

신수요 창출을 위한 기능성 콩 생산과 고부가가치  
제품화 및 산업화

Research on the production of functional soybean  
and industrialization of high value-added soy  
products

경북대학교

농림수산식품부

# 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “신수요 창출을 위한 기능성 콩 생산과 고부가가치 제품개발 및 산업화” 과제의 보고서로 제출합니다.

2010년 5월 일

## 총괄책임자

주관연구기관  
제1세부과제책임자  
위탁기관  
위탁과제책임자  
연 구 원  
제2세부과제책임자  
연 구 원  
위탁기관  
위탁과제책임자  
제3세부과제책임자  
연 구 원  
연 구 원  
연 구 원  
연 구 원  
연 구 원  
연 구 원  
제1협동연구기관  
제1협동연구책임자  
연 구 원  
연 구 원  
연 구 원  
연 구 원  
연 구 원  
제2협동연구기관  
제2협동연구책임자  
연 구 원  
연 구 원  
연 구 원

## 황영현

경북대학교  
황영현  
소이벤처(주)  
정연신  
박은숙  
신동현  
이인중  
안동대학교  
임언택  
김인겸  
최제용  
강영화  
김정상  
이상한  
석영미  
충북대학교  
김홍식  
송항림  
장성진  
박경호  
이재홍  
장은규  
(재)경북바이오산업연구원  
윤용휘  
황진만  
정인범  
전상훈

제3협동연구기관  
제3협동연구책임자  
연 구 원  
연 구 원  
연 구 원  
연 구 원  
연 구 원  
제4협동연구기관  
제4협동연구책임자  
연 구 원  
연 구 원  
연 구 원  
연 구 원  
연 구 원  
연 구 원  
연 구 원  
위탁기관  
위탁과제책임자  
연 구 원  
연 구 원  
연 구 원  
제5협동연구기관  
제5협동연구책임자  
참여기업 : 소이벤처(주), (주)천년약속, (주)엔앤비, (주)지엔지바이오, (주)제일그린산업, 니껴바이오, 동우당제약(주), 두두원발효(주), 등대, 에이징

안동대학교  
이종화  
김태완  
김종식  
임재환  
정형진  
서울원  
동아대학교  
정영기  
김정인  
최영현  
서권일  
김혜정  
장기철  
서민정  
한국식품연구원  
김현구  
도정룡  
백수연  
도건표  
(주)천년약속  
이강영



# 요 약 문

## I. 제 목

신수요 창출을 위한 기능성 콩 생산과 고부가가치 제품개발 및 산업화

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 수입콩과 차별화된 기능성 고품질 Non-GMO 콩의 육성과 친환경 재배 시스템 확립
- 개발된 고기능성 콩을 이용한 건강기능성 콩식품 개발 및 고부가가치 제품개발
- 안정적이고 장기적인 국산콩의 소비촉진으로 콩 재배농가의 소득증대 및 성공적인 벼 대체작물로서의 콩 재배산업을 육성

## III. 연구개발 내용 및 범위

- 내도복 다수성 고 기능성(isoflavone) 콩 품종육성
  - 내도복 다수성 고 기능성(isoflavone) 콩 품종육성
    - 아가콩 형질개량을 위한 계통육성
    - 기존 아가콩 집단 2,000 NILs의 isoflavone 검정
    - 아가콩 집단 중 내도복 다수성 6개 계통선발과 품종보호 출원
    - 고 세대 흑색종피 집단의 역돌연변이로부터 고함량 isoflavone 계통의 육성
  - 기능성 콩 분말 제품 개발 및 산업화(위탁)
    - 기존 품종을 이용한 isoflavone 증가
    - 소규모 생산 조건 확립
    - Pilot 규모에서의 기능성 분말의 제품화
    - 산업화를 위한 pterocarpan을 이용한 미백 기능성 검증
    - 기능성 아가콩 음료(차) 개발
    - 기능성 아가콩 탁주(막걸리 개발)
    - Genistein을 주 concept으로 한 기능성 화장품 개발
- 양질 지방산 함유 콩 품종개발
  - 콩 유전자원의 고지방 및 양질지방산 자원 발굴
    - 한국, 중국, 미국 및 일본 콩 유전자원 519종의 고지방 및 양질지방산 자원을 탐색하여 양질지방산 품종개발을 위한 유망자원 발굴
  - 양질 지방산 함유 계통육성



- 고지방 및 양질자원 선발과 이를 활용한 국내장려품종들과의 교배조합을 작성하고 양질 지방산 함유 계통육성
- 고지방 및 양질 지방산 유용자원의 환경적 변이 및 안정성 구명
  - 고지방 및 양질 지방산 유용자원의 년차(2개년), 파종기(3시기) 및 지역간(4지역)에 따른 안정성검토와 환경적 변이 구명
- 고지방 양질 지방산 자원의 가공적성 분석
  - 고지방 및 양질 지방산 유용자원 20종의 종실, 두유 및 두부의 물리적, 화학적 성분특성을 평가하여 가공적성을 구명
- 신품종의 친환경 재배시스템 개발
  - 신품종의 친환경 재배시스템 개발
    - 신품종 콩의 재배방법에 따른 기능성물질인 Isoflavone의 함량을 비교하고, Abiotic stresses 처리에 의한 기능성물질의 증대 기술을 개발하여 고품량 Isoflavone 신품종의 지역특성화 재배기술을 확립함.
    - 신품종 콩의 친환경적 재배법 확립을 위해 답전윤환, 피복작물 재배, 피복작물 부산물, 잡초생장억제물질 함유 Endophytic fungi 선발 동정함.
    - 콩의 병해충 발생 양상의 이해와 주요 병해충에 대한 친환경자재 및 천적의 선정 및 검증을 통한 콩의 친환경적 방제법 개발
  - 품종별 친환경 병충해방제 기술개발(위탁)
    - 아가콩 가해 병해충의 발생양상 및 주요 해충에 대한 천적군 조사
    - 아가콩의 주요 식물병에 대한 친환경 농자재 적용 방제법을 연구
    - 톱다리개미허리노린재 천적의 증식기술 개발
    - 아가콩 가해 주요 해충에 대한 천적과 친환경 농자재 적용방제 연구
- 신품종 육종공의 의학적 약리효능구명
  - 신품종 육종콩의 의학적 약리효능 구명
    - 골아세포 증식과 분화 과정에서 글리세올린의 효과
    - 골아세포 생성기 동안 Runx2 발현과정에서 글리세올린의 효과
    - 파골세포 생성기의 분화 과정에서 글리세올린의 효과
    - 고용량 vitamin D 투여한 골다공증 모델에서 뼈 흡수에 글리세올린의 효과
    - 글리세올린 I, II, 와 III의 구조
    - 혈관 수축에서 genistein, daidzein 혹은 글리세올린 I의 효과
    - 글리세올린 I에 의한 혈관 이완에 K<sup>+</sup> channel 억제제의 효과
    - 혈관 수축과 MLC20의 인산화에 미치는 genistein, daidzein 혹은 glyceollin I

의 효과

- MYPT1과 CPI17의 인산화에 미치는 genistein, daidzein 혹은 glyceollin I의 효과
- RhoA의 활성화에 미치는 genistein, daidzein 혹은 glyceollin I의 효과

○ 신제품 육종콩의 기능성 탐색 및 기능성분 구명

- 아가3호의 활성물질을 구명하기 위하여 대량추출, 용매분획, 감압농축 등의 방법에 의해 추출물을 제조하였고 활성추적 분리법을 이용하여 2종의 활성물질 분리
- MS, NMR 등 다양한 기기분석을 실시하여 기능성분 구명
- 활성분획물 제조하여 분획물들에 대한 활성 평가하였고 4종의 활성분획물 선정
- 활성분획물 Bu-3의 synergy effect 규명
- 신제품 아가콩의 기능성분의 특성을 조사하기 위해 아가콩 계통콩들과, 재배콩들의 이차대사산물을 HPLC를 이용하여 패턴분석 실시

○ 육성품종 콩을 이용한 기능성 청국장의 개발

- 육성콩 품종 (아가 3, 4호)을 이용한 항산화기능성이 높은 기능성 청국장 개발
- 육성콩 품종의 *in vitro* 및 *in vivo* 항산화 활성 평가
- 육성콩 품종을 이용한 청국장 제조를 위한 우수 균주의 선발
- 개발 청국장의 동물모델계 항산화 활성 평가
- 개발 청국장을 이용한 spread 및 salad dressing 제조

○ 콩의 주요 성분을 이용한 산업화 연구

- 글라이세오린(glyceollin)을 이용한 생리활성 물질 검증
- 피니톨과 이노시톨을 이용한 생리활성 물질 검증
- 콩의 유효성분을 이용한 산업화 연구

□ 레시틴 및 아가콩을 이용한 향장제품 및 두유제품 개발

○ 콩의 레시틴 분리

- 에센스 향장 시제품 제작을 위해 레시틴을 국산 콩에서 추출하고자 초임계 추출장치와 유기용매를 이용하여 레시틴을 분리

○ 대두 레시틴 및 이소플라본을 이용한 에센스 시제품의 개발

- 천연 유효제인 레시틴과 기능성 물질인 이소플라본을 이용하여 향장 제품을 개발

○ 두유 제품 및 발효 두유 제품 개발

- 아가콩 3호 및 청자콩을 이용한 두유 및 발효 두유 시제품을 개발

□ 콩 기능성 물질을 이용한 건강기능식품 및 미용제품개발

- 콩 저분자 단백질을 활용한 피부개선 효능분석 및 제품 개발
  - 효능추출물의 분리 및 동정
  - 효능추출물의 항산화 및 세포손상억제 효능 분석
  - 대두 분획물의 세포노화 억제효능 및 자외선 차단 효능 분석
  - 효능 강화 분획물 처리에 따른 피부 질환 억제 효능

○ 콩 기능성물질의 효능 검정 및 건강기능식품 개발

- 이소플라본 Genistein에 의한 항암 기전 연구
- 이소플라본 Genistein에 의한 항비만 기전 연구
- 콩 피틴산의 추출 및 항균효과
- 대두 및 대두 발효제품의 생리활성 검증
- 버섯 발효콩의 효능검증

□ 생활습관성 질환개선제품 개발

- 생활습관성 질환개선제품 개발
  - 기능성 육종 콩으로부터 혈행개선제품의 개발
  - 콩 유래 항 당뇨 peptide 소재 및 제품 개발
  - 면역활성 및 항암소재와 제품개발
  - 대두의 식용 사포닌을 이용한 항비만 음료 제품 개발
  - 고품질 검은콩 계통선발 및 안토시아닌 생리활성 연구

○ 신제품 콩을 이용한 고혈압 개선 제품개발(위탁)

- 항고혈압 기능성 콩 peptide 제조
- 항고혈압 제품 개발

□ 대량수요를 창출하는 전두유 개발

- 단백질분해효소를 이용한 전두유액 제조 및 가수분해도 측정, 칼슘결합능, DPPH 프리라디칼 소거능 등을 측정하여 기능성 실험을 통한 유익성 강조. 검은콩, 노란콩을 기본으로하여 단백질, 지방, 탄수화물 등 영양요구에 적합한 전두유 시제품 개발 또한, 소비자 기호와 기능성이 강조된 전두유를 개발하여 상품화

## IV. 연구개발결과

- 아가콩의 결점보완을 보완하고, 보다 이용가치가 있는 기능성의 콩 신품종 육성을 위해 2개년 간 23조합을 인공교배 하였으며, 이들 조합들은 현재 SSD 방법 등을 이용하여 세대 진전 중에 있다.
- 아가3, 4호 NILs 2,000 계통들을 이용하여 3개년간 isoflavone 함량과 농업적 특성검정을 실시하여 우량한 계통을 선발하였는데, 최종적으로 의미 있는 6개의 우량한 계통을 선발하여 2009년에 2계통을, 2010년에 4계통, 총 6개의 계통을 품종등록을 위한 “품종보호출원”을 하였다.
- 출원한 계통 중 아가5호는 흑색종피로서 isoflavone이 가장 높은 계통이고, 아가6호는 아가 3호에 비해 도복 저항성이 높고, 다수성이며 아가 7호와 9호는 각각 황색 종피종과 흑색 종피종으로서 daidzein(-in)의 총량이 높고, 아가 8호와 아가10호는 각각 황색 종피종과 흑색 종피종으로서 genistein(-in)의 총량이 높은 품종들로 이들 함량은 세계 최고의 함량으로 평가되었다.
- 아가콩 Y집단(황색 또는 황녹색 종피)에서 분리한 황갈모용 개체들에 대한 특성검정을 실시한 결과 종피색이 흑색인 계통들은 집단육종법에 의해 육성된 계통들에 비해 isoflavone의 함량이 세계 최고의 isoflavone의 함량을 가진 황색종피종들과 같을 정도로 매우 높았는데, 이는 이들 계통들이 후세대의 매세대마다 isoflavone의 함량을 검정하면서 선발된 계통 육종법에 의해 육성된 집단에서 종피 역돌연변이에 의한 계통들이기 때문으로 생각된다. 수년 내에 이들 계통집단에서 조생이면서 일반 흑색 종피종에 비해 isoflavone의 함량이 10배 가까운 고 기능성의 계통이 선발이 가능하리라고 기대되었다.
- 아가콩 3호를 이용한 미생물(*Aspergillus sojae*)을 이용한 경우 이소플라본을 ~10,500 ppm까지 증대시켰으며, 첨가제(피니톨)를 사용한 경우 ~12,500ppm 정도로 30%이상의 이소플라본 증대조건을 확립하였다.
- 특히 배당체 이소플라본을 비배당체 이소플라본으로 전환하는 실험을 통하여, genistein 및 deidzein의 함량을 9,000ppm까지 증대 시켰으며 이는 배당체로 환산할 경우 14,400ppm이 되는 높은 함량 증대효과를 거두었으며, 이는 생체 흡수율을 고려하면 엄청난 효과를 거둘 수 있었다.
- 스트레스 조건하에서 daidzein의 이차대사 산물인 pterocarpan을 prep LC 및 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 순수하게 분리하였다.

- 위에 얻어진 pterocarpan의 다양한 활용도를 찾는 목적으로 이들의 미백 기능을 확인하였으며, 이를 이용한 다양한 기능성 화장품제조에 이용할 것이다.
- 콩차 제조를 위해 아가콩의 볶음 전처리 조건으로 볶음온도는 250℃, 볶음시간 30분으로 설정하였을 때, 추출물의 콩향과 구수한 맛이 우수하였다.
- 볶음 아가콩 추출물을 이용한 차 제조시 추출물(용매비 1:100)에 대한 관능적 특성이 나쁘지 않은 것으로 나타나, 다른 부재료를 이용한 매스킹은 크게 필요하지 않을 것으로 생각 되었다.
- 콩차 제조시 daidzein은 추출온도 99.55℃, 추출시간 106.19분에서 최대값 11.64 µg/ml을 나타내었고, genistein은 추출온도 99.50℃, 추출시간 103.23분일 때 최대값 9.61 µg/ml을 나타내었다.
- 시판용의 콩차 제품을 340ml 병으로서 제조하였을 때, 병당 isoflavone의 총량은 30mg 내외를 함유하여 고도의 기능성 음료로 평가되었다.
- 30분간 볶은 아가콩을 30mesh 내외의 가루를 만들고, 탁주 제조 원료의 0.3-0.4% 정도의 아가콩 가루를 발효과정 중 2단 삼입하였을 때 양질의 탁주가 제조되었다.
- 탁주를 마실 때, 첫맛 부드러움 강화를 위한 새송이 버섯 가루 최적 첨가량은 원료 대비 2%이었고, 발효중 버섯가루의 삼입시기는 1단 삼입에 첨가하는 것이었음.
- 상기와 같이 아가콩을 첨가하여 탁주를 제조한 경우 740ml 병당 isoflavone의 함량은 약 30mg이었다.
- 본 연구에서 개발된 이소플라본 함유 시제품은 제니스테인의 항산화 효과와 DNA 손상저해 효과를 통한 주름개선효과, 그리고 콩 유래의 레시틴을 이용함으로써 천연유화제, 저 자극제 및 생체막과 친화성을 통한 인체 친화성을 제품의 컨셉으로 시제품을 생산하였다.
- 시제품을 대상은 앞으로 CCD-986sk, HS68, Detroit 5116세포를 이용한 세포내 콜라겐생성시험(collagen synthesis assay)주름 개선 효과와 세포내 콜라게나제활성 억제시험(collagenase inhibition assay) 등을 테스트 하여 주름 개선기능성을 검증할 계획이다.

- 2007년에 수행된 한국, 중국 및 미국 콩 유전자원 379종의 전체 지방함량은 평균 19.1%이었고, 12.7-26.0%의 범위이었다. 지방함량의 분포는 18.0-20%의 분포가 가장 많았고, 24%이상인 자원은 0.8%인 3종이었다.
- 한국, 중국 및 미국 콩 유전자원의 포화지방산인 palmitic acid의 함량은 평균 10.6%이었으며, stearic acid의 평균 함량은 2.9%이었다. 불포화지방산인 oleic acid의 평균 함량은 28.2%이었고, 범위는 15.3-56%이었고, linoleic acid의 평균함량은 51.2%로서 범위는 24.4-68%이었다. linolenic acid의 평균함량은 7.1%이었고, 범위는 3.4-11.1%이었다. linoleic/linolenic의 비율은 평균 7.5이었고, 최대 17에서 최소 3.8을 나타내었다. 포화지방산(palmitic acid+stearic acid)의 평균은 13.5%이었으며, 범위는 6.7-21.7%이었다. 불포화지방산(oleic acid + linoleic acid + linolenic acid)의 평균은 86.5%이었으며, 범위는 78.3%~93.4% 이었다.
- 2009년에 수행된 일본자원 140종의 평균 지방함량은 17.2%이었고, 22%이상인 품종은 2품종으로서 1-116(22.8%)과 1-112(22.4%)이었다. 지방산의 평균함량은 불포화지방산인 oleic acid는 평균 26.1%이었고, 최대 55.2%, 최소 16.6%이었다. linoleic acid의 함량은 평균 51.9%로서 최대 59.1%, 최소 25.8%이었다. linolenic acid의 함량은 평균 8.9%, 최대 12%, 최소 3.0%인 것으로 나타났다. linoleic/linolenic의 비율은 평균 6이고, 최대 18.6, 최소 3.4이었다.
- 고지방 육종을 위한 유망자원으로는 중국자원 수농14호(26.0%), 동농434호(25.7%) 및 동농46호(25%)이었다. 양질지방산 육종을 위한 유망자원으로는 고 oleic acid 함량을 가진 미국자원 KLG12073(56.0%)와 KLF12074(56.0%), 중국자원인 길림14호(52.2%), 일본자원 M23(55.2%), 한국육성품종인 광안콩(55.9%)과 봉의(50.9%)이었고, linoleic 함량이 낮은 자원은 미국자원 KLG12093(3.4%) 등의 9종과 일본자원 MS382(2.9%)이었다.
- 2007년도 교배조합 20조합 중에서 27001 등 5조합은 2008년도에 F<sub>1</sub>양성, 2009년도에 F<sub>2</sub>를 양성하였다. F<sub>2</sub>세대에서 선발목표(황,흑색종피, 눈색황, 다수초형)에 따라 5조합에서 우량계통 113개체를 선발하였다. 각 조합별로 후기세대까지 Bulk 육종법을 수행하기 위하여 SSD 육종법으로 교배번호 CS27001은 252립, CS27004는 352립, CS27006은 140립, CS27114는 196립 및 CS27017은 552립을 선발하여 총 1,492립을 선발하였다.
- 그 외 CS 27002 등 15조합은 2009년도에 F<sub>1</sub>세대에서 60개체를 양성하였으며, 차후 본 연구에서 육성된 계통들은 지속적인 세대축진의 수행과 아울러 유망

계통을 선발할 예정이다.

- 년차에 따른 시험품종의 평균 지방함량은 07년은 19.1%. 08년은 20.7%로서 08년이 높았으며, palmitic acid는 년차간에 차이가 없었으며, stearic acid는 08년이, oleic acid는 07년이, linoleic acid는 08년이, linolenic acid는 07년이 많았다.
- 2개년 평균 품종별 지방함량은 중국자원인 동농46호가 평균 25.5%로 가장 높았고 안정적이었으며, 불포화지방산 중에서 oleic acid는 KLG12073이 2개년 평균 51%로 가장 높았고, 안정적이었다. linoleic acid함량은 KLG12080이 2개년 평균 66.2%로 가장 높았고 안정적이었다. linolenic acid는 KLG12093와 KLG12096가 2개년 평균 각각 3.4%, 3.5%로 낮았다.
- 파종기에 따라서 지방함량과 불포화지방산인 palmitic acid와 stearic acid는 차이가 없었고, 불포화지방산인 oleic acid(C18:1)는 5월20일 파종이 6월5일 파종과 6월20일 파종보다 높았고, linoleic acid(C18:2)와 linolenic acid(C18:3)는 5월20일 파종이 낮았고, 6월5일과 6월20일 파종이 높았다.
- 불포화지방산인 oleic acid(C18:1)는 전 파종기에서 KLG12074가 가장 높았고 대풍콩이 가장 낮았는데, KLG12074는 파종기 간에 변이가 작았다. linoleic acid(C18:2)는 전 파종기에서 KLG12081이 가장 높아 파종기에 따른 변이가 작았다.
- 재배지역에 따른 지방함량은 품종간 및 지역과 품종간의 상호작용이 인정되었다. 재배지역에 따른 시험품종의 평균 지방함량은 무안이 가장 높았고, 연천이 가장 낮았다. 품종간에는 중국자원인 흑농44가 21.5%로 가장 높았고, 안정성이 높았다. 불포화지방산인 oleic acid(C18:1)함량은 청주가 높았고 대구가 낮았다. linoleic acid(C18:2) 함량은 지역간에 차이가 없었고, linolenic acid(C18:3)의 함량은 대구와 연천이 높았고, 청주와 무안이 낮았다.
- 재배지역에 따른 불포화 지방산인 oleic acid(C18:1)함량은 KLG12074와 KLG01397가 높았으며, linoleic acid(C18:2) 함량은 KLG12081가 가장 높았고, linolenic acid(C18:3)의 함량은 KLG12081이 가장 낮았다.
- 콩 20품종의 종실과 두유 및 두부의 지방함량은 각각 17.1-24.6%, 0.6-1.9% 및 2.8-8.8%의 범위이었다. 지방함량은 종실에서 높은 품종이 두유에서는 높았으나 두부에서는 낮은 경향이었다. 지방산 함량은 종실에서 높은 품종이 두유와 두부에서도 높았고, 종실에서 낮은 품종은 두유와 두부에서도 낮았다.

- 종실의 지방함량은 동농98-14가 가장 높았고, KLG12088이 가장 낮았으며, oleic acid함량은 봉의콩이 가장 높았고, KLG12081이 가장 낮았으며, linoleic acid는 KLG12081이 가장 높았고, KLG12073이 가장 낮았다. linolenic acid는 KLG12073이 가장 높았고, KLG12096이 가장 낮았다.
- 두유의 지방함량이 가장 높은 품종은 합풍95-873, 가장 낮은 품종은 단백콩이었다. 지방산 중에서 oleic acid 는 KLG12074가 가장 높았고, KLG12081이 가장 낮았고, linoleic acid 는 KLG12081이 가장 높았고, KLG1203이 가장 낮았으며, linolenic acid는 흑농44가 가장 높았고, KLG12096이 가장 낮았다.
- 두부의 지방함량이 가장 높은 품종은 석후대두, 가장 낮은 품종은 단백콩이었다. 지방산 중에서 oleic acid는 KLG12074가 가장 높았고, KLG12088이 가장 낮았으며, linoleic acid는 KLG12088이 가장 높았고, KLG12073이 가장 낮았으며, linolenic acid는 봉의콩이 가장 높았고 KLG12081이 가장 낮았다.
- 아가콩의 isoflavone 함량은 재배지역, 시비 수준, 대사조절물질 등에 의해 크게 차이가 나타났다. 따라서 아가콩의 isoflavone 함량이 높은 기능성 콩을 생산하기 위해서는 특산지 조성과 재배기술의 개발이 필요하며 이를 이용한 기능성 콩 제품의 개발에도 응용할 수 있을 것으로 사료된다.
- 친환경적 아가콩 재배를 위해서는 답전운환을 통해 잡초균락을 줄이고 이랑에 검정비닐피복과 고랑에 피복작물의 부산물을 피복함으로써 제초제의 사용을 피할 수 있으며, 고랑의 잡초방제를 위해 잡초억제물질 생성균류를 선발하여 피복작물 부산물과 혼합처리하는 것이 효과적일 것으로 사료됨.
- 아가콩에서 발견된 해충으로는 노린재류의 발생이 가장 많았으며 그중에서도 풀색노린재(*Nezara antennata*)와 툽다리개미허리노린재(*Riptortus pedestris*)의 밀도가 가장 높았다. 청자콩과 대원콩과의 비교에서는 아가콩에서 노린재류의 발생이 상대적으로 적었다.
- 아가콩에서는 세균성점무늬병(*Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*)은 8월 이후에, 점무늬병(*Ascochyta glycyines*)과 자주무늬병(*Cercospora kikuchii*)은 9월 이후에 심하게 발생되었으며 아가콩의 세균병 및 바이러스병에 대한 저항성은 청자 및 대원콩과 같은 수준이었다. 이들의 방제를 위해 고시된 3종의 살균제 생물농약을 이용하여 아가콩 포장에서의 방제력을 시험한 결과 처리별 통계적인 유의차는 인정되지 않았다. 다만 푸른세상(활성미생물: *Trichoderma harzianum*)을 처리한 구에서는 아가콩의 증수효과가 2,220g이었



으며, 무처리구에서는 1,980g이었다.

- 톱다리개미허리노린재 천적의 증식을 위해 기주알의 저온저장 기술을 이용하였다. 약 2°C에서의 30일 동안 냉장 보관 후에는 노린재 알이 부화하지 않았으며, 이들 알에서 천적인 노린재강충좀벌(*Ooencyrtus nezarae*)과 노린재검정알벌(*Gryon japonicum*) 모두 부정적인 영향을 받지 않고 성공적으로 발육 및 성장을 완료하였다. 또한 두 기생벌 개체군의 상호작용에도 영향이 없었다.
- 저온저장한 톱다리개미허리노린재의 알 방사가 노린재의 기생률 향상 및 밀도 억제에 효과가 있는지를 경북 안동시 송천동 소재의 아가콩 재배지를 조성하여 시험한 결과 노린재의 알, 약몽 및 성충의 밀도 억제효과는 미미하였으나, 노린재검정알벌의 기생율 증가 효과는 있었다.
- 글리세올린은 Runx2 단백질을 분해를 촉진시켰으며 alkaline phosphatase 활성과 Alizarin Red S 염색을 억제하였다. 글리세올린은 TRAP 염색을 억제하여 파골세포 생성을 억제함을 알 수 있었다.
- 골다공증 모델에서, 글리세올린은 calvaria의 주입에서 보호하는 효과를 보였다. 글리세올린은 osteoprotegerin의 큰 방황변이 없이 RANKL 발현을 강하게 억제하였다. 그러므로, RANKL/Opg 비율은 글리세올린에 의해 강하게 억제되었고, 마우스 모델에서 뼈 흡수를 반감시켰다. 글리세올린은 뼈의 교체비율을 억제하여, 골다공증을 강하게 완화 시켰다.
- Genistein, daidzein 혹은 글리세올린 I은 수축제인 KCl, NaF, U46619, phenylephrine, or PDBu에 의한 혈관 수축을 완화시켰다.
- Genistein, daidzein 혹은 글리세올린 I에 의한 혈관의 이완은 RhoA/Rho kinase의 신호전달을 억제하였다.
- 글리세올린 I에 의한 혈관의 이완은 K<sup>+</sup> channel에는 영향을 미치지 않았다.
- Genistein, daidzein 혹은 글리세올린은 골다공증과 심혈관계 질환을 치료하는 치료제로 좋은 후보이다.
- 아가콩의 항산화 활성을 평가하였고 및 항산화 활성물질로 2종을 분리하여 genistin과 daidzin로 구조 동정하였다. 활성분획물, Bu3의 synergy effect 구명하였다. 활성분획물, Bu3은 단일 화합물보다 높은 활성을 보여주었고 대표

적인 기능성분인 genistein에 유사한 정도의 높은 활성을 보여주었다. 또한 패턴분석 결과 아가콩에는 주요 이소플라본뿐만 아니라 타 품종에서는 검출되지 않는 미량 성분들도 많이 검출되어 추후 미량성분에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

- 육성콩 품종 (아가 3, 4호)을 이용하여 제조한 청국장의 항산화 활성을 비교한 결과, 아가 4호 또는 검정콩 계열이 항산화활성이 *in vitro* 및 마우스모델계에서 항산화활성이 우수한 것으로 나타났으며, 이러한 경향은 콩 자체의 경우도 동일하였다. 한편 기능성 청국장을 제조하기 위하여, 순창전통청국장에서 분리한 6가지 균주 가운데 항산화활성, 이소플라본 대사 활성 등을 검토하여 *Bacillus amyloliquefaciens* 86-1 균주를 선발하여 사용하였다. 또한 제조한 기능성 청국장의 식품 부원료로서의 가능성을 평가하기 위하여 청국장 함유 spread 및 dressing을 제조하여 기호도를 평가한 결과, 고형분 기준 1% 내외에서 관능적으로 대조군과 유의적인 차이 없이 우수한 것으로 나타났다.
- 클라이세오린을 이용하여 항암 및 항아토피 활성을 검증한 결과 wound assay를 이용하여 암세포의 운동성을 저해하는 것을 확인하였다.
- 마우스를 이용한 아토피 동물 모델을 이용하여 항아토피 활성이 있는 것을 확인하였다.
- 콩의 주요한 유효성분인 피니톨과 이노시톨을 이용한 생리활성 물질의 확인 결과 피니톨은 세포 운동성을 저하를 확인하였다.
- 피니톨은 항암분자마커인 ICAM-1, CD44, MMP17, MMP14, ARF2의 발현을 감소시켰다.
- 이노시톨은 항암분자마커인 MMP14와 VEGF-A의 발현을 감소시켰다.
- 피니톨은 항염증 관련 아토피 동물모델에 효과가 있는 것으로 나타났으며, 아토피 유도모델에서의 귀의 비후(두께)를 감소시키며, 면역세포의 염증 부위로의 이동을 감소시키는 것으로 나타났다.
- 피니톨의 항암활성을 마우스 항암모델을 이용하여 알아본 결과 colony의 성장을 억제하는 것을 알 수 있었으며, 이노시톨의 경우는 전체적인 colony 수를 약간 감소시키는 것을 알 수 있었다.

- 산업화와 관련된 콩의 유효물질에 대한 연구는 지속적으로 이루어지고 있으며, 특히 피니톨은 상품의 가치를 인정받아 다수 생산되고 있다.
- 1차 실험에서 콩 12개의 품종(대망, 대원, 대풍, 석량꽃, 선유, 신기, 아가, 일품검정, 청자, 큰올, 태광, 풍산나물)에 대하여 최적의 레시틴 추출방법을 연구하였으며 용매 추출법, 탈검·수화를 이용한 추출법, 초임계 추출 방법 등으로 레시틴을 추출하였다. 연구결과 탈검·수화를 통한 방법이 레시틴의 대량 추출 및 생산에 가장 적합한 것으로 판단되었다. 용매를 이용한 추출법은 생산 수율은 높으나 유기 용매의 사용으로 인한 환경오염의 문제를 야기시킬 가능성이 있어 적합하지 않은 것으로 판정되었으며 초임계 추출법은 양질의 레시틴을 얻을수 있는 있으나 용매 추출이나 수화로 인한 레시틴 추출법에 비해 분리 단가가 매우 비싸 대량 분리 시스템으로는 적합하지 않은 것으로 판단되었다.
- 콩에 존재하는 Isoflavone 가운데 Genistein과 Lecithin을 주성분으로 한 에센스 크림 시제품을 개발 하였다. Genistein은 항산화 기능이 있을뿐만 아니라 UV를 통한 DNA손상을 저하시키는 작용이 있어 마사지 크림의 주된 효능으로 컨셉을 잡았으며 Lecithin은 콩으로부터 추출된 천연 유효제료써 화장품 제형 설계시 유상(Oil Phase) 조성에 메인 소재로 사용하였다. 이는 Emulsion의 안정성을 증진시키는 것 외에도 화학 유효제에 비해 천연 소재를 이용하였다는 장점이 있어 콩으로부터 유래한 두 가지의 소재를 화장품 제조에 접목하여 Emulsion 형태의 에센스 시제품을 개발 하였다.
- 2차 실험에서는 1차에서 분리한 12개 품종간 조대두유의 레시틴 함량과 Phosphatidyl- choline(PPC)함량을 Colorimetric determination assay법을 이용하여 정량하였다. 이는 향후 기능성 물질인 레시틴과 PPC의 대량 분리시 이들 두 성분이 가장 높은 품종을 알아보기 위함이었으며 실험결과 선유콩이 레시틴과 PPC에서 가장 많은 함량을 나타내어 가장 우수한 품종으로 선발되었고 아가콩은 평균치 보다 높은 함량을 나타내었다. PPC는 Lecithin으로부터 추출한 지방질 분해 효소로써 향후 향장 산업에 접목하여 콩에서부터 추출한 천연물 컨셉트로 Slimming Gel (가칭) 형태의 화장품으로 개발 할 경우 큰 호응을 얻을 것으로 생각된다.
- 1차 때의 두유 제조기술을 바탕으로 하여 이소플라본 함량이 매우 높은 아가콩 3호를 메인으로 한 두유의 제조 및 유산균 접종을 통한 발효두유시제품의 제조와 이에 따른 기능성 분석을 실시하였다. 1년차에서 개발된 발효두유 시제품은 비타민D, 엽산, GABA등의 여타 제품이 가지지 않은 유용한 생리활성 물질을 함유하고 있는 것으로 나타났다. 발효 균주로써는 면역력 강화기능이

있는 김치 유래 유산균인 *Leuconostoc kimchii*와 장 기능개선효과 및 항산화 활성을 나타내는 *Leuconostoc citreum* 및 콜레스테롤 함량을 낮추어 심혈관계 통 질환에 효능이 있는 *Lactobacillus plantarum*등을 사용하였는데 관능평가 결과 뛰어난 기능성에 비하여 역취가 심하여 꺼리는 이가 많았지만 전체적으로는 발전가능성이 유망하다는 평가를 얻었다.

- 3차 실험에서는 본 두유 제조실험의 메인이 되는 소재인 아가콩 3호를 바탕으로 두유 제조를 하여 발효를 거치지 않은 것과 발효를 거친 것에 대한 기능성 비교 분석과 아가콩을 제외한 나머지 5개 품종(태광콩, 서목태, 백태, 속청콩, 화태)에 대해서도 비교 분석을 실시하였다. 이는 위에서 언급했다시피 여러 개의 품종 가운데 그 기능성과 관능평가를 거쳐 패널들이 선호하는 품종등을 종합하여 차후 콩 음료 개발시 우수한 품종을 선발하고자 하는데 그 의의를 두었다. 우선 발효여부에 대한 기능성 비교는 다음과 같다. 발효를 하였을 때 본래의 기능에서 어떤 영향을 미치는가에 대해 알아보기 위하여 발효를 하였는데 우선 항산화 기능분석에서 발효를 한 제품이 전반적인 결과가 더 우수하였으며 영양소 흡수를 저해하는 피트산 함량 분석과 혈압을 증가시켜 고혈압을 유발시키는 ACE 저해율 실험 역시 발효두유가 비발효 두유에 비해 활성이 더 높다는 결과를 나타내었다.
- 아가콩 외 다른 품종과의 비교 및 분석 결과는 다음과 같았다. 우선 항산화 기능분석에서는 서목태가 ABTS 래디컬 소거능과 DPPH 전자공여능에서 가장 우수한 결과를 나타내었고 SOD 유사활성 측정에서는 아가콩이 가장 우수한 결과를 나타내었다. 기능성 물질 분석에서는 Total Polyphenol과 Total Flavonoid, 피트산 함량, ACE 저해율, GABA 함량, 유리아미노산 정량, 항당뇨 실험등에서 모두 아가콩이 가장 우수한 기능을 가진 것으로 밝혀졌다. 또한, 관능평가에서도 아가콩이 모든 품종 가운데 우위를 점하여 유용한 기능성과 패널의 선호도 또한 높아 차후 콩 음료 제조시 매우 각광받을 수 있는 소재로 거듭날 가능성이 엿보였다.
- 콩으로부터 루나신강화추출물(LES)을 분리하고, 이에 대해 항산화 및 세포손상억제 효능 분석하였다. 루나신 처리에 의해 산화적 DNA 손상억제, elastase의 활성 억제, DPPH free radical 소거능 및 화학적 발암물질에 의해 야기되는 세포의 비정상적인 생육을 억제하였다. Lunasin은 UVB에 의해 야기되는 elastin의 degradation을 억제함으로써 photo-aging을 억제하고, 알레르기 접촉 피부염을 유도한 동물실험에서 LES 피부도포시 표피두께의 증가가 억제되는 것을 확인하였다.

- 콩의 대표적 이소플라본인 Genistein은 농도 의존적으로 암세포 HCT116의 생존율을 감소시켰으나, daidzain은 세포생존율에 큰 변화가 없었다. Genistein과 Gaidzein의 병합처리에 의한 상승적인 세포 독성효과가 발견되었으며, 이는 항암유전자인 *NAG-1* 유전자의 과대발현과 부분적으로 관련이 있다고 생각된다. Genistein은 마우스 전지방세포 3T3-L1 세포주의 생존율 및 분화를 억제하였으며, *Sirt-1* 유전자의 발현이 억제됨이 관찰되었다.
- 혈전용해효소를 생성하는 균주를 선별하고 아가콩을 이용하여 최적발효조건을 확립하였으며, 아가콩 발효물에서 항산화, 항당뇨, 항암의 다양한 생리활성을 보였다, 그리고 관능검사를 통한 기호도 조사에서 높은 평가를 받았다.
- 아가콩과 발효 아가콩에서 혈당개선효과, 혈당조절, 지방간개선 효과가 대두보다 높게 나타났으며, 발효 아가콩에서는 항염증, 항암에 높은 활성을 보였으며, 그리고 콩의 유효성분인 isoflavone genistein에서는 중앙 진이억제능 및 항암에 높은 활성을 보였다.
- 대두박에서 항비만 활성 물질을 분리하여 비만억제 효능을 검증하였고, 이를 이용하여 항비만음료를 개발하였으며, 이는 타제품 보다 항비만 효과가 우수한 것을 확인하였다.
- 고품질 검정콩 계통의 선발 하고 이러한 콩의 껍질로부터 안토시아닌을 분리하여 이들의 생리활성을 염증성 스트레스와 관련하여 검증한 결과 동맥경화, 당뇨, 항산화 및 노화억제등에 효과가 있음을 확인하였다.
- 국내에서 생산되는 콩을 이용하여 콩 단백질 제조조건을 설정하였다. 그리고 콩 단백질을 가수분해하여 항고혈압 기능성 peptide를 제조하였으며, 항고혈압 기능성 콩 peptide를 이용하여 환, 캡슐, tablet 시제품을 제조하였다.
- 총 페놀함량은 OD 765nm에서 분석한 결과, 단백질 분해효소의 농도가 높을수록 전두유액의 총 페놀함량은 증가하였고, 0.5% 단백질 분해효소를 처리하여 제조된 전두유액의 총 페놀함량은 약 750ug/ml 이었다. DPPH 프리라디칼 소거능은 0.5% 단백질 분해효소 처리시 약간 증가함을 보였다. 혈액순환 기능성 분석에서 혈당, GOT, GPT, 중성지방, 콜레스테롤 등 유의적 감소하는 것들 얻었다.
- 기능성 전두유는 OEM 생산 방식을 통한 시제품 디자인 및 제품 개발 완료 되었다.

## V. 연구성과 및 성과활용 계획

본 연구의 주요 연구성과는 기술이전, 특허, 논문발표 및 게재, 홍보 등다양하게 성과를 활용계획에 있으며, 그 내용은 다음과 같다.

- 신종의 육성은 영구 계속사업으로서 본 과제를 통해서 아가콩의 고 isoflavone 함량을 유지하면서 결점 보완 또는 보다 다양한 기능성, 다수성 및 내 재해성의 신품종 개량을 위해 인공 교배된 23개 조합에 대하여는 관행의 육종방법에 의해 계통육성이 계속하여 이루어질 것이다.
- 기존 아가콩 집단 2,000 NILs 전체에 대한 주요 농업적 특성과 isoflavone 함량검정을 통해 선발된 계통들은 품종등록을 위해 품종보호 출원된 계통 및 고 세대 흑색종피 집단의 역돌연변이로부터 고품량 isoflavone 함량을 가진 선발계통과 함께 isoflavone을 중심으로 세계 최고의 기능성 콩 품종육성에 활용코자 한다.
- 품종보호 출원된 6개 계통들은 2-3년 내에 계통별로 특정 의미를 가진 품종으로 등록될 것이며 이들 신품종들은 기능성 식. 의약품의 중요한 소재로 이용될 것이다.
- Isoflavon 및 pterocarpan을 함유한 기능성 아가콩 콩 분말을 이용하여, 현재 시판되고 있는 아가콩 플라본의 up-grade제품에 활용할 것이다.
- 순수 분리된 pterocarpan을 이용한 기능성화장품, 잇몸병 예방용 치약 및 가글을 제조하여 판매하고 있다.
- 개발된 기능성 아가콩 음료(차), 아가콩 탁주(막걸리 개발) 및 화장품은 홍보와 함께 시판을 시작하고 있다.
- 고지방 육종을 위한 유망자원으로 유전적 및 환경적으로 안정된 중국자원 3종을 발굴하였으며, 차후 고지방 품종개발의 교배모본으로 활용할 예정이며, 양질지방산 육종을 위한 유망자원으로는 고 oleic acid 함량을 가진 미국자원 2종, 중국자원 1종, 일본자원 1종, 한국육성품종 2종을 발굴하였고, linoleic 함량이 낮은 자원으로 미국자원 9종과 일본자원 1종을 발굴하였으며 이들 자원의 환경변이를 평가한 결과 안정적이었으며, 콩 육종 및 기타 관련기관에 육종소재로 제공할 예정이다.
- CS27002 등 15 교배조합의 F<sub>1</sub> 60개체 양성, CS27001 등 5교배조합의 F<sub>2</sub>세대

113개체를 선발하였고, SSD육종법에 의한 총 1492립을 선발하였으며 지속적인 세대축진과 선발을 통하여 중간모본 및 품종을 개발할 예정이다.

- 고지방 및 양질지방산 품종의 가공적성 평가를 통하여 두유 및 두부의 고품질화를 위한 육종소재를 발굴하고 차후 품종개발을 통한 신소재 식품의 산업화를 위해 활용할 예정이다.
- 중국, 미국 및 일본 도입 콩 유전자원들의 농업유전자원센터에 입고하고, 유망 유전자원들은 연구기관 및 수요자에 제공하여 국내의 고지방 및 양질지방산 육종에 활용하고자 한다.
- 콩 지방 및 지방산에 관한 본 연구의 수행과정에서 얻어진 중요결과들을 4건의 학술발표를 하였으며, 2012~2013년에 3건의 논문을 게재할 예정이다.
- 잡초생장억제물질 함유 Endophytic fungi를 이용한 친환경생물제초제 개발 연구에 응용하고, 고함량 isoflavone 생성을 위한 대사유도물질 사용과 친환경제배법의 기술을 농가에 전수시킬 예정이다.
- 신품종인 아가콩에서 최초로 해충 발생 양상 및 톱다리개미허리노린재 천적의 발생에 관한 연구결과를 각각 국제학술지인 Journal Asia Pacific Entomology 와 Applied Entomology and Zoology에 2010년 게재 수락되어 발간될 예정이다.
- 톱다리개미허리노린재 천적의 발생에 관한 연구결과는 2009년 5월 전남 보성에서 개최된 한국응용곤충학회에서 우수 발표상을 연구원인 김상원이 수상하였다.
- 톱다리개미허리노린재에서의 저온저장된 기주알을 이용한 노린재강충좀벌과 노린재검정알벌의 증식법을 최초로 개발하여 국제학술지인 Journal Asia Pacific Entomology(13: 139-143)와 Biocontrol Science and Technology(19: 315-325)에 각각 2010년과 2009년에 게재하였다.
- 유방암 치료와 함께, 글리세올린은 골다공증을 위한 치료에 효과가 있었다. 그것은 골다공증과 유방암을 함께 치료하는 치료제가 될 것이다.
- Genistein, daidzein 혹은 글리세올린 I은 RhoA/Rho-kinase 신호전달을 억제하여 혈관 수축을 완화시켰다. RhoA와 Rho-kinase는 고혈압, 관상동맥과 뇌동맥의 혈관경련, 죽상경화증과 당뇨병을 치료하는 치료제로 중요하다.

Genistein, daidzein 혹은 글리세올린 I의 혈관 이완의 효과는 심혈관계 병의 치료에 중요한 후보로 주목받는다. 우리는 많은 연구를 통해서 논문과 특허를 출판하고 있다.

- 국내 식품종 콩인 아가콩이 항산화활성, 암 예방활성을 보여주는 우수한 건강 기능성 콩임을 구명하였고 기능성 아가콩에 대한 연구결과는 SCI급 논문 (Food Sci & Biotech)에 출판되었다. 본 연구결과는 향후 아가콩이 건강기능성 식의약소재로 개발되는데 기초자료로 이용될 수 있을 것이다.
- 본 연구결과로서 우수청국장 균주에 대한 특허를 포함한 국내특허 2건을 출원하였고, 논문 2편 (SCIE급 1편 포함) 발표하였으며, 현재 2편을 투고준비중이다.
- 글라이세올린과 피니톨을 포함하는 콩에 대한 산업화 추진전략으로 전체적인 수요확대(두 성분에 대한 필요성 증대를 각인), 건강기능성 식품 개발, 콩성분에 대한 적절한 분리기술의 확보 및 이를 이용한 다양한 제품군의 개발 등이 필요하다. 본 연구는 이에 기능성을 확인하기 위한 기초적인 데이터를 제공한다.
- 본 연구에서 개발된 아가3중세트(화장품)는 시중에 출시되어 판매되고 있으며, (참여기업인 에이징과 공동개발) 아가콩을 이용한 두유는 기능성 측면에서 일반 콩(흰콩, 검정콩)에 비하여 매우 우수한 기능성을 나타내고 있어 본 연구원과 두유 제조회사와 제휴하여 상품 및 제품을 시장에 출시하기 위해 노력하고 있음.
- 언론 등에 아가3중세트 개발로 산,학,연 공동개발의 연구결과로 발표됨. 본 연구에서 개발된 기초 기술들을(분리기술, 제품화 기술, 두유제조기술) 등을 바이오산업 발전을 위한 자료로 사용할 계획임.
- 아가콩을 이용한 두유제품으로 생명아가두유, 생명청자두유를 상표등록 계획 중에 있다.
- 「대두추출물을 함유한 피부미용개선용 복합 조성물」에 관한 특허를 출원 준비 중이며, 관련 시제품을 제작하여 전국 한의원을 대상으로 효능 및 만족도 조사 중에 있다. 생명과학회지 1편의 논문이 게재되었으며, 2건의 논문은 투고, 심사 중에 있으며, 3편의 논문을 추가 투고할 계획이다.
- 본 연구를 수행하면서 기능성발효제품과, 항비만 음료를 개발하였고, 총 9개의



학술논문을 발표하고 2개의 특허를 출원하였으며, 그 외 많은 학술발표를 하였다.

- 국내에서 생산되는 콩을 이용하여 콩 단백질 제조조건을 설정하였다. 그리고 콩 단백질을 가수분해하여 항고혈압 기능성 peptide를 제조하였으며, 항고혈압 기능성 콩 peptide를 이용하여 환, 캡슐, tablet 시제품을 제조하였다.
  
- 개발된 전두유 시제품을 바탕으로 생산수율 및 가격 경쟁성을 검토한 후 양산 과정 계획을 가지고 있다. 양산 전 On-line 및 Off-line을 통한 제품판매, 대학 병원을 판매처로 활용할 계획을 세우고 있다. 또한, On-line상의 블로그와 카페 등을 이용하여 제품의 판로를 개척해 나아갈 예정에 있다.

# SUMMARY

## I. Title

Research on the production of functional soybeans and industrialization of high value-added soy-products

## II. Objectives and significance of the research

- Development of high quality functional non-GMO soybeans differentiated from the imported ones and establishment of friendly environmental cultivation system.
- Development of functional health aid soy-foods and value added products by the use of newly developed high functional soybean varieties.
- Increase of soy-grower's ensured income by habitual and encouraged consumption of domestic soybeans by consumers and the promotion of successful soy-industry as alternative crop of rice.

## III. Contents and scope

- Development of lodging resistant, high yielding, and high functional (isoflavone) soybean variety
  - Development of lodging resistant, high yielding, and high functional (isoflavone) soybean variety
    - Development of breeding lines for improving of Aga varieties
    - Screening of isoflavone content for pre-developed 2,000 Aga NILs
    - Selection of promising 6 Aga lines for registration of "certificate on grant of plant variety right"
    - Development of high isoflavone lines from the population of reverse mutation
  - Industrialization of functional products by the use of Agakong
    - Increasing of isoflavone by existing Agakong varieties
    - Establishment of small scale production
    - Development of functional powder product in a pilot scale.
    - Verification of whitening function with pterocarpan for industrialization

- Development of high functional Agakong tea
- Development of high functional Agakong Takjoo(Makgori)
- Development of functional cosmetics containing of genistein

Development of soybean variety with fatty acid composition of high quality

- Exploration of soybean genetic resources for high oil content and fatty acid composition of high quality.
  - Evaluation of a total of 519 soybean genetic resources for the development of new soybean varieties with high oil content and fatty acid composition of high quality.
  
- Selection of breeding lines for the development of varieties with fatty acid composition of high quality.
  - Selection of breeding lines crossed between Korean recommended varieties and prominent resources with high oil content and fatty acid composition by using the soybean resources
  
- Evaluation of environmental variation and stability of prominent genetic resources with high oil content and fatty acid composition of high quality.
  - Investigation of variation and stability of prominent genetic resources affected by environmental factors, year, planting date and cultivation region.
  
- Evaluation of processing adaptability of prominent varieties with high oil content and fatty acid composition of high quality.
  - Investigation of physical characteristics and chemical composition of 20 prominent soybean resources with high oil content and fatty acid composition of high quality for enhancing processing adaptability.

Development of environment friendly cultivation system for newly developed varieties

- For the newly developed varieties of soybean, cultural practices are developed to increase the contents of functional compound of isoflavone in different areas. Abiotic stresses are applied for

increasing the functional compounds. The cultural practices are applied to increase the functional compounds and to select the area suitable for production of higher contents of the compounds for the new varieties.

- Ways of paddy–upland rotation, cover crop cultivation, use of by–products of cover crops, and isolation of endophytic fungi with weed growth inhibitor are developed to establish environment–friendly cultivation technologies for the new soybean cultivars.
  
- Development of environmentally sound pest management in a soybean variety
  - Field occurrence of soybean diseases and insect pests was assessed in Agakong.
  - Environmentally sound disease management agents were evaluated for the control of the soybean diseases.
  - Developed a method of mass production of sympatric parasitoids of *R. pedestris*.
  - Environmentally sound insect pest management tactic using natural enemies was evaluated
  
- Pharmacological and medical effects of compounds derived from soybeans
  - Pharmacological and medical effects of compounds derived from soybeans
    - Effects of glyceollin on the expression of osteoblast differentiation markers in MC3T3–E1 cells and primary cultured osteoblasts.
    - Effects of glyceollin on the Runx2 expression during osteoblastogenesis.
    - Effects of glyceollin on the differentiation of osteoclastogenesis.
    - Effects of glyceollin on the osteoporosis model using a high dose vitamin D induced bone resorption
    - Structures of glyceollin I, II, and III.
    - Effect of genistein, daidzein or glyceollin I on vascular contraction
    - Effect of K<sup>+</sup> channel blockers on vascular relaxation induced by glyceollin I.
    - Effect of genistein, daidzein or glyceollin I on vascular contraction and MLC20 phosphorylation induced by NaF.

- Effect of genistein, daidzein or glyceollin I on MYPT1 and CPI17 phosphorylation.
  - Effect of genistein, daidzein or glyceollin I on RhoA activation.
- Search on Biological Activities and Active Compounds of Aga Bean
- Active compounds of Aga bean were isolated by activity-guided isolation.
  - Active compounds of Aga bean were identified with the spectroscopic data from MS, <sup>1</sup>H-NMR, and <sup>13</sup>C-NMR.
  - Active fractions of Aga bean were prepared and various biological activities including antioxidant activity, QR inducing effect and anticancer activity were examined.
  - Synergy effect of active fraction, Bu-3 was estimated.
  - In order to find the difference of secondary metabolites between Aga bean and other beans, HPLC pattern analysis were performed.
- Development of functional *cheonggukjang* using high-isoflavone varieties of soybean
- Developmnet of functional *cheonggukjang* using Aga 3 and 4 varieties
  - Evaluation of antioxidative activities of methanolic and water extracts of *cheonggukjang* made of Aga 3 and 4 varieties
  - Screening of Bacillus strain produced *cheonggukjang* with the highest antioxidatve activity
  - Evaluation of protective effect of functional *cheonggukjang* against oxidative stress-induced hepatic injury
  - Application of functional *chenonggukjang* to the formulation of bread spread and salad dressing
- Mechanism of soybean bioactive compounds
- Analysis of the biological activity glyceollin
  - Analysis of the biological activity pinitol and inositol
  - Using the industrialization of the active ingredients of soybeans
- Lecithin and Cosmetics products and soymilk products with Aga Soybean development

- Lecithin Isolation
  - Cosmetics products and domestic production of soybean lecithin for the supercritical extraction equipment to extract and remove solvent by using lecithin
  
- Essence prototype development using lecithin and isoflavones
  - Cosmetics Product Development by natural emulsifier lecithin and isoflavones
  
- Development of fermented soymilk products and soymilk products
  - Soymilk Products(including fermentation product) Development by Aga-III and Chungja
  
- Development of physiologically functional foods and cosmetic and/or therapeutic products using functional substances from soybean.
  - Development of cosmetic and/or therapeutic products
    - Isolation and identification of Lunasin enriched source from soybean
    - effects of lunasin on anti-oxidation and recovering from tissues suffered skin
    - effects of lunasin on anti-aging and protecting effect against UV
    - effects of lunasin on anti-inflammation agent
  
  - Development of physiologically functional foods
    - anticancer effect of genistein
    - Anti-adipogenic effects of genistein
    - extract of phytic acid from soybean and antimicrobial effect
    - physiological function of fermented soybean
    - physiological function of mushroom fermented soybean
  
- Development of the Products Improving Daily Custom Diseases
  - Development of the Products Improving Daily Custom Diseases
    - Development of a bio-product improving blood circulation by using a functionally bred bean species
    - Development of the bean-basis peptide material and product for anti-diabetes
    - Development of Anti-cancer and Immunomodulating agents
    - Development of anti-obesity beverage using soybean saponin

- Pedigree selection of a high quality black bean species and studies on the phylogeny of anthocyanin
- Development of antihypertensive products using new kind soybean
  - Manufacture of antihypertensive peptide using soybean
  - Development of antihypertensive products
- Product development for creating large-scale demands
  - Soybean-milk development for creating large-scale demands : By experiments of performance, such as by preparing whole-soy oil using proteolytic enzyme, measuring hydrolysis, calcium binding capacity, and DPPH free radical absorbance capacity, the benefits will be high-lightened. Based on black beans and yellow beans, prototype products out of whole-soy oil will be developed, which meet to nutritional needs of protein, carbohydrate, and fat. And, whole-soy beverages focused on customers' favors and functionality will be developed and merchandised.

#### IV. Results and suggestions

- To improve the demerits of Aga lines such as easy lodging, low yield, and some viny habit and develop better lines in use than Agakong, 23 cross combination were made. Those crosses are under generation advancement by breeding method of SSD and conventional pedigree one.
- Two thousands NILs of Aga 3, and 4 were screened for isoflavone content including of major agronomic characteristics in the last three years and total of six promising lines were selected. Total of six lines, two in 2009 and 4 in 2010, were applied for the registration of "certificate on grant of plant variety right".
- Out of applied lines, Aga 5 is known to have the highest isoflavone content among all black soybean varieties ever known in the world; Aga 6 is to be believed to have better lodging resistance and high yielding compared with Aga 3; Aga 7 and 9 are known to have the highest daidzein(-in) contents; and Aga 9 and 10 are known to have the highest

genistein(-in) content out of those lines of yellow and black seed coat, respectively.

- A new Agakong population having tawny pubescence and black seed coat was developed from Aga population of gray pubescence and yellow, green, and greenish yellow seed coat. Those lines believed to be resulted by reverse mutation in seed coat showed extremely high isoflavone content. In general, lines of black seed coat show more or less 60% of isoflavone content of yellow and green ones. It is assumed that the newly formed black seed coat lines were developed from the population developed by pedigree method which screened isoflavone content every generation. We hope that several lines having more than 10 times of isoflavone content than current leading black soybean varieties can be selected from the newly developed population within a few years.
- When we use microorganism(*Aspergillus sojae*) with Agar III, we could increase isoflavone up to ~10,500 ppm, in case of using additional materials(e.g. pinitol), we secured 30% above of increase condition of isoflavone up to ~12,500 ppm.
- Through the test that isoflavone(glycoside) especially changed into non-glycoside, we could increase genistein and daidzein contents up to 9,000ppm. When we converse them into glycoside rate, they showed up to 14,400ppm.
- We separated pterocarpan, which is a secondary metabolite of daidzein, by Prep LC and column chromatography under the stress condition.
- We verified whitening function while confirming of various application of pterocarpan.
- As pre-conditioning of bean roasting, roasting at 250°C for 30 minutes showed good flavor and taste.
- The masking using of 2nd additional materials were not necessary in making of soybean tea by the use of roasted Aga soy-extracts( solvent ratio of 1:100), because the extract itself showed very good penal scores.



- The highest daidzein content, 11.64 µg/ml, was obtained at 99.55°C, 106.19 minutes while 9.61 µg/ml was obtained at extraction temperature of 99.50°C and extraction time of 103.23 minutes for genistein.
- The selling products of 340ml bottle contained more or less 30mg isoflavone content which is evaluated as very good functional drink.
- Agakong powder was made by roasting of 30 minutes and sieving with 30 mesh. The best Macgori was made when 0.3-0.4% Agakong powder of all source materials was added at the stage of 2nd adding one during the fermentation.
- The optimum amount of Saesongee(mushroom) powder for enhancing of the first feeling of drinking was about 2% of all source materials and the best adding stage of mushroom powder was the first adding one.
- The selling product(Takjoo) of 740ml bottle contained about 30ml isoflavone content with good drinking feeling.
- The developed cosmetics in the project have basic concepts containing of especially much genistein which is known to have the effect of anti-oxidant and improving of wrinkles by protecting of DNA damage. At the same time, they are known to be pro-human products via natural emulsification, low stimulator, and affinity with membrane of living cells by use of soy-*lecithin*.
- The experimental products would be tested for collagen synthesis assay and improvement of wrinkles by the use of CCD-986sk, HS68, Detroit 5116 cell. At the same time, more experiment would be done such as collagenase inhibition assay for improving of wrinkles.
- A total of 379 soybean genetic resources including 128 Korean, 214 Chinese and 37 American varieties were used to evaluate oil content and fatty acid composition in 2007. Seed oil content of 379 genetic resources ranged from 12.7% to 26.0% with an average of 19.1%, and oil content was mostly distributed in range of 18.0% and 20.0%. Three resources were higher than

24% of oil content.

- Palmitic and Stearic acid contents of 379 soybean genetic resources ranged 4.1~18.1% and 1.9~12.7% with an average of 10.6% and 2.9%, respectively. Oleic, linoleic and linolenic acid contents ranged from 15.3 to 56.0%, from 24.4 to 68.1% and from 3.4 to 11.1% with an average of 28.2%, 51.2% and 7.1%, respectively. And saturated and unsaturated fatty acid contents ranged from 6.7 to 21.7% and from 78.3 to 93.4% with an average of 13.5% and 86.5%, respectively.
- A total of 140 Japanese genetic resources were used to evaluate oil content and fatty acid composition in 2009. An average oil content was 17.2%. Oleic, linoleic and linolenic acid contents ranged from 16.6 to 55.2%, from 25.8 to 59.1% and from 3.0 to 12.0% with an average of 26.1%, 51.9% and 8.9%, respectively. Among Japanese genetic resources, two resources, 1-116 and 1-112, contained higher oil content than 22%.
- Three Chinese resources, Shuinong 14(26.0%), Dongnong 434(25.7%) and Dongnong 46(25.0%) were considered to be prominent resources for breeding of new soybean with high oil content. And six resources containing high oleic acid content, KLG12073(56.0%), KLG12074(56.0%), Jilin 14(52.2%), M23(55.2%), Kwangankong (55.9%) and Bongeu(50.9%), and 9 resources including KLG12093(3.4%), KLG12096 (3.5%) and MS382(2.9%) containing low linoleic acid content were considered to be prominent resources for the breeding of new soybean varieties with fatty acid composition of high quality.
- A total of 20 combinations were crossed in 2007, and five combinations were selected and developed breeding lines for F<sub>1</sub> and F<sub>2</sub> generations in 2008 and 2009, respectively. 113 prominent lines were selected in five combinations of F<sub>2</sub> generation, and also, a total of 1,492 seeds including 252 seeds of CS27001 combination, 352 seeds of CS27004 combination, 140 seeds of CS27006 combination, 196 seeds of CS27114 combination and 552 seeds of CS27017 combination were selected by single seed descent (SSD) breeding method for using bulk breeding.
- The other 15 cross combinations were advanced for F<sub>1</sub> generation in 2009,

and 60 lines were selected in the same year. Generation advance of breeding lines developed in this study will be carried out continually for the selection of prominent lines.

- Experimental resources showed an average oil content of 19.1% and 20.7% in 2007 and 2008, respectively. Palmitic acid contents in both 2007 and 2008 were not significantly different. Oleic and linolenic acid contents were higher in 2007 than in 2008, but stearic and linoleic acid contents were higher in 2008 than in 2007.
- An average oil content of Dongnong 46 showed the highest content in two years (2007 and 2008). KLG12073 showed the highest content of oleic acid with an average of 51.0%, and KLG12080 showed the highest content of linoleic acid with an average of 66.2% in two years. KLG12093 and KLG12096 showed the lowest content of linolenic acid with an average of 3.4% and 3.5% in two years, respectively.
- Oil, palmitic and stearic acid contents were not significantly different by different planting dates. However, oleic, linoleic and linolenic acid contents were different by planting dates.
- Oleic acid content of KLG12074 and Daepungkong showed the highest and the lowest, regardless of planting dates, respectively.
- According to the difference of cultivation region, the highest and the lowest oil contents were recorded in Muan and Yeoncheon, respectively. Oleic acid content showed the highest in Cheongju and the lowest in Daegu. Linoleic acid content showed no significant difference by cultivation regions. However, linolenic acid showed higher content in Daegu and Yeoncheon than in Cheongju and Muan.
- Oleic acid contents of KLG12074 and KLG01397 showed the highest by different cultivation regions. KLG12081 showed the highest content of linoleic acid and the lowest content of linolenic acid.
- Oil content of soy milk and tofu in 20 varieties ranged from 17.1 to 24.6% and from 0.6 to 1.9%, respectively. Varieties with high oil content showed

positive correlation with oil content of soy milk, but showed negative correlation with oil content of tofu. Varieties with high fatty acid content showed positive correlation with oil contents of soy milk and tofu.

- Dongnong 98-14 and KLG12088 showed the highest and the lowest oil content of seed, respectively. Bongeui and KLG12081 showed the highest and the lowest oleic acid content of seed, respectively. KLG12081 and KLG12073 showed the highest and the lowest linoleic acid content of seed, respectively. KLG12073 and KLG12096 showed the highest and the lowest linolenic acid content of seed, respectively.
- Hefeng 95-873 and Danbaegkong showed the highest and the lowest oil content of soy milk, respectively. KLG12074 and KLG12081 showed the highest and the lowest oleic acid content of soy milk, respectively. KLG12081 and KLG12073 showed the highest and the lowest linoleic acid content of soy milk, respectively. Heinong 44 and KLG12096 showed the highest and the lowest linolenic acid content of soy milk, respectively.
- Shihoudadou and Danbaegkong showed the highest and the lowest oil content of tofu, respectively. KLG12074 and KLG12088 showed the highest and the lowest oleic acid content of tofu, respectively. KLG12088 and KLG12073 showed the highest and the lowest linoleic acid content of tofu, respectively. Bongeui and KLG12081 showed the highest and the lowest linolenic acid content of tofu, respectively.
- The isoflavone contents of Agakong were greatly affected by growing areas, fertilizer levels, and metabolism regulating elicitor such as SA, ASA, Chitosan. Therefore, in order to produce highly functional soybean a specific area should be selected and cultivation techniques developed to increase isoflavone content could be applied for production of functional soybean.
- For the environment friendly cultivation of Agakong, weed population should be reduced by paddy field–upland rotation system and black plastic cover and by–products of cover crop could be used in the ridge and the furrow to avoid the use of herbicides. For weed

management in the furrows, endophytic fungi with an inhibiting activity selected from rhizosphere of weeds could be applied with by-products of cover crop to reduce weed occurrence.

- *Riptortus pedestris* and *Nezara antennata* was the most abundant stink bug species on all the tested soybean varieties. The occurrence of *R. pedestris* eggs and nymphs were not significantly different among the three varieties. However, the seasonal density of *R. pedestris* adults was lower on Agakong than on Cheongjakong.
- Agakong was infected by *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*, *Ascochyta glycines*, and *Cercospora kikuchii* and found to be susceptible in similar degree with the other two varieties. Three environmentally sound disease management agents, i. e., *Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis*, and *Paenibacillus polymyxa*, were evaluated for the control efficacy in Songcheon, Andong in 2008. There was no treatment effect, although *Trichoderma harzianum* treated plot produce 2,220g meanwhile untreated control plot produced 1,980g seeds.
- Host egg refrigeration did not affect host acceptance behavior of *Gryon japonicum* and *Ooencyrtus nezarae* on parasitized eggs or larval competition between the two parasitoids in multiparasitized refrigerated host eggs. Therefore, host egg refrigeration may not interrupt biological attributes of the parasitoids.
- we conducted an experiment of cage-exclusion design to verify the former results that release of non-viable refrigerated eggs of *R. pedestris* is known to enhance natural parasitism in soybean fields in more manipulative approach in a Agakong field located at Songcheon, Andong in 2008. We found significantly higher parasitism by *G. japonicum* on the eggs collected from treated plots compared to the control plots. It is verified that releasing non-viable eggs of *R. pedestris* help to enhance natural parasitism in soybean field.
- Glyceollin inhibited Runx2 protein stability, alkaline phosphatase activity and Alizarin Red S staining. Glyceollin also inhibited osteoclastogenesis by inhibition of TRAP staining.

- In vivo osteoporosis mouse model, glyceollin showed a protective effects by injection of calvaria compared to wild type. Glyceollin strongly inhibited RANKL expression without big fluctuation of osteoprotegerin. Therefore, RANKL/Opg ratio was strongly inhibited by glyceollin, which makes a antiresorptive effect on bone resorption in mouse model. Glyceollin has a strong anti-osteoporotic effect by inhibition of bone turnover rate.
- Genistein, daidzein or glyceollin I reduced vascular contraction induced by KCl, NaF, U46619, phenylephrine, or PDBu. They exert vascular relaxation, at least in part, through inhibition of the RhoA/Rho kinase pathway. K<sup>+</sup> channels were not involved in vascular relaxation induced by glyceollin I.
- Genistein, daidzein or glyceollin is a good candidate to develop as a therapeutic drug for osteoporosis and cardiovascular diseases.
- Biologically active compounds of Aja bean were isolated by continuous column chromatography and were identified as genistin and daidzin, respectively using FAB-MS, <sup>1</sup>H-NMR, and <sup>13</sup>C-NMR analysis. Among active fractions, EA3 has showed the most potent anticancer effects in HepG2 and MCF7 cells. Active fractions, Bu-3 showed synergy effect.
- One of the objectives of the study was to develop *cheonggukjang* (Korean natto) using Aja 3 or 4 variety of soybean which are extraordinary high in isoflavone content. As a first step toward functional *cheonggukjang* development, six kinds of Bacillus strains were evaluated for the properties of isoflavone metabolism and antioxidant activity of the product. *Bacillus liqueniformis* 86-1 turned out to be one of best strains for preparing *cheonggukjang*. *Cheonggukjang* prepared with Aja 4 showed the highest protective effect against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mouse model, suggesting that *cheonggukjang* made of Aja 4 had good antioxidant capacity and deserves further endeavor for commercialization. It was also demonstrated that the functional *cheonggukjang* could successfully be applied to formulation of salad dressing and spread within 1% of total solid.
- Glyceollin using antitumor activity by wound assay and have anti-atopic activity by mouse animal models. The main effective components of

soybean were pinitol and inositol that identification of bioactive compounds inhibited cell motility. Also anti cancer marker such as ICAM-1, CD44, MMP17, MMP14 and ARF2 decreased expression in B16 cells. Inositol inhibited MMP14 and VEGF-A expression. Anti-inflammatory effects associated with atopy in animal models showed, in atopic derived model of the ear thickening (thickness) and reduces the movement of immune cells to sites of inflammation were reduced.

- In a first experiment, 12 soybean varieties (Dae-mang, Dae-won, Dae-poong, Seok-ryang-put, Seon-yu, Shin-gi, Aga, IL-pum-geomjung, Chung-ja, Keun-ol, Tae-kwang, Poong-san herb hefor the extraction of -jaithin was the best solvent extraction De-gumm Tae-nd hydrate extraction using supercritical extraction methods were extracted due to lecithin.
- Results, De-gumming and hydration through a method to extract and produce large amounts of lecithin was best suitable. Using solvent extraction yield but high due to the use of organic solvents cause environmental pollution problems are likely to have been determined to be unsuitable for supercritical extraction of lecithin, you get the quality of lecithin, but due to the extraction solvent extraction or hydration separation unit is very expensive compared to the bulk separation of systems was considered unsuitable.
- Soybean isoflavone present the main ingredient of Lecithin and Genistein a prototype was developed Essence Cream. Genistein also has antioxidant properties that reduce UV damage to DNA through the action's primary effect of massage cream took the concept and Lecithin was extracted from the beans as a natural emulsifier for cosmetic formulations designed Paid (Oil Phase) in the main material composition used.
- Emulsion stability of this chemical emulsifiers in addition to promoting the use of natural materials was compared to the benefits derived from soybean and two kinds of graft material in the manufacture of cosmetics Emulsion forms the essence of the prototype has been developed.
- Genistein and lecithin from soybeans Isoflavone to present the main

ingredient of a prototype essence cream was developed. Genistein also has antioxidant properties that reduce UV damage to DNA through the action's primary effect of massage cream took the concept and Lecithin was extracted from the beans as a natural emulsifier for cosmetic formulations designed Oil Phase on the composition as the main material used. Emulsion stability of this chemical emulsifiers in addition to promoting the use of natural materials was compared to the benefits derived from this are two kinds of beans in the manufacture of cosmetic ingredients by combining the essence of Emulsion forms a prototype was developed.

- In the 2nd research, isolated from the previous experiment 12 cultivar of crude soybean oil Lecithin content and Phosphatidylcholine (PPC) content of Colorimetric determination assay were determined. Functional compounds, lecithin, and PPC at a large separation of these compounds to evaluate the varieties were the highest and Results, PPC Seon-Yu the lecithin content in the most representative was selected as the best cultivar Aga soybeans with higher than average respectively. PPC Lecithin extracted from the fat by enzymes extracted from soybean Natural Cosmetics industry by integrating concept Slimming Gel (tentative title) in the form of cosmetics and get a great response when the development is considered.
- Soybean production technology in the past on the basis of experiments with very high isoflavone content of Aga-3 as a main manufacturer of soy milk and fermented soy milk with lactic acid bacteria inoculated manufacture of prototypes and functional analysis was performed accordingly. The last time developed a prototype fermented soymilk was vitamin D, folic acid, GABA and other products that do not have to contain useful physiologically active substances were found. Fermentation strains in the immune enhancement effect of *Leuconostoc kimchii* and improve bowel function and represents the antioxidant activity of *Leuconostoc citreum* and cholesterol lowering efficacy in cardiovascular disorders such as *Lactobacillus plantarum* was used in sensory evaluation because of severe superior functionality compared to the smell of Many people were reluctant, but overall progress is promising possibilities were evaluated.



- In the 3rd research, This is the main material for manufacturing soy milk experiment Aga-3 based on the manufacture of fermented milk have not been functional for being tough as compared to fermentation and 5 cultivar except for Aga soybean varieties (Tae-kwang, Seo-mok-tae, Baek-tae, Sok-cheong, Hwa-tae) were also analyzed. Among the several cultivar of the functional and sensory evaluation by the panel preferred the soy drink cultivar and comprehensive development of superior varieties are meant to choose. First, a functional effect on whether the comparison is as follows. Affects the fermentation of soybean oil that was about the first to investigate the effect of antioxidant effect in the analysis of a product that dominates the overall result was to inhibit the absorption of nutrients Phytate content analysis and high blood pressure causing increased blood pressure ACE inhibition is also fermented soymilk is higher than non fermented the activity showed the results.
  
- Aga soybeans compared with other varieties and analysis were as follows, Analysis of antioxidant ABTS radical scavenging activity and DPPH radical scavenging activity showed the Seo-mok was best results. In the SOD-like activity of the Aga was the most excellent results. Analysis of functional materials, the Total Polyphenol and Total Flavonoid, Phytate content, ACE Inhibition, GABA content, determination of free amino acids, such as antidiabetic in experiments with both Aga most outstanding feature was found. Aga-3 in sensory evaluation of all varieties were superior rating also increases the useful functionality and panel manufacturing soy beverages will very likely emerge as a material, as well as increased domestic consumption of soybeans and is expected to contribute to farm income.
  
- Effects of Lunasin enriched source(LES), fractionated from soybean extract, on the recovering against inflammation in the skin of mice and on the expression of the pro-inflammatory factors, Cox-2 and iNOS, were investigated after treatment LES in inflammation-introduced mice skin with DNCB in vivo, by scanning electron microscopy and immunoblot analysis. Also anti-oxidation effect and protecting effect against UV were detected with cultured cell and mice. Treatment with LES showed that recovering effect from tissues suffered skin inflammation and down-regulatory role in expression of iNOS and Cox-2 genes. Moreover lunasin

peptide was detected in nucleus after treatment with LES on the skin by confocal microscopy analysis. Taken together, LES from soybean extract is effective anti-inflammation agent and is able to use for cosmetic and/or therapeutic substances.

- Genistein decreased cancer cell viability in a dose-dependent manner, whereas daidzein did not show dramatic cytotoxic effects. The results of RT-PCR and real-time PCR indicate that a combination of genistein and daidzein can synergistically induce *NAG-1* expression in HCT116 cells. This result implies that *NAG-1* induction is highly associated with synergistic cytotoxic effect induced by a combination treatment of genistein and daidzein. The extraction yield of phytic acid was 0.32% when extracted with citric acid solution. The extract showed a good antioxidant activity as well as antimicrobial activity against *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* and *E. coli*. When the 3T3-L1 preadipocyte cells were treated with soy extract, their differentiation into adipocytes were slightly inhibited and the lipid accumulation in the cell was also diminished. In the animal trial for anti obesity experiment, animal group fed with fermented soybean showed a significant decrease in weight gain rate and cholesterol level in blood.
- The superior strains generating fibrinolytic enzymes were selected and the optimum fermentation condition by the use of Agabean were established. The extract from the fermentation of Agabean exhibited a variety of physiological activities including anti-oxidation, anti-diabetes and anticancer. In addition, its preference assessment through the organic examination gave the high valuation among the bean products .
- Blood glucose-improving effect, blood glucose regulation, and fatty liver-improving effect by the extract of Agabean and fermented Agabean were higher than those by the extract of soybean. The extract of the fermented Agabean showed the high inflammation and anticancer activity. In addition, the effective constituent of the bean showed the high activity in the suppression of tumor metastasis and anticancer.
- The substances showing the anti-obesity activity were purified from the bean and analyzed for the activity suppressing obesity. The anti-obesity beverage

was developed by the use of the substances, and the beverage was superior to other products in anti-obesity.

- Pedigree of the high quality black bean was performed and anthocyanin from the bean shell was analyzed to the physiological activity related to the inflammatory stress. As a result, the pigment had a crucial effect on arteriosclerosis, diabetes, anti-oxidation and aging suppression.
- Manufacturing process of soybean protein was developed. Antihypertensive peptide was manufactured from soybean protein using protease. Soybean protein isolate was hydrolysed by Alcalase 2.4 L, ACE inhibitory activity of soybean protein isolate hydrolysates were investigated.  $IC_{50}$  value of ACE inhibitory activity of soybean protein isolate hydrolysate was  $79.94 \mu\text{g}/\text{mL}$ . Antihypertensive products (Tablet, capsule, pill) was manufactured using soybean peptide.
- In Function analysis of total phenol content of OD 765ml, the higher concentration of proteolytic enzyme is, the phenol rate in whole-soy oil is higher. In whole-soy oil made by processing proteolytic enzyme of 0.5% degree, phenol was  $750\mu\text{g}/\text{ml}$ . DDPH free radical absorbance capacity was slightly increased in processing proteolytic enzyme. In analysis of blood circulating function, glucose in blood, GOT, neutral fat, and cholesterol have been significantly decreased.
- Whole-soy oil production : Preparing and designing of sample products by OEM is completed.

## V. Conclusions and utilization

- Breeding for new varietal development is a ever lasting works. The resulting 23 cross combinations made in the project for the development of better Agakong in the respect of maintaining of high isoflavone content, various functional properties, better lodging resistance, and high yielding would continuously be handled by conventional breeding method.
- Those breeding lines selected based on isoflavone content and evaluation of major agronomic characteristics from 2,000 Agakong NILs together with

those lines selected from the population of reverse mutation would be used for the development of the best functional soybean varieties in world.

- Those applied six Aga lines for "certificate on grant of plant variety right" would be registered as new varieties having meaningful properties in 2-3 years and those would be used important source materials for functional and health aid foods and medicines.
- We plan to apply functional Agar-Kong powder with isoflavone and pterocarpan to the up-grade product of existing Agakong isoflavones.
- High functional cosmetic, anti-gum disease toothpaste and gaggles with purely pterocarpan are on sale.
- Three Chinese soybean resources were considered to be prominent resources for breeding of high oil content, and six soybean resources with high oleic acid content and ten soybean resources with low linoleic acid content were considered to be prominent resources for breeding of fatty acid composition of high quality. And these resources were relatively stable in environmental variations. So, the soybean resources are expected as prominent resources for breeding of new soybean variety with high oil content and fatty acid composition of high quality in the near future.
- A total of 60 plants of 15 combinations were developed for F<sub>1</sub> generation, and 113 prominent lines were selected in five combinations of F<sub>2</sub> generation, and also, a total of 1,492 seeds were selected by single seed descent (SSD) breeding method for using bulk breeding.
- The soybean resources confirmed from this study are expected to be prominent resources for development of new soybean varieties and new materials for food industry.
- Chinese, American and Japanese soybean genetic resources will be put in the RDA Genebank, and prominent resources will be provided to research institutions and demanders for the utilization of breeding resources.
- Four academic presentations were accomplished, and three papers related to

this study will be published in 2012~2013.

- Using the endophytic fungi containing weed growth inhibitor, bio-herbicides for environment friendly soybean cultivation can be developed. The technologies increasing functional compounds of soybean could be transferred to soybean cultivators.
- Manuscripts on field occurrence of insect pests and natural enemies of *R. pedestris* were accepted for the publication in the two international journals, Journal Asia Pacific Entomology and Applied Entomology and Zoology.
- Sangwon Kim, research assistant in Andong National University, was awarded for best presentation in the scientific meeting of Korean Society of Applied Entomology held in Bosung in 2009.
- Researches on evaluation of refrigerated eggs for rearing *Gryon japonicum* and *Ooencyrtus nezarae*, egg parasitoids of *R. pedestris* were published in the international journals, Journal Asia Pacific Entomology (13: 139-143) and Biocontrol Science and Technology (19: 315-325).
- In addition to breast cancer treatment, glyceollin can be developed as a therapeutic drug for osteoporosis too. It will be a good therapeutic drug for both osteoporosis and breast cancer.
- Genistein, daidzein or glyceollin I reduced vascular contraction induced through inhibition of the RhoA/Rho-kinase signaling pathway. RhoA and Rho-kinase are regarded as important therapeutic targets for the treatment of numerous cardiovascular disorders including hypertension, coronary and cerebral vasospasm, atherosclerosis, and diabetes (Budzyn et al. 2006). Since genistein, daidzein or glyceollin I is a vasorelaxant, this study highlights its potential as a useful lead compound for development of therapeutics for cardiovascular diseases. We are under applying to make a patent and paper too.
- It has been elucidated that Aga bean is a novel functional bean showing

high isoflavon contents and various biological activities. This study were reported in SCIE Journal, *Food Sci & Biotech*. Aga bean can be used as a cancer chemopreventive food and developed as various health functional materials.

- Development of functional *cheonggukjang* using Aga 3 and 4 varieties of soybean: Two patents were filed, and two papers were published in peer-reviewed journal (one of them is enlisted in SCIE). Another a couple of papers are in preparation.
- Soybean components associated with industrial research on soybean effective and ongoing innovations, particularly the recognition of the value of pinitol production of the product is.
- "AGA Triple set" has developed in this study has been launched on the market are sold (Common developed with Aging Co.,) and Using the functional aspects of AGA in the regular soy milk (White Soybean, Black Soybean) compared to the very high functionality is showing. Therefore, we'll trying to this research institutes and manufacturers to partner with milk products and products on the market.
- The development of such media "AGA Triple Set" Industry & University Union has announced the joint development as a result of the study. In this study, based on technology developed (Separation Technology, to market technology, manufacturing technology), and bio-industry development plan to be used as data.
- Aga soybean with soymilk product registration plan. (AGA Saengmyeong Soymilk, Saengmyeong Chungja Soymilk, registration plans.)
- LES from soybean extract is effective anti-inflammation agent and is able to use for cosmetic and/or therapeutic substances. Overall, there results may provide a clue in explaining the anti-cancer activity of soy bean in human colorectal cancer. In conclusion, soybeans may be used as a good functional ingredient for diverse food preparation.
- In the process of this project, totally nine proceedings were published in the

bio- conferences. In addition, two cases of patent registration and further poster presentation was made in the conferences. Currently, we are industrializing functional fermentation products, diet products and other products by creating the mass production of the newly developed bean species.

- Manufacturing process of soybean protein was developed using domestic soybean. Antihypertensive peptide was manufactured using soybean protein. Antihypertensive products (Tablet, capsule, pill) was manufactured using soybean peptide.
  
- Industrialization plan : Based on the sample products, yield rates and price advantage will be analyzed, and then large-scale production will be exerted. Before large-scale production, sales are planned through on-line and off-line, and university hospitals. In addition, creating sale routes through on line, including cafes and blogs, is planned.

# CONTENTS

<b>Chapter 1. Introduction</b> .....	45
A. Background and importance of the research .....	45
B. Research objectives .....	51
<b>Chapter 2. Research development status</b> .....	54
<b>Chapter 3. Results and discussions</b> .....	59
A. Development of lodging resistant, high yielding, and high functional soybean variety .....	59
1. Development of lodging resistant, high yielding, and high functional soybean variety .....	59
2. Industrialization of functional products by the use of Agakong .....	82
B. Development of soybean variety with fatty acid composition of high quality .....	126
1. Materials and methods .....	126
2. Results and discussions .....	133
C. Development of environment friendly cultivation system for newly developed varieties .....	176
1. Development of environment friendly cultivation system for newly developed varieties .....	176
2. Development of friendly control system for diseases and insects .....	193
D. Pharmacological and medical effects of compounds derived from newly developed soybeans .....	221
1. Pharmacological and medical effects of compounds derived from newly developed soybeans .....	221
2. Search on biological activities and active compounds of Agakong .....	235
3. Development of functional cheonggukjang using Agakong .....	247
4. Industrialization by the use of bio-active compounds in soybean .....	269



E. Mass production and industrialization of functional substances in soybean .....	286
1. Lecithin isolation .....	286
2. Development of essence products containing of soy-isoflavones and lecithin .....	302
3. Development of fermented soy-milk .....	315
4. Comparison and analysis of functionality for soy-milk having different degree of fermentation .....	319
5. Comparison and analysis of soy-milk made from different soybean varieties .....	329
F. Development of physiologically functional foods and cosmetic and/or therapeutic products using functional substances from soybean .....	353
1. Development of cosmetic and/or therapeutic products by the use of soy-proteins having low molecular weight .....	353
2. Evaluation of effectiveness of functional substances in soybean and/or development of functional foods .....	382
G. Development of the products improving daily custom diseases .....	421
1. Development of the products improving daily custom diseases .....	421
2. Development of antihypertensive products using Agakong .....	524
H. Development of soy-products creating large-scale demands .....	560
1. Materials and methods .....	560
2. Results and discussions .....	565
<b>Chapter 4. Research goal attainment and contribution to related area .....</b>	<b>584</b>
<b>Chapter 5. Plan for application of research results .....</b>	<b>587</b>
<b>Chaper 6. The developed scientific and technical information .....</b>	<b>591</b>
<b>Chapter 7. References .....</b>	<b>593</b>
<b>APPENDIX .....</b>	<b>632</b>

# 목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	45
1. 연구개발대상 기술의 배경 및 연구개발의 필요성 .....	45
2. 연구 목표 .....	51
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	54
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 .....	59
제 1 절 내도복 다수성 고 기능성(isoflavone) 콩 품종육성과 기능성 콩 분말제품 개발 및 산업화 .....	59
(시험 1) 내도복 다수성 고 기능성 콩 품종육성 .....	59
(시험 2) 아가콩을 이용한 기능성 제품 산업화 .....	82
제 2 절 양질 지방산 함유 콩 품종개발 .....	126
1. 재료 및 방법 .....	126
2. 연구결과 및 고찰 .....	133
제 3 절 신제품의 친환경 재배시스템 개발 .....	176
1. 신제품의 친환경 재배시스템 개발 .....	176
2. 품종별 친환경 병충해방제 기술개발 .....	193
제 4 절 신제품 육종공의 의학적 약리효능구명 .....	221
1. 신제품 육종공의 의학적 약리효능 구명 .....	221
2. 신제품 육종공의 기능성 탐색 및 기능성분 구명 .....	235
3. 육성품종 콩을 이용한 기능성 청국장 개발 .....	247
4. 콩의 주요 성분을 이용한 산업화 연구 .....	269
제 5 절 기능성 물질의 대량 분리 생산 및 산업화 .....	286
1. 콩의 레시틴 분리 .....	286
2. 콩 유래의 이소플라본과 레시틴이 함유된 에센스시제품 개발 .....	302
3. 발효 두유 시제품 개발 .....	315
4. 발효 여부에 따른 두유의 기능성 비교·분석 .....	319
5. 콩 품종간 두유의 기능성 비교·분석 .....	329

제 6 절 콩 기능성 물질을 이용한 건강기능식품 및 미용제품개발 .....	353
1. 콩 저분자 단백질을 활용한 피부개선 효능 분석 및 제품 개발 .....	353
2. 콩 기능성 물질의 효능 검정 및 건강식품 개발 .....	382
제 7 절 생활습관성 질환개선제품 개발 .....	421
1. 생활습관성 질환 개선제품 개발 .....	421
2. 신제품 콩을 이용한 고혈압 개선 제품개발 .....	524
제 8 절 대량수요를 창출하는 제품개발 .....	560
1. 실험방법 .....	560
2. 연구결과 .....	565
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	584
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 .....	587
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	591
제 7 장 참고문헌 .....	593
부록 .....	632

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 1. 연구개발대상 기술의 배경 및 연구개발의 필요성

- 경제성장과 더불어 국민의 생활향상에 따른 건강에 대한 관심도가 높아지고 있으며, 특히 사회 환경의 변화로 인한 생활 습관, 환경오염, 식습관의 변화 및 고령화 사회로의 변화에 의한 다양한 성인병이 문제화 되고 있다.
- 성인병을 예방과 치료하기 위하여 여러 가지 대책의 필요성이 강조되고 있으며, 이는 환자나 일반인들이 평소에 섭취할 수 있는 바이오 제품으로서 이를 예방하고 치료하고자 하며, 따라서 이러한 바이오 제품의 산업화로 이어질 수 있다.
- 콩은 예로부터 우리나라 사람들이 친숙한 식품중의 하나이며 이는 아이소플라본, 제니스테인 등의 다양한 기능성을 성분을 가졌으며 이로 인하여 심혈관, 뇌혈관질환, 다양한 암의 억제효능, 골다공증등의 다양한 기능성이 보고되어 있다.
- 우리나라는 현재 평균 수명의 연장으로 50세 이상의 인구가 전체 인구의 17.3%를 차지하고 있으며 65세 이상의 노령 인구가 7.1%로 노령화 사회로 가는 중간 단계에 있음. 이와 같이 인간 수명이 연장됨에 따라 건강하게 살고자 하는 (well-being) 욕구와 이에 따른 관심이 고조되고 있는 반면, 생활습관의 변화, 산업화·도시화에 따른 환경오염 등으로 인해 암, 고혈압을 포함한 심혈관계 질환 등 만성·난치성 질환이 급속히 증가하고 있어 이들 질환에 대한 효과적인 치료방법 개발의 필요성이 증대되고 있음 (1999년 현재 65세 이상 노인 중 만성·퇴행성질환을 가진 노인의 비율은 86.8%에 달하고 있음).
- 건강 증진 및 노화 억제를 위한 다양한 제품들이 개발되고 있고 이중 앞서 언급한 만성·난치성 질환을 치료 또는 예방하는 관련 제품 산업의 시장 규모는 꾸준히 증가하고 있음. 더욱이 삶의 질과 경제력 향상으로 많은 돈을 건강증진에 투자하고 있음.
- 콩은 ‘밭에서 나는 쇠고기’로 알려져 있을 만큼 전통적으로 우리 한국인의 식생활에서 중요한 단백질 공급원이었음.
- 근래에 콩에 들어있는 isoflavones(genistein과 daidzein)이 암 발생을 억제하고, 심혈관계 질환이나 골다공증도 예방하는 것으로 알려짐.

- 은하콩과 야생콩의 교잡으로 육종한 “아가콩”은 다른 콩들에 비해 isoflavones의 함량이 3배 이상 높아서 콩의 기능성이 한층 더 우수할 것으로 생각됨.
- 콩의 isoflavone의 생리활성으로는 각종 암예방, 항산화, 항돌연변이 작용, 항치매, 골다공증예방, 항갱년기 장애, 혈관질환예방 등의 효과가 있는 것으로 알려져 있다.
- Isoflavone 을 이용한 여성 갱년기 장애 개선 보조식품, 골다공증 예방 및 항암관련 기능성 식품 등이 개발 되고 있고, 이들 식품에 대한 맞춤형 품종이 개발된다면 연구 및 산업의 효율을 높일 수 있을 것으로 기대된다.
- 콩의 기능성 물질이 isoflavone 함량이 높은 품종의 개발은 고부가가치를 가지는 다양한 형태의 콩 관련 제품을 생산 가능할 것이다.
- 최근 연구에 의하면 콩속의 pterocarpan이 혈관질환의 예방과 항산화 효능이 있는 것으로 알려져 있다.
- 콩의 기능성 성분이 산업적 고부가가치를 가지고 있어 분리, 정제, 추출, 대량 생산의 연구를 통한 다양한 제품의 생산은 콩의 소비를 더욱 촉진 및 농가소득 증대
- 우리나라에서도 새천년 들어 건강한 삶을 추구하는 웰빙에 대한 관심이 고조되면서 콩의 영양성과 기능성을 쉽게 접할 수 있는 두유의 인기는 급상.
- 최근 수입 GM콩에 대한 소비자의 거부감과 well-being 붐에 편승하여 국산콩의 소비가 확산되고 있는 추세이며, 국산 기능성 콩을 이용한 제품의 개발에 많은 관심과 연구가 이루어지고 있다. 특히, 값싼 수입 농산물과 차별화시키기 위한 전략으로 친환경기술에 의한 기능성 국산콩 생산을 추진하고 있는 실정이다.
- 본 연구단에서 육성하는 기능성 콩 품종은 야생종의 특성을 지니고 있으며 생육 특성이 일반 재배 품종과 다르기 때문에 기존의 재배법으로는 기능성 콩의 특성을 제대로 발현시킬 수 없으며 기능성 콩의 실용화와 산업화에도 장애요인이 될 수 있다. 콩 재배 농가의 경우 기능성 콩에 대한 표준재배법이 없어 콩 생산물의 균일성을 유지하기 힘들고 이를 이용한 제품의 개발에 이용 시에도 기술적인 어려움이 따른다.
- 최근에는 생체조절에 관여하는 효소들이 밝혀짐으로서 이러한 효소의 작용을 조절하여 질병치료에 이용하려는 연구가 진행되고 있으며, ACE억제제는 angiotensin전환효소를 억제함으로써 혈압을 조절 할 수 있게 되었다. 또한 인류가 식품으로 이용하고 있는 원료로부터 질병의 예방 및 치료제를 찾고자하는 연

구가 진행되고 있음.

- 일본의 경우 고혈압에 유효한 제품으로 카제인 데카펩타이드, 락토 트리펩타이드 함유식품이 시판 됨.
- 본 연구에서는 양질의 단백질 식품 자원인 콩을 생물 공학적 수식을 이용하여 흡수력이 우수하고, 고혈압개선 효능이 있는 새로운 형태의 식품소재를 개발하고자 하며, 식품자원의 부가가치를 높일 뿐만 아니라 국민 건강 차원에서 필요한 연구라 사료 됨.
- 저분자 단백질 가수분해물의 기능을 보면 생체 내에서 혈압 강하 작용을 하는 angiotensin- I converting enzyme(ACE) 저해 peptides, 진통, 마취, 장관 등 평활근의 수축, 식욕조절에 관여하는 물질인 opioid peptides, 면역 증강 작용을 하는 phagocytosis peptides, 혈소판 응집을 저해하는 antithrombotic peptides, 칼슘 흡수를 촉진하는 caseinophospho peptides, 콜레스테롤 강하 peptides, DNA 합성 촉진 peptides 등이 있다.
- 최근 우리나라의 식생활 습관의 변화, 환경오염의 증가, 인구의 고령화, 운동부족, 과도한 업무등에서 오는 스트레스의 증가 등으로 인해 혈액순환 장애와 관련된 질병이 증가되고 있으며, 특히 영양과다로 인한 고지혈증, 동맥경화증의 유병율이 증가하고 있다. 특히 비만 및 당뇨병이 꾸준히 증가되고 있으며, 당뇨학회에서 2010년에 가장 중요하게 다루어야 할 질병이 당뇨에 관한 질병이라고 까지 발표할 만큼 심각하다. 미국을 비롯한 선진국들의 의료비 지급에 대한 지출이 계속증가 되고 있고, 특히 캐나다의 경우 2004년과 2005년 의료비 지출이 490만 달러에서 2006년 180억 달러로 약2배 이상 증가되었을 만큼 재정적인 심각한 문제에 봉착했으며, 21세기에 해결되어야 할 중요한 사회적인 문제가 되고 있는 의료비 역시 예외는 아니다. 따라서 각국에서는 국가경제 및 국민 생활의 사회적인 문제가 되고 있는 의료비 지출을 줄이기 위하여 건강기능식품 개발 및 운동시설 등에 막대한 투자를 하고 있다. 또한, 건강기능식품 개발에 있어서 육고기의 대체 식품으로 콩에 대한 연구가 지속적으로 이루어지고 있다. 최근에 콩이 당뇨병, 암, 비만, 동맥경화, 고혈압 등에 유익하다고 알려지면서 콩에 대한 관심은 더욱 고조되었으며, 미국을 비롯한 해외의 콩 식품시장은 괄목할만한 성장을 이루고 있다.
- 우리나라 장류산업의 시장규모는 2004년 출하액 기준으로 약 5,000억원, 생산량 365톤으로 총 조미식품의 25%, 총 식품산업 매출규모 (약 33조)의 1.5% 점유하고 있으며, 향후 성장 잠재력이 큼.

- 최근 소비자들의 건강에 대한 의식증가로 전통장류의 소비가 지속적으로 증가하고 있으며, 특히, 청국장, 된장, 고추장등의 소비 증가폭이 큼.
- 장류의 제조가 소규모 자가제조에서 점차 공장제조 형태로 이동하고 있으며, 예를 들어, 2005년의 경우 간장은 53.4%, 된장은 54.4%, 고추장은 74.8% 이었음. 이렇듯 산업화의 진행에 따라, 장류산업의 규모가 점차 증가할 것으로 추정되지만 장류가 가지는 조미식품으로서 한계 때문에 큰 폭의 신장은 기대하기 어려움.
- 최근 웰빙 무드와 함께 전통장류 소비의 대폭적인 증가를 유도하기 위해서는 단순한 조미식품의 차원을 넘어서 건강기능성이 부여된 식품으로의 개발이 필요함.
- 본 연구단은 이미 다양한 콩 품종을 확보하고 있고, 특히, ‘아가콩’과 같은 이소플라본이나 안토시아닌화합물함량이 높은 품종을 개발한 상태임. 따라서 이들 원료를 이용하여 전통조미발효제품을 개발하고, 이들에 대한 기능성을 증명할 경우, 국제적인 경쟁력을 갖춘 제품이 될 가능성이 큼
- 콩에 함유된 기능성성분 가운데 isoflavones, anthocyanins 등은 배당체 형태로 대장에서 미생물에 의하여 분해되어 흡수되므로, 상대적으로 흡수율이 낮을 가능성이 큼. 그러나 콩을 발효시킬 경우, 대부분 비배당체 형태(aglycones)로 전환되어 생체이용률이 향상되어 기능성을 극대화할 수 있음.
- 기 개발되었거나 향후 개발하고자하는 육성품종콩에는 isoflavones과 anthocyanins이 일반품종에 비하여 월등하게 높은 농도로 함유되어 있어, 다양한 기능성식품소재로 활용될 수 있음. 특히 이들은 만성질환(예, 심장병, 동맥경화, 노화, 치매, 암 등)과 관련된 산화적스트레스를 완화하는 활성이 높은 것으로 보고되어 있음. 그러나 단독화합물 (예, isoflavones)보다는 병용하여 (예, isoflavones + anthocyanins) 섭취하였을 때, 기능성이 높을 가능성이 크나, 이와 관련된 연구는 거의 없음.
- 경제성장과 더불어 국민 생활향상에 따른 건강에 대한 관심도가 높아지고 있다. 특히, 최근 미국 등 선진국의 사망원인 1위는 심혈관계 질환이다. 우리나라에서도 사회 환경변화로 인한 생활 습관의 변화, 환경오염 변화, 식습관의 변화 그리고 고령화 사회로의 변화 등에 의한 혈액순환계질환이 문제화 되고 있어 이에 대한 대책이 필요한 것으로 사료됨. → 콩의 발효에 의한 혈행개선제의 개발은 기능성 식품의 제품화와 더불어 고부가가치 산업을 창출함.
- 최근 대한 뇌혈관외과 학회가 발표한 뇌혈관 질환의 새로운 경향에 따르면 여성 뇌혈관 환자의 증가, 서구형 뇌졸중(뇌경색)환자의 급증, 혈전성 심혈관환자와

뇌혈관환자가 급증하므로 혈행개선 및 심혈관계 질환에 대한 예방 및 치료대책의 필요성이 강조되고 있다. → 심혈관 환자 뿐 만아니라 일반인이 평소 섭취할 수 있는 바이오 제품의 산업화로 이어질 수 있음.

- 혈액 순환계 질환의 경우 40~60세의 중장년층이 54.7%로 가장 많았고, 60세 이상 고령은 32.6%, 39세 이하는 12.7%로 전반적으로 발병 연령층이 크게 낮아지고 있으므로 건강식품개발을 통한 예방대책의 필요성이 강조된다. → 콩을 이용한 혈행개선 기능성 식품의 산업화는 기업의 부흥과 더불어 고용창출 뿐만 아니라 콩소비를 증가시켜 농민소득 증대에도 직결됨.
- 건강보험 심사평가원에 따르면 뇌혈관질환 영양급여비를 분석한 결과에서도 뇌혈관질환으로 인해 지출되는 영양 급여비는 2000년 2,121억원에서 2001년도에는 2,292억원, 2002년도에는 2,509억원, 2003년도에는 3,248억원, 2004년도에는 3,500억원, 2005년도에는 4,000억원으로 5년사이 2배 가까운 상승을 보였다. 특히, 순환계 뇌경색 청구 건수 역시 2000년도의 6만 3606건에서 2005년에는 9만 5875건으로 무려 4배의 격차를 보임으로서 순환계 뇌질환의 심각성이 부각되고 있으므로 이에 대한 대책의 필요성이 강하게 요구됨.
- 콩을 쌀 다음으로 중요한 영양원으로 이를 이용한 질환개선 건강식품의 개발은 콩소비를 촉진 시켜 농민소득을 증대시킴과 동시에, 혈행개선제의 국내시장 약 1,000억원에 도전하는 새로운 브랜드창출과 더불어 고용창출의 효과를 기대할 수 있음.
- 혈행개선제 중 일본 제품인 Natokinase가 100만원/kg에 수입되어 일반 국내소비자에게 고가로 판매되고 있는 실정을 감안할 때, 확실한 효과가 있는 제품의 개발은 외화유출을 막을 수 있을 뿐만아니라, 국내 내수 시장의 확산과 더불어 수출 가능한 기능성 건강식품으로 발전할 수 있음.
- 혈액순환장애로 건강을 잃는 인구가 암환자 다음으로 많은 것으로 감안할 때 치료를 위한 의료비가 연간 약 10조원이 소비되며 주변가족들과 직장생활에서의 피해를 계산하면 약 30조원의 손실이 발생한다고 한다. 이에 비하여 건강기능성 식품이나 혈행 개선을 위한 의약품소재의 개발과 산업화는 국민의 의료비 절약과 함께 국내 바이오 산업발전에 크게 기여할 것임.
- 육종재배된 신품종콩을 이용하여 발효, 단백질 가수분해, 기능성물질 추출 등 다양한 가공처리 과정을 거쳐 기능성 유효물질을 분리하고, 이것을 소재로한 다양한 기능성 식품을 개발하여 이를 산업화함으로써 콩소비를 증진 시키고, 나아가 농민의 안정된 소득 보장과 소득 증대를 최종 목표로 한다. 최종 목표달성을 위



하여 다음의 소목표를 정함.

- 육종콩 종류별 기능성물질, 발효성과물, 기능성 식품소재로서 적합성등을 기준으로 상호 비교 선별하여 재료를 확정된 후 추출조건, 발효조건 등 제반 조건을 겸비함
- in vitro계에서 기능성활성을 확인하고 동물 모델계를 이용하여 산업화 예정 물질의 효과검정 실시 후 제품형태를 확정함.
- 검정콩에서 분리한 안토시아닌계 활성물질의 산화적 스트레스 및 염증에 대한 보호효과 및 세포내 보호기전을 연구하여 관련 질환에 대한 적용 가능성 제시
- 시장성, 소비자의 기호성을 감안한 기능성 식품 제작과 아울러 제품의 산업화를 위한 유통, 판매 방법 등을 감안한 마케팅 전략 완성
- 단백질소재로부터 얻을 수 있는 일부 기능성 peptide의 생리활성은 매우 우수하여 각종 성인병 예방 및 치료보조제로서의 이용가치가 크게 증가하고 있으나, 국내에서는 아직까지 관련기술의 개발이 미흡하여 일부 기능성 peptide 소재를 상당량 수입(2002년도 수입금액 : 약 1,300만 불)하고 있으며 국산화 가능한 소재 및 관련 기술개발 필요성이 증대되고 있는 실정이다.
- 현재 아미노산과 peptide를 함유하는 식품소재로서 큰 시장을 형성하고 있는 기능성 소재는 축 육, 어패류, 야채, 효모 등의 추출물계와 동물성 단백질과 식물성 단백질의 가수분해 형 아미노산계의 두 종류로 크게 대별된다. 후자의 경우 가수분해도에 따라 peptide 함유 천연조미료가 기대되고 있다. 또한 소장에서의 peptide 흡수는 아미노산과 다른 수송계가 존재하고 있는 점과 소장의 부위와 peptide의 종류에 따라서는 아미노산보다 흡수속도가 빠른 점이 명확해 짐으로써 이 성질을 이용한 스포츠식품, 기능성식품, 경구 경관 유동식으로의 이용이 검토되고 있다.
- 이러한 peptide의 기능성 이외에도 peptide 생산 공업은 무한대에 가까운 조합이 가능하고 peptide의 정제도에 따라서는 g당 수백 불에 이르는 고가의 제품으로 부가가치가 높으며 무공해 산업종이라는 특성을 지니고 있다. 학문적으로도 peptide는 아미노산과 polypeptide의 중간에 해당하는 물질로 단백질의 domain이나 2차 구조, 단백질의 기능해석 등이 연구대상이 되고 있다.
- 이와 관련하여, 생약재 및 식품 단백질을 이용한 항고혈압 기능성 소재 개발 및

고부가가치화는 경제성 부가가치 차원에서 제품화 기술 개발이 절실히 요구된다.

## 2. 연구 목표

- 새로운 품종육성에서는 지금까지 육성된 isoflavone의 함량이 세계 최고로 알려진 아가3, 4호의 결점을 인공교잡을 통해 보완하고, 2,000개의 아가콩 NILs를 이용하여 내도복 다수성 아가콩 계통을 육성하며 고 세대의 황색과 녹색유지 계통에서 역돌연변이에 의해 만들어진 황갈, 흑색 아가콩 계통집단으로부터 세계 최고의 isoflavone 함량을 가진 흑색 품종을 육성코자 하였다.
- 고기능성 isoflavone을 함유하고 있는 신품종을 이용하여 기능성물질인 isoflavone 및 pterocarpan 등의 기능성 원료가 고함축된 분말제품을 개발하여 다양한 고 기능서의 제품(화장품, 생활용품-치약, 가글, 콩차, 탁주 등)을 개발코자 하였다.
- 국내의 양질지방산 콩 품종을 개발하기 위하여 국내외 콩 품종 및 유전자원을 대상으로 지방함량 및 지방산 조성을 조사하여 양질 지방산 콩 육종에 활용할 유용자원을 발굴하고, 유용자원을 활용하여 유망 계통을 육성하고자 하였으며, 또한 이들 국내의 유망자원을 이용하여 환경변이에 대한 안정성을 검토하고, 국내에서 소비되는 콩 가공식품인 두유 및 두부의 가공적성을 평가하고자 하였다.
- 콩의 다양한 기능성 때문에 소비량이 늘어나고 소비자의 관심이 증가하고 있으나 재배 과정에서 농약의 과다 사용에 대한 우려가 높아지고 있어 콩의 친환경 재배 시스템 확립이 시급히 필요하며 새로운 기능성콩의 형질발현을 높이기 위한 기능성 증대 재배법의 개발도 필요하다. 따라서 콩의 친환경 재배 시스템 확립과 재배환경 조절이나 대사조절물질을 이용하여 콩의 기능성물질의 생합성을 증대시켜 안정적이고 장기적인 국산콩의 소비촉진으로 콩 재배농가의 소득증대 및 성공적인 벼 대체작물로서의 콩 재배산업을 육성하는 것이 필요함.
- 최근에 개발되었고 유용 성분의 함량이 높은 신품종인 아가콩에 대한 병해충 발생 및 친환경 방제법에 대한 정보가 전무하다. 따라서 아가콩의 병해충 발생 양상의 이해와 주요 병해충에 대한 친환경자재 및 천적의 선정 및 검증을 통한 아가콩의 친환경적 방제법을 개발하는 것이 이 연구의 목적이다.
- 콩의 isoflavone 중 genistein과 daidzein은 많은 연구를 통해서 혈관의 이완효과를 가지는 것으로 입증되었다. 콩에서 새롭게 추출한 피토알렉신의 한 종류인 글리세올린 (glyceollin)은 선택적 에스트로겐 수용체 조절제 (SERM, selective

estrogen receptor modulator)이고 daidzein으로부터 만들어지는 항에스트로겐 효과를 가지는 물질이다. 최근에 글리세올린의 항에스트로겐 효과에 의해 유방암과 자궁암을 억제한다는 내용의 연구 결과들이 활발히 이루어지고 있다. 이러한 연구 결과는 폐경 이후 여성의 에스트로겐 결핍에 의한 골다공증 치료를 위해 감수해야 할 위험한 부작용인 유방암과 자궁내막암을 유발하는 호르몬제를 대체할 수 있다는 점과 혈압 조절과 관련하여 중요한 역할을 하는 Rho kinase 신호 전달 조절과 혈관의 수축에 있어서 genistein, daidzein과 글리세올린은 아주 중요한 후보 물질인 것으로 생각된다.

- 콩은 대표적인 항암 및 암예방 식품이다. 콩에는 잘 알려진 건강 기능성분인 isoflavone 뿐만 아니라 사포닌, phenolic acid, pinitol 등 다양한 식물성분이 함유되어 있다. 아가콩은 새로이 육성된 신품종 콩으로 신품종 아가콩의 특성을 식물성분 측면에서 그리고 생리활성 측면에서 규명하고자 하였다. 아가콩에서 항산화 활성이 강하게 나타나 아가콩의 항산화 활성성분을 규명하고자 하였다
- 육성콩품종을 이용한 기능성 식품개발 (아가 3, 4호를 이용한 항산화활성이 우수한 청국장을 개발하고, 이의 식품소재로서의 활용가능성 평가)
- 콩 내의 생리활성 물질인 글라이세올린과 피니톨을 이용하여 항암 및 항염증 활성에 대한 연구를 수행 하였다. B16세포주를 이용하여 wound assay를 수행하여 세포의 운동성 억제활성을 알아보았으며, 항암 분자 마커인 ICAM-1, CD44, VEGF-A, MMP17, MMP14, ARF2를 RT-PCR을 통해 알아보하고자 하였다. 아토피 동물모델을 이용하여 피니톨이 염증에 효과가 있는지를 알아보하고자 하였다.
- 본 연구의 목적은 콩이 가지는 기능성 물질을 분리·정제하고 기능성 물질의 라이브러리 구축 및 대량 분리 추출 정제기술의 확립을 하고자 함이다. 대두는 오랜 역사를 가지는 작물임과 동시에 많이 섭취되고 있으며 고단백이라 흔히 ‘밭에서 나는 고기’라고 일컬어진다. 뛰어나고 많은 기능성에 비하여 아직 콩을 이용한 제품은 시중에 그리 다양하지 않은 편이다. 품종간의 생리활성작용 기능의 차이와 콩이 갖는 다양한 기능성을 규명하고 이를 바탕으로 기능성 물질을 이용한 콩 음료 제품 및 향장 제품을 제조하여 콩의 소비를 늘리는 것과 동시에 타 음료시장에 비해 크게 활성화되지 않은 두유시장 진입 및 향장산업으로의 진출로 고부가가치 아이템의 개발과 동시에 국산 대두 소비 촉진을 통한 농가소득 증대에 기여할 것으로 생각한다.
- 따라서 본 연구는 육종에 의해 만들어진 신품종 콩을 이용하여 암, 심혈관계질환, 골다공증, 고지혈증, 당뇨 등을 예방 및 완화 할 수 있는 다양한 기능성 콩

의 제품을 만들어 국민 건강 증진을 그 목적으로 한다.

- 국내에서도 생리 기능성 식품에 대한 관심이 고조되어 있으며, 부작용이 거의 없는 항고혈압 기능성 식품을 필두로 관련 제품들에 대한 잠재적 수요는 점진적으로 증가할 것으로 사료된다. 그러므로 양질의 식품 단백질자원인 콩을 이용한 항고혈압 기능성 제품의 개발이 필요할 것으로 사료된다.
- 본 연구는 수입콩과 차별화된 기능성 고품질 Non-GMO 콩의 친환경 재배 시스템 확립과 재배환경 조절이나 대사조절물질을 이용하여 콩의 기능성물질의 생합성을 증대시켜 안정적이고 장기적인 국산콩의 소비촉진으로 콩 재배농가의 소득증대 및 성공적인 벼 대체작물로서의 콩 재배산업을 육성하기 위한 목적으로 수행하였다.
- 콩 내의 생리활성 물질인 글라이세오린과 피니톨을 이용하여 항암 및 항염증 활성에 대한 연구를 수행 하였다. B16세포주를 이용하여 wound assay를 수행하여 세포의 운동성 억제활성을 알아보았으며, 항암 분자 마커인 ICAM-1, CD44, VEGF-A, MMP17, MMP14, ARF2를 RT-PCR을 통해 알아보려고 하였다. 아토피 동물모델을 이용하여 피니톨이 염증에 효과가 있는지를 알아보려고 하였다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

- 콩의 지방은 종실성분의 13-22%로 전 세계 식물성기름생산의 48%를 차지하는 경제적으로 중요한 작물이며 (Singh and Hymowitz, 1999), 국내유지산업에서도 매우 그 중요도가 높다(Hwang et al., 2004).
- 콩 지질은 단백질, 탄수화물 등과 함께 영양적으로 매우 중요할 뿐아니라 칼로리 제공, 필수지방산 및 지용성 비타민의 공급 등 각종 식품에 특유의 풍미를 제공하고 가공적성 및 저장성에 기능적으로 중요하게 영향한다(Liu, 1999).
- 콩의 지방은 상업적으로 매우 유용한 5종 이상의 지방산으로 구성되는데 이 중에서 palmitic acid(16:0), stearic acid(18:0), oleic acid(18:1), linoleic acid(18:2) 및 linolenic acid(18:2)의 함량과 조성비는 유지의 물리화학적 특성에 크게 영향을 미칠 뿐만 아니라 식품 가공 용도의 결정에도 영향한다(Liu, 1999; Neff, et al., 1999; Cahoon, 2003). 콩의 지방 함량은 약 20% 인데, 함량이 23-24%로 높은 품종도 보고되고 있다(Wilson, 1996; Burton and Brim, 1981).
- 우리나라에서 친환경 작물재배를 위해서는 잡초방제를 위한 제초제는 일절 사용할 수 없기 때문에 제초제 이외의 잡초생장 억제제나 소재를 사용해야 한다. 현재까지 제초제를 대신할 수 있는 방법이 개발되어 있지 않은 실정으로 실질적인 친환경 콩재배가 이루어지지 않고 있다.
- 현재 신품종인 아가콩의 병해충 발생 양상에 대한 보고는 없었으며, 그들에 대한 친환경 방제법에 대한 연구도 전무한 실정이다. 농작물의 주요 병에 대한 친환경 살균제로는 제일그린산업의 푸른세상(활성미생물: *Trichoderma harzianum*), 그린바이오텍의 쉐러스(활성미생물: *Bacillus subtilis*)와 탑시드(활성미생물: *Paenibacillus polymyxa*), B&L Agro사의 나이스키토(활성미생물: *Rhizopus oligosporus*) 등이 있으나 콩에서의 주요 병에 대해서는 그 효과가 아직 검증되지 않았다.
- 콩에서의 주요 해충으로는 최근에 문제시되고 있는 톱다리개미허리노린(*Riptortus pedestris*)와 같은 흡즙성 노린재류가 대표적이다. 하지만 아직 아가콩에서의 주요 해충에 대한 자료는 전무한 실정이며, 따라서 아가콩의 주요 해충에 대한 친환경 방제법도 알려진 바가 없다.
- 콩에서의 노린재류 방제를 위해 현재 집합페로몬을 이용한 통발형 트랩(그린아

그로텍)이나 녹두나 조생종 두과작물을 이용한 유인작물 이용법이 개발되었다.

- 정상적인 뼈의 재형성과정은 뼈 형성과 뼈 흡수의 균형으로 이루어지며, 이러한 뼈 형성과 뼈 흡수는 크게 세 가지 세포, 연골세포, 골아세포(osteoblast), 파골세포(osteoclast)의 상호 작용에 의해 이루어진다. 특히, 골아세포의 증식과 분화는 뼈의 석회화와 밀접한 관계가 있으며 골아세포에서 중요한 전사인자인 RUNX2에 변이(mutation)가 생기거나 발현량이 감소하면 뼈의 석회화가 일어나지 않는다. RANKL(receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand)은 골아세포의 분화과정 동안에 발현되어 파골세포의 분화를 촉진하는 인자로 알려져 있고 OPG (Osteoprotegerin) 역시 골아세포에서 발현되어 RANKL의 역할을 억제함으로써 파골세포의 분화를 억제하는 인자로 알려져 있다.
- 뼈(bone)는 인체의 연조직과 체중을 지탱해주고 내부기관을 둘러싸서 내부 장기를 외부의 충격으로부터 보호한다. 또한 근육이나 장기를 구조적으로 지탱할 뿐만 아니라 체내의 칼슘이나 다른 필수 무기질 즉 인이나 마그네슘과 같은 물질을 저장하는 인체의 중요한 부분 중 하나이다. 따라서 성장이 끝난 성인의 뼈는 멈추지 않고 죽는 날 까지 오래된 뼈는 제거하고 새로운 뼈로 대체하는 생성과 흡수 과정을 매우 역동적, 지속적으로 반복 재생 하면서 균형을 유지하게 된다. 이를 골재형성(bone remodeling)이라고 한다(Yamaguchi A. et al., Tanpaku-shitsu Kakusan Koso., 50(6Suppl):664-669(2005)).
- 오래된 뼈는 제거하고 새로운 뼈로 대체하는 뼈의 순환(turnover)은 성장과 스트레스에 의해서 일어나는 뼈의 미세한 손상을 회복시키고 적절히 뼈의 기능을 유지하는데 필수적이다(Cohen-Solal M. et al., Therapie., 58(5):391-393(2003)).
- 골다공증(osteoporosis)은 여러 가지 원인에 의하여 뼈의 질량이 감소하고 뼈 조직의 미세구조의 퇴화로 골절 위험이 지속적으로 증가하는 질환으로 뼈를 구성하는 미네랄(특히 칼슘)과 기질이 감소한 상태이며, 골재형성의 균형이 깨져서 파골작용이 조골작용보다 증가된 상태에서 발생한다(Iqbal MM., South Med J., 93(1):2-18(2000)).
- 에스트로겐의 부족 현상은 폐경 이후의 여성에서 많이 볼 수 있으며, 골아세포와 파골세포에 영향을 주어 뼈 형성 정도보다 뼈 흡수 정도가 더 많아져서 골다공증을 유발하는 주된 요인으로 알려져 왔다. 이러한 이유로 골다공증 치료를 위해 에스트로겐과 같은 호르몬을 장기간에 걸쳐 환자에 투여하기도 하였지만, 유방암과 자궁내막암 등의 발병 원인이 된다는 연구도 많이 있다.

- 콩에서 새롭게 추출한 피토알렉신의 한 종류인 글리세올린은 선택적 에스트로겐 수용체 조절제 (SERM, selective estrogen receptor modulator)이고 다이드제인 으로부터 만들어지는 항에스트로겐 효과를 가지는 물질이다. 최근에 글리세올린의 항에스트로겐 효과에 의해 유방암과 자궁암을 억제한다는 내용의 연구 결과들이 활발히 이루어지고 있다. 이러한 연구 결과는 폐경 이후 여성의 에스트로겐 결핍에 의한 골다공증 치료를 위해 감수해야 할 위험한 부작용인 유방암과 자궁내막암을 유발하는 호르몬제를 대체할 수 있다는 점에서 아주 중요한 후보 물질인 것으로 생각된다.
- 콩에 들어 있는 대표적인 기능성분은 이소플라본으로 콩과식물에 주로 들어있는 플라보노이드 화합물로 phytoestrogen으로 잘 알려진 성분이다. Phytoestrogen은 구조상 여성호르몬과 유사하여 기능적으로도 유사한 기능을 나타내는 성분으로 유방암, 전립선암 등에 항암효과가 있고 폐경기 다양한 여성질환, 골다공증 등에도 예방 효과가 보고되고 있다. 또한 최근에는 심혈관계, 면역체계 등의 조절에도 관련이 있는 것으로 알려지고 있다.
- 청국장에 대한 연구는 상당 수준 진행되었으나, 성분분석 및 일부 기능성평가, 그리고 기호성 개선 측면에서 다양한 소재의 첨가가 시도되었으며, 본 과제에서와 같은 고 이소플라본 함유한 우수콩 품종을 이용한 제품개발은 시도된 바 없음 (엄상미 등 2009).
- 청국장의 식품소재화연구로는 쿠키, 두부, 패티, 스프, 롤빵 등에 청국장 분말을 첨가한 제품 개발이 시도된 바 있음 (이정아 등 2009; 송윤미 등 2009; 안상희 등 2008).
- 피니톨은 항당뇨 치료제로서 많은 연구가 되어 있으며, 이와 관련한 산업이 다수 발달되어 있다. 피니톨을 이용한 논문으로는 주로 당뇨병에 관한 연구가 주를 이루고 있다. 2형 당뇨병 환자에서 피니톨의 혈당 강하효과, 피니톨의 분리정제방법, 이를 이용한 제품의 개발 등이 있다(Korean journal of medicine ,v.72 no.1 = no.557 ,2007 ,pp.29-36; Food preservation and processing industry ,v.6 no.1 ,2007 ,pp.23-30; Korean journal for food science of animal resources ,v.26 no.2 ,2006 ,pp.257-262).
- 피니톨은 건강 기능성 식품으로 이와 관련한 특허 등은 달개비 및 가시오가피 추출물을 포함하는 당뇨 기능성 음료 및 제조방법, D-피니톨의 대량 생산방법, 디-카이로-이노시톨의 제조방법, 피니톨 성분이 함유된 생식 건강 보조 식품의 제조방법, 대두가공 부산물로부터 카이로이노시톨 성분의 분리방법 등이 알려져 있다.

- 콩의 활성 성분 중의 하나인 글라이세오린은 국내 보다는 국외에 많이 알려져 있는데 이를 첨가한 제품 및 생리 활성에 관한 연구들이 이루어지고 있다. 특히 이를 이용한 항암, 세포내 신호전달 등에 연구가 이루어지고 있으며, 이의 정제 및 제조방법에도 많은 연구가 이루어지고 있다. 콩과의 고삼, 호프 등 여러 식물에서 발견된 8-dimethylallyl naringenin은 강한 에스트로젠 활성으로서 갱년기 장애 개선, 골다공증 예방, 콜라겐 합성 촉진작용, 대두의 glyceollin의 항균작용, 명일엽과 호프 꽃의 xanthohumol이나 xanthoangelol 및 Bacalis의 성분인 artepillin C는 항종양 항암작용, 레몬의 8-geranyloxypsolaren의 혈압조절 효능 등이 보고되었다.
- 두유 제조시 콩에서 유래하는 2-hexanal 및 saponin에 의한 풀냄새 또는 자극성 등의 안좋은 맛을 제거하는 발효두유 제조 기술의 보고가 있다. 연구결과 Bifidobacterium속에 속하는 유산균이 불쾌취 제거에 탁월한 효능을 보인다고 보고되었다.
- 두유 제조시 Beany Flavor에 원인이 되는 lipoxygenase를 불활성 시키는 최적온도에 대한 연구가 보고 되었다.
- Genistein은 주름 완화로 인한 노화방지 기능 이외에도 여드름, 탈모방지 등에 효과가 있다.
- 초고압 미세화에 의한 전성분 두유 제조 기술의 보고가 있다. 이는 1차 미분쇄 후 초고압 미세화기에 투입하여 2,000bar 내지 3,000bar의 초고압을 가하여 두유 입자를 15~30 $\mu$ m인 전성분 두유를 얻는 방법이 제시되었다. 이는 맛과 풍미를 향상시키며 음용 후 입에 이물감이 남지 않으며 장기 보관시에도 응집, 응고가 발생하지 않아 증점제를 굳이 쓰지 않아도 되는 이점이 있다.
- 국내에서는 두유의 기능성 분석에 관련한 연구는 많으나 Lipoxygenase가 결여된 품종에 대한 이취성분에 대한 연구 및 두유 제조과정 중 Lipoxygenase가 이취·이취에 미치는 영향에 대한 성과는 보고되지 않았다.
- 최근 고령화 및 웰빙문화 트렌드로 인해 고혈압, 당뇨, 암, 혈액순환계 질환 등과 같은 생활습관성 질환의 예방 및 치료에 대한 연구가 진행되고 있는 상황임.
- 이들 질병 완화 및 치료제의 개발이 진행되어 일부 제품으로 시판되고 있지만, 앞으로의 시장성을 보아 더 확대하여 연구가 진행될 필요성이 요구있는 실정임.



- Berry류에서 추출한 anthocyanins에 관한 연구는 상당수 있음. 하지만 콩으로부터 분리한 anthocyanins에 관한 연구는 전무함
- 최근에는 생체조절에 관여하는 효소들이 밝혀짐으로서 이러한 효소의 작용을 조절하여 질병치료에 이용하려는 연구가 진행되고 있으며, ACE억제제는 angiotensin전환효소를 억제함으로써 혈압을 조절 할 수 있게 되었다. 또한 인류가 식품으로 이용하고 있는 원료로부터 질병의 예방 및 치료제를 찾고자하는 연구가 진행되고 있음.
- 일본의 경우 고혈압에 유효한 제품으로 카제인 데카펩타이드, 락토 트리펩타이드 함유식품이 시판 됨.
- 본 연구에서는 양질의 단백질 식품 자원인 콩을 생물 공학적 수식을 이용하여 흡수력이 우수하고, 고혈압개선 효능이 있는 새로운 형태의 식품소재를 개발하고자 하며, 식품자원의 부가가치를 높일 뿐만 아니라 국민 건강 차원에서 필요한 연구라 사료 됨.
- 저분자 단백질 가수분해물의 기능을 보면 생체 내에서 혈압 강하 작용을 하는 angiotensin- I converting enzyme(ACE) 저해 peptides, 진통, 마취, 장관 등 평활근의 수축, 식욕조절에 관여하는 물질인 opioid peptides, 면역 증강 작용을 하는 phagocytosis peptides, 혈소판 응집을 저해하는 antithrombotic peptides, 칼슘 흡수를 촉진하는 caseinophospho peptides, 콜레스테롤 강하 peptides, DNA 합성 촉진 peptides 등이 있다.
- 우리나라에서 콩을 소비하는 방법은 두부, 두유, 콩나물 등의 비발효 제품과 된장, 간장, 청국장 등의 발효제품들이 주를 이루고 있다. 콩의 섭취수준을 증가시키기 위해서는 전통적인 방법이 아닌 콩 단백을 이용한 육류 제품, 유제품 및 음료 등 새로운 개념의 콩 제품이 개발되어야만 할 것이다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1절 내도복 다수성 고 기능성(isoflavone) 콩 품종육성과 기능성 콩 분말제품 개발 및 산업화

#### (시험 1) 내도복 다수성 고 기능성 콩 품종육성 (황영현)

##### 1. 시험 방법

###### 가. 아가3, 4호의 초형개량을 위한 인공교배 및 계통육성

아가3, 4호는 각각 종피색이 황록색과 흑색이면서 지금까지 알려진 세계의 어느 콩보다도 같은 종피색 중에서는 isoflavone의 함량이 가장 높은 품종이다. 그러나 이들 품종은 재배종과 야생종간의 중간교잡종으로서 초형이 완전한 재배종과는 약간의 차이가 나는데, 특히 조파시 경장의 끝부분이 약간 만화하는 성질이 남아 있어 도복에 약한 편이다.

인공교배에 공시된 품종 및 계통은 아가1, 3, 4호와 아가콩 육성시에 모본으로 사용되었던 은하콩과 국내에서 육성된 우량 나물콩 및 장콩용으로 다수성인 품종들이었다. 계통육성은 1, 2년차에 교배된 종자들에 대하여는 일부조합은 F1 수확후 SSD방법에 의해 나머지 조합들은 관행의 pedigree 방법에 의해 세대 진전이 이루어지고 있다.

###### 나. 아가3, 4호 NILs 계통집단에서 고 isoflavone 계통선발

경북대학교 식물유전학 연구실에서 보유하고 있는 황록색 종피종인 아가3와 흑색 종피종인 아가4호 NILs 약 2,000계통(녹색, 황록색 및 황색계통들은 아가콩 Y집단 또는 Y집단으로 표시, 흑색계통들은 아가콩 B집단 또는 B집단으로 표시)에 대한 isoflavone 함량을 검정하고, isoflavone 함량을 기준으로 선발된 계통들에 대하여는 주요 농업적 특성을 검정하였다. 1년차에는 각 집단별 850계통씩을 선발하고, 2년차에는 이들 계통들에 대하여 isoflavone 함량을 재 검정하였다. 3년차에는 2년차에 선발한 우량계통들에 대하여 품종등록에 필요한 특성을 조사하였다. 년차간 isoflavone 함량에서의 차이가 매우 컸는데, 이는 공시 계통수의 차이와 사용기기의 차이에 기인한 것으로 생각된다.

공시재료의 isoflavone 함량 분석은 건조된 시료를 50 mesh로 분쇄한 다음 0.2g을 80% ethanol 10ml과 test-tube에 넣어 뚜껑을 막고, 50℃ 초음파세정기(ultrasonic, (주)고도기기, Korea)에서 1시간동안 추출한 다음 shaking incubator(Vision Ltd. Co., Korea)에서 50℃, 150rpm에서 20시간 추출하여 0.45 $\mu$ m syringe

filter(Whatman)로 여과하였다. 얻어진 여과액을 HPLC 분석시료로 사용하였으며, HPLC 분석은 표 1과 같은 조건에서 실시하였다.

Table 1. Specifications and operating conditions for instrumental analysis.

Items	Conditions
Instrument	Detector : Waters 2487 Column : Symmetry C18 5.0 $\mu$ m 150*4.6mm
Mobile phase	A: acetonitrile, B: HPLC water(1% acetic acid) ( A: 5→35% (50min), 35→5% (5min), 5% (15min) )
Flow rate	1.0ml/min
Column temp	30 $^{\circ}$ C
Injection volume	10 $\mu$ l
UV detector	254nm

#### 다. 내도복 다수성 아가콩 계통 육성

기 육성된 아가콩(1, 2, 3, 4호)은 isoflavone 함량과 함께 다양한 기능성이 매우 높는데 반해 야생종과의 중간 교잡종으로 도복 저항성과 수량성이 낮은 문제가 있는 바, 이러한 형질이 비교적 우량한 계통을 선발코자 1년차 공시된 Y집단과 B집단으로부터 도복 저항성과 수량성을 중심으로 아가콩 Y집단(황색종피 집단)에서 선발된 30계통과 아가콩 B집단(흑색종피 집단)에서 선발된 52계통을 풍산나물콩과 태광콩을 표준 및 대비품종으로 하여 시험을 실시하였다. 파종일은 6월 1일, 재식밀도는 60 × 20cm, 1주 1본, 구당 1열로 하였으며 개화시, 성숙기, 경장, 분지수, 주경절수, 개체당협수, 수량, 도복, 종피색, 제색, 100립중 및 isoflavone 함량을 조사하였다.

#### 라. 아가콩 Y집단에서 분리한 황갈모용 개체들에 대한 특성검정

아가콩 집단은 원래 재배종과 우리나라에서 유일하게 발견된 종피색 돌연변이 야생종간에 인공교배된 것으로서 유전적인 연구가 이루어지지 않는 않았으나 후대(F<sub>9</sub>)에서 역 돌연변이로 추정되는 기작에 의해 모부분에 나타나지 않았던 흑색종피 개체의 분리가 많았다. 또한 F<sub>15</sub>에서는 만생종이면서 회갈 모용의 계통으로부터 종피색이 황색, 갈색, 녹색 및 혼색으로 분리되는 계통과 모용색이 황갈인 개체가 분리되었는데, 이들 이들 황갈 모용 개체들은 예외 없이 조생종 개체들로서 종피색이 황색, 갈색, 녹색 및 흑색의 개체들로 분리되었다. 본 시험에서는 모용색 변이개체에서 나타난 여러 가지 형질 중 우수한 형질을 탐색하여 새로운 아가콩 품종을 육성코자 황갈 모용색 107계통과 표준 및 대비품종으로 풍산나물콩과 태광콩 6월 1일에, 재식밀도 60 × 20cm, 1주 1본, 구당 1열로 파종한 후 개화시, 성숙기, 경장, 분지

수, 주경절수, 개체당협수, 수량, 도복, 종피색, 제색, 100립중, isoflavone 함량 등을 조사하였다.

## 2. 시험 결과

### 가. 인공교배

인공교배는 표2에서 보인 바와 같이 아가콩에 대한 1회의 backcross 또는 2회의 backcross를 실시하여 아가콩의 단점인 초형과 도복 저항성을 개량코자 한 교잡과 아가1호의 낮은 isoflavone을 더 높이기 위한 교잡, 아가3호나 아가4호보다 더 높은 isoflavone을 가진 계통의 육성을 위한 교잡, 내도복성의 증대와 아울러 아가콩의 다른 단점인 저 수량성을 개량코자 하는 교잡 및 다수성 우량 장콩에다 아가콩의 isoflavone 함량을 도입코자 하는 교잡 등으로 한 16조합의 교잡이 이루어 졌다.

표 2. 인공교배 결과

조합번호	조합	개량 목표	비고
KUS0726	아가 3 × 은하콩	고 isoflavone 다수성 아가콩 육성	16
KUS0727	아가 4 × 은하콩	고 isoflavoen 흑색 계통 육성	22
KUS0729	아가 3 × 아가 1	고 isoflavone 함량 다수성 아가콩 육성	8
KUS0723	아가 4 × 아가 1	고 isoflavone 흑색 계통 육성	10
KUS0712	아가 3 × 아가 4	고 isoflavone 흑색 계통 육성	7
KUS0812	(아가 3 × 아가 4) / 아가 3	아가 B의 isoflavone 증대를 위한 back cross	51
KUS0813	아가 4 × 풍산나물콩	아가 B의 초형개량	41
KUS0726	아가 3 × 은하콩	고 isoflavone 다수성 아가콩 육성	16
KUS0727	아가 4 × 은하콩	고 isoflavoen 흑색 계통 육성	22
KUS0729	아가 3 × 아가 1	고 isoflavone 함량 다수성 아가콩 육성	8
KUS0723	아가 4 × 아가 1	고 isoflavone 흑색 계통 육성	10
KUS0712	아가 3 × 아가 4	고 isoflavone 흑색 계통 육성	7
KUS0812	(아가 3 × 아가 4) / 아가 3	아가 B의 isoflavone 증대를 위한 back cross	51
KUS0813	아가 4 × 풍산나물콩	아가 B의 초형개량	41
KUS0814	아가 4 × 다채콩	아가 B의 초형개량	8
KUS0815	아가 4 × 청자콩3호	아가 B의 초형개량	14
KUS0816	대망2호 × 아가 3	다수, 고 isoflavone 육성	5
KUS0817	대망2호 × 아가 4	다수, 흑색, 고 isoflavone 육성	12
KUS0818	태광콩 × 아가 4	다수, 고 isoflavone 육성	11
KUS0819	태광콩 × 아가 4	다수, 흑색, 고 isoflavone 육성	12
KUS0820	아가 4 × 아가1호	고 흑색 isoflavone 육성	14
KUS0821	(아가 3 × 은하콩) / 은하콩	아가 3 초형개량과 다수성을 위한 back cross	10
KUS0822	(아가 4 × 은하콩) / 은하콩	아가 4호 초형개량과 다수성을 위한 back cross	10

나. 계통육성

1) 인공교배 집단

인공교배된 조합 중 수개 조합은 F1 양성 후 SSD방법에 의해 세대축진 중에 있으며 나머지 조합들은 관행의 pedigree 방법으로 세대 진진 중에 있다.

2) 1년차 아가3, 4호 NILs 집단의 육성

아가 3, 4호의 자매 계통 각각 1,000개 내외의 NILs에 대한 농업적 특성과 isoflavone 함량을 검정하였다. 아가콩 Y집단 1,000계통에 대하여 성숙기에 초형, 경장, 개체당 협수, 분지 등을 종합적으로 평가하여 가장 우수한 계통을 5로하고 가장 열악한 계통을 1로 하였을 때 각 등급별 계통수의 분포를 보면 그림 1과 같이 다양하게 나타났다. 대부분 3-4등급으로 생육이 양호하였으나, 1, 2등급인 개체도 많았다. 농업적 특성이 가장 우수한 5등급으로 평가된 27개 계통이었다.

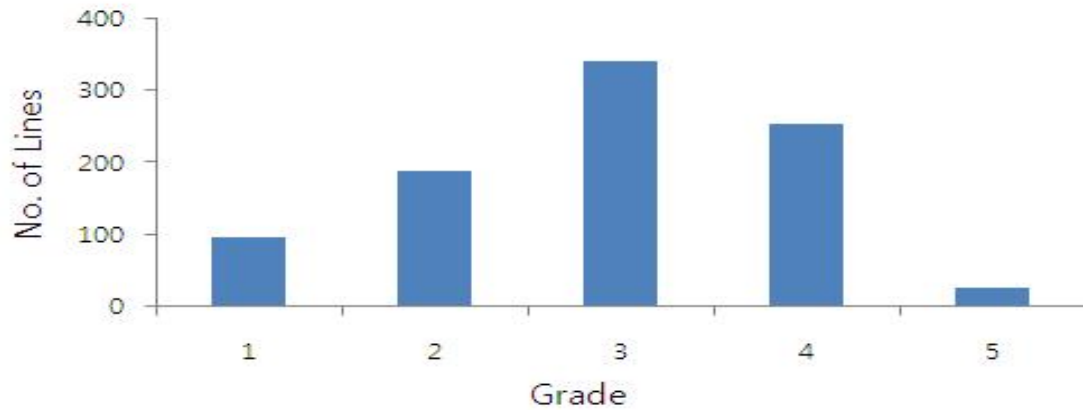



그림 1. 아가콩 Y집단 NILs 계통들에 대한 농업적 특성평가를 기초로 한 분포. 1: 가장 열악한 계통, 5: 가장 우수한 계통.

아가콩 Y집단 NILs 908개 계통들에 대한 종피색을 정밀 조사한 종피색의 분포는 표 2에서 보인 바와 같이 녹색 종피 계통이 54.8%인 498개, 황색 계통이 0.71%인 6개이었고, 황녹색 계통이 44.5%인 404개이었다.

표 2. “황색 종피” 아가콩 NILs 집단의 정밀 종피 분류

종 피 색	녹 색	황 녹 색	황 색	계
계통수(%)	498(54.8)	404(44.5)	6(0.71)	908(100.0)
종 피 색				

아가 Y집단의 1,000계통의 100립중 분포는 그림 2와 같았다. 100립중의 분포는 그림 2에서 보는 바와 같이 대부분 6g 내외이나 6계통은 10g 이상이었고, 1계통은 100립중이 14.1g 이었다.

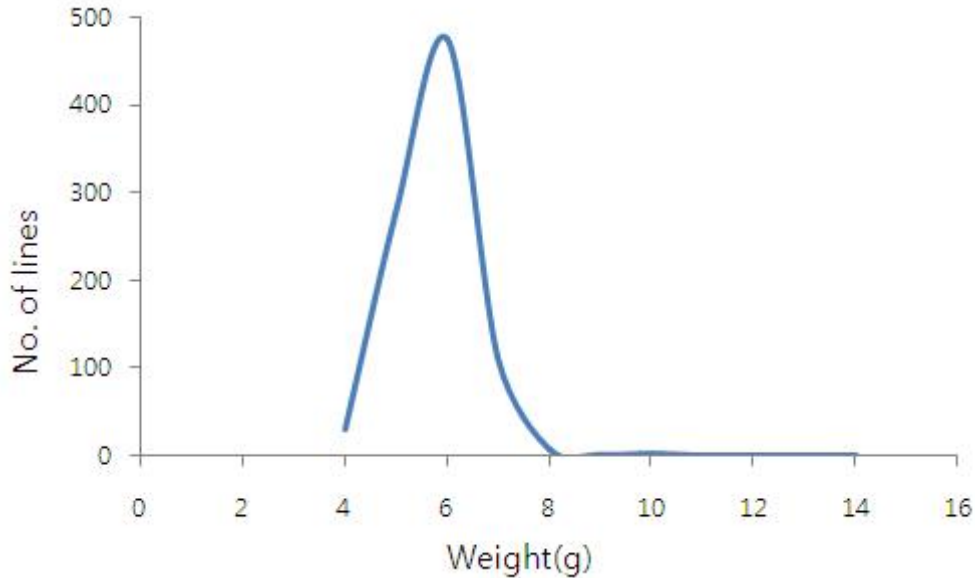


그림 2. 아가 Y 집단의 100립 중 변이.

아가콩 Y집단의 isoflavone 함량을 현재의 장려품종 중 나물콩과 장콩용으로 가장 많이 재배되고 있는 풍산나물콩과 태광콩과 비교한 결과는 표 3과 같다. Isoflavone 형태별 함량에서도 큰 차이가 있었으며 전체 isoflavone 함량은 장려품종인 풍산나물콩과 태광콩의 경우 1,936, 1,453ppm이었으나, 아가 Y집단의 경우 평균 6,347ppm이었으며, 범위는 1,980~9,537ppm으로 높은 함량을 보였다.

표 3. 아가콩 Y집단의 isoflavone 형태별 함량(ppm).

Isoflavone	풍산나물콩	태광콩	Range	Mean
Daidzin	46	36	57~244	151
Genistin	742	517	684~4,587	2,419
A-daidzin	21	17	14~268	86
M-genistin	1,030	785	995~4,945	3,403
A-genistin	23	24	28~301	102
Daidzein	38	39	37~86	47
Genistein	37	36	0~71	47
Total	1,936	1,453	1,980~9,537	6,347

아가 Y집단 전체 isoflavone 함량별 계통수의 분포를 보면 그림 3에서 보인 바와 같이 대부분 6,000~8,000ppm에 분포하고 있었으며, 8,000ppm이상이 계통도 다수 있었다.

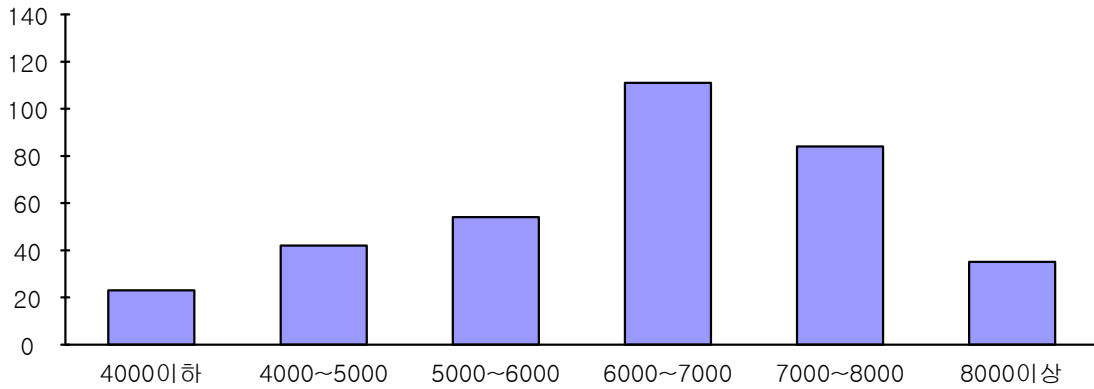


Fig 3. 아가 Y 집단의 전체 isoflavone 함량 분포.

아가 Y 집단의 종피색별 isoflavone 함량 평균의 분포를 보면 그림 4와 같이 황색과 녹색이 섞인 집단보다는 단일 종피색의 계통들이 높게 나타났다.

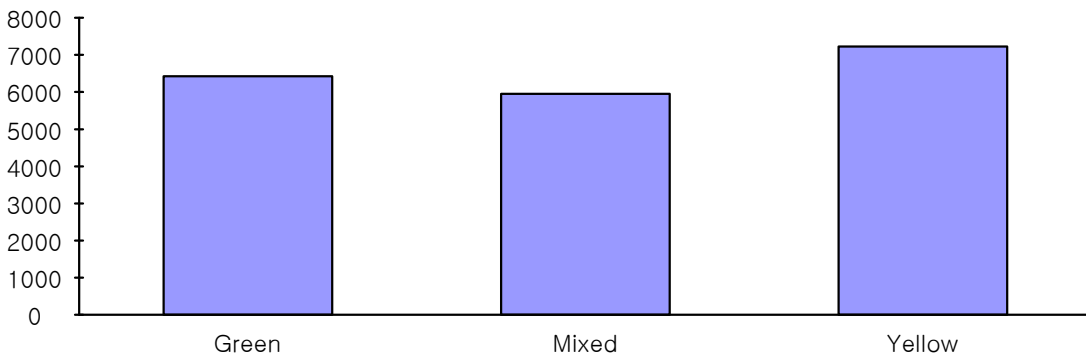


그림 4. 아가 Y집단의 종피색별 평균 isoflavone 함량.

아가 Y 집단에서 전체 isoflavone 함량이 가장 높은 계통을 선발한 결과는 표 4에서 보인 바와 같았다. 가장 높은 계통은 Y171계통으로 9,537ppm이었으며, 나머지 계통들도 장려품종인 풍산나물콩과 태광콩보다 5-6배정도 많았다.



표 4. 아가 Y집단의 isoflavone 함량에 따른 선발.

계통명	Isoflavone content(ppm)	계통명	Isoflavone content(ppm)
Y171	9,537	Y393	9,059
Y147	9,305	Y082	8,983
Y149	9,305	Y022	8,930
Y233	9,284	Y101	8,894
Y015	9,140	Y055	8,832
풍산나물콩	1,936	태광콩	1,453

아가 B집단(흑색종피) NILs 1,000계통의 100립중은 매우 다양하였으며 범위는 3.66-10.36g이었다. 아가 B 집단의 isoflavone 형태별 함량 및 범위를 황색 나물콩인 풍산나물콩과 우리나라 흑색 종피종으로서 isoflavone이 가장 높은 품종으로 알려진 청자콩과 비교한 결과 아가콩 B집단의 각 isoflavone 형태별 또는 전체 함량이 청자콩에 비하여 크게 높다는 것을 알 수 있었다(표 5).

표 5. 아가 B 집단의 isoflavone 함량(ppm).

Isoflavone	풍산나물콩	청자3	Range	Mean
Daidzin	46	64	49~137	95
Genistin	742	756	642~2,103	1,092
A-daidzin	21	19	24~1,485	74
M-genistin	1,030	1,198	49~2,296	1,571
A-genistin	23	28	29~137	68
Daidzein	38	39	38~63	47
Genistein	37	41	38~65	46
Total	1,936	2,272	1,910~4,420	3,012

전체 아가 B집단에서 isoflavone 함량을 선발해 보면 표 5와 같다. 일반적으로 검정콩은 황색콩보다 isoflavone 함량이 절반정도의 수준으로 알려져 있는데 아가 B 집단의 경우 표 5에서 보인바와 같이 황색 종피종인 풍산나물콩과 태광콩보다 2-3 배정도 높은 것으로 나타났다.

표 5. 아가 B 집단 의 고 isoflavone 계통

계통명	Isoflavone content(ppm)	계통명	Isoflavone content(ppm)
B143	4,735	B032	4,013
B086	4,420	B090	3,963
B061	4,207	B135	3,940
B130	4,057	B156	3,884
B071	4,029	B087	3,871
풍산나물콩	1,936	태광콩	1,453

3) 2년차 아가3, 4호 NILs 집단의 육성

아가 Y집단 850계통의 isoflavone 함량 분석결과는 그림 5에서 보는 바와 같이 최저 2,696 $\mu\text{g/g}$  에서 최고 15,156 $\mu\text{g/g}$ 으로 다양한 변이를 보였으며 평균 isoflavone 함량은 8,797 $\mu\text{g/g}$  이었다. 아가 Y집단 850계통의 isoflavone 함량은 근사 정규분포를 나타내었으며, 10,000 - 11,000 $\mu\text{g/g}$  에서 가장 많은 계통들이 분포하였다.

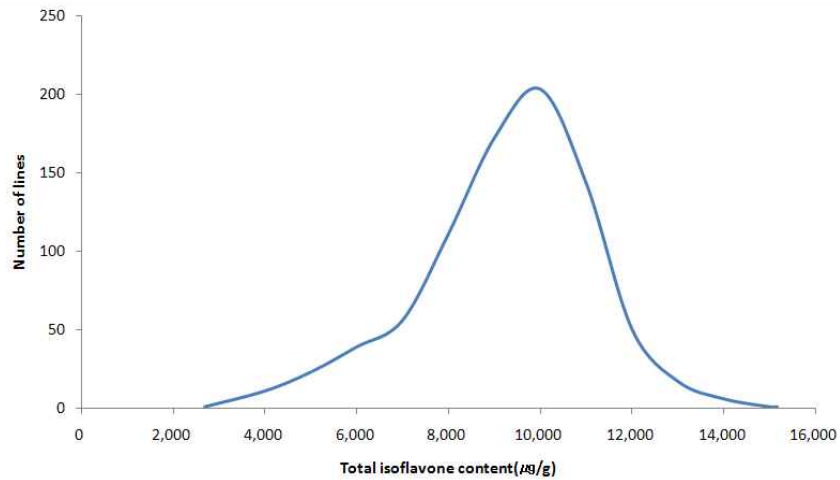


그림 5. 아가 Y집단 850 계통들의 isoflavone 함량 분포.

아가 B집단 850계통의 isoflavone 함량 분석결과 그림 6에서 보인 바와 같이 최저 1,747 $\mu\text{g/g}$ 에서 최고 7,558 $\mu\text{g/g}$ 으로 다양한 분포를 보였으며 평균 isoflavone 함량이 4,450 $\mu\text{g/g}$ 이었다. 아가 B집단 850계통의 isoflavone 함량의 분포도 정규분포를 나타내었으며, 5,000 - 6,000 $\mu\text{g/g}$  에서 가장 많은 계통들이 분포하였다.

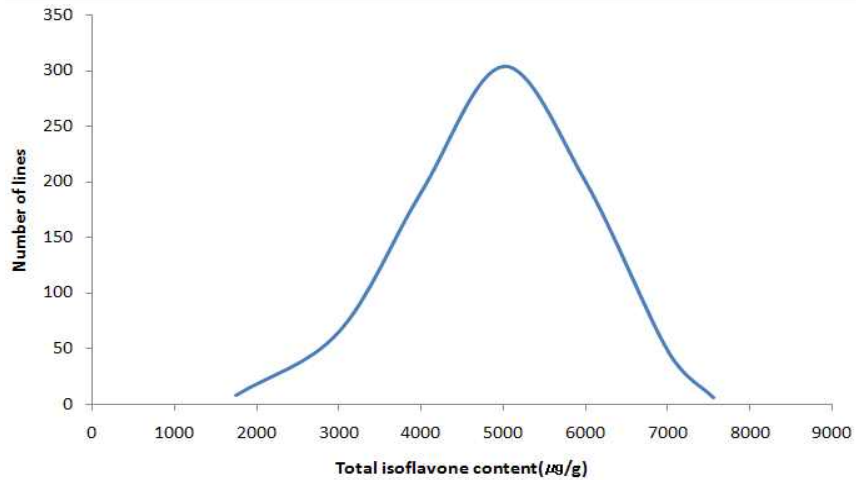


그림 6. 아가 B집단 850 계통들의 isoflavone 함량 분포.

표 6에서 보인 바과 같이 아가 Y집단 850 계통의 평균 isoflavone 함량은  $8,797\mu\text{g/g}$  으로 풍산나물콩의  $1,617\mu\text{g/g}$  보다 5.4배, 태광콩의  $1,907\mu\text{g/g}$  보다 4.6배 높았다. 일반적으로 검은콩의 경우 isoflavone 함량이 황색콩에 비해 절반 정도인 것으로 알려져 있는데, 아가 B집단 850계통의 경우에는 검은 콩임에도 불구하고 풍산나물콩보다 2.8배, 태광콩보다 2.3배 높게 나타났다. 따라서 아가 B집단 에서는 검은 콩이면서도 isoflavone 함량이 매우 높은 계통을 선발할 수 있을 것으로 기대된다.

표 6. 아가 Y, B집단 850계통들의 평균 isoflavone 함량.

(단위 :  $\mu\text{g/g}$ )

Population	Daid-zin	Glycitin	Genis-tin	M-daidzin	M-glycitin	A-daidzin	M-genistin	Daidzein	A-genis-tin	Genistein	Total
Aga Y	1,513	294	1,981	1,602	272	67	2,904	48	93	22	8,797
Aga B	679	153	981	805	172	49	1,469	58	72	27	4,450
풍산나물콩	177	13	240	443	85	0	607	43	9	0	1,617
태광콩	189	8	334	470	97	0	777	32	0	0	1,907

표 7은 아가 Y집단 850계통 중에서 총 isoflavone 함량이 높은 10계통을 선발 것이다. 가장 높은 계통은 아가 Y147로  $15,156\mu\text{g/g}$  이었다. 나머지 계통들도 장려품종인 태광콩과 풍산나물콩에 비해 isoflavone의 함량이 약 8-9배 정도 높았다.

표 7. 아가콩 Y집단의 isoflavone 함량에 따른 선발계통.

품종 및 계통명	Isoflavone content( $\mu\text{g/g}$ )	품종 및 계통명	Isoflavone content( $\mu\text{g/g}$ )
Aga Y147	15,156	Aga Y333	13,378
Aga Y352	14,146	Aga Y335	13,162
Aga Y816	13,624	Aga Y334	13,103
Aga Y055	13,424	Aga Y838	12,560
Aga Y430	13,389	Aga Y437	12,456
풍산나물콩	1,617	태광콩	1,907

표 8은 아가콩 B집단 850계통 중에서 총 isoflavone 함량이 높은 10계통을 선발한 계통의 isoflavone 함량을 표시하였다. 가장 높은 계통은 아가 B622로 7,558 $\mu\text{g/g}$ 이었다. 검정콩의 경우 일반적으로 황색종피종에 비해 isoflavone 함량이 절반 정도가 되는 것으로 알려져 있는데, 아가 B집단의 경우 황색종피를 가지는 장려품종인 풍산나물콩과 태광콩에 비해서도 isoflavone 함량을 더 높았으며 선발된 10계통은 장려품종보다 isoflavone 함량이 약 3-4배정도 높았다.

표 8. 아가콩 B집단의 isoflavone 함량에 따른 선발계통.

품종 및 계통명	Isoflavone content( $\mu\text{g/g}$ )	품종 및 계통명	Isoflavone content( $\mu\text{g/g}$ )
Aga B622	7,558	Aga B653	7,012
Aga B298	7,369	Aga B277	6,851
Aga B323	7,323	Aga B776	6,840
Aga B457	7,281	Aga B560	6,820
Aga B654	7,096	Aga B758	6,726
풍산나물콩	1,617	태광콩	1,907

그림 7은 황색종피를 가지는 아가콩 Y집단 850 line의 daidzein(-zin) 함량 분포이다. Daidzein은 isoflavone의 다양한 형태에서 중요한 작용을 하는 물질 중 하나로 비배당체 형태의 daidzein과 배당체 형태인 acetyl-daidzin, malonyl-daidzin 그리고 daidzin의 형태로 구성되어있다. Daidzein은 배의 칼슘 재 흡수를 억제하고, 노인과 여성의 골다공증 예방 효능이 있는 것으로 알려져 있다. 아가콩 Y집단에서의

daidzein(-zin) 함량은 최저 1,074 $\mu\text{g/g}$ 에서 최고 6,121 $\mu\text{g/g}$ 으로 다양했으며 유사정규 분포를 나타내면서 3,000 - 4,000 $\mu\text{g/g}$ 의 함량에서 가장 많은 계통들이 분포하였다.

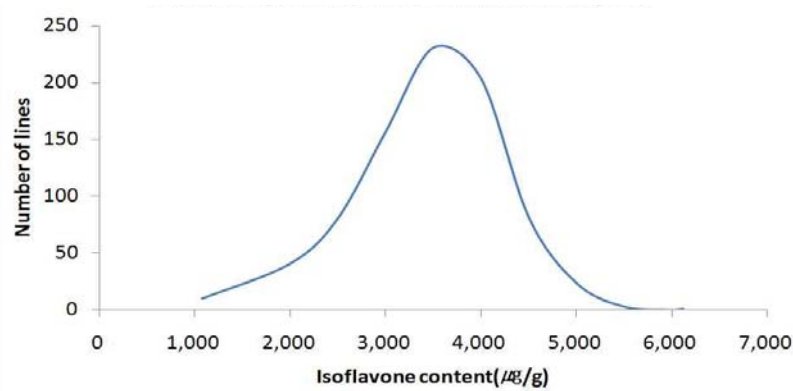


그림 7. 아가콩 Y집단에서 daidzein(-zin) 함량의 분포.

표 9는 아가 Y집단 중 daidzein(-zin) 함량이 높은 10계통을 선발한 것이다. 표 9에서 보인 바와 같이 선발된 계통들의 총 daidzein(-in)의 함량은 표준 품종인 풍산나물콩에 비해 8.1 - 10.4배 정도의 함량을 보였다. 특히 daizein(-in)은 골다공증에 대한 예방과 치료효능이 탁월할 뿐만 아니라 남성의 전립선 관련질환에도 효능이 있고, 발모에도 효능이 있어 고 daizein(-in) 품종의 육성은 크나큰 의의가 있다고 생각되어진다.

표 9. 아가콩 Y집단 850line에서 선발된 10계통에 대한 daidzein(-zin)함량.

(단위 :  $\mu\text{g/g}$ )

Rank	Name	Daidzin	m-Daidzin	a-Daidzin	Daidzein	Total(%)
1	Aga Y147	3,005	2,984	87	45	6,121(1,043)
2	Aga Y352	2,526	2,595	66	62	5,248(894)
3	Aga Y333	2,456	2,456	111	86	5,109(870)
4	Aga Y430	2,192	2,734	132	42	5,100(869)
5	Aga Y055	2,190	2,631	63	66	4,950(843)
6	Aga Y059	2,247	2,489	67	63	4,866(829)
7	Aga Y816	2,297	2,339	105	69	4,810(819)
8	Aga Y335	2,222	2,416	99	68	4,804(818)
9	Aga Y189	2,246	2,403	97	47	4,793(817)
10	Aga Y509	2,013	2,594	67	50	4,723(805)
표준품종	풍산나물콩	173	389	-	25	587(100)

그림 8은 황색종피를 가지는 아가콩 Y집단 850 line 중에서 genistein(-tin) 함량의 분포를 나타낸 것이다. Genistein은 isoflavone의 다양한 형태에서 중요한 작용을 하는 물질 중 하나로 비배당체 형태의 genistein과 배당체 형태인 acetyl-genistin, malonyl-genistin 그리고 genistin의 형태로 구성되어있다. Genistein은 여성호르몬인 에스테로젠과 유사한 화학적 구조를 가지고 있어 여성호르몬의 작용을 할 뿐만 아니라 암세포의 증식에 관여하는 효소인 protein tyrosin kinase와 DNA topoisomerase II의 작용을 저해하는 것으로 밝혀져 전립선암 억제 등 발암 억제 가능성이 여러 측면에서 보고되었고, 혈관수축을 억제해 고혈압 방지에도 효과가 있는 것으로 연구보고 되고 있다(2008, 김인겸). 아가 Y집단에서의 genistein(-tin) 함량은 최저 1,550 $\mu$ g/g에서 최고 8,113 $\mu$ g/g으로 다양했으며 5,000 - 6,000 $\mu$ g/g의 함량을 보인 계통들이 가장 많았다.

