

최 종
연구보고서

천연물을 이용한 기능성 두부응고제의 개발 및
이를 이용한 기능성두부의 제조

한약재를 응고제로 이용한 두부제조 공정의 최적화

Study on functional tofu made with coagulant extracted
from traditional herb sources

용인대학교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “천연물을 이용한 기능성 두부응고제의 개발 및 이를 이용한 기능성두부의 제조에 관한 연구” 과제 (세부과제 “한약재를 응고제로 이용한 두부제조 공정의 최적화에 관한 연구”)의 최종보고서로 제출합니다.

2004 년 8 월 15 일

주관연구기관명: 용인대학교

총괄연구책임자: 강현민

세부연구책임자: 김강성

연 구 원: 박갑주

연 구 원: 손준구

연 구 원: 이명진

연 구 원: 박상호

연 구 원: 김진희

협동연구기관명: 건국대학교

협동연구책임자: 이형환

여 백

요 약 문

I. 제 목

천연물을 이용한 기능성 두부응고제의 개발 및 이를 이용한 기능성두부의 제조

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 두부는 오래 전부터 우리 나라를 비롯, 중국·일본 등 동양권에서 널리 이용되는 식품으로 문헌에 의하면 2000년의 역사를 갖는다. 이렇게 긴 역사와 전통을 가진 두부가 현재까지 변치 않고 전래되어 온 것은 타 식품에 비해 맛이 담백하고 만복감이 있으며, 동물성 단백질에 비견할 만한 필수아미노산을 고루 갖추고 있는 두부 고유의 특성 때문이라 할 수 있다. 60, 70년대까지만 하더라도 두부는 단백질식품으로 국민건강에 큰 역할을 했으며, 최근에는 과도한 영양섭취 및 비균형성 음식으로 인한 비만이나 성인병에 대비키 위한 건강식품으로서도 각광 받는 식품으로 부상했다.
- 두부는 해마다 4,000억원 이상이 판매되는 중요한 전통식품이나, 전 근대적인 유통구조, 화학응고제의 이용 등으로 인하여 소비자들로부터 불신을 받고 있는 대표적인 식품의 한 예가 되고 있다.
- 두부제조에서 콩 다음으로 중요한 원료인 응고제는 화학 물질로서 식품 첨가 물질인 황산칼슘($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 분자량 172.27), 염화마그네슘($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 분자량 203.30), 글루코노델타락톤($\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_6$ 분자량 178.15), 염화칼슘($\text{CaCl}_2 \cdot 0 \sim 2\text{H}_2\text{O}$) 등의 단일품과 그것들을 혼합한 복합체만이 사용할 수 있는 첨가물로 허용되어 있다. 실제로 우리나라에서 가장 많이 쓰이고 있는 응고제는 황산칼슘으로 전량 중국으로부터 수입되고 있으며 복합체는 주로 일본에서 많이 사용되고 있다.
- 전통적으로 2000년 동안 쓰여진 응고제로인 천일염에서 흘러나오는 간수는 이물질 등의 혼입으로 인한 위생상의 문제점이 야기되어 지금은 거의 사용치 않고, 대

신 위에 열거한 4종류의 화학물질 응고제가 쓰여지고 있다. 그러나 이들 화학 응고제는 건강에 관심이 높은 소비자들에게 우려의 대상이 되고 있다. 소비자 단체가 실시한 한 설문조사에 의하면 45 % 이상의 주부는 값이 다소 비싸다 하더라도 화학 응고제 대신 천연 간수를 이용한 제품의 구매의사를 밝히고 있다.

- 두부응고시 주로 사용되는 염(금속이온에 의한 응고)은 신장병, 고혈압등 성인병환자들은 물론 건강한 사람에게도 좋지 않으며 또한 소금의 맛이 강하게 되면 두부고유의 맛을 떨어뜨릴 수 있으며 짠맛이 강하게 난다. 이때 짠맛을 제거하기 위해 두부 응고 후 장시간 물에 담가 염분 및 짠맛을 제거하는 과정을 거치게 되는데, 시간과 제조단가를 낮추기 위해서 석회두부와 같은 불량 두부를 만들게 하는 원인이 되기도 한다. 따라서 염분이 함유되지 않은 천연물로부터 두부응고제를 개발하는 것이 중요하며 이러한 두부 응고제가 개발될 경우 한국, 일본, 중국 등지에서 그 산업성은 무궁무진할 것으로 판단된다.
- 두부와 관련된 연구결과는 다수 있지만 전통콩을 이용한 두부 및 새로운 응고제에 대한 연구는 국내외적으로 아직 전무한 실정이다. 현재 국내의 두부관련 연구를 조사하려 보면 장등(1995)은 농촌진흥청에서 추천한 14가지 장려 콩품종을 대상으로 두부를 제조하여 콩과 두부의 화학적 조성, 텍스츄어 특성과 관능적 특성이 보고된 바 있다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 연구 목표

- 용도 별로 구별되어 있는 재래식 국산콩의 우수성을 과학적으로 입증하여 저가의 수입콩에 의해 잠식되어 있는 국산콩의 자급률을 50%이상으로 높이는 한편 부가가치가 높은 기능성두부를 개발하여 국내 두부시장의 활성화는 물론 성인병에 치료효과가 있는 두부의 수출을 통해 우리 나라 식품산업을 활성화하며,
- 익기생진(益氣生津)의 효능이 있어 대표적인 인체 생리활성 한약재인 인삼, 황기와 3종으로 구성된 한약처방(이하 P-1으로 표기)이 기존의 두부응고제인 염화칼슘 등과 비교하여 더욱 빠른 시간 안에 두부를 응고시키는 독창적인 효과를 확인하여 이에 대한 보다 심층적인 연구를 위해 연구제안서를 제출하고자 한다.
 - 한약재 및 marine sources로부터 두부응고제의 개발 및 응고물질의 추적
 - 기능성 두부의 개발

- 개발된 천연물의 인체 생리활성 기능성 연구
- 두부응고 한약재의 항피로, 항산화, 항고혈압, 항고혈장지질에 미치는 기능성 연구
- 시제품의 항피로, 항산화, 항고혈압, 항고혈장지질에 미치는 생리활성 연구
- 두부응고 한약재의 안전성 연구

2. 연구개발의 내용

- ① 한약재 및 Marine source에서 두부 응고제 screening 실험
- ② 예비실험결과 두부응고기능을 가진 것으로 밝혀진 한약재 (이하 P-1으로 표기)의 두부 응고 스크리닝
- ③ 시제품의 생리활성, 항피로, 항산화, 항고혈압, 항고혈장지질에 미치는 기능성 실험 (In vivo)
- ④ 시제품의 두부로서의 품질 연구
- ⑤ 예비실험에 의해 개발된 P-1의 급성, 아급성 독성 연구

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 연구의 결과 천연응고제의 기능적 및 가공적 우수성이 입증되었으며 따라서 이를 이용하여 두부, 및 기타 가공품을 생산하여 기존 제품과의 차별성을 적극적으로 홍보할 경우 우리나라 두부의 소비증대는 물론이고 농민의 소득증대로 이어질 수 있다.

V. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

본 연구의 결과, 당초 예상하였던 계획을 100% 달성하였으며, 아울러 본 연구를 통하여 개발한 기술을 벤처기업에 이전하여 제품이 출시 단계에 있음.

SUMMARY

This studies is to investigate the effect of organic acids found in herbs, such as *omija*, *hwanggi*, *mackmoondong*, *pumpkin* and *ginseng*, on coagulation of soy protein in the making of *tofu*. The water content of *pumpkin* is the highest with 93.42%, and the ash content of *omija* is the highst with 3.62%. *Omija tofu* showed the highest water content with 79.38%, while *jinunee tofu* showed the highest content of ash with 0.60%. *Organic acid tofu* had the highest protein content with 64.49%. The *omija* extracts was added to soymilk, the pH of the potein solution dropped to 4.58, which was closed to the isoelectric point of soy protein of pH 4.6. *Organic acid tofu's* L value was the highest as 82.25 and *jinunee tofu's* a value was the highest at 15.30, and *hypocotyl tofu's* b value was 13.55. In the result of measuring *tofu's* textural characteristics, toasted *omija tofu* showed the highest hardness at 988763 Dyne/cm², while adding *omija* and *pumpkin* extracts to *tofu* improved adhesiveness to -190 g. *Jinunee tofu* is the highest cohesiveness and springiness at 18.86% and 23.81%, and *organic acid tofu* showed the most gumminess and brittleness at 84.48 g and 14.31 g, respectively. *Omija* and *hwanggi* have most citric acid, while *mackmoondong*, *pumpkin* and *ginseng* have more malic acid than others. Lipid composition of hypocotyl consisted of 96.2% neutral lipid, 3.21% glycolipid, and 0.59% phospholipid. Fatty acid composition of lipid of hypocotyl showed linoleic acid(18:2) to be the most withs 39.9~50.0%. In the measuring of amino acid of hypocotyl, 7S and 11S, the most abundant amino acid was glutamic acid and next was aspartic acid. In the result of measuring comparing solubility of *tofu* protein, the protein content of *compound tofu* is the most, *herb tofu* is second and *general tofu* is third. *Tofu's* protein is affected by pH, and tertiary structure of hydrophobic bond and disulfide is broken easily, however secondary structure of hydrogen bond's is not b oken easily. As a result,

three kind of *tofu* have similar coagulation mechanism. The result of testing *tofu* during storage at room temperature and 4°C, *general tofu*, *herb tofu* and *compound tofu* in order of colony number. Especially, pasteurized group have fewer colony number than the nonpasteurized group. Storage at 4°C resulted in longer life-time than storage at room temperature.

여 백

CONTENTS

Summary -----	7
I. Introduction -----	23
1. Needs, objectives, and scopes of the research-----	23
2. Comparison of works done in Korea and overseas -----	28
II. Research Scopes and Results -----	30
1. Coagulation effects of omija-----	30
a. Coagulation effects of omija extract -----	32
1) Materials and methods -----	32
a) Materials-----	32
b) Herbal extract-----	32
c) Tofu making -----	33
2) Results and Discussions-----	35
3) Conclusions -----	37
b. Mechanism of coagulation-----	38
1) Introduction of bean gelation -----	38
2) Importance of developing natural coagulation agents-----	40
3) Objectives -----	41
4) Materials and Methods -----	41
a) Selecting soybean-----	41
b) Omija extract making-----	42
c) Fractionation of the extract -----	42
d) Coagulation of the extract -----	42
e) GC-Mass-----	43

f) Concentration effect	43
g) Fractionation effects	43
h) Evaluation	44
5) Results	44
a) Soymilk making	44
b) Omija extract analysis	45
c) GC-Mass	49
d) uv analysis	51
e) Mineral analysis	52
c. Coagulation mechanism of omija component	54
1) Methods	54
a) Materials	54
b) Analysis of omija extract	54
c) GC-Mass	55
d) uv analysis	56
e) Mineral analysis	56
f) Tofu making	56
g) Coagulation effect of fractions	57
h) Concentration effect	57
i) Coagulation effects of dried omija extract	57
j) Concentration effects	57
2) Results and Discussions	57
a) Tofu making	57
b) Fraction effects	58
c) Concentration effects	59
d) Component effects	66
e) Coagulation of soy protein using fractions	68
3) Conclusion	71

4) References -----	71
2. Animal testing of omija extract-----	73
a. Herbs for soy protein coagulation-I. -----	74
1) Material and methods -----	74
a) Materials -----	76
b) Classifications of materials -----	76
c) Soybean curd making -----	77
d) Physiological effects -----	77
2) Results and Discussions -----	79
a) Coagulation and O.D. -----	79
b) OD after adjusting for pH -----	79
c) Alcohol lowering effects -----	81
d) Resistance to fatigue -----	82
e) Anti-oxidants effects -----	83
f) Liver protecting effects -----	84
b. Herbs for soy protein coagulation-II. -----	90
1) Materials and methods -----	90
a) Materials -----	90
b) Soybean curd making -----	92
c) Physiological tests -----	93
2) Results and discussions-----	95
a) Bean curd making -----	95
b) Physiological effects -----	95
c. Physiological tests -----	95
1) Materials and methods -----	96
a) Animals -----	100
b) Classifications -----	100
c) Formulation -----	100

d) Feeding -----	101
e) Analysis -----	101
f) Weighing -----	102
g) Biochemical tests -----	102
h) Statistics -----	102
2) Results and Discussions-----	103
a) Weight changes -----	103
b) Weight of organs -----	103
c) AST, ALT -----	110
d) malondialdehyde -----	112
3) References -----	114
3. Soy bean curd formulation-----	115
a. Process optimization -----	115
1) Material and methods -----	115
a) Materials -----	115
b) Extracts -----	115
c) Weight-----	116
d) Analysis -----	116
e) Fatty acids -----	116
f) Amino acids -----	117
g) Isoflavones-----	117
h) Oligosaccharides -----	118
i) Phytic acids -----	118
j) Saponin -----	119
2) Results and Discussions -----	119
a) Appearances -----	119
b) Analysis -----	120
c) Fatty acids -----	120

d) Amino acids -----	124
e) Isoflavones-----	126
f) Oligosaccharides -----	129
g) Phytic acids -----	129
h) Saponin -----	130
b. Properties of the coagulant -----	132
1) Materials and methods -----	132
a) Analysis -----	132
b) pH of the extract -----	132
c) Color of soybean curd -----	132
d) Texture -----	133
e) Organic acid -----	133
2) Results and discussions -----	133
a) Analysis -----	133
b) pH of the extract -----	137
c) Color of soybean curd -----	139
d) Texture -----	141
e) Organic acid -----	145
c. Functional soybean curd -----	147
1) Material and methods -----	147
a) Coagulation mechanism-----	147
b) Time effects -----	148
c) Coagulant quantity effects -----	148
d) Storage -----	149
e) Statistics -----	149
f) Sensory-----	149
2) Results and discussion -----	150
a) Coagulation mechanism-----	150

b) Parameters of bean curd making-----	159
c) Storage -----	164
e) Sensory-----	167
3) Conclusions-----	169
4) References -----	172
4. Toxicity -----	185
a. Physiological effects -----	186
1) Material and methods -----	186
a) Animal tests-----	186
b) Classifications of rats -----	186
c) Formulation -----	187
d) Feeding-----	187
e) Weights -----	188
f) AST, ALT, TG, Cholesterol -----	188
g) Alcohol Dehydrogenase -----	188
h) Statistics -----	189
2) Results and discussions -----	189
a) Weight changes -----	190
b) Organ weights -----	190
c) AST, ALT -----	191
d) Cholesterol level -----	193
e) Alcohol Dehydrogenase -----	195
f) Safety-----	195
b. Toxicity -----	199
1) Material and methods -----	199
a) MTT assay-----	199
b) Safety -----	199
2) Results and Discussion-----	204

a) MTT assay	204
b) Safety	205
c. Functional effects	212
1) Material and methods	212
a) Animal tests	212
b) Classifications of rats	212
c) Formulation	213
d) Feeding	213
e) Analysis	213
f) Weight	214
g) Cholesterol, TG	214
h) Statistics	214
2) Results and discussion	215
a) Weight changes	215
b) Organ weights	215
c) Cholesterol level	218
3) References	222

여 백

목 차

제 출 문 -----	1
요 약 문 -----	3
SUMMARY -----	7
CONTENTS -----	9
목 차 -----	16
제1장 서 론 -----	23
제1절 연구개발의 개요 -----	23
제2절 국내외 기술개발 현황 -----	28
제2장 연구개발수행 내용 및 결과 -----	30
제1절 제1세부 과제 -----	30
1. 오미자즙을 이용한 두부 응고 반응에 관한 연구 -----	32
가. 재료 및 방법 -----	32
1) 실험재료 -----	32
2) 생약 엑기스의 제조 -----	32
3) 실험 시료의 분류 -----	33
나. 결과 및 고찰 -----	35
다. 결론 -----	37
2. 오미자즙을 이용한 두부 응고 반응에 관한 연구 -----	38
가. 서론 -----	38
나. 연구개발의 필요성 -----	40
다. 연구개발의 목적 -----	41
라. 재료 및 방법 -----	41
1) 대두 및 천연물질의 선정 -----	41
2) 대두유 및 오미자 추출액의 제조 -----	42
3) 오미자 추출액의 분획 및 성분 분석 -----	42
4) 오미자 추출액의 분획 물질에 의한 응고제 실험 -----	43
5) 오미자 추출액을 진공 냉동 건조 후 GC-MASS 분석 -----	43
6) 오미자 추출 농도변화에 의한 두부 응고 실험 -----	43
7) 오미자 각 성분별 두부 응고 실험 -----	43
8) 오미자 추출액의 응고성을 화학시약으로 확인 실험 -----	44
마. 결과 및 고찰 -----	44

1) 대두유 제조 및 추출방법-----	44
2) 오미자 추출방법에 의한 성분 분석-----	44
3) 오미자 추출액의 냉동건조에 의한 GC-MASS 분석-----	49
4) 오미자 추출액의 분말의 적외선 스펙트럼-----	51
5) 오미자 추출액의 무기이온 분석-----	52
3. 오미자즙을 이용한 두부 응고 반응에 관한 연구-----	54
가. 연구방법-----	54
1) 시약 및 측정기기-----	54
2) 오미자 성분 분석-----	54
3) 오미자 추출액의 냉동건조에 의한 GC-MASS 분석-----	55
4) 오미자 추출액의 분말의 적외선 스펙트럼-----	56
5) 오미자 추출액의 무기이온 분석-----	56
6) 두부 응고 실험-----	56
7) 유기용매에서 분획된 오미자 액의 두부 응고 실험-----	57
8) 오미자액의 농도별 두부 응고 실험-----	57
9) 오미자 분말을 이용한 두부 응고 실험-----	57
10) 오미자의 화학 성분별 농도 변화에 의한 실험-----	57
나. 결과 및 고찰-----	57
1) 두부 응고 실험-----	57
2) 용매에서 분획된 오미자 액의 두부 응고 실험-----	58
3) 오미자 추출액의 농도별 두부 응고 실험-----	59
4) 오미자의 화학 성분별 농도 변화에 의한 실험-----	66
5) 오미자 분말을 이용한 두부 응고 실험-----	68
다. 결론-----	71
라. 참고문헌-----	71
제2절 제2세부과제-----	73
1. 한약재료부터 두부응고제의 개발-----	74
가. 재료 및 방법-----	74
1) 실험재료-----	74
2) 실험 시료의 분류-----	76

3) 두부의 제조-----	77
4) 생리효과-----	77
나. 결과 및 고찰-----	78
1) 두부응고 1시간 후 각 시험군의 pH 및 O.D 값 측정 결과-----	78
2) 두부응고 1시간 후 각 시험군의 pH를 중성 pH인 7.0으로 맞춘 후 O.D 값을 측정한 결과-----	79
3) Alcohol lowering effects-----	81
4) 항피로 효과-----	82
5) 항산화 효과-----	83
6) 간의 조직학적 관찰-----	84
2. 한약재로부터 두부응고제의 개발-----	90
가. 재료 및 방법-----	90
1) 실험재료-----	92
2) 두부의 제조-----	92
3) 생리효과-----	93
나. 결과 및 고찰-----	95
1) 두부제조-----	95
2) 개발된 천연물의 인체 생리활성 기능성 연구-----	96
3. 동물실험-----	100
가. 실험 재료 및 방법 -----	100
1) 실험동물-----	100
2) 실험군의 분류-----	100
3) 시료의 제조-----	101
4) 시료의 투여-----	101
5) 부검-----	101
6) 체중 및 장기의 중량 계측-----	102
7) 생화학적 검사(AST, ALT)-----	102
8) 통계처리-----	102
나. 실험 결과 및 고찰 -----	103
1) 성장과 체중변화량 및 장기중량변화-----	103
2) 장기의 중량-----	103
3) 혈장 AST, ALT 효소활성도 변화-----	107
4) 혈장의 malondialdehyde 함량-----	110

다. 참고문헌-----	112
제3절 제3세부 과제-----	115
1. 제1세부과제 한약재를 응고제로 이용한 두부제조 공정의 최적화에 관한 연구	
가. 재료 및 방법-----	115
1) 재료-----	115
2) 한약추출물의 제조-----	115
3) 100립중 외형적 특성-----	116
4) 일반성분-----	116
6) 아미노산 조성 및 함량 측정-----	116
7) Isoflavone 함량 분석-----	117
8) 올리고당 함량 분석-----	118
9) Phytic acid 함량 측정-----	118
10) Saponin 분석-----	119
나. 연구결과 및 고찰-----	119
1) 원료 대두의 이화학적 특성-----	119
2) 일반성분-----	120
3) 지방산조성-----	120
4) 아미노산 조성 및 함량 -----	124
5) 원료 콩 종실, 자엽, 배축, 및 두부의 isoflavone 함량 -----	126
6) 올리고당 함량-----	129
7) Phytic acid 함량 -----	129
8) Saponin 함량-----	130
2. 제1세부과제: 응고제의 특성 연구-----	132
가. 실험재료 및 방법-----	132
1) 한약재와 두부의 일반성분 분석-----	132
2) 한약추출물의 pH측정-----	132
3) 두부의 색도 측정-----	132
4) 두부의 조직감 측정-----	132
5) 한약추출물의 유기산 분석-----	133
나. 결과 및 고찰-----	133
1) 한약재와 두부의 일반성분-----	133
2) 한약추출물의 pH-----	137
3) 두부의 색도-----	139
4) 두부의 조직감-----	141

5) 한약추출물의 유기산 조성 및 함량-----	145
3. 제1세부과제 기능성 두부의 특성연구-----	147
가. 실험 재료 및 방법-----	147
1) 두부 단백질 응고 매커니즘 측정-----	147
2) 두부 제조에 있어 응고 시간의 영향-----	148
3) 두부 제조에 미치는 응고제 첨가량의 영향-----	148
4) 두부의 저장성 실험-----	149
5) 통계분석-----	149
6) 두부의 관능검사-----	149
나. 결과 및 고찰-----	150
1) 두부 단백질의 응고 매커니즘-----	150
2) 두부 제조에 영향을 미치는 인자-----	159
3) 두부의 저장성-----	164
4) 두부의 기호도 검사-----	167
다. 결론-----	169
라. 참고문헌-----	172
 제4절 협동연구-----	 185
1. 협동연구과제 한약재로부터 개발된 두부응고제 P-1 (생맥산)의 항고혈압, 항고 혈장 지질에 미치는 기능성 연구-----	 186
가. 재료 및 방법-----	186
1) 실험동물-----	186
2) 실험군의 분류-----	187
3) 시료의 제조-----	187
4) 시료의 투여-----	187
5) 체중 및 장기의 중량계측-----	188
6) 생화학적검사(AST, ALT, TG, Cholesterol)-----	188
7) 간조직내의 Alcohol Dehydrogenase (ADH) 측정-----	188
8) 통계처리-----	189
나. 결과 및 고찰-----	189
1) 성장과 체중변화량 및 장기중량변화-----	189
2) 장기의 중량-----	190
3) 생맥산 투여군의 혈청 AST, ALT 효소활성도 변화-----	191
4) 혈청의 총 콜레스테롤과 중성지방의 함량-----	193

5)알코올 대사효소 활성-----	195
6)예비실험에 의해 개발된 P-1의 안전성 연구-----	197
2. 한약재로부터 개발된 P-1의 항고혈압, 항고혈장 지질에 미치는 기능성 연구 -----	199
가. 실험재료 및 방법-----	197
1) MTT Assay -----	199
2)동물실험모델을 이용한 아급성 독성 검사 연구-----	199
나. 실험 결과-----	204
1) MTT assay-----	204
2) 아급성 독성 검사 연구-----	205
3. 시제품 생맥산두부의 항고혈압, 항고혈장 지질에 미치는 기능성 연구-----	212
가. 실험재료 및 방법-----	212
1) 실험동물-----	212
2) 실험군의 분류 -----	212
3) 시료의 제조-----	213
4) 시료의 투여-----	213
5) 부검 -----	213
6) 체중 및 장기의 중량계측-----	214
7) 생화학적 검사(Cholesterol, TG) -----	214
8) 통계처리-----	214
나. 실험결과 및 고찰-----	215
1) 성장과 체중변화량 및 장기중량변화-----	215
2) 장기의 중량-----	215
3) 혈장의 총 콜레스테롤과 중성지방 함량-----	218
다. 참고문헌-----	222

제 1 장 서 론

제 1 절 연구개발과제의 개요

1. 연구개발의 필요성

두부는 오래 전부터 우리 나라를 비롯, 중국·일본 등 동양권에서 널리 이용되는 식품으로 문헌에 의하면 2000년의 역사를 갖는다. 이렇게 긴 역사와 전통을 가진 두부가 현재까지 변치 않고 전래되어 온 것은 타 식품에 비해 맛이 담백하고 만족감이 있으며, 동물성 단백질에 비견할 만한 필수아미노산을 고루 갖추고 있는 두부 고유의 특성 때문이라 할 수 있다. 60, 70년대까지만 하더라도 두부는 단백질식품으로 국민건강에 큰 역할을 했으며, 최근에는 과도한 영양섭취 및 비균형성 음식으로 인한 비만이나 성인병에 대비키 위한 건강식품으로서도 각광 받는 식품으로 부상했다. 또한 두부는 해마다 4,000억원 이상이 판매되는 중요한 전통식품이나, 전 근대적인 유통구조, 화학용고제의 이용 등으로 인하여 소비자들로부터 불신을 받고 있는 대표적인 식품의 한 예가 되고 있다.

최근의 통계에 의하면 1970년까지 두부가공에 이용된 콩은 (1970년도에는 약 26만톤) 전량 국산콩으로 충당이 되었으나, 1997년부터는 두부가공에 이용된 콩은 거의 전량이 (년간 약 120 만톤) 수입콩인 것으로 알려졌다. 국내산 콩의 낮은 자급률은 국산콩의 높은 가격 (국산콩 2000원/kg, 수입콩 700원/kg)에 따른 경쟁력 저하와 이에 따른 콩 재배면적의 감소와 콩의 낮은 단보당 수익률 등에 기인한다. 이와 같이 국산콩은 가격적인 측면에서 수입산에 비해 그 격차가 5~6배 차이가 남으로 국산콩의 경쟁력을 향상시켜 자급율을 끌어올리기 위하여서는 무엇보다도 국산콩과 국산콩가공제품의 우수성을 과학적으로 입증하여 소비를 적극적으로 유도해야 할 필요가 있다. 따라서 우리 나라 각 지방에서 나는 전통콩의 기능성 및 가공특성의 우수성을 입증하고 이를 이용하여 고 기능성 두부를 개발할 경우 콩의 수요가 높아져 농어민의 소득 증대에

기여하는 바가 매우 클 것으로 본다.

두부에는 단백질, 지질, 탄수화물이 각각 55-60%, 40-45%, 6-8%들어 있는 고단백 식품일 뿐만 아니라 생리활성기능을 수행하는 물질들이 함유되어 있음이 밝혀졌다. 두부는 질병의 방지와 회복 및 노화방지 기능을 갖는 물질이 존재하며 그 중요성이 강조되고 있다. 그러나 이와 같은 연구는 주로 미국을 비롯한 일본 등의 선진국에서 진행되어 온 바, 우리나라 고유의 대두 품종을 이용한 두부에 대하여서는 체계적인 연구가 아직 진행되지 못한 상태에 있다. 우리나라 국민소득의 급격한 향상은 국민 식생활 수준을 높이고 그 체계를 육식위주로 변화시켰으나 이로 인하여 각종 성인병의 발생빈도가 높아져 국민 의료비의 과중한 부담이 국가 경제적 차원에서 위기감을 자아내기에 이르렀다. 이와 같은 성인병을 두부로 예방할 수 있으며 한편으로 국민으로 하여금 높은 연간 30억달러에 해당하는 의료비의 부담을 덜어 줄 뿐만 아니라, 건강한 생활을 도모할 수 있도록 한다는 점에서 이점이 있다. 따라서 국산콩을 이용한 두부의 우수성을 과학적으로 입증함으로써 국민의 건강을 증진시킬 수 있다. 두부는 영양적인 측면에서 풍부하고 기능면에서 성인병의 예방과 치료에 효과가 있기 때문에 이와 같은 기능성 식품의 식생활 체계의 도입을 국민에게 건강하고 밝은 사회문화생활을 영위하게 한다. 각종 성인병으로 인한 국민의존의 가중을 두부로 예방함으로써 가계의 경제생활을 풍요롭고 원활하게 할 수 있다.

두부제조에서 콩 다음으로 중요한 원료인 응고제는 화학 물질로서 식품 첨가 물질인 황산칼슘($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 분자량 172.27), 염화마그네슘($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 분자량 203.30), 글루코노델타락톤($\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_6$ 분자량 178.15), 염화칼슘($\text{CaCl}_2 \cdot 0 \sim 2\text{H}_2\text{O}$)등의 단일품과 그것들을 혼합한 복합체만이 사용할 수 있는 첨가물로 허용되어 있다. 실제로 우리나라에서 가장 많이 쓰이고 있는 응고제는 황산칼슘으로 전량 중국으로부터 수입되고 있으며 복합체는 주로 일본에서 많이 사용되고 있다. 전통적으로 2000년 동안 쓰여진 응고제로인 천일염에서 흘러나오는 간수는 이물질 등의 혼입으로 인한 위생상의 문제점이 야기되어 지금은 거의 사용치 않고, 대신 위에 열거한 4종류의 화학물질 응고제가 쓰여지고 있다. 그러나 이들 화학 응고제는 건강에 관심이 높은 소비자들에게 우려의 대상이 되고 있다. 소비자 단체가 실시한 한 설문조사에 의하면 45 % 이상의 주부는 값이 다소 비싸다 하더라도 화학 응고제 대신 천연 간수를 이용한 제품의 구

매의사를 밝히고 있다. 따라서 기존의 화학 첨가제를 대체할 수 있는 천연 응고제의 개발이 절실한 상태이다. 두부응고 시 주로 사용되는 염(금속이온에 의한 응고)은 신장병, 고혈압등 성인병환자들은 물론 건강한 사람에게도 좋지 않으며 또한 소금의 맛이 강하게 되면 두부 고유의 맛을 떨어뜨릴 수 있으며 짠맛이 강하게 난다. 이때 짠맛을 제거하기 위해 두부 응고 후 장시간 물에 담가 염분 및 짠맛을 제거하는 과정을 거치게 되는데, 시간과 제조단가를 낮추기 위해서 석회두부와 같은 불량 두부를 만들게 하는 원인이 되기도 한다. 따라서 염분이 함유되지 않은 천연물로부터 두부응고제를 개발하는 것이 중요하며 이러한 두부 응고제가 개발될 경우 한국, 일본, 중국 등지에서 그 산업성은 무궁무진할 것으로 판단된다.

또한, 최근에는 유전자재조합 농산물(GMO)이 국내에 다량 수입되어 유통되고 있는데, 1997년에 총 수입량 162만톤 중 49만톤이 GMO 콩일 것으로 추정된다. GMO 농산물로 만든 두부는 알레르기 유발 문제, 항생제 내성 문제, 독성 문제 등 안전성에 관한 논란이 끊임없이 제기될 수 있으므로, 이는 우리에게 중요한 관심사가 아닐 수 없다. 따라서 본 연구에서는 어떠한 품종의 국내산 대두가 두부 등의 1차 가공식품제조에 적합한가를 성분적, 이화학적 및 가공적 측면에서 알아내고, 동시에 가공된 제품의 상품적 특성을 부각시켜 국내산 콩의 소비를 진작 부각시키고, 아울러 국민건강을 증진시키는 데 궁극적인 목표가 있다.

2 연구의 목적

본 연구의 목적은 다음과 같다:

-용도 별로 구별되어 있는 재래식 국산콩의 우수성을 과학적으로 입증하여 저가의 수입콩에 의해 잠식되어 있는 국산콩의 자급률을 50%이상으로 높이는 한편 부가가치가 높은 기능성두부를 개발하여 국내 두부시장의 활성화는 물론 성인병에 치료효과가 있는 두부의 수출을 통해 우리 나라 식품산업을 활성화하며,

-익기생진(益氣生津)의 효능이 있어 대표적인 인체 생리활성 한약재인 인삼, 황기 외 3종으로 구성된 한약처방(이하 P-1으로 표기)이 기존의 두부응고제인 염화칼슘 등과 비교하여 더욱 빠른 시간 안에 두부를 응고시키는 독창적인 효과를 확인하여 이에 대한 보다 심층적인 연구를 위해 연구제안서를 제출하고자 한다.

3. 연구의 범위

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차년도 (2001 - 2002)	<p><주관기관 연구과제></p> <ol style="list-style-type: none"> 1.선발된 콩 품종의 성분분석 2.한약재로부터 두부응고제의 개발 3.개발된 천연물의 인체 생리활성 기능성 연구 4.예비실험에 의해 개발된 P-1 및 구성성분의 항피로, 항산화 생리 활성 기능성 연구 5.P-1의 이화학적 성분 추출 및 분획 6.P-1구성 약재의 crude extract에 대한 기준지표 설정 7.두부의 기능성 성분 분석 8.두부제조에 영향을 미치는 인자 연구 <p><협동기관 연구과제></p> <ol style="list-style-type: none"> 1.한약재로부터 개발된 두부응고제의 항고혈압, 항고혈당 지질에 미치는 기능성 연구 2.예비실험에 의해 개발된 P-1의 안전성 	<p><주관기관 연구과제></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 선발된 콩 품종의 단백질 종류 및 함량 연구 및 콩 품종의 지질 (인지질) 분석 2. 한약재에서 두부 응고제 screening 실험 3. P-1 구성 한약재의 두부 응고 screening 연구 4. P-1 의 생리활성, 항피로, 항산화 기능성 실험(In vivo) 5. P-1의 추출 및 추출성분에 대한 용매의 특성(비극성→극성)을 이용한 1차분획 6. crude extract에 대한 HPLC/GC/UV-Vis 기준지표 확립 7. P-1 fraction screening 실험 8. 두부의 기능성 성분 분석 (phytate, isoflavone, saponin) 9. - 전통적 두부제조방법 연구 - 수분, 침지시간, 온도, 응고제의 영향 <p><협동기관 연구과제></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 예비실험에 의해 개발된 P-1의 항고혈압, 항고혈당 지질에 미치는 효능 연구 2. 예비실험에 의해 개발된 P-1의 급성 독성 연구
2차년도 (2002 - 2003)	<p><주관기관 연구과제></p> <ol style="list-style-type: none"> 1.한약재로부터 두부응고제의 개발 2.개발된 천연물의 인체 생리 활성 연구 및 분획 3.검색된 분획(P-1 및 P-m)에 대한 2차분획 4. 두부의 품질연구 5.두부의 기능성 성분 분석 <p><협동기관 연구과제></p> <ol style="list-style-type: none"> 1.한약재로부터 개발된 두부응 고제의 항고혈압, 항고혈당지질에 미치는 기능성 연구 2.예비실험에 의해 개발된 P-1의 안전성 연구 	<p><주관기관 연구과제></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 한약재에서 두부 응고제 screening 실험 2. 한약재의 생리활성, 항피로, 항산화 기능성 실험 3. P-1 구성한약재 중 두부응고 기능을 가진 단일 한약재(이하 P-m으로 표기) 각 fraction의 두부 응고 screening 연구 4. P-1 및 P-m의 1차 분획물 중 두부응고 기능성 및 생리활성기능을 가지는 분획물에 대한 chromatography(flash silica gel, TLC, size exclusion, ion exchange)를 이용한 2차분획 5. 두부의 texture, 색깔, 관능적 특성 검사를 통한 생산조건 연구 6. 두부의 기능성 성분 분석 (phytate, isoflavone) <p><협동기관 연구과제></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 개발된 두부응고제의 항고혈압, 항고혈당지질에 미치는 효능 연구 2. P-m의 급성 독성 연구

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
3차년도 (2003 - 2004)	<p><주관기관 연구과제></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 한약재로부터 두부응고제의 개발 2. 시제품의 항피로, 항산화, 생리활성 기능성 연구 3. 검색된 분획물로부터 유효 단일물질 분리, 정제, 구조결정 연구 4. 두부제조방법의 최적화 5. 저장성이 향상된 두부 생산 <p><협동기관 연구과제></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 시제품의 항고혈압, 항고혈장지질에 미치는 기능성 연구 2. 유효성분의 안전성 연구 	<p><주관기관 연구과제></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 한약재에서 두부 응고제 screening 실험 2. 시제품의 생리활성, 항피로, 항산화 기능성 실험(<i>In vivo</i>) 3. P-1 구성한약재 중 두부응고 기능을 가진 단일한약재(P-m)의 각 단일 peak의 두부 응고 screening 연구 4. P-m의 2차 분획물로부터 유효 활성단일물질의 분리, 정제 (HPLC) 5. 분리, 정제된 유효 활성단일물질에 대한 구조결정 (UV/Vis, AA, FT-IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, HRMS) 6. 응고제 종류에 따른 두부의 제조방법의 최적화 - 수율, 품질분석 7. 방부제의 처리 없이 저장성이 향상된 두부 생산 - 탈피된 자엽부를 이용한 두부의 생산 - High pressure steam으로 전 처리된 자엽부를 이용한 두부의 생산 <p><협동기관 연구과제></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 시제품의 항고혈압, 항고혈장지질에 미치는 효능 연구 2. 유효성분의 급성 독성 연구

제 2 절 국내외 기술개발 현황

1. 국내

두부와 관련된 연구결과는 다수 있지만 전통콩을 이용한 두부 및 새로운 응고제에 대한 연구는 국내외적으로 아직 전무한 실정이다. 현재 국내의 두부관련 연구를 조사하려 보면 장등(1995)은 농촌진흥청에서 추천한 14가지 장려 콩품종을 대상으로 두부를 제조하여 콩과 두부의 화학적 조성, 텍스츄어 특성과 관능적 특성 등이 보고된 바 있다. 품질간 두부 수율은 수분, 단백질, 탄수화물 등 화학적 조성과의 일정한 관계가 있으며 텍스츄어 특성은 품종간의 차이가 많음을 보고하였다. 그러나 아쉽게도 수입콩과 비교하여 품종별 연구는 전무한 상태이다. 여러 재래품종 콩 가운데 약리효과가 있으며 단백질 함량이 비교적 높은 쥐눈이콩, 검정콩, 준주리콩 등을 이용한 두부의 제조 연구는 시급한 상태이다. 대두단백질을 여러 순환기계 질병을 예방할 뿐아니라, 치료효과가 있음이 보고되고 있는데, 이와 더불어 전통적으로 뇌졸중 등의 약리효과가 있다고 알려진 재래품종 콩을 이용한 제품에 관한 연구는 절실한 상태이다. 그 밖에 두부의 보존에 대한 연구에서 송등은 침지수의 pH를 조절하여 두부 저장 시험을 한 결과, 0.15~0.2%의 초산수에 계속 침지하면 30℃에서도 100시간이나 보존할 수 있다고 하였다.

2. 국외

두부제조에 관한 국외 문헌을 보면, Wang등은 콩품종에 따른 두부의 수득율과 품질을 조사하였는데, 각각 5가지 품종의 미국산 대두와 일본산 대두로 두부를 제조한 결과 원료콩의 단백질 함량이 높을수록 두부의 단백질 함량은 증가하고, 가공과정 중 콩으로부터 단백질 추출율이 증가할수록 두부 수득율도 증가한다고 하였다. Cai등은 대만산 콩과 미국산콩을 사용하여 두부를 제조하여 두부품질 특성과 수율을 비교하였다. Hou등은 일본산과 미국산 대두를 품종별로 콩의 이화학적 특성과 두부를 제조하여 품질특성과 수율을 고찰하였는데, 그들의 연구 결과에 의하면 품종간의 이화학적

특성에는 차이가 있었으나 제조된 모든 두부에서는 두부고유의 맛과 texture를 갖고 있었으며 두부 수율, 단백질 회수율과 두부의 경도, 또한 두부의 성분, 색상에서는 차이가 있었다. 대두품종이 두부의 품질특성에 미치는 영향은 큰 것으로 생각되며, 따라서 적절한 품종을 선택함이 양질의 두부제조에 필수적 요건이다. 그밖에 두부제조에 관한 연구 및 개발에 힘써 일반두부 이외 제품의 다양화뿐만 아니라 2차 가공품의 개발이 절실히 요구되며 제품에 대한 품질관리를 철저히 실천하여 고급화를 유도해야 할 것이다.

3. 앞으로 전망

콩은 그 생산량이 많은 미국, 캐나다, 중국에서보다 90%이상을 수입하는 우리나라에 더욱 중요한 식량자원이므로 국내산 콩의 고부가가치화를 통한 자급율을 늘리는 것을 농림부정책과 국가안보 적인 차원에서 매우 중요한 일이다. 이를 달성하기 위하여 고기능성 두부와 같은 콩제품의 개발은 필수적인 선결 과제이다. 나아가서 국가적인 차원에서 범국민적 식생활 체제를 두부와 같이 저렴하고 기능성 있는 식품을 고려하여 장려한다면, 가까운 미래에 국민의 의료비 부담을 줄일 수 있을 뿐만 아니라 국민 모두가 건강한 생활을 영위할 수 있을 것으로 판단된다. 또한, 최근에는 유전자재조합 농산물(GMO)이 국내에 다량 수입되어 유통되고 있는데, GMO 농산물은 알레르기 유발 문제, 항생제 내성 문제, 독성 문제 등 안전성에 관한 논란이 끊임없이 제기되고 있으므로 콩을 제 2의 주식으로 하고 있는 우리에게 중요한 관심사가 아닐 수 없다. 안전성이 입증되지 않은 GMO 콩은 향후 10년 내에 미국수출 농산물의 95%를 차지할 것으로 예상되고 있는데, 따라서 파장적인 수입콩의 공세에 대한 국산콩의 과학적이며 다각적인 대응이 요구된다. 따라서 본 연구에서는 우리 나라 고유의 콩의 기능적 특성과 상품적 특성을 부각시켜 국내산 콩의 소비를 진작 부각시키고, 아울러 국민건강을 증진시키는 데 있다.

제 2 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절. 제 1세부 과제

제1세부 과제 (1차년 : 강현민)

세부과제별 연구기관	연구책임자	당해연도 소요예산
용인대학교	강 현 민	45,000,000원

연구 결과 :

두부는 오래 전부터 다양한 요리로 식탁에 제공되어진 콩으로 만든 전통 식품중의 하나로 보통 흰색을 띠는 균일하고 부드러운 질감을 갖는 중요한 단백질 공급원이다. 두부의 제조는 물에 불린 대두를 물을 가해 마쇄하는 과정에서 녹아 나온 각종 염에 의해 대두 단백질의 주성분인 글리시닌(glycinin)이 가용화되고 가열에 의해 트립신 저해제등과 같이 대두단백질의 소화흡수를 저해하는 물질이 변성되고 단백질이 disulfide 결합, 수소결합 및 소수결합에 의해 응집되어 gel화 된 후 염농도 증가에 의해 침전되거나 산에 의해 등전점(pH 4.2~4.6)에서 침전되는 성질을 이용한다. 본 연구에서는 오미자 추출물에는 무기이온이 Ca 86ppm, Mg 28ppm, Na 101ppm, Al 45ppm등이 함유되어 있으나 이 정도의 농도로서는 두부를 응고시키기에는 충분하지 못하지만, 이러한 무기금속이온들이 동일한 pH를 가지는 용액보다 이온세기를 증가시켜 두부응고 입자가 커진다고 생각된다. 그러므로 오미자 추출액 속에 포함되어 있는 유기산의 농도 및 무기가

온들이 모두 영향을 미친다고 사료된다. 특히 오미자 추출물의 농도가 3%, 5%인 경우에는 두부 응고가 잘 되지를 않았으며, 농도가 20%이상인 경우에도 입자 매우 작게 침전이 되므로 두부 성형이 잘 안된다. 그러므로 최적의 오미자 추출물의 농도는 10% 정도이고 전체 유기산의 농도로 보면 10%~15%와 약간의 무기금속이온들을 포함하고 있어야 한다. 또한 오미자 추출액은 오랫동안 보관하기가 어렵기 때문에 진공 냉동 건조하여 분말화하여 사용하는 것도 좋은 방법이 될 것이다.

1. 제1세부 과제 (1차년 : 강현민)

세부과제별 연구기관	연구책임자	당해연도 소요예산
용인대학교	강 현 민	45,000,000원

제 목 : 오미자즙을 이용한 두부 응고 반응에 관한 연구

가. 재료 및 방법

1) 실험재료-120여종의 한약재 및 13종의 한약 처방을 스크리닝하여 오미자 및 오미자를 포함한 생맥산이 대두단백질 응고 기능이 뛰어나다는 예비실험 연구결과를 얻었다. 생맥산은 동의보감을 비롯한 전통의학서에 보혈, 양혈하며, 폐음허(肺陰許)로 인한 권태무력(捲怠無力)·호흡곤란·현기증·해수·열감(熱感) 등의 치료 기능을 갖는 대표적인 처방으로 기록된 약으로^{17, 18)} 이의 구성약재는 오미자, 맥문동, 인삼, 황기이다. 따라서 본 연구에서는 예비실험 연구결과에 따라 생맥산에 호박을 가미하여 이를 생리활성 기능을 갖는 두부응고제로 개발키로 하였으며 본 연구에서 사용된 가미호박 생맥산(생맥산에 호박을 가미한 처방)의 구성 한약재는 2000년 10월에 경동시장에서 구입하여 사용하였다. 생맥산과 가미호박생맥산의 구성성분인 오미자, 맥문동, 황기, 호박의 학명 및 주치, 적응증은 아래와 같다.

2) 생약 엑기스의 제조-가미호박생맥산은 오미자, 맥문동, 황기, 인삼, 호박 각 60g(총 300g)에 증류수 1500 ml을 넣어 2시간 30분 동안 약탕기(대용약탕기)에서 추

출한 후 가제를 이용하여 1차 여과하고 8000 xg에서 15분간 원심분리한 액기스를 4℃에 보관하였다가 사용하였고 가미호박생맥산을 구성하는 주요 한약재인 오미자는 이 한약재 150g에 증류수 1500 ml을 넣어 2시간 30분 동안 약탕기(대응약탕기)에서 추출한 후 가제를 이용하여 1차 여과하고 8000 xg에서 15분간 원심분리한 액기스를 4℃에 보관하였다가 시료로 사용하였다.

3) 실험 시료의 분류

- No. 1 두유액 + 가미호박생맥산 추출물
- No. 2 두유액 + 오미자 추출물
- No. 3 두유액 + 20% Mgcl₂ 용액(양성대조군)
- No. 4 두유액 + 증류수(음성대조군)

두부의 제조

- Bean powder 100g에 D.W. 1000ml을 첨가하여 통상 10% 두유 액으로 만든 후
- 잘 저으면서 상기 시료를 40분간 끓이고
- 이때 기포가 생기면 4-5 방울의 soybean oil을 첨가하였다.
- 끓인 두유액을 gauze 사용하여 필터 후 soybean milk와 bean curd refuse를 분리하였다.
- soybean milk를 92⁰C까지 식힌 후 50ml의 soybean milk를 beakers에 분주하였다.
- 10%(v/v, 5ml)의 herb 추출물을 각각의 beakers에 첨가하여 섞은 후 실온에 1시간 방치하였다.
- 최초 bean powder 100g 에 대해 시료 2g 의 비율로 첨가
- Herb complex는 (v/v)으로 soybean milk 50ml(5g)에 대해 시료 5ml의 비율로 첨가
- Control인 Mgcl₂는 soybean milk 50ml (5g)의 2%(0.1g) 첨가
(즉, 20% Mgcl₂ 용액 0.5ml 첨가)
- 1시간 후 각각의 시료의 사진을 찍어 응고정도를 확인하였고, 1.5ml eppendorf tube에 시료를 옮긴 후 6000rpm에서 5분간 원심 분리하여 그 상층액의 pH와

O.D.(280nm, 600nm)를 측정하여 응고 정도를 확인하였다.

pH의 변화에 따른 두부응고의 변화를 확인하기 위해 각각의 시료를 1.5 ml eppendorf tube에 옮긴 후 pH를 중성 pH인 7.0으로 맞춘 후 이들 시료를 상온에 24시간 방치 후 6000rpm에서 5분간 원심 분리하여 그 상층액의 O.D. (280nm,600nm) 값을 측정하였다.

나. 결과 및 고찰

실험 시료의 분류

No. 1 두유액 + 가미호박생맥산 추출물

No. 2 두유액 + 오미자 추출

No. 3 두유액 + 20% MgCl₂ 용액(양성대조군)

No. 4 두유액 + 증류수(음성대조군)

Table 1. Sample 첨가 후 1hr 경과시 응고 실험

	육안		pH		O.D. (280nm)		비고
			시료	두유 상층액	시료	두유 상층액	
No. 1	입 자 +		4.38	6.15	1.603	29.66	
	Gel 化 +						
No. 2	입 자 -		6.03	6.57	2.728	194.1	
	Gel 化 -						
No. 3	입 자 +++		3.44	5.58	0.422	2.790	
	Gel 化 ++						
No. 4	입 자 -		5.85	6.45	0.493	784.0	cfg. 후 pellet 형성되지 않음
	Gel 化 -						
No. 5	입 자 +		3.91	6.08	0.752	24.61	
	Gel 化 +++						
No. 6	입 자 +		3.83	5.96	0.962	2.825	
	Gel 化 ++++						
No. 7	입 자 ++		3.61	5.77	0.261	2.790	
	Gel 化 ++++						
No. 8	입 자 ++		3.84	5.93	0.971	2.852	
	Gel 化 +++						
No. 9	입 자 ++		3.74	5.84	0.957	2.887	
	Gel 化 +++						
No. 10	입 자 -		5.62	6.52	1.305	171.1	cfg. 후 pellet 형성되지 않음
	Gel 化 -						
No. 11	입 자 ++		3.21	5.20	1.050	2.790	
	Gel 化 ++++						
No. 12	입 자 +++		3.06	4.85	1.045	2.790	
	Gel 化 +						
No. 13	입 자 -		5.60	6.51	0.937	184.2	cfg. 후 pellet 형성되지 않음
	Gel 化 -						
control	입 자 ++			6.08		2.790	20% Mgcl ₂ 1ml 첨가. 즉, 4%
	Gel 化 ++++						

Soybean milk를 92⁰C까지 식힌 후 가미호박생맥산 및 오미자 추출물, 양성대조구인 MgCl₂를 첨가하여 섞은 다음 1시간 실온에서 응고시킨 후의 pH 및 O.D. 값은 Table 2와 같다.

Table 2. pH and O.D values of each test sample at 1 hour after soybean milk coagulation.

	pH	O.D (280nm)	O.D (600nm)
No. 1	5.57	2.741	0.038
No. 2	5.09	2.741	0.052
No. 3	6.27	2.869	1.342
No. 4	6.80	2.097 × 10 ²	2.262 × 10

두부응고 1시간 후 각 시험군의 pH를 중성 pH인 7.0으로 맞춘 후 O.D 값을 측정한 결과 가미호박생맥산 추출물(pH 4.0) 및 오미자 추출물(pH 3.1)이 비교적 강한 산성 pH 이므로 이들 시료를 두유액에 첨가한 후 pH의 변화에 따라 두부응고의 정도가 변화하는지를 확인하기 위해 두유액과 가미호박생맥산 추출물(pH 4.0) 및 오미자 추출물(pH 3.1)을 섞어 응고가 시작된 지 1시간 후 각각의 시료를 1.5 ml eppendorf tube 에 옮겨 pH를 중성 pH인 7.0으로 맞춘 후 이들 시료를 상온에 24시간 방치 후 6000rpm에서 5분간 원심 분리하여 그 상층액의 O.D.(280nm, 600nm) 값을 측정한 결과 Table 3 과 같았다.

Table 3. pH and O.D values of each test sample(pH values raise to 7.0) at 1 hour after soybean milk coagulation.

	pH	O.D (280nm)	O.D (600nm)
No. 1	7.00	2.741	0.063
No. 2	7.00	2.684	0.045
No. 3	7.00	2.838	1.380
No. 4	7.00	2.274 × 10 ²	0.665 × 10 ²

즉, 각각의 시료의 pH를 7.0으로 올린후 No. 1(두유액 + 가미호박생맥산 추출물)은 280nm에서 2.741, No. 2(두유액 + 가미호박생맥산 추출물)는 2.684, 양성대조구인 No. 3(두유액 + Mgcl2)는 2.838의 수치를 나타내 pH를 7.0으로 올리기 전과 차이를 보이지 않았고 600nm에서의 O.D 값을 측정한 결과도 No. 1(두유액 + 가미호박생맥산 추출물)과 No. 2(두유액 + 가미호박생맥산 추출물)는 각각 0.063 및 0.045, 양성대조구인 No. 3(두유액 + Mgcl2)는 1.380의 수치를 나타내 pH를 올리기 전과 실험 오차 범위 내의 유의성 없는 오차를 보였을 뿐이다. 따라서 pH의 변화가 가미호박생맥산 추출물 및 오미자 추출물의 대두단백질을 응고시키는 능력에 아무런 지장을 주지 않는다는 것을 확인할 수 있었다.

