

최      중  
연구보고서

청국장유래 복합 biopolymer의 효소활성기구제어에  
의한 대량생산과 식품소재화 및 화장품개발

Production of Complex Biopolymer from Chung-guk-jang  
by Regulation of Genes involving Enzyme Productivity,  
and Development of Food Materials and Cosmetics.

연 구 기 관  
경 북 대 학 교

농 립 부

## 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “청국장유래 복합 biopolymer의 효소활성기구제어에 의한 대량생산과 식품소재화 및 화장품개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2006년 6월 2일

주관연구기관명 : 경북대학교  
총괄연구책임자 : 김종국  
연 구 원 : 이상한  
협동연구기관명 : 경북과학대학  
협동연구책임자 : 김성호  
연 구 원 : 이유순  
연 구 원 : 이진만  
연 구 원 : 정소형  
연 구 원 : 김인호

## 요 약 문

### I. 제 목

청국장유래 복합 biopolymer의 효소활성기구제어에 의한 대량생산과 식품소재화 및 화장품개발

### II. 연구개발의 목적 및 필요성

현재 우리나라에서는 웰빙 분위기에 편승하여, 천연의 건강식품에 대한 관심이 고조되고 있는 실정이다. 여기에 속하는 전통식품에는 김치와 된장 및 간장 등을 우선 열거할 수 있다. 이들에는 각각 우수한 생리활성 등이 많이 연구되고 있다. 본 연구에서는 “밭에서 나는 쇠고기“라 불릴 정도로 단백질 함량 및 지방의 함량이 풍부한 콩을 재료로 사용하며, 미생물에 의한 발효에 의해서 생산되며, 익히지 않은 분말상태의 발효산물을 그대로 섭취할 때, 더욱 유의한 성분들이 섭취될 수 있는 청국장의 발효에 관여하는 미생물에 초점을 맞추어 연구를 진행하였다.

청국장의 재료로서는 물, 콩, 볶짚 등에 존재하는 발효 미생물이 이용되는데, 삶은 콩에 미생물을 처리한 후 발효를 진행시키는 아주 간단한 과정을 통하여 청국장이 제조된다.

청국장이 발휘하는 효능으로는, 첫째로 단백질 분해효소가 많이 함유되어 있으며, 혈전예방 및 혈전 용해 효과가 탁월하므로, 뇌졸중(중풍), 심장병 및 돌연사 예방효과를 들 수 있으며, 두번째로는 폴리글루탐산이 청국장 biopolymer로서 다량 함유되어 있는데, 이것은 '탁솔'이라는 항암물질을 체내에 효율적으로 운반하는 기능을 가지고 있으며, 칼슘 등 영양물질의 체내 흡수율을 높이며, 또한 보습효과가 뛰어나므로 화장품으로도 개발가능하다. 세 번째로는 아미노산 단편들이 들어있는데, 이들은 고혈압에 관여하는 '안지오텐신 전환효소(ACE)'의 작용을 저지해 고혈압을 예방하며, 네 번째로 갈변물질은 강력한 항산화 효과를 가짐과 동시에, 당뇨병과 암 예방 효과 및 장내 유산균 증식효과를 발휘하며, 다섯 번째로는 제니스테인을 들 수 있는데, 이것

은 유방암 및 전립선암을 억제할 수 있는 등, 항암 작용을 발휘하며, 항산화 효과와 칼슘 흡수를 촉진하므로 골다공증예방과 여성 폐경기 및 갱년기 증후군을 완화시키며, 여섯 번째로는 레시틴이 함유되어 있으므로, 혈관 속 과다 콜레스테롤 배설작용을 수해함으로서, 동맥경화를 예방함과 동시에, 인슐린 분비를 촉진함으로서, 당뇨병 개선 효과와 혈액의 과도한 지방 흡수하므로 비만 예방효과를 발휘하며, 또한 치매 예방효과와 학습 능력 향상효과 및 피부 노화 방지효과 등이 발휘되며, 일곱 번째로는 사포닌이 함유되어 있어서, 암 발생 촉진인자를 감소시키는 항암 효과와 콜레스테롤 저하효과 및 변비 개선효과가 발휘되며, 여덟 번째로는 다른 식품보다 섬유질이 5배나 많이 함유되어 있으므로, 변비 개선 및 대장암 예방과 다이어트 효과가 발휘되며, 아홉 번째로는 비타민 B<sub>2</sub>가 많이 함유되어 있으며, 특히 콩에 비해 3배이상의 함량을 가지며, 이로 인해 당뇨병에 효과가 있음과 동시에 알코올 분해를 촉진하므로 숙취 해소에 효과가 있으며, 간 기능 개선과 피부와 점막을 건강하게 하며, 열 번째로는 비타민 B<sub>12</sub>가 콩에는 전혀 없으나 청국장으로 발효되면서 생성되어 신진대사를 촉진시키며, 빈혈을 예방하고, 열한번째로는 비타민 E가 다량 함유되어 있어서 피부 노화 및 주름 방지와 항산화 작용이 기대되며, 열두번째로는 비타민 K가 함유되어 있어서 칼슘의 흡수율을 높여 골다공증 예방효과가 발휘되며, 열세번째로는 고분자 핵산(DNA)이 많이 함유되어 있어서 면역증강 효과의 발휘가 기대되는 것으로 알려져 있다.

본 연구에서는 청국장 제조시 핵심적으로 작용하는 미생물에 초점을 맞추어 진행하였으며, 청국장 제조균에서 생산되는 polyglutamic acid(PGA) 및 levan 등의 biopolymer의 중요성을 인식하여, 이들의 생산량이 증가된 변이주들을 분리하여, PGA생산량이 증가된 변이주의 PGA 생산관련 유전자의 구조적인 특징을 고찰하였다. 이는 biopolymer생산을 담당하는 유전자 조절기구를 구명하고자 하였다. 또한 이들 변이주의 biopolymer생산시 proteome분석도 진행하였다. 그리고 이 연구에서 분리된 biopolymer생산균으로부터 유도된 PGA 고생산성 변이주 및 levan고생산성 변이주가 생산하는 biopolymer의 생리적인 특징을 고찰하고자 하였으며, 최종적으로 이들 변이주가 생산하는 biopolymer가 함유된 화장품시제품의 개발을 목표로 수행하였다..

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

- Biopolymer 고생산성 변이주 제작
- Biopolymer 생산성 유전자의 클로닝 및 구조
- Levansucrase/ℳ-PGA의 최적생산조건 확립
- ℳ-PGA 최적생산을 위한 proteome 분석
- Levansucrase의 최적 생산을 위한 proteome 분석
- 청국장유래 biopolymer의 항비만 효능검정
- 청국장유래 biopolymer의 항당뇨 효능검정
- Biopolymer들의 피부안정성 및 효능 · 효과검정
- 기존 biopolymer 상품과의 안정성 유효성 효능효과 비교
- ℳ-PGA우위 및 levan우위 각 biopolymer의 물성 및 유동학적 특성조사
- ℳ-PGA우위 및 levan우위 각 biopolymer의 콜레스테롤저하 효능검정
- ℳ-PGA우위 및 levan우위 각 biopolymer의 항고지혈 효능검정
- 항당뇨효능 검정
- ℳ-PGA우위 및 levan우위 각 biopolymer의 기존 biopolymer 제품과의 효능비교
- 제품에서의 유효성 연구
- 제품에 대한 피부 및 모발 친화력과 기능성 검토
- 각 biopolymer에 대한 유화 및 분산상태에 따른 제품의 안정성 검토 및 제형화 연구
- 기초화장품, 색조화장품, 모발화장품 시제품화

### Ⅳ. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본연구의 핵심은 청국장 발효균 중에서 본연구 수행중에 분리된 균주를 모균주로 하여, 돌연변이처리를 수행한 결과, PGA생산량이 증대된 변이주와 Levan의 생산량이 증대된 변이주를 분리하여, 모균주와 PGA 생산량 증대 변이주로부터 biopolymer 의 생합성에 관련된 유전자를 클로닝하고 구조를 분석하여 유전자의 구조적인 특징을 밝혔으며, 또한 이 균주를 이용하여 생산된

biopolymer 의 효과를 규명하고, 또한 이들을 이용한 시작품을 제작하였다. 본 연구의 결과가 국내에서 대단히 관심이 집중되고 있는 청국장 소비증가와 연결되어, 콩 생산량의 증대로 연결이 되고, 나아가서 청국장 제조업자의 소득 증대로 연결될 수 있으면 좋겠고, 또한 청국장의 제조에는 특별한 기법이 필요하지 않으므로, 많은 콩 재배 농가들이 가정에서 제조하여 판매할 수 있는 계기가 마련된다면, 농가소득증대와 직결될 수 있으리라 생각된다.

## SUMMARY

### (영문요약문)

The interests on natural food for health have been increased gradually. Kimchi, soybean paste and soy sauce is major member of Korean traditional functional food. Superior biological activity have been studied about those food materials. The Bean is called "the beef produced from field" in Korea, because the quantity of protein and lipid is very high in beans. And the bean can be used as a raw materials for chunggukjang which is produced from the bean by microbial fermentation. The microbial flora existing on straw play very important roles in the process of chunggukjang fermentation.

High amount of protease is contained in chunggukjang, so it shows a beneficial effect on paralysis, heart disease, sudden death. And polyglutamic acid is contained in chunggukjang, so it has an ability to transfer taxol, a kind of anticancer material, in the human body. and it helps Ca uptake, and it works for water preservation, so it can be applied to cosmetics. Fragments of amino acids are also inhibit angiotensin converting enzyme, so it can protect human body from hypertension, Some browning materials in chunggukjang play an antidiabets and cancer prevention effect, and at the same time those help the growth of *Lactobacillus* in intestinal tract. In addition to the points mentioned above, a lot of biological active materials are contained in the chunggukjang.

In this study, biopolymers, like  $\gamma$ -polyglutamic acis(PGA) and levan produced by microbes were focused. Mutants producing high amount of PGA or levan were constructed with NTG treatment on *B. subtilis* CBP which was isolated from chunggukjang. And the genes involved in producing biopolymers were cloned, sequenced and compared with the wild type the mutants were derived. Those genes were  $\gamma$ -glutamyltransferase,

γ-glutamyltranspeptidase and levansucrase.

The optimal condition for the production of biopolymers were also studied, and proteomic analysis of wild type biopolymer producing bacteria(BPB) and mutants were also carried out. From the proteomic analysis, it was shown that 56 proteins were upregulated during biopolymer synthesis, including the genes of three kinds of glutamine synthetase, two kinds of levansucrase, glutamyl-tRNA(Gln) aminotransferase(large subunit).

In rheological properties, biopolymer produced from chunggukjang(as below CBP), PBP(higher PGA form) and LBP(higher Levan form) showed pseudoplastic flow behavior of Non-Newtonian with the index values more than 1.0. For shear stress changes according to shear rate variation

The Power law model and Herschel-Bulkeley model were used to study of flow behaviors of all of the three biopolymers according to the changes of their concentrations, pH and temperature. From the results, flow indexes "n" calculated from the Power law model showed more than 1.0 in the pseudoplastic behavior. The correlation coefficients in the range of 0.90~1.0 indicates the Power law model with more reliably fit than Herschel-Bulkeley model.

At the temperature dependency on the apparent viscosity of 4% biopolymer CBP, PBP and LBP as values of shear rate  $2.04^{-1}$  was exceptionally well fitted at Arrhenius model equation. At the temperature dependency on the changes of concentration, biopolymer PBP and LBP was higher than biopolymer CBP.

At the concentration dependency on the apparent viscosity of biopolymer CBP, PBP and LBP was well fitted at both Power law model and Exponential model but Power law model fitness was showed highly.

The purpose of this study was to investigate the effects on supplementation of chunggukjang biopolymer and PBP and LBP on anti obesity and anti diabetic mellitus in Sprague-Dawley rats.

In first study, it was examined the effects on supplementation of chunggukjang and chunggukjang biopolymer on lipid metabolism in normal rats fed high cholesterol diets and streptozotocin-induced diabetic rats. In second study, it was examined the effects on supplementation of PBP and LBP on normal rats fed high cholesterol diets and streptozotocin-induced diabetic rats.

Experimental groups were divided into normal group which were given experimental diets with 1% cholesterol for six weeks and diabetic group which were given experimental diets with 1% cholesterol for four weeks ; control group were fed a casein-based diet. biopolymer groups were fed casein-based diet supplemented with 3% biopolymers.

The results of this studies aer as follows :

In first study, the effects of chunggukjang biopolymer supplementation on lipid metabolism in normal rats fed with high cholesterol diet was as follows. The serum triglyceride of chunggukjang biopolymer group was lower than that of the control group. But there were no significant difference. The level of GPT and GOP of chunggukjang biopolymer group were significantly lower than those of the control group. Fecal excretion of bile acids was increased by chunggukjang biopolymer supplementation in experimental rats, but there were no significant difference.

The effects of chunggukjang biopolymer supplementation on lipid metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats was as follows. The fasting plasma glucose levels, plasma glycosylated hemoglobin and serum insulin of chunggukjang biopolymer group were lower than those of the diabetic control group. but there were no significant difference. The serum triglyceride and total cholesterol of chunggukjang biopolymer group were lower than that of the diabetic control group. but there were no significant difference. There were no significant differences in hepatic triglyceride and cholesterol among all groups.

On the other hands, the effects of supplementation of PBP and LBP on

normal rats fed with high cholesterol diets and streptozotocin-induced diabetic rats was as follows. The serum triglyceride and total cholesterol of PBP group was significantly lower than control group and commercial authentic levan group. The serum triglyceride of LBP group was significantly lower than control group and commercial authentic levan group. Fecal excretion of bile acids was significantly increased by PBP supplementation in normal rats fed with high cholesterol diets.

The effects of PBP and LBP supplementation on lipid metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats was as follows. The level of GPT and GOP of PBP group were significantly lower than those of the control group. The serum triglyceride, total cholesterol and LDL-cholesterol were decreased than those of the control group, but there was no significant difference. Biopolymer did not affect fasting plasma glucose levels. Plasma glycosylated hemoglobin and serum insulin were not significantly different in diabetic rats.

In study for effectiveness on the skin and products from chunggukjang, current study tested the effect of carbomer and the biopolymer from chunggukjang on skin.

Skin affinity, moisturization, and UV blocking effects were measured with the two ingredient of CBP, PBP and LBP.

Upon the measurement of trans epidermal water loss (TEWL), and electric conductivity of skin (corneometer), PBP and LBP showed better or similar moisturization effect compared with carbomer which is usually used in cosmetics. However, the experiments showed that the ingredients could not block the UV.

The skin pH sustained after long-term use and skin irritation test turned out the degree of irritation is similar of the D.I. water that used in cosmetics. These experiments improved the ingredients have skin affinity.

Through the products and safety study for skin care, makeup, hair care using biopolymer, it turned out that the biopolymer could be a candidate as

emulsion stabilizer, viscosity controller in comparing with other polymers and the safety was very good.

In the test for the effectiveness on the skin, the biopolymer showed a similar or better results in comparing with other polymers used in commercial available cosmetics. The polymer showed also skin affinity.

## CONTENTS (영문목차)

Chapter I. Introduction .....	21
Chapter II. Current status of technology development in domestic and overseas .....	23
Chapter III. Contents and result of research .....	27
Section 1. What is chuggukjang? .....	27
Section 2. Biosynthetic pathway of biopolymer in chunggukjang. ....	27
Section 3. Preparation of mutants for hyperproducer of biopolymers .....	29
1. Materials and methods .....	29
가. Preparation of mutants .....	29
1) Strains used	
2) Isolation of mutants	
3) Composition ratio of biopolymer	
4) Assay of sugars in biopolymer	
5) Assay of glutamic acid in biopolymer	
6) Physicochemical characteristics of biopolymer	
7) Rheological characteristics of biopolymer	
2. Contents and results of research .....	31
가. Preparation of $\Psi$ -PGA hyperproducing mutants and levan hyperproducing mutants	
1) Isolation of mutants	
2) Assay of biopolymer	
가) Protein and sugar contents in biopolymer	
나) Unit sugar and amino acid contents in biopolymer	
Section 4. Cloning and characterization of genes for biopolymer production .....	36
1. Materials and methods .....	36
가. Chemical synthesis of primers for cloning of genes for biopolymer	
나. Condition for polymerase chain reaction.	
2. Contents and results of research. ....	37
가. Cloning and characterization of $\Psi$ -glutamyltransferase gene	
1) Structure of $\Psi$ -glutamyltransferase gene of chunggukjang biopolymer bacteria(CPB)	
나. Cloning and characterization of $\Psi$ -glutamyltranspeptidase gene	
다. Cloning and characterization of levansucrase gene	
Section 5. Optimal condition for biopolymer production .....	70
1. Materials and methods .....	70

가.	Cultural condition for biopolymer production	
1)	Conditions for levan hyperproduction.	
2)	Purification of biopolymer	
3)	Assay of total sugar	
4)	Assay of glutamic acid in biopolymer	
5)	Assay of protein	
2.	Contents and results of research	71
가.	Assay of biopolymer produced by levan hyperproducing producer(LBP)	
나.	Assay of biopolymer produced by PGA hyperproducing producer(PBP)	
다.	Assay of biopolymer	
Section 6.	Proteome analysis of biopolymer producers	77
1.	Materials and methods	77
가.	Growth condition	
나.	2-dimensional gel electrophoresis	
다.	Selection of protein spots	
라.	Identification of protein spots	
2.	Contents and results of research	79
Section 7.	The effects of chunggukjang biopolymer on anti obesity and anti diabetic mellitus in experimental rats	88
1.	Materials and methods	88
A.	Rheological properties and flow behavior of CBP, P-BP and L-BP biopolymer	
B.	The effects of chunggukjang biopolymer on anti obesity in experimental rats	
1)	Experimental rats	
2)	Experimental diets	
3)	Methods	
C.	The effects of chunggukjang biopolymer on anti diabetic mellitus in experimental rats	
2.	Results and Discussion	93
A.	Rheological properties and flow behavior of CBP, P-BP and L-BP biopolymer	
B.	The effects of chunggukjang biopolymer on anti obesity in experimental rats	
1)	Body weight gains, food intake and food efficiency ratio(FER)	
2)	Serum levels of triglyceride(TG), total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol and atherogenic index(AI)	
3)	Hepatic lipid profile and GPT, GOT	
4)	Hepatic microsomal HMG-CoA reductase activities	
5)	Fecal excretion levels of total neutral steroids and total bile acid	
C.	The effects of chunggukjang biopolymer on anti diabetic mellitus in experimental rats	

1) Body weight gains, food intake and food efficiency ratio(FER)	
2) Liver and kidney weight	
3) Hepatic lipid profile	
4) Serum phospholipid, glucose, HbA1c, insulin	
5) Serum lipid profile	
3. Summary and Conclusion .....	131
Section 8. P-BP and L-BP biopolymer on anti obesity and anti diabetic mellitus	
in experimental rats .....	134
1. Materials and Methods .....	134
1) Experimental rats	
2) Experimental diets	
3) Methods	
2. Results and Discussion .....	137
A. P-BP and L-BP biopolymer on anti obesity in experimental rats	
1) Body weight gains, food intake and food efficiency ratio(FER)	
2) Serum levels of triglyceride(TG), total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol and atherogenic index(AI)	
3) Hepatic lipid profile and GPT, GOT	
4) Hepatic microsomal HMG-CoA reductase activities	
5) Fecal excretion levels of total neutral steroids and total bile acid	
3. Summary and Conclusion .....	149
B. P-BP and L-BP biopolymer on anti diabetic mellitus in experimental rats	
1) Body weight gains, food intake and food efficiency ratio(FER)	
2) Liver and kidney weight	
3) Hepatic lipid profile	
4) Serum phospholipid, glucose, HbA1c, insulin	
5) Serum lipid profile	
6) Summary and Conclusion	
Section 9. The study of effective system on skin stability of chunggukjang	
biopolymer .....	152
1. Materials and Methods .....	152
1) Measurement of skin affinity and functionality	
2) Measurement of skin greasiness and moisture	
3) Measurement of melanin, stigmatism and skin pH	
4) Measurement of TEWL and skin elasticity	
5) Skin affinity functionality and on sun protection factor	
2. Results and Discussion .....	155
1) Measurement of skin affinity and functionality	
2) Measurement of skin greasiness and moisture	
3) Measurement of melanin, stigmatism and skin pH	

- 4) Measurement of TEWL and skin elasticity
- 5) Skin affinity functionality and on sun protection factor
- 4) Measurement of TEWL and skin elasticity
- 5) Skin affinity functionality and on sun protection factor

[Section 10]. The study of skin effectiveness and formulation on P-BP and L-BP biopolymer ..... 161

- 1. Materials and Methods ..... 161
  - 1) Effectiveness in products
  - 2) Affinity and functionality on skin and hair in products
  - 3) Product stability and formulation in emulsification and dispersion states of biopolymers
  - 4) Skin care, make-up and hair care testing product
- 2. Results and Discussion ..... 167
  - 1) Effectiveness in products
  - 2) Affinity and functionality on skin and hair in products
  - 3) Product stability and formulation in emulsification and dispersion states of biopolymers
  - 4) Skin care, make-up and hair care testing product

## 목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요 .....	21
제 2 장	국내외 기술개발 현황 .....	23
제 3 장	연구개발 수행 내용 및 결과 .....	27
제1절	청국장이란? .....	27
제2절	청국장 Biopolymer 생산 경로 .....	27
제3절	Biopolymer 생산증대 변이주 제작 .....	29
1.	연구수행 방법 .....	29
가.	변이주의 제작 .....	29
1)	사용균주 .....	29
2)	돌연변이주의 분리 .....	29
3)	Biopolymer의 구성비 측정 .....	30
4)	Biopolymer의 구성당 함량 측정 .....	30
5)	Biopolymer의 glutamic acid 함량 측정 .....	30
6)	Biopolymer의 물성학적 특성 .....	30
7)	Biopolymer의 유동학적 특성 .....	30
2.	연구수행 내용 및 결과 .....	31
가.	γ-PGA의 생산량 증대변이주 및 Levansucrase 생산량 증대변이주의 제작 .....	31
1)	변이주의 분리 .....	31
2)	Biopolymer의 분석 .....	32
가)	Biopolymer의 단백질 및 총당함량 .....	32
나)	Biopolymer의 구성당 및 구성아미노산 함량 측정 .....	33
제4절	Biopolymer 생산 유전자 클로닝 및 구조분석 .....	36
1.	연구수행 방법 .....	36
가.	Biopolymer 생합성 유전자 클로닝용 primer 의 제작 .....	36
나.	Polymerase Chain Reaction(PCR)의 조건 .....	36
2.	연구수행 내용 및 결과 .....	37
가.	γ-Glutamyltransferase gene 의 클로닝 및 염기배열 결정 .....	37
1)	모균주 CBP의 γ-glutamyltransferase유전자의 클로닝 및 구조 ·	38
나.	γ-Glutamyltranspeptidase gene의 클로닝 및 염기배열결정 .....	49
다.	Levansucrase gene의 클로닝 및 염기배열결정 .....	60
제5절	Biopolymer 생산최적조건 .....	70
1.	연구수행 방법 .....	70
가.	Biopolymer의 배양학적 특성조사 .....	70
1)	Levan 우위 biopolymer 생산조건 검토 .....	70
2)	Biopolymer의 제조 .....	70
3)	총당 함량 측정 .....	70
4)	Biopolymer의 glutamic acid의 함량 측정 .....	70
5)	단백질 함량측정 .....	71

2. LBP에 의해서 생산된 Levan 우위 biopolymer 분석 결과 .....	71
3. PBP에 의해 생산된 PGA 우위 biopolymer 분석 결과 .....	74
4. 최종생산 biopolymer의 분석 .....	75
제6절 Biopolymer 생산균의 proteome 분석 .....	77
1. 연구수행 방법 .....	77
가. 균주배양 .....	77
나. 이차원 전기영동 .....	77
다. Spot의 선별 .....	78
라. 동정 .....	78
마. 트립신 처리 .....	78
바. MALDI-TOF .....	78
2. 연구수행 내용 및 결과 .....	79
가. $\Psi$ -PGA우위 생산변이주의 proteome분석 .....	79
나. Levan 생산 변이주의 proteome 분석 .....	79
제7절 $\Psi$ -PGA우위 및 levan우위 각 biopolymer의 항비만·항당뇨 관련 효능 검정 .....	88
1. 연구수행 방법 .....	88
가. 청국장유래 biopolymer, $\Psi$ -PGA우위 및 levan우위의 각 biopolymer의 물성 및 유동학적 특성조사 .....	88
1) Biopolymer의 물성학적 특성 .....	88
2) 유동학적 특성 .....	88
3) 겔보기점도의 온도와 농도 의존성 조사 .....	89
나. 청국장 유래 biopolymer 의 항비만 효능검정 .....	90
1) 재료 및 방법 .....	90
가) 실험 동물 .....	90
나) 실험식이 .....	91
다) 실험방법 .....	92
(1) 체중 측정 및 실험 식이 섭취량 측정 .....	92
(2) 장기채취 .....	92
(3) 혈청의 중성지방, 총콜레스테롤, total cholesterol, HDL - cholesterol, LDL-cholesterol and atherogenic index(AI)측정 .....	92
다. 청국장 유래 biopolymer의 항고지혈 효능검정 .....	92
1) 간조직중의 지질성분 분석 .....	92
2) 변중 중성 스테로이드 및 담즙산 함량 측정 .....	93
3) 간조직 microsomal HMG-CoA reductase의 활성 측정 .....	93
라. 청국장 유래 biopolymer의 항당뇨효능 검정 .....	93
1) 실험 동물 .....	93
2. 연구수행 내용 및 결과 .....	93
가. 청국장유래 biopolymer, $\Psi$ -PGA우위 및 levan우위의 각 biopolymer의 물성 및 유동학적 특성조사 .....	93
1) 유동학적 특성 .....	93
2) 농도 변화에 따른 유체 흐름 특성 .....	94

3) pH변화에 따른 유체 흐름 특성 .....	99
4) 온도변화에 따른 유체흐름 특성 .....	104
5) 겔보기 점도의 변화 .....	109
6) 겔보기 점도의 온도 의존성 .....	110
7) 겔보기 점도의 농도의존성 .....	114
나. 청국장 유래 Biopolymer의 콜레스테롤 저하 효능 .....	118
1) 간 지질 성분에 미치는 영향 .....	118
2) 간의 HMG Co A reductase activities에 미치는 영향 .....	119
3) 분변의 총 중성지질, 담즙산 배설에 미치는 영향 .....	120
다. 청국장 유래 Biopolymer의 항고지혈 효능 .....	121
1) 체중증가량, 평균식이 섭취량, 식이효율(FER) .....	121
2) 혈청 지질농도 및 혈청지표에 미치는 영향 .....	121
라. 청국장 유래 Biopolymer의 항당뇨 효능 검정 .....	123
1) 체중증가량, 평균식이 섭취량, 식이효율(FER) .....	123
2) 혈청 지질농도 및 혈청지표에 미치는 영향 .....	125
3) 혈중 인지질, glucose, HbA1c, Insulin에 미치는 영향 .....	127
4) 간장 및 신장무게에 미치는 영향 .....	128
5) 간의 지질조성에 미치는 영향 .....	129
3. 요약 .....	131
제 8절. $\Psi$ -PGA 우위 biopolymer와 Levan 우위 biopolymer의 콜레스테롤 저하 및 항고지혈 효능 검정 .....	134
1. 연구수행방법 .....	134
가. $\Psi$ -PGA 우위 biopolymer와 Levan 우위 biopolymer의 콜레스테롤 저하 및 항고지혈 효능 .....	134
1) 실험 동물 .....	134
2) 실험식이 .....	134
3) 실험방법 .....	136
가) 체중 측정 및 실험 식이 섭취량 측정 .....	136
나) 장기채취 .....	136
다) 혈청의 중성지방, total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol and atherogenic index(AI)측정 .....	136
라) 간조직중의 지질성분 분석 .....	136
마) 변중 중성 스테로이드 및 담즙산 함량 측정 .....	136
바) 간조직 microsomal HMG-CoA reductase의 활성 측정 .....	137
2. 연구수행 내용 및 결과 .....	137
가. 체중증가량, 평균식이 섭취량, 식이효율(FER) .....	137
1) 혈중 지질농도 및 혈청지표에 미치는 영향 .....	138
2) 간 지질 성분에 미치는 영향 .....	140
3) 간의 microsomal HMG-CoA reductase activities에 미치는 영향 .....	141
4) 분변의 총 중성스테로이드, 담즙산 배설에 미치는 영향 .....	142
나. $\Psi$ -PGA 및 Levan 우위 biopolymer의 항당뇨 효능 검정 .....	143
1) 체중증가량, 평균식이 섭취량, 식이효율(FER) .....	143
2) 간 및 신장 무게, GPT, GOP에 미치는 영향 .....	144

3) 간의 지질성분에 미치는 영향 .....	144
4) 혈청 지질농도 및 혈청지표에 미치는 영향 .....	145
5) 혈중 phospholipid, glucose, HbA1c, Insulin 농도에 미치는 영향 .....	147
3. 요약 .....	149
제9절 청국장 유래 biopolymer 성분의 피부안정성에 대한 효능효과 시스템 연구 .....	152
1. 연구수행 방법 .....	152
가. 피부에 대한 친화성 및 기능성 검정 .....	152
1) 측정방법 .....	152
2) 실험방법 .....	152
가) 조건 .....	152
나) 측정시료 .....	152
다) 판정기준 .....	152
나. 피부 유분 및 수분 측정 .....	152
1) 측정기기 .....	152
2) 실험방법 .....	153
가) 조건 .....	153
나) 측정시료 .....	153
다) 측정횟수 .....	153
라) 수분보유량 변화율 계산 .....	153
다. 멜라닌, 홍반 측정 및 피부 pH 측정 .....	153
1) 측정기기 .....	153
2) 실험방법 .....	154
가) 조건 .....	154
나) 측정시료 .....	154
다) 측정횟수 .....	155
라. 경표피 수분손실량 및 피부탄력 측정 .....	155
1) 측정기기 .....	155
2) 실험방법 .....	155
가) 조건 .....	155
나) 측정시료 .....	155
다) 측정횟수 .....	155
라) 계산법 .....	155
마. 자외선 차단지수 측정 .....	155
1) 측정기기 .....	155
2) 실험방법 .....	155
가) 조건각 .....	155
나) 측정방법 .....	155
2. 연구수행 내용 및 결과 .....	155
가. 피부에 대한 친화성 및 기능성 검정 .....	155
나. 피부 유분 및 수분 측정 .....	156
다. 멜라닌, 홍반 측정 및 피부 pH 측정 .....	157
라. 경표피 수분 손실량 및 피부탄력 측정 .....	157

마. 자외선 차단지수 측정 .....	159
3. 요약 .....	159
제10절 ▼-PGA 우위 및 levan 우위 biopolymer 성분에 대한 피부 유효성 및 제형화 연구 .....	161
1. 연구수행방법 .....	161
가. 제품의 유효성 연구 .....	161
1) 기초화장품류 .....	161
가) 제형화 연구 .....	161
나) 제형의 물성(pH, 점도) 평가 .....	161
다) 제형 안정성 평가 .....	161
(1) 온도안정성 .....	161
(2) 광안정성 .....	161
(3) 상태안정성 판단기준 .....	162
2) 색조화장품류 .....	162
가) 제형화 연구 .....	162
나) 제형의 물성 평가 .....	162
(1) 경도 측정 .....	162
(가) 립스틱류 .....	162
(나) 투웨이케익 .....	162
(2) 융점 측정(립스틱) .....	162
(3) 성형성(투웨이케익) .....	162
다) 제형 안정성 평가 .....	163
(1) 립스틱 .....	163
(가) Sweating 정도 .....	163
(나) 내온성 .....	163
(2) 투웨이케익 .....	163
(가) 내온성 .....	163
라) 상태안정성 판단기준 .....	163
3) 모발화장품류 .....	163
가) 제형화 연구 .....	163
나) 제형의 물성(pH, 점도) 평가 .....	164
다) 제형 안정성 평가 .....	164
(1) 온도안정성 .....	164
(2) 광안정성 .....	164
(3) 상태 안정성 판단기준 .....	164
나. 제품의 피부 유효성 연구 .....	164
1) 기초화장품류 .....	164
가) 수분보유능 .....	164
(1) 측정기기 .....	164
(2) 실험방법 .....	164
(3) 측정시료 .....	165
(4) 측정횟수 .....	165
(5) 수분보유량 변화율 계산 .....	165

나) 경표피 수분 손실량(TEWL) .....	165
(1) 측정기기 .....	165
(2) 실험방법 .....	165
(3) 측정시료 .....	165
(4) 측정횟수 .....	166
(5) 계산법 .....	166
2) 색조화장품 .....	166
3) 모발화장품류 .....	166
다. 제품류에 대한 피부 친화력 .....	166
2. 연구내용 및 결과 .....	167
가. 제품의 유효성 연구 .....	167
1) 기초화장품류 .....	167
가) 스킨 제형 .....	167
나) 로션, 크림제형 .....	168
다) 에센스 제형 .....	169
2) 색조화장품류 .....	170
가) 립스틱 제형 .....	170
나) 투웨이케익 제형 .....	171
3) 모발화장품류 .....	171
나. 제품의 피부 유효성 연구 .....	172
1) 기초화장품류 .....	172
가) 수분보유능 .....	172
(1) 스킨제형 .....	172
(2) 로션, 크림 제형 .....	173
(3) 에센스 제형 .....	175
다. 유화 및 분산 상태에 따른 안정성 및 제형화 연구 .....	175
1) 기초화장품류 .....	176
2) 경표피 수분 손실량(TEWL) .....	176
3) 색조화장품류 .....	178
가) 립스틱 제형 .....	178
(1) 투웨이케익 제형 .....	179
라. 제품류에 대한 피부 친화력 .....	180
3. 시제품화 .....	181
가. 기초화장품 4종 (스킨, 로션, 크림, 에센스) .....	181
나. 색조화장품 2종 (립스틱, 투웨이케익) .....	181
4. 요약 .....	183
제 4 장    목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	186
제 5 장    연구개발결과의 활용계획 .....	191
제 6 장    연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	192
제 7 장    참고문헌 .....	193



# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1절 연구개발의 목적

최근 경제성장, 의학의 발전, 식생활의 개선 등으로 매년 평균수명이 증가하고 있는 추세이다. 2002년 우리나라 남성의 평균수명은 73.4세, 여성은 80.4세로 지난 10년 사이에 남성, 여성 모두 5 - 7세의 평균 수명이 증가하였다. 한국인의 주요 사망원인(2003년)으로는 암, 뇌혈관질환, 심장질환, 당뇨병의 순이며 지난 10년 동안 사망률이 증가한 질병은 암, 당뇨병, 허혈성 심장질환이다. 그 중 식사요인의 영향을 많이 받는 질환인 당뇨병이 인구 십만명 당 8.7명, 허혈성 심장질환이 11.3명으로 증가하였으며, 노인기 삶을 위협하는 중요한 원인들이 되고 있다(통계청 ; 2003). 비만은 최근 질병으로 분류되면서 건강의 대표적인 위험요인으로 간주되고 있는데, 2001년 국민영양조사의 결과로 우리나라는 20세 이상 성인의 27.4%가 경도비만(BMI 25.0 - 29.9 %), 3.2%가 고도비만(BMI 30.0이상)에 해당하는 것으로 발표됨으로서 성인의 23.9%가 경도비만 및 2.47%가 고도비만으로 국내 비만인구가 계속적인 증가 추세에 있다고 보고하였다(보건복지부 ; 2002).

비만으로 인하여 발생하는 합병증으로 고지혈증, 고혈압, 심혈관계 질환 및 뇌졸중의 발생이 증가하며 말초조직의 중성지방 증가로 인슐린 저항성이 유발되어 제2형 당뇨병이 발생할 수도 있다. 당뇨병은 췌장에서 분비되는 호르몬인 인슐린이 부족하거나 인슐린 작용이 저하되어 발생하며 고혈당과 합병증 중 지질대사 이상을 특징으로 하는 만성 퇴행성 질환이다. 당뇨병의 지질대사 이상으로는 혈중 중성지방, 총 콜레스테롤의 증가와 HDL-콜레스테롤이 감소하는 특징을 보인다(Reaven GM ; 1987, Yeh SL et al ; 1998). 이로 인해 당뇨병의 주 합병증인 대혈관 질환인 동맥경화(뇌, 심장, 미세혈관포함)의 위험을 높이는 요인이 되며, 또한 당뇨병 환자에 있어 심혈관계 질환의 사망률이 정상인의 2 - 5배에 달한다고 보고되었다(Eastman RC and Keen H ; 1997).

청국장은 전롱에 미생물(*Bacillus subtilis*)의 작용으로 조직을 연화시킨 대표적인 우리나라 대두발효 식품으로 대두의 단백질과 이소플라본 외에 발효

과정 중 생리활성 물질의 생산을 기대하고 있다. 그 중 청국장 발효과정 중에 생성되는 점질물에 대한 관심이 높아지고 있으며 구성성분은 gamma-poly-glutamic acid( $\gamma$ -PGA)와 fructose 중합체인 레반의 혼합물로 biopolymer임이 밝혀졌다(Lee YL 등 1992).

레반은 동물(Kang 등 ; 2002)과 사람(Kang 등 ; 2003)을 대상으로 한 실험에서 혈중지질 감소효과가 나타났다. 또한 gamma-poly-glutamic acid( $\gamma$ -PGA)는 지방간 쥐의 경우 고당질 식이를 섭취한 대조군은 간의 지방함량이 증가하였으나 고당질식이에 glutamine을 보충한 식이를 섭취시킨 경우 간의 지방함량이 고당질식이만 섭취한 군에 비하여 낮았다고 보고하였다(Li S et al ; 1990). 또한 굵긴 개에게 glutamine을 경구 투여 하였을 때 혈중 지방산과 글리세롤, 케톤체를 감소시켰고 간의 글리세롤 흡수를 감소시켰다고 보고되었다. (Cersosimo E et al ; 1986)

이와 같이 청국장 점질물은 구성성분이 규명되었으나 생리효과에 대한 보고는 없는 실정이다. 청국장과 유사한 균주를 이용한 일본의 natto 점질물의 물추출물은 지방대사 개선효과, 지질과산화 억제, LDL-콜레스테롤 저하 효과가 있음이 보고되었다(Yokota T. et al ; 1996). 그러나 이러한 점질물의 물추출물은 대두의 수용성 성분들이 함께 용출되기 때문에 정확한 biopolymer의 생리기능이라 단정하기는 어렵다.

그러므로 본 연구에서는 고콜레스테롤 식이를 한 쥐와 당뇨병 모델 쥐를 대상으로 청국장 biopolymer 및 PGA우위 biopolymer, levan 우위 biopolymer, 시판 levan을 식이로 보충하였을 때 흰쥐의 항비만 효과 및 항당뇨효과 중 항 고지혈 개선 효과를 알아보려고 하였다.

## 제 2장 국내외 기술개발 현황

동식물 및 미생물에 의해 생산되는 생체고분자물질(biopolymer)에는 고분자 peptide, 다당류(polysaccharide), 고분자유기산, 단백질, 핵산류 등이 있다(Sutherland, 1979 : Kang and Cottrell, 1989). 미생물에 의한 biopolymer의 발효생산은 고생산수율, 고품질의 생산물, 싸고 간편하며 풍부한 발효기질 물질, 재처리 회수, 연속배양기술에 의한 높은 생산성, 발효인자들의 조절 등에 따라 물성적인 성질, 순도, 종류의 다양성, 균일한 생산성 등의 생산 입지 조건의 장점 등으로 이에 대한 관심이 높아지고 있다. 그러나 발효설비의 설치와 운전에 대한 경제적인 부담, 배양액에서의 미생물의 제거, 발효조내 배양과정, 정상적인 교반 및 통기 등의 문제점도 있다(Sutherland, 1979).

미생물의 biopolymer물질로서 연구 및 상용화되고 있는 물질은 대부분 미생물 세포외로 분비되는 점액상의 extracellular polysaccharide의 일종인 xanthan gum, alginate, pullulan, curdlan, dextran 및 levan등의 단순 또는 복합 다당류물질(Ninomiya *et al.*, 1968 : Kang and Cottrell, 1979 : Hatcher, 1989 : Auer and Seviour, 1990)과 *Alcaligenes*속, *Pseudomonas*속, *Azotobacter*속 등을 이용한 polyhydroxy butyric acid ( PHB ) 생산 등의 연구가 활발하다(Sutherland, 1979 : Kang and Cottrell, 1989).

현재 biopolymer는 물질적, 생리적 특성을 이용하여 식품공업에서 광범위하게 사용되고 있다. 즉, 물성적 특성에 의한 물성개량제, 유화제, 안정제, 응고제로서 이용되거나 점착성, 윤활능을 이용한 식품의 안정감과 질감증가를 위한 첨가제로서, 표면장력 조절능의 특성을 기반으로 한 가공공정에서의 마찰력 감소, 결정질 크기조절 등에 사용되고 있다(Moore *et al.*, 1984 : Nakas and Henwood, 1989). 또한 biopolymer는 자기보호기능의 특성으로 인하여 이들 물질을 이용한 의료 및 제약공업에도 다양하게 이용되고 있다. Biopolymer의 생체적합성과 무독성을 갖는 특성을 이용한 수술용 인공 봉합사, 인공수정체, 수술용 슝, 접골 이음쇠의 생체 대체제 뿐만 아니라, 생리적 활성에 기인한 면역증강물질, 항종양제등의 의약품으로서 연구가 진행되고 있다(Burdon *et al.*, 1976 : Yashida *et al.*, 1988). 또한, 환경산업의 폐수정화용 응집제와 중금속 제거제 등으로, 산업용품으로써 연마제, 접착제, 도료, 서방성( controlled release )을 이용한 농약조제, 약품전달수단, 다이어트 식품 등

에 이르기까지 광범위하게 응용되고 있다(Shimamura *et al.*, 1987 : Yoshida, 1988). 이러한 biopolymer들 중 고분자peptide와 다당류는 미생물의 주위에 capsule(협막)이나 slime(점질물)의 형태로 존재하는데, 이들은 미생물의 배양상, 생육상의 대사 산물로서 바이러스의 감염에 대해 자신을 보호하는 기능과 독성물질의 중화, 극한 조건에서의 생체보호 기능성, 숙주가 갖는 탐식세포에 대한 저항성, 타 물체에 부착하는 기능성을 갖는 것으로 알려져 있다(Kang and Cottrell, 1979 : Moore *et al.*, 1984). 특히 협막성 biopolymer는 병원성 미생물의 항원으로서의 작용을 갖는 특성을 이용하여 세균질병의 백신개발에 이용되고 있다(Singh *et al.*, 1974 : Nakayama *et al.*, 1979).

우리나라의 청국장과 일본의 natto의 발효에 관여하는 *Bacillus*속 세균 (*Bacillus subtilis*와 *Bacillus natto*)이 생산하는 점성물질은 polysaccharide물질인 levan( polyfructan )과 polypeptide성 물질인 polyglutamic acid(PGA)가 혼합되어진 biopolymer물질이다(Hara and Ueda, 1982 : Lee *et al.*, 1992). Levan은 설당을 기질로 하여 생산되는  $\beta$ -2,6 polyfructan으로서 식물체에 존재하는  $\beta$ -2,1 polyfructan성분인 inulin과는 다른 구조체로 존재하고, 식물병원 균인 *Pseudomonas*속, *Xanthomonas*속, gram 양성인 *Bacillus*속과 *Streptococcus*속 등의 미생물에 의해서 생산되고 있다(Bacan and Edelman, 1950 : Whiting and Coggins, 1967 : Elisashvili, 1984). 특히 미생물에 의해서 생산되는 levan은 주로 배양학적 조건 즉, 배양시간, 온도, 배양 초기 pH, 산소농도, 교반속도 등에 의한 요인과 배양배지 내 탄소원, 질소원, 무기이온 등의 영양적인 요인과 발효방식에 의해 생산량과 특성이 좌우된다고 알려져 있다(Ninomiya and Kizaki, 1968 : Jarrell *et al.*, 1979 : Sutherland *et al.*, 1979 : Auer and Seviour, 1990). 미생물에 의한 levan의 합성은 levansucrase의 작용에 의해 이루어진다고 알려져 있고(Hestrin *et al.*, 1943 : Tanaka, *et al.*, 1978 : Iizuka, 1988) 그 효소를 이용한 levan의 생산과 효소에 대한 특성 등의 연구가 보고되어 있다(Matton *et al.*, 1955 : Hestrin *et al.*, 1956 : Dedonder and Peaud-Lenoel, 1957 : Tanaka *et al.*, 1979 : Reilly, 1990). 이러한 levan에 대한 응용은 biopolymer의 응용학적 측면과 유사하여 혈장제(Han, 1990), 약리효과 증강제(Leibovici *et al.*, 1985 : Stark and Leibovici, 1986), 식품공업( Whiting and Coggins, 1967 : Elisashvili, 1984 :

Hatcher 1989 : Han, 1990), 의약분야(Shioda *et al.*, 1971)등 광범위한 이용성과 응용분야에 대한 연구가 행해지고 있다.

PGA는 homopolypeptide성 물질로써 1937년 *Bacillus anthracis*의 협막 (capsule)성분으로 처음 발견되었다. *Bacillus*속의 일부 균주(*B. anthracis*, *B. megaterium*등)에 의해서는 액체배양시 세포의 생산물로써 협막의 구성성분으로 존재하나 *B. subtilis*와 그 변이주에 의해서는 세포외로 PGA를 생산하는 것으로 알려져 있다. 대개, *B. anthracis*의 PGA구성성분은 D-glutamic acid로만 구성되어있는 물질이지만 *B. subtilis*와 *B. megaterium*균주가 생산하는 PGA성분은 D-체와 L-체의 glutamic acid가 혼합되어 존재한다고 보고되어 있다(Watson *et al.*, 1947 : Thorne *et al.*, 1954). 특히, *B. subtilis*에서 생산되는 PGA에 대한 연구가 지속적으로 진행되어서 Thorne등(1954)이 배지의 조성을 변화시켜 대량배양을 위한 배양상의 특징을 조사하였다(Leonard *et al.*, 1958). PGA생산용 배양 배지내  $K^+$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $PO_4^{3-}$ 등의 무기염 이온인자들은 PGA의 생산과 D-, L- 구성체의 비에 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Housewright, 1962). 미생물에 의해 생산되는 PGA의 glutamic acid의 형태는  $\Psi$ -결합의 형태로서 이들  $\Psi$ -결합에  $\Psi$ -glutamylpolypeptidase라는 효소가 관여하는 것으로 알려졌다(Leonard, *et al.*, 1958).  $\Psi$ -Glutamyltransferase효소는 2가지 종류로 존재하는데 첫번째는 glutamine에서 각종 amine으로  $\Psi$ -glutamyl기를 전이해주는 효소이고 두 번째는 glutathion의  $\Psi$ -glutamyl기를 아미노산이나 peptide로 전이해주는 효소이다(Housewright, 1962). 그러나, PGA의  $\Psi$ -glutamyl기의 전이는  $\Psi$ -D-glutamyl-D,L-glutamic acid의 생합성에 관여하는 transpeptidase가 촉매하는 것으로 알려져 있다. 이 효소는 D-, L- glutamine의 가수분해나 glutamine과 glutamic acid사이의 transamidation,  $\Psi$ -D-glutamyl-D,L-glutamic acid의 transpeptidation에 관여하는 효소로 알려져 있다(Willans and Thorne, 1954 a, b : Williams *et al.*, 1955). PGA의 응용학적 측면에서 현재 까지 알려진 바로는 식세포 방어작용, 항원성 물질, 혈장 증량제 등에 대한 응용이 보고되고 있다(Thorne, 1954 a, b. : Housewright, 1962). 또, 최근에는 환경친화성 물질에 대한 관심과 환경오염에 대한 규제의 비용 등으로 plastic을 대체할 수 있는 biodegradable polymer로써 PGA에 대한 이용성 연구가

행해지고 있다(Giannos, *et al.*, 1990).

미생물을 이용한 유용물질의 생산에서 발효의 효율성을 높이는데 가장 근본적인 일은 발효에 관여하는 우수 미생물의 분리와 생산성 향상과 품질개선에 균주의 개량 및 육종이 이루어져야 한다. 이러한 미생물의 개량과 육종에는 돌연변이주의 획득, 유전자 조작에 의한 DNA 재조합, 형질전환, 형질도입, 세포융합 등의 방법이 널리 이용되고 있다(고영희, 1987). 그중 세포융합기술은 유전 교환계가 알려지지 않은 미생물 세포 등에 널리 이용되고 있다. 특히 세포융합은 조작이 간단하고 재조합 균주의 출현빈도가 높으며, 물리화학적 조작에 의한 속, 종 뿐 아니라 자웅의 구별 없이 융합이 가능하다는 장점이 있다(Kao *et al.*, 1974 : Fordor and Alfoldi, 1976 : Schaeffer, *et al.*, 1976). 대개 미생물이 생산하는 biopolymer는 분자상의 구조가 복잡하고 기본적인 성질이 다양하여 특수한 용도로서 이용성이 광범위하게 인식되고 있다. 또한, 최근에 다당류 등의 biopolymer의 화학적 구조 및 물성학적인 특성에 관한 기존연구와 더불어 alginate, xanthan gum 등의 다당류를 생산하는 미생물의 유전자 조작에 위한 수율을 높이는 연구와 독특한 기능을 가진 biopolymer를 생산하는 미생물의 균주 개발 연구가 이루어지고 있다(Goldberg and Ohman, 1987 : Harding *et al.*, 1987 : Morris, 1990). 그러나, 산업적으로 이용성이 높으며 유전 교환계가 알려지지 않은 세균세포에 대한 유전적 조작은 복잡하고 levan과 PGA와 같은 복합 화합물을 구성하고 있는 biopolymer를 생산하는 *Bacillus*속 균주에 대한 유전적 조작에 대한 관심이 높아지며 다양한 연구가 행해지고 있으나 대량생산과 연관한 산업적 생산에 이르지 못하고 있는 실정이다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제1절 청국장이란?

청국장(Chung-guk-jang)이란 익힌 콩을 재료로 사용하여, 미생물이 발효를 수행함으로써 생산되는 전통식품이다. 우리나라에서는 삼국시대에 이미 생산이 시작된 점을 감안하면, 그 제조 및 이용의 역사가 1500년 정도 된다고 생각할 수 있다. 이전의 시대를 살고 간 우리민족의 조상들이 미생물에 관한 지식을 어느 정도 구비하고 있었는지 정확히 측정할 수는 없지만, 현대과학의 지식을 총동원하여 청국장의 약리활성을 확인한 결과, 이미 언급한 부분에서 기술된 것과 같이 실로 다양하고도 중요한 생리활성을 가지고 있음이 확인되었는데, 이들 활성을 담당하고 있는 요소로는, 청국장 세균이 생산하는 PGA와 levan으로 구성된 biopolymer가 중요한 역할을 수행할 것으로 추정된다.

### 제2절 청국장 Biopolymer 생산 경로

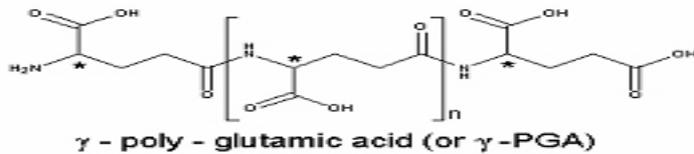
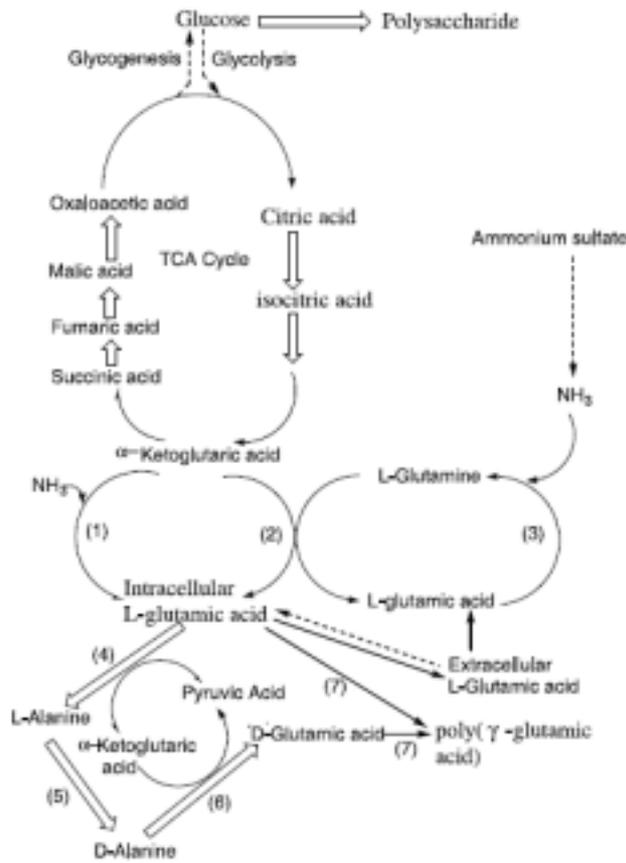


Fig.3.2.1.  $\gamma$ -poly-glutamic acid(or  $\gamma$ -PGA)

청국장에서 생산되는 주요 biopolymer 는  $\gamma$ -PGA와 levan 이다.  $\gamma$ -PGA 생합성경로는 그림 3.2.2와 같이 묘사될 수 있으며, 이 중에서 가장 중요한 효소로 열거할 수 있는 것은  $\gamma$ -glutamyltransferase와  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase이다. levan 의 생합성은 levansucrase 가 촉매하며, sucrose를 기질로 사용하여 이루어진다.

$\gamma$ -PGA는 청국장의 끈적끈적한 점액성의 성분으로, 수용성, 음이온성, 생분해성, 및 식용의 아미노산인 고분자의 소재로서 의약품, 화장품, 환경용, 공업용 소재 등으로 적용 범위가 매우 다양한 Biopolymer 이다. *B. subtilis* IFO 3335에 의한  $\gamma$ -PGA의 합성 경로는 다음과 같다. (Ing-Lung Shih, 2001)



- (1) Glutamate dehydrogenase (GDH)
- (2) Glutamate 2-oxoglutarate(α-ketoglutarate) aminotransferase(GOGAT)
- (3) Glutamine synthetase (GS)
- (4) L-Glutamic acid : Pyruvic acid aminotransferase
- (5) Alanine racemase
- (6) D-Glutamic acid : Pyruvic acid aminotransferase
- (7) PGA synthetase

Fig. 3.2.2. Pathway of  $\gamma$ -polyglutamic acid synthesis in *B. subtilis* IFO3335

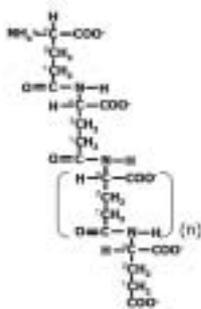


Fig. 3.2.3. Poly- $\gamma$ -glutamic acid 의 구조



### 3) Biopolymer의 구성비 측정

Biopolymer 분석에 사용된 시료는 모균주 *B. subtilis* CBP과 2개의 변이주를 각각 TSB에서 전배양 시킨 것을 biopolymer생산용 배지에 접종하여 37°C의 회전 진탕배양기에서 200 rpm으로 3일간 배양 후 원심 분리하여 얻은 상정액에 2배양의 methanol을 첨가 후 침전물을 회수하였다. 이 침전물을 다시 증류수에 재용해시킨 후, methanol을 첨가하여 침전물을 회수하는 방식으로 3회 반복하여 최종적으로 얻은 침전물을 증류수에 용해시켜 증류수에 대해 24시간 투석시키고, 이를 동결 건조시켜 biopolymer분석 실험의 시료로 사용하였다.