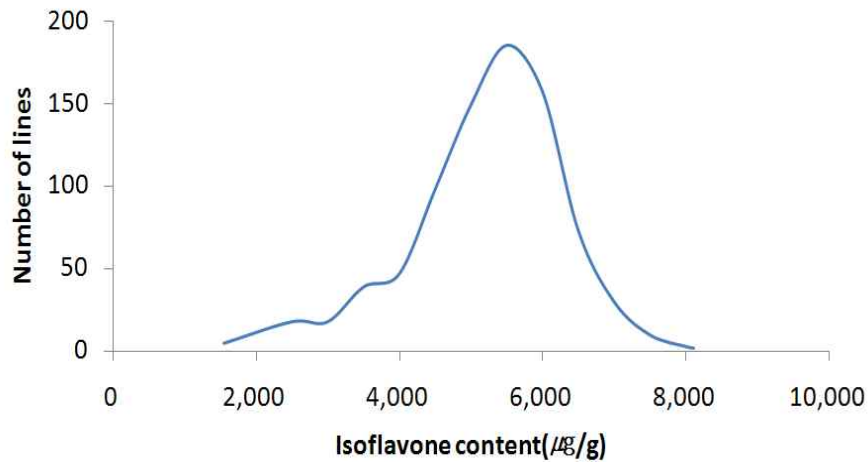


그림 8. 아가 Y집단에서 genistein(-tin) 함량의 분포.

표 10은 아가 Y집단 중 가장 높은 genistein(-tin) 함량을 보인 10계통을 선발한 성적이다. 표 10에서 보인 바와 같이 선발된 계통들의 총 genistein(-in)의 함량은 표준 품종인 풍산나물콩에 비해 7.4 - 8.3배 정도의 함량을 보였다.

표 10. 아가 Y집단 850line에서 선발된 10개 계통에 대한 genistein(-tin)함량.

(단위 :  $\mu\text{g/g}$ )

Rank	Name	Genistin	m-Genistin	a-Genistin	Genistein	Total
1	Aga Y352	3,085	4,924	84	19	8,113(825)
2	Aga Y147	3,428	4,553	84	8	8,073(821)
3	Aga Y055	2,822	4,843	105	9	7,778(791)
4	Aga Y816	3,044	4,430	167	73	7,713(785)
5	Aga Y334	3,008	4,587	81	31	7,707(784)
6	Aga Y335	2,784	4,587	110	16	7,496(762)
7	Aga Y430	2,678	4,623	157	9	7,467(760)
8	Aga Y336	2,793	4,351	153	14	7,311(744)
9	Aga Y333	2,816	4,276	116	38	7,246(755)
10	Aga Y838	2,844	4,197	128	58	7,227(735)
표준품종	풍산나물콩	286	691	6	-	983(100)

그림 9은 황색종피를 가지는 아가 B집단 850line의 daidzein(-zin) 함량분포를 보인 것이다. 아가 B집단에서의 daidzein(-zin) 함량은 최저  $631\mu\text{g/g}$ 에서 최고  $2,882\mu\text{g/g}$ 으로 오른 쪽으로 약간의 편포를 나타내면서 isoflavone 함량  $2,000\mu\text{g/g}$  내외에서 가장 많은 계통들이 분포하였다.

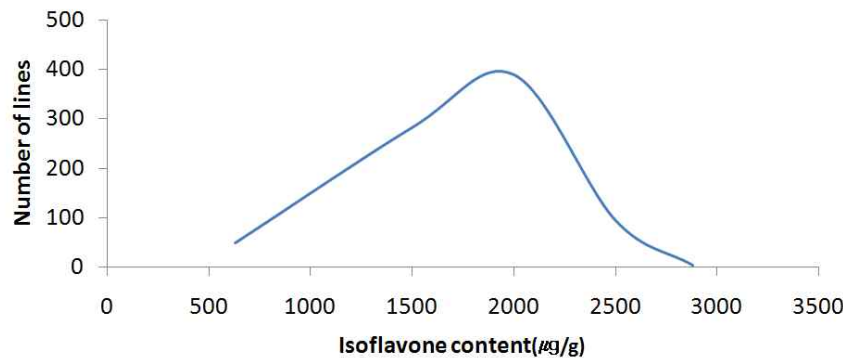


그림 9. 아가콩 B집단에서 daidzein(-zin) 함량의 분포.

표 11은 아가콩 B집단 중 가장 높은 daidzein(-zin) 함량을 보인 10계통을 선발한 성적이다. 그림에서 보인 바와 같이 선발된 계통들은 daidzein(-zin) 총 함량이 황색 종피종인 풍산나물콩에 비해서도 4-5배 정도로 매우 높은 값을 보였다.

표 11. 아가콩 B집단 850line에서 선발된 10계통에 대한 daidzein(-zin)함량.

(단위 :  $\mu\text{g/g}$ )

Rank	Name	Daidzin	m-Daidzin	a-Daidzin	Daidzein	Total
1	Aga B209	886	955	971	69	2,882(491)
2	Aga B622	1,344	1,303	35	75	2,757(470)
3	Aga B623	1,289	1,215	64	78	2,646(451)
4	Aga B298	1,169	1,400	21	53	2,643(450)
5	Aga B621	996	486	928	81	2,491(424)
6	Aga B457	1,051	1,218	112	89	2,470(421)
7	Aga B635	1,050	1,149	133	84	2,416(412)
8	Aga B654	1,100	1,217	14	71	2,401(409)
9	Aga B758	978	1,200	113	92	2,384(406)
10	Aga B653	1,075	1,187	59	56	2,377(405)
표준품종	풍산나물콩	173	389	-	25	587(100)

그림 10는 흑색종피 아가 B집단 850line의 genistein(-tin) 함량분포를 보인 것이다. 아가콩 B집단에서의 genistein(-tin) 함량은 최저  $581\mu\text{g/g}$ 에서 최고  $4,394\mu\text{g/g}$ 으로 다양하였으며 유사 정규분포를 나타내면서  $3,000\mu\text{g/g}$ 의 함량에서 가장 많은 계통들이 분포하였다.

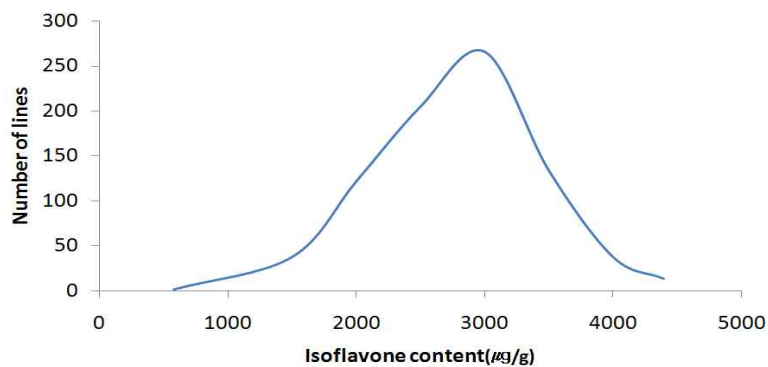


그림 10. 아가콩 B집단에서 genistein(-tin) 함량의 분포.



표 12는 아가콩 B집단 중 가장 높은 genistein(-tin) 함량을 보인 10계통을 선발한 성적이다. 표에서 보인 바와 같이 선발 계통들은 황색 종피종인 풍산나물콩에 비해서도 genistein의 함량이 4.2 - 4.5배 정도 높아 검정콩이 가진 기능성과 함께 높은 이소플라본의 효능을 함께 가진다면 기능성 식품의 소재로서 이용 가치가 높을 것으로 생각되어 진다.

표 12. 아가콩 Y집단 850 NIIs에서 선발된 10개 계통에 대한 genistein(-tin)함량.  
(단위 :  $\mu\text{g/g}$ )

Rank	Name	Genistin	m-Genistin	a-Genistin	Genistein	Total
1	Aga B457	1,569	2,596	177	52	4,394(447)
2	Aga B622	1,763	2,447	61	42	4,313(439)
3	Aga B654	1,620	2,530	37	43	4,230(430)
4	Aga B623	1,722	2,345	98	42	4,207(428)
5	Aga B776	1,384	2,676	53	52	4,164(424)
6	Aga B653	1,574	2,465	87	23	4,148(422)
7	Aga B298	1,653	2,368	50	32	4,103(417)
8	Aga B403	1,418	2,581	97	5	4,101(417)
9	Aga B608	1,631	2,370	63	24	4,088(416)
10	Aga B699	1,312	2,739	29	0	4,080(415)
표준품종	풍산나물콩	286	691	6	-	983(100)

#### 다. 내도복 다수성 아가콩 계통 육성

##### 1) 아가콩 Y집단 선발계통에 대한 주요 생육특성 및 isoflavones 검정

2007년도 아가콩 Y와 B집단 각각 1,000계통에 대하여 생육기간의 내병성과 성숙기의 초형, 경장, 개체당 협수, 분지수 등을 종합적으로 고려하여 평가한 계통 중에서 아가콩 Y집단에서 선발된 30계통을 2반복으로 재배한 후 주요 농업적 특성과 isoflavones의 함량을 조사한 결과는 표 13에서 보인 바와 같다.

표 12. 아가콩 Y집단에서 선발된 30계통에 대한 농업적 특성과 isoflavones의 함량.

Line	Height (cm)	No. of branches /pt.	No. of nodes/pt.	No. of pods/pt.	100seed weight(g)	Yield		Isoflavone	
						(Kg/10a) <sup>b</sup>	Index(%)	μg/g	Index(%)
아가 Y161	51	8.0	15.5	376	6.6	227	74	11,471	709
아가 Y196	62	7.0	15.5	347	6.0	188	61	3,688	228
아가 Y292	50	7.0	16.0	405	6.8	162	53	11,681	722
아가 Y312	55	9.5	16.0	415	4.9	200	65	9,665	598
아가 Y315	60	9.0	17.0	393	5.7	151	49	8,901	550
아가 Y316	70	9.0	18.0	484	6.4	209	68	11,218	694
아가 Y335	51	6.5	15.5	422	4.9	229	74	11,844	732
아가 Y339	65	7.5	17.0	330	6.2	192	62	11,001	680
아가 Y371	70	7.0	13.5	474	5.3	215	70	12,259	758
아가 Y389	76	7.5	18.5	346	9.0	207	67	6,112	378
아가 Y402	57	10.0	16.5	394	5.9	137	44	5,392	333
아가 Y406	56	6.5	16.0	335	6.3	208	67	10,757	665
아가 Y436	54	8.0	14.0	398	6.5	176	57	3,404	210
아가 Y449	67	6.0	17.0	298	6.5	212	69	6,860	424
아가 Y480	50	8.0	16.5	342	5.6	156	51	9,005	557
아가 Y614	62	8.0	17.5	367	5.1	141	46	8,653	535
아가 Y654	54	7.0	17.0	274	5.0	122	40	3,848	238
아가 Y666	62	7.0	18.0	314	4.6	111	36	7,460	461
아가 Y699	55	8.0	16.5	239	5.6	121	39	4,033	249
아가 Y716	58	6.5	16.5	235	5.7	162	53	1,234	76
아가 Y802	56	6.5	17.0	295	6.2	196	64	10,060	622
아가 Y807	58	7.5	15.5	300	6.1	127	41	8,578	530
아가 Y830	58	7.0	18.0	414	6.5	179	58	8,607	532
아가 Y834	61	7.0	16.5	248	6.8	208	68	9,154	566
아가 Y842	48	9.5	15.5	385	5.7	166	54	4,430	274
아가 Y883	59	7.5	16.0	300	11.2	267	87	2,279	141
아가 Y890	67	8.0	17.0	357	5.5	198	64	5,894	364
아가 Y894	57	7.5	17.0	292	6.1	181	59	6,551	405
아가 Y902	63	8.0	17.0	324	8.1	200	65	10,797	668
아가 Y960	56	7.5	16.5	289	10.8	267	87	7,628	472
아가계통 평균	59	7.6	16.5	346	6.4	184	60	7,749	479
풍산나물콩	48	7.0	15.0	222	13.5	309	100	1,617	100
태광콩	40	7.0	13.5	129	26.5	316	103	1,907	118

비고: 표의 번잡성을 피하기 위해 DMRT 분석결과의 표시는 생략하였음.

아가콩 Y집단 선발 계통들은 경장이 장려품종인 풍산나물콩과 태광콩 보다 길었으며, 가장 키가 큰 계통은 아가 Y389계통으로 76.0cm 이었고, 가장 작은 계통은 아가 Y842계통으로 48.0cm 이었다. 분지수의 경우 18계통이 장려품종인 풍산나물콩과 태광콩 보다 많았으며, 그 중에서 아가 Y312, Y402, Y842 계통이 10개로 가장 많았다. 나머지 12계통들은 장려품종인 풍산나물콩과 태광콩 보다 같거나 적게 나타났는데, 그 중에서 아가 Y449계통은 6개로 가장 적었다. 주경절수의 경우 아가

Y371, Y436계통이 14개로 태광콩과 같았고, 나머지 계통에서는 장려품종인 풍산나물콩과 태광콩 보다 많았는데 아가 Y389계통이 19개로 가장 많은 주경절수를 보였다. 협수는 아가 Y집단 선발계통 모두가 풍산나물콩과 태광콩 보다 많았으며, 선발계통 중 가장 많은 협수를 보인 것은 아가 Y316계통으로 484개이었다. 이 계통의 협수는 풍산나물콩의 2.18배, 태광콩의 3.75배나 되었다. 개체가 협수가 가장 적은 계통은 아가 Y716계통으로 235개이었다. 100립중의 경우 아가 Y집단 선발계통 중 가장 큰 것이 아가 Y883계통으로 11.2g이었고, 풍산나물콩 100립중인 13.5g의 83%, 태광콩의 100립중인 26.5g의 42%로 나타났다. 가장 작은 것은 아가 Y666계통으로 4.6g이었다. 이는 풍산나물콩 100립중의 34%, 태광콩 100립중의 17%이었다.

공시된 30계통의 isoflavone 함량은 평균이 7,749 $\mu$ g/g이었고, 범위는 1,234~12,259 $\mu$ g/g 으로 isoflavone의 함량이 가장 높은 아가Y371은 풍산나물콩의 7.58배이었다. 그러나 isoflavone의 함량과 아가콩 집단에서 가장 문제가 되는 도복 저항성 및 수량성을 포함한 모든 농업적 특성을 고려할 때 가장 우량한 계통은 아가 Y161계통으로 생각되어 이 계통을 아가6호로 명명하고 2009년도에 품종보호 출원하였다.

**아가6호 선발:** 아가Y161은 농업적 특성이 우수하고 isoflavone 함량도 높아 “아가6호”로 명명하고 2009년도에 품종보호출원을 하였음.

아가6호는 기존의 아가3호는 isoflavone의 함량은 높으나 농가 계약재배에서 도복의 위험성이 높고 종실수량이 낮은 것이 문제가 되었음. 아가6호는 도복 저항성이 높고(공시한 모든 계통은 도복이 없었음) 수량성이 비교적 높았음. 선발된 아가6호는 시험구 수량에서는 풍산나물콩과 태광콩에 비하여 상대적으로 낮으나 실제 농가실증시험에서는 비슷한 정도의 수량성을 보여 농가재배에서는 전연 문제가 되지 않았다.

## 2) 아가콩 B집단에서 선발한 52계통의 농업적 특성 및 isoflavones 함량 조사

아가콩 B집단 선발계통의 경장은 표준품종인 풍산나물콩 보다 작았으며, 선발계통 중 가장 키가 큰 계통은 아가 B027계통으로 46cm이었고, 가장 작은 계통은 아가 B560계통으로 27cm이었다. 분지수의 경우 아가 B033, B115, B131 및 B152계통은 6.5-7.0개로 표준품종과 같았고, 나머지 48계통들은 표준품종보다 많았는데, 아가 B060계통이 14개로 가장 많았다. 주경절수의 경우 아가 B027과 B090계통이 16개로 표준품종보다 많았고, 아가 B659 계통은 8개로 가장 적었다. 협수는 아가 B집단 선발계통 모두가 표준품종인 태광콩 보다 많았고, 아가 B060계통이 550개로 가장 많았는데, 풍산나물콩에 비해 2.5배, 태광콩에 비해 4.3배이었다. 선발 계통 중 아가

B104계통은 195개로 가장 적었다. 100립중은 아가 B560계통이 9.6g으로 가장 무거웠는데 풍산나물콩 100립중 13.5g의 70%, 태광콩 100립중 26.5g의 36%이었다. 100립 중이 가장 작은 것은 아가 B109, B693계통으로 5.8g이었는데 풍산나물콩의 42%, 태광콩의 22% 이었다. 모용색은 아가 B집단 선발계통 모두가 황갈색이었다.

공시된 52계통의 isoflavone 함량은 평균이 4,717 $\mu$ g/g이었고, 범위는 1,784~6,820  $\mu$ g/g 으로 isoflavone의 함량이 가장 높은 아가Y371은 풍산나물콩의 4.2배 이었다.

Table 2. 아가콩 B집단에서 선발된 52계통에 대한 농업적 특성과 isoflavones 함량.

Line	Height (cm)	No. of branches	No. of nodes	No. of pods	100seed weight (g)	Isoflavone	
						$\mu$ g/g	Index(%)
아가 B027	46	7.5	15.5	412	6.1	4,881	302
아가 B032	37	7.5	10.5	279	7.2	4,589	284
아가 B033	41	6.5	14.0	293	6.2	5,383	333
아가 B047	34	9.5	14.0	392	7.8	5,080	314
아가 B060	42	13.5	11.5	550	6.7	4,378	271
아가 B064	38	10.0	11.5	451	6.0	5,438	336
아가 B090	38	10.5	15.5	373	6.6	3,795	235
아가 B098	38	9.0	12.5	289	6.7	5,238	324
아가 B104	32	8.0	13.0	195	6.9	1,784	110
아가 B109	37	10.5	12.0	330	5.8	5,386	333
아가 B111	30	11.0	12.5	427	7.0	4,384	271
아가 B112	30	7.5	14.5	334	6.1	5,399	334
아가 B115	33	7.0	13.0	349	7.1	5,687	352
아가 B119	33	9.5	10.5	305	6.6	5,201	322
아가 B128	32	10.5	11.5	291	6.4	5,271	326
아가 B131	30	6.5	10.0	234	8.2	2,520	156
아가 B132	33	10.0	13.0	300	7.7	5,280	327
아가 B133	30	10.0	11.5	295	6.1	5,837	361
아가 B143	34	11.0	12.0	297	6.0	5,407	334
아가 B152	30	7.0	11.0	217	7.7	3,956	245
아가 B155	39	9.0	10.0	265	7.3	5,276	326
아가 B332	39	9.0	13.0	354	7.2	6,599	408
아가 B488	38	11.0	10.5	359	6.3	5,162	319
아가 B489	37	9.5	10.5	267	7.1	4,997	309
아가 B497	43	10.0	10.0	325	7.9	5,791	358
아가 B499	38	9.5	12.0	341	6.6	4,392	272
아가 B552	35	10.0	10.5	372	5.9	5,090	315
아가 B560	27	8.5	10.0	261	9.6	6,820	422
아가 B561	40	10.0	12.0	414	8.9	3,096	191
아가 B562	32	12.5	9.5	332	5.8	4,524	280
아가 B564	36	9.5	13.0	358	6.8	4,372	270

Line	Height (cm)	No. of branches	No. of nodes	No. of pods	100seed weight (g)	Isoflavone	
						µg/g	Index(%)
아가 B570	39	10.5	13.0	447	8.7	3,510	217
아가 B578	30	12.0	9.0	399	9.2	2,841	176
아가 B585	36	10.5	11.0	304	8.7	5,696	352
아가 B592	31	13.0	12.0	349	6.5	2,674	165
아가 B615	39	12.0	12.5	405	6.0	4,210	260
아가 B652	34	11.0	12.5	365	6.5	6,607	409
아가 B654	33	11.5	9.5	421	5.9	3,230	200
아가 B656	41	8.5	13.0	391	6.2	3,937	243
아가 B659	32	11.0	8.0	351	6.8	6,451	399
아가 B664	33	8.0	11.5	288	6.3	3,380	209
아가 B666	40	11.0	13.0	386	6.2	3,208	198
아가 B688	38	11.5	12.5	513	7.4	4,402	272
아가 B689	40	9.5	13.5	338	6.4	4,598	284
아가 B691	32	8.5	10.5	354	7.3	5,181	320
아가 B693	29	9.0	10.0	321	5.8	4,574	283
아가 B696	45	12.5	13.5	363	6.9	5,370	332
아가 B697	41	10.0	13.0	376	7.4	4,300	266
아가 B699	45	10.0	14.0	382	7.7	6,556	405
아가 B702	38	11.0	10.5	412	6.3	4,748	294
아가 B703	41	11.0	11.5	490	6.7	5,567	344
아가 B704	34	10.0	10.5	458	6.7	3,246	201
평균	36	9.9	11.8	353	6.9	4,717	292
풍산나물콩	48	7.0	15.0	222	13.5	1,617	100
태광콩	40	7.0	13.5	129	26.5	1,907	118

비고: 표의 번잡성을 피하기 위해 DMRT 분석결과의 표시는 생략하였음.

**아가5호 선발:** 아가B560은 농업적 특성이 아가4호와 비슷하였으나 isoflavone 함량이 아가4호에 비하여 80% 내외로 더 높아 지금까지 육성된 어느 흑색종피 계통보다도 더 높아 “아가5호”로 명명하고 2009년도에 품종보호출원 하였음.

### 3) 3년차 아가3, 4호 NILs 선발 집단의 육성

2년차에 아가3, 4호 NILs에서 isoflavone의 type 중 daizein(-in)과 genistein(-in)의 함량이 높았던 계통들을 선발하여 3년차에 농업적 특성을 검정함과 아울러 isoflavone을 정밀 검정하여 종피색별로 daidzein(-in)과 genistein(-in) 함량이 높은

우량한 계통을 1개씩 선발하여 각각 아가7, 8, 9, 10호로 명명하고 2010년 품종등록 출원을 하였다. 출원한 품종들의 주요 특성과 isoflavone 함량을 보면 표 13과 같다.

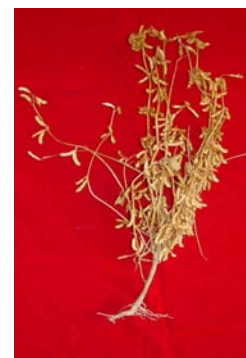
표 13. Daidzein(-in)과 genistein(-in) 함량을 중심으로 최종 선발된 4개 계통에 대한 농업적 특성과 isoflavone의 함량.

계통명	개화 일수	생육 일수	꽃색	경장 (cm)	분지수	주경 절수	협수	백립중 (g)	종피색	제색	Isoflavones( $\mu\text{g/g}$ )		
											Total	A $\omega$	B $\omega$
아가7	65	136	자	63	8	19	347	5.5	황	갈	15,634	6,713	7,923
아가8	62	135	자	92	7	21	197	4.9	황	회	13,394	5,530	8,013
아가9	59	126	자	71	6	14	119	6.2	흑	흑	7,156	2,593	4,075
아가10	59	126	자	76	6	15	134	6.1	흑	흑	7,095	2,498	4,105
풍산 나물콩	62	131	자	77	5	17	85	10.3	황	갈	3,812	1,420	2,284

A $\omega$ : Daidzein(-in)의 총함량, B $\omega$ : Genistein(-in)의 총함량.

라. 아가콩 Y집단에서 분리한 황갈모용 개체들에 대한 특성검정

1년차 아가콩 Y집단(회갈모용색에 황색 또는 황녹색 종피)의 F<sub>9</sub> 에서 분리를 보인 황갈모용색의 개체가 분리 되었는데, 분리된 107계통을 2년차에 계통 재배한 결과 그림 10에서 보인 것과 같이 동일 날짜에 파종되었으나 숙기가 빠르고 늦은 회갈 모용색 개체와 숙기가 빠른 황갈 모용색 개체로 분리되었다.



a. 만숙으로 회갈모용

b. 조숙으로 회갈모용

c. 조숙으로 황갈모용

그림 10. 황갈모용 집단에서 분리된 만숙 회갈모용, 조숙 회갈모용 및 조숙 황갈모용의 개체.

또한 이 집단은 그림 11에서 보인 바와 같이 다양한 종피색의 분리를 보였는데, 이들 계통들은 예외없이 상당히 높은 isoflavone의 함량을 보였다. 전기한 대로 흑색 종피종은 일반적으로 황색 또는 황녹색 종피종에 비하여 isoflavone의 함량이 상대적으로 낮다. 이는 phenylalanine으로부터 흑색 종피의 안토시아닌까지의 합성경로 상에서 isoflavone의 주 성분인 daidzein이나 genistein과는 상이한 경로에 의해 합성되어지기 때문이다.



그림 11. 황갈모용 집단에서 분리한 다양한 립색의 종자

(A: 아가 Y519 , B:아가 Y519 모용회갈 녹색종피, C:아가 Y519 모용회갈 갈색종피, D:아가 Y519 모용황갈 녹색종피, E:아가 Y519 모용황갈 밝은갈색종피, F:아가 Y519 모용황갈 흑색종피).

그런데 분리개체들 중 흑색종피색을 보이는 개체들을 모은 계통집단(Y집단으로 명명)의 isoflavone 함량은 그림 11과 표 14에서 보인 바와 같이 집단육종법에 의해 육성된 흑색종피 계통들 보다 훨씬 높은 isoflavone의 함량을 보였다. 그림에서 보인 바와 같이 Z집단의 isoflavone 함량은 집단육종법에 의해 육성된 Z집단의 평균 isoflavone 함량이  $4,444 \pm 38.4$ 이고, 최고의 isoflavone 함량을 보인 계통의 isoflavone 함량이  $10,835\mu\text{g/g}$ 인데 비하여 Y집단의 isoflavone 함량은  $7,508 \pm 456.9$  이고 가장 높은 isoflavone의 함량을 보인 계통의 isoflavone 함량은  $15,000\mu\text{g/g}$ 나 되었다. 아마도 이는 원집단인 X집단이 계통육종법을 통해 후대의 매 세대마다 isoflavone 함량을 검정하여 isoflavone 함량이 일정 이상인 계통을 선발하였기 때문으로 생각되어 졌다.

Isoflavone의 함량은 양적형질로서 재배년도, 지역 및 재배환경의 영향을 많이 받는 것으로 알려져 있다. 이들 계통들에 대한 농업적 특성과 아울러 isoflavone의 함량은 계속하여 정밀 검



정코자 한다. 왜냐하면 선발된 이들 계통들은 흑색 종피종으로서 지금까지 보고된 어느 흑색 품종이나 계통들 보다 아주 높은 isoflavone의 함량을 보이고 있기 때문에 앞으로 고 기능성의 콩 품종육성에는 매우 중요한 모본으로 이용가치가 높을 것이기 때문이다. 또한 흑색 종피가 갖는 기능성에 더하여 isoflavone의 함량이 이 정도 높은 경우 다양한 기능성 식품이나 약리성을 전제로 하는 건강 보조 식품의 좋은 소재로 이용될 수 있을 것으로 생각되기 때문이다.

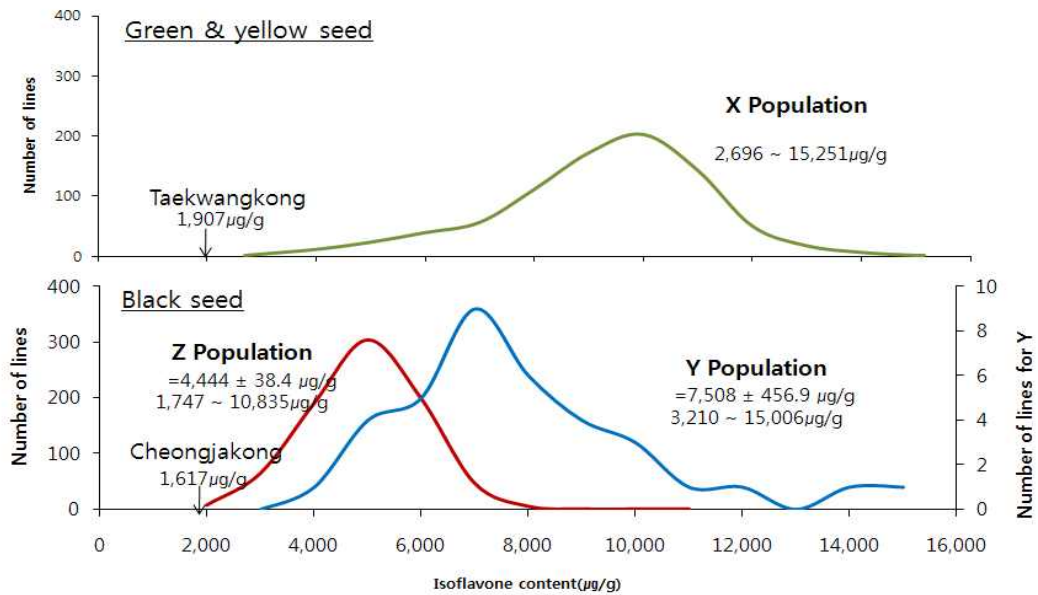


그림 12. 아가콩 3집단: 계통육종법에 육성된 녹,황색종피집단(X), 집단육종법에 의해 육성된 흑색종피 집단(Z) 및 X집단에서 분리한 흑색종피집단(Y)의 isoflavone별 계통분포.

### 3. 시험결과 요약

제1 세부과제, 내도복 다수성 고 기능성 콩 품종육성 주요 목표는 총괄책임자가 육성한 아가콩 집단을 이용하여 집단 중에서 기 품종으로 등록된 아가 3, 4호가 가지고 있는 농가재배 시의 결점을 보완하고, 집단의 계통을 이용하여 보다 우수한 품종으로 육성하는 것이었다. 이를 위해 아가콩의 계통간, 아가콩과 소립 나물콩 및 장콩용의 우수 품종과의 인공교잡을 통해 장기적으로 보다 이용가치가 큰 품종을 육성하는 것과 특성검정이 이루어지지 않은 2,000여 아가콩 집단에 대한 연구를 통해 바로 품종으로 육성할 수 있는 연구를 수행하는 것이었다. 3개년간 수행한 품종 육성의 결과를 요약하면 아래와 같다.

- 아가콩의 결점보완을 보완하고, 보다 이용가치가 있는 기능성의 콩 신품종 육성을 위해 2개년간 23조합을 인공교배하였으며 이들 조합들은 현재 SSD 방법 등



을 이용하여 세대진전중에 있다.

- 아가3, 4호 NILs 2,000 계통들을 이용하여 3개년간 isoflavone 함량과 농업적 특성을 검정을 실시하여 우량한 계통을 선발하였는데, 최종적으로 의미있는 6개의 우량한 계통을 선발하여 2009년에 2계통을, 2010년에 4계통, 총 6개의 계통을 품종등록을 위한 “품종보호출원”을 하였다.
- 출원한 계통 중 아가5호는 흑색종피로서 isoflavone이 가장 높은 계통이고, 아가 6호는 아가3호에 비해 도복 정향성이 높고, 다수성이며 아가 7호와 9호는 각각 황색 종피종과 흑색종피종으로서 daidzein(-in)의 총량이 높고, 아가 8호와 아가 10호는 각각 황색 종피종과 흑색종피종으로서 genistein(-in)의 총량이 높은 품종들로 이들 함량은 세계 최고의 함량으로 평가된다.
- 아가콩 Y집단(황색 또는 황녹색 종피)에서 분리한 황갈모용 개체들에 대한 특성 검정을 실시한 결과 종피색이 흑색인 계통들은 집단육종법에 의해 육성된 계통들에 비해 isoflavone의 함량이 세계 최고의 isoflavone의 함량을 가진 황색종피종들과 같은 정도로 매우 높았는데, 이는 이들 계통들이 후세대의 매 세대마다 isoflavone의 함량을 검정하면서 선발된 계통육종법에 의해 육성된 집단에서 종피 역돌연변이에 의한 계통들이기 때문으로 생각된다. 수년 내에 이들 계통집단에서 조생이면서 일반 흑색 종피종에 비해 isoflavone의 함량이 10배가까운 고기능성의 계통이 선발이 가능하리라고 기대된다.

## (시험 2) 아가콩을 이용한 기능성 제품 산업화(위탁-정연신:소이벤처)

### ■ 제1제품개발: Isoflavone(Pterocarpan, Glyceollin)를 이용한 제품개발

#### 가. Isoflavone 및 pterocarpan의 생합성 증대

□ 미생물 및 외부환경의 변화를 통한 isoflavone 및 pterocarpan함량의 증대

##### 1) 시험방법

###### 가) 실험 재료

본 실험에 사용한 콩은 소이벤처(주)에서 품종육종한 아가3호 콩을 4℃ 냉장고에서 보관하면서, 실험 시 70%-ethanol로 2회 표면 세척하여 사용하였다.

###### 나) 균배양

균배양 실험에 사용된 균주는 한국미생물보존센터에서 분양받은 균주를 계대 배양하여 사용하였다. 실험에 사용된 균주 및 배지의 조성은 table 1에 나타내었다.

Table 1. Culture media for elicitation of aga-kong

Species	Media Componets (g/100mL)
<i>Aspergillus sojae</i>	Potato dextrose agar(DIFCO 213400), pH 5.6- potato starch (4.0), Dextrose(20.0), Agar(15.0)
<i>Monascus pilusus</i>	Potato dextrose agar(DIFCO 213400), pH 5.6-Approximate formula(4.0), potato starch (20.0), Dextrose(15.0), Agar(15.0)

다) 균주, 온도, pH 및 첨가물에 대한 isoflavones 함량 변화

고함량의 isoflavone 및 pterocarpan 생성을 위한 미생물 균주의 영향을 측정하기 위하여, 균주, 온도, pH 및 첨가물에 따른 isoflavone 함량을 HPLC로 측정하였다. *Aspergillus sojae* 및 *Monasocus pilu*는 배양 5일 후 포자를 수확하여 15mL 멸균된 증류수에  $1.0 \sim 3.0 \times 10^5$ 을 이용하였다.

라) Isoflavonoid 함량분석

미생물처리 3일 후 시료를 110°C dry oven에서 6시간 건조한 후, 200mesh로 마쇄한 후 0.2g 을 용매 10mL과 함께 voltex에서 1분 정도 완전히 용해하였다. 그 후 초음파세척기에서 50°C, 1시간 추출한 후, 50°C shacking incubator에서 15시간, 150rpm으로 한번더 진탕 추출하였다. 그 후 실온에서 1시간 정도 방냉한 후 4°C, 3000rpm 원심분리하여 상층액을 0.45µm syringe filter로 여과한 것을 HPLC 시료로 이용하였다.

HPLC는 Perkinelmer series 200을 이용하여, isoflavon 및 pterocarpna을 260nm에서 분석하였다. 분석에 이용한 column은 Browlee choic C18 (150\*4.6mm) reverse-phase column, injection volume은 10µl, 유속은 1.0mL/min으로 분석하였다. HPLC 용매 및 분석조건은 Table 2 와 같은 조건에서 실시하였다.

Table 2. Specifications and operating conditions for HPLC analysis.

Items	Conditions
Instrument	PerkinElmer series 200 / (Browlee choic C18 150*4.6mm) : catalog # N9303628
Mobile phase	A: acetonitrile, B: HPLC water(0.1% acetic acid), (A: 0→45% (10.2min), 45→90% (6min), 90% (3min), 90%(3.6min), 90→0%(15min), 0% (10min)
Flow rate	1.0mL/min
Colum temp	30°C
Injection volume	10µl
UV detector	260nm

□ 콩속에 함유된 미량의 pterocarpan 추출조건의 확립

가) 추출 용매에 대한 영향 검토

MtOH, EtOH 및 DMSO 등을 이용하여 각각의 용매 10mL과 분말시료 0.2g를 함께 추출한 후 추출액 상태의 isoflavones 및 pterocarpan의 양을 비교하였다.

나) prep. HPLC를 이용한 pterocarpan의 분리

HPLC의 조건을 이용하여 prep HPLC에서 순수한 pterocarpan을 분리하여 이들을 향후 pterocarpan의 함량 조사를 위한 정량샘플로 이용한다.

□ 이소플라본의 비배당체화 조건 확립

고함량의 비배당체 이소플라본의 생성을 위한 환경조건(물리적 스트레스와 균주의 복합적인 영향)을 규명하기 위하여, 조각난 침지 아가콩에 미생물 균주 배양액을 첨가하여 3일간, 25°C incubator에서 배양하며 비배당체 이소플라본의 함량을 측정하였다.

□ 아가콩 10Kg에서의 생산조건 확립

가) 실험 재료

본 실험에 사용한 콩은 2007년 경상북도 영주군 일대에서 계약 생산한 아가3호 콩을 원료로 사용하였으며, 사용전 4°C 냉장보관한 콩을 실험시 깨끗한 정류수를 사용하여 2회 표면 세척한 후 사용하였다.

나) 균 배양

미생물 균주는 1차년도에 사용한 균 중 효능이 뛰어난 *Aspergillus sojae* (한국 미생물보존센터 분양)을 배양배지[potato dextrose agar (DIFCO 213400), pH 5.6, potato starch (4.0), dextrose (20.0) 및 agar(15.0)]에서 배양하여 실험에 이용하였다.

다) 1년차에서 확립된 조건에서의 isoflavone함량 변화 및 분석

*Aspergillus sojae*는 배양 5일 후 포자를 수확하여 15mL 멸균된 증류수에  $1.0 \sim 3.0 \times 10^5$  으로 하여 사용하였으며, 온도는 25°C, pH는 중성, pinitol(0.01%)을 아가콩 3호(10Kg)에 처리하여 수행하였다. 이소플라본 및 글리세올린의 분석 조건은 HPLC(Perkine Elmer series 200)에서 분석하였다.

□ 이소플라본의 효과적인 추출

생합성 증대된 아가3호 콩가루를 동량의 hexane(3회 반복)을 사용하여, 콩오일을 제거한후 80% 에탄올을 이용하여 30%이상의 이소플라본 및 글리세올린이 함유된 콩분말을 획득하여 기능성 TEST에 이용하였다.

□ 기능성 성분(polyphenol)이 1~2%함유된 고기능성 콩가루의 제조

가) 시험목적

고기능성 물질인 이소플라본을 고함량 포함하고 있는 아가콩을 원료로 사용하여 이소플라본 이외의 대두의 기능성 물질인 글리세올린 등을 대량 함유할 수있는 고기능성 콩가루를 제조하여 이들을 활용한 고기능성 제품을 개발하고자 한다.

나) 실험 재료

본 실험에 사용한 원료로 아가콩(25Kg)을 원료로 사용하였으며, 냉장 보관된 아가콩의 2배에 해당하는 정류수를 이용하여 2회 표면 세척한 후 5kg 씩 나누어 5개의 트레이를 겹쳐서 생합성증대 시켰다.

다) 균 배양

미생물 균주는 *Aspergillus Sojae*를 이용하였다. *A. Sojae*의 배양배지로는 Potatato dextrose, Potato Starch, Dextrose, Agar를 이용하여 pH 5.6에서 배양한후 사용하였다.

□ 고함량 isoflavone 품종을 이용한 선행연구조건을 이용한 isoflavone함량의 극대화

1년차에 확립된 이소플라본의 비배당체화 조건을 바탕으로 용량을 증가한 5Kg 조건하에서 비배당체화 시험을 진행하였다

2) 시험결과

□ 미생물 및 외부환경의 변화를 통한 isoflavone 및 pterocarpin함량의 변화

가) 균주에 대한 영향

고함량 isoflavones 생성에 미치는 균주의 영향을 알아보기 위하여 배양된 균주를 멸균된 1차 증류수와 함께 분쇄 및 희석하여, 배양액의 0~2.0%의 구간으로 첨가하여 25°C incubator에 3일간 배양하였다. *Monascus sp* 구간의 일부 시료에서는 약하게 포자가 형성되었으며, 배양 3일까지는 악취 및 slime 생성이 거의 없었으며, HPLC 분석결과 isoflavone 함량이 *Monascus sp* 보다 *Aspergillus sojae*에서 증가하는 양상도 보였다. 결과는 Table 3과 같다.

Table 3. 균주에 의한 isoflavone의 함량 변화

	Daidzin (ppm)	Genistin (ppm)	A-daidzin (ppm)	M-genistin (ppm)	A-genistin (ppm)	Daidzein (ppm)	Genistein (ppm)	Total (ppm)
아가3	1,645	2,057	152	4,598	116	114	99	8,779
<b><i>A. sojae</i></b>	<b>1,823</b>	<b>2,205</b>	<b>120</b>	<b>5,423</b>	<b>205</b>	<b>323</b>	<b>450</b>	<b>10,549</b>
<i>Monascus sp.</i>	1,505	2,156	135	4,654	220	312	384	9,366

나) 첨가물에 대한 영향

온도(20~25℃) 및 pH(5~9)의 조건에서는 Isoflavone 및 phytoalexin 함량의 변화에 커다란 영향을 미치지 않았으며, 미생물 균주에 다양한 첨가물(CuCl<sub>2</sub>, glucose, tannic acid, pinitol, progesteron)의 첨가에 따라 함량을 증대시킬 수 있음을 확인했다.

총 isoflavone의 함량은 금속성 첨가물인 구리이온의 경우 6,403ppm으로 많이 감소하였고, progesteron이나 tannic acid은 아가3호 보다 별다른 영향을 보이지 않았으며, 단당류의 경우 20%이상의 함량증대 결과를 확인할 수 있었다. 특히 콩의 대표적 단당류인 **pinitol의 경우 30%내외의 함량 증대되어 고휘분대비 1.24%의 콩 분말 제품을 만들 수 있었다.**

Table. 4. A. sojae 에 첨가물의 첨가에 의한 isoflavone의 함량 변화

	Daidzin (ppm)	Genistin (ppm)	A-daidzin (ppm)	M-genistin (ppm)	A-genistin (ppm)	Daidzein (ppm)	Genistein (ppm)	Total (ppm)
아가3	1,645	2,057	152	4,598	116	114	99	8,779
glucose	2,207	2,750	845	4,575	310	252	273	11,212
tannic acid	1,843	2,419	809	4,445	363	220	216	10,315
<b>pinitol</b>	<b>2,186</b>	<b>2,241</b>	<b>1,190</b>	<b>5,772</b>	<b>379</b>	<b>355</b>	<b>280</b>	<b>12,403</b>
progesteron	1,902	2,475	1,277	3,806	382	204	316	10,362
CuCl <sub>2</sub>	1,208	1,574	820	1,965	351	143	342	6,403

□ 콩속에 함유된 미량의 pterocarpan 추출조건의 확립

80%에탄올 추출물을 evaporator를 이용하여 감압농축 한 후, 잔류물을 메탄올을 이용하여 녹인다. silica 60으로 채워진 open column 에서 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:CH<sub>3</sub>OH 의 비율을 증대시키면서 pterocarpan fraction을 분리하였다.

이 분획물을 감압농축한후 메탄올로 5%로 희석하여 prep. HPLC에서 분리정제하였으며,순수한 pterocarpan은 HPLC로 98% 이상의 순수한 pterocarpan을 Fig 1에서와 같이 확인 할 수 있었다.

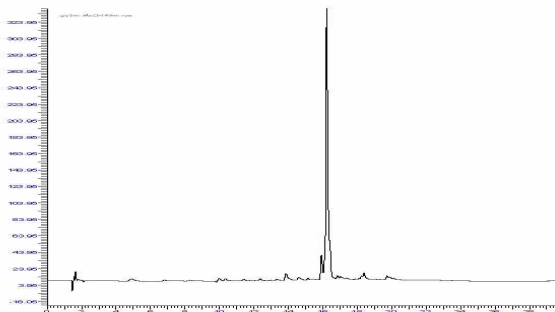


Fig. 1. Chromatogram of isolation pterocarpan.

□ 이소플라본의 비배당체화 조건 확립

기존의 산처리법, 효소처리법에 의한 비배당체화 방법과 다른 개념의 조각넨 콩의 Broth(콩:물=1:5)조건에서 aglycone isoflavone의 전환과 동시에 전체 isoflavone의 함량 증대 시켰다.

Fig 2.에서 보는바와 같이 3일 처리후 95% 이상의 비배당체 이소플라본의 생성을 확인할 수 있었다. 비배당체의 함량이 ~9,000ppm(genistein+daidzein)을 나타내며, 이는 콩에 함유되어있는 배당체형으로 계산할 경우  $9,000 \times 1.6 = 14,400\text{ppm}$ 의 양을 나타낸다.

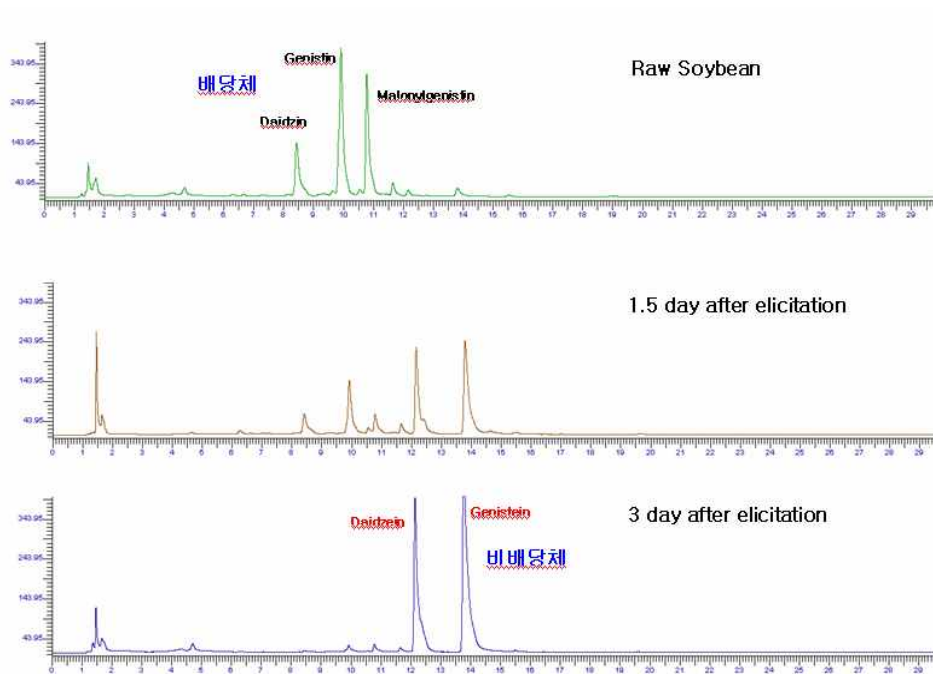


Fig 2. 아가3호의 배당체 및 비배당체 전환 정도

□ 아가콩 10Kg에서의 생산조건 확립

아가콩 10Kg에 aspergillus sojae (100g, 1%), pintol(1g, 0.01%)을 사용하여 25℃의 암조건에서 반응하여 10,000~12,000ppm의 범위 내에서 이소플라본 및 글리세올린 함량을 획득할수 있었다. 전체 공정 및 생합성 증대된 이소플라본의 함량은 HPLC에서 쉽게 확인할 수 있었다.

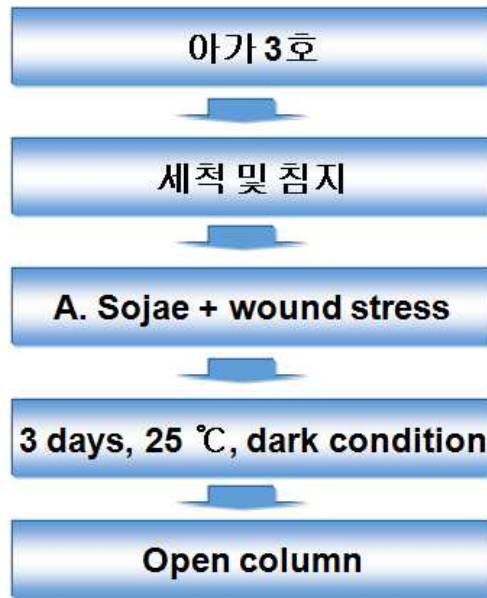


그림3. 생합성 증대 및 분리를 위한 전체 공정도

표1. 개질된 아가콩에서 이소플라본 및 글리세올린 함량

Run	Daidzin	Genistin	M-daidzin	M-Genistin	Daidzein	Genistein	Glyceollin	Total
1	2,250	2,190	1,598	5,240	240	119	1,215	12,852
2	1,850	2,524	1,850	4,120	304	257	1,454	12,359
3	1,650	2,105	1,751	5,076	240	352	1,264	12,438

아가콩 10Kg을 사용한 개질 실험에서 1년차의 조건에서와 별다른 차이를 보이지 않으며, 이소플라본의 함량은 10,000ppm이상으로 획득할 수 있었으며, 또한 285nm 측정에 의한 글리세올린의 함량을 첨가할 경우 12,000ppm이상의 고함량의 폴리페놀을 함유한 콩가루 분말을 쉽게 획득할 수 있었다.

□ 이소플라본의 효과적인 추출

1년차와 마찬가지로 10Kg의 아가콩을 이용한 시료에서도 효과적으로 이소플라본을 추출할수 있었으며, 대량의 추출에 의한 콩오일을 문제를 해결하기 위해 10L의 헥산을 3회 반복하여 콩오일을 제거한 후 80% 주정을 사용하여 효과적으로 30% 이상의 이소플라본 함유 분말을 얻을 수 있었다.

## □ 기능성 성분이 포함된 고기능성 콩가루 제조

A. *sojae*는 배양 5일 후 포자를 수확하여 20mL 멸균된 증류수에  $5 \times 10^5$  으로 하여 중국산 소립콩(5Kg) 대비 1%(50g, w/w)사용하였으며, 온도는 20°C, pH는 중성, 3일간 암조건에서 3일간 배양하여 생합성 증대시켰다. 이들 양산화 된 콩분말의 경우 글리세올린 5,000~10,000ppm 및 이소플라본(8,000ppm내외)을 확인할 수 있었다.

대량생산을 위하여 각 tray를 10cm간격으로 띄운후 겹쳐서 공기가 순환이 되는 배양기에서 배양하였으며, 3일 후 중간에 있는 트레이에서 약간의 부패성 보여서, 차후 양산 공장 설계에 있어서 공기 순환이 확실히 요구되는 설계가 요구됨을 확인하였다.

## □ 고함량 isoflavone 품종을 이용한 선행연구조건을 이용한 isoflavone함량의 극대화

기존 실험 조건에서 같이 5Kg을 사용한 경우에도 배당체가 떨어진 비배당체인 genistein 및 daidzein이 ~14,000ppm내외로 얻어졌으며, 또한 이소플라본 및 ptercarpan을 모두 함유한 시료의 경우 column chromatography를 이용하여 메탄올에서 추출된 추출물을 디클로메탄: 메탄올 = 80:20 의 전개 용액을 사용하여 손쉽게 분리할 수 있었다.

### 나. Ptercarpan의 미백기능성 검증

#### 1) 시험방법

#### 가) 실험의 재료

생합성 증대된 아가콩의 추출물을 open column에서 순수한 글리세올린을 분리하여 시료로 이용하였다.

#### 나) B16F10 melanoma세포배양 및 세포독성 측정

B16 세포주는 10% FBS, 2mM l-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100mg/ml streptomycin이 함유된 DMEM 배지에서 37°C CO<sub>2</sub>배양기에서 배양하였으며, 세포독성은 MTT법 [96 웰에 세포 ( $5 \times 10^3$  cells/well)를 주입한 후 시료를 농도별로 처리하여 24시간 배양하고 MTT시약 (1mg/ml)을 넣고 반응시킨후 formazan이 형성된 것을 DMSO에 넣어 녹여서 570nm에서 흡광도 측정]을 이용하였다.

#### 다) 티노신나제 활성도 측정

실험 조건에서 반응이 끝난 각 웰의 세포를 원심분하여 세포주의 침전물을 생성시킨 후, 100 mM sodium phosphate가 함유된 100ul 1% triton X-100을 처리한다. 4°C에서 세포를 분쇄한 후 원심분리후 상층액을 취하여 1ul 단백질 정량을 한후, 나머지 상층액을 효소액으로 이용하였다. 100 mM sodium phosphate용액 100ul에 시료인 효소 용액 50 ul을 가하고 L-DOPA (2mg/ml) 50 ul를 첨가하여 37°C에서 1시간 반응시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하여 tyrosinase활동도를 측정하였다.



#### 라) 멜라닌 함량 분석

원심분리된 상층액을 모아 extracellular melanin 양을 측정하고, 세포를 PBS로 2회 세척한 후 원심분리하여 세포 침전물을 만든다. 1N NaOH 용액을 100ul 첨가하여 100℃에서 1시간 용해하여 405nm에서 흡광도를 측정하여 합성멜라닌을 사용한 표준 멜라닌 직선을 구하고, 실험군의 멜라닌 양을 대조군의 멜라닌 함량에 대한 백분율로 계산하였다.

#### 마) 2.7 Western blot 분석

B16 멜라노마 세포를 60 mm dish에  $3 \times 10^5$ 을 준비한 후, 24 시간 동안 37 °C 항온기에서 배양하고, 글리세올린을 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10 uM 농도로 처리 후, 멜라닌 생합성 유도물질인 -MSH 10 nM을 처리하였다. 40 시간 동안 37 °C 항온기에서 배양하였으며, 이렇게 배양된 세포는 배지를 제거하고, PBS(potassium phosphate-buffered saline)를 첨가하여 세척 후, Cell lysis buffer를 이용하여 용해한 후, 원심분리하였다. 여기서 얻은 상층액 단백질을 이용하여 8% SDS-PAGE로 전기영동하고, 이를 20% methanol, 25 mM Tris, and 192 mM glycine buffer에서 nitrocellulose membrane에 이전시켰다. 각각의 단백질 시료를 정량하여 30 g씩을 SDS sample loading buffer (60 mM Tris-HCl, pH 6.8, 25% glycerol, 2% SDS, 14.4 mM -mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue)와 같이 5분간 100 °C에서 반응시킨 후, SDS-polyacrylamide gel에 전기영동 하였다. 이를 nitrocellulose membrane에 transfer한 후에 Ponceau S로 염색하여 확인한 다음 membrane을 5% non-fat dry milk/TBS-T (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20) buffer로 1시간 동안 blocking한 후 항체에 반응시켰다. 1차 항체는 5% non-fat dry milk/TBS-T에 1:1000으로 희석하여 4 °C, 16시간 동안 반응시켰다. TBS-T 용액으로 세척하고, 2차 항체로는 horse radish peroxidase가 결합된 anti-mouse, anti-rabbit IgG를 5% non-fat dry milk/TBS-T 용액에 희석하여 (1:1000), 상온에서 2시간 반응시켰다. 그 후, membrane을 TBS-T로 세 번 세척하고 ECL system (KPL Inc., Gaithersburg, MD)을 사용하여 반응 시킨 후 X-ray 필름으로 현상하였다. 사용된 1차 항체는 anti-tyrosinase, anti-TRP-1, anti-TRP-2, anti-actin 등 이다. Actin은 protein loading의 control로 사용하였다.

#### 바) RT-PCR (Semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction)

B16 멜라노마 세포로부터 easy-BLUE total RNA extraction kit (iNtRON, Biotechnology, Sungnam, Korea)를 이용하여 전체 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA를 260 nm에서 흡광도를 측정하여, 정량 하였다. 정량한 RNA를 2.5 μM oligo-dT primers, 1 mM dNTPs, and Moloney murine leukemia virus (MMLV) reverse transcriptase (Promega, Madison, WI)를 이용해 역전사하여 cDNA를 만들고, 이것을 Super-Therm DNA polymerase (SR Product, Kent, United Kingdom)

를 사용하여 polymerase chain reaction (PCR)반응을 통해 증폭시켰다. 실험에 사용된 RNA양이 동일한지 확인하기 위해  $\beta$ -actin을 인식하는 primer를 사용하여 같은 실험을 하였다. 최종 PCR한 시료를 1.5% agarose gel에 전기 영동 하였다. 실험에 사용된 primer는 tyrosinase이며, 반응 조건은 94 °C 30초, 55 °C 30초, 72 °C 30초, 25 cycle이다.

(5'-GGCCAGCTTTCAGGCAGAGGT-3', 5'-TGGTGCATGGGCAAAATC-3'),  
TRP-1

(5'-GCTGCAGGAGCCTTCTTTCTC-3', 5'-AAGACGCTGCACTGCTGGTCT),  
TRP-2

( 5 ' - G G A T G A C C G T G A G C A A T G G C C - 3 ' ,  
5'-CGGTTGTGACCAATGGGTGGTGCC-3'),

$\beta$ -actin (5'-TTCTTCGTTGCCGGTCCACA-3', 5'-GGTCTCCGGAGTCCATCA  
CA-3')

## 2) 시험결과

미백 메카니즘은 아래와 같다.

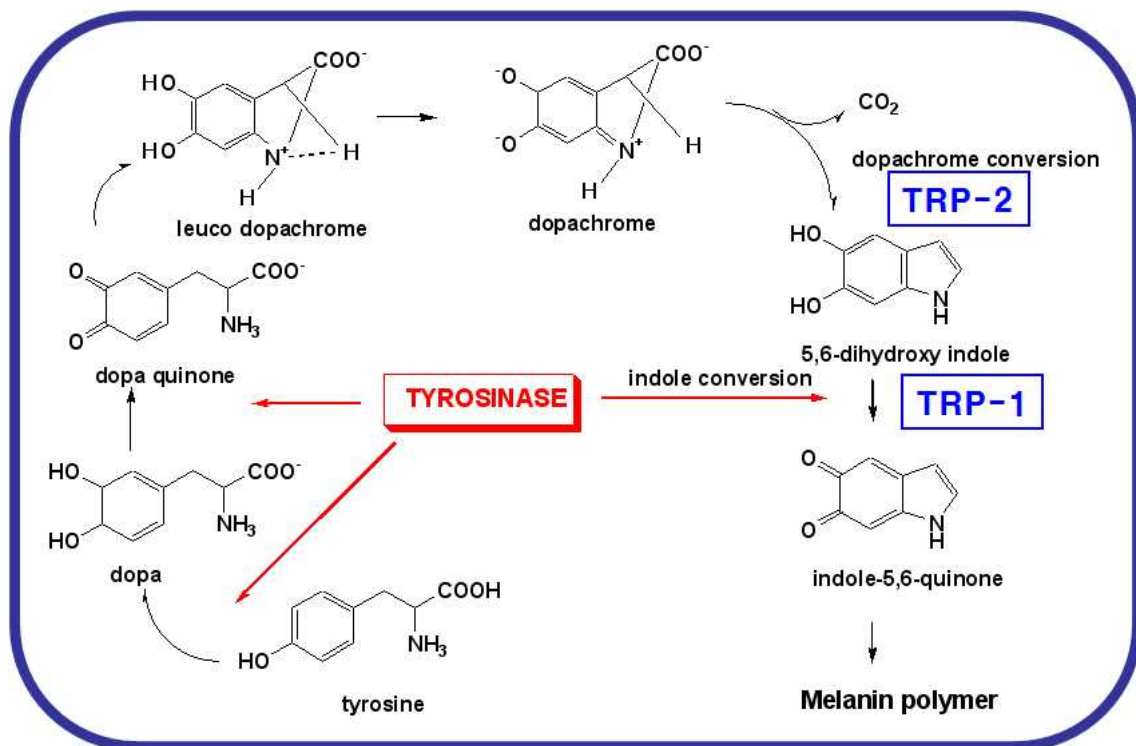


그림4. 미백 mechanism.

위의 메카니즘에서 보는 바와 같이 멜라닌 생성기작 중에서 tyrosinase, TRP-1, 및 TRP-2의 효소가 멜라닌 생성에 주요한 효소를 작용하고 있으며, 이들을 억제하는 물질을 탐색하여 새로운 기능성 미백 화장품의 개발이 가능하다.

가) 세포생존율 및 tyrosinase활성 측정

글리세올린에 의한 B16의 세포독성은 50 $\mu$ M까지 농도를 처리하였을때, 별다른 세포독성을 나타내지 않았다.

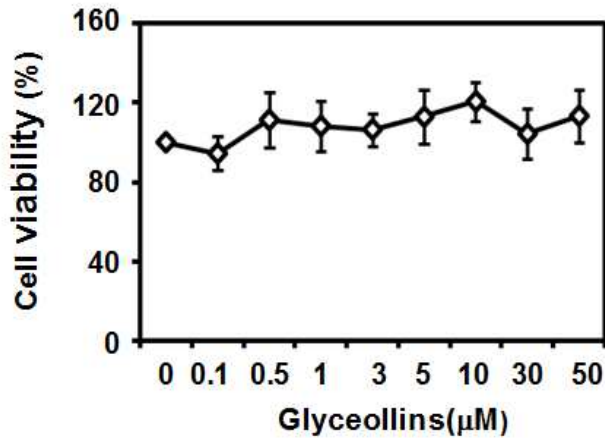


그림 5. 글리세올린 농도 처리에 의한 세포 viability 측정

티로신나제는 티로신을 DOPA로 전환시키는 tyrosine hydroxylase와 DOPA quinone으로 전환시키는 DOPA oxidase로서 처음의 멜라닌 합성의 두단계에 관여하는 효소이다. 글리세올린이 티로신나제활성에 미치는 영향을 검증하기 위해  $\alpha$ -MSH(10nM)을 처리한 B16세포에 농도별로 처리한후 48시간 배양후 티로신나제 활성도를 측정하여, 농도 의존적으로 유의적으로 감소함을 확인하였다.

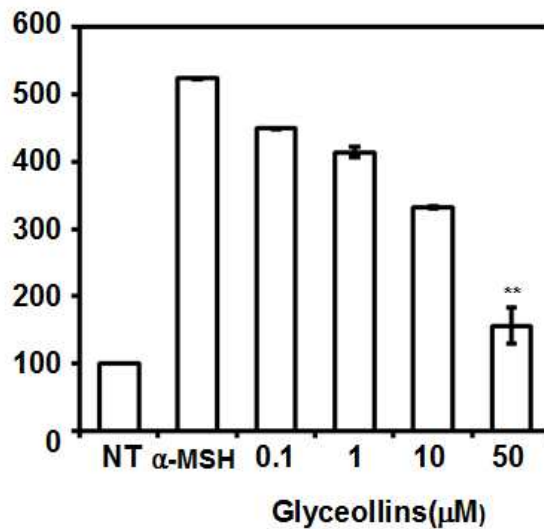
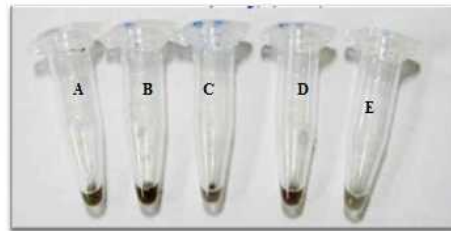


그림 6. 글리세올린에 대한 tyrosinase activity 감소 효과

나) 멜라닌 색소 침착 억제



A: no treat  
 B:  $\alpha$ -MSH 10nM  
 C:  $\alpha$ -MSH10nM+ Glyceollins 10uM  
 D:  $\alpha$ -MSH+ DMSO  
 E: Glyceollins 10uM

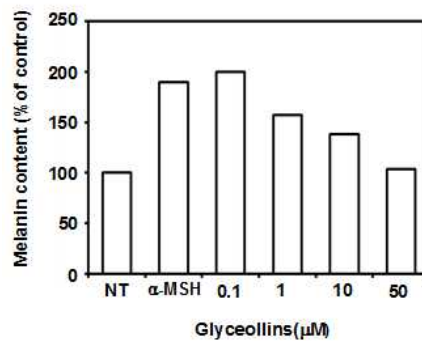


그림 7. Glyceollin 처리에 의한 melanin 함량의 변이

멜라닌 색소 침착은 B16세포에서  $\alpha$ -MSH 처리유무에 따른 글리세올린 처리에 의한 세포 침전물을 육안으로 관찰 하였으며, 대조군에 비해 글리세올린 처리군에서 멜라닌 색소 침착이 감소됨을 확인할 수 있었다. NaOH처리에 의한 멜라닌의 함량을 405nm의 흡광도를 측정하여 멜라닌의 함량이 글리세올린에 대하여 농도의존적으로 감소함을 확인 할 수 있었다.

다) 글리세올린의 Tyrosinase, TRP-1, 및 TRP-2 단백질 발현 저해 효과

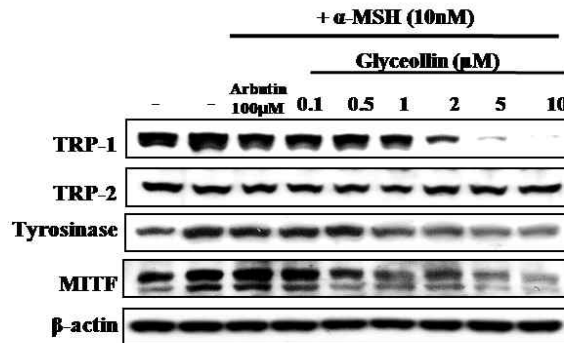
세포 내 tyrosinase 저해 실험의 결과로 글리세올린은 세포 내 tyrosinase활성을 저해하여 melanin생성을 감소시켰다. 이러한 결과가 멜라닌 생성에 관련된 단백질 발현과도 연관성이 있는지를 확인하기 위해 tyrosinase, TRP-1, 및 TRP-2의 발현 변화를 western blot을 이용하여 조사하였다. 글리세올린은 tyrosinase, TRP-1의 발현을 저해하는 것으로 나타났으며 TRP-2의 발현에는 영향을 미치지 않았다.

아래 figure에서 보듯이 글리세올린 10uM 농도에서 tyrosinase 발현을 55%, TRP-1 발현을 95%, 저해하는 것으로 나타났다. 이 결과에서 글리세올린이 tyrosinase 단백질 발현 양을 직접적으로 감소시킴으로써 세포수준에서의 tyrosinase 활성을 감소시키면서 멜라닌 생성을 저해시키며 동시에 멜라닌 생성에

관여하는 단백질인 TRP-1의 발현을 효과적으로 억제하는 것으로 나타났다.

라) 글리세올린의 Tyrosinase, TRP-1, 및 TRP-2 mRNA 발현 저해 효과

**A.**



**B.**

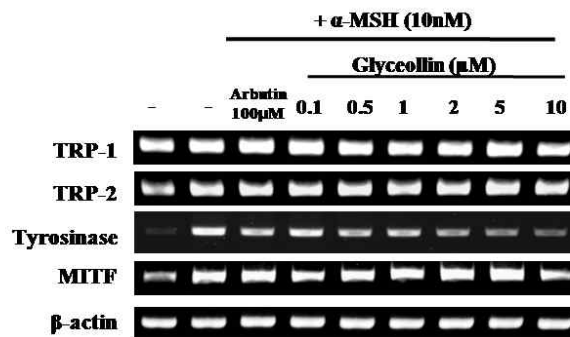


그림 8. B16 Cell 라인에서 tyrosinase, TRP-1, 및 TRP-2에 대한 글리세올린의 A) 단백질발현 및 B) RNA발현 억제

글리세올린이 멜라닌 생합성에 관여하는 유전자의 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다. B16 멜라닌 세포에 글리세올린을 농도별로 처리하고 24시간 동안 배양한 뒤 RNA를 채취하여 실험을 시행하였다. 실험 결과 그림 8에서 보듯이 글리세올린은 tyrosinase의 유전자의 발현을 저해하는 것으로 나타나지만, TRP-1, TRP-2의 유전자발현에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 아래 figure에서 보듯이 글리세올린 10 $\mu$ M 농도에서 tyrosinase 발현을 75% 억제하는 것으로 보여진다. 이상의 결과는 글리세올린이 tyrosinase의 유전자를 직접적으로 억제함으로써 단백질 발현 및 효소활성에까지 영향을 미침으로써 효과적으로 세포 미백효과를 나타내는 것으로 보여진다. 반면, TRP-1의 경우에는 유전자는 직접적으로 저해하지 않으나 단백질의 발현은 효과적으로 억제하였으므로, 글리세올린은 TRP-1 단백질의 post-translational modification 단계에서 작용하는지의 여부를 확인해볼 필요가 있다고 사료된다.

다. Ptercarpan을 이용한 제품화 (사진)



아가콩 추출물을 함유한 기능성 화장품



글리세올린을 함유한 치약 및 가글

라. 제품개발 요약

- 아가콩 3호를 이용한 미생물(*Aspergillus sojae*)을 이용한 경우 이소플라본을 ~10,500ppm 까지 증대시켰으며, 첨가제(피니톨)를 사용한 경우 ~12,500ppm 정도로 30%이상의 이소플라본 증대조건을 확립하였다.
- 특히 배당체 이소플라본을 비배당체 이소플라본으로 전환하는 실험을 통하여, genistein 및 daidzein의 함량을 9,000ppm까지 증대 시켰으며 이는 배당체로 환산할 경우 14,400ppm이 되는 높은 함량 증대효과를 거두었으며, 이는 생체 흡수율을 고려하면 엄청난 효과를 거둘수 있다.
- 스트레스 조건하에서 daidzein의 이차대사 산물인 pterocarpan을 prep LC 및 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 순수하게 분리하였다.
- 위에 얻어진 pterocarpan의 다양한 활용도를 찾는 목적으로 이들의 미백 기능성을 확인하였으며 향후 이를 이용한 다양한 기능성 화장품제조에 이용할 것이다.

## ■ 제 2 제품개발: 아가콩을 이용한 기능성 음료의 개발

콩은 우수한 단백질과 지질이 풍부하여, 인류 역사상 오래전부터 이용되어 온 식품으로 최근 항암, 콜레스테롤 저하, 심장병 위험감소 및 당뇨병 예방 등 인체에 유익한 생리활성이 보고되면서 건강식품으로 주목받고 있다. 콩이 함유하고 있는 생리활성물질로는 isoflavones, saponins, trypsin inhibitors, peptides, oligosaccharides, phytic acids, 인지질 및 식이섬유 등이 알려져 있으며, 그 중에서도 여성호르몬 estrogen과 구조적으로 유사한 isoflavone에 대한 관심이 집중되고 있다.

아가콩과 아가콩 청국장에 대한 암예방능 실험결과, 모·부분인 은하콩과 KLG10084에 비해 QR 효소 유도능, 항산화능이 유의하게 높은 것으로 나타났으며, 특히 아가콩청국장은 일반청국장과 서구의 대표적인 암예방 식품인 브로콜리에 비해 QR 효소유도능과 항산화능에서 유의하게 높은 생리활성을 보여 기능성 식품으로서 아가콩의 가능성을 확인한 바 있다.

최근 소비자들은 비타민 타블렛, 면역기능개선 과립, 다이어트 개선 캡셀 등과 같이 식품의 유용성분을 편리하게 이용할 수 있도록 한 건강기능식품에 대한 수요가 급격히 증가하고 있으며, 콩의 유효성분을 이용한 제품의 개발 및 소비자 수요도 계속적인 증가추세로 국산콩의 경쟁력 제고, 소비자 니즈 만족, 국내 콩 산업 발전 등을 위해 우수한 기능성 콩 가공제품의 개발이 필요한 실정이다. 실제 일본의 대부분 기능성 음료에는 콩 isoflavone이 첨가되고 있다.

따라서, 본 연구에서는 선행연구결과 유효성분이 매우 높은 것으로 확인된 바 있는 아가콩을 이용하여, 소비자들이 편리하게 섭취할 수 있는 기능성 콩 음료를 개발하고자 하였다.

### 1. 시험방법

#### 가. 실험재료

본 실험에 사용된 아가콩은 (주)소이벤처에서 제공받아 시료로 사용하였으며, 노란콩은 강원도 양구산, 검정콩은 전남 장흥산을 구입하여 실험에 이용하였다.

#### 나. 색도

색도는 색차계(Colori-meter JC 801S, Japan)를 이용하여 L, a, b 값을 측정하였다. 콩 분말의 색도는 실험실용 믹서기(Warning 7010, Germany)에서 3분간 분쇄 후 일회용 투명 페트리디쉬에 담아 측정하였으며, 추출물의 색도는 석영셀에 적량을 담은 후 값을 측정하였다.

#### 다. pH 측정

추출액의 pH는 상온에서 pH 측정기(Sartorius Docu-pH, Germany)를 사용하여 측

정하였다.

라. 당도 측정

추출물의 당도는 Atago 굴절계를 이용하여 측정하였다.

마. Isoflavone 분석

시료 1g에 1M HCl 3ml를 첨가하여 2시간 동안 98℃의 항온수조에서 180 rpm의 교반조건으로 가열하였다. 냉각 후 methanol 3ml를 첨가하여 완전히 교반한 다음 3,200 rpm에서 30분간 원심분리하여 상등액을 취하고, 0.2 µm syringe filter로 여과한 뒤 여액을 HPLC를 이용하여 표 1과 같은 조건으로 분석하여 총 isoflavone 함량을 구하였다.

Table 1. Instrumental conditions for isoflavone analysis by HPLC

Items	Conditions
Instrument	Perkin Elmer Series 200
Column	C18(150×4.6mm)
Detector	UV/VIS Series 200(254nm)
Mobile phase	ACN:CH <sub>3</sub> COOH 1% in D.W = 30:70
Flow rate	0.7ml/min
Sample injection volume	20µl

바. 볶음조건

아가콩은 (주)천보내츄얼푸드의 상업용 큰 무쇠솥을 이용하여 볶음조건에 따라 250℃에서 20, 25, 30분간 볶음처리를 하였다.

사. 중량감소율

볶음 아가콩의 중량감소율은 볶음온도 250℃, 볶음시간 20, 25, 30min으로 다르게 처리한 시료의 전후 중량차이를 구하여 중량감소율로 표시하였다.

아. 열수추출 실험계획

볶음 아가콩의 열수추출조건 설정을 위해 반응표면분석법(response surface methodology, RSM)을 사용하였으며, 추출조건에 대한 실험계획은 중심합성계획을 실시하여 추출시 중요한 독립변수로 고려되는 인자로서 추출온도(X1), 추출시간(X2)에 대한 실험범위를 설정하여 각각을 5단계로 부호화하였으며, 중심합성계획



에 따라 10구간으로 설정하여 추출실험을 행하였다(Table 2). 추출물의 품질인자로서 관능적 특성은 색(Y1), 향(Y2), 맛(Y3), 후미(Y4), 전반적 기호도(Y5)에 대하여 조사하였으며, 유효성분으로서 이소플라본 함량(Y6)을 측정하여 그 값을 회귀분석에 사용하였다. 추출물의 용매비는 예비실험을 통하여 1g당 100ml의 용매비로 고정하여 추출을 실시하였으며, 본 추출실험에서는 시료 5g에 물 500ml를 가하여 진탕항온수조(Jeiotech, BS-21)에서 각각의 조건에 따라 추출한 후 Whatman No.1 여과지로 여과하여 500 ml로 fill up한 후 아가콩 추출물로 하였다.

Table 2. Experimental design of hot-water extraction conditions for Aged soybean.

Extraction condition	-2	-1	0	1	2
X1 Temperature (°C)	60	70	80	90	100
X2 Time (hr)	30	60	90	120	150

#### 자. 관능검사

추출조건에 따른 아가콩추출물에 대한 관능적 특성을 알아보기 위해 호서대학교 식품생물공학과 20~30대 재학생과 연구원 10명을 대상으로 관능검사를 실시하였다. 콩 추출물에 대하여 색, 향, 맛, 후미 및 전반적인 기호도에 대하여 9점 척도법으로 평가를 실시하였으며, 시료는 일회용 흰색 소형 종이컵에 일정량을 냉장보관 후 차가운 상태에서 제시하여 검사를 실시하였다.

## 2. 시험 결과

### 가. 볶음 조건에 따른 아가콩의 이화학적 특성 변화

볶음조건을 달리한 아가콩의 이화학적 특성변화는 Table 3과 같다. 250°C에서 20, 25, 30분간 볶음을 실시한 결과 중량감소율은 13.04~13.33%로 나타났다. 볶음조건에 따른 아가콩 생것의 색도를 측정된 결과, 아가콩 생콩의 색도는 L값은 79.35, a값은 -1.22, b값은 25.61이었으며, 볶음시간이 증가할수록 L값은 크게 감소하였으며, a값은 볶음에 따라 증가하였으나 볶음시간에 따른 값의 차이는 미미하였다. b값은 볶음조건에 따라 증가하다가 볶음시간이 증가함에 따라 다시 감소하는 경향을 나타내었다. 볶음시간을 20분으로 하여 볶은 콩은 구수한 맛이 났으며, 볶음조건 25분은 약간 쓴맛, 30분 동안 볶은 콩은 매우 쓴 맛을 나타내었으며, 배전도가 가장 강하였다. 아가콩 추출물 제조를 위한 예비실험 결과 볶음시간을 30분으로 하였을 때, 추출물의 콩향과 구수한 맛이 우수하여 추출조건 설정을 위한 볶음콩 전처리 조건으로서 볶음온도는 250°C, 볶음시간 30분으로 설정하였다.

Table 3. Physicochemical properties of Aga soybeans as roasting conditions.

No.	Roasting temp. (°C)	Roasting time (min.)	Weight loss rate (%)	L	a	b	비고
1	0	0	0	79.35±0.00	-1.22±0.03	25.61±0.02	-
2	250	20	13.33	48.44±0.02	11.11±0.06	29.62±0.03	구수한 맛
3	250	25	13.33	39.08±0.00	12.04±0.04	27.54±0.00	약간 쓴맛
4	250	30	13.04	30.56±0.00	11.02±0.00	22.26±0.00	매우 쓴맛

250°C의 온도에서 아가콩을 20, 25, 30분간 볶음처리하여 유효성분 함량을 조사한 결과 daidzein은 595.35~657.18 µg/g, genistein은 556.52~645.71 µg/g으로 나타나 볶음시간이 증가할수록 daidzein과 genistein 함량이 약간 감소하는 경향을 보였다 (Table 4). 또한, 콩을 이용한 추출액상차, 음료 개발시 볶음에 의한 향미 증가로 인해 관능적 특성이 증가하는 것으로 예비실험결과 나타나 생콩을 열수에 그대로 추출하는 것보다 전처리로서 볶음 처리를 한 후에 추출액을 제조하는 것이 관능적 특성이 우수한 콩음료를 제조하기 위해 필수적인 공정일 것으로 사료된다.

Table 4. Isoflavones content of Aga soybeans as roasting conditions.

No.	Roasting temp. (°C)	Roasting time (min.)	Daidzein (µg/g)	Genistein (µg/g)	Total isoflavone(µg/g)
1	0	0	657.99*	569.03*	1,227.02*
2	250	20	657.18	645.71	1,302.89
3	250	25	635.54	589.41	1,224.95
4	250	30	595.35	556.52	1,151.87

\*Wet basis

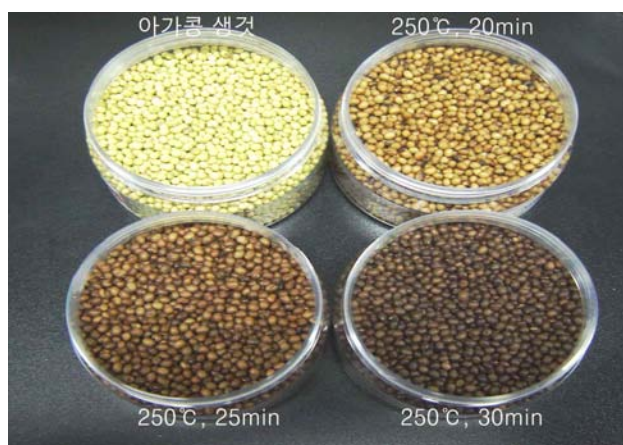


Fig. 1. Aga soybeans as roasting conditions.

#### 나. 추출조건에 따른 볶음 아가콩 추출물의 관능적 특성

열수추출조건에 따른 볶음 아가콩 추출물의 관능적 특성은 Table 5와 같이 나타났다. 관능적 특성 중 색, 향, 맛, 후미 및 전반적인 기호도에 대한 회귀식의  $R^2$ 는 각각 0.7456, 0.8920, 0.6156, 0.7938 및 0.8277로 나타났다(Table 6). 볶음 아가콩의 추출조건에 따른 관능적 특성 중 색에 대한 관능평점은 5.6~6.8, 향에 대해서는 5.5~7.2, 맛에 대한 관능평점은 5.4~6.8의 범위를 나타내었으며, 후미는 5.4~6.9, 전반적인 기호도는 5.3~7.4의 점수를 나타내었다. 관능적 특성 중 향의 경우 5% 이내의 유의수준에서 유의성이 인정되었으나, 색, 맛, 후미 및 전반적인 기호도는 10% 이내의 유의수준에서 유의성이 인정되지 않았다. 관능적 특성에 대한 평가의 경우 개인마다 선호하는 특성이 다르므로, 전반적으로 유의성이 낮게 나타난 것으로 생각된다. 관능적 특성 중 색의 경우 아가콩의 추출온도 77.12°C, 추출시간 30.62분에서 가장 높은 평점을 보였으며, 향의 경우 추출온도 83.71°C, 추출시간 85.52에서 최대의 관능평점을 나타내었다. 맛의 경우 추출온도 93.03°C, 추출시간 135.50분에서 가장 높은 평점을 보였으며, 후미의 경우 추출온도 94.25°C, 추출시간 132.09분에서 가장 높은 평점을 나타내었다. 전반적인 기호도는 추출온도 92.05°C, 추출시간 137.86분일 때 가장 높은 것으로 나타났다.

색의 경우 추출시간이 짧을수록 관능평점이 높게 나타났으며, 향의 경우 추출온도 75~90°C, 추출시간 70~110분일 때 관능평점이 높게 나타났다. 맛의 경우 추출온도가 높고, 추출시간이 길수록 관능평점이 높게 나타났으며, 전반적인 기호도의 경우 추출온도 90°C 이상, 추출시간 130~150분 범위 내에서 높게 나타났다. 향의 경우 Table 7과 같이 추출온도와 추출시간 모두에 영향을 많이 받고 있었으며, 후미의 경우 관능적 특성이 추출시간에 영향을 받고 있었고, 전반적인 기호도는 추출온도에 영향을 많이 받는 것으로 나타났다.

볶음 아가콩 추출물만을 이용하여 관능적 특성을 조사한 결과, 관능적 점수에 대한 평균이 모두 5점이상(보통이다)으로 나타나, 볶음 아가콩 추출물을 이용한 차 제조시 추출물(용매비 1:100)에 대한 관능적 특성이 나쁘지 않은 것으로 나타나, 다른 부재료를 이용한 매스킹은 크게 필요하지 않을 것으로 사료된다. 그러나, 유효성분을 높이기 위해 추출물의 함량비를 높여 이용할 시에는 볶음공정으로 인해 추출물의 쓴맛이 상당히 증가되므로, 이러한 맛을 보완하기 위한 부재료의 첨가나 배합비의 조정이 필요하리라 생각된다.

Table 5. Experimental data on sensory properties of Aga soybean extracts under different conditions based on central composite design for response surface analysis.

Exp. No.	Extraction conditions		Sensory properties				
	Extraction temp. (°C)	Extraction time. (min)	Color	Flavor	Taste	After taste	Overall palatability
1	90(1)	120(1)	5.8	6.5	6.8	6.9	7.4
2	90(1)	60(-1)	6.3	6.5	6.3	5.8	6.5
3	70(-1)	120(1)	5.6	6.3	5.4	6.1	5.9
4	70(-1)	60(-1)	6.2	5.9	6.5	6.8	6.8
5	80(0)	90(0)	6.5	7.2	5.6	6.5	6.4
6	80(0)	90(0)	6.1	6.7	6.8	6.2	6.7
7	100(2)	90(0)	5.9	6.2	5.9	5.7	5.7
8	60(-2)	90(0)	6.2	5.5	5.3	5.5	5.3
9	80(0)	150(2)	5.8	5.5	6.3	5.6	6.2
10	80(0)	30(-2)	6.8	6.0	6.0	5.4	6.5

Table 6. Polynomial equations calculated by RSM program for extraction conditions of roasted Aga soybeans.

Responses	Polynomial equations	R <sup>2</sup>	Significance
Color	$Y_C = 5.093750 + 0.060000X_1 - 0.019028X_2 - 0.000437X_1^2 + 0.0000833333X_1X_2 + 0.0000208333X_2^2$	0.7456	0.2147
Flavor	$Y_F = -16.718452 + 0.479762X_1 + 0.083929X_2 - 0.002696X_1^2 - 0.000333X_1X_2 - 0.000327 X_2^2$	0.8920	0.0457
Taste	$Y_T = 3.500893 + 0.164286X_1 - 0.101131X_2 - 0.001652X_1^2 + 0.001333X_1X_2 - 0.000030754X_2^2$	0.6156	0.4169
After taste	$Y_{AT} = 0.814881 + 0.218095X_1 - 0.068849 X_2 - 0.002196X_1^2 + 0.001500X_1X_2 - 0.000272X_2^2$	0.7938	0.1491
Overall palatability	$Y_{OP} = -2.998512 + 0.348810X_1 - 0.105774X_2 - 0.002920X_1^2 + 0.001500X_1X_2 - 0.000088294X_2^2$	0.8277	0.1083

Table 7. Regression analysis for regression model of color, flavor, taste, after taste and overall palatability in extraction conditions of roasted Aga soybeans.

Extraction conditions	F-Ratio				
	Color	Flavor	Taste	After taste	Overall palatability
Extraction temp. (°C)	0.19	8.01**	2.06	3.98	6.14*
Extraction time. (min)	3.61	7.34**	0.85	4.57*	2.27

\*Significant at 10% level ; \*\*Significant at 5% level ; \*\*\*Significant at 1% level.

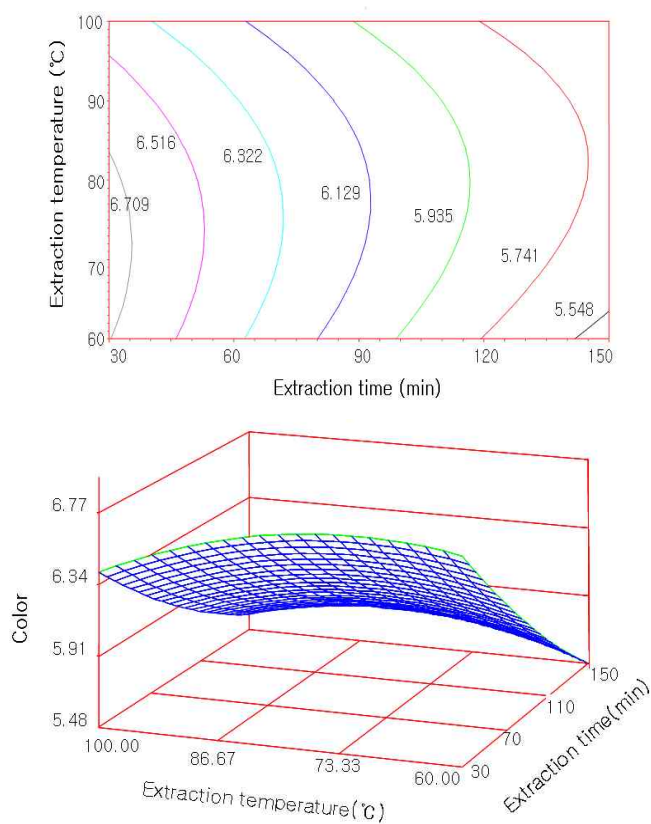


Fig. 2. Contour map (top) and response surface (bottom) of color in extraction condition of roasted soybean.

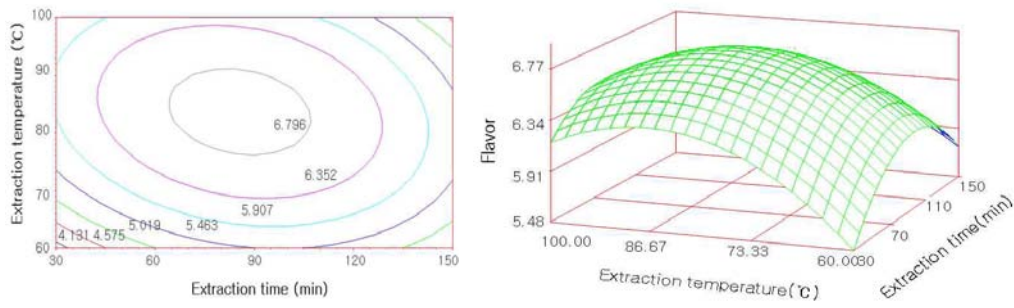


Fig. 3. Contour map (top) and response surface (bottom) of flavor in extraction condition of roasted soybean.

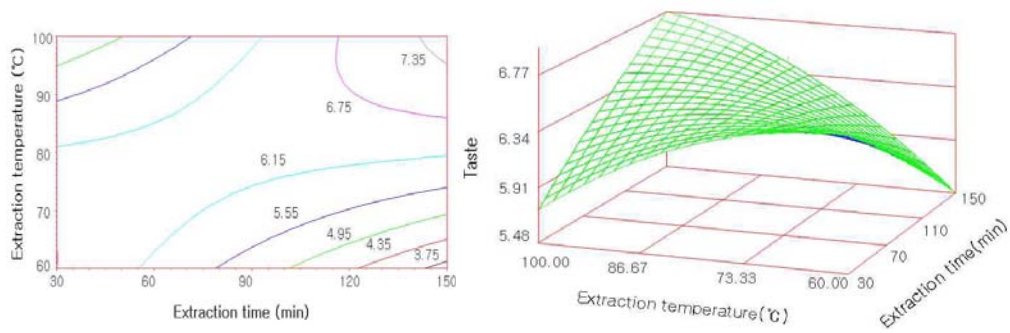


Fig. 4. Contour map (top) and response surface (bottom) of taste in extraction condition of roasted soybean.

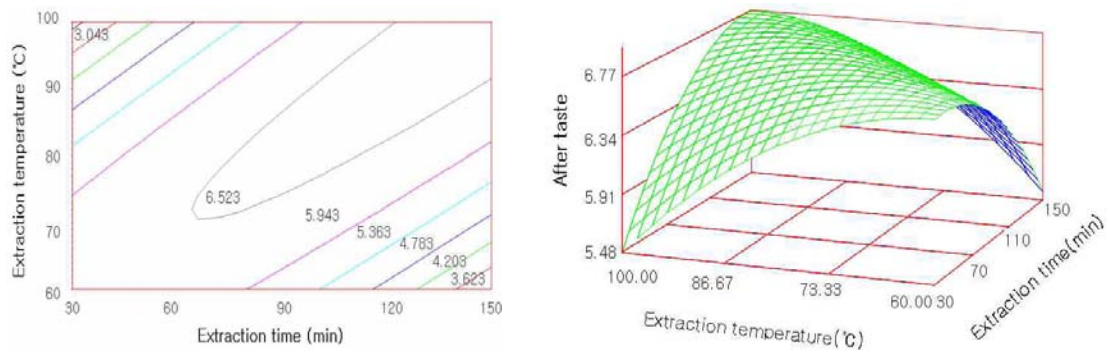


Fig. 5. Contour map (top) and response surface (bottom) of after taste in extraction condition of roasted soybean.

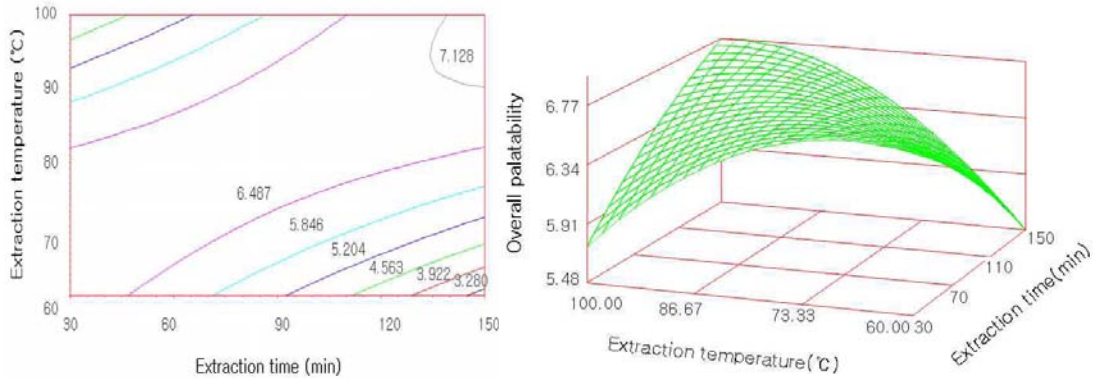


Fig. 6. Contour map (top) and response surface (bottom) of overall palatability in extraction condition of roasted soybean.

다. 추출조건에 따른 볶음 아가콩 추출물의 이화학적 특성

열수추출조건에 따른 볶음 아가콩 추출물의 이화학적 특성은 Table 9와 같이 나타났으며, pH, L, a 및 b 값에 대한 회귀식의  $R^2$ 는 각각 0.9882, 0.9818, 0.9568 및 0.9882로 나타났다(Table 10). 볶음 아가콩의 추출조건에 따른 pH는 6.00~6.77, L값은 78.58~86.32, a값은 0.82~4.88, b값은 29.97~48.39 범위로 나타났으며, pH, L, a, b 값 모두 1% 이내에서 유의성이 인정되었다.

pH는 추출온도가 높고, 추출시간이 증가할수록 값이 감소하는 경향을 보였으며, 추출물의 L값은 추출온도가 높고, 추출시간이 늘어날수록 감소하여 보다 어두운 색을 띠는 것으로 나타났다. a값은 추출온도가 높고, 추출시간이 길수록 증가하는 경향을 나타내었으며, b값도 유사한 경향을 나타내었다(Fig. 7~10).

Table 8. Predicted levels of optimum conditions for extraction conditions of roasted Aga soybeans by the ridge analysis.

Responses	Extraction temp. (°C)	Extraction time. (min)	Estimated responses	Morphology
Color	72.08	145.10	5.69(Min)	Saddle point
	77.12	30.62	6.75(Mix)	
Flavor	62.87	59.00	5.36(Min)	Maximum
	83.71	85.52	6.94(Max)	
Taste	63.02	121.72	4.75(Min)	Saddle point
	93.03	135.50	7.02(Max)	
After taste	93.28	45.13	4.70(Min)	Maximum
	94.25	132.09	6.69(Max)	
Overall palatability	62.87	121.00	4.71(Min)	Saddle point
	92.05	137.86	7.14(Max)	

Table 9. Experimental data on physicochemical properties of soybean extracts under different conditions based on central composite design for response surface analysis.

Exp. No.	Extraction conditions		Physicochemical properties			
	Extraction temp. (°C)	Extraction time. (min)	pH	L	a	b
1	90(1)	120(1)	6.00	79.08	4.88	43.27
2	90(1)	60(-1)	6.41	81.02	3.92	41.08
3	70(-1)	120(1)	6.37	82.94	2.66	38.51
4	70(-1)	60(-1)	6.63	85.44	1.41	32.34
5	80(0)	90(0)	6.30	82.65	2.72	38.80
6	80(0)	90(0)	6.31	82.15	3.21	39.95
7	100(2)	90(0)	6.02	78.58	4.85	48.39
8	60(-2)	90(0)	6.77	85.98	1.24	32.89
9	80(0)	150(2)	6.13	81.58	3.45	41.79
10	80(0)	30(-2)	6.69	86.32	0.82	29.97

Table 10. Polynomial equations calculated by RSM program for physicochemical properties of roasted Aga soybeans extracts.

Responses	Polynomial equations	R <sup>2</sup>	Significance
pH	$Y_{\text{pH}} = -9.714167 + 0.161333X_1 + 0.528722X_2 + 0.003175X_1^2 - 0.003317X_1X_2 - 0.000969X_2^2$	0.9882	0.0006
L	$Y_L = 109.153988 - 0.259190X_1 - 0.162607X_2 + 0.000155X_1^2 + 0.000467X_1X_2 + 0.000481X_2^2$	0.9818	0.0014
a	$Y_a = -11.239524 + 0.139619X_1 + 0.087869X_2 - 0.000114X_1^2 - 0.000242X_1X_2 - 0.000265X_2^2$	0.9568	0.0078
b	$Y_b = -9.714167 + 0.161333X_1 + 0.528722X_2 + 0.003175X_1^2 - 0.003317X_1X_2 - 0.000969X_2^2$	0.9882	0.0006



Table 11. Regression analysis for regression model of pH, L, a, b in extraction conditions of roasted Aga soybeans.

Extraction conditions	F-Ratio			
	pH	L	a	b
Extraction temp. (°C)	79.56***	49.50***	19.85***	68.46***
Extraction time. (min)	59.79***	21.52***	9.35**	40.89***

\*Significant at 10% level ; \*\*Significant at 5% level ; \*\*\*Significant at 1% level

Table 12. Predicted levels of optimum conditions for extraction conditions of roasted Aga soybeans by the ridge analysis.

Responses	Extraction temp. (°C)	Extraction time. (min)	Estimated responses	Morphology
pH	95.04	129.52	5.86(Min)	Minimum
	64.15	53.38	6.78(Mix)	
L	99.37	104.87	78.03(Min)	Minimum
	67.38	43.44	87.60(Max)	
a	67.73	42.60	0.25(Min)	Maximum
	99.34	105.21	5.28(Max)	
b	68.60	40.68	26.94(Min)	Saddle point
	99.93	94.93	48.10(Max)	

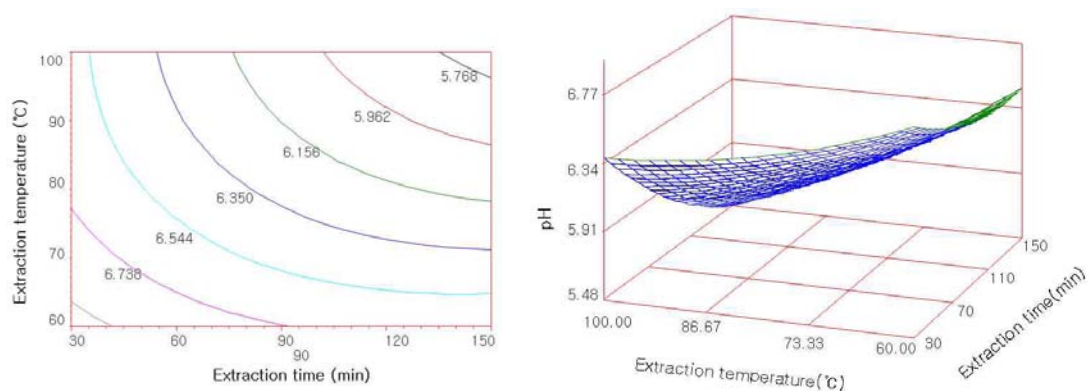


Fig. 7. Contour map (top) and response surface (bottom) of pH in extraction condition of roasted Aga soybean.

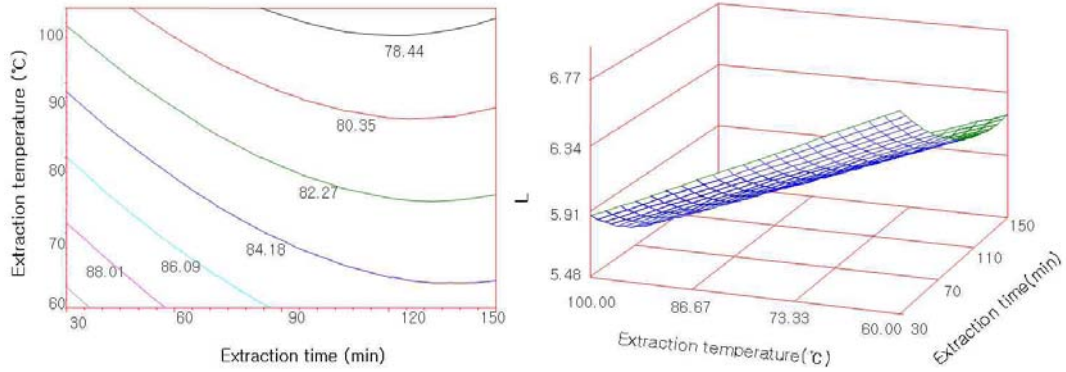


Fig. 8. Contour map (top) and response surface (bottom) of L in extraction condition of roasted Aga soybean.

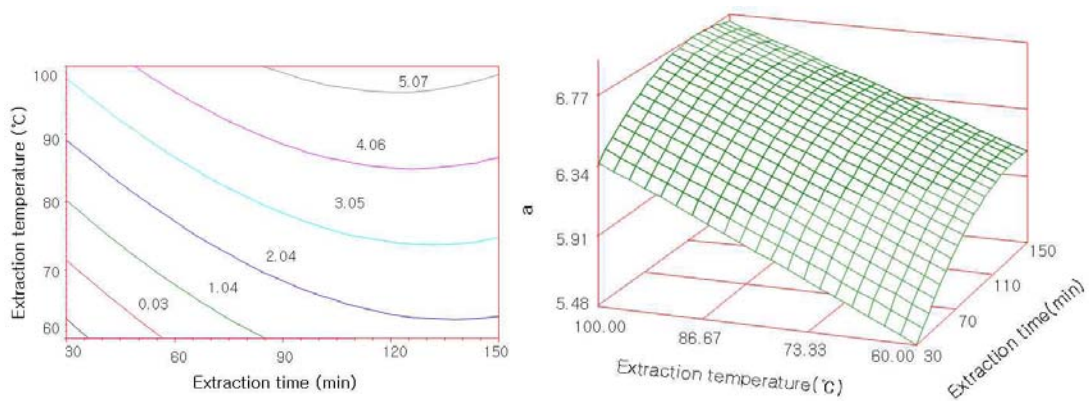


Fig. 9. Contour map (top) and response surface (bottom) of a in extraction condition of roasted Aga soybean.

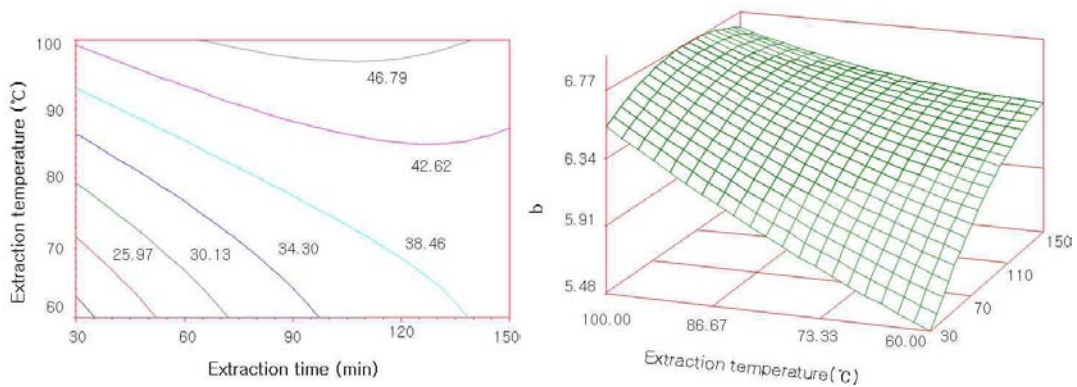


Fig. 10. Contour map (top) and response surface (bottom) of b in extraction condition of roasted Aga soybean.

라. 추출조건에 따른 볶음 아가콩 추출물의 isoflavone 함량 특성

열수추출조건에 따른 볶음 아가콩 추출물의 isoflavone 함량 특성은 Table 13과

같이 나타났으며, daidzein과 genistein에 대한 회귀식의  $R^2$ 는 각각 0.9874, 0.9769로 나타났다(Table 14). 볶음 아가콩의 추출조건에 따른 daidzein 함량은 4.28~11.63  $\mu\text{g/ml}$ 의 범위를 보였으며, genistein은 2.86~9.79  $\mu\text{g/ml}$ 로 나타났으며, 모두 1% 이내에서 유의성이 인정되었다. Daidzein 및 genistein 함량 모두 추출온도와 추출시간에 영향을 많이 받고 있는 것으로 나타났으며(Table 15), daidzein은 추출온도 99.55 $^{\circ}\text{C}$ , 추출시간 106.19분에서 최대값 11.64  $\mu\text{g/ml}$ 을 나타내었고 genistein은 추출온도 99.50 $^{\circ}\text{C}$ , 추출시간 103.23분일 때 최대값 9.61  $\mu\text{g/ml}$ 을 나타내었다(Table 16). 두 성분 모두 추출온도가 높고, 추출시간이 길어질수록 높은 것으로 나타났다(Fig. 11~12). 실험조건 내에서 추출온도가 높고 추출시간이 길수록 유효성분 함량의 추출율은 높아지는 것으로 나타났으나, 추출공정의 산업화 시에는 해당업체의 설비여건, 원가, 효율성 등 복합적인 요인을 고려하여 적정 추출조건을 설정하는 것이 필요할 것으로 사료된다.

Table 13. Experimental data on daidzein, genistein of roasted Aga soybean extracts under different conditions based on central composite design for response surface analysis.

Exp. No.	Extraction conditions		Daidzein ( $\mu\text{g/ml}$ )	Genistein ( $\mu\text{g/ml}$ )
	Extraction temp. ( $^{\circ}\text{C}$ )	Extraction time. (min)		
1	90(1)	120(1)	10.23	7.54
2	90(1)	60(-1)	8.64	6.32
3	70(-1)	120(1)	7.82	5.10
4	70(-1)	60(-1)	5.17	3.20
5	80(0)	90(0)	8.43	6.12
6	80(0)	90(0)	9.04	6.46
7	100(2)	90(0)	11.63	9.79
8	60(-2)	90(0)	5.10	3.13
9	80(0)	150(2)	9.79	7.21
10	80(0)	30(-2)	4.28	2.86

Table 14. Polynomial equations calculated by RSM program for isoflavone content of roasted Aga soybeans extract.

Response s	Polynomial equations	R <sup>2</sup>	Significance
Daidzein	$Y_D = -22.639345 + 0.356476X_1$ $+ 0.194448X_2 - 0.000745X_1^2$ $- 0.000883X_1X_2 - 0.000452X_2^2$	0.9874	0.0007
Genistein	$Y_G = - 11.212649 + 0.085619X_1$ $+ 0.134077X_2 - 0.000767X_1^2$ $- 0.000567X_1X_2 - 0.000311X_2^2$	0.9769	0.0023

Table 15. Regression analysis for regression model of daidzein, genistein in extraction conditions conditions of roasted Aga soybeans.

Extraction conditions	F-Ratio	
	Daidzein	Genistein
Extraction temp. (°C)	60.14***	38.52***
Extraction time. (min)	44.58***	16.81***

\*Significant at 10% level ; \*\*Significant at 5% level ; \*\*\*Significant at 1% level

Table 16. Predicted levels of optimum conditions for isoflavone content of roasted Aga soybeans extract by the ridge analysis.

Responses	Extraction temp. (°C)	Extraction time. (min)	Estimated responses	Morphology
Daidzein	67.95	42.10	3.00(Min)	Maximum
	99.25	106.19	11.64(Mix)	
Geinstein	67.54	43.04	1.61(Min)	Saddle point
	99.50	103.23	9.61(Max)	

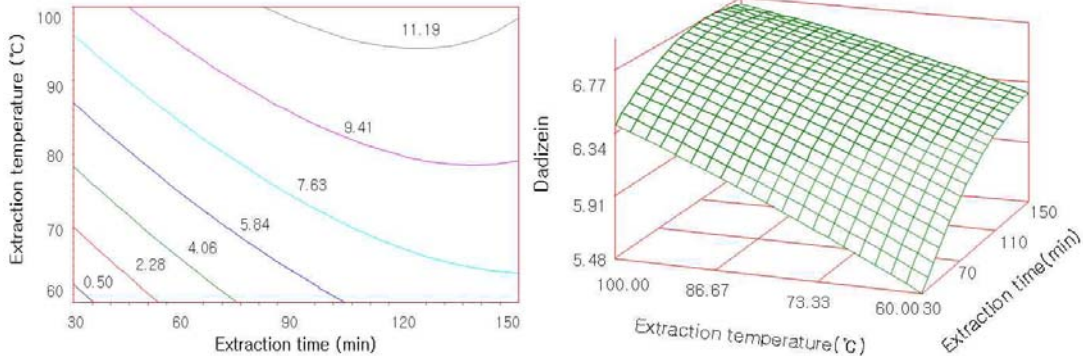


Fig. 11. Contour map (top) and response surface (bottom) of daidzein in extraction condition of roasted Aga soybean.

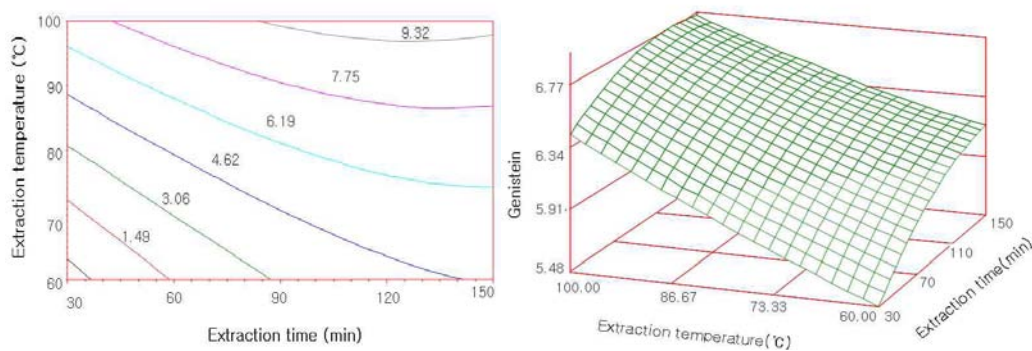


Fig. 12. Contour map (top) and response surface (bottom) of genistein in extraction condition of roasted Aga soybean.

#### 마. 아가콩 추출물의 isoflavone 함량 특성

아가콩 추출물에 대한 isoflavone 함량 특성을 조사한 결과는 Table 17과 같다. 아가콩이 시중에서 판매되고 있는 일반 노란콩, 검은콩에 비해 약 4배이상 isoflavone 함유량이 높은 것으로 나타났다. 볶음 아가콩 추출물 30°brix(농축액)의 daidzein 함량은 696.39 µg/g, genistein은 379.78 µg/g 함유되어 있었으며, 아가콩 추출액(2.4 °brix)의 total isoflavone 함량은 128.52 µg/ml인 것으로 나타났다.

Table 17. Physicochemical properties of roasted Aga soybean extracts.

	Daidzein ( $\mu\text{g/g}$ , ml)	Genistein ( $\mu\text{g/g}$ , ml)	Totalisoflavones ( $\mu\text{g/g}$ , ml)
Aga soybean*	657.99	569.03	1,227.02
Soybean*	134.87	158.18	293.05
Blackbean*	106.02	186.08	292.1
Aga soybean extracts(30°brix)	696.39	379.78	1,076.17
Aga soybean extracts(2.4°brix)	83.50	45.02	128.52

\*wet basis

바. 아가콩 차 및 음료의 배합비 설정

아가콩 차와 음료의 원재료 함량 및 배합비를 Table 18~19와 같이 확립하였다.

Table 18. Formulation for Aga soybean tea (180ml, can).

종류	함량(%)
볶음 아가콩 추출농축액 (30°Brix)	0.60
글리신	0.02
탄산수소나트륨	0.02
비타민C	0.12
검은깨향	0.07
비타 FM	0.05
정제수	99.12

Table 19. Formulation for Aga soybean drink (100ml, glass bottle)

종류	함량(%)
볶음 아가콩 추출액(2.4Brix)	15.0
글리신	0.02
탄산수소나트륨	0.02
비타민C	0.05
콩향	0.10
포도식초(A'd 5%)	1.00
구연산	0.10
액상과당	13.50
비타 FM	0.05
정제수	70.16

바. 아가콩 음료 시제품 제작

1) 시제품 제작 공정도

아가콩 차 및 음료에 대한 시제품 제작 공정을 Fig. 13과 같이 확립하였다.

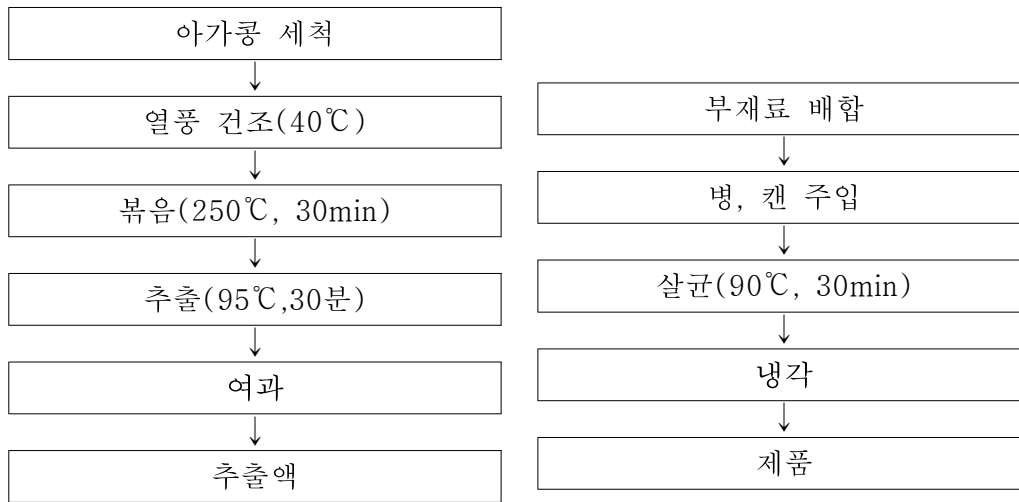


Fig. 13. 아가콩 차 및 음료 제조공정



Fig. 14. 아가콩 차 및 아가콩 음료

2) 아가콩 차, 음료의 품질특성

확립된 아가콩 차 및 음료의 formulation에 따라 음료를 제조하여 품질특성을 조사하였다(Table 20). 아가콩 차의 가용성 고형분 함량은 0.10 °brix이었으며, pH는 4.98이었으며, 아가콩 차의 isoflavone 함량은 total isoflavone으로서 1캔당 1162.26 µg/180ml 함유되어 있는 것으로 나타났다. 아가콩 음료의 고형분 함량은 8.60 °brix이었으며, pH는 3.96이었고, 아가콩 음료의 total isoflavone 함량은 1병당 1927.80 µg/100ml이었다.

Table 20. Physicochemical properties of Aga soybean tea and drink

Physicochemical properties	Aga soybean tea (180ml)	Aga soybean drink (100ml)
Soluble solid(°brix)	0.10	8.60
pH	4.98	3.96
Daidzein	752.10 (µg/180ml)	1252.50 (µg/100ml)
Genistein	410.16 (µg/180ml)	675.30 (µg/100ml)
Total isoflavone	1162.26 (µg/180ml)	1927.80 (µg/100ml)

### 3) 시판 아가콩 차의 모양



### 3. 개발결과 요약

최근 소비자들은 건강 기능성 식품을 선호하고 있으며 일본의 경우 다수의 기능성 음료에는 콩의 isoflavone이 첨가되고 있다. 본 음료개발에는 세계의 콩 중 isoflavone 함량이 가장 높은 아가코을 이용하여 소비자들이 편리하게 섭취할 수 있는 기능성 콩 음료 제품을 개발하고자 하였다.

- 아가콩의 볶음 전처리 조건으로 볶음온도는 250℃, 볶음시간 30분으로 설정하였을 때, 추출물의 콩향과 구수한 맛이 우수하였다.



- 볶음 아가콩 추출물을 이용한 차 제조시 추출물(용매비 1:100)에 대한 관능적 특성이 나쁘지 않은 것으로 나타나, 다른 부재료를 이용한 매스킹은 크게 필요하지 않을 것으로 생각되었다. .
- Daidzein은 추출온도 99.55℃, 추출시간 106.19분에서 최대값 11.64 µg/ml을 나타내었고 genistein은 추출온도 99.50℃, 추출시간 103.23분일 때 최대값 9.61 µg/ml을 나타내었다.
- 시판 제품 340ml 병으로서 제조하였을 때, 병당 isoflavone의 총량은 30mg 내외를 함유하여 고도의 기능성 평가되었다.

### ■ 제 3 제품개발: 아가콩을 이용한 전통 발효 및 기능성 막걸리(탁주) 개발

우리 민족의 역사와 같이한 술 문화 중 특히 식품학적으로 가장 우수한 전통주인 탁주를 현대인의 기호도에 맞게 개발됨이 요구된다. 한편, 자국 생산 농산물을 자국 전통주 소비에 사용되는 비율은 일본의 경우 약 20% 정도이지만 한국의 경우 3~4%(2006년)정도이다. 따라서, 이미 그 영양학적 우수성이 과학적으로 증명된 우리 전통 탁주를 새로운 맛과 기능성을 부여하여 소비를 증가시킬 필요가 있다. 또한 전국적으로 봄이 조성되는 막걸리 프렌차이즈 시장에 소비자 기호에 맞는 기능성 탁주의 개발 공급으로 틈새시장을 개척하고 국민건강과 관련 되는 올바른 술 문화를 정착시켜 우리의 기능성 농산물에 대한 고부가 가치화와 생산안정으로 농민 소득증대를 기할 필요가 있다.

민족의 역사와 같이해온 우리 술의 우수성을 고 기능성으로 알려진 아가콩을 이용하여 소비자가 원하는 맛있는 기능성 탁주를 생산할 경우 국내적으로는 우리 문화와 함께 우리 콩의 브랜드화를 할 수 있으며, 국제적으로는 우리 전통식품이며 우수한 영양학적 가치를 지닌 저(低)도주인 탁주의 우수성을 알려 대외경쟁력 강화와 동시에 고부가 가치화를 위한 가공이 절실한 실정이다.

전통주인 탁주(알코올 도수 6%)는 다른 술에 비교하여 사람에게 필요한 여러 가지 영양소를 골고루 갖추고 있는 식품으로 알려져 있다. 특히 단백질 성분으로 필수 아미노산인 라이신, 트립토판, 페닐알라닌, 메티오닌 등이 균형 있게 들어 있고 유익한 효모가 살아있다는 것이 특징이다. 한편, 탁주는 살아있는 효모와 생명 현상과 관계가 깊은 여러 가지 효소를 가지고 있으며, 그밖에 비타민B 복합체, 단백질, 무기질을 함유하고 있는 기능성이 높은 식품이다.

본 연구는 식생활과 국민 소득의 증가로 맛의 기호도가 현대화되고 깔끔한 맛에 익숙한 젊은 층의 욕구를 만족시키기에는 기존 탁주의 품질이 역부족인 실정이어서 현대인의 입맛에 맞는 첫맛이 부드럽고 고소한 냄새와 기능성 성분이 함유되어 숙취가 획기적으로 줄어든 고기능성 아가콩을 이용하여 고품질의 기능성 아가콩 탁주를 개발하는데 목표를 두었다. 따라서 아가콩의 기능적 우수성을 이용하여 아가콩

탁주 제조법의 비법화, 안정성 확보 및 품질 고급화로 새로운 탁주 시장 문화를 만들 수 있다고 기대된다. 본 연구의 최종 개발목표는

- (1) 기능성 탁주를 위한 아가콩 전(前)처리 최적 조건의 확립
  - ▶ 아가콩 탁주의 품질과 원가를 감안한 아가콩의 첨가형태 및 첨가량을 결정함
- (2) 첫맛이 부드럽고 고소한 아가콩 탁주 최적 조건의 확립
  - ▶ 지금까지 탁주가 현대인의 술 소비자에게 접근이 어려웠던 원인 중 가장 중요한 것 중 하나인 첫 맛이 부드럽지 못했던 것인데 이를 획기적으로 극복함
- (3) 아가콩 색깔이 함유된 아가콩 탁주 최적 조건 확립
  - ▶ 아가콩(노란색/검정색)은 고유한 기능성 색상을 가지고 있어서 최종 제품에도 아름다운 아가콩의 색상에 가장 접근함
- (4) 아가콩 탁주 제조 최적 조건에 의한 제조 및 품질 특성
  - ▶ 최적 조건으로 처리된 아가콩 탁주 제조법과 최종 제품을 일반 탁주와 품질특성 비교 함
- (5) 아가콩 탁주의 소비자 기호도 및 시장성 분석
  - ▶ 젊은 소비자층을 겨냥한 본 연구 아가콩 탁주를 실제로 소비자 기호도와 시장성을 테스트 마케팅으로 기능성 탁주로 명품화 함.

## 1. 시험 내용 및 범위

구분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위	달성도 (100%)
1	아가콩 탁주를 위한 아가콩 전(前)처리 최적 조건 확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 아가콩 전처리를 위한 방법 연구</li> <li>· 산업화를 위한 아가콩 전처리 최적 조건 확립</li> </ul>	100
2	첫맛이 부드럽고 고소한 아가콩 탁주 최적 조건 확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 최적 전처리 아가콩 이용 탁주 제조 시 최적 첨가 시기 실험</li> <li>· 아가콩 탁주 제조 시 전처리 아가콩의 최적 첨가량 실험</li> </ul>	100
3	아가콩 색깔이 함유된 아가콩 탁주 최적 조건 확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 아가콩의 최적 첨가량과 시기를 감안한 최종 제품의 색상 비교</li> </ul>	100
4	아가콩 탁주 제조 최적 조건에 의한 제조 및 품질 특성	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 아가콩 탁주의 주요 성분과 품질 특성 분석</li> <li>· 기존유통 탁주와 아가콩 탁주 품질 비교</li> </ul>	100
5	아가콩 탁주의 소비자 기호도 및 시장성 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 젊은 층의 성별, 연령별 소비자 기호도 조사</li> <li>· 원가 분석에 의한 시장 경쟁력 조사</li> </ul>	100

## 2. 시험 성과

### 가. 기술적 성과

- 1) 기능성 아가콩을 기능성 주류화의 기술적 know-how 확립
- 2) 기능성 성분과 색소를 가진 식품의 주류 제조 시 전(前)처리 및 최적 적용조건 확립

### 나. 경제적 성과

- 1) 기능성 우리 농산물을 기능성 주류화 하여 고 기능성 전통식품 및 브랜드화
- 2) 기능성 우리 농산물을 대량 생산하여 생산자, 개발자 및 유통 판매 관련업자들에게 직접적인 이익 창출의 발판을 마련함

## 3. 시험 결과

### 가. 아가콩 탁주를 위한 아가콩 전(前)처리 최적 조건

- ▶ 가격 경쟁을 고려하여 볶음(30분)⇒분쇄(약 30 mesh)

### 나. 첫맛이 부드럽고 고소한 아가콩 탁주 최적 조건 확립

- ▶ · 최적 전처리 아가콩 이용 탁주 제조 시 최적 첨가 시기  
⇒ 발효 과정 중 2단 사입
- 아가콩 탁주 제조 시 전처리 아가콩의 최적 첨가량  
⇒ 발효 과정 중 원료대비 0.3~0.4%
- 첫맛 부드러움 강화를 위한 새송이 버섯 가루 최적 첨가량  
⇒ 원료 대비 2% ,1단 사입에 첨가

### 다. 아가콩(검은콩) 색깔이 함유된 아가콩 탁주 최적 조건 확립

- ▶ 전(前)처리된 아가콩 추출물 (볶음⇒분쇄 ⇒추출)을 제성 시 최종 발효 물에 6%첨가
- ▶ 아가콩 추출물 ⇒ 분쇄 아가 콩 : 50% 프레타놀 A (식품 첨가물 에탄올)을 이용하여 중량비 (w/w) 1:10으로 24시간 침지, 추출 후 농축

### 라. 아가콩 탁주 제조 최적 조건에 의한 제조 및 품질 특성

- ▶ 아가콩 탁주의 주요 성분과 품질 특성 분석

표 1. 아가콩 탁주의 아미노산 분석

(mg/100 ml)

Amino acid	D사 제품	아가콩 탁주
Asp	0.123	0.124
Thr *	0.082	0.291
Ser	0.146	0.163
Glu	0.763	0.982
Pro	0.379	0.296
Gly	0.135	0.162
Ala	0.127	0.113
Cys	0.050	0.072
Val *	0.106	0.096
Met *	0.033	0.097
Ile *	0.178	0.161
Leu *	0.098	0.099
Tyr	0.121	0.131
Phe *	0.146	0.148
His	0.068	0.081
Lys *	0.113	0.160
Arg	0.119	0.119

1) \* 는 필수 아미노산임

▶ D사 제품 보다 아가콩 탁주에서 아미노산 함량이 전반적으로 높은 함량을 나타내었다.

표 2. 아가콩 탁주의 무기질 분석.

(mg/Kg)

원소	아가콩 탁주	D사 탁주
Zn	12	11
Mn	1.4	1.5
Fe	33	43
Mg	43	49
Ca	167	244
P	254	248
Na	265	195
K	306	159

▶ D사 제품 보다 아가콩 탁주에서 Zn , P, Na , K의 함량이 전반적으로 높게 나타났다.

마. 아가콩 탁주의 소비자 기호도 및 시장성 분석

1) 소비자 기호도 조사

표 3. 아가콩 탁주의 관능검사

처리별	신맛	떫은맛	쓴맛	단맛	청량감	종합적인맛
아가콩 생(生)탁주	1.02	1.14	1.16	2.37	3.34	4.52
아가콩 살균탁주	1.13	1.12	1.91	1.91	3.32	3.82
시중 D사 탁주	1.18	1.37	1.61	1.71	3.00	3.53

1) 관능검사는 잘 훈련된 10명이 패널 요원에 의하여 맛(신맛, 떫은맛, 쓴맛, 단맛, 청량감, 종합적인 맛), 냄새(시큼한 냄새, 알코올 냄새, 종합적인 냄새)등을 5점 강도 범(아주 약하다: 1점, 약하다: 2점, 보통이다: 3점, 강하다: 4점, 아주 강하다: 5점)으로 평점 하였다.

2) 주어진 값은 3회 평균값

3) 아가콩살균 탁주 처리 : 아가콩 생탁주를 60℃에서 10분 살균

- ▶ 관능 검사 결과 종합적인 맛에서 D사 제품 < 아가콩 살균탁주<아가 콩 생탁주 순서로 높은 값을 나타냈다.
- ▶ 일반 탁주보다 아가콩의 특성을 살린 맛과 품질의 선호도가 20대 젊은 층에서 가장 높았음.

2) 원가 분석에 의한 시장 경쟁력 조사

- ▶ 원가 상승 율은 최종 소비자 가격으로 약 7~9 % 상승됨.
  - ⇒ 아가콩 5,000원 /1Kg 기준 )
  - ⇒ 원료는 소맥분 80%,쌀20% 기준
  - ⇒ 경쟁력 있음

4. 사업화 생산 및 마케팅 계획

- 1) 연구 시제품과 개발 기술을 바탕으로 기존의 탁주생산 회사에 OEM 생산이 되도록 함
- 2) 제작된 시제품 및 공장 생산 최종 제품을 젊은 층이 상주하는 대학가에 marketing test 및 체계적인 홍보함.
- 3) 최종 제품을 젊은 층을 대상으로 시음회를 몇 회 더 실시해서 문제점들을 보완하여 시장 진출 및 확대를 적극적으로 모색함.

## 5. 향후 계획

- 1) 시음회(3회)를 통하여 본 아가콩 탁주에 대한 긍정적인 평가를 받았음.
- 2) 소비자 기호도 평가를 바탕으로 진정 소비자에게 접근 할 수 있는 최종 유통 판매 로드맵 작성.
- 3) 외국 수출을 위하여 아가콩 살균 탁주의 품질 향상과 원가 절감 기술 연구
- 4) 아가콩 탁주의 기능성을 증명하기 위하여 최종 제품에 대하여 과학적인 분석 연구.

## 6. 시제품 (사진)



그림 . 아가콩 막걸리

아가콩을 사용하여 제조한 막걸리: 병당 28mg의 isoflavone 함유하여 숙취해독의 효과가 있음

## 7. 개발 결과 요약

고기능성 아가콩을 이용하여 현대인의 입맛에 맞는 첫맛이 부드럽고 고소한 냄새와 기능성 성분이 함유되어 숙취가 획기적으로 줄어든 고품질의 기능성 아가콩 탁주를 개발하고자 새송이와 아가콩을 첨가한 탁주를 개발하였다.

- 30분간 볶은 아가콩을 30mesh 내외의 가루를 만들고, 탁주 제조 원료의 0.3-0.4% 정도의 아가콩 가루를 발효과정 중 2단 삼입하였을 때 양질의 탁주가 제조되었다.
- 첫맛 부드러움 강화를 위한 새송이 버섯 가루 최적 첨가량은 원료 대비 2%이었고, 발효중 버섯가루의 삼입시기는 1단 사입에 첨가하는 것이었다.
- 상기와 같이 아가콩을 첨가하여 탁주를 제조한 경우 740ml 병당 isoflavone의 함량은 약 30mg이었다.

## ■ 제 4 제품개발: 콩 유래의 이소플라본과 레시틴이 함유된 에센스시제품 개발

### 1. Isoflavone 함유 에센스 제형 개발

대두에서 유래된 성분 중 isoflavone 성분은 여성호르몬 유사작용을 한다고 알려져 있으며, 콜라겐의 합성을 촉진하고, 섬유아세포를 활성화하며, 콜라겐분해효소를 저해함으로써 세포의 노화를 방지해 주는 기능이 있다. 특히, 대두 isoflavone 성분 중에 하나인 Genistein은 항산화제로 작용하여 자외선으로부터의 DNA손상을 저해하는 작용이 있는 것으로 알려져 있다. 또한 대두유로부터 분리되는 레시틴은 천연 유화제로 화장품의 제형설계에 있어서 많이 사용되는 원료이다. 콩으로부터 유래되는 유효성분으로 주름개선에 효과가 있을 것으로 예상되는 Genistein과 Lecithin을 주성분으로 선정하여 화장품 제형형성에 필요한 다른 성분을 이용하여 유액타입의 에센스 시제품을 제작하였다.

### 2. 수상(Water Phase) 조성의 선택

항염증, 상처치유효과가 있는 Allantoin을 추가컨셉 원료로 0.2%로 배합하였다. 제품의 유화 안정성을 증진하기 위한 증점제(Thickner)로는 Xanthan Gum을 단독 사용하였다. Xanthan Gum은 수상에서 부풀어서(Swelling) 에멀전(Emulsion)의 마이셀(Micelle)의 구조를 안정화하는데, 이의 모형은 아래의 그림과 같고, 사용함량은 0.12% 정도에서 안정한 점도를 나타내었다.

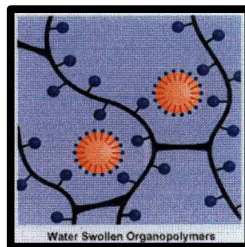


Fig. 1. Xanthan Gum 구조

보습력 증진과 Xanthan Gum의 Wetting 및 Swelling을 돕기 위하여 Glycerin과 1,3- Butylene Glycol의 다가알코올류를 총합량 9%정도 사용하였다. 수상에 유화제로 친수기가 비교적 많은 유화제인 PEG-20 METHYL GLUCOSE SESQUISTEARATE을 사용하였다. 화장품의 사용되는 유화제의 종류와 유화이론은 피부자극을 줄이고, 천연에 가까운 유화제를 개발하는 방향으로 발전되어 왔는데, 현재 각광받고 있는 유화제는 인지질로부터 유도된 천연유화제인 Lecithin과 Glucose로부터 유도된 유화제들을 대표적으로 들 수 있다. Lecithin의 경우에는 주로 난황이나 콩으로부터 얻는데, 특유의 비릿한 냄새로 인하여 화장품에서는 사용함량에 있어 제약을 받고 있으며, 가격도 비싸다는 단점이 있다. Glucose계열의 유화제는 포도당(Glucose)을 메탄올(Me-OH)로 치환한 Methyl glucose에 -OH기를

지방산과 에스테르화반응을 통해 얻는 것이 일반적으로 장점은 ①강력한 유화효과, ②유연효과/보습효과, ③강력한 수분보유력, ④TEWL(경피수분손실:Transepidermal Water Loss)의 감소, ⑤부드럽고 실키한 사용감, ⑥안료분산능력, ⑦증점효과, ⑧피부자극감소 등을 들 수 있고, 기존의유화제보다 마일드한 유액의 제조에 적합하여 본 제형의 유화제로 선택하였는데, 친수기인 폴리에틸렌글라이콜부분이 많이 도입되어 수상에 잘 용해되므로 공정상 수상에 투입하였다. 본 유화제의 구조는 아래와 같다.

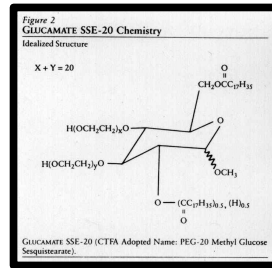


Fig. 2. Glucamate SSE-20 구조

### 3. 유상(Oil Phase) 조성의 선택

유상은 수상의 보습성분과 후첨될 컨셉원료의 피부흡수를 돕기 위해 피부에 유연한피막을 형성하는 유연제, 유화안정성을 돕는 안정제, 유화제로 구성하였는데, 첫째, 유화제로는 Glucate SSE-20과 유사한 Glucose구조를 갖는 유화제인 Glucate SS(METHYL GLUCOSE SESQUISTEARATE)를 같은 목적으로 사용하였다.

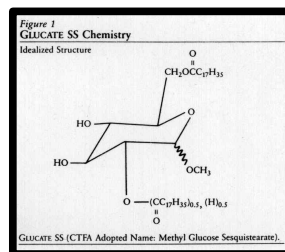


Fig. 3. Glucate SS의 구조

또한 콩으로부터 추출된 천연유화제인 Lecithin(Lipoid사의 LIPOID S75)를 제형의 메인이 되는 유화제로 Glucate SS, Glucamate SSE-20과 함께 사용하였다. 둘째, 유화안정제로 Lanette O, Rheodol MS-165V, Bees Wax를 유화의 안정을 돕기 위하여 보조유화제로 사용하였다. 이러한 보조유화제는 모두 유지로부터 유도된 탄소 16-18개의 친유기에 친수기인 알코올기나 에스테르기를 가지고 있는 구조를 가지고 있으며, 왁스상의 외관상 형태를 가진다. 종종 Polor Wax로 표현하기도 하는데 이러한 성분들이 유화의 안정성을 증진시키는 것은 이것들이 구형의 Micelle 외에도 선형의 Micelle을 형성하여 Emulsion의 안정성을 증진시키기 때문이다. 이러



한 모형을 이해하기 위한 그림은 아래와 같다.

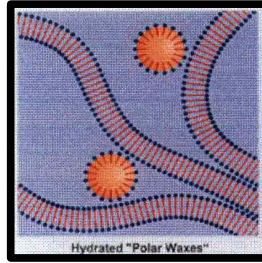


Fig. 4. 레시틴 및 기타 유화제의 Micelle 구조

셋째, 유연제로는 무거운 사용감의 Panalane L-14E에서부터 가벼운 사용감의 Cetiol OE까지 천연오일은 녹차씨오일과 홍화씨오일을 혼합하여 적당한 사용감의 오일피막을 형성할 수 있도록 오일량을 조정하였다.

4. 완성된 Isoflavone 제형 공정서

				승 인	담당	팀장	공장장
					전결		
제품코드		실험처방			제조일	2008년 2월 23일	
반제품 LOT NO.					제조자	전상훈	
성상	유액상	제품명	ISOFLAVONE 에센스				
제조단위	400 g						
NO.	기능	원료명	%	g	체크	공정도	
1	기제	D.I.Water	62.030	248.1200		80°C 균일용해 교반	균질교반
2	유화제	Glucamate SSE-20	2.300	9.2000			
3	중첩안정제	Keltrol F	0.120	0.4800			
4	보습제	Glycerin	3.000	12.0000			
5	보습제	1,3-BG	6.000	24.0000			
6	진정제	Allantoin	0.200	0.8000			
7				0.0000			
8	유연제	Tea Seed Oil	2.000	8.0000		80°C 승온용해 교반 수상에 투입후 유화 HOMO 3200RPM 10분	탈포
9	안정제	Bees Wax	1.500	6.0000			
10	유연제	Panalane L-14E	3.000	12.0000			
11	유연제	Waglinol MCT	3.000	12.0000			
12	유연제	Cetiol OE	3.000	12.0000			
13	보습제	Questamide-H	0.100	0.4000			
14	유화제	Lipoid S75-3	0.200	0.8000			
15	안정제	Lanette O	2.000	8.0000			
16	유화제	Glucate SS	2.000	8.0000			
17	안정제	Arlacel #165	1.500	6.0000			
18	유연제	Safflower Oil	1.500	6.0000			
19				0.0000			
20	사중감개선제	Silkem 1650	1.000	4.0000		70°C 투입 균일교반	
21	보습제	Hyaluronic Acid	2.000	8.0000		50°C 투입 균일교반	
22	주름개선	Genistein	1.000	4.0000			
23	용매	D.I.Water	2.000	8.0000			
24	진정제	Steviten LICO SG	0.100	0.4000		50°C 투입 균일교반	
25	진정제	Aloe Vera 200:1	0.100	0.4000			
26				0.0000			
27	방부제	Glydant Plus Liquid	0.200	0.8000		48°C 투입 균일교반	
28				0.0000			
29	향료	pf(Cool Wave)	0.050	0.2000		45°C 투입 균일교반	
30	향료	pf(KX OH 1964)	0.100	0.4000		45°C 투입 균일교반	
총계			100.000	400.0000			
특기사항							

5. Genistein 및 유효성분들의 후첨

콩으로부터 추출되는 유효한 isoflavone 성분으로는 Daidzein, Genistein, Glycitein 등의 aglycone 및 이것들의 배당체구조를 가지고 있는 것들인데, 구조는 아래와 같다.

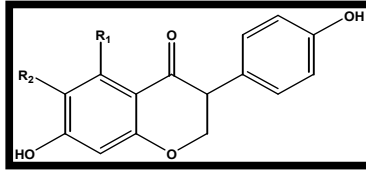


Fig. 5. 대두로부터 분리되는 Isoflavone의 구조

이러한 성분들은 여성호르몬의 항상성을 증진하고, 진피내 콜라겐을 합성을 증진하며, 콜라겐분해효소를 억제하고, 특히 Genistein은 피부암의 예방효과가 알려져 있어, 대두추출 Isoflavone 중Genistein의 함량이 90%이상인 Orient star사의 원료를 공급하여 처방에 사용하였다. 본 성분은 피부주름개선 및 노화예방에 도움을 줄 것으로 예상된다. 이밖에 피부의 보습과 주름개선에 효과가 있는 Hyaluronic Acid Na Salt와 감초로부터 추출한 DIPOTASSIUM GLYCYRRHIZATE, 제형의 자극완화를 돕기 위해 알로에베라의 동결건조품인 ALOE BARBADENSIS LEAF JUICE를 사용하였다. 방부제로는 Lonza사에 디엠디엠히단토인과 아이오도프로피닐부틸카바메이트가 혼합되어 있는 혼합방부제를 사용하였으며, 약간의 향료를 후첨하여 Genistein과 Lecithin으로부터의 원료취와 각종원료의 불쾌취를 마스킹하고 제품의 향취를 개선하였다.

#### 6. 제품의 컨셉 및 시제품 개발

본 연구에서 개발된 이소플라본 함유 시제품은 제니스테인의 항산화 효과와 DNA 손상저해 효과를 통한 주름개선효과, 그리고 콩 유래의 레시틴을 이용함으로써 천연유화제, 저자극제 및 생체막과 친화성을 통한 인체 친화성을 제품의 컨셉으로 시제품을 생산 하였다. 시제품은 30 여명의 연구원 내외 사용자들에 샘플을 주어 반응을 테스트 중에 있다. 향후 이 제품은 1) CCD-986sk, HS68, Detroit 5116 세포를 이용한 세포내 콜라겐 생성시험(Collagen synthesis assay)주름 개선 효과와 2) 세포내 콜라게나제활성 억제시험(Collagenase inhibition assay) 등을 테스트 하여 주름 개선 기능성을 검정할 계획이다.

## 7. 시제품 (사진)



그림 . 아가(AGA) 화장품

아가콩의 Genistein을 concept으로 한 화장품

## 8. 제품개발 요약

인체 세포의 노화방지와 주름 개선 효능이 있다고 알려진 isoflavone과 lecithin이 풍부한 아가콩을 주성분으로 하여 유액타입의 에센스 시제품을 제작하였다.

- 본 연구에서 개발된 이소플라본 함유 시제품은 제니스테인의 항산화 효과와 DNA 손상저해 효과를 통한 주름개선효과, 그리고 콩 유래의 레시틴을 이용함으로써 천연유화제, 저자극제 및 생체막과 친화성을 통한 인체 친화성을 제품의 컨셉으로 시제품을 생산 하였다.
- 시제품을 대상은 앞으로 CCD-986sk, HS68, Detroit 5116세포를 이용한 세포내 콜라겐 생성시험(Collagen synthesis assay)주름 개선 효과와 2) 세포내 콜라게나제활성 억제시험(Collagenase inhibition assay) 등을 테스트 하여 주름 개선 기능성을 검증할 계획이다.

## 제 2 절 양질 지방산 함유 콩 품종개발

### 1. 재료 및 방법

#### 가. 시험재료 및 처리내용

##### (1) 콩 유전자원의 고지방 및 양질지방산 자원 발굴

본 연구에서 이용된 콩 유전자원은 농촌진흥청 농업유전자원센터 충북대학교 콩 유전자원관리기관에서 보유하고 있던 한국자원 128종, 중국자원 214종, 경북대학교 두류유전자원관리기관에서 분양받은 미국자원 37종, 일본의 Biological Resource Center in *Lotus and Glycine*, Frontier Science Research Center, University of Miyazaki로부터 분양받은 일본자원 140종을 포함하여 총 519종을 사용하였다. 파종은 한국, 중국 및 미국자원 379종은 2007년 6월 15일에, 2008년 일본에서 도입한 콩 유전자원 140종은 2009년 6월 16일에 파종하였다. 재식거리는 휴폭 60 cm x 주간 15 cm 로 하여 1립씩 파종하고, 생육기간 중 중경제초와 배토를 실시하였다. 시비는 50kg/10a(N : P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> : K<sub>2</sub>O = 3 : 3 : 3.4 kg/10a)을 전량 기비로 하였다. 시험구는 유전자원당 1열씩 3m로 하였고, 재식거리는 휴폭 60 cm x 주간 15 cm로 하여 3립씩 파종하고, 출현 후 본엽 4~5엽기에 1주당 2본씩만 남기고 솎아주었으며, 생육기간 중 중경제초와 배토를 실시하였다. 콩성숙기에 수확하여 완전히 건조 후 탈립하여 -20℃의 냉동고에 저장하면서 분석시료로 사용하였다. 조지방은 Soxhlet 장치를 이용하여 분석하였다. 먼저 수기의 함량(W<sub>0</sub>)을 구하기 위해 수기를 깨끗이 세척한 다음 건조기(105℃)에서 2~4시간 정도 건조한 뒤 데시케이터에서 30분간 방냉한 후 실온에 도달하면 무게를 칭량하였다. 다시 수기를 건조기(105℃)에 넣어 1시간 건조시킨 다음 다시 데시케이터에서 30분간 방냉한 후 무게를 칭량하였다. 수기의 무게가 함량이 될 때까지 반복 칭량하였다. 시료는 37℃ 건조기에서 7일간 건조된 종자들을 이용하였으며, 분쇄기로 시료를 가루로 만든 후 시료 3g을 원통여지(thimble filter)에 넣고 그 위에 탈지면을 가볍게 덮었다. 칭량된 수기에 에틸에테르 200ml를 추출용매로 첨가하였다. 항온수조의 온도는 40℃로 하여 8시간 동안 추출하였다. 추출이 끝난 후 Soxhlet 장치를 분리하여 수기에 있는 에틸에테르를 감압농축기를 이용하여 완전히 제거한 다음 수기를 건조기(105℃)에서 1시간 건조시키고 데시케이터에 30분간 방냉한 후 조지방 무게를 칭량하였다. 조지방 분석은 3반복으로 하였다.

조지방 함량 계산(%)

$$\text{조지방(\%)} = \frac{W_1 - W_0}{S} \times 100$$

W<sub>1</sub> : 지방 추출한 수기 무게, W<sub>0</sub> : 함량한 수기 무게, S : 시료 무게

지방산 조성 분석은 조지방을 분석한 oil에서 추출된 50 $\mu$ l와 준비된 반응시약 (methanol : heptane : benzen : 2,2-dimethoxypropane : H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 37ml : 36ml : 20 ml : 5ml : 2ml) 2ml를 vial에 넣은 다음 격렬하게 흔들어 준 뒤 80 $^{\circ}$ C로 유지되는 heating block에서 20분간 반응시킨 후 냉장 보관하였다. 분석하기 바로 전에 두 개의 층층 상등액 100 $\mu$ l을 취하여 GC용 vial에 옮겨 넣고 GC (Agilent 6850)에 주입하여 지방산 조성을 분석하였다. 분석 조건은 불꽃 이온화 검출기(flame ionization detector : FID)와 HP-INNOWAX 19091N-133 (30 m $\times$ 0.25 mm, 0.25  $\mu$ m) column을 사용하였다. oven의 초기 온도는 150 $^{\circ}$ C에서 5분간 유지한 후 분당 5 $^{\circ}$ C씩 상승시키고 230 $^{\circ}$ C에서 유지하였다. 시료 주입구와 검출기의 온도는 각각 250 $^{\circ}$ C에서 300 $^{\circ}$ C를 유지시켰다. 이동상에 이용된 질소 가스는 분당 1.3ml의 유속으로 유지하였으며, 주입량의 분할 비율은 50 : 1로 조절하고 시료 1 $\mu$ l를 주입하여 분석하였으며, 3반복으로 시험하였다. 지방함량 및 지방산 결과의 통계분석은 SAS(Version. 9.1)와 Excel 2007을 이용하였으며 유의성검정은 Duncan 검정을 하였다.

## (2) 양질 지방산 함유 계통육성

시험재료로는 교배모본으로는 대풍콩, 대원콩, 청자3호 및 흑청콩을 이용되었고, 부분으로는 흑농44, KLG12073, KLG12074, CS00727, KLG12081 및 PI578100이 이용되었다(표 1). 인공교배는 2007, 2008년에 각 년도별로 4월29일부터 5월29일까지 비닐하우스에 4회 파종하여 교배가 가능하도록 개화기를 조절하였으며, 재식밀도는 비닐하우스에 100-60-100cm로 재식하였다. 계통육성은 2007년 교배종자는 2008년에 F<sub>1</sub>, 2009년에 F<sub>2</sub>종자를 세대축진하였고, 2008년 교배종자는 2009년에 F<sub>1</sub>종자를 세대축진하였으며, 재식밀도는 F<sub>1</sub>은 60 x 30cm, F<sub>2</sub>는 60 x 10cm로 1주 1개체로 재식하였다. 시비는 인공교배 및 계통육성 모두 50kg/10a(N : P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> : K<sub>2</sub>O = 3 : 3 : 3.4 kg/10a)을 전량 기비하였다(표 2).

표 1. 교배 모부분의 특성

모본명	특성	부분명	특성
대풍콩	양질, 다수, 황색, 장류콩	KLG12073	황색, 대립, 고지방
대원콩	양질, 다수, 황색, 장류콩	KLG12074	황색, 대립, 고oleic
청자3호	양질, 다수, 흑색속청콩	CS00727	황색, 대립, 7S결실
흑청콩	양질, 다수, 흑색속청콩	KLG12081	황색, 대립, 고linoleic 함량
경상대콩	양질, 다수 흑색소청콩, Lx 전 결실	PI578100	황색, 대립, 고 linoleic 함량, 고 linoleic/linolenic 비율
태광콩	양질, 다수	흑농44	황색, 대립, 고지방
		Fudou	대립, 황색눈
		KLS84099	대립, 황색눈
		Ken83-2922	대립, 황색눈

표 2. 처리내용

세대	파종기(월,일)	재식밀도(cm)	시비
인공교배	4.29-5.29(4회)	100-60-100, 하우스	50kg/10a(N : P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> : K <sub>2</sub> O = 3 : 3 : 3.4 kg/10a, 전량기비)
F <sub>1</sub>	5.20-25일 파종, 6.10-15일 이식	60 x30, 1주1개체	"
F <sub>2</sub>	5.20-6.10	60 x10, 1주1개체	"

(3) 고지방 및 양질 지방산 유용자원의 환경적 변이 및 안정성 구명

(가) 년차간 변이

한국자원 11종, 중국자원 18종, 미국자원 7종을 2007년에 6월15일, 2008년에는 6월 13일에 파종하였고, 시비는 50kg/10a(N : P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> : K<sub>2</sub>O = 3 : 3 : 3.4 kg/10a)을 전량기비로 하였다. 시험구는 유전자원당 1열씩 3m로 하였고, 재식거리는 휴폭 60 cm x 주간 15 cm 로 하여 3립씩 파종하고, 출현 후 본엽 4~5엽기에 1주당 2본씩만 남기고 솟아주었으며, 생육기간 중 중경제초와 배토를 실시하였다. 콩이 성숙되는 대로 수확하여 완전히 건조 후 탈립하여 -20℃의 냉동고에 저장하면서 지방, 지방산의 분석시료로 사용하였다.

(나) 파종기간 변이

한국자원 5종, 중국자원 1종, 미국자원 3종을 2008년 5월 20일, 6월 5일, 6월20일 15일 간격으로 파종하였다. 시험구는 유전자원당 1열씩 3m로 하였고, 재식거리는 휴폭 60 cm x 주간 15 cm 로 하여 3립씩 파종하고, 출현 후 본엽 4~5엽기에 1주당 2본씩만 남기고 솟아주었으며, 생육기간 중 중경제초와 배토를 실시하였다. 콩이 성숙되는 대로 수확하여 완전히 건조 후 탈립하여 -20℃의 냉동고에 저장하면서 지방 및 지방산의 분석시료로 사용하였다.

(다) 지역간 변이

한국자원 6종, 중국자원 3종, 미국자원 3종을 청주, 대구, 무안 및 연천의 4지역에 2008년 6월 13일-20일에 파종하였다. 시험구는 유전자원당 1열씩 3m로 하였고, 재식거리는 휴폭 60 cm x 주간 15 cm 로 하여 3립씩 파종하고, 출현 후 본엽 4~5엽기에 1주당 2본씩만 남기고 솟아주었으며, 생육기간 중 중경제초와 배토를 실시하였다. 콩이 성숙되는 대로 수확하여 완전히 건조 후 탈곡하여 -20℃의 냉동고에 저장하면서 지방 및 지방산의 분석시료로 사용하였다.

(4) 고지방, 양질 지방산자원의 가공적성 분석

본 연구에 사용한 콩은 2009년도에 충북대학교 농업생명환경대학 부속농장에서 재배한 콩 44종의 종실을 지방, 지방산 조성, 단백질, 11S/7S 비율, 무기성분, phytate 함량을 분석하여 가공적성 평가를 위한 20종의 자원을 선발하였다(표 3). 가공적성 평가를 위한 20종은 한국 자원인 단백콩, 봉의콩, 검정새울콩, 광안콩 등 4종, 중국자원인 중황31, 흑농44, 구농7714, 구농8, 합풍95-873, 수농10, 길림53, 동농98-14, 공교 8966-25, 공교 9010-2, 석후대두 등 11종, 미국자원인 KLG12073, KLG12074, KLG12081, KLG12088, KLG12096 등 5종이었다. 이들 품종들에 대한 두유 및 두부를 제조하여 종실성분과 두유 및 두부의 성분을 포함한 품질 특성을 평가하였다.

표 3. 가공적성 평가를 위한 선발된 품종 및 자원

특성	품종명	개수
고지방	합풍95-873	1
고 oleic	KLG12073, KLG12074	2
고단백질, 저지방	단백콩	1
고지방, 고 Oleic	구농8, 구농7714	2
고지방, 저Oleic	동농98-14, 중황31	2
고지방, 고11s/7s	KLG12096, 석후대두	2
고지방, 저11s/7s	흑농44	1
저지방, 고Oleic	봉의콩	1
저지방, 저Oleic	KLG12088, KLG12081, 수농10	3
저지방, 저Linoleic	광안콩	1
고Ca, 고 Phytate	검정새울콩	1
저Ca, 고 Phytate	공교9010-2	1
저Ca, 저 Phytate	공교8966-25, 길림53	2
합계		20



### (가) 두유 및 두부 제조

두유와 두부의 제조공정은 그림 1과 같다. 콩 30g을 10배가량의 증류수를 첨가하여 상온에서 12시간 동안 수침한 후, 분쇄기(후드믹서 HMF-995)를 사용하여 분쇄하였다. 분쇄한 두미액을 냄비에서 90-95°C에서 10분간 끓인 후, 면포로 착즙하여 두유를 제조하였다. 제조된 두유에 무기성분을 함유하지 않은 G.D.L(Food additives grade, Roquette, France)을 70-75°C에서 0.25%(w/v) 첨가하여 10분간 응고 시킨 후 63 g/cm<sup>2</sup> 압력으로 27분간 압착 성형 하였다.

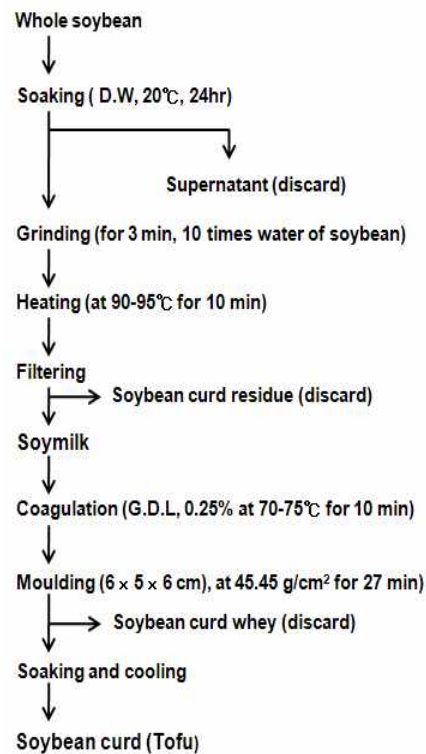


그림 1. 두유와 두부의 제조 과정

### (나) 종실, 두유 및 두부의 성분분석

#### ① 조지방 함량 분석

종실의 조지방은 Soxhlet 장치를 이용하여 위의 방법으로 분석하였으며, 두유의 조지방함량은 mojonnier 법을 이용하여 분석하였으며, 두부의 조지방은 Soxhlet 장치를 이용하여 위의 방법으로 분석하였다.

## ② 지방산 조성 분석

종실의 분석 조건은 불꽃 이온화 검출기(flame ionization detector : FID)와 HP-INNOWAX 19091N-133 (30 m×0.25 mm, 0.25  $\mu$ m) column을 사용하였고 전처리도 위의 방법과 동일하였다. 두유와 두부의 지방산 조성도 같은 방법으로 진행하였다.

## ③ 조단백질 함량 분석

종실의 조단백질 함량 분석은 Kjeldahl 분석법으로 분석하였다. 콩 분쇄시료 0.5g을 filter paper에 싼 다음 정확히 계측한후 kjeldahl flask 에 넣는다. flask에 촉매제 (K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : CuSO<sub>4</sub> = 9 : 1)를 한 스푼정도 넣은 다음 진한 황산 20ml를 넣고 digestion apparatus에 연결하여 405℃에서 120분간 가열하여 소화시키고 냉각한다. 냉각한 flask를 하나씩 꺼내서 증류수와 40% NaOH가 준비된 증류장치에 연결하여 증류시킨다. 증류되는 암모니아는 40ml의 boric acid용액으로 회수하고, 0.1N 황산 표준용액을 이용하여 적정한다. 두유와 두부의 조단백질 함량도 Kjeldahl 분석법으로 진행하였으며, 두유는 5g, 두부는 0.5g으로 분석하였다.

## ④ 11S/7S 비율 분석

종실의 11S/7S 비율을 결정하기 위하여 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)는 Bio-Rad사의 protein III을 사용하였다. 분석은 Laemmli(1970)의 방법에 준하여 12% separating gel(1.6ml 증류수, 2.0ml 30.0% acrylamide solution, 1.3ml 1.5M Tris-HCl(pH 8.8), 50 $\mu$ l 10% SDS, 50 $\mu$ l 10% Ammonium persulfate, 2 $\mu$ l TEMED)과 5% stacking gel(1.4ml 증류수, 330 $\mu$ l 30.0% acrylamide solution, 250 $\mu$ l 1.0M Tris-HCl(pH 6.8), 20 $\mu$ l 10% SDS, 20 $\mu$ l 10% Ammonium persulfate, 2 $\mu$ l TEMED)을 사용하였다. 시료 영동시 2x sample buffer(0.125M Tris-HCl, 4% SDS, 20% glycerol(v/v), 10% 2-mercaptoethanol, 0.2% bromophenol blue)를 1:1 비율로 혼합하여 100℃에서 3분간 중탕하여 lane에 주입하여 영동하였으며, 단백질 분자량 표준품은 Amersham 사의 표준품을 사용하였다. 전기영동은 gel 1매당 20~25mA의 전류를 가해 총 40~50mA(2매)로 평균 2시간 30간 하였다. 전기영동이 끝난 후 gel은 염색용액(31.25% Methanol, 6.25% acetic acid, 62.5% 증류수, PhastGel™ Blue R 350)을 사용하여 4시간 염색과정을 거친 후 탈색용액(31.25% Methanol, 6.25% acetic acid, 62.5% 증류수)을 사용하여 3~4 시간 탈색한 후 단백질 bands의 발현양상을 비교하였다.

## ⑤ 무기성분 분석

무기성분은 A.O.A.C 방법에 따라 건식법으로 전처리하여 분석하였다. 시료 2 g을 550℃에서 회화한 후 0.5 N HNO<sub>3</sub> 10 mL을 넣고 균질화 시킨 다음 GF/C(90 mm, Cat No. 1822 090, Whatman International Ltd. Maidstone, England) 여과지로 여과하고, 0.5 N HNO<sub>3</sub> 25 mL로 정용한 다음 inductively coupled plasma

spectrometer(ICP, Thermo Jarrell Ash, Franklin, MA, USA)로 분석하였고 분석조건은 표 4와 같으며 Ca, Mg, Na, Zn, Fe 및 K를 분석하였다.

표 4. Inductively coupled plasma (ICP) 분석조건

Auxiliary gas flow	High (1.5 L/min)
Nebulizer pressure	30.1 psi
Approximate RF power	950 w
Frequency	27.12 MHz
Type	Simultaneous
Analysis pump rate	130 rpm
Pump tubing type	EP-19

#### ⑥ phytate 분석

시료 2 g에 2.0%(v/v) HCl-10%(w/v) Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액 50 mL을 넣고, 상온에서 교반기 (Vision Scientific Co., Bucheon, Korea)로 200 rpm에서 3시간 추출 후, Whatman filter paper (20-25 μm, No. 4, Whatman)로 여과하였다. 여과액 10 mL을 falcon tube에 담은 후 FeCl<sub>3</sub> (FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 2 g을 conc. HCl 16.3 mL에 용해 후 증류수로 최종 1L로 정용) 12 mL을 첨가하고 끓은 물에서 75분간 가열하였다. 그리고 상온에서 1시간 동안 냉각시킨 다음 3,500 rpm에서 15분간 원심 분리하여 얻은 상층액을 Whatman filter paper(11 μm, No. 1, whatman)로 여과한 후 증류수로 50 mL로 정용하여 분석 시료로 사용하였다. 분석시료 4 mL에 Wade Reagent[0.03%(w/v) FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O와 0.3%(w/v) sulfosalicylic acid (Sigma-Aldrich)를 증류수 100 mL로 용해] 1 mL 첨가하여 5초 동안 교반시키고 상온에서 10분간 반응시킨 용액을 spectrophotometer (UV-1650PC, Shimadzu, Kyoto, Japan)로 500 nm에서 흡광도를 측정하여 phytate 분석하였으며 phytate의 표준물질로는 sodium phytate(Sigma-Aldrich)를 사용하여 검량선을 작성하였으며 각각의 품종에 따른 phytate의 함량 분석을 하였다. 두유와 두부의 phytate 함량도 위 방법으로 분석하였는데 두유는 시료 20mL에 시약을 넣어서 분석하였고, 두부의 phytate 함량은 두부 30g을 이용하여 분석하였다.