다. 결 론

1. 가미호박생맥산 및 오미자 추출물은 기존의 두부 응고제인 염화칼슘에 비해 대두 단백질의 응고 속도 및 응고 량을 증가시키며, 또한 염화칼슘과 비교 해 두유액의 응고를 유의성 있게 증가시키는 연구 결과를 나타내었다.
2. pH의 변화가 가미호박생맥산 추출물(pH 4.0) 및 오미자 추출물(pH 3.1)의 대두 단백질, soybean milk의 응고능에 아무런 지장을 주지 않는다는 연구 결과를 나타내 pH 안정성 두부응고제로의 개발 가능성을 나타내는 연구 결과를 확인할 수 있었다.
3. 상기의 연구 결과에 따라 가미호박생맥산을 응고제로 하여 개발되는 두부는 가미호박생맥산의 익기생진(益氣生津), 렴음지한(斂陰止汗), 이수(利水)·해열(解熱)·노폐물 제거·강장효과 등, 성인병 예방, 치료 및 인체 생리활성 효능 과 대두 단백질의 순기능 및 특히 11S 대두 단백질이 갖는 심혈관 질환 예방, 치료 효과를 동시에 지닌 고기능성 두부의 개발이 가능하며 따라서 한국, 일본, 중국 등지에서 고부가가치를 갖는 기능성 식품으로 생산 할 경우, 그 산업성 및 경제적 파급 효과는 막대할 것으로 판단된다.

: 1차년도에 연구 100% 달성

2. 제1세부 과제 (2차년 : 강현민)

세부과제별 연구기관	연구책임자	당해연도 소요예산
용인대학교	강 현 민	45,000,000원

제 목 : 오미자즙을 이용한 두부 응고 반응에 관한 연구

가. 서 론

인간은 역사 이래 오래전부터 우리 주변의 식물을 채취하여 수천년에 걸쳐 식용과 약용으로 이용하여 왔으며, 인류 생활의 시작과 함께 식생활 문화도 밀접하게 관련되어 변천하고 있다. 급속한 산업화 과정에 따라 가공 식품류가 다양해지고 이에 따라 새로운 식품도 매우 빠른 속도로 개발되고 있다. 동·서양을 막론하고 예로부터 식품이 우리 몸의 건강을 유지시키는 식량으로서의 역할뿐만 아니라 질병을 예방하고 치료하는 약의 기능을 수행하고 있다. 이러한 시대적 요구에 부응하여 식품의 생리활성 물질 또는 기능성 물질들의 상품화가 증가되고 있으며, 국가마다 이 기능성 식품들의 정의, 종류, 품질관리 및 법적 근거를 마련해야 하는 당면과제들을 안고 있다. 이러한 기능성 식품의 이용 역사는 상당히 길지만 이를 명확히 정의하여 사용한 시간은 상대적으로 매우 짧기 때문에 국가 또는 지역에 따라서 매우 다양하다. 즉 기능성 식품을 생리적 식품(physiological functional food), 의료 식품(medical food), 치료성 식품(therapeutical food), 건강 식품(health food), 건강기능성 식품(health functional food), 구상식품(designer food), 특정 보건용 식품, 영양 약리제(neutraceutical)등으로 불리우고 있다. 기능성 식품은 관례적으로 식품 성분이 갖는 생체 방어, 생체 리듬의 조절, 질병의 예방과 치료등 생체 조절 기능을 충분히 발휘할 수 있도록 설계되고, 가공된 식품이라고 정의 할 수 있다. 현재 우리나라는 2002년 8월 26일에 건강 기능식품에 관한 법률 제 6727호가 제정되어 있다. 이 중 “건강보조식품이라 함은 건강보조의 목적으로 특정성분을 원료로 하거나 식품원료에 들어 있는 특정성분을 추출, 농축, 정제,

혼합등의 방법으로 제조·가공한 식품을 말한다”라고 정의하고 있다. 특히 대두는 콩과(Leguminosae)에 속하며 학명은 *Glycine max* MERRILL이고 1년생 식물에서 생산된다. 대두중에는 수분 9.2%, 당질 21.6%, 지방질 17.6%, 단백질 41.3%, 섬유소 4.7%, 회분 0.0058%, 비타민등이 함유되어 있다. 콩은 여러 생리 활성 물질들을 함유하고 있어서 동맥경화, 골당공증, 지방간, 변비, 암등의 예방효과가 있다고 알려져 있다. 그러나 날콩 중에는 단백질을 분해하는 효소인 트립신의 작용을 방해하는 트립신 저해제(trypsin inhibitor)가 포함되어 있어 장내에서 소화, 흡수를 저해한다. 또한 날콩에는 혈구를 응집시키는 단백질인 lectin, phytohemagglutinin등이 들어있기 때문에 건강에 해로울 수 있다. 그러므로 날콩은 유해물질 파괴와 소화율의 향상을 위해서도 반드시 충분히 가열처리하여 식용을 하여야 한다. 이와 같은 콩을 소재로하는 식품들이 대두 요구르트, 두부, 유부, 이유식등 다양하다. 그러나 일반 소비자들이 손쉽게 구입할 수 있고 요리하기 쉬운 콩의 가공식품중에 가장 좋은 것이 두부라 사려된다. 본 연구에서는 두부를 제조하는데 있어서 오미자 추출물인 식물성 천연 응고제를 이용하여 기능성 두부를 제조하고, 이때 오미자 추출물 성분을 분석하여 두부응고에 미치는 영향을 알아본다. 오미자(*Schizandra Chinensis Baillon*, Omija)는 목련과(Magnoliaceae)에 속하는 것으로 중국, 일본, 대만 및 우리나라 전지역에서 자생하는 식물로 오미를 가지고 있으며, 한방의학면에서 널리 이용되어 왔다. 또한 오미자를 이용한 식품으로 오미자, 오미자쥬스, 오미자등으로 가공하여 이용되기도 하였다. 이러한 오미자는 열매는 강한 항산화성을 가지고 있어서 천연 항산화제로도 이용되고 있다. 이렇게 한방의학적 연구 및 약리학적 연구등에 대한 보고는 많이 있으나, 식품적인 면에서 오미자 성분의 영양성분을 규명하기 위한 연구는 시도하였지만 체계적인 연구는 아직 미흡한 실정이다. 본 연구에서는 통상적으로 사용되는 두부응고제인 간수, 염화칼슘, 염화마그네슘등을 사용하지 않고, 인체에 해가 없는 무간수두부를 제조하는데 필요한 천연 응고제, 즉 오미자 추출액을 이용하여 새로운 약리성을 가지는 기능성 두부를 제조하고, 이때 오미자 추출액의 성분을 분석하여 어떤 성분이 오미자의 응고작용을 하지는 규명함으로써 우리나라 국민의 건강증진에 매우 중요한 역할을 할 것으로 사려된다.

나. 연구개발의 필요성

21세기를 들어서 우리의 생활수준이 향상됨에 따라 건강 및 장수에 대한 관심이 높아지고 현재 well-being시대에 발맞추어 성인병, 퇴행성 질환, 대사성 질환등이 증가하고 있다. 이에 따라 약물에 의한 치료 못지 않게 중요한 것이 부작용 및 거부감이 적은 식품을 저렴한 가격으로 손쉽게 구입할 수 있는 천연식품, 즉 가공성, 기능성 식품으로서 질병의 예방 및 치료에 대한 효과가 있는 식품개발이 매우 필요하다. 기능성 식품의 분류는 다음과 같다.

1) 식품 소재(food source)에 의한 분류

기능성 식품을 소재에 따라서 식물성, 동물성 그리고 미생물식품등으로 분류한다.

2) 활성기전(mechanism of action)에 의한 분류

기능성 물질의 소재와 관계없이 생리적인 특성별로 분류한 것으로 항암성, 혈중 지질 관련성, 항산화성, 항염증성, 골형성등으로 분류한다.

3) 화학적 성질에 의한 분류

화학적 성질에 의한 분류는 매우 다양하며, 새롭게 발견, 추가되고 있다. 현재는 이소프레노이드계(isoprenoids) 및 테르페노이드계(terpenoids), 페놀 화합물(phenolic compounds), 유기합황 화합물, 당질 및 그 유도체, 지방질, 아미노산 및 단백질, 비타민, 무기질등이 있다.

본 연구에서는 상기에 있는 기능성 식품 분류중에 천연 존재하는 3가지 기능을 모두 가지고 있는 콩류를 이용한 가공식품의 개발이 매우 필요하다고 생각된다. 특히 대두는 주성분인 단백질보다 콩기름 가공에 주로 사용되고 있으며, 부산물로 생산되는 탈지대두분은 대부분이 사료로 이용되고 있다. 전 세계 대두 생산의 67.3%가 탈지대두분으로 가공되고 있는 실정이다. 이중 축육제품, 수산제품, 제과, 제빵등 가공식품의 품질개량등에는 그 사용량이 매우 적어 지속적인 연구 개발이 요구되고 있다. 한편 두부는 오랫동안 우리의 부족한 단백질 섭취를 보충하기 위한 고단백 식품으로 다양한 조리방법이 개발되고 있고, 대두가 고혈압, 동맥경화등 성인병의 억제 효과가 보고되면서 그 섭취량도 증가하고, 더불어 두부의 소비량도 증가되고 있는 실정이다. 특히

대두를 원료로하는 두부제품의 다양화, 기능성, 약리성을 가지는 저장성이 높은 두부가 경제성정과 더불어 국민 생활의 고급화, 건강식품화, 간편화를 가지는 기능성이 첨가된 건강식품이 절실히 필요한 시기이다. 현재는 두부응고제로 사용되는 간수, 농축해수, 염화칼슘, 염화마그네슘등은 최근 해수의 오염과 이들 성분이 혈액순환계 질환자에 유해성 우려가 발생되면서 두부가 우수한 식품으로서의 가치가 손상되고 있다. 그러므로 무간수응고제를 이용한 식물성 천연응고제, 즉 오미자 추출액을 이용한 약리성, 생리활성을 가지는 새로운 개념의 두부개발이 요구되는 된다. 본 연구에서는 천연물질인 오미자 추출액을 응고제로 이용하여 기능성 두부를 제조하였고, 이때 오미자 추출액 속에 포함된 물질을 분석하여 인체에 무해한지를 규명하는 것도 매우 필요하다.

다. 연구개발의 목적

본 실험은 두부를 응고하기 위하여 통상적으로 사용하는 무기성분을 이용하지 않고 인공 화학물질이 아닌 식물성 천연물질인 한약재 오미자(*Schizandra chinensis*) 추출액의 성분을 이용하였다. 현대인의 친자연, 친환경 식품에 부응할 수 있도록 식물체가 함유된 약리성, 생리활성 물질등을 함유하고 있어서 두부의 품성을 활성화시키고, 안전성 및 위생적인 새로운 두부 개념을 개발하고, 이에 따라 오미자 추출액의 성분을 분리 분석하여 두유와 반응하여 두부 응고시키는 성분 및 원인을 규명하고 저 한다.

라. 재료 및 방법

1) 대두 및 천연물질의 선정

두부제조에 필요한 대두는 품종에 따라 차이가 있으며, 같은 품종이라도 지방에 따라 다르다. 즉 높고 추운 지방에서는 탄수화물이 많고, 평지에서는 콩단백질의 아미노산 조성 중 곡류에 비교적 적은 lysine, tryptophan이 비교적 많고, methionine, cystine이

적다. 본 실험에 사용된 대두는 서울의 한 농가에서 수확한 국산 대두를 냉동 저장 후 필요시 분쇄하여 사용하였다. 대두 중 아미노산의 조성은 Table 1과 같다. 식물성 천연물질은 여러 종류들이 있으나 생리활성 및 약리성이 우수한 오미자를 선택하였고, 이것은 경동시장 한약상에서 구입을 하였다

2) 대두유 및 오미자 추출액 제조

상기에서 구입된 대두를 이용하여 대두유를 제조하였고, 식물성 천연물질인 오미자를 농도를 변화하면서 추출액을 제조하였다.

3) 오미자 추출액의 분획 및 성분 분석

오미자 추출액을 liquid-liquid partition을 이용하여 즉, hexane-diether ether-methylene chloride-ethyl acetate순으로 분획하여 각 유기용매 층에서 분획된 성분을 HPLC로 분석한다.

4) 오미자 추출액의 분획 물질에 의한 응고제 실험

유기용매 변화에 의한 오미자 추출액을 두부응고 실험을 한 후 자외선·가시광선 분광광도법을 이용하여 두부응고 정도를 확인한다.

Table 1. 콩단백질의 아미노산 구성비

아미노산 성분	아미노산 구성비(%)
glycine	0.87
valine	0.68
leucine	8.45
proline	3.78
phenylalanine	3.86
aspartic acid	3.89
glutamic acid	19.46
tyrosine	1.86
arginine	5.12
histidine	1.39
lysine	2.71
tryptophan	1.94
cystine	0.74
methionine	1.84

5) 오미자 추출액을 진공 냉동 건조 후 GC-MASS 분석

50% 오미자 추출액을 진공 냉동 건조시켜 일부분을 ethanol에 용해 한 후 GC-MASS을 이용하여 library search하여 오미자 추출액 속에 포함 유기 작용기를 해석한다.

6) 오미자 추출 농도변화에 의한 두부 응고 실험

오미자 추출액의 농도 3%, 5%, 10%, 50%의 농도변화에 의한 두부응고 후 280nm와 600nm에서 각각 흡광도를 측정하였다.

7) 오미자 각 성분별 두부 응고 실험

상기에서 분석된 성분을 각각의 화학시약을 이용하여 성분별, 농도별로 두부응고 실험

험을 하여 어떤 성분이 응고체로서 주 역할을 하는지 조사하였다.

8) 오미자 추출액의 응고성을 화학시약으로 확인 실험

상기에서 분석된 오미자 추출액의 전체 성분을 화학시약으로 대신하여 두부 응고 실험을 하였고, 흡광광도계를 이용하여 탁도 및 단백질의 응고 정도를 실험하였다.

마. 결과 및 고찰

1) 대두유 제조 및 추출방법

대두유 제조에 대한 도시는 Figure 3에 나타내었다. Figure 3에 나타낸 것처럼 10% 두유액을 제조하여 이 두유액의 단백질 흡수 스펙트럼을 주사하였고, 이 두유액의 자외선-가시광선 스펙트럼은 Figure 4에 나타내었다.

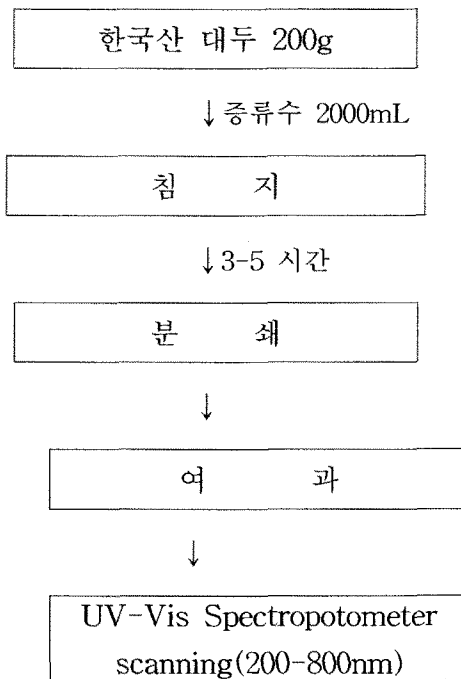


Figure 3. 두유액 제조 방법

Figure 4에 나타난 두유액의 스펙트럼을 보면 280nm부근에서 최대 흡수띠를 나타었으므로, 이 파장에서 단백질의 상대적인 농도를 측정하였다. 탁도를 확인하기 위한 600nm부근에서 육안으로는 구별하기 어렵지만 농도를 뚫게 했을때 600nm부근에서 약간의 흡수띠를 확인 할 수 있었다.

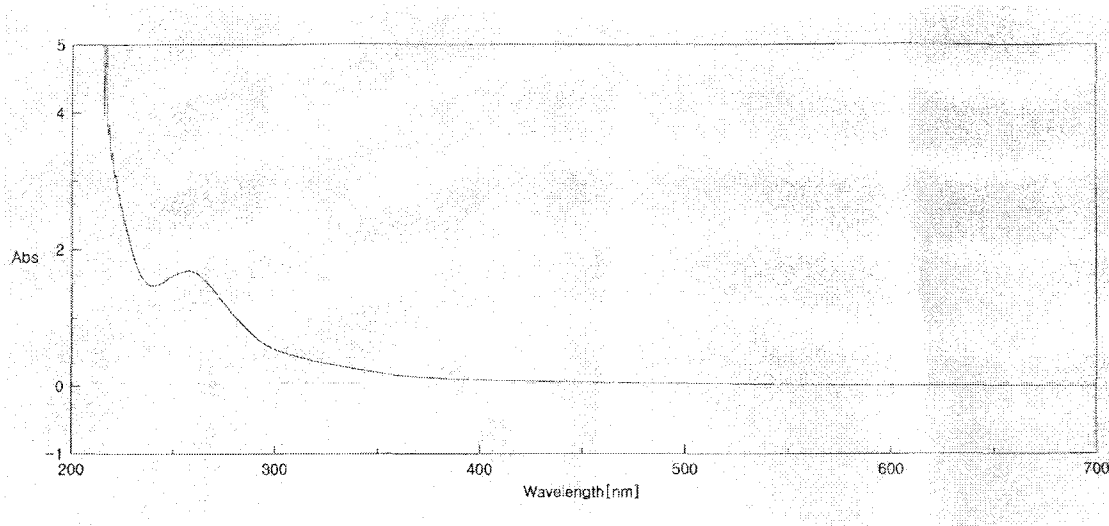


Figure 4. 두유액의 스펙트럼

2) 오미자 추출방법에 의한 성분 분석

오미자(*Schizandra chinensis*)는 경동시장 한약상에서 구입하여 사용하였다. 100g 오미자와 증류수 1500mL를 약탕기에 넣고 2시간 30분 동안 약탕기에서 추출하였다. 이 추출액은 거즈를 이용하여 1차 여과하고 4500rpm으로 30분 동안 원심분리하여 상등액을 오미자 추출액으로 사용하였다. 이 추출액을 유기용매에 의하여 분획 추출하여 오미자의 성분을 비교 조사하였다. 상기 실험 방법 Figure 1에 제시된 것처럼 각각의 유기용매층에서 획득한 분획물에 대한 HPLC로 성분을 비교한 결과를 Figure 5~10 각각 스펙트럼을 도시하였다.

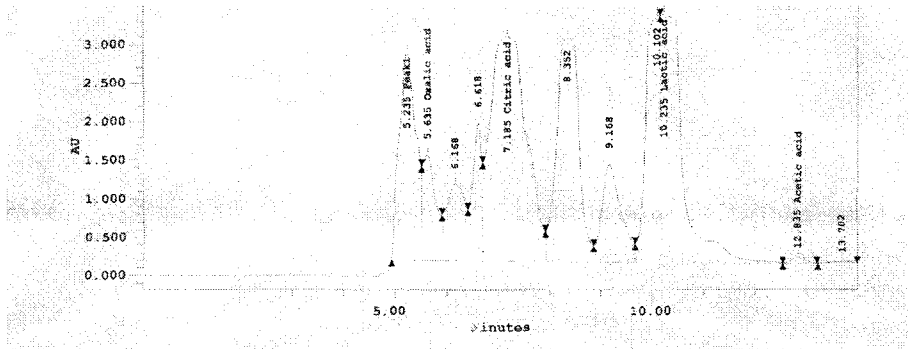


Figure 5. 오미자 원액의 HPLC 스펙트럼

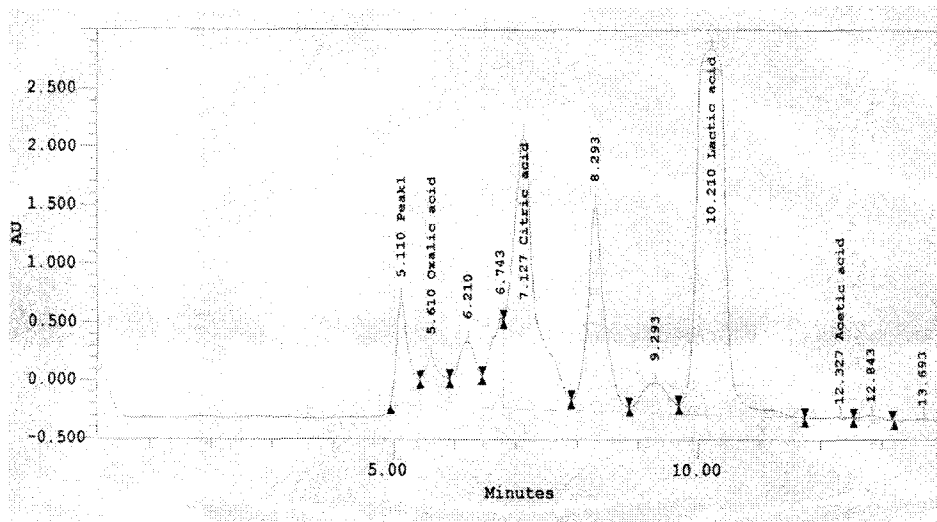


Figure 6. Hexane층에서 분획된 물질의 HPLC 스펙트럼

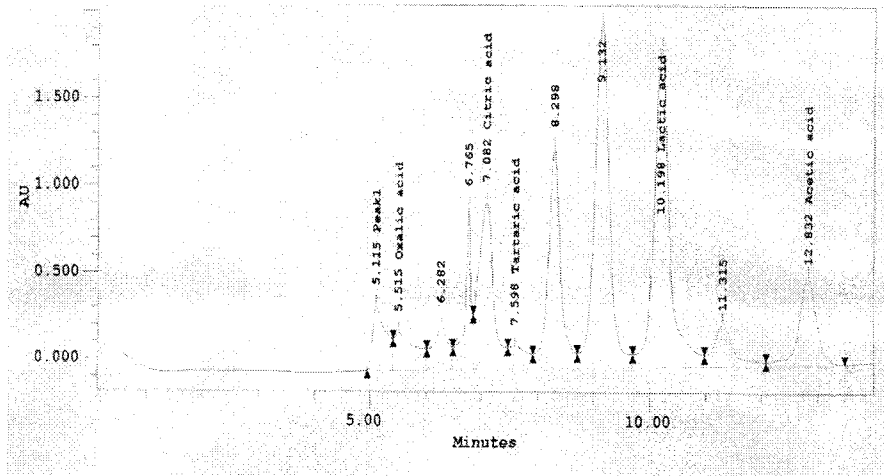


Figure 7. Diethyl ether층에서 분획된 물질의 HPLC 스펙트럼

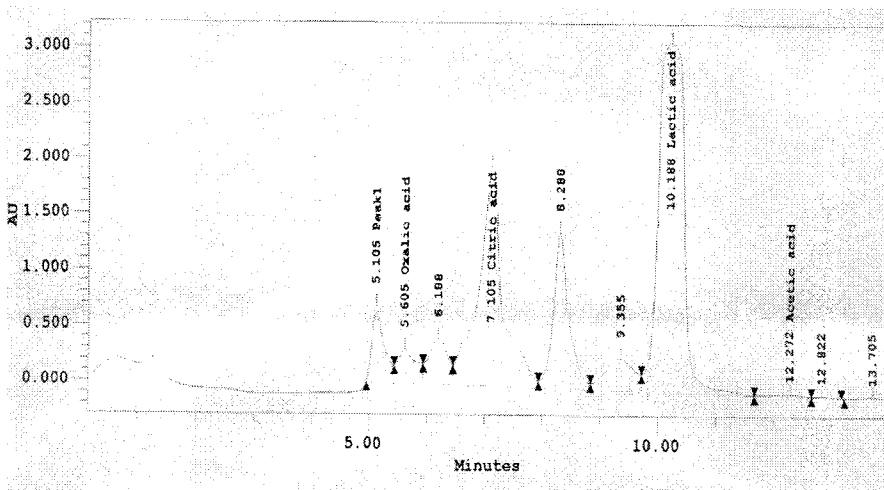


Figure 8. Methylene Chloride층에서 분획된 물질의 HPLC 스펙트럼

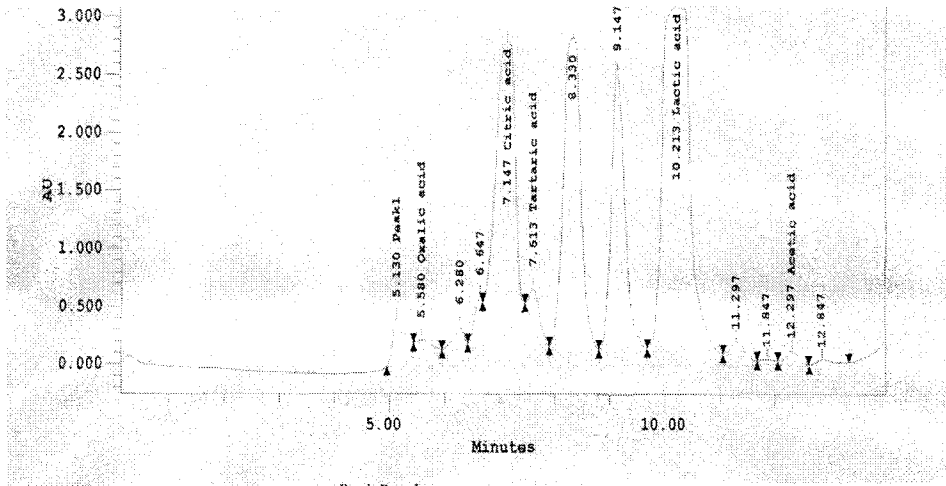


Figure 9. Ethyl Acetate층에서 분획된 물질의 HPLC 스펙트럼

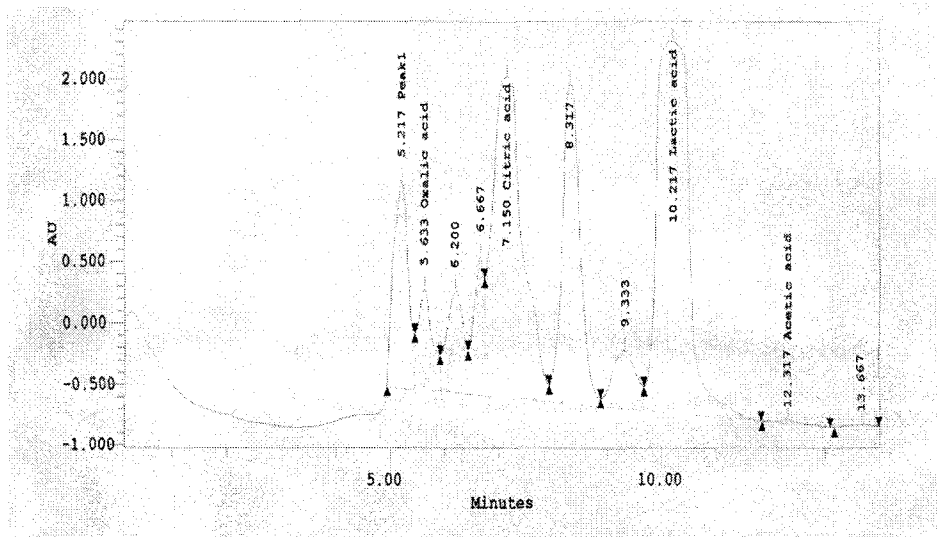


Figure 10. 수층에서 분획된 물질의 HPLC 스펙트럼

각각의 유기용매층 및 수층에서 분획된 오미자속에 포함된 화학성분에는 큰 차이는 없으나 유기산의 농도에는 약간의 차이를 나타내었다. 그러므로 오미자 추출액의 원액이 가장 유기산의 농도가 많이 들어있다. 오미자 추출액의 두유의 응고 역할을 할 것으로 생각되는 유기산은 succinic acid, citric acid, malic acid, tartaric acid의 농도

에 비례하여 나타내었다. 이때 사용된 HPLC(High Performance Liquid Chromatography)의 기기명 및 분석조건은 Table 2와 같다.

Table 2. HPLC condition

HPLC	: Waters 2690XE Separations Module
Detector	: Waters 996 Photodiode Array Detector(210nm)
Column	: Supelcogel C-610 (30cm x 7.8mm ID)
Mobile phase	: 0.1% H ₃ PO ₄
Flow rate	: 0.8ml/min
Column Temp.	: 30℃
Injection Volume	: 50ul

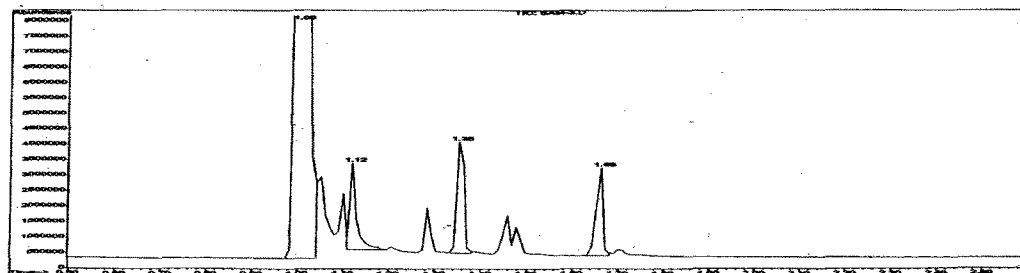
3) 오미자 추출액의 냉동건조에 의한 GC-MASS 분석

50% 오미자 추출액을 500mL을 hexane, ether로 지방산을 제거하였고, 이렇게 얻어진 물층의 추출 분획물은 진공 냉동 건조시켜 분말 형태로 얻었다. 3.0g 오미자분말을 20mL ethanol에 넣어 초음파 세척기에서 10분 동안 방치하여 용해시켰다. 이것을 GC-MASS로 분석한 결과를 Figure 11에 나타내었다. GC-MASS로 library search 통하여 정성분석을 하였다. Table 3에 GS-MASS의 기기 조건을 나타내었다.

Table 3. GC-MASS condition

GC-MS	: HP GC MSD
Column	: capillary HP-5(30m×0.25mm×0.25mm)
Carrier gas	: He gas 1.5ml/min
Flow rate	: 0.5ml/min
Column Temp.	: 150℃
Injection Volume	: 50ul

MASS의 조건으로는 이온화 전압은 70eV이었고 분자량의 범위는 70~500 a.m.u.이었다. 분리된 각 피크는 gas 크로마토그램의 머무른 시간을 확인한 후 개별 유기산 성분 피크의 동정을 위하여 mass spectrum를 Wiley's library로 확인하였으며, 이 때 85% 이상의 확률에 일치하는 화합물로 인정하였다.



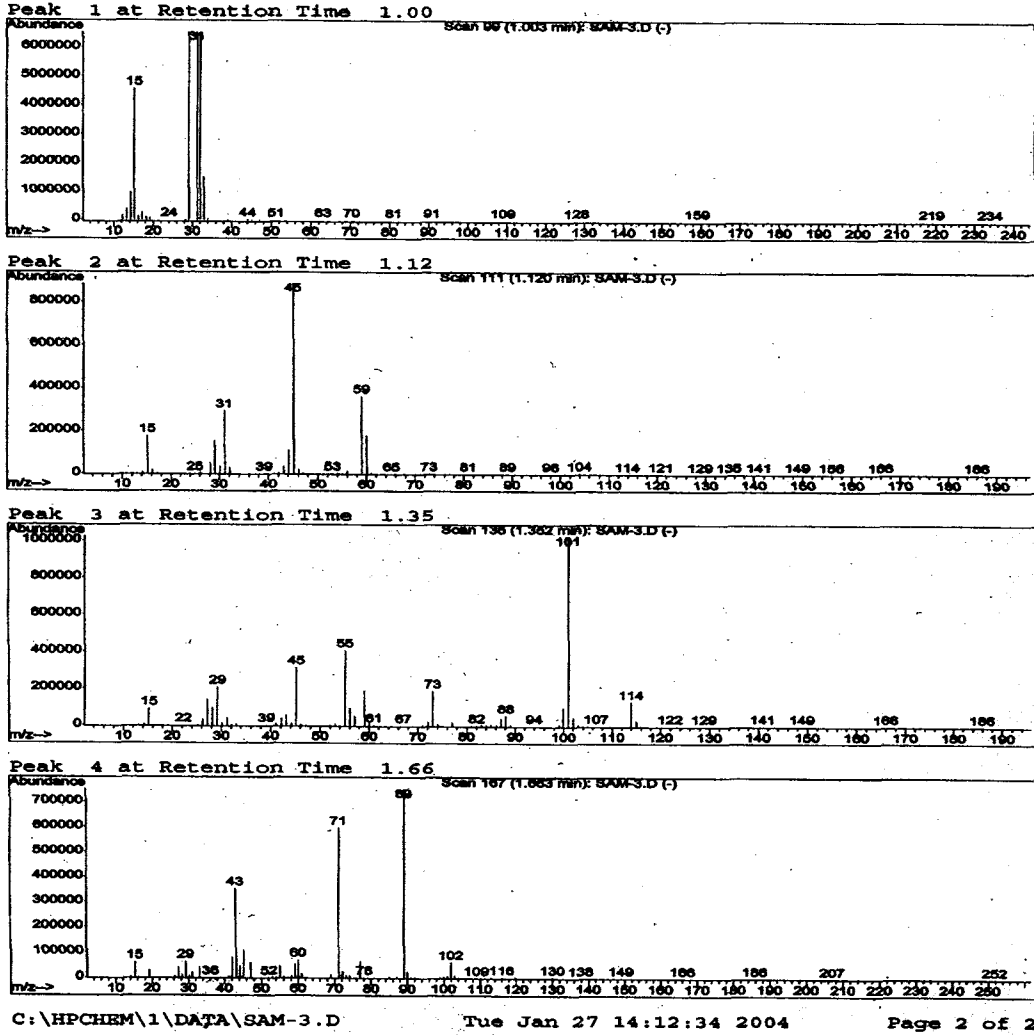


Figure 11. 오미자 추출액의 GC-MASS의 스펙트럼

4) 오미자 추출액의 분말의 적외선 스펙트럼

오미자 추출액을 분말화하여 KBr법에 의한 적외선 분광광도계를 측정하여 유기 작용기에 대한 분석 결과를 Figure 12에 나타내었다.

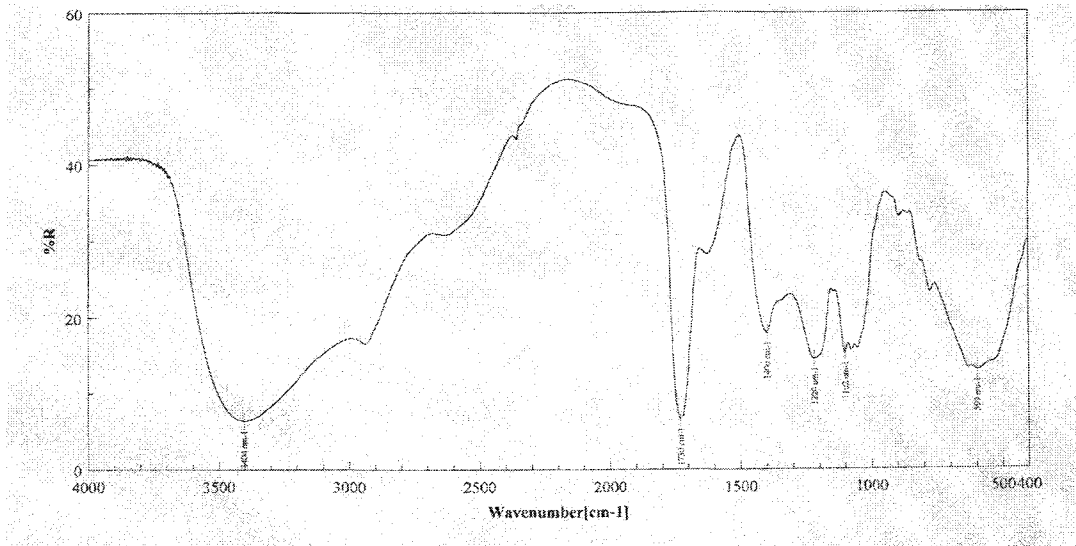


Figure 12. 오미자 추출물의 IR 스펙트럼

Figure 12에 나타난 것으로 확실히 유기산이 무엇인지는 알 수 없으나, 3400cm^{-1} , 와 1400cm^{-1} 에 나타난 peak로 인하여 -OH기를 많이 가지고 있다는 사실을 알 수 있고, 1102cm^{-1} 에서 C-OH에 대한 신축운동과 1730cm^{-1} 에서 포화 -COOH의 강한 peak가 나타났다.

5) 오미자 추출액의 무기이온 분석

단백질의 응고가 되는 요인 중의 하나는 가용성의 2가 또는 3가의 금속이온에 의해서 응고된다. 그 중에서 Ca, Mg은 대두의 단백질인 glycinin의 분자사이에 가교를 만들어 단백질분자와 결합하여 두부가 응고된다. 본 연구에서도 오미자 추출액의 농도변화 3%, 5%, 10%일때 각각의 무기금속이온, Ca, Mg, Al, Na에 대하여 ICP분석한 결과를 Table 4에 나타내었다. Table 4에 나타난 것과 같이 오미자 추출액에 대한 무기금속이온의 농도는 그 자체만으로 단백질을 응고시키기에는 농도가 너무 작다. 그러므로 오미자 추출액속의 무기이온만으로 두부 응고가 되지는 않는다.

Table 4. 오미자 추출액 농도 변화에 의한 무기이온 농도

오미자 추출농도(%)	무기금속이온(ppm)			
	Ca	Mg	Na	Al
3%	38	12	32	18
5%	42	14	46	22
10%	86	28	101	45

: 2차년도에 연구 100% 달성

3. 제1세부 과제 (3차년 : 강현민)

세부과제별 연구기관	연구책임자	당해연도 소요예산
용인대학교	강 현 민	45,000,000원

제 목 : 오미자즙을 이용한 두부 응고 반응에 관한 연구

가. 연구 방법

1) 시약 및 측정기기

대두(soybean)는 서울의 한 농가에서 수확한 국산 대두를 냉동 저장 후 필요시 분쇄하여 사용하였다. 오미자(Schizandra chinensis)는 생리활성 및 약리성이 우수한 오미자를 선택하여 경동시장 한약상에서 구입하여 사용하였다. 사용된 시약은 ethanol, hexane, dietherether, methylene chloride, ethyl acetate와 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 은 Merck Co.,에서 구입하였고, succinic acid, malic acid, tartaric acid, citric acid은 Aldrich회사 제품을 사용하였다. 오미자 추출액의 유기산의 작용기 및 성분 분석 위하여 GC-MSSS(HP GCD), IR Spectrophotometry(JASCO, FT/IR-620), HPLC(Waters 2690XE)를 각각 이용하였고, 오미자 추출액 속에 함유된 무기이온을 분석하기 위하여 유도결합플라즈마(ICP, Perkin Elmer 3300XL)를 이용하였다. 두부응고 정도를 확인하기 위하여 UV Visible Spectrophotometry(Shimadzu 1240)을 이용하였다. 오미자 추출액의 분말화를 하기 위하여 Freezing Dryer(Ilshin Engineering Co.)와 감압 농축을 위한 Rotary Evaporator(Büchi 461), 그 외 pH meter(Mettler 355)를 각각 사용하였다.

2) 오미자 성분 분석

오미자 추출액의 liquid-liquid partition

300mL 오미자 원액과 유기용매 각각의 비율이 1:1이 되도록 1000mL 분액깔대기에

냉고 30분 동안 잘 흔들어 섞어 방치한다. 이때 분액깔대기안에 가스에 의한 팽창을 방지하기 위하여 가끔 중간 밸브를 열어준다. 층분리가 잘 일어나도록 충분히 방치 후 동일방법을 3회 추출하여 완전히 분획되도록 한다. 오미자를 유기용매에 의한 분획 추출방법은 Figure 1에 나타내었다. 각 용매에 대하여 각각의 분획이 끝나면 감압 농축하여 HPLC로 분석하고, 이것을 이용하여 두부 응고 실험을 하였다.

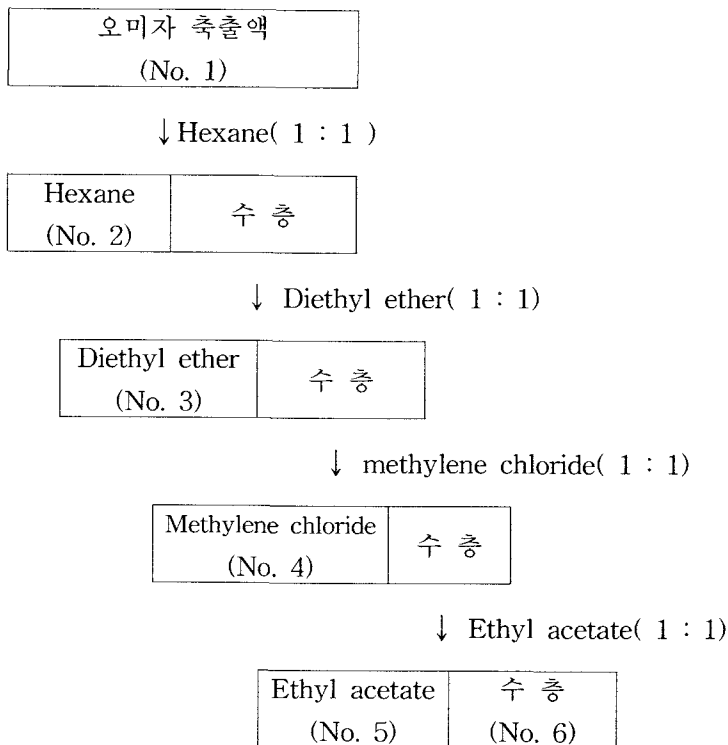


Figure 1 오미자액을 유기용매에 의한 분획추출방법

3) 오미자 추출액의 냉동건조에 의한 GC-MASS 분석

50% 오미자 추출액을 500mL을 hexane, ether로 2회동안 liquid-liquid partition을 이용하여 오미자중에 포함되어 있는 지방산을 제거하였고, 이렇게 얻어진 물층의 추출 분획물은 진공 냉동 건조시켜 분말 형태로 얻었다. 이렇게 제조된 오미자 분말 3.0g을 20mL ethanol에 용해시켰다. 이때 초음파 세척기에서 10분 동안 방치하여 완전히 용해·여과하여 GC-MASS의 분석하였다. 이것은 냉장실에 보관하여 필요시 두부 응고

제로 사용하였다.

4) 오미자 추출액의 분말의 적외선 스펙트럼

오미자 추출액을 분말화하여 KBr법에 의한 적외선 분광광도계를 측정하여 유기 작용기를 알아보았다.

5) 오미자 추출액의 무기이온 분석

단백질과 결합하여 두부 응고를 할 수 있는 무기이온 즉 Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^{+} 등을 ICP로 오미자 추출액의 농도 변화에 따라 분석하였다.

6) 두부 응고 실험

두부응고 실험은 상기에서 제조된 10% 두유액을 70-80°C로 조절을 한다. 이 두유액에 대하여 10%(v/v) 여러 종류의 응고제를 해당하는 양을 첨가하여 단백질이 응고상태를 280nm, 600nm에서 각각 측정하였다. 두유액에 응고제를 투입하여 흡광도를 측정하여, 응고량 및 탁도를 측정하는 실험이다.

10% 두유액

↓

Heating(82°C)

↓응고제

두유액 : 응고제(9:1)

↓1시간 방치

↓14,500rpm 5min. 원심분리

pH, 280, 600nm 측정

Figure 2. 두부 응고 실험

7) 유기용매에서 분획된 오미자 액의 두부 응고 실험

분리 추출한 용액의 유기산의 종류 및 농도에 따라 두부 응고 시험을 하여 오미자 중 어떤 유기산의 성분이 두유속에 포함되어 있는 글리시닌(Glycinin)과 결합을 하는지를 실험하였다.

8) 오미자액의 농도별 두부 응고 실험

오미자 추출액의 3%, 5%, 10%, 50% 농도변화에 따라 두부 응고상태를 분광광도계를 이용하여 분석하였고, 육안 관찰로 입자의 상태를 조사하였다.

9) 오미자 분말을 이용한 두부 응고 실험

오미자 추출액은 장기 보관이 어려우므로 이것을 분말하여 오미자의 농도비에 따라 성분 비교 분석을 하였고, 이에 따른 두부 응고 실험을 하여 최적 조건을 선정하였다.

10) 오미자의 화학 성분별 농도 변화에 의한 실험

오미자의 화학성분비의 농도를 단일 및 복합 오미자 농도용액을 제조하여 오미자 추출액의 성분 중 어떤 성분이 두부를 응고시키는 지 확인하였다.

나. 결과 및 고찰

1) 두부 응고 실험

전지대두분(whole soybean flour)은 단백질 약 38.5%, 지방 23.2% 수분 약 5.0%, 회

분 4.8%, 조섬유 2.2%, 비질소화합물 26.4%등 기능성 성분등이 존재하여 영향적으로 우수한 식품으로 최근 들어 식품의 생체조절기능에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 그러나 대두를 이용한 가장 보편적인 가공식품이 바로 두부이다. 대두에는 전체 단백질의 80-90%를 차지하고 있는 글리시닌(glycinin)과 albumin등의 단백질 성분과 비단백질 화합물이 함유되어 있는데 이것은 물과 함께 교질작용을 이룬다. 두부 응고에 적용되는 glycinin은 묽은 염류용액에 녹는 성질이 있는데 대두중에는 인산칼륨과 같은 가용성염류가 들어 있으므로 대두를 물과 함께 가열하여 용해하면 glycinin이 여기에 용해된다. 여기에 응고제를 첨가하면 glycinin이 응고하여 침전된다. 일반적으로 사용되는 응고제는 CaCl_2 , CaSO_4 , MgCl_2 , GDL(glucono-delta lactone)등이 사용된다. 두부 응고 과정은 2가지로 분류할 수 있다. 첫째, 금속염에 의한 응고 반응, 즉 단백질은 가용성의 2가 또는 3가의 금속이온에 의해 응고되는데 특히 Mg, Ca이 대두의 단백질인 glycinin의 분자사이에 가교를 만들어 단백질 분자와 반응하여 응고물을 만든다. 둘째, 산의 응고 즉 어떤 pH에서 (+)(-) 전하의 양이 분리되어 분자 자체로서는 전기적 중성이 되는데 이때의 pH를 등전점이라 한다. 대두 단백질의 경우 등전점은 약 pH 4.5정도이다. 두유를 산성으로 할 때 침전이 용이하게 된 단백질이 응고된다. 본 연구에서는 오미자 추출액을 분리 분획 물질들의 성분 및 pH를 알아보고 이를 이용하여 두부와 응고 정도를 알아본다. 두부 응고 실험은 상기에서 제조된 10% 두유액을 70-80℃로 조절을 하였고, 두유액에 10%(v/v)에 해당하는 응고제를 첨가하고, 두유액에 응고제를 넣고 1시간 방치 후 14,500rpm에서 5분간 원심분리를 하여 흡광도를 각각 280nm, 600nm에서 측정하여 단백질이 응고 상태와 탁도등을 조사하였다. 응고제는 오미자 추출액의 유기용매로 분획한 응고제를 각각의 두유액에 넣고 원액의 두유액과 응고제를 첨가 했을때의 흡광도를 비교하여 두부 응고 정도를 확인하였다. 이때 280nm에서 측정하는 것은 Figure 4에서 나타 낸 것과 두유액을 scanning하였을 때 최대흡수파장이 280nm에서 나타났기 때문이다.

2) 용매에서 분획된 오미자 액의 두부 응고 실험

오미자 추출액을 여러 종류의 용매로부터 분획된 추출물을 이용하여 두유 원액 및 오미자 추출물 액에 대한 pH 값 및 흡광도 값을 Table 5에 수록하였다.

Table 5. 오미자 추출액의 용매에 의해 분획된 추출물의 두부 응고

성 분	pH	흡광도	
		280nm	600nm
오미자 추출 원액	3.99	0.240	0.035
10% 두유액	5.89	0.923	0.087
20% MgCl ₂	5.00	0.291	0.038
Hexane 층	3.85	0.292	0.035
Diethyl ether	5.46	0.931	0.094
Methylene Chloride	4.27	0.311	0.035
Ethyl acetate	4.52	0.271	0.035
수 층	3.28	0.282	0.037

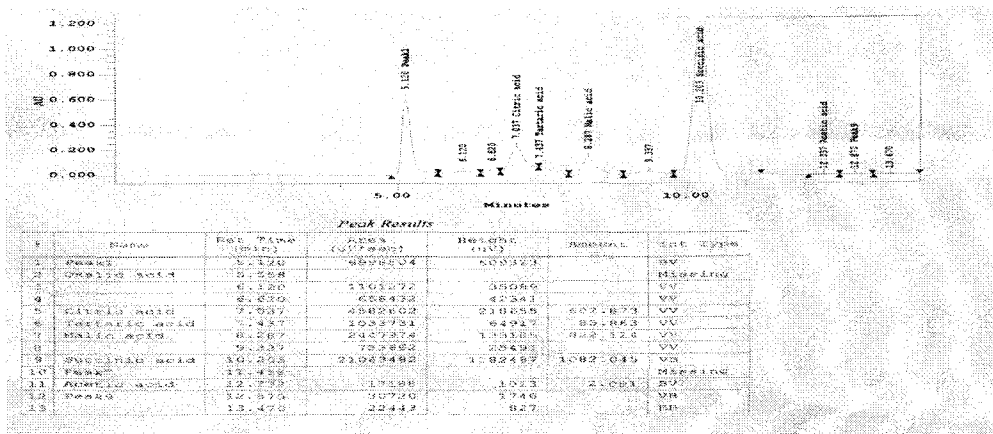
Table 5에 나타난 것으로 diethyl ether층에는 두부가 응고가 되지 않았고, 나머지 분획물에서는 두부가 응고됨을 알 수 있다. 그러나 두부 응고 시 입자가 작아 자연 상태에서 응고하기는 어렵다.

3) 오미자 추출액의 농도별 두부 응고 실험

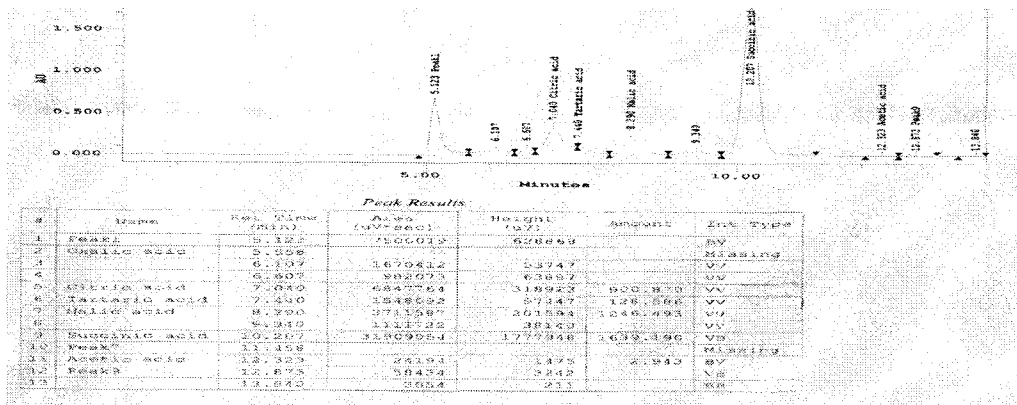
3%, 5%, 10% 오미자 추출액의 유기산의 농도비를 HPLC로 비교 분석하였고, 분광광도계를 이용하여 두부 응고상태를 분석하였고, 육안 관찰로 입자의 상태를 조사하였다. Table 6에는 오미자 추출농도에 따른 두부 응고성을 실험한 결과이다.

Table 6. 오미자 추출액의 농도 변화에 의한 두부 응고

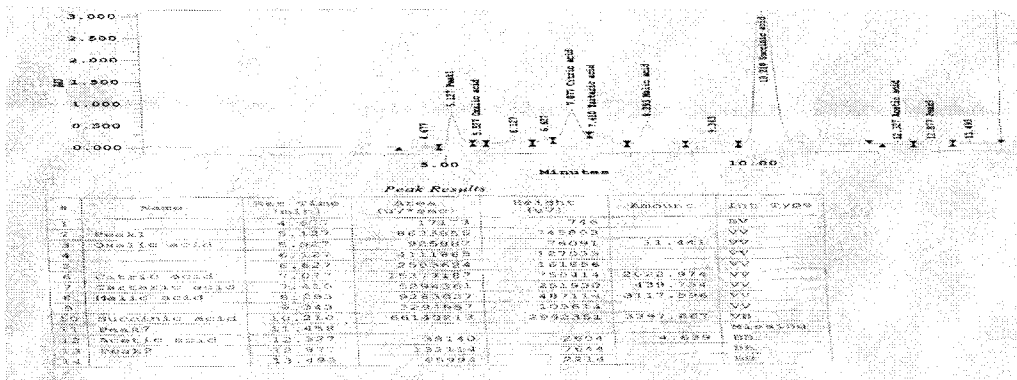
오미자 추출액 농도(%)	pH	흡광도		입자상태 및 응고성
		280nm	600nm	
3%	3.85	0.175	0.101	응고가 잘 안됨
5%	3.73	0.102	0.091	응고 속도 느림
10%	3.54	0.056	0.086	응고 잘됨
HCl	2.11	0.043	0.134	응고 안됨



(a)



(b)



(c)

Figure 13 오미자 추출액 3%(a), 5%(b), 10%(c)의 HPLC 스펙트럼

유기산의 농도가 증가 할수록 두부응고가 잘됨을 알 수 있다. 실제로 오미자 추출농도 변화에 의한 HPLC 스펙트럼을 Figure 13(a)(b)(c)에 나타내었다. 오미자 추출액 3%, 5%, 10%의 농도변화에 따라 주 유기산 succinic acid, citric acid, malic acid, tartaric acid의 농도도 비례하여 나타내었고, 이것을 Figure 14에 나타내었다.