### 4) Biopolymer의 구성당 함량 측정

Levan의 구성당인 fructose함량을 측정하기 위하여 biopolymer 10 mg을 각각 칭량하고 3 N-HCl 10 ml를 첨가하여 100°C, 3시간 산가수분해시킨 것을 3 N NaOH로서 중화 후, 이를 감압 농축시켜 HPLC용 증류수 10 ml에 재용해 시켰다. 이 용액을 0.45  $\mu$ m membrane filter로 여과시켜 Sep-Pak C18(Waters Co.)으로 처리한 후 HPLC로 분석하였다. 이때 사용된 HPLC의 분석조건은 Table 1과 같으며 fructose함량은 표준물질의 비례농도에 대한 1차 회귀분석곡선( R<sup>2</sup>=0.9995 )으로 산출하였다.

### 5) Biopolymer의 glutamic acid함량 측정

Polyglutamic acid(PGA)를 구성하는 glutamic acid 함량을 조사하기 위해 biopolymer를 각각 10 mg 씩을 칭량하여, 6N HCl 10 ml를 첨가 후 110°C에서 24시간 가수분해하여 감압 농축시킨 것을 sodium citrate buffer(pH 2.1) 10 ml에 재용해시켜 0.45  $\mu$ m membrane filter로 여과한 후, Amino acid auto analyzer로서 Table 2의 조건으로 분석하였다. 이때 glutamic acid 함량은 표준곡선의 glutamic acid 면적비로부터 산출되었다.

Table 3.1.1. HPLC conditions for sugar analysis of biopolymer.

Items	Conditions
Instrument	Analytical HPLC, LC-10A(Shimadzu Co. Japan)
Column	μBondapak NH <sub>2</sub> column( 3.9 mm×300 mm )
Column heating temperature	60°C
Detector	RID-10A
Mobil phase	Acetonitrile : water, 75: 25 ( v/v )
Flow rate	1.0 ml/min
Sample injection volume	20 μl
Integrator program	Class LC 10(Shimadzu Co.)

Table 3.1.2. Amino acid autoanalyzer conditions for amino acid analysis of biopolymer.

Items	Conditions
Instrument	Auto amino acid analyzer(SYKAM Co., Germany)
Column	150 × 4.0mm(PEEK)
Mobile phase	Sodium citrate buffer( pH 2.1 )
Reagent flow rate	0.25 ml/min
Reactor temp.	130°C
Injection volume	100 μl
Channel	440nm, 570 nm

## 2. 연구수행 내용 및 결과

가. Ψ-PGA의 생산량 증대변이주 및 levansucrase 생산량 증대변이주의 제작

### 1). 변이주의 분리

모균주인 *Bacillus subtilis* CBP 균주를 UV 및 MNNG로서 변이 처리한 것을 CM에서 배양한 후 그 중 MM에서 생육하지 않는 균주 중 형태학적으로 변화가 있는 30여종을 1차 선발하였다. 1차 선발한 균주를 대상으로 biopolymer 생산배지에 액체 배양하여 배양액내 biopolymer 생산량이 우수한

변이주 10여종을 2차선별 하였다. 이들 biopolymer를 분석하여 biopolymer(PGA 와 levan)의 구성비가 모균주와 완전히 다른 변이주 2종을 최종 선발 하였다.

## 2) Biopolymer의 분석

### 가) Biopolymer의 단백질 및 총당함량

모균주와 2개의 변이주가 생산하는 biopolymer의 구성성분 물질로서 PGA와 levan의 함량을 각각 단백질함량과 총당의 함량으로 조사한 결과는 Table 3.2.1와 같다. 변이주 PBP균주가 생산한 biopolymer(A)가 단백질함량이 55.5%로 상대적으로 두 균주 보다 높은 것으로 나타났다. 또 *B. subtilis* CBP이 생산하는 biopolymer(C)의 단백질함량은 17.5%로, LBP균주가 생산하는 biopolymer(B)의 단백질함량은 20.1%보다 함량이 낮았다. 변이주 PBP의 biopolymer가 다른 두 biopolymer보다 단백질함량이 높은 것은 상대적으로 높은  $\pi$ -GTP활성에 의해 생성된 PGA가 levan 보다 함량이 많기 때문인 것으로 사료된다.

총당 함량은 biopolymer A가 40.8%, biopolymer B가 70.9%, biopolymer C가 62.5%로 나타났다. 따라서 biopolymer의 구성비를 단백질함량과 총당 함량으로 나타내었을 때 biopolymer A는 PGA와 levan이 대략 55 : 40으로, biopolymer B는 20 : 70으로, biopolymer C는 17 : 62의 비율로 구성되어 있는 것으로 추론할 수 있다. 그러나 이와 같은 단백질함량과 총당 함량으로서 biopolymer의 구성성분에 대한 비는 구성성분의 함량에 대한 정확한 값이 구해졌을 때 가능할 것으로 사료된다.

Table 3.2.1. Protein and total sugar contents of biopolymer produced by mutants and *B. subtilis* CBP.

Composition Items	Biopolymer sample		
	A	B	C
Protein(%)	55.5 ± 1.5	20.1 ± 1.2	17.5 ± 0.9
Total sugar(%)	40.8 ± 1.2	70.9 ± 1.7	62.5 ± 2.7
Others(%)	2.7	2.4	3.2

- \* A : Biopolymer sample produced by Mutant PBP
- \* B : Biopolymer sample produced by Mutant LBP
- \* C : Biopolymer sample produced by *B. subtilis* CBP

나) Biopolymer의 구성당 및 구성아미노산 함량 측정

2개의 변이주와 모균주가 생산하는 biopolymer의 구성성분에 대한 정확한 함량비를 구하기 위하여 구성당을 HPLC로 분석한 결과는 Fig. 3.2.1의 chromatogram과 같다. Chromatogram상에서 3가지 biopolymer의 분해물은 fructose의 단일 peak로 이루어진 것으로 확인되었다. 따라서 두 변이주와 모균주가 생산하는 biopolymer 구성성분 중 다당 성분은 fructose만으로 구성된 levan성분임을 알 수 있었다. 세 종류의 biopolymer내 fructose함량을 조사한 결과는 Table. 3.2.2과 같다. Biopolymer A의 fructose 함량은 260.2 mg/g, biopolymer B의 fructose 함량은 604.1 mg/g, biopolymer C는 326.2 mg/g으로 나타났다. 또 세 biopolymer A, B, C의 구성 아미노산을 분석한 결과는 Fig. 3.2.2의 chromatogram A, B, C와 같다. Biopolymer 구성 아미노산은 거의 대부분 glutamic acid로 구성되어 있었다. 이 chromatogram을 토대로 glutamic acid의 함량을 조사한 결과(Table 3.2.3) biopolymer A의 glutamic acid 함량은 516.3 mg/g, biopolymer B는 124.4 mg/g, biopolymer C는 101.3 mg/g으로 나타났다. Fructose와 glutamic acid의 두 성분간의 함량비를 계산해 보았을 때 biopolymer A는 glutamic acid와 fructose의 비가 66 : 34, biopolymer B는 18 : 82, biopolymer C는 24 : 76의 비로 함유되어 있었다. 따라서 변이주에 의해 생산된 biopolymer는 모균주보다 구성상태가 변화된 biopolymer를 생산한 것으로 판단되어 물질의 구성적, 물질적 특성이 변화된 biopolymer를 생산할 수 있을 것이라 사료된다.

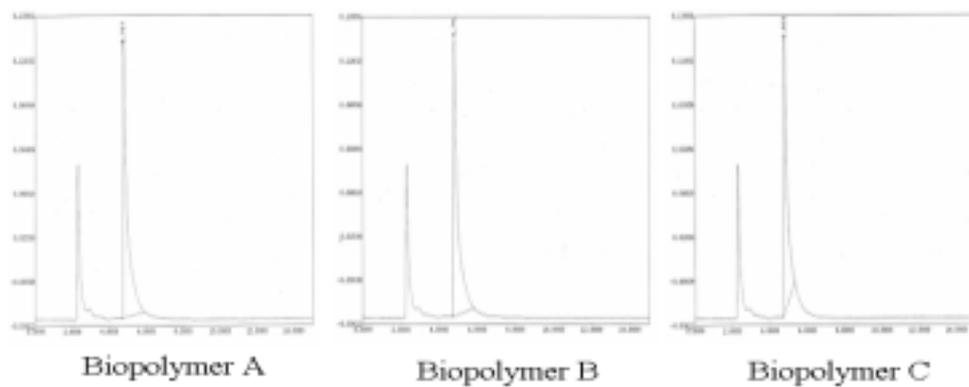


Fig. 3.2.1. HPLC chromatograms of the hydrolysates of biopolymer produced by mutants PBP(A), LBP(B) and *B. subtilis* CBP(C).

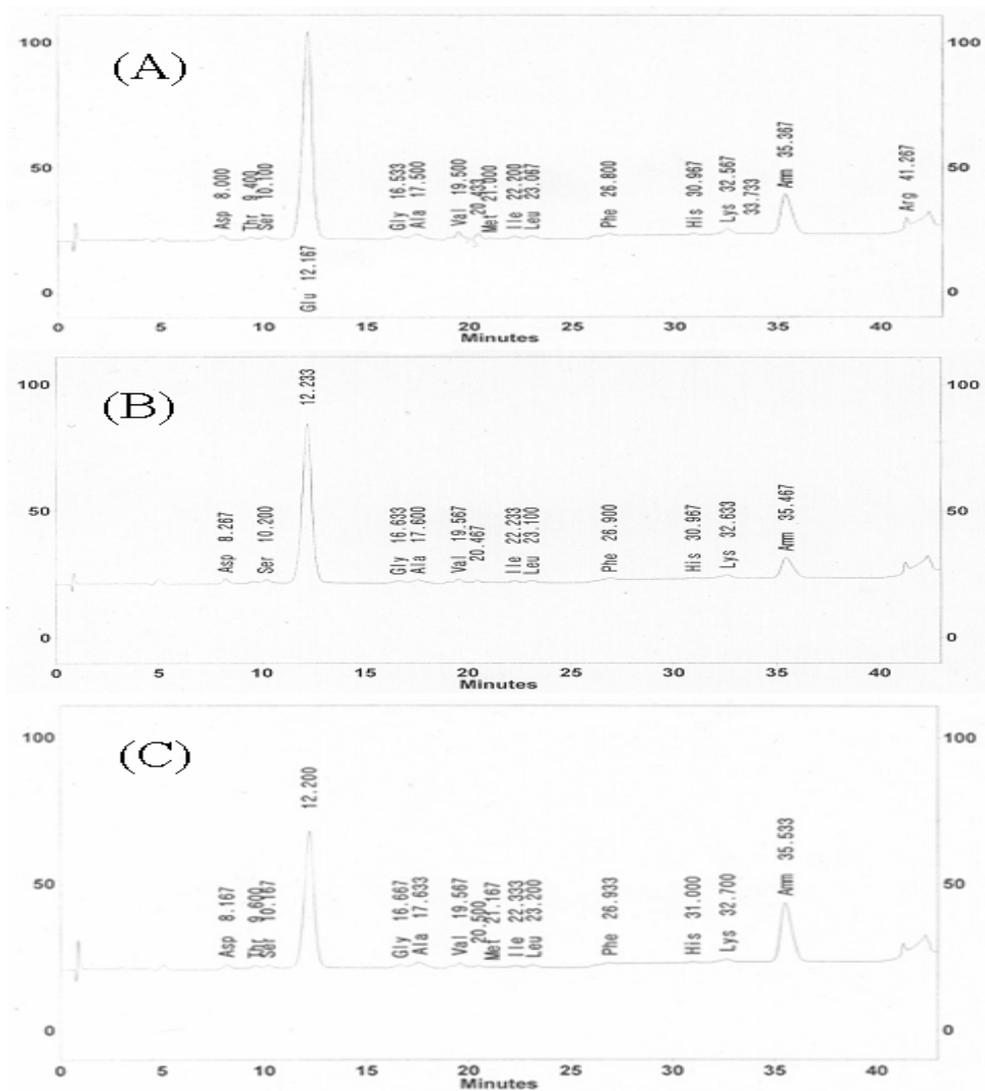


Fig.3.2.2. Auto amino acid analyzer chromatograms of acid hydrolysates of biopolymer produced by mutant PBP(A), LBP(B) and *B. subtilis* CBP(C).

Table 3.2.2. Fructose contents of biopolymer produced by mutant PBP, LBP and *B. subtilis* CBP

Composition Items	Biopolymer sample		
	A	B	C
Glutamic acid (mg/g, biopolymer)	516.3	124.4	101.3
Fructose (mg/g, biopolymer)	260.3	604.1	326.2

## 제4절 Biopolymer 생산 유전자 클로닝 및 구조분석

### 1. 연구수행 방법

가. biopolymer 생합성 유전자 클로닝용 primer 의 제작

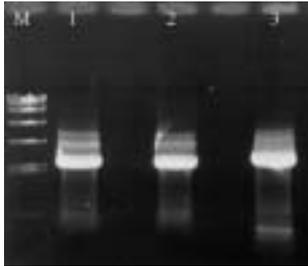
유전자의 상동성을 이용한 PCR을 이용하여, biopolymer 생합성 유전자 즉,  $\Psi$ -glutamyltransferase 유전자,  $\Psi$ -glutamylpolypeptidase 유전자 및 levansucrase 유전자를 포함하는 3종의 2kb크기의 유전자단편을 클로닝하였다. Biopolymer생합성 관련 유전자 3종을 클로닝하기 위해 사용된 primer의 염기서열은 Table 6과 같다.

Table 4.1.1. Oligonucleotide primers designed for amplification of  $\Psi$ -glutamyltransferase gene,  $\Psi$ -glutamylpolypeptidase gene and levansucrase gene.

Primers	Sequences
transpepup	5' - GCAGTCCCTTCTTAATCCGTATGCTGAT - 3'
transpepdn	5' - GGCTCCGAGCATCGTACAAATGTATGGA - 3'
transferup	5' - CGCTATTACCATCAGTCTCGCCTCTCAA - 3'
transferdn	5' - TGACTCAATTGCTCCACCTGCTTTTCGTA - 3'
transpepnattoEcoup	5' - CCGAATTCATGAAAAAATTGAGGGGCGAGTC - 3'
transpepnattoHinddn	5' - GGGAAAGCTTCTAATTCATTGTCTTGTATTT - 3'
transferBamup	5' - CCGGATCCATGAACAAATCTGTCATCGGTAC - 3'
transferXhodn	5' - GGGCTCGAGTTAAATCCCCACAGCCGCTCCG - 3'
levanup	5' - ATCGCGCGGGTTTGTACTGATAAAGCA - 3'
levandn	5' - CCGGTAGTCCGGCTTCTGTTTTGATTTT - 3'
levansucBamup	5' - CCGGATCCATGAACATCAAAAAGTTTGCAA - 3'
levansucXhodn	5' - GGGCTCGAGTTATTTGTTAACTGTTAATTGT - 3'

나. Polymerase Chain Reaction(PCR)의 조건

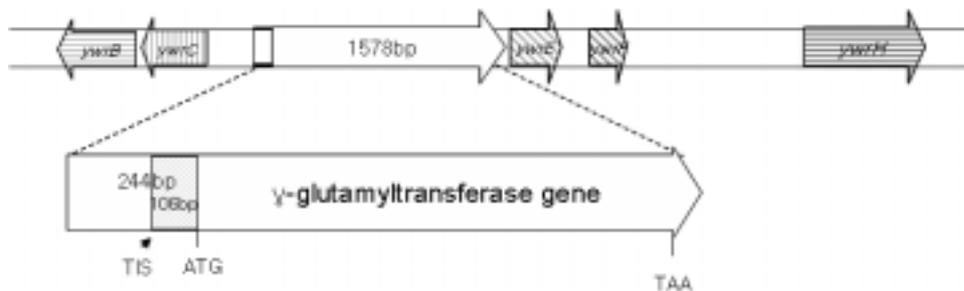
청국장 biopolymer 생산관련 유전자를 클로닝하기 위하여, CBP균주 및 PBP의 염색체 DNA 1ug을 주형으로 사용하였으며, 10× PCR buffer 5μl , dNTP 5μl, forward and reverse primer 4μl 그리고 dH<sub>2</sub>O 31.5μl를 가하고, 최종적으로 Taq DNA polymerase 0.5μl를 가한 후, 95℃에서 2분간 예비가열 후, 95℃에서 30초간 변성, 55℃에서 1분간 anealing 및 72℃에서 2 분간 중합 반응을 시키는 조작을 35 cycle 수행하였다. 증폭된 PCR 산물은 0.7% agarose gel에서 전기 영동하여 EtBr에 염색하여 UV조사기로 관찰하였다.



M, λ phage maker DNA  
 lane 1, γ-glutamyltransferase gene of PBP  
 lane 2, γ-glutamyltranspeptidase gene of PBP  
 lane 3, levansucrase gene of PBP

## 2. 연구수행 내용 및 결과

### 가. γ-glutamyltransferase gene 의 클로닝 및 염기배열 결정



#### 1) CBP

CBP 균주의 biopolymer 생산관련 γ-Glutamyltransferase 유전자의 구조 및 추정되는 아미노산 배열은 Fig. 4-2-1과 같다. 이 유전자는 1,575 bp로 구성되어 있었으며 ORF는 525개의 아미노산을 코드함이 확인 되었으며, 상류영역 약 1300 bp의 구조가 밝혀졌으며 하류영역에도 약 960 bp가 결정되었다.

ccgatacgcgattcagctggtaccggggatcctctagagattactatagggcacg-1261  
 cgtggtcgagcgcccggtgtaaaatgaaacgccccgtacgctaagaaaatgataatg-1201  
 acaagggcggttaaatctgtaaagtttgaggccgataaaagcgatgataaaaaacagg-1141  
 atgccggtgacccagccgaaaccttaagcgctttttggccaaactcgtacgccatgatt-1081  
 ccgagcatgacggtaattaccggcgtgacagcgccaatcatacctgcaacaattgctgaa-1021  
 tggcttaacacatttacagccgcaacaagcccaccatcgcaagacatgtaggcagaatg -961  
 tgggcgagggctgccacaattgacacctaattgtgccttttagcttaaagcccagataagca -901  
 gccattttgggtggcaatcggtccgggaagcgcattagcgattgctaataatttctccgaat -841  
 tcatcatcgtcaatccatttataatttattgaccgcttcatggcggatcagcgggaatcacg -781  
 gaaggtccgcccgcgaacctaatatgcccgtgcaaccattgcccgcgcatatcccga -721  
 taaggatgggtttttcattcgtttctctcctttacagcttcattcccatacggcttttga -661  
 tcgttgatcagcatctggcaatcaacactgacgacgctcgaatggatacagccgctt -601  
 tgtaaaaaattcttccatttcttgatcgttggcaaaagatcccatgcatatgcagcttgct -541  
 tgggcctgctcatgtgataaaggctggtgaccgcangctcttctcaagcttaagagcgac -481  
 ctcttctaaaaattgcccgttctacctcgacattgaaaaacacggaaacatgaatgccgat -421  
 tttagcgggattgatgacagcgggtgaatttttcaataaacactggcttcaattaattggtt -361  
 gatacgggcctgacggcgaccccgtaacaaatcgactcttttgccaagatccgtataaga -301  
 aattctgccttcttcatgcaaaatcgtagaatttgtttatcagctctcatcaagtacaag -241  
 gttggggatttgataattcatgactcaattgctccacctgcttttcgtagccttttagcaat -181  
 cattttatcataaaagttacgtatcgaaatgataatttttcatttggttttcgaaatgaat -121  
 gtaaaaaatcttattattttgcaaaaagaagaaagttcgtcagttttctgccggatcag -61  
 tagatgtgaaaaatcaggctccctataactgaagaaaatttcttaaaaaaggggacttgtg -1  
**ATGAACAAATCTGTCATCGGTACAAAGCAAATGATCGTCAGTCCGCATTACCTCGCTTCT** 60  
 M N K S V I G T K Q M I V S P H Y L A S  
 CAAGCCGGAAACCGCATACTGGATAAGGGAGGCAACGCGTTTGACGCCGCTGTTGCGGTG 120  
 Q A G N R I L D K G G N A F D A A V A V  
 AGTGCCTTGTCTTGCGGTTGTGTACCCGCATATGACCCGACTTGGCGGGGATTCTTTTGG 180  
 S A C L A V V Y P H M T G L G G D S F W  
 CTGACCTTTACCAGGAAACAAAGGCAGTAAAAGTCTACAATGGCAGCGGCAGTTCAGGA 240  
 L T F H Q E T K A V K V Y N G S G S S G  
 AAAACGTAACGAGAGATGTATATAAGGGAAAAGCGGATTCCGCTGCGGGGAATTGAC 300  
 K N V T R D V Y K G K S A I P L R G I D  
 AGTGCCATTACCGTGCCGGGAATGGTTGATAGCTGGGATGCGGTCTGAAGGAGTACGGG 360  
 S A I T V P G M V D S W D A V L K E Y G  
 CGTCTGTCTCTTGAGATGTATTGGAGCCCGCACGCGATTATGCCCAAATGGGTTTCCT 420  
 R L S L A D V L E P A R D Y A Q N G F P  
 GTATCAGCTGATCAGTGTGTCACACAGAAAAGAATATTGAATTGCTGGCTTCCACGCCT 480  
 V S A D Q C R H T E K N I E L L A S T P  
 TACACGGCTGACATCTTACAAGAAGGGGCAAAGCACCTGTCCCGGGAGAGCGGTTTGTG 540  
 Y T A D I F T R R G K A P V P G E R F V  
 CAAAAAGAGCTTGACAGACAGTCTGAACTTGATTGCTGAAAAAGGAAGAAGCGCATTTTAT 600  
 Q K E L A D S L N L I A E K G R S A F Y  
 GAAGGAGATCTCGCTCAGCGGATTGTCTCACATTTACAGAATAACGGCAGTTACATGACA 660  
 E G D L A Q R I V S H L Q N N G S Y M T  
 ATCGATGATTTTAAAGCGCATCGGGGTGAGTGGGCAGTGCCTGTATCAAGTATTATCGA 720  
 I D D F K A H R G E W A V P V S S D Y R

GGGTACAGTGTGTATCAGGCGCCGCAAATTCTCAGGGATTTACCGGTTTATTAACACTG 780  
G Y S V Y Q A P P N S Q G F T G L L T L  
AACATTTTGGAAAACATGATTTACCCCAAATCGAACACGGTTCATTTGAGTATTATCAC 840  
N I L E N Y D F T Q I E H G S F E Y Y H  
GTGCTTGTGGAGGCATTGAAAAAGAGTTTTCTAGATCGGGATGCCGTCCTGACTGATCCG 900  
V L V E A L K K S F L D R D A V L T D P  
GCGTTTGCAGACATTCCGCTTGAAAGGCTTTTGGACAAACGTTATGCAAAAACAATTGGCA 960  
A F A D I P L E R L L D K R Y A K Q L A  
GAAGAAATCGGCTATCTCGCAATACCGGCAGAAAGCAGGCCGGTGGGAAGTGATACGGCA 1020  
E E I G Y L A I P A E S R P V G S D T A  
TATGCGGCCGTAATCGATGCGGATGGCAACGCAGTGTCAATTCATTCAAAGCCTGTACTTT 1080  
Y A A V I D A D G N A V S F I Q S L Y F  
GAATTTGGCTCGGCAGTCACTGCCGGTGATACAGGCATATTACTGCAAAACCGCGGATCG 1140  
E F G S A V T A G D T G I L L Q N R G S  
TTTTTCTCACTGGATGAAAATCATGTCAACACGCTTGAACCGAGAAAGCGCACCTTCCAT 1200  
F F S L D E N H V N T L E P R K R T F H  
ACGTTGATGCCGGCTATGGTCTGTAAAGGCGGAAAGCCAAAATTCTGTACGGCACACAA 1260  
T L M P A M V C K G G K P K I L Y G T Q  
GGCGGCGAAGGCCAGCCGAGACTCAGACGGCCATCATTACCCGAATGCTGGACTACGGA 1320  
G G E G Q P Q T Q T A I I T R M L D Y G  
ATGCATCCACAGCAGGCAATCAGCGAACC CGCTGGGTATGGGGCAGAACGTGGGGAGAG 1380  
M H P Q Q A I S E P R W V W G R T W G E  
GAATACGAAGGTCTCAGAGTCGAGGGCAGATTACAGACAAAACAATCCAAAACCTGAAA 1440  
E Y E G L R V E G R F T D K T I Q K L K  
GACAGCGGGCATCTCGTGAGGTTGTGCGGTGACTATGATCCGCTGATGGGACAAGCGGCT 1500  
D S G H L V E V V G D Y D P L M G Q A A  
GCAATCAAAGTTGATGAAGAAGGCTTTCTCCAAGGCGGAGCCGATCCTCGGGGAGACGGA 1560  
A I K V D E E G F L Q G G A D P R G D G  
GCGGCTGTGGGGATTAAaataactatagggtacaaatataaatcaaaagcataaacataa 42  
A A V G I .  
gggagacctctacaatgtggtacatatatactgtttatcttcagggtctataatgccactcca 102  
taaaaattcgtattgagtcfaatcaataaaaaataaaagaagcaaatattcaacgggaa 162  
aaaaggagagtgaaaaacacaaacaaaataagtaaagtgatttcgatctatttgtgtgtat 222  
tgctgacatgcttataatcgccagccggatttatcaataaccgtatTTTTTctttataaaaa 282  
attgagagggcgagactgatggtaatagcgatcagcattaaaatccaaaagtttgtcattc 342  
caattcctcctaactctacctttatacgaagaaaaaggaaaaacgtttcataaaagaacac 402  
cccagacttactctgggtgttcttttttgatatttttttagttatctacagggcgatatt 462  
ttgtaatacataaggtctttttgactagtttcttctatttaaatagtccttctcttcagct 522  
gggacgaatcagtgtaattcttccccaggttttagcatagtgatttcccgccaatcgtga 582  
ggcaggctttaattcatccgttaaaatatatccctttctgcatcatacaccttttcatc 642  
taggtggaagcagacaactcttccgatgagcatalctgctgtagtgacgccttggtcatt 702  
gtcaaaggaatatgcccgtcctaatttgcactcaaagcgaacgcgggcttccttaatgcc 762  
ggggactgaaacagctttgctttcacaggatgaagcaggtgctgtgaagctcgctttca 822  
tccggccttaagcttgcagctgtttcattgataccagcccggggccgtagagcacgcgtg 902  
ccctatagtaaatctctagaggatccccgggaccgagctcgaattcgtaatncatgtncat 962  
gttttt

Fig. 4.2.1. Nucleotide sequences and deduced amino acid sequences determined from the  $\gamma$ -glutamyltransferase gene of the strain CBP, chungkookjang biopolymer producer.

2) PBP

CBP균주에 변이 처리하여 제작된 PGA우위 생산성변이주 PBP균주의  $\gamma$ -Glutamyltransferase 유전자의 구조를 결정하였다. 이 유전자는 1,575 bp 로 구성되었으며, ORF는 525의 아미노산을 코드 함을 알 수 있었으며, 상류영역 약 1,500 bp와 하류영역 약 3,000 bp가 결정되었다.

```

actatagggcacgcgtggctcgacggcccggtggtctgtatctgtttacaacttcttc-1401
aacattagcgggatagacgcaggtccgcgccatatcccagtaggtttgcgataaaaaa-1341
cgccataaataaataagatcgatatcatgaggctgacattcctttatcttttgaatgttta-1281
tttgtgattttgtctttcagtttaaaatgaaacgccccgtacgctaagaaaatgataatg-1221
accagggccgggattaatctgtaaagtttgaggccgataaaaagcgatgataaaaaacagg-1161
atgccggtaaccagccgaaaccttaagcgctttttggccaaactcgtacgccatgatt-1101
ccgagcattaccgcaattaccggcgtgacggcaccgatcatacctgcaacaattgctgaa-1041
tggcttaacacatttacagccgcaacaagcccaccatcgcaagacatgtaggcagaatg -981
tgggcgagggctcgccacaactgcacctaattgtgccttttagcttaaagcccagataagca -921
gccattttgggtggcaatcgggtccgggaagcgcattagcgattgctaataatttctccgaat -861
tcatcatcgtcaatccatttatatttattgaccgcttcatggcggatcagcgggaatcacg -801
gaaggctccgcccgcgaacctaatatgcccgtgcaaccattgcccgcgtcatatcccga -721
taaggatgggtttttcattcgtttctctcctttacagcttcattcccatacggcttttga -661
tcgtttgatcagcatctggcaatcaacactgacgacgcctcgcaatggatacagccgctt -601
tgtaagaattcttccatttcttgatcgttggcaaaagatcccagatgcatatgcagcttgc -541
cgggcctgtcatgtgataaaggctgggtggccgcaggctcttctcctcaagcttaagagcgac -481
ctcttctaaaaattgcggttctacctcgacattgaaaaacacggaaacatgaatgccgat -421
tttagcgggattgatgacagcgggtgaatttttcaataaacaccggcttcaattaattgggt -361
gatacgggcctggacggcgaccctgacaaaatcgactcttttgccaagatccgtataaga -301
aattctgccttcttcatgcaaaatcgtgagaatttggttatcagctctcatcaagtacaag -241
gttggggatttgataatcatgactcaattgctccacctgctttcgtagccttttagcaat -181
cattttatcataaaagttagctatcgaaatgataatttttcatttgcgaaatgaat -121
gtaaaaatatcttattatttgcgaaaagaagaagttcgtcagtttttctgcccgatcag -61
tagatgtgaaaaatcaggctccctatactgaagaaaatttcttaaaaaaggggacttgtg -1
ATGAACAATCTGTTCATCGGTACAAAGCAAATGATCGTCAGTCCGCATTACCTCGCTTCT 60
M N K S V I G T K Q M I V S P H Y L A S
CAAGCCGAAACCGCATACTGGATAAGGGAGGCAACGCGTTTGACGCCGCTGTTGCGGTG 120
Q A G N R I L D K G G N A F D A A V A V
AGTGCTTGTCTTGCGGTTGTGTACCCGCATATGACCGGACTTGGCGGGGATTCCTTTTGG 180
S A C L A V V Y P H M T G L G G D S F W
CTGACCTTTTACCAGGAAACAAAGGCAGTAAAAGTCTACAATGGCAGCGGCAGTTCAGGA 240
L T F H Q E T K A V K V Y N G S G S S G
AAAAACGTAACGAGAGATGTATATAAGGGAAAAGCAGGATTCCGCTGCGGGGAATTGAC 300

```

K N V T R D V Y K G K S A I P L R G I D  
 AGTGCCATTACCGTGCCGGGAATGGTTGATAGCTGGGATGCGGTCCTGAAGGAGTACGGG 360  
 S A I T V P G M V D S W D A V L K E Y G  
 CGTCTGTCTCTTGCAGATGTATTGGAGCCCGCACGCGATTATGCCCAAATGGGTTTCCT 420  
 R L S L A D V L E P A R D Y A Q N G F P  
 GTATCAGCTGATCAGTGTCTGTCACACAGAAAAGAATATTGAATTGCTGGCTTCCACGCCT 480  
 V S A D Q C R H T E K N I E L L A S T P  
 TACACGGCTGACATCTTACAAGAAGGGGCAAAGCACCTGTCCGGGAGAGCGGTTTGTG 540  
 Y T A D I F T R R G K A P V P G E R F V  
 CAAAAAGAGCTTGCAGACAGTCTGAACTTGATTGCTGAAAAAGGAAGAAGCGCATTTTAT 600  
 Q K E L A D S L N L I A E K G R S A F Y  
 GAAGGAGATCTCGCTCAGCGGATTGTCTCACATTTACAGAATAACGGCAGTTACATGACA 660  
 E G D L A Q R I V S H L Q N N G S Y M T  
 ATCGATGATTTTTAAAGCGCATCGGGGTGAGTGGGCAGTGCCTGTATCAAGTATTATCGA 720  
 I D D F K A H R G E W A V P V S S D Y R  
 GGGTACAGTGTGTATCAGGCGCCGCAAATTTCTCAGGGATTTACCGGTTTATTAACACTG 780  
 G Y S V Y Q A P P N S Q G F T G L L T L  
 AACATTTTGGAAAATATGATTTACCCAAATCGAACACGGTTCATTTGAGTATTATCAC 840  
 N I L E N Y D F T Q I E H G S F E Y Y H  
 GTGCTTGTGGAGGCATTGAAAAAGAGTTTTCTAGATCGGGATGCCGTCCTGACTGATCCG 900  
 V L V E A L K K S F L D R D A V L T D P  
 GCGTTTGCAGACATTCCGCTTCAAAGGCTTTTGGACAAACGTTATGCAAAAACAATTGGCA 960  
 A F A D I P L E R L L D K R Y A K Q L A  
 GAAGAAATCGGCTATCTCGCAATACCGGCAGAAAGCAGGCCGGTGGGAAGTGATACGGCA 1020  
 E E I G Y L A I P A E S R P V G S D T A  
 TATCGGCGCGTAATCGATGCGGATGGCAACGCAGTGTCAATTCATTCAAAGCCTGTACTTT 1080  
 Y A A V I D A D G N A V S F I Q S L Y F  
 GAATTTGGCTCGGCAGTCACTGCCGGTGATACAGGCATATTACTGCAAAACCGCGGATCG 1140  
 E F G S A V T A G D T G I L L Q N R G S  
 TTTTCTCACTGGATGAAAATCATGTCAACACGCTTGAACCGAGAAAGCGCACCTTCCAT 1200  
 F F S L D E N H V N T L E P R K R T F H  
 ACGTTGATGCCGGCTATGGTCTGTAAAGGCGGAAAGCCAAAATTTCTGTACGGCACACAA 1260  
 T L M P A M V C K G G K P K I L Y G T Q  
 GCGGCGAAGGCCAGCCGAGACTCAGACGGCCATCATTACCCGAATGCTGGACTACGGA 1320  
 G G E G Q P Q T Q T A I I T R M L D Y G  
 ATGCATCCACAGCAGGCAATCAGCGAACCGCGCTGGGTATGGGGCAGAACGTGGGGAGAG 1380  
 M H P Q Q A I S E P R W V W G R T W G E  
 GAATACGAAGGTCTCAGAGTCGAGGGCAGATTACAGACAAAACAATCCAAAACCTGAAA 1440  
 E Y E G L R V E G R F T D K T I Q K L K  
 GACAGCGGGCATCTCGTGGAGGTTGTCCGGTACTATGATCCGCTGATGGGACAAGCGGCT 1500  
 D S G H L V E V V G D Y D P L M G Q A A  
 GCAATCAAAGTTGATGAAGAAGGCTTTCTCCAAGGCGGAGCCGATCCTCGGGGAGACGGA 1560  
 A I K V D E E G F L Q G G A D P R G D G  
 GCGGCTGTGGGGATTAAataactatagggtacaaatataaatcaaaagcataaacataa 42  
 A A V G I .

gggagacctctacaatgtggtacataactgtttctcaggtctataatgccactcca 102  
 taaaaattcgtattgagtcfaatcaataaaaaataaaagaagcaaatattcaacgggaa 162  
 aaaaggagagtgaaaacacaaacaaaataagtaaagtatttcgatccatttgtgtgat 222  
 tgctgacatgcttataatgccagccggatttatcaataccgattttttctttataaaaa 282  
 attgagaggcgagactgatggtaatagcgatcagcattaaaatccaaaagtttgcattc 342  
 caattcctcctaactctacctttatacgaagaaaaaggaaaaacgtttcataaaagaacac 402  
 cccgagcttactctgggtgttcttttttgatatttttttagttatttacagggcgatatt 462  
 ttgtaatcataaggtctttttgactagtttcttctatttaaatagtccttctcttcagct 522  
 gggacgaatcagtggaattcttcccaggttagcatagtgatttcccgcgaatcgtga 582  
 ggcaggtcttaattcatccggttaaaatataatccctttctgcatcatcaccttttcac 642  
 taggtggaagcagacaactcttccgatgagcatatctgctgtagtgacgccttgatcatt 702  
 gtcaaaggtaatatgccgctctaatttgcactcaaagcgaacgcgggttcccttaatgcc 762  
 gggaaactgaaacagctttgctttcaacaggatgaagcaggggtgctgtaagctcgcttc 822  
 atccggccttaagcttgcagctgtttcattgatattctcaatgatggcttcatcactgac 882  
 atgaacgacaaaattctccggttctccactgcggttccgctgtatcttttggcgctcctc 942  
 cgtcctgttaacagaaatactgagaagcggaggatctgagctgacaacggtataaaaaact 1002  
 gaaaggcgcggcattgaccgctcctcctgaagaaagtgtgtgcacaaatgcaatggggcg 1062  
 gggaaataacggtacctgacaatagcttgtatgtgtctttggcactaagctgatcagcttg 1122  
 aaatatgtacatagcaacaaccgctttatcgttaggataccttgattataacgaaatgg 1182  
 ttaaaggaaaccaaataagtgccgggtgcatatgtatgtcatgacatataatctaataca 1242  
 gggcaataaaaaaaataggcttccgtacctccgcccagcctattgaaacaatgaaaac 1302  
 tttagattatttgtatttctttttgactaccagcaattgcccgtctttccagtttctttt 1362  
 ttgctgtcataatcatcgtgtctttttagtgcgagtggtggtacgggtttttttag 1422  
 tatttcttatgggaacgataagattttttagtgcgagctttttatagctgcga 1482  
 gatttttcttgtgagaacagtatgacttttttagtgcgagattttttgtaagaacgg 1542  
 caagattttttagtgcgagattttttgtaagaacggtaagattttttatagctgcga 1602  
 gattttttagtgcgagattttttgtaagaacggtaagatttttttagtgcgagat 1662  
 gattttttagtgcgagattttttgtaagaacggtaagatttttttagtgcgagat 1722  
 tttttagtgcgagatttttttagtgcgagatttttttagtgcgagatttttttagtgcgag 1782  
 tttttagtgcgagatttttttagtgcgagatttttttagtgcgagatttttttagtgcgag 1842  
 tttttagtgcgagatttttttagtgcgagatttttttagtgcgagatttttttagtgcgag 1902  
 tctccttttaaaaaatagttaaggatgaagatccttactaccctcatagtacgcgctg 1962  
 ttaaaaaagtgataagtgttccgctgagatcttataaaaaataaaagcctaaaatttgta 2022  
 aggaggattatggatgaagaatcaatccaatttaccgctttatcagctgtttgttcatcc 2082  
 aaaagacttgcgtgaattaaaaaaggatataatgggacgatgatccggtgccagctgtgat 2142  
 gaaggtaaatcaaaaaaggctggatattgatatcgccttatcggggatcacatatcagag 2202  
 acttcaaaaagaagtacacatatttctttttatcagccgaaaacattccgcccgcgc 2262  
 gagagattcacttaaatgcccagatataaagatccttctctgatgagaacaaaattgtctc 2322  
 tggattttttctcggagctagggacactgtctccaaaggcagagtttgtgtttgtaaaaga 2382  
 tgaatgggaagaatgaaggggtttatcttgaacttgaatccgtagatgaatattatttgg 2442  
 cgaaggaagctggctgatggcgcgatttttttagcgggtggatgatgatgccaaactttt 2502  
 ctctgatgagcgatttagaaagggaacgaaaacatcgctggagcttgggtatgaaaaga 2562  
 aaacagggactgaggaggatgattttatttacaggatagatttttaaaattaatacgg 2622  
 tcctaaagctcagtttaagtcagaagtgacaaagcatgtggatgtcgaagaattttgc 2682  
 gctggcttgcgggtattgtattcacctcaactatgacgggtttgtccacaactacgcat 2742  
 tatacagaagcgggaaaccggattatttgagggtgattccttgggattatgatgcgactt 2802  
 gggcagggatccatggagagcggatggctgcccattatgtaagaattcaaggattta 2862  
 atacactaacgccccggatattggatgaatccgagtttccgaagctcctacagggcctgt 2922

tagaaaaacgctccaatctctttttacaatagaatatatggaaccgaaaatcatggcga 2982  
 tgtatgagcggattaggaccagcccggcgctgaccacgcgtgcctatagt 3034

Fig. 4.2.2. Nucleotide sequences and amino acid sequences determined from the  $\gamma$ - Glutamyltransferase gene of the strain PBP, PGA biopolymer hyper producer.

### 3) CBP균주 와 PBP균주의 $\gamma$ - Glutamyltransferase의 비교

#### 가) 아미노산 배열의 비교

청국장 biopolymer 생산균주인 CBP 균주와 PGA 우위생산성 변이주 PBP 균주의  $\gamma$ - Glutamyltransferase의 아미노산 배열을 비교해 본 결과 Fig. 4-2-3과 같이 완전히 동일함을 알 수 있었다. 이로써  $\gamma$ - Glutamyltransferase 는 변이 효과에 아무런 기여를 하지 않음을 알 수 있었다.

CBP	MNKSIVGKQMI VSPHYLASQAGNRILDKGGNAFDAAVAVSACLAVVYPHMTGLGGDSFW
PBP	MNKSIVGKQMI VSPHYLASQAGNRILDKGGNAFDAAVAVSACLAVVYPHMTGLGGDSFW
	*****
CBP	LTFHQETKAVKVYNGSGSSGKNVTRDVYKGSAPIPLRGIDSAITVPGMVDSWDAVLKEYG
PBP	LTFHQETKAVKVYNGSGSSGKNVTRDVYKGSAPIPLRGIDSAITVPGMVDSWDAVLKEYG
	*****
CBP	RLSLADVLEPARDYAQNGFPVSADQCRHTEKNI ELLASTPYTADIFTRRGKAPVPGERFV
PBP	RLSLADVLEPARDYAQNGFPVSADQCRHTEKNI ELLASTPYTADIFTRRGKAPVPGERFV
	*****
CBP	QKELADSLNLI AEKGRSAFYEGDLAQRIVSHLQNNGSYMTIDDFKAHRGEWAVPVSSDYR
PBP	QKELADSLNLI AEKGRSAFYEGDLAQRIVSHLQNNGSYMTIDDFKAHRGEWAVPVSSDYR
	*****
CBP	GYSVYQAPPNSQGF TGLLTLNILENYDFTQIEHGSFEYHVLVEALKKSFLDRDAVLTDP
PBP	GYSVYQAPPNSQGF TGLLTLNILENYDFTQIEHGSFEYHVLVEALKKSFLDRDAVLTDP
	*****
CBP	AFADIPLERLLDKRYAKQLAEEIGYLAIPAESRPVGSDTAYA AVIDADGNAVSIQSLYF

```

PBP      AFADIPLERLLDKRYAKQLAEEIGYLAIPAESRPVGSDTAYA AVIDADGNAV SFIQSLYF
*****

CBP      EFGSAV TAGDTG ILLQNRGSFFSLDENHVNTLEPRKRTFHTLMPAMVCKGGKPKILYGTQ
PBP      EFGSAV TAGDTG ILLQNRGSFFSLDENHVNTLEPRKRTFHTLMPAMVCKGGKPKILYGTQ
*****

CBP      GGEGQPQTQTAI ITRMLDYGMHPQQAISEPRVWVGRTWGEEYEGLRVEGRFTDKTIQKLK
PBP      GGEGQPQTQTAI ITRMLDYGMHPQQAISEPRVWVGRTWGEEYEGLRVEGRFTDKTIQKLK
*****

CBP      DSGHLEVVVG DYDPLMGQAAA IKVDEEGFLQGGADPRGDGA AVGI
PBP      DSGHLEVVVG DYDPLMGQAAA IKVDEEGFLQGGADPRGDGA AVGI
*****

```

Fig. 4.2.3. Comparison of amino acid sequence between  $\gamma$ -Glutamyltransferase of the strain CBP and that of the strain PBP.

나) 상류영역 염기서열 비교

청국장 biopolymer 생산균주인 CBP 균주와 PGA 우위생산성 변이주 PBP균주의  $\gamma$ -Glutamyltransferase의 아미노산 배열을 비교해 본 결과 이들 유전자의 상류영역도 동일함을 알 수 있었다.

```

CBP      ATTGCTCCACCTGCTTTCGTAGCCTTTTAGCAATCATT TATCATAAAAAGTTACGTATCG
PBP      ATTGCTCCACCTGCTTTCGTAGCCTTTTAGCAATCATT TATCATAAAAAGTTACGTATCG
*****

CBP      AAATGATAATTTTTCATTGT TTTTCGAAATGAATGTAAAAATATCTTATTATTTGCGAAA
PBP      AAATGATAATTTTTCATTGT TTTTCGAAATGAATGTAAAAATATCTTATTATTTGCGAAA
*****

CBP      AGAAGAAAGTTCGTCAGT TTTTCTGCCGGATCAGTAGATGTGAAAAATCAGGCTCCCTAT
PBP      AGAAGAAAGTTCGTCAGT TTTTCTGCCGGATCAGTAGATGTGAAAAATCAGGCTCCCTAT
*****

CBP      ACTGAAGAAAATTTCTTAAAAAAGGGGACTTGTG
PBP      ACTGAAGAAAATTTCTTAAAAAAGGGGACTTGTG
*****

```

Fig. 4.2.4 Comparison of the upstream nucleotide sequences between  $\gamma$ -Glutamyltransferase gene of the strain CBP and the strain PBP.

다) 구조유전자 염기서열 비교

청국장 biopolymer 생산균주인 CBP 균주와 PGA 우위생산성 변이주 PBP균주의  $\gamma$ -Glutamyltransferase의 아미노산 배열을 비교해 본 결과 이들 유전자의 구조 유전자 부위도 동일함을 알 수 있었다.

```

CBP      ATGAACAAATCTGTCATCGGTACAAAGCAAATGATCGTCAGTCCGCATTACCTCGCTTCT
PBP      ATGAACAAATCTGTCATCGGTACAAAGCAAATGATCGTCAGTCCGCATTACCTCGCTTCT
*****

CBP      CAAGCCGGAACCGCATACTGGATAAGGGAGGCAACGCGTTTGACCCGCTGTTGCGGTG
PBP      CAAGCCGGAACCGCATACTGGATAAGGGAGGCAACGCGTTTGACCCGCTGTTGCGGTG
*****

CBP      AGTGCTTGCTTGCAGTTGTGTACCCGCATATGACCGACTTGGCGGGATTCTTTTGG
PBP      AGTGCTTGCTTGCAGTTGTGTACCCGCATATGACCGACTTGGCGGGATTCTTTTGG
*****

CBP      CTGACCTTTCACCAGGAAACAAAGGCAGTAAAAGTCTACAATGGCAGCGGCAGTTCAGGA
PBP      CTGACCTTTCACCAGGAAACAAAGGCAGTAAAAGTCTACAATGGCAGCGGCAGTTCAGGA
*****

CBP      AAAAACGTAACGAGAGATGTATATAAGGGAAAAAGCGGATTCCGCTGCGGGGAATTGAC
PBP      AAAAACGTAACGAGAGATGTATATAAGGGAAAAAGCGGATTCCGCTGCGGGGAATTGAC
*****

CBP      AGTGCCATTACCGTGCCGGAATGGTTGATAGCTGGGATGCGGTCCTGAAGGAGTACGGG
PBP      AGTGCCATTACCGTGCCGGAATGGTTGATAGCTGGGATGCGGTCCTGAAGGAGTACGGG
*****

CBP      CGTCTGTCTCTGCAGATGTATTGGAGCCCGCACGCGATTATGCCAAAATGGGTTTCCT
PBP      CGTCTGTCTCTGCAGATGTATTGGAGCCCGCACGCGATTATGCCAAAATGGGTTTCCT
*****

CBP      GTATCAGCTGATCAGTGTCGTCACACAGAAAAGAATATTGAATTGCTGGCTTCCACGCT

```

PBP GTATCAGCTGATCAGTGTCTGCACACAGAAAAGAATATTGAATTGCTGGCTTCCACGCCT  
 \*\*\*\*\*

CBP TACACGGCTGACATCTTACAAGAAGGGGCAAAGCACCTGTCCGGGAGAGCGGTTTGTG  
 PBP TACACGGCTGACATCTTACAAGAAGGGGCAAAGCACCTGTCCGGGAGAGCGGTTTGTG  
 \*\*\*\*\*

CBP CAAAAAGAGCTTGCAGACAGTCTGAACTTGATTGCTGAAAAAGGAAGAAGCGCATTAT  
 PBP CAAAAAGAGCTTGCAGACAGTCTGAACTTGATTGCTGAAAAAGGAAGAAGCGCATTAT  
 \*\*\*\*\*

CBP GAAGGAGATCTCGCTCAGCGGATTGTCTCACATTTACAGAATAACGGCAGTTACATGACA  
 PBP GAAGGAGATCTCGCTCAGCGGATTGTCTCACATTTACAGAATAACGGCAGTTACATGACA  
 \*\*\*\*\*

CBP ATCGATGATTTTAAAGCGCATCGGGTGAGTGGCAGTGCCTGTATCAAGTATTATCGA  
 PBP ATCGATGATTTTAAAGCGCATCGGGTGAGTGGCAGTGCCTGTATCAAGTATTATCGA  
 \*\*\*\*\*

CBP GGGTACAGTGTGTATCAGGCGCCCAAATCTCAGGGATTTACCGGTTTATTAACACTG  
 PBP GGGTACAGTGTGTATCAGGCGCCCAAATCTCAGGGATTTACCGGTTTATTAACACTG  
 \*\*\*\*\*

CBP AACATTTTGGAAAATATGATTTACCCAAATCGAACACGGTTCATTTGAGTATTATCAC  
 PBP AACATTTTGGAAAATATGATTTACCCAAATCGAACACGGTTCATTTGAGTATTATCAC  
 \*\*\*\*\*

CBP GTGCTTGTGGAGGCATTGAAAAAGAGTTTCTAGATCGGGATGCCGTCTGACTGATCCG  
 PBP GTGCTTGTGGAGGCATTGAAAAAGAGTTTCTAGATCGGGATGCCGTCTGACTGATCCG  
 \*\*\*\*\*

CBP GCGTTTGCAGACATCCGCTTGAAGGCTTTTGGACAAACGTTATGAAAACAATTGGCA  
 PBP GCGTTTGCAGACATCCGCTTGAAGGCTTTTGGACAAACGTTATGAAAACAATTGGCA  
 \*\*\*\*\*

CBP GAAGAAATCGGCTATCTCGCAATACCGGCAGAAAGCAGGCCGGTGGGAAGTGATACGGCA  
 PBP GAAGAAATCGGCTATCTCGCAATACCGGCAGAAAGCAGGCCGGTGGGAAGTGATACGGCA  
 \*\*\*\*\*

CBP TATGCGCCGTAATCGATGCGGATGGCAACGCAGTGCATTCATTCAAAGCCTGTACTTT  
PBP TATGCGCCGTAATCGATGCGGATGGCAACGCAGTGCATTCATTCAAAGCCTGTACTTT  
\*\*\*\*\*

CBP GAATTTGGCTCGGCAGTCACTGCCGGTGATACAGGCATATTACTGCAAAACCGGGATCG  
PBP GAATTTGGCTCGGCAGTCACTGCCGGTGATACAGGCATATTACTGCAAAACCGGGATCG  
\*\*\*\*\*

CBP TTTTCTCACTGGATGAAAATCATGTCAACACGCTTGAACCGAGAAAGCGCACCTTCCAT  
PBP TTTTCTCACTGGATGAAAATCATGTCAACACGCTTGAACCGAGAAAGCGCACCTTCCAT  
\*\*\*\*\*

CBP ACGTTGATGCCGGCTATGGTCTGTAAAGGCGGAAAGCCAAAAATTCTGTACGGCACACAA  
PBP ACGTTGATGCCGGCTATGGTCTGTAAAGGCGGAAAGCCAAAAATTCTGTACGGCACACAA  
\*\*\*\*\*

CBP GCGGCGAAGGCCAGCCGAGACTCAGACGGCCATCATTACCGAATGCTGGACTACGGA  
PBP GCGGCGAAGGCCAGCCGAGACTCAGACGGCCATCATTACCGAATGCTGGACTACGGA  
\*\*\*\*\*

CBP ATGCATCCACAGCAGGCAATCAGCGAACCGCGCTGGGTATGGGCAGAACGTGGGAGAG  
PBP ATGCATCCACAGCAGGCAATCAGCGAACCGCGCTGGGTATGGGCAGAACGTGGGAGAG  
\*\*\*\*\*

CBP GAATACGAAGTCTCAGAGTCGAGGGCAGATTCACAGACAAAACAATCCAAAACTGAAA  
PBP GAATACGAAGTCTCAGAGTCGAGGGCAGATTCACAGACAAAACAATCCAAAACTGAAA  
\*\*\*\*\*

CBP GACAGCGGCATCTCGTGAGGTTGTCGGTACTATGATCCGCTGATGGGACAAGCGGCT  
PBP GACAGCGGCATCTCGTGAGGTTGTCGGTACTATGATCCGCTGATGGGACAAGCGGCT  
\*\*\*\*\*

CBP GCAATCAAAGTTGATGAAGAAGGCTTCTCCAAGGCGGAGCCGATCCTCGGGGAGACGGA  
PBP GCAATCAAAGTTGATGAAGAAGGCTTCTCCAAGGCGGAGCCGATCCTCGGGGAGACGGA  
\*\*\*\*\*

CBP GCGGCTGTGGGATTAA  
PBP GCGGCTGTGGGATTAA  
\*\*\*\*\*

Fig. 4.2.5. Comparison of nucleotide sequence between structural gene of  $\gamma$ - Glutamyltransferase gene from the strain CBP and that of the strain PBP.

라) 하류영역 염기서열 비교

청국장 biopolymer 생산균주인 CBP 균주와 PGA 우위생산성 변이주 PBP균주의  $\gamma$ - Glutamyltransferase의 아미노산 배열을 비교해 본 결과 하류영역에 서는 T→C, C→T, G→A, G→A 치환 및 A 삽입 변이가 발견되었다.

```

CBP      ATAACTATAGGGTACAAATATAAATCAAAGCATAAACATAAGGGAGACCTCTACAATGT
PBP      ATAACTATAGGGTACAAATATAAATCAAAGCATAAACATAAGGGAGACCTCTACAATGT
*****

CBP      GGTACATATACTGTTTATCTTCAGGTCATAATGCCACTCCATAAAAAATTCGTATTGAGT
PBP      GGTACATATACTGTTTATCTTCAGGTCATAATGCCACTCCATAAAAAATTCGTATTGAGT
*****

CBP      CAATCACAAATAAAAAATAAAGAAGCAAATATTCAACGGGAAAAAAGGAGAGTGAAAACA
PBP      CAATCACAAATAAAAAATAAAGAAGCAAATATTCAACGGGAAAAAAGGAGAGTGAAAACA
*****

CBP      CAAACAAAATAAGTAAAGTGATTCGATCTATTTGTGTGTATTGCTGACATGCTTATATC
PBP      CAAACAAAATAAGTAAAGTGATTCGATCCATTTGTGTGTATTGCTGACATGCTTATATC
*****

CBP      GCCAGCCGGATTTATCAATACCGTATTTTTCTTTATAAAAAATTGAGAGGCGAGACTGA
PBP      GCCAGCCGGATTTATCAATACCGTATTTTTCTTTATAAAAAATTGAGAGGCGAGACTGA
*****

CBP      TGGTAATAGCGATCAGCATTAAATCCAAAAGTTTGTTCATTCCAATTCCTCCTAATCTAC
PBP      TGGTAATAGCGATCAGCATTAAATCCAAAAGTTTGTTCATTCCAATTCCTCCTAATCTAC
*****

CBP      CTTTATACGAAGAAAAGGAAAACGTTTCATAAAGAACACCCCGAGCTTACTCTGGGT
PBP      CTTTATACGAAGAAAAGGAAAACGTTTCATAAAGAACACCCCGAGCTTACTCTGGGT
*****

```

```

CBP      GTTCTTTTTTGGATATTTTTTAGTTATCTACAGGCGATATTTGTAATCATAAGGTCTT
PBP      GTTCTTTTTTGGATATTTTTTAGTTATTACAGGCGATATTTGTAATCATAAGGTCTT
*****

CBP      TTTGACTAGTTTCTTCTATTTAAATAGTCCTTCTTTCAGCTGGGACGAATCAGTGTGAA
PBP      TTTGACTAGTTTCTTCTATTTAAATAGTCCTTCTTTCAGCTGGGACGAATCAGTGTGAA
*****

CBP      TTCTCCCGAGTTTAGCATAGTGATTCCCGCAATCGTGAGGACAGGCTTTAATTCATC
PBP      TTCTCCCGAGTTTAGCATAGTGATTCCCGCAATCGTGAGGACAGGCTTTAATTCATC
*****

CBP      CGTTAAAATATATCCCTTTTCTGCATCATAACCTTTTCATCTAGGTGGAAGCAGACAAC
PBP      CGTTAAAATATATCCCTTTTCTGCATCATAACCTTTTCATCTAGGTGGAAGCAGACAAC
*****

CBP      TCTTCCGATGAGCATATCTGCTGTAGTGACGCCTTGGTCATTGTCAAAGGTAATATGCCG
PBP      TCTTCCGATGAGCATATCTGCTGTAGTGACGCCTTGTTCATTGTCAAAGGTAATATGCCG
*****

CBP      CTCTAATTTGCACTCAAAGCGAACGCGGGCTTCCTTAATGCCGGGACTGAAACAGCTTT
PBP      CTCTAATTTGCACTCAAAGCGAACGCGGGCTTCCTTAATGCCGGAACTGAAACAGCTTT
*****

CBP      GCTTTCAACAGGATGAAGCGAGGTGCGTGTAAGCTCGCTTTCATCCGGCCTTAAGCTTGC
PBP      GCTTTCAAACAGGATGAAGCGAGGTGCGTGTAAGCTCGCTTTCATCCGGCCTTAAGCTTGC
*****

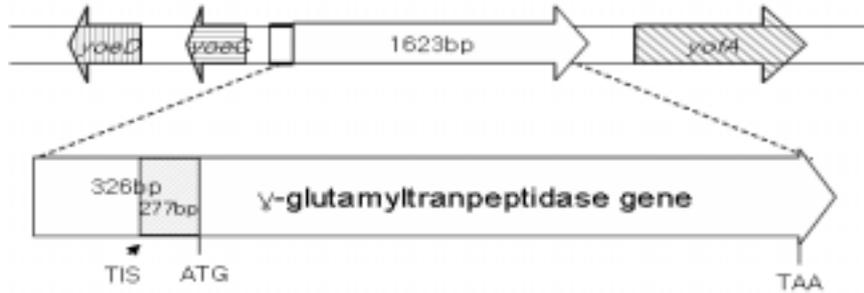
CBP      AGCTGTTTCATTG
PBP      AGCTGTTTCATTG
*****

```

Fig. 4.2.6. Comparison of downstream nucleotide sequence of  $\gamma$ -Glutamyltransferase gene between the strain CBP and that of the strain PBP.

