에서 소포체 스트레스를 유발하고 세포 사멸에 연관되어 있는 것으로 알려진 DR5 와 CHOP 의 발현이 증가되어 세포주의 사멸을 유도하는 주요인자로서 작용한다는 것을 알게 되었음. 류마티스 관절염은 심각한 자가면역질환으로 cytokine 과 같은 염증성물질에 의한 활막세포의 이상증식을 억제하는 것이 치료와 증상 완화에 중요함. 따라서 삼 중실 추출물과 DHA 를 류마티스 관절염 치료에 응용할 수 있을 것으로 기대함.

(다) LPS에 의한 대식세포의 염증반응 억제 효과

Hemp seed oil 의 지용성 유효성분이 대식세포에서 LPS 에 의한 염증반응을 감소시키는 효과가 있는 지 알아보기 위해 쥐의 대식세포주인 RAW264.7 세포에 DMSO 에 희석한 hemp seed oil 을 처리하였음. 24시간 후 CCK-8 을 통해 hemp seed oil 자체가 RAW264.7 세포의 생존에 영향을 주지 않는다는 것을 알게 됨 (Fig. 61A).

Hemp seed oil 의 항염 효과를 알아보기 위해 LPS 에 의해 유도되는 것으로 알려진 iNOS와 IL-1 β 의 발현을 RT-PCR 로 확인한 결과, hemp seed oil 의 농도가 높아질수록 iNOS와 IL-1 β 의 발현이 감소하는 것을 알 수 있었음 (Fig. 61B). Hemp seed oil 의 지용성 유효성분의 처리량을 높이기 위해 ethanol fraction 을 통해 유효성분을 추출하여 RAW264.7 세포에 전처리하고 3시간 후 100 ng/ml LPS 를 처리하였음. RT-PCR 을 통해 hemp seed oil 의 항염 효과를 확인할 수 있었으며, LPS 처리에 의해 증가된 UPR 타겟 유전자인 GRP78, ATF4, CHOP 의 발현이 감소된 것을 확인할 수 있었음 (Fig. 61C).

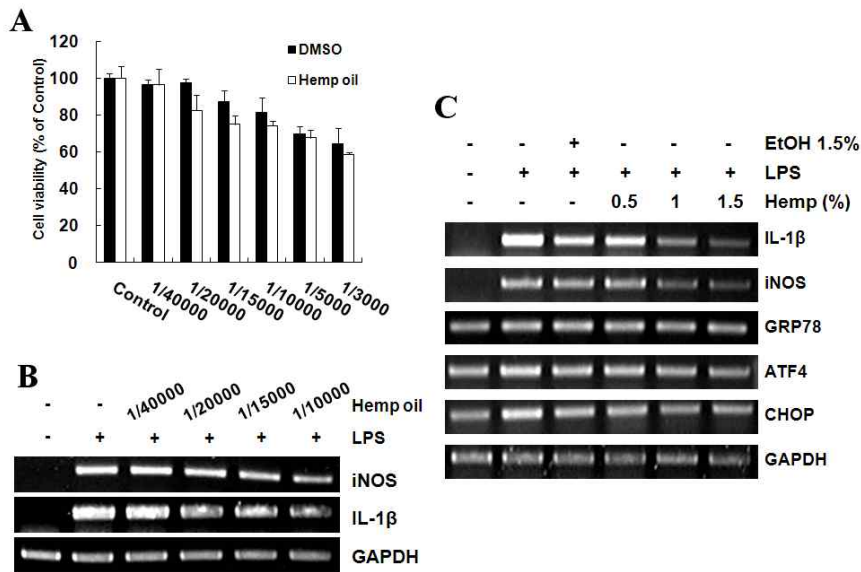


Figure 61. Hemp seed oil에 의한 대식세포의 염증반응 억제 효과

A. 세포의 생존을 조사, B. Inflammatory cytokines의 발현에 미치는 효과, C. ER stress target 유전자의 발현 조사

Ethanol fraction 이 항염 효과를 가지는 것을 알아보기 위해 RAW264.7 세포에 EtOH fraction 한 hemp seed oil 을 전처리한 후 LPS 를 처리하였음. 24시간 후에 RT-PCR 을 통해 LPS 에 의한 염증 반응이 hemp seed oil 에 의해 감소한 것을 확인할 수 있었음 (Fig. 62).

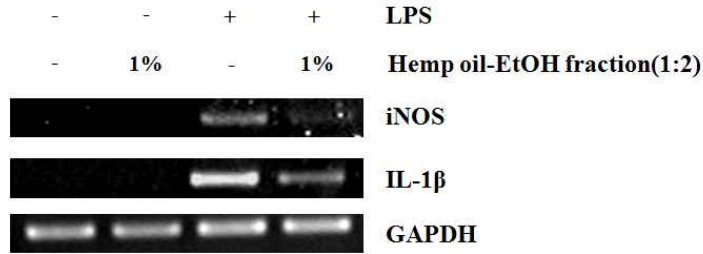


Figure 62. Hemp seed oil에 의한 대식세포의 염증반응 억제 효과

이러한 항염 효과가 hemp seed oil 의 유효성분인 DHA 와 EPA 의 효과일 것인지를 알아보기 위해서 먼저 대식세포에 대한 세포 독성 조사를 하였음. DHA 와 EPA 를 농도 별로 24시간 처리한 후 CCK-8 을 통해 cell viability 를 측정해보니 두 물질 모두 100 μ M 까지는 대식세포의 생존율에 큰 영향을 미치지 않았음 (Fig. 63). DHA 와 EPA 를 각각 전처리한 후 LPS 를 처리하여 염증을 유발시킨 후 세포의 생존율, 유전자 발현 변화, NO 의 양을 측정하였음. CCK-8 을 통해 세포의 생존율에는 변화가 없는 것을 확인하였고, RT-PCR 을 통해 DHA 와 EPA 의 항염 효과를 확인할 수 있었으며, LPS처리에 의해 증가된 UPR 타겟 유전자인 ATF4, CHOP 의 발현이 감소된 것을 확인할 수 있었음 (Fig. 64A, B). 염증반응에서 발생하는 NO 의 양 역시 DHA 와 EPA 에 의해서 감소하였음 (Fig. 64C).

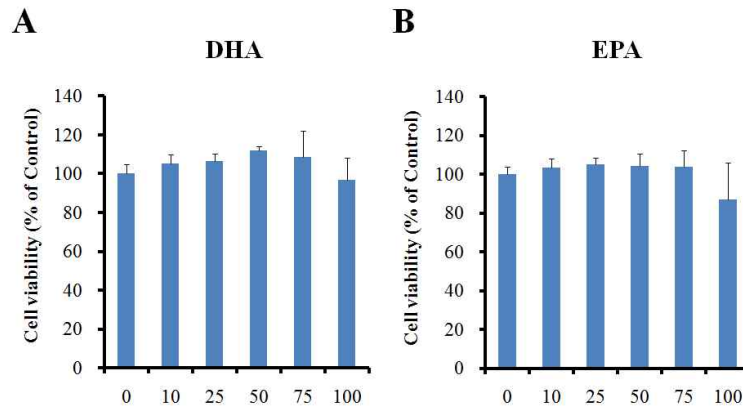


Figure 63. DHA와 EPA가 대식세포에 미치는 세포 독성 조사

A. DHA에 의한 세포의 생존율 조사, B. EPA에 의한 세포의 생존율 조사

유효 성분 중에서 DHA 의 효과를 좀 더 알아보기 위해 같은 방법으로 항염증 반응과 ER 스트레스 유전자의 발현을 알아보았음. 그 결과 항염증 효과가 발생하고, 이 때 GRP78 의 발현량이 증가하고 CHOP 과 ATF4 의 발현량은 감소하는 것을 알 수 있었음 (Fig. 65). DHA 의 항염증 효과가 일어날 때 증가한 GRP78 (BiP) 이 어떠한 역할을 하는지 알아보기 위해 과발현 실험을 하였음. 실험 결과 BiP 의 과발현 시에 iNOS 발현이 감소하는 것으로 나타났음 (Fig. 66). 이것은 DHA 의 항염증 기작에서 BiP 의 발현이 중요한 역할을 하고 있다는 것을 말해줌.

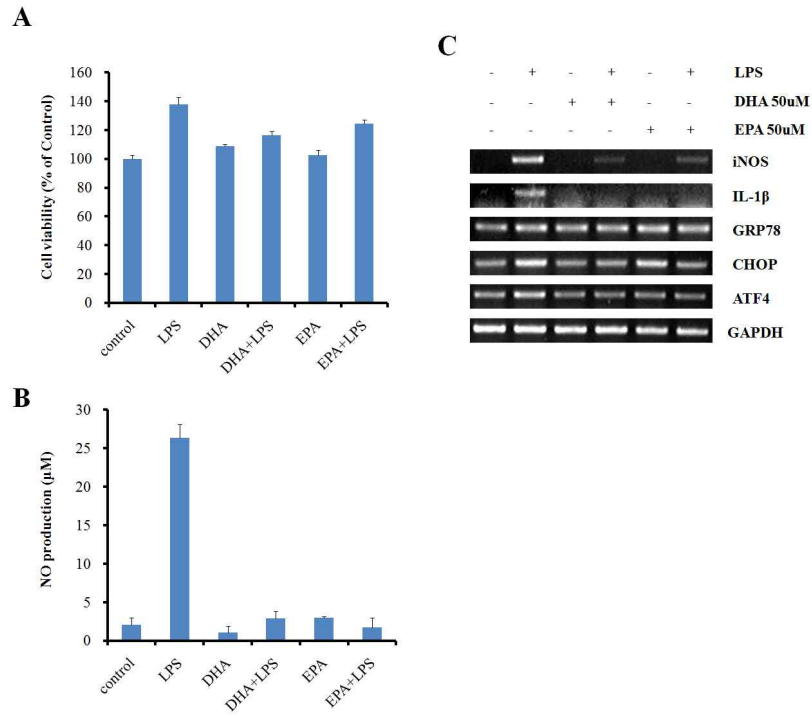


Figure 64. DHA와 EPA에 의한 대식세포의 세포 독성 조사 및 염증반응 억제 효과
 A. 세포의 생존을 조사, B. Inflammatory cytokines과 ER stress target 유전자의 발현 조사, C. NO 발생량 조사

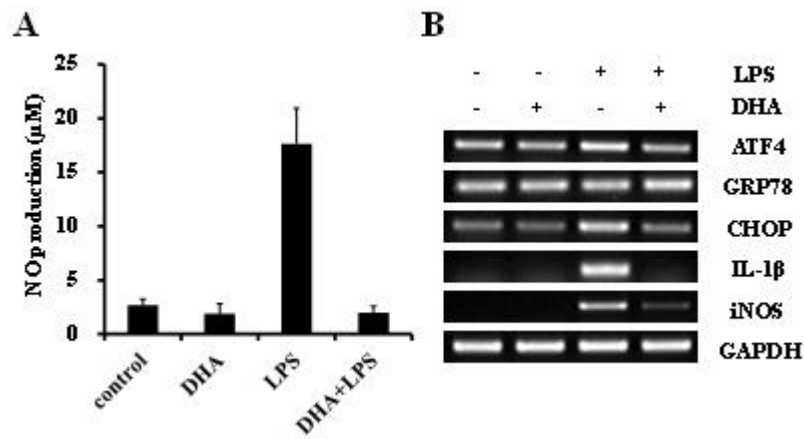


Figure 65. DHA의 항염증 효과와 ER 스트레스 유전자와의 관계
 A. NO 발생량 조사, B. Inflammatory cytokines과 ER stress target 유전자의 발현 조사

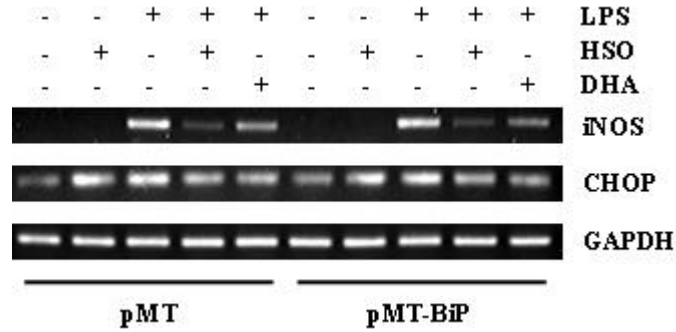


Figure 66. BiP 유전자의 과발현을 통한 항염증 효과

(라) 다양한 세포주에서의 독성 조사

Hemp seed oil 을 배지에 녹을 수 있도록 DMSO 에 희석하여 여러 세포주에 처리하여 24시간 후 CCK-8 을 통해 세포 수를 측정하여 독성 여부를 조사하였음.

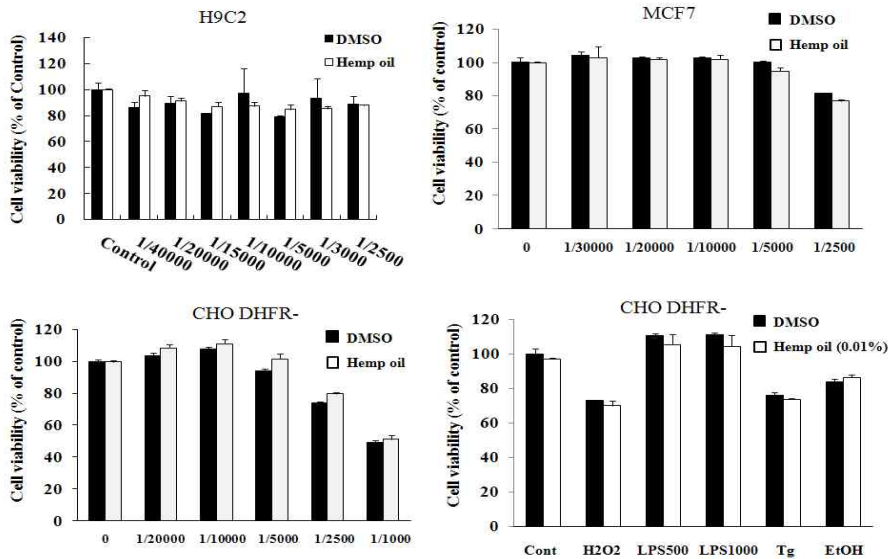


Figure 67. Hemp seed oil 이 다양한 세포에 미치는 세포 독성 조사

쥐의 심근세포주인 H9C2 세포, 사람의 유방암 세포주인 MCF7 세포, 쥐의 난소 세포주인 CHO DHFR- 세포주는 hemp seed oil 처리에 의해 세포의 생존율에 변화가 나타나지 않음을 알 수 있었음 (Fig. 67).

(3) 생쥐 모델을 이용한 삼 중실 추출물 (물, hexane)의 비만 예방효과 및 안전성 규명

(가) 삼 중실 추출물 (물, hexane)에 의한 비만 예방효과 평가

① 실험 방법

6 주령의 수컷 ICR 마우스에 삼 중질의 물 추출물을 15 mg/마리, hexane 추출물을 15 ul/마리, 5 회/주, 총 3 주간 위내 투여하여 체중 및 체중변화율을 측정하였다. 실험에 사용한 마우스는 물 추출물 대조군 (5마리), hexane 추출물 대조군 (5마리), 물 추출물 실험군 (10마리)와 hexane 추출물 실험군 (10마리) 총 30 마리를 사용하였다.

② 실험 결과

물 추출물을 투여한 실험군이 대조군에 비해 유의성 있게 체중 증가율을 감소시켜 물 추출물이 비만 예방 효과가 있음이 확인되었다 (Fig. 68).

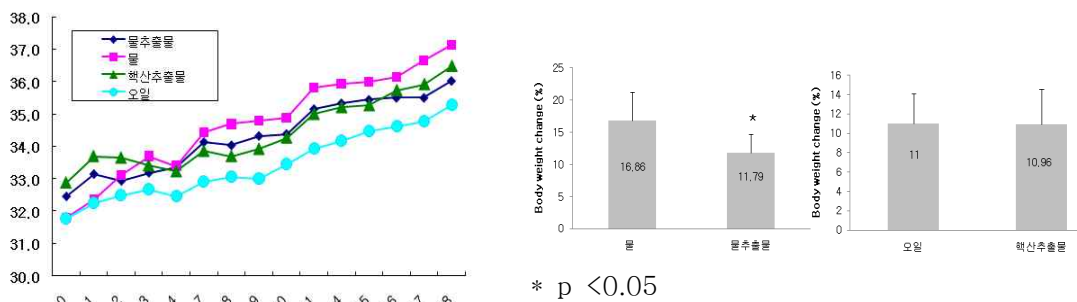


Figure 68. 삼 중질 추출물 (물, hexane) 투여에 의한 체중 및 체중변화 측정

(나) 혈액생화학적 분석을 통한 삼 중질 추출물 (물, hexane)에 의한 항비만 및 안전성 평가

① 실험 방법

후대정맥에서 채취된 혈액을 원심분리하여 -70°C 에 보관하여 혈액생화학 분석에 사용하였다. 혈액생화학 분석은 Hitachi 7020 모델을 이용하여 검사하였으며, 삼 중질 추출물 (물, hexane)에 의한 항비만 및 안전성 평가를 위해 혈청 내 biochemical parameter인 GOT, GPT, total cholesterol (CHO), triglyceride (TG), alkaline phosphatase (ALP), glucose (GLU), albumin (ALB), total protein (TP) 를 분석하였다.

② 실험 결과

물 추출물을 투여한 실험군이 대조군에 비해 혈중 콜레스테롤이 유의성 있게 감소되어 물 추출물이 콜레스테롤을 억제하는 효과가 있는 것으로 확인 되었으며, 혈액생화학적 검사결과 물 및 hexane 추출물을 투여한 실험군이 음성 대조군에 비해 독성의 지표인 GOT, GPT, ALP 등의 혈액생화학적 수치가 유의성 있게 높게 나타나지 않았고, 또한 정상범위에 있는 것으로 보아 마우스 체내에서 삼 중질 추출물 (물, hexane)이 특별한 독성

을 나타내지 않는 것으로 확인되었다 (Fig. 69).

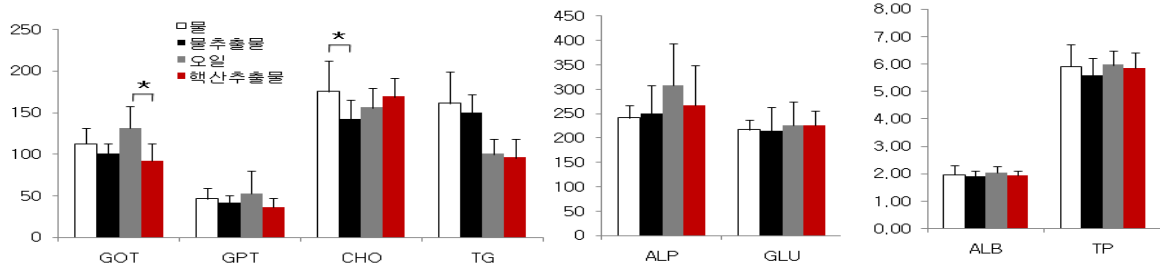


Figure 69. 삼 종실 추출물 (물, hexane) 투여에 의한 biochemical parameters의 변화

(다) 조직병리학적 분석을 통한 삼 종실 추출물 (물, hexane)의 안전성 평가

① 실험 방법

3 주간 위내 투여 후 부검하여 안전성 평가에 중요한 간장, 비장, 신장, 폐장 등을 10% 중성포르말린에 24시간 고정하였다. 일반적인 조직 처리과정을 거친 후 파라핀 포매한 조직을 5um 두께로 절삭하여 H & E 염색을 실시하였다.

② 실험 결과

독성병리전문가가 직접 조직을 관찰한 결과 독성과 관련된 어떠한 조직병리 소견도 관찰되지 않아, 삼 종실 추출물 (물, hexane)이 마우스 체내에서 독성을 나타내지 않는 것으로 확인하였다 (Fig 69-1)

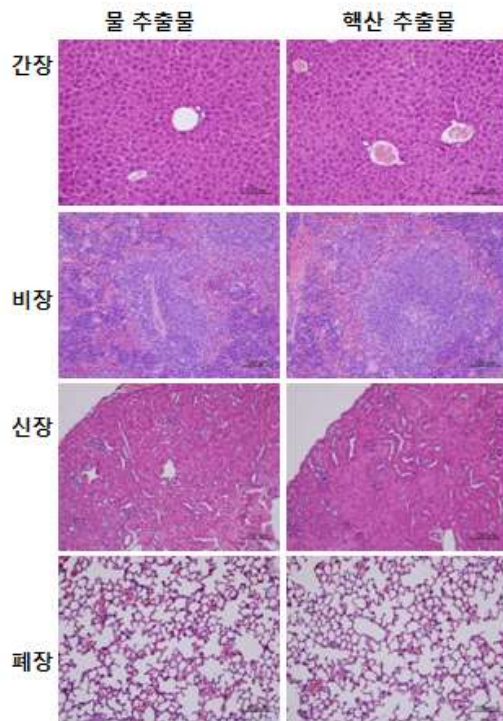


Figure 69-1. 삼 종실 추출물 (물, hexane) 투여 후 조직병리 소견 (H & E)

(4) 생쥐 모델을 이용한 삼 중실 추출물 (물, hexane)의 고지혈증 치료효과 및 항암효과 규명

(가) ApoE knockout 마우스를 이용하여 삼 중실 추출물 (물, hexane)의 고지혈증 예방효과 평가

① 고지혈증 마우스에서 삼 중실 추출물 (물, hexane) 투여에 의한 체중 변화 측정

㉠ 실험 방법

6 주령의 수컷 B6.129P2-*ApoE^{tm1Unc}* (ApoE knockout) 마우스에 삼 중실의 물 추출물을 15 mg/마리, hexane 추출물을 15 ul/마리, 5회/주, 총 14주간 위내 투여하여 체중 및 체중 변화율을 측정하였다. 실험에 사용한 마우스는 물 추출물 대조군 (7마리), hexane 추출물 대조군 (6마리), 물 추출물 실험군 (7마리)와 hexane 추출물 실험군 (7마리) 총 27마리를 사용하였다.

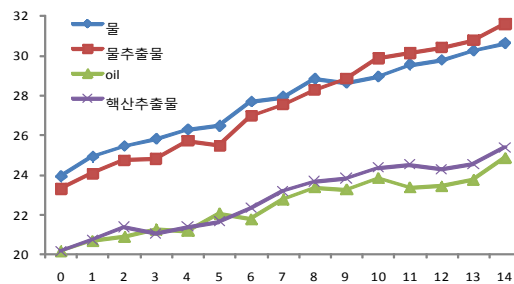


Figure 70. 고지혈증 마우스에서 삼 중실 추출물 (물, hexane) 투여에 의한 체중 변화

㉡ 실험 결과

대조군에 비해 물 추출물과 hexane 추출물을 투여한 실험군에서 유의성 있는 체중 증가는 관찰되지 않았다 (Fig. 70).

② 삼 중실 추출물 (물, hexane)의 고지혈증 예방효과 평가를 위한 혈중 콜레스테롤의 변화 측정

㉠ 실험 방법

후대정맥에서 채취된 혈액은 원심분리하여 -70°C 에 보관하여 혈액생화학 분석에 사용하였다. 혈액생화학 분석은 Hitachi 7020 모델을 이용해 검사하였으며, 고지혈증 예방을 평가

하기 위해 혈중 콜레스테롤 (Total Choesterol, HDL, LDL)의 변화를 분석하였다.

㉔ 실험 결과

혈액생화학적 분석기를 이용해 혈중 콜레스테롤의 변화를 측정된 결과 Total Choesterol, LDL, LDL/HDL 은 대조군에 비해 감소되었으며, 인체에 좋게 작용하는 콜레스테롤인 HDL 은 증가되었으나 유의성은 관찰되지 않았다 (Table 14).

Table 14. 혈액생화학적 분석을 이용한 삼 종실 추출물 (물, hexane)의 고지혈증 예방효과 평가를 위한 혈중 콜레스테롤의 변화 측정

Group	Total Choesterol	LDL	HDL	LDL/HDL
물	596.57±128.62	94.29±21.89	24.57±8.62	4.19±1.88
물 추출물	515.43±126.89	79.71±22.34	29.14±10.64	2.65±1.06
oil	513.00±123.05	118.33±28.61	12.33±3.88	10.13±0.73
Hexane 추출물	490.57±78.57	110.29±18.38	16.00±5.54	6.91±0.51

㉓ 삼 종실 추출물 (물, hexane) 투여에 의한 동맥경화병변의 변화 측정

㉗ 실험 방법

Aortic sinus를 냉동절편하여 Oil red O로 염색한 후 지질의 침착 정도를 측정하여 동맥경화병변의 크기를 분석하였다.

㉔ 실험 결과

Oil red O 로 염색한 후 병변의 크기를 분석한 결과 동맥경화 병변이 대조군 (물 투여군)에 비해 물 추출물을 투여한 실험군에서 유의성 ($p<0.05$) 있게 감소하였으며, 물 추출물에 의해 동맥경화가 억제되는 것이 확인되었다 (Fig. 71).

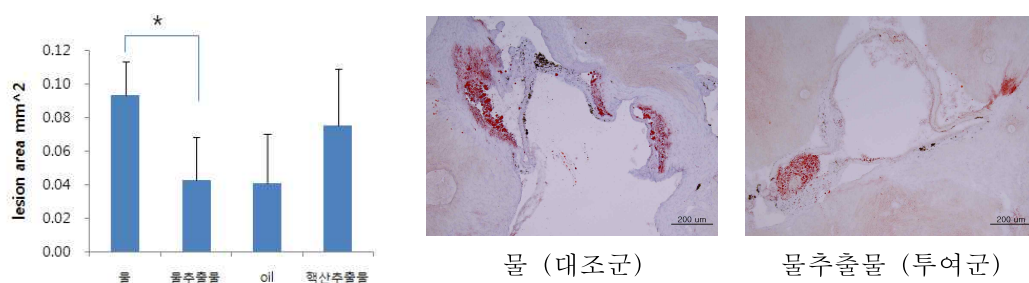


Figure 71. 삼 종실 추출물 (물, hexane) 투여에 의한 동맥경화병변의 변화

(나) 암 세포주를 이용한 in vitro 실험에서 삼 중실 추출물 (hexane)의 항암효과 평가

① 실험 방법

삼 중실 추출물 (물, hexane)에 의한 세포 독성을 알아보기 위하여 MTT assay (CCK-8, Dojindo Lab., Japan)를 이용하여 세포 생존율을 측정하였다. 폐암 (A549), 결장암 (HCT-15), 간암 (HepG2) 세포주를 96well plate 에 접종하고 삼 중실 추출물 (물, hexane)을 24, 48, 72, 96 시간 동안 처리한 후 CCK-8 solution 을 각 well 에 첨가 시켜 37°C에서 4 시간 배양하였다. 반응이 끝난 plate 는 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

② 실험 결과

MTT assay 를 통한 in vitro 실험결과 hexane 추출물을 처리한 A549 (폐암), HCT-15 (결장암), HepG2 (간암) 3종류의 암 세포주에서 시간이 경과함에 따라 세포 생존율이 유의하게 감소되는 결과, 폐암, 결장암, 간암에 대해 삼 중실의 hexane 추출물이 항암효과를 나타냈다 (Fig. 72).

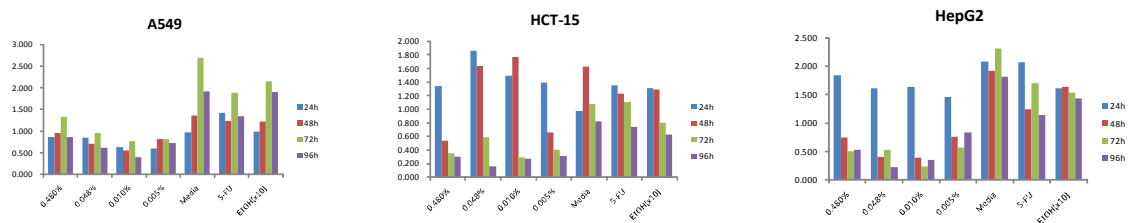


Figure 72. A549 (폐암), HCT-15 (결장암), HepG2 (간암) 세포주에서 삼 중실 추출물(hexane) 처리에 의한 세포 생존율 측정

(다) 생쥐모형을 이용한 in vivo 실험에서 삼 중실 추출물 (hexane)의 항암효과 평가

① 실험 방법

in vitro 실험에서 유의적인 항암효과를 나타낸 결장암 (HCT-15) 세포주를 6주령의 nude mice 에 5×10^6 cells 이식하여 삼 중실의 hexane 추출물을 15 ul/마리, 5회/주, 총 6주간 위내 투여하여 종양의 크기를 측정하였다. 실험에 사용한 마우스는 hexane 추출물 대조군 (5마리), hexane 추출물 실험군 (7마리) 총 12 마리를 사용하였다.

② 실험 결과

대조군에 비해 hexane 추출물을 위내 투여한 실험군에서 종양 크기의 증가율이 감소되었으나 유의성이 확인되지 않아 결장암에 대한 hexane 추출물의 항암효과를 관찰할 수 없었다 (Fig. 73).

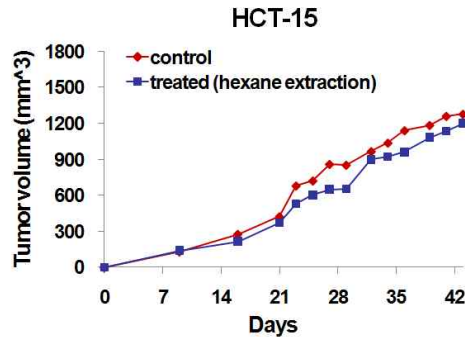


Figure 73. 삼 종실의 hexane 추출물 투여에 의한 HCT-15 (결장암) 종양 크기의 변화 측정

(5) 생쥐 모델을 이용한 삼 종실 추출물 (물, hexane)의 아토피 치료효과 및 항비만 효과 규명

(가) 아토피 유발 마우스 모델에서 삼 종실 추출물 (hexane)의 아토피 치료효과 평가

① 체중대비 조직의 무게

㉠ 실험 방법

6 주령의 BALB/c 마우스를 체모한 후 1%, 0.1% DNCB 를 이용하여 아토피를 유발하였으며, 실험군은 삼 종실의 hexane 추출물을 25 ul/마리, 100 ul/마리, 대조군은 hexane 추출물 대신에 olive oil 을 100 ul/마리, 4회/주, 총 2주간 피부에 도포하였다. 삼 종실의 hexane 추출물과 olive oil 을 2주간 도포한 후 부검하여 체중대비 림프절, 비장, 간의 무게를 측정하였다. 실험에 사용한 마우스는 대조군 (8마리), hexane 추출물 25 ul를 피부에 도포하는 실험군 (8마리), hexane 추출물 100 ul를 피부에 도포하는 실험군 (8마리) 총 24 마리를 사용하였다.

㉡ 실험 결과

체중대비 림프절, 비장, 간 무게의 유의한 차이는 나타나지 않았다 (Fig. 74).

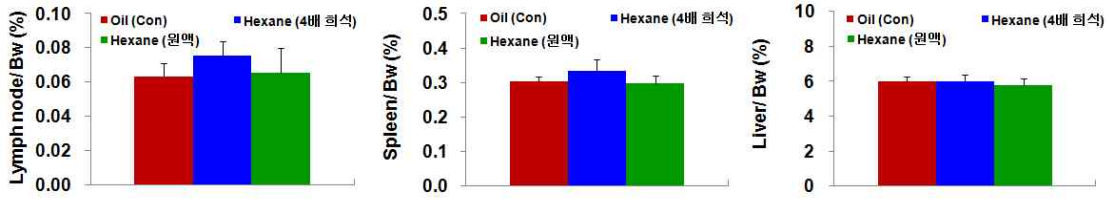


Figure 74. 삼 종실 추출물 (hexane)에 의한 아토피 마우스에서의 체중대비 조직무게 변화 측정

② 피부에서의 육안병변 관찰 및 혈청 내 IgE 측정

㉠ 실험 방법

삼종실의 hexane 추출물을 피부에 도포한 실험군과 olive oil 을 피부에 도포한 대조군 마우스에서 홍반, 출혈, 부종, 탈피, 깃무름, 건조를 관찰하였으며, 혈청 내 존재하는 IgE 는 Th2 cytokine 에 의해 분비되므로 세포 면역능의 편향성을 평가하여 아토피성 피부염 발현유무를 판단 하기 위하여 측정하였다. 혈액은 안와정맥얼기에서 채혈하였으며, 원심분리하여 -70℃에 보관하여 분석에 사용하였다. IgE 의 수준 측정은 sandwich ELISA 방법에 의하여 실시하였다.

㉡ 실험 결과

삼 종실의 hexane 추출물을 피부에 도포한 실험군과 olive oil 을 피부에 도포한 대조군 마우스에서 홍반, 출혈, 부종, 탈피, 깃무름, 건조를 관찰한 결과 아토피 치료 후 실험군과 대조군 에서 유의한 차이는 관찰되지 않았으며, 아토피성 피부염의 대표적인 면역학적 지표인 IgE 수준을 측정하였으나 유의한 결과는 관찰되지 않았다 (Fig. 75).

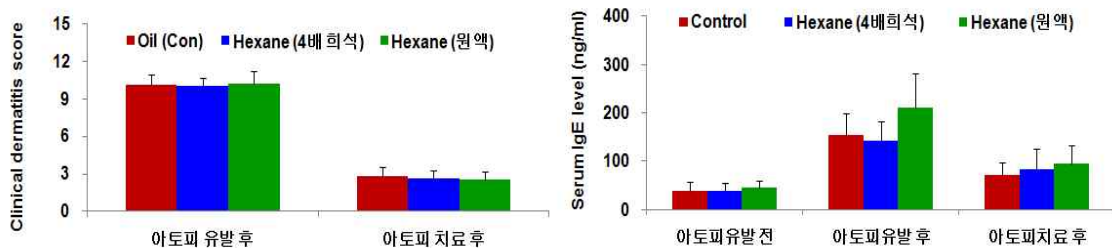


Figure 75. 육안적 소견에 따른 삼 종실 추출물(hexane)에 의한 아토피 치료효과 평가 및 혈청 내 IgE 수준 측정

③ 피부조직을 이용한 조직병리학적 검사

㉠ 실험 방법

피부조직에서의 acanthosis 와 염증세포 침윤정도를 측정하기 위하여 피부조직을 10% 중성 포르말린에 고정하고 탈수시킨 후 파라핀으로 포매하여 조직절편을 제작하였고

Hematoxyline-eosin(H&E) 염색을 실시하여 표피와 진피에서의 조직병리학적 변화를 관찰하였다.

㉔ 실험 결과

유의하지는 않았지만 삼 종실의 hexane 추출물을 피부에 도포한 실험군에서 acanthosis와 염증세포 침윤정도가 감소되는 것이 관찰되었다 (Fig. 76).

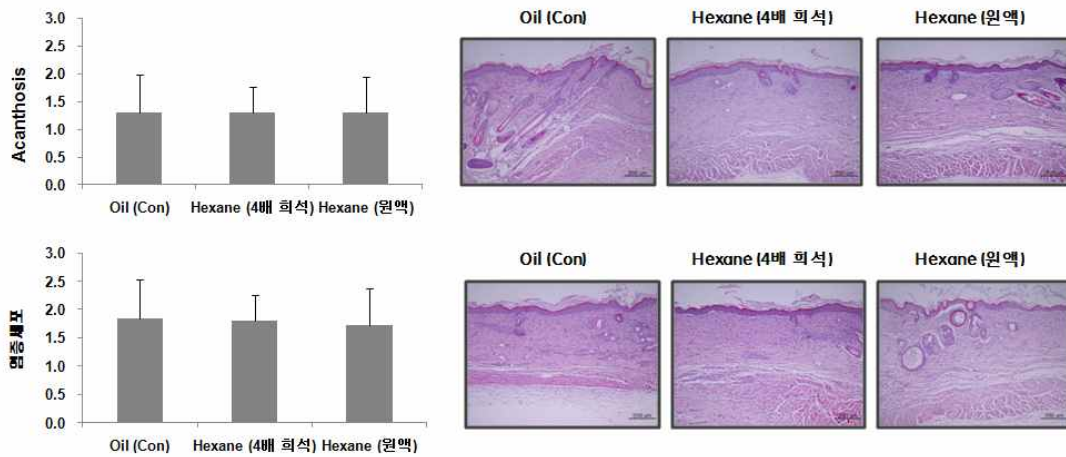


Figure 76. 조직병리학적 분석에 따른 삼 종실 추출물 (hexane)에 의한 아토피 치료 효과 분석

(나) 고지방사료를 급여한 마우스에서 삼 종실 추출물 (hexane)에 의한 항비만 효과 평가

① 비만 유도 마우스에서 삼 종실 추출물 (hexane)에 의한 체중변화

㉔ 실험 방법

5 주령의 C57BL/6J 마우스에 고지방사료 (60% kcal fat)를 급여하여 마우스 비만을 유도한 후 삼 종실의 hexane 추출물을 75 ul/마리, 6회/주, 총 7주간 위내 투여하여 체중 및 체중변화율을 측정하였다. 실험에 사용한 마우스는 대조군 (12마리), hexane 추출물 실험군 (12마리) 총 24마리를 사용하였다.

㉔ 실험 결과

대조군에 비해 삼 종실의 hexane 추출물을 위내 투여한 실험군에서 유의하지는 않았지만 체중과 체중증가율을 낮은 수치로 증가되는 것이 관찰되어 고지방사료를 급여한 비만 마우스에서 항비만 효과를 나타냈다 (Fig. 77).

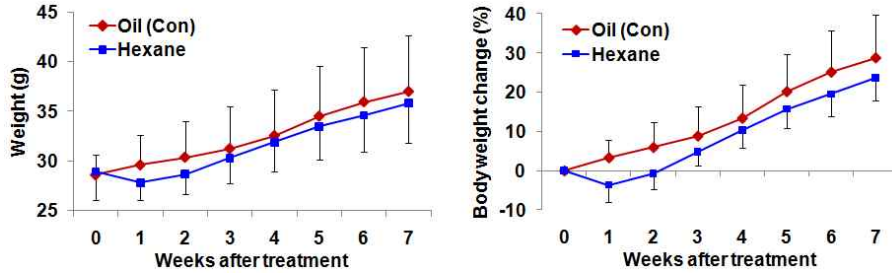


Figure 77. 비만 유도 마우스에서 삼 중실 추출물 (hexane)에 의한 체중 및 체중변화량 측정

② 비만 유도 마우스에서 삼 중실 추출물 (hexane)에 의한 혈액생화학적 변화 분석

㉞ 실험 방법

후대정맥에서 채취된 혈액은 원심분리하여 -70°C 에 보관하여 혈액생화학 분석에 사용하였다. 혈액생화학 분석은 Hitachi 7020 모델을 이용해 검사하였으며 간 기능 검사를 위해 GOT, GPT, ALP, TP 를 지질대사 검사를 위해 TG, CHO, HDL, LDL, GLU 를 분석하였다.

㉞ 실험 결과

혈액생화학 분석을 이용한 혈청 내 간 기능과 지질대사 검사 결과 삼 중실의 hexane 추출물을 위내 투여한 실험군과 대조군 사이 유의한 결과를 관찰 할 수 없었다 (Fig. 78).

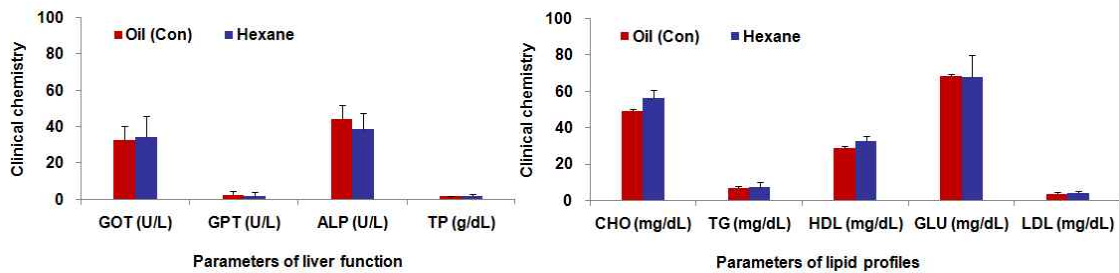


Figure 78. 혈액생화학적 분석을 이용한 삼 중실 추출물 (hexane)에 의한 간 기능 및 지질대사 검사

③ 조직병리학적 분석에 따른 삼 중실 추출물 (hexane)에 의한 비만 예방효과 평가

㉞ 실험 방법

부검하여 체중대비 복부 지방, 간 및 비장의 무게를 측정하였으며, 간 조직을 10% 중성 포르말린에 고정하고 탈수시킨 후 파라핀으로 포매하여 조직절편을 제작하였고 Hematoxyline-eosin(H&E)

염색을 실시하여 간 조직에서 lipid droplet 수를 측정하고 조직병리학적 변화를 관찰하였다.

㉔ 실험 결과

비만 유도 마우스에서 체중대비 복부 지방, 간 및 비장의 무게는 hexane 추출물을 위내 투여한 실험군과 대조군 사이 유의한 차이를 관찰 할 수 없었으나 간 조직에서 lipid droplet 수가 유의하지는 않았지만 실험군에서 대조군에 비해 적은 수가 관찰되었다 (Fig. 79).

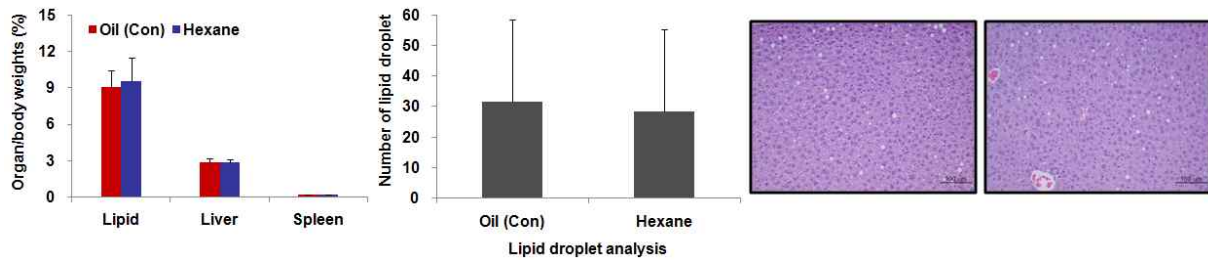


Figure 79. 비만 유도 마우스에서 삼 중실 추출물 (hexane)에 의한 비만 억제 효과

(6) 삼 중실 추출물의 세포독성 측정

(가) 항돌연변이 실험

① 실험 방법

Salmonella typhimurium (TA 98, TA 100) 및 *E. coli* (WP 2 uvr A)를 이용하여 위 2종의 박테리아를 고농도 피놀레닌산에 노출시키고 최소배지에 이식한 후 24시간 동안 배양하고 형성된 콜로니수를 대조군과 비교하였다.

② 실험 결과

시험물질의 최고농도는 항균작용과 용해도를 고려하여 설정하였다. 복귀 돌연변이 colony의 실측치와 평균치 및 표준편차를 표시하여 복귀 돌연변이 콜로니의 수가 음성대 조에 비하여 명확히 2배 이상이면서, 용량의존성을 가지며, 그 작용에 재현성이 인정될 경우 양성으로 판정할 수 있다.

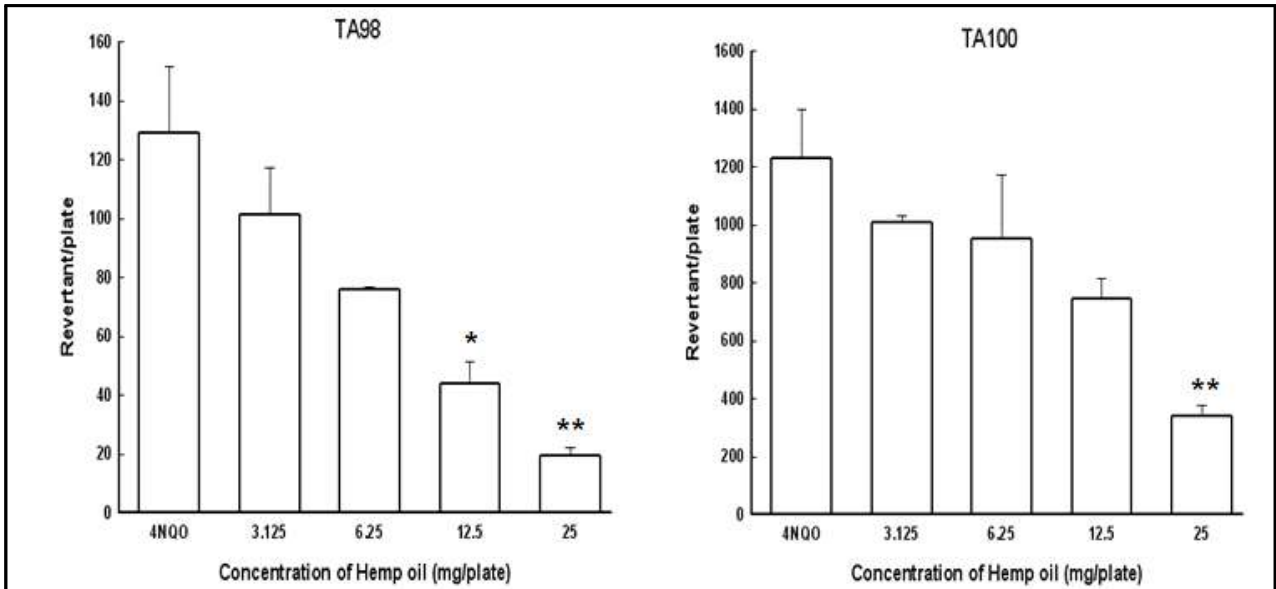


Figure 80. 삼종실 추출물을 항돌연변이 효과 측정

(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

(나) MTT 기법을 이용한 세포독성 측정

① 실험 방법

HepG2 cell 을 이용하여 삼 종실 추출물의 세포 독성을 측정하였다. HepG2 cell 에 삼 종실 추출물 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400 ug/mL를 각각 48시간 동안 처리하고 MTT assay 를 수행하였다.

② 실험 결과

MTT 실험 수행결과 모든 농도구간에서 세포들의 생존율이 대조군과 비슷하게 나왔으며 이로 미뤄보아 삼종실 추출물은 세포독성을 갖지 않은 것으로 확인되었으며 이를 토대로 추가 실험의 처리농도를 확립하였다 (Fig. 81).

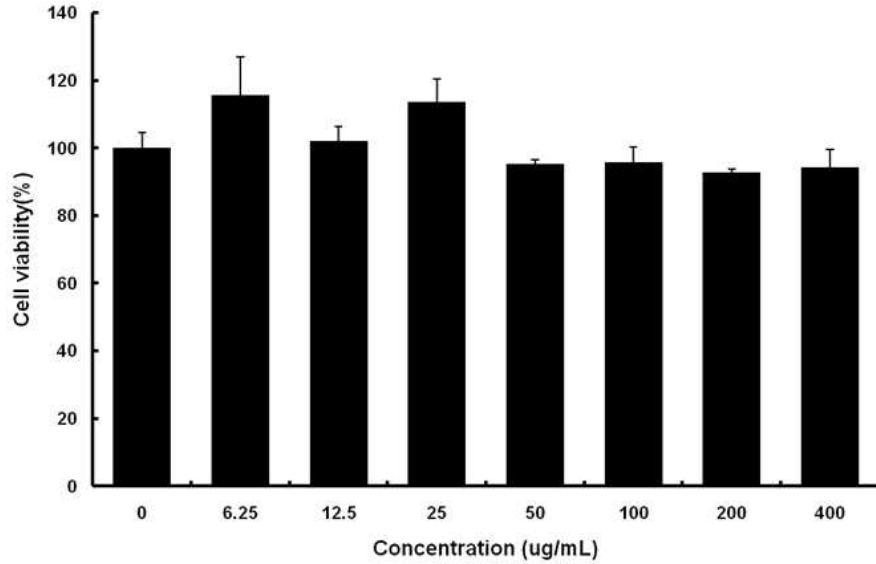


Figure 81. 삼종실 추출물을 이용한 MTT 실험 결과

(7) 삼 종실 추출물의 혈당조절 기능성 연구

(가) 포도당 흡수도 측정

① 실험 방법

3T3L1 adipocyte 를 이용하여 삼 종실 추출물이 포도당 흡수에 미치는 영향을 측정하였다. 분화된 3T3L1 adipocyte 에 $[^3\text{H}]2\text{-deoxyglucose}$ 와 삼 종실 추출물 25, 50, 100 ug/mL를 각각 처리하고 10분간 incubation 한 후 $[^3\text{H}]2\text{-deoxyglucose}$ 의 흡수도를 측정하였다. Insulin 처리군을 positive control 로 하여 insulin 에 의한 glucose 흡수도를 측정하였고 반응 종결 후 단백질을 정량하여 결과를 보정하였다.

② 실험 결과

삼 종실 추출물이 포도당 흡수에 미치는 영향은 Fig. 82 에 나타낸 바와 같다. 25, 50 및 100 ug/mL 농도의 삼종실 추출물 처리군은 insulin에 비해 각각 86, 73 및 71%의 포도당 흡수도를 나타내었으며, insulin 처리군과 비교하였을 때 유의적인 흡수효과를 보였다.

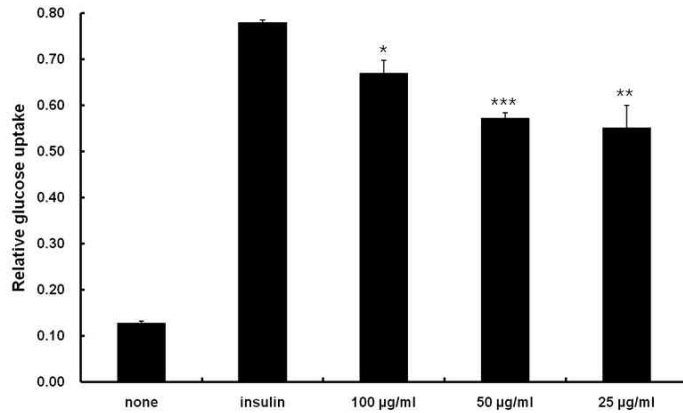


Figure 82. 삼종실 추출물이 포도당 흡수에 미치는 영향

(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

(8) 삼 종실 추출물의 지질대사 기능성 연구

(가) 지방산 흡수도 측정

① 실험 방법

HepG2 cell을 이용하여 삼 종실 추출물이 지방산 흡수에 미치는 영향을 측정하였다. HepG2 cell 에 삼종실 추출물 100 ug/mL 를 각각 처리하고 2시간 동안 incubation 한 후 유심분리기를 이용하여 지방산 흡수도를 측정하였다. 아무 처리를 하지 않은 그룹을 negative control 로 하여 상대적 지방산 흡수도를 비교하였다.

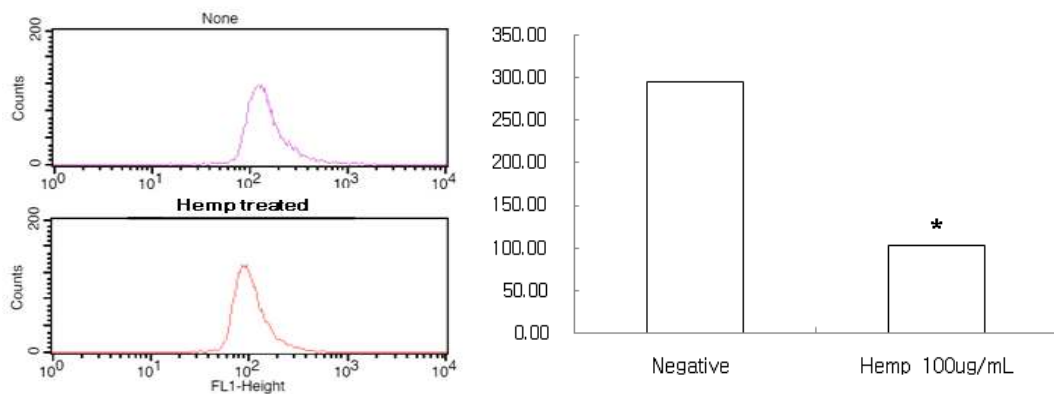


Figure 83. 삼종실 추출물이 지방산 흡수에 미치는 영향

(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

② 실험 결과

삼 종실 추출물이 지방산 흡수에 미치는 영향은 Fig. 83 에 나타난 바와 같다. 100 ug/mL 농도의 삼종실 추출물 처리군은 대조군에 비해 지방산 흡수가 약 60% 정도 감소하였음을 유심분리기를 통해 확인하였다.

(나) 지질대사 관련 주요 바이오마커 발현 변화 연구

① 실험 방법

HepG2 세포에 삼종실 추출물을 농도별로 24시간 처리한 후 RNA 를 추출하였다. 추출한 RNA 를 이용하여 cDNA 합성 후 HMG-CoA reductase, LDL receptor 및 PPAR γ 의 유전자 발현을 분석하였다.

② 실험 결과

HMG-CoA reductase 의 경우 삼추출물의 농도에 따라 비교적 유의적으로 감소하는 경향을 보였으며 LDL receptor 와 PPAR γ 의 경우 농도별로 큰 차이를 나타내지는 않았다 (Fig. 84).

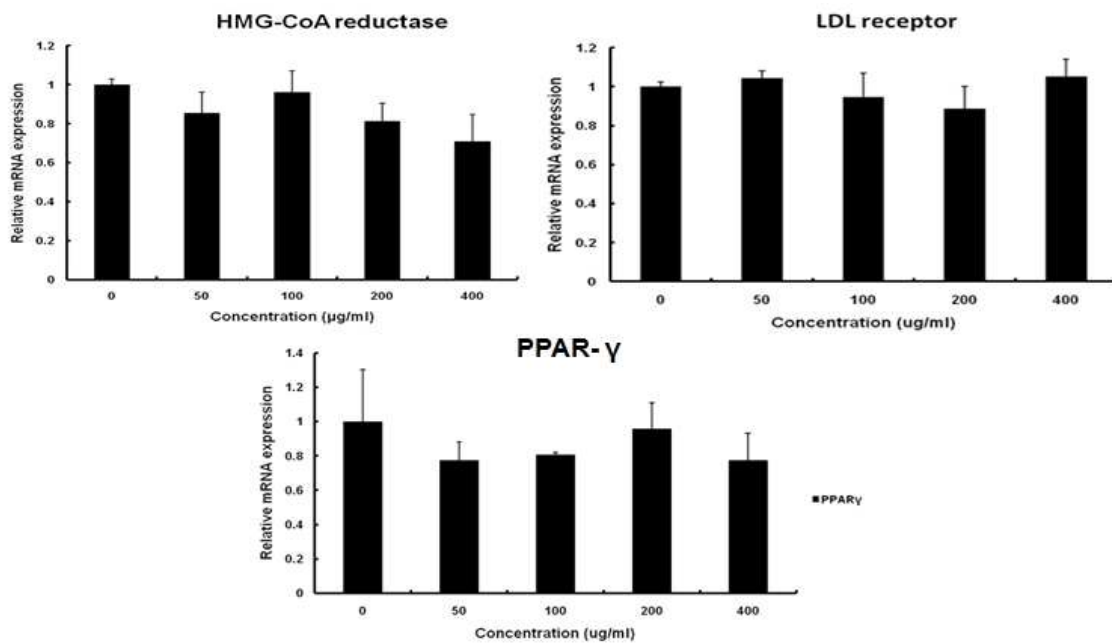


Figure 84. 삼종실 추출물이 지질대사 관련 주요 바이오마커들의 유전자 발현에 미치는 영향

III. 삼 종실 식품 개발

■ 삼 종실 중간소재 및 제품 개발

(1) 압출성형 삼종실의 이화학적 특성

삼종실은 보통 단백질 함량이 약 25% 이며, 지방 함량은 30% 이상으로 단백질과 지방의 성분비율이 높으며 식이섬유 또한 풍부하여 (Callaway, 2004) 에너지바 또는 다이어트바 가공에 적합하다. 그러나 삼종실은 표피가 단단하여 탈피 또는 전처리를 하지 않으면 섭취하기 힘들며 탈피 공정을 거치면 대부분의 식이섬유가 손실된다. 또한 국내에는 개발된 삼종실 탈피기가 없어 다양한 종류의 식품으로 이용하기 힘든 실정이다.

압출성형공정은 식품, 사료, 생물 산업 및 고분자 플라스틱 등 다양한 산업분야에 적용되고 있으며 압출성형은 압출성형기 내부물질에 온도, 압력, 물리적인 힘을 가하여 단시간에 혼합, 분쇄, 가열, 성형, 건조가 일어나는 단일공정으로서 다른 가공공정과 비교하여 효율적이며 경제적인 공정이다 (Haper, 1989). 또한 압출성형 공법은 곡류를 팽화시키는 공정중의 하나로 곡류를 팽화시키면 조직감과 맛이 향상되어 팽화식품에 널리 이용되고 있으며 연속공정이 가능하며 혼합된 분말원료를 사입할 수 있는 이점을 가지고 있다 (Kim, 2001). 압출성형공정을 이용하여 섬유소를 다량함유한 곡류를 압출성형하면 불용성 상태로 존재하는 식물세포벽의 구성성분의 결합구조를 약화시켜 수용화 시키며 사과주스의 부산물인 사과박을 압출성형하면 비기계에너지가 증가할수록 펙틴의 추출수율이 향상되었다는 연구보고가 있다 (Hwang et al., 1994; Cho et al., 1999).

이러한 압출성형의 이점과 삼종실의 영양적인 면을 활용하여 탈피공정을 거치지 않은 탈지삼종실을 분쇄하여 분말원료를 사용하여 단백질과 식이섬유가 풍부하며 조직감과 향산화활성이 우수한 에너지바를 제조하기 위한 기초연구로서 탈지 삼종실 압출성형물의 이화학적 특성을 비교분석하였다.

(가) 재료 및 방법

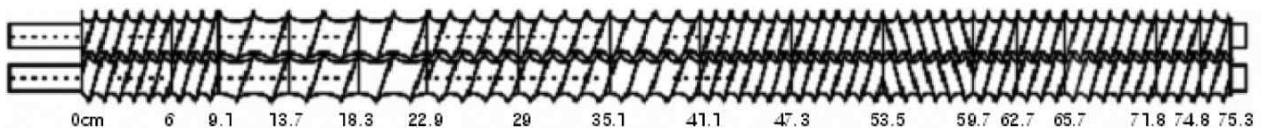
① 재료

멥쌀은 충남 부여에서 2008년에 수확한 쌀을 구입 후 입자크기를 70 mesh로 분쇄하여 사용하였다. 청삼은 충남 당진에서 재배하여 압착하여 지방을 제거한 청삼을 가정용 분쇄기 (FM-681, Hanil, Seoul, Korea)로 분쇄한 다음, 30 mesh 표준체 (Testing sieve, Chunggye Sanggong Co., Gunpo, Korea)를 통과한 분말을 사용하였다. 멥쌀과 탈지청삼종실의 수분함량은 각각 13.99, 8.92% 로 측정되었다.

② 압출성형

탈지 삼종실 분말을 전체중량의 30%로 멥쌀과 혼합하여 수분을 20, 25% 로 조절한 뒤 냉장고(4℃)에서 24시간 동안 수분을 고르게 분포시킨 뒤 압출성형원료로 사용하였다. 실험

에 사용된 압출성형기는 자체 제작한 실험용 동방향 쌍축 압출성형기 (THK31T, Incheon Machinery Co., Korea)를 사용하였으며 스크루 배열은 Fig. 1과 같다. 직경은 32.0 mm, 직경과 길이의 비 (L/D ratio)는 24:1이었고, 사출구는 원형으로 직경이 3.0 mm인 것을 사용하였으며 배럴온도는 전열기와 냉각수를 사용하여 조절하였다. 압출성형 공정변수는 배럴온도 (110, 130℃)와 원료의 수분함량 (20, 25%)이었다. 스크루 회전속도는 200 rpm, 원료투입량은 120 g/min 으로 고정하였으며, 제조된 압출성형물은 열풍건조기 (DS-FCPO250, DongSeo Sci. Co., Seoul, Korea)에서 50℃로 8시간 건조하고 가정용분쇄기 (FM-681, Hanil, Seoul, Korea)로 분쇄하여 30 mesh 표준체 (Testing sieve, Chunggye Sanggong Co., Gunpo, Korea)를 통과한 분말을 시료로 사용하였다.



1	1	3	3	3	2	2	2	1	1	4	1	1	1	1	1
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

1. 1/2 Pitch screw 3. Forward paddle L/D ratio : 24:1
 2. 2/3 Pitch screw 4. Reverse screw element ϕ : 3.2 cm

Figure 1. Screw configuration used in this experiment (Model THK 31T)

③ 팽화율

팽화율은 압출성형물의 직경을 캘리퍼스 (CD-15C, Mitutoyo Co., Tokyo, Japan)로 9회 측정하여 사출구의 직경과 압출성형물 직경비의 평균값으로 산출하였다.

④ 체적밀도

압출성형물의 체적밀도는 차조를 이용하는 종자치환법으로 6 회 반복하여 평균값을 산출하였다. 계량컵을 사용하여 무게를 측정해 압출성형물의 부피를 구한 후 밀도를 계산하였다. 압출성형물의 체적밀도는 (1)과 같다.

$$p_e = \frac{M}{M + M_0 - M_1} p_m \quad (1)$$

ρ_e : Bulk density of extrudate

ρ_m : Bulk density of millet

M: Mass of extrudate

M_0 : Mass of millet in cup

M_1 : Mass of extrudate and millet in cup

⑤ 겉보기탄성계수와 파괴력

압출성형물의 겔보기탄성계수와 파괴력은 Sun Rheometer (Compac-100II, Sun Sci. Co., Tokyo, Japan)를 사용하여 10회 측정하여 평균값을 산출하였다. 측정조건은 probe angle type (65 °), 최대응력 2 kg, 지지대 이동속도 120 mm/min, 지지대간의 거리 3 cm이었다. 측정치를 Launary & Lisch (1993)과 Ryu & Ng (2001)이 제시한 아래의 식을 이용하여 겔보기탄성계수 (E_{app})와 파괴력 (F_{bs})을 각각 식(2)와 식(3)으로 계산하였다.

$$E_{app} = (dF/dl) (64d^3/48\pi D^4) \quad (2)$$

E_{app} : Apparent elastic modulus

dF/dl : Slope of the linear section of the force-distance curve

D: Diameter of extrudate

d: Distance between two supports

$$F_{bs} = F_s/S \quad (3)$$

F_s : Maximum stress of extrudate

S: Cross-sectional area

⑥ 수분흡착지수와 수분용해지수

수용성 성질을 분석하기 위하여 AACC 방법 (1983)을 응용하여 건량기준의 시료 1 g에 증류수 25 mL을 가하여 30°C의 항온수조 (BF-45SB, Biofree Co., Seoul, Korea)에서 30분간 교반한 후 원심분리기 (H-1000-3, Hanil Science Industrial Co., Incheon, Korea)에서 3,000 rpm ($1,500 \times g$)으로 20 분간 원심 분리하였다. 상등액을 알루미늄접시에 부은 후 침전물의 무게를 측정하고 알루미늄접시를 105°C의 열풍건조기(HB-502MP, Han Beak Co., Kyunggi-do, Korea)에서 2시간 동안 건조한 뒤 상등액의 고형분 함량을 측정하여 수분흡착지수 (water absorption index)와 수분용해지수 (water solubility index)를 식(4)와 식(5)로 각각 계산하였다.

$$WAI (g/g) = (\text{Hydrated sample wt.} - \text{Dry sample wt.}) / \text{Dry sample wt.} \quad (4)$$

$$WSI (\%) = \frac{\text{Dry solid wt. recovered by evaporating the supernatant} \times 100}{\text{Dry sample wt.}} \quad (5)$$

⑦ 페이스트 점도

페이스트 점도를 측정하기 위하여 Rapid Visco Analyser (RVA-3D, Newport Scientific Inc., Narrabeen, Australia)를 사용하였다. 14% 수분함량을 기준으로 계산한 압출성형물 시료 3 g을 알루미늄캔에 넣은 후 25 mL의 증류수를 가하고 유리막대기를 이용하여 30초

동안 1차 교반 후 페이스트 점도를 측정하였다. 신속점도기의 온도조건은 Ryu et al. (1993)의 방법을 응용하였다. 초기온도 25℃에서 2분 동안 25℃로 유지한 다음 5분 동안 95℃로 가열 후 3분 동안 95℃로 유지하였으며 5분에 걸쳐 25℃로 냉각한 뒤 3분 동안 온도를 유지시켰다. 총 소요 시간은 18분이며 시료의 분산을 증가시키기 위하여 10 초간 960 rpm으로 페달을 회전시킨 후 160 rpm에서 점도를 측정하였다. Fig. 2의 페이스트 점도곡선으로부터 최고점도 (peak viscosity, PV), 최저점도 (trough viscosity, TV), 최종 점도 (final viscosity, FV), 구조 파괴점도 (breakdown viscosity, BV)와 회복점도 (setback viscosity, SV) 등의 페이스트 점도 지표를 각각 계산하였다.

⑧ DPPH에 의한 전자공여능

압출성형물의 전자공여능 또는 라디칼 제거능은 DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical)를 사용하여 Brand-Williams et al. (1995)의 방법을 응용하여 측정하였다. 압출성형물 시료 1 g을 60% ethanol로 60℃의 항온수조 (BF-45SB, Biofree Co., Seoul, Korea)에서 110 rpm로 1 시간 동안 추출하여 1% 추출액 0.25 mL에 0.3 mM DPPH를 2.5 mL 첨가하여 10분간 상온에서 반응시킨 후 UV/Vis-spectrophotometer (Libra S35, Biochrom Ltd., Cambridge, UK)를 사용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH에 의한 전자공여능은 식(6)을 이용하여 측정하였다.

$$\text{Scavenging activity (\%)} = [(\text{Abs blank} - \text{Abs sample}) / \text{Abs blank}] \times 100 \quad (6)$$

Abs blank: Absorbance of the control

Abs sample: Absorbance of the sample

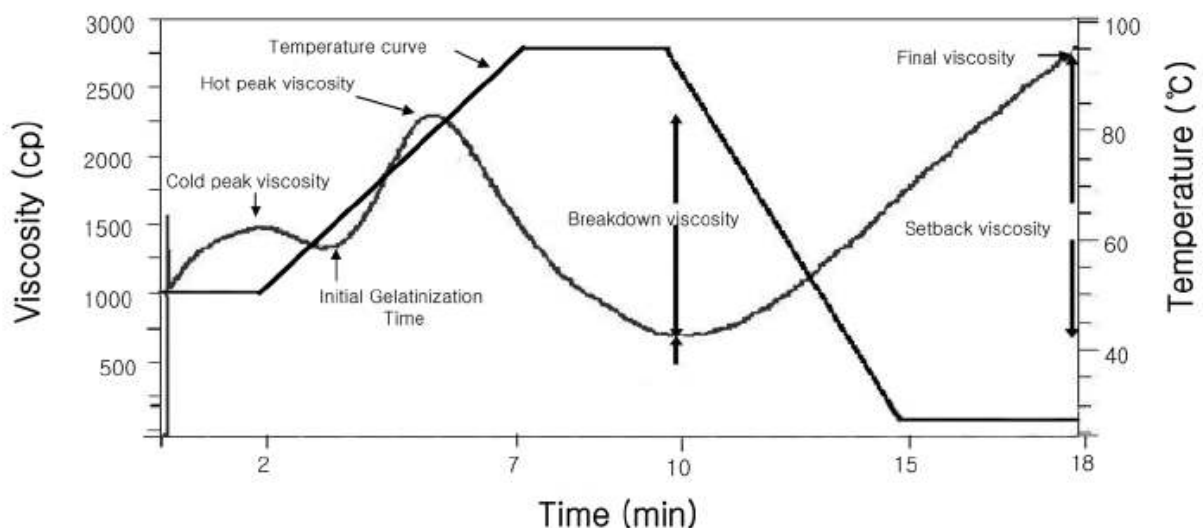


Figure 2. RVA temperature profile and pasting parameters

(나) 결과 및 고찰

① 탈지 삼종실 압출성형물의 물리적 특성

물리적 특성 (팽화율, 밀도, 겔보기탄성계수와 파괴력)은 압출성형물의 조직감에 영향을 미치는 중요한 인자로 제품의 질 및 소비자의 기호에 영향을 미친다. 수분함량과 배럴온도에 따른 압출성형물의 물리적 특성은 Table 1과 같다. 팽화율은 수분함량이 20%, 배럴온도 130℃에서 삼종실을 첨가하지 않았을 때 3.15 으로 가장 높았으며 삼종실을 30% 첨가하고 압출성형 조건을 수분함량 25%, 배럴온도가 110℃일 때 1.70으로 가장 낮게 나타났다. 수분함량이 낮고 배럴온도가 높을수록 팽화율이 높았으며 삼종실의 첨가에 따라 팽화율이 낮아지는 것을 알 수 있었다. 이는 삼종실의 첨가에 따라 섬유질과 지방의 증가와 함께 전분이 감소하여 팽화율이 감소한 것으로 판단되었다.

Table 1. Physical properties of extruded defatted hemp at different extrusion condition

Extrusion material ratio (hemp : rice)	Extrusion process variables		Expansion index	Density (kg/m ³)	Breaking strength (N/m ²)	Elastic modulus (N/m ²)
	Moisture content (%)	Barrel temperature (°C)				
0 : 100	20	130	3.15±0.03	216.22±23.07	8.62E+04	1.19E+07
	25	130	2.80±0.04	242.96±17.73	1.80E+05	3.24E+07
30 : 70	20	110	2.06±0.06	311.71±10.63	1.19E+05	7.44E+07
	20	130	2.15±0.05	274.95±6.28	9.37E+04	2.96E+07
	25	110	1.70±0.03	391.42±16.55	2.60E+05	1.93E+08
	25	130	2.09±0.05	291.59±9.93	1.12E+05	3.76E+07

Padmanabhan & Bhattacharya (1989)는 수분함량과 온도는 압출성형공정에서 중요한 요소로서 100℃ 이상에서는 물의 상변화에 의해 호화된 전분을 포함한 반죽은 점탄성에 의해 급격하게 팽화한다고 하였으며 Ryu (1995)는 고수분 함량의 반죽에서는 탄성의 감소에 의해 기공이 파괴되어 비체적이 감소되는 경향이 있다고 하였다. 밀도는 수분함량이 높을수록 배럴온도가 낮을수록 낮아졌다. 즉, 팽화율이 높아질수록 밀도는 낮아지는 역상관 관계를 나타내었다. 이는 쌀가루의 수분함량과 입자크기를 달리하여 팽화율과 밀도를 측정하였을 때 팽화율과 밀도는 음의 상관관계를 나타냈다는 Ryu & Lee (1988)의 결과와 일치하였다. 파괴력과 겔보기 탄성계수는 팽화율, 밀도, 기공구조에 영향을 받으며 압출성형물의 품질을 결정하는 중요한 인자이다. 수분함량 20%, 배럴온도 130℃에서 삼종실이 첨가되지 않았을 때와 삼종실이 첨가 되었을 때 팽화율은 3.15, 2.15로 차이를 나타내었다. 그러나 파괴력은 수분함량 20%, 배럴온도 130℃에서 삼종실이 첨가되지 않았을 때와 삼종실이 첨가 되었을 때 각각 8.62E+04, 9.37E+04 N/m², 겔보기탄성계수에서 1.19E+07, 2.96E+07 N/m²로 다른 압출성형 조건에 비해 상대적으로 낮은 값을 나타내었다. 이는 압출성형 비타민 C 매트릭스의 압출성형 공정변수에서 배럴온도의 증가와 수분함량의 감소에 따라 파괴력이 감소하는 Han et al. (2007)의 연구결과와 같은 경향을 나타내었다. Chinnawamy & Hanna (1999)는 팽화율이 증가하면 파괴력이 감소했으며 Bhattacharya

et al. (1986)은 수분함량이 증가하면 밀도와 파괴력은 증가했다고 보고 하였다.

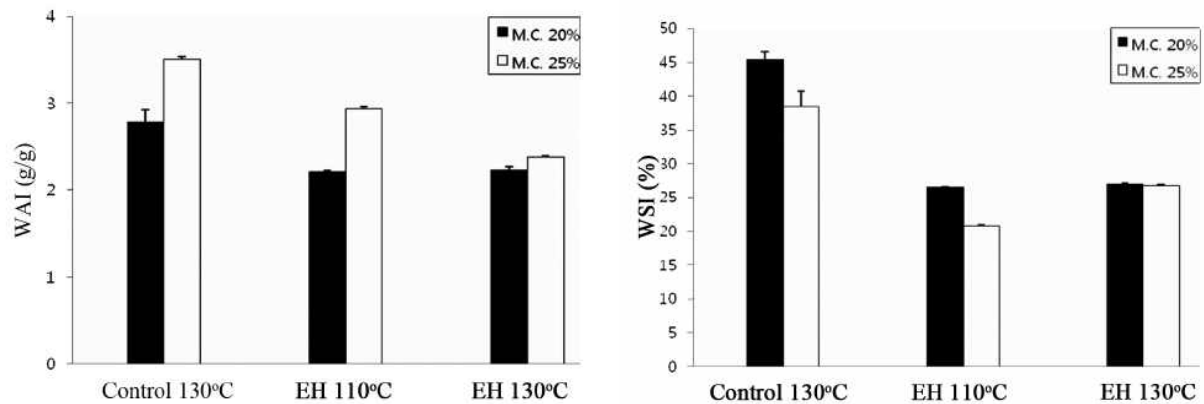


Figure 3. Water absorption index (WAI) and water solubility index (WSI) of extrudate at different extrusion condition

Control 130°C: extruded rice (100%) at a barrel temperature of 130°C; EH 110°C: extruded defatted hemp (30%) and rice (70%) mixture at a barrel temperature of 110°C; EH 130°C: extruded defatted hemp (30%) and rice (70%) mixture at a barrel temperature of 130°C

② 수분흡착지수와 수분용해지수

배럴온도와 수분함량이 수분흡착지수와 수분용해지수에 미치는 영향은 Fig. 3과 같다. 삼중질이 첨가되지 않은 압출성형물의 수분흡착지수와 수분용해지수는 삼중질이 첨가된 압출성형물에 비해 높았으며 배럴온도가 130°C일 때 가장 높은 경향을 보였다. 원료의 수분함량이 20%에서 25%로 증가함에 따라 수분흡착지수는 증가했지만 수분용해지수는 낮아지는 경향을 나타내었다. 이는 비타민 C 매트릭스 압출성형물의 압출성형 공정변수에서 배럴온도를 80°C에서 110°C로 증가함에 따라 압출성형 비타민 C 매트릭스 내부의 수분용해지수와 수분흡착지수가 증가하는 경향을 보였으며 수분함량이 25%에서 30%로 증가함에 따라 수분용해지수는 감소하고 수분흡착지수는 증가하는 경향을 보였다는 Han et al. (2007)의 결과와 일치하였다. Chinnaswamy & Hanna (1999)는 압출성형 공정 후 옥수수전분은 아밀로펙틴이 아밀로오스보다 분획화가 증가하였으며 Jackson et al. (1990)은 옥수수전분의 압출성형에 의해 용출되는 아밀로오스 함량이 증가하여 수분용해지수가 증가한다고 하였다.

본 실험에서 삼중질이 첨가된 압출성형물은 삼중질이 첨가되지 않은 압출성형물에 비해 수분흡착지수와 수분용해지수가 낮은 경향을 나타내었다. 이는 삼중질의 함량 증가에 따라 전분의 함량이 감소하는 동시에 섬유질, 지방의 함량이 증가하여 내부반죽의 비기계적 에너지 감소와 점도감소로 인해 압출성형기 내부에서의 체류시간이 짧아져 증발열, 압력의 영향 감소에 의한 것으로 사료된다.

③ 페이스트 점도

신속점도측정기로 측정한 삼종실 압출성형물의 페이스트 점도는 Table 2와 같다. 최고점도, 구조파괴점도, 최종점도는 삼종실 첨가되지 않은 압출성형물이 높았으며, 수분함량이 25%일 때 최고점도, 구조파괴점도, 최종점도, 회복점도가 높은 경향을 나타내었다.

Table 2. Paste viscosity of extruded defatted hemp at different extrusion condition

Extrusion material ratio (hemp : rice)	Extrusion process variables				Paste viscosity (cp)				
	Moisture content (%)	Barrel temperature (°C)	PV ¹⁾	TV ²⁾	BV ³⁾	FV ⁴⁾	SV ⁵⁾	PT ⁶⁾	
0 : 100	20	130	120	24	96	47	23	2.42±0.10	
	25	130	154	23	131	75	52	2.82±0.33	
30 : 70	20	110	24	10	14	14	4	7.80±0.47	
	20	130	16	10	6	13	3	4.23±0.24	
	25	110	33	26	7	33	7	6.53±0.19	
	25	130	36	24	12	24	0	7.20±0.19	

¹⁾Peak viscosity; ²⁾Trough viscosity; ³⁾Breakdown viscosity; ⁴⁾Final viscosity; ⁵⁾Setback viscosity; ⁶⁾Peak time (min)

수분함량에 증가에 따라 현미의 최고점도와 구조파괴점도가 증가하였다는 Jin et al. (2005)의 연구결과와 일치하였으며 Ryu (2002)은 옥수수전분 압출성형물에서 수분함량의 증가에 따른 압출성형물의 호화가 최고점도의 증가와 함께 구조파괴 점도를 증가시킨다고 하였다.

