

GA0626-

발효기법을 활용하여 Leguminosae에서  
갱년기 증상 예방 물질의 강화 및  
건강보조 식품 소재화

Development of Functional Food Materials for  
Prevention of Menopause Symptom from  
Leguminosae by Fermentaion Process

2006. 7. 14

연구기관

주관연구기관 : 한국식품연구원

협동연구기관 : 한의학연구원

위탁연구기관 : 경희대학교 약학대학

참 여 기 업 : (주)구안산업

농 립 부

# 제 출 문

## 농림부 장관 귀하

본 보고서를 “발효기법을 활용하여 Leguminosae에서 갱년기 증상 예방 물질의 강화 및 건강보조 식품 소재화에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2006년 7월 14일

주관연구기관 : 한국식품연구원

총괄연구책임자 : 이영철

참여연구원 : 최신양

참여연구원 : 김성란

참여연구원 : 이영경

참여연구원 : 표영희

참여연구원 : 권미자

협동연구기관 : 한의학연구원

협동연구책임자 : 마진열

참여연구원 : 송난영

위탁연구기관 : 경희대학교 약학대학

위탁연구책임자 : 김동현

참여연구원 : 한명주

참여기업 : (주)구안산업

참여연구원 : 김상욱

# 요 약 문

## I. 제 목

발효기법을 활용하여 Leguminosae에서 갱년기 증상 예방 물질의 강화 및 건강보조 식품 소재화에 관한 연구

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

식품의 원료로 사용할 수 있는 콩과식물(leguminosae)은 중에는 칩과 콩이 있으며, 칩과 콩에는 에스트로젠 활성을 지닌 식물성 에스트로젠(phytoestrogen)을 사용하고자 하는 연구가 시도되고 있어, 본 연구에서는 발효기법을 활용하여 Leguminosae에서 갱년기 증상 예방 물질의 강화 및 건강보조 식품 소재화에 관한 연구를 수행하였다.

미국에서 호르몬 대체제(hormone replacement agent)는 약 1000만명의 폐경여성들이 스테로이드성 HRT(hormone replacement therapy) 약물을 복용중인 것으로 추정되고 있으며, 국내에서도 갱년기 클리닉을 중심으로 HRT 요법을 하고 있어, 이를 대체하는 안전한 식품 소재의 개발이 필요하다. 따라서 갱년기 증상 치료 관점보다 식품학적인 관점에서 치료보다 예방 차원의 기능성 식품과 그 효능을 밝힌다면 HRT에 의한 부작용을 줄이면서 의료비 절감 및 노령화 시대에 대비한 건강한 삶의 질 향상을 유도할 수 있을 것이다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

1. 1차년도 연구개발 목표인 Phytoestrogenic 활성이 높은 Leguminosae의 선발 및 발효 조건을 확립하기 위해

가. 칩과 콩 추출물의 estrogenic activity 및 칩과 콩의 발효 후 estrogenic activity을 조사하였고,

나. Leguminosae중 칩과 콩의 발효 전·후 활성 물질의 변화에 대해서는 Phytoestrogenic materials을 HPLC로 분석하였으며,

다. Phytoestrogenic materials의 함량 변화를 보기 위해 콩에 존재하는 daidzein, daidzin, genistein, glycitein 등의 변화를 조사하였으며, 같은 근의 주요 이소플라본인 daidzein, daidzin, puerarin, genistein, 등의 변화를 조사하였다.

라. Phytoestrogen 전환 유산균주의 선정을 위해서 보유 균주중  $\beta$ -glucosidase 활성이 높은 균주를 선발하여 24시간과 48시간 발효시켜 phytoestrogen 물질의 전환 균주를 8종 선발하였으며, 발효중 특성을 조사하기 위해 발효 과정중 pH의 변화와 균수,  $\beta$ -glucosidase 활성, 균체량 등을 조사하였다.

2. 2차년도 연구개발 목표인 Phytoestrogenic 활성이 높은 Leguminosae의 선발 및 발효 조건에서

가. Phytoestrogen 전환 적정 조건의 선정하기 위해 선발 콩과식물인 콩에 탄소원 등 첨가 성분의 최적화를 하였으며, 환원제로 cysteine과 ascorbic acid를 이용하여 산화-환원 전위차에 따른 Phytoestrogen 전환 조건을 선정하였으며, 발효 및 배양시간에 따른 Phytoestrogen 활성 물질 전환량을 조사하였다.

나. Phytoestrogenic activity를 강화 소재의 제조 조건을 조사하기 위해 콩과 식물 발효물의 동결 건조 특성을 조사하였고, 동결건조 보호제의 첨

가에 따른 특성을 조사하였다. 또한 동결건조에 따른 발효물의 특성을 개선하고자 anti-caking agents를 사용하여 발효물의 품질을 개선하였다.

다. Phytoestrogen을 강화한 기능성 식품 소재가 칼슘 흡수에 미치는 영향은 동물시험을 통하여 Rrat의 난소 적출을 통한 골밀도 및 형태 등을 조사하였다.

라. Phytoestrogen을 강화한 기능성 식품 소재가 Bone cell에 미치는 영향은 동물시험을 통하여 골수 조직검사(Tissue microscopy)와 골밀도 분석(Bone mineral density Analysis)을 수행하였다.

3. 3차년도 연구개발 목표인 갱년기 예방 물질 강화 식품 소재 개발 및 임상 효능 평가에서는

가. 제품 유형 설정에서 갱년기 여성의 필요 영양소와 칼슘 제제의 종류 등을 조사하였다.

나. 제품제조사 위해 요소 분석(HACCP)를 대두 발효물과 갈근 발효물의 제조 공정에 따라 분석하였다.

다. 시제품 제작 및 안정성 조사에서는 대두 발효물과 갈근 발효물을 5℃와 25℃에서 6개월 동안 저장하면서 안정성을 조사하여 유통기한을 설정하였다.

라. Phytoestrogen을 강화한 기능성 식품 소재가 갱년기 증상 완화 시험을 임상시험하기 위해 갱년기 여성 7인을 대상으로 대형 병원의 협조를 받아 수행하였다.

#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 과제와 관련한 연구성과의 활용 내역을 보면

가. 유상 기술 이전 1건을 달성하였다. 즉 참여업체인 (주)구안산업에 유상 기술 이전(문서번호 연구 10200-1647)을 완료하였다.

나. 유상 기술 이전의 주요 내용

(주)구안산업에 유상 기술 이전한 “콩과식물에서 갱년기 증상 예방 물질 강화 및 건강보조식품 소재화“는 유산균으로 콩과 식물을 발효시켜 이소플라보노이드를 아글리콘 형태로 활성화시켜 효능을 강화 시킨 것이 특징이다. 이 기술로 개발한 소재를 이용하여, 동물 실험을 수행한 결과 난소를 제거하여 갱년기를 유발한 쥐에서 난소의 정상화와 동시에 체지방 등이 현저히 감소하여 갱년기 증상을 완화시킬 수 있음을 밝혀낸 생물전환 신기술이라 할 수 있다.

다. 특허출원은 발명 특허 1건으로 “갱년기 예방 효과가 있는 갈근 유산균 발효물”을 출원하였다.

라. 전문 학술지 게재 및 투고는 총 6건으로 SCI 논문 4건을 게재 및 투고중에 있으며, 국내 논문 2건을 게재하였으며, 그 세부 내용은 아래와 같다.

1) Effect of Lactic Acid Fermentation on Enrichment of Antioxidant Properties and Bioactive Isoflavones in Soybean. *J Food Science*. 70(3):S215-220(2005)

2) Enrichment of bioactive isoflavones in soymilk fermented with glucosidase-producing lactic acid bacteria. *Food Research International*. 38:551-559(2005)

3) The Research Regarding Prevention Effect of Osteoprosis used Arrowroot Fermentation from Ovaryecto,ized SD Rat. *Yakhak Hoeji*. 49(6) 1-10(2005)

4) A Study on Treatment of SD rat Menopausal Obesity Utilizing Fermentation Techniques. *Kor J. Clin. Pharm.* 15(2)1-9(2005)

5) Estrogenic Effect of Main Components Kakkalide and Tectoridin of Puerariae Flos and Their Metabolites. *Pharmacognosy*, In Press(2006)

6) Intestinal Bacteria Activate Estrogenic Effect of Main Constituents Puerarin and Daidzin of *Pueraria thunbergiana*. *Pharmacognosy*, Submitted(2006)

## 2. 타 연구에의 응용

과학기술본부 산업기술이사회에서 시행중인 유망기술 상용화 현장자문 지원 사업에 실용화를 위해 지원서를 제출하여 타 연구에 응용하고자 하고 있어, 이전 기술의 상용화가 이루어 질 것으로 생각되고 있다.

# Summary

## I. Title

Development of Functional Food Materials for Prevention of Menopause Symptom from Leguminosae by Fermentation Process

## II. Purpose and Significance of the Study

Soybean and Puerariae of leguminosae have been used as herbal medicines, against bone loss and climacteric symptoms in Korea, Japan, and China. In Western countries, these herbs are used as alternative therapies in postmenopausal women. Soybean is a rich source of isoflavones, which are reported to have beneficial estrogenic effects. Isoflavonoid consumption has been associated with a reduced risk of most hormone-associated health disorders prevalent in current Western civilizations. Asian populations, with their high intake (50 to 70 mg/d) of soy-derived isoflavones are known to have the lowest incidence of osteoporosis, menopausal symptoms, and mortality from cardiovascular disease and cancer. It has been reported that *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* possess  $\beta$ -glucosidase activity and play major roles in the intestinal hydrolysis of numerous plant  $\beta$ -glucosides. Thus, the aim of our study was to examine whether levels of both total phytoestrogenic and bioactive isoflavone aglycones increased in soybean fermented with  $\beta$ -glucosidase-producing lactic acid bacteria. Many researchers have also reported that Puerariae Radix and its

isoflavones exhibit estrogenic activity. These isoflavones also activate estrogen-responsive genes and regulate growth of human breast cancer cells. Most studies focused on estrogenic effects of daidzein, genistein, and their glycosides. However, their estrogenic effects have not been studied. Therefore, we isolated the metabolites of puerarin and daidzin of soybean and pueraria by lactic acid bacteria and investigated their estrogenic effect and their metabolites.

### III. Contents and Scope of Study

1. Soybean is a rich source of isoflavones, which are reported to have beneficial estrogenic effects. Isoflavonoid consumption has been associated with a reduced risk of most hormone-associated health disorders. It has been reported that *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* possess  $\beta$ -glucosidase activity and play major roles in the intestinal hydrolysis of numerous plant  $\beta$ -glucosides. Thus, the aim of our study was to examine whether levels of both total phytoestrogenic and bioactive isoflavone aglycones increased in soybean fermented with  $\beta$ -glucosidase-producing lactic acid bacteria.

2. *Puerariae Radix* and its isoflavones exhibit estrogenic activity. These isoflavones also activate estrogen-responsive genes and regulate growth of human breast cancer cells. Most studies focused on estrogenic effects of daidzein, genistein, and their glycosides. However, their estrogenic effects have not been studied. Therefore, we isolated the metabolites of puerarin and daidzin of soybean and pueraria by

lactic acid bacteria and investigated their estrogenic effect and their metabolites.

## IV. Results and Recommendation

1. The technology derived from this project was transferred to Kuan Co. Ltd. and panded patent on 2005, as fellows.

2. The results from this project was published on Journal of Food Science, Food Research International, Yakhak Hoeji. and Kor J. Clin. Pharm, respectively. and some results was processed on Journal of Pharmacognosy as in press status, as fellows.

1) Effect of Lactic Acid Fermentation on Enrichment of Antioxidant Properties and Bioactive Isoflavones in Soybean. *J Food Science*. 70(3):S215-220(2005)

2) Enrichment of bioactive isoflavones in soymilk fermented with glucosidase-producing lactic acid bacteria. *Food Research International*. 38:551-559(2005)

3) The Research Regarding Prevention Effect of Osteoprosis used Arrowroot Fermentation from Ovaryecto,ized SD Rat. *Yakhak Hoeji*. 49(6) 1-10(2005)

4) A Study on Treatment of SD rat Menopausal Obesity Utilizing Fermentation Techniques. *Kor J. Clin. Pharm*. 15(2)1-9(2005)

5) Estrogenic Effect of Main Components Kakkalide and Tectoridin of Puerariae Flos and Their Metabolites. *Pharmacognosy*, In

Press(2006)

6) Intestinal Bacteria Activate Estrogenic Effect of Main Constituents Puerarin and Daidzin of *Pueraria thunbergiana*. Pharmacognosy, In Press(2006)

# 목 차

요 약 문 .....	2
I. 제 목 .....	2
II. 연구개발의 목적 및 필요성 .....	2
III. 연구개발 내용 및 범위 .....	2
IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의 .....	4
Summary .....	7
I. Title .....	7
II. Purpose and Significance of th Study .....	7
III. Contents and Scope of Study .....	8
IV. Results and Recomendation .....	9
제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	16
제 1절. 연구개발의 필요성 .....	16
1. 기술적 측면 .....	16
2. 경제·산업적 측면 .....	19
3. 사회·문화적 측면 .....	21
제 2 절. 연구개발의 범위 .....	24
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	25
제 1절 국내·외 관련기술의 현황 .....	25
제 3 장 연구 개발 수행 내용 및 결과 .....	28
제 1 절 콩과식물인 콩과 칩을 이용한 phytoestrogen 활성 소재의 개발	

.....	28
1. 재료 및 실험 방법 .....	28
가. 재료 .....	28
나. 균주 .....	28
다. $\beta$ -glucosidase 활성 측정 .....	28
라. pH와 적정산도 측정 .....	29
마. Isoflavones의 추출 및 HPLC 분석 .....	29
1) Isoflavones의 추출 .....	29
2) HPLC에 의한 Isoflavones의 분석 .....	29
바. Estrogen 상 작용 측정 .....	30
1) E-screen assay .....	30
2) MTT assay .....	31
3) 시료의 처리 .....	31
사. Estrogen상 효능으로의 전환 활성이 우수한 전환 균주 선정 .....	31
.....	31
아. Phytoestrogen 전환 적정 조건의 선정 .....	32
1) 선발 콩과식물에 첨가 성분의 최적화 .....	32
2) 환원제로 cysteine과 ascorbic acid의 산화-환원 전위차에 따 른 Phytoestrogen 전환 .....	32
3) 발효 및 배양시간에 따른 Phytoestrogen 전환 및 발효 시간별 phytoestrogenic activity .....	33
자. Phytoestrogenic activity를 강화 소재의 제조 조건 .....	33
1) 콩과 식물 발효물의 동결 건조 특성 .....	33
2) 발효물의 특성 .....	33
2. 결과 및 고찰 .....	34

가. 콩을 이용한 phytoestrogen 활성 소재의 개발	34
1) 유산균주의 배양 및 $\beta$ -glucosidase 활성 측정	34
2) 콩의 발효 전·후 활성물질의 변화	37
3) Isoflavones의 추출 및 HPLC 분석	39
4) 콩 isoflavone의 에스트로젠상 효과	45
나. 갈근과 갈화를 이용한 phytoestrogen 활성 소재의 개발	47
1) 갈근과 갈화의 발효 전·후 특성 변화	47
다. Phytoestrogenic activity를 강화한 소재의 제조	59
1) Phytoestrogen 전환 적정 조건의 선정	59
2) Phytoestrogenic activity를 강화 소재의 제조 조건	63
가) 콩과 식물 발효물의 동결 건조 특성	63
3) 유산균 발효 제품 제조 및 안정성	68
라. 콩과 갈근 유산균 발효물의 HACCP	70
1) HACCP의 개요	70
2) HACCP 추진 절차	72
3) HACCP 관리계획(HACP Plan)	74
제 2 절 Phytoestrogen을 강화한 기능성 식품 소재의	86
1. 콩, 갈근, 갈화의 유산균 발효물의 갱년기 예방 효능 평가	86
가. 서 론	86
나. 재료 및 방법	88
1) 시험물질	88
2) 대조물질	88
3) 시험계	88
4) 사육 환경	89
5) 투여량 및 시험군의 구성	90

6) 시험물질의 투여 .....	91
7) 실험 방법 .....	91
8) 통계학적 방법 .....	98
2. 갈근 유산균 발효물의 갱년기 예방 효과 .....	98
가. 시험물질 및 용매물질 .....	98
1) 시험물질 .....	98
2) 용매물질 .....	98
나. 재료 및 방법 .....	98
1) 시험계 .....	98
2) 사육 환경 .....	99
3) 투여량 및 시험군의 구성 .....	100
4) 시험 물질의 투여 .....	101
5) 실험 방법 .....	101
6) 통계학적 방법 .....	107
3. 갈근 발효물의 임상 시험 .....	107
가. 설문조사 .....	107
나. 결과 및 고찰 .....	117
1) 콩, 갈근, 갈화의 유산균 발효물의 갱년기 예방 효과 .....	117
2. 갈근 유산균 발효물의 갱년기 예방 효과 .....	159
가. 재료 및 방법 .....	159
1) 일반증상 및 사망동물 .....	159
2) 체중 측정 .....	160
3) 부검소견 .....	161
4) 장기무게 측정 .....	162
5) 혈구분석 .....	163

6) 혈액 생화학 .....	164
7) 호르몬 측정 .....	166
나. 고찰 및 결론 .....	167
3. 갈근 발효물의 임상 실험 .....	169
가. 재료 및 방법 .....	169
1) 제품 유형 설정 .....	169
2) 물질 조제 .....	173
3) 투여 용량 .....	174
나. 결과 및 고찰 .....	174
1) 임상의 예 ①; .....	174
2) 임상의 예 ②; .....	175
3) 임상의 예 ③; .....	176
4) 임상의 예 ④; .....	177
5) 임상의 예 ⑤; .....	178
6) 임상의 예 ⑥; .....	179
7) 임상의 예 ⑦; .....	180
제 4 장 목표 달성도 및 관련 분야에의 기여도 .....	183
1. 연차별 연구개발 목표와 내용 .....	183
2. 관련분야에의 기여도 .....	185
제 5 장 연구 개발 결과의 활용 계획 .....	188
1. 과제와 관련한 연구성과의 활용 내역 .....	188
2. 타 연구에의 응용 .....	189
제 6 장 참고 문헌 .....	191

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

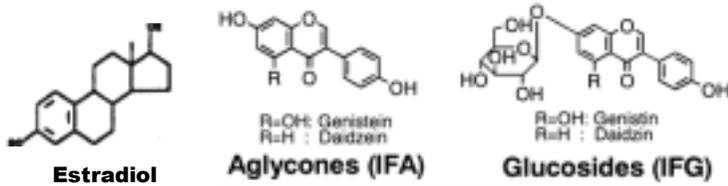
### 제 1절. 연구개발의 필요성

#### 1. 기술적 측면

식품의 원료로 사용할 수 있으며, 국내에서 쉽게 접할 수 있는 콩과 식물(leguminosae)은 중에는 칩(칩꽃과 칩뿌리)과 콩이 있다(한, 2002). 칩(칩꽃과 칩뿌리)과 콩과 같은 콩과식물같이 식물에서 유래되고 비스테로이드성이며 약한 에스트로겐성 활성을 지닌 물질을 식물성 에스트로젠(phytoestrogen)이라 한다. 갱년기 증상 완화나 혹은 예방하는데 식물성 에스트로젠(phytoestrogen)을 사용하고자 하는 연구가 시도되고 있으며, 이에 대한 효능이 발표되고 있다. 자연계에는 적어도 20여종의 식물성 에스트로젠이 발견되며, 주요 phytoestrogen은 isoflavone, coumestane, lignan 등이 있다(Duncan et al . 2000).

칩(칩꽃과 칩뿌리)과 콩같은 콩과식물중에는 phytoestrogen으로 작용하는 이소플라본이 다량 존재하며, 콩과식물중 칩의 주요 이소플라본은 daidzein, daidzin, puerarin, genistein, formonetin, puerarol, kakkonein, miroestrol 등이 있으며, 이들 물질중 daidzein과 genistein는 잘 알려진 phytoestrogen인 물질이다(Anderson, et. al 1999, Knight et. al, 1996). 한 방에서는 genistein과 formonetin이 들어 있는 생약을 卵胞hormone樣作用을 하는 약재로 분류하고 있어, 옛날부터 조상들은 phytoestrogen의 작용을 이용한 슬기를 알 수 있다.

그림 1에서 처럼 식물성 에스트로젠은 구조적으로 여성 호르몬인 스테로이드성 에스트로젠과 비슷하여 에스트로젠 수용체와 결합하여 에스트로젠에 대하여 작용제(agonist), 혹은 길항제(antagonist)로 작용한다. (Messina et. al., 2001). 이소플라본은 당이 떨어져 나간 aglycone 형태,



당이 붙어 있는 배당체(glycoside), acetylglucoside, malonylglucoside 4가지 형태가 있으며, 가공 정도에 따라 이소플라본의 형태는 달라진다. 이들 이소플라본은 장내의  $\beta$ -glucosidase에 의해 가수분해되어 활성형의 비배당체 형태 즉 aglycone이 되어 흡수된다. 사람의 경우 장내 미생물에 의해 daidzin과 genistin이 estrogen 구조 유사체인 daidzein과 genistein로 생물전환된다고 알려져 있다. 장내 미생물에 의한 이소플라본의 대사에 대한 연구를 보면 Morito(2001) 박사는 “Forgotten isoflavone”에서 Equol은 daidzein이 intestinal bacteria에 의해 전환된 대사물로서 에스트로겐 수용체의 결합력이 genistein보다는 낮지만, daidzein보다는 높으며, 모든 사람이 장내 박테리아에 의해 equol을 배설하는 것은 아니고, 이소플라본의 섭취와 상관없이 30~40% 만이 소변 내 equol이 약 2,000~20,000 nmol/day의 농도로 배설되며, 나머지 60~70%에서는 극히 미량이라고 하였다.

Lampe(1998)등은 식이성 섬유소가 장내 박테리아의 성장과 활성을 증진시켜 equol을 생성을 더욱 이롭게 할 수 있다고 언급하였다. Duncan(1999)등의 연구진은 equol의 배설이 높은 여성이 그렇지 못한 여성보다 estrone, estrone-sulfate, testosterone, androstenedione, dehydroepiandrosterone등의 농도가 감소되어 유방암 위험성을 저하시킬 것이라고 주장하였다. 최근 한방에서 일부 생약의 약효는 장내 미생물에 의해 대사되어 생성하는 물질에 의한 것으로 생약의 성분을 구별하고 있

다. 이들 장내 미생물에 의한 대사 경로를 기본경로중 polyketide pathway를 경유하여 배당체형은 비당체를 대장까지 수송함으로써 약효 성분을 발휘한다고도 한다. 또한 복합경로중 acetate malonate-shikimate pathway를 거쳐 플라보노이드 성분의 약효도 발휘한다고 하고 있다.

현재 병원에서 사용하는 호르몬 대체요법(HRT, hormone replacement therapy)으로 사용하는 스테로이드형의 estrogen은 17 $\beta$ -estradiol, diethylstilbestrol(DES) 등이 있으며 혈중에 estradiol을 초기 난포수준인 40 - 50pg/mL로 유지시킨다(Picherit et. al 2001). 화학적으로 호르몬대체요법(HRT, hormone replacement therapy)으로 사용하는 estrogen의 종류는 premarin(conjugated equine estrogen), micronized estradiol, estrogen sulfate, ethinyl estradiol, esterfied estrogen tablet 등이 있으며, 일일 최소 용량은 각각 0.625mg, 1.0 - 2.0mg, 0.625mg, 5 - 10 $\mu$ g, 0.3mg이며, 피하패취(transdermal 17- $\beta$ -estradiol patch)는 3 - 4일간 지속적으로 혈중공급을 한다(FDA, 1999). 화학적으로 호르몬대체요법(HRT, hormone replacement therapy)으로 사용하는 estrogen의 상품명으로 raloxifene(elista), tamoxifen, toremifene, droloxifene, monorest, estratab 등이 있다.

Phytoestrogen은 화학적 호르몬대체요법(HRT)으로 사용하는 estrogen과는 달리 비스테로이드 구조의 복합체로 분류되며, 주로 식품으로 섭취하는 식물 유래의 estrogen을 의미하는 것으로, phytoestrogen은 coumestane, isoflavone, lignan 등이 있다. 가장 잘 알려진 비스테로이드 식물성에스트로젠(non-steroidal phytoestrogens)은 이소플라본중 daidzein, genistein, formononetin, biochanin A, 0-desmethylangolensin, equol 등이 있으며, 쿠메스탄(coumestane)중 coumestrol, 리그난(lignans)중 secoisolariciresinol, matairesinol, enterodiol, enterolactone 등이 있다

(Xu, et. al 1998, Visser et al., 1994, Ranich et al. 2001). 식이성 에스트로겐은 식품에 복합상태로 있던 전구물질이 생체내 대사에 의해 얻어지는 물질로 일부 에스트로겐樣 물질이기도하고, 길항물질이기도한 영양소라고도 한다.

식물성에스트로겐에 대한 연구는 주로 콩에 대한 연구가 이루어져 있으며, 콩에 존재하는 이소플라보노이드중 diethylstilbestrol(DES)의 0.5ng에 상당하는 생물활성의 양은 coumestrol 1.5, genistein 48.3, daidzein 66.4이다(Divi, et. al. 1997). Phytoestrogen으로 작용하는 이소플라본은 estrogen이 부족할 경우에는 estrogenic activity를 나타내고, 반대로 estrogen이 과다할 경우 estrogenic activity를 억제하는 양면적인 성질을 지닌 신체조절자로서의 역할을 수행한다고 알려져 있다.

콩에 존재하는 이소플라본은 대두 배아 부분에 주로 포함되어 있으며, 대두 100g에서 50mg까지 밖에 추출할 수 있는 기술이 실용화가 되어 있으나, 원료내에 존재하는 아글리콘 형태의 이소플라본을 다량 존재하도록 하는 발효공정은 없으며, 주로 알콜 추출 및 산가수분해법을 사용하고 있다. 예로 알코올 수용액을 첨가하거나, 산 또는 염기 용액으로 가수분해하는 것을 특징으로 하는 특허와(특허 2001-030064, 골다공증예방 및 치료용 약학조성물과 건강식품, 김정숙), 바실러스속을 이용한 특허(특허명: 대두 배아로부터 발효를 통한 고순도 이소플라본아글리콘의 생산 방법, 2000-062967), 이온교환수지를 이용하여 이소플라본을 제조하는 방법(미국025206, ADM) 방법 등이 있으나 유산균 같은 유용균주를 이용한 연구 결과는 거의 없다고 할 수 있어 이에 대한 연구가 필요하다.

## 2. 경제·산업적 측면

1996년 NIC(National Center Institute)에서는 식이성 물질에서 “화학적 암예방제”로서의 가능성을 검토하여 콩과식물에 함유되어 있는 이소

플라본을 포함시켰다. 여러 역학 연구 결과에서 콩식품 섭취가 높은 동양인들이 서양인들에 비해 유방암, 전립선암 등으로 인한 사망률이 낮음을 보고하고 있다. 호르몬 요법으로 사용하는 스테로이드성 estrogen은 암을 일으키는 부작용이 있는 데, 콩과식물에 존재하는 이소플라본은 estrogen과 경쟁적으로 경쟁하여 estrogen receptor에 결합하여 estrogen이 발휘하는 여러 성질을 감소시켜 이런 부작용을 줄이는 것으로 알려져 있다.

Phytoestrogen으로 작용하는 이소플라본은 함암작용으로부터 시작하여, 심혈관 질환의 예방, 골다공증치료, 폐경증상, 신장 질환, 인지기능 및 면역 기능 향상에 이르기까지 다양한 효과가 있는 것으로 보고되어 있어, 노령화 시대에 의료비의 절감 등 경제적 이점이 상당히 많다고 할 수 있다. 4차 국제대두학회(International Symposium on the Role of Soy Preventing and Treating Chronic Disease. San Diego, USA, November 4-7, 2001)에서 Duffy R(Dept of Nutrition and Dietetics, Kings College, London, UK) 등이 연구한 “Dietary Soya Improves Memory in Humans”에서 에스트로겐과 관련된 여러 인자들이 인지기능 향상에 영향을 미친다는 가설을 토대로 건강한 남녀를 대상으로 이소플라본이 풍부한 대두 식이가 memory와 frontal lobe function에 미치는 영향을 측정하기 위해 15명에게는 99.6mg isoflavone/d, 12명은 0.5mg isoflavone/d의 농도가 함유된 대두 식이를 10주 동안 공급한 결과 식이를 통하여 이소플라본을 공급 함으로서 verbal, non-verbal episodic memory와 frontal lobe function이 향상된다고 하였다. 이들 연구 결과는 노령화 시대에 phytoestrogenic activity를 나타내는 제품은 노령인구증가에 따른 노인들의 생활에 도움을 줄 수 있는 것을 보여주는 연구 결과라 할 수 있다.

또한 칩(칩꽃과 칩뿌리)과 콩과 같은 콩과식물에 다량 존재하는 이소

플라본은 에스트로겐 활성화에 의해 성호르몬의 농도를 조절하여 암을 억제한다는 것과 이소플라본의 에스트로겐성 활성화는 독립적으로 protein tyrosine kinase inhibitor, topoisomerase II inhibitor, transforming growth factor 조절에 의해 암세포의 세포 증식 억제, apoptosis 유도, 세포분화 유도, 세포주기 정체 및 신생 혈관을 억제하는 것으로 밝혀졌다(Barnes, et al., 1998, Zheng et. al. 1999, Xu, et. al, 1998). 2003년 1월 미국 FDA는 폐경기 증상에 사용되는 estrogen 함유 호르몬대체제(hormone replacement agent)를 사용할 경우 심장질환, 유방암, 뇌졸중, 혈전 등이 발생할 가능성이 증가한다고 하여, 최단기간 사용을 권장하고 있으며, 새로운 안정성 자료를 보강하는 방향으로 변경하고자 하고 있다(FDA 2003).

현재 미국에서 호르몬 대체제(hormone replacement agent)는 약 1000만명의 폐경여성들이 스테로이드성 HRT 약물을 복용중인 것으로 추정되고 있다(FDA 2003). 국내에서도 갱년기 클리닉을 중심으로 HRT 요법을 하고 있어, 이를 대체하는 안전한 식품 소재의 개발이 필요하다. 따라서 갱년기 증상 치료 관점보다 식품학적인 관점에서 치료보다 예방 차원의 기능성 식품과 그 효능을 밝힌다면 HRT에 의한 부작용을 줄이면서 의료비 절감 등을 유도할 수 있을 것이다.

### 3. 사회·문화적 측면

갱년기 이후 골다공증은 주된 건강 문제로 제기되고 있으며, 남성보다 여성에게 발병률이 2배 정도 높은 것으로 알려져 있다. 여성이 남성보다 골다공증 위험이 높은 것은 폐경 같은 갱년기라는 특수한 생체리듬 때문이며, 남성보다 7배나 더 많이 골다공증을 앓고 있다. 여성이 폐경 같은 갱년기가 되면 여성호르몬이 감소되어 폐경기성 골다공증이 발생되

며, 폐경 후 5년내에 골밀도가 10 - 15% 감소된다고 알려져 있다. 우리나라에서도 한국여의사회 조사 결과 중년 여성 10명중 4명이 골다공증 치료를 받아야 할 만큼 골다공증이 심각한 것으로 알려져 있다(약사공론 2003). 골다공증 비율은 40대에는 0.63%에 불과하나, 50대에는 5.1%, 60대 12.4%, 70대 26%로 50대부터 2배 이상씩 늘어나는 것으로 발표되었다(약사공론 2003).

폐경기 여성의 골다공증 치료로서 호르몬 요법인 에스트로젠 주사요법을 시행하고 있으나, 여러 가지 부작용이 나타나, 식품에서 estrogen으로 작용할 수 있는 phytoestrogen을 대안으로 제시하고 있으며, 이에 대한 관심이 커지고 있다. 한 예로 4차 국제대두학회(4th International Symposium on the Role of Soy Preventing and Treating Chronic Disease. San Diego, USA, November 4-7, 2001)에서 Rice MM(George Washington University, Washington, DC, USA)박사는 “Dietary Isoflavone Intake, Postmenopausal Estrogen Use, and Self-Reported Arthritis in Older Japanese American Women”연구에서 폐경기 여성은 에스트로젠 호르몬 분비의 결핍으로 여러 가지 질병의 위험성이 높아지는데, 관절염과 고혈압이 가장 흔한 질병인데 미국에 거주하는 일본인 여성을 대상으로 이소플라본 섭취와 에스트로젠 사용이 관절염에 미치는 영향을 관찰한 결과 식이성 이소플라본 섭취량이 증가할수록 관절염 유발율이 낮아졌으며, 골 밀도로 다시 조정한 연구결과에서도 같은 결과가 나와 phytoestrogen 섭취가 관절염 유발율을 낮출 수 있는 것으로 확인하였다. 또한 식물성 에스트로겐이 기억력을 증진시킨다는 연구 결과가 있는데 4차 국제대두학회에서 Martin MM(Environmental Endocrinology Laboratory, Center for Bioenvironmental Research of Tulane and Xavier Universities, Tulane) 교수가 “Phytoestrogens Enhance Working

Memory in a 90-Minute Delayed Matching-to-Place Watermaze Task”의 연구에서 식물성 에스트로겐이 노화 쥐에서의 기억력을 증가 시킨다는 사실을 보고하였다. 즉 이들은 Ovariectomized retired breeder Sprague-Dawley rat을 대상으로 55ug/g의 이소플라본(65% genistein, 33% daidzein, 2% glycitein)이 함유된 phyto-diet, phyto-free diet를 하루 23~25g(2.7~3.3mg isoflavone/ kg body wt/ day)을 공급한 결과 식물성 에스트로겐이 memory load를 증가 시켜 aging female rat의 working memory performance를 향상시킨다고 보고하였다.

따라서 이소플라본 및 칩(칩꽃과 칩뿌리)과 콩과 같은 콩과식물을 이용한 제품은 갱년기 증상완화 및 기억력 증진에도 효과가 있어 노령화 시대를 대비한 제품으로 일석이조의 효과를 볼 수 있을 것이다. 칩(칩꽃과 칩뿌리)과 콩과 같은 콩과식물에 존재하는 이소플라본은 estrogenic activity를 발현하거나, 이와는 반대로 억제하는 두가지 양면성을 지니며, estrogenic activity와는 상관없이 독립적으로 암세포의 성장을 억제하는 등 여러 가지 생리기작에 관여하는 것으로 밝혀지면서 질병예방 측면에서 주목받고 있다. Phytoestrogen은 암세포의 성장에 필수적인 tyrosine kinase라는 효소를 억제하여 암세포의 성장을 저해하며, phytoestrogen중 genistein이 이러한 효과가 가장 높은 것으로 보고되었다(Williams et al., 1998). 이소플라본은 골 조직에서 발견되는 에스트로겐 수용체  $\beta$ 와의 친화력이 높으며 조골세포에 대하여 anabolic effect를 나타내어 골 형성과 골 무기질화를 촉진하고(Kuiper et al., 1998), 조골세포 활성을 촉진하는 IGF-1의 전사를 증가 시키는 등의 에스트로겐성 효과에 의해 골 건강에 영향을 미친다(Arjmandi et al., 1998). 또한 파골세포의 protein kinase의 활성을 억제하여 염산 분비를 막고(Williams, 1998), 칼슘 이온 신호 전달 과정을 통해 파골세포의 자가산화 유도하는 등(Gao, 1999)의 단백질 인산

화 및 신호전달에 영향을 미쳐 골 대사에 유용한 작용이 있다.

결론적으로 칩(칩꽃과 칩뿌리)과 콩과 같은 콩과식물에서 유래하는 phytoestrogen을 이용하면 갱년기 증상 완화 및 예방에 도움을 줄 수 있을 것이며, 발효기법을 이용하여 phytoestrogen을 강화한 기능성 소재는 앞으로 더욱 유용하게 사용될 것이다.

## 제 2 절. 연구개발의 범위

1. 발효기법을 활용하여 Leguminosae(칩,콩)에서 갱년기 증상 완화 물질의 강화 기술
2. 갱년기 증상 완화 물질을 이용한 기능성 식품 소재화
3. 동물시험을 통한 갱년기 증상 완화 효과 조사
4. 임상시험을 통한 갱년기 증상 완화 건강 식품화

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1절 국내·외 관련기술의 현황

호르몬 대체요법(HRT, hormone replacement therapy)은 여성의 폐경기 증후군, 골다공증을 치료하는 목적으로 사용하여 왔다. 그런데 최근 미국 국립보건원(NIH)은 복합 호르몬 요법이 유방암, 심장병, 뇌졸중 등의 위험을 높인다고 발표하여 호르몬 대체요법 사용 여부에 대한 논란이 일고 있다. 국내에서도 호르몬 대체요법(HRT, hormone replacement therapy)으로 약물을 사용하는 특허는 약 200여개가 조사되었으며, 주로 steroid형 제품이 주류를 이루고 있다. NIH에서는 이소플라본과 식물성 에스트로젠이 들어있는 buttercup, red clover의 시험 사용을 갱년기 예방에 허용하고 있다.

Knight 박사 등(1996)은 A review of the clinical effects of phytoestrogens에서 하루 40mg의 이소플라본을 공급한 결과 폐경전후 여성의 월경주기가 증가하고 스테로이드 호르몬이 변화되었으며, 이소플라본 섭취로 스테로이드 호르몬의 농도, 월경주기 길이를 변형시키는 등의 에스트로젠 대사에 영향을 주어 유방암의 위험성을 감소시키는 효과가 있을 것이라고 결론내렸다. 유럽연합은 4,600만유로화에 해당하는 자금을 phytoestrogen과 관련된 5대 구성 프로그램(5th framework programme, quality of life and management of living resources, key action)에 지원하는 것으로 밝혀졌다. 이것은 동양인이 서양인에 비해 골다공증, 유방암, 전립선암, 결장암 등의 질병 발생률이 낮은 것은 콩을 많이 먹는 식습관을 가졌기 때문이라는 연구 결과가 밝혀져 관심을 모으고 있다. 유럽연합이 지원하고 있는 것 중의 또 하나가 NICHE(Northern Ireland Center for Diet and Health) 프로젝트로 University of Ulster의 Lan Rowland 교수는 Belfast 시립병원인 Patrick Keane 박사팀과 함께 “콩섭취 식이요

법과 전립선암의 예방 사이의 연관”에 대한 연구를 하고 있다. Phytoestrogen과 암예방 차원에서 수행하고 있는 또 다른 프로젝트로서 Phytoprevent가 있다. 이 project에서는 “phytoestrogen이 유방암과 전립선암에 대한 예방 차원에서의 역할과 phytoestrogen 대사의 다양성이 암의 위험성 감소에 미치는 영향” 과 “장내 미생물에 의해 변화하는 phytoestrogen의 대사 산물들에 대한 연구”가 수행되고 있다. 이밖에 유럽연합은 “isoflavone이 골다공증 예방에 미치는 영향에 관한 연구”로 Phyto & Venus project에 지원하고 있다. Phyto & Venus project는 INRAN(National Research Institute for Food & Nutrition)의 Dr. Francesco Branca와 Dr. Annalisa Corsi의 주관으로 연구하고 있다. 여기에서 Venus project는 Vegetable Estrogen in Nutrition & Skeleton의 약자이다.

가까운 일본의 경우 카네사는 2002년 3월 대두성분인 이소플라본을 추출한 건강보조식품인 『빈즈 비너스 대두 이소플라본』이란 제품을 시판하고 있다.

국내의 경우 콩과 식물 중 콩에 대한 연구만 대부분 진행되어 있으며, 콩의 종류에 따른 이소플라본의 종류 및 분포, 대두에서 이소플라본을 추출하는기술 등이 있으나, 100g에서 50mg까지 밖에 추출할 수 있는 기술이 실용화가 되어 있으며, 주로 알콜 추출 및 산가수분해법, 이온교환수지법을 사용하고 있다. 예로 알코올 수용액을 첨가하거나, 산 또는 염기 용액으로 가수분해하는 것을 특징으로 하는 특허와(특허 2001-030064, 골다공증예방 및 치료용 약학조성물과 건강식품, 김정숙), 바실러스속을 이용한 특허(특허명: 대두 배아로부터 발효를 통한 고순도 이소플라본아글리콘의 생산 방법, 2000-062967), 이온교환수지를 이용하여 이소플라본을 제조하는 방법(미국025206, ADM) 방법 등이 있으나 유산균 같은 유용균

주를 이용한 연구 결과는 거의 없다고 할 수 있어 이에 대한 연구가 필요하다.

위의 설명에서 처럼 세계적으로 특히 유럽 각국에서 phytoestrogen에 대한 연구를 수행하고 있으며, 국내에서도 이런 일련의 연구가 성공적으로 수행되어 식품산업과 기능성 식품에 식물성 에스트로젠을 적용할 수 있는 기술적인 방법이 해결된다면 호르몬주사제가 아닌 식품에서 섭취하는 phytoestrogen을 강화한 식품이 건강 증진 차원에서 이바지하게 될 것이다.

## 제 3 장 연구 개발 수행 내용 및 결과

### 제 1 절 콩과식물인 콩과 칩을 이용한 phytoestrogen 활성 소재의 개발

#### 1. 재료 및 실험 방법

##### 가. 재료

국내산 콩(단양산, 황금종, 2003년산)을 구입하여 시료로 사용하였다. 정선한 대두는 충분히 수화시켜(20시간, 상온) 물기를 제거한 다음에 고압솥(121℃, 10분)에서 증자하고 냉각한 뒤, 시료중량의 3배의 물을 첨가하여 2분간 blender로 곱게 마쇄한 다음 멸균(121℃,15분)하였다. 표준배지에서 배양한 유산균을 시료 중량의 2%로 접종한 뒤 37℃에서 48시간 발효하였다.

##### 나.균주

분리 균주 및 시판 중인 *Lactobacillus bacteria*, *Bifidobacteria*, *streptococcus* 약 70여종을 표준배지(호기성균 ; MRS media, 혐기성균; GAM media)에서 계대 배양한 뒤 초기균수를  $10^8$ 으로 조절하여 사용하였다.

##### 다. $\beta$ -glucosidase활성 측정

효소액의 조제는 균배양액의 침전물(4000 G,15 min)에 1 mL의 완충용액(0.1 M, sodium phosphate buffer, pH 7.0)을 넣고 혼합하여 사용하였다.  $p$ -nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyraniside(2 mM) 0.2 mL을 함유한 완충용액 0.3 mL에 효소액 0.1 mL을 가하여 37℃에서 30분간 반응시킨 후 0.4 mL의 0.5 N NaOH로 반응을 종결시켰다.  $\beta$ -glucosidase의 활성은  $\beta$

-nitrophenyl- $\beta$ -D- glucopyraniside의 가수분해율을 결정하여 측정하였다. 유리된 p-nitrophenol의 양을 405 nm에서 그 흡광도를 측정하였고, 효소활성 1단위는 분당 생성되는 p-nitrophenyl 1  $\mu$ mol을 생성하는 효소의 양으로 결정하였다(Choi et al. 1996, 1999). Isoflavon glycoside의 전환활성은 0.3 mL의 완충용액(0.1 M, sodium phosphate buffer, pH 7.0)에 2 mM puerarin, 또는 daidzine 같은 Isoflavon glycoside 0.2 mL를 넣고 효소액 0.1 mL를 가하여  $\beta$ -glucosidase활성 측정시 효소액 첨가 이후의 같은 방법으로 측정하였다(Choi et al. 1996, 1999).

#### 라. pH와 적정산도 측정

시료의 pH는 pH meter로 측정하였고, 적정산도(Titratable acidity)는 0.1N NaOH용액으로 적정하여 % lactic acid함량으로 나타내었다.

#### 마. Isoflavones의 추출 및 HPLC 분석

##### 1) Isoflavones의 추출

발효물에 함유된 유용활성 성분인 phytoestrogenic materials 즉 이소플라본 물질(daidzein, glycitein, genistein)을 추출하기 위해 각 시료의 일정량에 10배의 80% methanol용액을 가하여 상온에서 24시간 추출하였다. 불용성 물질은 원심분리(4000 G, 15 min)하여 제거한 다음 상등액을 syringe filter ( 0.45  $\mu$ m, Millipore Co., Bedford, MA, USA ) 로 여과하여 HPLC의 분석 시료로 사용하였다(Wang et al. 1990).