나.  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase gene 의 클로닝 및 염기배열 결정

1) CBP



CBP 균주의 biopolymer 생산관련  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase 유전자의 구조 및 추정되는 아미노산 배열은 Fig. 4-2-7과 같다. 이 유전자는 1620 bp로 구성되어 있었으며 ORF는 540개의 아미노산을 코드 함이 확인 되었으며, 상류 영역 약 1300 bp의 구조가 밝혀졌으며 하류영역에도 약 700 bp가 결정되었다.

```

caatacgatagatt-1260
cactcgaccggggatcctctagagattactatagggcacgcgtggtcgacagcccgggct-1201
ggtcctgaatgcgggaaatcggcttcctggccgactgatataaaaagatattcgtttt-1141
ccttcatgtctttcgtatactcgtatatttcctgtttcagcgattctaaaataagaatct-1081
ttcttttcttttctgttttgctttcagtcgcccataaatgatctttattttgaacgtcct-1021
tcacttgcagcggcagaatatcagaaatgcggagcgcgctggtgatgccgaaaataaaca -961
gaaaaaatcccgttgtttttgttaagcaaaatactggttgacttcttggattttcteta -901
gactgcgaatcggctgtacaatatgcatcaaaaaactccttaaaaaccggttatgtaacgt -841
tttgagggtctatgttactattatagctgaaaaacggtgaatgtcaaagtgcggcgccatt -781
tatgtaacataatatacatagtggttacataagcttttaaaaaagcttcttcaaaccttca -721
ccctataaaataagctttaaagcctcttataaagcttttaacctcttggatacttatccc -661
cctgccaatcataaaaaaacctcttaaaacgaaatctgaagctcccaattttcaggagct -601
tccgcaaaaaaacatacaaaaaaagacacaatttcaaatgtgtcctaactcctcatcctt -541
tacatcaatatcttccgggattgggttcatttaatatctcctgcacgagtgctttgtaatt -481
ctccagctgttcaagatgcggttttgaactgctccttataaatcaaaaattgctccccgcc -421
atgaacggctctgattttcccttcgagcaccgaagcttttaataataatcctctgaaagatt -361
tgatatattctgctgtttcttcaatcgttaaatacatatagcagtccttcttaaatccgta -301
tgctgatttctaataatagcacatggctcatatcaatataatcaattttgacagaaaaacg -241
gctttatgcactatataatataccatttgtcacctgtgaaaacgctgtaattttttacg -181
ctaagattgtaacaatacagcttcatataggagggagaacatgaaaagaacgtggaacgt -121
ctgtttaacagctctgcttagtggttctgtagtcgctggaagtgtcccttttcacgcgga -61
agctaaaaaacgcccaaaaagctacgatgagtacaaacaagtagatgttgaaaagacggc -1
ATGGTTGCGACCGCACATCCTCTTGCTTCTGAAATCGGTGCTGATGTGCTGAAAAAAGGA 60
M V A T A H P L A S E I G A D V L K K G
GGAAATGCTATTGACGCAGCGGTTGCCATTCAATTTGCACTCAATGTAACAGAGCCGATG 120
G N A I D A A V A I Q F A L N V T E P M
ATGTCAGGTATTGGCGCGGGCGGTTTTATGATGGTGTATGACGGAAAAACGAAGGATACA 180
M S G I G G G G F M M V Y D G K T K D T
ACGATAATCGACAGCCGTGAGCGTGCTCCAGCAGGCGCAACTCCTGATATGTTTCTGGAC 240
T I I D S R E R A P A G A T P D M F L D

```

GAAAACGGAAAAGCAATACCTTTCTCTGAACGTGTAACAAAAGGTACTGCCGTTGGTGT 300  
E N G K A I P F S E R V T K G T A V G V  
CCAGGCACTCTGAAAGGGCTGGAAGAAGCCTTGGATAAATGGGGAACCCGTTTCGATGAAG 360  
P G T L K G L E E A L D K W G T R S M K  
CAATTAATTACCCCTTCTATTAAACTCGCTGAAAAAGGCTTTCCGATTGATTCTGTGTG 420  
Q L I T P S I K L A E K G F P I D S V L  
GCAGATGCCATTTCTGATTATCAGGAAAACTTTCACGGACTGCCGCAAAAAGATGTATTT 480  
A D A I S D Y Q E K L S R T A A K D V F  
TTACCAAATGGCGAACCGCTTAAAGAAGGAGATACCCTTATTCAAAGGATTTGGCTAAA 540  
L P N G E P L K E G D T L I Q K D L A K  
ACATTTAAGCTTATTTCGCTCCAAAGGCACTAACGCTTTTTATAAAGGAAAATTCGCCAAG 620  
T F K L I R S K G T N A F Y K G K F A K  
ACGCTTTCTGACACTGTCCAGGATTTCCGGCGGATCAATGACAGAAAAAGATTTAGAAAAT 680  
T L S D T V Q D F G G S M T E K D L E N  
TACGACATTACAATTGATGAACCGATTTGGGGAGACTATCAAGGCTATCAAATCGCTACT 720  
Y D I T I D E P I W G D Y Q G Y Q I A T  
ACTCCTCCTCCAAGCTCCGGCGGTATTTTCTTATTGCAAATGCTGAAAATCCTTGATGAT 780  
T P P P S S G G I F L L Q M L K I L D D  
TTTAACCTTTTACAATACGATGTCCGCTCATGGGAAAAATATCAGCTGCTTGCTGAAACG 840  
F N L S Q Y D V R S W E K Y Q L L A E T  
ATGCATTTGTCTTATGCCGACCGTGCCTTACGCAGGTGATCCCGAATTTGTAATGTT 900  
M H L S Y A D R A S Y A G D P E F V N V  
CCTCTCAAAGGCTTGCTTACCCCGATATATTAAGAAGCCAGCAATTAATCAACCTA 960  
P L K G L L H P D Y I K E R Q Q L I N L  
GATCAAGTGAATAAAGAACCAGAAAGCCGGTGACCCTTGAAATACCAAGAAGGATCAGCA 1020  
D Q V N K E P K A G D P W K Y Q E G S A  
AACTATAACAAGTTGAACAGCCGAAAGACAAAGTAGAAGCCAAACAACCCACTTTACA 1080  
N Y K Q V E Q P K D K V E G Q T T H F T  
GTTGCTGACCGTTGGGAAAATGTTGTTTCTTATAACAACAATCGAACAGCTATTTCGGA 1040  
V A D R W G N V V S Y T T T I E Q L F G  
ACGGGTATTATGGTCCCTGATTACGGTGTATCCTAAACAATGAATTAACGGATTTTGAT 1200  
T G I M V P D Y G V I L N N E L T D X D  
GCGATACCAGGCGGAGCTAACGAAGTACAGCCAAACAACCGCCTTTAAGCAGCATGACC 1260  
A I P G G A N E V Q P N K R P L S S M T  
CCGACGATTTTATTTAAGGATGACAAGCCTGTCTCACTGTTGGATCTCCTGGCGGGCG 1320  
P T I L F K D D K P V L T V G S P G G A  
ACAATTAATTCATCCGTTTTTGCAAACCATTCTCTACCACATTGAATATGGTATGGAATTA 1380  
T I I S S V L Q T I L Y H I E Y G M E L  
AAAGAAGCTGTTGAAGAGCCGAGAATTTACACAACAGCATGAGCTCTTACCGTTACGAA 1440  
K E A V E E P R I Y T N S M S S Y R Y E  
GACGGAGTTCCTAAAGATGTCCTCAGCAAGCTAAACGGCATGGGCCACAAATTCGGCACA 1500  
D G V P K D V L S K L N G M G H K F G T  
AGTCCGGTGGATATCGGAAACGTGCAAAGCATATCGATCGACCATGAAAACGGCACCTTT 1560  
S P V D I G N V Q S I S I D H E N G T F  
AAAGGTGTAGCTGATTCAAGCAGAAACGGCGCGGATCGGCATTAATTTAAAACGTAAA 1620

K G V A D S S R N G A A I G I N L K R K  
**TAA**ataaaaaaactgtactcgcttcaaagagtacagtttttcatgcagatctttaata 57  
 .  
 acaacgggcatttgctgatgcaacgggcatttgctgatgctctgtatccctgattgcaatcc 117  
 aaaatgacagaatgatgactgcttctttgacaaaacgtctttattctgctaatagcacgtct 177  
 atcttcatcttttcatcttctgtttatctcatcaagaaatgtctgaaacgcacttgtaataa 237  
 aaaagtctttcctgtatataaaagacgatctctaagtcttgatgctggcggcagtttat 297  
 gaatccatacatttgtacgatgctcggagccgtcaacacgggactttgggagcagcgcgcg 357  
 taccatccccggcggaacacctttataatagcctccaatgtgccaactctatgattt 417  
 tttgattgtgtatgcttctctctagtaactctttgaccctgtcacgatgagaacagc 477  
 cagccccaaaaagagcatcggctgctgaagcatgtcttctgcccctcccctctcgtgatg 537  
 aaatcaaaactaattcatcatgggaacatggagttgtctaactgcagcgtgttcaaccg 597  
 gccatatacaaaaagcgcacatcaactttatgatcaagaacctgttgaaatcaaatgatgcg 657  
 tatcagaccagcccggcgctcgaccacgcgctgcctatagt 699

Fig. 4.2.7. Nucleotide sequences and deduced amino acid sequences determined from the Glutamyltranspeptidase gene of strain CBP, chungkookjang biopolymer producer.

2) PBP

CBP균주에 변이 처리하여 제작된 PGA우위 생산성변이주 PBP균주의  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase 유전자의 구조를 결정하였다. 이 유전자는 1,620 bp로 구성되었으며, ORF는 540의 아미노산을 코드 함을 알 수 있었으며, 상류 영역 약 900 bp와 하류영역 약 1,300 bp가 결정되었다.

tgaataaattatatataagaggatgggtctt -840  
 ggtttgaagaatataatagtaataattaatgaaaaacaaggatataaaaaatgtctatacaa -781  
 ttaaagaacatatattaaatgagttgcgctgttttttaaaaaagattcttactactttca -721  
 ccgtataaaataagctataaatcatttttaaatagttttgtaacatagatgaaatztatcc -661  
 acctgacattcctaaaaaatcctcttaaaacgatatctgacgctcccaatztatggagc -601  
 ttccgcaaaaacatacaaaaaaagacacaatttcaaattgtgtcctaactcctcatccttt -541  
 acatcaatatcttccgggattgggttcatttaatatcttctgcacaagtgctttgtaattc -481  
 tccagctgttcgagatgcgctttgaaactgctccttataaatcaaaaatgctccccgtca -421  
 tgaacggctctgattcttcccttcgagcaccaagcttttaataataatcctctgaaagattt -361  
 gtatatctgctgtttcttcaatcgtaaaatacatatagcagtccttcttaatccgtat -301  
 gctgattcctaataatagcacatggctcatatcaatataatcaattttgacagaaaaacgg -241  
 ctttatgcactatataaatataccatttgtcacttgtgaaaacgctgtaattttttacgc -181  
 taagattgtaacaatacagcttcatataggagggagaacatgaaaagaacgtggaacgtc -121  
 tgtttaacagctctgcttagtgcttctgtagtcgctggaagtgtcccttttcacgcggaa -61  
 gctaaaaaacgcgccccaaaagctacgatgagtacaacaagtagatgttgaaaagacggc -1  
**ATC**GTTGCGACCGCACATCCTCTTGCTTCTGAAATCGGTGCTGATGTGCTGAAAAAAGGA 60  
 M V A T A H P L A S E I G A D V L K K G  
 GGAATGCTATTGACGCAGCGGTTGCCATTCAATTTGCACTCAATGTAACAGAGCCGATG 120

G N A I D A A V A I Q F A L N V T E P M  
 ATGTCAGGTATTGGCGCGCGGTTTTATGATGGTGTATGACGGAAAAACGAAGGATACA 180  
 M S G I G G G G F M M V Y D G K T K D T  
 ACGATAATCGACAGCCGTGAGCGTGTCCAGCAGGCGCAACTCCTGATATGTTTCTGGAC 240  
 T I I D S R E R A P A G A T P D M F L D  
 GAAAACGAAAAAGCAATACCTTTCTCTGAACGTGTAACAAAAGGTACTGCCGTTGGGGTT 300  
 E N G K A I P F S E R V T K G T A V G V  
 CCAGGCACTCTGAAAGGGCTGGAAGAAGCCTTGGATAAATGGGGAACCCGTTTCGATGAAG 360  
 P G T L K G L E E A L D K W G T R S M K  
 CAATTAATTACCCCTTCTATTAACTCGCTGAAAAAGGCTTTCCGATTGATTCTGTGTG 420  
 Q L I T P S I K L A E K G F P I D S V L  
 GCAGATGCCATTTCTGATTATCAGGAAAACTTTTCACGGACTGCCGCAAAAAGATGTATTT 480  
 A D A I S D Y Q E K L S R T A A K D V F  
 TTACCAAATGGCGAACCGCTTAAAGAAGGAGATACCCTTATTCAAAGGATTTGGCTAAA 540  
 L P N G E P L K E G D T L I Q K D L A K  
 ACATTTAAGCTTATTCGCTCCAAAGGCACTAACGCTTTTTATAAAGGAAAATTCGCCAAG 600  
 T F K L I R S K G T N A F Y K G K F A K  
 ACGCTTTCTGACACTGTCCAGGATTTCCGGCGGATCAATGACAGAAAAAGATTTAGAAAAT 660  
 T L S D T V Q D F G G S M T E K D L E N  
 TACGACATTACAATTGATGAACCGATTTGGGGGAGACTATCAAGGCTATCAAATCGCTACT 720  
 Y D I T I D E P I W G D Y Q G Y Q I A T  
 ACTCCTCCTCCAAGCTCCGGCGGTATTTTCTTATTGCAAATGCTGAAAATCCTTGATGAT 780  
 T P P P S S G G I F L L Q M L K I L D D  
 TTTAACCTTTTACAATACGATGTCCGCTCATGGGAAAAATATCAGCTGCTTGCTGAAACG 840  
 F N L S Q Y D V R S W E K Y Q L L A E T  
 ATGCATTTGTCTTATGCCGACCGTGCCTTACGCAGGTGATCCCGAATTTGTAAATGTT 900  
 M H L S Y A D R A S Y A G D P E F V N V  
 CCTCTCAAAGGCTTGCTTACCCCGATATATTAAGAAGCCAGCAATTAATCAACCTA 960  
 P L K G L L H P D Y I K E R Q Q L I N L  
 GATCAAGTGAATAAAGAACCAGAAAGCCGGTGACCCTTGAAAATACCAAGAAGGATCAGCA 1020  
 D Q V N K E P K A G D P W K Y Q E G S A  
 AACTATAACAAGTTGAACAGCCGAAAGACAAAGTAGAAGGCCAAACAACCCACTTTACA 1080  
 N Y K Q V E Q P K D K V E G Q T T H F T  
 GTTGCTGACCGTTGGGGAAATGTTGTTTCTTATAACAACAATCGAACAGCTATTTCGGA 1140  
 V A D R W G N V V S Y T T T I E Q L F G  
 ACGGGTATTATGGTCCCTGATTACGGTGTCTATCCTAAACAATGAATTAACGGATTTTGAT 1200  
 T G I M V P D Y G V I L N N E L T D F D  
 GCGATACCAGGCGGAGCTAACGAAGTACAGCCAAACAACGGCCTTTAAGCAGCATGACC 1260  
 A I P G G A N E V Q P N K R P L S S M T  
 CCGACGATTTTATTTAAGGATGACAAGCCTGTCTCACTGTTGGATCTCCTGGCGGGCG 1320  
 P T I L F K D D K P V L T V G S P G G A  
 ACAATTATTTACCCGTTTTTGCAAACCATTCTCTACCACATTGAATATGGTATGGAATTA 1380  
 T I I S P V L Q T I L Y H I E Y G M E L  
 AAAGAAGCTGTTGAAGAGCCGAGAATTTACACAAACAGCATGAGCTCTTACCGTTACGAA 1440  
 K E A V E E P R I Y T N S M S S Y R Y E

```

GACGGAGTTCCTAAAGATGTCCTCAGCAAGCTAAACGGCATGGGCCACAAATTCGGCACA 1500
D G V P K D V L S K L N G M G H K F G T
AGTCCGGTGGATATCGGAAACGTGCAAAGCATATCGATCGACCATGAAAACGGCACCTTT 1560
S P V D I G N V Q S I S I D H E N G T F
AAAGGTGTGGCTGATTCAAGCAGAAACGGCGCGGCGATCGGCATTAATTTAAAACGTAAA 1620
K G V A D S S R N G A A I G I N L K R K
TAAataaaaaaactgtactcgcttcaaatgagtacagttttttcatgcagatctttaata 57
.
acaacggggcatttgctgatgctctgtatccctgattgcaatccaaaatgacagaatgat 117
gactgcttctttgacaaaatctttattctgctaatagcacgtctatcttcatcttttcatt 177
tcgtttatctcatcaagaaatgtctgaaacgcactcgtaataaaaaagtctttcctgtat 237
ataaagacgatctctaagtcttgatgctggtggcagctgatgaatccatacatttgta 297
cgatgctcggagcagtcacacagcggactttgggagcagcgcctacccatcccggcggaa 357
acaccttttataatagcctccaatgtgcaaaactctatgattttttgattgtgtatgcct 417
gcttcctctagtaatcttttgaccctgtcacgatgagaacagccagcccaaaaaagagc 477
atcggctgctgaagcagtgcttctgacctccttctcgtgatgaaatcaaaactaattca 537
tcatggggagacatggagttgtcttaactgcagcgtgttcaaccggcccatatacaaaagc 597
ccatcaactttatgatcaagaacctgtgaaatcaaatgatgcgtatcagctgtgttccact 657
gataaatccacttcaggaaaacgcctgaggaaggatgctgcatgctcaggcagatgcgtt 717
accgctgctgtttccagtgatccgatccgcaaaggcccttttggttgctgctcattcgg 777
gtcgtatttttcagcttggtctaacagcgataaacttgatctgcatattgtaaaagattt 837
tctcctgcagcagtaagcttccattcccgatctcgttcgatgaaaaagcctgatattcaa 897
tcttctcaaggttatgcactctggctgtcacattcgactgaacataattcagcatttgg 957
gctgctttcgttatgcttcccttcgcgagcaacagcctgaaaaatttttaaactcctcgctt 1017
tccacgcgctctcacctgcttgctatgatgaaaagtgatattggctatcatatttggtca 1077
tttactcgaagaaaaccgctatgtaaaatgtaaaagatgaaaatacaattcaatga 1137
ggaggcagacagcatgaaagctgtaattcacaacggaaaagcggctcttctgggggtatc 1197
agttcaggacgttccatcaacaaagcctggatcggagaggttaaaggttaaattaaaatc 1257
tgcaggaccagcccggcgcgtgcaccacgcgtgccctatagtatcgaattcccgcggccg 1317
ccaggcggccggagcaggatcgcat 1342

```

Fig. 4.2.8. Nucleotide sequences and amino acid sequences determined from the  $\gamma$ - Glutamyltranspeptidase gene of the strain PBP, PGA biopolymer hyper producer.

### 3) CBP균주와 PBP균주의 $\gamma$ - Glutamyltranspeptidase의 비교

#### 가) 아미노산 배열의 비교

청국장 biopolymer 생산균주인 CBP 균주와 PGA 우위생산성 변이주 PBP균주의  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase의 아미노산 배열을 비교해 본 결과 Fig. 4-2-9 와 같이 X→F, S→P 치환변이가 발견되었다.

```

CBP      MVATAHPLASEIGADVLKKGNAIDA AVAIQFALNVTEPMMSGIGGGGFMMVYDGKTKDT
PBP      MVATAHPLASEIGADVLKKGNAIDA AVAIQFALNVTEPMMSGIGGGGFMMVYDGKTKDT
*****

CBP      TIIDS RERAPAGATPDMFLDENGKAI PFSERVTKGTAVGVPGLKGLEEALDKWGTRSMK
PBP      TIIDS RERAPAGATPDMFLDENGKAI PFSERVTKGTAVGVPGLKGLEEALDKWGTRSMK
*****

CBP      QLITPSIKLAEKGFPI DSVLADAI SDYQEKLSRTAAKDVFLPNGEPLKEGDTLI QKDLAK
PBP      QLITPSIKLAEKGFPI DSVLADAI SDYQEKLSRTAAKDVFLPNGEPLKEGDTLI QKDLAK
*****

CBP      TFKLIRSKGTNAFYKGF AKTLDSTVQDFGGSMTEKDLENYDIT IDEPIWGDYQGYQIAT
PBP      TFKLIRSKGTNAFYKGF AKTLDSTVQDFGGSMTEKDLENYDIT IDEPIWGDYQGYQIAT
*****

CBP      TPPPSSGGIFLLQMLKILDDFNLSQYDVRSWEKYQLLAETMHL SYADRASYAGDPEFVNV
PBP      TPPPSSGGIFLLQMLKILDDFNLSQYDVRSWEKYQLLAETMHL SYADRASYAGDPEFVNV
*****

CBP      PLKGLLHPDYIKERQQL INLDQVNKEPKAGDPWKYQEGSANYKQVEQPKDKVEGQTTHT
PBP      PLKGLLHPDYIKERQQL INLDQVNKEPKAGDPWKYQEGSANYKQVEQPKDKVEGQTTHT
*****

CBP      VADRWGNVVS YTTTIEQLFGTGIMVPDYGVILNNE L T D XDAIPGGANEVQPNKRPLSSMT
PBP      VADRWGNVVS YTTTIEQLFGTGIMVPDYGVILNNE L T D FDAIPGGANEVQPNKRPLSSMT
*****

CBP      PTILFKDDKPVLTVGSPGGATI I SSVLQTI LYHIEYGMELKEAVEEPR IYTNMSSSYRYE
PBP      PTILFKDDKPVLTVGSPGGATI I SSVLQTI LYHIEYGMELKEAVEEPR IYTNMSSSYRYE
*****

CBP      DGVPKDVL SKLNGMGHKFGTSPVDIGNVQSI SIDHENGTFKGVADSSRNGAAIGINLKRK
PBP      DGVPKDVL SKLNGMGHKFGTSPVDIGNVQSI SIDHENGTFKGVADSSRNGAAIGINLKRK
*****

```

Fig. 4.2.9 Comparison of amino acid sequence between  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase of the strain CBP and that of the strain PBP.

나) 상류영역 염기서열 비교

청국장 biopolymer 생산균주인 CBP 균주와 PGA 우위생산성 변이주 PBP균주의  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase의 아미노산 배열을 비교해 본 결과 이들 유전자의 상류영역도 C→T치환 및 A염기가 삽입된 것을 알 수 있었다.

```

CBP      ATAGCAGTCCCTTCTTAATCCGTATGCTGATTCTAATATAGCACATGGCTCATATCAATA
PBP      ATAGCAGTCCCTTCTTAATCCGTATGCTGATTCTAATATAGCACATGGCTCATATCAATA
*****

CBP      TAATCAATTTTGCACAGAAAAACGGCTTTATGCACTATATAATATACCATTGTGACCTG
PBP      TAATCAATTTTGCACAGAAAAACGGCTTTATGCACTATATAATATACCATTGTGACTTG
*****

CBP      TGAAAACGCTGTAATTTTTTTACGCTAAGATTGTAACAATACAGCTTCATATAGGAGGGA
PBP      TGAAAACGCTGTAATTTTTTTACGCTAAGATTGTAACAATACAGCTTCATATAGGAGGGA
*****

CBP      GAACATGAAAAGAACGTGGAACGTCTGTTTAAACAGCTCTGCTTAGTGTCTGTTAGTCGC
PBP      GAACATGAAAAGAACGTGGAACGTCTGTTTAAACAGCTCTGCTTAGTGTCTGTTAGTCGC
*****

CBP      TGGAAGTGCCCTTTTCACGCGGAAGCTAAAAA-CCGCCAAAAGCTACGATGAGTACAA
PBP      TGGAAGTGCCCTTTTCACGCGGAAGCTAAAAAACGCCAAAAGCTACGATGAGTACAA
*****

CBP      ACAAGTAGATGTTGAAAAGACGGC
PBP      ACAAGTAGATGTTGAAAAGACGGC
*****

```

Fig. 4.2.10. Comparison of the upstream nucleotide sequences between  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase gene of the strain CBP and the strain PBP.

다) 구조유전자 염기서열 비교

청국장 biopolymer 생산균주인 CBP 균주와 PGA 우위생산성 변이주 PBP균주의  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase의 아미노산 배열을 비교해 본 결과 이들 유전자의 구조 유전자 부위도 T→G, T→C, A→G가 치환된 것을 알 수 있었다.

```

CBP      ATGGTTGCGACCGCACATCCTCTTGCTTCTGAAATCGGTGCTGATGTGCTGAAAAAGGA
PBP      ATGGTTGCGACCGCACATCCTCTTGCTTCTGAAATCGGTGCTGATGTGCTGAAAAAGGA

```

\*\*\*\*\*

CBP GAAATGCTATTGACGCAGCGGTTGCCATTCAATTTGCACTCAATGTAACAGAGCCGATG  
PBP GAAATGCTATTGACGCAGCGGTTGCCATTCAATTTGCACTCAATGTAACAGAGCCGATG  
\*\*\*\*\*

CBP ATGTCAGGTATTGGCGGCGGGTTTTATGATGGTGTATGACGGAAAAACGAAGGATACA  
PBP ATGTCAGGTATTGGCGGCGGGTTTTATGATGGTGTATGACGGAAAAACGAAGGATACA  
\*\*\*\*\*

CBP ACGATAATCGACAGCCGTGAGCGTGCTCCAGCAGGCGCAACTCCTGATATGTTTCTGGAC  
PBP ACGATAATCGACAGCCGTGAGCGTGCTCCAGCAGGCGCAACTCCTGATATGTTTCTGGAC  
\*\*\*\*\*

CBP GAAAACGGAAAAGCAATACCTTTCTCTGAACGTGTAACAAAAGGTACTGCCGTTGGTGGT  
PBP GAAAACGGAAAAGCAATACCTTTCTCTGAACGTGTAACAAAAGGTACTGCCGTTGGGTT  
\*\*\*\*\*

CBP CCAGGCACTCTGAAAGGGCTGGAAGAAGCCTTGATAAATGGGAACCCGTTTCGATGAAG  
PBP CCAGGCACTCTGAAAGGGCTGGAAGAAGCCTTGATAAATGGGAACCCGTTTCGATGAAG  
\*\*\*\*\*

CBP CAATTAATTACCCCTTCTATTAAACTCGCTGAAAAGGCTTCCGATTGATTCTGTGTTG  
PBP CAATTAATTACCCCTTCTATTAAACTCGCTGAAAAGGCTTCCGATTGATTCTGTGTTG  
\*\*\*\*\*

CBP GCAGATGCCATTTCTGATTATCAGGAAAACTTTCACGGACTGCCGAAAAGATGTATTT  
PBP GCAGATGCCATTTCTGATTATCAGGAAAACTTTCACGGACTGCCGAAAAGATGTATTT  
\*\*\*\*\*

CBP TTACCAAATGGCGAACCGCTTAAGAAGGAGATACCCTTATTCAAAGGATTTGGCTAAA  
PBP TTACCAAATGGCGAACCGCTTAAGAAGGAGATACCCTTATTCAAAGGATTTGGCTAAA  
\*\*\*\*\*

CBP ACATTTAAGCTTATTCGCTCCAAAGGCACTAACGCTTTTATAAAGGAAAATTCGCCAAG  
PBP ACATTTAAGCTTATTCGCTCCAAAGGCACTAACGCTTTTATAAAGGAAAATTCGCCAAG  
\*\*\*\*\*

CBP ACGCTTCTGACACTGTCCAGGATTTGGCGGATCAATGACAGAAAAGATTTAGAAAAT

PBP ACGCTTCTGACTGTCCAGGATTTCCGGCGATCAATGACAGAAAAAGATTAGAAAAT  
 \*\*\*\*\*

CBP TACGACATTACAATTGATGAACCGATTTGGGAGACTATCAAGGCTATCAAATCGCTACT  
 PBP TACGACATTACAATTGATGAACCGATTTGGGAGACTATCAAGGCTATCAAATCGCTACT  
 \*\*\*\*\*

CBP ACTCCTCTCCAAGTCCGGCGTATTTCTTATTGCAAATGCTGAAAATCCTTGATGAT  
 PBP ACTCCTCTCCAAGTCCGGCGTATTTCTTATTGCAAATGCTGAAAATCCTTGATGAT  
 \*\*\*\*\*

CBP TTAACTTTTACAATACGATGTCCGCTCATGGGAAAAATATCAGCTGCTTGCTGAAACG  
 PBP TTAACTTTTACAATACGATGTCCGCTCATGGGAAAAATATCAGCTGCTTGCTGAAACG  
 \*\*\*\*\*

CBP ATGCATTGTCTTATGCCACCGTGCCTTACGCAGGTATCCCGAATTTGTAAATGTT  
 PBP ATGCATTGTCTTATGCCACCGTGCCTTACGCAGGTATCCCGAATTTGTAAATGTT  
 \*\*\*\*\*

CBP CCTCTCAAAGGCTTGCTTACCCCGATTATATTAAGAAGCCAGCAATTAATCAACCTA  
 PBP CCTCTCAAAGGCTTGCTTACCCCGATTATATTAAGAAGCCAGCAATTAATCAACCTA  
 \*\*\*\*\*

CBP GATCAAGTGAATAAAGAACCGAAAGCCGGTGACCCTTGAAATACCAAGAAGGATCAGCA  
 PBP GATCAAGTGAATAAAGAACCGAAAGCCGGTGACCCTTGAAATACCAAGAAGGATCAGCA  
 \*\*\*\*\*

CBP AACTATAAACAAGTTGAACAGCCGAAAGACAAAGTAGAAGCCAAACAACCCACTTTACA  
 PBP AACTATAAACAAGTTGAACAGCCGAAAGACAAAGTAGAAGCCAAACAACCCACTTTACA  
 \*\*\*\*\*

CBP GTTGCTGACCGTTGGGAAATGTTGTTTCCTATACAACAACAATCGAACAGCTATTTCGGA  
 PBP GTTGCTGACCGTTGGGAAATGTTGTTTCCTATACAACAACAATCGAACAGCTATTTCGGA  
 \*\*\*\*\*

CBP ACGGGTATTATGGTCCCTGATTACGGTGCATCCTAAACAATGAATTAACGGATTTTGAT  
 PBP ACGGGTATTATGGTCCCTGATTACGGTGCATCCTAAACAATGAATTAACGGATTTTGAT  
 \*\*\*\*\*

```

CBP      GCGATACCAGGCGGAGCTAACGAAGTACAGCCAAACAAACGGCCTTTAAGCAGCATGACC
PBP      GCGATACCAGGCGGAGCTAACGAAGTACAGCCAAACAAACGGCCTTTAAGCAGCATGACC
*****

CBP      CCGACGATTTATTTAAGGATGACAAGCCTGTCTCACTGTTGGATCTCCTGGCGGGGCG
PBP      CCGACGATTTATTTAAGGATGACAAGCCTGTCTCACTGTTGGATCTCCTGGCGGGGCG
*****

CBP      ACAATTATTTCATCCGTTTTGCAAACCATTCTCTACCACATTGAATATGGTATGGAATTA
PBP      ACAATTATTTCACCCGTTTTGCAAACCATTCTCTACCACATTGAATATGGTATGGAATTA
*****

CBP      AAAGAAGCTGTTGAAGAGCCGAGAATTTACACAAACAGCATGAGCTCTTACCGTTACGAA
PBP      AAAGAAGCTGTTGAAGAGCCGAGAATTTACACAAACAGCATGAGCTCTTACCGTTACGAA
*****

CBP      GACGGAGTTCCTAAAGATGTCCTCAGCAAGCTAAACGGCATGGGCCACAAATTCGGCACA
PBP      GACGGAGTTCCTAAAGATGTCCTCAGCAAGCTAAACGGCATGGGCCACAAATTCGGCACA
*****

CBP      AGTCCGGTGGATATCGGAAACGTGCAAAGCATATCGATCGACCATGAAAACGGCACCTTT
PBP      AGTCCGGTGGATATCGGAAACGTGCAAAGCATATCGATCGACCATGAAAACGGCACCTTT
*****

CBP      AAAGGTGTAAGCTGATTCAAGCAGAAACGGCGCGGATCGGCATTAATTTAAAACGTAAA
PBP      AAAGGTGTGGCTGATTCAAGCAGAAACGGCGCGGATCGGCATTAATTTAAAACGTAAA
*****

CBP      TAA
PBP      TAA
***

```

Fig. 4.2.11. Comparison of nucleotide sequence between structural gene of  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase gene from the strain CBP and that of the strain PBP.

라) 하류영역 염기서열 비교

청국장 biopolymer 생산균주인 CBP 균주와 PGA 우위생산성 변이주 PBP균주의  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase의 아미노산 배열을 비교해 본 결과 하류영역에서도 TGCAACGGGCATTGCTGA결실, AT 삽입 및 CG→A 치환 변이가 발견되었다.

```

CBP      ATAAAAAACTGTACTCGCTTCAAATGAGTACAGTTTTTTCATGCAGATCTTTAATAACA
PBP      ATAAAAAACTGTACTCGCTTCAAATGAGTACAGTTTTTTCATGCAGATCTTTAATAACA
*****

CBP      ACGGGCATTGCTGATGCAACGGGCATTGCTGATGCTCTGTATCCCTGATTGCAATCCAAA
PBP      ACGGGCATTGCTGA-----TGCTCTGTATCCCTGATTGCAATCCAAA
*****

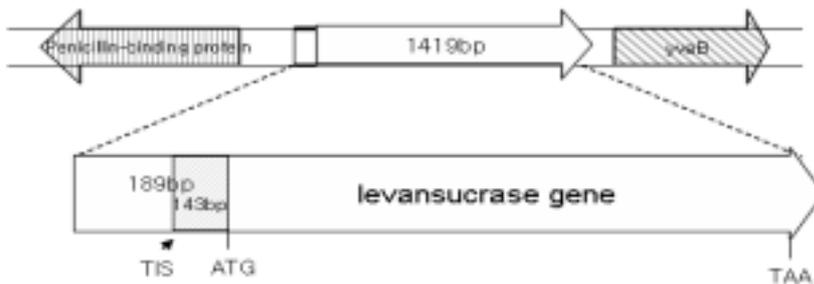
CBP      ATGACAGAAT--GATGACTGCTTCTTTGACAAACGCTTTATTCTGCTAATGCACGTCTA
PBP      ATGACAGAATATGATGACTGCTTCTTTGACAAA-ATCTTTATTCTGCTAATGCACGTCTA
*****

CBP      TCTTCAT
PBP      TCTTCAT
*****

```

Fig. 4.2.12. Comparison of downstream nucleotide sequence of  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase gene between the strain CBP and that of the strain PBP.

다. levansucrase gene의 클로닝 및 염기배열 결정



1) CBP

CBP 균주의 biopolymer 생산관련 levansucrase 유전자의 구조 및 추정되

는 아미노산 배열은 Fig. 4-2-13과 같다. 이 유전자는 1419 bp로 구성되어 있었으며 ORF는 473개의 아미노산을 코드 함이 확인 되었으며, 상류영역 약 180 bp의 구조가 밝혀졌으며 하류영역에도 약 80 bp가 결정되었다.

```

atttcggggccagtcagctccggccgcatggcggccgcggggaattcgattatcgcgcgggg -181
tttgttactgataaaagcagggaagacctaataatgtgtaaagggcaaaagtgtatactttgg -121
cgtcaccoccttacatatttttaggtctttttttattgtgcgtaactaacttgccatcttca -61
aacaggaggggctggaagaagcagaccgctaacacagtacataaaaaaggagacatgaacg -1
ATGAACATCAAAAAGTTTGCAAACAAGCAACAGTATTAACCTTTACTACCGCACTGCTG 60
M N I K K F A K Q A T V L T F T T A L L
GCAGGAGGCGCAACTCAAGCGTTTTGCGAAAGAAACGAACCAAAAGCCATATAAGGAAACA 120
A G G A T Q A F A K E T N Q K P Y K E T
TACGGCATTTCATATTACACGCCATGATATGCTGCAAATCCCTGAACAGCAAAAAAAT 180
Y G I S H I T R H D M L Q I P E Q Q K N
GAAAAATATCAAGTTCCTGAATTTCGATTCGTCCACAATTAATAATATCTCTTCTGCAAAA 240
E K Y Q V P E F D S S T I K N I S S A K
GGCCTGGACGTTTTGGGACAGCTGGCCATTACAAAACGCTGACGGCACTGTCGCAAACTAT 300
G L D V W D S W P L Q N A D G T V A N Y
CACGGCTACCACATCGTCTTTGCATTAGCCGGAGATCCTAAAAATGCGGATGACACATCG 360
H G Y H I V F A L A G D P K N A D D T S
ATTTACATGTTCTATCAAAAAGTCGGCGAAACTTCTATTGACAGCTGGAAAAACGCTGGC 420
I Y M F Y Q K V G E T S I D S W K N A G
CGCGTCTTTAAAGACAGCGACAAATTCGATGCAAATGATTCTATCCTAAAAGACCAAACG 480
R V F K D S D K F D A N D S I L K D Q T
CAAGAATGGTCAGGTTTCAGCCACATTTACATCTGACGGAAAAATCCGTTTATTCTACACT 540
Q E W S G S A T F T S D G K I R L F Y T
GATTTCTCCGGTAAACATTACGGCAAAACAAACACTGACAACCTGCACAGGTTAACGTATCA 600
D F S G K H Y G K Q T L T T A Q V N V S
GCATCAGACAGCTCTTTGAACATCAACGGTGTAGAGGATTATAAATCAATCTTTGACGGT 660
A S D S S L N I N G V E D Y K S I F D G
GACGGCAAAACGTATCAAAAATGTACAGCAGTTTCATCGATGAAGGCAACTACAGCTCAGGC 720
D G K T Y Q N V Q Q F I D E G N Y S S G
GACAACCATAACGCTGAGAGATCCTCCTACGTAGAAGATAAAGGCCACAAATACTTAGTA 780
D N H T L R D P H Y V E D K G H K Y L V
TTTGAAGCAAACACTGGAACCTGAAGATGGCTACCAAGGCGAAGAATCTTTATTTAACAAA 840
F E A N T G T E D G Y Q G E E S L F N K
GCATACTATGGCAAAAAGCACATCATTCTTCCGTCAAGAAAGTCAAAGCTTCTGCAAAGT 900
A Y Y G K S T S F F R Q E S Q K L L Q S
GATAAAAAACGCACTGCTGAATTAGCTAACGGCGCTCTCGGTATGATTGAGCTAAACGAT 960
D K K R T A E L A N G A L G M I E L N D
GATTACACACTGAAAAAGTGATGAAACCGCTGATTGCATCTAACACAGTAACAGATGAA 1020
D Y T L K K V M K P L I A S N T V T D E
ATTGAACGCGCAACGCTTTTAAAAATGAACGGCAAATGGTATCTGTTCACTGACTCCCGC 1080
I E R A N V F K M N G K W Y L F T D S R

```

GGGTCAAAAATGACGATTGACGGCATCACGTCTAACGATATTTACATGCTTGGCTATGTT 1140  
 G S K M T I D G I T S N D I Y M L G Y V  
 TCTAATTCTTTAACTGGCCCATACAAGCCGCTGAACAAAACCTGGCCTTGTGTTAAAAATG 1200  
 S N S L T G P Y K P L N K T G L V L K M  
 GATCTTGATCCTAACGATGTAACCTTTACTTACTCACACTTCGCTGTACCTCAAGCGAAA 1260  
 D L D P N D V T F T Y S H F A V P Q A K  
 GGAAACAATGTCGTGATTACAAGCTATATGACAAACAGAGGATTCTACGCAGACAAACAA 1320  
 G N N V V I T S Y M T N R G F Y A D K Q  
 TCAACGTTTGCGCCAAGCTTCCTGCTGAACATCAAAGGCAAGAAAACATCTGTTGTCAA 1380  
 S T F A P S F L L N I K G K K T S V V K  
 GACAGCATCCTTGAACAAGGACAATTAACAGTTAACAAATAAactcgagcccaatcactag 18  
 D S I L E Q G Q L T V N K .

tgaattcgggccgctgcaggtcgaccatattgggagagctcccaacgcggtgatcagtgg 78

Fig. 4.2.13. Nucleotide sequences and deduced amino acid sequences determined from the levansucrase gene of strain CBP, chungkookjang biopolymer producer.

## 2) PBP

CBP균주에 변이 처리하여 제작된 PGA우위 생산성변이주 PBP균주의  $\psi$ -levansucrase 유전자의 구조를 결정하였다. 이 유전자는 1419 bp 로 구성되었으며, ORF는 473의 아미노산을 코드 함을 알 수 있었으며, 상류영역 약 1,800 bp와 하류영역 약 1,300 bp가 결정되었다.

tgacagccagctccggccgcatg-1801  
 gcgcccggggaattcgattactatagggcacgcgtggtcgacggcccgggctggtctgt-1741  
 ccggtgatctccaaataaagccgttcattctcggctgtcacctgtgcagccgttccatcc-1681  
 tgcaacaggtagctgccaacatagcggctgtatatcgccgatcaattgcttttttcttt-1621  
 ttatcagcaggacgttccgggacctcatatggctggccaaatagaatatgttccgcgccc-1561  
 ttcagaatcgcttgttcatactcagtatcctcttccttattactcaaatagatcagtgtt-1501  
 ttacgatgatcgatataatcggatcatcaacgctcgaatagccgggcatcctccgctgtgg-1441  
 ctgacaatccgccccttttccaggactattttgcagtaccagccaaagccataatcaatt-1381  
 gtttctccattgttgaggcgcactggagaaaacgcagattccttagaagccttgctgatg-1321  
 aaatcgctcctgatataaagcctgatcaaatcgaaacaaatcgcttgtgacagagttcacc-1261  
 gtcccatctccctgtatgccatcgagatacacacatagttcgttttccctccagctcatca-1201  
 gggaggacgtatgtttcggaatgtacatcatacacatccatagcataatgatcaatt-1141  
 cgctcaggcgaaagcctcctgttatacactcttgtttcattcatgcccgatcggtgaaaaa-1081  
 atacttgttttcataaaaatccgcatagctcatgccagatgctttttcaatgataaccgcc-1021  
 agcagcacatacccccgtattgctgtacatccagccttcattcggttcaaaaataaccagat -961  
 agcccctcattcatcagcatatcgacaatatcctgattcacccgcaatcttgtgtgaatcc -901  
 caattggcaaaaaaccatcccatataatcaggaagccctgacgtatggttcaataaatgc -841  
 cgaatcgttacgcccctgatacggaaaaaccgggagccagccagatccactttatcctcatag -781  
 ccaagaatccccttctcctccagcaagatgattcccaatgctgtaaaaggctttgacaaa -721  
 gacgctaactcaaacaaagagttggttttcaacgggctgttttccgctcatttccgcatag -661

ccaaaagagtggatataaaaatcgcaccctccgcagccagaaccgtcccgttaaac -601  
 tgatgtttttcgcctaataatgtctcaaataatgtctgaagatgctttcttttattctgtttc -541  
 attcctccacctcccatatctctgtacgttactaacctaactaacgtttcaaataattttga -481  
 aaaacccttcagttagagatccttttaaccatcacatatacctgcggttcactactat -421  
 ttagtgaaatgagatattatgatattttctgaattatgattaaaaaggcaactttatgcc -361  
 catgcaacagaagctataaaaaatacagagaatgaaaagaacagatagatttttttagtt -301  
 ctttaggcccgtagaccgcaaatccttttatgattttctatcaaacaaaaggaggaaaata -241  
 gaccagttgcaatccaacagagagtctaataagaatgaggtcgaaaagtaaatcgcgcggg -181  
 tttgttactgataaaagcaggcaagacctaaaatgtgtaaagggcaaaagtgtataccttgg -121  
 cgtcacccttacatatttttaggtccttttttattgtgcgtaactaacttgccatcttca -61  
 aacaggaggggctggaagaagcagaccgctaacacagtacataaaaaaggagacatgaacg -1  
 ATGAACATCAAAAAGTTTGCAAAACAGCAACAGTATTAACCTTTACTACCGCACTGCTG 60  
 M N I K K F A K Q A T V L T F T T A L L  
 GCAGGAGGCGCAACTCAAGCGTTTTCGCAAAAGAAACGAACCAAAAGCCATATAAGGAAACA 120  
 A G G A T Q A F A K E T N Q K P Y K E T  
 TACGGCATTTCATATTACACGCCATGATATGCTGCAAAATCCCTGAACAGCAAAAAAAT 180  
 Y G I S H I T R H D M L Q I P E Q Q K N  
 GAAAAATATCAAGTTCCTGAATTCGATTCGTCCACAATTAATAATATCTCTTCTGCAAAA 240  
 E K Y Q V P E F D S S T I K N I S S A K  
 GGCCTGGACGTTTGGGACAGCTGGCCATTACAAAACGCTGACGGCACTGTGCAAACTAT 300  
 G L D V W D S W P L Q N A D G T V A N Y  
 CACGGCTACCACATCGTCTTTGCATTAGCCGGAGATCCTAAAAATGCGGATGACACATCG 360  
 H G Y H I V F A L A G D P K N A D D T S  
 ATTTACATGTTCTATCAAAAAGTCGGCGAAAACCTTCTATTGACAGCTGGAAAAACGCTGGC 420  
 I Y M F Y Q K V G E T S I D S W K N A G  
 CGCGTCTTTAAAGACAGCGACAAAATTCGATGCAAAATGATTCTATCCTAAAAAGACCAAACG 480  
 R V F K D S D K F D A N D S I L K D Q T  
 CAAGAATGGTCAGGTTTCAGCCACATTTACATCTGACGAAAAATCCGTTTATTCTACTACT 540  
 Q E W S G S A T F T S D G K I R L F Y T  
 GATTTCTCCGGTAAACATTACGGCAACAAACACTGACAACACTGCACAGGTTAACGTATCA 600  
 D F S G K H Y G K Q T L T T A Q V N V S  
 GCATCAGACAGCTCTTTGAACATCAACGGTGTAGAGGATTATAAATCAATCTTTGACGGT 660  
 A S D S S L N I N G V E D Y K S I F D G  
 GACGGCAAAACGTATCAAAATGTACAGCAGTTCATCGATGAAGGCAACTACAGCTCAGGC 720  
 D G K T Y Q N V Q Q F I D E G N Y S S G  
 GACAACCATACGCTGAGAGATCCTCACTACGTAGAAGATAAAGGCCCAAAATACTTAGTA 780  
 D N H T L R D P H Y V E D K G H K Y L V  
 TTTGAAGCAAACACTGGAAGTGAAGATGGCTACCAAGGCGAAGAATCTTTATTTAACAAA 840  
 F E A N T G T E D G Y Q G E E S L F N K  
 GCATACTATGGCAAAAGCACATCATTCTTCCGTCAAGAAAGTCAAAAGCTTCTGCAAAAGT 900  
 A Y Y G K S T S F F R Q E S Q K L L Q S  
 GATAAAAACGCACTGCTGAATTAGCTAACGGCGCTCTCGGTATGATTGAGCTAAACGAT 960  
 D K K R T A E L A N G A L G M I E L N D  
 GATTACACTGAAAAAGTGATGAAACCGCTGATTGCATCTAACACAGTAACAGATGAA 1020  
 D Y T L K K V M K P L I A S N T V T D E  
 ATTGAACGCGCAACGCTCTTTAAAATGAACGGCAAAATGGTACCTGTTCACTGACTCCCGC 1080

I E R A N V F K M N G K W Y L F T D S R  
GGGTCAAAAATGACGATTGACGGCATCACGTCTAACGATATTTACATGCTTGGCTATGTT 1140  
G S K M T I D G I T S N D I Y M L G Y V  
TCTAATTCTTTAACTGGCCCATACAAGCCGCTGAACAAAACCTGGCCTTGTGTTAAAAATG 1200  
S N S L T G P Y K P L N K T G L V L K M  
GATCTTGATCCTAACGATGTAACCTTTACTTACTCACACTTCGCTGTACCTCAAGCGAAA 1260  
D L D P N D V T F T Y S H F A V P Q A K  
GGAAACAATGTCGTGATTACAAGCTATATGACAAACAGAGGATTCTACGCAGACAAACAA 1320  
G N N V V I T S Y M T N R G F Y A D K Q  
TCAACGTTTGCGCCAAGCTTCCTGCTGAACATCAAAGGCAAGAAAACATCTGTTGTCAA 1380  
S T F A P S F L L N I K G K K T S V V K  
GACAGCATCCTTGAACAAGGACAATTAACAGTTAACAAATAAaaacgcaaaagaaaatgc 18  
D S I L E Q G Q L T V N K .  
cgatatacctattggcattttcttttattttcttatcaacataaagggtgaatcccatatgaa 78  
ctataataaagcagycaaatgggtaacctcattcctaaccttttttaggaatattgctgtt 138  
tatacgaactattttcacaagaagaacatgacaaaaacaaaatcaaacagaagccgga 198  
ctaccggggcggcatatcattttacgacgcccggataaatggaaaaatgacctcaaaaacc 258  
gatctattttgatggcaagtatcattattttctatctatataaccgggattacccaaaagg 318  
caacggcacagaatggcgccatgccgtctcagaggatttgggtgactggaccgatgaagg 378  
cgtggcgattccgaaatatacaaacccggacgggtgacatttggaccggttccgtcgtggt 438  
tgataaagagaacacagccggctttgggaaaaatgcgcttgtcgcgattgtgacacagcc 498  
ctcagccaaagacaaaaaacaggaacaatatttgggttacagcacagataagggaaaaatc 558  
attcaaatctacagtggaaccccgcttatgcctaaccgggtacagacgatttcagaga 618  
tccgaaagtcatatgggatgaccaggataacaaatgggtcatgggtcatgggtgaaggatc 678  
aaaaatcggcttttatgaatccgataatcttaaggactggcattacacaagcggattctt 738  
cccagaacagggcgggaatgggtggaatgtcccgcacctctacatgatgcgggcaagcgacgg 798  
aacgaataagtgggttctcgggtgccagcgcgaatggcaaaccgtggggcaaaccaaac 858  
gtacgcctactggaccggaagcttcgacggaaaagaattcaaagcggatcagactgaagc 918  
ccaatggcttgactatggcttcgactggatggcggtgtgacggttcgaagacagcaaaag 978  
cacagatccattagaaaagcgggtatgcgcttgccctggatgaacaattgggattatgcca 1038  
caacaccccagacaatgaagaacggctttaaaggccacagattctgtcatacgcgaactccg 1098  
gctgaaggagcaggatggaacatacagcctcgtctcacagccgattgaagctttggagca 1158  
gaccagcccgggcccgtcgaccacgcgtgccctatagt 1295

Fig. 4.2.14. Nucleotide sequences and amino acid sequences determined from the levansucrase gene of the strain PBP, PGA biopolymer hyper producer.

### 3) CBP균주와 PBP균주의 levansucrase의 비교

#### 가) 아미노산 배열의 비교

청국장 biopolymer 생산균주인 CBP 균주와 PGA 우위생산성 변이주 PBP 균주의 levansucrase의 아미노산 배열을 비교해 본 결과 Fig. 4-2-15와 같이

완전히 동일함을 알 수 있었다. 이로써 levansucrase는 변이 효과에 아무런 기여를 하지 않음을 알 수 있었다.

```

CBP      MNIKKFAKQATVLTFTTALLAGGATQAFKQETNPKPYKETYGISHITRHDMLQIPEQQKN
PBP      MNIKKFAKQATVLTFTTALLAGGATQAFKQETNPKPYKETYGISHITRHDMLQIPEQQKN
*****

CBP      EKQVPEFDSSTIKNISSAKGLDVWDSWPLQNADGTVANYHGYHIVFALAGDPKNADDT
PBP      EKQVPEFDSSTIKNISSAKGLDVWDSWPLQNADGTVANYHGYHIVFALAGDPKNADDT
*****

CBP      IYMFYQKVGETSIDSWKNAGRVFKDSKFDANDSILKDQTQEWSGSATFTSDGKIRLFYT
PBP      IYMFYQKVGETSIDSWKNAGRVFKDSKFDANDSILKDQTQEWSGSATFTSDGKIRLFYT
*****

CBP      DFGSKHYGKQTLTTAQVNVASDSSLNINGVEDYKSIDFGDGKTYQNVQQFIDEGNYSSG
PBP      DFGSKHYGKQTLTTAQVNVASDSSLNINGVEDYKSIDFGDGKTYQNVQQFIDEGNYSSG
*****

CBP      DNHTLRDPHYVEDKGHKYLVEANTGTEDGYQGEESLFNKAYYGKSTSFFRQESQKLLQS
PBP      DNHTLRDPHYVEDKGHKYLVEANTGTEDGYQGEESLFNKAYYGKSTSFFRQESQKLLQS
*****

CBP      DKKRTAELANGALGMIELNDYTLKKVMKPLIASNTVTDEIERANVFKMNGKWYLF TDSR
PBP      DKKRTAELANGALGMIELNDYTLKKVMKPLIASNTVTDEIERANVFKMNGKWYLF TDSR
*****

CBP      GSKMTIDGITSNDIYMLGYVSNLTPYKPLNKTGLVVKMDLDPNDVTFTYSHFAVPQAK
PBP      GSKMTIDGITSNDIYMLGYVSNLTPYKPLNKTGLVVKMDLDPNDVTFTYSHFAVPQAK
*****

CBP      GNNVVITSYMTNRGFYADKQSTFAPSFLLNKGGKTSVVKDSILEQGQLTVNK
PBP      GNNVVITSYMTNRGFYADKQSTFAPSFLLNKGGKTSVVKDSILEQGQLTVNK
*****

```

Fig. 4.2.15. Comparison of amino acid sequence between levansucrase of the strain CBP and that of the strain PBP.