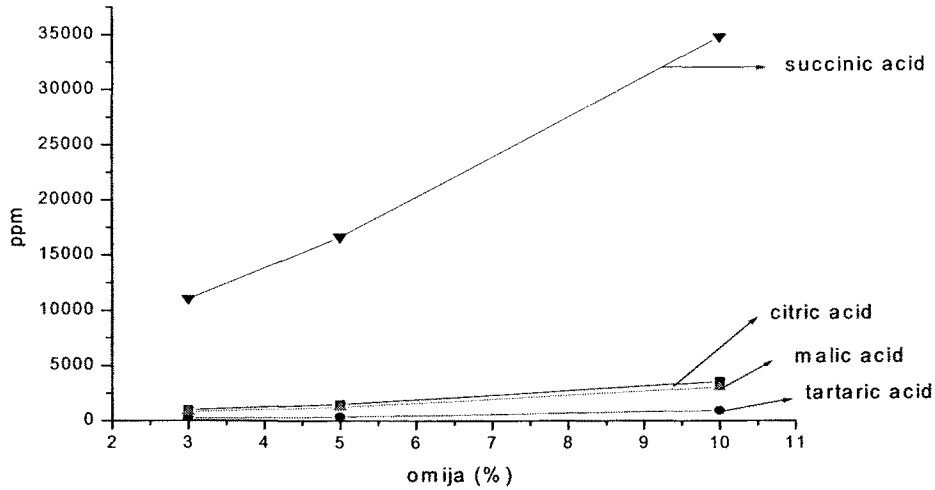
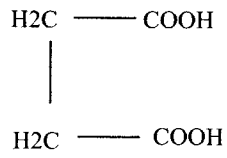


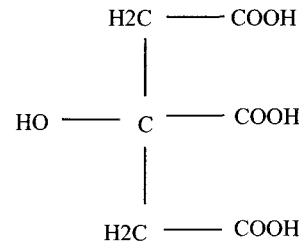
Figure 14. 오미자 추출 농도 변화에 의한 유기산의 농도

오미자 추출액 3%, 5%, 10%속에 포함되어 있는 succinic acid 농도는 1.11%, 1.67%, 3.48%로 비례하여 증가하였고, citric acid는 1.01%, 1.51%, 3.58%, malic acid는 0.83%, 1.27%, 3.08%, tartaric acid는 0.24%, 0.36%, 0.96%로 각각 증가하였고, 그리고 oxalic acid는 오미자 추출액의 농도 3%, 5%에서는 거의 나타나지 않았고, 10%용액에서 0.02% 조금 나타내었다. 그리고 glutaric acid가 미량 들어있다. 각각 물질의 화학적 구조는 Figure 15와 같다. 오미자 추출액의 유기산의 농도가 작으면 잘 응고가 되지를 앓는 것을 알 수 있다. 그러므로 오미자 추출액 3%, 5%에서는 두부 응고가 잘 되지를 앓았다.

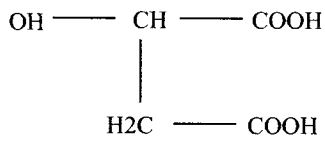
오미자 추출액의 주성분인 succinic acid, citric acid, malic acid, tartaric acid 용액의 종류 및 농도 변화에 따라 두부 응고 시험을 하여 오미자 중 어떤 유기산의 성분이 두유속에 포함되어 있는 글리시닌(Glycinin)과 결합을 하는지를 실험하였다. 유기산의 화학응고제의 종류별, 농도별에 대한 것을 Table 7에 나타내었다.



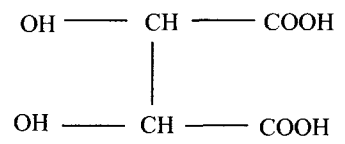
(Succinic Acid)



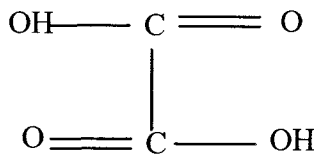
(Citric Acid)



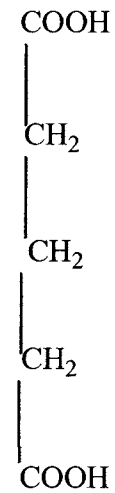
(Malic Acid)



(Tartaric Acid)



(Oxalic Acid)



(Glutaric Acid)

Figure 15. 유기산의 화학 구조식

Table 7 유기산의 종류 및 농도변화에 의한 두부응고

유기산	농도(%)	280nm(Abs)	600nm(Abs)	비고
succinic acid	1.11	0.231	0.211	fine, O
	1.67	0.228	0.198	fine, O
	3.48	0.211	0.092	coarse, O
	5.00	0.196	0.069	coarse, O
citric acid	1.01	0.364	0.237	fine, ×
	1.51	0.288	0.158	fine, ×
	3.58	0.245	0.072	fine, △
	5.00	0.208	0.060	coarse, O
malic acid	0.83	0.564	0.301	fine, ×
	1.27	0.427	0.282	fine, ×
	3.08	0.199	0.112	coarse, △
	5.00	0.108	0.081	coarse, △
tartaric acid	0.24	1.264	0.651	fine, ×
	0.36	1.167	0.499	fine, ×
	0.96	1.109	0.369	fine, ×
	1.50	0.967	0.249	fine, ×

* 입자 상태 : coarse(입자가 크다), fine(입자가 작다)

* 응고 정도 : O(매우 잘됨), △(중간), ×(응고 잘 안됨)

Table 7에는 오미자 추출액 3%, 5%, 10%속에 각각 포함되어 있는 유기산의 농도변화에 대한 두부 응고 실험을 한 결과이다. 유기산중에서 succinic acid가 낮은 농도에서도 응고는 되지만 입자가 입자 작아서 성형하기가 어렵고, 농도가 증가 할 수록 입자상태 및 두부 응고 성형이 잘되고, 280nm에서도 흡광도 값도 작으므로 단백질과 반응을 잘 하는 것으로 판단되며, 660nm 탁도 측정에서 흡광도값이 작게 나오므로 탁도

면에서도 매우 우수하게 나타내었다. 이때 사용된 물질의 농도에 따른 pH의 영향 및 오미자 추출액속에 포함되어 있는 각 성분별 농도에 따라 두부 응고 실험을 한 결과를 Table 7 나타내었다. Table 7에서 나타낸 것과 같이 오미자의 추출 농도의 pH는 3%, 5%, 10%로 증가할 수록 pH는 다소 감소하는 경향은 있으나 두부 응고에 크게 영향을 미치지 않는다고, 응고제의 농도가 산성이면 어느 정도 두부는 응고를 하는 것을 알 수 있다. Table 7에서 나타낸 것과 같이 유기산이 약 3% 농도가 되면 두부는 응고 즉 산성에서는 침전이 된다. 그러나 입자 너무 미세하여 두부를 응고하여 성형하기가 어렵다. 이것은 단순한 pH에 대한 영향만은 아니다. 일반적으로 단백질은 20개 이상의 아미노산들이 펩타이드 결합(peptide bond)을 하고 있는 거대 고분자 물질이다. 이때 아미노산의 일반구조식(RCH(NH₂)COOH) 및 화학구조는 Figure 16과 같다.

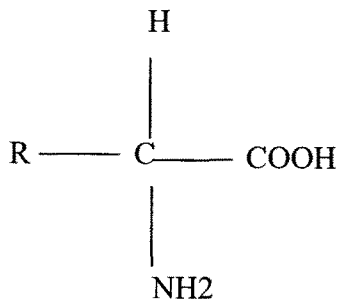


Figure 16. Amino Acid의 화학 구조

여기서 산성을 띠는 카르복실기(carboxyl acid group, -COOH)와 알칼리성을 띠는 아미노기(amino group, -NH₂)로 구성되어 있고, 작용기 R(radical)에 따라 20여종이 존재한다. 특히 두부속에 포함되어 있는 단백질 글리시닌은 16종의 아미노산들이 포함되어 있는 복잡한 거대 고분자 물질이다. 글리시닌은 산성을 가지는 분자량 28,000 - 45,000과 염기 기본단위를 가지는 분자량이 18,000-22,500를 가진다. 두유속에 포함되어 있는 글리시닌은 금속염에 의한 응고 반응 즉 단백질은 가용성의 2가 또는 3가의 금속이온에 의해 응고 및 산에 의하여 응고된다고 보고되어있다. 실제적으로 오미자 추출액속에 포함되어 있는 유기산의 농도 및 무기이온들이 모두 영향을 미친다고 생

각된다. 오미자 추출액속에 속에 녹아있는 무기이온들이 이온세기를 증가시켜 두부응고에 영향을 미친다고 사료된다. 이 이유는 동일 pH에서 이온세기를 증가함에 따라 두부 응고 입자가 커지는 현상을 알 수 있다. 일반적으로 사용되고 있는 응집제중 유기산을 이용하는 glucono delta lactone(GDL)의 구조식이 Figure 17과 같다.

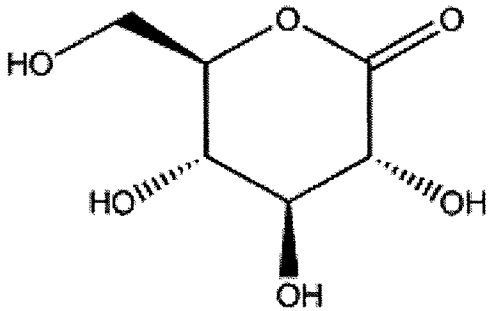


Figure 17. Glucono delta lactone의 화학구조

상기에서 사용되고 있는 유기산 GDL은 분말상태로 물에 서서히 가수분해되어 글루콘산(gluconic acid)이 되고 이것은 pH가 서서히 떨어지면서 글리시닌과 천천히 반응을 함으로써 입자 큰 형태로 응고가 되고 수율도 증가하게 된다. 이것은 두유액에 염산을 첨가했을 때 반응속도가 빠르게 진행되어 침전은 되나 작은 입자 형태를 형성함을 알 수 있다. 또한 오미자 추출액의 시간이 경과함에 따라 침전입자도 작을뿐만 아니라 응고가 거의 되지않았다. 오미자 추출액 10%농도는 두유액의 글리시닌과 응고를 하여 두부 형태로 성형하기가 용이하지만 시간이 경과함에 따라 거의 두부 형태로 성형이 되지않는다. 이것은 오미자 추출액이 포함하고 있는 유기산의 농도 및 pH는 큰 변화가 없으나 어떤 특정물질에 의하여 반응속도가 증가함으로써 입자 작아지므로 두부형태로 성형 잘되지 않는다고 사료된다.

4) 오미자의 화학 성분별 농도 변화에 의한 실험

오미자의 추출농도 3%, 5%, 10%에 해당하는 화학성분비의 용액을 제조하여 각각에

대하여 두부응고 실험을 하였다. 각 유기산의 구성비는 Table 8과 같다.

Table 8 유기산의 혼합농도비에 의한 두부 응고

오미자성분(%)	유기산	농도(%)	280nm(Abs)	600nm(Abs)	비고
3% 화학조성성분	succinic acid	1.11	0.134	0.191	coarse, △
	citric acid	1.01			
	malic acid	0.83			
	tartaric acid	0.24			
5% 화학조성성분	succinic acid	1.67	0.094	0.078	coarse, O
	citric acid	1.51			
	malic acid	1.27			
	tartaric acid	0.36			
10% 화학조성성분	succinic acid	3.48	0.068	0.075	coarse, O
	citric acid	3.58			
	malic acid	3.08			
	tartaric acid	0.96			
10% 화학조성성분 (Ca 86ppm Mg 28ppm Na 101ppm, Al 45ppm)	succinic acid	3.48	0.054	0.069	coarse, O
	citric acid	3.58			
	malic acid	3.08			
	tartaric acid	0.96			

Table 8에 표시된 것은 오미자 추출 농도비 3%, 5%, 10%에 해당하는 유기산을 화학 시약으로 대신하여 전체 유기산의 농도변화에 의한 두부 응고 실험을 한 것이다. 앞에서 언급한 것과 같이 유기산의 농도에 의하여 두부응고에 많은 영향을 준다. 오미자 추출농도 3%, 5%에서는 두부가 잘 성형이 되지를 않았고, 이것을 시약으로 대신 하여서도 비슷한 결과를 나왔다. 그러나 유기산의 농도가 너무 짙으면 흡광도 값은 매우 적게 나오지만 두부 응고 시 입자가 세밀하여 성형이 잘되지 않는 경향이 있다.

오미자 추출액의 두부를 응고시키는 요인은 유기산의 전체농도에 많은 영향을 주는 것으로 판단된다. Table 8에서 나타낸 것과 같이 10% 오미자 추출액의 농도를 갖는 화학시약으로 대신하여 두부를 응고 했을 때 입자 상태 혹은 흡광도 측정값에서 나타낸 것과 같이 좋은 결과를 얻었다. 그리고 오미자 추출액속에 포함되어 있는 농도만큼 무기이온 즉 86ppm Ca, 28ppm Mg, 101ppm Na, 45ppm Al을 첨가했을 때 좋은 결과를 나타내었다. 이것은 무기 금속이온들이 이온세기를 증가시켜 두부응고에 영향을 미친다고 생각된다. Figure 18에는 오미자 추출액의 화학성분비가 5%, 10% 유기산을 포함하고 있을 때 성형된 두부 형태이다.

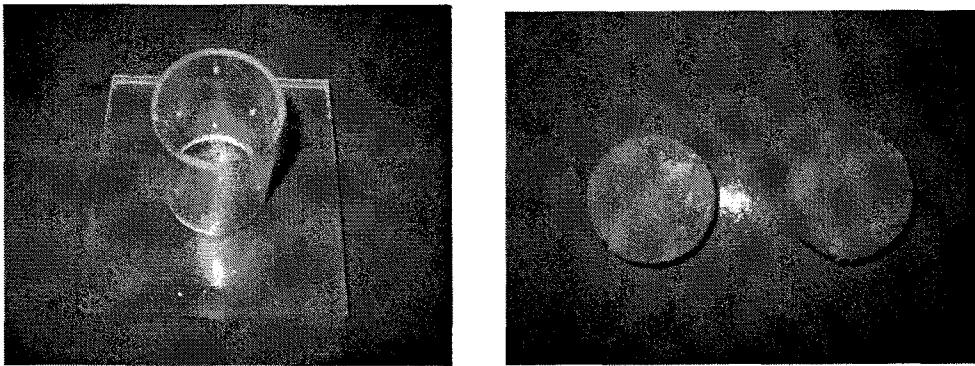


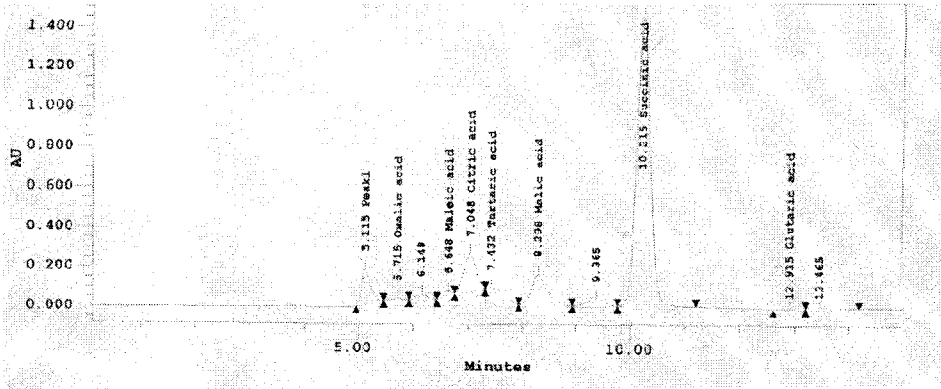
Figure 18 두부 성형기와 두부 성형상태(5%, 10% 유기산 농도)

5) 오미자 분말을 이용한 두부 응고 실험

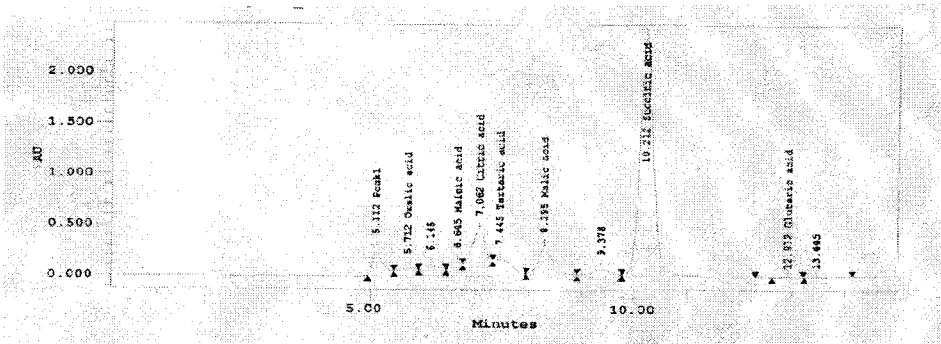
오미자 추출액은 장기 보관 시 미생물이 번식하여 부패하거나 곰팡이 피고 경향이 있고, 오랫동안 방치한 오미자 추출액은 메카니즘을 알 수 없으나 두부 응고가 잘 되지 않는다. 그러므로 추출액을 냉동 건조시켜 보관함으로써 이러한 요인을 제거 할 수 있고, 이에 따른 두부 응고 실험을 한 결과 처음 추출액과 유사한 결과를 나타냈다. Table 9에 오미자 추출액의 유기산의 농도비율에 맞추어 분말을 각각 0.3%, 0.5%, 1.0%의 농도를 조절하여 HPLC로 유기산의 농도를 분석하였고, 이를 이용하여 두부 응고 실험하였다.

Table 9. 분말화된 오미자 추출물의 농도변화에 의한 두부 응고

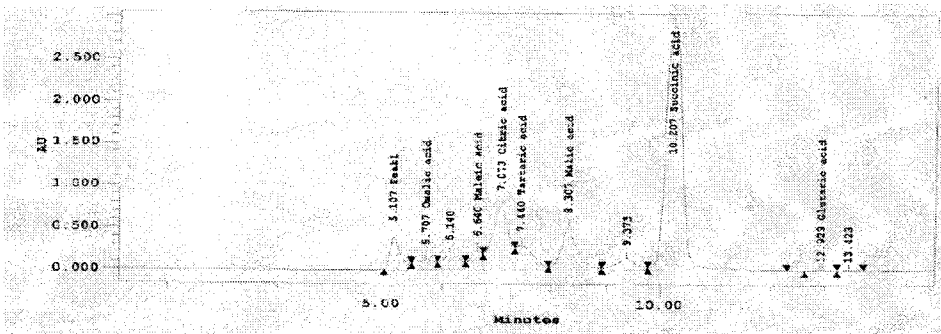
분말 추출물(%)	성분	(%)	280nm	600nm	비 고
0.3%	citric acid	1.23	0.195	0.105	fine, ×
	tartaric acid	0.45			
	succinic acid	1.68			
	malic acid	1.37			
0.5%	citric acid	6.28	0.102	0.087	coarse, O
	tartaric acid	2.23			
	succinic acid	8.40			
	malic acid	6.83			
1.0%	citric acid	12.57	0.092	0.062	coarse, △
	tartaric acid	4.56			
	succinic acid	16.80			
	malic acid	13.66			



(a)



(b)



(c)

Figure 19. 분말화된 오미자 추출물의 농도 변화에 의한 HPLC 스펙트럼
 (a) 0.3% 오미자 추출물 용액 (b) 0.5% 오미자 추출물 용액
 (c) 1.0% 오미자 추출물 용액

다. 결 론

두부는 오래 전부터 다양한 요리로 식탁에 제공되어진 콩으로 만든 전통 식품중의 하나로 보통 흰색을 띠는 균일하고 부드러운 질감을 갖는 중요한 단백질 공급원이다. 두부의 제조는 물에 불린 대두를 물을 가해 마쇄하는 과정에서 녹아 나온 각종 염에 의해 대두 단백질의 주성분인 글리시닌(glycinin)이 가용화되고 가열에 의해 트립신 저해제등과 같이 대두단백질의 소화흡수를 저해하는 물질이 변성되고 단백질이 disulfide 결합, 수소결합 및 소수결합에 의해 응집되어 gel화 된 후 염농도 증가에 의해 침전되거나 산에 의해 등전점(pH 4.2~4.6)에서 침전되는 성질을 이용한다. 본 연구에서는 오미자 추출물에는 무기이온이 Ca 86ppm, Mg 28ppm, Na 101ppm, Al 45ppm등이 함유되어 있으나 이 정도의 농도로서는 두부를 응고시키기에는 충분하지 못하지만, 이러한 무기금속이온들이 동일한 pH를 가지는 용액보다 이온세기를 증가시켜 두부응고 입자가 커진다고 생각된다. 그러므로 오미자 추출액 속에 포함되어 있는 유기산의 농도 및 무기이온들이 모두 영향을 미친다고 사료된다. 특히 오미자 추출물의 농도가 3%, 5%인 경우에는 두부 응고가 잘 되지를 않았으며, 농도가 20%이상인 경우에도 입자 매우 작게 침전이 되므로 두부 성형이 잘 안된다. 그러므로 최적의 오미자 추출물의 농도는 10% 정도이고 전체 유기산의 농도로 보면 10%~15%와 약간의 무기금속이온들을 포함하고 있어야 한다. 또한 오미자 추출액은 오랫동안 보관하기가 어렵기 때문에 진공 냉동 건조하여 분말화하여 사용하는 것도 좋은 방법이 될 것이다.

라. 참 고 문 헌

1. Il Jun Kang, Yasuki Matsumura, Koji Ikura and Tomohiko Mori, J. Agri. Food. Chem., 1994, 42, 159
2. Catriona M.M. Lakemond, Harmen H.J. de Jongh, Alphons G.J. Voragen, Food

- Hydrocolloids, 2003, 17, 365
3. Milena Bartlova, Lubomir Opletal, Vladimir Chobot, Helena Sovova, J. Chromatography B, 2002, 770, 283
 4. Lea Lojkova, Jiri Slanina, Jiri Vejrosta, Phytochem. Analysis, 1997, 8, 261
 5. Kyung-Hyung Ku, Woo-Jung Kim, Kor. J. Food. Sci. Technol. 1994, 26, 26
 6. Kyung-Im Kim, Joo-Hyung Nam, Tai-Wan Kwon, Kor. J. Food. Sci. Technol. 1973, 5, 178
 7. Kyu Hawn Hyun, Hack Jin Kim, Soo Cheol Shin, Kor. J. Plant. Res, 2000, 13, 35
 8. Kyung-Tack Kim, Ji-Soon Im, Sung-Soo Kim, Kor. J. Food. Sci. Technol. 1996, 28, 965
 9. Kyu Hawn Hyun, Hack Jin Kim, Hyun Chae Jeong, Kor. J. Plant. Res, 2002, 15, 1
 10. Joung Sook Lee, Mi Gyeong Lee, Sung Woo Lee, Kor. J. Dietary Culture, 1989, 4, 173
 11. Guoyan Zhang, Yasuki Matsumura, Shinya Matsumoto, J. Agric. Food Chem., 2003, 51, 236
 12. Mohamad Ramlan Bin Mohamed Salleh, Noboru Kato, J. Agric. Food Chem., 2002, 50, 7380
 13. Chan-Kyeong Park, In-Kyeong Hwang, J. Food. Sci. Technol. 1994, 26, 355
 14. Soon-Nam Ko, Woo-Jung Kim, J. Food. Sci. Technol. 1992, 24, 154
 15. Soo Cheol Shin, Kyu Hawn Hyun, Kab Yeon Lee, Kor. J. Plant. Res, 1998, 11, 47
 16. Joung Sook Lee, Sung Woo Lee, Kor. J. Dietary Culture, 1989, 4, 181

: 3차년도에 연구 100% 달성

제 2절: 제 2세부과제

제1세부 과제 (1차년 : 박갑주)

세부과제별 연구기관	연구책임자	당해연도 소요예산
용인대학교	강 현 민	45,000,000원

연구 결과 :

수 십 종의 한약재 및 한약처방을 이용하여 신규 천연물 두부응고제를 개발하기 위한 연구를 진행한 결과 이들 중 한약처방인 생맥산이 기존 두부응고제를 대체할 수 있는 뛰어난 두부응고 효과를 나타내었으며, 장기간 알코올을 투여하여 전신피로 및 간손상이 유도된 Rat에 이 생맥산 및 생맥산을 이용하여 응고시킨 두부를 5주간 투여한 결과 생맥산 추출물이 뛰어난 항피로 및 항산화 가능성을 나타내었고 생맥산 응고 두부 역시 기존 시판중인 일반 두부에 비해 간손상 예방, 치료 효과 및 항피로효과가 뛰어난 것으로 연구결과가 나타났다.

1. 제1세부 과제 (1차년 : 박갑주)

세부과제별 연구기관	연구책임자	당해연도 소요예산
용인대학교	강 현 민	45,000,000원

한약제로부터 두부응고제의 개발

가. 재료 및 방법

1) 실험재료-120여종의 한약재 및 13종의 한약 처방을 스크리닝하여 오미자 및 오미자를 포함한 생맥산이 대두단백질 응고 기능이 뛰어나다는 예비실험 연구결과를 얻었다. 생맥산은 동의보감을 비롯한 전통의학서에 보혈, 양혈하며, 폐음허(肺陰許)로 인한 권태무력(倦怠無力)·호흡곤란·현기증·해수·열감(熱感) 등의 치료 기능을 갖는 대표적인 처방으로 기록된 약으로^{17, 18)} 이의 구성약재는 오미자, 맥문동, 인삼, 황기이다. 따라서 본 연구에서는 예비실험 연구결과에 따라 생맥산에 호박을 가미하여 이를 생리활성 기능을 갖는 두부응고제로 개발키로 하였으며 본 연구에서 사용된 가미호박 생맥산(생맥산에 호박을 가미한 처방)의 구성 한약재는 2000년 10월에 경동시장에서 구입하여 사용하였다. 생맥산과 가미호박생맥산의 구성성분인 오미자, 맥문동, 황기, 호박의 학명 및 주치, 적응증은 아래와 같다.

맥문동 (麥門冬) : (1) 백합과(蓼科)(덤불란과). 치계초(治階草) *Ophiopogon japonicus* KER-GAWLER. [소엽맥문동(小葉麥門冬)] 괴근(槐根)의 건조품. (2) 포도당·점액질·소량의 β -sitosterol·vitamin A모양의 물질. (3) 윤조생진(潤燥生津)·화담지해(化痰止咳)

▷기원(起源) : 백합과 식물인 지계초의 괴근을 건조한 것이다.

▷효능(效能) : 양음윤조(養陰潤燥) · 생진지해(生津止咳)

▷주치(主治) : 폐조건해(肺燥乾咳) · 토혈(吐血) · 객혈(咯血) · 폐 (肺) · 폐옹(肺癰) · 열건구조(咽乾口燥) · 허로번열(虛勞煩熱)

오미자 (五味子) : (1) 오미자科. 북오미자(北五味子) *Schizandra chinensis* BALL. (오미자)의 성숙과실의 건조품. (2) citral 등의 정유 · schizandrin · vitamin A 모양의 물질 · vitamin C · 유기산. Ether 추출물(抽出物)에 각종 약리(藥理)가 인정되어 있음. (3) 림폐자신(斂肺滋腎) · 생진림두(生津斂肚) · 삼정지사(澀精止瀉). 중추신경계흥분(中樞神經系興奮) · 진해 담(鎮咳 痰) · 자궁흥분(子宮興奮) · 항균(抗菌) · Transaminarze 강하작용(降下作用)이 인정됨. 폐신양허(肺腎陽虛)에 사용. 본품은 오미(五味)를 고루 갖추고 있는데, 특히 산(酸) · 미(味)가 탁월하므로 소모된 폐기(肺氣)를 수렴(收斂)하여 익기생진(益氣生津)하고, 아울러 익신기(益腎氣)하여 진원(眞元)을 고섭(固攝)한다. 그 성질이 따뜻하되 건조하지 않아 폐신(肺腎)의 음허(陰虛)와 양허(陽虛)를 막론하고 모두 사용할 수 있다. 일반적으로 폐허(肺虛)로 인한 천해(喘咳) · 자한(自汗) · 도한(盜汗) · 신허(腎虛)로 인한 골정(骨精) · 구사불지(久瀉不止) 등을 치료하는 데 사용한다.

인삼(人蔘) : (1) 오갈피나무科. 인삼(人蔘) *Panax ginseng* G.A.MEY.(인삼)의 근(根)의 건조품. (2) panacene · panaquilon · panaxin · ginsenin · 인삼산(人蔘酸) · vitamin A · B₁ · B₂ · C, 자당 · 포도당 · 과당 · 맥아당 · choline · 무기염 · 고미질(苦味質) · 점액(粘液)등. (3) 대보원기(大補元氣) · 안신익지(安神益智) · 건비익기(健脾益氣) · 생진(生津). 신경계흥분(神經系興奮) · 부신피질기능흥분(副腎皮質機能興奮) · 성선자극(性腺刺激)Hormone모양의 작용 · 강심 · 혈당강하(血糖降下) · 소화흡수와 신진대사 항진(亢進) · 항이뇨(抗利尿) · 항 Anaphylaxis 등의 작용. 주로 급성 쇼크와 만성쇠약자에게 사용.

황기(黃耆) : (1)콩科. 황기 *Astragalus membranaceus* BGE.(황기)의 뿌리의 건조품. (2) 염산 · corin · amino acid 등. (3) 보기승양(補氣升陽) · 탁독배농(托毒排膿) 본품은

기허(氣虛)를 치료하는 요약(要藥)이야. 기허불함(氣虛不陷)인 경우에 사용하면 보기승양(補氣升陽)하고, 표허불고(表虛不固)인 경우에 사용하면 고표지한(固表止汗)하며, 기혈부족(氣血不足)에 사용하면 액기생혈(益氣生血)하며, 기허부종(氣虛不腫)에 사용하면 온양이수(溫陽利水)하고, 기허혈비(氣虛血痺)에 사용하면 온경화혈(溫經和血)한다.

호로(葫蘆) : (1) 박과. *Lagenaria siceraria*(MOLINA.) STANDL.(밤나무꽃)의 과실 (호롱박).(2) 포도당, pentosan 등. (3) 이수(利水)·해열(解熱)·거습소종(濕消腫)

생맥산(生脈散) <내외상관혹론(內外傷辨惑論)>

맥문동(麥門冬) 12g 인삼(人蔘) 6g 오미자(五味子) 5g <수전복(水煎服)>

▷적응증(適應症) : 폐음허(肺陰許)로 인한 권태무력(捲怠無力)·호흡곤란·현기증·해수·열감(熱感) 등.

▷효능 : 익기생진(益氣生津)하고 렴음지한(斂陰止汗)하는 효능이 있다.

▷주치 : 기음부족(氣陰不足)으로 인한 체권기단나언(體倦氣短懶言), 구갈다한(口渴多汗), 인건설조(咽乾舌燥),하고 맥(脈)이 허약(虛弱)한 증상(症狀)과 구해(久咳)에 의한 상폐(傷肺)로 기음(氣陰)이 양상(兩傷)되어 나타나는 견해다기(乾咳短氣), 자해(自咳)등의 증상(症狀)을 치료한다.

생약 엑기스의 제조-가미호박생맥산은 오미자, 맥문동, 황기, 인삼, 호박 각 60g(총 300g)에 증류수 1500 ml을 넣어 2시간 30분 동안 약탕기(대응약탕기)에서 추출한 후 가제를 이용하여 1차 여과하고 8000 xg에서 15분간 원심분리한 엑기스를 4℃에 보관하였다가 사용하였고 가미호박생맥산을 구성하는 주요 한약재인 오미자는 이 한약재 150g에 증류수 1500 ml을 넣어 2시간 30분 동안 약탕기(대응약탕기)에서 추출한 후 가제를 이용하여 1차 여과하고 8000 xg에서 15분간 원심분리한 엑기스를 4℃에 보관하였다가 시료로 사용하였다.

2) 실험 시료의 분류

No. 1 두유액 + 가미호박생맥산 추출물

- No. 2 두유액 + 오미자 추출물
- No. 3 두유액 + 20% Mgcl₂ 용액(양성대조군)
- No. 4 두유액 + 증류수(음성대조군)

3) 두부의 제조

1. Bean powder 100g에 D.W. 1000ml을 첨가하여 통상 10% 두유 액으로 만든 후
2. 잘 저으면서 상기 시료를 40분간 끓이고
3. 이때 기포가 생기면 4-5 방울의 soybean oil을 첨가하였다.
4. 끓인 두유액을 gauze 사용하여 필터 후 soybean milk와 bean curd refuse를 분리하였다.
5. soybean milk를 92^oC까지 식힌 후 50ml의 soybean milk를 beakers에 분주하였다.
6. 10%(v/v, 5ml)의 herb 추출물을 각각의 beakers에 첨가하여 섞은 후 실온에 1시간 방치하였다.
 - * 최초 bean powder 100g 에 대해 시료 2g 의 비율로 첨가
 - Herb complex는 (v/v)으로 soymilk 50ml(5g)에 대해 시료 5ml의 비율로 첨가
 - Control인 Mgcl₂는 soybean milk 50ml (5g)의 2%(0.1g) 첨가
(즉, 20% Mgcl₂ 용액 0.5ml 첨가)
7. 1시간 후 각각의 시료의 사진을 찍어 응고정도를 확인하였고, 1.5ml eppendorf tube에 시료를 옮긴 후 6000rpm에서 5분간 원심 분리하여 그 상층액의 pH와, O.D. (280nm, 60를 측정하여 응고 정도를 확인하였다.
8. pH의 변화에 따른 두부응고의 변화를 확인하기 위해 각각의 시료를 1.5 ml eppendorf tube에 옮긴 후 pH를 중성 pH인 7.0으로 맞춘 후 이들 시료를 상온에 24시간 방치 후 6000rpm에서5분간 원심 분리하여 그 상층액의 O.D. (280nm, 600nm) 값을 측정하였다.

4) Physiological effects

체중 290-310g 의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 4주 정도 순화시킨 후 사용하였

으며, 물과 고형사료는 자유롭게 섭취하도록 충분히 공급하였다. 실험 전 16-18시간 정도 절식한 후에 Table 1과 같이 시험물질(10ml/kg)과 20% alcohol을 2ml씩 1시간에 한번씩 3회 투여하였다. 그리고 마지막 시험물질을 투여하고 시간대 별로 혈액을 채취하였다. 혈액 채취 시에는 혈액이 응고되지 않게 하기 위해서 항 응고제인 EDTA가 들어 있는 tube를 사용하였다. 검사 시약은 Ethanol kit(Roche, Swizerland)을 사용하여 생화학 분석기(Cobas Integra, Roche, Swizerland)로 분석하였다. 0시간의 대조군 혈액은 alcohol 복용 30분전에 채취하였다. 그리고 혈액을 채취하는 시간은 0시간, 90분후, 1시간 30분후로 정하였다. 결과는 Table 2. 와 같다.

나. 결과 및 고찰

1) 두부응고 1시간 후 각 시험군의 pH 및 O.D. 값 측정 결과

soybean milk를 92°C까지 식힌 후 가미호박생맥산 및 오미자 추출물, 양성대조구인 Mgcl₂를 첨가하여 섞은 다음 1시간 실온에서 응고시킨 후의 pH 및 O.D. 값은 Table 1과 같고 응고형태는 Figure 1 - 4와 같다.

Table 1. pH and O.D values of each test sample at 1 hour after soybean milk coagulation.

	pH	O.D (280nm)	O.D (600nm)
No. 1	5.57	2.741	0.038
No. 2	5.09	2.741	0.052
No. 3	6.27	2.869	1.342
No. 4	6.80	2.097 × 10 ²	2.262 × 10

각각의 시료가 대두 단백질을 응고시킨 정도를 측정하기 위해 두유액이 응고되기 시작한지 1시간 후 각각의 시료를 1.5 ml eppendorf tube에 옮긴 후 6000rpm에서 5분간 원심 분리하여 그 상층액의 O.D.(280nm)값을 측정한 결과 No. 1(두유액 + 가미호박생맥산 추출물)과 No. 2(두유액 + 가미호박생맥산 추출물)는 각각 2.741의 수치를 보여 양성대조구인 No. 3(두유액 + $MgCl_2$)의 2.869에 비해 그 상층액에 남아 있는 단백질의 양이 더 적은 결과를 보여 가미호박생맥산 추출물 및 오미자 추출물이 기존의 두부 응고제인 염화칼슘에 비해 대두단백질을 더욱 빨리 그리고 더욱 많은 양을 응고시키는 결과를 얻었고 Figure 1에 나타난 사진 촬영 결과에서도 이를 확인 할 수 있었다. 또한 두유액의 solidify를 측정하기 위해 600nm에서의 O.D 값을 측정한 결과 No. 1(두유액 + 가미호박생맥산 추출물)과 No. 2(두유액 + 가미호박생맥산 추출물)는 각각 0.038 및 0.052의 수치를 보여 양성대조구인 No. 3(두유액 + $MgCl_2$)의 1.342에 비해 그 상층액의 turbid가 유의성 있게 적은 결과를 보여 가미호박생맥산 추출물 및 오미자 추출물이 기존의 두부 응고제인 염화칼슘에 비해 두유액을 각각 유의성이 있는 비율로 빨리, 그리고 더욱 많은 양을 응고시키는 매우 positive한 결과를 얻었다.

2) 두부응고 1시간 후 각 시험군의 pH를 중성 pH인 7.0으로 맞춘 후 O.D 값을 측정한 결과

가미호박생맥산 추출물(pH 4.0) 및 오미자 추출물(pH 3.1)이 비교적 강한 산성 pH 이므로 이들 시료를 두유액에 첨가한 후 pH의 변화에 따라 두부응고의 정도가 변화하는지를 확인하기 위해 두유액과 가미호박생맥산 추출물(pH 4.0) 및 오미자 추출물(pH 3.1)을 섞어 응고가 시작된 지 1시간 후 각각의 시료를 1.5 ml eppendorf tube에 옮겨 pH를 중성 pH인 7.0으로 맞춘 후 이들 시료를 상온에 24시간 방치 후 6000rpm에서 5분간 원심 분리하여 그 상층액의 O.D.(280nm, 600nm) 값을 측정한 결과 Table 2와 같았다.

Table 2. pH and O.D values of each test sample(pH values raise to 7.0) at 1 hour after soybean milk coagulation.

	pH	O.D (280nm)	O.D (600nm)
No. 1	7.00	2.741	0.063
No. 2	7.00	2.684	0.045
No. 3	7.00	2.838	1.380
No. 4	7.00	2.274×10^2	0.665×10^2

즉, 각각의 시료의 pH를 7.0으로 올린후 No. 1(두유액 + 가미호박생맥산 추출물)은 280nm에서 2.741, No. 2(두유액 + 가미호박생맥산 추출물)는 2.684, 양성대조구인 No. 3(두유액 + Mgcl₂)는 2.838의 수치를 나타내 pH를 7.0으로 올리기 전과 차이를 보이지 않았고 600nm에서의 O.D 값을 측정 한 결과도 No. 1(두유액 + 가미호박생맥산 추출물)과 No. 2(두유액 + 가미호박생맥산 추출물)는 각각 0.063 및 0.045, 양성대조구인 No. 3(두유액 + Mgcl₂)는 1.380의 수치를 나타내 pH를 올리기 전과 실험 오차 범위내의 유의성 없는 오차를 보였을 뿐이다. 따라서 pH의 변화가 가미호박생맥산 추출물 및 오미자 추출물의 대두단백질을 응고시키는 능력에 아무런 지장을 주지 않는다는 것을 확인할 수 있었다.

3) Alcohol lowering effects Table 1. 과 같이 시험물질 투여한 다음 3시간 경과 후 생맥산 투여군의 혈중알코올농도는 현저히 감소하였다.

Table 1. 시험물질 투여

	투여방법
1차 투여	시험물질 +20% alcohol
2차 투여	20% alcohol
3차 투여	20% alcohol +시험물질

Table 2. 혈중알코올농도

group	Alcohol concentration (%)	
	90min	180min
negative	0.17±0.01 ¹⁾	0.16±0.02
positive	0.15±0.03	0.14±0.02
생맥산	0.17±0.02	0.11±0.02
유3+동충	0.16±0.02	0.11±0.02
시제품	0.18±0.03	0.11±0.04

1) Mean ± S.D.

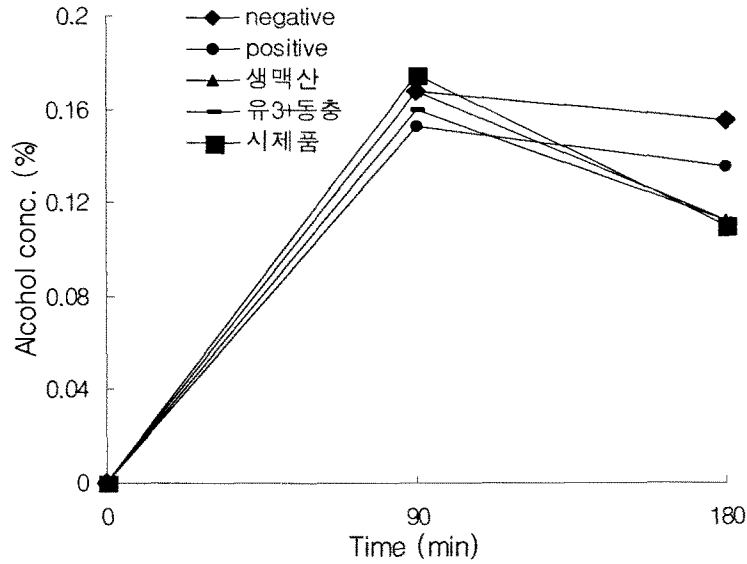


Figure 1. 채혈한 혈액내의 알콜농도의 변화

4) 항피로 효과

실험동물 : 체중 310-320g 의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 4주 정도 순화시킨 후 사용하였으며, 물과 고형사료는 자유롭게 섭취하도록 충분히 공급하였다. Table 1과 같이 시험 물질을 투여하고, 마지막 시험물질을 투여한 후 3시간 후에 ether 마취 하에 부검하여 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액은 상온에서 30분정도 방치한 후 원심분리(6000×g, 15min)하여 혈청을 분리 후 혈청 생화학적 검사를 위해 사용되었다. 혈청 내 분석항목은 스트레스에 의한 전신피로와 관련이 큰 것으로 보고된 lactate dehydrogenase (LDH), aspartate transaminase(AST) 및 alanine transaminase(ALT) 등을 선정하여 항피로 효과를 측정하였다. 이 때 사용한 kit은 각

각 Boehringer Mannheim(Germany)에서 제조한 Kit을 사용하였고 자동 생화학 분석기(Hitachi 747, Japan)을 이용하여 측정하였다. 실험 결과는 mean±S.D. 값으로 표시하였으며, Student's t-test에 의해 p 값이 0.5 또는 0.05 미만일 때 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다. 생맥산 투여군의 ALT, AST 수치는 정상대조군에 가깝게 감소하였으며 LDH 수치도 증가하여 생맥산의 전신피로에 대한 항피로효과를 나타내는 연구결과를 얻었다.

Table 3. ALT, AST LDH

group	ALT (U/L)	AST (U/L)	LDH (U/L)
normal	82.50±0.76 ¹⁾	32.60±4.41	1059.75±409.67
negative	104.60±10.44 [#]	38.80±3.87	1348.20±465.55*
positive	99.60±5.28 [#]	33.80±2.79	1346.33±176.93*
생맥산	96.50±7.50	33.60±4.32	1194.00±251.63
유3+동충	99.20±2.29 [#]	32.20±2.32	1227.80±470.97
시제품	101.80±11.36 [#]	35.40±3.44*	1144.80±274.54

1) Mean ± S.D. * : p < 0.5 compared to normal control group. # : p < 0.05 compared to normal control group

5) 항산화 효과

체중 320-340g 의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 4주 정도 순화시킨 후 사용하였으며, 물과 고형사료는 자유롭게 섭취하도록 충분히 공급하였다. 시험물질 투여 방법은 Table 1. 과 같다. 마지막 시험물질을 투여하고 16시간동안 방치한 후에 과산화 지질 형성 정도를 혈청에서 MDA(Malone Dialdehyde)를 정량하여 측정하였다. 검사는 MDA Kit(BIOTECH LPO-586 Assay. Oxis International, Inc. America)을 이용하여 Spectrophotometer (HP 8425A. Hewlette Packard. America)로 분석하였다. 실험 결

과는 mean±S.D. 값으로 표시하였으며, Student's t-test에 의해 p 값이 0.5 미만일 때 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다. 생맥산 투여군의 MDA 수치가 정상대조군과 비교하여 다소 감소하였으며 비교적 완만한 항산화효과를 나타낸 것으로 보인다.

Table 3. MDA

group	MDA (μmol/L)
normal	0.51±0.23 ¹⁾
negative	0.80±0.36*
positive	0.51±0.07
생맥산	0.71±0.08*
유3+동충	0.47±0.29
시제품	1.21±0.30*

1) Mean ± S.D.

* : p<0.5 compared to normal control group

6) 간의 조직학적 관찰

에테르로 흡입마취를 시킨 후 쥐의 흉강을 연 다음 심장의 좌심실에서 카테타로 혈액을 뽑아냈다. 그 후 생리식염수(0.9% NaCl)로 투여하여 혈액을 씻어내고 고정액(4% paraformaldehyde pH 7.2)으로 대체하였다. 고정 후 간 조직을 절취하여 위에서 사용한 동일한 고정액에 12시간 고정시켰다. 0.1M PBS buffer에 18시간 수세하였다. 탈수는 에탄올을 농도별로 1시간씩 각 단계별로 실행한 후 Xylene에서 투명과정을 거친 후 paraffin에 포매하였다. 포매된 조직은 rotary microtome(Leica Model 820)으로 4 μm로 연속절편을 제작하였다. 젤라틴으로 처리된 slide glass에 mounting 한다. 건조 후 다시 탈 paraffin 과 재함수 과정을 거친 다음 탈수를 역으로 하여 Xylene 3단계를 각 5분간 거쳤다. Hematoxylin and Eosin으로 염색 후 다시 탈수 과정을 거친 다음

mounting 하였다. 광학 현미경으로 관찰 후($\times 100$, $\times 200$) 사진 촬영하여 비교 분석하였다. 광학현미경과 시료제작은 동일하게 한 후 고정액(4% paraformaldehyde와 2.5% glutaraldehyde)으로 12시간 고정하였다. 세절한 다음 오스뮴산 (OsO_4 , 2% Osmium tetroxide)으로 1시간 동안 상온에서 고정 한 다음 수세하였다. 탈수는 에탄올을 농도별로 60분씩 처리하였다. 탈수된 조직은 propylene oxide로 치환하여 epon resin에 포매해서 incubator(60°C , 72시간)에서 중합하였다. 중합된 조직은 ultramicrotome으로 60~80 nm 두께로 절편을 제작하여 copper grid(300 mesh)부착시킨 다음, 건조시킨 후 1% uranyl acetate에서 15분간 lead citrate로 전자염색하여 투과전자현미경(JEM-2000 EX II, 80 KV)으로 관찰하였다.

간조직의 해부학적 관찰에서는 각 개체간에는 차이가 다양하나 평균적으로 고려하면 알코올 섭취군은 Fig. 1에서와 같이 지방구(lipid droplets)가 다수 출현함을 볼 수 있었다. 이러한 대조군의 지방분포는 반복실험동안 동일하게 일어났다. 증류수를 투여한 정상대조군은 정상적인 간세포판(hepatic plate)의 배열을 볼 수 있었고(Fig. 1), 또한 국소수의 지방구를 관찰할 수 있었으며, 음성대조군과 양성대조군의 경우 정상 대조군보다 그 수와 크기가 훨씬 증가되었을 뿐만 아니라 지방입자의 증가가 중심정맥(central vein, CV)주변부의 간세포에서 문맥정맥(portal vein)공간까지 확장되어 간소엽 전체에서 일어난 것을 볼 수 있었다. 이는 간이 에탄올에 의해 지속적으로 손상을 받으면 지방의 축적이 나타난다는(47)의 보고와도 일치하며 조직학적으로 췌소의 지방간에서는 지방적 침착이 중심정맥에서 시작하여 점차 문맥쪽으로 확산되며, 세포내 지방적 분포는 세포마다 다양하다는 보고(45-46)가 이를 뒷받침 해준다. 생맥산 투여군(Fig. 1)에서는 대조군에 비해 지방구가 국소적으로 드물게 관찰되어 정상에 가깝게 회복된 것으로 볼 수 있다. 이는 생맥산의 구성성분 중 인삼의 기초대사를 향상시키고(4), 생체내에서 단백질 합성을 촉진하는 작용(5)과 맥문동이 간의 glycogen을 증가시킨다는 보고서와 오미자의 간 보호작용(15-17)등의 작용기전으로 지방간의 완화와 개선에 영향을 미친 것으로 사료된다.

알코올로 유도된 지방간의 미세소기관들의 형태학적 측면을 살펴본 결과로 정상 대조군(Fig.2)에서는 핵(N, Nucleus), 미토콘드리아(M, Mitochondria)등 간 세포질내의 미세소기관의 변화는 거의 보이지 않았으며, 알코올만 투여한 음성 대조군(Fig. 2)에서

는 세포질내에 다수의 커다란 지방방울(L, Lipid droplets)들을 관찰할 수 있었고, 담세관 주위에는 전자밀도가 다소 높은 용해소체인 이차 라이소솜(↑, Secondary lysosome)의 출현을 볼 수 있었다. 또한 핵 주위에는 리보솜이 부착된 대부분의 조면소포체(rER, rough endoplasmic reticular)가 그물모양구조를 하고 있었으나, 일부에서는 조면소포체의 층판상 배열이 다소 불규칙하게 나타났다. 양성 대조군(Fig. 2)은 음성대조군과 비슷한 양상을 보였으며 지방방울의 크기가 더 크게 관찰되었다. 또한 원형과 길어진 미토콘드리아가 함께 관찰되었다. 생맥산 투여군(Fig. 2)에선 정상 대조군에 가까울 만큼 세포질내 미세구조들의 변화가 드물게 나타나 간 손상 억제 및 회복에 탁월한 효과가 있다고 할 수 있다. 본 실험에서 rER의 발달은 단백질 합성에 활성을 주는 것으로 생각되며, 또한 대조군에서의 지방방울의 대형화 및 다수 출현 등의 소견은 간이 에탄올에 의해 지속적으로 손상을 받으면 지방의 축적이 나타난다는 보고(47)와도 일치한다.

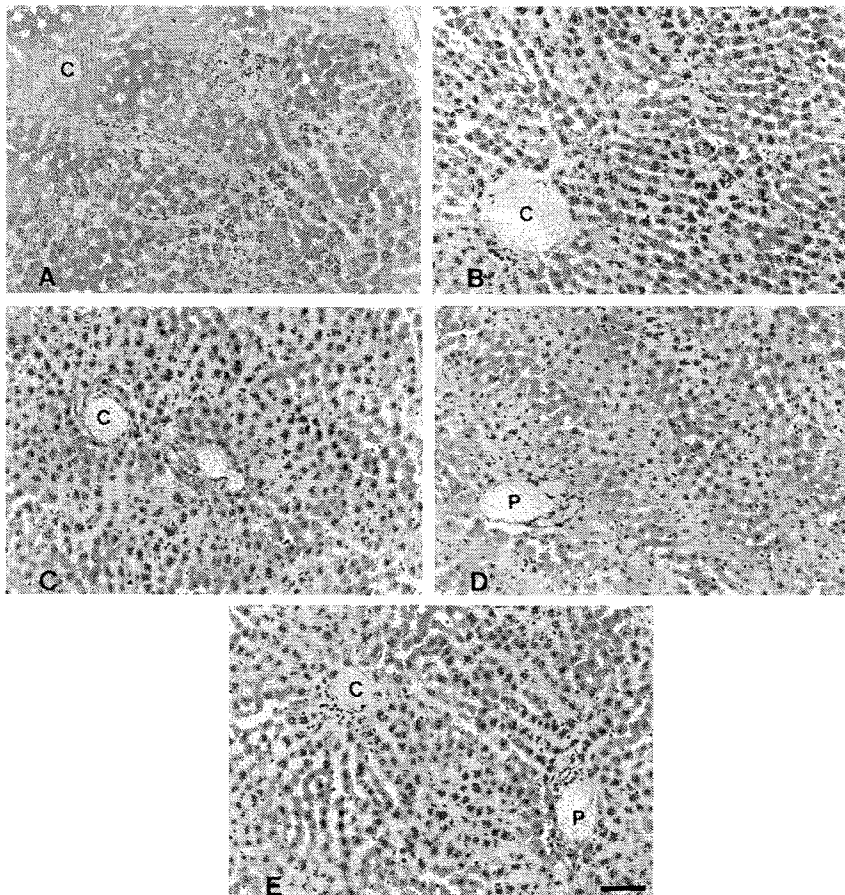


Figure 1. Light micrographs of hepatic tissue.

(A), Hepatic tissue from normal control rat exhibiting normal morphology. (B), Hepatic tissue from rat treated with ethanol alone. Cytoplasmic lipid droplets are evident. (C), Hepatic tissue from rat treated with both ethanol and hangover release medicine. (D), Hepatic tissue from rat treated with ethanol and SMS-1. (E), Hepatic tissue from rat treated with ethanol and SMS-2. (C-Central vein, P-Portal vein) Scale bar represents 50 mm. Cell staining was carried out by the H&E staining method.