삼종실을 첨가하지 않은 압출성형물의 경우 저온최고점도가 나타났는데 Jin et al. (2007)은 일반적으로 곡류 압출성형물의 페이스트 점도 곡선에서는 50°C 이하에서 최고점도가 나타나는데 이는 압출성형공정으로 인하여 곡류전분이 호화가 일어나 낮은 온도 (25°C)에서도 물을 흡수하여 점도가 상승하여 나타나며 저온최고점도는 2-4 min 사이에 나타난다고 하였다.

삼종실이 첨가 된 압출성형물의 경우 최고점도, 최저점도, 구조파괴점도, 최종점도, 회복점도 값이 낮게 나타났는데 이는 삼종실이 첨가됨에 따라 섬유질, 단백질, 지방의 함량이 증가하는 반면에 쌀가루의 함량이 감소하여 이에 따른 전분의 감소에 의한 결과라고 판단되며 호화가 충분히 일어난 것으로 사료된다.

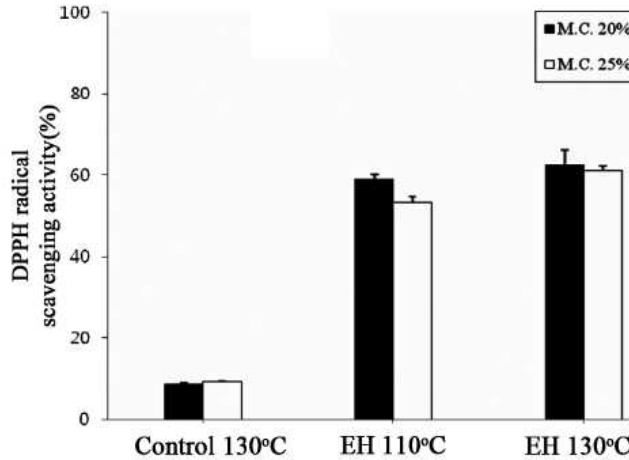


Figure 4. DPPH radical scavenging activity of extrudate at different extrusion condition. Refer to Fig. 3.

④ DPPH에 의한 전자공여능

안정한 라디칼인 DPPH 는 산화방지물질로부터 전자 또는 수소를 제공 받으면 비라디칼로 전환되면서 흡광도가 변화하는 원리를 이용하여 천연물의 수용성 혹은 유기용매 추출물의 항산화 활성에 널리 사용되는 항산화 측정법이다 (Lee et al., 2007). 삼종실 압출성형물의 배럴온도와 수분함량에 따른 DPPH 에 의한 전자공여능 측정 결과는 Fig. 4과 같다.

수분함량이 감소하고 배럴온도가 높을수록 DPPH 에 의한 전자공여능이 증가하는 경향을 나타내었다. 이는 배럴온도 110°C보다 고온인 140°C에서 압출성형한 백삼이 DPPH 에 의한 전자공여능 측정 결과가 높았다는 Son & Ryu (2009)의 결과와 유사하였다. 또한 삼종실이 첨가 되지 않았을 때 수분함량 20%, 25%에서 8.69%, 9.19%로 삼종실이 첨가 되었을 때와 비교하여 낮은 경향을 나타내었고 삼종실이 첨가 되었을 때 수분함량이 20%, 배럴온도가 130°C에서 62.57%로 가장 높게 나타나 항산화활성이 가장 우수한 것으로 판단되었다.

(다) 요약

압출성형의 이점을 활용하여 영양적으로 단백질과 식이섬유가 풍부한 삼종실 함유 식품을 제조하기 위해서 삼종실 압출성형물의 팽화율, 밀도, 파괴력, 겔보기탄성계수, 수분흡착지수와 수분용해지수, 페이스트 점도를 측정하였다. 또한 압출성형물의 항산화활성을 측정하기 위해 DPPH에 의한 전자공여능을 측정하여 비교 분석하였다. 압출성형 공정변수는 수분함량 (20, 25%), 배럴온도 (110, 130°C)이었으며 수분함량 20%, 배럴온도 130°C에서 팽화율이 가장 높았으며 밀도, 파괴력, 탄성계수가 낮았다. 수분함량이 증가할수록 수분흡착지수가 증가하였으며 수분용해지수는 배럴온도 130°C에서 높은 경향을 나타내었다. 압출성형 탈지 삼종실은 페이스트 점도 값이 낮게 나타났으며 DPPH 에 의한 전자공여능 값은 수분함량 20%, 배럴온도 130°C에서 항산화활성이 높게 나타났다.

(2) 압출성형 공정을 이용한 삼종자 후레이크 제조

곡류를 미리 조리하여 바로 먹을 수 있도록 만든 편의식품인 후레이크는 곡류를 가열하여 전분을 호화시켜 성형을 손쉽게 함과 동시에 바람직한 향미 생성과 스낵과 같은 조직감을 부여한 가공식품으로 압착 또는 압출성형 등의 방법에 의해 제조되고 있다 (Midden, 1989; Rokey, 1995). 압착방법은 곡립 그 자체를 압착하여 후레이크를 제조하는 전통적인 방법으로 비교적 공정이 간단하여 비용이 적게 들고 곡립의 형태를 그대로 살릴 수 있는 장점이 있는 반면 낱알 그 자체만 이용하기 때문에 쌀, 보리, 밀, 귀리, 등과 같이 낱알이 작은 곡류의 경우 외형상의 문제로 제품 경쟁력이 떨어지는 단점이 있다.

반면에 압출성형방법은 곡류를 분쇄, 압출성형하여 펠릿을 제조한 후 이를 압착하여 후레이크를 제조하기 때문에 원료의 낱알 크기에 상관없이 펠릿의 크기를 조정함으로써 경쟁력이 떨어지는 낱알 크기가 작은 원료를 이용하여 후레이크를 제조할 수 있을 뿐만 아니라 더욱 중요한 것은 원료간의 재조합이 가능하고 공정도 비교적 간단하여 후레이크 제조에 많이 이용되고 있다 (Midden, 1989).

따라서 본 연구는 경제적 잠재성이 큰 삼 종자의 식품소재로서의 활용을 모색하고자 압출성형공정으로 삼 종자 첨가 압출성형 펠릿과 후레이크를 제조한 다음 후레이크의 품질특성을 조사하였다.

(가) 재료 및 방법

① 재료

본 실험에 사용한 삼 종자 (whole hemp seed)는 충남 당진에서 구입하여 사용하였다. 찹쌀은 2008 년도에 수확한 동진찹쌀을 충남 부여에서 구입하였으며 밀가루는 대한제분(주)에서 생산한 고품질 중력분을 구입하여 사용하였다.

압출성형 삼 종자 펠릿을 제조하기 위하여 찹쌀을 4회 세척하고 실온에서 2시간 수침한 후 소쿠리에 담아 30분간 물 빼기를 하였다. 삼 종자를 깨끗이 세척하고 찹쌀, 밀가루의 배합비는 1:1, 삼 종자는 전체 중량의 0, 20, 25, 30%되게 찹쌀과 혼합한 후 롤밀 (Roller Mill, Shinpoong ENG., Ltd., Kimpo, Korea) 간격 0 mm에서 1회 분쇄하였다. 분쇄한 찹쌀과 삼 종자가루에 밀가루를 혼합한 후 수분함량이 35% 되게 조절하였고 냉장고 (3℃)에서 24시간 예비수분 조절하였다.

② 일반성분

삼 종자의 일반성분 함량을 AOAC (1990)방법에 준하여 분석하였다. 수분함량은 상압가열건조법, 조단백질 함량은 Kjeldahl법, 조지방 함량은 Soxhlet 추출법, 조회분 함량은 직접회화법으로 각각 측정하였다.

③ 압출성형 펠릿 제조

압출성형 삼 종자 펠릿의 제조는 실험용 쌍축 압출성형기 (THK 31T, Inchen Machinery, Incheon, Korea)를 사용하였으며 스크루배열은 Fig. 5와 같다. 스크루 직경은 3.2 cm이며 길이와 직경비 (L/D ratio)는 24:1 이었고 사출구는 원형으로 직경이 4.0 mm인 것을 사용하였다. 배럴의 온도조절은 전열기와 냉각수를 사용하여 조절하였다.

압출성형 공정변수는 배럴온도와 시료의 수분함량이며 배럴의 온도는 90, 100, 110℃이고 시료의 수분함량은 35%로 하였다. 스크루 회전속도는 200 rpm, 원료 사입량은 100 g/min으로 고정하였다. 제조된 펠릿은 50℃ 열풍건조기 (HB-502MP, Han Beak Co., Bucheon, Korea)에서 8시간 건조하고 후두믹서 (Gold mill 305W, Gold mill Co., Daegu, Korea)로 분쇄한 후 35 mesh체에 통과시킨 것을 시료로 사용하였다.

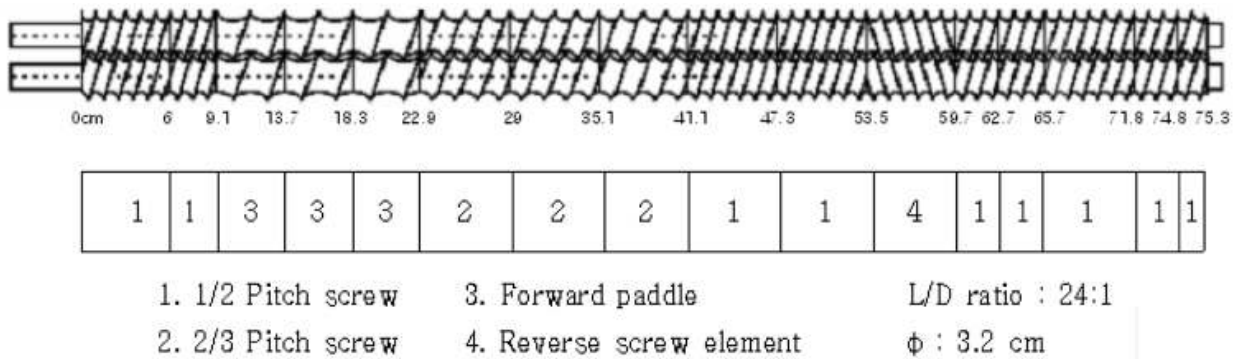
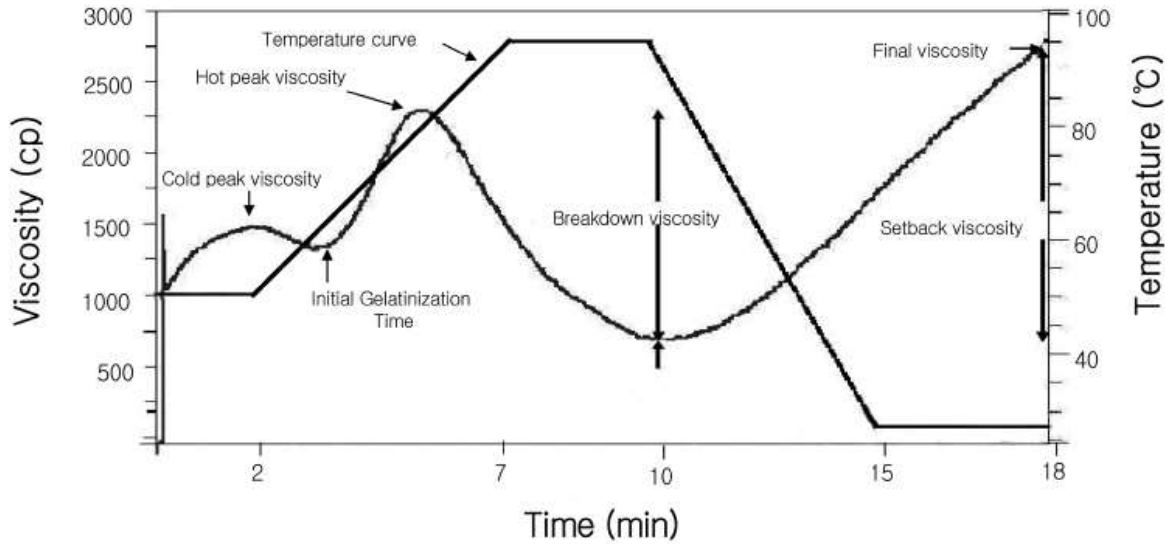


Figure 5. Screw configuration for hemp seed pellets process (Model THK 31T)

④ 후레이크 제조

삼 종자 후레이크의 제조는 Choi et al. (2004)의 방법을 응용하여 압출성형 삼 종자 펠릿을 상온에서 약간 건조한 다음 5 mm 크기로 절단한 후 수분함량이 20-22%되게 15시간 실온에서 수분 조절하였다. 수분 조절한 펠릿을 물 간격이 0.1 mm인 롤밀에 통과시켜 압착하였고 이를 냉장고 (3℃)에서 12시간 수분조절 (tempering)시킨 후 microwave를 이용하여 45초 동안 팽화하여 실험용 삼 종자 후레이크를 제조하였다.



PV: Peak viscosity TV: Trough viscosity
 SV: Setback viscosity FV: Final viscosity
 BV: Breakdown viscosity IGT: Initial gelatinization time

Figure 6. RVA temperature profile and pasting parameters

⑤ 페이스트 점도

페이스트 점도를 측정하기 위하여 Rapid Visco Analyser (RVA-3D, Newport Scientific Inc., Narrabeen, Australia)를 사용하였다. 14% 수분함량을 기준으로 계산한 압출성형물 시료 3 g을 알루미늄캔에 넣은 후 25 mL의 증류수를 가하고 유리막대기를 이용하여 30 초 동안 1차 교반 후 페이스트 점도를 측정하였다. 신속점도기의 온도조건은 Ryu et al.(1993)의 방법을 응용하였다. 초기온도 25°C에서 2분 동안 25°C로 유지한 다음 5분 동안 95°C로 가열 후 3분 동안 95°C로 유지하였으며 5분에 걸쳐 25°C로 냉각한 뒤 3분 동안 온도를 유지시켰다. 총 소요 시간은 18분이며 시료의 분산을 증가시키기 위하여 10초 간 960 rpm으로 페달을 회전시킨 후 160 rpm에서 점도를 측정하였다. Fig. 6의 페이스트 점도곡선으로부터 최고점도 (peak viscosity, PV), 최저점도 (trough viscosity, TV), 최종 점도 (final viscosity, FV), 구조 파괴점도 (breakdown viscosity, BV)와 회복점도 (setback viscosity, SV) 등의 페이스트 점도 지표를 각각 계산하였다.

⑥ 체적밀도

삼 종자 후레이크의 체적밀도는 종자치환법을 이용하여 125 mL 계량컵에 시중에서 구입 한 2008 년산 차조를 일정한 높이에서 떨어뜨려 가득 채우고 눈금자로 계량컵의 높이와 일치하게 차조를 평평하게 한 다음 차조의 질량을 측정하였다. 측정한 차조의 질량을 부피로 나누어 차조의 밀도를 계산하였다.

계량컵에 삼 종자 후레이크 시료 3 g을 넣고 측정된 질량만큼의 차조를 위의 방법과 동일하게 떨어뜨리고 계량컵의 높이와 일치하게 한 다음 질량을 측정하였다. 후레이크의 체적 밀도는 식(1)을 이용하여 계산하였다.

$$p_e = \frac{M}{M + M_0 - M_1} p_m \quad (1)$$

ρ_e : Bulk density of extrudate

ρ_m : Bulk density of millet

M: Mass of extrudate

M_0 : Mass of millet in cup

M_1 : Mass of extrudate and millet in cup

⑦ 색도

삼 종자 후레이크의 색도는 색차계 (CR-300, MINOLTA Co., LTD., Japan)를 이용하여 명도 (lightness, L), 적색도 (redness, a), 황색도 (yellowness, b)값을 측정하였으며 표준 색판의 값은 L = 97.26, a = -0.02, b = 1.77이었다.

⑧ 압착강도

삼 종자 후레이크의 압착강도는 Jin et al. (2007)의 방법을 응용하여 후레이크 3 g을 직경 23 mm, 높이 70 mm의 원통형 용기에 넣고 레오메타 (Sun Rheometer Compac-100, Sun Sci. Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 probe가 시료 높이의 30%까지 진입하는데 걸리는 힘-거리곡선의 최대피크로부터 경도 (hardness)를 계산하였다. 이때 사용된 probe type 은 경도 측정용 probe 로서 원형이며 직경은 20 mm이었다. Load cell 은 10 kg이었고 table speed는 120 mm/min이었다.

⑨ 수분흡착지수와 수분용해지수

수용성 성질을 분석하기 위하여 AACC 방법 (1983)을 응용하여 건량기준의 시료 1 g에 증류수 25 mL을 가하여 30°C의 항온수조 (BF-45SB, Biofree Co., Seoul, Korea)에서 30분간 교반한 후 원심분리기 (H-1000-3, Hanil Science Industrial Co., Incheon, Korea)에서 3,000 rpm ($1,500 \times g$)으로 20분간 원심 분리하였다. 상등액을 알루미늄접시에 부은 후 침전물의 무게를 측정하고 알루미늄접시를 105°C의 열풍건조기 (HB-502MP, Han Beak Co., Kyunggi-do, Korea)에서 2 시간 동안 건조한 뒤 상등액의 고형분 함량을 측정하여 수분흡착지수 (water absorption index)와 수분용해지수 (water solubility index)를 식(2)와 식(3)으로 각각 계산하였다.

$$WAI \text{ (g/g)} = (\text{Hydrated sample wt.} - \text{Dry sample wt.}) / \text{Dry sample wt.} \quad (2)$$

$$\text{WSI (\%)} = \frac{\text{Dry solid wt. recovered by evaporating the supernatant} \times 100}{\text{Dry sample wt.}} \quad (3)$$

⑩ 조직감 유지시간

배럴온도 100℃에서 제조한 삼 종자 후레이크의 조직감 유지시간 (bowl life)은 Lee et al. (2001)의 방법을 응용하였으며 4℃ 우유에 침지하여 삼 종자 후레이크의 아삭아삭한 맛이 없어질 때까지 걸리는 시간으로 나타내었다.

⑪ 관능검사

공주대학교 식품공학과에 재학 중인 학생 9명을 대상으로 배럴온도 100℃에서 제조한 삼 종자 후레이크의 색, 고소한 정도, 바삭한 정도, 단단한 정도, 거친 정도, 전반적인 기호도 등 6개 항목에 대하여 5점 채점법으로 2회 반복하여 평균치를 구하였다.

⑫ 통계처리

관능검사에서 얻은 수치는 통계 프로그램인 SPSS 14.0을 이용하여 일원배치 분산분석 (one-way ANOVA)을 Duncan 의 다중검정법으로 유의성을 검증하였다.

(나) 결과 및 고찰

① 일반성분

삼 종자의 일반성분을 분석한 결과는 Table 3과 같다. 수분함량은 $5.67 \pm 0.02\%$ 이었고 조단백질함량은 $25.93 \pm 0.16\%$ 이었다. 조지방함량은 $28.21 \pm 0.56\%$ 이었고 조회분함량은 $7.70 \pm 0.08\%$ 이었다.

Khan et al. (2010)은 삼 종자는 대체로 약 25% 단백질, 31% 지방을 함유하고 있다고 보고하였고 Small & Marcus (2002)는 삼 종자는 25-30% 의 단백질을 함유하고 있다고 보고하였다. 이는 본 실험의 조단백질 및 조지방함량과 비슷한 결과이었다.

Table 3. Proximate composition of hemp seed unit (%)

Sample	Moisture content	Crude protein	Crude fat	Crude ash
Hemp seed	$5.67 \pm 0.02^{1)}$	25.93 ± 0.16	28.21 ± 0.56	7.70 ± 0.08

¹⁾Means of triplicate±standard deviation

② 페이스트 점도

압출성형 삼 종자 펠릿의 호화양상을 알아보기 위하여 신속점도측정기 (RVA)를 사용하여 측정한 압출성형 삼 종자 펠릿의 페이스트 점도지표는 Table 4와 같다. 압출성형 배럴온도 90, 100, 110℃ 에서 삼 종자 첨가량이 0% 에서 30% 로 증가함에 따라 최고점도, 최저점도, 최종점도, 회복점도는 크게 감소하는 경향을 나타내었다. 구조파괴점도는 삼 종자 첨가량이 0% 에서 30% 로 증가함에 따라 배럴온도 90, 100℃ 일 때 감소하였다가 약간 증가하는 경향을 나타내었고 배럴온도 110℃ 일 때는 현저히 감소하는 경향을 나타내었다. 전체적으로 삼 종자 첨가량이 20, 25, 30% 일 때 0% 에 비해 페이스트 점도지표가 크게 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 삼 종자는 30% 정도의 지방을 함유하고 있어 삼 종자 첨가량이 증가함에 따라 원료의 지방함량이 증가하고 동시에 찹쌀과 밀가루의 함량 즉 전분의 함량이 감소하여 나타난 결과라고 판단되었다.

삼 종자 첨가량 0%일 때 배럴온도가 90℃ 에서 110℃ 로 증가함에 따라 최고점도와 구조파괴점도는 현저히 증가하는 경향을 나타내었고 최저점도, 최종점도, 회복점도는 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 배럴온도가 증가함에 따라 열에너지 투입량이 증가하여 압출성형기 배럴내부에서의 반죽의 용융이 충분히 일어나면서 점탄성이 증가하고 전단력이 증가하여 100, 110℃ 에서 전분이 완전히 호화되었기 때문으로 판단되었다. 삼 종자 첨가량이 20, 25, 30% 일 때는 배럴온도가 90℃ 에서 110℃ 로 증가함에 따라 최고점도와 구조파괴점도는 100℃ 에서는 감소하였다가 110℃ 일 때 크게 증가하는 경향을 나타내었고 최저점도, 최종점도, 회복점도는 감소하는 경향을 나타내었다.

최고점도가 나타나는 시간을 표시하는 peak time은 삼종자 첨가량이 0, 20, 25, 30% 일 때 배럴온도 90℃에서는 각각 7.67, 7.58, 7.60, 7.44 분, 100℃ 에서는 각각 2.16, 7.51, 7.38, 7.49 분, 110℃ 에서는 각각 2.56, 4.91, 5.51, 5.57 분이였다. 일반적으로 곡류 압출성형물의 페이스트 점도 곡선을 보면 50℃ 이하에서 peak 즉 저온최고점도(cold peak)가 나타나는데 이는 압출성형과정 중에 곡류전분이 호화가 일어나 낮은 온도(25℃)에서도 생전분과는 다르게 물을 흡수하여 점도가 상승하기 때문이다. 따라서 저온최고점도가 나타나는 시간은 2-4 분 사이에 나타난다.

배럴온도 90℃에서 peak time 은 모두 7분 이상으로 호화가 충분히 일어나지 않은 것으로 나타났고 배럴온도 100, 110℃에서 삼 종자 첨가량 0%일 때 peak time 은 각각 2.16, 2.56 분으로 50℃ 이하 저온구간에서 나타나는 저온최고점도로 충분히 호화가 일어난 것으로 나타났다. 반면에 삼 종자 첨가량 20, 25, 30%일 때 peak time 은 배럴온도 100℃ 에서 배럴온도 90℃일 때 보다는 감소하였지만 모두 7분 이상으로 호화가 일어나지 않은 결정형 부분이 잔존하는 것으로 나타났다. 배럴온도 110℃일 때는 peak time이 4-6분 사이로 배럴온도 90, 100℃보다 크게 감소하였지만 펠릿 제조 과정 중에 일부분 팽화가 일어나 후레이크 제조용 펠릿으로는 적합하지 않은 것으로 나타났다. 따라서 삼 종자 펠릿의 제조에 적합한 압출성형 배럴온도는 100-110℃인 것으로 판단되었다.

Table 4. Paste viscosity of pellets of hemp seed

Extrusion process variables		Added hemp seed (%)	Paste viscosity (cp)					
Moisture content (%)	Barrel temperature (°C)		PV ¹⁾	TV ²⁾	BV ³⁾	FV ⁴⁾	SV ⁵⁾	PT ⁶⁾
35	90	0	117	87	30	402	315	7.67±0.00 ⁷⁾
		20	60	42	19	273	231	7.58±0.08
		25	57	33	24	259	226	7.60±0.12
		30	47	20	27	236	216	7.44±0.04
	100	0	188	55	133	331	276	2.16±0.10
		20	32	16	16	230	214	7.51±0.27
		25	27	12	15	211	199	7.38±0.14
		30	29	7	22	206	199	7.49±0.10
	110	0	517	12	505	254	242	2.56±0.21
		20	202	0	202	139	139	4.91±0.32
		25	218	0	218	170	170	5.51±0.04
		30	105	0	105	122	122	5.57±0.14

¹⁾Peak viscosity

²⁾Trough viscosity

³⁾Breakdown viscosity

⁴⁾Final viscosity

⁵⁾Setback viscosity

⁶⁾Peak time

⁷⁾Means of triplicate±standard deviation

③ 후레이크의 특성

삼 종자 후레이크의 체적밀도, 색도, 압착강도, 수분용해지수, 수분흡착지수와 조직감 유지 시간은 Table 5와 같다.

체적밀도는 삼 종자 첨가량 0, 20, 25, 30% 에서 배럴온도 90℃일 때 0.38-0.43 g/mL 범위, 배럴온도 100℃일 때 0.32-0.41 g/mL 범위, 배럴온도 110℃일 때 0.24-0.38 g/mL 범위로 배럴온도가 증가함에 따라 감소하는 경향을 나타내었다.

색도에서 명도는 배럴온도 90, 100, 110℃일 때 삼 종자 첨가량이 0%에서 30%로 증가함에 따라 모두 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 탈피하지 않은 삼 종자 (whole hemp seeds)를 원료로 사용하였기 때문인 것으로 판단되었다. 적색도는 삼 종자 첨가량이 0%에서 30%로 증가함에 따라 증가하는 경향을 나타내었다. 황색도는 배럴온도 90, 110℃ 일 때 약간 증가하는 경향을 나타내었고 배럴온도 100℃ 에서는 큰 차이를 나타내지 않았다.

압착강도는 삼 종자 첨가량이 0%에서 30%로 증가함에 따라 모두 감소하는 경향을 나타내었고 배럴온도 110℃, 삼 종자 첨가량 30%일 때 가장 낮은 경도 값 993 g/cm²를 나타내었다. 후레이크 제조용 펠릿으로 적합한 배럴온도인 100℃에서 삼 종자 첨가량 30% 일 때 가장 낮은 경도 값 2277 g/cm²를 나타내었다.

수분용해지수와 수분흡착지수의 범위는 삼 종자 첨가량 0, 20, 25, 30%에서 배럴온도 90℃일 때 각각 17.79-29.62%와 4.32-4.84, 배럴온도 100℃일 때 각각 18.84-28.22%와 4.94-5.32, 배럴온도 110℃일 때 각각 15.93-27.68%와 5.61-6.32이었다. 배럴온도가 90℃에서 110℃로 증가함에 따라 수분용해지수는 감소하는 경향을 나타내었고 수분흡착지수는 증가하는 경향을 나타내었다. 삼 종자 첨가량이 0%에서 30%로 증가함에 따라 수분용해지수는 배럴온도 90℃일 때 감소하였다가 다시 증가하는 경향을 나타내었고 배럴온도 100, 110℃일 때 감소하는 경향을 나타내었다. 수분흡착지수는 삼종자 첨가량에 따라서 큰 차이를 나타내지 않았다.

Table 5. Characteristics of flakes of hemp seed

Extrusion process variables		Added hemp seed (%)	Bulk density (g/mL)	Color			Hardness (g/cm ²)	WSI (%)	WAI (g/g)	Bowl life (min)
Moisture content (%)	Barrel temperature (°C)			L ¹⁾	a ²⁾	b ³⁾				
35	90	0	0.43±0.07 ⁴⁾	84.74	-2.66	15.53	5618	29.62±2.80	4.70±0.19	-
		20	0.41±0.04	70.55	-1.12	17.18	3470	17.79±1.65	4.72±0.18	-
		25	0.41±0.10	60.50	-0.72	17.17	2856	23.55±3.33	4.84±0.10	-
		30	0.38±0.02	59.11	-0.60	17.51	2068	25.05±1.21	4.32±0.15	-
	100	0	0.32±0.01	82.12	-2.62	16.22	7414	28.22±1.14	5.00±0.11	15.5
		20	0.37±0.03	58.43	-0.50	16.87	4175	23.26±1.20	5.32±0.24	7.5
		25	0.40±0.04	59.45	-0.14	16.77	2442	23.08±1.30	4.97±0.10	6.7
		30	0.41±0.05	50.08	0.35	16.74	2277	18.84±0.80	4.94±0.07	5.8
	110	0	0.24±0.02	75.56	-2.82	13.36	7577	27.68±2.16	6.32±0.40	-
		20	0.38±0.03	61.13	-0.36	16.33	1613	18.68±1.05	5.87±0.46	-
		25	0.38±0.06	62.87	-0.69	16.41	1855	18.44±0.72	6.18±0.21	-
		30	0.33±0.03	59.86	-0.44	17.31	993	15.93±1.34	5.61±0.17	-

¹⁾Lightness

²⁾Redness

³⁾Yellowness

⁴⁾Means of triplicate±standard deviation

삼 종자 후레이크와 같은 breakfast cereal은 일반적으로 주스나 우유 등에 넣어서 먹게 되므로 후레이크의 수분용해지수와 수분흡착지수 등 물리적 성질들이 중요한 가공적성의 요인이 된다 (Lee et al., 2001). Choi et al. (2004)은 보리 파쇄립으로 제조한 후레이크의 수분용해지수의 범위는 7.05-10.12%, 수분흡착지수의 범위는 2.45-5.95이었다고 보고하였고, Lee et al. (2001)은 품종별 현미 후레이크의 수분용해지수의 범위는 0.5-3.1, 수분흡착지수의 범위는 4.7-9.8이었다고 보고하였다. Jin et al. (2007)은 고아미 후레이크의 수분용해지수는 7.48-16.88% 범위, 수분흡착지수는 3.13-4.46 범위이었다고 하였다. 본 실험에서 삼 종자 후레이크의 수분용해지수는 보리 파쇄립 후레이크, 현미 후레이크, 고아미 후레이크에 비해 높은 값을 나타내었고 수분흡착지수는 보리 파쇄립 후레이크와 고아미 후레이크와는 비슷한 결과이었고 현미 후레이크보다 낮은 값을 나타내었다.

배럴온도 100°C에서 삼 종자 첨가량이 0, 20, 25, 30% 일 때 후레이크의 조직감 유지시간 (bowl life)은 각각 15.5, 7.5, 6.7, 5.8분이었고 삼 종자 첨가량이 0%에서 30%로 증가함에 따라 감소하는 경향을 나타내었다. Park & Maeng (1992)은 조직감 유지시간은 수분용해지수의 영향을 가장 많이 받으며 제품의 크기, 모양이나 조직 등의 영향도 크게 받는 것으로 알려져 있다고 하였다. Lee et al. (2001)은 품종별 현미 후레이크의 조직감 유지시간의 범위는 6.2-8.2분 이었다고 보고하였는데 이는 본 실험의 삼종자 첨가량 0% 일 때를 제외하면 비슷한 결과이었다.

④ 관능검사

삼 종자 후레이크의 고소한 정도, 바삭한 정도, 거친 정도, 단단한 정도, 색 및 전체적인 기호도에 대한 관능검사 결과는 Table 6과 같다. 고소한 정도는 삼 종자 첨가량 20% 일 때 가장 높은 값을 나타내었는데 이는 삼 종자 25, 30% 일 때 삼 종자의 껍질 맛 때문에

낮은 값을 나타낸 것으로 판단되었다. 바삭한 정도와 단단한 정도는 삼 종자 첨가량에 따라 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 거친 정도와 색도는 삼 종자 첨가량 30% 일 때 가장 큰 값을 나타내었다. 전체적인 기호도는 삼 종자 첨가량 20% 일 때 가장 높은 값을 나타내었다.

Table 6. Sensory results of hemp seed flakes prepared in different adding hemp seed percentage

Added hemp seed (%)	Nuttiness	Crispiness	Coarseness	Hardness	Color	Overall quality
0	2.78±1.17 ¹¹	3.56±1.10 ^a	2.94±0.73 ^a	3.28±0.89 ^a	1.56±0.78 ^a	2.78±0.81 ^a
20	3.67±0.91 ^c	4.06±1.11 ^a	3.17±0.86 ^{ab}	3.06±0.87 ^a	3.22±0.81 ^b	3.89±0.68 ^c
25	3.50±0.79 ^{bc}	4.00±0.91 ^a	3.33±0.97 ^{ab}	3.11±0.83 ^a	3.56±0.70 ^{bc}	3.33±0.77 ^b
30	2.89±0.96 ^{ab}	3.61±1.09 ^a	3.61±1.09 ^b	3.22±0.87 ^a	3.83±0.99 ^c	2.67±0.77 ^a

¹¹Means followed by the same letter in column are not significantly different (p<0.05).

(다) 요약

경제적 잠재성이 큰 삼 종자의 식품소재로서의 활용을 모색하고자 삼 종자의 일반성분을 측정하였고 삼 종자 첨가 압출성형펠릿의 호화양상을 분석하기 위하여 페이스트 점도를 측정하였다. 또한 삼 종자 후레이크의 체적밀도, 색도, 압착강도, 수분용해지수와 수분흡착지수, 조직감 유지시간 (bowl life) 등의 품질특성을 조사하였다. 압출성형 공정조건은 배럴 온도 90, 100, 110℃, 수분함량 35% 이었다.

삼 종자의 수분, 조단백질, 조지방, 조회분함량은 각각 5.67±0.02, 25.93±0.16, 28.21±0.56, 7.70±0.08% 이었다. 압출성형 펠릿의 페이스트 점도 측정결과 삼 종자 펠릿의 제조에 적합한 압출성형 배럴온도는 100-110℃ 인 것으로 판단되었다. 삼 종자 후레이크의 체적밀도는 0.24-0.43 g/mL 범위로 배럴온도가 증가함에 따라 감소하는 경향을 나타내었다. 명도와 압착강도는 삼 종자 첨가량이 증가함에 따라 크게 감소하는 경향을 나타내었다. 배럴온도가 90℃에서 110℃로 증가함에 따라 수분용해지수는 감소하는 경향을 나타내었고 수분흡착지수는 증가하는 경향을 나타내었다. 조직감 유지시간은 5.8-15.5분 범위로 삼 종자 첨가량의 증가에 따라 감소하였다. 관능검사 결과 전체적인 기호도는 삼 종자 첨가량 20%일 때 가장 높은 값을 나타내었다.

(3) 삼종실 첨가에 따른 삼종실 에너지바의 이화학적 특성과 품질

에너지바는 운동선수와 활동량이 많은 사람들이 필요한 칼로리를 공급하는데 자주 이용되는 식이보충제이다. 에너지바는 단백질과 지방, 그리고 높은 탄수화물을 제공한다. 이미 쿵을 이용한 그레놀라 (Maurer, Fukuda, & Nielsen, 2005)와 편두 후레이크 (Ryland, Vaisey-Genser, Arntfield, & Malcolmson, 2010)를 이용한 스낵바가 연구 되었다. 압출성형 삼종실의 특성과 삼종실을 이용한 에너지바에 대한 연구는 현재 한정되어있다.

압출성형공정은 대중적인 기술로서 스낵과 시리얼 생산에 이용되는 고온단시간 공정이다. 시리얼 생산에 이용되는 압출성형물은 주로 옥수수, 밀, 콩, 쌀로 구성되어있다. 최근 다수의 연구에서 영양학적 가치를 향상시키는 연구와 쌀을 이용한 압출성형물의 물리적 특성에 대한 연구가 있었다 (Twomey, Pluske, Rowe, Choct, Brown, & Pethick, 2003; Hagenimana, Ding, & Gu, 2007; Shirani & Ganesharane, 2009). 쌀은 특별한 맛이 없고 비효소적 갈변 반응속도와 팽화능력을 제한 할 수 있는 낮은 단백질함량을 가지고 있다 (Sacchetti, Pinnavaia, Guidolin, & Dalla Rosa, 2004). Kim and Maga (1987)은 옥수수 또는 감자가루에 유청단백질 (200 g/kg)을 첨가하였을 때 압출성형물의 팽화율이 감소하였으나 쌀가루는 유의적으로 증가하였다고 보고하였다.

본 실험은 압출성형 탈지 삼종실과 전립 삼종실의 첨가량 (20, 30, 40%)에 따른 물리화학적 특성을 조사하였다. 삼종실의 첨가에 따른 영양학적 조성과 향산화활성 또한 연구하였다. 또한 압출성형 삼종실을 이용하여 에너지바를 제조하였으며 에너지바의 등온흡수곡선과 관능평가를 조사하였다.

(가) 재료 및 방법

① 재료

전립 삼종실, 탈지 삼종실, 쌀가루는 당진에서 구입하였다. 전립 삼종실은 세척 후 분쇄하여 혼합하였다. 전립 삼종실과 탈지 삼종실의 수분함량은 각각 5.4%, 8.9% 이었으며, 삼종실 첨가량을 0, 20, 30, 40% (w/w)로 하여 배합하였다.

② 압출성형공정

실험에 사용된 압출성형기는 Incheon Machinery Co., Ltd에서 제작한 동방향 쌍축 압출성형기로 직경은 32 mm, 길이는 768 mm이었다 (L/D ratio = 24). 압출성형공정 변수는 스크류 회전속도 200 rpm, 시료 투입량 120 g/min, 사출구 직경 3 mm이었고, 수분함량과 온도를 20%, 130℃로 고정하였다. 제조된 압출성형물은 열풍건조기에서 50℃로 8 시간 건조하였다. 건조된 압출성형물은 30 μm mesh로 분쇄하여 4℃에서 보관하여 시료로 사용하였다.

③ 일반성분 분석

압출성형물의 수분함량, 조지방, 조단백, 조회분 함량은 AOAC (1990)의 방법에 따라 분석하였다. 탄수화물 함량은 100-(회분+ 단백질+ 지방+ 수분함량)으로 계산하였다. 모든 실험은 3회 실시하였다.

④ 물리적 특성 분석

압출성형물의 팽화율은 압출성형물의 직경을 디지털 캘리퍼스로 10회 측정하여 압출성형

물의 직경을 사출구의 직경으로 나누어 팽화율을 계산하였다. 압출성형물의 비길이는 압출성형물의 길이를 무게로 나누어 나타내었다. 비길이 또한 10회 측정하였다. 밀도는 Bhatnagar & Hanna (1995)의 방법으로 수수의 부피를 압출성형물의 부피로 치환하여 산출하였다. 색도는 분쇄된 시료로 색차계 (Minolta CR-300, Osaka, Japan)를 이용하여 측정하였다. 압출성형물의 색도는 3회 측정한 평균 L, a, b 값을 사용하였다. 수분흡착지수 (WAI)와 수분용해지수 (WSI)는 Anderson, Conway, Pfeifer and Griff (1969)의 방법을 응용하여 3회 측정하였다.

⑤ 기계적 특성 분석

압출성형물의 파괴력과 겉보기 탄성계수는 Sun Rheometer (Compac-100 II, Sun Sci. Co., Japan)을 이용하여 최대응력 2 kg, 테이블 이동속도 60 mm/min로 10개의 압출성형물을 측정하였다.

⑥ 주사전자현미경(SEM)

압출성형물의 미세구조는 백금으로 코팅 후 고분해능 주사전자현미경 (MIRA II LMH)으로 가속전력 25 kV에서 미세 구조를 측정하였다.

⑦ 항산화 특성

압출성형 샘플 (0.4 g)을 1% HCl로 2시간 동안 산성화 시킨 80% 메탄올 (v/v) 5 ml로 상온에서 추출하였다. 혼합물은 1500 x g으로 20분간 원심분리 후 상등액은 0.45- μ m nylon 필터로 여과시킨 후 총 페놀 함량, 총 플라보노이드 함량, DPPH 에 의한 전자공여능, β -carotene bleaching, 환원력 분석의 시료로 이용하였다.

㉠ 총 페놀 함량

압출성형물의 총 페놀 함량은 folin-ciocalteau colorimetric 방법으로 측정하였다 (Slinkard & Singleton, 1997). 샘플용액 0.1 ml과 10배 희석된 folin-ciocalteau's 시약 1.5 ml을 혼합한다. 5분 뒤 6% 의 탄산나트륨 1.5 ml을 가한다. 90분 동안 암실에서 반응시킨 후 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 산성화된 메탄올을 blank 로 사용하였다. 갈산을 기준으로 나타냈으며 단위는 mg gallic acid/100 g (d.b) 이었다. 3회 측정하였다.

㉡ 총 플라보노이드 함량

샘플용액 0.5 ml을 10% 질산알루미늄 0.1 ml과 1 M 초산칼륨 0.1 ml, 95% 에탄올 4.3 ml과 혼합 한 뒤 40분 간 상온에서 반응시킨 후 415 nm에서 흡광도를 측정하였다 (Woisky & Salatino, 1998). 총 플라보이논 함량은 퀴세틴을 기준으로 mg 당량/100 g(d.b)으로 나타내었다.

㉢ DPPH에 의한 전자공여능

시료의 전자공여능은 Brand-Williams et al. (1995)의 DPPH에 의한 방법을 약간 수정하

여 측정하였다. 0.5 ml의 샘플용액에 메탄올로 용해한 0.1 mM DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)를 가하여 30분 간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 3회 측정하였으며 DPPH에 의한 전자공여능은 다음 식을 이용하여 측정하였다.

$$\text{Scavenging activity (\%)} = [(\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{sample}})/\text{Abs}_{\text{control}}] \times 100$$

Abs_{control} : the absorbance of the control

Abs_{sample} : the absorbance of the sample

㊤ β-carotene bleaching 방법

Tepe et al. (2005)의 방법으로 β-carotene/linoleic acid 를 준비하였다. 2.0 mg의 β-carotene 을 클로로폼 10 ml에 용해시킨 후 리놀레산 25 μl과 Tween 40 유화제 200 mg을 가하였다. 40°C에서 10분간 회전식 진공농축기로 클로로폼을 제거한 후 100 ml의 증류수를 혼합하였다. 이 혼합액 3 ml을 샘플용액 (100 μl)과 혼합하여 50°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 이 반응액을 470 nm에서 흡광도를 측정하였으며 blank는 산성화된 메탄올이었다. 항산화활성은 다음 식으로 산출하였다.

$$\text{Antioxidant activity (\%)} = [1 - (A_0 - A_t) / (A_{00} - A_{t0})] \times 100$$

A₀ and A₀₀ : the absorbance measured at time zero of incubation for the test sample and control

A_t and A_{t0} : the absorbance measured in the test sample and control, after 120 min incubation.

㊤ 환원력 분석

Gulcin et al. (2003)의 방법으로 환원력을 측정하였다. 샘플용액 1 ml에 0.2 M 인산완충액(pH 6.6) 2.5 ml과 1%의 육시아노철 (III)산칼륨 2.5 ml을 가하였다. 혼합액을 50°C에서 20분간 반응 후 10% 트리클로로초산 2.5 ml을 가하였다. 이 용액을 원심분리 (1500 × g, 10 min)하여 상등액 2.5 ml을 증류수 2.5 ml과 0.1%의 염화제 2철 용액을 혼합한 뒤 10분간 반응시킨 다음 700 nm의 흡광도를 측정하였다.

㊤ 에너지바의 제조

압출성형물 (30%), 밀가루 (10%), 건조사과 (5%), 호박씨 (5%), 쌀눈 (5%), 계피가루 (0.2%)를 칭량해 혼합한 뒤 달걀 (10%), 삼중실 오일 (4%), 바닐라 (3%)을 1분간 혼합하였다. 또한 꿀 (12%), 시럽 (12%), 흑설탕 (3.8%)를 2분간 전자레인지에서 가열한 뒤 냉각시켰다. 냉각 후 각 재료들을 혼합하여 직사각형의 틀에 15 g을 넣어 175°C에서 15분간 구웠다. 에너지바 제조 후 상온에서 냉각한 다음 플라스틱 백에 포장하여 보관하면서 에너

지바의 특성 분석에 사용하였다.

⑨ 등온흡습곡선

압출성형 삼종실 에너지바의 평행수분함량 (EMC)은 상대습도 (0.11-0.75)에 따른 중량을 측정하는 방법으로 측정하였다. 염화리튬, 염화마그네슘, 탄산칼륨, 질산마그네슘, 염화칼륨을 이용하여 5 개의 포화 소금 용액을 만들어 각각의 비습도를 만들었다. 에너지바는 무게를 측정 후 포화 소금 용액을 함유하고 있는 각각의 데시케이터에서 보관하면서 3일 마다 무게를 측정하였다. 에너지바가 수분평형에 도달하면 105℃에서 24 시간 건조 후 EMC 를 측정하였다. 각 샘플은 3 회 측정 되었다.

⑩ 관능평가

훈련 받은 공주대학교 식품공학과 의 대학원생 15 명을 대상으로 측정하였다. 압출성형 에너지바는 9 점 척도법으로 1 점은 매우 나쁨, 9 점은 매우 좋음으로 측정하였으며 평가 항목은 색, 향, 조직감, 쓴 맛, 전체적인 기호도로 나타냈다.

⑪ 통계분석

결과 값은 평균±표준편차로 나타냈으며 통계 프로그램인 SAS software (SAS 9.1, SAS Institute Inc., Cary)를 이용하여 completely randomized design 분산분석 (ANOVA)의 평균 값을 Duncan`s의 다중검정법으로 산출하였다 ($p < 0.05$).

(나) 결과 및 고찰

① 일반성분

대조군 (압출성형 쌀)에 비해 전립 삼종실이 첨가된 압출성형물은 지방, 단백질, 회분의 양이 증가하였으며 수분량은 감소하였다 (Table 7). Raphaelides et al. (2010)은 옥수수전분 압출성형공정에서 지방산이 첨가되면 amylase-fatty acid가 형성으로 인해 수분함량이 감소한다고 보고하였다. 삼종실 첨가량이 높을수록 낮은 수분, 탄수화물 함량을 나타냈으며 높은 지방, 단백질, 회분량의 결과를 보였다. whole-삼종실 압출성형물은 탈지 삼종실 압출성형물보다 같은 첨가량에서 유의적으로 지방, 회분량이 높은 값을 나타내었다 ($p < 0.05$). Callaway (2004)는 전립 삼종실은 삼종실 박 보다 3배 많은 지방을 함유하고 있다고 보고하였다.

Table 7. Proximate compositions of extruded rice-hemp products¹⁾

Materials	Level (%)	Component (%)				
		Moisture	Fat	Protein	Ash	Carbohydrate
Defatted hemp	20	8.65±0.09 ^b	1.13±0.02 ^e	10.10±0.03 ^e	2.38±0.17 ^c	78.06
	30	8.39±0.04 ^c	1.71±0.04 ^d	11.75±0.12 ^c	3.37±0.06 ^b	74.78
	40	6.51±0.10 ^e	2.95±0.17 ^c	14.09±0.07 ^a	3.59±0.43 ^b	72.86
Whole hemp	20	8.04±0.06 ^d	2.84±0.18 ^e	9.86±0.10 ^e	3.51±0.08 ^b	75.75
	30	7.97±0.06 ^d	5.30±0.11 ^b	11.12±0.08 ^d	4.39±0.06 ^a	71.22
	40	6.03±0.12 ^f	7.54±0.06 ^a	12.76±0.13 ^b	4.67±0.06 ^a	69.00
Control ²⁾	-	8.92±0.07 ^a	0.81±0.24 ^e	6.16±0.08 ^f	0.80±0.04 ^d	83.12

¹⁾ Values with in the same column with different letters are significantly different at $P < 0.05$. Each value is the mean \pm SD of three replicates.

② 물리적 특성

삼종실 첨가량에 따른 압출성형 삼종실의 물리적 특성은 Table 8과 같다. WAI는 탈 삼종실, 전립 삼종실 첨가량이 증가할수록 감소하였다 ($p < 0.05$). 이는 전분사를 절단의 감소로 인하여 WAI가 감소된 것으로 사료된다. 삼종실 압출성형물의 WSI는 $17.22 \pm 0.53 \sim 30.23 \pm 0.16$ 이었다. 삼종실 압출성형물은 대조군에 비해서 WSI값이 낮은 값을 나타내었다.

또한 대조군에 비하여 압출성형물은 L (명도)가 낮고 a (적색도)와 b (황색도)는 높은 값을 나타내었다 (Table 8). 전립 삼종실이 40% 첨가된 압출성형 물은 L (명도)가 가장 낮았다. 지방산을 첨가하여 천연 옥수수전분을 압출성형 후 기능적, 구조적 특성을 연구한 Raphaelides et al. (2010)의 연구결과와 일치하였다. 삼종실 첨가량이 증가 할수록 팽화율은 감소하였는데 이는 섬유질에 의해서 기공 벽이 파열되어 팽화율이 감소한 것으로 사료되며 탈지 삼종실은 전립 삼종실보다 많은 섬유질을 가지고 있어 더 낮은 팽화율을 나타낸 것으로 판단된다. 반면에 가장 낮은 밀도 값은 삼종실 첨가량이 낮을 때 높은 값을 나타내었다. 일반적으로 압출성형물의 팽화율은 밀도와 반비례의 관계를 나타낸다. 시트르산을 첨가한 전분-구아 압출성형에서도 유사한 결과를 나타내었다 (Wang, Jin & Yuan, 2007). 삼종실 압출성형물은 대조군보다 높은 비길이를 나타냈으며, 40% 탈지 삼종실 압출성형물이 105.94 ± 1.13 m/kg으로 가장 값이 크게 나타났다.

Table 8. Physical and mechanical properties of extruded rice-hemp products¹⁾

	Control ²⁾	Defatted hemp (%)			Whole hemp (%)		
		20	30	40	20	30	40
WAI (g/g)	2.92 ^b	3.16 ^a	2.58 ^c	2.33 ^c	2.43 ^d	2.3 ^c	2.20 ^f
WSI (%)	38.77 ^a	30.23 ^b	24.09 ^d	17.22 ^f	26.79 ^c	29.46 ^b	22.85 ^e
L*	86.69 ^a	70.70 ^b	66.78 ^d	60.92 ^f	68.83 ^c	64.33 ^c	57.29 ^g
a*	-2.02 ^c	-0.28 ^d	0.31 ^c	1.09 ^a	-0.24 ^d	0.34 ^c	0.89 ^b
b*	13.63 ^c	16.28 ^d	16.82 ^{bc}	17.42 ^a	17.22 ^{ab}	16.41 ^{cd}	16.32 ^d
Expansion ratio	3.46 ^a	2.51 ^c	2.15 ^d	1.82 ^f	2.68 ^b	2.44 ^c	2.06 ^a
Specific length (m/kg)	51.74 ^f	83.99 ^c	99.69 ^b	105.94 ^a	74.97 ^e	79.21 ^d	76.79 ^e
Bulk density (g/cm ³)	0.21 ^{cd}	0.19 ^d	0.22 ^{cd}	0.35 ^a	0.21 ^{cd}	0.24 ^c	0.30 ^b
Breaking strength (N/m ²)	1.78E+05 ^{cd}	1.65E+05 ^d	1.49E+05 ^d	2.13E+05 ^{bc}	2.23E+05 ^b	1.79E+05 ^{cd}	3.06E+05 ^a
Elastic modulus (N/m ²)	1.76E+07 ^f	3.61E+07 ^e	6.95E+07 ^c	1.31E+08 ^a	3.45E+07 ^c	5.54E+07 ^d	1.13E+08 ^b

1) Values with in the same column with different letters are significantly different at $P < 0.05$.

2) Control: extruded rice without hempseed.

③ 기계적 특성

기계적 특성 또한 Table 8에 나타내었다. 탈지 삼종실이 20, 30% 첨가되었을 때 압출성형물의 파괴력은 감소하였다. 하지만 40% 탈지 압출성형물은 절단강도가 유의적으로 증가하였다 ($p < 0.05$). 파괴력의 결과에서 대조군과 30% 전립 삼종실 압출성형물은 유의성을 발견할 수 없었다. 20, 40% 전립 삼종실 압출성형물의 파괴력은 유의적으로 증가하였다. Onwulata et al. (2001)은 유청단백질과 유청분말을 각각 250, 500 g/kg을 첨가한 쌀 압출성형물의 파괴력은 대조군과 비교하여 유의적으로 증가하였고 보고하였다. 겔보기탄성계수는 탈지 삼종실, 전립 삼종실 압출성형물 모두 대조군 보다 유의적으로 값이 높았다. 삼종실의 첨가량이 증가할수록 탈지 삼종실과 전립 삼종실 압출성형물의 겔보기탄성계수는 증가하였다. 본 연구에서 whole-삼종실 압출성형물의 겔보기탄성계수가 탈지 삼종실 압출성형물에 비하여 낮은 값을 나타내는 것을 발견하였다.

④ 압출성형물의 미세구조

대조군과 비교하여 탈지 삼종실과 전립 삼종실의 첨가량에 따른 압출성형물의 단면을 주사전자현미경을 이용하여 나타내었다 (Fig. 7). 삼종실을 첨가하지 않은 대조군의 기공 크기는 삼종실을 첨가한 압출성형물의 비하여 큰 사이즈를 나타냈다 (Fig. 7g). 삼종실 첨가량이 증가할수록 기공의 수는 많아지고 크기는 작아졌다. 한편 Lazou and Krokido (2010)는 옥수수를 이용한 압출성형에서 편두의 첨가량이 증가할수록 기공의 수가 감소하였다고 보고하였다. 또한 전립 삼종실 압출성형물의 지방입자가 부분적으로 둘러싸여있었다.

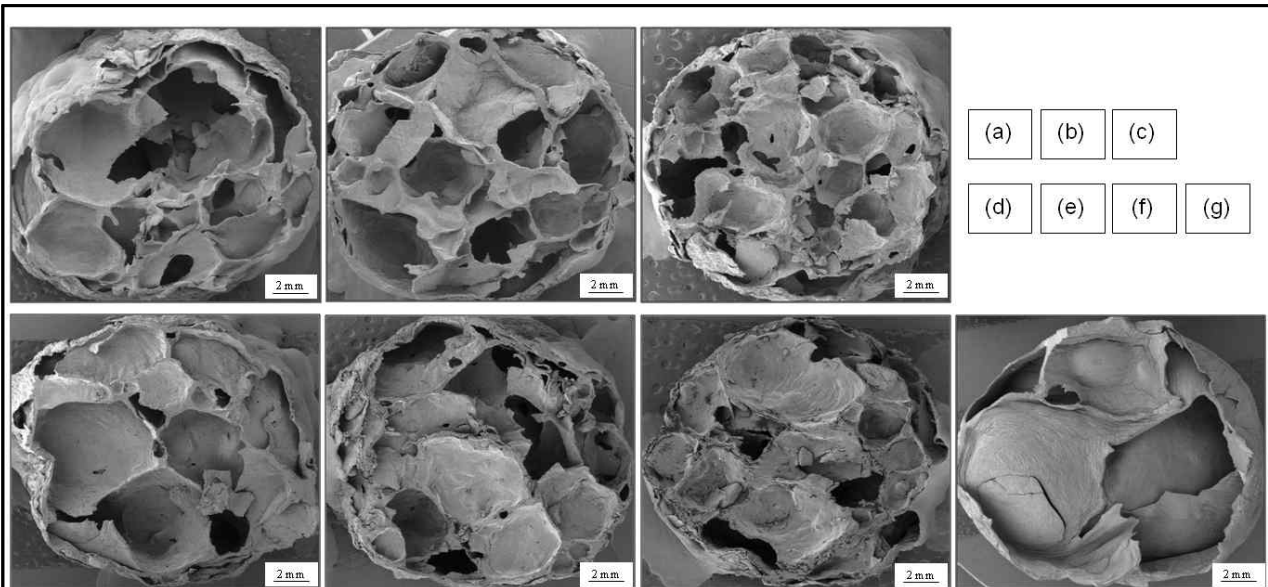


Figure 7. Scanning electron micrographs of extruded rice-hemp

a. Addition of 20% defatted hemp, b. Addition of 30% defatted hemp, c. Addition of 40% defatted hemp, d. Addition of 20% whole hemp, e. Addition of 30% whole hemp, f. Addition of 40% whole hemp, g. Control

⑤ 총 페놀, 플라보노이드 함량

총 페놀, 플라보노이드의 함량은 Table 9과 같이 삼종실의 첨가량이 20%에서 40%로 증가할수록 증가하였다 ($p < 0.05$). 20%를 첨가한 탈지 삼종실 압출성형물과 전립 삼종실 압출성형물의 총 페놀 함량은 대조군보다 각각 9.1 배, 10.2 배로 높았다. 쌀과 전립 삼종실의 비율이 60:40인 압출성형물의 총 페놀 함량이 가장 높았다. 총 플라보노이드 함량은 삼종실 첨가량에 따라 2.81~22.24 mg quercetin equivalents (QE)/100 g 으로 나타났다. 또한 전립 삼종실 압출성형물의 총 페놀, 플라보노이드 함량은 탈지 삼종실에 비하여 유의적으로 높은 값을 나타냈다 ($p < 0.05$). 이는 전립 삼종실에 함유하고 있는 vitamin E에 의하여 높은 값을 나타낸 것으로 사료된다. Siger et al. (2008)은 삼종실 오일에 함유하고 있는 총 페놀 함량은 2.45 mg caffeic acid equivalents/100 g이라고 하였다. 그러나 Yu, Zhou and Parry (2005)은 0.44 mg gallic acid equivalents (GAE)/100 g의 함량을 함유하고 있다고 보고하였다. 또한 총 페놀 함량은 총 플라보노이드 함량과 긍정적인 상관관계를 나타냈다.

⑥ 항산화 특성

여러 분석방법을 통해 식품과 식물 추출물의 다양한 천연 항산화성을 평가할 수 있다. 따라서 본 연구에서 탈지 삼종실, 전립 삼종실 압출성형물의 DPPH 에 의한 전자공여능과 환

원력, 항산화활성을 조사하였다 (Table 9).

DPPH에 의한 전자공여능은 압출성형물의 삼종실 첨가량이 증가할수록 증가하였으며 ($p < 0.05$) 대조군보다 높은 값을 나타내었다. 전립 삼종실 압출성형물의 전자공여능 값은 다른 삼종실 첨가 압출성형물보다 높은 값을 나타냈다. 삼종실 첨가량에 따른 압출성형물의 유의적인 변화는 나타났다. Table 9과 같이 탈지 삼종실의 함량이 20, 30, 40% 일때 각각 0.51, 0.73, 1.03의 환원력을 나타냈으며 전립 삼종실의 환원력은 0.46~0.77 으로 나타났다. 대조적으로 본 연구에서 DPPH 에 의한 전자공여능은 전립 삼종실 압출성형물이 높은 값을 나타내는 것을 발견하였다. 삼종실의 종류와 첨가량에 따른 압출성형물의 항산화활성은 β -carotene bleaching 분석방법을 사용하였다 (Table 9). 전립 삼종실 압출성형물은 탈지 삼종실 압출성형물 보다 높은 항산화활성을 나타냈다. 삼종실 함량이 40% 첨가되었을 때 높은 항산화활성을 나타냈다. 삼종실 압출성형물의 환원력은 DPPH 에 의한 전자공여능과 연관성을 나타내지 않았다 ($r^2=0.3973$). 하지만 DPPH 에 의한 전자공여능과 항산화활성은 높은 연관성을 나타냈다 ($r^2=0.9393$). 이는 항산화활성의 측정 방법에 따라 화학적 반응이 달라 다른 항산화활성을 나타낸 것으로 사료된다. 또한 본 실험에서 항산화활성은 총 페놀, 플라보노이드 함량과 유의적인 연관성을 나타내지 않았다. Camire et al. (2007)은 과일분말를 첨가한 옥수수 압출성형물의 페놀 함량과 항산화활성의 연관성이 없다고 보고하였으며 Shih et al. (2009) 또한 고구마의 건조방법 (동결건조, 열풍건조, 압출성형)에 따른 페놀 함량과 항산화활성의 연관성은 없다고 하였다. 이는 화합물이 페놀 측정방법으로 발견되지 않거나 추출되지 않아서 다음과 같은 항산화활성을 나타낸 것으로 사료된다. 종합적으로 전립 삼종실은 탈지 삼종실 보다 우수한 항산화 특성을 보였다. Siger et al. (2008)은 삼종실 오일의 전자공여능이 70%으로 강한 항산화활성을 나타낸다고 보고하였다.

Table 9. Total phenolics, total flavonoids, radical scavenging activity (DPPH assay), antioxidant activity (BCB assay) and reducing power (RP assay) of extruded rice-hemp products¹⁾

Materials	Level (%)	Total phenolics (mg GAE/100g)	Total flavonoid (mg QE/100g)	Antioxidant properties		
				DPPH ³⁾	BCB ³⁾	RP ⁴⁾
Defatted hemp	20	149.32±0.21 ^f	6.97±0.14 ^f	31.70±0.23 ^f	44.44±2.14 ^d	0.507±0.005 ^c
	30	198.10±0.32 ^d	10.65±0.51 ^d	39.71±0.24 ^e	58.85±2.57 ^c	0.729±0.007 ^c
	40	270.53±0.65 ^b	16.20±0.75 ^c	49.66±0.23 ^d	69.14±1.23 ^b	1.029±0.007 ^a
Whole hemp	20	166.81±1.17 ^e	9.26±0.24 ^e	54.49±0.30 ^c	65.84±0.7 ^b	0.460±0.003 ^f
	30	224.02±0.80 ^c	17.67±0.86 ^b	59.43±0.39 ^b	70.37±1.23 ^b	0.603±0.008 ^d
	40	275.63±0.75 ^a	22.24±1.36 ^a	63.16±0.35 ^a	76.95±4.99 ^a	0.770±0.015 ^b
Control ²⁾	-	16.43±1.07 ^g	2.81±0.14 ^g	20.45±0.57 ^g	27.98±2.57 ^c	0.034±0.002 ^g

1) Values with in the same column with different letters are significantly different at $P < 0.05$. Each value is the mean \pm SD of three replicates.

2) Control: extruded rice without hempseed.

3) Value expressed as % of dry sample.

4) Value expressed as absorbance at 700 nm.

⑦ 에너지바의 등온흡습곡선

압출성형공정을 이용한 탈지 삼종실 에너지바와 전립 삼종실 에너지바의 평행수분함량 (EMC)에 따른 수분활성도 (a_w)는 각각 Fig. 8a, b 와 같다. 모든 에너지바의 수분함량은 a_w 에 증가함에 따라 서서히 증가하였다. 각각의 삼종실의 등온흡습곡선은 S자 모양을 가졌다. 삼종실 첨가량 40% 인 에너지바는 30, 20, 0%의 에너지바보다 평행수분함량이 감소하였다. 또한 전립 삼종실 압출성형물을 이용한 에너지바가 탈지 삼종실 에너지바 보다 낮은 EMC 를 보였다. 따라서 이 결과를 통해 전립 삼종실을 이용한 에너지바는 낮은 흡습률을 나타낼 것으로 사료된다. Jensen and Risbo (2007)에 의하면 다양한 제품의 상대습도에 따른 수분함량은 결합수에 대한 서로 다른 열역학적 능력을 가졌다.

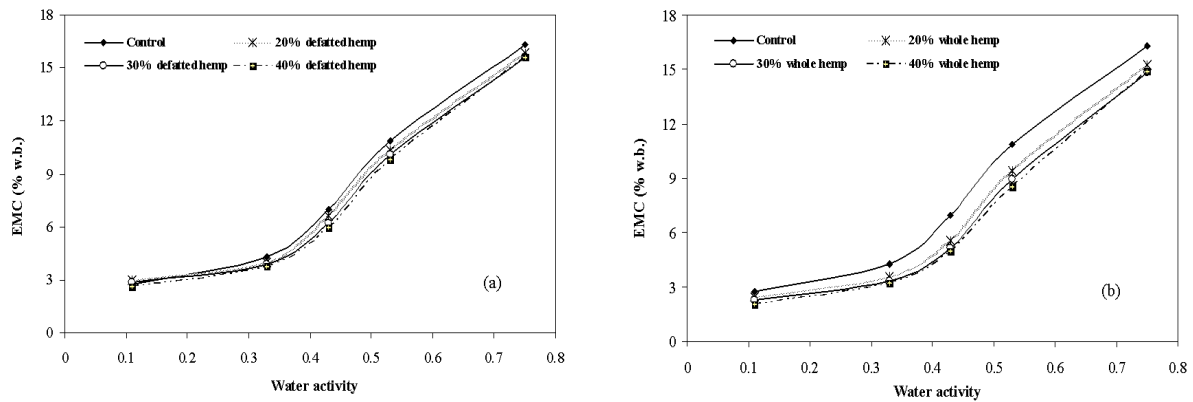


Figure 8. Moisture sorption isotherms of energy bars with extruded rice-defatted hemp (a) and extruded rice-whole hemp (b) that had various levels of hempseed added.

Table 10. Sensory qualities of energy bars with different types and levels of hempseed¹⁾

Materials	Level (%)	Sensory quality				
		Color	Texture	Flavor	Taste	Overall acceptance
Defatted hemp	20	6.38 ^b	6.00 ^b	5.25 ^{ab}	5.38 ^{ab}	6.13 ^a
	30	5.63 ^{bc}	7.75 ^a	6.25 ^a	5.88 ^{ab}	6.25 ^a
	40	4.88 ^c	7.75 ^a	5.13 ^{ab}	5.13 ^b	5.88 ^a
Whole hemp	20	6.50 ^b	7.63 ^a	5.50 ^{ab}	6.75 ^a	7.00 ^a
	30	5.75 ^{bc}	6.75 ^{ab}	5.00 ^{ab}	6.13 ^{ab}	6.75 ^a
	40	5.00 ^c	6.38 ^{ab}	4.88 ^{ab}	4.63 ^b	5.75 ^a
Control ²⁾	-	8.00 ^a	6.38 ^{ab}	4.75 ^b	6.13 ^{ab}	6.38 ^a

¹⁾ Values with in the same column with different letters are significantly different at $P < 0.05$.

²⁾ Control: extruded rice without hempseed.

⑧ 에너지바의 관능적 품질

압출성형 에너지바의 관능적 특성은 Table 10과 같다. 삼종실을 첨가하지 않은 압출성형물을 이용한 에너지바는 색 8점으로 가장 높았다. 향에 대한 점수는 대조군에 비하여 삼종실이 첨가된 에너지가 유의적으로 높았다. 전립 삼종실 에너지바에서 첨가량이 증가할수록 맛에 대한 평가는 낮아졌다. 종합적인 기호도에서 7가지의 샘플에 관하여 유의적인 차이는 없었다. 그러나 본 실험에서 전립 삼종실 압출성형물을 이용한 에너지바가 탈지 삼종실을 이용한 에너지바 보다 높은 기호도를 보였다. 실험자들은 40% 전립 삼종실의 에너지바의 향이 너무 강하다고 하였다.

(다) 결론

삼종실 종류와 첨가량에 따른 삼종실 압출성형물의 화학적 조성 (수분함량, 지방, 단백질, 회분, 탄수화물)은 유의적이었다. 삼종실 첨가량이 증가할수록 압출성형물의 팽화율은 유의적으로 감소하였다. 총 페놀, 플라보노이드 함량은 삼종실이 첨가됨에 따라 유의적으로 증가하였다. DPPH 에 의한 전자공여능과 β -carotene bleaching 의 방법으로 분석한 결과 40% 전립 삼종실 압출성형물이 높은 항산화활성을 나타냈다. 하지만 환원력과 같은 결과를 나타내지 않았다. 등온흡습곡선의 같은 수분활성도에서 탈지 삼종실 압출성형물을 원료로 제조한 에너지바는 전립 삼종실 압출성형물을 이용한 에너지바보다 높은 수분 흡착율을 보였다. 본 연구를 통해 삼종실을 기능성 원료로서 압출성형물을 생산하고 이를 통해 식품의 영양적 품질을 향상시킬 수 있을 것으로 사료된다.

(4) 삼종실 첨가에 따른 식빵이 품질특성

압출성형은 다양한 아침식사용 곡물가공식품을 생산하는 중요한 기술이다. 이러한 전처리 공정은 원료활용의 향상과 생산비용절감, 향미를 증진, 영양적으로 균형 잡힌 생산품을 생산하게 할 수 있다. 또한 영양적으로 우수한 섬유질섭취를 가능하게 한다. 그럼에도 불구하고, 이에 해당하는 평가 뿐 아니라 압출성형 된 삼종실 제품은 거의 조사되지 않았다. 압출성형시 높은 지방함량과 강한 윤활유의 영향 때문에, 삼종실의 단일 사용이 어렵다. 그러므로, 전분은 반드시 압출성형과 생산물의 성질의 향상을 위해 첨가되어야한다. 일반적으로 미백과 삼종실 특유의 풍미를 가리지 않는 맛을 가진 쌀가루는 가장 좋은 선택이다. 본 연구는 밀가루의 대용품으로 압출성형 삼종실-쌀을 사용하여 그 첨가량에 따른 식빵의 품질을 분석하여 영양적 및 품질적으로 우수한 삼종실 첨가 식빵 개발을 위한 원료 배합비를 결정하였다.

(가) 재료 및 방법

① 재료

삼중실은 당진에서 2010년 재배 수확한 것을 구입하였으며, 멥쌀은 2010년 부여에서 재배 수확한 일반계를 구입하여 사용하였으며, 강력밀가루 (대한제분), 백설탕 (CJ), 드라이이스트 (오뚜기), 쇼트닝 (오뚜기)는 일반 슈퍼마켓에서 구입하여 사용하였다.

삼중실은 분쇄하여 미분과 3:7 비율로 혼합하여 압출성형 하였다. 압출성형 조건은 수분함량 20%, 스크루 회전속도 200 rpm, 시료주입속도 120 g/min, 배럴온도 120℃, 사출구 직경 3 mm이다. 압출성형물은 50℃에서 8시간 건조 후 분쇄하여 30-mesh 체로 쳐서 보관하였다.

② 빵 만들기

밀가루의 대용품으로 EHR 가루를 5, 10, 15% 함량으로 직접 반죽법 방식에 따라 제조하였다. 대조군으로 EHR을 넣지 않은 밀가루로 식빵을 제조하였다.

식빵의 배합비는 빵가루(밀가루 및 EHR 가루 혼합가루) 100 g, 설탕 10 g, 소금 1.5 g, 이스트 1.5 g, 버터 6.7 g, 물 60 g으로 먼저 밀가루와 설탕을 섞어 체로 치고 30-40℃ 물에 녹인 이스트와 소금을 원료에 첨가하였다. 반죽기에서 speed-1 속도로 5 분간 혼합한 후 녹인 버터를 넣고 버터를 잘 섞어 speed-2 속도로 15 분간 혼합하였다. 그리고 반죽을 30℃ 배양기에 발효시켰다. 60 분 후에 반죽을 내려쳐 가스를 제거하고 반죽을 350 g씩 분할하였다. 분할한 반죽을 식빵틀(21.5 × 10 cm² in top, 19.5 × 8.5 cm² in bottom, 9.5 cm in depth)에 넣고 30℃ 발효조에서 40 분간 발효하였다. 발효된 반죽은 160℃ 오븐에서 50 분간 구워 상온에서 완전히 냉각시켜 분석에 사용하였다.

③ 반죽 팽화율

반죽의 팽화율은 반죽 (30 g)을 살균된 실린더에 넣고 부피를 측정 한 후 30℃에서 60 분간 발효시킨 후 다시 부피를 측정하여 발효 전 빵의 부피와 발효 후 빵의 부피의 비에 의해 측정하였다. 각 시료마다 3반복하여 측정하였다.

④ 식빵의 물리적 특성

㉠ 비체적

비체적 (specific volume)은 Lopez et al. (2004) 에 의해 고안된 종자치환법을 약간 수정하여 측정하였다. 부피를 아는 용기를 사용하여 무게를 측정한 후 식빵의 부피를 측정하였다.

㉡ 빵표피와 빵가루 색도

빵표피와 빵가루는 색차계 (CR-300, MINOLTA Co., LTD., Japan)를 이용하여 명도 (lightness, L), 적색도 (redness, a), 황색도 (yellowness, b)값을 측정하였으며 표준색판의 값은 L = 96.26, a = -0.04, b = 1.43이었다. 빵 표피는 빵의 상단 부분을 두께가 20

mm 로 균일하게 잘라내어 다섯 지점을 측정하였으며 색도는 $\Delta E = (\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2)^{1/2}$ 로 표시하였다.

㉞ 경도

빵 샘플을 $2.5 \times 2.5 \times 2.0 \text{ cm}^3$ 로 잘라 폴리에틸렌봉지에 담아 각각의 조각들을 상온에서 3일간 보관하면서 경도의 변화를 측정하였다. 경도측정은 24 시간 단위로 최대하중 10 kg, 25 mm aluminum cylindrical probe, 테이블 이동속도 120 mm/min, 원래 크기의 40%로 압축하는 조건으로 측정하였다.

㉟ 통계분석

통계분석은 SAS version 9.1 를 이용하였으며, 변량 분석은 General Linear Model 방법으로 수행하였다. $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's range test 의 유의성을 검증하였다.

(나) 결과 및 고찰

① 반죽 팽화율

Fig. 9는 반죽의 팽화율을 나타낸 것으로 반죽의 발효 전과 후의 특성을 보여준다. 10%-EHR (1.83)의 반죽이 다른 조건에 비해 낮게 측정되었으며, 5%-EHR과 대조군의 팽화율이 차이가 없었다. 반죽의 팽화는 대개 빵 제조시 혼합과 발효에 의존한다. Autio K 와 Laurikainen T. (1997)는 혼합하는 동안 탄산은 효소와 설탕에 의해 생성되며 반죽에 기공을 형성한다고 하였으며, Chevallier et al. (2010)의 보고에 의하면 발효하는 동안 반죽의 부피는 발효시간과 탄산가스의 증가에 따라 증가한다고 하였다.

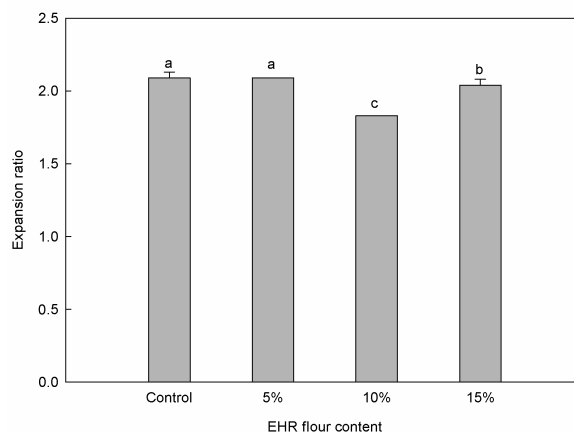


Figure 9. Effect of different contents of extruded hemp-rice (EHR) flour on dough expansion ratio

② 비체적

식빵의 비체적은 Fig. 10에 표시하였다. 비체적은 반죽 팽화율과 같은 형태의 결과를 나타내었다. EHR 를 포함한 식빵의 비체적이 대조군보다 낮고 EHR 의 비율이 증가함에 따라 비체적이 감소하였다. 특히, 10%-EHR 빵이 가장 낮은 비체적 값을 나타내었다. 대조군과 비교했을 때, 5%-EHR 빵의 비체적의 변화는 없으며 이는 밀가루의 대체물로서의 이용이 가능하다고 보여진다. Aini et al. (1996)은 적당한 지방은 부피증가, 질감과 빵표피의 부드러움, 빵의 품질 보존, 탄력있는 반죽을 만들 수 있음을 제안했다. 대조군에 비하여 10%-EHR 과 15%-EHR 의 비체적이 감소하는데 반하여 5%-EHR 이 대조군과 거의 같은 값을 나타낸 것은 삼중실에 포함되어 있는 적당한 지방의 양에 의한 것이라 할 수 있다.