나) 상류영역 염기서열 비교

청국장 biopolymer 생산균주인 CBP 균주와 PGA 우위생산성 변이주 PBP 균주의 levansucrase의 아미노산 배열을 비교해 본 결과 이들 유전자의 상류영역은 T→C가 치환된 것을 알 수 있었다.

```

CBP                                     TCGCGCGGGTTT
PBP                                     TCGCGCGGGTTT
*****

CBP      GTTACTGATAAAGCAGGCAAGACCTAAAATGTGTAAAGGGCAAAGTGTATACTTTGGCGT
PBP      GTTACTGATAAAGCAGGCAAGACCTAAAATGTGTAAAGGGCAAAGTGTATACC TTGGCGT
*****

CBP      CACCCCTTACATATTTTAGGTCTTTTTTTATTGTGCGTAACTAACTTGCCATCTTCAAAC
PBP      CACCCCTTACATATTTTAGGTCTTTTTTTATTGTGCGTAACTAACTTGCCATCTTCAAAC
*****

CBP      AGGAGGGCTGGAAGAAGCAGACCGCTAACACAGTACATAAAAAAGGAGACATGAACG
PBP      AGGAGGGCTGGAAGAAGCAGACCGCTAACACAGTACATAAAAAAGGAGACATGAACG
*****

```

Fig. 4.2.16. Comparison of the upstream nucleotide sequences between levansucrase gene of the strain CBP and the strain PBP.

다) 구조유전자 염기서열 비교

청국장 biopolymer 생산균주인 CBP 균주와 PGA 우위생산성 변이주 PBP 균주의 levansucrase의 아미노산 배열을 비교해 본 결과 이들 유전자의 구조유전자 부위도 T→C가 치환변이 된 것을 알 수 있었다.

```

CBP      ATGAACATCAAAAAGTTTGCAAAACAAGCAACAGTATTAACCTTTACTACCGCACTGCTG
PBP      ATGAACATCAAAAAGTTTGCAAAACAAGCAACAGTATTAACCTTTACTACCGCACTGCTG
*****

CBP      GCAGGAGGCGCAACTCAAGCGTTTGCGAAAGAAACGAACCAAAAGCCATATAAGGAAACA
PBP      GCAGGAGGCGCAACTCAAGCGTTTGCGAAAGAAACGAACCAAAAGCCATATAAGGAAACA
*****

```

CBP TACGGCATTCCCATATTACACGCCATGATATGCTGCAAATCCCTGAACAGCAAAAAAAT  
 PBP TACGGCATTCCCATATTACACGCCATGATATGCTGCAAATCCCTGAACAGCAAAAAAAT  
 \*\*\*\*\*

CBP GAAAAATATCAAGTTCCTGAATTGATTGCTCCACAATAAAAATATCTTCTGCAAAA  
 PBP GAAAAATATCAAGTTCCTGAATTGATTGCTCCACAATAAAAATATCTTCTGCAAAA  
 \*\*\*\*\*

CBP GGCCTGGACGTTTGGGACAGCTGGCCATTACAAAACGCTGACGGCACTGTCGCAAACAT  
 PBP GGCCTGGACGTTTGGGACAGCTGGCCATTACAAAACGCTGACGGCACTGTCGCAAACAT  
 \*\*\*\*\*

CBP CACGGCTACCACATCGTCTTTCATTAGCCGAGATCCTAAAAATGCGGATGACACATCG  
 PBP CACGGCTACCACATCGTCTTTCATTAGCCGAGATCCTAAAAATGCGGATGACACATCG  
 \*\*\*\*\*

CBP ATTTACATGTTCTATCAAAAAGTCGGCGAACTTCTATTGACAGCTGGAAAAACGCTGGC  
 PBP ATTTACATGTTCTATCAAAAAGTCGGCGAACTTCTATTGACAGCTGGAAAAACGCTGGC  
 \*\*\*\*\*

CBP CGCGTCTTTAAAGACAGCGACAAATTCGATGCAAATGATTCTATCCTAAAAGACCAAACG  
 PBP CGCGTCTTTAAAGACAGCGACAAATTCGATGCAAATGATTCTATCCTAAAAGACCAAACG  
 \*\*\*\*\*

CBP CAAGAATGGTCAGGTTAGCCACATTTACATCTGACGGAAAAATCCGTTTATTCTACACT  
 PBP CAAGAATGGTCAGGTTAGCCACATTTACATCTGACGGAAAAATCCGTTTATTCTACACT  
 \*\*\*\*\*

CBP GATTTCTCCGGTAAACATTACGGCAAACAACACTGACAACTGCACAGGTTAACGTATCA  
 PBP GATTTCTCCGGTAAACATTACGGCAAACAACACTGACAACTGCACAGGTTAACGTATCA  
 \*\*\*\*\*

CBP GCATCAGACAGCTCTTTGAACATCAACGGGTAGAGGATTATAAATCAATCTTTGACGGT  
 PBP GCATCAGACAGCTCTTTGAACATCAACGGGTAGAGGATTATAAATCAATCTTTGACGGT  
 \*\*\*\*\*

CBP GACGGCAAAACGTATCAAAATGTACAGCAGTTCATCGATGAAGGCAACTACAGCTCAGGC  
 PBP GACGGCAAAACGTATCAAAATGTACAGCAGTTCATCGATGAAGGCAACTACAGCTCAGGC  
 \*\*\*\*\*

CBP GACAACCATACGCTGAGAGATCCTCACTACGTAGAAGATAAAGGCCACAAATACTTAGTA  
PBP GACAACCATACGCTGAGAGATCCTCACTACGTAGAAGATAAAGGCCACAAATACTTAGTA  
\*\*\*\*\*

CBP TTTGAAGCAAACACTGGAAGTGAAGATGGCTACCAAGGCGAAGAATCTTTATTTAACAAA  
PBP TTTGAAGCAAACACTGGAAGTGAAGATGGCTACCAAGGCGAAGAATCTTTATTTAACAAA  
\*\*\*\*\*

CBP GCATACTATGGCAAAGCACATCATTCTTCGTCAAGAAAGTCAAAGCTTCTGCAAAGT  
PBP GCATACTATGGCAAAGCACATCATTCTTCGTCAAGAAAGTCAAAGCTTCTGCAAAGT  
\*\*\*\*\*

CBP GATAAAAAACGCACTGCTGAATTAGCTAACGGCGCTCTCGGTATGATTGAGCTAAACGAT  
PBP GATAAAAAACGCACTGCTGAATTAGCTAACGGCGCTCTCGGTATGATTGAGCTAAACGAT  
\*\*\*\*\*

CBP GATTACACACTGAAAAAGTGATGAAACCGCTGATTGCATCTAACACAGTAACAGATGAA  
PBP GATTACACACTGAAAAAGTGATGAAACCGCTGATTGCATCTAACACAGTAACAGATGAA  
\*\*\*\*\*

CBP ATTGAACGCGCAACGCTCTTTAAAATGAACGGCAAATGGTATCTGTTCCTGACTCCCGC  
PBP ATTGAACGCGCAACGCTCTTTAAAATGAACGGCAAATGGTATCTGTTCCTGACTCCCGC  
\*\*\*\*\*

CBP GGGTCAAAAATGACGATTGACGGCATCACGTCTAACGATATTTACATGCTTGGCTATGTT  
PBP GGGTCAAAAATGACGATTGACGGCATCACGTCTAACGATATTTACATGCTTGGCTATGTT  
\*\*\*\*\*

CBP TCTAATCTTTAACTGGCCATACAAGCCGCTGAACAAAAGTGGCCTTGTGTTAAAAATG  
PBP TCTAATCTTTAACTGGCCATACAAGCCGCTGAACAAAAGTGGCCTTGTGTTAAAAATG  
\*\*\*\*\*

CBP GATCTTGATCCTAACGATGTAACCTTTACTTACTCACACTTCGCTGTACCTCAAGCGAAA  
PBP GATCTTGATCCTAACGATGTAACCTTTACTTACTCACACTTCGCTGTACCTCAAGCGAAA  
\*\*\*\*\*

CBP GGAAACAATGTCGTGATTACAAGCTATATGACAAACAGAGATTCTACGCAGACAAACAA  
PBP GGAAACAATGTCGTGATTACAAGCTATATGACAAACAGAGATTCTACGCAGACAAACAA  
\*\*\*\*\*

```

CBP      TCAACGTTTGCGCCAAGCTTCCTGCTGAACATCAAAGGCAAGAAAACATCTGTTGTCAA
PBP      TCAACGTTTGCGCCAAGCTTCCTGCTGAACATCAAAGGCAAGAAAACATCTGTTGTCAA
*****

CBP      GACAGCATCCTTGAACAAGGACAATTAACAGTTAACAATAA
PBP      GACAGCATCCTTGAACAAGGACAATTAACAGTTAACAATAA
*****

```

Fig. 4.2.17. Comparison of nucleotide sequence between structural gene of levansucrase gene from the strain CBP and that of the strain PBP.

라) 하류영역 염기서열 비교

청국장 biopolymer 생산균주인 CBP 균주와 PGA 우위생산성 변이주 PBP 균주의 levansucrase의 아미노산 배열을 비교해 본 결과 하류영역은 동일함을 알 수 있게 되었다.

```

CBP      CTCGAGCCCAATCACTAGTGAATTCGCGGCCCGCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTC
PBP      CTCGAGCCCAATCACTAGTGAATTCGCGGCCCGCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTC
*****

CBP      CCAACGCGTGATCAGTGG
PBP      CCAACGCGTGATCAGTGG
*****

```

Fig. 4.2.18. Comparison of downstream nucleotide sequence of levansucrase gene between the strain CBP and that of the strain PBP.

## 제5절 Biopolymer 생산최적조건

### 1. 연구수행 방법

#### 가. Biopolymer의 배양학적 특성조사

##### 1) Levan 우위 biopolymer 생산조건 검토

Levan 우위 biopolymer의 생산에 영향을 미치는 배양상의 특징을 조사하기 위해 기본배지에 각종 탄소원을 각각 3% 첨가 후 최적 탄소원을 선정하였고, 이를 0~7%범위의 농도로 첨가한 후 최적 농도를 결정하였다. 최적 질소원을 결정하기 위해 각종 질소원과 농도를 변화시켜 첨가하고 배양한 후 생산된 biopolymer의 무게와 총당함량을 측정하였다. 또한 최적 pH 결정을 위해 pH 6.0~7.5와 최적 온도 결정을 위해 30~40℃의 범위로 배양하면서 최적 pH와 온도를 결정하였다.

##### 2) Biopolymer의 제조

각 조건에 따라 배양된 배양액을 원심 분리하여 얻은 상정액에 2배양의 ethanol을 첨가 후 침전물을 회수하였다. 이 침전물을 다시 증류수에 재용해시킨 후, 원심 분리 하고 침전물을 회수하여, 이를 동결 건조시켜 실험의 시료로 사용하였다.

##### 3) 총당 함량 측정

Biopolymer의 총당함량은 phenol-sulfuric acid법(Dubios *et al.*, 1956)으로 측정하였고, glucose를 표준당으로 한 표준곡선으로부터 총당 함량을 산출하였다.

##### 4) Biopolymer의 glutamic acid의 함량 측정

Biopolymer를 구성하고 있는 polyglutamic acid의 glutamic acid함량을 조사하기 위해 biopolymer를 각각 10mg씩 칭량하여, 6N HCl 10ml를 첨가 후 110℃에서 24시간 가수분해하여 감압 농축시킨 것을 sodium citrate buffer(pH

2.20) 10ml에 재 용해시켜 0.45um membrane filter로 여과한 후, Amino acid auto analyzer로서 Table의 조건에서 분석하였다. 이때 glutamic acid 함량은 표준곡선의 glutamic acid 면적비로부터 산출되었다.

Table 5.1.1. Operation condition of amino acid analyzer for the analysis of glutamic acid

Specification	Condition
Instrument	S 433 Amino acid analyzer(Sykam Co., Germany)
Column	LCA K01/Na Cation separation column (4.6×150 mm)
Buffer	A : 0.12 N Sodium citrate buffer(pH 3.45) B : 0.30 N Sodium citrate buffer(pH 10.85)
Buffer flow	0.45 mL/min
Ninhydrin flow	0.25 mL/min
Inj. vol	100 $\mu$ l

#### 5) 단백질 함량측정

단백질 함량은 자동질소분해증류장치(Kjedahl automatic distillation unit, J. P. Selecta. s. a. Co., Spain)를 이용해 분해 후 증류 · 적정하여 측정하였다.

## 2. LBP에 의해서 생산된 Levan 우위 biopolymer 분석 결과

Table 5.2.1. Effect of carbon source on the production of levan biopolymer from the strain LBP

Carbon source	Weight of biopolymer (g/200ml)	Total sugar (%)
Fructose	0.14	42.32
Glucose	0.50	47.37
Sucrose	0.72	61.08

\* Basal medium was composed of 3% carbon source, 1% yeast extract, 0.3%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.05% NaCl, 0.4%  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0.05%  $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.1ug/ml biotin, pH 6.5. Cells were cultured with shaking(150rpm) for 60hr at 37°C.

Levan 우위 biopolymer 생산균인 LBP의 배양 시 탄소원의 영향을 조사하기 위해서 Fructose등 수종의 탄수화물을 기질로 사용했을 때, levan 생산을 위해서 sucrose가 가장 효과적인 탄소원임을 알 수 있었다.

Table 5.2.2. Effect of Sucrose concentration on the production of levan biopolymer from the strain LBP

Carbon source concentration	Weight of biopolymer (g/200ml)	Total sugar (%)
1%	0.32	40.05
3%	0.72	59.17
5%	1.28	69.85
7%	1.86	74.56

Cultivation was carried out in the medium containing 5% sucrose, 1% yeast extract, 0.3%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.05% NaCl, 0.4%  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0.05%  $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.1ug/ml biotin, pH 6.5. Cells were cultured with shaking(150rpm) for 60hr at 37°C.

변이주 LBP에 의한 biopolymer 생산 시 sucrose 농도가 미치는 효과를 결정하기 위해서 기본배지에 sucrose의 농도를 1, 3, 5, 7%씩 첨가하여 배양했을 때, 1%에서 1.86%까지 sucrose 농도를 높여 줄수록 levan biopolymer의 생산량이 증가함을 알았다.

Levan 우위 생산변이주인 LBP를 이용하여 levan 생산 시, MSG등 수종의 질소원의 효과를 검토해본 결과 yeast extract가 가장 우수한 질소원임을 알 수 있었다.

Table 5.2.3. Effect of nitrogen source on the production of the levan biopolymer from the strain LBP

Nitrogen source	Weight of biopolymer (g/200ml)	Total sugar (%)
MSG	0.32	59.50
Peptone	0.95	53.11
Yeast extract	1.24	71.73

\* Basal medium was composed of 5% sucrose, 0.3% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05% NaCl, 0.4% NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05% MgSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0.1ug/ml biotin, pH 6.5. Cells were cultured with shaking(150rpm) for 60hr at 37°C.

또한 LBP를 이용하여 levan 생산 시, yeast extract의 농도를 달리하여 배양했을 때 1%의 yeast extract가 가장 효과적이었음을 알 수 있었다.

Table 5.2.4. Effect of nitrogen sucrose concentration on the production of levan biopolymer from the strain LBP

Nitrogen source concentration	Weight of biopolymer (g/200ml)	Total sugar (%)
0.3%	0.78	56.37
0.5%	0.74	57.98
1.0%	1.28	72.07
1.2%	0.64	56.43

Table 5.2.5. Effect of pH on the production of levan biopolymer from the strain LBP

pH	Weight of biopolymer (g/200ml)	Total sugar (%)
pH 6.0	1.55	53.00
pH 6.5	1.80	74.73
pH 7.0	1.49	72.70
pH 7.5	0.56	72.29

\* Basal medium was composed of 7% sucrose, 1% Yeast extract, 0.3%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.05% NaCl, 0.4%  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0.05%  $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.1ug/ml biotin. Cells were cultured with shaking(150rpm) for 60hr at 37°C

LBP에 의한 levan biopolymer 생산 시, pH의 영향을 검토해본 결과 pH6.5가 가장 효과적임을 알 수 있었다.

Table 5.2.6. Effect of pH on the production of levan biopolymer from the strain LBP

Temperature	Weight of biopolymer (g/200ml)	Total sugar (%)
30°C	0.71	57.29
33°C	1.94	67.29
37°C	1.53	73.71
40°C	0.90	55.56

\* Basal medium was composed of 7% sucrose, 1% Yeast extract, 0.3%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.05% NaCl, 0.4%  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0.05%  $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.1ug/ml biotin, pH 6.5. Cells were cultured with shaking(150rpm) for 60hr  
LBP균주에 의한 levan biopolymer 생산 시, 온도의 영향을 조사해본 결과 33°C가 levan의 생산에 최적임을 알 수 있었다.

### 3. PBP에 의해 생산된 PGA 우위 biopolymer 분석 결과

PGA 우위 생산 변이주인 PBP균주를 사용하여 PGA 생산시, 탄소원의 효과를 검토해본 결과 Glucose가 가장 효과적인 탄소원이었다.

Table 5.3.1. Effect of carbon source on the production of PGA biopolymer from the strain PBP.

Carbon source	Weight of biopolymer (g/100ml)	Total sugar (%)
C source control	0.08	3.38
Fructose	0.37	4.41
Glucose	0.58	4.77
Glycerol	0.12	0.26
Sucrose	0.34	17.92

PGA 우위 생산 변이주인 PBP균주를 사용하여 PGA 생산 시 질소원의 영향을 검토해본 결과 MSG가 가장 효과적인 질소원임을 알 수 있었다.

Table 5.3.2. Effect of nitrogen source on the production of PGA biopolymer from PBP

Nitrogen source	Weight of biopolymer (g/100ml)	Total sugar (%)
N source control	0.05	43.59
NaNO <sub>3</sub>	0.08	57.07
Peptone	0.12	31.78
NH <sub>4</sub> Cl	-	-
MSG	0.42	9.75

PGA 우위 생산 변이주인 PBP 균주를 이용하여 PGA 생산시 pH의 영향을 검토해 본 결과 pH7.5가 최적임을 알 수 있었다.

Table 5.3.3. Effect of pH on the production of PGA biopolymer from the strain PBP

pH	Weight of biopolymer (g/100ml)	Total sugar (단위)
pH 4.5	-	-
pH 5.5	0.46	24.64
pH 6.5	0.37	18.09
pH 7.5	0.57	19.21
pH 8.5	0.25	17.22

#### 4. 최종생산 biopolymer의 분석

Table 5.4.1. Protein and total sugar contents of biopolymer produced.

Composition Items	Biopolymer sample		
	A	B	C
Protein(%)	6.95	66.80	8.36
Total sugar(%)	74.56	17.92	26.22
Other(%)	18.49	15.28	65.42

\* A : Biopolymer sample produced by LBP

\* B : Biopolymer sample produced by PBP

\* C : Biopolymer sample produced by CBP

Table 5.4.2. Glutamic acid contents of biopolymer produced

Composition Items	Biopolymer sample(%)		
	A	B	C
Glutamic acid	1.47	64.62	41.56
Fructose	ND	ND	ND

CBP (모균주), LBP (levan 우위 생산 변이주) 및 PBP (PGA 우위 생산 균주)를 이용하여 biopolymer 생산을 시도한 결과 table과 같이 LBP에서는 총당의 생산이 74.56% 였으며, PBP의 경우에는 protein의 함량이 66.8% 로서, 각각의 균주에서 생산되는 biopolymer의 생산량은 균주의 성질과 잘 일치되고 있음을 알 수 있었다. 또한 이들 균주가 생산하는 biopolymer내에 함유된 Glutamic acid의 함량을 측정해본 결과, LBP에서는 1.47%, PBP에서는 64.62%로써 균주의 성질과 잘 부합되는 결과를 얻었다. 즉, levan 우위 생산 변이주(LBP)에서는 Glutamic acid의 생산이 모균주의 2.3% 정도가 생산되었으며 PGA 우위 생산 변이주(PBP)에서는 모균주의 약 1.6배의 Glutamic acid가 함유된 biopolymer가 생산되었음을 알 수 있었다.

## 제6절 Biopolymer 생산균의 proteome 분석

### 1. 연구수행 방법

#### 가. Bacterial strains and culture conditions

CBP와 PBP, LBP 균주를 Tryptic soy broth에 12시간 동안 전배양하여 활성화시켜 Table 6.1.1, Table 6.1.2 의 배지 100ml에 2% 접종하였다. 200rpm에, 37°C, 18시간 진탕 배양하고, 5000rpm에서 10분간 원심 분리하여 균체를 회수하였다. PBS (Phosphate buffered saline, 0.8% NaCl, 0.02% KCl, 0.144% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)에 Washing 하여 전처리 하였다.

Table 6.1.1 PBP 균주의 최적 배양 배지

Ingredients	Concentration(%)
Monosodium glutamate(MSG)	1.5
NaH <sub>2</sub> P <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.4
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.08
Biotin	0.3 µg/ml
pH	6.5

Table 6.1.2 LBP 균주의 최적 배양 배지

Ingredients	Concentration(%)
Sucrose	2.0
NaH <sub>2</sub> P <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.4
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.08
Biotin	0.3 µg/ml
pH	6.5

#### 나. Protein sample preparation

lysis buffer( 7M urea, 2M Thiourea containing, 4% CHAPS, 1% DTT, 2% pharmalyte, 1mM benzamidine)로 각각 CBP, MBP, LBP 균체를 해리시킨 후 mortar-driven homogenizer를 사용하여 용해시켰다. 동결과 해동과정을

5번 반복한 후, 원심분리하고(15,000 rpm, 15°C), 상등액을 분리하여 단백질을 추출하였고, Bradford 법에 의해 1차 전기영동 하여 등전점에 따라 단백질을 분리하였다.

#### 다. Two dimensional electrophoresis

스트립에 Rehydration buffer(7M urea, 2M Thiourea containing, 2%CHAPS, 1%DTT, 1% pharmalyte)를 첨가하여 16시간 동안 불린 후, Rehydration buffer와 각각의 CBP, PBP, LBP의 단백질 샘플 200ug을 IPG를 첨가하여, 준비된 스트립에 적혀지도록 채웠다. 20°C 에서 Multiphor II (Amersham Biosciences)와 EPS 3500 XL 장치를 사용하여 IEF (Isoelectric focusing)을 하였는데, 3시간에 걸쳐 150V-3,500V까지 전압을 증가시키면서, 총(전압-시간)이 96 kVh정도 되었을 때 포커싱을 완료하였다. 스트립은 equilibration buffer(50mM Tris-Cl, pH6.8 containing 6M urea, 2% SDS, 30% glycerol)와 1%DTT, 2.5% iodoacetamide를 각각 10분씩 처리하여, SDS-PAGE(Hoefler DALT 2-D) gel(20cm, 10%)에 2차 전기영동을 시켜서 분자량에 따라 단백질을 분리하였다.

#### 라. Image analysis

PDQuest(version 7.0, BioRad) 프로그램으로 디지털 이미지의 분석을 수행하였다. 단백질의 발현량을 intensity로 분석하여, CBP 단백질과 PBP와 LBP의 단백질 spot간의 값을 비교하고, 유의적인 차이를 보이는 spot을 선별하였다.

#### 마. Enzymatic digestion of protein in-gel

선별한 단백질 spot을 porcine trypsin을 사용하여 겔에서 내려내고, 50% acetonitrie로 세척하여 SDS, 염 등을 제거한 후, trypsin(8ng/ul)으로 rehydration 하고 37°C에서 8-10 시간 반응시켰다. 단백질 분해반응은 5ul 0.5% trifluoroacetic acid 첨가로 종료시켰고, C<sub>18</sub>ZipTips(Millipore)를 사용하여 분해된 단백질을 탈염했다.

#### 바. MALDI-TOF analysis and database search

백질을 MALDI-TOF(Amersham Biosciences)로 분석하였다. 트립신에 의해서 여러 개로 잘려진 펩티드의 peak들로 데이터의 이미지를 얻었고, ProFound 프로그램을 통해 mass fingerprinting 방법으로 단백질 동정을 하였다.

## 2. 연구수행 내용 및 결과

가.  $\gamma$ -PGA우위 생산변이주의 proteome 분석

$\gamma$ -PGA생산량이 가장 우수한 최적조건에서 각각 CBP균주와 PBP균주를 37°C, 20h 배양한 후 균체로부터 단백질을 정제하여 2-D electrophoresis를 수행한 결과 약 530개 정도의 spot에서 발현량의 차이를 확인하였다.(Fig. 6.1.1.)

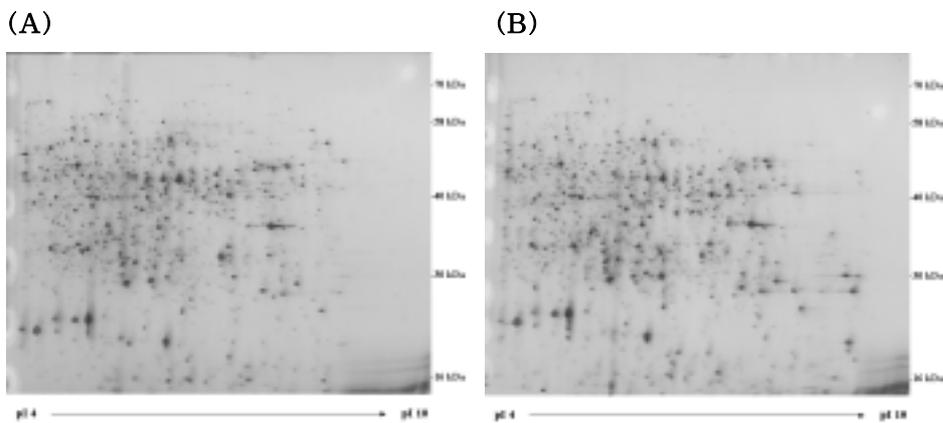


Fig. 6.1.1. Proteome analysis of CBP(A) and PBP(B) cultured in optimal condition for  $\gamma$ -PGA

나. levan 생산변이주의 proteome분석

levan생산량이 가장 우수한 최적조건에서 각각 CBP균주와 LBP균주를 37°C, 20h, 200rpm 배양한 후 균체로부터 단백질을 정제하여 2-D electrophoresis를 수행한 결과 protein composition에 있어서 큰 차이를 보여 비교분석할수없었다.(Fig. 6.1.2.)

(C) (D)

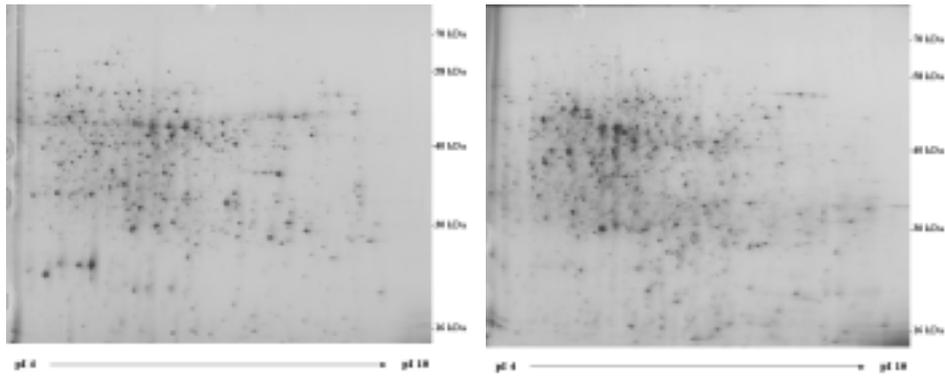


Fig. 6.1.2. Proteome analysis of CBP(A) and PBP(B) cultured in optimal condition for  $\gamma$ -PGA and CBP(C) and LBP(D) for Levan production.

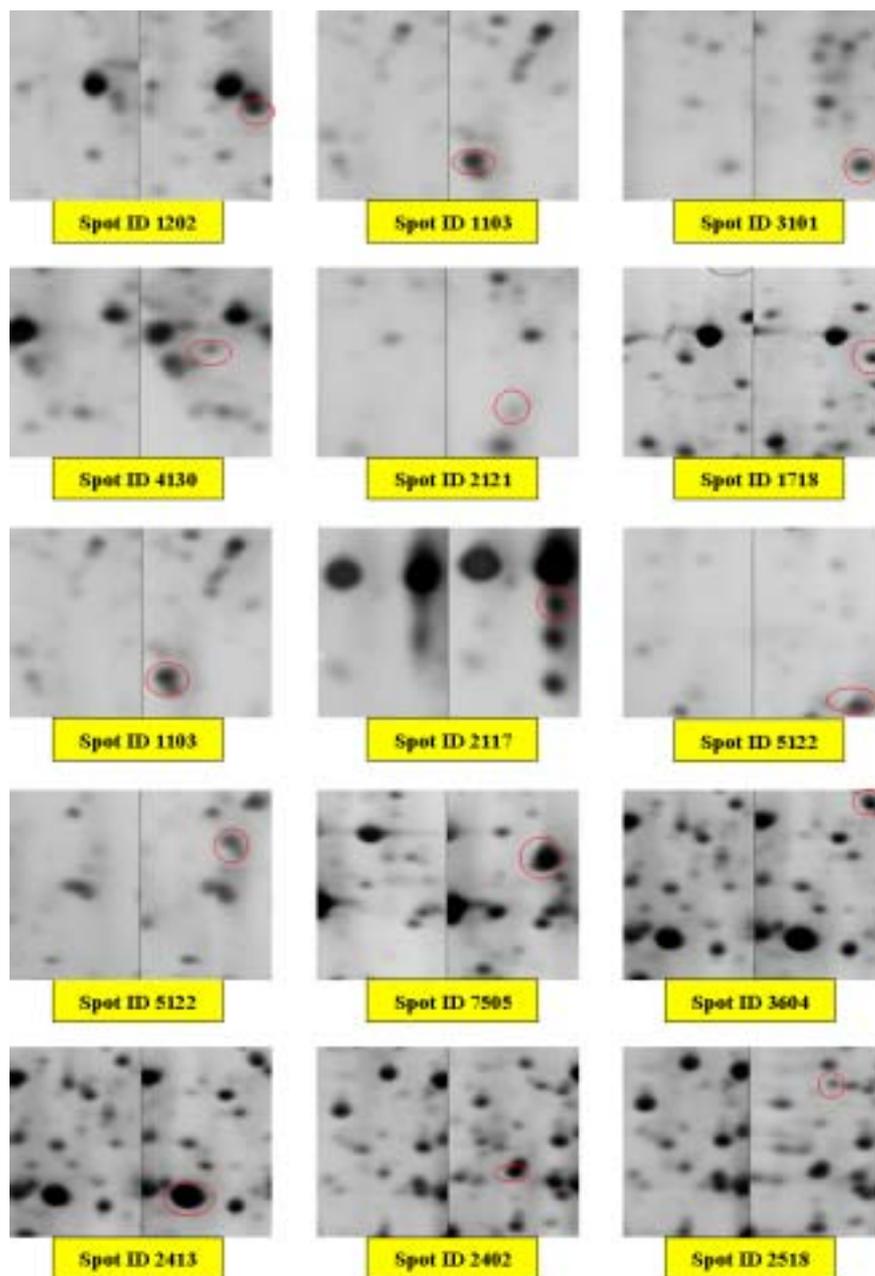


Fig. 6.1.3. Image of modified protein spots analysed and identified. Comparison of the concentration of protein spots between CBP(left) and PBP(right). 33 protein spots in total was analysed and 30 protein spots were identified.

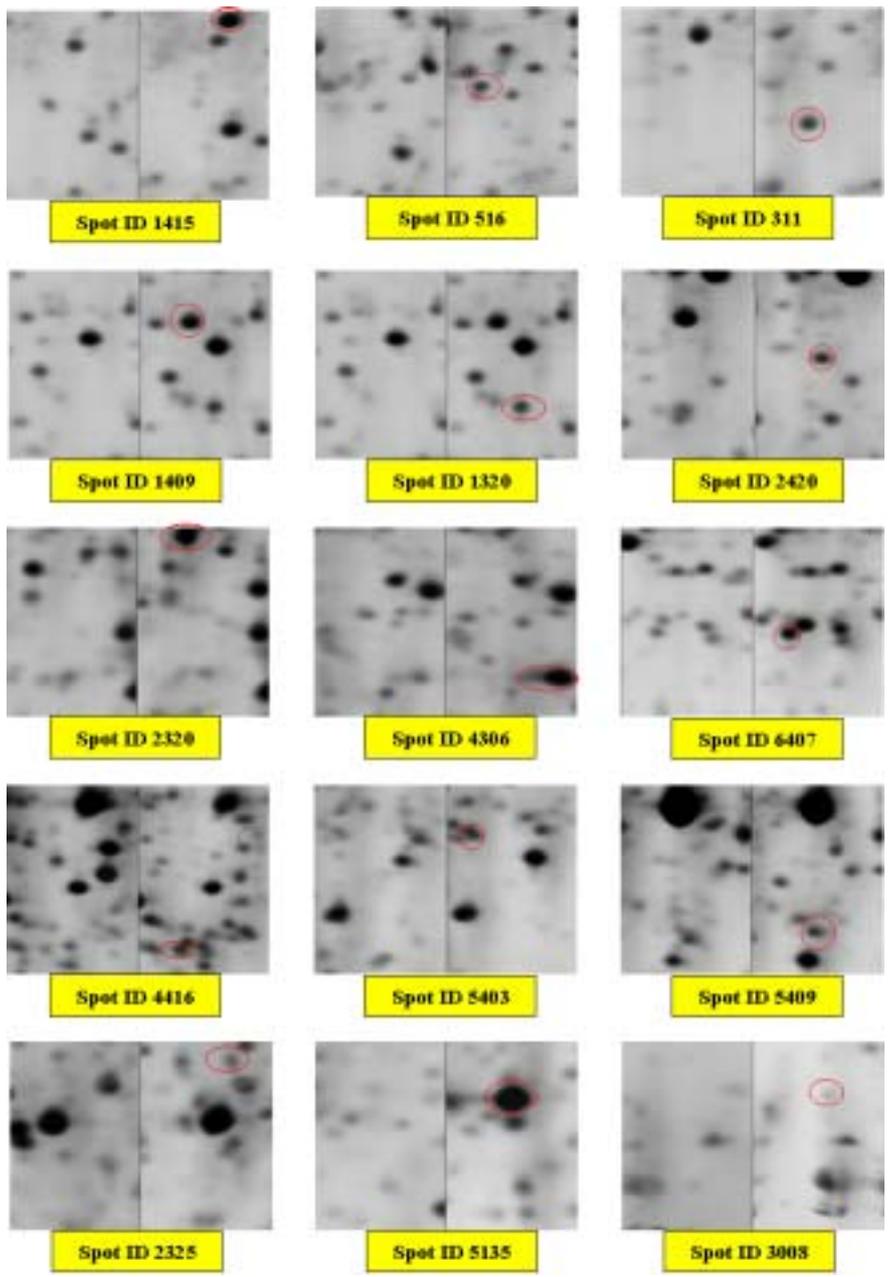


Fig. 6.1.3 continued

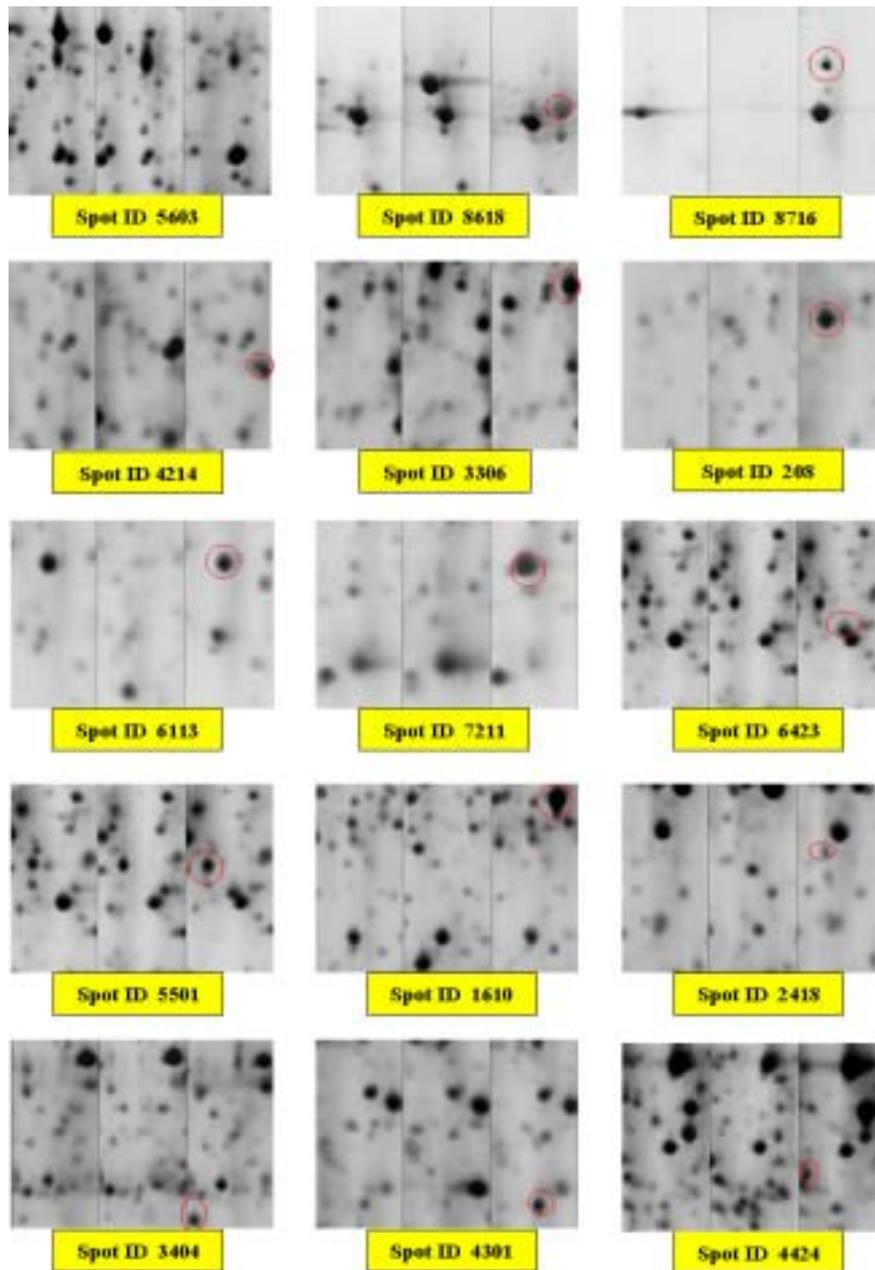


Fig. 6.1.4

Image of modified protein spots analysed and identified. Comparison of the concentration of protein spots between CBP(left; PGA producing condition), PBP(middle; PGA producing condition) and PBP(right; levan producing condition) in 23 protein spots in total was analysed and 18 protein spots were identified.

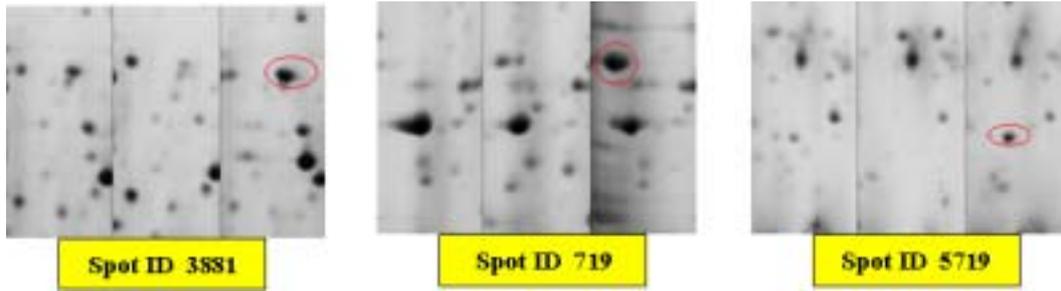


Fig. 6.1.4 continued

발현량에 있어서 큰 차이를 보이는 56개의 protein spot을 선정하여 MALDI-TOF를 이용한 protein identification을 실시한 결과 56개의 spot 중 48개의 protein이 동정되었다.(Table. 6.1.3)

Table. 6.1.3. Identification of protein spots by MALDI-TOF

Sample No.	Sample ID	Probability	Est'dZ	Protein Information and Sequence Analyse Tools (T)	%	pI	kDa
1	208	1.00E+00	<a href="#">2.27</a>	Tgi 16078809 ref NP_389628.1 glutamine synthetase	<a href="#">17</a>	5.1	50.55
2	311	1.00E+00	<a href="#">2.41</a>	Tgi 16080762 ref NP_391590.1 ywjI	<a href="#">45</a>	5.2	34.05
3	516	1.00E+00	<a href="#">2.39</a>	Tgi 16081039 ref NP_391867.1 yxbC	<a href="#">19</a>	4.8	37.44
4	1320	9.90E-01	0.84	Tgi 16080204 ref NP_391030.1 yufL	<a href="#">12</a>	6.9	59.08
5	1409	1.00E+00	<a href="#">2.35</a>	Tgi 16079964 ref NP_390790.1 malate dehydrogenase	<a href="#">40</a>	4.9	33.63
6	1415	1.00E+00	<a href="#">2.35</a>	Tgi 16079865 ref NP_390691.1 delta-aminolevulinic acid dehydratase	<a href="#">32</a>	5.1	36.42
7	1610	1.00E+00	<a href="#">2.41</a>	Tgi 16080717 ref NP_391545.1 (alpha subunit)	<a href="#">31</a>	5.2	61.45
8	2320	1.00E+00	<a href="#">2.31</a>	Tgi 1673402 emb CAB04812.1 hypothetical 54.4 kd protein	<a href="#">14</a>	8.9	54.69
9	2325	1.00E+00	<a href="#">2.35</a>	Tgi 16078084 ref NP_388901.1 yhfE	<a href="#">27</a>	5.9	38.89
10	2402	1.00E+00	<a href="#">2.35</a>	Tgi 16080937 ref NP_391765.1 UDP-glucose 4-epimerase	<a href="#">29</a>	5	37.22
11	2418	1.00E+00	<a href="#">2.04</a>	Tgi 216396 dbj BAA00730.1 glutamine synthetase	<a href="#">12</a>	5	50.6
12	2420	1.00E+00	<a href="#">2.18</a>	Tgi 16078032 ref NP_388848.1 D-alanine aminotransferase	<a href="#">41</a>	5.1	31.22
13	2518	1.00E+00	<a href="#">1.79</a>	Tgi 16077084 ref NP_387897.1 yaaH	<a href="#">17</a>	5.7	48.62
14	3008	3.40E-01	0.17	Tgi 16077267 ref NP_388080.1 ybdE	<a href="#">8</a>	5	16.43
15	3306			No Identification			

Sample No.	Sample ID	Probability	Est'dZ	Protein Information and Sequence Analyse Tools (T)	%	pI	kDa
16	3404	1.00E+00	<a href="#">1.85</a>	Tgi 38492704 pdb 1OYG AChain A, Crystal Structure Of Bacillus Subtilis Levansucrase	<a href="#">14</a>	5.8	50.25
17	3811	1.00E+00	<a href="#">2.3</a>	Tgi 16080040 ref NP_390866.1 malate dehydrogenase (decarboxylating)	<a href="#">18</a>	5.1	62.36
18	4214			No Identification			
19	4301	1.00E+00	<a href="#">1.78</a>	Tgi 16077461 ref NP_388275.1 glucose 1-dehydrogenase	<a href="#">29</a>	5.3	28.07
20	4306	1.00E+00	<a href="#">2</a>	Tgi 16080393 ref NP_391220.1 yvgN	<a href="#">32</a>	5.2	31.7
21	4416	9.80E-01	0.77	Tgi 16077279 ref NP_388092.1 fatty acid beta-hydroxylating cytochrome P450	<a href="#">12</a>	6.5	48.38
22	4424	1.00E+00	<a href="#">1.66</a>	Tgi 16080298 ref NP_391125.1 uricase	<a href="#">16</a>	5.6	56.71
23	4709	1.00E+00	<a href="#">1.66</a>	Tgi 16080108 ref NP_390934.1 phosphoenolpyruvate carboxykinase	<a href="#">17</a>	5.3	58.57
24	4726	1.00E+00	<a href="#">2.38</a>	Tgi 16080108 ref NP_390934.1 phosphoenolpyruvate carboxykinase	<a href="#">44</a>	5.3	58.57
25	4729	1.00E+00	<a href="#">2.31</a>	Tgi 16080108 ref NP_390934.1 phosphoenolpyruvate carboxykinase	<a href="#">20</a>	5.3	58.57
26	5135	1.00E+00	2.38	Tgi 16080142 ref NP_390968.1 spore coat protein	<a href="#">19</a>	6.6	41.29
27	5403	1.00E+00	1.85	Tgi 16078294 ref NP_389111.1 yjID	<a href="#">10</a>	6.3	41.94
28	5409	9.90E-01	0.82	Tgi 16079883 ref NP_390709.1 acetolactate synthase (large subunit)	<a href="#">7</a>	5.3	62.74
29	5501	1.00E+00	2.22	Tgi 16080447 ref NP_391274.1 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	<a href="#">39</a>	5.2	35.93
30	5603	1.00E+00	2.42	Tgi 50812264 ref NP_390267.2 yqiI	<a href="#">46</a>	5.2	51.93
31	5719	1.00E+00	2.26	Tgi 16077736 ref NP_388550.1 glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase (subunit A)	22	5.4	52.82
32	5807	1.00E+00	2.33	Tgi 16079883 ref NP_390709.1 acetolactate synthase (large subunit)	17	5.3	62.74
33	719	1.00E+00	2.37	Tgi 16079337 ref NP_390161.1 spoIVA	47	4.7	55.21
34	1103			No Identification			
35	1202	1.00E+00	2.16	Tgi 16080736 ref NP_391564.1 ATP synthase (subunit alpha)	17	5.2	54.69
36	1718			No Identification			
37	2117	1.00E+00	0.91	Tgi 285619 dbj BAA03500.1 cell wall hydrolase	18	6	27.13
38	2121			No Identification			
39	2413	1.00E+00	2.29	Tgi 16080736 ref NP_391564.1 ATP synthase (subunit alpha)	31	5.2	54.69
40	3101			No Identification			
41	3604	1.00E+00	2.14	Tgi 16081086 ref NP_391914.1 ornithine aminotransferase	16	5.1	44.14
42	4130			No Identification			
43	4211	1.00E+00	2.42	Tgi 16080505 ref NP_391332.1 yvdP	31	6.1	50.18

Sample No.	Sample ID	Probability	Est'dZ	Protein Information and Sequence Analyse Tools (T)	%	pI	kDa	
44	5121	1.00E+00	1.84	Tgi 16078125 ref NP_388942.1 yhjR	23	6	17.33	
45	5122	1.00E+00	1.84	Tgi 16078125 ref NP_388942.1 yhjR	23	6	17.33	
46	5210	1.00E+00	2.31	Tgi 16078991 ref NP_389813.1 aldehyde dehydrogenase	11	5.2	54.21	
47	5313	1.00E+00	2.23	Tgi 16077084 ref NP_387897.1 yaaH	31	5.7	48.62	
48	6113	1.00E+00	1.78	Tgi 853766 emb CAA89874.1 hypothetical protein U	27	5.7	20.01	
49	6319	No Identification						
50	6407	1.00E+00	2.34	Tgi 16078219 ref NP_389036.1 yjbG	19	5.3	70.18	
51	6423	1.00E+00	1.59	Tgi 16080298 ref NP_391125.1 uricase	13	5.6	56.71	
52	7211	1.00E+00	2.41	Tgi 16078809 ref NP_389628.1 glutamine synthetase	31	5.1	50.55	
53	7505	1.00E+00	1.76	Tgi 16078927 ref NP_389748.1 yaaN	27	5.5	43.59	
54	7627	1.00E+00	2.29	Tgi 16077084 ref NP_387897.1 yaaH	32	5.7	48.62	
55	8618	1.00E+00	2.4	Tgi 38492704 pdb 1OYG AChain A, Crystal Structure Of Bacillus Subtilis Levansucrase	52	5.8	50.25	
56	8716	1.00E+00	1.28	Tgi 39959 emb CAA39204.1 IMP dehydrogenase	13	6.3	55.99	

동정된 48개의 단백질 중 glutamine synthetase, Levansucrase, glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase (subunit A) 등  $\Psi$ -PGA 및 Levan 생합성 관련단백질들을 확인하였다. 이들  $\Psi$ -PGA 및 Levan 생합성 관련단백질들은 배지조건에 따라 현저한 발현변화를 보여주었다.

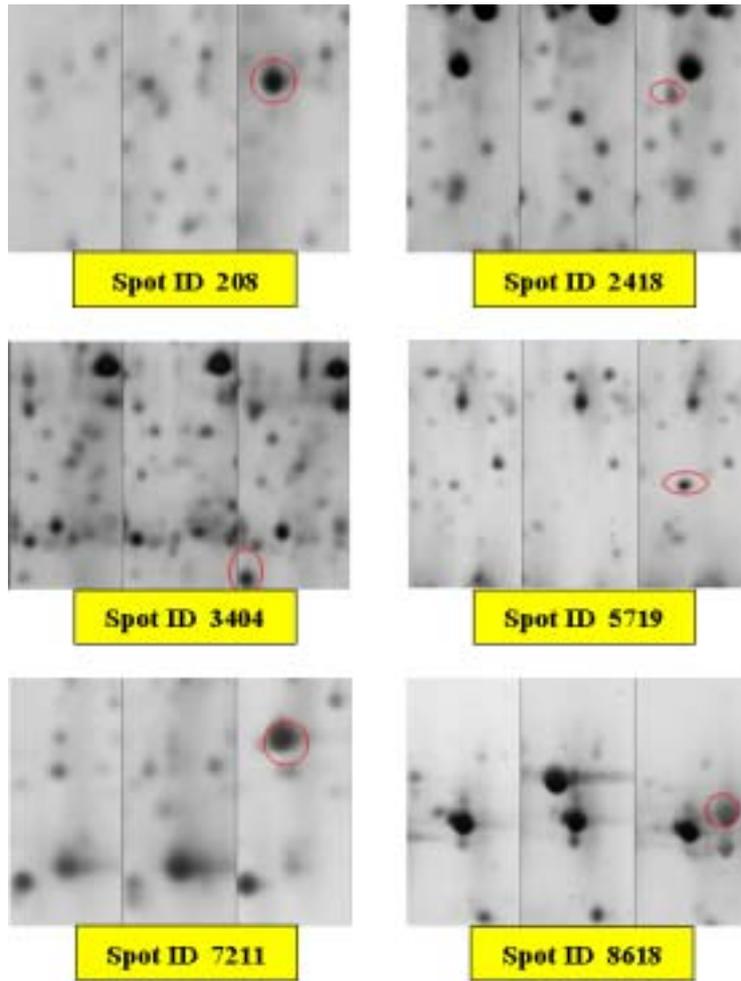


Fig. 6.1.5.  $\Psi$ -PGA 및 Levan 생합성 관련단백질의 발현변화.

## 제7절 $\Psi$ -PGA우위 및 levan우위 각 biopolymer의 항비만 · 항당뇨 관련 효능검정

### 1. 연구수행방법

가. 청국장유래 biopolymer,  $\Psi$ -PGA우위 및 levan우위의 각 biopolymer의  
물성 및 유동학적 특성조사

#### 1) Biopolymer의 물성학적 특성

청국장 및 변이균주가 생산하는 biopolymer의 물성학적 성질을 조사하기 위하여 Brookfield 회전점도계(Brookfields Co. LVDV II<sup>++</sup>, ver. 2.0, USA)에, small sample adapter를 부착시킨 후 SC4 #18 spindle추를 이용하여 측정하였다. 시료는 각각의 실험조건에 맞게 조제한 후 sample chamber에 각 biopolymer용액 8ml를 넣고 온도의 영향을 조사할 경우를 제외하고는 20℃를 유지하면서 전단속도를 0.1에서 20.4 s<sup>-1</sup>로 변화시키면서 점도값을 측정하였다. 이때 biopolymer의 점도의 특성으로서 농도의 영향은 biopolymer 농도를 3, 4, 5%로 각각 조제하여 점도를 측정하였고, 온도의 영향을 조사하기 위하여 측정온도를 10~70℃의 범위에서 측정하였고 측정온도에서 30분이상 열적 평형을 이룬 후에 측정하였다. pH의 영향은 pH 3.0~9.0 사이의 buffer용액에 시료를 용해시켜 점도를 각각 측정하였다.

#### 2) 유동학적 특성

Biopolymer의 유동학적 특성을 조사하기 위하여 Power law model식(1)(Rao and Anantheswaran, 1982)과 Herschel-Bulkley model식(2)(Herschel and Bulkley, 1963)의 상태 방정식을 이용하여 점조도지수( K, consistency index : Pa, s<sup>n</sup> )와 유동거동지수( n, flow behavior index )를 산출하였고 항복응력( C. yield stress, Pa )은 Casson model식(3)(Casson, 1959)을 적용하여 구하였다.

$$\tau = K \cdot \dot{\gamma}^n \text{-----(1)}$$

$$\tau = C + K \cdot \dot{\gamma}^n \text{-----(2)}$$

$$\sqrt{\tau} = \sqrt{C + K \cdot \sqrt{\dot{\gamma}}} \text{-----(3)}$$

$\tau$  : Shear stress, Pa

C : Yield stress, Pa

$\dot{\gamma}$  : Shear rate : 1/s

K : Consistency index : Pa, s<sup>n</sup>

n : Flow behavior index

### 3) 겔보기점도의 온도와 농도 의존성 조사

Biopolymer의 겔보기점도의 변화로서 온도 및 농도 의존성의 변화에 따른 유동적 특성을 조사하였다. 이때 점도변화의 예측모델로서 온도변화에 따른 biopolymer 시료의 점도변화는 Arrhenius model식(1)(Vitali and Rao, 1984)을 적용하였으며 농도 변화에 따른 biopolymer시료의 점도변화는 지수함수 model식(2)(Rao, 1977)과 Power law model식(3)(Rao and Anantheswaran, 1982)에 적용시켜 적합도를 조사하였다. 이때 전단속도 2.04 S<sup>-1</sup>에서 Arrhenius model(1)의 온도 의존성 실험에서는 1/T과 ln( $\mu$ )에 대하여, 지수함수 model(2)과 Power law model(3)의 농도 의존성 시험은 ln( $\mu$ )와 농도 C 및 ln C 에 대해 각각 회귀 분석하여 그 적합도를 조사하였다.

$$\mu = A \cdot \text{Exp}(Ea/RT) \text{-----(1)}$$

$$\mu = A \cdot \text{Exp}(K \cdot C) \text{-----(2)}$$

$$\mu = A \cdot C^n \text{-----(3)}$$

$\mu$  : Apparent viscosity, Pa · s

Ea : Activation energy of flow, J/kg · mol

T : Absolute temperature, K

C : Concentration, %

A, K, n : Experimental constants.

## 나. 청국장 유래 biopolymer 의 항비만 효능검정

### 1) 재료 및 방법

#### 가) 실험 동물

평균 체중이 200 g인 8주령의 암컷(Sprague-Dawley) 쥐 30 마리를 1주일 간 기본 사료로 사육한 뒤 난괴법(Completely randomized design)으로 실험군 별로 체중분포를 비슷하게 하여 나누어 6주동안 stainless steel wire cage에서 한 마리씩 분리 사육하였으며, 사육기간 동안 사육실의 온도는  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ , 습도는  $65\pm 5\%$ 를 유지하고 광주기와 암주기를 12시간(light 6:00~18:00) 자동 조절 장치를 이용하여 사육하였다. 실험 기간 동안 식이와 식수는 ad-libitum으로 급여하였으며, 이때 사용된 물은 모두 2차 이온 교환수였다.