##### 2) HPLC에 의한 Isoflavones의 분석

JASCO (Japan)사의 HPLC system을 이용하였으며, ODS계열의 YMC AM 303(4.6 x 250 mm) column을 사용하였다. 이동상은 0.1% acetic

acid를 함유한 acetonitrile과 0.1% acetic acid를 함유한 water를 사용하였으며 acetonitrile농도를 초기 15%에서 40분동안 35%로 증가시키는 농도구배(gradient program)로 분석하였다. 유속은 1.0 mL/min으로 조절하였고 injection volume은 20 $\mu$ L였으며 UV detector의 파장은 254 nm, 감도는 0.32로 분석하였다(Wang et al. 1990). Isoflavones의 표준물질을 methanol에 용해하여 분석한 peak area로부터 검량선을 작성하였다. 각 시료의 유용활성 성분의 생성량은 이소플라본의 배당체(daidzin, glycitin, genistin)가 유산균 발효에 의해 해당 비배당체물질(aglycones) 즉, daidzein, glycitein, genistein으로 가수분해된 비율을 산출하여 비교하였다.

$$\text{Hydrolysis(\%)} = \frac{\text{peak area of corresponding isoflavone aglycone}}{\text{peak area of corresponding total isoflavone}} \times 100$$

#### 바. Estrogen 상 작용 측정

##### 1) E-screen assay

MCF-7 세포는 10% FBS가 함유된 Dullbecco's modified Eagle's medium(DMEM) 배지를 사용하여 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 조건하에서 배양하였다. Hormone induction하기 전 세포는 PBS 완충액으로 세척하였으며, 샘플처리 전 모든 estrogenic source를 제거하기 위해서 2일 동안 10% charcoal-dextran stripped FBS(CD-FBS)가 함유된 phenol red free DMEM에서 배양하였다. 배양된 세포는 0.25% trypsin-EDTA를 처리하여 1000 rpm에서 5분간 원심분리하고, 세포수를 측정하여 5 $\times$ 10<sup>3</sup> cells/well이 되도록 96well 배양판에 분주하였다. 24시간 후 샘플을 처리하고 6일(144시간)간 배양한 후 MTT assay로 세포의 증식 정도를 측정하였다(Bae et al . 2005).

## 2) MTT assay

MTT assay는 먼저 6일간(144시간) 배양된 세포에 2 mg/ml의 MTT 시약을 well 당 50 $\mu$ l씩 가하여 30분 동안 인큐베이터에서 반응시킨 후 배지를 제거하고 DMSO (Dimethyl sulfoxide) 100  $\mu$ l를 가하여 540 nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하는 방법으로 시험하였다(Bae et al . 2005)

## 3) 시료의 처리

이때 사용한 시료의 처리는 콩과 콩발효물, 갈화, 갈근 또는 이들의 발효물의 ethyl acetate 분획물, 또는 이들로부터 분리한 isoflavone를 DMSO (최종 농도는 0.1% 이하)에 녹여 사용하였다.

HPLC외에 Isoflavone의 분리는 silica gel column으로 단일 성분을 분획하여 단일성분의 효과를 조사하고자 하였다. 즉 콩, 콩발효물 혹은 갈화 및 이들의 발효물 (0.5 kg)를 ethyl acetate로 추출하고 농축하여 silica gel column (5 x 45 cm)에 부하시키고 전개용매 CHCl<sub>3</sub>:MeOH (10:1 → 10:3)으로 각각의 성분 glycitin(120 mg), glycitein(50 mg), kakkalide (1.2 g), irisolidone (220 mg) 등을 분리하였다.

사. Estrogen상 효능으로의 전환 활성이 우수한 전환 균주 선정

예비적으로 70여종의 균에서  $\beta$ -glucosidase의 활성이 우수한 균주를 선발하여 콩과 갈근, 갈화를 발효시켜 estrogen성 활성을 측정하였다. 콩은 직접 갈아 유산균을 배양하였고, 갈화는 물로 추출하고 미리 배양한 유산균으로 24시간 발효시켜 ethylacetate 용매로 추출하여 estrogen 상 작용을 측정하였다.

아. Phytoestrogen 전환 적정 조건의 선정

1) 선발 콩과식물에 첨가 성분의 최적화

가) 탄소원

RCM 배지에서 배양한 *Bifidobacterium breve K-110*을 사용하였다. 콩 분쇄물에 ascorbic acid 0.1%를 첨가하여 pH 6.5로 조정 한 후, glucose, lactose, raftiline, raftimix, trehalose, maltdextrin을 1% 첨가하여 250 ml media bottle에 200 g씩 담아 멸균한 콩 분쇄물에 *Bifidobacterium breve K-110*  $1.40 \times 10^6$  /g을 접종하여 혐기조에서 37°C에서 24시간 incubation 후 pH, 산도, 균수를 측정하였다.

나) 질소원

콩 분쇄물에 ascorbic acid 0.1%를 첨가하여 pH 6.5로 조정 한 후, beef extract, casein acid hydrolysate, tryptone, whey, milk, soymilk를 1% 첨가하여, 250 ml media bottle에 200 g씩 담아 멸균한 콩 분쇄물에 bifidobacteria를  $1.40 \times 10^6$  /g을 접종하여 혐기조에서 37°C에서 24시간 incubation 후 pH, 산도, 균수를 측정하였다.

다) 무기염

콩 분쇄물을 pH 6.5로 조정 한 후, ammonium chloride, ammonium citrate dibasic, ammonium phosphate monobasic, magnesium sulfate, sodium acetate를 0.1% 첨가하여 같은 조건으로 살균과 배양을 시행한 후 pH, 산도, 균수를 측정하였다.

2) 환원제로 cysteine과 ascorbic acid의 산화-환원 전위차에 따른 Phytoestrogen전환

가) 환원제 첨가에 따른 발효

pH 6.5로 조절한 콩 분쇄물에 *bifidobacterium breve k-110*을 접종하여, 발효하였을 때, 발효가 원활히 진행하지 않아, 환원제인 ascorbic acid 또는 cystein-HCl을 0.1% 첨가 한 후, pH를 6.5로 조절한 후 *bifidobacterium breve k-110*을 접종하여 37°C에서 24시간 혐기 발효시켜, pH 저하(약 pH4.5 이하) 정도를 조사하여 환원제의 영향을 조사하였다.

3) 발효 및 배양시간에 따른 Phytoestrogen 전환 및 발효 시간별 phytoestrogenic activity

가) E-screen assay와 MTT assay는 앞에 언급한 방법을 이용하여, ELISA reader로 흡광도를 측정하는 방법으로 시험하였다.

자. Phytoestrogenic activity를 강화 소재의 제조 조건

1) 콩과 식물 발효물의 동결 건조 특성

0.1% ascorbic acid가 첨가·하여 발효시킨 콩 분쇄물에 *Bif. breve k-110* 전배양액을 접종하여 37°C에서 발효시켜, 당 1.5%를 첨가하여 -80도 deep freezer에서 24시간동안 동결후, 24시간 동안 동결 건조기에서 동결건조하였다. 동결 건조 전·후, 건조물을 멸균 saline에 100배 희석하여 BL agar배지에서 균수와 pH, 적정 산도를 측정하였다. 또한 glucose 농도별로 동결건조 보호 효과를 조사하였다.

2) 발효물의 특성

가) 고결방지제(anti-caking agents)에 따른 특성 조사

구아검, 실리코산 알루미늄, 제일인산칼슘, 제이인산칼슘, 탄산칼슘 등 5종의 anticaking agent 0.1%를 동결건조 전 발효물에 첨가하여 동결건조

한 후 shieve No.10 (2 mm)에 체를 쳐서 얻은 고운 분말을 10g씩 용기에 담아 35°C 포화 습도 상태의 인큐베이터에 방치하면서 분말의 흡습정도를 조사하였다.

나) 고결방지제의 농도별 효과

Anti-caking 효과가 좋은 구아검, 실리코산 알루미늄, 제일인산칼슘 0.2, 0.5%를 첨가하여 그 효과를 조사하였다.

다) 첨가 농도별 관능 특성 조사

구아검과 실리코산 알루미늄을 각각 0.2, 0.5% 첨가한 발효물에 대한 색, mouthfeel, 종합적 기호도를 9점 척도법으로 조사하였다.

## 2. 결과 및 고찰

가. 콩을 이용한 phytoestrogen 활성 소재의 개발

1) 유산균주의 배양 및  $\beta$ -glucosidase 활성 측정

유산균 80 여개 균주를 GAM 배지에서 배양하여 대표적인 균주에 대해 배양후 최종 배지의 최종 pH, 배지 ml 당 균체량,  $\beta$ -glucosidase 효소 활성을 측정하였다 (Table 1). 대부분의 균주가 강하게 산을 생성하는 것으로 볼 수 있었다. 그러나, 균주 번호 19, 30 번 등과 같이 산이 생산이 적은 균주도 있었다. GAM 배지에서 배양시 균체량은 19번과 같이 3.1 mg에서 58과 같이 95.6mg 까지 다양하게 생산하였다. 이 균주들이 isoflavone 배당체들을 전환하는 대표적인 효소인  $\beta$ -glucosidase를 갖는 균주를 선별하기 위해  $\beta$ -glucosidase 활성을 측정하였다. 대부분이 균주가 생산하였지만 작게는 0.012  $\mu$ mol/h/mg 에서부터 다양한 활성을 나타냈다. 그러므로 이 균주들중 활성을 갖는 균주를 선별하였다.

Table 1. Final pH, mass and  $\beta$ -glucosidase activities of tested lactic acid bacteria cultured in GAM broth

Bacterial No.	Final pH	Amount of cultured cells (mg/ml)	$\beta$ -Glucosidase activity ( $\mu$ mol/h/mg wet bacteria)
1	5.1	17.6	0.115
2	5.1	20.9	0.105
3	5.0	23.6	0.091
4	5.1	30.1	0.129
5	5.0	17.5	0.106
6	5.0	16.4	0.121
7	5.1	28	0.132
8	5.1	16.9	0.126
9	5.2	15.8	0.112
10	5.2	16.2	0.116
11	5.2	31.3	0.132
12	5.2	24.2	0.132
13	5.1	26.2	0.132
14	5.1	21.6	0.131
15	5.1	19.1	0.123
16	5.3	14.1	0.131
17	5.4	11.8	0.126
18	6.1	23.3	0.030
19	6.2	3.1	0.012
20	4.7	16.9	0.120
21	4.5	24	0.032
22	4.4	30.5	0.057
23	5.0	29	0.039
24	5.6	16.4	0.046
25	5.1	13.5	0.076
26	5.2	22.3	0.074
27	4.9	24.6	0.060
28	5.8	11.6	0.048
29	5.9	16	0.023
30	6.1	8.5	0.038
31	5.2	26.4	0.060
32	4.9	24.9	0.063
33	5.2	30.2	0.056
34	5.6	13.6	0.131
35	4.7	24.3	0.110
36	5.8	16	0.052
37	5.3	19.3	0.072
38	4.8	24.4	0.059
39	5.5	15.6	0.018
40	5.3	13.8	0.019

Continued			
Bacterial No.	Final pH	Amount of cultured cells (mg/ml)	$\beta$ -Glucosidase activity ( $\mu$ mol/h/mg wet bacteria)
41	4.5	14.8	0.040
42	5.2	21.6	0.148
43	5.3	17.9	0.144
44	5.2	12.7	0.144
45	5.3	15.3	0.085
46	5.2	22.5	0.090
47	5.3	19.1	0.084
48	5.4	21.5	0.109
49	5.6	17.2	0.049
59	4.6	12.5	0.163
51	5.3	20.8	0.158
52	5.2	23	0.158
53	5.2	26	0.152
54	4.6	50.2	0.136
55	4.8	44.5	0.072
56	4.9	41.1	0.071
57	4.5	27.9	0.066
58	4.7	95.6	0.021
59	4.6	84.1	0.014
60	4.7	81.8	0.013
61	4.1	48.5	0.059
62	4.8	38.8	0.039
63	4.7	31	0.055
64	5.3	20.7	0.112
65	5.3	21.2	0.136
66	5.3	16	0.129
67	5.3	17.2	0.129
68	5.3	26.3	0.085
69	5.2	20.4	0.093
70	5.3	20.6	0.136
71	5.3	19.5	0.136
72	5.1	16.8	0.115
73	5.3	23.3	0.114
74	5.3	18.4	0.110
75	5.4	18.9	0.115
76	5.4	18.1	0.113
77	5.5	23.8	0.107
78	5.5	19.2	0.110
79	5.3	21.5	0.124
80	5.4	24.3	0.101

## 2) 콩의 발효 전·후 활성물질의 변화

콩을 잘 발효시키는 균주인 8종(주로 시판 균주로 대부분 효소 활성이 높은 균주)는 시판균주인 *Lactobacillus* 균 4종과 *Bifido*균 4종으로 총 8종이었으며, 균주의 이름은 *Lactobacillus bacteria*는 *L. plantarum*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii subsp. lactis*이었으며, *Bifidobacterium*은 *B. breve* K-110, *B. adolescentis*, *B. breve*, *B. thermophilum*이었다. 이들 균주의  $\beta$ -glucosidase활성과 성장 속도는 그림 2에 나타내었다. Fig. 2에서 *delbrueckii subsp. lactis* 과 *B. breve*, *B. thermophilum* 등이 비교적  $\beta$ -glucosidase의 활성도가 높은 균주로 관찰되었으며, 발효 18 - 24 시간 후 대수기에 접어듦을 알 수 있었다.

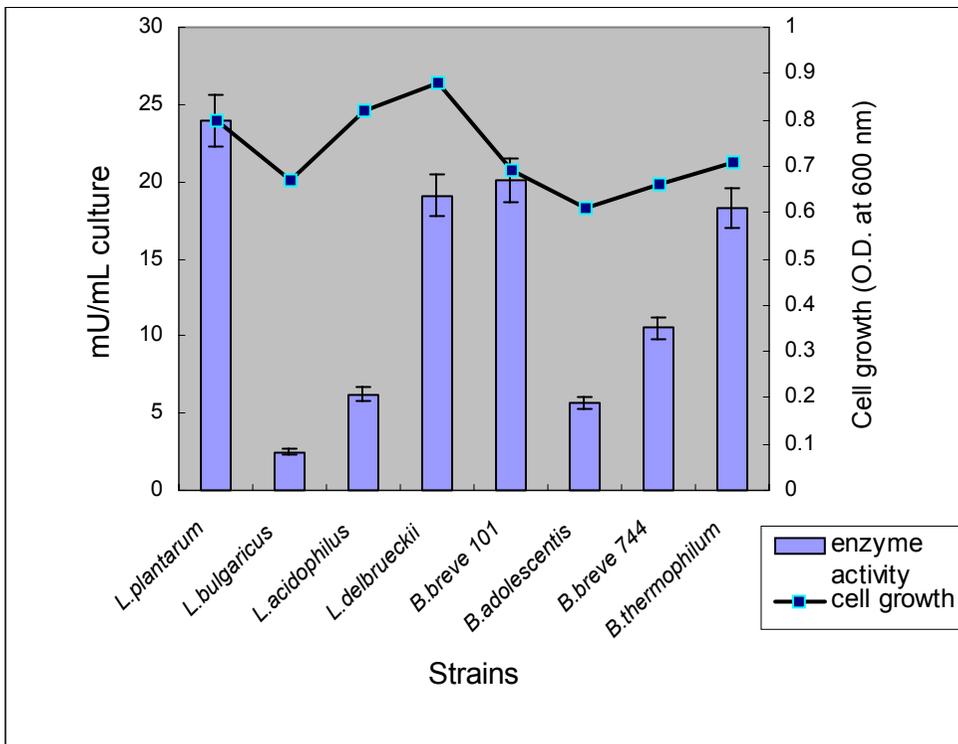


Fig. 2.  $\beta$ -Glucosidase activity and cell growth of some bacterial strains after 24 h of cultivation at 37 °C

24 시간과 48 시간 발효후 효소활성의 변화를 나타낸 Fig. 3에서 *Lactobacillus plantarum* 와 *Bifidobacteria breve* 은 다른 균주보다 높은 glucosidase 효소 활성을 보였으며, 특히 *L. plantarum* KFRI 균주가 가장 높은 효소활성을 보였다.

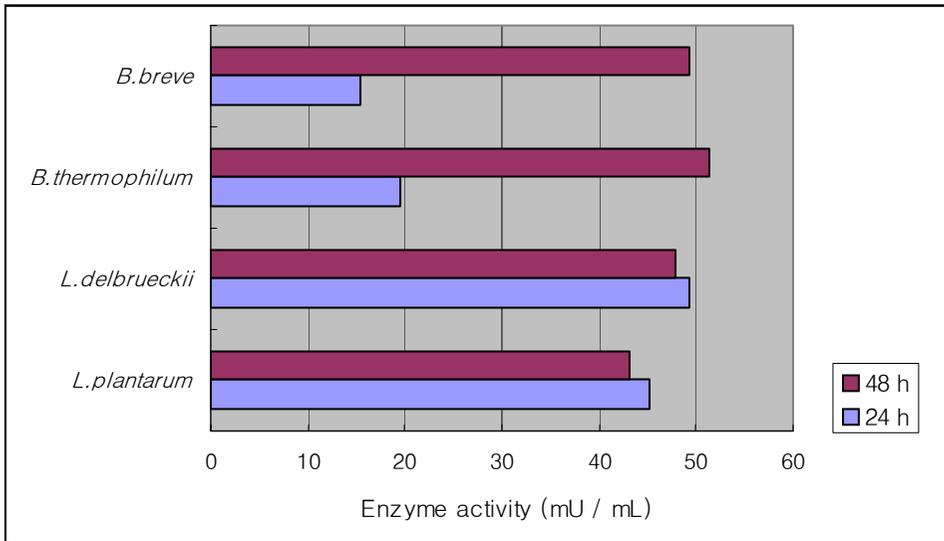


Fig. 3.  $\beta$ -Glucosidase activity from *Lactobacillus* and *Bifidobacteriain* soybean fermentation for 48 h at 37 C

최근 Jeon 등(2002)은 *Bifidobacterium* sp. Int-57은 BHI medium에서 *Bifidobacterium* 균주중 가장 높은 glucosidase 활성을 보였다고 보고하였으며, Tochikura et al. (1986)는 그들의 시험에서 *Bifidobacteria* 는 *Staphylococcus*, *Escherichia coli*, *Proteus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* 보다 높았다고 보고한바 있다.

콩에 4가지 유산균주를 접종하여 37도에서 48시간 동안 발효시킨 콩 발효물의 pH와 적정산도는 Table 2와 같이 나타났다.

Table 2. pH and titratable acidity in fermented soybean with lactic acid bacteria at 37. C for 48h.

Strains	pH		Acidity(% lactic acid)	
	24hr	48hr	24hr	48hr
Control	6.2	6.3	0.2	0.2
<i>L. plantarum</i>	5.6	5.5	0.4	0.4
<i>L. delbrueckii subsp. lactis</i>	4.4	4.1	1.2	1.3
<i>B. breve K-110</i>	5.8	4.9	0.5	0.7
<i>B. thermophilum</i>	5.9	4.0	0.5	1.5

콩발효물의 pH와 산도 측정의 결과, 유산균주를 접종하지 않은 시료에 비해 유산균발효로 인한 유기산 생성을 확인할 수 있었다. 그러나 발효시간에 따른 변화는 *Lactobacillus* 균주의 시료에서는 차이가 없었으나 *Bifidobacteria*균주의 시료는 24시간 발효보다 48시간 발효물의 유기산 생성량이 높게 나타나 *Bifidobacteria*의 발효속도는 서서히 진행되는 것으로 나타났다. 특히 *B. thermophilum*균주의 48시간 발효물은 24시간 발효물에 비해 급격히 pH가 낮아지는 것으로 나타나 균주의 활성에 시간이 필요함을 알 수 있었다. 그러나 *L. delbrueckii subsp. lactis* 균주의 시료는 24시간 발효에 이미 pH가 4.4로 떨어져 더 이상 유산 발효가 진행되지 않은 것으로 나타나 발효시간의 단축이 필요한 것으로 사료되었다.

4가지 균주 중 콩발효물의 pH와 산도 측정의 결과, 유산균주를 접종하지 않은 시료에 비해 모두 유산균발효가 확인되었다.

### 3) Isoflavones의 추출 및 HPLC 분석

콩발효 추출물의 비배당체 이소플라본의 가수분해 생성물은 발효시간 48시간에서 4개의 유산균주를 접종한 시료 모두, 대조군에 비해 8배이상

의 고효율적인 가수분해율을 나타냈다.

Fig. 4와 5의 HPLC-chromatogram에서 보듯이 유산균 발효가 적용되지 않은 대조군 발효추출물의 이소플라본 배당체 화합물은 모두 검출되었으나, *L. plantarum*의 발효물은 대조적으로 배당체 화합물이 검출되지 않은 반면 생체유용 활성성분인 비배당체 화합물 즉, phytoestrogens의 검출량은 높게 측정되었다.

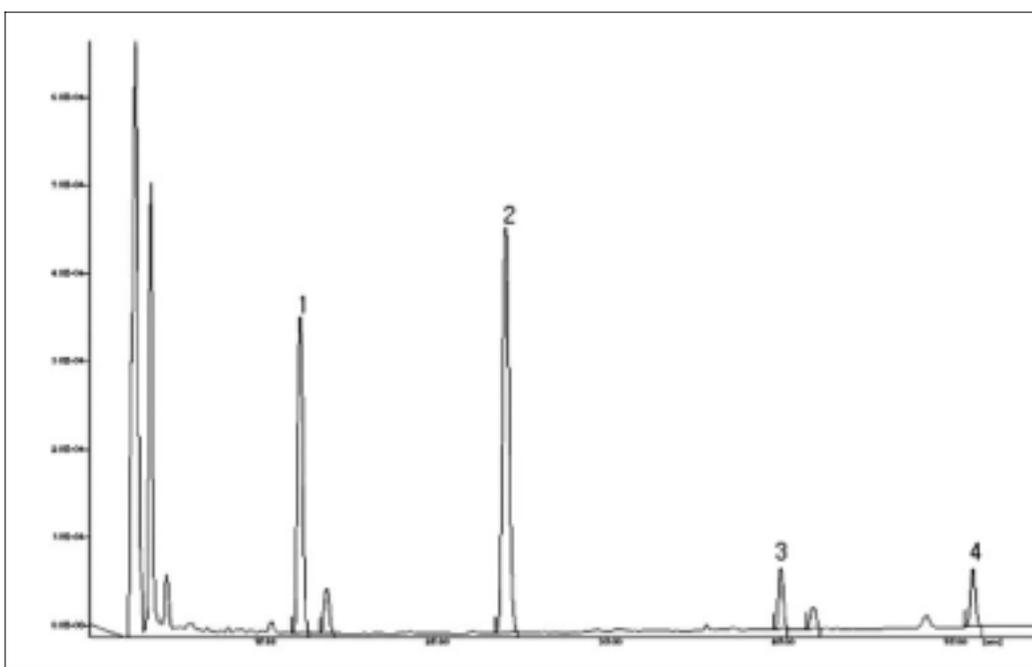


Fig. 4. HPLC chromatogram of isomeric isoflavones in 80% methanolic extract of fermented soybean without lactic acid bacteria at 37C for 48hr. (1: daidzin, 2: genistin, 3: daidzein, 4: genistein)

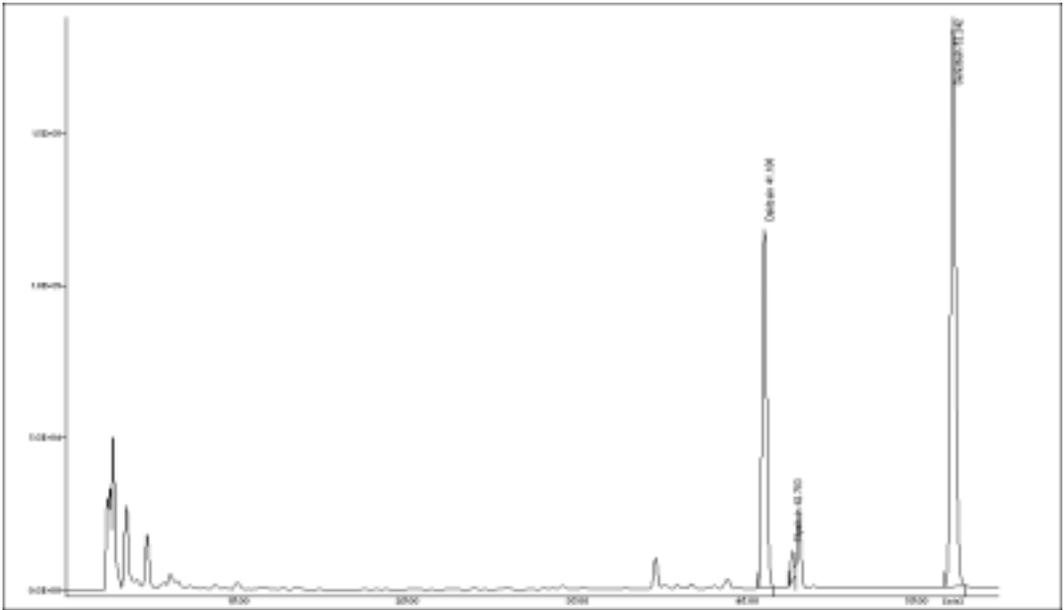
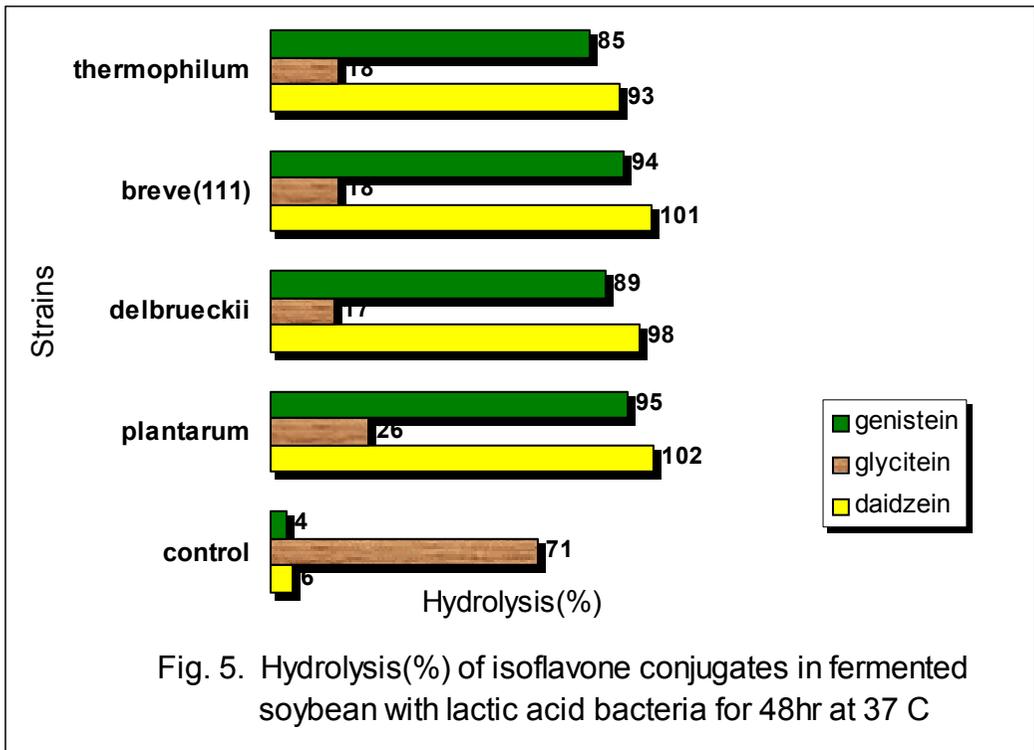


Fig. 5. HPLC chromatogram of isomeric isoflavones in 80% methanolic extract of fermented soybean with *L. plantarum* at 37C for 48hr. (1: daidzin, 2: genistin, 3: daidzein, 4: genistein)

그러나 Fig. 6.에서 보듯이 48시간 동안의 발효는 daizein과 genistein의 가수분해 생성율을 대부분 90%이상 증가시켰으나, glycitein의 양은 오히려 감소된 것으로 나타나, 48시간의 발효시간은 glycitein에 대해서는 오히려 손실량을 유도할 수 있을 것으로 사료되었다. 유산균발효에 의한 콩 발효물에 함유된 3가지 phytoestrogenic 물질 중에서 가장 효율적인 가수분해율을 나타낸 화합물은 daidzein으로 나타났다.

특히 *B. breve* k-110와 *L. plantarum*의 발효 추출물은 daidzein의 생성율이 각각 101%와 102%로 나타나, 유효 적절한 발효기법은 특정의 유용성분을 증강시킬 수 있을 것으로 기대된다.



전체적인 콩 발효 추출물의 phytoestrogenic material의 생성률은 *L. plantarum* > *B. breve* > *L. delbrueckii subsp. lactis* > *L. thermophilum*의 순서로 높게 나타났다.

발효시간에 따른 가수분해도는 Fig. 7에 나타난 바와 같이 발효 24시간에서는 *L. plantarum* > *B. breve k-110* > *L. delbrueckii subsp. lactis*가 90% 이상 *B. breve*와 *B. thermophilum*은 47%와 62%를 나타내어 lactobacillus 계열이 가수분해도는 빨랐고, 발효 48시간에는 사용균주 모두 가수분해도를 거의 100%를 나타내어 발효 48시간 이내에 콩에 존재하는 isoflavonoid 전환율은 100% 가능할 것으로 판단되었다.

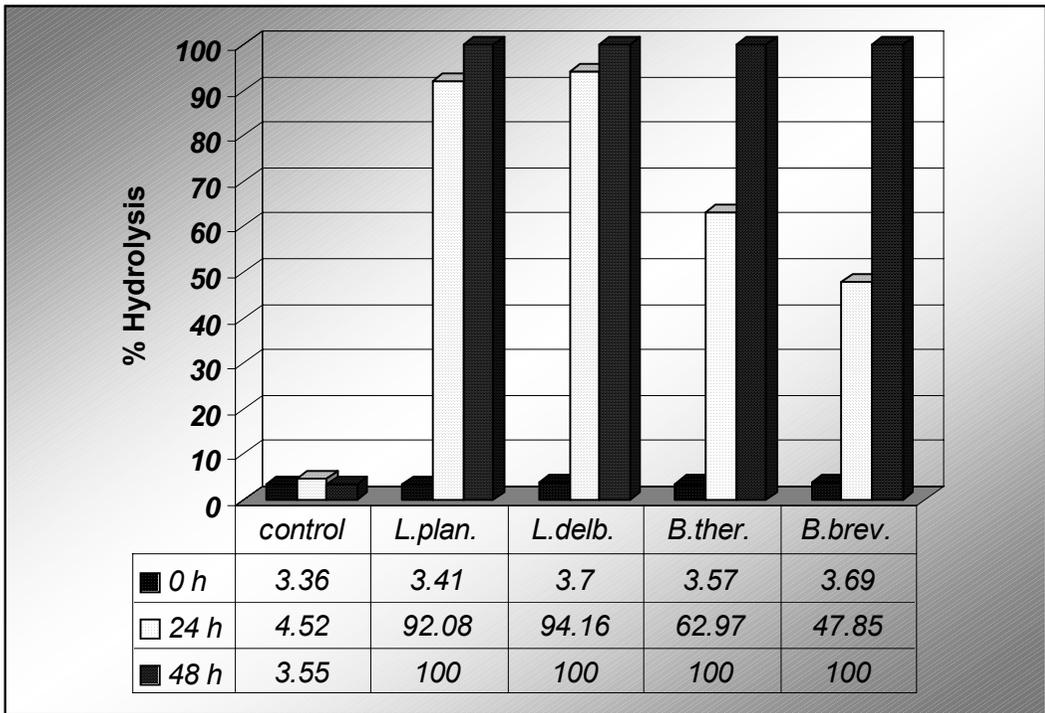


Fig. 7. Hydrolysis (%) of isoflavone conjugates in soybean fermented with lactic acid bacteria for 48 h at 37 °C.

Table 3은 발효시간에 따른 Daidzin, Genistin이 phytoestrogen으로 알려진 Daidzein, Genistein으로의 전환된 함량을 나타낸 것으로 발효전 Daidzin은 451.9mg에서 유산균으로 24시간 발효후 0 - 315mg/g을 나타내었으나 아글리콘인 diadzein 발효 24시간에서 696.5 - 1434.1mg/g이었으며, 발효 48시간후에는 1416 - 1591mg.g으로 증가하여 유산균에 의해 diazin에 부착되어 있는 당이 발효과정중 이용함을 알 수 있다. 또한 발효전 Genistin은 772.7mg/g이었으나, 유산균으로 24시간 발효후 85.3 - 430mg/g을 나타내었으나, 그아글리콘인 genistein은 발효 24시간에서 445.9 - 621.1mg/g이었으며, 발효 48시간후에는 727.4 - 858.7mg.g으로

증가하여 daidzin처럼 유산균에 의해 geintin에 부착되어 있는 당이 발효 과정중 이용함을 알 수 있다. 전반적으로 락토바실러스 유산균이 비피도 박테리아 유산균보다 발효 24시간이내에 전환율이 높게 나타났다. 콩과 콩제품에 함유된 isoflavones의 함량은 0.1-5 mg /g (Coward et al., 1993)으로 알려져 있다. 본 실험에 사용한 국내산 콩 ( 백태, 강원도 평창산, 2002 ) 의 이소플라본 함량(daidzin+ genistin+daidzein + genistein) 은 1.18 1.28 mg/g 으로 나타났다. 국내산 콩 품종을 대상으로 한 이소플라본의 함량은 Chio 등 (1996)에 의해 각 각 46-232mg%, 46-418mg% 범위로 보고되었다. 이소플라본의 함량과 조성은 품종 및 재배환경에 따라 큰 차이가 있는 것으로 알려져 있다. 최 등은(1999) 두유에 존재하는 daidzin과 genistin은 *L.bulgaricus* KCTC 3188, *L. casei* KCTC 3109, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* KCTC 1058, and *L. lactis* KCTC 2181로 발효 시 가수분해율은 99.8 - 104.7 % 이었다고 보고하였다.

Table. 3. Changes of isomeric isoflavones in soybean fermented with lactic acid bacteria for 48 h at 37C ( unit : mg /g dry weight )

Strains	Hr*	Conjugated Isoflavones			Unconjugated Isoflavone		
		Daidzin	Genistin	Total	Daidzein	Genistein	Total
Control	0	451.9	772.7	1224.6	15.8	26.8	42.6
	24	451.1	807.9	1259.0	35.3	24.3	59.6
	48	436.9	866.2	1303.1	36.1	11.9	48.0
<i>L. plantarum</i>	0	352.7	798.5	1151.2	11.3	29.4	40.7
	24	18.9	85.3	104.2	669.3	542.9	1212.2
	48	nd	nd		727.4	688.4	1416.2
<i>L. delbrueckii</i> <i>subsp. lactis</i>	0	349.5	790.6	1140.1	12.6	31.2	43.8
	24	nd	89.0	89.0	813.0	621.1	1434.1
	48	nd	nd		741.8	801.1	1542.9
<i>B. thermophilum</i>	0	435.9	801.8	1237.7	15.6	30.2	45.8
	24	220.1	290.5	510.6	336.6	531.6	868.2
	48	nd	nd		773.5	817.5	1591.0
<i>B. breve</i> K-110	0	402.1	794.8	1196.9	17.2	28.6	45.8
	24	315.7	443.5	759.2	250.6	445.9	696.5
	48	nd	nd		858.7	666.7	1525.4

\* : Fermentation time, nd : not detected, All data are expressed as mean (n=2, coefficient variation = 9.3 %)

#### 4) 콩 isoflavone의 에스트로젠상 효과

콩에 존재하는 isoflavone의 대표적인 성분인 genistein과 genistin의 에스트로젠상 효과를 측정하였다(Fig. 8). Fig. 8에서 보는 것같이 estrogen 상호작용을 나타냈으나 genistin 보다는 genistein이 더 우수한 estrogenic 효과를 나타냈다. 1 mM 전후에서 가장 강한 효과를 나타냈으며 이 보다 높은 농도에서는 estrogenic 효과를 나타내지않았다. 이러한 결과는 MCF7 cell에 대해 cytotoxicity를 나타냈기 때문으로 생각된다.

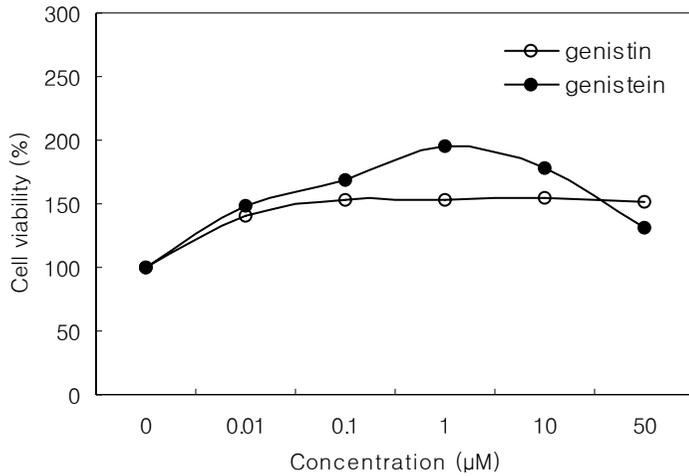


Fig. 8. Estrogenic effects of a representative isoflavone genistin and its metabolite genistein by the representative lactic acid bacteria.

결론적으로 선택된 4종의 유산균은 37도의 48시간 발효조건에서, 콩에 함유된 이소플라본 배당체, daidzin과 genistin을 완전히 가수분해시켜, 생체유용성 물질인 daidzein과 genistein으로 전환시켰으며, 시판중으로 균주가 확인된 Lacto균 즉, *L. plantarum* 와 *L. delbrueckii* subsp. *lactis* 의 가수분해율은 24시간 발효 후, 각각 92.08%, 94.16% (Fig. 5)를 나타내어 Bifido균인 *B. thermophilum* (62.97%) 과 *B. breve* K-110 (47.85%)보다 빠르게 진행되는 것으로 비교되었다. 이 같은 결과는 Fig. 3에서 보는 바와 같이 각 균주의  $\beta$ -glucosidase의 활성과 관계되는 것으로 설명할 수 있다. 각 시료의 발효전 총 이소플라본의 함량 (1183.9 - 1283.5 g /g) 보다 발효후의 함량 (1351.1 - 1591.0 g /g) 이 증가된 것은 시료 중의 malonyl- 혹은 acetyl-glucosides 가 가수분해되어 비배당체인 해당 화합물로 전환하였기 때문으로 추정된다. 일반적으로 콩의 가공과정 중의 열처리되는 isoflavones의 malonyl-과 acetyl-유도체의 당결합을 분

해하는 것으로 알려졌다 (Wang et al. 2003). 따라서 본 실험에 사용한 4가지 유산균주인 *L. plantarum*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, *B. thermophilum*, 그리고 *B. breve* K-110균주의 각  $\beta$ -glucosidase는 37도, 48시간의 발효조건에서 콩 시료에 함유된 isoflavone glucosides의 glucosyl bond를 완전히 가수분해하여, 생체 유용성분인 genistein과 daidzein을 성공적으로 전환시키는 유용균주로 나타났다.

나. 갈근과 갈화를 이용한 phytoestrogen 활성 소재의 개발

1) 갈근과 갈화의 발효 전·후 특성 변화

가) 갈근 및 갈화의 유산균 발효 전·후 에스트로젠상 효과

갈근에 존재하는 대표적인 isoflavone인 daidzine, daidzein, puearine 과 여성호르몬인 estradiol의 에스트로젠상 효과를 비교한 결과는 Fig. 9와 같았다. 이들 isoflavone중 estrogenic activity가 가장 높게 나타난 것은 daidzein이었다. Daidzein은 0.1 mM에서 MCF-7 cell의 증식을 1.7배 증가 시켰다. 그러나 puearin과 daizin은 거의 증가하지 않았다. Puearine은 장내세균에 의하여 daidzein으로 전환된다고 알려져 있어 유산균에 의해 puearine을 가수분해 시킬 수 있어야 할 것으로 사료되었다.

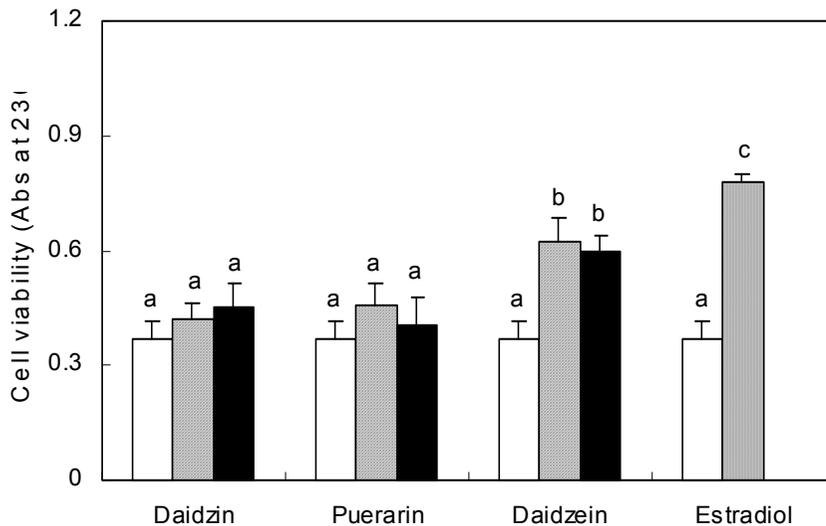


Fig. 9. Estrogenic Effect of Puerarin, Daidzin and Their metabolite Daidzein in MCF-7 Cells using the E-SCREEN assay. All samples were dissolved, treated 0.1 mM (▨) or 1 mM (◑) of each tested agent, 10 (◑) of 17 $\beta$ -estradiol, in MCF-7 cells in MCF-7 cells and assayed, as described. All values are means  $\pm$  S.D. (n=2). <sup>a,b,c,d</sup>Items with the same letter are not significantly different.

한편 갈화에 존재하는 대표적인 isoflavone인 Kakkalide와 그 분해물인 Irisolidone과 Tectoridin과 그 분해물인 Tectorigenin의 에스트로젠상 효과를 비교한 결과는 Fig. 10과 11과 같았다. Fig. 10에서 estrogenic activity는 Kakkalide보다 그 분해물인 Irisolidone이 강하게 나타났다. Irisolidone은 10 mM에서 MCF-7 cell의 증식을 1.9배 증가 시켰으며, 여성호르몬제로 사용하는 estradiol의 10 nM 농도와 유사한 효과를 보였다. Fig. 11에서 Tectoridin과 그 분해물인 Tectorigenin에서는 Tectorigenin이 Tectoridin보다 MCF-7 cell의 증식을 촉진하였으나, Irisolidone보다 강하지 않았다. 갈화에 존재하는 isoflavone중 estrogenic activity가 가장 높게 나타난 것은 Irisolidone이었으며, Irisolidone은 장내세균에 의하여

Kakkalide에서 전환된다고 알려져 있어 유산균에 의해 Kakkalide를 생물 전환 시킬 수 있어야 할 것으로 사료되었다.