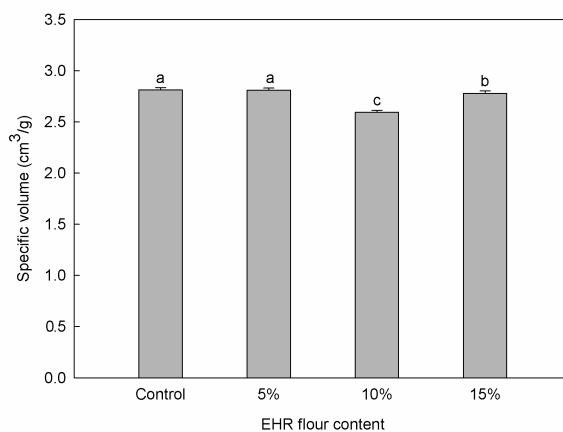


Figure 10. Effect of different contents of extruded hemp-rice (EHR) flour on bread specific volume

③ 식빵의 단면

Fig. 11은 EHR을 첨가한 식빵의 단면을 찍은 사진이다. 식빵의 단면을 관찰하면 EHR을 첨가한 식빵의 기공이 큰 것을 알 수 있다. 식빵의 비체적 측정에서 EHR을 첨가한 식빵의 비체적이 대조군보다 비체적이 적었음에도 EHR을 첨가한 식빵의 기공이 컸다. 이는 대조군은 전체적으로 기공이 고르게 분산되었으나 EHR을 첨가한 식빵은 기공이 부분적으로 형성된 것을 의미한다. 유사한 결과로 일반적인 밀가루-호밀 빵의 결과가 Hung et al. 에 의해 보고되었다.

④ 색도

빵표피의 백색도, 황색도, 적색도는 EHR의 함량이 증가함에 따라 감소하였다. EHR의 함량이 증가 즉, 삼중실 함량이 증가함에 따라 삼중실이 갖는 짙은 녹색에 의하여 빵표피의 백색도, 황색도, 적색도가 감소하는 것으로 나타났다. Koca와 Anil (2007)이 보고한 아마

종자 첨가 빵에서도 아마 종자 가루에 의하여 빵표피가 어둡게 변한다고 한 것과 같은 결과를 나타내었다.

⑤ 경도

저장기간에 따른 식빵의 경도는 Fig. 12에 나타내었다. 식빵의 경도는 5%-EHR 과 대조군이 비슷하였고, 전체적인 저장기간 동안 유사한 경향을 보여주었다. 10%-EHR 빵의 경도는 다른 시료보다 현저하게 높았으며, 96.71 g/cm^2 로 첫날부터 뚜렷한 증가를 보였다. 이는 낮은 비체적에 의하여 단위면적당 기공이 차지하는 부피가 작기 때문에 상대적으로 경도가 높은 것을 알 수 있다. 15%-EHR 빵은 다른 시료보다 상당히 낮은 경도를 보였다. 부피가 큰 빵들은 낮은 밀도와 경도를 가진다. 반면, 작은 빵들은 높은 밀도와 경도를 갖는다. Sciarini et al. (2010)의 보고에 의하면 글루텐이 없는 가루를 섞었을 때 비체적이 적게 나타나며, 비체적이 적은 빵은 상대적으로 경도가 높다고 한 것과 같은 결과를 보여주었다.

(다) 결론

반죽의 팽화율과 빵의 비체적은 유사한 경향을 나타내었으며, EHR 을 첨가한 식빵은 대조군보다 낮은 비체적을 나타내었으나 5%-EHR 첨가 식빵은 대조군과 거의 비슷한 비체적을 나타내었다. 10%-EHR 첨가 식빵의 비체적이 15%-EHR 첨가 식빵보다도 낮은 비체적을 나타내어 가장 적은 비체적과 가장 높은 경도를 나타내었다. 빵표피와 빵가루의 색도는 EHR 의 함량이 높아질수록 명도는 감소하며, 황색도 및 적색도는 증가하였다. 본연구에서 5%-EHR 첨가 식빵이 가장 높은 비체적과 가장 낮은 경도 그리고 큰 기공구조를 보여주어 EHR 배합비는 5%가 가장 적당한 것으로 확인되었다.

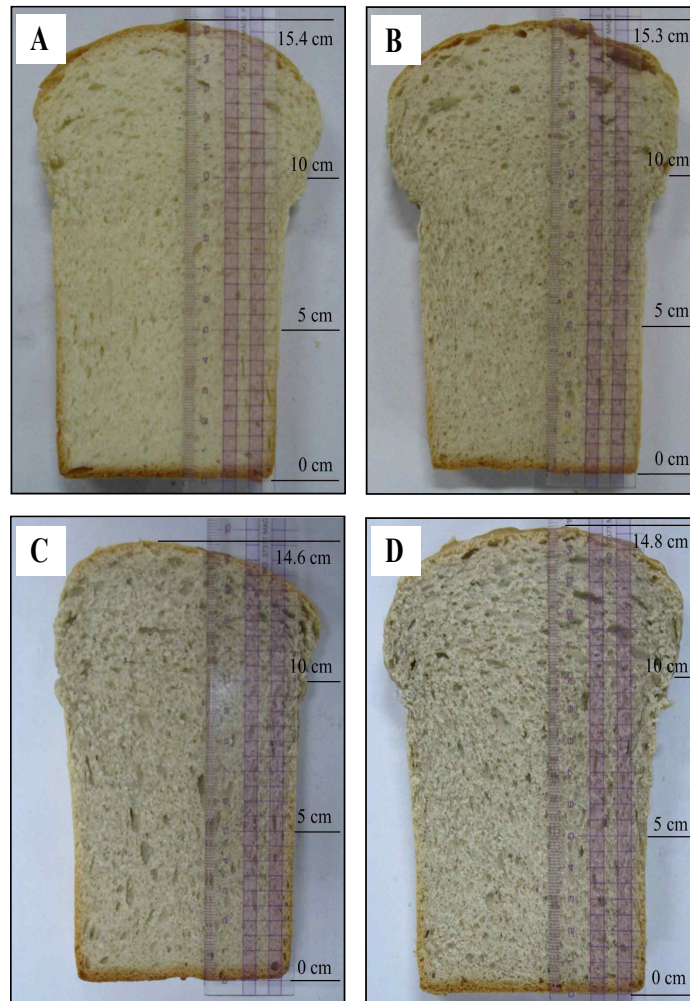


Figure 11. Digital photographs of EHR-containing bread crumbs.
 A. Control, B. 5%-EHR, C. 10%-EHR, D. 15%-EHR

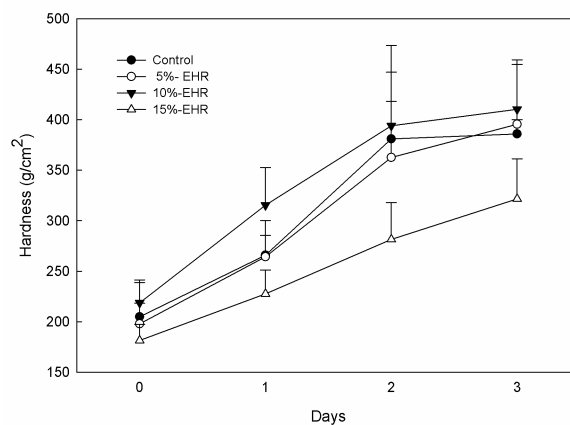


Figure 12. Effect of different contents of extruded hemp-rice (EHR) flour on bread hardness during 3-day storage.

(5) 산업화(제품화)를 위한 삼종실 첨가 제품의 제조 조건 및 배합비

(가) 삼종실 첨가 후레이크

① 펠릿제조

㉠ 압출성형기 : 실험용 쌍축 압출성형기 (THK 31T, Inchen Machinery, Incheon, Korea)를 사용

㉡ 압출성형 조건

스크루 직경 : 3.2 cm

길이와 직경비 (L/D ratio) : 24:1

출구 : 원형(직경 : 4.0 mm)

배럴온도 : 110℃

수분함량 : 35%

스크루 회전속도 : 200 rpm

원료 사입량 : 100 g/min

② 후레이크 제조

원료 : 20% 삼 종실 함유 펠릿(쌀 베이스)

크기 : 5 mm

수분조절 : 20-22%되게 15시간 실온에서 수분 조절

성형 : 0.1 mm인 롤밀에 통과시켜 압착

2차 수분조절 : 냉장고 (3℃)에서 12시간 수분조절 (tempering)

팽화 : microwave를 이용하여 45초 동안 팽화

(나) 삼종실 첨가 에너지 바

① 압출성형물 제조

삼종실 첨가량 : 30% (w/w, 쌀 베이스)

수분함량 : 20%

배럴온도 : 130℃

스크루 회전속도 : 200 rpm

시료 투입량 : 120 g/min

사출구 직경 : 3 mm

② 에너지바 제조

㉠ 압출성형물 (30%), 밀가루 (10%), 건조사과 (8%), 쌀눈 (7%), 계피가루 (0.2%)를 칭량해 혼합한 뒤 달걀 (10%), 삼종실 오일 (4%), 바닐라 (3%)을 1분간 혼합

㉡ 꿀 (12%), 시럽 (12%), 흑설탕 (3.8%)를 2분간 전자레인지에서 가열한 뒤 냉각냉각 후 각 재료들을 혼합하여 직사각형의 틀에 15 g을 넣어 175℃에서 15분간 굽기

Table 11. Formulation for energy bar.

Dry ingredients	Ratio (%)	Wet ingredients	Ratio (%)
Extruded hemp (hemp content :30%)	30	Hemp oil	4
Apple pits	8	Brown sugar	3.8
Rice germ	7	Honey	12
Cinnamon	0.2	Syrup	12
Wheat flour	10	Vanilla	3
		Egg	10

(다) 삼종실 첨가 식빵

① 식빵 첨가용 압출성형물 제조

삼종실 첨가량 : 30% (w/w, 쌀 베이스)

수분함량 : 20%

배달온도 : 120℃

스크류 회전속도 : 200 rpm

시료 투입량 : 120 g/min

사출구 직경 : 3 mm

② 식빵 제조

㉠ 밀가루의 대용품으로 압출성형 삼종실 가루를 5% 함량으로 직접 반죽법 방식에 따라 제조

㉡ 배합비 : 빵가루(밀가루 및 압출성형 삼종실 가루 혼합가루) 100 g, 설탕 10 g, 소금 1.5 g, 이스트 1.5 g, 버터 6.7 g, 물 60 g

㉢ 빵가루와 설탕을 섞어 체로 치고 30-40℃ 물에 녹인 이스트와 소금을 원료에 첨가

㉣ 반죽기에서 speed-1 속도로 5 분간 혼합한 후 녹인 버터를 넣고 버터를 잘 섞어 speed-2 속도로 15 분간 혼합

㉤ 반죽을 30℃ 배양기에 발효(60분)

㉥ 반죽의 가스를 제거하고 반죽을 350 g씩 분할

㉦ 분할한 반죽을 식빵틀(21.5 × 10 cm² in top, 19.5 × 8.5 cm² in bottom, 9.5 cm in depth)에 넣고 30℃ 발효조에서 40 분간 발효

㉧ 발효된 반죽은 160℃ 오븐에서 50 분간 굽기

Table 12. Formulation for bread.

Ingredients	Ratio (%)
Flour	100
Sugar	10
Yeast	1.5
Salt	1.5
Butter	6.7
Water	60

▣ 청삼종실을 이용한 음료, 두부 제품 개발

(5) 청삼종실을 이용한 음료 개발

(가) 재료 및 방법

① 재료

본 실험에 사용한 청삼종실은 농촌진흥청 작물과학원 목포시험장에서 육성한 저마약형 청삼을 충남 당진군에서 재배하고 수확한 것을 구입하여 저온저장하면서 사용하였다.

청삼종실의 영양학적 특성을 분석한 결과 단백질 23.46%, 지방 29.02%, 회분 5.98%, 탄수화물 32.66%였다. 무기질은 인이 1,031.04mg%로 가장 함량이 높았고 칼륨 773mg%, 마그네슘 438mg%, 칼슘 137mg%의 순으로 함량이 높았다. 총아미노산 함량은 glutamic acid, arginine, aspartic acid, leucine, serine의 순으로 높았다. 지방산 조성은 linoleic acid가 57.5%로 구성비가 가장 높고 그 다음으로 α -linolenic acid(ω 3)가 17.4%. oleic acid가 12.7%를 차지하였다.

② 실험방법

㉠ 종실 밀크 제조 기술 개발

㉡ 제조공정별 밀크 제조

Fig. 13과 같이 청삼종실을 물에 14~16시간 정도 수침시키고 채반위에 건져 탈수시킨 후 초기 종실의 중량대비 10배의 식용수를 첨가하여 믹서기(MX1050XTS, Waring commercial, U.S.A.)로 마쇄한 것을 가열용기에 담아 가열하여 내용물이 끓기 시작하면

5분간 가열하고 1회용 부직포로 여과하였다(방법 1), 다른 처리군으로는 방법 1에서 마쇄한 것을 부직포로 여과하여 껍질 등을 제거한 다음 90℃에서 5분간 가열하고 1회용 부직포로 다시 2차 여과하여 밀크를 제조하였다(방법 2). 또한, 마쇄된 종실의 블렌칭처리가 밀크에 미치는 영향을 비교하고자 수침한 종실을 끓는 물에 넣어 5분간 열처리한 다음 마쇄한 것을 방법 1의 처리공정을 거쳐 밀크를 제조하였다(방법 3). 마지막으로, 수침한 종실을 끓는 물에 넣어 5분간 열처리한 다음 마쇄한 것을 방법 2의 처리공정을 거쳐 밀크를 제조하였다(방법 4).

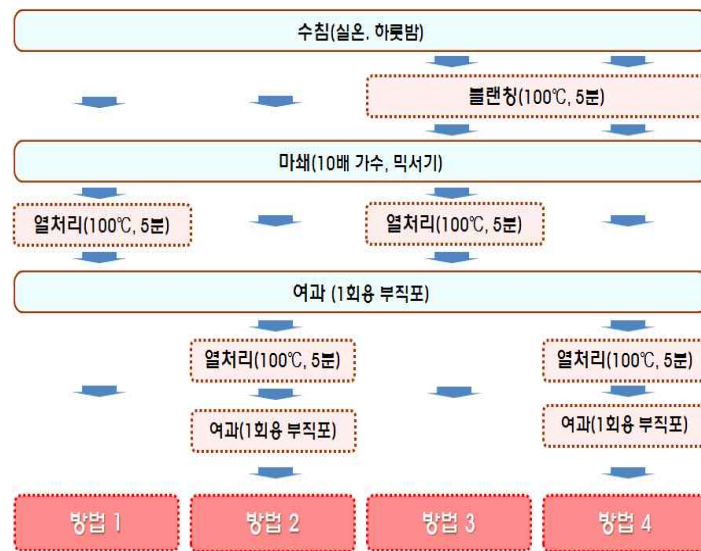


Figure 13. 청삼종실 밀크의 제조 공정도

㉞ 여과조건별 밀크 제조

앞의 실험에서 청삼종실 마쇄물을 1회용 부직포로 여과할 경우 껍질 유래 색소성분과 불용성 고형물의 제거에는 효과적이거나 밀크로 이행되는 단백질 함량이 너무 낮아 종실 밀크제조를 위한 가공공정 검토의 하나로 비가식 부위인 종실 껍질과 불용성고형물 제거를 위해 종실을 마쇄한 다음 여과조건을 달리하여 밀크를 제조하였다(Fig. 14).

즉, 껍질을 함유한 종실을 물에 하룻밤 수침시키고 건져낸 다음 끓는 물에 넣어 3분간 열처리하였다. 열처리한 종실에 중량대비 4배의 정제수를 가하여 믹서기로 3분간 1차 마쇄한 것을 다시 4배의 정제수를 가하여 호모믹서기(Ultra Turrax T-25, USA)를 이용하여 2차 마쇄하였다. 마쇄물은 먼저 60 mesh로 1차 여과한 다음 다시 140mesh(hemp milk 2), 200mesh(hemp milk 3), 270mesh(hemp milk 4), 325mesh(hemp milk 5), 부직포(hemp milk 6)로 각각 2차 여과하여 종실 밀크의 품질을 비교하였다.



Figure 14. 여과메쉬별 종실 밀크의 제조 공정도

㉔ 열처리 및 호모믹싱 처리공정별 밀크 제조

종실 마쇄물을 여과한 다음 발현되는 종실류 고유의 비린내와 꽃내를 제거하고 최종 밀크내의 단백질 이행율을 증가시키기 위한 방안의 하나로 여과 밀크를 대상으로 열처리와 호모믹싱 처리시기를 각기 달리하여 밀크를 제조하였다(Fig. 15). 즉, 앞의 hemp milk 2의 공정에 따라 종실 마쇄물을 60, 140 mesh로 연속여과한 다음 얻은 밀크를 바로 가열하여 끓기 시작하면 3분간 열처리한 후 140 mesh로 여과하여 밀크를 제조하였다(hemp milk 7). 앞서 열처리한 밀크를 다시 호모믹서기(Ultra Turrax T-25)로 2분간 처리하고 여과하여 hemp milk 8을 제조하였다. 한편 다른 처리군으로는 종실 마쇄물을 60, 140mesh로 여과한 후 바로 호모믹서기로 2분간 처리한 다음 열처리하고 여과(hemp milk 9)하였고 또 다른 처리군은 열처리한 것을 다시 호모믹서기로 처리하여 140mesh로 여과하여(hemp milk 10)를 밀크를 제조하였다.

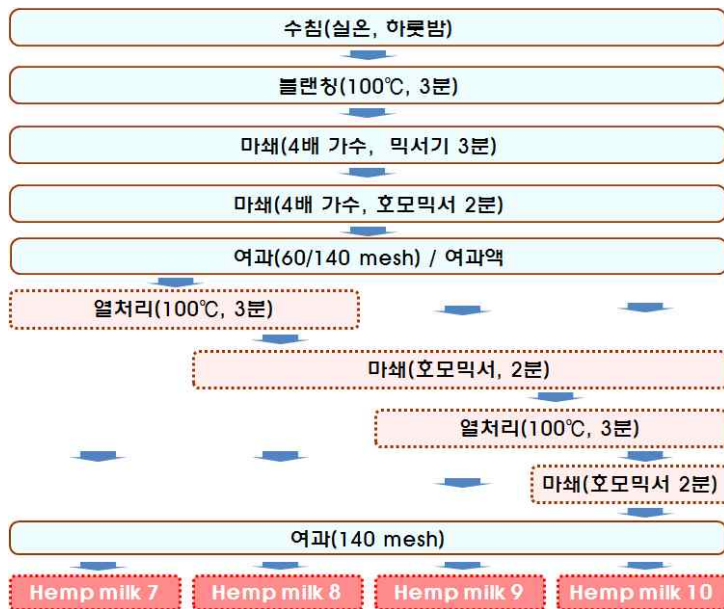


Figure 15. 열처리 및 호모믹서 처리시기를 달리한 종실 밀크의 제조 공정도

④ 효소적 처리공정에 따른 밀크 제조

밀크의 수율, 가용성고형물, 단백질 함량을 높이고자 Fig. 16와 같이 식물조직붕괴효소들을 이용하여 종실 밀크를 제조하였다. 즉, 수침, 열처리한 종실에 4배(초기 종실 중량 대비)의 물을 가하여 믹서기로 마쇄한 것에 다시 2배의 물을 첨가하고 호모믹서기로 처리한 것에 산업용 cytolase(역가 110,000 AVJP/g, 비전바이오), Rapidase press(역가 180,000 AVJP/g, 비전바이오)를 각각 종실 중량대비 100 ppm을 첨가하여 50℃ shaking incubator에서 1시간 반응시켰다. 이후 반응물에 2배의 90℃ 온수를 첨가, 혼합시킨 다음 60, 140mesh로 연속여과 후 호모믹서로 2분간 처리하고 100℃에서 3분간 가열한 것을 다시 호모믹서로 처리하고 140mesh로 여과하여 밀크를 제조하였다.



Figure 16. 효소처리에 의한 종실 밀크의 제조 공정도

⑤ 블랜칭 처리조건에 따른 밀크 제조

종실을 이용한 음료용 밀크를 제조하기 위한 적정 블랜칭 조건을 검토하고자 수침한 종실을 끓는 물에 넣고 물이 끓기 시작하면 3, 5, 7, 9분간 각각 블랜칭 처리 하였다 (Fig. 17). 열처리한 종실에 초기 중량대비 4배의 90~95℃ 온수를 가하여 믹서기로 3분간 1차 마쇄하고 마쇄물에 다시 4배의 90~95℃ 온수를 가하여 호모믹서기(Ultra Turrax T-25)로 2차 마쇄하였다. 종실 마쇄물을 60, 140mesh로 연속 여과한 다음 각각을 가열 용기에 담아 3분씩 열처리하고 호모믹서기로 2분간 처리하여 블랜칭 시간별 밀크를 제조 하였다.



Figure 17. 청삼중실의 블랜칭 시간을 달리한 밀크의 제조 공정도

㉠ 종실 밀크를 이용한 음료 제조 기술 개발

㉠ 균질화 공정에 따른 밀크의 품질특성 분석

종실을 이용하여 제조한 밀크는 다양한 크기의 입자들로 구성되어 있어 이들을 이용한 음료에 앞서 밀크내에 존재하는 고형물들의 음료내 분산을 위해 균질화처리 효과를 검토하였다. 균질화 공정에서 균질기의 적정 압력조건을 설정하고자 종실 밀크를 60%로 희석하고 70°C로 가온한 것을 200, 300, 400bar의 압력으로 조정된 균질기(15MR-8TBA, Gaulin, U.S.A.)에 2회 연속 통과시켜 밀크의 품질특성을 비교하였다.

㉠ 조미·살균처리 공정에 따른 밀크 음료의 품질 특성 분석

종실 밀크를 이용한 음료 제조는 밀크에 Almax 2700(일신유화), Almax 9064(일신유화), SWA-10D(남영화학), P-1570(남영화학), Step SS(남영화학), S570(남영화학), S1670(남영화학)등의 유화제, 당류, 유지 등과 같은 음료용 조미 부재료를 배합하였다. 즉, 당도와 pH 조정을 위해 설탕과 탄산수소나트륨을 각각 3.5%, 0.01% 첨가, 용해하고 해바리가씨유를 1.1%를 첨가한 밀크음료를 70°C로 가온한 다음 400 bar로 조정된 균질기에 2회 연속 통과시켰다. 음료를 음료용 유리병에 충전, 밀봉한 다음 레토르트살균기에서 121°C에 도달하면 20분간 살균하고 냉각시켰다.

㉠ 종실 밀크음료의 안정화 기술 개발

레토르트 살균처리와 저장, 유통 중 종실 밀크음료의 품질 안정화 기술 개발을 위한 실험으로 각종의 유화제(Almax 2,700, Almax 9064, SWA-10D, 자당지방산에스테르 P1570, 자당지방산에스테르 S570, 자당지방산에스테르 S570 등)를 단독 또는 혼합첨가하여 밀크 음료를 제조한 다음 레토르트살균 후 음료의 이화학적 품질특성과 안정도를 측정하였다. 즉, 소량의 물에 조미용 및 유화안정화용 첨가물을 용해시키고 70°C로 가온한

다음 여기에 미리 70℃로 가온시킨 종실 밀크를 60% 첨가하여 70℃를 유지하며 30분간 혼합하였다. 음료를 400bar로 압력을 조정한 균질기에 2회 통과시킨 다음 병 포장하여 121℃에서 20분간 레토르트살균하여 종실 밀크 음료를 제조하였다.

한편 레토르트살균 후 종실 밀크음료의 품질 변화를 분석하여 분산 안정도가 높은 음료 배합비를 선정한 다음 유화제의 첨가농도별 음료를 제조하여 LuMiSizer(L.U.M. GmbH, Germany)와 Turbiscan(Formulaction Smart Scientific Analysis, France)을 이용하여 저장 중 음료의 분산안정성을 예측하였다.

㉔ 종실 밀크음료의 기호도 개선 및 제품 다양화 기술 개발

㉔-1 종실 밀크음료의 향미 개선

밀크음료의 소비층을 어린이에서 젊은 층, 장년층에 이르기까지 다양화하고자 음료의 향미개선을 위해 기본 밀크음료의 배합비에 바닐라의 부드러운 향미와 초코의 달콤한 향미를 부여하기 위해 Sweet Flavor(301443), Vanilla Flavor(301441), Chocolate Flavor(301442), Chocolate Flavor(9415201) 등의 향미제와 sugar syrup, 고과당 등의 감미료의 배합비를 달리하여 밀크음료를 제조하였다. 모든 음료는 배합비에 따라 제조한 다음 음료용 병에 충전, 밀봉하고 레토르트살균 후 관능평가용 시료로 사용하였다.

㉔-2 비타민 강화 종실 밀크음료의 제조

비타민을 강화시킨 밀크음료 개발은 식품첨가물용 비타민 A(retinyl palmitate, BASF), B₂(riboflavin, DSM), B₁₂(cyanocobalamin, BASF), D₃(cholecalciferol, DMS)를 사용하였다. 우선, 일일권장량(Recommended Daily Allowance; RDA) 기준 50~100% 수준에 해당하는 식품첨가물용 비타민(A, B₂, B₁₂, D₃)을 증류수에 용해시킨 다음 관능적 특성을 비교하여 기호도에 영향을 미치지 않는 최대 비타민 첨가량을 설정하였다.

레토르트 살균공정으로 인해 파괴되는 비타민양을 감안한 음료 제조 초기 비타민의 적정 농도를 설정하고자 종실 밀크음료와 동일한 당/산비의 모델용액(당도 7.5°brix, pH 6)을 제조하고 여기에 RDA 일일권장량 기준으로 비타민 A는 50%, 비타민 B₂는 25%, 비타민 B₁₂는 20%, 비타민 D₃는 80%에 해당하는 농도로 첨가하여 병에 포장한 것을 레토르트살균한 다음 음료내 잔존 비타민의 함량을 DART-MS로 분석하였다.

㉕ 청삼종실 밀크 음료의 산업적 생산공정 모델 분석

㉕-1 종실 밀크 제조공정 분석

청삼종실로부터 산업적 음료 제품을 생산함에 있어 주요 공정의 하나인 종실 밀크의 제조공정을 보다 단순화하여 작업 편의성을 부여하기 위해 종실 밀크 제조공정 실험에서 최적공정으로 선정한 공정을 기준으로 Fig. 18과 같이 일부 공정을 변형시켜 블렌칭처리 유무와 마쇄시 첨가되는 물의 온도를 달리하여 밀크를 제조하였다.

실온에서 하룻밤 수침한 종실에 초기 종실 중량대비 총 8배의 정제수 중 먼저 4배의

정제수(또는 90~95℃ 온수)를 가수하여 믹서기로 3분간 마쇄하고 다시 호모믹서로 2분간 마쇄 후 나머지 4배의 정제수(또는 90~95℃ 온수)를 혼합하여 60, 140 mesh로 연속 여과 후 100℃에서 3분간 열처리하고 호모믹서로 3분간 처리하여 ‘공정 1 밀크’와 ‘공정 2 밀크’를 제조하였다. ‘공정 3 밀크’는 수침한 종실을 끓는 물에서 5분간 가열처리한 것에 4배의 90~95℃ 온수를 첨가하여 믹서기로 1차 마쇄하고 다시 호모믹서로 2차 마쇄한 것에 4배의 90~95℃ 온수를 혼합하여 여과, 열처리, 호모믹싱 처리하여 제조하였다.

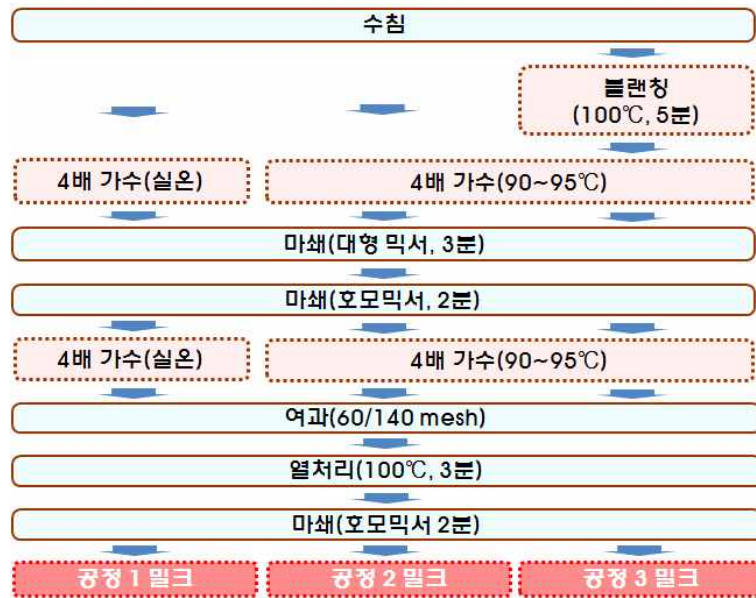


Figure 18. 블랜칭 유무와 정제수 온도를 달리한 밀크 제조 공정도

종실 밀크 제조공정에서 블랜칭 공정 후의 가공공정을 더욱 개선하고자 물과 함께 마쇄된 종실 마쇄물의 여과공정 적용 시기를 달리하여 가공하였다(Fig. 19). 즉, 종실 마쇄물을 60, 140 mesh로 연속 여과한 다음 가열, 호모믹싱하는 공정(공정 3)과 마쇄물을 여과, 가열 후 다시 140mesh로 여과한 다음 호모믹싱하는 공정(공정 4) 및 종실 마쇄물을 먼저 가열한 다음 60, 140mesh로 여과, 호모믹싱하는 공정(공정 5)으로 나누어 밀크를 제조하였다.



Figure 19. 종실 마쇄물의 여과공정 적용 시기를 달리한 밀크 제조 공정도

㉑ 소포제 적용공정 분석

종실 밀크 제조 또는 밀크음료의 살균직후 발생하는 거품을 억제하기 위해 소포제의 적용시기에 따른 효과를 분석하였다. 두부 제조시 사용되는 소포제(TJ-2000, 태진 GNS)와 유음료 제조시 사용되는 소포제(CA-L, 남영화학)를 이용하여 종실 밀크 제조과정 중 마쇄공정에 각각 0.4% 첨가하여 밀크를 제조하거나 또는 기존공정으로 제조한 밀크를 이용한 음료 제조과정 중 조미 배합액에 첨가하여 음료를 제조, 살균 후 품질특성을 비교하였다.

㉒ 종실 밀크음료 살균온도 분석

적정 종실밀크 제조공정과 음료의 분산안정성 및 향미개선 실험에서 최적조건으로 설정된 배합비에 따라 종실 밀크음료를 제조한 다음 병 용기에 일정량씩 충전, 밀봉한 음료를 120, 121, 122, 123, 124°C 각각의 살균온도로 20분간 레토르트살균하고 냉각하여 살균온도별 음료의 품질특성과 미생물적 안전성을 분석하였다.

㉓ 종실밀크 및 음료의 이화학적 품질특성 분석

㉑ 수율

공정을 거친 밀크의 무게를 청삼종실과 가수량을 합한 무게로 나눈 값을 백분율(%)로 환산하였다.

㉒ 고형분

균일하게 교반시킨 종실 밀크 및 음료 5 g을 미리 항량을 구한 용기에 칭량하여 105°C dry oven에서 항량이 되도록 건조하였다. 이때 얻은 고형분을 백분율(%)로 표시

하였다

㉔ 조단백

Auto-kjeldahl(Aauto 1030 analyzer, Kjell Tec., Sweden)을 이용하여 측정하였다. 종실 밀크 및 음료 1 g을 정밀하게 취하여 분해튜브에 분해촉진제(구리성분) 2알과 함께 넣고 황산 15 mL를 첨가하였다. 420°C의 분해장치에서 분해하여 분해액의 색이 투명한 연푸른색이 되면 상온으로 냉각시키고 증류, 적정, 계산과정을 거친 후 조단백 함량을 얻었다.

㉕ 조지방

Soxhlet 추출법에 따라 추출관에 종실밀크 및 음료 10 g을 정량하여 담고, 받는 용기에 무수에테르 약 1/2 용량을 넣어 8시간 추출하였다. 이를 98~100°C의 건조기에 넣고 약 1시간 향량이 될 때까지 건조한 다음 데시케이터에서 식히고 칭량하여 조지방의 양을 산출하였다.

㉖ 색도

종실 밀크와 음료의 색도는 측색색차계(Color QUEST II, HunterLab, U.S.A.)를 이용, L(lightness), a(redness/greenness), b(yellowness/blueness) 값을 측정하였으며, 그 값을 Hunter's L(명도), a(적색도), b(황색도) 및 ΔE 값으로 표시하였다. 이때 표준 백색 판은 L=92.68, a=-0.81, b=0.86의 값을 가진 것을 사용하였다.

㉗ 크림층

공정을 거친 밀크 음료를 내경 8 cm인 투명한 병에 담아 크림 가장 아랫면에서 가장 윗면까지의 높이를 측정하였다.

㉘ 투과율

투과율(%T)은 액상샘플 1 mL을 석영큐벳에 담아 분광광도계(DU650, Beckman, U.S.A.)를 이용하여 660 nm에서 측정한 값을 이용하였다.

㉙ 침전물량

50 mL 메스실린더에 종실밀크 30 mL을 정확히 취하고 4°C에서 16시간 방치한 뒤 침전되는 침전층의 부피를 측정하였다. 침전물량은 침전물의 부피를 종실밀크 전체 부피로 나누어 그 값을 백분율(%)로 나타내었다.

㉚ 입도분포

Particle size analyzer(1064, CILAS, France)를 이용하여 입도분포를 측정하였다. 종실 밀크는 vortexer를 이용하여 1분간 분산시킨 다음 5회 반복하여 입자를 측정하였다. 입자의 크기는 체적의 크기에 따른 입도분포도 d(0.1), d(0.5), d(0.9)의 값으로 측정하였

으며, 이때 d(0.1), d(0.5), d(0.9)는 각각 입자 분포 곡선에서 시료 부피 10%, 50%, 90% 일 때의 입자 크기를 의미한다.

① 입자 관찰

중질 밀크와 음료 시료에 10배의 benzene을 가해 시료에 함유된 수분을 증발시킨 뒤 위상차현미경(Olympus, U.S.A)을 이용해 400배율로 확대하여 관찰하였다.

② 탄닌

Folin-Denis법에 따라 시료 및 표준품(tannic acid, sigma)을 반응시킨 후 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 적정 유효수치 범위에 들어오도록 중질밀크를 희석하여 1 mL을 취하고 Folin reagent(sigma) 시약 1 mL과 10% Na₂CO₃ 용액 1 mL을 첨가하여 냉암소에서 1 시간 반응 시킨 뒤 분광광도계를 이용해 760 nm에서 흡광도 값을 측정하였다. 이때 동일한 방법으로 탄닌(sigma) 표준품을 10~50 µg의 농도로 희석하여 나온 값으로 표준곡선을 그려 수식을 얻었다. 이 수식에 청삼밀크와 음료를 반응시켜 나온 흡광도 값을 대입하여 그 함량을 구하고 3 회 반복하여 평균값을 사용하였다.

③ 분산안정성

청삼중질 밀크음료의 저장 중 분산상태의 입도 특성은 LUMiSizer(L.U.M. GmbH, Germany)를 이용하여 조사하였다. 중질 밀크 1.8 mL을 20℃에서 3000rpm의 회전속도로 10초간의 분석 간격으로 총 3,600초 동안 프로파일을 측정하였으며, 프로파일은 순차적으로 적색으로부터 녹색으로 나타내며, 전송된 프로파일의 변화로 분산안정성과 demixing 현상 또는 불안정성을 분석하였다. 모든 실험은 최소 3반복으로 이루어졌다.

음료의 제조 및 저장기간에 따른 안정화 측정을 위해 Turbiscan(Formulation Smart Scientific Analysis, France)을 사용하였다. 중질밀크 1 mL을 전용 cell에 담아 매 40 µm 간격으로 scanning하여 분산상인 입자의 크기와 분산상과 연속상의 부피분율에 따라 후방산란된 빛의 flux(%)를 동시에 측정하였다.

④ 점도

음료 50 mL을 canister(용기)에 담고 water bath에서 10분간 온도를 25℃로 조정하였다. 시료를 포함한 canister에 점도계(Rapid visco-analyzer-3D, Newport, Australia)의 stirrer를 담그고 스피들 회전속도 60 rpm에서 측정하였다.

⑤ 비타민

비타민 A, B₂, B₁₂, D₃ 표준물질을 탈이온화한 증류수로 5단계 희석하여 측정 후 정량곡선으로 이용하였다. 비타민 분석을 위한 시료는 A, B₂, B₁₂, D₃를 각각 0.5, 0.2, 10, 5 mg/mL의 농도로 증류수에 희석하여 이를 시험용액으로 하여 JMS-T100TD와 결합된 DART 이온소스(Ion sense, Japan)를 이용하여 positive ion mode에서 Table 11의 조건으로 분석하였다.

Table13. 비타민 분석을 위한 DART-MS 기기 분석 조건

Needle voltage : 3200 V	Fing lens voltage : 5 V
Electrode 1,2 voltage : 100 V	Helium flow : 3 L/min
The first orifice lens : 15 V	Temperature : 250℃

㉔ 당도

Vortexter로 1분간 혼합한 음료 1 mL을 취해 hand refractometer(ATAGO, N-1E, Japan)를 사용하여 측정하였다.

㉕ 미생물

식품공전 10.일반시험법 내 3.5.3 내열성세균수(세균아포수)의 방법을 적용하였다. 레토르트 살균을 거친 시험용액 1 mL와 각 10배 단계 희석액 1 mL를 무균적을 취해 영양 배지(nutrient agar)에 접종한 후 55℃에서 48시간 배양한 후 즉시 집락 계산기를 사용하여 생성된 집락수를 계산하였다.

㉖ 기호도 평가 및 통계처리

종실 밀크와 음료에 대한 기호도 평가는 한국식품연구원에 재직중인 30명의 전문 패널로 구성하여 쓴맛, 짠맛, 고소한 맛, 색상, 향 및 종합적 기호도의 평가항목에 대해 9점 기호도척도법으로 평가하였다. 모든 실험은 3회 반복하여 평균치를 구하였으며, 실험 결과는 분산분석하여 Duncan's multiple range test로 시료간의 유의적 차이($p < 0.05$)를 검정하였다.

(나) 연구수행 결과 및 고찰

① 종실 밀크 제조 기술 개발

㉑ 제조공정에 따른 종실밀크의 품질특성

청삼 종실을 이용한 음료용 밀크 제조 공정에 있어서 원료 종실에 대한 열처리공정 적용유무와 종실 마쇄물의 열처리시기 등 제조공정에 따른 밀크의 품질특성을 비교하였다(Table 14). 방법 1~4의 제조공정을 거친 밀크의 고형분 함량은 종실을 열처리한 다음 마쇄하는 방법 3, 4 시료가 2.27, 2.24%로 높았고 종실을 열처리하지 않고 바로 마쇄한 후 부직포로 2회 여과한 방법 2 시료가 0.98%로 처리군 중 가장 낮았다. 그러나 종실에서 밀크로 이행되는 조단백 함량은 제조공정간 거의 차이가 없었고 함량이 0.31~0.38%로 낮았다.

색상 특성을 분석한 결과 백색도(L-value)는 밀크내 고형분 함량이 가장 낮은 방법 2가 26.18로 가장 높은 반면 종실을 열처리한 다음 1회 여과한 방법 3이 2.28로 가장 낮

았다. 황색도(b-value)는 방법 1, 2가 각각 12.40, 14.72로 방법 3, 4에 비해 높았고 적색도(a-value)는 방법 2로 제조한 밀크가 0.61로 처리군 중 가장 낮았고, 수침한 종실에 열처리공정을 적용하는 방법 3, 4는 여과횟수에 따른 차이가 없었다. 이들 밀크의 관능적 특성을 비교한 결과 방법 1은 짙은맛, 아린맛이 강한 반면 방법 4는 약간 구수한 향미가 발현되어 음료용 종실 밀크 제조시 수침한 종실을 끓는 물에서 블랜칭처리하고 마쇄, 여과하여 껍질을 제거한 여과액을 열처리하는 방법 4 공정이 기호적 측면에서 우수하였다.

Table 14. 제조공정을 달리한 종실 밀크의 품질특성

처리군	고형분(%)	조단백(%)	색도		
			L-value	a-value	b-value
방법 1	1.68	0.35	8.25	7.37	12.40
방법 2	0.98	0.38	26.18	0.61	14.72
방법 3	2.27	0.31	2.28	3.88	3.75
방법 4	2.24	0.31	4.27	3.74	6.55

방법 1 : 종실을 마쇄, 가열, 여과한 밀크

방법 2 : 종실을 마쇄, 여과 후 가열하고 다시 여과한 밀크

방법 3 : 블랜칭한 종실을 마쇄, 가열, 여과한 밀크

방법 4 : 블랜칭한 종실을 마쇄, 여과 후 가열하고 다시 여과한 밀크

Fig. 20은 방법 1~4의 공정으로 제조한 밀크를 음료용 병에 포장한 다음 121℃에서 20분간 레토르트살균처리한 음료의 성상을 나타낸 결과이다. 방법 1로 제조한 밀크의 경우 살균 후 상층부의 물층과 하층부의 침전물로 확연히 나뉘 가라앉았으며, 방법 2의 결과는 방법 1에 비해 약한 정도의 층분리가 발생하였다. 그러나 수침 청삼을 끓는 물에서 블랜칭처리 후 가공한 방법 3, 4의 밀크는 살균 후 확연한 층분리는 일어나지 않았다. 결과적으로 청삼 종실의 블랜칭 전처리를 수행하지 않은 제조 방법은 살균 후 밀크의 층분리를 수반함을 알 수 있었다.



Figure 20. 전처리방법에 따른 종실 밀크의 레토르트살균 후 성상

㉠ 여과조건에 따른 종실밀크의 품질특성

앞서 청삼종실로부터 밀크를 제조함에 있어 방법 1~4의 과정 중 종실 마쇄물을 1회 용 부직포로 여과할 경우 껍질 유래 색소성분과 불용성 고형물의 제거에는 효과적이거나 밀크로 이행되는 단백질 함량이 너무 낮은 것으로 나타났다. 따라서 본 실험에서는 종실 밀크제조를 위한 가공공정 검토의 하나로 종실 마쇄물로부터 비가식 부위인 껍질과 불용성고형물 제거를 위해 종실을 마쇄한 다음 여과시 메쉬입자를 달리하여 밀크를 제조하였다.

수침시킨 종실을 100℃ 끓는 물에 넣어 3분간 열처리하고 종실 중량대비 4배의 정제수를 가하여 믹서기로 3분간 1차 마쇄한 것을 다시 4배의 정제수를 가하여 호모믹서기(Ultra Turrax T-25)를 이용하여 2차 마쇄하였다. 이들 밀크를 공통적으로 60 mesh로 1차 여과 후 다시 140 mesh(hemp milk 2), 200mesh(hemp milk 3), 270mesh(hemp milk 4), 325 mesh(hemp milk 5)로 각각 2차 여과하여 밀크의 품질특성을 비교하였다.

여과시 메쉬사이즈를 달리하여 얻은 종실 밀크를 일정량씩 튜브에 담아 일정시간 정치시킨 결과 Fig. 21에서 보는바와 같이 튜브 하단부에 껍질에서 이행된 색소성분을 함유하는 침전물이 형성되었다. 그러나 불용성고형분으로 구성되는 침전층의 높이는 2차 여과시 적용된 메쉬의 입자가 미세한 것일수록 낮았으나 140 mesh 이상에서는 큰 차이가 없었다.

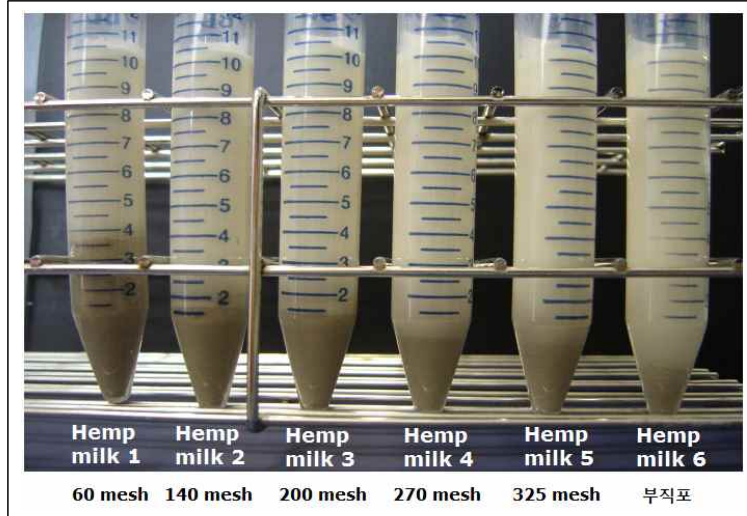


Figure 21. 여과메쉬별 종실 밀크의 성상

Hemp milk 1 : 블렌칭한 종실을 마쇄, 60 mesh로 여과한 밀크

Hemp milk 2 ~6 : hemp milk 1을 140, 200, 270, 325mesh, 부직포로 각각 2차 여과한 밀크

이들 밀크의 품질특성을 분석한 Table 13의 결과를 보면 종실에서 밀크로 이행되는 고형분 함량은 60 mesh로만 여과한 hemp milk 1이 6.29%로 가장 높았으나 이것을 다시 140~325 mesh로 각각 2차 여과과정을 거칠 경우 밀크내 고형분 함량은 5.47~5.65%로 여과시 적용되는 메쉬 입자에 따른 차이는 없는 것으로 나타났다. 1회용 부직포를 사용하여 여과처리한 hemp milk 6은 3.28%로 고형분의 함량이 가장 낮았다. 이들 밀크를 정지할 경우 형성되는 침전물의 높이를 측정한 결과 여과시 메쉬 입자가 미세할수록 감소하였다. 종실 원료에서 밀크로 이행된 조단백의 함량에 있어서도 140 mesh 이상부터는 차이가 없었으나 1회용 부직포로 여과한 밀크는 0.63%로 다른 것에 비해 1/3정도였다. 밀크의 수율은 60 mesh만을 통과시킬 경우 70%정도였고 이것을 다시 140, 200, 270, 325mesh로 2차 여과시켜 60% mesh 여과액을 100%로 기준할 경우 83.1, 82.5, 80.6, 77.3%로 감소하였다.

한편 본 결과에서는 나타내지 않았으나 밀크의 관능평가 결과 60 mesh만을 통과시킨 밀크는 종실의 껍질에서 유래되는 불용성 물질의 함량이 많을 뿐 아니라 쓴맛, 떫은맛, 아린맛이 강하였고 140 mesh 처리군에서는 이러한 맛이 약해지는 것으로 나타났고 270 mesh 부터는 밀크농도가 너무 묽다는 느낌이 들었다.

Table 15. 여과메쉬별 종실 밀크의 품질특성

분석 항목	Hemp milk 1 (60mesh)	Hemp milk 2 (140mesh)	Hemp milk 3 (200mesh)	Hemp milk 4 (270mesh)	Hemp milk 5 (325mesh)	Hemp milk 6 (부직포)
고형분(%)	6.29	5.62	5.65	5.47	5.64	3.28
침전물양(%)	47.5	31.2	27.5	25.2	23.8	15.3
조단백(%)	2.04	1.68	1.76	1.65	1.73	0.63
수율(%)	69.9	83.1	82.5	80.6	77.3	80.8
색도	L-value	42.02	46.81	47.09	48.80	57.57
	b-value	17.16	13.66	13.50	12.22	5.92

Hemp milk 1 : 블랜칭한 종실을 마쇄, 60 mesh로 여과한 밀크

Hemp milk 2 ~6 : hemp milk 1을 140, 200, 270, 325mesh, 부직포로 각각 2차 여과한 밀크

㉔ 열처리 및 호모믹싱 처리공정에 따른 종실밀크의 품질특성

청삼종실 밀크의 경우 종실류 특유의 비린내와 풋내가 발현되어 이들 냄새를 제거함과 동시에 밀크로의 단백질 이행률을 높이는 방안의 하나로 수침, 블랜칭, 마쇄, 여과한 밀크를 가열하여 끓기 시작하면 3분간 열처리 후 140 mesh로 여과한 것과, 열처리한 것을 다시 호모믹서로 처리하고 여과한 것으로 구분하였다. 또 다른 처리군은 수침, 블랜칭, 마쇄, 여과한 밀크를 먼저 호모믹서로 처리한 다음 가열하여 끓기 시작하면 3분간 열처리 후 140 mesh로 여과한 것과, 호모믹싱, 열처리 후 다시 호모믹싱처리 후 여과한 것으로 구분하여 밀크의 품질특성을 분석하였다.

Fig. 22와 Table 16에서 알 수 있듯이 밀크내 고형분 함량은 종실 마쇄물을 60, 140 mesh로 연속여과 후 바로 가열처리하여 여과한 hemp milk 7이 6.29%로 가장 높았고 다른 처리군은 차이가 없었다. 그러나 이들 밀크를 정치할 경우 생성되는 침전물 층의 높이는 hemp milk 10이 가장 높았다. 밀크 수율과 조단백 함량은 처리군에 따라 차이를 보여 가열처리한 밀크를 호모믹서로 2차 처리한 hemp milk 8, 10이 각각 53.4, 55.9%, 1.79, 2.01%로 높았다. 이는 초기 청삼 종실을 끓는 물에서 블랜칭처리하고 마쇄, 60, 140mesh로 연속 여과하여 얻은 밀크를 다시 가열처리할 경우 밀크내의 일부 단백질이 변성을 일으켜 큰 입자들이 생성되나 다음의 호모믹싱 처리공정에서 다시 미세입자화되어 140 mesh를 통과함에 따라 발생한 결과로 판단된다. 밀크 색도에 있어서도 열처리 공정 후 호모믹싱 처리공정을 적용하지 않은 hemp milk 7, 9에 비해 호모믹싱 공정을 적용한 hemp milk 8, 10이 백색도가 15.65, 14.33으로 낮고 황색도는 16.90, 16.78로 높았다.

따라서 음료용 밀크 제조공정에서 원료 종실을 블랜칭, 마쇄, 여과한 후 호모믹싱 처리공정의 추가는 밀크내 단백질의 함량을 높일 수 있는 공정의 하나임을 알 수 있었고 특히, 호모믹싱 처리공정의 적용 시기는 종실 밀크를 열처리한 다음 적용(hemp milk 10) 하는 것이 밀크의 수율과 조단백의 함량 상승 측면에서 유리한 것으로 판단되었다.

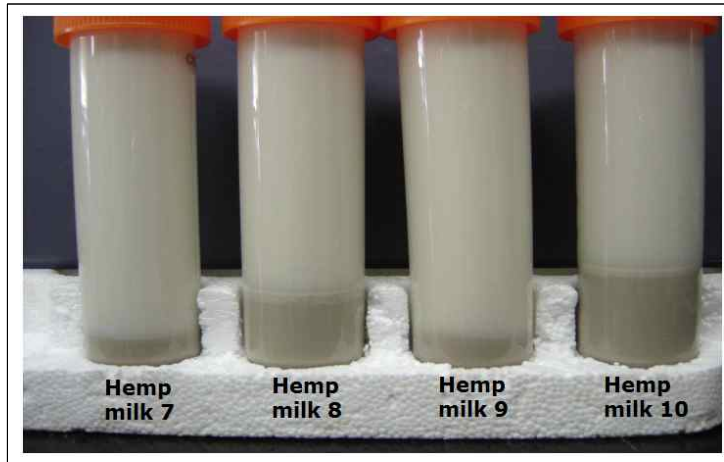


Figure 22. 열처리, 호모믹서 처리공정을 달리한 종실 밀크의 성상

Table 16. 열처리, 호모믹서 처리공정을 달리한 종실 밀크의 품질특성

분석 항목		Hemp milk 7	Hemp milk 8	Hemp milk 9	Hemp milk 10
고형분(%)		6.29	5.62	5.65	5.47
침전물양(cm)		21	31	20	35
조단백(%)		0.73	1.79	0.66	2.01
수율(%)		47.74	53.4	48.5	55.9
색도	L-value	27.87	15.65	28.03	14.33
	b-value	12.55	16.90	12.47	16.78

Hemp milk 7 : 블랜칭한 종실을 마쇄, 여과하고 100℃, 3분간 가열 후 여과한 밀크

Hemp milk 8 : 블랜칭한 종실을 마쇄, 여과, 100℃, 3분간 가열 후 호모믹싱처리, 여과한 밀크

Hemp milk 9 : 블랜칭한 종실을 마쇄, 여과하고 호모믹싱처리 후 100℃, 3분간 가열 후 여과한 밀크

Hemp milk 10 : 블랜칭한 종실을 마쇄, 여과, 호모믹싱, 100℃, 3분간 가열, 2차 호모믹싱처리 후 여과한 밀크

종실 밀크내의 입자들의 입도분포도와 입자크기를 측정된 결과는 Fig. 23, Table 17와 같다. 호모믹싱 처리공정의 적용 시기에 따라 입자분포도에 있어서도 차이를 보여 밀크의 이화학적 품질특성 분석 결과와 비슷하게 열처리 공정 후 호모믹싱 처리공정을 적용하지 않은 hemp milk 7, 9가 비슷하고 호모믹싱 공정을 적용한 hemp milk 8, 10이 비슷한 입도분포도를 나타내었다. 또한 hemp milk 8, 10은 입자 분포도에 있어서도 보다 중심부에 모여 좁은 분포도를 나타내었다. 평균 입도에 있어서도 열처리 후 호모믹싱처리한 밀크가 각각 9.45, 9.55 μm 으로 열처리 공정 후 호모믹싱 처리공정을 적용하지 않은 시료의 12.63~12.78 μm 보다 입자가 작은 것으로 나타났다.

이상의 결과로부터 밀크내 조단백, 고형분 함량은 블랜칭한 종실을 마쇄, 여과하여 얻은 밀크를 가열하고 호모믹서기로 분쇄하는 공정을 적용함으로써 높아지게 되며 이는 호모믹서에 의한 분쇄공정에 의해 밀크를 열처리할 경우 발생하는 변성단백질 입자가 다시 작은 입자들로 분쇄되어 여과시 밀크로 이행됨에 따라 그 함량이 높아짐을 입도분포도 측정 결과를 통하여 확인하였다.

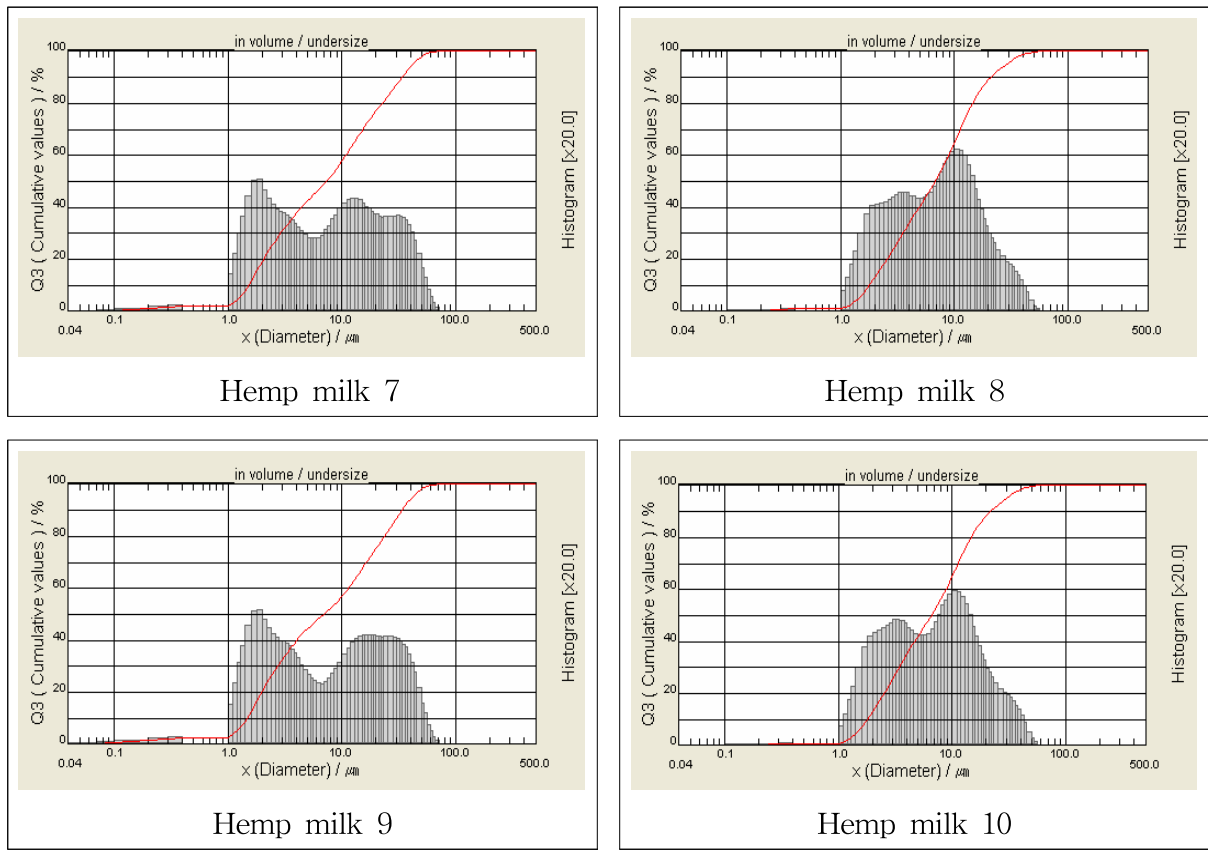


Figure 23. 열처리, 호모믹서 처리과정을 달리한 종실 밀크의 입도분포도

Table 17. 열처리, 호모믹서 처리과정을 달리한 종실 밀크의 입도크기

Sample	Particle size(μm)			
	Diameter at 10%	Diameter at 50%	Diameter at 90%	Mean Diameter
Hemp milk 7	1.51	7.31	33.58	12.63
Hemp milk 8	1.79	6.79	20.88	9.46
Hemp milk 9	1.46	6.95	33.70	12.78
Hemp milk 10	1.80	6.59	21.61	9.55

Hemp milk 7 : 블렌칭한 종실을 마쇄, 여과하고 100℃, 3분간 가열 후 여과한 밀크

Hemp milk 8 : 블렌칭한 종실을 마쇄, 여과, 100℃, 3분간 가열 후 호모믹싱처리, 여과한 밀크

Hemp milk 9 : 블렌칭한 종실을 마쇄, 여과하고 호모믹싱처리 후 100℃, 3분간 가열 후 여과한 밀크

Hemp milk 10 : 블렌칭한 종실을 마쇄, 여과, 호모믹싱, 100℃, 3분간 가열, 2차 호모믹싱처리 후 여과한 밀크

㉔ 효소적 처리공정에 따른 종실밀크의 품질특성

종실로부터 밀크 수율, 고형분과 단백질 함량을 높이기 위한 방안으로 식물조직붕괴 효소를 이용하여 밀크를 제조하였다. 즉, 수침 종실을 블렌칭하고 90℃ 온수를 첨가 마쇄, 호모믹서처리한 것에 효소를 첨가하여 50℃, 1시간 반응 후 여과, 가열, 호모믹서처리하여 고형분, 조단백, 색도 및 입도크기를 분석하였다(Table 18, 19). 밀크의 색도 중 백색도는 대조군이 11.61로 가장 높고 cytolase 처리군은 8.81로 가장 낮으며 적색도는 5.43으로 가장 높아 효소처리로 인해 껍질 유래 색소성분이 밀크로 더 많이 이행됨을 알 수 있었다. 그러나 밀크내 고형물, 조단백 함량은 대조군과 효소처리군 사이에 거의 차이가 없는 것으로 나타나 종실 마쇄물에 식물조직분해효소를 적용, 더 많은 가용성 성분을 밀크로 이행하는 처리공정은 효과가 없음을 알 수 있었다.

한편 효소처리하여 제조한 종실 밀크의 입도는 대조군에 비해 유의적인 차이는 없었으나 평균입자가 약간 더 큰 것으로 나타났다. 또한 본 결과에는 나타내지 않았으나 단백질분해효소인 Protex(역가 560,000DU/g, 비전바이오)로 처리한 밀크의 품질 특성을 비교한 결과 고형분, 조단백 함량은 대조군에 비해 약간 상승하나 입도분도도와 평균입경에 있어서는 차이가 없었다.

Table 18. 효소적 처리공정에 따른 종실 밀크의 품질특성

분석 항목		대조군	Rapidase press	Cytolase
고형분 (%)		7.43	7.48	7.98
조단백 (%)		2.21	2.21	2.49
색도	L-value	11.61	10.71	8.81
	a-value	4.95	5.12	5.43
	b-value	14.13	13.47	11.44

Table 19. 효소적 처리공정에 따른 종실 밀크의 입도크기

Sample	Partical size(μm)			
	Diameter at 10%	Diameter at 50%	Diameter at 90%	Mean Diameter
대조군	1.69	7.18	24.98	10.62
Rapidase press	1.73	8.32	29.79	12.45
Cytolase	1.69	7.45	29.58	11.9

㊦ 블랜칭 처리조건에 따른 종실밀크의 품질특성

청삼 종실로부터 음료용 밀크 제조를 위한 가공공정을 검토한 결과 밀크 수율, 단백질 함량을 높이고 이미, 이취를 최소화하기 위한 공정으로 수침한 종실을 끓는 물에서 블랜칭처리하고 초기 종실 중량대비 8배의 정제수와 함께 마쇄, 여과한 것을 호모믹서처리하고 다시 여과하여 제조한 밀크가 적합한 것으로 나타났다. 따라서 본 실험에서는 종실밀크의 품질에 큰 영향을 미치는 것으로 나타난 블랜칭 공정을 확립하고자 블랜칭시간(3, 5, 7, 9분)을 달리한 종실로 밀크를 제조하여 품질특성을 분석하였다.

블랜칭시간(3, 5, 7, 9분)을 달리한 종실로 제조한 밀크를 튜브에 담아 방치한 결과 Fig. 24에서 볼 수 있는 바와 같이 하단에 형성되는 침전물의 양이 블랜칭 시간이 길수록 많아졌다. 이러한 현상은 종실의 열처리 시간이 길어짐에 따라 마쇄 후 여과공정에서 종실의 껍질물질이 밀크로 더 많이 이행되어 발생하는 현상으로 생각된다. 이러한 껍질물질의 유입이 많아지게 되면 관능적으로 쓴맛이나 떼은맛도 전이되어 맛에 영향을 줄 수 있기 때문에 선행결과를 토대로 블랜칭 시간을 조정하였다.

또한 본 결과에는 나타내지 않았으나 블랜칭 시간을 달리한 종실로 밀크를 제조할 경우 블랜칭시간이 길어질수록 1차 여과한 밀크를 100℃에서 3분간 가열처리할 경우 밀크내 영감현상이 줄어드는 반면 밀크의 색은 더 어두워졌다. 100℃에서 3분간 가열처리한 밀크를 2차 140 mesh로 여과한 결과 3분 블랜칭 처리한 시료의 밀크는 메쉬를 통과하지 못하는 잔존박의 양이 많고 이들 잔존박의 외형에 있어서도 다른 시료에 비해 더

거친 편이었다. 그러나 2차 여과시 140 mesh를 통과하지 못하는 잔존박의 양은 5분 블랜칭 처리군부터 9분 블랜칭 처리군으로 갈수록 조금씩 줄어들면서 2차 여과가 더 용이하였다.

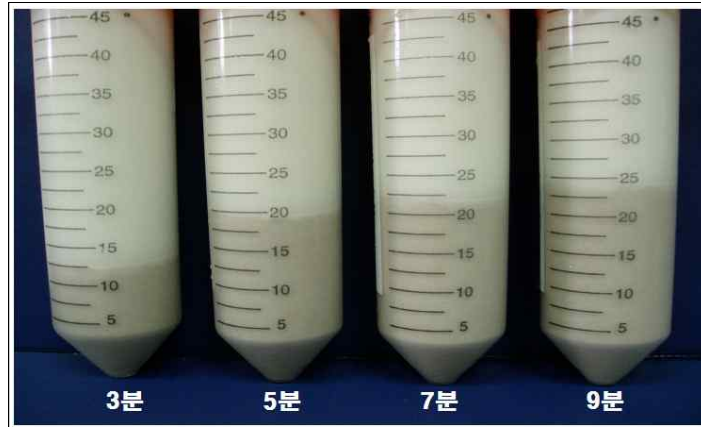


Figure 24. 블랜칭 시간을 달리한 종실로 제조한 밀크의 성상

블랜칭 시간을 달리한 청삼종실로 제조한 밀크의 품질특성을 측정한 결과는 Table 20과 같다. 색도 중 백색도는 블랜칭 시간이 길어질수록 감소하여 3분 블랜칭 처리한 종실로 제조한 밀크가 55.62, 5분 처리군이 44.97, 9분 처리군이 44.99였고 7분 처리군부터는 실험군간 차이가 없었다. 적색도와 황색도는 블랜칭 시간이 길수록 증가하는 경향을 보였고 7분 처리군부터는 차이가 없었다. 이는 연구에서 사용한 청삼종실의 경우 비가식 부위인 껍질부위를 탈피하지 않고 전체를 밀크용 원료로 사용함에 따라 Fig. 24에서 나타난 바와 같이 껍질부위의 색소물질은 블랜칭 시간이 길어질수록 마쇄공정에서 더 많이 용출되어 밀크로 이행된 것으로 판단된다. 밀크 수율의 경우 3분 처리한 종실 시료의 경우 57.5%였으나 5분 처리한 종실은 67.0%로 약 10%정도 수율이 증가하였다. 그러나 5분 이상 블랜칭 처리한 종실부터는 수율이 약간씩 증가하나 그 차이가 2% 미만으로 나타났다. 밀크내의 조단백 함량 측정 결과에서도 3분 블랜칭 처리한 종실로 제조한 밀크가 0.81%로 가장 낮았고 5분 처리한 시료는 1.82%로 증가하여 전반적으로 블랜칭 시간이 길수록 종실 조직내의 단백질이 밀크로 더 많이 이행되는 것으로 나타났다. 고형분 함량에 있어서도 3분 블랜칭한 것의 6.61%보다 9분 처리한 것이 9.27%로 더 높았다. 조지방 함량 또한 3분 처리군이 2.80%, 5분 처리군이 3.05%, 7분 처리군이 3.35%, 9분 처리군이 3.40%로 블랜칭 시간이 길어짐에 따라 밀크내의 조지방 함량이 유의적인 증가를 보였다. 탄닌을 측정한 결과 3분 처리군이 88.8 mg/L, 5분은 115.6 mg/L, 7분은 126.7 mg/L, 9분 처리군은 135.3 mg/L로 증가하였는데 앞서 블랜칭 시간이 길어질수록 밀크 제조시 종실 껍질의 색소물질들이 밀크로 더 많이 이행되어 나타난 결과로 판단된다.

Table 20. 블랜칭 시간을 달리한 종실로 제조한 밀크의 품질특성

분석항목		블랜칭 시간			
		3분	5분	7분	9분
색도	L-value	60.65	44.97	42.37	42.87
	a-value	1.02	1.70	2.08	2.06
	b-value	7.79	14.39	15.60	15.40
조단백(%)		0.81	1.82	2.02	2.03
고형분(%)		6.61	8.77	9.38	9.27
수율(%)		57.5	67.0	68.8	70.2
탄닌(mg/L)		88.8±3.8	115.6±5.2	126.7±3.6	135.3±4.3
조지방(%)		2.80±0.04	3.05±0.01	3.35±0.18	3.40±0.14

블랜칭 시간을 달리한 종실로 제조한 밀크의 입자 분포패턴을 분석한 결과는 Fig. 25와 같다. 종실 밀크는 0.3 μm , 2 μm , 11~13 μm 과 32~45 μm 범위에서 정점을 보이는 4개의 피크를 형성하는 패턴을 나타내었다. 그러나 종실의 블랜칭 처리시간에 따라 밀크내 구성 입자크기 분포도 패턴에 차이를 보였다. 즉, 입자 크기가 큰 4번째 피크의 경우 3분 처리군은 40~45 μm 범위에서 peak 정점을 보였으나 블랜칭 시간이 길어질수록 밀크내 입자 크기가 작아지면서 9분 처리군은 30~32 μm 범위에서 피크의 정점을 보였다. 또한 이들 피크를 나타내는 입자 분포도의 범위가 줄어들면서 피크 높이는 높아졌고 3번째 피크는 반대로 블랜칭 시간이 길수록 피크 정점이 완만해지면서 피크 높이도 낮아졌다.

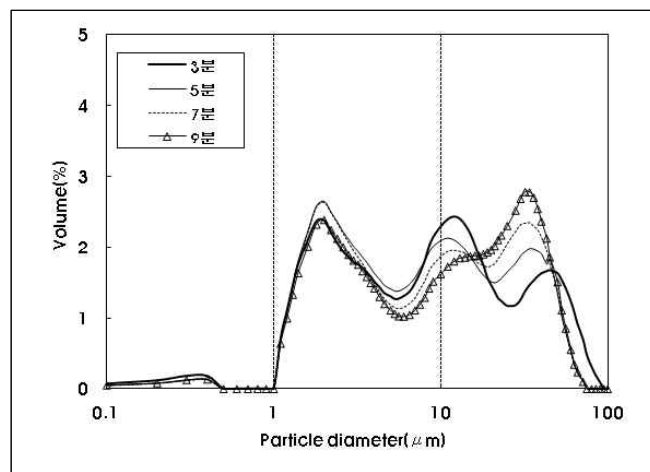


Figure 25. 블랜칭 시간을 달리한 종실로 제조한 밀크의 입자크기 분포곡선

밀크내의 입자크기를 5 μm 이하, 5~10 μm , 10~30 μm , 30~50 μm , 50 μm 이상의 5

구간으로 나누어 그들의 구성비를 비교한 결과는 Table 19와 같다. 블랜칭 시간별로 보면 50 μm 이상의 입자 분획은 3분 처리군의 7.99%에서 5분 처리군은 3.20%로 감소하였다. 반면 30~50 μm 이하, 10~30 μm 이하 범위의 입자분획은 3분 처리군이 각각 12.59%, 28.03%였으나 블랜칭 시간이 길어질수록 이들 분획의 부피가 증가하여 9분 처리군의 경우 18.66%, 32.46%였다. 그러나 5~10 μm 이하 범위의 입자분획은 3분 처리군의 16.64%에서 9분 처리군의 12.31%로 종실의 블랜칭 시간이 길어질수록 약간씩 감소하였다. 결과적으로 밀크 제조시 종실의 블랜칭공정은 종실 조직을 부드럽게 하고 조직내 단백질의 변성에 영향을 미쳐 열처리 시간이 길수록 마쇄공정에서 조직에서 밀크로 이행되는 가용성물질의 함량을 증가시킴과 동시에 밀크로 이행되는 입자 중 50 μm 이상의 입자를 더 작은 입자로 파쇄시키는 역할을 하는 것으로 판단되었다.

종실의 블랜칭 시간이 길어질수록 밀크 수율의 증가와 함께 밀크내의 지방, 단백질 등의 함량도 증가함에 따라 그 다음 공정인 가열공정에서 이들 성분과 밀크에 함유되어 있는 식물세포조직과 같은 고형물이 상호반응에 의한 응집, 복합체를 형성하여 원래의 입도사이즈보다 커지면서 Fig. 25의 결과와 같이 11~13 μm 범위의 peak는 감소하고 30 μm 의 범위의 peak는 높아진 것으로 추측된다.

밀크내 입자는 small particles와 large particles로 구분되고 small particles는 물보다 밀집도가 낮은 범위로서 단일 fat globules이거나 emulsion oil droplets이고, large particles는 물보다 밀집도가 큰 불용성의 단백질이나 전분, 섬유조직이나 식물세포조직이며 열처리에 의해 particles size가 달라진다고 하였다. 또한 탄수화물을 함유하고 있는 전분은 열처리에 의해 팽윤현상이 일어나 입자크기가 증가하며, 탄수화물과 단백질의 응집현상 또는 단백질과 지방의 복합체 형성에 의해서 granules의 크기가 커지고 분포도가 증가한다고 보고하였다.

Table 21. 블랜칭 시간을 달리한 종실로 제조한 밀크내 입자크기 구간별 구성비

Blanching 시간	Particle size range(μm)					Mean diameter(μm)
	<5	5~10	10~30	30~50	50<	
3분	34.75	16.64	28.03	12.59	7.99	14.53
5분	37.48	16.77	28.09	14.66	3.00	12.85
7분	35.98	14.16	30.51	16.40	2.95	13.77
9분	33.36	12.32	32.46	18.66	3.20	14.95

블랜칭 시간을 달리한 청삼종실로 제조한 밀크의 기호도를 조사한 결과는 Table 22과 같다. 쓴맛의 강도는 처리군간에 유의적인 차이는 없었으나 7분, 9분 블랜칭 처리한 시료가 3분, 5분 시료에 비해 높은 것으로 나타났다. 떫은맛은 처리군간에 유의적인 차이를 보였으며 5분 처리군이 가장 낮고 9분 처리군이 가장 높았다. 밀크의 고소한 맛과 진한 정도는 블랜칭 시간이 길수록 강도가 유의적으로 높았으나 7, 9분 처리군은 차이가

없었다. 밀크의 종합적 기호도는 처리군간에 유의적인 차이를 보여 5분 처리군이 가장 좋은 기호도를 나타낸 반면 3분 처리군이 가장 낮은 기호도를 나타내었다.

한편 본 결과에는 나타내지 않았으나 블랜칭 시간을 달리한 종실을 원료로 하여 제조한 밀크의 전반적인 특성을 비교해 보면 3분 처리군은 콩 비린내와 풋내가 약간 발현되지만 쓴맛은 거의 없었으며 다른 시료에 비해 농도가 묽은 것으로 나타났다. 5분 처리군은 밀크를 먹고 나면 쓴맛이 입안에 약하게 남으며, 콩 비린내가 약하나 고소한 맛이 있어 전반적으로 먹기에 좋은 특성을 나타내었다. 7분 처리군은 후미에서 쓴맛이 조금 강하게 발현되고 한 컵을 일회에 마시기에는 쓴맛이나 뚝은맛이 강한 것으로 판단되었다. 9분 처리군은 7분 시료보다 고형분과 침전물의 양이 많아 입안에서의 텁텁한 정도가 심해지고 쓴맛이 강해져 기호적으로 좋지 않은 결과를 보였다. 이상의 결과를 종합하면 결과적으로 관능적 특성 조사에서 밀크 제조용 청삼종실의 블랜칭 시간은 5분 정도로 처리하는 것이 적당하였다.

Table 22. 블랜칭 시간을 달리한 종실로 제조한 밀크의 관능강도와 기호도 조사

관능항목	3분	5분	7분	9분
쓴맛	5.00±1.63 ^a	4.86±0.90 ^a	5.43±1.13 ^a	5.57±0.98 ^a
뚝은맛	4.86±1.46 ^{ab}	4.57±0.98 ^b	5.57±0.79 ^{ab}	5.86±0.90 ^a
고소한 맛	4.29±0.95 ^b	5.14±0.69 ^{ab}	5.43±1.13 ^a	5.43±0.98 ^a
진한정도	3.71±0.76 ^b	4.71±0.76 ^{ab}	5.57±0.98 ^a	5.57±1.13 ^a
종합적 기호도	4.00±1.29 ^b	5.86±1.46 ^a	5.71±1.25 ^a	4.86±0.69 ^{ab}

㉠ 종실 밀크를 이용한 음료 제조 기술 개발

일반적으로 상품성을 가지는 상업적 음료 제품이 되기 위해서는 음료의 우수한 기호적 특성과 함께 저장성이 확보되어야 하며 유통 중 음료의 품질변화가 적어야 한다. 단백질, 지질 등의 함량이 높은 두류와 종실류를 원료로 사용하는 음료의 경우 과실·채소음료에 비해 저장, 유통 중 음료의 품질유지가 어려우며 특히, 단백질, 지질 함량이 높은 종실류 음료의 경우 내용물의 분산안정화와 품질변화 최소화를 위한 적정 유화제, 균질처리, 레토르트살균 조건 등이 검토되어야 한다.

㉠ 균질화 공정에 따른 밀크의 품질특성

종실로부터 제조한 밀크는 앞선 연구결과에서 나타난바와 같이 다양한 크기의 입자들로 구성되어 있는 것으로 나타나 이들 밀크를 이용한 음료 제조에 앞서 밀크내 고형물들의 분산을 위해 적정 균질조건을 검토하였다. 60%로 희석시킨 밀크를 70℃ 정도로 가온시킨 다음 각기 다른 압력으로 조정된 균질기에 2회 연속 통과시켜 균질처리 효과를 비교하였다(Table 23). 균질 처리한 밀크를 일정시간 방치한 결과 비균질 처리시와 같이 껍질에서 용출, 밀크로 이행된 색소성분을 포함하는 침전물이 하단부에 형성되었으나 균

질 처리시 압력이 높을수록 감소하였다. 그러나 종실 밀크의 크림층은 균질기의 압력에 따른 차이가 없었고 색도 또한 처리군간 차이가 없는 것으로 나타났다.