실험 식이는 단백질 급원으로 카제인과 청국장 분말(CH군)을 사용하였으며 청국장에서 추출한 biopolymer(CHB군)를 카제인 식이에 3% 첨가하였다. AIN-93M 정제식이(Reesves PG et al ; 1993)를 기준으로 조정하였으며 콜레스테롤을 식이의 1%로 첨가하였다. 실험에 사용한 카제인과 청국장 분말의 일반성분 함량을 분석하였으며 그 결과는 Table 3.7.1과 같다. 일반성분은 AOAC법(AOAC. 1995)에 의해 분석하였다. 즉, 수분함량은  $105^{\circ}\text{C}$  상압건조법으로, 조회분함량은  $550^{\circ}\text{C}$  회화법을 사용하여 분석하였으며, 조단백질 함량은 kjeldahl법으로, 조지방은 soxhlet법으로 추출하였으며, 조섬유는 약산과 약알칼리에 처리하였고, 당질분석은 phenol-sulfuric acid법(Dubois M et al ; 1956)으로 측정하였다. 실험 식이는 분석한 일반성분을 기초로 하여 실험 식이군의 에너지, 단백질, 지방, 식이 섬유, 당질의 함량을 동일하게 되도록 조정하였으며 Table 3.7.2와 같다.

Table 3.7.1. Proximate composition of casein and Chungkookjang(%)

Ingredients	Casein	Chungkookjang
Moisture	5.07	3.74
Crude proteins	90.57	54.78
Crude lipids	0.58	24.66
Ash	3.42	5.70
Dietary fiber	0.14	2.88
Carbohydrates	0.22	8.24
Total	100	100

나) 실험식이

실험식이의 조성은 Table 3.7.2와 같다.

Table 3.7.2. Composition of control and experimental diets(g/kg of diet)

Ingredients	Dietary group		
	Control	CH	CHBP
Casein <sup>1)</sup>	140	-	140
Chungkookjang	-	231.5	
Chungkookjang biopolymer	-	-	30
Corn-starch	594.6	565.9	579.6
Sucrose	100	100	100
Soybean oil	56.3	-	56.3
Cellulose <sup>2)</sup>	49.8	43.33	34.8
Mineral Mix <sup>3)</sup>	35	35	35
Vitamin Mix <sup>4)</sup>	10	10	10
L-cystein <sup>5)</sup>	1.8	1.8	1.8
Choline bitartate <sup>6)</sup>	2.5	2.5	2.5
TBHQ <sup>7)</sup>	0.008	0.008	0.008
Cholesterol <sup>8)</sup>	10	10	10

<sup>1)</sup>Casein, Maeil Dairy Industry CO. Korea

<sup>2)</sup>α-Cellulose, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA

<sup>3)</sup>AIN-93M-MX, Teklad Test Diets, Medison, Wisconsin, USA

<sup>4)</sup>AIN-93M-VM, Teklad Test Diets, Medison, Wisconsin, USA

<sup>5)</sup>L-Cystine, Sigma Chemical CO., St. Louis, MO, USA

<sup>6)</sup>Choline bitartate, Sigma Chemical CO., St. Louis, MO, USA

<sup>7)</sup>Tert-butyl hydroquinone, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA

<sup>8)</sup>Cholesterol, Sigma Chemical CO., St. Louis, MO, USA

CH : Chungkookjang group

CHBP : Chungkookjang biopolymer group

다) 실험방법

(1) 체중 측정 및 실험 식이 섭취량 측정

실험 식이를 시작한 날을 기준으로, 식이섭취량은 이틀에 한 번씩 일정한 시간에 측정하였고, 체중은 일주일 단위로 일정한 시간에 측정하였다.

식이효율(Food Efficiency Ratio : FER)은 실험기간 동안의 체중증가량을 총 식이섭취량으로 나누어 계산하였다.

(2) 장기채취

실험종료 후 실험동물을 12시간 이상 절식시킨 후 실험동물의 대동맥에서 혈액을 채취하여 상온에서 30 분간 방치한 이후 3000 rpm에서 20 분간 원심 분리하여 혈청을 분리하였다. 혈청은 분석할 때까지 -70℃에서 냉동 보관하였다가 성분 분석하였다. 간과 신장은 적출하여 차가운 생리식염수로 씻어내어 무게를 측정한 후 액체 질소로 급속 동결시켜 -70℃에 보관하였다.

(3) 혈청의 중성지방, 총콜레스테롤, total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol and atherogenic index(AI)측정

혈청내 중성지방 측정은 표준 효소비색법에 의한 kit( Asan, Co, Korea)을 사용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였으며 혈청내 총 콜레스테롤 농도 및 HDL-cholesterol,는 표준 효소비색법에 의한 kit( Asan, Co, Korea)을 사용하여 500 nm에서 흡광도를 측정하였다.

LDL-cholesterol은 Friedwald식 ( Total cholesterol - ( HDL cholesterol + triglyceride/5 )을 이용하여 계산하였고 Atherosclerotic index 는 ( Total cholesterol - HDL cholesterol) / HDL - cholesterol을 이용하여 계산하였다.

다. 청국장 유래 biopolymer의 항고지혈 효능검정

1) 간조직중의 지질성분 분석

간조직의 총지질은 Folch(Folch J et al ; 1957) 등의 방법에 의해 추출하였으며 간조직의 지질정량은 혈청의 방법에 준하여 정량하였다.

## 2) 변중 중성 스테로이드 및 담즙산 함량 측정

변중 담즙산은 Miettinen 등(Miettinen TA et al ; 1965)의 방법으로 담즙산을 추출한 후 Crowell·Macdald의 방법(Crowell MJ and Macdald IA ; 1980)에 따라 효소법으로 측정하였다. 중성 스테로이드 함량은 추출 단계 중 얻어진 물층을 이용하여 530nm에서 흡광도를 측정하였다.

3) 간조직 microsomal HMG-CoA reductase의 활성 측정은 Hulcher와 Oleson의 방법(Hulcher and Oleson ; 1973)을 수정 보완한 방법에 따라 HMG-CoA reductase의 활성을 측정하였다.

## 라. 청국장 유래 biopolymer의 항당뇨효능 검증

### 1) 실험 동물

당뇨유발은 실험 동물의 평균 체중이 약 200 g 되었을 때 streptozotocin(Sigma S0130) 50 mg/kg B.W.을 신선한 0.25 M citrate buffer(pH 4.5)에 용해하여 대퇴부 근육에 1회 주사하여 실험적으로 당뇨를 유발하였고, 대조군은 동량의 citrate buffer용액을 주사하였다. 당뇨유발의 확인은 streptozotocin 주사 4일 후 꼬리정맥에서 채혈하여 간이 혈당계로 (precision Q.I.D) 혈당을 측정하고 혈당량이 300 mg/dl 이상인 동물을 당뇨가 유발된 것으로 간주하여 4주간 사육하였다.

## 2. 연구수행 내용 및 결과

가. 청국장유래 biopolymer,  $\Psi$ -PGA우위 및 levan우위의 각 biopolymer의 물성 및 유동학적 특성조사

### 1) 유동학적 특성

청국장 유래 biopolymer(이하 CBP),  $\Psi$ -PGA우위 biopolymer(이하 P-BP) 및 levan우위 biopolymer(이하 L-BP)의 유동학적 흐름거동의 특성을 살펴보기 위하여 각 시료 4%를 pH 7.0의 완충용액에 용해하여 20℃에서 전단속도의 변화에 따른 전단응력의 변화를 측정한 결과는 Fig 3.7.1과 같다. 흐름거동의 특성상 세 시료 모두 비직선적인 증가의 non-Newtonian의 의가소성유체

(psuedoplastic fluid)의 특성을 보였다. 세 시료중 전단속도의 변화에 따른 전단응력의 변화는 CBP가 가장 크게 나타났고 P-BP가 L-BP보다 전단응력의 변화가 큰 것으로 나타났다. 이는 biopolymer 구성물질이 polypeptide성 물질인 polyglutamic acid와 levan화합물로서 구성되어진 거대 화합물의 용액으로서 이들 물질의 구성비와 구성상태가 물질의 흐름에 영향을 주는 것으로 나타났다. 따라서 biopolymer내 구성물질의 구성함량과 구성물질간의 결합양상도 유동적 특성에 영향을 줄 것으로 사료된다.

## 2) 농도 변화에 따른 유체 흐름 특성

Biopolymer의 농도변화에 따른 유체의 특성을 파악하기 위하여 CBP, P-BP, L-BP를 각각 3, 4, 5%의 농도로 pH 7.0의 완충용액에 용해시켜 20℃에서 점도를 측정 후 전단속도의 변화에 따른 전단응력의 변화를 측정한 결과는 Fig 3.7.2, 3.7.3 및 3.7.4와 같다. 흐름의 특성상 세 시료 모두 Newtonian fluid에 벗어난 의가소성유체(psuedoplastic fluid)의 특성을 보였다. 세 biopolymer 모두 농도가 증가함에 따라 전단응력의 값도 증가하였으며 CBP의 값이 가장 높게 나타났고 L-BP의 값이 가장 낮게 나타났다.

흐름거동의 해석에 필요한 Power law model과 Herschel-Bulkely model의 상태 방정식에 적용시켜 점조도 지수 K값과 흐름유동지수 n값을 Casson model식을 적용시켜 항복응력 C값을 나타낸 결과는 Table 3.7.3과 같다. 이들 biopolymer의 흐름에 대한 유동지수 n값을 비교한 결과 세시료는 농도에 상관 없이 Power law model의 유동지수 n값이 1이상을 나타내어 의가소성 유체의 특성을 보여 농도변화에 따른 biopolymer유체의 흐름은 Power law model이 잘 적용됨을 알 수 있었다. 대개 점조도 지수 K값은 유체의 점도값과 상응하는 값으로 해석되는데, biopolymer농도가 높을수록 점조도 지수도 증가하였으며 CBP가 증가폭이 상대적으로 가장 크게 나타났고 L-BP가 증가폭이 가장 작은 것으로 나타났다. 따라서 세 biopolymer중 CBP가 농도 의존성이 가장 높은 것으로 사료된다.

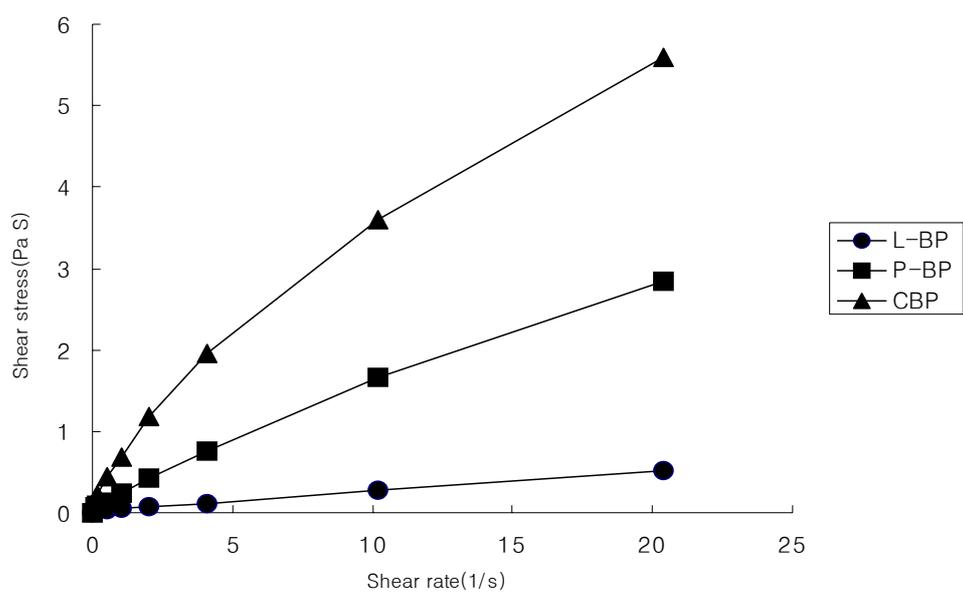


Fig. 3.7.1. Flow behavior of biopolymers.

Flow behaviors were examined with 4% of biopolymer A, B and C at 20°C, pH 7.0, respectively.

●-●, LPB 4.0% ; ■-■, P-BP 4.0% ; ▲-▲, CBP 4.0%

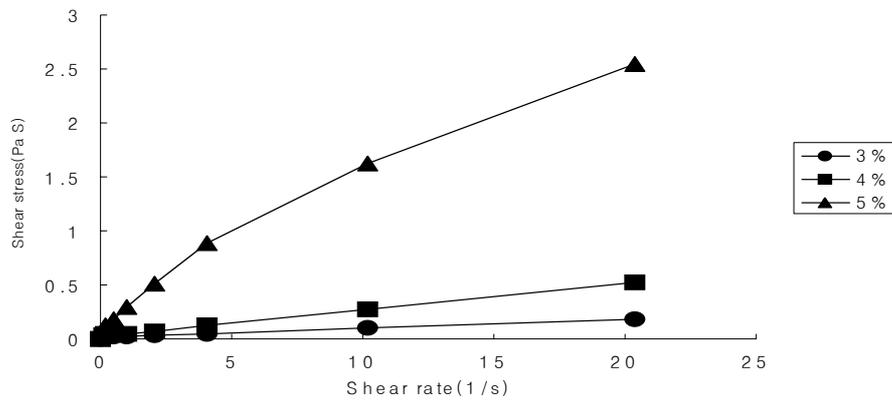


Fig. 3.7.2. Effect of concentration of biopolymer L-BP on the flow behavior.

Flow behavior was examined with various concentration of biopolymer L-BP at 20°C, pH 7.0.

●-●, 3% ; ■-■, 4% ; ▲-▲, 5%

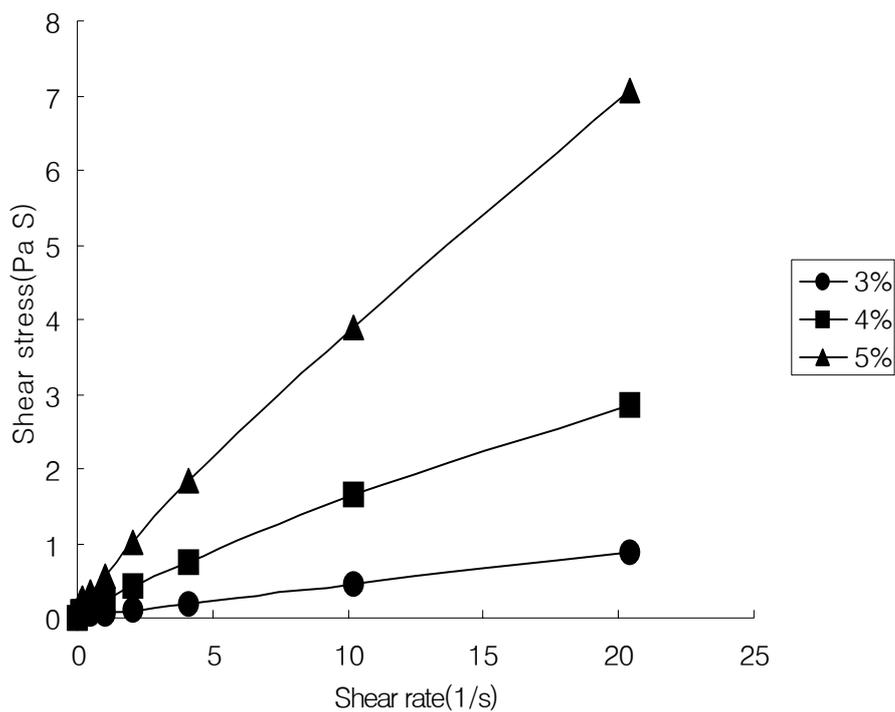


Fig. 3.7.3. Effect of concentration of biopolymer P-BP on the flow behavior. Flow behavior was examined with various concentration of biopolymer P-BP at 20°C, pH 7.0.

●-●, 3% ; ■-■, 4% ; ▲-▲, 5%

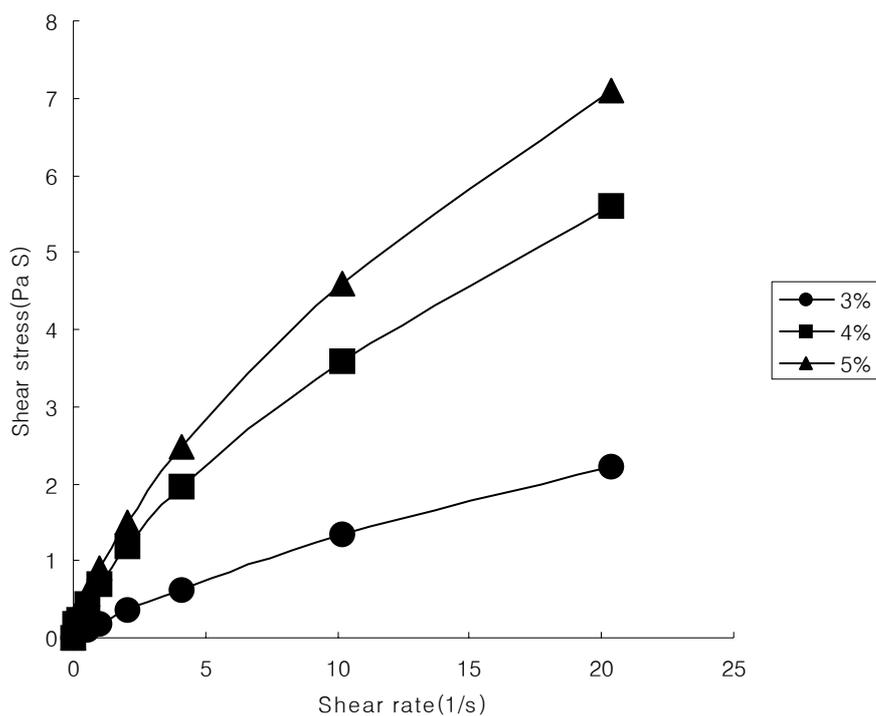


Fig. 3.7.4. Effect of concentration of biopolymer CBP on the flow behavior.

Flow behavior was examined with various concentration of biopolymer CBP at 20°C, pH 7.0.

●-●, 3% ; ■-■, 4% ; ▲-▲, 5%

Table 3.7.3. Viscometric constants of biopolymer solutions at different concentration.

Bio-polymer	Conc. (%)	Power law model			Herschel-Bulkley model			Casson model
		K	n	R <sup>2</sup>	K	n	R <sup>2</sup>	C
L-BP	3	2.95	1.96	0.90	1.85	1.32	0.88	0.19
	4	2.01	1.73	0.95	1.86	1.67	0.91	0.25
	5	0.72	1.53	0.99	0.66	1.21	0.91	0.38
P-BP	3	1.55	1.48	0.97	1.35	1.23	0.89	0.11
	4	0.76	1.36	0.99	0.95	1.09	0.93	0.21
	5	0.2	1.41	0.98	0.22	1.25	0.86	0.33
CBP	3	0.88	1.35	0.99	0.76	1.02	0.91	0.09
	4	0.20	1.50	1.0	0.12	1.11	0.90	0.13
	5	-0.01	1.60	1.0	0.01	1.01	0.88	0.21

K : Consistency index, Pa · s<sup>n</sup>

n : Flow behavior index

C : Yield stress, Pa

R<sup>2</sup> : Correlation coefficient

### 3) pH변화에 따른 유체 흐름 특성

L-BP, P-BP 및 CBP를 각각 4%씩 pH 3.0~9.0의 완충용액에 용해하여 20°C에서 점도를 측정하여 전단속도 변화에 따른 전단응력의 변화를 나타낸 결과는 Fig. 3.7.5, 3.7.6 및 3.7.7과 같다. 세 biopolymer의 유체흐름에서 pH 7.0에서 최대 전단응력 값을 보였으며 CBP는 pH 7.0과 pH 9.0에서이 값이 거의 유사하게 나타났다. 세 biopolymer 모두 pH가 산성영역에서 중성 영역으로 갈수록 전단응력의 값이 증가하여 pH 7.0에서 최대의 전단 응력을 나타내었다. pH변화에 따른 흐름 거동의 특성 파악을 위해 Power law model과 Herschel-Bulkley model에 적용시켜 점조도지수 K값과 흐름 유동지수 n값

및 Casson model 에 의한 항복응력 C값을 나타낸 결과는 Table 3.7.4와 같다. 두 model의 적용 결과 Power law model 이 유동지수 n값이 1이상의 의사소성유체(pseudoplastic fluid)의 특성을 보였고 0.94이상의 높은 상관관계를 보여 적용성이 높은 것으로 나타났다. 점조도 지수 K값도 점도의 변화와 마찬가지로 세 biopolymer 모두 pH 7.0 에서 가장 높았으며 BCP는 pH 7.0과 pH 9.0에서 비슷한 값을 나타내었다. Casson model에 의해 계산된 항복응력 C값도 모두 pH 7.0에서 가장 높은값을 나타내었다, 각 pH영역에서 점도값의 변화로서 비교했을 때 bodie등(1985)은 4% levan용액의 점도는 pH 10~12의 알카리 영역에서 점도가 높은 것으로 보고하여 비교하면 본 실험의 결과는 다소 다른 경향을 나타내었다. 이는 본 실험의 biopolymer가 PGA와 levan의 혼합물과 상관성이 있을 것으로 사료된다.

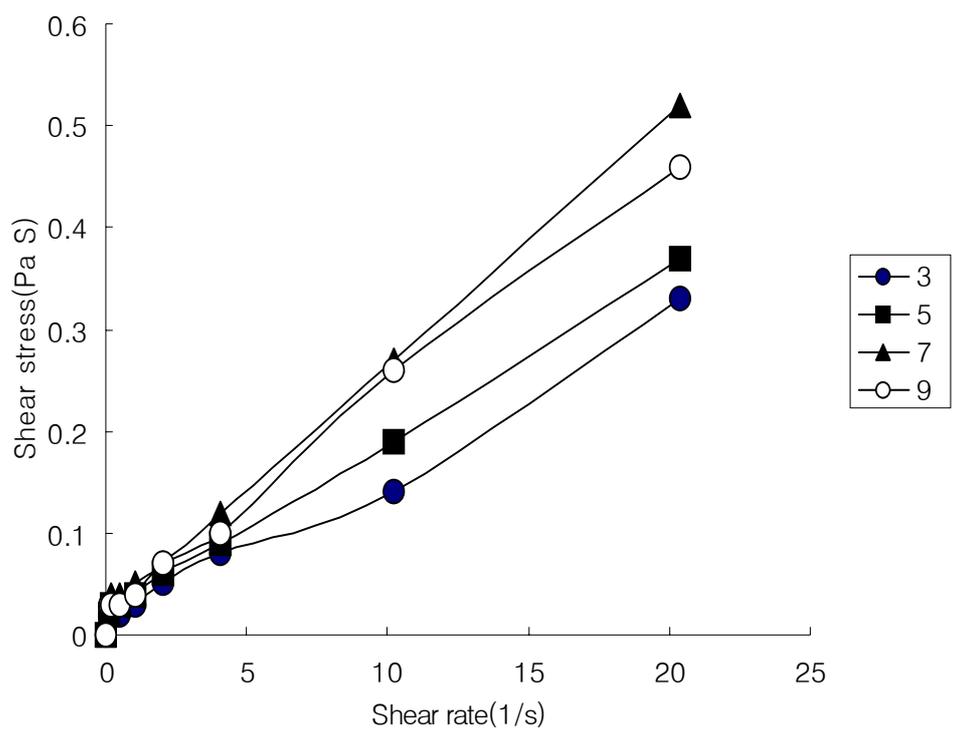


Fig. 3.7.5. Effect of pH of biopolymer L-BP on the flow behavior.

Flow behavior was examined with 4% of biopolymer L-BP, different pH at 20°C. ●-●, pH 3.0 ; ■-■, pH 5.0 ; ▲-▲, 7.0 ; ○-○, pH 9.0

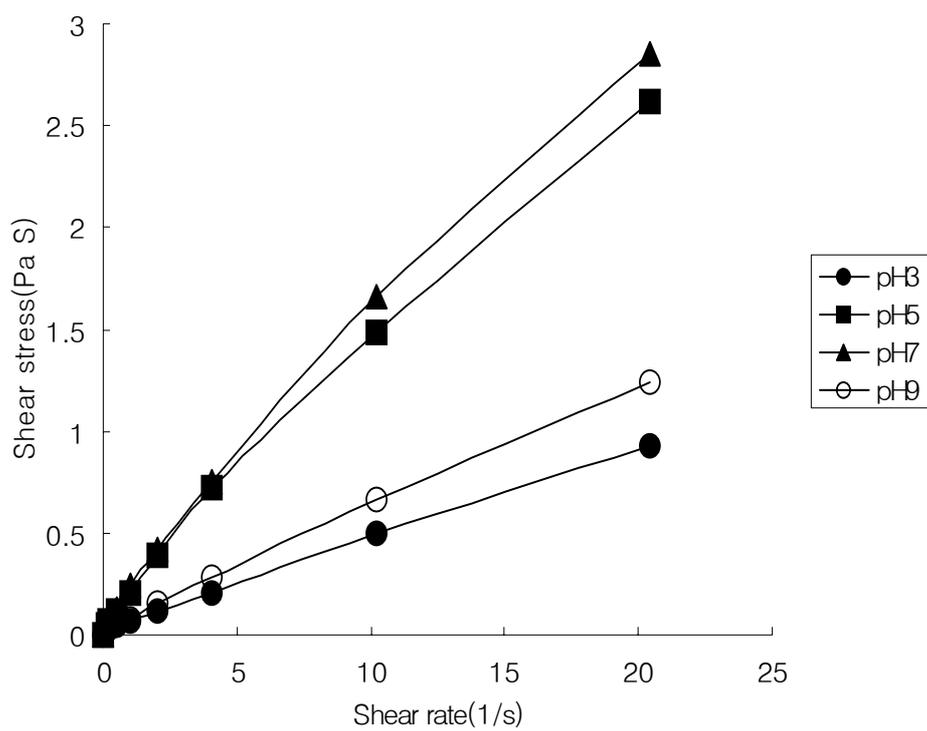


Fig. 3.7.6. Effect of pH of biopolymer P-BP on the flow behavior. Flow behavior was examined with 4% of biopolymer P-BP, different pH at 20°C. ●-●, pH 3.0 ; ■-■, pH 5.0 ; ▲-▲, 7.0 ; ○-○, pH 9.0

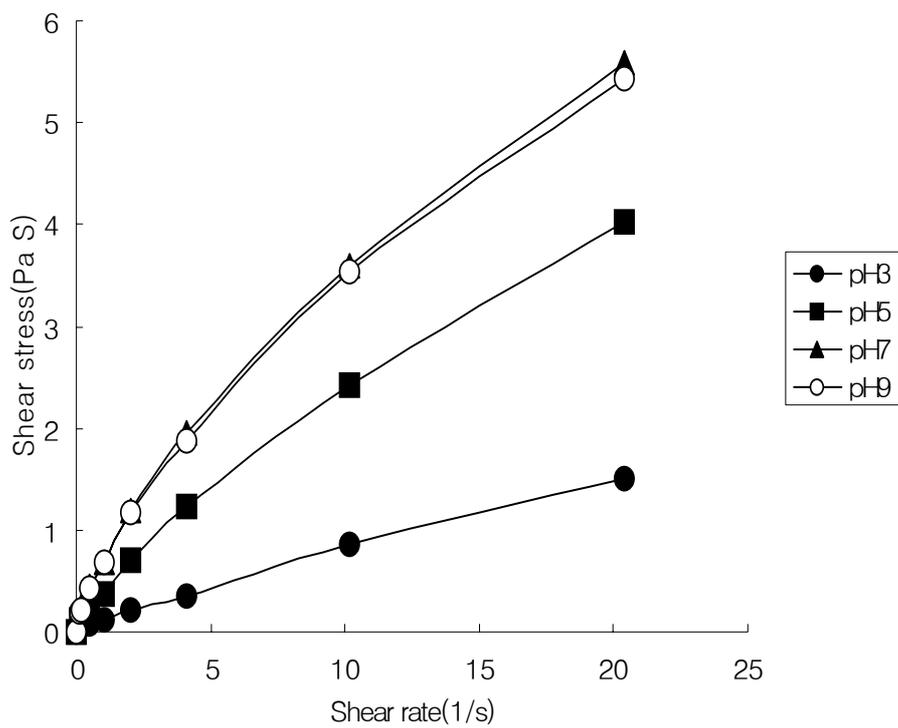


Fig. 3.7.7. Effect of pH of biopolymer CBP on the flow behavior. Flow behavior was examined with 4% of biopolymer CBP, different pH at 20°C. ●-●, pH 3.0 ; ■-■, pH 5.0 ; ▲-▲, 7.0 ; ○-○, pH 9.0

Table 3.7.4. Viscometric constants of biopolymer solutions at different pH.

Bio polymer	pH	Power law model			Herschel-Bulkley model			Casson model
		K	n	R <sup>2</sup>	K	n	R <sup>2</sup>	C
L-BP	3.0	2.35	1.69	0.95	1.26	1.78	0.96	0.63
	5.0	2.29	1.78	0.96	1.65	1.26	0.87	0.72
	7.0	2.01	1.73	0.95	1.04	1.69	0.93	0.91
	9.0	2.02	1.65	0.94	1.03	1.70	0.91	0.56
P-BP	3.0	1.50	1.47	0.98	0.85	1.60	0.93	0.79
	5.0	0.81	1.29	1.0	0.81	1.05	0.91	0.50
	7.0	1.28	1.36	0.99	0.87	1.89	0.91	0.92
	9.0	1.16	1.31	0.98	0.90	1.35	0.92	0.70
CBP	3.0	1.16	1.38	0.99	0.67	0.95	0.95	0.76
	5.0	0.51	1.36	0.99	0.74	1.05	0.94	0.79
	7.0	0.19	1.51	1.0	0.83	0.98	0.85	0.93
	9.0	0.21	1.50	1.0	0.47	0.93	0.91	0.92

K : Consistency index( Pa · s<sup>n</sup> ), n : Flow behavior index  
 C : Yield stress( Pa ), R<sup>2</sup> : Correlation coefficient

#### 4) 온도변화에 따른 유체흐름 특성

온도 변화에 따른 유체의 흐름 특성을 파악하기 위하여 세 biopolymer를 각각 4%를 pH 7.0의 완충용액에 용해하여 10~70℃의 온도를 변화시키면서 전단속도의 변화에 따른 전단응력의 변화를 나타낸 결과는 Fig. 3.7.8, 3.7.9 및 3.7.10과 같다. 세 시료 모두가 온도가 높아질수록 전단응력의 값은 감소하였고, CBP가 L-BP와 P-BP보다 온도가 높아질수록 점성변화에 따른 전단응력 값의 감소도 높은 것으로 나타나 L-BP와 P-BP보다 분자상호간의 결합력이 높을 것으로 사료된다. 이는 온도가 높을수록 열 운동에 대한 교란 현상이 높아져 분자 상호간의 결합력이 떨어져 저항이 적어지기 때문이라 생각된다.

한편, 온도변화에 따른 흐름거동 특성을 조사하기 위해 Power law model 과 Herschel- Bulkley model을 적용시켜 점조도 지수  $K$ 값과 흐름 유동지수  $n$ 값 및 항복응력  $C$ 값을 구한 결과는 Table 3.7.5와 같다. 두 model식의 적용 결과 Power law model의  $n$ 값이 1이상의 의사소성유체(pseudoplastic fluid)의 특성이 잘 나타나 적용성이 높았다. 점조도 지수  $K$ 값은 점도에 상응하여 온도가 높을수록  $K$ 값은 다소 증가하였으며 CBP가 점조도 지수의 감소폭이 큰 것으로 나타났다. Casson model에 의한 항복응력의 변화양상 역시 세 시료는 온도가 증가할수록 항복응력 값이 약간 증가 것으로 나타났으며, CBP의 항복응력 값이 세 시료중 가장 높은 것으로 나타나 분자구성물의 상호간의 강한 결합력으로 인한 흐름에 대한 저항성이 크게 나타났을 것으로 생각된다. 또한 P-BP처럼 구성성분중 PGA함량이 높은 것이 유체의 흐름에 영향을 미칠 것으로 사료된다.

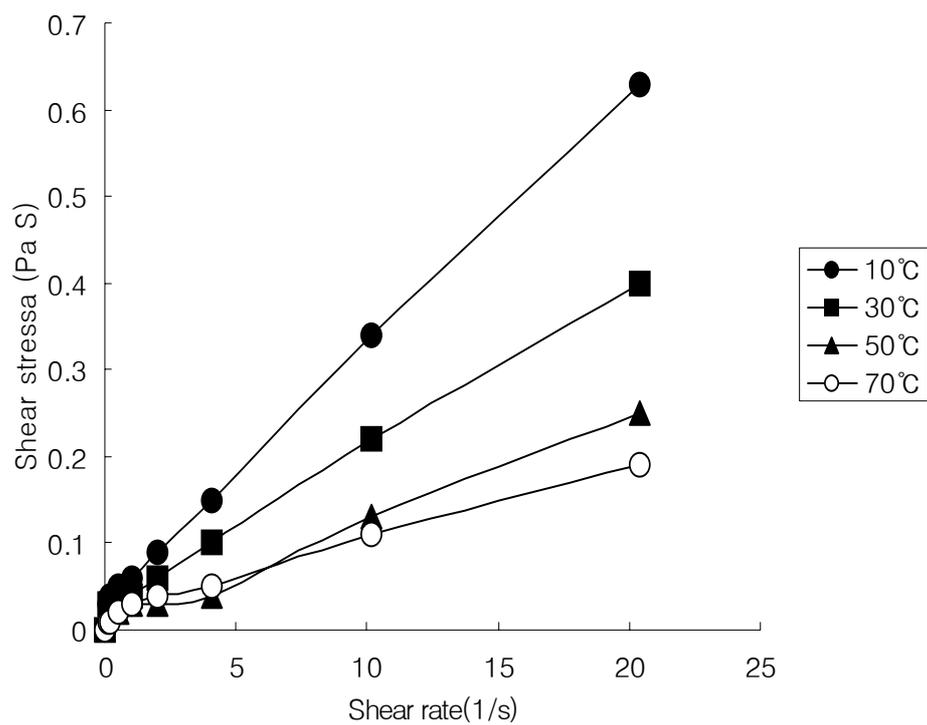


Fig. 3.7.8. Effect of temperature of biopolymer L-BP on the flow behavior. Flow behavior was examined with 4% of biopolymer at different temperature, pH 7.0. ●-●, 10°C ; ■-■, 30°C ; ▲-▲, 50°C ; ○-○, 70°C

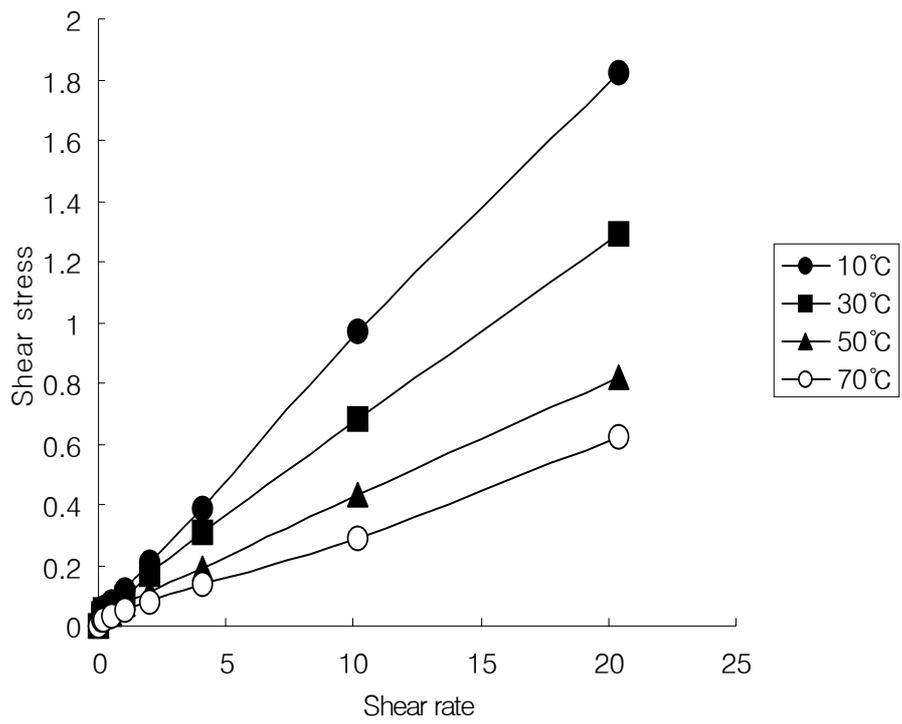


Fig. 3.7.9. Effect of temperature of biopolymer P-BP on the flow behavior. Flow behavior was examined with 4% of biopolymer at different temperature, pH 7.0. ●-●, 10°C ; ■-■, 30°C ; ▲-▲, 50°C ; ○-○, 70°C

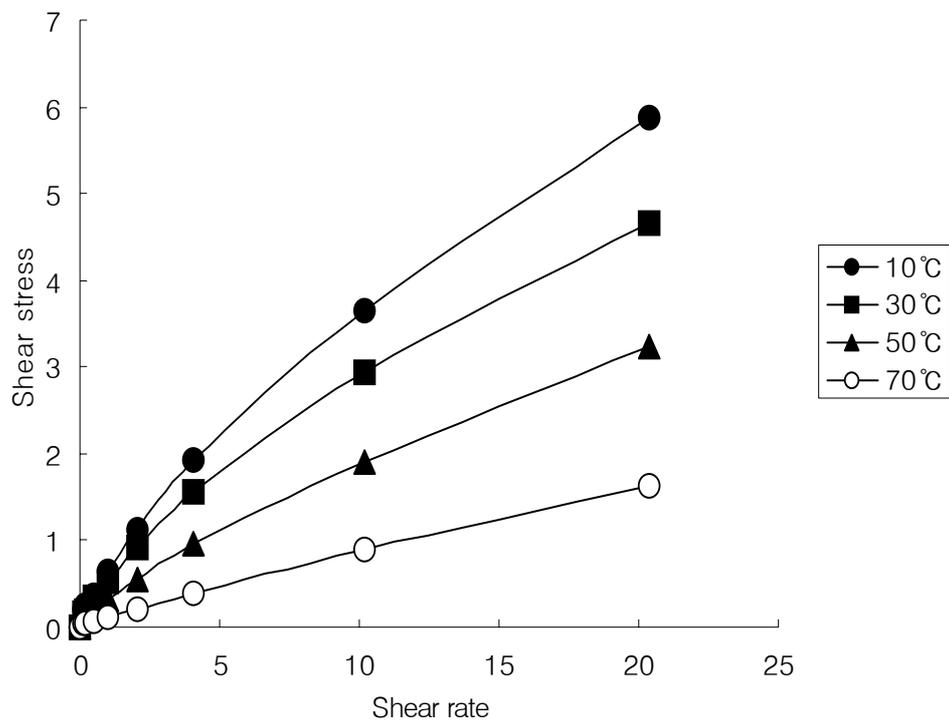


Fig. 3.7.10. Effect of temperature of biopolymer CBP on the flow behavior. Flow behavior was examined with 4% of biopolymer at different temperature, pH 7.0. ●-●, 10°C ; ■-■, 30°C ; ▲-▲, 50°C ; ○-○, 70°C

Table 3.7.5. Viscometric constants of biopolymer solutions at different

Bio polymer	Temp. ℃	Power law model			Herschel-Bulkley model			Casson model
		K	n	R <sup>2</sup>	K	n	R <sup>2</sup>	C
L-BP	10	1.83	1.68	0.97	1.49	1.62	0.93	0.35
	30	2.18	1.75	0.94	1.85	1.63	0.92	0.29
	50	2.57	1.75	0.90	1.91	1.66	0.92	0.18
	70	2.88	1.86	0.99	1.93	1.71	0.92	0.13
P-BP	10	1.08	1.38	0.98	0.09	1.16	0.82	0.57
	30	1.28	1.42	0.98	0.22	1.08	0.92	0.62
	50	1.57	1.46	0.98	0.27	1.15	0.86	0.79
	70	1.77	1.44	0.98	0.30	1.41	0.83	0.85
CBP	10	0.20	1.50	0.99	0.09	1.37	0.90	0.83
	30	0.34	1.49	1.0	0.18	1.13	0.85	0.94
	50	0.61	1.54	0.99	0.26	1.26	0.83	1.61
	70	1.13	1.34	0.98	0.37	0.95	0.91	1.77

Temperature. K : Consistency index( Pa · s<sup>n</sup> ), n : Flow behavior index  
C : Yield stress( Pa ), R<sup>2</sup> : Correlation coefficient

##### 5) 겔보기 점도의 변화

L-BP, P-BP 및 CBP를 전단속도의 변화에 의한 겔보기 점도의 변화를 관찰하기 위하여 pH 7.0의 완충용액에 각 시료를 4% 농도로 용해하여 20℃에서 전단속도 0.1~20.4 s<sup>-1</sup>로 변화시키면서 겔보기 점도를 측정된 결과는 Fig. 3.7.11과 같다. 세 시료 모두 전단속도가 증가함에 따라 겔보기 점도값은 감소하였으며 낮은 전단속도 (0.1~1.02)에서 점도의 감소 폭이 크게 나타났고 전단속도가 증가할수록 감소 폭은 낮아져서 거의 일정한 값인 극한 점도 (limiting viscosity)에 도달하는 특성을 보였다.

#### 6) 겔보기 점도의 온도 의존성

L-BP, P-BP 및 CBP biopolymer유체에 대한 겔보기 점도의 온도 의존성을 조사하기 위하여 Arrhenius model식을 적용하였다. 이때 전단 속도는  $2.04 \text{ s}^{-1}$ 에서  $1/T$ 과  $\ln(\mu)$ 에 대한 회귀분석의 결과는 Fig. 3.7.12와 같다. L-BP, P-BP 및 CBP는 각각 4%의 농도에서 절대온도의 역수와 겔보기 점도와 사이에 직선적인 결과를 나타내어 다음의 Arrhenius식으로 적합성을 설명할 수 있었다.

$$K = A \cdot \text{Exp}(E_a/RT)$$

Arrhenius식의 적용에 의한 온도 의존성조사에서 각 온도에서의 농도의 변화를 조사하여 활성화에너지  $E_a$ 와 실험상수  $A$ 를 조사한 결과는 Table 3.7.6과 같다. 활성화 에너지는 뉴우튼 유체의 경우 점도를, 비뉴우튼 유체의 경우엔, 일정 전단속도에서 겔보기 점도를 대상으로 계산하는데 본 실험의 세 biopolymer는 의가소성 유체로 조사되었기에  $2.04 \text{ sec}^{-1}$ 에서의 겔보기 점도를 대상으로 하여 조사하였다. 활성화에너지 값은 각 농도에서 biopolymer P-BP가 가장 높았고 biopolymer L-BP의 3.0%, 4%에서 biopolymer CBP보다 활성화 에너지 값이 높게 나타났다. 따라서 biopolymer P-BP와 L-BP는 biopolymer CBP보다 온도의존성이 큰 유체라 사료된다. 또한 세시료 모두 농도가 증가할수록 실험상수  $A$ 의 값도 증가하였고 biopolymer  $A$ 의 값이 가장 높은 값을 나타내었다. pH변화에 따른 biopolymer의 온도의존성을 Arrhenius식에 적용시켜 활성화 에너지 값  $E_a$  및 실험상수  $A$ 값을 조사한 결과는 Table 3.7.7과 같다. 활성화 에너지 값은 각 시료별로 pH 3.0에서 가장 높게 나타났다. 그리고 농도 및 pH의 변화에서 모두  $R^2$ 값이 0.99이상의 높은 적합성을 보였다.

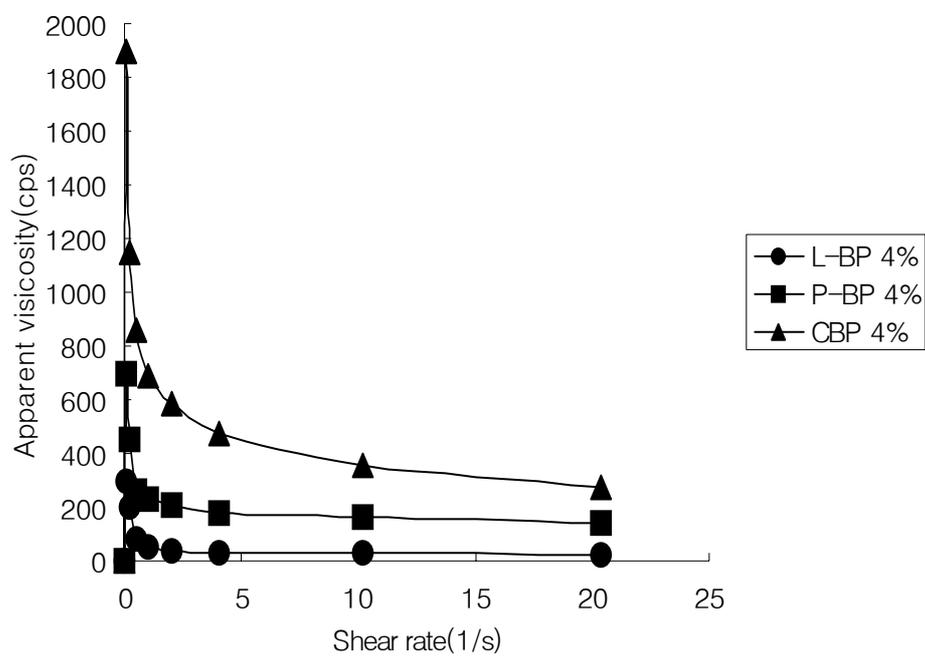


Fig. 3.7.11. Effect of shear rate on the on the apparent viscosity of biopolymers solutions.

Apparent viscosity was measured 4% of L-BP, P-BP and CBP solutions, pH 7.0 at 20°C.

●-●, L-BP 4.0% ; ■-■, P-BP 4.0% ; ▲-▲, CBP 4.0%

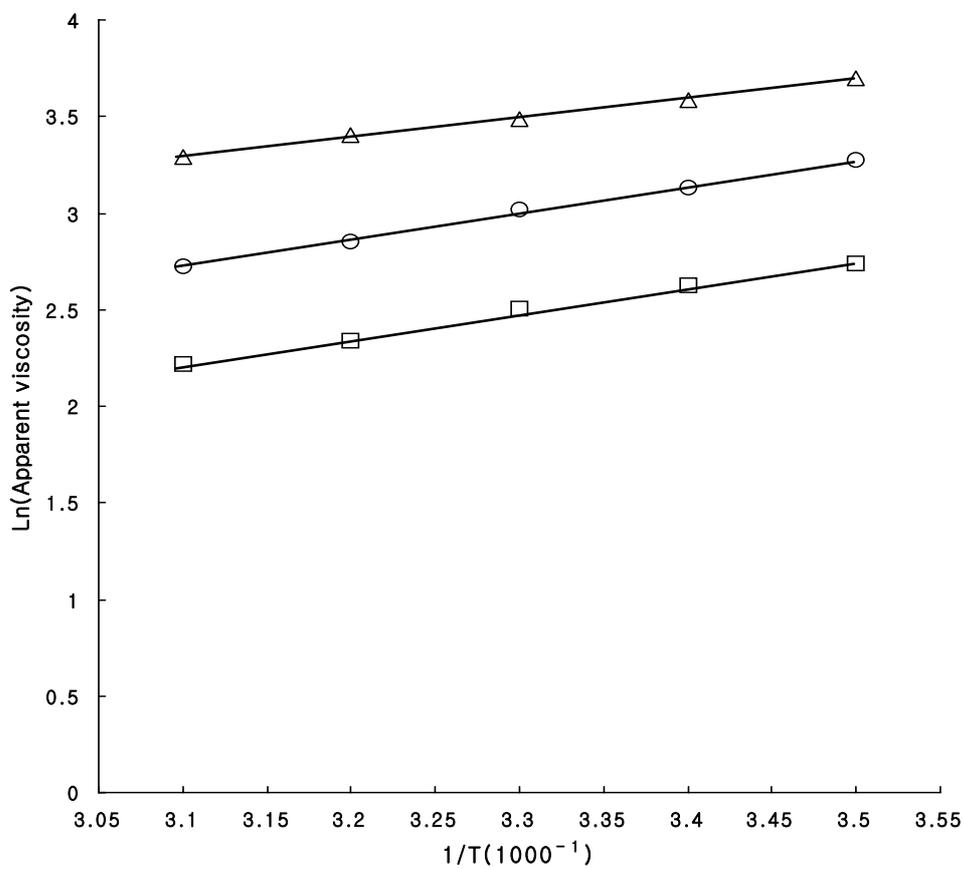


Fig. 3.7.12. Temperature dependence on the apparent viscosity of 1% biopolymers solutions.

△-△, CBP-4.0% ; ○-○, PBPB-4.0% ; □-□, LBP-4.0%

Table 3.7.6. Effect of temperature on the apparent viscosity of biopolymer solutions at various concentration.

Concentration.		Viscosity model		Correlation coefficient
		constant		
Biopolymer (%)		A	Ea	R <sup>2</sup>
		( $\times 10^3$ KJ/kg · mol)		
	0.5	0.09	3.33	0.99
CBP	1.0	1.47	1.87	0.99
	2.0	2.94	1.55	0.99
	0.5	0.003	4.97	0.99
PBP	1.0	0.32	2.49	0.99
	2.0	0.81	2.04	0.99
	0.5	0.01	4.16	0.99
LBP	1.0	0.20	2.47	0.99
	2.0	1.73	1.37	0.99

Ea and A : Experimental constants

Table 3.7.7. Effect of temperature on the apparent viscosity of biopolymer solutions at different pH.

Biopolymer	pH	Viscosity model constant		Correlation coefficient
		A kg.mol)	Ea( $\times 10^3$ KJ/	R <sup>2</sup>
CBP	3.0	0.09	3.33	0.99
	5.0	1.48	1.87	0.99
	7.0	2.94	1.55	0.99
	9.0	1.05	2.03	0.99
P-BP	3.0	0.08	3.14	0.98
	5.0	0.10	3.08	0.99
	7.0	0.32	2.49	0.99
	9.0	0.62	2.13	0.99
L-BP	3.0	0.02	3.55	0.99
	5.0	0.16	2.55	0.99
	7.0	0.20	2.48	0.99
	9.0	3.32	2.27	0.99

Ea, A : Experimental constants

#### 7) 겔보기 점도의 농도의존성

L-BP, P-BP와 CBP의 각 농도에 따른 겔보기 점도의 변화를 알아보기 위하여 전단속도  $2.04\text{sec}^{-1}$ 에서 농도에 따른 겔보기 점도의 증가치를 Exponential model(3)과 Power law model에 적용시켜 적합성을 조사한 결과는 Table 7.1.8과 7.1.9와 같다. 이때 두 model에 대하여 각각을 회귀 분석 후 얻은 계수 값과 상관계수 값을 각각 A, K, R<sup>2</sup>로 나타내었다. 농도의존성에 대한 온도의 영향에서(Table 7.1.9)는 두 model에서 모두 높은 적합성을 보였으나 Power law model의 상관계수(0.94~0.99)가 Exponential model의 상관계수(0.86~0.99)보다 적합성이 높은 것으로 나타났다. 또한 농도의존성에 미치는 pH의 영향도 두 model식 모두 높은 적합도를 보였으나 Power law model식의 상관계수(0.95~0.99)가 Exponential model식(0.88~0.99)보다 적합도가 높은것으로 나타났다. 따라서 농도의존성에서 Power law model의 다음 식을 적용할 수 있을 것으로 사료된다. 또한, biopolymer 세 시료의 각 농도에 대하여 다음의 식에 적용시켜본 결과 Fig. 7.1.13에 나타낸 바와 같이 직선적인 결과를 나

타내어 농도의존성에 적합한 model식임을 확인하였다.

$$\mu = A \cdot C^n$$

Table 3.7.8. Effect of temperature on the apparent viscosity of biopolymer solutions at different pH.

Biopolymer	pH	Viscosity model constant		Correlation coefficient
		A (kg.mol)	Ea( $\times 10^3$ KJ/	R <sup>2</sup>
CBP	3.0	0.09	3.33	0.99
	5.0	1.47	1.87	0.99
	7.0	2.94	1.55	0.99
	9.0	1.05	2.03	0.99
P-BP	3.0	0.08	3.14	0.98
	5.0	0.10	3.08	0.99
	7.0	0.32	2.49	0.99
	9.0	0.62	2.13	0.99
L-BP	3.0	0.02	3.55	0.99
	5.0	0.16	2.55	0.99
	7.0	0.20	2.48	0.99
	9.0	3.32	2.27	0.99

Ea, A : Experimental constants

Table 3.7..9. Effect of concentration on apparent viscosity of biopolymer solutions at different temperature.

Biopolymer	Temp. (°C)	Power law model			Exponential model		
		K	n	R <sup>2</sup>	K	n	R <sup>2</sup>
CBP	10	37.86	0.30	0.97	28.14	0.25	0.90
	30	34.58	0.33	0.98	24.69	0.28	0.91
	50	30.07	0.41	0.97	20.15	0.34	0.91
	70	27.13	0.47	0.97	17.03	0.40	0.90
P-BP	10	23.33	0.33	0.98	16.88	0.28	0.92
	30	21.01	0.36	0.96	14.79	0.30	0.89
	50	18.16	0.46	0.94	11.59	0.38	0.86
	70	15.96	0.61	0.96	8.24	0.51	0.89
L-BP	10	15.87	0.26	0.98	11.97	0.24	0.99
	30	13.85	0.37	0.99	9.36	0.36	0.99
	50	12.47	0.42	0.99	8.04	0.38	0.99
	70	10.50	0.52	0.99	0.13	0.46	0.97

K : Consistency index( Pa · s<sup>n</sup> ), n : Flow behavior index

R<sup>2</sup> : Correlation coefficient

Table 3.7.10. Effect of concentration on apparent viscosity of biopolymer solutions at different pH.

Biopolymer	pH	Power law model			Exponential model		
		A	n	R <sup>2</sup>	A	K	R <sup>2</sup>
CBP	3.0	18.51	0.63	0.98	9.87	0.54	0.92
	5.0	26.30	0.47	0.97	16.58	0.401	0.91
	7.0	34.27	0.33	0.98	24.69	0.28	0.93
	9.0	31.14	0.37	0.97	21.53	0.32	0.90
P-BP	3.0	15.40	0.52	0.96	9.19	0.44	0.90
	5.0	16.74	0.48	0.96	10.42	0.41	0.89
	7.0	21.01	0.36	0.96	14.79	0.30	0.89
	9.0	22.58	0.32	0.98	16.37	0.27	0.92
L-BP	3.0	9.83	0.58	0.99	5.38	0.52	0.97
	5.0	12.76	0.44	0.99	8.09	0.39	0.97
	7.0	13.85	0.37	0.99	9.37	0.34	0.99
	9.0	14.58	0.36	0.99	9.95	0.33	0.99

A, K and n : Experimental constants

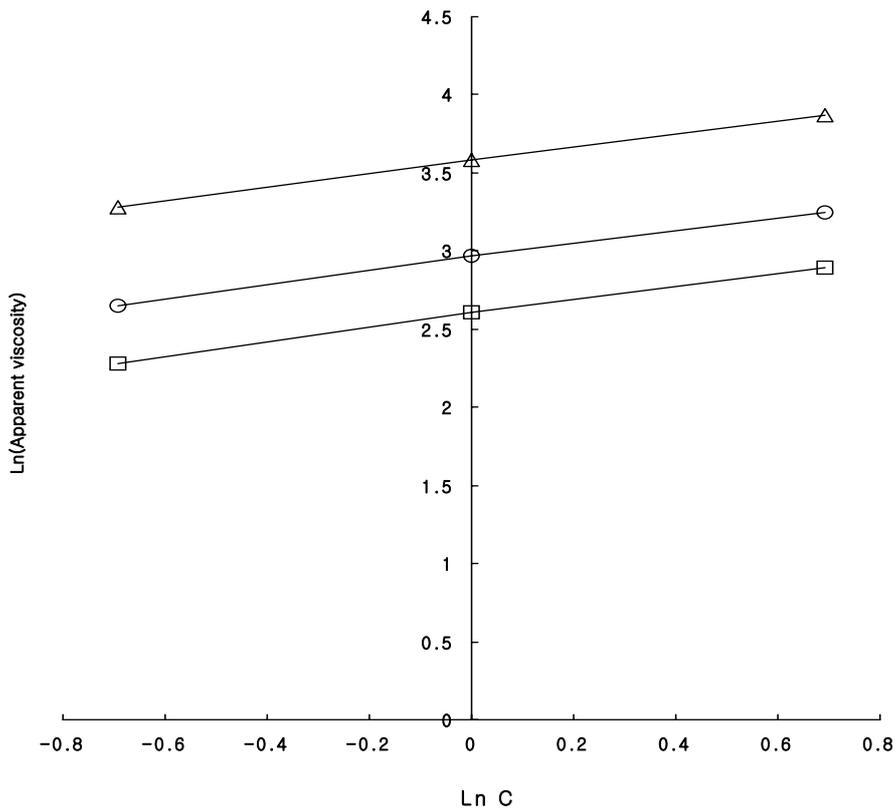


Fig. 3.7.13. Concentration dependence on the apparent viscosity of biopolymers 4% solutions.