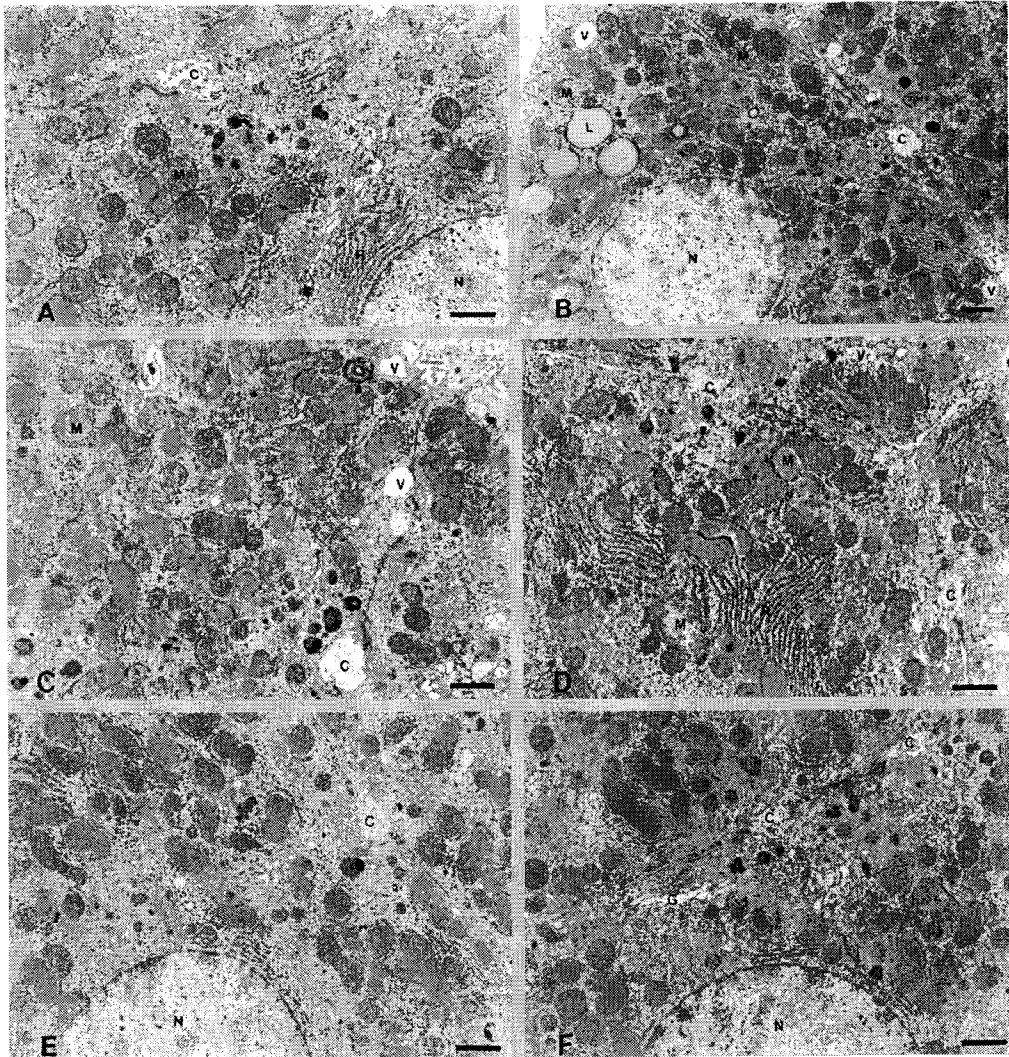


Figure 2. Electron micrographs of hepatocytes from rat treated with ethanol and SMS1 or 2.

(A), Hepatocytes from normal control rat. (B), Hepatocytes from rat treated with ethanol alone. B. Swollen mitochondria with destroyed cristae are observed. Lipid droplets and variably sized vesicles are increased in the cytoplasm. C. Bile

canaliculi between the adjacent hepatocytes are usually enlarged and microvilli in the lumen are severely depleted. Myelin figures, swollen mitochondria and vesicles are also observed in the cytoplasm. (C), Hepatocytes from rats treated with both ethanol and hangover release medicine. Degenerate mitochondria, myelin-like figures and small vesicles are still observed but these signs of degeneration are less marked compared to the disease group. (D), Hepatocytes from rat treated with ethanol and SMS1. General ultrastructural appearance is similar to that of normal untreated control rat. (E), Hepatocytes from rat treated with ethanol and SMS2. General ultrastructural appearance is similar to that of normal untreated control rat except for the slight dilatation of the Golgi cisterns. C, bile canaliculus; G, Golgi cisterns; L, lipid droplet; M, mitochondria; N, nucleus; R, rough endoplasmic reticulum; V, vesicle; Arrow head, myelin-like figure. Scale bar=1 mm.

: 1차년도에 연구 100% 달성

2. 제1세부 과제 (2차년 : 박갑주)

세부과제별 연구기관	연구책임자	당해연도 소요예산
용인대학교	강 현 민	45,000,000원

한약제로부터 두부응고제의 개발

가. 재료 및 방법

1) 실험재료-120여종의 한약재 및 13종의 한약 처방을 스크리닝하여 오미자 및 오미자를 포함한 생맥산이 대두단백질 응고 기능이 뛰어나다는 예비실험 연구결과를 얻었다. 생맥산은 동의보감을 비롯한 전통의학서에 보혈, 양혈하며, 폐음허(肺陰許)로 인한 권태무력(倦怠無力)·호흡곤란·현기증·해수·열감(熱感) 등의 치료 기능을 갖는 대표적인 처방으로 기록된 약으로^{17, 18)} 이의 구성약재는 오미자, 맥문동, 인삼, 황기이다. 따라서 본 연구에서는 예비실험 연구결과에 따라 생맥산에 호박을 가미하여 이를 생리활성 기능을 갖는 두부응고제로 개발키로 하였으며 본 연구에서 사용된 가미호박 생맥산(생맥산에 호박을 가미한 처방)의 구성 한약재는 2002년 11월에 경동시장에서 구입하여 사용하였다. 생맥산과 가미호박생맥산의 구성성분인 오미자, 맥문동, 황기, 호박의 학명 및 주치, 적응증은 아래와 같다.

맥문동 (麥門冬) : (1) 백합과(躑躅草科). 치계초(治階草) *Ophiopogon japonicus* KER-GAWLER. [소엽맥문동(小葉麥門冬)] 괴근(槐根)의 건조품. (2) 포도당·점액질·소량의 β -sitosterol·vitamin A모양의 물질. (3) 윤조생진(潤燥生津)·화담지해(化痰止咳)

▷기원(起源) : 백합과 식물인 지계초의 괴근을 건조한 것이다.

▷효능(效能) : 양음윤조(養陰潤燥)·생진지해(生津止咳)

▷주치(主治) : 폐조건해(肺燥乾咳) · 토혈(吐血) · 객혈(咯血) · 폐 (肺) · 폐옹(肺癰) · 열건구조(咽乾口燥) · 허로번열(虛勞煩熱)

오미자(五味子) : (1) 오미자科. 북오미자(北五味子) *Schizandra chinensis* BALL. (오미자)의 성숙과실의 건조품. (2) citral 등의 정유 · schizandrin · vitamin A 모양의 물질 · vitamin C · 유기산. Ether 추출물(抽出物)에 각종 약리(藥理)가 인정되어 있음. (3) 렴폐자신(斂肺滋腎) · 생진렴두(生津斂肚) · 삼정지사(澁精止瀉). 중추신경계흥분(中樞神經系興奮) · 진해 담(鎮咳痰) · 자궁흥분(子宮興奮) · 항균(抗菌) · Transaminarze 강하작용(降下作用)이 인정됨. 폐신양허(肺腎陽虛)에 사용

본품은 오미(五味)를 고루 갖추고 있는데, 특히 산(酸) · 미(味)가 탁월하므로 소모된 폐기(肺氣)를 수렴(收斂)하여 익기생진(益氣生津)하고, 아울러 익신기(益腎氣)하여 진원(眞元)을 고섭(固攝)한다. 그 성질이 따뜻하되 건조하지 않아 폐신(肺腎)의 음허(陰虛)와 양허(陽虛)를 막론하고 모두 사용할 수 있다. 일반적으로 폐허(肺虛)로 인한 천해(喘咳) · 자한(自汗) · 도한(盜汗) · 신허(腎虛)로 인한 골정(骨精) · 구사불지(久瀉不止) 등을 치료하는 데 사용한다.

인삼(人蔘) : (1) 오갈피나무科. 인삼(人蔘) *Panax ginseng* G.A.MEY.(인삼)의 근(根)의 건조품. (2) panacene · panaquilon · panaxin · ginsenin · 인삼산(人蔘酸) · vitamin A · B₁ · B₂ · C, 자당 · 포도당 · 과당 · 맥아당 · choline · 무기염 · 고미질(苦味質) · 점액(粘液)등. (3) 대보원기(大補元氣) · 안신익지(安神益智) · 건비익기(健脾益氣) · 생진(生津). 신경계흥분(神經系興奮) · 부신피질기능흥분(副腎皮質機能興奮) · 성선자극(性腺刺激)Hormone모양의 작용 · 강심 · 혈당강하(血糖降下) · 소화흡수와 신진대사 항진(亢進) · 항이뇨(抗利尿) · 항 Anaphylaxis 등의 작용. 주로 급성 쇼크와 만성쇠약자에게 사용.

황기(黃耆) : (1)콩科. 황기 *Astragalus membranaceus* BGE.(황기)의 뿌리의 건조품. (2) 염산 · corin · amino acid 등. (3) 보기승양(補氣升陽) · 탁독배농(托毒排膿) 본품은 기허(氣虛)를 치료하는 요약(要藥)이야. 기허불함(氣虛不陷)인 경우에 사용하면 보기승양(補氣升陽)하고, 표허불고(表虛不固)인 경우에 사용하면 고표지한(固表止汗)하며, 기혈부족(氣血不足)에 사용하면 액기생혈(益氣生血)하며, 기허부종(氣虛不腫)에 사용하면 온양이수(溫陽利水)하고, 기허혈비(氣虛血痺)에 사용하면 온경화혈(溫經和血)한

다.

호로(葫蘆) : (1) 박과. *Lagenaria siceraria*(MOLINA.) STANDL.(밤나무꽃)의 과실 (호롱박).(2) 포도당, pentosan 등. (3) 이수(利水)·해열(解熱)·거습소종(濕消腫)

생맥산(生脈散) <내외상판혹론(內外傷辨惑論)>

맥문동(麥門冬) 12g 인삼(人蔘) 6g 오미자(五味子) 5g <수전복(水煎服)>

▷적응증(適應症) : 폐음허(肺陰許)로 인한 권태무력(倦怠無力)·호흡곤란·현기증·해수·열감(熱感) 등.

▷효능 : 익기생진(益氣生津)하고 렴음지한(斂陰止汗)하는 효능이 있다.

▷주치 : 기음부족(氣陰不足)으로 인한 체권기단나연(體倦氣短懶言), 구갈다한(口渴多汗), 인건설조(咽乾舌燥),하고 맥(脈)이 허약(虛弱)한 증상(症狀)과 구해(久咳)에 의한 상폐(傷肺)로 기음(氣陰)이 양상(兩傷)되어 나타나는 건해다기(乾咳短氣), 자해(自咳)등의 증상(症狀)을 치료한다.

생약 엑기스의 제조-가미호박생맥산은 오미자, 맥문동, 황기, 인삼, 호박 각 60g(총 300g)에 증류수 1500 ml을 넣어 2시간 30분 동안 약탕기(대응약탕기)에서 추출한 후 가제를 이용하여 1차 여과하고 8000 xg에서 15분간 원심분리한 엑기스를 4℃에 보관하였다가 사용하였고 가미호박생맥산을 구성하는 주요 한약재인 오미자는 이 한약재 150g에 증류수 1500 ml을 넣어 2시간 30분 동안 약탕기(대응약탕기)에서 추출한 후 가제를 이용하여 1차 여과하고 8000 xg에서 15분간 원심분리한 엑기스를 4℃에 보관하였다가 시료로 사용하였다.

2) 두부의 제조

1. Bean powder 100g에 D.W. 1000ml을 첨가하여 통상 10% 두유 액으로 만든 후, 잘 저으면서 상기 시료를 40분간 끓이고
2. 이때 기포가 생기면 4-5 방울의 soybean oil을 첨가하였다.
3. 끓인 두유액을 gauze 사용하여 필터 후 soybean milk와 bean curd refuse를 분리하였다.
4. soybean milk를 92⁰C까지 식힌 후 500ml의 soybean milk를 두부 성형기에 분주 후 2시간 동안 압착 성형하였다.
5. 그 후 성형된 두부의 사진을 찍어 형태 및 응고정도를 확인하였다.

3) Physiological test

가) 실험동물

실험동물은 체중이 100±10g인 Sprague Dawley종의 4주된 웅성 흰쥐를 대한 실험 동물센터에서 구입하여 다시 4주간 본 대학의 동물 사육실에서 적응시켰다. 4주간 적응시키는 동안에 사육실의 온도와 습도는 각각 22±2℃, 55±5%로 항온 항습을 유지하였다. 식이는 고품사료(삼양사)와 물을 자유롭게 섭취하도록 하였다.

나) 실험군의 분류

4주간 적응시킨 체중이 350g(8주령) 전후의 흰쥐 7마리를 한 군으로 하여 정상대조군(Normal Control), 음성대조군(Negative Control), 양성대조군(Positive Control) 및 실험군(Test group)으로 분류하였다. 음성대조군은 알코올과 물을, 양성대조군은 시판되고 있는 J사의 숙취해소제(숙취해소 및 간기능회복 기능)와 알코올을 섭취하도록 하였다. 실험군은 알코올과 가미호박생맥산(오미자 + 인삼 + 맥문동 + 황기 + 호박)을 투여하였다. 이때 식이는 고품 사료(삼양사)를 자유 공급하였고 알코올은 쥐 한 마리당 5g/kg.bw/day를 섭취하도록 계산하여 매일 음용수에 희석하여 공급하였다. 각 군의 처리는 Table 1과 같다.

Table 1. Composition of Groups

Group	No. of exam	Treatment
No.1 (Normal Control)	7	None-alcohol
No.2(Negative Control)	7	Alcohol + Water
No.3(Positive Control)	7	Alcohol + 숙취해소제
No.4(Test group1-T1)	7	Alcohol + 생맥산*

생맥산*; 오미자(*Schizandra chinensis*) + 인삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer)+맥문동 (*Liriope platyphylla*) + 황기(*Astragalus membranaceus* BUNGE) + 호박 (*Cucurbita* spp.)

다) 시료의 제조

가미호박생맥산은 오미자, 맥문동, 황기, 인삼, 호박 각 60g(총 300g)에 증류수 1500

ml을 넣어 2시간 30분 동안 약탕기(대응약탕기)에서 추출한 후 가제를 이용하여 1차 여과하고 8000 xg에서 15분간 원심분리한 액기스를 4℃에 보관하였다가 사용하였고 가미호박생맥산을 구성하는 주요 한약재인 오미자는 이 한약재 150g에 증류수 1500 ml을 넣어 2시간 30분 동안 약탕기(대응약탕기)에서 추출한 후 가제를 이용하여 1차 여과하고 8000 xg에서 15분간 원심분리한 액기스를 4℃에 보관하였다가 시료로 사용하였다.

라) 시료의 투여

생맥산은 60kg 성인이 하루 한약재를 100g 섭취하는 것을 기준으로 하여 역시 350g 흰쥐에 맞는 양을 계산하여 구강투여하였다.

바) 부검

사육 마지막 날 동물을 overnight로 16시간 절식시키고 ethyl ether로 약하게 마취시킨 상태에서 복부를 절개하고 주사기를 이용하여 후대정맥에서 3~4ml 혈액을 채취한다. EDTA tube에 넣어 혈액이 응고하는 것을 방지하였다. 채취한 혈액은 Aspartate aminotransferase(AST), Alanine aminotransferase(ALT), Cholesterol, Triglyceride (TG) 분석에 사용하였다. 채혈직후 간과 신장을 적출하여, 즉시 냉각된 생리식염수로 세척하고 여과지로 표면의 물기를 제거한 다음 중량을 측정하였다.

사) 체중 및 장기의 중량계측

체중은 약물 투여한 날부터 부검하기 전날까지 4주 동안 일주일에 한번씩 같은 시간에 측정하였다. 장기의 중량은 부검 후에 실험동물의 후대정맥을 찾아서 채혈한 후 간, 신장을 각각 적출하고 그 중량을 측정하였다.

아) 생화학적 검사 (AST, ALT)

채혈한 혈액을 30분 동안 실온에 방치한 후 3000xg에서 15분간 원심분리 하여 얻은 혈장의 활성치는 AST kit(Boehringer Mannheim, Germany)을 사용하여 다음과 같은 원리로 측정하였다. 혈장중의 AST의 작용으로 aspartic acid와 α -ketoglutamic acid는

oxaloacetic acid와 L-glutamic acid로 변화한다. 이때 생성된 oxaloacetic acid는 조효소 NADH의 존재 하에 MDH의 작용으로 malate로 변화되고 이때 NADH가 NAD⁺로 산화될 때의 흡광도 감소치를 파장 340 nm에서 자동 생화학 분석기(Hitachi 747)로 측정하였다.

ALT의 활성치는 ALT(Boehringer Mannheim, Germany)kit을 사용하여 자동 생화학 분석기(Hitachi 747)로 측정하였다. 혈장중의 ALT 작용으로 L-alanine과 α-ketoglutamine acid는 pyruvic acid와 L-glutamic acid로 변화한다. 생성된 pyruvate는 조효소 NADH의 존재 하에 LDH의 작용으로 lactate로 변화되고 이때 NADH가 NAD⁺로 산화될 때의 흡광도 감소치를 파장 340nm에서 자동 생화학 분석기(Hitachi 747)로 측정하였다.

자) 통계처리

모든 실험 결과 측정치는 일변수 분석법을 사용하여 통계처리 하였으며 Student's T-test를 이용하여 p<0.5 수준에서 각 실험군 간의 유의성을 검증하였다. 모든 자료는 mean±standard deviation으로 나타내었다.

나. 결과 및 고찰

1) 두부제조

성형 2시간 후에 만들어진 두부의 형태를 그림 1에 나타내었다. 신규 천연물 두부용 고제에 의해 만들어진 기능성 두부는 유백색의 색택을 지닌 두부로 일반 두부에 비해 탄력 및 조직감이 뛰어났으며 한약 냄새는 거의 나지 않았고 시식 후의 뒷맛이 일반 두부에 비해 깊고 고소한 것으로 나타나 그 상품성이 뛰어난 것으로 판단되었다

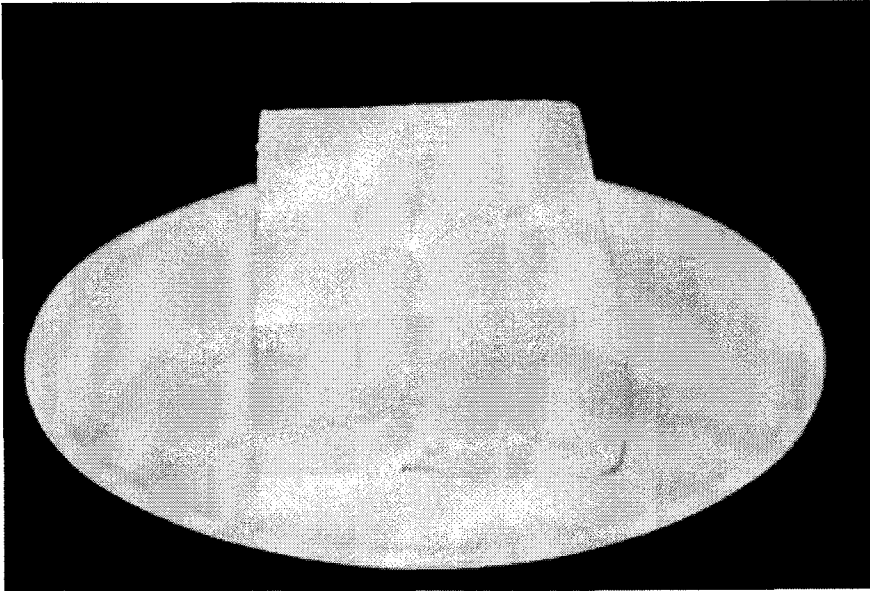


그림 1. 신규 두부응고제로 응고 후 2시간 동안 압착 성형한 두부의 모습

2) 개발된 천연물의 인체 생리활성 기능성 연구

1차년도에 시행된 생리활성 기능성 연구 중 간세포 생리활성 효과에 대한 실험을 재실시 P-1(생맥산)의 간세포 보호 및 재생 효과를 재확인하였다.

Pirola와 Lieber 등(1)은 쥐에게 알코올을 섭취시켰을 때 체중증가가 저하되었다는 연구 결과를 보고한 바 있고, 이들의 또 다른 연구에 의하면 사람이 전체 에너지 중 50%를 당질 대신 알코올로 섭취하였을 때 체중이 감소되었다는 연구 결과를 제시하였다. 이러한 이유는 알코올 섭취로 인해 산소의 소비가 증가되고 대사율이 증가되며 세포 내 microsome에서 알코올 산화기구의 ATP 생성이 저하되기 때문인 것으로 생각되고 있다.(3) 본 연구 결과도 이와 유사한 경향을 나타내었는데 실험동물 Sprague-Dawley(수컷)의 시료 투여 후 4주 동안의 성장과 체중변화량을 측정된 결과 Table 2에 나타난 바와 같다. 즉, 알코올을 투여한 음성대조군이 다른 군들에 비해 유의적으로 낮은 체중변화량을 나타내었고 생맥산을 투여한 T1군은 음성대조군에 비해 체중이 정상대조군에 가까운 유의성 있는 증가를 나타내었다.

에탄올을 장기적으로 섭취하면 지방간 및 간장의 섬유화로 간이 비대해지게 된다(4). 간의 중량은 alcohol 섭취에 의해 간 조직 내에 지질이 축적됨으로써 alcohol을 섭취시킨 모든 군에서 증가되었다는 연구보고(5-6)와 본 실험 결과도 유사한 경향을 나타내었다. Table 2에 나타난 결과를 보면 알코올을 장기 투여한 음성대조군은 알코올을 투여하지 않은 정상대조군에 비해 대체중간비율(실험동물 체중 100g 당 간중량%)이 유의적으로 증가하여 지방간 및 간장의 섬유화가 진행되었음을 알 수 있었고 따라서 알코올을 장기 투여하면 간이 비대해진다는 위의 보고와 일치함을 알 수 있었다. 그에 반해 생맥산을 투여한 T1군은 대체중간비율이 정상대조군에 가까운 회복세를 나타내어 장기간의 알코올 투여로 인한 지방간 및 간장의 섬유화에 치료 및 개선 효과가 있는 것으로 나타났다. 대체중신장비율(실험동물의 체중 100g 당 신장중량%)은 실험군이 음성대조군에 유의성($p < 0.5$)을 보였고 정상대조군에 가까운 수치를 보여 알코올 섭취로 인해 손상된 신장의 회복에 효과가 있음을 나타내었다.

Table 2. Total body weight gains and the weight ratio of liver and kidney

Groups	Total body weight gains(g)	Liver (% of body weight)	Kidney (% of body weight)
	Mean±S.D.	Mean±S.D.	Mean±S.D.
<u>No.1</u> None-alcohol	43.67±5.96	2.646±0.05	0.619±0.02
<u>No.2</u> alcohol	35.17±5.98**	2.873±0.07***	0.652±0.03*
<u>No.3</u> alcohol+숙취해소제	36.00±3.78	2.705±0.06	0.627±0.03*
<u>No.4</u> T1	41.57±11.37*	2.624±0.13**	0.619±0.04*

¹⁾Each value represents the mean±S.D. of 7 rats.

Means with different superscript asterisks within a column and significantly different from each other at $P < 0.5$ (*) and $P < 0.05$ (**) and $P < 0.005$ (***) as determined by Student's T-test.

Table 3는 생맥산 투여군(T1)의 간 보호활성효과를 알아보기 위해 4주 간 시료 투여 후 혈장 AST, ALT 수치의 변화를 나타낸 것으로 AST는 L-Aspartate + α -ketoglutarate 에 반응하여 oxaloacetate + glutamate 를 생성시키며 oxaloacetate를 pyruvate로 변화시키는 과정에 참여하는 효소이며, ALT 는 DL-Alanine + α -krtoglutarate 에 반응하여 pyruvate + glutamate 을 생성시키는 전이 효소로 이 효소들은 그 활성 치가 증가하면 간 기능이 저하되었음을 알려주므로 간 질환 판정효소로 알려져 있다.

Table 3 및 Figure 3에 나타난 바와 같이 normal control의 혈장 중 AST 치는 84.43 ± 47.88 U/L였으나 alcohol을 장기간 투여한 음성대조군의 AST 수치는 254.57 ± 463.20 U/L로 약 3배 가량의 상승을 보여 장기간의 알코올 투여로 인해 간손상이 유도되었음을 알 수 있었다. 이에 반해 T1군은 64.80 ± 6.24 U/L의 AST 활성치를 나타내 음성대조군은 물론 양성대조군(positive control)의 70.29 ± 12.60 U/L과 비교했을 때 매우 뛰어난 AST 상승 억제효과를 나타낸 것을 알 수 있었다.

Table 3에 ALT 효소 활성치를 나타내었다. 정상군의 ALT 수치는 44.00 ± 9.04 U/L로 나타났으며 이에 비해 음성대조군은 215.43 ± 428.93 U/L으로 정상군에 비해 매우 높은 수치를 나타내어 장기간의 알코올 투여로 인한 간손상을 확인할 수 있었다. T1군은 36.40 ± 8.50 U/L으로 정상군보다도 유의적으로($p < 0.5$) 낮은 수치를 나타내었다. 일반적으로 알코올의 장기 섭취는 AST, ALT 의 활성치를 증가시키는 경향이 있으며 이는 곧 간 기능의 활성이 감소됨을 시사해주는 것이다. 간기능이 저하될 때 간에서 제일 먼저 나타나는 임상증상의 하나가 AST, ALT 활성의 증가로 볼 수 있다(7-8). 특히 혈장 ALT는 간세포 변성과 괴사를 예민하게 반영하여 상승하기 때문에 특히 간 담도 질환의 유력한 지표로서 널리 이용되고 있다(9). 본 연구에서 나타난 결과를 살펴보면 장기간의 알코올 섭취로 발생된 간기능 장애에 오미자, 인삼, 황기, 맥문동, 호박 등의 한약재를 복합처방한 생맥산이 상당한 회복효과를 나타내는 것을 알 수 있으며, 장기 투여하였을 때 간기능 장애의 회복기능이 현저히 증가함을 알 수 있었다.

Table 3. Enzyme activity of AST and ALT in plasma

Groups	AST(U/L)	ALT(U/L)
	Mean±S.D .	Mean±S.D.
<u>No.1</u> None-alcohol	84.43±47.88 ¹⁾	44.00±9.04*
<u>No.2</u> alcohol	254.57±463.20	215.43±428.93
<u>No.3</u> alcohol+숙취해소제	70.29±12.60*	37.29±9.30*
<u>No.4</u> T1	64.80±6.24*	36.40±8.50*

¹⁾Each value represents the mean±S.D. of 7 rats.

Means with different superscript asterisks within a column and significantly different from each other at P<0.05(**) and P<0.5(*) as determined by Student's T-test.

: 2차년도에 연구 100% 달성

3. 제1세부 과제 (3차년 : 박갑주)

세부과제별 연구기관	연구책임자	당해연도 소요예산
용인대학교	강 현 민	45,000,000원

동물실험

가. 실험 재료 및 방법

1) 실험동물

실험동물은 체중이 $100 \pm 10\text{g}$ 인 Sprague Dawley종의 4주된 웅성 흰쥐를 대한 실험동물센터에서 구입하여 다시 4주간 본 대학의 동물 사육실에서 적응시켰다. 4주간 적응시키는 동안에 사육실의 온도와 습도는 각각 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, $55 \pm 5\%$ 로 항온 항습을 유지하였다. 식이는 고품사료(삼양사)와 물을 자유롭게 섭취하도록 하였다.

2) 실험군의 분류

4주간 적응시킨 350g(8주령) 전후의 흰쥐 7마리를 한 군으로 하여 정상대조군(Normal Control), 음성대조군(Negative Control), 양성대조군(Positive Control) 및 실험군(Test group)으로 분류하였다. 음성대조군은 알코올과 물을, 양성대조군은 시판되고 있는 J사의 숙취해소제(숙취해소 및 간기능회복 기능)와 알코올을 섭취하도록 하였다. 실험군은 알코올과 시판되고 있는 P사의 일반두부를 투여한 T1군(이하 T1으로 표기), 알코올과 생맥산으로 응고시킨 두부를 투여한 T2군(이하 T2로 표기), 알코올과 생맥산(오미자 + 인삼 + 맥문동 + 황기 + 호박)을 투여한 T3군(이하 T3로 표기)으로 설정하였다. 이때 식이는 고품 사료(삼양사)를 자유 공급하였고 알코올은 쥐 한 마리당 5g/kg.bw/day 를 섭취하도록 계산하여 매일 음용수에 희석하여 공급하였다(Table1).

Table 1. Composition of Groups

Group	No. of exam	Treatment
No.1 (Normal Control)	7	None-alcohol
No.2(Negative Control)	7	Alcohol + Water
No.3(Positive Control)	7	Alcohol + 숙취해소제
No.4(Test group1-T1)	7	Alcohol + 일반두부
No.5(Test group2-T2)	7	Alcohol + 생맥산두부
No.6(Test group3-T3)	7	Alcohol + 생맥산*

생맥산*; 오미자(*Schizandra chinensis*) + 인삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer)+맥문동 (*Liriope platyphylla*) + 황기(*Astragalus membranaceus* BUNGE) + 호박 (*Cucurbita* spp.)

3) 시료의 제조

일반두부는 시중에서 구입하였고, 생맥산 두부는 10% 두유액에 두유액 양의 10%만큼의 생맥산으로 실험실에서 직접 두부를 응고시켰다.

4) 시료의 투여

일반두부와 생맥산 두부는 60kg 성인이 하루 두부 반모(250g)를 섭취하는 것을 기준으로 하여 350g 흰쥐에 맞는 양을 계산하였고 생맥산은 60kg 성인이 하루 한약재를 100g 섭취하는 것을 기준으로 하여 역시 350g 흰쥐에 맞는 양을 계산하여 구강투여하였다.

5) 부검

사육 마지막 날 동물을 overnight로 16시간 절식시키고 ethyl ether로 약하게 마취시킨 상태에서 복부를 절개하고 주사기를 이용하여 후대정맥에서 3~4ml 혈액을 채취한다. EDTA tube에 넣어 혈액이 응고하는 것을 방지하였다. 채취한 혈액은Aspartate

aminotransferase(AST), Alanine aminotransferase(ALT), Malondialdehyde(MDA) 분석에 사용하였다. 채혈직후 간과 신장을 적출하여, 즉시 냉각된 생리식염수로 세척하고 여과지로 표면의 물기를 제거한 다음 중량을 측정하였다.

6) 체중 및 장기의 중량계측

체중은 약물 투여한 날부터 부검하기 전날까지 4주 동안 일주일에 한번씩 같은 시간에 측정하였다. 장기의 중량은 부검 후에 실험동물의 후대정맥을 찾아서 채혈한 후 간, 신장을 각각 적출하고 그 중량을 측정하였다.

7) 생화학적 검사(AST, ALT)

채혈한 혈액을 30분 동안 실온에 방치한 후 3000×g에서 15분간 원심분리 하여 얻은 혈장의 활성치는 AST kit(Boehringer Mannheim, Germany)을 사용하여 다음과 같은 원리로 측정하였다. 혈장중의 AST의 작용으로 aspartic acid와 α-ketoglutaric acid는 oxaloacetic acid와 L-glutamic acid로 변화한다. 이때 생성된 oxaloacetic acid는 조효소 NADH의 존재 하에 MDH의 작용으로 malate로 변화되고 이때 NADH가 NAD⁺로 산화될 때의 흡광도 감소치를 파장 340 nm에서 자동 생화학 분석기(Hitachi 747)로 측정하였다.

ALT의 활성치는 ALT(Boehringer Mannheim, Germany)kit을 사용하여 자동 생화학 분석기(Hitachi 747)로 측정하였다. 혈장중의 ALT 작용으로 L-alanine과 α-ketoglutaric acid는 pyruvic acid와 L-glutamic acid로 변화한다. 생성된 pyruvate는 조효소 NADH의 존재 하에 LDH의 작용으로 lactate로 변화되고 이때 NADH가 NAD⁺로 산화될 때의 흡광도 감소치를 파장 340nm에서 자동 생화학 분석기(Hitachi 747)로 측정하였다. MDA가 45℃에서 chromogenic reagent인 N-methyl-2-phenylindole과 반응하여 586nm에서 최대 흡광도를 나타내는 안정한 chromophore를 생성하는데 이 원리를 이용하여 Spectrophotometer HP 8452A (Hewlette Packard, America)로 측정한다.

8) 통계처리

모든 실험 결과 측정치는 일변수 분석법을 사용하여 통계처리 하였으며 Student's T-test를 이용하여 $p < 0.5$ 수준에서 각 실험군 간의 유의성을 검증하였다. 모든 자료는 $\text{mean} \pm \text{standard deviation}$ 으로 나타내었다.

나. 실험 결과 및 고찰

1) 성장과 체중변화량 및 장기중량변화

Pirola와 Lieber 등(1)은 쥐에게 알코올을 섭취시켰을 때 체중증가가 저하되었다는 연구 결과를 보고한 바 있고, 이들의 또 다른 연구에 의하면 사람이 전체 에너지 중 50%를 당질 대신 알코올로 섭취하였을 때 체중이 감소되었다는 연구 결과를 제시하였다. 이러한 이유는 알코올 섭취로 인해 산소의 소비가 증가되고 대사율이 증가되며 세포 내 microsome에서 알코올 산화기구의 ATP 생성이 저하되기 때문인 것으로 생각되고 있다.(3)

본 연구 결과도 이와 유사한 경향을 나타내었는데 실험동물 Sprague-Dawley(수컷)의 시료 투여 후 4주 동안의 성장과 체중변화량을 측정된 결과 Table 2, Figure 1 및 Figure 2에 나타난 바와 같다. 즉, 알코올을 투여한 음성대조군이 다른 군들에 비해 유의적으로 낮은 체중변화량을 나타내었고 한약재를 투여한 T1군과 생맥산 두부를 투여한 T2군 및 생맥산을 투여한 T3군은 음성대조군에 비해 체중이 정상대조군에 가까운 유의성 있는 증가를 나타내었고 특히 생맥산으로 응고시킨 두부를 투여한 T2군에서 현저한 체중증가 효과를 나타내었다. 반면 일반두부를 투여한 T1군은 음성대조군과 비슷한 체중변화량을 보임으로써 알코올 섭취로 인한 체중감소를 거의 회복하지 못하였음을 나타낸다.

2) 장기의 중량

에탄올을 장기적으로 섭취하면 지방간 및 간장의 섬유화로 간이 비대해지게 된다(4). 간의 중량은 alcohol 섭취에 의해 간 조직 내에 지질이 축적됨으로써 alcohol을 섭취시킨 모든 군에서 증가되었다는 연구보고(5-6)와 본 실험 결과도 유사한 경향을 나타내었다. Table 2에 나타난 결과를 보면 알코올을 장기 투여한 음성대조군은 알코올

을 투여하지 않은 정상대조군에 비해 대체중간비율(실험동물 체중 100g 당 간중량 %)이 유의적으로 증가하여 지방간 및 간장의 섬유화가 진행되었음을 알 수 있었고 따라서 알코올을 장기 투여하면 간이 비대해진다는 위의 보고와 일치함을 알 수 있었다. 그에 반해 생맥산이나 생맥산으로 응고시킨 두부를 투여한 T2군과 T3군은 대체 중 간비율이 정상대조군에 가까운 회복세를 나타내어 장기간의 알코올 투여로 인한 지방간 및 간장의 섬유화에 치료 및 개선 효과가 있는 것으로 나타났다. 대체중신장 비율(실험동물의 체중 100g 당 신장중량 %)은 모든 실험군이 음성대조군에 유의성 ($p < 0.5$)을 보였고 정상대조군에 가까운 수치를 보여 알코올 섭취로 인해 손상된 신장의 회복에 효과가 있음을 나타내었다. 특히 T2군과 T3군이 회복효과를 보였고 양성 대조군과 T1군 역시 T2군이나 T3군에는 미치지 못하지만 다소 감소된 수치를 나타내 효과가 있음을 나타내었다.

Table 2. Total body weight gains and the weight ratio of liver and kidney

Groups	Total body weight	Liver (% of body	Kidney (% of body
	gains(g) Mean±S.D.	weight) Mean±S.D.	weight) Mean±S.D.
<u>No.1</u> None-alcohol	43.67±5.96	2.646±0.05	0.619±0.02
<u>No.2</u> alcohol	35.17±5.98**	2.873±0.07***	0.652±0.03*
<u>No.3</u> alcohol+숙취 해소제	36.00±3.78	2.705±0.06	0.627±0.03*
<u>No.4</u> T1	36.00±7.37	2.716±0.33	0.628±0.04*
<u>No.5</u> T2	43.14±10.11*	2.620±0.12**	0.615±0.03*
<u>No.6</u> T3	41.57±11.37*	2.624±0.13**	0.619±0.04*

¹⁾Each value represents the mean±S.D. of 7 rats.

Means with different superscript asterisks within a column and significantly different from each other at P<0.5(*) and P<0.05(**) and P<0.005(***) as determined by Student's T-test.

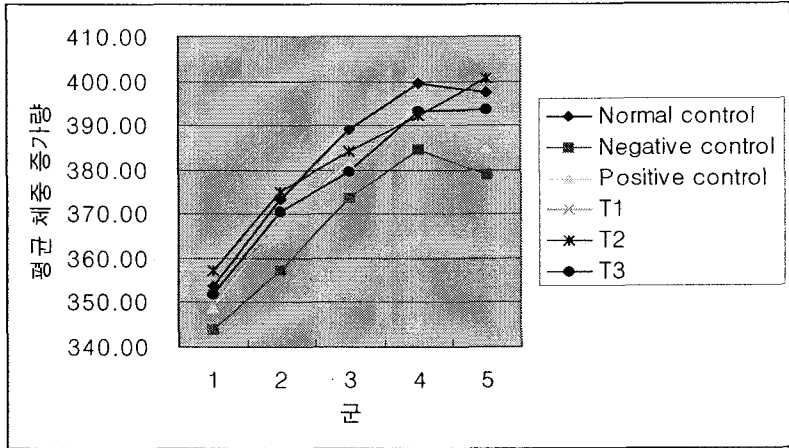


Fig. 1. The body weight of the rats.

Each value represents the mean of 7 rats.

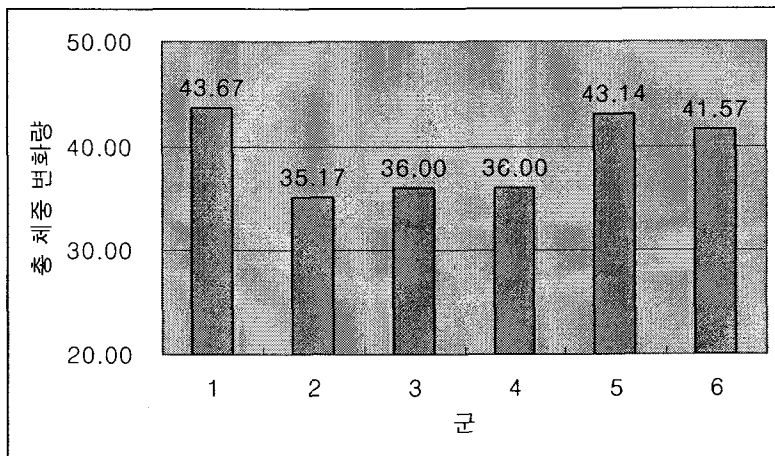


Fig. 2. The changes of body weight gain.

Each value represents the mean of 7 rats.

1; normal control, 2; negative control, 3; positive control, 4; T1, 5; T2, 6; T3

3) 혈장 AST, ALT 효소활성도 변화

Table 3과 Fig.3, Fig 4는 일반두부 투여군(T1)과 생맥산 두부 투여군(T2), 그리고 생맥산 투여군(T3)의 간 보호활성효과를 알아보기 위해 4주 간 시료 투여 후 혈장 AST, ALT 수치의 변화를 나타낸 것으로 AST는 L-Aspartate + α -ketoglutarate 에 반응하여 oxaloacetate + glutamate 를 생성시키며 oxaloacetate를 pyruvate로 변화시키는 과정에 참여하는 효소이며, ALT 는 DL-Alanine + α -krtoglutarate 에 반응하여 pyruvate + glutamate 을 생성시키는 전이 효소로 이 효소들은 그 활성 치가 증가하면 간 기능이 저하되었음을 알려주므로 간 질환 판정효소로 알려져 있다.

(1)AST 활성

Table 3 및 Figure 3에 나타난 바와 같이 normal control의 혈장 중 AST 치는 84.43 ± 47.88 U/L였으나 alcohol을 장기간 투여한 음성대조군의 AST 수치는 254.57 ± 463.20 U/L로 약 3배 가량의 상승을 보여 장기간의 알코올 투여로 인해 간손상이 유도되었음을 알 수 있었다. 이에 반해 T2군과 T3군은 61.00 ± 3.78 U/L, 64.80 ± 6.24 U/L의 AST 활성치를 나타내 음성대조군은 물론 양성대조군(positive control)의 70.29 ± 12.60 U/L과 비교했을 때 매우 뛰어난 AST 상승 억제효과를 나타낸 것을 알 수 있었으며 알코올과 함께 일반두부를 투여한 T1군은 78.40 ± 36.77 U/L로 AST 상승 억제 효과를 나타내긴 했지만 유의성($p < 0.5$)을 보이지는 않았다.

(2)ALT 활성

Table 3 및 Figure 4에 ALT 효소 활성치를 나타내었다. 정상군의 ALT 수치는 44.00 ± 9.04 U/L로 나타났으며 이에 비해 음성대조군은 215.43 ± 428.93 U/L으로 정상군에 비해 매우 높은 수치를 나타내어 장기간의 알코올 투여로 인한 간손상을 확인할 수 있었다. T2군과 T3군은 각각 34.14 ± 5.49 U/L 및 36.40 ± 8.50 U/L으로 정상군보다도 유의적으로($p < 0.5$) 낮은 수치를 나타냈으며 알코올과 함께 일반두부를 투여한 T1군 역시 T2군이나 T3군에는 미치지 못하지만 37.83 ± 6.57 U/L로 낮은 활성치를 보였다. 일반적으로 알코올의 장기 섭취는 AST, ALT 의 활성치를 증가시키는 경향이 있으며 이는 곧 간 기능의 활성이 감소됨을 시사해주는 것이다. 간기능이 저하될 때 간에

서 제일 먼저 나타나는 임상증상의 하나가 AST, ALT 활성의 증가로 볼 수 있다 (7-8). 특히 혈장 ALT는 간세포 변성과 괴사를 예민하게 반영하여 상승하기 때문에 특히 간 담도 질환의 유력한 지표로서 널리 이용되고 있다(9).

본 연구에서 나타난 결과를 살펴보면 장기간의 알코올 섭취로 발생된 간기능 장애에 오미자, 인삼, 황기, 맥문동, 호박 등의 한약재를 복합처방한 생맥산 뿐만 아니라 이 생맥산으로 응고시킨 두부가 상당한 회복효과를 나타내는 것을 알 수 있으며, 장기 투여하였을 때 간기능 장애의 회복기능이 생맥산을 단독으로 투여했을 때 보다 현저히 증가함을 알 수 있었다.

Table 3. Enzyme activity of AST and ALT in plasma

Groups	AST(U/L)	ALT(U/L)
	Mean±S.D .	Mean±S.D.
<u>No.1</u> None-alcohol	84.43±47.88 ^{*1)}	44.00±9.04*
<u>No.2</u> alcohol	254.57±463.20	215.43±428.93
<u>No.3</u> alcohol+숙취해소제	70.29±12.60*	37.29±9.30*
<u>No.4</u> T1	78.40±36.77	39.20±9.22*
<u>No.5</u> T2	61.00±3.78*	34.14±5.49**
<u>No.6</u> T3	64.80±6.24*	36.40±8.50*

¹⁾Each value represents the mean±S.D. of 7 rats.

Means with different superscript asterisks within a column and significantly different from each other at P<0.05(**) and P<0.5(*) as determined by Student's T-test.

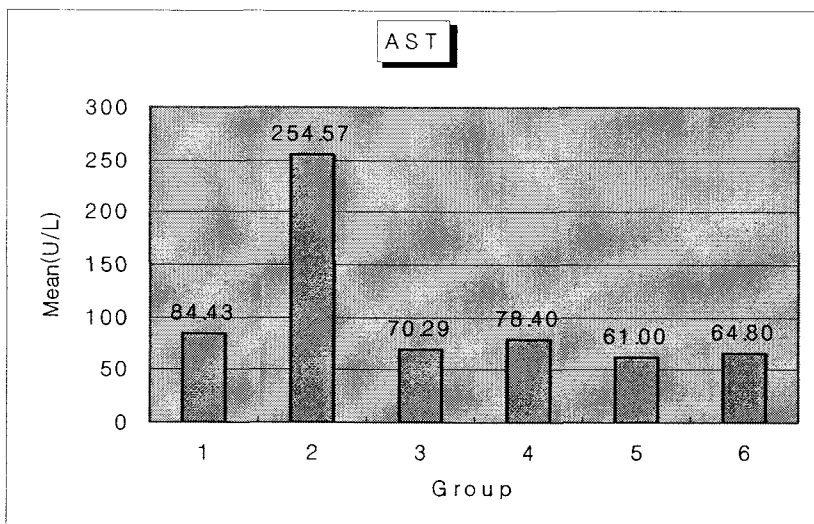


Fig 3. Activity of AST in the rat plasma.

Each value represents the mean of 7 rats.

1; normal control, 2; negative control, 3; positive control, 4; T1, 5; T2, 6; T3

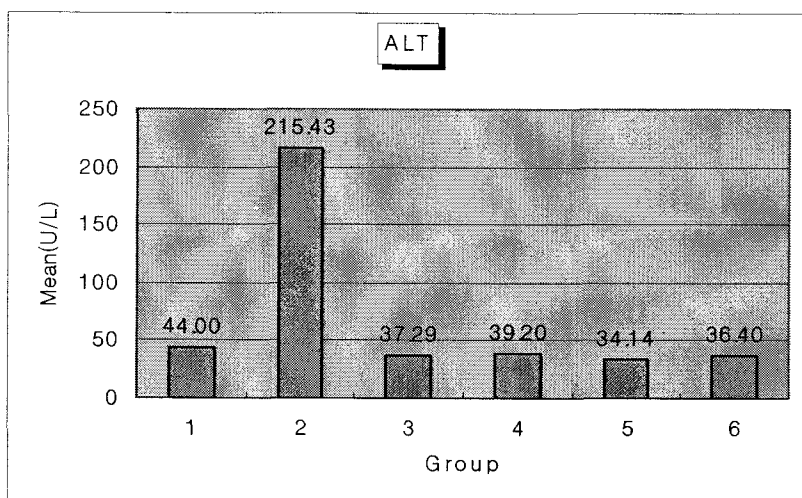


Fig 4. Activity of ALT in the rat plasma.

Each value represents the mean of 7 rats.

1; normal control, 2; negative control, 3; positive control, 4; T1, 5; T2, 6; T3

4) 혈장의 malondialdehyde 함량

Table 4와 Fig. 5에 malondialdehyde 함량을 나타내었다. 알코올만을 장기 투여한 음성대조군은 5.70 ± 3.24 umol로 정상대조군의 4.40 ± 0.13 umol에 비해 혈장 내 malondialdehyde 함량이 현저히 증가하여 장기간의 알코올 투여로 인한 과도한 피로가 과산화지질을 유발한 것을 알 수 있었다. 본 실험 결과 T1군은 5.97 ± 1.91 umol, T2군은 4.82 ± 0.45 umol, T3군은 5.18 ± 1.23 umol의 malondialdehyde 함량을 나타내어 음성대조군과 비교할 때 T2군이 현저히 과산화지질을 개선시키는 유의성 있는 ($p < 0.05$) 연구 결과를 나타내었다. T1군은 음성대조군보다 높은 수치를 나타낸 반면 T3군은 T2군에 미치지 못하는 못하지만 유의성 있는 ($p < 0.1$) 수치를 보였다. 이는 생맥산(오미자, 인삼, 맥문동, 황기, 호박)이나 또는 생맥산으로 응고시킨 두부가 항피로 효과에 기여할 수 있음을 시사해 준다.

Table 4. Concentration of plasmid lipid in rat.

Groups	MDA(umol)
	Mean±S.D.
<u>No.1</u> None-alcohol	4.40 ± 0.13^1
<u>No.2</u> alcohol	5.70 ± 3.24
<u>No.3</u> alcohol+숙취 해소제	$4.56 \pm 0.15^{**}$
<u>No.4</u> T1	5.97 ± 1.91
<u>No.5</u> T2	$4.82 \pm 0.45^{**}$
<u>No.6</u> T3	$5.18 \pm 1.23^*$

¹⁾Each value represents the mean±S.D. of 7 rats.

Means with different superscript asterisks within a column and significantly different from each other at $P < 0.5(^*)$ and $P < 0.1(^{**})$ as determined by Student's T-test.

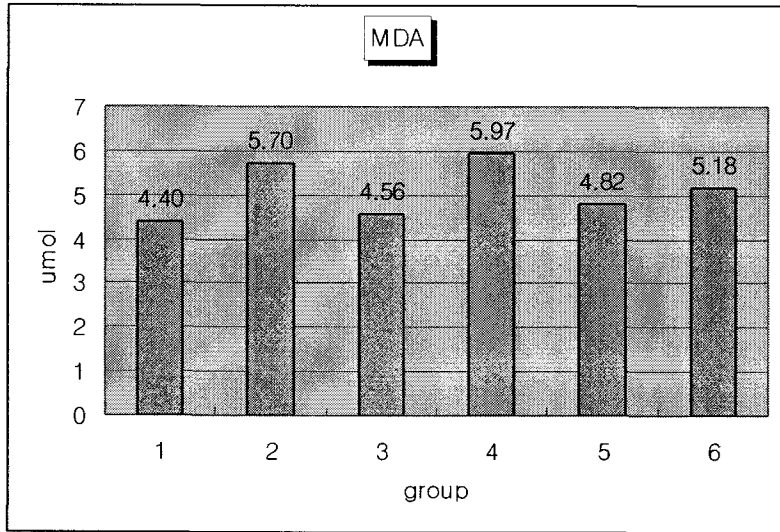


Fig. 5 Concentration of malondialdehyde in the rat plasma.

Each value represents the mean of 7 rats.

1; normal control, 2; negative control, 3; positive control, 4; T1, 5; T2, 6; T3

3차년도에 연구 100% 달성

4. 참고문헌

Castelli WP, Wilson PW, Levy D, Anderson K. (1990) Serum Lipids and risk of coronary artery disease. *Atheroscl. Rev.* 21 : 7~10.

Castelli WP, Wilson PW, Levy D, Anderson K. (1990) Serum Lipids and risk of coronary artery disease. *Atheroscl. Rev.* 21:7~10.

Cutta, S.K., P.A. Miller, L.B. Greenberg and O.A. Levander (1983) Celenium and acute alcoholism. *Am. J. Clin. Nutr.* 38 : 713~718.

Gruchow HW, Sobocinski KA, Barboriak JJ and Scheller JG. Alcohol consumption, nutrient intake and relative body weight among U.S. adults. *Am J Clin Nutr* 42: 289-595, 1985

Han, B.H., M.H. Park, L.K. Woo and Y.N. Han. (1979) Studies on the anti-oxidant components of Korea Ginseng. *Korea Biochem. J.*, 12:33.

Kien, C.L. and H.E. Ganther (1983) Manifestations of chronic selenium deficiency in a child receiving total parenteral nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 37 : 319~328.

Levy, R.I., Bonnel, M. and Ernst, N.D. (1976) *J. Am. Dieter. Assoc.*, 58 : 406~417.

Lieber, C.S., Don P. Jones. and M. DeCarli. (1965) *Am. J. Clin. Nutr.*, 44(6) : 1009.

Ma, E., Luo, C., Hung, C. (1983) The treatment of severe hemorrhage of the G01 tract in burn children by combined traditional chinese and western medicine. *Chung I TSA Chih* 1 : 59-61.

Miettinen TA. (1987) Dietary fiber and lipids. *Am. J. Clin. Nutr.* 45 : 1237~1242.

Moon CS *et al.* (1996), Diffusive sampling and urinalysis for 2-bromopropane exposure monitoring, *Japan Society for Industrial Hygiene Health*, K17.

Onishi, Y., Yasumizu, R., Fan, H.(1990) Effects of Zuzen-taiho-toh(Tj-48), A traditional oriental medicine, on hemopoietic recovery from radiation injury in mice. *Exp. Hematol.* 18 : 18-22.

Piola RC and Lieber CS. Energy wastage in rats given drugs that induce microsomal enzymes. *J Nutr* 105: 1544-1548, 1975

Thompson, J.N. and M.L. Scott(1970)Impaired lipid and Vitamin E absorption related to atrophy of the pancreas in selenium-deficient chicks. *J. Nutr.* 100 : 797~809.

Wang,B.,Zhao,X.,Qi,S,Kaneko., Hattori,M., Namba,Tand,Nomura,Y.(1988) Effect of repeated administration of biochemical changes related to aging in senescence-accelerated mice. *Chem.Pharm. Bull.* 36 : 2587-2592.

김순호,손한철,이은엽,장철훈(1999)최신 임상검사진단학, 계축문화사, pp.50~52.

김현영,정재황,정용현,이용목,서길수(1998), Rat를 이용 1-Bromopropane의 급성 및 아 급성 흡입 독성 연구, *Korean Ind.Hyg. Assoc.*J.8(2).

이귀영, 이종순 (1993), 임상병리파일, 의학문화사, 71~878.

이영순 (1991), 실험동물의학, 508~512.

오덕자, 박명희, 박성섭, 윤종현, 조한익(1996) 약제의 조혈작용에 관한 실험적 연구.대한혈액학회지. 31 : 225-234.

주근제(1993) Erythropoietin. 대한혈액학회지.28: 1-5.