Table 23. 균질압력에 따른 종실 밀크(60% 희석액)의 품질특성

분석항목		균질 압력		
		200bar	300bar	400bar
고형분 (%)		8.93	8.95	8.81
크림층(%)		1.25	1.25	1.25
침전물양(%)		57.5	52.5	50.0
색도	L-value	18.79	18.65	19.22
	a-value	4.08	4.22	4.10
	b-value	17.66	18.02	17.83

Fig. 26은 균질기의 압력을 달리하여 균질 처리한 종실 밀크의 입자크기 분포곡선의 변화를 측정된 결과이다. 종실밀크를 정제수로 60%용액으로 희석시킨 대조군의 경우 2.4 μm , 9 μm , 30 μm 크기에서 정점을 보이는 입도분포 패턴을 나타내었다. 그러나 이들 균질 처리한 밀크는 대조군과 다른 입도분포 패턴을 보여 0.3 μm , 2 μm , 10~15 μm 의 범위에서 3개의 peak를 형성하였고 대조군에서 나타난 30 μm 에서의 피크는 사라지는 것으로 나타났다. 또한 대조군의 경우 2.4 μm 에서 형성되는 피크가 주 피크였으나 균질처리에 의해 15 μm 에서 형성되는 피크가 주 피크로 변화되었다. 균질압력에 따른 차이를 살펴보면 균질압력이 200 bar에서 400 bar로 높아질수록 2번째 피크의 높이는 낮아지면서 3번째 피크의 높이와 면적은 증가하는 것으로 나타났다.

일반적으로 균질 압력이 증가함에 따라 입자가 작아지면서, 분포도도 밀집된 형태를 나타내며 또한 균질화에 따른 두유의 안정성 연구에서 입자의 크기가 작아질수록 침전량이 감소하여 안정성이 증가하고, 균질처리에 의해서 지방구나 단백질 입자가 어느 정도 분쇄되므로 균질처리를 1회한 것보다 2회한 것의 침전량이 감소되어 안정성이 높아지며 균질압력을 높인 경우에 크림 분리층이 현저히 감소하여 안정성이 증가하는 것으로 알려져 있다. 또한 균질 처리시 casein 단백질이 지방구와 소수성 결합에 의해 복합체를 형성하며, 균질처리 압력이 증가함에 따라 복합체 형성도 증가하여 안정성이 증가하는 것으로 보고되어 있다.

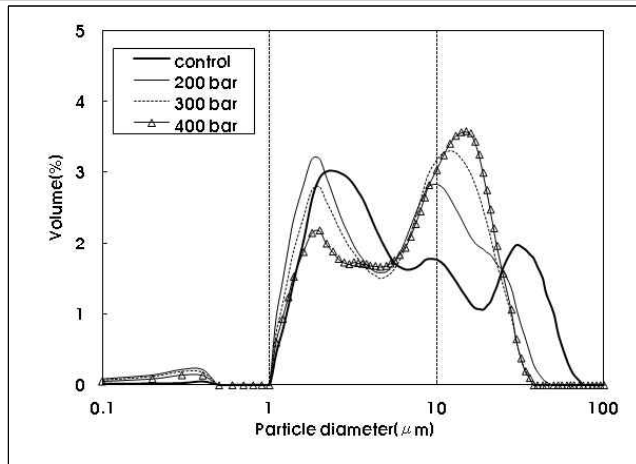


Figure 26. 균질압력별 종실 밀크(60% 회석액)의 입자크기 분포 곡선 변화

Table 24는 각기 다른 압력(200, 300, 400 bar)으로 균질 처리한 청삼종실 밀크의 입자크기를 5 μm 이하, 5~10 μm, 10~30 μm, 30~50 μm, 50μm 이상의 5구간으로 나누어 그들의 구성비를 비교한 결과이다. 균질압력별로 보면 앞서 Fig. 26에서 나타난바와 같이 대조군은 30 μm 이상의 입자 분획이 15%인 반면 균질 처리한 밀크는 200 bar 처리군의 2.66%에서 400 bar 처리군의 0.68%로 사이즈가 큰 입자의 구성비가 감소하였다. 5 μm 이하의 입자 분획은 반대로 균질압력이 증가할수록 감소하여 대조군이 45.70%로 분획 볼륨이 가장 높고, 400 bar 처리군이 33.63%로 가장 낮았다. 그러나 5~10 μm, 10~30 μm 범위의 입자 분획은 균질압력이 높을수록 증가하였고, 특히 10~30 μm 범위의 분획은 400 bar 처리시 대조군에 비해 약 2배 정도 구성비가 상승하였다. 이상의 결과로 미루어 보면 청삼종실 밀크의 균질처리는 밀크내 입자들의 분포도에 영향을 미쳐 특정 범위의 크기를 가진 입자 구성비를 높이는 효과가 있는 것으로 나타났다. 결과적으로 균질압력이 높아질수록 밀크내에 함유되어 있는 fat globule의 사이즈나 단백질 그리고 다른 고형물들이 균질화가 되면서 밀크내 입자의 입도분포 범위가 줄어들어 밀크의 안정성이 증가할 것으로 예상되었다.

Table 24. 균질압력별 청삼종실 밀크(60% 회석액)의 입자크기 구간별 구성비

균질 압력	Range of particle size(μm)					Mean diameter (μm)
	<5	5~10	10~30	30~50	50<	
Control	45.70	17.09	22.20	12.96	2.05	11.53
200bar	42.77	22.80	31.77	2.66	0.00	8.08
300bar	38.21	22.89	38.20	0.70	0.00	8.28
400bar	33.63	22.53	43.16	0.68	0.00	9.09

㉞ 조미 및 살균처리 공정에 따른 밀크 음료의 품질특성

60% 밀크에 당도와 pH 조정을 위해 설탕과 탄산수소나트륨을 각각 3.5%, 0.01% 첨가, 용해하고 해바라기씨유를 1.1%를 첨가한 밀크에 음료의 유화 안정화를 위해 사용되는 유화제 중 예비실험을 통해 선정된 Almax 2700을 0.1% 첨가하여 종실 밀크음료를 제조하였다. 음료를 70℃로 가온한 다음 400 bar로 조정된 균질기에 2회 연속 통과시켰다. 음료를 유리병에 충전, 밀봉한 것을 레토르트 살균기에서 살균, 내부온도가 121℃에 도달하면 20분간 살균하고 냉각시켰다.

Fig. 27은 종실 밀크를 이용한 음료 제조과정 변화에 따른 내용물의 입자크기 분포 곡선을 조사한 결과이다. 밀크내 지방입자의 안정성 증대를 위해 유화제를 첨가하고 균질공정을 거친 시료(조미/균질처리군)는 유화제 무첨가구(균질처리군)에 비해 0.3 μm에서 형성되는 피크 높이가 높아질 뿐 아니라 주피크인 3번째 피크정점의 입자가 8.5 μm으로 유화제 무첨가구의 15 μm보다 입자가 훨씬 적어지며 입자분포도가 밀집된 형태를 나타내었다. 그러나 조미/균질한 밀크를 121℃에서 20분간 레토르트 살균처리한 밀크음료(균질/살균처리군)의 경우 살균과정에서의 열변성에 의해 내용물의 입도분포도가 다시 유화제 무첨가구와 비슷한 패턴으로 변화되어 2번째, 3번째 피크의 구분이 명확하게 나타났다.

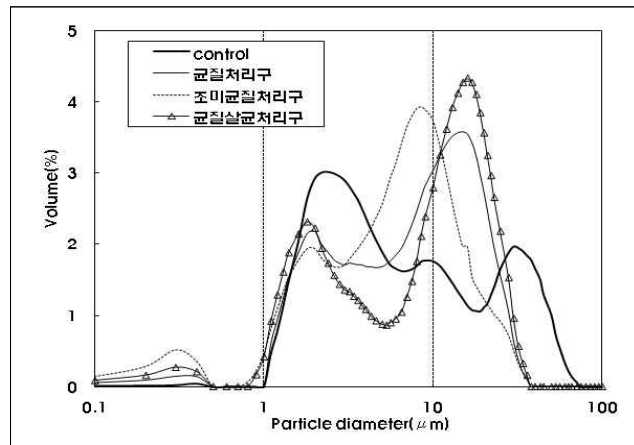


Figure 27. 종실 밀크를 이용한 음료 제조과정별 내용물의 particle size 분포 곡선 변화

Table 25은 종실 밀크를 이용한 음료 제조과정별 내용물의 입자크기를 5구간으로 나누어 그들의 구성비를 비교한 결과이다. 종실 밀크를 400 bar로 균질처리한 것은 앞서 언급한 것과 같이 대조군에 비해 30 μm 이상의 입자와 5 μm이하의 입자는 크게 감소한 반면 10~30 μm 범위의 입자는 증가하여 균질처리만으로도 밀크내의 입자 분포도가 크게 변하는 것을 확인하였다. 유화제를 첨가, 균질처리할 경우 밀크내 입자는 더욱 큰 변화를 보여 유화제 무첨가구와 비교할 때 5 μm 이하, 5~10 μm 범위의 입자분획의 볼륨이 증가하면서 평균입자 크기도 7.07 μm으로 작아졌다. 이는 유화제를 첨가하고 균질화함으로써 밀크내 친수성, 소수성 성분들이 유화작용에 의해 안정적인 상태로 결합을 이루고, 작은 입자들과 큰 입자들의 상호적인 결합 및 분산으로 평균 입자 사이즈도 줄어

들고 입자 사이즈가 고르게 분포됨에 따라 발생하는 현상으로 판단된다. 그러나 이들 유화제 첨가, 균질처리한 음료를 121℃에서 20분간 레토르트살균처리할 경우 음료내 입자 분포도는 다시 변화되어 살균 전에 비해 5 μm 이하, 5~10 μm 범위의 입자분획 볼륨은 감소하면서 10~30 μm 범위의 분획 구성비는 52.81%로 크게 증가하고 평균입자 크기도 9.94 μm으로 상승하였다. 이러한 현상은 유화제 첨가, 균질처리공정에 의해 밀크내 균일하게 분산된 입자들이 높은 온도의 레토르트살균처리로 인한 열변성으로 입자간 상호반응에 의해 결합되면서 입자가 커진 것으로 생각되어진다.

일반적으로 과도한 열처리는 유액 중의 단백질을 변성시키고 유화제를 분해할 뿐만 아니라 점도를 감소시키며 지방구의 운동에너지를 증대시킴으로써 지방구간의 flocculation과 coalescence 등을 촉진시켜 유화상태를 파괴하는 원인이 될 수 있다고 한다. 또한 125℃ 이상에서 대두단백질의 변성이 일어나기 때문에 살균온도가 증가하게 되면 온도에 비례하여 stability index가 감소하고 열처리량의 증가에 따라 대두의 주 단백질인 glycinin 획분이 불용성의 응결물질(aggregate)로 변한다고 한다.

Table 25. 종실 밀크를 이용한 음료 제조공정별 내용물의 입자크기 구간별 구성비

처리군	Range of particle size(μm)					Mean diameter(μm)	점도(cp)
	<5	5~10	10~30	30~50	50<		
Control	45.70	17.09	22.20	12.96	2.05	11.53	1.50±0.05
균질구	33.63	22.53	43.16	0.68	0.00	9.09	1.63±0.12
조미/균질구	38.09	35.14	26.11	0.67	0.00	7.07	3.02±0.07
조미/균질/살균구	30.61	15.53	52.81	1.05	0.00	9.94	3.29±0.06

종실 밀크를 이용한 음료 제조공정 변화에 따른 내용물 입자의 성상을 위상차현미경 (Olympus BH-2, USA)으로 관찰한 결과는 Fig. 28와 같다. 60% 밀크 희석액은 개개 입자들이 부유되어 있는 형태를 띠었고, 밀크에 유화제와 조미용 부재료를 첨가, 용해시킨 후 균질처리 했을 경우 몇 개의 입자가 결합하여 엉겨있는 형태를 이루나 입자형태가 선명하였다. 그러나 음료 제조의 최종단계인 레토르트 살균처리한 시료는 결합된 입자덩어리가 늘고 형태가 뚜렷하지 않음을 확인할 수 있어 앞서 입자크기 구간별 구성비율의 결과와 일치하는 경향을 나타내었다.

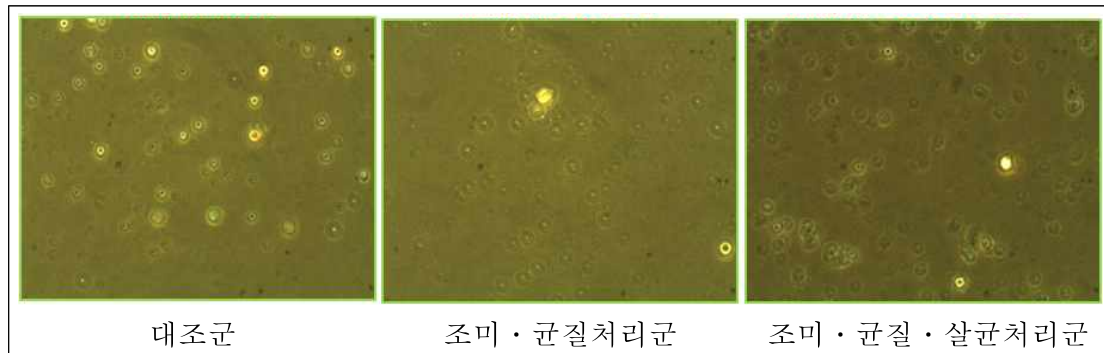


Figure 28. 종실 밀크를 이용한 음료 제조공정별 내용물 입자의 위상차현미경 사진(x400)

㉔ 종실밀크 음료의 안정화 기술 개발

㉑ 분산안정성 종실 밀크 음료 제조 배합비 선정

앞서 종실 밀크를 이용하여 조미용 부재료와 유화제를 첨가, 균질처리, 살균한 밀크 음료의 경우 외형적 성상에 있어서 우유빛의 상층부와 고형물이 함유되는 침전층의 2개의 층으로 분리되는 현상이 발생하여 이들 밀크음료가 상품성을 가지는 음료 제품이 되기 위해서는 살균전후 고형물의 분산안정화 기술 확립이 필요하였다.

유화제 종류, 혼합방법을 달리하여 제조한 밀크음료를 레토르트살균한 결과 음료의 성상은 처리군에 차이를 보였다(Fig. 29). 유화제를 첨가하지 않은 대조군은 종실의 껍질에서 유래되는 색소성분이 함유되는 침전층의 높이가 다른 시료에 비해 높았고 상층부에도 부유물이 형성되었다. 유화제 처리군 중에서는 Almax 2700을 단독으로 첨가한 것에 비해 자당지방산에스테르(P1570, S570)를 1종 또는 2종을 혼합 첨가한 처리군의 안정화 지수가 높아 약간 효과가 있었으나 모든 처리군에서 껍질 유래 색소물질과 고형물이 음료 전체에 분산되지 못하고 육안으로 식별되는 침전층이 형성되었다.

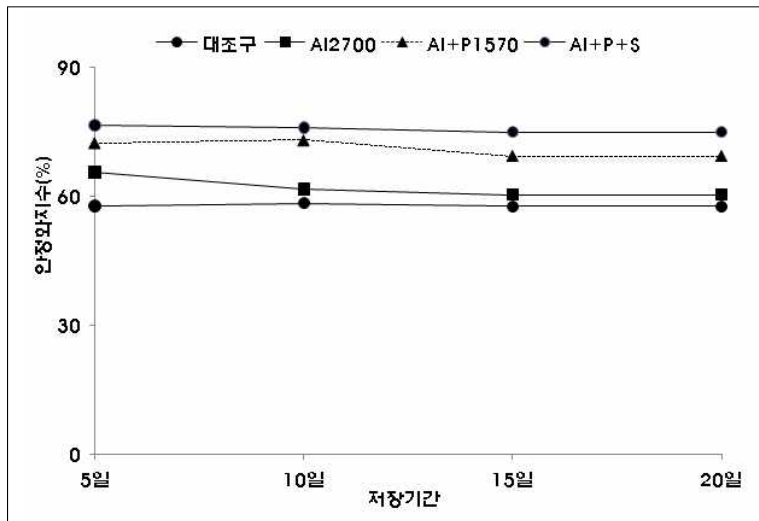
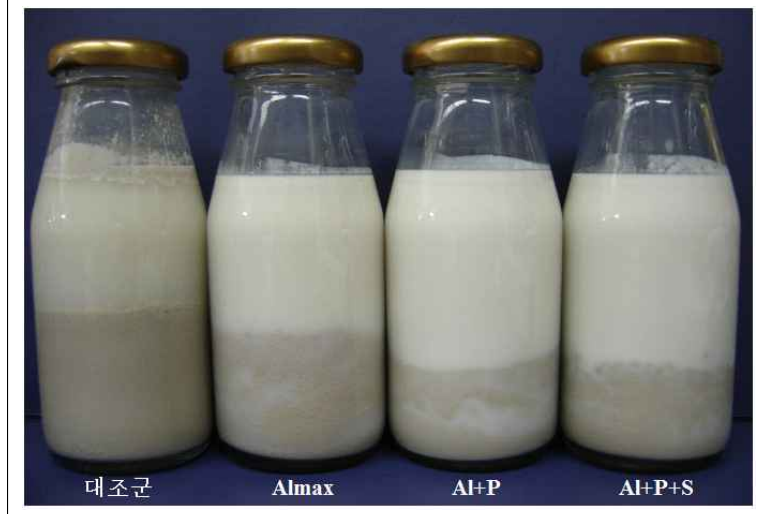


Figure 29. 유화제 종류, 혼합방법에 따른 중실밀크 음료의 살균 후
성상(위)과 안정화 지수(아래)

이들 음료의 품질특성을 분석한 결과(Table 26) 살균 음료의 상층부의 크림층은 Almax 2700 단독 첨가군에 비해 자당지방산에스테르를 혼합 첨가한 것이 낮았고 침전물의 양 또한 자당지방산에스테르를 혼합첨가군이 낮아 이들 유화제 첨가에 따른 약간의 분산 효과는 있는 것으로 나타났다. 음료의 백색도는 대조군이 23.19, Almax 2700 단독 첨가구가 19.51로 유화제 첨가에 의해 감소하였고 자당지방산에스테르의 첨가숫자가 증가함에 따라 약간씩 더 감소하였다. 반면 밀크 음료의 적색도, 황색도는 유화제 첨가로 인해 증가하는 것으로 나타났다.

Table 26. 유화제 종류, 혼합방법에 따른 종실밀크 음료의 살균 후 품질특성

분석항목	대조군	유화제			
		Almax 2700	A1 2700+P1570	A1+P+S570	
고형분 (%)	8.10	8.76	8.98	9.28	
크림층(%)	5.0	2.5	1.25	1.25	
침전물양 (%)	57.5	56.25	50.28	51.25	
조단백(%)	6.8	6.7	6.6	6.6	
색도	L-value	23.19	19.51	16.45	15.12
	a-value	3.42	4.16	4.86	5.30
	b-value	16.00	16.90	17.37	17.24

종실 밀크음료의 살균 후 발생하는 층분리 현상을 개선하고 음료내 고형물의 분산 안정성을 도모하고자 유화제의 종류와 첨가농도를 달리한 음료 제조 배합비는 Table 25와 같다.

Table 27. 유화제 종류와 첨가농도를 달리한 종실 밀크음료의 제조 배합비

원·부재료	음료 1	음료 2	음료 3	음료 4	음료 5	음료 6
종실 밀크	60	60	60	60	60	60
설탕	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
정제염	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
해바라기씨유	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1
Almax 2700	0.7	0.3	-	-	-	-
Almax 9064	-	-	-	-	-	0.5
SWA-10D	-	-	-	0.8	-	-
Step SS	-	-	-	-	0.3	-
P1570	0.1	0.1	-	-	-	0.1
S1670	-	-	0.5	-	0.5	-
S570	0.1	0.02	0.3	0.3	-	0.01
탄산수소나트륨	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
정제수	34.39	34.87	34.49	34.19	34.49	34.68
합계	100	100	100	100	100	100

Fig. 30은 이들 음료의 레토르트살균 후의 성상을 나타낸 결과로써 음료 1, 음료 5는 살균 후 바로 층분리가 일어나지 않았으며, 입자들의 분산이 고르게 이루어져 색상도 균일한 반면 음료 2, 음료 4, 음료 6은 살균 후 2개의 층분리가 선명하게 분리가 일어나 상층부와 침전층의 경계가 뚜렷하였다. 반면 음료 3은 음료의 중간부분에서 약간의 분리현상이 발생하였다.



Figure 30. 유화제 종류와 첨가농도를 달리한 종실 밀크음료의 살균 후 성상

Table 28은 이들 음료의 상·하층부위에서 각각 30mL씩 시료를 취하여 색도, 점도, 고형분 함량을 분석한 결과이다. 음료의 색도 중 백색도 분석 결과로 음료 1, 3, 5는 상·하층부위 차이가 3 미만인 반면 상·하층부위간의 차이가 확연히 구분되는 음료 2, 4, 6의 경우 12~17까지 차이가 있었다. 황색도 또한 음료 1, 3, 5는 부위에 따른 차이가 거의 없는 반면 그 외의 음료는 2배 이상의 차이가 있었다. 고형분 함량에서도 색도 차이와 유사한 경향을 보였으나 점도의 경우 음료 1은 살균 후 층분리는 발생하지 않았지만 음료의 상·하층부간 점도 차이는 시료 중 가장 컸다.

Table 28. 유화제 종류와 첨가농도를 달리한 종실 밀크음료의 부위별 품질특성

분석항목	음료 1		음료 2		음료 3		음료 4		음료 5		음료 6		
	상층	하층	상층	하층	상층	하층	상층	하층	상층	하층	상층	하층	
색도	L-value	48.23	45.64	49.41	37.93	41.67	43.43	50.66	33.33	44.00	43.47	52.45	36.31
	a-value	1.67	2.00	0.59	3.58	2.90	2.54	0.60	5.60	2.32	2.42	0.46	4.13
	b-value	12.79	14.54	9.76	18.92	17.82	16.91	10.33	22.63	17.73	18.04	8.69	19.92
점도(cp)	10.4	24.4	2.23	3.55	14.9	14.7	1.79	3.5	13.0	12.6	1.33	2.77	
고형분(%)	9.21	9.87	7.70	9.67	9.27	9.17	8.29	10.69	9.13	9.14	7.84	11.03	

앞서 제조한 음료 중 육안으로 보아 층분리가 확연하게 구분되는 시료를 상·중·하층부위로 구분한 다음 위상차현미경으로 음료 부위별 입자의 성상을 관찰하였다(Fig. 31). 층분리가 발생한 음료의 경우 상층부에 비해 하층부로 갈수록 입자의 개수가 많아지면서 입자의 크기도 다양하게 분포됨을 확인할 수 있었다.

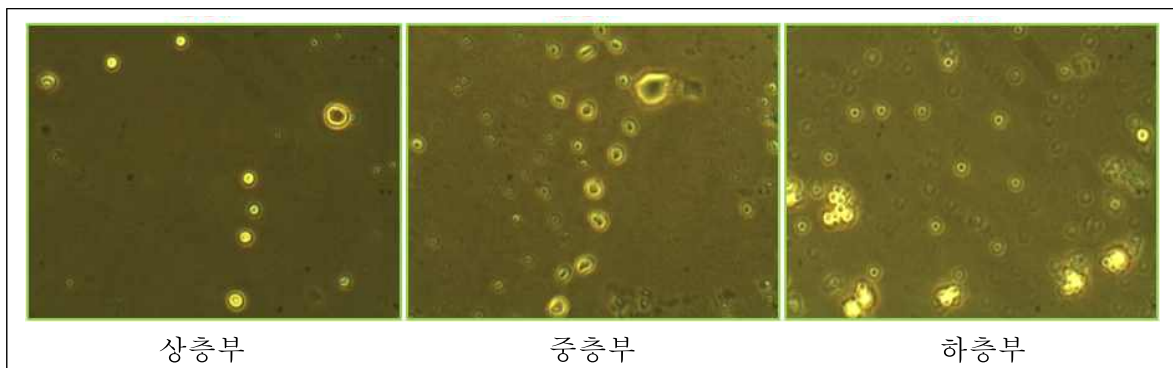


Figure 31. 유화제 종류와 첨가농도를 달리한 종실 밀크음료 부위별 입자의 위상차현미경 사진(x400)

Fig. 32는 유화제를 달리한 음료의 입도분포도를 측정한 결과이다. 그림에서 음료 상층부의 입자분포도는 빨간색, 하층부는 파란색으로 나타내었다. 앞서 색도, 점도, 고형분 함량 측정 결과와 마찬가지로 음료 1, 음료 3, 음료 5 음료의 입자분포도는 상·하층부가 거의 일치되게 겹쳐진 반면 음료 2, 4, 6은 상·하층부의 입자분포도가 서로 다른 것을 확인할 수 있었다.

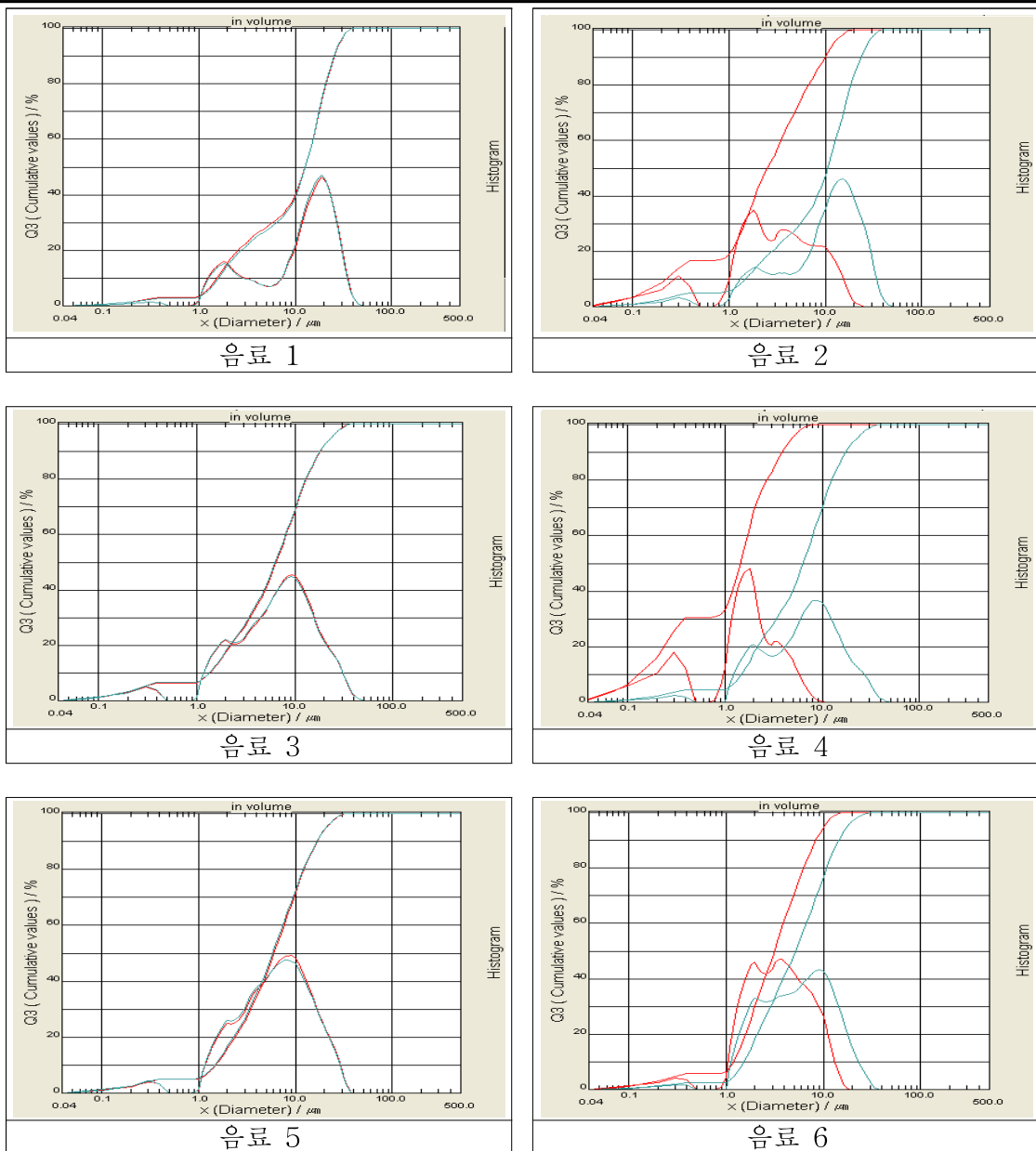


Figure 32. 유화제 종류와 첨가농도를 달리한 종실 밀크음료의 부위별 입도분포 곡선

이들 유화제 종류와 첨가농도를 달리한 종실 밀크음료의 입자분포도를 누적에 따른 사이즈를 비교한 결과(Table 29)에서도 음료 1, 3, 5번은 누적에 따른 입자크기가 상·하 층부에서 차이가 없는 것으로 나타나 음료내 입자들이 균일하게 분산됨을 알 수 있었다. 또한 레토르트살균 후 분산안정성이 확인된 음료 1, 3, 5번 음료를 실온에 저장하면서 외형적 성상 변화를 관찰한 결과 5번 이외의 음료는 시일이 경과함에 따라 층분리가 발생하는 것으로 나타났다. 따라서 종실 밀크를 이용한 음료 제조시 Step SS와 S1670 유화제를 혼합 첨가하는 것이 살균 후 밀크에 존재하는 다양한 크기의 입자들의 분산안정성에 가장 효과적인 것으로 판단되었다.

Table 29. 유화제 종류와 첨가농도를 달리한 종실 밀크음료의 부위별 누적 particle size

측정 부위		Particle size(μm)			
		Diameter at 10%	Diameter at 50%	Diameter at 90%	Mean Diameter
음료 1	상(빨강)	1.55	12.72	25.45	12.97
	하(파랑)	1.61	12.79	25.11	12.99
음료 2	상(빨강)	0.22	2.53	9.95	3.99
	하(파랑)	1.49	10.58	23.49	11.56
음료 3	상(빨강)	1.37	6.53	18.40	8.37
	하(파랑)	1.35	6.40	18.34	8.29
음료 4	상(빨강)	0.13	1.46	3.92	1.72
	하(파랑)	1.48	6.45	17.59	8.14
음료 5	상(빨강)	1.50	6.01	16.92	7.76
	하(파랑)	1.43	6.20	15.83	7.48
음료 6	상(빨강)	1.20	3.17	8.47	4.03
	하(파랑)	1.53	5.19	14.51	6.80

㉞ 유화제 처리조건에 따른 종실 밀크 음료의 분산안정성 예측

앞서 유화제 종류와 혼합비율 실험 결과 음료의 분산안정성에 효과가 있는 것으로 나타난 배합비를 토대로 종실 밀크음료의 분산안정성을 더욱 향상시키고자 Step SS와 S1670 유화제의 첨가농도에 따른 효과를 분석하였다. 즉, Step SS는 0.3%로 고정시키고 S1670의 농도를 0.2~0.5%로 조절하여 밀크 음료를 제조하여 레토르트 살균하였다 (Table 30).

Table 30. 유화제 S1670 첨가농도별 종실 밀크음료의 제조 배합비

원·부재료	(%)			
	음료 5-1	음료 5-2	음료 5-3	음료 5
종실 밀크	60	60	60	60
설탕	3.5	3.5	3.5	3.5
정제염	0.1	0.1	0.1	0.1
해바라기씨유	1.1	1.1	1.1	1.1
Step SS	0.3	0.3	0.3	0.3
S1670	0.2	0.3	0.4	0.5
탄산수소나트륨	0.01	0.01	0.01	0.01
정제수	34.79	34.69	34.59	34.49
합계	100	100	100	100

유화제 Step SS의 농도는 0.3%로 고정하고 S1670의 농도를 0.2~0.5%로 조절하여 첨가한 종실 밀크음료의 분산안정성을 LUMiSizer로 측정된 결과는 Fig. 33과 같다.

음료 5-1의 경우 position 122 위치에서 첫 번째 profile은 약 27%의 투과율을 나타내지만 3번째 profile은 약 55%, 마지막으로 측정된 last profile은 약 95%의 투과율을 나타내었다. 반면 position 122에서 상층부로 갈수록 투과율이 급격히 증가되는 것을 알 수 있다. 이러한 결과는 position 122를 기점으로 원심력에 의해서 상층부로 가면서 응집(침전)현상으로 투과율이 높아지는 것을, 그리고 position 122에서 하층부로 갈수록 응집(침전)현상에 의해서 투과율이 급격히 낮아짐을 확인할 수 있다. 음료 5-1과 비교했을 때 음료 5-2, 음료 5-3, 음료 5는 position의 넓이가 좁고, profile line이 일정하고 조밀하며 표면적이 작은 것을 알 수 있다. 음료 5의 경우 음료 5-1과 비교했을 때 position 124 mm의 위치에서 첫 번째 profile을 확인해보면 투과율이 약 10%이며 3번째 profile도 거의 비슷한 값을 나타내며, 시간에 따라서 position의 line 모양이 균일하고 line과 line의 표면적이 작고 간격이 일정하였다. 이는 음료내에 분산된 입자의 크기가 균일하고 분산 상태가 안정하다는 것을 의미한다. 또한 음료들의 profile을 보면 음료 5-1에서 음료 5로 갈수록 부유층의 면적이 크고 물층의 면적이 작아지는 것을 확인할 수 있다.

이러한 결과를 통하여 원심력에 의해서 음료 5-1의 경우는 부유층보다 물층이 더 많아져 분산안정성이 떨어진 반면, 음료 5의 경우 원심력에 의해서 물층 보다는 부유층으로 유지되는 면적이 크기 때문에 분산 안정성에서도 음료 5-1보다 좋다는 결론을 얻을 수 있었다.

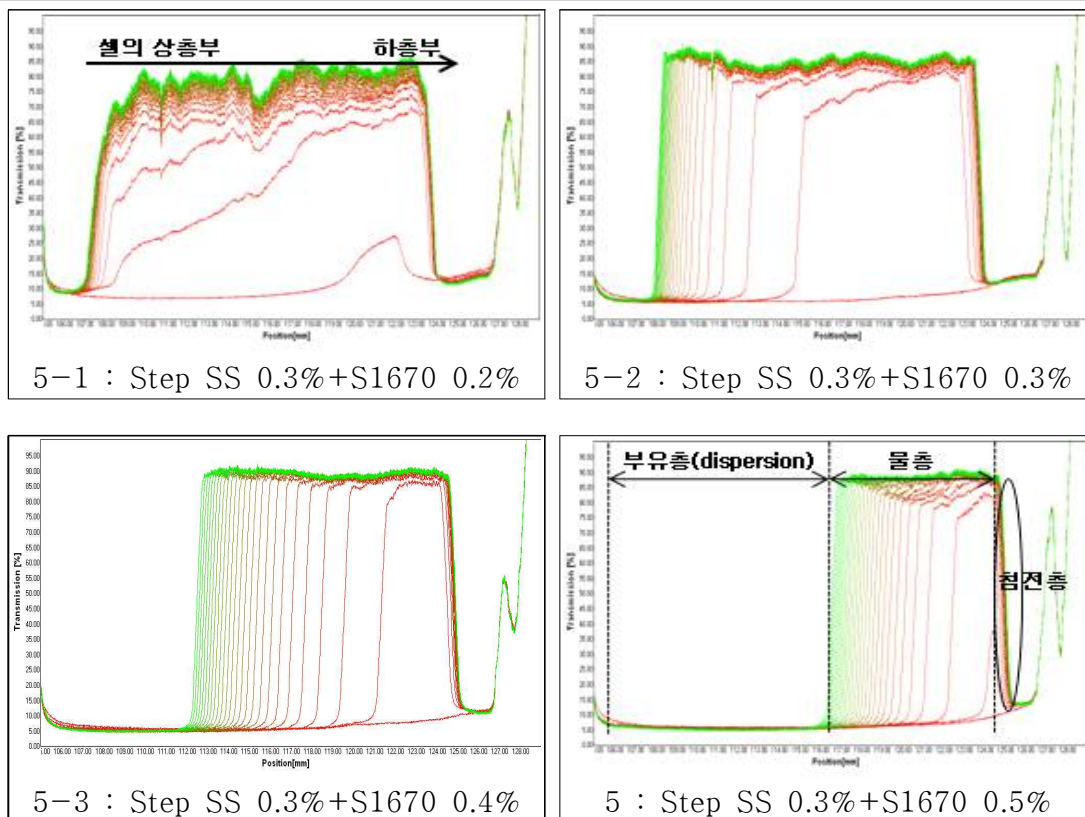


Figure 33. 유화제 S1670 첨가농도별 종실 밀크음료의 투과율 프로파일

Fig. 34은 유화제 S1670의 첨가농도를 달리한 종실 밀크음료의 분산안정성을 시간에 따른 투과율로 나타내어 저장 안정성을 측정된 결과이다. 저장 15일의 투과율을 봤을 때 음료 5-1의 경우 기울기 값이 약 116%/hour, 음료 5-2의 경우 약 118%/hour를 나타낸 반면 음료 5-3의 경우 약 67%/hour, 음료 5의 경우에는 약 25%/hour의 값을 보였다. 이 결과는 저장 15일 동안 분산안정성을 확인했을 때 음료 5-1, 음료 5-2 배합의 음료가 음료 5-3, 음료 5보다 분산상태를 유지하는 능력이 떨어져 응집현상이 더 빠르게 일어났음을 알 수 있었다. 특히 음료 5-1, 음료 5-2의 경우 저장 30일까지 급격하게 투과율이 높아진 반면 음료 5-3, 음료 5의 경우는 음료 5-1, 음료 5-2보다 분산상태를 유지하는 능력이 높아 투과율의 변화가 서서히 증가함을 알 수 있었다. 본 실험 결과로부터 음료에 첨가되는 유화제 S1670의 농도가 증가됨에 따라 종실 밀크 음료내 입자들의 분산안정성이 좋아짐을 확인할 수 있었다.

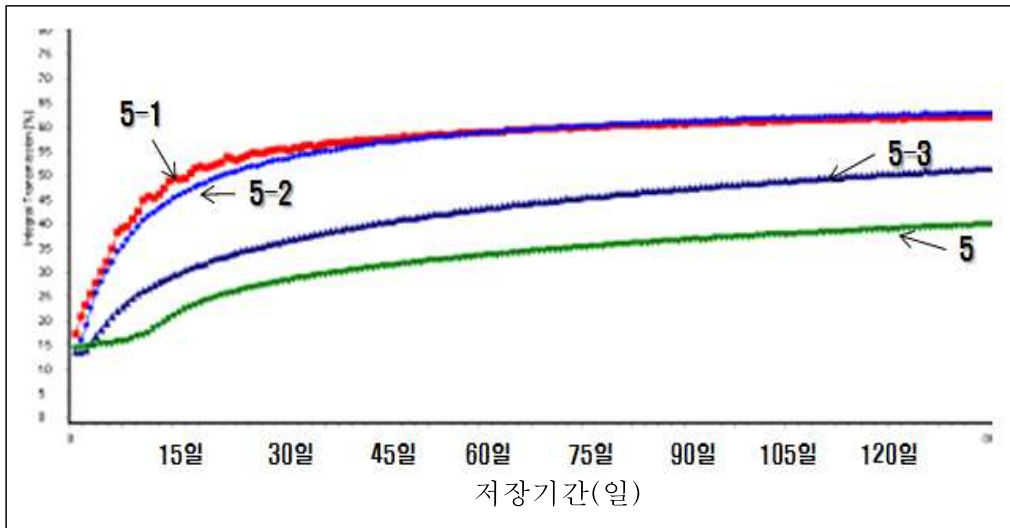


Figure 34. 유화제 S1670 첨가농도별 종실 밀크음료의 시간에 따른 투과율 변화

Table 31의 배합비는 Step SS의 첨가농도에 따른 음료의 분산 안정성을 확인하기 위해 유화제 S1670의 첨가농도는 0.5%로 고정하고 Step SS를 0.1, 0.2, 0.3%의 농도로 각각 조절하여 제조한 음료 배합비이다.

Table 31. 유화제 Step SS 첨가농도별 종실 밀크음료의 제조 배합비

원·부재료	음료 (%)		
	음료 5-4	음료 5-5	음료 5
종실 밀크	60	60	60
설탕	3.5	3.5	3.5
정제염	0.1	0.1	0.1
해바라기씨유	1.1	1.1	1.1
Step SS	0.1	0.2	0.3
S1670	0.5	0.5	0.5
탄산수소나트륨	0.01	0.01	0.01
정제수	34.69	34.59	34.49
합계	100	100	100

유화제 Step SS의 농도를 0.1~0.3%로 조절하여 제조한 밀크음료의 분산안정성 변화를 LUMiSizer로 측정한 결과(Fig. 35) Step SS의 농도가 가장 높은 0.3%에서 가장 좋은 분산 안정성을 확인할 수 있었다. 본 그림에서 가장 중요한 것은 last profile의 line을 보면 Step SS 농도가 0.3%(음료 5)인 경우 line이 직선의 모양을 나타내는 반면 Step

SS 농도가 0.1%(음료 5-4)의 경우 line의 투과율이 60%에서 85%로 증가하는 것을 볼 수 있는데, 이는 음료내 입자의 크기가 균일하지 못하여 나타나는 현상으로 추측할 수 있다.

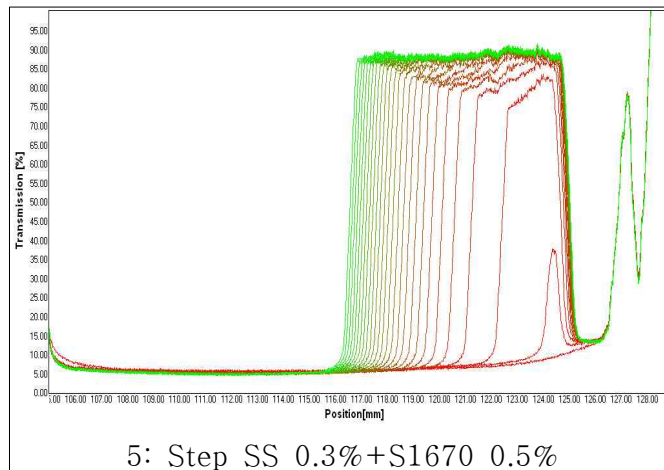
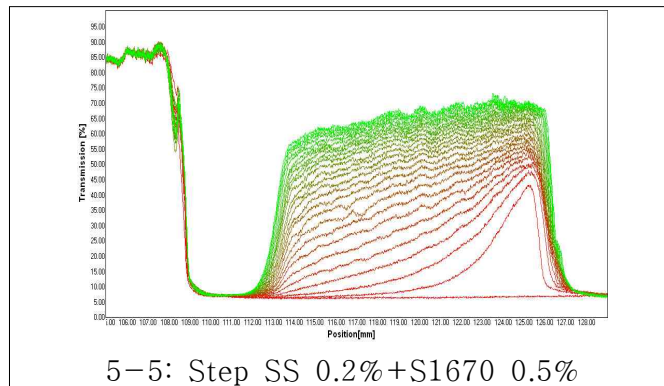
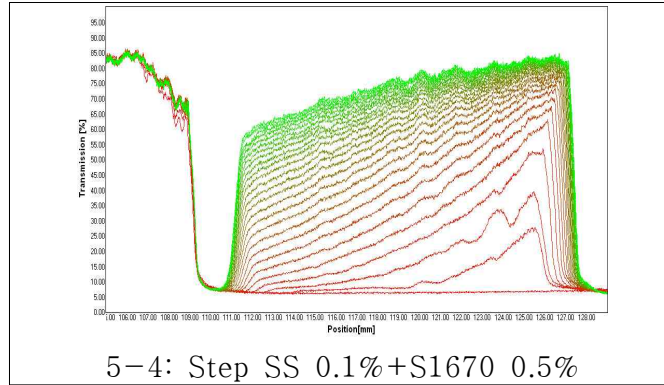


Figure 35. 유화제 Step SS 첨가농도별 종실 밀크음료의 투과율 프로파일

저장기간에 따른 분산안정성을 분석한 결과(Fig. 36)에서 초기 20일 정도까지는 3가지 샘플의 저장안정성이 유사하였으나 30일 이후부터는 3가지 음료 샘플에서 조금씩 분산성의 안정도가 차이가 있는 것을 확인할 수 있다. 이는 앞의 Fig. 33에서 설명하였듯이

Step SS 0.1% 첨가구가 0.3%보다 last profile로 갈수록 투과율의 차이가 크게 나타난 결과와 일치하였다. 결과적으로 first profile의 차이는 크지 않지만 음료 제조 후 시간이 경과할수록 특히 last profile의 모양에서 확인한 차이를 나타내므로 본 실험결과에서는 분산안정성이 20일 이후부터 샘플간 차이를 보인다는 것을 알 수 있었다.

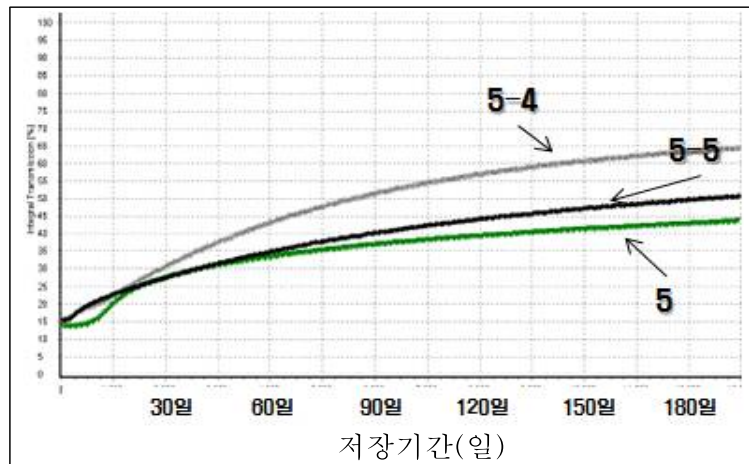


Figure 36. 유화제 Step SS 첨가농도별 종실 밀크음료의 시간에 따른 투과율 변화

© 저장기간에 따른 종실 밀크 음료의 품질특성 분석

앞서 저장에 따른 음료의 분산안정성 예측 실험 결과를 확인하고자 Table 32의 배합비로 종실 밀크음료를 제조하여 레토르트 살균한 다음 음료를 실온에 저장하면서 음료의 안정성과 관련되는 품질특성 변화를 분석하였다. 이때 음료 5-6의 경우 고형물이 첨가되는 음료 제조시 고형물의 안정적인 분산을 위해 산업적으로 가장 보편적으로 적용되는 젤란검을 첨가하여 비교하였다.

Table 32. 유화제 종류와 농도를 달리한 종실 밀크음료의 제조 배합비(%)

원·부재료	음료 3	음료 5-4	음료 5-5	음료 5-3	음료 5	음료 5-6
종실 밀크	60	60	60	60	60	60
설탕	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
정제염	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
해바라기씨유	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1
Step SS	-	0.1	0.2	0.3	0.3	0.3
S1670	0.5	0.5	0.5	0.4	0.5	0.5
S570	0.3	-	-	-	-	-
LT-100	-	-	-	-	-	0.01
젖산칼슘	-	-	-	-	-	0.02
구연산나트륨	-	-	-	-	-	0.007
탄산수소나트륨	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
정제수	34.49	34.69	34.59	34.59	34.49	34.453
합계	100	100	100	100	100	100

Fig. 37은 이들 음료의 저장 80일 경과 후 성상을 나타낸 결과이다. 음료 제조 직후에는 층분리가 발생하지 않았으나 S1670, S570을 사용한 3번 음료와 S1670 0.5%에 Step SS 0.1, 0.2% 첨가구인 음료 5-4, 음료 5-5의 경우 그림에서 볼 수 있는 바와 같이 저장 80일 경과 후에는 층분리가 발생하였다. 그러나 음료 5-3, 음료 5, 음료 5-6의 경우 제조 초기와 차이가 없이 안정적인 분산형태가 유지되는 것을 확인할 수 있었다.



Figure 37. 유화제 종류와 농도를 달리하여 제조한 종실 밀크음료의 저장 80일 후 성상

Table 33은 저장기간별 종실 밀크 음료의 색도변화를 측정된 결과이다. 저장기간별 음료를 개봉하기에 앞서 병을 흔들어 내용물을 혼합한 다음 색도를 측정하였다. 유화제

종류와 첨가농도를 달리하여 제조한 음료의 백색도, 적색도, 황색도는 표에서 보는바와 같이 음료 제조 초기와 저장 80일 경과 후 차이가 없는 것으로 나타났다.

Table 33. 유화제 종류와 농도를 달리하여 제조한 종실 밀크음료의 저장기간별 색도 변화

색도	저장기간	음료 3	음료 5-4	음료 5-5	음료 5-3	음료 5	음료 5-6
L-value	0일	44.11	44.41	44.71	43.79	40.11	44.84
	15일	42.82	42.76	43.83	39.71	39.95	40.41
	30일	43.26	44.23	43.73	43.84	43.62	44.18
	80일	42.69	44.37	43.87	43.76	43.01	43.58
a-value	0일	2.37	2.29	2.22	2.14	3.50	2.11
	15일	2.61	2.76	2.19	3.04	3.18	3.08
	30일	2.51	2.41	2.21	2.12	2.43	2.28
	80일	2.68	2.47	2.28	2.13	2.49	2.31
b-value	0일	16.94	17.32	17.33	16.85	19.72	17.37
	15일	17.64	18.41	17.10	19.09	19.94	19.75
	30일	17.40	17.91	17.01	16.72	17.96	17.82
	80일	17.79	17.89	17.3	16.90	18.24	17.90

Table 34는 유화제를 달리하여 제조한 음료의 저장 중 점도 변화를 측정된 결과이다. 초기 음료의 점도는 유화제의 종류와 첨가농도에 따라 차이를 보였고, S1670, S570 유화제를 혼합 첨가한 음료 3이 22.6cp로 가장 높고 젤란검을 첨가한 음료 5-6이 그 다음으로 높았으며 음료 5-4, 음료 5-5가 7.2cp로 가장 낮았다. 저장 시일이 경과함에 따라 앞서 확인한 것과 같이 층분리가 발생하는 음료 3, 음료 5-4, 음료 5-5는 용기 상층부와 하층부 음료간의 점도차이가 크고 특히, 초기 점도가 가장 높은 음료 3의 경우 저장 80일 경과시 전체 음료의 점도가 15.7cp로 다른 음료에 비해 크게 감소하는 것으로 나타났다. 그러나 0.01% 젤란검을 유화제와 함께 첨가한 음료 5-6은 용기 상·하층부 및 전체 음료에 있어서 저장기간에 따른 점도 차이가 거의 없는 것으로 나타났고 Step SS 0.3%, S1670 0.5%를 혼합 첨가한 음료 5 또한 저장기간에 따른 음료의 점도 변화가 거의 없어 안정적인 초기 물성을 유지하는 것으로 나타났다.

Table 34. 유화제 종류와 농도를 달리하여 제조한 종실 밀크음료의 저장기간별 상·하층부 및 전체 음료의 점도 변화

(25°C, cp)

저장기간 (일수)		음료 3	음료 5-4	음료 5-5	음료 5-3	음료 5	음료 5-6
제조직후	전체	22.6	7.1	7.2	11.6	12.7	19.9
15일	상층	13.0	2.0	4.0	8.5	10.9	20.9
	하층	39.3	22.4	9.0	12	11.6	20.0
	전체	21	11.2	9.6	11.8	13.0	20.3
30일	상층	16.1	2.1	2.8	7.4	13.0	21.1
	하층	41.4	11.0	10.7	12.5	14.8	20.0
	전체	24.1	9.19	8.23	10.1	12.5	21.1
80일	상층	6.9	1.6	1.4	7.5	13.2	22.2
	하층	40.5	14.1	11.9	12.5	14.8	19.4
	전체	15.7	7.5	7.6	10.4	11.9	20.3

Fig. 38은 저장기간 경과에 따른 음료의 입자크기 변화를 측정된 것으로 음료 제조 직후 입도분포 패턴을 살펴보면 저장 중 층분리가 발생하는 음료 3, 음료 5-4, 음료 5-5가 분산안정성이 높은 음료 5, 음료 5-6에 비해 피크 정점을 나타내는 영역대의 입자크기가 크고 보다 넓은 범위의 입도분포도를 보이는 것으로 나타났다. 이는 유화제의 종류와 첨가농도 그리고 유화제의 혼합정도에 따라 밀크내 입자간의 결합과 분산정도는 차이가 나며 이러한 차이는 궁극적으로 음료의 저장 중 분산안정성에 영향을 미쳐 저장 중 음료의 층분리나 침전 생성에서 차이를 보이는 것으로 판단된다. 저장기간에 따른 입도분포곡선의 형태는 저장 80일 경과 후 전체적인 분포곡선의 형태는 비슷한 양상을 보이나 음료 5-3와 5-4의 경우 다소 입자크기가 큰 우측으로 약간 이동한 것을 확인할 수 있었다.

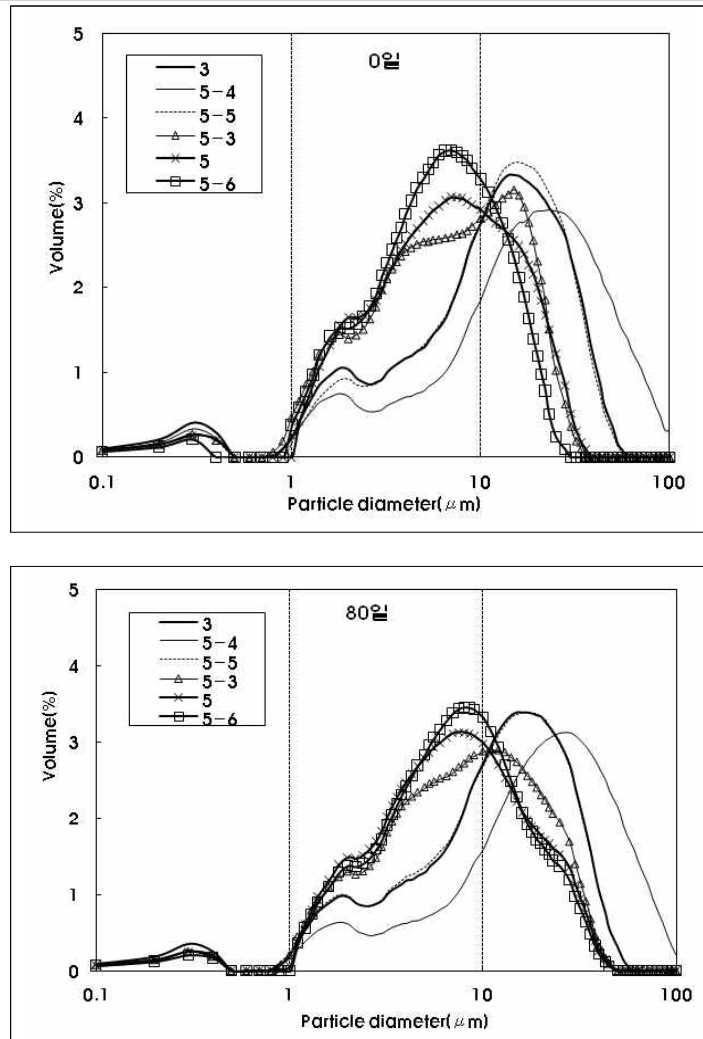


Figure 38. 유화제 종류와 농도를 달리하여 제조한 종실 밀크음료의 저장기간별 입자크기 분포 곡선 변화. 제조 직후(위), 제조 후 80일(아래)

Table 35은 종실 밀크 음료내의 구성 입자크기를 5구간으로 나누어 각 구간별 구성비를 비교한 결과이다. 제조직후 음료의 입자 구간별 구성비를 살펴보면 음료 3, 음료 5-4, 음료 5-5는 10~30 μm 범위에서 입자 구성비가 각각 49.10, 43.63, 51.39%로 가장 높은 반면 음료 5-3, 음료 5, 음료 5-6은 이보다 입자가 적은 5~10 μm 범위에서 입자 구성비가 각각 36.88, 37.08, 40.38%로 가장 높은 것으로 나타났다. 또한 저장 중 분산안정성이 우수한 음료들은 5 μm 이하, 5~10 μm 범위 입자의 구성비가 높았고 밀크내 입자들의 평균입경에 있어서도 7.47~8.80 μm 으로 훨씬 적은 것으로 나타났다. 저장 80일 경과 후 음료내 입자들의 입자크기 구간별 구성비를 비교해보면 층분리가 발생하지 않고 분산안정성이 좋은 젤란검 첨가 음료 5-6의 경우 초기에 비해 5 μm 이하, 5~10 μm 범위 입자의 구성비는 약간 감소한 반면 10~30, 30~50 μm 범위 입자의 구성비는 증가하는 것으로 나타나면서 평균입경에 있어서도 약간 커지는 것을 알 수 있었다. 그러나 음

료 5의 경우 젤란검 첨가 음료보다 저장 80일 후 이들 구간별 입자 구성비의 변화가 적은 것으로 나타나 분산안정성이 더 우수한 것으로 판단되었다.

Table 35. 유화제 종류와 농도를 달리하여 제조한 종실 밀크음료의 저장기간별 particle size 구간별 구성비

저장 기간	시료	Range of particle size(μm)					Mean diameter (μm)
		<5	5~10	10~30	30~50	50<	
제조 직후	음료 3	21.02	19.67	49.10	9.95	0.26	13.03
	음료 5-4	13.79	12.35	43.63	18.79	11.44	21.63
	음료 5-5	19.35	19.75	51.39	9.29	0.22	13.45
	음료 5-3	36.88	26.40	36.42	0.30	-	8.80
	음료 5	37.08	29.90	32.45	0.57	-	8.08
	음료 5-6	40.38	35.02	24.60	-	-	7.47
80일	음료 3	20.22	19.33	50.74	9.49	0.22	13.25
	음료 5-4	11.97	10.68	43.70	21.16	12.49	23.42
	음료 5-5	20.70	19.58	50.34	9.18	0.20	13.27
	음료 5-3	31.72	26.48	38.01	3.79	-	9.89
	음료 5	35.18	30.39	31.25	3.18	-	8.92
	음료 5-6	33.52	32.95	30.86	2.67	-	8.82

4) 온도에 따른 종실 밀크 음료의 분산안정성 분석

일반적으로 시중에서 유통 중인 두유류의 경우 겨울철에는 음료를 온장보관하며 판매하는 점을 고려하여 실온과 50℃에서 종실 밀크 음료의 분산안정성을 turbiscan을 이용, 측정하였다. Turbiscan은 시료의 농도 및 입경의 차이에 따른 분산상태를 고려하여 일정 온도 조건하에서 시간에 따른 분산안정성의 변화를 측정할 수 있다. Reading head는 시료가 담긴 measurement cell의 아래쪽에서 위쪽으로 움직이며 분석 시 매 40 μm간격으로 scanning하여 각 liquid dispersion의 분산상태, 즉 분산상인 입자의 크기와 분산상과 연속상의 부피 분율에 따른 transmission 및 backscattering된 빛의 flux(%)를 동시에 측정한다. 일반적으로 농도가 짙은 시료를 분석한다고 가정해 보면, one scan 시 측정된 결과는 아래 Fig. 39와 같다. X축은 시료의 높이(mm)를 의미하며, Y축은 시료의 분산상태에 따른 transmission 및 backscattering된 빛의 flux(%)를 의미한다.

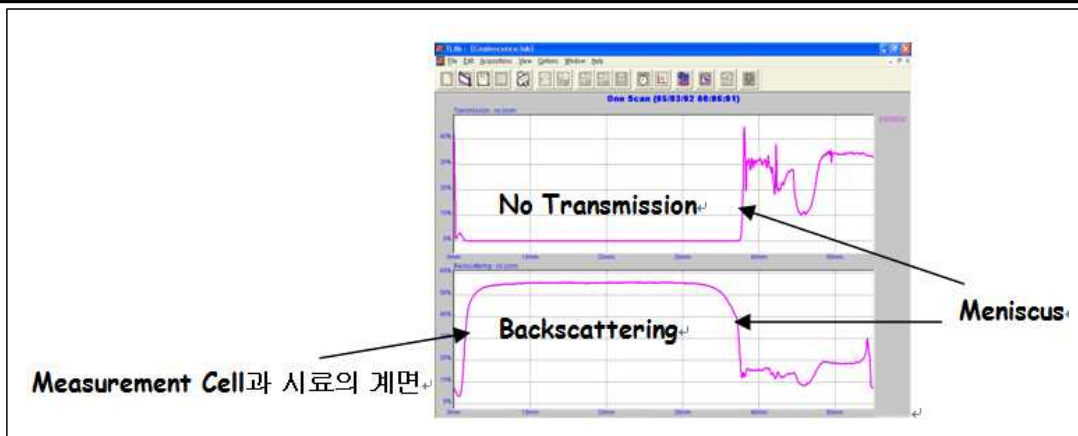


Figure 39. One Scan Measurement

앞서 유화제 종류와 첨가농도를 달리하여 제조한 종실 밀크음료의 저장 중 분산안정성 실험에서 안정도가 높은 것으로 나타난 음료 5(Step SS 0.3%, S1670 0.5%)을 대상으로 온도에 따른 안정성을 검토하였다(Fig. 40). 이때 Step SS 0.3%, S1670 0.4% 첨가 시료(음료 5-3)를 비교구로 사용하였다.

그림에서 우측은 분석용기의 상층부에 해당하며 좌측은 하층부에 해당하는데 두 시료의 50℃에서 분석한 결과를 보면 전체에 걸쳐서 초기 profile과 최종 profile이 형태가 각 부위별 다른 형태를 보이는 것을 확인할 수 있다. Fig. 40에서 보는바와 같이 각 부위별 profile의 변화는 각기 다른 현상에 의한 것으로 다음과 같이 설명할 수 있다. Backscattering값의 증가와 감소에 따라 분산상인 입자들의 이동 또는 분산상인 입자들의 응집현상을 예상할 수 있으며, 그림에서 상층부의 초기 backscattering값에 비해 최종 backscattering값이 크게 증가하는데 이와 같은 경우 입자(유지성분)들의 상층부로의 이동 즉, 부유로 인한 creaming 현상이 backscattering값의 상승을 가져온 것으로 판단된다. 중간부분 profile의 형태는 backscattering의 값이 점점 감소하면서 하층부 쪽으로 이동하는 형태를 보이는데 이는 분산되었던 시료가 시간경과에 따라 중력으로 인해 입자들이 아래쪽으로 가라앉게 되면서 청징화를 일으키게 되고 용액의 농도가 묽어지는 것을 확인하였다.

그림의 좌측부분에 해당하는 하층부의 profile의 변화를 관찰해보면 backscattering이 초기 값에 비해 전체적으로 증가한 것을 확인할 수 있는데 이는 중간부분의 입자들이 침전된 것과 더불어 제조시 하층부에 자리잡고 있던 입자들의 응집현상이 일어나면서 입자의 크기가 커지고 입자덩어리들 사이의 공간이 줄어들어 backscattering의 값이 증가한 것으로 판단된다. 이 같은 변화는 두 개 음료 시료의 50℃ 분석결과에서 모두 나타나지만 그 변화폭이 Step SS 0.3%, S1670 0.5% 첨가구(음료 5)보다는 Step SS 0.3%, S1670 0.4%(음료 5-3)의 경우가 더 크다는 것을 Fig. 40을 통해 알 수 있었다.

분석온도에 따라 실온과 50℃를 비교해보면 한눈에 보기에 두 개 시료 모두 profile의 형태가 현저히 차이나는 것을 확인할 수 있는데 50℃와 비교해 실온에서의 시료는 초기 profile과 최종 profile의 변화가 50℃에 비해 변화폭이 현저히 적으며, profile

형태 또한 상층부와 하층부 전체에 걸쳐 거의 일정한 형태를 유지하였다. 변화폭을 비교해보면 음료 5가 더 안정적이며, 그림상에서 경과된 시간까지의 변화량으로 보아 음료 5의 경우 실온에서의 분산안정성은 문제가 없을 것으로 판단되었다.

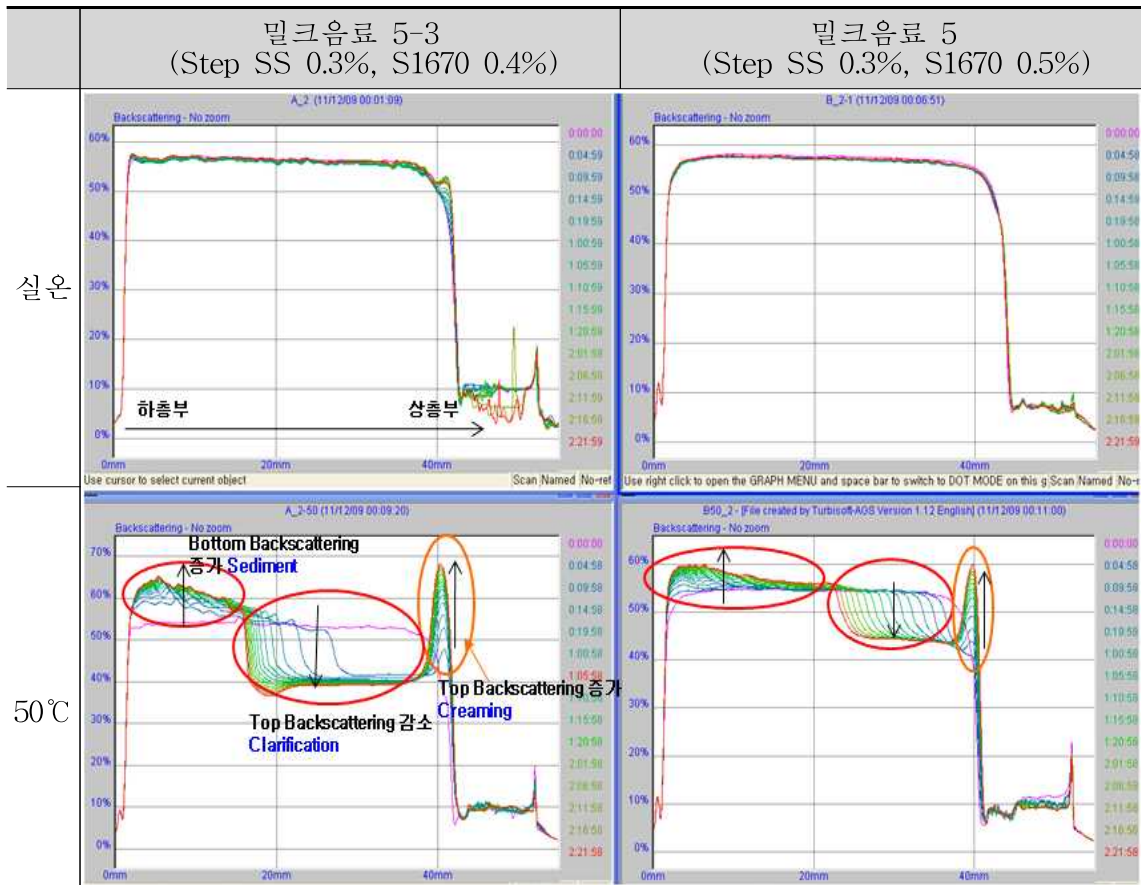
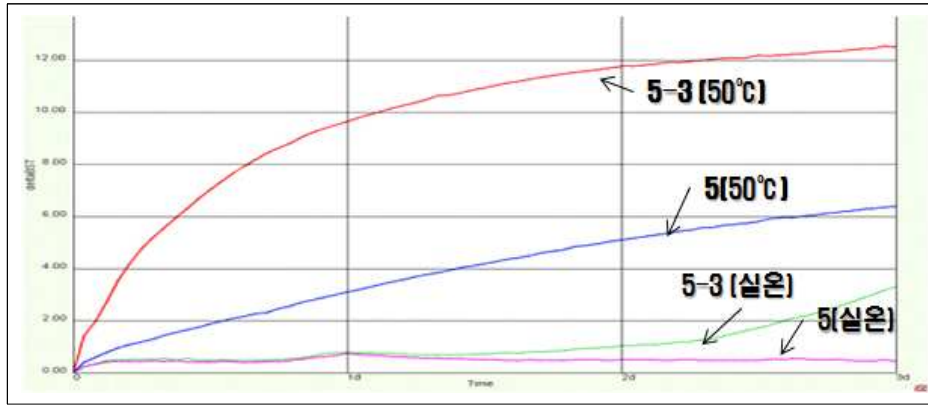


Figure 40. 온도에 따른 종실 밀크음료의 분산안정성 분석

Fig. 41은 이들 음료의 시간경과에 따른 안정도 지수를 나타낸 그래프이다. 앞서 profile의 결과에서와 같이 profile 변화 폭이 크고 형태가 불안정했던 음료 5-3(50℃)의 그래프가 가장 높은 곳에 곡선의 형태로 시간에 따라 진행되었고, 다음으로 음료 5(50℃)의 그래프가 직선으로 점차 증가하는 형태를 보였다. 실온에서 분석한 음료는 모두 1일까지는 거의 동일한 형태를 보이다 1일 이후로 음료 5-3(실온)의 그래프가 점차 상승하며 2일 이후부터 두 시료간의 편차는 더 커졌다. 이와 같은 추세는 전체 경과시간에 대한 안정도 지수에서도 확인할 수 있는데 음료 5(실온), 음료 5-3(실온), 음료 5(50℃), 음료 5-3(50℃) 순으로 안정도 지수가 높게 나타났다. 이는 앞서 profile 그래프에서 확인한 상층부의 creaming 현상이나 중간층의 청정화, 하층부의 침전현상을 이유로 들 수 있으며 시료 모두 실온에서의 안정성은 높은 편이지만 가온 상황 즉, 온장고(50~55℃)에서는 안정성에는 다소 문제가 될 것으로 예상되었다.



Stability index	음료 5-3 (실온)	음료 5-3 (50°C)	음료 5 (실온)	음료 5 (50°C)
		1.05	9.82	0.49

Figure 41. 온도에 따른 종실 밀크음료의 안정도 그래프(위)와 stability index 변화(아래)

㉔ 종실 밀크음료의 기호도 개선 및 제품 다양화 기술 개발

㉔ 종실 밀크 음료의 향미 개선

청삼 종실을 이용하여 음료용 밀크 제조를 위한 적정 전처리 방법과 밀크내 입자들의 살균, 저장, 유통 중 분산안정성이 보장되는 안정화 조건 등의 실험을 통하여 기본 종실 밀크음료(이하 오리지날 타입)의 최적 제조공정과 원·부재료의 배합비를 확립하였다. 오리지날 타입의 종실 밀크음료는 구수한 향미를 가지는 특징으로 하는 밀크형 음료로 본 실험에서는 종실 밀크 음료의 소비층을 어린이에서 젊은 층에 이르기까지 다양화하고자 밀크 음료의 향미개선을 위한 배합비 실험을 검토하였다.

Table 36는 기본 밀크음료의 배합비에 바닐라의 부드러운 향미와 초코의 달콤한 향미를 부여한 음료 제조 배합비이다. 바닐라 타입은 향미가 다소 약했으나 기본 청삼밀크음료에 비해 음용전후 맛이 더 부드러워졌고 초코타입의 경우 sugar syrup의 첨가농도가 0.2%에서 0.4%로 높아짐에 따라 음료의 색상이 약간 황색으로 되며 단맛강도가 더 느껴지면서 설탕 태운 향이 발현되어 0.2% 첨가구가 0.4%에 비해 기호적으로 좋았다. 초코향 타입별로는 타입 II가 타입 I에 비해 더 달게 느껴지고 타입 I에 비해 자연스런 신선한 코코아 향이 덜 느껴졌다. 그러나 초코타입 음료의 경우 타입 I, II 모두 180 mL 음료 1병을 한번에 섭취하기에는 단맛이 강한 것으로 판단되었다.

Table 36. 종실 밀크음료의 향미 개선을 위한 제조 배합비 및 음료의 당도

		(%)		
원 · 부재료	바닐라 타입	초코타입 I		초코타입 II
		1	2	
밀크 음료 베이스액	종실 밀크		60	
	설탕		3.5	
	정제염		0.1	
	해바라기씨유		1.1	
	Step SS		0.3	
	S1670		0.5	
	탄산수소나트륨		0.01	
	정제수		34.49	
밀크음료 베이스 액	99.87	91.65	91.45	91.65
Sweet Flavor(301443)	0.10	-	-	-
Vanilla Flavor(301441)	0.03	-	-	-
Chocolate Flavor(301442)	-	0.15	0.15	-
Chocolate Flavor(9415201)	-	-	-	0.15
Sugar syrup	-	0.2	0.4	0.2
고과당	-	8.0	8.0	8.0
합계	100	100	100	100
당도(°brix)	7.9	13.4	13.5	13.8

앞의 Table 36의 배합대로 바닐라향 첨가 음료 제조 실험 결과 바닐라 향미가 약한 것으로 나타나 바닐라향의 적정 첨가농도를 설정하고자 음료의 당도는 7.9°brix로 고정하고 바닐라향의 농도를 0.03~0.07%로 조절하여 음료를 제조한 다음 관능 평가하였다 (Table 37).

바닐라향의 첨가농도가 상승할수록 음료를 음용한 후 느껴지는 후미는 부드러워졌으며 0.03%의 경우 바닐라향이 약하여 음료의 맛과 향에서 바닐라향의 특색이 없었다. 0.05%와 0.07% 첨가 음료는 바닐라 고유의 향미가 느껴지면서 전체적인 음료의 맛도 훨씬 풍부해졌다. 종합적기호적에 있어서 바닐라향 0.05%보다는 0.07%가 종실 특유의 풋내는 가라앉히면서 부드러운 맛을 발현시켜 관능평가 점수가 높게 나타났다.

Table 37. 바닐라 향미 증실 밀크 음료의 제조 배합비 및 관능평가 결과

		(%)		
원·부재료		바닐라 1	바닐라 2	바닐라 3
밀크 음료 베이스액	증실 밀크		60	
	설탕		3.5	
	정제염		0.1	
	해바라기씨유		1.1	
	Step SS		0.3	
	S1670		0.5	
	탄산수소나트륨		0.01	
	정제수		34.49	
Sweet Flavor(301443)		0.10	0.10	0.10
Vanilla Flavor(301441)		0.03	0.05	0.07
합계		100.13	100.15	100.17
음료 당도(°brix)		7.9	7.9	7.9
관능평가	색상	6.67±1.03 ^a	6.50±1.05 ^a	6.50±1.05 ^a
	향	5.00±0.89 ^a	5.83±1.17 ^a	6.00±1.67 ^a
	맛	5.83±1.60 ^a	6.17±0.75 ^a	6.50±1.52 ^a
	종합적 기호도	5.83±1.33 ^a	6.17±0.75 ^a	6.50±1.38 ^a

한편 초코 향미가 가미된 밀크 음료의 제조는 다양한 초코 향을 대상으로 향료를 정제수에 일정 농도로 용해시켜 향미 특성을 분석한 다음 실험에 사용하였다. Table 38은 예비실험에서 선정한 초코 향 중 증실 밀크음료와 조화를 이루면서 기호적으로 적합한 초코 향을 선정하기 위한 음료 제조 배합비와 이들 음료의 관능평가 결과를 나타내었다.

초코향미를 가지는 음료의 경우 초코 특유의 단맛과 색상을 부각시키기 위해 sugar syrup과 고과당을 각각 0.2%, 6.0% 농도로 음료 제조에 사용하였으며 음료의 최종당도는 Chocolate Flavor(9415201)을 사용한 것이 12.1°brix로 약간 높았는데 이는 초코향 자체의 당도차이에서 기인한 것으로 판단된다. Chocolate Flavor(301442)를 첨가한 음료의 경우 인공적인 초코향과 맛이 발현되어 기호적으로 좋지 않았을 뿐 아니라 증실 밀크와 어울리지 않는다는 반응을 보였다. 그러나 Chocolate Flavor(9415201)은 음료에 깊은 단맛을 부여하면서 증실 특유의 풋내를 약하게 해주어 기호적으로 높은 점수를 얻었다. 하지만 이들 2가지 음료 모두 180mL 기준으로 음료를 포장할 경우 한 번에 마시기에는 단맛이 강하다는 평가가 제기되었다.

Table 38. 초코 향미 종실 밀크 음료의 제조 배합비 및 관능평가 결과

		(%)	
원·부재료		초코 1-1	초코 2-1
밀크 음료 베이스액	청삼종실 밀크	60	
	설탕	3.5	
	정제염	0.1	
	해바라기씨유	1.1	
	Step SS	0.3	
	S1670	0.5	
	탄산수소나트륨	0.01	
	정제수	34.49	
Chocolate Flavor(301442)		0.15	-
Chocolate Flavor(9415201)		-	0.15
Sugar syrup		0.2	0.2
고과당		6.0	6.0
합계		106.35	106.35
음료 당도(°brix)		11.5	12.1
관능평가	색상	6.75±1.28 ^a	6.75±1.28 ^a
	향	5.75±0.89 ^b	6.75±0.89 ^a
	맛	5.75±0.71 ^a	6.38±1.19 ^a
	종합적 기호도	5.75±0.89 ^a	6.50±1.07 ^a

Table 39은 앞서 초코향을 이용한 향미개선 실험에서 음료의 단맛이 강하다고 지적됨에 따라 초코타입 음료의 적정 당도를 설정하고자 고과당의 농도를 조절하여 제조한 음료의 배합비와 음료의 관능평가 결과이다. 이때 초코향은 종실 밀크 음료와 좋은 조화를 이룬 Chocolate Flavor(9415201)를 사용하였다. 음료의 당도를 7.0°brix로 조정한 음료가 관능평가 결과 맛, 종합적기호도에서 가장 높은 점수를 받았으나 당도를 달리하여 제조한 음료간의 유의적인 차이는 없는 것으로 나타났다.