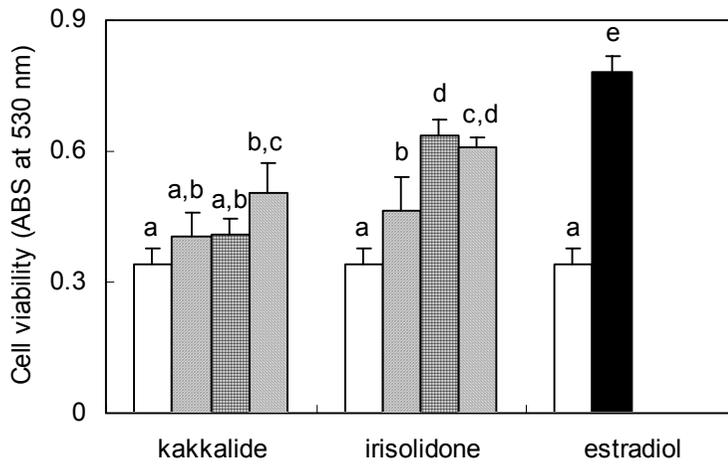


Fig. 10. Estrogenic Effect of Kakkalide and its Metabolite Irisolidone in MCF-7 Cells using the E-SCREEN assay. All samples were dissolved and treated with 0.1 mM (▨), 1 mM (▩), or 10 mM (▩) of each test agent, 10 nM (■) of 17 $\beta$ -estradiol, or vehicle alone (□) in MCF-7 cells and assayed. All values are mean  $\pm$  S.D. (n=3). Those with the same letter are not significantly different at  $p < 0.05$ .

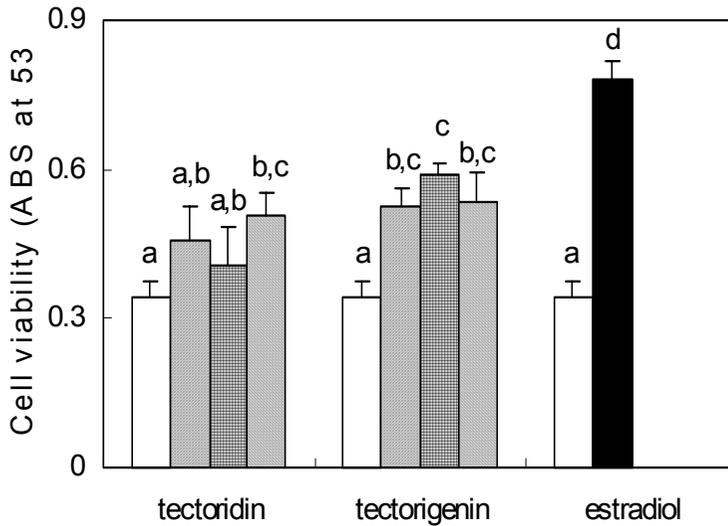


Fig. 11. Estrogenic Effect of Tectoridin and its Metabolite Tectorigenin in MCF-7 Cells using the E-SCREEN assay. All samples were dissolved and treated with 0.1 mM (▨), 1 mM (▩), or 10 mM (▩) of each test agent, 10 nM (■) of 17 $\beta$ -estradiol, or vehicle alone (□) in MCF-7 cells and assayed. All values are mean  $\pm$  S.D. (n=3). Those with the same letter are not significantly different at  $p < 0.05$ .

예비적으로 콩에서 발효가 잘되었던 8종의 균을 갈화 및 갈근에서 발효시켰을 때 발효가 잘 이루어지지 않아 다른 유산균을 선발하여 사용하였다. 즉 Table 1에 유산균 중 *Bifidobacterium* K-110, K-111 및 *Lactobacillus acidophilus*로 갈근에 존재하는 대표적인 isoflavone의 발효산물을 조사한 결과를 나타내었다. 갈근에 존재하는 puerarin과 daidzin을 대사할 수 있는 유산균은 *Bifidobacterium* K-110, K-111 및 *Lactobacillus acidophilus*로 나타났다(Table 4). 주요 생물전환 대사물질

은 daidzein으로 전환 물질의 90% 이상으로 나타났으며, calycosine은 10% 이하였다. Puerarin보다 daidzin이 쉽게 생물전환 되어 daidzein으로 전환됨을 알 수 있었으며, 이들 전환율은 유산균에 따라 차이가 있었다. Yasuda 등(1995, 1998)은 쥐에게 puerarin과 daidzin을 구강으로 투여하였을 때 소변에서 검출되는 대사물질로 daidzeine이었다고 하였다. 이들은 또한 puerarin을 투여한 쥐보다 daidzin을 투여한 쥐의 소변에서 daidzein 함량이 높았다고 하였다. 갈근에는 4.5%의 puerarin과 0.3%의 daidzin이 존재한다. 갈근에 존재하는 isoflavone 함량에 비추어, daidzin보다 puerarin이 가수분해되어야 할 것으로 생각되었다. 더욱이 daidzein은 항산화 및 항알러지 효과가 있는 것으로 보고되고 있으며, 이러한 효과는 daidzein이 puerarin과 daidzin보다 큰 것으로 보고되어 있다.

Table 4. The Activities of Lactic Acid Bacteria Metabolizing Puerarin or Daidzin

Microbe	Metabolic activity ( $\mu\text{mole/h/g}$ wet weight)			
	Puerarin		Daidzin	
	to daidzein	to calycosin	to daidzein	to calycosin
<i>Bifidobacterium longum</i>	7.4	-	45.5	-
<i>Bifidobacterium breveK-111</i>	-	-	58.3	-
<i>Bifidobacterium breveK-110</i>	15.5	1.2	65.7	3.6
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	-	-	28.9	-

<sup>a)</sup> Not detected.

갈근 추출물을 유산균의 종류에 따라 발효시킨 발효물의 estrogenic effect를 조사한 결과는 Fig. 12에 나타내었다.

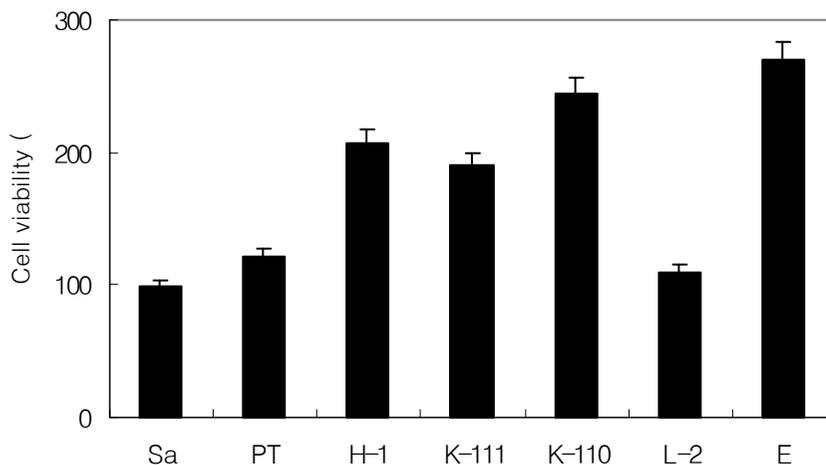


Fig. 12. Effect of lactic acid bacteria on Estrogenic Activity of *Pueraria thunbergiana*(PT) extract. PT extract (0.5 g), which was extracted with water, was incubated with 0.5 g (wet weight) of lactic acid bacteria : *Bifidobacterium longum* (H-1), *Bifidobacterium breve K-111* (K-111), *Bifidobacterium breve K-110* (K-110), *Lactobacillus acidophilus* (L-2) in 50 ml of a reaction mixture adjusted to pH 7 with 0.05 M NaOH for 12 h at 37°C, then extracted with ethyl acetate and evaporated. PT indicates extract of *Pueraria thunbergiana* incubated without LAB and Sa is normal control group treated with saline alone without PT. The resulting extract was used as a sample. All samples were dissolved, treated 0.1 mg/ml of transformed extract, 10 of 17 $\beta$ -estradiol or vehicle alone in MCF-7 cells and assayed, All values are means  $\pm$  S.D. (n=3). <sup>a,b,c,d</sup>Items with the same letter are not significantly different.

발효전 갈근 추출물에 비하여 발효 갈근 추출물이 MCF-7 cell의 증식을 증가시켰다. *B. breve* K-110으로 갈근 추출물을 발효시킨 것이 다른 유산균으로 발효시킨 것 보다 MCF-7 cell의 증식을 증가시켜, 사용한 유산균 중 *B. breve* K-110이 가장 좋게 나타났다. 결론적으로 갈근 추출물을 유산균으로 발효시키면 MCF-7 cell의 증식을 촉진시키므로, 갈근 발효물은 갱년기 예방 소재로 활용할 수 있을 것으로 생각되었다. Estrogen-response gene의 activator로 daidzin, puerarin, daidzein, 17 $\beta$ -estradiol의 potential을 조사한 결과는 Fig. 13과 같았다. MCF-7 cell에서 제조한 total RNA에 대한 RT-PCR로 steady-state c-fos mRNA를 조사한 결과, internal control로 사용한 GAPDHmRNA가 지속적으로 나타났다. 17 $\beta$ -estradiol을 처리한 후에도 c-fos mRNA expression이 유도되었다. 이들 갈근 발효 산물은 c-fos gene의 transcription도 활성화 시켰다. Endogeneous estrogen responsive gene의 유도를 조사하기 위해 immunoblot 분석으로 PR protein level을 조사한 결과(Fig 13-C), 17 $\beta$ -estradiol과 daidzein을 처리하였을 때, PR protein level도 증가하였다. Beck et al.(2005)은 direct-receptor interaction없이 genistein은 ER-mediated transcription을 활성화시키며, Lehmann 등은 daidzein은 장내 미생물에 의해 다시 equol로 대사되어 강력한 estrogenic effect를 보인다고 하였다. 따라서 갈근 추출물을 유산균으로 발효시키면 estrogenic effect가 상승하는 결과는 이들의 연구 결과와 유사하다고 할 수 있었다.

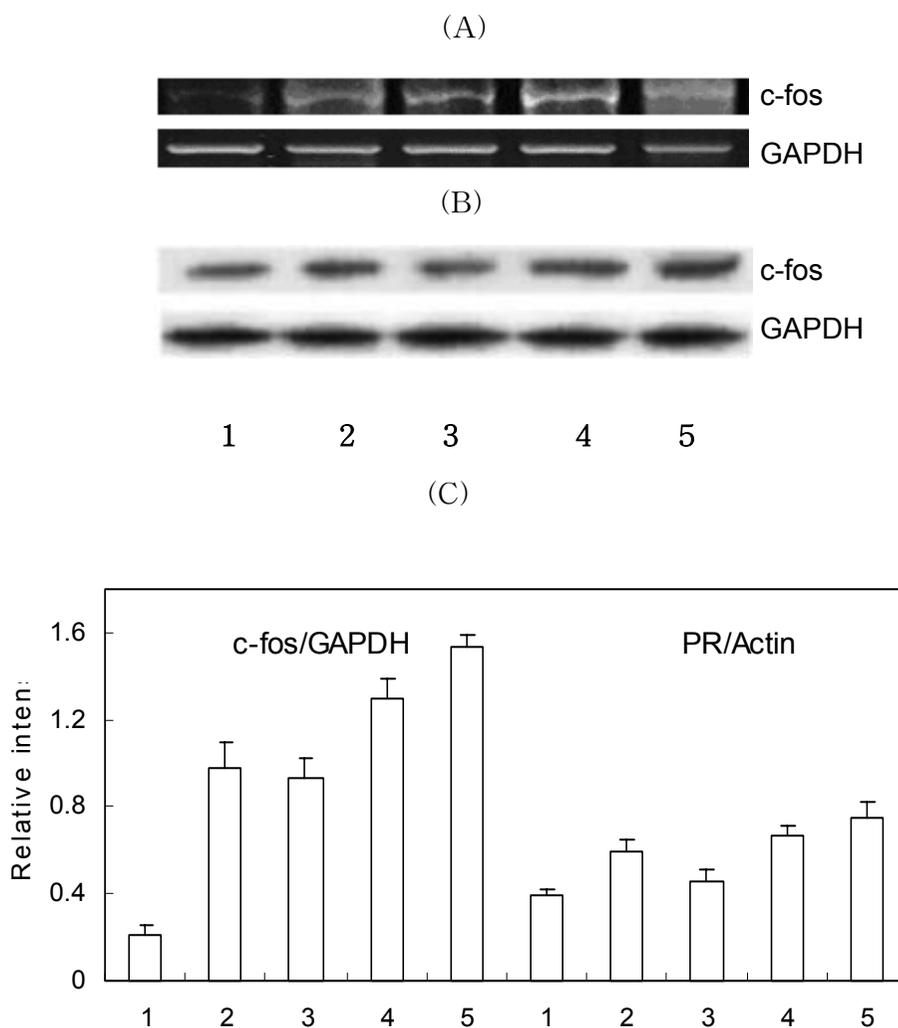


Fig. 13. The Effect of Puerarin, Daidzin, and Their Metabolites on the Expressions of Estrogen-Responsive Genes in MCF-7 Cells. MCF-7 cells were treated with a vehicle alone, 10 mM of each tested agent or 1017b-estradiol for 24as indicated. (A) Total RNA, prepared from each treatment, was analyzed for the steady-state c-fos mRNA level, using RT-PCR assays, with constitutively expressed GAPDH mRNA used as a control. (B) Immunoblot of the PR protein from protein samples treated as above. (C), Relative intensities of RT-PCR (c-fos/GAPDH) and immunoblot products(PR protein / $\beta$ -Actin).1, normal; 2, daidzin; 3, puerarin; 4, daidzein; 5, 17b-estradiol.

갈화에 존재하는 주요 isoflavonoid인 Kakkalide와 Tectoridin 을 대사할 수 있는 유산균은 *Bifidobacterium* K-110, K-111 및 *Lactobacillus acidophilus*로 나타났다(Table 5). 주요 생물전환 대사물질은 Irisolidone으로 Kakkalide가 가수분해되어 Kakkalidone과 Irisolidone을 생성하며, Tectoridin 은 Tectorigein으로 전환되었다. *Lactobacillus acidophilus*는 Tectoridin을 가수분해하나, Kakkalide 가수분해율은 낮게 나타났다. Kakkalide를 가수분해하는 유산균은 *B. breve* k-110으로 나타났다. 갈화에는 Kakkalide의 함량이 3%, Tectoridin 함량은 0.3% 함유되어 있는 주요 isoflavone이다. Kakkalide와 Tectoridin을 강하게 생물전환할 수 있는 유산균은 *B. breve* k-110이었다.

Table 5. The Activities of Lactic Acid Bacteria Metabolizing Kakkalide and Tectoridin

Strains	Hydrolyzing Activity ( $\mu\text{mol/h/mg}$ )		
	Kakkalide		Tectoridin
	Kakkalidone	Irisolidone	Tectorigein
<i>B. breve</i> K-110	0.82	0.75	1.80
<i>B. breve</i> K-111	0.78	0.69	1.75
<i>B. longum</i>	0.39	0.12	9.8
<i>L. acidophilus</i>	0.01	-.06	1.05

Fig. 14에서 갈화 유산균 발효물은 발효전에 비하여 MCF-7 cell의 증식을 더욱 촉진하였으며, 사용한 유산균 중 *B. breve* k-110이 가장 좋게 나타났다. *B. breve* k-110은 발효 과정중 Kakkalide를 irisolidone으로 대사시키므로 MCF-7 cell를 증식하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 갈화추출물이 나타내는 estrogenic effect는 tectoridin보다 kakkalide가 어떻게 대사되느냐에 따라 달라진다고 할 수 있다. 이러한 이유는 갈화의 주성분이 tectoridin이 아니라, kakkalide이기 때문이다.

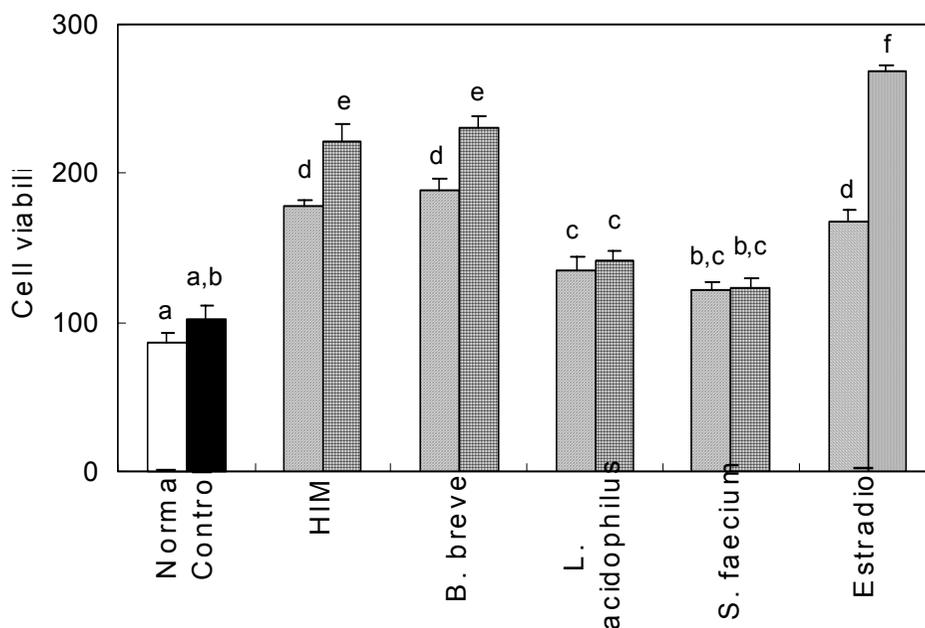
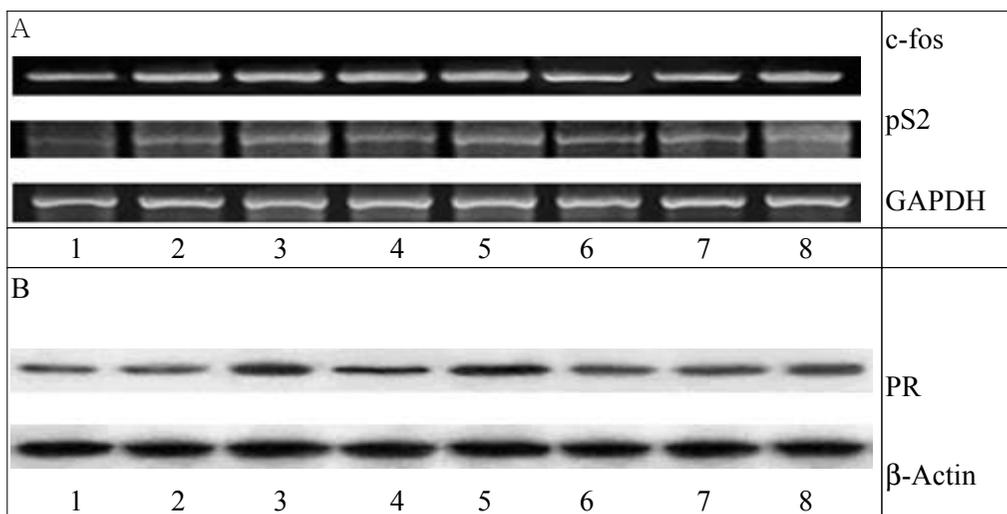
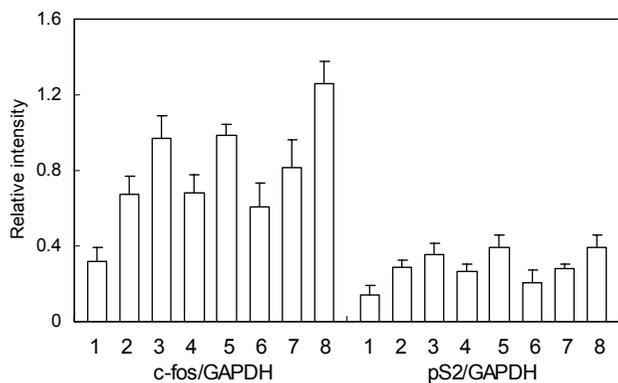


Fig. 14. Effect of Kakkalide-hydrolyzing lactic acid bacteria on Estrogenic Activity of Puerariae Flos (PF). PF extract (0.5 g) extracted with water was incubated with 0.5 g(wet weight) of human fecal suspension (or isolated bacteria) in 50 ml of areaction mixture adjusted to pH 7 with 0.05 M NaOH at 37°C for 12 h,then extracted with ethyl acetate and evaporated. The resulting extract wasused as a sample. All samples were dissolved and treated with 1 mg/ml(▨), or 10 mg/ml (▩) of PF extract treated withhuman intestinal microflora (HIM) or intestinal bacteria, 1 nM (▧) or10 nM (▦) of 17b-estradiol,10 mg/ml of PF extract (■), or vehicle alone (□) inMCF-7 cells and assayed. All values aremean ± S.D. (n=3). Those with the same letter are not significantly different at  $p < 0.05$ .

Fig. 15는 Estrogen-response gene의 activator로 Kakkalide, Tectoridin과 그 대사산물, 17 $\beta$ -estradiol의 potential을 조사한 결과이다. MCF-7 cell에서 제조한 total RNA에 대한 RT-PCR로 steady-state c-fos mRNA를 조사한 결과, internal control로 사용한 GAPDHmRNA가 지속적으로 나타났다. 17 $\beta$ -estradiol을 처리한 후에도 c-fos mRNA expression이 유도되었다. 이들 갈화 발효 산물은 c-fos gene의 transcription도 활성화 시켰다. Endogeneous estrogen responsive gene의 유도를 조사하기 위해 immunoblot 분석으로 PR protein level을 조사한 결과(Fig 15-C), 17 $\beta$ -estradiol과 daidzein을 처리하였을 때, PR protein level도 증가하였다. 특히 irisolidone은 강하게 transcription하였다. 이와 Han 등(2003)은 갈화에서 분리한 kalkalide를 장내미생물로 대사시켜 구강으로 쥐에게 투여하였을 때, irisolidone으로 혈액내로 흡수가 된다고 하였다. Irisolidone은 간 보호효과와 알콜 해독 효과도 있다고 알려져 있다 Han 등(2003). Tectorigenin도 tectoridin보다 간보호효과가 크다고 보고되어 있다 Han 등(2003). 따라서 본연구에서 갈화를 *B. breve* K-110으로 발효시키면, kakkalide와 tectoridin은 irisolidone과 tectorigenin으로 대사되며, 여기에 관여하는 효소는 D-xylosidase가 관여한다고 알려져 있다 (Park et al 1998). 따라서 갈화 추출물을 유산균으로 발효시키면 estrogenic effect가 상승하는 결과는 이들의 연구 결과와 유사하다고 할 수 있었다.



C



D

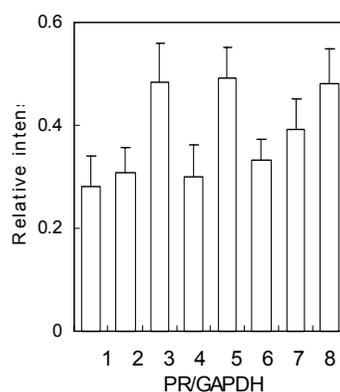


Fig.15. The Effect of Kakkalide, Tectoridin, and their Metabolites on Expression of Estrogen-responsive Genes in MCF-7 Cells. MCF-7 cells were treated with vehicle alone, 10 mM of each tested agent or 10 nM 17 $\beta$ -estradiol for 24 h as indicated. (A) Total RNA prepared from each treatment, was analyzed for steady-state mRNA levels of c-fos and pS2 by RT-PCR assays with constitutively expressed GAPDH mRNA used as control. (B) Immunoblot of the PR protein from protein samples

treated as above. (C) Relative intensities of (A)RT-PCR products (c-fos or pS2/GAPDH). (D) Relative intensities of (B)immunoblot products (PR protein/b-actin). 1,normal; 2, tectoridin; 3, tectorigenin; 4, kakkalide; 5, irisolidone; 6,Puerariae flos (PF) extract; 7, PF extract metabolized with human intestinalmicroflora; 8, 17 $\beta$ -estradiol. All values are mean  $\pm$ S.D. (n=2).

다. Phytoestrogenic activity를 강화한 소재의 제조

1) Phytoestrogen 전환 적정 조건의 선정

가) 환원제의 첨가

*B. breve* k-110의 발효 추출물은 daidzein의 생성율이 100%로 나타났으며, 갈근과 갈화에서도 발효가 잘 일어나, 특정의 유용성분을 증강시킬 수 있을 것으로 판단되어 *B. breve* k-110의 적정 조건을 조사하였다. 생육시에 혐기적인 환경이 요구되는 bifidobacteria는 환원제의 첨가로 유리한 증식 조건을 조성하는 필요한 요소 중 하나이다. 콩분쇄물에 환원제로서 0.1% ascorbic acid 및 0.005% cystein-HCl을 첨가하여 *Bif. breve* k-110의 증식에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 6과 같다. 생균수는 대조군인 경우 발효물 1g당  $2.70 \times 10^7$ 이며, ascorbic acid 첨가한 경우  $5.33 \times 10^7$ 로 나타나 환원제인 ascorbic acid를 첨가하였을 때 균수가 증가하였다. Ascorbic acid를 첨가한 경우, *Bif. breve* k-110의 colony형태가 분명하고, 윤기 있는 형태를 띄고 있었다. 그러므로, 이후 실험 진행에 ascorbic acid를 첨가하여 진행하였다.

Table 6. Properties of soybean fermented products by addition of reducing agents using *Bif. breve k-110*

Reducing agents	pH	Acidity (%)	Microbial accounts (cfu/g)
Control	5.29	0.474	$2.70 \times 10^7$
Ascorbic acid <sup>1)</sup>	4.85	0.812	$5.33 \times 10^7$
Cystein-HCl <sup>2)</sup>	5.15	0.560	$4.97 \times 10^7$

<sup>1)</sup>0.1%, <sup>2)</sup>0.005%

나) 첨가 성분의 최적화

(1) 탄소원

Table 7에서 처럼 lactose 첨가에 의해 균수의 증식이 가장 많이 되었다.

Table 7. Properties of soybean fermented products by addition of carbohydrates using *Bif. breve k-110*

Carbohydrates	pH	Acidity (%)	Microbial accounts
			(cfu/g)
Control	5.61	1.462	$2.02 \times 10^7$
Glucose	5.56	1.370	$3.26 \times 10^8$
Lactose	5.59	1.406	$7.40 \times 10^9$
Maltodextrin	5.56	1.389	$3.30 \times 10^7$
Raftiline	5.55	1.167	$2.67 \times 10^8$
Raftimix	5.55	1.434	$1.90 \times 10^8$
Trehalose	5.55	1.404	$2.13 \times 10^8$

## (2) 질소원

Table 8에서 처럼 대조구 균수가  $10^7$ 에 비해 casein acid hydrolysate 첨가시  $10^5$  cfu/g대로 저해되었으나, 우유와 casein acid hydrolysate이외의 질소원을 첨가한 경우에선 유의적인 균수 증식이 일어났다. 질소원중 trypton, beef extract 첨가에 의해 각각 균수가  $5.60 \times 10^8$ ,  $4.50 \times 10^8$  cfu/g까지 증가하였다.

Table 8. Properties of soybean fermented products by addition of nitrogen sources using *Bif. breve k-110*

Nitrogen source	pH	Acidity (%)	Microbial accounts (cfu/g)
Control	5.89	1.284	$1.18 \times 10^7$
Beef extract	4.85	1.941	$4.50 \times 10^8$
Casein acid hydrolysate	5.93	1.385	$3.45 \times 10^5$
Tryptone	4.51	2.393	$5.60 \times 10^8$
Whey	5.69	1.389	$1.96 \times 10^8$
Milk	5.75	1.302	$5.00 \times 10^7$
Soy milk	5.64	1.365	$1.89 \times 10^8$

## (3) 무기염류

Table 9에서 처럼, ammonium phosphate monobasic, ammonium citrate dibasic이  $1.66 \times 10^{11}$ ,  $1.38 \times 10^{11}$  cfu/g으로 control  $3.88 \times 10^9$  cfu/g 비해 균수가 증가하였다. 이는 앞에 언급한 탄소원, 질소원 첨가보다 무기염류의 첨가가 Bifidobacteria의 증식에 더 크게 영향을 미치는 것을 알 수 있었다.

Table 9. Properties of soybean fermented products by addition of inorganic salts using *Bif. breve k-110*

Inorganic salt	pH	Acidity (%)	Microbial accounts (cfu/g)
Control	5.80	1.189	$3.88 \times 10^7$
Ammonium chloride	5.53	1.313	$2.38 \times 10^{10}$
Ammonium citrate dibasic	5.60	1.418	$1.38 \times 10^{11}$
Ammonium phosphate monobasic	5.66	1.427	$1.66 \times 10^{11}$
Magnesium sulfate	5.65	1.269	$1.42 \times 10^{10}$
Sodium acetate	5.71	1.268	$1.64 \times 10^{10}$

#### (4) 시간대별 균수 변화

앞에서 선정된 영양원을 첨가하여 *B. breve k-110*를 접종하여 48시간 동안 발효 과정중 산도, pH, 균수는 Table 10에 나타내었다. pH는 발효 시간이 지남에 따라 점차 감소한 반면 산도는 증가하였다. 균수는 2 - 12 시간사이에 급격히 증가해서 발효 시작 36-48시간 사이에 최고 균수를 나타냈으며, *B. breve k-110* 균수는 가  $9.53 \times 10^9 \sim 2.46 \times 10^{10}$  cfu/g으로 가장 높게 나타났다.

Table 10. Properties of soybean products during fermentative time using *Bif. breve k-110*

Time(hr)	pH	Acidity (%)	Microbial accounts (cfu/g)
0	6.00	1.189	
2	6.00	1.188	3.38 X 10 <sup>6</sup>
12	5.80	1.418	1.38 X 10 <sup>9</sup>
24	5.66	1.487	9.66 X 10 <sup>8</sup>
36	5.00	1.509	9.53 X 10 <sup>9</sup>
48	4.80	1.680	2.46 X 10 <sup>10</sup>

결론적으로 콩분쇄물에서 탄소원이나 질소원보다 무기염인 ammonium phosphate monobasic이 *B. breve k-110*의 증식에 큰 영향을 주며, 최대 균수를 유도할 수 있는 발효시간은 36-48시간이었다.

## 2) Phytoestrogenic activity를 강화 소재의 제조 조건

### 가) 콩과 식물 발효물의 동결 건조 특성

#### (1) 발효물의 동결건조시 동결전·후의 유산균수

*Bif. breve* K-110으로 발효시킨 발효물에 당을 1.5% 첨가해 동결건조 하였을 때, Table 11에서 처럼 glucose 첨가시엔 동결 건조 후 생균수가  $8.84 \times 10^8$ 로 8가지 당류 중 가장 우수한 동결 보호효과가 있었다. 그외 에도 raftilose p95는 생균수가  $7.60 \times 10^8$ , trehalose는  $6.92 \times 10^8$ 로 대 조군보다 생균수가 높아 동결건조 효과가 나타났다. 그러나, 당의 보관중 변화 특성상 raftilose p95는 흡습성이 강해 이것을 첨가한 동결 건조물의 건조상태 유지가 어려울 것으로 사료되었다.

Table 11. Properties of soybean fermented products after freeze drying by addition of sugars

The kind of carbohydrates	pH	Acidity (%)	Viable cell count (CFU/g)	
			Before FD*	After FD
Control	4.48	0.724	6.00 X 10 <sup>8</sup>	4.78 X 10 <sup>7</sup>
DE 12				4.34 X 10 <sup>8</sup>
Glucidex 12				4.34 X 10 <sup>8</sup>
Glucose				8.84 X 10 <sup>8</sup>
Raftiline GR				4.08 X 10 <sup>8</sup>
Raftimix 10				3.04 X 10 <sup>8</sup>
Raftilose p95				7.60 X 10 <sup>8</sup>
Synergy 1				5.60 X 10 <sup>8</sup>
Trehalose				6.92 X 10 <sup>8</sup>

FD\* : freeze drying

## (2) glucose 농도별 보호 효과

Glucose 농도별 *Bif. breve k-110*에 대한 보호 효과를 조사하기 위해 콩 발효물에 glucose 0, 1.5, 3.0, 4.5, 6.0%를 첨가해 잘 교반한 후, -80도 deep freezer에서 24시간동안 동결후, 동결 건조기에서 건조 시켰을 때 생균수는 Table 12에 나타내었다. 유산균 동결보호제로서 glucose를 발효물에 농도별로 첨가하였을 때, 생균수를 최대화하는 glucose의 첨가 농도는 3%였다. 그러나 그 이상의 glucose 농도에서는 유의적인 차이는 없었으며, 오히려 감소 경향을 보였다. 그러나 대조군과 glucose 첨가군이 1g당 같은 량의 균수를 관찰하였다 하더라도 glucose 첨가로 인한 증량 효과를 고려하면 총 유산균 생균수는 더욱 증가한 것이라 할 수 있다.

Table 12. Properties of soybean fermented products after freeze drying by glucose concentration

The conc. of glucose (%)	pH	Acidity (%)	Viable cell count (CFU/g)	
			Before FD*	After FD
Control	4.51	0.711	$3.86 \times 10^8$	$2.98 \times 10^7$
1.5				$2.13 \times 10^8$
3.0				$5.62 \times 10^8$
4.5				$4.90 \times 10^8$
6.0				$4.71 \times 10^8$

나) 동결 건조 발효물의 흡습억제 특성

(1) 고결방지제(Anti-caking agents)에 의한 분산성

구아검, 실리코산 알루미늄, 제일인산칼슘, 제이인산칼슘, 탄산칼슘 등 5종의 고결방지제(anti-caking agent) 0.1%를 동결건조 전 발효물에 첨가하여 동결건조한 후 sieve No.10 (2mm)에 채를 쳐서 얻은 고운 분말을 10g씩 용기에 담아 35℃ 포화 습도 상태의 인큐베이터에 방치하면서 분말의 흡습정도를 조사한 결과는 Table 13에 나타내었다. 구아검, 제일인산칼슘, 실리코산 알루미늄, 탄산칼슘의 순으로 흡습에 의한 anti-caking 효과가 있는 것으로 나타났으며, 제이인산칼슘은 caking 현상을 나타내었다.

Table 13. Effects of anti-caking by anti-caking agents during storage days

anti-caking agents	2 days	3 days
Control	6.392 ± 0.547	8.746 ± 0.319
Calcium phosphate monobasic	4.969 ± 0.160	8.125 ± 0.203
Calcium phosphate dibasic	7.380 ± 1.105	9.002 ± 0.245
Guar gum	4.770 ± 0.609	7.945 ± 0.106
silico aluminate	5.052 ± 0.247	8.817 ± 0.565
Calcium carbonate	6.260 ± 0.754	9.120 ± 0.864

(2) 고결방지제의 농도별 효과

위의 실험에서 caking 억제 효과가 좋았던 구아검, 실리코산 알루미늄, 제일인산칼슘 0.2, 0.5%를 첨가하여 그 효과를 조사하였다(Table 14). 그 결과, 구아검과 실리코산 알루미늄이 고결방지에 우수한 효과를 나타내었다.

Table 14. Effects of anti-caking by concentrations of some anti-caking agents during storage days

Anti-caking agents	2 days	3 days
Control	2.064 ± 0.452	5.555 ± 0.055
Guar gum-0.2%	2.143 ± 0.418	4.954 ± 0.645
Guar gum-0.5%	1.788 ± 0.398	2.524 ± 0.267
silico aluminate-0.2%	2.175 ± 0.566	4.667 ± 0.231
silico aluminate-0.5%	1.530 ± 0.088	2.843 ± 0.109
Calcium phosphate monobasic-0.2%	4.229 ± 0.183	-
Calcium phosphate monobasic-0.5%	2.807 ± 0.271	-

(3) 첨가 농도별 관능 특성 조사

구아검과 실리코산 알루미늄을 각각 0.2, 0.5% 첨가한 발효물에 대한 기호도를 조사하였다(Table 14). 색, mouthfeel은 실리코산 알루미늄이 구아검 보다 높은 것으로 조사되었으나, 종합적인 기호도는 구아검을 첨가했을 때가 더 좋은 것으로 나타났다. 이는 관능검사원에 대한 묘사 질의 결과 구아검을 첨가했을 경우는 맛을 부드럽고 조화있게 하기 때문인 것으로 묘사되었다. 농도가 발효물의 기호도에 미치는 영향은 고결방지제의 첨가 농도가 낮을 때 선호도가 높은 것으로 나타났다.

Table 14. Sensory properties of fermented products by addition of Anti-caking agents

Anti-caking agents	Color	Mouthfeel	Overall acceptance
Control	6.00 ± 1.15	5.14 ± 1.95	5.00 ± 1.63
Guar gum-0.2%	5.14 ± 1.35	5.29 ± 1.50	5.86 ± 1.68
Guar gum-0.5%	4.29 ± 1.11	4.86 ± 2.27	4.71 ± 1.89
Silico aluminated-0.2%	6.14 ± 1.07	5.71 ± 1.70	5.29 ± 1.80
Silico aluminated-0.5%	3.86 ± 2.12	4.86 ± 1.46	4.86 ± 1.46

결론적으로 37 °C의 48 시간 발효조건에서, *b. breve* k-110은 콩에 함유된 isoflavone glucosides를 완전히 가수분해하여, 생체 유용성분인 genistein과 daidzein을 성공적으로 전환시키는 유용균주로 나타났으며, 이들 전환물은 estrogenic activity를 나타내었다. 발효물을 유산균을 최대화 하면서 동결건조하였을 때의 조건은 glucose의 첨가 농도는 3%, anti-caking agent인 구아검을 0.2 - 0.5 % 첨가하였을 때 가장 좋게 나타났다. 따라서 동결건조 분말을 식품소재나 유산균제로도 쉽게 응용할 수 있을 것으로 생각된다.

### 3) 유산균 발효 제품 제조 및 안정성

#### 가) 콩발효물 시제품 제조 및 안정성

정선한 국내산 대두를 충분히 수화시켜(20시간, 상온) 물기를 제거한 다음에 고압솥(121℃, 10분)에서 증자하고 냉각한 뒤, 시료중량의 3배의 물을 첨가하여 2분간 blender로 곱게 마쇄한 다음 멸균(121℃, 15분)하였다. 표준배지에서 배양한 유산균인 *B. breve* K-110을 시료 중량의 2%로 접종한 뒤 37℃에서 48시간 발효하였다. 발효 후 glucose 3%, anti-caking agent인 구아검을 0.2 % 첨가하여 동결건조하여 분말 시제품을 제조하였다. 분말 시제품을 불투명 PT병(100 mL)에 50 G씩 넣어 5℃와 25℃에 저장하면서 균수 및 관능 특성을 조사한 결과는 Table 16에 나타내었다. 이 때 초기 균수는  $8.25 \times 10^8$ 이었다. 5℃에서 콩 발효물을 저장하였을 때 저장 6개월까지 균수의 변화는 크지 않았으나, 저장 5개월부터 시제품의 색을 제외한 향과 맛의 기호도가 떨어졌으며, 저장 6개월에서는 향과 맛의 관능적 특성이 급격히 감소하였다. 이러한 결과는 저장 5개월에서 콩에 존재하는 지방산들이 산패하여 이취를 발생하는 것으로 판단되었다. 25℃에서 콩 발효물을 저장하였을 때 저장 2개월까지 균수의 변화는 크지 않았으나, 저장 3개월부터 균수가 감소하였으며, 시제품저장 3개월에서는 향과 맛의 관능적 특성이 나빠졌는데 이러한 원인은 5℃와 마찬가지로 콩에 존재하는 지방산들이 산패하여 이취를 발생하여 지방 산패취를 많이 느낀다고하였다. 따라서 콩발효물은 최대 유통기한이 약 3개월로 판단되었다.

Table 16. Viability of *B. breve* K-110 and sensory property of fermented soybean product during storage at 5°C and 25°C

Storage Temp. (°C)	Property	1 month	2 month	3 month	4 month	5 month	6 month	
5	Viability of <i>B. breve</i>	7.93 X 10 <sup>8</sup>	6.39 X 10 <sup>8</sup>	7.02 X 10 <sup>8</sup>	6.88 X 10 <sup>8</sup>	7.86 X 10 <sup>8</sup>	7.77 X 10 <sup>8</sup>	
	Sensory Property	Color	4.2	4.3	4.2	4.5	4.3	4.2
		Flavor	4.0	4.0	3.8	3.5	3.0	2.0
		Taste	4.0	3.8	3.8	3.5	3.2	1.3
		Overall acceptance	4.0	4.0	3.9	3.6	3.1	1.3
25	Viability of <i>B. breve</i>	6.38 X 10 <sup>8</sup>	6.03 X 10 <sup>8</sup>	8.93 X 10 <sup>7</sup>	5.38 X 10 <sup>7</sup>			
	Sensory Property	Color	4.0	3.8	3.8	3.5		
		Flavor	3.5	3.0	2.3	1.5		
		Taste	3.5	3.0	2.3	1.5		
		Overall acceptance	3.5	3.1	2.2	1.6		

나) 갈근 시제품 제조 및 안정성

정선한 건조 갈근을 파쇄한 후 물을 5배량 가하여 충분히 수화시킨 다음에 고압솥(121°C, 10분)에서 멸균하고 냉각한 뒤, 표준배지에서 배양한 유산균인 *B. breve* K-110을 시료 중량의 2%로 접종한 뒤 37°C에서 48시간 발효하였다. 발효 후 glucose 3%, anti-caking agent인 구아검을 0.2% 첨가하여 동결건조하여 분말 시제품을 제조하였다. 분말 시제품을 불투명 PT병(100 mL)에 50 G씩 넣어 5°C와 25°C에 저장하면서 균수 및 관능 특성을 조사한 결과는 Table 17에 나타내었다. 이 때 초기 균수는 1.56 x 10<sup>9</sup>이었다.

Table 17. Viability of *B. breve* K-110 and sensory property of fermented arrowroot product during storage at 5°C and 25°C

Storage Temp. (°C)	Property	1 month	2 month	3 month	4 month	5 month	6 month	
5	Viability of <i>B. breve</i>	1.02 X 10 <sup>9</sup>	8.39 X 10 <sup>8</sup>	7.26 X 10 <sup>8</sup>	7.88 X 10 <sup>8</sup>	7.56 X 10 <sup>8</sup>	6.97 X 10 <sup>8</sup>	
	Sensory Property	Color	4.2	4.3	4.2	4.5	4.3	4.2
		Flavor	4.0	4.0	3.8	3.8	3.6	3.8
		Taste	4.0	3.8	3.8	3.5	3.6	3.6
		Overall acceptance	4.0	4.0	3.9	3.6	3.5	3.8
25	Viability of <i>B. breve</i>	9.85 X 10 <sup>8</sup>	8.94 X 10 <sup>8</sup>	6.93 X 10 <sup>8</sup>	5.77 X 10 <sup>8</sup>	1.33 X 10 <sup>8</sup>	5.77 X 10 <sup>7</sup>	
	Sensory Property	Color	4.0	3.8	3.8	3.5	3.6	3.5
		Flavor	3.5	3.5	3.6	3.3	3.5	3.4
		Taste	3.5	3.5	3.8	3.7	3.6	3.6
		Overall acceptance	3.5	3.5	3.6	3.6	3.6	3.6

5°C에서 갈근 발효물을 저장하였을 때 저장 6개월까지 균수와 향과 맛, 기호도의 변화가 거의 없어, 저장성은 6개월 이상으로 판단되었다. 25°C에서 갈근 발효물을 저장하였을 때 저장 2개월까지 균수의 변화는 크지 않았으나, 저장 5개월부터 균수가 감소하였으며, 저장 6개월에서는 균수가 5.77 X 10<sup>7</sup> 이었다. 유산균 제품에서 유산균수는 10<sup>7</sup>으로 정하고 있어 갈근 발효물은 최대 유통기한이 약 6개월로 판단되었다.

라. 콩과 갈근 유산균 발효물의 HACCP

1) HACCP의 개요

HACCP는 위해요소분석(Hazard Analysis)과 중요관리점(Critical Control Point)의 영문 약자로서 “햇썸” 또는 “위해요소중점관리기준”이라 한다.



위해요소 분석이란 “어떤 위해를 미리 예측하여 그 위해요인을 사전에 파악하는 것”을 의미하며, 중요관리점이란 “반드시 필수적으로 관리하여야 할 항목”이란 뜻을 내포하고 있다. 즉 HACCP는 위해 방지를 위한 사전 예방적 식품안전관리체계를 말한다.

HACCP 제도는 식품을 만드는 과정에서 생물학적, 화학적, 물리적 위해요인들이 발생할 수 있는 상황을 과학적으로 분석하고 사전에 위해요인의 발생여건들을 차단하여 소비자에게 안전하고 깨끗한 제품을 공급하기 위한 시스템적인 규정을 말한다.