제 3절: 제 3세부 과제

제1세부 과제 (1차년 : 김강성)

세부과제별 연구기관	연구책임자	당해연도 소요예산
용인대학교	강 현 민	45,000,000원

연구 결과 :

본 연구에서는 익기생진에 효능이 있는 한약재인 오미자, 황기, 맥문동, 호박 및 인삼에 함유되어 있는 유기산의 대두 단백질 응고 기작에 관한 메커니즘 규명과 품질이 우수한 국산콩 등을 이용한 새로운 기능성 두부를 개발하였다.

한약재의 수분 함량은 호박이 93.42%로 가장 많았으며 다른 한약재는 8.19~10.23%로 큰 차이를 보이지 않았다. 한약재의 회분 함량은 오미자가 3.62%로 가장 많았으며 호박은 0.39%로 가장 적게 나타났다. 오미자와 다른 한약재를 한가지씩만 첨가한 4종류의 한약두부의 수분 함량을 비교한 결과 오미자와 호박추출물을 첨가한 두부가 79.38%로 가장 많았으며 오미자와 인삼추출물을 첨가한 두부가 75.26%로 가장 적게 나타났다. 나머지 두부의 일반성분을 비교한 결과 흑태두부가 75.66%로 수분 함량이 가장 많았고 11S두부가 57.92%로 수분 함량이 적게 나타났다. 회분 함량은 쥐눈이두부가 0.60%로 가장 많았고 11S두부가 0.12%로 가장 적게 나타났다. 여러 종류

두부의 단백질 함량을 분석한 결과는 유기산 두부가 64.49%로 가장 많이 나타났다.

1. 제1세부 과제 (1차년 : 김강성)

세부과제별 연구기관	연구책임자	당해연도 소요예산
용인대학교	강 현 민	45,000,000원

한약재를 응고제로 이용한 두부제조 공정의 최적화에 관한 연구

가. 재료 및 방법

1)재료

본 실험에 사용된 메주콩 (황금콩)은 시중 농협에서 구입했으며 배아는 미국에서 수입한 것을 2002년 10월 정식품에서 제공받아 사용하였다. 11S는 탈지한 대두에서 분리하여 사용하였으며 국산콩인 쥐눈이와 흑태는 2002년 11월 전북 순창군 농협에서 구입한 것을 실험에 사용하였다. 한약재인 오미자, 황기, 백문동은 2003년 3월 경동시장에서 구입한 것을 사용하였고 호박과 인삼은 2003년 3월 시중에서 구입하여 실험에 사용하였다. 그밖에 GDL (Glucono- δ -lactone), 유기산, urea, SDS, DTT (DL-Dithiothreitol) 등의 시약은 Sigma (USA)사에서 구입하여 사용하였다.

2) 한약추출물의 제조

각각의 한약재 250 g에 증류수 1300 mL을 넣어 2시간 30분간 약탕기 (DWP-1800T, Daewoong, Korea)에서 추출한 후 한약재를 제거하고 추출물을 300 mL로 농축시켰

다. 농축된 추출물을 여과포를 이용하여 걸러준 뒤 각각의 한약추출물은 따로 담아 4℃에서 보관하였다가 사용하였다.

3) 100립중 및 외형적 특성

콩의 백립중은 종피가 파괴된 종자, 분할된 종자, 이물질 등을 제거하여 선별한 건전립 100립을 취하여 3반복으로 무게를 칭량한 후 평균값으로 나타내었다.

콩을 100개 취한 후 콩의 부위를 수직길이, 장폭, 단폭 및 배꼽길이와 종피의 두께를 caliper로 이용하여 5반복 측정하여 평균값으로 나타냈는데, 종피 두께의 측정부위는 배꼽의 반대쪽을 택하였다.

색도 측정은 색차계(Color JC801, Color Techno System Co., Ltd. Japan)를 사용하여 L값(명도), a값(적색도), b값(황색도)를 측정하였는데 측정 전 모든 시료는 분쇄하여 입도가 80~100 mesh가 되도록 하였다. 이때 사용한 표준 백판은 L=100.04, a=3.61, b=10.77이었다.

4) 일반성분분석

일반성분 분석은 AOAC법(AOAC, 15th ed.)에 의하여 수분함량은 105℃에서 상압 건조하여 측정하였고, 조단백 함량은 micro-kjeldahl법으로 측정하였으며 질소계수 6.25를 사용하여 환산하였다. 조지방 함량은 시료를 Soxhlet 장치를 사용하여 65℃에서 8시간 petroleum ether로 추출하였다. 회분함량은 550℃ 직접 회화법을 사용하여 측정하였다. 탄수화물 함량은 100에서 수분함량, 조단백 함량, 조지방 함량, 회분 함량을 뺀 값을 사용하였다. 각 실험은 3회 반복하여 얻은 평균값을 사용하였다.

5) 지방산 조성 분석

지방질은 silicic acid 컬럼 크로마토그래피에 의하여 중성지방질, 당지방질 및 인지방질로 분리하였다. Silicic acid는 콜로이드성 미립자를 제거하기 위하여 증류수로 2번 washing하고, methyl alcohol로 2번 washing하여 105~110℃에서 12시간 활성화시켰다. 1.76×42.8cm column을 사용하여 flow rate는 1~3 mL/min으로, solvent volume은

bed volume의 6배로 하여 chloroform, acetone, methyl alcohol의 순서로 용출시켜, 중성지방질은 chloroform, 당지질은 acetone, 인지지방질은 methyl alcohol 용출시켜 분획하였다. 각 지방질 분획을 분석하기 전에 먼저 유리지방산을 얻기 위하여 지방질을 비누화 한 후 가스크로마토그래피를 이용하여 지방산을 분석하였다. 시료 0.2 g을 정확히 취해 이형 플라스크에 넣고 0.5 N MeOH-NaOH 4 mL을 첨가하여 냉각관을 설치하였고 30분간 반응시킨 후 BF₃-methanol 5 mL첨가하고 2분 후에 냉각관을 통해 hexane 3 mL을 넣고 1분 후에 saturated salt solution을 첨가해 hexane층을 25 mL 삼각 플라스크에 옮겼다. 이에 과량의 무수 sodium sulfate를 넣어 hexane층에 잔류하는 수분을 제거한 다음 여과하여 지방산 분석 시료로 사용하였다.

6) 아미노산 조성 및 함량 측정

60~70 mesh가 되도록 분쇄한 콩분말 0.25 g을 칭량하여 ampule에 넣고 6 N-HCl 15 mL를 가한 다음 질소가스로 치환하여 신속하게 밀봉하였다. 이를 110°C 오븐에서 24시간 가수분해시킨 뒤 방냉하여 탈이온수로 50 mL 정용플라스크에 정용 후 0.2 μm membrane filter로 여과하여 AccQ-Tag(1993)방법으로 유도체화시킨 다음 아미노산을 HPLC로 분석하였다. 이때 column은 Nova-Pak C18 (3.9×150 mm, Nova, Switzerland), injection volume는 5μL, flow rate는 1 mL/min이고, 검출기는 fluorescence, 이동상은 0.14M sodium acetate(A), 60% acetonitrile(B)를 gradient법으로 분석하였다.

7) Isoflavone 함량 분석

각 시료를 분쇄하여 건조시킨 0.1 g을 정확히 칭량하여 0.1% acetic acid를 포함한 70% ethanol 수용액 0.5 mL을 가하여 교반한 후 실온에서 24시간 방치하여 추출하였다. 이것을 원심분리(12,500 rpm, 5min)한 후 상층액을 취하여 membrane filter(0.45 μm, Whatman, Germany)로 여과하여 HPLC 분석 시료로 사용하였다. Isoflavone은 aglycon인 daidzein, glycitein, genistein과 그들의 포도당 배당체인 daidzin, glycitin, genistin, malonyl-daidzin, malonyl-glycitin, malonyl-genistin, acetyl-daidzin,

acetyl-glycitin, acetyl-gencitin으로 12가지의 성분을 HPLC로 검출하였다. JASCO(Japan)사의 HPLC system을 이용하였으며 column은 ODS A303(4.6×250 mm, YMC, U.S.A)을 사용하고, UV detector 254 nm에서 측정하였고 flow rate는 1.0 mL/min이었다.

8) 올리고당 함량 분석

시료 1.0 g에 10% alcohol 25 mL를 가하고 30°C의 water bath에서 1시간 추출 후에 10% lead acetate를 5 mL 첨가하여 단백질을 제거하였다. 추출액을 12,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상등액을 취하여 membrane filter(0.45 μ m, Whatman, Germany)로 여과하여 HPLC 분석 시료로 사용하였다. 분석조건은 JASCO사의 HPLC system을 이용하였으며 column은 KR100-10NH₂(4.6×250 mm, Kromasil, Sweden)을 사용하였다. 이동상은 acetonitrile과 water를 70:30비로 혼합한 용매를 사용하여 분석하였다. 유속은 2.0 mL/min으로 조절하였고, injection volume은 20 μ l였으며 RI 930 detector(Jasco, Japan)로 분석하였다. 올리고당 분석에 사용된 표준물질은 sucrose, raffinose, stachyose의 3종류였다.

9) Phytic acid 함량 측정

Phytic acid의 함량 측정을 위한 시료의 제조는 Hartland와 Oberlass(1977)에 의한 온 교환수지 방법을 이용하였으며, phytic acid 함량은 Latta와 Ersknin(1980)에 의한 비색법으로 측정하였다. 시료 0.5 g에 2.4% HCl 30 mL를 가한 후 2시간 동안 실온에서 교반하였다. 이를 12,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 냉장 보관하여 사용하였다. 한편 직경이 1.0×15 cm column에 음이온 교환 수지(AG1-X8, Bio-Red Lab) 1.5 g을 충전한후 0.7 M NaCl로 활성화시켰으며 이를 증류수로 Cl⁻이온이 검출되지 않을 때까지 충분히 씻어 주었다. 여기에 추출한 상등액을 5배 희석하여 10 mL를 주입하였으며, 증류수 20 mL와 0.05 M NaCl 25 mL로 씻어 주어 무기인을 제거하고 0.7 M NaCl 15 mL를 가하여 phytate를 용출한 후 이 용액을 30 mL로 정용하였다. 이 희석 용액 3 mL에 Wade 시약(Ferric chloride 0.03%와 sulfosalicylic acid 0.3%) 1 mL를 넣어 발색시켜, 500 nm에서 분광광도계로 흡광도를 측정하고, phytic

acid(dodecasodium salt)를 표준물질로 작성한 표준 곡선에 의해 phytic acid를 정량하였다.

10) Saponin 분석

본 실험에서 이용한 saponin의 분석방법은, 먼저 탈지한 분말 콩 1g을 80% methanol에 녹여 80℃에서 water bath에서 4hr 추출한 후 농축하여 완전 건조시킨 다음 7% methanolic-HCl를 가해 80℃에서 3hr동안 가수분해하여 중화시켜 다시 evaporator로 건조시켜 ethyl ether 50 mL를 취해 shaking 후에 ether층만 취해 filtering하여 농축 후에 methanol을 취해 filtering HPLC 분석시료로 사용하였다.

나. 연구결과 및 고찰

1) 원료 대두의 이화학적 특성

원료 콩(황금콩)의 백립중을 계산하여 본 결과 13.44 g으로 나타났다. 콩을 60~80 mesh로 분쇄한 분말에 대한 색도 측정 결과, L, a, b값을 Table 1에 나타내었다. 시료 콩은 종피색이 황색인 콩이다. 백색도를 나타내는 L값의 표준이 100.04로 L값이 커질수록 백색에 가까워지고, a값은 커질수록 적색에 가까워지며, 그 값이 작아질수록 녹색에 가까워진. 한편 b값은 황색도를 나타낸다.

Table 1. Color and color difference of the soybean sample

Variety	L	a	b
Soybean	78.56 ^d	5.40 ^d	28.4 ^c

L = white ↔ black, a = red ↔ green, b = yellow ↔ blue

2) 일반성분

황금콩 시료에 대한 일반 성분은 Table 2와 같다. 조단백 함량은 38.7%, 수분 함량은 10.5% 이었으며 회분 함량은 4.5%이었다. 일반적으로 이들 성분들의 함량은 품종에 따라 차이가 크고, 재배 환경 및 환경 요인에 의해 영향을 많이 받는 것으로 알려져 있다.

Table 2. Proximate composition of the soybean sample (unit : %, w/w)

Variety	Moisture	Crude protein	Crude lipid	Ash	Carbohydrate
Soybean	10.5	38.7	20.8	4.5	26.2

3) 지방산 조성

시료 콩으로부터 추출한 총지방질의 지방질 종류의 구성비는 Table 3과 같다. 지방질은 가운데 중성지방, 인지질 및 당지방질의 순서로 함량이 낮았다. 총지방질의 지방산 조성은 Table 4과 같다. 지방산 중 linoleic acid(18:2)이 가장 많았으며, oleic acid(18:1), palmitic acid(16:0) 순으로 불포화지방산인 이들 세 지방산이 80%이상을 차지하였으며, 주요 지방산으로는 stearic acid(18:0)가 4.6%로서 낮게 나타났고, 주요 지방산 이외에 myristic acid(14:0), arachidic acid(20:0) 및 behenic acid(22:0)는 미량 검출되었다. 중성지방질, 당지방질 및 인지지방질의 지방산 조성은 각각 Table 5, 6 및 7과 같다.

Table 3. Percentage of lipid fraction in soybean (%)

Lipid	Soybean
Neutral lipid	98.3
Glycolipid	0.2
Phospholipid	1.6

Table 4. Fatty acid composition of total lipid of soybean (%)

Fatty acid	Soybean
Myristic acid (14:0)	0.2
Palmitic acid (16:0)	11.4
Stearic acid (18:0)	4.6
Oleic acid (18:1)	23.4
Linoleic acid (18:2)	52.2
Linolenic acid (18:3)	7.1
Arachidic acid (20:0)	0.2
Behenic acid (22:0)	0.3

Table 5. Fatty acid composition of neutral lipid of soybean (%)

Fatty acid		Imported bean
Myristic acid	(14:0)	0.2
Palmitic acid	(16:0)	10.9
Stearic acid	(18:0)	4.5
Oleic acid	(18:1)	23.6
Linoleic acid	(18:2)	53.0
Linolenic acid	(18:3)	7.4
Arachidic acid	(20:0)	0.4
Behenic acid	(22:0)	0.2

Table 6. Fatty acid composition of glycolipid of soybean (%)

Fatty acid		Imported bean
Capric acid	(10:0)	tr
Lauric acid	(12:0)	0.3
Myristic acid	(14:0)	0.4
Palmitic acid	(16:0)	20.0
Stearic acid	(18:0)	6.2
Oleic acid	(18:1)	15.5
Linoleic acid	(18:2)	49.6
Linolenic acid	(18:3)	6.8
Arachidic acid	(20:0)	0.4
Behenic acid	(22:0)	0.4

Table 7. Fatty acid composition of phospholipid of soybean (%)

Fatty acid	Soybean
Palmitic acid (16:0)	21.2
Stearic acid (18:0)	5.5
Oleic acid (18:1)	13.1
Linoleic acid (18:2)	54.3
Linolenic acid (18:3)	6.0

4) 아미노산 조성 및 함량

시료의 아미노산 조성 및 함량을 분석한 결과는 Table 8 과 같다. 콩의 아미노산은 aspartic acid, serine, glutamic acid, glycine, histidine, threonine, arginine, alanine, proline, cysteine, tyrosine, valine, methionine, lysine, isoleucine, leucine, phenylalanine으로 17종이 분석되었는데, 이 중 glutamic acid, aspartic acid 순으로 비교적 높은 것으로 나타났다. Aspartic acid는 164.9 mg/g protein의 함량을 나타냈 으며, 곡류에는 제한 아미노산이나 콩의 주요 아미노산인 lysine 함량은 56.5 mg/g protein이었다. 콩에 가장 적게 함유되어 있는 아미노산은 methionine인 것으로 나타 났고 다음으로는 cysteine, histidine 순으로 적게 나타났다.

Table 8. Amino acid content of the soybean sample
(unit: mg/gprotein)

Amino acid	Soybean
Asp	103.1
Ser	28.0
Glu	155.9
Gly	37.2
His	22.2
Thr	26.0
Arg	57.4
Ala	38.2
Pro	42.2
Cys	5.7
Tyr	29.0
Val	43.8
Met	2.9
Lys	56.5
Ile	42.7
Leu	64.2
Phe	43.7
Total	798.6

5) 원료 콩 종실, 자엽, 배축 및 두부의 isoflavone 함량

콩에 존재하는 주요 isoflavone 함량은 품종 및 환경에 따라 다양하게 나타난다. 주요 isoflavone은 aglycone인 genistein, daidzein, glycitein과 그들의 포도당 결합유도체들로 12가지 정도가 밝혀져 있다. HPLC를 이용하여 isoflavone을 분석하는 방법은 시료를 malonyl, acetyl 유도체화 시킬 필요 없이 직접 분석할 수 있는 편리함이 있어 본 실험에서는 Wang와 Murpy(1994)의 방법을 보완하여 분석하였다. Isoflavone은 식물성 에스트로젠으로 알려진 화합물로서 특히 곡류와 콩에 많이 함유되어 있다. 콩에 함유된 주요 isoflavone은 daidzin과 genistin인데, 이들은 대장내 미생물에 의해 estrogen 구조 유사체인 daidzein과 genistein으로 전환되며, 콩의 씹쓸한 뒷맛에 관여하는 성분으로 이를 제거하기 위한 연구가 시도되어 왔으나(Okubo et al., 1992), 콩의 식물성화합물(isoflavone)은 콩 자체의 기능성분들 때문에 특별한 관심이 있다.

콩 종실의 총 isoflavone 함량은 Table 9과 같이 나타났고 대부분 glucosides 형태로 존재하였다. Anlin et al.(1995)은 녹색 종피의 콩들에서 isoflavone 함량이 낮고 검정색 종피의 콩이 isoflavone 함량이 높은 편이라고 보고하였고, 김석동(1996)은 노란콩이며 소립중에서 isoflavone 함량이 높은 것으로 보고하였다. 따라서 종피의 색과 무게보다는 동일한 품종이라도 재배환경, 수확년도에 따라 다양하게 나타나는 것으로 유전적인 품종 특성이 크게 관여한다고 보여진다. 종실 전체 isoflavone 함량이 주로 6"-O-malonyl genistin, 6"-O-malonyl daidzin 및 6"-O-malonyl glycitin의 형태로 80% 이상을 차지하는데 acetyl화된 형태로는 미량 존재한다. 그러나 malonyl 유도체는 열에 불안정하여 쉽게 배당체로 전환이 일어난다. 이는 김성란, 김석동(1997)의 경우 같은 품종이라도 재배지역에 따라 즉 온도가 낮은 지방의 품종이 월등히 높은 함량분포를 나타냈다는 결과가 이를 뒷받침하고 있다. 그러므로 콩에서의 실질적인 isoflavone은 genistein, daidzin과 이들의 aglycone인 genistein, daidzein으로 볼 수 있다.

콩 종실을 whole soybean, 배축(hypocotyl), 및 자엽(cotyledon)으로 나누어 isoflavone 함량을 분석한 결과는 Table 9, 10과 11에 나타내었다. 배축의 isoflavone 함량이 자엽에 isoflavone 함량보다 높았다. 배축과 자엽에 존재하는 isoflavone은 다른 기작 및 다

큰 유전요인에 의하여 축적될 것이라는 보고(Tsukamoto et al., 1995)와 같이, 배축의 경우 자엽보다 환경의 영향을 적게 받으면서 고농도로 isoflavone을 축적하는 기작이 존재하리라고 판단된다. 따라서 교배육종을 통해 배축에 isoflavone을 더욱 축적시켜 생리활성 물질로의 이용방안을 모색하고, 그 동안 콩 제품의 좋지 않은 뒷맛을 초래해 온 isoflavone 성분을 자엽에서 제거시켜 콩제품 가공시 배축과 자엽을 분리 이용하는 시도가 가능할 것으로 보인다(김성란과 김석동, 1996).

Table 9. Isoflavone content of whole seeds in soybean (unit : mg/100g)

Variety	Glucoside			Malonyl			Acetyl			Aglycon			Total isoflavones
	Din	Glin	Gin	Din	Glin	Gin	Din	Glin	Gin	Dein	Glein	Gein	
Soybean	33.4	12.0	43.3	174.1	20.1	233.8	14.3	4.9	nd	7.6	26	8.8	407.9

Table 10. Isoflavone content of hypocotyl

(unit : mg/100g)

Variety	Glucoside			Malonyl			Acetyl			Aglycon			Total isoflavones
	Din	Glin	Gin	Din	Glin	Gin	Din	Glin	Gin	Dein	Glein	Gein	
Soybean	425.5	441.4	111.9	1351.1	532.1	377.8	25.1	28.9	tr	74.8	57.7	26.2	3453.3

Table 11. Isoflavone content of cotyledon

(unit : mg/100g)

Variety	Glucoside			Malonyl			Acetyl			Aglycon			Total isoflavones
	Din	Glin	Gin	Din	Glin	Gin	Din	Glin	Gin	Dein	Glein	Gein	
Soybean	42.4	nd	67.8	115.8	4.9	211.6	16.3	nd	nd	9.2	2.3	12.2	482.5

Abbreviations : Din, daidzin; Glin, glycitin; Gin, genistin; Gein, daidzin; Glein, glycitein; Gein, genistein; tr, trace; nd, no detected.

대두를 이용하여 두유나 두부를 제조할 경우 콩의 마세 등의 과정 중에 isoflavone 성분의 유출이 일어난다. 따라서 최종 제품의 isoflavone 함량을 조사한 결과 두유와 두부에는 isoflavone이 67.8 mg/100g와 115.4 mg/100g의 농도로 함유되고 있음을 확인하였다 (Table 12).

Table 12. Isoflavone content of unfermented soybean drink

Product	Isoflavone (mg/100g)			
	Glycosides	Aglycones	Total	Aglycone ratio, %
Soy milk	65.5	2.3	67.8	3.4
Tofu	110.5	4.6	115.1	4.0

6) 올리고당 함량

시료의 올리고당 함량은 HPLC를 이용하여 분석하였으며, 올리고당은 sucrose, raffinose, stachyose의 함량은 측정하였고 그 결과는 Table 13에 나타내었다.

올리고당은 설탕에 비해 감미도가 70%이하이며, 충치예방 또는 발생을 완화시키며, 장내세균 중 유익하다고 알려진 비피더스균을 증식시키며, 변비 등을 완화시키는 동시에 장내 부패산물의 생성을 억제하는 등의 장점을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 성숙한 종실에 함유된 가용성 당의 주요 성분은 sucrose, raffinose, stachyose 등이 있다. Raffinose, stachyose는 콩 뿐만 아니라 식물에 광범위하게 분포되어 있으며, 특히 legume에 다량 함유되어 있다. 콩 중에는 stachyose가 약 4%, raffinose가 약 1%, sucrose가 약 5% 존재한다고 보고하였다(Kennedy, 1985). 본 실험에 사용한 시료의 총 올리고당 함량은 10.3%로 나타났다. 한편 두부의 경우 oligosaccharide의 잔유량은 1.2%에 해당하였다

Table 13. Content of oligosaccharides of the soybean and tofu

(unit : % w/w)

Variety	Sucrose	Raffinose	Stachyose	Total
Soybean	5.1	1.3	3.9	10.3
Tofu	1	0.1	0.1	1.2

7) Phytic acid 함량

본 실험에서 사용한 실험 방법의 phytic acid 회수율을 조사한 결과 평균 102.7%에 해당하였다. 대두의 부위별(cotyledon, hypocotyl) phytic acid 함량 분석 결과는 Table 14과 같다. 종실 전체의 phytic acid 함량은 2.17%이었다. 대두의 phytic acid에 대하여 Latta 등(1980)은 1.8%의 phytic acid가 함유되어 있다고 보고하였고, 국내 연구는 대부분이 phytic acid를 제거하는 실험이 많은 부분을 차지하고 최근에 와서 phytic

acid 함량 분석 실험이 이루어지고 있다. 국내 대두에서 1.35~2.67%의 범위로 분포한다고 보고하여 본 실험과 비슷한 결과를 보였다.

Table 14. Content of phytic acid in soybean (%)

Variety	Hypocotyl	Cotyledon	Whole seed
Soybean	0.99	2.35	2.17

8) Saponin 함량

콩 saponin은 group A, group B, group E등 세 group으로 구분되는데 본 실험에서는 saponin 함량을 group A와 group B에 대해 HPLC로 분석하여 그 결과를 Table 15, 16에 나타내었다. 배축과 자엽에서 본 saponin는 자엽보다는 배축에 많은 양이 있음을 볼 수 있었다. 배축의 총 saponin 함량은 55.96 mg/100 g으로 나타났다. 한편 두부로 제조하였을 경우의 saponin 함량은 2mg/ 100g에 해당하였다.

Table 15. Content of saponin in hypocotyl of soybean

(unit : mg/100g)

	Sapogenol A	Sapogenol B	Total
Soybean	38.99±2.48	16.96±1.29	55.96±1.19

Table 16. Content of saponin in cotyledon of soybean

(unit : mg/100g)

	Sapogenol A	Sapogenol B	Total
Soybean	0.54±0.08	0.27±0.04	0.82±0.12

: 1차년도에 연구 100% 달성

2. 제1세부 과제 (2차년 : 김강성)

세부과제별 연구기관	연구책임자	당해연도 소요예산
용인대학교	강 현 민	45,000,000원

응고제의 특성 연구

가. 실험 재료 및 방법

1) 한약재와 두부의 일반성분 분석

일반성분 분석은 AOAC법 (AOAC, 14th ed.)에 의하여 수분은 상압가열 건조법, 회분은 직접 회화법, 단백질은 Micro-Kjeldahl법을 사용하여 측정하였다. 각 실험은 3회 반복하여 얻은 평균값을 사용하였다.

2) 한약추출물의 pH 측정

한약추출물의 pH는 pH Meter (Corning pH Meter 440, New York, USA)로 실온에서 3회 반복하여 측정하였고, 두유를 제조하여 한약추출물을 각각 5 mL씩 혼합한 뒤 같은 방법으로 3회 반복하여 측정하였다.

3) 두부의 색도 측정

두부의 색도는 분광색차계 (Color JC801, Color Techno System, Tokyo, Japan)를 사용하여 L (명도), a (적색도) 및 b (황색도)값을 측정하였다. 이때 사용한 표준백판의 L값은 98.63, a값은 0.19 및 b값은 -0.67이었다.

4) 두부의 조직감 측정

조직감은 두부를 동일한 크기 (1.5×1.5×1.5 cm)로 잘라내어 Rheometer

(COMPAC-100, Sun Scientific, Tokyo, Japan)를 사용하여 측정하였다. 직경 15 mm, 두께 1 mm의 원형 probe를 이용하여 두부의 견고성 (hardness), 부착성 (adhesiveness), 응집성 (cohesiveness), 탄력성 (springiness), 껌성 (gumminess) 및 파쇄성 (brittleness)을 측정하였다. Rheometer를 이용한 측정조건은 Table 1과 같다.

5) 한약추출물의 유기산 분석

한약추출물에 들어있는 유기산은 시료를 희석하여 Sep-Pak C₁₈ Cartridge (Waters, Milford, Ireland)와 membrane filter (0.45 μ m, Whatman, Germany)로 여과한 뒤 HPLC (M930, Young-Lin Instrument, Korea)를 이용하여 분석하였다.

Table 1. Rheometer conditions for *tofu*

Conditions	
Test type	Mastication
Max weight	10 kg
Table speed	120 mm/min
Adaptor type	15 mm round
Sample type	Hexahedron (1.5×1.5×1.5 cm)

나. 결과 및 고찰

1) 한약재와 두부의 일반성분

한약재의 일반성분에 대한 분석결과는 Table 2에 나타내었다. 한약재의 수분 함량은 호박이 93.42%로 가장 많았으며 다른 한약재는 건조품을 사용했기 때문에 호박과는

달리 8.19~10.23%로 큰 차이를 보이지 않았다. 한약재의 회분 함량은 오미자가 3.62%로 가장 많았으며 황기와 인삼은 비슷하였으나 맥문동은 1.74%로 적게 나타났으며 호박은 0.39%로 가장 적게 나타났는데 이것은 호박의 수분 함량이 많기 때문이라고 사료된다. Oh et al(1990)은 오미자의 일반성분 분석결과가 수분 16.1%, 회분 5.2%, 지방 21.5%, 단백질 5.9%, 섬유소 2.8%라고 하였는데 이는 건조 정도가 달라 함량에 차이가 있었다고 사료된다. 여러 종류의 두부의 일반성분에 대한 분석결과는 Table 3~5에 나타내었다 (이하 황금콩을 이용하여 GDL로 응고시킨 두부를 일반두부 또는 general tofu로 명명함). 먼저 오미자와 다른 한약재를 한가지씩만 첨가한 4종류의 한약두부의 수분 함량을 비교한 결과는 오미자와 호박추출물을 첨가한 두부가 79.38%로 가장 많았으며 다른 두부는 75.26~79.08%로 오미자와 인삼추출물을 첨가한 두부가 가장 적었으나 유의차를 보이지는 않았다. 나머지 두부의 일반성분을 비교한 결과는 한약추출물 응고제의 첨가량이 가장 많았던 흑태두부가 75.66%로 수분 함량이 가장 많았고 일반두부와 혼합두부를 제외하고는 유의적인 차이를 보였으며 오미자두부와 11S두부가 61.10%와 57.92%로 수분 함량이 적게 나타났다. 회분 함량은 쥐눈이두부가 0.60%로 가장 많았는데 전반적으로 오미자추출물만 응고제로 사용한 두부가 회분 함량이 많게 나타났다. 11S두부의 회분 함량은 0.12%로 가장 적게 나타났는데 대두에서 11S 단백질을 추출하여 두부 제조에 이용했기 때문에 다른 두부에 비해 회분 함량이 적다고 사료된다. 여러 종류 두부의 단백질을 분석한 결과는 Table 5에 나타내었다. 두부를 동결건조 시킨 후 건조물을 이용하여 단백질을 분석하였는데 유기산 두부가 64.49%로 다른 두부와 유의차를 보이며 가장 많았고 나머지 두부는 45.15~54.89%로 유의차를 보이지는 않았다. 그 중 11S두부가 45.15%로 가장 적게 나타났는데 콩기름을 첨가하여 두부를 제조하였기 때문에 건조물에 지방 함량이 높기 때문이라고 사료된다. 식품위생법에 따른 식품공전(2001)의 두부의 성분 규격을 보면 고형분은 일반두부가 12% 이상, 연두부가 6% 이상이고, 조단백질은 40% 이상 (건조물)이 되어야한다고 하며 일반적인 두부의 수분 함량은 85.0%, 회분 함량은 0.5%, 단백질 함량은 9.5%라고 하였는데 일반성분 분석결과와 비교하면 비슷한 경향을 나타내었다.

Table 2. Water and ash content of herbs¹⁾

	<i>Omija</i>	<i>Hwanggi</i>	<i>Mackmoondong</i>	<i>Pumpkin</i>	<i>Ginseng</i>
Water (%)	8.71	10.23	10.16	93.42	8.19
Ash (%)	3.62	3.08	1.74	0.39	3.16

¹⁾Means of three replications.

Table 3. Water content of tofu¹⁾

Variety	Water (%)
<i>Omija+Hwanggi tofu</i> (황금콩 이용)	79.08 ^a
<i>Omija+Mackmoondong tofu</i> (황금콩 이용)	78.21 ^a
<i>Omija+Pumpkin tofu</i> (황금콩 이용)	79.38 ^a
<i>Omija+Ginseng tofu</i> (황금콩 이용)	75.26 ^a

¹⁾Means of three replications. Same letters in a column are not significantly different each other ($p < 0.05$)

Table 4 Water and ash content of tofu¹⁾

Variety	Water (%)	Ash (%)
<i>General tofu</i> ²⁾	73.52 ^b	0.32 ^d
<i>Compound tofu</i> (황금콩 이용)	72.23 ^b	0.31 ^d
<i>Omija tofu</i> (황금콩 이용)	61.10 ^e	0.58 ^a
<i>Organic acid tofu</i> (황금콩 이용)	68.57 ^d	0.52 ^b
<i>Jinunee tofu</i>	70.51 ^c	0.60 ^a
<i>Huktae tofu</i>	75.66 ^a	0.34 ^d
<i>Germ tofu</i>	68.07 ^d	0.45 ^c
<i>11S tofu</i>	57.92 ^f	0.12 ^e

¹⁾Means of three replications. Same letters in a column are not significantly different each other ($p < 0.05$). ²⁾ coagulants: General tofu, GDL; Compound tofu, omija extract+GDL; Omija tofu, omija extract; Organic acid tofu, organic acid; Jinunee tofu, omija extract; Huktae tofu, herb extracts; Germ tofu, GDL; 11S tofu, GDL

Table 5. Protein content of tofu¹⁾

Variety	Protein (%)
<i>General tofu</i> ²⁾	45.44 ^{bc}
<i>Compound tofu</i> (황금콩 이용)	49.57 ^{bc}
<i>Herb tofu</i> (황금콩 이용)	48.65 ^{bc}
<i>Organic acid tofu</i> (황금콩 이용)	64.49 ^a
<i>Huktae tofu</i>	54.89 ^b
<i>Germ tofu</i>	53.82 ^{bc}
<i>11S tofu</i>	45.15 ^c

¹⁾Means of three replications. Same letters in a column are not significantly different each other ($p < 0.05$). ²⁾ Coagulants: General tofu, GDL; Compound tofu, omija extract+GDL; Herb tofu, herb extracts; Organic acid tofu, organic acid; Huktae tofu, herb extracts; Germ tofu, GDL; 11S tofu, GDL

2) 한약추출물의 pH

예비실험 결과 다른 한약추출물과는 달리 오미자는 단독으로 응고제로 사용해도 대두 단백질이 응고되지만 다른 한약추출물은 단독으로 응고시키지 못하고 오미자와 같이 첨가해야 응고된다는 것을 알았다. 이런 결과는 한약추출물의 pH에 의해 대두 단백질이 응고되는 현상으로 설명되는데 한약추출물의 pH를 측정한 결과는 Table 6에 나타내었다. 오미자추출물의 pH는 3.03으로 가장 낮게 측정되었고 호박추출물의 pH는 6.39로 가장 높게 나타났다. Oh et al(1990)은 오미자 추출물의 pH는 2.9로 다른 한약재들에 비해서 아주 낮아 강산성이라고 하여 비슷한 경향을 보였으며 산도는 9.88%로 매우 신맛을 나타내었다고 보고하였다. 또한 대두 단백질의 등전점에서의 산 응고는 전하의 완전한 중화를 위하여 친수성을 잃기 때문에 이 방법에서는 가열 중 pH를 저

하시켜 5.3~5.7 전후에서 멈추게 하며 일반적으로 산 응고에 의한 젤은 칼슘응고에 비하여 결합력이 약하기 때문에 연두부제조에 이용된다고 하였다 (황경수, 1996). 한 약추출물에 의한 대두 단백질의 응고 반응을 보기 위해 두유에 한약추출물을 혼합했을 경우에는 두유의 pH인 6.91과 비슷하게 측정되어 응고 반응을 보이지 않았고 오미자추출물을 첨가한 두유의 pH만 4.58로 두유 응고가 가장 잘되는 pH인 4.6과 비슷하게 측정되었다.

Table 6. pH of herb extracts ¹⁾

Variety	pH	pH of mixed soy milk
soy milk	6.91	-
<i>Omija</i>	3.03	4.58 ^d
<i>Hwanggi</i>	5.03	6.65 ^c
<i>Mackmoondong</i>	4.33	6.76 ^b
<i>Pumpkin</i>	6.39	6.91 ^a
<i>Ginseng</i>	5.38	6.78 ^b

¹⁾ Means of three replications. Same letters in a column are not significantly different each other ($p < 0.05$)

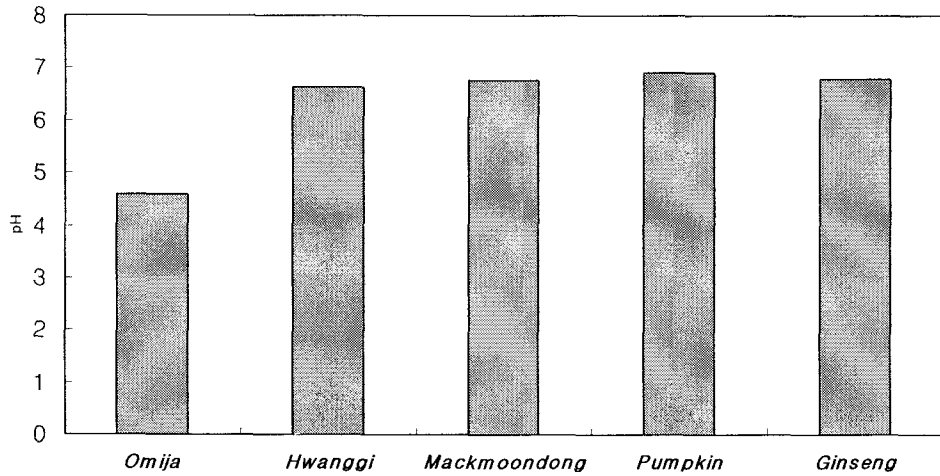


Fig. 1. pH of herb extracts of mixed soy milk.

3) 두부의 색도

두부의 색도를 비교 측정한 결과는 Table 7과 8에 나타내었다. 먼저 오미자와 다른 한약재를 한가지씩만 첨가한 4종류의 한약두부의 색도를 측정한 결과는 오미자와 호박추출물을 첨가한 두부의 색의 밝기를 나타내는 L값이 74.26으로 가장 밝게 평가되었는데 이것은 호박추출물의 색이 다른 한약재추출물보다 더 밝았기 때문이라고 사료된다. 오미자와 인삼추출물을 첨가한 두부는 그와 반대로 L값이 73.37로 유의적인 차이를 보이며 가장 어둡게 평가되었다. 색의 붉은 정도를 나타내는 a값은 오미자와 인삼추출물을 첨가한 두부가 4.70으로 가장 높게 평가되었고 다른 두부의 a값도 4.20~4.42로 비슷하게 평가되었는데 이것은 Kim et al (1973)이 오미자는 높은 함량의 유기산과 anthocyanin이 함유되어 있어 강한 신맛과 독특한 붉은색을 지닌다고 한 결과처럼 오미자추출물의 붉은색이 강하게 나타났기 때문이라고 사료된다. 색의 노란 정도를 나타내는 b값은 오미자와 황기추출물을 첨가한 두부가 10.99로 가장 높게 평가되었고 다른 두부는 10.36~10.59로 평가되며 유의적인 차이를 보였다. 나머지 여러 종류의 두부의 L값은 유기산두부가 82.25로 가장 밝게 평가되었는데 한약재추출물을 넣

은 두부일수록 어둡게 평가되었고 쥐눈이와 흑태두부는 콩 자체의 색이 어둡기 때문에 쥐눈이두부는 58.07, 흑태두부는 63.37로 유의적이 차이를 보이며 어둡게 평가되었다. a값은 쥐눈이두부가 15.30으로 가장 높게 평가되었는데 쥐눈이두유의 색과 오미자 추출물의 색이 모두 붉게 나타났기 때문이라고 사료된다. 일반두부의 a값은 유의적인 차이를 보이며 -0.78로 가장 낮게 평가되었다. b값은 배아두부가 13.55로 가장 높게 평가되었고 모든 두부가 유의적인 차이를 보이며 흑태두부와 쥐눈이두부가 7.73과 4.57로 가장 낮게 평가되었다. Jung et al(2000)의 오미자즙과 매실즙두부는 두부의 선택에 영향을 미치지 않는다고 하였고 Tajiri(1993)의 감귤즙두부와 Kim et al(1996)의 인삼 첨가 두부는 L값은 떨어뜨리고 a와 b값은 상승시킨다고 하였다. 또한 Lu et al(1980)은 두부의 색은 흰색 또는 연한 노란색이 좋다고 하였다. 한약재추출물을 첨가한 두부가 일반두부에 비해 색도의 유의차가 많이 나는 것은 유의차를 줄여 사람들에게 좀더 친숙한 색의 두부를 만들어야할 앞으로 더 연구해 볼 문제라 판단된다.

Table 7. Colormeter characteristics of tofu (황금콩 이용)¹⁾

Variety	L ²⁾	a	b
<i>Omija+Hwanggi tofu</i>	73.78 ^b	4.42 ^b	10.99 ^a
<i>Omija+Mackmoondong tofu</i>	73.48 ^c	4.20 ^c	10.59 ^b
<i>Omija+Pumpkin tofu</i>	74.26 ^a	4.20 ^c	10.36 ^d
<i>Omija+Ginseng tofu</i>	73.37 ^d	4.70 ^a	10.51 ^c

¹⁾Means of three replications. Same letters in a column are not significantly different each other (p<0.05)

²⁾L, Light scale (100 = pure white, 0 = black); a, redness (+100 = red, -80 = green); b, yellowness (+70 = yellow, -70 = blue)

Table 8. Colormeter characteristics of tofu¹⁾

Variety	L ²⁾	a	b
General tofu ³⁾ (황금콩 이용)	77.51 ^c	-0.78 ^f	12.72 ^b
Compound tofu (황금콩 이용)	73.98 ^d	1.42 ^e	11.77 ^e
Omija tofu (황금콩 이용)	70.33 ^e	1.35 ^e	11.91 ^c
Organic acid tofu(황금콩 이용)	82.25 ^a	5.09 ^c	11.83 ^d
Jinunee tofu	58.07 ^g	15.30 ^a	4.57 ^h
Huktae tofu	63.37 ^f	9.10 ^b	7.73 ^g
Germ tofu	79.53 ^b	2.55 ^d	13.55 ^a
11S tofu	82.13 ^a	2.76 ^d	9.55 ^f

¹⁾Means of three replications. Same letters in a column are not significantly different each other ($p < 0.05$)

²⁾L, Light scale (100 = pure white, 0 = black); a, redness (+100 = red, -80 = green); b, yellowness (+70 = yellow, -70 = blue)

³⁾coagulants: General tofu, GDL; Compound tofu, omija extract+GDL; Omija tofu, omija extract; Organic acid tofu, organic acid; Jinunee tofu, omija extract; Huktae tofu, herb extracts; Germ tofu, GDL; 11S tofu, GDL

4) 두부의 조직감

두부의 조직감을 비교 측정한 결과는 Table 9~11에 나타내었다. 먼저 오미자와 다른 한약재를 한가지씩만 첨가한 4종류의 한약두부의 조직감을 측정한 결과에서 견고성은 유의적인 차이를 보이지 않았으며 오미자와 인삼추출물을 첨가한 두부가 274988 Dyne/cm²으로 가장 강하게 나타났다. 부착성은 오미자와 호박추출물을 첨가한 두부가 -190 g으로 가장 강하게 평가되었지만 다른 두부와 유의적인 차이는 보이지 않았다. 응집성과 탄력성은 오미자와 인삼추출물을 첨가한 두부가 7.79%와 8.05 %로 가장 강하게 평가되었고 오미자와 맥문동추출물을 첨가한 두부가 5.43%와 5.23%로 가장 약

하게 평가되었다. 껌성과 파쇄성도 오미자와 인삼추출물을 첨가한 두부가 40.20 g과 3.23 g으로 가장 강하게 평가되었는데 여러 가지 조직감에서 강하게 평가된 것은 결과적으로 내부적 결합력이 강하기 때문이라고 사료된다. 껌성은 오미자와 호박추출물을 첨가한 두부가 26.11 g으로 가장 약하게 평가되었고 파쇄성은 오미자와 맥문동추출물을 첨가한 두부가 1.51 g으로 가장 약하게 평가되었다. 일반두부, 혼합두부 및 오미자두부의 조직감과 이것들을 살짝 구워낸 후의 조직감을 비교 측정한 결과 이들 두부는 부착성을 제외한 특성에서 유의적인 차이를 보였으며 두부를 살짝 구워낸 후가 구워내기 전보다 수치가 모두 증가되었다. 이것은 두부를 살짝 구워내면 내부적 결합력이 증가하면서 단단해지는 결과라 사료된다. 견고성은 오미자두부를 살짝 구워낸 후가 988763 Dyne/cm²으로 아주 강하게 평가되었다. 오미자두부의 견고성과 부착성을 제외한 다른 특성은 견고성이 너무 강하기 때문에 측정이 잘 되지 않은 것으로 사료된다. 견고성과 부착성을 제외한 특성에서는 혼합두부가 일반두부에 비해 더 강하게 평가되었다. 이러한 결과는 오미자두부보다는 혼합두부의 조직감이 일반두부에 가깝기 때문에 오미자추출물만으로 응고제를 사용하는 것은 고려해볼 문제라 판단된다. 견고성은 오미자두부와 유기산두부를 제외하고는 211975~344419 Dyne/cm²으로 비슷한 경향을 보였으며 흑태두부는 한약재추출물 첨가량이 다른 두부에 비해 많기 때문에 가장 약하게 평가되었다. 부착성은 쥐눈이두부, 흑태두부 및 배아두부를 제외하고는 유의적인 차이를 보이지 않았고 배아두부가 -289 g으로 가장 약하게 평가되었다. 견고성과 부착성을 제외한 특성에서는 모든 두부가 유의적인 차이를 보였으며 응집성과 탄력성은 쥐눈이두부가 18.86%와 23.81%로 가장 강하게 평가되었고 껌성과 파쇄성은 유기산두부가 84.48 g과 14.31 g으로 가장 강하게 평가되었다. Lu et al(1980)은 두부조직은 부드러워야 바람직하다고 하였고 김태영(1994)은 두부의 기호성이 높기 위해서는 견고성이 낮고 부착성이 어느 정도 유지되어야 한다고 하였다.

Table 9. Textural characteristics of tofu¹⁾

	<i>Omija+</i> <i>Hwanggi</i> <i>tofu</i>	<i>Omija+</i> <i>Mackmoondong</i> <i>tofu</i>	<i>Omija+</i> <i>Pumpkin</i> <i>tofu</i>	<i>Omija+</i> <i>Ginseng</i> <i>tofu</i>
Hardness (Dyne/cm ²)	264135 ^a	266209 ^a	253950 ^a	274988 ^a
Adhesiveness (g)	-196 ^a	-204 ^a	-190 ^a	-201 ^a
Cohesiveness (%)	7.28 ^{ab}	5.43 ^b	6.37 ^{ab}	7.79 ^a
Springiness (%)	6.81 ^{ab}	5.23 ^c	6.28 ^{bc}	8.05 ^a
Gumminess (g)	33.62 ^{ab}	29.13 ^{bc}	26.11 ^c	40.20 ^a
Brittleness (g)	2.29 ^b	1.51 ^c	1.66 ^{bc}	3.23 ^a

¹⁾Means of three replications. Same letters in a column are not significantly different each other (p<0.05)

Table 11. Textural characteristics of tofu¹⁾

	Hardness (Dyne/cm ²)	Adhesiveness (g)	Cohesiveness (%)	Springiness (%)	Gumminess (g)	Brittleness (g)
<i>General tofu</i>	216081 ^c	-102 ^a	9.82 ^d	13.91 ^d	34.07 ^e	4.73 ^d
<i>Compound tofu</i>	288977 ^{bc}	-109 ^a	15.17 ^b	20.30 ^b	46.44 ^c	9.44 ^b
<i>Omija tofu</i>	748098 ^a	-105 ^a	0.05 ^g	0.92 ^h	0.81 ^g	0.01 ^f
<i>Organic acid tofu</i>	386480 ^b	-108 ^a	11.49 ^c	15.64 ^c	84.48 ^a	14.31 ^a
<i>Jinunee tofu</i>	331526 ^{bc}	-133 ^b	18.86 ^a	23.81 ^a	41.12 ^d	9.79 ^b
<i>Huktae tofu</i>	211975 ^c	-178 ^c	7.48 ^e	7.34 ^f	27.34 ^f	2.10 ^e
<i>Germ tofu</i>	328285 ^{bc}	-289 ^d	4.37 ^f	5.72 ^g	26.52 ^f	1.35 ^e
<i>11S tofu</i>	344419 ^{bc}	-114 ^a	9.88 ^d	10.30 ^e	67.48 ^b	6.74 ^c

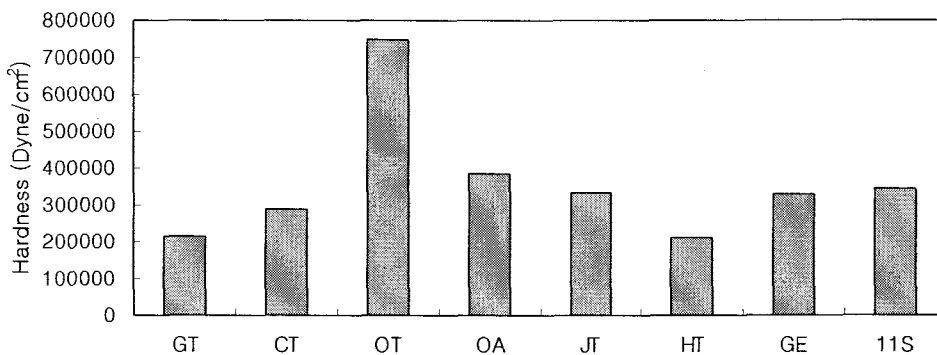


Fig. 4. Hardness of tofu.

GT, General tofu; CT, Compound tofu; OT, Omija tofu; JT, Jinunee tofu; OA Organic acid tofu; HT, Huktae tofu; GE, Germ tofu; 11S, 11S tofu

5) 한약추출물의 유기산 조성 및 함량

한약추출물의 유기산 조성 및 함량을 분석한 결과는 Table 12에 나타내었다. 한약추출물의 유기산은 oxalic acid, citric acid, DL-malic acid, fumaric acid, succinic acid, pyroglutamic acid, maleic acid로 7종이 분석되었는데, 이 중 citric acid의 함량이 높은 오미자추출물을 제외하고는 DL-malic acid의 함량이 비교적 높은 것으로 나타났다. 두유에 한약추출물을 혼합했을 경우 오미자추출물을 첨가한 두유만 응고되었는데 다른 한약추출물에 비해 높은 citric acid의 함량이 작용한 것으로 판단된다. 오미자추출물의 유기산 함량은 오미자 100 g당 citric acid 3.80 g, DL-malic acid 1.18 g으로 가장 많이 나타났고, 황기추출물의 유기산 함량은 황기 100 g당 citric acid 1.70 g, DL-malic acid 1.30 g으로 가장 많이 나타났다. 맥문동추출물의 유기산 함량은 맥문동 100 g당 DL-malic acid 2.82 g, pyroglutamic acid 0.60 g으로 가장 많이 나타났고, 호박추출물의 유기산 함량은 호박 100 g당 DL-malic acid 1.23 g, succinic acid 1.01 g으로 가장 많이 나타났으며, 인삼추출물의 유기산 함량은 인삼 100 g당 DL-malic acid 2.18 g, maleic acid 0.91 g으로 가장 많이 나타났다. Oh et al(1990)은 오미자의 주 유기산 함량이 오미자 100 g당 citric acid 3.91 g, malic acid 3.90 g으로 Kim et al(1973)의 유기산 분석 결과와도 비슷한 경향을 보이며 오미자추출물에는 citric acid와 malic acid의 함량이 많은 결과와 비슷하게 나타났다.

Table 12. Content of organic acid of herb extracts (g/100 g)

Organic acid	<i>Omija</i>	<i>Hwanggi</i>	<i>Mackmoondong</i>	<i>Pumpkin</i>	<i>Ginseng</i>
Oxalic acid	0.07	0.67	0.04	0.12	0.03
Citric acid	3.80	1.70	0.51	0.21	0.69
DL-Malic acid	1.18	1.30	2.82	1.23	2.18
Fumaric acid	-	-	-	0.08	-
Succinic acid	-	0.36	0.22	1.01	0.26
Pyroglutaric acid	-	-	0.60	-	0.56
Maleic acid	-	-	-	-	0.91

: 2차년도에 연구 100% 달성

3. 제1세부 과제 (3차년 : 김강성)

세부과제별 연구기관	연구책임자	당해연도 소요예산
용인대학교	강 현 민	45,000,000원

기능성 두부의 특성 연구

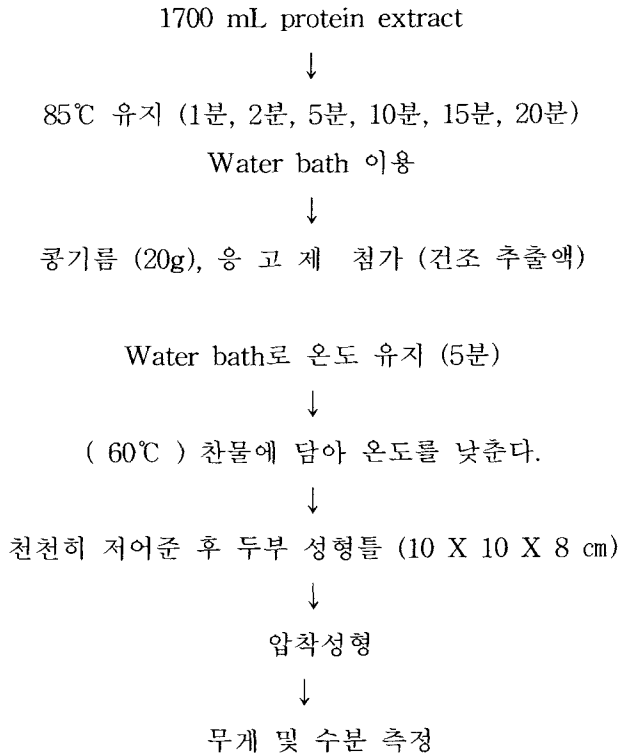
가. 실험 재료 및 방법

1) 두부 단백질의 응고 메커니즘 측정

일반두부, 한약두부 및 혼합두부 3가지를 동결건조기 (Clean vac 8B, Hanil, Korea)를 이용하여 건조시킨 후 분말상태로 4℃에서 보관하여 시료로 사용하였다. pH를 2~12로 맞춘 0.1 M의 KCl-HCl buffer, KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 buffer 및 Tris-NaOH buffer 용액 10 mL과 시료 0.1 g을 5분동안 vortexing한 후 8,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 상등액을 취하여 BCA법으로 단백질 함량을 측정하였다. 0~6 M의 urea 용액 10 mL과 시료 0.1 g도 위와 같은 방법으로 단백질 함량을 측정하였다. 0~1%의 SDS 용액 10 mL과 시료 0.1 g도 위와 같은 방법으로 단백질 함량을 측정하였다. 또한 pH 8인 0.1 M의 KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 buffer 용액 10 mL에 0~0.2 M이 되도록 DTT를 첨가하고 시료 0.1 g을 넣어 위와 같은 방법으로 단백질 함량을 측정하였다. 6 M urea 용액 10 mL에 0~0.2 M이 되도록 DTT를 첨가하고 시료 0.1 g을 넣어 위와 같은 방법으로 단백질 함량을 측정하였다. 0.4% SDS 용액 10 mL에 0~0.2 M이 되도록 DTT를 첨가하고 시료 0.1 g을 넣어 위와 같은 방법으로 단백질 함량을 측정하였다. 또한 0.4% SDS 용액 10 mL에 0~0.2 M이 되도록 DTT를 첨가하고 시료 0.1 g을 넣어 pH를 8과 12로 맞춘 뒤 위와 같은 방법으로 단백질 함량을 측정하였다. 본 실험에 있어 모든 두부는 황금콩을 이용하여 제조되었으며 herb 두부, 일반 두부 및 compound 두부는 응고제로 각각 한약제, GDL 그리고 한약제와 GDL의 혼합물을 이용한 경우를 의미한다.