#### (다) 두유 및 두부의 품질특성 분석

##### ① 수율 측정

두유의 수율은 생산된 두유의 부피(mL)를 측정하여 원료 대두의 단위 무게 g 당 두유의 생산량 mL/g으로 나타내었으며, 두부의 수율은 Pyun 등의 방법으로 사용한 원

료 대두 g 당 얻어지는 두부의 무게와의 비율로 수율(%)을 나타내었다.

## ② pH 측정

두유의 pH는 pH meter(Orion 4 star, Thermo Scientific, Beverly, MA, USA)로 측정 하였으며, 두부의 pH는 두부 5 g에 증류수 50 mL를 가하여 마쇄한 후 Whatman filter paper(8  $\mu$ m, No. 2, whatman)로 여과하여 pH meter(Thermo Scientific)를 이용하여 3회 반복 측정하였다.

## ③ 색도 측정

두유와 두부의 색도는 색차계(Chromatometer CR-300, Minolta Co., Tokyo, Japan)를 사용하여 명도(lightness)를 나타내는 L값, 적색도(redness)를 나타내는 a값 및 황색도(yellowness)를 나타내는 b값을 3회 반복 측정하여 평균값으로 나타내었다. 이 때 표준색은 L값(98.07), a값(0.63) 및 b값(0.47)인 표준색판을 이용하여 표준화 작업을 한 후 측정하였다.

## ④ 점도 측정

두유의 점도는 Brookfield viscometer(RV-DV II+, Brookfield Engineering Labs, Middleboro, MA, USA)를 사용하여 20°C에서 spindle No. 2로 100 rpm, 60초간 회전시킨 후 측정하였으며 3회 반복 측정하였다.

## ⑤ Texture 측정

두부의 texture는 일정한 크기(1×1×1 cm)로 절단한 다음 Rheometer(RT-3010D, Fudoh, Tokyo, Japan)를 사용하여 견고성(Hardness), 응집성(Cohesiveness), 탄력성(Elasticity), 씹힘성(Chewiness) 및 검성(Gumminess) 측정하였다. 측정조건은 test type : mastication, max weight : 2 kg, table speed : 30 mm/min, adaptor type : 2Ø 및 반복회수는 4회로 설정하여 실시하였다.

## 2. 연구결과 및 고찰

### 가. 콩 유전자원의 고지방 및 양질지방산 자원 발굴

#### (1) 지방함량

2007년에 재배한 한국, 중국, 미국 콩 유전자원 379종 자원의 지방함량의 평균 및 범위는 표1-1 와 같다. 지방함량 평균은 19.1%이었으며, 최대 26%에서 최소 12.7%이었으며, 넓은 변이폭을 나타내었다(표 5). 지방함량의 분포는 그림 2와 같이 18-20% 범위에 43.5%(165종)가 분포되어 가장 많았으며, 지방함량이 22%이상인 고지방 품종

은 5.5%(21종) 이었고, 24%이상인 자원은 0.8%(3종)이었다. 지방함량이 높은 자원은 모두 중국 자원이었으며, 수농14(26%), 동농434(25.7), 동농46(25%)의 세 자원은 지방함량이 25%이상으로서 매우 높았다(표 6).

표 5. 한국, 중국, 미국 콩 유전자원의 지방함량의 변이

성분	평균±표준편차	최대	최소	C.V.(%)
Oil(%)	19.1±1.9	26.0	12.7	9.9

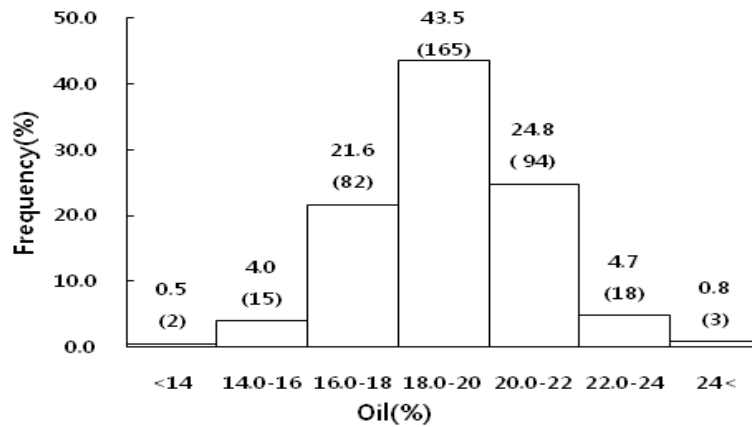


그림 2. 한국, 중국, 미국 콩 유전자원 379개의 지방함량 분포

표 6. 지방 함량이 높은 유망자원

품종명	Oil	지방산 조성					Linoleic/ Linolenic 비율	포화 지방산 <sup>1)</sup>	불포화 지방산 <sup>2)</sup>
		Palmitic	Stearic	Oleic	Linoleic	Linolenic			
수농14	26.0	11.7	2.8	34.7	46.6	4.2	11.1	14.5	85.5
동농434	25.7	10.9	2.9	30.0	49.3	6.9	7.2	13.9	86.1
동농46	25.0	10.7	2.7	24.8	51.7	10.2	5.1	13.3	86.7
구농7714	23.0	9.7	2.8	32.7	49.7	5.1	9.8	12.6	87.4
수농8	22.7	12.1	3.1	25.0	53.4	6.4	8.4	15.2	84.8
흑농44	22.6	10.2	3.1	38.7	43.0	5.1	8.4	13.2	86.8
료녕11	22.6	10.0	2.6	28.6	52.8	6.0	8.8	12.6	87.4

1)포화지방산 : Palmitic + Stearic, 2)불포화지방산 : Oleic + Linoleic + Linolenic

(2) 지방산 조성

콩 지방산의 크로마토그램은 retention time에 따라 palmitic acid와 stearic acid 그리고 oleic acid와 linoleic acid 순으로 20분 이내에 분리되었는데 불포화지방산 보다는 포화지방산의 머무른 시간이 빨라 먼저 검출되었다(그림 3).

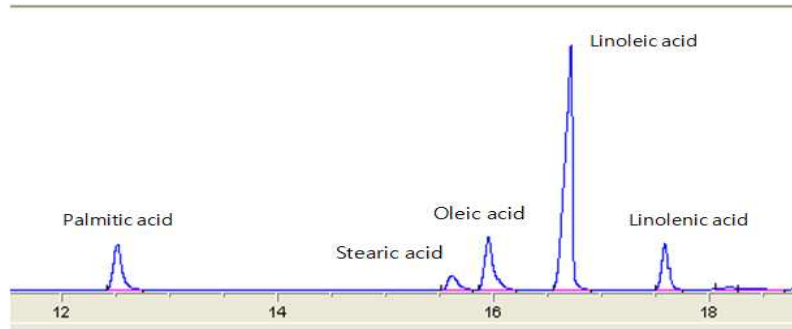


그림 3. 콩 지방산의 GC chromatogram

2007년에 수확된 한국, 중국 및 미국 콩 유전자원 379종의 포화지방산인 palmitic acid의 평균 함량은 10.6%이었으며, 최대 18.1%에서 최소 4.1%이었다. stearic acid의 평균 함량은 2.9%이었고, 범위는 1.9%~12.7%이었다. 불포화지방산인 oleic acid의 평균 함량은 28.2%이었고, 범위는 15.3~56%로 변이계수가 25로 가장 컸다. linoleic acid의 평균함량은 51.2%로서 지방산 중에서 가장 많았고 범위는 24.4~68%이었다. linolenic acid의 평균함량은 7.1%이었고, 범위는 3.4~11.1%이었다. linoleic/linolenic의 비율은 평균 7.5이었고, 최대 17에서 최소 3.8의 범위이었다. 포화지방산(palmitic acid+stearic acid)의 평균은 13.5%이었으며, 범위는 6.7~21.7%이었다. 불포화지방산(oleic acid + linoleic acid + linolenic acid)의 평균은 86.5%이었으며, 범위는 78.3%~93.4% 이었다(표 7).

표 7. 한국, 중국 및 미국 콩 유전자원의 지방산 조성 (%)

통계	지방산 조성					Linoleic/ Linolenic 비율	포화 지방산 <sup>1)</sup>	불포화 지방산 <sup>2)</sup>
	Palmitic	Stearic	Oleic	Linoleic	Linolenic			
평균±	10.6±	2.9±	28.2±	51.2±	7.1±	7.5±	13.5±	86.5±
표준편차	1.6	0.7	7.1	6.1	1.5	2.0	1.8	1.8
최대	18.1	12.7	56	68.1	11.1	17	21.7	93.4
최소	4.1	1.9	15.3	24.4	3.4	3.8	6.7	78.3
C.V.(%)	15.2	22.2	25	11.9	21.2	26.4	13	2

1)포화지방산 : Palmitic + Stearic, 2)불포화지방산 : Oleic + Linoleic + Linolenic

콩 유전자원의 palmitic acid, stearic acid, oleic acid, linoleic acid, linolenic acid 함량의 분포는 그림 4와 같다. palmitic acid는 8-14% 범위에 97%(359종)로 가장 많이 분포되었으며, 14% 이상인 품종은 2개로서 미국자원인 KLG12075(18.1%), KLG12076(18.0%)이었다. stearic acid는 2-3%범위에 63.6%(241개)로 가장 많이 분포되었고, 5% 이상인 자원은 1종으로서 미국 콩자원인 KLG12077(12.7%)이었다. oleic acid는 25-30% 범위에 116종으로 가장 많이 분포되었고, 50%이상인 자원은 한국콩 품종인 봉의콩(50.9%), 광안콩(55.9%), 중국콩인 길림14(52.2%), 미국콩인 KLG12074(56%), KLG12073(%)이었다. linoleic acid는 50-55% 범위에 가장 많이 분포되었고, 60%이상인 자원은 중국콩인 철풍30(60.3%)외에 미국품종인 KLG12092(60.7%), KLG12086(64.1%), KLG12088(65.6%), KLG12080(65.6%), KLG12082(65.8%), KLG12081(67%), KLG12083(68.1%) 이었다. linolenic acid는 6-8%사이에 50.4%(191자원)로 가장 많이 분포되었고, 4%이하인 자원은 중국콩인 길농9705-3(3.8%)외에 모두 미국콩이었으며, 가장 작은 품종은 KLG12093(3.4%)이었다.

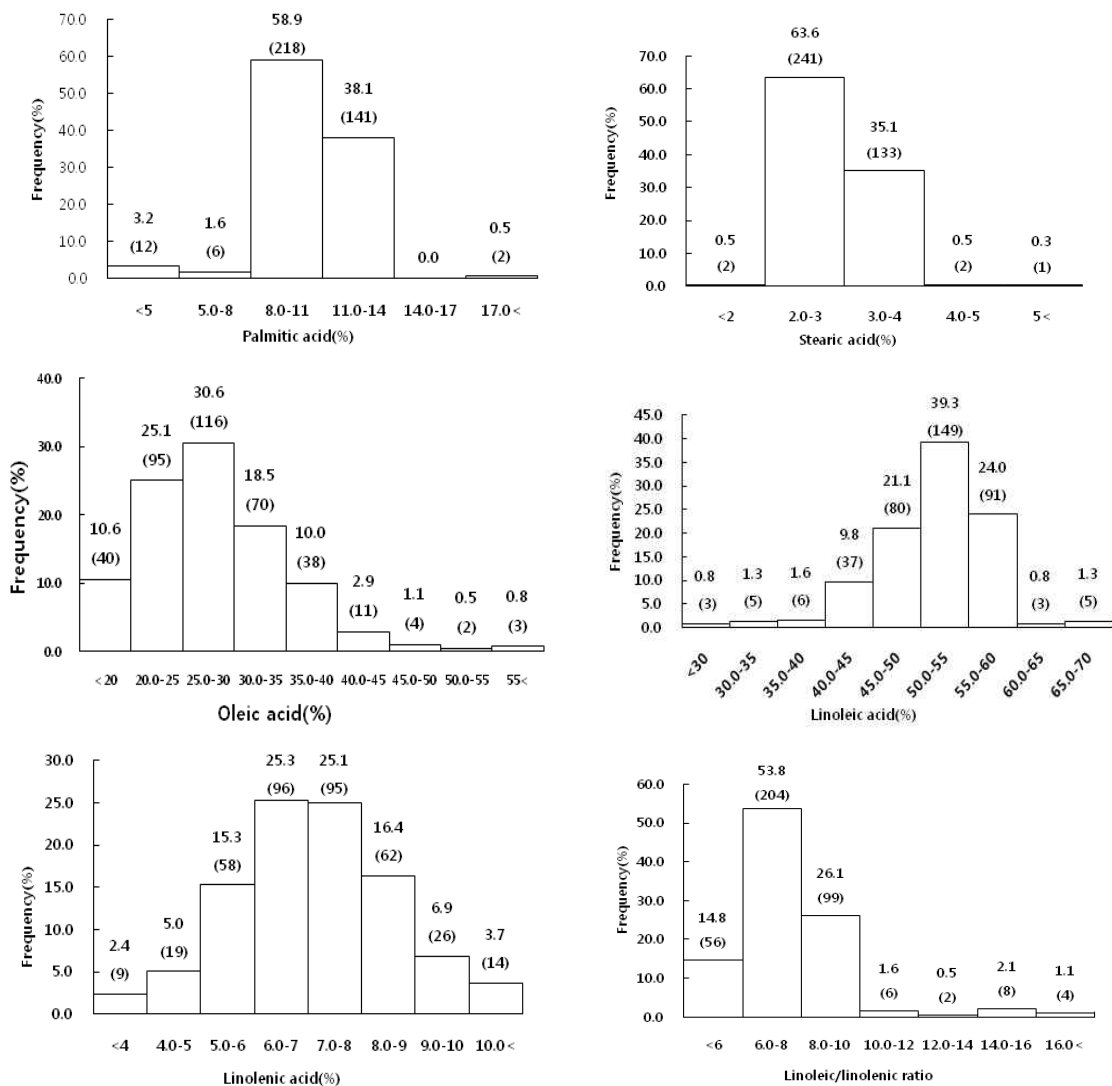


그림 4. 한국, 중국 및 미국 콩 유전자원의 지방산 분포

oleic acid 함량이 가장 높은 유망자원은 미국콩인 KLG12073(56%)과 KLG12074 (56%)이었으며, 광안콩(55.9%), 길림14(52.2%), 봉의콩(50.9%)도 50% 이상이였다(표 8). linoleic acid 함량이 많은 품종은 모두 미국콩이었으며, KLG12083이 68.1%로 가장 높았다(표 9).

표 8. Oleic acid가 높은 유망자원 (%)

유망자원	Oil	Oleic	Linoleic	Linolenic	Linoleic/ Linolenic 비율	포화 지방산 <sup>1)</sup>	불포화 지방산 <sup>2)</sup>
KLG12073	19.4	56.0	25.1	6.7	3.8	12.2	87.8
KLG12074	20.1	56.0	25.1	6.7	3.8	12.3	87.7
광안콩	15.2	55.9	24.4	6.4	3.8	13.2	86.8
길림14	17.8	52.2	32.2	4.2	7.7	11.5	88.5
봉의	15.5	50.9	32.3	7.2	4.5	9.6	90.4

1)포화지방산 : Palmitic + Stearic, 2)불포화지방산 : Oleic + Linoleic + Linolenic

표 9. linoleic acid 함량이 높은 유망자원 (%)

유망자원	Oil	Oleic	Linolei c	Linoleni c	Linoleic/ Linolenic 비율	포화 지방산 <sup>1)</sup>	불포화 지방산 <sup>2)</sup>
KLG12083	17.6	19.2	68.1	4.6	14.9	8.1	91.9
KLG12081	19.5	22.0	67.0	4.0	16.8	6.9	93.1
KLG12082	20.0	23.2	65.8	4.1	15.9	6.8	93.2
KLG12080	21.6	22.9	65.6	4.0	16.3	7.4	92.6
KLG12088	16.3	22.8	65.6	4.7	13.8	6.9	93.1

1)포화지방산 : Palmitic + Stearic, 2)불포화지방산 : Oleic + Linoleic + Linolenic

포화지방산과 불포화지방산의 분포는 그림 5와 같다. 포화지방산은 11-14% 범위에 61.5%(233자원)로 가장 많이 분포하였고, 17%이상인 자원은 미국자원인 KLG12077 (17.2%), KLG12076(21.3%), KLG12075(21.7%)이었다. 불포화지방산은 78-93% 범위에 분포하였고, 90%이상인 자원은 16개 이었고, 봉의콩(90.4%)외에 모두 미국자원이었으며, KLG12085(93.4%)가 가장 높았다.



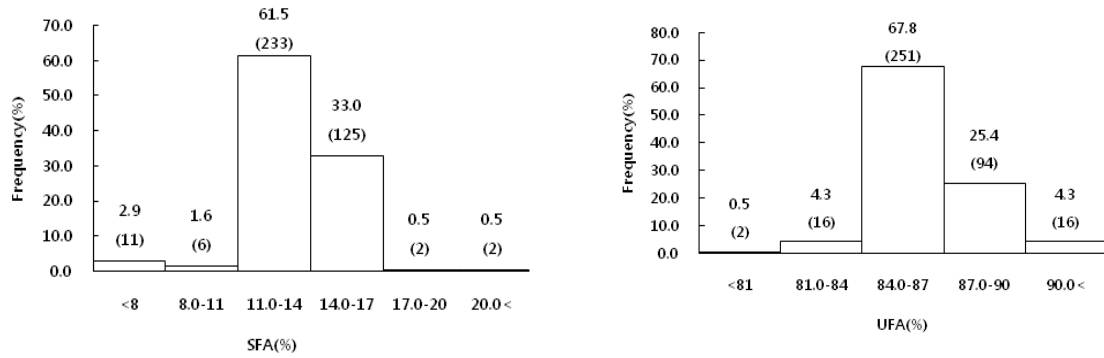


그림 5. 한국, 중국 및 미국 콩 유전자원의 포화지방산, 불포화지방산의 분포.

한국, 중국 및 미국 콩 379종의 유전자원 중에서 고지방 품종은 모두 중국자원이었고, 그중에서 수농14(26%), 동농434(25.7%) 및 동농46(25%)이 가장 높았다. oleic acid 함량은 미국자원이인 KLG12073(56%)와 KLG12074(56%)이 가장 높았고, 국내 자원인 광안콩(55.9%), 봉의콩(50.9%)이었고, 중국 자원인 길림14(52.2%)도 50% 이상으로 높았다. linoleic acid 함량은 미국자원이 높았으며, 그중에서 KLG12083(68.1%)이 가장 높았고, 한국자원에서는 안평콩(60%)이 가장 높았고, 중국자원에서는 철풍30(60.3%)이 높았다. linolenic acid 함량은 KLG12095(3.4%)이었으며, 3%이하인 자원은 없었다. linoleic/linolenic 비율을 보면 미국자원이 높았으며, KLG12093(17.1)이 가장 높았다. 불포화지방산함량은 미국콩이 높았으며, KLG12085(93.4%)이 가장 높았고, 한국자원에서는 봉의콩(90.5%)이 높았다(표 10).

표 10. 한국, 중국 및 미국 콩 유전자원의 고지방, 양질 지방산 자원 선발

구분	자원명
고지방(≥24%)	Shuinong14(C*,26%), Dongnong434(C,25.7%), Dongnong46(C,25%)
고oleic acid(≥50%)	KLG12073(A,56%), KLG12074(A,56%), Kwangan(K,55.9%), Jilin14(C,52.2%), Bongeu(K,50.9%)
고Linoleic acid(≥59%)	KLG12083(A,68.1%), KLG12081(A,67.1%), KLG12082(A,65.9%), KLG12080(A,65.6%), KLG12088(A,65.6%), KLG12086(A,64.1%), KLG12092(A,60.7%), Tiefeng30(C,60.3%), Anpyeong(K,60%)
저Linolenic acid(≤4%)	KLG12093(A,3.4%), KLG12096(A,3.5%), KLG12097(A,3.6%), KLG12095(A,3.7%), KLG12085(A,3.8%), KLG12087(A,3.8%), 196(C,3.8%), KLG12079(A,4.0%), KLG12081(A,4.0%)
고linoleic/linolenic acid 비율(≥15.0)	KLG12093(A,17.1), KLG12081(A,16.8), KLG12096(A,16.5), KLG12080(A,16.3)
고 USFA(≥ 90%)	KLG12085(A,93.4%), KLG12082(A,93.2%), KLG12088(A,93.1%), Bongeu(K,90.5%)

2009년에 재배된 일본 자원 140종의 평균 지방함량은 17.2%이었고, 지방함량의 분포는 16.8-18.8%의 범위가 60종으로 가장 많이 분포되었고, 22%이상은 2종으로서 1-116(22.8%)과 1-112(22.4%)이었다(표 11, 그림 6). 지방산 함량의 평균은 Oleic acid는 평균 26.1%이었고, 최대 55.2%, 최소 16.6%의 범위이었고, 변이계수는 24.4%로서 변이가 컸다. linoleic acid의 함량은 평균 51.9%로서 최대 59.1%, 최소 25.8%이었다. linolenic acid의 함량은 평균 8.9%, 최대 12%, 최소 3.0%이었다. linoleic/linolenic의 비율은 평균 6이고, 최대 18.6, 최소 3.4이었다. 불포화지방산의 함량은 평균 13.1%이었고, 포화지방산의 함량은 평균 86.9%이었으며, 최대 93.4%이었다. oleic acid의 함량 분포를 보면 16-32%이상이 118종으로 가장 많이 분포되었고, 48%이상인 자원은 1종이었다. linoleic acid의 함량은 52-59%의 범위에 77종으로서 가장 많이 분포되었고, linolenic acid의 분포는 8-9.4%의 범위에 61종으로 가장 많이 분포되었다. linoleic/linolenic acid의 비율은 5-6.49범위에 가장 많이 분포되었다(표 12, 그림 7).

표 11. 일본 도입자원의 지방함량의 평균, 최대, 최소 및 변이계수

구분	평균±표준편차	최대	최소	C.V.(%)
Oil(%)	17.2±2.0	22.8	12.6	11.3

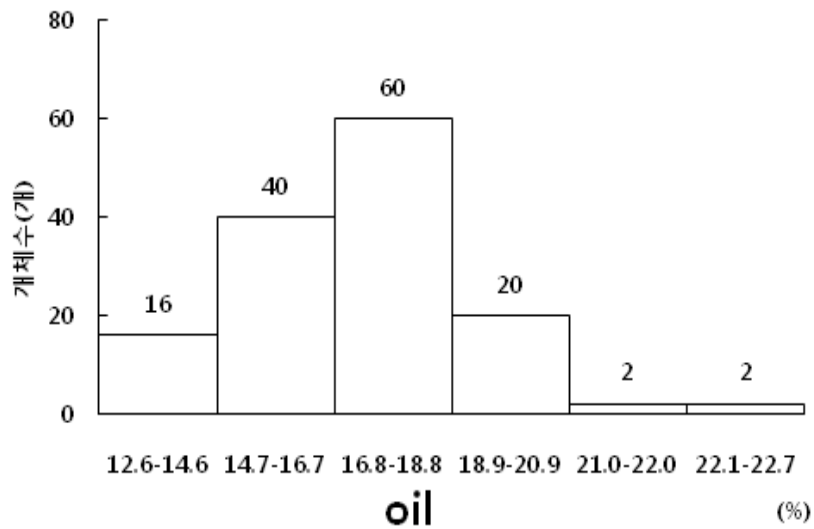


그림 6. 일본도입자원의 지방함량의 분포

표 12. 일본 도입자원의 지방산 조성 변이 (%)

통계	지방산 조성					Linoleic /Linolenic 비율	포화 지방산 <sup>1)</sup>	불포화 지방산 <sup>2)</sup>
	Palmitic	Stearic	Oleic	Linoleic	Linolenic			
평균±	10.6±	2.5±	26.1±	51.9±	8.9±	6.0±	13.1±	86.9±
표준편차	1.0	0.6	6.4	4.8	1.6	1.4	1.3	1.3
최대	12.8	12.8	55.2	59.1	12	18.6	16.2	93.4
최소	7.7	0.9	16.6	25.8	3.0	3.4	10.0	83.3
C.V.(%)	9.0	26.4	24.4	9.3	18.0	23.9	10.1	1.5

1)포화지방산 : Palmitic + Stearic, 2)불포화지방산 : Oleic + Linoleic + Linolenic

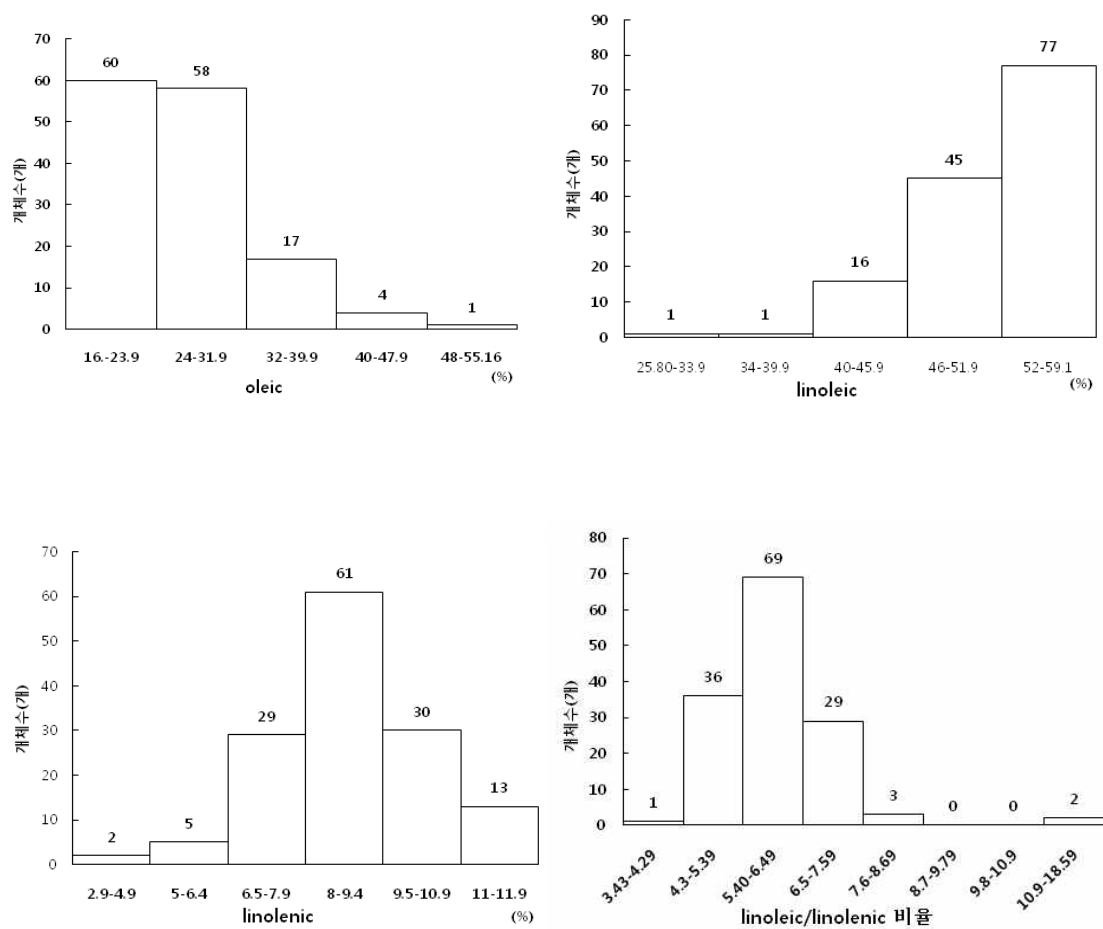


그림 7. 일본 도입자원의 지방산 분포

일본 도입자원중에서 고지방 자원은 계통번호 1-116이 22.8%로 가장 높았고, 1-112, 1-036, 1-066 및 Bay는 20%이상이었다. oleic acid 함량이 높은 자원은 M23이 55.2%로 가장 높았다. linoleic acid 함량이 높은 자원은 1-189가 59.1%로 가장 높았고, 1-101, 1-127, 6-038, 1-007도 58%이상으로 높았다. linolenic acid 함량은

MS382자원이 2.9%로 가장 낮았다. linoleic/linolenic acid의 비율은 MS382가 18.6으로 가장 높았다(표 13).

표 13. 일본 도입자원의 고, 저지방 및 지방산 자원의 발굴

	High Oil	High Oleic	High Linoleic	Low Linolenic	High Linoleic/Linolenic 비율
1	1-116* (22.8%)	M23 (55.2%)	1-189 (59.1%)	MS382 (2.9%)	MS382 (18.6)
2	1-112 (22.4%)	1-131 (43.2%)	1-101 (58.9%)	T2427 (4.2%)	T2427 (11.1)
3	1-036 (21.8)	1-004 (42.7%)	1-127 (58.9%)	1-004 (6.1%)	SW2084 (8.1)
4	1-066 (21.1%)	1-106 (40.9%)	6-038 (58.1%)	SW2084 (6.2%)	1-175 (7.9)
5	Bay (20.9%)	1-105 (40.8%)	1-007 (58.1%)	1-116 (6.2%)	6-003 (7.7)

\* 일본도입 RIL 계통 번호

### (3) 수집 및 도입국가별 지방함량 및 지방산 조성

수집 및 도입국가별로 한국, 중국, 미국종의 지방함량 및 지방산 조성을 조사한 결과는 표 14 및 표 15와 같다. 수집 국가별 지방함량의 평균은 중국콩이 평균 20.0%로 가장 높았고, 다음으로 미국콩이 18.9%이었고, 한국콩이 17.8%로 가장 낮았다. Oleic acid 평균함량은 중국콩이 29.2%로 가장 높았고, 미국콩이 27%, 한국콩이 26.5%이었다. Linoleic acid 함량은 미국콩이 54.2%로 가장 높았고, 한국콩이 51.2%, 중국콩이 50.7% 이었다. Linolenic acid 함량은 한국콩이 8.2%로 가장 높았고, 중국콩이 6.6% , 미국콩이 6.3%이었다. Linoleic acid / Linolenic acid의 비율은 미국콩이 10으로 가장 높았고, 중국콩이 7.8, 한국콩이 6.3의 순으로 낮았다. 불포화지방산 함량은 미국콩이 88.2%로 가장 높았고, 중국콩이 86.5%, 한국콩이 85.9% 순으로 낮았다.

표 14. 한국, 중국, 미국 콩 유전자원의 지방함량 및 지방산 조성 변이

(%)

구분	통계	Oil	지방산 조성				
			C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
한국 n=12	평균± 표준편차	17.8±1.5 <sup>c</sup>	11±1.1 <sup>a</sup>	3±0.5 <sup>b</sup>	26.5±7.3 <sup>c</sup>	51.2±5.9 <sup>b</sup>	8.2±1.2 <sup>a</sup>
	8 범위	13.3~20.8	7.5~13.1	2.0~4.4	15.2~55.9	24.4~59.9	5.8~11.1
중국 n=21	평균± 표준편차	20.0±1.9 <sup>a</sup>	10.7±0.8 <sup>b</sup>	2.8±0.4 <sup>c</sup>	29.2±6.5 <sup>a</sup>	50.7±5.3 <sup>b</sup>	6.6±1.1 <sup>b</sup>
	4 범위	14.6~26.0	8.8~13.0	1.9~3.8	16.6~52.2	32.2~60.3	3.8~10.2
미국 n=37	평균± 표준편차	18.9±1.9 <sup>b</sup>	8.7±4.1 <sup>c</sup>	3.2±1.7 <sup>a</sup>	27.7±1.0 <sup>b</sup>	54.2±10.3 <sup>a</sup>	6.3±2.2 <sup>c</sup>
	범위	12.7~21.6	4.1~18.1	2.0~12.7	16.5~56.0	25.1~68.1	3.4~10.8
	평균	19.1	10.6	2.9	28.2	51.2	7.1

표 15. 한국, 중국, 미국 콩 유전자원의 linoleic /linolenic acid의 비율, 포화 및 불포화 지방산함량

구분	통계	C18:2/C18:3 비율	포화지방산(%)	불포화지방산(%)
한국 n=128	평균±표준편차	6.3±0.8 <sup>c</sup>	14.1±1.3 <sup>a</sup>	85.9±1.3 <sup>c</sup>
	범위	3.8~8.4	9.6~16.4	83.6~90.4
중국 n=214	평균±표준편차	7.8±1.0 <sup>b</sup>	13.5±1.0 <sup>b</sup>	86.5±1.0 <sup>b</sup>
	범위	4.3~11.1	11.3~16.8	83.2~88.7
미국 n=37	평균±표준편차	10±4.7 <sup>a</sup>	11.8±4.3 <sup>c</sup>	88.2±4.3 <sup>a</sup>
	범위	3.8~17.0	6.6~21.7	78.3~93.4
	평균	7.5	13.5	86.5

국가별 지방 함량 분포를 볼 때, 한국콩은 16-20%범위에 많이 분포되었고, 미국콩은 18-20%범위에 많이 분포되었으며, 중국콩은 18-22%범위에 많이 분포되었다. oleic acid 함량을 보면 한국콩은 15-30%의 범위에 많이 분포되었고, 중국콩은 25-30%의 범위에, 미국콩은 15-40%의 범위에 고루 분포되었다. linoleic acid 함량은 한국콩과 중국콩 모두 50-55%의 범위에 많이 분포되었고, 미국콩은 55-60%의 범위

에 많이 분포되었으며, 고 linoleic acid 자원은 모두 미국자원이었다. linolenic acid 함량은 한국콩은 7.1-8.0%의 범위에 많이 분포되었고, 중국콩은 6.1-7%의 범위에 많이 분포되었으며, 미국콩은 고루 분포하였다(그림 8).

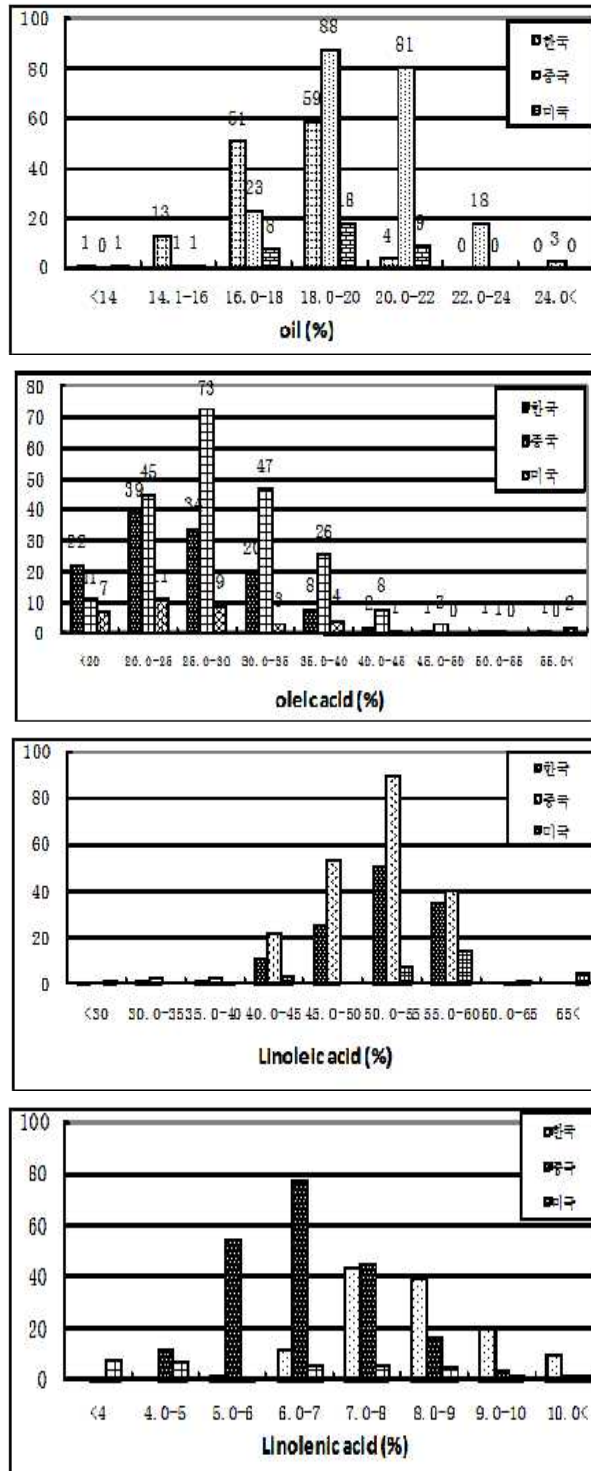


그림 8. 국가별 지방 함량, 지방산 조성 분포도

(4) 지방함량과 지방산 조성과의 상관관계

한국, 중국 및 미국 콩 379종을 대상으로 지방함량과 지방산 조성의 상관을 분석한 결과는 표 16과 같다. 지방함량은 oleic acid 함량과 부의 상관이었으며, 지방산중에서 포화지방산인 C16:0와 C18:0는 불포화지방산인 C18:1와 고도의 부의 상관이었다. C18:1은 다른 종류의 불포화 지방산인 C18:2 및 C18:3과 고도의 부의 상관이었다. C18:2와 C18:3은 고도의 정의 상관이었다.

표 16. 한국, 중국, 미국 콩 유전자원의 지방함량, 지방산 조성의 상관관계

구분	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	포화 지방산	불포화 지방산
Oil	-0.056	-0.055	0.088	0.02	-0.413**	-0.072	0.072
C16:0		0.038	-0.231**	-0.114*	0.462**	0.929**	-0.929**
C18:0			-0.384**	0.253**	0.312**	0.404**	-0.404**
C18:1				-0.916**	-0.590**	-0.353**	-0.353**
C18:2					0.283**	-0.011	0.011
C18:3						0.538**	-0.538**
포화지방산							-1.000**

나. 양질 지방산 함유 계통육성

2007년도 교배조합 20조합 중에서 CS27001 등 5조합은 2008년도에 F<sub>1</sub>양성, 2009년도에 F<sub>2</sub>를 양성하였다. 그 외 CS27002 등 15조합은 2008년도에 F<sub>1</sub>세대 60개체를 양성하였고, 2009년도에 F<sub>2</sub> 세대를 양성하였으며, F<sub>2</sub>세대에서 선발목표(황,흑색종피, 눈색황, 다수초형)에 따라 5조합에서 우량계통 113개체를 선발하였다. 각 조합별로 후기세대까지 Bulk 육종법을 수행하기 위하여 SSD 육종법으로 교배번호 CS27001은 252립, CS27004는 352립, CS27006은 140립, CS27114는 196립 및 CS27017은 552립을 선발하여 총 1,492립을 선발하였다(표 17, 표 18). 본 연구에서 육성된 계통들은 차후 계속적인 세대축진의 수행과 아울러 유망계통을 선발할 예정이다.

표 17. 양질 지방산 계통육성을 위한 F<sub>1</sub> 양성

교배번호	교배조합	수확 개체수	교배번호	교배조합	수확 개체수
CS27002	태광콩 x KLG12074	1	CS27015	청자3호x KLG12073	3
CS27003	청자3호x Fudou	5	CS27018	청자3호x KLG12074	5
CS27005	청자3호x KLS84099	3	CS27019	태광콩 x KLS84099	3
CS27007	대풍콩x Fudou	3	CS27020	청자3호x 흑농44	1
CS27008	대풍콩x KLS84099	3	CS27021	대풍콩xKen83-2922	5
CS27010	대풍콩x Fudou	4	CS27022	태광콩xKen83-2922	5
CS27012	대원콩x Fudou	8	CS27023	청자3호xKen83-292 2	5
CS27013	흑청콩 X KLG12074	7	계		60

표 18. 양질 지방산 양질 지방산 계통육성을 위한 F<sub>2</sub> 양성

교배번호	교배조합	과중 립수	유망 계통 선발개체수	SSD 선발립수	선발목표특성
CS27001	경상대콩xKLG12073	400	45	252	황, 흑색종피, 눈색황, 다수초형
CS27004	대원콩xKLG12073	511	21	352	황색종피, 눈색황, 다수초형
CS27006	대원콩xKLG12074	525	24	140	황색종피, 눈색황, 다수초형
CS27014	경상대콩xKLG12074	368	14	196	황, 흑색종피, 눈색황, 다수초형
CS27017	태광콩xKLG12073	762	9	552	황색종피, 눈색황, 다수초형
계		2,564	113	1,492	

다. 고지방 및 양질 지방산 유용자원의 환경적 변이 및 안정성 구명

(1)년차간 변이

(가)년차별 콩 생육기간의 기상



2007, 2008년의 시험지역인 청주의 기상조건은 표 19와 같다. 평균온도는 파종기-개화기 동안에는 07년에는 24℃로서 08년의 25.2℃보다 1.2℃가 낮았다. 개화기-성숙기의 성숙기간에는 07년이 24.2℃로서 08년의 23.6℃보다 0.6℃가 높았다. 파종에서 성숙기까지의 생육기간 동안에는 07년도에는 24.1℃, 08년도에는 24.3℃로서 큰 차이가 없었다. 최고온도와 최저온도의 온도교차를 볼 때 파종기-개화기에는 07년이 9.1℃, 08년이 8.6℃이었으며, 개화-성숙기에는 07년이 8.0℃, 08년이 10.6℃로서 08년이 2.6℃ 높았으며, 파종에서 성숙기까지의 생육기간에는 07년이 8.5℃, 08년이 9.7℃로서 08년이 1.2℃가 높았다. 강수량은 파종기-개화기 동안에는 07년이 363.1mm, 08년이 330.2mm로서 07년이 30mm정도 많았으며, 개화-성숙기에는 07년이 670.1mm, 08년이 300.7mm로서 07년이 370mm정도 많았다. 파종기에서 성숙기까지의 생육기간에는 07년이 1033.2mm, 08년이 630.9mm로서 07년이 400mm정도 더 많았다.

표 19. 2007, 2008년도 콩 생육기간의 기상

년차	기간	평균온도 (℃)	최고온도(a) (℃)	최저온도(b) (℃)	a-b (℃)	강수량 (mm)
2007	파종-개화기	24.0	29.0	19.9	9.1	363.1
	개화-성숙기	24.2	28.6	20.7	8.0	670.1
	파종-성숙기	24.1	28.8	20.3	8.5	1033.2
2008	파종-개화기	25.2	29.9	21.2	8.6	330.2
	개화-성숙기	23.6	29.4	18.9	10.6	300.7
	파종-성숙기	24.3	29.6	19.9	9.7	630.9

(나) 년차 및 품종별 지방함량 및 지방산 조성

지방함량과 지방산조성의 분산분석을 보면(표 20), 년차간에 지방함량과 palmitic acid를 제외한 stearic, oleic, linoleic 및 linolenic acid가 유의성이 인정되었고, 품종간에는 지방함량과 지방산 간에 유의성이 인정되었다.

표 20. 년차별 고지방 및 양질지방산 자원의 지방 및 지방산조성의 분산분석

구분	df	M. S.					
		Oil	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
년도 (A)	1	110.82**	42.81	7.73**	321.95*	303.53**	13.31**
품종 (B)	35	20.21**	0.80**	0.79**	320.7**	318.78**	11.92**
A * B	35	3.53	0.20	0.14	58.29	38.21	1.35
반복 (A *B)	98	3.51	1.93	0.06	2.48	2.66	0.08
계	169	-	-	-	-	-	-

년차에 따라서 평균 지방함량은(표 21), 07년은 19.1%. 08년은 20.7%로서 08년이 높았으며, palmitic acid는 년차간에 차이가 없었으며, stearic acid는 08년이, oleic acid는 07년이, linoleic acid는 08년이, linolenic acid는 07년이 많았다.

표 21. 고지방 및 양질지방산 자원의 지방 및 지방산조성의 년차간 변이 (%)

년도	Oil	지방산 조성				
		C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
2007	19.1 <sup>b</sup>	10.3 <sup>a</sup>	2.8 <sup>b</sup>	32.1 <sup>a</sup>	47.6 <sup>b</sup>	6.9 <sup>a</sup>
2008	20.7 <sup>a</sup>	10.5 <sup>a</sup>	3.2 <sup>a</sup>	29.4 <sup>b</sup>	50.3 <sup>a</sup>	6.3 <sup>b</sup>

품종간에 지방함량은 중국콩인 동농46호가 07년에 26%, 08년에 25%로서 07년과 08년의 평균 25.5%로 가장 높았으며, 그 다음으로는 2개년 평균으로 중국콩인 수농 20호가 22.5%, 수05-7466가 22.6%, 수05-7368가 22.3%, 동농47호가 22.0%, 공교 93155-13가 22.0% 및 미국자원인 KLG12080이 22.0%로 높았다. 년차간에 지방함량이 높은 자원들은 대부분이 중국콩들로서 년차간에 변이가 적은 자원들이며 고지방함량의 품종개발에 유용자원으로 이용이 가능할 것으로 생각된다. 한국콩중에서는 대망콩이 21.2%로서 높은 경향이였다. 지방산 중에서 포화지방산인 palmitic acid 함량이 높은 자원은 KLG12075와 KLG12076이였고 낮은 자원은 KLG12080와 KLG12085이였으며, stearic 함량이 높은 자원은 광안콩과 새별콩이였으며, 낮은 자원은 남천콩, KLG12080, 동농48 및 검정새울콩이였다(표 22).

표 22. 년차별 지방 및 포화지방산 함량의 변이

(%)

품종	Oil			Palmitic			Stearic			포화 지방산		
	07년	08년	평균	07년	08년	평균	07년	08년	평균	07년	08년	평균
광안콩	15.2	17.5	16.3	10.1	12.2	11.2	3.1	4.0	3.5	13.2	16.1	14.7
봉의콩	15.5	18.3	16.9	7.5	8.8	8.1	2.0	3.1	2.6	9.6	11.9	10.7
단백콩	15.2	18.1	16.6	9.4	11.7	10.5	2.9	3.5	3.2	12.3	15.2	13.8
검정콩2호	18.9	20.4	19.7	9.2	9.6	9.4	2.4	3.1	2.8	11.6	12.7	12.1
검정새울콩	17.8	18.2	18.0	11.1	11.9	11.5	2.2	2.7	2.5	13.3	14.6	13.9
흑청콩	18.9	18.9	18.9	11.7	10.8	11.2	3.2	3.3	3.2	14.8	14.0	14.4
남천콩	17.3	20.3	18.8	9.4	9.5	9.4	2.2	2.6	2.4	11.6	12.0	11.8
대망콩	20.8	21.6	21.2	11.4	11.8	11.6	3.3	3.4	3.4	14.8	15.2	15.0
새별콩	18.6	21.3	20.0	11.8	11.6	11.7	3.4	3.8	3.6	15.2	15.4	15.3
진품콩2호	18.3	21.3	19.8	13.1	13.6	13.3	3.0	3.6	3.3	16.1	17.1	16.6
진울콩	16.3	19.4	17.9	10.4	10.4	10.4	2.4	2.7	2.6	12.8	13.1	13.0
KLG12075	19.4	21.1	20.3	9.5	9.7	9.6	2.7	3.3	3.0	12.2	13.0	12.6
KLG12076	19.2	21.3	20.3	18.1	17.5	17.8	3.6	4.0	3.8	21.7	21.5	21.6
KLG12080	17.9	19.4	18.7	18.0	17.8	17.9	3.4	3.9	3.6	21.3	21.7	21.5
KLG12085	21.6	22.3	22.0	4.9	3.9	4.4	2.6	2.4	2.5	7.4	6.3	6.9
KLG12093	18.6	18.8	18.7	4.1	3.6	3.9	2.5	2.1	2.3	6.6	5.7	6.2
KLG12096	19.7	22.7	21.2	5.3	4.9	5.1	2.7	3.8	3.3	8.0	8.7	8.4
평안1007	20.8	21.8	21.3	8.7	8.3	8.5	2.6	2.8	2.7	11.3	11.1	11.2
공교93155-13	19.1	18.3	18.7	9.4	9.5	9.5	2.6	2.7	2.7	12.0	12.2	12.1
합풍41	21.8	22.2	22.0	11.2	10.4	10.8	2.6	3.1	2.9	13.8	13.4	13.6
흑농34	21.4	22.7	22.1	10.8	11.9	11.4	3.1	3.5	3.3	13.9	15.4	14.7
동농44	20.7	20.8	20.8	10.4	11.8	11.1	2.8	3.2	3.0	13.2	15.0	14.1
중황16	22.2	22.1	22.2	10.1	11.8	10.9	2.9	3.8	3.3	12.9	15.5	14.2
중황28	21.6	19.9	20.8	10.1	10.2	10.1	2.7	2.7	2.7	12.7	12.8	12.8
중황31	21.0	20.7	20.9	10.4	10.8	10.6	2.6	3.0	2.8	13.0	13.9	13.5
동농42	21.8	20.9	21.3	9.5	9.9	9.7	2.9	3.1	3.0	12.4	13.0	12.7
동농46	20.9	19.1	20.0	10.5	11.6	11.0	3.0	3.3	3.2	13.5	14.9	14.2
동농47	25.0	26.0	25.5	10.7	11.2	10.9	2.7	3.3	3.0	13.3	14.5	13.9
동농48	21.3	22.7	22.0	12.9	11.2	12.0	3.3	3.3	3.3	16.2	14.5	15.3
흑농44	18.6	20.2	19.4	10.7	11.2	10.9	2.0	2.8	2.4	12.7	14.0	13.4
수05-7288	20.4	22.8	21.6	10.3	11.1	10.7	2.9	3.8	3.4	13.3	14.8	14.1
수05-7292	21.2	22.5	21.9	10.4	11.2	10.8	3.1	3.5	3.3	13.5	14.8	14.1
수05-7368	21.1	22.4	21.8	10.3	10.6	10.5	3.1	3.5	3.3	13.4	14.1	13.8
수05-7466	20.8	23.9	22.3	12.1	12.5	12.3	3.0	3.4	3.2	15.1	15.9	15.5
수농20	22.2	23.0	22.6	10.9	11.2	11.0	2.6	3.1	2.9	13.6	14.3	13.9
평균	21.0	24.0	22.5	10.9	11.2	11.0	2.6	3.4	3.0	13.4	14.6	14.0

불포화지방산인 oleic acid는 KLG12073이 07년에 56%, 08년에 46%로 2개년 평균 51%로 가장 높았고, 다음으로 광안콩이 07년에 55.9%, 08년에 37.8%로 2개년 평균 46.8%로 높았으며, 봉의콩이 07년에 50.9%, 08년에 35.6%로 2개년 평균 43.3%로 높았다. oleic acid가 낮은 자원은 2개년평균 KLG12075가 16.9%, KLG12076이 17.2%로서 낮았다. linoleic acid함량은 KLG12080이 07년도 66.9%, 08년도 66.9%로 2개년 평균 66.2%로, KLG12085가 07년도 59.6%, 08년도 68.5%로 2개년 평균 64.1%로 높았으며, KLG12073과 광안콩이 2개년 평균 각각 24.4%, 29.6%로 낮았다. linolenic acid는 KLG12075와 KLG12076 및 진품콩2호가 높았으며, KLG12093이 07년 3.4%, 08년 3.4%로 2개년 평균 3.4%, KLG12096이 07년 3.5%, 08년 3.4%로 2개년 평균 3.5%로 낮았다(표 23). 최근에 가공적성 및 산업용으로의 효율적인 활용을 위한 세계적인 콩 육종동향을 볼 때 포화지방산이 낮고, oleic acid가 높거나 또는 linoleic acid가 높으며 linolenic acid가 낮은 품종이 요구되는 실정으로 KLG12073은 고 oleic acid 품종개발 그리고 KLG12080와 KLG12085는 고linoleic acid 품종개발을 위한 육종소재로서의 이용이 가능할 것으로 생각된다.

표 23. 년차별 불포화지방산 함량의 변이

(%)

품종	Oleic			Linoleic			Linolenic			불포화 지방산		
	07년	08년	평균	07년	08년	평균	07년	08년	평균	07년	08년	평균
광안콩	55.9	37.8	46.8	24.4	39.1	31.7	6.4	7.0	6.7	86.7	83.9	85.3
봉의콩	50.9	35.6	43.3	32.3	45.5	38.9	7.2	7.0	7.1	90.4	88.1	89.3
단백콩	47.3	28.1	37.7	33.3	49.3	41.3	7.1	7.4	7.3	87.7	84.8	86.3
검정콩2호	43.6	39.6	41.6	38.0	41.8	39.9	6.8	5.9	6.4	88.4	87.3	87.9
검정새울콩	42.1	34.2	38.2	38.8	44.9	41.8	5.8	6.3	6.1	86.7	85.4	86.1
흑청콩	25.7	24.4	25.1	52.4	54.0	53.2	7.1	7.5	7.3	85.2	85.9	85.6
남천콩	36.3	37.6	36.9	45.2	43.9	44.5	6.9	6.6	6.7	88.4	88.1	88.3
대망콩	21.6	24.8	23.2	55.3	52.5	53.9	8.3	7.6	7.9	85.2	84.9	85.1
새별콩	21.5	24.3	22.9	54.6	53.1	53.8	8.7	7.3	8.0	84.8	84.7	84.8
진품콩2호	25.9	24.9	25.4	48.2	49.5	48.8	9.8	8.5	9.1	83.9	82.9	83.4
진울콩	31.1	29.9	30.5	48.7	50.2	49.5	7.5	6.7	7.1	87.3	86.8	87.1
KLG12073	56.0	46.0	51.0	25.1	34.1	29.6	6.7	6.8	6.7	87.8	86.9	87.4
KLG12075	16.5	17.4	16.9	51.8	52.1	51.9	10.0	9.0	9.5	78.3	78.5	78.4
KLG12076	17.5	16.9	17.2	51.8	52.5	52.1	9.5	8.9	9.2	78.8	78.3	78.6
KLG12080	22.9	22.8	22.9	65.6	66.9	66.2	4.0	4.1	4.1	92.5	93.8	93.2
KLG12085	30.0	21.3	25.7	59.6	68.5	64.1	3.8	4.4	4.1	93.4	94.2	93.8
KLG12093	30.5	26.1	28.3	58.0	61.8	59.9	3.4	3.4	3.4	91.9	91.3	91.6
KLG12096	27.6	29.2	28.4	57.6	56.3	56.9	3.5	3.4	3.5	88.7	88.9	88.8

평안1007	31.6	37.9	34.8	50.4	44.3	47.4	5.9	5.6	5.8	87.9	87.8	87.9
공교93155-13	36.1	34.9	35.5	45.1	46.2	45.6	5.1	5.5	5.3	86.3	86.6	86.5
합풍41	27.0	24.4	25.7	52.7	53.5	53.1	6.5	6.7	6.6	86.2	84.6	85.4
흑농34	31.3	24.6	27.9	50.0	54.0	52.0	5.6	6.5	6.0	86.9	85.1	86.0
동농44	39.8	22.2	31.0	42.2	54.8	48.5	5.0	7.5	6.3	87.0	84.5	85.8
중황16	26.7	33.1	29.9	53.4	48.3	50.9	7.1	5.8	6.5	87.2	87.2	87.2
중황28	27.5	28.8	28.2	52.3	51.3	51.8	7.1	6.0	6.6	86.9	86.1	86.5
중황31	25.9	26.8	26.3	54.5	54.0	54.2	7.2	6.3	6.8	87.6	87.1	87.4
동농42	34.1	23.3	28.7	46.5	54.4	50.5	5.9	7.4	6.7	86.5	85.1	85.8
동농46	24.8	30.7	27.8	51.7	48.0	49.8	10.2	6.8	8.5	86.7	85.5	86.1
동농47	29.2	29.1	29.1	44.3	49.6	47.0	10.2	6.9	8.6	83.7	85.6	84.7
동농48	35.7	30.0	32.8	46.0	50.5	48.2	5.6	5.6	5.6	87.3	86.1	86.7
흑농44	36.7	32.2	34.5	44.2	47.2	45.7	5.9	5.8	5.8	86.8	85.2	86.0
수05-7288	28.0	31.5	29.8	50.0	46.9	48.5	8.5	6.8	7.7	86.5	85.2	85.9
수05-7292	24.0	25.9	24.9	54.0	53.5	53.8	8.6	6.6	7.6	86.6	86.0	86.3
수05-7368	23.4	26.6	25.0	52.1	51.3	51.7	9.4	6.3	7.8	84.9	84.2	84.6
수05-7466	24.2	29.0	26.6	54.1	51.2	52.6	8.1	5.6	6.9	86.4	85.8	86.1
수농20	28.0	34.6	31.3	51.3	45.6	48.4	7.4	5.1	6.3	86.7	85.3	86.0
평균	31.6	29.1	30.3	48.2	50.6	49.4	7.0	6.4	6.7	86.8	86.1	86.5

## (2)파종기간 변이

### (가) 파종기별 콩 생육기간의 기상

2008년 청주지역의 기상조건은 표 24와 같다. 평균온도는 파종기에서 개화기까지의 생육기간에 5월20일 파종은 22.7℃로 가장 낮았고, 6월5일 파종은 23.7℃, 6월20일 파종은 25.7℃로서 6월20일 파종, 6월5일 파종 및 5월20일 파종 순으로 높았다. 개화기에서 성숙기까지의 성숙기간은 5월20일 파종이 24℃로 가장 높았고, 6월5일 파종은 23.5℃, 6월 20일 파종은 22.8℃로서 5월20일 파종이 가장 높았으며, 6월20일 파종이 가장 낮았다. 전 파종기에서 성숙기까지의 생육기간의 평균온도는 5월20일 파종, 6월5일 파종 및 6월20일 파종이 각각 23.5℃, 23.6℃ 및 23.9℃로서 비슷하였다. 각 생육기간의 평균 최고온도와 최저온도의 온도교차를 볼 때 파종기에서 개화기까지는 5월20일 파종이 10.2℃로 높았고, 6월5일 파종은 9.3℃, 6월20일 파종은 8.2℃로 온도교차가 적었다. 개화기에서 성숙기까지는 모두 10.2 - 10.9℃의 범위이었고, 파종기에서 성숙기까지의 전 생육기간에는 큰 차이가 없었다. 강수량은 파종기에서 개화기까지는 5월20일 파종이 131.8mm, 6월20일 파종이 158.1mm 및 6월20일 파종이 282.5mm로서 6월20일 파종이 가장 많았고, 5월20일 파종이 가장 적었다. 개화기에서 성숙기까지는 5월20일 파종이 533.1mm, 6월5일 파종이 499.2mm 및 6월20일 파종이 297.2mm로서 5월20일 파종이 가장 많았고, 6월20일 파종이 가장 적

었다. 전 생육기간의 강수량은 5월20일 파종이 664.9mm, 6월5일 파종이 657.3mm 및 6월20일 파종이 597.7mm로서 5월20일 파종과 6월5일 파종은 많았고, 6월20일 파종은 적었다.

표 24. 파종기별 콩 생육기간의 기상

파종기	기간	평균온도 (°C)	최고온도 (°C)	최저온도 (°C)	a-b (°C)	강수량 (mm)
5월20일	파종-개화기	22.7	27.9	17.7	10.2	131.8
	개화-성숙기	24.0	29.6	19.4	10.2	533.1
	파종-성숙기	23.5	28.9	18.7	10.2	664.9
6월5일	파종-개화기	23.7	28.7	19.4	9.3	158.1
	개화-성숙기	23.5	29.2	18.9	10.3	499.2
	파종-성숙기	23.6	29.1	19.1	10.0	657.3
6월20일	파종-개화기	25.7	30.2	22.0	8.2	282.5
	개화-성숙기	22.8	28.8	17.9	10.9	297.2
	파종-성숙기	23.9	29.3	19.4	9.9	579.7

(나) 파종기 및 품종별 지방함량 및 지방산 조성

파종기 및 품종의 지방함량 및 지방산 조성의 분산분석 결과, 파종기 간에는 유의성이 인정되지 않았으나, 품종간에 그리고 파종기와 품종간의 상호작용이 모두 고도의 유의성이 인정되었다(표 25).

표 25. 파종기 및 품종에 따른 지방함량 및 지방산 조성의 분산분석.

변인	df	M. S.					
		Oil	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
파종기(A)	2	0.76	0.11	0.329	64.62	47.32	1.71
품종 (B)	8	14.79**	63.09**	1.12**	830.8**	1109.01**	24.81**
A * B	16	0.89**	0.25**	0.23**	20.3**	12.14**	0.39**
반복 (A *B)	54	0.065	0.011	0.015	0.0951	0.068	0.0195
계	80	-	-	-	-	-	-

지방함량은 파종기에 따라 차이가 없었으며, 지방산 중에서도 불포화지방산인 palmitic acid와 stearic acid는 차이가 없었고, 포화지방산인 oleic acid는 5월20일

과중이 높았고, linoleic acid와 linolenic acid는 5월20일 과중이 낮았고, 6월5일과 6월20일 과중이 높았다(표 26).

표 26. 고지방 및 양질지방산 자원의 지방 및 지방산 함량의 과중기간 변이 (%)

과중기 (월.일)	Oil	지방산 조성				
		C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
5.20	19.6 <sup>a</sup>	8.7 <sup>a</sup>	2.9 <sup>a</sup>	31.0 <sup>a</sup>	51.4 <sup>b</sup>	6.0 <sup>b</sup>
6.5	19.2 <sup>a</sup>	8.8 <sup>a</sup>	2.7 <sup>a</sup>	28.3 <sup>b</sup>	53.8 <sup>a</sup>	6.5 <sup>a</sup>
6.20	19.5 <sup>a</sup>	8.9 <sup>a</sup>	2.9 <sup>a</sup>	28.3 <sup>b</sup>	53.5 <sup>a</sup>	6.4 <sup>a</sup>

지방함량은 전 과중기에서 흑농44호가 가장 높았고, 다음으로 KLG12093이 높았으며, 과중기에 따른 지방함량의 변이가 적었다. 포화지방산인 Palmitic acid(C16:0)는 전 과중기에서 녹채콩이 가장 높았고, KLG12081이 가장 낮았다. Stearic acid(C18:)는 전 과중기에서 흑농44가 가장 높았고, KLG12081, KLG12093이 가장 낮았다(표 27). 불포화지방산인 oleic acid(C18:1)는 전 과중기에서 KLG12074가 가장 높았고 대풍콩이 가장 낮았는데, KLG12074는 과중기 간에 변이가 작았으며 고 oleic acid 품종개발을 위한 육종자원으로의 이용이 가능할 것으로 생각된다. linoleic acid(C18:2)는 전 과중기에서 KLG12081이 가장 높아 과중기에 따른 변이가 작았다(표 28).

표 27. 과중기별 지방함량 및 포화지방산 함량의 변이

(%)

품종	Oil				C16:0				C18:0			
	5.20	6.5	6.20	평균	5.20	6.5	6.20	평균	5.20	6.5	6.20	평균
대풍콩	19.5	19.2	19.6	19.4	10.4	10.0	10.0	10.1	3.3	3.1	3.0	3.1
대원콩	19.0	19.9	20.5	19.8	9.8	10.0	9.9	9.9	3.2	2.9	2.8	3.0
청자3호	17.8	17.9	17.1	17.6	10.1	10.0	10.3	10.2	2.9	2.5	2.6	2.7
청두1호	18.6	17.7	17.8	18.1	10.1	9.9	10.1	10.0	3.3	2.7	3.0	3.0
녹채콩	19.3	18.5	18.3	18.7	10.9	10.6	10.9	10.8	3.1	2.5	3.0	2.9
KLG12074	19.9	19.0	18.9	19.2	9.2	9.1	9.2	9.2	3.0	3.1	2.7	2.9
KLG12081	20.4	19.6	19.8	19.9	3.3	3.3	3.5	3.4	2.2	2.4	2.3	2.3
KLG12093	20.2	20.3	20.8	20.4	5.3	5.2	4.8	5.1	2.3	2.4	2.4	2.3
흑농44	21.6	21.1	22.8	21.8	9.7	10.6	11.1	10.5	3.1	3.1	4.1	3.4

표 28. 파종기별 불포화지방산 함량의 변이

(%)

품종	C18:1				C18:2				C18:3			
	5.20	6.5	6.20	평균	5.20	6.5	6.20	평균	5.20	6.5	6.20	평균
대풍콩	19.9	19.0	22.3	20.4	58.6	59.6	57.2	58.5	7.8	8.3	7.5	7.9
대원콩	32.4	24.7	27.3	28.1	48.1	55.0	53.1	52.1	6.6	7.5	6.9	7.0
청자 3호	24.1	23.4	23.2	23.5	55.0	56.2	56.2	55.8	7.9	7.8	7.7	7.8
청두 1호	30.6	28.6	29.3	29.5	49.4	51.9	50.8	50.7	6.6	6.9	6.8	6.8
녹채콩	25.0	27.3	27.8	26.7	53.4	51.4	50.5	51.8	7.6	8.1	7.7	7.8
KLG12074	52.6	50.9	50.5	51.3	28.9	30.4	30.8	30.0	6.3	6.5	6.8	6.5
KLG12081	21.1	21.1	21.3	21.2	69.5	69.2	68.7	69.1	3.8	3.9	4.2	4.0
KLG12093	29.0	26.6	26.4	27.3	60.0	62.3	62.8	61.7	3.4	3.5	3.5	3.5
흑농44	43.9	32.9	30.5	35.8	38.7	47.9	48.2	44.9	4.6	5.6	6.0	5.4

## (3)지역간변이

## (가) 청주, 대구, 무안, 연천의 콩 생육기간의 기상

2008년의 청주, 대구, 무안 및 연천 4개 지역의 기상조건은 표 29와 같다. 2008년의 평균온도는 파종-개화기에 청주, 연천 및 무안은 각각 24.0℃, 24.2℃ 및 24.8℃로서 낮았고, 대구는 26.2℃로서 가장 높았다. 개화-성숙기는 연천이 20.5℃로서 가장 낮았고, 대구는 24.4℃로서 가장 높았으며, 무안은 23.5℃이었고, 청주는 22.9℃이었다. 전 생육기간에는 연천과 무안이 각각 21.1℃, 21.7℃로서 낮았으며, 청주는 22.5℃이었으며, 대구는 24.2℃로 가장 높았다. 각 생육기간의 평균 최고온도와 최저온도의 온도교차를 볼 때 파종-개화기에는 대구가 8.2℃, 무안이 6.5℃, 연천은 9.1℃ 및 청주는 9.8℃로서 무안이 가장 작았고, 청주가 가장 컸다. 개화-성숙기에는 연천이 10.8℃로 가장 컸고, 다음으로 청주가 10.6℃로 컸으며, 무안은 8.3℃로 가장 작았다. 전 생육기간의 기온격차는 청주와 연천이 각각 10.7℃, 10.6℃로 가장 컸으며, 다음으로 대구가 9.1℃로 컸으며, 무안은 8.3℃으로 가장 낮았다. 대체로 콩 생육기간의 기온교차는 파종-개화기 간, 개화-성숙기 간 및 파종-성숙기 간 모두 청주와 연천이 가장 컸고, 대구와 무안은 상대적으로 다른 지역에 비해 기온격차가 작은 경향이였다. 강수량은 연천이 1175.1mm로 가장 많았고, 대구가 464mm로 가장 적었으며, 청주는 664.9mm, 무안은 568.4mm이었다. 2008년의 시험지역인 청주, 대구, 연천, 무안의 개화-성숙기의 기상을 종합하여 보면, 평균온도는 연천이 가장 낮았고, 그 다음으로 무안이 낮았으며, 대구가 24.2℃로 가장 높았다. 기온교차도 연천과 청주가 많이 컸고, 대구와 무안은 낮았다. 강수량은 연천이 가장 많았고 대구는 가장 적었다.



표 29. 지역별 콩 생육기간의 기상

지역	기간	평균온도 (°C)	최고온도(a) (°C)	최저온도(b) (°C)	a-b (°C)	강수량 (mm)
청주	파종-개화기	24.0	29.1	19.4	9.8	390.1
	개화-성숙기	22.9	28.8	18.2	10.6	573.1
	파종-성숙기	22.5	28.3	17.6	10.7	664.9
대구	파종-개화기	26.2	30.8	22.5	8.2	206.6
	개화-성숙기	24.4	29.6	20.2	9.4	317.4
	파종-성숙기	24.2	29.2	20.1	9.1	464.0
연천	파종-개화기	24.2	29.5	20.4	9.1	878.1
	개화-성숙기	20.5	26.7	15.9	10.8	1004.3
	파종-성숙기	21.1	27.2	16.6	10.6	1175.1
무안	파종-개화기	24.8	28.6	22.1	6.5	340.5
	개화-성숙기	23.5	28.2	19.8	8.3	180.8
	파종-성숙기	21.7	26.3	18.0	8.3	568.4

(나) 지역에 따른 품종별 생육단계별 일수

지역에 따른 품종별 개화기 및 성숙기는 표30과 같다. 지역에 따른 품종별 개화기는 시험품종 평균 청주와 대구가 빠른 경향이었고, 연천과 무안이 다소 늦은 경향이였다. 품종별로는 청주와 대구에서는 중국자원인 흑농44호가 가장 빨랐고, 다음으로 KLG01397, 장B2000-25 및 구교96123-8-2가 빠른 경향이였으며, KLG1207과 KLG12081이 늦은 경향이였다. 연천에서는 대원콩과 대풍콩이 빠른 경향이였고, 흑농 44와 KLG01397이 늦은 경향이였다. 무안에서는 흑농44호, KLG01397, 장B2000-25 및 구교96123-8-2가 빠른 경향이였으며, KLG12074와 KLG12081가 늦은 경향이였다. 지역에 따른 품종별 성숙기는 청주에서는 장B2000-25와 구교96123-8-2가 빨랐고, KLG12081와 청자3호가 늦은 경향이였다. 대구에서도 B2000-25와 구교96123-8-2가 빨랐고, KLG12081가 가장 늦었고, 대원콩, 단백콩 및 KLG12074가 늦은 경향이였다. 연천에서는 구교96123-8-2가 가장 빨랐으며, 청자3호, 녹채콩 및 청두1호가 늦은 경향이였다. 무안에서는 흑농44호, 장B2000-25 및 구교96123-8-2가 빨랐고, 청자3호, 단백콩, KLG12074 및 KLG12081가 늦은 경향이였다.

표 30. 지역별 개화기 및 성숙기

(월. 일)

품종	청주		대구		연천		무안	
	개화기	성숙기	개화기	성숙기	개화기	성숙기	개화기	성숙기
대원	7.26	10.1	7.28	10.8	7.15	10.6	8.2	10.15
대풍	7.26	10.9	7.27	10.6	7.19	10.6	8.2	10.9
청자3호	7.27	10.17	7.27	9.3	8.1	10.15	8.3	10.14
청두1호	7.26	10.8	7.28	9.3	7.3	10.15	8.2	10.9
녹채콩	7.25	9.29	7.26	9.28	8.5	10.15	8.1	9.29
단백콩	8.4	10.1	8.1	10.9	7.31	9.25	8.5	10.15
KLG12074	8.8	10.8	8.4	10.9	7.25	10.15	8.8	10.15
KLG12081	8.8	10.2	8.5	10.2	8.4	10.1	8.9	10.15
KLG01397	7.18	9.21	7.2	9.21	8.11	10.1	7.28	9.16
흑농44	7.12	9.22	7.15	9.26	8.13	10.3	7.2	9.12
장B2000--25	7.19	9.19	7.2	9.19	7.21	9.24	7.25	9.12
구교96123-8-2	7.2	9.5	7.21	9.19	7.24	9.9	7.28	9.12
평균	7.24	9.29	7.23	9.25	7.27	10.3	7.3	10.1

지역 및 품종별 생육단계별 일수는 표 31과 같다. 파종으로부터 개화까지인 개화 일수는 지역간에 시험품종 평균 무안이 47일로 길은 경향이었고 그 외의 지역은 비슷한 경향이였다. 품종 간에는 시험품종 평균 흑농44와 장B2000-25가 짧았고, 단백콩, KLG12074 및 KLG12081이 길었다. 개화로부터 성숙까지인 성숙일수는 지역간에 무안이 64일로 짧았고, 청주, 연천 및 대구가 비슷하게 긴 경향이였다. 파종으로부터 성숙까지인 생육일수는 110일에서 113일 사이로 지역간에 큰 차이가 없었다. 품종간에는 중국자원인 구교96123-8-2이 90일로 가장 짧았고, 중국자원인 장B2000-25, 흑농44가 98-102일 사이로 짧았으며, 미국자원인 KLG12081이 123일로 가장 길었다. 중국자원인 흑농44, 장B2000-25 및 구교96123-8-2이 생육기간이 짧았고, 한국자원인 청자3호와 미국자원인 KLG12081와 KLG12074가 생육기간이 길었다.

표 31. 지역 및 품종별 개화일수, 성숙일수, 및 생육일수 (일)

	품종	청주	대구	연천	무안	평균
개화일 수	대원	43	45	32	50	43
	대풍	43	44	36	50	43
	청자3호	44	44	49	51	47
	청두1호	43	45	20	50	40
	녹채콩	42	43	53	49	47
	단백콩	52	49	48	53	51
	KLG12074	56	52	42	53	51
	KLG12081	56	53	52	57	55
	KLG01397	35	37	59	45	44
	흑농44	29	32	61	19	35
	장B2000--25	36	37	38	42	38
	구교96123-8-2	37	38	41	45	40
	평균	43	43	44	47	45
	성숙일 수	대원	76	72	83	74
대풍		75	71	79	68	73
청자3호		82	65	75	72	74
청두1호		74	64	104	68	77
녹채콩		66	64	71	59	65
단백콩		67	69	56	71	66
KLG12074		61	66	82	71	70
KLG12081		73	76	58	67	69
KLG01397		65	63	51	50	57
흑농44		72	73	51	72	67
장B2000--25		62	61	65	49	59
구교96123-8-2		47	60	43	46	49
평균		68	67	68	64	67
생육일 수		대원	119	117	115	124
	대풍	118	115	115	118	117
	청자3호	126	109	124	123	121
	청두1호	117	109	124	118	117
	녹채콩	108	107	124	108	112
	단백콩	119	118	104	124	116
	KLG12074	117	118	124	124	121
	KLG12081	129	129	110	124	123
	KLG01397	100	100	110	95	101
	흑농44	101	105	112	91	102
	장B2000--25	98	98	103	91	98
	구교96123-8-2	84	98	88	91	90
	평균	111	110	113	111	111

(다) 지역 및 품종별 지방함량 및 지방산 조성

지역 및 품종에 따른 지방함량 및 지방산 조성의 분산분석 결과는 표 32와 같다.

지방함량은 지역간, 품종간 및 지역과 품종간의 상호작용이 인정되었다.

표 32. 지역 및 품종의 지방함량 및 지방산 조성의 분산분석

변인	df	M. S.					
		Oil	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
지역(A)	3	39.3**	0.9	1.03**	40.5	17.6	7.4**
품종 (B)	11	27.0**	48.3**	2.14**	982.2**	1120.3**	18.3**
A * B	33	1.6**	0.3**	0.16**	24.95**	16.6**	0.6**
오차(A *B)	96	0.3	0.02	0.02	3.6	2.89	0.68
계	143	-	-	-	-	-	-

지역에 따른 시험품종의 평균 지방함량은 연천이 17.4%, 대구가 18.1%, 청주가 19.3%, 무안이 19.6%로서 무안이 가장 높았고, 그다음으로 청주, 대구, 연천 순으로 연천이 가장 낮았다. 품종간에는 지역평균으로 볼때 중국콩인 흑농44가 21.5%로 가장 높았고, 안정성이 높았으며, 다음으로 대원콩과 장B2000-25이 20.1%로 높았으며, 단백콩이 15.6%로 가장 낮았다. 그 외 콩들의 지방함량은 지역간에 다소 다른 경향이였다(표 33).

표 33. 지역 및 품종별 지방함량 (%)

품종	청주	대구	무안	연천	평균
대원콩	21.6	19.8	20.5	18.6	20.1
대풍콩	20.0	18.5	20.8	18.5	19.5
청자3호	17.7	16.7	20.4	16.3	17.7
청두1호	18.1	17.7	19.4	16.9	18.0
녹채콩	19.1	17.8	18.7	17.6	18.3
단백콩	16.5	14.9	16.0	15.2	15.6
KLG12074	17.6	16.9	18.9	17.7	17.8
KLG12081	19.1	17.0	20.0	17.3	18.3
KLG01397	18.5	17.3	18.5	17.2	17.9
흑농44	22.3	21.6	21.9	20.1	21.5
장B2000-25	21.3	20.6	21.1	17.3	20.1
구교96123-8-2	19.6	18.0	19.2	15.6	18.1
평균	19.3	18.1	19.6	17.4	

지역 및 품종별 지방산 함량은 표 34와 같다. palmitic acid (C16:0)함량은 무안이 10.0%로 가장 높았고 청주, 대구 및 지역간에는 큰 차이가 없었고, stearic acid(C18:0)은 연천이 3.2%로 가장 높았으며 그 외의 지역간에는 큰 차이가 없었다. oleic acid(C18:1)함량은 청주가 31.2%, 무안이 30.4% 및 연천이 29.9%이었고 대구가 28.7%로 낮았다. linoleic acid(C18:2) 함량은 지역간에 차이가 없었고, linolenic acid(C18:3)의 함량은 대구와 연천이 각각 7.5%, 7.3%로 높았고, 청주와 무안이 6.6%로 낮았다.

표 34. 지역 및 품종별 지방산 조성

(%)

지역	품종	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
청주	대원콩	10.0	3.2	26.0	53.8	7.1
	대풍콩	10.3	3.2	19.6	58.7	8.1
	청자3호	10.1	2.7	24.7	54.7	7.8
	청두1호	10.0	3.0	28.8	51.0	7.3
	녹채콩	10.1	2.8	37.0	42.8	7.2
	단백콩	11.0	3.4	32.4	46.1	7.1
	KLG12074	9.2	3.2	50.0	31.0	6.6
	KLG12081	3.4	2.3	21.3	68.9	4.1
	KLG01397	9.7	1.8	47.3	36.2	5.0
	흑농44	10.9	3.3	31.5	48.4	5.9
	장B2000-25	11.4	3.2	31.3	48.7	5.4
	구교96123-8-2	10.7	3.0	24.5	54.2	7.6
	평균	9.7	2.9	31.2	49.5	6.6
대구	대원콩	10.0	2.9	23.4	55.5	8.3
	대풍콩	10.2	3.2	20.7	57.3	8.6
	청자3호	10.0	3.0	24.5	54.2	8.4
	청두1호	10.0	2.9	24.0	54.5	8.5
	녹채콩	10.7	2.8	23.3	53.9	9.3
	단백콩	10.7	3.1	31.2	46.9	8.2
	KLG12074	9.5	3.2	47.0	33.0	7.3
	KLG12081	3.8	3.1	20.2	68.3	4.6
	KLG01397	9.7	1.9	43.8	38.8	5.8
	흑농44	11.1	3.7	28.6	49.9	6.7
	장B2000-25	11.3	3.3	28.0	51.3	6.0
	구교96123-8-2	9.7	2.5	28.9	51.0	7.9
	평균	9.7	3.0	28.6	51.2	7.5
무안	대원콩	10.1	2.7	27.6	52.9	6.7
	대풍콩	10.4	3.4	19.5	58.8	7.9
	청자3호	10.2	2.3	25.5	54.6	7.5
	청두1호	10.5	2.8	26.5	53.2	7.1
	녹채콩	11.1	2.9	26.4	50.9	8.6
	단백콩	10.8	2.8	39.5	40.3	6.6
	KLG12074	9.2	2.7	55.1	26.6	6.3
	KLG12081	3.6	2.7	22.8	67.1	3.7
	KLG01397	10.8	1.7	43.4	38.9	5.2
	흑농44	11.5	3.6	26.1	52.1	6.7
	장B2000-25	11.7	2.8	27.8	51.5	6.2
	구교96123-8-2	10.9	2.9	23.2	55.1	8.0
	평균	10.1	2.8	30.3	50.2	6.7
연천	대원콩	10.0	3.4	26.1	52.9	7.6
	대풍콩	10.3	3.4	21.0	57.3	8.0
	청자3호	9.7	3.0	22.3	56.0	9.0
	청두1호	10.3	3.3	24.8	53.7	7.9
	녹채콩	10.5	3.1	32.3	46.0	8.1
	단백콩	10.9	3.7	34.6	43.6	7.1
	KLG12074	9.1	3.3	50.2	30.0	7.5
	KLG12081	3.9	2.6	18.9	69.9	4.7
	KLG01397	10.3	2.0	38.9	42.1	6.7
	흑농44	11.0	3.9	29.6	48.8	6.7
	장B2000-25	10.9	3.9	34.0	45.2	5.9
	구교96123-8-2	9.5	2.8	24.7	53.4	9.7
	평균	9.7	3.2	29.8	49.9	7.4

시험품종에 따른 지역의 평균 지방산함량은 표 35와 같다. palmitic acid (C16:0) 함량은 흑농44와 장B2000-25가 각각 지역 평균 11.14%, 11.29%로서 높았고, KLG12081이 지역 평균 3.68%로서 낮았다. stearic acid(C18:0)는 흑농44가 높았고, KLG01397이 1.91%로서 가장 낮았으며 그 다음으로 KLG12081이 2.7%로서 낮았다. oleic acid(C18:1)함량은 KLG12074가 50.8%로 가장 높았고, 그 다음으로 KLG01397가 40.4%로 높았으며, KLG12081가 가장 낮았는데 이 품종들은 지역간에도 안정적인 큰 변이가 없어 고oleic acid 품종개발을 위한 유용자원으로서의 활용이 가능할 것이다. linoleic acid(C18:2) 함량은 KLG12081가 가장 높았고, KLG12074가 가장 낮았다. linolenic acid(C18:3)의 함량은 녹채콩과 구교96123-8-2이 각각 8.3%, 8.2%로서 높았고 KLG12081이 4.3%로 가장 낮았다.

표 35. 시험품종에 따른 지역의 평균 지방산 함량

품종	지방산 조성 (%)				
	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
대원	10.0 <sup>e</sup>	3.1 <sup>bcd</sup>	25.7 <sup>ef</sup>	53.9 <sup>c</sup>	7.4 <sup>bcd</sup>
대풍	10.3 <sup>de</sup>	3.3 <sup>ab</sup>	20.3 <sup>g</sup>	58.2 <sup>b</sup>	8.0 <sup>ab</sup>
청자3호	10.0 <sup>e</sup>	2.8 <sup>cd</sup>	24.3 <sup>fg</sup>	54.8 <sup>c</sup>	8.2 <sup>a</sup>
청두1호	10.1 <sup>e</sup>	3.0 <sup>bcd</sup>	26.1 <sup>def</sup>	53.0 <sup>cd</sup>	7.7 <sup>abc</sup>
녹채콩	10.7 <sup>cd</sup>	2.9 <sup>bcd</sup>	29.8 <sup>de</sup>	48.4 <sup>e</sup>	8.3 <sup>a</sup>
단백콩	10.8 <sup>bc</sup>	3.3 <sup>ab</sup>	34.4 <sup>c</sup>	44.3 <sup>f</sup>	7.2 <sup>cd</sup>
KLG12074	9.3 <sup>f</sup>	3.1 <sup>bc</sup>	50.8 <sup>a</sup>	30.0 <sup>h</sup>	6.8 <sup>de</sup>
KLG12081	3.7 <sup>g</sup>	2.7 <sup>d</sup>	20.8 <sup>g</sup>	68.5 <sup>a</sup>	4.3 <sup>h</sup>
KLG01397	10.1 <sup>e</sup>	1.9 <sup>e</sup>	43.4 <sup>b</sup>	38.9 <sup>g</sup>	5.7 <sup>g</sup>
흑농44	11.1 <sup>ab</sup>	3.6 <sup>a</sup>	29.0 <sup>de</sup>	49.8 <sup>de</sup>	6.5 <sup>ef</sup>
장B2000-25	11.3 <sup>a</sup>	3.3 <sup>ab</sup>	30.4 <sup>cd</sup>	49.2 <sup>e</sup>	5.8 <sup>fg</sup>
구교96123-8-2	10.2 <sup>e</sup>	2.8 <sup>cd</sup>	25.4 <sup>ef</sup>	53.5 <sup>c</sup>	8.2 <sup>a</sup>

라. 고지방 양질 지방산 자원의 가공적성 분석

(1) 종실의 성분특성

(가) 지방 및 지방산 조성

두유와 두부의 가공적성을 검토하기 위하여 선발한 콩 20품종의 지방함량과 지방산

조성은 표 와 같다. 지방함량은 17.1-24.6% 범위에 분포되었으며, 평균 20.7%를 나타내었다. 포화지방산인 palmitic acid의 평균 함량은 9.7%이었으며, 최대 12.6%에서 최소 3.8%이었다. stearic acid의 평균 함량은 3.1%이었고, 범위는 2.0%-3.9%이었다. 불포화지방산인 oleic acid의 평균 함량은 29.7%이었고, 범위는 18.8-50.9%이었다. linoleic acid의 평균함량은 50.4%로서 지방산 중에서 가장 많이 포함되었으며 범위는 30.2-69.3%이었다. linolenic acid의 평균함량은 7.1%이었고, 범위는 4.0-8.7%이었다. 포화지방산(palmitic acid+stearic acid)의 평균은 12.8%이었으며, 범위는 6.3-16.3%이었다. 불포화지방산(oleic acid + linoleic acid + linolenic acid)의 평균은 87.2%이었으며, 범위는 83.7%~93.7%이었다(표 36).

표 36. 고지방 및 양질지방산 자원의 지방 및 지방산 함량

(%)

품종명	Oil	Palmitic	Stearic	Oleic	Linoleic	Linolenic	포화 지방산	불포화 지방산
봉의콩	17.6	7.5	2.0	50.9	32.3	7.2	9.6	90.4
단백콩	18.7	10.6	3.7	27.6	49.9	8.2	14.3	85.7
검정새울콩	18.6	12.2	3.1	27.9	49.3	7.5	15.3	84.7
광안콩	17.9	11.6	3.4	35.8	40.8	8.3	15.1	84.9
중황31	24.4	10.0	3.6	22.9	55.8	7.7	13.6	86.4
흑농44	23.7	11.3	3.8	28.5	50.0	6.5	15.1	84.9
구농7714	23.1	9.7	3.3	31.8	49.4	5.8	13.0	87.0
구농8	22.5	10.5	3.5	33.2	46.9	6.0	13.9	86.1
합풍95-873	23.0	11.0	2.2	26.4	53.5	6.8	13.3	86.7
수농10	18.0	10.2	2.5	22.6	56.1	8.6	12.7	87.3
길림53	21.7	10.9	2.9	26.6	52.3	7.3	13.8	86.2
동농98-14	24.6	12.6	3.7	25.7	50.9	7.2	16.3	83.7
공교8966-25	21.9	10.2	3.9	26.6	52.2	7.1	14.1	85.9
공교9010-2	18.9	10.5	2.6	20.3	58.3	8.3	13.2	86.9
석후대두	21.7	10.5	3.7	25.9	52.7	7.2	14.2	85.8
KLG12073	19.9	9.0	2.6	49.6	30.2	8.7	11.5	88.5
KLG12074	19.9	9.2	3.2	47.0	32.5	8.1	12.4	87.6
KLG12081	18.4	3.8	2.9	18.8	69.3	5.0	6.8	93.2
KLG12088	17.1	4.0	2.3	20.1	68.1	5.6	6.3	93.7
KLG12096	21.6	8.6	3.2	25.8	58.4	4.0	11.8	88.2
평균	20.7	9.7	3.1	29.7	50.4	7.1	12.8	87.2



(나) 무기성분 함량

선발한 콩 20품종에 대한 무기성분 함량을 비교한 결과(표 37), Ca의 함량은 전체적으로 1.233-2.698 mg/g 범위로 분포하였고, 11품종은 2.000 mg/g 이하이었다. 8품종은 2.000-2.500 mg/g의 범위이었고, 검정새울콩은 2.698 mg/g으로 높았다. Magnesium 함량은 전체적으로 1.630-2.310 mg/g의 범위이었고, 평균 1.93mg/g이었다. zinc와 ferrous의 함량은 0.044- 0.110mg/g, sodium의 함량은 0.171-0.535mg/g의 범위로 매우 낮았다. potassium 함량은 15.13-23.05mg/g로 다른 무기성분에 비해 높았다.

표 37. 고지방 및 양질지방산 자원의 무기성분 함량 (mg/g)

품종명	Ca	Mg	K	Na	Fe	Zn
봉의콩	1.233	1.68	15.13	0.171	0.048	0.052
단백콩	2.113	1.93	21.99	0.373	0.089	0.066
검정새울콩	2.698	2.31	22.78	0.524	0.102	0.061
광안콩	2.252	1.86	19.13	0.468	0.076	0.056
중황31	2.036	1.93	17.58	0.432	0.061	0.047
흑농44	2.444	2.00	23.05	0.535	0.110	0.057
구농7714	1.840	1.87	19.99	0.402	0.052	0.071
구농8	2.084	1.67	17.98	0.313	0.051	0.045
합풍95-873	2.297	1.63	19.16	0.338	0.047	0.049
수농10	2.120	1.99	20.17	0.498	0.062	0.076
길림53	1.435	1.84	19.17	0.471	0.068	0.073
동농98-14	1.510	1.93	18.79	0.509	0.061	0.094
공교8966-25	1.294	1.82	15.63	0.296	0.044	0.065
공교9010-2	1.348	2.24	18.01	0.521	0.061	0.086
석후대두	1.829	2.01	18.94	0.419	0.054	0.079
KLG12073	1.699	1.87	19.34	0.303	0.077	0.056
KLG12074	1.594	1.94	21.94	0.482	0.085	0.065
KLG12081	2.158	2.09	20.96	0.449	0.105	0.069
KLG12088	1.875	2.06	19.22	0.464	0.093	0.064
KLG12096	1.752	1.99	20.43	0.409	0.074	0.063
평균	1.881	1.93	19.47	0.419	0.071	0.065

(다) phytate 함량

콩 20품종의 phytate 함량은 0.8-3.78mg/g 범위이었으며, 평균 2.3mg/g 이었다. 광안콩은 phytate 함량이 3.67mg/g로 가장 높았으며, 3.0mg/g이상인 품종은 단백콩(3.15mg/g), 검정새울콩(3.16mg/g), 수농10(3.39mg/g)이었다. KLG12073은 0.83mg/g으로 가장 낮았다(표 38).

표 38. 고지방 및 양질지방산 자원의 phytate 함량 (mg/g)

품종명	Phytate	품종명	Phytate
봉의콩	2.01	길림53	1.22
단백콩	3.15	동농98-14	2.58
검정새울콩	3.16	공교8966-25	0.92
광안콩	3.67	공교9010-2	2.25
중황31	2.99	석후대두	2.38
흑농44	2.21	KLG12073	0.83
구농7714	1.90	KLG12074	1.80
구농8	2.97	KLG12081	1.47
합풍95-873	2.21	KLG12088	2.03
수농10	3.39	KLG12096	1.99
		평균	2.26

(라) 11S/7S 비율

20품종의 11S/7S 비율은 0.5-2.4 범위이었으며, 평균 1.38이었다. 품종별로는 수농10이 2.4로 11S/7비율이 가장 높았다. KLG12081은 0.5로 가장 낮았다(표 39).

표 39. 고지방 및 양질지방산 자원의 11S/7S 비율

품종명	7S			Total	11S			Total	11S/7S 비율
	$\alpha'$	$\alpha$	$\beta$		A3	Acidic	Basic		
봉의콩	15.1	18.1	7.8	41.0	2.6	19.3	37.0	59.0	1.4
단백콩	30.9	7.8	10.4	49.1	0.8	22.1	28.1	50.9	1.0
검정새울콩	25.8	6.2	8.4	40.4	1.9	20.8	36.9	59.6	1.5
광안콩	19.6	9.2	9.7	38.5	3.5	26.7	31.3	61.5	1.6
중황31	27.4	6.9	9.0	43.2	1.7	25.9	29.2	56.8	1.3
흑농44	19.4	19.2	9.0	47.6	1.7	10.9	39.8	52.4	1.1
구농7714	18.1	16.3	8.3	42.7	2.4	17.5	37.4	57.3	1.3
구농8	18.4	12.3	7.6	38.3	1.3	24.4	36.0	61.7	1.6
합풍95-873	36.9	10.2	4.7	51.8	3.3	9.4	35.5	48.2	0.9
수농10	15.7	7.9	6.2	29.8	5.9	31.2	33.1	70.2	2.4
길림53	22.1	11.8	13.7	47.7	0.2	13.7	38.5	52.3	1.1
동농98-14	22.8	22.4	6.7	51.8	1.9	13.6	32.7	48.2	0.9
공교8966-25	21.0	23.9	3.8	48.6	2.8	9.7	38.8	51.4	1.1
공교9010-2	17.1	14.4	13.5	45.0	0.9	14.1	40.1	55.0	1.2
석후대두	9.8	13.0	7.8	30.6	2.9	23.5	43.0	69.4	2.3
KLG12073	27.8	8.9	10.9	47.6	3.8	21.3	27.3	52.4	1.1
KLG12074	22.7	15.3	7.0	45.0	4.3	27.1	23.5	55.0	1.2
KLG12081	33.9	9.3	21.6	64.9	7.0	20.4	7.7	35.1	0.5
KLG12088	10.7	12.0	8.7	31.4	8.8	35.7	24.0	68.6	2.2
KLG12096	4.5	15.5	14.1	34.0	3.5	21.6	40.9	66.0	1.9
평균	21.0	13.0	9.4	43.5	3.1	20.4	33.0	56.6	1.4

(2) 두유의 특성

(가) 두유의 지방 함량 및 지방산 조성

두유의 지방함량 및 지방산 조성은 표 40과 같다. 지방함량은 0.6-1.9%(평균 1.1%)의 범위이었고, KLG12096와 합풍95-873이 1.9%로 가장 높았으며, 단백콩이 0.6%로 가장 낮았다. oleic acid 함량은 20.2-49.5%(평균 30.2%)의 범위이었고, KLG12074가 49.5%로 가장 높았으며, KLG12081이 20.2%로 가장 낮았다. linoleic acid 함량은 30.4-68.3%(평균 50.2%)의 범위이었고, KLG12081이 68.3%로 가장 높았으며, KLG12073이 30.4%로 가장 낮았다. linolenic acid 함량은 3.6-14.7%(평균 7.0%)의 범위이었고, 흑농44는 14.7%로 가장 높았으며, KLG12096은 3.6%로 가장 낮았다.

표 40. 두유의 지방 함량 및 지방산 조성

(%)

품종명	지방 함량	Palmitic	Stearic	Oleic	Linoleic	Linolenic	포화 지방산	불포화 지방산
봉의콩	0.9	9.5	3.4	32.1	47.7	7.3	12.9	87.1
단백콩	0.6	11.3	3.6	30.6	47	7.5	14.9	85.1
검정새울콩	0.8	12.9	2.8	30	47.2	7.1	15.7	84.3
광안콩	0.8	11.8	3.4	37.2	50.1	7.5	15.2	94.8
중황31	1.3	9.8	2.4	24.8	57.9	5.1	12.2	87.8
흑농44	1.2	12.5	2.9	28.8	41.1	14.7	15.4	84.6
구농7714	1.5	10.4	3.4	32.8	48.3	5	13.8	86.1
구농8	1.3	10.3	3.7	34.6	45.5	5.7	14	85.8
합풍95-873	1.9	11.1	2.1	28.6	51.8	6.3	13.3	86.7
수농10	1.2	10.7	2.7	24.8	53	8.3	13.4	86.1
길림53	1.4	11.5	2.3	27.1	51.9	7.2	13.8	86.2
동농98-14	0.7	11.9	3.6	26.3	51	7.5	15.5	84.8
공교8966-25	1.1	10.5	3.2	27.7	52	6.7	13.7	86.4
공교9010-2	1.1	11	2.8	28	51.7	6.5	13.8	86.2
석후대두	1.3	11	3.8	25	53	7.1	14.9	85.1
KLG12073	0.9	9.6	3	48.1	30.4	8.9	12.6	87.4
KLG12074	0.9	9.8	2.9	49.5	31.5	7.3	12.7	88.3
KLG12081	1	4.6	2.2	20.2	68.3	4.7	6.8	93.2
KLG12088	1	4.3	2.2	21.2	67.1	5.2	6.5	93.5
KLG12096	1.9	9.4	2.2	26.8	57.8	3.8	11.5	88.5
평균	1.1	10.2	2.9	30.2	50.2	7.0	13.1	87.4

(나) phytate 함량

20품종의 두유를 제조하여 phytate 함량을 분석한 결과는 표 41과 같으며, 두유의 phytate 함량은 0.09-0.19mg/ml범위이었으며, 광안콩이 0.19mg/ml으로 가장 높은 phytate 함량을 나타내었고, KLG12073이 0.09mg/ml으로 낮았다.

표 41. 두유의 phytate 함량 (mg/ml)

품종명	phytate	품종명	phytate
봉의콩	0.16	길림53	0.17
단백콩	0.17	동농98-14	0.14
검정새울콩	0.16	공교8966-25	0.13
광안콩	0.19	공교9010-2	0.16
중황31	0.17	석후대두	0.15
흑농44	0.1	KLG12073	0.09
구농7714	0.15	KLG12074	0.15
구농8	0.17	KLG12081	0.13
합풍95-873	0.13	KLG12088	0.14
수농10	0.17	KLG12096	0.15
		평균	0.15

(다) 두유의 조단백질 함량

20품종의 콩으로 두유를 제조하여 조단백질 함량을 분석한 결과는 표 42와 같다. 두유의 조단백질 함량은 1.84-2.97% 의 범위이었고, 미국콩인 KLG12096이 1.84%로 가장 낮았고, 중국콩인 길림 53이 2.97%로 가장 높았다.

표 42. 두유의 조단백질 함량 (%)

품종명	조단백질	품종명	조단백질
봉의콩	17.1±0.47	길림53	14.3±0.23
단백콩	12.3±0.58	동농98-14	14.5±0.44
검정새울콩	15.6±0.91	공교8966-25	10.1±0.26
광안콩	16.6±0.21	공교9010-2	10.4±0.29
중황31	14.4±0.69	석후대두	15.5±0.37
흑농44	14.2±0.61	KLG12073	13.5±0.49
구농7714	9.2±0.34	KLG12074	15.2±0.77
구농8	10.2±0.31	KLG12081	10.5±0.34
합풍95-873	13.7±0.18	KLG12088	12.2±0.27
수농10	10.4±0.41	KLG12096	14.2±0.39
		평균	13.2±0.56

(라) 두유의 수율 및 고형분함량

콩으로 두유를 제조하여 수율과 고형분 함량을 측정한 결과는 표 43과 같다. 두유의 수율은 12.5-13.6ml/g 범위이었고, KLG12096으로 만든 두유가 13.6ml/g 로 가장 높았고, KLG12073과 검정새울콩으로 만든 두유에서는 12.5ml/g 로 가장 낮았다. 두유의 고형분 함량은 4.7-5.2 °Brix 범위이었으며 검정새울콩으로 만든 두유가 5.2 °Brix로 가장 높았으며 KLG12096과 동농 98-14로 만든 두유가 4.7 °Brix로 가장 낮았다.

표 43. 두유의 수율 및 고형분함량

품종명	수율 (ml/g)	고형분함량 (°Brix)	품종명	수율 (ml/g)	고형분함량 (°Brix)
봉의콩	12.8±0.22	4.9±0.35	길림53	13.2±0.09	4.9±0.19
단백콩	12.8±0.16	5.1±0.24	동농98-14	13.4±0.13	4.7±0.12
검정새울콩	12.5±0.12	5.2±0.21	공교8966-25	13.1±0.16	4.9±0.11
광안콩	12.8±0.17	5.2±0.17	공교9010-2	13.3±0.12	5.1±0.26
중황31	13.0±0.31	5.0±0.21	석후대두	13.1±0.09	5.0±0.27
흑농44	12.7±0.11	4.9±0.21	KLG12073	12.5±0.27	5.0±0.13
구농7714	13.2±0.19	5.1±0.13	KLG12074	13.3±0.28	4.8±0.29
구농8	13.2±0.17	4.8±0.18	KLG12081	12.6±0.07	4.9±0.31
합풍95-873	13.1±0.24	5.1±0.10	KLG12088	13.1±0.16	5.0±0.20
수농10	13.5±0.11	4.8±0.21	KLG12096	13.6±0.20	4.7±0.19
			평균	13.0±0.17	5.0±0.19

(마)두유의 pH

두유를 제조하여 pH를 측정한 결과는 표 44와 같다. 두유의 pH를 측정한 결과는 6.63-7.04로 중성에 가까운 pH이었고. 미국자원인 KLG12081로 만든 두유가 7.04로 가장 높았고 중국자원인 공교9010-2로 만든 두유가 6.63으로 가장 낮았다.

표 44. 두유의 pH와 점도

품종명	pH	점도측정 (cp)	품종명	pH	점도측정 (cp)
봉의콩	6.72±0.07	14.6±0.83	길림53	6.65±0.05	15.2±0.27
단백콩	6.81±0.03	14.9±0.45	동농98-14	6.88±0.04	16.8±0.11
검정새울콩	7.02±0.08	15.4±0.32	공교8966-25	6.76±0.02	15.6±0.27
광안콩	6.99±0.03	14.7±0.29	공교9010-2	6.63±0.04	15.0±0.36
중황31	6.9±0.05	13.9±0.91	석후대두	6.87±0.07	15.8±0.42
흑농44	6.81±0.07	14.5±0.38	KLG12073	6.94±0.07	13.9±0.66
구농7714	6.78±0.06	15.2±0.43	KLG12074	7.01±0.01	14.5±0.41
구농8	6.85±0.07	17.3±0.33	KLG12081	7.04±0.06	16.9±0.31
합풍95-873	6.73±0.09	16.2±0.51	KLG12088	6.88±0.07	15.7±0.27
수농10	6.68±0.01	14.6±0.33	KLG12096	6.93±0.02	15.9±0.47
			평균	6.8±0.05	15.3±0.48

(바) 두유의 색도

20품종의 콩으로 두유를 제조하여 색도를 측정한 결과는 표 45와 같다. 측정 결과 검정 새울콩으로 만든 두유를 제외한 나머지 품종들을 사용하여 제조한 두유에서의 L값은 1.99-5.78, a값은 4.33-8.51 및 b값은 3.41-9.71 범위이었다. 반면에 검정새울콩을 사용하여 만든 두유에서의 L값은 0.01, a값은 -0.02 및 b값은 -0.02였으며 다른 품종들에 비해 L값, a값 및 b값이 현저히 감소하였다. 이는 검정 새울콩의 외피의 검정색 색소들이 콩을 마쇄 후 가열하여 두유를 만드는 과정에서 용출되어서 L값이 감소한 값을 나타낸 것으로 생각된다.

표 45. 두유의 색도

품종명	L	a	b
봉의콩	5.06±0.11	7.74±0.19	8.54±0.10
단백콩	5.33±0.13	8.51±0.18	9.03±0.08
검정새울콩	0.01±0.02	-0.02±0.01	-0.02±0.01
광안콩	5.29±0.09	8.48±0.05	8.96±0.03
중황31	1.99±0.09	4.42±0.04	3.41±0.03
흑농44	3.11±0.05	6.34±0.07	5.33±0.03
구농7714	3.36±0.05	6.64±0.05	5.72±0.06
구농8	4.38±0.18	7.63±0.03	7.47±0.09
합풍95-873	3.66±0.04	7.61±0.08	6.19±0.08
수농10	2.97±0.03	7.23±0.01	5.11±0.04
길립53	4.03±0.05	7.59±0.06	6.85±0.10
동농98-14	3.49±0.06	7.33±0.07	5.91±0.05
공교8966-25	3.81±0.10	6.82±0.04	6.44±0.06
공교9010-2	4.04±0.05	7.41±0.06	6.83±0.07
석후대두	2.48±0.03	5.84±0.08	4.18±0.03
KLG12073	4.95±0.03	7.21±0.02	8.42±0.09
KLG12074	4.48±0.09	7.26±0.03	7.58±0.03
KLG12081	5.78±0.04	7.07±0.08	9.71±0.02
KLG12088	4.34±0.07	6.09±0.14	7.19±0.17
KLG12096	2.3±0.03	4.33±0.06	3.93±0.05
평균	3.7±0.06	6.6±0.09	6.3±0.07

(3)두부의 특성

(가) 두부의 지방함량과 지방산 조성

20품종의 콩으로 두부를 제조하여 지방함량과 지방산 조성을 분석한 결과는 표 46과 같다. 두부의 지방함량은 2.8-8.8%사이였으며, 석후대두로 만든 두부의 지방함량이 8.8%로 가장 많았으며 단백콩으로 만든 두부의 지방함량은 2.8%로 가장 적었다. 두부

에서 지방함량이 높은 품종들이 대부분 종실에서 지방함량이 높은 중국품종이었고, 그리고 두부에서 지방함량이 낮은 품조은 종실의 지방함량이 가장 낮은 단백질인 것으로 볼 때, 종실의 지방함량이 높으면 두부의 지방함량도 높고, 종실의 지방함량이 낮으면 두부의 지방함량도 낮은 것으로 생각된다. oleic acid 함량은 평균30.86%이었으며, 함량이 가장 높은 두부는 미국자원 KLG12074 로 만든 두부로 함량이 50.8%이었고 함량이 가장 낮은 두부는 함량이 22.4%인 미국자원 KLG12088로 만든 두부이었다. linoleic acid 함량은 29.6-65.2%사이이었으며, 평균은 49%이었다. KLG12088로 만든 두부가 65.2%로 linoleic acid 함량이 가장 많았고, KLG12073으로 만든 두부가 29.6%로 linoleic acid 함량이 가장 적었다. 두부의 linolenic acid 함량은 2.8-8.4%이었으며, 평균 6.59% 이었다. linolenic acid 함량이 가장 적은 두부는 KLG12081로 만든 두부이었고, 함량이 가장 많은 두부는 8.4%인 봉의콩으로 만든 두부이었다. 두부의 포화지방산 함량은 평균 13.54%이었고, 불포화지방산 함량의 평균은 86.46% 이었다.

표 46. 두부의 지방함량과 지방산 조성 (%)

품종명	Oil	Palmitic	Stearic	Oleic	Linoleic	Linolenic	포화 지방산	불포화 지방산
봉의콩	7.9	9.2	3.6	30.0	48.8	8.4	12.8	87.2
단백콩	2.8	11.1	4.0	28.8	48.0	8.0	15.1	84.9
검정새울콩	7.1	13.1	2.3	29.6	47.8	7.1	15.5	84.5
광안콩	6.8	12.3	3.6	35.8	40.2	8.1	15.9	84.1
중황31	7.1	10.2	2.8	23.1	56.0	7.8	13.0	87.0
흑농44	5.4	12.2	3.2	27.9	50.1	6.6	15.3	84.7
구농7714	4.0	10.2	3.2	33.4	47.6	5.7	13.4	86.6
구농8	4.3	10.5	3.8	32.8	46.8	6.1	14.3	85.7
합풍95-873	8.5	14.7	3.2	36.0	42.5	3.6	17.9	82.1
수농10	4.5	11.4	2.2	25.3	53.3	7.9	13.6	86.4
길립53	6.0	11.0	2.8	26.8	52.0	7.4	13.9	86.1
동농98-14	7.4	12.7	3.3	27.0	49.6	7.3	16.0	84.0
공교8966-25	5.7	10.4	2.9	28.0	51.8	6.9	13.3	86.7
공교9010-2	3.5	10.8	2.8	28.6	51.2	6.6	13.6	86.4
석후대두	8.8	11.0	3.4	26.8	51.9	6.8	14.5	85.5
KLG12073	3.4	9.2	2.7	50.3	29.6	8.0	12.0	88.0
KLG12074	5.4	9.2	2.4	50.8	29.6	8.0	11.6	88.4
KLG12081	5.4	5.9	3.8	27.3	60.2	2.8	9.8	90.2
KLG12088	5.0	4.2	3.5	22.4	65.2	4.7	7.7	92.3
KLG12096	7.1	8.8	2.8	26.5	57.9	4.0	11.6	88.4
평균	5.8	10.4	3.1	30.9	49.0	6.6	13.5	86.5

(나) 두부의 단백질 함량

20품종의 콩으로 두부를 제조하여 지방함량과 지방산 조성을 분석한 결과는 표 47과 같다. 두부의 단백질 함량은 9.17-17.07% 범위이었고, 봉의콩이 17.07%으로 가장 높은 함량이었고 구농 7714가 9.17%으로 가장 낮았다.

표 47. 두부의 단백질 함량 (%)

품종명	조단백질	품종명	조단백질
봉의콩	17.1±0.47	길림53	14.3±0.23
단백콩	12.3±0.58	동농98-14	14.5±0.44
검정새울콩	15.6±0.91	공교8966-25	10.1±0.26
광안콩	16.6±0.21	공교9010-2	10.4±0.29
중황31	14.4±0.69	석후대두	15.5±0.37
흑농44	14.2±0.61	KLG12073	13.5±0.49
구농7714	9.2±0.34	KLG12074	15.2±0.77
구농8	10.2±0.31	KLG12081	10.5±0.34
합풍95-873	13.7±0.18	KLG12088	12.2±0.27
수농10	10.4±0.41	KLG12096	14.2±0.39
		평균	13.2±0.41

(다) 두부의 phytate 함량

20품종의 콩으로 두부를 제조하여 phytate 함량을 분석한 결과는 표 48과 같다. 두부의 phytate 함량은 0.08-0.28mg/g으로 분포하였으며, 수농10이 0.28mg/g으로 가장 높았고, 흑농44가 0.08mg/g으로 가장 낮았다.

표 48. 두부의 phytate 함량 (mg/g)

품종명	phytate	품종명	phytate
봉의콩	0.22	길림53	0.12
단백콩	0.26	동농98-14	0.16
검정새울콩	0.2	공교8966-25	0.23
광안콩	0.26	공교9010-2	0.21
중황31	0.19	석후대두	0.12
흑농44	0.08	KLG12073	0.09
구농7714	0.21	KLG12074	0.2
구농8	0.17	KLG12081	0.18
합풍95-873	0.14	KLG12088	0.2
수농10	0.28	KLG12096	0.26
		평균	0.19



(라) 두부의 수율

20품종의 콩으로 두부를 제조하여 수율을 측정한 결과는 표 49와 같다. 품종별 두부의 수율은 132.0 - 231.3% 범위이었으며 단백콩으로 만든 두부가 231.3 %로 가장 높았고, 봉의콩으로 만든 두부가 132.0% 으로 가장 낮았다.

표 49. 두부의 수율 (%)

품종명	두부수율	품종명	두부수율
봉의콩	132.0±6.5	길림53	150.2±4.2
단백콩	231.3±5.7	동농98-14	145.8±6.3
검정새울콩	140.3±6.8	공교8966-25	207.4±5.6
광안콩	161.5±11.3	공교9010-2	203.6±5.2
중황31	155.3±5.5	석후대두	144.5±5.5
흑농44	138.3±5.6	KLG12073	150.3±6.7
구농7714	228.4±7.6	KLG12074	145.5±8.3
구농8	218.6±4.3	KLG12081	223.8±12.35
합풍95-873	159.8±3.4	KLG12088	214.5±7.5
수농10	211.1±5.6	KLG12096	137.8±8.3
		평균	175±6.3

(마) 두부의 pH

20품종의 콩으로 두부를 제조하여 두부의 pH를 측정한 결과는 표 50과 같다. 두부의 pH는 4.32-4.55 범위이었으며 석후대두로 만든 두부의 pH가 4.55로 가장 높았고, 검정새울콩으로 만든 두부가 4.32 로 가장 낮았다.

표 50. 두부의 pH

품종명	pH	품종명	pH
봉의콩	4.55±0.03	길림53	4.56±0.01
단백콩	4.37±0.02	동농98-14	4.63±0.03
검정새울콩	4.32±0.02	공교8966-25	4.56±0.02
광안콩	4.54±0.04	공교9010-2	4.76±0.03
중황31	4.48±0.01	석후대두	4.55±0.01
흑농44	4.5±0.01	KLG12073	4.52±0.01
구농7714	4.47±0.02	KLG12074	4.46±0.02
구농8	4.44±0.01	KLG12081	4.6±0.02
합풍95-873	4.45±0.01	KLG12088	4.62±0.01
수농10	4.54±0.01	KLG12096	4.65±0.03
		평균	4.53±0.02

(바)두부의 색도

20품종의 콩으로 두부를 제조하여 색도를 측정된 결과는 표 51과 같다. 검정새울콩을 제외한 나머지 품종들을 사용하여 제조한 두부에서의 L값은 81.1-84.59, a값은 0.08-2.11, b값은 11.23-21.22 범위이었다. 검정 새울콩을 사용하여 만든 두부에서의 L값은 65.36, a값은 4.13, b값은 2.44였다.

표 51. 두부의 색도

품종명	L	a	b
봉의콩	82.13±1.98	1.01±0.07	15.58±0.19
단백콩	83.14±3.44	0.75±0.09	18.99±0.13
검정새울콩	65.36±2.13	4.13±0.18	2.44±0.09
광안콩	81.62±0.90	1.12±0.09	16.68±0.18
중황31	82.18±1.78	1.45±0.04	17.86±0.07
흑농44	82.96±2.18	1.43±0.10	15.29±0.05
구농7714	83.62±2.39	0.92±0.11	14.96±0.06
구농8	82.45±4.85	0.75±0.03	21.22±0.16
합풍95-873	81.94±1.01	1.41±0.04	17.53±0.18
수농10	83.12±1.90	1.89±0.06	14.40±0.05
길립53	84.59±2.65	1.04±0.07	15.11±0.03
동농98-14	83.21±1.39	1.70±0.02	17.75±0.02
공교8966-25	84.35±2.56	0.68±0.03	15.35±0.04
공교9010-2	83.84±0.70	1.16±0.06	16.56±0.07
석후대두	81.10±1.98	2.11±0.06	16.09±0.03
KLG12073	82.12±0.98	1.18±0.02	15.48±0.08
KLG12074	82.81±0.77	1.12±0.06	16.19±0.10
KLG12081	84.00±2.88	0.23±0.04	11.23±0.08
KLG12088	84.53±1.63	0.08±0.09	11.41±0.04
KLG12096	82.61±1.45	0.76±0.07	12.59±0.13
평균	82.08±1.6	1.25±0.06	15.33±0.07

(사) 두부의 Texture

20품종의 두부를 제조하여 두부의 texture를 측정된 결과는 표 52와 같다. Hardness는 362.2-1943.8 g의 범위이었고, 공교 9010-2가 1943.8g으로 가장 높았다.

중황 31이 362.2g으로 가장 낮았다. Cohesiveness는 0.330-0.500의 범위이었고, Chewiness는 118.8-394.2의 범위로 공교 8966-25가 394.2로 가장 높았고, 중황31은 118.8로 가장 낮았다. 그리고 gumminess는 134.8-638.2의 범위로 공교 9010-2가 638.2로 가장 높았고, 중황 31이 134.8로 가장 낮았다.

표 52. 두부의 texture

품종명	Hardness(g)	Chewiness	Gumminess	Cohesiveness
봉의콩	770.7±25.3	240.7±11.02	285.2±9.89	0.370±0.04
단백콩	470.7±25.3	221.9±5.78	236.1±12.38	0.500±0.02
검정새울콩	764.2±30.8	324.5±12.39	353.5±14.57	0.460±0.05
광안콩	910.3±38.2	241.0±6.91	337.3±18.35	0.370±0.04
중황31	362.2±12.5	118.8±8.09	134.8±4.93	0.370±0.02
흑농44	724.7±56.8	243.8±5.20	257.7±12.72	0.355±0.04
구농7714	561.7±46.8	203.6±6.37	239.9±11.56	0.425±0.03
구농8	500.4±33.9	202.1±7.33	224.2±10.32	0.445±0.07
합풍95-873	509.4±36.6	176.5±4.21	200.9± 9.76	0.395±0.02
수농10	613.5±36.8	234.3±5.88	257.6±13.59	0.420±0.05
길림53	816.5±27.9	290.9±8.31	302.1±12.51	0.365±0.04
동농98-14	823.3±32.9	254.8±13.80	299.5±11.30	0.365±0.06
공교8966-25	926.9±48.0	394.2±4.70	415.0±12.79	0.450±0.02
공교9010-2	1943.8±58.2	369.0±14.57	638.2±17.89	0.330±0.03
석후대두	584.9±46.7	204.9±9.43	222.6±10.57	0.383±0.03
KLG12073	949.9±32.2	334.5±13.29	402.8±19.25	0.425±0.01
KLG12074	1101.4±67.9	368.9±7.87	447.5±10.95	0.405±0.03
KLG12081	819.1±46.8	375.3±14.80	398.9±13.25	0.485±0.03
KLG12088	775.4±38.2	378.6±8.72	391.2±14.89	0.480±0.01
KLG12096	613.2±48.1	186.0±7.21	214.9±9.78	0.350±0.01
평균	777.1±45.5	268.2±7.4	313±11.3	0.407±0.03

### 3. 적요

#### 가. 콩 유전자원의 고지방 및 양질지방산 자원 발굴

- (1) 한국, 중국 및 미국 콩 유전자원 398종의 전체 지방함량은 평균 19.1%이었고, 12.7-26.0%의 범위이었다. 지방함량의 분포는 18.0-20%의 분포가 가장 많았고, 24%이상인 자원은 0.8%인 3종이었다.
- (2) 한국, 중국 및 미국 콩 유전자원의 포화지방산인 palmitic acid의 평균 함량은 10.6%이었으며, stearic acid의 평균 함량은 2.9%이었다. 불포화지방산인 oleic acid의 평균 함량은 28.2%이었고, 범위는 15.3-56%이었고, linoleic acid의 평균함량은 51.2%로서 범위는 24.4-68%이었다. linolenic acid의 평균함량은 7.1%이었고, 범위는 3.4-11.1%이었다. linoleic/linolenic 의 비율은 평균 7.5이었고, 최대 17에서 최소 3.8을 나타내었다. 포화지방산(palmitic acid+stearic acid)의 평균은 13.5%이었으며, 범위는 6.7-21.7%이었다. 불포화지방산(oleic acid + linoleic acid + linolenic acid)의 평균은 86.5%이었으며, 범위는 78.3%~93.4% 이었다.
- (3) 일본 콩 140종의 평균 지방함량은 17.2%이었고, 22%이상인 콩은 2종으로서 1-116(22.8%)과 1-112(22.4%)이었다. 지방산의 평균함량은 불포화지방산인 Oleic acid는 평균 26.1%이었고, 최대 55.2%, 최소 16.6%이었다. linoleic acid 의 함량은 평균 51.9%로서 최대 59.1%, 최소 25.8%이었다. linolenic acid의 함량은 평균 8.9%, 최대 12%, 최소 3.0%인 것으로 나타났다. linoleic/linolenic 의 비율은 평균 6이고, 최대 18.6, 최소 3.4이었다.
- (4) 고지방 육종을 위한 유망자원으로는 중국자원 수농14호(26.0%), 동농434호(25.7%) 및 동농46호(25%)이었다. 양질지방산 육종을 위한 유망자원으로는 oleic acid 함량을 가진 미국자원 KLG12073(56.0%)와 KLF12074(56.0%), 중국자원인 길림14호(52.2%), 일본자원 M23(55.2%), 한국육성품종인 광안콩(55.9%)과 봉의(50.9%)이었고, linoleic 함량이 낮은 자원은 미국자원 KLG12093(3.4%) 등의 9종과 일본자원 MS382(2.9%)이었다.

#### 나. 양질 지방산 함유 계통육성

- (1) 2007년도 교배조합 20조합 중에서 CS27001 등 5조합은 2008년도에 F1양성, 2009년도에 F2를 양성하였다. F2세대에서 선발목표(황,흑색종피, 눈색황, 다수초형)에 따라 5조합에서 우량계통 113개체를 선발하였다. 각 조합별로 후기세대까지 Bulk 육종을 수행하기 위하여 SSD 육종법으로 교배번호 CS27001은 252립, CS27004는 352립, CS27006은 140립, CS27114는 196립 및 CS27017은 552립을 선발하여 총 1,492립을 선발하였다.
- (2) 그 외 CS27002 등 15조합은 2009년도에 F<sub>1</sub>세대에서 60개체를 양성하였으며, 차후 본 연구에서 육성된 계통들은 지속적인 세대축진의 수행과 아울러 유망

계통을 선발할 예정이다.

다. 고지방 및 양질 지방산 유용자원의 환경적 변이 및 안정성 구명

- (1) 년차에 따른 시험품종의 평균 지방함량은 07년은 19.1%. 08년은 20.7%로서 08년이 높았으며, palmitic acid는 년차간에 차이가 없었으며, stearic acid는 08년이, oleic acid는 07년이, linoleic acid는 08년이, linolenic acid는 07년이 많았다.
- (2) 2개년 평균 품종별 지방함량은 중국자원인 동농46호가 평균 25.5%로 가장 높았고 안정적이었고, 불포화지방산 중에서 oleic acid는 KLG12073이 2개년 평균 51%로 가장 높았고, 안정적이었다. linoleic acid함량은 KLG12080이 2개년 평균 66.2%로 가장 높았고 안정적이었다. linolenic acid는 KLG12093와 KLG12096 2개년 평균 각각 3.4%, 3.5%로 낮았다.
- (3) 파종기에 따라서 지방함량과 불포화지방산인 palmitic acid와 stearic acid는 차이가 없었고, 불포화지방산인 oleic acid(C18:1)는 5월20일 파종이 6월5일 파종과 6월20일 파종보다 높았고, linoleic acid(C18:2)와 linolenic acid(C18:3)는 5월20일 파종이 낮았고, 6월5일과 6월20일 파종이 높았다.
- (4) 불포화지방산인 oleic acid(C18:1)는 전 파종기에서 KLG12074가 가장 높았고 대풍콩이 가장 낮았는데, KLG12074는 파종기 간에 변이가 작았다. linoleic acid(C18:2)는 전 파종기에서 KLG12081이 가장 높아 파종기에 따른 변이가 작았다.
- (5) 재배지역에 따른 지방함량은 품종간 및 지역과 품종간의 상호작용이 인정되었다. 재배지역에 따른 시험품종의 평균 지방함량은 무안이 가장 높았고, 연천이 가장 낮았다. 품종간에는 중국자원인 흑농44가 21.5%로 가장 높았고, 안정성이 높았다. 불포화지방산인 oleic acid(C18:1)함량은 청주가 높았고 대구가 낮았다. linoleic acid(C18:2) 함량은 지역간에 차이가 없었고, linolenic acid(C18:3)의 함량은 대구와 연천이 높았고, 청주와 무안이 낮았다.
- (6) 재배지역에 따른 불포화 지방산인 oleic acid(C18:1)함량은 KLG12074와 KLG01397가 높았으며, linoleic acid(C18:2) 함량은 KLG12081가 가장 높았고, linolenic acid(C18:3)의 함량은 KLG12081이 가장 낮았다.

라. 고지방 양질 지방산 자원의 가공적성 분석

- (1) 콩 20품종의 종실과 두유 및 두부의 지방함량은 각각 17.1-24.6%, 0.6-1.9% 및 2.8-8.8%의 범위이었다. 지방함량은 종실에서 높은 품종이 두유에서는 높았으나 두부에서는 낮은 경향이었다. 지방산 함량은 종실에서 높은 품종이 두유와 두부에서도 높았고, 종실에서 낮은 품종은 두유와 두부에서도 낮았다.
- (2) 종실의 지방함량은 동농98-14가 가장 높았고, KLG12088이 가장 낮았으며, oleic acid 함량은 봉의콩이 가장 높았고, KLG12081이 가장 낮았으며, linoleic

acid는 KLG12081이 가장 높았고, KLG12073이 가장 낮았다. linolenic acid는 KLG12073이 가장 높았고, KLG12096이 가장 낮았다.

- (3) 두유의 지방함량이 가장 높은 품종은 합풍95-873, 가장 낮은 품종은 단백콩이었다. 지방산 중에서 oleic acid 는 KLG12074가 가장 높았고, KLG12081이 가장 낮았고, linoleic acid 는 KLG12081이 가장 높았고, KLG1203이 가장 낮았으며, linolenic acid는 흑농44가 가장 높았고, KLG12096이 가장 낮았다.
- (4) 두부의 지방함량이 가장 높은 품종은 석후대두, 가장 낮은 품종은 단백콩이었다. 지방산 중에서 oleic acid는 KLG12074가 가장 높았고, KLG12088이 가장 낮았으며, linoleic acid는 KLG12088이 가장 높았고, KLG12073이 가장 낮았으며, linolenic acid는 봉의콩이 가장 높았고 KLG12081이 가장 낮았다.

## 제 3 절 신품종의 친환경 재배시스템 개발

### 1. 신품종의 친환경 재배시스템 개발

#### 가. 연구개발의 방법

본 실험에 사용한 아가1호 또는 아가3호는 소이벤처(주)에서 분양 받아 시료로 사용하였다. 콩의 생육과 콩 종실의 isoflavone 함량에 미치는 영향을 조사한 실험의 일반적인 방법은 다음과 같다.

#### 1) 지역별 콩 생육특성 및 종실의 isoflavone 함량변화

지역별 콩 생육과 종실의 isoflavone 함량 차이를 검정하기 위해 아가3호를 경북 군위 경북대학교 실험실습 포장과 경북영주에서 재배하여 비교실험을 수행하였다. 군위는 6월 20일에 파종하였으며 영주에서는 6월 27일에 파종하였다. 군위포장에서 개화 시기는 8월 3일경이었으며 영주포장에서는 8월 8일 이었다. 종자 수확은 10월 18일이었으며, 재식밀도 70x20cm, 1주 2본으로 파종하였다.

성숙기에 반복별로 전체의 종자를 수확하여 탈곡하였으며 반복별로 10g의 종자를 취하여 마쇄한 후 그 중에 1g의 콩 분말을 이용하여 isoflavone 함량을 분석 하였다.

#### 2) 경북지역 일반농가에서 재배한 아가1호의 isoflavone 함량변화

아가1호의 재배지역에 따른 isoflavone 함량의 차이를 조사하기 위해서 경북지역 내 영천, 포항, 영양, 영주의 70 농가에서 재배한 아가1호를 대상으로 isoflavone 함량 분석을 하였다.

아가1호를 재배한 농가를 시군별로 보면 영천시 고경면 3농가, 화북면 8농가, 화남면 6농가, 화산면 13농가, 신령면 10농가이었고, 영주시 부석면 4농가, 문수면 5농가, 이산면 7농가이었으며, 영양군 석보면 4농가, 포항시 청하면 10농가이었다.

재식밀도, 시비량, 재배법은 각 농가의 관행 농법에 준하여 재배하였으며 수확한 콩의 isoflavone 함량 분석을 위해 농가별로 수확한 콩의 10g씩을 마쇄하여 그 중에 1g을 취하여 분석하였다.

#### 3) N-P-K 처리에 의한 아가1호의 isoflavone 함량변화

토양의 영양 상태를 균일하게 조절하기 위해 경북대학교 실험실습 포장에서 실험용 원형포트는 1/2,500 a pot 이며 시비량은 N-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-K<sub>2</sub>O, 30-30-34 kg/ha을 표준시비량으로 하였다. 비료 함량의 조절은 무시비(NO), 표준시비(ST), N의 50% 증비(IN), P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>의 50% 증비(IP), K<sub>2</sub>O의 50% 증비(IK), P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>와 K<sub>2</sub>O의 50% 증비(IPK), 무질소시비(NN)로 처리한 포트에 아가1호를 6월 19일 파종하였다.

포트 당 3주, 처리당 4포트로 2반복으로 실험을 수행 하였다. 수확은 성숙기인

10월 12일에 처리구별로 건조 후 탈곡하였으며 10g의 종자를 취하여 마쇄한 후 그 중에 1g의 콩 분말을 이용하여 isoflavone 함량을 분석하였다.

#### 4) Abiotic stresses 처리에 의한 isoflavone의 증대

대사유도물질 처리가 콩 종실의 isoflavone 함량에 미치는 영향을 조사하기 위하여 콩 품종은 소이벤처(주)에서 아가3호를 분양 받아 시료로 사용하였다. 콩 재배는 경북대학교 농업생명과학대학 부속 실험실습장(군위)에서 2008년 6월 14일에 재식밀도 70×20 cm, 1주 2본으로 파종하였다. 시비는 N-P-K=30-30-34 kg/ha을 전량 기비로 사용하였으며, 기타 재배법은 영남농업연구소 콩연구센터의 표준재배법에 준하였다.

대사유도물질은 분무기(Oriental Koshin, HS-703W)를 이용하여 경엽 살포 하였으며 각각의 대사유도물질은 10, 100ppm 농도로 처리하였으며 키토산은 추천농도로 처리하였다.

처리시기는 R3(꼬투리가 맺히기 시작하는) 시기와 R7(성숙이 시작되는) 시기에 처리하여 수확한 종실의 isoflavone 함량을 조사한다. 성숙기에 수확한 종자를 10g을 마쇄하여 그 중에 1g의 콩 분말을 이용하여 isoflavone 함량을 분석 하였다.

##### 가) 대사유도물질

대사유도물질로 사용된 Salicylic acid (2-Hydroxybenzoic acid), Acetyl salicylic acid (2-Acetoxybenzoic acid)는 Duchefa biochem 제품을 사용하였으며, 농도는 10ppm과 100ppm으로 1차처리(8월 29일)와 2차처리(9월12일)로 처리시기를 달리하였고 1차 및 2차에 걸쳐 2회 처리한 구를 포함시켰다.

##### 나) 키토산

자연산 계 껍질을 원료로 제조 판매되고 있는 SBB(주) 키토산액(1%)을 추천량인 10ppm 농도로 희석하여 대사유도물질과 동일한 시기에 처리하였다.

#### 5) 대사조절물질 함유 Endophytic fungi의 선발

콩에 유용한 천연 대사물질을 탐색하기 위하여 콩의 뿌리에서 생육하는 endophytic fungi의 isolates를 waito-c rice와 콩을 대상으로 생물검정을 실시하여 작물 생육조절 효능을 검정하였다. 본 실험에 사용한 fungal isolates의 조제는 아래와 같이 실시하였다.

- o Washing of samples: soil particles, Tween 80 (5 min/120 rpm), wash, 1% perchloric acid (5 min/120 rpm), wash
- o Root cut in to 0.5cm pieces with sterilized blade
- o Pieces- Hagem medium plates containing streptomycin, incubated at 25°C (Bayman *et al.*, 1997 and Vazquez *et al.*, 2000)
- o Fungi were carefully picked with sterilized needle tip and placed on fresh



- Hagem and PDA medium plates (25°C)
- o Bioassay: Fungal isolates were grown on Czapek medium for 7 days at 30°C at 120rpm, centrifuged, lyophilized
  - o Supernatant was diluted in 1ml autoclaved distilled water
  - o Waito-C rice, 20 ppm uniconazol (24 hr)
  - o Seeds placed in autoclaved DW till emergence of radicle
  - o Germinated seedlings were placed in glass tubes containing 0.8% water-agar medium, growth chamber
  - o Hagem medium: 0.5% glucose, 0.05% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.05% NH<sub>4</sub>Cl, 0.1% FeCl<sub>3</sub>, 80ppm Streptomycine and 1.5% agar, with pH 5.6
  - o Czapek medium: 1% Glucose, 1% Peptone, 0.05%KCl, 0.05% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O and 0.001% FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O at pH 7.3±0.2

<Identification of fungal strains>

- o Identification of samples was done by SolGent Co. Ltd.  
 Universal primers for ITS-1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3')  
 and ITS-4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') regions for 18S rDNA

6) 지역별 Abiotic stresses 처리에 의한 아가콩의 생육특성

대사유도물질 처리가 콩 종실의 isoflavone 함량에 미치는 영향을 조사하기 위하여 콩 품종은 소이벤처(주)에서 아가3호를 분양 받아 시료로 사용하였다. 콩 재배는 군위와 영주에서 2008년 6월 15일에 재식밀도 80×20 cm, 1주 2본으로 파종하였다. 시비는 N-P-K=30-30-34 kg/ha을 전량 기비로 사용하였으며, 기타 재배법은 영남농업연구소 콩연구센터의 표준재배법에 준하였다. 대사유도물질은 분무기 (Oriental Koshin, HS-703W)를 이용하여 경엽 살포 하였으며 각각의 대사유도물질은 10, 100ppm 농도로 처리하였다. 처리시기는 R3(꼬투리가 맺히기 시작하는) 시기와 R7(성숙이 시작되는) 시기에 처리하여 수확한 종실의 isoflavone 함량을 조사한다. 성숙기에 수확한 종자를 10g을 마쇄하여 그 중에 1g의 콩 분말을 이용하여 isoflavone 함량을 분석 하였다.

대사유도물질로 사용된 Salicylic acid (2-Hydroxybenzoic acid), Acetyl salicylic acid (2-Acetoxybenzoic acid)는 Duchefa biochem 제품을 사용하였으며, 농도는 10ppm과 100ppm으로 전 식물체에 충분한 살포량으로 9월 12일에 1회 경엽처리하였다.

#### 7) 시비수준에 따른 아가3호의 isoflavone 함량변화

경북대학교 실험실습 포장에서 아가3호를 표준재배법으로 6월 24일 파종하였다. 시비는 N-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-K<sub>2</sub>O, 30-30-34 kg/ha를 표준시비량으로 하였고, 시비 수준은 무시비(NO), 표준시비(ST), N의 50% 증비(IN), P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>의 50% 증비(IP), K<sub>2</sub>O의 50% 증비(IK), P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>와 K<sub>2</sub>O의 50% 증비(IPK), 무질소시비(NN)로 처리하였다.

처리구 면적은 15m<sup>2</sup>으로 3반복으로 실험을 수행 하였다. 수확은 성숙기인 10월 15일에 처리구별로 건조 후 탈곡하였으며 10g의 종자를 취하여 마쇄한 후 그 중에 1g의 콩 분말을 이용하여 isoflavone 함량을 분석하였다.

#### 8) 작부체계 및 친환경적 잡초방제법 확립

##### 가) 답전윤환에 의한 잡초발생 경감

벼이앙재배답에 콩을 도입하여 답전윤환 콩재배를 실시하여 잡초의 발생 양상을 조사하였다. 콩의 재배는 표준재배법으로 실시하였다. 시험구의 잡초발생 양상과 발생량을 조사하였다.

##### 나) 친환경적 잡초방제법 확립

○ 피복자재를 이용한 콩재배 : 콩밭 잡초방제를 위해 널리 사용하고 있는 제초제를 사용하지 않고 친환경적으로 콩을 재배하기 위하여 일반흑색비닐을 이용하여 이랑재배법으로 아가3호를 파종하였다. 재식거리는 80cm x 15cm로 1주 2분으로 파종하였다.

○ 보리 및 호밀 피복재배 : 벼나 콩을 수확한 후 11월 중순과 이듬해 4월에 10a당 호밀 종자 100kg/10a을 파종하고 콩은 6월 중순에 파종한다.

○ 보릿짚 피복 : 비닐 무피복 부분인 골에 발생하는 잡초의 방제를 위해 보릿짚을 골에 피복하였다.

#### 나. 연구결과

##### 1) 지역별 콩 생육특성 및 종실의 isoflavone 함량변화

지역별 아가3호의 생육은 영주에서 재배된 아가3호의 경장은 군위에서 재배된 콩보다 40cm 이상 증가하였다. 마디수와 분지수는 비슷한 반면 협수는 영주에서 재배된 것이 훨씬 많았다. 아가3호의 전체적인 생육은 군위보다 영주에서 재배할 경우 훨씬 나은 것으로 조사되었다(표 1). 본 실험에서 지역간의 토양 비옥도나 조건이 동일하지 않기 때문에 단정적인 결론을 토출하기는 어려우나 콩의 경우에도 재배에 유리한 지역이나 기상조건이 있기 때문에 고품질 콩을 다수확하기 위해서는 재배지역의 선택이 중요하다고 사료된다.

Table 1. Growth characteristics of Aga3 grown at different locations, Youngju and Gunwi.

Location	Plant length (cm)	No. of node	Branch no.	No. of pods.
Youngju	106	17	6	130
Gunwi	64	15	5	68

표 2는 영주와 군위에서 재배한 아가3호의 종실에서 isoflavone 함량을 나타낸 것이다.

군위에서 재배된 아가3호의 총 isoflavone 함량은  $2,824\mu\text{g/g}$ 으로 조사된 반면, 영주에서 재배된 아가3호의 총 isoflavone 함량은  $3,344\mu\text{g/g}$ 으로 조사되어 영주에서 재배된 아가3호의 총 isoflavone 함량이 약 18% 높게 조사되었다.

상기 실험의 결과를 종합해 보면 재배지역별로 콩의 isoflavone 함량은 크게 차이가 나타났다. 따라서 기능성 콩의 생산을 위해서는 특산지 조성 및 재배기술의 개발이 필요하며 이를 이용한 기능성 콩 제품의 개발에도 응용할 수 있을 것으로 사료된다.

Table 2. Isoflavone contents of Aga3 soybean cultivar grown at different locations, Youngju and Gunwi.

Location	Isoflavone			
	Daidzein	Glycitein	Genistein	Total
		----- $\mu\text{g/g}$ -----		
Youngju	1,791	283	1,269	3,344
Gunwi	1,565	201	1,059	2,824

## 2) 경북지역 일반농가에서 재배한 아가1호의 isoflavone 함량변화

경북지역의 일반농가 70호를 대상으로 개별 농가의 콩 재배방법에 따라 재배된 아가1호의 isoflavone 함량을 지역별로 조사하였다(표 3). 지역별 아가1호의 isoflavone 평균함량은 영주 부석면이 평균  $2,782\mu\text{g/g}$ 이고, 포항 청하면이  $1,678\mu\text{g/g}$ 으로 지역 간에 약 1.6 배 차이가 나는 것으로 조사되었다. Yun 등(2006)에 의하면 콩의 입중이 무거울수록 isoflavone 함량은 낮아졌다고 보고하였으나 본 실험에서는 입중과 isoflavone 함량과는 관련이 없는 것으로 조사되었다.

Table 3. Changes in 100-seeds weight and isoflavone contents of the seeds of Agal as planted at different locations.

Location (number of samples)		100-seeds weight (g)	Isoflavone contents ( $\mu\text{g/g}$ )
Yungchun	Gokungmun (3)	6.02	2,498 <sup>ab</sup>
	Hwapukmun (8)	6.09	2,389 <sup>b</sup>
	Hwanammun (6)	6.09	2,304 <sup>b</sup>
	Hwasanmun (13)	6.30	2,478 <sup>ab</sup>
	Shinryungmun (10)	6.56	2,629 <sup>ab</sup>
Pohang	Chunghamun (10)	5.38	1,678 <sup>c</sup>
Yungyang	Sukbomun (4)	6.57	2,688 <sup>ab</sup>
	Busukmun (4)	6.77	2,782 <sup>a</sup>
Yungju	Munsumun (5)	6.94	2,603 <sup>ab</sup>
	Leesanmun (7)	6.85	2,700 <sup>ab</sup>

\* Same letter in each column are not significantly different at the 5% level by DMRT.

Each value is the average of sample collected from the same location

영천과 포항의 월별기온은 비슷한 반면 포항과 영주의 등숙기의 온도는 포항에 비해 약 2~3°C 정도 낮았다. 포항과 영천의 기온은 비슷하였으나 isoflavone 함량이 큰 차이를 보인 것은 기온뿐만 아니라 토양 등의 재배 환경변이에 의한 요인으로 판단되며, 영주와 포항지역의 isoflavone 함량의 차이는 등숙기에 온도차이가 큰 요인으로 작용하였을 것으로 사료된다. Kitamura 등(1991)은 등숙기의 저온이 콩의 isoflavone 함량을 높인다고 하였으나 이외에도 여러 가지 환경적인 요인들이 isoflavone 함량변화에 관련이 있을 것으로 추정되어 콩의 isoflavone 함량을 높이기 위해서는 특정지역에 맞는 품종과 파종기 등 재배방법의 확립이 이루어져야 할 것으로 생각된다.

### 3) N-P-K 처리에 의한 아가1호의 isoflavone 함량변화

본 실험은 NPK 처리 수준이 콩 종실의 isoflavone 함량에 미치는 영향을 구명하기 위하여 수행하였다. NPK의 증감에 따른 isoflavone 함량은 무시비, N의 50% 감소, N의 무시비, K의 50% 증비 처리구에서 표준시비나 증비구에서 보다 증가되어 질소시비에 따른 isoflavone 함량은 오히려 감소하는 경향이 있는 것으로 조사되었다(표 4). NPK 수준에 따라 isoflavone 함량은 1,452~1,875 $\mu\text{g/g}$ 으로 조사되었다. 이와 같은 결과는 Tony 등(2002)이 토양의 K 함량을 높일 경우 isoflavone 함량의

증가효과가 있다고 보고한 것과 일치한다.

따라서 콩의 isoflavone 함량 증대를 위해서는 표준시비에 PK시비를 50% 증가시키는 것이 더욱 효과적임을 알 수 있었다. 일반적으로 질소시비의 감소는 콩에 스트레스를 유발하여 isoflavone의 생성을 증가시킨다고 보고한 것으로 미루어 보아 본 실험에서 무시비, 질소감비, PK 증비 처리의 isoflavone 증대효과는 이들 처리가 아가1호의 phenylpropanoid 대사작용에 영향을 미쳐 외부 스트레스에 대한 반응으로 isoflavone 함량의 증가를 나타낸 것으로 사료된다.

Table 4. Isoflavone contents of Agal as influenced by various fertilizer levels and root nodule bacteria.

Cultivar	Fertilization	Isoflavone			
		Daidzein	Glycitein	Genistein	Total
			----- $\mu\text{g/g}$ -----		
Agal	NO	958	136	737	1,830
	ST	859	106	619	1,585
	50% IN	680	98	583	1,362
	50% IP	714	83	712	1,509
	50% IK	842	126	774	1,742
	50% IPK	722	86	757	1,564
	NN	826	113	758	1,697
	Mean	800	107	705	1,613

\* NO: no fertilization, ST: standard fertilization, IN: increase 50% N, IP:increase 50% P, IK: increase 50% K, IPK: increase 50%P and K, NN: no N, standard fertilization.

#### 4) Abiotic stresses 처리에 의한 isoflavone의 증대

콩 재배 시에 대사유도물질 처리에 의한 콩 종실의 isoflavone 함량을 증가시키기 위하여 대사유도물질을 개화 후 일정한 시기(R3 및 R7시기)에 10ppm과 100ppm의 대사유도물질을 경엽 처리한 콩 종실의 isoflavone 함량을 측정한다. 1차년도 예비연구에서 얻어진 결과를 토대로 금년도 시험에서는 농도수준과 처리시기를 단축 조정하여 시험을 수행하였다. 대사유도물질의 농도와 처리시기에 따른 콩 종실의 isoflavone 함량은 표 5와 6과 조사되었다.

Table 5. Changes in the isoflavone contents of soybean seeds of Aga3 as treated different elicitors and application timings.

Elicitor	Application time	Concentration (ppm)	Isoflavone				
			Daidzein	Glycitein	Genistein	Total	
SA	R3	10	1,713	163	1,796	3,672	
		100	1,567	167	1,739	3,473	
	R7	10	1,958	187	2,116	4,261	
		100	1,811	158	1,905	3,874	
	ASA	R3	10	1,626	184	1,767	3,577
			100	1,406	167	1,644	3,217
R7		10	1,898	205	2,004	4,107	
		100	1,735	218	1,930	3,883	
Control	-	-	1,636	194	1,796	3,626	

Table 6. Changes in the isoflavone contents of soybean seeds of Aga3 treated by kitosan and application timings.

Elicitor	Application time	Isoflavone			
		Daidzein	Glycitein	Genistein	Total
Kitosan	R3	1,640	145	1,756	3,541
	R7	1,807	170	1,923	3,900
	Control	1,593	158	1,733	3,484

5) 대사조절물질 함유 Endophytic fungi의 선발

식물생장촉진 **Endophytic fungi** 선발 : Endophytic fungi 9종류를 선발하여 waito-c rice 에 처리하여 이들 endophytic fungi가 식물생육에 어떤 영향을 미치는지에 대해 조사하였다 (표 7). P-4-3이 무처리구와 비교하여 가장 식물생육을 촉진하였기에 추가적인 실험을 실시하였다.

Table 7. Screening of fungal isolates on waito-c rice for their growth promoting capacity

Fungal isolates	Plant height (cm plant <sup>-1</sup> )	Shoot length (cm shoot <sup>-1</sup> )	Increase (cm shoot <sup>-1</sup> )	Growth status
Control	16.3±1.8	6.0±0.5	0.0	N.A
<i>G. fujikuroi</i>	19.0±1.9	8.6±0.9	2.6	Promoted
P-2-4	18.3±2.4	8.9±0.3	2.9	Promoted
P-4-3	19.4±1.8	9.5±0.4	3.5	Promoted
P-1-1	16.2±1.1	8.2±0.3	2.2	Promoted
P-2-2	14.5±4.1	7.3±0.07	1.3	Promoted
P-4-2	18.8±0.2	7.3±0.3	1.3	Promoted
P-1-3	16.0±3.8	7.3±1.2	1.3	Promoted
P-1-2	17.7±0.9	7.5±0.2	1.5	Promoted
P-2-1	15.6±2.7	7.7±0.8	1.7	Promoted
P-4-1	16.3±0.9	6.7±0.2	0.7	Promoted

P-4-3를 콩을 대상으로 bioassay 한 결과, 식물의 신장, 줄기의 길이, 식물체의 생체중, 줄기의 생체중이 증가하는 것으로 나타났다(그림 1과 2).

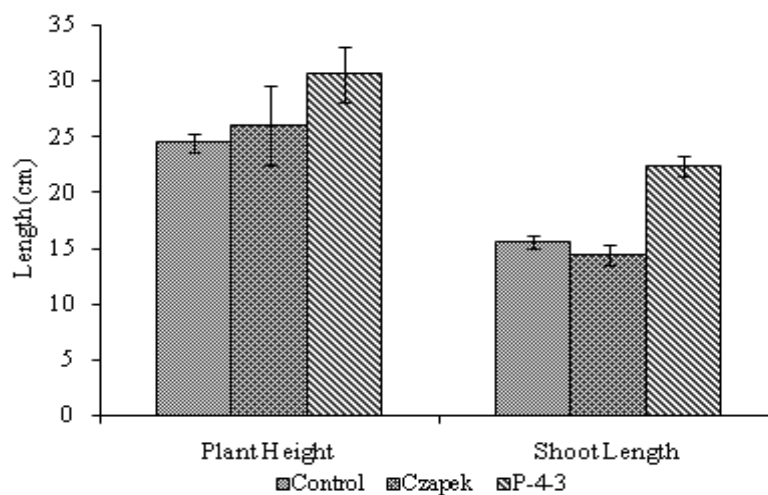


Fig. 1. Effect of P-4-3 culture filtrate on plant height and shoot length of soybean seedlings. P-4-3 culture filtrate treated seedlings showed increased lengths than those by wild type *G. fujikuroi* indicating possibility of higher GA production. Error bars indicate standard deviations.

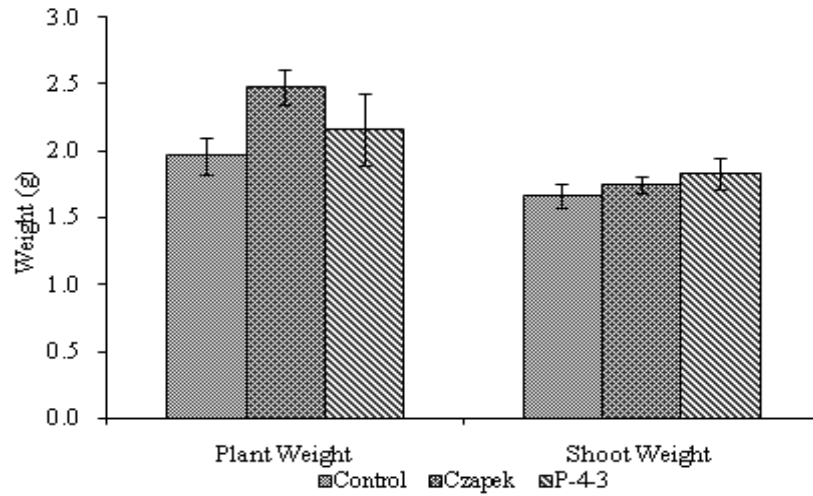


Fig. 2. Effect of P-4-3 culture filtrate on plant and shoot weight of soybean seedlings. P-4-3 culture filtrate treated seedlings showed increased plant weight than control. Error bars show standard deviations.

**IR-3-3 배양여액의 Gibberellins 분석** : P-4-3를 처리하였을 때 wild type *G. fujikuroi* 와 비교하였을 때 생리활성 GAs인 GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub>, GA<sub>7</sub> 보다 더 많은 GA 활성을 보였다(그림 3).

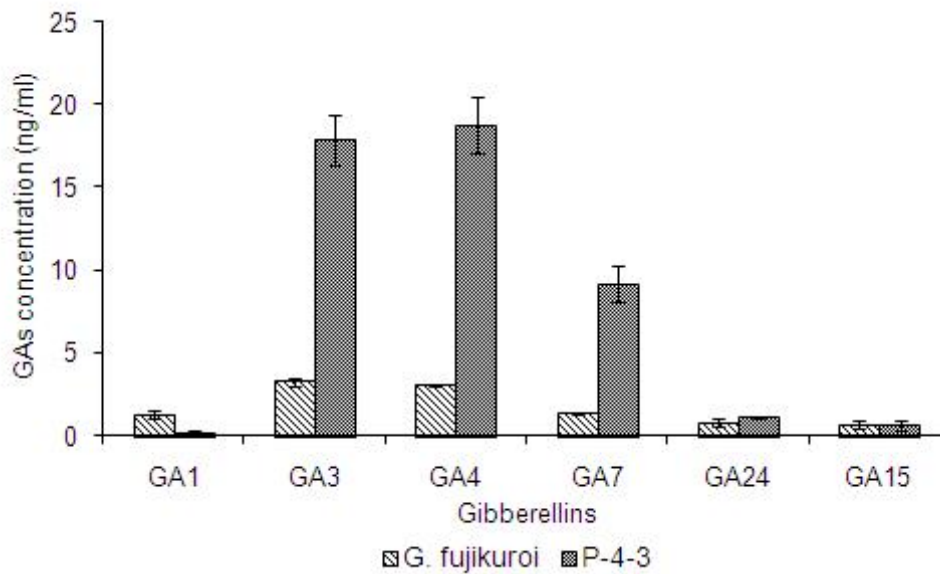


Fig. 3. Gibberellins content of fungal isolate P-4-3 and wild type *G. fujikuroi*. The GC-MS SIM analysis of culture filtrate extracts from P-4-3 showed presence of all four bioactive GAs. Error bars indicate standard deviations.



**P-4-3의 형태적 동정 :** 형태적 동정결과 morphological characteristics of fungal isolate P-4-3는 *Scolecobasidium tshawytschae*.와 유사성을 보였다.

**P-4-3의 Molecular and Phylogenetic 동정 :** Molecular and Phylogenetic 동정결과 P-4-3는 새로운 strain of *Scolecobasidium tshawytschae*으로 구명되었다. *Scolecobasidium tshawytschae* IJL03는 NCBI GenBank에 EU823314로 등록이 되었다.

**식물생장억제 Endophytic fungi 선발 :** 식물생장조절물질을 선발하기 위하여 잡초의 뿌리로부터 endophytic fungi를 분리하여 waito-c rice와 피에 처리하여 반응을 조사하였다. 쇠비름에서 분리된 Pa-4-1는 무처리구와 비교하여 식물생장을 53%촉진하였고(표 8), 선개불알풀에서 분리된 V-3-4는 42% 억제하는 효과를 보였다(표 9). 이와 같이 억제효과를 보인 추출물은 천연 식물생장억제제로 사용이 가능해 잡초의 생장억제제로 사용이 가능할 것이다.

Table 8. Effect of fungal isolates from *Portulaca oleracea* on plant height, shoot length and root length of waito-c rice.

Treatment	Plant Height (cm)	Shoot Length (cm)	Root Length (cm)	Shoot Ext Rate (%)
Control	14.2±0.34	5.6±0.13	8.5±0.22	100
Pa3.1	12.6±0.89	6.2±0.29	6.4±0.63	110
Pa5.1	13.6±0.65	6.9±0.25	6.8±0.79	122
Pa4.4	13.6±0.69	6.7±0.44	6.9±0.97	119
Pa6.1	13.0±0.11	6.4±0.12	6.5±0.20	114
Pa2.1	14.5±0.31	7.2±0.29	7.2±0.57	128
Pa 3.5	15.3±0.44	6.9±0.22	8.4±0.28	122
Pa1.1	14.5±0.61	6.4±0.18	8.1±0.77	113
Pa4.3	16.5±0.79	7.5±0.21	9.0±0.68	132
Pa 4.1	16.3±0.1	9.3±0.75	7.0±0.89	156

Table 9. Effect of fungal isolates from *Veronica arvensis* on plant height, shoot length, and root length of waito-c rice.

Treatment	Plant Height (cm)	Shoot Length (cm)	Root Length (cm)	Shoot Ext.(%)
Control	14.2±0.33	5.7±0.57	8.4±0.21	100
V.1.4	12.7±0.21	6.1±0.95	6.5±0.81	107
V.1.7	15.8±0.24	6.1±0.89	9.7±0.22	107
V.2.1	14.3±0.21	6.0±0.59	8.2±0.18	106
V.2.5	16.2±0.28	6.6±0.36	9.6±0.24	116
V.2.6	14.7±0.76	6.0±0.23	8.7±0.16	105
V.3.1	9.8±0.27	4.0±0.12	5.8±0.17	71
V.3.4	8.1±0.44	3.3±0.27	4.8±0.43	58
V.3.6	13.2±0.19	5.4±0.18	7.8±0.11	94
V.4.2	15.8±0.18	6.4±0.36	9.5±0.21	112
V.4.7	15.4±0.22	6.1±0.84	9.3±0.23	107
V.5.4	15.2±0.15	5.9±0.36	9.3±0.11	104
V.6.3	17.2±0.20	6.4±0.12	10.8±0.17	112
V.6.5	14.8±0.13	6.3±0.11	8.5±0.76	108
V.8.4	15.0±0.59	6.4±0.89	8.6±0.36	110
V.10.1	17.1±0.45	6.8±0.46	10.3±0.72	119

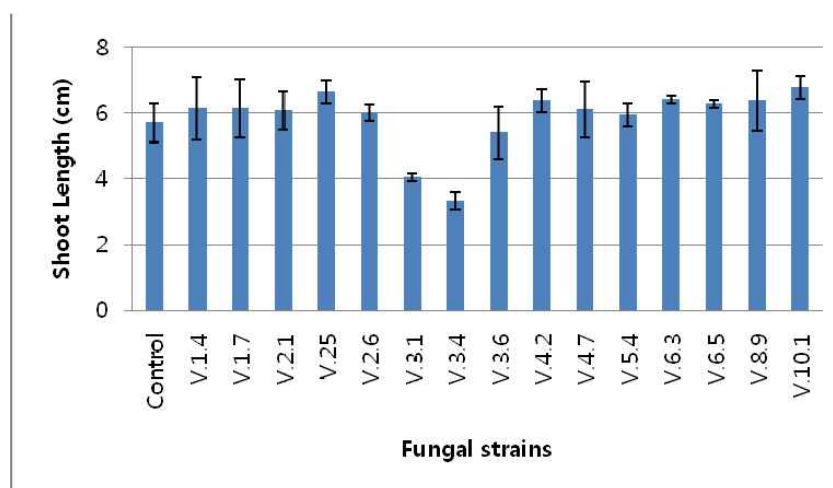
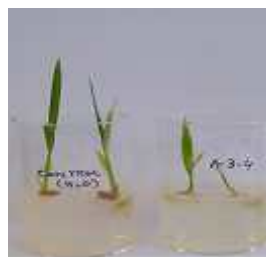
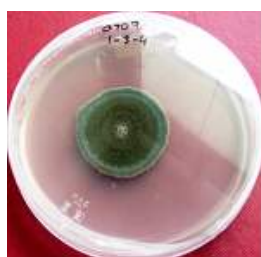


Fig. 4. Growth promotion/inhibition effect on waito-c rice seedlings treated with culture filtrates of fungi isolated from roots of *Veronica arvensis*

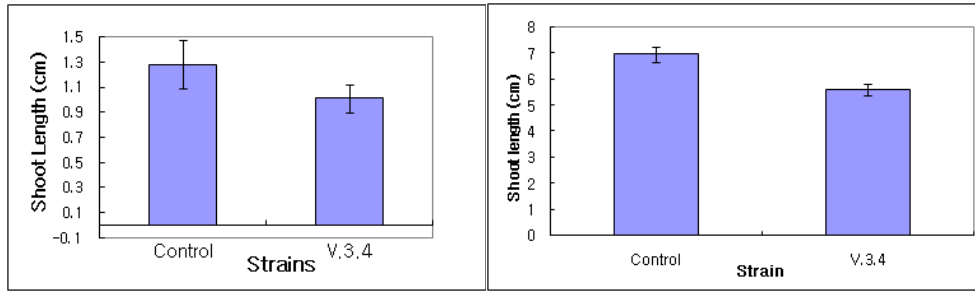


Fig 5. Bioassay of culture filtrate (CF) of fungal isolate V.3.4 on *Digitaria sanguinalis* (R) and Dongjinbyeo (L).

6) 지역별 Abiotic stresses 처리에 의한 아가콩의 생육특성

아가3호의 생육은 지역에 따라 차이를 보였는데, 영주에서 재배된 아가3호의 경장은 군위 보다 20cm 이상 증가하였다. 협수는 영주에서 재배된 것이 훨씬 많았고 마디수와 분지수는 비슷하였으나 전체적인 생육은 군위보다 영주에서 재배할 경우 훨씬 나은 것으로 조사되었다(표 10). 본 실험에서 지역 간에 생육의 차이를 보이는 것은 재배지 토양의 비옥도나 조건이 다르기 때문으로 추정되며, 콩의 경우에도 재배에 유리한 지역이나 기상조건이 있기 때문에 고품질 콩을 다수확하기 위해서는 재배지역의 선택이 중요하다고 사료된다.

Table 10. Growth characteristics of Aga3 grown at different locations, Youngju and Gunwi.

Location	Elicitor	Conc. (ppm)	Plant length (cm)	No. of node	No. of branch	No. of pods
Youngju	SA	10	109	15	6	135
	SA	100	110	16	6	140
	ASA	10	108	17	6	130
	ASA	100	107	16	6	130
	Control	-	110	17	6	140
Gunwi	SA	10	85	15	5	95
	SA	100	83	16	5	100
	ASA	10	83	16	5	93
	ASA	100	84	16	5	96
	Control	-	85	16	5	97

7) 지역별 Abiotic stresses 처리에 의한 아가콩의 isoflavone 함량 변화

표 11은 영주와 군위에서 재배한 아가3호의 종실에서 isoflavone 함량을 나타낸 것이다.

Table 11. Isoflavone contents of Aga3 soybean cultivar grown at different locations, Youngju and Gunwi.