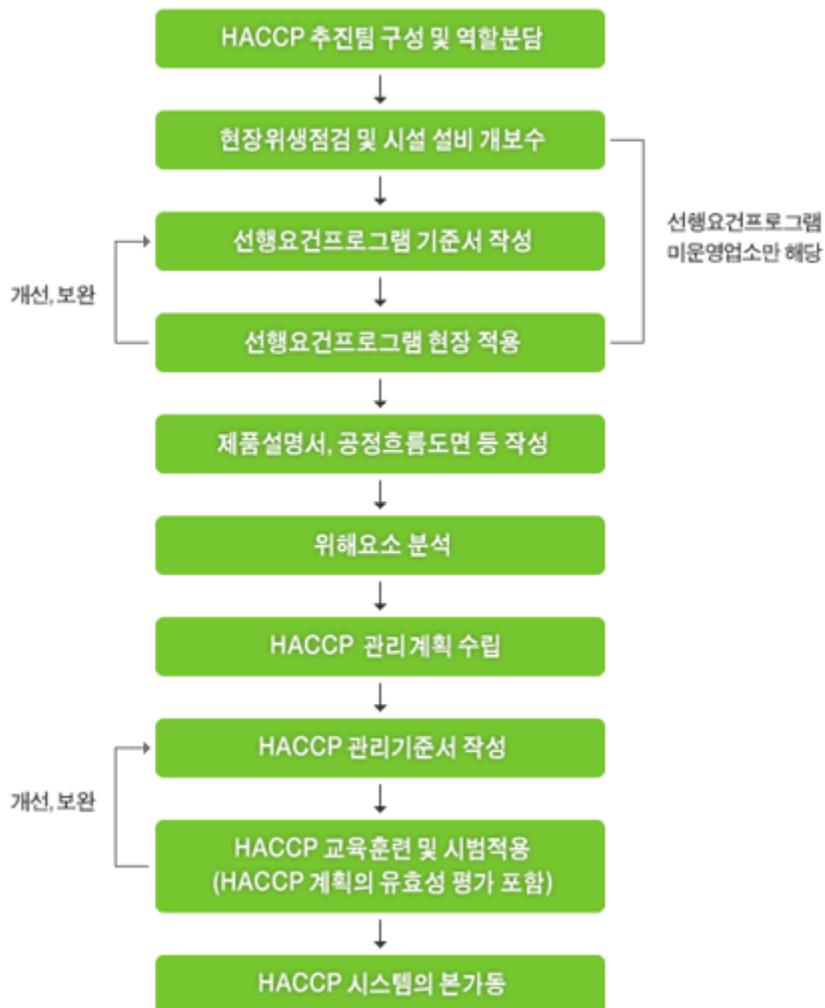
결론적으로 HACCP란 식품의 원재료부터 제조, 가공, 보존, 유통, 조리 단계를 거쳐 최종소비자가 섭취하기 전까지의 각 단계에서 발생할 우려가 있는 위해요소를 규명하고, 이를 중점적으로 관리하기 위한 중요관리점을 결정하여 자율적이며 체계적이고 효율적인 관리로 식품의 안전성을 확보하기 위한 과학적인 위생관리체계라고 할 수 있다.

HACCP는 전 세계적으로 가장 효과적이고 효율적인 식품 안전 관리 체계로 인정받고 있으며, 미국, 일본, 유럽연합, 국제기구(Codex, WHO,

FAO) 등에서도 모든 식품에 HACCP를 적용할 것을 적극 권장하고 있다.

## 2) HACCP 추진 절차

식품 제조·가공 업체 및 집단급식소에서 HACCP 적용을 추진할 때 절차는 다음과 같다.



가) HACCP 추진팀 구성 및 역할분담

HACCP시스템의 확립과 운용을 주도적으로 담당할 HACCP팀 구성  
품질관리, 생산, 공무, 연구개발 등 다양한 분야의 직원으로 구성  
팀장 및 팀원별로 각각 구체적이고 실질적인 역할을 분담

나) 현장위생점검 및 시설·설비 개보수

식품을 위생적으로 생산·조리하기 위한 기본적인 위생시설·설비 및 위생  
관리 현황을 점검, 기본적인 GMP, SSOP 구축·운영에 필요한 문제점을  
개선·보완

다) 선행요건프로그램 기준서 작성 및 현장 적용

영업장, 위생, 제조시설·설비, 냉장·냉동설비, 용수, 보관·운송, 검사, 회수  
프로그램 관리를 포함하는 선행요건 프로그램 기준서를 작성  
현장 적용 후 실행상의 문제점·개선점을 파악, 기준서를 개정

라) 제품설명서, 공정흐름도면 등 작성

제품성분, 규격, 유통기한, 사용용도 등을 포함하는 제품설명서를 작성  
제조·가공·조리공정도, 작업장 평면도, 공조시설 계통도, 용수 및 배수처리  
계통도 등을 작성

상기 자료는 위해분석의 기초자료로 활용

마) 위해요소 분석, HACCP 관리계획 수립

원료별 제조공정별 발생가능한 위해요소들에 대한 위해평가를 실시  
중요관리점, 한계기준, 모니터링 방법, 기준이탈시 개선조치 방법 등을 포

합하는 HACCP 관리계획 수립

바) HACCP 관리기준서 작성

HACCP팀 구성, 제품설명서, 공정흐름도, 위해요소분석, 중요관리점 결정, 한계기준 설정, 모니터링 방법의 설정, 개선조치, 검증, 교육훈련, 기록유지 및 문서화 등을 포함하는 HACCP 관리기준서를 작성

마) HACCP 교육·훈련 및 시범 적용

현장 종업원, 관리자, HACCP 팀원 등을 대상으로 수립된 HACCP 관리계획에 대한 교육·훈련 후 현장에 시범 적용  
실제 수립된 계획이 현장에 적용하였을 경우 효과적으로 적용·운영되는지 반드시 확인(유효성 평가 실시)

아) HACCP 시스템의 본 가동

효성 평가 결과를 HACCP 관리계획에 반영하여 문제점을 개선하여 HACCP 시스템을 본격적으로 운영, 1개월간의 운영실적을 첨부하여 식품의약품안전청에 HACCP 적용업소 지정 신청

### 3) HACCP 관리계획(HACP Plan)

HACCP 관리 계획은 공정분석, 위해요소분석을 거쳐 개발되고, 식품공장 현장에서 운영·실시된다. HACCP 관리 계획의 실행은 반드시 기록으로 유지·보관되어야 하며, 수립·운영된 HACCP 관리 계획의 효과성과 이행가능성에 대한 검증을 실시하여 그 결과를 지속적으로 HACCP 관리계획에 반영하여야 한다.



HACCP 관리 계획은 중요관리점(CCP)에 해당하는 공정에 대한 한계기준, 모니터링, 개선조치, 검증, 기록유지 사항을 포함한다.

#### 4) 유산균 대두·갈근 발효분말의 HACCP 계획

Table 18. 유산균 대두·갈근 발효분말의 제품설명서

제품명·제품유형	제품명 : 유산균 대두(갈근) 발효분말 제품유형 : 유산균 제품
품목제조보고 연·월·일	200 . .
작성자 및 작성 연월일	이영철, 200 . .
성분배합비율	대두(갈근)분말 85.7%, 유청칼슘 10%, 포도당 3%, 구아검 0.2%, 비타민 D 50IU, 초유단백 0.1%, 갈락토올리고당 1%, 유산균 10 <sup>7</sup> cfu 이상
제조(포장)단위	5g
완제품의 규격	성상 : 외형 팽창, 변경이 없고, 고유의 색택과 향미를 가지고 이미, 이취가 없을것. 생물학적 규격 : 유산균 10 <sup>7</sup> cfu 이상, 대장균군 음성 물리적 규격 : 이물 불검출
보관·유통상의 주의사항	직사광선을 피하여 상온 보관하고, 파손에 주의한다. 저온(-5℃) 이하에서 보관하면 더욱 좋다.
제품용도 및 유통기간	제품용도 : 갱년기 여성용 섭취방법 : 물과 같이 섭취 유통기간 : 제조일로부터 6개월(상온보관)
포장방법 및 재질	포장방법 : PP 포장 후 카톤박스 포장 후 종이박스 포장한다. 포장재질 : 내포장지 - PP , 카톤포장지 종이, 외포장지 - 골판지
표시사항	내포장지 : 제품명, 조리방법 카톤포장지 : 제품명, 식품유형, 중량, 주원료명, 제조 원, 유통기한, 보관방법, 영양분표시, 소 비자상담실, 피해보상규정, 취급시 주의 사항, 조리방법설명 외포장지 : 회사명 주소, 제품명, 유통기한, 입수량, 중량
기타 필요한 사항	
* 제조방법은 제조공정도 참조	

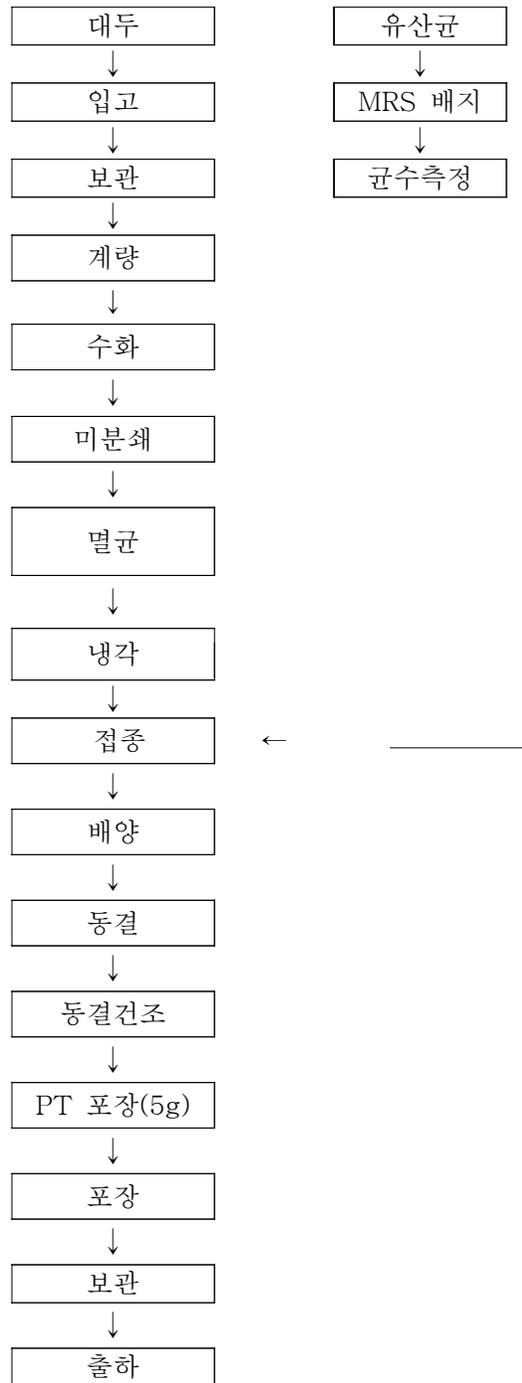


Fig. 16. 유산균 대두 발효분말의 제조 공정도

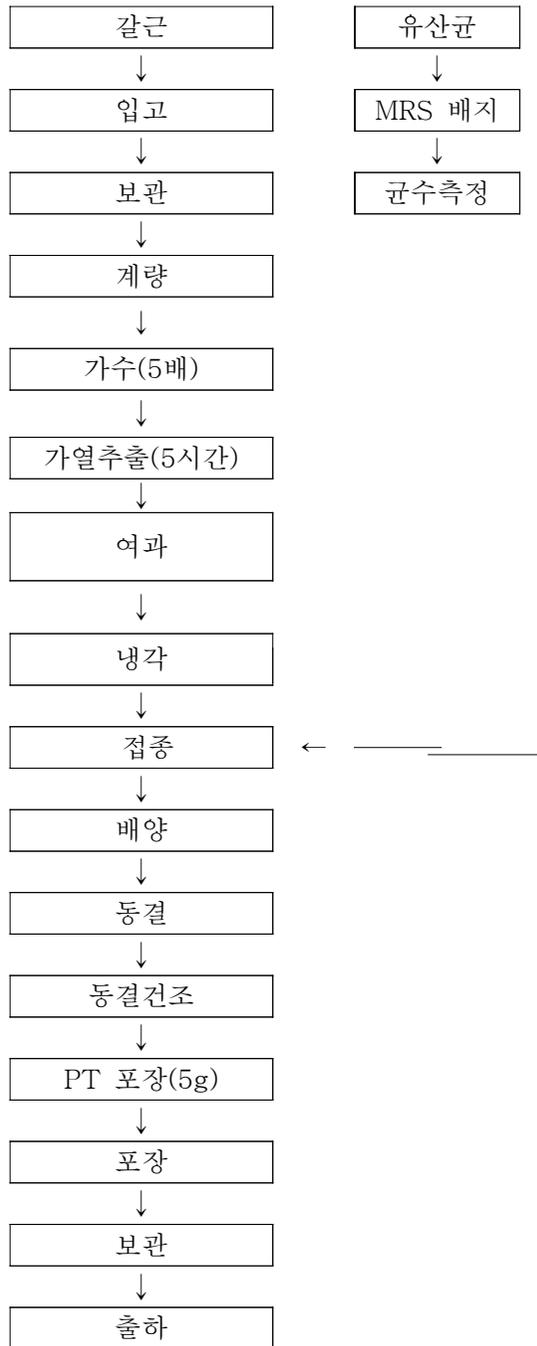


Fig. 17. 유산균 갈근 발효분말의 제조 공정도

Table 19. 유산균 대두(갈근) 발효분말의 공정별 가공방법

순서	공정명	주요설비	공정 요약
1	입고	입고차량 팔레트	입고검사를 한 후 반입한다
2	보관	보관창고	해당 창고에 보관한다
3	계량	계량기	각 원료를 배합비율대로 계량한다
4	수화	워터베스	물을 첨가한다
(4)	가수	실린더	추출용 물을 첨가한다
5	미분쇄	그라인더	대두를 그라인더를 이용하여 미분쇄한다
(5-1)	가열추출	추출조	추출조를 이용하여 5시간 동안 가열추출 한다
(5-2)	여과	여과망	여과망을 이용하여 여과한다
6	멸균	멸균기	적정온도 이상으로 가열하여 멸균시킨다
7	냉각	냉장창고, 상온	37°C로 냉각시킨다
8	유산균접종	배양조	유산균( $10^{8-9}$ cfu/ml)을 접종한다( <i>B. breve</i> K-110)
9	배양	배양조	37°C에서 배양한다
10	동결	냉동고	배양액을 냉각시킨 후 동결한다
11	동결건조	동결건조기	동결건조를 이용하여 건조시킨다
12	PT 포장	PT 포장기	5g의 용량으로 PT 포장한다
13	카톤포장	카톤포장기	카톤 포장기로 포장한다.
14	외박스포장	박스포장기	카톤 포장된 제품을 박스에 담은 후 테이핑하여 팔레트에 적재한다.
15	보관	제품창고	박스 포장된 제품을 상온 창고로 이송, 보관한다.
16	출하	지게차 운송차량	차량으로 이송한다.

표 20. 유산균 대두(갈근) 발효분말의 원부재료별 위해요소 목록표

구분	위해요소	발생원인	위해성평가		위해요소 여부	예방조치방법
			심각성	발생 가능성		
대두	B 병원성 미생물	가공공정중 오염원료자체의 오염	높음	낮음	No hazard	시험성적서 수령 입고검사 가열공정관리 멸균공정관리
	B 부패성 세균 및 내열성 세균	보관 및 유통온도에 의한 오염	보통	보통	No hazard	시험성적서 수령 입고검사 가열공정관리 멸균공정관리
	C 중금속(수은, 납)	원료자체의 오염	높음	낮음	No hazard	시험성적서 수령
	P 이물	가공공정중 오염	낮음	보통	No hazard	입고검사 협력업체관리
원료 갈근	B 병원성 미생물(내열성 세균 포함)	가공공정중 오염	높음	보통	Hazard	입고검사 멸균공정
	C 중금속	가공공정중 혼입	낮음	낮음	No hazard	시험성적서수령
	P 돌, 유리조각, 금속조각 등 이물	협력업체의 가공혼입 부주의에 의한 이물 원료자체의 제거 미흡	높음	낮음	No hazard	협력업체관리 입고검사
유산균	B 병원성 미생물(내열성 세균 포함)	전배양시 오염	높음	보통	<b>Hazard</b>	스타터관리
	P 이물(금속류 등)	전배양중 이물 및 배양용기 파손	낮음	보통	No hazard	여과공정에서 제거
포도당, 구아검, 비타민	B <i>B.cereus</i> , <i>Clostridium</i> 등 내열성 세균, 효모	원료자체의 오염 및 보관 유통중 증식	낮음	보통	No hazard	시험성적서 수령 입고검사 멸균공정관리
	P 이물, 금속류	제조공정중 오염	낮음	보통	No hazard	입고검사 혼합공정에서 자석통과

구분	위해요소	발생원인	위해성평가		위해요소 여부	예방조치방법	
			심각성	발생 가능성			
원료	초유단백	B 병원성 미생물(내열성균 포함)	원료 또는 제조과정 중 오염	높음	낮음	Hazard	시험성적서 수령 및 입고검사
		C 비소, 중금속	제조과정 중 오염	높음	낮음	No hazard	시험성적서 수령 입고검사
		P 이물질(금속류 등)	제조과정중 오염	높음	낮음	No hazard	입고검사 혼합공정에서 자석 통과
포장재	PP	B 파우치 내부의 미생물오염	가공과정 및 보관관리 부주의로 인한 미생물 오염	낮음	낮음	No hazard	입고검사
		C 잔류용제	협력업체 제품관리 소홀로 인한 잔류용제 용출	보통	낮음	No hazard	시험성적서 수령 입고검사
		P 머리카락 등 이물질	협력업체 가공시 작업자의 부주의 및 포장과손에 의한 혼입	보통	낮음	No hazard	입고 검사 협력업체관리
용수	가공용수	B <i>Salmonella</i> spp., <i>E. coli</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> 등 병원성세균	주위 환경 및 저수조 오염	보통	낮음	No hazard	수질검사 저수조 청결관리
		C 중금속, 청관제	주위 환경 및 저수조 오염	높음	낮음	No hazard	수질검사 저수조 청결관리, 담당자 교육
		P 금속이물질	송수관 노후 및 저수조 오염	높음	낮음	No hazard	수질검사 저수조 청결관리 송수관 및 저수조 설비관리

Table 21. 유산균 대두(갈근) 발효분말의 공정별 위해요소 목록표

구분	위해요소	발생원인	위해성평가		위해요소 여부	예방조치방법	
			심각성	발생 가능성			
공정	B	병원성세균 및 부패세균	보관온도(냉동, 냉장) 관리 미흡에 의한 유해 미생물 증식	보통	보통	NO hazard	보관온도관리
	B	병원성 미생물 오염	계량기구 및 작업자로부터 오염	보통	낮음	No hazard	계량기구청결관리 작업자위생관리 멸균공정관리
	P	이물질	계량기구 및 작업자로부터 오염	보통	아주 낮음	No hazard	계량기구청결관리 작업자위생관리 작업자 교육
	B	병원성세균 및 부패세균	용수 및 기기에 의한 미생물 오염	보통	낮음	NO hazard	기기 관리 설비 정기 점검
	P	머리카락 등 이물 혼입	제조공정중 작업자의 머리카락 등 혼입	낮음	보통	NO hazard	작업자 위생관리
	P	금속성 이물	자석 감도 불량으로 인한 금속성 이물 제거 미흡	높음	보통	<b>Hazard</b>	혼합공정의 자석관리 작업자교육
	B	병원성 세균, 내열성 세균 등	가열온도 불량으로 인한 살균 미흡	낮음	보통	NO hazard	가열온도관리 가열시간관리 검사관리
	P	머리카락 등 이물	작업환경 작업자 위생 불량으로 혼입	낮음	보통	NO hazard	작업자 위생관리 및 설비 정기 점검
	B	병원성세균 및 내열성 세균	멸균시간 및 온도관리 미흡으로 미생물 잔존	높음	낮음	NO hazard	멸균시간관리 멸균온도관리 자동기록지 확인
	B	병원성세균 및 내열성 세균	냉각시간 및 온도관리 미흡으로 증식	낮음	보통	NO hazard	냉각시간관리 냉각온도관리
	B	병원성세균 및 내열성 세균	공기 및 작업자에 의한 미생물 오염	높음	높음	<b>Hazard</b>	보관관리 육안검사 미생물검사
	B	병원성세균 및 내열성 세균	온도관리 미흡으로 미생물 증식	높음	높음	<b>Hazard</b>	육안검사 관능검사
	P	머리카락 등 이물	작업환경 작업자 위생 불량으로 혼입	낮음	낮음	NO hazard	작업자 위생관리 및 설비 정기 점검
	P	머리카락 등 이물	작업환경 작업자 위생 불량으로 혼입	낮음	낮음	NO hazard	작업자 위생관리 및 설비 정기 점검
	P	금속 등 이물	작업기기에서 혼입	높음	높음	<b>Hazard</b>	금속검출기
	B	병원성 세균	포장공정시 파손에 의한 미생물 오염	보통	낮음	NO hazard	작업자 교육
	B	병원성 세균	포장공정시 파손에 의한 미생물 오염	보통	낮음	NO hazard	작업자 교육
	B	병원성 세균	박스포장공정시 파손으로 미생물 오염	보통	낮음	NO hazard	파손제품제거 작업자 교육
	P	지분 등의 이물	보관중 파손에 의한 혼입	보통	낮음	NO hazard	보관관리 작업자교육
	B	병원성 세균	출하시 파손에 의한 병원성 미생물 오염	보통	낮음	NO hazard	출하관리 작업자교육

Table 22. 유산균 대두(갈근) 발효분말의 중요관리점 결정표

구분	원부재료/ 제조공정	위해요소	질문 1	질문 2	질문 2-1	질문 3	질문 4	질문 5	CCP
원료	유산균	B	병원성 미생물(내열성균 포함)	예 (접종 관리)					CP
	초유단백	B	병원성 미생물(내열성균 포함)	아니오	예(입고검사/시험성적서 수령)		아니오	아니오	CP
공정	미분쇄	P	금속성 이물	아니오	예 (금속검출기 통과)		아니오	예 (금속검출기)	CP
	접종	B	병원성 미생물(내열성균 포함)	예 (접종 관리)					CP
	배양	B	병원성 미생물(내열성균 포함)	아니오	예 (순수배양)		예		CCP-1
	금속검출	P	금속 등 이물	아니오	예 (금속검출기 감도 및 작동상태 확인)		예		CCP-2

Table 23. 유산균 대두(갈근) 발효분말의 HACCP 계획 일람표

<b>공정</b>		<b>배양</b>
<b>CCP</b>		<b>CCP-1</b>
<b>위해</b>		· 병원성세균 및 내열성 세균
<b>한계기준</b>		· 병원성 세균 및 기타 세균 불검출
<b>모니터링방법</b>	<b>내용</b>	· 이상발효 측정
	<b>방법</b>	· 관능검사 실시
	<b>주기</b>	· 매 배치후 관능검사 실시
	<b>담당</b>	· 공정담당자, 실험실 요원
<b>개선조치방법</b>	<b>내용</b>	· 이상발효
	<b>방법</b>	· 모니터링 담당자는 즉시 작업을 중지하고 공정제품을 보류한 뒤 생산팀 담당자에게 보고한다. · 생산팀 담당자는 한계기준 이탈중에 작업된 제품은 재검사를 실시한다. 재검사후 이상이 있을시 즉시 제품을 폐기한다 · 생산팀 담당자는 내역을 기록, 유지한다.
	<b>담당</b>	· 공정담당자, 실험실 요원
<b>검증방법</b>	<b>내용</b>	· CCP-1 공정일지 기록 확인 · 관능검사 및 미생물 검사
	<b>방법</b>	○CCP-1 공정일지 기록 확인 · 생산담당자는 공정일지가 제대로 기록되고 있는지 매일 확인 ○관능검사 및 미생물 검사 · 공정담당자와 실험실요원은 매 배치당 관능검사와 미생물검사를 실시한다.
<b>기록</b>		· CCP-1 공정 일지

공정	금속검출	
CCP	CCP-2	
위해	· 금속검출 감도 저하 및 고장으로 금속성 이물 혼입	
한계 기준	· 금속성 이물 불검출 철 Ø1.5mm, SUS Ø2.0mm 이상	
모니터링 방법	내용	· 금속검출기의 감도
	방법	· 철 Ø1.5mm, SUS Ø2.0mm의 테스트피스를 통과시 감지되는지 확인
	주기	· 작업시작전, 작업시작 후 매 시간마다
	담당	· 공정작업자
개선 조치 방법	내용	· 감도 이상 발생 · 기계적 고장
	방법	○ 감도 이상 발생 · 모니터링 담당자는 즉시 금속검출기의 작업을 중지하고 공정 제품을 보류한 뒤 생산팀 담당자에게 보고한다. · 생산팀 담당자는 감도를 조정후 정상적으로 작동시 재가동한다. · 생산팀 담당자는 금속검출기의 이상 발생전 정상 운전 확인시점의 그 이후에 생산된 제품을 다시 검사한다. · 생산팀 담당자는 그 내역을 기록, 유지한다. ○ 기계적 고장 · 모니터링 담당자는 즉시 금속검출기의 작업을 중지하고 공정제품을 보류한 뒤 생산팀 담당자에게 보고한다. · 생산팀 담당자는 기계적인 고장발생시 여분의 금속검출기를 사용하며, 공무팀에 수리를 의뢰한다. · 공무팀이 수리 불가능할 때에는 납품업체에 수리를 의뢰한다. · 생산팀 담당자는 한계기준 이탈시 작업된 제품은 재작업을 실시한다. · 생산팀 담당자는 금속검출기의 이상발생전 정상 운전 확인시점의 그 이후에 생산된 제품을 다시 검사한다. · 생산팀 담당자는 그 내역을 기록, 유지한다.
	담당	· 공정작업자
검증 방법	내용	· CCP-2 공정일지 기록 확인 · 금속검출기의 정상작동 및 감도 확인
	방법	○ CCP-2 공정일지 기록 확인 · 생산담당자는 공정일지가 제대로 기록되고 있는지 매일 확인 ○ 금속검출기의 정상작동 및 감도확인 · 품질관리팀 담당자는 매일 금속검출기의 정상작동 및 감도확인을 위해 Test Piece를 통과시켜 확인하고, 작업자의 인터뷰를 통해 인지도 확인
기록	· CCP-2 점검 일지	

## 제 2 절 Phytoestrogen을 강화한 기능성 식품 소재의 효능 평가

### 1. 콩, 갈근, 갈화의 유산균 발효물의 갱년기 예방 효능 평가

#### 가. 서론

에스트로겐(estrogen)과 프로게스테론(progesterone)은 난소에서 분비되는 여성 호르몬으로 자궁내막의 증식, 자궁근의 발육, 제2차 성징(性徵)의 발현, 월경주기 성립의 매개, 임신시의 모체변화 야기, 유선관(乳腺管)의 증식분비 촉진 등의 작용을 한다. 또한 골량 감소로 인한 뼈 손실을 막아주며 혈중 콜레스테롤을 감소시켜 심장질환을 예방하는 등의 역할을 한다. 그러나 폐경기 이후 호르몬 분비가 감소하면서 폐경기의 여성들은 다양한 증상을 겪게 된다.

폐경기 이후 겪게 되는 대표적인 증상에는 안면홍조, 발한, 냉증, 심장의 두근거림, 숨이 참, 구토, 어깨 결림, 초조함, 무력감, 스트레스성 궤양, 과민성 대장 증후군, 식욕부진, 요통, 손발 저림 등이 있으며 골다공증의 위험도 현저히 증가하는 것으로 보고되고 있다. 또한 요실금과 빈뇨, 부인과 의 대하, 외음부의 소양증 및 악취 등의 증상으로 겪게 되어 삶의 질에도 영향을 주고 있다.

이러한 갱년기 증상을 완화시키기 위한 대안으로는 식이요법, 운동요법, 호르몬 대체요법(hormone replacement therapy, HRT), 식물성 에스트로젠 공급 등이 있다. 이들 중 가장 빈번히 이용되고 있는 방법은 호르몬 대체 요법으로 이는 감소된 에스트로젠을 의약품인 주사제, 복용약품, 패취제 및 크림제로 보완하여 인체에 직접 투여하는 방법이다. 호르몬 대체 요법은 호르몬 생성 부족의 여러 가지 증상들을 효과 빠르게 개선하는 확실한 방법이나 자궁출혈, 유방암, 자궁암, 뇌졸중, 심장발작 등의 부작용 위험이 있으며 특히 장기간 치료 시 그 위험성은 증가될 수 있다. 이와 같은 호르몬 대

체 요법의 부작용을 해소하기 위한 대안으로 식물성 에스트로겐 (phytoestrogen: phyto+estrogen)을 이용하기도 한다. 이는 식물에서 추출된 에스트로겐 유사 물질 군으로 화학구조가 에스트로겐과 유사하여 체내에서 에스트로겐과 같은 작용을 나타내는 것으로 보고되고 있다. 부작용의 위험에서 안전하다고 보고되어 있다. 식물성 에스트로겐의 종류는 다양하며 활성 성분으로 알려진 물질에는 대표적으로 daidzein과 genistein 등이 있다.

연구에서는 갈근 추출물 및 갈근 추출 발효물에 대하여 폐경기 여성의 갱년기 질환의 예방 및 치료의 효능을 평가하기 위하여 SD rat 암컷을 이용하여 실험하였다. 또한 효능이 확인되었던 시험물질을 장기간 투여하여 효능을 비교 평가 하고, 호르몬 분비 변화 등의 원인으로 발생할 수 있는 부작용을 확인하고자 하였다. 또한 효능이 입증된 시험물질을 7명의 여성을 대상으로 투약하여 갱년기 질환 예방 및 치료 효과에 대하여 설문조사로 평가하였다.

나. 재료 및 방법

1) 시험물질

- 가) 명 칭 : T1 (extraction of soybeans)  
T2 (extraction of ferment soybeans)  
T3 (extraction of ferment arrowroot)  
T4 (extraction of ferment arrowflower)

2) 대조물질

- 가) 명 칭 : 멸균 생리식염수
- 나) 공 급 자 : 중외제약 주식회사

3) 시험계

- 가) 종 및 계통  
Rat(SD), Female

나) 공급원

- (주) 오리엔트  
주 소 : 서울시 금천구 가산동 459-24

다) 시험계의 선택이유

Rat(SD)는 약리 효능시험에 적당한 실험동물로 널리 사용되고 있다. 본 계통의 Rat는 풍부한 시험 기초자료가 축적되어 있어서, 시험결과와의 해석 및 평가 시 이러한 자료를 이용하는 것이 가능하다.

라) 주령 및 체중범위

- ▶ 암컷 . 입수시 주령 : 8주령  
. 입수시 동물수 : 110마리  
. 난소적출시 주령 : 9주령  
. 투여개시시 주령 : 10주령  
. 투여개시시 동물수 : 90마리

. 투여개시시 체중 :

① 정상대조군 225.3 ~ 286.4 g

② 난소적출군 239.0 ~ 311.0 g

마) 검역 및 순화

동물입수 시에 외관을 육안으로 검사한 후, 7일간 시험을 실시하는 동물실에서 순화시키면서 난소 적출술을 시행하였다. 난소적출 7일 후, 군 분리하여 건강한 동물만 선별하여 시험에 사용하였다.

4) 사육 환경

가) 환경조건

본 시험은 온도  $23\pm 3^{\circ}\text{C}$ , 상대습도  $50\pm 10\%$ , 조명시간 12시간(오전 7시~오후 7시), 환기횟수 10~20회/hr. 및 조도 150~300 Lux로 설정된 한국한의학연구원 동물실험실에서 실시되었다.

나) 사육환경모니터링

시험기간 중 동물실험실의 온습도는 항온항습기에 의해 자동조절 되었으며, 조도 등의 환경조건은 정기적으로 측정되었다. 환경측정 결과, 시험에 영향을 미칠 것으로 사료되는 변동은 없었다.

다) 사육상자, 사육밀도 및 사육상자의 식별

순화, 검역 및 투여 후의 전기간 동안 Rat용 Polycage 사육상자에 3 마리씩 수용하였다. 시험기간 중 사육상자는 시험번호 및 동물번호를 기입한 개체식별카드를 붙여 식별하였다.

라) 사료 및 물

(1) 사료의 급여방법

사료는 실험동물용 고형사료(제일사료 주식회사)를 자유섭취시켰다. 본 시험에 영향을 미칠만한 요인은 발견되지 않았다.

(2) 물의 급여방법

물은 상수도수를 자유섭취 시켰으며 시험에 영향을 미치는 요인은 발견되지 않았다.

#### 5) 투여량 및 시험군의 구성

##### 가) 투여량 설정

본 시험물질은 콩과식물 중, phytoestrogen이 다량 함유된 식물을 선정하여 시험물질로 사용하였으며, 시험물질 건조함량 5g/kg을 용매로 추출하여 투여용량으로 결정하였다.

##### 나) 시험군의 구성, 투여농도 및 용량

군	동물수 (마리)	동물번호	투여액량 (g/kg)	투여량 (ml/kg)
C	15	1~15	0	10
N.C	15	16~30	0	10
T1	15	31~45	5	10
T2	15	46~60	5	10
T3	15	61~75	5	10
T4	15	76~90	5	10

C; Control group, N.C; Negative control group, T1; Extraction of soybeans group, T2; Extraction of ferment soybeans, T3; Extraction of ferment arrowroot group, T4; Extraction of ferment arrowflower group.

##### 다) 군분리 및 동물식별

동물의 군분리는 다음과 같이 실시하였다. 먼저, 순화기간 중 건강하다고 판정된 동물의 체중을 측정 후, 5 g 간격으로 구분하여 각각의 평균체중에 가까운 동물 90마리를 선택하였다. 이렇게 선택된 90마리를 각 군에 15마리씩 균등한 체중으로 분배되도록 순위화한 체중과 난수를 이용한 무작위법으로 분배하였다. 동물의 개체식별은 피모의 색소염색

법과 개체식별카드 표시법으로 실시하였다.

## 6) 시험물질의 투여

### 가) 투여액의 조제법

각각의 시험물질은 건조함량(5g/kg)을 기준으로 용매(10ml/kg)에 녹여 투여물질로 사용하였으며, 대조군 및 negative control군은 주사용 멸균 생리식염수(10ml/kg)를 투여하였다.

### 나) 투여경로 및 투여방법

배부피부 고정법으로 실험동물을 고정하고 경구투여용 금속제 존테와 주사관을 이용하여 위내에 강제 경구투여 하였다.

### 다) 투여경로 선택이유

사람에게 예상되는 투여 경로로써 경구투여를 선택하였다.

### 라) 투여횟수 및 투여기간

투여당일 오전에 개체별로 7회/주, 경구 투여하였다. 투여기간은 7주 및 14주로 결정하였다.

### 마) 투여액량 계산

매주 1회 측정된 체중을 기준으로 하여, 각각의 군별 투여량에 맞게 투여액량을 계산하였다.

## 7) 실험 방법

### 가) 골다공증 유발

골다공증을 유발하는 동물모델은 폐경기 이후의 Type I 으로, 골다공증을 유발시키는 Sprague-Dawley계 female을 대상으로 난소적출 모형을 선택하여 갱년기 질환의 예방 및 치료효능을 연구하였다.

### 나) 난소 적출술

마취약(염산 ketamine 50mg/ml, 유한양행 + xylazine 20mg/ml, 바이엘 코리아주식회사)을 시험동물(Female Rat) 등배부에 피하 주사하여 전신 마취 시킨 다음, 하복부의 털을 제거하고 동물의 체위를 반듯이 눕힌 상태에서 요오드(삼일제약)로 수술부위를 소독한 후, 난소적출을 시행하였다. 시험동물의 정중선을 중심으로 하복부에서 1 cm 정도로 피부, 복근 및 복막을 차례로 절개하고 소독된 핀셋으로 난소를 노출시켜 난관을 견사로 결찰한 후, 좌측 및 우측의 난소를 제거하였다. 감염방지를 위해 항생제(셀파포르테-4, 유니화학주식회사) 0.4ml를 복강내 주입하였고 견사로 복막, 복근 및 피부를 봉합하였다.

#### 다) 일반증상 및 사망동물의 관찰

투여기간 동안 매일 1회 일반증상 변화 및 사망동물의 유무를 관찰하였다(Hayes et al. 1986).

#### 라) 체중측정

시험에 사용된 모든 동물에 대하여 1회/주(Am; 10시) 체중을 측정하였다.

#### 마) 부검소견

투여 7주 및 14 주째에 Ether 마취 하에서 하복부를 개방한 후, 복대 동맥에서 채혈하였으며 내부 장기를 육안으로 관찰하였다.

#### 바) 장기무게 측정

부검시 채혈한 후, 잔혈은 방혈하였으며 자궁, 뇌, 뇌하수체, 비장, 부신, 신장, 간, 폐 및 심장의 무게를 저울(Mettler, AT261)을 이용하여 측정하였다.

#### 사) 혈구분석

혈액학적 검사는 WBC(white blood cell), RBC(red blood cell), HGB(hemoglobin), HCT(hematocrit), MCHC(Mean Corpuscular

Hemoglobin Concentration), MCH(Mean Corpuscular Hemoglobin), MCV(Mean Corpuscular Volume), PLT(platelet)를 혈구분석기 Coulter counter(Coulter Co., Miami, FL, U.S.A)를 이용하여 측정하였다.

아) 혈액 생화학

생화학분석기를 사용하여 무기인, 칼슘, ALP(alkaline phosphatase), Total cholesterol, HDL-cholesterol(High density lipoprotein), LDL-cholesterol(Low density lipoprotein), T.G(Triglyceride) 농도를 각각 측정하였다.

(1) 혈중 무기인 정량분석

인체내 인산의 80% 이상이 뼈에 인산칼슘염의 형태로 존재한다. 칼슘과 무기 인산염의 농도는 서로 반비례하는 경향이 있고 혈중 인산염의 농도가 높은 예로 신장질환, hypoparathyroidism(갑상선의 기능저하증) 또는 과량의 vitamin D 흡수를 들 수 있다. 반대로 혈중 인산염 농도의 저하는 구루병(rickets), 골연화증, hyperparathyroidism(갑상선의 기능항진증) 및 당뇨 등의 경우에 나타난다. 인산이 ammonium molybdate와 함께 phospho molybdate를 생성하고 molybdenum blue로 변화하는 것을 이용하여, 생성된 phospho molybdate를 340 nm/380 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다(Wang et al. 1983, Daly et al. 1972).

(2) 혈중 칼슘 정량분석

골다공증의 주된 요인중의 하나가 혈중칼슘 농도의 변화이다. Cresolphthalein complexone을 사용한 Moorehead and Briggs의 방법(1974)으로 Cresolphthalein complexone이 칼슘이나 마그네슘의 알카리 용액에서 complex를 형성하는 것을 이용하는 방법이다. 8-hydroxy-quinoline을 넣어 마그네슘을 제거한 후 칼슘을 측정하였다. 570 nm/600 nm에서 흡광도의 변화를 측정해서 정량하였다.

### (3) 혈중 ALP 정량분석

ALP는 주로 뼈와 간, 골, 태반 및 장에 많이 존재하는데, 일반적으로 골 성장이 활발히 이루어질때, 그 농도가 증가한다. 혈중 ALP의 측정은 Bower 와 McComb의 방법(2004)을 사용하였다. 이것은 무색의 p-nitrophenylphosphate를 노란색의 p-nitrophenol과 phosphate로 분해 촉진시키는 것을 이용한 것이다. 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### (4) 혈중 total cholesterol 정량분석

혈장내 cholesterol 수치는 관상동맥질환, Thyroid 기능, 간 기능, 담즙분비의 기능, 장의 흡수 및 adrenal 질환의 가능성을 나타내는 지표라 할 수 있다. 스트레스, 노화, 임신 및 호르몬 balance 등은 콜레스테롤 수치에 영향을 미친다. Allain 등(1974)의 방법을 변형시킨 Roeschlau Method로 정량하였다. 혈장의 cholesterol ester가 cholesterol esterase에 의해 cholesterol과 free fatty acid로 가수분해되고, Cholesterol은 cholesterol oxidase에 의해 cholest-4-en-3-one과 hydrogen peroxide로 산화된다. 이렇게 생성된 hydrogen peroxide는 시약 중의 hydroxybenzoic acid와 4-aminoantipyrine과 결합하여 발색하게 된다. 이를 510 nm/620 nm에서 정량한다.

### (5) 혈중 HDL-cholesterol 정량분석

유산소 운동 및 채소, 과일, 불포화 지방산이 많은 음식물 섭취는 혈액 내 HDL-cholesterol량을 증가시킨다. HDL-cholesterol 정량법은 polyanion 침전법으로, 양전하로 하전된 Apoprotein B-containing lipoprotein이 polyanion과 결합하는 것이다(Burstein et al 1970). 평균 분자량이 6000 dalton인 PEG가 특정 농도에서 분자나 입자의 크기에 근거하여 lipoprotein 같은 거대분자를 침전시키는 성질을 이용하여, HDL-cholesterol을 분리해 낼 수 있다(Demacher et al. 1980, Allen et

al. 1979). 따라서 PEG 처리 후, 원심분리하여 얻은 상층액으로 HDL-cholesterol을 정량하였다.

(6) 혈중 LDL-cholesterol 정량분석

LDL-cholesterol은 혈관벽에 쌓여 동맥경화증 등을 유발하는 인자이며 동물의 내장, 간, 알, 붉은 살코기 및 포화지방산 등의 섭취에 의해 혈장 내 LDL-cholesterol량은 증가된다.

(7) 혈중 Triglyceride 정량분석

Triglyceride는 체내에서 여분의 칼로리가 전환되어 생성된 혈중 지질의 한 형태로, 비만, 고혈당, 심장질환 및 지방간 발생과 관련이 있다.

자) 골밀도 측정

동물 부검시, 우측 대퇴골을 적출하여 근육을 제거하고 10% 중성 포르말린에 7일간 고정하였다. 골밀도 측정은 포르말린을 제거한 후 Dual Energy X-ray Absorption(LUNAR<sup>®</sup> Corp. PIXImus, Madison, WI U.S.A) 기기를 사용하여 7주 및 14주에 각각 측정하였다.

차) 파골세포 측정

암컷 랫드의 난소를 강제로 적출하여 골다공증을 유발시키고 본 시험 물질을 투여하여 대퇴골에서 파골세포를 분리하였으며, 활성을 측정하여 시험물질의 효과를 관찰하였다.

(1) 파골세포의 분리 및 관찰

(가) 근육을 제거한 후 0.85 % saline을 이용하여 대퇴골의 bone marrow를 제거하였다.

(나) Bone marrow가 제거된 대퇴골은 enzyme solution 5 ml 들어 있는 50 ml Tube를 37 °C waterbath에서 15 분 따뜻하게 주었다.

(다) Enzyme solution 상등액 3 ml에 serum (FBS) 300 ml를 넣

고 1200 rpm에서 10 분간 원심분리 하였다.

(라) 상층액을 버리고 차가운 HBSS로 washing 한다.

(마) 차가운  $\alpha$ -MEM medium을 5 ml씩 넣고 15 분 동안 방치하였다.

(바) 40  $\mu$ m cell strainer로 여과한 후 여과액을 1440 rpm으로 10 분간 원심분리 하였다.

(사) 침전물에 차가운  $\alpha$ -MEM medium을 넣어 cell을 풀어준 후 파골세포를 계수하여 caluium phosphate apatite-coated 48 well에  $2 \times 10^5$  cells/0.3 ml/well이 되도록 세포를 분주한다.

(아) 7 일 동안 37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양한 후 증류수로 2 번 washing 한 후 5 % sodium hypochlorite를 넣고 5 분간 방치 하였다.

(자) 증류수로 washing 한 후 clean bench에서 24 시간 물기없이 말려 흡수된 부위를 관찰 하였다.

(차) 광학현미경에서 사진 측정하여 촬영된 파골세포의 양을 육안적으로 관찰하였다.