△-△, CBP-4.0% ; ○-○, PBP-4.0% ; □-□, LBP-4.0%

나. 청국장 유래 biopolymer의 콜레스테롤 저하 효능

1) 간 지질 성분에 미치는 영향

Table 3.7.11은 간조직의 총 지질, 중성지방, 콜레스테롤 함량 측정 결과이다. 간의 총 지질 농도, 중성지방 및 총 콜레스테롤 농도는 C군에 비해 CH군과 CBP군이 유의적으로 낮게 나타났다. 이는 청국장 유래 biopolymer가 간의 지질대사 개선효과를 가져와 조직내의 지질, 중성지방, 콜레스테롤 농도감소에 영향을 미친 것으로 사료된다.

Table 3.7.11 Effect of chunggukjang(CH) and chunggukjang biopolymer(CBP) on hepatic levels of total lipid, triglyceride(TG) and total cholesterol in rats fed with high cholesterol diets

(unit : mg/day)

Groups	Total lipid	Triglyceride(TG)	Total cholesterol
C <sup>3)</sup>	70.60±28.12 <sup>1)a2)</sup>	124.58±45.99 <sup>a</sup>	171.77±73.80 <sup>a</sup>
CH <sup>4)</sup>	39.36±11.38 <sup>b</sup>	60.47±10.74 <sup>b</sup>	105.99±36.12 <sup>ab</sup>
CBP <sup>5)</sup>	47.03±5.48 <sup>ab</sup>	71.81±32.99 <sup>b</sup>	76.74±18.90 <sup>a</sup>

1) All values are mean ± S.D.

2) Values are significantly different at P < 0.05 by duncan test

3) C : Control group

4) CH : Chunggukjang group

5) CBP : Chunggukjang Biopolymer group

2) 간의 HMG Co A reductase activities에 미치는 영향

Table 3.7.12. Effect of chunggukjang and chunggukjang biopolymer on hepatic HMG Co A reductase activities in rats fed high cholesterol diets

Groups	HMG Co A reductase activities (nmol/mg protein/min)
C	0.10±0.06 <sup>a</sup>
CH	0.27±0.15 <sup>a</sup>
CBP	0.15±0.09 <sup>a</sup>

1) All values are mean ± S.D.

2) Values are significantly different at P < 0.05 by duncan test

Table 3.7.12는 내인성 콜레스테롤 합성 조절효소인 HMG Co A reductase 활성을 나타낸 결과이다. 세 군 사이에 유의적인 차이를 나타내지 않았지만 C군에 비해 CH군과 CHB군이 높은 경향을 나타내었다.

3) 분변의 총 중성지질, 담즙산 배설에 미치는 영향

분변 중 총 중성 스테로이드는 세 군간에 유의적인 차이를 나타내지 않았으나 분변 중 담즙산 함량은 CH군과 CHB군이 C군에 비해 유의적으로 높게 나타났다. 담즙산 배설은 체내 콜레스테롤의 유일한 배설 경로로 청국장 유래 biopolymer는 대조군에 비해 간의 HMG Co A reductase 활성을 증가시켰고 이는 간에서의 담즙합성 촉진과 콜레스테롤의 소장내 흡수 지연 및 분변 중 담즙산 배설의 증가로 인한 것이라 사료된다.

Table 3.7.13. Effect of chunggukjang and chunggukjang biopolymer on fecal excretion levels of total neutral steroids and total bile acid in rats fed high cholesterol diets

Groups	Total neutral steroids (g/day)	Total bile acid (mg/g feces)
C	2.63±1.56 <sup>a</sup>	70267.89±27318.46 <sup>b</sup>
CH	1.24±0.89 <sup>a</sup>	155266.40±28867.05 <sup>a</sup>
CBP	1.67±0.22 <sup>a</sup>	106805.60±61562.77 <sup>ab</sup>

1) All values are mean ± S.D.

2) Values are significantly different at P < 0.05 by duncan test

다. 청국장 유래 Biopolymer의 항고지혈 효능

1) 체중증가량, 평균식이 섭취량, 식이효율(FER)

단백질 급원을 카제인 대신 청국장으로 대체한 CH군과 청국장 Biopolymer(CBP)를 3%첨가한 CHB 군의 체중증가량은 C군과 CHB군이 CH군에 비해 높은 경향이던 유의적인 차이는 나타내지 않았다. 또한 평균 식이

섭취량이나 식이효율이 세 군간에 유의성을 나타내지 않았다. (Table 3.7.14)

Table 3.7.14. Effect of chunggukjang and chunggukjang biopolymer on body weight gains, food intake and food efficiency ratio(FER) in rats fed high cholesterol diets

Groups	Body weighty gains (g)	Food intake (g/day)	FER
C	62.30.57±14.94 <sup>1)a2)</sup>	17.58±1.39 <sup>a</sup>	1.29 ± 0.64 <sup>a</sup>
CH	44.40±22.4 <sup>a</sup>	16.26±0.88 <sup>a</sup>	0.94 ± 0.60 <sup>a</sup>
CBP	60.13±14.12 <sup>a</sup>	16.60±0.60 <sup>a</sup>	1.43 ± 0.31 <sup>a</sup>

1) All values are mean ± S.D.

2) Values are significantly different at P < 0.05 by duncan test

3) C : Control group

4) CH : Chunggukjang group

5) CBP : Chunggukjang Biopolymer group

## 2) 혈청 지질농도 및 혈청지표에 미치는 영향

청국장과 청국장 Biopolymer의 첨가가 실험동물의 혈청 내 지질수준에 미치는 효과는 Table 3.7.15에 나타난 바와 같다. 혈청 중성지방 수준은 C군에 비해 CH군이 43.07% 감소하였으며 CHB군은 38.46% 감소하였으나 유의적인 차이는 나타내지 않았다. 혈청 총 콜레스테롤 농도는 세 군사이에 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 혈청의 HDL-cholesterol, LDL-Cholesterol 농도 또한 실험군 간에 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 동맥경화지수( atherogenic index , AI)는 세 군간에 유의적인 차이를 나타내지 않았으나 CH군, CHB군, C군의 순서로 나타났다.

Table 3.7.15. Effect of chunggukjang and chunggukjang biopolymer on serum levels of triglyceride(TG), total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol and atherogenic index(AI) in rats fed high cholesterol diets

(unit : mg/dL)

Groups	TG	Total cholesterol	HDL cholesterol	LDL cholesterol <sup>3)</sup>	AI <sup>4)</sup>
C	13.00±6.28 <sup>1)a2)</sup>	104.00±5.43 <sup>a</sup>	11.80±2.39 <sup>a</sup>	89.72±7.20 <sup>a</sup>	7.59±2.77 <sup>a</sup>
CH	7.40±6.65 <sup>a</sup>	82.20±48.95 <sup>a</sup>	10.80±3.56 <sup>a</sup>	82.60±51.06 <sup>a</sup>	13.32±9.85 <sup>a</sup>
CBP	8.00±2.91 <sup>a</sup>	106.66±4.04 <sup>a</sup>	12.80±1.79 <sup>a</sup>	101.25±20.94 <sup>a</sup>	9.91±3.37 <sup>a</sup>

1) All values are mean ± S.D.

2) Values are significantly different at P < 0.05 by duncan test

3) LDL-cholesterol : Total cholesterol - ( HDL cholesterol + triglyceride/5 )

4) AI : Atherosclerotic index = ( Total cholesterol - HDL cholesterol) / HDL - cholesterol

Table 3.7.16. Effect of chunggukjang and chunggukjang biopolymer on serum levels of phospholipid, total protein, GPT and GOT in rats fed high cholesterol diets

Groups	Phospholipid (mg/dL)	Total protein (g/dL)	GPT (IU/L)	GOT (IU/L)
C	80.50±9.35 <sup>ab</sup>	6.55±0.23 <sup>a</sup>	37.83±4.40 <sup>a</sup>	127.40±10.88 <sup>a</sup>
CH	74.17±15.26 <sup>b</sup>	6.55±0.43 <sup>a</sup>	23.00±6.29 <sup>b</sup>	139.20±14.45 <sup>a</sup>
CHB	93.25±5.12 <sup>a</sup>	6.90±0.14 <sup>a</sup>	26.60±2.70 <sup>b</sup>	105.20±12.07 <sup>b</sup>

1) All values are mean ± S.D.

2) Values are significantly different at P < 0.05 by duncan test

Table 3.7.16은 실험식이 혈청 내 인지질, 총 단백질, GPT, GOT에 미치는 영향을 나타낸 표이다. 혈청내 인지질은 CHB군이 유의적으로 높게 나타났으며 총 단백질 함량은 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 간기능 척도가 되는 GPT와 GOT는 CHB군에서 유의적으로 낮게 나타나므로 고 콜레스테롤 식이에 의한 간기능 저하가 가장 최소화되었다고 볼 수 있다.

라. 청국장 유래 Biopolymer의 항당뇨 효능 검증

1) 체중증가량, 평균식이 섭취량, 식이효율(FER)

실험동물의 체중증가량, 섭취량, 식이효율(FER)은 Table 3.7.17과 같다. 4주 동안 실험동물의 체중변화는 정상군이  $39.13 \pm 10.80g$ 의 체중증가를 보인 반면 당뇨군이 정상군에 비해 유의적인 감소를 나타내었으며 실험군들 사이에서는 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 평균 식이 섭취량 또한 정상군에 비해 당뇨유발군에서 유의적으로 높게 나타났다. 이는 STZ의 투여로 인한 당뇨 증상인 다식의 결과를 알 수 있다. 식이효율(FER)은 정상군과 당뇨실험군간에 유의적인 차이를 보였다. STZ로 유도된 당뇨쥐는 정상쥐에 비해 유의적으로 식이 섭취량이 높다고 보고되었다. 이는 인슐린이 결핍된 쥐에게서 NPY(neuropeptide Y) mRNA의 증가와 시상하부의 leptin receptor의 작용저하로 식이 섭취량이 현저히 증가하였다고 보고 되었으며 인슐린이 보충 되었을 때는 이러한 식이 섭취량의 증가는 감소되었다고 하였다(Malabu UH ; 1994). 본 연구 결과에서 당뇨군의 식이 섭취량이 정상군에 비해 유의적으로 높았음에도 불구하고 식이 효율은 정상군에 비해 유의적으로 감소하였다. 정상군에 비해 식이 섭취량이 유의적으로 높음에도 불구하고 지속적인 체중감소를 나타낸 것은 당뇨에 의한 체내 대사의 퇴행적인 변화로 식이효율이 감소된 것으로 보여진다.

Table 3.7.17. Effect of chunggukjang and chunggukjang biopolymer on body weight gains, food intake and food efficiency ratio(FER) in streptozotocin-induced diabetic rats

Groups	Body weighty gams (g)	Food intake (g/day)	FER
Normal	39.13±10.80 <sup>a</sup>	16.06±1.08 <sup>b</sup>	0.09±0.02 <sup>a</sup>
DM <sup>1)</sup>	-14.30±11.77 <sup>b</sup>	33.47±2.27 <sup>a</sup>	-0.02±0.01 <sup>b</sup>
DMCH <sup>2)</sup>	-22.50±12.40 <sup>b</sup>	31.31±2.18 <sup>a</sup>	-0.03±0.01 <sup>b</sup>
DMCBP <sup>3)</sup>	-25.81±18.05 <sup>b</sup>	31.51±2.56 <sup>a</sup>	-0.03±0.03 <sup>b</sup>

- 1) DM : Diabetic mellitus control group
- 2) DMCH : Diabetic mellitus chunggukjang group
- 3) DMCBP : Diabetic mellitus chunggukjang biopolymer group

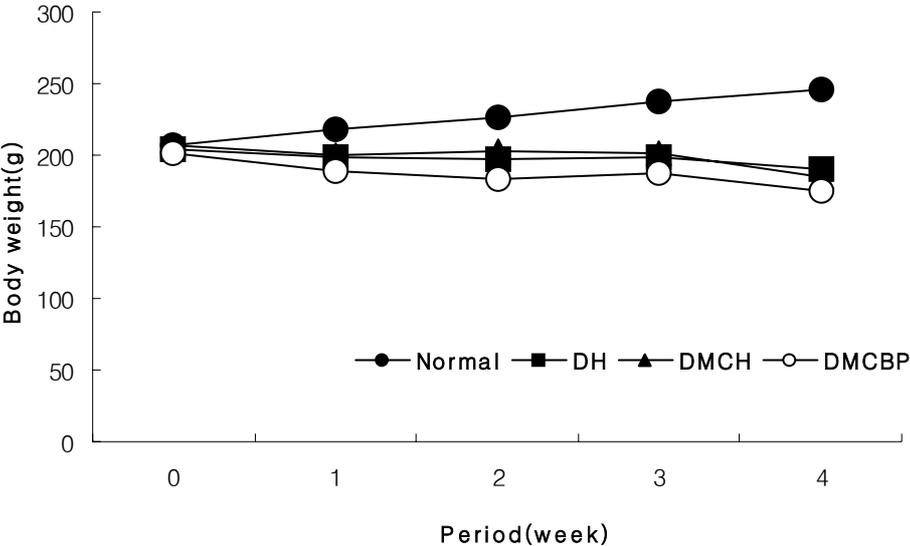


Fig. 3.7.14. Changes in body weight in rat fed with different experimental diets for 4 weeks in streptozotocin-induced diabetic rats

## 2) 혈청 지질농도 및 혈청지표에 미치는 영향

청국장 및 청국장 유래 biopolymer가 혈청 지질 농도에 미치는 영향은 Table 3.7.18과 같다. 혈청 중성지질 농도는 세 군간에 유의적 차이를 나타내지 않았다. 혈청 총 콜레스테롤 농도는 정상군에 비해 당뇨유발군이 유의적으로 높게 나타났으며 당뇨유발군 중 DMCH군이 다른 실험군에 비해 낮게 나타났다. HDL-cholesterol은 정상군에 비해 당뇨군들이 유의적으로 높게 나타났다. LDL-cholesterol은 정상군에 비해 당뇨유발군이 유의적으로 높게 나타났으며 DM군, DMCHB군, DMCH군의 순서로 나타났다. 혈중 중성지방은 DM군이 100.50 mg/dL로 Normal군의 26.00 mg/dL에 비해 유의적으로 높았으며 당뇨군 내에서는 DMCH군 22.17 mg/dL, DMCHB군 53.00 mg/dL로 DMCH군은 DM군에 비해 유의적으로 낮았다. 혈중 총 콜레스테롤은 DM군이 263.75 mg/dL로 Normal 군 61.33 mg/dL에 비해 유의적으로 높았고 DMCH군 171.57 mg/dL, DMCHB군 216.67 mg/dL로 DMCH군이 DM군에 비해 낮은 경향이었으나 유의적 차이는 없었다. HDL-콜레스테롤은 Normal군이 14.17 mg/dL로 다른 군에 비해 유의적으로 낮았으며 실험식이 군내에서는 유의적인 차이가 없었다. LDL-콜레스테롤은 DM군 162.50 mg/dL로 Normal 군 41.97 mg/dL에 비해 유의적으로 높았고 DMCH군 92.50 mg/dL, DMCHB군 175.67 mg/dL로 유의적인 차이는 없었으나 DMCH군이 DM군에 비해 낮은 경향이였다. 제 2형 당뇨병은 인슐린 민감도가 낮아져 식후 혈당이 조절되지 않아 고혈당이 유발되며, 이로 인해 혈중 지질농도가 증가한다. 혈중 중성지방 농도의 증가는 HDL-콜레스테롤의 농도를 낮추고 chylomicron remnant의 함량을 높여주는 기작을 통해 관상동맥질환의 주요원인이 된다고 보고되었다 (Goldberg IJ ; 1996). 본 연구에서 당뇨대조군의 혈중 중성지방은 정상군에 비해 유의적으로 증가하였다. 그 원인으로 STZ로 유도된 당뇨쥐는 인슐린 결핍증상을 나타내며 이로 인해 지방조직이 분해되어 혈중 유리지방산 및 글리세롤 농도가 증가하게 되어 VLDL의 농도도 증가하게 된다. 또한 말초조직에서 LPL의 활성 저하로 VLDL과 chylomicron의 대사가 저하되어 혈중 중성지방 농도가 증가하게 된다고 하였다(Siegel RD ; 1996). 그러나 청국장의 혈중 중성지방은 당뇨대조군에 비해 유의적으로 감소하였으므로 STZ에 의해 야기된 혈중 중성지방 농도의 불균형을 어느 정도 조절해 준 것으로 보여 진다.

혈중 총 콜레스테롤 농도는 당뇨대조군이 정상군에 비해 유의적으로 높았다. 청국장군과 청국장 biopolymer군은 당뇨대조군과 유의적인 차이는 없었으나 감소하는 경향이였다. 당뇨대조군의 혈중 콜레스테롤 증가는 간에서 VLDL의 합성과 이로 인하여 증가된 LDL의 생성이 증가되었기 때문이라고 보고되었다(Goldstein LJ and Brown SM ; 1977). 혈중 LDL-콜레스테롤 농도는 당뇨대조군이 정상군에 비해 유의적으로 높았다. 그 이유로 당뇨쥐는 인슐린 결핍에 의한 LDL 수용체 활성도가 감소되고, 고혈당에 의해 LDL apoprotein B가 당화되어 LDL 수용체로의 이동이 이루어지지 않아 혈중 LDL-콜레스테롤의 제거가 감소되기 때문이라 하였다(Frayan KN ; 1993). 청국장군의 혈중 LDL-콜레스테롤은 대조군에 비해 낮은 경향이였으나 유의적인 차이가 없었고 청국장 biopolymer군의 LDL-콜레스테롤은 당뇨대조군과 유의적인 차이가 없었다.

본 연구에서 청국장과 청국장 biopolymer를 당뇨쥐에게 4주간 보충 시킨 결과 청국장은 당뇨쥐의 혈중 중성지방을 대조군에 비해 유의적으로 감소시켰으며 혈중 총 콜레스테롤, LDL-콜레스테롤은 대조군에 비해 낮게 나타났으나 유의적이지 않았다. 청국장 biopolymer 또한 당뇨쥐의 혈중 중성지방과 총 콜레스테롤을 감소시키는 경향을 나타내었으나 유의적이지 않았다.

Table 3.7.18. Effect of chunggukjang and chunggukjang biopolymer on triglyceride(TG), total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol and atherogenic index(AI) and in streptozotocin-induced diabetic rats(unit : mg/dL)

Groups	TG	Total cholesterol	HDL cholesterol	LDL cholesterol	AI
Normal	26.00±17.64 <sup>a</sup>	61.33±36.32 <sup>b</sup>	14.17±2.64 <sup>b</sup>	41.97±35.04 <sup>b</sup>	3.86±4.19 <sup>a</sup>
DM	61.67±27.97 <sup>a</sup>	296.33±123.52 <sup>a</sup>	32.33±10.26 <sup>a</sup>	206.35±136.98 <sup>a</sup>	3.62±1.73 <sup>b</sup>
DMCH	22.17±15.01 <sup>a</sup>	137.67±35.59 <sup>ab</sup>	28.00±8.05 <sup>ab</sup>	105.37±100.44 <sup>a</sup> b	4.06±0.83 <sup>b</sup>
DMCHB	53.00±51.48 <sup>a</sup>	216.67±82.20 <sup>a</sup>	27.00±14.59 <sup>ab</sup>	175.67±98.40 <sup>a</sup>	11.15±17.27 <sup>b</sup>

### 3) 혈중 인지질, glucose, HbA1c, Insulin에 미치는 영향

Table 3.7.19는 실험동물의 혈청 인지질, 당, HbA1c, Insulin함량의 결과이다. 혈청 인지질은 DMCHB군이 가장 높게 나타났다. 혈당은 정상군에 비해 당뇨유발군이 유의적으로 높았으며 DMCH군이  $298.67 \pm 61.76 \text{mg/dL}$ , DMCHB군이  $340.25 \pm 110.15 \text{mg/dL}$ 로 DM군의  $395.80 \pm 64.36 \text{mg/dL}$ 보다 유의적으로 낮게 나타나 당뇨쥐에 있어서 청국장 및 청국장 유래 biopolymer의 혈당 강하효과를 확인할 수 있었다. HbA1c농도는 정상군에 비해 당뇨유발군에서 유의적으로 높았으나 실험군간의 차이는 없었다. 인슐린 농도는 Normal군이  $0.40 \text{ uIU/mL}$ 로 DM군의  $0.25 \text{ uIU/mL}$ 에 비해 유의적으로 높았고, DMCH군  $0.13 \text{ uIU/mL}$ , DMCHBP군  $0.12 \text{ uIU/mL}$ 로 DM군에 비해 낮은 경향이었으나 유의성은 없었다. 코호트 연구 결과 공복 시 혈당이  $1 \text{ mmol/L}$  낮아짐에 따라 발작(total stroke) 위험율은 21% 감소되었고, 허혈성 심장질환의 위험률은 23% 감소되었다고 하여 당뇨병의 혈당 관리에 대한 중요성을 제시하였다(Asia Pacific Cohort Studies, 2004). Kang(2004)은 STZ로 유도된 제 2형 당뇨모델 쥐에게 청국장을 8주간 섭취케 하였을 때 식후 혈당은 청국장군이  $202.1 \text{ mg/mL}$ 로 대조군의  $253.9 \text{ mg/mL}$ 에 비해 유의적으로 낮았다고 하였다. 이것은 청국장이  $\alpha$ -glycosidase 활성을 저해하고 인슐린 민감도를 개선시켜 식후 혈당 조절에 효과를 나타낸 것으로 고찰하였다. 당화헤모글로빈은 당뇨군이 정상군에 비해 유의적으로 높았으며 청국장군의 당화헤모글로빈은 당뇨대조군에 비해 낮은 경향이었으나 유의적인 차이는 없었다. 당화헤모글로빈은 2 - 3개월 이전의 평균 혈당을 반영하는 혈당조절 지표로 당뇨병인 경우 적혈구 세포내에 비효소적이며 비가역적인 당화반응이 계속 일어나 그 수준이 증가되며, 최근 당화헤모글로빈은 당뇨병 합병증인 심혈관 질환의 위험정도와 밀접한 관계가 있다고 보고되었다(Khaw KT ; 2004). 제 2형 당뇨병 환자는 당화헤모글로빈이 1% 증가하면 심혈관질환의 위험률이 18% 유의적으로 증가한다고 한다(Selvin E ; 2004). Han(2001)은 청국장을 식이의 42.7% 수준으로 STZ 유도 당뇨쥐에게 공급하였을 때 당화헤모글로빈은 청국장군이 3.87%로 당뇨대조군의 4.56%에 비해 유의적으로 감소하였다고 보고하였다. 본 연구에서 인슐린 농도는 당뇨군이 정상군에 비해 유의적으로 감소하였으며 청국장군과 청국장 biopolymer군은 당뇨대조군에 비해 유의적인 차이는 없으나 낮게

나타났다. STZ은 췌장의 Langerhan's 섬의  $\beta$ -cell을 파괴하여 인슐린 결핍을 초래하고 포도당에 대한  $\beta$ -cell 예민도를 저하시키는 역할을 한다고 보고되었다(Matkovics B ; 1998). 당뇨병의 인슐린 농도가 정상군에 비해 유의적으로 감소한 것은 STZ의 췌장  $\beta$ -cell 파괴로 인한 결과로 해석된다. 청국장군과 청국장 biopolymer군의 인슐린 농도는 당뇨대조군에 비해 낮은 경향이었으나 유의성은 없었다.

Table 3.7.19. Effect of chunggukjang and chunggukjang biopolymer on phospholipid, glucose, HbA1c and insulin in streptozotocin-induced diabetic rats

Groups	Phospholipid (mg/dL)	Glucose (mg/dL)	HbA1c (% of Hb)	Insulin (ul U/mL)
Normal	82.33±18.62 <sup>c</sup>	119.83±30.73 <sup>c</sup>	0.84±0.69 <sup>b</sup>	0.05±0.02 <sup>a</sup>
DM	182.20±37.80 <sup>ab</sup>	395.80±64.36 <sup>a</sup>	1.67±0.23 <sup>a</sup>	0.12±0.04 <sup>a</sup>
DMCH	123.86±39.60 <sup>bc</sup>	298.67±61.76 <sup>b</sup>	1.59±0.39 <sup>a</sup>	0.13±0.04 <sup>a</sup>
DMCHB	229.00±80.66 <sup>a</sup>	340.25±110.15 <sup>ab</sup>	1.74±0.29 <sup>a</sup>	0.15±0.12 <sup>a</sup>

#### 4) 간장 및 신장무게에 미치는 영향

실험동물의 체중 100g 당 간장 및 신장 무게를 Table 3.7.20에 나타내었다. 간장의 무게는 정상군에 비해 당뇨유발군이 유의적으로 높게 나타났으며 실험군사이에서는 청국장군이 유의적으로 낮게 나타났다. 신장의 무게는 정상군에 비해 당뇨유발군에서 유의적으로 높게 나타났으나 실험군간의 유의적인 차이를 나타내지는 않았다. 실험군들의 간 무게와 체중 당 간 무게는 당뇨군이 정상군에 비해 유의적으로 증가하였다. 당뇨쥐의 간 무게 증가는 인슐린 결핍으로 인해 체지방 분해가 증가되고 증가된 유리 지방산이 간으로 가서 중성지방 합성에 이용되어 간의 지방축적이 증가한 것이라고 하였다(Goldberg RB ; 1981). 그러나 청국장 식이는 이러한 간의 지방 침착을 어느 정도 방지하여

당뇨군 중 유의적으로 낮은 간 무게와 체중 당 간 무게를 나타낸 것으로 사료된다. 실험군들의 신장무게는 정상군에 비해 당뇨군에서 유의적으로 높았으며 실험 식이에 의한 차이는 나타나지 않았다. 당뇨군의 신장 무게 증가는 당뇨 발병 초기에 신사구체 여과율의 증가와 함께 신장의 크기와 용적이 증가하는 병태적 특징으로 신장의 비대 정도는 혈당 조절 정도와 상관관계가 있다고 하였다( Mogensen CE and Andersen MJ ; 1973). 즉, 혈장 내 고농도의 포도당은 UDP-galactose나 glycogen으로 대사되어 사구체내의 혈관간세포에 축적되어 신장의 비대현상을 가져온다고 하였으며 혈당이 정상으로 조절 되었을 경우 신사구체 여과율과 신장의 비대증상이 호전 될 수 있다고 하였다 (Stackhouse S ; 1990).

Table 3.7.20. Organ weight in rat fed with different experimental diets for 4 weeks in streptozotocin-induced diabetic rats

Groups	Liver weight (g/100g body wt)	Kidney weight (g/100g body wt)
Normal	3.05±0.37 <sup>c</sup>	0.30±0.02 <sup>b</sup>
DM	5.89±0.52 <sup>a</sup>	0.53±0.06 <sup>a</sup>
DMCH	5.03±0.70 <sup>b</sup>	0.51±0.07 <sup>a</sup>
DMCHB	5.93±0.38 <sup>a</sup>	0.55±0.04 <sup>a</sup>

5) 간의 지질조성에 미치는 영향

실험동물의 간조직 중 총지질, 중성지방, 콜레스테롤 함량 측정결과는 Table 13에 나타내었다. 간조직의 총지질함량은 정상군에 비해 당뇨유발군이 유의적으로 높았으며 당뇨대조군의 76.20±22.93mg/day에 비하여 DMCH군 61.57±6.35mg/day, DMCHB군이 63.77±14.24mg/day으로 유의적으로 낮게 나타나 간조직의 총지질 함량의 감소를 확인할 수 있었다. 간의 중성지방은 실험군간에 유의적인 차이가 없었으나 Normal군은 193.76 mg/g tissue로 DM군

의 166.84 mg/g tissue에 비해 높은 경향이었고 DMCH군은 131.39 mg/g tissue, DMCHB군은 122.07 mg/g tissue로 당뇨대조군에 비해 낮은 경향이였다. 간의 콜레스테롤은 DM군이 176.27 mg/g tissue로 Normal군 114.86 mg/g tissue에 비해 높은 경향이였으나 유의적인 차이는 없었다. DMCH군은 97.90 mg/g tissue, DMCHB군은 109.04 mg/g tissue로 DMCH군은 DM군에 비해 유의적으로 낮았다.

간의 중성지방 함량은 정상군에 비해 당뇨군에서 낮은 경향을 나타내었다. 당뇨쥐의 간 중성지방 함량이 높은 것은 STZ로 유도된 당뇨쥐에서 나타나는 현상으로 Hong 등(2002)은 당뇨로 인한 인슐린 기능 저하로 세포내로 운반되어 오는 포도당의 양 감소와 세포내 당신생 증가로 간에서 지방합성이 감소하고 이미 생성된 지방마저 에너지원으로 이용되었기 때문이라고 고찰하였다. 청국장군과 청국장 biopolymer군에서 간의 중성지방은 유의적인 차이는 없었으나 당뇨대조군에 비해 감소하는 경향을 나타내었다.

Table 3.7.21. Effect of chunggukjang and chunggukjang biopolymer on hepatic levels of total lipid, triglyceride(TG) and total cholesterol in streptozotocin-induced diabetic rats

(unit : mg/day)

Groups	Total lipid	Triglyceride	Total cholesterol
Normal	52.69±7.46 <sup>b</sup>	96.35±62.77 <sup>b</sup>	59.42±30.41 <sup>b</sup>
DM	76.20±22.93 <sup>a</sup>	166.84±92.89 <sup>a</sup>	176.27±65.44 <sup>a</sup>
DMCH	61.57±6.35 <sup>ab</sup>	98.37±60.76 <sup>b</sup>	108.76±40.83 <sup>ba</sup>
DMCHB	63.77±14.24 <sup>ab</sup>	99.65±38.07 <sup>b</sup>	168.39±143.72 <sup>a</sup>

### 3. 요약

1) 청국장 biopolymer(CBP), PGA우위 biopolymer(P-BP) 및 levan 우위 biopolymer(L-BP) 세 biopolymer의 물성학적 특성에서 세 시료 모두 Non-Newtonian유체의 유동지수가 1이상의 의가소성유체(pseudoplastic fluid)의 유동특성을 보였다.

2) 세 biopolymer의 농도변화, pH의 변화, 온도변화에 따른 유체의 흐름특성을 Power law model과 Herschel-Bulkley model식에 적용시킨 결과 Power law model 식의 유동지수  $n$ 값이 1이상의 의가소성유체(pseudoplastic fluid) 특성을 나타내었고 0.90~1.0의 높은 상관 관계를 보여 적용성이 높은 것으로 나타났다.

3) 겔보기 점도의 온도의존성에 대한 조사에서 4% 농도의 세 시료가 전단속도  $2.04^{-1}$ 에서 Arrhenius model식에 잘 적용되는 것으로 나타났다. 농도변화에 따른 온도의존성의 조사 결과 biopolymer P-BP와 L-BP가 CBP보다 온도의존성이 큰 유체로 나타났다.

4) 겔보기 점도의 농도의존성의 조사에서는 Power law model 과 Exponential model 식 모두 잘 적용되었으나 Power law model의 적합성이 더 높은 것으로 나타났다.

5) 체중 증가량과 식이효율은 당뇨군이 정상군에 비해 유의적으로 낮았고, 식이 섭취량은 당뇨군이 정상군에 비하여 유의적으로 높았으나, 당뇨군 내에서 실험 식이에 의한 차이는 없었다.

6) 체중 당 간 무게는 당뇨군이 정상군보다 유의적으로 높았으며, 당뇨군 내에서 청국장군은 대조군보다 간 무게가 유의적으로 낮았다. 체중 당 신장무게는 당뇨군이 정상군에 비해 유의적으로 높았으며 실험 식이에 의한 차이는 없었다.

7) 공복 시 혈당은 당뇨군이 정상군에 비해 유의적으로 높았으며, 당뇨군 내에서 청국장군은 당뇨대조군에 비해 유의적으로 낮았다. 청국장 biopolymer군은 당뇨대조군에 비해 낮은 경향이었으나 유의적인 차이는 없었다. 당화해모글로빈은 당뇨대조군이 정상군에 비해 유의적으로 높았으며 실험 식이에 의한 차이는 없었다. 인슐린은 당뇨대조군은 정상군에 비해 유의적으로 낮았으며 청국장과 청국장 biopolymer군은 당뇨대조군에 비해 낮은 경향이었으나 유의적인 차이는 없었다.

8) 혈중 중성지방 농도는 당뇨대조군이 정상군에 비해 유의적으로 높았다. 당뇨군내에서 청국장군의 혈중 중성지방 농도는 당뇨대조군보다 유의적으로 낮았으며, 청국장 biopolymer군은 당뇨대조군에 비해 낮은 경향을 보였으나 유의적인 차이는 없었다. 혈중 총 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤 농도는 당뇨대조군이 정상군에 비해 유의적으로 높았다. 당뇨군 내에서 청국장군과 청국장 biopolymer군의 혈중 지질 농도는 당뇨대조군에 비해 낮은 경향을 보였으나 유의적인 차이는 없었다. HDL-콜레스테롤/총 콜레스테롤과 동맥경화지수는 실험군 간에 유의적인 차이가 없었다. 간의 총지질은 당뇨대조군이 정상군에 비해 유의적으로 높았으며 당뇨군내에서는 청국장군과 청국장 biopolymer군은 당뇨대조군에 비해 낮은 경향이었으나 유의적인 차이는 없었다. 간의 중성지방 함량은 실험군 간에 유의적인 차이는 없었다. 간의 콜레스테롤 함량은 당뇨대조군이 정상군에 비해 높은 경향을 보였으나 유의적인 차이는 없었고, 당뇨군 내에서 청국장군은 당뇨대조군에 비해 유의적으로 낮았다.

결론적으로 이상의 연구 결과를 종합하면 다음과 같다.

당뇨쥐에서 청국장은 당뇨쥐의 혈당 감소와 혈중 중성지방 및 간의 콜레스테롤 함량을 유의적으로 감소시켜 혈당 조절 및 지질대사에 유효하였으며 청국장 biopolymer는 당뇨쥐에서 혈당 감소 경향과 혈액과 간의 지질농도 및 지질 함량 저하 경향을 나타내었으나 통계적 유의성은 나타나지 않았다. 이와 같은 사실은 국내에서 청국장 biopolymer에 대한 연구가 아직 부족한 상황에서 흰

쥐에게 청국장 유래 biopolymer의 한 구성성분인 levan을 전체 식이의 3%로 섭취시켰을 때 비만쥐의 혈당을 유의적으로 감소시켰다는 보고(Kang 등 ; 2002)를 기초로 한 첨가량이었으나, 본 연구에서 청국장 유래 biopolymer의 첨가량이 이에 미치지 못함을 알 수 있었다. 차후의 연구에서는 다양한 수준의 청국장 유래 biopolymer를 첨가하여 항당뇨 효과를 연구함으로써 청국장 유래 biopolymer가 항당뇨 효과를 가지는데 필요한 적정 수준을 검색하는 것에 의미가 있다고 보여진다.

## 제8절. $\Psi$ -PGA 우위 biopolymer와 Levan 우위 biopolymer의 콜레스테롤 저하 및 항고지혈 효능 검정

### 1. 연구수행방법

가.  $\Psi$ -PGA 우위 biopolymer와 Levan 우위 biopolymer의 콜레스테롤 저하 및 항고지혈 효능

#### 1) 실험 동물

평균 체중이 190 g인 8주령의 암컷(Sprague-Dawley) 쥐 40 마리를 1주일 간 기본 사료로 사용한 뒤 난괴법(Completely randomized design)으로 실험군 별로 체중분포를 비슷하게 하여 나누어 6주동안 stainless steel wire cage에서 한 마리씩 분리 사육하였으며, 사육기간 동안 사육실의 온도는  $22\pm 2^\circ\text{C}$ , 습도는  $65\pm 5\%$ 를 유지하고 광주기와 암주기를 12시간(light 6:00~18:00) 자동조절 장치를 이용하여 사육하였다. 실험 기간 동안 식이와 식수는 ad-libitum으로 급여하였으며, 이때 사용된 물은 모두 2차 이온 교환수였다.

당뇨유발은 실험 동물의 평균 체중이 약 200 g 되었을 때 streptozotocin(Sigma S0130) 50 mg/kg B.W.을 신선한 0.25 M citrate buffer(pH 4.5)에 용해하여 대퇴부 근육에 1회 주사하여 실험적으로 당뇨를 유발하였고, 대조군은 동량의 citrate buffer용액을 주사하였다. 당뇨유발의 확인은 streptozotocin 주사 4일 후 꼬리정맥에서 채혈하여 간이 혈당계로 (precision Q.I.D) 혈당을 측정하고 혈당량이 300 mg/dl 이상인 동물을 당뇨가 유발된 것으로 간주하여 4주간 사육하였다.

#### 2) 실험식이

실험동물의 실험식은 AIN-93M기준에 맞추었으며 실험군간의 단백질, 지방, 탄수화물 비율을 동일하게 조정하여 실험기간 동안 사육하였다. 실험식의 조성은 Table 3.8.1과 같다.

Table 3.8.1. Composition of control and experimental diets(g/kg of diet)

Ingredient	Diet group			
	대조군	P-BP군 <sup>9)</sup>	L-BP군 <sup>10)</sup>	Levan <sup>11)</sup>
Casein <sup>1)</sup>	140	-	140	140
Corn-starch	594.6	594.6	594.6	594.6
Sucrose	100	100	100	100
Soybean oil	56.3	56.3	56.3	56.3
Cellulose <sup>2)</sup>	49.8	49.8	49.8	49.8
Mineral Mix <sup>3)</sup>	35	35	35	35
Vitamin Mix <sup>4)</sup>	10	10	10	10
L-cystein <sup>5)</sup>	1.8	1.8	1.8	1.8
choline bitartate <sup>6)</sup>	2.5	2.5	2.5	2.5
TBHQ <sup>7)</sup>	0.008	0.008	0.008	0.008
P-BP	-	30	-	-
L-BP	-	-	30	-
Levan	-	-	-	30
Cholesterol <sup>8)</sup>	10	10	10	10

<sup>1)</sup>Casein, Maeil Dairy Indstry CO. Korea

<sup>2)</sup>Cellulose, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA

<sup>3)</sup>AIN-93M-MX, Teklad Test Diets, Medison, Wisconsin, USA

<sup>4)</sup>AIN-93M-VM, Teklad Test Diets, Medison, Wisconsin, USA

<sup>5)</sup>L-Cystine, Sigma Chemical CO., St. Louis, MO, USA

<sup>6)</sup>Choline bitartate, Sigma Chemical CO., St. Louis, MO, USA

<sup>7)</sup>Tert-bulyl hydroquione, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA

<sup>8)</sup>Cholesterol, Sigma Chemical CO., St. Louis, MO, USA

<sup>9)</sup> P-BP : P-PGA우위 biopolymer group

<sup>10)</sup> L-BP : Levan 우위 biopolymer group

<sup>11)</sup> Levan : 시판 Levan group ( (주)리얼 바이오텍 제공)

### 3) 실험방법

#### 가) 체중 측정 및 실험 식이 섭취량 측정

실험 식이를 시작한 날을 기준으로, 식이섭취량은 이틀에 한 번씩 일정한 시간에 측정하였고, 체중은 일주일 단위로 일정한 시간에 측정하였다.

식이효율(Food Efficiency Ratio : FER)은 실험기간 동안의 체중증가량을 총 식이섭취량으로 나누어 계산하였다.

#### 나) 장기채취

실험종료 후 실험동물을 12시간 이상 절식시킨 후 실험동물의 대동맥에서 혈액을 채취하여 상온에서 30 분간 방치한 이후 3000 rpm에서 20 분간 원심 분리하여 혈청을 분리하였다. 혈청은 분석할 때까지  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 냉동 보관하였다가 성분 분석하였다. 간과 신장은 적출하여 차가운 생리식염수로 씻어내어 무게를 측정 후 액체 질소로 급속 동결시켜  $-70^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다.

다) 혈청의 중성지방, total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol and atherogenic index(AI)측정

혈청내 중성지방 측정은 표준 효소비색법에 의한 kit( Asan, Co, Korea)을 사용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였으며 혈청내 총 콜레스테롤 농도 및 HDL-cholesterol은 표준 효소비색법에 의한 kit( Asan, Co, Korea)을 사용하여 500 nm에서 흡광도를 측정하였다.

LDL-cholesterol은 Friedwald식 ( Total cholesterol - ( HDL cholesterol + triglyceride/5 ) )을 이용하여 계산하였고 Atherosclerotic index는 ( Total cholesterol - HDL cholesterol ) / HDL - cholesterol을 이용하여 계산하였다.

#### 라) 간조직중의 지질성분 분석

간조직의 총지질은 Folch(Folch J et al ; 1957) 등의 방법에 의해 추출하였으며 간조직의 지질정량은 혈청의 방법에 준하여 정량하였다.

#### 마) 변중 중성 스테로이드 및 담즙산 함량 측정

변중 담즙산은 Miettinen 등(Miettinen TA et al ; 1965)의 방법으로 담즙산

을 추출한 후 Crowell · Macdald의 방법(Crowell MJ and Macdald IA ; 1980)에 따라 효소법으로 측정하였다. 중성 스테로이드 함량은 추출 단계 중 얻어진 물층을 이용하여 530nm에서 흡광도를 측정하였다.

바) 간조직 microsomal HMG-CoA reductase의 활성 측정은 Hulcher와 Oleson의 방법(Hulcher and Oleson ; 1973)을 수정 보완한 방법에 따라 HMG-CoA reductase의 활성을 측정하였다.

## 2. 연구수행 내용 및 결과

가. 체중증가량, 평균식이 섭취량, 식이효율(FER)

Table 3.8.2. Effect of dietary supplementation of biopolymers on body weight gains, food intake and food efficiency ratio(FER) in rats fed high cholesterol diets

Groups	Body weighty gains (g)	Food intake (g/day)	FER
C <sup>3)</sup>	61.33 ± 13.57 <sup>1)a2)</sup>	17.57 ± 1.39 <sup>a</sup>	0.085 ± 0.02 <sup>a</sup>
P-BP <sup>4)</sup>	59.20 ± 14.14 <sup>a</sup>	17.20 ± 0.96 <sup>a</sup>	0.084 ± 0.02 <sup>a</sup>
L-BP <sup>5)</sup>	54.00 ± 4.92 <sup>a</sup>	16.49 ± 0.89 <sup>a</sup>	0.080 ± 0.01 <sup>a</sup>
Levan <sup>6)</sup>	65.50 ± 9.12 <sup>a</sup>	17.21 ± 1.01 <sup>a</sup>	0.090 ± 0.01 <sup>a</sup>

1) All values are mean ± S.D.

2) Values are significantly different at P < 0.05 by duncan test

3) C : Control group

4) P-BP :  $\Psi$ -PGA우위 biopolymer group

5) L-BP : Levan 우위 biopolymer group

6) Levan : 시판 Levan group ( (주)리얼 바이오텍 제공)

실험 동물의 체중 증가량, 평균 식이 섭취량 및 식이 효율은 Table 3.8.2에 나타내었다.  $\Psi$ -PGA우위 biopolymer군과 Levan 우위 biopolymer군의 체중 증

가량이 대조군과 Levan군에 비해 낮은 경향이었으나 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 또한 평균 식이 섭취량이나 식이효율이 실험 식이 군간에 유의성을 나타내지 않았다.

1) 혈중 지질농도 및 혈청지표에 미치는 영향

Table 3.8.3은 실험 식이가 혈중 인지질, 총 단백질, GPT, GOT에 미치는 영향을 나타낸 표이다. 혈청내 인지질과 총 단백질 함량은 실험식이에 의한 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 간기능 척도가 되는 GPT와 GOT는 실험군간에 유의적인 차이는 나타나지 않았으나 GPT의 경우 P-BP군과 L-BP군이 C군에 비해 낮은 경향을 나타내었다.

▶-PGA 우위 biopolymer와 Levan 우위 biopolymer의 식이 첨가가 실험동물의 혈청 내 지질수준에 미치는 효과는 Table 3.8.3에 나타난 바와 같다. P-BP군과 L-BP군의 혈중 중성지방 농도는 C군에 비해 유의적으로 감소하였다. 또한 시판 biopolymer인 Levan군보다도 유의적으로 낮게 나타났다. 혈중 총 콜레스테롤 농도는 P-BP군과 L-BP군이 C군에 비해 낮은 경향이었으나 유의적인 차이는 없었다. 그러나 P-BP군의 총콜레스테롤 농도는 시판 Levan군에 비해 유의적으로 낮게 나타났다. 혈중 HDL - 콜레스테롤 농도는 실험군간에 유의적인 차이가 나타나지 않았다. LDL-콜레스테롤 농도 및 동맥경화 지수는 P-BP군과 L-BP군이 C군과 Levan군에 비해 낮은 경향이었으나 유의적인 차이는 없었다. 선행연구를 살펴보면 Kang 등(2002)의 연구에서 고지방 식이로 유도된 비만쥐에게 levan을 3%, 5% 공급 하였을 때 혈중 총 콜레스테롤 농도는 실험군 사이에서 유의적인 차이를 나타내지 않았으나 혈중 중성지방 농도, 인슐린 농도 및 leptin농도는 레반 공급군에서 유의적으로 낮게 나타났다고 하였다. 혈중 인슐린 농도 감소는 에너지 대사에 관여하여 내장의 지방 축적 억제로 비만에도 효과가 있음을 시사하였다. 또한 한국인 여성에게 (Kang 등 ; 2003) 3개월간 레반을 보충하였을 때 혈중 중성지방, leptin 농도, 체지방량은 대조군에 비해 유의적으로 감소하였고, 갈색지방의 UCP mRNA 발현량이 높게 나타나 레반 섭취에 의한 에너지 소비율이 증가하여 비만에 효과가 있을 것이라고 보고되었다. 본 연구에서 ▶-PGA 우위 biopolymer의 식이 첨가는 비만에 효과가 있는 것으로 보고된 시판 levan군에 비해 혈중 중성지

방과 총 콜레스테롤이 유의적으로 낮게 나타난 것으로 미루어 장기간 복용시 비만에 효과가 있음을 시사한다고 보여진다.

Table 3.8.3. Effect of dietary supplementation of biopolymers on serum levels of phospholipid, total protein, GPT and GOT in rats fed high cholesterol diets

Groups	Phospholipid (mg/dL)	Total protein (g/dL)	GPT (IU/L)	GOT (IU/L)
C	80.50 ± 9.35 <sup>1)a2)</sup>	6.55 ± 0.23 <sup>a</sup>	37.83 ± 4.40 <sup>a</sup>	123.60 ± 17.56 <sup>a</sup>
P-BP	83.67 ± 17.14 <sup>a</sup>	6.55 ± 0.38 <sup>a</sup>	31.67 ± 8.24 <sup>a</sup>	114.83 ± 6.01 <sup>a</sup>
L-BP	86.67 ± 11.43 <sup>a</sup>	6.75 ± 0.14 <sup>a</sup>	28.00 ± 7.07 <sup>a</sup>	114.00 ± 22.98 <sup>a</sup>
Levan	96.67 ± 13.59 <sup>a</sup>	6.68 ± 0.24 <sup>a</sup>	36.67 ± 12.96 <sup>a</sup>	105.20 ± 26.51 <sup>a</sup>

1) All values are mean ± S.D.

2) Values are significantly different at P < 0.05 by duncan test

Table 3.8.4. Effect of dietary supplementation of biopolymers on serum levels of triglyceride(TG), total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol and atherogenic index(AI) in rats fed high cholesterol diets

(unit : mg/dL)

Groups	TG	Total cholesterol	HDL cholesterol	LDL cholesterol <sup>3)</sup>	AI <sup>4)</sup>
C	13.00 ± 6.28 <sup>1)a2)</sup>	103.67 ± 4.93 <sup>ab</sup>	12.33 ± 2.50 <sup>b</sup>	87.00 ± 5.06 <sup>a</sup>	7.72 ± 1.85 <sup>a</sup>
P-BP	9.00 ± 4.43 <sup>bc</sup>	79.00 ± 2.05 <sup>b</sup>	13.50 ± 3.56 <sup>ab</sup>	63.70 ± 12.03 <sup>a</sup>	5.19 ± 2.40 <sup>a</sup>
L-BP	6.60 ± 1.51 <sup>c</sup>	85.60 ± 8.44 <sup>ab</sup>	14.33 ± 3.27 <sup>ab</sup>	69.88 ± 11.54 <sup>a</sup>	5.34 ± 1.96 <sup>a</sup>
Levan	16.20 ± 4.60 <sup>a</sup>	119.00 ± 14.98 <sup>a</sup>	16.80 ± 1.48 <sup>a</sup>	98.96 ± 19.65 <sup>a</sup>	6.29 ± 3.42 <sup>a</sup>

1) All values are mean ± S.D.

2) Values are significantly different at P < 0.05 by duncan test

3) LDL-cholesterol : Total cholesterol - ( HDL cholesterol + triglyceride/5 )

4) AI:Atherosclerotic index=(Total cholesterol-HDL cholesterol)/HDL-cholesterol

2) 간 지질 성분에 미치는 영향

Table 3.8.5. Effect of dietary supplementation of biopolymers on hepatic levels of total lipid, triglyceride(TG) and total cholesterol in rats fed high cholesterol diets

(unit : mg/g tissue)

Groups	Total lipid	Triglyceride(TG)	Total cholesterol
C	54.32 ± 12.42 <sup>1)a2)</sup>	79.41 ± 13.08 <sup>a</sup>	138.60 ± 18.92 <sup>a</sup> (100%)
P-BP	50.93 ± 12.03 <sup>a</sup>	56.72 ± 18.25 <sup>a</sup>	110.75 ± 14.91 <sup>a</sup> (79.9%)
L-BP	52.03 ± 19.59 <sup>a</sup>	87.24 ± 4.71 <sup>a</sup>	88.43 ± 13.05 <sup>a</sup> (63.8%)
Levan	56.92 ± 15.25 <sup>a</sup>	104.22 ± 7.85 <sup>a</sup>	98.12 ± 13.11 <sup>a</sup> (70.7%)

1) All values are mean ± S.D.

2) Values are significantly different at P < 0.05 by duncan test

Table 3.8.5는 간조직의 총 지질, 중성지방, 콜레스테롤 함량 측정 결과이다. 간의 총 지질 함량, 중성지방 및 총 콜레스테롤 함량은 실험군간에 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 그러나 P-BP군은 C군에 비해 간의 총지질, 중성지방 총 콜레스테롤 함량이 낮은 경향을 나타내어 C군에 비해 각각 6.24%, 28.57%, 20.09%의 감소효과를 나타내었다. 레반형 fructan은 간의 지질대사에 관여한다고 알려졌다. 레반은 장에서 발효되며 발효에 의해 생성된 단쇄 지방산 중 propionate가 재흡수 되어 간의 콜레스테롤 합성을 저해한다고 보고 되었다(Lin Y et al 1995), fructan은 중성지방이 풍부한 지단백을 분해하는 것 보다는 간의 지방합성에 관여하는 주요 효소를 저해하고 간에서의 지방산 합성(*de novo* fatty acid synthesis)을 감소시킴으로 혈액과 간의 중성지방을 감소시킨다고 보고되었다(Delzenne NM and Kok N ; 2001). 본 연구에서 간의 중성지방 함량과 콜레스테롤 함량은  $\Psi$ -PGA 우위 biopolymer와 Levan 우위 biopolymer의 식이 첨가시 대조군에 비해 낮은 경향을 나타내었다.

3) 간의 microsomal HMG-CoA reductase activities에 미치는 영향

Table 3.8.6. Effect of dietary supplementation of biopolymers on hepatic HMG-CoA reductase activities in rats fed with high cholesterol diets

Groups	HMG-CoA reductase activities (nmol/mg protein/min)
C	0.1744 ± 0.17 <sup>1)a2)</sup>
P-BP	0.2369 ± 0.13 <sup>a</sup>
L-BP	0.1788 ± 0.19 <sup>a</sup>
Levan	0.1103 ± 0.09 <sup>a</sup>

1) All values are mean ± S.D.

2) Values are significantly different at P < 0.05 by duncan test

Table 3.8.6은 내인성 콜레스테롤 합성 조절효소인 HMG-CoA reductase 활성을 나타낸 결과이다. Microsomal HMG-CoA reductase 활성은 실험 군사이에서 유의적인 차이를 나타내지 않았지만 C군과 시판 Levan군에 비해 P-BP군이 높은 경향을 나타내었다. 이로 미루어 간의 HMG-CoA reductase 활성 증가는 간에서의 담즙 합성 촉진과 콜레스테롤의 소장 흡수 지연 및 분변 중 중성 스테롤과 담즙산 배설 증가로 체내 콜레스테롤의 소모가 증가하여 HMG-CoA reductase 활성이 증가되는 생체의 항상성 기작으로 사료된다.

4) 분변의 총 중성스테로이드, 담즙산 배설에 미치는 영향

Table 3.8.7. Effect of dietary supplementation of biopolymers on fecal excretion levels of total neutral steroids and total bile acid in rats fed high cholesterol diets

Groups	Total neutral steroids (g/day)	Total bile acid (mg/days)
C	11.15 ± 5.13 <sup>1)a2)</sup>	78.11 ± 21.71 <sup>b</sup>
P-BP	15.48 ± 5.13 <sup>a</sup>	124.28 ± 14.80 <sup>a</sup>
L-BP	16.93 ± 2.92 <sup>a</sup>	121.84 ± 34.71 <sup>ab</sup>
Levan	16.38 ± 4.76 <sup>a</sup>	86.27 ± 26.70 <sup>ab</sup>

1) All values are mean ± S.D.

2) Values are significantly different at P < 0.05 by duncan test

분변 중 총 중성 스테로이드 함량은 실험 군간에 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 분변 중 담즙산 함량은 P-BP군이 C군에 비해 유의적으로 높게 나타났다. L-BP군은 유의적인 차이는 없었으나 대조군과 시판 Levan군에 비해 높은 경향을 나타내었다. 선행연구에서 레반이 혈중 지질대사를 개선하는 기전 중 담즙산 배설 증가에 의한다는 가설이 보고되었다(Yamamoto Y et al ; 1999) Yamamoto 등(1999)은 *in vitro* 실험에서 레반은 *Bifidobacteria*에 의해 완전히 가수분해되지 않았으나, 흰쥐의 식이에 1%와 5% 수준으로 첨가하였을 때 혈중 콜레스테롤은 대조군에 비해 유의적으로 낮았고 변으로 스테롤과 지질 배설은 대조군에 비해 유의적으로 높았다. 그러므로 bifidobacteria 발효에 의해 생성된 단쇄 지방산의 콜레스테롤 저하효과와는 독립적으로 스테롤의 장내 흡수 감소로 인해 혈중 콜레스테롤이 감소되었다고 제안하였다. 본 연구에서 체내 콜레스테롤의 유일한 배설 경로인 변으로의 담즙산 배설은  $\Psi$ -PGA 우위 biopolymer군에서 대조군에 비해 유의적으로 높았으므로 변으로의 담즙산 배설을 증가시킴으로 장내 콜레스테롤의 흡수를 감소시키고 이는 체내 콜

레스테롤 pool을 감소시켜 고지혈증 개선에 도움을 주었으리라 사료된다.