Location	Elicitor	Conc. (ppm)	Isoflavone contents			
			Daidzein	Glycitein	Genistein	Total
				----- $\mu\text{g/g}$ -----		
Youngju	SA	10	2,129	279	1,616	4,024
	SA	100	2,095	261	1,441	3,797
	ASA	10	2,084	289	1,675	4,048
	ASA	100	1,986	295	1,531	3,812
	Control	-	1,825	290	1,301	3,416
Gunwi	SA	10	1,814	198	1,301	3,313
	SA	100	1,913	205	1,220	3,338
	ASA	10	1,795	207	1,298	3,300
	ASA	100	1,690	218	1,185	3,093
	Control	-	1,605	209	1,097	2,911

군위에서 재배된 아가3호의 총 isoflavone 함량은 2,911 $\mu\text{g/g}$ 으로 조사된 반면, 영주에서 재배된 아가3호의 총 isoflavone 함량은 3,416 $\mu\text{g/g}$ 으로 조사되어 영주에서 재배된 아가3호의 총 isoflavone 함량이 약 17% 높게 조사되었다.

아가콩의 isoflavone 함량은 재배 지역에 따라 크게 차이가 나타났기 때문에 기능성 콩의 생산을 위해서는 특산지 조성 및 재배기술의 개발이 필요하며 이를 이용한 기능성 콩 제품의 개발에도 응용할 수 있을 것으로 사료된다.

콩 재배 시에 대사유도물질 처리에 의한 콩 종실의 isoflavone 함량을 증가시키기 위하여 1, 2차년도 연구에서 얻어진 결과를 토대로 대사유도물질을 개화 후 R7 시기에 10ppm과 100ppm으로 경엽 처리한 콩 종실의 isoflavone 함량을 측정하였다. SA와 ASA 10ppm 처리에서 대체로 isoflavone의 함량이 무처리 보다 증가하여 고기능성 아가콩 생산에 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

8) 시비수준에 따른 아가3호의 isoflavone 함량변화

NPK 처리 수준이 콩 종실의 isoflavone 함량에 미치는 영향을 구명하기 위하여 NPK의 함량을 무시비, N의 50% 감소, N의 무시비, K의 50% 증비 처리하였는데, 아가3호의 isoflavone 함량은 무처리구에서 표준시비나 증비구에서 보다 증가되어 질소시비는 isoflavone 함량을 오히려 감소시키는 경향이 있는 것으로 조사되었다

(표 12). 지역에 따라서도 차이가 있었으나 NPK 처리에 따른 isoflavone 함량은 비슷한 경향을 보였다. 이와 같은 결과는 Tony 등(2002)이 토양의 K 함량을 높일 경우 isoflavone 함량의 증가효과가 있다고 보고한 것과 일치한다.

Table 12. Isoflavone contents of Aga3 as influenced by various fertilizer levels.

Location	Fertilizer application	Isoflavone			
		Daidzein	Glycitein	Genistein	Total
			----- $\mu\text{g/g}$ -----		
Youngju	NO	1,892	317	1,387	3,596
	ST	1,763	285	1,321	3,369
	50% IN	1,594	266	1,202	3,062
	50% IP	1,698	278	1,396	3,372
	50% IK	1,801	318	1,512	3,631
	50% IPK	1,721	285	1,421	3,427
	NN	1,709	306	1,398	3,413
	Mean	1,740	294	1,377	3,411
Gunwi	NO	1,662	246	1,215	3,123
	ST	1,587	205	1,006	2,798
	50% IN	1,395	198	895	2,488
	50% IP	1,501	209	1,019	2,729
	50% IK	1,612	251	1,220	3,083
	50% IPK	1,472	188	1,193	2,853
	NN	1,599	211	1,187	2,997
	Mean	1,547	215	1,105	2,867

\* NO: no fertilization, ST: standard fertilization, IN: increase 50% N, IP: increase 50% P, IK: increase 50% K, IPK: increase 50%P and K, NN: no N, standard fertilization.

따라서 콩의 isoflavone 함량 증대를 위해서는 표준시비에 N 수준을 낮추고 K시비를 50% 증가 시키는 것이 더욱 효과적임을 알 수 있었다. 일반적으로 질소시비의 감소는 콩에 스트레스를 유발하여 isoflavone의 생성을 증가시킨다고 보고한 것으로 미루어 보아 본 실험에서 무시비, 질소감비, K 증비 처리의 isoflavone 증대효과는 이들 처리가 아가3호의 phenylpropanoid 대사작용에 영향을 미쳐 외부 스트레스에 대한 반응으로 isoflavone 함량의 증가를 나타낸 것으로 사료된다.

#### 9) 작부체계 및 친환경적 잡초방제법 확립

##### 가) 제초제를 이용한 화학적 잡초방제

제초제를 이용한 콩밭의 잡초방제는 가장 경제적이고 효과적인 방법으로 여기고 있으나 최근 친환경농업에 대한 관심이 고조되면서 제초제 사용을 기피하는

경향이 있다. 기존의 제초제나 현재 개발되고 있는 제초제의 잡초방제효과를 표 13에 나타내었다.

Table 13. Weed control in soybean treated by several herbicides.

Treatment	Grass weeds				Broadleaf weeds			
	Weed no.	Dry weight	DMRT (5%)	Control rate(%)	Weed no.	Dry weight	DMRT (5%)	Control rate(%)
Herbicide A	0.0	0.0	a	100	3.5	2.1	a	96.2
Herbicide B	1.3	2.0	a	97.0	2.5	2.5	a	95.4
Herbicide C	0.4	4.5	a	93.2	4.1	6.1	a	88.9
Alachlor (check)	1.2	2.3	a	96.5	3.9	4.3	a	92.2
Hand weeding	0.0	0.0	a	100	0.0	0.0	a	100
Control	64.7	65.8	b	-	44.2	54.9	b	-

Weed no.: Number/m<sup>2</sup>, Dry weight: g/m<sup>2</sup>

나) 답전윤환에 의한 잡초발생 경감

화분과인 피는 논과 밭에서 대량 발생하는 문제의 잡초인데 논밭에서 발생이 가능하기 때문에 답전윤환에서도 발생량이 많은 것으로 나타났다(표 14). 따라서 답수와 밭상태에서 발생할 수 있는 피의 발생을 억제하는 것이 친환경재배에 중요한 요인이다. 주요잡초의 건물중으로 볼 때 답전윤환으로 잡초의 발생량을 40% 정도 경감시킬 수 있어 친환경농업을 위한 한 가지 대책이 될 수 있을 것이다. 따라서 답전윤환재배법으로 콩을 재배할 경우 친환경적인 콩의 재배가 가능할 것이다.

Table 14. Major weeds and their occurrence in a crop-rotated fields.

Crop rotation	<i>Echinochloa crus-galli</i>		<i>Digitaria sanguinalis</i>		<i>Monochria vaginalis</i>		<i>Cyperus amuricus</i>		<i>Eclipta prostrata</i>		Total	
	Wee dno.	Dry wt.	Wee dno.	Dry wt.	Wee dno.	Dry wt.	Wee dno.	Dry wt.	Wee dno.	Dry wt.	Wee dno.	Dry wt.
Rice	35.0	30.3	0	0	17.3	16.9	7.7	3.6	6.0	2.6	66.0	53.4
Soybean	36.0	16.4	40.7	24.1	0	0	8.3	3.7	5.7	1.8	90.7	46.0
S o y b e a n fb rice	33.7	20.9	10.7	5.4	0	0	9.3	3.9	5.3	1.8	59.0	32.0

Weed no.: Number/m<sup>2</sup>, Dry weight: g/m<sup>2</sup>

다) 친환경적 잡초방제법 확립

○ 피복자재를 이용한 콩재배 : 콩밭에 일반흑색비닐이나 친환경피복자재의 사용으로 잡초의 발생을 크게 감소시킬 수 있으나 골에 발생하는 잡초는 제초제의 사용으로 방제해야하는 문제점을 안고 있기 때문에 피복자재를 이용한 잡초방제의 경우 중경제초법을 병행하여 시행하고 있다. 표 15는 피복재, 제초제 및 보릿짚 사용이 콩밭의 잡초발생에 미치는 영향을 나타낸 것인데, 흑색비닐을 두둑에 피복하고 골에는 보릿짚을 피복하였을 때 84% 잡초방제율을 보였다. 따라서 보릿짚 사용 시에 본 연구에서 개발하고 있는 천연식물생장억제물질을 첨가하여 처리할 경우 제초제 사용없이 친환경적 콩 재배가 가능하리라 사료된다.

Table 15. Weed control in soybean field treated with vinyl covering, herbicide, and barley straw.

Treatment	<i>Echinochloa crus-galli</i>		<i>Digitaria sanguinalis</i>		<i>Setaria viridis</i>		<i>Chenopodium album</i>		<i>Portulaca oleracea</i>		Total	
	Wee dno.	Dry wt.	Wee dno.	Dry wt.	Wee dno.	Dry wt.	Wee dno.	Dry wt.	Wee dno.	Dry wt.	Wee dno.	Dry wt.
Vinyl covering	4.3	4.0	5.7	6.5	1.7	1.6	2.3	1.0	2.0	2.6	16.0	15.7
Herbicide (Alachlor)	2.3	0.9	10.0	2.5	1.7	0.3	0	0	3.3	1.8	17.3	5.5
Vinyl + herbicide	2.7	0.4	3.3	1.2	1.3	0.5	0.3	0.2	1.7	0.5	7.3	2.8
Vinyl + barley straw	6.7	4.8	4.0	3.0	1.7	1.7	0	0	1.3	1.5	13.7	11.0
Control	36.0	16.4	40.7	24.1	5.3	6.2	5.0	5.1	15.0	17.4	102.0	69.2

Weed no.: Number/m<sup>2</sup>, Dry weight: g/m<sup>2</sup>

○ 보리 및 호밀 피복재배 : 콩밭에 녹비용 피복작물인 호밀을 재배하면 잡초 발생 억제와 유기물 공급 등의 효과로 친환경 콩재배를 실현할 수 있는 방법으로 최근 호밀 피복에 의한 잡초방제를 시도하고 있다. 호밀재배에 의한 잡초의 억제효과는 표 16과 같다.

Table 16. Inhibition of weed occurrence in soybean field pre-cultivated with rye.

Rye cultivation	Aug. 1			Sep. 1		
	Weed no.	Dry weight	Control rate(%)	Weed no.	Dry weight	Control rate(%)
Autumn planting	257	62	67.9	70	188	41.3
Spring planing	104	27	86.0	79	128	60.0
Control	503	193	-	103	320	-

## 2. 품종별 친환경 병충해방제 기술개발(위탁)

가. 콩 가해 병해충의 발생양상

1) 연구 내용 및 결과

가) 콩 품종에 따른 병 발생 양상

안동시 풍산면 포지에서 아가콩과 대원콩·청자콩을 라틴방각법으로 식재하고 자연발생되는 병해를 조사하였다. 세균성점무늬병(*Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*)은 8월 이후에, 점무늬병(*Ascochyta glycinis*)과 자주무늬병(*Cercospora kikuchii*)은 9월 이후에 심하게 발생되었다(표 1, 그림 1-3). 아가콩은 세균성점무늬병과 자주무늬병에 대해 대원콩 및 청자콩과 같은 수준인 감수성으로 생각된다. 아가콩에서의 역병(*Phytophthora sojae*) 발생율은 1% 미만으로 높지 않았으나, 대원콩과 청자콩에서는 발생되지 않은 것으로 미루어 아가콩이 이 병에 대해서도 감수성일 가능성이 있다고 생각된다. 역병에 감염된 포기에서는 전혀 수확을 기대할 수 없기 때문에, 이 병에 대한 감수성 검정은 계속되어야 할 것으로 생각된다.

표 1. 아가콩과 대원·청자콩의 병해 발생 상황<sup>1</sup>

콩 품종	조사 주수	세균성점무늬병			역병			점무늬병			자주무늬병		
		7월 하순	8월 하순	10월 중순	7월 하순	8월 하순	10월 중순	7월 하순	8월 하순	10월 중순	7월 하순	8월 하순	10월 중순
대원	1244	0.1	72.8 <sup>a</sup>	72.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.6	0.0	0.0	9.5
청자	1244	0.0	66.1 <sup>b</sup>	66.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	2.4	0.0	0.0	15.5
아가	1244	0.1	69.5 <sup>ab</sup>	-	0.6	0.6	0.6	0.2	0.2	1.0	0.0	0.0	8.9

<sup>1</sup> 역병은 발병주율로, 그외의 병해는 발병지수(1~3)에 의한 피해엽율로 환산하였음.

<sup>ab</sup> 라틴방각법 3반복에 의한 품종별 유의성 검정 결과 (LSD<sub>0.05</sub>).





그림 1. 세균성점무늬병에 감염된 아가콩.



그림 2. 역병에 감염된 아가콩.



그림 3. 세균성점무늬병에 감염된 대원콩.

나) 콩 품종에 따른 해충 발생 양상

조사대상 포장은 산지에 인접하고, 주변에 다른 콩 포장들과 혼재된 곳으로, 산지성 곤충인 메뚜기목에 벼메뚜기(*Oxya japonica*), 섬서구메뚜기(*Atractomorpha lata*), 여치 등의 피해를 예상하였으나, 이들의 밀도나 이에 따른 피해는 미미했다. 두줄박이애잎벌레(*Medythia nigrobilineata*)는 정식 초기에 주로 나타나 신초를 가해하는 해충으로(그림 4), 정식 이후부터 꾸준히 두줄박이애잎벌레의 밀도가 일부 형성되었으나, 콩의 생육기가 진전되면서 그 피해는 크게 나타나지 않았다. 반면, 콩잎말이명나방(*Pleuroptya ruralis*)과 기타 노린재류의 밀도와 피해가 많이 발생하였다. 콩잎말이명나방은 8월에서 9월 콩의 착협 이후에 그 밀도가 높아져, 밀도에 비해 피해가 매우 크게 나타났다. 또한 노린재류는 4종의 노린재가 주를 이루었고, 그 중에서 툽다리개미허리노린재(*Riptortus pedestris*), 풀색노린재(*Nezara antennata*), 썩덩나무노린재(*Halyomorpha halys*)가 밀도 형성 및 피해가 많이 나타나는 것으로 나타났다(표 2).

표 2. 2007년 안동, 풍산소재 조사대상 포장에서 콩 가해 해충의 발생 정도

	발생시기(월)	발생정도 <sup>&amp;</sup>	가해부위*	가해정도
총채벌레류	7	+	L	++
벼메뚜기	8~10	+	L, S	+
섬서구메뚜기	7~9	++	L	+
여치류	8	+	L, S	+
콩잎말이명나방	8~9	+	L	++++
두줄박이애잎벌레	6~7	+++	L, R, P	+
풍뎅이류	9	+	L, R	+
진딧물류	7	+	L, S	++
끝동매미충	8~10	+	L, S, P	+
툽다리개미허리노린재	8~10	+++	L, S, P	++++
알락수염노린재	8~9	+	L, S, P	+++
풀색노린재	9~10	+++	L, S, P	+++
썩덩나무노린재	9~10	+++	L, S, P	+++

<sup>&</sup>(-: 발생 없음 +: 1-2 마리, ++: 2-5마리, +++: 5마리 이상)

\* (L: 잎, R:뿌리, P:꼬투리, S:줄기)

연중 누적 발생량을 토대로 품종별 해충 발생 정도를 비교한 결과, 두줄박이애잎벌레는 아가품종에서 가장 많이 발생하였고, 청자에서 가장 적었다(ANOVA,  $F=7.57$ ,  $df=2,8$ ,  $P=0.02$ ). 벼메뚜기는 대원콩에서 가장 발생이 가장 많았으나 ( $P=0.04$ ), 섬서구메뚜기, 총채벌레(*Frankliniella* spp.), 콩잎말이명나방의 발생량은 품종간 차이가 없었다(각각  $P=0.56$ ,  $0.54$ ,  $0.64$ ).



그림 4. 2007 조사된 콩의 주요 해충 및 그의 피해 사진.

품종별 노린재류 누적 발생량에서는 톱다리개미허리노린재의 경우, 청자품종에서 가장 많았으며, 아가품종에서 가장 적게 나타났다(ANOVA,  $F=5.76$ ,  $df=2,8$ ,  $P=0.04$ ). 반면, 썩덩나무노린재와 풀색노린재의 발생량은 품종간 차이가 없었다(각  $P=0.35$ ,  $0.63$ ). 아가콩의 경우, 풀색노린재가 47%로 가장 많이 발생하였고, 톱다리개미허리노린재 30% 순이었다. 대원콩과 청자콩은 톱다리개미허리노린재가 우점종이었으며, 풀색노린재, 썩덩나무노린재 순으로 발생하였다. 반면, 알락수염노린재(*Dolycoris baccarum*)의 발생은 극히 미미하였다.

콩 피해에 중요한 R6 이전 단계 발생한 노린재는 아가콩의 경우, 톱다리개미허리노린재와 풀색노린재였다. 하지만 대원콩과 청자콩의 경우, 톱다리개미허리노린재의 발생이 많았다 (그림 5).

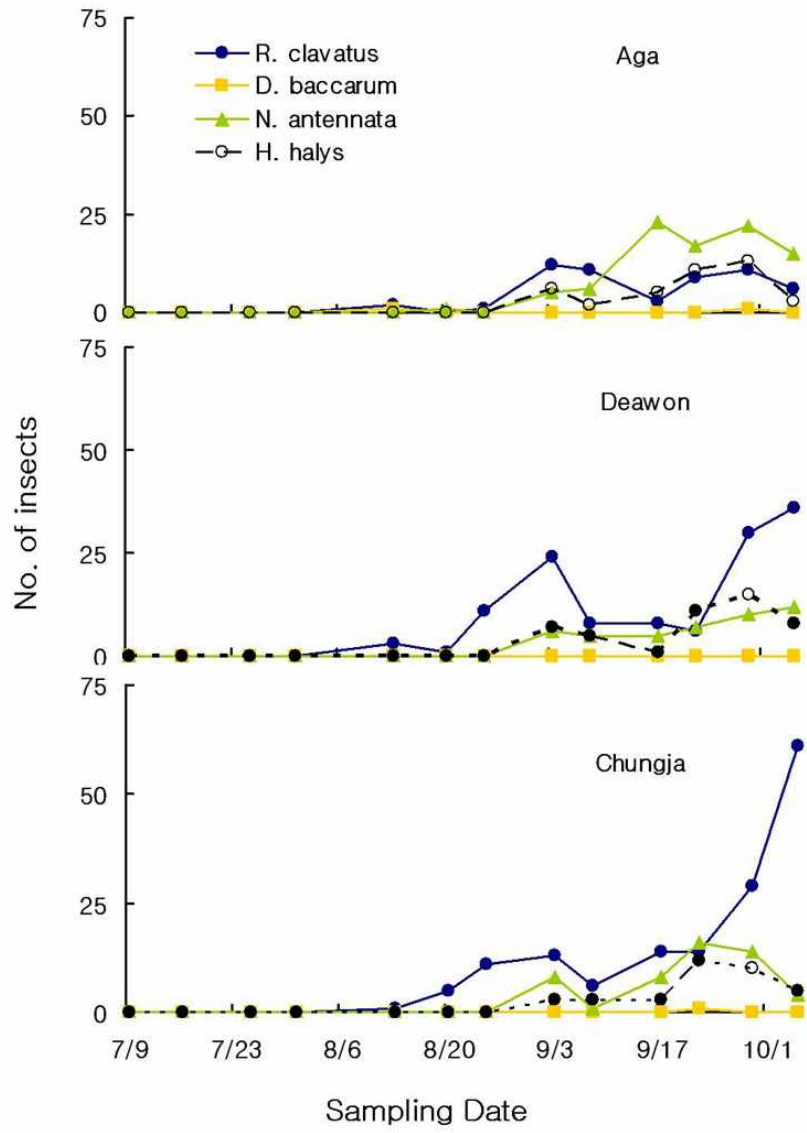


그림 5. 콩 주요 노린재 4종의 발생 소장.



다) 톱다리개미허리노린재의 주요 기생 천적 조사

톱다리개미허리노린재의 주요 알 기생천적으로는 노린재깡충좀벌(*Ooencyrtus nezarae*)였으며(그림 6) 노린재검정알벌(*Gryon japonicum*)(그림 7)도 6 - 22%의 기생율을 보였다(그림 8).



그림 6. 톱다리개미허리노린재의 알기생벌인 노린재깡충좀벌(*Ooencyrtus nezarae*).



그림 7. 톱다리개미허리노린재의 알기생벌인 노린재검정알벌(*Gryon japonicum*).

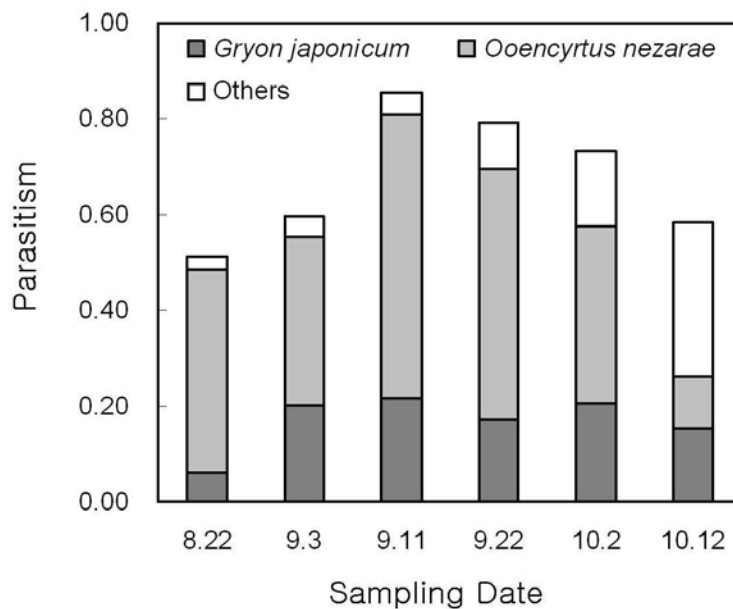


그림 8. 안동시 소재 3곳의 친환경콩재배지에서 조사한 톱다리개미허리노린재의 알기생벌에 의한 기생율의 변화.

라) 경북 북부지역 농민의 병 방제와 관련한 콩 재배법

경북북부지역 4개 시·군의 콩 재배농민 50명을 대상으로, 병해발생과 관련되는 재배법을 설문형식으로 조사하였다. 가장 많이 재배되는 품종은 대원콩(약 25%)이었으며, 다양한 품종의 콩이 일부 농민에 의해 재배되고 있었다(표 3). 품종을 선택한 이유 중 자신의 경험에 의한 선택이 가장 많은 30%를 차지하였으며, 종묘상의 권유나 책에서 본 품종의 특성을 고려한 농민이 약 5%, 농업지도사의 추천에 의한 선택은 2%에 지나지 않았다. 품종의 특성은 구매자의 선호도와 토양의 특성이라고 응답한 농민이 가장 많았다. 따라서 전문기관에서 지역 특성을 고려한 콩 품종의 특성을 교육할 필요가 있다고 생각되었다.

표 3. 경북 북부지역의 콩 품종 재배 현황

재배 품종		품종선택 이유	
품 종	농민(%)	선택이유	농민(%)
대 원	26.53	자신의 경험	60.5
검정콩	16.33	스스로 선택	15.8
매주콩	10.20	주위의 권유	15.8
흰 콩	6.12	기 타	7.9
속 청	6.12		
기 타*	35.7		

\* 태광, 서리태, 백달, 명, 대풍, 면태 등 43품종.

병이나 해충을 방제하기 위하여 농약을 사용하는 농민은 조사대상 농가의 1/3에 불과하였으며, 그나마 대부분 년1-2회만 농약을 살포하고 있었다(표 4). 약 6%의 농가가 친환경재배를 하고 있었으나, 친환경 병해충 방제는 거의 실시되지 않고 있었다.

표 4. 경북북부지역 콩 재배 농가의 병해 방제 실태

농약구입비용		농약 사용	
비용 (원)	농민 (%)	사용횟수	농민 (%)
1만 ~ 2만	20	1	69.6
2만 ~ 4만	35	2	17.4
4만 ~ 6만	10	10	4.4
6만 이상	10	모름	8.7
모름	25		

조사대상 농가 중 약 2/3가 콩 전용 밭을 운영하고 있었으며, 콩밭의 면적은 200-4,000평까지 다양하였다. 설문에 응답한 농민의 약 40%가 500평 미만의 콩밭을

가지고 있었으며, 약 70%의 농민이 1,000평 미만의 콩밭을 운영하고 있었다(표 5). 따라서 아직 콩 재배의 규모는 영세성을 면하지 못하고 있는 것으로 생각된다.

표 5. 경북북부지역의 농가 당 콩밭 규모

콩밭(평)	500 미만	500 ~ 1,000	1,000 ~ 1,500	2,000 ~ 2,500	2,500 이상	모름
농민(%)	41.4	27.6	3.5	6.9	10.3	10.3

간작으로 콩을 재배하는 농민 중 약 50%의 농민이 수박밭의 주변에 콩을 재배하고 있었고, 고추와 담배·사과밭에 간작으로 콩을 재배하고 있었다(표 6). 따라서 콩 재배 농가의 소득 증대를 위해서는 작부체계에 따른 농가 소득 비교도 필요하다고 생각된다.

표 6. 콩 간작 재배의 주작물

주작물	수박	고추	사과	담배
농민 (%)	46.1	23.1	15.4	15.4

#### 나. 아가콩의 주요 식물병에 대한 친환경 농자재 적용

##### 1) 연구내용

##### 가) 아가콩과 주요 콩 품종 사이의 병해 발생상황 비교

아가콩과 청자콩, 대원콩을 경상북도 안동시 남선면 구미리 소재 포장에 재배하면서 주요 병해의 발생상황을 조사하였다. 아가콩 종자는 경북대학교로 부터, 청자콩은 안동시 서후면 농협으로 부터 분양받아 사용하였으며, 대원콩은 농가에서 사용하는 시판 종자를 사용하였다. 콩 종자는 5월 25일에 파종하여 본 밭에 정식하였으며, 품종 별로 60 포기 씩 난괴법 3반복으로 이식하였다.

병 발생상황은 병징과 표징에 의해 보름 간격으로 조사하였으며, 바이러스에 의한 모자이크병은 발병주율로, 잎에 발생하는 점무늬병은 발병지수를 조사하여 발병엽율로 환산하였다.

##### 나) 살균제 생물농약의 콩 병원균 생육억제 효과 조사

살균제 생물농약 4종과 각 생물농약의 활성미생물을 개발회사로부터 분양받아 사용하였다(표 7). 이 생물농약의 활성미생물의 콩 병원균에 대한 생육억제효과를 한천배지 위에서 조사하였다. 대상 콩 병원균은 농촌진흥청으로부터 분양받아 사용하였으며, 자주무늬병균은 안동대학교에서 분리하여 보관 중인 균을 사용하였다(표 8). 세균은 nutrient agar 배지에서, 곰팡이는 감자한천배지에서 배양하여 사용하였다.

표 7. 시험에 사용된 4종의 생물농약 살균제와 활성 미생물 내역

농 약 명	활성 미생물	개발회사	대 상 병
푸른세상	<i>Trichoderma harzianum</i>	제일그린	고추 역병, 토마토 잿빛곰팡이병
셀러스	<i>Bacillus subtilis</i>	그린바이오텍	토마토 잿빛곰팡이병
탑시드	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	그린바이오텍	고추 역병, 오이 흰가루병
나이스키토	<i>Rhizopus oligosporus</i>	B&L	사과탄저병, 오이흰가루병

표 8. 시험에 사용된 콩 병원균

콩 병원균	균주번호
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>glycines</i> (콩 불마름병원균)	KACC 11151
<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i> (콩 세균성점무늬병원균)	KACC 13263
<i>Colletotrichum gloeosporiodes</i> (콩 탄저병원균)	KACC 40690
<i>Cercospora kikuchi</i> (콩 자주무늬병원균)	-

*Bacillus subtilis*와 *Paenibacillus polymyxa*의 병원세균에 대한 항균능력을 조사하기 위하여, nutrient한천평판배지 상에 각각의 활성미생물의 현탁액( $10^9$ cfu ml<sup>-1</sup>)을 흡습시킨 여과지(직경 6mm)를 올려놓고 28°C에서 3일 동안 배양하였다. 그 후, 활성미생물이 자라고 있는 배지 전면에 병원세균 현탁액( $10^9$ cfu ml<sup>-1</sup>)을 분무기로 뿌려주었다. 병원미생물을 분무 접종하여 1일 동안 배양한 후에 활성미생물 주위에 형성된 병원세균 생육억지원의 직경을 측정하였다. *Trichoderma harzianum*과 *Rhizopus oligosporus*의 병원세균의 대한 항균능력을 조사하기 위하여, 한천평판배지 중앙과 주위에 각각 길항곰팡이의 절편(직경 6mm)을 올려놓고 24°C에서 3일 동안 배양하였다. 그 후, 길항곰팡이가 자라고 있는 배지 전면에 병원세균 현탁액( $10^9$ cfu ml<sup>-1</sup>)을 분무기로 뿌려주었다. 병원미생물을 분무 접종하여 1일 동안 배양한 후에 활성미생물 주위에 형성된 병원세균 생육억지원의 직경을 측정하였다. 이 4종의 길항균의 병원곰팡이에 대한 항균력을 조사하기 위하여, 길항균과 병원균의 절편(직경 6mm)을 감자한천평판배지의 중앙과 주위에 각각 올려놓고 24°C에서 배양하였다. 길항균의 반대편으로 자란 병원균의 콜로니 반경과 길항균에 의해 생육이 정지된 병원곰팡이의 콜로니 반경을 측정하여, 그 차이에 의한 억지율(%)을 다음 공식에 의해 산출하였다.

$$\text{균사생육억제율(\%)} = \{(\text{정상적으로 생육한 콜로니 반경} - \text{길항균에 의해 억제된 콜로니 반경}) / \text{정상적으로 생육한 콜로니}\} \times 100.$$



다) 살균제 생물농약 처리에 의한 콩 병해 방제 효과 조사

콩 품종은 아가콩 품종의 종자를 경북대학교로부터 분양받아 사용하였다. 콩 종자는 5월 25일에 파종하였으며, 경상북도 안동시 남선면 구미리 소재 포장에 처리별 60 포기 씩 난괴법 3반복으로 정식하였다.

생물농약의 처리 방법은 개발회사의 추천방법에 따랐다. 즉 푸른세상은 콩 밭 100평 당 5Kg을 밭 표면에 뿌려주고 아가콩을 이식하였다. 실러스와 탐시드는 물을 더하여 300배 및 200배로 희석한 후 15일 간격으로 콩의 지상부에 살포하였다. 병방제효과 시험구와는 별도로, 콩 15포기씩 추천량의 2배량을 처리하여 약해 발생 여부를 기준량 처리구와 비교하였다.

병 발생상황은 병징과 표징에 의해 보름 간격으로 조사하였으며, 바이러스에 의한 모자이크병은 발병주율로, 잎에 발생하는 점무늬병은 발병지수를 조사하여 발병엽율로 환산하였다. 수확된 콩에서 처리별로 200알을 임의로 선정하여 자주무늬병 감염율을 조사하였다. 자주무늬병에 의한 감염여부는 수확된 콩 표면의 자주무늬병 징 발생여부를 육안으로 관찰하여 판단하였다.

2) 연구 결과

가) 아가콩과 주요 콩 품종의 병해 발생상황

아가콩의 세균성점무늬병 발병율은 청자콩과 대원콩에 비하여 두 배 까지 높았으나, 품종 사이에 유의차는 인정되지 않았다(표 9). 점무늬병(*Ascochyta glycinis*)에 대한 발병율도 대원콩에 비하여 크게 낮았으나 통계적 유의차는 인정되지 않았다. 이러한 결과는 2007년도 경북 안동시 풍산면 포지에서 조사한 결과와 같은 경향이였다. 따라서 아가콩의 세균성점무늬병과 검은점무늬병, 바이러스병에 대한 저항성은 청자 및 대원콩과 같은 수준인 것으로 생각된다. 2007년도에 풍산면 포지에서 아가콩에 발생되었던 역병(*Phytophthora sojae*)은 2008년도 남선면 포지에서는 발생되지 않았다.

표 9. 콩 품종에 따른 병해 발생 상황

콩 품종	조사 주수	발 병 정 도 (%) <sup>a</sup>											
		세균성점무늬병				점무늬병				바이러스병			
		6월	7월	8월	9월	6월	7월	8월	9월	6월	7월	8월	9월
아가콩	180	10.0	16.3	19.7	20.0	0.7	3.7	4.3	5.7	2.7	2.7	3.7	4.0
청자콩	180	10.3	11.7	15.3	17.0	3.3	3.7	7.3	7.7	0.0	0.0	1.3	3.7
대원콩	180	0.0	5.0	7.0	10.0	3.0	7.0	8.0	31.0	0.0	4.0	4.0	6.0

<sup>a</sup> 세균성점무늬병과 점무늬병 발병정도는 발병지수(0: 건전, 1~3: 전체 잎의 1/3 이내~2/3 이상에서 발병)에 의한 발병엽율(%),  $\sum(\text{발병지수} \times \text{발병주수}) \times 100 / (3 \times \text{총 조사주수})$ 로, 바이러스병의 발병정도는 발병주율로 조사되었음.

나) 살균제 생물농약 활성 미생물의 콩 병원균 생육억제 효과

공시된 4종의 살균제 생물농약의 주성분인 활성미생물과 콩의 주요 병원균 4종을 각각 한천평판배지에 이식하여 대치배양을 하였다. 그 결과, *Cercospora kikuchi*(자주무늬병균)와 *Colletotrichum gloeosporioides*(탄저병균)의 콜로니는 모두 *Trichoderma harzianum*과 *Rhizopus oligosporus*쪽으로 성장하지 못하고 이들 활성미생물의 반대편으로 성장하는 것이 관찰되었다(표 10, 그림 9). 또한 *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*(불마름병균)과 *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*(세균성점무늬병균) 모두 *Bacillus subtilis*와 *Paenibacillus polymyxa*의 콜로니 주변에 2~5cm의 생육억제권을 형성하였다(표 10, 그림 10). 따라서 살균제 생물농약 4종의 활성미생물 모두 콩의 주요병원균에 대한 생육억제효과가 인정되었다. 그러나 *T. harzianum*가 3일 동안 배양된 한천평면배양기 위에 병원세균을 살포해준 결과, 한천배지 위에서 증식하고 있는 세균 위에 *T. harzianum*가 한천배지 위에서 증식하고 있는 세균 위를 덮으며 자라고 있었다(그림 11). 따라서 *T. harzianum*의 세균 억제 능력은 평가할 수 없었다.

표 10. 살균제 생물농약의 활성미생물과 대치배양에 의한 콩 병원균의 생육억제 효과

활성미생물	생육억제효과 <sup>a</sup>			
	자주무늬병균	탄저병균	불마름병균	세균성점무늬병균
<i>Trichoderma harzianum</i>	67.3	75.8	-	-
<i>Rhizopus oligosporus</i>	36.9	47.5	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	3.8	4.9
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	-	-	3.6	2.3

<sup>a</sup> 활성미생물과의 대치배양에 의해 조사하였으며, 자주무늬병균과 탄저병균에 대한 생육억제효과는 군사생육억제율로 산출하였다. 군사생육억제율(%) = {(정상적으로 생육한 콜로니 반경 - 길항균에 의해 억제된 콜로니 반경) / 정상적으로 생육한 콜로니 반경} × 100. 불마름병균과 세균성점무늬병균에 대한 생육억제효과는 병원균 생육억제권의 직경(mm)으로 표시하였다.

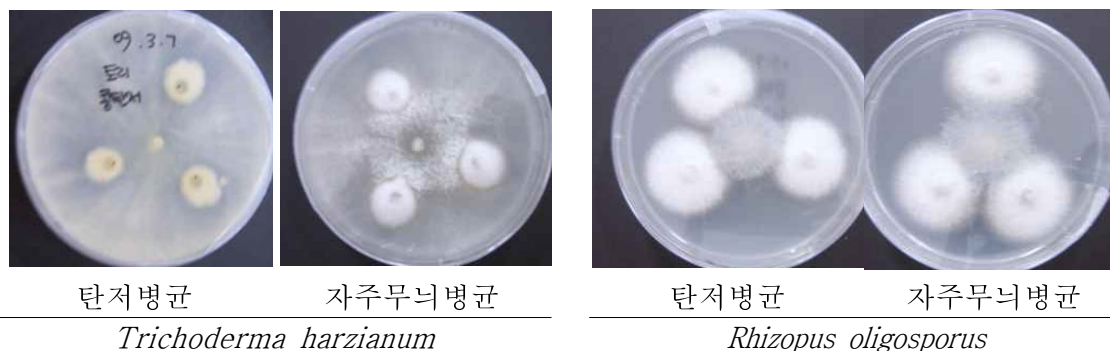
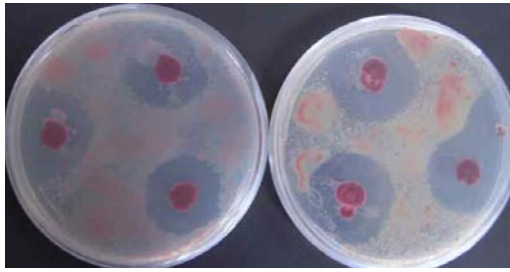
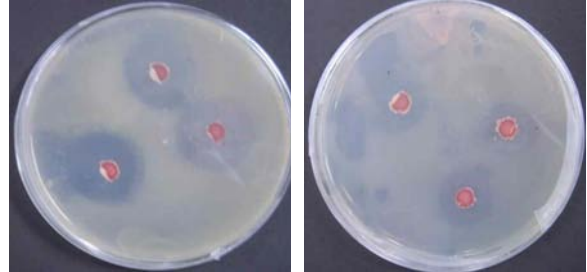


그림 9. *Trichoderma harzianum*와 *Rhizopus oligosporus*에 의한 콩 탄저병균(*Colletotrichum gloeosporioides*)과 자주무늬병균(*Cercospora kikuchi*)의 생육억제. 중앙의 *T. harzianum*와 *R. oligosporus*의 주변에 접종된 병원균의 군사들이 중앙 쪽으로 자라지 못하였다.



불마름병균      세균성점무늬병균

*P. polymyxa*



불마름병균      세균성점무늬병균

*B. subtilis*

그림 10. *Paenibacillus polymyxa*와 *Bacillus subtilis*에 의해 생성된 콩 세균성점무늬병균(*Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*)과 콩 불마름병균(*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*)의 생육저지원.



그림 11. 대치배양된 콩 세균성점무늬병균(*Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*, 왼쪽)과 콩 불마름병균(*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, 오른쪽)의 콜로니 위를 덮으며 자라고 있는 *Trichoderma harzianum*.

다) 살균제 생물농약의 주요 병해에 대한 방제효과

가장 병 발생이 심하였던 세균성점무늬병에 대해서는 공시된 생물농약 3종 모두에 의해서 50% 전 후의 병 발생 억제 효과가 나타났다(표 11). 점무늬병과 바이러스병에 대해서도 평균 병 발생율은 낮았으나, 약제별 발병율 사이에 통계적 유의차는 인정되지 않았다. 이러한 결과는 두 종류의 병 발생율이 높지 않았기 때문인 것으로 생각되었다.

표 11. 살균제 생물농약 처리에 따른 병해 발생 상황

처리 내용	조사 주수	세균성점무늬병				점무늬병				바이러스병			
		6월	7월	8월	9월	6월	7월	8월	9월	6월	7월	8월	9월
무처리	180	10.0	16.3	19.7	20.0a <sup>*</sup>	0.7	3.7	4.3	5.7	2.7	2.7	3.7	4.0
푸른세상	180	6.7	10.7	11.7	12.3b	0.0	1.7	2.3	2.7	1.0	1.0	2.0	2.3
실러스	180	8.0	8.7	9.3	9.3b	0.0	0.7	1.3	3.0	0.0	1.0	1.0	2.0
탑시드	180	6.7	8.0	8.0	8.7b	0.0	1.0	2.0	2.7	2.0	2.3	2.3	3.3

\* 난괴법 3반복에 의한 품종별 유의성 검정 결과 (LSD<sub>0.05</sub>).

3종의 생물농약을 각각 처리한 콩의 종자를 수확하여 콩 표면에 나타난 자주무늬병(*Cercospora kikuchii*)의 병징을 조사한 결과, 3~4%의 콩에서 자주무늬병반을 관찰할 수 있었다(표 12). 그러나 생물농약의 종류 및 무처리 콩과의 사이에 통계적 유의차는 인정되지 않았다.

표 12. 살균제 생물농약 처리에 의한 아가콩의 자주무늬병 발생 억제 효과

처리 내용	무처리	푸른세상	실러스	탑시드
자주무늬병 발병율(%)	3.5	3.6	3.9	4.1

공시된 생물농약 3종 모두 기준량의 2배량으로 처리한 콩에서 약해라고 인정할 수 있는 어떤 증상도 찾아볼 수 없었다. 처리별 아가콩의 수확량을 비교한 결과, 푸른세상을 처리한 콩의 수확량이 가장 높았으나, 처리별 수확량의 통계적 유의차는 인정되지 않았다(표 13).

표 13. 살균제 생물농약 처리에 의한 아가콩의 증수효과

생물농약	무처리	푸른세상	실러스	탑시드
수확량(g)	1,980	2,220	1,960	1,763

*Trichoderma harzianum*와 *Bacillus subtilis*, *Paenibacillus polymixa*를 비롯한 몇 종의 미생물들의 식물병원균에 대한 길항효과 및 식물생육촉진효과에 의한 식물병 방제효과는 이미 국내외에서 보고되어 있다. 이 시험 결과, 살균제 생물농약을 처리한 콩에서 일부 병해에 대한 발병 억제효과가 인정되었으나, 한 해의 실험결과만으로 공시된 생물농약의 병해방제 효과 여부를 인정하기는 어렵다. 따라서 이 생물

농약의 콩 병해 방제효과에 대한 반복 실험 및 병해 방제 기작에 대한 실험이 뒤따라야 할 것이다. 또한 선발된 생물농약의 대 농민 보급을 위해서는 가장 효과적인 처리약량 및 처리방법을 확립할 수 있는 실험도 뒤 따라야 할 것으로 생각된다.

#### 다. 천적증식 기술 개발

##### 1) 연구내용

###### 가) 콩의 주요 해충인 톱다리개미허리노린재의 콩 품종별 발육 양상

1차년도 연구 결과 아가콩에서는 주요 해충이 톱다리개미허리노린재로 밝혀졌지만, 다른 콩 품종에 비해 노린재의 밀도가 높지 않았다. 이것은 아가콩이 새로 개발된 품종이어서 전년도에 비교 대상으로 조사된 대원콩이나 청자콩에 비해 작물의 형태적 특징 등의 다른 점에 의한 현상으로 생각된다. 하지만 만약 아가콩의 다른 영양분 및 조성으로 인해 그들의 발육 및 생식을 증가시켜 잠재적으로 향후 주요한 기주로 선택되어 질 수도 있을 것이다. 따라서 톱다리개미허리노린재에게 아가콩을 먹이로 공급했을 때 그들의 생물적 특징에 미치는 영향을 조사하였다.

###### 나) 저온저장 기술을 이용한 노린재 알의 비활성화

1차년도 연구에서 톱다리개미허리노린재의 주요 천적으로 노린재검정알벌과 노린재깡충좀벌이 조사되어 생물적방제 인자로서 가능성이 있을 것으로 생각된다. 천적을 이용한 생물적방제 기술의 적용을 위해서는 천적의 대량 증식이 무엇보다도 중요하다 할 수 있는데, 이들 노린재 기생벌들의 대량증식을 위해서는 노린재 기주알을 대량으로 공급할 수 있어야 한다. 하지만 노린재류는 비교적 발육기간이 길고 산란 기간이 특정 시기로 정해져 있는 경우가 많아 안정적인 기주 알 확보가 어려운 실정이다. 이에 따라 이미 다른 연구에서 밝혀진 노린재 알의 저온저장기술 (Gautam 1987; Orr 1988; Kivan & Kilic 2005; Mahmoud & Lim 2007)을 톱다리개미허리노린재에 적용해 보기위해 우선 저온저장 기간에 따른 노린재 알의 비활성화로 인해 부화율의 저하가 일어나는 지를 조사하였다.

###### 다) 저온저장 후 비활성화된 기주알에 대한 기생벌의 기주수용 행동

저온저장된 기주알에 대해 기생벌 노린재검정알벌의 기주수용 행동들(촉각으로 두드리기[drumming], 산란관으로 찔러서 산란하기[drilling and oviposition], 산란후 표지[marking]; Strand & Vinson 1983; Noda 1993)을 조사하여 저온 처리를 하지 않는 알과 비교하여 기생벌이 저온저장된 알을 적합한 기주로 수용하는지 여부를 검증하였다.

###### 라) 저온저장 후 비활성화된 기주알에서의 기생벌의 기생 및 발육

저온저장된 기주알에 대한 노린재검정알벌과 노린재깡충좀벌의 기생여부, 기생된

알에서 부화된 기생벌 유충이 노린재 알에서의 발육, 발육 후 우화된 성충의 성비, 수명 그리고 크기 등을 저온저장되지 않은 알에서 나온 기생벌과 비교하여 저온저장 기술이 기생벌의 생물적 특성에 부정적인 영향을 미치는지 여부를 조사 하였다.

마) 저온저장 후 비활성화된 기주알에서의 발육 후 우화된 기생벌의 생식 능력 또한 저온저장된 알에서 발육 및 우화되어 나온 노린재검정알벌과 노린재깡충좀벌의 생식 능력과 그 다음 자손 세대의 기생벌의 위에서 열거한 생물적 특성에 미치는 영향을 조사 하였다.

바) 저온저장 후 기간에 따른 기생벌의 기생 여부

저온저장 기간이 길어지면 노린재 알이 급격한 수분함량의 감소로 인해 천적의 먹이로서의 질이 떨어지는 것이 보고되었다(Kivan & Kilic 2005; Chen & Leopold 2007; Mahmoud & Lim, 2007). 따라서 저온저장 후 어느 기간 동안 노린재검정알벌과 노린재깡충좀벌에 의해 정상적으로 기생될 수 있는 지를 조사하였다. 이것은 차후 저온저장된 알을 포장에 방사하여 자연 적인 기생률 증가효과를 보고자 할 때 (Lim & Mahmoud, 2009) 필요한 정보가 될 것이다.

사) 저온저장된 기주알이 천적 기생벌들의 중간 상호작용에 미치는 영향

(1) 노린재검정알벌에 의해 먼저 기생된 기주알에 대한 노린재깡충좀벌의 반응

산란경험이 없는 우화 후 4일이 경과한 노린재검정알벌에 의해 먼저 기생된 톱다리개미허리노린재 기주알을 역시 산란경험이 없는 우화 후 4일이 경과한 노린재깡충좀벌에 공급하여 노린재깡충좀벌의 기주 수용 행동(Takasu & Hirose, 1988)을 관찰하였다. 노린재깡충좀벌이 기주 수용 행동을 마치고 산란흔적(stalks)을 남겼으면 공기생(multiparasitism)한 것으로 간주하여(Takasu & Hirose, 1988; Noda, 1993)  $26.3 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$  항온기에 두었다. 공기생된 기주알에서 우화하는 기생벌의 종류, 성비, 발육기간, 치사율 등을 기록하였다. 우화된 성충 기생벌에 대해서는 따로 물에 적신 솜을 바닥에 깔고 뚜껑에는 환기를 위해 천으로 덮힌 구멍이 있는 원심분리용 튜브(50 ml 용량)에 두고 수명을 기록하였다. 매 3일 마다 한 번씩 물과 꿀을 보충해 주었다. 죽은 성충은 뒷다리 경절(tibia)의 길이를 측정하였다. 총 30개의 기주알과 30개체의 노린재깡충좀벌에 대해서 반복을 실시하였으며, 두 기생벌에 의한 산란간격 시간을 달리 하여 같은 날에 기생한 경우(1시간 미만의 차이)와 첫 번째 기생 후 4일째 두 번째 기생을 하는 경우를 나누어 같은 실험을 실시하였다. 또한, 위와 똑 같은 방법으로 냉장된 기주알을 이용해서 비교 실험을 진행하였다.

(2) 노린재깡충좀벌에 의해 먼저 기생된 기주알에 대한 노린재검정알벌의 반응

위의 실험과는 반대로 산란경험이 없는 우화 후 4일이 경과한 노린재깡충좀벌에 의해 먼저 기생된 톱다리개미허리노린재 기주알을 역시 산란경험이 없는 우화 후 4일이 경과한 노린재검정알벌에 공급하여 노린재검정알벌의 기주 수용 행동(Strand & Vinson, 1983)을 관찰한 다음 같은 방법 및 조건으로 공기생된 알을 처리하고 데이터를 수집하였다.

아) 통계분석

부화율, 우화율, 성비는 분할표의 카이스케어 테스트( $\chi^2$  test)를 이용하여 통계분석 하였으며, 유의차가 발견되면 투키형 다중 검증(Tukey type multiple range test)을 실시하여 저장기간별 비교를 하였다(Zar, 1999). 하루 동안의 기생하는 기주알의 수, 기주수용행동에 걸리는 시간, 발육기간, 성충수명과 성충의 크기는 쿠르스칼왈리스 테스트(Kruskal-Wallis test)를 하였으며 던 테스트(Dunn test)를 이용해서 다중 비교하였다.

2) 연구 결과

가) 콩의 주요 해충인 톱다리개미허리노린재의 콩 품종별 발육 양상

아가콩, 청자콩, 대원콩을 먹인 노린재 약충의 발육기간은 품종별 차이를 발견할 수 없었지만(표 14) 약충의 치사율은 아가콩에서 가장 낮게 나타났다(표 15). 또한 비록 성충의 산란 수에는 약충때 먹이로 사용한 콩의 품종에 의한 영향이 없었지만(표 16) 성충의 크기는 아가콩에서 가장 크게 나타나(그림 12) 아마도 아가콩의 성분이 노린재의 적응도(fitness)를 증가시키는 역할을 하는 것으로 보인다.

표 14. 먹이로 공급한 콩 종자가 톱다리개미허리노린재 약충의 발육기간에 미치는 영향

Soybean variety	Life stage of nymph					
	1st	2nd	3rd	4 <sup>th</sup>	5th	1st - 5th
Aga	2.0 ± 0.0	2.7 ± 0.1	2.9 ± 0.1	3.0 ± 0.1	4.1 ± 0.1	14.5 ± 0.2
Cheongja	2.0 ± 0.0	2.5 ± 0.1	2.6 ± 0.1	2.9 ± 0.0	4.1 ± 0.1	14.0 ± 0.2
Daewon	2.0 ± 0.0	2.8 ± 0.1	2.8 ± 0.1	3.1 ± 0.0	4.1 ± 0.1	14.6 ± 0.2

표 15. 먹이로 공급한 콩 종자에 따른 톱다리개미허리노린재 약충의 치사율 비교

Soybean variety	Mortality of nymph					
	1st	2nd	3rd	4th	5th	1st – 5th*
Aga	8 (8/105)	22 (21/97)	5 (4/76)	3 (2/72)	1 (1/70)	34 (36/105)a
Cheongja	14 (15/105)	32 (29/90)	3 (2/61)	2 (1/59)	3 (2/58)	46 (49/105)ab
Daewon	28 (29/105)	29 (22/76)	4 (2/54)	2 (1/52)	0 (0/51)	51 (54/105)b

표 16. 약충기간에 공급한 콩 종자에 따른 톱다리개미허리노린재 성충의 산란 수 비교

Soybean variety	No. of <i>R. clavatus</i> females tested	Preoviposition period (days, ± SE)	Daily mean number (± SE) of eggs produced							Total mean number of eggs
			1	2	3	4	5	6	7	
Aga	33	3.2 ± 0.2	8.6 ± 1.0	9.8 ± 0.8	10.0 ± 0.9	8.6 ± 0.9	10.7 ± 1.1	10.0 ± 1.1	10.2 ± 1.1	67.8 ± 3.9
Cheongja	26	3.4 ± 0.2	7.0 ± 1.1	9.9 ± 1.1	11.5 ± 1.0	9.2 ± 0.8	8.3 ± 0.9	11.8 ± 1.6	10.3 ± 1.2	68.0 ± 4.4
Daewon	16	3.6 ± 0.2	7.1 ± 1.0	8.6 ± 1.0	9.8 ± 0.9	7.6 ± 1.1	11.3 ± 1.5	10.2 ± 1.6	10.3 ± 1.3	67.7 ± 5.1

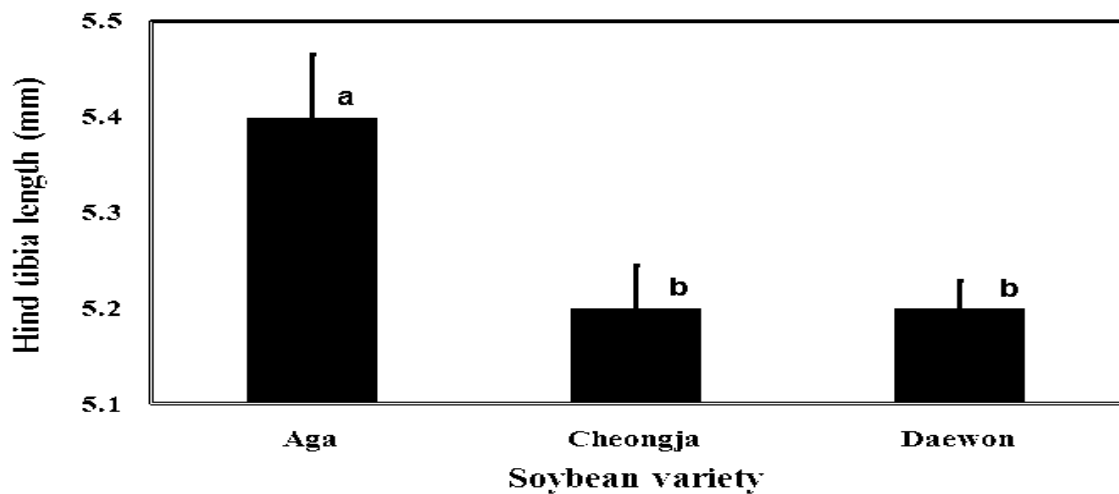


그림 12. 약충기간에 공급한 콩 종자에 따른 톱다리개미허리노린재 성충의 크기 비교.

나) 저온저장 기술을 이용한 노린재 알의 비활성화

저온저장 기간이 길어짐에 따라 노린재의 부화율은 급격히 떨어졌으며 30일 후에는 부화율이 0이 됨을 알 수 있었다(그림 13). 이러한 현상은 다른 노린재류에서도 보고된 바 있다(Kivan & Kilic 2005; Chen & Leopold 2007; Mahmoud & Lim, 2007).



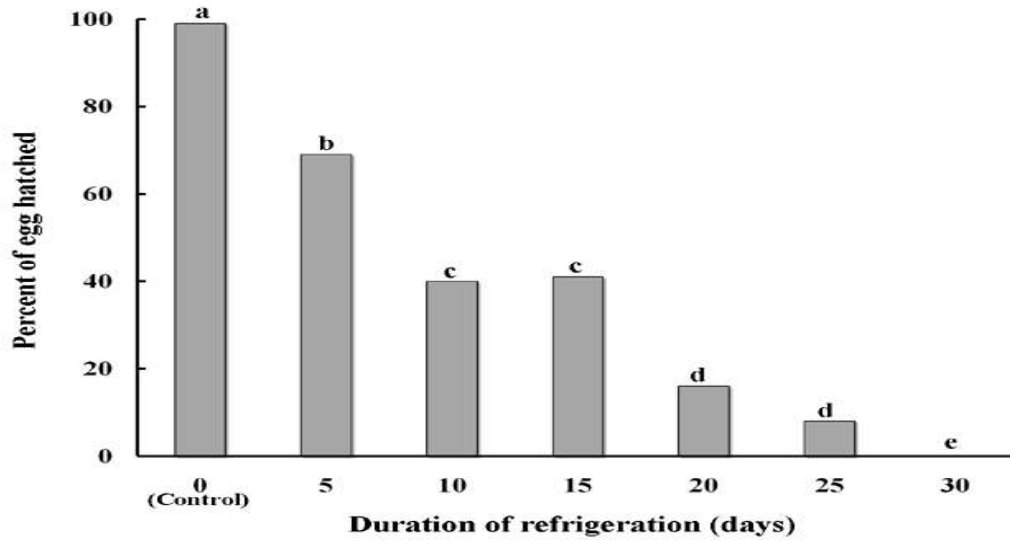


그림 13. 저온저장 기간에 따른 톱다리개미허리노린재 알의 부화율.

다) 저온저장 후 비활성화된 기주알에 대한 기생벌의 기주수용행동

기생벌 노린재검정알벌의 저온저장된 기주알에 대한 기주수용 행동이 저온저장이 안 된 기주 알에 비해 유의하게 변하였다. 이 것은 저온저장 중 노린재 알의 수분 함량 감소와 이로 인한 물리적인 알의 형태 변화로 인한 기주알의 검증에 더 많은 시간이 걸리기 때문인 것으로 생각된다(표 17).

표 17. 기생벌 노린재검정알벌의 저온저장되어 비활성화된 톱다리개미허리노린재의 알에 대한 기주수용 행동

	Duration of refrigeration (days) at 2.0 °C				
	0 (Control)	15	30	60	120
Drumming	17.9 ± 1.1 a	26.9 ± 1.3 bc	23.2 ± 1.0 b	30.7 ± 1.7 cd	33.1 ± 2.1 d
Drilling and Oviposition	226.7 ± 7.0 a	322.8 ± 9.7 bc	293.4 ± 6.2 b	309.9 ± 9.4 b	366.8 ± 16.9c
Marking	40.9 ± 1.5 a	48.2 ± 2.0 b	45.4 ± 1.6 ab	39.8 ± 1.6 a	42.6 ± 2.7 a

라) 저온저장 후 비활성화된 기주알에서의 기생벌의 기생 및 발육

노린재검정알벌의 저온저장된 기주알에 대한 기생 및 발육이 저온저장 기간에 의해 영향을 받음을 알 수 있다. 하지만 약 30일까지 저온저장해도 기생벌 암컷 성충의 발육기간과 발육 완료 후 우화한 성충의 크기를 제외하고 다른 생물적 특징들은 저온저장이 안 된 대조구의 알에 비해 통계적인 차이를 보이지 않아 약 30일까지 기생벌의 기생률에 영향을 미치지 않는 것으로 보인다(표 18). 노린재깡충좀벌의 경

우에는 저장기간 60일 까지 기생률, 우화율 및 성비에 영향이 없이 냉장알이 사용될 수 있음을 보여 주었지만(표 19), 60일 동안 냉장된 알에서 발육을 완료한 성충의 크기는 감소함을 알 수 있었다(그림 14).

표 18. 저온저장되어 비활성화된 노린재 알이 기생벌 노린재검정알벌의 발육 및 생물적 특성에 미치는 영향

	Duration of refrigeration (days) at 2.0 °C				
	0 (Control)	15	30	60	120
Number of parasitized eggs/female, ± SE	14.10 ± 0.5 a	15.60 ± 0.8 a	14.30 ± 1.1 a	9.00 ± 0.9 b	4.40 ± 1.0 b
Development time, days ± SE					
Male	15.00 ± 0.1 b	14.60 ± 0.1 a	14.80 ± 0.1 ab	14.90 ± 0.2 ab	18.20 ± 0.3 c
Female	16.00 ± 0.1 b	15.80 ± 0.1 a	16.30 ± 0.1 b	16.50 ± 0.2 b	20.00 ± 0.3 c
Emergence rate	0.84 (119/141) bc	0.92 (144/156) ac	0.97 (138/143) a	0.83 (75/90) bc	0.73 (32/40) bc
Proportion of male	0.19 (27/141) a	0.23 (36/156) a	0.18 (26/143) a	0.27 (24/90) a	0.30 (13/44) a
Adult longevity, days ± SE	96.2 ± 4.6 a	89.1 ± 4.6 a	86.8 ± 5.6 a	88.1 ± 4.2 a	78.3 ± 3.4 a
Hind tibia length, mm ± SE	0.0464 ± 0.0004 bc	0.0479 ± 0.0002 a	0.0470 ± 0.0002 b	0.0457 ± 0.0002 d	0.0462 ± 0.0002 cd

표 19. 저온저장되어 비활성화된 노린재 알이 노린재깡충좀벌의 발육 및 생물적 특성에 미치는 영향

	Duration of refrigeration (days) at 2.0 °C				
	0 (Control)	15	30	60	120
Number parasitized eggs, ± SE	4.6 ± 0.4a	4.4 ± 0.6a	5.2 ± 0.3a	4.2 ± 0.3a	2.4 ± 0.6b
Number parasitoid emerged, ± SE	15.8 ± 1.7a	16.1 ± 1.6a	17.4 ± 0.9a	12.6 ± 0.8a	4.7 ± 1.3b
Emergence rate	1.00 (158/158)a	1.00 (161/161)a	1.00 (174/174)a	1.00 (126/126)a	1.00 (47/47)a
Proportion of male	0.20 (30/158)a	0.14 (22/161)a	0.12 (21/174)a	0.20 (23/126)a	0.23 (11/47)a
Development time, days ± SE					
Male	14.0 ± 0.3b	13.5 ± 0.1b	13.1 ± 0.1c	14.4 ± 0.2a	15.1 ± 0.3a
Female	13.8 ± 0.1b	13.5 ± 0.1b	13.2 ± 0.04c	14.5 ± 0.1a	15.1 ± 0.2a

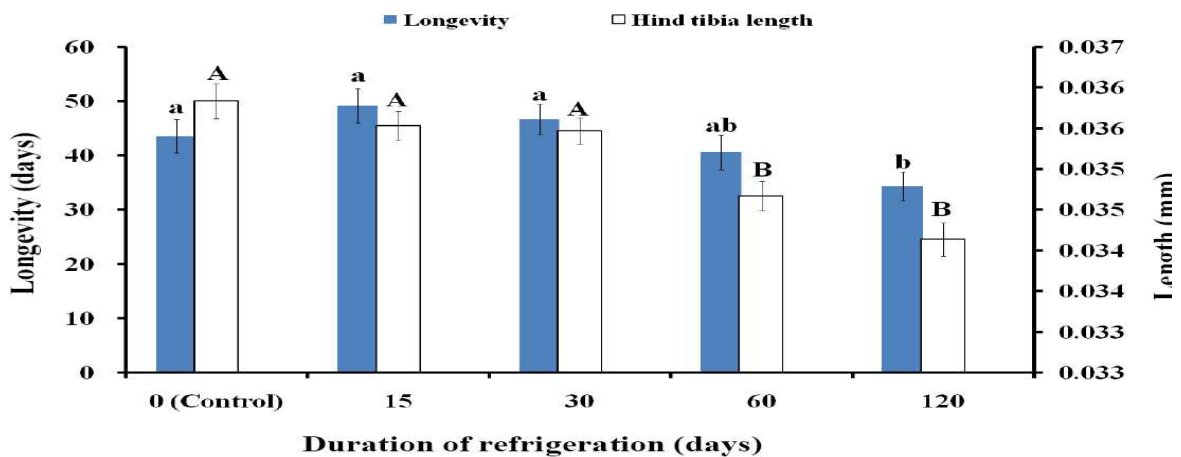


그림 14. 저온저장된 노린재 알에서 발육을 완료한 노린재깡충좀벌 성충의 수명과 크기

마) 저온저장 후 비활성화된 기주알에서의 발육 후 우화한 기생벌의 생식 능력  
저온저장된 기주알에서 발육 및 우화한 기생벌의 생식 능력은 저온저장 기간에  
관계없이 영향을 받지 않음을 알 수 있다(표 20, 21). 따라서 이러한 기주알의 저온  
저장 기술은 기생벌 노린재검정알벌과 노린재깡충좀벌의 실험실내 증식에 적합한  
방법임을 보여 주었다.

표 20. 기주알의 저온저장이 기생벌 노린재검정알벌의 자손세대에 미치는 생물적  
특성의 변화

	Duration of refrigeration of host eggs from first generation (days)				
	0 (Control)	15	30	60	120
Number of parasitized eggs/female, ± SE	16.10 ± 1.2 bc	12.80 ± 0.8 ab	17.70 ± 0.6 c	12.40 ± 0.7 a	9.80 ± 0.9 a
Emergence rate	0.90 (145/161) a	0.92 (119/128) a	0.95 (169/177) a	0.94 (116/124) a	0.95 (93/98) a
Proportion of male	0.22 (35/161) a	0.23 (29/128) a	0.28 (50/177) a	0.32 (40/124) a	0.23 (23/98) a
Development time, days ± SE					
Male	14.20 ± 0.1 a	14.40 ± 0.1 a	15.50 ± 0.3 b	14.70 ± 0.1 ab	14.30 ± 0.1 a
Female	16.10 ± 0.1 c	15.50 ± 0.1 a	16.10 ± 0.1 b	15.60 ± 0.1 ab	15.40 ± 0.1 a

표 21. 기주알의 저온저장이 노린재깡충좀벌의 자손세대에 미치는 생물적 특성의 변화

	Duration of refrigeration of host eggs from the first generation (days) at 2.0°C				
	0 (Control)	15	30	60	120
Number parasitized eggs, ± SE	4.6 ± 0.2a	4.4 ± 0.2a	4.7 ± 0.2a	4.6 ± 0.3a	3.7 ± 0.5a
Number parasitoid emerged, ± SE	15.3 ± 1.1a	16.0 ± 0.9a	16.9 ± 0.9a	14.6 ± 1.1ab	10.6 ± 1.5b
Emergence rate	1.00 (153/153)a	1.00 (146/146)a	1.00 (169/169)a	1.00 (146/146)a	1.00 (106/106)a
Proportion of male	0.20 (30/153)a	0.20 (25/146)a	0.20 (31/169)a	0.13 (19/146)a	0.14 (15/106)a
Development time, days ± SE					
Male	14.2 ± 0.2ab	12.4 ± 0.2cd	11.8 ± 0.2d	13.5 ± 0.2b	14.7 ± 0.2a
Female	14.0 ± 0.1b	12.3 ± 0.1d	12.3 ± 0.1d	13.6 ± 0.1c	15.0 ± 0.1a

바) 저온저장 후 기간에 따른 기생벌의 기생 여부

저온저장 후 경과된 시간에 따른 노린재검정알벌과 노린재깡충좀벌의 기생 반응  
및 발육, 성충의 수명과 크기는 4일 까지는 저온저장 후 바로 사용된 알에 비해서  
유의한 차이를 찾을 수 없어(표 22, 23, 그림 15), 만약 실험실뿐만 아니라 야외에  
방사될 경우에는 4일 까지 유효할 것이다. 4일 이상이 경과할 경우에는 노린재 알  
의 수분 함량이 급격히 떨어져 물리적인 형태가 변형되기 때문에 기생율도 떨어지  
는 것으로 생각된다.

표 22. 저온저장된 기주알의 저온저장 후 경과된 시간이 노린재검정알벌의 생식활동에 미치는 영향

	Duration of post refrigeration (days) at 26.3 °C			
	0 (Control)	2	4	8
Number of parasitized eggs/female, ± SE	15.20 ± 0.92 a	14.30 ± 0.60 a	12.90 ± 0.55 a	9.80 ± 0.73 b
Emergence rate (from pupae)	1.00 (152/152) a	1.00 (143/143) a	0.99 (128/129) a	0.99 (97/98) a
Proportion of male	0.15 (23/152) a	0.18 (26/143) a	0.19 (25/129) a	0.19 (19/98) a
Development time, days ± SE				
Male	14.50 ± 0.12 b	13.80 ± 0.08 a	14.50 ± 0.20 b	15.70 ± 0.10 c
Female	15.40 ± 0.04 b	15.10 ± 0.10 a	15.50 ± 0.10 b	17.20 ± 0.10 c

표 23. 저온저장된 기주알의 저온저장 후 경과된 시간이 노린재깡충좀벌의 생식활동에 미치는 영향

	Duration of post-refrigeration (days) at 26.3 °C			
	0 (Control)	2	4	8
Number of parasitized eggs, ± SE	6.3 ± 0.4a	6.1 ± 0.3a	6.2 ± 0.6a	3.9 ± 0.4b
Number of parasitoid emerged, ± SE	18.4 ± 1.6a	17.3 ± 1.3a	15.4 ± 2a	8.5 ± 1.4b
Emergence rate (pupae)	1.00 (184/184)a	1.00 (130/130)a	1.00 (154/154)a	1.00 (85/85)a
Proportion of male	0.13 (23/184)a	0.20 (29/144)a	0.20 (27/154)a	0.20 (16/85)a
Development time, days ± SE				
Male	13.7 ± 0.1a	14.2 ± 0.1ab	14.7 ± 0.3b	15.3 ± 0.2c
Female	14.0 ± 0.1a	14.2 ± 0.04b	14.4 ± 0.1b	15.4 ± 0.1c

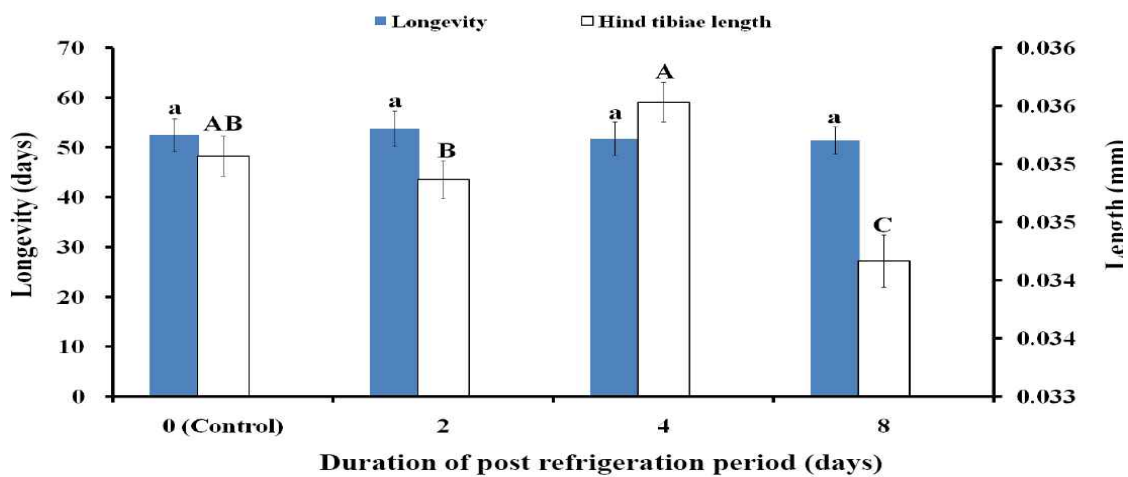


그림 15. 저온저장후 경과된 시간에 다른 노린재 알에서 발육을 완료한 노린재깡충좀벌 성충의 수명과 크기.

사) 저온저장된 기주알이 천적 기생벌들의 중간 상호작용에 미치는 영향

(1) 노린재검정알벌에 의해 먼저 기생된 기주알에 대한 노린재깡충좀벌의 반응  
 노린재검정알벌에 의해 이미 기생된 알에 대해 노린재깡충좀벌은 100% 기주 수용 행동을 보여 주었다(표 24). 두 기생벌에 의해 같은 날에 산란한 경우에는 50%의 공기생된 저온저장되지 않은 기주알에서는 노린재깡충좀벌이, 43%에서는 노린재검정알벌이 우화하였다. 하지만 노린재깡충좀벌이 4일 후에 공기생한 경우에는 노린재검정알벌이 전혀 우화하지 못하였다. 저온저장된 알의 경우에도 비슷한 경향을 보여 주었다.

노린재깡충좀벌의 발육기간은 두 기생벌에 의해 같은 날에 산란한 경우에는 저온저장되지 않은 기주알과 저온저장된 기주알에서 차이가 없었지만(male  $H_c=1.427$ ,  $df=1$ ,  $P=0.232$ ; female  $H_c=2.289$ ,  $df=1$ ,  $P=0.130$ ), 노린재깡충좀벌이 4일 후에 공기생한 경우에는 저온저장된 기주알에서 발육기간이 짧아지는 것을 발견하였다(male  $H_c=16.121$ ,  $df=1$ ,  $P<0.001$ ; female  $H_c=52.014$ ,  $df=1$ ,  $P<0.001$ ). 노린재검정알벌의 발육 기간은 두 기생벌에 의해 같은 날에 산란한 경우 기주알의 저온저장 여부와 관계없이 다르지 않았다(male  $H_c=5.120$ ,  $df=1$ ,  $P=0.023$ ; female  $H_c=0.123$ ,  $df=1$ ,  $P=0.725$ )(표 24).

표 24. 노린재검정알벌에 의해 먼저 기생된 톱다리개미허리노린재의 저온저장된 알에 대한 노린재깡충좀벌의 기주수용행동 및 생물적 특성에 미치는 영향

Egg status	No. of eggs	% of <i>O. nezarae</i> complete host acceptance behaviors			<i>O. nezarae</i>				<i>G. japonicum</i>			% of host eggs do not produce any parasitoid	
		Drumming	Drilling and oviposition	Marking	Development time (days)		Proportion of male	Development time (days)		Emergence (%)	Proportion of male		
					Male	Female		Male	Female				
<b>0 day ovipositional interval</b>													
Fresh	30	100	100	100	13.6	13.6	50.0 (15/30)	0.20 (13/61)	15.0	16.1	43.3 (13/30)	0.30 (4/13)	6.6 (2/30)
Refrigerated	30	100	100	100	14.0	13.8	43.3 (13/30)	0.20 (10/50)	15.8	16.2	56.7 (17/30)	0.29 (5/17)	0.0 (0/30)
<b>4 days ovipositional interval</b>													
Fresh	30	100	100	100	16.0b	15.9b	66.7 (20/30)	0.25 (14/55)	-	-	-	-	33.3 (10/30)
Refrigerated	31	100	100	100	14.1a	14.1a	74.2 (23/31)	0.25 (20/80)	15.0	16.3	12.9 (4/31)	0.25 (1/4)	12.9 (4/31)

기주알의 치사율은 기주알의 저온 저장여부에 의해서는 영향을 받지 않았으나(0 day  $Z_c=0.719$ ,  $P=0.472$ ; 4 days  $Z_c=1.592$ ,  $P=0.111$ ), 두 기생벌에 의한 산란간격 시간이 증가함에 따라 치사율이 증가함이 저온저장되지 않은 알에서 발견되었다( $Z_c=2.259$ ,  $P=0.023$ )(표 25).

공기생된 기주알에서 우화한 성충 기생벌의 수명은 기주알의 저온저장 여부에 영향을 받지 않았으며 두 기생벌에 의한 산란간격 시간에 의한 영향도 없었다. 뒷다리 경절의 크기는 노린재깡충좀벌에서는 저온저장된 기주알에서 커졌으나(0 day  $H_c=4.406$ ,  $df=1$ ,  $P=0.035$ ; 4 days  $H_c=10.264$ ,  $df=1$ ,  $P=0.001$ ) 노린재검정알벌에서는 그러한 경향을 찾을 수 없었다(0 day  $H_c=1.733$ ,  $df=1$ ,  $P=0.187$ )(표 25).

표 25. 노린재검정알벌에 의해 먼저 기생된 다음 노린재깡충좀벌에 의해 기생된 톱다리개미허리노린재의 알에서 우화한 각각의 기생벌의 수명과 크기

Parameters	Egg status	Ovipositional interval (days)			
		0		4	
		<i>O. nezarae</i>	<i>G. japonicum</i>	<i>O. nezarae</i>	<i>G. japonicum</i>
Female longevity (days)	Fresh	52.9 ± 4.02	52.7 ± 3.48	50.8 ± 3.86	-
	Refrigerated	53.8 ± 3.60	59.0 ± 4.61	50.4 ± 3.78	51.5 ± 13.5
Hind tibia length (µm)	Fresh	33.7 ± 0.18a	47.2 ± 0.29	30.3 ± 0.21a	-
	Refrigerated	34.2 ± 0.25b	47.8 ± 0.18	31.3 ± 0.19b	48.3 ± 0.55

(2) 노린재깡충좀벌에 의해 먼저 기생된 기주알에 대한 노린재검정알벌의 반응  
 노린재깡충좀벌에 의해 이미 기생된 후 4일이 경과한 저온저장되지 않은 혹은 저온저장된 기주알에 대해 노린재검정알벌은 각각 63%와 77%만이 기주 수용 행동을 보여 주었다(표 26). 하지만 두 기생벌이 같은 날에 산란한 경우에는 100%가 기주 수용 행동을 완료하였다. 두 기생벌이 같은 날에 산란한 경우에는 80%의 공기생된 저온저장되지 않은 기주알에서는 노린재검정알벌이, 17%에서는 노린재깡충좀벌이 우화하였다. 하지만 저온저장된 알에서는 노린재깡충좀벌의 우화율이 증가하였다(0 day  $Z_c=2.946$ ,  $P=0.003$ ). 노린재검정알벌이 4일 후에 공기생한 경우에는 기주알의 저장여부와 관계없이 노린재검정알벌이 전혀 우화하지 못하였다.

암컷 노린재검정알벌( $H_c=5.877$ ,  $df=1$ ,  $P=0.015$ )과 노린재깡충좀벌( $H_c=13.312$ ,  $df=1$ ,  $P=0.003$ )의 발육기간은 두 기생벌에 의해 같은 날에 산란한 경우에는 저온저장된 기주알에서 더 길었지만 노린재검정알벌이 4일 후에 공기생한 경우에는 저온저장된 기주알에서 발육기간이 짧아지는 것을 발견하였다( $H_c=17.699$ ,  $df=1$ ,  $P<0.001$ ) (표 26).

기주알의 치사율은 기주알의 저온 저장에 의해서 영향을 받지 않았다 (0 day  $Z_c=0.000$ ,  $P=1.000$ ; 4 days  $Z_c=0.719$ ,  $P=0.472$ )(표 26).

표 26. 노린재깡충좀벌에 의해 먼저 기생된 톱다리개미허리노린재의 저온저장된 알에 대한 노린재검정알벌의 기주수용행동 및 생물적 특성에 미치는 영향

Egg standing	No. of eggs	% of <i>G. japonicum</i> exhibiting host acceptance behaviors			<i>G. japonicum</i>				<i>O. nezarae</i>			% of host eggs do not produce any parasitoid	
		Drumming	Drilling and oviposition	Marking	Development time (days)		Emergence (%)	Proportion of male	Development time (days)		Proportion of male		
					Male	Female			Male	Female			
<b>0 day ovipositional interval</b>													
Fresh	30	100	100	100	15.5	16.2a	80 (24/30)	0.63 (15/24)	13.8	13.3a	16.7 (5/30)	0.29 (5/17)	3.3 (1/30)
Refrigerated	30	100	100	100	15.9	17.3b	36.7 (11/30)	0.73 (8/11)	14.1	14.1b	56.7 (17/30)	0.21 (14/66)	6.6 (2/30)
<b>4 day ovipositional interval</b>													
Fresh	30	100	100	63.3 (19/30)	-	-	-	-	14.0	14.0b	96.7 (29/30)	0.25 (27/109)	3.3 (1/30)
Refrigerated	30	100	100	76.6 (23/30)	-	-	-	-	13.7	13.7a	96.6 (29/30)	0.23 (31/133)	3.3 (1/30)

공기생된 기주알에서 우화한 성충 기생벌의 수명 및 크기는 기주알의 저온저장에 의해 짧아지지 않았으며 두 기생벌에 의한 산란간격 시간에 의한 영향도 없었다. 오히려 저온저장된 알에서 산란간격이 0일때, 노린재깡충좀벌의 수명은 증가하였다 ( $H_c=5.093$ ,  $d\neq 1$ ,  $P=0.024$ )(표 27). 이상의 결과와 2차년도에 대한 시험 결과를 종합했을 때 저온저장된 기주알이 기생 천적의 생물적 특성에 부정적인 영향이 적어 이를 이용한 생물적 방제가 유효할 것으로 생각된다.

표 27. 노린재깡충좀벌에 의해 먼저 기생된 다음 노린재검정알벌에 의해 기생된 톱다리개미허리노린재의 알에서 우화한 각각의 기생벌의 수명과 크기

Parameters	Egg status	Ovipositional interval (days)			
		0		4	
		<i>O. nezarae</i>	<i>G. japonicum</i>	<i>O. nezarae</i>	<i>G. japonicum</i>
Female longevity (days)	Fresh	40.6 ± 2.18a	58.4 ± 4.58	50.8 ± 2.27	-
	Refrigerated	49.9 ± 3.60b	61.6 ± 7.48	52.1 ± 2.36	-
Hind tibia length (µm)	Fresh	34.5 ± 0.14	48.2 ± 0.26	34.6 ± 0.18	-
	Refrigerated	34.2 ± 0.13	47.5 ± 0.20	34.4 ± 0.22	-

다. 아가콩 가해 주요 해충에 대한 천적과 친환경 농자재 적용방제

#### 1) 연구 내용

저온저장한 톱다리개미허리노린재의 알 방사가 노린재의 기생률 향상 및 밀도 억제에 효과가 있는지를 경북 안동시 송천동 소재의 아가콩 재배지(45m×26m)를 조성하여 시험하였다(그림 16). 아가콩 파종은 6월 6일에 하였으며, 재식거리를 20cm를 두고 기계파종기를 이용하였다. 아가콩이 생식성장 단계에 들어가기 전후인 8월 19일에 상단 개방형 케이지(1m H×3m L×2m W) 15개를 16개의 시험구(10m×6m) 중앙에 1개씩 설치하고 3가지의 처리를 완전임의배치하였다(C: 무처리 대조구, T1: 저온저장된 기주알 처리구, T2: 저온저장된 기주알과 살충제 치오메톡삼 처리구)(그림 16, 17). 모든 시험구에는 8월 19일부터 60개의 톱다리개미허리노린재의 알을 두 개의 그룹으로 나누어 콩잎 위에 올려 두었으며 3일 후에 그 중 30개의 알을 수거하여 기생률을 조사하였다. 매 6일 마다 알을 추가설치 하였다(채집 3일 전에 방사). 처리구 T1과 T2에는 8월 12일에 40개, 8월 19일에 60개의 저온저장된 노린재 알을 추가로 두어 기생봉에 의한 기생률이 향상되도록 하였다. T2에서는 8월 22일에 치오메톡삼을 살포하였다.



그림 16. 2009년 경북 안동시 송천동 소재에 조성한 아가콩 재배지에 저온저장된 노린재 알 방사구를 개방형 케이지로 설치한 모습.

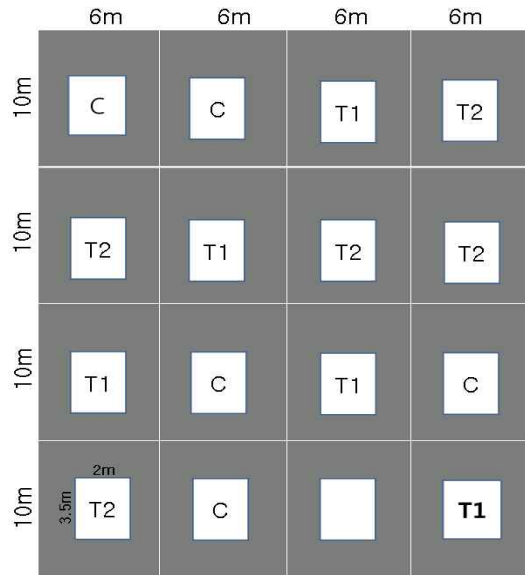


그림 17. 아가콩 재배지의 시험배치도 (C: 무처리 대조구, T1: 저온저장된 기주알 처리구, T2: 저온저장된 기주알과 살충제 처리구)

## 2) 연구 결과

시험구내 톱다리개미허리노린재 밀도는 전체적으로 낮게 조사 되었으며 무처리 대조구에서만 성충의 밀도가 서서히 증가하는 양상을 보여 주었다. 처리의 효과는 노린재 알(그림 18;  $F=1.17$ ,  $df=2$ ,  $P=0.343$ )과 약충(그림 19;  $F=0.25$ ,  $df=2$ ,  $P=0.779$ )에 있어서는 없었으며, 성충에 대해서만 시험 후반기에 유의한 차이를 보여 주었다(그림 20;  $F=9.42$ ,  $df=2$ ,  $P=0.004$ ). 저장된 기주알만 처리한 것(T1)과 기주알과 살충제 1회 처리구간의 통계적 차이는 없었다(투키다중 검증법). 하지만 노린재검정알벌에 의한 기생률은 두 처리구에서 무처리구에 비해 높게 유지되었다(그림 21;  $F=7.16$ ,  $df=2$ ,  $P=0.009$ ). 특히, 살충제 처리가 T2에서의 기생률은 급격히 감소시키는



것을 볼 수 있었다. 하지만 노린재깡충좀벌에 의한 기생률은 전체적으로 낮게 유지되었으며 처리간 통계적 차이는 없었다(그림 22;  $F=0.17$ ,  $df=2$ ,  $P=0.846$ ). 이와 같이 저온 저장된 기주알 방사가 노린재 밀도 억제 효과는 성충에 있어서 부분적으로만 있었지만 전체 기생률 증가에는 유의한 효과가 있었다.

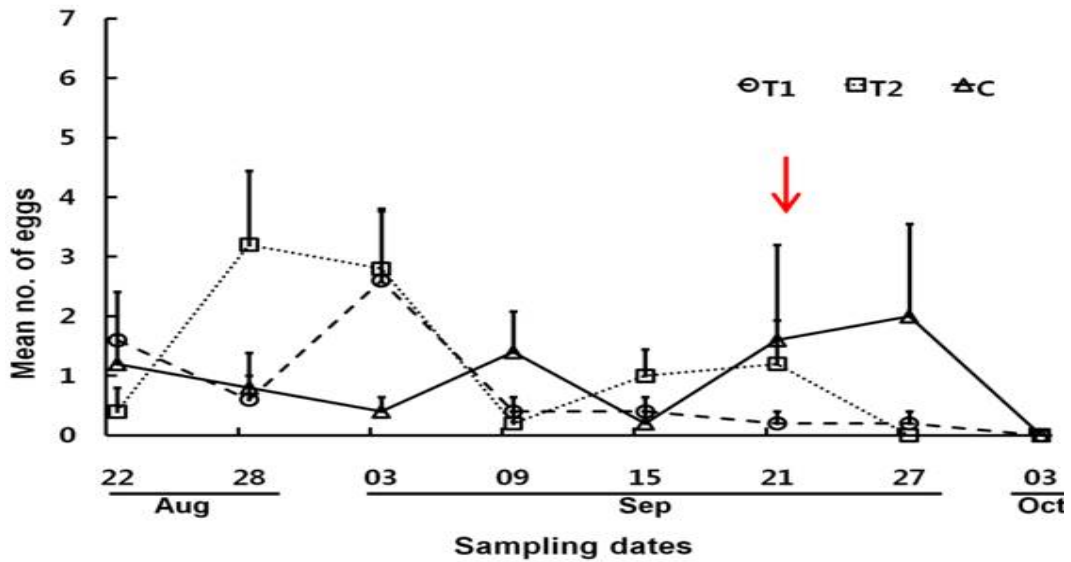


그림 18. 경북 안동시 송천동 소재 아가콩 재배지에서 저온저장된 노린재 알을 방사한 처리구(T1)와 저온저장된 노린재 알과 살충제를 1회 처리한 처리구(T2), 무처리 대조구(C)에서의 톱다리개미허리노린재 알의 밀도 변동.

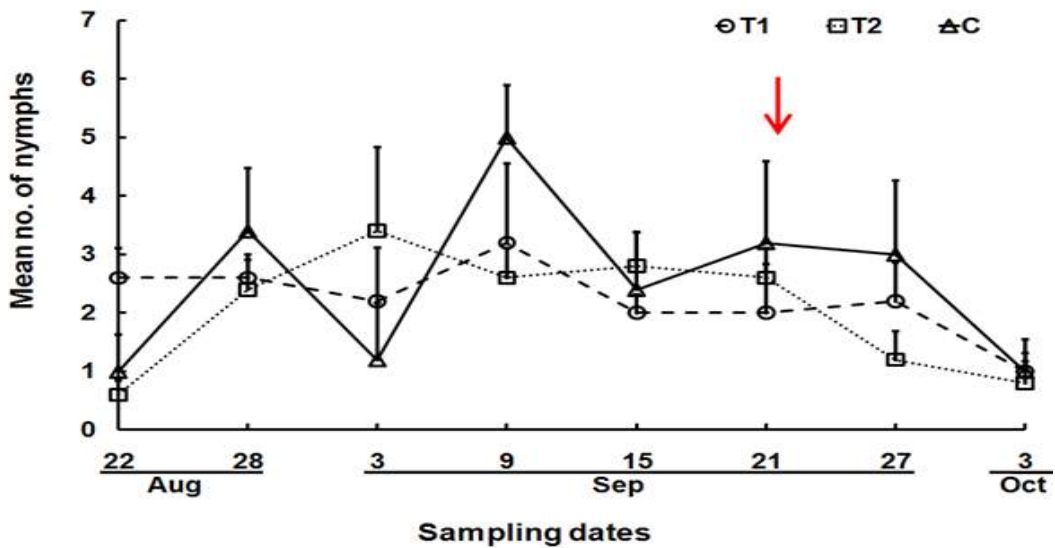


그림 19. 경북 안동시 송천동 소재 아가콩 재배지에서 저온저장된 노린재 알을 방사한 처리구(T1)와 저온저장된 노린재 알과 살충제를 1회 처리한 처리구(T2), 무처리 대조구(C)에서의 톱다리개미허리노린재 약충의 밀도 변동.

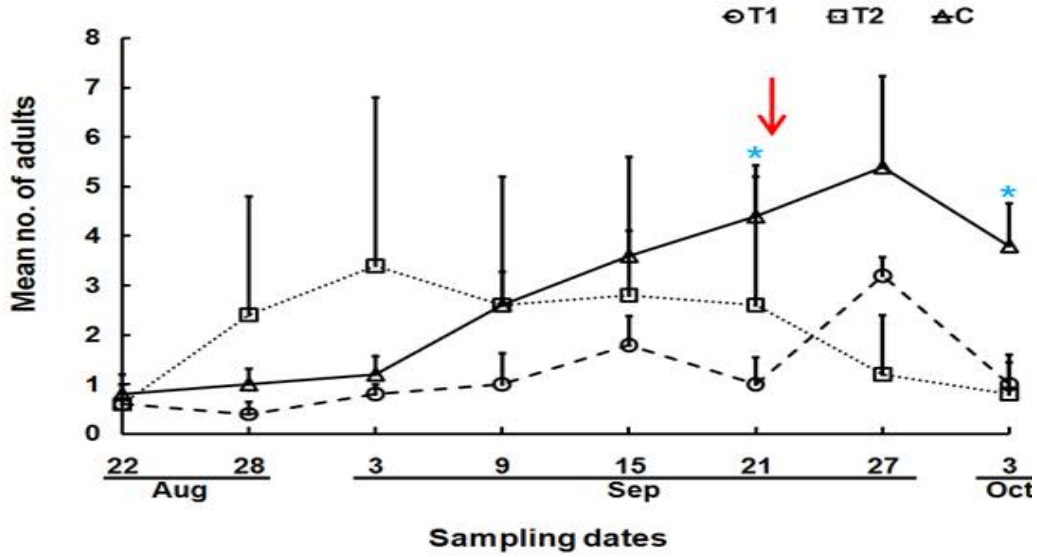


그림 20. 경북 안동시 송천동 소재 아가콩 재배지에서 저온저장된 노린재 알을 방사한 처리구(T1)와 저온저장된 노린재 알과 살충제를 1회 처리한 처리구(T2), 무처리 대조구(C)에서의 톱다리개미허리노린재 성충의 밀도 변동.

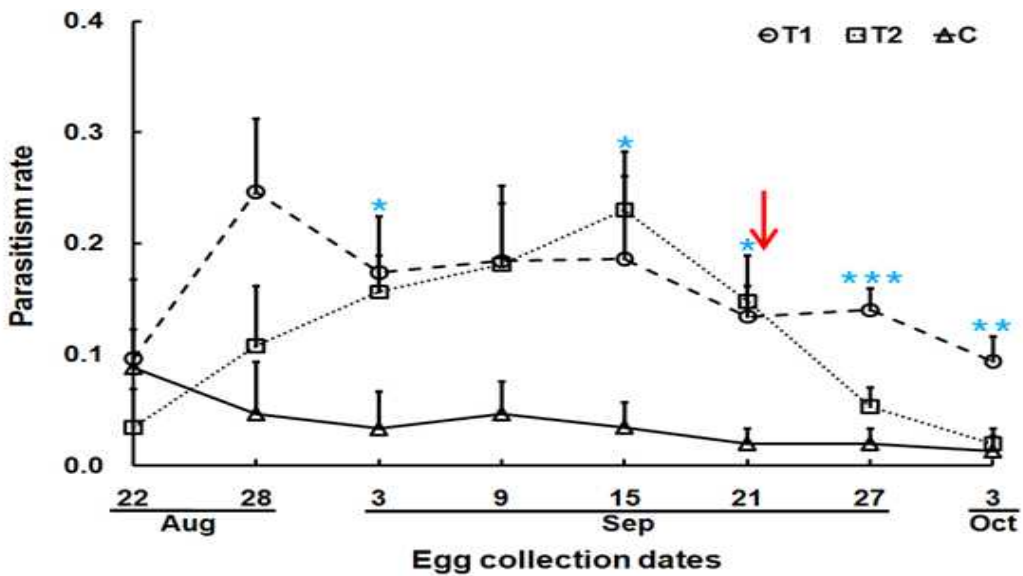


그림 21. 경북 안동시 송천동 소재 아가콩 재배지에서 저온저장된 노린재 알을 방사한 처리구(T1)와 저온저장된 노린재 알과 살충제를 1회 처리한 처리구(T2), 무처리 대조구(C)에서의 노린재검정알벌의 기생률 변동.

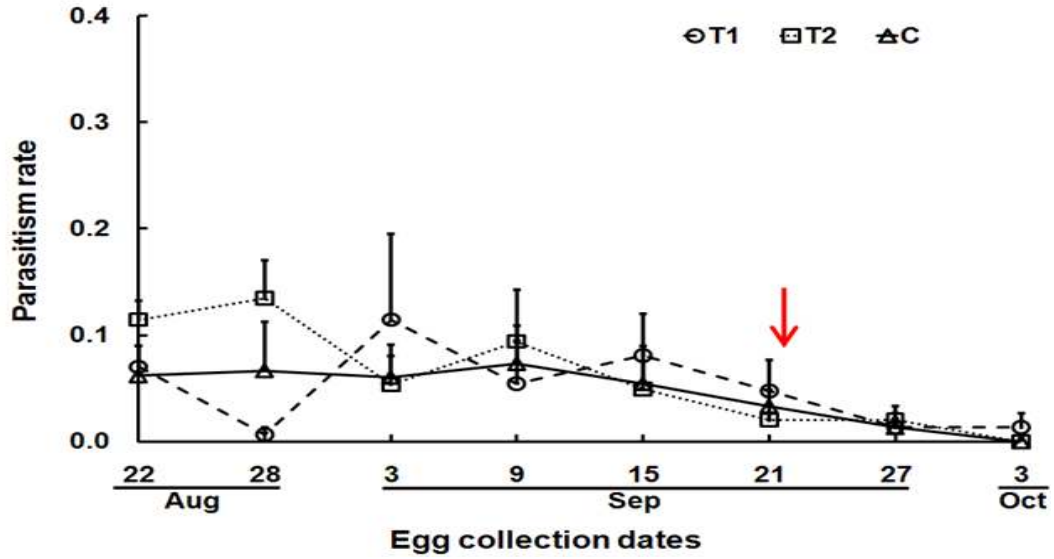


그림 22. 경북 안동시 송천동 소재 아가콩 재배지에서 저온저장된 노린재 알을 방사한 처리구(T1)와 저온저장된 노린재 알과 살충제를 1회 처리한 처리구(T2), 무처리 대조구(C)에서의 노린재깡충좀벌의 기생률 변동.

## 제 4 절 신제품 육종공의 의학적 약리효능구명

### 1. 신제품 육종공의 의학적 약리효능 구명

#### 가. 실험방법

##### 1) 세포배양

태아 18.5일째의 생쥐 두개골에서 분리한 골아세포와 마우스 유래의 MC3T3E1 세포를 10% 우태아 혈청이 포함된  $\alpha$ -MEM 배지와 함께 배양용기에 넣어 5% 이산화탄소가 있는 37°C 항온기에서 배양하였다. 골아세포와 MC3T3E1 세포의 분화유도를 위해서 10% 우태아 혈청이 포함된  $\alpha$ -MEM 배지에 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 아스코르브산(ascorbic acid)와 10mM  $\beta$ -글리세로포스페이트(beta-glycerophosphate)를 첨가해주었다. RAW264.7 (murine monocyte/macrophage) 세포는 10% 우태아 혈청이 포함된 D-MEM 배지에서 배양 하였으며, 파골세포로의 분화를 유도하기 위해서 10% 우혈청이 포함된  $\alpha$ -MEM 배지에 200 ng/ml의 RANKL를 첨가하였다.

##### 2) 골다공증 마우스 모델 제작

골다공증 마우스 모델 정상마우스(C57BL/6)를 골다공증 마우스로 유도하기 위해 고용량의 비타민 D ( $60 \times 10^4$  IU/kg 체중)를 하루에 한 번씩 3일 동안 주사 후 처음 주사한 날로부터 10일 동안 관찰하였다.

##### 3) 글리세올린을 동물세포 및 골다공증 마우스 모델에 처리

MC3T3E1 세포에는 분화유도과정 동안 글리세올린을 0, 5, 10, 25, 50  $\mu\text{M}$ 의 농도로 처리하였다. RAW264.7세포에는 분화유도과정 동안 글리세올린을 0, 5, 10, 25  $\mu\text{M}$ 의 농도로 처리하였다. 생쥐 두개골에서 분리한 골아세포에는 분화유도과정 동안에 글리세올린을 0, 10, 20  $\mu\text{M}$ 의 농도로 처리하였다. 고용량의 비타민 D를 투여하여 골다공증을 유도한 마우스에는 글리세올린을 0, 0.5, 5  $\mu\text{g}/\text{kg} \cdot \text{체중}$ 의 농도로 9일 동안 하루에 한 번씩 처리하였다.

##### 4)조직조 (organ bath) 실험

무게 320~350 g의 수컷 Sprague-Dawley rat을 sodium pentobarbital (50 mg  $\text{kg}^{-1}$  i.p.)로 마취하여 즉시 흉부 대동맥을 적출한 후 Krebs' solution에 담근다. 혈관 대동맥을 Kim 등의 방법에 따라 Krebs' solution에 담그고 젖은 여과지 위에서 혈관에 부착된 결체조직을 제거한 후 4 mm의 고리를 만든다. Forcep 끝부분으로 혈관 고리의 내부 표면을 부드럽게 문질러 내피세포를 제거한다. 각각의 혈관 고리에 두개의 스테인리스 스틸 삼각 고리를 끼우는데 이때 혈관 손상을 방지하기 위해

주의를 기울인다. 대동맥 고리를 조직조 (20 ml)에 현수시키고 조직조의 온도는 37°C로 유지하고 95% O<sub>2</sub>와 5% CO<sub>2</sub> 혼합가스를 공급한다. 두개의 삼각 고리 가운데 하나는 아래 고정축에 연결하고, 다른 하나는 등장력 변환기 (Grass FT03C, Quincy, Mass., USA)에 연결한다. 대동맥 고리에 2.0 g의 장력을 가해서 수동적으로 신장시키고, 실험 전체에 걸쳐 장력을 유지한다. 각각의 대동맥 고리를 조직조에서 90분 동안 안정화시킨 후, 50 mM KCl에 대한 수축 반응을 유도한다. Computerized data acquisition system (PowerLab/8SP, ADInstruments, Castle Hill, NSW, Australia)을 이용하여 각각의 대동맥 고리에 대한 장력을 기록한다.

#### 5) MLC<sub>20</sub> 인산화.

혈관 고리를 10% trichloroacetic acid (TCA)와 10 mM dithiothreitol (DTT)를 포함한 -80°C 아세톤 (acetone)에 침강시켜 급속 냉동시킨다. TCA를 제거하기 위하여 5 mM DTT를 함유한 아세톤으로 근육 조직을 15분씩 네 차례 씻고, 20 mM Tris base/23 mM glycine (pH 8.6), 8.0 M urea, 10 mM DTT, 10% glycerol, 0.04% bromphenol blue를 함유한 sample buffer 80 µl에 옮겨 자주 vortex를 하며 1시간 동안 담가 둔다. 40% glycerol를 함유한 polyacrylamide gel을 200V에서 30분간 사전 전기영동(pre-electrophoresis)을 합니다. Running buffer의 조성은 다음과 같다 : 20 mM Tris base/23 mM glycine (pH 8.6), 2.3 M thioglycolate, 2.3 mM DTT. Urea-extracted sample (15 µl)을 300 V에서 5시간 동안 전기영동한 후 nitrocellulose membrane으로 옮겨 특이 myosin light chain 항체 (1:2,000, Sigma, St. Louis, MO, USA)로 immunoblot을 시행한다. Horse-radish peroxidase와 결합된 Anti-mouse IgG (goat)을 이차항체로 사용한다 (1:4,000, Stressgen, Victoria, BC Columbia, Canada). Myosin light chain이 포함된 band는 enhanced chemiluminescence (ECL)로 필름에 인화하여, NIH image로 분석한다.

#### 6) Western blot-MYPT1, CPI17

기능적 연구가 끝난 후 혈관 고리를 10% trichloroacetic acid (TCA)와 10 mM dithiothreitol (DTT)를 포함한 -80°C 아세톤 (acetone)에 침강시켜 급속 냉동한다. TCA를 제거하기 위하여 5 mM DTT를 함유한 아세톤으로 근육 조직을 15분씩 네 차례 씻고 공기 중에 건조한 후 -80°C에서 보관 한다. 실험 당일 미리 보관된 표본을 320 mM sucrose, 50 mM TRIS, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM NaF, 100 mM ZnCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, and protease inhibitors leupeptin (10 g/ml), trypsin inhibitor (10 g/ml), aprotinin (2 g/ml), phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF 100 g/ml)를 함유한 완충액으로 균질화 한다. Protein-matched sample (Bradford assay)을 SDS-PAGE로 전기영동을 한 후에 nitrocellulose membrane으로 옮겨 인산화된 MYPT1과 CPI17을 검출하기 위해 pMYPT1<sup>Thr855</sup> antibody (1:2,000, Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA)와

pCPI17<sup>Thr38</sup> antibody (1:500, Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA)로 immunoblot을 시행한다. Horse-radish peroxidase와 결합된 Anti-rabbit IgG (goat)를 이차항체로 사용한다 (1:2,000, Sigma, St. Louis, MO, USA). pMYPT1<sup>Thr855</sup>과 pCPI17<sup>Thr38</sup>이 포함된 band는 enhanced chemiluminescence (ECL)로 필름에 인화한다.

#### 7) RhoA-GTP

혈관 고리를 액체 질소에 얼린 후, -80°C에 보관 한다. RhoA의 활성을 측정하기 위해서 G-LISA<sup>TM</sup> RhoA Activation Assay (Cytoskeleton Inc, Denver, CO, USA)의 프로토콜을 따른다. 간략히 설명하면, 준비된 샘플을 lysis buffer에 담귀서 homogenizing 시킨 후, 13,200rpm, 4°C에서 15분간 원심분리 한다. 37µg의 단백질을 포함하는 상층액과 같은 볼륨의 ice-cold binding buffer를 섞어서 plate의 각 well에 넣는다. plate를 microplate shaker(300rpm, 4°C) 위에 놓고 30분간 흔들여 준다. well을 wash buffer로 씻어 준 후, anti-RhoA primary antibodies를 넣고 microplate shaker(300rpm, 상온) 위에서 45분간 흔들여 준다. 그 후, well을 wash buffer로 씻어 주고 secondary antibodies를 넣고 microplate shaker(300rpm, 상온) 위에서 45분간 흔들여 준다. HRP detection reagent를 넣고 37°C에서 15분간 반응을 시킨 후, HRP stop buffer를 넣어주고, Magellan 기계를 이용해서 490nm에서 흡광도를 측정한다.

#### 나. 실험 결과

##### 1) Glyceollin I, II, 그리고 III의 구조.

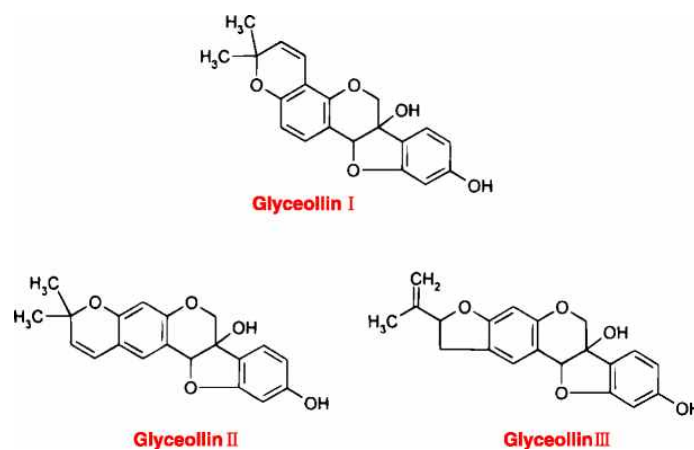


그림 1 Glyceollin I, II, 그리고 III의 구조.

2) 골아세포 증식과 분화 과정에서 글리세올린의 효과

글리세올린의 골아세포 증식과 관련된 기능을 밝히기 위해 MC3T3 세포에 글리세올린을 처리 후 세포의 모양, 세포의 수, MTT 분석을 시행한 결과 글리세올린을 처리하지 않은 경우와 비슷한 것을 알 수 있었다 (그림 2a,b,c 참조). 또한, MC3T3 세포의 증식 및 분화를 유도시키면서 글리세올린을 0, 5, 10, 25, 50  $\mu\text{M}$ 의 농도로 처리하고, Runx2 단백질의 수준을 측정된 결과 처리한 글리세올린의 농도가 증가할수록 Runx2 단백질의 수준이 감소하는 것을 알 수 있었다 (그림 2d 참조). 이어서, 글리세올린 1 처리에 의해 Runx 단백질 수준이 감소하는 것이 Runx2의 mRNA 수준이 감소한 것에 기인한 것인지를 확인하기 위해 글리세올린을 처리한 후 Runx2의 mRNA 수준을 조사하였다. 그 결과, Runx2의 mRNA 양은 글리세올린의 처리에 무관하게 변함이 없음을 알 수 있었다(그림 2e 참조). 다음으로, 글리세올린이 골아세포의 증식 및 분화과정에서 Runx2 단백질의 양을 감소시키는 효과가 유비퀴틴 결합된 Runx2 단백질의 분해를 촉진함으로써 Runx2 단백질의 안정성을 낮추는 기작을 통한 것인지를 조사하였다. 골아세포에 프로테아좀 억제자 (proteasome inhibitor)인 MG132를 처리하여 Runx2 단백질의 수준을 확인한 결과, 글리세올린에 의해 줄어든 Runx2 단백질의 양이 글리세올린의 처리에 의해 회복되는 것을 확인하였다(그림 2f 참조). 이러한 결과들은 글리세올린이 골아세포에서 유비퀴틴과 결합된 Runx2의 분해를 촉진시킴으로써 골아세포의 분화를 억제하는 효과를 가지는 것임을 입증하는 것이다.

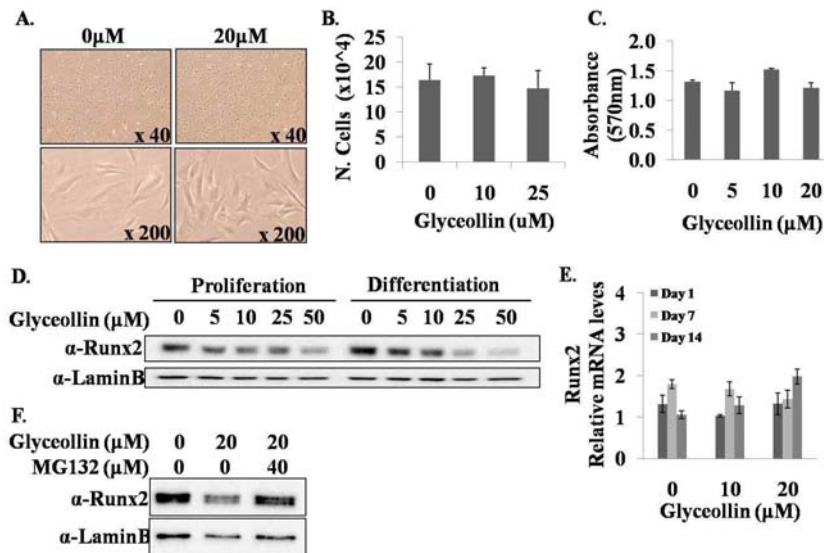


그림 2. MC3T3 세포에 글리세올린을 처리 후 세포의 모양, 수, MTT 분석을 시행한 결과

글리세올린의 기능을 마우스 두개골에서 분리한 골아세포를 분화시키면서 (분화 유도 후 21일 동안) 글리세올린 (0, 10, 20  $\mu\text{M}$ )을 처리 후 단백질과 mRNA를 분리하

여 기능 유전자들을 조사하였다. MC3T3 세포에서와 마찬가지로, 글리세올린의 농도가 증가할수록 Runx2 단백질 수준은 감소하였지만 (그림 3a 참조), mRNA 수준은 변함이 없는 것이 한 번 더 증명되었다 (그림 2b 참조). 골아세포 분화 표지자인 osteocalcin의 mRNA 수준이 감소하는 것으로 보아 골아세포로의 분화가 글리세올린에 의해 감소되었다는 것을 알 수 있었다 (그림 3b 참조). 또한, 골아세포 분화과정 동안 분비되어 파골세포 분화를 촉진시키는 Rankl(receptor-activator of NF  $\kappa$ B ligand) 및 Rankl의 decoy receptor인 Opg (osteoprotegerin)의 mRNA 발현 수준을 Real-time PCR을 통해 조사하였다. 그 결과, Rankl의 mRNA 수준은 글리세올린의 농도가 증가함에 따라 감소하는 것을 확인하였지만, Opg의 mRNA 수준은 변화가 없거나 약간 증가하는 경향이 있었다 (그림 3c 참조). 결과적으로, 글리세올린은 골아세포의 분화과정 동안 Rankl/Opg 비를 감소시키는 결과를 확인하였다 (그림 3c 참조). 종합적으로, 글리세올린은 골아세포의 증식과정에는 큰 영향을 주지 않았지만, 분화과정에서 Runx2의 단백질 분해를 촉진시켜 분화를 억제하고 이로 인해 Rankl/Opg 비를 감소시킴으로써 파골세포의 분화를 억제시키는 것으로 예상된다.

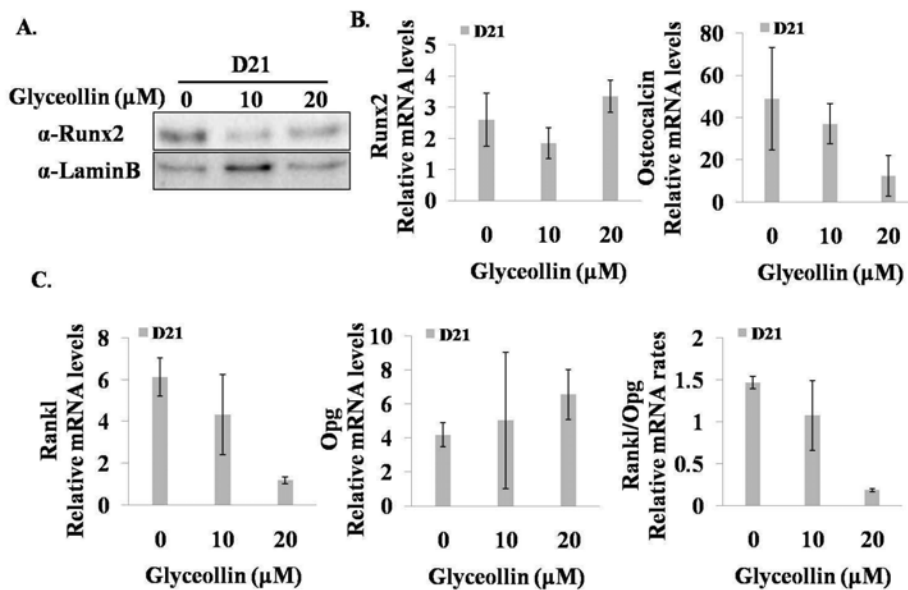


그림 3. 글리세올린 (0, 10, 20  $\mu$ M)을 처리 후 단백질과 mRNA를 분리하여 기능 유전자

## 2) 글리세올린의 골아세포 분화 억제 효과

마우스 두개골로부터 분리한 골아세포를 분화 유도하는 과정 동안에 글리세올린을 0, 10, 20  $\mu$ M의 농도별로 처리하여 ALP 염색 (분화유도 후 7일)과 Alizarin Red 염색 (분화유도 후 21일)을 통해 분화의 정도를 측정된 결과 글리세올린의 농도가 증가할수록 골아세포의 분화가 억제되는 것을 확인하였다(그림 4a,b 참조). 또한, 칼슘농도 (분화유도 후 21일)를 측정된 결과 글리세올린의 농도가 증가할수록 칼슘농도가 감소하는 것을 확인하였다 (그림 4c 참조). 이러한 결과는, 그림 1에서 보여준



골아세포의 분화과정동안 기능 유전자들을 조사한 결과와 일치한다.

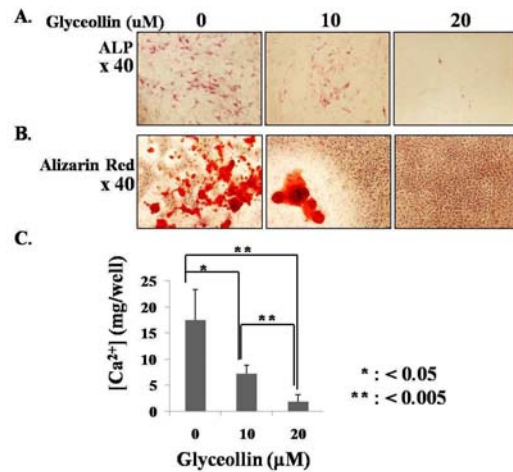


그림 4. 글리세올린 처리 후 분화의 정도를 측정

### 3) 글리세올린의 파골세포 분화 억제 효과

RAW264.7세포를 파골세포로 분화 유도하는 과정 동안에 글리세올린을 0, 5, 10, 25 μM의 농도별로 처리하여 4일 후에 TRAP 염색법으로 파골세포를 관찰하였다. 그 결과, 글리세올린의 농도가 증가할수록 TRAP 염색된 파골세포가 줄어드는 것을 확인하였다(그림 5a 참조). 이러한 결과 역시 그림 1에서 보여준 골아세포 분화 과정동안 기능 유전자들을 조사한 결과와 일치한다.

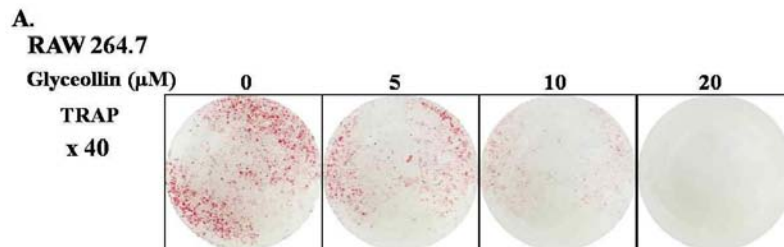


그림 5. 글리세올린처리 후 파골세포

### 4) 글리세올린의 골다공증 유도 마우스 모델에서의 뼈 보호 효과

인 비트로(in vitro)에서 검증된 글리세올린 1의 파골세포 분화 억제 효과를 인 비보(in vivo) 실험으로 검증하기 위하여, 마우스에 고용량의 비타민 D를 3일 동안 하루에 한번 주사하여 골다공증을 유도하였다. 처음 비타민 D를 주사한 날부터 9일 동안 하루에 한 번씩 글리세올린을 농도별로 주사한 후 10 일째 마우스를 희생시켜, 두개골에 대해 마이크로CT 분석, Trichrome 염색, TRAP 염색으로 관찰하였다. 그 결과 골 미네랄 함량(bone mineral contents, BMC), 골 미네랄 밀도(bone

mineral density, BMD), 조직 미네랄 함량(tissue mineral contents, TMC)가 글리세올린의 농도가 증가할수록 증가되는 것을 확인하였다(그림 6ab 참조).

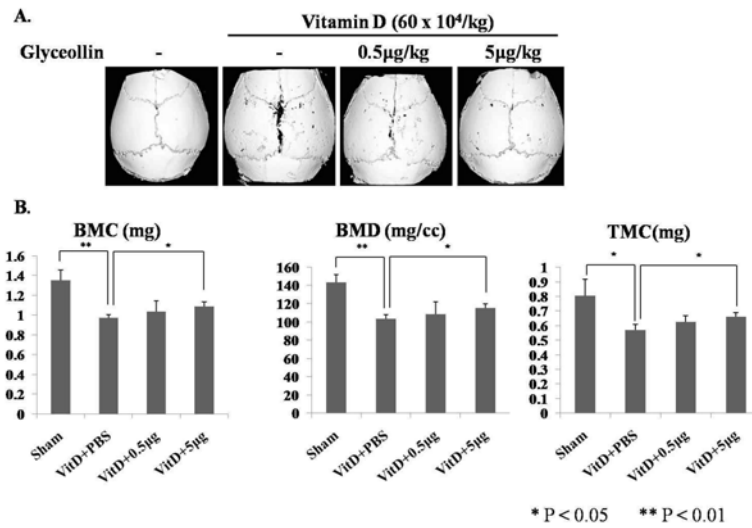


그림 6. 글리세올린의 골다공증 유도 마우스 모델에서의 뼈 보호 효과

Trichrome 염색으로 뼈의 세포외기질로 알려진 콜라겐 염색이 글리세올린에 의해 증가되는 것을 확인하였으며, TRAP 염색으로 파골세포를 관찰한 결과 글리세올린에 의해 파골세포의 수가 감소되는 것을 확인하였다 (그림 7ab 참조).

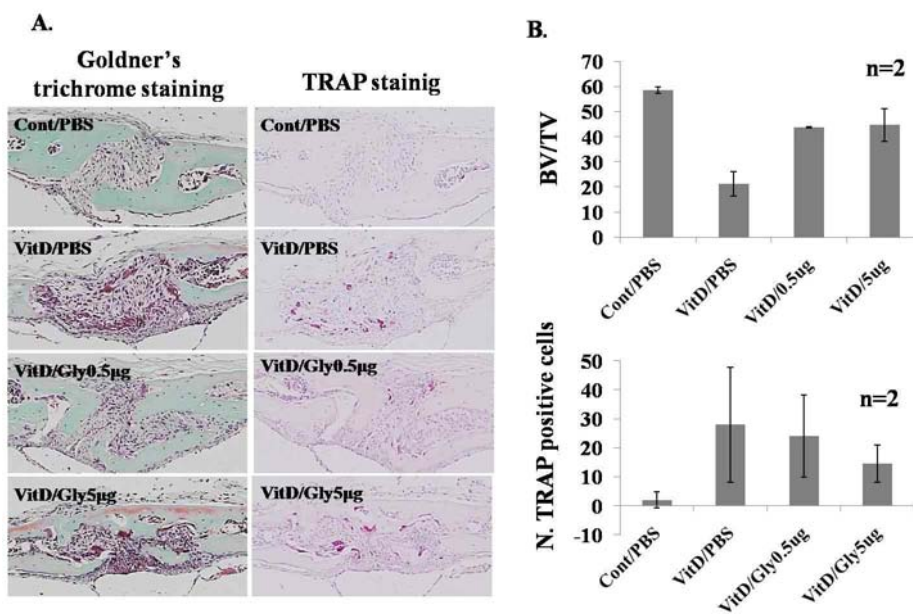


그림 7. 글리세올린에 의해 파골세포의 수

5) Glyceollin I에 의한 혈관 이완작용

NaF (8.0 mM, 60 min), U46619 (30 nM, 25 min), PE (0.1  $\mu$ M, 15 min), 그리고 PDBu (0.1  $\mu$ M, 30 min)를 수축제로 사용하여 수축을 유도시킨 후, 글리세올린의 처리에 따른 혈관의 이완 작용을 관찰 하였다. 글리세올린의 처리는 수축제에 의해 유도 되어진 수축을 유의하게 감소 시켰다.

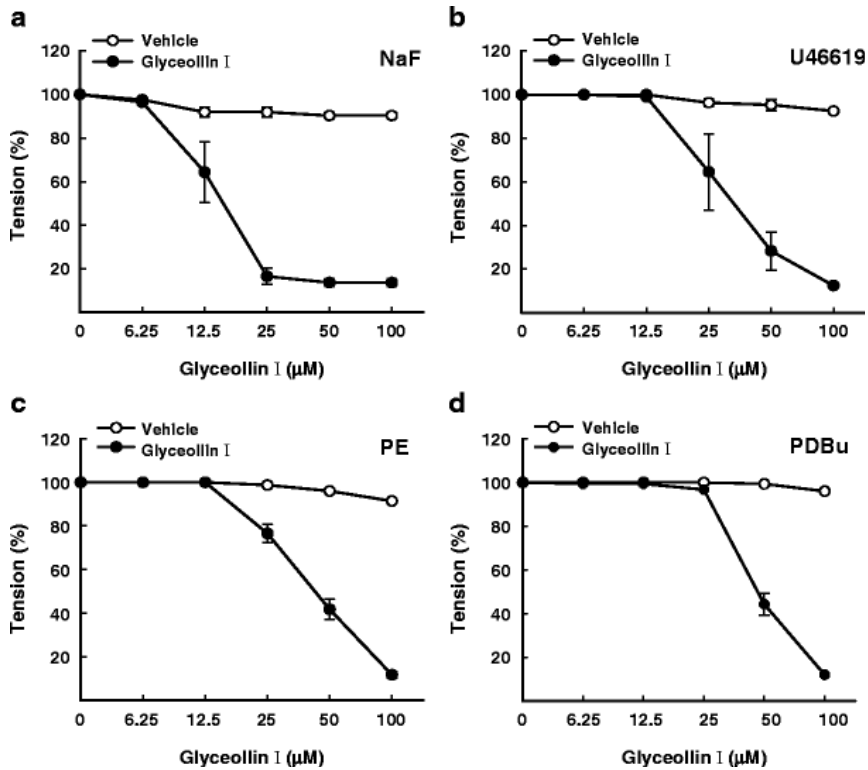


그림 8. 글리세올린의 처리에 따른 혈관의 이완 작용

6) Genistein과 daidzein에 의한 혈관 이완작용

Genistein과 daidzein을 10, 30과 100 $\mu$ M을 사용하여 30분 전 처리 한 후 U46619와 KCl을 수축제로 사용하여 수축을 유도시켜 혈관의 이완 작용을 관찰 하였다. Genistein과 daidzein의 전 처리는 수축제에 의해 유도 되어진 수축을 유의하게 감소 시켰다.

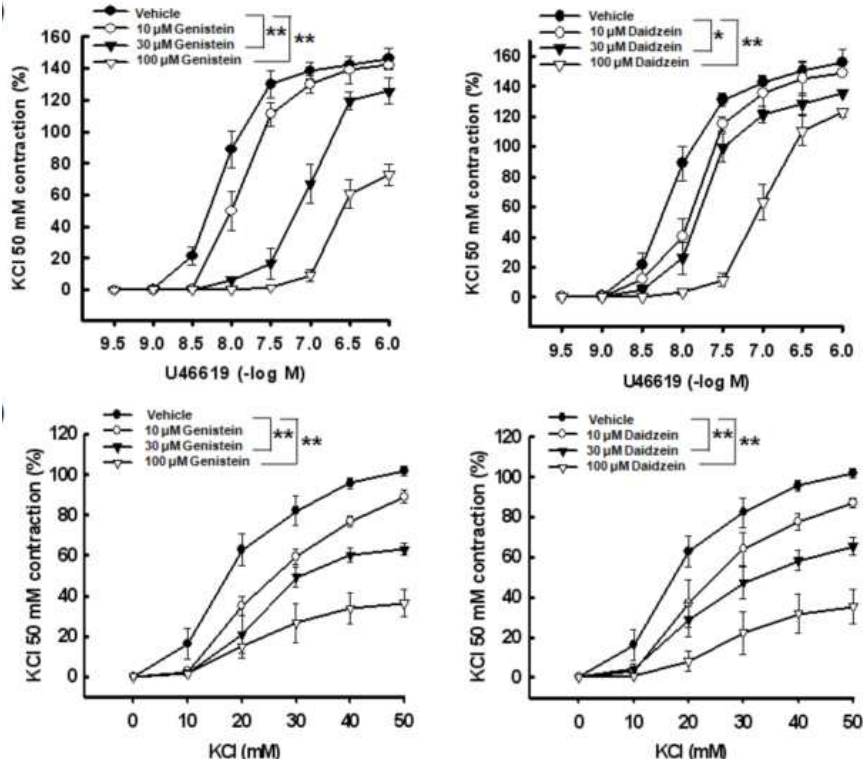


그림 9. Genistein과 daidzein 처리 한 후 혈관의 이완 작용

7) Glyceollin I에 의한 혈관의 이완 작용에 미치는 K<sup>+</sup> channel의 효과

내피를 제거한 혈관 고리에 K<sup>+</sup> channel inhibitor로 알려진, 4-aminopyridine, voltage-gated K<sup>+</sup> channel 억제제 (4-AP, 3 mM, c); charybdotoxin, large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel 억제제 (CTX, 10 nM, d); tetraethylammonium chloride, nonselective K<sup>+</sup> channel 억제제 (TEA, 6 mM, e); 그리고 glibenclamide, ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel 억제제 (GB, 10 μM, f)를 20분간 전처리하고, phenylephrine (0.1 μM, 15 min)을 투여하여 혈관을 수축시킨 후, 글리세올린을 처리하여 혈관의 이완효과를 관찰하였다. K<sup>+</sup> channel의 억제제를 처리하여도 글리세올린의 혈관 이완에 영향을 미치지 않았다.

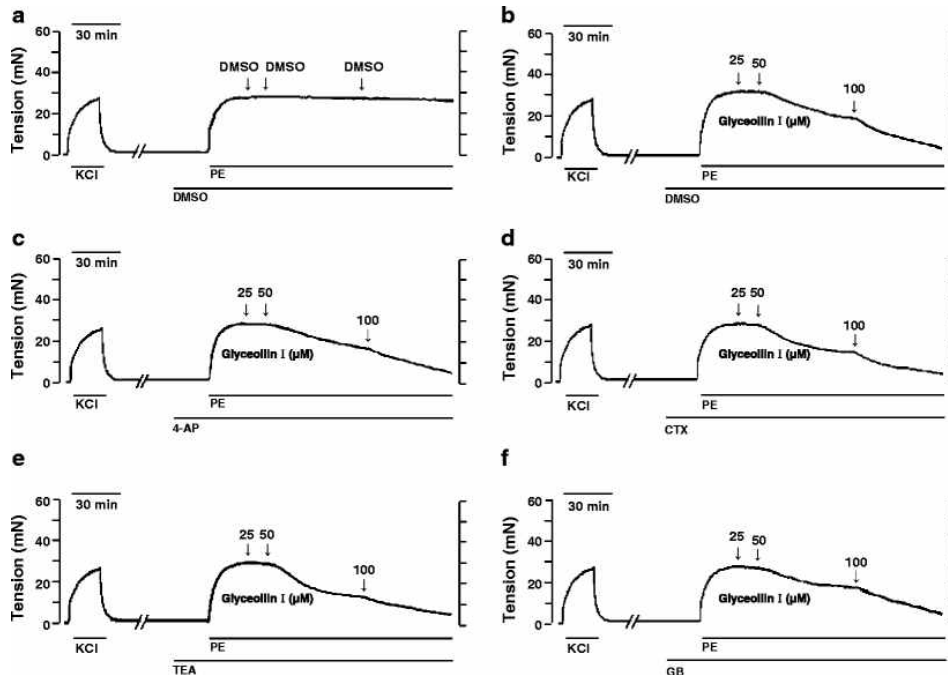


그림 10. 혈관을 수축시킨 후, 글리세올린을 처리하여 혈관의 이완효과

## 8. Glyceollin I에 의한 혈관 이완작용 및 MLC<sub>20</sub> 인산화 변화 측정

Rho kinase를 활성화시킨다고 알려진 NaF(8.0mM)를 수축제로 사용하여 수축을 유도시킨 후, glyceollin I(20 or 100  $\mu$ M)의 처리에 따른 혈관의 이완 작용을 관찰하였다. 20 혹은 100  $\mu$ M의 글리세올린 처리는 NaF에 의해 유도 되어진 수축을 유의하게 감소 시켰다.(그림 11. a) 민무늬근의 수축은 MLC<sub>20</sub>의 인산화 정도에 의해 결정된다. NaF에 의해 수축이 유도된 조직에서 MLC<sub>20</sub>의 인산화 정도는 NaF를 넣지 않은 조직에 비해 증가 하였다. 그리고 NaF에 의해 증가 되어진 MLC<sub>20</sub>의 인산화 정도는 20 혹은 100  $\mu$ M의 글리세올린 처리에 의해 유의하게 감소하였다. (그림 11. b)

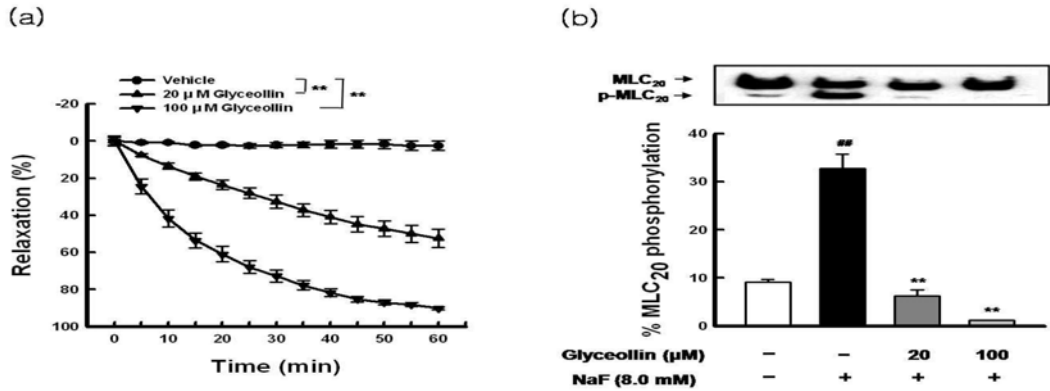


그림 11. Glyceollin I에 의한 혈관 이완작용 및 MLC<sub>20</sub> 인산화 변화 측정

9) Genistein과 daidzein에 의한 MLC<sub>20</sub> 인산화 변화 측정

Genistein과 daidzein을 30과 100μM을 30분 전 처리 한 후 U46619(30 nM)와 KCl(60 mM)을 수축제로 사용하여 수축을 유도시켜 혈관의 MLC<sub>20</sub> 인산화 작용을 관찰 하였다. Genistein과 daidzein의 전 처리는 MLC<sub>20</sub> 인산화를 유의하게 감소 시켰다. (그림 12)

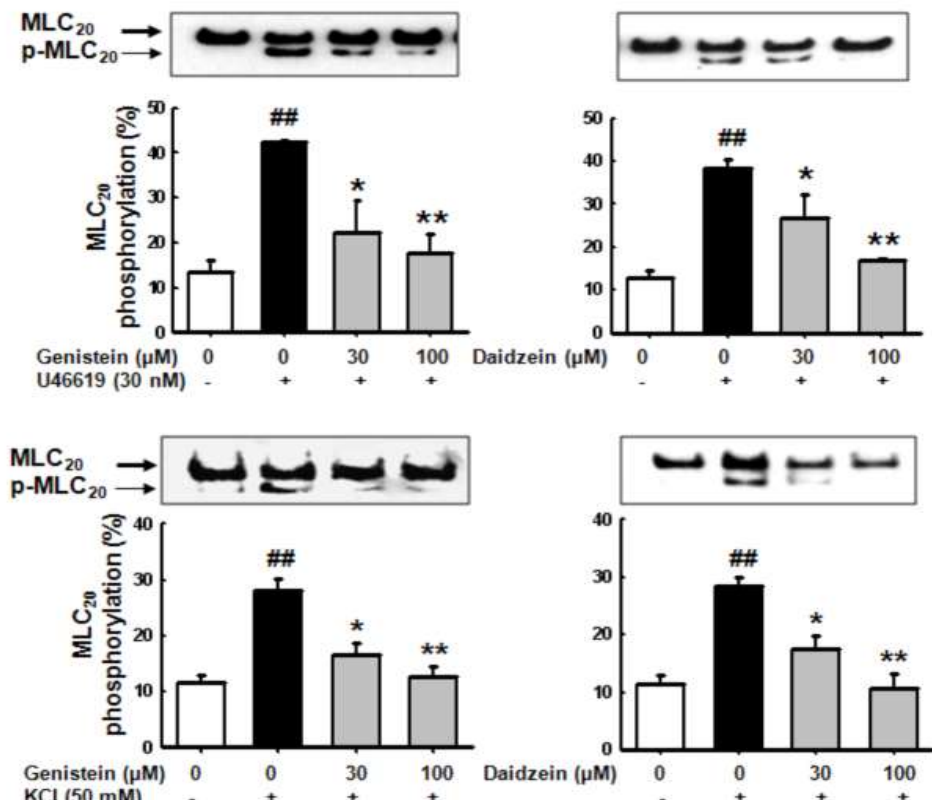


그림 12. Genistein과 daidzein에 의한 MLC<sub>20</sub> 인산화 변화 측정

10) Glyceollin I에 의한 Rho kinase 효과기 (MYPT1과 CPI-17)의 인산화 변화 측정

Rho kinase에 의해 인산화되는 효과기(effector molecule, downstream target)는 myosin light chain phosphatase를 구성하는 3개의 subunits 중 하나인 MYPT1(myosin phosphatase target subunit 1)과 MLCP의 내인성 억제제인 CPI-17이 있다. NaF에 의해 수축이 유도되어진 조직에서 MYPT1과 CPI-17의 인산화 정도는 NaF를 넣지 않은 조직에 비해 증가 하였다. 그리고 NaF에 의해 증가 되어진 MYPT1과 CPI-17의 인산화 정도는 20 or 100  $\mu$ M의 글리세올린 처리에 의해 유의하게 감소하였다 (그림 13).

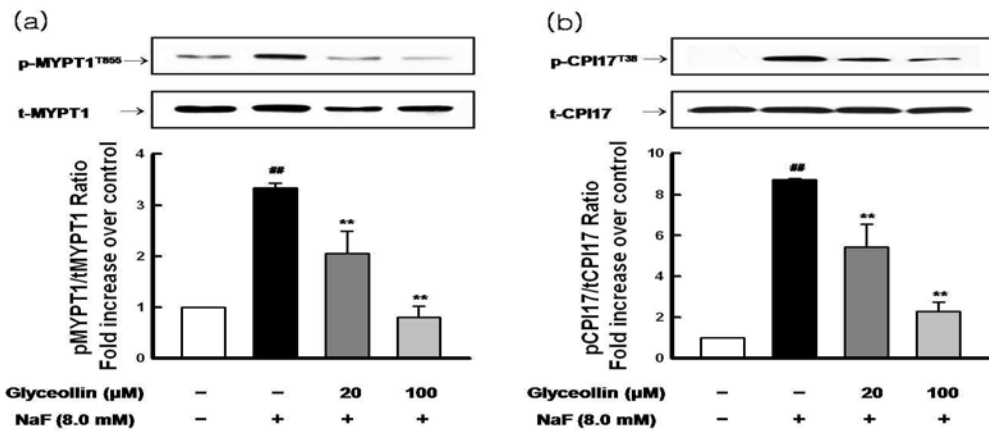


그림 13. Glyceollin I에 의한 Rho kinase 효과기 (MYPT1과 CPI-17)의 인산화 변화 측정

11) Genistein과 daidzein에 의한 MYPT1의 인산화 변화 측정

Genistein과 daidzein을 30과 100 $\mu$ M을 30분 전 처리 한 후 U46619(30 nM)와 KCl(60 mM)을 수축제로 사용하여 수축을 유도시켜 MYPT1 인산화 작용을 관찰 하였다. Genistein과 daidzein의 전 처리는 MYPT1 인산화를 유의하게 감소 시켰다. (그림 14)

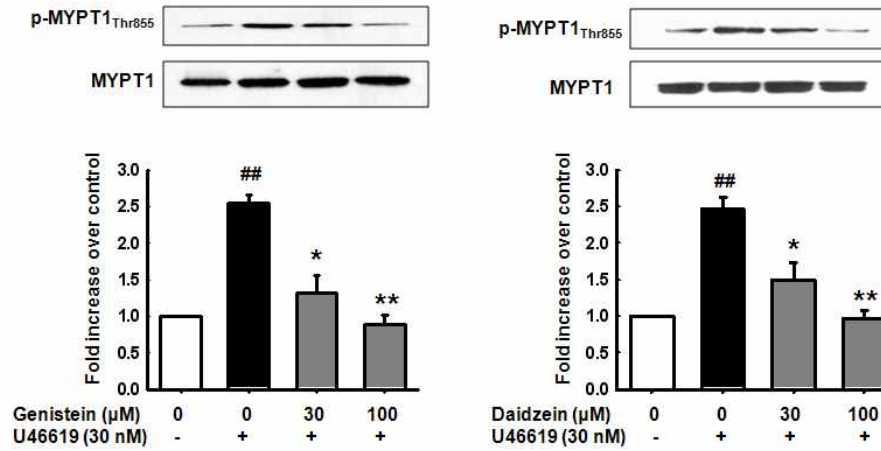
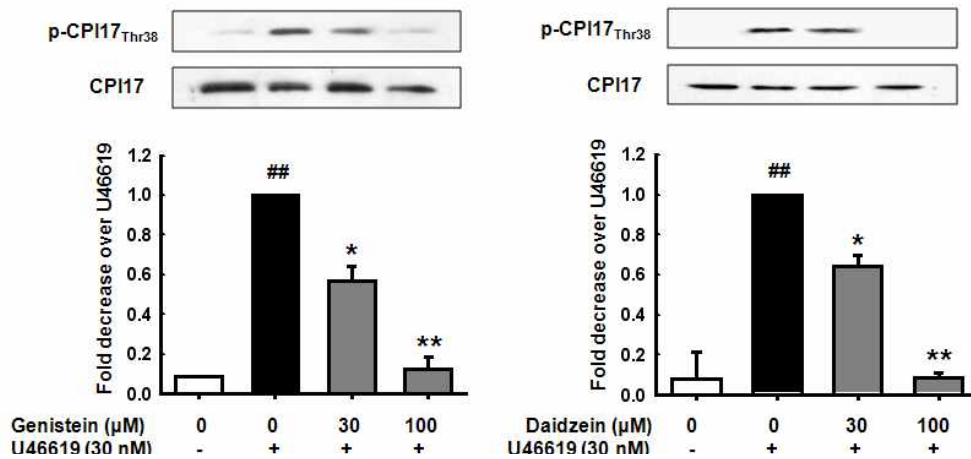


그림 14. Genistein과 daidzein에 의한 MYPT1의 인산화 변화 측정

12. Genistein과 daidzein에 의한 CPI17의 인산화 변화 측정

Genistein과 daidzein을 30과 100μM을 30분 전 처리 한 후 U46619(30 nM)와 KCl(60 mM)을 수축제로 사용하여 수축을 유도시켜 CPI17 인산화 작용을 관찰 하였다. Genistein과 daidzein의 전 처리는 CPI17 인산화를 유의하게 감소 시켰다. (그림 15)



(그림 15)



13) Glyceollin I에 의한 Rho kinase 조절기 (RhoA-GTP)의 활성 변화 측정

Rho kinase의 조절기(regulator, upstream molecule)는 RhoA 이다. RhoA의 활성화는 다양한 Rho-specific guanine nucleotide exchange factors (RhoGEFs)에 의해 일어나는데, 이 때 GDP가 GTP로 교체되면서 활성을 나타내게 된다. NaF에 의해 수축이 유도되어진 조직에서 RhoA의 활성화 정도는 NaF를 넣지 않은 조직에 비해 증가 하였다. 그리고 NaF에 의해 증가 되어진 RhoA의 활성화 정도는 20 혹은 100  $\mu$ M의 글리세올린 처리에 의해 유의하게 감소하였다. (그림 16)

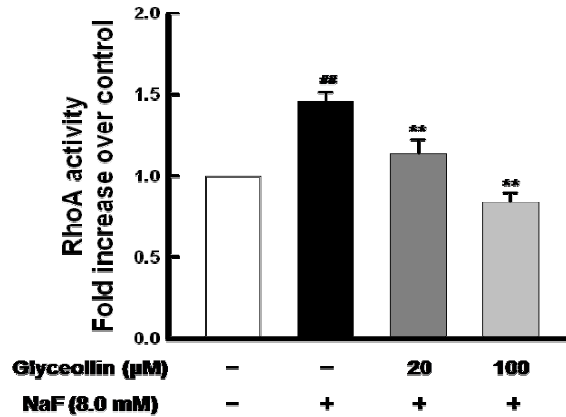


그림 16. Glyceollin I에 의한 Rho kinase 조절기 (RhoA-GTP)의 활성 변화 측정

14) Genistein과 daidzein에 의한 RhoA-GTP의 활성 변화 측정

U46619(30 nM)와 KCl(60 mM)에 의해 수축이 유도되어진 조직에서 RhoA의 활성화 정도는 수축제를 넣지 않은 조직에 비해 증가 하였다. 그리고 U46619와 KCl에 의해 증가 되어진 RhoA의 활성화 정도는 30 혹은 100  $\mu$ M의 genistein과 daidzein 처리에 의해 유의하게 감소하였다. (그림 17)

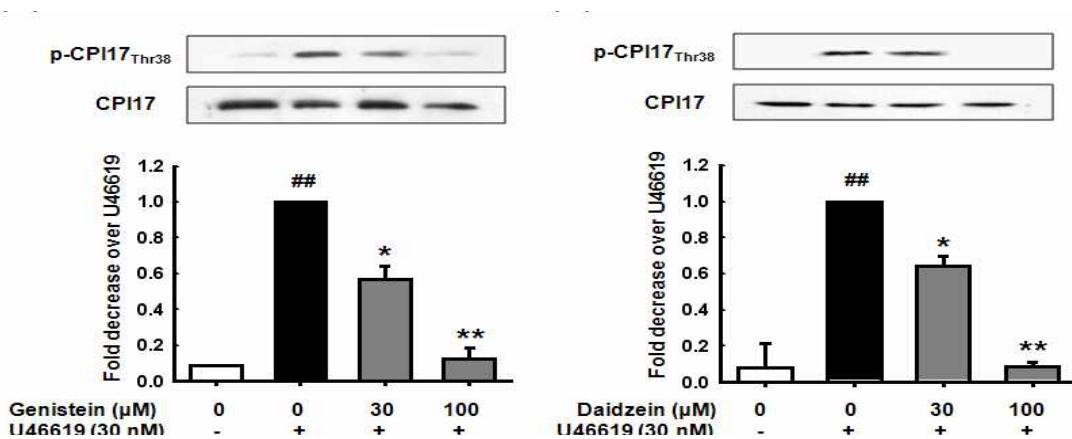


그림 17. Genistein과 daidzein에 의한 RhoA-GTP의 활성 변화 측정

## 2. 신제품 육종콩의 기능성 탐색 및 기능성분 구명

### 가. 실험방법

#### 1) 시료

본 연구에 사용된 콩(Glycine Max)은 ‘아가콩’, ‘태광콩’, ‘풍산나물콩’ 등으로 경북대학교 농학과 황영현교수 연구실에서 제공받았다.

#### 2) 시약 및 기구

세포배양과 관련된  $\alpha$ -MEM은 Gibco BRL에서 구입하였으며 trypsin-EDTA, FBS는 HyClone에서 구입하였다. DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), ABTS[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)], TPTZ(2,4,6-tripyridyl-s-triazine), Trolox, Naringin, DMSO(dimethyl sulfoxide), MTT, FAD, NADP 등의 시약은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo)에서 구입하였다. HPLC 분석에 이용한 용매는 HPLC grade를 사용하였고 추출용 용매는 특급시약을 사용하였으며 흡광도 측정을 위한 spectrophotometer는 DI Biotek의 Power Wave XS를 사용하였다.

#### 3) 추출

‘아가콩’을 환류냉각장치가 된 추출기에서 hexane으로 추출하여 탈지한 후 methanol로 추출하였다. Methanol 추출물을 극성에 따라 hexane, ethyl acetate, butanol로 분획하여 용매 분획물을 얻었고 회전감압 농축기를 이용하여 농축 후 시료로 사용하였다.

#### 4) 동물 세포주 및 배양

QR 유도 활성의 측정을 위해서 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, USA)로부터 분양 받은 hepa 1c1c7 murine hepatoma cell을 사용하였다. 세포를 10% fetal bovine serum (FBS, HyClone Laboratories, Logan, USA)을 함유하는  $\alpha$ -MEM(Gibco BRL, Invitrogen Corp., New York, USA) 배지를 사용하여 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 상태에서 배양하였다.

#### 5) Total phenol 및 flavonoid 함량

총 페놀 함량의 측정은 Folin-Denis법을 변형하여 실험하였다. (Singleton & Rossi, 1965). 96 well plate에서 시료에 0.2 N Folin-Ciocalteu's phenol reagent를 넣고 실온에서 반응시킨 후 7.5% saturated sodium carbonate를 넣고 증류수를 가하여 20분 동안 반응시킨 뒤, 반응용액을 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준품으로 gallic acid를 사용하였으며 gallic acid의 농도에 따른 O.D 값을 분산형 그래프로 나타낸 후 직선회귀 방정식을 이용하여 시료의 gallic acid equivalent concentration을 최종농도 40  $\mu$ g/ml에서 0사이의 5개 농도로 표준곡선을 얻었다. 총

플라보노이드 함량 측정은 Davis의 방법을 변형하여 사용하였다. (AOAC, 1980). 96 well plate에서 시료와 반응용액(5% NaNO<sub>2</sub>, 10% AlCl<sub>3</sub>)을 첨가하여 혼합하였다. 1N NaOH 용액을 다시 혼합한 뒤 1시간동안 실온에 둔 다음 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준품으로 Naringin을 사용하여 표준곡선을 얻었다.

#### 6) 활성 표적분리법을 이용한 활성분획물 제조 및 활성성분 분리

Hexane으로 기름 성분을 제거하고 methanol로 ‘아가콩’을 추출하여 얻어진 농축물을 분획하여 ethyl acetate, butanol층 분획물을 얻었다. Ethyl acetate 분획물에 대하여 silica gel column chromatography(c.c) (Dichloromethan:MeOH=10:1)를 실시하여, 7개의 분획물(EA1~EA7)을 얻었다. Butanol 추출물의 경우에도 EtOAc : Acetone : H<sub>2</sub>O = 1 : 1 : 0.1 용매조건에서 실시하여 6개의 분획물 (Bu1 ~ Bu6)을 얻었다. 각 분획물에 대하여 ABTS 항산화 활성과, QR 유도활성, 항암활성 등을 조사하였다. Activity-guided isolation방법에 의해 연속적으로 컬럼크로마토그래피를 수행하여 활성분획물로부터 두 개의 화합물 AgK1, AgK2를 각각 분리하였다.

#### 7) 이차대사체 HPLC 패턴 분석

Murphy 등의 방법을 변형하여 콩 2 g에 17 ml MeOH, 2 ml의 0.1N HCl을 첨가 후 실온에서 stirring하면서 추출하였다. 추출물을 여과후 30 °C 이하에서 농축하여 residue를 80% methanol(HPLC grade)에 녹여 0.45 um filter에 여과하여 분석하였다. 이소플라본의 배당체와 비배당체의 비율 및 패턴 분석을 위해 HPLC (High performance liquid chromatography)를 실시하였다. 분석을 위한 조건은 Table 1에 나타내었다.

Table 1. HPLC conditions for isoflavone analysis.

Column	Agilent Inc., ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4.6×250mm, 5μm)
Wavelength	UV-visible 254nm
Mobile phase	Water : methanol (50 : 50 V/V)
Flow rate	1.0 ml/min
Injection volume	20μl

#### 8) ABTS[2,2'-azinobis (3-thylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] assay

ABTS assay는 Rice-Evans 등(1999)의 방법을 변형하여 이용하였다. 7.4 mM ABTS와 2.45 mM K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>를 섞어 16시간 동안 냉암소에 보관하여 준비하였으며

O.D 값이  $0.7 \pm 0.02$ 에 도달하게 PBS (pH 7.4)로 희석하였다. ABTS 용액과 시료를 혼합하여 실온에서 6분간 반응 시킨 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 항산화능은 시료를 녹인 용매인 DMSO를 대조군으로 하여 대조군에 대한 라디칼 소거능을 백분율로 나타내었다.

$$\begin{aligned} & \text{ABTS radical scavenging activity (\%)} \\ & = (1 - A_{\text{test}} / A_{\text{control}}) \times 100 \end{aligned}$$

#### 9) Quinone reductase assay

QR 활성의 측정은 Prochaska와 Santamaria의 방법에 따라 실시하였다 (15). Hepa 1c1c7 세포를  $1.0 \times 10^4$  cells/mL 농도로 96 well plate에 분주하고 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>에서 24시간 배양한 다음, 새로운 배지와 함께 시료를 4개 농도로 희석하여 각 well에 넣어주었다. 48시간 추가 배양하고 배지를 제거한 후, 0.8% digitonin/2 mM EDTA (pH 7.8)을 가하여 10분 동안 37 °C에서 세포를 용해하였다. 0.5 M Tris-HCl (pH 7.4), 20 mg bovine serum albumin, 1.5% Tween-20, 7.5 mM FAD, 150 mM glucose-6-phosphate, 50 mM NADP, 60 unit glucose-6-phosphate dehydrogenase, MTT, 50 mM menadione을 혼합한 반응액을 96 well 용기에 주입하여 10분간 반응시킨 후 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 well 당 단백질 함량은 crystal violet assay를 이용하여 측정하였다. Specific activity는 살아있는 세포의 단백질 함량에 대한 QR 활성의 정도로 계산하였으며 induction ratio는 대조군에 대한 실험군의 specific activity 비율로 나타내었다.

#### 10) MTT assay

MTT assay는 Martin 등(1993)의 방법에 따라 실험하였다. 인간유래 간암세포인 HepG2와 유방암 세포인 MCF-7 세포를  $5 \times 10^4$  cell/well 농도로 96 well에 분주하고 24시간 후 새로운 배지와 시료 첨가 후 48시간 추가 배양하였다. 2 mg/ml 농도의 MTT를 처리하고 4시간 후 DMSO와 ethanol을 1:1로 녹인 용액에 녹인 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군으로 항종양제인 doxorubicin을 사용하였다.

### 나. 실험 결과

#### 1) 아가3호 활성 분획물제조

Ethyl acetate 분획물에 대하여 실리카젤 컬럼 크로마토그래피 (Dichloromethan:MeOH=10:1)를 실시하여, 2개의 활성분획물 EA3, EA7를 얻었다. Butanol 추출물의 경우에도 EtOAc : Acetone : H<sub>2</sub>O = 1 : 1 : 0.1 용매조건에서 실

리카젤 컬럼 크로마토그래피를 실시하여 6개의 분획물 (Bu1 ~ Bu6)을 얻었고 그 중 Bu3이 항산화 활성이 가장 높게 나타났다.

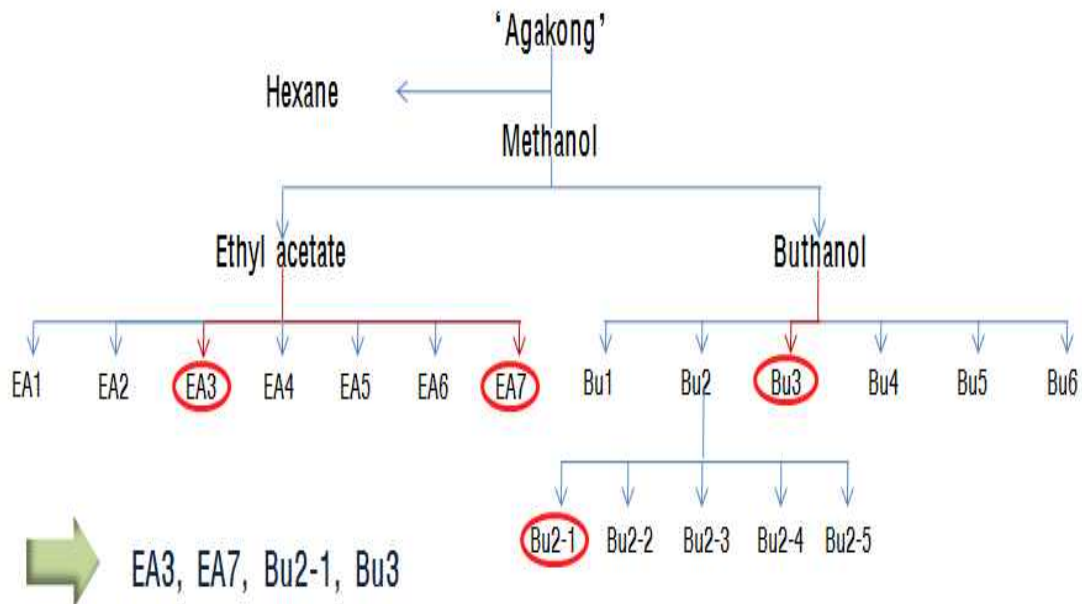


Fig 1. Preparation of active fractions from Aka bean extract.

## 2) 아가3호 분획물들의 생리활성 평가

제조된 분획물의 활성 평가 결과 4개의 활성분획물, EA3, EA7, Bu2-1, Bu-3이 우수한 활성을 보여주어 활성분획물로 선정하였다. 선정된 이들 4개의 분획물들에 대하여 다양한 생리활성을 비교, 평가한 결과는 다음과 같다.

### - 해독효소 유도활성

Quinone reductase는 phase II 무독화 효소 중의 하나로 돌연변이 또는 발암물질 등에 의한 DNA와의 상호 작용을 차단하는 효소이며, NAD(P)H를 이용하여 quinone류의 환원을 촉매하는 flavoprotein이다. '아가콩'을 추출하여 얻은 용매 분획물의 QR 유도효과에 관한 전년도 연구결과를 바탕으로 활성이 높게 나타난 ethyl acetate층과 buthanol층에 대하여 컬럼크로마토그래피를 수행하여 활성분획물을 얻었다.

활성분획물의 해독 효소 유도능은 EA3이 20ug/ml 농도에서 2배 이상의 유도율을 나타내었고 Bu2-1에서 1.76배를 유도하였다.

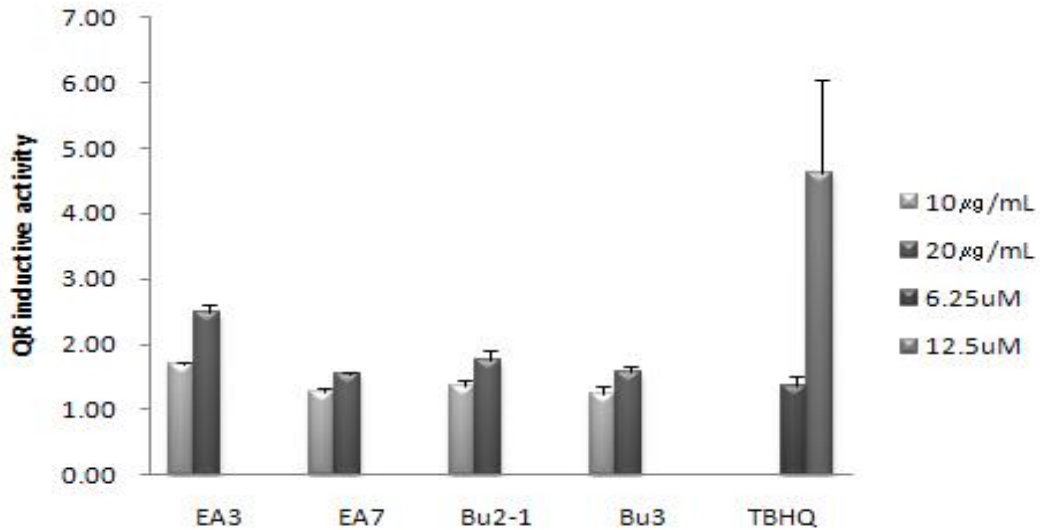


Fig 2. QR inductive activity of active fractions of 'Agakong'.

- 항암 활성

활성이 높은 분획물 EA3, EA7, Bu2-1, Bu3의 세포독성 효과를 확인하였다.

인간 유래 간암 세포인 HepG2에 각각의 활성 분획물을 처리하였을 때 나타난 세포독성의 결과는 Table 2와 같다.

Table 2. Cytotoxicity of active fraction by MTT assay (HepG2)

	EA3	EA7	Bu3	Bu2-1
200ug/ml	21.33 ± 5.59	7.15 ± 12.65	-1.19 ± 7.02	9.23 ± 3.08

네 개의 활성 분획물 중 EA3이 200 ug/ml 농도에서 유의하게 독성이 나타났고 세포의 형태학적인 변화에서도 두드러지는 변화를 보였다(Fig. 3). HepG2는 부착세포로 아무것도 처리하지 않은 대조군의 경우 돌기가 잘 발달하여 별 모양의 특징적인 모습을 보인다. 그러나 세포독성을 유도하는 양성대조군으로 doxorubicin을 처리하면 세포는 본래의 모습을 잃어버리고 거의 사멸하게 된다. 활성분획물 EA3번의 경우 doxorubicin과 가장 비슷한 정도로 세포가 사멸되는 것을 보여주었다.