## (2) 파골세포 측정 원리

파골세포를 배양하는 48 Well은 바닥에 칼슘이 코팅되어 이를 영양분으로 하여 파골세포가 성장하게 된다. 그래서, 파골세포의 활성이 높으면 바닥에 코팅되어 있는 칼슘의 양이 적어지기 때문에 칼슘을 염색하는 시약(Sodium hypochloride)에 의해 염색이 안되기 때문에 흰색의 점처럼 보인다.

## (3) 파골세포 판정

활성을 사진으로 판정하는 기준은 측정원리를 근거로하여 사진상으로 흰색의 점이 많으면 활성이 증가한 것이고, 흰색이 적으면 활성이 감소한 것으로 판정한다.

카) 병리조직 검사

시험물질을 7주, 14주간 연속 경구투여 후, 부검 시 대퇴골 및 자궁 조직을 10% 중성 포르말린에 고정한 후 xylene, 에탄올 탈수 및 함수과정을 거쳐 파라핀을 침투하여 포매 한다. 4 $\mu$ m 두께로 절편을 만들어 Hematoxyline-Eosin(H&E) Stain하여, 광학현미경으로 Trabeculae in epiphysis and metaphysis in the femur(대퇴골 뼈지주), Frequency of osteoclast(뼈파괴세포의 출현정도) 및 Fatty accumulation(골수내 지방 축적)을 아래를 토대로 하여 상대적 평가를 수행하였다. 대퇴골 뼈 지주의 낮은 골다공증 정도를 평가할 수 있는 가장 중요한 평가 항목이며, 뼈파괴세포의 출현정도는 뼈 파괴세포의 활성도를 개략적으로 평가할 수 있다. 골수내에서 지방의 축적은 골수의 위축정도를 평가할 수 있다.

1	대퇴골 뼈지주	난소절제를 하지 않은 대조군(control)에서 치밀하게 형성된 뼈지주를 +4로 하고, 난소절제한 군에서 미약한 정도로 형성된 뼈지주 정도를 +1로 설정한 후, 이것을 기준으로 하여 처치군의 대퇴골내 뼈지주 형성정도를 평가하였다.
2	뼈 파괴세포의 출현 정도	골수내에서 활동하고 있는 뼈파괴세포의 수를 세어 4 개 이하는 +/-로, 4-7개 사이는 +1, 8-14개 사이는 +2, 그 이상은 +3으로 평가하였다.
3	골수내 지방축적	골수내에서 지방의 축적은 골수의 위축정도를 평가할 수 있는 항목으로 본 예의 경우 골수세포를 지방세포가 치환한 정도를 난소를 절제한 그룹에 관찰되는 심한 정도를 +3으로, 정상에서도 관찰될 수 있는 아주 미약한 정도 또는 미약한 정도를 각각 +/-와 +1로 비교, 평가하였다.

타) 복부지방 측정

부검시 동물의 Body Weight를 측정하였으며, 복벽지방 및 복부지방을 분리하고 동물 장기 측정용 저울(Mettler, PM2000)을 사용하여 무게를 측정하였다.

8) 통계학적 방법

모든 실험군에 대하여 동물측정용 저울로써 체중을 측정하고 평균과 표준 편차를 구하였다. 용매 대조군과 처치군 사이의 통계학적 유의차는 Student's t-test에 의하여 검정하였고,  $p < 0.05$ 를 실험군간의 유의성 있는 차이로 판정하였다.

2. 갈근 유산균 발효물의 갱년기 예방 효과

가. 시험물질 및 용매물질

1) 시험물질

- 가) 명 칭 : T1 (extraction of ferment arrowroot)  
T2 (extraction of arrowroot)

2) 용매물질

- 가) 명 칭 : 멸균 생리식염수  
나) 공 급 자 : 중외제약 주식회사

나. 재료 및 방법

1) 시험계

- 가) 종 및 계통  
Rat(SD), male

나) 공급원

- (주) 오리엔트

주 소 : 서울시 금천구 가산동 459-24

다) 시험계의 선택이유

Rat(SD)는 약리 효능시험에 적당한 실험동물로 널리 사용되고 있다. 본 계통의 Rat는 풍부한 시험 기초자료가 축적되어 있어서, 시험결과의 해석 및 평가 시 이러한 자료를 이용하는 것이 가능하다.

라) 주령 및 체중범위

- ▶ 암컷 . 입수시 주령 : 8주령
- . 입수시 동물수 : 100마리
- . 투여개시시 주령 : 48주령
- . 투여개시시 동물수 : 30마리
- . 투여개시시 체중 : 590.0 ~ 946.5 g

마) 검역 및 순화

동물입수 시 외관을 육안으로 검사한 후, 40주간 시험을 실시하는 동물실에서 순화시키면서 균분리하여 건강한 동물만 선별하여 시험에 사용하였다.

2) 사육 환경

가) 환경조건

본 시험은 온도  $23\pm 3^{\circ}\text{C}$ , 상대습도  $50\pm 10\%$ , 조명시간 12시간(오전 7시 ~ 오후 7시), 환기횟수 10~20회/hr. 및 조도 150~300 Lux로 설정된 한국한의학연구원 동물실험실에서 실시되었다.

나) 사육환경모니터링

시험기간 중 동물실험실의 온습도는 항온항습기에 의해 자동조절 되었으며, 조도 등의 환경조건은 정기적으로 측정되었다. 환경측정 결과, 시험에 영향을 미칠 것으로 사료되는 변동은 없었다.

다) 사육상자, 사육밀도 및 사육상자의 식별

순화, 검역 및 투여 후의 전기간 동안 Rat용 Wire cage에 3마리씩 수용하였다. 시험기간 중 사육상자는 시험번호 및 동물번호를 기입한 개체식별 카드를 붙여 식별하였다.

라) 사료 및 물

(1) 사료의 급여방법

사료는 실험동물용 고품사료(제일사료 주식회사)를 자유섭취시켰다. 본 시험에 영향을 미칠만한 요인은 발견되지 않았다.

(2) 물의 급여방법

물은 상수도수를 자유섭취 시켰으며 시험에 영향을 미치는 요인은 발견되지 않았다.

3) 투여량 및 시험군의 구성

가) 투여량 설정

본 시험물질은 갈근추출발효액(T1) 및 갈근추출액(T2)을 열수 추출하여 건조함량 5 g/kg의 용량으로 투여하였다.

나) 시험군의 구성, 투여농도 및 용량

군	동물수 (마리)	동물번호	투여액량 (g/kg)	투여량 (ml/kg)
C	10	1 ~ 10	0	10
T1	10	11 ~ 20	5	10
T2	10	21 ~ 30	5	10

C; Control group, T1; Extraction of ferment arrowroot group, T2; Extraction of arrowroot group.

다) 군 분리 및 동물식별

동물의 군 분리는 다음과 같이 실시하였다. 먼저, 순화기간 중 건강하다고 판정된 동물의 체중을 측정 후, 10 g 간격으로 구분하여 각각의 평균 체중에 가까운 동물 30마리를 선택하였다. 이와 같은 기준으로 선택된 30마리를 각 군에 10마리씩 균등한 체중으로 분배되도록 순위화 한 체중과 난수를 이용한 무작위법으로 분배하였다. 동물의 개체식별은 피모의 색소염색법과 개체식별카드 표시법으로 실시하였다.

#### 4) 시험 물질의 투여

##### 가) 투여액의 조제법

각각의 시험물질은 건조함량(5 g/kg)을 기준으로 용매(10 ml/kg)에 녹여 투여물질로 사용하였으며, 대조군은 주사용 멸균 생리식염수(10 ml/kg)를 투여하였다.

##### 나) 투여경로 및 투여방법

배부피부 고정법으로 실험동물을 고정하고 경구투여용 금속제 존데와 주사관을 이용하여 위내에 강제 경구투여 하였다.

##### 다) 투여경로 선택이유

사람에게 예상되는 투여 경로로써 경구투여를 선택하였다.

##### 라) 투여횟수 및 투여기간

투여당일 오전에 개체별로 7회/주, 경구 투여하였다. 투여기간은 21주로 결정하였다.

##### 마) 투여액량 계산

매주 1회 측정된 체중을 기준으로 하여, 각각의 군별 투여량에 맞게 투여액량을 계산하였다.

#### 5) 실험 방법

##### 가) 일반증상 및 사망동물의 관찰

투여기간 동안 매일 1회 일반 증상 변화 및 사망 동물의 유무를 관찰하

였다.

나) 체중측정

시험에 사용된 모든 동물에 대하여 1회/주(A.M. 10시) 체중을 측정하였다.

다) 부검소견

투여 21 주째에 Ether 마취 하에서 하복부를 개복한 후, 복대동맥에서 채혈하였으며 내부 장기를 육안으로 관찰하였다.

라) 장기무게 측정

부검 시 채혈한 후, 잔혈은 방혈하였으며 뇌, 비장, 부신, 신장, 간, 폐, 정소상체, 정소, 전립선, 정낭 및 심장의 무게를 저울(Mettler, AT261)을 이용하여 측정하였다.

마) 혈구분석

혈액학적 검사는 WBC(white blood cell), RBC(red blood cell), HGB(hemoglobin), HCT(hematocrit), MCHC(Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration), MCH(Mean Corpuscular Hemoglobin), MCV(Mean Corpuscular Volume), PLT(platelet)에 대하여 실시하였다. 측정을 위해 혈구 분석기 Coulter counter(Coulter Co., Miami, FL, U.S.A)를 이용하였다.

바) 혈액 생화학

생화학분석기를 사용하여 무기인, 칼슘, ALP(alkaline phosphatase), Total cholesterol, HDL-cholesterol(High density lipoprotein), LDL-cholesterol(Low density lipoprotein), T.G(Triglyceride), GOT(AST), GPT(ALT) 및 BUN(Blood urea nitrogen) 농도를 각각 측정하였다.

(1) 혈중 무기인 정량분석

갱년기 증상을 평가하기 위한 지표로서 갑상선 기능과 밀접한 관계가 있는

혈중 무기인의 변화를 측정하였다. 체내에 존재하는 인의 80% 이상이 인산칼슘의 형태이며 그 대부분이 뼈에 존재한다. 인산칼슘염에 있어서 칼슘과 무기인산염의 농도는 서로 반비례하는 경향을 나타낸다. 이와 같이 반비례 관계인 칼슘과 무기인염의 관계에서 인산염의 농도가 높아지는 경우, 갑상선 기능 저하증(hypoparathyroidism)이나 신장질환, vitamin D의 과량 흡수 등의 증상이 나타나게 되며 이와 반대로 혈중 인산염의 농도가 저하되는 경우에는 갑상선 기능 항진증(hyperparathyroidism) 및 골연화증, 당뇨 등의 증상이 나타나게 된다. 측정 원리는 인산이 ammonium molybdate와 함께 phospho molybdate를 생성하고 molybdenum blue로 변화하는 것을 이용하였으며, 실험에서는 생성된 phospho molybdate를 340 nm/380 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다(Wang et al. 1983. Daly et al. 1972).

## (2) 혈중 칼슘 정량분석

폐경기 이후 급격히 증가하는 골다공증에 대한 효능 평가를 위하여 혈중 칼슘 농도의 변화를 측정하였다. 측정방법은 Cresolphthalein complexone을 사용한 Moorehead and Briggs의 방법으로 Cresolphthalein complexone이 칼슘이나 마그네슘의 알카리 용액에서 complex를 형성하는 것을 이용하는 방법이다. 정확한 측정을 위하여 8-hydroxy-quinoline을 넣어 마그네슘을 제거하였고 570 nm/600 nm에서 흡광도의 변화를 측정해서 정량하였다(Moorhead et al 1974).

## (3) 혈중 ALP 정량분석

골 성장 효능을 평가하기 위하여 혈중 ALP를 측정하였다. ALP는 주로 뼈와 간, 골, 태반 및 장에 많이 존재하는데, 일반적으로 골 성장이 활발히 이루어질 때, 그 농도가 증가한다. 혈중 ALP의 측정은 Bower 와 McComb(2004)의 방법을 사용하였다. 무색의 p-nitrophenylphosphate를 노란색의 p- nitrophenol과 phosphate로 분해 촉진시키는 것을 이용하여 405

nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### (4) 혈중 total cholesterol 정량분석

스트레스나 노화, 임신, 호르몬 balance 등에 의해 영향을 받는 콜레스테롤 수치를 측정하였다. 혈장 내 cholesterol 수치는 관상동맥질환, Thyroid 기능, 간 기능, 담즙분비의 기능, 장의 흡수 및 adrenal 질환의 가능성을 나타내는 지표라 할 수 있다. Allain의 방법(1974)을 변형시킨 Roeschlau Method로 정량하였다. 혈장의 cholesterol ester가 cholesterol esterase에 의해 cholesterol과 free fatty acid로 가수분해 되고, cholesterol은 cholesterol oxidase에 의해 cholest-4-en-3-one과 hydrogen peroxide로 산화된다. 이렇게 생성된 hydrogen peroxide는 시약 중의 hydroxybenzoic acid와 4-aminoantipyrine과 결합하여 발색하게 된다. 이를 510 nm/620 nm에서 정량한다.

#### (5) 혈중 HDL-cholesterol 정량분석

HDL-cholesterol은 동맥벽의 플라그를 감소시켜 동맥경화증을 퇴화시키며 심혈관질환 위험을 낮추는 지표가 되기도 한다. 유산소 운동 및 채소, 과일, 불포화 지방산이 많은 음식물 섭취는 혈액 내 HDL-cholesterol량을 증가시킨다. HDL-cholesterol 정량법은 polyanion 침전법으로, 양전하로 하전된 Apoprotein B-containing lipoprotein이 polyanion과 결합하는 것이다. 평균 분자량이 6000 dalton인 PEG가 특정 농도에서 분자나 입자의 크기에 근거하여 lipoprotein 같은 거대분자를 침전시키는 성질을 이용하여, HDL-cholesterol을 분리해 낼 수 있다. 따라서 PEG 처리 후, 원심 분리하여 얻은 상층액으로 HDL-cholesterol을 정량하였다(Burstein et al 1970).

#### (6) 혈중 LDL-cholesterol 정량분석

LDL-cholesterol은 혈관벽에 쌓여 동맥경화증 등을 유발하는 인자이며 동물의 내장, 간, 알, 붉은 살코기 및 포화지방산 등의 섭취에 의해 혈장 내

LDL-cholesterol 량은 증가된다.

(7) 혈중 Triglyceride 정량분석

Triglyceride는 체내에서 여분의 칼로리가 전환되어 생성된 혈중 지질의 한 형태로, 비만, 고혈당, 심장질환 및 지방간 발생과 관련이 있다.

(8) 혈중 GOT 정량분석

아스파르트산 아미노기 전달효소(AST)는 간독성과 심장 질환을 진단하는데 있어서 중요한 지표로 이용된다. 간조직 파괴에 의해 관동맥이 지방질의 침착으로 폐쇄되면 국소적으로 심한 산소 결핍이 유래되어 혈장내 AST 량을 증가 시킨다. AST 측정은 Karmen et al 및 Henry et al 방법(1997)을 이용하였으며, 생화학 분석기를 이용하여 340nm에서 흡광도로 정량하였다. 그 반응 기전은 아래와 같다.

AST



MDH



LDH



(9) 혈중 GPT 정량분석

알라닌 아미노기 전달효소(ALT)는 전염성 감염에 그 수치가 증가하며 간 질환 때에는 AST의 활성도 높아진다. ALT는 Henry and Bergmeyer의 실험방법(1998)에 의해 340nm에서 측정하였으며 그 반응기전은 아래와 같다.

ALT



LDH



LDH



#### (10) 혈중 BUN 정량분석

Blood urea nitrogen과 Creatinine 같은 물질들은 신장의 기능이 저하된 상태에서 혈중내 수치가 높아진다. BUN 측정시 Tiffany 방법(1998)에 의해 NADH가 NAD로 전환되는것을 340nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 반응 기전은 아래와 같다.

Urease



GLDH



#### 사) 혈청 호르몬 측정

혈액내 Estrogen 및 Testosterone 를 RIA를 이용하여 호르몬 변화를 측정하였다.

(1) 여성호르몬의 대표적 물질인 estrogen은 난소에서 분비되며 난소의 기능이 퇴화되어 여성호르몬의 분비가 감소된다. 이는 모든 여성들이 50세를 전후해 폐경을 맞이하게 되어 갱년기 증상들이 발병된다.

(2) Testosterone은 정소에서 생성되는 남성 호르몬이며 남성의 생식선에

떨린 기관의 발육을 촉진한다. 이것이 부족하면 남성의 여성화 현상이 일어난다.

#### 6) 통계학적 방법

모든 실험군에서 평균과 표준 편차를 구하였다. 대조군과 처치군 사이의 통계학적 유의차는 Student's t-test에 의하여 검정하였고, Origin 통계처리를 이용하여 유의성( $p < 0.05$ ) 평가를 하였다.

### 3. 갈근 발효물의 임상 시험

#### 가. 설문조사

동물 실험 결과 효능이 우수한 소재로 선발된 갈근 발효액을 투약 전·후 갱년기 증상에 대한 설문조사를 아래와 같이 실시하였다.

#### 갱년기 설문조사 (갈근발효액 투약전·후)

본 설문서는 갱년기 임상증상관찰을 위해 작성한 것입니다. 귀하께서 답하여 주신 결과는 본 연구의 귀중한 기초자료로 활용될 것입니다.

바쁘시더라도 성의껏 답하시어 제출하여 주시면 감사하겠습니다.

한국한의학 연구원

일반정보

성명:

신장:

체중:

체지방:

주민등록번호:

실제출생년도:

주소:

전화번호:

휴대전화번호:

월경 및 산과력

1. 초경나이: 만 세 2. 첫만삭분만나이: 만 세

3. 마지막월경: 년 월

4. 월경주기:  규칙적(24-34일 주기),  불규칙적(1년에 회)

5. 결혼상태:  미혼,  기혼:  초혼,  재혼

6. 부부관계 주기( 회/주)

7. 임신횟수: 총 회

사회력

1. 학력:  무학,  초졸,  중졸,  고졸,  대졸이상

2. 흡연:  아니오,

예 [  과거흡연 ( 년 월 이후 금연),  현재흡연 ]

(흡연량: 일일 개피, 흡연기간: 년)

3. 음주:  아니오,  달 1-2회,  주 3회 미만,  주 3회 이상,  거의 매일(일회 평균 주량: 소주 병, 맥주 병, 와인 잔)

가족력(친부모, 형제, 자식에 국한된 병력)

1. 골절 (관계: , 부위:  골반  척추)

2. 허혈성 심장병 (관계: , 발병연령: 만 세); 혈관조형술 후 진단된 경우

3. 뇌졸중 (관계: , 종류:  허혈성,  출혈성,  미상)

4. 정맥혈전색전증 (관계: , 발병연령: 만 세)

5. 유방암 ( 한명,  두명 이상)

(관계: , 발병연령: 만 세,  일측성,  양측성)

(관계: , 발병연령: 만 세,  일측성,  양측성)

과거력

1. 간질환 (병명: , 치료기간 년간)

2. 정신질환 (병명: , 치료기간 년간)

3. 폐경후 골절( 외상성,  비외상성)

(부위; 손목, 척추, 골반, 기타: )

4. 갑상선 질환( 저하증,  항진증,  기타: )

(치료기간 년간)

5. 부갑상선 질환(구체적 서술: )

(치료기간 년간)

6. 고지혈증 (약물치료:  아님,  예) (치료기간 년간)

7. 고혈압 (약물치료:  아님,  예) (치료기간 년간)

8. 당뇨병 (약물치료:  아님,  예) (치료기간 년간)

9. 허혈성 심장병(진단연령: 만 세); 혈관조형술 후 진단된 경우

10. 뇌졸중(진단연령: 만 세):

ischemic ( thrombotic,  embolic)

hemorrhagic ( intracerebral,  subarachnoidal)  unknown

11. 담낭질환 (구체적서술: )

12. 양성 유방 질환(진단연령: 만 세)
13. 유방암(진단연령: 만 세) (병기: 제 기,  모름)  
(치료:  수술,  방사선,  약물치료,  기타 )
14. 자궁내막염(진단연령: 만 세) (병기: 제 기,  모름)  
(치료:  수술,  방사선,  약물치료,  기타 )
15. 두부외상 (구체적서술: )
16. 정맥혈전 색전증 (구체적서술: )
17. 부인과 수술: 만 세 ( 폐경 전, 폐경 후), 병명:

I. 귀하의 갱년기 증상에 관련한 질문입니다. 귀하의 생각에 가장 가깝다고 생각하는 해당번호에 √ 표하여 주시기 바랍니다.

### I. 홍 조 감

앞가슴과 목 얼굴부위에 갑자기 반복적인 홍조와 열감이 나타나며 가끔 불안감과 오한도 동반된다. 잠잘 때 땀이나고 피로감, 신경과민, 불안, 신경질, 우울증, 수면방해, 기억상실 등이 동반됨.

1) 얼굴 목 가슴 등이 갑자기 달아오르며 화끈거린다.

① 매우 그렇다. ② 그렇다. ③ 보통이다. ④ 그렇지 않다. ⑤ 전혀 그렇지 않다.

2) 때때로 열이 오르면서 땀이 난다.

① 매우 그렇다. ② 그렇다. ③ 보통이다. ④ 그렇지 않다. ⑤ 전혀 그렇지 않다.

3) 입이 마르고 입안에서 열이 난다.

- ① 매우 그렇다. ② 그렇다. ③ 보통이다. ④ 그렇지 않다. ⑤ 전혀 그렇지 않다.

4) 잠 들기 힘들다.

- ① 매우 그렇다. ② 그렇다. ③ 보통이다. ④ 그렇지 않다. ⑤ 전혀 그렇지 않다.

## II. 위축성 증상

질, 요도 및 방광 기저부가 에스트로겐 저하에 의해 위축현상이 일어나 건조감과 염증, 성교통, 질염 및 긴장성 요실금이 발생됨.

1) 월경이 불규칙하며 하혈이 있다.

- ① 매우 그렇다. ② 그렇다. ③ 보통이다. ④ 그렇지 않다. ⑤ 전혀 그렇지 않다.

2) 냉이 늘었다.

- ① 매우 그렇다. ② 그렇다. ③ 보통이다. ④ 그렇지 않다. ⑤ 전혀 그렇지 않다.

3) 질이 건조하다.

- ① 매우 그렇다. ② 그렇다. ③ 보통이다. ④ 그렇지 않다. ⑤ 전혀 그렇지 않다.

4) 요실금 현상이 있다.

① 매우 그렇다. ② 그렇다. ③ 보통이다. ④ 그렇지 않다. ⑤ 전혀 그렇지 않다.

5) 기침, 웃음 등의 조그만 자극에도 소변이 종종 나온다.

① 매우 그렇다. ② 그렇다. ③ 보통이다. ④ 그렇지 않다. ⑤ 전혀 그렇지 않다.

6) 소변이 급하게 마렵고 소변을 보아도 시원치 않으며 자주 본다.

① 매우 그렇다. ② 그렇다. ③ 보통이다. ④ 그렇지 않다. ⑤ 전혀 그렇지 않다.

7) 성관계가 불편하거나 성욕이 없다.

① 매우 그렇다. ② 그렇다. ③ 보통이다. ④ 그렇지 않다. ⑤ 전혀 그렇지 않다.

8) 골반이 아프다.

① 매우 그렇다. ② 그렇다. ③ 보통이다. ④ 그렇지 않다. ⑤ 전혀 그렇지 않다.

9) 골반내 종괴(자궁근종)의 유·무

① 있다. ② 없다.

골반내 종괴(자궁근종)이 있다면 어느정도?                      cm

### Ⅲ. 골다공증

에스트로겐이 칼슘 농도에 따른 골대사의 조절에 관여하기 때문에, 뼈의 조성을 담당하는 조골세포와 흡수를 담당하는 파골세포는 모두 골수에서 유래되며 이들의 활동은 여성호르몬에 의해 조절됨.

1) 골절로 인해 병원에 치료받은 유·무

① 있다. ② 없다.

치료받은적 있다면,

골절부위:

치료기간:

#### IV. 순환기와 대사 장애

에스트로겐 저하로 인하여 혈액순환부전, 손발냉증과 저림, 동맥경화, 고지혈증, 복부비만 등의 질환을 동반함.

1) 두통이 자주오며 머리가 무겁다.

① 매우 그렇다. ② 그렇다. ③ 보통이다. ④ 그렇지 않다. ⑤ 전혀 그렇지않다.

2) 젖 가슴이 저리며 아프다.

① 매우 그렇다. ② 그렇다. ③ 보통이다. ④ 그렇지 않다. ⑤ 전혀 그렇지않다.

3) 몸이 차고 손발이 저린 증상을 느낀다.

① 매우 그렇다. ② 그렇다. ③ 보통이다. ④ 그렇지 않다. ⑤ 전혀 그



렇지않다.

10) 구조적 이상은 없는데 허리가 아프다.

① 매우 그렇다. ② 그렇다. ③ 보통이다. ④ 그렇지 않다. ⑤ 전혀 그렇지않다.

11) 어깨가 무겁고 근육이 아프다.

① 매우 그렇다. ② 그렇다. ③ 보통이다. ④ 그렇지 않다. ⑤ 전혀 그렇지않다.

12) 변비 증상이 있다.

① 매우 그렇다. ② 그렇다. ③ 보통이다. ④ 그렇지 않다. ⑤ 전혀 그렇지않다.

## V. 인지 장애와 알츠하이머

에스트로겐 감소에 의해 집중력이 떨어지거나 단기 기억력(건망증)에 영향을 미침.

1) 기억력이 떨어진다.

① 매우 그렇다. ② 그렇다. ③ 보통이다. ④ 그렇지 않다. ⑤ 전혀 그렇지않다.

## VI. 피부노화

에스트로겐이 부족하면 피부의 두께를 청명하게 유지하지 못하고 주름

과 피부 노화를 촉진시킴.

1) 최근 몇 년 사이에 피부가 많이 거칠어졌다.

① 매우 그렇다. ② 그렇다. ③ 보통이다. ④ 그렇지 않다. ⑤ 전혀 그렇지 않다.

설문에 참여해 주셔서 감사합니다. 수고하셨습니다.

갈근발효액 투여 전·후, 신체변화 기록지

성명:

연령:

투약 개시일: 2006. 04. .

측정 기간	체 중 (kg)	체 지방 (%)	가슴둘레 (cm)	허리둘레 (cm)	기타
투약 전					
투약 1주					
투약 2주					
투약 3주					
투약 4주					
특이사항					

한국한의학연구원

다. 결과 및 고찰

1) 콩, 갈근, 갈화의 유산균 발효물의 갱년기 예방 효과

가) 일반증상 및 사망동물

시험기간 중, 시험물질 투여에 의한 이상증상 및 사망동물은 관찰되지 않았다(Table 18).

Table 18. Clinical finding in Test Substances-administered Female Rat.

Variable	\ Sex	Female					
	\ Group	C	N.C	T1	T2	T3	T4
\ Dose(g/kg)		0	0	5	5	5	5
\ No. of animal		15	15	15	15	15	15
normal		15	15	15	15	15	15
abnormal		0	0	0	0	0	0

C; Control group, NC; Negative control group, T1; Extraction of soybeans group, T2; Extraction of ferment soybeans, T3; Extraction of ferment arrowroot group, T4; Extraction of ferment arrowflower group.

나) 체중측정

난소를 적출한 시험동물의 체중이 대조군에 비해 1주부터 유의성 ( $p < 0.01$ ) 있게 증가되었으며, 여기에 시험물질 2주간 연속 경구투여 시 증가됐던 체중이 T3군에서 유의성 ( $p < 0.01$ ) 있게 감소됐음을 확인하였다 (Fig. 16).

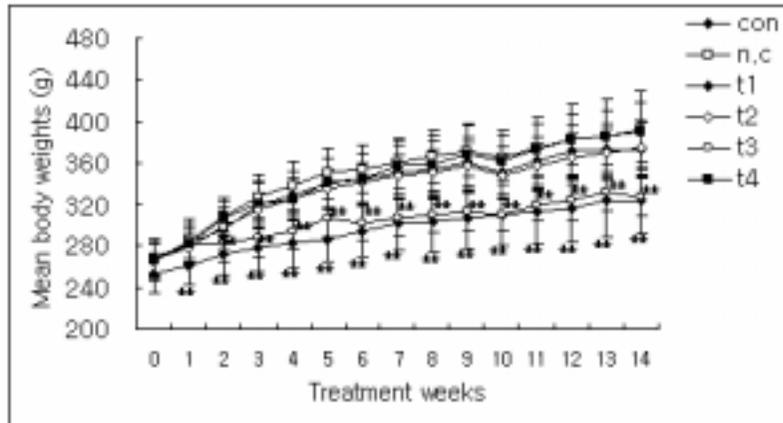


Fig. 16. Mean body weight changes of female rats treated with test substances(\*\*p<0.01). C; Control group, N.C; Negative control group, T1; Extraction of soybeans group, T2; Extraction of ferment soybeans, T3; Extraction of ferment arrowroot group, T4; Extraction of ferment arrowflower group.

#### 다) 부검소견

부검소견에서는 모든 투여 군에서 시험물질 투여와 관련된 이상 소견은 나타나지 않았다. 그러나 난소 적출에 의한 자궁 위축 현상이 관찰되었다(Table 19, 20, Fig 17, 18).

Table 19. Autopsy finding in Test Substances Administered Female

Rat.						
Sex	Female					
Group	C <sup>1)</sup>	N.C <sup>2)</sup>	T1 <sup>3)</sup>	T2 <sup>4)</sup>	T3 <sup>5)</sup>	T4 <sup>6)</sup>
Dose(g/kg)	0	0	5	5	5	5
No. of animal	5	5	5	5	5	5
Normal	5	0	0	0	1	0
Uterus Atrophy		5	5	5	4	5
Minimal		0	0	0	3	0
Moderate		1	1	3	1	4
Severe		4	4	2	0	1

Autopsy finding at 7 weeks treatment of Test Substances, <sup>1)</sup>Control group, <sup>2)</sup>Negative control group, <sup>3)</sup>Extraction of soybeans group, <sup>4)</sup>Extraction of ferment soybeans group, <sup>5)</sup>Extraction of ferment arrowroot group, <sup>6)</sup>Extraction of ferment arrowflower group.

Table 20. Autopsy finding in Test Substances Administered Female

Rat.						
Sex	Female					
Group	C <sup>1)</sup>	N.C <sup>2)</sup>	T1 <sup>3)</sup>	T2 <sup>4)</sup>	T3 <sup>5)</sup>	T4 <sup>6)</sup>
Dose(g/kg)	0	0	5	5	5	5
No. of animal	10	10	10	10	10	10
Normal	10	0	0	0	0	0
Uterus Atrophy		10	10	10	10	10
Minimal					4	0
Moderate		2	5	6	6	7
Severe		8	5	4	0	3

Autopsy finding at 14 weeks treatment of Test Substances, <sup>1)</sup>Control group, <sup>2)</sup>Negative control group, <sup>3)</sup>Extraction of soybeans group, <sup>4)</sup>Extraction of ferment soybeans group, <sup>5)</sup>Extraction of ferment arrowroot group, <sup>6)</sup>Extraction of ferment arrowflower group.

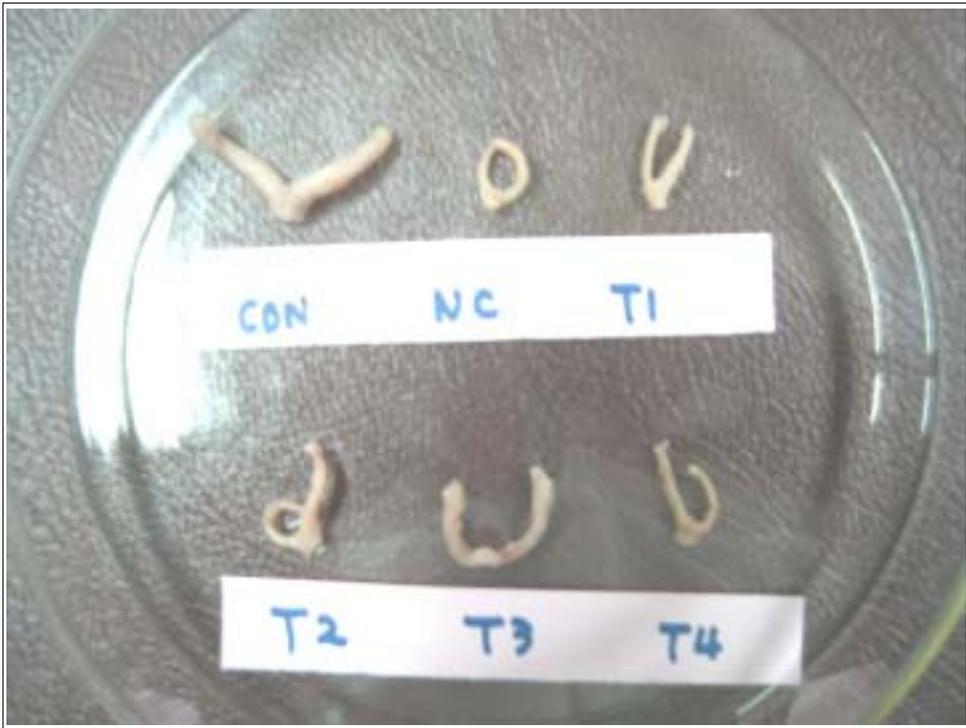


Fig. 17. Effect of test substances treated orally for 14 weeks on uterus photo of female rats. C; Control group, N.C; Negative control group, T1; Extraction of soybeans group, T2; Extraction of ferment soybeans, T3; Extraction of ferment arrowroot group, T4; Extraction of ferment arrowflower group.

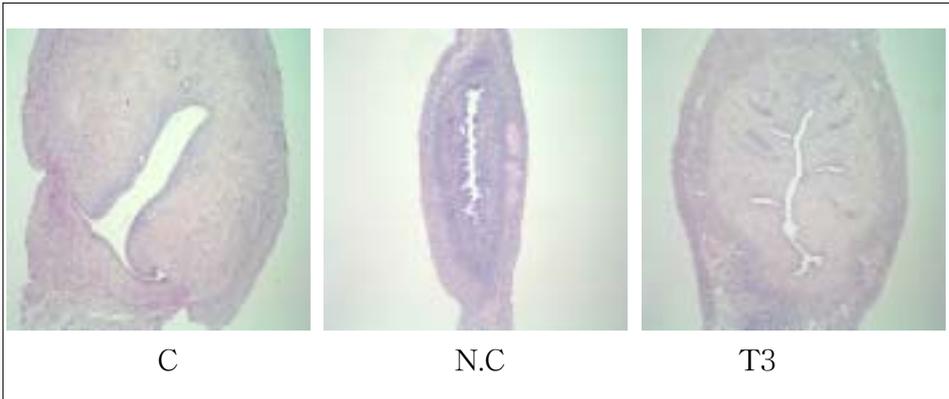


Fig. 18. Effect of test substances treated orally for 14 weeks on uterus Photomicrograph of female rats(H-E stain, x40). C; control group, normal arrangement of uterus cells. N.C; Negative control group, atrophy arrangement of severe uterus cells. T3; Extraction of ferment arrowroot group, atrophy arrangement of minimal uterus cells.

#### 라) 장기무게 측정

시험물질 투여에 의한 장기의 육안적 이상 변화는 관찰되지 않았으나, 난소 적출에 의한 자궁 위축 현상이 N.C 군에서 뚜렷이 나타났다. 그러나 시험물질 투여 T3군에서는 음성대조군 보다 위축된 정도가 7주 23.64 %, 14주에는 24.44 %를 통계적으로 유의성( $p < 0.05$ ) 있게 증가되었다. 비장 장기는 대조군에 비해 난소 적출군에서 종대 되었으며 시험물질(Extraction of ferment arrowroot group, Extraction of ferment arrowflower group) 14주 연속 경구투여 시, 비대된 장기를 유의성( $p < 0.05$ ) 있게 감소시켰다(Table 21, 22., Fig. 19 ~ 22).

Table 21. Relative organ weight of rats orally treated with Test Substances.

Sex	Female					
	C	N.C	T1	T2	T3	T4
Group						
Dose(g/kg/day)	0	0	5	5	5	5
No. of animal	5	5	5	5	5	5
Uterus	0.65(0.18)**	0.10 <sup>a</sup> (0.02) <sup>b</sup>	0.10(0.01)	0.10(0.01)	0.23*(0.04)	0.11(0.02)
Lung	1.24(0.12)	1.31(0.24)	1.45(0.15)	1.52(0.14)	1.32(0.08)	1.40(0.08)
Heart	0.85*(0.06)	1.05(0.09)	1.10(0.09)	1.09(0.09)	0.87*(0.08)	1.11(0.16)
Liver	6.47(0.63)	7.55(0.9)	8.4(0.61)	8.39(1.42)	7.76(0.48)	8.17(0.66)
Spleen	0.40**(0.05)	0.58(0.07)	0.62(0.10)	0.58(0.1)	0.58(0.09)	0.64(0.06)
Kidney left	0.77(0.07)	0.79(0.07)	0.89(0.09)	0.87(0.07)	0.80(0.07)	0.92(0.13)
Kidney right	0.77(0.05)	0.79(0.08)	0.87(0.06)	0.88(0.04)	0.81(0.08)	0.92(0.13)
adrenal gland L	0.03(0.01)	0.03(0.02)	0.03(0.0)	0.03(0.01)	0.02(0.0)	0.03(0.0)
adrenal gland R	0.03(0.0)	0.03(0.01)	0.03(0.01)	0.03(0.01)	0.02(0.01)	0.02(0.01)

a ;Values were expressed as mean, b ;±S.D., Statistically Significantly different from Negative Control group(\*p<0.05, \*\*p<0.01). Relative organ weight at 7 weeks after treatment of test substances. C; Control group, N.C; Negative control group, T1; Extraction of soybeans group, T2; Extraction of ferment soybeans, T3; Extraction of ferment arrowroot group, T4; Extraction of ferment arrowflower group.

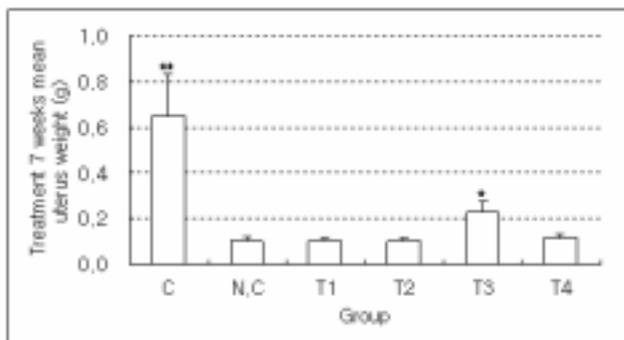


Fig. 19. Mean uterus weight changes of female rats treated with test substances. C; Control group, N.C; Negative control group, T1; Extraction of soybeans group, T2; Extraction of ferment soybeans, T3; Extraction of ferment arrowroot group, T4; Extraction of ferment arrowflower group. Statistically Significantly different from negative control group(\*p<0.05, \*\*p<0.01).

Table 22. Relative organ weight of rats orally treated with Test Substance.

Sex	Female					
	C <sup>1)</sup>	N.C <sup>2)</sup>	T1 <sup>3)</sup>	T2 <sup>4)</sup>	T3 <sup>4)</sup>	T4 <sup>6)</sup>
Group						
Dose(g/kg/day)	0	0	5	5	5	5
No. of animale	10	10	10	10	10	10
Body weight(g)	297.38** (26.37)	376.58 <sup>a</sup> (28.56) <sup>b</sup>	356.95 (26.73)	356.6 (25.95)	310.39** (21.37)	378.45 (39.19)
Uterus	0.54**(0.09)	0.09(0.2)	0.1(0.01)	0.11(0.3)	0.2*(0.05)	0.11(0.01)
Brain	1.94(0.13)	1.94(0.07)	1.95(0.15)	1.94(0.1)	1.91(0.11)	1.95(0.12)
hypophysis	0.0187(0.004)	0.0157(0.002)	0.0136(0.001)	0.0119(0.10)	0.0151(0.001)	0.0137(0.001)
Lung	1.32(0.13)	1.42(0.17)	1.44(0.18)	1.4(0.17)	1.33(0.11)	1.35(0.15)
Heart	0.92(0.11)	0.93(0.06)	0.93(0.05)	0.93(0.07)	0.88(0.07)	0.99(0.11)
Liver	6.64(0.73)	6.91(1.07)	6.51(1.01)	6.23(0.65)	6.65(0.75)	6.48(0.55)
Spleen	0.44**(0.05)	0.61(0.15)	0.51(0.08)	0.53(0.07)	0.50*(0.06)	0.50*(0.03)
Kidney left	0.78(0.07)	0.79(0.08)	0.76(0.07)	0.76(0.09)	0.75(0.07)	0.76(0.07)
Kidney right	0.81(0.07)	0.8(0.06)	0.75(0.07)	0.76(0.11)	0.76(0.06)	0.76(0.09)
adrenal gland L	0.03(0.00)	0.03(0.00)	0.03(0.00)	0.02(0.01)	0.02(0.00)	0.02(0.00)
adrenal gland R	0.03(0.01)	0.03(0.00)	0.02(0.00)	0.02(0.01)	0.03(0.01)	0.02(0.00)

a ;Values were expressed as mean, b ;±S.D., Statistically Significantly different from Negative Control group(\*p<0.05, \*\*p<0.01). Relative organ weight at 14 weeks after treatment of test substances. <sup>1)</sup>Control group, <sup>2)</sup>Negative control group, <sup>3)</sup>Extraction of soybeans group, <sup>4)</sup>Extraction of ferment soybeans group, <sup>5)</sup>Extraction of ferment arrowroot group, <sup>6)</sup>Extraction of ferment arrowflower group.

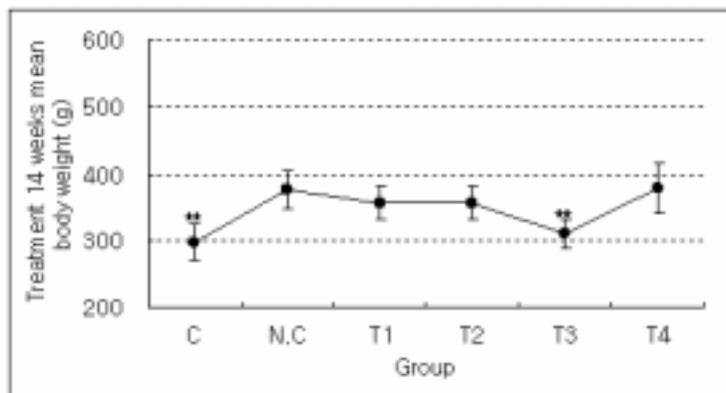


Fig. 20. Mean body weight changes of female rats with autopsy. C; Control group, N.C; Negative control group, T1; Extraction of soybeans group, T2; Extraction of ferment soybeans, T3; Extraction of ferment arrowroot group, T4; Extraction of ferment arrowflower group. Statistically Significantly different from negative control group(\*\* $p < 0.01$ ).

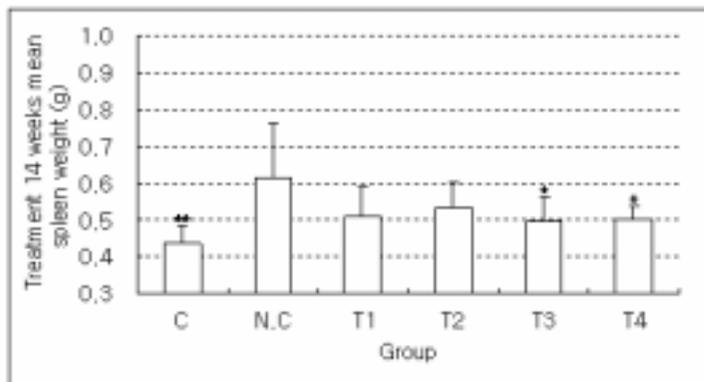


Fig. 21. Mean spleen weight changes of female rats treated with test substances. C; Control group, N.C; Negative control group, T1; Extraction of soybeans group, T2; Extraction of ferment soybeans, T3; Extraction of ferment arrowroot group, T4; Extraction of ferment arrowflower group. Statistically Significantly different from negative control group(\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

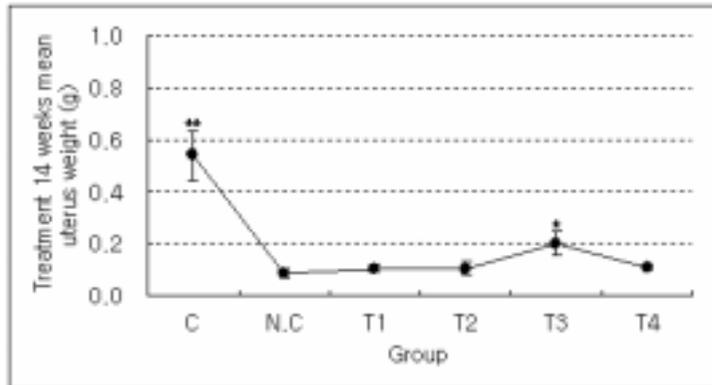


Fig. 22. Mean uterus weight changes of female rats treated at 14 Weeks with test substances. C; Control group, N.C; Negative control group, T1; Extraction of soybeans group, T2; Extraction of ferment soybeans, T3; Extraction of ferment arrowroot group, T4; Extraction of ferment arrowflower group. Statistically Significantly different from negative control group(\*p<0.05, \*\*p<0.01).