Table 39. 초코 향미 종실 밀크 음료의 제조 배합비 및 관능평가 결과

		(%)			
원·부재료		초코 2-1-1	초코 2-1-2	초코 2-1-3	초코 2-1
밀크 음료 베이스액	청삼종실 밀크		60		
	설탕		3.5		
	정제염		0.1		
	해바라기씨유		1.1		
	Step SS		0.3		
	S1670		0.5		
	탄산수소나트륨		0.01		
	정제수		34.49		
Chocolate Flav.(9415201)		0.15	0.15	0.15	0.15
Sugar syrup		0.2	0.2	0.2	0.2
고과당		-	2	4	6.0
합계		100.35	102.35	104.35	106.35
음료 당도(°brix)		7.0	8.5	10.5	12.0
관능평가	색상	6.72±1.05 ^a	6.65±1.18 ^a	6.34±1.22 ^a	6.52±1.05 ^a
	향	6.86±0.92 ^b	6.20±0.75 ^a	6.59±0.88 ^a	6.59±0.88 ^a
	맛	6.96±1.18 ^a	6.10±1.22 ^a	6.32±1.35 ^a	5.89±1.43 ^a
	종합적 기호도	6.92±1.05 ^a	6.32±1.05 ^a	6.59±1.43 ^a	5.93±1.22 ^a

이상의 청삼종실 밀크음료의 향미개선을 위한 향료 적용 실험 결과 설정한 바닐라 및 초코 향미가 가미되는 음료의 배합비를 토대로 2가지 타입의 밀크음료를 제조하여 121℃에서 20분간 레토르트 살균하여 음료의 관능적 특성 변화를 조사하였다. 바닐라향 첨가 음료의 경우 본 실험에서 사용한 향료가 천연향이 관계로 레토르트살균 후 음료에서 느껴지는 바닐라 향미 강도가 약해졌고, 초코향 가미 음료는 색상이 진해졌다. 또한 음료를 실온에 저장한 결과 오리지널 타입 음료와 달리 향료가 가미된 음료는 내부에 약간의 덩어리가 생겼으며, 병 용기 내부 기벽에 줄 형태의 공기 자국이 생겨 분산안정성에 나쁜 영향을 미치는 것으로 나타났다.

Table 40은 레토르트살균 후에도 향 강도에 변화가 적고 종실 밀크음료의 품질특성과 분산안정성에 영향을 미치지 않는 향료 배합비를 설정하고자 또 다른 종류의 향료를 선별하여 음료를 제조하고 레토르트살균 후 관능평가를 실시하였다.

새로이 적용한 향료 모두 앞서 사용한 향료에 비해 레토르트살균 후 강도 변화가 거의 없었으며 종실 밀크음료의 향미를 보다 자연스럽게 향상시키는 것으로 나타났다. 그

리나 라이스향은 고소한 향이 종실 밀크의 단백질과 잘 어울리기는 하나 반대로 누룽지 사탕을 먹는 것 같아 종실 밀크음료 특유의 맛을 도리어 감소시키는 것으로 나타났다. 바닐라향(3101123)을 0.14%의 농도로 첨가한 시료는 자연스러우면서 음료 후미의 아린맛을 감소시켜주어 관능적으로 가장 좋은 평가를 받았다. 초코향 첨가 음료는 다른 2가지 음료보다 인공적인 향미가 발현되어 기호도 점수가 낮았으나 처리군간 유의차는 없는 것으로 나타났다.

Table 40. 바닐라 향미 종실 밀크 음료의 제조 배합비 및 관능평가 결과

원·부재료		라이스 1	바닐라 4	초코 5
밀크 음료 베이스액	종실 밀크		60	
	설탕		6.57	
	정제염		0.09	
	해바라기씨유		1.03	
	Step SS		0.28	
	S1670		0.47	
	탄산수소나트륨		0.01	
	정제수		35.42	
라이스향(3101122)	0.14	-	-	
바닐라향(3101123)	-	0.14	-	
초코향(3101124)	-	-	0.14	
합계	100.14	100.14	100.14	
음료 당도(°brix)	11.3	11.3	11.3	
관능평가	향	5.18±1.60 ^a	5.55±0.93 ^a	4.73±1.56 ^a
	맛	5.18±0.94 ^a	5.55±1.04 ^a	4.55±1.81 ^a
	종합적 기호도	5.36±1.50 ^a	5.64±1.12 ^a	4.55±1.86 ^a

Table 41는 앞서 초코향 첨가 시 음료에서 발현되는 인공적인 향미에 대한 약한 거부감을 해결하고자 초코향의 첨가농도는 줄이고 바닐라향을 혼합하여 제조한 음료의 배합비와 관능평가 결과이다. 초코향 단독 첨가구에 비해 바닐라를 혼합 첨가함으로써 초코타입을 선호하지 않던 관능평가요원들도 전반적인 기호도 평가점수가 상승하였으며 특히 바닐라향과 초코향을 1:1 비율로 혼합한 배합비 5-1이 달콤하면서도 부드러운 향미로 가장 높은 기호도를 보였다.

Table 41. 기호도 개선을 위한 초코향 첨가 청삼종실 밀크음료의 제조 배합비 및 관능평가 결과

		(%)		
원·부재료		초코 5-1	초코 5-2	초코 5-3
밀크 음료 베이스액	종실 밀크		56.00	
	설탕		6.57	
	정제염		0.09	
	해바라기씨유		1.03	
	Step SS		0.28	
	S1670		0.47	
	탄산수소나트륨		0.01	
	정제수		35.42	
바닐라향 (3101123)		0.07	0.093	0.105
초코렛향 (3101124)		0.07	0.047	0.035
합계		100.14	100.14	100.14
음료 당도(°brix)		11.2	11.2	11.2
관능평가	색상	6.75±1.04 ^a	6.50±1.20 ^a	6.88±0.83 ^a
	향	6.25±0.83 ^a	6.13±0.65 ^a	6.25±0.89 ^a
	맛	6.63±1.19 ^a	5.88±0.99 ^a	6.13±1.13 ^a
	종합적 기호도	6.75±1.04 ^a	6.00±0.93 ^a	6.25±1.04 ^a

⑥ 비타민 강화 종실 밀크 음료 제조

종실 밀크음료의 제품 다양화를 위해 비타민 강화 음료를 제조하였다. 시중에서 판매되고 있는 음료 제품 중 종실 밀크 음료와 유사한 두유 제품을 조사한 결과 비타민 A, B₂, B₁₂, D₃가 첨가되어 있었다. 이들 두유 제품들은 일일 권장량 기준으로 비타민 A는 0.2~21.3%, 비타민 B₂는 0.01~20%, 비타민 B₁₂는 8.3%~10.4%, 비타민 D₃는 9.4~56% 수준으로 첨가된 것으로 용기에 표기되었다.

본 실험에서는 식품첨가물용으로 생산, 판매되고 있는 비타민 A, B₂, B₁₂, D₃을 음료에 첨가할 경우 발생할 수 있는 색상, 이취, 이취 변화를 파악하여 적정 농도를 설정하고자 먼저 RDA 기준 일일 권장량의 50~100% 수준에 해당하는 식품첨가물용 비타민(A, B₂, B₁₂, D₃)을 증류수에 용해시킨 다음 시각 및 관능적 특성을 비교하였다.

일일 비타민 권장량 50% 수준에 해당하는 용액의 경우 색상은 비타민 A는 무색투명, B₂는 형광색 나는 노란색, B₁₂는 보라색, D₃는 무색으로 모든 용액에서 불순물은 보이지 않고 투명하였다. 향은 비타민 B₁₂에서 단내가 약하게 있으나 감지하기 힘들었고,

다른 비타민 용액은 특별한 향이 감지되지 않았으며 맛에 있어서 지용성비타민 A, D₃에서 약간의 이미가 발현되지만 극히 강도가 약하였다. RDA 기준 100% 수준에 해당하는 비타민을 첨가한 용액은 색상에서 비타민 A는 무색투명, B₂는 노란색, B₁₂는 보라색, D₃는 무색을 띄었으며 비타민 B₂와 B₁₂의 색상 강도가 50%에 비해 강해졌지만 탁도는 생기지 않았다. 향은 비타민 A에서 약한 기름내가 발현되었고, B₁₂는 단내가 감지(가루약 냄새)되나 음료에 적용 시 영향이 없을 정도의 강도였으며 다른 용액은 향이 없었다. 맛은 비타민 A에서 약간의 이미가 발현되나 강도는 약하였고 B₂와 D₃는 쓴맛과 떼은맛이 약간 감지되었고 특히, B₂의 쓴맛 강도가 비교적 강하였다.

Table 42. RDA 기준 일일 권장량의 50%, 100% 수준 비타민 첨가제의 첨가량

Vit. 농도	Vit A	Vit B ₂	Vit B ₁₂	Vit D ₃
50%/RDA 기준	375 μ g	750 μ g	1.2 μ g	2.5 μ g
100%/RDA 기준	750 μ g	1500 μ g	2.4 μ g	5 μ g

중실 밀크음료(오리지널 타입)에 RDA 기준 일일 권장량의 50%와 100% 수준으로 비타민 첨가제를 첨가, 용해시킨 다음 관능특성을 조사하였다. 색상측면에서 일일 권장량 100% 수준으로 비타민 A, B₂, B₁₂, D₃를 혼합 첨가한 음료의 경우 비타민 B₂의 영향으로 약간의 황색을 띄었으나 이미, 이취에 있어서는 50%와 100% 모두 청삼 중실 밀크 자체의 맛과 향에는 아무런 영향을 미치지 않는 것으로 나타나 비타민 강화 중실 밀크음료 제조시 RDA 기준 일일 권장량의 100%에 해당하는 비타민 A, B₂, B₁₂, D₃를 혼합 첨가하여도 음료의 향미에는 문제가 없는 것으로 판단되었다.

본 실험에서 개발한 청삼중실 밀크음료의 경우 장기 저장, 유통 중 음료의 안전성을 위해 레토르트살균공정이 필수적으로 적용되어야 한다. 따라서 본 실험에서 사용한 비타민 첨가제의 레토르트살균 후 잔존율을 분석하여 살균 중 파괴되는 양을 파악하여 초기 비타민 첨가제의 첨가농도를 설정하고자 중실 밀크음료와 동일한 당/산비의 모델용액(당도 7.5°brix, pH 6)을 제조하였다. 여기에 RDA 일일 권장량 기준 비타민 A는 50%, B₂는 25%, B₁₂는 20%, D₃는 80%에 해당되게 첨가, 용해 후 음료 제조공정에 따라 레토르트 살균하였다.

DART-MS를 이용하여 레토르트살균 후 용액에 잔존하는 비타민의 함량을 분석한 결과는 Table 43과 같다. 비타민 B₁₂가 레토르트살균 후 잔존율이 91.29%로 가장 안정적이었으며 비타민 B₂, D₃는 각각 64.35%, 69.36%의 잔존율을 보였다. 그러나 비타민 A의 경우 RDA 기준으로 50%에 해당하는 비타민을 첨가하였으나 121°C, 20분의 레토르트살균 조건에서는 열에 인해 파괴되어 살균 후 음료내에 잔존하지 않는 것으로 나타났다. 이상의 결과를 토대로 하면 RDA 기준으로 일일 권장량 중 비타민 A는 50%, B₂는 25%, B₁₂는 20%, D₃는 80%에 해당하는 비타민을 레토르트살균 후에 음료내 유지시키기 위해서는 중실 밀크음료 제조시 비타민 B₂는 582.75 μ g, B₁₂는 0.53 μ g, D₃는 5.77 μ g이 각각 첨

가되어야 살균 후 초기의 설정한 함량이 함유됨을 예측할 수 있었다.

Table 43. 비타민 첨가제의 레토르트살균 후 잔존율 및 RDA 기준 충족을 위한 실제 첨가량

비타민	살균 후 잔존율(%)	살균 후 RDA 기준치 충족 첨가량
Vit. A	0.00	-
Vit. B ₂	64.35	582.75µg/RDA 25%
Vit. B ₁₂	91.29	0.53µg/RDA 20%
Vit. D ₃	69.36	5.77µg/RDA 80%

㊤ 청삼종실 밀크 음료의 생산공정 모델 분석

㉠ 제조공정에 따른 밀크 및 음료의 품질특성 분석

청삼종실로부터 음료 제품을 생산하기 위한 여러 단계의 가공공정에 있어서 첫 번째 주요 공정인 종실 밀크의 제조공정을 보다 단순화하여 작업 편의성을 부여하고자 앞서 종실 밀크 제조공정 실험에서 최적공정으로 설정한 공정을 기준으로 하여 Fig. 17과 같이 일부 공정을 변형시켜 종실 밀크를 제조하였다. 즉, 수침한 종실에 대한 블랜칭처리 유무와 마쇄시 첨가되는 물의 온도를 달리하여 밀크를 제조하였다.

밀크 제조공정별 작업과정에서의 차이점을 살펴보면 종실을 블랜칭 처리를 하지 않고 바로 정제수와 함께 마쇄한 공정 1의 경우 60, 140 mesh 여과공정까지는 특별한 문제점이 없었으나, 여과액을 100℃에서 3분간 가열처리할 경우 단백질의 열변성으로 인한 응집현상과 비교적 많은 양의 거품이 생성되었다. 종실에 90~95℃ 온수를 가수하여 마쇄한 공정 2는 여과공정에서 비교적 시간이 더 소요되었고 여과 후 박의 양도 많았으며 박의 형태 또한 응집으로 입자의 크기가 크게 형성되었다. 또한 여과액의 가열처리 공정에서도 단백질 변성으로 인한 응집현상이 발생하였다. 종실을 끓는 물에 넣어 5분간 블랜칭 처리한 공정 3의 경우 마쇄물의 여과시간이 비교적 적게 소요되었고, 여과 후 박의 입자크기 또한 일정하게 형성되었고 여과액의 가열처리지 열변성에 의한 응집 현상이나 거품생성이 거의 없어 가장 안정적이었다.

Fig. 42는 종실 마쇄물을 여과, 가열처리한 공정별 밀크의 성상 및 이들을 호모믹서 처리한 후의 성상 변화를 나타낸 결과이다. 제조공정 1, 2의 경우 마쇄시 첨가되는 물의 온도에 관계없이 종실 마쇄물 여과액을 가열하면 단백질의 열변성에 의한 응집으로 입자 덩어리가 형성되었으나 95℃ 온수를 가수하여 마쇄한 제조공정 2가 제조공정 1보다 덩어리 크기가 훨씬 작았다. 또한 이들 밀크는 향과 맛에서도 풋내와 아린맛이 강하게 발현되었다. 반면 블랜칭 처리 후 마쇄한 제조공정 3은 여과액을 가열할 경우 열변성에 의한 밀크 내 입자덩어리를 관찰할 수 없었다. 이들 밀크를 호모믹서로 처리한 후에는 밀크내 덩어리는 관찰할 수 없었으나 밀크를 정치시킬 경우 하단부에 생성되는 침전층의 색상에 있어서 블랜칭 처리한 제조공정 3 처리군이 가장 검은 것으로 나타났다.

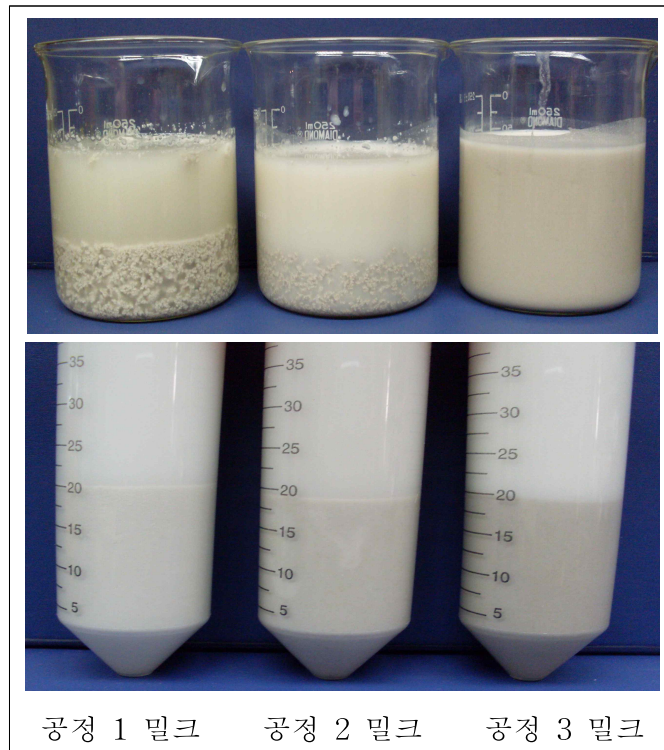


Figure 42. 제조공정에 따른 종실 밀크의 가열(위) 및 호모믹서처리 후 성상(아래)

Table 44는 앞의 공정 1~3의 방법으로 제조한 종실 밀크의 품질특성을 조사한 결과이다. 밀크의 색도를 측정된 결과 색의 밝기를 나타내는 백색도는 공정 1 처리군이 25.75로 가장 높고 반면 적색도와 황색도는 공정 3 처리군이 3.55, 15.56으로 가장 높았으며 90~95℃ 온수를 가수하여 마쇄처리한 공정 2는 이들의 중간정도였다. 이는 청삼 종실을 끓는 물에 넣어 블랜칭 처리함에 따라 마쇄공정에서 종실의 껍질에 존재하는 색소 성분이 더 많이 밀크로 이행됨에 따라 발생한 것으로 결과로 판단된다. 밀크내 조단백 함량은 2.27%~2.46%로 공정간 유의차가 없었으며 고형분 함량의 경우 공정 1 처리군이 7.46%로 공정 2 처리군의 6.55%보다 약 0.9%가량 높았다. 그러나 밀크 수율은 처리군간에 큰 차이를 보여 공정 2 처리군이 57.13%로 가장 낮고 공정 3 처리군이 76.16%로 가장 높은 것으로 나타났다. 이들 결과로 미루어 보아 밀크 제조시 청삼종실의 블랜칭 처리공정은 수율 증진에 효과적 공정이었고 또한 블랜칭 처리를 하지 않은 종실의 경우 마쇄시 첨가되는 물의 온도가 높을수록 종실조직내의 단백질이 마쇄공정에서 변성되어 여과공정에서 박으로 남게 됨에 따라 밀크의 수율이 감소함을 알 수 있었다.

Table 44. 제조공정에 따른 종실 밀크의 품질특성

분석항목		공정 1 밀크	공정 2 밀크	공정 3 밀크
색도	L-value	25.75±0.01	20.78±0.01	17.07±0.00
	a-value	0.94±0.01	3.19±0.01	3.55±0.00
	b-value	11.19±0.01	14.69±0.02	15.56±0.00
조단백(%)		2.46±0.19	2.27±0.05	2.35±0.01
고형분(%)		7.46±0.02	6.55±0.03	6.90±0.01
수율(%)		69.99±2.57	57.13±4.51	76.16±2.18
당도(°brix)		2.9±0.1	3.1±0.1	3.1±0.1
점도(cp)		1.63±0.08	1.53±0.11	1.97±0.10

공정 1 밀크 : 수침한 종실에 4배 가수하여 마쇄, 균질, 4배 가수, 여과(60, 140 mesh), 가열, 균질의 공정을 거친 밀크

공정 2 밀크 : 수침한 종실에 4배 가수(95℃)하여 마쇄, 균질, 4배 가수(95℃), 여과(60, 140 mesh), 가열, 균질의 공정을 거친 밀크

공정 3 밀크 : 수침한 종실을 블랜칭 후 4배 가수(95℃)하여 마쇄, 균질, 4배 가수(95℃), 여과(60, 140 mesh), 가열, 균질의 공정을 거친 밀크

제조공정을 달리한 종실 밀크의 입자크기 분포 곡선과 이들을 입자크기별 구간으로 나누어 구성비를 조사한 결과는 Fig. 43, Table 45과 같다. 블랜칭 공정을 삭제한 공정 1, 2 밀크는 10~20µm 구간에서 하나의 주 피크를 중심으로 양쪽으로 퍼지는 형태의 입자분포 곡선을 보인 반면 블랜칭 공정을 거친 공정 3 밀크는 5µm, 10~20µm, 30µm부근에서 3개의 피크를 형성하는 입자 분포곡선을 보여 블랜칭 공정을 삭제한 공정 1, 2에 비해 매우 다양한 입자크기의 물질로 구성되어 있음을 알 수 있었다.

이들을 입자크기별 구간으로 나누어 구성비를 비교해 보면 공정 1, 2는 10~30 µm 구간의 구성비가 각각 50.80, 43.49%로 가장 높고 5~10µm 구간이 22.13%로 그 다음으로 높았다. 반면 블랜칭 공정을 거친 공정 3은 5 µm이하 구간의 구성비가 38.54%로 가장 높았고 공정 1, 2에 비해 30~50 µm 구간의 구성비가 17.12%로 높았으며 평균입경에 있어서도 약간 큰 것으로 나타났다.

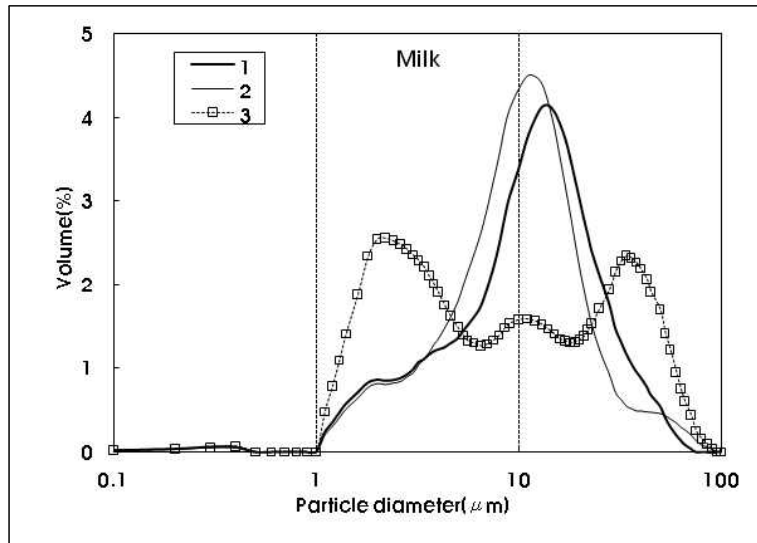


Figure 43. 제조공정에 따른 종실 밀크의 입자크기 분포 곡선 변화

Table 45. 제조공정에 따른 종실 밀크의 입자 구간별 구성비 비율

시 료	Range of particle size(μm)					Mean diameter (μm)
	<5	5~10	10~30	30~50	50<	
공정 1 밀크	18.42	22.13	50.80	7.45	1.20	13.47
공정 2 밀크	19.01	31.24	43.49	4.06	2.20	12.03
공정 3 밀크	38.54	13.94	24.44	17.12	5.96	15.03

제조공정을 달리한 밀크를 이용하여 앞서 설정한 음료 안정화 기법과 품질개선 배합비 결과에 따라 밀크를 조미하고 레토르트살균하여 음료를 제조한 다음 저장에 따른 성분 변화를 관찰하였다(Fig. 44). 블랜칭 공정을 삭제한 공정 1과 90~95℃ 온수를 가수하여 마쇄하는 공정 2에 의해 제조한 밀크로 만든 음료는 레토르트살균직후 단백질의 열변성에 의한 응집 현상으로 물층과 응집된 덩어리의 분리가 발생하였다. 반면 블랜칭 공정을 거친 공정 3 밀크로 제조한 음료는 분산안정성이 유지되었다. 또한 본 결과에는 나타나지 않았으나 이들 음료의 향미를 비교한 결과 공정 1, 2 음료는 풋내가 다소 강하게 감지되었다. 저장 30일 후 음료 성상에 있어서도 공정 3을 제외한 다른 처리공정은 음료 분산 안정성에 문제가 있었다.

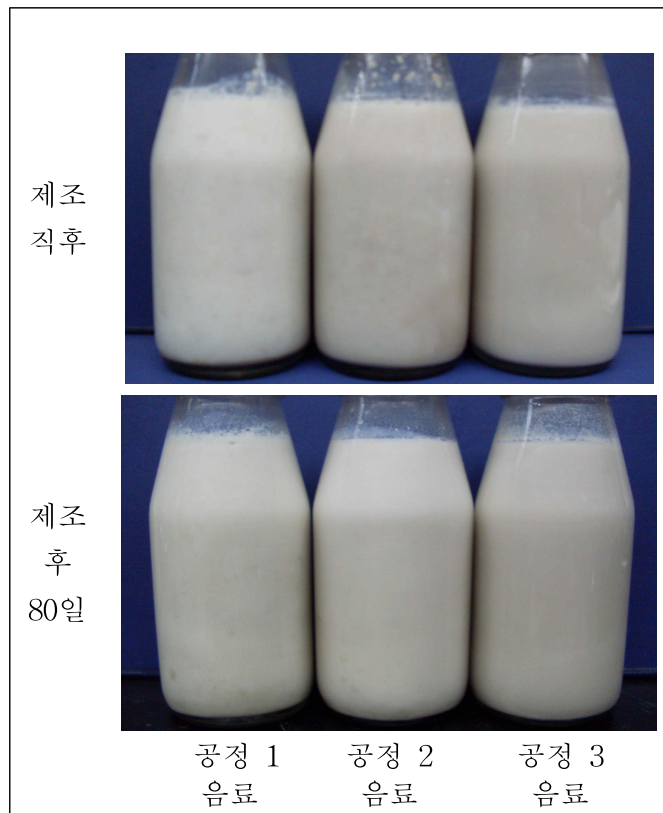


Figure 44. 제조공정을 달리한 종실 밀크로 제조한 음료의 살균 및 저장에 따른 성상.

Table 46는 제조공정을 달리한 밀크로 제조한 음료의 품질특성을 비교한 결과이다. 앞서 밀크의 품질특성 결과에서 나타난 것과 동일하게 공정 3 밀크가 공정 1, 2 밀크에 비해 백색도는 19.82로 가장 낮고 적색도와 황색도는 각각 4.11, 19.27로 가장 높았다. 음료내 고형분 함량에 있어서는 공정 1 밀크로 제조한 음료가 11.6%로 가장 높았으며 당도는 공정 3 밀크로 제조한 음료가 8.3°brix로 약간 높았다. 점도 측정 결과 제조공정별 밀크에 따라 음료 제조 후 차이를 보여 공정 3 밀크는 6.10cp로 공정 1 밀크에 비해 2배 정도 높은 것으로 나타났다. 따라서 제조공정을 달리하여 만든 밀크의 경우 밀크 상태에서 서보다 이들을 이용하여 음료를 제조한 후 공정별 차이가 확연히 발생함을 알 수 있었다.

Table 46. 제조공정을 달리한 청삼종실 밀크로 제조한 음료의 품질특성

분석항목		공정 1 음료	공정 2 음료	공정 3 음료
색도	L-value	28.85	22.21	19.82
	a-value	0.69	3.52	4.11
	b-value	11.19	16.65	19.27
조단백(%)		1.44	1.43	1.34
고형분(%)		11.60	8.89	9.26
당도(°brix)		7.6	7.6	8.3
점도(cp)		3.61	5.38	6.10

Fig. 45는 제조공정을 달리한 밀크로 제조한 음료의 particle size 분포 곡선의 변화를 나타낸 결과이다. 공정 1, 2 밀크로 제조한 음료는 앞서 밀크의 입도분포 측정 결과에서 나타난 주 피크대(10~20 μm)보다 훨씬 입자가 큰 100 μm 부근으로 주 피크가 이동하여 형성되었다. 이는 제조공정별 밀크의 품질특성 결과에서 설명한 바와 같이 열변성에 의해 형성된 덩어리 물질들이 비록 호모믹서 처리공정에서 작은 덩어리들로 파쇄되어 분산안정화를 위해 첨가되는 유화제와 반응하여 균질화공정을 거치면서 작은 입자들로 분산되지만 레토르트 살균시 열에 의해 다시 응집현상을 일으킴에 따라 살균전보다 더 큰 입자들의 구성비가 증가한 것으로 판단된다.

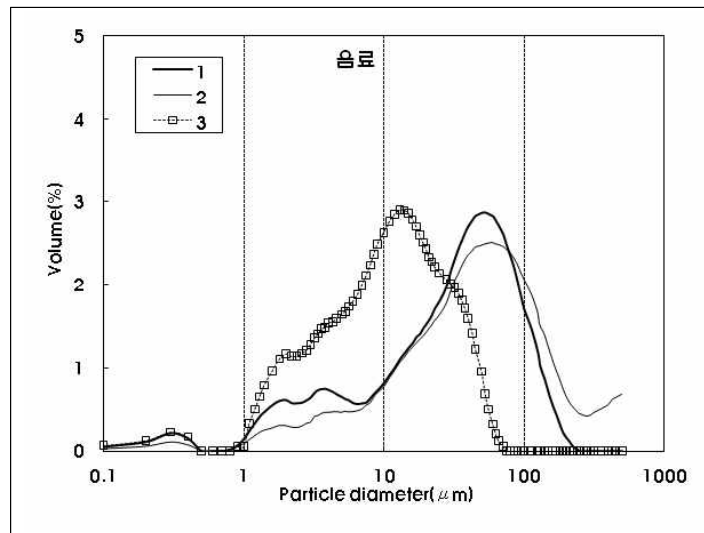


Figure 45. 제조공정을 달리한 종실 밀크로 제조한 음료의 particle size 분포 곡선 변화

Table 47의 입자크기별 구성비에서도 공정 1, 2 음료의 경우 50 μm 이상의 입자 구성비가 밀크 대비 급격하게 증가하였고 동시에 평균입경에 있어도 41~71 μm 으로 커지는 것으로 나타났다. 그러나 공정 3 밀크로 제조한 음료는 하나의 주 피크를 중심으로

비교적 안정적인 형태를 보여 10~30 μm 부근의 입자 구성비가 40.31%로 가장 높고 평균입경에 있어서도 13.84 μm 으로 공정 1, 2보다 월등히 적은 것으로 나타났다. 이는 블렌칭 공정에서 열에 불안정한 물질들이 변성, 여과공정에서 제거됨에 따라 얻어진 밀크는 음료 제조시 유화제와의 유화작용, 균질화 공정을 통해 밀크상태일 때에 비해 훨씬 일정하고 작은 사이즈의 입자로 전환되어 음료 안정화에 기여함을 알 수 있었다. 따라서 청삼종실을 이용한 음료 제조시 블렌칭 공정은 비록 작업성, 에너지 측면에서는 떨어지나 최종 음료 제품의 품질과 안정화 측면에서 가장 효율적인 공정으로 판단되었다.

Table 47. 제조공정을 달리한 종실 밀크로 제조한 음료의 particle size 구간별 구성비 비율

종실 음료	Range of particle size(μm)					Mean diameter (μm)
	<5	5~10	10~30	30~50	50<	
공정 1 음료	12.80	6.43	23.45	21.09	36.23	41.00
공정 2 음료	4.21	5.63	21.80	18.39	49.97	71.61
공정 3 음료	24.29	20.92	40.30	12.59	1.90	13.84

본 실험에서는 블렌칭 공정 후 가공공정을 더욱 개선하고자 물과 함께 마쇄된 종실 마쇄물에 대해 여과공정 적용 시기를 달리한 밀크 가공공정을 검토하였다. 종실 마쇄물을 60, 140 mesh로 여과한 다음 가열, 호모믹싱하는 제조공정 3과 마쇄물을 여과, 가열 후 다시 140 mesh로 여과한 다음 호모믹싱하는 공정(공정 4) 및 종실 마쇄물을 먼저 가열한 다음 60, 140 mesh로 여과, 호모믹싱하는 공정(공정 5)으로 나누어 밀크를 제조하였다.

작업공정 중 특징을 살펴보면 종실 마쇄물을 바로 가열처리하는 공정 5 밀크는 마쇄물을 여과하여 여과액을 가열하는 공정 3, 4 밀크에 비해 가열 중 고형분이 많아 용기에 눌러 붙었고 내용물이 끓기까지 소요되는 가열시간도 더 길었다.

Fig. 46과 Table 48은 이들 밀크의 성상과 품질특성을 분석한 결과이다. 색도를 비교하면 공정 5 처리 밀크는 백색도가 13.30으로 낮고 적색도는 5.12로 높은 값을 보였으며 육안상으로도 다른 공정의 밀크에 비해 색상이 약간 어두운 것으로 나타났다. 수율은 종실 마쇄물을 여과 후 가열처리하는 공정 3, 4가 76.16, 72.66%로 높았으며 고형분 함량은 공정 5 밀크가 7.26%로 가장 높았으나 밀크내 조단백 함량, 당도, 점도는 공정간에 유의적인 차이는 없는 것을 나타냈다.

이상의 결과를 종합하면 종실 마쇄물을 바로 가열처리하는 공정 5의 경우 마쇄물 전체를 가열함에 따라 가열과정에서 종실 껍질성분이 더 많이 용출되어 그 다음 공정인 여과과정에서 밀크로 더 많이 이행됨에 따라 밀크내 고형분 함량이 증가하고 색의 밝기를 나타내는 백색도는 감소하는 결과를 나타내었다. 또한 공정 5의 경우 종실 마쇄물 전체를 가열함으로써 가열에 소요되는 시간이 길어짐으로서 이로 인해 수분 증발도 많아 최종 밀크의 수율은 감소되는 것으로 나타났다.



Figure 46. 제조공정을 달리한 종실 밀크의 가열(위) 및 호모믹서처리 후 정상(아래)

Table 48. 제조공정을 달리한 종실 밀크의 품질특성

분석항목		공정 3 밀크	공정 4 밀크	공정 5 밀크
색도	L-value	17.07±0.00	17.95±0.02	13.30±0.01
	a-value	3.55±0.00	3.34±0.00	5.12±0.01
	b-value	15.56±0.00	15.47±0.01	15.47±0.00
조단백(%)		2.35±0.01	2.10±0.09	2.12±0.09
고형분(%)		6.90±0.01	6.66±0.05	7.26±0.08
수율(%)		76.16±2.18	72.66±3.21	69.44±2.23
당도(°brix)		2.9±0.20	3.2±0.20	3.2±0.10
점도(cp)		1.97±0.10	1.90±0.22	1.88±0.15

공정 3 밀크 : 수침한 종실을 블랜칭 후 4배 가수하여 마쇄, 균질, 4배 가수, 여과(60, 140 mesh), 가열, 균질의 공정을 거친 밀크

공정 4 밀크 : 수침한 종실을 블랜칭 후 4배 가수하여 마쇄, 균질, 4배 가수, 여과(60, 140 mesh), 가열, 여과(140 mesh), 균질의 공정을 거친 밀크

공정 5 밀크 : 수침한 종실을 블랜칭 후 4배 가수하여 마쇄, 균질, 4배 가수, 가열, 여과(60, 140 mesh), 균질의 공정을 거친 밀크

Fig. 47, Table 49은 공정 3, 4, 5 밀크의 particle size 변화 곡선과 입자 구성비를 나타낸 것이다. 모두 5 μm 와 30 μm 에서 가장 큰 피크를 보이며 10 μm 부근에 작은 피크가 나타났다. 입자구간별 구성비에 있어서 마쇄물을 여과 후 가열처리하는 공정 4와 가열 후 여과하는 공정 5를 비교해 보면 입자의 평균직경은 차이가 없었으나 5~10 μm 입자 구성비는 공정 4가 약간 높았고 10~30, 30~50 μm 구성비는 공정 5가 높았다. 여과액을 가열 후 2차 여과처리공정의 적용 유무를 달리한 공정 3과 4를 비교해 보면 2차 여과처리한 공정 4가 5 μm 이하 구성비가 높고 50 μm 이상 구성비가 낮은 것으로 나타나 종실 밀크내 입자 크기는 가열처리전 마쇄물의 여과공정 적용 여부보다 가열 후 2차 여과처리공정 적용 여부에 더 큰 영향을 받는 것으로 나타났다.

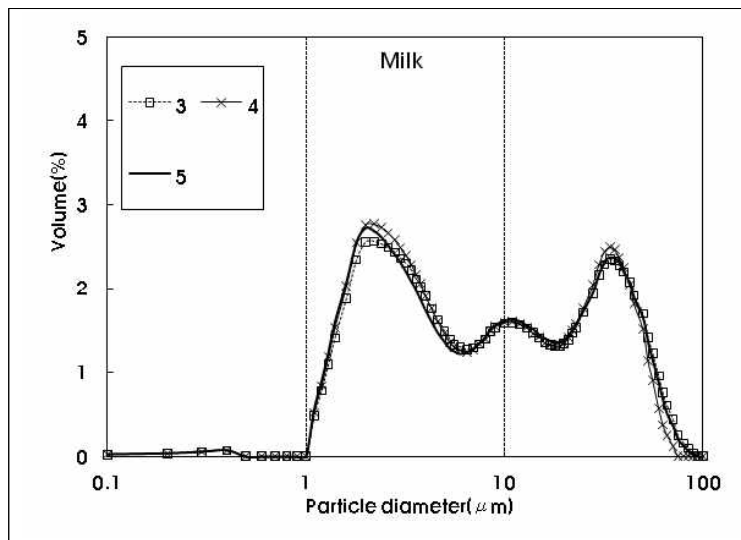


Figure 47. 제조공정을 달리한 종실 밀크의 입자크기 분포 곡선 변화

Table 49. 제조공정을 달리한 종실 밀크의 particle size 구간별 구성비 비율

제조공정	Range of particle size(μm)					Mean diameter (μm)
	<5	5~10	10~30	30~50	50<	
공정 3 밀크	32.72	16.05	27.83	17.15	6.25	15.87
공정 4 밀크	35.15	16.51	27.92	17.26	3.16	14.19
공정 5 밀크	35.29	13.43	29.54	18.54	3.20	14.68

Fig. 48은 공정 3, 4, 5로 제조한 밀크를 이용하여 앞서 음료의 안정화, 향미개선 실험에서 설정한 원·부재료의 배합비에 따라 제조한 종실 밀크음료의 살균 후 성상을 나타낸 결과이다. 살균직후 모두 약간의 거품이 생성되었으나 냉각 후 줄어들었다. 육안상

으로 볼 때 음료의 색상은 공정 5 밀크가 약간 어두웠고 공정 3, 4 음료는 차이가 없었으며 살균으로 인한 음료내 입자의 엉김이나 응집으로 인한 층분리 현상은 발생하지 않았다.

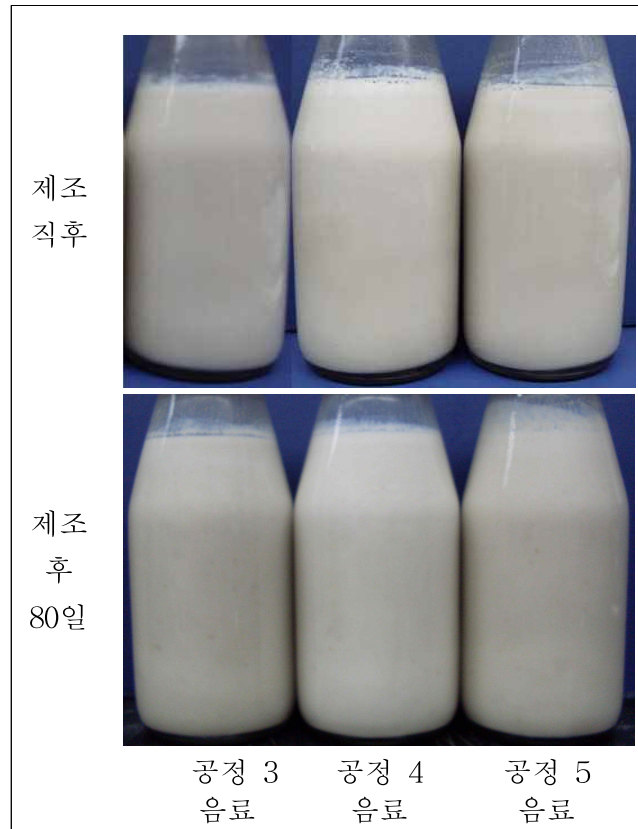


Figure 48. 제조공정을 달리한 종실 밀크로 제조한 음료의 살균 및 저장 후 성상

음료의 품질특성을 살펴보면(Table 50) 공정 3, 4 음료의 경우 밀크에서와 같이 색도와 조단백 함량 등 전체 분석항목에서 비슷한 수치를 나타내었고, 공정 5 음료 또한 종실 마쇄물을 바로 가열함으로서 용출된 껍질 유래 색소 성분에 의해 나타난 색도나 고형분 함량의 차이가 음료 제조 후에도 같은 경향을 보였다. 그러나 음료의 당도는 공정 5 밀크로 제조한 음료가 8.6°brix로 공정 3, 4 밀크로 제조한 음료보다 약간 높았다.

Table 50. 제조공정을 달리한 종실 밀크로 제조한 음료의 품질특성

분석항목		공정 3 음료	공정 4 음료	공정 5 음료
색도	L-value	19.82±0.00	19.84±0.00	14.21±0.05
	a-value	4.11±0.02	4.03±0.01	6.28±0.00
	b-value	19.45±0.01	19.93±0.03	18.77±0.02
조단백(%)		1.34±0.08	1.32±0.06	1.42±0.06
고형분(%)		9.89±0.01	9.99±0.00	10.54±0.22
당도(°brix)		8.1±0.2	8.3±0.1	8.6±0.3
점도(cp)		6.10±0.45	6.16±0.22	6.81±0.27

공정 3, 4, 5 밀크를 이용하여 제조한 음료의 particle size 분포 곡선(Fig. 49)을 조사한 결과 공정간의 차이는 거의 없는 것으로 나타났다. 그러나 입자구간별 구성비에 있어서는 5 μm 이하 구성비는 공정 5, 4, 3의 순으로 높았고, 10~30 μm 구성비는 공정 3, 4, 5의 순으로 높았다. 30~50 μm 입자 구성비는 공정 4가 5.38%로 다른 것에 비해 약간 높았으며 평균입자 크기는 비슷하였다.

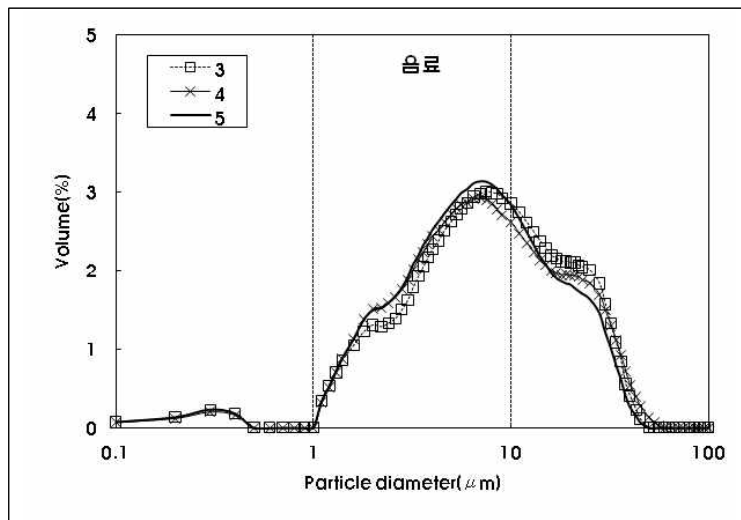


Figure 49. 제조공정을 달리한 종실 밀크로 제조한 음료의 particle size 분포 곡선 변화

Table 51. 제조공정을 달리한 종실 밀크로 제조한 음료의 particle size 구간별 구성비

종실 음료	Range of particle size(μm)					Mean diameter (μm)
	<5	5~10	10~30	30~50	50<	
공정 3 음료	31.59	29.04	34.81	4.56	-	9.96
공정 4 음료	34.50	28.21	31.81	5.38	0.10	9.85
공정 5 음료	35.43	30.31	30.84	3.42	-	9.02

음료의 관능적 특성을 평가한 결과(Table 52) 색상과 향에서는 음료간에 유의적인 차이는 없었으나 향의 경우 공정 4처리 음료가 좀 더 후미가 깔끔하여 기호도가 높았다. 맛은 후미에 쓴맛이 발현되는 공정 5 처리 음료의 기호도가 가장 낮았고 종합적인 기호도에서는 공정 4 처리 음료가 유의적인 차이를 보이며 가장 높은 점수를 얻어 기호도가 가장 좋은 것으로 판명되었다.

Table 52. 제조공정을 달리한 종실 밀크로 제조한 음료의 관능평가 결과

종실 음료	색상	향	맛	종합적 기호도
공정 3 음료	6.63±1.06 ^a	5.63±1.06 ^a	6.13±1.55 ^a	6.25±1.16 ^b
공정 4 음료	6.63±0.92 ^a	6.38±1.41 ^a	6.88±1.13 ^a	7.25±0.89 ^a
공정 5 음료	6.63±0.92 ^a	5.88±1.25 ^a	6.00±0.93 ^a	6.13±0.64 ^b

이상의 실험 결과를 종합하면 청삼 종실로부터 음료용 밀크 제조공정은 청삼종실을 수침, 블랜칭, 마쇄, 여과하여 얻은 밀크액을 가열하고 140 mesh로 2차 여과한 것을 호모믹싱 처리하는 공정이 최종 제품의 이화학적, 관능적 품질특성 측면에서 좋은 것으로 판단되었다.

㉔ 소포제 처리시기에 따른 밀크음료의 품질특성 분석

종실 밀크 제조공정 또는 밀크음료의 살균직후 상층부에 발생하는 거품을 억제하기 위해 소포제의 적용시기별 효과를 조사하였다. 즉, 밀크 마쇄공정 또는 음료 조미 배합공정에 소포제를 처리하여 효과를 비교하였다.

균질기로 2분간 균질 후 생성되는 거품 볼륨의 증가량(%)을 환산한 값인 거품 형성도 측정 결과 소포제를 사용하지 않은 대조군(19%)과 비교할 때 CA-L이 거품 억제 효과가 우수하였고 특히, 음료 제조시 조미용 부재료에 함께 첨가하는 것이 9.5%로 가장 거품 형성 억제 효과가 높은 것으로 나타났다.

0.4%의 소포제를 종실 마쇄공정에서 적용한 결과 그 다음 공정인 여과, 가열처리공정에서 대조군과 비교하여 효과가 크게 나타나지 않았다. 이들 소포제를 처리하여 얻은 밀크를 이용하여 음료를 제조, 살균한 결과 효과는 없었으며 도리어 소포제 중 TJ-2000의 경우 살균 후 물층 생성과 함께 음료내 층분리가 일어나는 것을 확인 할 수 있었다.

한편 기존 공정에 따라 제조한 밀크를 이용하여 음료 제조를 위한 조미, 배합공정에서 0.4%의 소포제를 첨가하여 제조한 음료를 살균한 결과 거품억제 효과는 대조군과 차이가 없었으며 TJ-2000처리군은 음료의 분산안정성을 떨어뜨리고 층분리가 발생하였다 (Fig. 50).

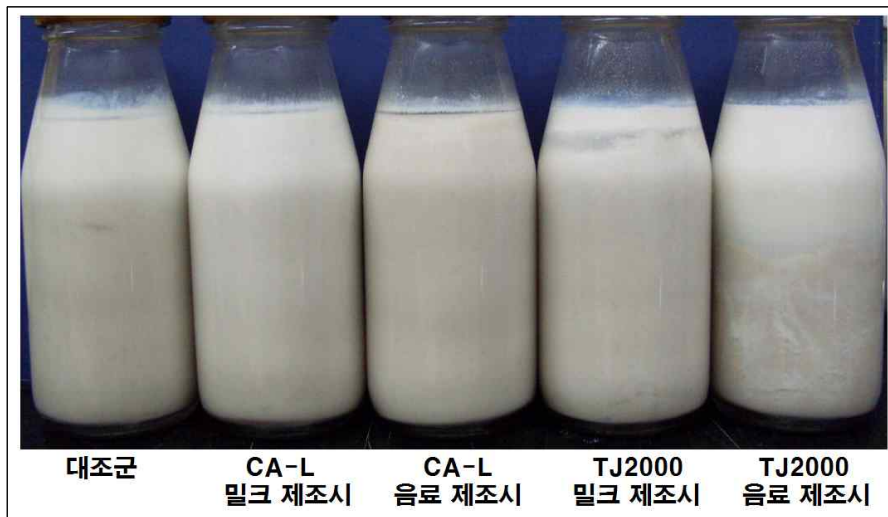


Figure 50. 소포제 적용시기에 따른 종실 밀크 음료의 살균 후 성상

이들 소포제 적용시기를 달리한 음료의 품질특성을 조사한 결과는 Table 53과 같다. 음료의 상·하층부위를 나누어 분석한 결과 점도에 있어서 음료 제조시 첨가한 CA-L의 경우 상하층간에 차이가 없었으나 나머지 음료는 약간의 차이를 보였다. 백색도와 적색도에서 대조군과 CA-L의 경우 상·하층간에 차이가 없었으나 TJ-2000의 경우 소포제 적용시기에 관계없이 큰 차이를 보였다. 균질기로 2분간 균질 후 생성되는 거품 볼륨의 증가량(%)을 환산한 값인 거품 형성도 측정 결과 소포제를 사용하지 않은 대조군(19%)과 비교할 때 CA-L이 거품 억제 효과가 우수하였고 특히, 음료 제조시 조미용 부재료에 함께 첨가하는 것이 가장 거품 형성 억제 효과가 높은 것으로 나타났다.

Table 53. 소포제 적용시기에 따른 중실 밀크 음료의 품질특성

분석항목		대조군		밀크 제조시				음료 제조시			
				TJ-2000		CA-L		TJ-2000		CA-L	
		상층	하층	상층	하층	상층	하층	상층	하층	상층	하층
색도	L-value	21.07	19.13	21.47	15.63	21.27	19.62	29.02	9.11	20.96	19.45
	a-value	3.63	4.31	3.4	5.7	3.36	3.96	-0.04	7.84	3.73	4.17
	b-value	18.01	18.72	17.63	18.49	17.50	18.18	12.30	12.99	17.86	18.31
점도(cp)		1.7	2.1	1.3	1.6	1.1	1.1	1.7	2.1	0.8	1.1
거품형성률(%)		19.0		14.5		11.1		19.3		9.5	

소포제 처리에 따른 청삼중실 밀크 음료 상·하층부위의 입자크기 분포 곡선 변화를 조사하였다. 대조군의 경우 5 μm부근에 작은 피크가 생성되고 15 μm부근에 가장 큰 피크가 생성되는 형태로 상·하층간에 차이가 나타나지 않았다. TJ-2000의 경우 밀크 제조시 첨가했을 때는 비교적 그 형태의 차이가 크지 않지만 음료 제조시 첨가했을 때 입자 분포곡선의 형태가 완전히 달라진 것을 확인할 수 있었다. CA-L의 경우 밀크 제조시 첨가한 것과 음료 제조시에 첨가한 것 모두 상·하층부위간에 큰 차이는 없었으나 대조군보다 더 작은 입자 사이즈 쪽으로 주 피크가 이동하여 전체적인 입자 분포곡선의 형태에 차이가 있었다(Fig. 51).

입자 구간별 구성비를 살펴보면(표 44) CA-L는 소포제의 적용시기에 관계없이 대조군과 비교해 5 μm이하, 5~10 μm범위의 입자 구성비가 증가하는 것으로 나타났고 특히, 음료 조미 배합공정에 적용한 것이 5 μm이하, 5~10 μm 입자 구성비가 높았다. CA-L 소포제 처리는 밀크내의 다양한 크기의 입자들을 결합, 분산시켜 평균입자크기도 작게 하면서 고른 입자분포도를 가지게 하는 것으로 판단되나 음료차이를 보이지 않았다.

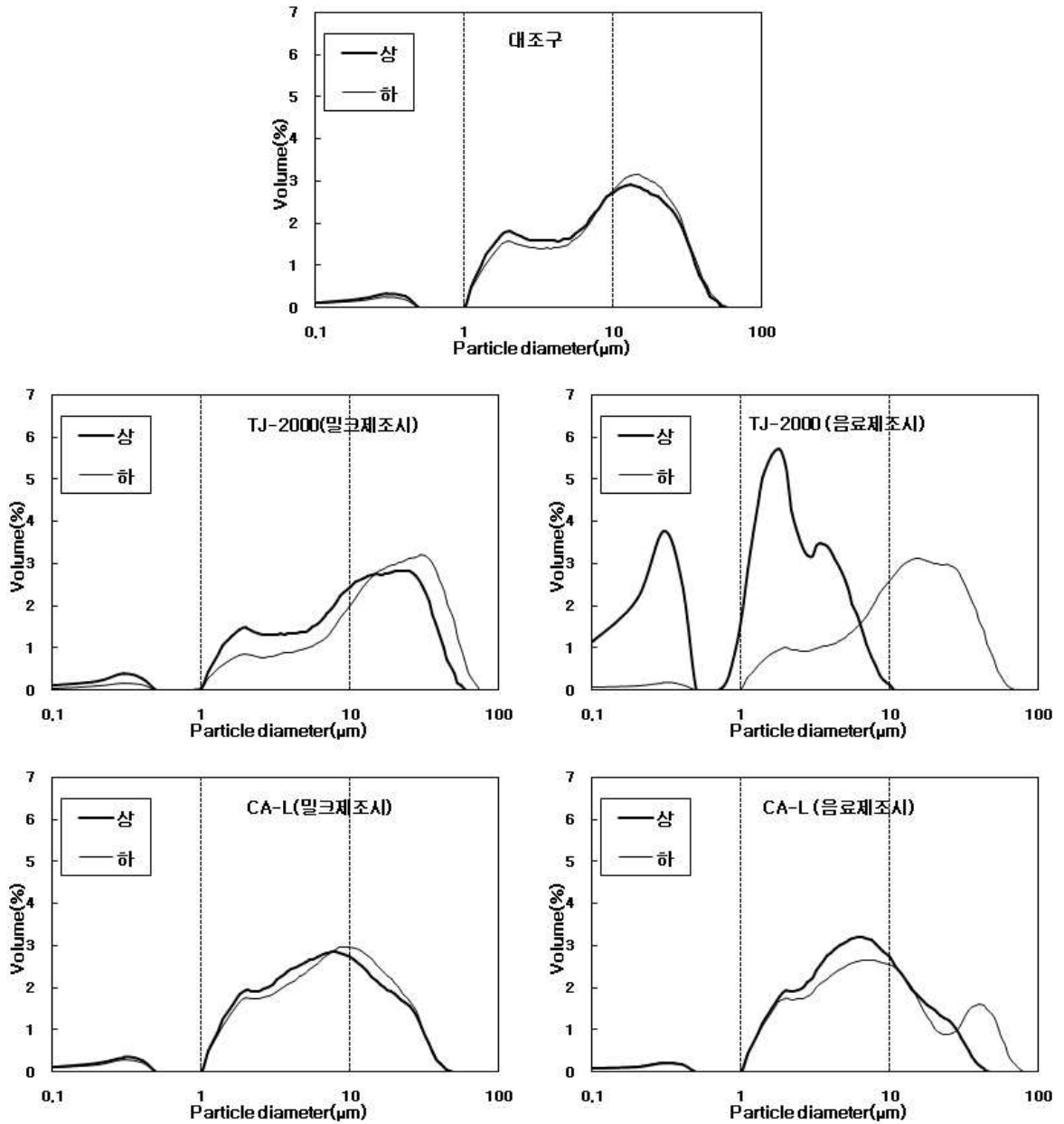


Figure 51. 소포체 적용시기에 따른 종실 밀크음료의 입자크기 분포 곡선 변화

Table 54. 소포제 적용시기에 따른 종실 밀크음료의 particle size 구간별 구성비(%)

소포제		Range of particle size(μm)					Mean diameter (μm)
		<5	5~10	10~30	30~50	50<	
대조군	상	30.67	21.81	41.39	6.04	0.09	11.55
	하	26.77	21.17	45.19	6.74	0.13	10.65
TJ-2000 (밀크제조시)	상	25.76	19.00	43.76	11.18	0.30	12.74
	하	15.81	13.99	45.77	20.82	3.61	18.48
CA-L (밀크제조시)	상	38.87	27.68	30.81	2.64	-	5.38
	하	34.41	27.51	35.32	2.76	-	9.07
TJ-2000 (음료제조시)	상	89.29	10.71	-	-	-	1.67
	하	18.69	18.81	47.70	13.68	1.12	15.05
CA-L (음료제조시)	상	41.49	30.57	25.89	2.05	-	7.83
	하	35.40	26.09	23.12	11.90	3.49	11.48

④ 살균온도에 따른 밀크음료의 품질특성 분석

청삼종실 음료의 유통 중 안전성이 보장되는 최소 살균온도를 설정하여 고온의 레토르트 살균으로 인해 발생하는 음료의 품질 열화를 최소화하고자 최적의 밀크제조공정과 조미 배합비에 의해 밀크 음료를 제조하여 살균온도(120~124℃, 20분)에 따른 음료의 품질특성과 미생물적 안전성을 분석하였다. 살균온도에 따른 종실 밀크음료의 살균 후 외형적 성상을 관찰한 결과 120~122℃까지 살균처리군은 아무런 변화가 없었으나 123℃부터는 일부 음료에서 덩어리가 발생하면서 색상이 약간씩 어두워지는 것으로 나타났다(Fig. 52). 이들 음료는 관능적 특성에 있어서도 온도가 높을수록 음료를 마실 경우 덩어리가 느껴졌다.

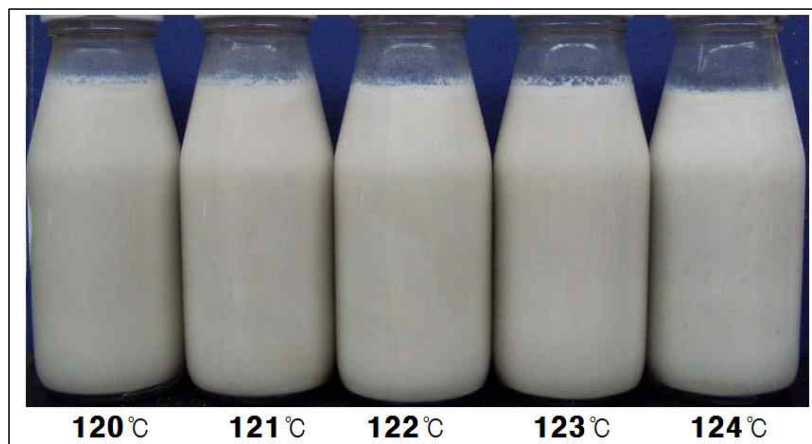


Figure 52. 살균온도를 달리하여 제조한 종실 밀크음료의 성상

Table 55은 살균온도를 달리한 밀크 음료의 이화학적 특성과 미생물적 안전성을 분석한 결과이다. 음료의 백색도는 19.23~20.36, 적색도는 4.27~4.70, 황색도는 19.57~20.34로 살균온도에 따른 큰 차이는 없었으나 살균온도 120℃ 처리 음료가 다른 것에 비해 약간 밝은 색상을 보이는 것으로 나타났다. 당도와 pH는 살균온도에 따른 차이가 없었으나 점도의 경우 120℃ 살균 음료가 5.64cp로 처리군 중 가장 낮았고 그 이상의 온도에서 살균한 것은 증가하였으나 121℃부터는 차이가 없었다. 미생물안정성은 두유류와 같은 레토르트 살균식품에서 내열성포자형성 유해미생물의 지표 미생물인 *Geobacillus Stearothermophilus*를 지표로 하여 식품공전상의 내열성 세균수 시험법에 따라 영양배지 (nutrient agar)에 접종, 55℃에서 48시간 배양하여 검사를 실시한 결과 모든 온도에서 음적으로 나타나 청삼종실 밀크음료의 경우 120℃이상에서 20분 살균시 미생물 안정성 측면에서는 문제가 없음을 알 수 있었다.

Table 55. 살균온도를 달리하여 제조한 종실 밀크음료의 품질특성과 미생물 안전성

분석항목		살균온도				
		120℃	121℃	122℃	123℃	124℃
색도	L-value	20.36	19.24	19.23	19.31	19.50
	a-value	4.27	4.42	4.70	4.64	4.54
	b-value	19.57	19.58	20.16	20.34	20.22
당도(°brix)		11.1	11.2	11.2	11.2	11.4
pH		6.18	6.18	6.18	6.17	6.17
점도(cp)		5.64	6.42	6.53	6.32	6.42
유해 미생물		음성	음성	음성	음성	음성

살균온도를 달리하여 제조한 종실 밀크음료의 입도 분포곡선을 측정된 결과(Fig. 53) 120℃에서 레토르트 살균한 음료는 그림에서 볼 수 있는 바와 같이 다른 살균온도대의 음료와 입도분포도에 차이가 있었다.

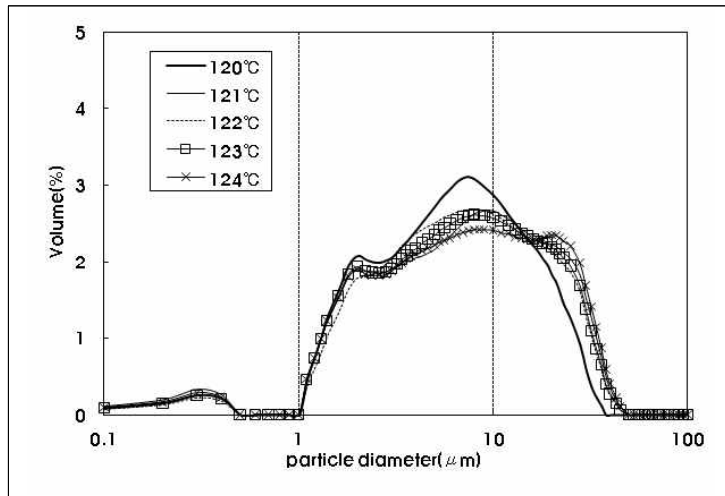


Figure 53. 살균온도를 달리하여 제조한 종실밀크 음료의 particle size 분포 곡선 변화

이들의 입도분포도를 구간별로 나누어 구성비를 비교하면(Table 56) 120℃ 살균 음료의 경우 5~10μm범위의 입도 구성비가 39.31%로 높고 30~50μm 범위의 입도 구성비는 낮으면서 평균입도도 7.77μm로 가장 적은 반면 121℃이상 살균온도 음료부터는 120℃에 비해 10~30μm, 30~50μm범위의 입도 구성비는 증가하고 5μm 이하, 5~10μm범위의 구성비는 감소하면서 평균입자크기도 9.21μm이상으로 증가하였다. 이는 음료 살균온도가 121℃이상이 되면 밀크 음료내 입자간의 상호반응으로 입자크기가 약간 더 큰 입자로 변화되는 것을 알 수 있다. 따라서 종실밀크 음료의 경우 품질 변화를 최소화하면서 미생물적 안전성이 보장되는 120℃, 20분 살균조건이 적당한 것으로 판단되었다.

Table 56. 살균온도를 달리하여 제조한 종실 밀크 음료의 particle size 구성비 비율

살균온도	Range of particle size(μm)					Mean diameter (μm)
	<5	5~10	10~30	30~50	50<	
120℃	39.32	29.82	30.16	0.70	-	7.77
121℃	35.27	24.90	35.62	4.21	-	9.47
122℃	36.42	26.36	33.94	3.28	-	9.21
123℃	36.24	25.51	34.73	3.52	-	9.25
124℃	35.44	23.70	36.07	4.79	-	9.78

㉔ 청삼종실 밀크 음료 제조공정별 매뉴얼

Table 57. 청삼종실 밀크 음료 제조 매뉴얼(오리지널 타입)

번호	공정/단계	공정설명	주요설비
1	입 고		
1-1	원료(청삼 종실)	적합품에 한하여 입고한다.	전동지게차, 바스켓
1-2	용수(상수도)	수질검사에 적합한 먹는 물을 사용한다.	-
1-3	부재료(가공품)	입고 시 적합품에 한하여 입고한 후 냉장보관한다. : 설탕, 정제염, 해바라기씨유, 탄산수소나트륨, 유화제(Step SS, S1670)	냉장고
1-4	부자재(포장재)	입고 시 적합품에 한하여 입고한다. : 병, 캡, 종이박스	창고
2	보 관		-
2-1	부재료(가공품)	용도별로 구분 후 적재하여 보관한다.	냉장창고
2-2	부자재(포장재)	규격별로 구분 후 적재하여 보관한다.	-
3	종실 전처리		
3-1	계량	배합비율에 따라 청삼종실을 계량한다.	저울
3-2	계량(부재료)	배합비율에 따라 설탕, 정제염, 해바라기씨유, 유화제, 탄산수소나트륨을 계량한다.	전자저울
3-3	수침	종실 중량 대비 3배 식용수를 가하여 10℃ 저온조에서 16시간 유지한다.	저온조
3-4	탈 수	충분히 수침과정을 거친 종실을 선반에 얹어 탈수한다.	타공선반
4	종실 밀크 제조		
4-1	블랜칭	끓는 물에 종실을 넣고 5분간 열처리한다.	
4-2	가수	95℃로 가열된 열수를 종실의 중량대비 4배 첨가한다.	
4-3	마쇄(1차)	믹서기를 이용해 3분간 마쇄한다.	Mixer
4-4	가수	95℃로 가열된 열수를 종실의 중량대비 4배 첨가한다.	
4-5	마쇄(2차)	호모믹서를 이용해 2분간 마쇄한다.	Homogenizer
4-6	여과(1차)	60 mesh→ 140 mesh로 순차적으로 여과한다.	Mesh (60, 140)
4-7	가열	100℃까지 온도를 상승시킨 후 3분간 열처리 한다.	

4-8	여과(2차)	140 mesh로 여과한다.	Mesh(140)
4-9	호모믹서	2분간 호모믹서한다.	homogenizer
5	중실 밀크음료 제조		
5-1	<u>부재료 용해</u>	70℃로 가온시킨 정제수에 부재료(설탕, 정제염, 해바라기씨유, 탄산수소나트륨, 유화제(Step SS, S1670)를 혼합 후 용해, 20분간 교반한다.	교반, 혼합기
5-2	<u>밀크 혼합</u>	60% 농도의 중실 밀크를 70℃로 가온한다. 부재료 용액과 혼합하여 70℃에서 20분간 교반한다.	교반기
5-3	균질	400 bar의 압력으로 2회 연속 균질한다.	균질기
5-4	충전	용기 규격에 맞도록 정량 충전한다.	충전기
5-5	밀봉	용기의 뚜껑을 덮는다.	Seamer
5-6	살균	품온 120℃에서 20분간 열처리 한다.	레토르트 살균기
5-7	냉각	냉수에 담귀 20℃까지 품온을 낮춘다.	
6	X-RAY 검출	이물(Sus:0.6 mm 이상)이 불검출된 것을 적합품으로 한다.	x-ray 검출기& 리젝트
7	외포장	내포장된 제품을 종이박스에 담아 포장한다.	작업대
8	보 관	완제품보관실(직사광선이 들어오지 않는 서늘한 곳)에 입고하여 보관한다.	보관창고
9	출고/운송	차량에 출고하여 거래처에 배송한다.	전동지게차

Table 58. 청삼종실 밀크 음료의 제조 배합
표

원·부재료	첨가량(%)
종실 밀크	60
설탕	3.5
정제염	0.1
해바라기씨유	1.1
Step SS	0.3
S1670	0.5
탄산수소나트륨	0.01
정제수	34.49
합계	100

Table 59. 청삼종실 밀크 음료의 품질관리
기준

당도(brix)	8.3±0.2
pH	6.1±0.1
고형분함량	9% 이상
외관	제조 3일 후 침전 없음

(6) 청삼종실의 탈피방법 및 탈피장치 개발

(가) 청삼 종실 탈피공정 검토 및 탈피기 시제품 제작

① 종실 건조

청삼종실은 먼저 건조를 한 후에 껍질을 분쇄하는 것이 바람직한데, 이는 건조 과정을 거친 청삼종실은 분쇄되는 경우 내피가 내용물로부터 쉽게 떨어질 수 있기 때문이다. 건조과정은 40℃ 내지 60℃ 사이에서 4 내지 5시간 동안 이루어지는 것이 좋으며, 이는 상기한 온도 범위보다 높은 온도로 건조하는 경우 청삼종실의 성분이 변질될 수 있고, 그 보다 낮은 온도에서는 건조의 시간이 길어질 수 있기 때문이다.

② 종실 크기별 분류

청삼 종실은 크기가 다양하기 때문에 분쇄공정에서 껍질이 연약한 내용물과 함께 분쇄되지 않고 껍질에만 크랙을 형성하거나 껍질을 반할하기 위해서는 종자를 일괄적으로 크기별로 분류하는 것이 매우 중요하다. 이는 종자를 크기별로 분류할 경우 종자의 입자 크기에 맞춰서 분쇄 공간의 높이를 조정할 수 있기 때문에 종자 껍질이 연약한 내용물과 함께 분쇄되어 파손되는 것을 최소화시킬 수 있다.

건조된 청삼종실은 서로 다른 직경의 통공을 갖는 체(제1 체, 제2 체, 및 제3 체)를 이용하여 크기가 비슷한 것들끼리 분류되는 과정을 거친다. 이때 체의 형태는 사각형보다 원형이 청삼 종실 분리에 유리하다. 청삼종실을 3.53±0.17, 3.11±0.19, 2.41±0.20 mm의 직경을

갖는 그룹들로 분류할 수 있다.

③ 종실 분쇄

㉠ 롤밀형 분쇄기

1차 제작한 롤밀형 분쇄기는 회전하는 롤밀과 롤밀 사이의 간격을 조절하여 청삼 종자를 투입, 분쇄한다(Fig. 54. A). 종자 크기가 일정하지 않기 때문에 롤밀과 롤밀의 이격거리(L)을 조정하기 어려웠고 이격거리보다 작은 종자는 분쇄되지 않으며 큰 종자의 껍질은 분쇄되면서 내용물이 손상되었다. 또한 분쇄가 롤밀과 롤밀 사이에서만 이루어지기 때문에 분쇄거리가 짧아 효율적인 분쇄가 이루어지질 않았다. 특히, 종실 껍질이 반할되지 않고 작은 조각으로 분쇄되었다.

㉡ 맷돌형 분쇄기

2차 제작한 분쇄기는 상하로 배치되는 상부 맷돌과 하부 맷돌을 이용하여 분쇄한다(Fig. 54. B). 상부 맷돌의 저면 및 하부 맷돌의 상면이 이격되도록 배치되어, 그 사이에 상부 맷돌 및 하부 맷돌의 중심부에서 가장자리를 향하여 아래로 경사지게 형성되는 분쇄 공간을 형성한다. 상부 맷돌의 중심부가 움푹한 이유는 투입된 종실을 바깥으로 밀어낼 수 있고 평편할 때 발생하는 종실이 조각 조각으로 깨어지는 것을 해결 할 수 있다.

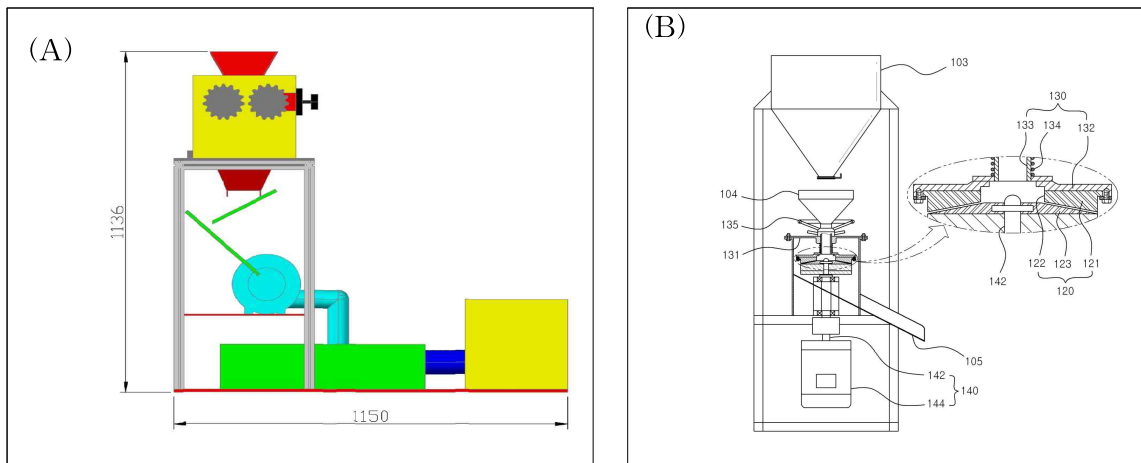


Figure 54. 청삼종실 분쇄기 단면도. 롤밀형(A), 맷돌형(B)

㉢ 맷돌 표면의 거칠기

상하부 맷돌의 표면 거칠기는 분쇄할 대상의 껍질의 정도에 따라서 변경되는 것이 바람직하며, 표면 거칠기가 30 mesh 내지 40 mesh인 것을 사용할 수 있으며, 바람직 하계는 36 mesh의 표면 거칠기를 갖는 맷돌을 사용할 수 있다. 이는 위에서 언급한 표면 거칠기보다 작은 경우 청삼종실의 껍질 분쇄가 용이하지 않고 그 이상인 경우에는 청삼종실의 껍질 분쇄가 너무 쉽게 일어나 청삼종실이 분쇄 경로를 따라서 이동하

는 동안 이미 분쇄된 껍질에 의해서 연약한 내용물에 손상을 줄 수 있기 때문이다.

② 멧돌간 간격

상부 멧돌과 하부 멧돌의 간격조절을 이용하여 분쇄 공간의 높이(H)는 소정의 직경을 기준으로 분류된 청삼종실의 직경에 대응하여 조절될 수 있으며, 다르게는 청삼종실의 단경(SD) 이상, 장경(LD) 이하 범위 내에서 결정될 수 있다(Fig. 55). 이는 청삼종실의 단경(SD) 이하로 분쇄 공간의 높이(H)가 결정되면 청삼종실의 장경(LD)에서 종실이 가압되는 경우 껍질과 함께 내용물이 파손되는 경우가 발생할 수 있고, 반대로 청삼종실의 장경(LD) 이상으로 높이가 결정되면 종실이 분쇄 경로를 따라서 이동하는 동안 한번도 가압되지 않아 껍질이 분쇄되는 경우가 발생하지 않을 수 있기 때문이다.

본 탈피장치에서 분쇄 경로는 종래의 탈피 장치들처럼 일직선으로 형성되지 않고, 점차 직경이 증가하는 원호를 형성하여 나선형을 그리기 때문에 정해진 분쇄 공간 내에서 가장 효율적으로 그 길이를 증가시킬 수 있다. 종래의 탈피장치들처럼 분쇄 거리를 증가시키기 위해서 롤밀의 직경을 늘려야 했던 것과는 다르게 상부 멧돌 및 하부 멧돌 사이에서 용이하게 분쇄 경로를 늘릴 수 있기 때문에 공간적으로 유리하다.

또한 분쇄 공간의 높이(H)를 적절하게 조절함으로써, 종자의 껍질에 크랙을 형성하거나 껍질을 반할하는 것이 가능하기 때문에, 껍질과 내용물이 밀착된 종자의 껍질 분쇄 시에 내용물의 손상을 최소화시킬 수 있다. 상부 멧돌 및 하부 멧돌의 직경은 10 내지 15 inch를 갖는 것을 사용할 수 있으며, 12 inch를 갖는 것이 바람직하였다.

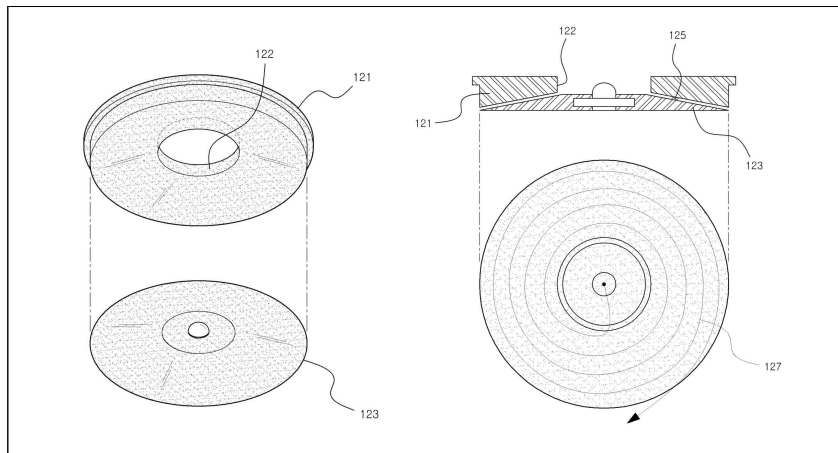


Figure 55. 멧돌형 분쇄기 상·하부 멧돌 단면도 및 분쇄경로

③ 멧돌 회전수

회전부재는 하부 멧돌을 회전시켜 청삼종실의 껍질을 분쇄할 수도 있고 경우에 따라서는 상부 멧돌만을 또는 상하부 멧돌을 모두 회전시켜 껍질을 분쇄할 수도 있다. 다만, 멧돌의 회전수는 500 rpm 내지 700 rpm을 갖는 것이 바람직하며, 600 rpm의 회전수로 회전시키는 것이 가장 적절하다. 이는 멧돌의 회전수가 너무 빠르면 작업시간은

단축되거나 청삼종실이 조각으로 깨지는 경우가 많아지며, 회전수가 너무 느리면 작업시간이 지연되는 문제가 발생하기 때문이다. 껍질이 분쇄된 청삼종실은 분쇄 공간의 가장자리로 배출되어 과쇄물 배출 배관을 통해서 외부로 배출될 수 있다.

