

흑염소와 약용식물 복합 증탕추출액 및 증류액이 조골세포 증식과 파골세포 형성에 미치는 영향*

송효남^{1†} · 임강현² · 권인숙³

세명대학교 한방바이오융합과학부,¹ 세명대학교 한의대,² 안동대학교 식품영양학과³

Effect of water extract and distillate from the mixture of black goat meat and medicinal herb on osteoblast proliferation and osteoclast formation*

Song, Hyo-Nam^{1†} · Leem, Kang-Hyun² · Kwun, In-Sook³

¹School of Integrated Oriental Medical Bioscience, Semyung University, Chungbuk 390-711, Korea

²College of Korean Medicine, Semyung University, Chungbuk 390-711, Korea

³Department of Food Science and Nutrition, Andong National University, Gyeongbuk 760-749, Korea

ABSTRACT

Purpose: The effects of water extract and distillate from the mixture of black goat meat and medicinal herb on MG-63 osteoblast proliferation and mouse bone marrow derived osteoclast formation were investigated. **Methods:** Proximate composition, volatile basic nitrogen (VBN), mineral content, free amino acid composition and free fatty acid composition in black goat meat were determined. Water extract and distillate were prepared with three groups; goat meat only (BG-E, BG-D), six herbs added group (BG-E6, BG-D6), and eight herbs added group (BG-E8, BG-D8). Osteoblast proliferation, mineralization and calcium uptake activity of MG-63 cells were measured and tartrate resistant acid phosphatase activity of osteoclasts was analyzed. **Results:** Black goat meat had remarkably low fat and high level of calcium. Glutamic acid was the most abundant amino acid. Herbs added extract groups (BG-E6 and BG-E8) showed increased MG-63 cell proliferation in a concentration dependent manner, while all the distillates did not show the effect. All extracts and distillates showed significantly increased osteoblast mineralization depending on the concentration. In particular, herb added extract, BG-E6, increased 170.3% of control and the distillate of BG-D and BG-D6 increased up to 168.5% and 159.8%, respectively. Calcium uptake activities of all water extracts showed remarkable increase of BG-E6 and BG-E8 up to 615.5% and 628.1% of control, respectively. Distillates had no effect except BG-D6. All water extracts significantly reduced the activity of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) in osteoclasts derived from mouse bone marrow. **Conclusion:** Combination of black goat meat and medicinal herb increased the MG-63 cell proliferation and effectively inhibited osteoclast differentiation in both water extracts and distillate of them, which implies that they could be used as potent functional food materials for bone health.

KEY WORDS: black goat meat, medicinal herb, MG-63 cell, osteoblast, osteoclast

서 론

우리나라에서의 흑염소 사육기원은 삼한시대 말경까지 거슬러 올라가며 예로부터 임산부의 보약으로 널리 알려져 왔다. 한방에서 염소고기는 온양성 식품으로서 특히 노인들의 찬 몸을 따뜻하게 해 주는 식품으로 분류되며, 본초 강목에는 몸을 보하고 허약을 낫게 하며 피로와 추위를 물

리치고 위장의 작용을 보호하며 마음을 평안케 하는 식품으로 기록되어 있다.¹ 특히 흑염소는 지방 함량이 적은 반면 단백질과 칼슘 및 철분이 많아 임산부뿐만 아니라 회복기 환자, 허약체질인 사람 및 어린이에게도 좋은 식품으로 알려져 있으며 또한 근육섬유가 연해서 소화 흡수율이 매우 높고 비타민 E가 많다.¹

흑염소는 고기자체와 증탕가공품인 추출액의 형태로 소

Received: January 29, 2015 / Revised: February 13, 2015 / Accepted: March 17, 2015

*This work was supported by the research grant from Semyung University in 2013.

†To whom correspondence should be addressed.

tel: +82-43-649-1430, e-mail: hnsong@semyung.ac.kr

© 2015 The Korean Nutrition Society

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

비되는데 우리나라 흑염소의 80% 이상이 소위 개소주집으로 일컬어지는 가내임가공 형태의 수동기계식 증탕가공 방식에 의해 증탕추출액으로 유통되어 왔다. 1993년 한식식품업체가 흑염소엑기스를 고온·이중살균처리한 파우치 형태로 대량생산한 것을 계기로 1996년부터 축협 11개 지역조합에서 흑염소 엑기스 제조사업을 벌이기 시작한 이래 현재까지 축협, 농협, 영농조합 및 관련 농장 등이 염소추출액 가공품의 시장을 점유하고 있다.^{2,3}

그러나 이와 같이 공공연히 고가의 건강식품으로 유통되는 흑염소 증탕가공품의 품질이나 효능에 대해 정작 학계에서의 관심은 매우 저조한 편이다. 흑염소 관련 선행연구는 가축으로서의 사육과 경제성에 대한 분야에 치중되어 있는데, 예를 들면, 급여하는 사료의 종류가 흑염소의 발육과 육질에 어떻게 영향을 주는지^{4,5} 또는 흑염소의 거세시기나 방목의 형태가 경제성과 육질에 어떤 영향을 미치는지^{6,7} 등에 초점을 맞추고 있어 식품분야에서의 체계적인 연구는 매우 미흡한 실정이다. 식품과 관련된 흑염소의 선행연구로는 흑염소육의 영양성분의 분석,⁸⁻¹⁰ 흑염소 육골액 제조,^{11,12} 흑염소 불고기 조리법¹³ 및 흑염소 추출액의 품질지표 도출에 관한 연구¹ 등과 같은 기본적인 특성에 결과가 보고되어 있는 정도이다.

한편, 흑염소 원료육에 각종 한약재 등을 첨가하고 열탕으로 일정시간 추출한 증탕추출액은 특유의 누린맛과 거부감 있는 냄새로 인해 기호성이 떨어지기 때문에 약으로 인식하고 섭취하는 성인들과 달리 성장기 어린이들의 복용은 매우 드문 편이다.¹ 이러한 점을 보완하기 위해 최근 개발된 증류식 추출물은 맛과 향미가 개선되어 섭취하기 용이하며 소화와 흡수가 빠르나 증탕추출액에 비해 효능면에 있어 아직 논란이 많은 가공법이다. 증탕추출액이 지니고 있는 유효성분들이 휘발성인 경우 유사한 효과를 기대할 수 있는 제한점이 있기 때문이다. 그러나 이러한 공정 차이에 따른 효능평가 선행연구 또한 전무한 형편이다.