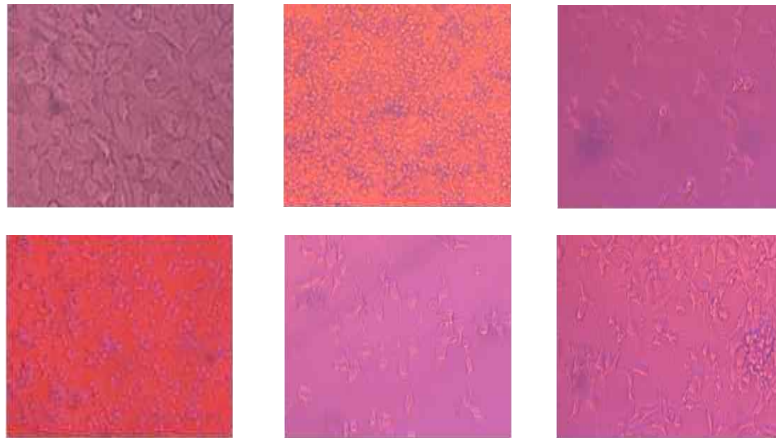


Fig 3. Morphology of human liver cancer cell HepG2 by treated active fractions. (A:control, B:doxorubicin 2.5ug/ml, C:EA3 200ug/ml, D:EA7 200ug/ml, E:Bu2-1 200ug/ml, F:Bu3 200ug/ml)

인간 유래 유방암 세포인 MCF-7에 각각의 활성 분획물을 처리하였을 때 나타난 세포독성의 결과를 Table 3에 나타내었다. MCF-7에서도 EA3이 세포의 형태학적인 면에서 원래의 모양과 다르게 나타났다. 그러나 억제율은 EA7번이 가장 높게 나타났고 Bu3도 33%로 측정되어 간암세포와는 차이점을 보여주었다. (Fig. 4)

Table 3. Cytotoxicity of active fraction by MTT assay (MCF-7)

	EA3	EA7	Bu3	Bu2-1
200ug/ml	23.41 ± 3.37	38.66 ± 2.81	33.87 ± 2.53	24.06 ± 2.71

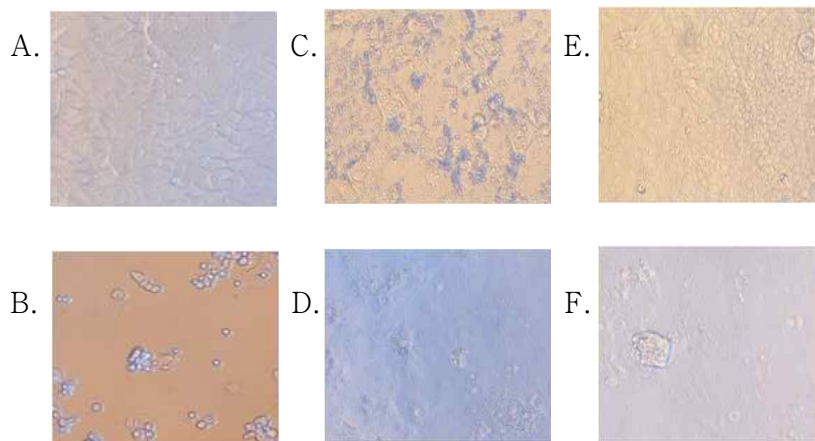


Fig 4. Morphology of human breast cancer cell MCF-7 by treated active fractions. (A:control, B:doxorubicin 2.5ug/ml, C:EA3 200ug/ml, D:EA7 200ug/ml, E:Bu2-1 200ug/ml, F:Bu3 200ug/ml)

- 항산화 활성

'아가콩' 용매 분획물 및 활성 분획물의 항산화 활성을 ABTS radical 소거능으로 측정된 결과는 다음과 같다(Fig. 5). 용매 분획층 중 ethyl acetate층과 butanol층이 80% 이상 소거하였고 활성 분획층에서는 Bu2-1을 제외한 모든 분획층에서 높은 항산화능을 보여주었다.

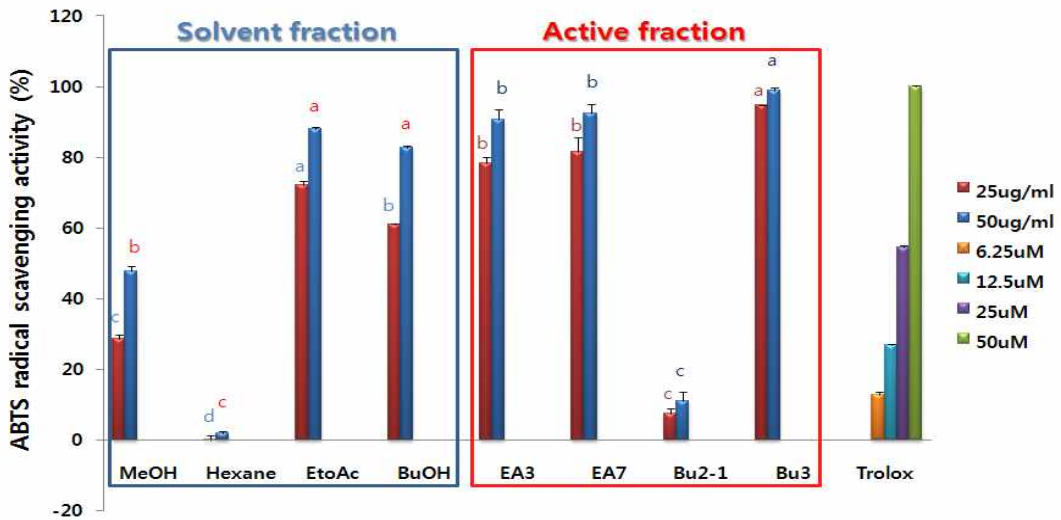


Fig 5. Antioxidant effect by ABTS radical scavenging activity of solvent fractions and active fractions of 'Agakong'.

3) 활성분획물의 기능성분 분석

Table 4는 용매 분획층의 총 페놀, 플라보노이드 함량을 측정된 결과를 나타낸 것으로 해독효소 유도 활성 및 ABTS 라디칼 소거능과 마찬가지로 ethyl acetate층에서 높게 나타나 ethyl acetate층으로 항산화능을 가지는 페놀성 물질이 이행됨을 보여주었다.

Table 4. Contents of total phenol, flavonoid of solvent fractions of 'Agakong'.

	MeOH	Hexane	EtoAc	BuOH
Total phenol contents. (mg%)	4.57	1.55	10.80	6.27
Total flavonoid contents. (mg%)	5.00	4.67	5.87	4.90



#### 4) 항산화 활성성분 분리

활성 분획물 EA3, EA7, Bu3번에 대하여 활성물질을 규명하기 위하여 컬럼크로마토그래피를 수행하였다. 항산화 활성이 높은 EA3(107mg), EA7(6.2g)을 silica gel c.c, PTLC 등으로 분리하여 isoflavone aglycone과 compound1, compound2를 얻었다. Butanol 45.3g 분획물을 silica gel 컬럼크로마토그래피를 실시해 그 중 Bu3번이 항산화 활성이 높게 나타났다. Activity-guided isolation 방법에 의해 분리된 활성 물질 EA7과 Bu3을 coTLC 한 결과 같은 성분임을 확인하고 합쳐서 재결정을 시행하여 침상 결정 AgK1과 AgK2를 얻었다.

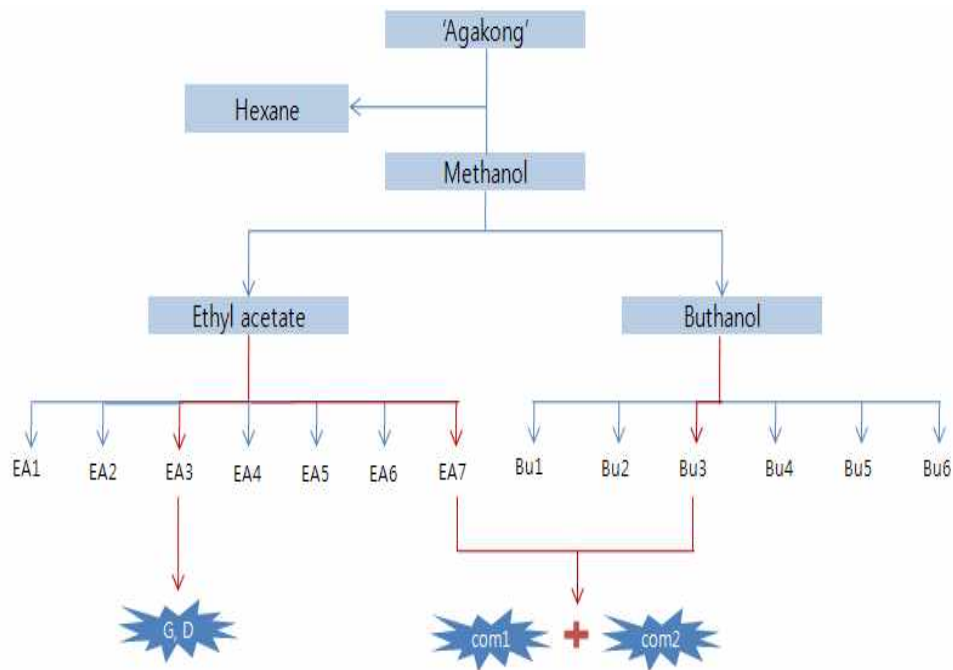


Fig 6. Isolation of active compounds from Aga bean.

#### 5) 활성물질 구조동정

항산화 활성이 높은 EA3을 silica gel c.c, PTLC 등으로 분리하여 isoflavone aglycone을 얻었다. 또한 EA7과 Bu3을 co-TLC 한 결과 같은 성분임을 확인하고 합쳐서 재결정을 시행하여 침상 결정 AgK1과 AgK2를 얻었다. 분리된 활성 물질의 구조를 동정하기 위해 FAB-MS를 측정하여 분자량을 확인하고  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ 을 실시하여 구조를 확인하였다.

#### AgK1

$^1\text{H-NMR}$  (400MHz, DMSO- $d_6$ ) :  $\delta$  8.48(s, H-2), 6.53(d,  $J=2.5\text{Hz}$ , H-6), 6.78(d,

$J=2.5\text{Hz}$ , H-8), 13.00(br, OH), 7.45(d,  $J=8\text{Hz}$ , H-2' and H-6'), 6.88(d,  $J=8\text{Hz}$ , H-3' and H-5'), 9.71(br, OH), 3.22-4.71 ppm(protons of the sugar moiety).

$^{13}\text{C}$ -NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ ) :  $\delta$  60.97(C-6''), 69.94(C-4''), 73.43(C-2''), 76.75(C-3''), 77.53(C-5''), 94.89(C-8), 99.94(C-6), 100.19(C-1''), 106.45(C-10), 115.41(C-3' and C-5'), 121.86(C-1'), 122.92(C-3), 130.55(C-2' and C-6'), 154.96(C-2), 157.58(C-9), 157.85(C-4'), 161.99(C-5), 163.36(C-7), 180.88(C-4).

FAB-MS : m/z 431.

#### AgK2

$^1\text{H}$ -NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ ) :  $\delta$  8.40(s, H-2), 8.05(d,  $J=8\text{Hz}$  H-5), 7.15(dd,  $J=2.5\text{Hz}$ , H-6), 7.24(d,  $J=2.5\text{Hz}$ , H-8), 7.41(d,  $J=8\text{Hz}$ , H-2' and H-6'), 6.82(d,  $J=8\text{Hz}$ , H-3' and H-5'), 3.16-4.03 ppm(protons of the sugar moiety).

FAB-MS : m/z 431.

항산화능이 높게 나타난 활성 분획물 EA3, EA7, Bu3번을 분리하여 EA3의 major compound는 genistein, daidzein임을 확인하였고, EA7과 Bu3은 co-TLC 한 결과 major 물질이 같은 물질인 것으로 밝혀져 함께 분리하여 AgK1, AgK2를 얻었다. 두 compound의 구조를 동정하기 위해 FAB-MS,  $^1\text{H}$ -NMR,  $^{13}\text{C}$ -NMR을 시행하였다. AgK1의 FAB-MS 결과 분자량은 431로 측정되었고 Fig 10에  $^1\text{H}$ -NMR,  $^{13}\text{C}$ -NMR의 스펙트럼을 나타내었다.  $^1\text{H}$ -NMR에서 나타난 바와 같이 13.00ppm은 flavonoid A, C ring의 5번 탄소에 위치한 OH기의 값을 의미하며 3.22-4.71ppm은 glucose의 moiety를 나타낸다. AgK2는 flavonoid A, C ring의 5번 탄소에 OH기가 존재하지 않는 차이점을 보여주었다. 따라서 spectral data의 해석 및 문헌조사 결과 AgK1은 genistin으로 AgK2는 daidzin으로 확인되었다(Kudou et al 1991).

#### \* AgK1

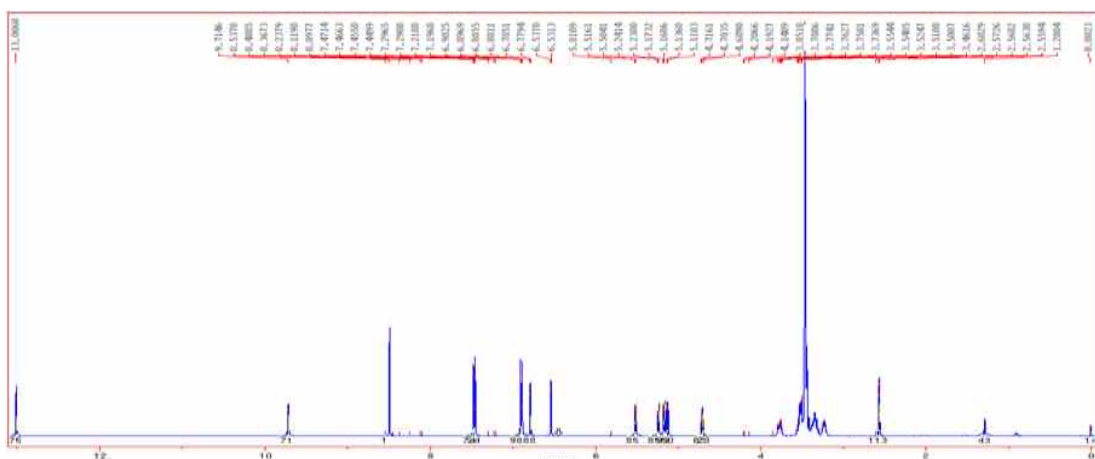


Fig 7.  $^1\text{H}$ -NMR data of AgK1.

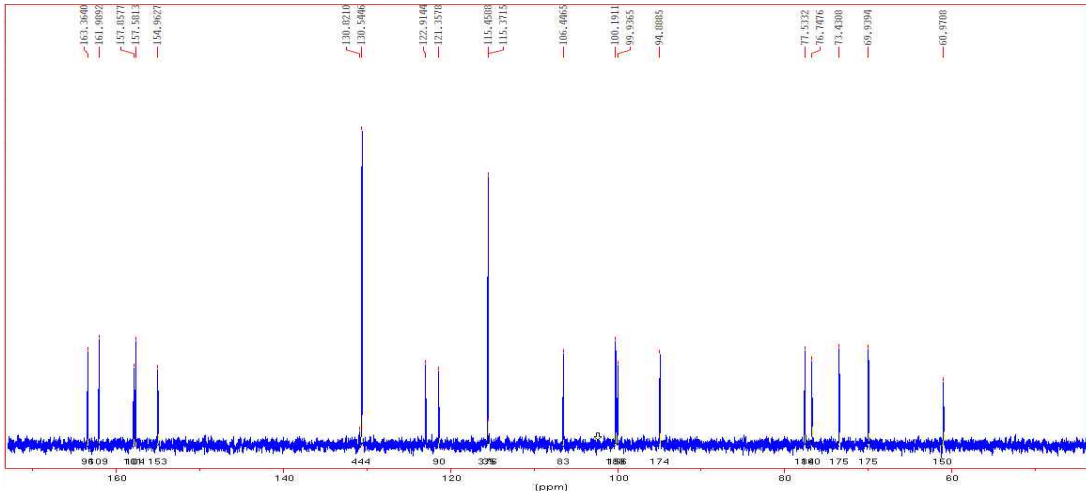


Fig 8.  $^{13}\text{C}$ -NMR data of AgK1.

\* AgK2

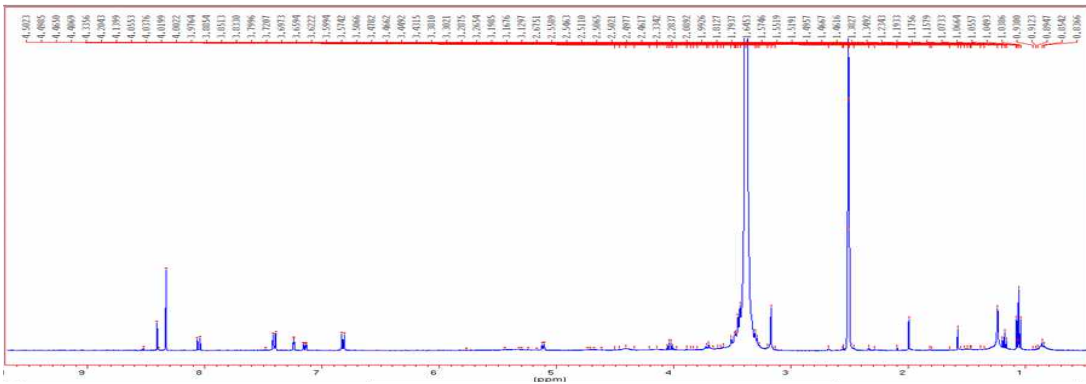


Fig 9.  $^1\text{H}$ -NMR data of AgK2

### 6) 활성분획물의 synergy effect

Moon(19) 등은 콩의 항산화 효과를 측정하는데 적합한 실험방법을 알아보기 위해 DPPH법, FRAP법, ABTS법을 이용하여 콩의 항산화 원인물질을 표준물질을 이용하여 측정한 결과 ABTS법이 콩의 주요성분인 isoflavone과 대부분의 phenolic acids의 활성을 평가할 수 있어 콩의 항산화 효과 측정에 가장 적합한 방법이라고 보고하였다.

앞에서 밝혀진 AgK1, AgK2가 각각 genistin, daidzin임을 확인하고 이들의 시너지 효과를 확인하였다. genistin과 daidzin은 각각의 아글리콘인 genistein과 daidzein이 당과 결합한 형태이다. 일반적으로 배당체보다 당이 떨어진 아글리콘의 활성이 높다고 알려져 있다. 이 실험에서도 배당체보다는 aglycone의 항산화능이 높게 나타나 다른 실험결과들과 일치했다. 그러나 두 배당체를 1:1로 혼합하여 비교

해 보니 배당체 각각으로 존재할 때보다 혼합된 상태에서 항산화능이 높게 나타나 aglycone의 라디칼 소거능과 비슷한 수준으로 나타났다. 따라서 이소플라본의 배당체의 경우 순수한 compound 수준보다 활성이 있는 분획물을 이용하는 것이 높은 항산화를 기대할 수 있다는 것을 보여주었다.

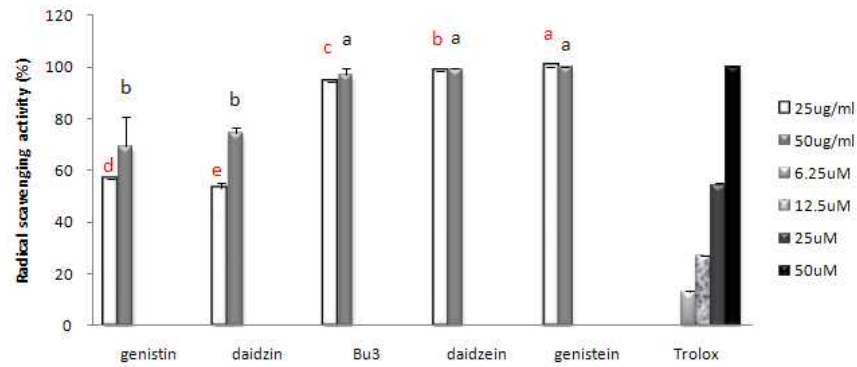


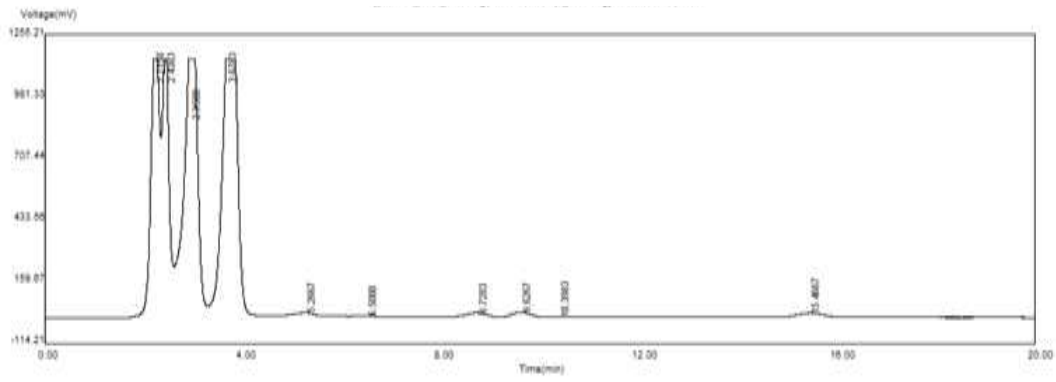
Fig 10. Antioxidant effects of active fractions and isoflavone by ABTS assay.

#### 7) HPLC 패턴 분석

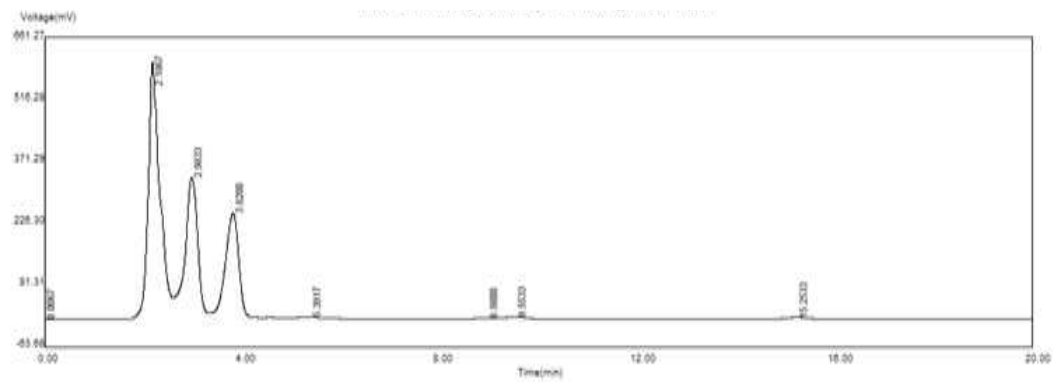
이소플라본의 배당체와 비배당체의 비율 및 패턴 분석을 위해 HPLC를 실시하였다. 분석을 위한 조건은 Table 1에 나타내었다.

아가콩, 태광콩, 풍산나물콩 추출물의 패턴분석을 실시하였다. 크로마토그램상에서 daidzein, genistein의 함량이 태광콩, 풍산나물콩보다 아가콩에 유의하게 높게 나옴을 확인할 수 있었다. 9분, 14분대에 나타나는 것이 각각 daidzein, genistein의 배당체인 genistin과 daidzine의 피크로 태광콩, 풍산나물콩보다 아가콩에서 함량이 높게 나왔다. 이상의 패턴분석 결과 아가콩에는 이소플라본 배당체 뿐만 아니라 비배당체의 함량 또한 높음을 알 수 있었다. 아가콩에는 또한 다른 콩에서 나타나지 않는 피크도 관찰되어 미량으로 존재하는 기지물질이 다른 콩보다 함량이 많거나 다른 콩에는 존재하지 않는 아직 보고되지 않은 물질도 존재할 가능성이 있음을 확인할 수 있었다.

A.



B.



C.

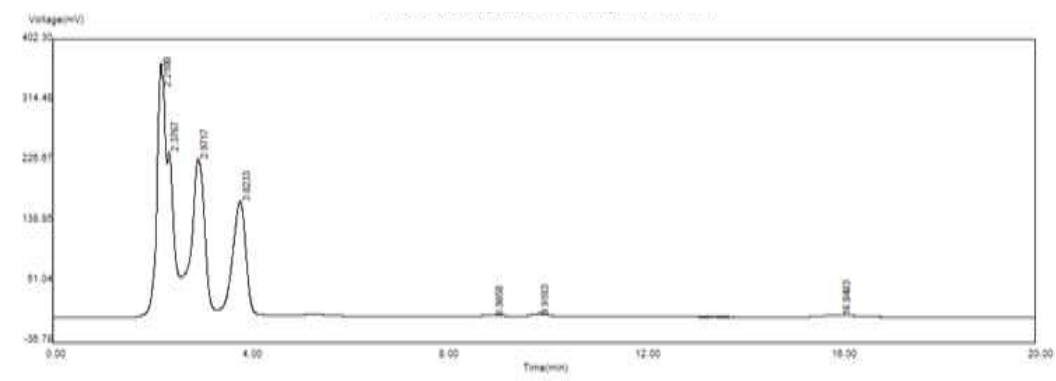


Fig 11. HPLC Chromatogram of soybean (A : 아가콩, B : 태광콩, C : 풍산나물콩)

### 3. 육성품종 콩을 이용한 기능성 청국장의 개발

#### 가. 연구방법

##### 1) 콩 시료추출물의 제조

4가지 콩 품종 (대망2호, 일품검정, 아가, 검정아가)을 실온에서 18시간 수침한 후, 121°C에서 20분간 증자하고 동결건조하여, 60 mesh 이하로 분쇄하였다. 분쇄시료에 메탄올을 10배 넣고 실온에서 12시간 교반하면서 추출하였다. 회전식 증발농축기에서 용매를 증발시키고, 메탄올:DMSO:DW=4:4:2의 용액에 녹여, 항산화활성 측정용 시료로 사용하였다.

##### 2) 청국장제조 및 시료추출물의 제조

4가지 콩 품종 (태광, 일품검정1호, 아가 3호, 아가4호)을 실온에서 18시간 수침한 후, 121°C에서 60분간 가압 증자하였다. 증자콩을 50°C까지 냉각시키고, 42°C로 유지되는 인큐베이터에 넣고, 48시간 발효하면서 시간별로 시료를 채취하여 동결건조하여 분석용 시료로 사용하였다. 동결건조하여, 60 mesh 이하로 분쇄하였다. 분쇄시료에 메탄올 (또는 70% acetone)을 10배 넣고 실온에서 12시간 교반하면서 추출하였다. 회전식 증발농축기에서 용매를 증발시키고, 메탄올:DMSO:DW=4:4:2의 용액에 녹여, 항산화활성 측정용 시료로 사용하였다.

##### 3) DPPH 방법에 의한 항산화활성 평가

시료추출물의 항산화활성은 Hantano (1988)등의 방법에 따라, DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl( $\alpha,\alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl) 방법으로 평가하였다. DPPH는 안정한 free radical로서 짙은 보라색을 띄어 에탄올 용액의 경우 520 nm에서 최대흡광도를 보인다. DPPH 용액이 수소원자를 공여하는 물질과 함께 존재하면, 환원형으로 전환되면서 용액의 색깔이 짙은 보라색이 소멸되는 원리를 이용한다. 시료의 항산화활성은 다음 계산식으로 산출하였다.

$$\% \text{ DPPH scavenging} = [(OD_{\text{control}} - OD_{\text{sample}})/OD_{\text{control}}] \times 100\%$$

##### 4) 2-DCFDA를 이용한 항산화활성 평가

인위적으로 생성이 유도된 peroxy radical의 소거능을 평가하기 위하여, DCFDA (dichlorofluorescein-diacetate)시약을 이용한 Wang 과 Joseph의 방법을 이용하였다.

즉, HT29 대장암세포를 96-well plate에 접종하고, 24시간 동안 배양하여 세포를 washing 한 후, 50  $\mu$ M DCFDA를 넣고, 30분간 배양하고, 100  $\mu$ M 과산화수소 (in

PBS)에서 40분간 반응시켰다. 형광광도 (FI)의 증가는 fluorescent microplate reader를 이용 0, 40 분에 측정하였다. 항산화활성은  $(F_{40min} - F_{0min})/F_{0min} \times 100$  계산식을 적용하여 산출하였다.

#### 5) 총 페놀 함량 측정

시료중의 총 페놀함량은 Folin-Ciocalteu방법 (Slinkard and Singleton 1977)으로 측정하였다. Folin-Ciocalteu assay (FC assay)는 총 페놀성 함량을 측정하도록 고안된 오래된 방법들 중에 하나이다. 이 방법은 알카리 용액 (5~10% soluble sodium carbonate)에서 tungstate와 molybdate의 혼합물을 이용하는 것으로 phenolic compound는 산화되어  $\cdot O_2^-$ 를 형성하여 molybdate와 반응하여 molybdenum oxide( $MoO_4^{4-}$ )을 형성하는데 이 물질은 750nm에서 강한 흡수를 보인다. 일반적으로 FC assay에 의해 측정된 총 페놀 함량은 gallic acid equivalents로 표현한다.

96-well plate에 시료와 반응시약을 넣고 5분간 반응시킨 후, 655 nm에서 흡광도를 측정하여 gallic acid 표준곡선에서 단위 시료무게당 페놀함량을 산출한다.

#### 6) Isoflavones 분석

시료중의 isoflavones 분석은 Murphy등의 방법 (1997)에 따라 수행하였다. 표준품은 malonyl-genistin, malonyl-daidzin, malonyl-glycitin, acetyl-genistin, acetyl-daidzin, acetyl-glycitin, genistein, daidzein, glycitein등 12가지를 사용하였으며, 분석용 컬럼으로 Gemini C18 (Phenomenex)를 사용하였다. HPLC에서 isoflavone 대사체의 분리하기 위한 용매로 0.1 mM 인산용액과 acetonitrile 두 종류를 gradient 로 사용하였다.

#### 7) 동물실험

##### 7-1) Fe-NTA로 유도된 신장독성에 대한 콩 함유 식이의 방어활성

6주령의 수컷 ICR 마우스 70마리를 샘타코(주)에서 구입하여 group당 10마리씩, 7개 군으로 나누었다. 사육실의 표준환경 ( $22 \pm 1^\circ C$ ,  $50 \pm 10\%$  습도, 08:00 - 19:00 light cycle)에서 2~3일간 일반 Chow를 급여하였으며, 이후 7일간 시험 식이를 제공하였다. 시험식이의 조성은 Table 1과 같으며, 콩 시료의 일반조성을 분석하여 주요성분을 보정하였다. 실험시작 7일째 산화적 스트레스를 가하기 위하여 신장 특이적 산화제인 Iron-Nitritotriacetate (Fe-NTA)를 주사하고 (Fe로서 9 mg), 15일째 마우스를 희생시켜 장기를 적출하고, 분석에 사용하였다 (Ueno *et al.* 2007).

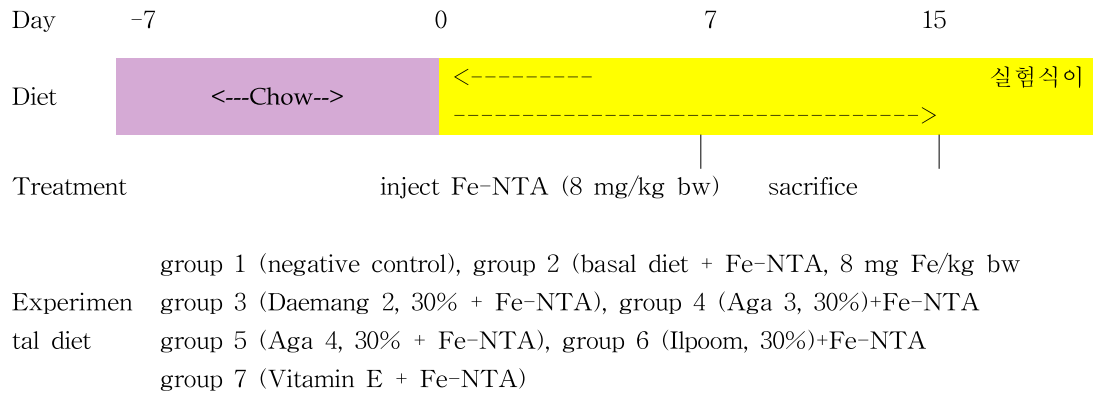


Figure 1. Experimental design for evaluating the preventive effect of soy-containing diets against Fe-NTA-induced nephrotoxicity.

Table 1. Diet composition for the study of evaluating the preventive effect of soy-containing diets against Fe-NTA-induced nephrotoxicity

Ingredient (g/Kg)	Basal diet		Soybean diet (30%)			Vitamin E
	control	대망2호	일품검정	아가	아가검정	
sucrose	500	500	500	500	500	500
casein	200	96.8	120.5	54	95.3	200
soy oil	50	7.2	6	9.2	11.4	50
cellulose	50	50	50	50	50	50
Corn starch	150	65.2	32.5	40.3	60.4	150
soy powder	0	300	300	300	300	0
Mineral mix	35	35	35	35	35	35
Vitamin mix	10	10	10	10	10	10
DL-Methionine	3	3	3	3	3	3
Choline Bitartrate	2	2	2	2	2	2
vitamin E	0	0	0	0	0	1.334
Total	1000	1008.4	1006.6	1006	1005.8	1001.334



7-2) 사염화탄소 유도된 간독성에 대한 청국장 함유 식이의 방어활성

6주령의 수컷 ICR 마우스 70마리를 대한바이오링크에서 구입하여 group당 10마리씩, 7개 군으로 나누었다. 사육실의 표준 환경 (22±1°C, 50±10% 습도, 08:00 - 19:00 light cycle)에서 2~3일간 일반 Chow를 급여하였으며, 이후 7일간 시험 식이를 제공하였다. 시험식이의 조성은 Table 2와 같으며, 청국장 시료의 일반조성을 분석하여 주요성분을 보정하였다. 실험시작 7일째 산화적 스트레스를 가하기 위하여 간 특이적 산화제인 carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>)를 복강주사하고 (0.8 mL/kg 체중), 14일째 마우스를 희생시켜 장기를 적출하고, 분석에 사용하였다 (Ueno et al. 2007).

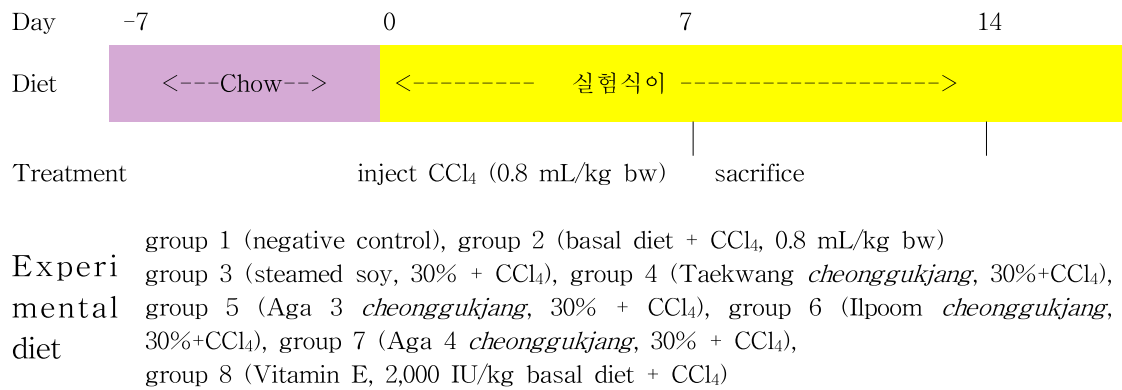


Figure 2. Experimental design for evaluating the preventive effect of soy-containing diets against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity.

Table 2. Diet composition for the study of evaluating the preventive effect of soy-containing diets against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity

식이 원료 (g/Kg)	대조군	청국장 식이 (30%)				비타민 E
		태광	일품검정	아가3호	아가4호	
sucrose	500	500	500	500	500	500
casein	200	96.8	120.5	54	95.3	200
soy oil	50	7.2	6	9.2	11.4	50
cellulose	50	50	50	50	50	50
Corn starch	150	65.2	32.5	40.3	60.4	150
cheonggukjang powder	0	300	300	300	300	0
Mineral mix	35	35	35	35	35	35
Vitamin mix	10	10	10	10	10	10
DL-Methionine	3	3	3	3	3	3
Choline Bitartrate	2	2	2	2	2	2
vitamin E	0	0	0	0	0	1.334
Total	1000	1008.4	1006.6	1006	1005.8	1001.334

나. 연구결과

1) 콩의 일반성분 및 isoflavones 함량

본 실험에 사용한 콩을 수침, 증자를 거친 후 동결건조하여 제조한 실험용 콩 분말의 일반영양성분은 표 2과 같다. 콩의 평균 조성과 비교하여 지방과 단백질 함량이 약간 낮은 것으로 나타났고, 회분이 높게 나타났다.

콩 품종별 isoflavones 함량은 표 3과 같이, 아가콩이 13,371 mg/kg, 아가검정이 8219, 대망2호와 일품검정이 각각 4,641, 5352 mg/kg으로 나타났다.

Table 3. Proximate composition of soybean varieties used in the study (%)

Variety	Aga 3	Aga 4	Daemang 2	Ilpoom Black
Property	high isoflavones low anthocyanins	medium-isoflavones high anthocyanins	low isoflavones low anthocyanins	low isoflavones high anthocyanins
Moisture	2.04	1.86	1.99	2.22
Sugars	36.57	29.86	32.6	39.14
Lipid	13.62	12.83	14.27	14.64
Protein	32	34.9	34.38	26.5
Ash	12.27	17.05	13.26	14

Table 4. Isoflavone composition of soybean varieties used in the study (%)

Isoflavones	Aga 3	Aga 4	Daemang 2	Ilpoom Black
daidzin	1383	746	532	335
glycitin	219	256	53	47
genistin	1817	1229	846	1125
M-daidzin	4466	3043	1726	1431
M-glycitin	561	367	157	150
M-genistin	1504	44	0	0
A-daidzin	167	82	67	24
A-glycitin	1204	808	402	704
A-genistin	56	38	25	33
Total glycosides	11376	6614	3784	3850
daidzein	1834	1508	788	1353
glycitein	62	38	11	23
genistein	98	59	58	125
Total aglycones	1995	1605	857	1502
Total isoflavones	13371	8219	4641	5352

Table 5. Proximate composition of cheonggukjang prepared with various varieties of soybean

(%)	Taekwang	Ilpoom black	Aga 3	Aga 4
Moisture	1.99	2.22	2.04	1.86
Ash	13.26	14.00	12.27	17.05
Fat	14.27	14.64	13.62	12.83
Crude protein	34.38	26.50	32.00	34.90
Crude fiber	3.50	3.50	3.50	3.50
NFE*	32.60	39.14	36.57	29.86

\*NFE represents nitrogen free extract.

### 2) 콩 추출물의 *in vitro* 항산화 활성

콩추출물의 항산화활성을 DPPH 방법으로 살펴본 결과, 그림 2와 같이, 일품검정, 아가검정콩의 활성이 높은 것으로 나타났다. 본 연구에 사용한 시료콩의 100% 메탄올 추출물의 총 페놀농도는 그림 3과 같다. 총페놀함량은 아가3호 가 가장 높았으며, 일품검정, 아가4호, 대망2호 순으로 나타났다.

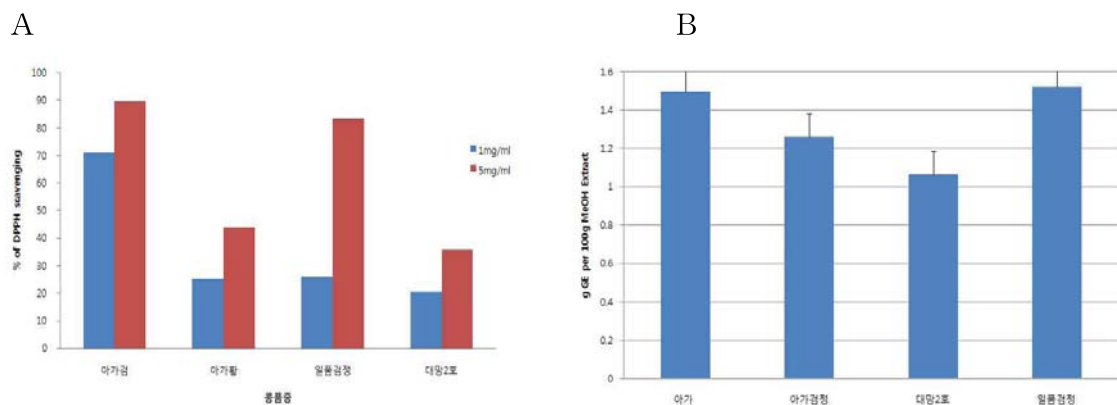


Figure 3. DPPH radical scavenging activity (A) and total phenolic contents (B) of methanolic extracts from different varieties of soybean.

### 3) 청국장 추출물의 항산화 활성

각 콩 품종별 청국장 10 g을 50 mL의 70% 아세톤 용액에 초음파 추출을 20분 동안 한 후 여과하여 DPPH 활성을 측정하였다. 활성은 안토시아닌 함유된 검정콩류로 만든 일품검정1호와 아가4호 청국장 추출물에서 높게 나타났고, 삶은 콩과 이소플라본이 함유된 노랑콩류로 만든 태광 품종과 아가3호 청국장 추출물의 활성은 상대적으로 낮았다. 또한 청국장의 항산화성분 함량 지표의 하나인 총페놀 함량을

측정한 결과는 그림 5와 같다. 즉, 70% 아세톤을 이용하여 추출한 콩 품종별 청국장  
 장의 총 페놀함량 분석결과, 일품 검정1호로 만든 청국장 추출물이 15.81 mg/mL로  
 가장 높은 함량을 보였고, 아가 4호, 아가 3호, 태광으로 만든 청국장 추출물순으로  
 페놀 함량이 높았다.

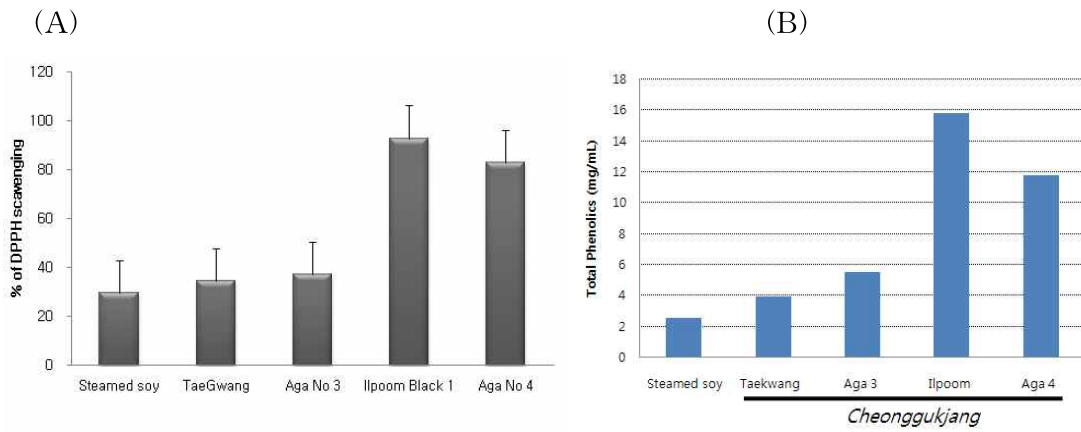


Figure 4. DPPH radical scavenging activity (A) and total phenolic contents (B) of methanolic extracts from cheonggukjang prepared with different varieties of soybean.

한편, 마우스 간암세포에 과산화수소로 산화적 스트레스를 유도한 후 콩 품종별 청국장 메탄올 추출물을 농도별로 처리하여 DCFDA 분석법으로 항산화 활성을 측정하였다. BPRc1 세포에서는 삶은 콩과 태광, 아가3호로 만든 청국장 추출물에서 농도의존적으로 항산화 활성을 보였고 Hepal1c7 세포에서는 아가 3호로 만든 청국장 추출물에서 농도 의존적인 활성을 보였고 다른 콩 품종 청국장의 추출물을 처리한 군에서는 일관성이 없었다.

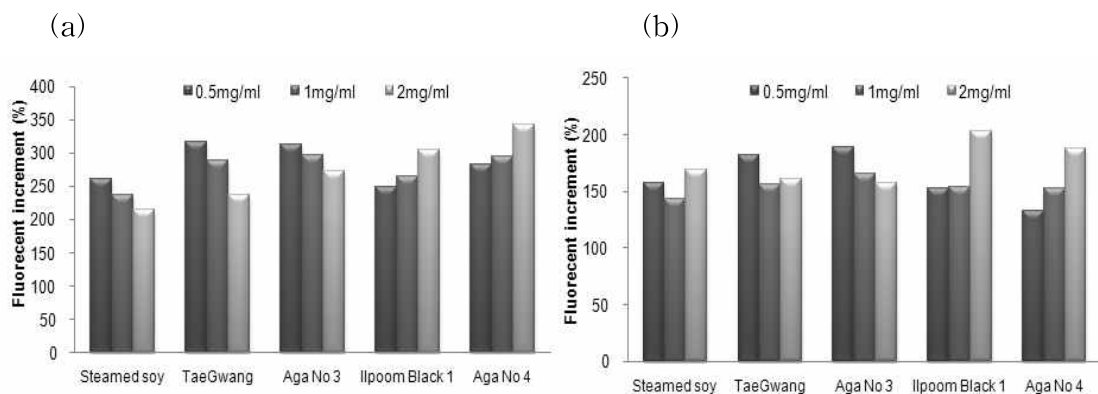


Figure 5. Antioxidant activities of methanolic extracts of *cheonggukjang* prepared with different varieties of soybean as assessed by DCFDA assay. (a) BPRc1 (b) Hepal1c7 mouse hepatoma cancer cells.

4) 콩 섭취가 Fe-NTA 유도된 신장독성에 미치는 영향

가) 콩 섭취에 의한 Fe-NTA 유도된 사망 억제 효과

마우스의 식이에 콩 분말을 30% 함유하도록 하고, 이를 섭취시키면서 신장에 선택적으로 산화적 스트레스를 통하여 독성을 발휘하는 Fe-NTA를 처리하였을 때, 동물의 치사율은 표 6과 같다. 일품검정콩이 치사율을 가장 많이 낮추는 것으로 나타났다으며, 다음으로 아가검정콩이 효과적이었다.

Table 6. Death rate of mice injected with Fe-NTA and fed diets with different varieties of soybean

Experimental Group		Deaths
Group 1	Control	0/10
Group 2	Fe-NTA	5/10
Group 3	Daemang 2 + Fe-NTA	5/10
Group 4	Aga 3 + Fe-NTA	5/10
Group 5	Aga 4 + Fe-NTA	3/10
Group 6	Ilpoom Black + Fe-NTA	1/10
Group 7	Vitamin E + Fe-NTA	4/10

나) Fe-NTA 처리한 마우스에서 콩의 섭취가 체중에 미치는 영향

마우스의 식이에 콩분말을 30% 함유하도록 하고, 이를 섭취시키면서 신장에 선택적으로 산화적스트레스를 통하여 독성을 발휘하는 Fe-NTA를 처리하였을 때, 생존한 마우스의 체중 변화는 사용한 시료종류별로 그림 6과 같다. 비타민 E함유군을 제외한 모든 처리군이 체중이 감소하는 것으로 나타났다.

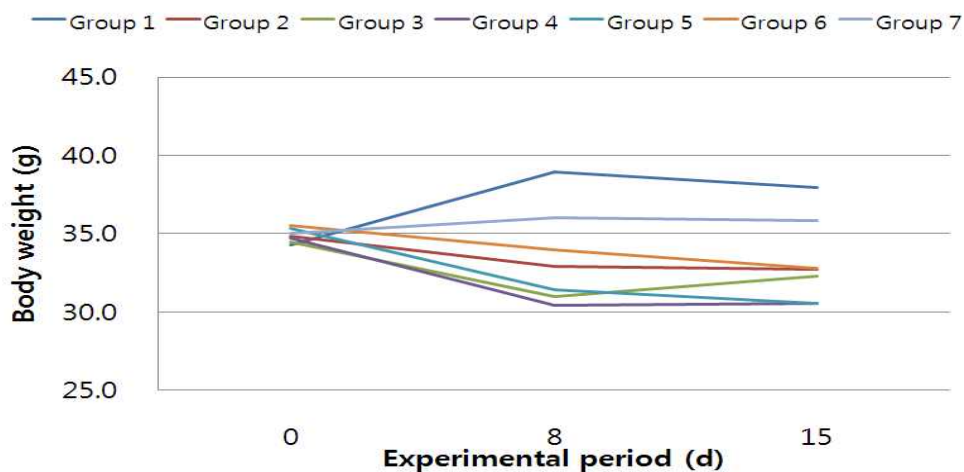


Figure 6. Change in body weight of mice fed different kinds of diets with injection of Fe-NTA.

다) Fe-NTA 처리한 쥐에서 콩의 섭취가 장기무게에 미치는 영향

마우스의 식이에 콩분말을 30% 함유하도록 하고, 이를 섭취시키면서 신장에 선택적으로 산화적스트레스를 통하여 독성을 발휘하는 Fe-NTA를 처리하였을 때, 생존한 마우스의 장기무게 변화는 그림 7과 같다.

간의 무게는 아가콩, 아가검정콩, 일품검정콩 함유식이를 섭취시킨 군이 대조군에 비하여 유의적으로 적게 나타났다. 한편 Fe-NTA만을 처리한 양성대조군의 간 무게는 음성대조군과 차이가 없는 것으로 나타났다. 위와 폐의 무게는 실험군간 유의적인 차이가 관찰되지 않았다.

신장은 Fe-NTA만을 처리한 양성대조군이 가장 무거운 것으로 나타났으며, 다른 처리군들 간에는 유의적인 차이가 없었다. Fe-NTA처리에 의하여 신장이 손상됨에 따라 무게가 증가하는 것으로 추정되며, 콩의 섭취는 품종에 상관없이 이를 어느 정도 완화하는 것으로 판단된다.

소장과 대장의 경우는 양성대조군이 무게가 감소하는 경향을 보였으며, 다른 실험군들 간에는 유의적인 차이가 없었다.

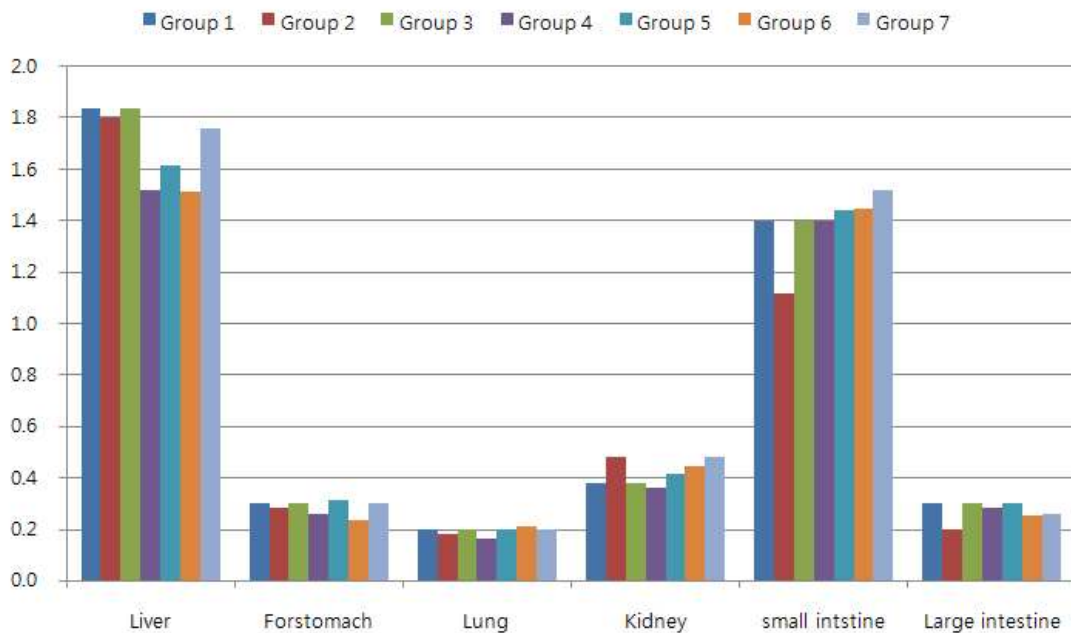


Figure 7. Change in organ weights of mice fed different kinds of diets with injection of Fe-NTA.

라) 콩섭취가 혈장 항산화능에 미치는 영향

처리군별 마우스의 혈장의 항산화능의 지표로서 FRAP (ferric reducing activity of plasma)를 측정된 결과, 그림 8에 나타난 바와 같이, group 3(대망2호), 4(아가3), 5(아가검정)가 약간 높은 경향을 보였으나, 통계적으로 유의성은 없었다.

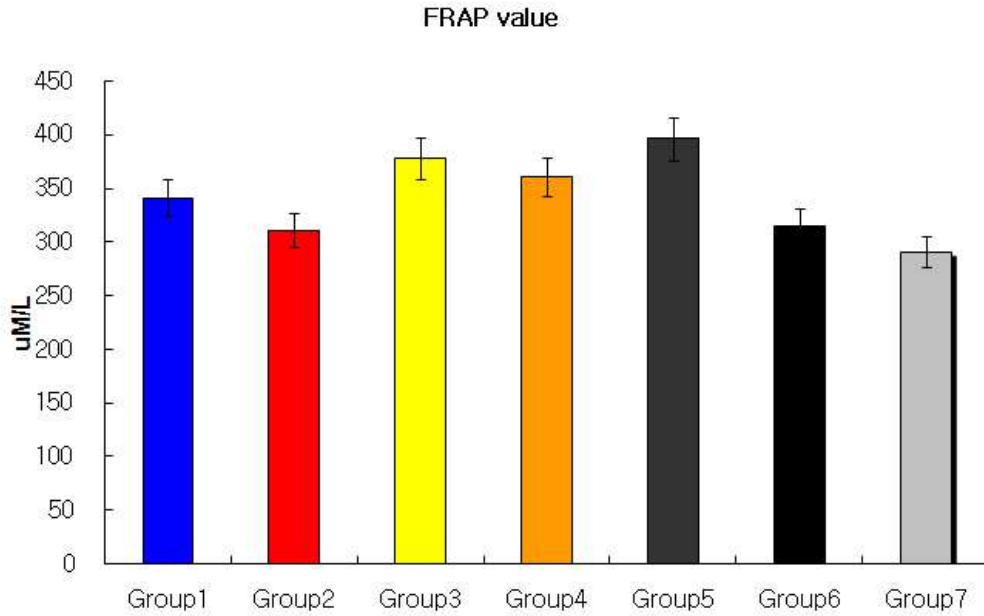


Figure 8. FRAP levels of mice fed different kinds of diets with injection of Fe-NTA.

5) 청국장 식이가 사염화탄소로 유도된 산화적스트레스에 미치는 영향

가) 사망률, 체중 및 장기무게에 미치는 영향

마우스에게 실험 식이를 1주일간 급여한 다음, 사염화탄소를 주사하고 (1일), 계속하여 실험 식이를 12일간 급여한 후, 14일 째 마우스를 이산화탄소 질식법으로 마취시켰다. 혈액과 장기를 수집하고 무게를 측정하는 다음, 액체질소에서 급속 동결하여 분석 시까지  $-70^{\circ}\text{C}$  deep freezer에서 보관하였다.

사염화탄소 주사 후 실험군 별로 1~6마리의 마우스가 사망하였으며 아가콩 3호로 제조한 청국장을 섭취시킨 경우가 사망률이 가장 높은 것으로 나타났다 (표 7).

Table 7. Death rate of mice injected with carbon tetrachloride and fed diets with *cheonggukjang* prepared with different varieties of soybean

	Treatment	No of Deaths	Death Rate (%)
1	Control	0	0
2	$\text{CCl}_4$	1	10
3	$\text{CCl}_4$ + Steamed soy	1	10
4	$\text{CCl}_4$ + TaeGwang CGJ	2	20
5	$\text{CCl}_4$ + Aga 3 CGJ	6	60
6	$\text{CCl}_4$ + Il poom CGJ	1	10
7	$\text{CCl}_4$ + Aga 4 CGJ	1	10
8	$\text{CCl}_4$ + Vitamin E	1	10

또한 실험군 별 체중 및 장기무게를 측정된 결과, 아가3호와 태광콩으로 제조한 청국장을 섭취한 경우가 체중 감소가 가장 큰 것으로 나타났으며, 간의 무게는 사염화탄소처리에 의하여 증가하였고, 콩 품종별로 제조한 청국장을 먹었을 때 태광콩을 제외하고 모든 품종에서 간의 무게가 증가하는 것으로 나타났다. 신장, 위, 폐, 대장의 경우도 사염화탄소 처리에 의하여 약간씩 증가하는 경향을 보였으며, 청국장의 급여가 장기 무게증가 억제에 유의적인 영향은 미치지 않는 것으로 나타났다. 한편, 위의 무게는 사염화탄소 처리에 의하여 변하지 않았으나, 모든 사염화탄소처리 + 청국장 급여군에서 무게가 증가하는 것으로 나타났다.

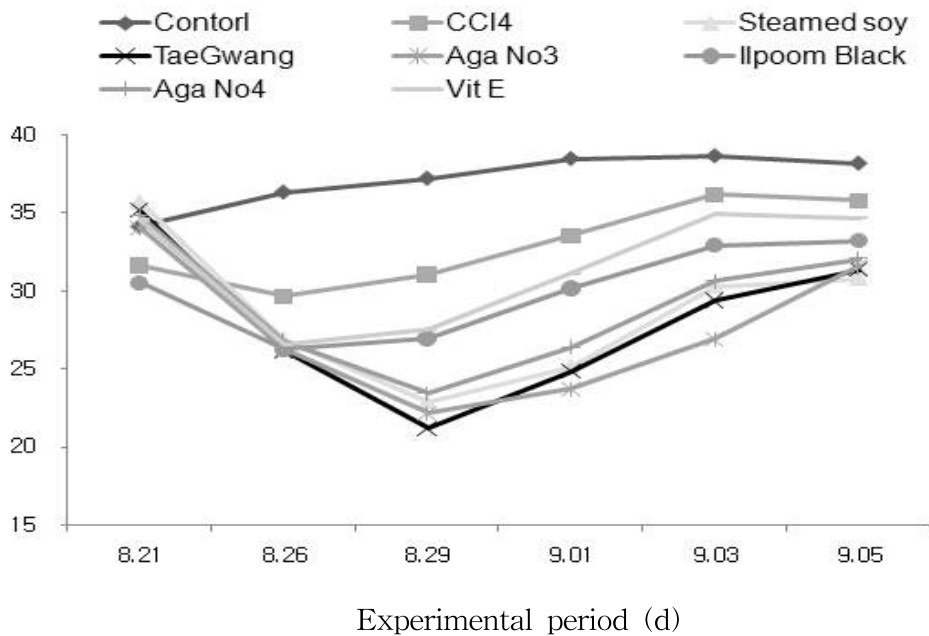


Figure 9. Change in body weight of mice fed diets with *cheonggukjang* prepared with different varieties of soybean in combination with carbon tetrachloride injection.

#### 나) 혈장의 항산화능에 미치는 영향

실험군 별 혈장의 항산화능의 지표로서 FRAP (ferric reducing activity of plasma)를 분석한 결과, 아가콩 3호, 일품검정1호, 아가콩 4호로 제조한 청국장 및 비타민 E 급여군이 FRAP이 상대적으로 낮은 것으로 나타났으며 (그림 10), 증자한 콩과 태광콩 청국장 섭취 군이 FRAP 값이 약간 높은 것으로 나타났다. 이와 같이 대부분의 청국장군이 FRAP 값이 낮은 것은 청국장이 항산화활성을 발휘하여 체내에서 만들어지는 항산화물질의 함량이 감소된데 기인하는 것으로 추정된다.



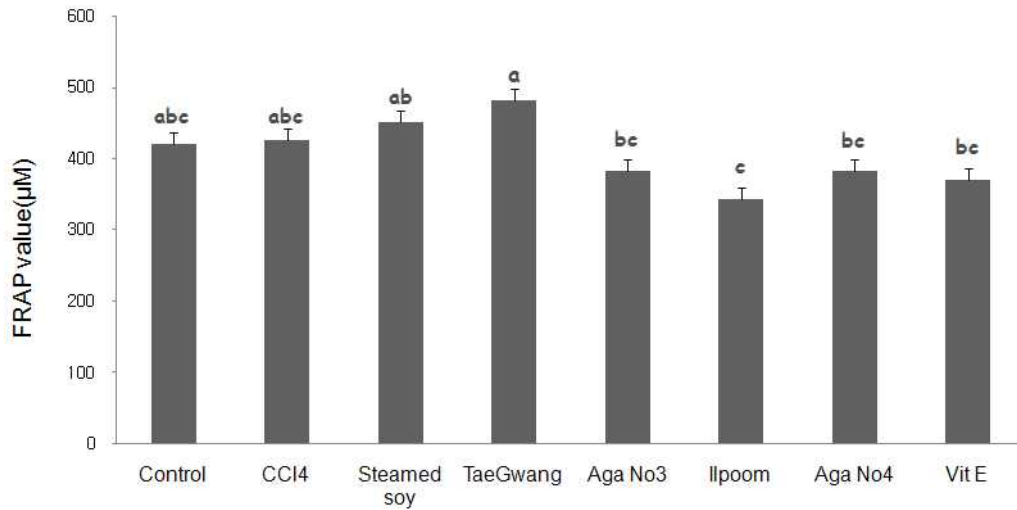


Figure 10. FRAP levels of mice fed diets with *cheonggukjang* prepared with different varieties of soybean in combination with carbon tetrachloride injection.

다) 혈장 8-OHdG 농도에 미치는 영향

실험군 별 혈장의 DNA의 산화적 손상의 지표로서 혈장 8-OHdG 농도를 살펴본 결과, 사염화탄소 군에 비하여 사염화탄소 처리 후 콩 또는 청국장을 급여한 군이 8-OHdG 농도가 가장 낮은 것으로 나타나 (그림 11), 콩 섭취가 외부 유전독성 물질에 의한 DNA 손상을 억제하는 효과가 있는 것으로 판단된다.

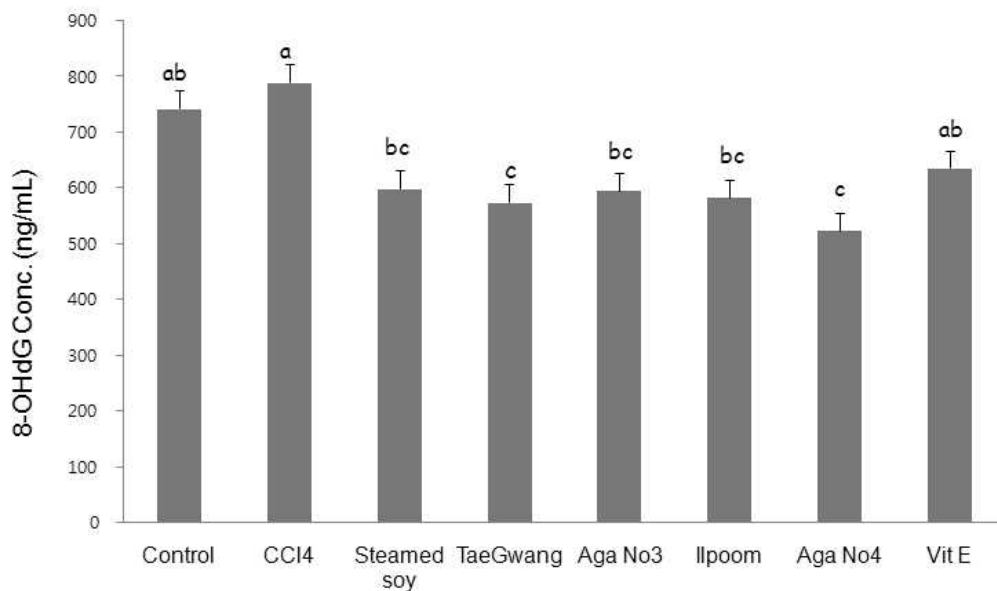


Figure 11. Level of plasma 8-OHdG of mice fed diets with *cheonggukjang* prepared with different varieties of soybean in combination with carbon tetrachloride injection.

라) 혈장 MDA 농도에 미치는 영향

실험군별 사염화탄소에 의하여 유도되는 산화적 손상을 청국장 식이가 억제하는 정도를 평가하기 위한 지표로서 지질과산화에 의해서 생기는 혈장 malondialdehyde 농도를 측정된 결과, 비타민 E군을 제외한 나머지 군은 큰 차이가 없는 것으로 나타났다 (그림 12).

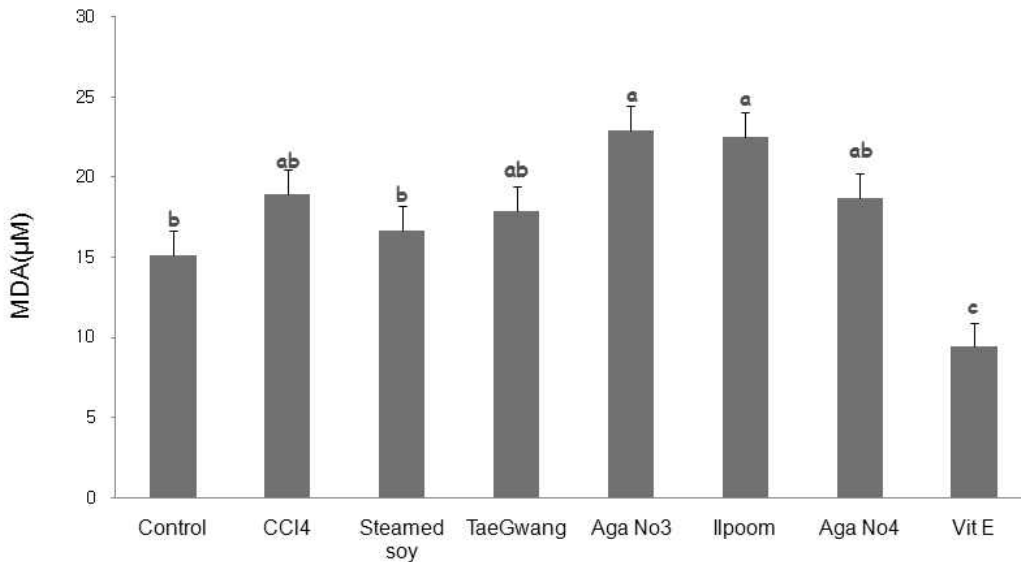


Figure 12. Level of hepatic MDA of mice fed diets with *cheonggukjang* prepared with different varieties of soybean in combination with carbon tetrachloride injection.

마) 청국장 식이가 사염화탄소 처리한 마우스의 간 및 신장조직의 형태에 미치는 영향

실험군 별 사염화탄소에 의하여 유도되는 산화적 손상을 청국장 식이가 억제하는 정도를 평가하기 위한 지표로서 간 및 신장 조직에 대하여 histology 평가를 수행한 결과, 그림 13, 14에 나타난 바와 같이 실험군간 유의성 있는 차이는 보이지 않았으나 아가3호의 경우 necrosis가 진행된 것으로 보이는 부위가 관찰되었다.

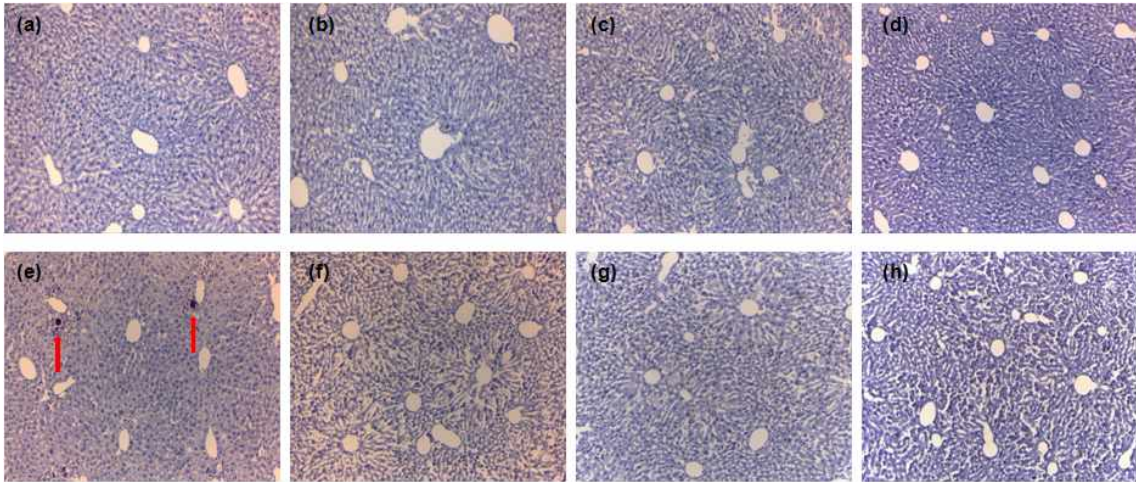


Figure 13. Hepatic morphology of mice fed diets with *cheonggukjang* prepared with different varieties of soybean in combination with carbon tetrachloride injection.

(a) control (b) CCl<sub>4</sub> (c) CCl<sub>4</sub> + steamed soy (d) CCl<sub>4</sub> + TaeGwang CGJ (e) CCl<sub>4</sub> + Aga 3 CGJ (f) CCl<sub>4</sub> + Ilpoom CGJ (g) CCl<sub>4</sub> + Aga 4 CGJ (h) CCl<sub>4</sub> + vitamin E. Hematoxylin/Eosin staining, 100X magnification. CGJ represents '*cheonggukjang*'.

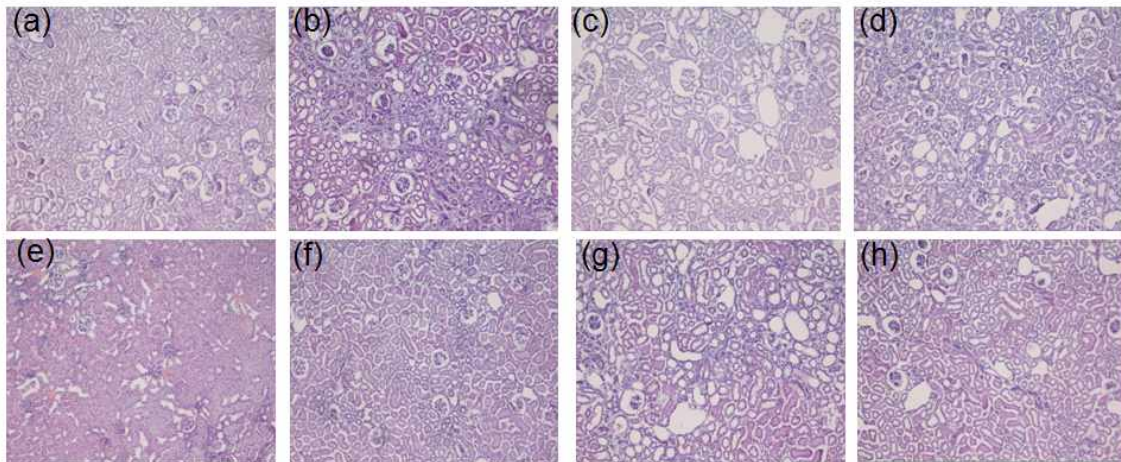


Figure 14. Kidney morphology of mice fed diets containing *cheonggukjang* prepared with different varieties of soybean in combination with carbon tetrachloride injection.

(a) control (b) CCl<sub>4</sub> (c) CCl<sub>4</sub> + steamed soy (d) CCl<sub>4</sub> + TaeGwang CGJ (e) CCl<sub>4</sub> + Aga 3 CGJ (f) CCl<sub>4</sub> + Ilpoom CGJ (g) CCl<sub>4</sub> + Aga 4 CGJ (h) CCl<sub>4</sub> + vitamin E. Hematoxylin/Eosin staining, 100X magnification. CGJ represents '*cheonggukjang*'.

바) 청국장 및 사염화탄소가 마우스 간 CYP1A2, CYP2E1, heme oxygenase 1 발현에 미치는 영향

실험군 별 마우스 간 조직 내 1상 해독효소계 CYP1A2 및 2E1과 2상효소계 heme oxygenase 1의 발현정도를 조사한 결과, 그림 15과 같이 일품검정 및 아가4

호 등 안토시안화합물이 많은 청국장을 섭취한 군에서 CYP1A2 발현이 낮았으며, 2E1의 경우는 아가3호로 제조한 청국장의 발현이 높은 것으로 나타났다. 이렇듯 사염화탄소에 의한 독성이 콩 섭취에 의하여 감소되는 것은 사염화탄소의 반응성이 강한 라디칼로의 대사에 관여하는 CYP2E1의 발현조절과 관련이 있는 것으로 추정된다.

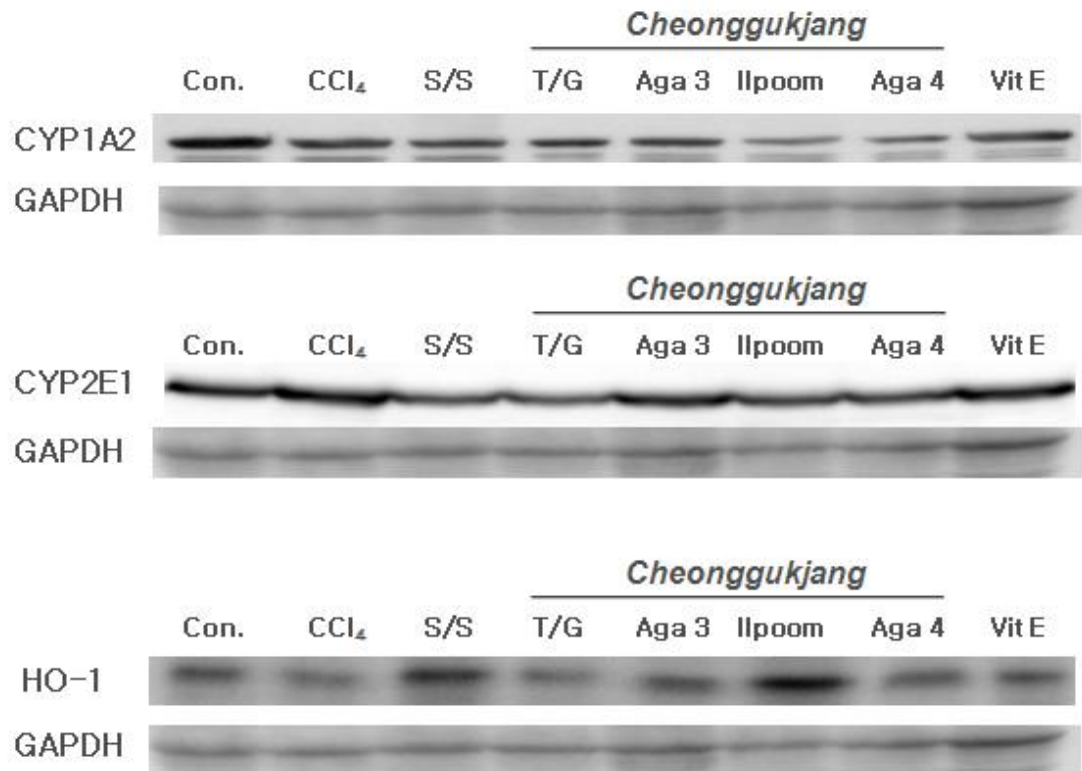


Figure 15. Regulation of hepatic phase 1 and antioxidant enzymes in mice fed *cheonggukjang* prepared with different varieties of soybean in combination with carbon tetrachloride injection.

6) 분리된 청국장균주를 이용하여 isoflavones 발효과정중 대사체 프로파일 및 항산화 활성 변화

순창장류마을에서 제조한 전통 청국장에 분리 동정한 6개의 Bacillus 균주를 이용하여 순수한 isoflavones (genistein, daidzein)을 발효하여, 생성되는 대사체의 profile 과 항산화활성을 평가하였다.

Genistein을 기질로 전통 청국장에 분리한 균주로 발효한 후, isoflavone profile을 조사한 결과, 그림 11과 같이, *B. amyloliquifaciens* 51, 86-1, *B. subtilis* 3-25 균주가 genistein을 가장 많이 대사하는 것으로 나타났다. 한편 daidzein을 5종류의 균주로 처리하였을 때, 254 nm에서 한 개의 대사체 peak가 관찰되었으며, glycitein은 다른 형태의 화합물로 전환되지 않는 것으로 나타났다.

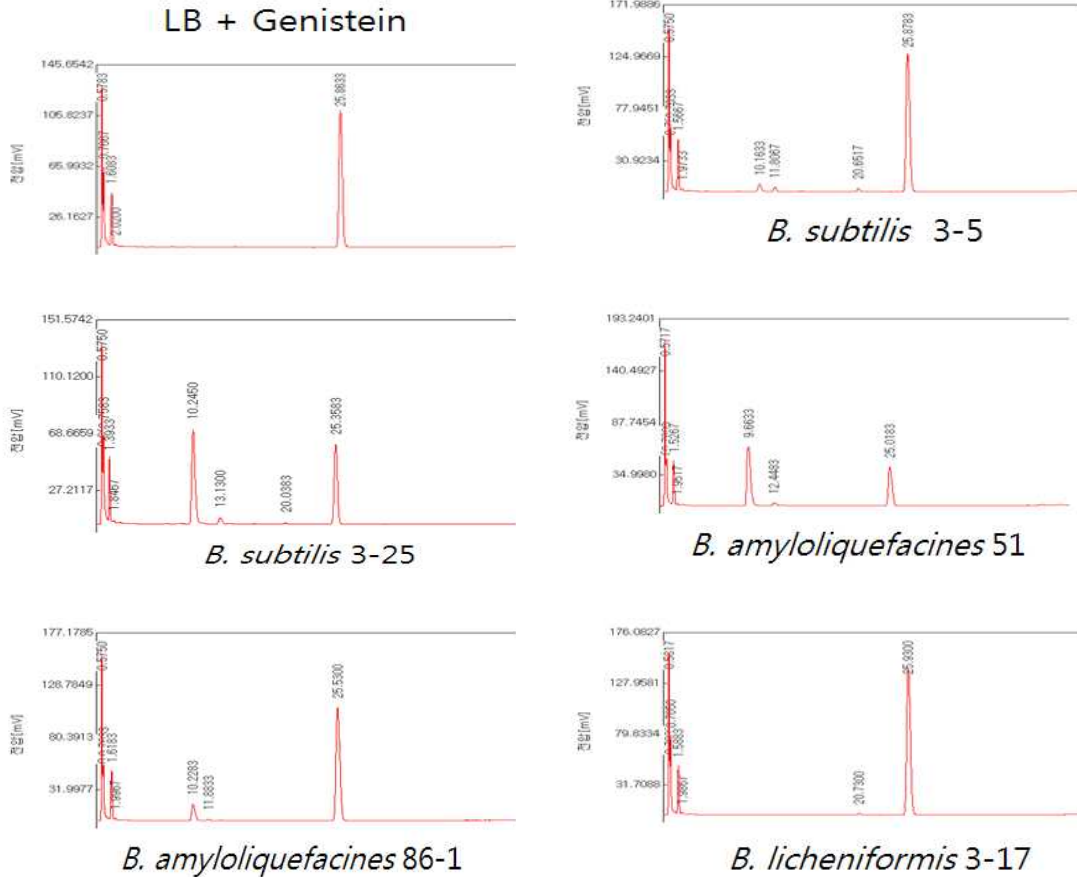


Figure 16. HPLC chromatograms of metabolites produced by incubating genistein with various microorganisms.

Genistein을 청국장에서 분리한 균주가운데, *B. amyloliquefaciens* 86-1과 51로 발효하였을 때, 항산화활성이 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다 (그림 16). 이렇듯 일부 청국장균주들은 genistein을 대사하여 보다 항산화 활성이 높은 대사체를 생성하는 것으로 사료된다.

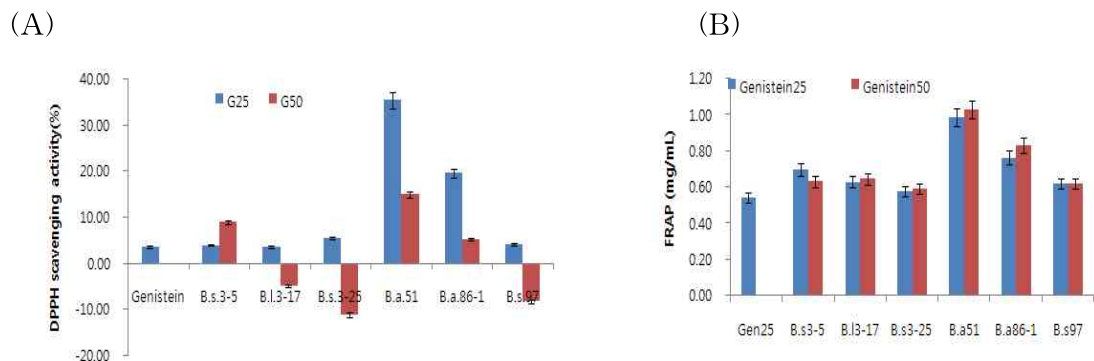


Figure 17. Antioxidant activities of metabolites produced by incubating genistein with various microorganisms. A: DPPH radical scavenging activity. B: FRAP level



7) 분리된 청국장 균주를 이용하여 제조한 청국장의 항산화 활성

4 가지 콩 품종(대원, 아가3호, 아가4호, 청자)에 위의 6가지 균주를 접종하여 48 시간 발효시켜 제조한 청국장의 항산화 활성을 평가하였다. 제조된 청국장은 동결 건조하여 분석용 시료로 사용하였다. 동결건조하여 60 mesh 이하로 분쇄하였고, 분쇄시료에 에탄올을 5배 넣고 실온에서 16시간 교반하면서 추출하였다. 회전식 증발 농축기에서 용매를 증발시키고 DMSO 용액에 녹여, 항산화활성 측정용 시료로 사용하였다.

가) 콩 품종 및 균주별 청국장의 FRAP 수준 비교

항산화 지표로서 FRAP 수준을 분석한 결과, 6가지 균주 중에서 대체적으로 CH86-1을 접종하여 제조한 청국장의 FRAP 수준이 가장 높았다(그림18). 콩 품종 가운데서는 안토시안 함량이 높은 검은 콩피 품종인 아가4호, 청자콩으로 제조한 청국장이 FRAP 수준이 높았다. 하지만 대조군인 찌콩과 비교하여, 이 보다 높은 FRAP 값을 나타내는 청국장은 없었다.

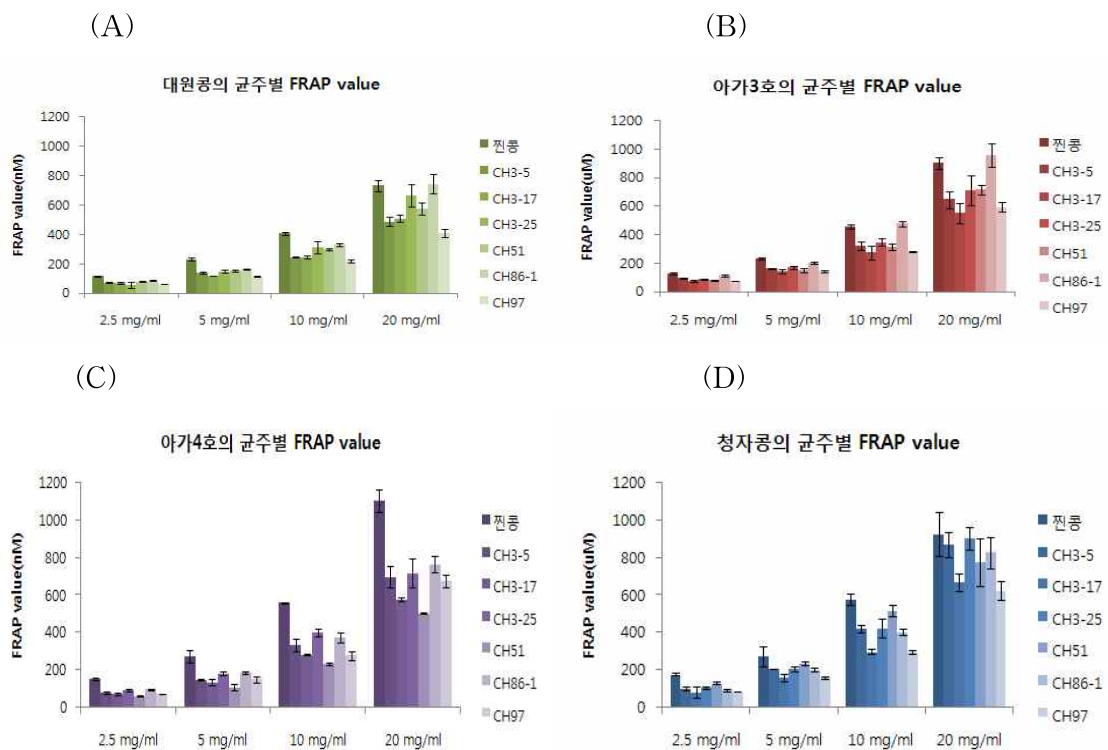


Figure 18. FRAP levels of *cheonggukjang* prepared with different varieties of soy and microorganisms. (A) Daewon (B) Aga 3 (C) Aga 4 (D) Chungja

나) 콩 품종 및 균주별 청국장의 DPPH 라디칼 소거능 비교

제조한 청국장을 에탄올 추출하여 DPPH 활성을 알아보았다(그림 19). 콩 품종 별로 차이는 있었으나 대체적으로 CH3-25 균주와 CH86-1, CH97 균주를 접종하였을 때 대조군에 비하여 높은 라디칼 소거능을 보였다. FRAP 수준과 유사하게 안토시안 함량이 많은 검은 콩을 이용한 청국장 추출물에서 더 높은 소거능을 보였다.

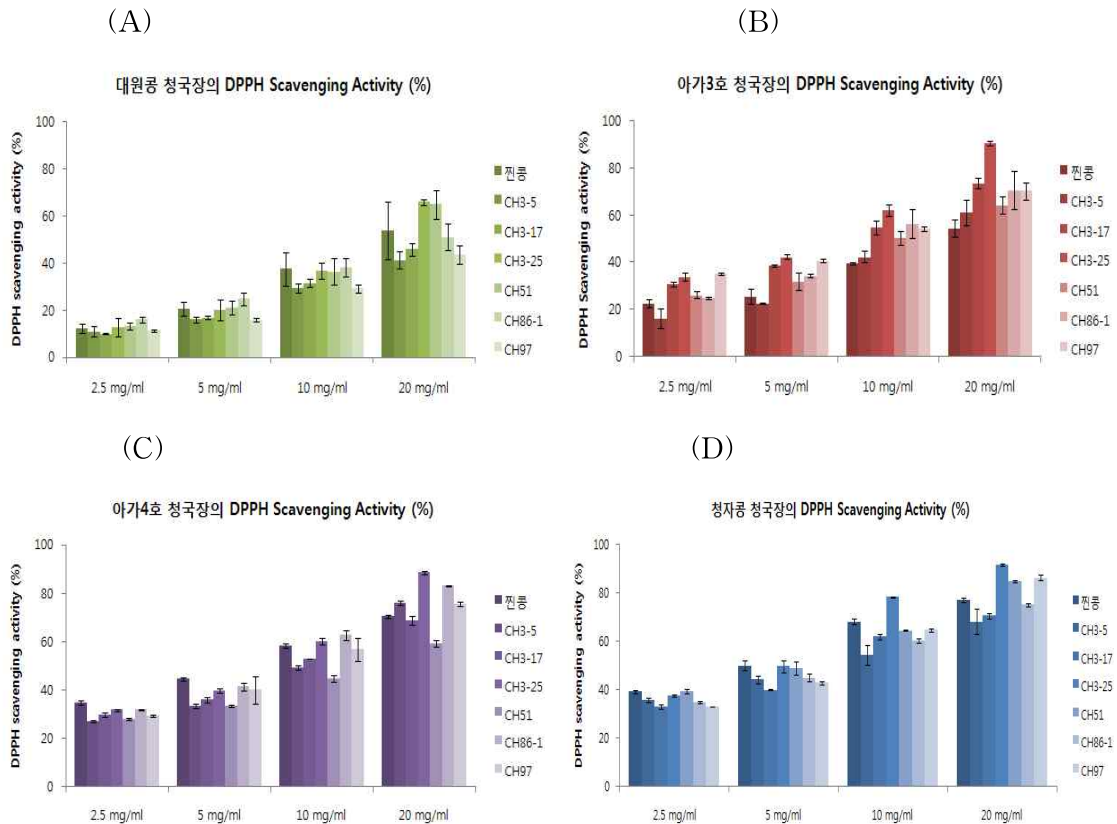


Figure 19. DPPH radical scavenging activities of *cheonggukjang* prepared with different varieties of soy and microorganisms.

다) 콩 품종별 균주별 청국장의 ABTS 라디칼 소거능 비교

ABTS+· cation decolorization assay 방법을 이용하여 ATBS 라디칼을 이용한 항산화력을 측정하였다(그림21). 하지만, ABTS 라디칼 소거능을 비교하였을 때 같은 품종으로 제조한 청국장 내에서는 균주별로 일관성을 보였으나, 품종간 유의적인 차이는 관찰되지 않았다.

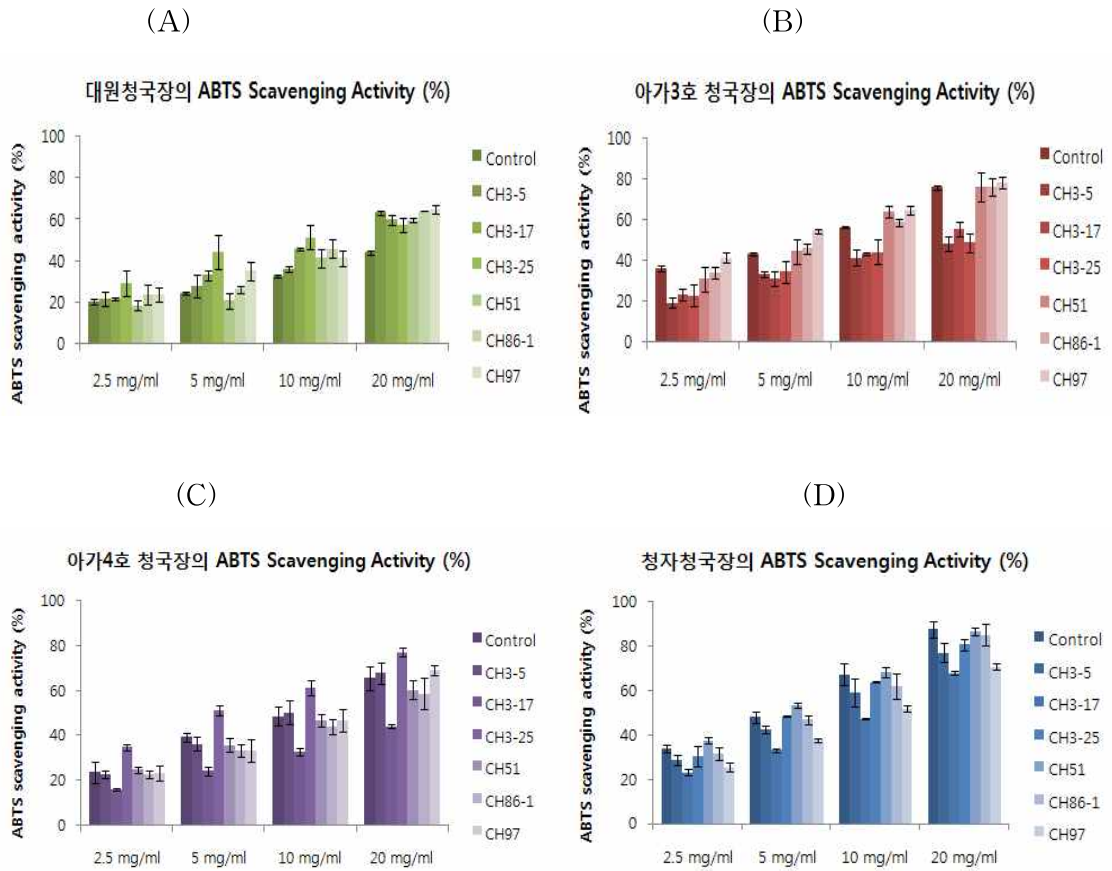


Figure 20. ABTS radical scavenging activities of *cheonggukjang* prepared with different varieties of soy and microorganisms.

라) *Bacillus amyloliquifaciens* CH86-1 균주로 제조한 콩 품종별 청국장 추출물의 DCFDA 분석

사람 간암세포에 과산화수소로 산화적 스트레스를 유도한 후 콩 품종별 청국장에 탄을 추출물을 농도별로 처리하여 DCFDA 분석법으로 항산화 활성을 측정하였다. HepG2 세포에서 모든 균은 농도 의존적으로 산화적 스트레스가 감소하는 것을 알 수 있었고, 특히 아가3호와 아가3호로 제조한 청국장에서 가장 감소폭이 큰 것으로 나타났다. 그러나 청국장과 일반 콩 추출물간에는 유의적인 차이가 없었다.



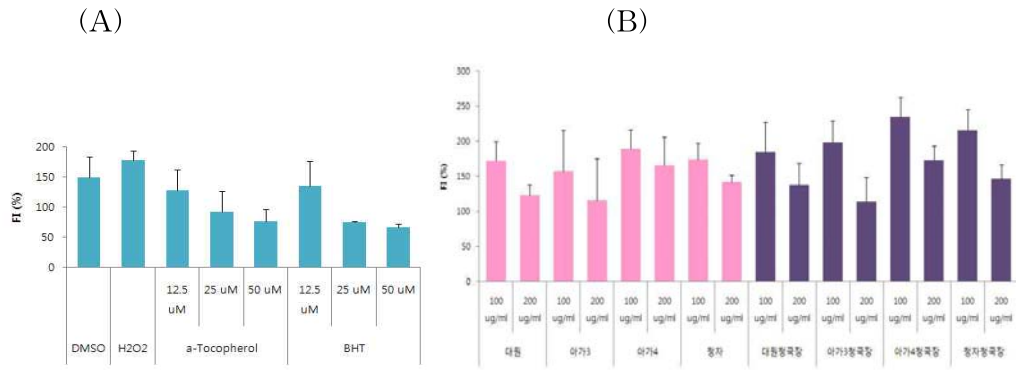


Figure 22. Antioxidant activities of *cheonggukjang* prepared with different varieties of soy using *Bacillus liqueniformis* CH86-1 as assessed by DCFDA assay in HepG2 cells. (A) Positive control, (B) Extracts from *cheonggukjang* prepared with different varieties of soybean.

#### 8) 개발청국장을 이용한 식품소재화 연구

육성 콩 품종인 아가3호에 *B. amyloliquefaciens* 86-1을 접종하여 48시간 발효시켜 제조한 청국장을 이용하여 드레싱과 spread 제품을 만들어 관능평가를 실시하였다. 개발한 제품은 청국장과 땅콩이 함유된 spread와 Thousand Islands 샐러드 드레싱이다. 관능평가는 경북대학교 응용생명과학부 재학생 12명을 대상으로 시행하였으며, 모두 4가지 시료에 대하여 기호도를 평가하도록 하였다. 평가항목은 외관 (appearance), 색(color), 풍미(flavor), 맛(taste), 전반적인 기호도(overall preference) 등으로 5점 채점법으로 평가하여 기호도가 높을수록 5점에 가까운 점수를 주도록 하였다. 관능평가 결과는 SPSS program을 이용하여 분산분석과 Duncan's multiple range test로 각 시료간의 유의성을 5% 수준에서 검정하였다.

#### 가) 아가3호 청국장을 함유한 피넛버터의 관능검사

일반적인 피넛버터에 아가3호 청국장을 농도별로 첨가하여 관능검사를 실시하였다. 제조한 피넛버터의 조성은 표 8과 같다. 12명의 관능요원을 대상으로 검사를 한 결과(표9), 외관과 색은 아가3호 청국장을 10% 첨가한 군에서 대조군과 유의적인 차이를 보였고, 풍미는 청국장을 1% 첨가한 군에서는 대조군과 유의적인 차이를 나타내지 않았으나, 5%와 10% 첨가한 군에서는 유의적인 차이를 나타내었다. 아가3호 청국장을 첨가하여 제조한 피넛버터의 맛에 대한 결과는 1%를 첨가한 군이 대조군에 비하여 결과가 좋았으나 유의적인 차이를 보이지 않았다. 전반적인 기호도 역시 아가3호 청국장을 1% 첨가한 피넛버터가 대조군에 비해 결과가 좋았으나 유의적인 차이는 없었고, 청국장을 각각 5, 10% 첨가한 피넛버터는 기호도가 낮은 것으로 나타났다.

Table 8. Composition of ingredients of *cheonggukjang* spread

	Peanut butter (PB)	PB+ <i>cheonggukjang</i> (1%)	PB+ <i>cheonggukjang</i> (5%)	PB + <i>cheonggukjang</i> (10%)
Peanut	70 g	69.3 g	66.5 g	63 g
Cheonggukjang	0 g	0.7 g	3.5 g	7 g
Vegetable oil	1 Ts*	1 Ts	1 Ts	1 Ts
Sugar	4 Ts	4 Ts	4 Ts	4 Ts
Salt	1 Ts	1 Ts	1 Ts	1 Ts
Total	70 g	70 g	70 g	70 g

\*Ts= 5 mL

Table 9. Sensory evaluation data of *cheonggukjang* spread

Sample	Evaluation items				
	Appearance	Color	Flavor	Taste	Overall preference
PB <sup>2)</sup>	4.00±0.95 <sup>a1,3)</sup>	3.92±0.90 <sup>a</sup>	3.58±1.00 <sup>a</sup>	3.33±0.89 <sup>ab</sup>	3.50±1.08 <sup>ab</sup>
PA1	3.58±0.79 <sup>ab</sup>	3.58±0.79 <sup>ab</sup>	3.75±0.75 <sup>a</sup>	3.58±1.08 <sup>a</sup>	3.70±0.82 <sup>a</sup>
PA5	3.67±0.89 <sup>ab</sup>	3.50±1.00 <sup>ab</sup>	2.58±0.79 <sup>b</sup>	2.58±1.08 <sup>b</sup>	2.70±0.82 <sup>bc</sup>
PA10	2.92±1.24 <sup>b</sup>	2.92±1.16 <sup>b</sup>	2.83±1.03 <sup>b</sup>	3.00±1.13 <sup>ab</sup>	2.50±0.97 <sup>c</sup>

<sup>1)</sup> Values are mean±S.D.

<sup>2)</sup> PB: Peanut Butter, PA1: Peanut butter with 1% of Ağa No.3 *Cheongukjang*, PA5: Peanut butter with 5% of Ağa No.3 *Cheongukjang*, PA10: Peanut butter with 10% of Ağa No.3 *Cheongukjang*.

<sup>3)</sup> <sup>a-c</sup> Means in a column preceded by different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

나) 아가3호 청국장을 함유한 사우전 아일랜드 드레싱의 관능검사

일반적인 Thousand Island 드레싱에 아가3호 청국장을 농도별로 첨가하여 제조한 뒤, 경북대학교 응용생명과학부 재학생 10명을 대상으로 하여 관능검사를 실시하였다. 드레싱의 조성표는 표 10과 같다. 검사결과 아가3호 청국장을 1% 첨가한

드레싱과 청국장을 3% 첨가한 군을 비교하였을 때, 외관, 색깔, 향은 유의적인 차이가 없었으나 맛과 종합적인 기호도는 유의적으로 청국장을 1% 첨가한 군에서 결과가 더 좋았다. 청국장을 1% 첨가한 군과 일반 사우전 아일랜드 드레싱 간에는 모든 평가항목에서 유의적인 차이가 없었다(표11). 이를 미루어볼 때, 아가3호 청국장을 1% 첨가한 Thousand Island 드레싱은 청국장 특유의 향과 맛을 좋아하지 않는 소비자들도 거부감 없이 섭취할 수 있을 것이라 사료된다.

Table 10. Composition of ingredients of *cheonggukjang* dressing

	Control (Thousand Islands)	TI + + 1% <i>cheonggukjang</i>	TI + + 3% <i>cheonggukjang</i>
Mayonnaise	10 g	10 g	10 g
Ketchup	6 g	6 g	6 g
Lemon juice	2 Ts	2 Ts	2 Ts
Onion	1/16 개	1/16 개	1/16 개
Paprika	1/8 개	1/8 개	1/8 개
<i>Cheonggukjang</i>	0 g	0.36 g	1.08

Table 11. Sensory evaluation data of *cheonggukjang* salad dressing

시료	Evaluation items				
	Appearance	Color	Flavor	Taste	Overall preference
TD <sup>2)</sup>	3.40±0.52 <sup>a1,3)</sup>	3.10±0.32 <sup>a</sup>	3.90±0.57 <sup>a</sup>	3.90±0.57 <sup>a</sup>	4.00±0.67 <sup>a</sup>
TDA1	3.20±0.63 <sup>ab</sup>	2.80±0.42 <sup>ab</sup>	3.50±0.71 <sup>ab</sup>	3.90±0.88 <sup>a</sup>	3.80±1.03 <sup>a</sup>
TDA3	2.70±0.67 <sup>b</sup>	2.70±0.48 <sup>b</sup>	2.80±1.03 <sup>b</sup>	2.20±1.32 <sup>b</sup>	2.20±1.03 <sup>b</sup>

<sup>1)</sup> Values are mean±S.D.

<sup>2)</sup> TD: Thousand island dressing, TDA1: Thousand island dressing with 1% of Aga No.3 *cheonggukjang*, TDA3: Thousand island dressing with 3% of Aga No.3 *cheonggukjang*.

<sup>3)</sup> <sup>a-b</sup> Means in a row preceded by different superscripts are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

## 4. 콩의 주요 성분을 이용한 산업화 연구

### 가. 연구개발 수행 내용

#### 1) 글라이세오린(glyceollin)을 이용한 생리활성 물질 검증

##### 가) Wound healing assay

B16F1 cell을 plate에 spreading한 다음 CO2 incubator에서 세포가 plate에 80% 정도 confluent 상태로 될 때까지 배양한다. 배양은 RPMI 1640 배지에 10% FBS, 5% CO2, 37°C의 incubator에서 배양하였다. Wound healing은 세포의 운동성을 확인하는 것으로 배양 중인 B16 cell의 표면에 yellow tip을 이용하여 약 1 mm의 wound를 만든 다음, 배양액을 교체한 후 시료를 농도별로 처리하였다. 37°C의 5% CO2 incubator에서 24 h 배양 후, healing 정도를 현미경을 통하여 관찰 하였다. Wound healing 비율은 현미경을 통하여 남아있는 wound의 width를 측정한 다음 무처리군과의 비교를 통하여 억제활성 정도를 비교하였다.

##### 나) Angiogenesis 억제 활성

종양세포는 지속적인 성장을 위해 종양 내에 혈관을 형성하게 되는데 이때 VEGF 등의 혈관 생성인자들의 분비가 증가하게 된다. Angiogenesis 시험은 이러한 혈관 형성 과정을 Matrigel을 이용하여 tube 형성 정도를 확인 할 수 있는 방법이다. 실험에 이용된 세포는 HUVEC cell (Human Umbilical Vein Endothelial Cells)을 이용하였다. Matrigel을 24 well에 코팅한 다음 HUVEC cell을 2×10<sup>4</sup>/well로 분주 한 다음 글라이세오린 A/B를 처리하여 tube formation 형성 정도를 확인하였다.

##### 다) Cell spreading assay

세포의 형태는 그 구조와 기능에 많은 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 본 실험에 사용한 B16 세포주는 전형적인 부착형 세포로서 세포 배양시 fibroblast 형태를 가진다. 부착세포를 trypsin을 이용하여 떼어낸 다음 이를 다시 부착하는 과정에서 글라이세오린 A/B에 의한 부착 억제효과를 알아보았다.

##### 라) Colony formation assay

세포분열은 세포의 수적증가를 보여주는데 일반적으로 암세포의 경우 세포분열이 무한정 일어남으로서 발생하게 된다. 본 실험은 글라이세오린 A/B가 세포분열에 어떠한 영향을 주는지 확인하기 위하여 실시하였다. 실험 방법은 soft agar배지에 B16 세포를 배양하면서 생기는 colony 숫자를 파악하여 세포분열에 글라이세오린 A/B가 미치는 영향을 알아보았다.

## 마) NO 활성 측정

RAW 264.7 세포주(mouse macrophage cell line)를 이용하여 콩추출물에 대한 NO 활성, 또는 억제능을 알아보았다. Raw 264.7 세포를  $2 \times 10^4$ /well (96 wells)에 배양을 한 다음, lipopolysaccharide (LPS)를 200 ng/well의 농도로 처리한 군과 처리하지 않은 군에 콩추출물을 농도별로 처리하여 24시간 배양 후 NO 생성량을 알아보았다. NO의 정량은 Greiss reagent (0.1% naphthylendiamine- dihydrochloride in water, 1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid, w/v)와 NaNO<sub>2</sub>를 이용하였으며, 실험은 동량의 culture media와 혼합 후, 약 10분간 상온에서 반응을 시킨 후 560 nm에서 흡광도를 측정하여 확인하였다.

## 2) 피니톨과 이노시톨을 이용한 생리활성 물질 검증

### 가) Wound assay

실험은 B16F1 (B16, mouse melanoma cell line) 세포주를 이용하여 세포의 운동성을 확인 할 수 있는 wound assay를 수행하였다. 세포의 운동성은 암의 전이와 밀접한 관련을 가지고 있으며, 운동성을 억제함으로써 암세포의 이동을 억제할 수 있다. 실험은 6 wells plate에 세포를 완전히 깎 차게 배양한 다음 팁(tip)을 이용하여 wound를 만들고, 배양배지를 교체하였다. 이후 피니톨을 농도별로 처리한 다음 20시간 배양기에서 배양하면서 wound를 관찰함과 동시에, wound 억제효과에 대한 사진촬영을 실시하였다.

### 나) RT-PCR

항암 분자 마커의 활성 정도를 알아보기 위해 RT-PCR을 수행 하였다. 세포는 B16 세포주를 이용하였으며, 세포배양 조건은 RPMI 1640, 10% FBS, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에 24시간 배양하였다. 피니톨의 처리농도는 0, 10, 100, 1000  $\mu$ M 농도로 처리하였다. RNA 추출은 Tri-reagent를 이용하여 추출하였으며, RT 과정을 수행하였다. PCR 과정은 primer ICAM-1, CD44, VEGF-A, MMP17, MMP14, ARF2, GAPDH를 이용하여 수행하였다.

표 1. PCR primer list.

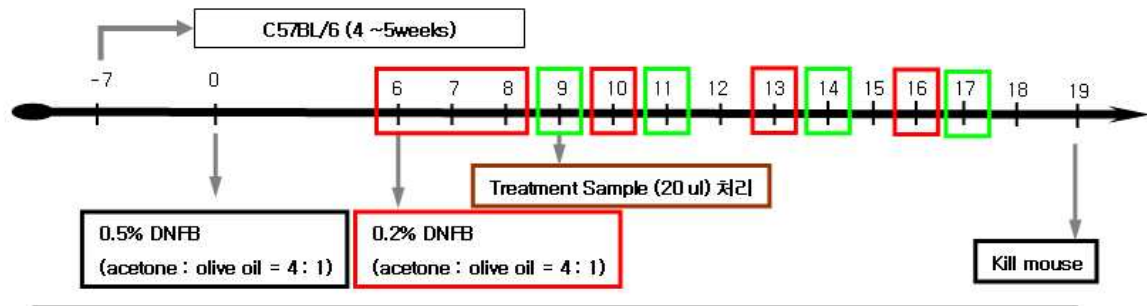
Name		Sequence (5'-3')	
1	mouse MMP17	F	AGGCGAAGCATTCTTTTTCA
		R	GCCGTGTGTGGTCATCATAG
2	mouse MMP14	F	GGCCTGGAACATTCTAACGA
		R	GCATTGGGTATCCATCCATC
3	mouse ARF2	F	CACAGTCTGGGATGTTGGTG
		R	TTCGTAAAGCCCATCTCCAC
4	mVEGF-A	F	GAGACCCTGGTGGACATCTT
		R	AACGCGAGTCTGTGTTTTTG
5	mCD44	F	TCGATTTGAATGTAACCTGCC
		R	TGGTGTGTTCTATACTCGCCC
6	mICAM-1	F	AGGCATGGCACACGTATGTA
		R	CGAAGGTGGTTCTTCTGAGC
7	GAPDH	F	ATGTTCCAGTATGACTCCAC
		R	GCCAAAGTTGTCATGGATGA

#### 다) 아토피 동물모델을 이용한 항염증 활성 연구

아토피는 자가면역반응의 일종으로 최근 산업의 발달과 함께 크게 증가하고 있는 질환이다. 아토피는 T-세포(T-cell)중 Th2 (T helper 2) 세포에 의해 발생하는 질환으로 알려져 있는데 이에 대한 아토피 동물모델을 이용하여 피니톨과 이노시톨이 면역 활성이 있는지를 확인해 보고자 하였다.

아토피 동물모델은 C57BL/6 (4-5 weeks, male)를 이용하였으며, 0.5% DNFB (in acetone:olive oil = 4:1)를 마우스의 복강에 처리한 다음, 일주일 후 마우스의 귀에 0.2% DNFB를 10 µl를 3일간 처리하였다. 이후 피니톨과 이노시톨 (100 mM) 20µl를 DNFB와 번갈아 가며 처리하였다. DNFB 처리군에서 아토피 유무정도를 확인한 다음 사진촬영을 실시하였으며, 10% 포르말린에 고정하였다.

고정된 시료는 수세과정을 거쳐 조직학적 변화를 알아보기 위하여 파라핀 블록으로 만들었으며 역 4-6 µm의 두께로 절편을 만든 다음 헤마톡실린-에오신(Hematoxyline-Eosin)연색을 실시하였다.



No	0.2% DNFB 처리	Treatment of Compound	Note
1	No treatment	-	Negative control
2	0.2% DNFB	50% Acetone	Asthma induced model
3	0.2% DNFB	Pinitol (100mM)	Experiment group
4	0.2% DNFB	Inositol (100mM)	Experiment group

그림 1. 마우스 아토피 모델의 실험 일정

라) 마우스 모델을 이용한 항암 활성

C57BL/6 마우스를 이용하여 B16F1 세포를 정맥 주사(intravenous injection, i.v.) 하여 허파에 암세포 콜로니(colony) 형성 억제효과를 알아보았다. 마우스는 샘타코(주)에서 구입을 하였으며, 마우스 사육장에 입고 후 일주일간 순화과정을 거친 후 실험에 사용하였다. 암 유도를 위한 세포처리는 마우스 C57BL/6 (5주령, 수컷)을 각 그룹별 3-6마리로 나누는 다음 B16F1 세포를  $5 \times 10^5$ /head 으로 마우스의 꼬리 미정맥에 주사(i.v.)하였다. 버섯 추출물의 처리는 3차례에 걸쳐 세포주입 1일전, 이후 5일, 12일에 각각 500  $\mu$ g을 200  $\mu$ l의 용량으로 복강주사(Intraperitoneal injection, i.p.) 하였다. 세포 주입 후 19일째 해부를 통하여 허파를 절취하였다. 마우스는 일반적인 마우스 사육조건하에서 사육되었으며, 먹이와 물은 무한 공급 하였다.

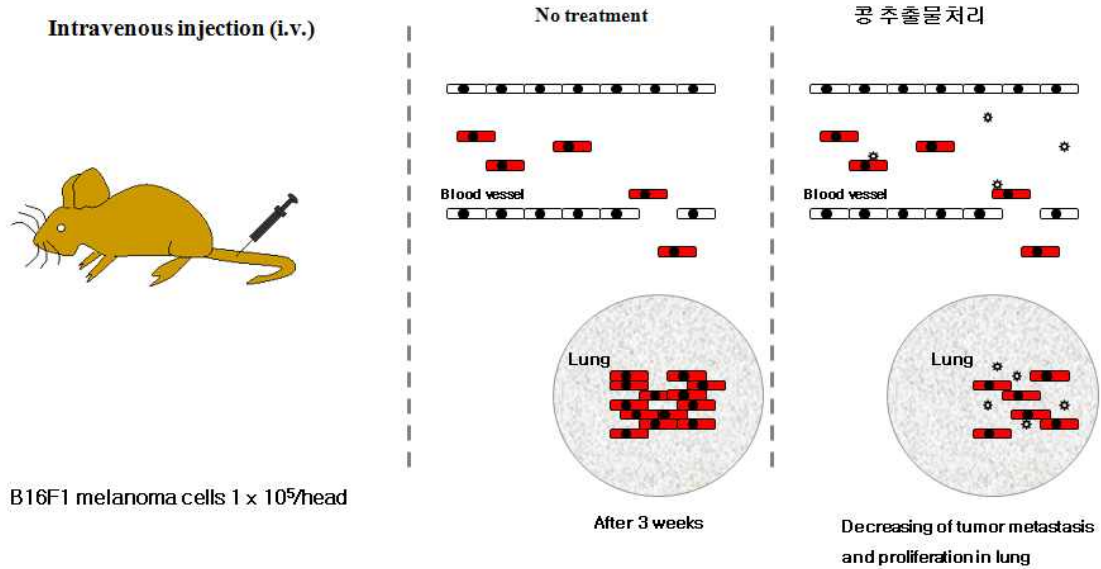


그림 2. 마우스모델을 이용한 항암활성 모식도

### 3) 공의 유효성분을 이용한 산업화 연구

피니톨과 글라이세오린을 이용한 논문, 특히 밋 이를 이용한 제품을 조사 하였으며, 이를 바탕으로 향후 제품으로 개발 할 경우 이점에 대해 알아보하고자 하였다.

#### 나. 연구개발 수행 결과

##### 1) 글라이세오린(glyceollin)을 이용한 생리활성 물질 검증

###### 가) Wound healing assay

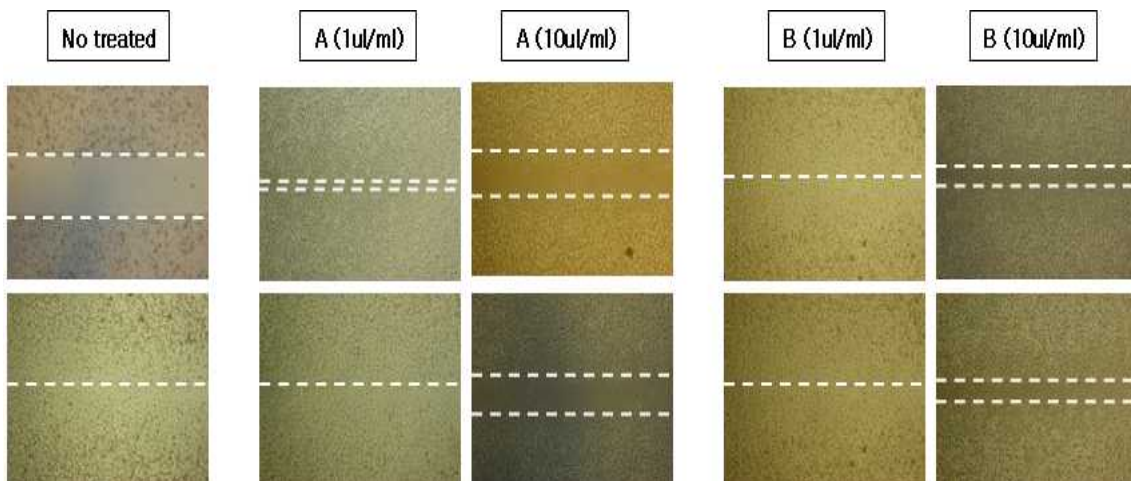


그림 3 글라이세오린을 이용한 wound assay



B16 모델을 이용하여 세포의 운동성을 확인 해 본 결과, 글라이세오린A/B에서 세포의 운동성을 저해하는 효과를 확인 할 수 있었다. 활성 정도는 농도에 따른 효과를 보여 주었다. A는 B보다 wound healing assay에서 활성이 우수함을 알 수 있었다.

나) 글라이세오린 A/B의 angiogenesis 억제 활성

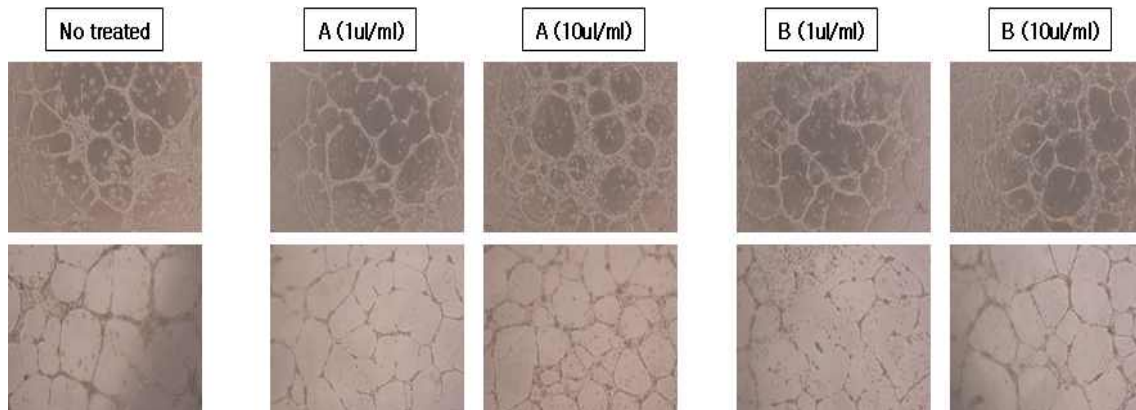


그림 4. 글라이세오린을 이용한 angiogenesis 억제 활성

Tube formation assay의 결과, 글라이세오린을 처리한 군이 처리하지 않은 군에 비해 tube formation이 다소 감소한 것을 알 수 있었다. 글라이세오린의 농도 의존적으로 tube formation이 증가하지만 본 실험에 사용한 글라이세오린의 purity가 높아진다면 이의 활성은 더욱 증가할 것으로 추측된다.

다) Cell spreading assay

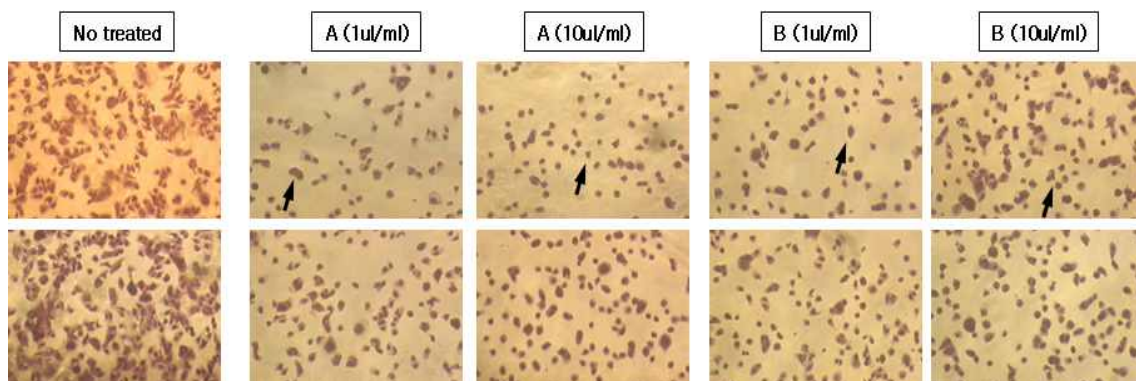


그림 5. 글라이세오린을 이용한 cell spreading assay

세포의 부착과정 중에는 많은 단백질이 관여하게 되는 것으로 알려져 있다. 본 실험

험은 글라이세오린이 세포부착과정에 어떠한 영향을 주는지를 확인해 보았다. 실험 결과, 글라이세오린의 낮은 농도(10 ug/ml 보다는 1 ug/ml)에도 세포부착에 많은 영향을 주는 것으로 나타났다. 무처리군의 경우에 비해 글라이세오린은 처리한 군에서 부착된 세포의 수가 현저히 감소하는 것을 알 수 있었으며, 부착된 형태 또한 fibroblast의 형태를 보이는 무처리군에 비해 둥근 형태를 보여주고 있다. 본 실험결과로 판단하여 보면 부착단백질(cell adhesion molecules)과 관련하여 많은 관련성이 있는 것으로 사료된다.

#### 라) Colony formation assay

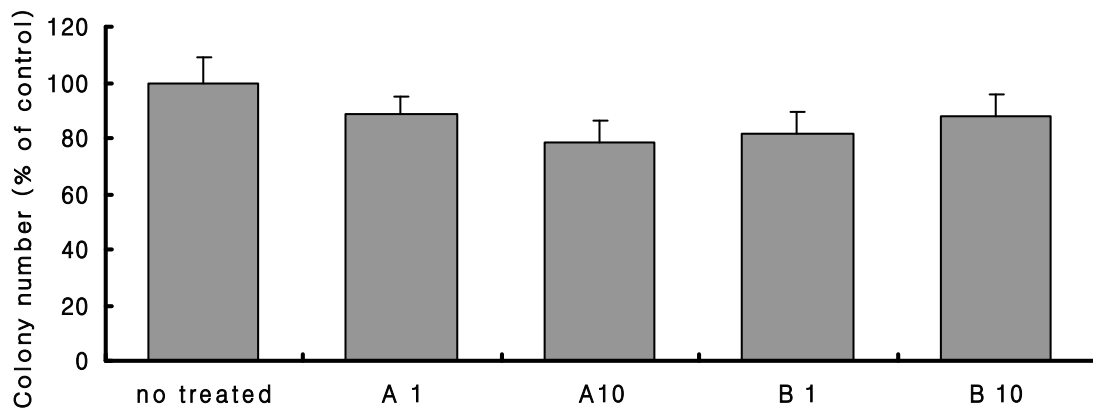


그림 6. 글라이세오린을 이용한 colony formation assay

세포분열과의 관련성을 알아보기 위해 colony formation 실험을 실시하였다. 실험 결과, 글라이세오린을 처리한 군에서 큰 차이는 아니지만 세포분열을 다소 감소시키는 것으로 나타났다.

#### 마) 글라이세오린의 마우스 아토피 모델에서의 효과 검증

마우스를 사용한 아토피 모델을 이용하여 글라이세오린의 효과를 알아본 결과, 마우스 모델에서는 다소 효과가 있는 것으로 나타났다.

마우스 귀에 DNFB(1-Fluoro-2,4 dinitrobenzene)를 이용하여 아토피를 유발시킨 다음, 글라이세오린 A/B를 처리한 후 Hematoxiline-Eosin 염색을 통해 아토피에 관련이 있는 분자표적에 대한 면역조직학적 변화를 알아보았다.

실험결과 DNFB에 의한 아토피 유발군에서는 면역세포의 침투현상이 증가되는 것을 알 수 있었다. 반면 글라이세오린을 처리한 군에서는 정도의 차이는 있으나 아토피 유도군에 비해 면역세포의 침투현상 정도가 현저히 감소한 것을 알 수 있었다.

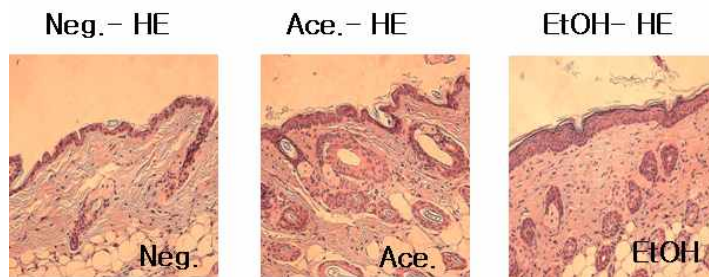
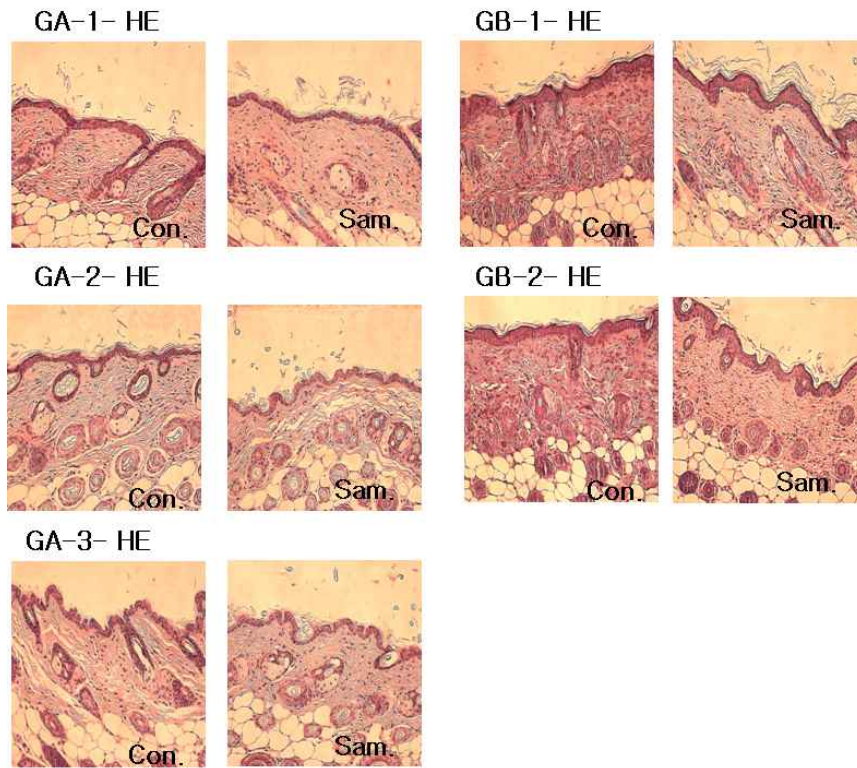


그림 7. 글라이세오린을 이용한 항아토피 활성 검증

## 2) 피니톨을 이용한 생리활성 물질 검증

피니톨은 항당뇨 효과가 우수한 것으로 알려진 물질로 콩의 주요 활성 성분으로 알려져 있다. 본 연구에서는 피니톨을 이용하여 항암 활성 효과를 보고자 하였다.

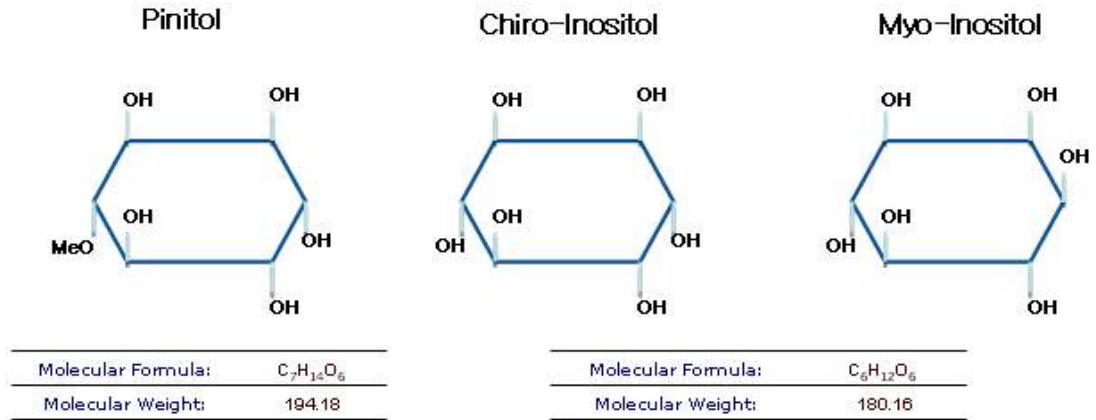


그림 8. 피니톨과 이노시톨의 구조.

가) 피니톨의 항암 활성 연구

피니톨을 이용한 항암활성을 알아보기 위한 wound assay 실험결과 피니톨은 B16 세포의 운동성을 억제시키는 것으로 나타났다. 피니톨의 농도에 따라 wound의 범위가 크게 나타났으며, wound 정도를 확인한 결과 농도에 다른 세포의 운동성 저하를 확인할 수 있었다.

피니톨을 이용한 항암 분자마커인 ICAM-1, CD44, VEGF-A, MMP17, MMP14, ARF2의 발현 정도를 RT-PCR을 통해 확인 한 결과 세포의 운동성과 관련된 분자 마커인 ICAM-1, CD44, MMP17, MMP14, ARF2의 발현을 감소시키는 것으로 나타났다.

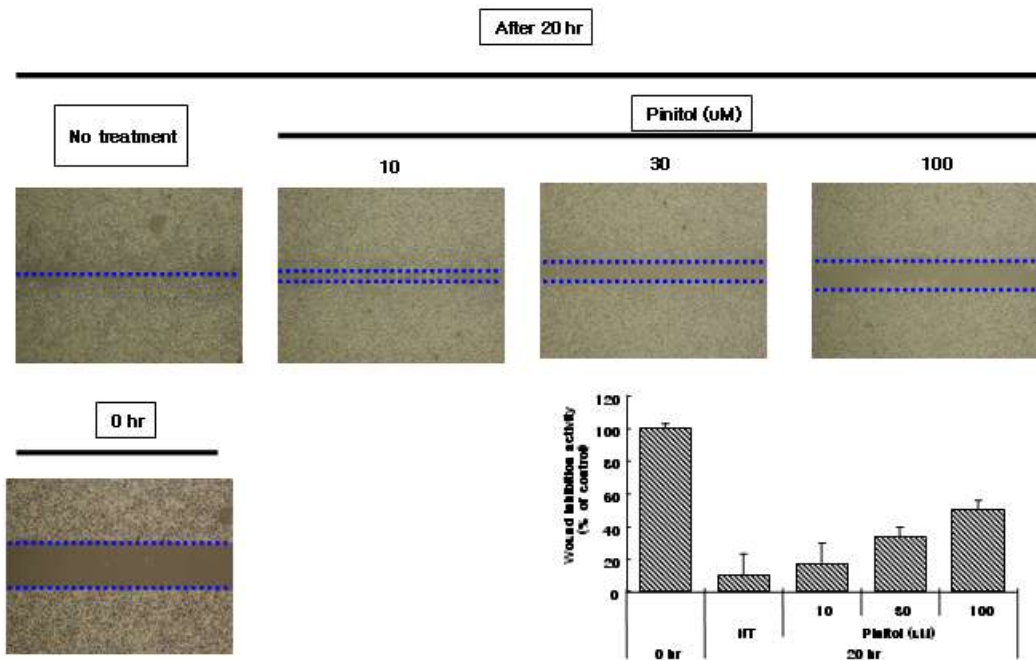


그림 9. 피니톨을 이용한 wound assay 결과.

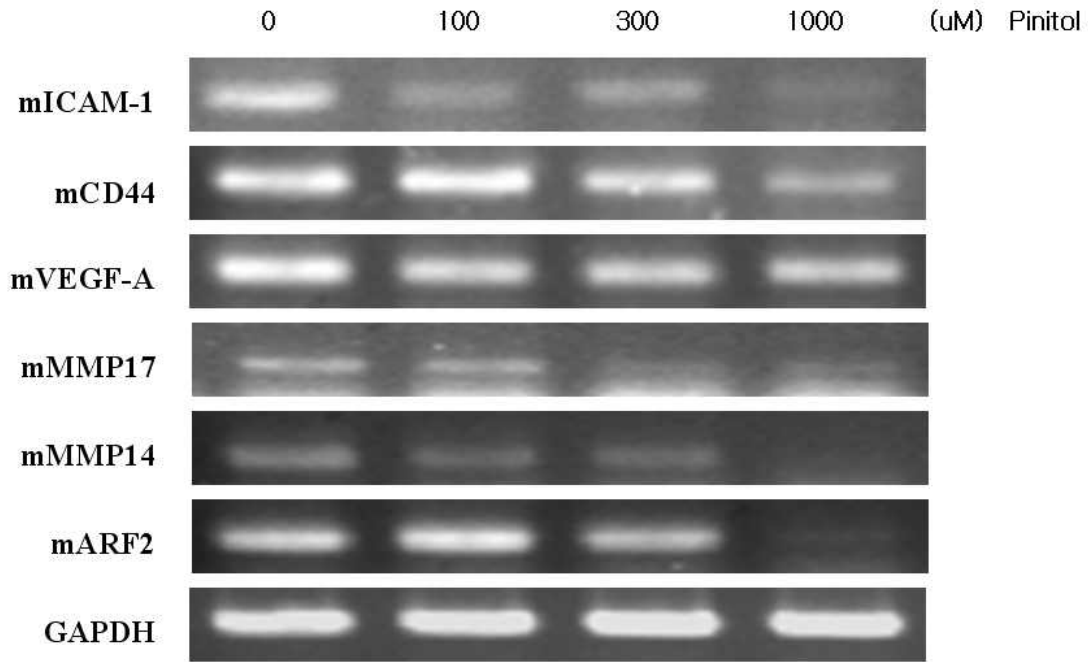


그림 10. 피니톨을 이용한 항암 분자마커의 RT-PCR.

나) 이노시톨을 이용한 항암 활성 연구

이노시톨을 이용한 항암 분자마커인 CD44, VEGF-A, MMP14의 발현 정도를 RT-PCR을 통해 확인 한 결과 세포의 운동성과 관련된 분자마커인 MMP14와 VEGF-A의 발현을 감소시키는 것으로 나타났다.

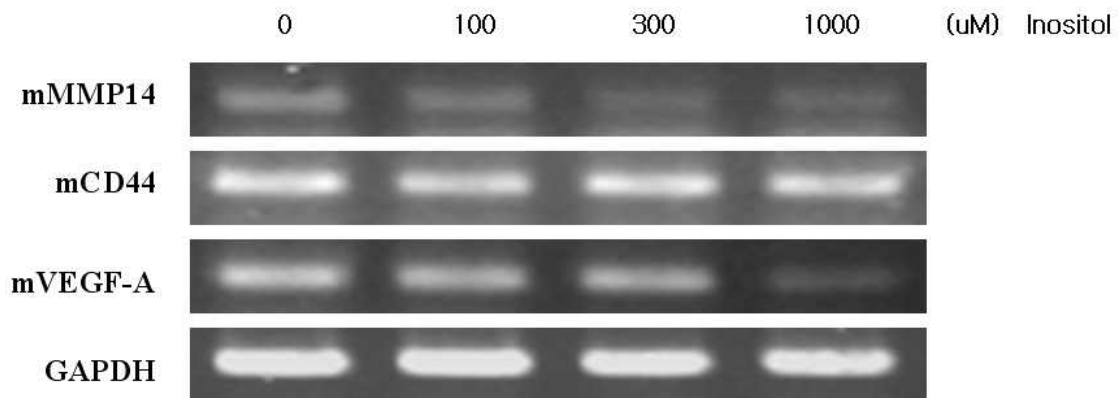


그림 11. 이노시톨을 이용한 항암 분자마커의 RT-PCR.

다) 아토피 동물모델을 이용한 항염증 활성 연구

피니톨을 이용한 항면역활성의 하나인 항아토피 활성을 확인한 결과 육안으로의 피니톨



과 이노시톨에 의한 귀의 손상정도는 아토피를 유도한 군에 비해 크게 차이가 나지 않는 것을 알 수 있었다. 반면 조직학적 검사결과 피니톨을 처리한 군에서 면역세포의 침투현상이 현저하게 감소하는 것을 알 수 있었으며, 귀의 두께 또한 감소한 것으로 알 수 있었다. 이노시톨의 경우 아토피 유도군과 비교하여 큰 차이를 나타내지 않았다.

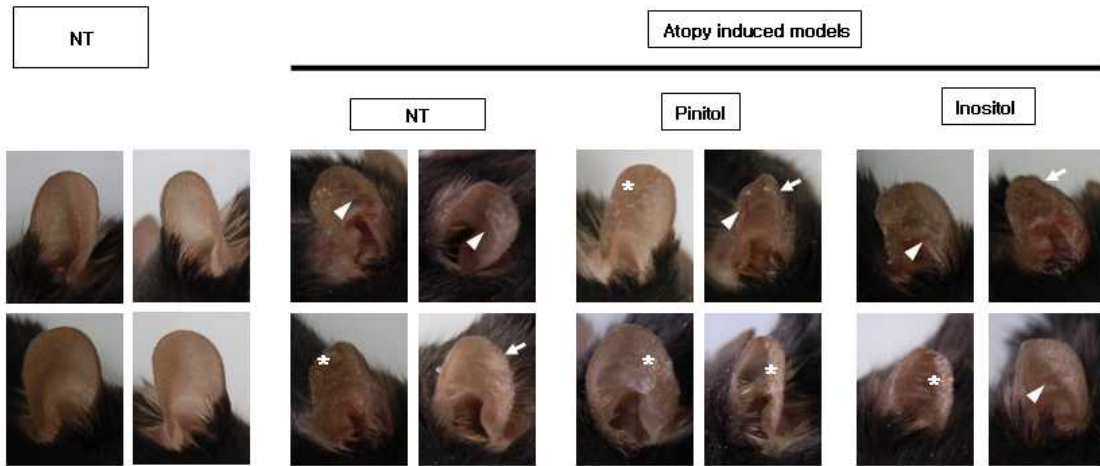


그림 12. 피니톨과 이노시톨에 의한 아토피 동물모델

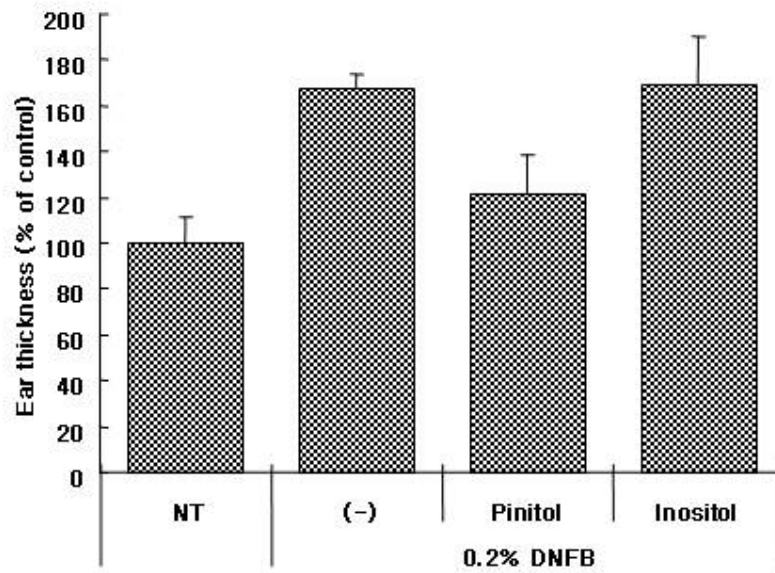


그림 13. 아토피 동물모델에서의 귀두께 측정

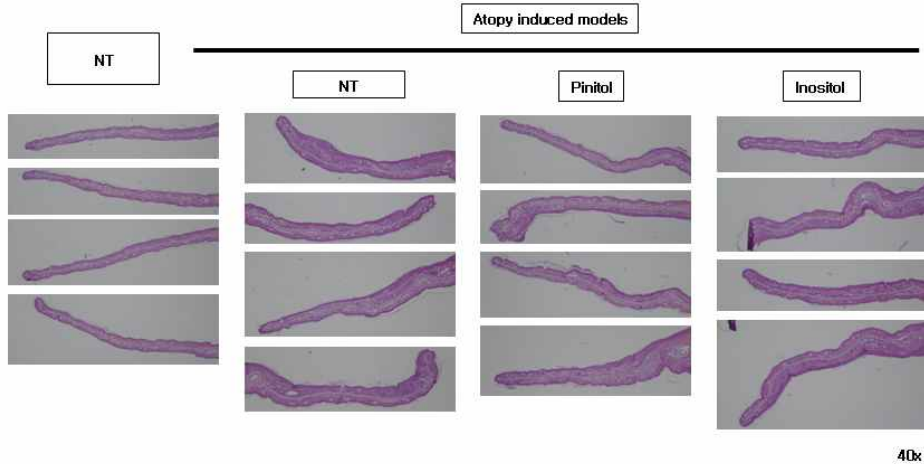


그림 14. 피니톨과 이노시톨에 의한 아토피 동물모델

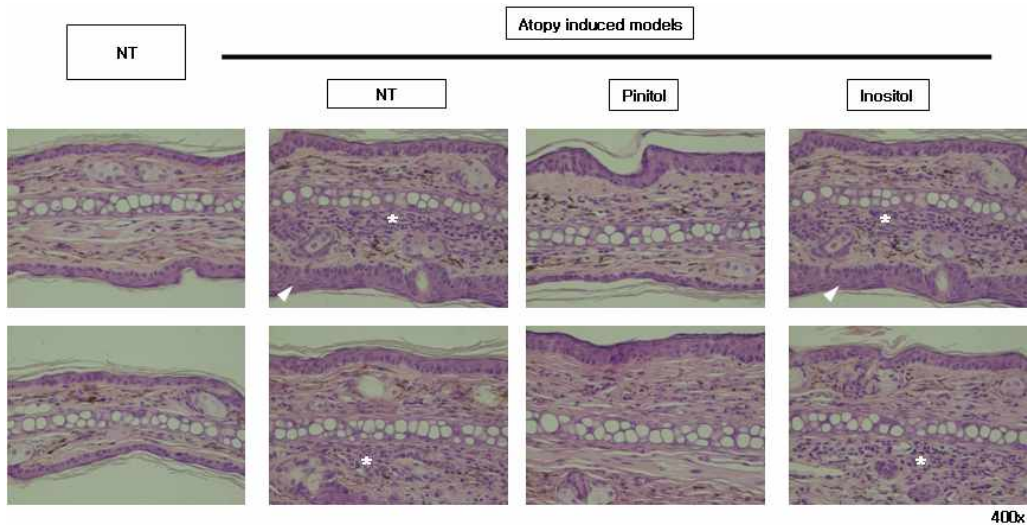


그림 15. 피니톨과 이노시톨에 의한 아토피 동물모델

#### 라) 마우스 모델을 이용한 항암 활성

마우스 항암 모델을 이용하여 허파에 cancer colony 형성 정도를 알아보았다. 실험 결과 무처리군에 비해 B16F1 cell을 정맥주사 한 그룹의 허파에 cancer colony가 형성되는 것을 알 수 있었으며, 피니톨을 처리한 그룹에서는 colony 숫자는 약 20% 내외정도 증가하는 것으로 나타났다. 반면 colony의 크기가 큰 것의 비율은 30% 정도 감소하는 것으로 나타났으며, 작은 콜로니의 수가 다수 나타나는 것을 알 수 있었다. 이노시톨 두 종의 경우는 피니톨과는 다르게 큰 콜로니의 수가 감소하는 경향을 나타내며, 작은 콜로니의 수는 유도군과 큰 차이를 보이지 않았다.

피니톨의 항암활성을 알아본 결과 colony의 성장을 억제하는 것을 알 수 있었으며, 이노시톨의 경우는 전체적인 colony 수를 약간 감소시키는 것을 알 수 있었다.

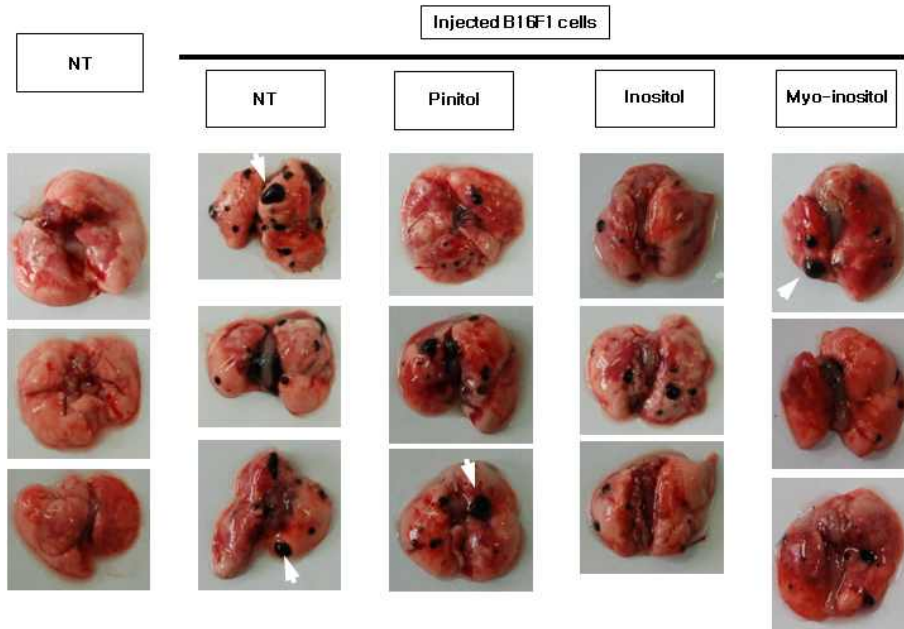


그림 16. 마우스 모델을 이용한 항암 활성 측정

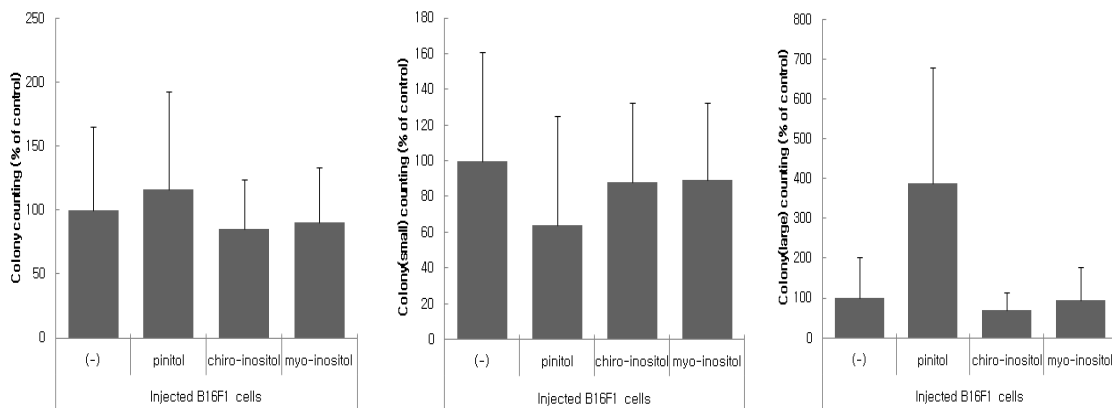


그림 16. 동물모델을 이용한 피니톨의 항암 활성

#### 다. 콩의 유효성분을 이용한 산업화 연구

##### 1) 피니톨

피니톨은 항당뇨 치료제로서 많은 연구가 되어 있으며, 이와 관련한 산업이 다수 발달되어 있다.

##### (가) 논문

○ 제 2형 당뇨병 환자에서 D-chiro-inositol의 혈당강하 효과(Korean journal



- of medicine, v.72 no.1 = no.557, 2007, pp.29-36)
- 대두에서 분리한 피니톨의 (Food preservation and processing industry ,v.6 no.1, 2007, pp.23-30)
  - 혈당 강하 요구르트 개발에 관한 연구(Korean journal for food science of animal resources, v.26 no.2, 2006, pp.257-262)
  - 대두에서 분리한 피니톨의 생리활성(Food industry and nutrition, v.9 no.1, 2004, pp.28-35)
  - d-pinitol regulates Th1/Th2 balance via suppressing Th2 immune response in ovalbumin-induced asthma (FEBS letters, v.581 no.1, 2007, pp.57-64 )
  - d-pinitol inhibits Th1 polarization via the suppression of dendritic cells (International immunopharmacology, v.7 no.6, 2007, pp.791-804)

(나) 특허

- 달걀비 및 가시오가피 추출물을 포함하는 당뇨 기능성 음료 및 제조방법, 한국공개특허 / 안건일; / 10-2007-0066505 (2007-07-03)
- D-피니톨의 대량 생산방법, 한국공개특허 / 노동선;박훤범; / 10-2008-0028067 (2008-03-26)
- 디-카이로-이노시톨의 제조방법, 한국등록특허 / 주식회사 카이로캠; / 10-2006-0115124 (2006-11-21)
- 피니톨 성분이 함유된 생식 건강 보조 식품의 제조방법, 한국공개특허 / 박 원 희; / 10-2003-0015996 (2003-03-14)
- 대두가공 부산물로부터 카이로이노시톨 성분의 분리방법, 한국등록특허 / 아미코젠주식회사; / 10-2001-0016111 (2001-03-27)
- 피니톨 또는 카이로이노시톨을 포함하는 간 질환 예방 및치료용 조성물, 한국공개특허 / 아미코젠주식회사; / 10-2003-0019018 (2003-03-26)
- 글루코사민과 피니톨을 유효성분으로 하는 염증성 질환의예방 및 치료용 조성물, 한국등록특허 / 아미코젠주식회사; / 10-2005-0057923 (2005-06-30)
- D-피니톨을 유효성분으로 포함하는 골 대사성 질환의 예방 또는 치료용 조성물, 한국등록특허 / 솔젠트 (주);충남대학교산학협력단; / 10-2007-0090073 (2007-09-05)

## (다) 제품



Vital Nutrients d-Pinitol 600mg 60c (PCOS) - Vital Nutrients



Food grade pinitol extracted from soybean or carob and purified to 95% purity



CaroPinitol (D-Pinitol)



로하스피니톨



## 2) 글라이세오린

### (가) 논문

- Molecular effects of soy phytoalexin glyceollins in human prostate cancer cells LNCaP. Payton–Stewart, Florastina, Schoene, Norberta W., Kim, Young S., Molecular carcinogenesis, v.48 no.9, 2009, pp.862–871
- Glyceollin I, a novel antiestrogenic phytoalexin isolated from activated soy. Zimmermann, M Carla, Tilghman, Syreeta L, Boue, Stephen M., The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 2009
- Prenylation of aromatic compounds, a key diversification of plant secondary metabolites. Yazaki, K., Sasaki, K., Tsurumaru, Y., Phytochemistry, v.70 no.15/16, 2009, pp.1739–1745
- Identification of the potent phytoestrogen glycinol in elicited soybean (Glycine max). Bou, Stephen M, Tilghman, Syreeta L., Endocrinology, v.150 no.5, 2009, pp.2446–2453
- Effects of Soybean Glyceollins and Estradiol in Postmenopausal Female Monkeys. Wood, Charles E., Clarkson, Thomas B., Appt, Susan E.

Nutrition and cancer, v.56 no.1, 2006, pp.74-81

- Interactions of dietary estrogens with human estrogen receptors and the effect on estrogen receptor-estrogen response element complex formation. Nikov, G N, Hopkins, N E, Boue, S, Environmental health perspectives : EHP, v.108 no.9, 2000, pp.867-872

(나) 특허

- Methods of inducing production of isoflavones in plants using nuclear receptor ligands. 국제공개특허 / the ohio state university research foundation ; graham, terrence, l. ; graham, lian-mei, y. ; landini, serena / us-0004420 (2001-02-12)
- Methods for synthesizing glycinols, glyceollins i and ii, compositions of selected intermediates, and therapeutic uses thereof. 국제공개특허 / the administrators of the tulane educational fund; the university of toledo xavier university of louisiana united states department of agriculture / us-0035803 (2009-03-03)
- Antiestrogenic glyceollins suppress human breast and ovarian carcinoma proliferation and tumorigenesis. 미국공개특허 / cleveland,thomas e.; boue,stephen m.; burow,matthew e.; mclachlan,john a. / us-0082583 (2008-04-11)
- Antiestrogenic glyceollins suppress human breast and ovarian carcinoma proliferation and tumorigenesis. 국제공개특허 / the united states of america, as represented by the secretary of agriculture; tulane center for bioenvironmental research; cleveland, thomas, e.; boue, stephen, m.; burow, matthew, e.; mclachlan, john, a. / us-0015637 (2006-04-24)
- Antiestrogenic glyceollins suppress human breast and ovarian carcinoma proliferation and tumorigenesis. 미국공개특허 / cleveland,thomas boue,stephen burow,matthew mclachlan,john / us-0118431 (2005-04-29)

(다) 제품



- The ability of the glyceollins to regulate estrogen signaling was analyzed using the ER-positive MCF-7 human breast carcinoma cell line and ER-negative HEK 293 cells transfected with either ER (alpha) or ERβ (beta).
- Potential Therapeutic Use of Glyceollins (I-III), Novel Anti-Estrogenic Flavonoid Phytochemicals Isolated From Soy<sup>^</sup> Annual rept. 17 Jun 2002-16 Jun 2003 / Tulane Univ., New Orleans, LA. Health Science Center. / 2003, 18
- 유방암 및 난소암 치료 가능성이 확인된 글리세올린 콩 추출물 /해외과학기술 동향 /2007-01-15 (KISTI)
- 프레닐화 폴리페놀 생산식물의 개발 /최영욱 /ReSeat 모니터링 분석보고서 /2010-03-26 (KISTI)
- 콩과의 고삼, 호프 등 여러 식물에서 발견된 8-dimethylallyl naringenin은 강한 에스트로겐 활성으로서 갱년기장애 개선, 골다공증 예방, 콜라겐 합성 촉진작용, 대두의 glyceollin의 항균작용, 명일엽과 호프 꽃의 xanthohumol이나 xanthoangelol 및 Bacalis의 성분인 artemillin C는 항종양 항암작용, 레몬의 8-geranyloxypsolaren의 혈압조절 효능 등이 보고되었다.

3) 전략

본 연구를 통한 기본적인 전략으로는 글라이세올린(Glyceollin) 항암활성, 피니톨(pinitol) 항염증 활성 등에 대한 효과적인 홍보효과를 통해 콩에 대한 기본적인 수요확대에 중점을 두어야 한다. 글라이세올린과 피니톨을 포함하는 콩에 대한 산업화 추진전략으로 전체적인 수요확대(두 성분에 대한 필요성 증대를 각인), 건강기능

성 식품 개발, 콩성분에 대한 적절한 분리기술의 확보 및 이를 이용한 다양한 제품군의 개발 등이 필요하다.

#### 라. 요약

글라이세오린을 이용하여 항암 및 항아토피 활성을 검증한 결과 wound assay를 이용하여 암세포의 운동성을 저해하는 것을 확인 할 수 있었으며, 마우스를 이용한 아토피 동물 모델을 이용하여 항아토피 활성이 있는 것을 알 수 있었다.

콩의 주요한 유효성분인 피니톨과 이노시톨을 이용한 생리활성 물질의 확인 결과 피니톨은 세포의 운동성을 저하시킨다. 또한 항암분자마커인 ICAM-1, CD44, MMP17, MMP14, ARF2의 발현을 감소시키는 것으로 나타났다.

이노시톨은 항암분자마커인 MMP14와 VEGF-A의 발현을 감소시키는 것으로 나타났다. 피니톨은 항염증 관련 아토피 동물모델에 효과가 있는 것으로 나타났으며, 아토피 유도모델에서의 귀의 비후(두께)를 감소시키며, 면역세포의 염증 부위로의 이동을 감소시키는 것으로 나타났다. 피니톨의 항암활성을 마우스 항암모델을 이용하여 알아본 결과 colony의 성장을 억제하는 것을 알 수 있었으며, 이노시톨의 경우는 전체적인 colony 수를 약간 감소시키는 것을 알 수 있었다.

산업화와 관련된 콩의 유효물질에 대한 연구는 지속적으로 이루어지고 있으며, 특히 피니톨은 상품의 가치를 인정받아 다수 생산되고 있다.

## 제 5 절 기능성 물질의 대량 분리 생산 및 산업화

### 1. 콩의 레시틴 분리

#### 가. 콩에서 발견되는 기능성 물질인 레시틴(Lecithin)의 특성

레시틴은 그리스어 난황인 "LEKITHOS"로부터 유래되었고 1850년 Gobley라는 화학자가 명명하였으며 세포막의 인지질(phospholipid)중 한 성분이지만, 흔히들 인지질을 통합하여 레시틴으로 불린다. 특히 세포막구성 물질로 알코올, 에테르에 용해되며 물과는 에멀전을 만들며 가수분해하며 콜린, 인산, 글리세롤, 지방산을 생성한다. 지방산은 주로 스테아르산, 팔미트산, 올레산, 리놀레산 등으로 구성되어 있다.

콩 레시틴은 phosphatidylcholine(PC), phosphatidylethanolamin(PE), phosphatidylinositol(PI), phosphatidic acid(PA), phosphatidylserine(PS)를 주요성분으로 하고 있다.

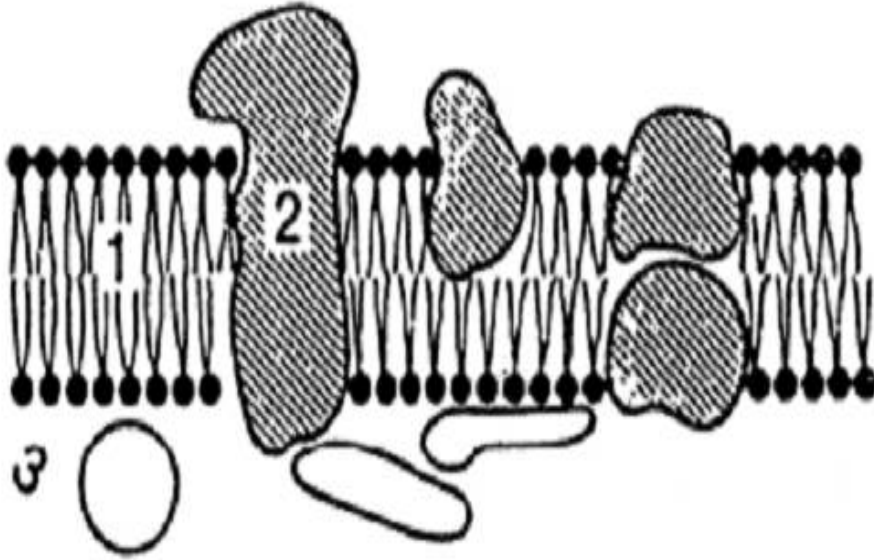


그림 1. Cell membrane 단면도

1. phospholipids 2. integral protein 3. peripheral protein

레시틴의 분자식은 위 그림과 같이 글리세린의 R1, R2 위치에 지방산이 에스테르 결합을 하고 R3 위치에 인산이 붙어 있으며 인산의 반대끝은 다른 물질이 OH-기와 결합을 하는 형태를 취하고 있다. 콩에 함유된 레시틴은 주로 세포막에 존재하며, R3에 들어가는 주요구성 성분은 phosphatidylcholine(PC), phosphatidylethanolamin(PE), phosphatidylinositol(PI), phosphatidic acid(PA), phosphatidylserine(PS) 등으로 분류되고 있다.

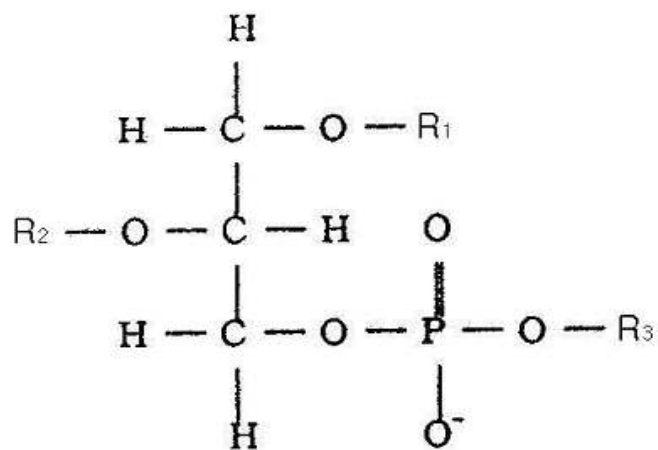


그림 2. Lecithin의 분자 구조

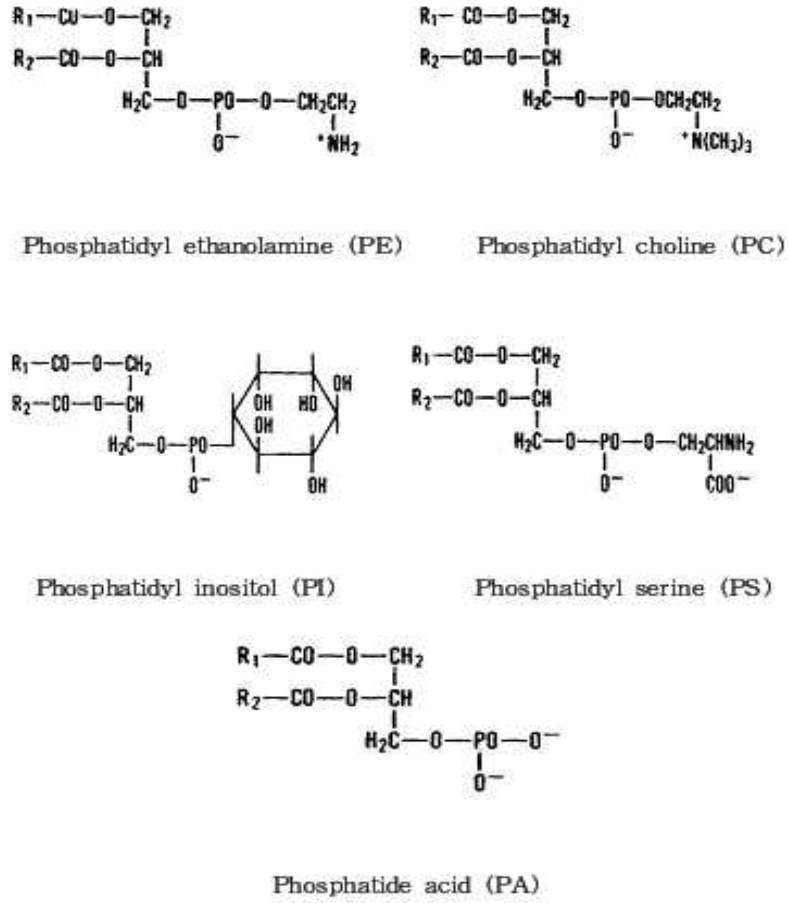


그림 3. 콩에서 발견되는 레시틴의 종류

나. 콩 12 품종에서 레시틴의 분리

1) 용매를 이용한 Crude Soybean Oil

Balas등, Folch등, 박순혜등, 김지영 등과 김천희 등의 방법을 다소 수정하여 레시틴을 분리하였다. 추출을 위해 가루를 곱게 갈아 놓은 콩가루 5g에 chloroform/methanol(2:1=v/v) 45ml을 가해 1day 정도 추출한 지방을 filter paper를 이용하여 여과한다. 여과액을 감압회전농축기를 이용하여 추출에 사용된 용매의 70~80%를 회수한다. 추출된 조대두유의 정성 분석을 위해 식품공전의 레시틴 가공식품 분석법을 응용하여 정성분석을 실시하였다. 박층 크로마토그래피(TLC)를 전개시킬 solvent는 chloroform:methanol:7N ammonium hydroxide(130:60:8=v/v/v)의 비율로 만들고, 조대두유 10mg을 1ml chloroform에 용해시켜 이 중 100ul를 TLC판 하단에 점적하고 전개 후 20분정도 건조시킨다. 건조된 TLC을 U/V를 이용하여 확인하였다.