#### 마) 혈구 분석

난소 적출군에서 혈소판이 대조군에 비해 유의성(p<0.05) 있게 감소된 것이 관찰되었다. 그러나 시험물질 7주간 연속 경구투여 시, 모든 군에서는 혈소판이 음성대조군에 비해 증가되는 경향을 보였다. 특히 14주간 시험물질 투여 T3군에서는 음성 대조(N.C)군에 비해 유의성(p<0.05) 있게 증가되었다(Table 23, 244, Fig. 23, 24).

Table 23. Hematological values of female rats orally treated with Test substances.

Tested Unit	WBC x1000	#LYM %	#MO %	#GR %	RBC x10 <sup>6</sup>	HGB g/dl	HCT %	MCV fl	MCH pg	MCHC g/dl	PLT x1000
Group : C											
Mean	9.80 <sup>a</sup>	91.74	7.16	1.10	7.36	13.94	41.6	56.58	18.96	33.52	1088*
SD	0.74 <sup>b</sup>	1.68	1.59	0.22	0.33	0.49	1.7	2.72	0.72	0.52	314
Group : N.C											
Mean	8.20	90.72	7.9	1.38	7.62	14.22	42.52	55.88	18.54	33.2	640
SD	2.74	1.67	1.67	0.4	0.82	1.29	3.65	1.77	1.0	1.31	316
Group : T1(5g/kg/day)											
Mean	11.26	92.68	5.74	1.58	7.92	14.34	44.42	56.22	18.18	32.32	984
SD	4.31	1.49	0.92	0.84	0.55	0.57	1.59	2.93	1.38	1.99	214
Group : T2(5g/kg/day)											
Mean	10.56	91.96	6.4	1.64	7.95	14.86	45.4	57.18	18.72	32.72	962
SD	2.86	2.56	1.26	1.42	0.36	0.48	0.80	2.48	0.98	0.85	260
Group : T3(5g/kg/day)											
Mean	9.9	89.92	8.08	2.0	7.73	14.6	43.8	56.72	18.94	33.38	956
SD	4.73	5.89	3.61	2.37	0.71	1.0	3.65	0.84	0.59	0.72	131
Group : T4(5g/kg/day)											
Mean	7.74	90.68	7.68	1.64	7.55	14.58	43.02	56.98	19.32	33.94	880
SD	1.82	1.75	1.46	0.53	0.44	0.75	2.6	2.06	0.78	0.82	169

All hematological values were measured at 7 weeks after treatment of test substance. C; Control group, N.C; Negative control group, T1; Extraction of soybeans group, T2; Extraction of ferment soybeans, T3; Extraction of ferment arrowroot group, T4; Extraction of ferment arrowflower group. a ;Values were expressed as mean, b ;±S.D., Statistically Significant from Negative control(\*P<0.05).

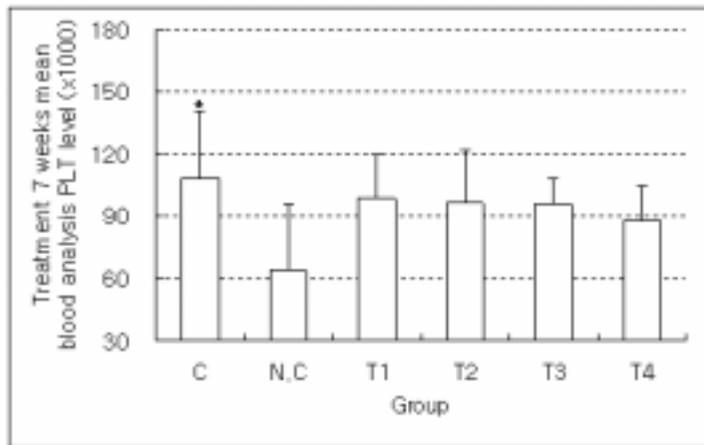


Fig. 23. Effect of test substances treated orally for 7 weeks on Platelet Values of female rats. C; Control group, N.C; Negative control group, T1; Extraction of soybeans group, T2; Extraction of ferment soybeans, T3; Extraction of ferment arrowroot group, T4; Extraction of ferment arrowflower group. Statistically Significantly different from negative control group(\* $p < 0.05$ ).

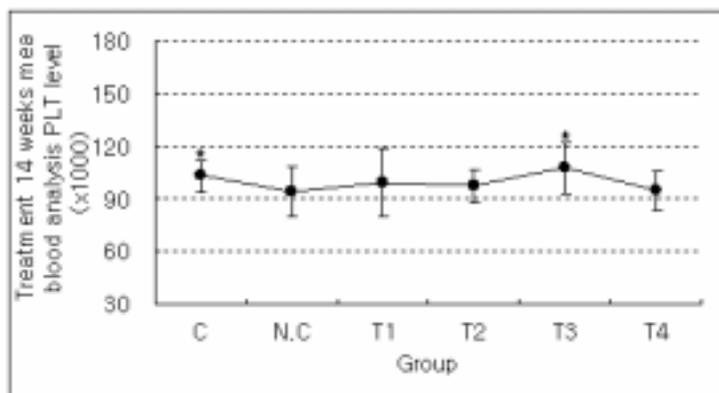


Fig. 24. Mean Platelet values of female rats treated at 14 Weeks with test substances. C; Control group, N.C; Negative control group, T1; Extraction of soybeans group, T2; Extraction of ferment soybeans, T3; Extraction of ferment arrowroot group, T4; Extraction of ferment arrowflower group. Statistically Significantly different from negative control group(\* $p < 0.05$ ).

Table 24. Hematological values of female rats orally treated with Test substances.

Tested	WBC	#LYM	#MO	#GR	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	PLT
Unit	x1000	%	%	%	x10 <sup>6</sup>	g/dl	%	f1	pg	g/dl	x1000
Group : C <sup>1)</sup>											
Mean	4.13 <sup>a</sup>	91.14	7.43	1.43	7.41	14.22	41.7	56.32	19.21	34.13	1034*
SD	1.29 <sup>b</sup>	3.9	3.22	0.85	0.38	0.63	2.31	1.65	0.58	1.06	92
Group : N.C <sup>2)</sup>											
Mean	6.18	91.64	7.06	1.28	7.54	14.46	42.07	55.84	19.21	34.39	943
SD	2.56	2.86	2.27	0.75	0.25	0.43	1.89	1.89	0.51	0.8	142
Group : T1 <sup>3)</sup> (5g/kg/day)											
Mean	4.06	91.72	7.06	1.22	7.64	14.59	42.89	56.14	19.11	34.07	993
SD	1.18	3.05	2.37	0.75	0.29	0.44	1.81	1.41	0.78	1.44	199
Group : T2 <sup>4)</sup> (5g/kg/day)											
Mean	4.98	90.71	7.67	1.62	7.54	14.63	42.5	56.36	19.4	34.49	973
SD	1.89	4.3	3.28	1.12	0.26	0.44	2.16	1.84	0.38	1.39	102
Group : T3 <sup>5)</sup> (5g/kg/day)											
Mean	5.34	92.62	6.18	1.2	7.74	14.47	42.98	55.6	18.76	33.68	1076*
SD	1.37	2.84	1.99	0.99	0.38	0.58	1.75	1.65	1.03	1.09	148
Group : T4 <sup>6)</sup> (5g/kg/day)											
Mean	5.93	90.32	7.92	1.76	7.61	14.29	42.2	55.54	18.82	33.89	949
SD	1.86	3.64	2.71	1.08	0.44	0.53	1.98	2.31	1.1	1.44	115

a ;Values were expressed as mean, b ;±S.D., All hematological values were measured at 14 weeks after treatment of test substances. <sup>1)</sup>Control group, <sup>2)</sup>Negative control group, <sup>3)</sup>Extraction of soybeans group, <sup>4)</sup>Extraction of ferment soybeans group, <sup>5)</sup>Extraction of ferment arrowroot group, <sup>6)</sup>Extraction of ferment arrowflower group. Statistically Significant from Negative control(\*P<0.05)

바) 혈액 생화학

시험물질을 투여한 T3군에서 Total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol 및 T.G가 음성 대조군에 비해 유의성(p<0.01) 있게 감소되는 경향을 보였으며 ALP 농도는 난소 적출시 증가되는 경향으로 나타났다. 특히 T3군에서 대조군에 비해 254 % 증가되었다. 혈청내 인산염 및 칼슘의 농도는 실험군에서 이상이 관찰되지 않았다(Table 25, 26, Fig. 25~36)

Table 25. Serum biochemical values of female rats orally treated with Test substances.

Variable	\ Sex	Female					
	\ Group	C	N.C	T1	T2	T3	T4
	\ Dose (g/kg/day)	0	0	5	5	5	5
	\ No. of animal	5	5	5	5	5	5
Total cholesterol(mg/dl)		88.8 <sup>a</sup>	109.8	123.0	105.2	35.4 <sup>**</sup>	112.8
SD		(18.65) <sup>b</sup>	(20.29)	(18.56)	(13.26)	(5.32)	(16.84)
HDL-cholesterol(mg/dl)		74.28	89.14	95.96	83.98	22.8 <sup>**</sup>	92.42
SD		(12.65)	(12.24)	(11.64)	(10.16)	(9.64)	(14.09)
LDL-cholesterol(mg/dl)		10.2	9.2	10.6	7.8	4.6 <sup>*</sup>	12.4
SD		(5.54)	(1.3)	(2.97)	(1.3)	(1.52)	(3.91)
Triglyceride(mg/dl)		24.6	43.2	46.0	49.8	30.8	34.4
SD		(22.3)	(27.7)	(34.43)	(45.77)	(7.4)	(38.8)
Alkaline phosphatase(IU/L)		110.4 <sup>*</sup>	237.4	246.8	188.4	280.8	261.2
SD		(31.67)	(81.05)	(62.21)	(10.19)	(74.12)	(93.96)
Phosphate(mg/dl)		5.94	6.62	6.24	6.08	6.4	6.98
SD		(1.17)	(1.16)	(0.33)	(0.93)	(0.51)	(1.36)
Calcium(mg/dl)		10.4	10.02	10.02	10.14	10.0	10.48
SD		(0.35)	(0.44)	(0.4)	(0.38)	(0.26)	(0.61)

a ;Values were expressed as mean, b ;±S.D., Statistically Significantly different from Negative Control group(\*p<0.05, \*\*p<0.01). Serum biochemical values at 7 weeks after treatment of test substances. C; Control group, N.C; Negative control group, T1; Extraction of soybeans group, T2; Extraction of ferment soybeans, T3; Extraction of ferment arrowroot group, T4; Extraction of ferment arrowflower group.

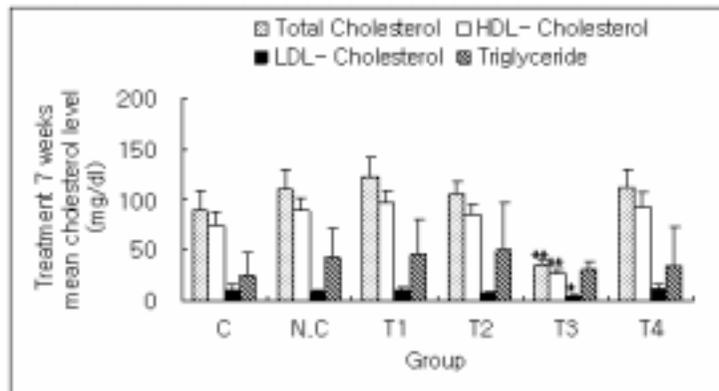


Fig. 25. Effect of test substances treated orally for 7 weeks on cholesterol Values of female rats(\*\*p<0.01. \*p<0.05). C; Control group, N.C; Negative control group, T1; Extraction of soybeans group, T2; Extraction of ferment soybeans, T3; Extraction of ferment arrowroot group, T4; Extraction of ferment arrowflower group. Statistically Significantly different from negative control group(\*p<0.05, \*\*p<0.01).

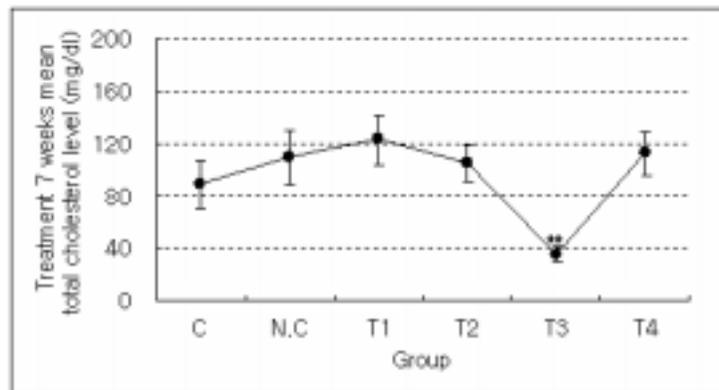


Fig. 26. Effect of test substances treated orally for 7 weeks on Total cholesterol Values of female rats(\*\*p<0.01). C; Control group, N.C; Negative control group, T1; Extraction of soybeans group, T2; Extraction of ferment soybeans, T3; Extraction of ferment arrowroot group, T4; Extraction of ferment arrowflower group. Statistically Significantly different from negative control group(\*\*p<0.01).

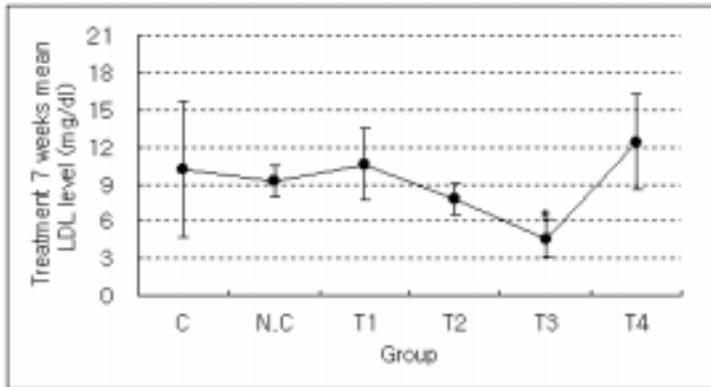


Fig. 27. Effect of test substances treated orally for 7 weeks on HDL cholesterol Values of female rats(\*\*p<0.01). C; Control group, N.C; Negative control group, T1; Extraction of soybeans group, T2; Extraction of ferment soybeans, T3; Extraction of ferment arrowroot group, T4; Extraction of ferment arrowflower group.

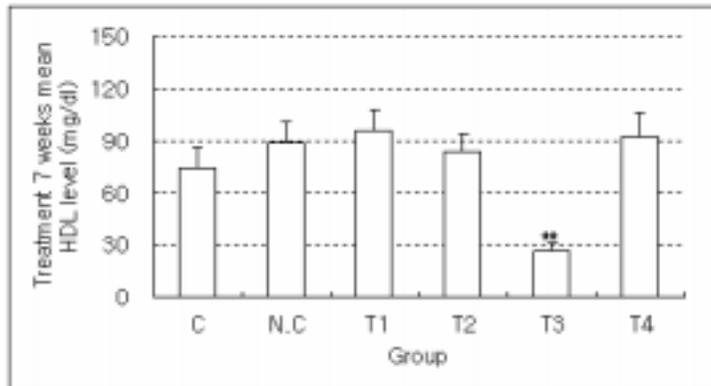


Fig. 28. Effect of test substances treated orally for 7 weeks on LDL cholesterol Values of female rats(\*p<0.05). C; Control group, N.C; Negative control group, T1; Extraction of soybeans group, T2; Extraction of ferment soybeans, T3; Extraction of ferment arrowroot group, T4; Extraction of ferment arrowflower group. Statistically Significantly different from negative control group(\*\*p<0.01).

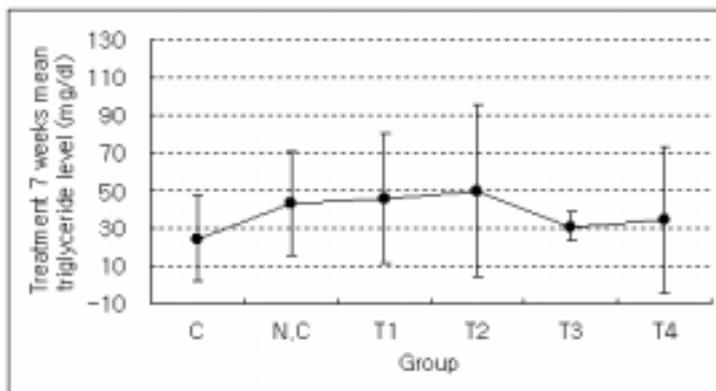


Fig. 29. Effect of test substances treated orally for 7 weeks on T.G Values of female rats. C; Control group, N.C; Negative control group, T1; Extraction of soybeans group, T2; Extraction of ferment soybeans, T3; Extraction of ferment arrowroot group, T4; Extraction of ferment arrowflower group.

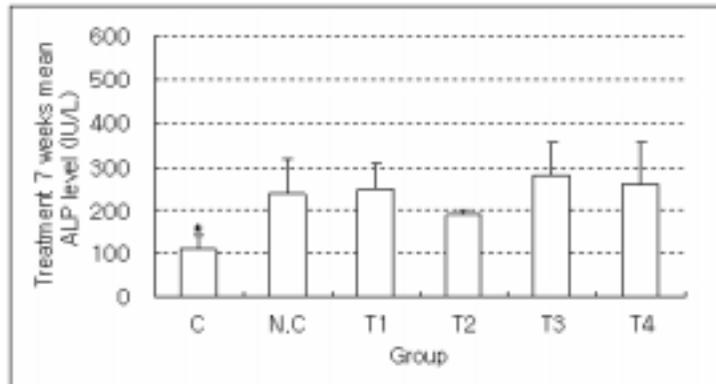


Fig. 30. Effect of test substances treated orally for 7 weeks on ALP cholesterol Values of female rats(\*p<0.05). C; Control group, N.C; Negative control group, T1; Extraction of soybeans group, T2; Extraction of ferment soybeans, T3; Extraction of ferment arrowroot group, T4; Extraction of ferment arrowflower group.

Table 26. Serum biochemical values of rats orally treated with Test substances.

Variable	\ Sex	Female					
	\ Group	C <sup>1)</sup>	N.C <sup>2)</sup>	T1 <sup>3)</sup>	T2 <sup>4)</sup>	T3 <sup>5)</sup>	T4 <sup>6)</sup>
	\ Dose (g/kg/day)	0	0	5	5	5	5
	\ No. of animal	10	10	10	10	10	10
Total cholesterol(mg/dl)		112.92 <sup>a</sup>	96.83	101.45	104.36	63.0 <sup>**</sup>	107.5
SD		(31.22) <sup>b</sup>	(15.83)	(14.58)	(16.67)	(28.38)	(20.77)
HDL-cholesterol(mg/dl)		90.82	83.63	86.82	90.26	55.34 <sup>**</sup>	92.73
SD		(20.99)	(12.82)	(9.51)	(12.35)	(24.84)	(16.71)
LDL-cholesterol(mg/dl)		10.33	7.42	9.18	8.09	5.2 <sup>**</sup>	7.58
SD		(6.01)	(1.93)	(2.79)	(2.51)	(1.87)	(2.15)
Triglyceride(mg/dl)		36.6	36.67	33.5	39.91	25.1	57.83
SD		(21.2)	(17.66)	(26.8)	(25.03)	(11.62)	(41.25)
Alkaline phosphatase(IU/L)		124.42	150.08	174.18	188.09	243.3 <sup>**</sup>	168.0
SD		(52.88)	(42.97)	(31.7)	(48.38)	(45.45)	(38.51)
Glucose(mg/dl)		106.27	89.10	88.89	98.55	102.4	97.64
SD		(25.25)	(23.7)	(15.48)	(34.6)	(29.62)	(18.88)
Phosphate(Pi)(mg/dl)		5.18	4.88	5.18	4.73	5.48	5.23
SD		(1.24)	(0.75)	(0.81)	(0.75)	(0.95)	(0.67)
Calcium(mg/dl)		10.69	9.97	10.15	9.95	9.94	10.23
SD		(0.8)	(0.29)	(0.51)	(0.32)	(0.3)	(0.37)

a ;Values were expressed as mean, b ;±S.D., Serum biochemical values at 14 weeks after treatment of test substances. <sup>1)</sup>Control group, <sup>2)</sup>Negative control group, <sup>3)</sup>Extraction of soybeans group, <sup>4)</sup>Extraction of ferment soybeans group, <sup>5)</sup>Extraction of ferment arrowroot group, <sup>6)</sup>Extraction of ferment arrowflower group. Statistically Significant from Negative control(\*\*p<0.01, \*p<0.05)

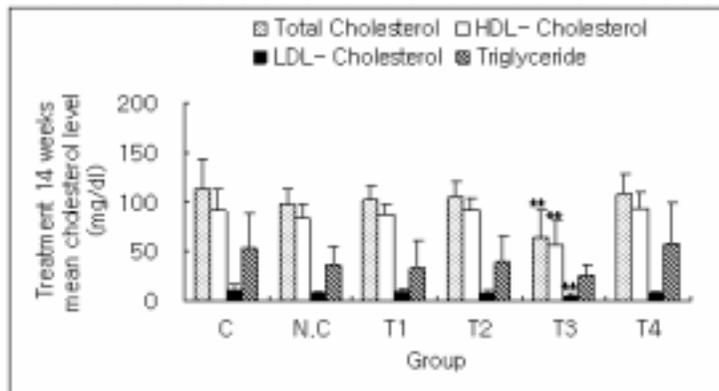


Fig. 31. Effect of test substances treated orally for 14 weeks on cholesterol Values of female rats(\*\*p<0.01, \*p<0.05). C; Control group, N.C; Negative control group, T1; Extraction of soybeans group, T2; Extraction of ferment soybeans, T3; Extraction of ferment arrowroot group, T4; Extraction of ferment arrowflower group. Statistically Significantly different from negative control group(\*p<0.05, \*\*p<0.01).

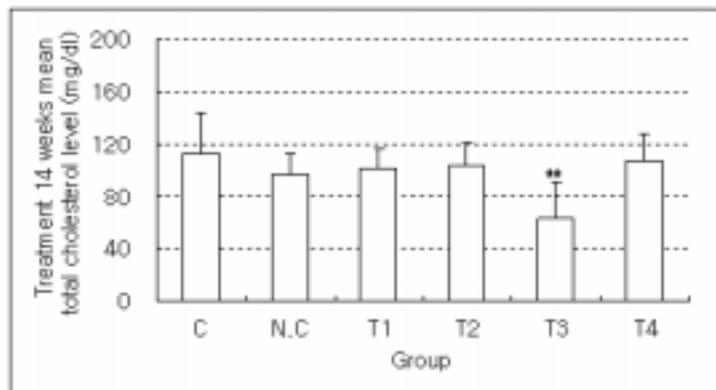


Fig. 32. Effect of test substances treated orally for 14 weeks on Total cholesterol Values of female rats(\*\*p<0.01). C; Control group, N.C; Negative control group, T1; Extraction of soybeans group, T2; Extraction of ferment soybeans, T3; Extraction of ferment arrowroot group, T4; Extraction of ferment arrowflower group. Statistically Significantly different from negative control group(\*\*p<0.01).

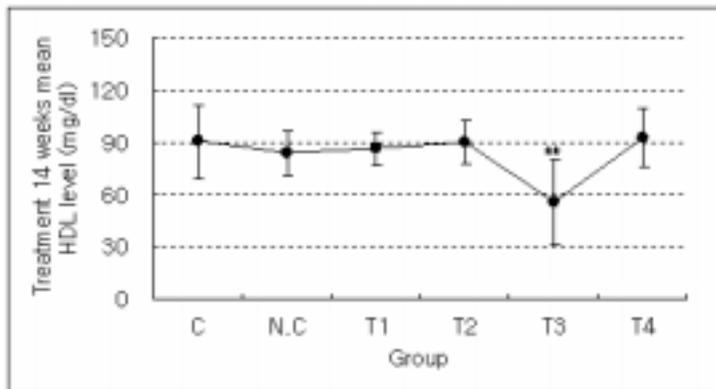


Fig. 33. Effect of test substances treated orally for 14 weeks on HDL cholesterol Values of female rats(\*\*p<0.01). C; Control group, N.C; Negative control group, T1; Extraction of soybeans group, T2; Extraction of ferment soybeans, T3; Extraction of ferment arrowroot group, T4; Extraction of ferment arrowflower group. Statistically Significantly different from negative control group(\*\*p<0.01).

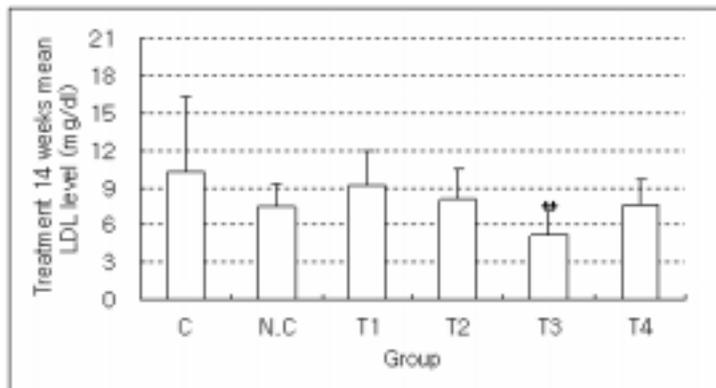


Fig. 34. Effect of test substances treated orally for 14 weeks on LDL cholesterol Values of female rats(\*\*p<0.01). C; Control group, N.C; Negative control group, T1; Extraction of soybeans group, T2; Extraction of ferment soybeans, T3; Extraction of ferment arrowroot group, T4; Extraction of ferment arrowflower group. Statistically Significantly different from negative control group(\*\*p<0.01).

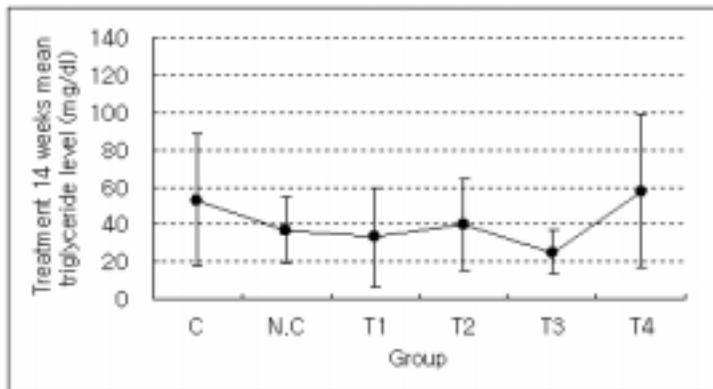


Fig. 35. Effect of test substances treated orally for 14 weeks on T. G Values of female rats. C; Control group, N.C; Negative control group, T1; Extraction of soybeans group, T2; Extraction of ferment soybeans, T3; Extraction of ferment arrowroot group, T4; Extraction of ferment arrowflower group.

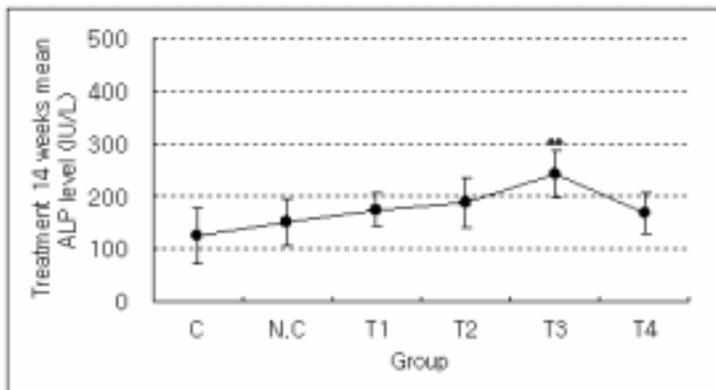


Fig. 36. Effect of test substances treated orally for 14 weeks on ALP Values of female rats (\*\*p<0.01). C; Control group, N.C; Negative control group, T1; Extraction of soybeans group, T2; Extraction of ferment soybeans, T3; Extraction of ferment arrowroot group, T4; Extraction of ferment arrowflower group. Statistically Significantly different from negative control group (\*\*p<0.01).

사) 호르몬 측정

난소적출 시 에스트로겐 함량은 대조군에 비해 21.37 % 감소하는 것으로 나타났으며 시험물질 투여 T1군 4.49, T2군 7.62로 각각 에스트로겐 농도는 음성대조군 보다 증가하는 경향을 보였으며 시험물질 투여 T3군 100.46 %, T4군 117.65 %로 대조군 보다 각각 증가되었다. 특히 T4군은 통계적으로 유의성( $p < 0.01$ ) 있게 관찰되었다.

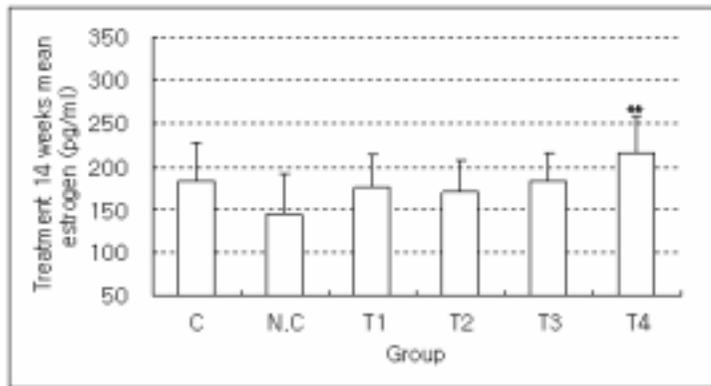


Fig. 37. Effect of test substances treated orally for 14 weeks on Estrogen of female rats(\*\* $p < 0.01$ ). C; Control group, N.C; Negative control group, T1; Extraction of soybeans group, T2; Extraction of ferment soybeans, T3; Extraction of ferment arrowroot group, T4; Extraction of ferment arrowflower group.

아) 골밀도 측정

7주 부검동물에서 흉골 및 대퇴골의 골밀도 변화는 측정되지 않았다. 그러나 난소적출 14주 대퇴골에서 대조군에 비해 N.C군 9.33%, T3군 5.46% 감소되었으며, 시험물질 14주 연속 경구투여 시, 그 감소된 양의

41.48%를 회복시키는 것으로 나타났다(Table 27).

Table 27. Bone density values of rats orally treated with Test substances

Variable	\ Sex	Female					
	\ Group	C	N.C	T1	T2	T3	T4
	\ Dose (g/kg/day)	0	0	5	5	5	5
AD 7 weeks							
Sternum		0.0750 <sup>a</sup>	0.0732	0.0729	0.0762	0.0701	0.071
		(0.005) <sup>b</sup>	(0.016)	(0.012)	(0.004)	(0.005)	(0.007)
Femur		0.1814	0.1863	0.1891	0.183	0.1839	0.1853
		(0.112)	(0.008)	(0.008)	(0.008)	(0.010)	(0.009)
AD 14 weeks							
Sternum		0.0658	0.056	0.0571	0.0563	0.0592	0.0558
		(0.005)	(0.003)	(0.005)	(0.003)	(0.006)	(0.005)
Femur		0.2068	0.1875	0.1912	0.1878	0.1955	0.1867
		(0.007)	(0.01)	(0.012)	(0.007)	(0.008)	(0.009)

a ;Values were expressed as mean, b ;±S.D., Statistically Significantly different from Negative Control group. Sternum & Femur bone density values at 7 & 14 weeks after treatment of test substance. C; Control group, N.C; Negative control group, T1; Extraction of soybeans group, T2; Extraction of ferment soybeans, T3; Extraction of ferment arrowroot group, T4; Extraction of ferment arrowflower group.

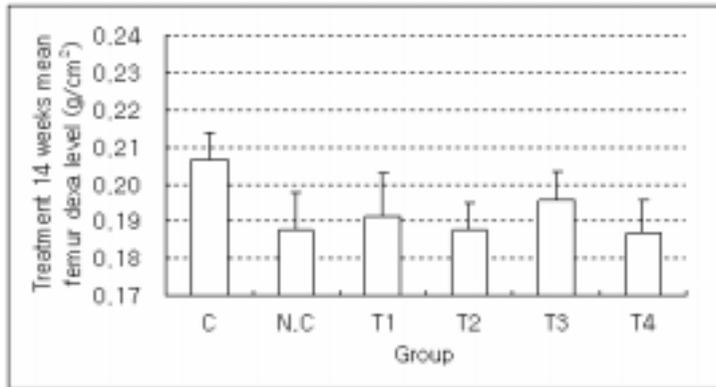


Fig. 38. Effect of test substances treated orally for 14 weeks on Bone density Values of female rats. C; Control group, N.C; Negative control group, T1; Extraction of soybeans group, T2; Extraction of ferment soybeans, T3; Extraction of ferment arrowroot group, T4; Extraction of ferment arrowflower group.

#### 자) 파골 세포 측정

난소적출 동물에서 파골세포의 활성이 증가하였으며, 시험물질 7주 처리 T3군에서는 음성대조군에 비해 미약한 활성을 보였다. 따라서 본 시험법에 의한 시험물질 *Extraction of ferment arrowroot*은 파골세포 활성을 억제하는 것으로 사료된다(Fig. 39).

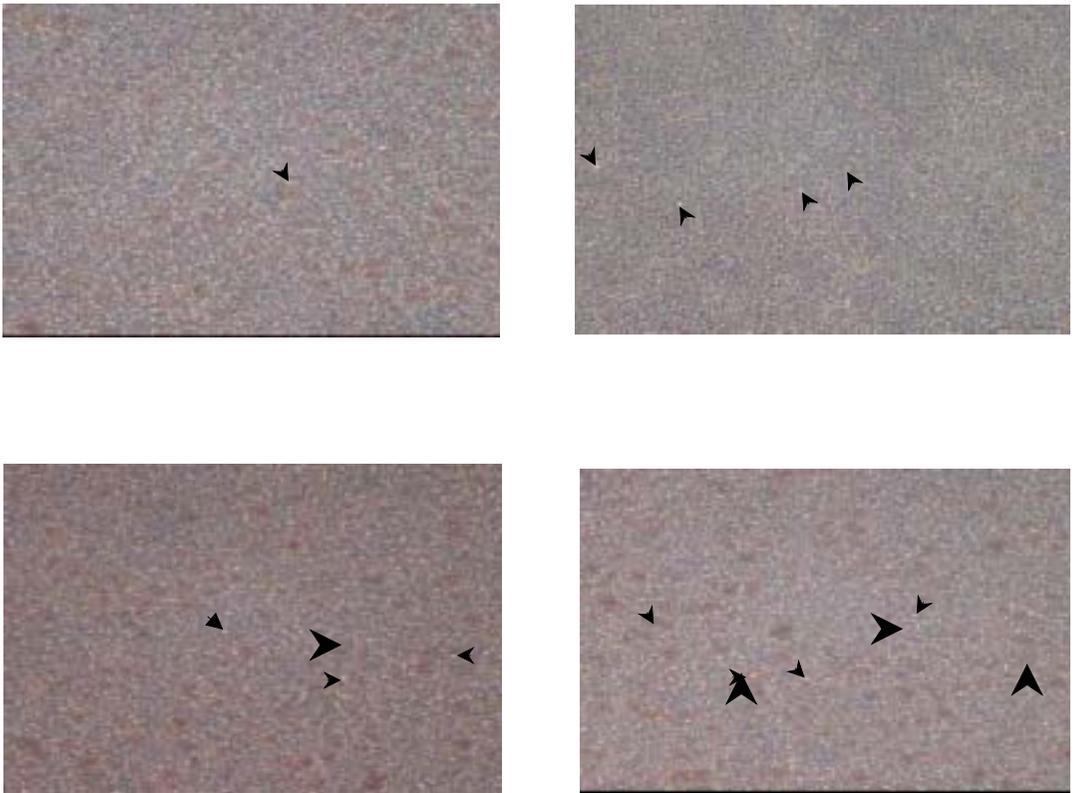


Fig. 39. Effect of test substances treated orally for 7 weeks on osteoclast activity of female rats. C; control group, N.C; negative control group, T3; extraction of ferment arrowroot group, T4; extraction of ferment arrowflower group. (Sodium hypochloride stain, x10,000) C, N.C, T3, T4

#### 차) 조직 소견

7주 및 14주 시험물질 연속 경구투여 후, 대조군의 모든 동물에서 대퇴골의 뼈지주(Trabeculae), 파골세포(Osteoclast)의 출현빈도 및 골수내 지방축적(Fatty accumulation)이 정상으로 관찰되었다. N.C군에서는 뼈지주가 현저히 감소되었고 파골세포의 출현빈도는 상대적으로 증가하였다(Photo 4). 또한 골수내 지방 축적이 현저히 증가하였다. 난소적출 후

에 시험물질 T1, T2 및 T4 투여시 미세한 개선 효과가 형태학적으로 관찰되었으며, T3군에서는 시험물질 7주 및 14주 연속경구 투여 시, 대퇴골 뼈지주와 파골세포의 출현빈도에서 N.C군에 비해 개선효과가 확인되었고 특히 14주 시험의 경우 대퇴골 뼈지주에서 7주 시험보다 더 현저한 개선효과가 뚜렷이 관찰되었을 뿐만 아니라 지방축적에서도 구별이 가능한 정도의 개선효과가 있는 것으로 나타났다. 자궁조직에 대한 병리소견은 Control군에서는 정상적인 자궁조직 소견이 관찰되었으나 N.C, T1 및 T4군에서는 현저한 자궁위축 소견이 나타났다. 그러나 T3군에서는 미약한 자궁위축소견이 관찰되었다(Table 28~39, Fig. 40, 41).

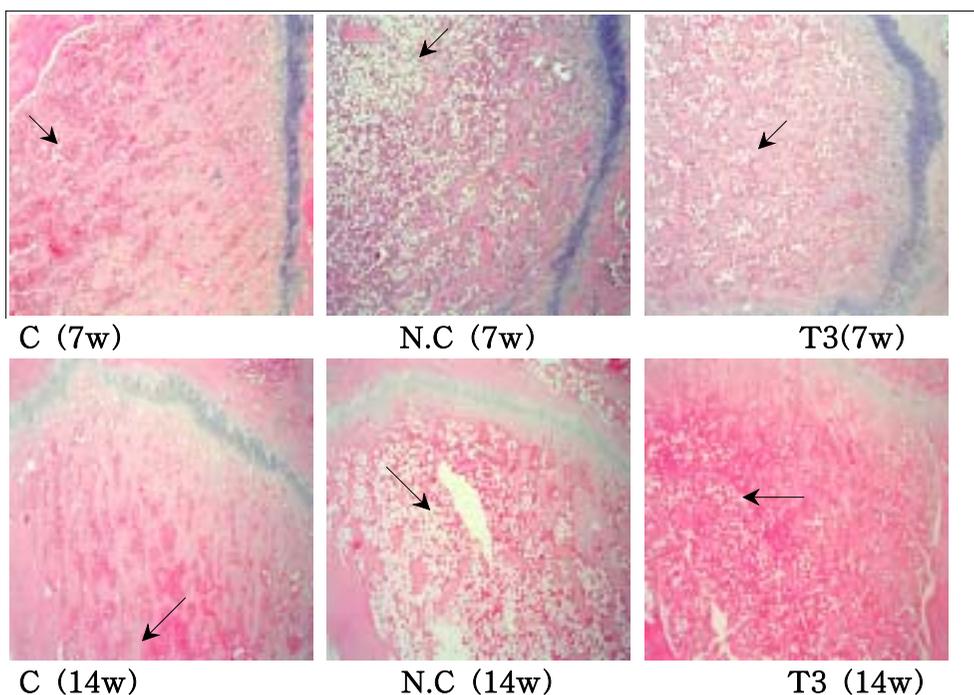


Fig. 40. Effect of test substances treated orally for 7 & 14 weeks on femur photomicrograph of female rats. (H-E stain, x40) C (7w), Femur trabeculae(+4) was observed in large quantities normally while fat(+1) accumulation was showed slightly in bone marrow in the control group. N.C (7w), Femur trabeculae(+2) was remarkably decreased and fat(+3) accumulation was also considerably showed in the negative control group compared to that of the control group. T3 (7w), Femur trabeculae(+3) was showed improved effect perceptibly in T3 group and fat(+2) accumulation was considerably decreased compared to that of the N.C. group. C (14w), Femur trabeculae(+4) was observed in large quantities normally while fat(+1) accumulation was showed slightly in bone marrow in the control group. N.C (14w), Femur trabeculae(+1) was severely decreased and fat(+3) accumulation was also considerably showed in the negative control group compared to that of the control group. T3 (14w), Femur trabeculae(+3) was showed improved effect perceptibly in T3 group and fat(+2) accumulation was considerably decreased compared to that of the N.C. group.

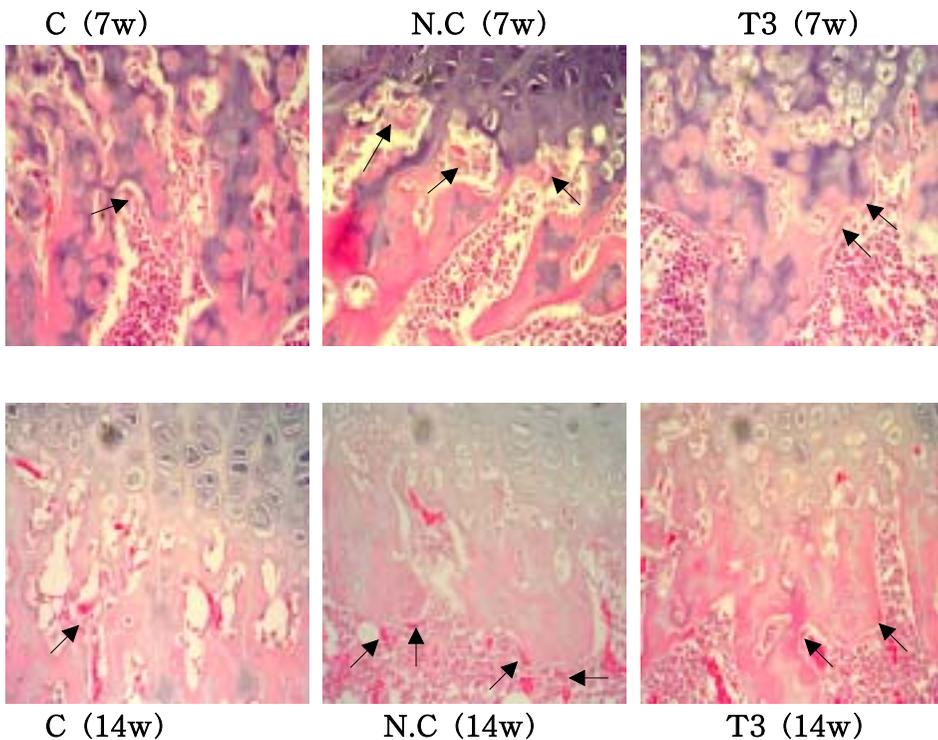


Fig. 41. Effect of test substances treated orally for 7 & 14 weeks on femur photomicrograph of female rats. (H-E stain, x400)

C (7w), The appearance probability of femur osteoclast was minimal(+/-) showed in the control group.