골 조직은 콜라겐, 당단백과 같은 세포외기질 (extracellular substance) 외에 골세포, 골 형성에 관여하는 조골세포 (osteoblast) 및 골 흡수에 관여하는 파골세포 (osteoclast) 등 여러 종류의 세포들로 구성되어 있다. 파골세포에 의한 골 흡수와 조골세포에 의한 새로운 골 기질 형성 및 무기질화 과정의 반복으로 골 항상성이 유지된다. 정상적인 경우 조골세포의 활동으로 인한 골 형성이 파골세포의 활동으로 인한 골 흡수보다 많다.²⁰ 그러나 30~45세 이후에는 점차 골 흡수가 골 형성을 능가하게 되며 과도한 골 소실은 골다공증을 유발하기도 한다. 즉, 골다공증 (osteoporosis)은 골 형성 (bone formation)과 골 흡수 (bone resorption)의 불균형에 의하여 단위용적내의 골량 (bone quantity)이 감

소되어 쉽게 골절을 일으키는 질환인 것이다.²¹

이러한 불균형의 원인은 골 흡수작용을 하는 파골세포의 활성도는 증가하고 골 형성에 관여하는 조골세포의 활성도가 감소하기 때문이며 따라서 골다공증의 치료에 있어 파골세포의 분화를 억제하거나 조골세포의 활성을 증가시키는 것은 매우 중요한 포인트가 된다.²² 2011년 질병관리본부의 국민건강 영양조사 결과 발표에 따르면 50세 이상의 골다공증 유병률은 전체인구의 22.5%, 남자가 7.5%, 여자가 37.5%로 나타났으며, 특히 여성이 남성보다 5배 높은 유병률을 보였다.²³

한편, 어린이와 같은 성장기에는 몸무게, 키, 뼈, 치아, 뇌 등이 급속하게 발달되는 중요한 시기로 뼈의 경우 자라는 동시에 뼈가 단단해지는 화골현상이 계속된다. 유아 및 어린이들의 뼈 건강과 성장을 위해 마시기 쉬운 성장음료 형태의 제품이 이미 시판중인데 홍삼, 폴리칸, 젯산칼슘, CPP (casein phosphopeptide) 등의 성분이 함유되어 있다.¹¹

최근에는 약용식물로부터 골강화를 위한 소재발굴에 많은 관심이 모아지고 있어 100여편 이상의 연구가 이루어져 있으며 이중 식품의 원료로 이용되는 한약재 중 갈근의 경우 phytoestrogen 중의 하나인 daidzein이 상당량 함유되어 있어 고용량 투여 시 골다공증에 대한 효과가 있는 것으로 보고되었다.¹⁴ 이외에도 오미자,¹⁵ 건지황,¹⁶ 우슬,¹⁷ 녹용^{18,19} 등 다수의 한약재에 대한 분석이 이루어져 있다.

본 연구에서는 골강화가 본격적으로 필요한 성인들과 성장기 어린이를 위한 골 기능 개선용 흑염소 액상제품을 개발하기 위한 기초연구로서 흑염소 원료육과 골 건강에 유용한 한약재 복합물을 수동기계식 증탕가공방식과 증류식 추출기계에 의한 증류가공방식으로 제조하였다. 흑염소 원료육에 대한 기초적인 영양성분을 분석하였고, 골강화 효능평가를 위해 MG-63 조골세포를 이용한 조골세포의 증식 촉진활성과 골수세포유래 파골세포의 분화억제활성을 비교 분석함으로써 흑염소 및 천연약용식물로부터 골대사에 관련하는 세포들의 분화나 기능을 조절할 수 있는 기능성 소재를 개발하고자 하였다.

연구방법

흑염소 원료육의 전처리

흑염소육의 부위별 영양성분을 분석하기 위하여 약용으로 쓰이는 흑염소 (도체중량 15 kg) 3마리를 구입하여 전문도축장에서 도축한 후 원료육 중에서 식용하지 않거나 저장 중 변질을 일으키는 원인이 되어 사용하지 않는 뿔의 각질, 내장 부위 및 네 굽은 공시재료에서 제거하였다. 절단부위를 처리한 원료육은 한약재 및 물과의 접촉 면적을

넓히고 추출기내의 효율적 공간 확보를 위해서 도체를 2분 체로 절단한 후 발골하여 다시 다리살 부위, 목살부위 및 뺏살부위의 주요 세 부위로 분할하였다. 영양성분 분석을 위해 발골된 살코기 각 부위를 200~400 g씩 취하여 만육기로 만육시켜 균질화한 후 별도의 저장없이 즉시 분석실험을 수행하였다.

흑염소 원료육의 영양성분 분석

일반성분

일반성분은 AOAC방법²⁴에 준하여 분석하였다. 수분함량은 105°C 상압건조법, 조회분 함량은 550°C에서 직접회화법으로 분석하였다. 조단백질 함량은 micro-Kjeldahl법을 이용한 단백질 자동분석기 (Kjeltec protein analyzer, Tecator Co., Hoeganaes, Sweden)로, 조지방 함량은 Soxhlet법을 이용하여 분석하였다. 식이섬유 함량은 효소중량법으로 분석하였고, 총 당질 함량은 차감법으로 계산하였다.

휘발성 염기질소

휘발성 염기질소 (VBN, Volatile Basic Nitrogen)의 함량은 식품공전에 따라 Conway unit를 이용하는 micro-diffusion method로 측정하였다.²⁵

무기질 함량

주요 5종의 무기질 (Na, Ca, K, P, Fe) 함량을 식품공전중의 ICP-AES법에 의거하여 측정하였다.²⁶ 즉, 시료 약 3 g을 항량이 된 도가니에 정확히 취해 전열기 위에서 예비탄화한 후 550°C 회화로에서 백색 또는 회백색이 될 때까지 회화시켰다. 실온으로 냉각한 후 남아있는 회백색 재에 증류수 10방울 정도를 떨어뜨려 날리지 않도록 한 다음 묽은 질산 (질산 : 증류수 = 1:1, v/v) 3 mL를 넣고 열판에서 가열하여 질산을 완전하게 건고시켰다. 이를 550°C 전기회화로에서 1시간 동안 회화시킨 다음 방냉하고 다시 도가니에 묽은 염산 (염산 : 증류수 = 1:1, v/v) 10 mL를 천천히 가하여 재를 녹인 후 고속액체크로마토그래피용 증류수를 이용하여 50 mL로 정용한 다음, 무회분 여과지로 여과하여 시험용액으로 하였다. 분석은 ICP-AES (Activa, HORIBA Jobin-Yvon, Longjumeau, France)를 사용하였으며 RF power 1,000 W, nebulizer gas flow 0.7~0.8 L/min, plasma gas flow 12 L/min, sheath gas flow 0.2 L/min 및 pump speed 20 rates/min의 조건으로 분석하였다.