2) 두부 제조에 있어 응고 시간의 영향

Soybean flour (황금콩)를 이용하여 제조한 두부의 경우 예비 실험을 통하여 80℃ 이상의 온도에서 단백질을 변성시키는 과정이 두부단백질의 응고에 필수적인 전 처리 과정임을 확인하였다. 본 실험에서는 두미의 최적 가열 시간을 알아본다.



3) 두부 제조에 미치는 응고제 첨가량의 영향

Defatted soy flour (황금콩) 625 g에 증류수 2.5 L를 넣고 2시간 동안 상온에서 교반하여 두부 제조에 필요한 단백질을 추출하였다. 단백질 용액의 pH를 8.0으로 고정하고 원심분리에 의해 대두박을 제거하였다. 용액의 단백질 함량과 부피를 각각 3.53% 과 1700 mL으로 하여 두부를 제조하였다. Defatted soy flour에는 지방이 극소량 존재하므로 두부제조시 식용유를 20 g씩 첨가하였다.

4) 두부의 저장성 실험

일반두부, 한약두부 및 혼합두부 3가지를 저온 살균한 그룹과 하지 않은 그룹으로 나눈 뒤 실온과 4℃에서 보관하며 미생물 실험에 이용하였다. PCA (Plate count agar, Difco, USA) 배지에 100 µL씩 접종한 다음 37℃에서 24시간동안 배양한 후 colony 수를 계수하였다. 균수는 CFU (colony forming unit)/g으로 나타내었다.

5) 통계분석

모든 측정결과는 3번 반복 실험하여 각 시료들 간의 유의성 검정은 SAS (Statistic Analysis System, USA)를 이용하여 분산 분석을 행한 후 Duncan's multiple range test로 5% 수준에서 그 유의성을 검정하였다.

6) 두부의 관능검사

시료는 기호도검사 하기 전에 3×3cm 크기로 약 20g으로 잘라 임의의 세 자리 숫자를 적은 접시에 각각 한 조각씩 담아 제시 하였다. 모든 시료의 평가 사이에 입가심을 할 수 있도록 증류수와 빨는 컵을 함께 제시하였다. 소비자 검사는 식품영양학과 남녀 대학생 80명을 대상으로 실시하였다. 기호검사는 9점척도(hedonic scale)를 이용하여 표시하도록 하였으며 1점으로 갈수록 '아주싫다'에서 9점으로 갈수록 '아주좋다'를 표시하도록 하였다. 평가된 특성은 외관(appearance)특성의 색(color), 향미(flavor) 특성의 고소한맛(savory), 비린맛(beany), 떫은맛(astringency), 쓴맛 (bitter) 그리고 조직감(texture) 특성의 단단한정도(hardness), 탄력성 (springness), 거친정도(adhesiveness) 및 전반적인 기호도(overall acceptability) 순서대로 진행되었다

나. 결과 및 고찰

1) 두부 단백질의 응고 메커니즘

상등액의 단백질 함량을 측정한 결과는 Fig. 1-8과 같다. 먼저 상등액의 단백질 함량을 비교하면 복합두부, 한약두부, 일반두부 순으로 단백질 함량이 많은 것으로 나타났으며 비슷한 경향으로 증가하거나 감소하였다.

pH를 2~12로 맞춘 buffer 용액을 이용한 실험은 pH가 4~5의 등전점일 때 단백질을 침전시키므로 그 영향을 받아 상등액의 단백질 함량은 pH 4에서 가장 적었다가 pH가 높아질수록 계속 증가하였다. 0~6 M 농도의 urea 용액을 이용한 실험은 urea가 단백질의 hydrogen bond (수소 결합)를 파괴시키지만 용액의 농도가 높아져도 상등액의 단백질 함량에는 별로 영향을 미치지 않았다. 0~1% 농도의 SDS 용액을 이용한 실험은 SDS가 단백질의 hydrophobic bond (소수성 결합)를 파괴시키므로 용액의 농도가 높아질수록 상등액의 단백질 함량은 계속 증가하였다.

pH 8 buffer, 6 M urea 및 0.4% SDS 용액에 0~0.2 M의 농도로 DTT를 첨가한 용액을 이용한 실험은 DTT가 단백질의 disulfide 결합을 파괴시키므로 3종류의 용액이 차이는 있었으나 농도가 높아질수록 상등액의 단백질 함량은 모두 계속 증가하였으며 pH와 SDS보다 더 많은 영향을 미쳤다.

0.4% SDS 용액에 0~0.2 M의 농도로 DTT를 첨가하고 pH를 8과 12로 맞춘 용액을 이용한 실험은 pH, SDS 및 DTT의 상호작용으로 농도가 높아질수록 계속 증가하여 상등액의 단백질 함량이 68.33~78.92%까지 나타났으며 pH를 맞춘 buffer 용액을 이용한 실험에서처럼 pH 8보다 pH 12에서 더 많이 나타났다.

결과적으로 두부의 단백질은 위의 실험한 용액에 의해서 pH의 영향을 받으며 3차구조의 소수성 결합과 disulfide 결합이 잘 풀리는 것으로 나타났고 2차구조의 수소 결합은 잘 풀리지 않는 것으로 나타나 3종류의 두부가 모두 비슷한 응고 메커니즘을 보였다.

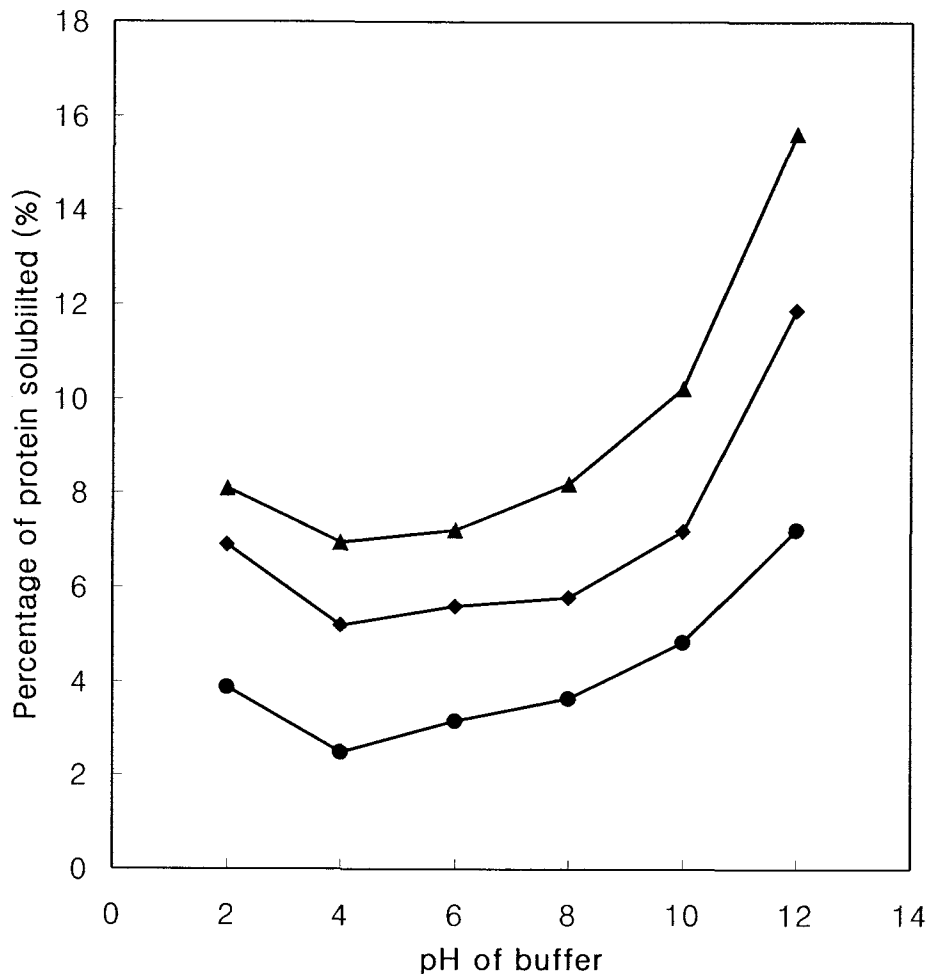


Fig. 1. Solubilisation of tofu protein at different pH of buffer.

●, General tofu; ◆, Herb tofu; ▲, Compound tofu

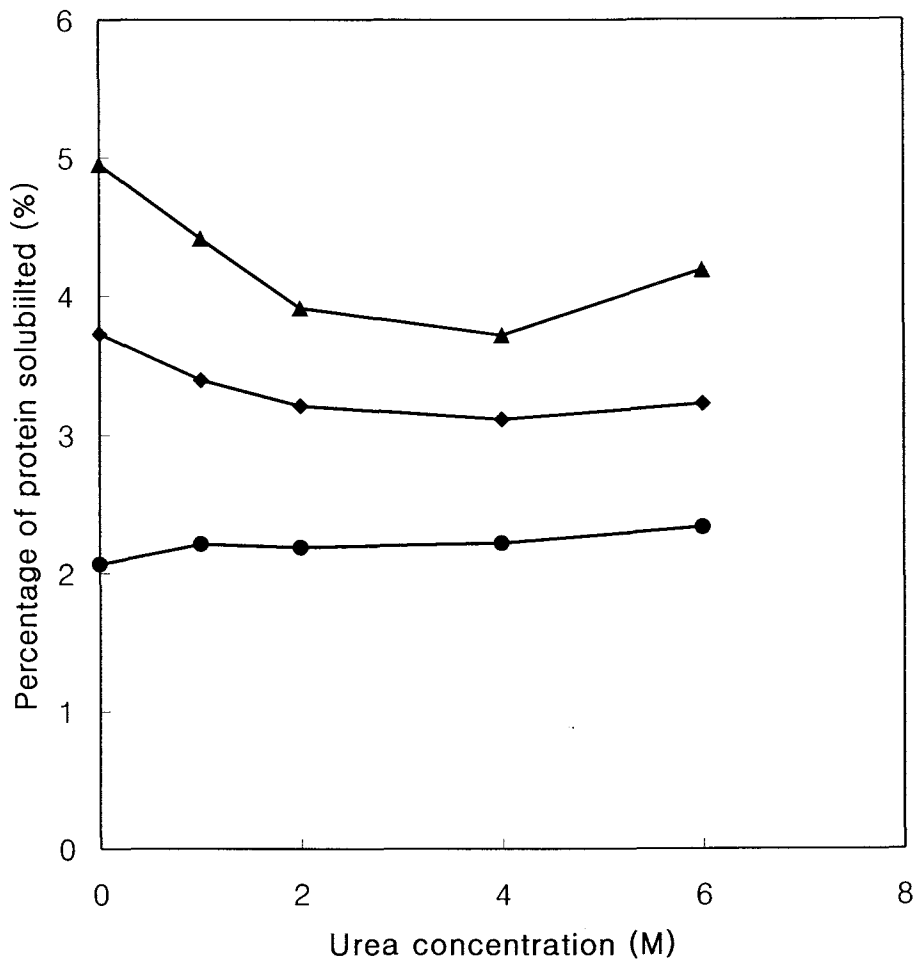


Fig. 2. Solubilisation of tofu protein at different concentration of urea.

●, General tofu; ◆, Herb tofu; ▲, Compound tofu

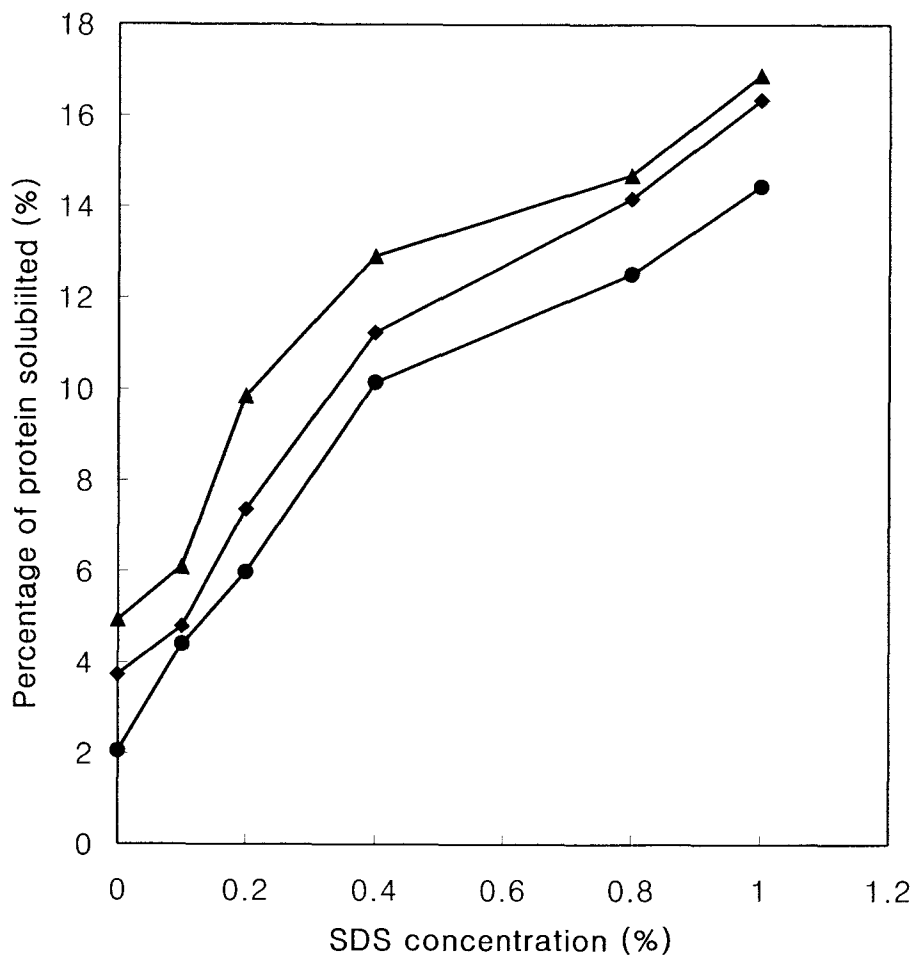


Fig. 3. Solubilization of tofu protein at different concentration of SDS.

●, General tofu; ◆, Herb tofu; ▲, Compound tofu

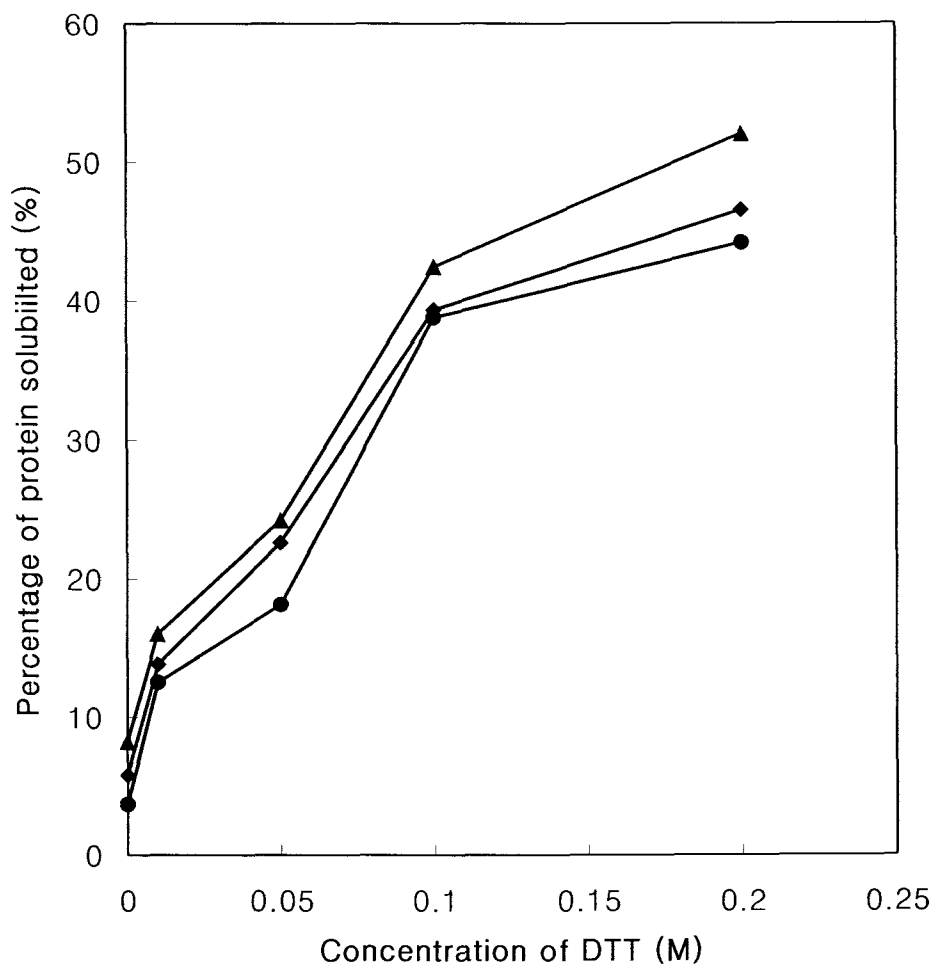


Fig. 4. Solubilisation of tofu protein due to different concentration of DTT in $\text{H}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ buffer. ●, General tofu; ◆, Herb tofu; ▲, Compound tofu

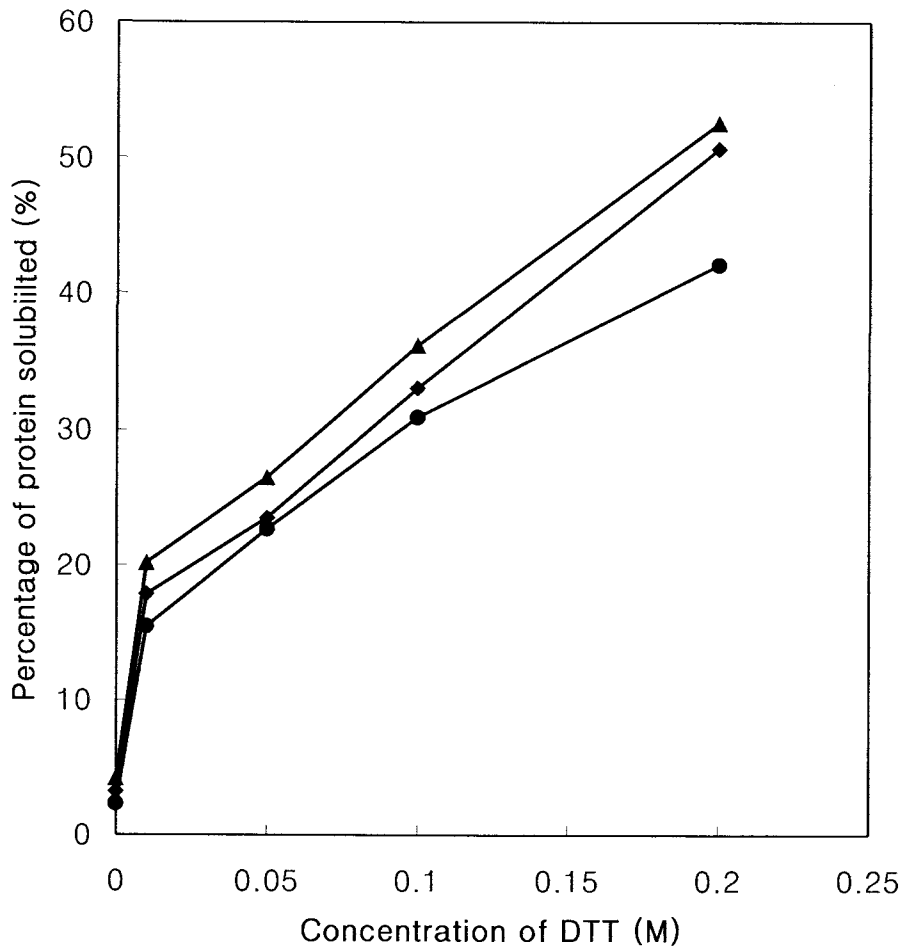


Fig. 5. Solubilisation of tofu protein due to different concentration of DTT in 6 M urea. ●, General tofu; ◆, Herb tofu; ▲, Compound tofu

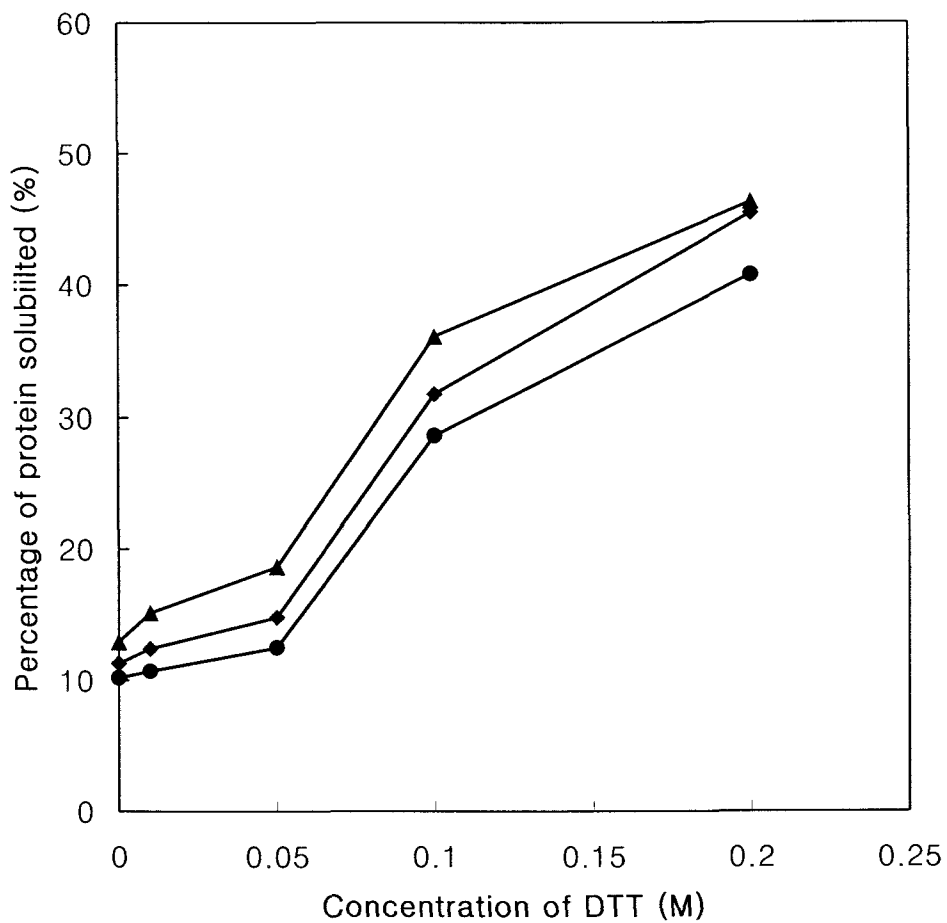


Fig. 6. Solubilisation of tofu protein due to different concentration of DTT in 0.4% SDS. ●, General tofu; ◆, Herb tofu; ▲, Compound tofu

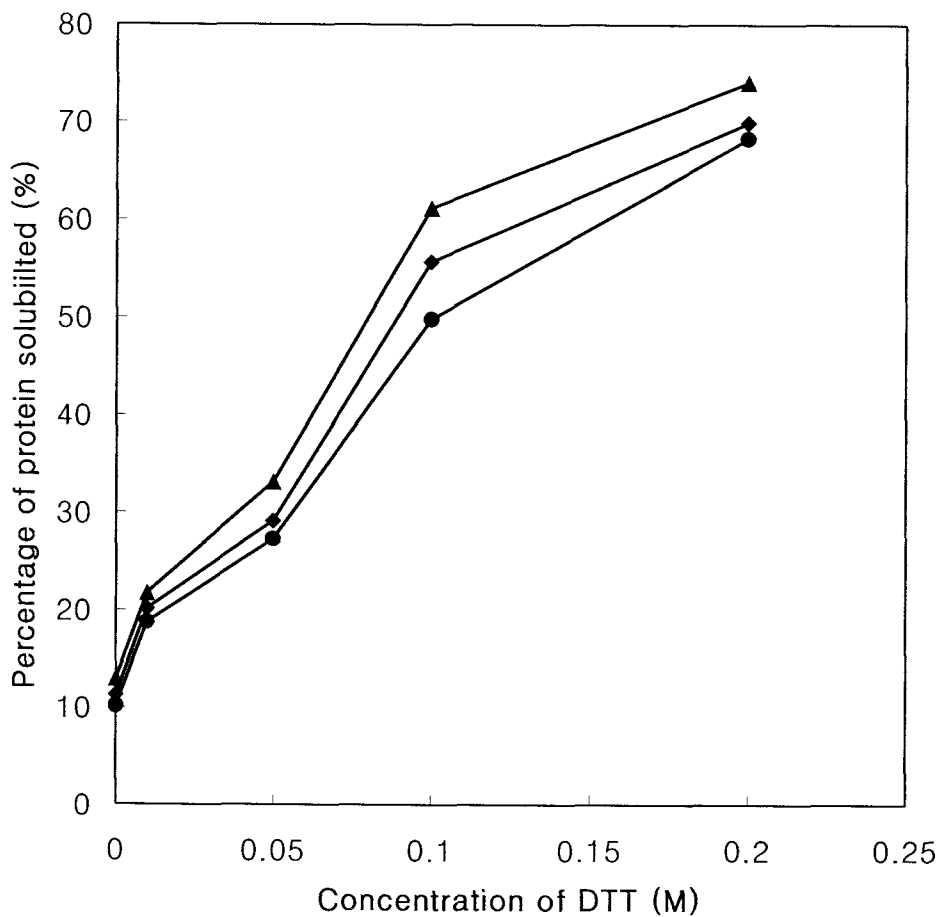


Fig. 7. Solubilisation of tofu protein due to different concentration of DTT in 0.4% SDS (pH 8). ●, General tofu; ◆, Herb tofu; ▲, Compound tofu

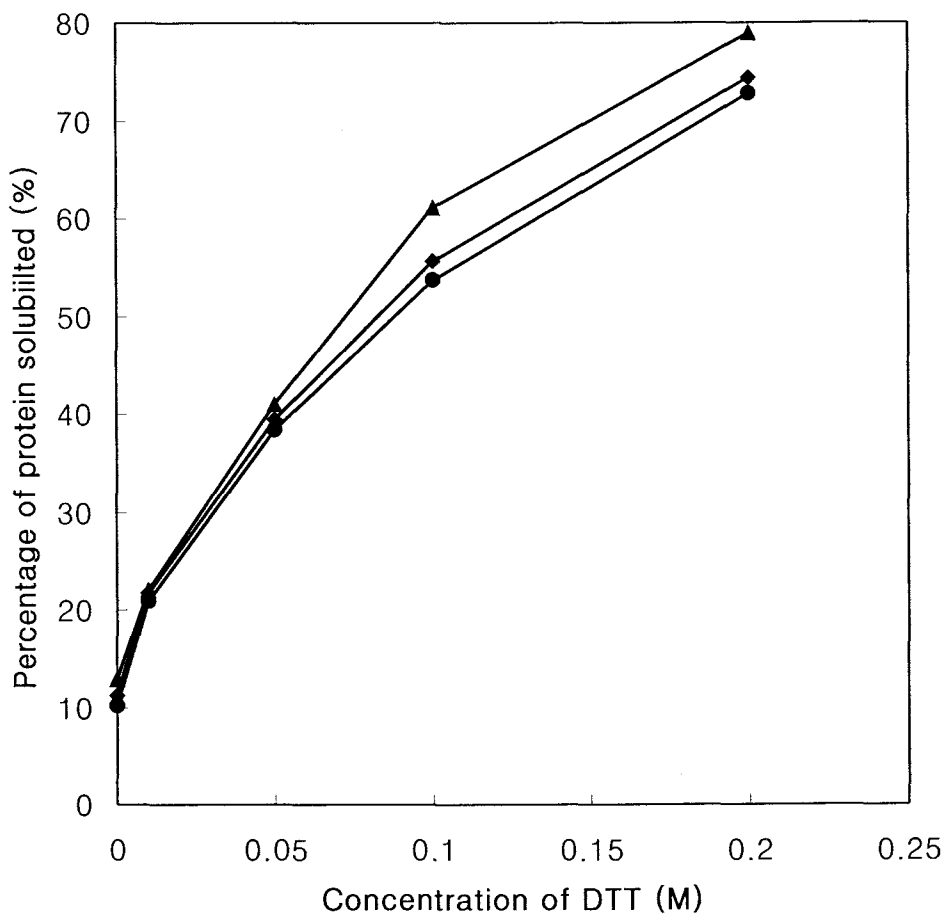


Fig. 8. Solubilisation of tofu protein due to different concentration of DTT in 0.4% SDS (pH 12). ●, General tofu; ◆, Herb tofu; ▲, Compound tofu

2) 두부 제조에 영향을 미치는 인자

가. 두미의 가열 온도가 두부수율에 미치는 영향

본 실험을 통하여 두미단백질을 80°C 이상에서 변성시키는 과정이 두부단백질의 응고에 필수적인 것으로 판단된다. 90°C, 85°C, 및 80°C에서 가열처리된 두미단백질은 응고제 (한약제) 첨가에 의해 aggregate되었으나 75°C 이하에서 가열된 두미단백질은 aggregation 현상을 보이지 않았다 (Fig. 9). 이때 생성된 두부의 수분 함량 변화와 rheological properties는 Fig 10 및 Table 1과와 같다. 따라서 두부를 제조하기 위하여서는 두미를 85°C에서 가열하여 대두단백질의 열변성을 일으키는 과정이 대두단백질의 aggregation에 필요한 pretreatment로 나타났다. 이와 같은 방법에 의해 생성된 두부는 수분 함유량이 높아 부드러운 texture를 갖게 된다.

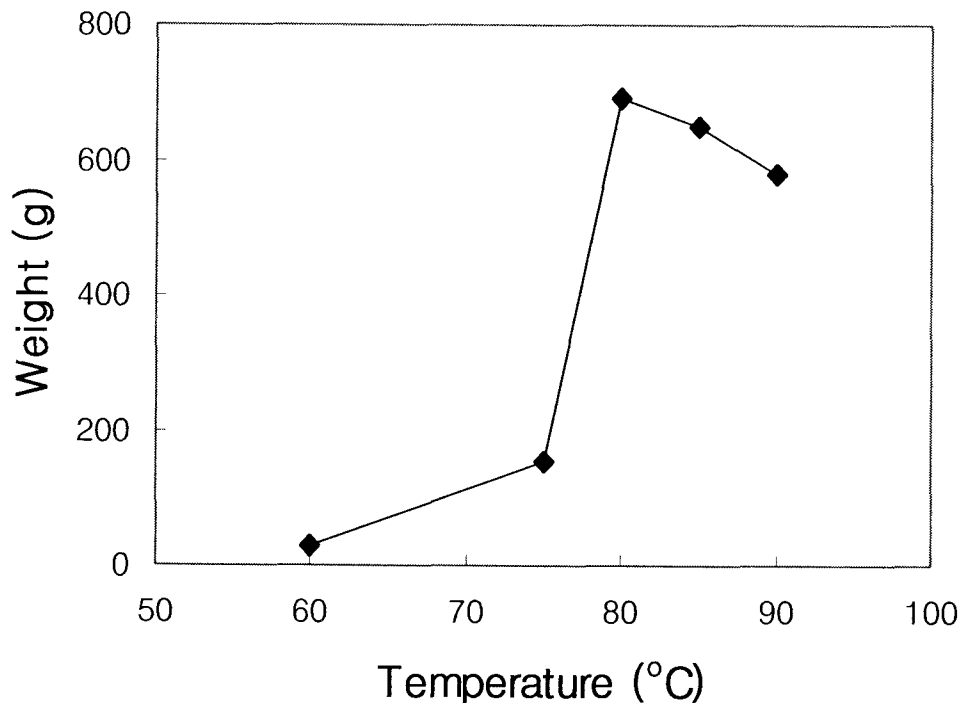


Fig. 9. Effects of heating temperature of protein extract for 20 min on weight of tofu formulated.

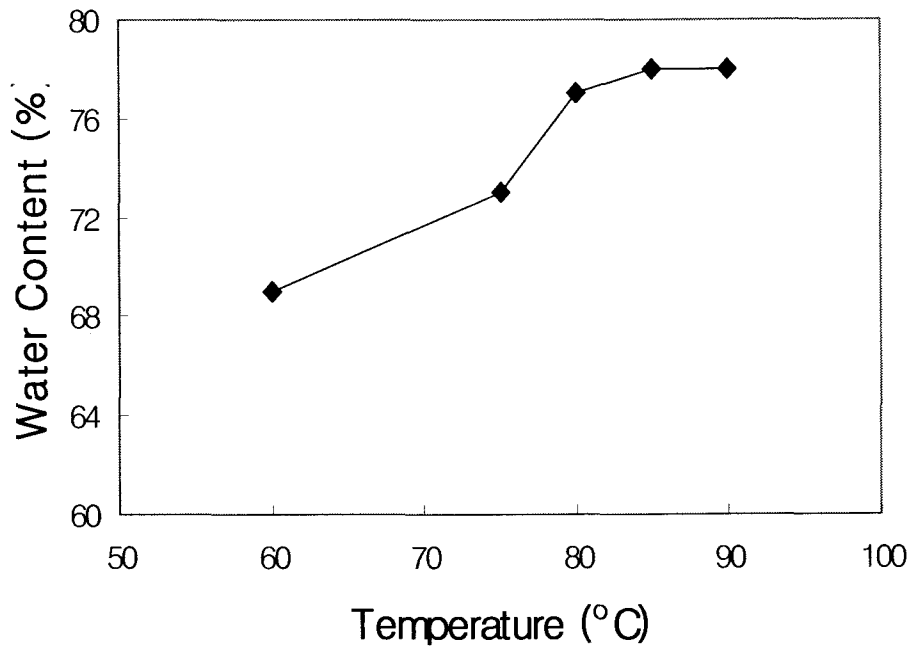


Fig. 10. Effects of heating temperature of protein extract for 20 min on water content of tofu formulated

Table 1. Physicochemical properties of tofu formulated

	두부 (80℃)	두부 (85℃)	두부 (90℃)
Hardness (Dyne/cm ²)	429134.43	560694.57	512011.22
Adhesivness (%)	-105	-106	-73
Cosiveness (%)	9.706	16.322	15.875
Sprigness (%)	13.18	36.36	25.88
Gumminess (g)	107.89	176.26	100.63
Brittleness (g)	6.99	59.75	25.55

Fig 11은 85°C에서 가열 시간에 따른 두부의 생성량을 조사한 결과이다. Maximum quantity를 얻기 위하여서는 두미를 5-12분가량 가열하는 것이 prerequisite하였다. 한편 두미의 가열 시간이 5분 이하일 경우 대두단백질의 변성이 충분히 일어나지 않아 응고제를 첨가하여도 단백질의 aggregation이 발생하지 않는 것으로 나타났다.

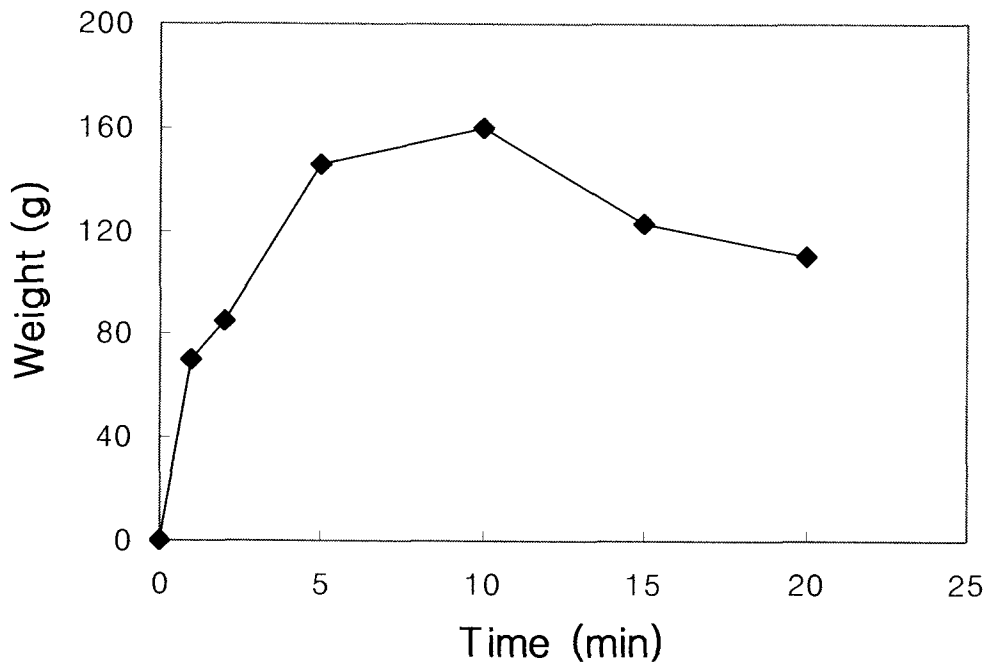


Fig. 11. Effects of heating time of protein extract at 85°C on weight of tofu formulated

Fig. 12는 이때 생성된 두부의 water content를 나타내고 있다. 두미의 가열이 1-10분 사이일 경우 생성된 두부의 water content는 약 80% 정도였으나 가열 시간이 10분을 초과할 경우 대두 단백질의 overheating에 의해 단백질의 보수력이 떨어져 두부의 water content가 낮게 되었다. 이는 단백질 subunit 사이에 형성되는 disulfide bond와 hydrophobic interaction이 단백질과 water molecule 사이의 hydrogen bonding을 저해하기 때문인 것으로 판단된다.

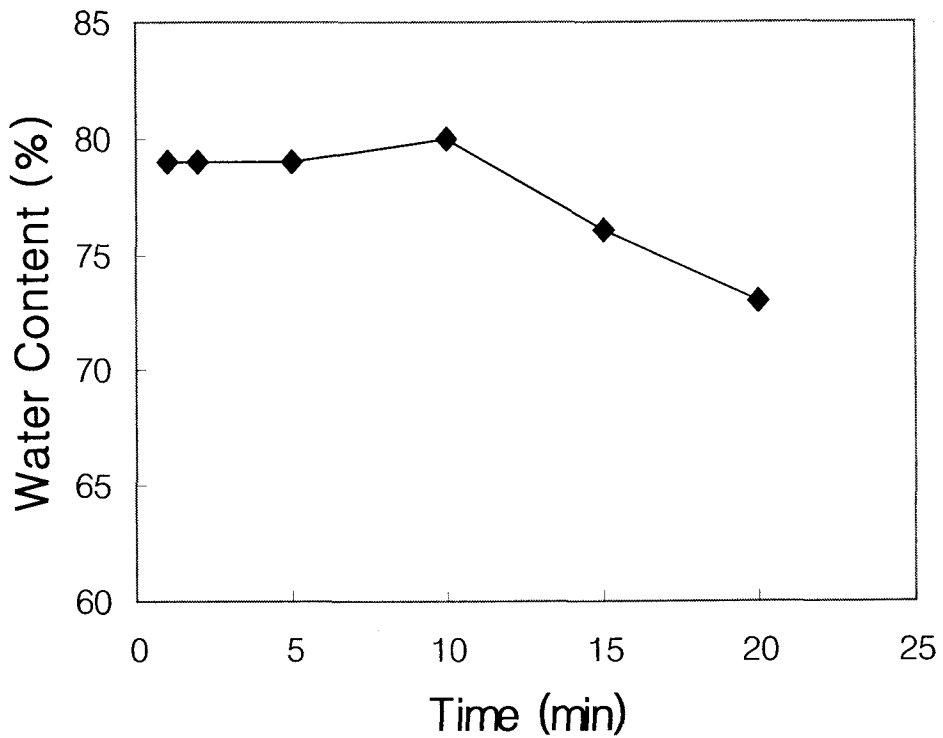


Fig. 12. Effects of heating time of protein extract at 85°C on water content of tofu formulated

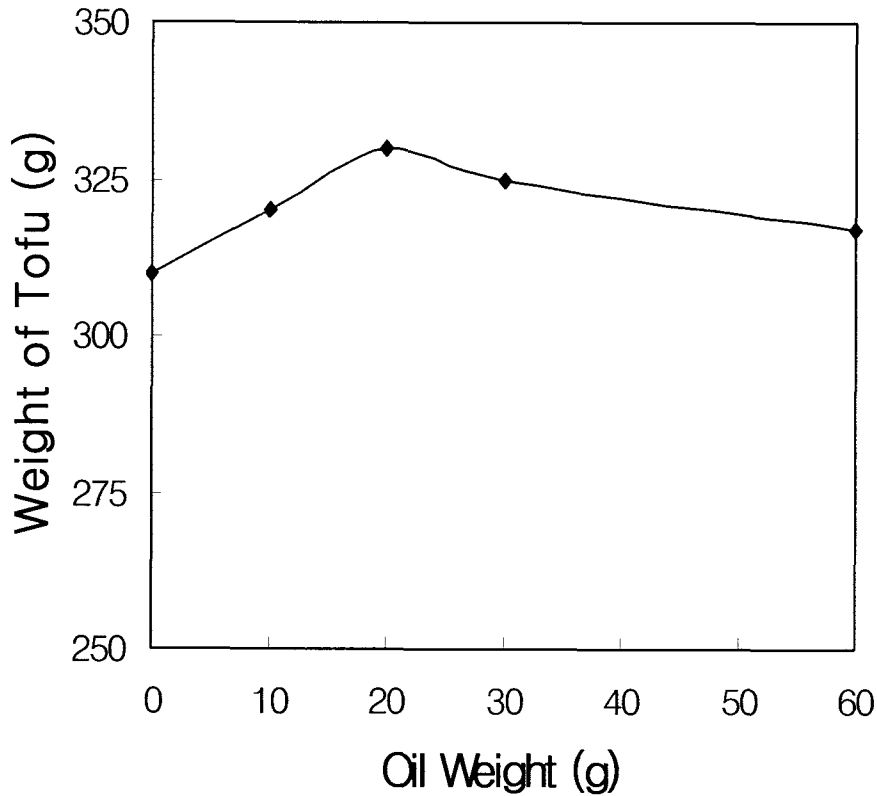


Fig. 13. Weight of tofu formed according to weight of oil added to protein solution 60g/1700mL (deffated soy flour 이용)

식용유 첨가량 변화에 따른 제조된 두부의 무게를 살펴보면 식용유 20 g에서 가장 많은 양의 두부가 생성되었다 (Fig. 13). 두부의 주 성분은 수분 이외에 단백질과 지방질 이므로 두부의 제조에는 단백질 이외에 지방질이 필요하다. 두부 조직에 있어 지방질은 protein matrix 사이에 위치하고 있는 것으로 생각되며, 지방질은 두부의 관능 및 texture를 향상시키는데 중요한 역할을 한다. 첨가된 지방질의 양이 20 g 이상일 경우 두부의 생성은 오히려 저해되는 양상을 보였다. 한편 응고제의 첨가량이 두부

제조에 미치는 영향 조사한 결과 응고제의 첨가량이 증가함에 따라 제조된 두부의 무게는 비례하게 증가하였으나 12 g 이후부터는 생성된 두부의 양은 일정한 수준을 유지하였다. 응고제의 양이 10 g 이하일 경우 두부의 생성이 저조하였다.

3) 두부의 저장성

두부를 실온과 4℃에서 저장하면서 시간의 경과에 따른 세균수의 변화는 Fig. 14와 15에 나타내었다. 일반두부, 한약두부 및 혼합두부는 저장 시간이 경과할수록 colony 수는 증가하였으며 일반두부에서 가장 많이 검출되었고 혼합두부에서 colony 수가 가장 적게 나타났다. 특히 저온 살균한 그룹이 하지 않은 그룹보다 colony의 수가 더 적게 나타났다. Kim et al(2002)은 빵 제조시 한약재추출물 및 액상칼슘 첨가량이 많은 빵의 일반세균이 급격히 감소하여 보존성이 높게 나타났다고 하였고, Jung et al(2000)은 오미자즙과 매실즙 첨가가 두부의 pH를 낮춰 두부 부패 세균의 생육이 억제된다고 하였는데 일반두부보다는 한약두부가 일반세균이 적어 비슷한 경향을 보였다. 식품은 미생물의 원인으로 부패하게 되며 일반적으로 시중에서 판매하는 두부는 상온에서 보관하고 있는데 상온에서 보관할 때는 보통 저장기간이 하루정도라고 한다.

또한 저장온도에 따른 두부의 보존성을 비교해보면 4℃에서 저장한 두부가 실온에 저장한 두부보다 더 오래 저장되었고 colony의 수도 더 느리게 증가되었는데 이것은 저온이 미생물의 생육을 억제시킨 결과라고 하였다 (Frazier and Westhoff, 1978). Champagene et al(1991)은 4℃와 25℃에서 두부를 저장하면서 미생물의 성장을 비교하였는데 25℃에서는 미생물의 성장이 하루만에 109 CFU/g에 도달하여 부패하였고, 반면에 4℃에서는 미생물의 성장이 느려 15일 동안에 108 CFU/g가 되어 저장온도가 낮을수록 두부의 저장성이 증대된다고 하였으며 Grover et al (1983)과 이해원(1984)도 저장온도를 낮출수록 보존성이 증대한다고 하여 비슷한 경향을 보였다.

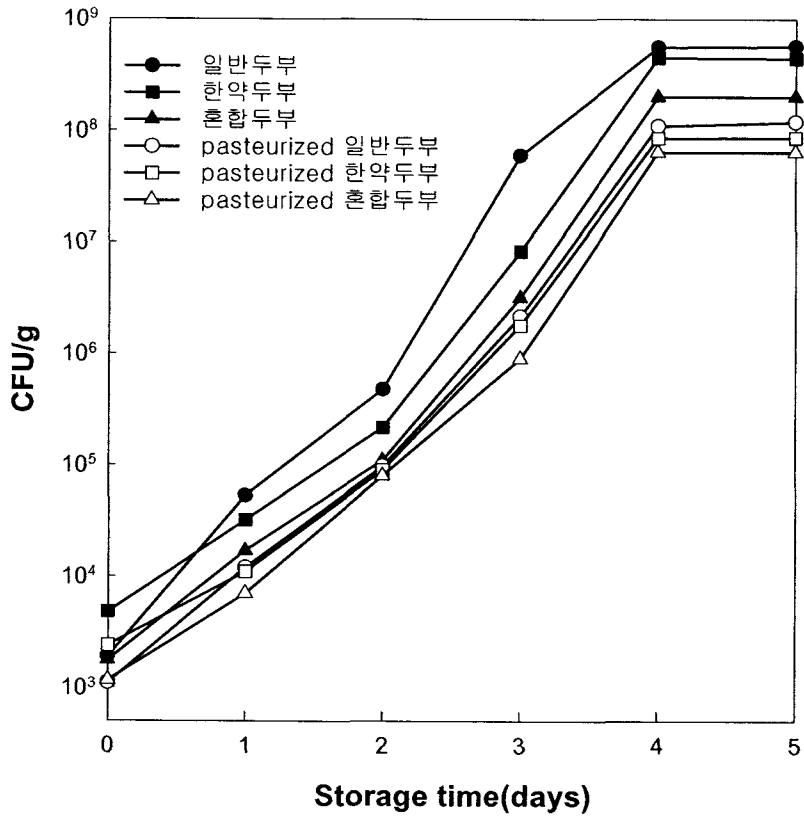


Fig. 14. Changes in total microbial count of tofu during storage at room temperature.

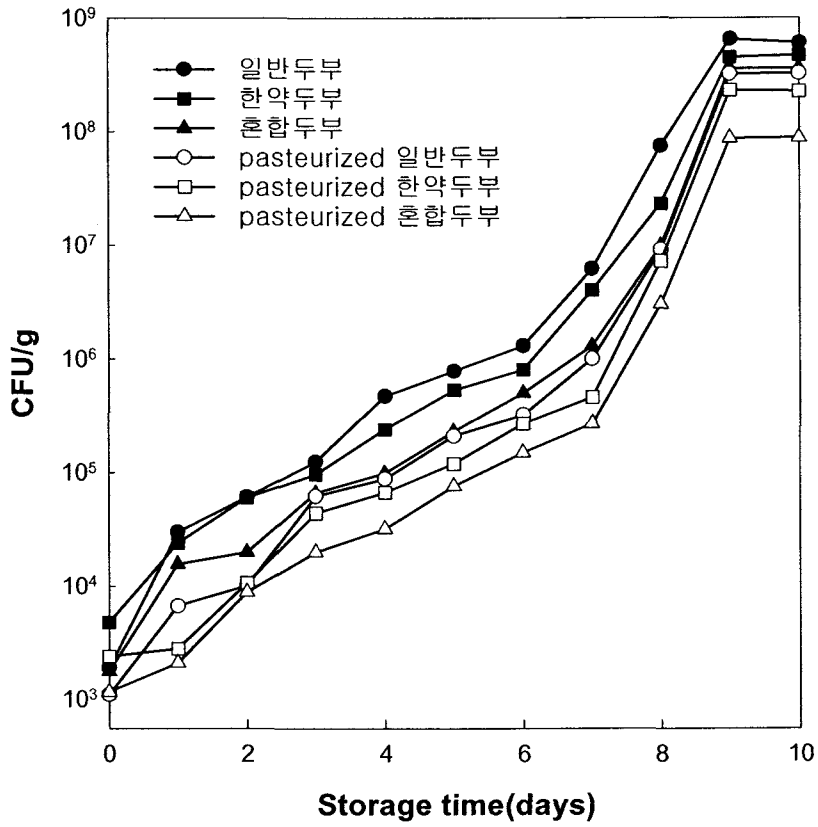


Fig. 15. Changes in total microbial count of tofu during storage at 4°C

4)두부의 기호도 검사

Table 2. 한약두부 소비자 기호도 조사

	시료	한약두부	한약+GDL	풀무원
외관 appearance	색 color	4.90 ^b	4.95 ^b	7.01 ^a
향미 flavor	고소한맛 savory	5.60 ^a	5.60 ^a	5.51 ^a
	비린맛 beany	5.14 ^a	5.23 ^a	5.30 ^a
	떫은맛 astringency	5.09 ^a	5.14 ^a	4.84 ^a
조직감	단단한정도 hardness	5.51 ^a	5.50 ^a	5.99 ^a
	탄력성 springness	5.46 ^b	5.26 ^b	6.38 ^a
	거친정도 adhesiveness	5.33 ^a	5.34 ^a	5.81 ^a
전반적인기호도 overall acceptability		5.94 ^a	5.49 ^a	5.59 ^a

1) Same letters in a row are not significantly different each other ($p < 0.05$)

외관의 색 기호도는 일반두부가 7.01로 유의적으로 가장 높은 기호도를 나타내었다.

두부의 고소한 맛의 기호도는 모든 시료군에서 유의적인 기호 차이를 보이지 않았으나 한약두부, GDL두부가 일반두부보다 기호도가 높은 경향을 보였다. 두부의 단단한 정도는 일반두부의 기호도가 높은 경향을 나타내었다. 탄력성도 마찬가지로 일반두부가 일반두부가 6.38로 유의적으로 높은 기호도를 나타 내었고 그 다음으로 한약두부가 5.46을 나타내며 기호도가 높게 평가 되었으나 5.26을 나타낸 GDL두부와는 유의적으로 기호 차이를 보이지 않았다. 두부의 전반적인 기호도에서는 한약두부가 5.94로 기호도가 높은 경향을 나타내었다 (Table 2).