N.C (7w), The appearance probability of femur osteoclast was remarkably(+2) showed in the negative control compared to that of the control group.

T3 (7w), The appearance probability of femur osteoclast was mild(+1) showed improved effect recognizably in the T3 group compared to that of the N.C group.

C (14w), The appearance probability of femur osteoclast was minimal(+/-) showed in the control group.

N.C (14w), The appearance probability of femur osteoclast was severe(+3) showed in the negative control compared to that of the control group.

T3 (14w), The appearance probability of femur osteoclast was moderate(+2) showed improved effect recognizably in the T3 group compared to that of the N.C group.

Table 28. Histopathological findings of control group

Parameter(7 weeks)	Histopathological findings																			
C(control group)	1	2	3	4	5															
Trabeculae in epiphysis and metaphysis in the femur	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4										
Frequency of osteoclast	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+1	+/-	+/-	+/-										
Fatty accumulation	+1	+1	+2	+2	+1	+/-	+1	+1	+1	+/-										

Effect of test substances treated orally for 7 weeks on histopathological findings of femur.

Table 29. Histopathological findings of control group

Parameter(14 weeks)	Histopathological findings																			
C(control group)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10										
Trabeculae in epiphysis and metaphysis in the femur	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4	+4
Frequency of osteoclast	+/-	+1	+/-	+1	+/-	+1	+/-	+/-	+1	+1	+1	+1	+/-	+/-	+1	+/-	+1	+1	+/-	+/-
Fatty accumulation	+/-	+/-	+1	+1	+1	+1	+/-	+/-	+1	+1	+/-	+1	+1	+1	+/-	+/-	+/-	+/-	+1	+1

Effect of test substances treated orally for 14 weeks on histopathological findings of femur.

Uterus: Normal

Table 30. Histopathological findings of negative control group

Parameter(7 weeks)	Histopathological findings																			
N.C(Ovariectomized group)	1	2	3	4	5															
Trabeculae in epiphysis and metaphysis in the femur	+1	+1	+2	+1	+1	+2	+1	+2	+1	+2										
Frequency of osteoclast	+2	+2	+2	+1	+2	+2	+2	+1	+2	+2										
Fatty accumulation	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3										

Effect of test substances treated orally for 7 weeks on histopathological findings of femur.

Table 31. Histopathological findings of negative control group

Parameter(14 weeks)	Histopathological findings																			
N.C(Ovariectomized group)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10										
Trabeculae in epiphysis and metaphysis in the femur	+1	+1	+2	+1	+1	+1	+1	+2	+1	+1	+1	+1	+2	+1	+2	+1	+1	+1	+1	+1
Frequency of osteoclast	+3	+3	+2	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+2	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3
Fatty accumulation	+3	+3	+3	+2	+3	+3	+3	+3	+3	+2	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3

Effect of test substances treated orally for 14 weeks on histopathological findings of femur.

Uterus: Marked atrophy

Table 32. Histopathological findings of T1 group

Parameter(7 weeks)	Histopathological findings																			
T1(Ovariectomized group treated with T1)	1	2		3		4		5												
Trabeculae in epiphysis and metaphysis in the femur	+1	+2	+2	+2	+1	+1	+2	+2	+1	+1										
Frequency of osteoclast	+2	+2	+2	+2	+1	+1	+1	+1	+2	+1										
Fatty accumulation	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+2	+2	+3	+3										

Effect of test substances treated orally for 7 weeks on histopathological findings of femur.

Table 33. Histopathological findings of T1 group

Parameter(14 weeks)	Histopathological findings																			
T1(Ovariectomized group treated with T1)	1	2		3		4		5		6	7	8		9	10					
Trabeculae in epiphysis and metaphysis in the femur	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+2	+2	+1	+1	+2	+1	+1	+1	+1	+1	+2	+1	+1	+1
Frequency of osteoclast	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+2	+2	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+2	+2	+3	+3	+3
Fatty accumulation	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+2	+2	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+2	+3

Effect of test substances treated orally for 14 weeks on histopathological findings of femur.

Uterus: Marked atrophy

Table 34. Histopathological findings of T2 group

Parameter(7 weeks)	Histopathological findings														
T2(Ovariectomized group treated with T2)	1	2		3		4		5							
Trabeculae in epiphysis and metaphysis in the femur	+1	+1	+1	+2	+2	+2	+1	+1	+2	+2					
Frequency of osteoclast	+2	+3	+1	+1	+1	+1	+1	+2	+1	+1					
Fatty accumulation	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3					

Effect of test substances treated orally for 7 weeks on histopathological findings of femur.

Table 35. Histopathological findings of T2 group

Parameter(14 weeks)	Histopathological findings																		
T2(Ovariectomized group treated with T2)	1	2		3		4		5		6	7	8	9	10					
Trabeculae in epiphysis and metaphysis in the femur	+1	+1	+2	+1	+2	+1	+2	+1	+1	+1	+1	+1	+3	+1	+1	+1	+1	+1	
Frequency of osteoclast	+3	+2	+3	+3	+3	+3	+2	+2	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+2	+2	+2
Fatty accumulation	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+2	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+2	+2	+3	+3

Effect of test substances treated orally for 14 weeks on histopathological findings of femur.

Uterus: Marked atrophy

Table 36. Histopathological findings of T3 group

Parameter(7 weeks)	Histopathological findings																			
T3(Ovariectomized group treated with T3)	1	2	3	4	5															
Trabeculae in epiphysis and metaphysis in the femur	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+2	+3										
Frequency of osteoclast	+2	+2	+1	+1	+1	+/-	+1	+1	+1	+1										
Fatty accumulation	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3										

Effect of test substances treated orally for 7 weeks on histopathological findings of femur.

Table 37. Histopathological findings of T3 group

Parameter(14 weeks)	Histopathological findings																			
T3(Ovariectomized group treated with T3)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10										
Trabeculae in epiphysis and metaphysis in the femur	+2	+2	+2	+2	+1	+3	+3	+2	+2	+2	+3	+3	+3	+2	+1	+2	+1	+2	+3	+3
Frequency of osteoclast	+3	+2	+3	+3	+3	+3	+3	+2	+2	+3	+2	+2	+2	+3	+3	+3	+2	+2	+3	+2
Fatty accumulation	+3	+3	+2	+2	+2	+3	+1	+2	+2	+2	+1	+2	+2	+2	+3	+3	+3	+3	+3	+3

Effect of test substances treated orally for 14 weeks on histopathological findings of femur.

Uterus: Mild atrophy

Table 38. Histopathological findings of T4 group

Parameter(7 weeks)	Histopathological findings														
T4(Ovariectomized group treated with T4)	1	2		3		4		5							
Trabeculae in epiphysis and metaphysis in the femur	+2	+2	+1	+1	+1	+2	+1	+1	+1	+1					
Frequency of osteoclast	+2	+1	+2	+1	+2	+1	+2	+1	+2	+2					
Fatty accumulation	+2	+2	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3					

Effect of test substances treated orally for 7 weeks on histopathological findings of femur.

Table 39. Histopathological findings of T4 group

Parameter(14 weeks)	Histopathological findings																			
T4(Ovariectomized group treated with T4)	1	2		3		4		5		6	7	8	11	12						
Trabeculae in epiphysis and metaphysis in the femur	+2	+2	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+2	+2	+2	+1	+2	+1
Frequency of osteoclast	+2	+2	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+2	+3	+2	+3	+2	+3
Fatty accumulation	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3	+3

Effect of test substances treated orally for 14 weeks on histopathological findings of femur.

Uterus: Marked atrophy

카) 복부 지방 측정

시험동물 부검 시, 난소 적출 음성대조군에서 복부지방이 유의성 ( $p<0.01$ ) 있게 증가되었다. 그러나 시험물질 14주간 연속경구 투여군에 서는 복부지방이 음성대조군에 비해 유의성( $p<0.01$ ) 있게 감소되었다 (Table 40). 따라서 난소적출 14주 복부지방은 대조군에 비해 N.C군 264% 증가하였으며 T3군은 81%로 대조군에 비해 오히려 복부지방을 감소시켰다(Fig. 42~45).

Table 40. Body lipid values of rats orally treated with Test substances.

Variable	\ Sex	Female					
	\ Group	C <sup>1)</sup>	N.C <sup>2)</sup>	T1 <sup>3)</sup>	T2 <sup>4)</sup>	T3 <sup>5)</sup>	T4 <sup>6)</sup>
	\ Dose (g/kg/day)	0	0	5	5	5	5
	\ No. of animal	10	10	10	10	10	10
Abdominal wall Lipid(g)		3.83** (1.85)	9.72 <sup>a</sup> (2.74) <sup>b</sup>	7.31 (1.67)	7.04 (1.87)	3.48** (1.23)	8.68 (3.97)
Abdominal Lipid(g)		6.7** (1.76)	18.03 (7.36)	14.34 (4.6)	12.98* (3.94)	5.05** (2.55)	17.22 (3.31)

a ;Values were expressed as mean, b ;±S.D., Body lipid values at 14 weeks after treatment of test substances. <sup>1)</sup>Control group, <sup>2)</sup>Negative control group, <sup>3)</sup>Extraction of soybeans group, <sup>4)</sup>Extraction of ferment soybeans group, <sup>5)</sup>Extraction of ferment arrowroot group, <sup>6)</sup>Extraction of ferment arrowflower group. Statistically Significant from Negative control(\* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ )

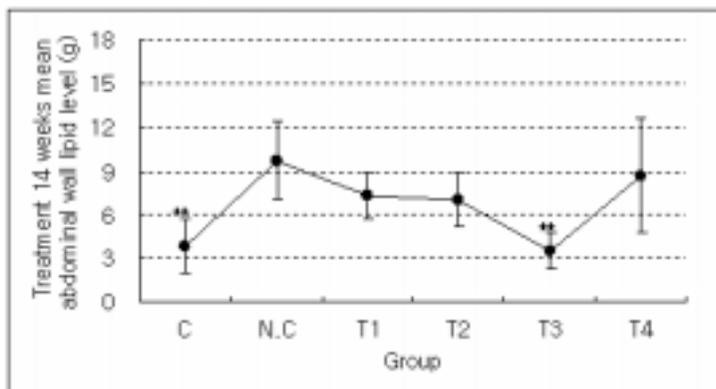


Fig. 42. Mean Total body lipid weight changes of female rats treated with test substances(\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ). C; Control group, N.C; Negative control group, T1; Extraction of soybeans group, T2; Extraction of ferment soybeans, T3; Extraction of ferment arrowroot group, T4; Extraction of ferment arrowflower group.

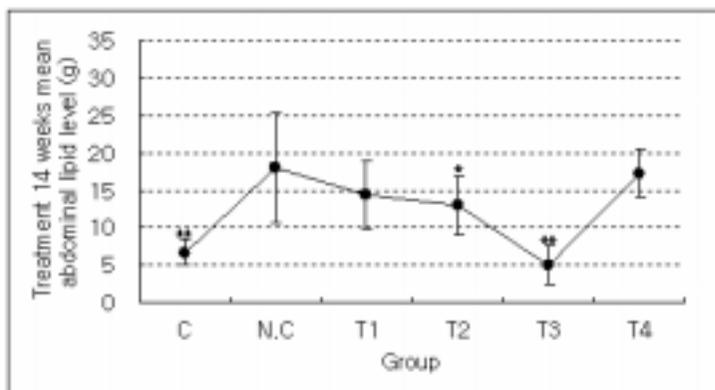


Fig. 43. Mean Abdominal wall lipid weight changes of female rats treated with test substances(\*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ ). C; Control group, N.C; Negative control group, T1; Extraction of soybeans group, T2; Extraction of ferment soybeans, T3; Extraction of ferment arrowroot group, T4; Extraction of ferment arrowflower group.

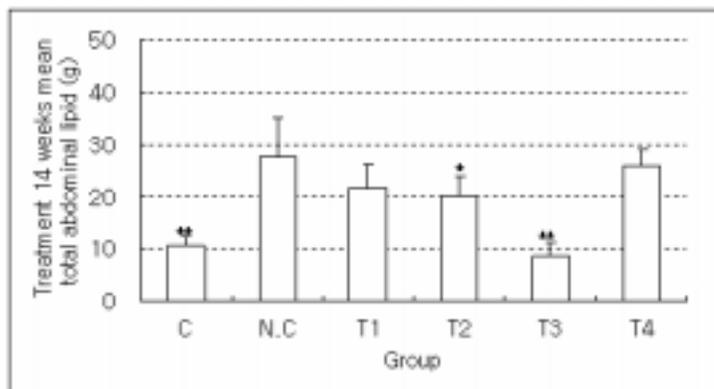


Fig. 44. Effect of test substances treated orally for 14 weeks on Bone density Values of Female rats(\*\*p<0.01. \*p<0.05). C; Control group, N.C; Negative control group, T1; Extraction of soybeans group, T2; Extraction of ferment soybeans, T3; Extraction of ferment arrowroot group, T4; Extraction of ferment arrowflower group. Statistically Significantly different from negative control group(\*p<0.05, \*\*p<0.01).



Fig. 45. Effect of test substances treated orally for 14 weeks on total body lipid photo of Female rats. C; Control group, N.C; Negative control group, T3; Extraction of ferment arrowroot group.

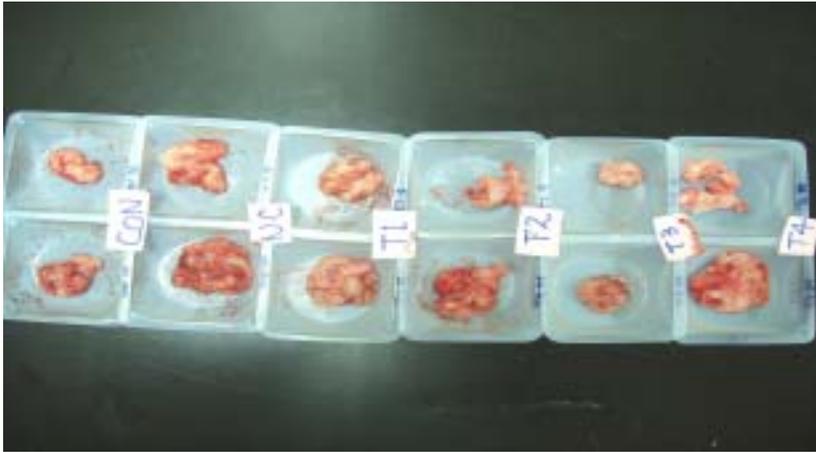


Fig. 46. Effect of test substances treated orally for 14 weeks on total body lipid photo of Female rats. C; Control group, N.C; Negative control group, T1; Extraction of soybeans group, T2; Extraction of ferment soybeans, T3; Extraction of ferment arrowroot group, T4; Extraction of ferment arrowflower group.

지금까지 연구 결과를 고찰하여 보면, 골다공증의 유형은 3가지로 나눌 수 있는데, 그 첫번째는 원인불명의 골다공증(idiopathic osteoporosis), 둘째는 폐경기 이후 여성호르몬 부족에 의해 나타나는 질병으로 Type I, 나머지는 고령화된 노인층의 남녀에게 발견되는 Type II의 골다공증으로 분류할 수 있다. 치료방법에는 estrogen 효과와 같이 파골세포의 활성을 억제시켜 골다공증을 예방 하는 방법과, Bone modeling unit의 활성을 증가시켜 조골세포의 활성을 높여 골다공증을 치료하는 방법이 있다(Scrip reports, 1994). 특히 폐경기에 나타나는 골다공증환자의 경우에는 혈중 콜레스테롤의 증가를 동반하며 이는 LDL-cholesterol의 증가로 나타난다(Dempster et al. 1993). 폐경기 골다공증 환자에게 estrogen을 투여할 경우 LDL-cholesterol은 감소하고 HDL-cholesterol은 증가 한다고 알려져 있다(Kalu et al. 1995,

Bryant et al. 1998). 그러나 estrogen을 장기간 복용함으로써 자궁비대 및 자궁암(endometrial cancer) 유발할 수 있다는 부작용이 보고되어 있다 (Bergkvist et al. 1989). 본 연구에서 Sprague-Dawley계 Female의 난소적출 모형을(Nordin et al. 1980) 이용하여 골다공증을 유발하였으며, 폐경기 이후 Type I의 유형인 갱년기 질환의 예방 및 치료효능 연구에 사용하였다.

시험물질 14주간 연속경구 투여에 의한 임상증상 및 사망동물은 관찰되지 않았으나 난소를 제거한 시험동물의 체중이 대조군에 비해 1주부터 유의성( $p < 0.01$ )있게 증가되었다. 이는 난소 적출에 의한 호르몬의 급격한 변화로 체지방의 축적을 유도하여 시험동물의 체중을 증가시킨 것으로 사료된다. 여기에 시험물질 2주부터 14주까지 연속 경구투여 시 증가됐던 체중이 T3군에서 유의성( $p < 0.01$ )있게 감소됨을 확인하였다. 이는 본 시험물질이 estrogen과 같은 유사 작용으로 체중 증가를 억제시킨 것으로 생각된다.

부검소견으로는 모든 투여 군에서 시험물질 투여와 관련된 이상소견은 나타나지 않았으며, 난소 적출에 의한 자궁 위축 현상이 N.C(음성대조) 군에서 뚜렷이 관찰되었다. 그러나 시험물질을 투여한 T3군에서는 음성대조군 보다 위축된 정도가 7주 23.64 %, 14주에는 24.44 %로 통계적으로 유의성( $p < 0.05$ ) 있게 증가되었다. 또한 비장 장기는 대조군에 비해 난소 적출군에서 종대 되었으며, 이에 시험물질 T3 및 T4를 14주간 연속 경구투여 시, 비대된 장기를 유의성( $p < 0.05$ ) 있게 감소시켰다. 이는 시험물질이 에스트로겐 결핍에 의한 자궁, 비장장기의 변화에 대하여 estrogen 대체 효능이 있음을 의미한다.

혈구변화는 난소 적출군에서 혈소판이 대조군에 비해 유의성( $p < 0.05$ ) 있게 감소된 것이 관찰되었으며, 시험물질 7주간 연속 경구투여 시, 모든 시험물질 투여 군에서 혈소판이 음성대조군에 비해 증가되는 경향을 보

였다. 특히 14주간 시험물질 투여 T3군에서는 음성 대조군에 비해 유의성( $p < 0.05$ ) 있게 증가되었다. 이는 조혈작용이 N.C군에 비해 T3군에서 왕성히 일어나고 있는 것으로 생각된다. 일반적으로 골 성장이 활발히 이루어질 때 혈장내 ALP 농도는 증가한다. SD(Rat) 암컷의 난소제거시, ALP의 농도는 대조군보다 증가되었으며 시험물질 투여 T3군에서 혈청내(7주 및 14주차) ALP 농도의 증가폭이 더 유의성( $p < 0.01$ ) 있게 나타났다. 이는 시험물질에 의해 골 성장이 활발히 진행되고 있음을 추측할 수 있다. Phosphate 및 calcium의 농도는 대조군과 비교하여 모든 군에서 변화는 관찰되지 않았다. 스트레스, 노화, 임신 및 호르몬 balance 등은 콜레스테롤 수치에 영향을 미친다. 콜레스테롤 농도는 음성대조군에 비해 7주 68%, 14주 35% 각각 감소되었다. 위의 결과로 보아 시험물질 T3는 steroid hormone, sex hormone의 선구물질인 cholesterol이 estrogen으로 대사되는 것을 촉진시킨 것으로 추측할 수 있다. 또한 동맥경화증의 중요 발병요인인 LDL-cholesterol 양은 7주 50%, 14주 30%, 혈중 중성지방은 7주 29%, 14주 32% 감소가 확인되었다. 따라서 시험물질 T3군에서 모든 cholesterol이 유의성 있게 ( $p < 0.01$ ) 감소됨을 확인하였다. 대조군에 비해 난소 적출시 혈청내 콜레스테롤 농도변화는 크게 발견되지 않았다.

식물성 에스트로젠은 isoflavone류, coumestan류, 그리고 lignan류로 분류할 수 있는데, 이들은 hormone 작용, protein tyrosine kinase 및 DNA topoisomerase와 관련한 종양세포 분화 및 mitogenesis, 신혈관 생성작용, 항산화 작용, 골다공증 등의 생리적 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다(Fotsis et al. 1993). 그러나 부작용으로 생식능력 이상, 고환이나 유방암과 같은 에스트로젠 의존적인 암의 발병률을 증가 시킨다(Formann et al. 1994, Sharpe et al. 1993, Wolff et al. 1977). 난소 적출

시 에스트로겐 함량은 대조군에 비해 21.37 % 감소하는 것으로 나타났으며 시험물질 투여 T1군 4.49 %, T2군 7.62 %로 각각 에스트로겐 농도는 음성대조군 보다 증가하는 경향을 보였으며 시험물질 투여 T3군 100.46 %, T4군 117.65 %로 대조군 보다 각각 증가되었다. 특히 T4군은 통계적으로 유의성( $p < 0.01$ ) 있게 나타났다. 이는 난소적출에 의한 에스트로겐 결핍을 시험물질이 호르몬 생성을 촉진시키는 것으로 사료된다.

7주 부검동물에서 흉골 및 대퇴골의 골밀도 변화는 측정되지 않았다. 그러나 난소적출 14주 대퇴골에서 대조군에 비해 N.C군 9.33%, T3군 5.46% 감소되었으며, 시험물질 14주 연속 경구투여 시, 그 감소된 량의 41.48%를 회복시키는 것으로 나타났다. 따라서 시험물질 T3는 뼈지주세포 및 파골세포에 관여하여 골밀도를 증가시키는 물질로 작용되는 것을 알 수 있었다. 파골세포 측정(원 등 1999, Ravel et al 2003)<sup>1)</sup>은 난소를 적출한 후 골다공증을 유발한 랫트를 이용하여 대퇴골에서 분리한 파골세포의 활성을 비교하여 평가하였다. 파골세포의 활성은 난소적출 동물에서 증가되었으며, 시험물질 7주처리 T3군에서는 음성대조군에 비해 미약한 활성을 보였다. 이상의 결과로 보아, 본 시험조건에서 파골세포의 활성감소에 시험물질 T3는 영향을 미치는 것으로 사료된다.

병리조직 소견은 Control군에서 대퇴골의 뼈 지주(trabeculae)가 정상적으로 많이(+4) 관찰되었으며(7주 및 14주), 파골세포(osteoclast)의 출현빈도는 매우 미약(7주 +/-, 14주 +/-)하였다. 이에 반해 N.C군에서는 대퇴골에서 뼈 지주가 현저히 감소(7주 +2, 14주 +1)되었고 대퇴골 파골세포의 출현빈도는 상대적으로 증가(7주 +2, 14주 +3)하였다. 시험물질투여군의 경우 T1, T2 및 T4에서는 뼈 지주 정도에 있어 난소 절제한 N.C군에 비교할 때 유의할 만한 개선효과를 관찰할 수 없었으나, T3군에서는 대퇴골의 뼈 지주에서 구별이 가능한 정도의 유의한 개선효과(7

주 +3, 14주 +3)가 확인되었다. 파골세포의 출현빈도에 있어서도 시험물질투여군의 경우 T1, T2 및 T4에서는 뼈 파괴세포의 출현빈도에 있어 난소 절제한 N.C군에 비교할 때 유의할 만한 개선효과를 관찰할 수 없었으나, T3에서는 대퇴골의 파골세포가 N.C군에 비교할 때 구별이 가능한 정도의 감소(7주 +1, 14주 +2)를 확인할 수 있었다. 대퇴골에서의 뼈 지수와 파골세포 출현빈도 외에 본 실험에서 평가한 골수내 지방축적에 있어서는 Control군에서는 골수내 지방축적이 정상적으로 적게(7주 및 14주 +1) 관찰되었다. 이에 반해 N.C군에서는 골수내 지방축적이 현저히 증가(7주 및 14주+3)하였다. 7주 시험의 경우 모든 시험물질 투여군에서 난소 절제한 N.C군에 비교할 때 약간의 감소가 있었으나 주목할 만한 차이점은 확인하지 못하였다. 그러나 14주 시험의 시험물질투여군의 경우 T1, T2 및 T4에서는 골수내 지방축적에 있어 난소 절제한 N.C군에 비교할 때 다소간의 증감이 있었으나, 주목할 만한 차이점은 확인하지 못하였으나, T3에서는 구별이 가능한 정도의 감소(+2)가 확인되었다. 또한 14주 시험의 모든 군에서 각각 1마리 동물의 자궁에 대한 병리학적 소견에 있어서 Control군에서는 정상적인 자궁조직소견이 관찰되었으나, 이에 반면 난소 절제한 N.C군에서는 현저한 자궁위축 현상이 관찰되었다. 시험물질투여군의 경우 T1, T2 및 T4에서는 난소 절제한 N.C군에 비교할 때 주목할 만한 차이점은 확인하지 못하였으나, T3군에서는 미약한 자궁위축소견이 관찰되었다. 결론적으로 7주 및 14주 시험 모두에서 시험물질 T3에서 대퇴골 뼈 지수와 파골세포의 출현빈도에서 개선효과가 확인되었고 특히 14주 시험의 경우 대퇴골 뼈 지수에서 7주 시험보다 더 현저한 개선효과가 관찰되었을 뿐만 아니라 지방축적에서도 구별이 가능한 정도의 개선효과가 있는 것으로 나타났다.

비만은 과량의 에너지 섭취 또는 에너지 소비저하로 인한 열량대사

의 불균형으로 체내에 과량의 지방이 축적되고 이로 인하여 성인병 등의 각종 대사성 질환을 유발할 수 있다(이 등 1992, 이 등 1993). 그러나 갱년기 비만은 노화에 의한 호르몬 불균형에 의해 체지방이 증가되는 현상이다. 복부지방은 난소 적출 음성대조군에서 대조군 보다 유의성( $p<0.01$ ) 있게 증가되었다. 그러나 시험물질 갈근발효 추출액을 14주간 연속 경구투여 시 통계적으로 유의성( $p<0.01$ )있게 감소됨을 확인하였다. 복부지방의 양은 대조군에 비해 N.C군 264% 증가하였으며 T3군은 81%로 대조군에 비해 오히려 복부지방을 19% 감소시켰다.

위의 모든 실험결과로 보아 실험동물 암컷 SD(rat)에서, 난소제거에 의한 호르몬 불균형으로 과량의 지방이 체내 축적되고 이로 인하여 골다공증, 비만, 고혈압, 고지혈증, 지방간, 동맥경화, 당뇨병 등의 각종 대사성 질환이 유발된다. 따라서 시험물질 *Extraction of ferment arrowroot*를 14주간 연속 경구 투여 시, 호르몬 균형을 일정부분 유지하여 지방축적을 저해하는 물질로 작용하는 것으로 생각되며 골다공증 Type I 뿐만 아니라 각종 내분비 질환 예방, 치료에 도움이 될 것으로 사료된다.

## 2. 갈근 유산균 발효물의 갱년기 예방 효과

### 가. 재료 및 방법

#### 1) 일반증상 및 사망동물

시험기간 중, 시험물질 투여에 의한 이상증상은 관찰되지 않았으나 대조군에서는 하복부 피하 mass가 1례 관찰되었다. 갈근 추출액 투여군에서는 횡와 및 하복부 피하 mass가 각각 1례씩 발견되었다(Table 41).

Table 41. Clinical signs of male rats orally treated with substances.

Variable	\ Sex	Male		
	\ Group	C	T1	T2
	\ Dose(g/kg)	0	5	5
	\ No. of animal	10	10	10
	normal	9	10	8
	abnormal	1	0	2
	hypodermic mass	1		1
	recumbent position			1

C; Control group, T1; Extraction of ferment arrowroot group, T2; T1; Extraction of arrowroot group.

## 2) 체중 측정

시험물질 투여 3주부터 대조군에 비해 체중이 감소하는 경향을 보였으나 통계학적 유의성은 관찰되지 않았다(Fig. 47). 그 감소폭은 3주째 T1군에서 3.62 %, T2군 0.43 % 로 나타났으며, 10주는 T1그룹에서 4.81 %, T2 1.17 % 감소되었다. 또한 21주는 T1군 6.0 %, T2군에서 1.01 % 로 갈근발효 추출액 투여에 의한 체중감소가 각각 확인 되었다.

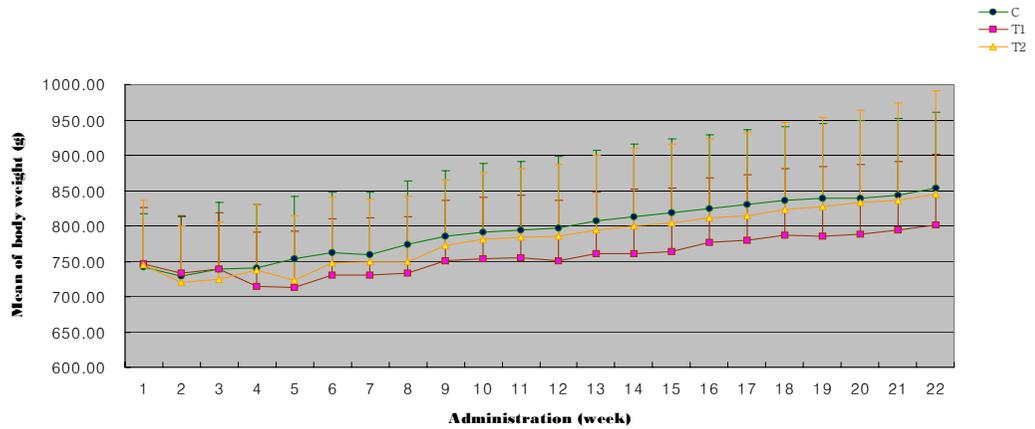


Fig. 47. Mean body weight changes of male rats orally treated with test substances for 21 weeks. C; Control group, T1; Extraction of ferment arrowroot group, T4; Extraction of arrowroot group.

### 3) 부검소견

부검소견에서는 모든 투여 군에서 시험물질 투여와 관련된 이상 소견은 나타나지 않았다. 그러나 실험동물 노화에 기인된 자연발생적인 장기 변화 및 mass가 관찰되었다(Table 42).

Table 42. Autopsy finding of male rats orally treated with test substances for 21 weeks.

Variable	\ Sex	Male		
	\ Group	C <sup>1)</sup>	T1 <sup>2)</sup>	T2 <sup>3)</sup>
	\ Dose(g/kg)	0	5	5
	\ No. of animal	10	10	10
normal		6	7	6
mass of the hypodermic		1	0	1
mass of the kidney		1	0	0
mass of the lung		2	0	0
mass of the pituitary		1	1	1
infiltration of the lungs		1	1	1
atrophic of the epididymal		0	1	0
mass of the prostate		0	0	1

Autopsy finding at 21 weeks treatment of Test Substances, <sup>1)</sup>Control group, <sup>2)</sup>Extraction of ferment arrowroot group, <sup>3)</sup>Extraction of arrowroot group.

#### 4) 장기무게 측정

시험물질 투여에 의한 장기의 육안적 이상 변화는 관찰되지 않았으나, 시험물질 21주간 연속 경구 투여시 생식에 관련된 장기(부고환, 고환, 전립선, 정낭)들의 미세한 종대가 관찰되었다(Table 43). 특히 갈근 투여군에서 정소 및 정소상체가 대조군에 비해 유의성( $p < 0.05$ ) 있게 증가하였다.

Table 43. Relative organ weight of male rats orally treated with test substances for 21 weeks.

Sex	Male		
	C	T1	T2
Group			
Dose(g/kg/day)	0	5	5
No. of animal	10	10	10
Brain	2.12(0.10)	2.06(0.09)	2.09(0.11)
Lung	2.84(0.43)	2.44*(0.26)	2.91(0.39)
Heart	1.79(0.09)	1.76(0.2)	1.7(0.19)
Liver	15.66(1.92)	14.94(1.82)	15.01(1.71)
Spleen	0.9(0.15)	0.83(0.15)	0.93(0.14)
Kidney L.	1.86(0.15)	1.83(0.24)	1.93(0.24)
Kidney R.	1.92(0.18)	1.89(0.27)	1.93(0.26)
Epididymal L.	0.58(0.12)	0.64(0.11)	0.71*(0.06)
Epididymal R.	0.66(0.09)	0.71(0.09)	0.74(0.07)
Testis L.	1.69(0.31)	1.7(0.4)	1.96*(0.09)
Testis R.	1.76(0.22)	1.84(0.17)	1.95*(0.09)
Samenblase	2.48(0.48)	2.94(0.55)	2.26(0.95)
Prostate	0.75(0.27)	0.83(0.21)	0.94(0.41)

a ;Values were expressed as mean, b ;±S.D., Statistically Significantly different from Control group. Relative organ weight at 21 weeks after treatment of test substances. C; Control group, T1; Extraction of ferment arrowroot group, T2; Extraction of arrowroot group.

##### 5) 혈구분석

같은 발효액 투여군에서 혈소판이 대조군에 비해 유의성(p<0.05) 있게 증가 되었다. 그러나 다른 혈액 변화에서는 이상이 관찰되지 않았다.(Table 44).

Table 44. Hematological values of male rats orally treated with test substances for 21 weeks.

Tested Unit	WBC x1000	#LYM %	#MO %	#GR %	RBC x10 <sup>6</sup>	HGB g/dl	HCT %	MCV fl	MCH pg	MCHC g/dl	PLT x1000
Group : C											
Mean	12.11 <sup>a</sup>	63.57	22.2	14.23	7.98	14.54	42.27	52.97	18.23	34.42	950
SD	2.77 <sup>b</sup>	10.18	7.79	5.53	0.31	0.71	1.94	1.49	0.59	0.55	117.15
Group : T1(5g/kg/day)											
Mean	9.67	62.56	19.05	18.18	7.61	14.2	41.03	53.94	18.68	34.61	1061.11*
SD	2.26	10.14	2.25	9.71	0.43	0.68	1.96	1.27	0.63	0.62	95.58
Group : T2(5g/kg/day)											
Mean	10.95	61.69	18.8	19.68	7.91	14.7	42.61	53.85	18.6	34.58	961.25
SD	1.47	8.36	4.18	7.31	0.59	1.01	3.92	2.04	0.71	0.97	161.73

All hematological values were measured at 21 weeks after treatment of test substance. C; Control group, T1; Extraction of ferment arrowroot group, T2; Extraction of arrowroot group. a ;Values were expressed as mean, b ;±S.D., Statistically Significant from control group(p<0.05).

#### 6) 혈액 생화학

시험물질을 투여한 T1 및 T2군에서 LDL-cholesterol은 대조군에 비해 유의성(p<0.05) 있게 감소되었다. 그러나 ALP 농도는 대조군에 비해 T1군 38 %, T2군 51 % 증가되었다(p<0.01). 혈청내 GOT, GPT, BUN, 인산염 및 칼슘의 농도는 실험군에서 이상 변화가 관찰되지 않았다 (Table 45, Fig. 48).

Table 45. Biochemical serum values of male rats orally treated with test substances for 21 weeks.

Variable	\ Sex	Male		
	\ Group	C	T1	T2
	\ Dose(g/kg/day)	0	5	5
	\ No. of animal	5	5	5
Total cholesterol(mg/dl)		84.0 <sup>a</sup>	80.09	69.44
SD		(18.29) <sup>b</sup>	(15.68)	(16.04)
HDL-cholesterol(mg/dl)		70.41	68.72	61.06
SD		(14.89)	(12.87)	(12.86)
LDL-cholesterol(mg/dl)		11.33	7.45*	7.0*
SD		(4.97)	(1.69)	(1.73)
Triglyceride(mg/dl)		81.22	79.91	61.78
SD		(43.14)	(29.28)	(22.48)
Alkaline phosphatase(IU/L)		153.56	211.82**	231.89**
SD		(27.29)	(35.25)	(48.97)
Phosphate(mg/dl)		5.71	5.25	5.8
SD		(0.80)	(0.44)	(0.92)
Calcium(mg/dl)		10.44	10.25	10.32
SD		(0.58)	(0.34)	(0.5)
GOT(IU/L)		121.2	136.0	161.89
SD		(48.55)	(25.75)	(37.13)
GPT(IU/L)		29.6	31.3	33.33
SD		(7.95)	(7.7)	(12.56)
Blood urea nitrogen(mg/dl)		13.12	12.36	12.86
SD		(1.67)	(1.23)	(1.93)

a ;Values were expressed as mean, b ;±S.D., Statistically Significantly different from Negative Control group(\*p<0.05, \*\*p<0.01). Serum biochemical values at 21 weeks after treatment of test substances. C; Control group, T1; Extraction of ferment arrowroot group, T2; Extraction of arrowroot group.

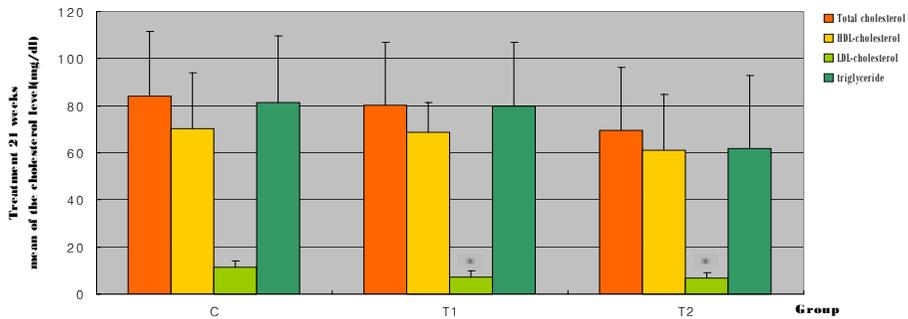


Fig. 48. Effect of test substances treated orally for 21 weeks on cholesterol values of male rats(\* $p < 0.05$ ). C; Control group, T1; Extraction of ferment arrowroot group, T2; Extraction of arrowroot group. Statistically Significantly different from negative control group(\* $p < 0.05$ )

## 7) 호르몬 측정

실험동물 SD(RAT) 숫컷의 혈청내 에스트로겐 함량 변화는 Fig. 49 처럼 대조군에 비해 T1군에서 통계적으로 유의성( $p < 0.01$ ) 있게 26 %, T2군은 11 %로 각각 증가하였다. Testosterone 함량 변화는 관찰되지 않았다.

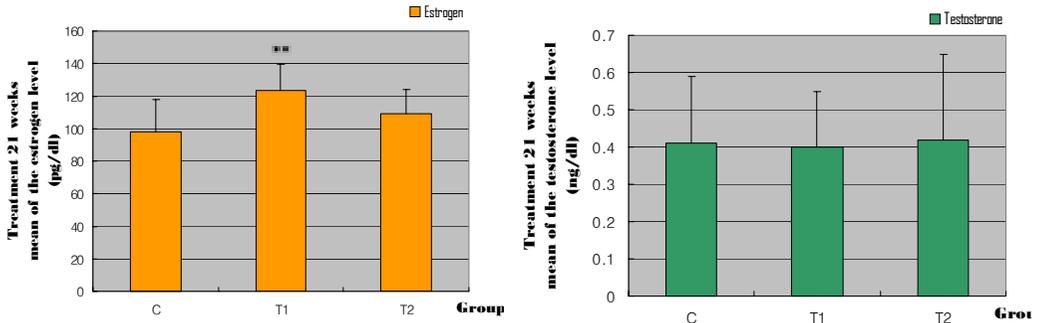


Fig. 49. Effect of test substances treated orally for 21 weeks on hormone values of male rats(\*\*p<0.01). C; Control group, T1; Extraction of ferment arrowroot group, T2; Extraction of arrowroot group. Statistically Significantly different from negative control group(\*\*p<0.01).

#### 나. 고찰 및 결론

난소의 기능이 퇴화되어 에스트로겐 분비가 저하되면 폐경을 맞이하게 되어 안면홍조, 위축성 증상, 순환기와 대사 장애, 골다공증, 인지장애와 알츠하이머, 피부노화 등의 갱년기 증상들이 나타나게 된다. 이전에는 SD(RAT) 암컷에 난소를 적출하여 갈근추출액이 골다공증, 혈장 내 에스트로겐, 콜레스테롤의 함량 변화, 갱년기 비만 및 자궁에 미치는 영향 등을 연구하였으며 3차 년도는 노화된 SD(RAT) 수컷에 에스트로겐 장기간 투여 시 발생하는 부작용 및 효능에 대한 연구와 효능이 입증된 시험물질을 7명의 여성을 대상으로 각각 투약하고 갱년기 질환 예방 및 치료 효과에 대하여 설문조사 하였다.

동물실험 결과 시험물질 투여에 의한 임상 증상은 관찰되지 않았으나 대조군에서는 하복부 피하 mass가 1례 관찰되었다. 갈근 추출액 투여군(T2)에서는 횡와 및 하복부 피하 mass가 각각 1례씩 발견되었다. 이는 실험동물이 노화에 기인된 자연 발생적인 질병으로 사료된다. 그리

고 갈근 발효 추출 투여군(T1)에서는 아무런 임상 증상이 관찰되지 않았다. 시험물질 투여에 의한 체중변화는 대조군에 비해 3주부터 갈근 발효 투여군(T1)이 감소하는 경향을 보였으나 통계학적 유의성은 관찰되지 않았다. 그 감소의 폭은 3주째 T1군에서 3.62 %, T2군 0.43 % 로 나타났으며, 10주는 T1그룹에서 4.81 %, T2 1.17 % 감소되었다. 또한 21주는 T1군 6.0 %, T2군에서 1.01 %로 갈근 발효 추출액 투여 시 체중이 감소되는 결과를 얻었다.

부검소견에서는 모든 투여 군에서 시험물질 투여와 관련된 이상소견은 나타나지 않았으나 실험동물 노화에 기인된 자연발생적인 장기 변화 및 폐, 신장, 간장에 mass가 관찰되었다. 갈근 및 갈근 발효 추출액 21주간 연속 경구 투여 시 생식에 관련된 장기(부고환, 고환, 전립선, 정낭)들의 미세한 종대가 나타났으며 특히 갈근 투여군에서 정소 및 정소상체가 대조군에 비해 유의성( $p < 0.05$ ) 있게 증가하였다. 이는 갈근 시험물질이 수컷 SD(rat)에서도 성기능 향상에 기여하는 것으로 사료된다.

혈구 분석에 있어서는 갈근 발효액 투여군에서 혈소판이 대조군에 비해 유의성( $p < 0.05$ ) 있게 증가 되었다. 그러나 다른 혈액 변화에서는 이상이 관찰되지 않았다. 혈청 내 혈액 생화학 분석은 시험물질을 투여한 군에서 Total cholesterol이 감소하는 경향을 보였으며 특히 T1 및 T2군에서 LDL-cholesterol 함량은 대조군에 비해 유의성( $p < 0.05$ ) 있게 감소하였다. 또한 ALP 농도는 대조군에 비해 T1군 38 %, T2군 51 % 증가되었다. 이와 같은 결과를 통해 시험물질을 장기간 복용하는 경우, 고지혈증의 예방 및 골 성장을 촉진할 것으로 예상된다.

약물의 장기간 복용 시에 간 및 신장 독성의 지표로 이용되는 혈청 내 GOT, GPT 및 BUN의 농도를 분석 결과, 이상 변화가 관찰되지 않았다. 이와 같은 결과를 통해 갈근 시험 물질들은 장기간 복용에 의한 신장

및 간독성이 일어나지 않는 것으로 사료된다. 혈청 내 에스트로겐 함량 변화는 대조군에 비해 T1( $p < 0.01$ )군에서 26 %, T2군은 11 %로 각각 증가하였고 Testosterone 함량 감소는 관찰되지 않았다. 이상의 결과로 수컷 rat에서 장기간 식물성 에스트로겐 섭취는 Testosterone 호르몬에 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다. 같은 시험물질들에 대하여 21주간 연속 투여하고 얻은 데이터를 종합 분석한 결과, 부작용은 관찰되지 않았고 체중 감소 및 생식장기의 증대, 혈장 내 콜레스테롤 감소 및 에스트로겐 증가 등이 관찰되었다. 결론적으로 이와 같은 요인들로 인하여 같은 시험물질들은 실험동물 수컷의 노화를 지연시키는 것으로 사료된다.