④ 종실 내용물 선별

㉠ 체질

종실 분쇄물에서 너트내용물만을 효율적으로 분리시키기 위해 초기 종실 입자 크기를 감안하여 제작한 체로(지름 4.17 mm)로 한번 쳐서 반할된 껍질을 1차 제거한다. 체를 통과한 너트 함유 내용물을 2차 체로(지름 3.37 mm) 쳐서 반할된 너트 내용물과 껍질조각, 배아, 내피 등을 함유하는 부위로 분리한다.

㉡ 풍력 선별

내용물 및 껍질을 서로 분리시키기 위하여 바람을 공급하는 풍력선별기는 후방에 배치되는 풍구, 풍구로 공기를 바람을 제공하는 팬, 풍구 전방에서 상방으로 경사지게 형성된 경사면을 제공하는 가변 플레이트로 구성되며, 껍질 및 내용물의 무게 차이에 따라서 경사면의 길이를 조절 가능하도록 가변 플레이트의 길이가 변경될 수 있다(Fig. 56). 가변 가능한 경사면을 제공하는 것은 껍질과 내용물의 무게가 유사하더라도 조금이라도 다르면 경사면의 길이를 더 길게 조절함으로써 껍질과 내용물을 분리하는 것이 가능해지기 때문이다.

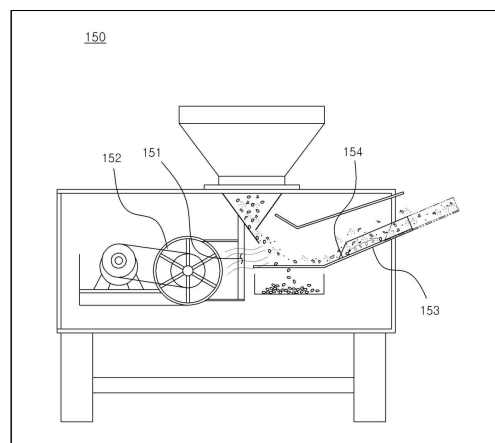


Figure 56. 종실 분쇄물로부터 내용물(너트)과 껍질 분리용 선별기 단면도

(나) 개발 탈피기를 이용한 청삼 종실의 탈피 효율 분석

Fig. 57는 본 연구에서 개발, 제작한 청삼 종실 탈피방법 및 탈피장치에 의한 공정별 껍질과 내용물의 성상 변화를 나타낸 결과이다.

본 연구에서 개발한 종실 탈피기를 적용, 최적 분쇄기 조건에서 탈피시킨 후 공정별 내

용물의 수율을 살펴보면 분쇄기 통과 후 얻어지는 분쇄물을 1차 체질처리할 경우 약 9%의 껍질을 제거할 수 있고 2차 체질과 풍구처리 후에는 약 32%의 껍질을 제거할 수 있었다. 그러나 최종 풍구처리 후 건전한 상태로 얻어지는 내용물의 수율은 37% 정도였다. 이는 초기 종실 구성물 65%를 기준으로 할 경우 약 57%에 해당하는 수율이었다.

본 연구에서 개발한 탈피시스템에 청삼 종실을 적용, 탈피처리할 경우 2차 체질처리 후 얻어지는 30%의 부산물은 종실의 껍질 조각, 내피, 배아, 내용물 조각 등으로 구성되어 있었다. 부산물로부터 종실 내용물을 더욱 회수하고자 부산물을 풍구로 5회 연속처리한 것을 공기분급기(100 ATP air classifying system, Alpine GmbH, Germany)를 이용, ACWS(air classifying speed) 1,000rpm에서 조분획(coarse fraction)과 미분획(fine fraction)으로 분급하였다.

Fig. 58, 59에서 볼 수 있는 바와 같이 분쇄공정시 종실에서 분리된 배아부위가 주를 이루는 물질만을 분리할 수 있었고 초기 부산물 비율 30% 중 약 40%에 해당하는 배아물질을 분리하였다. 그러나 배아부위를 분리하고 남은 부산물은 일부 조각으로 분쇄된 너트 내용물과 껍질 조각이 혼재된 상태로 공기분급 1회 처리로는 완전한 분리가 어려운 것으로 나타났다.

이상의 결과를 종합하면 반할된 너트 내용물(37%)과 공기분급기로부터 회수된 배아(초기 너트 내용물 기준 12%)를 합칠 경우 약 49% 정도의 종실 내용물을 분리할 수 있었으며 이는 원료 종실 내용물 65% 기준시 77%에 해당하는 수치였다.

한편 청삼 종실의 입자크기별 탈피 효율을 개발 탈피기에서 비교한 결과(Table 60) 중간 크기 입자가 탈피, 체질, 풍구처리 후 43%의 내용물 수율을 보여 대입자에 비해 약 5%정도 회수되는 내용물의 수율이 높은 것으로 나타났다.

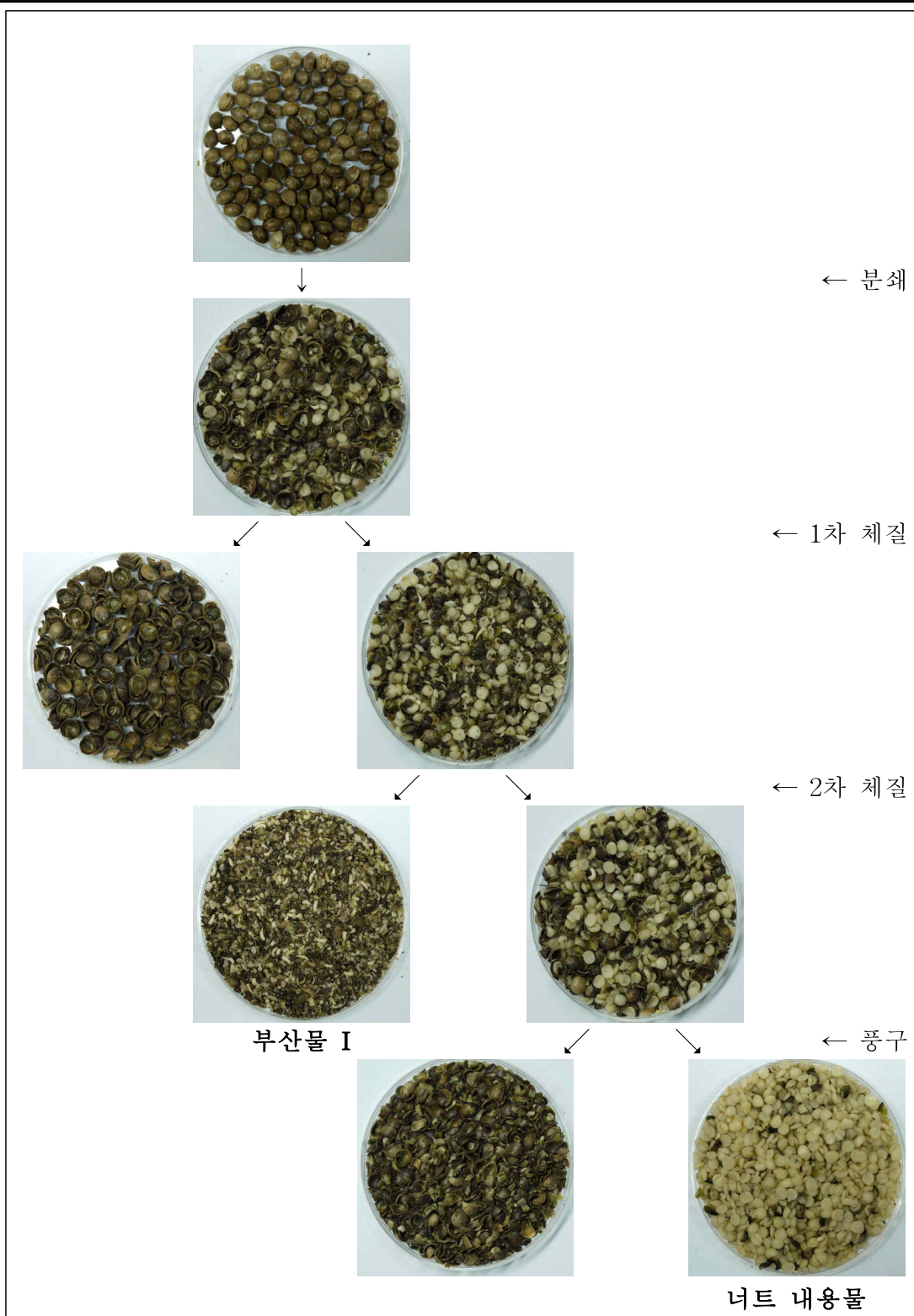


Figure 57. 개발 탈피기 적용 탈피과정별 청삼중질의 정상 변화



Figure 58. 탈피공정에서 얻어진 부산물을 공기분급기로 분리한 배아와 부산물의 정상

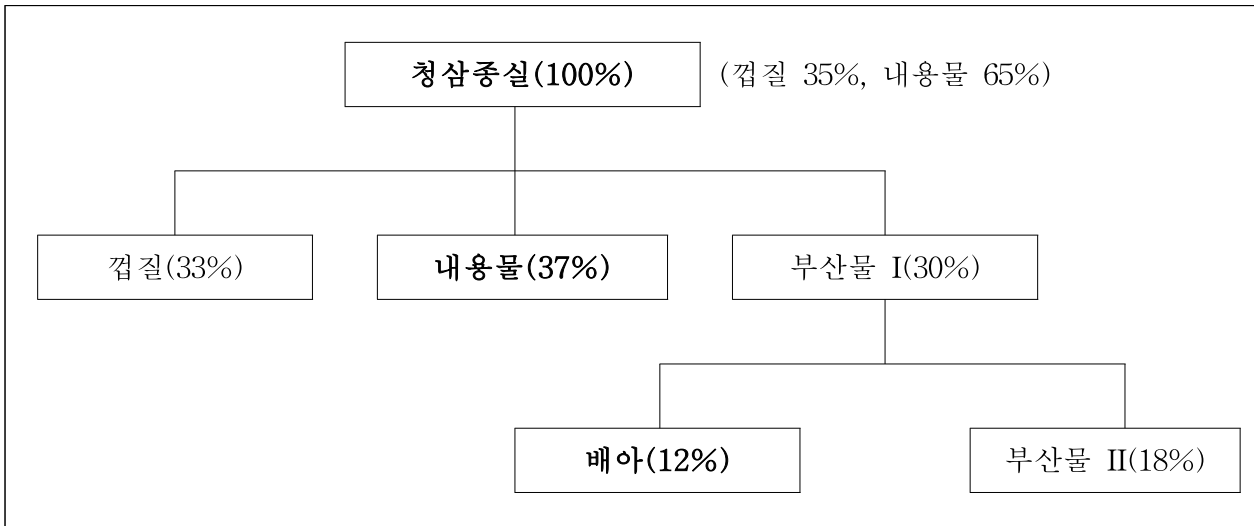


Figure 59. 개발 탈피기와 공기분급기를 적용한 청삼 종실의 탈피 효율

Table 60. 청삼 종실 입자 크기별 탈피 효율 비교(%)

종실 입자	껍질	내용물	부산물 I		
			총량	배아	부산물 II
大	33	37	30	12	18
中	31	43	26	10	15

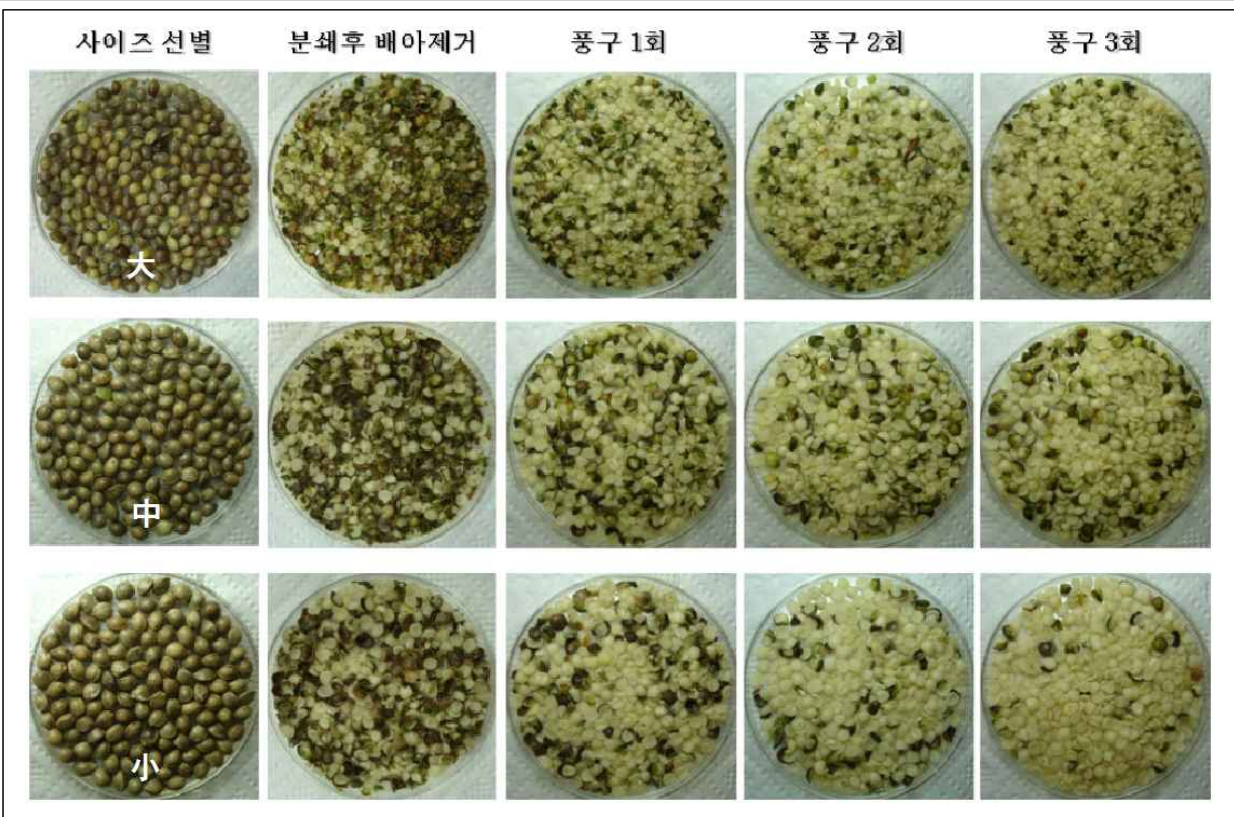


Figure 60. 개발 탈피기를 적용한 청삼종실의 입자크기별 탈피 내용물의 정상 변화
 大(위) : 3.53 ± 0.17 , 中(중간) : 3.11 ± 0.19 , 小(아래) : 2.41 ± 0.20 mm

(7) 청삼종실을 이용한 두부 개발

(가) 재료

충남당진에서 재배된 청삼종실을 본 연구에서 개발, 제작한 탈피기 시작품을 이용하여 탈피한 종실을 사용하였다.

(나) 실험방법

① 청삼종실을 이용한 두부 제조

㉠ 적정 두부 제조공정 분석

㉡ 제조공정을 달리한 두부 제조

일반 콩 두부 제조공정에 따라 탈피한 청삼을 2시간가량 수침하여 초기 청삼 중량대비 7배의 정제수를 첨가하여 콜로이드밀(Masuka, Japan)로 3회 마쇄한 뒤 나일론 부직포와 두부제조용 메쉬(polypropylene, 대영화학)로 여과하여 두부용 밀크를 제조하였

다. 밀크를 가열용기에 담아 100℃까지 가열한 후 82℃로 냉각하여 밀크 중량대비 3.5%(w/v)의 응고제(맛순 45S, (주)태진GNS)를 소량의 정제수에 용해, 첨가하여 82℃에서 25분간 응고시켰다. 응고물을 성형틀(9cm×9cm, KOCO, Korea)에 넣고 10분간 압착(8.64 g/cm²)하여 두부를 제조하였다(공정 1). 이때 두부용 콩을 하룻밤 수침하여 청삼종실과 동일한 방법으로 밀크와 두부를 제조하여 비교하였다.

한편 또 다른 방법으로 앞서 제조한 두부용 밀크를 가열용기에 담아 가열하여 밀크온도가 82℃에 도달하면 바로 밀크 중량대비 3.5%의 응고제를 첨가하고 82℃에서 25분 유지하여 응고시킨 다음 공정 1과 동일하게 압착, 성형하여 두부를 제조하였다(공정 2). 이때 콩으로 제조한 밀크와 동일한 방법으로 두부를 제조하였다.



Figure 61. 제조공정에 따른 청삼종실 두부 제조 공정도

㉞ 가열온도를 달리한 두부 제조

앞의 공정과 동일하게 제조한 밀크를 가열용기에 담아 가열하여 밀크온도가 65, 75, 85, 95℃에 도달하면 밀크 중량대비 3.5%(w/v)의 응고제(맛순 45S, (주)태진GNS)를 첨가한 후 각각의 가열온도에서 25분간 응고시켰다. 가열온도별 응고물을 두부틀에서 압착(8.64 g/cm², 10분), 성형하여 두부를 제조하였다.



Figure 62. 가열온도를 달리한 청삼종실 압착식 제조 공정도

㉔ 응고제를 사용하지 않는 두부 제조

응고제 무첨가 청삼종실 두부 제조공정을 검토하고자 종실 밀크를 가열용기에 담아 가열하여 밀크온도가 65, 75, 85, 95°C에 도달하면 각각의 가열온도에서 25분간 유지하여 응고시킨 후 응고물을 두부틀에서 압착(8.64 g/cm², 10분)하여 두부를 제조하였다.

㉕ 응고제를 사용하지 않는 두부의 품질개선 연구

㉕ a) Phytic acid 첨가 두부 제조

청삼종실 두부의 품질 개선을 위한 방안의 하나로 phytic acid의 효과를 검토하였다. 즉, 종실로 제조한 밀크를 85°C로 가열하여 phytic acid를 인(P)으로 환산하였을 경우 6.65mg%, 26.58mg%에 해당하는 양을 첨가하여 85°C에서 25분간 유지시켜 응고시킨 후 응고물을 두부틀에서 압착(8.64 g/cm², 10분)하였다.

㉕ b) 난백 첨가 두부 제조

청삼종실 밀크에 난백분말(난백액 99.7%, 풍림산업)을 초기 탈피 청삼종실 중량대비 0%, 0.6%, 1.2%, 1.8%에 해당하는 양을 첨가하여 교반기로 난백을 완전히 분산, 용해시킨 다음 85°C로 가열하여 85°C에서 25분간 유지하여 응고시킨 다음 응고물을 두부틀에서 압착(8.64 g/cm², 10분)하였다.

㉕ c) 응고제를 사용하지 않는 두부의 저장 중 품질특성 분석

탈피 청삼종실 중량 대비 7배의 정제수를 가수하여 제조한 밀크(또는 원료 종실 중량대비 1.2%의 난백분말을 첨가하여 용해한 밀크)를 이중 스푼을 이용하여 가열, 85°C의 온도에 도달하면 25분 유지시키고 미리 준비한 pilot 규모의 두부틀에 거즈면을 깔아 응고물을 압착(3500g/396cm²압력, 10분)하여 두부를 제조하였다. 제조한 두부는 15x20x cm

크기로 절단한 다음 플라스틱 포장용기에 담고 두부 중량과 동량의 증류수를 가수하여 비닐접착기로 용기 상단부를 밀봉포장하고 85℃에서 10분간 살균 후 냉각하여 4℃에 저장하였다.

㉔ 두부의 이화학적, 관능적 품질특성 분석

㉑ 수율

두부의 수율은 압착, 성형된 두부의 무게를 측정하여 사용한 종실 무게를 기준으로 환산하여 백분율(%)로 나타내었다.

㉒ 조직감

제조한 두부를 7×7cm로 재단하여 Texture analyzer(TA-XT2, Stable Micro system Ltd., England)를 사용하여 측정하였다. 기기의 측정 조건은 probe는 직경 70mm의 blade타입, option Rupture, per-test speed 5.0 mm/sec, test speed 0.5 mm/sec, post-test speed 10.0 mm/sec, strain 90%, tigger force 5.0 g 및 maximum force 5 kg으로 세팅, 5회 반복 후 평균값을 구하였다.

㉓ 조단백 함량(%)

식품공전 상 일반성분시험법에 의거하여 시료를 1~2g 정도 취하고 분해촉진제 2알과 황산 15mL을 넣어 420℃에서 분해한 뒤 냉각하여 auto-kjeldahl(Kjel Tec. auto 1030 analyzer, Sweden) 방법으로 측정하였다.

㉔ 수분함량

수분은 식품공전 상 일반성분시험법에 의거하여 시료를 2~3g내외로 취하고 105℃ Dry oven에서 항량이 되도록 건조하여 정량한 값을 백분율로 표시하였다.

㉕ 투광도

두부 제조시 순물 및 저장용으로 제조한 포장두부 충전액의 투광도는 분광광도계(Jenway 6715, UK)를 이용하여 660nm파장에서 투광도(%T)를 측정하였다.

㉖ 미세구조 관찰

액체질소로 급속동결한 두부를 동결건조하여 시료를 aluminum stub에 고정하고 ion coater(Hitachi C1010 ionsputter, Japan)를 사용하여 gold-polladium으로 coating한 다음 주사전자현미경(SEM-Hitachi, S2380N, Japan)을 이용하여 미세구조를 관찰하였다

㉗ pH

포장 두부 충전액을 pH meter(Orion 720A, USA)를 사용하여 측정하였다.

㉘ 미생물검사

두부의 미생물 검사는 포장용기에서 미리 살균하여 준비한 칼로 1g가량의 두부를

절단하여 멸균백에 멸균수 100mL과 함께 넣고 1분간 균질하였다. 이 액 1mL을 취한 뒤 petri film(3M)을 이용하여 총균수, E. coli/coliform을 확인하였다. 총균수, E. coli/coliform은 시료 접종 후 37±1℃에서 48±3시간동안 배양한 후 나타나는 colony를 계수하였다.

① 기호도 평가 및 통계처리

두부의 기호도 평가는 한국식품연구원에 재직중인 30명의 전문패널을 대상으로 9점 척도법으로 실시하였으며 평가항목은 조직감에 대한 강도, 풍미에 대한 기호도 및 전반적기호도에 관하여 평가하였다. 통계적 유의성은 SAS 프로그램을 이용하여 ANOVA 분산분석과 Duncan의 다범위 검정을 사용하여 유의성 검정을 시행하였다.

② 청삼종실을 이용한 응고제 무첨가 전두부의 제조

㉠ 가수량을 달리한 전두부 제조

전두부 제조시 적정 가수량을 설정하고자 탈피한 청삼을 2시간 수침하여 초기 청삼 중량대비 2, 2.5, 3배의 정제수를 첨가하여 믹서기(Osterizer, Mexico)로 마쇄한 후 부직포로 여과하여 전두부용 마쇄물을 제조하였다. 종실 마쇄물을 비이커에 일정량씩 계량하여 90℃로 조정된 항온수조에 넣어 해당온도에 도달하면 40분간 가열, 응고시킨 다음 냉각하여 전두부를 제조하였다.



Figure 63. 가수량을 달리한 전두부의 제조 공정도

㉡ 가열온도와 응고시간을 달리한 전두부 제조

탈피 청삼종실 마쇄물을 이용한 전두부 제조공정에서 적정 가열, 응고조건을 설정하고자 탈피한 청삼을 2시간 수침하여 초기 청삼 중량대비 2배의 정제수를 첨가하여 믹서기로 마쇄한 후 부직포로 여과하여 전두부용 마쇄물을 제조하였다. 종실 마쇄물을 용기에 일정량씩 계량하여 항온수조에 넣고 마쇄물의 온도가 각각 75, 80, 85, 90℃에 도달하

면 해당온도에서 30, 40, 50, 60분 가열, 응고시킨 다음 냉각하여 전두부를 제조하였다.

㉔ 전두부의 이화학적 품질특성 분석

㉑ 조직감

Texture analyzer(TA-XT2, Stable Micro system Ltd., England)를 사용하여 측정하였다. 기기의 측정 조건은 probe는 직경 70 mm의 blade타입의 probe, option Rupture, per-test speed 5.0 mm/sec, test speed 0.5 mm/sec, post-test speed 10.0 mm/sec, strain 90%, trigger force 5.0 g 및 maximum force 5 kg으로 세팅, 5회 반복 후 평균값을 구하였다.

㉒ 수분 이수량(%)

두부를 절단 또는 그대로를 방치했을 때 이수되는 수분의 양을 측정하고자 미리 항량을 구한 여과지에 두부를 놓고 10분간 방치하여 이수된 수분을 흡수하게 하여 흡수전후의 무게 변화를 측정하여 이수된 수분의 양을 측정하였다.

$$\text{수분 이수량(\%)} = \frac{\text{흡수 후 paper의 무게} - \text{흡수 전 paper의 무게}}{\text{전체 두부의 무게}} \times 100$$

㉓ 미세구조 관찰

액체질소로 급속동결한 두부를 동결건조하여 시료를 aluminum stub에 고정하고 ion coater(Hitachi C1010 ionsputter, Japan)를 사용하여 gold-polladium으로 coating한 다음 주사전자현미경(SEM-Hitachi, S2380N, Japan)을 이용하여 미세구조를 관찰하였다.

㉔ 기호도 평가 및 통계처리

기호도 평가는 한국식품연구원에 재직중인 30명의 전문패널을 대상으로 9점 척도법으로 실시하였으며 평가항목은 조직감에 대한 강도, 풍미에 대한 기호도 및 전반적 기호도에 관하여 평가하였다. 통계적 유의성은 SAS 프로그램을 이용하여 ANOVA 분산분석과 Duncan의 다범위 검정을 사용하여 유의성 검정을 시행하였다.

Table 61. 9점 척도법에 따른 기호도 평가 배점표

• 외관, 종합적기호도								
평 장 히 나 쁨	매 우 나 쁨	나 쁨	약 간 나 쁨	보 통	약 간 좋 음	좋 음	매 우 좋 음	평 장 히 좋 음
• 고소한 향, 콩 비린내, 고소한맛, 콩 비린맛, 단맛								
평 장 히 적 음	매 우 적 음	적 음	약 간 적 음	보 통	약 간 많 음	많 음	매 우 많 음	평 장 히 많 음
• 절단면(두부표면)								
평 장 히 거 침	매 우 거 침	거 침	약 간 거 침	보 통	약 간 부 드 러 움	부 드 러 움	매 우 부 드 러 움	평 장 히 부 드 러 움
• 견고성								
평 장 히 무 름	매 우 무 름	무 름	약 간 무 름	보 통	약 간 단 단 함	단 단 함	매 우 단 단 함	평 장 히 단 단 함
• 씹힘성								
평 장 히 으 깨 짐	매 우 으 깨 짐	나 쁨	약 간 으 깨 짐	보 통	약 간 좋 음	좋 음	매 우 좋 음	평 장 히 좋 음

(다) 연구수행 결과 및 고찰

① 청삼종실을 이용한 두부 제조

㉠ 제조공정에 따른 두부의 품질특성

콩을 이용한 두부 제조공정에 따라 종실 밀크를 100℃로 가열한 후 82℃로 냉각하고 응고제를 첨가, 82℃에서 25분간 응고시킨 후 압착하여 제조한 두부(공정 1)의 품질특성을 비교하였다. Fig. 64는 청삼종실 밀크 응고물과 두부 절단면의 성상을 나타낸 결과이다.

탈피 청삼종실로 제조한 밀크의 경우 가열과정에서 콩과는 큰 차이를 나타내었다. 즉, 콩으로 제조한 밀크의 경우 100℃로 가열하여도 밀크상태로 유지되고 이들 밀크를 82℃로 냉각하여 응고제를 첨가하여야 응고물이 형성되는 반면 청삼종실 밀크는 가열공정에서 밀크온도가 60℃이상이 되면 밀크내 작은 입자의 응고물이 형성되기 시작하여 가열온도가 상승함에 따라 응고물의 입자크기가 커지는 것으로 나타났다. 또한 응고물이 형성된 청삼종실 밀크를 100℃까지 가열한 다음 82℃로 냉각하여 응고제를 첨가할 경우

더 이상의 응고가 일어나지 않았고 응고물의 덩어리 형태도 콩의 그것에 비해 적은 것으로 나타났다.

이러한 밀크의 응고특성 차이는 밀크 구성단백질의 특성에서 유래되는 것으로 콩의 경우 구성단백질의 90%가 glycinine과 glutelin으로 이들 단백질은 각각 117℃, 133℃에서 열변성되는 반면 청삼종실은 edestin 66%, albumin 33%로 구성되어 있고 edestin은 85℃에서 열변성이 시작되어 90℃에서 최대를 보이는 것으로 보고되어 있다. 응고물을 압착, 성형시킨 두부 절단면을 비교하면 청삼종실 두부가 더 거칠고 경도도 단단하면서 탄력성은 떨어졌고 특히, 종실 두부는 입안에서 느끼는 식감은 비지가 혼입된 것과 같이 퍼석한 식감이 느껴졌다.

두부 제조를 위한 다른 처리구로 콩과 종실밀크를 각각 82℃까지만 가열한 후 응고제를 첨가하여 응고 후 압착하여 두부(공정 2)를 제조하여 비교하였다. 콩의 경우 앞서 100℃로 가열 후 82℃로 냉각하여 응고제를 첨가하는 공정에 비해 응고물의 덩어리가 적었으나 청삼종실의 경우 최종 응고물의 덩어리가 100℃ 가열처리시보다 큰 것으로 나타났다. 두부 성상에 있어서 청삼종실 두부는 절단면이 훨씬 매끄러워졌고 탄력성도 100℃ 처리구보다 좋았으나 콩은 기존 공정 두부에 비해 떨어지는 것으로 나타났다.









	제조공정 1		제조공정 2	
	콩	청삼종실	콩	청삼종실
절단면				
응고물				

Figure 64. 제조공정을 달리한 밀크 응고물과 두부 절단면의 성상

공정 1 : 밀크를 100℃ 가열 후 82℃ 냉각하고 응고제를 첨가, 응고시키고 압착, 성형하는 두부 제조공정

공정 2 : 밀크를 82℃ 가열 후 응고제를 첨가, 응고, 압착, 성형하는 두부 제조공정

Fig. 65는 제조공정을 달리한 두부의 품질특성을 분석한 결과이다. 먼저 일반적인 두부 제조공정에 따라 밀크를 100℃로 가열한 후 82℃로 냉각하고 응고제를 첨가, 응고 후 성형, 압착하여 제조한 두부의 경우 조단백 함량은 12%로 차이가 없었으나 수율과 수분 함량에 있어서는 청삼종실이 각각 140%, 54%로 콩의 174%, 75%에 비해 월등히 낮았고

조직감은 1,141g으로 콩의 971g보다 높은 것으로 나타났다. 그러나 본 연구에는 나타나지 않았으나 7배의 정제수를 가하여 두부용 밀크 제조시 원료 100g 기준으로 얻어지는 밀크 수율은 탈피청삼 종실이 7배로 콩의 5배 보다 높았지만 이들 밀크로 제조한 두부 수율은 반대의 경향을 나타내었다.

두부는 대두 단백질이 열변성 과정 중 망상구조사이에 물을 보유하여 제조된 유백색의 부드럽고 수분 함량이 큰 겔(gel)상 식품으로 단백질 겔화는 응고제 첨가에 의해 단백질-단백질, 단백질-용매간의 인력에 의해 이루어지고 너무 빠른 응고는 단백질이 일정한 모양으로 정렬될 시간이 없으므로 단단해지며 물이 빠져나오는 이수현상을 가져온다는 연구 결과로 미루어 볼 때 청삼 종실을 이용하여 제조한 두부는 응고가 서서히 균일하게 일어나지 않고 응고가 급격하게 일어나 단백질 등 밀크내 구성입자간 결합과 입자사이에 결합되는 물 분자가 적어 응고물이 고르지 못하고 두부 수율과 함유율도 낮아지게 되는 것으로 생각된다.

한편 밀크를 82℃까지만 가열한 후 응고제를 첨가하여 응고 후 압착, 성형하여 제조한 두부의 경우 수율, 수분함량은 앞과 비슷한 경향이었으나 청삼종실 두부의 경우 함유율이 58%로 증가하면서 수율도 상승하였다. 두부 조직감에 있어서도 705g으로 감소하였다.

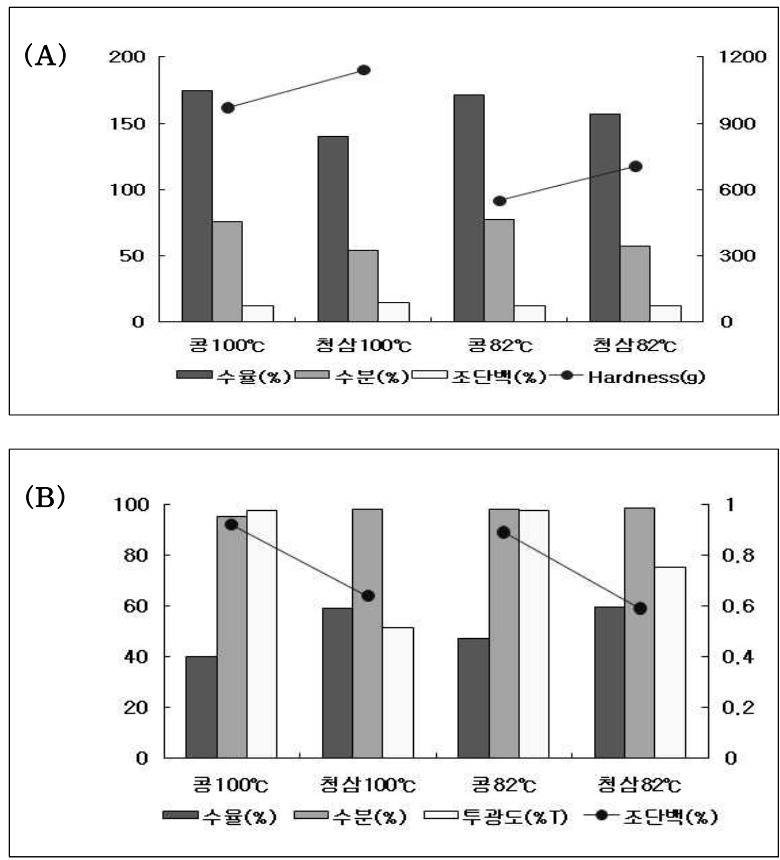


Figure 65. 제조공정을 달리한 두부의 이화학적 특성 분석. 두부(A), 순물(B)

Fig. 66은 제조공정을 달리하여 제조한 두부의 미세구조를 주사전자현미경으로 관찰

한 결과이다. 공정 1로 제조한 콩두부의 경우 균일한 타원형태의 기공이 형성되고 조직적이며 부드러운 형태의 망상구조를 구성하는 반면 청삼두부의 경우 기공의 형태가 불균일하고 조직 층이 다층구조를 이루는 것을 확인할 수 있었다. 공정 2에 의해 제조한 두부 중 콩 두부는 망상구조가 사라지고 단층 구조의 평면에 기공이 생성되나 공정 1 두부보다 그 수가 적고 기공의 깊이 또한 깊지 않았다. 청삼종실 두부는 비교적 복합적인 층 구조에 작은 기공 분포와 함께 균열이 일어난 형태를 보이며 단층의 면이 공정 1 두부보다 부드러우며 덩어리가 비교적 크게 결합되어 있는 것을 알 수 있었다.

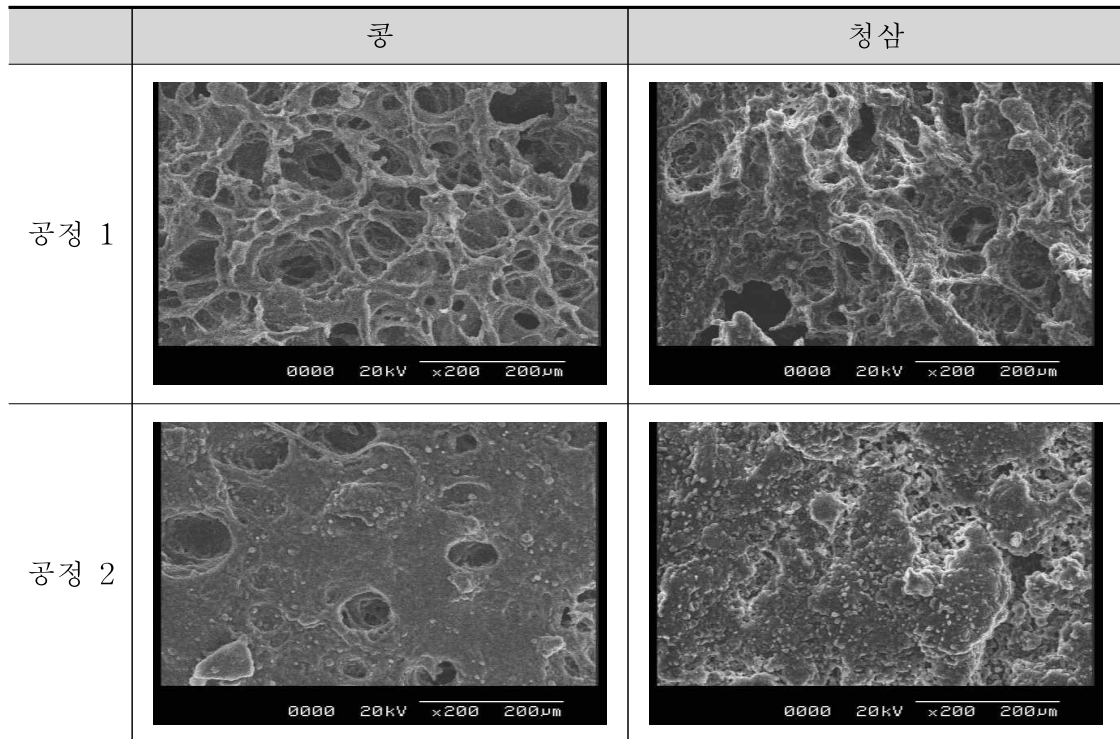


Figure 66. 제조공정을 달리한 두부의 주사전자현미경 사진(x200)

㉠ 가열 온도에 따른 두부의 품질특성

앞서 제조공정을 달리한 두부의 품질특성 분석 결과 청삼종실을 원료로 두부를 제조할 경우 종실 밀크는 기존의 콩 두부 제조공정보다 낮은 온도에서 밀크가 응고되고 응고물을 성형, 압착할 경우 기존 공정보다 낮은 온도에서 가열, 응고시킨 것이 도리어 두부 품질이 좋은 것으로 나타났다. 따라서 본 실험에서는 청삼종실을 이용한 두부 제조를 위한 적정 가열, 응고온도를 설정하고자 각기 다른 온도에서 밀크를 가열, 응고시켜 두부의 품질을 비교하였다.

Fig. 67은 각기 다른 온도로 밀크를 가열한 다음 동일농도의 응고제를 첨가하여 각 온도에서 응고시킨 응고물과 이들로부터 제조한 두부 절단면의 성상을 나타낸 결과이다. 밀크 가열, 응고 온도가 65℃에서 95℃로 상승함에 따라 밀크내 curd 형성이 잘 이루어졌으며 순물과의 분리도 뚜렷해지는 것을 확인할 수 있었다. 65℃의 경우 밀크액 상층부로 작은 입자의 curd가 형성되었으나 75℃ 이상부터는 curd의 형상이 뚜렷이 보이기 시

작하여 85℃에서 응고가 최고조에 이르렀으나 95℃에서는 과열에 의해 가열용기 기벽에 curd가 눌러 붙으면서 색상도 약간 어두워지면서 curd 입자가 작아지는 것을 확인하였다.

두부 형태와 절단면을 살펴보면 65℃의 경우 성형, 압착 후 두부틀에서 분리할 때 파손으로 손실되는 양이 많고 조직이 물러 형태를 유지시키기가 어려웠고 75℃는 두부의 형태가 가장 균일하였으나 85℃이상은 두부의 모서리부분이 다시 거칠어졌다. 두부 절단면에서도 다른 처리구 두부의 면은 거칠고 일부 형태가 파손되었으나 75℃ 두부는 매끄러웠다.




가열 온도	65℃	75℃	85℃	95℃
절단면				
응고물				

Figure 67. 가열온도를 달리한 종실 밀크 응고물과 두부 절단면의 성상

가열, 응고 온도를 달리하여 제조한 두부의 품질특성을 분석한 결과는 Fig. 68과 같다. 두부 수율은 65℃ 처리구가 116%로 가장 낮았고 가열, 응고온도가 높아짐에 따라 상승하여 75℃ 처리구가 157%로 가장 높았고 85℃ 처리구도 비슷한 수율을 보였으나 95℃ 처리구는 136%로 다시 감소하였다. 수분함량은 반대로 가열온도가 높을수록 감소하는 경향을 보여 65℃ 처리구가 62%로 가장 높고 95℃ 처리구가 55%로 가장 낮았다. 경도는 65℃의 111g에서 95℃의 1,651g으로 계속 증가하였다. 조단백 함량은 상대적으로 수분 함량이 적은 95℃ 두부가 17%로 다른 처리구 두부보다 높은 것으로 나타났다.

순물의 특성을 살펴보면 수율은 가열, 응고온도가 높을수록 감소하여 두부 수율과 같은 경향이었고 투광도에 있어서는 curd 형성이 완전히 일어나지 않은 65℃가 28%로 가장 낮았고 두부 수율이 가장 높은 75℃가 77%로 가장 높아 수율 변화에 비례하였고 조단백질 함량도 65℃가 curd 형성이 완전하게 일어나지 않고 순물로 빠져나간 수용성단백질의 양이 많아 2.0%로 가장 높았다.

일반적으로 두부 제조시 응고가 서서히 균일하게 일어나면 두부 수득율이 좋은 반면 응고가 급격하게 일어나 응고물이 고르지 못하면 수율도 낮아진다는 보고로 미루어 볼 때 청삼종실 밀크를 75℃ 정도의 온도까지 가열한 다음 응고제를 첨가하여 75℃에서 일

정시간 응고시키는 것이 종실 밀크내 단백질의 응고를 가장 균일하게 형성시킬 수 있는 온도로 판단되었다.

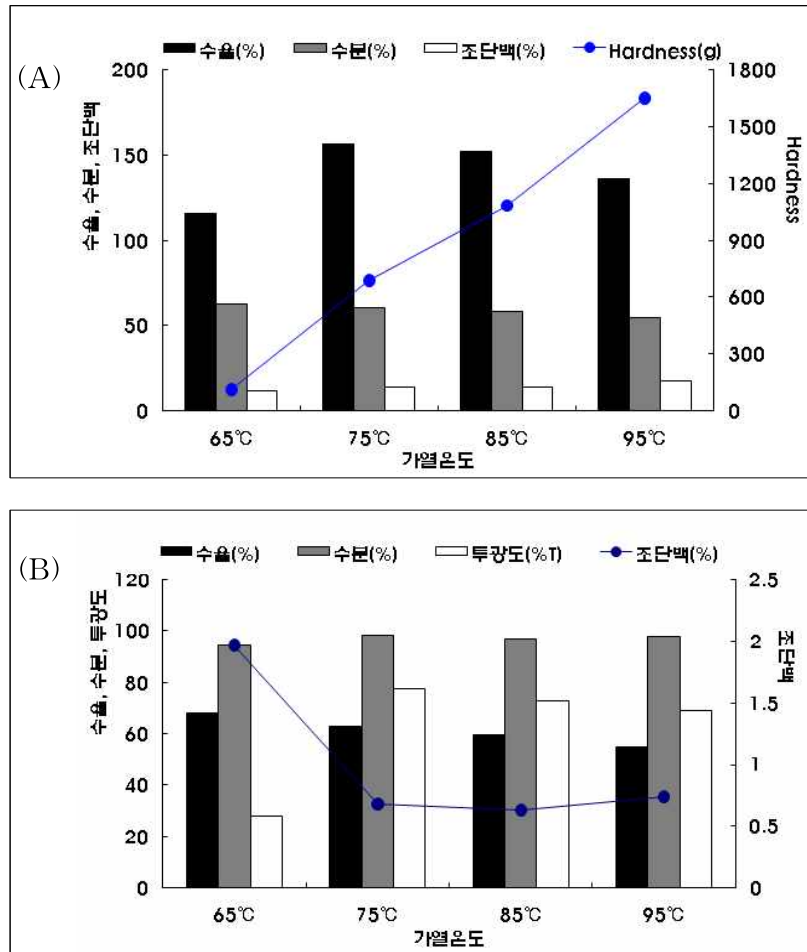


Figure 68. 가열온도를 달리한 종실두부의 이화학적 특성. 두부(A), 순물(B)

Fig. 69는 가열, 응고온도를 달리한 두부의 표면 미세구조를 주사전자현미경으로 관찰한 것이다. 65°C 두부의 경우 비교적 다량의 기공이 분포하고 있으며 크기가 작은 편이었으나 밀크의 가열, 응고 온도가 높을수록 입자사이 기공의 크기와 개수가 줄어들고 입체구조는 덩어리가 뭉친 형태에서 여러 층이 켜켜이 쌓여 이루는 복층구조를 보이며 형태도 단순해졌다. 이는 65°C 두부의 경우 응고가 완전히 일어나지 않아 단백질 입자와 고형분의 결합이 충분하지 못해 빈 공간을 차지하고 있던 수분이 두부를 동결건조할 경우 증발되면서 공간이 비어지게 되어 많은 기공이 형성된 것으로 생각된다. 그러나 가열, 응고온도가 높아질수록 단백질 입자와 고형분간의 결합력이 강해져 빈 공간이 줄어들게 되면서 수분이 차지하는 공간도 적어지게 되어 크기도 좁아진 것으로 생각된다.

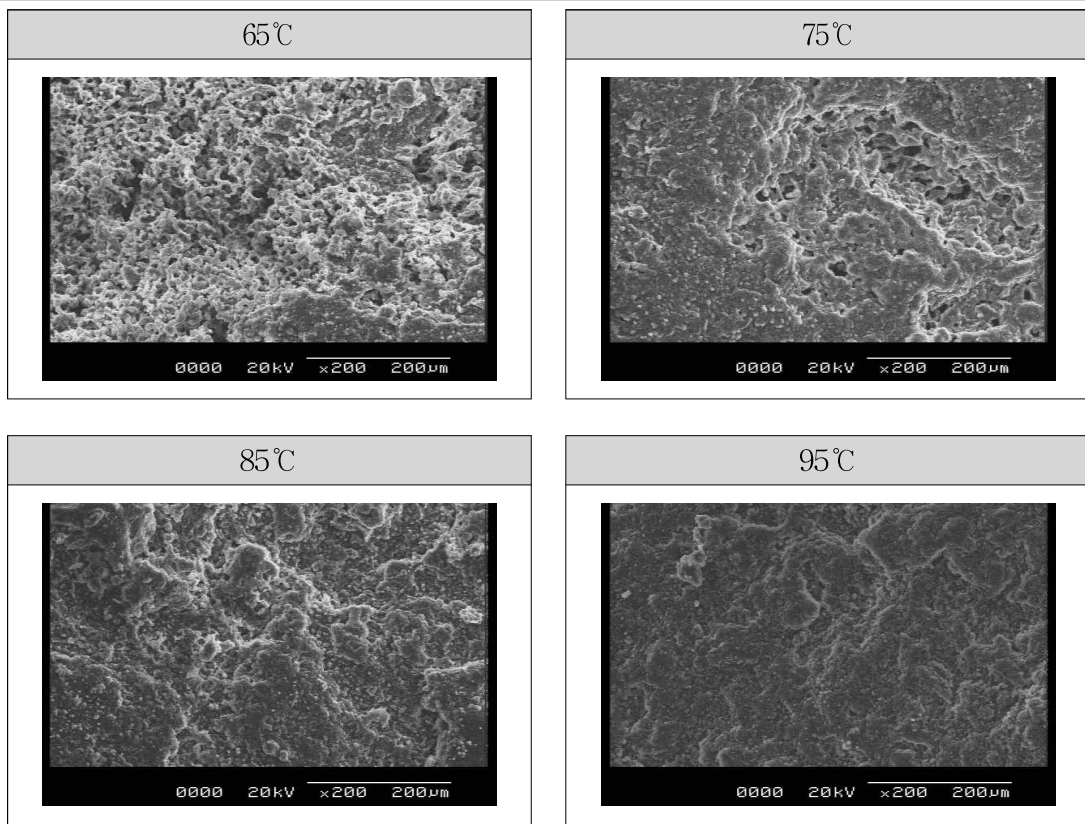


Figure 69. 가열온도를 달리한 종실두부의 주사전자현미경 사진(x 200)

가열, 응고온도를 달리하여 제조한 청삼종실 두부를 일정 크기로 절단하여 관능검사 결과는 Fig. 70과 같다. 외관과 절단면의 경우 전반적인 형태가 거친 95°C 두부와 응고가 완전히 일어나지 않아 무른 식감을 지닌 65°C 두부가 전반적으로 낮은 점수를 보여 75°C 두부와 유의적인 차이를 나타내었다. 견고성과 씹힘성의 강도는 앞서 조직감 측정 결과에서 나타난바와 같이 가열, 응고온도가 높을수록 더 견고하고 씹는 식감이 강하게 느껴져 강도가 상승하였다. 그러나 두부의 고소한 향이나 콩비린내, 맛에서는 시료간 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다. 종합적기호도에 있어서는 적당한 씹힘성과 외관상 깔끔한 성상을 유지하는 75°C 가열, 응고 두부가 가장 높았으며, 반대로 조직감이 다소 무르거나 또는 단단하고 형태가 매끄럽지 못한 65°C, 95°C 두부는 낮은 기호도를 나타내었다. 이는 관능요원들이 두부를 선택할 경우 향이나 맛보다는 두부의 식감이나 외관을 더 중요시함을 알 수 있었다.

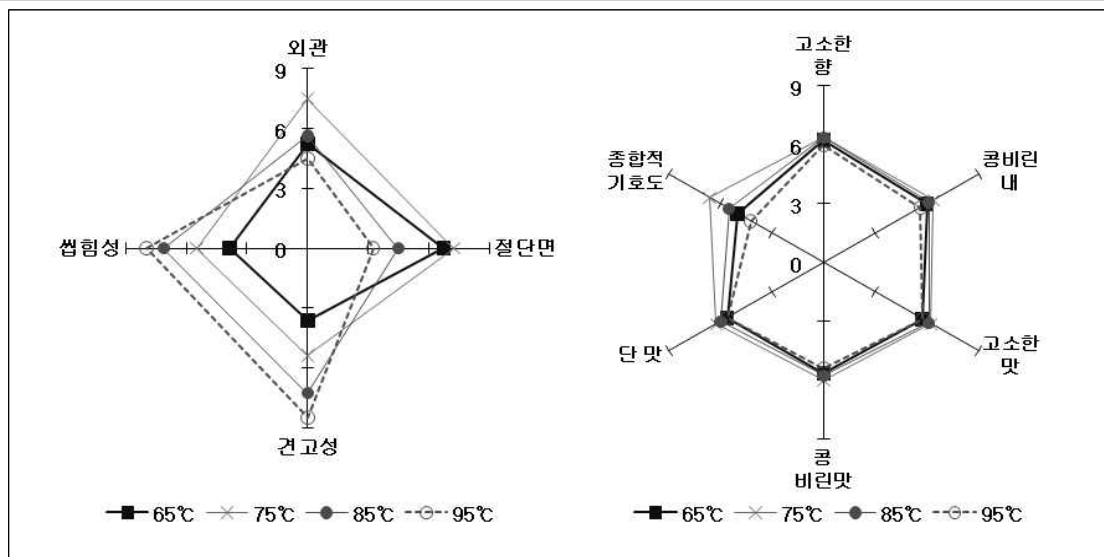


Figure 70. 가열온도를 달리한 종실두부의 기호도 평가 결과

3) 가열온도에 따른 응고제를 사용하지 않는 청삼종실 두부의 품질특성

본 실험에서는 두부 제조시 단백질 응고를 위해 필수적으로 첨가되어야 하는 응고제를 사용하지 않고 청삼종실 단백질의 열변성 특성을 활용하여 응고제 무첨가 두부 제조를 위한 적정 열처리 조건을 검토하였다.

Fig. 71은 응고제를 사용하지 않고 청삼종실 밀크를 각기 다른 온도에서 열처리할 경우 발생하는 응고물과 이들로 제조한 두부 절단면의 성상을 나타낸 결과이다. 밀크내 형성되는 응고물의 형태를 살펴보면 65°C의 경우 curd의 크기가 작아 순물과 뚜렷이 구분되지 않으나 75°C부터는 서서히 눈으로 구분이 되는 curd가 생성되어 95°C에서 가장 큰 덩어리의 형태를 띄어 앞의 응고제 첨가 두부 공정의 경우 85°C에서 가열처리시 curd 크기가 가장 큰 결과와 차이가 있었고 가열용기 기벽에 눌러 붙는 정도도 응고제 첨가구에 비해 적었다.

청삼 밀크내 단백질이 열변성에 의해 커드를 형성하는 온도이상에서 응고제를 첨가하면 응고제가 약간의 고유 기능을 보이는 반면 열변성이 일어나기전의 온도에서 응고제를 첨가하면 응고제가 먼저 구성단백질 등과 작용함으로서 가열온도가 상승하더라도 큰 형태의 응고물이 형성되지 않는 것으로 생각된다.

두부 절단면 또한 응고제 첨가구에 비해 전반적으로 매끄럽고 외관 성상도 95°C 두부를 제외하고는 비교적 안정된 두부 형태를 보였다.

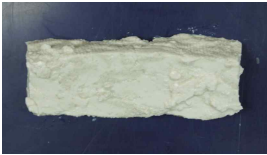
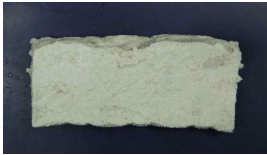






가열 온도	65℃	75℃	85℃	95℃
절단면				
응고물				

Figure 71. 가열온도에 따른 응고제 무첨가 종실밀크의 응고물과 두부 절단면의 성상

Fig. 72는 응고제를 사용하지 않고 각기 다른 온도에서 가열, 응고시켜 제조한 두부의 품질특성을 분석한 결과이다.

두부 수율은 65℃ 121%에서 85℃ 175%로 증가하다가 95℃는 142%로 감소하는 형태를 보여 응고제를 사용하여 제조한 두부와 비슷한 경향이었으나 각 온도별 수율은 응고제를 사용하지 않은 것이 높았다. 수분함량은 65℃ 처리구가 71%, 95℃ 처리구가 57%로 가열온도가 높을수록 감소하였으나 앞서 응고제를 사용하여 제조한 두부들 보다 각각의 온도에서 높은 것으로 나타났다. 조직감은 65℃ 186g에서 95℃ 842g로 증가하는 경향을 나타내었고 조단백 함량은 약간 증가하지만 큰 차이는 없었으나 응고제 첨가구와 비교해 각 온도별로 약간 낮은 편이었다. 이는 청삼종실 밀크를 이용한 두부 제조시 밀크 가열 후 응고제의 첨가는 단백질-단백질 또는 단백질-고형분간의 결합력을 강하게 하여 결과적으로 조직내 수분 보유력을 떨어뜨리는 원인이 되는 것으로 생각된다.

한편 순물의 투광도는 65℃ 13.5%, 75℃~95℃ 47~59%로 가열온도가 상승할수록 증가하였으나 전체적인 수치가 응고제 첨가구보다 낮아 두부제조공정에서 가열한 밀크에 응고제를 첨가함으로써 밀크내 수용성단백, 고형분 등의 응고, 결합력이 약간 더 촉진됨을 알 수 있었다.

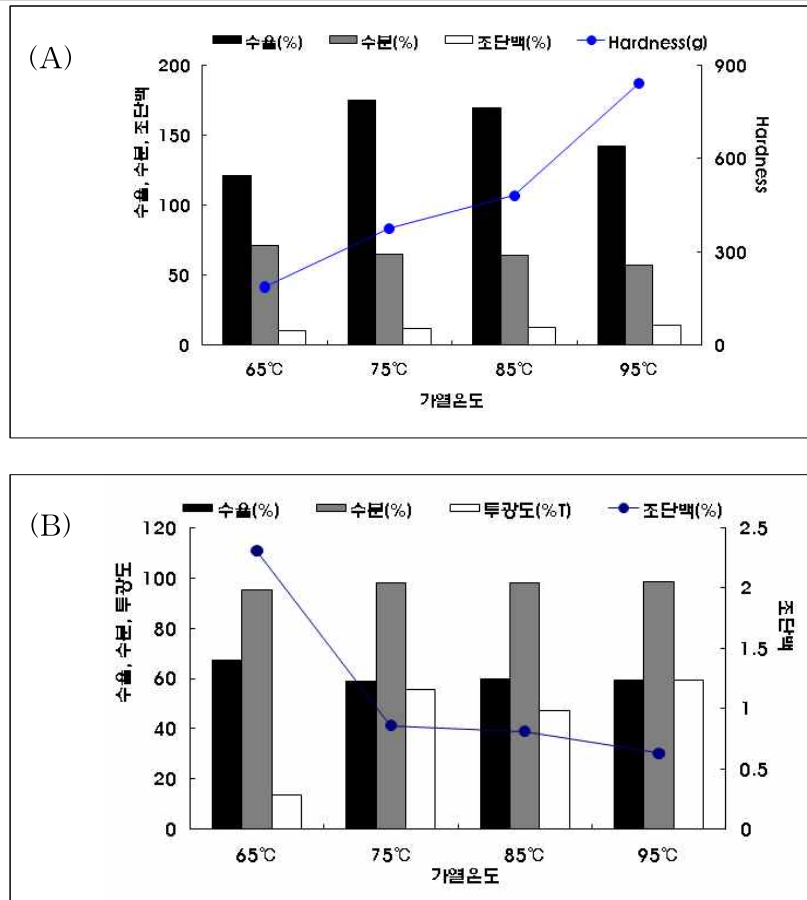


Figure 72. 가열온도에 따른 응고제 무첨가 종실두부의 이화학적 특성. 두부(A), 순물(B)

Fig. 73은 응고제를 사용하지 않고 제조한 두부의 표면 미세구조를 주사전자현미경으로 관찰한 것이다. 65°C 두부 표면은 비교적 기공이 크고 조직을 이루는 단면도 부드럽고 매끄러웠으나 가열온도가 올라갈수록 기공의 크기가 작아지고 그 개수도 줄어드는 경향을 보였다. 응고제 첨가 유무에 따른 두부 미세구조를 비교하면 65°C 처리구 중 응고제 무첨가구가 조직 기공이 훨씬 크고 단면이 거친 망상구조를 보였고 층구조에 있어서도 응고제 무첨가 85°C 두부는 응고제 첨가구의 75°C, 응고제 무첨가구 95°C 두부는 85°C 시료와 비슷한 표면구조를 나타내었다.

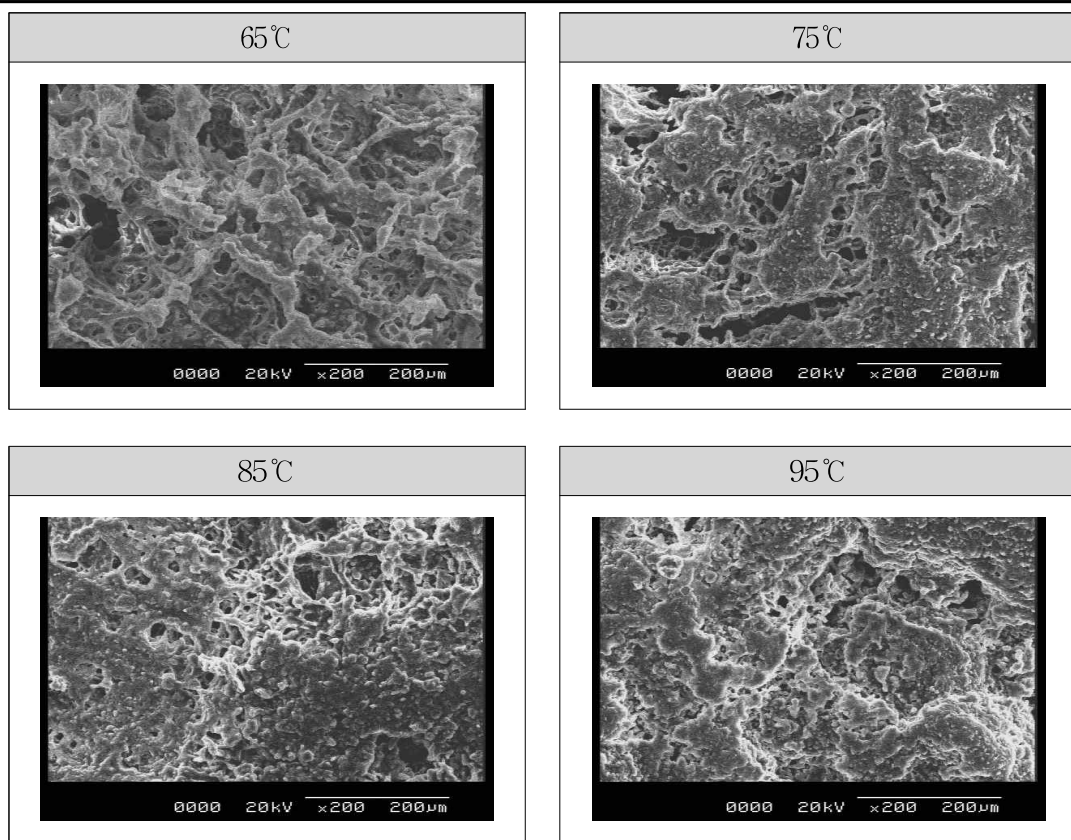


Figure 73. 가열온도에 따른 응고제 무첨가 종실두부의 주사전자현미경 사진(x 200)

응고제를 사용하지 않고 제조한 두부의 관능검사를 실시한 결과(Fig. 74) 외관과 절단면의 경우 95℃ 두부의 점수가 비교적 낮지만 전반적으로 유의차가 크지 않았는데 이는 앞서 응고제 첨가구와는 다른 결과였다. 반면 씹힘성과 견고성의 경우 가열온도가 높을수록 강도가 강해지는 것으로 나타나 응고제 첨가구와 일치하는 결과를 보였다. 고소한 향이나 콩 비린내, 단맛, 콩 비린맛에서는 큰 유의차를 느끼지 못하는 것으로 나타났지만 고소한 맛에서는 85, 95℃ 온도의 두부가 기호적으로 높은 수치를 보였다. 종합적 기호도는 식감이 너무 무르거나 단단하지 않고 적당한 씹힘성과 외관상 깔끔한 성상을 유지하고 있는 85℃가 가장 높은 점수를 얻었다.

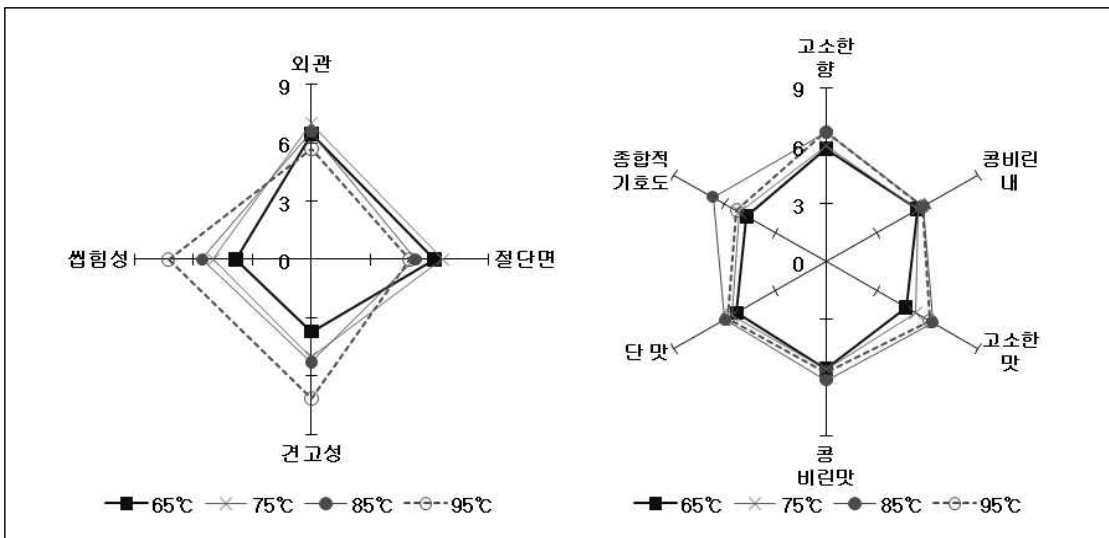


Figure 74. 가열온도에 따른 응고제 무첨가 종실두부의 관능평가 결과

한편 앞서 청삼종실을 이용한 두부 제조공정 연구에서 응고제의 사용 유무를 달리하여 제조한 두부의 경우 응고제를 사용할 경우 밀크를 75°C로 가열하고 여기에 응고제를 첨가하여 75°C에서 25분간 유지, 응고시켜 제조한 두부가 수율, 색상, 관능적 특성에서 가장 좋았다. 반면 응고제를 사용하지 않고 두부를 제조할 경우에는 밀크를 85°C로 가열한 후 25분간 유지, 응고시킨 두부가 가장 좋은 것으로 나타났다. 따라서 본 실험에서는 이들 2가지 제조조건에 따라 두부를 제조한 다음 관능평가를 실시하였다(Fig. 75).

외관에서는 유의차가 없었으나 절단면은 표면이 더 매끄러운 응고제 무첨가구의 점수가 7.63으로 높았고 식감을 좌우하는 견고성과 씹힘성은 응고제 첨가 두부가 더 높은 강도를 보였다. 두부의 맛을 평가하는 항목에서는 무첨가구의 기호도가 높았는데 이는 응고제가 갖고 있는 특유의 짭짜름한 맛과 시큼한 쓴맛을 이전 관능검사에서는 못 느끼다가 직접으로 두 시료를 비교함으로써 그 차이를 명확히 느낀 것으로 생각된다. 이에 따라 응고제 첨가 유무를 달리한 두부의 경우 식감에서 느끼는 차이보다 맛에서 느끼는 차이를 더 명확히 구분함으로써 종합적인 기호도에서 유의적인 차이는 없으나 응고제를 사용하지 않고 제조한 두부를 더 선호하는 것으로 나타났다.

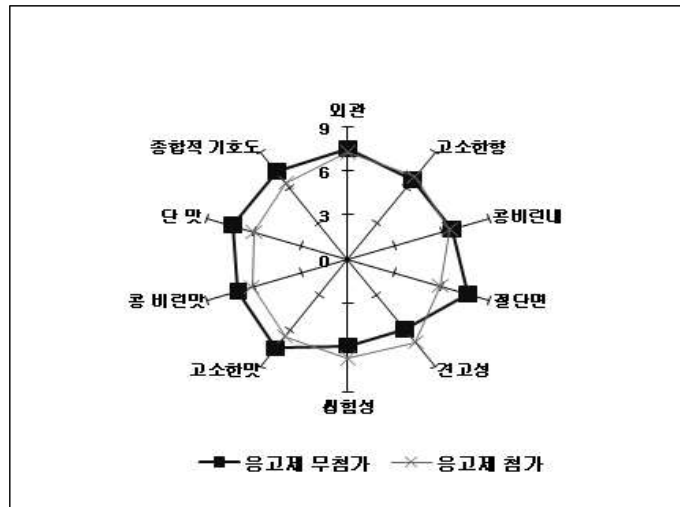


Figure 75. 응고제 첨가유무에 따른 중실두부의 관능평가 결과

4) 응고제를 사용하지 않는 두부의 품질개선 연구

가) Phytic acid를 이용한 두부의 품질 개선 효과

청삼중실 밀크를 이용하여 제조한 두부의 품질개선을 위해 두부 겔 중에 더 많은 수분을 함유시키기 위한 방안으로 P(인)로 환산 시 6.65mg%과 26.58mg%에 해당하는 phytic acid를 밀크에 첨가하여 응고제 무첨가 두부 제조공정에 따라 두부를 제조하였다.

Phytic acid을 첨가할 경우 curd 형성이 무첨가구에 비해 느린 편이며, 그 농도가 높을수록 그 정도가 더 느렸다. 또한 응고물의 형태에 있어서도 대조구에 비해 입자 크기가 작게 형성되었다. 두부의 외형 성상 또한 무른 편으로 형태가 쉽게 일그러지는 것을 확인할 수 있었으며 phytic acid를 첨가한 두부는 절단이나 다른 물리적으로 충격을 가하지 않아도 쉽게 수분이 이수되어 나왔다(Fig. 76). 이는 phytic acid가 밀크내 단백질, 칼슘과 반응하여 콜로이드성 침전물을 형성하여 두부 겔 중에 더 많은 수분을 보유하게 함으로서 일어나는 현상으로 알려져 있다.





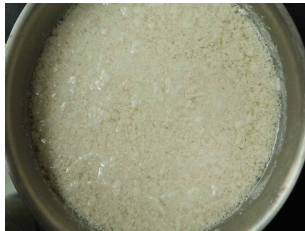

	대조구	Phosphorus 6.65 mg	Phosphorus 26.58 mg
절단면			
응고물			

Figure 76. Phytic acid 첨가량에 따른 응고제 무첨가 중질밀크 응고물과 두부 절단면의 성상

Phytic acid 첨가 두부의 품질특성을 비교한 결과(Fig. 77) 수율에서는 시료 간에 유의적 차이가 없었으나 수분함량의 경우 phytic acid 첨가량에 상관없이 무첨가구에 비해 약 5%정도 높은 61%정도였고 조직감은 phytic acid 6.65mg 첨가구가 134.1g, 126.58mg 첨가구가 130.3g으로 무첨가구의 223.2g보다 낮았다. 또한 조직감 측정 시 두부가 probe에 의해 절단되어지면 phytic acid 첨가구의 경우 많은 양의 수분이 이수되어 나왔다. 이는 중질 밀크에 첨가한 phytic acid가 가열과정에서 밀크내 칼슘과 결합하여 중질 밀크내 단백질이 칼슘과 결합하는 것을 지연시킴으로 응고물내의 보수력을 증가시킴으로 인해 일어난 현상으로 생각된다.

한편 본 결과에는 나타내지 않았으나 이들 두부의 관능적인 특성을 비교한 결과 phytic acid 첨가구의 경우 물성이 물러 식감이 기호적으로 좋지 못했다. 식감에서 오는 기호도보다 전체적인 풍미에서 phytic acid 특유의 신맛이 느껴져 기호적으로 좋지 못했다.

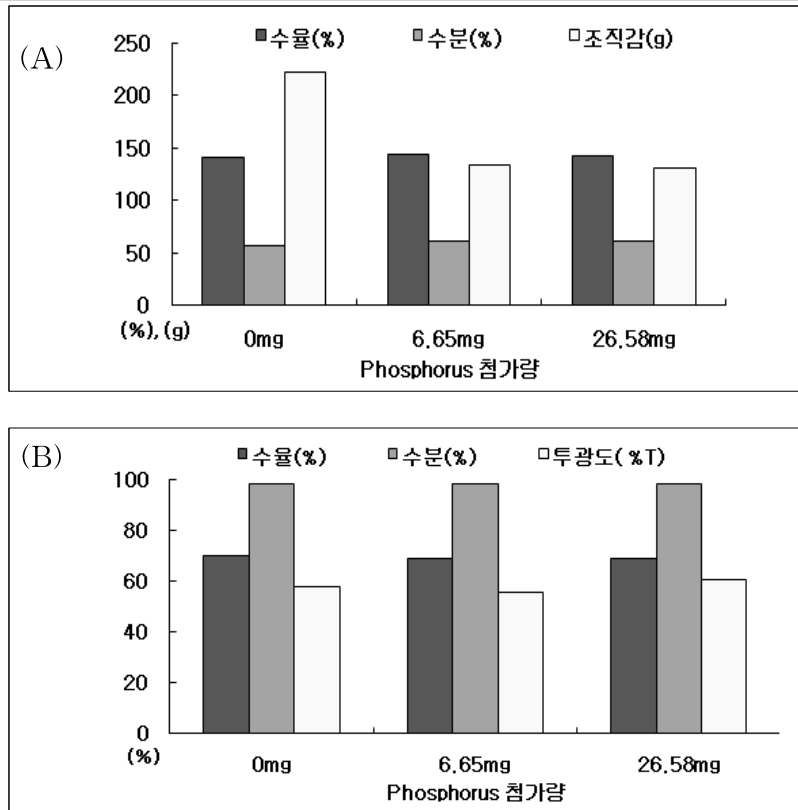


Figure 77. Phytic acid 첨가량에 따른 응고제 무첨가 종실두부의 이화학적 특성. 두부(A), 순물(B)

㉔ 난백을 이용한 두부의 품질 개선 효과

청삼종실로 제조한 두부의 품질특성 중 탄력성을 증진시켜 식감을 개선하고자 밀크에 탈피 청삼종실대비 0.6%, 1.2%, 1.8%에 해당하는 난백분말을 첨가하여 두부를 제조하고 품질특성을 비교하였다. Fig. 78은 난백분말 첨가농도별 밀크 응고물과 이로부터 제조한 두부 절단면의 성상을 나타낸 결과이다. Curd가 형성되는 성상은 난백의 첨가농도가 높을수록 응고물 발생속도가 비교적 빨랐고 무첨가구에 비해 curd가 더욱 뚜렷하게 형성되었다. 이와 같이 난백 첨가로 응고속도가 빨라지고 온도가 하강한 것은 난백의 응고 작용과 종실단백이 2가 금속이온에 잘 응고되는 응고작용이 동시에 작용한 결과로 판단된다. 순물의 탁도 또한 난백의 첨가농도가 높을수록 맑아지는 것을 육안으로도 구분할 수 있었다. 두부 절단면은 비교적 매끄러웠으며 난백함량이 높을수록 절단할 때의 강도가 단단하고 약간씩 거친 느낌도 있으나 탄성이 더해져 두부 조직의 탄력성은 좋아졌다. 밀크의 커드형성 온도 범위에서 난백의 첨가량이 증가할수록 응고 온도가 낮아져 응고 온도 강하에 영향을 미치는데 이는 난백의 주성분인 albumin이 62~65℃에서 응고되는 성질에 기인하는 것으로 보고되어 있다.









	대조구	난백 0.6%	난백 1.2%	난백 1.8%
절단면				
응고물				

Figure 78. 난백 첨가량을 달리한 응고제 무첨가 종실밀크 응고물과 두부 절단면의 정상

Fig. 79는 앞서 제조한 두부의 품질특성을 비교한 것으로 수율은 무첨가구의 151.3%에서 난백의 첨가농도가 증가할수록 증가하는 경향을 보여 난백분말 1.8%첨가시 10% 정도 상승하였다. 흔히 난백 첨가시 두부의 무게와 부피가 증가한 것은 난백이 두유에 비하여 같은 용적에 대한 단백질을 비롯한 고형물 함량이 많은 것이 원인이라 한다. 수분함량은 무첨가구의 70.1%에서 난백분말 1.8% 첨가 시 63.6%로 난백분말의 첨가량에 따라 다소 감소하는 경향을 보였고 조직감 또한 무첨가구는 164.7g이었으나 난백첨가에 따라 증가해 1.8%를 첨가한 두부의 경우 415.4g으로 2.5배 높은 수치를 보였다. 이는 난백분말의 첨가로 난백자체의 고형분 함량의 증가도 있지만 난백분말이 밀크내의 단백질 입자와 고형물의 결합에 영향을 미쳐 보다 견고한 결합을 일으키고 결합된 고형분과 단백질 입자로 수분을 흡수할 시간을 단축시켜 조직내의 수분함량이 줄어들어 따라 두부 조직감이 증가하게 되는 것으로 판단된다.

Curd의 형성정도를 판단할 수 있는 순물의 투광도는 무첨가구의 60%에서 난백분말을 0.6~1.2% 첨가할 경우 62%T로 약간 증가하다가 1.8% 난백분말을 첨가한 경우 60.4%T로 다소 감소하였다.