지방산 조성

지방산 조성은 Folch 등²⁷의 방법에 의하여 지질을 추출

및 정제한 후 14% BF₃-methanol로 methyl ester화하여 Gas Chromatography (HP-6890GC FID, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)로 분석하였다. GC 분석시 HP-FFAP column (30 m × 0.32 µm ID, 0.52 mm film thickness, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)을 사용하였고, injector 230°C, detector 50°C, column oven 100°C (2 min)~4°C/min~230°C (20 min) 및 carrier gas인 He를 1.5 mL/min, split ratio 10 : 1의 조건으로 흘려주면서 불꽃이온화검출기 (FID)로 분석하였다.²⁸

유리아미노산 조성

단백질을 강산으로 가수분해하여 발생하는 유리아미노산을 ion exchange를 통해 분리하고 ninhydrin post column 유도체를 형성시킨 후 발색시켜 visible detector로 분석하는 원리를 이용하여 아미노산 조성을 분석하였다.²⁹ 즉, 시료 약 10 g을 정확히 칭량하여 ampule에 넣은 후 6 N HCl 15 mL를 가한 다음 3분간 진탕하였다. 질소가스로 30초간 치환하여 밀봉한 후 질소가스가 충전된 상태에서 105°C heating block에 장착시킨 후 24시간 동안 가수분해 하였다. 분해가 끝난 시료를 실온에서 방냉하고 50 mL 정용 flask에 시료용액을 모두 옮겨 담은 후 증류수로 정용하여 1차 중화시켰다. 용액을 여과지 (Whatman 5)로 여과하여 test tube에 10 mL 정도 여액을 모은 후 2 mL를 취해서 25 mL 정용 flask에 3차 증류수로 정용하여 2차 중화하였다. 이를 0.45 µm PTFE filter (Millipore Co., Billerica, MA, USA)로 여과한 후 시험용액으로 하여 아미노산자동분석기 (Hitachi AAA L-8900, Hitachi High-Technologies Co., Tokyo, Japan)로 분석하였다. 아미노산 표준물질은 amino acid standard H (Pierce Co., Rockford, IL, U.S.A.)를 사용하였으며, 분석조건은 ion exchange column (4.6 × 60 mm, packed with Hitachi custom ion exchange resin), column flow 1.0 mL/min, injection volume 20 µL, wavelength 570 nm 및 440 nm (for proline)로 분석하였다.

흑염소와 약용식물 복합 증탕추출액 및 증류액의 제조

한의학 문헌과 전문가의 자문을 근거로 하여 골강화 효능이 있는 약용식물 중 현행 식품위생법의 식품공전상에 식품의 주부원료로 사용할 수 있는 후보원료를 선발하였다. 조골세포 증식 촉진활성에 관한 예비세포실험과 일일 복용량을 고려하여 두 종류의 복합배합비를 결정한 후 각각의 증탕추출액 및 증류액을 제조하였다. 즉, 흑염소육과 황기, 홍화씨, 당귀, 황정, 속단, 우슬 (2/2/2/2/1/1) 등 6종 약재의 복합배합과 동일배합에 녹용과 녹각 (0.3/1.2) 2종을 더 추가한 8종의 복합배합비를 개발하였다. 한 마리 분

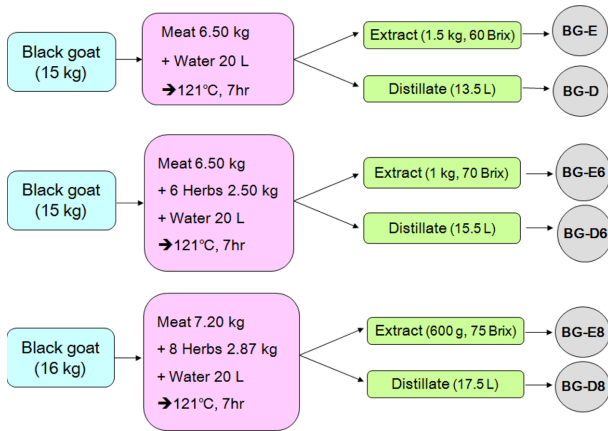


Fig. 1. Scheme of manufacturing black goat extract and its distilled extract

량의 흑염소육과 배합된 모든 한약재를 광목으로 만든 주머니에 담아 30 L 들이의 대형 전탕용기에 넣고 물 20 L를 가수한 후 121°C에서 7시간 전탕하여 증탕추출액 (이하 BG-E, BG-E6, BG-E8)을 제조하였으며, 전탕용기에서 방출되는 증기를 포집, 회수하여 증류액 (이하 BG-D, BG-D6, BG-D8)을 제조하였다 (Fig. 1).

조골세포 배양

MG-63 (human osteoblastic cell line) 조골세포는 한국 세포주 은행에서 구입하여 Dulbecco's modification of Eagle's medium (DMEM, GIBCO BRL, Grand Island, NY)에 10%의 FBS (Gibco BRL, Grand Island, NY)에서 배양하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂의 환경에서 배양하였으며, 세포가 충분한 증식이 일어나는 3~4일 간격으로 계대배양하였다.

조골세포의 증식촉진 활성

96 well plate에 100 µL/well로 24시간 배양한 세포에 BrdU labeling solution을 well당 10 µL씩 넣고 시료를 첨가하였다. 각 추출액의 원액을 기준으로 1/10, 1/80 및 1/640의 희석액을 만들어 처리하였다. 약 15시간 후 labeling media를 털어낸 후 well당 FixDenat를 200 µL씩 넣었다. 30분 후 FixDenat를 제거하고 anti-BrdU-POD working solution을 100 µL/well를 처리하고 90분 후 이 용액을 제거하였다. Washing solution으로 3회 세척한 후 다시 기질 용액을 well당 100 µL씩 넣고 각 well에 25 µL의 1M H₂SO₄를 가하여 ELISA reader에서 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.³⁰

골석회화 촉진활성

배양한 MG-63 세포의 석회화 유도를 위해 osteogenic media (αMEM + 10% FBS + 50 mg/L ascorbic acid + 10 mM β-glycerophosphate)에서 시료를 첨가하여 21일간 배양하였다. 세척한 세포를 1 N HCL 용액에 15분 침지하여 hydroxy apatite를 추출하여 칼슘을 정량하고 대조군과 비교하였다. 칼슘측정 kit는 QuantiChrom Calcium Assay Kit (DICA-500, BioAssay Systems, Hayward, CA, USA)를 사용하여 612 nm에서 측정하였다.³¹

Calcium uptake 활성

Mouse의 골수에서 꺼낸 primary cell에 각 시료를 처리하고 Premo Cameleon Calcium Sensor (Invitrogen Ltd., Paisley, UK)를 사용하여 순간적인 calcium uptake를 측정하였다. 미리 칼슘 센서를 제조사의 프로토콜에 따라 전처리한 세포에 각 시료를 처리한 후 60초 후에 fluorescence resonance energy transfer (FRET)방식으로 유도된 파장의 변화를 측정하기 위해 ELISA reader기를 이용하여 405 nm 파장으로 excitation하고, 2개 파장 (YFP emission 535 nm와 CFP emission 485 nm)의 fluorescence 값을 측정하였다.³²