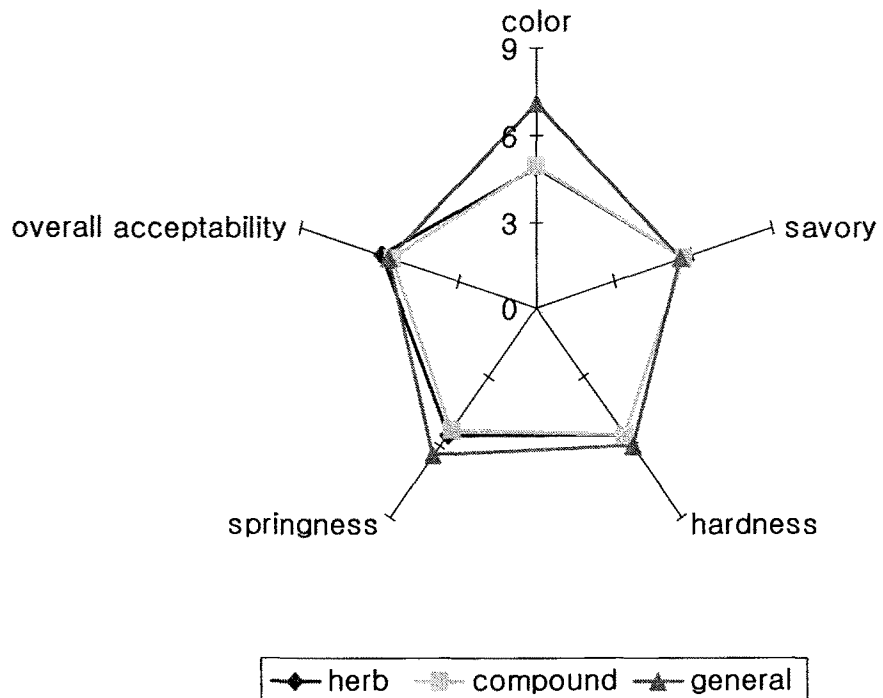


Fig. 16. Sensory characteristics of tofu

다. 결 론

본 연구에서는 익기생진에 효능이 있는 한약재인 오미자, 황기, 맥문동, 호박 및 인삼에 함유되어 있는 유기산의 대두 단백질 응고 기작에 관한 메커니즘 규명과 품질이 우수한 국산콩 등을 이용한 새로운 기능성 두부를 개발하였다.

한약재의 수분 함량은 호박이 93.42%로 가장 많았으며 다른 한약재는 8.19~10.23%로 큰 차이를 보이지 않았다. 한약재의 회분 함량은 오미자가 3.62%로 가장 많았으며 호박은 0.39%로 가장 적게 나타났다. 오미자와 다른 한약재를 한가지씩만 첨가한 4종류의 한약두부의 수분 함량을 비교한 결과 오미자와 호박추출물을 첨가한 두부가 79.38%로 가장 많았으며 오미자와 인삼추출물을 첨가한 두부가 75.26%로 가장 적게 나타났다. 나머지 두부의 일반성분을 비교한 결과 흑태두부가 75.66%로 수분 함량이 가장 많았고 11S두부가 57.92 %로 수분 함량이 적게 나타났다. 회분 함량은 쥐눈이두부가 0.60%로 가장 많았고 11S두부가 0.12%로 가장 적게 나타났다. 여러 종류 두부의 단백질 함량을 분석한 결과는 유기산 두부가 64.49%로 가장 많게 나타났다.

한약추출물의 pH 측정에서는 오미자추출물의 pH가 3.03으로 가장 낮게 측정되었고 호박추출물의 pH는 6.39로 가장 높게 나타났다. 두유에 각각의 한약추출물을 혼합했을 경우에는 두유의 pH인 6.91과 비슷하게 측정되어 응고 반응을 보이지 않았고 오미자추출물을 첨가한 두유의 pH만 4.58로 두유 응고가 가장 잘되는 pH인 4.6과 비슷하게 측정되었다.

오미자와 다른 한약재를 한가지씩만 첨가한 4종류의 한약두부의 색도를 측정된 결과 오미자와 호박추출물을 첨가한 두부의 L값이 74.26으로 가장 밝게 평가되었고 오미자와 인삼추출물을 첨가한 두부의 L값이 73.37로 가장 어둡게 평가되었다. a값은 오미자와 인삼추출물을 첨가한 두부가 4.70으로 가장 높게 평가되었고 다른 두부의 a값도 4.20~4.42로 비슷하게 평가되었다. b값은 오미자와 황기추출물을 첨가한 두부가 10.99로 가장 높게 평가되었고 다른 두부는 10.36~10.59로 평가되며 유의적인 차이를 보였다. 나머지 여러 종류의 두부의 L값은 유기산두부가 82.25로 가장 밝게 평가되었고 한약재추출물을 넣은 두부일수록 어둡게 평가되었으며 쥐눈이두부는 58.07로 가장 어둡게 평가되었다. a값은 쥐눈이두부가 15.30으로 가장 높게 평가되었고 일반두부의 a값

은 -0.78로 가장 낮게 평가되었다. b값은 배아두부가 13.55로 가장 높게 평가되었고 쥐눈이두부가 4.57로 가장 낮게 평가되었다.

오미자와 다른 한약재를 한가지씩만 첨가한 4종류의 한약두부의 조직감을 측정된 결과에서 견고성은 유의적인 차이를 보이지 않았으며 오미자와 인삼추출물을 첨가한 두부가 274988 Dyne/cm²으로 가장 강하게 나타났다. 부착성은 오미자와 호박추출물을 첨가한 두부가 -190 g으로 가장 강하게 평가되었다. 응집성과 탄력성은 오미자와 인삼추출물을 첨가한 두부가 7.79%와 8.05%로 가장 강하게 평가되었고 오미자와 맥문동추출물을 첨가한 두부가 5.43%와 5.23%로 가장 약하게 평가되었다. 껌성과 파쇄성도 오미자와 인삼추출물을 첨가한 두부가 40.20 g과 3.23 g으로 가장 강하게 평가되었다. 껌성은 오미자와 호박추출물을 첨가한 두부가 26.11 g으로 가장 약하게 평가되었고 파쇄성은 오미자와 맥문동추출물을 첨가한 두부가 1.51 g으로 가장 약하게 평가되었다. 일반두부, 혼합두부 및 오미자두부의 조직감과 이것들을 살짝 구워낸 후의 조직감을 비교 측정된 결과는 부착성을 제외한 특성에서 유의적인 차이를 보였으며 두부를 살짝 구워낸 후가 구워내기 전보다 수치가 모두 증가되었다. 견고성은 오미자두부를 살짝 구워낸 후가 988763 Dyne/cm²으로 아주 강하게 평가되었다. 견고성과 부착성을 제외한 특성에서는 혼합두부가 일반두부에 비해 더 강하게 평가되었다. 나머지 여러 종류의 두부의 조직감을 측정된 결과에서 견고성은 211975~344419 Dyne/cm²으로 비슷한 경향을 보였으며 흑태두부가 가장 약하게 평가되었다. 부착성은 배아두부가 -289 g으로 가장 약하게 평가되었다. 응집성과 탄력성은 쥐눈이두부가 18.86%와 23.81%로 가장 강하게 평가되었고 껌성과 파쇄성은 유기산두부가 84.48 g과 14.31 g으로 가장 강하게 평가되었다.

오미자추출물의 유기산 함량은 오미자 100 g당 citric acid 3.80 g, DL-malic acid 1.18 g으로 가장 많이 나타났고, 황기추출물의 유기산 함량은 황기 100 g당 citric acid 1.70 g, DL-malic acid 1.30 g으로 가장 많이 나타났다. 맥문동추출물의 유기산 함량은 맥문동 100 g당 DL-malic acid 2.82 g, pyroglutamic acid 0.60 g으로 가장 많이 나타났고, 호박추출물의 유기산 함량은 호박 100 g당 DL-malic acid 1.23 g, succinic acid 1.01 g으로 가장 많이 나타났으며, 인삼추출물의 유기산 함량은 인삼 100 g당 DL-malic acid 2.18 g, maleic acid 0.91 g으로 가장 많이 나타났다.

배아의 총지방질의 함량은 전체 중량의 8.4%로 나타났고, 중성지방은 96.20%, 당지질은 3.21%, 인지질은 0.59%로 나타났다. 배아의 총지방질은 지방산 중 linoleic acid(18:2)가 40.5%로 가장 많았고, oleic acid (18:1), linolenic acid(18:3)의 순으로 함량이 높게 나타났다. 배아의 중성지방은 지방산 중 linoleic acid(18:2)가 50.0%로 가장 많았고, 총지방질과 같은 순서로 함량이 높게 나타났다. 배아의 당지질은 지방산 중 linoleic acid(18:2)가 39.9%로 가장 많았고, palmitic acid(16:0), oleic acid(18:1)의 순으로 함량이 높게 나타났다. 배아의 인지질은 지방산 중 linoleic acid (18:2)가 40.1%로 가장 많았고, 당지질과 같은 순서로 함량이 높게 나타났다.

배아, 7S 및 11S의 아미노산 조성 및 함량을 분석한 결과는 다른 아미노산에 비해 glutamic acid, aspartic acid 순으로 비교적 높게 나타났다. Glutamic acid의 함량은 6410.0~19977.5 mg%로 나타났고 곡류에는 제한 아미노산이지만 콩의 주요 아미노산인 lysine 함량은 3485.7~5833.7 mg%로 나타났으며 다른 아미노산에 비해 가장 적게 함유되어 있는 아미노산은 cysteine인 것으로 나타났고, 다음으로는 methionine, histidine, tyrosine 및 threonine 순으로 적게 나타났다. Cysteine의 함량은 608.9~1219.3 mg%로 나타났다. 모든 아미노산 함량을 비교하면 11S, 7S, 배아 순으로 아미노산 함량이 많은 것으로 나타났다.

상등액의 단백질 함량을 비교하면 복합두부, 한약두부, 일반두부 순으로 단백질 함량이 많은 것으로 나타났다. pH를 2~12로 맞춘 buffer 용액을 이용한 실험에서 상등액의 단백질 함량은 pH 4에서 가장 적었다가 pH가 높아질수록 계속 증가하였다. 0~6 M 농도의 urea 용액을 이용한 실험에서 상등액의 단백질 함량에는 별로 영향을 미치지 않았다. 0~1% 농도의 SDS 용액을 이용한 실험은 농도가 높아질수록 상등액의 단백질 함량은 계속 증가하였다. pH 8 buffer, 6 M urea 및 0.4% SDS 용액에 0~0.2 M의 농도로 DTT를 첨가한 용액을 이용한 실험은 3종류의 용액이 차이는 있었으나 농도가 높아질수록 상등액의 단백질 함량은 모두 계속 증가하였으며 pH와 SDS보다 더 많은 영향을 미쳤다. 0.4% SDS 용액에 0~0.2 M의 농도로 DTT를 첨가하고 pH를 8과 12로 맞춘 용액을 이용한 실험은 pH, SDS 및 DTT의 상호작용으로 농도가 높아질수록 계속 증가하여 상등액의 단백질 함량이 68.33~78.92%까지 나타났으며 pH 8보다 pH 12에서 더 많이 나타났다. 결과적으로 두부의 단백질은 위의 실험한 용

액에 의해서 pH의 영향을 받으며 3차구조의 소수성 결합과 disulfide 결합이 잘 풀리는 것으로 나타났고 2차구조의 수소 결합은 잘 풀리지 않는 것으로 나타나 3종류의 두부가 모두 비슷한 응고 메커니즘을 보였다.

두부를 실온과 4℃에서 저장하면서 시간의 경과에 따른 저장성 실험 결과에서 저장 시간이 경과할수록 colony 수는 증가하였으며 일반두부에서 가장 많이 검출되었고 혼합두부에서 colony 수가 가장 적게 나타났다. 특히 저온 살균한 그룹이 하지 않은 그룹보다 colony의 수가 더 적게 나타났다. 저장 온도에 따른 두부의 보존성을 비교하면 4℃에서 저장한 두부가 실온에 저장한 두부보다 더 오래 저장되었고 colony의 수도 더 느리게 증가되었다.

이상의 연구결과 한약재에 함유되어 있는 유기산의 대두 단백질 응고 기작에 관한 메커니즘은 일반두부의 응고기작과 비슷하게 나타났으며 품질이 우수한 국산콩 및 배아, IIS 등을 이용한 새로운 기능성 두부를 개발할 수 있음이 밝혀졌다.

라. 참고문헌

- 강인희(1997). 한국의 맛. 대한교과서, 12.
- 고순남(1991). 분리대두단백 두부의 물리적 특성에 미치는 응고온도 및 응고제의 영향. 세종대학교 대학원 석사학위논문.
- 권태완(1971). 두류. 한국식품연구문헌총람(I-V), 한국식품과학회, 1, 1071-1145.
- 김길용(1990). 호박잰의 제조방법. 특허공보, 90-3549.
- 김길용(1990). 남과주 (호박술)의 제조방법. 특허공보, 90-3706.
- 김길용(1990). 호박음료의 제조방법. 특허공보, 90-31.
- 김길용(1990). 호박분말의 제조방법. 특허공보, 90-32.
- 김길용(1990). 호박스택의 제조방법. 특허공보, 90-12.
- 김길환(1982). 콩, 두부와 콩나물의 과학. 한국과학기술원, 119-133.
- 김동만, 윤혜현, 김길환(1990). 장려품종 콩의 단백질 특성. 한국식품과

- 학회지, 22(4), 386-392.
- 김민정(2000). 우리나라 전통콩의 이화학적 특성과 기능성 성분에 관한 연구. 용인대학교 대학원 석사학위논문.
- 김영희(1998). 오미자로부터 Sterol의 분리. 상지대학교 논문집, 제19집, 12, 475-481.
- 김중만, 김형태, 최용배, 황호선, 김태영(1993). 우유 첨가가 두부 품질에 미치는 영향. 한국영양식량학회지, 22(4), 437-442.
- 김태영(1994). 우유첨가 두부 및 두부치즈의 이화학적 품질특성에 관한 연구. 원광대학교 대학원 박사학위논문.
- 박무현(1994). 구기자를 이용한 건강음료의 개발. 한국식품개발연구원 보고서, II130-0439.
- 박용곤(1984). 대두의 수침시간에 따른 조직의 미세구조, 단백질 특성 및 두부수율의 변화. 영남대학교 대학원 석사학위논문.
- 박용문, 석호문(1995). 호박농축물을 이용한 호박차 및 호박음료의 제조방법. 특허공보, 제081467호.
- 손현수(1997). 한국의 두부 연혁과 신규 두부의 개발. 민족과 문화, 제6집, 71-92.
- 송석훈, 장건형(1964). 두부의 shelf-life 연장에 관한 연구 (제2보). 기술연구보고, 제3집, 육군기술연구소, 3, 5.
- 송태희, 김상순(1991). 인삼첨가 김치의 가식기간과 기호성에 미치는 영향. 한국식문화학회지, 6, 237.
- 식품공전(2001). 보건복지부, 218-219.
- 윤서석(1983). 한국음식. 수학사, 372-374.
- 윤영미, 손경희(1985a). 두부의 생산량 및 수용력에 미치는 지방의 영향. 한국식품과학회지, 1(1), 1.
- 윤영미, 손경희(1985b). 두부의 구조 및 질감특성에 미치는 지방의 영향. 한국조리과학회지, 1(1), 1-7.
- 이경원(1982). 국민영양과 대두의 수입정책. 식품과학, 15, 40.

- 이명환, 안혜숙(1983). **두부 제조시 응고제 및 성형압력이 미치는 영향**. 서울여자대학교 논문집, 제12호, 345-359.
- 이부용, 김동만, 김길환(1990). **한국산 콩품종의 두부 가공 적성에 관한 연구**. 한국식품과학회지, 22(3), 363-368.
- 이혜원(1984). **두부의 보존성 및 물성에 관한 연구**. 서울여자대학교 대학원 석사학위논문.
- 최서규(1989). **두부제품에 있어서의 당면과제**. 한국콩연구회지, 5(1), 5-9.
- 황경수(1996). **대두단백질의 변성과 식품가공에의 이용**. 한국의 콩연구, 33(1), 38.
- Albert, J.C.(1965). ***Economic aspects; Protein-rich food from oil seeds***. Food Technol., 9, 929.
- A.O.A.C.(1984). ***Association of Official Analytical Chemists***. 14th ed., Washington D.C., USA, 413.
- A Soyatech Publication(1988). ***Soya Bluebook***. Soyatech Inc., ME, USA.
- Back, N.I., Cho, S.J., Bang, M.H., Lee, I.Z., Park, C.G., Kim, M.S., Kim, K.S. and Sung, J.D.(1998). ***Cytotoxicity of steroid saponins from the tuber of Liriope platyhylla W.T.*** Agri. Chem. Biotechnol., 41, 390-394.
- Bae, D.H., Youn, K.S. and Chio, Y.H.(1997). ***Effect of various reagents on hardness and formation of coconut tofu***. Food Bio Technol., 6(1), 34-38.
- Baek, S.H., Kang, K.H. and Choe, S.N.(1996). ***Effect of seaweeds added in preparation of Tofu***. Korean J. Food and Nutr., 9(4), 529-535.
- Baik, S.H., Kim, M.K., Yun, S.E. and Joo, H.K.(1996). ***Improvement on textural properties of soybean curd by freeze***

- denaturation of soybeans.** Korean J. Food Sci. Technol., 28(2), 267-172.
- Berra, R. and Pontecorvo, A.(1975). ***New ways of utilizing soy in human diets in Latin America.*** J. Am. Oil Chem. Soc., 52(4), 280-282.
- Brekhman, I.I. and Dardymov, I.V.(1969). ***New substance of plant origin which increase nonspecific resistance.*** Ann. Re. Pharm., 9, 419.
- Burton, G.W. and Ingold, G.W.(1984). ***An unusual type of lipid antioxidant.*** Science, 224, 56-63.
- Champagene, C.P., Aurouze, B. and Goulet, G.(1991). ***Inhibition of undesirable gas production in tofu.*** J. Food Sci., 56(6), 1600-1603.
- Chang, K.S., Kim, M.J. and Kim, S.D.(1995). ***Effect of Ginseng on the preservability and quality of Chinese Cabbage Kimchi.*** J. Korean Soc. Food Nutr., 24(2), 313-322.
- Cho, G.S.(1997). ***Chemical compositions of the green and ripened pumpkin (Cucurbita moschata Duch.).*** Korean J. Food Sci. Technol., 29, 657-662.
- Cho, J.S.(1981). ***Food Stuff.*** Geejeon Yeongusa, Seoul, Korea, 162-164.
- Cho, S.B., Kim, H.J., Yoon, J.I. and Chun, H.S.(2003). ***Kinetic study on the color deterioration of crude anthocyanin extract from Schizandra Fruit (Schizandra chinensis fructus).*** Korean J. Food Sci. Technol., 35(1), 23-27.
- Choi, C.B., Park, Y.K., Kang, Y.H. and Park, M.W.(1998). ***Effects of pumpkin powder on chemically induced stomach and mammary cancers in Spragur-Dawley rats.*** J. Korean Soc. Food

Sci. Nutr., 27, 973-979.

Choi, H.J., Zhang, Y.B. An, B.J. and Choi, C.(2002). **Identification of biologically active compounds from Panax ginseng C. A. Meyer.** Korean J. Food Sci. Technol., 34(3), 493-497.

Choi, U., Shin, D.H., Chang, Y.S. and Shin, J.I.(1992). **Screening of natural antioxidant from plant their antioxidative effect.** Korean J. Food Sci. Technol., 24, 142-148.

Doston, C.R., Frank, H.A. and Cavaletto, C.G.(1977). **Indirect methods as criteria of spoilage in Tofu (Soybean Curd).** J. Food Sci., 42, 273-279.

Frazier, W.C. and Westhoff, D.C.(1978). **Food microbiology.** Mcgraw-hill Book Co., 130-142.

Grover, U., Songh, S. and Mital, B.K.(1983). **Studies on extending the shelf-life of soybean curd.** J. Food Science and Tech., 20, 298.

Han, D.S.(1993). **Pharmacognosy.** 5th ed., Dongmyungsa, Seoul, 148.

Hong, J.W., Kim, I.H., Kim, J.H., Kwon, O.S., Lee, S.H., Seo, W.S., Kim, C., Kim, E.S. and Chung, Y.H.(2002). **Effects of dietary Astragalus membranaceus, Ginseseng and Onion complex on growth performance and carcass characteristics in finishing pigs.** J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 31(1), 149-154.

Hwang, T.I. and Byoun, K.E.(2000). **Studies on the production of functional soybean curd.** Soonchunhyang J. Nat. Sci., 6(1), 213-216.

Jang, J.G., Lee, K.S., Kwon, D.W., Nam, K.Y. and Choi, J.H.(1983). **Study on the change of saponin contents in relation root age of Panax ginseng.** Korean J. Food and Nutr., 12, 37.

Jang, S.M., Park, N.Y., Lee, J.B. and Ahn H.(2001). **The comparison of food constituent in different parts of Pumpkin.** J. Korean Soc.

Food Sci. Nutr., 30(6), 1038-1040.

Jeong, Y.J.(2001). **Monitoring on extraction condition of old pumpkin using response surface methodology.** J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 30, 466-470.

Jhee, O.H. and Yang, C.B.(1996). **Antioxidative activity of extract from Bangah Herb (in Korean).** Korean J. Food Sci. Technol., 28, 1157-1163.

Jung, G.T., Ju, I.O. and Choi, J.S.(1998). **Studies on drying and preservation of omija (Schizandra chinensis).** Korean Postharvest Sci. Technol., 5, 217-223.

Jung, G.T., Ju, I.O., Choi, J.S. and Hong, J.S.(2000). **The antioxidative, antimicrobial and nitrite scavenging effects of Schizandra chinensis Ruprecht (Omija) seed.** Korean J. Food Sci. Technol., 32, 928-935.

Jung, G.T., Ju, I.O., Choi, J.S. and Hong, J.S.(2000). **Preparation and shelf-life of soybean curd coagulated by fruit juice of Schizandra chinensis RUPRECHT (Omija) and Prunus mume (Maesil).** Korean J. Food Sci. Technol., 32(5), 1087-1092.

Jung, J.Y. and Cho, E.J.(2002). **The effect of green tea powder levels on storage characteristics of tofu.** Korean J. Soc. Food Cookery Sci. 18(2), 129-135.

Kang, K.C., Park, J.H., Baek, S.B., Jhin, H.S. and Rhee K.S.(1992). **Optimization of beverage preparation form Schizandra chinensis Baillon by response surface methodology.** Korean J. Food Sci. Technol., 24, 74-81.

Kim, D.H., Lee, K.S.(1992). **Effects of coagulants on storage of packed tofu.** Korean J. Food Sci. Technol., 24(1), 92-96.

Kim, D.H., Lim, M.S. and Kim, Y.O.(1996). **Effect of seaweeds**

addition on the physicochemical characteristics of soybean curd. J. Korean Soc. Food Nutr., 25(2), 249-254.

Kim, D.Y.(1973). *Studies on the browning of the red ginseng.* J. Korean Agr. Chem. Soc., 16, 60.

Kim, H.J., Kim, B.Y. and Kim, M.H.(1995). *Rheological studies of the tofu upon the processing conditions.* Korean J. Food Sci. Technol., 27, 324-328.

Kim, J.M., Baek, S.H. and Hwang, H.S.(1988). *Preparation of the tofu coagulant from egg-shell and it's use.* J. Korean Soc. Food Nutr., 17(1), 25-31.

Kim, J.M., Choi, Y.B., Kim, H.T., Kim, T.Y., Hwang, H.S. and Hwang, S.M.(1991). *Effects of egg-white addition on the quality of soybean curd.* J. Korean Soc. Food Nutr., 20(4), 363-368.

Kim, J.S. and Yoon, H.G.(1996). *The effect of omija on the physical fitness in athlete.* The Journal of Physical Education, 24, 403-418.

Kim, J.W., Lee, J.K. and Hong, J.H.(1997). *Effect of mixed coagulant on the rheological properties of soybean curd.* J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 26(6), 1096-1101.

Kim, J.Y., Kim, J.H., Kim, J.K. and Moon, K.D.(2000). *Quality attributes of whole soybean flour tofu affected by coagulant and theirs concentration.* Korean J. Food Sci. Technol., 32(2), 402-409.

Kim, K.T., Im, J.S. and Kim, S.S.(1996). *A study of the physical and sensory characteristics of ginseng soybean curd prepared with various coagulants.* Korean J. Food Sci. Technol., 28(5), 965-969.

Kim, K.I., Nam, J.H. and Kwon, T.W.(1973). *On the proximate*

composition, organic acid and anthocyanins of omija, Schizandra chinensis Baillon. Korean J. Food Sci. Technol., 5, 178-182.

Kim, M.H., Kim, M.C., Park, J.S., Kim, J.W. and Lee, J.O.(2001). *The antioxidative effects of the water-soluble extracts of plants used as tea materials.* Korean J. Food Sci. Technol., 33, 12-18.

Kim, O.M., U, H., Kim, K.E., Woo, S.M. and Jeong, Y.J.(2002). *Quality characteristic of breads added herb extracts and liquid calcium.* Food Industry and Nutrition, 7(3), 39-43.

Kim, S.D., Ku, Y.S., Lee, I.Z., Kim, I.D. and Youn, K.S.(2001). *General components and sensory evaluation of hot water extract from Liriopsis Tuber.* J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 30(1), 20-24.

Kim, S.D., Ku, Y.S., Lee, I.Z., Kim, M.K. and Park, I.K.(2000). *Major components in fermented beverages of Liriopsis Tuber.* J. East Asian Soc. Dietary Life, 10, 25-30.

Kim, S.J. and Park, K.H.(1996). *Antimicrobial substances in leek (Allium tuberosum) (in Korean).* Korean J. Food Sci. Technol., 28, 604-608.

Kim, S.M., Cho, Y.S. and Sung, S.K.(2001). *The antioxidant ability and nitrite scavenging ability of plant extracts.* Korean J. Food Sci. Technol., 33, 626-632.

Kim, Y.J., Kim, C.K. and Kwon, Y.J.(1997). *Isolation of antioxidative components of Perillae semen (in Korean).* Korean J. Food Sci. Technol., 29, 38-43.

Ko, S.N. and Kim, W.J.(1992). *Effect of coagulants and coagulation temperature on physical properties of ISP-tofu.* Korean J. Food Sci. Technol., 24(2), 154-159.

- Ku, K.H. and Kim, W.J.(1994). *Effect of heating time and mixed coagulants for prepared SPI tofu*. Korean J. Food Sci. Technol., 26, 26-30.
- Ku, K.H., Kim, D.W. and Kim, W.J.(1994). *Effect of water addition and heating on textural properties of uncompressed SPI tofu*. Korean J. Food Sci. Technol., 26, 31-36.
- Kwak, E.J., An, J.H, Lee, H.G., Shin, M.J. and Lee, Y.S.(2002). *A study on physicochemical characteristics and sensory evaluation according to development of herbal sauces of Jujube and Omija*. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 31(1), 7-11.
- Lee, J.S. and Lee, S.W.(1989). *The studies of composition of free sugar, fatty acid and nonvolatilitic organic acid in part of Omija (Schizandra chinensis Baillon)*. Korean J. Dietary Culture, 4, 177-181.
- Lee, J.S. and Lee, S.W.(1990). *Effects of extracts in fruits of Omija (Schizandra chinensis Baillon) on alcohol metabolism*. Korean J. Dietary Culture, 5, 259-263.
- Lee, J.Y., Min, Y.K. and Kim, H.Y.(2001). *Isolation of antimicrobial substance from Schizandra chinensis Baillon and antimicrobial effect*. Korean J. Food Sci. Technol., 33, 389-394.
- Lee, K.S., Kim, D.H., Baek, S.H. and Choun, S.H.(1990). *Effects of solutions of tofu (soybean curd) on extending its shelf-life*. Korean J. Food Sci. Technol., 22(2), 116-122.
- Lee, S.H. and Lim, Y.S.(1997a). *Antimicrobial effects of Schizandra chinensis extract against Listeria monocytogenes*. Korean J. Applied Microbiol. Biotechnol., 25, 442-447.
- Lee, S.H. and Lim, Y.S.(1997b). *Effect of Omija (Schizandra chinensis) extract on the growth of lactic acid bacteria*

- isolated from Kimchi*. Korean J. Applied Microbiol. Biotechnol., 25, 224-228.
- Lee, S.H. and Lim, Y.S.(1998). *Antimicrobial effects of Schizandra chinensis extract on pathogenic microorganism*. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 27, 239-243.
- Lee, Y.C., Oh, S.W. and Hong, H.D.(2002). *Antimicrobial characteristics of edible medicinal herbs extracts*. Korean J. Food Sci. Technol., 34(4), 700-709.
- Miller, C.D., Denning, H. and Bauer, A.(1952). *Relation of nutrients in commercially prepared soybean curd*. Food Res., 17, 261-265.
- Miskovsky, A. and Stone, M.B.(1987). *Effect of chemical preservatives on storage and nutrient composition of soybean curd*. J. Food Sci., 52(6), 1535-1537.
- Mok, C.K., Song, K.T., Lee, S.K., Na, Y.J., Park, J.H., Kwon, Y.A. and Lee, S.J.(2001). *Optimization of roasting process as pre-treatment for extraction of Omija (Schizandra chinensis Baillon)*. Korean J. Food Sci. Technol., 33(3), 333-337.
- Moon, S.W. and Jang, M.S.(2000). *Effects of water extract from Omija (Schizandra chinensis Baillon) on Nabak Kimchi preservation*. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 29(5), 814-821.
- Nam, H.K. and Koh, D.H.(1994). *Fatty acid composition of Korean pumpkins*. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 7, 95-99.
- No, H.K., Beik, K.Y. and Kim, S.J.(2002). *Effect of chitosan-soybean curd on serum lipid metabolism in rats fed high-fat diet*. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 31(6), 1078-1083.
- Oh, S.L., Kim, S.S., Min, B.Y. and Chung, D.H.(1990). *Composition of free sugars, free amino acids, non-volatile organic acids and*

- tannins in the extracts of L. chinensis M., A. acutiloba K., S. chinensis B. and A. sessiliflorum S.* Korean J. Food Sci. Technol., 22(1), 76-81.
- Park, H.R., Ham, Y.H., Jung, U.H., Jeong, I.Y. and Jo, S.K.(2002). *Genotoxicological safety of hot water extracts of the γ -irradiated Astragali Radix, Atractylodes Rhizoma, and Cimicifugae Rhizoma in vitro.* J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 31(5), 910-916.
- Park, M.H.(1993). *Studies on the development of functional food from Chinese Bellflower Roots (Platycodon grandiflorum A. DC).* Korea Food Research Institute report, I1083-03414.
- Park, Y.H.(1995). *A study on the development pumpkin-citron-honey drink.* J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 24, 625-630.
- Park, Y.K., Cha, H.S., Park, M.W., Kang, Y.H. and Seog, H.M.(1997). *Chemical components in different parts of Pumpkin.* J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 26(4), 639-646.
- Pontecorvo, A. and Bourne, M.(1978). *Simple methods for extending the shelf life of soy curd in tropical areas.* J. food Sci., 43, 969.
- Ryu, K.S., Kang, C.W., Song, G.S. and Paik, S.W.(1998). *Effect of dietary supplemental Astragalus membranaceus on performance, blood components and meat quality of broiler chicks.* Korean J. Poul. Sci., 25, 185-193.
- Saio, K.(1979). *Tofu-relationships between texture and fine structure.* Cereal Food World, 24(8), 342-349.
- Sato, E., Miki, E., Gohtani, S. and Yamano, Y. *The effect of preparation conditions on the physical properties and microstructure of Gomatofu.* Nippon Shokuhin Kagaku kaishi, 42,

737-747.

Sekiya, K. and Okuda, H.(1981). *Purification of an antilipolytic (insuline-like) substance from Panax ginseng. Proc. Symp. Wakan-Yaku*, 14, 133.

Shimada, K. and Matsushita, S.(1980). *Gel formation of soybean 7S and 11S proteins. Agric. Biol. Chem.*, 44(3), 637.

Shin, Y.S., Lee, K.S. and Kim, D.H.(1993). *Studies on the preparation of yogurt from milk and sweet potato or pumpkin. Korean J. Food Sci. Technol.*, 25, 666-671.

Shon, H.J., Bock, J.Y., Bail, S.O. and Kim, Y.H.(1989). *Determination of lignan compounds in fruits of Schizandra chinensis Baillon by capillary-GC (FID). J. Korean Agric. Chem. Soc.*, 32, 350-356.

Song, G.S., Ahn, B.Y., Lee, K.S., Maeng, I.K. and Choi, D.S.(1997). *Effect of hot extracts from medicinal plants on the mutagenicity of indirect mutagens. Korean J. Food Sci. Technol.*, 29, 1288-1294.

Sun, N. and Breene, W.M.(1991). *Calcium sulfate concentration influence on yield and quality of tofu from five soybean varieties. J. Food Sci.*, 56(6), 1604.

Tajiri, T.(1993). *Physical properties of tofu produced using citrus fresh fruit juice and Ume-zu as coagulation agent. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 40, 814-823.

Takagi, S., Dkamoto, N., Akashi, M. and Yasumatsu, K.(1979). *Hydrophobic bonding and S-S bonding in heat denaturation of 11S of soybean protein. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 26, 139.

Wang, D.Y., Yang, W.Y., Zhai, S.K. and Shen, M.L.(1980). *Effect of Astragalus polysacchride of ribonucleic acid metabolism. Acta*

Biochem. Biophys. Sin., 12, 343-348.

Wu, M.T. and Salunkhe, D.K.(1977). *Extending shelf-life of fresh soybean curds by in-package microwave treatments*. J. Food Sci., 42, 1448-1451.

Yang, H.C., Lee, J.M. and Song, K.B.(1982). *Anthocyanins in cultured omija (Schizandra chinensis Baillon) and its stability*. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol., 25, 35-43.

Yokozawa, T., Seno, H. and Oura, H.(1975). *Effect of c extract on lipid and sugar metabolism. I. Metabolic correlation between liver and adipose tissue*. Chem. Pharm. Bull., 23, 3095.

Yook, C.S.(1997). *An illustrated guide to Asia herb*. Gyeongwon Publishing Co Inc, Seoul.

Zhang, Y.D., Wang, Y.L., Shen, J.P. and Li, D.X.(1984). *Hypotensive and antiinflammatory effects of Astragalus saponin I*. Acta Pharm. Sin., 12, 343-348.

: 3차년도에 연구 100% 달성

제 4절: 협동연구

협동연구과제 (1차년)

세부과제별 연구기관	연구책임자	당해연도 소요예산
건국대학교	이 형 환	15,000,000원

연구 결과 :

기존 두부응고제를 대체할 수 있는 뛰어난 신규 천연물 두부응고제인 생맥산 및 이 생맥산을 이용하여 응고시킨 두부의 항고혈장지질 효과를 연구하기 위해 장기간 알코올을 투여하여 Hyperlipidemia가 유도된 Rat에 생맥산 및 생맥산응고 두부를 5주간 투여한 결과 생맥산 추출물이 지질총량을 현저히 감소시켜 뛰어난 항고혈장지질 효과를 나타내었으며, 생맥산 응고 두부는 지질총량 및 총콜레스테롤 수치를 모두 감소시켜 항고혈장지질 효과가 뛰어난 것으로 연구결과가 나타났다. 또한 생맥산의 안전성을 연구하기 위해 생맥산 추출물을 마우스간세포주(NCTC) 및 Vero cell line에 투여한 결과 전혀 세포독성이 나타나지 않았고 rat를 이용한 아급성독성 실험에서도 전혀 생체독성이 나타나지 않아 생맥산의 생체안전성을 입증하는 연구결과를 얻었다.

1. 협동연구과제 (1차년)

세부과제별 연구기관	연구책임자	당해연도 소요예산
건국대학교	이 형 환	15,000,000원

한약제로부터 개발된 두부응고제 P-1 (생맥산)의 항고혈압, 항고혈 장 지질에 미치는 기능성 연구

가. 재료 및 방법

1) 실험동물

실험동물은 체중이 $200 \pm 10\text{g}$ 인 Sprague Dawley종의 4주된 웅성 흰쥐를 대한 실험 동물센터에서 구입하여 다시 4주간 본 대학의 동물 사육실에서 적응시켰다. 4주간 적응시키는 동안에 사육실의 온도와 습도는 각각 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, $55 \pm 5\%$ 로 항상 항습을 유지하였다. 식이는 고품사료(삼양사)와 물을 자유롭게 섭취하도록 하였다.

적응이 끝난 흰쥐를 5주간 각각의 시료를 투여한 후, 사육 마지막날 overnight로 14시간 절식시키고 ethyl ether로 약하게 마취시킨 상태에서 헤파린을 처리하지 않은 주사기와 시험관을 이용하여 후대정맥에서 5~6 ml 혈액을 채취하여, 상온 30분 처리후 3000 rpm에서 15분간 저온(4°C)원심 분리시켜 혈청을 얻었다. 이는 Aspartate aminotransferase(AST), Alanine aminotransferase(ALT), Triglyceride(TG), Total cholesterol 분석에 사용하였다. 채혈직후 간과 신장을 적출하여, 냉각된 생리식염수로 세척하고 여과지로 표면의 물기를 제거한 다음 간은 적출 직후에 일부($1 \times 1 \times 0.5\text{cm}$)를 절편하여 10%중성 formalin 액에 고정시켰고 나머지의 일부는 일정 중량을 측정후 sucrose 용액에 일시적으로 보관한 후 균질기로 마쇄하여 1500 rpm에서 15분간 저온(4°C)원심 분리시켜 Alcohol dehydrogenase(ADH)측정에 사용하였다.

2) 실험군의 분류

4주간 적응시킨 체중이 400 g(8주령) 전후의 흰쥐를 한 군당 6마리씩 배치하여 정상군(Normal Control), 음성대조군(Negative Control)은 알코올과 증류수를, 양성대조군 A(Positive Control A)과 양성대조군 B(Positive Control B)는 시판되는 A사와 B사의 숙취해소제를 각각 대조군으로 설정하였고, 실험군은 알코올과 생맥산(인삼 + 맥문동 + 오미자 + 황기)을 투여한 SMS 1 군과 알코올과 가미호박 생맥산을 투여한 SMS 2와 인삼을 제거한 맥문동 오미자 황기 호박으로 구성된 SMS 3으로 설정하였다. 이때 식이는 고형 사료(삼양사)를 자유 공급하였고 알코올은 쥐 한 마리 당 5g/kg.bw/day를 섭취하도록 계산하여 매일 시료투여 후 재투여하였다. 각 군의 처리는 Table 1과 같다.

Table 1. Composition of Groups

Group	No. of exam	Treatment
Normal Control	6	None-alcohol
Negative Control	6	Alcohol + Distilled Water
Positive Control A	6	Alcohol +hss A
Positive Control B	6	Alcohol +hss B
SMS 1	6	Alcohol + SMS* 1
SMS 2	6	Alcohol + SMS 2
SMS 3	6	Alcohol + SMS 3

*SMS : Saeng-maek-san

3) 시료의 제조

한약시료는 각각 100 g을 3차 증류수 1500 ml에 2시간 30분 동안 끓인 후 거즈로 1차 여과하고 6000×g에서 15분 동안 원심분리 한 후 3MM Paper로 2차 여과한 후 4℃에 보관하면서 사용하였다.

4) 시료의 투여

한약시료는 사람(체중 60kg)이 하루 200g를 섭취하는 것을 기준으로 400g의 쥐에게

맞는 양을 계산하였고, 30일 동안 경구 투여하였다.

5) 체중 및 장기의 중량계측

체중은 약물 투여한 날부터 부검하기 전날까지 4주동안 일주일에 한번씩 같은 시간에 측정하였다. 장기의 중량은 부검 후에 실험동물의 후대정맥을 찾아서 채혈한 후, 신장을 각각 적출하고 그 중량을 측정하였다.

6) 생화학적검사(AST, ALT, TG, Cholesterol)

EDTA freed tube에 채워진 혈액을 30분 동안 실온에 방치한 후 3000×g에서 15분간 원심분리 하여 얻은 혈청의 활성치는 AST kit(Boehringer Mannheim, Germany)을 사용하여 다음과 같은 원리로 측정하였다. 혈청중의 AST의 작용으로 aspartic acid와 α -ketoglutamic acid는 oxaloacetic aci와 L-glutamic acid로 변화한다. 이때 생성된 oxaloacetic acid는 조효소 NADH의 존재 하에 LDH의 작용으로 malate가 생성되고 NADH가 NAD^+ 로 산화될 때 파장 340 nm에서 흡광도의 감소를 자동 생화학 분석기(Hitachi 747)로 측정하였다.

ALT의 활성치는 ALT(Boehringer Mannheim, Germany)kit을 사용하여 자동 생화학 분석기(Hitachi 747)로 측정하였다. 혈청중의 ALT 작용으로 L-alanine과 α -ketoglutamine acid는 pyruvic acid와 L-glutamic acid로 변화한다. 생성된 pyruvate는 조효소 NADH의 존재 하에 LDH 작용으로 lactate가 생성되고 NADH가 NAD^+ 로 산화될 때, 파장 340nm에서 흡광도의 감소를 측정하였다. Triglyceride(TG)는 글리세롤 비소거법에 의해 TG kit(Boehringer Mannheim, Germany)를 이용하여 자동분석기(Hitachi 747)에서 측정하였고, Cholesterol은 enzymatic colometric test를 이용하여 T. chol. kit(Boehringer Mannheim, Germany)를 사용하여 자동 분석기(Hitachi 747)로 측정하였다.

7) 간조직내의 Alcohol Dehydrogenase (ADH) 측정

간에 주로 분포되어있는 Alcohol dehydrogenase(ADH)를 측정하기 위해서 적출한

간조직을 식염수로 충분히 세척한 후 그 중 0.5 g을 0.25 M sucrose용액을 가하여 병냉 하에서 마쇄하였다. 마쇄한 용액을 14,000×g에서 15분간 원심분리하여 얻어진 상층액을 0.45 μ m pore size의 filter로 여과하여 70℃에 보관한 후 검사 재료로 이용하였다.

8) 통계처리

모든 실험 결과 측정치는 SAS package를 이용하여 각 군의 평균과 표준 편차를 산정하여, mean±standard deviation으로 나타내었다. 그리고 각 군간의 유의적 차이는 Duncan multi-range test에 의한 one-way 분산분석을 이용하여 검증하였다. 그 결과는 모두 $P < 0.05$ 수준에서 유의적 차이를 인정하였다.

나. 결과 및 고찰

1) 성장과 체중변화량 및 장기중량변화

Table 2는 실험기간 4주 동안의 각 군의 최종 체중증가량과 각 주간의 체중과 주간의 변화량을 나타낸다. 1주간의 체중증가량은 정상군이 나머지 군들에 비해 유의성 있게 높았고($p < 0.05$), SMS 1군에 비해 양성대조군 B(Positive control B)가 다소 낮은 경향을 보였다. 2주째의 변화량에서는 대조군(Control)과 실험군 간에 있어서 유의적으로 뚜렷한 체중변화가 나타났다. Positive A군이 가장 높게 나타났고 SMS군에선 낮은 변화량을 보였다. 그러나 3주째 변화량에서는 SMS 2, 3군이 유의적으로($p < 0.05$) 매우 높은 체중변화량을 보였으며, 이에 반해 대조군의 체중변화량은 유의적으로 매우 낮은 변화량을 나타내었다. 최종 체중변화량을 보면 SMS 2, 3군은 대조군에 비해 높게 나타났고, 이는 SMS 투여군 중 호박이 가미된 군으로서 호박이 심신불안을 치료하며 오장을 편안하게 하는 작용(12)으로 미루어 보아 다른 군에 비해 영양분의 체내 흡수율이 높았다고 볼 수 있다.

2) 장기의 중량

Table 2 에 나타난 결과를 보면 실험동물의 체중 100g 당 간중량 %는 control 에 비해 SMS 투여군에서 전반적으로 낮은 경향을 보였으며 신장의 중량은 정상군 (normal control)이 나머지군에 비해 유의적으로 ($p<0.05$) 매우 낮은 수치를 나타내었으며 양성대조군 A(positive control A)가 유의적으로 매우 높은 수치를 나타내었다. 이와 같이 간의 중량은 alcohol 섭취에 의해 간장중에 지질이 축적됨으로서 alcohol을 섭취시킨 모든 군에서 증가되었다고 (25-26)은 보고하였는데 본 실험과 유사한 경향을 볼 수 있었다. 또한 실험 투여군에 비해 대조군이 전반적으로 장기의 중량이 높은 것은 체중증가량을 반영한 것으로 보인다.

Table 2. Total body weight gains and the weight of liver and kidney

Group	Total body weight gains(g)	Liver (% of body weight)	Kidney (% of body weight)
	Mean±S.D.	Mean±S.D.	Mean±S.D.
Normal control ²⁾	59.83±5.49 ^{1)ab}	3.98±0.40 ^{abc}	0.78±0.02 ^d
Negative control ³⁾	58.50±12.49 ^{ab}	4.06±0.24 ^{abc}	1.11±0.0 ^{ab}
Positive control A ⁴⁾	56.17±11.50 ^{ab}	4.33±0.13 ^a	1.14±0.02 ^a
Positive control B ⁵⁾	52.33±13.57 ^b	4.20±0.08 ^{ab}	1.08±0.05 ^{abc}
SMS 1 ⁶⁾	52.50±6.25 ^b	3.98±0.33 ^{abc}	1.05±0.04 ^{bc}
SMS 2 ⁷⁾	61.50±7.40 ^{ab}	3.77±0.31 ^c	1.02±0.06 ^c
SMS 3 ⁸⁾	66.50±12.45 ^a	4.20±0.23 ^{ab}	1.08±0.07 ^{abc}

¹⁾Each value represents the mean±S.D. of 6 rats. ²⁾Healthy normal control group.

³⁾Normal control plus alcohol solution. ⁴⁾Negative control plus alcohol solution and #A solution. ⁵⁾Negative control plus alcohol solution and #B solution. ⁶⁾Negative control plus alcohol solution and aqueous extract Saeng-maek-san. ⁷⁾Negative

control plus alcohol solution plus aqueous extract Saeng-maek-san and *Lagenaria siceraria*. ⁸⁾SMS2 minus *Panax ginseng*. ⁹⁾a,b,c,d,e value with different superscript letters are significantly different at $p < 0.05$. #A and #B solution is hangover solved solution(hss).

3) 생맥산 투여군의 혈청 AST, ALT 효소활성도 변화

Table 3은 생맥산 추출액 투여군의 간 보호 및 회복효과를 알아보기 위해 시료 투여 시 혈청 AST, ALT 수치의 변화를 나타낸 것으로 AST는 L-Aspartate + α -ketoglutarate 에 반응하여 oxaloacetate + glutamate 를 생성시키며 oxaloacetate 를 pyruvate로 변화시키는 과정에 참여하는 효소이며, ALT 는 DL-Alanine + α -krtoglutarate 에 반응하여 pyruvate + glutamate 을 생성시키는 전이 효소로 이 효소들은 그 활성치가 증가하면 간 기능이 저하되었음을 알려주므로 간 질환 판정효소로 알려져 있다.

(1)AST 의 활성

흰쥐 정상군(normal control)의 혈청중의 AST 치는 60.33 ± 4.97 unit 였으나alcohol로 고지혈증을 유발시킨 음성 대조군(negative control) 은 117.00 ± 20.02 unit 로 두 배 가량의 상승을 보였으며 알코올과 함께 시판되는 숙취해소제 solution A를 투여한 양성 대조군 A (positive control A)은 95.33 ± 4.46 unit로 나타났다. 이와 비슷한 수치로 SMS 1군이 96.17 ± 10.57 unit로 양성 대조군 A(positive control A)과 근접하게 나타났으며 다른 군에 비해 매우 유의성있게 ($p < 0.05$) AST 수치의 상승이 억제되었다고 볼 수 있다. SMS 3군 또한 SMS 2 군 정도의 효과는 나타나지 않았으나 대조군에 비해 유의성 있게 효소 활성도를 감소시켰다.

(2)ALT의 활성

ALT 수치에 있어서는 정상군이 19.17 ± 2.14 unit로 나타났다. 이에 비해 음성대조군 45.83 ± 7.14 unit와 양성대조군 A, B 즉 43.50 ± 8.62 unit, 40.33 ± 5.79 unit 는 정상군에 비해 유의적으로 매우 높은 수치를 나타냈다($p < 0.05$), SMS 군 중에서 특히 SMS 1군

은 정상군에 가까운 수치 25.17 ± 2.4 unit 로 유의적으로($p < 0.05$) 매우 낮은 활성치를 나타냈고 SMS 2 와 SMS 3 역시 대조군들에 비해 유의적으로 낮은 활성치를 보였다 ($p < 0.05$).

본 연구결과를 볼 때 알코올의 섭취는 AST, ALT 의 활성치를 증가시키는 경향이 있으며 이것은 곧 간 기능의 변화를 시사해주는 것이었다. 일반적으로 간기능이 떨어질 때 간에서 제일 먼저 보이는 것 중의 하나가 AST, ALT 활성 증가로 볼 수 있기 때문이다(27-28). 혈청 ALT는 간세포 변성과 괴사를 예민하게 반영하여 상승하게 때문에 특히 간 담도 질환의 유력한 지표로서 널리 이용되고 있다(29). 한편 알코올을 섭취해도 동시에 생맥산을 함께 복용하면 매우 효과적으로 간기능 관련 효소 활성치를 낮출 수 있음을 시사해 준다. 그리고 생맥산 구성 성분 중에 함유되어있는 보간작용을 하는 성분에 의해 간 손상이 지연되고 보호되는 것으로 짐작된다. 특히 생맥산 성분 중 하나인 맥문동 수 추출액의 간 보호 및 회복효과를 알아본 실험에서도 AST, ALT 의 수치가 대조군에 비해 매우 유의성 있게 감소하였다고 보고되어있다(30). 또 하나의 구성원 중 오미자의 생리활성에 있어서도 간이 손상된 쥐의 혈장의 AST 치를 저하시킨다는 보고(24)와도 일치한다.

Table 3. Enzyme activity of AST and ALT in serum

Groups	AST(U/L)		ALT(U/L)	
	Mean±S.D .	range(minimum-maximum)	Mean±S.D.	range(minimum-maximum)
Normal control ²⁾	60.33±4.97 ^{d 1)}	55-69	19.17±2.14 ^e	17-22
Negative control ³⁾	117.00±20.02 ^{abc}	90-140	45.83±7.14 ^a	34-49
Positive control A ⁴⁾	95.33±4.46 ^c	89-102	43.50±8.62 ^a	35-57
Positive control B ⁵⁾	104.33±19.34 ^{bc}	85-131	40.33±5.79 ^a	32-47
SMS 1 ⁶⁾	96.17± 10.57 ^c	83-113	25.17±2.04 ^{de}	23-28
SMS 2 ⁷⁾	112.50± 7.61 ^{abc}	107-126	29.00±1.55 ^{cd}	28-32
SMS 3 ⁸⁾	132.17±33.68 ^a	91-185	39.17±4.07 ^{ab}	36-47

¹⁾Each value represents the mean±S.D. of 6 rats. ²⁾Healthy normal control group. ³⁾Normal control plus alcohol solution. ⁴⁾Negative control plus alcohol solution and #A solution. ⁵⁾Negative control plus alcohol solution and #B solution. ⁶⁾Negative control plus alcohol solution and aqueous extract Saeng-maek-san. ⁷⁾Negative control plus alcohol solution plus aqueous extract Saeng-maek-san and *Lagenaria siceraria*. ⁸⁾SMS2 minus *Panax ginseng*. ⁹⁾a,b,c,d,e value with different superscript letters are significantly different at p<0.05. #A and #B solution is hangover solved solution(hss).

4) 혈청의 총 콜레스테롤과 중성지방의 함량

(1)혈청 triglyceride 농도

Table 4에 나타난 혈청 triglyceride 함량은 SMS군이 다른 군에 비해 매우 뚜렷하게

유의적인 차이로 나타났다. 정상군에서는 14.17 ± 6.80 mg/dL 였으며, 음성대조군 71.33 ± 44.27 mg/dL, 양성대조군 A는 76.33 ± 23.57 mg/dL, 양성대조군 B는 58.17 ± 20.15 mg/dL 에 대해 SMS 1의 수치는 18.50 ± 7.77 mg/dL, SMS 2 또한 21.83 ± 5.08 mg/dL 로서 두 SMS 군에서 정상군과 유사한 수치를 나타내어 매우 유의성 있는 감소를 보였다($p < 0.05$). 위의 결과를 미루어 보아 alcohol 섭취는 triglyceride 함량을 현저하게 높여주어 지방간을 유도한다는 것을 알 수 있으며, 만성적 alcohol 섭취는 지방간을 초래한다는데 이것은 영양불량이 주요원인으로 alcohol 섭취로 인한 음식물의 섭취감소 특히 단백질, methionine, choline, vitamin E, Se 등의 항 지방간 인자들의 결핍이라고 보고되었다(31). 이 결과는 기존의 생맥산의 일반적인 효능 즉 더위와 갈증, 해수(기침) 등을 해결해주는 처방에서 나아가 고지혈증 치료에도 탁월한 효과가 있음을 입증해준다. 나아가 이는 alcohol을 섭취해도 생맥산을 함께 복용하면 TG 함량을 정상에 가깝도록 조절해 줄 수 있음을 분명히 시사해 준다.

(2)혈청 total cholesterol 농도

Table 4에서 보면 혈청 cholesterol 의 농도에 있어서 전 대조군에 비해 SMS 2, 3 군의 수치가 크게 감소되지는 않았으나 SMS 1 군의 수치는 66.50 ± 6.75 mg/dL 으로 유의성 있게($p < 0.05$) 감소한 결과를 볼 수가 있었다. 이는 혈액중 높은 cholesterol 농도가 동맥경화증 등 심장순환기계 질환 유발의 주요인자로 작용한다는 보고(32-33)에 비추어 각 개인의 혈장 cholesterol 농도를 낮추는 약품과 식품개발에 노력하여 cholestyramine, probucol 등 혈장 cholesterol을 낮추는 의약품이 개발되어 일부 치료에 이용되고 있지만 일반 대중이 고 콜레스테롤혈증의 예방차원에서 널리 섭취될 수 있는 천연물에 대한 연구는 아직 미미한 실정이다(34-36). 이에 대해 위의 결과는 생맥산이 고 콜레스테롤혈증의 예방과 치료에 있어 도움을 줄 수 있는 가능성을 제시해 준다.