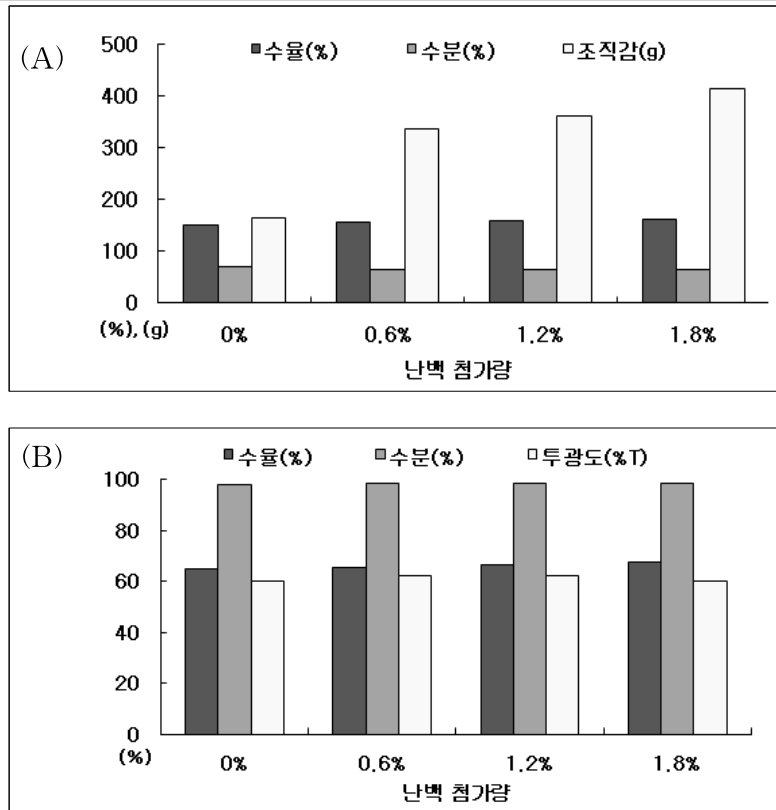


Figure 79. 난백 첨가량을 달리한 응고제 무첨가 중실두부의 이화학적 특성.
두부(A), 순물(B)

난백분말의 첨가가 청삼중실 두부의 미세표면구조에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 주사전자현미경을 이용하여 관찰하였다(Fig. 80). 무첨가구의 표면구조는 다소 불규칙적이며 입자를 이루는 알갱이들이 산재해 있고 벌어진 틈이 많으며 단면을 이루는 입자가 비교적 거칠고 날카로운 반면 난백분말 첨가구는 작은 알갱이들이 큰 입자의 표면에 부착되어 있고 층 구조는 평탄하고 단면을 이루는 입자의 거칠기가 무뎠으며 전체적인 밀도도 더 조밀하고 견고한 것을 확인할 수 있었다. 하지만 1.8% 첨가두부의 경우 결합력이 비교적 강하게 작용해 전체가 균일하게 결합해있던 것이 고품분과 단백질입자간의 결합력이 커져 층 구조를 이루던 입자의 틈이 벌어지는 형태를 보였다.

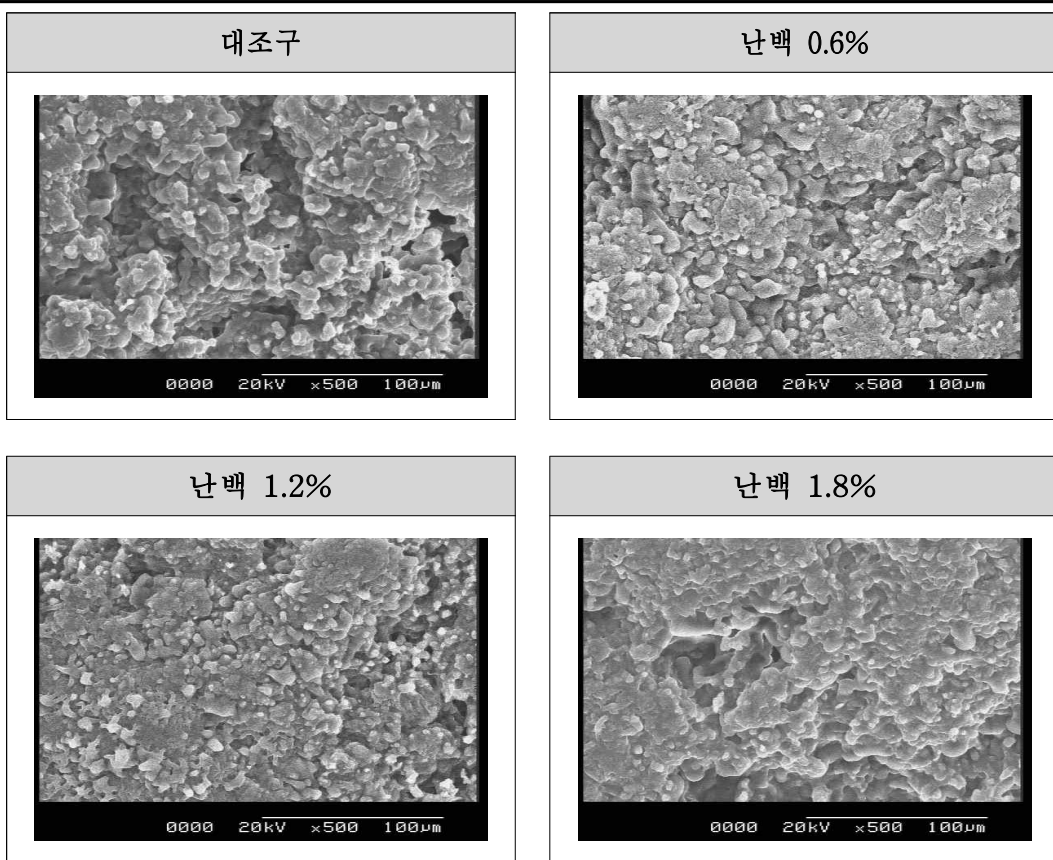


Figure 80. 난백 첨가량을 달리한 응고제 무첨가 종실두부의 주사전자현미경 사진(x 500)

난백 첨가량을 달리하여 제조한 두부의 관능적 특성을 비교한 결과(Fig. 81) 두부의 외관, 견고성 및 씹힘성 특성에서 난백분말의 첨가량에 따라 차이가 확인하였다. 전체적인 외관에 있어서는 너무 단단하거나 무른 식감보다는 적당한 탄력과 견고성을 갖춘 난백분말 1.2% 첨가한 두부가 가장 좋았고 그 다음으로 0.6% 두부가 좋았다. 절단면은 난백분말 1.2%첨가한 두부가 가장 매끄러웠으며, 난백을 첨가하지 않은 두부와 1.8%첨가한 두부는 조직이 너무 무르거나 거칠어져 매끄럽지 못한 것으로 나타났다.

두부의 풍미를 비교했을 때 이미, 이취에서는 처리구간 차이가 없었으나 고소한 향, 맛에서는 난백분말 1.2% 첨가구의 기호도가 높은 것으로 나타났고 그 다음으로 0.6% 첨가 두부, 무첨가 두부 순으로 기호도가 높았다. 이는 난백분말 첨가 두부의 경우 난백분말이 갖고 있는 특유의 비린내로 인하여 거부감을 줄 수 있으나 밀크 가열공정에서 종실의 향미와 반응하여 도리어 청삼종실로만 제조한 두부보다 풍부한 풍미를 부여하는 것으로 나타났다. 종합적기호도에 있어서도 외관이나 식감뿐만 아니라 풍미에서 기호도가 높은 난백분말 1.2% 첨가 두부가 가장 기호도가 높았고 다음으로 0.6% 첨가 두부의 기호도가 높아 난백분말을 첨가하지 않은 두부보다 품질이 개선되었다.

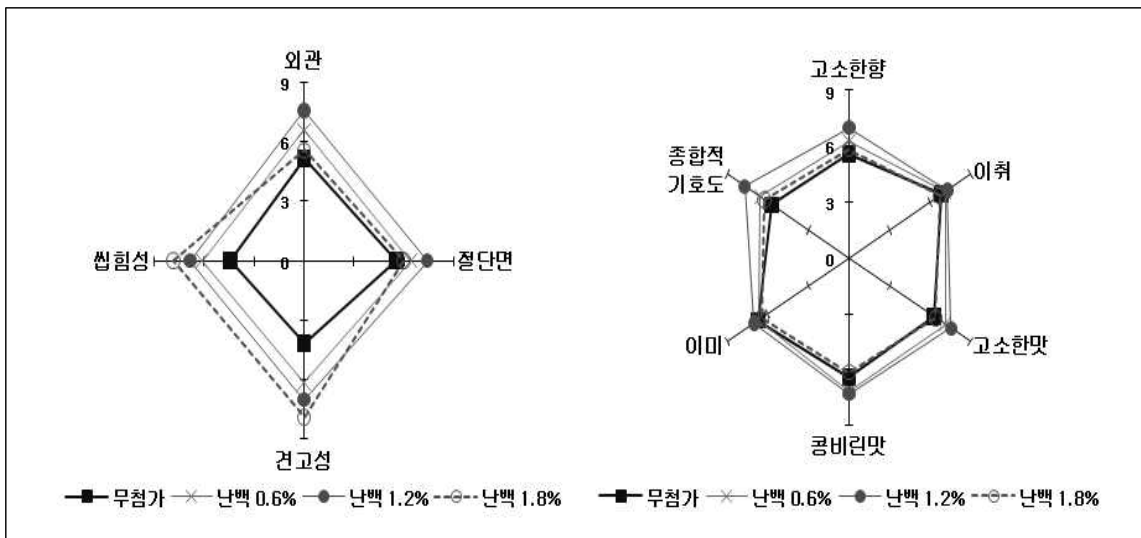


Figure 81. 난백 첨가량을 달리한 응고제 무첨가 종실두부의 관능평가 결과

5) 응고제를 사용하지 않는 종실두부의 저장 중 품질특성 분석

청삼종실 두부를 플라스틱 용기에 넣고 중량대비 같은 양의 정제수를 가하여 sealer로 밀봉한 다음 4℃ 냉장고에 보관하면서 저장 중 품질특성을 분석하였다(Fig. 82).

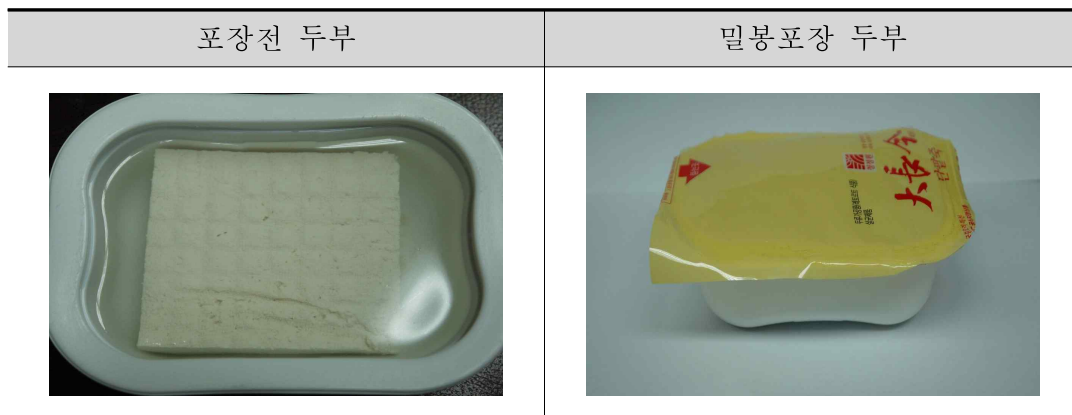


Figure 82. 저장 안정성 분석용 포장 두부 정상

Fig. 83은 pilot 규모로 제조한 응고제를 사용하지 않는 두부의 저장기간에 따른 특성변화를 분석하기 위하여 4℃에서 냉장 보관하며 저장중의 pH, 투광도, 조직감 및 미생물군의 변화를 조사하였다. 두부 침지액의 pH는 저장 7일까지 변화가 없었으나 두부 고형물의 용출 정도를 분석하기 위해 침지액의 투광도를 측정된 결과, 대조구가 난백첨가 두부에 비해 저장기간별 투광도 값이 낮아 침지액에 용출되는 물질의 양이 많은 것으로 나타났다. 두부 조직감은 저장 1일 후부터 약간씩 증가하여 저장 7일 경과시 대조구는 581g, 난백첨가구는 627g까지 증가하였는데 일반적으로 콩 두부의 경우에 있어서도 제조 직후보다 두부를 냉장보관 및 냉수에 침지시켰을 때 밀도가 조밀해져 조직감이 상승하는

것으로 보고되어 있다. 두부의 총 미생물과 대장균 변화를 측정한 결과 대장균은 저장 7일까지 발견되지 않아 유통상의 문제점은 없는 것으로 나타났다.

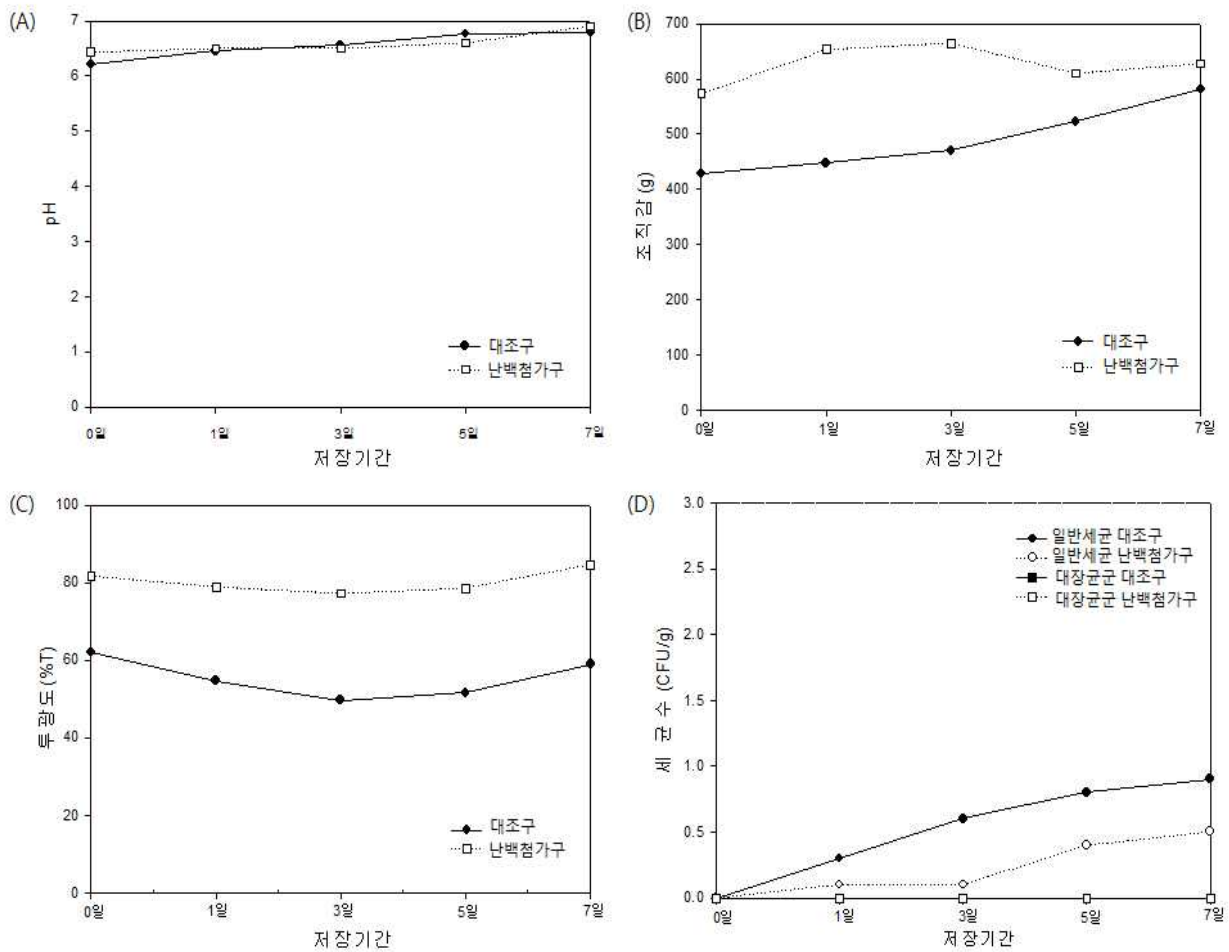


Figure 83. 응고제를 사용하지 않는 종실두부의 저장 중 이화학적 특성 및 미생물 검사, (A): pH, (B): 조직감, (C): 투광도, (D): 미생물

② 청삼종실을 이용한 응고제 무첨가 전두부 제조

㉠ 가수량에 따른 전두부의 품질특성

앞서 청삼종실 밀크를 이용한 두부 제조시 응고제를 사용하지 않고도 두부 제조가 가능하였다. 본 실험에서는 청삼종실 마쇄물을 이용하여 전두부형태의 제품을 개발하였다. 먼저 종실 마쇄물 제조시 가수량에 따른 전두부의 품질특성을 조사하여 전두부용 적정 가수량을 설정하고자 탈피종실 중량대비 2배, 2.5배, 3배의 정제수를 가하여 마쇄물을 제조하였다. 이들 마쇄물을 적당한 크기의 용기에 일정량씩 계량하여 가열온도 90℃, 가열시간 40분의 조건에서 가열, 응고 후 냉각시켜 전두부의 외관 및 절단면을 비교하였다 (Fig. 84).

가수량이 높아짐에 따라 전두부 수율은 높아질 수 있으나 사진에서 보는바와 같이

2.5배, 3배 가수량 전두부의 중심부는 응고가 균일하지 않아 생긴 무른 형태의 층이 발견되었다. 특히, 가수량을 3배로 적용한 전두부의 절단면을 살펴보면 전체적인 두부의 형태가 생성되지 않아 상층부는 푸딩처럼 흘러내리는 형상을 보였고 두부 조직에 많은 기공이 형성되었다.







	2 배	2.5 배	3 배
절단면			
두부윗면			

Figure 84. 가수량에 따른 응고제 무첨가 종실전두부의 외관과 절단면의 성상

가수량을 달리하여 제조한 전두부의 품질특성을 조사한 결과는 Fig. 85와 같다. 가수량을 2배로 하여 제조한 전두부의 경우 절단 이전에 이수되는 수분이 거의 없었으나 가수량을 높여 제조한 두부의 경우 용기에서 전두부를 분리하는 과정에서부터 수분이 이수되어 나왔다. 절단 후 이수되는 수분의 양도 상당한 차이를 보여 가수량 2배 전두부가 2.81%, 2.5배 두부가 8.51%, 3배 두부가 14.69%로 시료간 6배 차이가 났다. 전두부의 경도를 측정된 결과 2배 가수량 전두부는 339.39g의 수치를 보였고 2.5배는 215.50g, 3배는 192.53g의 수치를 나타내어 가수량에 따른 경도의 차이가 비교적 큰 것을 확인할 수 있었다. 이상의 실험 결과 전두부 제조를 위한 청삼종실 마쇄물 제조시 적정 가수량은 원료 중량대비 2배 정도가 적당한 것으로 판단되었다.

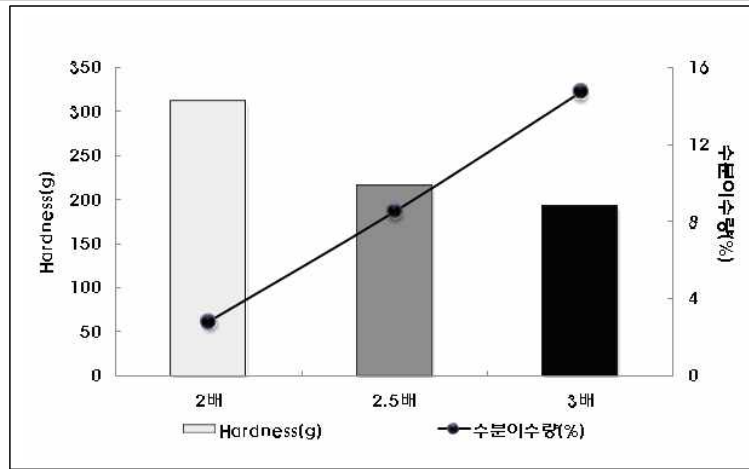


Figure 85. 가수량에 따른 응고제 무첨가 종실전두부의 이화학적 특성

㉔ 가열온도와 응고시간에 따른 전두부의 품질특성

탈피 청삼종실에 2배의 정제수를 가수하여 전두부용 마쇄물을 제조하고 적정 응고조건을 설정하고자 가열온도와 응고시간을 달리하여 전두부를 제조하였다.

Fig. 86은 종실 마쇄물을 용기에 담아 각각 가열하여 80, 85, 90℃에 도달하면 해당 온도에서 30, 40, 50, 60분간 유지, 응고시켜 제조한 전두부의 외관과 절단면의 성상을 나타낸 결과이다. 외형적인 성상을 살펴보면 가열온도에 따른 차이는 확연하게 나타났으나 각각의 온도에서 응고시간에 따른 차이는 나타나지 않았다.

가열온도 80℃의 경우 응고시간에 짧으면 두부의 중심 쪽으로 응고가 제대로 이뤄지지 않아 부분적으로 조직이 무른 성상을 보였으나 응고시간이 길어짐에 따라 정상적인 성상을 보였다. 절단면에서도 80℃에서 30분, 40분 가열한 두부는 견고히 응고되어 굳어 있는 것이 아니라 입자끼리 뭉쳐있는 듯한 형상을 보였다.

가열온도가 85℃이상이 되면서 80℃두부와 비교했을 때 보다 균일한 형태의 응고를 보였으며 시간이 길어질수록 용기에서 분리 시 옆면에 붙는 양이 늘어나고 전체적인 조직도 가열시간이 증가할수록 비교적 퍼석한 듯한 조직감을 보였다. 또한 80℃ 두부에서 보다 85℃ 두부가 응고시간에 따른 성상 차이가 비교적 뚜렷하게 나타나는데 30분부터 60분까지 점차 균일한 형태 응고가 일어나며 절단 시에 칼에 고형물이 묻어나지 않고 깔끔하게 잘리지만, 절단면은 응고시간이 길어질수록 거칠었다.

90℃ 두부의 경우 80℃, 85℃의 두부와 비교해 가열시 용기기벽과 접촉한 바깥쪽부분에 노란색 띠가 형성된 것을 확인할 수 있었는데 이는 가열온도가 높아질수록 밀크가 닿는 용기 벽면이 과열되어 생기는 변성으로 보인다. 절단면을 비교해 보면 80℃, 85℃의 두부보다 전체적으로 거친 편이며, 응고시간이 길수록 두부 조직에 형성되는 기공의 수가 증가하는 것을 관찰할 수 있었다.

























온도 \ 시간		시간			
		30분	40분	50분	60분
80℃	절단면				
	윗면				
85℃	절단면				
	윗면				
90℃	절단면				
	윗면				

Figure 86. 가열온도와 응고시간에 따른 응고제 무첨가 종실전두부의 외관 및 절단면의 성장

Fig. 87은 각기 다른 가열온도에서 응고시간을 달리하여 제조한 전두부의 수분이수량을 측정된 결과이다. 마쇄물 응고를 위한 가열온도가 높을수록, 그리고 각 온도에서 응고시간이 길수록 두부를 절단할 경우 이수되는 물량은 감소하는 경향을 나타내었다. 즉, 80℃에서 가열, 응고시킨 전두부의 이수량은 응고시간 30분에서 5.76%, 60분이 5.02%로 응고시간이 길어질수록 약간씩 감소하였고 가열온도를 85℃로 하여 제조한 전두부는 30분이 4.01%, 60분이 2.50%로 80℃ 두부와 비교해 전체적으로 수분 이수량이 적고 응고

시간간의 차이가 비교적 뚜렷하였다. 90℃ 두부를 보면 30분 2.83%, 40분 2.64%, 50분 2.25%로 응고시간별 차이가 줄어들었다. 또한 80℃의 경우 수분이수량 측정 후에도 상당량의 수분이 계속 이수된 반면 가열시간 85℃ 이상이 될 경우 일정시간 경과 후 이수되는 수분의 양이 훨씬 줄어들었다.

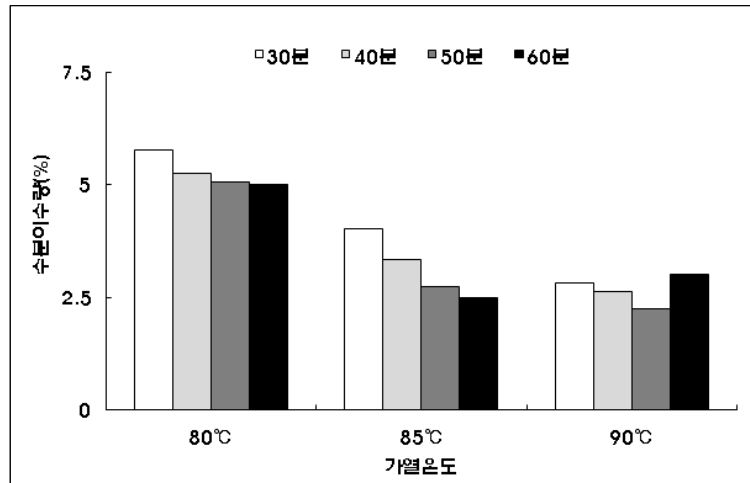


Figure 87. 가열온도와 응고시간에 따른 응고제 무첨가 종실 전두부의 수분 이수량

Fig. 88은 전두부의 경도 변화를 texture analyzer로 측정한 결과이다. 80℃에서 30분 가열, 응고시킨 전두부가 112.1g였고 60분 두부가 157.8g로 동일 가열온도에서 응고시간의 증가에 따라 경도 또한 증가하는 것으로 나타났다. 85℃에서 응고시킨 전두부의 경우 30분 189.04g, 40분 251.92g, 50분 288.79g, 60분 301.98g의 수치를 보여 시간에 따라 증가하였으나 80℃ 처리구보다 응고시간간의 차이가 큰 것으로 나타났다. 90℃에서 응고시간을 달리했을 때 30분 328.73g, 40분 330.82g, 50분 335.61g, 60분 325.11g의 값을 보여 80℃, 85℃의 전두부보다 경도 값은 높으나 응고시간별 시료 간에는 큰 차이가 없었고 60분에서 약간 감소하였다. 따라서 청삼종실 마쇄물을 이용하여 제조한 전두부의 조직감은 가열온도에 더 큰 영향을 받으며 수분 이수량과 경도사이에 상관관계가 있음을 알 수 있었다.

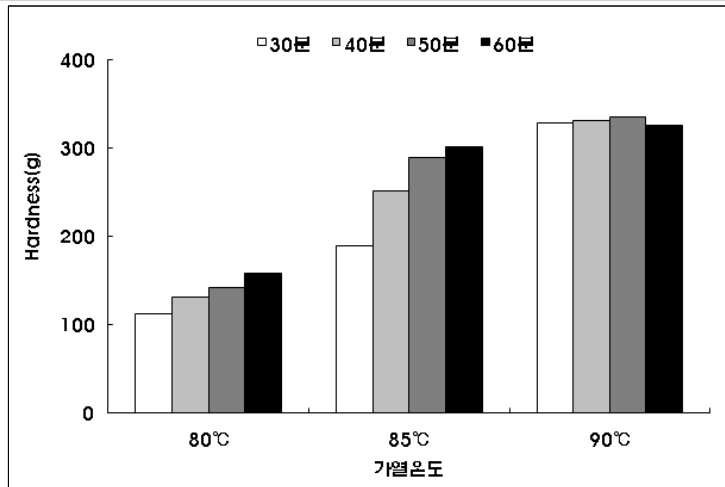


Figure 88. 가열온도와 응고시간에 따른 응고제 무첨가 종실 전두부의 경도

Fig. 89는 전두부의 표면미세구조를 주사전자현미경으로 관찰한 결과이다. 가열온도가 높을수록 입자가 이루는 망상구조가 단순해지면서 표면이 매끄러워지고, 망상구조 형태가 덩어리로 뭉쳐있는 단층구조에서 과열로 인해 결합력이 강해지면서 켜켜이 쌓이는 복층형태의 구조로 변화했다. 각각의 가열온도에서 응고시간이 길어질수록 표면이 다시 거칠고 날카롭게 변화했고 각각의 가열온도에서 30분간 응고시킨 전두부 조직을 비교해보면 가열온도가 높을수록 기공 크기와 거칠고 날카로운 표면이 줄어들었다. 또한 80°C, 85는 응고시간에 따라 정도의 차이가 있기는 하지만 전체적으로 기공의 크기 또한 작아지는 것을 확인할 수 있었다.

이러한 특징은 전두부 원료인 종실 마쇄물의 경우 앞서 종실 밀크를 이용하는 두부에 비해 입자가 굵고 거친 고형물을 응고, 성형시키고 압착공정과 같은 물리적 힘의 작용도 없어 수분 이동이 적으므로 일반 두부에 비해 상대적으로 조직내 기공의 크기가 크고 기공을 이루는 조직의 형태도 거칠어짐에 따라 나타난 현상으로 생각된다.

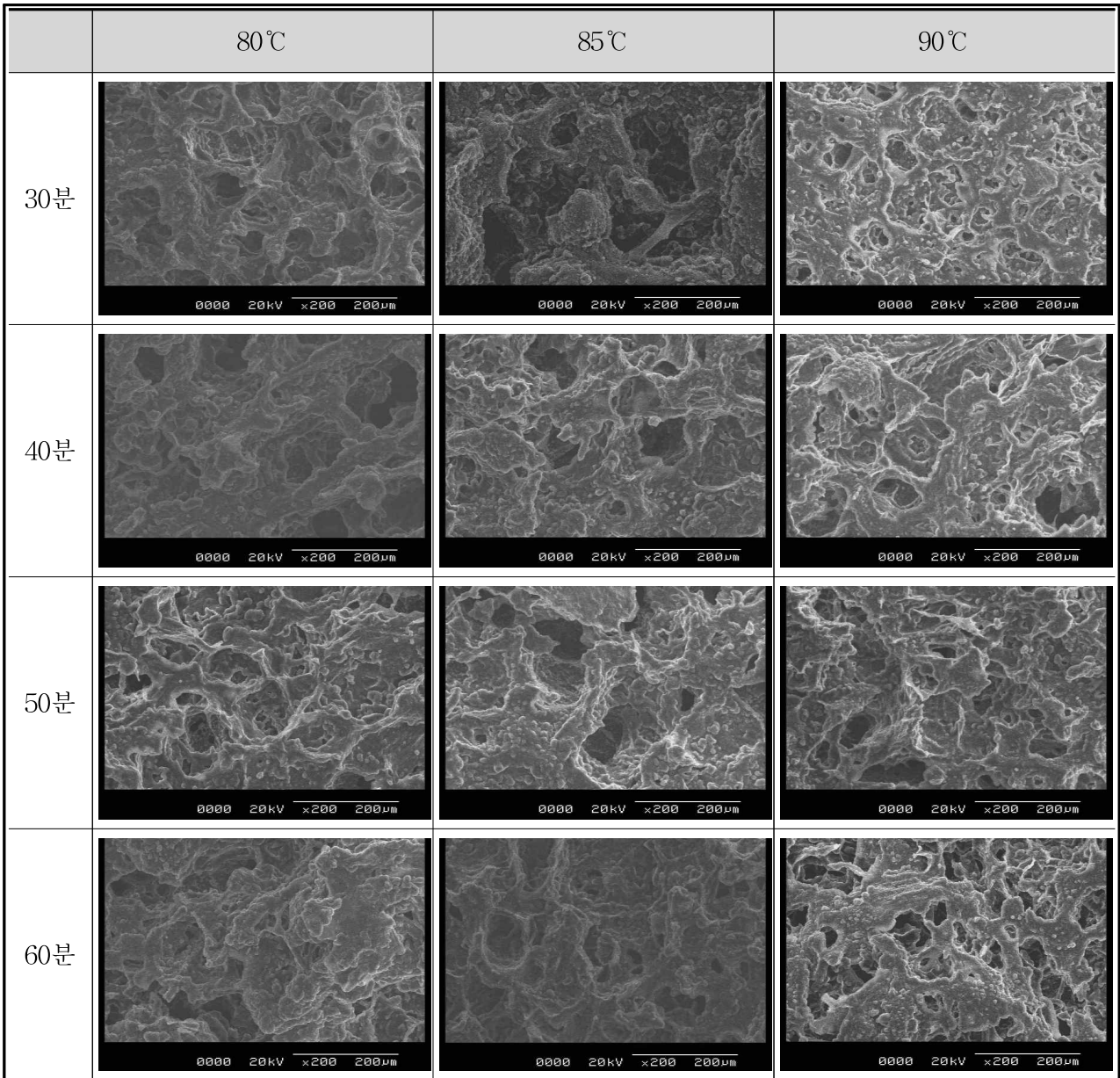


Figure 89. 가열온도와 응고시간에 따른 응고제 무첨가 종실 전두부의 주사전자현미경 사진(x 200)

Table 62은 앞서 제조한 가열온도별, 시간별 전두부의 기호도 평가를 실시한 결과이다. 외관과 절단면의 경우 가열온도가 높고 응고시간이 길어질수록 기공이 생기며 전체적인 표면이 거칠어져 비교적 낮은 점수를 받았고 특히, 90℃ 처리구가 다른 것에 비해 낮았다. 충분한 열처리를 하지 않아 생길 수 있는 종실 특유의 비린내와 가열온도에 따라 달라질 수 있는 고소한 향이나 고소한 맛에 대한 강도는 약간의 차이가 있었지만 통계처리에 의한 유의적인 차이가 거의 없었으나 비린맛은 가열온도가 높을수록 강도가 낮아지는 것으로 평가되었다. 견고성, 씹힘성의 강도 차이를 비교한 결과 가열온도가 높고 응고시간이 길수록 강도가 강해지는 것으로 평가되어 시료간에 유의적인 차이를 나타내

었다. 가열온도가 낮고 응고시간이 짧은 전두부의 경우 식감이 물리 씹을 때 쉽게 절단되며 씹히는 식감이 딱딱하여 입안을 메우는 식감을 부여하는 문제점을 지적하였다. 종합적기호도에 있어서 85℃ 50분 처리구, 90℃ 30분 처리구가 다른 것보다 기호도 점수가 높았다.

Table 62. 가열온도와 응고시간에 따른 응고제 무첨가 종실 전두부의 기호도 평가 결과

항목	80℃			85℃			90℃		
	30분	40분	50분	30분	40분	50분	30분	40분	50분
외관	7.25±0.46 ^{ab}	7.38±0.52 ^a	6.50±1.31 ^{abc}	6.50±1.07 ^{abc}	6.00±0.93 ^c	6.25±0.89 ^{bc}	4.13±1.25 ^d	4.38±0.92 ^d	4.38±0.92 ^d
고소한향	6.25±1.28 ^a	6.50±1.51 ^a	6.88±0.83 ^a	5.88±1.46 ^a	6.13±1.13 ^a	6.63±1.30 ^a	6.38±1.41 ^a	7.13±1.13 ^a	7.13±0.99 ^a
콩비린내	4.13±1.55 ^a	5.25±1.39 ^a	5.38±1.19 ^a	4.38±1.41 ^a	4.50±1.51 ^a	5.13±1.96 ^a	4.63±1.77 ^a	5.13±1.89 ^a	5.00±1.77 ^a
절단면	6.88±0.64 ^a	6.63±0.92 ^a	6.25±0.83 ^{ab}	5.13±1.55	5.38±1.69 ^{bc}	5.00±1.51 ^c	3.75±0.46 ^{cd}	4.25±1.16 ^d	3.75±1.16 ^d
견고성	3.00±0.76 ^c	3.38±0.92 ^c	3.75±0.46 ^{bc}	3.88±0.83 ^{bc}	4.00±0.76 ^b	4.88±1.46 ^b	6.00±1.13 ^a	6.38±1.41 ^a	7.00±1.19 ^a
씹힘성	3.13±0.99 ^b	3.50±1.07 ^b	4.00±0.76 ^a	5.38±1.19 ^a	5.50±0.93 ^a	5.50±1.41 ^a	6.13±0.99 ^a	6.50±1.19 ^a	6.63±1.60 ^a
고소한맛	4.88±1.89 ^a	5.75±1.83 ^a	5.50±1.77 ^a	5.00±1.93 ^a	5.38±1.69 ^a	6.13±1.64 ^a	5.38±1.19 ^a	5.75±1.04 ^a	5.70±0.71 ^a
콩비린맛	5.38±1.60 ^a	5.00±1.77 ^{ab}	4.38±1.30 ^{ab}	4.25±1.39 ^{ab}	4.38±1.60 ^{ab}	3.50±1.19 ^b	4.13±1.36 ^{ab}	3.88±1.25 ^{ab}	4.00±1.31 ^{ab}
단맛	3.38±1.77 ^a	4.00±1.85 ^a	4.13±1.96 ^a	4.38±1.51 ^a	4.13±1.73 ^a	4.75±1.91 ^a	4.63±1.92 ^a	4.75±1.75 ^a	4.88±1.81 ^a
종합적기호도	3.75±2.05 ^b	4.38±2.07 ^{ab}	4.88±2.10 ^{ab}	4.88±1.46 ^{ab}	4.50±1.20 ^{ab}	6.25±1.55 ^a	6.12±1.19 ^a	5.88±1.25 ^a	6.00±1.58 ^a

외관, 종합적기호도(1점-굉장히 나쁨, 5점-보통, 9점-굉장히 좋음)
 고소한 향, 콩 비린내, 고소한맛, 콩 비린맛, 단맛(1점-굉장히 적음, 5점-보통, 9점-굉장히 많음)
 절단면(두부표면. 1점-굉장히 거침, 5점-보통, 9점-굉장히 부드러움)
 견고성(1점-굉장히 무름, 5점-보통, 9점-굉장히 단단함)
 씹힘성 (1점-굉장히 으깨짐, 5점-보통, 9점-굉장히 좋음)

③ 청삼종실 두부 제조공정 매뉴얼

㉠ 탈피 청삼종실을 이용한 응고제를 사용하지 않는 두부 제조 매뉴얼

번호	공정/단계	공정설명	주요설비
1	입 고		
1-1	원료(청삼 탈피종실)	적합품에 한하여 입고한다.	전동지게차, 바스켓
1-2	용수(상수도)	수질검사에 적합한 먹는 물을 입고한다.	-

1-3	부재료(가공품)	입고 시 적합품에 한하여 입고한 후 냉장 보관한다. : 난백	냉장고
1-4	부자재(포장재)	입고 시 적합품에 한하여 입고한다. : PE, 캡, 종이박스	창고
2	보 관		-
2-1	부재료(가공품)	용도별로 구분 후 적재하여 보관한다.	냉장창고
2-2	부자재(포장재)	규격별로 구분 후 적재하여 보관한다.	-
3	전처리		
3-1	계량	탈피된 청삼종실을 계량한다.	저울
3-2	계량(부재료)	배합비율에 따라 난백을 계량한다.	전자저울
3-3	수침	탈피 종실 중량대비 3배 식용수를 가하여 15℃ 저온조에서 2시간 침지한다.	저온조
3-4	탈 수	충분히 수침과정을 거친 종실을 선반에 얹어 탈수한다.	타공 선반
3-5	마쇄	탈피 종실 중량대비 7배 정제수를 가수하여 콜로이드 밀을 이용해 마쇄한다.	Colloid mill
3-6	여과(1차)	부직포를 이용해 여과한다.	
3-7	여과(2차)	두부 제조용 메쉬를 이용하여 여과한다.	두부제조용 메쉬
4	두부 제조		
4-1	가열/응고	밀크를 가열하여 85℃까지 온도를 상승시킨 후 25분간 유지하며 응고시킨다.	
4-2	성형	성형 틀에 응고물을 충전한다.	성형틀
4-3	압착	8.64 g/cm ² 의 압력을 가해 10분간 누른다.	누름판
4-4	냉각	냉수에 담귀 10℃까지 품온을 낮춘다.	수조
4-5	절단	일정한 크기로 두부를 절단한다	절단기
4-6	포장	두부의 동량(W/V)에 해당하는 식용수를 첨가한 후 밀봉한다.	Sealing기
4-7	살균	품온 80℃에서 15분간 열처리한다.	가열수조
5	X-RAY 검출	이물(Sus:0.6 mm 이상)이 불검출된 것을 적합품으로 한다.	x-ray 검출기& 리젝트
6	외포장	내포장된 제품을 종이박스에 담아 포장한다.	작업대
7	보 관	완제품보관실(직사광선이 들어오지 않는 서늘한 곳)에 입고하여 보관한다.	보관창고

8	출고/운송	차량에 출고하여 거래처에 배송한다.	전동지게차
---	-------	---------------------	-------

㉔ 탈피 청삼종실을 이용한 응고제를 사용하지 않는 전두부 제조 매뉴얼

번호	공정/단계	공정설명	주요설비
1	입 고		
1-1	원료(청삼 탈피종실)	적합품에 한하여 입고한다.	전동지게차, 바스켓
1-2	용수(상수도)	수질검사에 적합한 먹는 물을 입고한다.	-
1-3	부재료(가공품)	입고 시 적합품에 한하여 입고한 후 냉장 보관한다.	냉장고
1-4	부자재(포장재)	입고 시 적합품에 한하여 입고한다. : PE, 캡, 종이박스	창고
2	보 관		-
2-1	부재료(가공품)	용도별로 구분 후 적재하여 보관한다.	냉장창고
2-2	부자재(포장재)	규격별로 구분 후 적재하여 보관한다.	-
3	전처리		
3-1	계량	탈피된 청삼종실을 계량한다.	저울
3-2	계량(부재료)	배합비율에 따라 난백을 계량한다.	전자저울
3-3	수침	탈피 종실 중량대비 3배 식용수를 가하여 15℃ 저온조에서 2시간 유지한다.	저온조
3-4	탈 수	충분히 수침과정을 거친 종실을 선반에 얹어 탈수한다.	타공 선반
3-5	마쇄	탈피 종실 중량대비 2배 정제수를 가수 후 믹서기를 이용해 3분간 마쇄한다.	믹서기
3-6	여과	부직포를 이용해 여과한다.	부직포
4	전두부 제조		
4-1	성형	성형 용기에 마쇄물을 일정량 충전한다.	성형틀
4-2	가열	85℃의 온도로 가열 후 50분간 열처리를	가열 수조

		유지한다.	
4-3	냉각	냉수에 담귀 10℃까지 품온을 낮춘다.	
4-4	살균	품온 80℃에서 15분간 열처리한다.	가열수조
5	X-RAY 검출	이물(Sus:0.6mm 이상)이 불검출된 것을 적합품으로 한다.	x-ray 검출기& 리젝트
6	외포장	내포장된 제품을 종이박스에 담아 포장한다.	작업대
7	보 관	완제품보관실(직사광선이 들어오지 않는 서늘한 곳)에 입고하여 보관한다.	보관창고
8	출고/운송	차량에 출고하여 거래처에 배송한다.	전동지게차

IV. 삼 포장 제품 개발

(1) 화학 성분 분석

삼 섬유의 효율적인 이용 및 연구를 위해 삼의 화학성분인 holocellulose, α -cellulose, lignin, 추출물, 회분을 분석하였다.

(가) Holocellulose 정량 (Wise 법)

탈지 삼 목분 2.50 g을 300 ml 삼각플라스크에 넣고 증류수 150 ml를 가하였다. 아염소산 나트륨 1.00 g을 가하고 70~80°C 수조에서 한 시간 동안 교반 시키는 작업을 5회 반복하여 실시 한 후, 백색 잔사를 글라스필터로 여과하고 냉수와 아세톤으로 순차적으로 세정한 후 건조시켜 칭량하였다.

(나) α -cellulose 정량 (NaOH법)

Holocellulose 1.00 g을 200 ml 비커에 넣고 20°C의 17.5% NaOH 용액 25 ml를 피펫으로 가하고, 4분간 방치 한 다음 5분간 유리막대로 충분히 해리시켜서 알칼리액의 흡수를 균일하게 해주었다. 30분 후 교반 하면서 20°C의 증류수 25 ml를 추가하여 1분간 다시 교반하고 5분간 방치하였다. 이를 글라스필터로 여과하고 추출 잔여물에 10% acetic acid 40 ml를 가하고 5분간 방치한 다음 1 l 증류수로 세정하고 건조시켜 칭량하였다.

(다) Lignin 정량 (Klason lignin)

탈지 삼 목분 1.00 g을 100 ml 비커에 넣고 72% 황산 20 ml를 가하고 잘 교반하여 20°C에서 4시간 방치하였다. 이를 1 l 삼각 플라스크에 넣고 765 ml 증류수를 넣은 후 2 시간 동안 온화하게 비등시켰다. 이를 글라스필터로 여과하고 건조시킨 후 칭량하였다.

(라) 추출물 정량

① Alcohol-benzene 추출

Soxhlet 추출기의 플라스크를 미리 칭량 해 놓고, 정칭한 삼 목분 2 g을 원통형 여과지에 넣고, 추출기 플라스크에 150 ml의 ethanol (95%)-benzene 혼액 (1:2 v/v) 넣은 후 6시간 동안 10분에 한번 비율로 환류 되도록 가열하였다. 용매를 수조상에서 증류 회수하고, 플라스크를 건조시킨 후 칭량하였다.

② 냉수 추출

정칭한 삼 목분 2 g을 500 ml 비커에 넣고 증류수 300 ml를 가한 후 $25 \pm 5^\circ\text{C}$ 에서 48 시간 방치 하고, 글라스 필터 (1G3)로 여과 한 후 추출 잔류물을 건조시켜 그 무게를 측정 하였다.

③ 온수 추출

정칭한 삼 목분 2 g을 500 ml 삼각 플라스크에 넣고 증류수 300 ml를 가한 후 80°C 항온 수조에서 3시간 동안 처리 하고, 글라스 필터로 여과 한 후 추출 잔류물을 건조 시켜 그 무게를 측정하였다.

(마) 회분 정량

미리 칭량해 둔 도가니에 삼 목분을 2 g을 정칭하여 넣고, 회화로에 넣어 $575 \pm 25^\circ\text{C}$ 에서 20시간 유지하여 완전히 탄화 시킨 후 잔존 회분을 칭량하였다.

Table 61. Chemical composition of hemp

Composition		Content (%)
Holocellulose		78.94
α-cellulose		61.89
Klason lignin		3.33
Extractives	Ethanol-benzene	3.55
	Cold-water	13.97
	Hot-water	16.00
Ash		3.26

삼 섬유유의 주요 구성 성분인 cellulose와 hemicellulose 그리고 lignin의 성분비는 Table 61 에서 보는 바와 같이 약 61.9%, 17.1%, 3.3% 로 목재(평균 50.0%, 25.0%, 25.0%)에 비해 cellulose 의 함량이 높아 종이 자원으로써의 가치가 높고, lignin 의 함량이 적기 때문에 펄핑시 lignin 제거를 위한 약품과 에너지의 사용량을 줄일 수 있어 경제적이며 친환경적인 제품을 생산 할 수 있다.

(2) 해부학적 특성

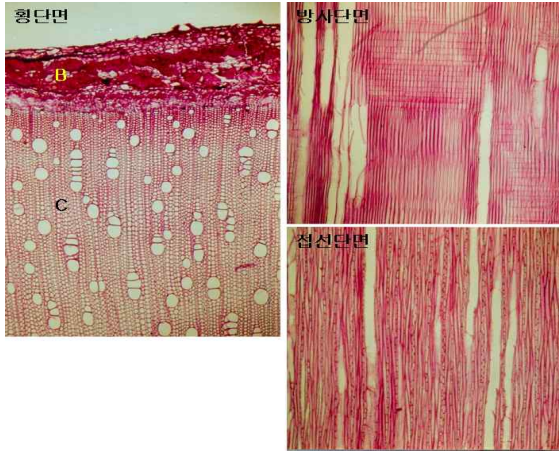


Figure 90. Hemp tissue

Hemp tissue 횡단면에서 B 는 수피부, C 는 목질부 (코아부) 임. 수피부는 피층유세포와 세포벽이 두꺼운 후박세포의 인피섬유가 존재하고, 목질부에는 도관, 목부섬유, 방사조직 등으로 구성되어 있다.

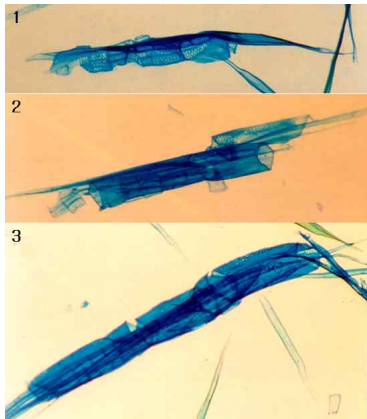


Figure 91. Vessel

Fig. 91 는 목질부의 도관이다. 목질부에 존재하는 도관은 고립관공과 방사복합관공으로 되어 있었고 1, 2, 3과 같이 크기도 일정하지 않고 조금씩 다른 형태로 존재하고 있었다.

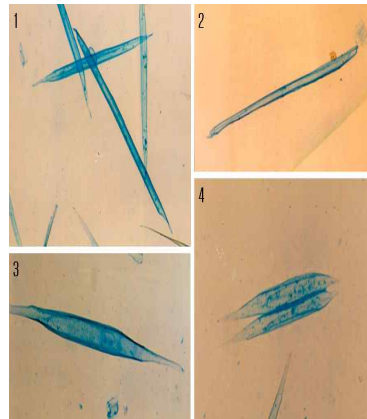


Figure 92. Xylem fiber

Fig. 92 은 목질부의 목부섬유이며 1, 2, 3, 4와 같이 형태적으로는 비슷하지만 길이 및 폭이 약간 다른 형태를 보이고 있다. 목부섬유의 표면에 벽공이 관찰되었다.

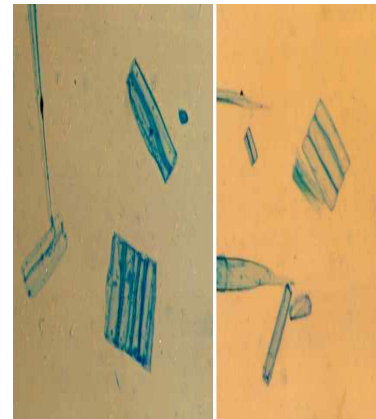


Figure 93. Parenchyma cell

Fig. 93 는 목질부 방사조직에 존재하는 유세포이며 유세포는 대마를 구성하고 있는 세포 중에 제일 작은 세포이다. 크기는 50 μm 정도이고, 폭은 26.4 μm 정도였다.

대마의 조직 및 세포 구성의 특성을 검토하기 위하여 3단면과 구성 세포를 분리하여 광학 현미경을 사용하여 형태 및 크기를 측정하였다. 대마의 수피부는 피층 유세포와 세포벽이 두꺼운 후박세포의 인피섬유가 존재하고, 목질부에는 도관, 목부섬유, 방사조직 등으

로 구성되어 있다. 고립관공과 방사복합관공이 존재하며, 분포형태는 방사공재 같지만 산공재에 가깝고 유세포는 단열방사 조직이며, 인피섬유의 길이는 약 4.4 mm, 폭은 약 30.5 μm 이며, 도관의 길이는 약 600.0 μm , 폭은 약 493.6 μm , 목부섬유의 길이는 약 1000 μm , 폭은 약 38.9 μm , 유세포의 크기는 약 50 μm , 폭은 약 26.4 μm 이다. 도관은 벽공이 매우 발달되어 있으며, 목부섬유에서 벽공이 관찰되었다. 전자 현미경에 의한 세포 표면의 관찰이 필요하다.

(3) 최적 펄핑 조건 탐색

Table 62. Pulping condition of hemp

Cooking time		Cooking temperature				Chemical dosage					
(min)		(°C)				AA(g/L)		Sulfidity(%)			
40	60	80	160	170	180	16	18	20	20	22	24

Table 62 와 같이 증해 시간, 증해 온도, 투입 약품량 변화에 따라 1 cm hemp chip을 크라프트 펄핑을 하였다.

Table 63. Result of hemp pulping

No.	Pulping condition				Pulp yield (%)	Kappa no.
	Time(min)	Temp(°C)	Chemical dosages			
			AA(g/L)	Sulfidity(%)		
1-1	40	160	16	20	58.02	7.03
1-2	40	160	18	22	57.98	6.32
1-3	40	160	20	24	56.46	5.98
1-4	40	170	16	20	54.33	6.38
1-5	40	170	18	22	53.06	5.65
1-6	40	170	20	24	51.49	5.61
1-7	40	180	16	20	53.58	5.88
1-8	40	180	18	22	53.52	5.10
1-9	40	180	20	24	52.65	4.73
2-1	60	160	16	20	54.01	5.88
2-2	60	160	18	22	53.71	5.41
2-3	60	160	20	24	53.26	4.66
2-4	60	170	16	20	53.10	6.18
2-5	60	170	18	22	52.04	5.95
2-6	60	170	20	24	52.37	5.33
2-7	60	180	16	20	51.29	5.51
2-8	60	180	18	22	50.81	5.13
2-9	60	180	20	24	49.67	4.79
3-1	80	160	16	20	57.21	7.58
3-2	80	160	18	22	50.94	6.56
3-3	80	160	20	24	50.00	5.82
3-4	80	170	16	20	54.23	5.61
3-5	80	170	18	22	51.63	4.53
3-6	80	170	20	24	51.31	4.52
3-7	80	180	16	20	54.32	6.00
3-8	80	180	18	22	50.96	4.50
3-9	80	180	20	24	50.96	4.55

Table 63에서 알 수 있듯이 증해 시간, 온도, 투입 약품량 증가에 따라 펄프 수율과 카파 값이 감소함을 확인 할 수 있었다. 약품첨가량에 있어서 AA 18 g/L, Sulfidity 22%와 AA 20g/L, Sulfidity 24%의 수율과 카파가에 큰 차이가 없었다. 각각의 조건으로 펄핑을 한 결과 Table 63 에서 알 수 있듯이 펄핑조건 3-5의 170°C, 80 min, AA 18g/L, Sulfidity 22%에서 수율 51.63%, 카파가 4.53 으로 최적의 크라프트 펄핑 조건을 확인할 수 있었다.

(4) 삼 수초지의 물리적 특성분석

삼 수초지의 물리적 특성을 측정하기 위하여 hemp pulp : hard wood pulp 혼합비(100:0, 0:100, 10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50)를 변화시켜 평량 80 g/m²의 수초지를 제조하였다. 제조된 시트의 인장강도와 파열강도를 측정한 후, tensile index 와 tensile energy absorption 로 환산하였다.

Table 64. Tensile & bursting strength of sheet

proportion of hemp to hardwood	Tensile strength					Bursting strength (kPam ² /g)
	Load (N)	Stress (N/mm ²)	Strain (%)	Index (Nm/g)	TEA (J/m ²)	
hemp 100	41.91	13.15	2.35	38.55	31.98	2.88
hardwood 100	52.00	24.60	3.65	42.57	90.75	3.03
10:90	62.21	29.80	4.03	51.59	120.37	3.46
20:80	60.32	26.81	4.15	49.44	111.20	3.35
30:70	61.61	25.20	3.80	50.89	95.69	3.24
40:60	57.32	21.19	3.43	46.03	72.51	3.00
50:50	55.84	19.99	3.23	46.81	64.82	3.01

Table 64에서 알 수 있듯이 hemp pulp 100%와 hard wood pulp 100%를 비교 했을 때 hard wood pulp 100%에 비해 hemp pulp 100%의 강도가 크게 떨어졌다. 그러나 hemp pulp 와 hard wood pulp 를 혼합한 수초지의 경우 10:90, 20:80, 30:70에서 hard wood pulp 100%보다 강도면에서 우수했으면 특히 10:90 비율에서 가장 우수한 강도를 보였다.

(5) 삼 섬유소의 소다 펄프화 조건 선정

(가) 고온화 펄핑 조건 선정

Table 65. Soda cooking conditions for hemp bast fiber

NaOH dosage (% on dry hemp)	10, 15, 20, 25
Liquor to hemp ratio	6:1, 8:1, 10:1
Chipping size (mm)	50
Cooking Temperature (°C)	130, 150, 170
Time to temperature (min)	27, 52, 67
Time at temperature (min)	80

실험실용 증해기를 사용하여 Table 65 와 같은 조건으로 소다 펄프화를 진행하였다. 최고 온도 도달시간, 액비, 최고온도, NaOH 첨가량이 펄프화 kinetics 에 미치는 영향을 평가

하였고, 펄프에 잔존하는 리그닌은 kappa number를 측정하여 평가하였다.

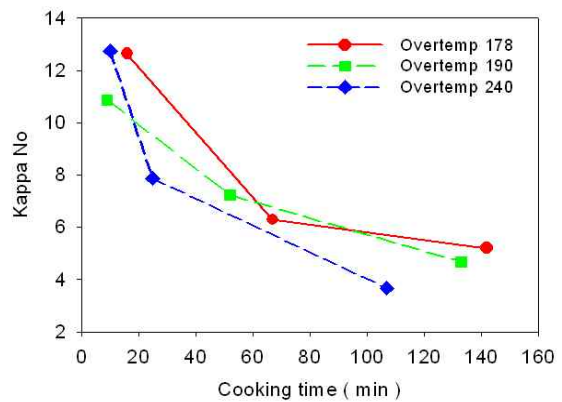
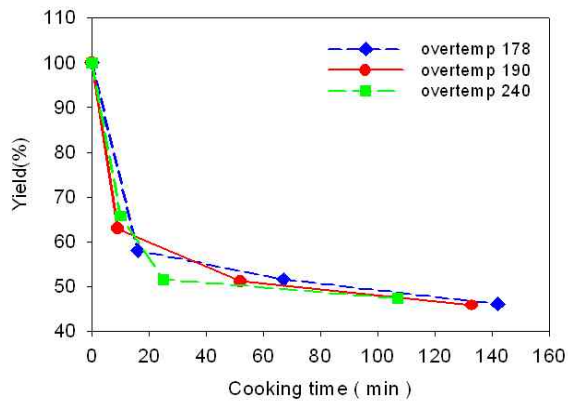


Figure 94. Effect of time to maximum temperature on pulping yield

Figure 95. Effect of time to maximum temperature on kappa number

① 최고온도 도달시간의 영향

증해기의 외부온도를 조절하여 최고온도 도달시간을 27분에서 67분까지 변화시켰으나, Fig. 94와 95에서 나타나는 것과 같이 펄프화 수율과 탈리그닌율에 미치는 뚜렷한 영향은 관찰되지 않았다. 최고온도 도달시간이 길었을 경우, 수율이 좀 더 감소되었으며 이는 단순히 증해시간이 길었기 때문으로 관찰되었다.

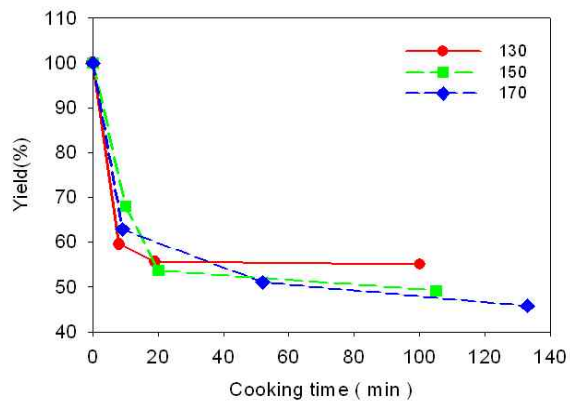


Figure 96. Effect of cooking temperature on pulping yield

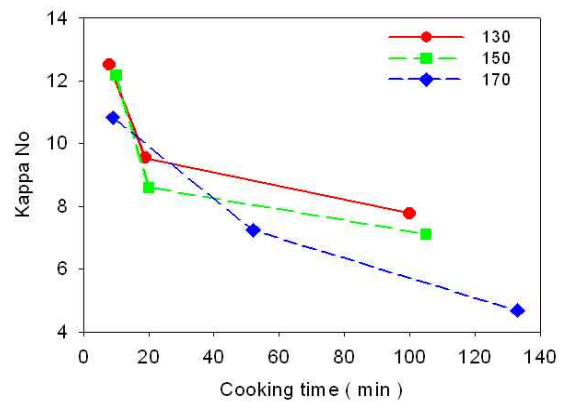


Figure 97. Effect of cooking temperature on kappa number

② 최고온도의 영향

Fig. 96과 97에서 나타나는 것과 같이 액비를 6:1에서 10:1까지 변화시켰을 경우, 수율과 kappa number 에 미치는 영향은 크지 않았다. 100°C까지 증해하는 동안에 수율감소가 크고, 그 이후에는 감소가 둔화되는 경향을 보였다.

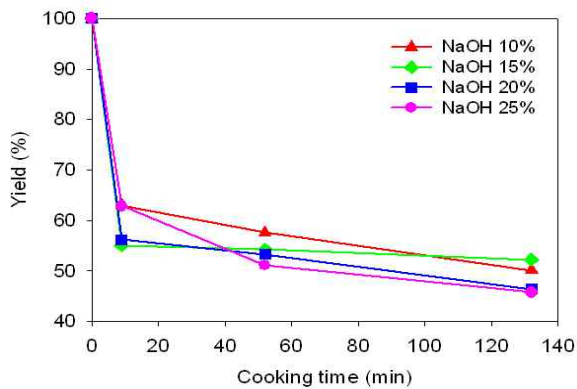


Figure 98. Effect of the added amount of NaOH on pulping yield

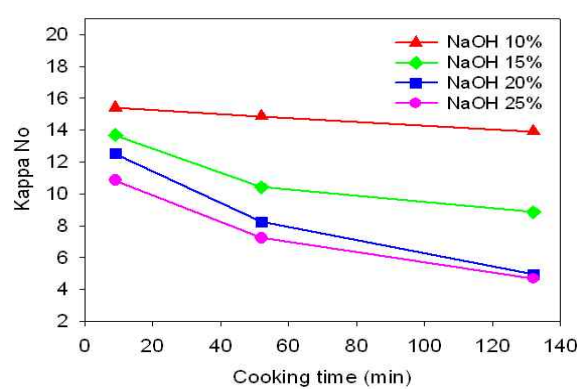


Figure 99. Effect of the added amount of NaOH on kappa number

③ NaOH 첨가량의 영향

Fig. 98에서 나타나는 것과 같이 NaOH 첨가량이 25% 일 때 수율감소가 가장 심했지만 큰 영향을 미치지 않는 않았다. NaOH 첨가량이 높아짐에 따른 뚜렷한 수율의 변화는 관찰할 수 없었으나 Fig. 99에서 나타나는 것과 같이 kappa number 는 10% 에서 20%

투입시까지 점차적으로 감소하였다. NaOH 첨가량은 탈리그닌에 큰 영향을 미치는 것을 알 수 있었다.

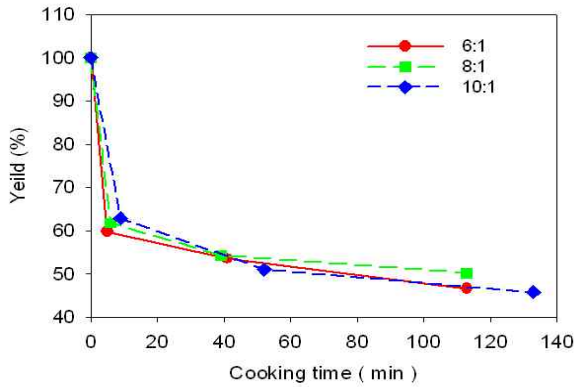


Figure 100. Effect of liquor to hemp ratio on pulping yeild

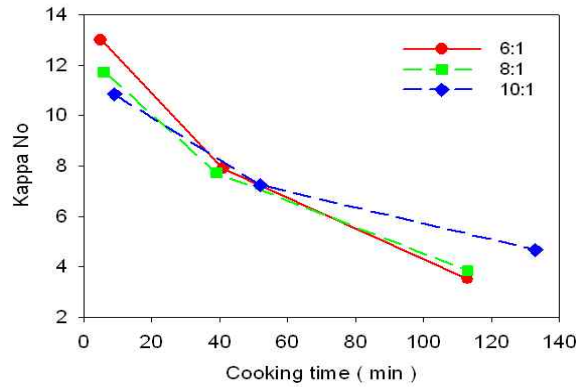


Figure 101. Effect of liquor to hemp ratio on kappa number

④ 액비의 영향

Fig. 100, 101에서 나타나는 것과 같이 액비를 6 : 1 에서 10 : 1 까지 변화시켰을 경우에도 수율과 kappa number 에 미치는 영향은 발견되지 않았다. 100℃까지 증해하는 동안 수율이 크게 감소하였으나 이후 커다란 변화가 없었다.

(나) 저온화 펄핑 조건 선정

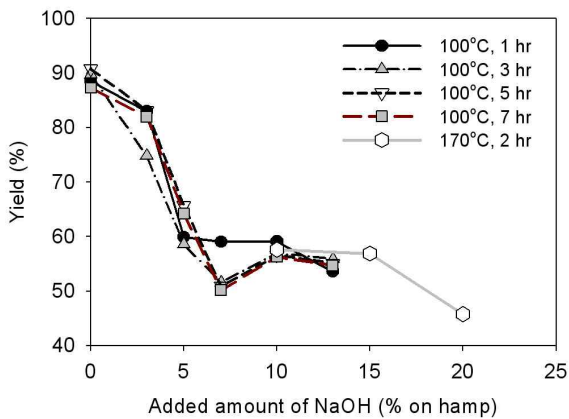


Figure 102. Effect of the added amount of NaOH on pulping yeild

증해온도를 100℃로 감소시키고, NaOH 첨가량과 증해시간을 1시간에서 7시간까지 변화시켰을 때, Fig. 102에서 나타나는 것과 같이 수율의 변화 거의 관찰되지 않았다. 일정시간 이후의 증해시간은 펄프화에 크게 영향을 미치지 않는 것으로 보였다. 반면 NaOH 첨가량을 증가시킴에 따라, 5% 정도까지 수율은 급격히 감소하고, 그 이후에는 서서히 감소하는 경향을 보였다.

(다) 결론

삼 섬유를 펄프화하는 경우에 NaOH 의 첨가량이 가장 중요한 인자였다. 130℃ 이상의 온도에서 증해온도와 증해시간은 수율감소와 탈리그닌에 큰 영향을 미치지 않았고, 100℃ 이하의 온도에서 삼 섬유의 구성성분의 분해가 많이 발생하였으므로 초기에 탈리그닌화와 추출물이 많이 용출됨을 알 수 있었다.

(6) 삼섬유 (Hemp) 펄프 표백 조건 선정

Table 66. Soda cooking condition for hemp fiber bleaching

NaOH dosage (% on dry hemp)	25
Liquor to hemp ratio	10:1
Chipping size (mm)	10
Cooking Temperature (°C)	170
Time to temperature (min)	52
Time at temperature (min)	80

- Table 67과 같은 조건에서 증해한 hemp 펄프를 NaClO 농도(4, 6, 8, 10, 15, 20%)를 변화시켜 표백 수율과 카파값의 변화를 관찰하였다. (NaClO 농도는 전건 hemp 펄프 대비 투입비로 계산.)

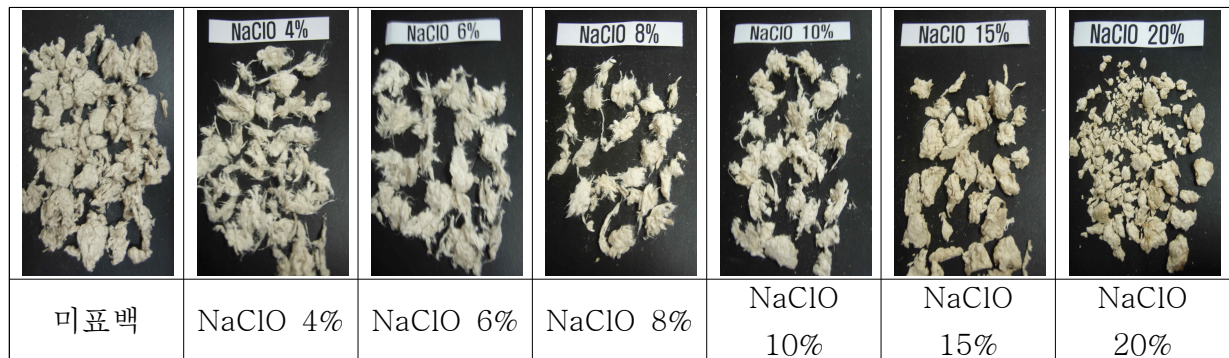


Figure 103. Bleaching hemp pulp

표백을 실시한 hemp 펄프는 NaClO 농도 10%가 넘어가면서 수율이 급격히 낮아지고, 섬유의 파괴가 진행되어 펄프 자체가 딱딱하게 고형화되는 현상이 발생하였다.

Table 67. Effect of added amount of NaClO on bleaching yield and kappa number

NaClO dosage (%on dry hemp)	4	6	8	10	15	20
Bleaching yield(%)	45.1	45.0	44.7	45.0	40.7	39.3
Kappa number	2.1	2.0	2.9	2.8	2.8	2.8

NaClO 농도가 10% 될 때까지 수율의 변화는 거의 관찰할 수 없으나 15%, 20% 투입 시 수율이 급격하게 낮아지는 것을 확인할 수 있었으며 카파값의 변화는 거의 없었다. NaClO 의 투입량이 많아질수록 수율은 감소하고 카파값의 변화는 거의 없으므로 NaClO 4% 투입이 가장 적절하였다.

(7) 삼 소다 펄프 (hemp 펄프)를 이용한 수초지 제조

충분히 삼 섬유가 분리된 상태를 확보하기 위한 펄핑조건을 적용하여 수초지를 제조하였다. 제작한 수초지는 물리적 성질을 분석하여 강도특성을 가장 잘 발휘할 수 있는 조건을 탐색하고, 표백한 hemp 펄프가 백색도에 미치는 영향을 평가하기 위하여 백색도 측정하였다.

(가) 실험 방법

실험실용 증해기를 사용하여 Table 68과 같은 조건으로 소다 펄프화 실시하였고, 펄프화 조건은 고정시켜 놓고 실험실용 사각 수초지기를 사용하여 목재 펄프와 삼 펄프의 혼합 초지 조건을 Table 69와 같이 실시하였다. 삼 펄프의 투입비가 종이의 formation과 인장 강도, 인열강도, 파열강도에 미치는 영향을 평가하였다. 삼 펄프는 목재펄프와 따로 고해를 시켜 섬유의 분산정도를 파악할 수 있게 실시하였고, 삼 섬유가 회전체에 잘 영키는 성질이 관찰되었으므로 지료를 혼합할 때 사용하는 교반기의 속도는 200 rpm 이하로 설정하였으며 사각 수초지기에는 공기 펌프식 교반장치를 부착하여 지료의 분산을 원활하게 하였다.

Table 68. Soda cooking condition for hemp fiber

NaOH dosage (% on dry hemp)	25
Liquor to hemp ratio	10:1
Chipping size (mm)	10
Cooking Temperature (°C)	170
Time to temperature (min)	52
Time at temperature (min)	80

Table 69. Sheet forming condition for hemp fiber and wood pulp

NBKP to LBKP ratio	1:1
Wood to hemp ratio	10:0(R), 9:1(A), 8:2(B), 7:3(C), 6:4(D), 5:5(E)
Grammage(g/m ²)	60
Sheet size (cm)	20 × 20
Wood pulp freeness(mL)	500
Hemp fiber beating time(min)	10

(나) 실험 결과

① 강도 및 지합지수 특성 변화

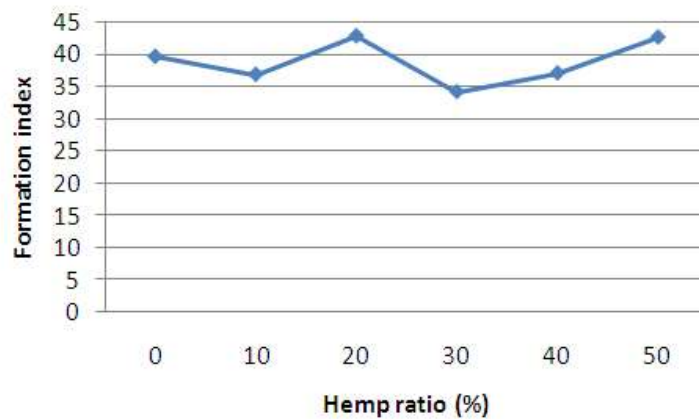


Figure 104. Effect of hemp ratio on formation index

Fig. 104와 같이 삼 펄프 투입량을 10% 부터 50% 까지 변화시켰으나 지합지수에 미치는 영향은 뚜렷하게 관찰되지 않았다. 삼 섬유의 섬유길이 길어 목재펄프와의 결합력을 저하

시켜 지합을 저하시킬 것이라고 예상하였으나, 10분간 고해를 실시하였기 때문에 장섬유들의 소섬유화가 많이 발생하였고, 그로인해 목재 펄프와의 결합 상태가 균일하게 일어난 것으로 판단되었다. 삼 펄프를 물에 분산시켰을 때 flocc의 발생이 거의 없었다.

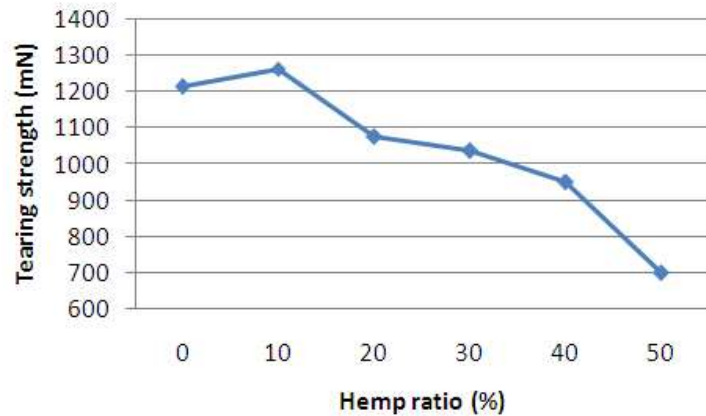


Figure 105. Effect of hemp ratio on tearing strength

Fig. 105에서 나타난 것과 같이 삼 펄프를 10% 투입하여 초지하였을 때 목재펄프만을 사용한 수초지에 비해 높은 인열강도를 나타냈다. 그러나 hemp 20% 투입부터는 목재펄프만을 사용한 수초지보다도 더 낮은 인열강도를 나타내었는데, 이는 고해시간이 길어짐에 따라 삼 섬유의 긴 섬유장이 많이 짧아졌기 때문이라고 판단되었다. 장섬유의 특성을 살리기 위한 종이를 제조하기 위해서는 고해시간을 단축해야하고 10분간 고해하였을 때는 hemp 펄프가 10% 투입된 수초지가 가장 우수한 인열강도를 나타내는 것으로 관찰되었다.

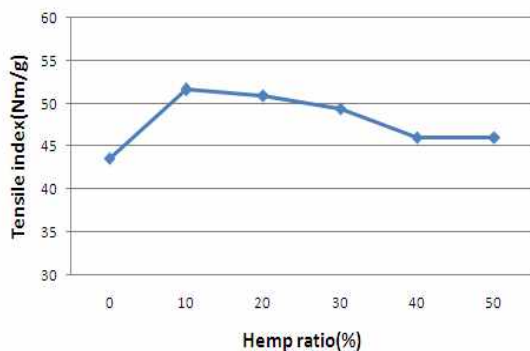


Figure 106. Effect of hemp ratio on tensile index

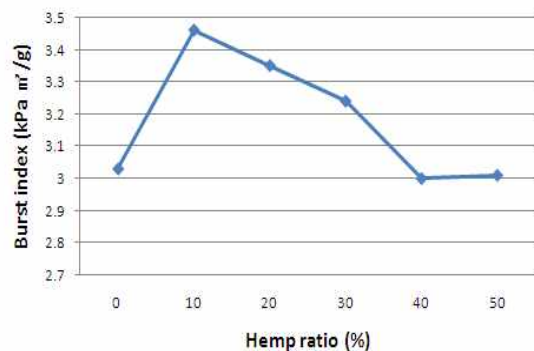
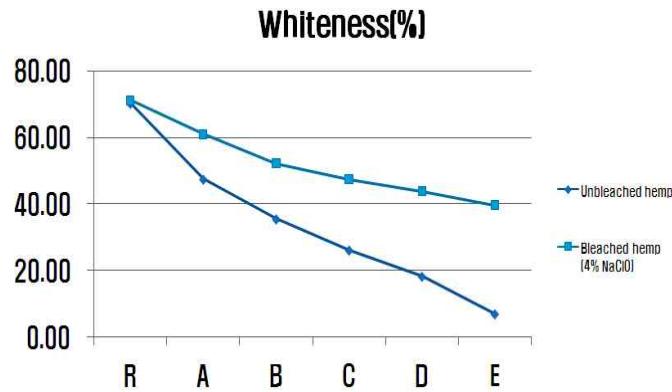


Figure 107. Effect of hemp ratio on burst index.

인장지수와 파열지수도 Fig. 106과 107에서 알 수 있듯이 삼 펄프의 투입비가 10% 일 때 가장 높은 값을 나타냈고 이후에 투입비가 높아질수록 강도가 떨어지는 경향을 보였다.