나.  $\Psi$ -PGA 및 Levan 우위 biopolymer의 항당뇨 효능 검증

1) 체중증가량, 평균식이 섭취량, 식이효율(FER)

실험동물의 체중증가량, 식이 섭취량, 식이효율(FER)은 Table 3.8.8과 같다. 4주 동안 실험동물의 체중변화는 대조군이  $-4.43 \pm 9.01\text{g}$ 이었으나 P-BP군의 체중증가는  $4.17 \pm 7.73\text{g}$ , L-BP군이  $7.50 \pm 10.42\text{g}$ , 시판 Levan군은  $1.01 \pm 4.67\text{g}$ 이었다. Streptozotocin(STZ)으로 유도된 당뇨유발 쥐에서 실험기간 동안 현저하게 체중이 감소하는 증상은 여러 선행연구에서 보고되었다(Kim 등 ; 2001 , Rho 등 1998). 이는 당뇨 유발 후 인슐린 기능 저하로 세포내 포도당 이용률이 감소되면서 간, 근육, 지방조직의 지방과 단백질이 부족한 에너지 생산에 이용되었기 때문으로 사료된다. 본 연구에서는 당뇨병의 대표적 증상인 체중 감소현상이  $\Psi$ -PGA 우위 biopolymer와 Levan 우위 biopolymer의 식이 첨가로 인해 완화되었음을 알 수 있다. 식이 섭취량과 식이효율은 실험 군간에 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

Table 3.8.8. Effect of dietary supplementation of biopolymers on body weight gains, food intake and food efficiency ratio(FER) in streptozotocin-induced diabetic rats

Groups	Body weighty gains (g)	Food intake (g/day)	FER
C	$-4.63 \pm 9.01^{1)a2)}$	$33.47 \pm 2.26^a$	$-0.05 \pm 0.01^a$
P-BP	$4.17 \pm 7.73^a$	$34.04 \pm 1.71^a$	$-0.05 \pm 0.09^a$
L-BP	$7.50 \pm 10.42^a$	$33.27 \pm 5.46^a$	$0.09 \pm 0.01^a$
Levan	$1.01 \pm 4.67^a$	$32.58 \pm 1.25^a$	$-0.01 \pm 0.01^a$

1) All values are mean  $\pm$  S.D.

2) Values are significantly different at  $P < 0.05$  by duncan test

2) 간 및 신장 무게, GPT, GOP에 미치는 영향

실험동물의 체중 100g 당 간 및 신장 무게를 Table 3.8.9에 나타내었다. 간 및 신장의 무게는 실험군간에 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 간기능의 척도가 되는 GPT와 GOT는 P-BP군이 C군에 비해 유의적으로 낮게 나타났으며 L-BP군은 유의적인 차이는 나타나지 않았으나 C군에 비해 낮게 나타났다. 당뇨병의 경우 합병증인 고지혈증과 지질대사이상으로 인하여 간기능의 저하를 가져올 수 있으나 PGA 우위 biopolymer와 Levan 우위 biopolymer 식이 첨가로 인해 간기능 저하가 최소화되었다고 볼 수 있다.

Table 3.8.9. Organ weight in rats fed with different experimental diets for 4 weeks in streptozotocin-induced diabetic rats

Group	Liver weight (g/100g body wt)	Kidney weight (g/100g body wt)	GPT (IU/L)	GOP (IU/L)
C	5.52 ± 0.31 <sup>1)a2)</sup>	0.48 ± 0.03 <sup>a</sup>	61.50 ± 14.57 <sup>1)a2)</sup>	139.50 ± 39.00 <sup>a</sup>
P-BP	5.55 ± 0.64 <sup>a</sup>	0.52 ± 0.06 <sup>a</sup>	38.60 ± 14.25 <sup>b</sup>	77.00 ± 25.49 <sup>b</sup>
L-BP	5.75 ± 0.71 <sup>a</sup>	0.53 ± 0.06 <sup>a</sup>	42.40 ± 17.16 <sup>ab</sup>	115.20 ± 35.13 <sup>ab</sup>
Levan	5.08 ± 0.24 <sup>a</sup>	0.54 ± 0.06 <sup>a</sup>	52.83 ± 13.24 <sup>ab</sup>	103.17 ± 16.75 <sup>ab</sup>

1) All values are mean ± S.D.

2) Values are significantly different at P < 0.05 by duncan test

3) 간의 지질성분에 미치는 영향

실험동물의 간조직 중 총지질, 중성지방, 콜레스테롤 함량 측정결과는 Table 3.8.10에 나타내었다. 간조직의 총 지질함량은 실험군간에 유의적인 차이를 나타내지 않았으나 P-BP군과 L-BP군은 C군에 비해 각각 26.5%, 19.0%의 감소를 나타내었으며 시판 Levan군에 비해서도 낮은 경향을 나타내었다. 간의 중성지방 함량 역시 실험군간에 유의적인 차이를 나타내지 않았으나 P-BP과 L-BP군은 C군에 비해 낮은 경향을 나타내어 C군에 비해 각각 38%,

42%의 감소효과를 나타내었으며 시판 Levan군에 비해서도 낮은 경향을 나타내었다. 간의 콜레스테롤 함량은 실험군간에 유의적인 차이를 나타내지 않았으나 P-BP군이 C군에 비해 낮은 경향을 나타내었다. 당뇨병 환자의 약 90%를 차지하는 제 2형 당뇨병에서 가장 특징적으로 관찰되는 지질대사의 비정상성은 고중성지방혈증이며 그 외 고콜레스테롤혈증과 혈중 HDL-콜레스테롤 농도의 감소를 들 수 있다(Reaven GM ; 1987). 그 발생 기전으로 인슐린 결핍은 lipoprotein lipase(LPL)의 활성저하로 말초조직의 중성지방 제거율이 감소되며, 인슐린 저항상태에서는 간에서 VLDL 생성을 억제하는 인슐린의 기능이 저하되어 간의 중성지방 농도가 증가하게 된다(Siegel RD ; 1996) 본 연구에서 통계적 유의성은 나타나지 않았으나 P-BP군의 간 중성지방 함량과 간의 콜레스테롤 함량이 대조군에 비해 낮은 경향을 나타내었다.

Table 3.8.10. Effect of dietary supplementation of biopolymers on hepatic levels of total lipid, triglyceride(TG) and total cholesterol in streptozotocin-induced diabetic rats

(unit : mg/g tissue)

Groups	Total lipid	Triglyceride	Total cholesterol
C	76.20 ± 12.93 <sup>1)a2)</sup>	166.84 ± 12.89 <sup>a</sup>	176.27 ± 15.43 <sup>a</sup>
P-BP	56.00 ± 10.76 <sup>a</sup>	103.44 ± 10.83 <sup>a</sup>	130.30 ± 16.19 <sup>a</sup>
L-BP	61.68 ± 14.75 <sup>a</sup>	95.27 ± 31.40 <sup>a</sup>	221.57 ± 19.86 <sup>a</sup>
Levan	77.84 ± 16.60 <sup>a</sup>	117.33 ± 16.75 <sup>a</sup>	180.98 ± 18.15 <sup>a</sup>

1) All values are mean ± S.D.

2) Values are significantly different at P < 0.05 by duncan test

4) 혈청 지질농도 및 혈청지표에 미치는 영향

실험식이의 첨가가 혈중 지질농도 및 혈청지표에 미치는 영향은 Table 3.8.11에 나타내었다.

혈중 중성지방 농도는 실험 군간에 유의적인 차이가 나타나지 않았으나

P-BP군과 L-BP군은 C군과 시판 Levan군에 비해 낮은 경향을 나타내었다. 혈중 콜레스테롤 농도와 HDL-콜레스테롤 농도는 실험 군간에 유의적인 차이를 나타내지 않았다. LDL-콜레스테롤 농도는 P-BP군과 L-BP군은 C군과 유의적인 차이를 나타내지 않았으나 시판 Levan군은 L-BP군에 비해 유의적으로 낮게 나타났다. 동맥경화지수는 실험 군간에 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 제 2형 당뇨병은 인슐린 민감도가 낮아져 식후 혈당이 조절되지 않아 고혈당이 유발되며, 이로 인해 혈중 지질농도가 증가한다. 혈중 중성지방 농도의 증가는 HDL-콜레스테롤의 농도를 낮추고 chylomicron remnant의 함량을 높여주는 기작을 통해 관상동맥질환의 주요원인이 된다고 보고되었다 (Goldberg IJ ; 1996). 선행연구에서 인슐린 비의존성 당뇨병 환자에게 하루 8 g의 fructooligosaccharide를 14일 동안 보충하였을 때 총 콜레스테롤과 LDL-콜레스테롤은 보충 후 각각 19 mg/dL, 17 mg/dL의 유의적인 감소를 나타내었다(Yamashita K et al ; 1984). Fructan이 당뇨의 지질대사에 미치는 영향은 분자량이나 섭취량, 연구기간에 따라 연구자들마다 상반된 결과를 보고하고 있다. 일반적으로 수용성이면서 난소화성 탄수화물 중 점도가 높은 guar gum, pectin 등은 위를 비우는 시간을 지연시키고 혈중 포도당 농도를 감소시켜 내당능을 개선하며 혈중 중성지방을 감소시킨다고 알려져 있다(Delzenne NM and Kok NN ; 1999). Yamashita 등(1984)은 제 2형 당뇨병 환자가 14일 동안 8 g의 FOS를 섭취하였을 때 공복 혈중 포도당 농도(8%), 총 콜레스테롤(6%), LDL-콜레스테롤 농도(10%)는 감소하였다고 보고하였다. 또한 수용성이며 난소화성인 식이섬유 psyllium 5.1g을 34명의 당뇨병 환자에게 8주간 공급하였을 때 식후 포도당(19.2%), 총 콜레스테롤(8.9%), LDL-콜레스테롤(13%)은 대조군에 비해 유의적으로 낮았다고 하였다. 그러나 이와는 상반되게 당뇨에 효과가 없다는 결과들도 보고되었다.

Table 3.8.11. Effect of dietary supplementation of biopolymers on triglyceride(TG), total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol and atherogenic index(AI) and in streptozotocin-induced diabetic rats

(unit : mg/dL)

Group s	TG	Total cholesterol	HDL cholesterol	LDL cholesterol	AI
C	100.50 ± 27.45 <sup>1)a2)</sup>	167.25 ± 14.51 <sup>a</sup>	37.80 ± 10.80 <sup>a</sup>	105.15 ± 13.71 <sup>a</sup>	3.01 ± 0.58 <sup>a</sup>
P-BP	90.00 ± 19.53 <sup>a</sup>	155.80 ± 16.74 <sup>a</sup>	48.00 ± 10.01 <sup>a</sup>	99.40 ± 19.64 <sup>a</sup>	3.02 ± 1.86 <sup>a</sup>
L-BP	86.60 ± 12.51 <sup>a</sup>	194.00 ± 17.04 <sup>a</sup>	39.83 ± 8.01 <sup>a</sup>	137.75 ± 12.43 <sup>a</sup>	4.19 ± 1.95 <sup>a</sup>
Levan	135.40 ± 24.86 <sup>a</sup>	142.80 ± 13.32 <sup>a</sup>	46.00 ± 13.20 <sup>a</sup>	69.72 ± 16.69 <sup>a</sup>	2.33 ± 1.06 <sup>a</sup>

1) All values are mean ± S.D.

2) Values are significantly different at P < 0.05 by duncan test

5) 혈중 Phospholipid, Glucose, HbA1c, Insulin농도에 미치는 영향

Table 3.8.12는 실험동물의 혈청 인지질, 당, HbA1c, insulin결과이다. 혈중 인지질은 실험군간에 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 혈당과 HbA1c은 실험군간에 유의적인 차이는 나타나지 않았으나 P-BP군과 L-BP군이 C군에 비해 낮은 경향을 나타내었다. Insulin농도는 실험군간에 유의적인 차이를 나타내지 않았다. Biopolymer의 식이 섭취가 당뇨에 미치는 영향에 대한 연구는 거의 보고되지 않았다. 그러나 레반은 당뇨쥐의 인슐린 저하에 효과가 있다고 보고되었다. Yamamoto 등(1999)의 연구에서 실험쥐에게 1%와 5% 수준으로 레반을 보충하였을 때 인슐린 농도는 유의적이지 않으나 레반군에서 감소하는 경향을 나타내었다고 하였다. 또한 레반은 장내 미생물에 의해 발효되어 그 발효 부산물들이 GIP(glucose-dependente insulinotropic peptide) 또는 GLP(glucagon-like peptide)등의 장내 호르몬 생성을 조절하여 식후 인슐린 분비를 조절한다고 고찰하였다.

당화헤모글로빈은 2 - 3개월 이전의 평균 혈당을 반영하는 혈당조절 지표로 당뇨병인 경우 적혈구 세포내에 비효소적이며 비가역적인 당화반응이 계속

일어나 그 수준이 증가되며, 최근 당화헤모글로빈은 당뇨병 합병증인 심혈관 질환의 위험정도와 밀접한 관계가 있다고 보고되었다(Khaw KT ; 2004).본 연구에서는 P-BP과 L-BP군의 항당뇨효과가 대조군에 비해 감소하는 경향을 보였으나 유의적인 차이는 나타내지 않은 이유는 당뇨유발 후 콜레스테롤의 식이 첨가로 인해 그 효과가 가려진 것으로 사료된다.

Table 3.8.12. Effect of dietary supplementation of biopolymers on phospholipid, glucose, HbA1c and insulin in streptozotocin-induced diabetic rats

Groups	Phospholipid (mg/dL)	Glucose (mg/dL)	HbA1c (% of Hb)	Insulin (ul U/mL)
C	180.20 ± 17.79 <sup>1)a2)</sup>	475.80 ± 19.86 <sup>a</sup>	3.08 ± 0.60 <sup>a</sup>	0.14 ± 0.03 <sup>a</sup>
P-BP	206.80 ± 12.00 <sup>a</sup>	469.20 ± 8.29 <sup>a</sup>	2.88 ± 0.24 <sup>a</sup>	0.15 ± 0.01 <sup>a</sup>
L-BP	213.50 ± 16.64 <sup>a</sup>	462.40 ± 14.49 <sup>a</sup>	2.36 ± 0.71 <sup>a</sup>	0.14 ± 0.03 <sup>a</sup>
Levan	227.83 ± 11.24 <sup>a</sup>	454.80 ± 16.45 <sup>a</sup>	2.50 ± 0.42 <sup>a</sup>	0.16 ± 0.06 <sup>a</sup>

1) All values are mean ± S.D.

2) Values are significantly different at P < 0.05 by duncan test

### 3. 요약

체중증가량, 평균식이 섭취량, 식이효율(FER)은 실험군간에 유의적인 차이가 없었다.

혈중 중성지방은 P-BP군과 L-BP군이 대조군과 시판 레반군에 비해 유의적으로 낮았으며 총 콜레스테롤은 P-BP군이 대조군에 비해 유의적으로 낮게 나타났다. HDL-콜레스테롤과 LDL-콜레스테롤 동맥경화지수는 P-BP군과 L-BP군이 대조군에 비해 낮은 경향이었으나 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 혈액의 인지질과 총 단백질은 실험군간에 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 간 기능의 지표인 GPT, GOT는 P-BP군과 L-BP군이 대조군에 비해 낮은 경향이었으나 유의적인 차이가 없었다.

간의 총 지방과 콜레스테롤 함량, 중성지방 함량은 실험군간에 유의적인 차이는 없었으나 P-BP군이 대조군에 비해 낮은 경향을 나타내었다.

간의 HMG-CoA reductase활성은 P-BP군과 L-BP군이 대조군에 비해 낮은 경향이었으나 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 분변으로의 총 중성스테로이드 배설량은 P-BP군과 L-BP군이 대조군에 비해 높은 경향이었으나 유의적이지 않았으며 총 담즙산 배설량은 P-BP군이 대조군에 비해 유의적으로 높았다.

이상의 결과를 종합하면  $\Psi$ -PGA우위 biopolymer군은 대조군에 비해 혈중 중성지방 농도와 총 콜레스테롤 농도가 유의적으로 낮았으며 간의 HMG-CoA reductase활성 증가 및 변으로의 담즙산 배설량을 유의적으로 증가시켰고 이로 인해 체내 콜레스테롤 pool 감소와 고지혈증 개선 및 비만에 효과가 있다고 추정된다. 이러한  $\Psi$ -PGA우위 biopolymer효과는 시판 레반에 비해 통계적 유의성은 나타내지 않았으나 그 효과가 우수하게 나타났다.

Levan 우위 biopolymer군의 대조군에 비해 혈중 중성지방 농도가 유의적으로 낮았으며 통계적 유의성을 없으나 혈중 지질농도 및 간 지질농도가 대조군

에 비해 낮은 경향을 나타내었으며 변으로의 담즙산 배설량이 대조군에 비해 높은 경향을 나타내어  $\Psi$ -PGA우위 biopolymer에 미약한 효과를 나타내었다.

체중 증가량은 실험군간에 유의적인 차이는 없었으나 P-BP군과 L-BP군이 대조군에 비해 높은 경향을 나타내었다. 평균식이 섭취량과 식이효율은 실험군간에 유의적인 차이가 없었다.

체중 당 간 무게와 체중 당 신장무게는 실험 식이에 의한 차이는 없었다. GPT와 GOT는 P-BP군이 대조군에 비해 유의적으로 낮았다. 간의 총지질, 중성지방, 콜레스테롤 함량은 P-BP군이 대조군과 시판 레반군에 비해 낮은 경향이였으나 유의적인 차이는 없었다. L-BP군의 간 총지질과 중성지방은 대조군과 시판 레반군에 비해 낮은 경향을 나타내었다.

혈중 중성지방 농도는 P-BP군과 L-BP군이 대조군에 비해 낮은 경향을 나타내었고 총콜레스테롤과 HDL-콜레스테롤, 동맥경화지수는 실험군간에 유의적인 차이는 없었다. LDL-콜레스테롤은 P-BP군이 대조군에 비해 낮은 경향이였으나 유의적인 차이는 없었다.

혈중 HbA1c은 P-BP군과 L-BP군이 대조군에 비해 낮은 경향이였으나 유의적인 차이는 없었으며 혈당 및 혈중 인지질 및 인슐린 농도는 실험군간에 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

이상의 결과를 요약하면 당뇨쥐에서  $\Psi$ -PGA우위 biopolymer군은 대조군에 비해 혈중 혈중 중성지방 농도와 LDL-콜레스테롤 농도, 간의 총지질, 중성지방, 콜레스테롤 함량 및 HbA1c이 낮은 경향을 나타내었으나 유의적이지 않았다. 또한 혈중 GPT와 GOT농도는 대조군에 비해 유의적으로 낮게 나타나 항당뇨 효과 및 항고지혈 효과를 시사하였으나 통계적으로 유의성은 나타내지 않았다. Levan 우위 biopolymer군은 대조군에 비해 간의 총지질 중성지방 함량, 혈중 중성지방과 혈당, HbA1c이 낮은 경향을 나타내었으나 유의적이지 않았다.

국내에서 아직 biopolymer가 당뇨병에 대한 생리활성에 미치는 영향에 관한 연구는 전무한 현실이며 본 연구는 biopolymer의 항당뇨 효과에 대한 가능성을 확인한 것이라 의의를 둘 수 있다. 따라서 차후 연구에서는 biopolymer의 식이 첨가량을 조절하고 실험동물로써는 선천성 유전적 당뇨쥐를 사용해 봄으로써 좀더 의미있는 결과를 도출해 낼 수 있으리라 본다.

## 제9절 청국장 유래 biopolymer 성분의 피부안정성에 대한 효능효과 시스템 연구

### 1. 연구수행 방법

#### 가. 피부에 대한 친화성 및 기능성 검증

##### 1) 측정방법

시판하는 첩포 테스트용 반창고를 이용하여 첩포 시험을 한다.

##### 2) 실험방법

#### 가) 조건

실내온도 20-25℃, 상대습도 45-55%로 유지시킨 항온항습실에서 10명의 피시험자에 대하여 좌,우 팔 하박 안쪽에 각각의 시료 1.0% sol'n 0.5ml를 첩포 테스트용 반창고를 이용하여 24시간 폐쇄첩포 방법으로 실시하였다.

#### 나) 측정시료

청국장 유래 biopolymer(이하 CBP), PGA 우위 biopolymer(이하 P-BP), Levan우위 biopolymer(이하 L-BP), 정제수

#### 다) 판정기준

24시간 투여 부위를 육안 판별하여 아래의 조건으로 채점하였다.

- ± : 미약한 홍반
- + : 명확한 홍반 또는 소량의 구진
- ++ : 홍반과 종창 또는 홍반과 구진
- +++ : 홍반, 종창 및 작은 수포
- ++++ : 수포, 진무름

#### 나. 피부 유분 및 수분 측정

##### 1) 측정기기

피부의 수분 측정에 가장 많이 사용되고 있는 Corneometer CM820(Courage + Khazaka Co. West Germany)를 사용하였다.

## 2) 실험방법

### 가) 조건

실내온도 20~25℃, 상대습도 45~55%로 유지시킨 항온항습실에서 10명의 피시험자에 대하여 좌, 우 팔 하박 안쪽을 측정 부위로 하여 직경 40mm circle의 면적에 0.05g/circle의 시료를 각각 도포한 후 2분 후부터 20분간 피부의 수분량에 대한 변화 상태를 측정하였다.

### 나) 측정시료

CBP 1.0%, P-BP 1.0%, LBP 1.0%, carbopol 941 각 각 1.0%용액으로 하였다.

### 다) 측정횟수

1 circle 당 5회를 측정하였다.

### 라) 수분보유량 변화율 계산

상기의 측정 결과를 시간에 따른 수분보유량 변화율을 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{수분보유량} = [ (B-A)/A ] \times 100(\%)$$

∴ A : 시료 도포 전의 피부 수분량

B : 시료 도포 후의 피부 수분량

## 다. 멜라닌, 홍반 측정 및 피부 pH 측정

### 1) 측정기기

피부의 pH 측정기기로는 Skin-pH-meter(Courage + Khazaka Koln-Germany)를 사용하였다.

## 2) 실험방법

### 가) 조건

실내온도 20-25℃, 상대습도 45-55%로 유지시킨 항온항습실에서 10명의 피시험자에 대하여 좌,우 팔 하박 안쪽을 측정 부위로 하여 직경 40mm circle의 면적에 0.05g/circle의 시료를 각각 도포한 후 15분 경과 후의 피부 pH 변화를 측정하였다..

### 나) 측정시료

CBP 1.0%, P-BP 1.0%, LBP 1.0%, carbopol 941 1.0% 용액, 정제수를 이용하여 측정하였다.

### 다) 측정횟수

1 circle 당 5회를 측정하였다

## 라. 경표피 수분손실량 및 피부탄력 측정

### 1) 측정기기

피부의 경표피 수분증발량 측정기기로는 Tewameter TM 300 (Courage + Khazaka cologne Germany)를 사용하였다.

## 2) 실험방법

### 가) 조건

팔의 상박 부위에 테이프 스트리핑(Tape stripping)을 실시하여 피부의 방어막을 약화시킨 후 실내온도 20~25℃, 상대습도 45~55%로 유지시킨 항온항습실에서 10명의 피시험자에 대하여 좌, 우 팔 하박 안쪽을 측정 부위로 하여 직경 40mm circle의 면적에 0.05g/circle의 시료를 각각 도포한 후 3시간, 6시간, 9시간, 24시간, 48시간 경과 후 경표피 수분 손실량을 측정하였다.

### 나) 측정시료

CBP 1.0%, P-BP 1.0%, L-BP 1.0%, carbopol 941 1.0% 용액, 정제수를 이용하여 측정하였다.

다) 측정횟수

1 circle 당 5회 측정하여 평균값을 구하였다.

라) 계산법

도포후/도포전 값을 사용하였다.

마. 자외선 차단지수 측정

1) 측정기기

자외선 차단효과를 측정하기 위해 UV-1601PC (Shimadzu)를 사용하였다.

2) 실험방법

가) 조건각

각각의 시료를 330ppm 농도(용매:정제수)로 희석하여 파장 280-400nm에서 흡광도를 측정하여 UVA, UVB 방어효과를 측정하였다..

나) 측정방법

CBP 1.0%, P-BP 1.0%, L-BP 1.0%, carbopol 941 1.0% 용액, 정제수를 이용하여 측정하였다.

2. 연구수행 내용 및 결과

가. 피부에 대한 친화성 및 기능성 검증

각각의 원료에 대한 24시간 폐쇄접촉 시험을 통한 피부에 대한 친화성을 평가한 결과는 아래 Table 3.9.1과 같다.

CBP, P-BP, L-BP bipolymer원료의 피부자극 정도가 화장품 원료인 정제수와 비슷한 수준으로 나타났으며, 각각 원료의 농도를 화장품에 사용 예상량인 1.0% 용액을 사용한 결과로 볼 때 화장품의 원료로서의 피부 친화성이 있는 것으로 나타났다. 그러나 각각의 원료를 최종제품에 적용시 원료간의 상호반응에 따른 변화가 있을 수 있으므로 추후 최종제품으로 검토가 필요할 것으로 예상된다.

Table 3.9.1. 원료의 첩포시험에 따른 자극성 평가

(0.5ml, 1.0% sol'n)

	CBP	P-BP	L-BP	정제수
첩포 결과	±	±	±	±

나. 피부 유분 및 수분 측정

피부에 대한 수분보유능 즉, 보습력을 평가한 결과는 아래의 Table 3.9.2 및 3.9.3 과 같다. 각질층의 수분량이 감소하면 유연성이 소실되어 나빠지며 잔 주름의 발생 원인이 된다. 수분량의 절대량은 구할 수 없지만 전기전도도는 각질층의 수분량과 상관관계를 나타내어 준다. 각각의 원료의 피부에 정량 도포한 후 피부의 전기전도도를 측정한 결과 CBP, P-BP, L-BP 원료가 화장품에 주로 사용되는 폴리머인 carbopol 941에 비해 피부 보습력이 유사하거나 다소 우위에 있는 것으로 관찰되었다.

그리고 Fig. 3.9.1의 그래프를 볼 때 CBP, P-BP, L-BP biopolymer 원료가 시간경과에 따른 수분변화량이 완만한데 비해 carbopol 941은 초기에 비해 다소 감소되는 수분량의 변화가 많은 것으로 나타났다.

Table 3.9.2. 각 시료별 Corneometer로 측정된 피부 수분량 데이터

구 분	도포전	2분	3분	5분	7분	9분	11분	13분	15분	20분
CBP	32	48	41	38	33	32	31	30	30	28
P-BP	32	44	41	36	32	31	30	29	29	28
L-BP	32	44	40	37	33	31	30	30	29	27
Carbopol 941	32	47	42	38	34	32	31	30	29	28

Table 3.9.3. 피부에 대한 수분 보유량 변화율

구 분	도포전	2분	3분	5분	7분	9분	11분	13분	15분	20분
CBP	0	50.00	28.13	18.75	3.13	0.00	-3.13	-6.25	-6.25	-12.50
P-BP	0	37.50	28.13	12.50	0.00	-3.13	-6.25	-9.38	-9.38	-12.50
L-PB	0	37.50	25.00	15.63	3.13	-3.13	-6.25	-6.25	-9.38	-15.63
Carbopol 941	0	46.88	31.25	18.75	6.25	0.00	-3.13	-6.25	-9.38	-12.50

다. 멜라닌, 홍반 측정 및 피부 pH 측정

피부에 대한 pH 변화를 평가한 결과는 아래의 Table 3.9.4와 같다. 피부의 표면은 산성으로서 산성막이 존재하며 피부표면에 박테리아 등의 세균으로부터 피부를 보호하게 된다. 따라서 각각의 원료가 피부 pH에 미치는 영향은 중요하다.

CBP, P-BP 및 L-BP가 피부에 미치는 영향을 평가한 결과 모든 시료에서 피부 pH에 영향을 주는 않고 기존의 피부 pH를 유지하는 것으로 볼 때 각각의 원료가 피부의 산성막에 악영향이 없는 것으로 나타났다.

Table 3.9.4. 원료별의 피부 pH 변화

	CBP	PBP	LBP	Carbopol 941	정제수
도포 전	5.4	5.3	5.4	5.3	5.3
도포 후	5.6	5.4	5.5	6.0	5.2

라. 경표피 수분 손실량 및 피부탄력 측정

피부 내부로부터 피부를 통해 휘산하는 수분량 즉, 경표피 수분 손실량 (trans epidermal water loss. TEWL)을 평가한 결과는 아래의 Table 3.9.5와

같다. 경표피 수분 손실량은 각질층의 배리어 기능의 지표로서 경표피 수분 손실량이 많으면 각질층을 통해 피부 내부의 수분 손실량이 많다는 뜻으로 각질층의 배리어 기능이 저하되는 것이다. 따라서 경표피 수분 손실량이 적게 나타나면 피부 내부로부터의 수분 증발량이 적게 되므로 피부의 보습력이 좋아지게 되는 것이다.

Table 3.9.5의 값은 시료를 피부에 도포시 피부에 일시적으로 수분량이 증가하게 되어 경표피 수분손실량 증가하는 현상이 나타나므로 도포후 경표피 수분 손실량 / 도포전 경표피 수분 손실량으로 나눈 값으로 나타내어 피부의 배리어 기능에 효과를 평가한 결과이다.

각각의 시료를 평가한 결과로는 CBP, P-BP 및 L-BP 성분들이 기존 화장품 원료로 사용되는 Carbopol 941, 정제수에 비해 평가 우위로 나타났으며, CBP, P-BP 및 L-BP Carbopol 941, 정제수의 순으로 나타났다. 실질적으로 화장품에서는 폴리머를 피부 배리어 기능을 위해서 사용되는 경우가 많다. 특히 피부 배리어 기능을 평가하는 경표피 수분 손실량은 화장품의 제품에서 다른 원료에 의해서 영향을 받기 때문에 향후 각각의 시료를 제품에 적용한 최종제품으로 검토해 볼 필요가 있다고 사료된다.

Table 3.9.5. 원료별 경표피 수분 손실량 평가

(g/m<sup>2</sup>h)

	CBP	P-BP	L-BP	Carbopol 941
도포 전	6.30	6.30	6.30	6.30
도포 3시간 후	-7.36	-7.08	-6.59	-6.02
도포 6시간 후	-6.87	-6.52	-5.74	-4.58
도포 9시간 후	-5.76	-6.00	-3.98	-2.70
도포 24시간 후	-3.23	-3.45	-1.38	-0.95
도포 48시간 후	-0.42	-0.38	-0.17	-0.03

마. 자외선 차단지수 측정

화장품에서 자외선 차단제로서의 용도로 사용되기 위해서는 280nm~400nm 범위의 파장을 흡수하는 능력이 있어야 한다. 각각의 원료를 용매(정제수) 중 일정농도로 하여 자외선 흡광도를 측정한 결과, CBP 및 P-BP, L-BP 모두 자외선 영역에서의 흡수피크가 나타나지 않는 것으로 볼 때 자외선 차단 능력이 없는 것으로 나타났다. 또한 시료의 농도는 330 ppm까지 농도를 높였으나 특별한 흡수 피크는 나타나지 않았다. 따라서 화장품의 자외선 차단제로서의 용도로 적당하지 않는 것으로 나타났다

3. 요약

폐쇄접포 시험을 통해 피부에 대한 친화성을 평가할 결과 정국장 유래 biopolymer(CBP), PGA우위biopolymer(P-BP), levan우위 biopolymer(-LBP) 모두 피부에 대한 자극성이 없어 화장품의 원료로서 적합한 것으로 나타났다.

피부 유분 및 수분 측정은 각질층의 수분 보유능으로 볼 때 CBP, PBP, LBP 원료가 피부보습력에서 기존 화장품 원료를 사용 되는 폴리머에 비해 유사하거나 다소 우위인 것으로 나타났다.

멜라닌, 홍반 측정 및 피부 pH 측정은 피부 pH는 피부의 산성막에 의해 산성을 나타내는데, CBP, PBP, LBP원료를 피부에 도포 한 후에 피부의 pH의 변화는 없는 것으로 볼 때 피부 산성막에 악영향이 없는 것으로 나타났다.

경표피 수분 손실량 및 피부 탄력 측정은 피부 내부의 수분 증발을 방지하는 피부 배리어 기능을 평가한 결과 CBP, PBP, LBP의 순으로 나타났으며 피부의 배리어 기능 개선에 효과가 있는 것으로 나타났다.

자외선 차단지수 측정은 자외선의 파장 범위에서 흡광도를 측정한 결과 CBP, PBP, LBP 모두 자외선 차단 능력이 없어 자외선 차단제 원료로서는 적당하지 않는 것으로 나타났다.

제품에서의 유효성 연구에서 CBP, L-BP, P-BP biopolymer 원료를 화장품 제형화 하여 피부의 대한 효능효과를 검토한 결과 보습능이 우수한 것으로 나타났다.

## 제10절 $\gamma$ -PGA 우위 및 levan 우위 biopolymer 성분 대한 피부 유효성 및 제형화 연구

### 1. 연구수행방법

#### 가. 제품의 유효성 연구

##### 1) 기초화장품류

##### 가) 제형화 연구

기초화장품류에 사용되는 폴리머는 일반적으로 점도 상승을 위한 점증제, 사용감을 높이기 위한 점도 조절제, 제품계의 안정을 위한 유화안정제의 목적으로 사용되고 있다. 또한 폴리머를 단독으로 사용하거나 2가지 이상의 종류로 혼용하여 사용한다. 따라서 본 연구에서는 3종의 biopolymer(청국장 유래 biopolymer 이하 CBP, levan 우위 biopolymer 이하 L-BP, PGA우위 biopolymer 이하 P-BP)를 화장품의 원료서 사용 가능성을 판단하기 위해 현재 기초화장품류에 사용 중인 폴리머와 비교하였다. Biopolymer의 성분들과 기존의 화장품 제조에 사용되는 폴리머인 Carbopol 940, Keltrol F, Veegum을 가용화 제형 1종(스킨), 유화 제형 3종(로션, 크림, 에센스)을 제조, 연구하였다

##### 나) 제형의 물성(pH, 점도) 평가

상기의 폴리머를 함유하여 제조된 기초 화장품 4종의 원액을 실온에서 pH 측정기와 Brookfield 점도계(Model DV- I +)를 이용하여 제품의 물성변화를 측정하였다.

##### 다) 제형 안정성 평가

##### (1) 온도안정성

시료를 온도조건(5℃, 35℃, 45℃)의 항온조에 방치하고 2개월경과 후 시료의 상태 변화(분리, 침전, 변색, 변취)에 대하여 표준품과 비교 관찰하였다.

##### (2) 광안정성

시료를 일광에서 방치하여 1주일간 시료의 상태 변화에 대하여 표준품과 비

교 관찰하였다.

(3) 상태안정성 판단기준

매우 양호 ◎ , 양호 O, 대체로 불량 △, 불량 X 등으로 표기하여 구분하였다.

2) 색조화장품류

가) 제형화 연구

색조화장품류에서의 폴리머의 역할을 보면, 먼저 립스틱제형에는 일반적으로 폴리머를 사용하지 않으며, 투웨이케익의 경우에는 폴리머로서 Nylon powder을 퍼짐성 좋게 하기 위해 사용된다. 따라서 Biopolymer의 성분들은 색조화장품류에 사용되는 폴리머의 용도로는 상이하기 때문에 색조화장품에서의 다른 기능의 원료로서의 가능성을 판단하기 위해 기존의 색조화장품 제형에 biopolymer 성분을 함유한 실험군과 함유하지 않은 대조군의 립스틱 제형과 투웨이케익 제형을 제조, 연구하였다

나) 제형의 물성 평가

(1) 경도 측정

(가) 립스틱류

시료를 용기에 채우고 항온조에 넣어 안정화 시킨 다음 Fudoh Rheo Meter를 이용하여 경도를 측정 하였다.

(나) 투웨이케익

내용물이 채워진 사를 주어진 부위에 놓고 Hardness 측정기(JAL type)를 이용하여 Tester가 일정 속도, 일정 하중으로 낙하하며 경도를 측정하였다.

(2) 용점 측정(립스틱)

모세관을 이용한 시료의 용점을 측정하였다..

(3) 성형성(투웨이케익)

파우더 형태의 시료를 press기를 사용하여 케이스에 압축 성형시 성형 정도를 평가하였다.

다) 제형 안정성 평가

(1) 립스틱

(가) Sweating 정도

립스틱을 몰딩 후 3일이 지난 제품을 각각 37℃, 45℃ 항온조에 넣어 두었을 때 나오는 sweating 정도를 표준품과 비교 관찰하였다.

(나) 내온성

시료를 50℃의 항온조에서 경시시 립스틱의 제형이 흘러내림 현상을 관찰한다.

(2) 투웨이케익

(가) 내온성

시료를 -15℃, 0℃, 45℃의 조건으로 2개월간 cycle chamber에서 2 cycle 후의 시료의 상태 변화(변색, 변형, 변취, 석출, greasing, caking)에 대하여 표준품과 비교 관찰하였다.

라) 상태안정성 판단기준

매우 양호 ◎, 양호 O, 대체로 불량 △, 불량 X 등으로 표기하여 구분하였다.

3) 모발화장품류

가) 제형화 연구

샴푸제형에 이용되는 폴리머는 점도조절이나 컨디셔닝제의 목적으로 사용되고 있다. 본 연구에서는 biopolymer가 점도형성 정도가 높지 않아 기존의 샴푸제형에 biopolymer의 성분들을 함유한 실험군과 함유하지 않은 대조군의 샴푸 제형을 제조, 연구하였다

나) 제형의 물성(pH, 점도) 평가

상기의 폴리머를 함유하여 제조된 샴푸 원액을 실온에서 pH 측정기, Brookfield 점도계(Model DV- I+)를 이용하여 제품의 물성변화를 측정하였다.

다) 제형 안정성 평가

(1) 온도안정성

시료를 온도조건(5℃, 35℃, 45℃)의 항온조에 방치하고 2개월 경시후 시료의 상태 변화(분리, 침전, 변색, 변취)에 대하여 표준품과 비교 관찰하였다.

(2) 광안정성

시료를 일광에서 방치하여 1주일간 시료의 상태 변화에 대하여 표준품과 비교 관찰하였다.

(3) 상태 안정성 판단기준

매우 양호 ◎, 양호 O, 대체로 불량 △, 불량 X 등으로 표기하여 구분하였다.

나. 제품의 피부 유효성 연구

1) 기초화장품류

가) 수분보유능

(1) 측정기기

피부의 수분 측정에 가장 많이 사용되고 있는 Corneometer CM820(Courage + Khazaka Co. West Germany)를 사용하였다.

(2) 실험방법

조건은 실내온도 20~25℃, 상대습도 45~55%로 유지시킨 항온항습실에서 10명의 피시험자에 대하여 좌, 우 팔 하박 안쪽을 측정 부위로 하여 직경 40mm circle의 면적에 0.05g/circle의 시료를 각각 도포한 후 5분 후부터 95분간 피부의 수분량 변화상태를 측정하였다.

(3) 측정시료

CBP, L-BP, P-BP, Carbopol 940, Keltrol F, Veegum을 함유한 스킨, 로션, 크림, 에센스 제품 등을 측정하였다.

(4) 측정횟수

1 circle 당 5회를 측정하였다.

(5) 수분보유량 변화율 계산

상기의 측정 결과를 시간에 따른 수분보유량 변화율을 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{수분보유량 변화율계산식} = [ (B-A)/A ] \times 100(\%)$$

∴ A : 시료 도포 전의 피부 수분량

B : 시료 도포 후의 피부 수분량

나) 경표피 수분 손실량(TEWL)

(1) 측정기기

피부의 경표피 수분증발량 측정기기로는 Tewameter TM 300 (Courage + Khazaka cologne Co., Germany)를 사용하였다.

(2) 실험방법

팔의 상박 부위에 테이프 스트리핑(Tape stripping)을 실시하여 피부의 방어막을 약화시킨 후 실내온도 20-25℃, 상대습도 45-55%로 유지시킨 항온항습실에서 10명의 피시험자에 대하여 좌, 우 팔 하박 안쪽을 측정 부위로 하여 직경 40mm circle의 면적에 0.05g/circle의 시료를 각각 도포한 후 3시간, 6시간, 9시간 24시간, 48시간 경과 후의 경표피 수분 손실량을 측정하였다.

(3) 측정시료

CBP, L-BP, P-BP, Carbopol 940, Keltrol F, Veegum을 함유한 스킨, 로션, 크림, 에센스 제품M로 하였다.

(4) 측정횟수

1 circle 당 5회 측정하여 평균값을 구하였다.

(5) 계산법

도포후/도포전 값을 사용하였다.

2) 색조화장품

실생활에서 소비자들이 사용하는 방법으로 피시험자 20명을 대상으로 평가하였다. 청국장, Leven, PGA 원료를 함유하는 실험군과 함유하지 않은 대조군 제품을 10일간 사용한 후 평가항목별 5점 척도로 평가하였다.

평가 방법 : 매우 좋음(5점), 좋음(4점), 보통(3점), 나쁨(2점), 매우 나쁨(1점)

3) 모발화장품류

실생활에서 소비자들이 사용하는 방법으로 피시험자 20명을 대상으로 평가하였다. 청국장, Leven, PGA 원료를 함유하는 실험군과 함유하지 않은 대조군 제품을 10일간 사용한 후 평가항목별 5점 척도로 평가하였다.

평가 방법 : 매우 좋음(5점), 좋음(4점), 보통(3점), 나쁨(2점), 매우 나쁨(1점)

다. 제품류에 대한 피부 친화력

CBP L-BP, P-BP를 함유한 제품류 용액을 각각 15 $\mu$ g씩 8mm Finn chamber에 도포하고 실내온도 20-25 $^{\circ}$ C, 상대습도 45-55%로 유지시킨 항온항습실에서 20명의 피시험자에 대하여 좌,우 팔 하박 안쪽에 부착하고 24시간 경과 후 첩포(patch)를 제거하였다. 시료 제거후 2시간 후 반응정도를 판정하였다.

- 시료 : 원액(스킨, 로션, 크림, 에센스), 10% 수용액(샴푸)
- 판정기준

반응정도	판정기준
-	아무런 증상 없음
±	약한 홍반
+	명확한 홍반
++	부종을 동반한 심한 홍반
+++	수포, 부종을 동반한 심한 홍반

## 2.. 연구내용 및 결과

### 가. 제품의 유효성 연구

#### 1) 기초화장품류

##### 가) 스킨 제형

스킨제형의 경우에는 가용화 타입으로 폴리머를 사용하지 않는 경우가 많으며, 폴리머는 사용하는 경우에는 점도조절제로 사용하여 사용감을 향상시키기 위해서 사용되고 있다. Biopolymer들을 스킨제형에 적용한 결과는 Table 3.10.1과 같다. CBP, L-BP, P-BP는 점도형성 정도가 Veegum과는 유사하나 carbopol 940, keltrol F에 비해서는 낮은 점도를 형성하였다. 점도 형성이 많은 carbopol의 경우에는 점증제로 주로 많이 사용하고 있으며 스킨제형에 사용될 경우 사용량을 최대로 줄여서 스킨제형의 점도를 조절하고 있다. 따라서 CBP, L-BP, P-BP의 경우 점도형성이 낮아 점도조절제로 스킨제형에 사용하기는 적당한 것으로 나타났다. 안정성 측면에서 볼 때 CBP, L-BP, P-BP를 함유한 스킨제형의 안정성이 온도별에 따른 평가에서도 우수한 것으로 볼 때 유효안정제로서도 적당한 것으로 나타났다.

Table 3.10.1. 스킨제형의 물성 및 안정성

구 분	CBP	L-BP	P-BP	Carbopol 940	Keltrol F	Veegum
pH	6.10	6.80	6.45	6.60	5.45	6.50
점도(cps)	10	21	14	1200	130	10
안정성	5℃	◎	◎	◎	◎	◎
	35℃	◎	◎	◎	◎	◎
	45℃	◎	◎	◎	◎	◎
광안정성	◎	◎	◎	◎	◎	◎

나) 로션, 크림제형

로션제형과 크림제형에 있어서 폴리머는 점도 상승을 위한 점증제, 사용감을 높이기 위한 점도 조절제, 제품계의 안정을 위한 유화안정제의 목적으로 사용되고 있다. Biopolymer들을 로션제형과 크림제형에 적용한 결과는 Table 3.10.2, 3.10.3의 결과를 볼 때, CBP, L-BP 및 P-BP를 함유한 제품의 점도가 Carbopol 940, Keltrol F를 함유한 제품에 비해 낮게 형성되었으며, 제형의 안정성 측면에서는 우수한 것으로 나타났으며, CBP, L-BP 및 P-BP의 경우 사용감을 위한 점도 조절제 및 제품계의 안정성을 위한 유화안정제로는 적용이 적합한 것으로 판단된다. 그리고, 점증제로서는 낮은 점도가 요구되는 로션과 크림제형에는 적용에 문제가 없으나, 다소 높은 점도를 필요로 하는 제품에는 기존 화장품에 사용하고 있는 폴리머와 적당한 비율로 혼용하여 사용할 경우에는 점증제로서도 사용이 가능할 것으로 판단된다.

Table 3.10.2. 로션제형의 물성 및 안정성

구 분	CBP	L-BP	P-BP	Carbopol 940	Keltrol F	Veegum
pH	7.50	7.75	7.60	6.80	7.90	7.80
점도(cps)	5100	6900	5900	12200	8200	5200
안 5℃	◎	◎	◎	◎	◎	◎
정 35℃	◎	◎	◎	◎	◎	◎
성 45℃	◎	◎	◎	◎	◎	◎
광안정성	◎	◎	◎	◎	◎	◎

Table 3.10.3. 크림제형의 물성 및 안정성

구 분	CBP	L-BP	P-BP	Carbopol 940	Keltrol F	Veegum
pH	6.20	6.50	6.30	5.50	6.60	6.30
점도(cps)	17800	17200	19020	35000	19300	16700
안 5℃	◎	◎	◎	◎	◎	◎
정 35℃	◎	◎	◎	◎	◎	◎
성 45℃	◎	◎	◎	◎	◎	◎
광안정성	◎	◎	◎	◎	◎	◎

다) 에센스 제형

에센스의 제형의 경우 폴리머를 제형의 안정화를 위한 유화안정제와 사용감을 위한 점도조절제로 주로 사용되고 있다. 3종의 Biopolymer들을 에센스제형에 적용한 결과는 Table 3.10.4와 같다. 에센스제형은 점도가 높지 않아 CBP, L-BP 및 P-BP의 사용이 유화안정제와 점도조절제로 기능으로는 적합한 것으로 판단된다.

Table 3.10.4. 에센스제형의 물성 및 안정성

구 분	CBP	L-BP	P-BP	Carbopol 940	Keltrol F	Veegum
pH	7.10	7.20	7.20	7.00	7.10	7.20
점도(cps)	110	190	380	1900	270	30
안 정 성	5℃	◎	◎	◎	◎	◎
	35℃	◎	◎	◎	◎	◎
	45℃	◎	◎	◎	◎	△
광안정성	◎	◎	◎	◎	◎	◎

2) 색조화장품류

가) 립스틱 제형

Biopolymer의 성분인 CBP, L-BP 및 P-BP를 립스틱 제형에 적용시 립스틱의 기본 물성인 경도, 용점, 점도 및 제품의 안정성 측면에서 biopolymer 성분을 함유하지 않는 대조군과 비교시 Table 3.10.5와 같이 비슷한 수준으로 립스틱 제형과의 상용성에 문제가 없는 것으로 나타났다.

Table 3.10.5. 립스틱의 물성 및 안정성

구 분	대조군	실 험 군		
		CBP	L-BP	P-BP
경도(gf)	126	126	127	126
용점(℃)	62	61	60	62
Sweating	◎	◎	◎	◎
내온성	◎	◎	◎	◎

나) 투웨이케익 제형

Biopolymer의 성분인 CBP, L-BP 및 P-BP를 투웨이케익 제형에 적용시 물성과 제품의 안정성 측면에서 biopolymer 성분을 함유하지 않는 대조군과 비교시 Table 6과 같이 유사한 것으로 나타났다. 특히 내온성과 광안정성의 경시 후에도 greasing, caking에서 이상이 없는 것으로 나타났으며 투웨이케익의 제형화를 위한 성형성에 있어도 문제가 없는 것으로 볼때 biopolymer의 사용성이 좋은 것으로 나타났다.

Table 3.10.6. 투웨이케익의 물성 및 안정성

구 분	대조군	실 험 군		
		CBP	L-BP	P-BP
경도(gf)	31	32	31	31
성형성	양호	양호	양호	양호
내온성	◎	◎	◎	◎

3) 모발화장품류

Biopolymer 성분인 CBP, L-BP 및 P-BP를 샴푸제형에 적용한 결과는 Table 3.10.7과 같으며 실험군의 물성이 대조군의 물성과 유사하고 안정성 측면에서도 우수한 것으로 볼 때 CBP, L-BP 및 P-BP의 샴푸제형에 적용시 문제점이 없는 것으로 나타났다.

Table 3.10.7. 샴푸제형의 물성 및 안정성

구 분	대조군	실 험 군		
		청국장	Leven	PGA
pH	5.8	5.8	5.9	5.9
점도(cps)	8150	8450	8380	8480
안 정 성	5℃	◎	◎	◎
	35℃	◎	◎	◎
	45℃	◎	◎	◎
내광성	◎	◎	◎	◎

나. 제품의 피부 유효성 연구

1) 기초화장품류

가) 수분보유능

1) 스킨제형

피부에 대한 수분보유능은 각질층의 수분량과의 상관관계를 나타내어 주는 것으로 수분보유능이 낮으면 각질층의 유연성이 소실되어 나빠지며 잔주름의 발생 원인이 된다. 각각의 폴리머들을 함유하는 시료들의 피부에 대한 수분 보유능 및 수분 보유량 변화율을 측정된 결과는 Table 3.10.8와 3.10.9와 같다. Biopolymer 성분인 Leven, PGA, 청국장 원료가 화장품에 주로 사용하는 폴리머인 Carbopol 940, Keltrol F, Veegum에 비해 유사하거나 다소 우위로 나타났다.

Table 3.10.8. 스킨 제형에서의 시료별 피부에 대한 수분 보유능 데이터

구 분	도포전	5분	15분	35분	55분	75분	95분
CBP	51	75	64	60	55	50	46
L-BP	51	78	65	60	54	50	46
P-BP	51	71	64	59	52	49	45
Carbopol 940	51	74	63	58	52	48	45
Keltraol F	51	73	64	60	53	49	44
Veegum	51	73	64	58	51	46	42

Table 3.10.9. 스킨 제형에서의 시료별 피부에 대한 수분 보유량 변화율(%)

구 분	도포전	5분	15분	35분	55분	75분	95분
CBP	0	47.06	25.49	17.65	7.84	0.00	-9.80
L-BP	0	52.94	27.45	17.65	5.88	0.00	-9.804
P-BP	0	39.22	25.49	15.69	1.96	-3.92	-11.76
Carbopol 940	0	45.10	23.53	13.73	51.96	-5.88	-11.76
Keltraol F	0	43.14	25.49	17.65	3.92	-3.92	-13.73
Veegum	0	43.14	25.49	13.73	0.00	-9.80	-17.65

2) 로션, 크림 제형

로션제형에 적용한 폴리머의 수분보유능 및 수분보유량 변화율의 결과는 Table 3.10.10 ~ 3.10.13과 같았다. L-BP와 P-BP가 Carbopol 940, Keltrol F와 같은 수분 보유능을 나타내었고 CBP와 Veegum은 다소 낮은 수분 보유능의 결과로 나타났다. 크림제형에서는 L-BP, P-BP 및 CBP의 biopolymer가 Carbopol 940, Keltrol F, Veegum에 비해 비교 우위로 나타났다.

Table 3.10.10. 로션 제형에서의 시료별 피부에 대한 수분 보유능 데이터

구 분	도포전	5분	15분	35분	55분	75분	95분
CBP	50	83	72	66	61	54	51
L-BP	50	78	71	64	60	54	50
P-BP	50	78	71	65	61	54	50
Carbopol 940	50	80	71	65	60	53	49
Keltrol F	50	80	71	63	59	51	48
Veegum	50	82	70	64	59	52	48

Table 3.10.11. 로션 제형에서의 시료별 피부에 대한 수분 보유량 변화율(%)

구 분	도포전	5분	15분	35분	55분	75분	95분
CBP	0	66.00	44.00	32.00	22.00	8.00	2.00
L-BP	0	56.00	42.00	28.00	20.00	8.00	0.00
P-BP	0	56.00	42.00	30.00	22.00	8.00	0.00
Carbopol 940	0	60.00	42.00	30.00	20.00	6.00	-2.00
Keltraol F	0	60.00	42.00	26.00	18.00	2.00	-4.00
Veegum	0	64.00	40.00	28.00	18.00	4.00	-4.00

Table 3.10.12. 크림 제형에서의 시료별 피부에 대한 수분 보유능 데이터

구 분	도포전	5분	15분	35분	55분	75분	95분
CBP	53	80	76	72	68	63	58
L-BP	53	83	77	72	68	64	60
P-BP	53	80	77	71	65	61	57
Carbopol 940	53	81	76	70	67	62	57
Keltraol F	53	82	75	70	66	61	56
Veegum	53	79	74	69	64	59	54

Table 3.10.13. 크림제형에서의 시료별 피부에 대한 수분 보유량 변화율(%)

구 분	도포전	5분	15분	35분	55분	75분	95분
청국장	0	50.94	43.40	35.85	28.30	18.87	9.43
Leven	0	56.60	45.28	35.85	28.30	20.75	13.21
PGA	0	50.94	45.28	33.96	22.64	15.09	7.55
Carbopol 940	0	52.83	43.40	32.08	26.42	16.98	7.55
Keltraol F	0	54.72	41.51	32.08	24.53	15.09	5.66
Veegum	0	49.06	39.62	30.19	20.75	11.32	1.89

3) 에센스 제형

에센스 제형의 수분보유능과 수분보유량 변화율 결과는 Table 14, 15와 같으며, 로션,크림 제형의 결과 유사하게 Leven, PGA, 청국장이 Carbopol 940, Keltrol F와 유사한 결과가 나타났다. Veegum의 경우 안정성에 다소 미흡한 결과로 시료의 성분들의 상분리 현상으로 인해 내용물의 효능이 떨어져 피부 수분보유능 및 수분보유량 변화율에서 다소 낮은 결과를 나타낸 것으로 사료된다.

Table 3.10.14. 에센스 제형에서의 시료별 피부에 대한 수분 보유능 데이터

구 분	도포전	5분	15분	35분	55분	75분	95분
CBP	47	87	82	76	71	66	62
L-BP	47	85	82	75	71	67	62
P-BP	47	88	83	77	73	68	63
Carbopol 941	47	87	84	77	73	69	63
Keltraol F	47	83	80	74	69	64	60
Veegum	47	74	71	67	62	57	54

Table 3.10.15. 에센스 제형에서의 시료별 피부에 대한 수분 보유량 변화율(%)

구 분	도포전	5분	15분	35분	55분	75분	95분
CBP	0	85.11	74.47	61.70	51.06	40.43	31.91
L-BP	0	80.85	74.47	59.57	51.06	42.55	31.91
P-BP	0	87.23	76.60	63.83	55.32	44.68	34.04
Carbopol 941	0	85.11	78.72	63.83	55.32	46.81	34.04
Keltraol F	0	76.60	70.21	57.45	46.81	36.17	27.66
Veegum	0	57.45	51.06	42.55	31.91	21.28	14.89

다. 유화 및 분산 상태에 따른 안정성 및 제형화 연구

1) 기초화장품류

기초화장품류인 스킨, 로션, 크림, 에센스 제형에 biopolymer 성분과 기존 화장품 원료로서 사용중인 Carbopol 940, Keltrol F, Veegum 성분을 적용하여 유효성을 평가한 결과 Leven, PGA, 청국장을 적용한 시료에서 기존 화장품의 원료로 사용되고 있는 폴리머들에 비해 유사하거나 다소 우위를 결과를 얻을 수 있었다.