골수세포의 분리 및 파골세포 분화

6주령 SD-Rat의 골수에서 primary cell을 수집하여 DMEM (with 10% FBS)에 3시간 동안 배양하였다. 미부착 부유 세포들만을 취하여 24 well plate에 분주하고 3일간 안정화시켰다. 각 시료는 원액을 최종 농도 10 µL/mL이 되도록 하였고 정상군을 제외한 모든 군에는 TNF-α를 10 ng/mL씩 처리하여 파골세포로의 분화를 유도하였다. 각 배지는 2일마다 교체하였으며 교체시마다 TNF-α 및 시료를 동일하게 반복 처리하였다.³³

파골세포의 TRAP (tartrate resistant acid phosphatase) 활성

파골세포의 분화정도를 Hotokezaka 등³⁴의 방법을 수정하여 TRAP활성으로 확인하였다. 96-well에 5 × 10⁴ cells/well 이 되게 cell을 접종하고 분화인자와 시료를 처리하여 7일간 배양하였다. 고정된 cell에 기질로서 15 mM 4-nitrophenyl phosphate in 100 mM Sodium acetate 용액과 100 mM Sodium Tartrate in 100 mM Sodium acetate용액의 혼합액으로 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 효소 반응액을 0.1 N NaOH로 반응을 중지시키고 405 nm에서 흡광도를 측정하여 TRAP 활성으로 표시하였다.

통계분석

모든 실험은 3번 이상 반복 수행하여 평균 \pm 표준편차로 나타내었다. 결과 사이의 통계적인 유의성은 공분산분석 (ANOVA test)을 이용하여 분석하였고, 사후 검정은 Tukey's test를 사용하였으며, $p < 0.05$ 인 경우를 통계적으로 유의한 것으로 인정하였다.

결 과

흑염소 원료육의 영양성분

일반성분

흑염소 원료육을 다리살, 목살 및 뱃살 등의 세 부위로 나누어 분석한 결과 (Table 1) 수분함량은 72.4~74.0%로 부위에 따라 큰 차이가 없었고, 조단백질 함량 (16.6~16.7%)과 회분 함량 (0.8~0.9%)도 차이가 없었다. 그러나 조지방 함량은 2.2~2.8%로 부위에 따라 다소 차이가 있었으며 탄수화물 함량도 목살 5.6%로 가장 낮았고 뱃살이 8.0%로 가장 높았다.

휘발성 염기질소

흑염소 원료육의 VBN은 3.2~5.4 mg%로 부위에 따라 차이가 있었다 (Table 1).

무기질 함량

흑염소 원료육의 부위별 주요 무기질 함량은 Table 2와 같다. 인 (P) > 나트륨 (Na) > 마그네슘 (Mg) > 칼슘 (Ca) > 철 (Fe)의 순서로 나타나 인 함량이 132.0~151.9 mg%로 가장 많았고 철분의 함량이 1.3~1.4 mg%로 가장 적었다.

유리아미노산 조성

다리살 부위 흑염소육의 아미노산 함량과 조성은 Table 3에 나타내었다. 총 아미노산 함량은 15,727.9 mg%로 나타났고 이중 필수아미노산 함량은 5,856.2 mg%였으며 비필수 아미노산은 9,871.7 mg%였다. 총 아미노산에 대해 필수

Table 1. Proximate composition and volatile basic nitrogen (VBN) of black goat meat

Composition	Fore limb ¹⁾	Neck	Dorsal trunk
Moisture (%)	73.4 \pm 2.1 ²⁾	74.0 \pm 1.8	72.4 \pm 1.6
Crude protein (%)	16.6 \pm 0.8	16.7 \pm 1.4	16.6 \pm 1.0
Crude lipid (%)	2.7 \pm 0.3	2.8 \pm 0.2	2.2 \pm 0.2
Ash (%)	0.9 \pm 0.1	0.9 \pm 0.2	0.8 \pm 0.2
Carbohydrate (%)	6.4 \pm 0.7	5.6 \pm 0.5	8.0 \pm 1.0
VBN (mg%)	5.4 \pm 0.4	3.2 \pm 0.2	4.2 \pm 0.3

1) The carcass is classified based on Webb et al. (35). 2) Values are Mean \pm SD (n = 3).

Table 2. Mineral contents of black goat meat (Unit: mg%)

Mineral	Black goat meat			Beef ²⁾	Pork ²⁾	Chicken ²⁾
	Fore limb ¹⁾	Neck	Dorsal trunk			
P	151.9	151.9	132.0	169.0	248.0	339.0
Na	84.1	88.1	88.1	51.8	63	46.0
Mg	15.5	16.7	14.4	20.1	2.3	17.8
Ca	9.3	4.9	10.4	3.8	6.0	5.8
Fe	1.4	1.4	1.3	2.8	2.1	2.2

1) The carcass is classified based on Webb et al. (35). 2) Source: Young HT et al. (11)

Table 3. Amino acid composition of fore limb meat of black goat (Unit: mg/100 g)

Amino acid	Fore limb meat of black goat
Essential amino acid (EAA)	
Lysine	1,476.3
Leucine	1,183.1
Threonine	779.6
Valine	733.7
Isoleucine	646.1
Phenylalanine	603.8
Methionine	433.6
Σ EAA	5,856.2
Non-essential amino acid (NEAA)	
Glutamic acid	2,638.9
Aspartic acid	1,542.3
Arginine	1,108.7
Alanine	1,085.7
Glycine	964.1
Proline	714.9
Serine	664.8
Tyrosine	562.8
Histidine	472.6
Cysteine	116.9
Σ NEAA	9,871.7
Total amino acid (TAA)	15,727.9
EAA/TAA (%)	37.2

아미노산은 37.2%를 차지하는 것으로 나타났다. 유리아미노산 중 글루탐산의 함량이 2,638.9 mg%로 가장 많았다.

지방산 조성

흑염소 원료육 중 다리살 부위의 지방산 조성비를 분석한 결과 Table 4에서와 같이 oleic acid의 함량이 46.8%로 가장 높았고 다음으로 stearic acid (25.8%)와 palmitic acid (18.7%)의 함량이 높은 것으로 나타났다.