### 3. 갈근 발효물의 임상 실험

#### 가. 재료 및 방법

##### 1) 제품 유형 설정

##### 가) 갱년기 여성의 필요 영양소

##### (1) 칼슘

건강한 정신과 신체를 유지하는데는 흡연을 삼가고 균형있는 식사와 적절한 운동이 최상의 방법이다. 이러한 건강습관들은 호르몬 대체요법을 받고 있는 사람들에게도 마찬가지로 중요하다. 폐경기의 생활을 건강하게 유지하기 위한 한 방법으로 우선 식이요법을 들 수 있다. 연령에 관계없이 누구에게나 유익한 식이요법은 골다공증 예방을 위해 유제품 등의 고칼슘 식품을 섭취하고 하루 1500mg의 칼슘 요구량을 보충하기 위해 매일 500mg의 칼슘을 섭취하는 것이다.

##### (2) 비타민 D

동물의 칼슘 대사에 필요한 2개의 지용성 알코올이다. 피부에 있는 스테롤이 태양 광선을 받으면 생긴다. 이러한 스테롤에는 동물의 대사과

정에서 생기는 7-디히드로콜레스테롤과 에르고스테롤이 있다. 이 두 화합물은 태양 광선을 받으면 각각 콜레칼시페롤(비타민 D3)과 칼시페롤(에르고칼시페롤, 비타민 D2)로 전환된다. 비타민 D의 하루 권장량을 고려해보면 이 영양소는 활성이 매우 큰 비타민 중 하나이며, 성장기 아동의 경우에 단지 10 $\mu$ g(400IU) 정도면 충분하다. 비타민 D가 결핍되면 구루병이 생기나, 비타민 D를 과잉섭취하면 독성 반응을 일으킬 수도 있다. EU에서는 성인 하루 권장량을 50ug으로 하고 있다.

### (3) 기타 영양물질

초유 단백질 성분 'GP-C'(Growth Protein-Colostrum)는 조골세포 증가와 골밀도를 높인다고 알려져 있다. 이외에도 미국 식품의약국에서는 서구 여성을 위해 콩단백질을 하루 25g(콩알 100개) 이상 섭취할 것을 권장하고 있다.

#### 나) 칼슘 제제의 선정 ,

칼슘은 동물의 경우 뼈와 혈액의 조성 및 생성에 꼭 필요한 성분이며, 식물의 경우 부족 시 여러 종류의 병에 대한 저항력이 떨어지며, 이상현상을 나타낸다. 칼슘의 제조법으로는 현재 공업적으로는 주로 전해법과 열환원법의 두가지가 사용되고 있다. 전해법은 염화칼륨을 15% 2000 정도 혼합한 염화칼슘을 용해시키고(약 800 $^{\circ}$ C), 흑연을 양극, 철을 음극으로 하여 전기분해한다. 이 때 얻는 것은 순도 85% 정도가 보통이며, 증류에 의한 정제로 98% 정도가 된다. 나트륨·칼륨·철 등이 불순물로 함유되어 있다. 열환원법은 진공 중에서 1,200  $^{\circ}$ C로 산화칼슘을 알루미늄에 의해서 환원시킨다.  $6CaO + 2Al \rightarrow 3Ca + 3CaO \cdot Al_2O_3$  얻는 칼슘은 증기로부터 결정(結晶)이 되므로 98%로 순도가 높다. 어느 방법으로 얻은 것이든 불

순한 것은 진공 중에서 증류를 반복함으로써 98%까지 정제할 수 있다.

칼슘의 종류로는 탄산칼슘으로 물에 난용성이며, 탄산칼슘에는 석회석(방해석), 난각칼슘(계란껍질), 패각칼슘(굴, 조개껍질), 해조칼슘(불가사리, 산호), 진주칼슘(진주)등의 형태가 있다. 황산칼슘도 물에 난용성. 석고라고 하며, 석탄/중유/등유를 사용 시 발생하는 아황산가스와 탄산칼슘을 반응시켜 부산물로 제조한다. 유산칼슘이라고도 한다. 인산칼슘도 물에 난용성이며, 인회석이라 하며, 탄산칼슘과 인산을 반응시켜 제조, 치아/손톱/뼈의 주성분이다. 산화칼슘은 물과 반응 수산화칼슘이 된다. 산화칼슘은 생석회라 하며, 탄산칼슘을 900℃에서 소성하면 만들어진다. 수산화칼슘은 0.18% 산화칼슘에 물을 반응시켜 만들고, 소석회라고 말하며, 용해도가 작고, 강 알칼리성 물질(pH 13)이다. 염화칼슘은 수용성으로, 탄산칼슘을 염산과 반응하여 제조하거나, 소다회 생산 시 부산물로 생산된다. 탄산칼슘은 제설용 혹은 두부제조용, 주사제용으로 쓰인다. 질산 칼슘은 수용성으로 탄산칼슘을 질산과 반응시켜 제조한다. 액상석회 비료에 많이 사용한다. 일본식표기는 초산칼슘이라 한다. 젖산칼슘도 수용성으로, 탄산칼슘을 젖산과 반응시켜 제조한다. 요구르트, 김치, 우유에 사용되며 식품첨가물로 사용한다. 구연산칼슘도 수용성, 탄산칼슘과 구연산을 반응시켜 제조한다. 기능성음료와 된장에 많이 있으며 식품첨가물로 사용한다. 글루콘산칼슘도 수용성으로, 글루콘산과 반응시켜 제조하며, 젖산칼슘과 혼용 시 생체흡수에 유리하며, 식품첨가물로 사용한다. 초산칼슘은 수용성으로, 아세트산(초산)과 반응하여 제조하며, 액상석회로 많이 사용한다. 유청칼슘은 우유(밀크)칼슘이라고 부르는 것으로 우유의 가공과정에서 얻는 유청에서 분리해 낸 것으로 우유에서 유래하였다고 하여 우유칼슘이라고 부르기도 한다.

즉 칼슘에는 화학적 합성품인 식품첨가물용 칼슘이 있는데 탄산칼슘,

구연산칼슘, 글루콘산칼슘, 젖산칼슘, 인산칼슘, 판토텐산칼슘, 수산화칼슘, 염화칼슘, 황산칼슘등이 대표적이고 주로 음료형 식품에 많이 사용되며 유용성이 인정된 건강보조식품군에 등재되어 있는 천연칼슘은 해조칼슘, 牛骨칼슘, 魚骨칼슘, 계란껍질의 난각칼슘, 조개껍질의 패각칼슘, 유청칼슘, 발효생성유기산칼슘, 산호칼슘, 섬게껍질분말, 상어연골분말, 오징어연골분말이 있으며 이중 식물성은 해조칼슘 하나 밖에 없다.

다) 칼슘강화제로 여러 제품에 쓰이는 칼슘의 형태

무기염은 탄산칼슘, 염화칼슘, 황산칼슘, 제 1,2,3 인산칼슘이 있으며, 유기염은 젖산칼슘, 구연산칼슘 등이 있다.

라) 식품에 사용되는 천연 calcium의 종류

패각(굴껍질)칼슘,해조(해조류)칼슘,유청(우유)칼슘은 칼슘을 추출한 원료물질의 이름에 따라 명명된 것이며 이온화칼슘은 흡수되기 어려운 결합형칼슘을 이온화시켜 흡수율을 향상시킨 칼슘을 말한다.

(1) 패각칼슘

패각칼슘은 모려(굴껍질)에서 추출한 칼슘을 말한다. 그러나 요즘은 칼슘의 흡수율을 높이기 위해서 대부분 모려칼슘을 이온화시켜서 이용한다. 왜냐하면 체내에 섭취된 칼슘은 이온화 상태로 되지 않는 한 흡수가 되지 않는 성질을 가지고 있기 때문이다. 그러므로 칼슘은 제아무리 많은 양을 섭취해도 이온화 상태로 흡수되지 않으면 충분한 칼슘보급이 되지 않는다.

(2) 해조칼슘

해조칼슘의 원료인 해조는 홍조류로서 청정해역에서만 자라는 식용 식물이다. 해조칼슘의 원료인 해조도 일반 다른 해조와 마찬가지로 광합성

작용을 하고, 바다의 여러 가지 영양물질과 미네랄을 먹고 생명을 유지한다. 그러나 특이하게도 이 해조는 미네랄을 세포벽에 축적하는 경향이 있는데, 생명을 다하여 죽기 전의 줄기에는 95~99.5%의 미네랄을 축적한다. 바로 이 때 수확하여 가공한 것이 해조칼슘이다. 해조칼슘은 천연칼슘으로 칼슘함량 32%이상으로 무미,무취하며 oil 및 수분흡수력이 우수한 벌집형의 다공질 구조를 보인다. 다공질 구조의 특징은 소화흡수율이 우수하고 Buffering Capacity가 탁월하여 입안의 젖산을 중화하여 주름으로 충치를 예방하고 이산화탄소 발생을 느리게 하고 식감인 이물감이 전혀 없다. 또한, 중금속 함량(특히 납)이 매우 낮아 요즘 중금속 오염문제로 심각한 논란이 제기되고 있는 타 칼슘제의 대체 원료로도 각광 받고 있다.

### (3) 유청칼슘

유청칼슘은 우유에서 추출한 칼슘으로 칼슘의 흡수를 증진 시키는 성분이 함유되어 있기 때문에 다른 칼슘원에 비해 그 흡수율이 2배이상 높아 갱년기이후의 성인과 성장기 어린이의 칼슘보급에 이상적인 칼슘영양원으로 알려져 있다.

### (4).이온화 칼슘

우리가 섭취한 칼슘은 체내신진대사과정에서 모든 결합형 칼슘(비활성)이 일단 이온화칼슘으로 만들어져야 비로서 활성화 되어 흡수가 이루어진다. 자연계에 존재하는 모든 칼슘은 결합형칼슘(예, 탄산칼슘등)으로 구성되어 있어서 우선 유리형 칼슘(즉 이온화칼슘)으로 바뀌지 않으면 흡수가 일어나지 못하는 것은 의문의 여지가 없다.

## 2) 물질 조제

갈근발효 분말 450 mg에 부형제(유청칼슘 등) 50 mg을 가하고, 타정하

여 삼각형의 정제를 만들었으며, 그 내용물은 Fig. 50과 같으며, MLK로 명명하였다.



Fig. 50. MLK-001 prepared with PT fermented by *B. breve* k-110

### 3) 투여 용량

1일 5g(아침 2.0 g, 점심 1.0 g, 저녁 2.0 g; 갈근발효액 4.5 g)을 4주간 연속 투약하여 갱년기 증상의 호전 효과를 관찰하였다.

#### 나. 결과 및 고찰

1일 5g의 MLK를 4주간 연속 투약하여 갱년기 증상의 호전 효과를 관찰하여 아래의 임상예에 대해 아래와 같이 적시하였다.

#### 1) 임상예 ①;

안면홍조감, 질 건조, 성교통, 두통, 몸이 차고 손발이 저림, 만성피로 등의 갱년기 증상을 느끼던 51세 무월경의 여성이 갈근 발효액 4주간(4.5 g/day) 섭취 후, 아래와 같은 결과가 관찰되었다.

증상	섭취 전	섭취 후
체중(kg)	62.2	61.5
체지방(%)	39.2	38.2
가슴둘레(cm)	97	97
허리둘레(cm)	86	86
갱년기 증상		
홍조감	얼굴, 목, 가슴이 달아오르고 화끈 거림 열이 오르면서 땀이 남 입이 마르고 입안에서 열이 남	시험물질 섭취 후 증상 소실
위축성 증상	매우 건조하고 냉이 없음	분비물이 생기며 촉촉함 성교통 개선
순환기 및 대사 장애	몸이 차고 손발이 저리고 머리가 무거움 자주 피곤함을 느낌	증상 소실
인지장애 및 알츠하이머	정상	정상
피부노화	피부거침	마른버짐 등이 없어짐 개선됨
월경	무(1년 6개월)	유

결과; 갱년기 증상을 느끼며 무월경인 51세의 여성이 같은 발효액 4주간 (4.5 g/day) 섭취 시, 갱년기 증상이 완전히 소실되고 월경이 나타남. 체중(1.13 %) 및 체지방(2.55 %)의 감량은 미미하게 나타났다.

## 2) 임상예 ②;

갱년기 증상은 나타나지 않은 52세의 복부 비만 여성에게 같은 발효액 4주간(4.5 g/day) 섭취 후, 아래와 같은 결과가 관찰되었다.

증 상	섭 취 전	섭 취 후
체중(kg)	68.1	67.0
체지방(%)	40.1	37.5
가슴둘레(cm)	95	92
허리둘레(cm)	92	90
갱년기 증상		
홍조감	정상	정상
위축성 증상	정상	정상
골다공증	정상	정상
순환기 및 대사장애	정상	정상
인지장애 및 알츠하이머	정상	정상
피부	정상	정상

결과; 갱년기 증상은 나타나지 않은 52세의 복부 비만 여성에게 같은 발효액 4주간(4.5 g/day) 섭취 시, 체중(1.62 %) 및 체지방(6.48 %)의 감량은 미미하게 나타났다. 특히 복부지방(2.17 %)이 감소되었음.

### 3) 임상적 예 ③;

안면 홍조감, 질 건조, 성교통, 두통, 몸이 차고 손발이 저림, 만성피로 등의 갱년기 증상을 느끼던 60세 무월경의 당뇨병 여성이 같은 발효액 4주간(4.5g/day) 섭취 후, 아래와 같은 결과가 관찰되었다.

증 상	섭 취 전	섭 취 후
체중(kg)	68.2	65.0

체지방(%)	29.0	28.0
가슴둘레(cm)	102	100
허리둘레(cm)	81	76
갱년기 증상		
홍조감	얼굴, 목, 가슴이 달아오르고 화끈 거림 열이 오르면서 땀이 남 입이 마르고 입안에서 열이 남	시험물질 섭취 후 30% 정도 증상이 개선됨(발생 빈도)
위축성 증상	질분비물이 매우 건조하고 냉이 없었음	좌동
골다공증	정상	정상
순환기 및 대사 장애	몸이 차고 손발이 저리고 머리가 무거움 자주 피곤함을 느낌	시험물질 섭취 후 30% 정도 증상이 개선됨(발생 빈도)
인지장애 및 알쯔하이머	기억력 감소	일부 개선됨
피부노화	정상	정상
월경	무	좌동
특이 사항	혈당량 ; 식전 150mg, 식후 2시간 180mg	좌동

결과; 갱년기 증상을 느끼며 무월경인 60세의 여성이 갈근 발효액 4주간 (4.5 g/day) 섭취 시, 갱년기 증상의 빈도가 1/3정도 소실 되었음. 체중 (4.69 %) 및 체지방(3.45 %)의 감량이 나타났다. 특히 복부지방(6.17 %)이 감소되었음.

#### 4) 임상예 ④;

자궁근종으로 인한 자궁이 절개(2년 8개월)된 44세의 비만 여성(갱년기 증상이 나타나지 않음, 평소 수영으로 몸 관리함)이 갈근 발효액 4주간

(4.5 g/day) 섭취 후, 아래와 같은 결과가 관찰되었다.

증상	섭취 전	섭취 후
체중(kg)	84.2	79.1
체지방(%)	40.6	37.1
가슴둘레(cm)	105	105
허리둘레(cm)	87.5	82
갱년기 증상		
홍조감	정상	정상
위축성	정상	정상
골다공증	정상	정상
순환기와 대사장애	정상	정상
인지장애와 알츠하이머	정상	정상
피부	정상	정상
특이 사항	1. 자궁 절개 2. 식후 30분에 시험물질 섭취시 소화가되지 않았으며, 식후 90-120분후에 섭취시 소화에 아무런 문제가 없었음. 특히 소화가 되지 않을시 두통이 수반됨	

결과; 2년 8개월 전, 자궁근종으로 인하여 자궁이 절개된 44세의 비만 여성이 갈근 발효액 4주간(4.5 g/day) 투약 시, 체중(6.06 %) 및 체지방(8.62 %)의 감량이 나타났다. 특히 복부지방(6.29 %)이 감소되었음.

##### 5) 임상적 예 ⑤;

안면홍조감, 성교통, 만성피로, 피부노화의 증상을 느끼던 57세 무월경의 여성이 갈근 발효액 4주간(4.5 g/day) 섭취 후, 아래와 같은 결과가 관찰되었다.

증 상	섭 취 전	섭 취 후
체중(kg)	63.0	59.0
체지방(%)	37.8	32.1
가슴둘레(cm)	101	101.6
허리둘레(cm)	93	89
갱년기 증상		
홍조감	얼굴, 목, 가슴이 달아오르고 화끈거림 열이 오르면서 땀이 남 입이 마르고 입안에서 열이 남	좌동
위축성 증상	성관계가 불편하고 성욕이 없음	좌동
골다공증	정상	정상
순환기와 대사장애	어깨가 무겁고 자주 피곤함을 느낌 복부비만	복부비만 일부 개선
인지장애와 알츠하이머	정상	정상
피부노화	피부 거침	좌동
월경	무	좌동

결과; 갱년기 증상을 느끼며 무월경인 57세의 여성이 같은 발효액 4주간 (4.5 g/day) 섭취 시, 갱년기 증상의 변화는 투약 전·후 변화가 관찰되지 않았음. 체중(6.35 %) 및 체지방(15.08 %)의 감량이 나타났다. 특히 복부 지방(4.3 %)이 감소되었음.

#### 6) 임상적 예 ⑥;

갱년기 증상은 나타나지 않으며 유선이 발달된 52세의 야윈 여성에게 같은 발효액 3일(4.5 g/day) 섭취 후, 아래와 같은 결과가 관찰되었다.

증 상	섭 취 전	섭 취 후
체중(kg)	46.0	?
갱년기 증상		
피부	정상	정상
특이 사항	가슴이 팽창되어 아파서 손으로 만지지도 못함. 가슴 통증에 의해 시험물질을 섭취 할 수 없었음.	

결과; 갱년기 증상은 나타나지 않은 52세(신장 167 Cm, 체중 46 kg, 가슴이 발달됨)의 야윈 여성에게 갈근 발효액 3일간(4.5 g/day) 섭취 시, 가슴이 팽창되어 통증을 느껴 시험물질을 섭취 할 수 없었음. 위의 임상증상으로 보아 시험물질은 유선을 자극하여 가슴을 탱탱하게 만들며, 갈근발효액이 피검자에게 너무 과민하게 작용하는 것으로 사료된다. 따라서 용량을 감소시켜 투약하여야 될 것으로 생각된다.

#### 7) 임상예 ⑦;

유방암으로 좌측 유방을 절개(2 개월)한 48세의 여성(갱년기 증상이 나타나지 않음)이 갈근 발효액 4주간(4.5 g/day) 섭취 후, 아래와 같은 결과가 관찰되었다.

증 상	섭 취 전	섭 취 후
체중(kg)	?	?
체지방(%)	?	?
가슴둘레(cm)	?	?
허리둘레(cm)	?	?
갱년기 증상		

홍조감	정상	정상
위축성	정상	정상
골다공증	정상	정상
순환기와 대사장애	정상	정상
인지장애와 알츠하이머	정상	정상
피부	정상	정상
특이 사항	1. 좌측 유방 절개 2. Data가 입수되지 않아 통계 및 결과 해석시 제외 시킴.	

결과; 2개월 전, 유방암으로 인하여 좌측 유방이 절개된 48세의 여성은 Data가 입수되지 않아서 결과 해석 시 제외함.

질환에 의해 일부 장기를 절개한 환자와 가슴 통증으로 인한 시험물질 미 섭취한 자, 3인을 제외한 임상 data 4인을 분석해 본 결과 피검자 전체 평균 체중은 65.4 kg에서 63.1 kg으로 전체평균 체중의 3.44 % 감소되었으며, 특히 체지방은 7.1 %, 복부둘레는 3.13 %가 감소됨을 알았다. 이는 갈근발효액이 체지방을 분해하여 하복부 지방을 감소시키는 물질로 작용한다고 생각된다. 홍조감은 피검자 4인 중, 3인에서 임상 증상이 유발되었고 2인이 개선되었다. 생식기 위축성은 2인에서 1인, 순환기와 대사장애는 3인 2인, 인지 장애와 피부노화는 2인에서 1인이 각각 개선됨을 알았다. 특히 1인은 1년 6개월간 무 월경 상태였으나 갈근발효액 4주간 섭취 시 월경이 다시 시작되었다. 또한 갱년기 증상이 유발되지 않고 자궁 절개로 인한 비만 여성의 체중은 6.1 %, 체지방 8.6 % 및 하복부 지방 6.3 %로 갱년기 질환 여성들에 비해 그 감소의 폭은 증가되었고, 가슴이 발달된 1인은 4.5 mg/kg 용량으로 3일 복용 시, 유선을 자극하여 가슴을 탕

탱하게 만들어 주는 효과가 있는 것으로 나타났다.

위와 같이 호르몬 분비 이상 여성에게 시험물질 4주간 4.5 g/day 투약 해 본 결과 대부분 피검 여성들은 위의 시험물질이 갱년기 증상 예방 및 치료효과가 확인되었고, 부작용으로 소화장애와 두통, 가슴 통증을 각각 1 인씩 호소하였다. 그 부작용에 대해서는 앞으로 적합한 용량설정 및 소화 장애 등을 중심으로 연구가 진행되어야 될 것으로 생각된다.

## 제 4 장 목표 달성도 및 관련 분야에의 기여도

### 1. 연차별 연구개발 목표와 내용

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (2003)	Phytoestrogenic 활성이 높은 Leguminosea의 선발 및 발효 조 건	가. Leguminosae중 칩과 콩의 phyto-estrogenic activity 나. Leguminosae중 칩과 콩의 발효 전·후 활성물질 의 변화 다. Phytoestrogen 전환 유산균주의 선정
2차 년도 (2004)	갱년기 예방 물질 강화 및 동물 효 능 평가	가. Phytoestrogen 전환 적정 조건의 선정 나. Phytoestrogenic activity를 강화 소재의 제조 조건 다. Phytoestrogen을 강화한 기능성 식품 소재가 갈슘 흡수에 미치는 영향 (동물시험) 라. Phytoestrogen을 강화한 기능성 식품 소재가 Bone cell에 미치는 영향 (동물시험)
3차 년도 (2005)	갱년기 예방 물질 강화 식품 소재 개발 및 임상 효 능 평가	가. 제품 유형 설정 나. 제품제조시 위해 요소 분석(HACCP) 다. 시제품 제작 및 안정성 조사 라. Phytoestrogen을 강화한 기능성 식품 소재가 갱년기 증상 완화 시험 (임상시험)

2. 연구개발 목표의 달성도를 보면 1차년도 연구개발 목표인 Phytoestrogenic 활성이 높은 Leguminosea의 선발 및 발효 조건을 확립하기 위해

가. 칩과 콩 추출물의 estrogenic activity 및 칩과 콩의 발효 후

estrogenic activity을 조사하였고,

나. Leguminosae중 칩과 콩의 발효 전·후 활성 물질의 변화에 대해서는 Phytoestrogenic materials의 분석방법을 HPLC로 설정하여 분석하였으며,

다. Phytoestrogenic materials의 함량 변화를 보기 위해 콩에 존재하는 daidzein, daidzin, genistein, glycitein 등의 변화를 조사하였으며, 같은 근의 주요 이소플라본인 daidzein, daidzin, puerarin, genistein, 등의 변화를 조사하였다.

라. Phytoestrogen 전환 유산균주의 선정을 위해서 보유 균주중  $\beta$ -glucosidase 활성이 높은 균주를 선발하여 24시간과 48시간 발효시켜 phytoestrogen 물질의 전환 균주를 8종 선발하였으며, 발효중 특성을 조사하기 위해 발효 과정중 pH의 변화와 균수,  $\beta$ -glucosidase 활성, 균체량 등을 조사하였다.

2차년도 연구개발 목표인 Phytoestrogenic 활성이 높은 Leguminosae의 선발 및 발효 조건에서

가. Phytoestrogen 전환 적정 조건의 선정하기 위해 선발 콩과식물인 콩에 탄소원 등 첨가 성분의 최적화를 하였으며, 환원제로 cysteine과 ascorbic acid를 이용하여 산화-환원 전위차에 따른 Phytoestrogen 전환 조건을 선정하였으며, 발효 및 배양시간에 따른 Phytoestrogen 활성 물질 전환량을 조사하였다.

나. Phytoestrogenic activity를 강화 소재의 제조 조건을 조사하기 위해 콩과 식물 발효물의 동결 건조 특성을 조사하였고, 동결건조 보호제의 첨

가에 따른 특성을 조사하였다. 또한 동결건조에 따른 발효물의 특성을 개선하고자 anti-caking agents를 사용하여 발효물의 품질을 개선하였다.

다. Phytoestrogen을 강화한 기능성 식품 소재가 칼슘 흡수에 미치는 영향은 동물시험을 통하여 Rrat의 난소 적출을 통한 골밀도 및 형태와 Hormone Analysis을 통해 estrogen 함량을 조사하였다.

라. Phytoestrogen을 강화한 기능성 식품 소재가 Bone cell에 미치는 영향은 동물시험을 통하여 골수 조직검사(Tissue microscopy)와 골밀도 분석(Bone mineral density Analysis)을 수행하였다.

3차년도 연구개발 목표인 갱년기 예방 물질 강화 식품 소재 개발 및 임상 효능 평가에서는

가. 제품 유형 설정에서 갱년기 여성의 필요 영양소와 칼슘 제제의 종류 등을 조사하였다.

나. 제품제조사 위해 요소 분석(HACCP)를 대두 발효물과 갈근 발효물의 제조 공정에 따라 분석하였다.

다. 시제품 제작 및 안정성 조사에서는 대두 발효물과 갈근 발효물을 5℃와 25℃에서 6개월 동안 저장하면서 안정성을 조사하여 유통기한을 설정하였다.

라. Phytoestrogen을 강화한 기능성 식품 소재가 갱년기 증상 완화 시험을 임상시험하기 위해 갱년기 여성 7인을 대상으로 대형 병원의 협조를 받아 수행하였다.

## 2. 관련분야에의 기여도

관련분야에의 기여도에서는 식품의 원료로 사용할 수 있으며, 국내에서 쉽게 접할 수 있는 콩과식물(leguminosae)은 중에는 칩(칩꽃과 칩뿌리)과 콩을 이용하여 에스트로젠성 활성을 지닌 식물성 에스트로젠(phytoestrogen)소재를 개발하여 효능을 평가하였다. 현재 병원에서 사용하는 호르몬 대체요법(HRT, hormone replacement therapy)으로 사용하는 스테로이드형의 estrogen은 17 $\beta$ -estradiol, diethylstilbestrol(DES) 등이 있는데 콩과 같은 유래의 Phytoestrogen은 화학적 호르몬대체요법(HRT)으로 사용할 수 있을 것으로 생각된다. 콩에 존재하는 이소플라본은 대두 배아 부분에 주로 포함되어 있으며, 대두 100g에서 50mg까지 밖에 추출할 수 있는 기술이 실용화가 되어 있으나, 원료내에 존재하는 아글리콘 형태의 이소플라본을 다량 존재하도록 하는 발효공정은 없으며, 주로 알콜 추출 및 산가수분해법을 사용하고 있어, 유산균 같은 유용균주를 이용한 연구 결과는 거의 없다고 할 수 있어 본 연구 결과에 따라 이들 분야의 연구가 진일보 한 것이라 할 수 있을 것이다. 또한 경제·산업적 측면에서 1996년 NIC(National Center Institute)에서는 식이성 물질에서 “화학적 암예방제”로서의 가능성을 검토하여 콩과식물에 함유되어 있는 이소플라본을 포함시킨 점에 비추어, 선진국의 정책에도 부합하여, 노령화 시대에 의료비의 절감 등 경제적 이점이 많다고 할 수 있다. 현재 미국에서 호르몬 대체제(hormone replacement agent)는 약 1000만명의 폐경여성들이 스테로이드성 HRT 약물을 복용중인 것으로 추정되고 있다. 국내에서도 갱년기 클리닉을 중심으로 HRT 요법을 하고 있어, 갱년기 증상 치료 관점보다 식품학적인 관점에서 치료보다 예방 차원의 기능성 식품과 그 효능을 밝힌다면 HRT에 의한 부작용을 줄이면서 의료비 절감 등을 유도할 수 있을 것이다. 한국여의사회 조사 결과 중년 여성 10명중 4명이 골다공증 치료를 받아야 할 만큼 골다공증이 심각한 것으로 알려져

있다. Phytoestrogen인 이소플라본 섭취와 에스트로겐 사용이 관절염에 미치는 영향을 관찰한 결과 식이성 이소플라본 섭취량이 증가할수록 관절염 유발율이 낮아졌으며, 골 밀도로 다시 조정한 연구결과가 있어, phytoestrogen 섭취가 관절염 유발율을 낮출 수 있을 것이다. 결론적으로 칩(칩꽃과 칩뿌리)과 콩과 같은 콩과식물에서 유래하는 phytoestrogen을 이용하면 갱년기 증상 완화 및 예방에 도움을 줄 수 있을 것이며, 발효기법을 이용하여 phytoestrogen을 강화한 기능성 소재는 앞으로 더욱 유용하게 사용될 것이다.

## 제 5 장 연구 개발 결과의 활용 계획

### 1. 과제와 관련한 연구성과의 활용 내역

가. 유상 기술 이전 : 1건

(주)구안산업에 유상 기술 이전(기술이전료 24,000천원, 문서번호 연구 10200-1647)

나. 유상 기술 이전의 주요 내용

(주)구안산업에 유상 기술 이전한 “콩과식물에서 갱년기 증상 예방 물질 강화 및 건강보조식품 소재화“는 유산균으로 콩과 식물을 발효시켜 이소플라보노이드를 아글리콘 형태로 활성화시켜 효능을 강화 시킨 것이 특징이다. 이 기술로 개발한 소재를 이용하여, 동물 실험을 수행한 결과 난소를 제거하여 갱년기를 유발한 쥐에서 난소의 정상화와 동시에 체지방 등이 현저히 감소하여 갱년기 증상을 완화시킬 수 있음을 밝혀낸 생물전환 신기술이라 할 수 있음

다. 특허출원(발명특허) : 1건

갱년기 예방 효과가 있는 갈근 유산균 발효물을 출원하였음

라. 전문 학술지 게재 및 투고 : 6건(SCI 논문 4건)

1) Effect of Lactic Acid Fermentation on Enrichment of Antioxidant Properties and Bioactive Isoflavones in Soybean. *J Food Science*. 70(3):S215-220(2005)

2) Enrichment of bioactive isoflavones in soymilk fermented with glucosidase-producing lactic acid bacteria. *Food Research International*. 38:551-559(2005)

3) The Research Regarding Prevention Effect of Osteoporosis used Arrowroot Fermentation from Ovaryectomized SD Rat. *Yakhak Hoeji*. 49(6) 1-10(2005)

4) A Study on Treatment of SD rat Menopausal Obesity Utilizing Fermentation Techniques. *Kor J. Clin. Pharm.* 15(2)1-9(2005)

5) Estrogenic Effect of Main Components Kakkalide and Tectoridin of Puerariae Flos and Their Metabolites. *Pharmacognosy*, In Press(2006)

6) Intestinal Bacteria Activate Estrogenic Effect of Main Constituents Puerarin and Daidzin of *Pueraria thunbergiana*. *Pharmacognosy*, In Press(2006)

## 2. 타 연구에의 응용

과학기술본부 산업기술이사회에서 시행중인 유망기술 상용화 현장자문 지원 사업에 실용화를 위해 아래와 같이 지원서를 제출하여 타 연구에 응용하고자 하고 있음

--

기 관 명	한국식품연구원	연구개발 자	이영철
-------	---------	-----------	-----

지원대상기술명	식물성여성호르몬 전환 유산균주 및 발효기술		
---------	-------------------------	--	--

관련 지적재산번호		지적재산형 태	<input checked="" type="checkbox"/> 특허 <input type="checkbox"/> 실용신안 <input type="checkbox"/> <b>know-how</b>	
--------------	--	------------	--	--

기 술 분 야	<input type="checkbox"/> 정보 <input type="checkbox"/> 통신 <input type="checkbox"/> 전기·전자 <input type="checkbox"/> 생명과학 <input type="checkbox"/> 보건·의료 <input type="checkbox"/> 환경 <input type="checkbox"/> 화학 <input type="checkbox"/> 물리학 <input type="checkbox"/> 기계 <input type="checkbox"/> 재료 <input type="checkbox"/> 화학 공정 <input type="checkbox"/> 우주·항공·천문·해양 <input type="checkbox"/> 에너지·자원 <input type="checkbox"/> 원자력 <input type="checkbox"/> 지구 과학 <input type="checkbox"/> 건설·교통 <input checked="" type="checkbox"/> 농림·수산 <input type="checkbox"/> 기술혁신·과학기술정책 <input type="checkbox"/> 기타			
---------	---	--	--	--

기술이전 진행상태	<input checked="" type="checkbox"/> 기술이전완료 (협약체결일:2004. 9. 30) <input type="checkbox"/> 기술이전 진행 중		
--------------	--	--	--

자문실시기업	기 업 명	구안산업(주)
	기업실무자	김상욱
	연 락 처	

지원사업의 목표 및 내용	1. 유산균주를 이용한 발효물의 관능적 특성 개선을 통한 소비자 기호도 증진 2. 기호도를 개선한 유산균 발효물의 산업적 생산을 위한 pilot 규모 조건 확립		
------------------	--	--	--

기대효과	1. 유산균주를 활용한 다양한 제품 개발에 따른 새로운 고부가가치 상품 가능 2. 국내산 농산물의 부가가치 향상 및 수출 기반 기술 개발 효과 3. 중소기업의 생산성 향상을 위한 다양한 제품 set화		
------	---	--	--

담당자	성 명	이영철	전화/FAX	
	E-mail		휴대전화	
첨부사항				

## 제 6 장 참고 문헌

1. 김정숙 : 특허 2001-030064, 골다공증예방 및 치료용 약학조성물과 건강식품
2. 특허 2000-062967, 대두 배아로부터 발효를 통한 고순도 이소플라본아글리콘의 생산방법(2000),
3. 약사공론, 호르몬대체요법(2003)
4. 이흥규. 비만과 관련된 질환. *대한비만학회지* 1:34, 1992
5. 이득주, 한인권, 정호연, 이규래. 비만증 환자에서 소량의 세로토닌 길항제의 체중감량 효과. *대한비만학회지* 2(1):1-4, 1993
6. 한 대석 : 생약학, 서울, 동명사(2002)
7. ADM(Archer Daniels Midland Company). "Method of preparing and using isoflavones", U.S. Patent No. 6,261,565
8. Anderson JW, Smith BM, Washnock CS. Cardiovascular and renal benefits of dry bean and soybean intake. *Am. J. Clin. Nutr.*, 70(3 Suppl):464-474 (1999)
9. AOAC. 1984. Official methods of analysis, 14th ed., Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists, USA
10. Allain CC, Poon LS, Chan CSG, Richmond W and Fu PC. *Clin. Chem.*, 20: 470-475, 1974
11. Allen JK, Hensley WJ, et al., *Clin. Chem.*, 25: 325, 1979
12. Arjmandi BH, Getlinger MJ, Goyal NV, Alekel L, Hasler CM, Juma S, Drum ML, Hollis BW, Kukreja SC. : Role of soy protein with normal or reduced isoflavone content in reversing bone loss induced by ovarian hormone deficiency in rats. *Am J Clin Nutr.* 68(6S):1358S-1363S(1998)
13. Barnes S, Kim H, Peterson G, Xu J. : Isoflavones and cancer- the estrogen paradox. *Korea Soybean Digest.*, 15(2):81-93 (1998)

14. Bae E.A., Choo M.K., Park E.K., Park S.Y., Shin H.Y., Kim D.H., *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 743-747 (2003).
15. Beck V., Rohr U., Jungbauer A., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **94**, 499-518 (2005).
16. Bergkvist L, Adami H-O, Persson I, Hoover R, and Schairer C.: the risk of breast cancer after estrogen and estrogen-progestin replacement. *N. Engl. J. Med.* 321: 293-297, 1989
17. Bryant, H. U. and Dere, W. H. Selective estrogen receptor modulators: an alternative to hormone replacement therapy. *Proc. Soc. Exp. Bio. Med.* 217:45-52, 1998
18. Burstein M, Scholnick HR & Morfin R. *J Lipid Res.*, 11: 583, 1970
- Choi, Y. B., Woo J. G., Noh W. S. 1999. Hydrolysis of  $\beta$ -glucosidase bonds of isoflavone conjugates in the lactic acid fermentation of soymilk. *Korean Journal of Food Science and Technology.* 31, 189- 195
19. Choi, Y. J., Kim C. J., Park S. Y., Ko Y. T., Jeong H. K., Ji G. E.. 1996. Growth and  $\beta$ -glucosidase of *Bifidobacterium*. *Journal of Microbiology and Biotechnology.* 6, 255- 259
20. Coward, L., Barnes N. C., Setchell K. D. R., Barnes S. 1993. Genistein, daidzein, and their  $\beta$ -glucoside conjugates; Antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 41, 1961- 1967
21. Daly JA and Ertingshausen G: Direct method for determining inorganic phosphate in serum with the Centrifichem. *Clin. Chem.*, 18: 263-5, 1972
22. Demacher PNM, Hijmans AGM, et al., *Clin. Chem.*, 26: 1775, 1980
23. Demacher PNM, Hijmans AGM, et al., *Clin. Chem.*, 24: 1780, 1977
24. Dempster DW and Lindsay R: Pathogenesis of osteoporosis. *Lancet* 34: 797-801, 1993
25. Divi RL, Chang HC, Doerge DR. Anti-thyroid isoflavones from soybean: isolation, characterization, and mechanisms of action. *Biochem.*

Pharmacol., 54(10):1087-96 (1997)

26. Duncan AM, Merz BE, Xu X, Nagel TC, Phipps WR, Kurzer MS. Soy isoflavones exert modest hormonal effects in premenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab.* 84(1):192-7 (1999)

27. Duncan AM, Merz-Demlow BE, Xu X, Phipps WR, Kurzer MS. Premenopausal equol excretors show plasma hormone profiles associated with lowered risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 9(6):581-6 (2000)

28. FDA. 21 CFR Part 101: Food labeling : Health Claims; Soy protein and coronary heart disease; final rule(1999)

29. Forman D. and Moller H.: *Testicular cancer. Cancer survey*, 19-20: 323-341, 1994

30. Fourth International Symposium on the Role of Soy Preventing and Treating Chronic Disease. San Diego, USA, November 4-7, 2001.

31. Fotsis t., Pepper M., Adlercreutz H., Flerischmann G., Hase T., Montesano R. and Schweigerer L.: Genistein a dietary derived inhibition of in vitro angiogenesis. *proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 2690-2694, 1993

32. Gao YH, Yamaguchi M. Suppressive effect of genistein on rat bone osteoclasts: apoptosis is induced through Ca<sup>2+</sup> signaling. *Biol Pharm Bull.* 22(8):805-9(1999)

33. Han Y.O., Han M.J., Park S.H., Kim D.H., *J. Pharmacol. Sci.*, **93**, 331-336 (2003).

34. Hayes A.W., Principles and methods of Toxicology. Raven Press, 347-349, 1986

35. Jeon, K. S., Ji G. E., Hwang I. K.. 2002. Assay of  $\alpha$ -glucosidase activity of bifidobacteria and hydrolysis of isoflavone glycosides by *Bifidobacterium* sp. Int-57 in soymilk fermentation. *Journal of Microbiology and Biotechnology.* 12, 8-13

36. Kalu, D. N. Evolution of the pathogenesis of postmenopausal bone

loss. *Bone*. 17: 135S-144S, 1995

37. Knight DC, Eden, J.A. A review of the clinical effects of phytoestrogens. *Obstet. Gynecol.*, 87(5 Pt 2):897-904(1996)

38. Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der

39. Saag PT, van der Burg B, Gustafsson, JA. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology*, 139(10) : 4252 (1998)

40. Lampe JW, Karr SC, Hutchins AM, Slavin JL. Urinary equol excretion with a soy challenge: influence of habitual diet. *Proc Soc Exp Biol Med*. 217(3):335-9 (1998)

41. Messina MJ, Loprinzi CL. Soy for breast cancer survivors: a critical review of the literature. *J Nutr*.131(11 S):3095S-108S(2001)

42. Moorehead WR and Briggs HC: 2-Amino-2-methyl-1-propanol as the alkalizing agent in an improved continuous-flow cresolphthalein complexone procedure for calcium in serum, *Clin. Chem.*, 20: 1458-1460, 1974

43. Morito K, Hirose T, Kinjo J, Hirakawa T, Okawa M, Nohara T, Ogawa S, Inoue S, Muramatsu M, Masamune Y. Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta. *Biol Pharm Bull*. 24(4):351-6 (2001)

44. Nordin B. E., Heyburn P. J., Peacock M. et al: Osteoporosis and osteomalacia. *Clin Endocrinol. Metab*. 9(1): 177-205, 1980

45. Park H.Y., Bae E.A., Han M.J., Choi E.C., Kim D.H., *Arch. Pharm. Res.*, 21, 54-61 (1998).

46. Picherit C, Chanteranne B, Bennetau-Pelissero C, Davicco MJ, Lebecque P, Barlet JP, Coxam V. Dose-dependent bone-sparing effects of dietary isoflavones in the ovariectomised rat. *Br J Nutr* 85(3):307-16(2001)

47. Ranich T, Bhatena SJ, Velasquez MT. Protective effects of

dietary phytoestrogens in chronic renal disease. *J Ren Nutr*11(4):183-93(2001)

48. Tochikura, T., K. Sakai, T. Fujiyoshi, T. Tachiki, and H. Kumagai. 1986. -Nitrophenyl glucose hydrolyzing activities in bifidobacteria and characterization of -D-galactosidase of *Bifidobacterium longum*401. *Agricultural & Biological Chemistry*. 50. 2279-2286

49. Revel L. et al. *Drugs of the Future*, 25(8), 803-808. 2002

50. Rhyee Y. et al. *Journal of Endocrinology* 174: 419-425.

51. Roeschlau P, Beernt E and Gruber WA. *Clin. Chem.*, 12: 226, 1974

52. Visser JJ, Hoekman K. Arginine supplementation in the prevention and treatment of osteoporosis. *Med. Hypotheses*, 43(5) : 339 (1994)

53. Wang J, Chen CC and Osaki S: Optimization of the phosphorus-UV reagent, *Clin. Chem.*, 29: 1225, 1983

54. Scrip Reports, Osteoporosis: *research, markets, trends and opportunities*. PJB Publications Ltd. pp.57-84, 1994

55. Sharpe R. M. and Skakkebaek N. E.: Are oestrogen involved falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract, *Lancet*, 341: 1392-1395, 1993

56. Wang, G., S. S. Kuan, O. J. Francis G. M., A. S. Carman. 1990. A simplified HPLC method for the determination of phytoestrogens in soybean and its processed products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 38, 185- 190

57. Wang, Y. C., Yu R. C., Yang H. Y., Chou C. C. 2003. Sugar and acid contents in soymilk fermented with lactic acid bacteria alone or simultaneously with *Bifidobacteria*. *Food Microbiology*. 20, 333- 338

58. Warnick GR, Nguyen T and Albers AA., *Clin. Chem.*, 31: 217, 1985

59. Williams JP, Jordan SE, Barnes S, Blair HC. Tyrosine kinase inhibitor effects on avian osteoclastic acid transport. *Am J Clin Nutr*.

68(6 Suppl):1369S-1374S(1998)

60. Wolff M. S. and Weston A.: Breast cancer risk and environmental exposure, *Environmental health perspectives*, 105: 891-896, 1977

61. Xu X, Duncan AM, Merz BE, Kurzer MS. Effects of soy isoflavones on estrogen and phytoestrogen metabolism in premenopausal women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 7(12):1101-8 (1998)

62. Yasuda T., Kano Y., Saito K., Ohsawa K., *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 300-303 (1995).

63. Yasuda T., Ohsawa K. *Biol. Pharm. Bull.*, **21**, 953-957(1998).

64. Zheng W, Dai Q, Custer LJ, Shu XO, Wen WQ, Jin F, Franke AA. Urinary excretion of isoflavonoids and the risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 8(1):35-40. (1999)

## 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.