## 2) Crude Soybean Oil에서 레시틴의 분리 Lecithin

조레시틴의 분리를 위해 탈검과 수화를 이용하였다. 탈검을 위해 조대두유에 아세톤을 가해 아세톤 불용물을 회수 후 50°C dry oven에서 overnight 시켜 조레시틴을 얻었다. 또다른 방법으로 가온(55~75°C)하 조대두유의 3~10%에 해당하는 물을 가하여 100~200rpm으로 30분정도 교반 후 원심분리하여 하층의 sluge를 건조시켜 수화된 레시틴을 얻는다.

## 3) TLC(thin layer chromatography)를 이용한 정성분석

실험에 사용된 발색시약은 anisaldehyde 0.5ml : sulphuric acid 1ml : acetic acid 50ml(v/v/v)로 제조한다. 시료 레시틴 10mg을 1ml로 용해하여 이중 100ul를 TLC 판에 점적하고, 포화된 TLC chamber에서 전개시킨다. TLC를 전개시킬 용매는 chloroform : methanol : 7N ammonium hydroxide(130:60:8, v/v/v)의 비율로 하여 사용하였다. 물질이 분리되면 1~2cm를 남기고 chamber에서 꺼내 20~30분 가량 건조 시킨 후, UV를 이용해 1차로 물질을 확인한다. TLC에 나타나지 않은 물질의 확인을 위해 질소를 이용하여 발색시약을 TLC에 뿌리고 약 20분 후 핫플레이트에서 굽게 되면 TLC에 나타나지 않았던 spot이 나타날 수 있다.

## 4) 초임계유체 추출 장치를 이용한 레시틴의 분리 등

본 실험에 사용된 콩은 2007년 생산된 것으로 시장에서 구입하여 수세 후 건조하여 사용하였다. 콩 2kg을 분쇄기로 분쇄하여 입자의 크기가 약 3mm 정도를 지퍼백에 밀봉하여 -20°C 냉동 보관하여 시료로 사용하였다. 본 실험에는 초임계유체 추출장치(SC-CO<sub>2</sub> extraction system, Ilshin Autoclave Co., Ltd)를 사용하였다. 추출장치는 추출조, 분리조, 폭엿팍프, 이산화탄소 저장탱크로 구성되어 있다. 추출조에 분쇄된 콩 약 2kg을 넣고 HP pump를 이용하여 폭엿한다. 폭엿된 이산화탄소는 압력 조절기(BPR)을 이용하여 조절하고 추출조에 이송된다. 추출조 내의 용적은 4L이고 온도 조절기에 의해 조절된다. 추출조에서 콩 기름을 용해한 이산화탄소는 분리조에서 기체 이산화탄소와 추출물로 분리된다. 분리된 콩기름은 구연산 농도가 0.2-1% 가하여 30분 동안 교반하고 검화시킨다. 검화된 조레시틴은 원심분리하여 얻는다. 검화된 조레시틴은 아세톤으로 세척하여 정제된 레시틴을 얻는다.

## 5) Colorimetric determination assay

### (가) 시약제조

Totani 등<sup>1)</sup>이 측정한 방법을 응용하여 측정하였다. 뜨거운 물 12ml에 Ammonium molybdate 1.6 g을 넣고 solution I를 만들었다. Solution I 8ml에 농염산 2~3방울과 0.1g tin chloride를 섞은 뒤, 30분간 실온에서 반응시켜 solution II를 얻는다. Solution I에 농황산 20ml을 넣고 solution II와 혼합하여 solution III을 얻었다.



#### (나) 측정방법

추출된 조대두유에 oil과 acetic acid를 1:1의 비율로 잘 섞어준 후 2,000rpm으로 1분간 원심분리하고 acetic acid층에 0.1ml 발색시약과 0.4ml chloroform을 넣고 끓는 수조(90~100°C)에 1분간 담근 뒤 꺼내서 식혔다. Chloroform 3ml를 넣고 735nm에서 spectrophotometer로 흡광도를 측정하였다. Standard curve는 레시틴을 5~25ug, phosphatidylcholine 0.05~0.25ug 농도별로 희석하여 이용하였다.

#### 6) HPTLC(High Performance Thin Layer Chromatography)를 이용한 정성·정량 분석

Lee. E.H 등<sup>5)</sup>의 TLC법을 변형하여 레시틴의 정성·정량 분석에 이용한다. 조대두유 중 레시틴을 정량하기 위해 조대두유 시료 100mg을 헥산 10ml로 용해시키고, 이 중 100ul를 TLC판 우측하단에 점적한다.

Solvent(클로로포름:메탄올:아세트산:물 = 170:25:25:6, v/v/v/v)의 비율로 만들어 점적한 TLC판을 chamber에 담귀 HPTLC 기기를 작동한다. 건조과정을 거친 뒤 10%황산을 뿌려 발색하고, 이를 HPTLC 기기를 이용하여 정성·정량분석을 한다.

#### 7) HPLC(High Performance Liquid Chromatography)를 이용한 정성·정량 분석

Yoon, S. H. 등<sup>6)</sup>, W.JEFFREY HURST 등<sup>7)</sup>, Roman Szucs 등<sup>8)</sup>을 변형하여 HPLC 분석에 이용하였다. Kromasil sil column(4.5mm × 25cm)를 사용하였고, 용매는 n-hexane : 2-propanol : 10mM acetate buffer pH4.2(8 : 10 : 1, v/v/v)를 사용하였다. 주입량은 10ul이며 205nm 파장에서 UV detection system을 이용하여 확인하였다.

#### 8) DPPH free radical 소거활성

항산화효과는 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl(DPPH)이 항산화성 물질과 만나 전자를 내어 주고 라디칼이 소거되면서 색깔이 변하는 원리를 이용한 Blois 등<sup>2)</sup>, Jeong 등<sup>3)</sup>, Lee<sup>4)</sup>의 DPPH법을 변형하여 측정하였으며 Scavenging Ability에 의한 환원력으로 나타냈다. 조대두유의 항산화능을 측정하기 위하여 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)를 이용하였다. 시료유 10mg에 DMSO 990ul를 첨가하여 sample(10mg/ml oil)을 준비한다.  $2.0 \times 10^{-4}$  M DPPH용액 3.8ml에 준비한 sample 0.2ml를 첨가한 후 vortex mixer로 10초간 진탕하고 상온에서 30분간 방치한다. 516nm UV/Vis-spectrophotometer로 측정하여 % DPPH radical scavenging activity로 나타내었다. 시료 고유색의 흡광도를 보정 해주기 위하여 공시험은 sample 대신 ethanol을 넣어 흡광도를 측정하였다.

$$\text{Scavenging Ability(\%)} = \left\{ \frac{\text{Control} - \text{Sample}}{\text{Control}} \right\} \times 100$$

#### 다. 콩의 레시틴 분리 연구 결과

##### 1) 용매를 이용한 Crude Soybean Oil

실험에서 제시한 헥산, 클로로포름, 클로로포름-메탄올 혼합물로 추출한 결과 클로로포름-메탄올 혼합물에서 가장 많은 양의 조대두유를 얻을 수 있었다. (Fig 1.) 향후 레시틴 추출시 클로로포름:메탄올에서 추출하는 것이 가장 적당한 것으로 판단된다.



Fig 1. .CHCl<sub>3</sub>-MeOH(2:1,v/v)로부터 얻은 조대두유

##### 2) Crude Soybean Oil에서 수화를 통한 레시틴의 분리

조대두유로부터 sluge 침전 효율을 알아보기 위해 온도 50~75℃에서 물 3~10% 첨가로 다양한 교반 조건에서 확인한 결과 75℃, 수분 3% 조건에서 수화가 가장 잘 일어나며 수율이 좋다는 결과를 얻을 수 있었다. 수화는 용매를 사용하는 측면에서 환경오염 등 기타 좋은 조건을 가지고 있으나 수율면에서 아세톤 불용물에 비하여 다소 낮았다. 그러나 아세톤 추출에 비하여 용매가 필요없고, 용매를 제거할 필요가 없으며, 아세톤 추출물 보다 색상 등에서 월등히 좋았다. 따라서 향후 대량 분리시 수화를 통한 레시틴의 분리가 더 경제적인 것으로 보인다.



수화과정에서 슬러지 생성



수화된 레시틴

Fig 2. 대광콩에서 교반을 이용한 sluge 침전 및 수화물

### 3) Crude Soybean Oil에서 아세톤불용물을 이용한 레시틴의 분리

조대두유를 이용하며 아세톤에 녹지 않은 아세톤 불용성을 이용하여 조대두유에 일정양의 아세톤을 첨가하여 아세톤에 녹지 않은 침전물을 filter paper로 여과 후 overnight 시켜 얻은 조레시틴이다. 수화하는 것보다 많은 양의 조레시틴을 얻을 수 있었으며, 대량 분리시 용매를 사용하여야 한다는 점에서 약점을 가지고 있는 방법이다.

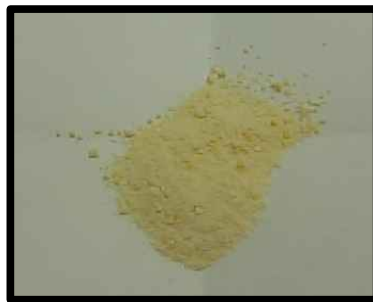
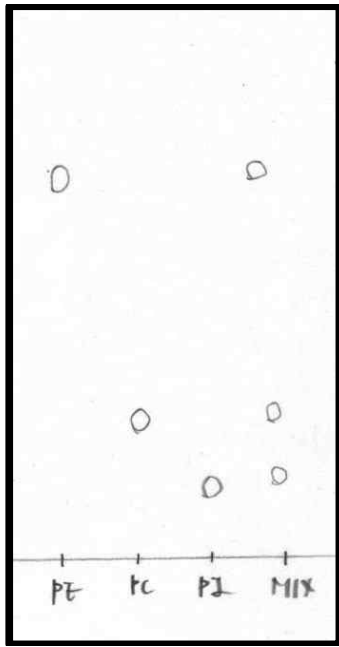


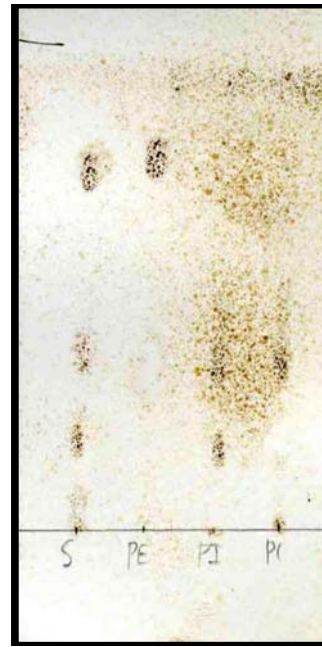
Fig 3. 아세톤 불용물 조레시틴

### 4) TLC(thin layer chromatography)를 이용한 정성분석

TLC로 전개한 Standards(Mixed with PC, PI and PE)를 대조구로 하여 조대두유와 조대두로부터 분리한 레시틴으로 PC, PI, PE의 성분물질을 확인하는 정성분석을 수행하였다. (Fig 4.)



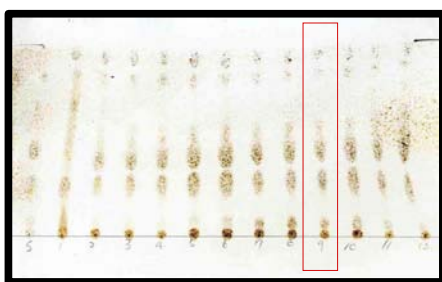
UV를 통한 육안확인



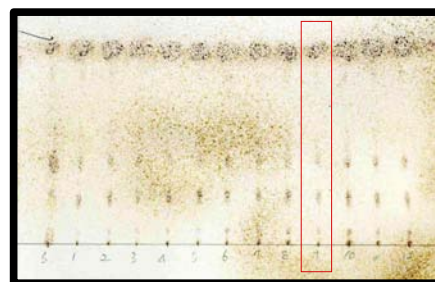
발색

Fig 4. 콩의 레시틴(PE, PC, PI) Standard를 이용한 TLC 분석

위에서 TLC를 통하여 표준물질의 전개 거리를 통해 측정하고 조대두유와 정제된 레시틴에서도 TLC를 이용한 정성 분석을 실시하였다. 아래에 나타난 바와 같이 본 연구에서 추출한 레시틴이 표준물질과 일치하는 것으로 분석되어, 레시틴을 국산콩에서 분리하여 향장 제품, 레시틴 제품을 생산하는 데에도 가능품, 보였다. 본 연구에서는 현- HPLC 분석을 통하여 레시틴을 분리하고 있다. 향후에는 본 연구에서 육성된 아가콩에서 레시틴을 대량 분리하여 향장제품 및 레시틴 제품의 생산에 적용하고자 한다.



Curde soybean oil



Crude lecithin

Fig 5. 콩 12품종에서 분리된 조대두유와 레시틴의 TLC 분석 (붉은색 네모: 아가콩)

- 5) 콩 12 품종에서 분리한 성분의 특성  
인지질의 구성성분인 레시틴 성분들이 물과 아세톤에 녹지 않는 성질을 이용하여

탈검 및 수화작용을 수행하였다. 아가콩은 조대두유의 추출 0.89g/5g(마쇄된 콩, 용매 80% 제거시) 수율은 상대적으로 낮게 나타났으나 조대유로부터 분리된 조레시틴의 함량은 40.5mg/5g(마쇄된 콩) 우수한 것으로 나타났다.

Table 1. 콩 품종별 단백질, 조유, 콩 껍묵, 레시틴 함량

Sample	Contents of protein (ug protein/g)	Color of extracted sample	Soybean oil cake	Crude soybean oil	Crude soybean lecithin(mg)
1 (대망콩)	275382.514	Yellow	3.92g	1.23g	33.9
2 (대원콩)	258989.071	Yellow	3.82g	1.20g	39.8
3 (대풍콩)	237950.82	Yellow	3.90g	1.19g	36.4
4 (석광꽃콩)	243688.525	Green	3.93g	1.29g	30.1
5 (선유콩)	190683.06	Yellow	3.95g	0.93g	44.5
6 (신기콩)	260901.639	Yellow	3.93g	1.05g	41.6
7 (아가콩)	235491.803	Yellow	4.11g	0.89g	40.5
8 (일품검정콩)	191229.508	Black	3.85g	0.78g	28.9
9 (청자콩)	175928.962	Black	4.05g	1.20g	20.3
10 (큰올콩)	227841.53	Yellow	4.06g	1.17g	40.2
11 (태광콩)	245327.869	Yellow	3.96g	1.42g	19.4
12 (풍산나물콩)	244508.197	Yellow	3.97g	1.01g	22.6

#### 6) 초임계 장치를 이용한 정유 및 레시틴 분리

이산화탄소 초임계 추출장치를 통한 레시틴의 분리는 아래 그림에 나타낸 바와 같이 IlshinAutoclave SC-CO<sub>2</sub> Extraction system을 사용하여 추출하였다. 추출 조건은 압력 425 bar, 40℃에서 레시틴을 추출하였으며, 2kg의 대두를 사용시 약 200ml의 정유를 얻을 수 있었다. 그래서 탈검과정을 거쳐 레시틴을 분리하고자 하였으나, 탈검 과정에서 레시틴이 거의 침전되지 않아 초임계 추출 장치를 통한 레시틴은 0.1 ppm 이하라고 판단되었다. 초임계 추출 장치는 용매 추출 보다 매우 높은 레시틴 분리 단가가 사용됨으로 대량 분리 시스템으로서는 적합하지 아니한 것으로 판단되었으나, 용매로 이산화탄소를 사용함으로써 양질을 정유 및 레시틴을 얻을 수 있을 것으로 판단되었다.

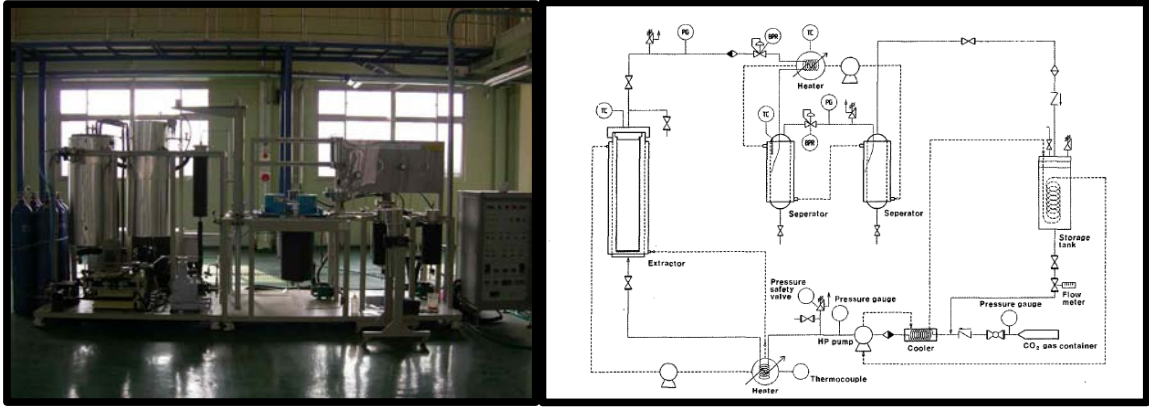


Fig 6. 초임계 추출장치 모식도(ILshin-Autoclave SC-CO2 Extraction system)

아래는 초임계 추출장치를 통하여 정유를 분리한 그림으로 상위 정유층과 하위 수층으로 분리 되었고 정유층과 수층 사이에 단백질 덩어리로 추정되는 물질들을 발견할 수 있었다.



Fig 7. 이산화탄소 초임계 장치를 이용한 콩의 정유

### 7) Colorimetric determination assay

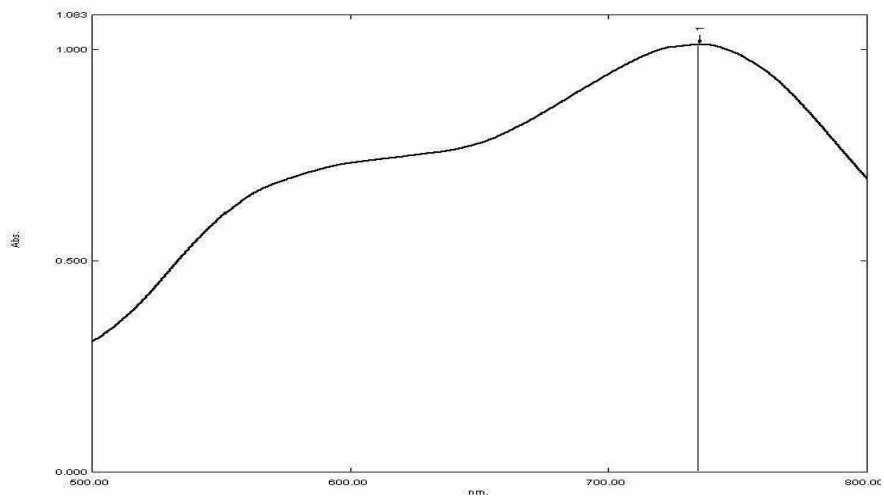


Fig 8. Difference of absorbance in wavelength variation

조대두유로부터 분리된 acetic acid layer를 이용하여 발색시킨 후 최대흡광도가 나타나는 파장을 조사하였다. spectrumphotometer를 이용하여 전 파장을 scanning한 결과 Fig 1.에서 보듯이 600~800nm 부근에서 흡광도가 높게 나타남을 확인할 수 있다. 이 중 최대 흡광도는 Totani 등<sup>1)</sup>의 조사처럼 735nm 부근에서 최대의 흡광도를 내는 것을 확인할 수 있다.

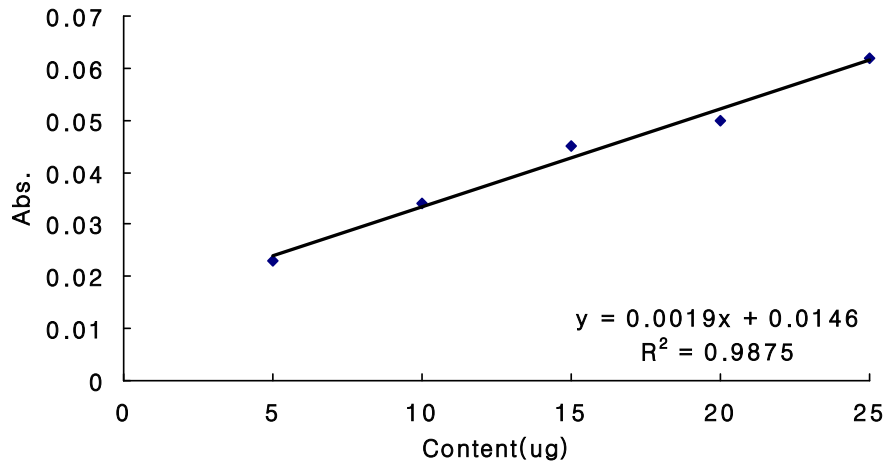


Fig 9. Standard curve of lecithin from soybean

Standard curve는 레시틴을 5, 10, 15, 20, 25ug 농도별로 희석하여 작성하였다 (Fig 2.). 레시틴의 표준곡선으로 물질의 농도 증가와 흡광도의 변화를 조사한 것이다. 시료의 농도가 증가함에 따라 흡광도가 비례하여 증가하는 것을 확인할 수 있다.

Table 2. Concentration of lecithin from different soybean cultivar

Cultivar name	mg lecithin/g oil
대망	5.8 ± 0.06
대원	5.5 ± 0.08
대풍	5.5 ± 0.21
석량꽃	4.7 ± 0.05
선유	7.2 ± 0.09
신기	6.6 ± 0.05
아가	6.8 ± 0.14
일품검정	5.6 ± 0.16
청자	3.8 ± 0.21
큰올	5.7 ± 0.09
태광	5.4 ± 0.10
풍산나물	5.8 ± 0.06

Fig 9.의 표준곡선으로부터 colorimetric determination assay를 이용하여 조대두유의 레시틴 함량을 정량한 결과이다. (Table 2.) 조대두유의 레시틴 함량은 평균  $5.7 \pm 0.06$  mg/g oil의 함량을 나타내었다. 조대두유 중 레시틴 함량이 가장 높은 콩 품종으로는 선유콩이 가장 높은  $7.2 \pm 0.09$  mg/g oil의 함량을 나타내었고, 아가콩에서는 평균치보다 높은  $6.8 \pm 0.14$  mg/g oil의 함량을 나타내었다.

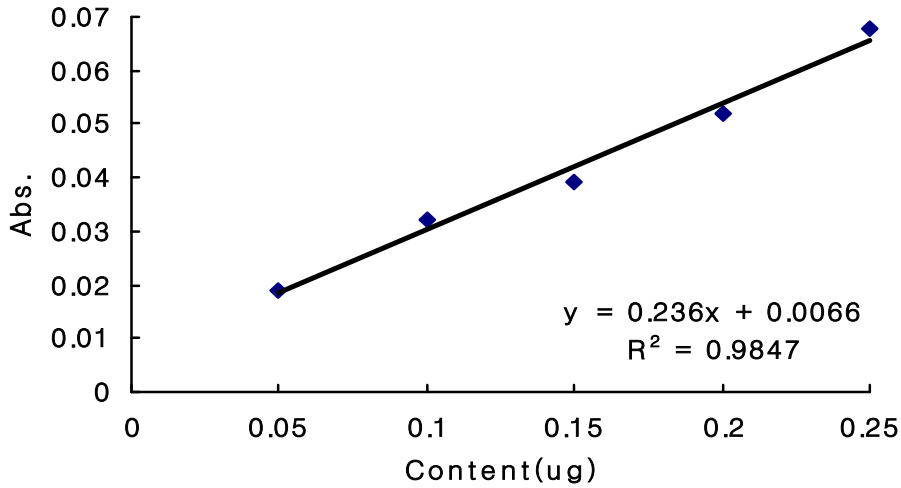


Fig 10. Standard curve of phosphatidylcholine from soybean

Standard curve는 phosphatidylcholine을 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25ug 농도별로 희석하여 작성하였다. (Fig 10.) Phosphatidylcholine의 표준곡선으로 물질의 농도 증가와 흡광도의 변화를 조사한 것이다. 시료의 농도가 증가함에 따라 흡광도가 비례하여 증가하는 것을 확인할 수 있다.

Table 3. Concentration of PC from different soybean cultivar

Cultivar name	ug PC/g oil
대망	$46.5 \pm 0.37$
대원	$44.9 \pm 0.35$
대풍	$46.5 \pm 0.55$
석량꽃	$38.2 \pm 0.30$
선유	$58.8 \pm 0.25$
신기	$53.6 \pm 0.50$
아가	$54.8 \pm 0.42$
일품검정	$45.8 \pm 0.16$
청자	$29.6 \pm 0.48$
큰올	$47.5 \pm 0.53$
태광	$44.7 \pm 0.37$
풍산나물	$48.0 \pm 0.30$



Fig 10.의 표준곡선으로부터 colorimetric determination assay를 이용하여 조대두유의 phosphatidylcholine의 함량을 정량한 결과이다. (Table 3.) Colorimetric determination assay를 이용하여 조대두유의 phosphatidylcholine 함량을 정량한 결과 평균  $46.57 \pm 0.15$  at assay의 함량을 나타내었다. 선유콩에서 가장 높은  $58.8 \pm 0.25$  at assay의 함량을 나타내었고, 아가콩에서는 평균치보다 높은  $54.8 \pm 0.42$  at a oil의 함량을 나타내었다.

#### 8) DPPH free radical 소거활성

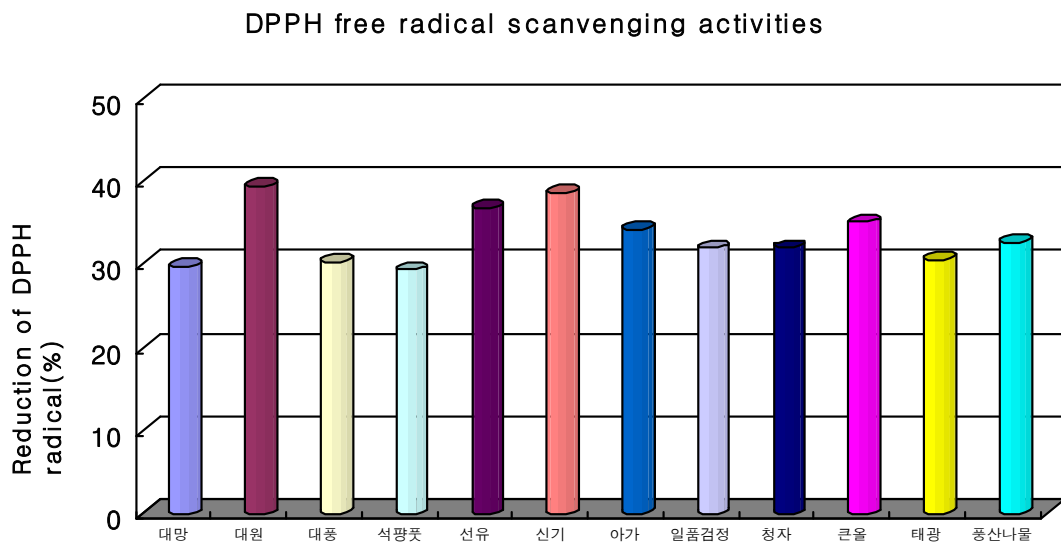


Fig 11. DPPH free radical scavenging activities from different soybean cultivar (10mg/ml oil)

조대두유의 DPPH 활성산소 소거능을 평가한 결과이다. 10 mg/ml의 농도의 sample에서 평균 33.3%의 소거능을 보였다. 가장 소거능이 좋은 품종으로는 신기콩에서 38.5%의 소거능을 나타내었으며, 아가콩에서도 평균치보다 조금 높은 34.1%의 소거능을 나타내었다.(Fig 11.)

9) HPTLC(High Performance Thin Layer Chromatography)를 이용한 정성·정량 분석

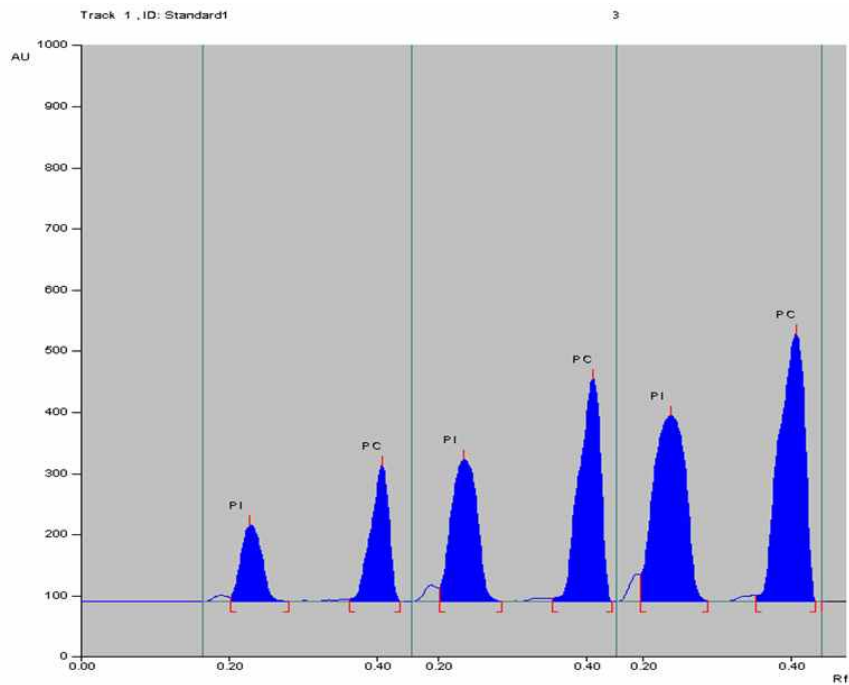


Fig 12. Value of Rf in different standards from HPTLC

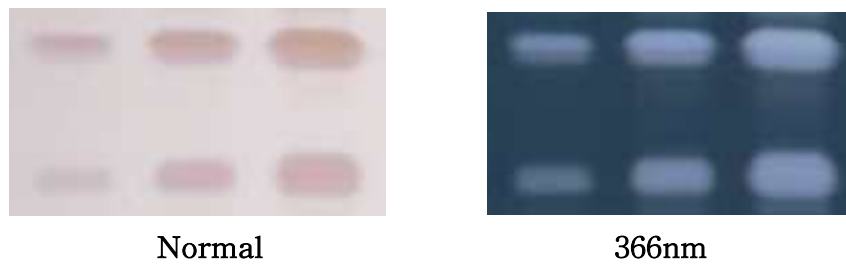


Fig 13. Diagram HPTLC of different contents from PC and PI in mixed standard (1,000ppm, 2,500ppm, 5,000ppm)

HPTLC를 이용하여 얻은 동일 Rf 값의 물질들을 확인한 결과이다. 1,000, 2,500, 5,000 ppm의 농도별 물질의 함량변화를 확인할 수 있다. 동일 물질의 Rf 값이 일치하는 것을 이용하여 standard로부터 콩 품종의 정성·정량 분석에 이용할 수 있을 것으로 사료된다. (Fig 13.)

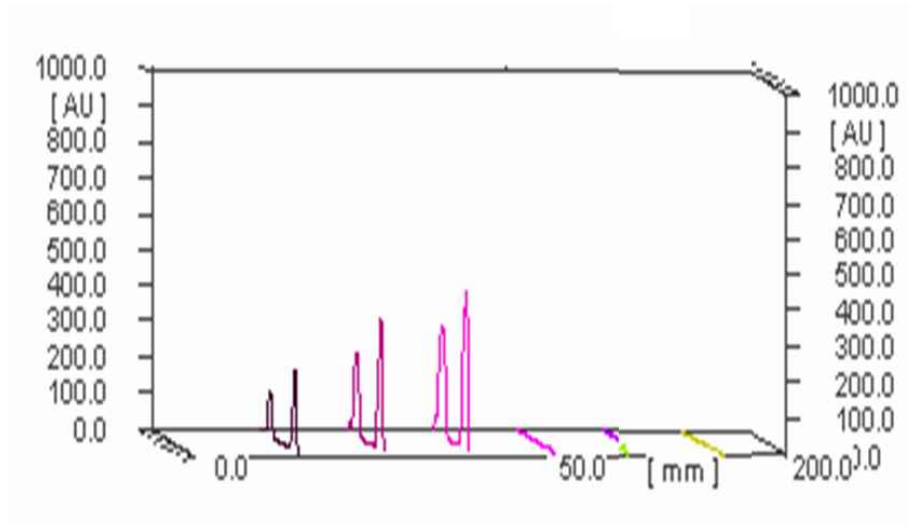


Fig 14. Contents 3D graph from PC and PI in mixed standard.

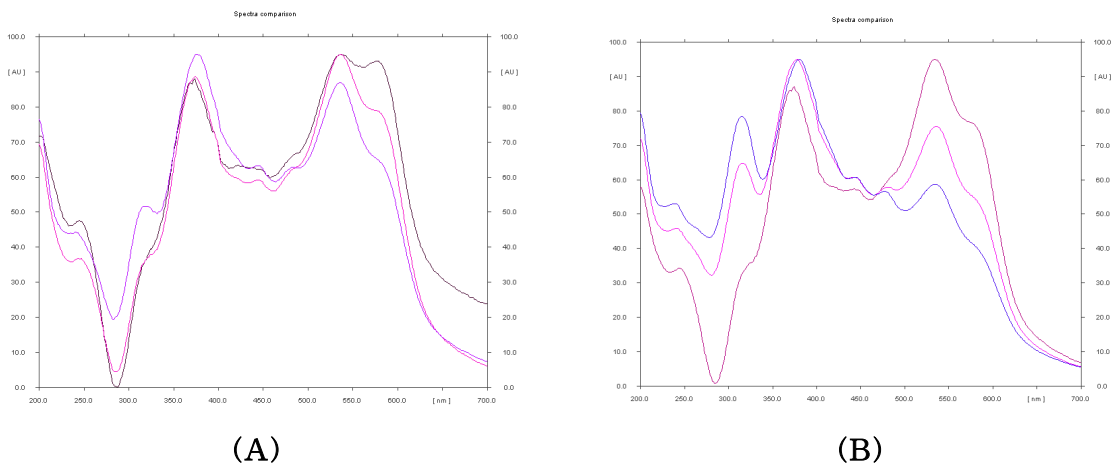


Fig 15. Spectra comparison of phosphatidylinositol and phosphatidylcholine

Fig 14., 15.의 결과는 레시틴의 표준물질 중 phosphatidylcholine 과 phosphatidylinositol 을 HPTLC를 이용하여 전개 및 흡광도를 측정한 결과이다. 흡광도가 일치함으로 미루어 보아 3가지 농도의 standard 물질이 동일 물질임을 확인할 수 있고, 이를 이용하여 레시틴 의 보다 정밀한 정성·정량 분석이 가능할 것으로 사료된다.

10) HPLC(High Performance Liquid Chromatography)를 이용한 정성·정량 분석

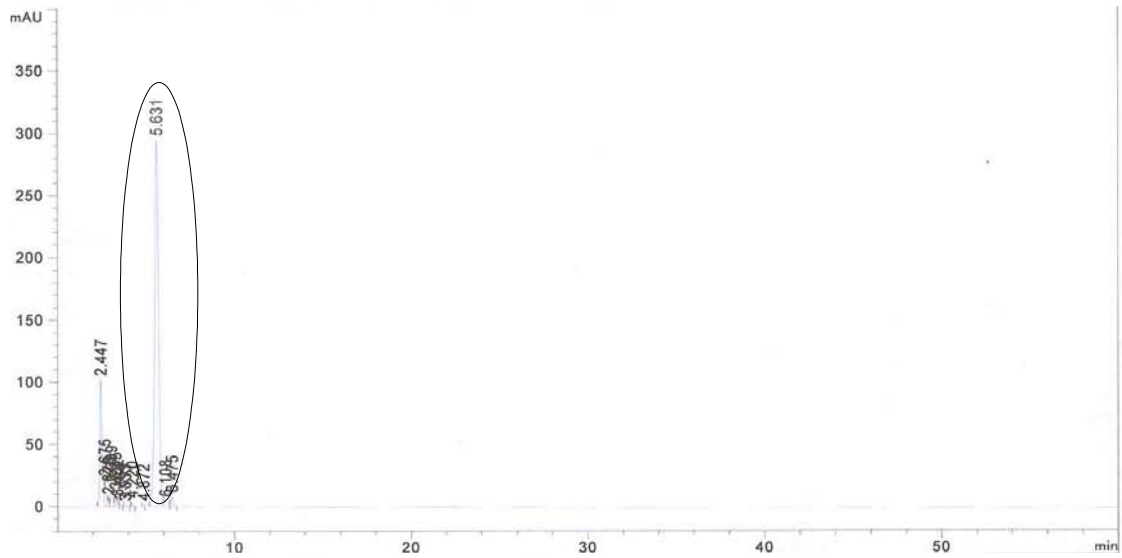


Fig 16. HPLC chromatograms of phosphatidylethanolamin

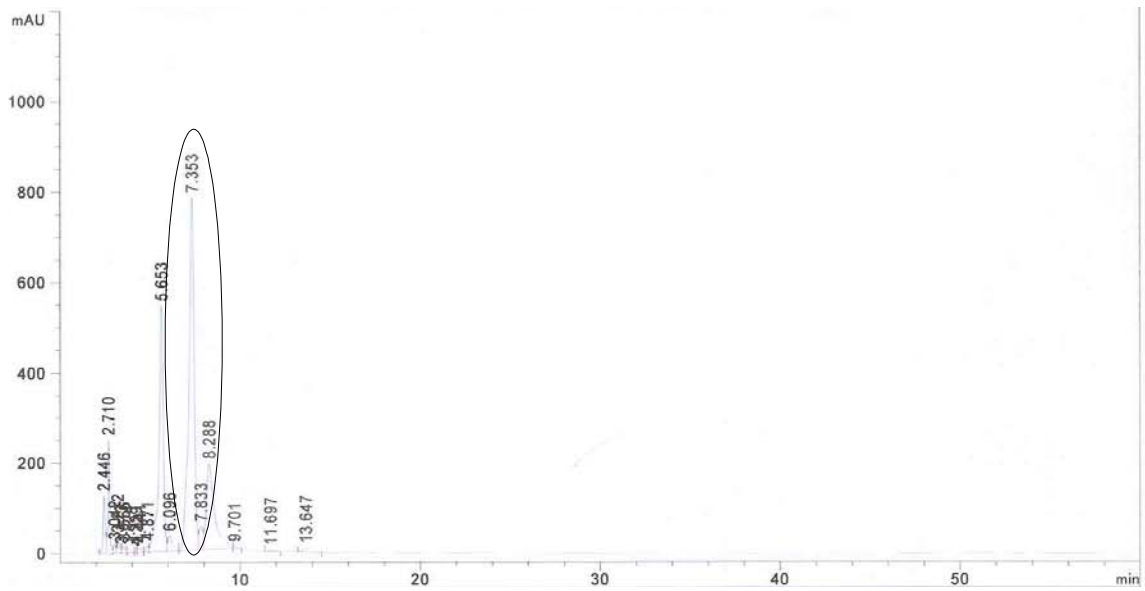


Fig 17. HPLC chromatograms of phosphatidylinositol

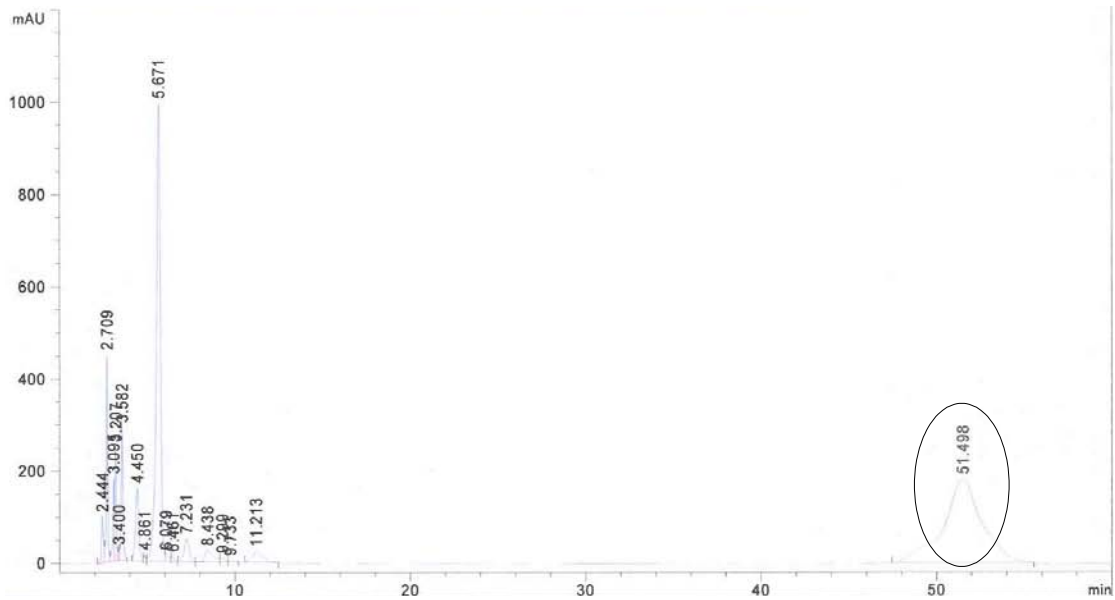


Fig 18. HPLC chromatograms of phosphatidylcholine

Fig 16., 17., 18.은 3가지의 표준물질 phosphatidylethanolamin, phosphatidylinositol, phosphatidylethanolamin을 HPLC 분석한 결과이다. PE가 5~6분 사이, PI가 7~8분 사이, PC가 51~53분 사이에 각각의 피크를 만들면서 분리되었다. Yoon, S. H. 등<sup>6)</sup>, W.JEFFREY HURST 등<sup>7)</sup>, Roman Szucs 등<sup>8)</sup> 등의 방법이 각기 다른 시간에 표준 물질이 검출되므로 반복적인 실험을 통하여 최적의 분석 조건을 확립하고 이를 이용하여 시료 레시틴을 ppm단위까지 보다 정밀한 정성·정량 분석이 가능할 것으로 사료된다.

## 2. 콩 유래의 이소플라본과 레시틴이 함유된 에센스시제품 개발

### 가. Isoflavone 함유 에센스 제형 개발

대두에서 유래된 성분 중 isoflavone 성분은 여성호르몬 유사작용을 한다고 알려져 있으며 콜라겐의 합성을 촉진하고 섬유아세포를 활성화하며 콜라겐분해효소를 저해함으로써 세포의 노화를 방지해 주는 기능이 있다. 특히, 대두 isoflavone 성분 중에 하나인 Genistein은 항산화제로 작용하여 자외선으로부터의 DNA손상을 저해하는 작용이 있는 것으로 알려져 있다. 또한 대두유로부터 분리되는 레시틴은 천연 유효성분으로 화장품의 제형설계에 있어서 많이 사용되는 원료이다. 콩으로부터 유래되는 유효성분으로 주름개선에 효과가 있을 것으로 예상되는 Genistein과 Lecithin을 주성분으로 선정하여 화장품 제형형성에 필요한 다른 성분을 이용하여 유액타입의 에센스 시제품을 제작한다.

1) 시제품 제작을 위한 원재료

Table 1. Materials for Prototype Producing

사용원료명	제조사	ICID(국제화장품원료사전) 명칭
Genistein 90 1% sol'n	Orient Star	Genistein
Lipoid S75	LIPOID	Lecithin
Glucamate SSE-20	Amerchol	PEG-20 METHYL GLUCOSE SESQUISTEARATE
Glucate SS	Amerchol	METHYL GLUCOSE SESQUISTEARATE
Glycerin	LG화학	Glycerin
1,3-Butylene Glycol	Koywa	Butylene Glycol
Keltrol F	Hercules	Xanthan Gum
Allantoin	ISP	Allantoin
Tea Seed Oil	China	Camellia Sinensis Seed Oil
Safflower Oil	Desert	CARTHAMUS TINCTORIUS (SAFFLOWER) SEED OIL
Panalane L-14E	AMOCO	HYDROGENATED POLYISOBUTENE
Waglinol MCT	QUIMICA	CAPRYLIC/CAPRIC TRIGLYCERIDE
Cetiol OE	Cognis	DICAPRYLYL ETHER
Questamide-H	Quest	BISHYDROXYETHYL BISCETYL MALONAMIDE
Lanette O	Cognis	CETEARYL ALCOHOL
Bees Wax	Kahl & Co	Beeswax
Rheodol MS-165V	KAO	GLYCERYL STEARATE, PEG-100 STEARATE
Silkem 1650	CNTEC	VINYL DIMETHICONE/LAURYL DIMETHICONE CROSSPOLYMER, WATER, ETHYL HEXYL STEARATE, LAURETH-23
Hyaluronic Acid Na salt	CPN	Sodium Hyaluronate
Steviten LICO SG	(주)대평	DIPOTASSIUM GLYCYRRHIZATE
Aloe vera 200:1	Aloestar	ALOE BARBADENSIS LEAF JUICE
Glydant Plus Liquid	Lonza	DMDM HYDANTOIN, IODOPROPYNYLBUTYLCARBAMATE
Fragrance	KIMEX	Fragrance

## 2) 수상(Water Phase) 조성의 선택

항염증, 상처치유효과가 있는 Allantoin을 추가 컨셉 원료로 0.2%로 배합하였다. 제품의 유화 안정성을 증진하기 위한 증점제(Thickner)로는 Xanthan Gum을 단독 사용하였다. Xanthan Gum은 수상에서 부풀어서(Swelling) 에멀전(Emulsion)의 마이셀(Micelle)의 구조를 안정화하는데, 이의 모형은 아래의 그림과 같고 사용함량은 0.12% 정도에서 안정한 점도를 나타내었다.

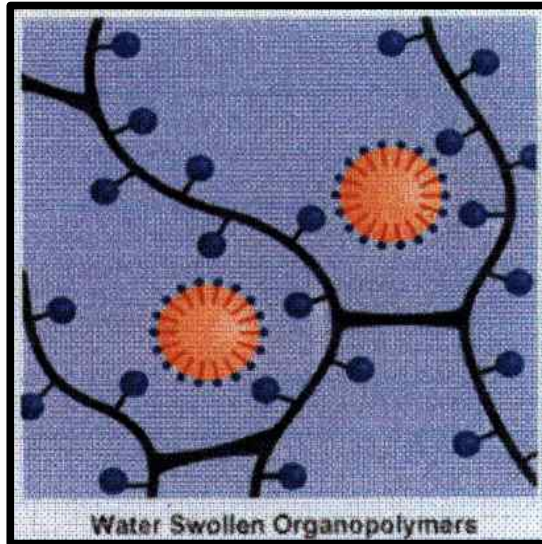


Fig 1. Xanthan Gum 구조

보습력 증진과 Xanthan Gum의 Wetting 및 Swelling을 돕기 위하여 Glycerin과 1,3-Butylene Glycol의 다가알코올류를 총합량 9%정도 사용하였다. 수상에 유화제로 친수기가 비교적 많은 유화제인 PEG-20 METHYL GLUCOSE SESQUISTEARATE을 사용하였다. 화장품의 사용되는 유화제의 종류와 유화이론은 피부자극을 줄이고 천연에 가까운 유화제를 개발하는 방향으로 발전되어 왔는데 현재 각광받고 있는 유화제는 인지질로부터 유도된 천연유화제인 Lecithin과 Glucose로부터 유도된 유화제들을 대표적으로 들 수 있다. Lecithin의 경우에는 주로 난황이나 콩으로부터 얻는데 특유의 비릿한 냄새로 인하여 화장품에서는 사용함량에 있어 제약을 받고 있으며 가격도 비싸다는 단점이 있다. Glucose계열의 유화제는 포도당(Glucose)을 메탄올(Me-OH)로 치환한 Methyl glucose에 -OH기를 지방산과 에스테르화반응을 통해 얻는 것이 일반적으로 장점은 ①강력한 유화효과, ②유연효과/보습효과, ③강력한 수분보유력, ④TEWL(경피수분손실: Transepidermal Water Loss)의 감소, ⑤부드럽고 실키한 사용감, ⑥안료분산능력, ⑦증점효과, ⑧피부자극감소 등을 들 수 있고 기존의 유화제보다 마일드한 유액의 제조에 적합하여 본 제형의 유화제로 선택하였는데 친수기인 폴리에틸렌글라이콜부분이 많이 도입되어 수상에 잘 용해되므로 공정상 수상에 투입하였다. 본 유화제의 구조는 Fig 2.와 같다.

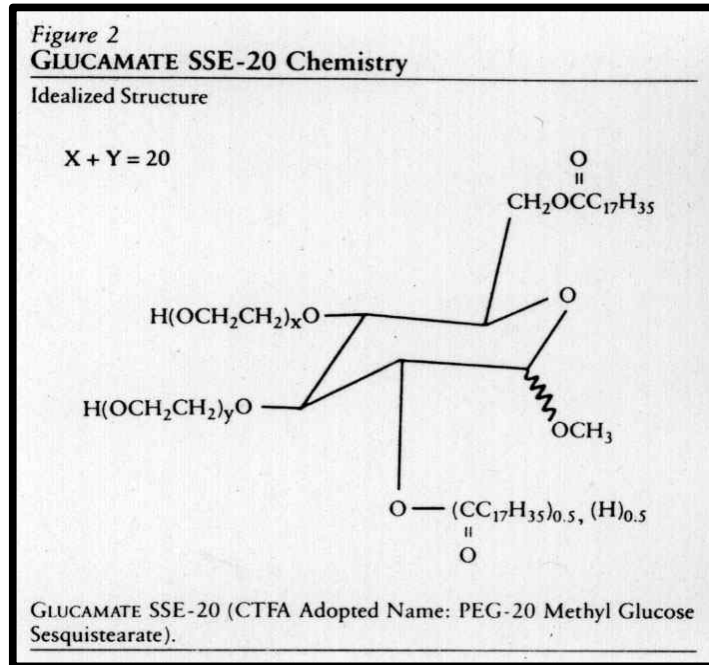


Fig 2. Glucamate SSE-20 구조

### 3) 유상(Oil Phase) 조성의 선택

유상은 수상의 보습성분과 후첨될 컨셉 원료의 피부흡수를 돕기 위해 피부에 유연한 피막을 형성하는 유연제, 유화안정성을 돕는 안정제, 유화제로 구성하였는데 첫째, 유화제로는 Glucate SSE-20과 유사한 Glucose구조를 갖는 유화제인 Glucate SS(METHYL GLUCOSE SESQUISTEARATE)를 같은 목적으로 사용하였다.

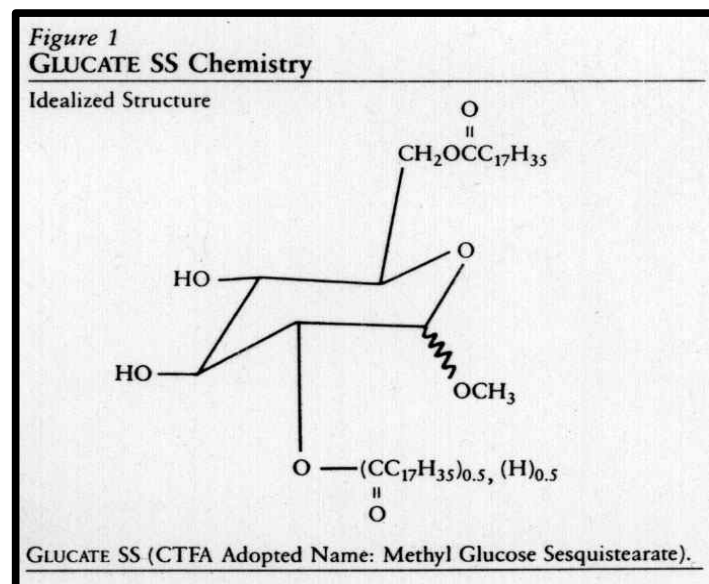


Fig 3. Glucate SS의 구조



또한 콩으로부터 추출된 천연유화제인 Lecithin(Lipoid사의 LIPOID S75)를 제형의 메인이 되는 유화제로 Glucate SS, Glucamate SSE-20과 함께 사용하였다. 둘째, 유화안정제로 Lanette O, Rheodol MS-165V, Bees Wax를 유화의 안정을 돕기 위하여 보조유화제로 사용하였다. 이러한 보조유화제는 모두 유지로부터 유도된 탄소 16-18개의 친유기에 친수기인 알코올기나 에스테르기를 가지고 있는 구조를 가지고 있으며, 왁스상의 외관상 형태를 가진다. 종종 Polar Wax로 표현하기도 하는데 이러한 성분들이 유화의 안정성을 증진시키는 것은 이것들이 구형의 Micelle 외에도 선형의 Micelle을 형성하여 Emulsion의 안정성을 증진시키기 때문이다. 이러한 모형을 이해하기 위한 그림은 Fig 4.와 같다.

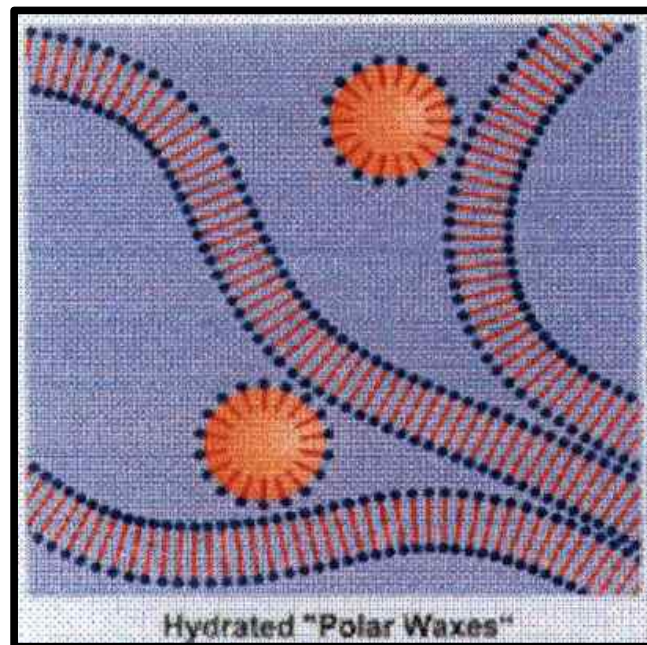


Fig 4. 레시틴 및 기타 유화제의 Micelle 구조

셋째, 유연제로는 무거운 사용감의 Panalane L-14E에서부터 가벼운 사용감의 Cetiol OE까지 천연오일은 녹차씨 오일과 홍화씨 오일을 혼합하여 적당한 사용감의 오일피막을 형성할 수 있도록 오일량을 조정하였다.

4) 완성된 Isoflavone 제형 공정서

승 인		담당	팀장	공장장		
			전결			
제품코드		<b>실험 처 방</b>		제조일	2008년 2월 23일	
반제품 LOT NO.				제조자	전상훈	
성 상	유액상	제품명	ISOFLAVONE 에센스			
제조단위	400 g					
NO.	기능	원 료 명	%	g	체크	공 정 도
1	기제	D.I.Water	62.030	248.1200	80°C 균일용해 교반	균질교반
2	유화제	Glucamate SSE-20	2.300	9.2000		
3	중첩안정제	Keltrol F	0.120	0.4800		
4	보습제	Glycerin	3.000	12.0000		
5	보습제	1,3-BG	6.000	24.0000		
6	진정제	Allantoin	0.200	0.8000		
7				0.0000		
8	유연제	Tea Seed Oil	2.000	8.0000	80°C 승온용해 교반 수상에 투입후 유화 HOMO 3200RPM 10분	탈포
9	안정제	Bees Wax	1.500	6.0000		
10	유연제	Panalane L-14E	3.000	12.0000		
11	유연제	Waglinol MCT	3.000	12.0000		
12	유연제	Cetiol OE	3.000	12.0000		
13	보습제	Questamide-H	0.100	0.4000		
14	유화제	Lipoid S75-3	0.200	0.8000		
15	안정제	Lanette O	2.000	8.0000		
16	유화제	Glucate SS	2.000	8.0000		
17	안정제	Arlacel #165	1.500	6.0000		
18	유연제	Safflower Oil	1.500	6.0000		
19				0.0000		
20	사용감개선제	Silkem 1650	1.000	4.0000	70°C 투입 균일교반	
21	보습제	Hyaluronic Acid	2.000	8.0000	50°C 투입 균일교반	
22	주름개선	Genistein	1.000	4.0000		
23	용매	D.I.Water	2.000	8.0000	50°C 투입 균일교반	
24	진정제	Steviten LICO SG	0.100	0.4000		
25	진정제	Aloe Vera 200:1	0.100	0.4000		
26				0.0000		
27	방부제	Glydant Plus Liquid	0.200	0.8000	48°C 투입 균일교반	
28				0.0000		
29	향료	pf(Cool Wave)	0.050	0.2000	45°C 투입 균일교반	
30	향료	pf(KX OH 1964)	0.100	0.4000	45°C 투입 균일교반	
총계			100.000	400.0000		
특기사항						

Fig 5. Isoflavone Cream의 제형 공정서

### 5) Genistein 및 유효성분들의 후첨

콩으로부터 추출되는 유효한 isoflavone 성분으로는 Daidzein, Genistein, Glycitein 등의 aglycone 및 이것들의 배당체구조를 가지고 있는 것들인데 구조는 아래와 같다.

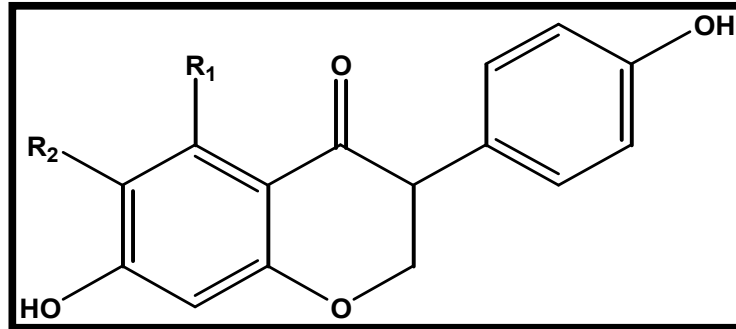


Fig 6. 대두로부터 분리되는 Isoflavone의 구조

이러한 성분들은 여성호르몬의 항상성을 증진하고 진피내 콜라겐을 합성을 증진하며 콜라겐분해효소를 억제하고 특히 Genistein은 피부암의 예방효과가 알려져 있어 대두추출 Isoflavone 중 Genistein의 함량이 90%이상인 Orient star사의 원료를 공급하여 처방에 사용하였다. 본 성분은 피부주름개선 및 노화예방에 도움을 줄 것으로 예상된다. 이밖에 피부의 보습과 주름개선에 효과가 있는 Hyaluronic Acid Na Salt와 감초로부터 추출한 DIPOTASSIUM GLYCYRR HIZATE, 제형의 자극 완화를 돕기 위해 알로에 베라의 동결건조품인 ALOE BARBADENSIS LEAF JUICE를 사용하였다. 방부제로는 Lonza사에 디엠디엠히단토인과 아이오도프로피닐 부틸카바메이트가 혼합되어 있는 혼합방부제를 사용하였으며, 약간의 향료를 후첨하여 Genistein과 Lecithin으로부터의 원료취와 각종원료의 불쾌취를 마스킹하고 제품의 향취를 개선하였다.

### 6) 제품의 컨셉 및 시제품 개발

본 연구에서 개발된 이소플라본 함유 시제품은 제니스테인의 항산화 효과와 DNA 손상저해 효과를 통한 주름개선효과, 그리고 콩 유래의 레시틴을 이용함으로써 천연유화제, 저자극제 및 생체막과 친화성을 통한 인체 친화성을 제품의 컨셉으로 시제품을 생산 하였다. 시제품은 30 여명의 연구원 내외 사용자들에 샘플을 주어 반응을 테스트 중에 있다. 향후 이 제품은 1) CCD-986sk, HS68, Detroit 5116 세포를 이용한 세포내 콜라겐 생성시험(Collagen synthesis assay)주름 개선 효과와 2) 세포내 콜라게나제활성 억제시험(Collagenase inhibition assay) 등을 테스트 하여 주름 개선 기능성을 검증할 계획이다.



Fig 7. 시제품의 컨셉



Fig 8. 콩 유래 Isoflavone, 레시틴 함유 에센스 시제품

#### 나. Genistein 함유 마사지 크림 제형 개발

##### 1) 실험목표 및 배경

셀룰라이트(Cellulite)는 지방조직과 결합조직이 뭉쳐서 살이 뭉쳐져 있는 상태의 용어로 의학적으로는 gynoid lipodystrophy(GLD)라고도 불리운다. 셀룰라이트는 복부와 둔부, 여성들의 지방축적이 쉬운 부위(엉덩이, 대퇴부)에 특징적으로 발생하며, 피하에 지방이 축적되면서 미세혈류 장애와 림프순환 장애를 일으키고, 부종과 결절 등 피부와 체형의 미용상의 문제를 초래한다.

화장품 산업분야에서는 미용상 문제를 초래하는 셀룰라이트의 조절을 위하여 다음과 같은 세가지 단계에 적용되는 컨셉 원료(Concept Ingredient)를 함유하는 화장품 제형을 개발하고 있다.

- ① 지방조직(Adipose tissue)의 양을 감소시키는 원료
- ② 피부조직을 강화시키는 원료
- ③ 미세순환(Microcirculation)을 자극하는 원료

현재 이러한 목표를 위해 사용되는 원료는 카페인(Caffeine), 초콜렛의 theobromine, 녹차의 theophylline과 같은 원료는 지방(Triglycerides)를 가수분해 하여 고급지방산을 생성하고 생산된 지방산은 에너지로 변환된다고 알려져 있어 사용되고 있으며, 카페인(Caffeine)의 경우는 혈관확장작용으로 미세순환에도 도움을 주는 것으로 알려져 있어 지방분해산물의 제거효과를 기대하여 화장품산업에서 셀룰라이트 조절용 제품에 널리 사용되고 있는 원료이기도 하다. 그러나 위에 언급한 컨셉 원료를 제외한 원료들에 대한 연구는 거의 없는 실정이다.

Soy Isoflavone과 Heterocyclic Phenol의 구조는 Steroidal Estrogen의 구조와 매우 흡사하고, Estrogen receptors와 결합할 수 있는 구조로 피토에스트로젠(Phytoestrogen)으로 알려져 있으며, 셀룰라이트의 형성은 전형적으로 여성에게 나타나는 현상이라는 점과 에스트로젠(estrogen)에 의해 조절된다는 점에 착안하게 되었다. 또한 Genistein은 Soy Isoflavone의 주된 성분으로 protein tyrosine kinases의 억제자로 널리 알려져 있다. 또한 Kinases는 Radicals과 Inflammatory cytokines에 의해서 활성화되어 피부의 콜라겐, 엘라스틴의 파괴를 야기하는 효소인 MMPs(Matrix metalloproteinases)로 잘 알려져 있으며, 피부과학에서는 피부노화의 주된 역할을 한다고 알려져 있다. 그러므로, Genistein은 Radicals과 Inflammatory cytokines들의 신호를 차단함으로써 피부조직을 튼튼하게 할 수 있는데, 이는 피부조직을 강화하는 단계에 해당하는 역할을 할 수 있다고 판단된다. 또한 Genistein은 지방세포(Adipocyte)에 직접적으로 작용하여 지방형성(Adipogenesis)를 막는 효과가 있다고 최근 보고되고 있는 실정이다.

Genistein 성분은 셀룰라이트 조절용 컨셉의 제품에 적용사례가 흔하지 않지만 위와 같은 근거에 의해 셀룰라이트 조절용 화장품개발에 컨셉 원료로 사용하기로 하였으며 물리적 마찰을 수반하는 마사지효과와 함께 적용되는 마사지크림이 제품 효능향상에 기여할 것으로 판단되어 마사지 시술시 나타나는 물리적인 마찰과 피부 손상을 최소화할 수 있도록 유효효과가 충분한 W/O형의 마사지크림 제형을 개발하기로 하였다.

2) 원재료

Table 1. Raw Material

사용원료명	제조사	ICID(국제화장품원료사전) 명칭
Emersol 7036NF	Cognis	Stearic Acid
C1698	LG화학	Cetyl Alcohol
KM 105	광일화학	Glyceryl Stearate
KM 205	광일화학	Glyceryl Stearate SE
Rheodol TW-S120V	KAO	Polysorbate 60
Rheodol AO-15V	KAO	Sorbitan Sesquioleate
KF-70	서진화학	Mineral Oil
Vasellin EC	Witco	Petrolatum
IPM	Nippon Fine Chem	Isopropyl Myristate
Silicone 200F/100CS	Dow Corning	Dimethicone
Tea Seed Oil	NOF	Camellia Sinensis Seed Oil
Paraffin Wax Refined	Witco	Paraffin
Vitamin E Acetate	BASF	Tocopheryl Acetate
B.P	Nippa	Butylparaben
E.P	Nippa	Ethylparaben
1,3-Butylene Glycol	Daicel	Butylene Glycol
PG-FOOD	SKC화학	Propylene Glycol
Nipagin M	CPN	Methylparaben
Steviten LICO SG	(주)대평	Dipotassium Glycyrrhizate
Allantoin	ISP	Allantoin
TEA	미원상사	Triethanolamine
Arnica Liquid B	Ichimaru	Arnica Montana Flower Extract
Genistein	연구원추출	Genistein
황색4호	보락	Yellow 5
청색1호	보락	Blue 1
Fragrance	Charabot	Fragrance

### 3) 실험기구

IKA Homogenizer, Water Bath, Chemical Balance, pH Meter, Brookfield Viscometer

### 4) 실험방법

#### 가) W/O형 제형 및 공정설계

마사지 크림의 용도상, 마사지 기술을 하는 사람과 받는 사람의 피부마찰과 자극이 수반되므로 충분한 윤�활작용이 있어야한다. 대부분의 수상 성분은 마사지사 피부에 흡수되는 양이 많으므로 일반적인 O/W형의 제형은 마사지크림에 적당하지 않다. 그러므로 윤�활성이 풍부한 Non-polar Hydrocarbon 중 오일상의 원료를 풍부하게 사용하는 것이 윤�활용도에 최적이므로, 서진화학의 KF-70(Mineral Oil)을 35%로 주로 사용하였으며, Witco사의 Vasellin EC등을 보조로 사용하였다.

이러한 Non-polar한 오일류는 상대적으로 에스테르기나 에테르기 등이 도입된 Polar Oil류 보다 친유성이 강하여 주유화제는 Polysorbate 60, Sorbitan Sesquioleate외에 Glyceryl Monostearate, Glyceryl Monostearate SE, Cetyl Alcohol, Stearic Acid, Paraffine Wax를 보조유화제로 사용하였으며, 유화제와 Mineral Oil의 Binding을 위해 IPM, Tea Seed Oil을 소량 사용하여, 마사지사 주외상인 Mineral Oil이 툭툭 터지는 듯한 사용감을 구현했다. 또한 산화방지역할을 위해 Vitamin E Acetate를 사용하였다.

수상에는 약간의 보습제로 1,3-Butylene Glycol, Propylene Glycol와 함께 피부항염, 진정효과를 위해 Allantoin과 Dipotassium Glycyrrhizate를 사용하였다. 방부제는 Methylparaben, Ethylparaben, Butylparaben 을 혼합하여 사용하여 적정한 방부시스템을 구축하였으며, Stearic Acid의 검화를 통한 유화능을 증가를 위해 Triethanolamine을 사용하였다. 또한 약간의 색상을 위해 황색4호, 청색1호를 혼합하여 녹색의 크림상을 제조하였다.

또한 본 개발시제품의 컨셉인 셀룰라이트 조절을 위해 Genistein과 Arnica Montana Flower Extract를 사용하였다. 사용농도는 Genistein 3%, Arnica Montana Flower Extract는 1%를 사용하였다. 제조공정은 유상조의 유상원료를 평량하고, 수상조에 수상원료를 평량 후, 두 상을 80℃로 승온하여 균질히 녹인 후, IKA Homogenizer로 15분간 충분히 유화 후 냉각면서 45℃에 컨셉원료와 색상제, 향료를 투입하여 실온까지 냉각하여 제형을 완성하였다. (Fig 1).



Fig 1. Isoflavone 마사지 크림 시제품

나) 임상결과

위와 같이 제조된 시제품을 20명의 셀룰라이트 정도가 심각한 여성을 대상으로 실험 시작 후 6주간 하루에 한번 허벅지 부위에 시제품을 10분간 사용하는 실험을 시행하였다. 아직 셀룰라이트 감소효과를 측정하는 명확한 임상실험법이 개발되어 있지 않기 때문에 20명의 실험 참가 여성들에게 사용전후의 피부결 만족도를 설문 조사하여 시제품을 평가하였다.

피부결의 만족도는 아래와 같은 평가항목과 배점으로 시행하였다.

Table 2. 피부결 만족도 실험

피부결 만족도 항목	매우 불만족	불만족	보통	만족	매우 만족
피부가 탄력있고 건강한가?	1	2	3	4	5
피부의 부드러움의 정도는?	1	2	3	4	5
셀룰라이트 형성이 감소했나?	1	2	3	4	5

임상에 참여한 참여자들의 시제품 사용 전 평점 점수는 1.6점으로 매우 낮았으나, 실험종류 후 설문 평점은 4.0점으로 나타났다.



5) 완성된 Genistein Massage Cream 제형 공정서

승 인	담당	팀장	공장장
		전결	

제품코드	<b>실험처방</b>		제조일	2009년 2월 4일
반제품 LOT NO.			제조자	전상훈
성상	연녹색크림상	제품명 <b>Genistein Massage Cream</b>		
제조단위	400 g			

NO.	기능	원료명	%	g	체크	공정도
1	보조유화제	Emersol 7036NF	2.500	10.0000		80°C 균일용해 교반
2	보조유화제	C1698	1.500	6.0000		
3	보조유화제	KM 105	1.200	4.8000		
4	보조유화제	KM 205	1.200	4.8000		
5	유화제	Rheodol TW-S120V	2.500	10.0000		
6	유화제	Rheodol AO-15V	1.200	4.8000		
7	윤활유연제	KF-70	35.000	140.0000		
8	윤활유연제	Vaseline EC	2.000	8.0000		
9	유연제	IPM	1.500	6.0000		
10	유연제	Tea Seed Oil	1.000	4.0000		
11	유연제	Silicone 200F/100CS	1.000	4.0000		
12	유화안정제	Paraffin Wax	3.000	12.0000		
13	보습제	Vitamin E Acetate	0.500	2.0000		
14	방부제	B.P	0.100	0.4000		
15	방부제	E.P	0.100	0.4000		
16				0.0000		
17	용매	정제수	34.530	138.1200		80°C 균질용해 교반 승온 후 수상을 유상에 투입하여 유화 HOMO 3500RPM 10분
18	보습제	1,3-Butylene Glycol	2.000	8.0000		
19	보습제	PG-FOOD	4.000	16.0000		
20	방부제	Nipagin M	0.200	0.8000		
21	항염진정제	Allantoin	0.100	0.4000		
22	항염진정제	Steviten LICO SG	0.100	0.4000		
23	중화감화제	TEA	0.250	1.0000		냉각
24				0.0000		
25	색제	황색 4호 (0.1% 용액)	0.300	1.2000		48°C 투입 균일교반
26	색제	청색 1호 (0.1% 용액)	0.070	0.2800		
27	슬리밍제	Genistein	3.000	12.0000		
28	혈행촉진제	Arnica Liquid B	1.000	4.0000		
29				0.0000		
30	향료	Fragrance	0.150	0.6000		45°C 투입 균일교반
총계			100.000	400.0000		

특기사항	
------	--

### 3. 발효 두유 시제품 개발

#### 가. 콩 시제품 개발 개요

1차 년도에서 개발된 콩 발효 두유 시제품은 아래와 같이 다양한 형태의 두유 제품이 가지지 않은 비타민D, 엽산, 가바 등을 함유하고 있었다. 특히 GABA의 경우는 국내에서 첨가하지는 못하나 자연적으로 생성되는 제품은 생산할 수 있는 것으로 영양학적 측면에서 매우 중요한 가치를 가지고 있었다. 2차 년도에서는 1차년도의 발효두유 생산 know-how를 이용하여 콩 원재료를 아가콩 3호를 이용하여 발효 두유 제품을 생산하였다. 아가콩 3호는 이소플라본 함량이 매우 높다고 알려져 있어 아래의 결과에 이소플라본이 높게 함유되어 있으리라 기대하고 영양 성분 분석 중에 있다.

Table 1. 1차년도 발효두유 시제품의 영양성분

영양성분	발효두유시제품 (mg/100g)	두유★ (mg/100g)
비타민 B1	1.0	0.04
비타민 B2	0.1	0.04
비타민 B3	5.1	0.4
비타민 B6	0.4	0.06
비타민 C	54.0	0
비타민 D	0.076	0
비타민 E	3.4	0.3
엽산	1.1	0.028
가바	13.0	
유리아미노산	2,400	
이소플라본	15.0	9.0
텍스트란	4.8	0



Fig 1. 콩 발효 시제품

#### 나. 두유 시제품 개발 방법

아가콩 3호와 안동에서 생산되는 청자콩을 이용하여 두유 시제품을 생산하였다. 콩 원료를 수세하여 10시간 정도 침지하고, 불린 콩을 10분 정도 삶고 비벼서 껍질을 제거한 후 콩 원료에 80%의 물을 첨가하여 마쇄한다. 그 후 여과포를 이용하여 여과액을 만들고, 백설탕, 정제염을 첨가하여 두유 제품을 생산한다.

#### 다. 발효 두유 시제품 개발 방법

아가콩 3호를 정선하여 수세하고 마쇄 후 여과하여 두유를 분리하고 분리된 두유에 *Leuconostoc kimchii*, *Leuconostoc citreum*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus plnatarum*을 접종하여 24시간 발효시켜 발효 두유제품을 생산한다.

#### 라. 아가콩 두유 및 청자콩 두유, 아가발효 두유 시제품 생산

아가콩 3호, 안동 생명의 콩 중 청자콩을 이용하여 두유 시제품을 개발하였다. 콩은 많은 양이 수입됨으로 국내 콩 재배 농가들이 콩을 생산하여도 상대적인 생산 단가의 상승으로 판매처가 확보되지 않아 매우 곤란한 실정에 있다. 그러나 국내에서 콩의 소모는 두부, 메주, 청국장 등에 한정되어 있어 국산 콩을 이용한 두유의 생산 및 소비가 매우 중요하다고 판단되었다. 따라서 두유 및 발효두유를 개발하여 학교 급식에 두유를 소비할 계획으로 아가콩 및 청자콩을 이용하여 두유를 시제품을 개발하였다. (Fig 2.)



Fig 2. 아가콩, 청자콩을 이용한 두유 시제품

#### 마. 아가콩 두유 및 청자콩 두유 평가

2차년도에서 아가콩 3호를 이용하여 생산된 시제품을 안동아가두유, 청자콩을 이용한 시제품을 안동청자두유로 임시로 명명하고, 판매될 제품이 생산될 경우 상표로 등록할 예정이다. 아가두유, 청자 두유의 경우 생산 공정이 간단하고 콩의 소비량이 높아 향후 가능성 있는 제품 개발로 의견을 모으고 있으며, 제품의 평가를 위하여 시제품을 20명 대학생, 연구원을 대상으로 시음 및 제품에 대한 평가를 의뢰하였다. 시제품은 시각, 맛, 향, 당도, 여운, 호감도, 점도 등을 종합하여 판단하였으며, 그 결과는 Fig 3.과 같다.

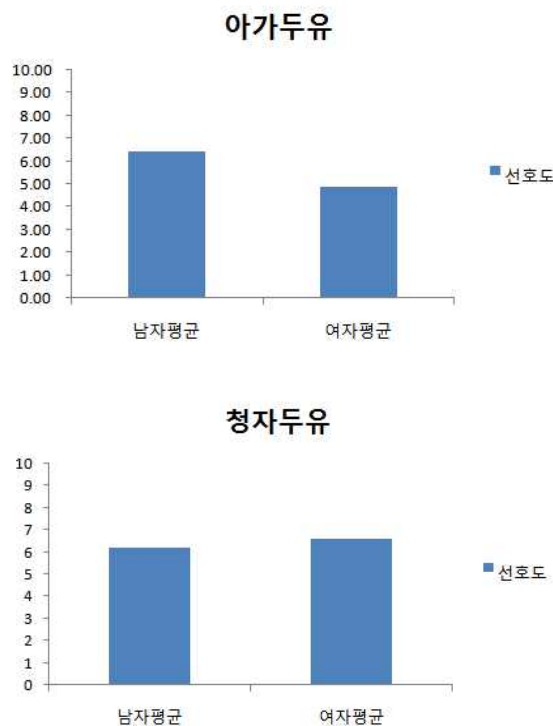


Fig 3. 아가두유, 청자두유의 선호도

두유에 대한 종합적인 평가에서는 20명 중 14명이 사업화 가능성 및 개선 후 사업화 가능성을 제시하였다. 본 시제품에서는 일반적으로 두유 제품에 첨가되는 증점제, 착향료 등이 전혀 첨가되지 않은 순수 두유 제품임을 감안할 때 매우 높은 호응도를 보여 준다고 하겠다. 향후 두유 제품 개발시 생산 원가가 사업성이 있을 경우 한약재의 단맛을 보이고, 부작용이 없는 약재를 선택하여 3차 년도에서 시제품을 개선하고자 한다.

#### 사. 아가 발효 두유 시제품 생산 평가

발효 두유 생산은 먼저, 콩이 발효 되면서 발효세균에 의한 다양한 필수 영양소

가 생성되고 흡수율을 높여 준다고 알려 있고, 1차 년도에의 발효 두유 시제품의 특징은 *Leuconostoc kimchii*에 의해서 수용성 dextran을 형성하고, influenza에 대항하는 효과를 나타낼 것으로 기대되고, *Leuconostoc citreum*은 배변을 좋게 하고 항산화능을 보이며, *Lactobacillus plantarum*은 총 콜레스테롤 함량을 낮게하고, *Bifidobacterium*은 보고에 의하면 면역력 및 피부질환에 효과를 보일 것을 시제품 컨셉으로 개발하였다. (Fig 4).



Fig 4. 아가발효 두유의 시제품

2차년도에서는 아가콩 3호를 이용하여 발효 두유 시제품을 개발하였다. 그리고 20명 대학생, 연구원을 대상으로 설문하여 두유와 같은 방법으로 시제품을 평가하였다. 아가 발효 두유의 경우 영양적으로는 매우 효과적으로 기대되나 제품으로서 판매될 경우 낮은 호응도를 보여 *Leuconostoc kimchii*에 의한 시큼한 냄새를 제거하는 것이 매우 중요할 것으로 판단된다. 그러나 발효 두유의 경우 처음 몇 번의 시큼한 냄새를 이겨낼 경우 뒷맛이 점점 좋아지고 친숙해 지는 경향이 있으나, 다양한 소비층을 개발하기 위해서는 또 다른 균주를 개발하는 것이 타당하다고 생각된다.



Fig 5. 아가 발효두유에 대한 선호도

#### 4. 발효 여부에 따른 두유의 기능성 비교 · 분석

##### 가. 연구개발방법

###### 1) 두유의 제조

아가 콩 500 g을 정선 후 수세하여 중량 대비 7배의 물을 첨가한 다음 12시간 동안 상온에 침지시키고 불린 콩을 거품이 안 생길 때 까지 물로 세척한 다음 콩이 최소한 잠길 만큼의 물을 냄비에 부은 다음 콩이 끓기 시작한 때로부터 10분간 가열하여 주고 삶은 콩의 거품 제거를 위해 3~4차례 씻어내었다.

원료 콩 7배의 정제수를 준비하여 ACE Homogenizer(AM-12, Nissei, Japan)에 콩과 정제수를 일정량 혼합하고 15,000 rpm에서 10분간 균질화 시켰다. 균질화가 끝난 원료 두유는 300  $\mu\text{m}$  Testing Sieve(Chung-gye sang Ind. Korea)를 통하여 1차로 여과한 다음 150  $\mu\text{m}$  Testing Sieve를 이용하여 2차로 여과 해주고 고형물 양이 7% 이상이 될 수 있도록 두유액과 침전물의 비율을 조정하고 난 뒤 121 $^{\circ}\text{C}$ , 15분에서 멸균작업을 실시하고 이 후 4 $^{\circ}\text{C}$ 에 냉장 보관하여 분석 실험 및 Panel Test용 시료로 준비해두었다.

###### 2) 발효 두유의 제조

위에서 제조한 원료 두유에 Yokoyama Hitoshi 등이 발명한 발효두유 제조방법을 응용하여 두유 접종 시 Beany Flavor 감소 및 전반적인 풍미에 우수한 작용을 나타내는 두 개의 유산균 *Lactobacillus Bulgaricus*와 *Bifidobacterium longum*을 원료 두유 대비 2%의 유산균을 접종하고 37 $^{\circ}\text{C}$  Incubator에서 24시간 발효시킨 것을 발효 두유 시료로 하였다.

##### 가) 일반 성분 분석

###### (1) 조회분 정량 (Crude Ash)

도가니의 함량을 구하기 위해 200 $^{\circ}\text{C}$ 에서 예열 후 600 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2시간 동안 강열하여 데시케이터에서 30분 동안 방냉을 하고 무게를 기록하였다. 이 작업을 수차례 반복하여 도가니의 무게 오차가 0.3 mg 이내가 될 때 이것을 함량으로 하였고 그 값을 기록하였다. 함량을 구한 도가니에 시료를 넣고 무게를 기록한 다음 200 $^{\circ}\text{C}$ 에서 예비 탄화 과정을 거쳐 600 $^{\circ}\text{C}$ 에서 3시간 동안 회화한 다음 데시케이터에 30분 방냉시키고 함량에 도달할 때 까지 그 값을 기록하였다. 함량을 모두 구했을 때 아래의 공식에 값을 대입하여 정량하였다.

$$\text{Crude Ash} = \frac{(a - b)}{s} * 100$$

s: 시료의 무게(g), a: 함량이 된 시료+수기 무게(g), b: 함량이 된 빈 수기의 무게(g)

## (2) 조지방 정량 (Crude Lipid)

지방 함량은 Rose-Gottlieb법에 의해 측정하였다. 삼각플라스크의 항량을 구하기 위해 105°C의 Dry Oven에서 가열 후 데시케이터에서 30분간 방냉을 하고 무게를 기록하는 작업을 수차례 반복하여 삼각플라스크의 항량을 구하고 그 값을 기록하였다. 그 다음 Mojonnier관에 시료를 일정량 채취하고 증류수로 부피가 총 11 ml이 되도록 맞추고 진한 암모니아와 Ethyl Alcohol 및 Ether를 일정량 혼합하여 진탕한 후, Mojonnier관 상층부에 분리된 여액을 여과하여 삼각플라스크에 넣고 70°C의 수욕 상에서 Ether를 전부 휘발시켜 순수 지방만 분리된 삼각플라스크를 95°C의 Dry Oven에 넣고 항량에 도달할 때까지 가열과 방냉을 반복하였다. 위에서 나온 값을 아래의 공식에 대입하여 정량하였다.

$$\text{Crude Lipid} = \frac{a-b}{w} * 100$$

a: 추출물이 든 삼각플라스크의 항량(g), b: 삼각플라스크의 항량(g), w: 시료의 무게(g)

## (3) 조단백질 정량 (Crude Protein)

조단백질 함량은 발효 두유와 비발효 두유를 일정량 채취하고 Semi-micro Kjeldahl 방법으로 단백질 자동분석기(Kjeltec 2400 Auto, Foss Tecator, Eden Prairie, MN, USA)를 이용하여 함량을 정량하였다.

## (4) Dry Oven을 이용한 고형분 함량 측정

영점을 맞춘 Chemical Balance에 고형분 함량 측정에 필요한 Aluminium Dish를 올려놓고 Aluminium Dish의 무게를 측정한 값을 기입하였다. 이어 Aluminium Dish위에 두유를 1 ml 채취한 다음 무게를 측정하여 시료+빈 Dish의 무게를 기록하였다. 유의성 있는 실험을 하기 위해 같은 방법으로 2회 반복 실험하였다. 그 다음 105°C로 예열된 Dry Oven (JSON-150, Natural Convection Oven, JSR)에 시료가 든 Aluminium Dish를 넣고 3시간 동안 건조를 하였다. 건조가 끝난 Dish를 데시케이터로 옮겨 30분 동안 방냉을 한 다음 무게를 재고 그 값을 아래의 공식에 대입하여 고형분 함량을 산출 하였다.

$$\text{Total Solid Content} = \frac{W1 - W2}{W1 - W0} * 100 (\%)$$

W0: 빈 Dish의 무게(g)

W1: 건조 전 시료+Dish의 무게(g)

W2: 건조 후 시료+Dish의 무게(g)

## 나) 항산화 측정

### (1) ABTS radical scavenging activity

ABTS radical을 이용한 항산화력 측정은 ABTS+· cation decolourisation assay 방법에 의하여 시행하였다. 7 mM 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiaz-olin-e-6-sulfonic acid) (ABTS, Wako Chemical Co., Japan) 와 2.45 mM potassium persulfate를 최종농도로 혼합하여 실온인 암소에서 24시간 동안 방치하여 ABTS+·을 형성시킨 후 734 nm에서 흡광도 값이 0.70 ( $\pm 0.02$ ) 이 되게 phosphate buffer saline (PBS, pH7.4) 로 희석하였다. 희석된 용액 100  $\mu$ L에 시료 50  $\mu$ L를 가하여 5분 동안 방치한 후 흡광도를 측정하였다.

### (2) 전자공여능 측정 (DPPH)

전자공여능(EDA: electron donating ability)은 Blois의 방법을 변형하여 항산화물질에 의한 라디칼 소거 효과를 측정하였다. 각 시료용액 100  $\mu$ L에 0.2 mM의 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl(DPPH) 50  $\mu$ L을 넣고 교반한 후 실온에서 10분 간 방치한 다음 517 nm에서 UV/Visible spectrophotometer (UV-1700, SHIMADZU, Japan)로 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{전자공여능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}}\right) \times 100$$

### (3) Superoxide dismutase(SOD) 유사활성 측정

SOD 유사활성은 Marklund의 방법에 준하여 측정하였다. 시료 20  $\mu$ L에 pH 8.5로 보정한 Tris-HCl buffer 200  $\mu$ L와 7.2 mM pyrogallol 20  $\mu$ L를 첨가하여 37°C에서 10분간 반응 후 1N HCl 20  $\mu$ L 가하여 반응을 정지시켰다. 반응액 중 산화된 pyrogallol의 양은 ELISA Reader로 420 nm에서 OD값을 측정하였다.

$$\text{Radical scavenging activity(\%)} = (1 - \text{시료첨가구 흡광도} / \text{무첨가구 흡광도}) \times 100$$

### (4) 총 폴리페놀 함량 측정

폴리페놀 정량은 AOAC에 준하여 정량하였다. 두유 시료 1 mL에 Folin-Ciocalteu phenol reagent 시약 1 mL 을 가하고 3분 반응 후 0.7 M sodium carbonate 포화용액 1 mL을 가하여 혼합한 후 1시간 실온에서 방치하고 750nm에서 UV/Visible spectrophotometer(UV-1700, SHIM ADZU, Japan)로 흡광도를 측정한 후 표준물질인 tannic acid(Sigma, USA)로 미리 작성한 표준곡선의 흡광도 값과 비교하여 폴리페놀 함량을 산출하였다.



#### 다) 피트산 함량 측정

Phytate의 함량은 Haug 등의 방법에 준하여 측정하였다. Standard Curve값을 구하기 위해 표준 용액을 제조하였다. Sodium Phytate(Sigma, USA)를 증류수 1 ml에 5~40 ug 함유되게 하고 표준 용액 600 ul와 Modified Wade Reagent 200 ul을 혼합하여 5초간 Vortexing 하였다. 이 혼합액을 10분 동안 원심분리를 한 다음 상등액만 취하여 Elisa Leader를 통해 500 nm에서 흡광도를 측정하여 표준 곡선을 구하고 Sodium Phytate 대신 발효, 비발효 두유시료를 첨가하여 표준곡선 대비 두유시료의 Phytic acid의 함량을 산출하였다. (\*Modified Wade Reagent = 0.03% FeCl<sub>3</sub> • 6H<sub>2</sub>O+0.3% Sulfosalicylic acid+Distilled Water)

#### 라) ACE 저해율 측정

두유 시료의 ACE 저해율 측정은 Cushaman등의 방법을 변형하여 측정하였으며 각각의 시료는 증류수를 이용하여 적당한 농도로 희석한 뒤 시료로 이용하였다. 기질 및 효소는 0.3 M Sodium borate buffer (pH 8.3)를 이용하여 조제 하였으며 각각의 시료액 20 ul와 기질인 5 mM Hip-His-Leu 80 ul를 Sample tube에 취한 후 37°C에서 10분간 Pre-incubation 하였다. 10분 후 0.3 unit/ml의 농도로 조제한 ACE 효소액 20 ul을 가하고 37°C에서 20분간 반응시키고 1N HCl 용액 150 ul을 가하여 반응을 정지하였다. 여기에 ethyl acetate 1 ml을 첨가한 뒤 1분간 교반 후 4,000 rpm에서 3분간 원심 분리하여 상등액 0.5 ml 취하고 95°C에서 완전 건조시켰다. 이 후 증류수 1 ml을 첨가하여 용해시킨 후 228 nm에서 흡광도를 측정하여 다음 식에 의해 ACE 저해율을 산출하였다.

$$\text{ACE inhibition activity (\%)} = (C-T/C-B)*100$$

**T:** The absorbance of hippuric acid generated in the presence of ACE inhibitorComponent

ACE 저해제에서 생성되어 존재하는 마노산의 흡광도

**C:** The absorbance of hippuric acid generated without inhibitors

저해제 없이 생성되는 마노산의 흡광도

**B:** The absorbance of hippuric acid generated without ACE

ACE 없이 생성되는 마노산의 흡광도

### 나. 연구개발결과

#### 1) 일반 성분 분석

Table 1. Proximate composition of soymilk (Based on Aga Soybean)

시 료	Crude Ash (%)	Crude lipid (%)	Crude protein(%)	Solid content (mg/mL)
발효	0.25±0.02	1.74±0.01	2.351±0.002	10.99%
비발효	0.32±0.02	2.21±0.01	2.456±0.003	11.45%

두유 시료를 조회분 정량한 결과 발효를 한 두유 시료에서는 약 0.25%로 나타났으며 발효를 하지 않은 두유 시료에서는 0.32%로써 비발효 시료가 발효를 거친 시료에 비해 조회분 함량이 0.07% 높은 것으로 나타났으며 조지방은 발효를 한 두유 시료에서 약 1.74%로 나타났으며 발효를 하지 않은 두유 시료에서는 2.21%로써 발효를 거치지 않은 시료가 발효 시료에 비해 조지방 함량이 0.47% 높은 것으로 나타났다. 조단백은 자동 단백질 분석기를 통하여 두 개의 시료를 분석하였는데 유의성이 있도록 3회에 걸쳐 반복실험을 하였으며 위에 기재된 값은 3회 반복에 대한 평균 값을 나타낸 것이다. 실험의 원리는 Semi-micro Kjeldahl법과 동일하며 Factor 값은 보통 6.25 값을 주지만 두류 및 두류 가공품에서는 5.71로 Factor 값을 정하여 결과를 산출 하였다. 실험 결과 발효한 것과 발효를 하지 않은 것에 대한 조단백질 함량의 차이는 약 0.105% 차이로써 그다지 높은 수준의 차이는 보이지 않았다.

#### 1) 항산화 효과 측정

##### 가) ABTS radical scavenging activity

ABTS radical을 이용한 항산화능의 측정은 potassium persulfate와의 반응에 의해 생성된 ABTS free radical이 추출물 내의 항산화 물질에 의해 제거되어 radical 특유의 색인 청록색이 탈색되는 것을 이용한 방법으로 ABTS+cation decolourisation assay 방법에 의하여 측정하였다. 2가지 두유 시료(발효, 비발효)의 농도별 항산화능의 측정 결과는 Fig 1.과 같다. 우선 발효 두유의 경우 농도별로 1,000 ppm에서 37.5%, 2,500 ppm에서 38.73%, 5,000 ppm에서 51.44%, 7,500 ppm에서 60.06%, 10,000 ppm에서 64.59%, 20,000 rpm에서 84.34%, 30,000 rpm에서 99.08%의 ABTS radical 소거능을 나타내었으며 라디칼을 50% 소거하는데 필요한 값을 나타낸 RC<sub>50</sub>은 4900 µg/ml로 나타났다. 비발효 두유는 1,000 rpm에서 31.52%, 5,000 rpm에서 39.70%, 10,000 rpm에서 42.56%, 13,000 rpm에서 61.10%, 15,000 rpm에서 81.17%의 ABTS Radical 소거능을 나타내었으며 라디칼을 50% 소거하는데 필요한 값을 나타낸 RC<sub>50</sub>은 11,000µg/ml로써 발효시료의 값보다 높았다. 발효, 비발효 두유 모두 다 농도가 높아질수록 항산화력도 증가하는 경향을 보였으며 위 결과에서 발효, 비발효 시료의 RC<sub>50</sub>값을 비교 하면 발효두유가 비발효 두유에 비해 적은 양을 사용하였을 때 항산화력이 높게 나오는 것을 알 수 있었다.

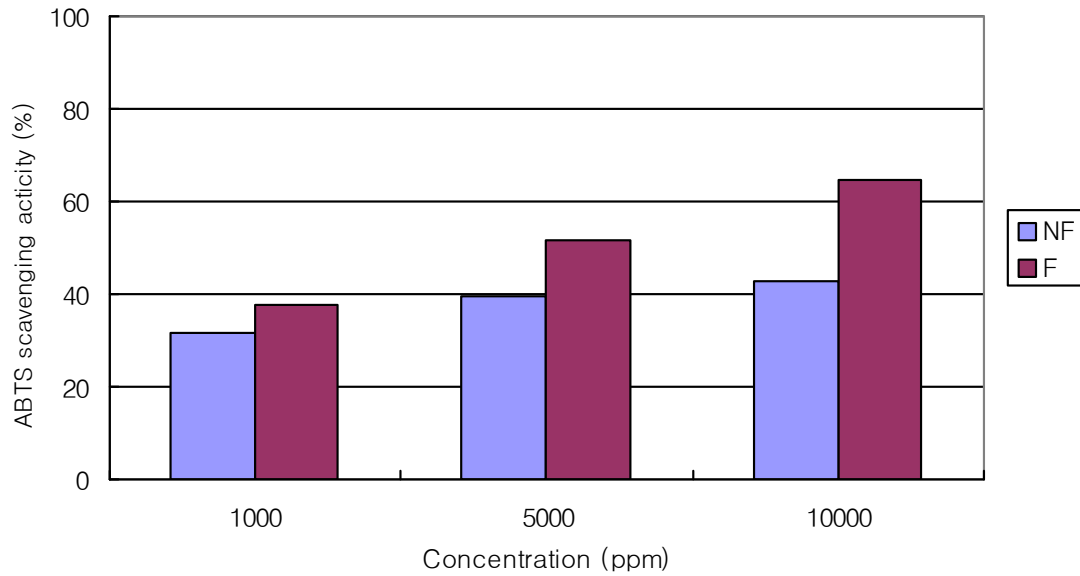


Fig 1. ABTS radical scavenging activity of the Fermented and non-fermented Aga Soymilk

#### 나) DPPH radical scavenging activity

전자공여능 측정에 사용된 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)는 자체가 매우 안정한 free radical로서 517 nm에서 특징적인 광흡수를 나타내는 보라색 화합물이다. DPPH는 알코올 등의 유기용매에 매우 안정하며 항산화 기작 중 proton-radical scavenger에 의하여 탈색되기 때문에 항산화 활성을 육안으로 쉽게 관찰할 수 있는 장점이 있어 다양한 천연소재로부터 항산화 물질을 검색하는데 많이 이용되고 있다. 또한 자유라디칼은 인체 내에서 지질 또는 단백질 등과 결합하여 노화를 일으키기 쉬운데 페놀성 화합물의 경우 자유라디칼을 환원시키거나 상쇄시키는 능력이 강해 인체 내에서 자유 라디칼에 의한 노화를 억제하는 척도로 이용할 수 있다. 발효 두유와 비발효 두유를 천연 항산화제로서의 이용 가능성을 확인하기 위하여 전자공여능을 측정한 결과 Fig 2.와 같이 나타내었다. 발효 두유의 경우 40,000 ppm에서 약 60%의 효과를 나타내었고 라디칼을 50% 소거하는데 필요한 값을 나타낸  $RC_{50}$ 은 30,000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 나타났다. 비발효 두유는 40,000 ppm에서 58.2%의 효과를 나타내었고 같은 농도인 40,000 ppm에서 발효두유에 비해 약 8%정도 낮음을 보였다. 라디칼을 50% 소거하는데 필요한 값을 나타낸  $RC_{50}$ 은 30,000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 나타나 발효두유와의  $RC_{50}$ 은 비슷한 수준을 보였다.

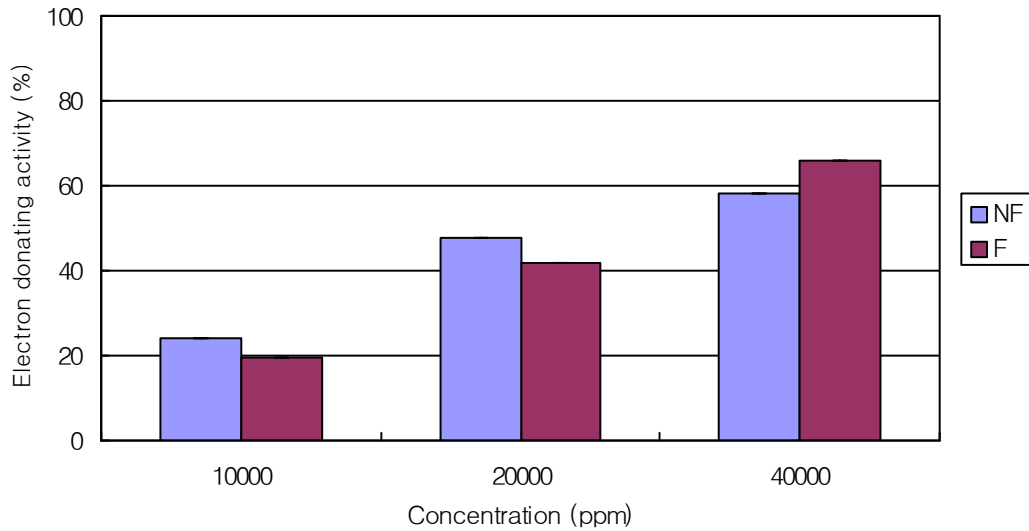


Fig 2. DPPH radical scavenging activity of the Fermented and non-fermented Aged Soymilk

#### 다) Superoxide dismutase 측정

SOD 유사활성 물질은 효소는 아니지만 SOD와 유사한 역할을 하는 저분자 물질로 주로 phytochemical에 속하며 superoxide의 반응성을 억제한다. 따라서 이 SOD 유사 물질을 섭취하면 인체 내의 superoxide를 제거함으로써 산화적 장애를 방어하고 노화 억제 효과를 기대할 수 있다. SOD 활성도는 알칼리 상태에서 pyrogallol의 자동 산화에 의한 발색을 이용하는 실험이다. 측정된 결과는 Fig 3.에 나타내었다. 발효 두유에서는 10,000 rpm에서 22.58%, 30,000 ppm에서 28.54%, 50,000 ppm에서 38.12%를 나타내었고 비발효 두유에서는 SOD 유사활성이 10,000 ppm에서 23.09%, 30,000 ppm에서 35.33%, 50,000 ppm에서 49.84%를 나타내었다. 이 결과로 비발효 두유가 발효 두유보다 값이 높게 나타남으로 SOD 유사활성은 발효를 하지 않은 두유가 더 좋을 수 있었다.

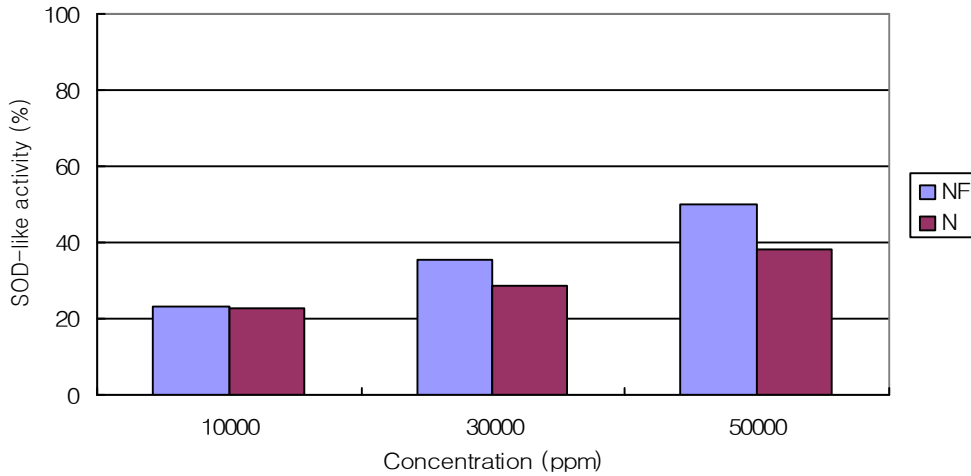


Fig 3. SOD-like activity of the Aga Soymilk

라) Total polyphenol 함량

식물체에 함유되어 있는 페놀성 화합물들은 항 돌연변이원성, 콜레스테롤 저하작용, 정상작용, 항산화 및 항암 작용 등 다양한 생리활성들을 가지고 있는데, 이것은 분자 내 phenolic hydroxyl기가 효소 단백질과 같은 거대 분자들과 결합하는 성질이 있어 이러한 생리기능 활성을 나타내는 주체로 인정되고 있다고 알려져 있다. 특히 항산화 작용과 관련하여 최근 생체내에서의 산소 free radical 반응이 생체조직의 노화나 질병과 관련이 있으며 페놀성 물질의 hydroxyl group은 유지의 유리기 수용체로서 유지 산패의 초기 단계에 생성된 유리기들이 안정된 화합물들을 형성하도록 하여 산화억제 작용을 한다. 즉, 페놀함량이 높게 나타남은 산화 억제 작용이 높음을 의미한다. 발효 두유 및 비발효 두유의 총 폴리페놀 함량은 Fig 4.와 같이 나타내었다. 발효 두유와 비발효 두유를 각각 3,000 ppm과 5,000 ppm으로 희석하고 실험을 3회 반복하여 폴리페놀 함량을 측정하였다. 그 결과 3,000 ppm으로 희석한 비발효 두유는 폴리페놀 함량이 77.01 ug/ml, 5,000 ppm으로 희석하였을때는 96.75 ug/ml로 나타났으며 3,000 ppm으로 희석한 발효 두유는 76.30 ug/ml, 5,000 ppm으로 희석한 발효 두유는 57.92 ug/ml로 농도에 비례하지 못한 결과가 나타났다. 총체적인 결과로 보아 같은 농도로 희석한 3,000 ppm의 결과값을 비교 하였을 때 발효 두유와 비발효두유의 폴리페놀 함량 차이는 약 0.7 ug/ml로 나타나 두 제품군 간의 차이는 거의 없는 것으로 나타났다.

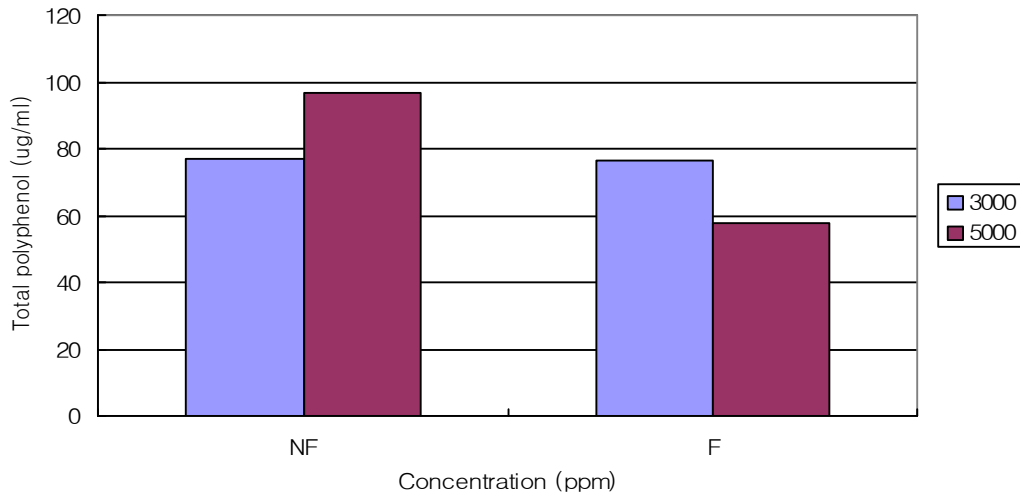


Fig 4. Total polyphenol content of the Fermented and non-fermented Aga Soymilk

### 3) 피트산 함량

피트산(Phytic acid)는 두류나 곡류의 외피에 많이 함유되어 있으며 인산의 저장 역할을 담당하는 천연 식물성 항산화제이다. 피트산은 간의 콜레스테롤 농축과 지방산 합성효소를 줄여주며 암세포의 분화와 세포 증식을 줄여주는 역할을 한다. 그러나 피트산이 함유된 식품을 섭취할 경우 체내 필수 미네랄 (Ca<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, K 등)을 흡착하여 불용성인 Phytate-mineral 복합체를 형성, 필수 미네랄 이용성 저하 및 단백질 흡수 저하와 같은 무기질 흡수저해작용 등의 영양소 흡수를 저해하는 항 영양소로 알려져있다. 최근에는 지방산 및 대장암 억제와 항산화 및 항암작용등으로의 이용성이 부각되고 있는 실정이다.

Sodium Phytate (Sigma, USA)를 이용하여 피트산의 농도별 표준 곡선을 구하였고 이에 따라 발효 두유와 비발효 두유의 피트산 함량을 구한 결과는 Fig 5.와 같이 나타내었다. 발효 두유와 비발효 두유를 원액 그대로 사용하여 피트산 함량을 구한 결과 비발효 두유가 18.7 µg/ml를 나타내었으며 발효 두유는 12.9 µg/ml를 나타내었다. 이는 발효 두유가 비발효 두유에 비해 ml 당 피트산의 함유량이 더 적으므로 발효 두유가 비발효 두유에 비하여 체내 영양소 흡수저해를 더 적게 한다는 것을 알 수 있었다.

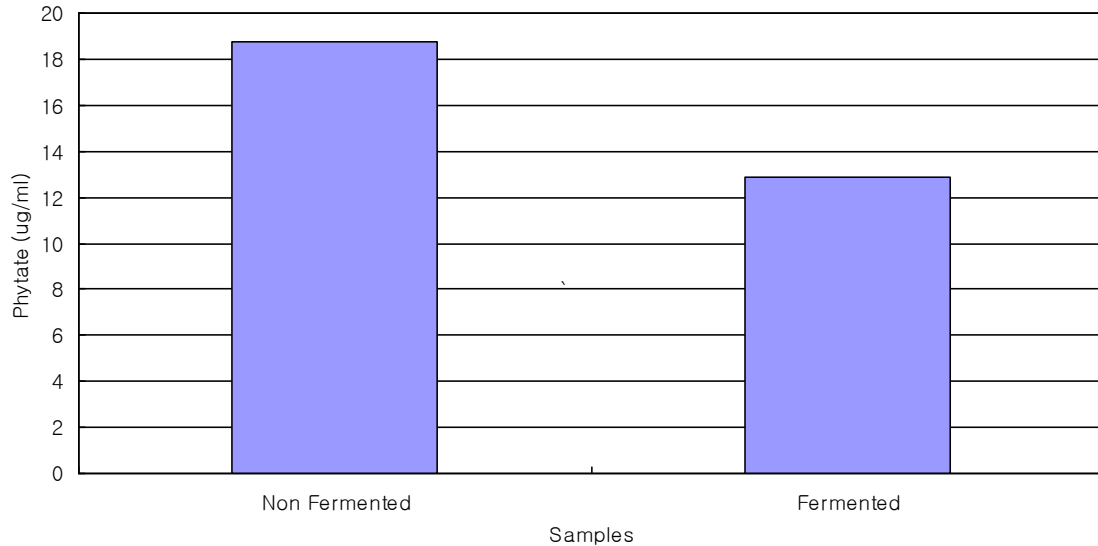


Fig 5. Phytate content of the Soymilk

#### 4) ACE 저해율

고혈압은 성인병으로서 노화, 체질, 비만, 염분 과다섭취 및 심한 스트레스에 의해 혈압이 높아져서 생기는 질환으로 이에 따르는 합병증(동맥경화, 신부전증, 뇌내출혈, 신장질환 등)이 많기 때문에 위험하다고 알려져 있다. (배종화 외, 2006).

ACE(Angiotensin-Converting Enzyme)는 뇌 및 심장 혈관, 폐, 신장의 근위세뇨관 등에서 발견되는 peptidases로써 수분 균형 및 혈압을 조절하는 rennin-angiotensin system 과정 중 angiotensin I에서 angiotensin II를 합성하는 마지막 단계에 관여하는 효소로 혈압을 증가시키는 작용을 하고 있다. (Ma, 2000). 따라서 ACE 저해제들은 ACE 활성을 억제하는 물질로써 항고혈압제로 잘 알려져 있다. (Messerli,1999)

이에 따라 발효 두유와 비발효 두유의 ACE 저해율 결과는 아래의 Fig 6.과 같이 나타내었다. 비발효 두유에서는 ACE 저해율이 86%정도로 나타났으며 발효 두유에서는 119%로 나타났다. 발효 두유가 100%를 상회하는 결과 값을 나타내었는데 이는 두유 발효 과정 중에 분해된 아미노산이 Hip-His-Leu과 유사한 물질로 변환되어 흡광도에 영향을 주었기 때문에 결과 값의 변수가 나타났다고 예상되었다. 위의 결과에 준하여 두 개의 제품군을 비교 하였을 때는 발효를 한 두유가 그렇지 않은 두유 보다 ACE 저해율이 높은 것으로 추측되었다.

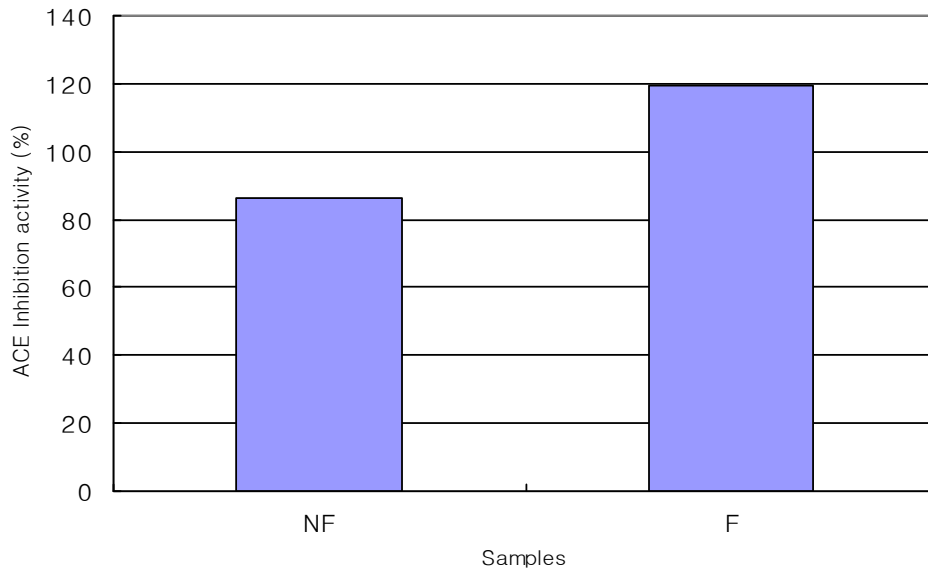


Fig 6. ACE Inhibition activity of the Soymilk

## 5. 콩 품종간 두유의 기능성 비교 · 분석

### 가. 연구개발방법

#### 1) 시료의 제조

본 실험에 사용된 품종은 아가콩, 태광콩, 서목태(쥐눈이 콩), 백태, 속청콩, 화태(불콩)로써 총 6개 품종을 비교분석에 이용하였다. 각각의 개체는 동일한 환경에서 같은 조건으로 처리되었으며 처리방법은 다음과 같다.

우선 콩 500 g을 정선 후 수세하여 중량 대비 7배의 물을 첨가한 다음 12시간 동안 상온에 침지시키고 불린 콩을 거품이 안 생길 때 까지 물로 세척한 다음 콩이 최소한 잠길 만큼의 물을 냄비에 부은 다음 콩이 끓기 시작한 때로부터 10분간 가열하여 주고 삶은 콩의 거품 제거를 위해 3~4차례 씻어내었다.

원료 콩 7배의 정제수를 준비하여 Homogenizer(AM-12, Nissei, Japan)에 콩과 정제수를 일정량 혼합하고 15,000 rpm에서 10분간 균질화 시켰다. 균질화가 끝난 원료 두유는 300  $\mu$ m Testing Sieve(Chung-gye sang Ind. Korea)를 통하여 1차로 여과한 다음 150  $\mu$ m Testing Sieve를 이용하여 2차로 여과 해주고 고형물 양이 7% 이상이 될 수 있도록 두유액과 침전물의 비율을 조정하고 난 뒤 121°C, 15분에서 멸균작업을 실시하고 이 후 4°C에 냉장 보관하여 분석 실험 및 Panel Test용 시료로 준비해두었다.



Table 1. Soymilk samples (6 cultivar)



## 2) 일반성분 분석

### 가) 조회분 정량 (Crude Ash)

도가니의 함량을 구하기 위해 200℃에서 예열 후 600℃에서 2시간 동안 강열하여 데시케이터에서 30분 동안 방냉을 하고 무게를 기록하였다. 이 작업을 수차례 반복하여 도가니의 무게 오차가 0.3 mg 이내가 될 때 이것을 함량으로 하였고 그 값을 기록하였다. 함량을 구한 도가니에 시료를 넣고 무게를 기록한 다음 200℃에서 예비 탄화 과정을 거쳐 600℃에서 3시간 동안 회화한 다음 데시케이터에 30분 방냉시키고 함량에 도달할 때 까지 그 값을 기록하였다. 함량을 모두 구했을 때 아래의 공식에 값을 대입하여 정량하였다.

$$\text{Crude Ash(\%)} = \frac{(a - b)}{s} * 100$$

s: 시료의 무게(g), a: 함량이 된 시료+수기 무게(g), b: 함량이 된 빈 수기의 무게(g)

#### 나) 조지방 정량 (Crude Lipid)

지방 함량은 Rose-Gottlieb법에 의해 측정하였다. 삼각플라스크의 항량을 구하기 위해 105℃의 Dry Oven에서 가열 후 데시케이터에서 30분간 방냉을 하고 무게를 기록하는 작업을 수차례 반복하여 삼각플라스크의 항량을 구하고 그 값을 기록하였다. 그 다음 Mojonnier관에 시료를 일정량 채취하고 증류수로 부피가 총 11 ml이 되도록 맞추고 진한 암모니아와 Ethyl Alcohol 및 Ether를 일정량 혼합하여 진탕한 후, Mojonnier관 상층부에 분리된 여액을 여과하여 삼각플라스크에 넣고 70℃의 수욕 상에서 Ether를 전부 휘발시켜 순수 지방만 분리된 삼각플라스크를 95℃의 Dry Oven에 넣고 항량에 도달할 때까지 가열과 방냉을 반복하였다. 위에서 나온 값을 아래의 공식에 대입하여 정량하였다.

$$\text{Crude Lipid(\%)} = \frac{a-b}{w} * 100$$

a: 추출물이 든 삼각플라스크의 항량(g), b: 삼각플라스크의 항량(g), w: 시료의 무게(g)

#### 다) 조단백질 정량 (Crude Protein)

조단백질 함량은 발효 두유와 비발효 두유를 일정량 채취하고 Semi-micro Kjeldahl 방법으로 단백질 자동분석기(Kjeltec 2400 Auto, Foss Tecator, Eden Prairie, MN, USA)를 이용하여 조단백질 함량을 분석하였다.

#### 라) 조섬유 정량 (Crude Fiber)

조섬유 정량은 AOAC 법(Henneberg-Stohmann 개량법)에 준하여 측정하였으며 시료를 조섬유 분석장치(Fibertec 2010, Foss Analytical, USA)를 이용하여 조섬유 함량을 분석하였다.

#### 마) 수분 함량 측정 (Moisture Amount)

Chemical Balance에 수분함량 측정에 필요한 Aluminium Dish를 올려놓고 Aluminium Dish의 무게를 측정한 값을 기입하였다. 이어 Aluminium Dish위에 두유를 1 ml 채취한 다음 무게를 측정하여 시료+빈 Dish의 무게를 기록하였다. 유의성 있는 실험을 하기 위해 같은 방법으로 2회 반복 실험하였다. 그 다음 105℃로 예열된 Dry Oven (JSON-150, Natural Convection Oven, JSR)에 시료가 든 Aluminium Dish를 넣고 3시간 동안 건조를 하였다. 건조가 끝난 Dish를 데시케이터로 옮겨 30분 동안 방냉을 한 다음 무게를 재고 그 값을 아래의 공식에 대입하여 수분 함량을 산출 하였다.

$$\text{Moisture(\%)} = \frac{W2 - W0}{W1 - W0} * 100$$

W0: 빈 Dish의 무게(g), W1: 건조 전 시료+Dish의 무게(g), W2: 건조 후 시료+Dish의 무게(g)

### 3) 항산화 활성 분석

#### 가) ABTS radical scavenging activity

ABTS radical을 이용한 항산화력 측정은 ABTS+ · cation decolourisation assay 방법에 의하여 시행하였다. 7mM 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiaz-olin-e-6-sulfonic acid) (ABTS, Wako Chemical Co., Japan) 와 2.45 mM potassium persulfate를 최종농도로 혼합하여 실온인 암소에서 24시간 동안 방치하여 ABTS+을 형성시킨 후 734 nm에서 흡광도 값이 0.70 (±0.02) 이 되게 phosphate buffer saline (PBS, pH7.4) 로 희석하였다. 희석된 용액 100 µL에 시료 50 µL를 가하여 5분 동안 방치한 후 흡광도를 측정하였다.

#### 나) 전자공여능 측정 (DPPH radical scavenging activity)

전자공여능(EDA: electron donating ability)은 Blois의 방법을 변형하여 항산화물질에 의한 라디칼 소거 효과를 측정하였다. 각 시료용액 100 µL에 0.2 mM의 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl(DPPH) 50 µL을 넣고 교반한 후 실온에서 10분 간 방치한 다음 517 nm에서 UV/Visible spectrophotometer (UV-1700, SHIMADZU, Japan)로 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 시료용액의 첨가군과 무첨가군의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{전자공여능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의 흡광도}}{\text{무첨가군의 흡광도}}\right) \times 100$$

#### 다) Superoxide dismutase (SOD-Like activity) 유사활성 측정

SOD 유사활성은 Marklund의 방법에 준하여 측정하였다. 시료 20 µL에 pH 8.5로 보정한 Tris-HCl buffer 200 µL와 7.2 mM pyrogallol 20 µL를 첨가하여 37°C에서 10분간 반응 후 1N HCl 20 µL 가하여 반응을 정지시켰다. 반응액 중 산화된 pyrogallol의 양은 ELISA Reader로 420 nm에서 OD값을 측정하였다.

$$\text{SOD-Like activity(\%)} = (1 - \text{시료첨가구 흡광도} / \text{무첨가구 흡광도}) \times 100$$

### 4) 기능성 물질 분석

#### 가) 총 폴리페놀 함량 측정

폴리페놀 정량은 AOAC에 준하여 정량하였다. 두유 시료 1 mL에 Folin-Ciocalteu

phenol reagent 시약 1 mL 을 가하고 3분 반응 후 0.7 M sodium carbonate 포화용액 1 mL을 가하여 혼합한 후 1시간 실온에서 방치하고 750 nm에서 UV/Visible spectrophotometer(UV-1700, SHIMADZU, Japan)로 흡광도를 측정 한 후 표준물질인 tannic acid(Sigma, USA)로 미리 작성한 표준곡선의 흡광도 값과 비교하여 폴리페놀 함량을 산출하였다.

#### 나) 총 플라보노이드 함량 측정

시료를 원액 대비 0.1%의 농도로 희석한 것을 실험 재료로써 이용하였으며 총 플라보노이드 정량은 Nieva Moreno등의 방법을 변형하여 측정하였다. 시료 0.5ml 에 10% aluminum nitrate 0.1ml , 1M potassium acetate 0.1ml 및 ethanol 4.3ml을 차례로 가한 뒤 실온에서 40분간 반응시켜 415nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 플라보노이드 정량은 표준물질인 Quercetin을 이용하여 최종 농도가 0, 10, 30, 50, 70, 100 ug/mL가 되도록 위와 동일한 방법으로 표준곡선을 작성하여 표준물질의 흡광도 값과 비교하여 총 플라보노이드 함량을 산출하였다.

#### 다) Phytate Contents (피트산 함량 측정)

Phytate의 함량은 Haug 등의 방법에 준하여 측정하였다. Standard Curve값을 구하기 위해 표준 용액을 제조하였다. Sodium Phytate(Sigma, USA)를 증류수 1 ml 에 5~40 ug 함유되게 하고 표준 용액 600 ul와 Modified Wade Reagent 200 ul을 혼합하여 5초간 Vortexing 하였다. 이 혼합액을 10분 동안 원심분리를 한 다음 상등액만 취하여 Elisa Leader를 통해 500 nm에서 흡광도를 측정하여 표준 곡선을 구하고 Sodium Phytate 대신 두유시료를 첨가하여 표준곡선 대비 두유시료의 Phytic acid의 함량을 산출하였다.

(※Modified Wade Reagent = 0.03%  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ +0.3% Sulfosalicylic acid+Distilled Water)

#### 라) Angiotensin-I Converting Enzyme Inhibition (ACE 저해율 측정)

두유 시료의 ACE 저해율 측정은 Cushman등의 방법을 변형하여 측정하였으며 각각의 시료는 증류수를 이용하여 적당한 농도로 희석한 뒤 시료로 이용하였다. 기질 및 효소는 0.3 M Sodium borate buffer (pH 8.3)를 이용하여 조제 하였으며 각각의 시료액 20 ul와 기질인 5 mM Hip-His-Leu 80 ul를 Sample tube에 취한 후 37°C에서 10분간 Pre-incubation 하였다. 10분 후 0.3 unit/ml의 농도로 조제한 ACE 효소액 20 ul을 가하고 37°C에서 20분간 반응시키고 1N HCl 용액 150 ul을 가하여 반응을 정지하였다. 여기에 ethyl acetate 1 ml을 첨가한 뒤 1분간 교반 후 4,000 rpm에서 3분간 원심 분리하여 상등액 0.5 ml 취하고 95°C에서 완전 건조시켰다. 이 후 증류수 1 ml을 첨가하여 용해시킨 후 228 nm에서 흡광도를 측정하여 다음 식에 의해 ACE 저해율을 산출하였다.

$$\text{ACE inhibition activity (\%)} = (C-T/C-B)*100$$

**T:** The absorbance of hippuric acid generated in the presence of ACE inhibitor Component

ACE 저해제에서 생성되어 존재하는 마노산의 흡광도

**C:** The absorbance of hippuric acid generated without inhibitors

저해제 없이 생성되는 마노산의 흡광도

**B:** The absorbance of hippuric acid generated without ACE

ACE 없이 생성되는 마노산의 흡광도

#### 마) GABA( $\gamma$ -amino butyric acid) Contents

두유의 GABA( $\gamma$ -aminobutyric acid) 함량분석은 Zhang 등의 방법을 사용하였다. Eppendorf tube에 시료 0.1g을 취한 후 Methanol 400 $\mu$ l를 가하고 70-80 $^{\circ}$ C로 조정된 항온조에서 완전 건조 시켰다. 여기에 70mM LaCl<sub>3</sub> 용액 1mL를 가하여 10분간 혼합한 후 3,000g에서 5분간 원심분리 후 상등액 800 $\mu$ l를 취해 0.1M KOH 용액 160 $\mu$ l를 미리 넣어둔 Eppendorf tube에 가해 3분간 혼합해 주었다. 그리고 이를 3,000g에서 5분간 원심분리한 후 상등액 550 $\mu$ l를 Cuvette에 넣었다. 여기에 0.5M Potassium Pyrophosphate (Sigma, USA) 용액 200 $\mu$ l, 4mM NADP 용액 150 $\mu$ l, 2.0 units GABase/mL 용액 50 $\mu$ l를 각각 혼합하여 340nm에서 흡광도 측정을 하였고 이후 20mM  $\alpha$ -ketoglutarate 용액 50 $\mu$ l를 가하여 실온에서 1시간 방치후 340nm에서 흡광도를 측정하여 측정된 O.D값을 Standard curve에 대입하여 GABA량을 구하였으며, 다음 식으로 실제의 GABA( $\gamma$ -aminobutric acid) 함량을 구하였다

$$\text{실제 GABA 양} = \text{측정된 GABA} \times (100/55)$$

#### 바) $\alpha$ -Glucosidase Inhibitory (항당뇨 저해율 측정)

$\alpha$ -glucosidase 활성억제 측정은 Tibott 등의 방법에 따라 측정하였다. 50mM sodium succinate buffer(pH 4.2) p-nitrophenol- $\alpha$ -D-glucopyranoside(PNPG)를 용해시켜 1mg/mL의 농도로 기질을 만들고, 기질 1mL와 효소액 0.1mL를 혼합하고 대조구에는 증류수 0.1mL, 반응구에는 시료 0.1mL와 효소액 0.1mL를 넣어 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시킨후 1N-NaOH 0.1mL를 첨가하여 발색시켰다. 이때 생성된 p-nitrophenol(PNP)은 400nm에서 흡광도를 측정하였으며, 그 양은 p-nitrophenol로부터 작성한 표준곡선으로부터 구하여 다음의 식으로 저해율을 구하였다.

$$\text{저해율(\%)} = (1 - \text{반응구의 PNP생성량} / \text{대조구의 PNP생성량}) \times 100$$

사) Free amino acid amount (유리아미노산 검출 정량)

유리아미노산 검출 정량은 단백질 함량 측정방법인 Lowry Assay of Protein법을 변형하여 측정하였다. 우선 아미노산 표준물질로써 L-Tyrosine(Sigma, USA)를 0, 20, 40, 60, 80, 100ppm농도로 제조하여 표준 곡선을 구한 다음 시료를 7,000rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 새로운 Effendorf tube에 100ul 취하였다. 여기에 0.55M의 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액을 1ml 가하여 1분간 반응시킨 다음 2N Folin Ciocalteu's Phenols (Sigma, USA) 100ul을 넣고 30℃로 맞춰진 Incubator에 30분동안 Pre-Incubation을 시키고 750nm에서 흡광도를 측정한 후 표준곡선에 대입하여 값을 산출하였다.

5) Cytotoxicity assay (세포 독성 실험)

가). 세포 배양

HepG2 Cells은 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 10% FBS, Penicillin(100U/mL), streptomycin(100μg/mL)이 첨가된 DMEM 배지로 배양하였다. HepG2 Cells은 75cm<sup>2</sup> T-Flask (SPL, Korea)에서 충분히 증식한 후 배양 2일 간격으로 배양세포 표면을 Phosphate Buffered Saline(PBS) 용액으로 씻어준 후 50mL Flask 당 1mL의 0.25% Trypsin-EDTA 용액을 넣고 37℃에서 1분간 처리한 다음 Trypsin 용액을 버리고 37℃에서 5분간 보관하여 세포를 탈착 후 계대배양을 실시하였다. 탈착된 세포는 10% FBS가 첨가된 DMEM 배양액 10mL에 부유시킨 다음 새로운 배양용기(50mL Culture Flask)에 옮겨 1:2의 비율로 split하여 CO<sub>2</sub> 배양기 (37℃, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양하였다.

나) 세포독성 검사

준비된 시료가 HepG2 cells에 나타내는 세포독성 유발효과를 알아보기 위하여 MTT assay를 실시 하였다. 96 well plate에 5×10<sup>3</sup> cells/well의 cell을 100μl씩 넣고 37℃, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 동안 배양 후 배지를 버리고 배양세포 표면을 Phosphate Buffered Saline (1×PBS) 용액으로 씻어주었다. 같은 양의 배지와 PBS에 녹인 시료 (50, 100, 200 ug/mL)를 각 well에 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 PBS에 녹인 1mg/mL MTT(Sigma, USA)를 20μl씩 각 well에 처리하여 알루미늄 호일로 차광시켜준 후 3시간 동안 같은 조건에서 배양하였다. 배양시간이 끝나면 각 well의 배양액을 조심스럽게 Suction 해준 후 DMSO를 200μl 처리하고 상온에서 15분 동안 Soft Shaking 하여준 다음 Microplate reader (Molecular Devices, USA)를 이용하여 570nm에서 흡광도를 측정하였으며 Cell viability는 다음 공식으로 계산 하였다.

$$\text{Cell viability(\%)} = 100 \times \text{AT} / \text{AC}$$

AC: absorbance of control, AT: absorbance of tested soymilk solution

#### 6) Water Absorption (수분흡수율 측정)

콩 10g을 정확히 칭량하여 상온에서 24시간 동안 증류수에 침지하였다. 시간별로 침지콩을 꺼내어 표면수를 제거한 후 무게를 측정하여 수분흡수율을 나타내었으며 수분흡수율은 수침 후 증가한 무게에서 침지 이전의 무게를 비교하여 비율로 나타내었고 24시간이 지난 후 같은 방법으로 측정하여 산출한 결과를 최종증가율로 하였다.

#### 7) pH and Titration Acidity Test (pH측정 및 적정산도)

콩 20g에 증류수를 사용하여 200g으로 정용한 후 마쇄하고 마쇄액 9mL을 취하여 pH-Meter(SevenEasy, METTLER TOLEDO, Switzerland)로 pH를 측정하였다. 적정산도는 위의 마쇄액 9mL을 취하고 증류수 9mL을 더하여 pH8.3까지 맞추는데 소비된 0.1N NaOH 소비량을 Lactic acid %로 환산하여 아래 식으로 적정산도를 구하였다.

$$TA(\%) = \frac{a * 1.010 * 0.009}{m} * 100$$

a: 0.1N NaOH 소모량, m: 시료의 무게(g), 1.010: 0.1N-NaOH의 Factor, 0.009: 0.1N NaOH 1mL에 해당하는 Lactic acid의 당량

#### 8) 총균수 측정 (Total Number)

미생물 측정은 시료 20g에 멸균 증류수를 사용하여 200g으로 정용한 후 마쇄하고 마쇄액을 단계별로 희석하여 Pour plating 방법으로 측정하였으며 일반 미생물의 경우 Plate Count Agar (DIFCO Lab, Detroit, USA)에 도말한 후 37°C에서 48시간 배양하였다. 배양 후 나타난 Colony를 계측하여 Log No. CFU/mL로 나타내었다.

#### 9) Panel Test

2.1.1에서 제조한 시음료를 무균상태에서 정백당(CJ, Korea)을 1L에 6%가 되도록 첨가하고 37°C의 Water bath에서 Soft Shaking 하여 설탕을 완전히 용해시킨 것을 관능평가용 시료로 하였다. 조사 대상은 20대 남녀로 구성된 안동대학교 식품생명공학과 의 학생을 임의로 15명 선발하여 관능평가를 실시하였다.

각각의 시료에는 임의로 난수를 매겨 평가 대상자들이 시음료명을 알아볼 수 없게 처리를 하였으며 각각의 시음료를 음용한 다음에는 1~2회 물로 입을 헹귀 시료간의 관능 오차를 최소화 할 수 있도록 유도 하였다. 주된 평가내용은 색, 향, 맛이었으며 마지막에는 난수 6개 가운데 평가자들이 선호하는 시음료에 대하여 하나씩 체크하는 방식으로 시제품화 하였을 때 가장 전망이 있는 품종에 대해 표기를 하게 하였다.

## 나. 연구개발결과

### 1) 일반성분 분석

아가콩, 태광콩, 서목태, 백태, 속청콩, 화태를 각각 2.1.1의 방법으로 두유를 만들어 일반성분을 분석한 결과는 Table 3.과 같다. 수분은 아가콩이  $95.21\pm 0.01\%$ 로 가장 높았고 서목태가  $91.10\pm 0.01\%$ 로 가장 낮게 나타났다. 조단백질은 속청콩이  $4.03\pm 0.01$ 로 가장 높았으며 아가콩이  $1.88\pm 0.00\%$ 로 가장 낮게 나타났다. 조섬유는 속청콩이  $1.09\pm 0.00$ 으로 가장 높게 나타났으며 아가콩은  $0.49\pm 0.00$ 으로 속청콩에 비하여 2배가량 조지방 함량이 낮은 것으로 나타났다. 조지방에서는 태광콩이  $1.22\pm 0.0\%1$ 로 가장 낮게 나타났고 화태(불콩)이  $4.74\pm 0.04\%$ 로 태광콩에 비하여 약 4배 가량의 높은 조지방 함량이 나타난 것으로 밝혀졌다. 마지막 조회분에서는 아가콩이  $0.15\pm 0.01\%$ 로 가장 낮게 나타났고 백태가  $0.39\pm 0.01$ 로 가장 높게 측정되었다. 아가콩은 타 품종에 비하여 입자의 크기가 작아 조회분이나 조단백질 함량 측정에서 열세한 결과를 나타낸 것으로 추측 되었다.

Table 1. Proximate composition of soymilk

Cultivar	Crude Ash (%)	Crude lipid (%)	Crude protein (%)	Crude Fiber (%)	Moisture (%)
아가콩	$0.15\pm 0.01$	$1.23\pm 0.03$	$1.88\pm 0.00$	$0.49\pm 0.00$	$95.21\pm 0.01$
태광콩	$0.21\pm 0.00$	$1.22\pm 0.01$	$3.08\pm 0.00$	$0.58\pm 0.00$	$92.81\pm 0.03$
서목태	$0.32\pm 0.02$	$1.65\pm 0.02$	$3.32\pm 0.00$	$0.55\pm 0.00$	$91.10\pm 0.01$
백태	$0.39\pm 0.01$	$4.17\pm 0.00$	$3.60\pm 0.00$	$0.94\pm 0.00$	$91.13\pm 0.02$
속청콩	$0.33\pm 0.01$	$1.68\pm 0.00$	$4.03\pm 0.01$	$1.09\pm 0.00$	$92.32\pm 0.01$
화태	$0.22\pm 0.00$	$4.74\pm 0.04$	$3.06\pm 0.01$	$1.02\pm 0.00$	$92.16\pm 0.03$

### 2) 항산화 효과 측정

#### 가) ABTS radical scavenging activity

ABTS radical을 이용한 항산화능의 측정은 potassium persulfate와의 반응에 의해 생성된 ABTS free radical이 추출물 내의 항산화 물질에 의해 제거되어 radical 특유의 색인 청록색이 탈색되는 것을 이용한 방법으로  $ABTS + \cdot$  cation de-colorization assay 방법에 의하여 측정된 결과를 Fig 1.과 같이 나타내었다. 6개의 두유 시료를 농도별로 ABTS 래디컬 저해능 분석을 한 결과는 아래와 같다. 각각의 시료를 1000, 3000, 5000, 7000, 10000, 20000ppm으로 희석 처리하여 분석하였는데 서목태는 1000, 5000ppm에서 각각 53.54%, 77.56%의 래디컬 저해능을 나타내



가장 높은 활성을 나타내어 가장 우수한 결과를 보였으며 그 다음으로는 화태, 아가, 백태, 태광콩 순으로 나타났으며 속칭콩은 5000ppm에서 미미하게 활성을 보여 대조구 가운데 가장 활성이 낮게 나타났다. 모든 시료는 전반적으로 5000ppm에서 래디컬 저해 활성을 나타내기 시작했으며 속칭, 태광콩을 제외한 나머지 시료는 10,000ppm에서 래디컬을 50% 소거하는데 필요한 값인 IC<sub>50</sub>을 초과한 것으로 나타났다.

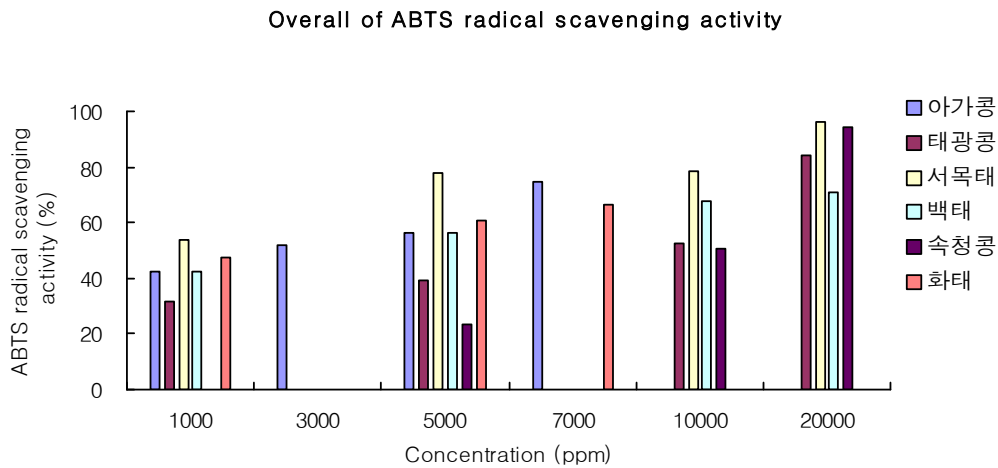


Fig 1. ABTS radical scavenging activity of Soymilk

#### 나) 전자공여능 측정 (DPPH radical scavenging activity)

전자공여능 측정에 사용된 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)는 자체가 매우 안정한 free radical로서 517 nm에서 특징적인 광흡수를 나타내는 보라색 화합물이다. DPPH는 알코올 등의 유기용매에 매우 안정하며 항산화 기작 중 proton-radical scavenger에 의하여 탈색되기 때문에 항산화 활성을 육안으로 쉽게 관찰할 수 있는 장점이 있어 다양한 천연소재로부터 항산화 물질을 검색하는데 많이 이용되고 있다. 또한 자유라디칼은 인체 내에서 지질 또는 단백질 등과 결합하여 노화를 일으키기 쉬운데 폐놀성 화합물의 경우 자유라디칼을 환원시키거나 상쇄시키는 능력이 강해 인체 내에서 자유 라디칼에 의한 노화를 억제하는 척도로 이용할 수 있다. 두유를 천연 항산화제로서의 이용 가능성을 확인하기 위하여 전자공여능을 측정한 결과 Fig 2.와 같이 나타내었다. 전 시료가 농도에 비례하여 활성이 높아지는 추세를 보였는데 1,000ppm에서는 태광콩이 활성이 가장 높았으나 5,000ppm부터는 서목태의 활성이 급격해 높아졌고 10000ppm에서는 94.29%로써 전 시료대비 활성이 가장 높게 측정이 되어 래디컬 소거능이 가장 뛰어난 것으로 나타났다. 이와는 반대로 속칭콩은 20,000ppm부터 30.41%의 첫 활성이 나타나 대조구 가운데 가장 열약한 것으로 밝혀졌다. 나머지 시료역시 10,000ppm에서부터 백태를 제외하고는 IC<sub>50</sub>값을 초과한 것으로 나타났다.

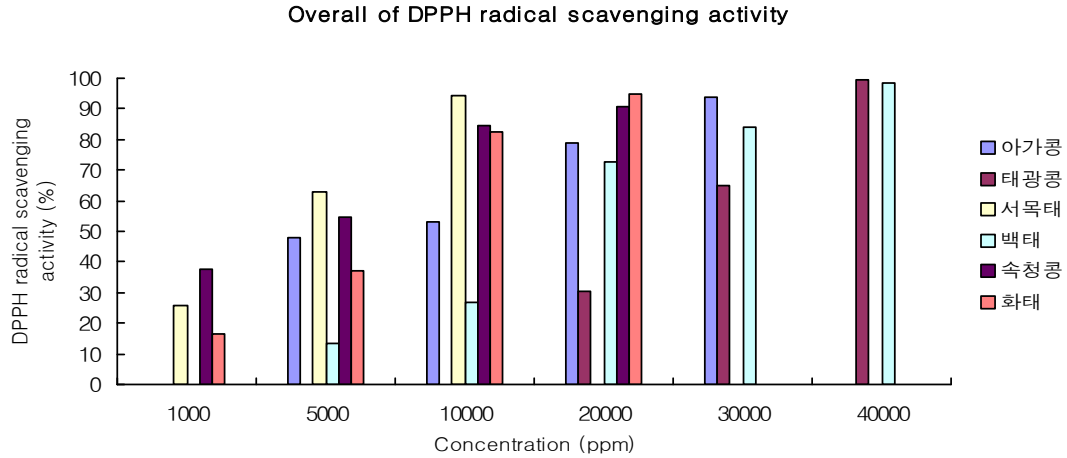


Fig 2. DPPH radical scavenging activity of Soymilk

#### 다) Superoxide dismutase 측정

SOD 유사활성 물질은 효소는 아니지만 SOD와 유사한 역할을 하는 저분자 물질로 주로 phytochemical에 속하며 superoxide의 반응성을 억제한다. 따라서 이 SOD 유사물질을 섭취하면 인체 내의 superoxide를 제거함으로써 산화적 장애를 방어하고 노화억제 효과를 기대할 수 있다. SOD 활성도는 알칼리 상태에서 pyrogallol의 자동 산화에 의한 발색을 이용하는 실험이다. 측정된 결과는 Fig 3.에 나타내었다. 실험 결과 아가콩이 5,000ppm에서 26.25%의 활성을 나타내었으며 10,000ppm일 때 54.45%의 활성을 보여 가장 우수한 결과를 보였으며 반면에 화태는 40,000ppm일 때 6.89%의 가장 낮은 활성을 나타내었다. 아가콩을 제외한 나머지의 시료는 30,000ppm부터 미미한 활성이 나타났으며 아가콩을 제외한 나머지 품종에서는 IC<sub>50</sub>을 초과 하는 품종은 없는것로 나타났다.

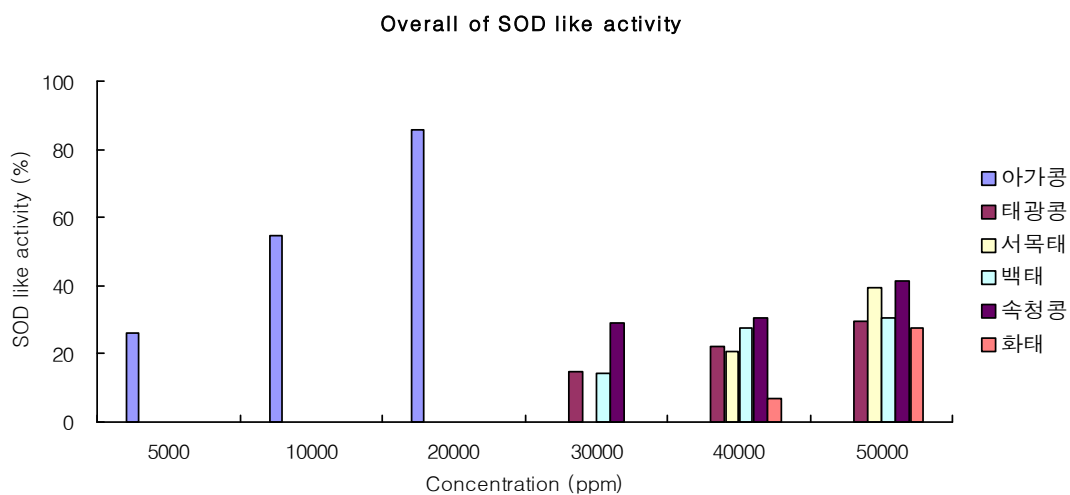


Fig 3. SOD-like activity of Soymilk

### 3) 기능성 물질 분석

#### 가) Total polyphenol 함량

식물체에 함유되어 있는 페놀성 화합물들은 항 돌연변이원성, 콜레스테롤 저하 작용, 정상작용, 항산화 및 항암 작용 등 다양한 생리활성들을 가지고 있는데, 이것은 분자 내 phenolic hydroxyl기가 효소 단백질과 같은 거대 분자들과 결합하는 성질이 있어 이러한 생리기능 활성을 나타내는 주체로 인정되고 있다고 알려져 있다. 특히 항산화 작용과 관련하여 최근 생체내에서의 산소 free radical 반응이 생체조직의 노화나 질병과 관련이 있으며 페놀성 물질의 hydroxyl group은 유지의 유리기 수용체로서 유지 산패의 초기 단계에 생성된 유리기들이 안정된 화합물들을 형성하도록 하여 산화억제 작용을 한다. 즉, 페놀함량이 높게 나타남은 산화 억제 작용이 높음을 의미한다. 두유의 총 폴리페놀 함량은 Fig 4.와 같이 나타내었다.

6개의 품종을 대상으로 두유를 제조하여 총 폴리페놀 함량을 측정된 결과 아가콩의 폴리페놀 함량이 10.17mg/ml로써 타 품종에 비해 월등히 우수한 결과를 나타내었고 다음으로 태광콩 5.24mg/ml, 화태 3.74mg/ml, 속칭콩 3.71mg/ml, 백태 3.22mg/ml, 서목태 3.00mg/ml의 함량 순으로 나타났다

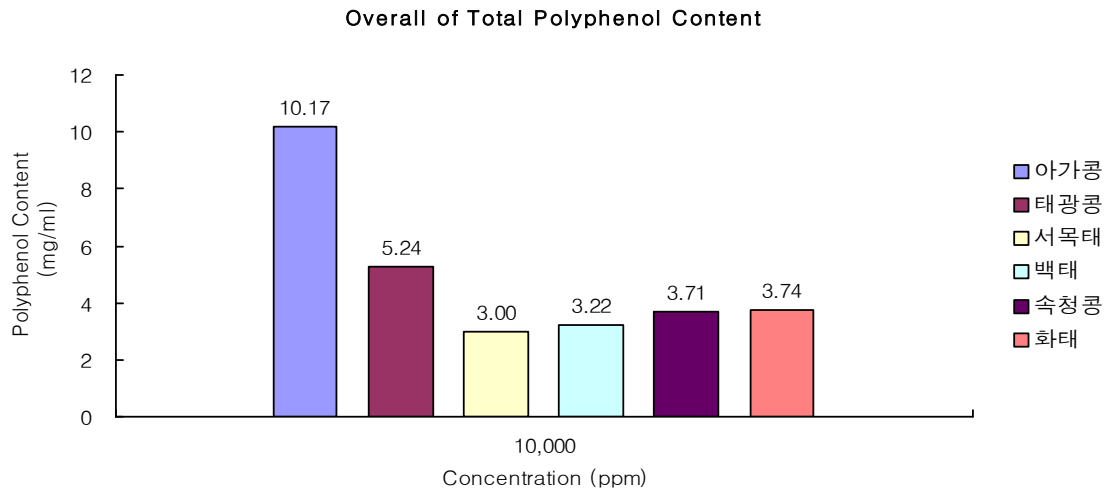


Fig 4. Total polyphenol content of Soymilk

#### 나) Total Flavonoid 함량

플라보노이드는 식품에 널리 분포하는 노란색 계통의 색소로써 산화-환원 반응에서 기질로 작용하며 산에서 안전하여 더욱 선명한 색을 띠나 강알칼리에서는 그 구조가 변하여 황색 혹은 갈색으로 변하는 성질이 있으며 그 기능으로써는 항산화, 항암, 충치 예방 등의 다양한 생리활성을 가지는 물질이다. 시료에 들어있는 총 플라보노이드 함량을 측정된 결과는 Fig 5.와 같다. 아가콩의 플라보노이드 함량이 23.27ug/ml로 가장 높았으며 화태가 17.09ug/ml로 함량이 가장 낮은 것으로 나타났

다. 미 콜로라도 주립대학 연구팀에서는 흰콩 보다 완두콩이나 검은콩 등의 색이 있는 콩에서 플라보노이드와 같은 항산화 성분이 10배 가량 더 많이 함유되어 있다고 보고를 하였는데 어째서 검붉은 계통의 속청콩과 서목태가 가장 높게 나오지 않은 것을 추측해보면 두유를 만들기 전 콩을 24시간 동안 상온에 수침시키는 과정과 삶는 과정에서 유독 검붉은 계통의 콩만 눈에 확연히 드러날 정도로 색소 유출이 확인되는데 이 과정에서 플라보노이드가 대거 손실 되었을 것으로 추측이 된다.

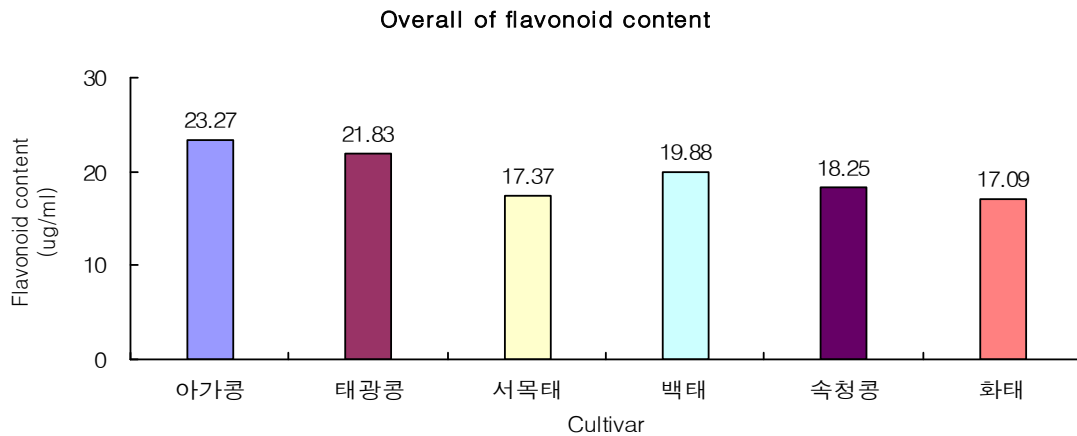


Fig 5. Total flavonoid content of soymilk

#### 다) Phytate Content (피트산 함량)

피트산(Phytic acid)는 두류나 곡류의 외피에 많이 함유되어 있으며 인산의 저장 역할을 담당하는 천연 식물성 항산화제이다. 피트산은 간의 콜레스테롤 농축과 지방산 합성효소를 줄여주며 암세포의 분화와 세포 증식을 줄여주는 역할을 한다. 그러나 피트산이 함유된 식품을 섭취할 경우 체내 필수 미네랄 (Ca<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, K등)을 흡착하여 불용성인 Phytate-mineral 복합체를 형성, 필수 미네랄 이용성 저하 및 단백질 흡수 저하와 같은 무기질 흡수저해작용 등의 영양소 흡수를 저해하는 항 영양소로 알려져 있으나 최근에는 지방산 및 대장암 억제와 항산화 및 항암 작용등으로의 이용성이 부각되고 있는 실정이다. 본 실험에서는 피트산이 가지는 기능 중 미네랄 이용성 저하, 단백질 및 무기질 흡수 저해기능 등의 단점을 위주로 의미를 두고 실험에 임하였다.

Sodium Phytate (Sigma, USA)를 이용하여 피트산의 농도별 표준 곡선을 구하였고 이에 따라 두유의 피트산 함량을 구한 결과는 Fig 6.와 같이 나타내었다. 개체군별 큰 차이는 보이지 않았고 비슷한 수준의 결과를 나타내었는데 그 중에 아가콩의 피트산 함량이 49.15ul/ml로 가장 낮게 측정되었으며 백태가 52.49ul/ml로 가장 높게 측정이 되었다. 나머지 품종 역시 이와 대등한 함량을 보여 품종간의 피트산 함량차는 거의 대등한 수준임을 나타내었다.

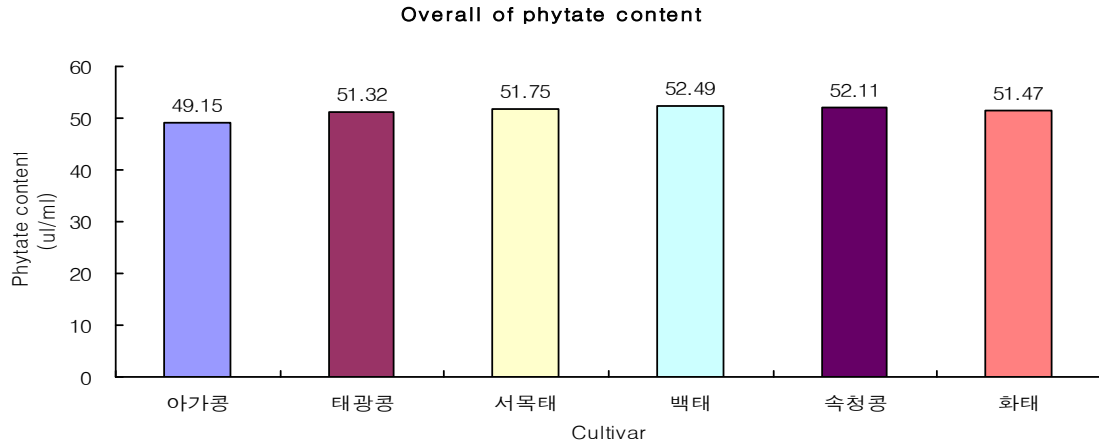


Fig 6. Phytate content of Soymilk

라) Angiotensin-I Converting Enzyme Inhibition (ACE 저해율)

고혈압은 성인병으로서 노화, 체질, 비만, 염분 과다섭취 및 심한 스트레스에 의해 혈압이 높아져서 생기는 질환으로 이에 따르는 합병증(동맥경화, 신부전증, 뇌내출혈, 신장질환 등)이 많기 때문에 위험하다고 알려져 있다. (배중화 외, 2006). ACE(Angiotensin-I Converting Enzyme)는 뇌 및 심장 혈관, 폐, 신장의 근위세뇨관 등에서 발견되는 peptidases로서 수분 균형 및 혈압을 조절하는 rennin-angiotensin system 과정중 angiotensin I에서 angiotensin II를 합성하는 마지막 단계에 관여하는 효소로 혈압을 증가시키는 작용을 하고 있다. (Ma, 2000). 따라서 ACE 저해제들은 ACE 활성을 억제하는 물질로서 항고혈압제로 잘 알려져 있다. (Messerli,1999) 이에 따라 두유의 ACE 저해율 결과는 아래의 Fig 7.과 같이 나타내었다. 6개의 품종에 대하여 각각 ACE 저해율 측정을 하였는데 아가콩이 68.5%를 나타내 가장 우수한 활성을 나타내었고 다음으로 태광콩, 화태, 속청콩, 백태, 서목태 순으로 이 중 서목태는 28.37%로 가장 낮은 ACE 저해율을 나타내었다.

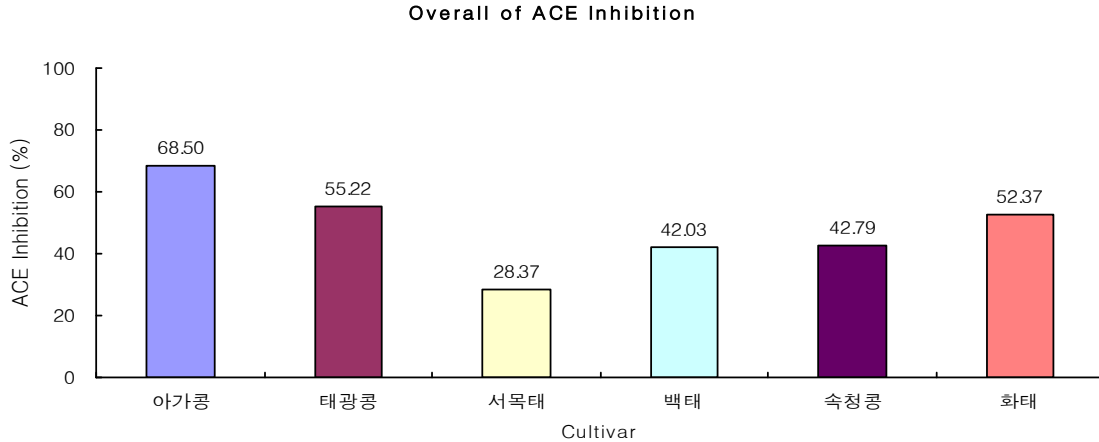


Fig 7. ACE Inhibition activity of Soymilk

#### 마) GABA ( $\gamma$ -amino butyric acid) Content

GABA( $\gamma$ -amino butyric acid)는 포유류 중추신경에서 발생하는 억제성 신경 전달 물질로써 뇌혈류 개선, 뇌세포 대사기능 촉진등의 신경안정작용 및 스트레스 해소, 기억력 증진, 혈압강하 작용, 불면, 비만, 갱년기 장애 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 일반적으로 인체 내에서는 GABA 요구량을 모두 생산하지만 식품첨가물의 과잉섭취, 저단백 식단, 아연과 Vit B의 부족이 GABA 생성을 저해하며 이를 식품을 통해 보충하려면 1일 필요량은 500-3000mg 정도이다. GABA는 식품소재, 건강보조식품, 기능성 식품, 약, 음료, 우유, 죽, 떡, 드링크, 두부, 김치 등에 적용되고 있는데 식품관련 분야에서는 발아 현미시장이 GABA 관련 제품시장의 대부분을 차지 하고 있는 실정이다.