조골세포의 증식촉진 활성

흑염소 및 약용식물 복합추출물이 조골세포의 증식에

Table 4. Fatty acid composition of fore limb meat of black goat (Unit : %)

Fatty acid		Fore limb meat
Myristic acid	C14:0	1.7
Palmitic acid	C16:0	18.7
Palmitoleic acid	C16:1	1.7
Stearic acid	C18:0	25.8
Oleic acid	C18:1	46.8
Linoleic acid	C18:2	1.8
Linolenic acid	C18:3	0.2
Arachidic acid	C20:0	0.2
Gadoleic acid	C20:1	0.1
Eicosadienoic acid	C20:2	0.2
Eicosatrienoic acid	C20:3	0.1
Arachidonic acid	C20:4	0.6
Others		2.1
Σ PUFA ¹⁾		2.9
Σ MUFA ²⁾		48.6
Σ SFA ³⁾		46.4
Total Sum		97.9

1) PUFA: Polyunsaturated fatty acid 2) MUFA: Monounsaturated fatty acid 3) SFA: Saturated fatty acid

미치는 영향을 분석한 결과 시료별 및 농도별로 매우 유의적인 차이가 나타났으며 한약재를 첨가하지 않은 흑염소 군보다 한약재를 6종 및 8종으로 첨가할수록 전반적으로 활성이 높아지는 경향을 보였다. 증탕추출액은 녹용과 녹각이 추가된 8종 한약재 첨가군에서 원액의 1/10 및 1/80 희석농도에서 증식에 효과적이었고, 6종 한약재 첨가군에서 1/640 희석농도에서 유의하게 증가하였다. 증류액은 모든 처리군에서 유의한 효과를 나타내지 않았고 전반적으로 증탕액보다 효과가 낮았으나 한약재 첨가종류가 많아질수록 활성이 유의적으로 증가하는 경향을 보였다 (Fig. 2).

조골세포의 골석회화 촉진활성

조골세포에 농도별 시료를 처리한 21일 후 칼슘 함량을 정량한 결과 아무것도 처리하지 않은 대조군에 비해 흑염소군과 한약재 첨가군, 증탕추출액과 증류액 모든 시료처리군에서 칼슘함량이 유의적으로 증가하여 MG-63 세포의 석회화 결절 형성을 농도 의존적으로 유의하게 증가시킨 것으로 나타났다 (Fig. 3). 흑염소군을 제외한 모든 증탕액 및 증류액의 1/10 농도군은 시료간 유의적 차이없이 모두 높은 증가활성을 보였고, 1/80 농도군은 1/10 농도군보다 유의적으로 낮은 활성을 나타내었다. 특히 6종 한약재 첨가군의 증탕추출액의 1/10 농도군은 대조군에 비해 석회화 형성을 170.3% 증가시켜 가장 높았고, 다음으로 흑염소육 증류액도 168.5% 증가활성을 보였으며, 6종 한약재 첨가군의 증류액 또한 159.8% 증가시킨 것으로 나

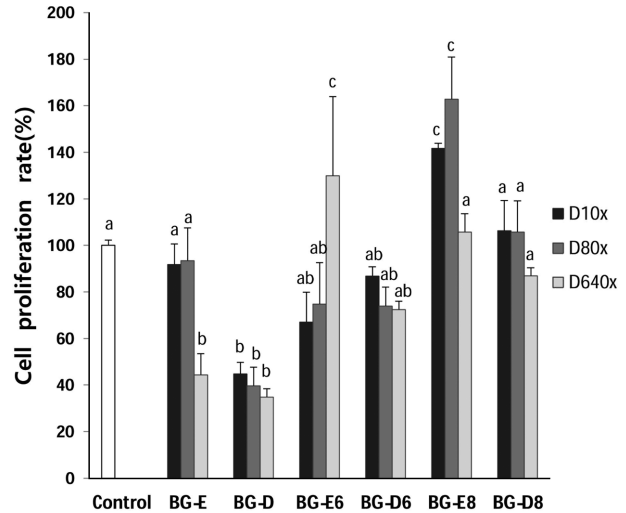


Fig. 2. Effect of black goat meat and medicinal herb mixture on proliferation of human osteoblast MG-63 cells. D10x, 1/10 dilution; D80x, 1/80 dilution; D640x, 1/640 dilution. Data shown are the mean and SD values of three independent samples. The treatments sharing a common alphabet are not statistically significant at 5% level.

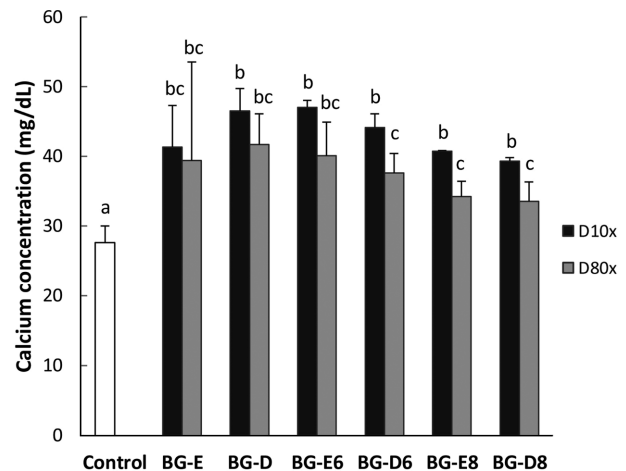


Fig. 3. Effect of black goat meat and medicinal herb mixture on mineralization of human osteoblast MG-63 cells. D10x, 1/10 dilution; D80x, 1/80 dilution. Data shown are the mean and SD values of three independent samples. The treatments sharing a common alphabet are not statistically significant at 5% level.

타냈다. 시료간 차이에 있어서는 한약재 첨가군이 무첨가군보다 높았고, 증탕추출액이 증류액보다 높은 활성을 보였다.

Calcium uptake 활성

세포의 칼슘 흡수량을 FRET방식으로 측정한 순간적인 칼슘 흡수량을 측정한 결과 거의 모든 증탕추출액에서 활성이 증가하였다 (Fig. 4). 가장 높은 증가율을 보인 시료군은 6종과 8종 한약재 첨가군으로 1/10 농도의 경우 대조

군에 비해 각각 615.5%와 628.1%로 매우 높게 나타났다. 반면에 흑염소 증탕추출액은 1/10 농도에서 214.0% 증가하였고, 1/80 희석농도에서 6종 및 8종 한약재 첨가군은 각각 184.7% 및 209.5% 증가되었으며 이들 시료간의 유의적 차이는 없었다 ($p < 0.05$).