Table 4. Concentration of serum lipid in rat.

Groups	TG(mg/dL)		Cholesterol(mg/dL)	
	Mean±SD	range(minimum-maximum)	Mean±SD	range(minimum-maximum)
Normal control ²⁾	14.17±6.20 ^{1c}	8-25	42.83±12.77 ^c	32-70
Negative control ³⁾	71.33±40.4 ^{ab}	26-125	70.50±5.65 ^{ab}	63-79
Positive control A ⁴⁾	76.17±21.54 ^{ab}	59-119	81.17±6.39 ^a	68-88
Positive control B ⁵⁾	58.17±18.40 ^b	34-93	76.67±7.52 ^{ab}	67-88
SMS 1 ⁶⁾	18.50±7.09 ^c	10-31	66.50±6.75 ^b	54-75
SMS 2 ⁷⁾	21.83±4.63 ^c	16-29	75.00±5.7 ^{ab}	64-82
SMS 3 ⁸⁾	92.17±22.89 ^a	58-113	72.00±5.60 ^{ab}	65-83

¹⁾Each value represents the mean±S.D. of 6 rats. ²⁾Healthy normal control group. ³⁾Normal control plus alcohol solution. ⁴⁾Negative control plus alcohol solution and #A solution. ⁵⁾Negative control plus alcohol solution and #B solution. ⁶⁾Negative control plus alcohol solution and aqueous extract Saeng-maek-san. ⁷⁾Negative control plus alcohol solution plus aqueous extract Saeng-maek-san and *Lagenaria siceraria*. ⁸⁾SMS2 minus *Panax ginseng*. ⁹⁾a,b,c,d,e value with different superscript letters are significantly different at p<0.05. #A and #B solution is hangover solved solution(hss).

5) 알코올 대사효소 활성

알코올에 의한 독성은 알코올의 대사와 밀접한 관련이 있으며, 또한 알코올에 의한 생체조직의 상해 및 숙취작용은 알코올 대사 중간 생성물질인 acetaldehyde 에 기인된 것은 잘 알려진 사실이다.(37) 그러므로 알코올의 숙취는 알코올의 대사와 관련되어 나타나기 때문에 이러한 알코올에 의한 숙취에 생맥산이 어떤 효과를 나타내는지

대해 간 조직 중 알코올 대사에 관여하는 ADH(alcohol dehydrogenase) 활성을 측정하였으며 Table 5 와 같다.

실험동물에서 알코올의 만성 투여 시에는 ADH 활성이 증가된다고 한다(37). 본 실험에서도 25% 알코올을 1개월간 음용시킨 경우 SMS 2, 3군의 수치는 2.02±0.4 mg/dL, 2.16±0.55 mg/dL 로서, ADH 활성은 정상군 0.61±0.52 mg/dL에 비해 4배 가량이나 증가됨을 볼 수 있었으며 이는 통계적으로 매우 유의하게 증가된 수치였다 (p<0.05). 이러한 실험결과로 미루어보아 알코올을 장기간 섭취시에 생체조직 내에 acetaldehyde 축적현상이 초래될 가능성이 있으나 생맥산이 알코올 대사를 촉진시킴을 보여주고 있다. 따라서 생맥산, 특히 가미 호박 생맥산은 알코올의 대사를 촉진시킴으로서 간 조직 세포 내 acetaldehyde 의 축적을 억제시켜 알코올의 해독능을 나타낼 수 있는 가능성을 제시해 주고 있다.

Table 5. Activity of alcohol dehydrogenase in rat.

Groups	ADH(U/L)	
	Mean±SD	range(minimum-maximum)
Normal normal ²⁾	0.61±0.52 ^{1)d}	0.25 - 1.7
Negative control ³⁾	1.05±0.40 ^{cd}	0.46 - 1.54
Positive control A ⁴⁾	1.31±0.55 ^c	0.36 - 2.24
Positive control B ⁵⁾	1.41±0.27 ^{bc}	0.91 - 1.75
SMS 1 ⁶⁾	1.67±0.50 ^{abc}	1.13 - 2.63
SMS 2 ⁷⁾	2.02±0.4 ^{ab}	1.5 - 2.81
SMS 3 ⁸⁾	2.16±0.55 ^a	1.6 - 2.69

¹⁾Each value represents the mean±S.D. of 6 rats. ²⁾Healthy normal control group.

³⁾Normal control plus alcohol solution. ⁴⁾Negative control plus alcohol solution and #A solution. ⁵⁾Negative control plus alcohol solution and #B solution. ⁶⁾Negative control plus alcohol solution and aqueous extract Saeng-maek-san. ⁷⁾Negative control plus alcohol solution plus aqueous extract Saeng-maek-san and *Lagenaria siceraria*. ⁸⁾SMS2 minus *Panax ginseng*. ⁹⁾a,b,c,d,e value with different superscript letters are significantly different at $p < 0.05$. #A and #B solution is hangover solved solution(hss).

6) 예비실험에 의해 개발된 P-1의 안전성 연구

DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco)배지에 10% FBS(Fetal Bovine Serum), 100 $\mu\text{g/ml}$ penicilline, 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycine을 첨가하여 배양액으로 사용하였으며, cell은 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 에서 배양하였다.

생맥산의 세포독성을 측정하기 위해 MTT(Cell Proliferation Kit I, Boehringer Mannheim, Germany)kit을 사용하여 MTT [3-(4, 5-dimethyl thiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] colorimetric 검정법으로 실험하였다(38-40). 96 well flat bottom microtiter 의 각 well에 마우스 정상 간세포(NCTC clone 1469 ; derivative of NCTC 721, 한국 세포주 은행)를 2×10^5 cells/ml이 되도록 맞추고 48시간 배양(37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 incubator)하였다. 동결 건조시킨 생맥산 분말을 0.8% methanol에 녹인 후 단계별로 희석하여 50 $\mu\text{l/ml}$ 가 되도록 처리한 후 MTT labeling reagent(final concentration 0.5 mg/ml)을 각 well에 10 μl 씩 첨가한 뒤 4시간 배양하였다. 형성된 formazan crystal product를 용해시키기 위해, solubilization solution을 100 μl 씩 첨가한 후 1일간 배양하였다. ELISA Reader(Molecular Devices spectra MAX 340)로 흡광도 650 nm에서 측정하였다.

간세포에 대한 생맥산의 세포독성을 측정한 결과 시료를 처리하지 않은 정상군에 비해 생맥산 처리군은 유의성 있게($p < 0.05$) 3배가량 높은 증식률을 나타냈으며 전혀 세포독성은 나타나지 않았다. 이는 생맥산의 구성성분 중 인삼의 기초대사를 항진시키고(4), 생체내에서 단백질 합성을 촉진하는 작용(5)과 맥문동이 간의 glycogen을 증가

시킨다는 보고서와 오미자의 간 보호작용(15-17)에 관한 연구결과를 뒤받침 해 주는 결과이며 생체에 전혀 독성을 나타내지 않는 것으로 나타났다.

Table 1. Effect of SMS on NCTC by MTT

Groups	Spectrophotometrical absorbance (at 650 nm)
	Mean±S.D.
Normal control ²⁾	0.033±0.008 ¹⁾
SMS 1 ³⁾	0.062±0.009
SMS 2 ⁴⁾	0.065±0.005

¹⁾Each value represents the mean±S.D. of 6 rats. ²⁾Healthy normal control group.

³⁾Normal control plus alcohol solution. ³⁾Negative control plus alcohol solution

and aqueous extract Saeng-maek-san. ⁴⁾Negative control plus alcohol solution plus aqueous extract Saeng-maek-san and *Lagenar siceraria*.

: 1차년도에 연구 100% 달성

2. 협동연구과제 (2차년)

세부과제별 연구기관	연구책임자	당해연도 소요예산
건국대학교	이 형 환	15,000,000원

한약제로부터 개발된 P-1의 항고혈압, 항고혈장 지질에 미치는 기능성 연구

: 1차년도에 연구 100% 달성

가. 실험재료 및 방법

1) MTT Assay

vero 세포주(African green monkey kidney cell, ATCC CCL81)를 96 well plate의 한 well 당 5×10^4 cells 이 되도록 분주한 후 Plate 바닥에 cells이 부착하도록 24hr incubation 한다. 동결건조된 P-1(생맥산)을 0.8% methanol에 녹인 후 200mg/ml 농도 부터 1/2씩 계단 희석하여 각 well에 분주하고 이틀간 incubation한 후 MTT labeling reagent $10 \mu\text{l}$ 첨가하고 4hr incubation한다. 그 후 solubilization solution을 $100 \mu\text{l}$ 첨가하고 overnight incubation 한 후 wavelength 560nm에서 ELISA reader로 측정 O.D 값을 측정한다. 정상대조군으로는 0.8% Methanol을 사용하였으며 같은 실험을 총 4회 반복하여 실시한 후 이들의 평균 값을 측정하였다.

2)동물실험모델을 이용한 아급성 독성 검사 연구

(1)실험동물

실험동물은 체중이 $200 \pm 10\text{g}$ 인 Sprague-Dawley(SD)계의 7주된 웅성 흰쥐를 대한 실험 동물센터에서 구입하여 10일간 본 대학의 동물사육실에서 적응시켰다. 적응시키는 동안에 사육실의 온도와 습도는 각각 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, $55 \pm 5\%$ 로 항온, 항습을 유지하였고 식이는 고품사료(삼양사)와 물을 자유롭게 섭취하도록 하였다.

(2) 실험군의 분류

10일 간 사육실에 적응시킨 체중이 300 g 전후의 흰쥐 6마리를 한 군으로 하여 정상대조군(Normal control group) 및 실험군(Test group)으로 분류하였다. 정상대조군은 사료와 물을 자유 섭식토록 하였으며 매일 오전 11시 30분 1ml의 증류수를 경구 투여하였다. 실험군 1(이하 T1로 표기)은 사료와 물을 자유 섭식토록 하였으며 매일 오전 11시 30분에 생맥산을 2ml 경구 투여하였다. 이때 식이는 삼양사의 고품사료를 자유 공급하였으며 각 군의 처리는 Table 1과 같다.

Table 1. Composition of Groups

군(Group)	마리수 (No. of exam)	
No.1 (Normal Control)	6	사료+음용수+증류수
No.2(Test group1:T1)	6	사료+음용수+생맥산 ¹⁾

생맥산¹⁾; 오미자(*Schizandra chinensis*) + 인삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer) + 맥문동(*Liriope platyphylla*) + 황기(*Astragalus membranaceus* BUNGE) + 호박 (*Cucurbita* spp.)

(3) 시료의 제조 및 투여

한약시료는 경동약재시장에서 구입한 인삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer, 충청남도 금산산), 황기(*Astragalus membranaceus* BUNGE, 강원도 양양산), 오미자(*Schizandra chinensis*), 맥문동 (*Liriope platyphylla*) 및 호박 (*Cucurbita* spp.)을 각각 20g을 혼합하여 총 100g의 한약재에 3차 증류수 1,000ml을 첨가하여 2시간 30분 동안 끓인 후(대응약탕기, DWP-2000M) 거즈로 1차 여과하고, 3MM Paper로 2차 여과한 후 최종 volume을 400ml로 하여 4℃ 냉장고에 보관하면서 사용하였다. 생맥산 400ml를 사람에게 1일 투여하는 dose로 계산하여 300g의 랫트에게 28일 동안 매일 2

ml 씩 경구투여 하였다.

(a) 관찰사항

① 시료 투여 시 일반상태 이상유무 관찰

매일 적어도 2회 이상 동물의 일반상태를 세밀히 관찰하였다. 일반상태로서 피부, 피모, 안·점막, 배변, 운동 및 패턴 등에 대하여 이상상태의 발현시간, 정도, 지속시간을 관찰하였고 또 서로에 대한 공격성의 증가 유무, 자해유무, 조직의 자기유해 등을 면밀히 관찰 체크하였다. 그리고 군마다의 동물 수를 항상 확인하여 시험동물의 실종을 체크하였다.

② 부검 후 각 장기의 이상유무 관찰

부검 후에는 복강 내 각 기관들의 색깔, 크기, 외형적 변화 등을 육안으로 관찰하여 이상 유무를 체크하고 간장과 신장은 보존액에 보존하였다.

(b) 측정사항

① 사망률 측정

시료 투여 28일 간 각 군의 랫트 사망률을 측정하였다.

② 체중 측정(1회/1주일) 및 기관중량 측정(부검 후)

체중은 시료 투여 후 부검하기 전날까지 4주 동안 일주일에 한번씩 같은 시간에 측정하였으며 장기의 중량은 부검 후에 실험동물의 후대정맥을 찾아서 채혈한 후 각 군의 실험동물의 간 및 신장을 정확히 적출하고 각각의 중량을 측정하여 대체중 장기비율을 계산하였다.

③ 섭취량 및 섭취량 측정

시료 투여 28일 간 1회/1일, 매일 동일시간에 각 군의 섭취량 및 섭취량을 측정하여

이상유무를 관찰하였다.

④ 혈액학적 검사(Hematological values 및 CBC differentiation 측정)

EDTA tube에 채워진 혈액은 곧바로 잘 흔들어 균등질이 되게 하고 Coulter® JT(coulter electronics Inc, USA, PN 4235846B)로 WBC(White Blood Cell, 백혈구), RBC(Red Blood Cell, 적혈구), HGB(Hemoglobin, 헤모글로빈), HCT(Hematocrit, 혈액 용적백분율), 혈소판(Platelet)을 측정하였다. 에탄올에 12시간 담근 후 깨끗이 세척한 slide glass에 면봉막대로 혈액을 도말하여 공기 중에서 건조한 후 Wright stain(Yong Dong pharm, Co. Kyungki, Korea)액을 10방울 떨어뜨려 3분간 고정염색하고 Wright 완충 용액(Yong Dong pharm, Co. Kyungki, Korea) 10방울로 충분히 혼합시켜 5~6분간 염색하였다. 이때 침사가 고착하지 않도록 유의하여 검경에 불편을 최소화하였다. 이 slide glass는 spray를 사용하여 삼차증류수로 조심스럽게 수세하고 실온에서 건조하였다. 충분히 마른 후 oil immersion하에서 cover slide를 사용하지 않고 검경하였다. Manual WBC differential counter를 사용하여 백혈구를 종류별로 구별하면서 총 백혈구수 백개를 세어서 백분율로 분포를 측정하고 granularcytes는 coulter 결과와 이중확인(double check) 하였다. 망상적혈구(reticulocyte)빈도는 capillary를 사용하여 3차 증류수에 용해시켜 여과 후 실온에 보관중인 1% new methylene blue(sigma)를 혈액과 동량으로 잘 섞어 3~5분 방치하고 깨끗이 준비된 slide glass에 도말하였다. Reticulocyte count는 1000개의 적혈구를 계수하는 동안에 나타나는 reticulocyte의 빈도를 백분율로 나타내었다.

⑤ 혈액생화학적 검사(총단백, cholesterol, albumin, AST, ALT, alkaline phosphatase, bilirubin 측정)

EDTA freed tube에 채워진 혈액을 30분 동안 실온에 방치한 후 3000×g에서 15분간 원심분리 하여 얻은 혈청의 Aspartate aminotransferase(AST) 활성치는 AST kit(Boehringer Mannheim, Germany)을 사용하여 자동 생화학 분석기(Hitachi 747)로 측정하였다. Alanine aminotransferase(ALT)의 활성치는 ALT(Boehringer Mannheim, Germany)kit을 사용하여 자동 생화학 분석기(Hitachi 747)로 측정하였다.

Total cholesterol(T-Chol.)은 enzymatic colorimetric test를 이용하여 T. chol. kit(Boehringer Mannheim, Germany)를 사용하여 자동 생화학 분석기(Hitachi 747)로 측정하였다. Albumin은 pH 4.2에서 BCG(Brom Cresol-Green)과 결합하여 화합물을 형성하는데 이때의 흡광도를 ALB(Boehringer Mannheim, Germany)kit을 사용하여 자동 생화학 분석기(Hitachi 747)로 측정하였다.

Alkaline phosphatase(ALP)는 IFCC 검사 원리 하에 ALP(Boehringer Mannheim, Germany) Kit을 사용하여 자동 생화학 분석기(Hitachi 747)로 측정하였다. Total bilirubin(T-Bil.)은 DPD method 하에 Bil-T(Boehringer Mannheim, Germany) Kit을 사용하여 자동 생화학 분석기(Hitachi 747)로 측정하였다. Total protein(TP)은 Biuret method 하에 TP(Boehringer Mannheim, Germany) Kit을 사용하여 자동 생화학 분석기(Hitachi 747)를 이용하여 측정하였다.

⑥ 뇨검사(pH, 뇨잠혈, 뇨단백, 뇨당, 뇨 ketone의 측정)

부검하기 전날 각 군의 실험동물을 각각 한 마리씩 에탄올로 소독된 깔짚이 깔려있지 않은 cage에 넣고 뇨를 배출하기를 기다린 후, 배출된 뇨를 멸균된 cap tube에 담은 후, 지시 시험지(Serotech Korea Co. Ltd., Seoul)법을 이용 각각의 실험동물의 뇨pH, 뇨단백, 뇨당, 뇨ketone 및 뇨잠혈의 정도를 검사하였다.

5.부검

사육 마지막날 동물을 overnight로 16시간 절식시키고 체중을 측정하였다. 체중 측정이 끝난 SD계의 랫트를 데시케이터에 넣고, ether anhydrous(T.J. Baker Analyzed ACS reagent, USA)로 마취시킨 후 해부대에서 네다리를 압핀/thumb tag)으로 고정하였다. 복부 전면을 소독한 후 forcep으로 복부피부를 집어서 정중선을 따라서 절제하고, 해부칼로 장기가 보이도록 절개하였다. 0.85% saline으로 세척하고, 충분히 식염수를 뿌려주면서 EDTA를 처리하지 않은 주사기와 시험관을 이용하여 후대정맥에서 5~6ml의 혈액을 채취하여 상온에서 30분 경과 후, 3000 rpm에서 15분간 저온(4℃)원심 분리하여 혈청을 얻었다. 이는 Aspartate aminotransferase(AST), Alanine aminotransferase(ALT), alkaline phosphatase(ALP), Total cholesterol, total protein,

albumin, total bilirubin 분석에 사용하였다. EDTA tube에 혈액을 따로 채혈하여 얻은 EDTA 혈액을 이용하여 hematological values 및 CBC differentiation 측정에 사용하였다. 간, 신장을 차례로 절제하여 무게를 측정하고 buffered formalin 용액(40% formaldehyde 10 ml, 0.65 g sodium phosphate monobasic, sigma, 0.4 g sodium phosphate dibasic, sigma/100 ml T.D.W)에 고정한 후 실온에 보관하였다.

6. 통계처리

모든 실험 결과 측정치는 일변수 분석법을 사용하여 통계처리 하였으며 Student's T-test를 이용하여 $p < 0.05$ 수준에서 각 실험군 간의 유의성을 검증하였다. 모든 자료는 $\text{mean} \pm \text{standard deviation}$ 으로 나타내었다.

나. 실험 결과

1) MTT assay

세포실험 결과를 Table 1에 나타내었다. 고농도에서 P-1(생맥산) 투여군은 대조군(methanol 군)에 비해 약간 낮은 수치를 나타내었으나 6.25mg/ml 이하의 농도에서는 현저히 높은 수치를 나타내어 오히려 vero 세포주(African green monkey kidney cell, ATCC CCL81)에 대해 세포생리 활성효과를 나타낸 것으로 연구 결과가 나타났다.

Table 1. Viability of vero cells treated with SMS measured by MTT assay

samples	Viability(%) at the following concentration(mg/ml) of the samples									
	200	100	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39
Methanol	70.63	67.71	65.76	63.81	59.43	60.16	60.89	61.13	65.03	81.59
SMS	61.01	40.80	55.90	42.38	31.18	75.38	115.69	89.39	75.50	91.82

In order to determine the cytotoxicity of the specimens, vero cells were incubated with

the various concentrations of samples. After 2 days, the formazan produced by living vero cells was determined by the MTT assay. Then, the group of 100% viability on Vero cells is assumed to treat with PBS(Phosphate-buffered saline). Viability(%)=the group treated with sample/the group treated with PBS*100.

2) 아급성 독성 검사 연구

1.일반상태의 이상유무 관찰 및 사망률

시료투여 후 매일 적어도 2회 이상 실험동물의 일반상태를 세밀히 관찰하였는 바, 시료 투여기간 중 시험 물질에 기인된 특이한 이상 임상 증상은 관찰되지 않았다. 즉, 피부, 피모, 안·점막, 배변, 운동 및 패턴 등에 대하여 이상상태가 전혀 관찰되지 않았으며 상대 동물에 대한 공격성 및 자신에 대한 자해, 조직의 용해 등 이상 징후도 전혀 발견되지 않았다.

2.장기 이상유무 관찰

사육 마지막날 실험동물을 overnight로 16시간 절식시키고 ether로 3~4분간 마취시킨 상태에서 부검 후 정상대조군과 각각의 실험군의 심장, 폐, 간장, 신장, 비장, 부신, 위, 정소의 이상유무를 관찰하였다. 각 실험군의 장기들은 정상대조군의 장기들과 비교하여 모양 및 형태, 크기, 색깔 등에서 전혀 외형적 이상 변화를 나타내지 않았으며 각 장기의 빛깔 및 형태가 아주 선명한 것으로 관찰되어 투여시료에 기인한 각 장기의 이상적 특이 증상은 나타나지 않는 것으로 사료되었다.

3.섭이량, 섭취량 및 사망률

시료 투여 후 4주 동안 정상대조군 및 생맥산을 투여한 T1군의 섭이량 및 섭취량은

일정하였으며 전혀 기복을 나타내지 않았고 정상대조군과 실험군을 망라하여 사망한 실험동물은 없었다.

4. 성장과 체중변화량 및 장기중량변화

실험동물 Sprague-Dawley 계 랫트(수컷)의 시료 투여 후 4주 동안의 주간 체중변화량은 정상대조군과 거의 차이를 나타내지 않았다. 시료 투여 후 4주 동안의 총 체중증가량 역시 Table 2에 나타난 바와 같이 정상대조군에 비해 유의성($p < 0.05$)있는 차이점을 나타내지 않았다. 즉, 시료를 투여한 4주 간 실험동물의 주간 체중변화량 및 총 체중증가량은 T1이 정상군과 비슷한 수치를 보임으로써 투여시료가 체중의 증감에 특별한 영향을 미치지 않는다는 연구 결과를 나타내었다. 실험동물의 장기 중량 변화는 Table 2에 나타난 바와 같다. 실험동물의 체중 당 간중량 %는 정상대조군에서 2.94 ± 0.077 의 수치를 나타내었는데 모든 실험군에서 유의성($p < 0.05$)있는 차이를 나타내지 않아 투여시료가 실험동물의 장기 중량에 특별한 영향을 나타내지 않는 결과를 보여주었다. 실험동물의 체중 당 신장중량 % 역시 0.711 ± 0.043 의 수치를 보인 정상대조군에 비해 모든 실험군에서 유의성($p < 0.05$)있는 차이를 나타내지 않았다.

Table 2. Total body weight gains and the weight ratio of liver and kidney

Group	Total body weight gains(g)	Liver (% of body weight)	Kidney (% of body weight)
	Mean±S.D.	Mean±S.D.	Mean±S.D.
No.1 (Normal)	$120.17 \pm 7.84^{1)}$	2.94 ± 0.077	0.711 ± 0.043
No.2 (T1)	120.20 ± 12.86	3.09 ± 0.279	0.717 ± 0.039

¹⁾Each value represents the mean±S.D. of 6 rats.

*Significant differences as compared with control : $p < 0.05$.

5. 뇨 생화학 검사

각 군(n = 6)의 실험동물로부터 채취한 뇨에 대한 routine urinalysis 결과를 Table 3

에 나타내었다. 통상 검체의 뇨의 변화는 신장, 뇨로계의 병태를 잘 반영하므로 진단 예후 판정에 유용하며 아울러 체액의 변화를 잘 반영하므로 대사 장애, 당뇨병, 간질환, 전해질의 unbalance 등의 지표가 된다.

1) 뇨 pH

Table 3에 나타난 정상대조군 및 실험군의 뇨 pH는 7.5 ~ 8.5를 나타내 두 군 간의 차이는 없었으며 urinalysis의 기준치에도 부합되어 투여시료에 기인한 뇨 pH의 특이 사항은 나타나지 않았다.

2) 뇨단백

각 실험동물의 뇨단백은 urinalysis의 기준치 상 negative(-) ~ trace(\pm)를 나타내는 것이 정상이나 본 실험에서는 T1군 6마리 중 1마리에서 trace, 4마리에서 1 positive 1마리에서 2 positive를 나타냈으며 정상대조군에서도 6개체 중 1마리에서 trace, 3마리에서 1 positive, 1마리에서 2 positive를 나타내는 등 거의 모든 실험동물에서 뇨단백이 검출되었다. 이와 같이 정상대조군과 실험군 모두에서 positive 한 결과가 나타난 것은 투여시료가 뇨단백 이상을 유발한 것으로는 판단할 수 없다. 통상 정상대조군의 뇨단백이 음성인데 반하여 실험군의 뇨단백이 양성으로 나타나는 경우는 투여약재에 기인한 사구체성 단백뇨, 세뇨관성 단백뇨, 신장 및 신후성단백뇨 등의 병적단백뇨를 의심할 수 있는데 반하여 정상대조군 및 시료투여군 모두에서 단백뇨가 검출될 때는 운동성단백뇨, 기능성단백뇨 등의 생리적단백뇨(비병적단백뇨)로 판단할 수 있다. 본 실험에서 정상대조군과 실험군 모두에서 단백뇨가 검출된 것은 야행성인 랫트에서 야간에 뇨를 채취함으로써 인해 활발한 운동성 생리적단백뇨가 검출된 것으로 판단되었으며 부검 후 신장에 아무런 이상징후를 발견할 수 없었던 점등도 활발한 운동으로 인해 운동성 생리적 단백뇨가 검출되었다는 판단을 뒷받침해 주는 것으로 사료된다.

3) 뇨당

검체의 뇨에서 당이 검출되는 것은 당뇨병, 신성당뇨, 내분비질환, 췌장질환, 간경변, 뇌종양 등의 징후를 반영하는 것이다. Table 3에 나타난 바와 같이 정상대조군 및 한

약제 시료 추출물을 투여한 T1군 모두에서 당이 검출되지 않은 것으로 연구 결과가 나타나 투여시료에 기인한 뇨당의 이상상태는 나타나지 않은 것으로 사료되었다.

4) 뇨 ketone

Table 3에 정상대조군과 실험군 각 군의 뇨 ketone 측정결과를 나타내었다. 뇨 ketone은 지방산 산화 향진 여부를 진단하는 주요 지표로써 ketone체는 생체 energy 의존도가 당질보다 지방산으로 기울 때 증가하며 이의 증가는 인슐린의 결핍을 반영한다. 따라서 검체의 뇨에서 ketone이 검출되는 것은 검체가 중증당뇨병이거나 또는 당질 섭취부족 심한 경우 기아상태에 직면해 있음을 나타낸다. 뇨 ketone에 대한 본 실험의 연구 결과에서는 정상대조군 랫트 6마리 중 2마리에서 1 positive를 나타내었으며, T1군은 1마리에서 1 positive를 나타내었다. 상기와 같이 정상대조군과 실험군 모두에서 positive 결과가 나타난 것은 투여시료가 뇨 ketone체 이상을 유발한 것으로는 판단할 수 없다. 오히려 실험동물들이 충분한 식이를 섭취한 점과 모든 실험군에서 뇨당이 검출되지 않은 연구 결과로 미루어 볼 때 실험동물들이 섭취한 삼양사 사료의 조성(조단백 22.1% 이상, 조지방 3.5% 이상, 조섬유 5.0% 이하, 조회분 8.0% 이하 ...)이 상기와 같은 결과를 초래한 것으로 판단되었다. 즉 정상대조군과 실험군의 랫트들이 섭취한 사료가 당질인 조섬유의 비율은 지극히 낮았고 상대적으로 조지방 및 조단백의 비율은 조섬유의 5, 6 배에 달할 정도로 높았기 때문에 뇨 ketone이 증가한 것으로 판단되었다. 보다 정확한 결과를 얻기 위해서는 사료를 바꾸어 섭취시킨 후 재 실험이 필요할 것으로 사료된다.

5) 뇨잠혈

뇨잠혈은 요로의 이상을 진단하는 지표로 Table 3에 정상대조군과 실험군 각 군의 뇨잠혈 측정결과를 나타내었다. 각 군 모두에서 뇨잠혈이 검출되지 않았으며 따라서 투여시료에 기인한 뇨잠혈의 이상상태는 나타나지 않은 것으로 판단되었다.

Table 3. Urinary analysis

	pH	Protein(U)	Glucose(U)	Ketone(U)	Blood(U)
No. 1 (Normal)	7.5	1Positive	Negative	Negative	Trace(±)
	8.5	Trace(±)	Negative	1Positive	Negative
	8.5	1Positive	Negative	Negative	Negative
	8.5	2Positive	Negative	1Positive	Negative
	8.5	Negative	Negative	Negative	Negative
	8.5	1Positive	Negative	Negative	Negative
No. 2 (T1)	8.0	2Positive	Negative	Negative	Negative
	8.5	1Positive	Negative	1Positive	Negative
	8.5	1Positive	Negative	Negative	Negative
	8.5	Trace(±)	Negative	Negative	Negative
	8.5	1Positive	Negative	Negative	Negative
	8.5	1Positive	Negative	Negative	Negative

6.혈액학적 검사

4주간 시험물질 투여 후 hematological values 및 CBC differentiation 측정 결과를 Table 4에 나타내었다. 생맥산을 투여한 T1군의 RBC, WBC, HCT, HGB, PLT, Reticulocyte, WBC diff. count 수치를 Student's T-test에 의해 통계 처리한 결과, 각각의 실험군에서 미미한 차이를 나타냈지만 정상군의 그것과 비교하여 유의적인 차이($p < 0.05$)를 나타내는 군은 전혀 없었다. 따라서 투여시료에 기인한 혈액학적 독성은 전혀 나타나지 않은 것으로 연구결과가 나타났다.

Table 4. Hematological results

	No. 1 (Normal)	No. 2 (T1)
RBC	7.86±0.13 ¹⁾	7.78±0.66
WBC	9.97±1.57	9.42±2.79
HCT	47.80±3.19	46.20±4.40
HGB	15.28±0.17	14.80±1.27
PLT	1072±188.71	1033.40±75.67
Reticulocyte	3.26±0.25	3.23±0.29
Neutrophil Stab.	-	-
Neutrophil Seq.	8.60±3.38	8.00±0.71
Lymphocyte	88.20±5.56	88.20±2.32
Monocyte	3.20±2.48	3.60±1.50
Eosinophil	-	-
Basophil	-	-
Normoblast	-	-
Blast	-	-

¹⁾Each value represents the mean±S.D. of 6 rats.

*Significant differences as compared with control : p<0.05.

RBC, red blood cell count ($10^6/\text{mm}^3$); WBC, white blood cell count ($10^3/\text{mm}^3$); HCT, hematocrit (%); HGB, hemoglobin (g/dl); PLT, platelet ($10^3/\text{mm}^3$)

7. 혈액생화학적 검사

Table 5에 4주간 시험물질 투여 후 혈액 생화학적 검사를 한 결과를 나타내었다.

T1군의 TP, albumin, T-Bil., ALP, AST, ALT, T-Chol. 수치를 통계 처리한 결과, 각각의 실험군에서 미미한 차이를 나타냈지만 정상군의 그것과 비교하여 유의적인 차이($p<0.05$)를 나타내는 군은 전혀 없었다. 따라서 투여시료에 기인한 혈액생화학적 독성은 전혀 나타나지 않은 것으로 판단되었다.

Table 5. Biochemical values

	No.1 (Normal)	No. 2 (T1)
TP	6.27±0.23 ¹⁾	6.35±0.13
Albumin	3.75±0.14	3.82±0.09
T-Bil.	0.1±0.00	0.1±0.00
ALP	95.00±5.77	100.80±4.79
AST	111.33±35.42	104.17±24.45
ALT	40.33±6.07	39.83±3.48
T-Chol.	75.67±4.82	75.83±13.58

¹⁾Each value represents the mean±S.D. of 6 rats.

*Significant differences as compared with control : $p<0.05$

TP, total protein (mg/dl); Albumin (g/dl); ALP, alkaline phosphotase (u/l);
 AST, aspatate aminotransferase (U/l); ALT, alanine aminotransferase (U/l);
 T-Chol., total cholesterol (g/dl); T-Bil., total bilirubin (mg/dl).

: 2차년도에 연구 100% 달성

3. 협동연구과제 (3차년)

세부과제별 연구기관	연구책임자	당해연도 소요예산
건국대학교	이 형 환	15,000,000원

시제품 생맥산두부의 항고혈압, 항고혈장 지질에 미치는 기능성 연구

가. 실험 재료 및 방법

1) 실험동물

실험동물은 체중이 100±10g인 Sprague Dawley종의 4주된 웅성 흰쥐를 대한 실험동물센터에서 구입하여 다시 4주간 본 대학의 동물 사육실에서 적응시켰다. 4주간 적응시키는 동안에 사육실의 온도와 습도는 각각 22±2℃, 55±5%로 항온 항습을 유지하였다. 식이는 고형사료(삼양사)와 물을 자유롭게 섭취하도록 하였다.

2) 실험군의 분류

4주간 적응시킨 350g(8주령) 전후의 흰쥐 7마리를 한 군으로 하여 정상대조군(Normal Control), 음성대조군(Negative Control), 양성대조군(Positive Control) 및 실험군(Test group)으로 분류하였다. 음성대조군은 알코올과 물을, 양성대조군은 시판되고 있는 J사의 숙취해소제(숙취해소 및 간기능회복 기능)와 알코올을 섭취하도록 하였다. 실험군은 알코올과 시판되고 있는 P사의 일반두부를 투여한 T1군(이하 T1으로 표기), 알코올과 생맥산으로 응고시킨 두부를 투여한 T2군(이하 T2로 표기), 알코올과 생맥산(오미자 + 인삼 + 맥문동 + 황기 + 호박)을 투여한 T3군(이하 T3로 표기)으로 설정하였다. 이때 식이는 고형 사료(삼양사)를 자유 공급하였고 알코올은 쥐 한 마리

당 5g/kg.bw/day를 섭취하도록 계산하여 매일 음용수에 희석하여 공급하였다 (Table1).

Table 1. Composition of Groups

Group	No. of exam	Treatment
No.1 (Normal Control)	7	None-alcohol
No.2(Negative Control)	7	Alcohol + Water
No.3(Positive Control)	7	Alcohol +숙취해소제
No.4(Test group1-T1)	7	Alcohol + 일반두부
No.5(Test group2-T2)	7	Alcohol + 생맥산두부
No.6(Test group3-T3)	7	Alcohol + 생맥산*

생맥산*; 오미자(*Schizandra chinensis*) + 인삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer)+맥문동 (*Liriope platyphylla*) + 황기(*Astragalus membranaceus* BUNGE) + 호박 (*Cucurbita* spp.)

3) 시료의 제조

일반두부는 시중에서 구입하였고, 생맥산 두부는 10% 두유액에 두유액 양의 10%만큼의 생맥산으로 실험실에서 직접 두부를 응고시켰다.

4) 시료의 투여

일반두부와 생맥산 두부는 60kg 성인이 하루 두부 반모(250g)를 섭취하는 것을 기준으로 하여 350g 환쥐에 맞는 양을 계산하였고 생맥산은 60kg 성인이 하루 한약재를 100g 섭취하는 것을 기준으로 하여 역시 350g 환쥐에 맞는 양을 계산하여 구강투여하였다.

5) 부검

사육 마지막 날 동물을 overnight로 16시간 절식시키고 ethyl ether로 약하게 마취시

킨 상태에서 복부를 절개하고 주사기를 이용하여 후대정맥에서 3~4ml 혈액을 채취한다. EDTA tube에 넣어 혈액이 응고하는 것을 방지하였다. 채취한 혈액은 Cholesterol, Triglyceride (TG)분석에 사용하였다. 채혈직후 간과 신장을 적출하여, 즉시 냉각된 생리식염수로 세척하고 여과지로 표면의 물기를 제거한 다음 중량을 측정하였다.

6) 체중 및 장기의 중량계측

체중은 약물 투여한 날부터 부검하기 전날까지 4주 동안 일주일에 한번씩 같은 시간에 측정하였다. 장기의 중량은 부검 후에 실험동물의 후대정맥을 찾아서 채혈한 후 간, 신장을 각각 적출하고 그 중량을 측정하였다.

7) 생화학적 검사(Cholesterol, TG)

채혈한 혈액을 30분 동안 실온에 방치한 후 3000×g에서 15분간 원심분리 하여 얻은 혈장을 이용하여 Triglyceride(TG)는 글리세롤 비소거법에 의해 TG kit(Boehringer Mannheim, Germany)를 이용하여 자동분석기(Hitachi 747)에서 측정하였고, Cholesterol은 enzymatic colorimetric test를 이용하여 T. chol. kit(Boehringer Mannheim, Germany)를 사용하여 자동 분석기(Hitachi 747)로 측정하였다.

8) 통계처리

모든 실험 결과 측정치는 일변수 분석법을 사용하여 통계처리 하였으며 Student's T-test를 이용하여 $p < 0.5$ 수준에서 각 실험군 간의 유의성을 검증하였다. 모든 자료는 $\text{mean} \pm \text{standard deviation}$ 으로 나타내었다.

나. 실험 결과 및 고찰

1) 성장과 체중변화량 및 장기중량변화

Pirola와 Lieber 등(1)은 쥐에게 알코올을 섭취시켰을 때 체중증가가 저하되었다는 연구 결과를 보고한 바 있고, 이들의 또 다른 연구에 의하면 사람이 전체 에너지 중 50%를 당질 대신 알코올로 섭취하였을 때 체중이 감소되었다는 연구 결과를 제시하였다. 이러한 이유는 알코올 섭취로 인해 산소의 소비가 증가되고 대사율이 증가되며 세포 내 microsome에서 알코올 산화기구의 ATP 생성이 저하되기 때문인 것으로 생각되고 있다.(3)

본 연구 결과도 이와 유사한 경향을 나타내었는데 실험동물 Sprague-Dawley(수컷)의 시료 투여 후 4주 동안의 성장과 체중변화량을 측정한 결과 Table 2, Figure 1 및 Figure 2에 나타난 바와 같다. 즉, 알코올을 투여한 음성대조군이 다른 군들에 비해 유의적으로 낮은 체중변화량을 나타내었고 한약재를 투여한 T1군과 생맥산 두부를 투여한 T2군 및 생맥산을 투여한 T3군은 음성대조군에 비해 체중이 정상대조군에 가까운 유의성 있는 증가를 나타내었고 특히 생맥산으로 응고시킨 두부를 투여한 T2군에서 현저한 체중증가 효과를 나타내었다. 반면 일반두부를 투여한 T1군은 음성대조군과 비슷한 체중변화량을 보임으로써 알코올 섭취로 인한 체중감소를 거의 회복하지 못하였음을 나타낸다.

2) 장기의 중량

에탄올을 장기적으로 섭취하면 지방간 및 간장의 섬유화로 간이 비대해지게 된다(4). 간의 중량은 alcohol 섭취에 의해 간 조직 내에 지질이 축적됨으로써 alcohol을 섭취시킨 모든 군에서 증가되었다는 연구보고(5-6)와 본 실험 결과도 유사한 경향을 나타내었다. Table 2에 나타난 결과를 보면 알코올을 장기 투여한 음성대조군은 알코올을 투여하지 않은 정상대조군에 비해 대체중간비율(실험동물 체중 100g 당 간중량%)이 유의적으로 증가하여 지방간 및 간장의 섬유화가 진행되었음을 알 수 있었고 따라서 알코올을 장기 투여하면 간이 비대해진다는 위의 보고와 일치함을 알 수 있었

다. 그에 반해 생맥산이나 생맥산으로 응고시킨 두부를 투여한 T2군과 T3군은 대체 중 간비율이 정상대조군에 가까운 회복세를 나타내어 장기간의 알코올 투여로 인한 지방간 및 간장의 섬유화에 치료 및 개선 효과가 있는 것으로 나타났다. 대체중신장 비율(실험동물의 체중 100g 당 신장중량 %)은 모든 실험군이 음성대조군에 유의성 ($p<0.5$)을 보였고 정상대조군에 가까운 수치를 보여 알코올 섭취로 인해 손상된 신장의 회복에 효과가 있음을 나타내었다. 특히 T2군과 T3군이 회복효과를 보였고 양성 대조군과 T1군 역시 T2군이나 T3군에는 미치지 못하지만 다소 감소된 수치를 나타내 효과가 있음을 나타내었다.

Table 2. Total body weight gains and the weight ratio of liver and kidney

Groups	Total body weight gains(g) Mean±S.D.	Liver (% of body weight) Mean±S.D.	Kidney (% of body weight) Mean±S.D.
<u>No.1</u> None-alcohol	43.67±5.96	2.646±0.05	0.619±0.02
<u>No.2</u> alcohol	35.17±5.98**	2.873±0.07***	0.652±0.03*
<u>No.3</u> alcohol+숙취 해소제	36.00±3.78	2.705±0.06	0.627±0.03*
<u>No.4</u> T1	36.00±7.37	2.716±0.33	0.628±0.04*
<u>No.5</u> T2	43.14±10.11*	2.620±0.12**	0.615±0.03*
<u>No.6</u> T3	41.57±11.37*	2.624±0.13**	0.619±0.04*

¹⁾Each value represents the mean±S.D. of 7 rats.

Means with different superscript asterisks within a column and significantly different from each other at $P < 0.5$ (*) and $P < 0.05$ (**) and $P < 0.005$ (***) as determined by Student's T-test.

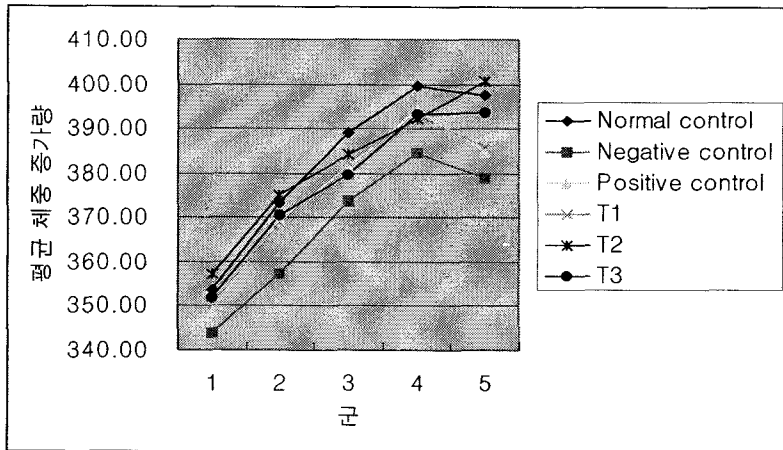


Fig. 1. The body weight of the rats.

Each value represents the mean of 7 rats.

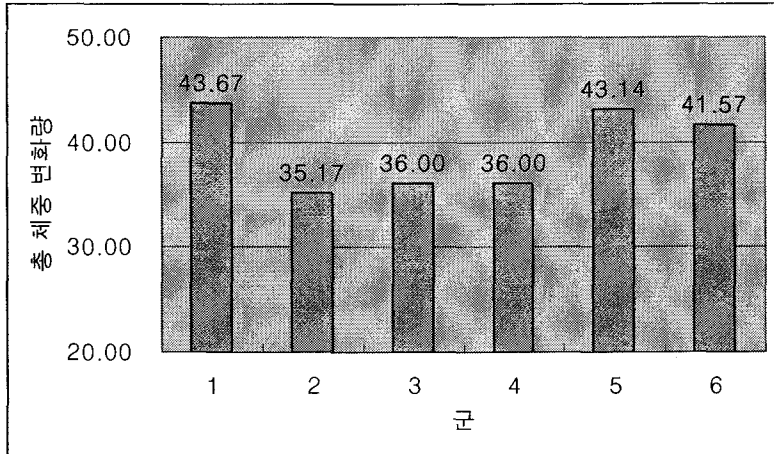


Fig. 2. The changes of body weight gain.

Each value represents the mean of 7 rats.

1; normal control, 2; negative control, 3; positive control, 4; T1, 5; T2, 6; T3

3) 혈장의 총 콜레스테롤과 중성지방 함량

(1) 혈장 triglyceride 함량

Table 3와 Fig. 4에 혈장 triglyceride 함량을 나타내었다. 알코올만을 장기 투여한 음성대조군은 73.71 ± 61.20 mg/dL로 정상대조군의 39.57 ± 8.62 mg/dL에 비해 혈장 내 triglyceride 함량이 현저히 증가하여 장기간의 알코올 투여로 인해 고지혈증이 유도된 것을 알 수 있었다. 보고된 바에 의하면 장기간의 alcohol 섭취는 triglyceride 함량을 현저하게 높여주어 지방간을 유도하며, 특히 만성적 alcohol 섭취는 지방간을 초래하여 영양불량의 주요원인이 되는데(11-12) 이로 인한 음식물의 섭취감소 특히 단백질, methionine, choline, vitamin E, Se 등의 항 지방간 인자들의 결핍을 초래한다(10). 본 실험 결과 T1군은 30.20 ± 4.71 mg/dL, T2군은 26.57 ± 1.68 mg/dL, T3군은 27.29 ± 6.96 mg/dL의 혈장 내 triglyceride 함량을 나타내어 음성대조군과 비교할 때 T2군과 T3군이 현저히 고지혈증을 개선시키는 유의성 있는($p < 0.05$, $p < 0.01$) 연구 결과를 나타내었으며 이

는 생맥산(오미자, 인삼, 맥문동, 황기, 호박)이나 또는 생맥산으로 응고시킨 두부가 매우 효과적으로 고지혈증을 치료 또는 개선할 수 있음을 시사해 준다.

(2) 혈장 total cholesterol 함량

Table 3와 Fig. 5에 혈장 내 cholesterol 함량을 나타내었다. 정상군의 95.71 ± 6.86 mg/dL에 비해 음성대조군의 혈장 내 cholesterol 함량은 113.80 ± 38.19 mg/dL로 증가하여 혈장 내 triglyceride 함량의 경우와 마찬가지로 장기간의 알코올 투여로 인해 고지혈증이 유발되었음을 알 수 있었다. 실험군 중 T1군은 86.17 ± 5.58 mg/dL, T2군은 85.00 ± 5.76 mg/dL 및 T3군은 84.00 ± 9.20 mg/dL의 수치를 나타내어 모든 실험군에서 현저히 cholesterol 수치를 감소시키는 유의성 있는($p < 0.05$) 결과를 나타내어 뛰어난 고지혈증 개선 및 치료 효과를 기대할 수 있는 가능성을 나타내었다. 혈액 중 높은 cholesterol 농도가 동맥경화증 등 심장순환기계 질환 유발의 주요인자로 작용한다는 보고(11-13)에 비추어 각 개인의 혈장 cholesterol 농도를 낮추는 약품과 기능성물질 개발에 세계적으로 많은 연구와 노력이 진행되고 있으며 특히 인체에 부작용이 적은 천연물로부터 위의 약재, 또는 기능성물질을 개발하였을 경우 그 부가가치는 막대하리라고 예상된다. 이러한 관점에서 볼 때, 본 연구의 결과들은 신규 천연 고지혈증 치료제로서의 가능성을 제시해 주는 것으로 사료된다.

Table 3. Concentration of lipid in rat.

Groups	TG(mg/dL)	Cholesterol(mg/dL)
	Mean±S.D.	Mean±S.D.
<u>No.1</u> None-alcohol	39.57±8.62 ^{**1)}	92.80±6.01*
<u>No.2</u> alcohol	73.71±61.20	113.80±38.19
<u>No.3</u> alcohol+숙취 해소제	30.14±6.73	91.57±6.30
<u>No.4</u> T1	30.20±4.71	86.17±5.58*
<u>No.5</u> T2	26.57±1.68 ^{****}	85.00±5.76 ^{**}
<u>No.6</u> T3	27.29±6.96 ^{***}	84.00±9.20 ^{**}

¹⁾Each value represents the mean±S.D. of 7 rats.

Means with different superscript asterisks within a column and significantly different from each other at P<0.5(*) and P<0.1(**) and P<0.05(***) and P<0.01(****) as determined by Student's T-test.

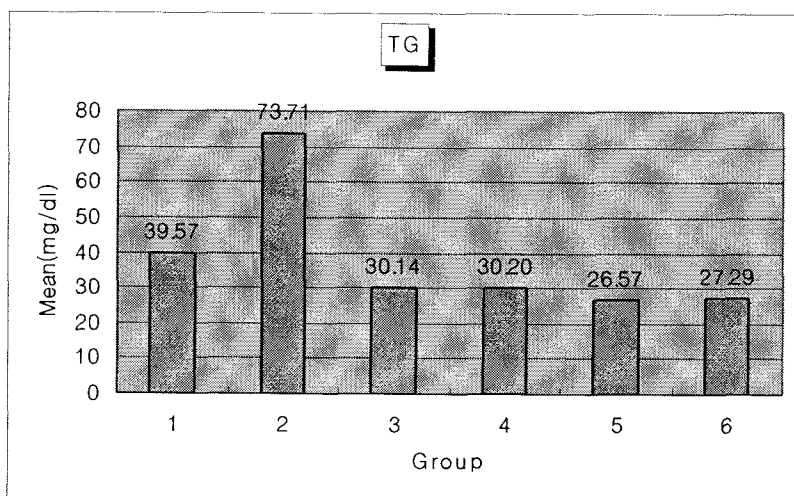


Fig. 4 Concentration of triglyceride in the rat plasma.

Each value represents the mean of 7 rats.

1; normal control, 2; negative control, 3; positive control, 4; T1, 5; T2, 6; T3

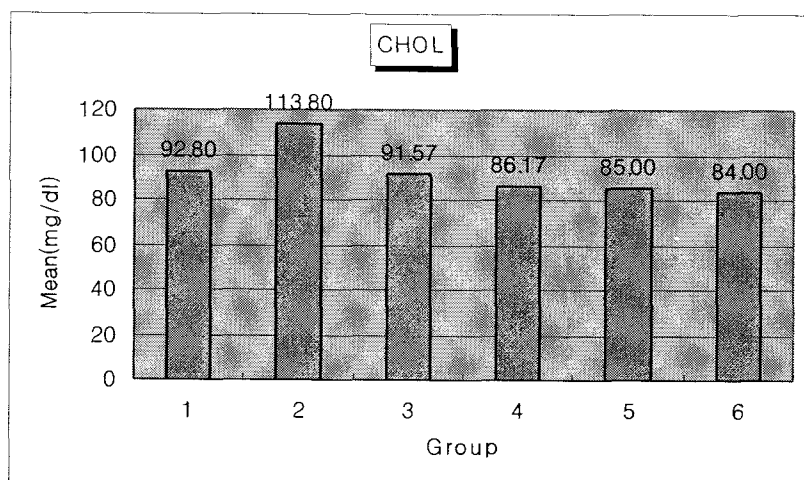


Fig. 5 Concentration of total cholesterol in the rat plasma.

Each value represents the mean of 7 rats.

1; normal control, 2; negative control, 3; positive control, 4; T1, 5; T2, 6; T3

: 3차년도에 연구 100% 달성

다. 참고 문헌

1. Piola RC and Lieber CS. Energy wastage in rats given drugs that induce microsomal enzymes. *J Nutr* 105: 1544-1548, 1975
2. Piola RC and Lieber CS. The energy cost of the metabolism of drugs, including ethanol, *Pharmacology* 7: 185, 1972
3. Gruchow HW, Sobocinski KA, Barboriak JJ and Scheller JG. Alcohol consumption, nutrient intake and relative body weight among U.S. adults. *Am J Clin Nutr* 42: 289-595, 1985
4. Han, B. H.M.H. Park, L.K. Woo and Y.N. Han. (1979) Studies on the anti-oxidant components of Korea Ginseng, *Korea Biochem. J*, 12 : 33.
5. Levy, R.I., Bonnel, M. and Ernst, N.D. (1976) *J. Am. Dieter. Assoc.* 58 : 406~417.
6. Lieber, C.S., Don P. Jones. and M. DeCarli. (1965) *Am. J. Clin. Nutr.*, 44(6) : 1009.
7. Kien, C.L. and H.E. Ganther (1983) Manifestations of chronic selenium deficiency in a child receiving total parenteral nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 37 : 319~328.

- 8.Thompson, J.N. and M.L Scott (1970) Impaired lipid and Vitamin E absorption related to atrophy of the pancreas in selenium-deficient chicks. *J. Nutr.* 100 : 797~809.
- 9.김순호, 손한철, 이은엽, 장철훈 (1999) 최신 임상검사진단학, 계축문화사, pp.50~52.
- 10.Cutta, S.K., P.A. Miller, L.B. Greenberg and O.A. Levander (1983) Celenium and acute alcoholism. *Am. J. Clin. Nutr.* 38 : 713~718.
- 11.Rahimtoola SH.(1985) Cholesterol and coronary heart disease. *J. Am. Med. Assoc.* 253 : 2094~2095.
- 12.Castelli WP, Wilson PW, Levy D, Anderson K.(1990) Serum Lipids and risk of coronary artery disease. *Atheroscl. Rev.* 21 : 7~10.
- 13.Miettinen TA. (1987)Dietary fiber and lipids. *Am.J. Clin. Nutr.* 45:1237~1242.