또 GABA는 미생물과 고등생물에 까지 널리 발견되고 있으며 유산균 계열인 *Lactobacillus brevis*, *Lactococcus lactis*등이 GABA를 생산하는것으로 알려져 쌀 및 콩 발효식품, 김치 등에서 분리한 유산균이 고농도로 생산하는 것으로 알려져 있다. (Kang&Woo, 2007 BRIC Webzine) 이에 콩 소비를 높이기 위한 두유제조 과정에서 발효를 실시할 경우 GABA 함량 상승에 시너지 효과를 나타낼 것으로 여겨진다. 이에 콩에 콩에별 GABA 함량을 알아보기 위해 실험위해 싹으며 그 결과를 Fig 8나타낼 것으로 여겨진다. 싹으며 100g당 148.33mg의 GABA 함량을 Fig 8나타낼 것으로결과를 나타내었으며 그 다음으로 백태, 태광콩, 화태, 속청콩, 서목태 순으로 나타났다. 위에서 언급했다시피 현재 발아현미 제품이 GABA관련 제품 시장의 대부분을 차지 하고 있다고 하였는데 발아현미의 GABA 함량은 10-100mg/100g이지만 실험결과를 통해 보았을 때 콩은 발아현미에 비하여 GABA 함량을 10-50mg 이상 상회하므로 콩을 이용한 제품으로 충분히 발아현미 시장을 대체하리라고 추측해본다.

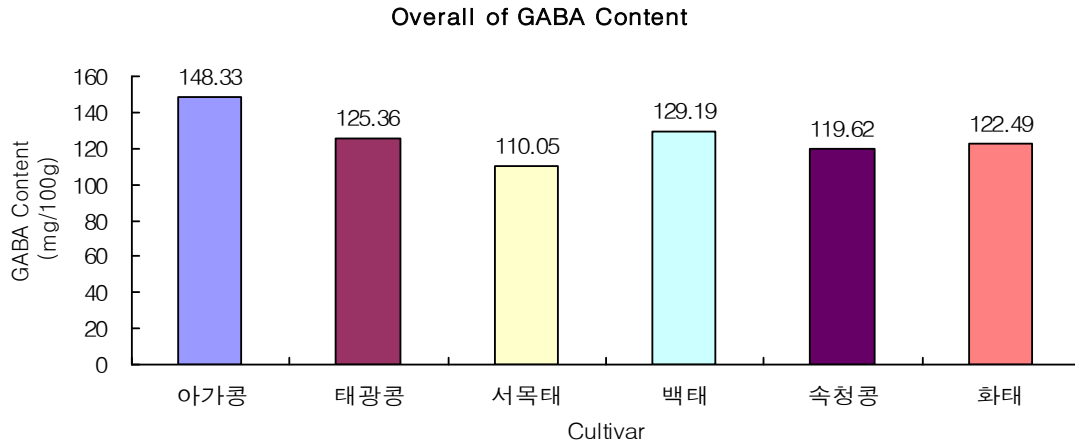


Fig 8. GABA( $\gamma$ -amino butyric acid) content of Soymilk

바)  $\alpha$ -Glucosidase Inhibition

$\alpha$ -glucosidase는 인체 장내에서 탄수화물로부터  $\alpha$ -glucose를 방출하는  $\alpha$ -glucosidic bond의 분해를 촉진하여 포도당을 흡수하는데 관여하는 생체내 필수 효소인데 이를 저해하는 AGI( $\alpha$ -glucosidase inhibitor)는 탄수화물의 소화흡수율을 저하시키는 기능성 물질로 혈당치의 상승을 억제하여 당뇨병, 비만증, 과당증 등의 성인병 예방과 치료 목적에 이용될 수 있으며 이미 같은 원리로 식사 후 고혈당을 억제하는 의약품이 개발되어 시판되고 있다. 흔히 AGI를 당뇨병 치료물질이라 부르는데 이에 우리는 아가콩을 포함한 시중에 판매되고 있는 콩으로 두유를 제조하여 품종별 두유가 가지는  $\alpha$ -glucosidase 저해율을 개체군별로 분석하여 우수품종의 선별은 물론 품종간 저해율 차이를 확인할 수 있었다. 두유의 AGI 효과를 분석한 결과는 Fig 9와 같이 나타내었다. 분석에 사용된 시료는 모두 10,000ppm으로 희석을 하였으며 시료 첨가군에서 무첨가군을 나눠 값을 산출한 것에 이를 백분율 한 것을 값으로 나타내었다. 아가콩이 41.15%로 가장 높은 활성을 나타냈고 서목태가 26.20%로 가장 낮은 활성을 나타내었다. 결과로 보아 아가콩으로 만든 두유가 항당뇨 활성이 가장 높은 것으로 나타났다.

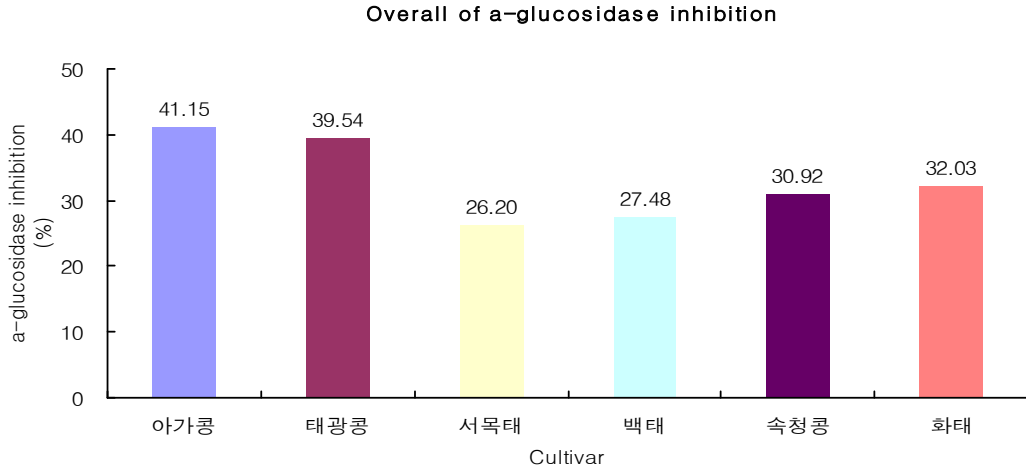


Fig 9.  $\alpha$ -Glucosidase inhibition of Soymilk

사) Free amino acid amounts (유리아미노산 검출 · 정량)

아미노산은 모든 생명체를 주관하는 단백질을 산으로 완전히 가수분해 하였을 때 생성되는 것으로 인체에 여러 가지로 유익한 작용을 하는 물질이다. 인체에 관련된 아미노산은 그 종류가 필수 아미노산 8종, 비필수 아미노산 10종으로써 총 18종에 달한다. 본 실험에서는 여러 가지 아미노산 가운데 L-Tyrosine을 표준물질로 하여 단백질 함량 측정방법인 Lowry법을 변형(Folin Ciocaltue's Phenol에 대한 Trp, Tyr 등의 환원성 반응), 시료속의 유리아미노산을 검출 정량하는 실험을 실시하였다. 실험에 사용된 L-Tyrosine은 인체 대사작용에 필수적으로 요구되는 아미노산은 아니지만 우울증, 알러지, 두통해소에 그 기능이 유효하며 멜라닌 색소의 합성 및 기분 전환제, 식욕억제, 체지방 분해등에 효능이 있는 물질이다. 시료는 각각 10,000ppm으로 희석하여 실험에 사용하였으며 그 결과를 Fig 10.에 나타내었다. 실험결과 아가콩의 유리아미노산 함량이 100g중 32.06mg로 나타나 가장 우수하였으며 그 다음으로 속청콩, 화태, 백태, 태광콩, 서목태 순이었다.



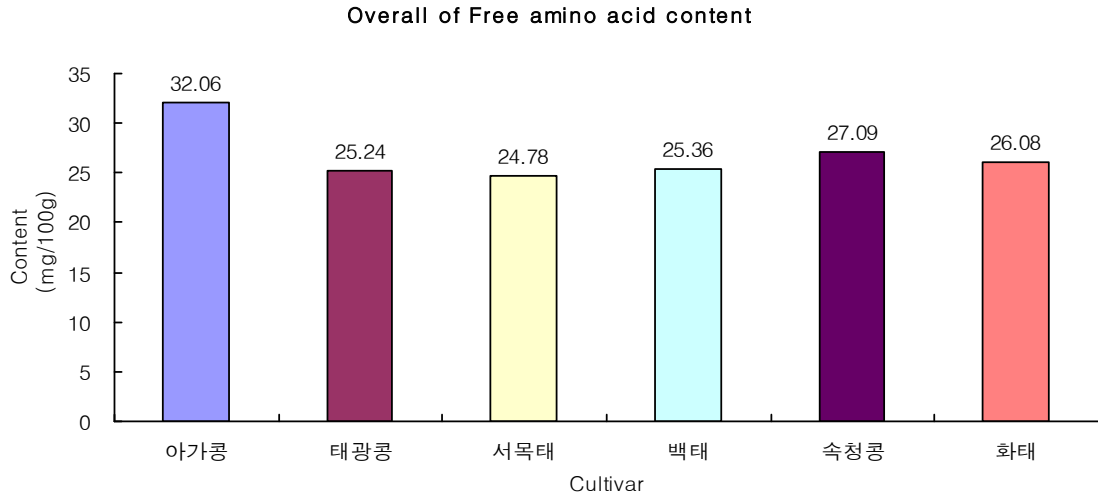


Fig 10. Free amino acid content of soymilk

#### 4) Cytotoxicity Assay (세포독성실험)

간암 유래세포인 HepG-2를 배양하여 품종별로 약물처리 한 결과를 Fig 12. 와 같이 나타내었다. 세포 활성도는 시료 첨가군에서 시료 무첨가군을 나눈 값을 100% 기준으로 환산하여 나타내었다. 약물처리를 하지 않은 것을 대조구(Normal)로 봤을 때 속청콩이 50ppm에서의 세포생존도가 81.9%로 나타나 18.1%의 독성률을 보였으나 농도가 증가함에 따라 독성률이 점점 높아져 200ppm에서는 기준치 보다 4.5%가 더 높아지는 현상이 나타났으며 백태를 제외한 나머지 시료는 농도에 반비례하는 결과는 나오지 않았다. 백태의 경우 농도에 반비례하는 결과는 나타내었지만 200ppm의 약물 처리시 1.6%의 독성을 나타내어 대조구에 비해 큰 활성을 나타내지는 않았다. 실험 결과를 근거로 보아 분석 하였을 때 대조구를 제외한 나머지 6개의 시료가 갖는 세포독성도는 그다지 유의성이 없는 것으로 밝혀졌다.

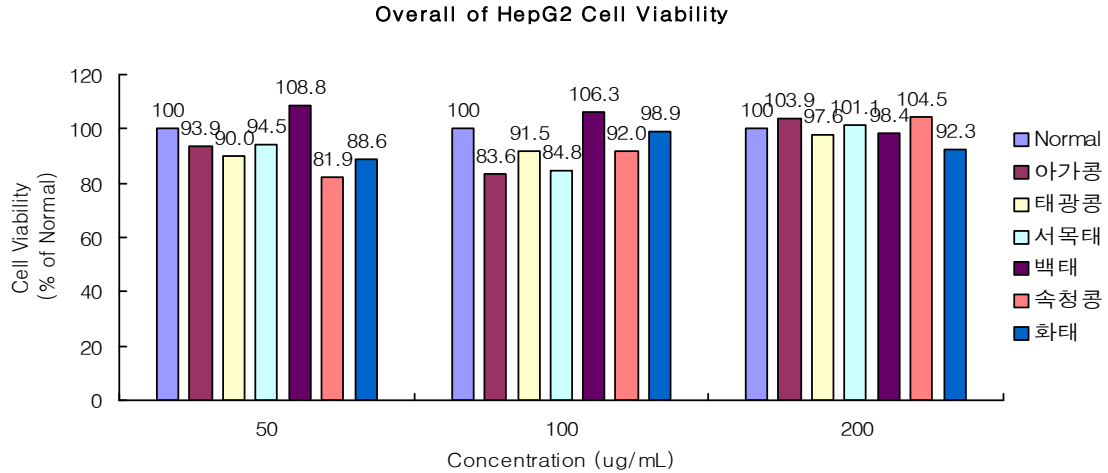


Fig 12. After soymilk treated HepG-2 Cell Viability

#### 5) 물리·화학적 특성

##### 가) 수분 흡수율 측정

6개의 시료마다 각각 10g을 칭량하여 비커에 넣고 증류수로 100ml까지 정용하여 24시간 수침시켜 시간 경과에 따른 수분흡수율을 측정된 결과를 Table 3.에 나타내었다. 수침 후 1시간이 지났을 때 아가콩이 6.43g이 증가한 64.3%로 가장 높은 흡수율을 보였으며 속청콩이 4.27g 증가하여 약 43%로 가장 낮은 흡수율을 보였다. 거의 모든 품종이 수침 후 6시간이 경과한 때로부터 흡수속도가 현저히 낮아지지만 무게는 수침시간에 비례하여 꾸준히 증가함을 보였으나 아가콩의 경우는 6시간째 부터 무게가 오히려 감소하는 현상을 나타내었다. 이를 제외한 나머지 5개 품종군은 실험이 종료되는 시간인 24시간이 지나서도 흡수율이 소폭 상승하는 결과를 보였으며 48시간까지 수침시간을 늘려보았으나 전 품종에서 부패취가 발생하여 수침 시간을 24시간까지 조정 하였다. 최종 증가율은 수침 전 무게와 24시간이 지나 실험이 완료되는 시점의 무게를 비교하여 총 수분흡수율을 나타낸 것인데 화태(불콩)의 수분흡수율이 수침전 대비 1.38배 증가로 가장 높은 것으로 나타났으며 아가콩의 수분흡수율은 1.15배로 가장 낮게 나타났다.

Table 3. Water absorption of soybeans

품종	건조전 중량(g)	1시간	2시간	4시간	6시간	12시간	24시간	최종 증가율 (%)
아가콩		16.43	19.89	22.69	22.21	22.00	21.50	115
태광콩		14.48	16.92	19.75	21.05	22.38	22.58	125.8
서목태	10g	13.87	16.87	19.29	20.22	21.09	21.95	119.5
백태		15.86	19.09	21.39	22.25	22.77	22.84	128.4
속칭콩		14.27	16.81	19.60	21.13	22.14	23.08	130.8
화태		16.24	18.85	21.14	22.34	23.11	23.83	138.3

## 나) pH 및 적정산도

우유가 나타내는 산성은 산성인산염 등 우유가 가지고 있는 산성물질과 발효되어 생기는 젖산에 의하여 주로 나타나게 되는데 우유의 산도를 측정하면 우유의 신선도(산패 여부)를 알 수 있다. 즉, 적정산도가 높다는 것은 NaOH의 소모량이 많다는 것이며 이는 발효정도가 강하여 젖산의 양이 많음을 의미하는 것으로 신선도가 좋지 않음을 의미하는 것이다. 따라서 본 실험에서는 우유 대신에 품종별로 제조한 두유를 pH측정 및 적정산도를 구한 결과를 Table 4.에 나타내었다. 서목태의 pH가 6.9를 나타내어 타 품종에 비하여 pH가 가장 높았으며 아가콩의 pH가 6.66으로 가장 낮게 측정이 되었다. 적정산도는 NaOH 소모량이 가장 많은 속칭콩, 백태가 가장 높은 것으로 나타났다.

Table 4. pH measurement and titration acidity test

Cultivar	시료 무게 (g)	0.1N NaOH 소모량(mL)	pH	T.A(%)
아가콩	20.20	0.35	6.66±0.03	0.016
태광콩	20.04	0.40	6.75±0.02	0.018
속칭콩	20.13	0.45	6.85±0.03	0.020
서목태	20.19	0.35	6.90±0.01	0.016
백태	20.09	0.45	6.80±0.02	0.020
화태	20.20	0.3	6.79±0.04	0.014

#### 6) 총균수 측정 (Total Number)

제조한 두유의 균수 측정을 위해 각각의 시료에 대하여 10배~10<sup>6</sup>배 까지 단계별로 희석을 하여 Plate Count Agar (DIFCO, USA)로 중첩하여 37℃, 48시간 동안 배양을 하였고 30~300개 범위내의 집락군 개수를 세어 그 결과를 Table 5.와 같이 나타내었으며 단위는 Log No. CFU/ml로 표기하였다. 모든 시료가 10배부터 10<sup>3</sup>배까지는 집락군 형성 계측이 가능하였고 그 이상 희석한 곳에 대해서는 30개 미만 혹은 집락군이 아예 형성되지 않은 것으로 계산을 할 수 없는 범위에 해당되었다. 10배 희석의 경우 태광, 서목태는 집락군이 300개 이상 형성되어 계산이 불가능 하였으며 특히 태광콩은 1000배 희석에서 유일하게 2.5×10<sup>4</sup>CFU/ml의 결과를 나타내어 균중식이 가장 높은 시료로 밝혀졌으며 이와 반대로 백태는 10배 희석에서 4.3×10<sup>2</sup>CFU/ml을 나타내어 균중식이 가장 낮은 시료로 밝혀졌다.

Table 5. Total number of soymilk (CFU/ml)

	10	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>
아가콩	6.1×10 <sup>2</sup>	N.D	N.D
태광콩	T.M	2.7×10 <sup>4</sup>	2.5×10 <sup>4</sup>
서목태	T.M	2.9×10 <sup>4</sup>	N.D
백태	4.3×10 <sup>2</sup>	N.D	N.D
속칭콩	1.8×10 <sup>3</sup>	N.D	N.D
화태	3.0×10 <sup>3</sup>	2.7×10 <sup>3</sup>	N.D

※ T.M: Over the colony number 300 (Too much)

※ N.D: Non-Detected or Under the colony number 30

#### 7) 관능 평가 (Panel Test)

대두고형분 7%로 조정된 시료를 121℃, 15분 멸균처리 한 것에 당 함량을 6% 처리하여 관능평가를 실시하였다. 설문에 응한 인원은 총 16명이며 음용한 시료간의 혼란을 막기 위해 1개의 시료를 음용하고 나서 물로 입을 헹군 다음에 다른 시료를 맛보는 것으로 진행을 하였다. 각각의 시료에는 임의로 난수를 매겨 패널이 알아볼 수 없게 하였고 시료는 무작위로 선별하여 음용하게 하였다.

##### 가) 향

전체적으로 비린 향이 느껴진다는 항목이 37점으로 가장 높았으며 시료별 두유의 향에 대해서는 속칭콩>백태>화태 순으로 속칭콩이 11점을 얻어 가장 비린 것으로 밝혀졌다. 고소함은 22점을 얻었으며 시료중에 서목태가 7점을 얻어 가장 고소한 것으로 나타났다.

Table. 6 Fragrance of soymilk

	아가콩	태광콩	서목태	백태	속청콩	화태	Total
고소함	3	3	7	4	0	5	22
비릿함	2	4	3	9	11	8	37
플냄새	2	4	0	0	2	0	8
느낌없음	5	0	4	1	2	1	13
기타	4	5	2	2	2	1	16

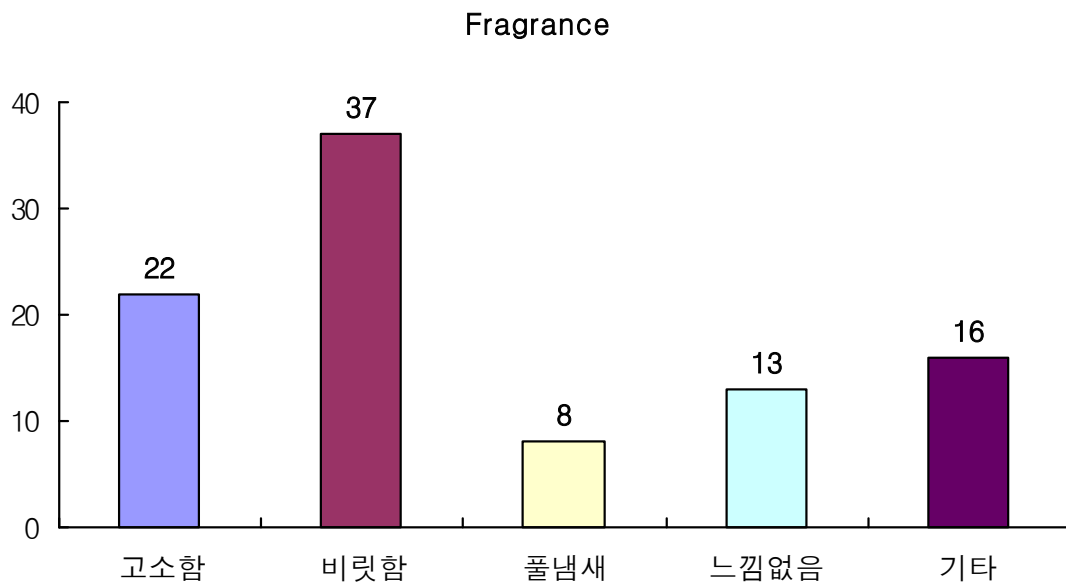


Fig 12. Fragrance of soymilk

나) 단맛

당첨가량의 여부를 결정짓는 단맛 조사에서는 지나치게 달다는 항목이 39점으로 가장 높았으며 적당한 당도의 항목도 31점으로 큰 차이는 보이지 않았다. 지나치게 달게 느껴진 품종은 아가콩>속청콩>태광콩 순으로 각각 9점, 8점, 7점을 기록하였으며 적당하다고 느낀 품종은 서목태, 백태, 화태가 7점으로 같았다.

Table 7. Sweetness of soymilk

	아가콩	태광콩	서목태	백태	속청콩	화태	Total
너무달다	9	7	6	3	8	6	39
적당하다	4	4	7	7	2	7	31
싱거움	2	4	3	5	3	3	20
기타	1	1	0	1	2	0	5

### Sweetness

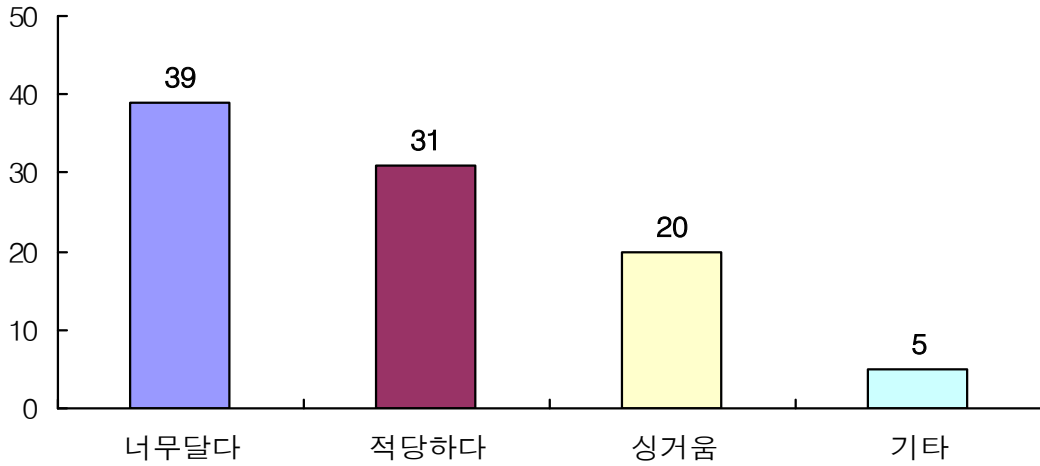


Fig 13. Sweetness of soymilk

#### 다) 색

두유의 색 부문에서는 패널 거의 대부분이 무난하거나 만족하다는 결과를 보여 주었다. 색에 대한 만족도는 황색 계열의 태광콩, 백태 그리고 검은콩 계열의 서목태와 속청콩이 유달리 높은 점수를 획득하였다. 특히 서목태와 속청등의 검은콩은 검은콩이 가져다 주는 색깔이 Well-being 이미지와 연관되어 같은 두유제품이라도 검은콩으로 만든 제품을 더 선호한다고 하는 이들도 있었는데 이로 봤을 때 두유는 향과 맛 뿐만 아니라 시각적인 측면에서도 선호도를 불러 일으킬 수 있다는 가능성을 엿보았다.

촉감, 색상, 향, 맛 4가지 조건중에 색깔에 대하여 만족도가 가장 높았으며 그 다음이 촉감, 향 순이었다. 이에 반해 불만족스러웠던 점은 향>맛>촉감 순으로 나타났다. 대표적인 불만족 사항으로 거론되었던 항목은 단맛이 강했던 점과 생콩 냄새 혹은 콩 비린내로 인한 역취 및 짝은맛이 문제가 되었다. 전체적인 만족도에서는 아가콩이 만족도가 가장 높았으며 태광콩, 화태, 서목태, 백태=속청콩 순이었다.

Table 8. Color of soymilk

	아가콩	태광콩	서목태	백태	속청콩	화태	Total
매우만족	0	0	1	1	1	1	4
만족	7	9	4	9	3	4	36
무난함	7	7	8	4	8	8	42
불만족	2	0	3	2	4	1	12
매우불만족	0	0	0	0	0	1	1

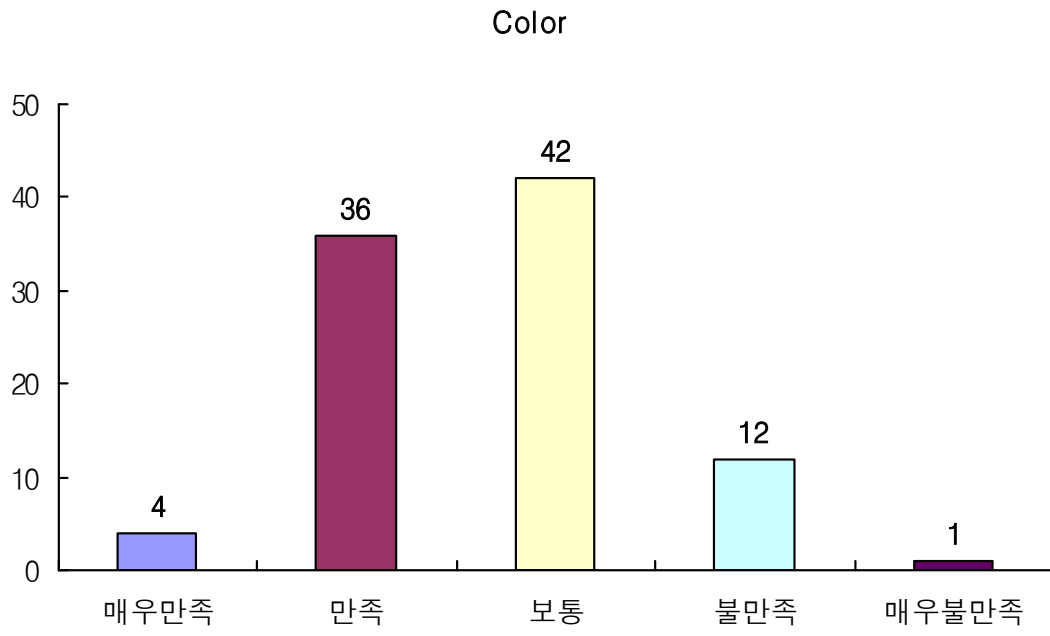


Fig 14. Color of soymilk

# 제 6 절 콩 기능성 물질을 이용한 건강기능식품 및 미용제품개발

## 1. 콩 저분자 단백질을 활용한 피부개선 효능 분석 및 제품 개발

가. 효능추출물의 분리 및 동정

### (1) 재료 및 방법

#### (가) 단백질의 추출

분석을 위한 시료는 시험된 종자 100g 을 분쇄기를 이용하여 마쇄한 후 0.1 M-phosphate buffer (pH 7.0) 100 ml을 넣고 4℃에서 24시간 추출 후, 7겹의 거즈로 불용성 물질을 제거한 다음, 상등액을 4℃, 14,000 rpm에서 30분간 원심 분리하여 상등액을 취하였다. 추출용매에 따른 lunasin 펩타이드 분리 실험은 water, 0.1M phosphate buffer (pH 7.0), 0.1 M NaCl phosphate buffer (pH 7.0), 0.1M Sodium acetate buffer(pH 7.0)의 용매를 각각 사용하였다.

#### (나) SDS-PAGE

조 추출된 종자의 단백질 분리는 SDS-PAGE에 의하여 수행하였고, resolving gel은 최종적으로 0.1%-SDS, 15%-acrylamide 농도로, stacking gel은 0.1%-SDS, 4%-acrylamide 농도가 되게 조제하였다. Loading sample은 종자로부터 추출한 단백질과 laemmli buffer를 1 : 2로 혼합하여 100℃에서 5분간 끓인 샘플을 사용하였고, 전기영동 시 전압은 150 V로 1시간 실시하였다. 전기영동이 끝난 gel의 염색 및 탈색은staining solution (Coomassie brilliant blue 1 g / methanol 450 ml + acetic acid 100 ml + DH<sub>2</sub>O 450 ml)에서 염색한 후, destaining solution (methanol 100 ml + acetic acid 100 ml + DH<sub>2</sub>O 800 ml)에서 탈색하여 밴드를 확인하였다.

#### (다) Ion-exchange column chromatography

시료의 조추출물로부터 lunasin 펩타이드를 정제하기 위한 1차적인 방법으로 ion-exchange column chromatography를 실시하였다. 컬럼의 정지상은 0.1M sodium phosphate 버퍼(pH 7.0) 1L에 Bio-gel resin AG1-X4, mesh size 100-200 (Bio-Rad Labs)를 100g을 넣은 후 4℃에서 4시간 동안 안정화 시킨 후 컬럼(지름 12cm, 높이 200cm)을 이용하였다. Lunasin 펩타이드 조추출물 10g을 30ml의 0.1M sodium phosphate 버퍼(pH 7.0)에 녹인 후, 이동상은 0.1M sodium phosphate 버퍼



(pH 7.0)내의 NaCl phosphate buffer(pH 7.0)의 농도가 0M, 0.1M 0.3M, 0.5M, 0.7M, 1.0M 로 순차적으로 분취하였다.

#### (라) Lunasin 펩타이드의 정량

Lunasin 펩타이드의 함량은 Western blot에 의하여 각각의 합성 lunasin의 표준 곡선과 샘플을 비교하여 측정되었다. 합성 lunasin 펩타이드는 UC, Berkeley 의 de Lumen 교수로부터 분양받았다. 합성 lunasin 펩타이드의 표준곡선은 샘플과 동일한 방법에 의한 standard의 광도로 만들어졌고, 샘플과 합성 lunasin의 광도는 software Un-SCAN-IT *gel* Version 5.1(Silk Scientific. Inc)을 사용하여 정량하였다.

#### (마) BBIC의 추출

미세하게 파쇄 한 대두 50g 을 1.25 L hexane에 침지시켜 24시간 동안 교반하면서 추출하였다. 24시간 후 filter paper로 필터하고 필터 된 solution는 제거하고 filter paper부분은 1.25 L 60%-EtOH로 55-60℃에서 1시간동안 교반하면서 다시 2차 추출을 하였다. 추출 후 filter paper로 필터를 하고 60%-EtOH로 세척하였다. 필터 된 EtOH solution에 HCl을 넣어가면서 pH 5.3으로 맞추고 침전이 일어나면 filter pape를 이용하여 filter 한 다음 filter paper부분을 건조시켜 BBIC를 회수 하였다. 회수 후 샘플 내 염분을 제거를 위해 1 L 증류수로 투석한 후 동결건조를 하였다.

### (2) 연구 결과

#### (가) 콩 품종별 lunasin 펩타이드의 함량비교

국내 재배종의 품종별 lunasin 펩타이드의 함량을 조사 해 본 결과는 아래와 같다.

- 단백질 당 lunasin 펩타이드의 함량은 품종별로 ug protein 당 2.33-8.98ng의 범위로 다양하게 나타났으며, 저 품종에 비하여 고품종은 lunasin 펩타이드의 함량이 3.85배 높음.
- 종자 당 lunasin 펩타이드의 함량은 품종별로 g 종자 당 235-795g의 범위로 다양하게 나타났으며, 저품종에 비하여 고품종은 lunasin 펩타이드의 함량이 3.38 배 높음.
- 쥐눈이콩 및 청자콩1호의 ug protein 당 lunasin 펩타이드 함량은 6.45와 8.98로 매우 높음.
- 1  $\mu$ g protein 당 lunasin 펩타이드가 높은 품종이 종자 g 당 lunasin 펩타이드 함

량도 높음.

- 품종별로 단백질 및 종자 당 lunasin 펩타이드 함량의 차이가 큰점을 미루어 보면, 추후 기능성식품소재 개발 시에 중요한 자료가 될 것임.

표 1. Lunasine content of protein extracts extracted from Korean soybean

품종명	ug protein/ ml	ng Lunasin /ug protein	ug lunasin/ g seed
소원콩	19,103	4.13	442
안동밤콩1호	20,788	4.31	465
장원콩	17,213	4.76	432
안동검정콩	20,854	4.51	478
안동밤콩2호	22,116	3.67	373
청자콩3호	19,386	4.89	498
황금콩	19,213	5.67	523
안동눈콩1호	20,276	4.65	543
안동재래	19,874	2.33	235
안동재래메주콩	20,233	5.65	762
안동불콩1호	22,156	3.23	467
쥐눈이콩	19,131	6.45	578
청자콩1호	19,688	8.98	795

#### 나. 효능추출물의 항산화 및 세포손상억제 효능 분석

##### (1) 재료 및 방법

##### (가) Foci 형성 assay

화학적 발암물질인 MCA에 의해 야기되는 mouse skin으로부터 유래된 NIH 3T3 세포의 비정상적인 생육과 foci형성 억제에 대한 lunasin 펩타이드의 억제영향을 평가하였다. NIH 3T3 (600 cells/well)를 37°C, 5%-CO<sub>2</sub>하에서 24시간동안 배양 후 대두 종자로부터 정제된 1 µM lunasin을 처리 한 후 lunasin 펩타이드가 핵 내 크로마틴과 binding 하도록 약 20시간동안 37°C, 5%-CO<sub>2</sub>하에서 배양하였다. 20시간 후 화학적 발암물질인 MCA (5 µg/mL)을 처리한 후 약 20시간 동안 다시 배양하였다. 20시간 후 1×PBS로 3회 세척 후 1 µM lunasin이 포함 된 새로운 배지를 첨가한 후 약 5일간 배양하였다. 1 µM lunasin이 포함 된 새로운 배지는 5일에 한

번 씩 교체하면서 약 4주간 배양하였고, 4주 후부터는 일주일에 한번씩 1  $\mu$ M lunasin이 포함 된 새로운 배지를 교체하면서 2주 동안 배양하였다. 화학적 발암물질에 의해 야기되는 mouse skin으로부터 유래된 NIH 3T3 세포의 비정상적인 생육을 평가하기 위해 처리별 세포를 회수 한 후 Coulter counter를 이용하여 세포 생육을 비교하였고 foci형성 억제력을 평가하기 위해 10% formaldehyde saline를 각 well에 넣고 16시간동안 세포를 고정하였다. 고정 후 Giemsa로 염색 후 현미경을 이용하여 foci의 수를 측정하였다.

#### (나) 세포 foci 형성 및 세포분화, 성장 억제 분석

대두로부터 정제된 lunasin 펩타이드의 화학적 발암물질인 MCA에 의해 야기되는 mouse skin으로부터 유래된 NIH 3T3 세포의 비정상적인 생육과 foci형성억제에 대한 메커니즘을 규명하기 위해 세포주기 중 G1/S기로의 transition에 관여하는 세포내 단백질인 p21, p15INK4b, cyclin D1, CDK4 그리고 phospho-Rb단백질의 발현 정도를 평가하였다. NIH 3T3 (600 cells/well)를 37°C, 5%-CO<sub>2</sub>하에서 24시간동안 배양 후 대두 종자로부터 정제된 1  $\mu$ M lunasin을 처리 한 후 lunasin 펩타이드가 핵 내 크로마틴과 binding 하도록 약 20시간동안 37°C, 5%-CO<sub>2</sub>하에서 배양하였다. 20시간 후 화학적 발암물질인 MCA (5  $\mu$ g/mL)을 처리한 후 약 20시간 동안 다시 배양하였다. 20시간 후 1×PBS로 3회 세척 후 1  $\mu$ M lunasin이 포함 된 새로운 배지를 첨가한 후 약 5일간 배양하였다. 1  $\mu$ M lunasin이 포함 된 새로운 배지는 5일에 한번 씩 교체하면서 약 4주간 배양하였고, 4주 후부터는 일주일에 한번씩 1  $\mu$ M lunasin이 포함 된 새로운 배지를 교체하면서 2주 동안 배양하였다. 총 6주후 각 처리별로 세포를 회수한 다음 200  $\mu$ L lysate buffer [1×Protease Inhibitor Cocktail in RIPA buffer (150 mM NaCl, 0.1% SDS, 50 mM Tris, pH 8.0, 1% Triton X-100)]를 넣고 세포 단백질을 추출하였다. 추출된 단백질은 Bradford assay에 의해 정량되었다. 세포 단백질 분리는 SDS-PAGE에 의하여 수행하였고, resolving gel은 최종적으로 0.1%-SDS, 15%-acrylamide 농도로, stacking gel은 0.1%-SDS, 4%-acrylamide 농도가 되게 조제하였다. Loading sample은 세포로부터 추출한 단백질과 laemmli buffer를 1 : 2로 혼합하여 100°C에서 5분간 끓인 샘플을 사용하였고, 전기영동 시 전압은 150V로 1시간 실시하였다. 전기영동한 gel은 100V에서 1시간 40분간 PVDF 막으로 전이하여 blocking buffer (1×TBS, 0.1% Tween-20 with 5% w/v nonfat dry milk)에서 1시간 동안 block한 후 TBS/T buffer (1×TBS, 0.1% Tween-20) 세척하였다. p21, p15INK4b, cyclin D1, CDK4 그리고 phospho-Rb단백질에 대한 1차 항체와 2차 항체를 1 : 1000으로 희석하여 4°C에서 약 16시간동안 blocking 하였다. 16시간 후 TBS/T 버퍼로 세척한 후 chemiluminescent reagent ECL (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)로 발색시킨 후 촬영하였다.

(다) DPPH free radical scavenging activity

각 처리별 시료 1.0kg에 80% methanol 2,000ml을 가하여 분쇄한 후, 1일간 침지하였다. 여과 농축한 추출물을 450ml로 농축한 다음 50ml 증류수를 첨가하고 이를 petroleum ether로 분획하였다. 분획된 수용층을 농축하여 이를 ethyl acetate로 분획한 다음 유기 용매 층을 sodium sulfate anhydrous로 탈수시켜 결정화하였다. 소거활성 측정을 위하여 시료 0.1ml에 0.041mM DPPH시약을 0.9ml 첨가한 뒤 10분 동안 반응 시킨 후 517nm에서 흡광도를 측정하고, 다음의 식에 의해 라디칼 소거능을 구하였다.

$$\% \text{ DPPH radical scavenging activity} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}} / A_{\text{control}}) \times 100]$$

(라) 세포내 DNA손상억제 및 세포 손상 억제

① phi X 174 RF I plasmid DNA cleavage assay : 대두의 생리활성물질인 lunasin, BBI, genistein, daidzein을 각각 농도별로 처리한 시료와 FeSO<sub>4</sub>를 약 상온에서 30분간 반응시킨 후 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 plasmid DNA를 첨가하고 37°C에서 약 30분간 반응. 반응 후 DNA loading 버퍼와 반응시킨 시료를 희석하여 1% agarose 겔을 이용하여 전기영동. 전기영동 후 ethinum bromide를 염색하여 사진촬영하여 Plasmid DNA의 supercoiled 형태가 iron sulfate에 의해 cleavage되어 open-circular형태로 전환되는 정도를 통해 억제력 평가

② Fastin<sup>TM</sup> ELASTIN Assay : Lunasin, BBI, genistein, daidzein, LES, BBIC을 처리한 시료에 elastin 그리고 elastase를 37°C에서 30분간 반응시킨 후 precipitating reagent를 이용하여 elastin을 침전시킨다. 침전 후 Fastin Dye Reagent를 이용하여 elastin을 약 90분 동안 shaking 시키면서 염색한다. 염색 후 Dye Dissociation Reagent로 염색된 elastin을 녹인 후 513 nm에서 흡광도를 측정한다.

③ GeneFishing DEG Premix Kit를 이용한 PCR : 1차년도에 시행된 실험방법과 동일하게 PCR을 이용하여 reverse transcription을 통해 만들어진 cDNA들과 GeneFishing<sup>TM</sup>DEG 101과 102 Premix Kit를 가지고 대량으로 DNA들을 복제하였고 전기영동을 통하여 처리시료별, 농도별로 복제된 DNA 밴드의 특이성을 살펴보았다. 간세포 및 피부세포에 처리된 시료는 콩 열수 추출물 10 ug/ml 과 100 ug/ml 농도 2가지로 처리하였다. 또한 메탄올을 이용한 콩 추출물과 열수 추출한 검정콩 추출물 역시 분석하였다. 실험방법은 ice에서 total volume이 20μl이 되도록 PCR tube에 4μl의 diluted first-strand(~50ng), 2μl의 5μM arbitrary ACP(one of the arbitrary ACPs)(표 2.), 1μl의 10μM dT-ACP2, 3μl의 distilled water와 10μl의 2X

seeAmp™ ACP™ Master Mix를 첨가하였다. 사용된 PCR 조건은 GeneFishing 설명법 (94℃, 40sec; 65℃, 40sec, 72℃, 40sec; 40 cycles)을 따랐다.

표 2. Gene Fishing을 이용한 PCR에 사용된 프라이머(Primer)

프라이머 이름	서 열
ACP1	5' -GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXGCCATCGACC-3'
ACP2	5' -GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXAGGCGATGCC-3'
ACP3	5' -GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXCCGGAGGATG-3'
ACP4	5' -GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXGCTGCTCGCG-3'
ACP5	5' -GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXAGTGCGCTCG-3'
ACP6	5' -GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXGGCCACATCG-3'
ACP7	5' -GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXCTGCGGATCG-3'
ACP8	5' -GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXGGTCACGGAG-3'
ACP9	5' -GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXGATGCCGCTG-3'
ACP10	5' -GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXTGGTCGTGCC-3'
ACP11	5' -GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXCTGCAGGACC-3'
ACP12	5' -GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXACCGTGGACG-3'
ACP13	5' -GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXGCTTCACCGC-3'
ACP14	5' -GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXGCAAGTCGGC-3'
ACP15	5' -GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXCCACCGTGTG-3'
ACP16	5' -GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXGTCGACGGTG-3'
ACP17	5' -GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXCAAGCCACG-3'
ACP18	5' -GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXCGGAGCATCC-3'
ACP19	5' -GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXCTCTGCGAGC-3'
ACP20	5' -GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXGACGTTGGCG-3'

## (2) 연구 결과

### (가) 대두로부터 분리 정제된 lunasin, BBI, genistein 그리고 daidzein의 산화적 DNA 손상 억제력 비교

활성 산소종은 세포에 있어 에너지 생산과 세포의 생육에 중요한 역할을 한다. 그러나 과도한 활성 산소종은 세포 단백질과 세포막을 산화시키고, DNA를 손상시킨다. 활성 산소종에 의한 DNA 손상은 암을 비롯한 여러 질병의 원인이 된다. 대두의 생리활성 물질로 알려진 lunasin, BBI, genistein 그리고 daidzein의 산화적

DNA 손상 억제력 비교는 중요하다. 산화적 DNA 손상 억제력 비교는 phi X-174 RF I plasmid DNA를 이용한 *in vitro* DNA cleavage assay를 통해 평가되었다. Plasmid DNA의 supercoiled form (SC)이 open circular form (OC)와 linear form (LC)로의 전환은 산화적 DNA 손상의 지표로 사용된다. Lunasin, genistein과 daidzein은 10  $\mu$ M 농도에서 각각 약 80%, 88% 그리고 58% 정도 산화적 DNA 손상을 억제한 반면 BBI는 억제활성이 없었다 (Fig. 1). Lunasin의 농도별 억제활성을 평가한 결과 0.5  $\mu$ M에서 19%, 1  $\mu$ M에서 25%, 5  $\mu$ M에서 41% 그리고 10  $\mu$ M에서 약 80% 정도 억제하였다 (Fig. 2).

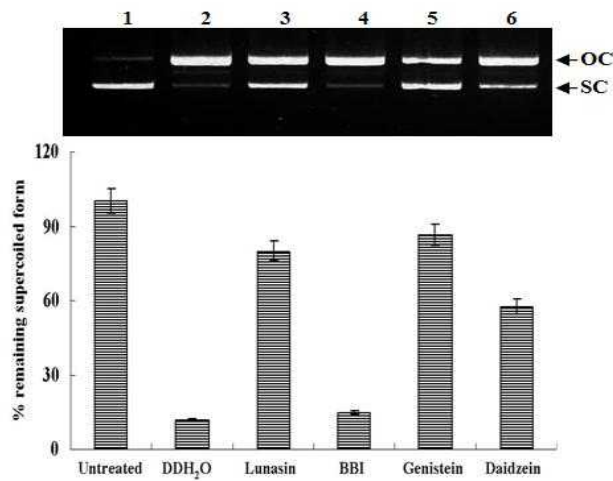


Fig. 1. Comparison of protective level against oxidative DNA damage induced by hydroxyl radical. Lane 1 was treated with nothing, and lane 2~6 were treated with distilled water as the positive control, lunasin, BBI, genistein and daidzein. Lunasin, BBI, genistein and daidzein were treated with 10  $\mu$ M and they were firstly reacted with iron at the room temperature and then reacted with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

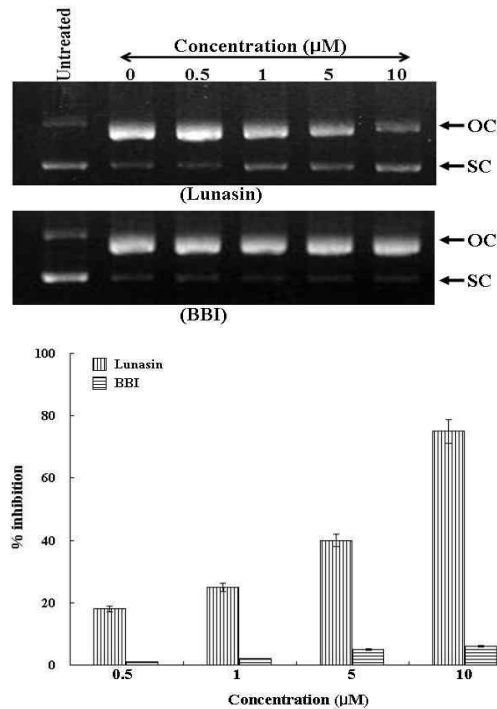


Fig. 2. Inhibitory effect of lunasin and BBI against oxidative DNA damage by the varying concentrations. The plot shows the inhibitory effect (%) of lunasin and BBI against oxidative DNA cleavage. Lunasin and BBI was firstly reacted with  $\text{FeSO}_4$  at the room temperature for 30 min and then reacted with  $\text{H}_2\text{O}_2$  at  $37^\circ\text{C}$  for 30 min.  $\text{FeSO}_4$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$  were treated with  $250\ \mu\text{M}$ , respectively.

(나) 열수 및 메탄올을 이용하여 추출 분리된 대두 단백질 및 저분자 단백질의 피부 아세포 및 간세포내 유전자 발현 변이 분석

GeneFishing DEG Premix Kit 와 특정 프라이머(표. 2)를 사용하여 PCR 하여 일부 유전자의 증가 또는 감소현상을 나타내는 결과를 얻을 수 있었다. 먼저 ACP4 프라이머를 사용한 PCR 결과에서 콩 추출물을 처리하지 않은 시료(0 hr)에서는 존재 하지 않는 유전자가 콩 열수 추출물 처리 시 시간이 지남에 따라 발현이 증가되었고 (0.2, 0.4, 0.5, 0.6 kbp), 48 hr 이후 급격히 사라지는 것을 확인 할 수 있었다. 또한 ACP12 활용 시 600 bp 에 해당하는 유전자가 24 hr 에서 나타났다가 바로 사라지는 것을 확인하였으며 150 bp 에 해당하는 유전자는 콩 추출물 처리와 함께 서서히 감소하고 있음을 확인하였다. 이들 유전자는 TA Cloning 과 염기서열 분석을 통하여 유전자를 동정할 계획이다. 프라이머를 다양하게 설계하여 반복실험을 하게 되면 다양한 유전자 변이 패턴을 확인할 수 있음.

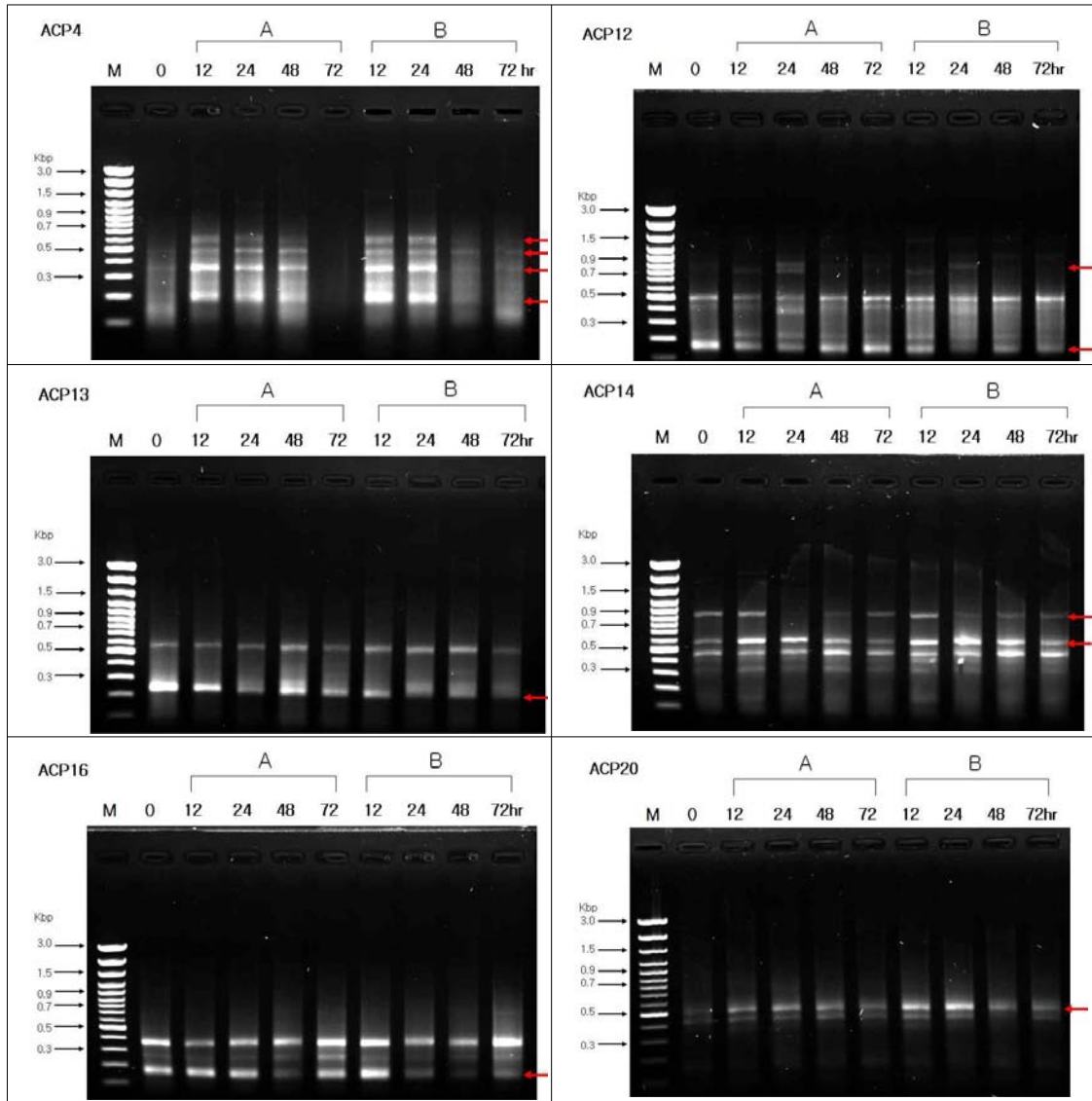


Fig. 3. 대두 분획물 (A; 10 ug/ml, B; 100 ug/ml) 처리에 따른 간세포내 유전자 변이 분석

(다) Lunasin, BBI, Genistein, Daidzein, LES, BBIC의 elastase 억제 활성 비교

엘라스틴은 생체 내 연결조직의 주요한 단백질로서 피부에 있어 탄력을 유지시켜주는 주요한 물질이다. 이러한 엘라스틴은 단백질 분해효소의 일종인 elastase에 의해 분해되어 피부노화를 유발시킨다. 따라서 피부 미용에 있어서 elastase 억제 활성을 통한 엘라스틴의 보호는 중요한 인자이다.

Lunasin, BBI, Genistein, Daidzein, LES(Lunasin enriched source), BBIC의 elastase 억제활성 비교는 Fastin<sup>TM</sup> ELASTIN assay를 통해 평가되었다. Lunasin, daidzein 그리고 genistein는 elastase 억제활성이 거의 없었으나, BBI, LES 그리고



BBIC는 각각 65%, 94% 그리고 85% 정도 elastase의 활성을 억제하였다.

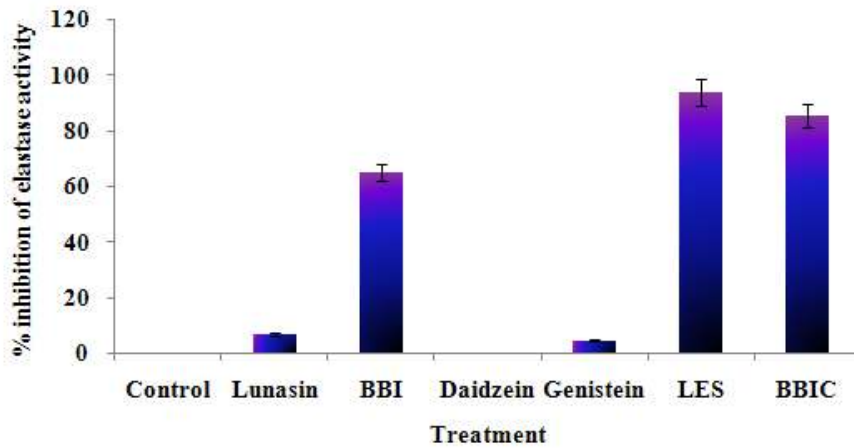


Fig. 4. Inhibitory effect of elastase by lunasin, BBI, daidzein, genistein, LES(Lunasine enriched source) and BBIC from soybeans.

(라) Inhibitory effect of lunasin on the growth and foci formation of NIH3T3 cells treated with MCA.

화학적 발암물질인 MCA에 의해 야기되는 mouse skin으로부터 유래된 NIH 3T3세포의 비정상적인 생육억제실험에서 % 생육억제는 control과 비교하여 계산되었다 (Fig. 5A). 대두로부터 정제된 1  $\mu$ M lunasin의 처리는 control과 비교하였을 때 세포의 생육억제에 아무런 영향이 없었다. 화학적 발암물질인 MCA의 처리는 control과 비교하였을 때 세포의 비정상적인 생육을 약 34%정도 야기하였다. 반면 MCA가 처리된 그룹에 정제된 1  $\mu$ M lunasin의 첨가는 오직 MCA만 처리된 그룹과 비교하였을 때 약 85%정도 세포의 비정상적인 생육을 억제하였다. 이러한 결과는 lunasin는 화학적 발암물질에 의해 야기되는 세포의 비정상적인 생육을 억제한다는 것을 보여준다. 또한 lunasin 펩타이드의 화학적 발암물질에 의해 야기되는 발암과정억제여부를 평가하기 위한 foci형성억제실험에서 control그룹과 오직 1  $\mu$ M lunasin만 처리된 세포는 거의 foci가 형성되지 않았지만, 오직 MCA만 처리된 세포에서는 약 15개의 foci가 형성되었다. MCA가 처리된 세포에 1  $\mu$ M lunasin의 첨가는 오직 MCA만 처리된 그룹과 비교하였을 때 약 67%정도 foci형성을 억제하였다.

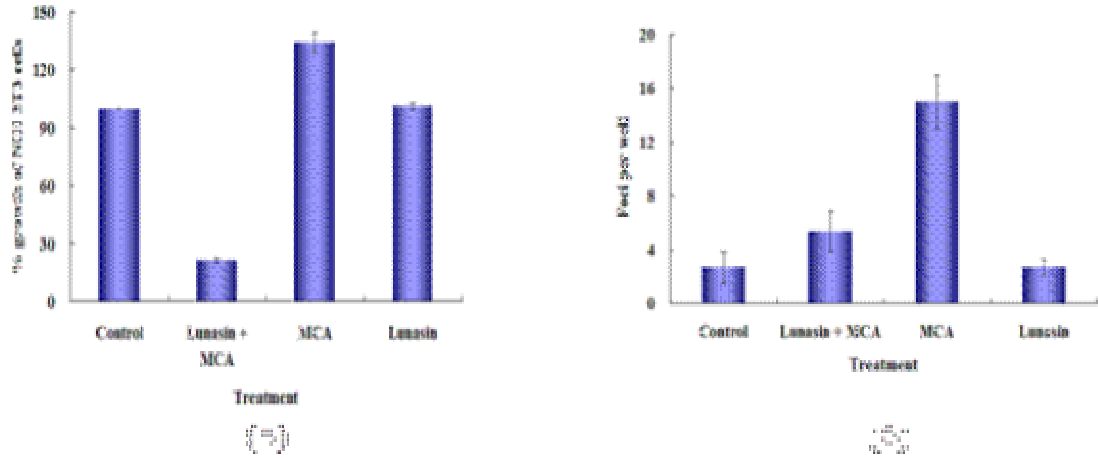


Fig. 5. Inhibitory effect of lunasin on the growth (A) and foci formation of NIH3T3 cells (B) treated with MCA. In this assay, % rate of the growth is calculated by comparing with the control without any treatment. 1  $\mu$ M lunasin purified from soybean and MCA (5  $\mu$ g/mL) were used. Vertical lines on bars are  $\pm$ SD, n=3.

(마) Effects of lunasin on p21 and p15INK4b expression in NIH 3T3 cells treated with MCA.

Lunasin 펩타이드의 비정상적인 세포주기진행에 대한 억제영향을 결정하기 위해 종양세포억제단백질인 p21과 p15INK4b의 발현정도를 평가하였다. p21은 cyclin-dependent kinase inhibitor로 cyclin-CDK4의 결합을 억제한다. 또한 p21은 세포주기 중 G1기에서 세포주기진행의 조절자 역할을 한다. NIH 3T3세포에 MCA의 처리는 control그룹과 비교하였을 때 약 30% 정도 p21의 발현을 야기하였다. 그러나 MCA가 처리된 세포의 1  $\mu$ M lunasin의 첨가는 control그룹과 비교하였을 때 약 33%정도 p21의 발현을 촉진하였고, 오직 MCA만 처리된 그룹과 비교하였을 때 약 63%정도 p21의 발현을 촉진하였다. p15INK4b는 in vivo에서 CDK4의 활성을 억제하는 종양억제단백질의 기능을 한다고 알려져 있다. 또한 p15INK4b는 CDK4와 이중결합을 형성하거나 cyclin D과 CDK4와 3중 결합을 하여 최종적으로는 세포주기진행을 억제한다고 알려져 있다. NIH 3T3세포에 MCA의 처리는 control그룹과 비교하였을 때 약 69%정도 p15INK4b의 발현을 억제하였다. 그러나 MCA가 처리된 세포에 1  $\mu$ M lunasin의 첨가는 오직 MCA만 처리된 그룹과 비교하였을 때 약 75% 정도 p15INK4b의 발현을 촉진하였다.

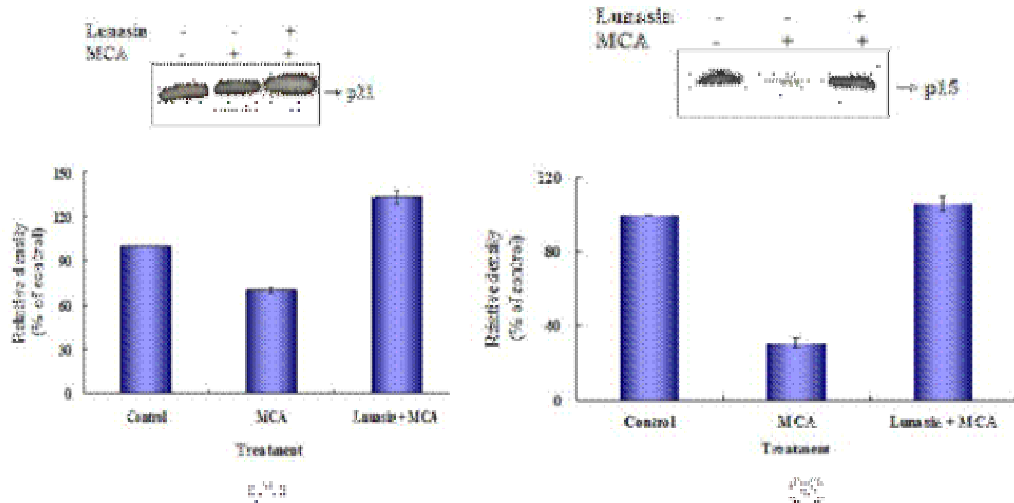


Fig. 6. Effects of lunasin on p21 (A) and p15INK4b (B) expression in NIH 3T3 cells treated with MCA. Each lane was loaded with 25  $\mu$ g protein. Relative density for p21 and p15INK4b expression was calculated by comparing with the control without any treatment. 1  $\mu$ M lunasin purified from the soybean and MCA (5 $\mu$ g/mL) were used. Vertical lines on bars are  $\pm$ SD, n=3.

#### (바) DPPH free radical scavenging activity of soybean fraction

UV와 화학적 발암물질인 MCA, 그리고 benzo[a]pyrene은 세포 내 활성산소를 유발하여 발암의 초기단계에 관여하는 산화적 DNA 손상을 유발한다. 자유 라디칼을 제거하는 항산화 물질의 메커니즘은 수소이온을 발생시켜 활성적 자유라디칼을 비 활성적으로 변환시켜 산화적 손상을 억제하는 것이다. Fig. 7은 대두 분획별 DPPH free radical 소거능을 보여준다. LES와 BBIC의 DPPH free radical 소거능은 160  $\mu$ g/ml 농도에서 각각 약 20%와 8%이었으나 정제된 lunasin 펩타이드와 BBI는 동일농도에서 거의 활성이 없었다. 각각의 대두 분획을 세포 내 처리하여 세포의 항산화 활성의 변화를 측정된 결과 LES와 BBIC 분획을 세포 내 처리하여 control 그룹과 비교하면 각각 세포 내 항산화 활성이 26% 그리고 19%정도 증가되었다.

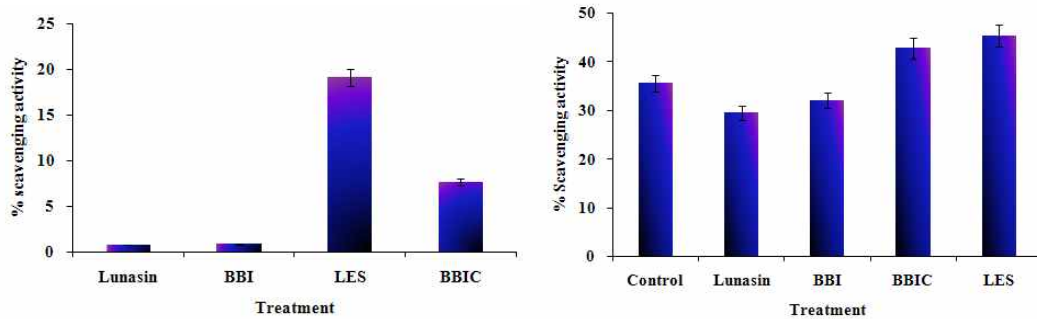


Fig. 7. (A) DPPH free radical scavenging activity of soybean fractions and (B) that of NIH 3T3 treated with soybean fractions.

다. 대두 분획물의 세포노화 억제효능 및 자외선 차단 효능 분석

(1) 재료 및 방법

(가) 실험동물

생후 4주령 Sprague-Dawley 수컷 흰쥐를 (주) 샘타코 BIO KOREA에서 구입하여 고형사료와 탈 이온수를 자유롭게 섭취시키면서 사육실 환경에 1주일간 적응시킨 뒤 체중이  $150 \pm 10g$  흰쥐를 선별하여 실험에 사용한다. 이때 사육실의 온도는  $21.4 \pm 0.05^\circ C$ , 습도  $61 \pm 1\%$ , 12시간 명암주기하에서 사육한다.

(나) DNCB 제조와 도포에 의한 알레르기성 접촉피부염 유발

본 실험에서는 1-chloro-2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB: Aldrich, USA) 는 acetone과 olive oil이 3:1로 혼합된 용액에 2.5%와 1%로 희석한 다음 사용한다. 1주일간 사육환경에 적응시킨 랫드의 등 부위를 제모하고 피부의 미세 상처가 치유 되도록 24시간 방치한다. 우선 1차로 2.5% DNCB용액 1ml로 등 부위에 도포하여 면역반응을 유발하고 이 후 4일이 경과한 후 1주일에 3회씩 4주 동안 1% DNCB용액 1ml를 등 부위에 도포하여 알레르기성 접촉피부염을 유발한다. 알레르기성 접촉피부염 유발 여부는 직접 육안으로 확인한다.

(다) 효능 강화 분획물 처리에 따른 피부 질환 억제

알레르기성 접촉피부염은 DNCB로 유발을 실시하고 실험군은 Group I (대조군), Group II (DNCB 처리군), Group III (LES 도포군), Group IV (LES 도포 +LES 투여군)으로 나누며 Group I, Group II는 각 2마리, Group III, Group IV 각 3마리씩 실험에 사용한다. 접촉성 피부염이 확인된 실험군에는 LES를 직접 도포(Group III) 혹은 직접도포와 투여(Group IV), 및 피부염의 자연 치유군(Group II)로 나누어 실험

험을 실시한다. Group III( LES 도포 ) 그룹에 LES 은 olive oil에 5%로 희석하여 매일 1ml씩 도포하고, Group IV( LES 도포와 LES 투여 )그룹은 매일 일정한 시간에 5% LES 도포와 1ml/체중/day(100mg/ 체중 kg/ day)씩 oral zonde needle를 이용하여 경구투여한다. normal 군과 CG군은 증류수를 1ml/체중 kg/day씩 4주 동안 경구 투여한다.

(라) 광학현미경 및 SEM/ TEM 을 이용한 조직학적 변화 관찰

피부 조직을 절취하여 FAA로 24시간 고정 후 수세, 탈수 과정을 거친 후 일반적인 조직 제작 방법에 따라 조직을 paraffin 포매 하였다. 이 후 paraffin block을 두께 4~6  $\mu\text{m}$  로 제작하여 hematoxylin과 eosin에 이중염색한 후, 광학현미경(Olympus BX50, Japan)하에서 관찰하였으며 사진 촬영은 Olympus DP-71을 사용한다. 주사현미경 분석을 위해서 피부 조직 및 간 조직을 절취하여 glutaraldehyde (2.5%)에서 2시간 전고정 후, 0.1 M phosphate buffer(pH 7.0)로 15분씩 3회 수세하였다. 후고정은 1% osmium tetroxide ( $\text{OsO}_4$ )에 1~2시간 고정 시켜 탈수 과정을 거친 후 freeze dryer에서 완전히 건조시켜 Au를 이용하여 coating한 후, 주사전자현미경(Hitachi S-2500C, Japan)하에서 아가미 표면의 미세구조를 관찰한다. 또, 투과 전자현미경 분석을 위해서 Glutaraldehyde에서 전고정 후, osmium tetroxide로 1시간 30분간 후고정 하였다. Ethyl alcohol을 사용하여 계대 탈수과정을 행하였으며, propylene oxide로 치환하였다. 그리고 epon resin에 포매하여 60 배양기에서 48시간 중합하여 block을 제작하였다. Ultra microtome을 이용하여 80 nm로 박절 후 Uranyl acetate와 lead nitrate로 이중 염색하여 투과전자현미경(H-7000, Hitachi, Japan)을 이용하여 미세구조를 관찰한다.

(2) 연구 결과

(가) Inhibitory effects of lunasin on cyclin D1 and CDK4 expression, and Rb phosphorylation in NIH 3T3 cells treated with MCA.

Cyclin D1은 외부적 자극에 의해 반응하는 세포주기진행 단백질 중 첫 번째 cyclin 단백질이다. Cyclin D1은 세포 내 존재하는 CDK4와 결합하여 세포주기 중 G1/S기로의 transition을 야기하는 retinoblastoma 단백질 (Rb)의 인산화를 유발한다. Fig. 8A와 8B는 cyclin D1과 CDK4의 발현에 대한 lunasin의 영향을 보여준다. MCA는 control과 비교하였을 때 cyclin D1의 발현을 약 85%정도 증가시켰다. 반면 MCA가 처리된 그룹에 1  $\mu\text{M}$  lunasin의 첨가는 오직 MCA만 처리된 그룹과 비교하였을 때 약 80%정도 cyclin D1의 발현을 억제하였다. 그러나 MCA와 MCA + lunasin의 처리는 CDK4의 발현에는 아무런 영향이 없었다. 또한 세포주기 중 G1/S기로의 transition 억제에 대한 lunasin의 영향을 G1/S기로의 transition을 야기하는

retinoblastoma 단백질의 인산화정도를 비교하여 평가하였다. Rb 단백질의 인산화는 여러 종류의 암에서 발견된다. Rb 단백질은 dephosphorylation 상태에서 세포주기의 진행을 억제하는 반면 과도한 phosphorylation 상태에서 세포주기의 진행을 억제하는 기능을 상실한다. Fig. 8C는 MCA에 야기되는 Rb 단백질의 과도한 phosphorylation에 대한 lunasin 펩타이드의 억제영향을 보여준다. NIH 3T3세포에 MCA의 처리는 control 그룹과 비교하였을 때 과도한 Rb 단백질의 과도한 phosphorylation을 야기하지만 MCA가 처리된 세포에 lunasin의 첨가는 오직 MCA만 처리된 그룹과 비교하였을 때 약 69%정도 Rb 단백질의 phosphorylation을 억제하였다. Fig. 9는 연구 결과를 통한 lunasin 펩타이드의 발암과정 억제에 대한 메커니즘을 보여준다. 세포의 핵 내 lunasin 펩타이드의 부재 하에서 화학적 발암물질은 종양 억제단백질인 p21과 p15INK4b 단백질을 비 활성화시키고 cyclin D1 단백질의 발현을 증가시켜 cyclin D1/CDK4의 complex를 형성하여 Rb 단백질의 과도한 phosphorylation을 야기한다. 야기된 과도한 phosphorylation은 세포주기조절의 활성을 비활성화 시키고 Rb-HDAC complex로부터 HDAC를 분리시켜 HAT에 의한 histone 단백질의 acetylation을 유발한다. 이것은 E2F 전사조절인자를 자유롭게 하여 G1/S기로의 transition에 필수적인 cyclin E/CDK complex를 활성화시켜 S기로의 전환을 유발시킨다 (Fig. 9A). 그러나 MCA가 처리된 세포에 lunasin의 첨가는 종양억제단백질인 p21과 p15INK4b 단백질의 발현을 증가시킨다. lunasin 펩타이드에 의해 발현이 증가된 p21과 p15INK4b 단백질은 cyclin D/CDK4의 complex를 억제하여 과도한 Rb 단백질의 phosphorylation을 억제한다. 이것은 E2F-Rb-HDAC의 complex를 활성화시키고 histone을 deacetylation 상태로 유지하여 E2F 전사조절인자의 전사를 억제하여 G1/S기로의 transition에 필수적인 cyclin E/CDK의 complex를 억제함으로써 세포 주기 중 G1/S기로의 transition을 억제한다 (Fig. 9B). Lunasin 펩타이드는 in vitro와 in vivo 모델에서 화학방어적 항암 단백질이라고 알려져 있다. 따라서 lunasin 펩타이드는 Rb 단백질의 과도한 phosphorylation을 억제하여 세포주기 중 G1/S기로의 무절제한 transition을 억제함으로써 발암과정 중 promotion 단계를 억제한다고 사료된다.

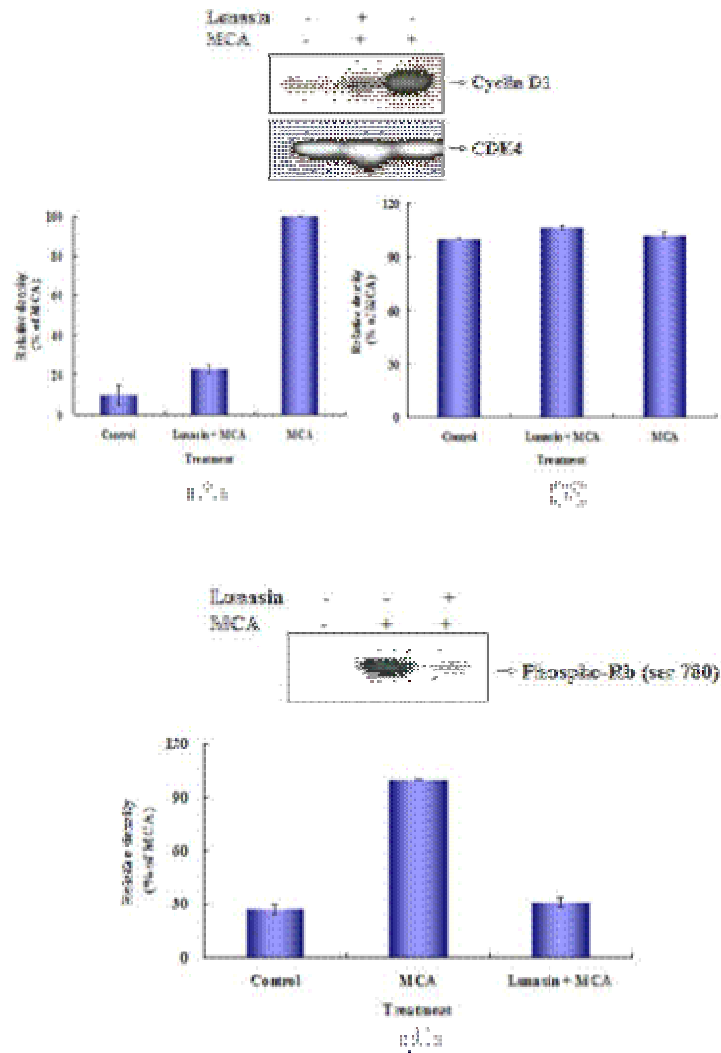


Fig. 8. Inhibitory effects of lunasin on cyclin D1 (A) and CDK4 (B) expression, and Rb phosphorylation (C) in NIH 3T3 cells treated with MCA. Each lane was loaded with 25  $\mu$ g protein. 1  $\mu$ M lunasin purified from the soybean and MCA (5 $\mu$ g/mL) were used. Relative density for cyclin D1 and CDK4 expression was calculated by comparing with the group treated only with MCA. Vertical lines on bars are  $\pm$ SD, n=3.

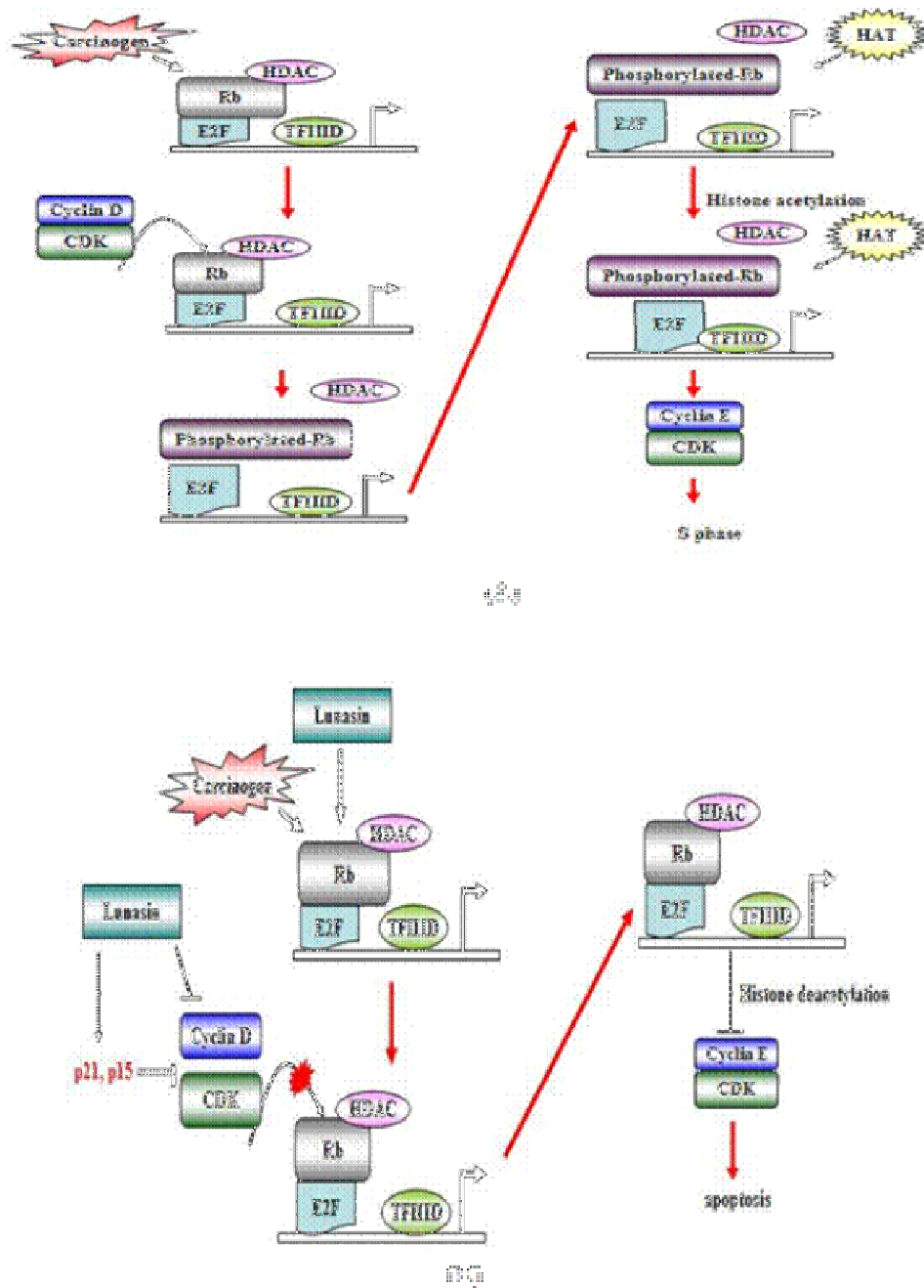


Fig. 9. Rb-HDAC model to explain the ability of lunasin to suppress the abnormal cell growth induced by chemical carcinogens. In the absence of lunasin in the nucleus (A) and in the presence of lunasin in the nucleus (B).

(-) Inhibitory effect of soybean fraction on Elastin degradation induced by UVB



Elastin은 피부의 주요한 extracellular matrix 단백질 중 하나이며 노화가 진행되면 될수록 elastin의 합성이 감소하게 된다. Fig. 10은 UVB에 의해 야기되는 elastin의 degradation에 대한 대두 분획별 억제영향을 보여준다. Control 그룹과 비교하였을 때 mouse skin으로 유래된 NIH 3T3세포에 UVB의 처리는 약 83% 정도 elastin의 degradation을 야기하였다. 하지만 대두 분획별 중 lunasin 펩타이드와 BBIC는 오직 UVB만 처리한 그룹과 비교하였을 때 UVB에 의해 야기되는 elastin의 degradation을 각각 약 54% 그리고 34% 정도 억제하였지만, 반면에 BBI와 LES의 처리는 elastin의 degradation의 억제에 큰 영향이 없었다. 따라서 lunasin은 UVB에 의해 야기되는 elastin의 degradation을 억제함으로써 photo-aging을 억제할 것으로 사료되어진다.

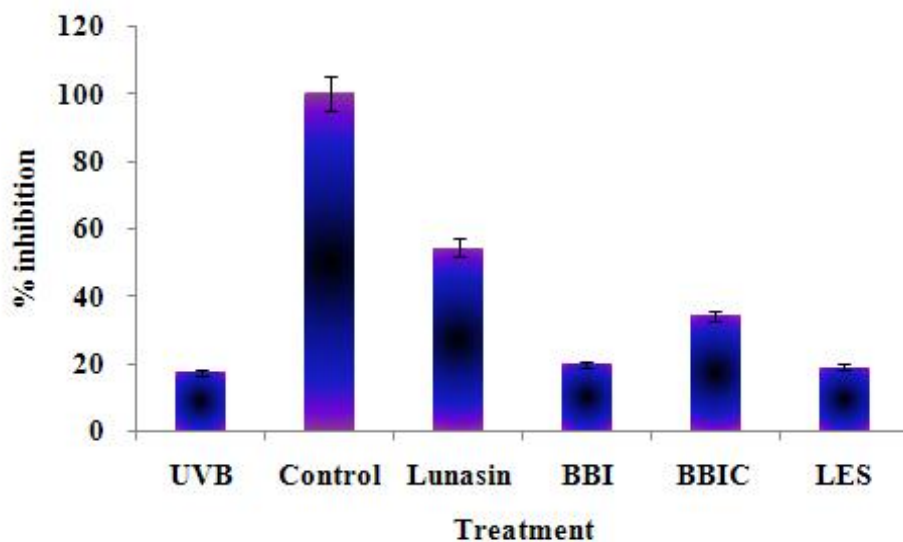


Fig. 10. Inhibitory effect of soybean fractions on elastin degradation induced by UVB. Tested concentration of soybean fractions was 80  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

라. 효능 강화 분획물 처리에 따른 피부 질환 억제 효능

#### (1) 재료 및 방법

##### (가) 혈장분석

혈액에는 단백질, 탄수화물과 같은 필수 영양소 외에 미량원소도 포함되어 있는데, 미량원소는 인체 내에서 전기 에너지의 흐름을 원활하게 해주는 기능을 한다. 미량원소가 생체 내에 결핍되거나 균형이 깨지면 세포 신진대사의 이상변화로 인해

성장장애, 탈모, 피부염, 심부전 등의 다양한 증상을 나타낸다. 혈액을 채혈하여 혈장만을 분리한 후 혈장내의 총단백질(TP), 알부민(ALB), 중성지방(TG), 총콜레스테롤(TCHOL), 나트륨(Na), 칼륨(K), 염소(Cl), 인(Pi), 아미노산 전이효소(ALT, AST), IgE(Immuno globulin E) 등을 혈액분석기(Hitachi 7600)에서 분석하였다.

(나) 간조직내 항산화효소의 활성 측정

① SOD 활성 : SOD의 활성은 기본적으로 McCord 와 Fridovich(1969)의 방법에 의해 이루어졌다. 활성의 측정은 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.8), 0.1 M cytochrome C, 50 mM xanthine, 0.1 mM EDTA, 효소액이 포함된 용액을 25°C에서 예치한 다음 Xanthine oxidase를 첨가하여 반응을 개시하였으며 반응은 550 nm에서 10초 단위로 150초간 흡광도를 측정하였다. Xanthine oxidase 첨가량은 효소액을 함유하지 않은 반응액의 흡광도 흡수가 분당 0.025가 되도록 조절하고 SOD 활성은 cytochrome C의 환원 속도를 50% 억제하는 양을 1 unit으로 책정하여 unit/mg protein/min으로 정의하였다.

② CAT 활성 : CAT 활성도는 Aebi(1984)의 방법에 따라 측정하였다. 50 mM phosphate buffer(pH 7.0), 15 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 용액과 1 mg protein의 시료를 넣은 후 240 nm에서 3분간 변화되는 흡광도를 측정하여 직선으로 나타나는 최초 60초 동안의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 감소량을 활성도로 나타내었다. 효소의 활성도는 1 mg의 단백질이 1분 동안에 1 μM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 분해시키는 효소의 양을 1 unit로 하였다.

③ GST 활성 : Glutathione S-transferase 활성도는 Habig and Jakoby(1981)의 방법에 따라 측정하였다. 100 mM phosphate buffer(pH 7.0), 0.4 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene(CDNB), 1 mM GSH와 1 mg protein에 해당하는 시료를 넣은 후 340 nm에서 3분간 변화되는 흡광도를 측정하였다. GST의 활성도는 1분동안에 1 nM GSH를 소비하는 효소의 양을 1 unit로 하였다.

④ GPX 활성 : GPX 활성도 Flohe 등(1984)의 방법에 따라 측정하였다. 1 mM EDTA를 함유한 100 mM phosphate buffer(pH 7.0), 3 mM GSH, 0.45 mM NADPH, 20 mM glutathione reductase 0.72 U와 1 mg protein 시료를 넣고 37°C에서 5분간 방치한 다음 4 mM cumene hydroperoxide를 첨가한 후 반응을 개시하여 340 nm에서 3분 동안 변화되는 흡광도를 측정하였다.

(다) 효능 강화 분획물 처리에 따른 피부 노화 관련 유전자 변이 분석

① 세포배양 및 추출물 처리

본 연구에 사용된 HEK001 세포주를 미국세포주은행(American Type Culture Collection [ATCC], Manassas, VA, USA)에서 구입하였다., 세포는 Keratinocyte-Serum Free Medium (Keratinocyte-SFM) (Gibco BRL, USA, Cat. No. 10724-011)에 1% antibiotics-antimycotic (Gibco BRL, Cat. No. 15240-062)와 배지와 함께 제공된  $0.04 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  농도의 EGF(Epidermal Growth Factor) Human Recombinant Protein (Gibco BRL, Cat. No. 10450-013)를  $100 \mu\text{l}$ (최종농도  $8 \text{ pg}/\mu\text{l}$ ) 넣어 배양하였다. 90mm 배양접시에  $1 \times 10^7$  cell을 seeding 하였고, 배양조건은  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  세포배양기에서 배양하였다. 배양하는 동안 이틀에 한 번씩 배지를 교환해 주었고 배양접시에 70%정도 자랐을 때 LES (최종농도 65 ppm, 130 ppm, 260 ppm) 처리하여 각 12시간과 48시간 후에 scrap하여 회수하였다.

## ② Cell viability test (MTT assay)

HEK001 세포에 LES 추출물의 세포 독성도를 측정하기 위하여 MTT assay를 수행하였다.  $0.04 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  농도의 EGF(Epidermal Growth Factor) Human Recombinant Protein (Gibco BRL, Cat. No. 10450-013) 과 1% antibiotics-antimycotic (Gibco BRL, Cat. No. 15240-062)가 들어간 Keratinocyte-SFM (Gibco BRL, Cat. No. 10724-011)에  $5 \times 10^4$  cell을 96 well plate에 seeding하고 LES (최종농도 65 ppm, 130 ppm, 260 ppm) 처리한 후 24시간 동안  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  배양기에서 배양하였다. 24시간 후 배양된 배지를 버리고 난 다음 새로운 배지로 교환해주고, 5 mg/ml MTT(Sigma, Cat. No. M5655) solution  $10 \mu\text{l}/\text{well}$ 을 첨가하여 3시간 동안 배양한 다음 DMSO(Sigma, Cat. No. D2650)  $150 \mu\text{l}$ 를 첨가하고 96well plate reader(infinite M200, Austria)에 30분 shaking incubation하여 MTT를 녹인 뒤 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포에 대한 독성은 각각의 대조군의 평균 흡광도 값에 대한 백분율로 나타내었다.

## ③ Cell morphological change assay

LES를 처리한 후의 HEK001 세포주에 형태적인 변화가 일어나는지 관찰하였다. 위상차 현미경(OLYMPUS IMT-2, Japan)의 100배 배율 하에서 처리군과 대조군을 관찰하였고, 설치된 카메라(DFC 295, Leica, Germany)를 이용하여 촬영하였다.

## ④ Quantitative Real-Time PCR

Quantitative Real-Time PCR은 ABI Prism 7500 cycler (Applied Biosystem, USA)를 이용하여 실험을 수행하였다. Primer는 Primer Express 3.0 software(Applied Biosystem, USA)를 이용하여 디자인하였다. 디자인한 primer를 제노텍(주)에 합성을 의뢰하였다. 이전 과정에서 합성된 cDNA를 정량하여  $25 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 로 희석하여  $2 \mu\text{l}$ 씩 사용하였고, PCR Mixture는 Power SYBR<sup>®</sup> Green PCR

Master Mix(Applied Biosystem, Cat. No. 4367659) 10  $\mu$ l, 2pmol로 희석한 Forward & Reverse Primer 각 1  $\mu$ l, 6  $\mu$ l의 Cell/Tissue Culture Grade Water(WelGENE, Cat. No. LS016-01)를 96well optical reaction plate에 첨가하여 최종 PCR반응 부피를 20  $\mu$ l로 하였다. Optical adhesive covers(Applied Biosystem, USA)를 이용하여 plate를 덮고, Real-Time PCR machine(Applied Biosystem, USA)을 이용하여 PCR반응을 수행하였다. 반응 첫 번째 단계는 50°C에서 2분, 95°C에서 10분간 반응시키고, 두 번째 단계는 95°C에서 15초, 62°C에서 30초, 72°C에서 33초의 cycle을 40번 반복하였다. 반응이 끝난 후에 ABI Prism 7500 SDS software program(Applied Biosystem, USA)을 이용하여 증폭 산물의 동질성, 비 특이적인 증폭 산물의 생성 여부, primer-dimer의 생성 여부를 확인하여 target gene이 정확히 얻어졌는지 확인하였다. 상대적인 유전자 발현양의 분석은  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  Method를 이용하였다(Livak and Schmittgen, 2001). 3개의 반복적인 PCR 반응 값의 평균  $C_T$  값을 구하여 각 sample들의 normalized 하였고,  $\Delta C_T$  값을 다음 공식①에 대입하여 계산 하였으며, Untreat에 대한 sample의 상대적 유전자 발현 값인 RQ(Relative Quantification)은 공식②에 대입하여 계산하였다.

① $\Delta C_T = \text{Target gene } C_T \text{ mean} - \text{GAPDH } C_T \text{ mean}$
② $RQ = 2^{(\text{Target gene } \Delta C_T \text{ mean} - \text{Untreat } \Delta C_T \text{ mean})}$

표 3. Sequence of oligonucleotide primer used for real-time PCR

Gene	F Primer	R Primer
HIF1A	5'-CGGACAGCCTCACCAAACA-3'	5'-TTGCCCCAGCAGTCTACATG-3'
E2F1	5'-CCCATCCCAGGAGGTCACCT-3'	5'-TGCCCATCCGGGACAA-3'
AKT1	5'-CGCTGGACGATAGCTTGGA-3'	5'-GAGGACAGCGTGGCTTCTCT-3'
RB1	5'-CAAGCAACCTCAGCCTTCCA-3'	5'-AAGGGCTTCGAGGAATGIGA-3'
STAT3	5'-ACCTCGGAGTGCCTACCT-3'	5'-CACCCCCCGCCACAT-3'
PARP1	5'-GACAGTGTGCAGGCCAAGGT-3'	5'-GCTGGCATTGCTTTCAC-3'
CREB1	5'-AACCCCCACCTCCTCAA-3'	5'-CATGCGGCCACACATTAC-3'
AIFM1	5'-CCCGCTCTCACAGCCATT-3'	5'-TGCCTCTCGCTTCTTAGGA-3'
ATF2	5'-AGGTCATGGTAGCGGATTGG-3'	5'-GCTGGAGAAGCCGGAGTTTC-3'
SHC1	5'-CCGGTTTGGGTTGGGATAAC-3'	5'-ATGGGAGGGCAGGCCTTA-3'
HMGB1	5'-CCCCGATGTTGGCTATGAAG-3'	5'-AGGCCTCGGACTCTGTCTCA-3'
TGFB1	5'-GCCCAGCATCTGCAAAGC-3'	5'-GGTCCTTGCGGAAGTCAATG-3'

## (2) 연구 결과

### (가) DNCB 도포에 의한 알레르기성 접촉피부염 유발

일반적으로 육안평가를 한 결과 DNCB 도포 후 4회부터 피부병변의 변화를 관찰할 수 있었으며, 피부가 건조하고, 홍반과 심한 소양증을 관찰되었다. DNCB 5회 도포 후에는 홍반이 많이 생겼고, 피부가 매우 건조하였으며, 약간의 부종을 확인할 수 있었다. 또 피부에 있는 잔 털 까지도 모두 자연적으로 제거 되는 것을 볼 수 있었다 (Fig. 11B). LES 5회 도포 후 피부조직은 무처리 대조군(Fig11. B) 및 LES 용매로 사용된 에탄올(EtOH)만 처리된 대조군(Fig11. C)에 비하여 피부염증 및 부종이 상당히 감소하는 것을 관찰하였다.



Fig. 11. DNCB 도포에 의한 알레르기성 접촉피부염 유발 결과사진.

A: 정상군(Nomal), B: 대조군(Control), C: 실험군 (EtOH+LES 5회 피부도포)

### (나) 조직학적 변화 관찰 결과

조직절편의 표피의 두께변화 관찰 결과 알레르기 접촉피부염을 유도한 대조군에서 피부 외피의 두께가 유의수준으로 증가하였으며 LES 피부도포시 표피두께의 증가가 억제되는 것을 확인하였다 (Fig. 12). 주사전자현미경을 이용한 피부표면 관찰 결과 정상군에서는 피부 표면이 매끄러운 것을, DNCB 처리된 대조군에서 피부 표면이 거칠게 일어는 것을 확인하였으며 LES 처리군에서는 대조군에 비해 피부표면이 매끄럽고 깨끗한 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 13). 따라서 알레르기 접촉피부염을 유도한 군에서 LES의 피부도포에 의해 피부표면 및 외피의 두께 변화가 정상군과 비슷한 수준을 유지하게 되는 것을 보아 LES 및 LES를 포함하는 콩추출물이 피부표면의 개선에 효과적인 것으로 생각된다.



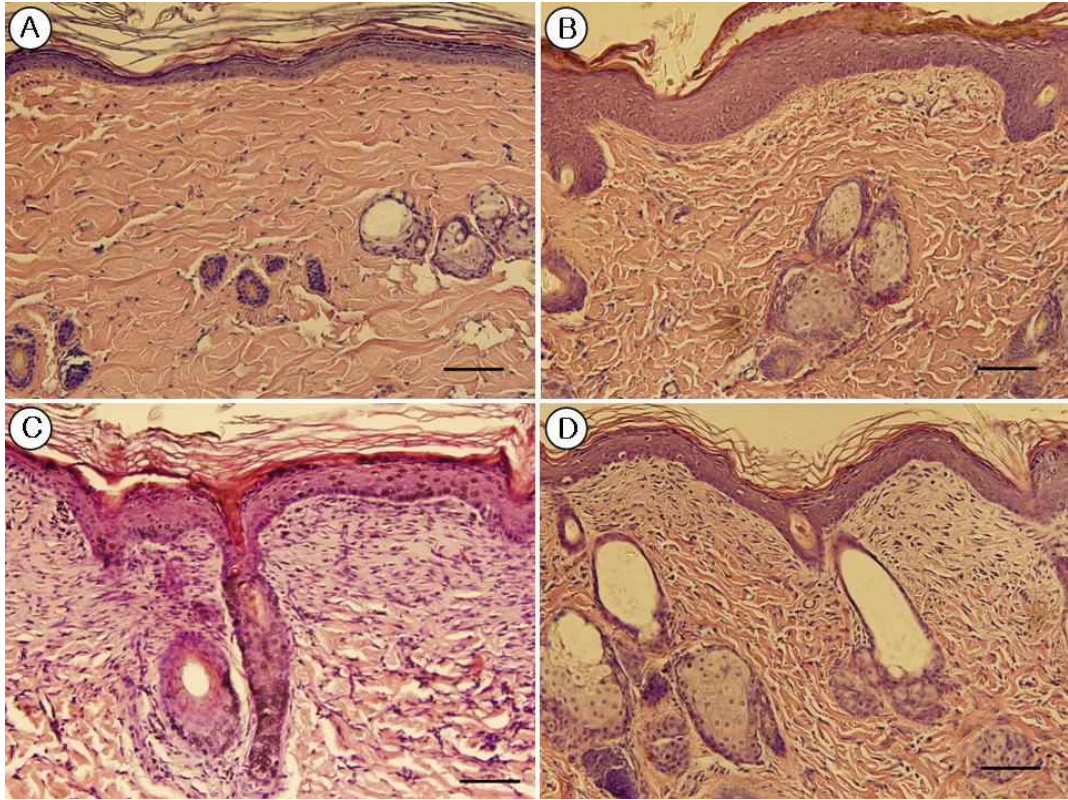


Fig. 12. 알레르기성 접촉피부염 유발 후 콩추출물 도포한 피부의 광학현미경사진 (X20)-scale bar= 100um. A: 정상군(Nomal), B: 대조군(Control), C: 100% EtOH, D: 실험군 (EtOH+LES 5회 피부도포)

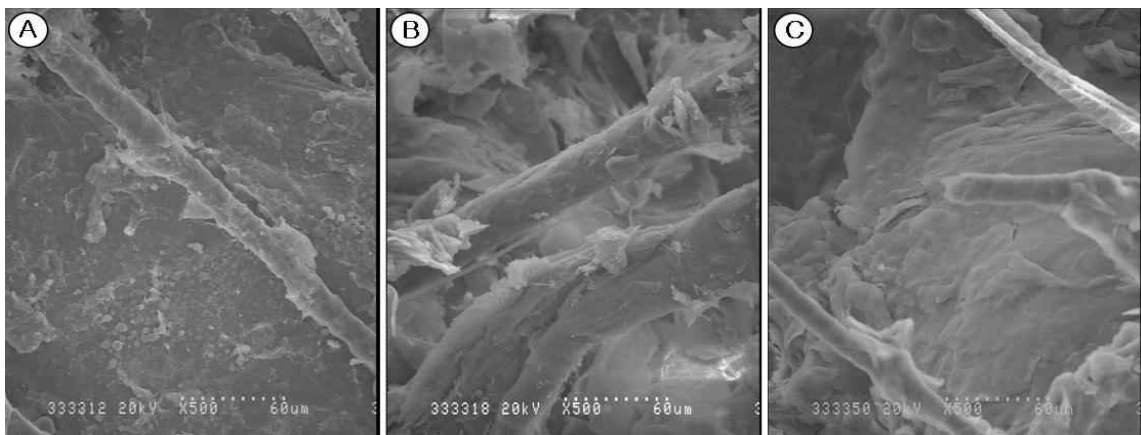


Fig. 13. 알레르기성 접촉피부염 유발 후 콩추출물 도포한 피부의 주사전자현미경사진(X500)

A: 정상군(Nomal), B: 대조군(Control), C: 실험군 (EtOH+LES 5회 피부도포)

(다) Immunostaining 분석 - lunasine 물질 처리시 세포내 위치 확인

피부 조직절편의 DAPI 염색을 통한 세포 핵내 DNA 와 lunasine 항체를 이용한 면역 염색을 수행하였다. 관찰 결과 LES 도포된 피부 세포의 경우 LES에 포함된 주 성분중 하나인 lunasine 단백질은 세포 침투와 함께 핵 내로 이동하는 것을 확인하였다 (Fig. 14). 핵 내로 이동된 lunasine 단백질은 nucleosome에 결합하여 유전자 발현조절에 중요한 요소인 histone acetylation을 억제하는 것으로 알려져 있다. 이는 LES 처리시 핵 내로 이동된 lunasine 단백질에 의해 전체 유전자 또는 일부 유전자의 발현이 억제 또는 증가될 수 있음을 의미한다. 따라서 향후 lunasine에 의해 조절되는 유전자를 동정하고 또 epigenetic한 조절 과정을 입증하는 것이 필요할 것이다.

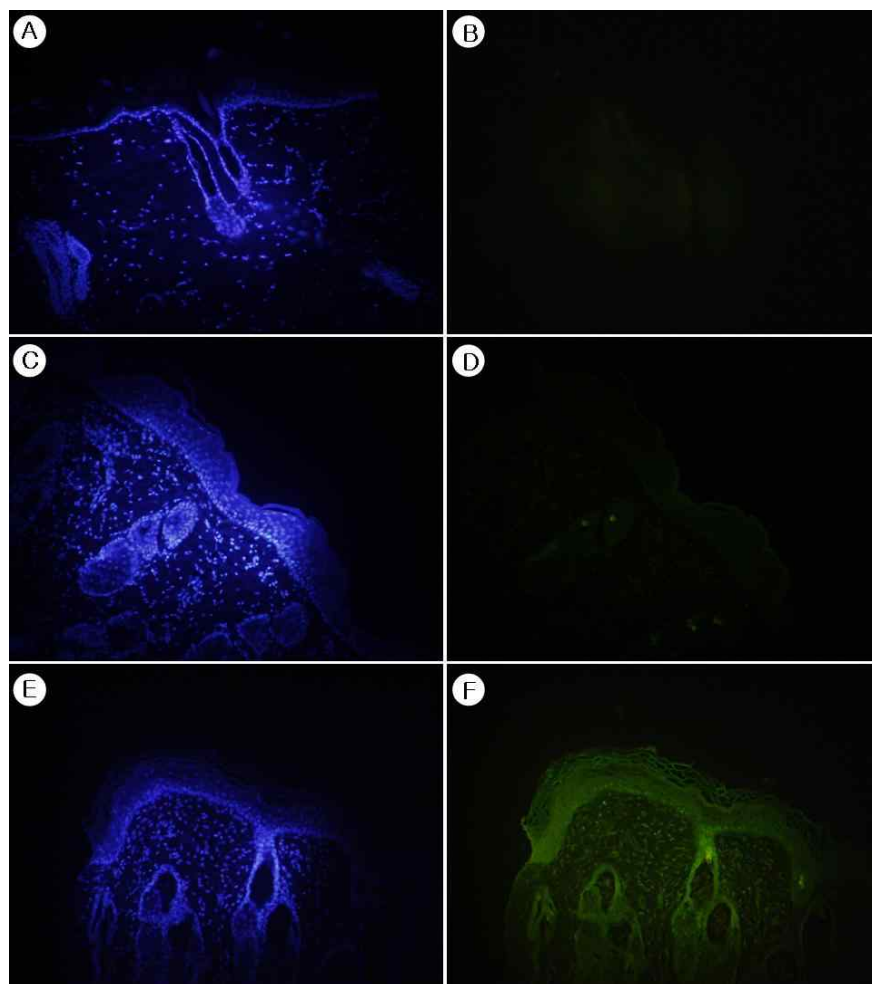


Fig. 14. DAPI staining과 lunasine을 이용한 immunostaining 형광현미경 사진  
A: 정상군(Nomal, DAPI), B: 정상군(Lunasin) C: 대조군(Control, DAPI),  
D: 대조군(Lunasin) E: 실험군(EtOH+LES, DAPI), F: 실험군(Lunasin)

(라) 혈액 성분 분석

혈장성분 중 Chloride는 lunasin 피부도포에 의한 영향을 받지 않는 것으로 보였고, 알부민, GOT의 함량은 control 군에서 감소하였으며 실험군에서는 정상군에 비해 조금 높아지는 것을 볼 수 있었다. Total protein, Phosphate, Potassium, GPT, Total Cholesterol 은 정상군에 비해 대조군, 실험군에서 점점 수치가 감소하였다. Sodium, Triglyceride의 함량은 알레르기를 유발시킨 대조군에서 수치가 증가하였다가 실험군에서 감소하였다.

표 4. 혈액성분분석

Item \ Group	Nomal	Control	EtOH+LES(5)
Total Ig E (KU/L)	2.00미만	2.00미만	2.00미만
Albumin (g/dL)	2.92	2.36	2.43
Total protein (g/dL)	6.94	6.51	6.85
Chloride (mmol/L)	99	99	98
Phosphate (mg/dL)	11.4	10.8	9.0
Potassium (mmol/L)	8.9	8.6	6.9
Sodium (mmol/L)	144	145	137
GOT (IU/L)	215	109	190
GPT (IU/L)	80	70	61
Total Cholesterol (mg/dL)	78	70	67
Triglyceride (mg/dL)	81	96	69

(마) 간 조직내의 항산화효소 활성 측정

콩추출물을 피부에 도포한 쥐의 간 조직 내 항산화효소의 활성에 미치는 영향을 조사하기 위해서 superoxide anion의 농도와 이의 제거에 관여하는 superoxide dismutase(SOD), catalase(CAT)의 활성 및 glutathion (GSH) 농도와 GSH를 이용하여 반응하는 glutathione peroxidase(GPX), glutathione s-transferase(GST)의 활



성 변화를 조사하였다.

간조직의 SOD 활성을 측정한 결과는 Fig. 15. 와 같다. SOD의 활성은 nomal군, Control군, EtOH+LES군에서 각각 12.96, 14.42, 15.05 (unit/mg protein)로 효소활성이 DNCB를 도포하지 않은 nomal군에 비해 DNCB를 도포한 Control군과 EtOH+LES군에서 유의하게 증가하였으며, 콩추출물을 도포한 EtOH+LES군의 활성이 Control군에 비해서 유의하게 증가하여 가장 높은 활성을 나타내었다. Catalase의 활성은 nomal군, Control군, EtOH+LES군에서 각각 28.93, 29.40, 27.65 (unit/mg protein)로 nomal군에 비해 EtOH+LES군의 활성도가 감소하였으며 GST의 활성을 측정한 결과 nomal군, Control군, EtOH+LES군에서 각각 8.95, 13.78, 13.00 (unit/mg protein)로 nomal군에 비해 Control군에서 유의하게 증가하였다가 EtOH+LES군에서 다시 감소하는 경향을 나타냈다. GPX 활성은 nomal군, Control군, EtOH+LES군에서 각각 17.99, 21.87, 22.14 (unit/mg protein)로 유의하게 증가하였다.

항산화효소 활성은 nomal군에서 낮은 활성을 나타냈으며, Control군과 EtOH+LES군에서는 높은 활성을 나타내었다. 이는 콩추출물 피부도포에 의해 항산화효소 활성이 nomal군에 비해 증가하는 것을 알 수 있다.

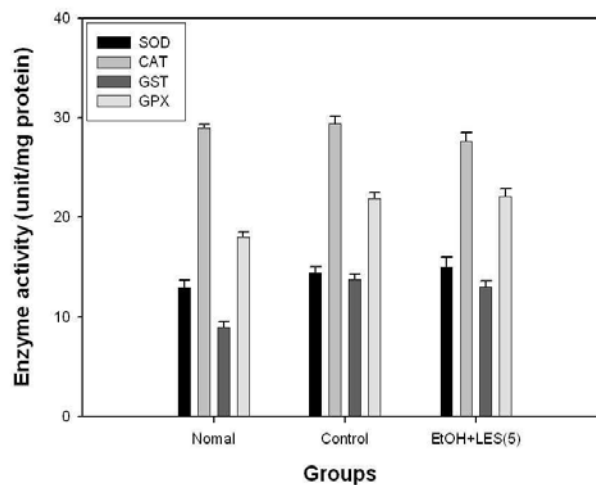


Fig. 15. 항산화효소활성

(바) LES가 HEK001 세포주의 생존력에 미치는 영향

LES가 HEK001 세포주에 미치는 독성도를 알아보기 위해 추출물 처리 후 24 시간 동안 배양하였다. LES는 최종농도 65 ppm, 130 ppm, 260 ppm이 되도록 처리하였다. LES 처리시 세포의 양이 LES 무처리 대조군과 비슷하거나 일부 증가하는 것이 확인되어 LES추출물이 세포주에 독성이 없음을 확인하였다(Fig. 16). 따라서 유전자 발현 조절 분석을 위한 실험에서는 260 ppm을 사용하였다.

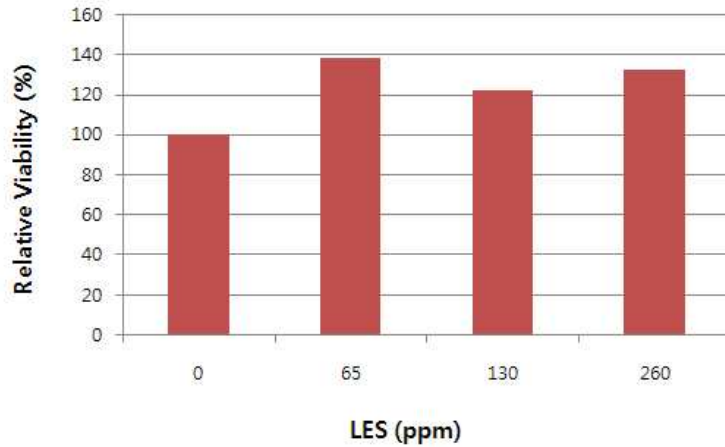


Fig. 16. Relative viability of HEK001 cell after treatment with LES

(사) LES와 한약재 추출물이 HEK001의 형태적 변화에 미치는 영향

LES가 HEK001 세포주의 외형에 변화를 주는지 알아보기 위해 위상차 현미경을 이용하여 관찰하였다. 그 결과 처리하지 않은 세포들과 비교하였을 때(Fig. 17) 모든 처리 농도에서 일부 외형변화가 보였으나 MTT결과에서 보여진 바와 같이 관찰된 세포외형 변화가 추출물이 세포에 독성으로 작용하는 것이 아닌 세포가 급속한 성장을 하는 가운데 관찰된 외형변화라 판단된다.

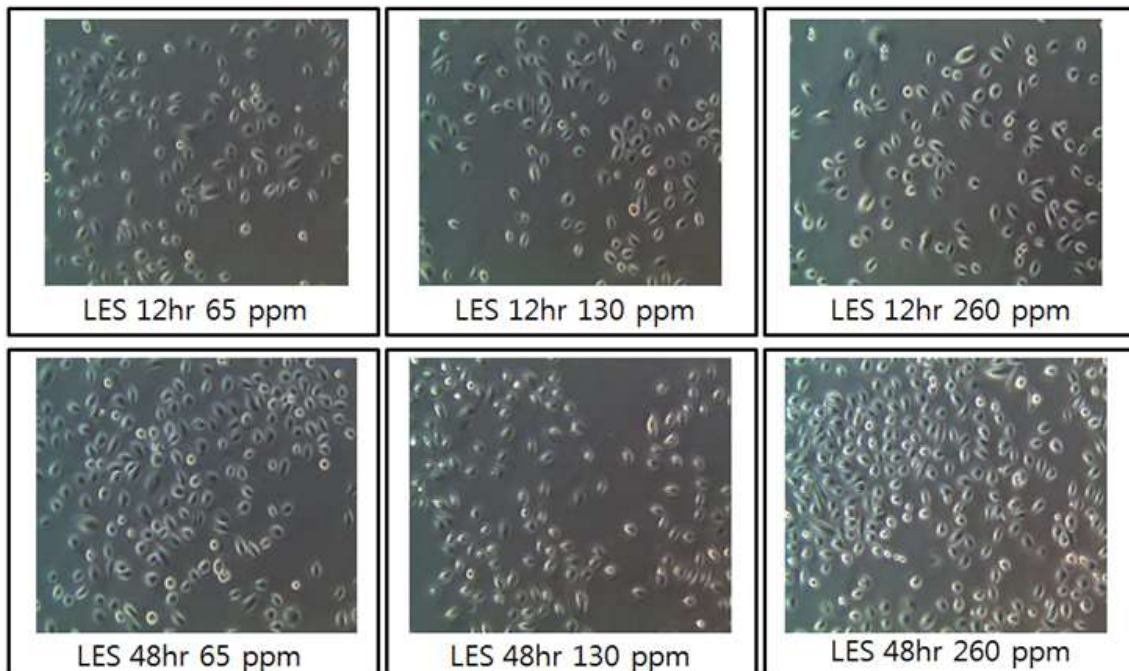


Fig. 17. Morphological changes of HEK001 cells after treatment with LES 65, 130, 260 ppm, respectively.

(아) LES와 한약재 추출물이 노화 관련 유전자 발현에 미치는 영향

LES를 처리한 후 Total RNA를 분리한 후 cDNA를 합성하여 농도별 시간별 유전자 발현을 상대 정량 분석하고자 Quantitative real-time RT-PCR을 수행하였다. LES를 260 ppm 농도로 처리 하였을 때 STAT3, PARP1, HMGB1, SHC1 각 유전자의 발현이 급격히 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 18). 따라서, LES 처리시 성장과 관련된 유전자의 발현이 증가되는 것을 확인하였으며, 이 성장관련 유전자의 증가된 발현량의 차이는 LES 처리 후 세포의 수의 증가와 상관관계가 있는 것으로 생각된다. 또한 LES추출물이 Oxidative stress와 관련된 유전자의 발현을 감소시키는 것을 확인함으로써 LES 처리 후 세포내 항산화력의 증가를 유전자 발현 수준에서 증명하였다.

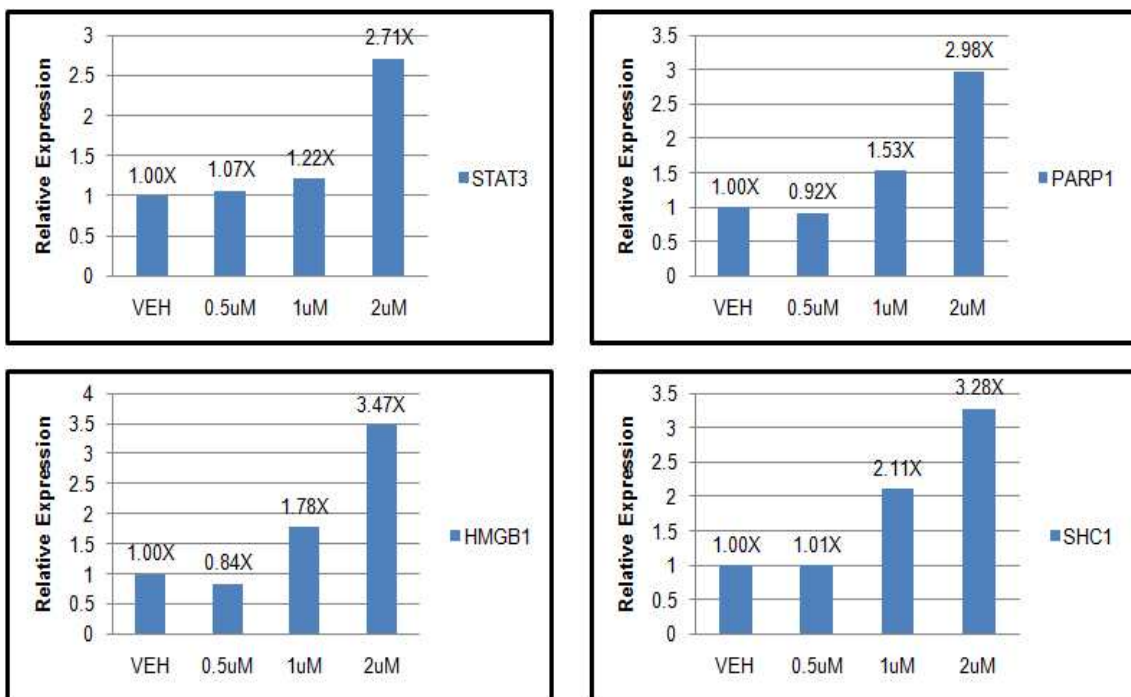


Fig. 18. Relative expression of genes related to proliferation with qRT-PCR

(자) LES (루나신 강화 분획물)을 활용한 피부개선 제품 시제품 제작

루나신 강화 분획물을 활용하여 피부개선 제품 시제품 제작 공정을 아래와 같이 확립하였음. 2, 3 차년도 결과를 종합 분석하여 기능강화 피부개선제품 제작완료 단계로 자체 유통망을 통한 선호도 조사중에 있음.

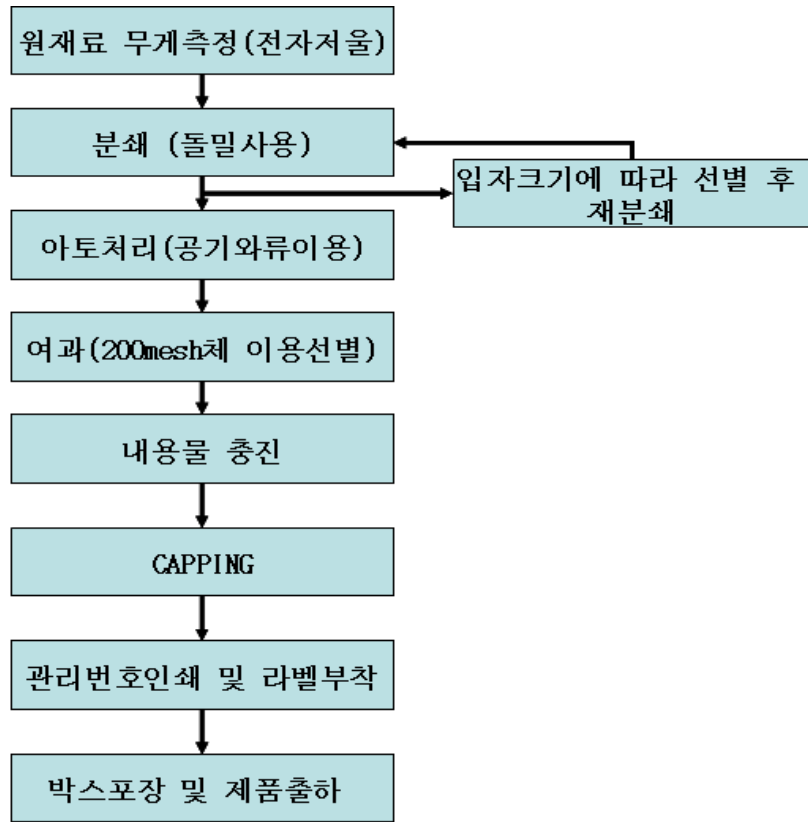


Fig. 19. 피부개선 제품 시제품 제작 공정

개발시기	제품명 / 개발기업	제품개요	비고
2009년 7월	가칭 “아물고” 시리즈 피부질환 개선 기능 크림	전임상 실험 및 in vitro 실험을 통해 입증(2차년도 결과보고) 된 아토퍼 개선 효능 및 피부개선 효능을 바탕으로 피부질환 개선 크림 제품 개발중	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 동우당 제약의 납품 한의원 (전국 1600여개) 대상으로 시제품의 효능 및 만족도 평가계획</li> <li>- 한의원 대상 판매시 연 1000만원 이상 매출 기대</li> <li>- 만족도 평가 후 동우당 제약의 자체 판매망을 이용한 판매 계획</li> </ul>
참여기업 : 동우당제약	 스넵팩형태의 선호도 조사용 시제품		

## 2. 콩 기능성 물질의 효능 검증 및 건강식품 개발

### 가. 이소플라본 Genistein에 의한 항암 기전 연구

#### (1) 재료 및 방법

##### (가) 세포배양 및 isoflavone

인간 대장암 세포주인 HCT116는 American Type Culture Collection (ATCC, USA)에서 구입하였다. 세포주의 배양 및 계대에는 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 배지 (Gibco-BRL Inc., USA)를 사용하였으며, 10% FBS (Fetal Bovine Serum, Gibco-BRL Inc., USA), 1% penicillin 및 streptomycin (WelGene Inc., Korea)을 첨가하여 사용하였다. 본 연구에 사용된 콩 유래의 isoflavone인 genistein과 daidzein은 Sigma-Aldrich Chemical Co. (USA)에서 구입하였다.

##### (나) 세포 생존율 연구

Genistein과 Daidzein의 처리에 의한 HCT116 세포 생존에 미치는 영향을 확인하기 위하여 MTS 용액(Promega, USA)을 이용하여 세포생존율 연구를 수행하였다. 즉, 96 well plate에 well당  $3 \times 10^3$  개의 세포를 접종하고 24시간 동안 배양한 후, genistein과 daidzein의 최종 처리농도가 25, 50 그리고 100  $\mu\text{M}$ 이 되도록 처리하였다. Genistein과 daidzein을 각각 24시간 동안 반응시킨 후, MTS ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium]) 용액을 각 well 당 20  $\mu\text{l}$ 씩 넣고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 4시간 동안 반응 시켰다. 반응 종료 후 96 well plate reader (Expert 96 UV ASYS Hitech, Austria)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정 하였다. 결과 수치는 4개의 독립적인 well 에서 수행한 값을 mean $\pm$ SD 값으로 나타내었다.

##### (다) 세포 형태변화 관찰

Genistein과 Daidzein의 처리에 의한 암 세포주 형태 변화를 관찰하기 위하여, 6 well plate에 well 당  $2.5 \times 10^5$  개의 세포를 분주하고 24시간 동안 배양한 후, Genistein과 Daidzein의 최종 처리 농도가 25, 50 그리고 100  $\mu\text{M}$ 이 되도록 처리하였다. 추가적으로 24시간 배양한 후, 역상 현미경(Leica DMIL, Wetzlar, Germany)의 100배 배율 하에서 세포주의 형태 변화를 대조군과 비교 관찰 하였고, 현미경에 설치된 카메라를(Olympus, Japan) 이용하여 well 단위로 세포 형태를 촬영하였다.

##### (라) Total RNA 분리

Total RNA 분리는 RNeasy mini kit (Qiagen Inc., USA)을 이용해 제조사의

매뉴얼에 따라 수행하였다. 최종 단계에서 RNase-free water 40  $\mu$ l를 첨가하여 total RNA를 분리하였다. 분리 정제한 RNA는 정량 후, reverse transcription PCR 및 real-time PCR에 사용하였다.

#### (마) RT-PCR 과 real-time PCR

유전자의 발현의 확인을 mRNA 수준에서 측정하기 위하여 reverse transcription-PCR과 real-time PCR 방법으로 수행하였다. 각 시료로부터 total RNA를 추출한 후, 5  $\mu$ g을 취하여 MMLV RTase (Bioneer, Korea)를 이용하여 cDNA를 제조하였다. RT-PCR의 경우 최종 cDNA를 50  $\mu$ l로 희석한 후 5  $\mu$ l를 사용하였으며, PCR 반응은 94 $^{\circ}$ C에서 5분 denaturation시키고, 94 $^{\circ}$ C에서 30초, 58 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 30초의 cycle을 30번 반복한 후, 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 수행하였다. Real-time PCR의 경우 최종 cDNA를 200  $\mu$ l로 희석한 후 5  $\mu$ l를 사용하였으며, PCR mixture는 Power SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA)를 사용하였다. 반응조건은 첫 번째 step으로 50 $^{\circ}$ C에서 2분, 95 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시키고, 두 번째 step으로 95 $^{\circ}$ C에서 15초, 54 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 33초의 cycle을 40번 반복하여 수행하였다. 결과는 ABI Prism 7500 SDS software program (Applied Biosystems, USA)을 이용하여 분석, 정량 하였으며 분석법으로는 comparative Ct (threshold cycle) method를 이용하였다[Livak KJ and Schmittgen TD, 2001].

## (2) 연구 결과

### (가) Genistein과 Daidzein 처리에 의한 농도 의존적 세포생존율 억제 및 세포형태변화

콩의 대표적인 isoflavone인 Genistein과 Daidzein 처리에 의한 HCT116 세포의 성장에 미치는 영향을 확인하기 위하여, Genistein과 Daidzein의 각각의 최종 처리 농도가 25, 50 100  $\mu$ M이 되도록 처리하였다. 그 후 24시간 동안 배양한 다음, MTS 용액을 이용하여 cell viability assay를 수행하였다. 그 결과 Genistein을 처리한 경우 처리한 Genistein 농도 의존적으로 세포 생존율이 감소함을 확인하였다 (Fig. 1A). 그러나 Daidzein을 처리한 경우, 25  $\mu$ M 와 50  $\mu$ M 처리농도에서는 세포 생존율에 영향이 없었으나, 100  $\mu$ M 처리농도에서는 세포 생존율의 감소를 확인할 수 있었다(Fig. 1B). 이러한 연구 결과는 세포의 형태학적 변화의 결과와 일치하는 것으로, Fig. 2A에서 보는 바와 같이 Genistein을 농도별로 처리한 경우, Genistein에 의한 세포독성 효과가 농도 의존적임을 확인할 수 있다. 이에 반해 Daidzein의 경우 25  $\mu$ M 와 50  $\mu$ M Daidzein을 처리한 경우는 세포독성효과를 관찰할 수 없었

으며, 100  $\mu\text{M}$ 의 Daidzein을 처리한 경우 약한 세포독성 효과를 확인할 수 있었다 (Fig. 2B).

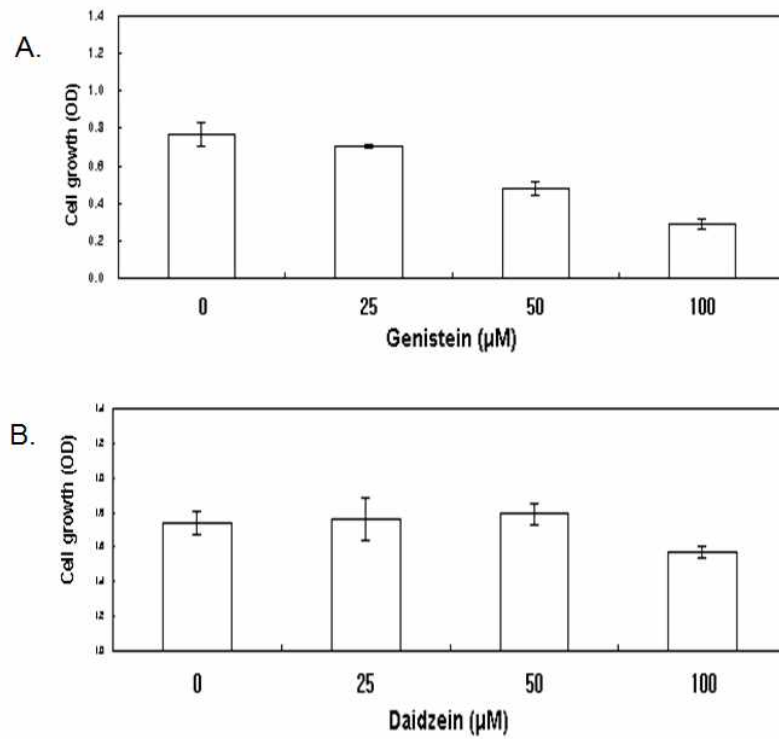


Fig. 1. Effects of genistein and daidzein on HCT116 cell viability. (A) HCT116 cells were plated at 3,000 cells/well in a 96-well plate and incubated with 0, 25, 50 or 100  $\mu\text{M}$  of genistein for 24 hr. (B) HCT116 cells were treated with 0, 25, 50 or 100  $\mu\text{M}$  of daidzein for 24 hr. After each treatment, cell viability was measured using MTS cell proliferation assay kit.

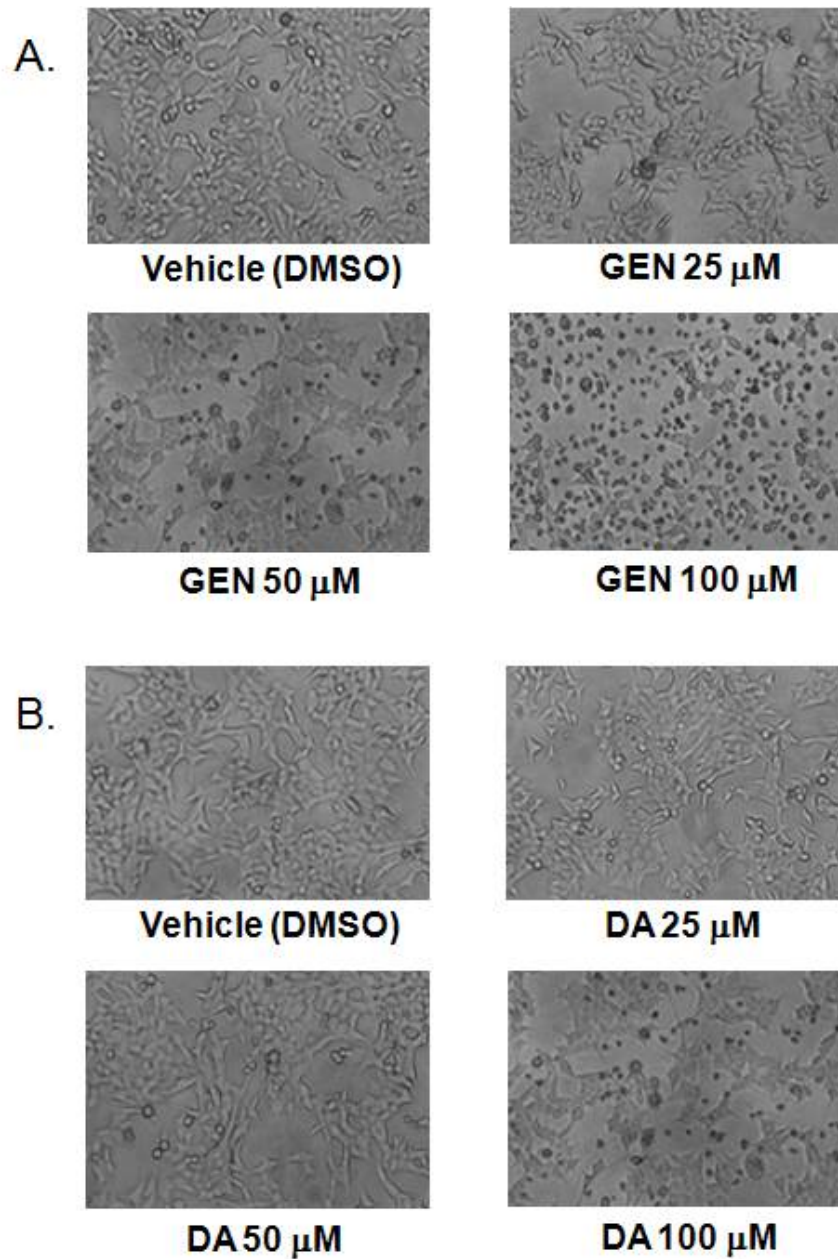


Fig. 2. Detection of morphological changes by genistein and daidzein treatments for 24 hr. HCT116 cells were treated with four different doses (0, 25, 50, and 100  $\mu$ M) of genistein (A) or daidzein (B) for 24 hr.

(나) RT-PCR을 통한 유전자 발현변화 분석

Genistein의 처리에 의한 유전자 발현 변화를 확인하고자 oligo DNA microarray 실험을 수행하였다. 즉, 대조군은 HCT116에 DMSO를 처리하고, 실험군은 HCT116에 Genistein 50  $\mu$ M을 24시간 동안 처리하였다. 실험결과에 의해 발



현이 2배 이상 up-regulation된 유전자는 71개, 2배 이상 down-regulation 된 유전자는 64개로 각각 분류 되었다.

DNA microarray 분석 결과를 검증하기 위하여, 2배 이상 up-regulation 되는 유전자 중에 *DKK1*, *ATF3* 그리고 *NAG-1* 유전자를 선택하여 RT-PCR을 수행하였다. 한편 internal control로서 *GAPDH*를 사용하였다. 그 결과 Fig. 3에서 보는바와 같이 모든 유전자의 발현이 genistein을 처리 하였을 때, 대조군에 비해 발현이 증가됨을 확인하였다.

이 중 *NAG-1* 유전자는 항암 기능이 있는 것으로 알려져 있는 유전자로서, genistein의 처리에 의해 대표적인 암 억제 유전자인 p53을 경유하여 증가된다는 것이 보고 되었다[Wilson et al, 2003]. 또한, 파이토케미칼인 Resveratrol에 의해서도 p53 의존적으로 *NAG-1* 유전자의 발현을 증가시킬 수 있는 것으로 보고되었다[Baek et al., 2002]. 하지만, cyclooxygenase inhibitors에 의해서는 전사조절인자인 EGR-1을 경유하여 *NAG-1* 유전자의 발현이 증가됨이 보고되었다[Baek et al, 2005]. 이러한 항암 유전자인 *NAG-1*은 여러 가지 다양한 chemopreventive agents에 의해서 발현이 유도되며, 이러한 발현은 여러 가지 기전에 의해 이루어진다. 본 연구에서는 Genistein과 Daidzein의 병합처리에 의해 *NAG-1* 유전자 발현의 변화를 확인하였다.

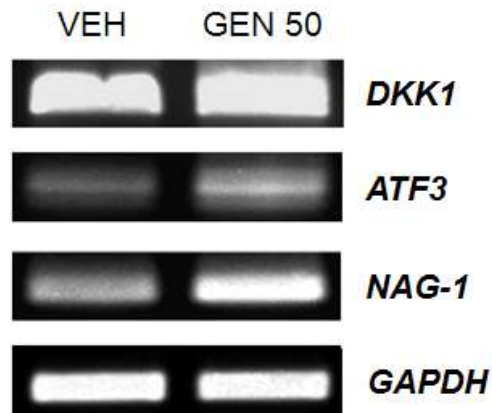


Fig. 3. Changes of gene expression in 50  $\mu$ M Genistein-treated HCT116 cells. HCT116 cells were treated with 50  $\mu$ M of Genistein (GEN) or vehicle (DMSO). Total RNA was prepared for RT-PCR with gene specific primers.

(다) Genistein과 Daidzein의 병합처리에 의한 세포독성 상승효과

Genistein과 Daidzein의 병합처리에 의한 대장암 세포주 HCT116의 세포독성 효과를 정량적으로 확인하기 위하여 24시간 동안 Genistein 25  $\mu$ M, Daidzein 25  $\mu$ M 그리고 Genistein 25  $\mu$ M와 Daidzein 25  $\mu$ M를 병합 처리하여 비교하였다(Fig.

4). 그 결과 Genistein 25  $\mu$ M의 농도에서는 대조군에 비해 97.6%로 세포사멸이 조금 일어났으나, Daidzein 25  $\mu$ M의 농도에서는 116.7%로 오히려 세포 생존율을 증가시켰다. 하지만 Genistein 25  $\mu$ M과 Daidzein 25  $\mu$ M의 병합처리에서는 세포의 생존율이 84.8%로 병합처리에 의한 상승적인 세포사멸 효과를 확인하였다.

이러한 상승적인 세포 독성효과는 대두를 식품으로 섭취하는 관점에서 매우 의미 있다고 생각된다. Rayalam 등에 의하면 Resveratrol이 전지방 세포인 3T3-L1에서 genistein에 의한 항비만 효과와 세포사멸 효과를 강화시킨다고 보고하였다 [Rayalam *et al.*, 2007]. 또한, 최근에 여러 그룹에 의해 두 가지 이상의 파이토케미칼을 병합처리함으로써 상승적인 암 억제현상이 보고된바 있다[Hsieh TC and Wu JM, 2008; Reiter *et al.*, 2007; Schlachterman *et al.*, 2008]. 이러한 병합처리는 두 가지 측면에서 매우 중요하다. 즉, 처리하는 파이토케미칼의 각각의 농도를 감소시킬수 있다는 점과 처리하는 파이토케미칼들이 각각 다른 신호전달 체계에 의해 효율적으로 암 세포를 사멸시킬 수 있다는 점이다. 따라서 이러한 두 가지 이상의 다른 파이토케미칼의 병합처리 및 관련된 기전연구 분야는 계속적으로 많은 주목을 받을 것으로 생각된다.

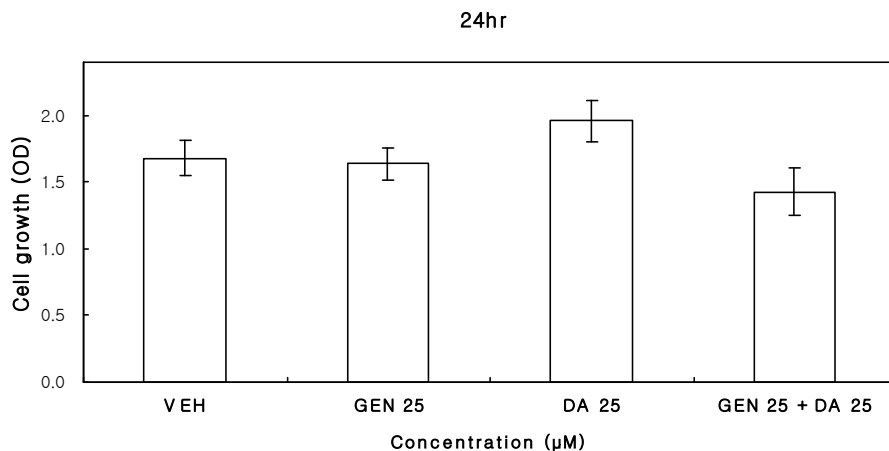


Fig. 4. Effects of combination treatment of genistein (GEN) and daidzein (DA) on HCT116 cell viability. HCT116 cells were plated at 3,000 cells/well in a 96-well plate and incubated with vehicle (VEH, DMSO), 25  $\mu$ M of genistein, 25  $\mu$ M of daidzein or combination of 25  $\mu$ M genistein and 25  $\mu$ M daidzein for 24 hr. After each treatment, cell viability was measured using MTS cell proliferation assay kit.

(라) Genistein과 Daidzein의 병합처리에 의한 *NAG-1* 유전자의 발현증가

Genistein과 Daidzein의 병합처리에 의한 상승적인 세포독성 효과와 항암유전자인 *NAG-1*과의 관련성을 확인하기 위하여 대장암 세포주 HCT116에 25, 50  $\mu$ M의

Genistein, 25  $\mu$ M Genistein과 25  $\mu$ M Daidzein의 병합처리, 그리고 25, 50  $\mu$ M의 Daidzein을 각각 처리한 후, RT-PCR을 수행하였다. 그 결과 25  $\mu$ M의 Genistein과 25  $\mu$ M의 Daidzein의 병합처리에서 *NAG-1* 유전자의 발현이 가장 크게 증가하였다. 또한 vehicle에 비해 25  $\mu$ M와 50  $\mu$ M의 Genistein에서 *NAG-1*의 발현이 증가하였으며, 50  $\mu$ M Daidzein을 처리한 경우에서도 *NAG-1* 유전자의 발현이 유도됨을 확인할 수 있었다(Fig. 5A). 또한 *NAG-1*의 발현 증가를 정량적으로 확인하기 위하여 real-time PCR을 수행하였다. 그 결과 RT-PCR과 마찬가지로 25  $\mu$ M Genistein과 25  $\mu$ M Gaidzein의 병합처리에서 *NAG-1*의 발현이 가장 크게 증가하였다(Fig. 5B). 이러한 결과는 Genistein과 Daidzein의 병합처리에 의해 항암유전자인 *NAG-1*의 상승적인 발현이 유도된다는 것을 보여준다. 따라서, Genistein과 Gaidzein의 병합처리에 의한 상승적인 세포 독성효과는 항암유전자인 *NAG-1* 유전자의 과대발현과 부분적으로 관련이 있다고 생각된다.

따라서, 이러한 연구결과는 콩의 이소플라본 뿐만 아니라 대두식품에 의한 암 화학예방법의 기전을 이해하는데 도움을 줄 것으로 생각된다.

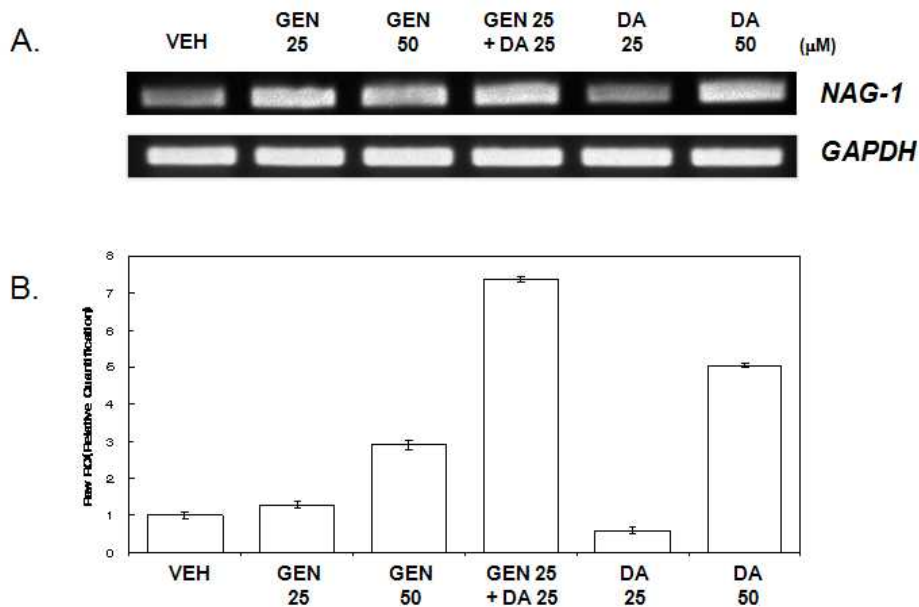


Fig. 5. Up-regulation of *NAG-1* by combination treatment of genistein (GEN) and daidzein (DA). HCT116 cells were treated with VEH (vehicle, DMSO), 25, 50  $\mu$ M of genistein, combination of 25  $\mu$ M genistein and 25  $\mu$ M daidzein or 25, 50  $\mu$ M of daidzein for 24 hr. (A) Total RNA was prepared from treated cells and used for RT-PCR with *NAG-1* gene specific primers. (B) Expression of *NAG-1* gene was detected with real-time PCR.

## 나. 이소플라본 Genistein에 의한 항비만 기전 연구

### (1) 재료 및 방법

#### (가) 세포배양 및 파이토케미칼

마우스 전지방세포인 3T3-L1은 한국식품연구원으로부터 분양 받았다. 세포주 배양은 10% BS (Bovine Serum, Gibco, USA), 1% penicillin 및 streptomycin (WelGene, Korea)이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, USA)을 사용하였으며, 배양은 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건 하에서 배양하였다. 파이토케미칼인 Genistein, Resveratrol, Capsaicin, Daidzein과 대조구로 사용된 DMSO (Dimethyl Sulfoxide)는 Sigma사(USA)로부터 구입을 하였다. 각 파이토케미칼은 DMSO에 녹여 100 mM의 stock solution으로 만들어 -20°C에 보관하며 사용하였다.

#### (나) Cell viability assay (MTS assay)

마우스 전지방세포 3T3-L1에 Genistein을 포함한 4 종류의 다른 파이토케미칼 (Genistein, Resveratrol, Capsaicin, Daidzein)의 50 µM를 24시간 동안 처리한 후 cell viability assay를 수행하였다. 또한 Genistein을 농도별(0, 25, 50, 100 µM)로 처리한 후 cell viability assay를 수행하였다. Cell viability assay는 96 well plate에 well당 3×10<sup>3</sup>개의 세포를 접종하고 24시간 동안 배양한 후, 파이토케미칼을 24시간 처리 후, MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxy methoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium)용액(Promega, USA)을 각 well당 20 µl씩 첨가하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 4시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 NanoQuant Plate<sup>TM</sup> (Tecan Trading AG, Switzerland)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과 수치는 4개의 독립적인 well에서 수행한 값을 Microsoft EXCEL program을 이용하여 분석한 후 mean±SD 값으로 나타내었다.

#### (다) 전지방세포의 분화 유도

마우스 전지방세포 3T3-L1을 90% confluent 상태가 될 때 까지 10% BS (Bovine Serum, Gibco, USA), 1% penicillin 및 streptomycin (WelGene, Korea)이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, USA)배지에 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양했다. 세포가 100% confluence 상태가 되었을때 10% FBS (Fetal Bovine Serum, Gibco, USA), 1% penicillin 및 streptomycin (WelGene, Korea)이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, USA) 배지에 분화유도 물질인 Methylisobutylmethylxanthine(IBMx, Cayman, USA), Dexamethasone(Dex, Cayman, USA) 그리고 Insulin(Ins, Cayman, USA)을 1 µl/ml로 섞어 2일간 분화를 유도하였다. 그리고 분화도 중 Genistein이 미치는 영향을 알아보기 위해 배지에 Genistein 50 µM과 DMSO를 각각 처리하였다. 그 후 2일 후에

Insulin 1  $\mu\text{l/ml}$ 를 첨가한 배지와 Genistein 50  $\mu\text{M}$ 과 DMSO를 각각 처리하여 배지를 교환하였고 분화유도 4일후에 Genistein 50  $\mu\text{M}$ 과 DMSO만을 각각 처리한 배지로 배양액을 교환해주어 4일간 배양시켰다. 또한, 배지는 2일 간격으로 새로운 배지로 교환해주었다.

(라) Oil red O staining

분화된 3T3-L1 세포는 배지를 제거한 후 4% formaldehyde로 20분 동안 상온에서 고정 시켰다. 그 후 isopropanol로 5분간 cell dry시킨 후 Oil red O staining solution(Sigma, USA) 을 이용하여 지방세포를 염색시킨뒤 DW로 4~5회 wash한 후 destaining한 후, 역상 현미경 (DFC-295, Leica, Germany)을 이용하여 100배의 배율 하에서 세포의 염색여부를 비교 관찰하였고, 현미경에 설치된 카메라를 이용하여 well 단위로 염색여부를 촬영하였다.

(마) Total RNA 추출

마우스 전지방 세포주 3T3-L1을 100 mm dish에  $1 \times 10^6$  cells /ml 만큼 cell을 분주하고 추가적으로 48시간 배양한 후 Genistein 50  $\mu\text{M}$ 과 DMSO를 각각 처리한 후 24시간 배양하여 배지를 제거하고 Trizol reagent (Invitrogen, USA)을 이용하여 제조사의 manual에 따라 total RNA를 추출 하였다. 그 후 RNase mini kit Qiagen, USA)을 이용하여 RNA cleanup을 실시 하였다. 정제된 total RNA는 NanoQuant Plate™ 를 이용하여 정량하였다. 정량화한 RNA는 oligo DNA microarray 실험 혹은 reverse-transcription PCR, quantitative real-time PCR에 사용하였다.

(바) Oligo DNA microarray 실험 및 데이터 분석

Oligo DNA microarray 실험은 대전에 위치하고 있는 지노믹트리사 (GenomicTree, Inc, Korea)에 위탁하여 수행하였고, 미국 Microarrays사의 Agilent Mouse whole genome 4 X 44K arrays (Agilent Techonologies, Palo Alto, USA)를 사용하였다. Hybridization을 마친 microarray는 GenePix 4000B scanner (Axon, USA)를 이용하여 microarray의 이미지를 scan한 후, Gene Spring 7.3 program (Agilent, USA)을 이용하여 fluorescence 발현정도를 측정하여 분석하였다. 얻어진 data는 실험적 오류를 최소화하기 위하여 Lowess function을 기반으로 하는 intensity dependent normalization 방법을 이용하여 표준화하였다.

(사) Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

수확한 세포주로부터 추출한 total RNA 1  $\mu\text{g}$ 을 주형으로, PrimeScript™ RT-PCR Kit (TaKaRa, Japan)을 이용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 cDNA를 제조 하였다. Total RNA를 1  $\mu\text{g}$ 이 되도록 sample을 준비하고 oligo dT (2.5  $\mu\text{M}$ )와 dNTP mixture (10 mM)을 1  $\mu\text{l}$ 씩 첨가한 뒤 증류수를 이용하여 최종 부피를 10  $\mu\text{l}$

으로 하고 65°C에서 10분간 반응시켰다. 이후 4°C에서 방치하고 5X PrimeScript™ buffer 4 µl, RNase Inhibitor (40 units/µl) 0.5 µl, PrimeScript™ RTase 0.5 µl, 그리고 RNase free dH<sub>2</sub>O 5 µl를 첨가하여 45°C에서 30분 동안 cDNA를 합성시켰다. 합성된 cDNA를 주형으로 하여 유전자 특이적인 oligo primer를 이용하여 PCR (polymerase chain reaction) 과정을 수행하였다. PCR에 사용된 primer는 Table 1과 같고, Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>)를 통해 디자인하여 Bioneer (Korea)사로부터 제조하여 사용하였다. GAPDH 유전자는 internal control로서 사용하였다. PCR은 PrimeScript™ RT-PCR Kit (TaKaRa, Japan)을 이용하여 10× PCR buffer II 5 µl, dNTP mixture 4 µl, TaKaRa EX Taq HS 0.25 µl, dH<sub>2</sub>O 8.5 µl, 10 pmole forward primer 1 µl, 10 pmole reverse primer 1 µl,를 첨가하여 최종부피를 20 µl로 하였고 cDNA 5 µl를 PCR tube에 첨가하여 PCR 반응의 최종부피를 25 µl로 하였다. PCR 반응은 94°C에서 5분 denaturation시키고, 94°C에서 30초, 58°C에서 30초, 72°C에서 30초의 cycle을 30번 반복한 후, 마지막으로 72°C에서 10분간 반응시켰다. 최종적인 PCR product는 1.8% agarose gel에서 전기영동 하고 ethidium bromide (EtBr, Bioneer, Korea)로 염색하여 Gel Image Analysis System (CoreBio, Korea)을 이용하여 사진 촬영하였다.

Table 1. Sequences of oligonucleotide primers used for RT-PCR and real-time PCR

Gene Name	GenBank Acc. No.	Sequence
<i>GAPDH</i>	NM_008084	F: 5'-CTGGAGAAACCTGCCAAGTA-3' R: 5'-TGTTGCTGTAGCCGTATTCA-3'
<i>Sirt-1</i>	NM_019812	F: 5'-TTTAAGGCTGTTGGTTCCAG-3' R: 5'-CTGCCACAGGAAGTAGAGGA-3'

(자) 정량적인 real-time PCR

Quantitative real-time PCR은 ABI Prism 7500 cyclor (Applied Biosystem, USA)를 이용하여 수행하였다. Primer는 Table 1과 같고, 각각의 T<sub>m</sub> 값은 Primer express 1.5 software program (Applied Biosystems, USA)을 이용하여 확인하였다. 주형으로 사용하는 cDNA는 RT-PCR시 수행한 과정과 같은 방법으로 합성하고, 합성된 cDNA에 RNase-free water 60 µl를 첨가하여 희석한 후 사용하였다. PCR mixture는 Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA) 10 µl, 2 pmole forward primer 2 µl, 2 pmole reverse primer 2 µl, 증류수 1 µl를 첨가하여 최종부피를 15 µl로 하였고, PCR mixture 15 µl와 cDNA 5 µl를 96 well optical reaction plate에 첨가하여 PCR 반응의 최종부피를 20 µl로 하였다. Optical adhesive covers (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 plate를 덮고, real-time

PCR machine (Applied Biosystems, USA)을 이용하여 PCR 반응을 수행하였다. 반응 조건은 첫 번째 step으로 50°C에서 2분, 95°C에서 10분간 반응시키고, 두 번째 step으로 95°C에서 15초, 54°C에서 30초, 72°C에서 33초의 cycle을 40번 반복하여 수행하였다. 결과는 ABI Prism 7500 SDS software program (Applied Biosystems, USA)을 이용하여 분석, 정량 하였으며 분석법으로는 comparative Ct (threshold cycle) method가 이용되었다(Livak and Schmittgen, 2001).

(차) *Sirt-1* siRNA transfection

*Sirt-1* small interfering RNA (siRNA)는 Bioneer (Korea)사로부터 구입하였다. 마우스 3T3-L1 세포주에 Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, USA)을 이용하여 *Sirt-1* siRNA 혹은 negative control siRNA를 transfection 하였다. 실험과정은 FBS가 첨가 되지 않은 DMEM 배지 1 ml을 시료의 개수의 두 배로 준비하고 두개의 e-tube에는 lipofectamine 30 µl를 첨가하고 두개의 e-tube에는 siRNA 6 µl를 첨가하였다. 24시간 동안 transfection시킨 후 DMSO 혹은 50 µM의 Genistein을 처리하여 다시 24시간 동안 배양시킨 후 세포를 수확하였다. 수확한 세포주로부터 추출한 total RNA는 real-time PCR 및 PCR에 이용되었다.

(2) 연구 결과

(가) 파이토케미칼이 마우스 전지방세포주인 3T3-L1 생존율에 미치는 영향

마우스 전지방세포 3T3-L1세포주의 생존율에 미치는 파이토케미칼의 영향을 확인하기 위해 Genistein 50 mM, Resveratrol 50 mM, Capsaicin 50 mM, Daidzein 50 mM을 각각 24 시간 동안 처리하여 MTS assay를 수행하였다. 그 결과, 50 mM Genistein 처리군에서 대조군과 비교하여 36%의 세포 사멸효과를 확인 할 수 있었다.

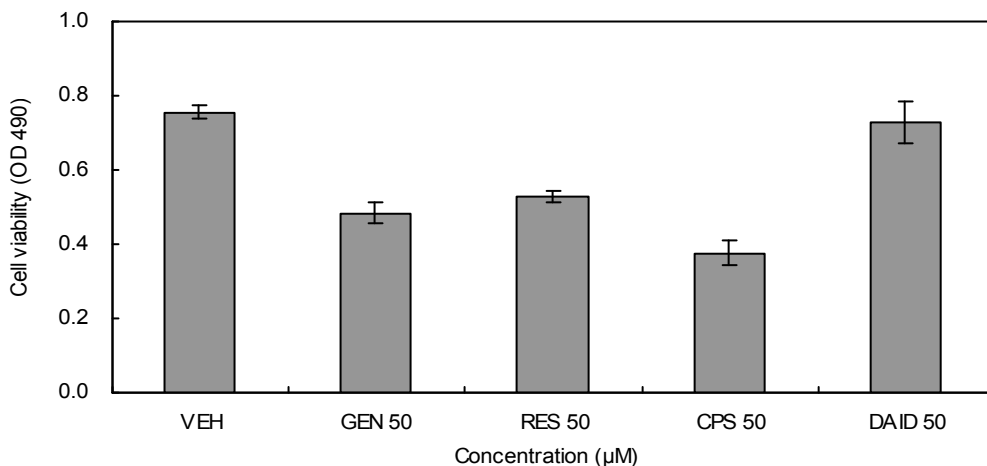


Fig. 3. Effect of phytochemicals on 3T3-L1 cell viability. 3T3-L1 cells were treated with four different phytochemical for 24 hr. After treatment, cell viability was measured using MTS proliferation assay kit.

(나) 마우스 전지방세포의 생존율에 미치는 Genistein의 영향

마우스 전지방세포 3T3-L1세포주의 생존율에 미치는 Genistein의 영향을 알아보기 위해 Genistein을 0, 10, 25, 50, 100  $\mu\text{M}$ 의 농도로 24 시간 동안 처리하여 MTS assay를 수행한 결과 농도 의존적인 세포 생존율을 보였으며, Genistein 10, 25  $\mu\text{M}$ 의 농도에서는 90.4%, 81% 세포생존율로 큰 변화를 보이지 않았으며 Genistein 50  $\mu\text{M}$ 는 69.9%의 세포생존율을 보였다. 이러한 cell viability assay 결과에 근거하여 적정 농도인 Genistein 50  $\mu\text{M}$ 을 선정하여 추후 실험을 진행하였다.

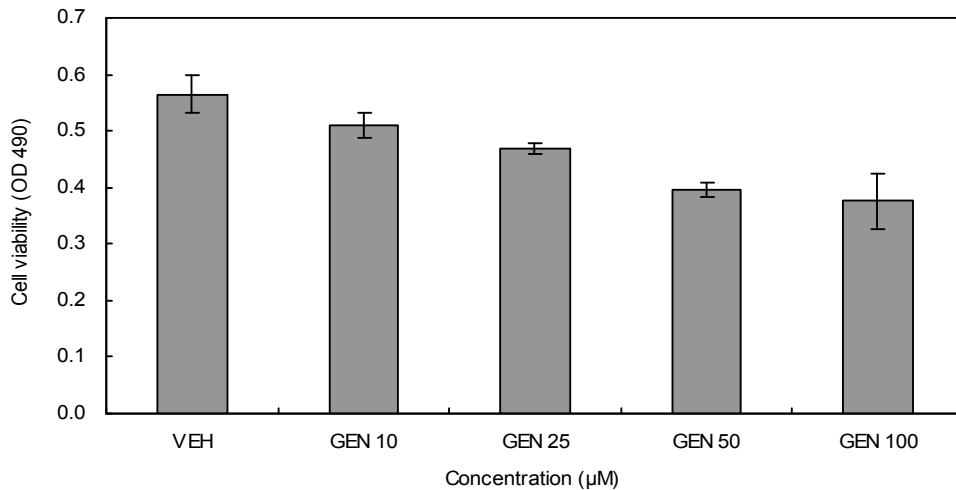


Fig. 4. Effect of genistein on 3T3-L1 cell viability. 3T3-L1 cells were treated with four different dose of genistein for 24 hr. After treatment, cell viability was measured using MTS proliferation assay kit.

(다) 마우스 전지방세포의 분화에 미치는 Genistein의 영향

마우스 전지방세포 3T3-L1 세포주가 지방세포 형성과정에 Genistein이 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위해 지방세포형성을 유도하면서 Genistein 50  $\mu\text{M}$ 와 대조군으로 알아보기 위해 DMSO를 각각 처리 하였다. 그 결과 DMSO를 처리한 세포는 지방세포 형성이 일어난 반면 Genistein 50  $\mu\text{M}$ 를 처리한 세포에서는 지방세포 형성이 저해되는 것을 확인하였다. 이 결과로 Genistein이 3T3-L1 세포주가 지방세포형성을 저해하는 효과가 있다고 판단 추후 실험을 진행하였다.



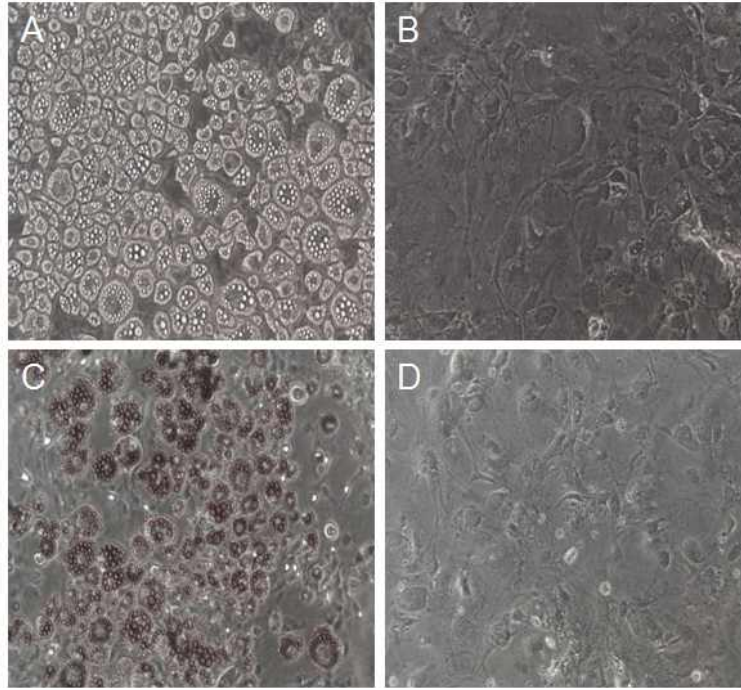


Fig. 5. Effect of genistein on 3T3-L1 adipogenesis. Differentiated cells were stained with Oil-red O(C, D). 3T3-L1 adipocyte were treated with DMSO. (A, C) 3T3-L1 adipocyte were treated with genistein(B, D).

(라) Oligo DNA microarray를 이용한 유전체 전체 수준에서의 유전자 발현 분석

Genistein에 의한 3T3-L1 세포주의 세포생존율 및 지방세포형성 억제 효과를 유전자 발현 수준에서 이해하고자, 3T3-L1 세포주에 50  $\mu$ M의 Genistein을 처리한 후, oligo DNA microarray 실험을 수행하였다. 마우스 전지방 3T3-L1 세포주에 Genistein의 처리에 의해 발현되는 obesity 관련 유전자 분석 결과, 발현양의 차이를 보이는 유전자는 총 688개로 나타났으며 50  $\mu$ M Genistein의 처리에 의해 1.5배 이상 up-regulation된 유전자는 105개, 1.5배 이상 down-regulation된 유전자는 133개로 선별되었다. Up-regulation된 유전자 중 일부를 Table 2에 나타내었다.