파골세포 형성억제 및 TRAP (tartrate resistant acid phosphatase)활성

파골세포의 증식억제 실험결과 TNF- α 만을 처리한 대조군에 비해 모든 시료군이 TRAP 활성을 억제하는 경향을 나타내었다 (Fig. 5). 특히 흑염소만의 증류액 및 두 종

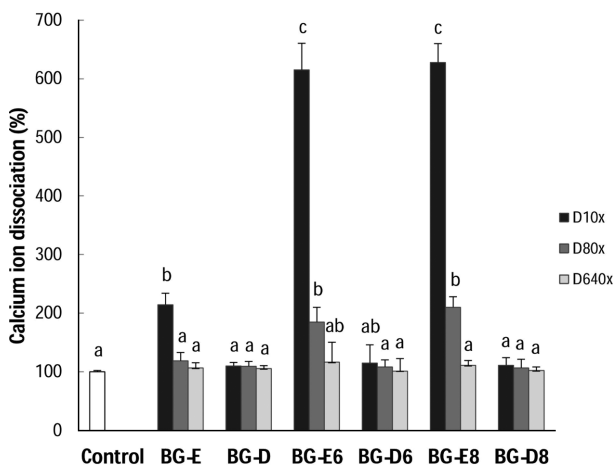


Fig. 4. Effect of black goat meat and medicinal herb mixture on calcium uptake of human osteoblast MG-63 cells. D10x, 1/10 dilution; D80x, 1/80 dilution; D640x, 1/640 dilution. Data shown are the mean and SD values of three independent samples. The treatments sharing a common alphabet are not statistically significant at 5% level.

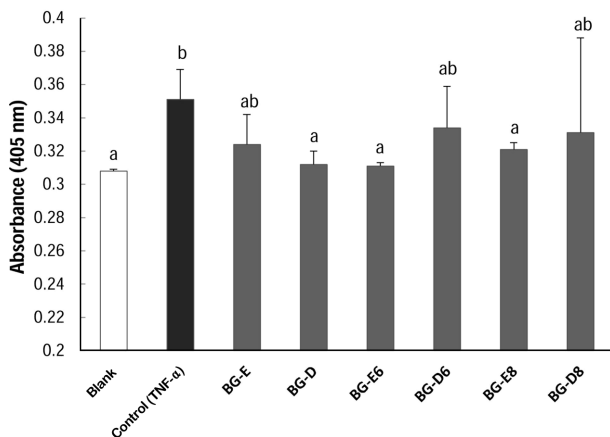


Fig. 5. Effect of black goat meat and medicinal herb mixture on TRAP activity. Data shown are the mean and SD values of three independent samples. The treatments sharing a common alphabet are not statistically significant at 5% level.

류의 한약재 첨가군의 증탕추출액은 통계적으로 유의한 높은 감소활성을 보였고, 흑염소 증탕추출액, 6종 및 8종 한약재 첨가군의 증류액 또한 TNF- α 처리군보다 유의한 감소활성을 나타내었다 ($p < 0.05$).

고 찰

흑염소 원료육의 영양성분

흑염소 원료육의 일반성분은 다른 기존의 연구에서 수분 74.3~75.9%, 조단백 20.0~22.3%, 조지방 2.2~3.6%, 회분 1.1~1.3% 등으로 보고된 결과와 유사하였다.¹ 육류생산을 목적으로 교배된 남아프리카의 염소품종인 Boer goat 중 6종의 염소육에서는 수분 59.5~69.8%, 단백질 17.0~29.2%, 지질 4.4~21.2%로 매우 다양한 분포로 나타나 염소의 품종, 사육환경, 사료 등에 따라 육의 영양성분은 큰 차이가 있는 것으로 사료된다.³⁵

한편, 쇠고기, 돼지고기 및 양고기 등의 다른 육류와 비교할 때 흑염소 원료육의 수분함량은 쇠고기 (73.7%), 양고기 (74.1%)와 비슷하고 돼지고기 (59.9%)보다는 높았다. 단백질 함량은 쇠고기·양고기의 20.2%보다 낮았으나 돼지고기 (17.2%)와 큰 차이가 없었다.¹¹ 특히 지방함량은 돼지고기 (22.1%)에 비해 현저히 낮은 것으로 나타나 지방의 섭취를 제한하고 있는 현대인들에게 있어 매우 좋은 저지방 육류로 사료된다. 회분함량은 모든 육류가 1.0% 내외로 유사하였다.¹¹

휘발성 염기질소 (VBN)는 육류에 있어 단백질 사슬이 일부가 절단되면서 유리아미노산, 핵산관련 물질, 아민류, 암모니아, 크레아틴 등 비단백질 질소화합물의 상승에 의한 육류의 독특한 맛과 향에 기여하는 물질로 동시에 이상취를 발생시키는 원인물질이기도 하다. 따라서 육류와 어류의 선도변화를 측정하는 데에 유용한 지표로 이용 된다.¹⁰ 이와 같이 육류제품의 변패와 가식성 여부의 판단기준으로 적용되고 있는²⁵ VBN에 대해 흑염소 원료육은 3.2~5.4 mg%로 나타나, 원료육 및 포장육의 경우 식품공전상 함량 기준이 20 mg% 이하이어야 함에 적합하였다.

흑염소 원료육의 부위별 주요 무기질 함량은 보고된 선행연구에서의 쇠고기, 돼지고기 및 닭고기와 비교했을 때 특히 흑염소육의 칼슘함량이 확연히 높았고,¹¹ 이러한 분포경향은 Boer goat에서도 유사하게 나타나는 독특한 특징을 보였다.³⁵ 칼슘은 우유 및 유제품과 같은 특정식품 이외의 일반 식품에는 그 함유량이 매우 낮은 무기질이라는 점을 감안하면 다른 육류에 비해 흑염소육의 골강화 기능성과 무관하지 않음을 시사한다고 볼 수 있다.

다릿살 부위 흑염소육의 총 아미노산 함량은 다른 연구

에서 13,398~13,928 mg%로 보고된 것보다 높았다.¹¹ 총 아미노산에 대해 필수아미노산은 37.2%로 나타나 양질의 단백질인 것으로 사료되며 유리아미노산 중 가장 많은 글루탐산은 흑염소육의 맛난맛에 기여하는 것으로 사료된다.

지방산은 oleic acid > stearic acid > palmitic acid의 순서였다. 기존의 타 연구에서 oleic acid 50.9~52.5%, stearic acid 8.9~10.2%로 나타난 것과는 각각 큰 차이가 있었다.⁸ 일반적으로 육류의 지방을 구성하는 주요한 지방산은 palmitic acid, stearic acid, oleic acid 및 linoleic acid 등이나 동물의 종류에 따라 이들 지방의 지방산 조성은 각기 다르며 섭취된 사료의 종류에 따라서도 영향을 받기 때문인 것으로 추측된다.

조골세포 및 파골세포에 미치는 영향

활성화된 조골세포는 골 조직의 세포와 기질을 합성하고 기질의 침착과 석회화를 조절하며 여러 cytokine 분비를 통해 파골세포의 활성을 조절한다.²⁰ 흑염소 및 약용식물 복합추출물의 증탕추출액은 조골세포의 증식에 효과적이었으나 증류액은 모든 처리구에서 유의한 효과를 나타내지 않았다 (Fig. 2). 현재 흑염소에 대한 조골세포 관련 연구는 전무하여 선행연구와의 비교검토는 어려우나 각종 약용작물에 의한 조골세포 증식 활성화에 대한 연구에서 복분자 미숙과와 황기의 7:3 비율 추출물,¹² Hos cell에서 녹용추출물,³⁶ 갈근¹⁴ 등이 세포증식에 효과적인 것으로 보고되어 있다. 따라서 흑염소육만 섭취하는 것보다 적합한 한약재를 첨가하는 것은 매우 효율적인 것으로 사료된다.