수분보유능과 수분보유량 변화율 측면에서 보면, 기초화장품류 제형 중에서도 에센스, 크림, 로션, 스킨 제형의 순으로 피부에 대한 수분 보유능 효과 뛰어난 것으로 나타났다. 이것은 적용하는 폴리머 외의 원료들에게서 피부 수분 보유능의 효과를 주는 성분들이 에센스, 크림, 로션, 스킨 순으로 많이 구성되어 있기 때문으로 사료된다.

2) 경표피 수분 손실량(TEWL)

경표피 수분 손실량(trans epidermal water loss. TEWL)은 피부 내부로부터 피부를 통해 휘산하는 수분량을 말한다. 경표피 수분 손실량은 각질층의 배리어 기능의 지표로서 경표피 수분 손실량이 많으면 각질층을 통해 피부 내부의 수분 손실량이 많다는 뜻으로 각질층의 배리어 기능이 저하되는 것이다. 따라서 경표피 수분 손실량이 적게 나타나면 피부 내부로부터의 수분 증발량

이 적게 되므로 피부의 보습력이 좋아지게 되는 것이다. 도포 후 경표피 수분 손실량 / 도포전 경표피 수분 손실량으로 나눈 값으로 나타내어 피부의 배리어 기능에 효과를 평가하였다.

제형별, 원료별의 결과는 Table 3.10.16~3.10.19 와 같았다. 스킨, 로션, 크림, 에센스 제형별로 각각의 폴리머 원료를 적용하여 평가한 결과 L-BP, P-BP, CBP 성분들이 기존 화장품 원료로 사용되는 Carbopol 941, Keltrol F, Veegum와 별 차이가 없이 비슷한 수준의 결과를 나타내었다. 경표피 수분 손실량의 차이가 없는 것은 각각의 폴리머들의 효능 차이보다는 폴리머 외의 다른 원료에 의한 영향을 더 받기 때문인 것으로 사료된다.

Table 3.10.16. 스킨 제형에서의 원료별 경표피 수분 손실량

구 분	도포전	3시간	6시간	9시간	24시간	48시간
CBP	5.73	-6.55	-4.34	-3.06	-1.26	-0.06
L-BP	5.73	-6.67	-4.36	-3.12	-1.25	-0.08
P-BP	5.73	-6.43	-4.39	-3.11	-1.29	-0.05
Carbopol 941	5.73	-6.08	-4.26	-3.02	-1.24	-0.10
Keltraol F	5.73	-6.32	-4.23	-3.21	-1.20	-0.07
Veegum	5.73	-6.19	-4.18	-3.01	-1.18	-0.03

Table 3.10.17. 로션 제형에서의 원료별 경표피 수분 손실량

구 분	도포전	3시간	6시간	9시간	24시간	48시간
CBP	4.98	-9.79	-8.19	-5.28	-3.89	-2.03
L-BP	4.98	-9.36	-8.11	-5.24	-3.84	-2.12
P-BP	4.98	-9.53	-8.24	-5.18	-3.75	-2.18
Carbopol 941	4.98	-9.65	-8.66	-5.34	-3.89	-2.22
Keltraol F	4.98	-9.27	-8.12	-5.20	-3.65	-2.03
Veegum	4.98	-9.34	-8.09	-5.09	-3.47	-2.00

Table 3.10.18. 크림 제형에서의 원료별 경표피 수분 손실량

구 분	도포전	3시간	6시간	9시간	24시간	48시간
CBP	6.16	-10.31	-8.13	-6.13	-4.97	-3.67
L-BP	6.16	-10.09	-8.18	-6.08	-4.86	-3.69
P-BP	6.16	-10.02	-8.16	-6.10	-4.88	-3.59
Carbopol 941	6.16	-10.57	-8.20	-6.24	-4.99	-3.70
Keltraol F	6.16	-10.25	-8.06	-6.02	-4.82	-3.49
Veegum	6.16	-10.21	-8.02	-5.98	-4.76	-3.41

Table 3.10.19. 에센스 제형에서의 원료별 경표피 수분 손실량

구 분	도포전	3시간	6시간	9시간	24시간	48시간
CBP	5.52	-9.15	-7.75	-5.96	-4.32	-3.03
L-BP	5.52	-9.23	-7.79	-5.93	-4.30	-2.97
P-BP	5.52	-9.16	-7.73	-5.87	-4.30	-2.98
Carbopol 941	5.52	-9.29	-7.82	-6.03	-4.41	-3.10
Keltraol F	5.52	-9.07	-7.71	-5.89	-4.28	-2.96
Veegum	5.52	-9.03	-7.65	-5.87	-4.24	-2.95

### 3) 색조화장품류

#### 가) 립스틱 제형

소비자의 사용성 평가한 결과는 Table 3.10.20과 같으며 L-BP, P-BP, CBP 을 함유한 실험군이 함유지 않는 대조군에 비해 바른후 촉촉함, 입술이 트지 않음 항목에서 비교 우위로 나타났다. 이는 biopolymer의 성분들이 피부의 다른 부위에 비해 수분 증발이 높고 유핵 세포수가 많아 쉽게 건조해는 피부에 보습기능을 부여하는 것으로 사료된다.

Table 3.10.20. 립스틱제형의 소비자 사용성 평가

구 분	대조군	실 험 군		
		CBP	L-BP	P-BP
바른후 촉촉함	3.95	4.05	4.11	4.12
발림성	4.02	3.98	4.00	4.03
입술이 트지 않음	3.86	3.90	3.94	3.95
지속성	3.84	3.82	3.80	3.82
적당한 유분감	3.92	3.90	3.88	3.92

2) 투웨이케익 제형

투웨이케익 제형에 대한 소비자의 사용성을 평가한 결과는 Table 3.10.21과 같으며 L-BP, P-BP, CBP을 함유한 실험군이 함유하지 않는 대조군에 비해 발림성, 밀착감, 들뜸이 없음의 항목에서 비교 우위로 나타났다.

Table 3.10.21. 투웨이케익제형의 소비자 사용성 평가

구 분	대조군	실 험 군		
		CBP	L-BP	P-BP
발림성	3.68	3.88	3.91	3.87
밀착감	3.75	3.90	3.89	3.88
커버력	3.89	3.85	3.84	3.87
번들거림 없음	3.65	3.62	3.66	3.68
들뜸 없음	3.80	3.98	4.01	3.97
지속성	3.75	3.76	3.72	3.76

소비자에 대한 사용성 평가한 결과는 Table 3.10.22와 같으며 L-BP, P-BP, CBP를 함유한 실험군이 함유하지 않는 대조군에 비해 사용후 매끄러움 항목에서 비교 우위로 나타났다. 사용후 매끄러움은 샴푸에서의 컨디셔닝 효과의 판단 항목으로 청국장, L-BP, P-BP, 원료가 모발에서의 컨디셔닝 효과를 나타냈었다. 일반적으로 모발에서 컨디셔닝제로는 유기 변성실리콘 오일을 사용한다. 실리콘류는 효과 측면에서 좋으나 샴푸의 제형에서 있어서 불투명 샴푸제형에 한정되고 있다. 따라서 CBP, L-BP 및 P-BP biopolymer원료의

컨디셔닝제로서 적용 가능성을 확인 할 수 있었다.

Table 3.10.22. 샴푸제형의 소비자 사용성 평가

구 분	대조군	실 험 군		
		CBP	L-BP	P-BP
세정력	3.86	3.84	3.85	3.88
기포력	3.75	3.90	3.89	3.88
사용후 매끄러움	3.64	3.93	3.98	3.95
사용감	3.65	3.64	3.67	3.72

라. 제품류에 대한 피부 친화력

각각의 제품에 24시간 폐쇄침포 시험을 통한 피부에 대한 친화성을 평가한 결과는 아래 Table 23과 같다. CBP, P-BP, L-BP 원료를 함유한 제품들의 피부친화성이 있는 것으로 나타났다.

Table 3.20.23. 원료의 침포시험에 따른 자극성 평가

구 분	청국장	PGA	Levan
스킨 제형	-	-	-
로션 제형	-	-	-
크림 제형	-	-	-
에센스 제형	-	-	-
샴푸 제형	-	-	-

### 3. 시제품화

가. 기초화장품 4종 (스킨, 로션, 크림, 에센스),



나. 색조화장품 2종 (립스틱, 투웨이케익)



### 3. 요약

제품에서의 유효성 연구에서 CBP, L-BP, P-BP biopolymer 원료를 화장품 제형화 하여 피부의 대한 효능효과를 검토한 결과 보습능이 우수한 것으로 나타났다.

제품에 대한 피부 및 모발의 친화력 기능성에서 기초화장품 및 모발화장품 제형에 적용된 CBP, L-BP, P-BP biopolymer 원료가 피부에 대한 안전성을 있었으며 모발에 대한 컨디셔닝 효과의 가능성을 확인하였다.

유화/분산 상태에 따른 제품의 안정화 검토 및 제형화 연구에서 CBP, L-BP, P-BP biopolymer 를 이용하여 기초화장품 4종, 색조화장품 2종, 모발화장품의 제형화 및 제품의 안정성을 검토한 결과 화장품 원료로서 적용 가능성을 나타냈다.

시제품화로서 기초화장품 4종 (스킨, 로션, 크림, 에센스) 및 색조화장품 2종 (립스틱, 투웨이케익)을 제품화하였다.

## 협동연구과제 연구내용 요약

1) CBP, P-BP 및 L-BP 세 biopolymer의 물성학적 특성과 유체의 흐름특성에서 3종의 시료 모두 Non-Newtonian 유체의 유동지수가 1이상의 의가소성유체(pseudoplastic fluid)의 유동특성을 보였고 Power law model과 Herschel-Bulkley model식에 0.90~1.0의 높은 상관 관계를 보여 적용성이 높은 것을 보였다.

2) 겔보기 점도의 온도의존성에 대한 조사에서 Arrhenius model식에 잘 적용되었고 농도변화에 따른 온도의존성의 조사 결과 biopolymer P-BP와 L-BP가 CBP보다 온도의존성이 큰 유체로 나타났다. 농도의존성의 조사에서는 Power law model의 적합성이 더 높은 것으로 나타났다.

3) 당뇨쥐에서 청국장은 당뇨쥐의 혈당 감소와 혈중 중성지방 및 간의 콜레스테롤 함량을 유의적으로 감소시켜 혈당 조절 및 지질대사에 유효하였으며 청국장 biopolymer는 당뇨쥐에서 혈당 감소 경향과 혈액과 간의 지질농도 및 지질함량 저하 경향을 나타내었으나 통계적 유의성은 나타나지 않았다.

4)  $\Psi$ -PGA우위 biopolymer(P-BP)군은 대조군에 비해 혈중 중성지방 농도와 총 콜레스테롤 농도가 유의적으로 낮았으며 간의 HMG-CoA reductase활성 증가 및 변으로의 담즙산 배설량을 유의적으로 증가시켰고 이로 인해 체내 콜레스테롤 pool 감소와 고지혈증 개선 및 비만에 효과가 있다고 보여진다. 이러한  $\Psi$ -PGA우위 biopolymer효과는 시판 레반에 비해 통계적 유의성은 나타나지 않았으나 그 효과가 우수하게 나타났다.

5) Levan 우위 biopolymer(L-BP)군의 대조군에 비해 혈중 중성지방 농도가 유의적으로 낮았으며 통계적 유의성을 없으나 혈중 지질농도 및 간 지질농도가 대조군에 비해 낮은 경향을 나타내었으며 변으로의 담즙산 배설량이 대조군에 비해 높은 경향을 나타내었다.

6) P-BP군은 대조군에 비해 혈중 혈중 중성지방 농도와 LDL-콜레스테롤 농도, 간의 총지질, 중성지방, 콜레스테롤 함량 및 HbA1c이 낮은 경향을 나타내었으나 유의적이지 않았다. 또한 혈중 GPT와 GOT농도는 대조군에 비해 유의적으로 낮게 나타나 항당뇨 효과 및 항고지혈 효과를 시사하였으나 통계적으로 유의성은 나타내지 않았다. Levan 우위 biopolymer군은 대조군에 비해 간의 총지질 중성지방 함량, 혈중 중성지방과 혈당, HbA1c이 낮은 경향을 나타내었으나 유의적이지 않았다.

7) 국내에서 아직 biopolymer가 당뇨병에 대한 생리활성에 미치는 영향에 관한 연구는 전무한 현실이며 본 연구는 biopolymer의 항당뇨 효과에 대한 가능성을 확인한 것이라 의의를 둘 수 있다. 따라서 차후 연구에서는 biopolymer의 식이 첨가량을 조절하고 실험동물로써는 선천성 유전적 당뇨쥐를 사용해보므로써 좀더 의미있는 결과를 도출해 낼 수 있으리라 본다.

8) 폐쇄접포 시험을 통해 피부에 대한 친화성을 평가할 결과 CBP, P-BP, L-BP 모두 피부에 대한 자극성이 없어 화장품의 원료로서 적합한 것으로 나타났다.

9) 피부 유분 및 수분 측정은 각질층의 수분 보유능으로 볼 때 CBP, PBP, LBP 원료가 피부보습력에서 기존 화장품 원료를 사용되는 폴리머에 비해 유사하거나 다소 우위인 것으로 나타났다.

10) 멜라닌, 홍반 측정 및 피부 pH 측정에서 CBP, PBP, LBP원료를 피부에 도포 한 결과 피부의 pH의 변화는 없는 것으로 볼 때 피부 산성막에 악영향이 없는 것으로 나타났다.

11) 경표피 수분 손실량 및 피부 탄력 측정은 피부 내부의 수분 증발을 방지하는 피부 배리어 기능을 평가한 결과 CBP, PBP, LBP의 순으로 나타났으며 피부의 배리어 기능 개선에 효과가 있는 것으로 나타났다.

12) 자외선 차단지수 측정은 자외선의 파장 범위에서 흡광도를 측정한 결과 CBP, PBP, LBP 모두 자외선 차단 능력이 없어 자외선 차단제 원료로서는 적합하지 않는 것으로 나타났다.

13) 제품에서의 유효성 연구에서 CBP, L-BP, P-BP biopolymer 원료를 화장품 제형화 하여 피부의 대한 효능효과를 검토한 결과 보습능이 우수한 것으로 나타났다.

14) 제품에 대한 피부 및 모발의 친화력 기능성에서 기초화장품 및 모발화장품 제형에 적용된 CBP, L-BP, P-BP biopolymer 원료가 피부에 대한 안전성을 있었으며 모발에 대한 컨디셔닝 효과의 가능성을 확인하였다.

15) 유화/분산 상태에 따른 제품의 안정화 검토 및 제형화 연구에서 CBP, L-BP, P-BP biopolymer 를 이용하여 기초화장품 4종, 색조화장품 2종, 모발화장품의 제형화 및 제품의 안정성을 검토한 결과, 화장품 원료로서 적용 가능성을 나타냈다. 시제품화로서 기초화장품 4종 (스킨, 로션, 크림, 에센스) 및 색조화장품 2종 (립스틱, 투웨이케익)을 제품화하였다.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

\* 연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도 및 관련분야의 기술발전  
에의 기여도 등을 기술

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위	달성도
1 차 년도	변이주 의 제작 및 Biopolym er 생합성 유전자	▼-PGA의 생산량 증대 변이주의 제작	100%
		Levansucrase 생산량 증대 변이주의 제작	100%
		▼-PGA 생합성 유전자의 클로닝 및 구조결정	100%
		Levan 생합성 유전자의 클로닝 및 구조결정	100%
	청 국 장 유 래 biopolym er의 항당 뇨, 항비 만 및 피 부안정성	물성 및 유동학적 특성조사	100%
		콜레스테롤 저하 효능검정	100%
		항고지혈 효능검정	100%
		항당뇨효능 검정	100%
		피부에 대한 친화성 및 기능성검정	100%
		피부 유분 및 수분 측정	100%
멜라닌, 홍반 측정 및 피부 pH 측정	100%		
경표피 수분 손실량 및 피부 탄력 측정	100%		
자외선 차단지수 측정	100%		
2 차 년도	Biopolym er 생합성 조 건 및 proteome 분석	▼-PGA/Levansucrase 생산최적조건 확립	100%
		▼-PGA/Levansucrase 생산시의 proteome 분석	100%
	변이주가 생산하는 Biopolym er 의 항 당뇨, 항 비만 효능 및 피부 유효성과 제형화 연구	○ ▼-PGA우위 및 levan우위 각 biopolymer의 물성 및 유동학적 특성조사	100%
		○ ▼-PGA우위 및 levan우위 각 biopolymer의 콜레스테롤저하 효능검정	100%
		○ ▼-PGA우위 및 levan우위 각 biopolymer의 항고지혈 효능검정	100%
		○ ▼-PGA우위 및 levan우위 각 biopolymer의 항당뇨효능 검정	100%
		○ ▼-PGA우위 및 levan우위 각 biopolymer의 기존 biopolymer 제품과의 효능비교	100%
		○ 제품에서의 유효성 연구	100%
		○ 제품에 대한 피부 및 모발 친화력과 기능성 검토	100%
		○ 각 biopolymer에 대한 유화 및 분산상태에 따른 제품의 안정성 검토 및 제형화 연구	100%
○ 기초화장품, 색조화장품, 모발화장품 시제품화	100%		

□ 청국장 biopolymer(CBP), PGA우위 biopolymer(P-BP) 및 levan 우위 biopolymer(L-BP) 세 biopolymer의 물성학적 특성에서 세시료 모두 Non-Newtonian유체의 유동지수가 1이상의 의가소성유체(pseudoplastic fluid) 유동특성을 보였다.(목표치 : 100%달성)

□ 새 biopolymer의 농도변화, pH의 변화, 온도변화에 따른 유체의 흐름특성을 Power law model과 Herschel-Bulkley model식에 적용시킨 결과 Power law model 식의 유동지수  $n$ 값이 1이상의 의가소성유체(pseudoplastic fluid)특성을 나타내었고 0.90~1.0의 높은 상관 관계를 보여 적용성이 높은 것으로 나타났다.(목표치 : 100%달성)

□ 겔보기 점도의 온도의존성에 대한 조사에서 4% 농도의 세 시료가 전단속도  $2.04^{-1}$ 에서 Arrhenius model식에 잘 적용되는 것으로 나타났다. 농도변화에 따른 온도의존성의 조사 결과 biopolymer P-BP와 L-BP가 CBP보다 온도의존성이 큰 유체로 나타났다.(목표치 : 100%달성)

□ 겔보기 점도의 농도의존성의 조사에서는 Power law model 과 Exponential model 식 모두 잘 적용되었으나 Power law model의 적합성이 더 높은 것으로 나타났다.(목표치 : 100%달성)

□ 혈청 지질농도 및 혈청지표에서 혈청 중성지방 수준은 Control(이하 C군) 군에 비해 청국장(이하 CH)군과 청국장 biopolymer(이하 CBP)군은 감소하였으나 유의적인 차이는 나타내지 않았다. 혈청 총 콜레스테롤 농도, 혈청 HDL-cholesterol, LDL-Cholesterol 농도는 실험군간에 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 동맥경화지수(atherogenic index , AI)는 CH군, CBP군, C군의 순서로 나타났다. (목표치 : 100%달성)

□ 혈청의 Glutamic pyruvic acid(GPT) 및 Glutamic Oxaloacetic

transaminase(GOT) 활성도 : 간기능 척도인 GPT와 GOT는 CBP군에서 유의적으로 낮게 나타났다.(목표치 : 100%달성)

□ 청국장 유래 biopolymer의 콜레스테롤 저하 효능에서 간의 총 지질 농도, 중성지방 및 총 콜레스테롤 농도는 C군에 비해 CH군과 CBP군이 유의적으로 낮게 나타났고 간의 HMG CoA reductase activities는 CH군과 CBP군이 높았고 분변 중 담즙산 함량은 CH군과 CBP군이 C군에 비해 유의적으로 높게 나타났다.(목표치 : 100%달성)

□ 청국장 유래 biopolymer의 항당뇨 효능  
혈청 총 콜레스테롤 농도는 당뇨유발군 중 DMCH(청국장 식이)군이 다른 실험군에 비해 낮게 나타났다. HDL-cholesterol과 LDL- cholesterol은 정상군에 비해 당뇨유발군들이 유의적으로 높게 나타났다. 당뇨쥐에 있어서 청국장 및 청국장 유래 biopolymer의 혈당 강하효과를 확인할 수 있었다.(목표치 : 100%달성)

□ biopolymer 식이시 체중 증가량은 실험군간에 유의적인 차이는 없었으나 P-BP군과 L-BP군이 대조군에 비해 높은 경향을 나타내었다. 평균식이 섭취량과 식이효율은 실험군간에 유의적인 차이가 없었다.(목표치 : 100%달성)

□ 체중 당 간 무게와 체중 당 신장무게는 실험 식이에 의한 차이는 없었다. GPT와 GOT는 P-BP군이 대조군에 비해 유의적으로 낮았다. 간의 총지질, 중성지방, 콜레스테롤 함량은 P-BP군이 대조군과 시판 레반군에 비해 낮은 경향이었으나 유의적인 차이는 없었다. L-BP군의 간 총지질과 중성지방은 대조군과 시판 레반군에 비해 낮은 경향을 나타내었다. (목표치 : 100%달성)

□ 혈중 중성지방 농도는 P-BP군과 L-BP군이 대조군에 비해 낮은 경향을 나타내었고 총콜레스테롤과 HDL-콜레스테롤, 동맥경화지수는 실험군간에 유의적인 차이는 없었다. LDL-콜레스테롤은 P-BP군이 대조군에 비해 낮은 경향이었으나 유의적인 차이는 없었다.(목표치 : 100%달성)

□ 혈중 HbA1c은 P-BP군과 L-BP군이 대조군에 비해 낮은 경향이었으나 유의적인 차이는 없었으며 혈당 및 혈중 인지질 및 인슐린 농도는 실험군간에 유의적인 차이를 나타내지 않았다.(목표치 : 100%달성)

□ 피부에 대한 친화성 및 기능성 검증

폐쇄접포 시험을 통해 피부에 대한 친화성을 평가할 결과 청국장 유래 biopolymer(CBP), PGA우위biopolymer(P-BP), levan우위 biopolymer(L-BP) 모두 피부에 대한 자극성이 없어 화장품의 원료로서 적합한 것으로 나타났다. (목표치 : 100% 달성)

□ 피부 유분 및 수분 측정

각질층의 수분 보유능으로 볼 때 CBP, PBP, LBP 원료가 피부보습력에서 기존 화장품 원료를 사용되는 폴리머에 비해 유사하거나 다소 우위인 것으로 나타났다. (목표치 : 100% 달성)

□ 멜라닌, 홍반 측정 및 피부 pH 측정

피부 pH는 피부의 산성막에 의해 산성을 나타내는데, CBP, PBP, LBP원료를 피부에 도포 한 후에 피부의 pH의 변화는 없는 것으로 볼 때 피부 산성막에 악영향이 없는 것으로 나타났다. (목표치 : 100% 달성)

□ 경표피 수분 손실량 및 피부 탄력 측정

피부 내부의 수분 증발을 방지하는 피부 배리어 기능을 평가한 결과 CBP, PBP, LBP의 순으로 나타났다. (목표치 : 100% 달성)

□ 자외선 차단지수 측정

자외선의 파장 범위에서 흡광도를 측정한 결과 CBP, PBP, LBP 모두 자외선 차단 능력이 없어 자외선 차단제 원료로서는 적합하지 않는 것으로 나타났다. (목표치 : 100% 달성)

□ 제품에서의 유효성 연구(목표치 : 100% 달성)

: CBP, L-BP, P-BP biopolymer 원료를 화장품 제형화 하여 피부의 대한 효능효과를 검토한 결과 보습능이 우수한 것으로 나타났다.

□ 제품에 대한 피부 및 모발의 친화력 기능성 검토(목표치 : 100% 달성)

: 기초화장품 및 모발화장품 제형에 적용된 CBP, L-BP, P-BP biopolymer 원료가 피부에 대한 안전성을 있었으며 모발에 대한 컨디셔닝 효과의 가능성을 확인하였다.

□ 유화/분산 상태에 따른 제품의 안정화 검토 및 제형화 연구(목표치 : 100% 달성)

: CBP, L-BP, P-BP biopolymer 를 이용하여 기초화장품 4종, 색조화장품 2종, 모발화장품의 제형화 및 제품의 안정성을 검토한 결과 화장품 원료로서 적용 가능성을 나타냈다.

□ 시제품화 (목표치 : 100% 달성)

- 기초화장품 4종 (스킨, 로션, 크림, 에센스),
- 색조화장품 2종 (립스틱, 투웨이케이)

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 연구 결과의 적용분야는, biopolymer 생산관련 유전자 네트워크의 종합적인 이해를 위한 연구를 위해서 활용될 수 있다. 즉 본연구의 proteome 분석에서 유의한 유전자발현량의 변화를 보인 단백질의 유전자를 개별심화연구를 진행시키면, 유전자 발현조절에 관련된 새로운 현상이 밝혀질 가능성이 있다. 그러므로 본 연구실에서는 가능하다면, 청국장 미생물을 이용한 biopolymer 생산의 유전자 발현조절에 관한 연구를 본연구에서 제작된 변이주를 이용하여 지속적으로 추진하는것이 좋겠다고 생각한다. 그리고 이 연구결과는 PGA또는 levan 을 선택적으로 생산하는 데 기초자료로 활용될 수 있을 것이다. 또한 본 연구에서 밝혀진 변이주가 생산하는 Biopolymer 를 활용한 시제품의 우수성이 홍보되면, 기능성 biopolymer 를 활용한 화장품의 개발로 연결될 가능성이 있다.

## 제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보

한국과 일본에서는 콩을 발효하여 장을 제조하는 산업은 오래 전부터 있었다. 청국장을 제조하여 판매하는 업체 또한 양국 모두 다양하게 존재하며, 특히 최근에는 청국장을 이용하여 다양한 상품을 개발하고 있다. 우리나라에서는 무취의 청국장이나 분말형태로 제조된 청국장 등 먹기 쉽게 구성된 제품부터 집에서 간단히 청국장을 제조할 수 있는 발효기까지 청국장에 관련된 여러 형태의 상품이 출시되고 있다. 특히 청국장에서 유래된 물질인  $\gamma$ -PGA를 이용한 제품에는 뼈건강연구소206(남양유업) 유제품, 모이스처 워터 에센스, 모이스처 크림(바이오리더스)같은 화장품이, levan을 이용한 제품에는 다이어트껌(삼립허브텍, 오리온)등이 출시되었다. 하지만 일본에 비해 청국장을 제조하는 업체수나 관련 상품수의 파악에는 미흡한 편이고 체계적인 관리하에 놓여져 있지 못한 것이 현실이다. 일본은 다양한 민간기구를 중심으로 닛토에 관한 연구 및 홍보를 함으로써 다양한 형태의 닛토 관련 상품이 출시되어 있을만큼 닛토에 대한 일본인의 관심은 높다고 할 수 있다. 우리나라도 체계적인 연구와 관리를 하고 다양한 청국장 상품의 개발과 홍보를 통해 우리나라 고유성과 독창성이 있는 건강식품 시장을 지켜나가야 하겠다.

대두에서 유래하는 항암활성물질로는 Protease inhibitor(Kennedy AR등 1981), phytic acid(Shamsuddin등 1989), isoflavone(prochaska등 1994)이 보고되고 있다.

대두는 미국 국립암연구소에서도 대표적인 암예방 식품으로 인정하고 있다. 대두발효식품인 청국장에는 대두가 갖고 있는 원래의 유익한 물질과 더불어 단백질 분해효소(Urano등 2001), 고분자 핵산, 갈변물질, 점질성 polyglutamic acid(Kambourova등 2001)등이 새로이 만들어지는데 청국장에 존재하는 trypsin inhibitor는 항암효과가 있다고 알려져 있다.

이웃 일본이 청국장을 다양하게 활용하는 것을 살펴보면, 청국장 콩을 설탕과 함께 조리한 과자(아마닛토), 곰팡이로 발효시킨 청국장 콩을 소금에 버무려서 몇 달 동안 숙성시켜 술안주나 군음식으로 이용한 시오까라닛토, 닛토피자를 비롯, 샌드위치, 고로켓, 케익, 샐러드, 오무라이스, 볶음밥, 스파게티, 카

레라이스, 마끼 등을 닛토카페나 닛토레스토랑에서도 즐기고 있다.

## 제 7 장   참고문헌

### REFERENCE

#### 총괄과제 참고문헌

A.A. Sawyera, D.M. Weeks, S.S. Kelpke, M.S. McCracken, S.L. Bellis. 2005. The effect of the addition of a polyglutamate motif to RGD on peptide tethering to hydroxyapatite and the promotion of mesenchymal stem cell adhesion. *Biomaterials* **26**: 7046-7056.

Ashiuchi. M., H. Misono. 2002. Biochemistry and molecular genetics of poly- $\gamma$ -glutamate synthesis. *Appl. Microbiol Biotechnol.* **59**: 9-14.

Aleksandr V. Mikhonin, Nataliya S. Myshakina, Sergei V. Bykov, and Sanford A. Asher. 2004. UV Resonance Raman Determination of Polyproline II, Extended 2.5<sub>1</sub>-Helix, and  $\beta$ -Sheet  $\Psi$  Angle Energy Landscape in Poly-L-Lysine and Poly-L-Glutamic Acid. *J. AM. CHEM. SOC.* **127**, 7712-7720.

Akagi Takami, Tatsuo Kaneko, Toshiyuki Kida, Mitsuru Akashi. 2005. Preparation and characterization of biodegradable nanoparticles based on poly( $\gamma$ -glutamic acid) with l-phenylalanine as a protein carrier. *J. Controlled Release* **108**: 226- 236.

Ashiuchi. M., T. Kamei, D. H. Baek, S. Y. Shin, M. H. Sung, K. Soda, T. Yagi, and H. Misono. 2001. Isolation of *Bacillus subtilis*(*chungkookjang*), a poly- $\gamma$ -glutamate producer with high genetic competence. *Appl. Microbiol Biotechnol.* **57**: 764-769.

Ashiuchi. Makoto, Kenji Soda, and Haruo Misono. 1999. A poly- $\gamma$ -glutamate synthetic system of *Bacillus subtilis* IFO 3336: Gene cloning and biochemical analysis of poly- $\gamma$ -glutamate produced by *Escherichia coli* clone cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **263**, 6-12.

Aysen Tulpar, Douglas B. Henderson, Min Mao, Beth Caba, Richey M. Davis, Kevin E. Van Cott, and William A. Ducker. 2005. Unnatural proteins for the control of surface forces. *Langmuir.* **21**, 1497-1506.

Carsten Janke, Krzysztof Rogowski, Dorota Wloga, Catherine Regnard, Andrey V. Kajava, Jean-Marc Strub, Nevzat Temurak, Juliette van Dijk, Dominique Boucher, Alain van Dorsselaer, Swati Suryavanshi, Jacek Gaertig, Bernard Edde. 2005. Tubulin Polyglutamylase Enzymes Are Members of the TTL Domain Protein Family. *SCIENCE* Vol. 308.

Chen Xiong, Chen Shouwen, Sun Ming, Yu Ziniu. 2005. Medium optimization by response surface methodology for poly- $\gamma$ -glutamic acid production using dairy manure as the basis of a solid substrate. *Appl Microbiol Biotechnol* 69: 390-396.

Chien-YangHsieh, Sung-Pei Tsai, Da-MingWang, Yaw-Nan Chang, Hsyue-Jen Hsieh. 2005. Preparation of  $\gamma$ -PGA/chitosan composite tissue engineering matrices. *Biomaterials* 26: 5617-5623.

Constant Vodouhe, Matthieu Schmittbuhl, Fouzia Boulmedais, Dominique Bagnard, Dominique Vautier, Pierre Schaaf, Christophe Egles, Jean-Claude Voegel, Joelle Ogier. 2005. Effect of functionalization of multilayered polyelectrolyte films on motoneuron growth. *Biomaterials* 26: 545-554.

Giuseppe Orsomando, Rocio Diaz de la Garza, Brian J. Green, Mingsheng Peng, Philip A. Rea, Thomas J. Ryan, Jesse F. Gregory III, and Andrew D. Hanson. 2005. Plant  $\gamma$ -glutamyl hydrolases and folate polyglutamates. *J. BIOLOGICAL CHEMISTRY*. Vol. 280, No. 32, pp. 28877-28884.

Gougeon Re'gis D., Marc Reinholdtc, L. Delmotte, Jocelyne Mieh'e'-Brendle', Philippe Jeandet. 2006. Solid-state NMR investigation on the interactions between a synthetic montmorillonite and two homopolypeptides. *Solid State Nuclear Magnetic Resonance* 29: 322.329.

Ing-Lung Shih, Yun-Ti Yu. 2005. Simultaneous and selective production of levan and poly( $\gamma$ -glutamic acid) by *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Letters* 27: 103-106.

Jeong Young-Il, Seog-Jin Seo, In-Kyu Park, Hyun-Chul Lee, In-Chul Kang, Toshihiro Akaike, Chong-Su Cho. 2005. Cellular recognition of paclitaxel-loaded polymeric nanoparticles composed of poly( $\gamma$ -benzyl l-glutamate) and poly(ethylene glycol) diblock copolymer endcapped with galactose moiety. *International Journal of Pharmaceutics* 296: 151-161.

Kang Seong Eun, Joo Hyung Rhee, Chung Park, Moon-Hee Sung, and Inhyung Lee. 2005. Distribution of poly- $\gamma$ -glutamate ( $\gamma$ -PGA) producers in Korean fermented foods, *Cheongkukjang*, *Doenjang*, and *Kochujang*. *Food Sci. Biotechnol.* Vol. 14. No. 5. pp. 704-708.

Kazuko Okamura-Ikeda, Harumi Hosaka, Masato Yoshimura Eiki Yamashita, Sachiko Toma, Atsushi Nakagawa, Kazuko Fujiwara Yutaro Motokawa and Hisaaki Taniguchi. 2005. Crystal structure of human T-protein of glycine cleavage system at 2.0Å resolution and its implication for understanding on-ketotic hyperglycinemia. *J. Mol. Biol.* **351**, 1146-1159.

Kazuhico Tabata, Hajime Ikeda, and Shin-ichi Hashimoto. ywfE in *Bacillus subtilis* codes for a novel enzyme, L-amino acid lgase. 2005. *J.BACTERIOLOGY*. p. 5195-5202 **Vol. 187**, No. 15.

Kim Yoon, Jeong-Yong Cho, Ju-Hee Kuk, Jae-Hak Moon, Jeong-Il Cho, Young-Cheol Kim, Keun-Hyung. 2004. Identification and antimicrobial activity of phenylacetic acid produced by *Bacillus licheniformis* isolated from fermented soybean, Chungkook-Jang. *Curr. Microbiology*. **Vol. 48**, pp. 312-317.

Kim Young-Sik, Sung-Ho kim, Nack-Sung Choung, Moo-Hyun Yim. 1995. A study on the production and properties of levan by levansucrase of *Bacillus* sp. K-1 and its mutants. *J. Sci. Technol.* **Vol. 2**. No. 2.

Kimura Keitarou, Lam-son Phan Tran, Ikuo Uchida, and Yoshifumi Itoh. 2004. Characterization of *Bacillus subtilis*  $\gamma$ -glutamyltransferase and its involvement in the degradation of capsule poly- $\gamma$ -glutamate. *Microbiology*. **150**, 4115-4123.

Leo Kager, Meyling Cheok, Wenjian Yang, Gianluigi Zaza, Qing Cheng, John C. Panetta, Ching-Hon Pui, James R. Downing, Mary V. Relling, and William E. Evans. 2005. Folate pathway gene expression differs in subtypes of acute lymphoblastic leukemia and influences methotrexate pharmacodynamics. *The Journal of Clinical Investigation*. **Vol. 115**, No. 1.

Lisa A. Marshall, Myung S. Rhee, Lars Hofmann, Alexey Khodjakov, Erasmus Schneider. 2005. Increased lysosomal uptake of methotrexate-polyglutamates in two methotrexate-resistant cell lines with distinct mechanisms of resistance. *Bi ochem. pharmacology* **71**: 203-213.

Lukas Palivec, Marie Urbanova and Karel Volka. 2005. Circular dichroism spectroscopic study of non-covalent interactions of poly-L-glutamic acid with a porphyrin derivative in aqueous solutions *J. Peptide Sci.* **11**: 536-545.

Martin Behe, PhD; Gerald Kluge, MD; Wolfgang Becker, MD; Martin Gotthardt, MD; and Thomas M. Behr, MD. 2005. Use of Polyglutamic Acids to Reduce Uptake of Radiometal-Labeled Minigastrin in the Kidneys. *J. Nucl. Med.* **46**: 1012-1015.

Michiya Matsusaki, Takeshi Serizawa, Akio Kishida, Mitsuru Akashi. 2005. Novel functional biodegradable polymer. III. The construction of poly( $\gamma$ -glutamic acid)-sulfonate hydrogel with fibroblast growth factor-2 activity. *J Biomed Mater Res* **73A**: 485-491.

Michiya Matsusaki and Mitsuru Akashi. 2005. Novel functional biodegradable polymer IV: pH-sensitive controlled release of fibroblast growth factor-2 from a poly( $\gamma$ -glutamic acid)-sulfonate matrix for tissue engineering. *Biomacromolecules* **6**, 3351-3356.

Michiya Matsusaki, Takeshi Serizawa, Akio Kishida, and Mitsuru Akashi. 2005. Novel functional biodegradable polymer II: Fibroblast growth factor-2 activities of poly( $\gamma$ -glutamic acid)-sulfonate. *Biomacromolecules* **6**, 400-407.

Monserrat Garcia-Alvarez, Jose Alvarez, Abdelilah Alla, Antxon Martiez de Ilarduya, Concepcion Herranz, Sebastian Munoz-Guerra. 2005. Comb-Like Ionic Complexes of Cationic Surfactants with bacterial poly( $\gamma$ -glutamic acid) of racemic composition. *Macromol. Biosci.* **5**, 30-38.

Myung S. Rhee, Erasmus Schneider. 2005. Lack of an effect of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) overexpression on methotrexate polyglutamate export and folate accumulation in a human breast cancer cell line. *Biochemical Pharmacology* **69**. 123-132.

Nadia A. Soliman, Mahmoud M. Berekaa, Yasser R. Abdel-Fattah. 2005. Polyglutamic acid (PGA) production by *Bacillus* sp. SAB-26: application of Plackett-Burman experimental design to evaluate culture requirements. *Appl Microbiol Biotechnol* **69**: 259-267.

Nicola R. Stanley and Beth A. Lazazzera. Defining the genetic differences between wild and domestic strains of *Bacillus subtilis* that affect poly( $\gamma$ -DL-glutamic acid) production and biofilm formation. *Molecular Microbiology*. **57(4)**, 1143-1158.

Peter D. Cole, Mari´ a Jose´ Alcaraz, Angela K. Smith, John Tan, Barton A. Kamen. 2005. Pharmacodynamic properties of methotrexate and Aminotrexate<sup>TM</sup> during weekly therapy. *Cancer Chemother Pharmacol.* **57(6)**: 826-34.

Peter Wielinga, Jan Hendrik Hooijberg, Sjofn Gunnarsdottir, Ietje Kathmann, Glen Reid, Noam Zelcer, Kasper van der Born, Marcel de Haas, Ingrid van der Heijden, Gertjan Kaspers, Jan Wijnholds, Gerrit Jansen, Godefridus Peters, and Piet Borst. 2005. The human multidrug resistance protein MRP5 transports folates and can mediate cellular resistance against antifolates. *Cancer Res* **65**:

(10).

P. Papadopoulos and G. Floudas. Nanodomain-Induced Chain Folding in Poly( $\gamma$ -benzyl-L-glutamate)-*b*-polyglycine Diblock Copolymers. *Biomacromolecules* **6**, 2352-2361.

P. Dolezalova, J. Krijt, J. Chladek, D. Nemcova and J. Hoza. 2004. Adenosine and methotrexate polyglutamate concentrations in patients with juvenile arthritis. *Rheumatology* **44**: 74-79.

Peter Wielinga, Jan Hendrik Hooijberg, Sjöfn Gunnarsdóttir, Ietje Kathmann, Glen Reid, Noam Zelcer, Kasper van der Born, Marcel de Haas, Ingrid van der Heijden, Gertjan Kaspers, Jan Wijnholds, Gerrit Jansen, Godefridus Peters, and Piet Borst. 2005. The human multidrug resistance protein MRP5 transports folates and can mediate cellular resistance against antifolates. *Cancer Res* **65**: (10).

Shih Ing-Lung, Yi-Tsong Van. 2001. The production of poly( $\gamma$ -glutamic acid) from microorganisms and its various applications. *Bioresource Technology*. **79**, 207-225.

Shih Ing-Lung, Yun-Ti Yu. 2005. Simultaneous and selective production of levan and poly( $\gamma$ -glutamic acid) by *Bacillus subtilis*. *Biotechnol Lett.* **27**: 103-106.

Singer Jack W. 2005. Paclitaxel poliglumex (XYOTAX<sup>TM</sup>, CT-2103): A macromolecular taxane. *J. Controlled Release* **109**: 120-126.

Smulders Y. M., D. E. C. Smith, R. M. Kor, T. Teerlink, D. W. Swinkels, C. D. A. Stehouwer, and C. Jakobs. 2005. Cellular folate vitamers distribution during and after correction of vitamin B12 deficiency: a case for the methylfolate trap. *British Journal of Haematology*, **132**, 623-629.

Song H.K., B. Tosteb, K. Ahmanna, D. Hoffman-Kima., G.T.R. Palmore. 2006. Micropatterns of positive guidance cues anchored to polypyrrole doped with polyglutamic acid: A new platform for characterizing neurite extension in complex enviro. *Biomaterials* **27**: 473-484.

Stanislava Kocianova, Cuong Vuong, Yufeng Yao, Jovanka M. Voyich, Elizabeth R. Fischer, Frank R. DeLeo, and Michael Otto. 2005. Key role of poly( $\gamma$ -DL-glutamic acid) in immune evasion and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. *J. Clin. Invest.* **115**: 688-694.

Stefan Wilkening, Barbara Burwinkel, Ewa Grzybowska, Rudiger Klaes, Jolanta

Pamula, Wioletta Pekala, Helena Zientek, Kari Hemminki, and Asta Forsti. 2005. Polyglutamine repeat length in the NCOA3 does not affect risk in familial breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **14(1)**.

Sung Moon-Hee. Chung Park. Chul-Joong Kim. Haryoung Poo, Kenji Soda, Makoto Ashiuchi. 2005. Natural and edible biopolymer poly- $\gamma$ -glutamic acid: Synthesis, production, and applications. *The Chemical Record.* **Vol. 5**, 352-366.

Takami Akagi, Mariko Higashi, Tatsuo Kaneko, Toshiyuki Kida, Mitsuru Akashi. 2005. In vitro Enzymatic Degradation of Nanoparticles Prepared from Hydrophobically-Modified Poly( $\gamma$ -glutamic acid). *Macromol. Biosci.* **5**, 598-602.

Tan Xiao-Jian and Heather A. Carlson. 2005. Docking Studies and Ligand Recognition in Folylpolyglutamate Synthetase. *J. Med. Chem.* **48**, 7764-7772.

Tarui Yutaka, Hanako Iida, Eiirichino Ono, Wataru Miki, Eiji Hirasawa, Ken-Ichi Fujita, Toshiro Tanaka, Makoto Taniguchi. 2005. Biosynthesis of poly- $\gamma$ -glutamic acid in plants: Transient expression of poly- $\gamma$ -glutamate synthesis complexes in tobacco leaves. *J. Biosci. Bioengineering.* **Vol. 100**, No. 4. 442-448.

Thomas Candela and Agnes Fouet. 2005. *Bacillus anthracis* CapD, belonging to the  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase family, is required for the covalent anchoring of capsule to peptidoglycan. *Molecular Microbiology* **57(3)**, 717-726.

Yang Jeong-Lye, Soon-Hee Lee, and Young-Sun song. 2003. Improving effect of powders of cooked soybean and *Chongkukjang* on blood pressure and lipid metabolism in spontaneously hypertensive rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **32(6)**, 899-905.

Xiong Chen, Shouwen Chen, Ming Su, Ziniu Yu. 2005. High yield of poly- $\gamma$ -glutamic acid from *Bacillus subtilis* by solid-state fermentation using swine manure as the basis of a solid substrate. *Bioresource Tech.* **96**: 1872-1879.

권하영, 김영숙, 권기석, 권정숙, 손호용. 2004. 청국장으로부터 면역증강활성이 우수한 *Bacillus pumilus* JB-1의 분리 및 분리균의 청국장 발효특성. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **Vol. 32**, No. 4, 291-296.

김관필, 정성호, 정낙현. 2001. 배양조건이 *Bacillus subtilis* 융합주의  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase( $\gamma$ -GTP) 활성에 미치는 영향. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **30(3)**, 395-402.

이용림, 김성호, 정낙현, 임무현. 1992. 청국장 발효 중 점질성 고분자 물질의 생성에

관한 연구. *J. Korea Agric. Chem. Soc.* **35**: 202-209.

정낙현, 김성호, 임무현. 1996. *Bacillus* sp. K-1과 그의 변이주가 생산하는 Biopolymer의 물성에 관한 연구. 한국농화학회지. 제 39권 제 3호.

유경옥, 오유나, 김병우, 남수완, 전승중, 김동은, 김영만, 권현주. 2005. 고효율 Poly- $\gamma$ -glutamic acid 생산 균주의 분리 및 생산 특성. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **Vol. 33**, No. 3, 200-206.

#### 협동과제

Asia Pacific Cohort Studies. 2004. Blood glucose and risk of cardiocascular disease in the Asia Pacific region. *Diabetes Care* **27**: 2836-2842.

AOAC. 1995. Official methods of analysis. 16th ed. Association of official analytical chemists, Washington DC. p 9-202.

Beynen AC. 1990. Comparision of the mechanisms proposed to explain the hypocholesterolemic effect of soybean protein versus casein in experimental animals. *J Nutr Sci Vitaminol* **36**: 87-93.

Casson, N., 1959, A flow equation for pigment-oil suspensions the printing ink type, In rheology of disperse systems, Mill, C. C. (ed), Pergamon, Press, London, p84.

Cersosimo E, Williams P, Hoxworth B, Lacy W, Abumrad N. 1986. Glutamine blocks lipolysis and ketogenesis of fasting. *Am J Physiol* **250**: 248-252.

Crowell MJ, Macdald IA. 1980. Enzymatic determination of 3 $\alpha$ -, 7 $\alpha$ -, and 12 $\alpha$ - groups of fecal bile acids. *Clin Chem* **26**: 1298-1300.

Delzenne NM, Kok NN. 1999. Biochemical basis of oligofructose-induced hypolipidemia in animal models. *J Nutr* **129**: 1467-1470.

Delzenne NM, Kok N. 2001. Effects of fructans-type prebiotics on lipid metabolism. *Am J Clin Nutr* **73**: 456-458.

Dubois M, Gillers KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substance. *Anal Chem* **28**: 350-352.

Eastman RC, Keen H. 1997. The impact of cardiocascular disease on people with diabetes: The potential for prevention. *Lancet* **350**: 29-32.

Folch J, Lees M, Sloanestanley GH. 1957. A simple method for the

- isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J Biol Chem* 226: 497-509.
- Frayan KN. 1993. Insulin resistance and lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol* 4: 197-204.
- Goldberg IJ. 1996. Lipoprotein lipase and lipolysis: Central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis. *J Lipid Res* 37: 693-707.
- Goldstein LJ, Brown SM. 1977. The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Annual Review of Biochemistry* 46: 897-930.
- Goldberg RB. 1981. Lipid disorders in diabetes. *Diabetes Care* 4: 561-572.
- Han JH. 2001. Antidiabetic effect of soybean and Chonkukjang. Dissertation of Ph. D., Inje University, Gimhae.
- Herschel, W. H. and Bulkley, R., 1963, Flow of fluid foods, In *Fundamentals of Food Engineering*, Charm, S. E. (ed), AVI, Conneticut, p59.
- Hong JH, Park MR, Rhee SJ. 2002. Effects of YK-209 mulberry leaves on HMG-CoA reductase and lipid composition of liver in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31: 826-833.
- Hulcher FH, Oleson SH. 1973. Simplified spectrophotometric assay for microsomal 3-hydroxy -3-methylglutaryl Co A reductase by measurement of coenzyme A. *J. Lipid Res.*, 14, 625-631
- Iwai K, Nakaya N, Kawasaki Y, Matsue H. 2002. Antioxidative functions of natto, a kind of fermented soybeans: Effect on LDL oxidation and lipid metabolism in cholesterol-fed rats. *J Agric Food Chem* 50: 3597-3601.
- Lee YL, Kim SH, Choung NH, Yim MH. 1992. A study on the production of viscous substance during chungkookjang fermentation. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* 35: 202-209.
- Li S, Nussbaum MS, Mcfadden D, Zhang FS, LaFrance RJ, Dayal R, Fischer JE. 1990. Addition of L-glutamine to total parenteral nutrition and its effects on portal insulin and glucagon and the development of hepatic steatosis in rats. *J Surg Res* 48: 421-426.

- Lin Y, Vonk RJ, Slooff MJH, Kuipers F, Smit MJ. 1995. Differences in propionate-induced inhibition of cholesterol and triacylglycerol synthesis between human and rat hepatocytes in primary culture. *Br J Nutr* 72: 197-207.
- Miettinen TA, Ahrens EH, Grundy SM. 1965. Quantitative isolation and gas liquid chromatographic analysis of total dietary and fecal neutral steroids. *J Lipid Res* 6: 411-424.
- Malabu UH, Dryden S, Mccarthy HD, Kilpatrick A, Williams G. 1994. Effects of chronic vanadate administration in the STZ-induced diabetic rats. The antihyperglycemic action of vanadate is attributable entirely to its suppression of feeding. *Diabetes* 43: 9-15.
- Matkovics B, Kotorman M, Varga IS, Hai DQ, Varga C. 1998. Oxidative stress in experimental diabetes induced by streptozotocin. *Acta Physiol Hung* 85: 29-38.
- Mogensen CE, Andersen MJ. 1973. Increased kidney size and glomerular filtration rate in early juvenile diabetes. *Diabetes* 22: 706-712.
- Kang MJ. 2004. Antidiabetic effect of soy pinitol and Chongkukjang: Animal studies and clinical trials. Dissertation of Ph. D., Inje University, Gimhae.
- Kang SA, Hong KH, Jang KH, Kim SH, Jang EK, Kim CH, Choue RW. 2002. Effects of low level of levan feeding on serum lipids, adiposity and UCP expression in rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31: 788-795.
- Kang SA, Hong KH, Kim SH, Jang KH, Kim CH, Choue RW. 2002. Effects of dietary levan on adiposity, serum leptin and UCP expression in obese rats fed high fat diet. *Korean J Nutr* 35: 903-911.
- Kang SA, Jang KH, Lee JC, Chang BI, Lim YA, Song BC. 2003. The effects of fructose polymer levan on the body fat accumulation and serum lipid profiles of Korean women. *Korean J Community Nutrition* 8: 986-992.
- Khaw KT, Wareham N, Bingham S, Luben R, Welch A, Day N. 2004. Association of hemoglobin A1c with cardiovascular disease and mortality in adults: The European prospective investigation into cancer in Norfolk. *Ann Intern Med* 141: 413-20.

- Kim BN, Kim JD, Ham SS, Choi YS, Lee SY. 1995. Effects of spice added natto supplementation on the lipid metabolism in rats. *J Korean Soc Food Nutr* 24: 121-126.
- Kim MH, Kim HY, Kim WK, Kim JY, Kim SH. 2001. Effects of soyoligosaccharides on blood glucose and lipid metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J Nutr* 34: 3-13.
- Kim SC, Lee SH, Wi SJ. 2002. The effects of natto mucilage on the components of serum lipid in rats. *J of Korean Oil Chemists' Soc* 19: 63-67.
- Rao, M. A. and Anantheswaran, R. C., 1982, Rheology of fluids in food processing, *Food Technol.*, 36, 116.
- Reaven GM. 1987. Abnormal lipoprotein metabolism on non-insulindependent diabetes mellitus. Pathogenesis and treatment. *Am J Med* 83: 31-40.
- Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. 1993. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: *J Nutr* 123: 1939-1951.
- Rho MH, Choi MA, Koh JB. 1998. Effects of raw soy flour (yellow and black) on serum protein concentrations and enzyme activity in streptozotocin-diabetic rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27: 724-730.
- Selvin E, Marinopoulos S, Berkenblit G, Rami T, Brancati FL, Powe NR, Golden SH. 2004. Meta-analysis: Glycosylated hemoglobin and cardiovascular disease in diabetes mellitus. *Ann Intern Med* 141: 421-431.
- Siegel RD, Cupples A, Schaefer EJ, Wilson PWF. 1996. Lipoproteins, apolipoproteins, and low-density lipoprotein size among diabetics in the framingham offspring study. *Metabolism* 45: 1267-1272.
- Stackhouse S, Miller PL, Park SK, Meyer TW. 1990. Reversal of glomerular hyperfiltration and renal hypertrophy by blood glucose normalization in diabetic rats. *Diabetes* 39: 989-995.
- Vitali, A. A. and Rao, M. A., 1984, Flow properties of low-pulp concentrated orange juice effect of temperature and concentration. *J. Food Sci.*, 49, 882.
- Yamamoto Y, Takahashi Y, Kawano M, Iizuka M, Matsumoto T, Saeki S,

Yamaguchi H. 1999. In vitro digestibility and fermentability of levan and its hypocholesterolemic effects in rats. *J Nutr Biochem* 10: 13-18.

Yamashita K, Kawai K, Itakura M. 1984. Effects of fructo-oligosaccharides on blood glucose and serum lipids in diabetic subjects. *Nutrition Research* 4: 961-966.

Yang JL, Lee SH, Song YS. 2003. Improving effect of powders of cooked soybean and Chongkukjang on blood pressure and lipid metabolism in spontaneously hypertensive rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 899-905.

Yeh SL, Hsu CY, Shieh MJ. 1998. Effect of dietary casein and soy protein on plasma lipids in a streptozotocin-induced diabetes model in hamsters. *Nutrition Research* 18: 1757-1768.

Yokota T, Hattori T, Ohishi H, Hasegawa K, Watanabe K. 1996. The effect of antioxidant-containing fraction from fermented soybean food on atherosclerosis development in cholesterol-fed rabbits. *Lebensm Wiss u Technol* 29: 751-755.

Kennedy AR, Little JB. Effects of protease inhibitors on radiation transformation *in vitro*. *Cancer Res* 41: 2103(1981).

Shamsuddin AM, Ullah A, Chakraarthy AK. Inositol and inositol hexaphosphate suppress cell proliferation and tumor formation in CD-1 mice. *Carcinogenesis* 10: 1461 (1989).

Prochaska HJ, Screening strategies for the detection of anticarcinogenic enzyme inducers. *J Nutr Biochem* 43: 360(1994).

Urano TH, Ihara K, Umemura Y, Suzuki M, Oike S, Akita Y, Tsukamoto I, Suzuki A. The profibrinolytic enzyme subtilisin NAT purified from *Bacillus subtilis* cleaves and inactivates plasminogen activator inhibitor type 1. *J Biol Chem* 276: 24690-24696 (2001).

Kambourova MM, Tangney FG. Regulation of polyglutamic acid synthesis by glutamate in *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol* 67: 1004-1007 (2001).

Yokota T, Hattori T, Ohishi H, Hasegawa K, Watanabe K. 1996. The effect of antioxidant-containing fraction from fermented soybean food on atherosclerosis development in cholesterol-fed rabbits. *Lebensm Wiss u Technol* 29: 751-755.

## 주 의

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