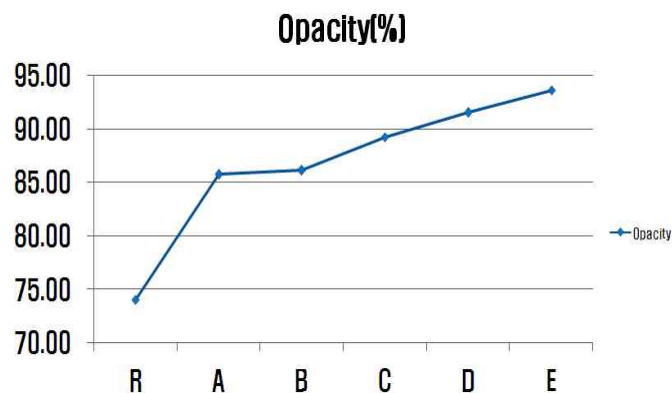
50% 투입시까지 목재펄프만을 사용하여 제작한 수초지와 같거나 높은 강도를 유지하였으나 10% 투입시 강도가 가장 우수한 것으로 관찰되었으며, 고해 시간이 길어진 것이 인장강도와 파열강도가 향상되는 효과를 보였다.

② 광학적 특성, 투기도, 거칠음도, 벌크, 겉보기 밀도 특성 변화



10:0(R), 9:1(A), 8:2(B), 7:3(C), 6:4(D), 5:5(E)

Figure 108. Effect of hemp ratio on whiteness



10:0(R), 9:1(A), 8:2(B), 7:3(C), 6:4(D), 5:5(E)

Figure 109. Effect of hemp ratio on whiteness

삼 펄프의 투입비가 높아질수록 황색화가 나타나기 때문에 Fig. 108와 같이 백색도는 낮아지는 경향을 보였다. 표백을 실시한 hemp 펄프의 투입비가 50%까지 높아지면 백색도는 40%까지만 떨어지는 결과를 나타내기 때문에 백색도를 요구하는 제품의 경우 투입비를 낮추고 표백을 실시하는 것이 효과적이라고 판단되었다.

불투명도의 경우에는 Fig. 109에서 나타나는 것과 같이 삼 펄프를 10% 첨가하였을 때 급

격하게 상승하고 이후 삼 펄프의 첨가량이 증가하면서 조금씩 증가하는 경향성을 보였는데 이는 섬유의 구조에 영향을 받은 것으로 판단되었다. 삼 펄프의 장섬유와 목재펄프의 단섬유가 결합하면서 벌크한 구조를 형성하여 자외선이 섬유를 투과하면서 빛의 산란이 일어났기 때문에 불투명도가 높게 측정된 것으로 판단되었다. 경제성을 고려한다면 삼 펄프 10% 투입만으로 우수한 불투명도를 가진 지류 제품을 생산할 수 있는 가능성이 있다고 판단되었다.

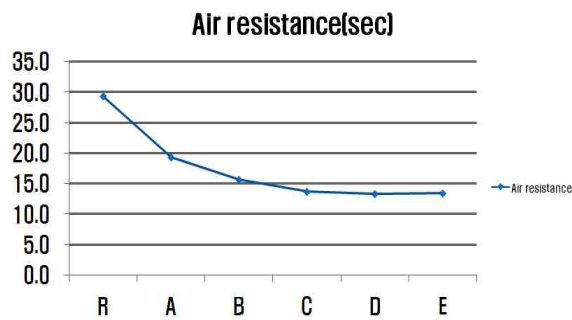


Figure 110. Effect of hemp ratio on Air resistance

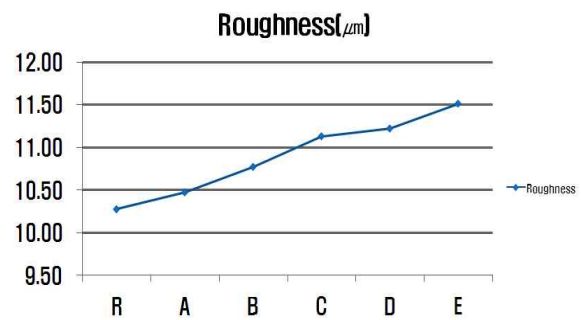


Figure 111. Effect of hemp ratio on roughness

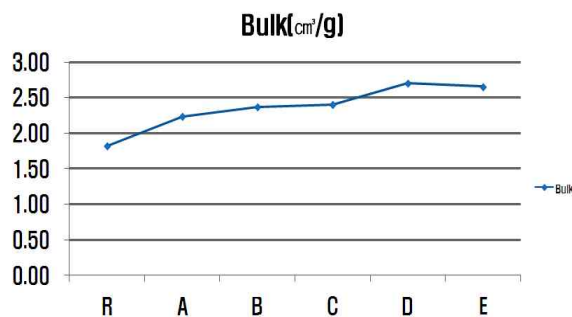


Figure 112. Effect of hemp ratio on bulk

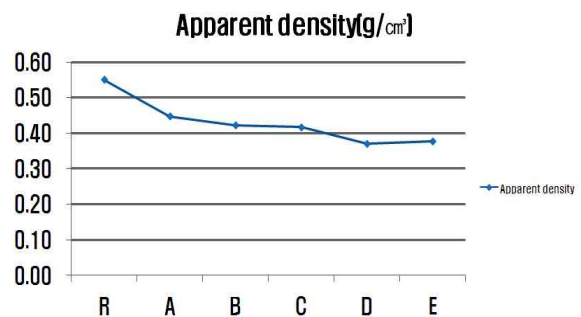


Figure 113. Effect of hemp ratio on Apparent density

10:0(R), 9:1(A), 8:2(B), 7:3(C), 6:4(D), 5:5(E)

Fig. 110에 나타난 바와 같이 삼 펄프가 30% 투입되었을 때까지 투기도가 증가하고 이후 삼 펄프 투입량이 증가함에 따라 투기도의 변화가 증가폭이 거의 없는 것으로 관찰되었다.

거칠음도의 경우에는 Fig. 111에서 나타나는 것과 같이 삼 펄프의 투입비에 비례하여 거칠음도가 증가하는 것이 관찰되었다. 장섬유의 분포가 높을수록 표면의 거칠음도는 높아졌다.

Fig. 112에서 나타나는 것과 같이 삼 펄프의 투입비가 높아질수록 bulk는 증가하는 경향을 보였으나, 삼 펄프 40% 투입 이후에는 증가하는 경향성을 찾을 수 없었다. 삼 펄프의

투입이 수초지 내부의 공극구조를 많이 형성하는 것으로 판단되었고 10~40% 투입비에서 공극구조의 증가 효과를 얻을 수 있었다.

겉보기 밀도는 bulk가 증가함에 따라 Fig. 113 와 같이 감소하였다.

(8) Hemp dripmat 및 라벨지 제작

(가) Hemp dripmat 제조

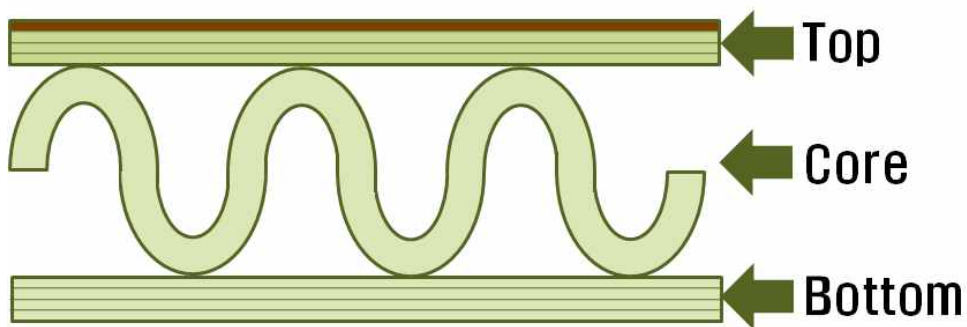


Figure 114. Dripmat's three layers

① Dripmat의 삼단 구조

- * **Top layer** : 평량 60 g/m² 인 종이를 3단합지로 제작하고, 식품과 직접적으로 닿는 부분만 hemp paper 사용하였다.
- * **Core layer** : 목재펄프만 사용하여 초지하였으며 골심지의 역할을 한다.
- * **Bottom layer** : Top layer 와 같은 방법으로 목재펄프를 이용하여 평량 60 g/m² 인 종이를 3단 합지로 제작하였다.

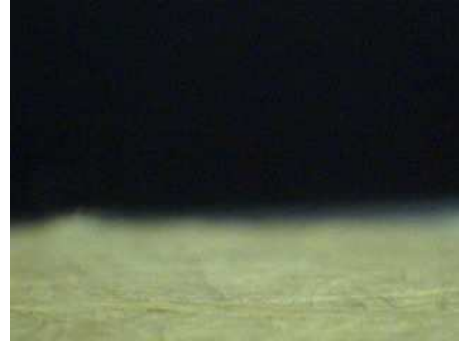
② Top layer의 후 가공 조건

Dripmat의 top 층은 수분을 함유하고 있는 식품과 직접 닿는 부분이기 때문에 발수성이 요구되고 섬유가 묻어나오면 제품의 질을 떨어뜨릴 수 있으므로 표면 사이징을 실시하였고 캘린더 처리를 거쳐 표면의 섬유가 탈락되는 것을 방지하였다.

Top 층의 발수성을 높이고 표면에 섬유가 묻어나오는 것을 방지하기 위해서 발수제 처리와 캘린더링 처리를 하였음. 발수제는 paraffin wax(12~16%), polyethylene(4~8%)으로



Before calendaring



After calendaring

Figure 115. Hemp paper surface

구성되었으며 용액과 증류수를 1:1로 혼합하여 표면 사이징을 실시하고 캘린더 처리를 하여 Fig. 115과 같이 평활도를 향상시키고 발수성을 부여하였다.

(나) Hemp 라벨지 제조

전통주의 라벨지로 활용하기 위한 hemp paper 제작하였다. 삼 섬유 고유의 질감과 색감 유지하였으며 전통한지 제작 방식으로 제작하였다.



Figure 116A. 라벨 원지

미표백 hemp 사용하여 친환경적 이미지 활용하였다. 표면 사이징 처리로 인쇄적성, 내수성 강화하였으며 캘린더링 처리로 평활도 및 인쇄적성 강화하였다.

광학 현미경을 이용하여 ×40 (Figure 27B의 좌측 사진), ×100(Figure 27B의 우측 사진) 배율로 촬영하여 인쇄 성능 평가.



Figure 116B. Hemp 라벨지의 사이징과 캘린더링 처리 유무에 따른 인쇄물의 번짐 정도 차이

① 사이징과 캘린더링 처리 후 내수성 변화

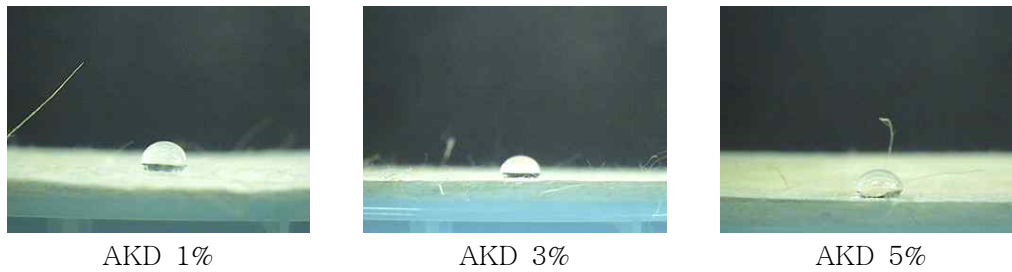


Figure 117. Effect of AKD dosage on water absorption

사이징제(AKD)는 고형분 농도 12.5%인 용액을 사용하였고, 증류수와 희석하여 고형분 농도가 1, 3, 5%가 되도록 투입하여 내수성에 미치는 영향을 알아보려고 하였다. 사이징 처리를 하지 않은 대조군은 물방울이 접촉하자마자 흡수되었기 때문에 관찰이 불가능 하였으며, Fig. 117에서 보여지는 것과 같이 AKD 투입비 1%에서도 충분히 내수성을 나타내며 첨가량이 증가하면서 내수성의 증가는 관찰하기 어려웠기 때문에 AKD 투입비는 1%가 가장 적절하다고 판단되었다.

② 사이징과 캘린더링 처리 후 거칠음도 변화

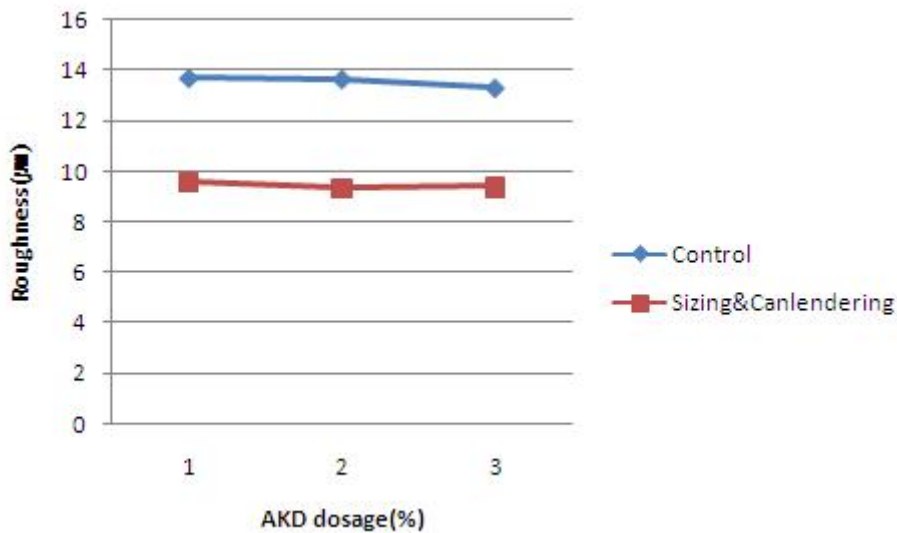


Figure 118. Effect of AKD dosage on roughness

AKD 첨가량은 제조한 용액 대비 첨가량으로 1, 2, 3%로 투입하여 사이징 처리를 실시하고 캘린더링을 하여 거칠음도를 측정된 결과, AKD 투입비에 따른 거칠음도의 차이는 없었지만 캘린더링한 종이의 거칠음도가 4 µm 정도 감소하였다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 연구개발의 목표 및 연구개발 수행내용

세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
삼 종실 단백질의 세포, 조직학적 분석	삼 종실 조직 내부의 단백질 분포 분석	100%	조직학적, 세포학적 샘플 제작과 염색 및 관찰을 통한 분석.
	삼종자의 조직학적, 세포학적 연구를 위한 샘플 제작 방법 데이터 구축		
	단백질 생성 위치, 분포 연구		
삼 종실 지질의 세포, 조직학적 분석	삼 종실 조직 내부의 지질분포 분석	100%	세포 및 조직화학법 및 염색반응
	삼 종실 조직내 지질의 종류, 저장부위 연구		
	삼 종실 세포 내부의 지질합성 분석		
삼 종실 탄수화물의 세포,조직학적 분석	종실의 조직 내부의 탄수화물 종류 분석 종실조직의 탄수화물 저장 및 합성 부위 연구	100%	조직화학법 및 염색반응
	종실세포의 탄수화물 저장부위 및 분포 연구	100%	세포화학 및 염색반응 탄수화물 종류별 탐색
삼 종실 마커 개발	삼 종실의 특성 및 기능성 파악을 위한 마커의 개발	100%	삼 종실의 지역별 구분 및 청삼 종실을 감별하기 위한 분자 마커 탐색
삼 종실 기능관련 분자마커 개발(1)	삼 종실의 기능 단백질과 연계된 삼 종실 특성 파악을 위한 DNA 마커 개발	100%	삼 종실로부터 분리된 단백질의 염기서열을 이용한 마커 탐색 및 개발
삼종실 기능관련 분자마커 개발(2)	삼종실의 기능단백질과 연계된 삼종실 특성파악을 위한 DNA 마커개발	100%	삼종실로부터 분리된 단백질을 암호화하고 있는 유전자의 염기서열을 이용한 마커개발
모델 동물을 이용한 삼 종실 및 그 추출물의 기능성 연구	삼 종실 추출물 배지에서의 용화율 및 배란율 측정	100%	삼 종실 배지에서의 초파리 성장 및 생식 능력 측정
	삼 종실의 노화방지 효능 분석		삼 종실의 노화방지 효능 분석
질환 동물 모델을 이용한 삼 종실의 질환 경감 기능분석	삼 종실 및 그 추출물의 퇴행성뇌질환 경감 기능 분석	100%	파킨슨병, 헌팅턴무도병 모델 초파리의 신경세포 사멸에 미치는 영향 분석
	삼 종실 및 그 추출물의 항산화 기능 분석	100%	과산화수소 배지에 의한 산화 스트레스 모델에 미치는 영향 분석
동물모델을 이용한 삼 제품의 기능성 분석	초파리의 삼 종실 식품 장기복용 기능성 분석	100%	장기간 섭취 후 용화율 및 배란율 측정 삼 종실 식품을 이용한 배지에서의 초파리 수명 측정
헵프 제품의 상품화 및 마케팅 전략 연구	기능성 연구 등을 바탕으로 한 상품화 및 마케팅 전략에 대한 연구	100%	헵프 제품의 기능성 홍보
			헵프 제품의 상품화 방안 및 마케팅 전략
제 2 세부과제 삼 종실로부터 분리된 추출물 및 주요 성분의 세포 안전성 연구	삼 종실 추출물의 항암, 항 류마티즘 효과 연구	100%	삼 종실 추출물에 의한 폐암세포와 류마티스 활막세포 증식 억제 연구
	삼 종실 추출물의 항염 효과와 세포 독성 연구	100%	삼 종실 추출물에 의한 대식세포의 염증 억제 작용과 다양한 세포에서의 독성 연구
	Hemp 종자유 및 주요 성분의 항 류	100%	Hemp 종자유 및 주요 성분에 의한 활

		마티즘 및 항 염증 효과 연구		막세포의 증식 억제 기작 및 염증 억제 효과 및 기작 연구
		Hemp 종자유 및 주요 성분의 항암 효과 연구	100%	<i>in vitro</i> 실험을 통해 Hemp 종자유 및 주요 성분에 의한 폐암세포의 증식 억제 연구
	모델 동물을 이용한 삼 종실 및 그 추출물의 안전성 연구	삼종실 추출물을 이용하여 비만 예방 효과 규명	100%	삼 종실 추출물(물, hexane)이 ICR 마우스 비만 예방 효과 및 혈액생화학적 변화 분석을 통한 안전성 평가
	모델 동물을 이용한 삼 종실 및 그 추출물의 안전성 연구	삼 종실 추출물을 이용하여 고지혈증 예방효과 및 항암효과 규명	100%	삼 종실 추출물(물, hexane)에 의한 ApoE knockout 마우스에서 고지혈증 예방효과 규명 및 암 세포주에 대한 세포독성을 평가, 암 세포주를 이식한 nude 마우스에서 항암효과 규명
	모델 동물을 이용한 삼 종실 및 그 추출물의 안전성 연구	삼 종실 추출물을 이용하여 아토피 치료효과 및 항비만 효과 규명	100%	아토피 모델 동물에서 삼 종실 추출물(hexane)에 의한 아토피 치료효과 평가 및 비만 유도 마우스에서의 항비만 효과 규명
제 1 위탁 과제	삼 종실내의 전체 단백질 프로파일 분석	단백체기술을 통한 삼 종실내 발현 단백질 분리 및 동정	100%	이차원전기영동을 통한 삼 종실내 발현 단백질 분리 질량분석법을 통한 단백질 동정
	삼 종실 variate간의 단백질 프로파일 비교 분석	단백체기술을 통한 삼 variate간의 발현단백질 비교 및 동정	100%	이차원전기영동을 통한 삼 variate간의 발현 단백질 비교 질량분석법을 통한 단백질 동정
	기능성 유용단백질 분리	기능성 유용단백질 발굴 및 분리정제	100%	Hempseed protein isolate (HPI)와 edestin 분리 및 특성 규명
제 2 위탁 과제	삼의 유용성분 추출 및 안전성 평가	삼의 유용성분 추출 및 안전성 평가	100%	삼추출물 제조 삼추출물의 안전성 평가
	삼 종실 추출물의 성분 분석, 세포 독성 측정 및 혈당조절, 지질대사 기능성 평가	삼 추출물의 성분 분석 (추가실험)	200%	GC-MS를 이용한 삼추출물의 성분 분석
		초음파 추출기법을 이용하여 유효성분 추출	100%	유기용매 추출법에 초음파 추출기술을 병합하여 삼유효성분의 추출수율 증진효과 연구
		HepG2 cell line 이용하여 삼추출물의 세포 독성측정 및 처리농도 확립	100%	MTT assay를 통한 독성 측정 및 처리농도 확립
		3T3-L1 adipocyte를 이용하여 포도당 흡수도 측정, 혈당대사 주요 바이오마커 발현 분석	100%	<i>in vitro</i> 혈당조절 기능성 연구 HepG2 cell line 이용하여 지방산 흡수도 측정, 지질대사 주요 바이오마커 발현 분석
	향상된 추출법을 이용한 Hexane 추출물 제조 및 시료 공급	HepG2 cell line 이용하여 지방산 흡수도 측정, 지질대사 주요 바이오마커 발현 분석	100%	<i>in vitro</i> 지방산조절 기능성 연구 유전자 및 단백질 발현에서의 효과 탐색을 통한 지질대사 메카니즘 연구
		삼 종실 hexane 추출물을 제조하여 타 세부의 실험에 제공. 제품화 및 논문작성을 위해 hexane 추출물의 성분분석 자료 확보 및 타 세부에 자료 제공	100%	유기용매 추출법에 초음파 추출기술을 병합하여 삼유효성분의 추출수율 증진효과 연구하여 안정적으로 삼종실 추출물을 제공할 수 있는 방안 모색하여 공급 EPA, DHA 성분 함량 분석 시도
제 1 협동과	압출성형기 일부 시스템의 보완(시작품의 제작)	압출성형기의 스크루, 사출구 등을 설계, 제작	100%	압출성형기의 일부 스크루를 교환하였고 온도조절 시스템을 보완
	삼 종자 whole meal의	삼 종자 whole meal의 식품중간소재		

	식품중간 소재화 및 공정개발	화 기술개발 식품중간 소재화 적성 분석		의 식품중간소재화 적성분석
	삼 종자나 착유박을 이용하여 삼 소재 강화 breakfast cereal 제품개발	Breakfast cereal 제조 배합비(쌀가루, 밀가루, 삼 종자)	100%	압출성형공정을 적용하여 삼 종자를 첨가한 breakfast cereal 제조 원료 배합비 및 제조공정의 개발과 개발된 제품의 품질특성 분석
		Breakfast cereal 개발을 위한 펠릿제조에 적합한 배럴온도분포, 스크루배열, 수분함량, 사출구 기하학적구조 등의 압출성형 공정변수의 최적화		
		제조된 breakfast cereal 제품의 품질 특성 분석(페이스트 점도, 수분용해지수와 수분흡착지수, 체적밀도, 색도, 압착강도, bowl life)		
	1차년도 삼 종자 후레이크 제조 보장 사항	삼 종자를 0, 20, 25, 30% 첨가하여 제조한 후레이크의 기호도 평가 및 관능검사를 실시하여 평가결과가 우수한 후레이크를 선택	100%	삼 종자 후레이크의 관능검사 실시
삼 종자, 탈지박 혹은 개발된 삼 종자 식품중간소재를 이용한 삼의 기능성 성분을 강화한 energy bar 제품개발	Energy bar 제조원료 참깨, 견포도, 땅콩버터, 오렌지즙, 쌀이나 보리의 팽화물의 배합비를 결정	100%	Energy bar의 제조배합비를 결정하고 삼 종자, 탈지박 혹은 삼 종자 식품중간소재를첨가하여 energy bar를 제조한 후 물리적 품질특성 분석	
	삼 종자, 탈지박 혹은 개발된 삼 종자 식품중간소재를 첨가하여 삼 기능성 강화 energy bar를 제조 시럽, 올리고당 등의 결합제의 선정과 품질특성의 분석			
삼 종자, 탈지박을 원료로 제조한 식품중간소재 활용 팽화스낵의 개발	압출성형 팽화스낵 개발을 위한 최적 배합비의 결정	100%	삼 종자, 탈지박 유래 중간소재를 이용한 팽화스낵 원료 배합비 및 제조공정의 개발과 개발된 제품의 품질 특성 분석, 소비자 기호도 평가	
	팽화스낵의 제조공정변수 최적화			
	제조된 팽화스낵의 제품의 품질특성 분석			
	소비자 기호도 평가			
삼 종자, 착유박, 개발된 삼 종자 식품중간소재를 이용하여 삼 기능성 성분을 강화한 다양한 bakery 제품개발	밀가루, 물, 설탕, 효모, 지방, 우유, 계란, 삼 종자 meal의 배합비를 결정하고 반죽하여 빵 제조	100%	빵, 쿠키 등 다양한 bakery 제품의 제조를 위한 배합비 결정	
	반죽에 삼 종자 그대로 첨가하여 빵을 제조			
	쿠키 등 bakery 제품의 개발			
	제조된 빵의 물리적 특성과 기호도 평가			
제 2 협동과제	삼 종실을 이용한 음료 제품 개발을 위한 기반 연구	삼 종실의 전처리방법 및 적정 추출 기술 개발	90%	삼 종실로부터 밀크 제조를 위한 적정 가공공정 설정
		삼 종실의 음료화를 위한 조미 및 안정화 기술 개발	90%	삼 종실 밀크를 이용하여 음료 제조를 위한 적정 배합비와 음료의 안정화 기반 조건을 설정
	청삼을 이용한 음료, 두부제품 개발	청삼 종실을 이용한 음료 제품의 상품화 기술 개발 및 제조공정 모델 확립	95%	종실로부터 최적 음료용 밀크 가공공정 설정 종실 밀크 음료의 안정화 기술 개발 종실 밀크 음료의 품질 개선 및 제품 다양화 기술 개발 종실 밀크 음료의 산업적 생산공정 분석
	청삼 종실을 이용한 음료, 두부제품 개발	종실 밀크 이용 두부 제조 적정 조건 설정	100%	밀크 농도, 열처리시간, 교반조건, 응고 제별 두부제조 조건 분석
		종실 두부의 조직감 개선과 저장성 검토	100%	Gelling agent 등 이용 두부 조직감 개선 및 저장성 검토
제 3 협동과제	삼의 성분 분석	화학성분 분석 : 냉수 추출, 열수 추출, 알칼리 추출, 알콜-벤젠 추출, 홀로셀룰로오스, α-셀룰로오스, 리그닌, 회분	100%	화학성분 분석

	해부학적 특성 : 섬유장, 섬유폭, 세포벽 두께		해부학적 특성 분석
삼 크라프트 펄프 제조	약품 투입량별 수율	100%	약품/증해시간/온도에 따른 최적 증해 조건 분석
	증해시간에 따른 수율		
	삼 칩 크기에 따른 수율		
	각 제조 조건 별 섬유특성 분석		
	삼 칩 크기에 따른 수조지후 물성 분석		크라프트 펄핑 후 수율 및 kappa number 측정
삼 크라프트 펄프종이제조	삼 수조지 제조	100%	삼 수조지 제조
	삼 수조지의 물리적 특성 분석		삼 수조지의 물리적 특성 분석
			hard wood와 혼합비에 따른 물리적 특성 분석
Hemp 소다 펄프	삼의 소다 펄프 제조 조건 선정	100%	알칼리 농도별 펄프 수율 및 최적 제조 온도 및 defibrating 시간 선정
Hemp저온 펄프화법	Hemp의 저온펄프화법 개발	100%	100℃에서 적정 NaOH 첨가량 및 반응 시간 선정
Hemp펄프 표백	Hemp펄프의 효과적인 표백제 선정	90%	차염소산 표백
Hemp 소다 펄프 및 저온화 펄프 종이 제조	펄프 종이의 제조 및 물리적 성질 분석	100%	삼 수조지 제조 삼 수조지의 물리적 성질 분석
Hemp dirp mat 제조	dirp mat 구비조건 검토	80%	흡습도 개선
Hemp 포장지 제조	포장지 구비조건 검토	80%	거칠음도 개선
삼의 고부가가치특수 기능지 제조	drip mat 개발	80%	제품개발
	포장지 개발	80%	

2. 연구 성과

가. 논문게재 성과

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2011	Proteomic profiling of Cheungnam hempseed proteins	박슬기	이미영	서종복	Biochim. Biophys. Acta	-	국외	SCI (수정중)
2011	The effect of hempseed meal intake on <i>Drosophila</i> models of	이민정	조경상	박승환	Mol. Cells	31(4)	국내	SCI

	neurodegenerative diseases and hypercholesterolemia							
2011	Mutagenic and antimutagenic effects of hemp seed oil evaluated by Salmonella testing	전정애	이성준	김은수, 조경상	Food science and biotechnology	43(3)	국내	SCIE
2011	헴프종자 자엽 세포의 저장과립에 관한 형태학적 연구	이나영	김은수	김동민	Korean J. Microscopy	41(1)	국내	학진등재
2011	Influence of extruded hemp-rice flour addition on the physical properties of wheat bread.	Yuan-Yuan Wang	류기형	Krittika Norajit	Journal of Food Science and Nutrition	Vol.16, 62-66 (2011.03.25)	국내	비SCI
2011	Characterization of hempseed protein in Cheungsam from Korea	김점지	이미영	-	J. Korean Acad. Indus. Soc.	12,(4)	국내	학진등재
2011	Isolation and characterization of edestin from Cheungsam hempseed	김점지	이미영	-	J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.	-	국내	학진등재 (2011년 6월 게재 예정)
2011	Hemp 투입비가 종이의 흡수성에 미치는 영향	김지섭	이명구	윤승락	한국펄프 종이공학회 학술발표 논문집	춘계학술 발표논문집	국내	비 SCI
2010	Dietary hempseed meal intake increases body growth and shortens the larval stage via up-regulation of cell growth and sterol level in	이민정	조경상	황수진	Mol. Cells	30,(1)	국내	SCI

	Drosophila melanogaster							
2010	압출성형공정을 이용한 삼 종자 후레이크 제조	김철	류기형	구본재	Food Engineering Progress	Vol. 14, No. 2.pp. 127~134 (2010.5)	국내	비SCI
2010	압출성형 삼종실의 이화학적 특성과 에너지바의 제조	구본재	류기형	Krittika Norajit	Food Engineering Progress	Vol. 14, No. 2. pp. 99~105 (2010.5)	국내	비SCI
2010	펄프제지용 원료로서의 삼 섬유 이용에 관한 연구	윤승락	이명구		펄프·종이 기술	Vol.42 No.1	국내	비 SCI
2010	대마의 소다펄프화 kinetics에 관한 연구	조병욱	이명구	채수명, 윤승락,	한국펄프 종이공학회 학술발표 논문집	춘계학술 발표논문집	국내	비 SCI
2010	Hemp 섬유와 목재펄프 배합이 종이 강도와 formation에 미치는 영향	김지섭	이명구	윤승락	한국펄프 종이공학회 학술발표 논문집	추계학술 발표논문집	국내	비 SCI
2009	대마구성세포의 현미경적 관찰	윤승락	이명구		한국펄프 종이공학회 학술발표 논문집	추계학술 발표논문집	국내	비 SCI

나. 학회 구두/포스터 발표

계재연도	발표명	저자			학회명	주최
		주저자	교신저자	공동저자		
2011	Hemp의 투입비가 종이의 흡수성에 미치는 영향	김지섭	이명구	윤승락	춘계학술 논문발표회	사단법인 한국펄프·종이 공학회
2011	삼(Hemp)의 효능을 이용한 LOHAS형 식품 및 포장제품 개발 (구두발표)		김은수		식품과학회	식품과학회 주관
2011	DHA induces CHOP-mediated apoptosis in human fibroblast-like synovial cells	정민이	이경호		분자세포생물 학회	분자세포생물 학회

2010	Utilization of hemp fiber for a packaging paper	이명구	조병욱	윤승락	X X III IUFRO World Congress	IUFRO
2010	Soda pulping kinetics of hemp at low and high temperature	이명구	조병욱	윤승락	X X III IUFRO World Congress	IUFRO
2010	헵프 (<i>Cannabis sativa</i> L.) 종자의 배유세포 연구 (구두발표)	이나영	김은수		41차 추계학술대회	한국현미경학회
2010	Immunohistochemistry of sebaceous glands of mice irradiated with UVB and the blocking effect of hemp fabrics	이나영	김은수		41차 춘계학술대회	한국현미경학회
2010	쥐의 피부에 미치는 헵프섬유 혼합 선블럭크림의 UV-B 차단 효과	이나영	김은수		41차 춘계학술대회	한국현미경학회
2010	Isolation and characterization of hempseed protein,	김점지	이미영		6th International conference on toxicgenomics	국제독성학회
2009	mutagenic and antimutagenic effect of hexane extract of hemp seed in vitro	전정애	이성준		한국영양학회 추계학술대회	한국영양학회
2009	Dietary hemp seed intake accelerates larval growth and egg-laying and increases ecdysone level in <i>Drosophila melanogaster</i>	이민정	조경상		제 64회 한국생물과학 협회 학술대회	한국생물과학 협회
2009	대마구성세포의 현미경적 관찰	윤승락			한국펄프 종이공학회 춘계학술논문 발표회	한국펄프 종이공학회
2009	Scanning electron microscopic characterization of bast fibers in <i>cannabis sativa</i> L. during the development	최원규	김은수		7th Asean microscopy conference	Asean microscopy conference
2010	Proteomic analysis of the seed proteins from Cheungsam	Seul-Ki Park	Jong-Bok Seo	Mi-Young Lee	KHUPO 10th Annual International	International Proteomics Conference

					Proteomics Conference	
2010	대마의 소다펄프화 kinetics에 관한 연구	조병욱			한국펄프 종이공학회 춘계학술논문 발표회	한국펄프 종이공학회
2010	The effects of hempseed meal and linoleate on oxidative stress and cholesterol reduction in <i>Drosophila</i>	이민정	조경상		제65회 한국생물과학 협회 정기학술대회	한국생물과학 협회
2010	Hemp 섬유와 목재펄프 배합이 종이 강도와 Formation에 미치는 영향	김지섭			한국펄프 종이공학회 추계학술논문 발표회	한국펄프 종이공학회
2011	The effects of hempseed meal intake in development and disease-like phenotypes of <i>Drosophila melanogaster</i>	이민정	박승환	조경상	한국분자세포 생물학회 제22회 동계학술대회	한국분자세포 생물학회
2011	Hempseed water extract decreases atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice.	최양규			한국실험동물 학회 국제학술대회	한국실험동물 학회

다. 특허 성과

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2009	비극성 용매 추출법으로 추출한 헴프종자 추출물을 함유한 배지 조성물 및 이의 제조방법	건국대학교 산학협력단	대한민국	10-2009-0035252	2010	헴프종자 추출물을 함유한 항산화성 초파리 배지 조성물 및 이의 제조방법	건국대학교 산학협력단	대한민국	10-2010-0032836
2009	대마섬유를 포함하는 자외선 차단 및/ 또는 지성피부 조절용 조성물	건국대학교 산학협력단	대한민국	10-2010-0012561	2010	헴프 섬유를 유효성분으로 하는 치약 조성물	건국대학교 산학협력단	대한민국	10-0963301
2010	대마종자 구분용 마커 단백질 및 이를 이용한 대마종자 구분용 kit	순천향대학교 산학협력단	대한민국	10-2010-35241	2010	헴프종자가 루를 함유한 초파리 배지 조성물 및 이의 제조방법	건국대학교 산학협력단	대한민국	1009414920000
2010	삼종실 추출물을 함유하는 당뇨병 및 비만예방 또는 치료용 조성물	고려대학교 산학협력단	대한민국	10-2010-0044950	2011	화학첨가제를 함유하지 않는 두부형태의 청삼종실 커드 및 이것의	한국식품연구원	대한민국	10-2011-0067982
2010	헴프 종자 추출물을 포함하는 관절염 예방 및 치료용 조성물	건국대학교 산학협력단	대한민국	10-2010-0042339					
2010	종자의 탈피방법 및 탈피장치	식품연	대한민국	10-2010-0102773					
2010	청삼종실밀크 제조방법 및 이를 함유하는 음료	식품연	대한민국	10-2010-0122092					

라. 연구 확산 활동 내용

행사일시	행사				장소	참여형태
		주최	주관	후원		
2011.06.09.	고부가가치 식품 기술개발사업 우수 기술발표회 및 전시회	농림수산식품부	농림수산식품기술기획평가원, 한국식품과학회	한국식품연구원, 농업기술실용화재단	대구 EXCO	시제품 전시 판넬 제작 구연 발표
2010.06.17. - 06.19.	자연·건강·미래가 있는 생명산업 D.N.A.展	농림수산식품부, 미래기획위원회	농림수산식품기술기획평가원, 한국생명공학연구원	농촌진흥청, 산림청, SBS, 매일경제, 한국식품연구원, (재)연구소재중앙센터	양재역 aT센터	시제품 전시 포스터 제작
2011.06.08 - 06.19	2011년 한국식품과학회	한국국식품과학회	한국국식품과학회		대구 exco	청삼밀크음료, 청삼두부, 탈피청삼

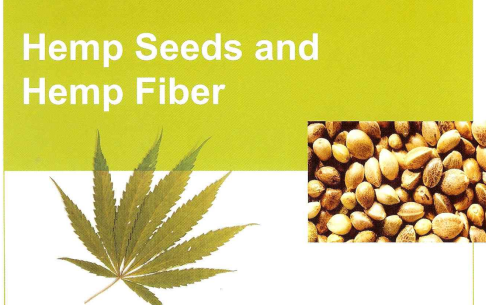
그 밖의 성과 확산

- 고급 전통 주류 label 제조업체 발굴 추진 중
- 시제품 출품 및 전시
 - 생명산업이어달리기, aT center(2010)
 - 한국식품과학회 학술발표대회, 대구(2011.6)
- 교육지도, 기술확산 계획
 - 관련 업계 대상으로 식품 원료내의 목표 단백질을 분리하기 위한 단백질 분석 기술, 크로마토그래피 기술과 같은 분석기술 및 분리정제 기술은 지도가능함.

행사 관련 자료 및 사진

#1. 팜플렛

Hemp Seeds and Hemp Fiber



중국 평지성 바이원은 100에 이상 노인이 거주하거나 살고 있는 세계 5대 중추선에 속하는데, 이곳 주민들은 매년 일인당 평균 15kg의 헴프종자과를 식용으로 섭취한다.

헴프 종자에는 9가지 필수아미노산을 모두 포함한 양질의 단백질이 25% 포함

몸이 힘이 쇠약해 같은 류마티스관절염 환자로 구성되어, 몸이 힘이 쇠약한데 걸이 아닌 순수 단백질로만 이루어진 인산염염분, 올리고당, 크립신산과 유기산에 해당, 소화불량이 전혀 없다. 특히 알기닌, 시스테인, 엑스틴 등이 다량 함유되어 있어 어린이 성장과 한자의 노약자의 건강회복에 매우 좋다.

헴프 종자에는 탄수화물의 대부분이 식이섬유로 구성되어 있으며 이중 미네랄과 비타민이 풍부

아그네유, 말강, 쌀, 아연, 칼륨 등 미네랄과 비타민 B1, B5, B6, 비타민 B12 등이 풍부한 영양성분이 함유되어 있어 식이조절 및 다이어트 건강식으로 적합하다.



헴프 종자에는 오메가-3, 오메가-6 필수지방산이 다량함유

리놀렌산, 리놀렌산 등 불포화지방산이 90% 이상 함유된 최고의 지방으로, 구성된 지방은 콜레스테롤저해기능, 혈관재해기능, 면역세포활성기능, 심혈관계 질환의 예방과 치유기능, 이도피 피부염 치유기능, 뇌기능 증진 등의 다양한 기능이 있다.

헴프 종자의 영양성분 조성 (100g 당)

Energy content	580 kcal
Fat	45 g
Protein	35 g
Total Carbohydrate	8 g
Ash	6 g

헴프 종자의 주요 미네랄 및 비타민 (100g 당)

Phosphorus	130 %
Magnesium	150 %
Manganese	450 %
Iron	90 %
Zinc	60 %
Vitamin B1	90 %
Vitamin B3	30 %
Vitamin B5	90 %
Vitamin E	20 %

헴프 오일의 지방산 조성

Unsaturated fatty acids	~ 90 %
Oleic acid (18:1 omega-9)	13 %
Linoleic acid (18:2 omega-6)	57 %
Alpha-Linolenic acid (18:3 omega-3)	15 %
Gamma-Linolenic acid (18:3 omega-6)	3 %
Stearidonic acid (18:4 omega-3)	1 %
Saturated fatty acids	~ 10 %



헴프는 환경오염을 줄이며 녹색환경을 만드는 가장 효율적인 식물

헴프는 대기의 이산화탄소 흡수율이 타 식물 보다 3~4배 이상 높고, 폐배 시에 농약, 제초제, 화학비료 등을 거의 사용하지 않는 친환경 녹색작물이다. 식분생장도 매우 빨라 약 120일 이면 수확한다.

헴프 섬유는 리그닌이 적고 섬유소 함량이 높아 산업적 이용성이 매우 큰 소재

헴프 섬유는 4%의 리그닌과 77%의 섬유소 함량을 지니고 있어서, 의류, 필름, 제지산업에 매우 유리하다. 목재에 비해 단위면적당 생산량은 4배, 펄프 재활용은 약 3배이다.

헴프 섬유는 인장강도, 흡유성, 단열성이 커서 다양한 산업소재로 적합

헴프 섬유는 천연섬유 중 인장강도, 흡유성, 단열성 등이 매우 앞떨어지는 장광작용, 자외선차단작용 등의 특성을 함께 지니므로, 직물, 바이오플라스틱, 건축소재, 공기정화필터, 가습용소재 등 다양한 산업제품의 소재로 이용된다.



2008-ARPC 기획과제: 삼(hemp)의 효능을 이용한 LOHAS형 식품 및 포장제품 개발

리모델링, 목주대, 합목식용유, 강원대, 고리대, 순천원대, 진주신원대

KHI 한국헴프과학연구소 Korea Hemp Institute
서울 광진구 화양동 1번지 한국대학교 과학관 322호
TEL: 02-450-9490 FAX: 02-2201-2456

LOM NEPESH
서울시 금천구 가산동 60-73 박산단지빌딩 5차 401호
TEL: 02-2082-4009 FAX: 02-2082-4010

한국유업소협
한국대학교 한국유업 협 / 충북 음성군 대소면 대동리 39-2
TEL: 089-4567-003 FAX: 02-214-8068

#2. 생명산업대전



생명산업
DNA展
Design Nature & Agriculture

자연·건강·미래가 있는
생명산업D.N.A#展
Design Nature & Agriculture

2010년 6월 17일(목) - 19일(토) 10:00 - 17:00, aT센터

주최 농림수산식품부, 미래기획위원회
주관 농림수산식품기술기획평가원, 한국생명공학연구원
후원 농촌진흥청, 산림청, SBS, 매일경제, 한국식품연구원, (재)연구소·제정당센터

Invitation
www.DNAexpo.kr

찾아 오시는 길



교통편 안내

고속도로를 통해 오시는 길 [북대구IC]
북대구IC(안동, 침곡방향으로 진입) → 동변동(우회전) → 산격대로 → 중림유동단지 → EXCO
소요시간은 약 10분 정도입니다.
공항에서 오시는 길 [대구공항]
택시 - 소요시간 10분
역, 고속터미널에서 오시는 길 [동대구역, 고속터미널]
버스 - 소요시간 35분(간선 일반 937번) / 택시 - 소요시간 20분
대중교통(버스를 이용해서 오시는 길
EXCO로 오시는 길 : 303(303-1), 305(간선일반), 323, 323-1(간선일반), 503(간선일반),
653(간선일반), 937(간선일반)
EXCO 인근으로 오시는 길
- 중림유동단지 : 순원2(순원일반), 순원2-1(순원일반), 300(간선일반)
- 코스트코몰세일 : 101, 101-1(간선일반), 623(간선일반)



경기도 안양시 동안구 관양동 1117-5 우양빌딩 4층~7층
Tel. 031-420-6773 Fax. 031-425-6443
www.ipet.re.kr

고부가가치 식품기술개발사업 우수기술발표회 및 전시회

일시 | 2011년 6.9.(목) 09:30~17:00
장소 | 대구 EXCO(3층 322, 324호)



주최 | 농림수산물부
주관 | 농림수산물기술기획평가원
한국식품과학회
후원 | 한국식품연구원
농업기술실용화재단

#3. 우수 기술 발표회

초청합니다

식품산업은 인간의 생명과 직결되는 중요한 생명산업인 동시에 새로운 가치를 창조하여 경제적 부를 창출해 낼 수 있는 고부가가치 전략산업입니다.

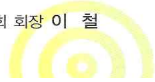
현재 세계 식품시장은 4조 달러 규모이며 앞으로 신흥경제 국가를 중심으로 소비시장이 확대되고 고부가가치, 고기능성 식품의 등장으로 그 규모가 더욱 빠르게 늘어날 것으로 예상됩니다.

정부는 식품산업의 글로벌 경쟁력을 키워갈 수 있도록 기능성 강화식품 개발, 전통식품 상품화 개발 연구 등 고부가가치 식품 개발사업에 연간 248억원을 지원하고 있습니다.

금번 행사는 산·학·연이 보유한 지금까지의 연구성과와 기술 정보를 교류·확산할 수 있는 좋은 기회가 될 것으로 확신합니다. 참석하시어 자리를 빛내주시기 바랍니다.

2011. 5.

농림수산식품부 장관 **유정복**
 농림수산식품기획평가원 원장 **유병린**
 한국식품과학회 회장 **이철**



행사 세부 일정

시 간	내 용	비 고
9:30~9:50(20)	등록	사회
9:50~10:00(10)	축사	
10:00~10:25(25)	초청 특강 : 농식품 R&D 정책	농림수산식품부 과학기술정책과장
	좌장 : 채수원(전북대학교 의과대학)	
10:30~10:50(20)	대두의 발아 및 발효를 통한 glyceollins 강화 기능성식품의 개발	김정삼 교수 (경북대학교)
10:55~11:15(20)	생미(temp)의 효능을 이용한 LO-HAS형 식음 및 포장제품 개발	김은수 교수 (건국대학교)
11:20~11:40(20)	세계 특허 기술을 활용한 발효안(생홍삼) 요구르트 음료의 천연물 투입제품의 산업적 생산기술 개발 및 사업화	김상욱 박사 (구인산업체)
11:45~12:05(20)	영고알집 기능성 천연조미료 개발	도정용 박사 (한국식품연구원)
12:10~12:30(20)	장류식품의 고급화 기술 개발 및 기능성 규명	정도원 박사 (순창군 상류연구소)
12:30~13:30(60)	점심 및 교류	
	좌장 : 김태원(인동대학교)	
13:30~13:55(25)	염증 및 알러지 개선용 기능성 제품 개발	양신미 교수 (계명대학교)
14:00~14:25(25)	수출전략형 전통 쌀 가공기술 고도화 및 가공식품 개발	김준석 박사 (한국식품연구원)
14:30~14:55(25)	청국장 종균 개발 및 보급	류종호 박사 (한국장류협회)
15:00~15:25(25)	한식 테이블용 거품 조리기구 개발	권기원 박사 (한국식품연구원)
15:30~15:40(15)	휴 식	
15:45~16:10(25)	상업료모 대체형 한국토종효모 자원선발과 이를 이용한 고품질 특화 제빵사업화	김희경 박사 (비알유업(주))
16:15~16:40(25)	고구마 신수요 창출을 위한 가공기술 및 제품 개발	김성수 박사 (한국식품연구원)
16:40~17:05(25)	국내산 축육의 고부가가치화의 유통 혁신을 위한 case-ready형 조미 육제품 개발과 표준화	정승희 박사 (W산림의고집)
17:05	폐 회	

성과물 전시는 발표장 로비 등 주변 공간 활용



바. 인력활용/양성 성과

(1) 인력지원 성과

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
12	5	7		-	6	6	10	-	2

제 5 장 연구개발 성과활용 계획

가. 실용화/산업화계획

- ① 삼의 목표 단백질을 분리하기 위한 단백질 분석 기술과 크로마토그래피 기술 등의 적용을 통해 청삼유래 유용단백질 생산성 향상이 가능
- ② 한국산 청삼 유래 기능성 유용 단백질을 이용한 기능성 식의약 원료로서의 개발이 가능함.

나. 관련기술의 기업체 기술이전 추진

- ① 청삼종실로부터 너트를 회수할 수 있는 탈피공정 및 탈피기 제작 관련 원천기술 이전 및 보급
- ② 당진군 농업기술센터 : 2012년 회계연도 시행 예정
청삼종실을 이용한 음료, 두부제품 제조 기술 관련 업체 또는 농민생산자단체에 기술이전 추진 예정
- ③ 풀잎영농조합 : 두부 관련 제품 가공기술 이전
- ④ 당진군 관련업체, 당진군청 : 2013년 농식품부 향토산업육성사업 신청 계획

다. 교육지도, 기술확산 계획

- ① 관련 업계 대상으로 식품 원료내의 목표 단백질을 분리하기 위한 단백질 분석 기술, 크로마토그래피 기술과 같은 분석기술 및 분리정제 기술은 지도 가능함.

라. 특허/품종/논문 등 지식재산권 확보계획

- ① 종자 구분용 마커 단백질의 개발로 대마종자 구분용 kit 제작 및 특허 축적이 가능함
- ② 한국산 청삼 유래 기능성 유용 단백질에 대한 특허 축적이 가능할 것으로 기대됨

마. 추가연구, 타 연구에 활용계획

- ① 단백질 분석기술을 통해 분리된 청삼 유래 기능성 단백질의 특성규명 연구를 추가적으로 실시할 예정
- ② 본 사업을 통해 개발된 기술 적용시 유용단백질 생산시 수율과 생산성 향상 가능하므로 천연식물유래 기능성 식품 산업에 직접 적용 가능함.

제 6 장 참고문헌

- AACC. 1983. Approved Method of the AACC (10th ed). Method 56-20. American Association of Cereal Chemists. St. Paul, MN, USA.
- AACC. 1983. Approved Method of the AACC. 10th ed. Method 56-20. American Association of Cereal Chemists. St. Paul, MN, USA.
- Abdul-Karim, L.A., Rab, A., Polyánszky, É., and Rusznák, I., Kinetics of delignification in kraft pulping of wheat straw and hemp, *Tappi J.*, 77(6) : 141-150 (1994).
- Abdul-Karim, L.A., Rab, A., Polyánszky, É., and Rusznák, I., Optimization of process variables for production of dissolving pulps from wheat straw and hemp, *Tappi J.*, 77(6) : 141-150 (1994).
- Aini IN, Maimon CHC. 1996. Characteristics of white pan bread as affected by tempering of the fat ingredient. *Cereal Chem* 73:462-465.
- Anderson, R. A., Conway, H. F., Pfeifer, V. F., & Griffin, E. L. (1969). Roll and extrusion-cooking of grain sorghum grits. *CerealScienceToday*,14,372-375,381.
- AOAC. 1990. Official Methods of Analysis. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA.
- Association of Official Analytical Chemists (1990). In *Official methods of analysis of AOAC international*. Arlington: AOAC International., S., & Hanna, M. A. (properties of starch-based plastic foams. *Transaction of the ASAE*, 38, 567-571.
- Autio K, Laurikainen T. 1997. Relationships between flour/dough microstructure and dough handling and baking properties. *Trends Food Sci Technol* 8:181-185.
- Bae, S.H. and Rhee, C. : Engineering / Processing / Sensory : Influences of Extraction pH on the Functionality of Soybean Protein Isolate. *Korean J. Food Sci. Technol.* 30(3), 557-561(1998)
- Baik, S.H., Kim, M.K., Yun, S.E. and Joo, H.K. : Improvement on Textural Properties of Soybean Curd by Freeze Denaturation of Soybeans. *J. Food Sci. Technology.* 28(2), 267-272(1996)
- Baik, Y.K., Kim, S.H. and Park I.S. : Quality Characteristics of Mugwort-Tofu with Various Salts. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 37(10), 1307-1311(2008)
- Bhattacharya M, Hanna MA, Kaufman RE. 1986. Textural properties of extruded plant protein blends. *J. Food Sci.* 51: 988-993.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.* 28: 25-30.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 28, 25-30.
- Callaway JC. 2004. Hempseed as a nutritional resource: An overview. *Euphytica*. 140: 65-72.
- Callaway, J.C. (2004). Hempseed as a nutritional resource: An overview. *Euphytica*, 140, 65-72.
- Callaway, J.C. : Hempseed as a nutritional resource: An overview. *Euphytica* 140, 65-72(2004)

- Camire, M. E., Dougherty, M. P., & Briggs, J. L. (2007). Functionality of fruit powders in extruded corn breakfast cereals. *Food Chemistry*, 101, 765-770.
- Chae SK. 2005. Prooxidants. In: Food Chemistry. Kim SH (ed). Hyoil, Korea, pp. 158-162.
- Chang, C.I., Lee, J.K., Ku, K.H. and Kim, W.J : Comparison of Soybean Varieties for Yield , Chemical and Sensory Properties of Soybean Curds. Korean J. Food Sci. Technol. 22(4), 439-444(1990)
- Chen, K.-L., Tosaka, K., and Hayashi, j., Alkali-oxygen pulping of rice straw : two-stage pulping by alkali soaking and oxygen cooking. Tappi J., 77(7) : 109 (1994).
- Chevallier S. Zúñiga R, Le-Bail A. 2010. Assessment of bread dough expansion during fermentation. *Food Bioprocess Technol.*(Inpress)
- Chifnnaswamy R, Hanna MA. 1999. Macromolecular and functional properties of native and extrusion cooked cornstarch. *Cereal Chem.* 6: 490-498.
- Cho YJ, Kim CT, Kim CJ, Hwang JK. 1999. Modeling of extrusion for pectin extraction from apple pomace. *Korean J. Food Sci. Technol.* 31: 1011-1016.
- Choi HD, Seog HM, Choi IW, Park MW, Ryu GH. 2004. Preparation of extrusion cooking using barley broken kernels. *Korean J. Food Sci. Technol.* 36: 276-282.
- Choi, T.-H. and Hwang, W.-R., Pulping characteristics of seed-gathering hemp(*Cannabis sativa L*), *J. Agr. Sci.* 25(1) : 43-47 (2009).
- Correia, F., Roy, D. N., and Goel, K., Chemistry and delignification kinetics of canadian industrial hemp(*Cannabis sativa L*). *Journal of wood Chemistry and Technology.* (2001).
- Durand, A., Franks, G.V. and Hosken, R.W. : Particle sizes and stability of UHT bovine, cereal and grain milks. *Food Hydrocolloids.* 17(5), 671-678(2003)
- Esat Gu`mu` skaya, Mustafa Usta, Mualla Balaban, Carbohydrate components and crystalline structure of organosolv hemp (*Cannabis sativa L*.) bast fibers pulp, *Bioresource Technology* 98, pp.491 - 497 (2007).
- Fatima, M. C. C., The characterization of hemp(*Cannabis sativa L*) chemical pulp and paper, the thesis for the degree of doctor of philosophy, faculty of forestry, University of Toronto, Canada (2004).
- Fox, K.K., Holsinger, V.H., Caha, J. and Pallansch, M.J. : Formation of a Fat Protein Complex in Milk By Homogenization. *Journal of Dairy Science.* 43(10), 1396-1406(1960)
- Frans, H. A. Z., Richard, J. A. G., Jan, E. G. V. D., and Boke, F. T., Organosolv pulping and test paper characterization of fiber hemp, *Tappi Journal*, 78(5) : 149-155 (1995).
- Gill S, Vasanthan T, Oraikul B, Rossnagel B. 2002. Wheat bread quality as influenced by the substitution of waxy and regular barley flours in their native and extruded forms. *J Cereal Sci* 36: 219-237.
- Gulcin, I., Oktay, M., Kirecci, E., & Kufrevioglu, O. I. (2003). Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*PimpinellaanisumL.*)seedextracts. *Food Chemistry*, 83, 371-382.
- Hagenimana, A., Ding, X., & Gu, W. Y. (2007). Steady state flow behaviours of extruded blend of rice flour and soy protein concentrate. *Food Chemistry*, 101, 241-247.

- Han GS, Lee SM, Shin SJ. 2009. Densified pellet fuel using woody core of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) as an agricultural waste. *Korean J. Plant Res.* 22: 293-298.
- Han JY, Kim MH, Jin T, Kim SJ, Kim MH, Ryu GH. 2007. Change in characteristics of extruded vitamin C cornstarch matrix by moisture content and barrel temperature. *Food Eng. Progr.* 11: 253-260.
- Haper JM. 1989. Food extruders and their application. In: *Extrusion Cooking*. Mercier C, Linko P, Harper JM (eds). AACC, Inc., St. Paul, MN, USA, pp. 91-155.
- Holguin-Acuña, A.L., Carvajal-Millán, E., Santana-Rodríguez, V., Rascón-Chu, A., Márquez-Escalante, J.A., Ponce de León-Renova, N.E., & Gastelum-Franco, G. (2007). Oat flour extruded. *Food Chemistry*, 111, 657.
- Hung PV, Maeda T, Morita N. 2007. Dough and bread qualities of flours with whole waxy wheat flour substitution. *Food Res Int* 40:273-279.
- Hwang JK, Kim CT, Hong SI, Kim CJ. 1994. Solubilization of plant cell walls by extrusion. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 23: 358-370.
- Jackson DS, Gomez MH, Waniska RD, Rooney LW. 1990. Effects of single-screw extrusion cooking on starch as measured by aqueous high-performance size-exclusion chromatography. *Cereal Chem.* 67:529-535.
- Jensen, P. N., & Risbo, J. (2007). Oxidative stability of snack and cereal products in relation to moisture sorption. *Food Chemistry*, 103, 717-724.
- Jeon, M.K. and Kim, M.R. : Quality Characteristics of Tofu Prepared with Herbs. *Korean J. Soc. Food. Cookery Sci.* 22(1), 30-36(2006)
- Jim L. Bowyer., Hemp (*Cannabis sativa* L.) as a papermaking raw material in Minnesota : Technical, Economic and Environmental consideration. (2001).
- Jin T, Lee ES, Hong ST, Ryu GH. 2007. Manufacturing of Goami flakes by using extrusion process. *Korean J. Food Sci. Technol.* 39: 146-151.
- Jin T, Lee ES, Hong ST, Ryu GH. 2007. Manufacturing of goami flakes by using extrusion process. *Korean J. Food Sci. Technol.* 39:146-151.
- Jin T, Park HY, Ryu GH. 2005. Characteristics of cereals prepared by extrusion-cooking and freeze-drying. *Korean J. Food Sci. Technol.* 37: 757-762.
- Johnson, P., *Industrial hemp : A critical review of claimed potentials for Cannabis sativa*, *Tappi J.*, 82(7) : 113-123 (1999).
- Jones, K. (1995). *Nutritional and medicinal guide to hemp seed*. Gibsons, BC, Canada: Rainforest Botanical Laboratory.
- Jung, J.Y. and Cho, E.J. : The effect of Green tea powder levels on Storage Characteristics of Tofu. *Korean J. Soc. Food. Cookery Sci.* 18(2), 129-135(2002)
- Khan RU, Durrani FR, Chand N, Anwar H. 2010. Influence of feed supplementation with cannabis sativa on quality of broilers carcass. *Pakistan Vet. J.* 30: 34-38.
- Kim JH, Ryu GH. 2001. Effects of extrusion process parameters on puffing of extruded pellets. *Korean J. Food Sci. Technol.* 33: 55-59.

- Kim, C. H., & Maga, J. A. (1987). Properties of extruded whey protein concentrate and cereal flour blends. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 20, 311-318.
- Kim, E.S. and Jo, J.S. : Studies on Stability of Soymilk Suspension. *Korean J. Food Sci. Technol.* 22(3), 312-318(1990)
- Kim, E.S., Chung, S.S. and Jo, J.S. : Effect of pH , Chemical Composition and Additives on Stability of Soymilk Suspension. *Korean J. Food Sci. Technol.* 22(3), 319-324(1990)
- Kim, H.J., Kim B.Y. and Kim, M.H. : Rheological Studies of the Tofu upon the Processing Conditions. *Korean J. Food Sci. Technol.* 27(3), 324-328(1995)
- Kim, J. and Jeon, J.R. : Quality Characteristics of Tofu Added with Black Soybean Hull Powder. *Korean J. Food Culture.* 20(6), 633-637(2005)
- Kim, J.H., Moon, K.D. and Kim J.Y. : Quality Attributes of Whole Soybean flour Tofu Affected by Coagulant and Theirs Concentration. *Korean J. Food Sci. Technology.* 32(2), 402-409(2000)
- Kim, J.M., Choi, Y.B., Kim, H.T., Kim, T.Y., Hwang, H.S. and Hwang, S.M. : Effects of Egg - White Addition on the Quality of Soybean Curd. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 20(4), 363-368(1991)
- Kim, J.Y., Kim, J.H., Kim L.K. and Moon, K.D. : Quality and sensory evaluation of whole soybean flour tofu prepared from various processing conditions. *Dept. of Food Sci. and Technology.* 30(3), 455-459 (2001)
- Kim, K.S. : Functional Ingredient Compotions of Soybean Curd(Tofu) Made With Black Soybeans(Huktae) and White Soybeans(Baktae). *Korean J. Food & Nutr.* 20(2), 158-163(2007)
- Kim, S.L., Lee, Y.H., Choi, H.Y., Lee, S.J. and Kim. S.J. : Diversity in lipid contents and fatty acid composition of soybean seeds cultivated in Korea. *Korean J. Crop Sci.* 52(3), 348-357(2007)
- Kim, W.J., Oh, H.I., Oh, M.W. and Byun, S.M. : Effect of Germination on the Quality and Amino acid Composition of Soymilk. *Korean J. Food Sci. Technol.* 15(1), 12-18(1983)
- Kobayashi, Y., Recent worldwide trends of R&D on pulping and paper-making of nonwood plant fiber, *Tappi J.*, 69(6) : 1-23 (1986).
- Koca AF, Anil M. 2007. Effect of flaxseed and wheat flour blends on dough rheology and bread quality. *J Sci Food Agr* 87:1172-1175.
- Koh DH. 1990. A study on the composition of fatty acids of hempseed. *Korean J. Food Nutr.* 3: 201-206.
- Ku, K.H., Jeon, H.S. and Lee, M.K. : Development of Environment Attractive Chundubu(whole soybean curd) using Microparticulated soybean powder. *Ministry for Agriculrure*(2002)
- Ku, K.H., Kim, M.J., Kim, N.Y. and Chun, H.S. : Effects of Microparticulated Soybean Powder and Its Preparation Condition on Textural Properties of Chundubu. *Food Science and Biotechnology.* 10(3), 211-218(2001)
- Kuentz, M., Rothlisberger, D. : Rapid assessment of sedimentation stability in dispersions using near infrared transmission measurements during centrifugation and oscillatory rheology. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 56, 355 - 361(2003)

- Kwon, K.H., Jeong, J.W., Kim, B.S., Ku, K.H. and Lee, M.K. : 전두부 최적 제조공정 확립 및 가공공자의 제조설비 설계. Korea food research institute(2008)
- Launay B, Lisch JM. 1993. Twin-screw extrusion cooking of starches:Flow behavior of starch pastes, expansion and mechanical properties of extrudates. J. Food Eng. 2: 159-180.
- Laurel M. Sheppard., How Product are Made : Industrial Hemp. (2009)
- Lazou, A., & Krokida, M. (2010). Structural and textural characterization of corn-lentil extruded snacks. *JournalofFoodEngineering*,100,392-408.
- Lee JM, Chang PS, Lee JH. 2007. Comparison of oxidative stability for the thermally-oxidized vegetable oils using a DPPH method. Korean J. Food. Sci. Technol. 39: 133-137.
- Lee YR, Choi YH, Koh HJ, Kang MY. 2001. Quality characteristics of brown rice flakes prepared giant embryonic rice and normal rice cultivars. Korean J. Food Sci. Technol. 33: 540-544.
- Lee, C.H., Kim, H.R. and Yang H.C. : Effect of External Conditions on the Emulsifying Property of Proteins. Korean J. Food Sci. Technol. 14(1), 49-56(1982)
- Lee, H.C. and Kim, B.Y., Manufacture and characterization of papers made from New-Zealand hemp fibers, J. KTAPPI 36(1) : 67-74 (2004).
- Lee, H.J. and Hwang, I.K. : Textural Characteristics and Microstructure of Soybean Curds Prepared with Different Coagulants. Korean J Soc. Food Sci. 10(3), 284-290(1994)
- Lee, H.J. and Park H.O. : A Study of Tofu Prepared with Blanched Soybean. Korean J Soc. Food Sci. 10(4) 369-375(1994)
- Lee, H.J., Shin, H.C., Lee, Y.S., Kim, J.Y. and Moon, Y.H. : Comparison of Quality Characteristics of Soybean Curd and Whole Soybean Curd. Korean J. Food Sci. Technol. 41(2), 117-121(2009)
- Lee, J.E. and Lee, S.Y. : Effects of the Types and Concentrations of Sugars on the Physicochemical and Sensory Characteristics of Soy Milks during Storage. Korean J Soc. Food Sci. 13(1), 70-77(1997)
- Lee, J.H. : Uncurdled bean curd containing chitosan and chitosanoligo sugar. patent application num. 10-1999-0001400(1999)
- Lee, M.Y. and Kim, S.D. : Shelf-life and Quality Characteristics of Tofu Coagulated by Calcium Lactate. J Korean Soc Food Sci Nutr. 33(2), 412-419(2004)
- Lee, S.M. and Hwang, I.K. : Texture Characteristics of Soybean - Curds Prepared with Different Coagulants and Compositions of Soybean - Curd Whey. Korean J Soc. Food Sci. 13(1), 78-85(1997)
- Lee, S.W. and Rhee, C. : Emulsifying and Rheological Properties of the Pine Nut's Extracts. Korean J. Food Sci. Technol. 32(5), 1093-1101(2000)
- Leem, Y.S. : Preparation method of the TOFU(soybean curd) by Crab-Shell powder and it's products. patent application num. 10-2001-0007632(2001)
- Leizer, C., Ribnicky, D., Poulev, A., Dushenkov S., & Raskin, I. (2000). The composition of hempseed oil and its potential as an important source of nutrition. *Journal of Nutraceuticals*,

- Functional and Medical Foods*, 2, 35-53.
- Lim, B.T., deMan, J.M and deMan, L. : Yield and quality of tofu made from soybeans and soy/peanut blends. *JAOCS*, 67(6), 381-387(1990)
- Lopez A C B, Pereira A J G, Junqueira R G. 2004. Flour mixture of rice flour, corn and cassava starch in the production of gluten-free white bread. *Brazilian Arch Biol Technol* 47: 63-70.
- Mamers, H., Yuritta, J. P., and Menz, D. J., The siropulper - an explosive alternative for non-wood pulping. *Tappi J.*, 64(7) : 93 (1981).
- Marguerite, S., Environmental compatibility of effluents of aspen biomechanical pulping of bagasse and wheat straw. *Tappi. J.*, 77(1) : 161-166 (1994).
- Maurer, G., Fukuda, G., & Nielsen, S. (2005). Development of bean-based granola bars and cereal. *Cereal Foods World*, 50, 27-32.
- Midden TM. 1989. Twin screw extrusion of corn flakes. *Cereal Foods World* 34: 941-943.
- Moon YH, Lee BH, Jeong BC, Kim YU, Kim GY. 2002. Breeding history of non-drug type hemp variety "Cheungsam" and its characteristics. *Kor. J. Int. Agri.* 14: 119-126.
- Moon YH, Song YS, Jeong BC, Bang JK. 2005. Variation on fatty acid profile including γ -linolenic acid among hemp (*Cannabis sativa* L.) accessions. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 13:190-193.
- Moon YH, Song YS, Jeong BC, Bang JK. 2006. Variation of cannabinoids content in hemp (*Cannabis sativa* L.) produced with mixed seeds of drug and non-drug type varieties. *Korean J. Crop Sci.* 51: 187-190.
- Moon YH, Song YS, Jeong BC, Bang JK. 2006. Variation of cannabinoids content in hemp (*Cannabis sativa* L.) produced with mixed seeds of drug and non-drug type varieties. *Korean J. Crop Sci.* 51: 187-190.
- Moon YH. 2008. Review for legislation of industrial hemp regulation: The proposal to legislate industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) and their research review and regulations in Korea. *Korean J. Int. Agri.* 20: 203-210.
- Moon, S.J., Sohn, K.H., and Kim, Y.H. : The Study of textural characteristics of soybean curd prepared with various coagulants. *Dept. of Foods and Nutrition.* 17(1), 11-19(1972)
- Mustafa, A. F., McKinnon, J. J., & Christensen, D. A. (1998). The nutritive value of hemp meal for ruminants. *Canadian Journal of Animal Science*, 79, 91-95.
- Noh, E.J., Park, S.Y., Park, J.I., Hong, S.T. and Yun, S.E. : Coagulation of soymilk and quality of tofu as affected by freeze treatment of soybeans. *Food chemistry.* 91, 715-721(2005)
- Onodera, Y., Ono, T., Nakasato, K. and Toda K. : Homogeneity and Microstructure of Tofu Depends on 11S/7S Globulin Ratio in Soymilk and Coagulant Concentration. *Food Sci. Technol. Res.*, 15(3), 265-274(2009)
- Onwulata, C. I., Smith, P. W., Konstance, R. P., & Holsinger, V. H. (2001). Incorporation of whey products in extruded corn, potato or rice Snacks. *Food Research International*, 34, 679-687.

- Oomah, B. D., Busson, M., Godfre, D. V., & Drover, J. C. G. (2002). Characteristics of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil. *Food Chemistry*, 76, 33-43.
- Padmanabhan M, Bhattacharya M. 1989. Extrudate expansion during extrusion cooking of foods. *Cereal Foods World* 34: 945-949.
- Park CK, Maeng YS. 1992. Quality characteristics of commercial breakfast cereals. *Korean J. Food Sci. Technol.* 24: 289-293.
- Park, C.K. and Hwang, I.K. : Effects of Coagulant Concentration and Phytic Acid Addition on the Contents of Ca and P and Rheological Property of Soybean Curd. *Korean J. Food Sci. Technology.* 26(4), 355-358(1994)
- Park, S.R. and OH, C.G. : NATURAL COAGULANT FOR BEAN CURD. patent application num. 10-1997-0009049(1999)
- Park, Y.K., Seok, H.M., Choi, I.W., Kim, W.S., Park, M.W., Kim, J.H., Lee, E.M., Kim, B.C. and Jeong, Y.J. : Development of various processed products using mulberry fruit as an indigenous product in Jungup Province. *Korea food research institute*(2005)
- Putzeys, P. and Mahieu, L. : Heat-Coagulation of Edestin. *Nature* 194, 773-774(1962)
- Pyun, J.W. and Hwang I.K. : Effects of Protease Treatment on Functional Properties of Soymilk Protein. *Korean J Soc. Food Sci.* 11(1), 26-32(1995)
- Raphaelides, S. N., Arsenoudi, K., Exarhopoulos, S., & Xu, Z. M. (2010). Effect of processing history on the functional and structural characteristics of starch-fatty acid extrudates. *Food Research International*, 43, 329-341.
- Rhee SK, Lee KB, Son JY. 1999. Prediction of shelf-life and quality changes of dried noodle during storage period. *Korean J. Soc. Food Sci.* 15: 127-132.
- Rokey GJ. 1995. RTE breakfast cereal flake extrusion. *Cereal Foods World* 40: 422-426.
- RVA manual. 1995. RVA-3 series operation manual using Dos thermocline software. Newport Scientific, Narrabeen, Australia.
- Ryland, D., Vaisey-Genser, M., Arntfield, S. D., & Malcolmson, L. J. (2010). Development of a nutritious acceptable snack bar using micronized flaked lentils. *Food Research International*, 43, 642-649.
- Ryu GC. 2002. Effect of melt moisture and post-extrusion variables on pasting and thermal properties of corn starch extrudates. MS thesis, Kongju National University, Yesan, Korea.
- Ryu GH, Lee CH. 1988. Effects of moisture content and particle size of rice flour on the physical properties of the extrudate. *Korean J. Food Sci. Technol.* 20: 463-469.
- Ryu GH, Neumann PE, Walker CE. 1993. Pasting of wheat flour extrudates containing conventional baking ingredients. *J. Food. Sci.* 58: 567-573.
- Ryu GH, Ng PKW. 2001. Effects of selected process parameters on expansion and mechanical properties of wheat flour and whole cornmeal extrudates. *Starch-Starke* 53: 147-154.
- Ryu GH. 1995. Extrusion process with gas injection. *Food Sci. Ind.* 28: 30-38.
- Sacchetti, G., Pinnavaia, G. G., Guidolin, E., & Dalla Rosa, M. (2004). Effects of extrusion temperature and feed composition on the functional, physical and sensory properties of chestnut

- and rice flour-based snack-like products. *Food Research International*, 37, 527-534.
- Sciarini LS, Ribotta PD, León AE, Pérez GT. 2010. Influence of gluten-free flours and their mixtures on batter properties and bread quality. *Food Bioprocess Technol* 3:577-585.
- Shih, M. C., Kuo, C. C., & Chiang, W. (2009). Effects of drying and extrusion on colour, chemical composition, antioxidant activities and mitogenic response of spleen lymphocytes of sweet potatoes. *Food Chemistry*, 117, 114-121.
- Shirani, G., & Ganesharane, R. (2009). Extruded products with Fenugreek (*Trigonella foenum-graecium*) chickpea and rice: Physical properties, sensory acceptability and glycaemic index. *Journal of Food Engineering*, 90, 44-52.
- Siddiq M, Nasirb M, Ravi R, Butt MS, Dolan KD, Harte JB. 2009. Effect of defatted maize germ flour addition on the physical and sensory quality of wheat bread. *LWT-Food Sci Technol* 42:464-470.
- Siger, A., Nogala-Kalucka, M., & Lampart-Szczapa, E. (2008). The content and antioxidant activity of phenolic compounds in cold-pressed oils. *Journal of Food Lipids*, 15, 137-149.
- Slinkard, K., Singleton, V. L. (1997). Total phenol analyses: automation and comparison with manual methods. *Enology and Viticulture*, 28, 49-55.
- Small E, Marcus D. 2002. Hemp: A new crop with new uses for north america. In: Trends in new crops and new uses. Janick J and Whipkey A (eds). ASHS Press, Alexandria, VA, USA, pp. 284-326.
- Son HJ, Ryu GH. 2009. Chemical compositions and antioxidant activity of extract from an extruded white ginseng. *J Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 38: 946-950.
- Tepe, B., Daferera, D., Sokmen, A., Sokmen, M., & Polissiou, M. (2005). Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chemistry*, 90, 333-340.
- Twomey, L. N., Pluske, J. R., Rowe, J. B., Choct, M., Brown, W., & Pethick, D. W. (2003). The replacement value of sorghum and maize with or without supplemental enzymes for rice in extruded dog foods. *Animal Feed Science and Technology*, 108, 61-69.
- Veluppillai S, Nithyanantharajah K, Vasantharuba S, Balakumar S, Arasaratnam V. 2010. Optimization of bread preparation from wheat flour and malted rice flour. *Rice Sci* 17:51-59.
- Wang, J., Jin, Z., & Yuan, X. (2007). Preparation of resistant starch from starch-guar gum extrudates and their properties. *Food Chemistry*, 101, 20-25.
- Wang, X.S., Tang, C.H. Yang, X.Q. and Gao, W.R. : characterization, amino acid composition and in vitro digestibility of hemp (*Cannabis Sativa* L.) protein. *Food Chemistry*. 107, 11-18(2008)
- Wei, C.H., Sok, D.E., Yang, Y.H., Oh, S.H., Kim, H.C., Yoon, W.K., Kim, H.M. and Kim, M.R. : Protein composition of domestic and glyphosate-tolerant soybean. *J Korean Soc Food Sci. Nutr.* 35(4), 470-475(2006)
- Woisky, R., & Salatino, A. (1998). Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *of Apicultural Research*, 37, 99-105.

Yu, L., Zhou, K., & Parry, J. (2005). Antioxidant properties of coldpressed black caraway, carrot, cranberry, and hemp seed oils. *FoodChemistry*, 91, 723-729.

원종명, 제지용 원료로서의 비목재 자원. 한국펄프·종이공학회 2005년 춘계학술논문집, pp. 56-67 (2005).

이명구, 윤승락, 대마 구성 세포의 현미경적 관찰. 한국펄프·종이공학회 2009년 추계학술발표논문집, pp. 137-144 (2009).

이명구, 최경화, 박은호, Hemp 섬유를 이용한 kraft pulp 제조. 한국펄프·종이공학회 2008년 추계학술발표논문집, pp. 323-329 (2008).

조병욱, 채수명, 윤승락, 이명구, 대마의 소다펄프화 kinetics에 관한 연구. 한국펄프·종이공학회 2010년 춘계학술발표논문집, pp. 1-6 (2010).