골 석회화와 골 형성능은 조골세포의 분화에 중요한 표식인자이다. 대조군에 비해 모든 시료처리군에서 조골세포의 칼슘함량을 유의적으로 증가시킨 것은 매우 고무적인 결과이다. 전체적으로 증탕추출액이 증류액보다 활성이 높았으나 증류액의 1/80 농도에서조차 유의적인 증가를 보인 것은 흑염소 및 한약재의 이용이 골 석회화에 매우 효과적임을 시사한다고 볼 수 있다.

세포의 칼슘 흡수량에 있어서 한약재 첨가군이 매우 높은 증가율을 보였다. 흑염소 증탕추출액은 상대적으로 효과가 낮아 1/10 농도군의 활성이 한약재 첨가군의 1/80 농도군과 유사한 활성을 보임으로서 동일한 활성을 나타내기 위해서 흑염소군은 한약재 첨가군보다 8배의 고농도가 필요함을 의미하는 것으로 사료된다. 증류액의 경우 6중 첨가군의 1/10 농도군이 유의적으로 근소한 증가를 나타낸 것 외에 다른 처리군은 효과가 없었다.

뼈조직에서 유일하게 뼈의 파괴를 담당하는 파골세포는 여러 조직에 존재하는 단핵구 대식 전구세포로부터 시험관내에서 파골세포의 생성이 가능하다.³⁷ 파골세포는 특

징적으로 TRAP와 풍부한 칼시토닌 수용체를 가지며 실제로 뼈의 흡수작용을 할 때는 산 생성이 활발한 특징을 가진다. 이에 TRAP은 파골세포의 표지인자로 널리 사용되고 있다.²⁷ 파골세포의 증식억제 시험에서 모든 시료군이 TRAP 활성을 효과적으로 억제한 것으로 나타나 흑염소육 뿐만 아니라 본 실험에서 이용한 한약재는 골 기능에 매우 효과적인 기능성 원료가 될 수 있을 것으로 사료된다. 한약재 중에서도 갈근추출물은 파골세포의 증식억제 효과가 없는 것으로 보고되었으며,¹⁴ 개다래, 두충, 형개 등은 파골세포의 분화 및 억제에 효과적인 한약재로 보고된 바 있다.²³

요 약

골기능 개선용 흑염소 액상제품을 개발하기 기초연구로서 흑염소 및 약용식물 복합추출물이 MG-63 조골세포 및 마우스 골수세포 유래 파골세포의 분화에 미치는 영향을 분석하였다. 흑염소 원료육의 일반성분, 휘발성 염기질소, 무기질함량, 유리아미노산 조성 및 지방산 조성 등의 영양성분을 분석하여 기초자료를 마련하였다. 흑염소에 첨가할 약용식물의 종류와 배합을 달리한 두 그룹의 한약재 첨가군에 대해 증탕추출액과 증류액을 제조하여 총 6개 시료군 (흑염소육 (BG-E, BG-D), 6중 한약재 첨가군 (BG-E6, BG-D6) 및 8중 한약재 첨가군 (BG-E8, BG-D8)을 대상으로 골강화 활성을 분석하였다. 식품공전상 식품의 원료로 사용이 가능한 원료 중 황기, 홍화씨, 당귀, 황정, 숙단, 우슬 각각 2/2/2/2/1/1의 배합비를 지닌 한약재 6중 첨가군 및 동일배합에 녹용과 녹각을 각각 0.3/1.2 로 추가배합한 한약재 8중 첨가군을 사용하였다. 조골세포 MG-63의 증식 촉진 활성에 대해 시료별 및 농도별로 유의적인 차이가 나타났으며 한약재 무첨가 흑염소군보다 6중 및 8중 등 한약재 첨가량이 많을수록 활성이 증가하였다. 증탕추출액과 달리 증류액은 모두 유의한 효과가 없었다. 조골세포의 골석회화 촉진활성시험 결과 대조군에 비해 모든 시료 처리군에서 칼슘함량이 유의적으로 증가하여 MG-63 세포의 석회화 결절 형성을 농도 의존적으로 유의하게 증가시켰다. BG-E6는 대조군에 비해 석회화 형성을 170.3% 증가시켰고, 증류액인 BG-D와 BG-D6는 각각 168.5% 및 159.8%의 증가를 나타내었다. 시료별 차이에 있어 한약재 첨가군이 무첨가군보다 높았고, 증탕추출액이 증류액보다 높은 활성을 보였다. 세포의 칼슘 흡수량을 측정한 결과 모든 증탕추출액에서 활성이 증가하였고 특히 BG-E6와 BG-E8은 각각 615.5%와 628.1%로 유의적으로 가장 높은 증가율을 보였다. 증류액은 BG-D6의 1/10 농도군외에 효과가 없었

다. 마우스 골수세포 유래 파골세포의 증식억제 실험결과 TNF- α 만을 처리한 대조군에 비해 모든 시료군이 TRAP 활성을 억제하는 경향을 나타내었다. 특히 BG-D 및 BG-E6, BG-E8은 유의하게 파골세포로의 분화를 억제하였다. 종합적으로 흑염소육을 비롯하여 황기, 홍화씨, 당귀, 황정, 속단, 우슬, 녹용 및 녹각 등 한약재의 복합추출물은 골 기능 강화에 매우 효과적인 기능성 원료가 될 수 있을 것으로 사료된다.

References

- Gil B, Song H. Establishment of quality index on the black-goat meat extracts. Korean J Food Nutr 2001; 14(4): 322-328.
- The Kyunghyang Shinmun [Internet]. Seoul: The Kyunghyang Shinmun; 1993 Sep 25 [cited 2015 Jan 20]. Available from: <http://newslibrary.naver.com/viewer/index.nhn?publishDate=1993-09-25&officeId=00032&pageNo=1>.
- Yonhap News [Internet]. Seoul: Yonhap News; 1996 Jul 27 [cited 2015 Jan 21]. Available from: <http://news.naver.com/main/read.nhn?mode=LSD&mid=sec&sid1=101&oid=001&aid=0004031653>.
- Choi SH, Park BY, Cho YM, Choi CY, Kwon EG, Kim YK, Hur SN. Effects of feeding browses on growth and meat quality of Korean native goats. J Anim Sci Technol 2003; 45(5): 819-824.
- Choi SH, Kim SW, Park BY, Sang BD, Kim YK, Myung JH, Hur SN. Effects of dietary crude protein level on growth and meat quality of Korean native goats. J Anim Sci Technol 2005; 47(5): 783-788.
- Kim SW, Yoon SH, Kim JH, Ko YG, Kim DH, Kang GH, Kim YS, Lee SM, Suh SW. Effects of feeding levels of concentrate on the growth, carcass characteristics and economic evaluation in feeds based on rice-straw of Korean black goats. J Korean Soc Grassl Forage Sci 2012; 32(4): 429-436.
- Hwangbo S, Choi SH, Kim SW, Son DS, Jeon BS, Lee SH, Jo IH. Effects of different grazing types of hilly pasture on growth and meat quality in organic Korean black goats. Korean J Org Agric 2008; 16(3): 309-320.
- Kim YB, Jeon KH, Lee NH, Yang SY, Moon BY, Jang A. Nutritional quality of black goat meat. Proceedings of 36th Conference of Korean Society for Food Science of Animal Resources; 2005 Oct 28; Korea University. Seoul: Korean Society for Food Science of Animal Resources; 2005.
- Kim JS, Kim KP, Lee MC. Mineral contents and fatty acid composition of jemsosojoo. J Korean Soc Food Sci Nutr 1998; 27(2): 220-226.
- Park CI, Kim YJ. Composition in amino acid and changes in protein, mineral contents during storage of black goat extracts. J Korean Soc Food Sci Anim Resour 2000; 20(4): 257-263.
- Young HT, Kim MW, Choi HJ. Studies on the characterization of black goat meat and bone beverage containing honey with red ginseng. Korean J Food Nutr 2005; 18(2): 135-139.
- Jo KS. A study on the extraction time and component analysis of goat meat with bone extract. Korean J Food Preserv 2002; 9(4): 396-399.
- Kim SA. The recipe standardization and nutrient analysis of broiled black goat meat. Korean J Diet Cult 2001; 16(4): 269-275.
- Kim C, Ha H, Kim H, Lee JH, Song KY. Pueraria lobata Ohwi as an osteoporosis therapeutics. Korean J Food Sci Technol 2002; 34(4): 710-718.
- Lee Y, Lee HS, Jang SJ, Song JH. Effect of water extract of Schisandra Chinensis on osteoclast differentiation. Korean J Orient Physiol Pathol 2010; 24(5): 848-853.
- Im KJ, Choi KH, Jung EH, Yoo DY. The effect of dried roots of Rehmannia glutinosa extract on osteoblast in rat fetus calvarial cells. J Orient Obstet Gynecol 2013; 26(3): 33-43.
- Kim JH, Ki JY, Ann JY, Park HJ, Kim HJ, Kwak HB, Oh JM, Kim YK. Inhibitory effects of Achyranthis Bidentatae Radix on osteoclast differentiation and bone resorption. Korean J Herbol 2010; 25(1): 65-74.
- Kwak HB, Kim JH, Kwon YM, Oh JM, Kim YK. Effect of water extract of deer antler in osteoclast differentiation. Korean J Orient Physiol Pathol 2008; 22(4): 891-895.
- Kim YK, Choi YH, Song JH, Jang SJ, Kim HJ, Lee CH, Ahn SH, Lee JE, Kim JJ, Choi MK. Inhibitory effect of deer antler on osteoclastic bone resorption. Korean J Orient Physiol Pathol 2009; 23(6): 1299-1304.
- Choi KH, Yoo DY. The effect of Guibi-tang water extract on osteoclast differentiation and osteoblast proliferation. J Orient Obstet Gynecol 2014; 27(3): 12-27.
- Jeon MH, Kim M. Effect of Hijikia fusiforme fractions on proliferation and differentiation in osteoblastic MC3T3-E1 cells. J Life Sci 2011; 21(2): 300-308.
- Koo HJ, Sohn EH, Kang SC. The optimal combination of the mixture of unripe Rubus coreanus and Astragalus membranaceus in the activation and differentiation of osteoblastic cells. Korean J Plant Resour 2013; 26(5): 658-662.
- Im NK, Kim HJ, Kim MJ, Lee EJ, Kim HI, Lee IS. Effects of medicinal herb extracts on osteoblast differentiation and osteoclast formation. Korean J Food Sci Technol 2010; 42(5): 637-642.
- Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis, 15th edition. Washington, D.C.: Association of Official Analytical Chemists; 1990.
- Ministry of Food and Drug Safety (KR). 11. Processed meat and egg products. In: Korea Food Code. Article 5. Standards and Specifications for Each Food Product. Cheongju: Ministry of Food and Drug Safety; 2009. p.37.
- Song HN, Gil B. Analysis of nutritional composition and phenolic compound in propolis collected from falseacacia and chestnut tree in Korea. Korean J Food Sci Technol 2002; 34(4): 546-551.
- Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. J Biol Chem 1957; 226(1):497-509.
- Song HN. Quality properties of fermented mugworts and the rapid pattern analysis of their volatile flavor components via surface acoustic wave (SAW) based electronic nose sensor in the GC system. Korean J Food Preserv 2013; 20(4): 554-563.
- Song HN. Quality analysis for recycle of the drained soybean boiling water discarded in the mass production of fermented soy foods. Korean J Food Cookery Sci 2013; 29(5): 525-531.
- Kim HK, Kim MG, Leem KH. Effects of egg yolk-derived peptide on osteogenic gene expression and MAPK activation. Molecules

- 2014; 19(9): 12909-12924.
31. Arpornmaeklong P, Brown SE, Wang Z, Krebsbach PH. Phenotypic characterization, osteoblastic differentiation, and bone regeneration capacity of human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 2009; 18(7): 955-968.
32. Miyawaki A, Llopis J, Heim R, McCaffery JM, Adams JA, Ikura M, Tsien RY. Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* 1997; 388(6645): 882-887.
33. Kil JS, Kim MG, Choi HM, Lim JP, Boo Y, Kim EH, Kim JB, Kim HK, Leem KH. Inhibitory effects of *Angelicae Gigantis Radix* on osteoclast formation. *Phytother Res* 2008; 22(4): 472-476.
34. Hotokezaka H, Sakai E, Kanaoka K, Saito K, Matsuo K, Kitaura H, Yoshida N, Nakayama K. U0126 and PD98059, specific inhibitors of MEK, accelerate differentiation of RAW264.7 cells into osteoclast-like cells. *J Biol Chem* 2002; 277(49): 47366-47372.
35. Webb EC, Casey NH, Simela L. Goat meat quality. *Small Rumin Res* 2005; 60(12): 153-166.
36. Lee JW, Kim DK. Analyses of the expression profiles of genes responsible for the growth of osteoblast upon Velvet antlers treatment. *J Korean Orient Pediatr* 2002; 16(1): 39-74.
37. Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* 1999; 20(3): 345-357.