Up-regulation된 유전자 중 *Sirt-1*은 히스톤과 비히스톤 단백질을 탈아세틸화하여 염증매개물질을 조절하는 NAD<sup>+</sup> 의존성 단백질/히스톤 탈아세틸화효소로서, 항노화, 항염 단백질로 알려져 있으며(Blander G *et al.*, 2004) 최근연구에서는 Sirt-1이 비만과 관련된 대사적 질환과 연관이 있는 것으로 널리 알려졌다(Bordone L *et al.*, 2006).

Table 2. Several up-regulated genes by genistein treatment

No.	Gene Name	GenBank Acc. No.	Sequence Description	Fold Change
1	Ggt1	NM_008116	gamma-glutamyltransferase 1	8.10
2	Drd2	NM_010077	dopamine receptor 2	5.64
3	Igfbp1	NM_008341	insulin-like growth factor binding protein 1	5.10
4	Ccl25	NM_009138	chemokine (C-C motif) ligand 25	3.83
5	Nr0b1	NM_007430	nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1	3.46
6	Igf1r	NM_010513	insulin-like growth factor I receptor	3.35
7	Fasn	AK080374	fatty acid synthase	3.17
8	Tnfrsf1b	NM_011610	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1b	3.15
9	Pard3	NM_001013581	par-3 (partitioning defective 3) homolog (C. elegans)	2.87
10	Hbegf	NM_010415	heparin-binding EGF-like growth factor	2.62
11	Pnpla2	NM_025802	patatin-like phospholipase domain containing 2	2.61
12	Sirt1	NM_001159589	sirtuin 1 (silent mating type information regulation 2, homolog) 1 (S. cerevisiae)	1.62

(마) 파이토케미칼에 의한 *Sirt-1* (sirtuin-1) 유전자의 발현

DNA microarray 실험 결과를 검증하기 3T3-L1 세포주에 여러 가지 파이토케미칼을 처리하여 *Sirt-1* 유전자를 선택하여 RT-PCR을 수행하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 유전자의 발현이 여러 파이토케미칼중 50  $\mu$ M Genistein에 의해 up-regulation 되는 것을 확인할 수 있었고, 반면에 control로 사용한 *GAPDH* 유전자의 발현 변화는 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 DNA microarray 실험 결과와 일치하였다.

(바) Genistein에 의한 *Sirt-1* 유전자의 발현

포유류의 경우 *Sirt-1*의 활성화를 통해 노화를 지연시키며 스트레스로부터 유도되는 세포사멸을 예방하며, 생존을 연장시킨다. 또한 *Sirt-1*의 과대발현은 adipogenesis를 억제하며, lipolysis를 촉진하여 지방의 소모를 일으킨다. 이러한 현상은 insulin 저항성을 감소시키고 수명을 연장하는 것으로 알려져있다(Das UN, 2005). 식이제한을 할때 체내에 나타나는 여러 효과의 조절자인 *Sirt-1* [Bordone L and Guarente L, 2005]의 발현을 확인하고, adipogenesis억제 등과의 관계를 이해하는 것은 항비만을 이해하는데 매우 중요할 것이다. 여러 가지 phytochemical에 의한 *Sirt-1*의 발현 증가를 확인하기 위해 mouse 전지방 3T3-L1 세포주에 처리한 후, RT-PCR을 수행한 결과 genistein 50  $\mu$ M에서 가장 높은 발현을 보였다(Fig. 5). Genistein은 mouse 전지방세포 3T3-L1의 지방세포 형성과정에서도 지방세포의 형성을 저해하는 결과를 보였다. 이러한 *Sirt-1*의 발현 증가를 정량적으로 확인해보기

위하여 real-time PCR을 수행하였다. 그 결과 RT-PCR의 결과와 마찬가지로 Genistein 50  $\mu$ M에서 가장 높은 발현률을 보였다.

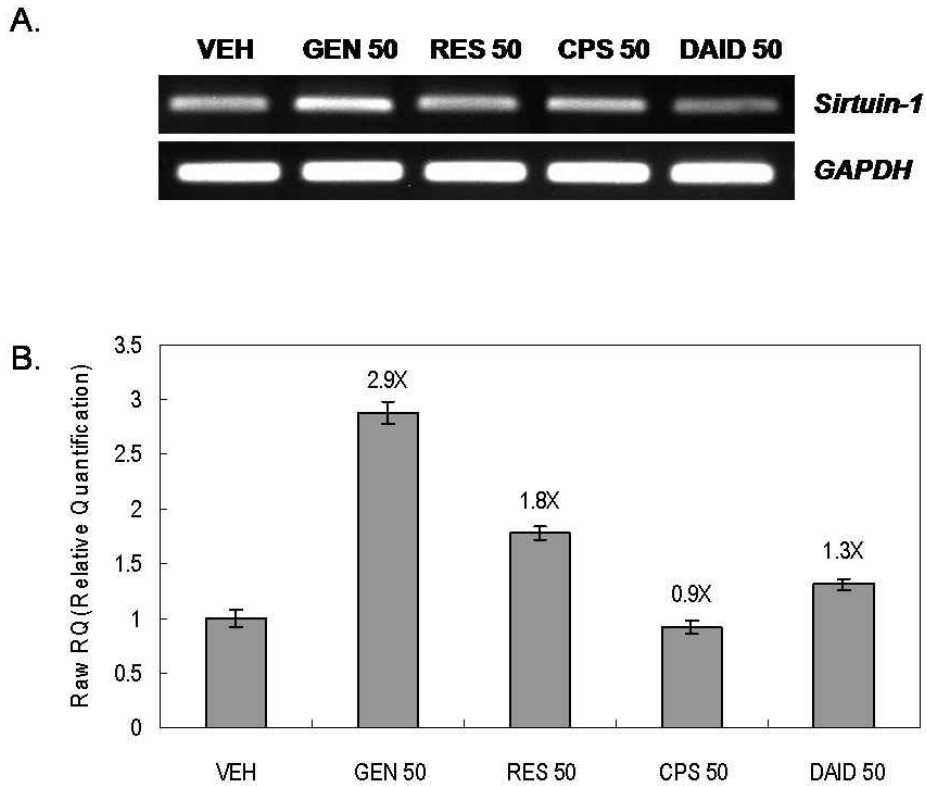


Fig. 5. Up-regulation of *Sirt-1* by several phytochemicals.. 3T3-L1 cells were treated with five different phytochemicals. (A) Total RNA was prepared from treated cells and used for RT-PCR with sirtuin-1 gene specific primers. (B) Total RNA was prepared from treated cells and used for real-time PCR with sirtuin-1 gene-specific primers.

(사) *Sirt-1* siRNA transfection에 의한 *Sirt-1* 유전자의 발현 억제 연구

이전의 실험 결과는 Genistein에 의해 *Sirt-1* 유전자가 발현이 유도 된다는 것을 보여준 것으로 Genistein과 *Sirt-1* 유전자발현과의 직접적인 관련성을 규명하기 위해 *Sirt-1* small interfering RNA(siRNA)를 이용한 실험을 수행하였다. Mouse 전지방세포 3T3-L1에 *Sirt-1* siRNA를 transfection하여 24시간 후에 Genistein 50  $\mu$ M을 처리하여 다시 24시간 배양 후 세포를 수확하여 RT-PCR과 정량적인 검증을 위한 real-time PCR을 수행하였으며 사용된 *Sirt-1*과 internal control인 *GAPDH*

primer 서열은 Table 1과 같다.

*Sirt-1* siRNA의 경우 control과 비교하였을때 *Sirt-1*의 발현이 감소한 것을 확인할 수 있었다. 정량적 real-time PCR의 경우에서도 RT-PCR의 결과와 마찬가지로 발현의 감소를 볼 수 있었다. 이 결과 transfection에 의해 *Sirt-1*의 발현이 감소한 것을 확인할 수 있었다.

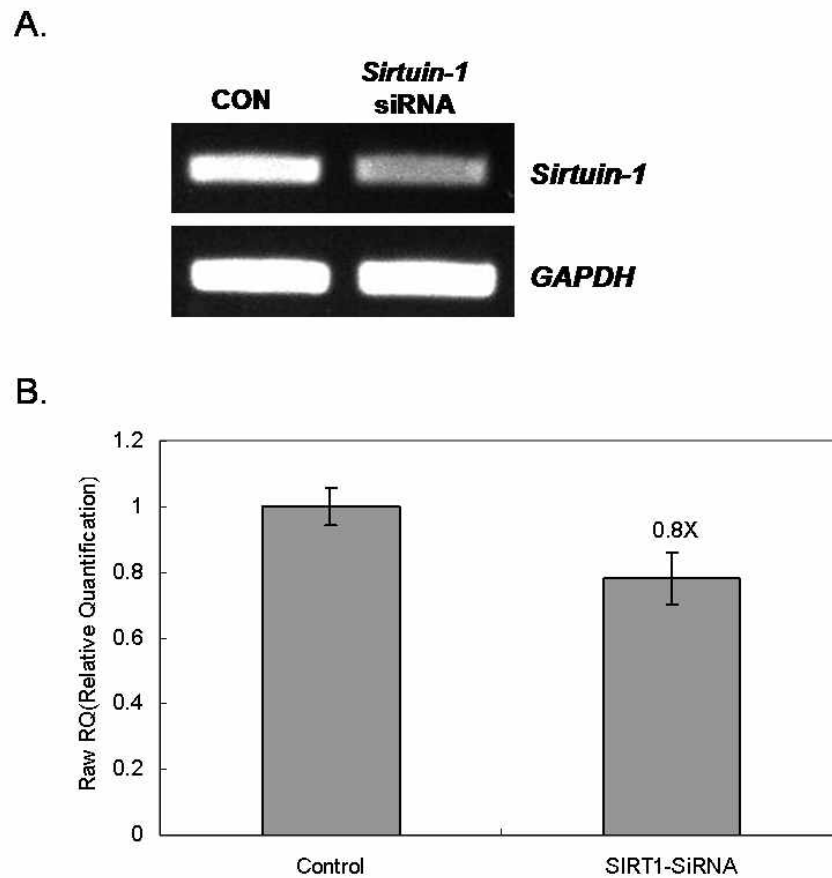


Fig. 6 Changes of gene expression by *Sirt-1* siRNA transfection. 3T3-L1 cells were transfected with negative control or *Sirt-1* siRNA for 24 hr. (A) Total RNA was prepared from treated cells and used for RT-PCR with sirtuin-1 gene specific primers. (B) Total RNA was prepared from treated cells and used for real-time PCR with *Sirt-1* gene-specific primers.

(자) *Sirt-1* 유전자의 발현 억제가 세포분화에 미치는 영향연구

*Sirt-1*의 발현은 지방세포형성과정을 억제한다고 보고되었다[Qiao L and Shao J, 2006]. *Sirt-1* siRNA실험을 통해 확인된 Genistein에 의한 *Sirt-1*의 발현의 관련

성으로 보아 genistein에 의한 *Sirt-1*의 발현은 지방세포 형성과정을 억제할 가능성이 있다. 그래서 *Sirt-1*의 발현과 3T3-L1 세포의 지방세포 형성과정에는 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위해 *Sirt-1*, negative control-siRNA를 transfection시킨 세포와 보통의 3T3-L1 세포를 분화를 시키며 Genistein을 처리하였다. 그 결과 negative control-siRNA로 transfection된 세포와 대조구 세포에서는 Genistein에 의해 지방세포가 거의 형성되지 않은 반면 *Sirt-1*이 knock down된 세포에서는 다른 세포에 비해 지방세포형성이 다시 일어남을 확인하였다. 이 결과는 Genistein에 의한 *Sirt-1*의 발현이 mouse 전지방세포 3T3-L1의 지방세포형성의 억제 작용에 직접적인 영향을 준다는 것을 시사한다.

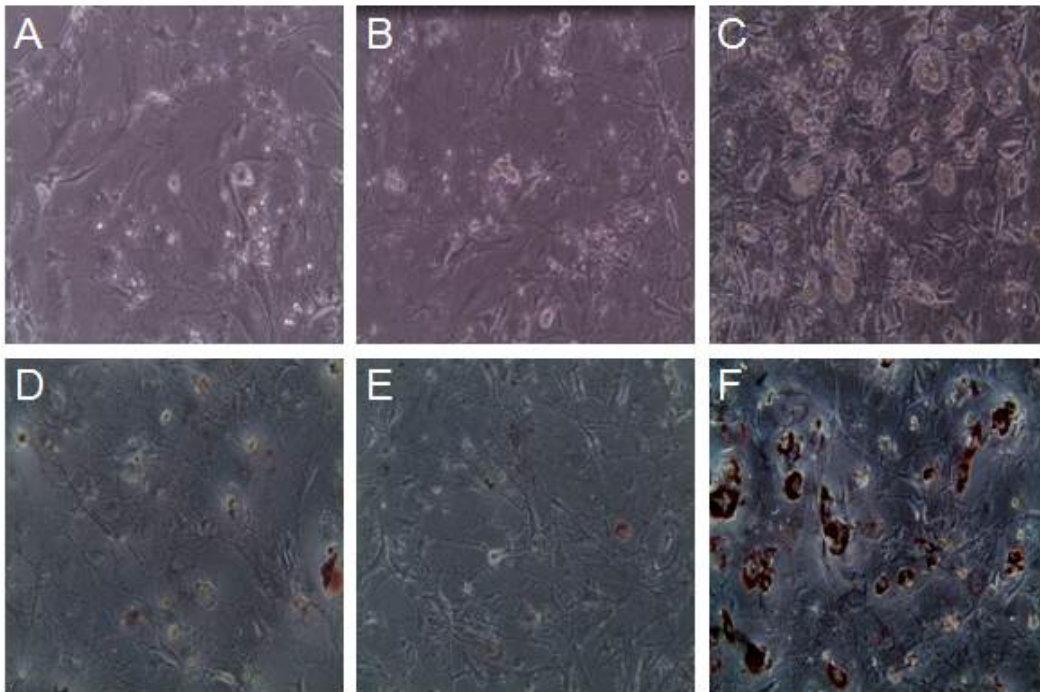


Fig. 7. Effect of Genistein on 3T3-L1 differentiation by sirtuin-1 siRNA transfection. Differentiated cells were stained with Oil-red O(D, E, F). (A) 3T3-L1 preadipocyte were treated with DMSO. (B) Negative control transfecting 3T3-L1 preadipocyte were treated with genistein. (C) *Sirt-1* siRNA transfecting 3T3-L1 preadipocyte were treated with genistein. (D) 3T3-L1 preadipocyte were treated with DMSO by Oil red O staining. (E) Negative control transfecting 3T3-L1 preadipocyte were treated with genistein by Oil red O staining. (F) *Sirt-1*-siRNA transfecting 3T3-L1 preadipocyte were treated with genistein by Oil red O staining.

## 다. 콩 피틴산의 추출 및 항균효과

### (1) 재료 및 방법

#### (가) 피틴산의 추출

피틴산의 추출은 소재의 이온화에 따른 용해도를 고려하여 추출하였다. 콩을 건조분쇄기로 분쇄한후, 1mm sieve에 통과시킨 분쇄물을 1:10 혹은 2:8의 비율로 추출용매를 첨가한후 1시간 동안 교반 추출하였다. 추출 용매는 증류수, 50mM 구연산완충용액(pH5.5), 0.65N HCl을 이용하였다.

#### (나) 피틴산의 정량

추출된 피틴산의 정량은 산가수분해 혹은 효소가수분해를 통하여 유리된 무기인산을 발색정량하여 측정하였다.(Kim & Lei, 2005).

#### (다) 피틴산의 효소가수분해

피틴산에 가수분해에 사용된 피틴산분해효소는 E. coli, A. niger 및 B. subtilis에서 유래된 재조합효소를 분쇄콩 1g당 10unit의 효소를 사용하여 37℃에서 1시간 가수분해 한후 발색정량법과 HPLC분석법을 이용하여 효소의 활성화도, 가수분해율 및 가수분해산물의 정량, 정성적 분석을 실시하였다. 피틴산 추출액의 가수분해도 콩분말의 가수분해와 같은 조건에서 반응한 후 분석하였다.

#### (라) 피틴산 및 피틴산 가수분해물의 항산화력 검증

① Electron donating ability 측정 : 전자공여능(EDA: electron donating ability)은 Blois의 방법을 변형하여 측정하였다. 각 시료용액 2 mL에 0.2 mM의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 1 mL 넣고 교반한 후 30분간 방치한 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타낸다.

② Superoxide dismutase(SOD) 유사활성 측정 : SOD 유사활성은 Marklund의 방법에 준하여 측정하였다. 각 시료용액 0.2 mL에 Tris-HCl 완충용액(50 mM tris + 10 mM EDTA, pH 8.5) 2.6 mL와 7.2 mM pyrogallol 0.2 mL를 가하여 25℃에서 10분간 반응시킨 후 1 M HCl 0.1 mL를 가하여 반응을 정지시키고 반응액 중 산화된 pyrogallol의 양을 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. SOD 유사활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타낸다.

#### (마) 피틴산 및 피틴산 가수분해물의 항암 효과 측정

암세포 주에 대한 증식 억제효과는 Carmichael의 방법에 따라 측정하였다. 각 암세포주를 96 well plate에  $0.6 \sim 8 \times 10^3$  cells/well이 되게 0.18 mL 분주하고 시료를 농도 별로 조절하여 0.02 mL 첨가한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양하였다. 대조군은 시료와 동량의 증류수를 첨가하여 동일한 조건으로 배양하고, 여기에 5 mg/mL 농도로 제조한 MTT 용액 0.02 mL를 첨가하여 4시간 배양한 후 배양액을 제거하고 각 well당 DMSO:EtOH (1:1) 0.15 mL를 가하여 실온에서 30분간 반응 시킨 뒤 ELISA reader로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 암세포주의 성장억제 효과는 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

#### (바) 피틴산 및 피틴산 가수분해물의 항균활성 검증

항균력 측정은 paper disc법으로 측정하였다. 즉, 평판 배지에 배양된 각 균주를 1 백금이량 취해서 액체 배지 10 mL에서 18~24시간 배양하여 활성화시킨 후 다시 액체 배지 10 mL에 균액을 0.1 mL 접종하여 3~6시간 배양한 후 평판배지 1개당 균액을 약  $10^7$  cells되게 접종하여 멸균 면봉으로 균일하게 도말하였다. 멸균된 filter paper disc (Tokyo, 8 mm, Japan)를 고체 평판배지에 올려놓은 다음 0.05 mL/disc가 되도록 시료를 농도별로 흡수시켜 35°C에서 18~24시간 배양하여 disc주위의 clear zone (mm)의 직경을 측정하였다.

### (2) 연구 결과

#### (가) 피틴산의 추출 및 정량

분쇄한 콩을 구연산완충액으로 상온에서 1시간 동안 교반 추출한 후, 여과액을 이용하여 발색정량한 결과 0.32%의 피틴산 함량을 나타내었다. 추출 용매에 따른 추출율은 구연산완충용액(pH5.5)에 비해 증류수 추출액의 경우 62% 정도의 추출수율을 나타내었다. 이러한 결과는 피틴산이 산성pH에서 이온화되어 용해도가 증가한다는 결과와 일치하였다.

#### (나) 피틴산의 항산화력 검증

피틴산은 표 1과 2에 나타낸 바와 같이 DPPH활성과 SOD유사활성효능을 나타내긴 하였지만, 문헌상 알려진 바와는 달리 상대적으로 낮은 항산화력을 나타내었음.



표 1. 피틴산의 항산화력 검증 (DPPH활성)

농도	150ppm	750ppm	1500ppm	7500ppm	15000ppm
sample	0.8359	0.784033	0.7896	0.7338	0.705067
sample blank	0.8227	0.00685	0.0102	0.0474	0.0655
sample-sample blank	0.8227	0.777183	0.7794	0.6864	0.639567
저해율	10.21336	15.18089	14.93897	25.08867	30.1999

표 2. 피틴산의 항산화력 검증 (SOD 유사활성)

농도	150ppm	750ppm	1500ppm	7500ppm	15000ppm	20000ppm
sample	0.299767	0.2974	0.292167	0.286867	0.2829	0.2802
sample blank	0.00295	0.0024	0.0046	0.00455	0.00905	0.0108
sample-sample blank	0.296817	0.295	0.287567	0.282317	0.27385	0.2694
저해율	0.840757	1.447661	3.930958	5.684855	8.513363	10

(다) 피틴산의 항균 효능

식품의 부패 및 식중독의 원인균으로 알려진 미생물을 대상으로 피틴산의 항균 활성을 검증한 결과 Fig. 1 에서와 같이 테스트한 모든 균들에 항균활성을 가지고 있었으며, 특히 *B. subtilis*에 대한 항균활성이 우수한 것으로 나타났다.

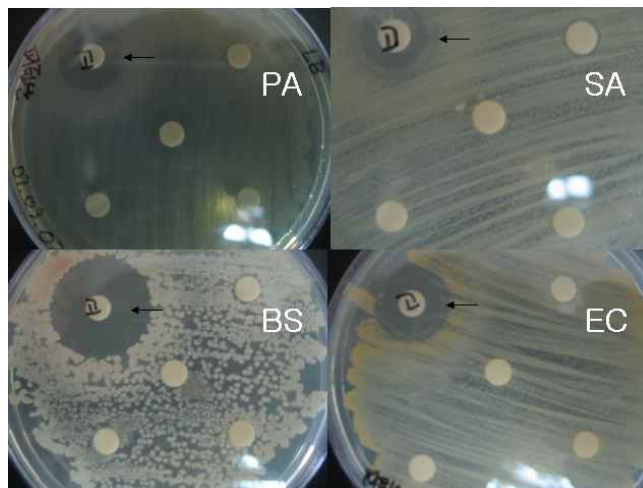


Fig. 1. 피틴산의 항균활성 (SA: *S. aureus*, PA: *P. aeruginosa*, BS: *B. subtilis*, EC: *E. coli*)



## 라. 대두 및 대두 발효제품의 생리활성 검증

### (1) 재료 및 방법

(가) 체중 및 체지방 조절 기능성 평가: in vitro 시험법

① 동물세포 : 마우스 3T3-L1 지방전구세포는 American Type Culture Collection (ATCC)에서 구입하였고, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지, 트립신, fetal bovine serum (FBS, 우태아 혈청)은 캄브렉스사 (Cambrex Corporation, East Rutherford, NJ)에서 구입하였다.

② MTT 에 의한 세포 증식 측정 : 대두발효제품 및 항비만 기능성 부재의 용액 처리 농도에 따른 3T3-L1 의 세포 활성 변화를 확인하고자 96 well plate 에 3T3-L1 세포를  $5 \times 10^4$  cells/well로 배양 한 후, 각각의 물질을 다양한 농도(25, 50, 100, 200 $\mu$ g/mL)로 처리한 다음 배양하여 MTT assay를 수행하였다.

③ 세포배양 : 실험에 사용된 3T3-L1 세포의 배양액은 10% heat-inactivated fetal boins serum (FCS), 1% 항생제 (penicillin, streptomycin)를 포함하는 Dulbecco's modified Eagle medium-high glucose (DMEM) 배지를 배양액으로 하여 37 $^{\circ}$ C, humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양한다. 3T3-L1 세포를 6 well plat 에 각각  $1.25 \times 10^4$  세포 수가 되도록 분주한다. 10% FBS, 1% 항생제를 포함하는 DMEM 배지에서 배양한 후 3일 후에 새로운 배양액으로 교체 해주고 다시 3일 후에 90% confluence로 세포가 자랐을 때 분화 유도를 시작한다. 배양액을 흡입한 후 분화용 배양액 (0.25  $\mu$ M dexamethasone, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine, 100 nM insulin, 10% FBS, 1% 항생제를 포함하는 DMEM) 으로 교체 한다. 3일 후에 100 nM insulin, 10% FBS, 1% 항생제를 포함하는 DMEM 배양액으로 교체 한다. 다음, 3일 후에 10% FBS, 1% 항생제를 포함하는 DMEM 배양액으로 교체한다. 분화를 시작한 후 12일부터 완벽한 분화상태의 세포 형태를 관찰할 수 있다.

④ 3T3-L1 분화 확인 : 3T3-L1 세포의 분화 정도는 Oil Red O로 염색하여 측정하였다. 분화된 세포를 관찰하기 위해서는 배양 후 세포표면을 D-PBS로 2회 씻어준 다음 10% formalin/D-PBS로 30분간 고정하고 D-PBS로 씻어준 다음 Oil Red O 를 1ml을 넣고 실온에서 1시간 염색한 다음, 세포를 D-PBS로 씻어준 다음 Fat droplets는 현미경으로 관찰하였다.

(나) 대두 발효 제품의 항염증 효과 검증 : Xanthine Oxidase(XOase) 저해 효과  
XOase 활성저해 측정법은 Stirpe와 Corte의 방법에 준하여 측정한다. 즉, 반응구는 0.1M potassiumphosphate buffer(pH 7.5)에 효소 액 0.1 ml와 추출용액 0.1 ml를 넣고 대조구에는 추출용액 대신 증류수를 0.1 ml 첨가하여 37°C에서 2분간 반응시킨 다음, xanthine 2 mM을 녹인 기질 액 0.4 ml를 첨가한 후 20분간 반응시키고 20% TCA 0.5 ml를 가하여 반응을 종료시킨 다음 원심 분리 (2000rpm, for 5mins) 하여 단백질을 제거한 후 반응 액 중에 생성된 uric acid를 흡광도 292 nm에서 측정하여 변화율을 구하였다.

(다) 체중 및 체지방 조절 기능성 평가: in vivo 시험법

① 고지방식이 유도 비만모델 동물 평가 (C57BL/6J mouse 이용) :

- 실험군; 실험군은 정상식이(Control Diet; AIN-93G)를 섭취하는 군과 고지방식이(High Fat Diet)를 섭취하는 군 및 실험물질을 투여하는 군, 양성대조군으로 나뉜다. 양성대조군으로는 일반의약품으로 개발된 녹차추출물 AR-25(GreenTea Ext. Arkopharma., 상품명 Exolise)를 사용.

- 실험군을 부검하고 채혈하여 혈청 중의 글루코스, 중성지방, 총콜레스테롤 및 HDL 콜레스테롤을 kit 또는 자동혈액생화학분석기를 사용하여 분석. 체중별 도체지방 무게 및 전체지방함량 측정.

혈중 total protein, triglyceride, calcium 측정; 청국장유래 기능성물질을 섭취한 쥐의 혈중 전체 단백질 양, triglyceride, calcium을 kit 또는 자동혈액 생화학분석기를 사용하여 분석.

- 근육 및 지방조직에서 중성지방 함량 측정: 조직으로부터 지방 추출 후 triton X-100 sol. 을 이용하여 녹인 후 enzymatic assay.

② 항당뇨 활성 test (C57BL/6J db/db mouse 이용)

- 실험군; 실험군은 당뇨대조군, 샘플 섭취군, 양성대조군 (metformin)으로 나뉜다.

- 혈액지표분석: 혈중 포도당, 중성지방, 총콜레스테롤 및 인슐린 농도 측정

- 간에서의 글리코겐 함량 측정: Glucose oxidase method를 이용하여 500nm에서 흡광도 측정

- 근육 및 지방조직에서 중성지방 함량 측정

- 췌장의 형태학적 관찰: 조직학적 관찰을 위해 실험동물에서 췌장을 0.1M PBS로 세척하여 혈액을 제거한 후 단계별로 1시간씩 탈수. 이어 xylene으로 치환 후, paraplast (60°C)로 침투시킨 다음 포매하여 조직을 5 mm의 두께로 절편을 제작한 후 파라핀 제거 과정을 거쳐 hematoxylin과 eosin으로 염색.

## (2) 연구 결과

### (가) 대두 발효제품의 세포 증식

대두 발효 제품에 의한 적절한 농도를 찾기 위해서 MTT assay를 수행하였다. 사용된 대두 발효제품은 대두를 발효시킨 균주에 따라 Soy only, Bacillus, 유산균 (LAB) 혹은 Bacillus+LAB로 나뉘어 졌으며, 각 실험 군마다 세가지 다른 농도 (0.25, 0.5, 1.0%)가 사용되었다. 24시간 처리한 결과 전 지방 세포인 3T3-L1 adipocyte의 모든 발효제품 1% 농도에서 세포 증식이 억제 되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

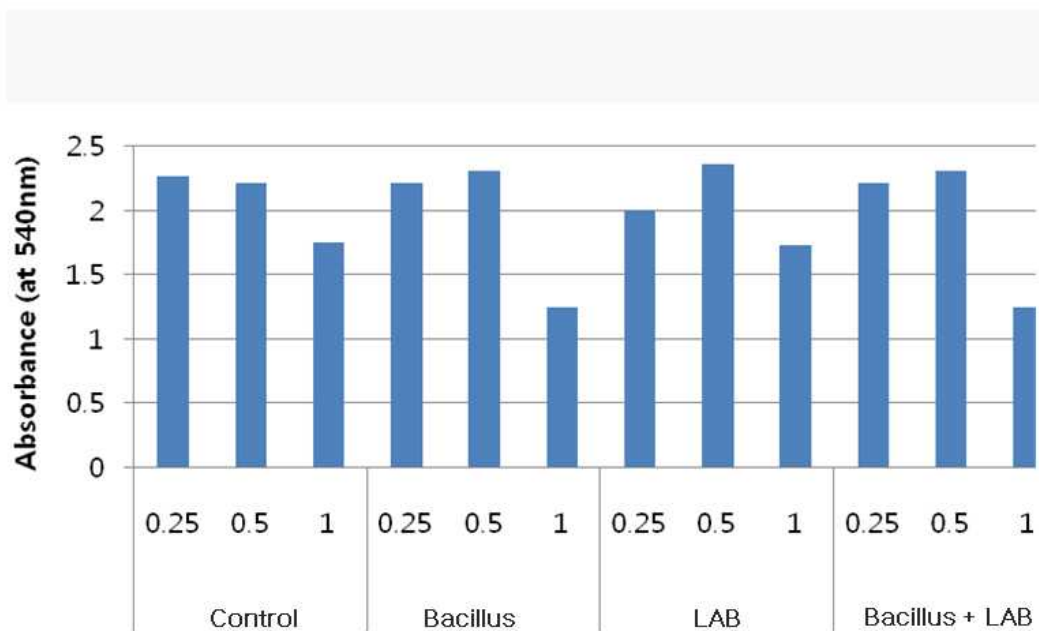


Fig. 1. The effect of soybean products fermented with Lactic acid bacteria(LAB), Bacillus, or both microorganisms on the viability of mouse pre-adipocyte, 3T3-L1, after 24 hr treatment.

### (나) 대두 발효제품의 지방 세포 분화

대두 발효 제품이 지방세포 분화에 있어서 미치는 영향을 알아보기 위해서 전 지방 세포인 3T3-L1 adipocyte에 대두 발효제품을 포함하는 분화 촉진 배지를 6일 동안 처리하였다. 음성 대조군으로는 지방 세포 분화 억제물질로 잘 알려진 retinoic acid가 사용되었다. 지방세포의 분화 여부는 Oil Red O staining 방법으로 확인되었

다 (Fig. 2). 대조군을 참고할 때, 각 실험 군마다 지방세포의 분화가 농도 의존적으로 증가 됨을 볼 수 있다. 특히, 비발효 대두균과 유산균 대두발효균에서는 모든 농도에서 분화 촉진 배지(D.M.)군 보다 확연하게 높은 지방세포 분화율이 보여졌다. 하지만, 특이적으로 Bacillus균과 Bacillus+LAB 혼합 균에서는 0.25의 낮은 농도에서는 분화 촉진 배지 단독 처리 군보다 60, 61.5% 정도의 감소를 보이고 0.5 이상의 높은 농도에서 급격히 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

전 지방 세포인 3T3-L1 adipocyte에 대두 발효제품을 포함하는 분화 촉진 배지를 2일 동안 처리한 후, Oil Red O staining 방법으로 확인된 결과 BL2 균주를 이용한 발효제품에서 높은 지방세포 분화억제율이 나타났다(Fig. 4).

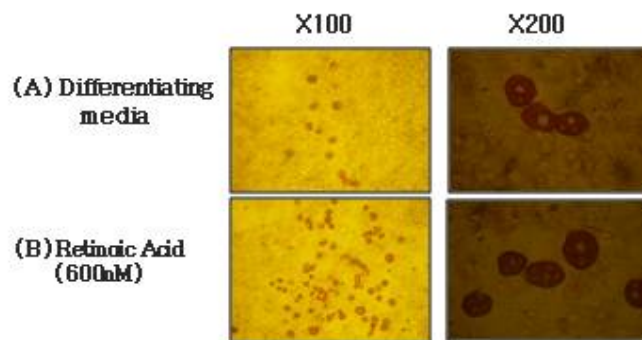
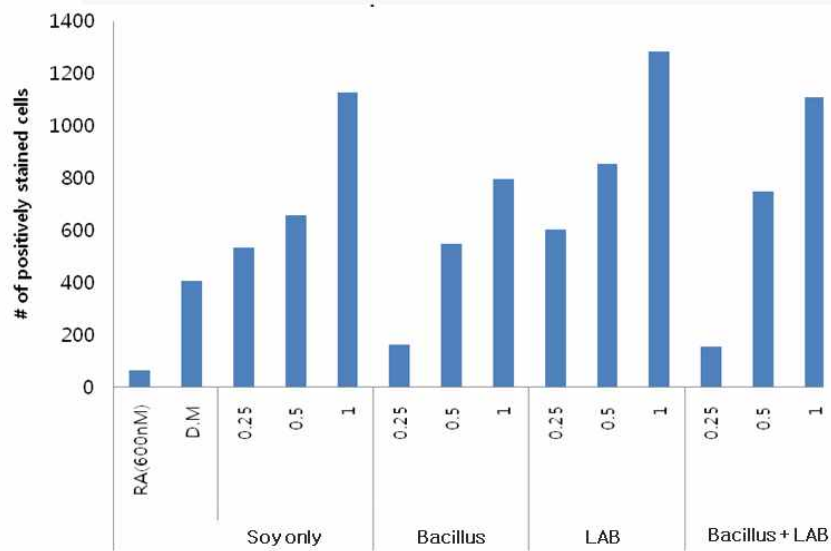
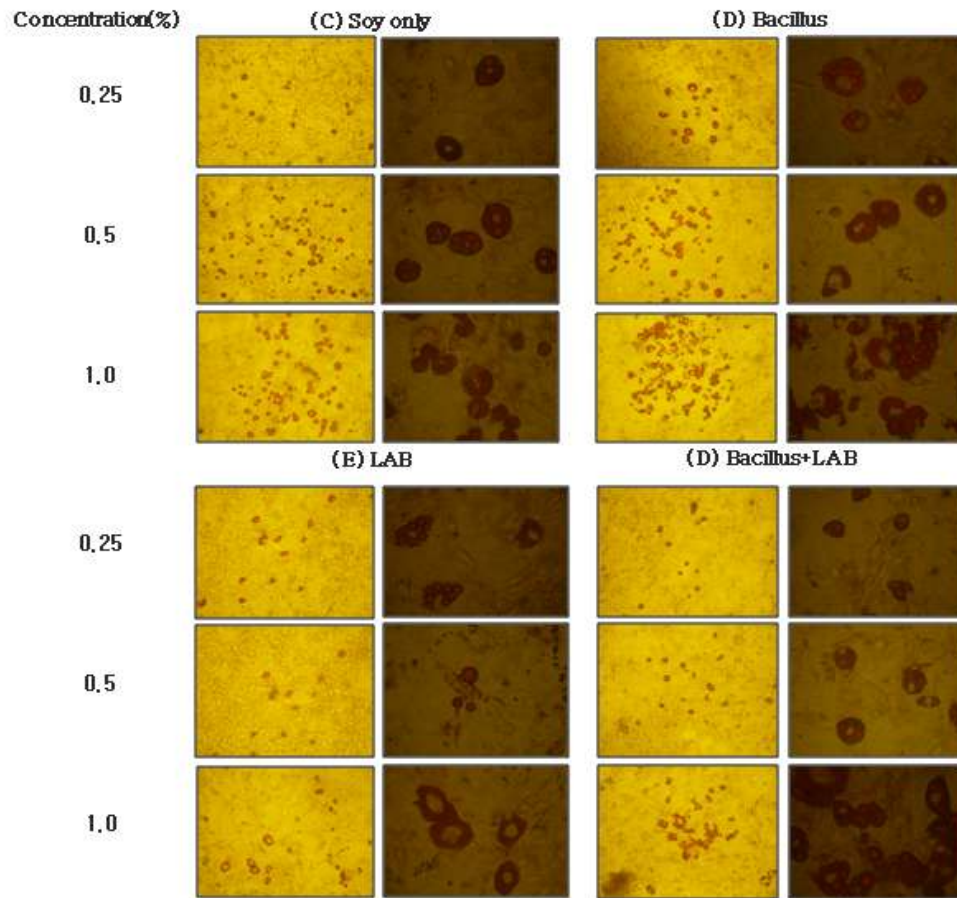
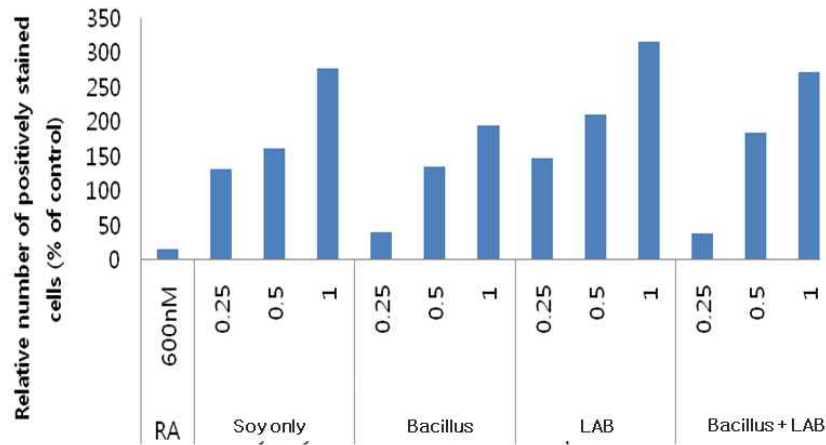


Fig. 2. The effect of soy products fermented with different microorganisms on the differentiation of preadipocytes, 3T3-L1, into the adipocytes after treatment with. The soy products were fermented with Lactic acid bacteria(LAB), Bacillus, or both microorganisms and applied to pre-adipocytes, 3T3-L1. Then, the differentiation into adipocytes were measured by Red Oil O staining. The positively stained with Red Oil O were considered as differentiated adipocytes.



(A) The differentiation of pre-adipocyte, 3T3-L1, after treatment with soy and fermented soy products



(B) The normalized number of differentiated adipocytes

Fig. 3. The effect of soy products fermented with different microorganisms on the differentiation of preadipocytes, 3T3-L1, into the adipocytes. The soy products were fermented with Lactic acid bacteria(LAB), Bacillus, or both microorganisms and applied to pre-adipocytes, 3T3-L1. Then, the differentiation into adipocytes were measured by Red Oil O staining. The positively stained with Red Oil O were considered as differentiated adipocytes. The bar represents the number of cells positively stained in 6-well plate.

➤ Oil Red O staining

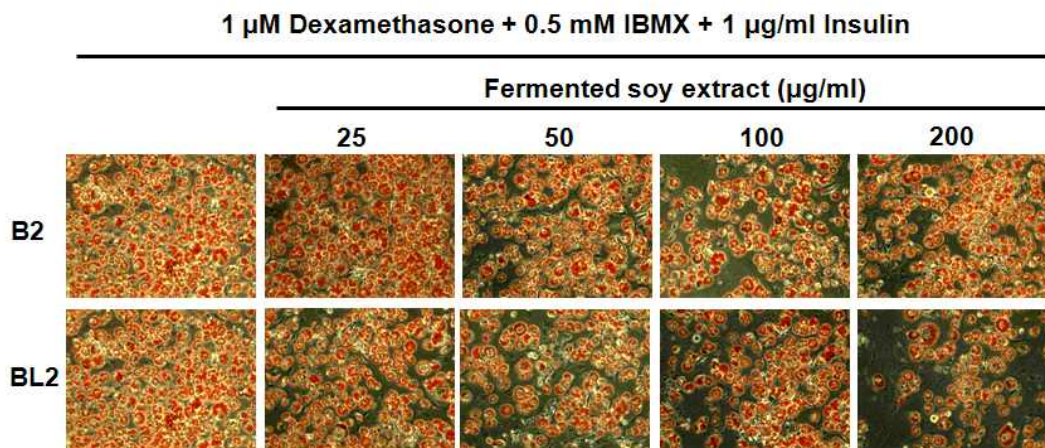


Fig. 4. 대두발효추출물의 지방세포분화 억제능

(다) Xanthine oxidase activity

Xanthine Oxidase는 purine염기의 대사물인 Hypoxanthine으로부터 요산을 생성하는 효소이다. 또한, 과도한 혈중 내 요산은 관절염의 일종인 통풍의 요인이기 때문에 xanthine oxidase의 활성은 관절염의 지표로 여겨지고 있다. 이에 본 실험에서는 네 종류의 대두 및 대두발효제품(Soy only, Bacillus, LAB, Bacillus+LAB)이 xanthine oxidase 활성에 어떠한 영향을 미치는지 조사해 보았다. Fig 2. 를 참고해 볼 때, 1% Soy only군과 0.25% Bacillus+LAB군을 제외한 모든 대두 발효 제품이 오히려 xanthine oxidase의 활성을 증가시키는 것으로 나타났다. Bacillus군에서는 효소의 활성이 농도 의존적으로 증가 된 반면, Soy only 군과 유산균 발효군, 혼합발효군에서는 1%에서 효소 활성의 감소를 보였다. 이러한 결과는 대두 발효 제품이 xanthine oxidase 의 활성을 오히려 증가시킴을 나타내지만, xanthine oxidase외 다른 관절염 지표에 대한 영향을 확인해 볼 수 있다(Fig. 5). 예를 들어, hypoxanthine을 purine 염기의 재 합성에 활용토록 하는 효소인 hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase(HGPRT)의 결핍 시 요산의 과다한 생성을 초래할 수 있다.

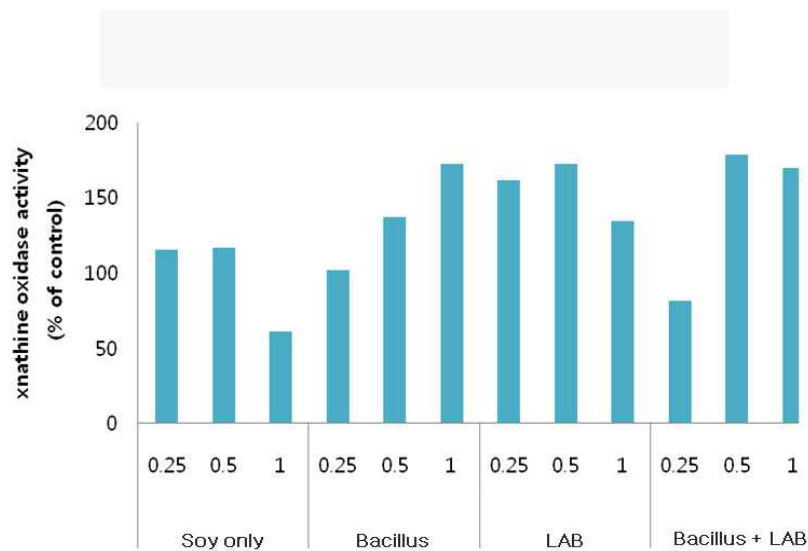


Fig. 5. The effect of soy products fermented with different microorganisms on the Xanthine Oxidase Activity. The activity of xanthine oxidase was determined using the reaction converting hypoxanthine into uric acid. The formation of uric acid was detected at a wavelength of 292nm using spectrophotometer. For each treatment group, different concentrations (0.25, 0.5 and 1%, respectively) of fermented soy products were applied. The enzyme activities for every groups were normalized to the enzyme activity in the control group, treated with distilled water instead of the soy sample. The bar represents the mean value of duplicates.

(라) 예비 동물실험을 통한 청국장의 항비만 효과

① 청국장을 급여시킨 쥐의 체중변화

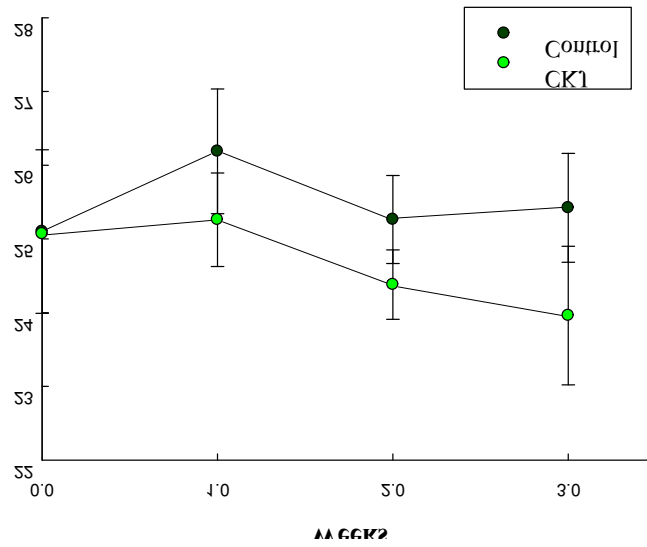


Fig. 6. 대두발효추출물 급여 쥐의 체중변화

② 청국장을 급여시킨 쥐의 콜레스테롤 변화

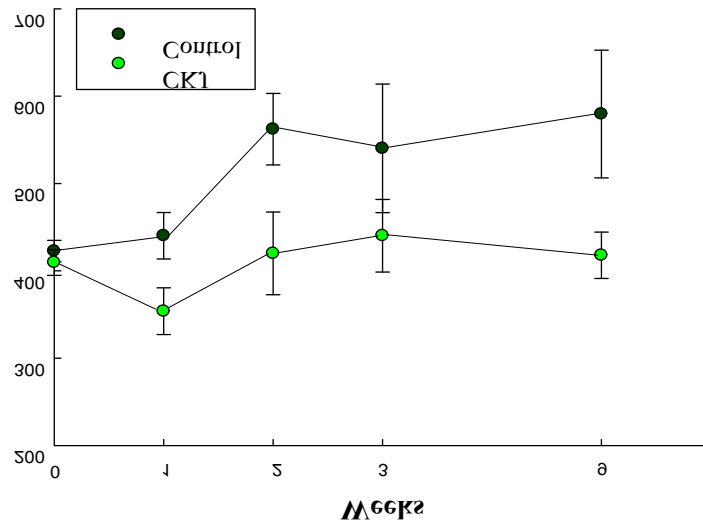


Fig. 7. 대두발효추출물 급여 쥐의 혈중 콜레스테롤 변화



③ 청국장을 급여시킨 쥐의 혈당치 변화

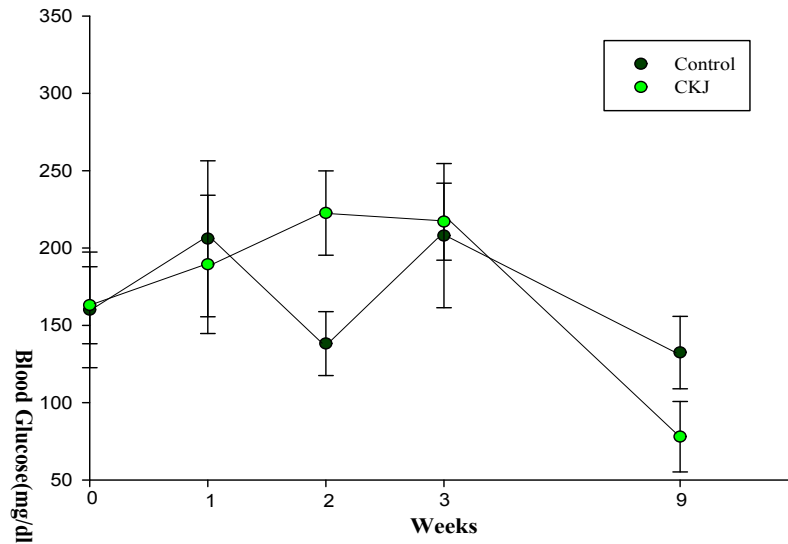


Fig. 8. 대두발효추출물 급여 쥐의 혈당변화

- 300mg/kg의 대두발효추출물 섭취군과 무처리군을 비교하였을 때 3주차까지 실험 동물의 체중이 감소가 나타나지 않음. 대두발효추출물 투여군의 체중이 더 높은 것으로 보이지만 그 차이가 유의적이지 않고 오차범위가 큼(Fig. 6).
- 혈중 총 콜레스테롤 함량에서 대두발효추출물 섭취군에서 더 낮은 수치를 보임(Fig. 7). HDL콜레스테롤 수치는 그룹간에 유의적인 차이를 보이지 않았음 (data생략)
- 대두발효추출물을 섭취한 동물의 혈당수치는 처음 2주 동안 증가하는 경향을 보였지만 최종 9주째에는 대조군 보다 다소 낮은 혈당수치를 나타냄(Fig. 8).
- 9주간 시행한 예비 동물실험 결과 약간의 체중감소 및 콜레스테롤 감소효과가 보였으며 2차 동물실험에서는 투여량을 상향 조정할 계획임 (500mg/kg).

(마) 항비만 부소재의 지방 세포 분화 억제 활성화

대두발효추출물을 처리한 동물실험에서 고지방식이 첨가군의 체중증가를 억제하는 효능이 나타나기는 하였지만 통계처리시 유의차를 나타낼 정도의 우수한 활성을 관측하지는 못하였다. 이러한 이유로 대두발효물의 항비만활성의 증가와 대두발효제품의 풍미증가를 위하여 다양한 약용식물의 추출물을 활용하여 항비만 활성을 측정할 결과 천초의 에탄올 추출물이 우수한 지방세포분화 억제능을 나타내었다. Preadipocyte 세포인 mouse 3T3-L1 세포에 천초 에탄올 추출물을 0.05 및 0.1 mg/mL의 농도로 48시간 동안 처리한 결과 0.1 mg/mL 투여시 지방세포로 분화가 억제되었으며 대조군과 비교하여 유의적 차이를 나타냈다 (Fig. 9).

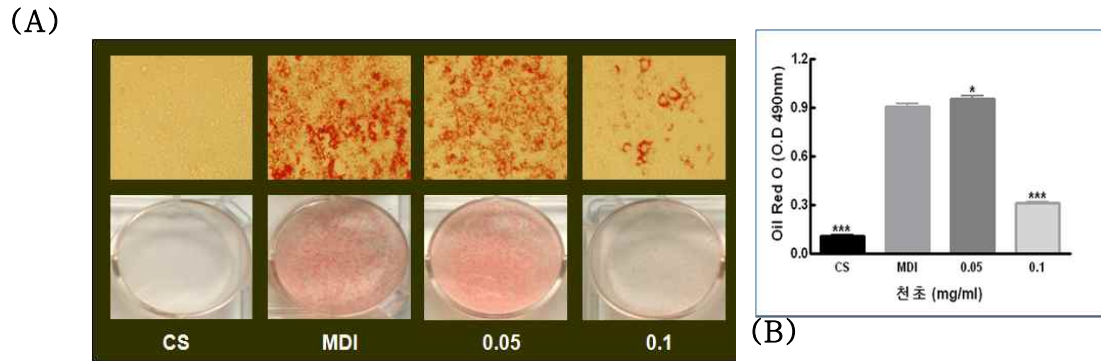


Fig. 9. 천초추출물의 지방세포분화 억제능

마. 버섯 발효공의 효능검증

(1) 재료 및 방법

(가) 버섯균 배양

균사체 배양은 각 버섯들에 Table 1과 같은 고체배지에 각각 접종하여 28 °C에서 일정기간 평판배양하였다. 배양된 균사의 가장자리 일정부위를 5mm cork borer로 절단하여 액체배양의 접종원으로 사용하였다. 100 mL 삼각 플라스크에 50 mL 액체 배지를 넣고 분리한 균사체를 접종하여 28 °C, 180 rpm에서 각각 맞는 최적의 배양일 까지 진탕배양하였다. 진탕배양 된 액체 배양물을 homogenizer로 균질화한 후, 5 %(v/v)의 비율로 액체배지에 접종하여 28 °C, 180 rpm에서 최적배양일 까지 2차 진탕배양한 후 각각 1일간 정치배양한 것을 고체 배양시 접종원으로 사용하였다.

Table 1. Culture condition of different mushroom hyphae

Name	Culture condition		
	medium	temperture	rpm
구름버섯( <i>Coriolus vericola</i> )	PDA1)	24	160
양송이버섯( <i>Agaricus bisporus</i> )	PDA	24	160
영지버섯( <i>Ganoderma lucidum</i> )	PDA	24	160
말굽버섯( <i>Fomes fomentarius</i> )	PDA	24	160
치마버섯( <i>Schizphyllum commune</i> )	Malt	24	180

1) PDA: Potato Dextrose Agar

(나) 대두를 기질로 한 고체배양

대두는 물에 3회 세척하여 12시간 침지한 후, 30분 동안 물빼기를 실시하여 과잉수분을 제거한 다음 121 °C에서 30분간 증자하여 원료로 사용하였으며 증자한 대두 40 g에 2회 액체 배양한 버섯균사체를 5 % 접종하였다. 만들어진 샘플은 동결 건조를 한 후 분말화 하여 70 % 에탄올 추출하여 시료로 사용하였다.



Fig. 1. Photograph of fermented bean prepared with various mushroom hyphae

(다) 발효콩의 성분 분석 및 생리활성 검증

① Total phenolics compound : Reena 등의 방법을 이용하여 측정하였으며 시료 0.1mL에 2N Folin-ciocalteu phenol reagent 0.1 mL를 가하여 5분간 상온에서 반응시키고 다시 0.7M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 mL을 가한 후 암 상태에서 30시간 보관하였다. 반응액을 마지막으로 잘 호한 다음 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 standard로써 tannic acid를 사용하였으며 같은 방법으로 반응을 시켜 standard curve를 작성하고 추출물의 흡광도를 이에 대입하여 함량을 계산하였다.

② 전자공여능 Electron donating ability 측정 (DPPH) : 전자공여능(EDA: electron donating ability)은 Blois의 방법을 변형하여 측정하였다. 각 시료용액 1mL에 0.2 mM의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 0.5 mL을 넣고 교반한 후 30분간 방치한 다음 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구로는 시료대신 에탄올을

사용하였으며, 그 값은 다음 식에 의하여 계산하였으며 RC50 값으로 나타내었다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{\text{실험구측정치}}{\text{대조구측정치}}\right) \times 100$$

③ ABTS 라디칼 소거 활성 측정 : Re 등 (1999)의 ABTs. + cation decolorization assay 방법을 응용하여 실험하였다. 2.45 mM potassium persulfate (P5592, Sigma, USA)에 용해한 7 mM ABTs (2,2'-azino-bis[3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid]diammoniumsalt; A9941, Sigma, USA)를 실온 . 암소에서 24시간 동안 방치하여 라디칼을 형성시켰다. ABTs 용액은 사용 직전에 734 nm에서 흡광도 값이 0.7~0.9가 되도록 희석하여 실험에 사용하였으며, 준비한 추출물 시료 500  $\mu$ L에 ABTs 용액 100  $\mu$ L를 첨가하여 10분간 반응시킨 후 734 nm에서 흡광도 값을 측정하였다. 대조구로는 시료대신 증류수를 사용하였으며, 그 값은 다음 식에 의하여 계산하였으며 시료의 ABTs 라디칼 소거활성 정도는 RC50 값으로 나타내었다.

$$\text{ABTs radical scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{\text{실험구측정치}}{\text{대조구측정치}}\right) \times 100$$

④ Protein content (Lowry assay) : 대두 버섯 발효물의 단백질 함량을 구하기 위하여 Lowry et al. (1951)의 방법에 따라 발효시료를 100  $\mu$ L 이용하여 Lowry시약을 이용하여 발색한 후, 분광광도계 (SHIMADZU, UV-1700)를 사용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도는 Bovine Serum Albumine (Sigma, A-7030)을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 시료 중의 단백질함량을 추정하였다.

⑤ Free amino acid (Folin-ciocalteu) : 유리아미노산 함량 측정을 위해 0.55 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , Phenol reagent - 2N (Folin\_Ciocalteu reagent) 시약을 사용하여 확인하였다. 우선 시료 100  $\mu$ L와 0.55 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  용액을 1 mL을 tube에 넣는다. 그리고 Folin\_Ciocalteu reagent 반응시약을 넣고 30°C에서 30분간 반응을 시킨 후 교반을 한다. 그리고 반응액 150  $\mu$ L씩을 취하여 96 well plate에 넣고 750 nm에서 흡광도를 측정한다.

⑥ Total sugar (dubois method) 총당 측정 : 총당 변화는 페놀 황산법을 이용하여 측정하였다. 시약은 Conc. sulfuric acid, 5% phenol을 사용 하였다. 실험 방법은 tube에 sample 500  $\mu$ L, 5% phenol 500  $\mu$ L, 2.5 mL Conc. sulfuric acid를 넣고 잘 섞은 후 끓는 물에 10분간 반응 시킨 후 아이스에서 15분간 식힌 후 UV

spectrometer를 이용하여 OD 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총당 함량의 검량곡선은 sucrose를 이용하여 작성하였다.

⑦ 환원당 측정 : 대두 버섯 발효액 환원당측정은 DNS법을 응용하여 측정하였다. 시약은 DNS시약(Dinitrosalicylic Acid Reagent Solution 1% 와 Dinitrosalicylic acid: 10 g , Phenol: 2 g (optional, see Note 1), Sodium sulfite: 0.5 g, Sodium hydroxide: 10 g, Add water to: 1 liter), potassium sodium tartrate solution 40%를 사용하였다. Tube에 시료 1 mL, DNS 3 mL를 넣은 후 40% potassium sodium tartrate solution 40%를 첨가하고 끓는 물에 5분간 반응을 시키고 바로 꺼내서 얼음위에서 급 냉동시켰다. 그리고 575 nm에서 흡광도를 측정하여 검량곡선을 이용하여 정량하였다. 환원당 함량의 검량곡선은 glucose를 이용하여 작성하였다.

(라) 버섯발효공의 지방세포 분화 억제 효과 측정

① 세포 배양 : 실험세포 3T3-L1 (Mouse preadipocyte)은 한국 세포주 은행(KCLB)에서 분양받아 사용하였으며 사용한 배지는 10% fetal bovine serum (FBS)을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지를 사용하였으며 세포배양은 37°C에서 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 수행하였다. (Mosmann, 1983)

② 세포 분화 : 3T3-L1 세포가 80% 이상 성장하게 되면 0.5 mM methyisobutylxanthine, 0.25 uM dexamethaxone 및 1uL/mL 인슐린이 함유된 10 % FBS-DMEM으로 배양하고 48시간 후 MDI (1uL/mL 인슐린, 0.5 mM 3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), 1uM Dexamethasone) - DMEM으로 교환하여 48시간 배양한 다음 인슐린-DMEM과 인슐린을 포함한 sample-DMEM을 2일 간격으로 첨가하면서 8~10일간 배양하였다. (Brasaemle et al., 1997; Moreno et al., 2003)

③ Oil Red O 염색법 : Oil Red O 염색은 Novakofski & Hu (1987)의 방법에 의하여 수행하였다. 배양 8일 또는 10일에 배양액을 제거하여 phosphate buffer saline (ph 7.0)로 2~3회 세척한 후 3.7% formaldehyde로 1시간 동안 고정시킨 다음 formaldehyde 제거하고 증류수로 세척하였다. 0.3% formaldehyde로 1시간 동안 고정시킨 다음 formaldehyde 제거하고 증류수로 세척하였다. 0.3% Oil Red O working solutiondms 0.3g의 Oil Red O stain을 2-propanol 100mL에 용해하여 여과한 다음 증류수로 희석하여 고정시킨 3T3-L1 cell을 1시간 동안 염색하였다. 1시간 후 염색액을 제거하고 증류수로 세척한 후 2-propanol로 지방세포 내의 triglyceride를 용출시킨 액을 수집하여 96 well로 옮긴 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## (2) 연구 결과

### (가) Antioxidant activity

① Total phenolics compound : 식물계에 널리 분포되어 있는 페놀화합물은 구조식에 hydroxyl기가 존재하므로 공명 안정화된 구조를 갖게 되며, 따라서 전자를 수용하는 기작으로 항산화 반응에 직접적으로 기여하게 된다. 용매별 추출물을 mL당 100  $\mu\text{g}$ 의 농도로 첨가하여 페놀함량을 측정한 결과 총 폴리페놀 함량은 전반적으로 대조군에 비하여 높게 나타났으나 대두 양송이 발효액의 경우는 다른 발효액에 비하여 낮은 폴리페놀 함량을 나타내었다. (Table 2)

Table 2. Total phenolic scavenging effects from mushroom fermented bean ethanol extract

Samples	Total phenolic content (mg/g)
Control	5.70 $\pm$ 0.01
구름	9.06 $\pm$ 0.01
말굽	16.58 $\pm$ 0.01
양송이	7.83 $\pm$ 0.00
영지	10.72 $\pm$ 0.01
치마	15.33 $\pm$ 0.01

② 전자공여능 Electron donating ability 측정 (DPPH) : 전자공여능 측정에 사용된 DPPH는 안정한 자유 라디칼로서 그것의 비 공유전자로 인해 517 nm 부근에서 최대 흡수치를 나타내며, 전자 또는 수소를 받으면 517 nm 부근에서 흡광도가 감소하기 때문에 각 추출물에서 이러한 라디칼을 환원시키거나 상쇄시키는 능력이 크면 높은 항산화 활성 및 활성산소를 비롯한 다른 라디칼에 대하여 소거 활성을 기대할 수 있으며 인체 내에서 활성 라디칼에 의한 노화를 억제하는 척도로도 이용할 수 있다.

DPPH 소거활성은 영지버섯 균사체 발효액에서 가장 높았으며  $RC_{50}$  (reducing concentration) 값은 11689  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었다. 대조군의  $RC_{50}$  값은 55,918  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 나타났다. 전반적으로 대조군에 비하여 항산화력이 좋으며 대두 버섯 발효액은 비슷한 수준의 항산화력보여주었다. 그러나 양송이 버섯 균사체 발효액은 다른 버섯류에 비하여 항산화력이 낮은 것을 알 수 있었다. (Table 3).

Table 3. DPPH radical scavenging effects from mushroom fermented bean ethanol extract .

Samples	RC <sub>50</sub> (Reducing concentration) <sup>1)</sup>
	concentration( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
Control	55,918
구름버섯( <i>Coriolusvericola</i> )	16,555
말굽버섯( <i>Fomesfomentarius</i> )	16,228
양송이버섯( <i>Agaricusbisporus</i> )	42,647
영지버섯( <i>Ganodermalucidum</i> )	11,689
치마버섯( <i>Schizphyllumcommune</i> )	19,497

1) RC 50: Concentration required for 50% reduction of DPPH at 10 min after starting the reaction

③ ABTS 라디칼 소거 활성 측정 : 혈장에서 ABTs의 양이온 라디칼의 흡광도가 항산화제에 의해 억제되는 것에 기초하여 개발된 라디칼 소거 활성법이다. ABTs와 potassium persulfate를 암소에 방치하여 ABTs<sup>+</sup>이 생성되면 추출물의 항산화 활성에 의해 ABTs<sup>+</sup>이 소거되어 radical 특유의 색인 청록색이 탈색되는데 이를 흡광도 값으로 나타내어 ABTs<sup>+</sup>의 소거 활성을 측정할 수 있다. ABTs<sup>+</sup>는 600~750 nm의 범위에서 강한 흡수를 보여주며 이로 인해 분광 분석으로 쉽게 측정할 수 있다. 이러한 원리를 이용하여 ABTs radical scavenging을 측정하였으며, 그 결과 구름과 영지는 대조군과 비슷한 활성을 나타냈으며 대두 양송이 발효액은 DPPH 소거활성 활성과 같이 낮은 활성을 나타냈다. 그에 비하여 말굽과 치마 발효액은 5114, 5042 mg/mL 같이 대조군에 비하여 높은 활성을 나타내었다. (Table 4)

Table 4. ABTS radical scavenging effects from mushroom fermented bean ethanol extract.

Samples	RC <sub>50</sub> (Reducing concentration) <sup>1)</sup>
	concentration( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
Control	9,725
구름버섯( <i>Coriolusvericola</i> )	9,290
말굽버섯( <i>Fomesfomentarius</i> )	5,114
양송이버섯( <i>Agaricusbisporus</i> )	16,233
영지버섯( <i>Ganodermalucidum</i> )	9,328
치마버섯( <i>Schizphyllumcommune</i> )	5,042

1)RC50 : Concentration required for 50% reduction of ABTS at 5min after starting the reaction

(나) Protein content (Lowry assay)

대두 버섯 발효액의 단백질함량 변화를 Lowry assay를 이용하여 측정하였다. 대조군에 비해 전체적으로 단백질 함량이 증가한 것을 알 수 있었다. 그 중에서도 말굽이 단백질 함량이 높게 나타났으며 양송이 발효액이 가장 낮음을 알 수 있었다. (Table 5)

Table 5. Protein content scavenging effects from mushroom fermented bean ethanol extract.

Sample	protein content (mg/g)
Control	3.38 ± 0.00
구름	9.07 ± 0.01
말굽	14.71 ± 0.02
양송이	8.05 ± 0.01
영지	10.18 ± 0.01
치마	12.81 ± 0.02

(다) Free amino acid (Folin-ciocalteu)

유리아미노산 함량의 측정은 tyrosine을 사용하여 작성한 검량곡선에 대입하여 계산하였다. 그 결과 측정된 아미노산의 함량은 대조군에 비하여 유리아미노산 함량이 전체적으로 높게 나타났으며 대두 양송이 발효액의 경우 단백질 함량은 낮았으나 아미노산함량은 반대로 가장 높은 경향을 나타냈다. (Table 6)

Table 6. Freeamino acid scavenging effects from mushroom fermented bean ethanol extract .

Samples	Free amino acid (mg/g)
Control	0.22 ± 0.00
구름버섯( <i>Coriolusvericola</i> )	0.94 ± 0.01
말굽버섯( <i>Fomesfomentarius</i> )	1.49 ± 0.01
양송이버섯( <i>Agaricusbisporus</i> )	2.75 ± 0.02
영지버섯( <i>Ganodermalucidum</i> )	0.99 ± 0.01
치마버섯( <i>Schizphyllumcommune</i> )	1.20 ± 0.01



(라) Total sugar (dubois method) 총당 측정

대두 버섯 발효액의 당성분 변화를 측정하기 위해서 페놀, 황산법을 이용하였다. 총당은 sucrose를 이용하여 작성한 검량곡선에 측정된 OD값을 대입하여 정량하였다. 그 결과 대두 구름발효액의 경우 당함유율이 가장 높은 것을 알수 있었으며 말굽 발효액의 경우 가장 낮은 것을 알수 있었다. (Table 7)

Table 7. Total sugar scavenging effects from mushroom fermented bean ethanol extract .

Samples	Total sugar (mg/g)
Control	27.10 ± 0.04
구름구름버섯( <i>Coriolusvericola</i> )	51.02 ± 0.05
말굽버섯( <i>Fomesfomentarius</i> )	11.71 ± 0.01
양송이버섯( <i>Agaricusbisporus</i> )	21.60 ± 0.03
영지버섯( <i>Ganodermalucidum</i> )	24.92 ± 0.06
치마버섯( <i>Schizphyllumcommune</i> )	39.95 ± 0.03

(마) 환원당 측정

발효시간에 따른 환원당의 변화는 DNS법을 사용하여 측정하였다. 환원당은 glucose를 이용하여 작성한 검량곡선에 OD값을 대입하여 구하였다. 구름, 치마 발효액이 대조군에 비하여 환원당 함량이 높은 것을 알 수 있었다.

Table 8. Reducing sugar scavenging effects from mushroom fermented bean ethanol extract.

Samples	Reducing sugar (mg/g)
Control	9.22 ± 0.00
구름버섯( <i>Coriolusvericola</i> )	11.93 ± 0.01
말굽버섯( <i>Fomesfomentarius</i> )	6.19 ± 0.00
양송이버섯( <i>Agaricusbisporus</i> )	10.81 ± 0.01
영지버섯( <i>Ganodermalucidum</i> )	8.73 ± 0.01
치마버섯( <i>Schizphyllumcommune</i> )	13.49 ± 0.00

(바) 지방세포 분화 억제 효과

세포 성장률을 바탕으로 세포내 지방 축적에 대한 효과를 측정하기 위해 3T3-L1 세포의 분화 변화를 관찰한 결과 지방세포분화군(MDI 처리군)은 분화 물질의 처리에 의해 세포 내에 중성지질이 쌓이는 것에 비해 시료 첨가에 따른 세포 모양 변화가 줄고 세포내 중성지질의 축적이 감소됨을 관찰 할 수 있었다. (Fig. 3, 4)

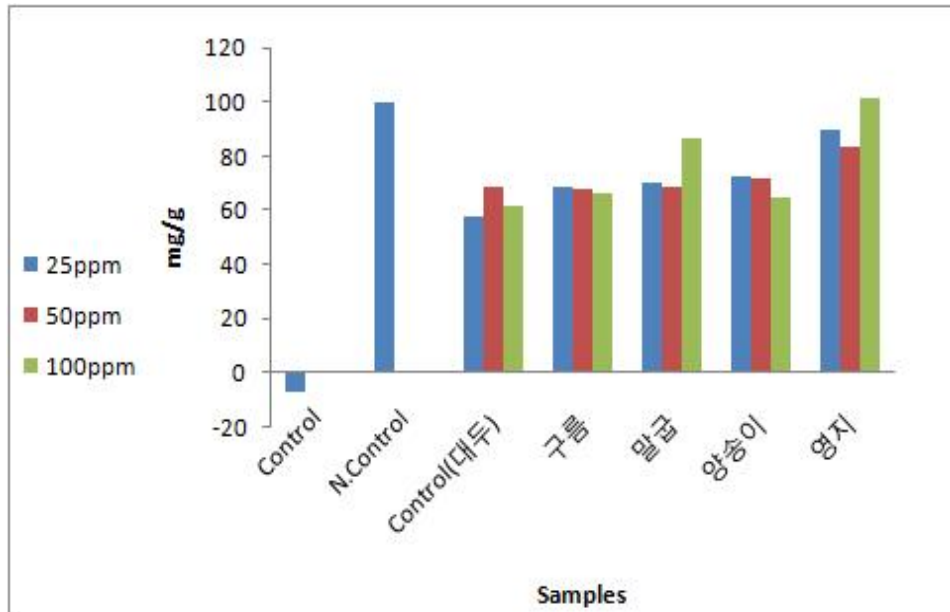


Fig. 3. Effect of bean through mushroom fermentation on the lipid accumulation in the 3T3-L1 cell

1  $\mu\text{m}$  Dexame thasone + 0.5 Mm IBMX + 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Insulin

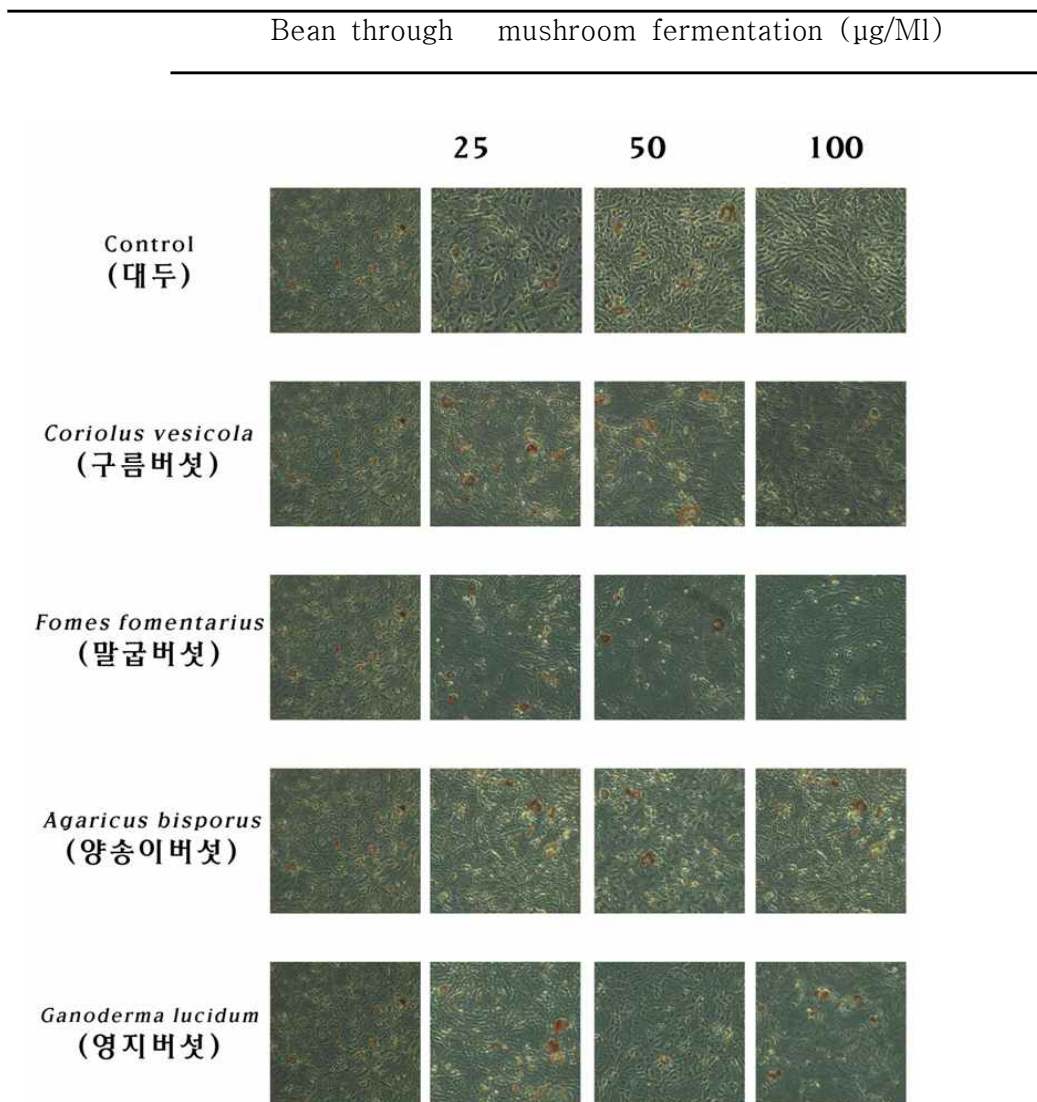


Fig. 4. Mophological bean through mushroom fermentation.

## 제 7절 생활습관성 질환개선제품 개발

### 1. 생활습관성 질환 개선제품 개발

#### 가. 연구개발 수행 내용

##### 1) 기능성 육종 콩으로 혈행 개선제의 개발

- 혈행개선 물질의 생산방법의 확립을 위한 물질 생산균의 결정과 다양한 육종콩을 혈행개선 발효균에 의한 발효의 최적 발효 콩 및 발효 조건의 확립. 그리고 기능성 활성 유지를 위한 최적 조건 및 물질 추출을 위한 최적의 조건 확립
- 혈행개선 물질 생산균주를 이용하여 발효한 육종콩의 대량 배양을 통하여 대량배양한 발효물의 당, 페놀 등의 성분 및 기능성 확인으로서 DPPH 라디칼 소거 활성능, Superoxide dismutase (SOD) 유사 활성, 환원력, Hydrogen peroxide,  $\beta$ -carotene bleaching 활성을 검토하여 항산화 효능을 검증
- 발효물의 관능 검사를 통한 기호도 조사 및 시제품 제작을 위한 기능성을 발효물의 시제품을 제조하여, 제조한 시제품을 이용한 관능검사를 통하여 제품화를 위한 소비자 기호도에 맞는 고기능성 식품을 개발하고자 하며, 시장성을 고려한 다양한 시제품 개발 및 사업화를 위한 전략 수립

##### 2) 콩 유래 항당뇨 peptide 소재 및 제품 개발

- db/db mouse에 있어서 아가콩의 혈당개선 효과 규명을 위한 db/db mouse에 게 대두, 이소플라본 함량이 높은 아가콩이 함유된 식이를 6주간 제공한 후 공복혈당, 인슐린, 혈액 당화헤모글로빈 농도를 측정하였고, HOMA-IR(Homeostasis model assessment of insulin resistance)을 계산하고, 혈장 중성지방, 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 농도를 측정하였고, 동맥경화지수(atherogenic index)를 [중성지방/HDL-콜레스테롤], 간조직의 지질과산화물 농도 및 항산화효소계 활성을 검증
- 제2형 당뇨동물 모델에 있어서 아가콩 및 발효아가콩의 항당뇨 효과 규명을 위한 고이소플라본 아가콩과 발효과정으로 펩타이드 함량을 증가시킨 발효 콩의 당질 및 지질소화효소 억제효과를 in vitro에서 조사하였고, 대두, 노란아가콩, 검정아가콩, 발효대두, 발효 노란아가콩, 발효 검정아가콩의 주정 추출물을 제조한 후  $\alpha$ -glucosidase 및 pancreatic lipase 저해활성 및 db/db mouse에게 대두, 노란아가콩, 발효 대두, 발효 노란아가콩을 6주간 공급한 후 공복 혈당, 혈장 인슐린 농도, 당화헤모글로빈 농도, 혈장 중성지방, 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, 혈장 GOT, GPT 활성 및 간조직의 지질과산화물 농도, 항산화효소

계 활성을 검증

- ob/ob mouse에 있어서 아가콩 및 발효아가콩의 혈당조절 및 지방간 개선효과 규명을 위한 아가콩 및 발효 아가콩을 첨가하여 10주간 제공한 후 공복 혈당, 프락토사민, 인슐린 농도, 혈장 adiponectin, 중성지방, 콜레스테롤 및 HDL-콜레스테롤 농도 및 간조직의 지질을 추출하여 중성지방, 콜레스테롤 함량, 지질 과산화물 측정 그리고 간조직의 glucose transporter(GLUT4) 발현 수준을 검증

3) 면역활성 및 항암소재와 제품개발

- 검정 아가콩(아가콩 4호) 및 노란 아가콩(아가콩 3호)의 항염증 효능을 조사하기 위하여 U937 혈구세포 모델을 사용하여, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)처리에 의한 cyclooxygenase (COX)-2 및 early growth response gene-1 (Egr-1)의 발현 증가와 prostaglandin E2 생성 및 nuclear factor kappaB (NF-κB) 활성 증가에 미치는 검정 아가콩 및 노란 아가콩 에탄올 침전물의 영향을 대두 에탄올 침전물과 비교검증
- Genistein (4',5,7-trihydroxyisoflavone)은 대두에 풍부하게 존재하는 phytoestrogen isoflavone으로 선행연구들에 의하여 강력한 항암작용이 있음이 알려졌으나 항전이 효능에 관한 구체적인 기전 해석은 상대적으로 미비한 실정이므로 genistein의 항전이 효과와 연관된 기전을 조사
- 검정 아가콩 및 노란 아가콩의 항암활성 효능을 조사하기 위하여 U937 혈구세포 모델을 사용하여 항염증 효능 검증
- 대두에 풍부하게 존재하는 Genistein(4',5,7-trihydroxyisoflavone)을 이용하여 다양한 인체 암세포를 이용하여 genistein에 의한 이들 암세포의 증식억제에 따른 apoptosis 유도에 COX-2 및 telomerase 활성의 조절에 대한 검증

4) 대두의 식용 사포닌을 이용한 항비만 음료시제품 개발

- 대두박으로부터 식용사포닌 추출 및 분리조건 확립을 위한 식용 사포닌 추출 및 분리
- 대두 음료 시제품 최적 제조공정 확립을 위한 대두사포닌의 최적 활성 배합률 및 보조 부용제 원료 선정, 대두 음료 시제품의 제조 공정도 확립, 대두 음료 시제품 제조(I, II, III)
- 대두 음료 시제품(I, II, III)에 대한 항비만 효과 검증을 위한 비만유도 동물의 체중 변화 및 일일 섭취량, 내장 지방 변화, 혈장 중의 지질 함량, 간 조직 중의 지질 함량에 미치는 영향에 대한 검증
- 대두 음료 최종 시제품에 대한 비만 억제 효과 검증을 위한 비만유도 동물의

체중 변화 및 일일 섭취량, 내장 지방 변화, 혈장 중의 지질 함량, 간 조직 중의 지질 함량에 미치는 영향에 대한 검증

5) 고품질 검은콩 계통선발 및 안토시아닌의 생리활성 연구

- 수입콩과 차별화된 고기능성 고품질 Non-GMO 콩 품종의 개발을 위한 고 Isoflavones 함유, 고 Pterocarpans 함유, 양질 지방산 함유, 소화억제 단백질 결핍콩 개발 및 비린내 없는 콩 품종 등 다양한 종류의 기능성 콩 품종의 육성, 비린내 및 소화억제단백질 제거 F2 개체 선발
- 안토시아닌 정제 및 분리를 위한 검은콩(*Glycine max* (L) Merr.) 껍질 200g을 메탄올로 3회 반복하여 추출하여 Amberlite XAD-7 컬럼과 Sephadex LH-20을 이용하여 안토시아닌을 정제
- 안토시아닌의 의학적 효과 구명을 위한 단백질성 콩 기능성 물질과 안토시아닌계 활성물질의 의학적 약리효과 구명, 이들 방법을 이용한 기능성 물질의 대량 분리 생산 및 산업화, 안토시아닌의 항산화 효능 검색 및 작용기전 규명, 안토시아닌의 항염증 효능 검색 및 작용기전 규명, 상처재생과 관련한 안토시아닌 효과, 동물실험을 통한 심혈관 및 당뇨 관련 질환에 대한 효과 검증

나. 연구개발 결과

1) 기능성 육종 콩으로 혈행 개선제의 개발

가) 혈전용해효소 생성균주의 선별 및 발효조건의 확립

(1) 혈전용해효소 생산균주의 선별

연구실에서 보관중인 혈전 용해능을 가진 균주를 10가지 (*Bacillus. sp* LC-1, LC-3, LC-5, CKJ, #15, #18, #20, #38, BB-1, sm26)를 선별하여 LB배지에서 37°C에서 18시간동안 배양하여 배양 상등액으로부터 혈전용해효소의 생성여부를 확인하였다. *Bacillus. sp* LC-1, LC-3, CKJ, #18, #38, BB-1, sm26에서 혈전용해효소의 활성을 보였으며 *Bacillus. sp* BB-1의 균주에서 혈전용해효소 활성이 가장 높게 나타났다(Fig. 1). 그러나 콩 발효물을 제조하였을때의 혈전용해효소의 활성을 확인하기 위해서는 전 균주에 대하여 콩 발효를 수행하였다.

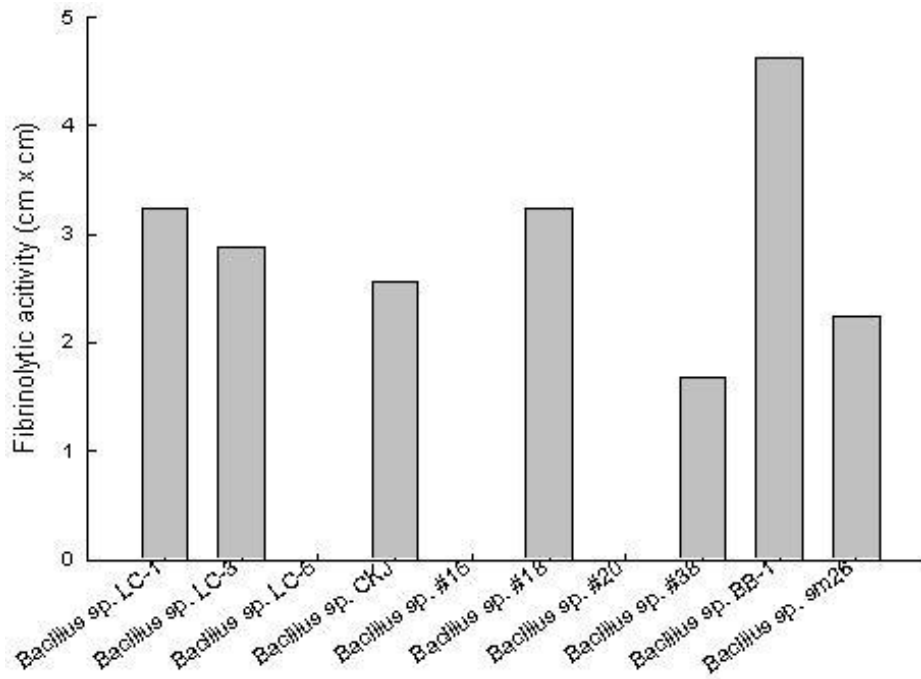


Fig. 1. Comparison of fibrinolytic activity by different *Bacillus* strains culture.

#### (2) 혈전용해효소 생산균주의 단일 발효 및 혼합발효

전 균주에 대하여 콩 발효물을 제조한 결과는 Table 1과 같다. 각각의 균주에 대하여 집중하였을 때, *Bacillus* sp. BB-1와 *Bacillus* sp. sm26가 가장 높은 혈전용해 활성을 보였으며, 점질물의 형성은 *Bacillus* sp. CKJ에서 가장 높게 형성을 보였다. 각 균주를 혼합배양하여 각각의 균주에 대하여 혼합발효를 해본 실시 해본 결과 단일 균주에 대하여 발효를 Table 2과 같이 비교해본 결과 전체적으로 혈전용해활성은 저하되며 혼합 발효시 점질물의 형성 또한 낮게 나타나는 것으로 보아 전체적으로 발효의 진행이 저하된 것으로 사료된다. *Bacillus* sp. sm26가 암모니아테의 함량이 낮게 나타났으며 암모니아테는 단백질 분해 과정에서 탈아민에 의하여 생성되며 암모니아테 질소가 식품 내에 과량으로 축적되면 부패취로 작용하므로 일반적으로 장류 제품의 변패 또는 이상발효의 지표표로 사용된다. 따라서 콩 발효물 특유의 이취에 영향이 있는 아미노테 함량이 낮고, 혈전용해효소활성이 높으며 그리고 점질물의 형성이 높은 것은 *Bacillus* sp. sm26로서 발효 균주로서 적합하다고 사료되며 본 연구에 공시균주로서 사용하였다.

Table 1. Comparison of pH, viscous substance, water contents, fibrinolytic activity, reducing sugar and ammonia type nitrogen in solid culture of different *Bacillus* stains.

	pH	Viscous substance (%)	Water contents (%)	Fibrinolytic activity (cmxcm)	Reducing sugar (mg%)	Ammonia type nitrogen (mg%)
<i>Bacillus</i> sp. LC-1	7.33	17.13595	35.49839	4	800.1915	160.3532
<i>Bacillus</i> sp. LC-3	7.79	9.343384	42.72577	7.14	634.9121	160.3532
<i>Bacillus</i> sp. LC-5	7.17	7.692308	44.65906	6.5	911.3529	97.35316
<i>Bacillus</i> sp. CKJ	7.55	27.49387	42.92784	6.24	678.7916	139.9058
<i>Bacillus</i> sp. #15	7.37	6.953503	38.46092	3.25	813.3554	128.8532
<i>Bacillus</i> sp. #18	7.29	16.39439	36.18049	5.4	541.3025	113.9321
<i>Bacillus</i> sp. #20	7.37	14.30735	35.98706	7.56	1004.963	128.3005
<i>Bacillus</i> sp. #38	7.42	7.363954	40.27075	6.75	889.4132	140.4584
<i>Bacillus</i> sp. BB-1	7.76	4.890878	42.65622	28.8	418.4398	152.0637
<i>Bacillus</i> sp. sm26	7.84	10.21753	43.75225	32.5	532.5265	111.7216



Table 2. Comparison of pH, viscous substance, water contents, fibrinolytic activity, reducing sugar and ammonia type nitrogen in solid culture by the mixed culture of stains.

	pH	Viscous substance (%)	Water contents (%)	Fibrinolytic activity (cmxcm)	Reducing sugar (mg%)	Ammonia type nitrogen (mg%)
<i>Bacillus</i> sp LC-1 +3	7.08	12.29789	42.54743	5.5	1291.642	87.95842
<i>Bacillus</i> sp LC-5 +CKJ	6.95	4.794921	44.36497	4.4	1124.9	77.45842
<i>Bacillus</i> sp sm26 +BB-1	7.22	≒ 12.99767	44.14125	16.64	642.2253	47.06368
<i>Bacillus</i> sp #15 +18	7.42	9.230769	42.31404	5.4	1129.288	92.93211
<i>Bacillus</i> sp #20 +38	7.27	10.25333	42.79071	4.83	1258.001	66.40579
<i>Bacillus</i> sp sm26 +CKJ	7.36	5.625128	35.1443	7.65	1155.616	78.01105
<i>Bacillus</i> sp LC-1 +3 +5	7.56	16.74232	42.67482	21.2	547.1531	145.4321
<i>Bacillus</i> sp LC-1 +3 +5 +CKJ	7.55	17.05003	39.03625	6	766.5506	85.74789
<i>Bacillus</i> sp LC-1 +3 +sm26 +BB-1	7.32	8.651755	40.71205	4.4	639.3	169.1953
<i>Bacillus</i> sp LC-1 +3 +#15 +18	7.4	16.78358	39.79475	14.04	547.1531	85.74789
<i>Bacillus</i> sp LC-1 +3 +#20 +38	7.3	6.120248	44.99939	6.25	1113.199	87.40579
<i>Bacillus</i> sp LC-5 +CKJ +sm26 +BB-1	7.12	7.211585	43.26017	7.5	1012.276	86.30053
<i>Bacillus</i> sp LC-5 +CKJ +#15 +18	7.33	7.925961	43.60152	3.74	959.6204	70.27421
<i>Bacillus</i> sp LC-5 +CKJ +#20 +38	7.07	13.99641	82.9152	10.81	471.0952	94.03737
<i>Bacillus</i> sp sm26 +BB-1 - #15 +18	7.18	6.844548	36.4286	4.25	1124.9	94.59
<i>Bacillus</i> sp sm26 +BB-1 +#20 +38	7.75	8.414239	42.98339	3.8	1382.326	49.82684
<i>Bacillus</i> sp #15 +18 +#20 +38	6.95	2.633736	35.83153	15.05	497.4229	102.8795

### (3) 증자시간의 영향

콩 증자시간을 15, 30, 45, 60, 75분으로 각각 조정하여 증자한 후 선발된 공시균 주인 *Bacillus* sp. sm26를 접종하여 콩 발효물을 제조한 결과 Table 3과 같다.

*Bacillus* sp. sm26를 접종한 콩 발효물은 증자시간이 증가할수록 점질물의 생성이 증가하였고 증자시간이 45분일 경우 혈전용해활성은 12.8로 가장 높게 나타났고, 암모니아태 함량이 낮으며 및 환원당 함량이 높게 나타났다. 따라서 45분으로 설정하는 것이 적합하다고 사료된다.

Table 3. Comparison of pH, viscous substance, water contents, fibrinolytic activity, reducing sugar and ammonia type nitrogen in solid culture with different stem time.

stem time (min)	pH	Viscous substance (%)	Water contents (%)	Fibrinolytic activity (cmxcm)	Reducing sugar (mg%)	Ammonia type nitrogen (mg%)
15	8.19	10.50326	55.54632	9.3	447.6928	181.3532
30	7.55	24.60432	42.67731	9.88	506.1988	121.6689
45	8.12	28.542394	44.09747	12.8	532.5265	111.7216
60	8.27	34.98432	40.75894	10.36	653.9265	211.7479
75	8.25	33.60751	38.56158	10.24	683.1795	157.0374

#### (4) 발효온도의 영향.

콩 발효온도를 30, 35, 40, 45, 50, 55℃로 각각 조정하여 3일간 발효한 후 선발된 공시균주인 *Bacillus* sp. sm26를 접종하여 콩 발효물을 제조한 결과 Table 4와 같다. *Bacillus* sp. sm26를 접종한 콩 발효 물은 발효온도가 *Bacillus* sp.의 생육에 적합한 온도인 35~45℃사이에서 10.5, 15, 12로 높은 혈전용해활성이 높았고, 점질물의 생성도도 증가하였다. 발효시간이 50℃이상에서는 *Bacillus* sp.의 생장이 저하되고 온도가 높으므로 인하여 수분의 증발이 증가하여 발효가 되지 않았다. 따라서 발효온도가 35~40℃일때 혈전용해활성이 높게 나타났고, 암모니아태 함량이 낮으며 및 환원당 함량이 높게 나타났으므로 발효온도는 35~45℃로 설정하는 것이 적합하다고 사료된다.

Table 4. Comparison of pH, viscous substance, water contents, fibrinolytic activity, reducing sugar and ammonia type nitrogen in solid culture with different fermentation temperature.

Fermentation temperature (°C)	pH	Viscous substance (%)	Water contents (%)	Fibrinolytic activity (cmxcm)	Reducing sugar (mg%)	Ammonia type nitrogen (mg%)
30	7.93	6.655639	44.18125	4.14	678.7916	108.9584
35	8.36	32.0057	39.59502	10.5	408.2013	129.4058
40	8.42	18.35744	54.35942	15	386.2615	154.8268
45	8.12	8.542394	44.09747	12	358.4712	173.0637
50	7.49	7.26657	33.12146	0	349.6953	111.7216
55	6.47	5.624615	33.31966	0	188.8038	65.30053

#### (5) 발효시간의 영향

상기의 조건으로 발효시킨 콩 발효물을 1일 간격으로 품질의 특성을 조사한 결과는 Table 5와 같다. 발효 과정 중 점질물은 8일째까지 증가하는 경향을 보이며 혈전용해활성은 3일째가장 높은 활성을 나타내었고, 그 이후부터는 활성이 현저히 저하되었다. 암모니아태는 발효는 발효 5일째부터 증가하는 것을 보였으며 발효가 진행됨에 따라 지속적인 증가를 나타내었다. 발효가 진행될수록 수분의 함량은 점질물에 의해서 증가하지만 8일 이후부터는 더 이상의 발효는 진행되지 않고 건조되어 수분의 함량이 감소되면서 색의 변화도 나타났다. 따라서 콩발효물의 적절한 발효기간은 3일이 적절한 발효시간으로 나타났다.

Table 5. Change of pH, viscous substance, water contents, fibrinolytic activity, reducing sugar and ammonia type nitrogen during solid culture fermentation

Fermentation time (day)	pH	Viscous substance (%)	Water contents (%)	Fibrinolytic activity (cmxcm)	Reducing sugar (mg%)	Ammonia type nitrogen (mg%)
1	6.61	3.583492	35.63988	4.6	804.5795	29.37947
2	6.73	10.17125	38.11816	9	677.3289	77.45842
3	7.17	9.766262	38.34769	33	664.1651	84.09
4	7.77	10.34886	37.46717	21.45	614.435	86.85316
5	7.81	12.23284	36.79432	14	585.182	110.6163
6	7.88	11.32825	37.31306	13.44	544.2278	123.8795
7	7.76	15.18304	36.58795	7.8	542.7651	124.4321
8	7.09	21.21574	34.97631	7.7	520.8253	129.4058
9	7.78	19.82605	34.134	7.25	497.4229	129.4058
10	7.77	15.72349	36.54703	7.02	481.3338	134.9321
11	7.72	14.72164	42.57239	6.9	427.2157	136.0374
12	7.71	13.62286	35.80196	6.6	370.1724	136.59
13	7.76	9.643302	35.02833	4.6	342.382	137.1426
14	7.76	15.48742	33.64036	2.0	317.517	142.6689

(6) 최적 배양조건에서 콩의 종류에 따른 영향

앞선 연구에서 설정한 최적발효 조건을 기능성 콩(A. 개척1호, B.개척2호, C.약콩, D.점유 178, E. S-178, F. 백태 (대조구), G. 아가콩)에 발효를 하여 각각 비교해 본 결과 7가지 모든 균주에서 높은 혈전용해활성을 보였으며 특히, A. 개척1호, D.점유 178, G. 아가콩에서 높은 활성을 나타냈다. 점질물의 형성은 B.개척2호, D.점유 178에서 8.77, 9.56%로 높게 나타났으며 암모니아태 함량은 A. 개척1호, E. S-178, F. 백태에서 49.27, 99.01, 70.82 mg%로 낮게 나타났다. 그리고 아가콩을 이용한 경우 아가콩의 경우 크기면에서 1/3이하로 매우작지만 그에 반하여 혈전용해활성의 비율이 일반콩의 비율의 3/2이상의 비율을 보여 활성이 높음을 확인하였고, 발효 시간도 일반콩에 비하여 감소하였다. 따라서 발효 콩으로서는 혈전용해활성이 높으며 암모니아태 생성이 낮은 개척1호나 아가콩을 이용하는 것이 발효에 적합한 콩으로 사료된다.

Table 6. Comparison of pH, viscous substance, water contents, fibrinolytic activity, reducing sugar and ammonia type nitrogen in solid culture to optimum conditions with different functional beans.

beans	pH	Viscous substance (%)	Water contents (%)	Fibrinolytic activity (cmxcm)	Reducing sugar (mg%)	Ammonia type nitrogen (mg%)
A	7.96	4.450697	39.41028	13.3	358.4712	49.27421
B	8.27	8.779343	34.96389	10.85	614.435	173.0637
C	7.92	3.119521	42.05161	9.9	370.1724	112.2742
D	8.11	4.676947	40.19568	13.2	348.2326	222.8005
E	8.17	3.93362	40.57357	8.06	435.9916	99.01105
F	8.35	9.563907	52.71371	10.88	362.8591	70.82684
G	8.41	8.43215	48.25410	6.24	324.484	60.54824

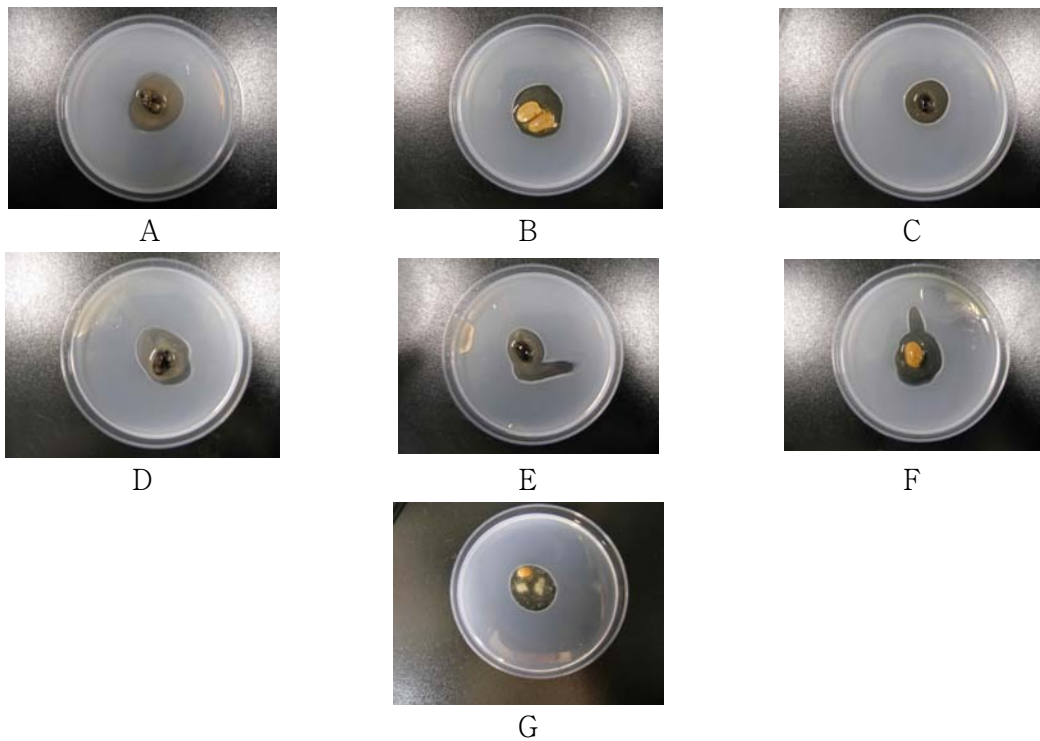


Fig. 3 Fibrinolytic activities of various beans by fibrin plate assay

A. 개척1호, B.개척2호, C.약콩, D.점유 178, E. S-178, F. 백태 (대조구), G. 아가콩

나) 선별된 발효콩의 발효 및 기능성 확인

(1) 발효 및 추출

대두, 노란 아가콩, 검정 아가콩을 발효과정은 그림 4과 같이 나타내었다. 각각의 준비된 콩을 수세하여 5배의 물에 침지하여 불린 다음 30분 동안 물 빼기를 하여 발효원을 준비하였으며 이를 121 °C에서 45 min 동안 증자하여 증자물에 *Bacillus* sp. sm26의 균주를 3 %접종하여 45°C에서 3일간 발효하여 발효물을 준비하였다. 이 발효 물에 대하여 혈전용해능을 확인하였으며 이 발효물에 대하여 10배의 70% 에탄올을 가하여 3일간 추출하였다. 에탄올 추출물을 거즈에 의해 1차 여과과정을 거친 후 일부 잔여물에 대하여 whatman paper로 2차 여과를 하여 이를 evaporator에서 에탄올 용매를 제거하고 고농도의 발효추출물을 얻었다.

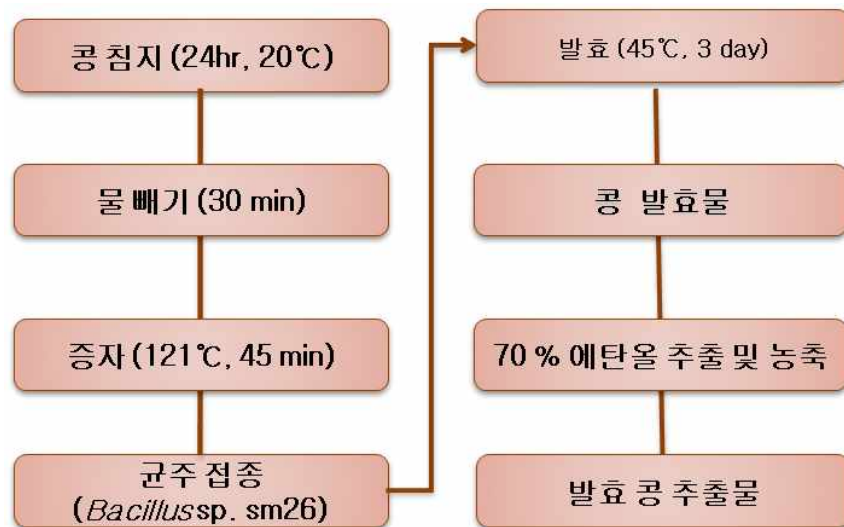


그림 4. 기능성 콩 발효 과정

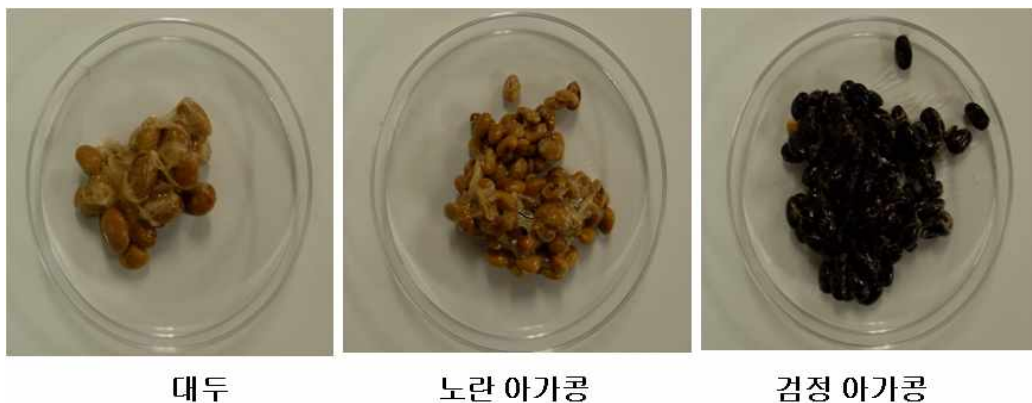


그림 5. 대두, 노란, 검정 아가콩의 발효 사진

(2) 혈전용해 효능 측정

그림 6는 대두, 노란 아가콩, 검정 아가콩의 혈전용해 효능을 비교한 사진을 나타 내었다. 혈전용해 효능은 대두에서  $0.88 \pm 0.2$  unit/ml이며, 노란 아가콩에서  $1.17 \pm 0.1$  unit/ml, 검정아가콩에서  $1.25 \pm 0.1$  unit/ml을 활성을 보여 대두에 비하여 노란, 검정 아가콩에서 높은 혈전용해 효능을 확인하였다. 활성면에서는 큰 차이를 나타내지 않지만 콩의 크기면에서 대두가 아가콩에 비하여 5배 이상 크기가 차이는 것으로 보아 콩 발효에는 아가콩이 혈전용해 효소 생산면에서 적합하다고 사료된다.

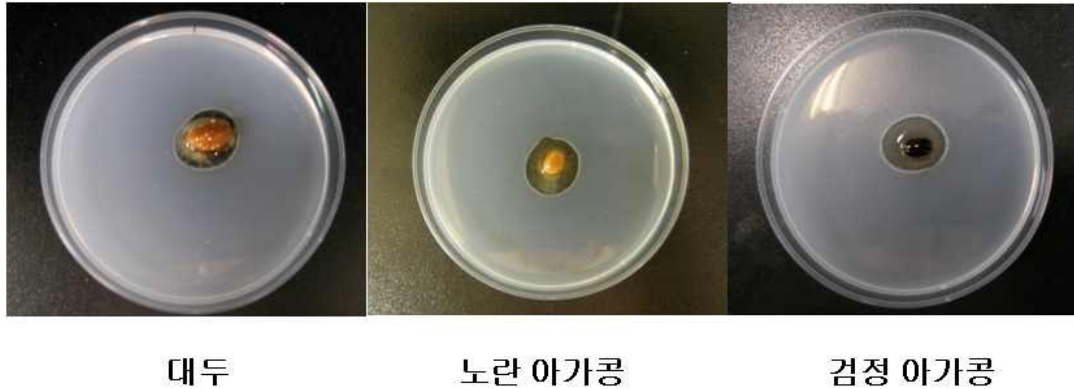


그림 6. 대두, 노란아가콩, 검정아가콩의 혈전용해효과

(3) 총 단백질, 총 당, 총 페놀 함량

대두, 노란 아가콩, 검정 아가콩의 총 단백질, 당, 페놀 함량의 정량 분석 결과는 표 1에서 나타냈었다. 총 단백질의 함량은 대두에서  $4.8 \pm 1.7$ , 노란아가콩에서  $22.5 \pm 4.6$ , 검정 아가콩에서  $15.61 \pm 4.8$   $\mu\text{g}/\text{mg}$ 로 노란아가콩에서 많은 단백질 함량을 보였으며, 총 당의 함량은 대두에서  $58.4 \pm 11.0$ , 노란 아가콩에서  $96.3 \pm 19.1$ , 검정 아가콩에서  $108.9 \pm 25.3$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  으로 당의 함량은 검정 아가콩에서 높은 함량을 나타내 었다. 그리고 항산화 효능과 관련있는 총 페놀 함량의 정량 결과 대두에서  $63.1 \pm 12.3$ , 노란 아가콩에서  $135.9 \pm 17.8$ , 검정 아가콩에서  $98.0 \pm 11.8$   $\mu\text{g}/\text{mg}$ 으로 페놀 함량은 노란 아가콩이 대두에 비하여 2배 이상의 높은 페놀 함량 분석 결과를 확인 하였다.

표 7. 콩 추출물의 단백질, 환원당, 총 페놀 함량

	대두	노란 아가콩	검정 아가콩
총 단백질 함량 ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	$4.8 \pm 1.7$	$22.5 \pm 4.6$	$15.61 \pm 4.8$
총 당 함량 ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	$58.4 \pm 11.0$	$96.3 \pm 19.1$	$108.9 \pm 25.3$
총 페놀 함량 ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	$63.1 \pm 12.3$	$135.9 \pm 17.8$	$98.0 \pm 11.8$

#### (4) DPPH 라디칼 소거 활성능

발효 콩의 에탄올 추출물의 항산화능을 DPPH에 대한 전자 공여능(electron donation ability, EDA (%))으로 측정하였다. 이러한 DPPH radical 소거 활성법은 DPPH가 자신이 가지고 있는 홀수의 전자 때문에 518 nm에서 강한 흡수를 보이거나 Pheolic 화합물과 같이 수소에 전자를 제공해주는 전자공여체와 반응을 하게 되면 전자나 Hydrogen radical을 받아 phenoxy radical을 생성하게 되어 안정한 분자가 된다. 또한 공여된 전자는 비가역적으로 결합하여 그 수에 비례하여 진보라색의 DPPH의 색깔이 점점 없어지게 되며 흡광도도 감소하게 된다. 그림 7는 발효된 대두, 노란 아가콩, 검정 아가콩 식품의 DPPH 라디칼 소거 활성능을 알아보기 위하여 측정한 결과 나타내었다.

Ascorbic acid와 a-tocopherol, BHT, BHA를 대조구로 하여 콩 추출물과 동일하게 0.1~10mg/ml 의 농도로 측정하였다. 그 결과 ascorbic와 a-tocopherol, BHT는 90%이상의 높은 활성을 나타내었고, BHA 또한 10 mg/ml에서 90%이상의 활성을 보이며 농도에 의존적으로 활성이 증가하였다.

대두, 노란 아가콩, 검정 아가콩 추출물의 경우 모두 40%이상의 활성을 나타내었으며, 특히 10 mg/ml의 농도에서는 3가지 시료 모두 80% 이상의 활성을 보이며 역시 농도에 의존적으로 활성이 증가함을 나타내었다. 대두는 84.3 %, 노란 아가콩은 82.2 %, 검정 아가콩은 87.8 % 가장 높은 활성을 나타낸다.

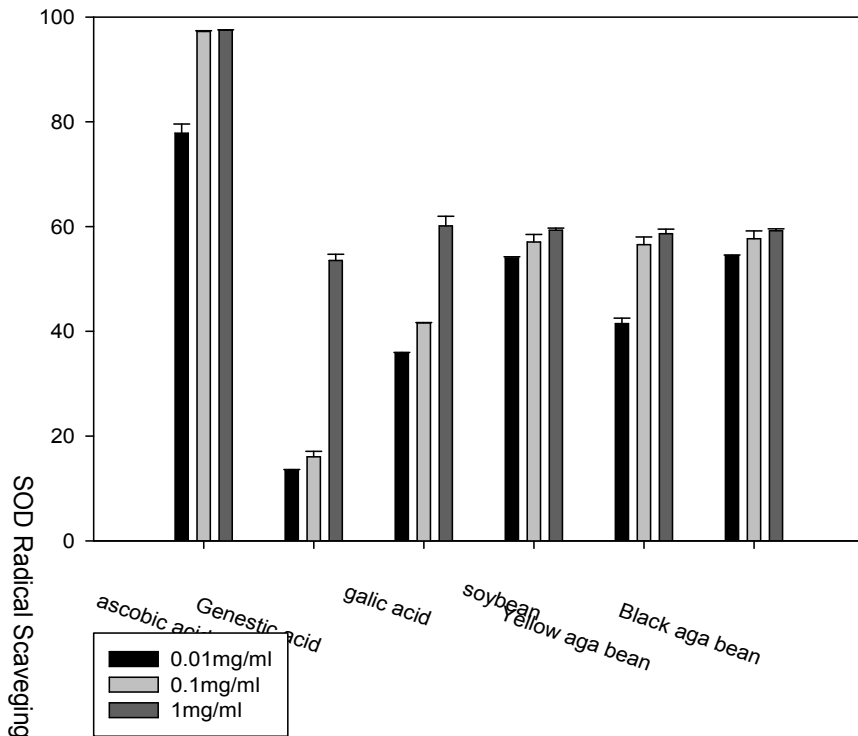


그림 7. 콩 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성능



(5) Superoxide dismutase (SOD) 유사 활성 측정

SOD(Superoxide dismutase)는 산폐로 인하여 형성된 세포에 해로운 환원 산소종을 과산화수소로 전환시키는 반응( $2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ )을 촉매하고, catalase는 SOD에 의해 생성도니  $H_2O_2$ 를 무해한 물 분자와 산소 분자로 전환시키는 역할을 하는 효소이다. 생체 내 활성 산소종은 산소에서 유래한 것들로 안정한 분자 상태인 triplet oxygen이 자외선, 대사과정, 화학반응을 통하여 생성된다. 이러한 활성 산소종류에는 다양한 자유라디칼 형태로 존재하며 이러한 활성 산소에 의한 체내 산화에 의해 생성되는 과산화물은 세포의 산화적 파괴로 다양한 질병을 야기시킨다. 본 실험에서는 생체내의 항산화 방어기구중 효소적 방어체계의 하나로 superoxide radical을 환원시켜 생체를 보호하는 superoxide radical 소거활성을 pyrogallol 자동 산화로 생성되는 superoxide anion radical 소거 여부로 확인하였다.

그림 8은 발효된 대두, 노란 아가콩, 검정 아가콩 식품의 SOD 유사 활성을 알아보기 위하여 측정한 결과를 나타내었다.

기준에 알려진 합성항산화제와 천연항산화제인 Ascorbic acid, genestic acid, galic acid를 대조구로 사용하였으며 이들 대조구와 콩 추출물은 0.01~1 mg/ml로하여 측정하였다. Ascorbic acid 경우 0.1 mg/ml에서 98 %의 높은 활성을 보였으며 콩 추출물은 1 mg/ml의 농도에서 대두에서는 59 %에서 노란 아가콩에서는 57.6 %, 검정 아가콩에서는 대두와 유사한 59%의 높은 유사 활성을 보였다. 이는 농도가 증가함에 따라 그 활성도 증가 되었으며 이들 추출물을 Genestic acid, gallic acid에 비하여 높은 유사활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

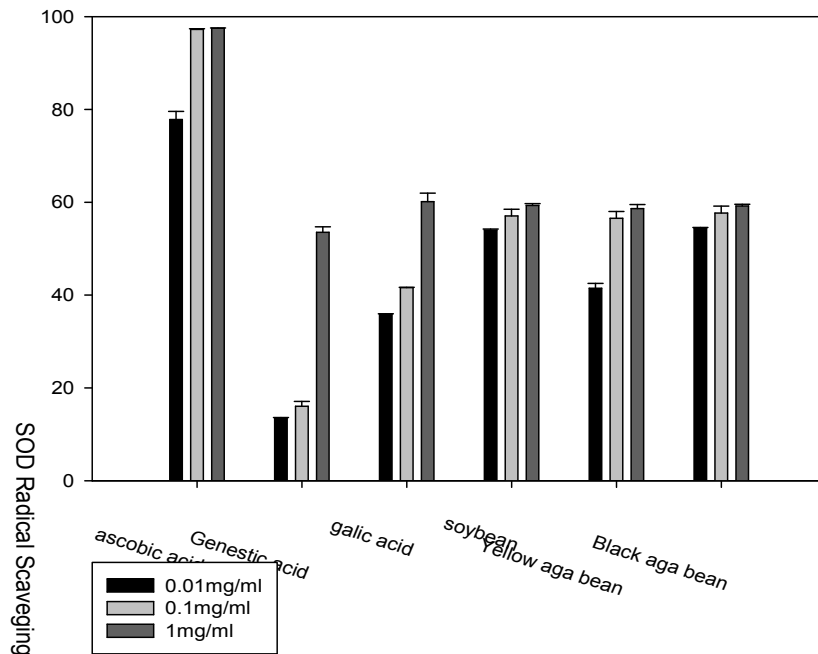


그림 8. 콩 추출물의 Superoxide dismutase (SOD) 유사 활성

(6) 환원력

환원력은 항산화 활성과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있으며 이는 항산화 활성에 주요한 인자로 작용한다. 환원력은 시료 그 자체의 능력에 따라 그림 9 발효된 대두, 노란 아가콩, 검정 아가콩 식품의 환원력을 알아보기 위하여 측정한 결과 나타내었다.

콩 추출물의 환원력은 1 mg/ml의 농도에서 대조구와 비슷한 높은 환원력을 나타내었으며 노란 아가콩의 경우 같은 농도의 ascorbic acid에 약 2배의 높은 환원력을 나타내었다. 또한 나머지 추출물 또한 다른 합성 산화제에 비하여 높은 환원력을 나타내었으며, 대조구와 콩 추출물의 환원력은 0.1에서 1 mg/ml의 농도 변화에서 급격한 환원력의 증가를 나타내었다.

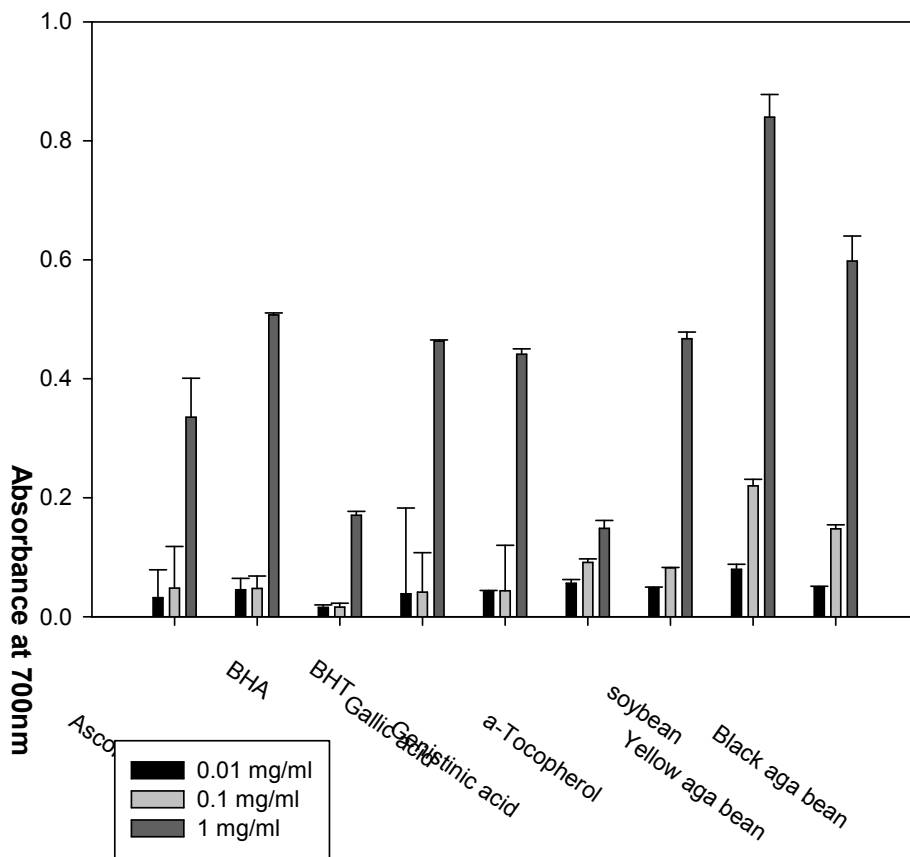


그림 9. 콩 추출물의 환원력

(7) Hydrogen peroxide

Hydrogen peroxide는 산소의 환원 대사물질로서 mitochondria나 peroxisome 등의 정상 세포로부터 형성되거나 다양한 외부요소에 의하여 형성되기도 하며 이는

DNA 및 단백질 손상을 유발하여 생체막의 구성성분인 불포화지방산에 작용하여 과산화 지질을 생성함으로써 생체기능의 저하를 유발하게 된다. 본 연구에서는 이러한 작용을 확인하고자 hydrogen peroxide 소거능에 의하여 그 활성을 확인하였다. 그림. 10은 hydrogen peroxide 소거능을 측정된 결과이다. 기존에 알려진 합성 항산화제와 천연항산화제인 Ascorbic acid, BHA, BHT, genestic acid, galic acid, a-Tocophrol을 대조구로 사용하였으며 이들 대조구와 콩 추출물은 0.0025~0.25 mg/ml로 하여 측정하였다. 그 결과 모두 0.25 mg/ml의 농도에서 80%이상의 높은 소거활성을 보였으며 특히 같은 농도에서 대두, 노란아가콩, 검정아가콩 추출물이 대조구보다 높은 소거능을 나타내었다. 추출물에서는 0.25 mg/ml에서는 발효물의 소거능이 95%이상을 보였으며 활성은 대두, 노란아가콩, 검정아가콩 추출물의 순으로 농도 의존적으로 그 활성을 보였음을 확인할 수 있었다.

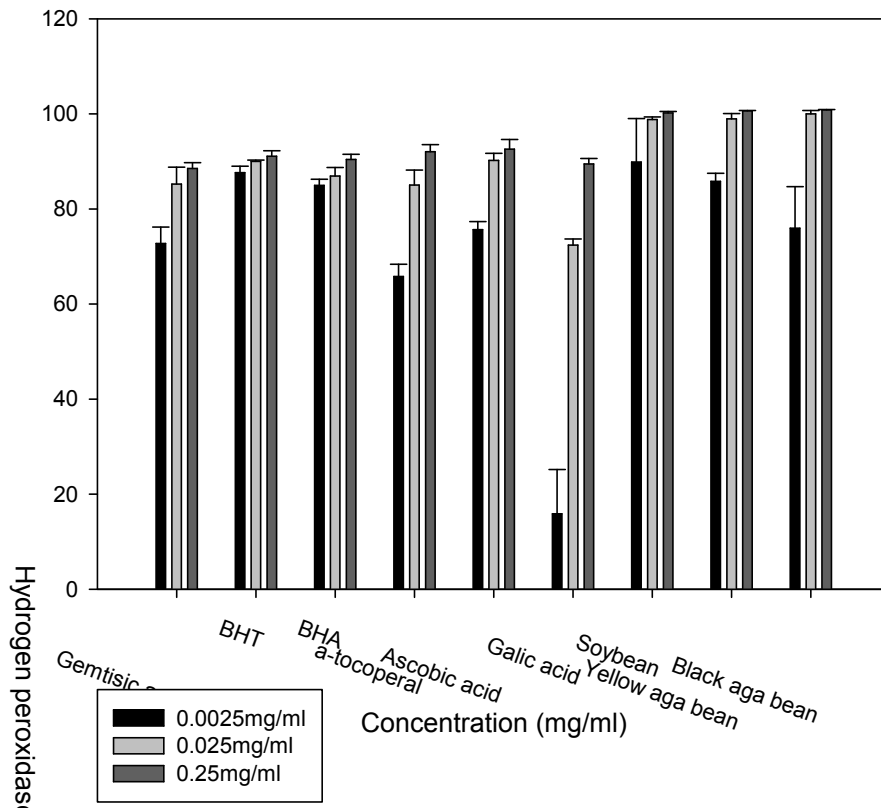


그림. 10 콩 추출물의 Hydrogen peroxide 소거능

#### (8) $\beta$ -carotene bleaching

$\beta$ -carotene의 작용은 linoleic acid로 형성된 hydroperoxide로부터 유리된 free radical과 연관되어 나타난다. 이는  $\beta$ -carotene이 발생기산소를 소거할 수 있는 능력을 가지고 있기 때문에 유리라디칼의 발생을 저지하여 세포막의 손상과 괴사를 방지함으로써 강력한 항산화작용하거나 특히, 암 유발물질은 산화에 의하여 유도되

는데,  $\beta$ -carotene이 free radical을 유도하는 발생기산소를 소거함으로써 암 발생 원인물질의 생성을 저지하게 되며 또한, 세포증식과 분화에 관련하게 된다. 본 실험에서는  $\beta$ -carotene의 bleaching에 의하여 이러한 free radical의 억제능을 확인하였다. 그림 11은  $\beta$ -carotene의 bleaching의 활성을 측정한 결과를 나타내었다. 기존에 알려진 합성항산화제와 천연항산화제인 Ascorbic acid, BHA, BHT, genestic acid, galic acid, a-Tocophrol을 대조구로 사용하였으며 이들 대조구와 콩 추출물은 0.02~2 mg/ml로 하여 측정하였다. 그 결과 농도에 의존적으로 활성이 증가하였으며, 특히 2 mg/ml의 농도에서 BHA와 a-tocopherol 이 1684.7와 1675.0로 높은 활성을 나타내었다. 대두, 노란 아가콩, 검정 아가콩 추출물의 경우 2 mg/ml의 농도에서 검정 아가콩, 노란 아가콩, 대두 추출물은 각각 836.9, 814.3, 605.0의 순으로 활성을 보였으며, 또한 농도 의존적으로 그 활성이 증가함을 확인할 수 있었다.

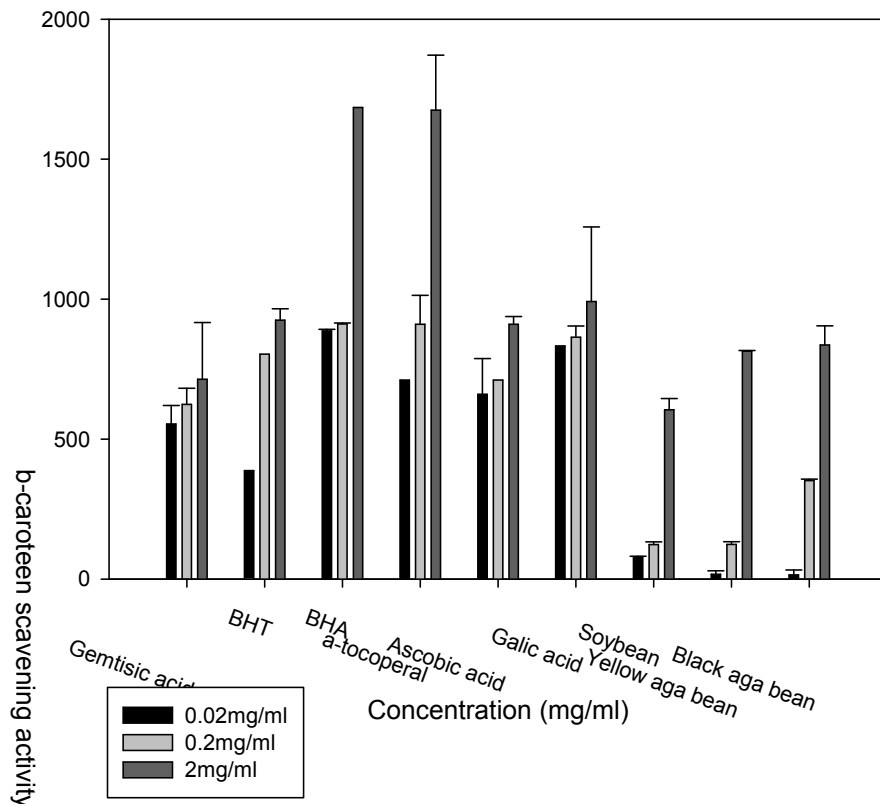


그림. 11 콩 추출물의  $\beta$ -carotene bleaching 활성

#### 다) 기능성 육종콩을 이용한 발효 시제품 제조 및 관능평가

##### (1) 시제품의 제조과정

기능성 육종콩으로부터 발효물 시제품을 제작하기 위하여 부일 F&B에 의뢰하여 본 시제품을 제작하였다. 제작방법은 준비된 아가콩을 품질이 좋은 콩을 선별하여

세척하여 물에 침적하여 물에 불려서 약 2 배 부피가 될 때 증숙기를 통하여 증숙한 다음 약 60℃정도로 될 때 낫또균을 콩에 고루 분사하여 접종한다. 이를 싸이로 기기에 넣어 이를 완제품의 용기에 넣어 제품에 필요한 필름이나 소스를 삽입하여 봉한 다음 3일정도의 발효와 숙성과정을 거쳐 완제품을 제작한다.



그림. 12 시제품의 제조과정



그림. 13 완성된 시제품

(2) 시제품의 관능검사

제조된 시제품의 관능검사를 실시하였다.

나또 (natto)의 기호도 조사용 설문지

이 설문조사는 본 연구에서 제작한 제품과 다른 타사제품간의 소비자 기호를 알아 보기 위한 것으로 이 결과는 순수한 연구 자료로서 사용됨을 말씀드리며, 제품에 구매 받지 마시고 솔직한 답변 부탁드립니다.

※ 다음 해당 항목에 √하여 주세요.

1. 일반사항

- 1) 귀하의 성별은?
  - ⓐ 남성 (    ), ⓑ 여성 (    )
- 2) 귀하의 연령은?
  - ⓐ 10-20대 (    ), ⓑ 30-40대 (    )
  - ⓒ 50-60대 (    ), ⓓ 70대 이상 (    )
- 3) 발효식품의 종류와 기능성에 대하여 잘 알고 있다.
  - ⓐ 알고있다 (    ), ⓑ 모른다 (    )
- 4) 발효식품을 판단할 때 가장 중요시 생각하는 것은 무엇입니까?

- ① 맛 (    ), ② 향기 (    )
- ③ 색 (    ), ④ 기능성 (    )
- 5) 나또(natto)에 대하여 들어본 적이 있다.
  - ① 있다 (    ), ② 없다 (    )
- 6) 나또(natto)를 먹어 본 경험이 있다.
  - ① 있다 (    ), ② 없다 (    )
- 7) 먹어본 경험이 있을 경우 횟수는?
  - ① 1~3회 (    ), ② 5~10회 (    )
  - ③ 10회 이상 (    )
- 8) 먹어보게 된 경위 ?
  - ① 여행지(일본)에서 처음 먹어봄 (    )
  - ② 마트나 쇼핑상가에서 직접 구매하여 먹어봄 (    )
  - ③ 주변의 권유로 먹어봄 (    )
- 9) 먹어본 경우 제품은?
  - ① 국내 시판제품 (풀무원 생나또 “실의 힘” 외) (    )
  - ② 인터넷 구매 (국내 온라인 판매 제품) (    )
  - ③ 인터넷 구매 (일본 수입 제품) (    )

2) 색, 맛, 향미 평가

- 1) 방금 드신 제품(검정 A, 검정B, 노란A, 노란B)의 색을 평가하신다면?
 

[① : 진하다, ② : 비슷하다, ③ : 연하다.]

  - ① 검정 A제품 (    ), ② 검정 B제품 (    )
  - ③ 노란 A제품 (    ), ④ 노란 B제품 (    )
- 2) 방금 드신 제품(검정 A, 검정B, 노란A, 노란B)의 향기를 평가하신다면?
 

[① : 구수하다, ② : 보통이다 ③ : 발효취가 강하다.]

  - ① 검정 A제품 (    ), ② 검정 B제품 (    )
  - ③ 노란 A제품 (    ), ④ 노란 B제품 (    )
- 3) 방금 드신 제품(검정 A, 검정B, 노란A, 노란B)의 점질물의 생성여부를 평가하신다면?
 

[① : 많다, ② : 비슷하다 ③ : 적다.]

  - ① 검정 A제품 (    ), ② 검정 B제품 (    )
  - ③ 노란 A제품 (    ), ④ 노란 B제품 (    )
- 4) 방금 드신 제품(검정 A, 검정B, 노란A, 노란B)의 콩의 단단한 정도를 평가하신다면?
 

[① : 단단하다. ② : 적당하다. ③ : 무르다]

- ① 검정 A제품 (     ), ② 검정 B제품 (     )  
 ③ 노란 A제품 (     ), ④ 노란 B제품 (     )
- 5) 방금 드신 제품(검정 A, 검정B, 노란A, 노란B)의 맛을 평가하신다면?  
 [① : 아주좋다. ② : 보통이다. ③ : 미흡하다]
- ① 검정 A제품 (     ), ② 검정 B제품 (     )  
 ③ 노란 A제품 (     ), ④ 노란 B제품 (     )
- 6) 방금 드신 제품(검정 A, 검정B, 노란A, 노란B)을 전체적으로 평가하신다면?  
 [① : 아주좋다. ② : 보통이다. ③ : 미흡하다]
- ① 검정 A제품 (     ), ② 검정 B제품 (     )  
 ③ 노란 A제품 (     ), ④ 노란 B제품 (     )
- 7) 방금 드신 제품의 평가에 가장 영향을 미치는 요인은 무엇입니까?
- ① 맛 (     ), ② 향기 (     )  
 ③ 색 (     ), ④ 기능성 (     )

3) 기타 하시고 싶은 말씀이 있으시다면?

설문에 답하여 주셔서 감사합니다.

---

### (3) 일반사항

관능검사는 제작한 시제품 검은아가콩 (아가BB), 노란아가콩 (아가YB) 과 대조구로 시판제품 (풀무원의 “실의힘”)을 이용하여 관능검사를 실시하였다. 그리고 인원은 총 50명을 실시하였으며 남42%, 여58%의 비율로 실시하였다. 연령은 10대-20대는 82%, 30대-40대 12%, 50대 이상은 6%의 비율로 나타났다. 이는 조사기관이 학교인 관계로 상대적으로 10대-20대의 비율이 높았으며, 이러한 발효제품의 섭취 유무를 조사한 결과 82%의 비율로 대체적으로 섭취한 경험이 없었으며 이는 대부분 10대-20대에서 나온 결과이며 섭취경험이 있는 경우는 여행이나 주변의 권유 등으로 인하여 섭취경험이 있다고 조사되었다. 본 결과는 섭취 경험이 없으면서 그리고 발효식품에 대체적으로 그 수요가 낮은 연령층을 상대로 나타낸 결과 이므로 다양한 계층에 기호도가 높은 제품의 개발을 위한 필수적인 자료로 사료된다.

### (4) 색, 향미 평가

본 시제품의 색은 시판제품에 비하여 개발한 시제품 모두 짙은 색을 나타낸다고 설문하였으며, 이는 노란콩의 경우 증자나 성분의 차이에 의하여 약간 짙은 색을



보이는 것으로 사료되며 검은 콩의 경우는 오히려 다른 제품의 콩보다 안토시아닌 성분이 높아 상대적으로 짙은색을 나타내는 것으로 사료된다.

향미에서는 모든 제품에 대하여 70%이상에서 보통이상의 평가를 해주었으며 이는 어릴때부터 콩발효 제품에 익숙해서 이러한 결과를 보였다고 사료된다. 그리고 결과에서는 검은콩 제품이 상대적으로 노란콩에 비하여 구수하고, 발효취정도가 적다고 평가하는 것은 검정콩의 경우 포함된 성분이 다른 균의 번식을 억제시키거나 향미를 줄수 있는 성분으로 인하여 이러한 결과를 보인 것으로 사료된다. 그리고 전체적인 결과를 보았을 때 판단기준이 다양하여 이는 발효제품의 향의 구분이 쉽취하는 사람의 주관적인 판단에 따라 다르게 느껴진다고 사료되며, 전체적인 결과로 보아 아가콩이 38%, 26%로 시판제품보다는 구수하다는 평가를 확인할 수 있었다.

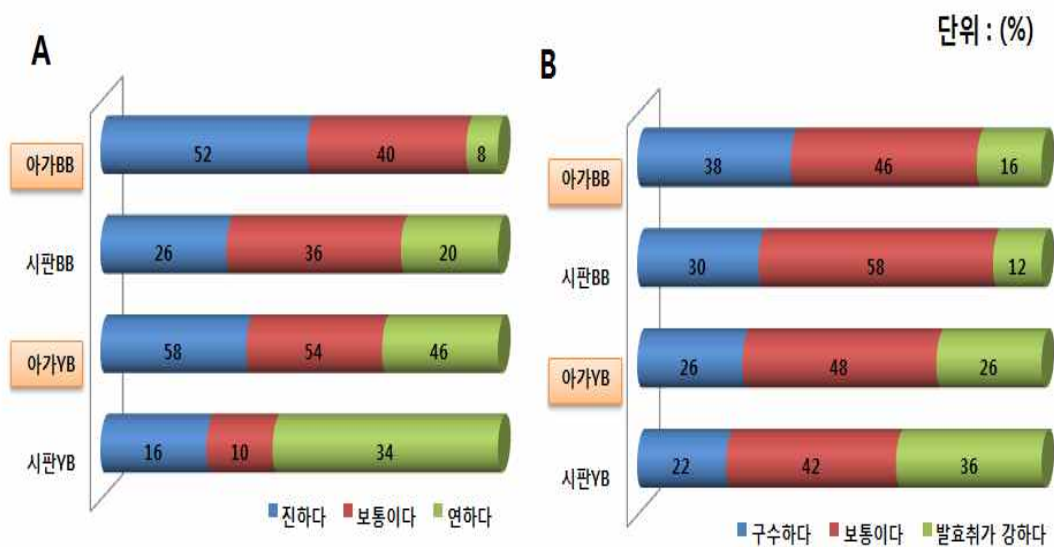


그림. 14 발효시제품의 색(A), 향미(B)의 평가

#### (5) 단단한 정도, 점질물 생성정도와 맛 평가

본 시제품의 단단한 정도는 전체적으로 검정콩이 노란콩에 비하여 단단하다고 설문하였으며, 시판제품에 비하여 개발한 시제품의 섭취시 검정콩은 거의 비슷하다는 평가를 한 반면에 노란콩의 경우는 시판제품에 비하여 그 단단한 정도가 낮다는 평가를 하였다. 이는 콩제품을 다양한 연령층에서 쉽게 섭취하기 적당하다고 사료된다.

그리고 콩발효제품의 가장 중요한 점질물의 생성은 아가콩 시제품이 시판제품에 비하여 점질물의 생성이 현저히 낮다고 평가하였다. 특히 시판제품의 점질물은 점도가 높다고 평가하였다. 이는 균주의 차이 뿐만 아니라 제조공정, 제조일의 차이

등으로 나타날 수 있다고 사료된다.

맛에 대한 평가는 검정콩제품이 노란콩 제품에 비하여 맛에서는 “아주좋다“는 결과를 30%이상 나타내었다. 검정 아가콩 제품의 경우는 시제품이나 시판제품이나 별다른 차이를 느끼지 못했다고 답변하였고 노란콩은 오히려 시판제품보다 좋다는 평가를 나타내었다. 전체적인 맛의 평가에서는 80%이상에서 보통이상의 평가를 해주었으며 이는 우리나라 사람이 오래전부터 콩제품에 익숙하며 그리고 특히 콩을 이용한 발효제품인 된장, 청국장에 익숙해져 있어서 이러한 제품에 크게 거부감 없이 섭취를 할 수 있는 것으로 사료된다.

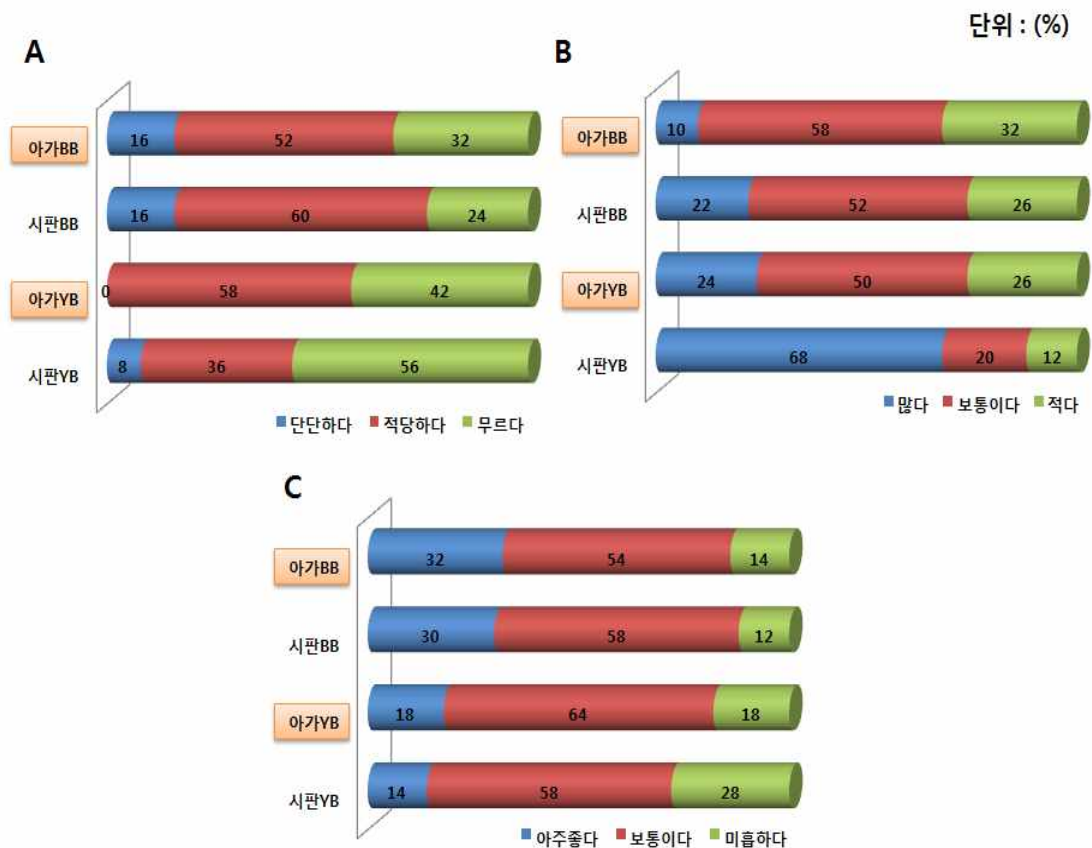


그림. 15 발효시제품의 단단한 정도(A), 점질물 생성량(B), 맛(C)의 평가

#### (6) 전체적인 평가

본 연구에서 개발한 발효제품을 전체적인 평가 및 앞으로 개선을 위하여 평가하게된 기준을 조사해본 결과 본 연구에서 개발한 발효제품은 검정, 노란 아가콩제품의 경우 40%, 22%로 “아주 좋다“는 결과를 나타내었으며 이는 시판되는 제품보다 높은 평가를 나타내었으며 70%이상에서는 모두 ‘보통이다’ 이상의 결과를 나타내었

다. 그리고 이러한 발효식품을 평가하는데 맛, 향기, 색, 기능성을 제시하여 평가하는 기준을 조사해본 결과 평가기준으로서는 맛에 대한 의존도가 60%로 높게 나타났으며, 그 외 향미, 기능성의 순으로 이러한 식품을 판단하는데 영향을 보였다. 그러나 색은 크게 평가기준에 포함되지 않는 것을 확인할 수 있었다.

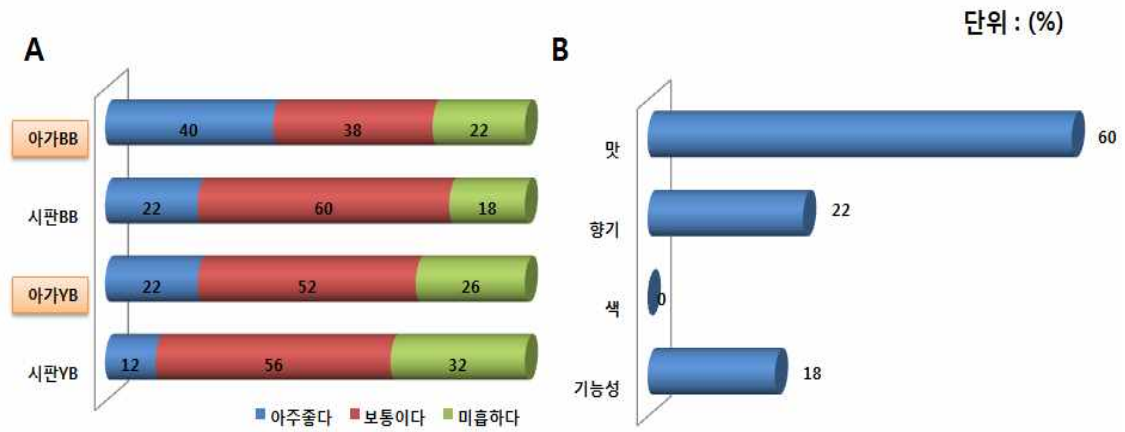


그림. 16 전체적인 평가(A), 평가기준(B)의 평가

## 2) 콩 유래 항당뇨 peptide 소재 및 제품 개발

### 가) db/db mouse에 있어서 아가콩의 혈당개선 효과 규명

#### (1) 대두 및 아가콩(아가-3)의 일반성분

가압증자한 후 동결건조한 대두 및 아가-3의 일반성분 분석결과는 Table 3에 나타내었다. 대두의 수분 함량은 6.9%, 단백질 34.1%, 지방 17.8%, 회분 4.8%, 총 식이섬유는 18.2%로 나타났다. 아가-3의 수분함량은 6.5%, 단백질 33.4%, 지방 16.0%, 회분 5.2%, 그리고 총 식이섬유는 18.7%로 나타났다.

Table 3. Proximate composition of soybean and *Aga*-bean (*Aga*-3)

	Soybean (%)	<i>Aga</i> -3 (%)
Moisture	6.9	6.5
Crude protein	34.1	33.4
Crude lipid	17.8	16.0
Crude ash	4.8	5.2
Total dietary fiber	18.2	18.7

(2) db/db mouse에 있어서 혈당조절 효과 규명

(가) 체중 및 식이섭취량

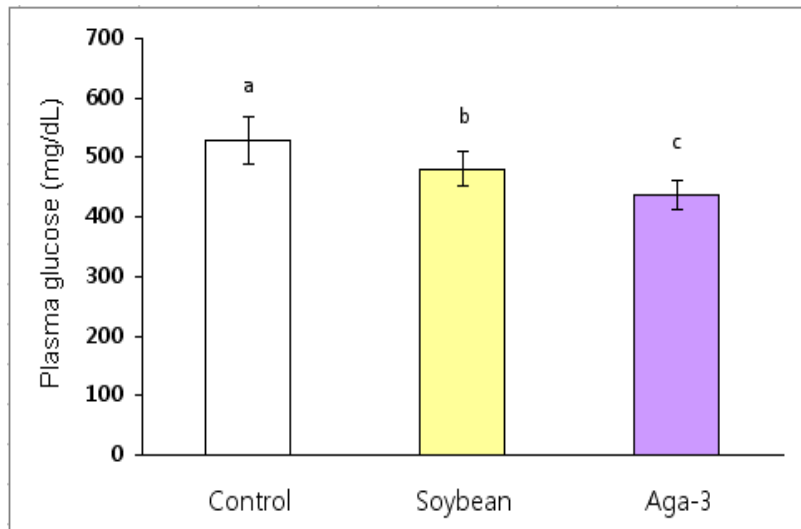
db/db mouse에게 대두, 아가-3이 함유된 식이를 6주간 섭취시킨 결과 체중과 식이섭취량은 유의적인 차이가 없었다(Table 4).

Table 4. Body weight and food intake of db/db mice

	Control group	Soybean group	<i>Aga-3</i> group
Body weight (g)	39.0 ± 1.3	41.7 ± 5.3	42.0 ± 6.3
Food intake (g/d)	4.5 ± 0.3	5.0 ± 0.6	4.6 ± 0.2

(나) 혈당개선 효과

db/db mouse에게 대두 및 아가-3을 함유한 식이를 6주간 공급한 후 공복 혈당을 측정한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 공복 혈당은 대조군 529.4±40.5 mg/dL, 대두군 481.0±29.2 mg/dL, 아가-3군 436.7±24.0 mg/dL로 나타나, 대조군에 비해 대두군이 유의적으로 감소하였고, 대두군에 비해 아가-3군이 유의적으로 감소하였다( $p < 0.05$ ). 따라서 대두의 섭취는 제2형 당뇨병에 있어서 고혈당 개선효과를 나타내고, 아가콩은 대두보다 고혈당 개선효과가 더 우수한 것으로 나타났다.



$p < 0.05$

Fig. 1. Fasting plasma glucose levels of db/db mice fed soybean and *Aga-3*.

대조군, 대두군, 아가-3군의 혈장 인슐린 농도는 각각  $4.53 \pm 0.44$  ng/mL,  $4.31 \pm 0.37$  ng/mL,  $4.20 \pm 0.32$  ng/mL로 나타나, 3군 간에 유의적인 차이가 없었다 (Fig. 2).

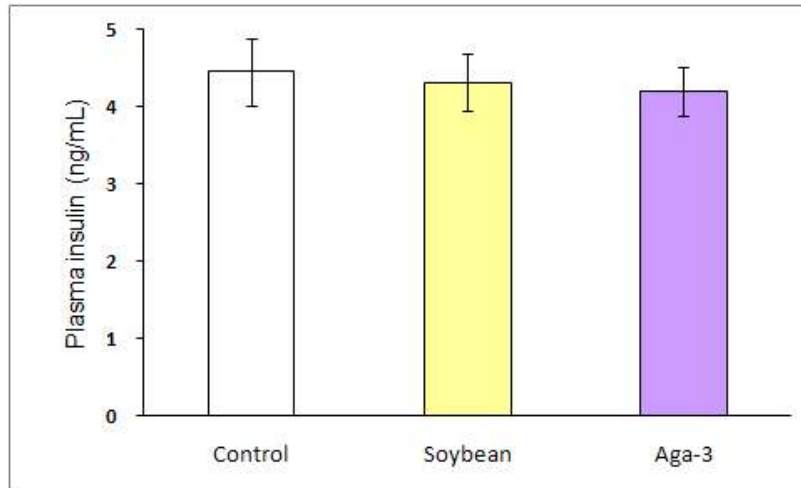
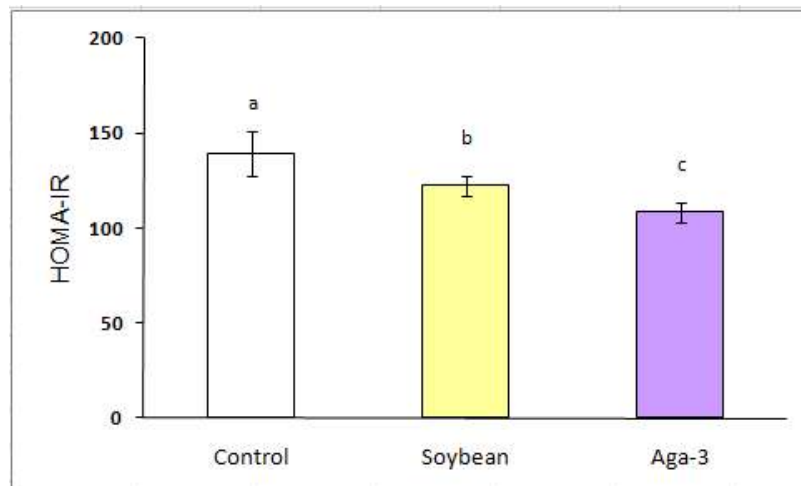


Fig. 2. Plasma insulin levels of db/db mice fed soybean and *Aga-3*.

인슐린저항성 지표인 HOMA-IR은 대두군의 경우  $122.4 \pm 5.1$ 로 나타나, 대조군 ( $139.2 \pm 11.9$ )에 비해 유의적으로 감소하였고, 아가-3군의 경우  $108.3 \pm 5.6$ 로 나타나, 대두군에 비해 유의적으로 감소하였다( $p < 0.05$ , Fig. 3).

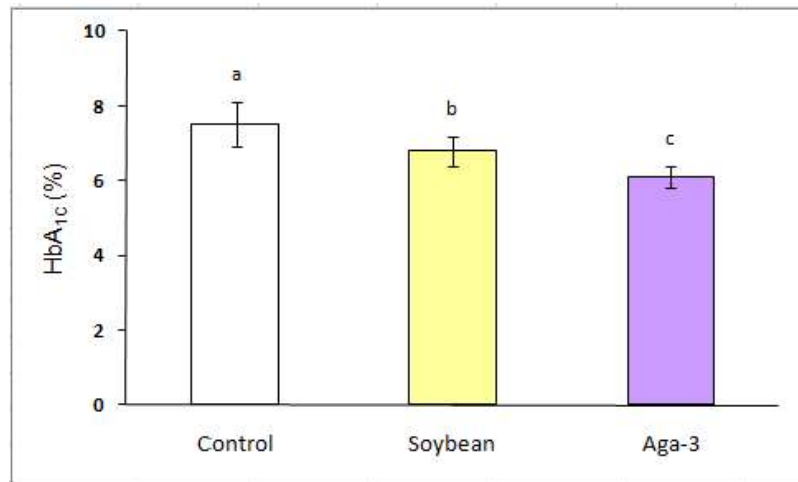


$p < 0.05$

Fig. 3. HOMA-IR of db/db mice fed soybean and *Aga-3*.

당화헤모글로빈 농도는 대두군의 경우  $6.8 \pm 0.4\%$ 로 나타나, 대조군 ( $7.5 \pm 0.6\%$ )에 비해 유의적으로 감소하였고, 아가-3군의 경우  $6.1 \pm 0.3\%$ 로 나타나, 대두군에 비해 유의적으로 감소하였다( $p < 0.05$ , Fig. 4). 따라서 제2형 당뇨병 동물에 있어서

아가-3의 섭취는 대두보다 혈당을 유의적으로 감소시키고 인슐린저항성을 개선하는 효과가 더 우수한 것으로 나타났다. 당화헤모글로빈은 장기간의 혈당조절 정도를 나타내는 중요한 지표이다. 따라서 아가-3은 대두보다 당뇨병의 가장 중요한 목표인 혈당조절에 더 큰 도움이 되는 것으로 사료된다.

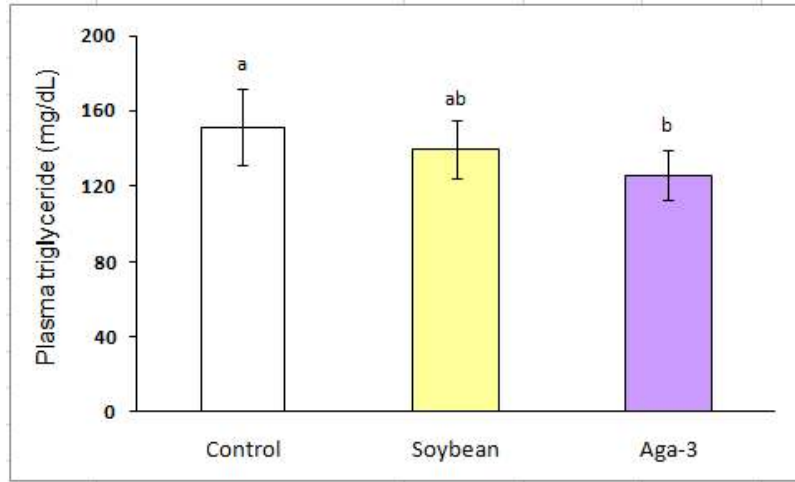


$p < 0.05$

Fig. 4. HbA<sub>1c</sub> levels of db/db mice fed soybean and *Aga-3*.

#### (다) 지질대사 개선효과

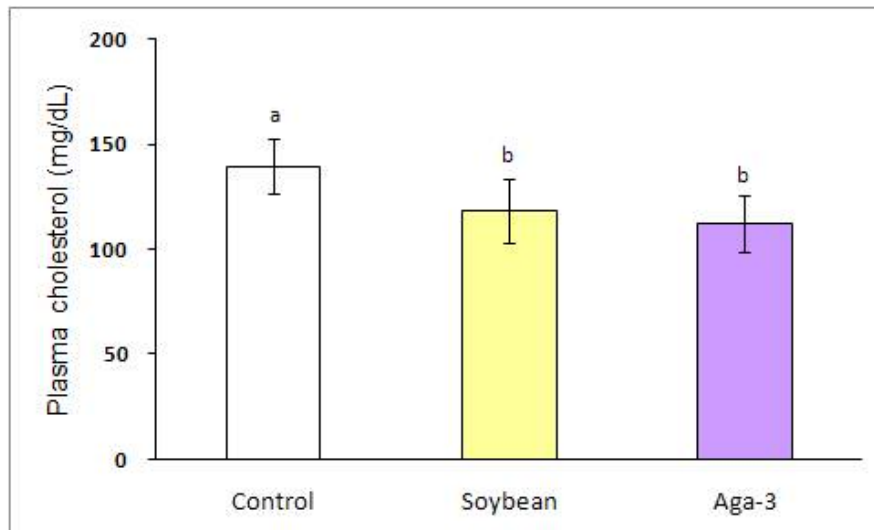
db/db mouse에게 대두 및 아가-3을 장기간 섭취시킨 후 혈장 중성지방 농도를 측정된 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 아가-3군의 혈장 중성지방 농도는  $125.4 \pm 13.3$  mg/dL로 나타나, 대조군( $151.1 \pm 20.5$  mg/dL)에 비해 유의적으로 감소하였으며 ( $p < 0.05$ ), 대두군( $139.3 \pm 15.3$  mg/dL)은 대조군 및 아가-3군간에 유의적인 차이가 없었다. 아가-3의 섭취는 인슐린저항성 개선효과를 나타내고, 인슐린저항성이 개선되면 중성지방 농도가 개선되는 효과를 기대할 수 있다. 당뇨병의 경우 중성지방 농도가 증가하는 이상지혈증이 나타나며, 이는 당뇨합병증의 중요 위험인자가 된다. 따라서 아가-3의 섭취는 중성지방 농도를 감소시켜, 당뇨합병증을 개선시키는 효과를 나타낼 것으로 사료된다.



p<0.05

Fig. 5. Plasma triglyceride levels of db/db mice fed soybean and *Aga-3*.

대두군 및 아가-3군의 콜레스테롤 농도는  $118.5 \pm 15.2$  mg/dL 및  $111.9 \pm 13.5$  mg/dL로 나타나 대조군( $139.4 \pm 13.0$  mg/dL)에 비해 유의적으로 감소하였다(p<0.05, Fig. 6). 콜레스테롤의 증가는 동맥경화를 포함하는 심혈관계질환의 주요 위험인자가 된다. 대두와 아가-3의 섭취는 콜레스테롤 농도를 감소시켜, 심혈관계질환을 예방하는 효과를 나타낼 것으로 사료된다. 대두와 아가-3의 단백질이 콜레스테롤 농도 감소에 기여한 것으로 사료된다.

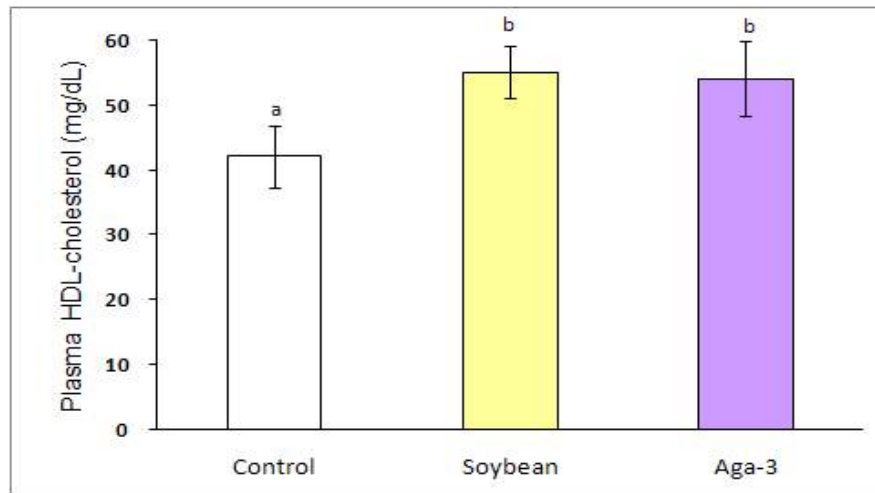


p<0.05

Fig. 6. Plasma cholesterol levels of db/db mice fed soybean and *Aga-3*.

대두군 및 아가-3군의 HDL-콜레스테롤 농도는  $54.9 \pm 5.7$  mg/dL,  $56.6 \pm 5.3$  mg/dL로 나타나 대조군( $46.3 \pm 6.3$  mg/dL)에 비해 유의적으로 증가하였다(p<0.05, Fig. 7).

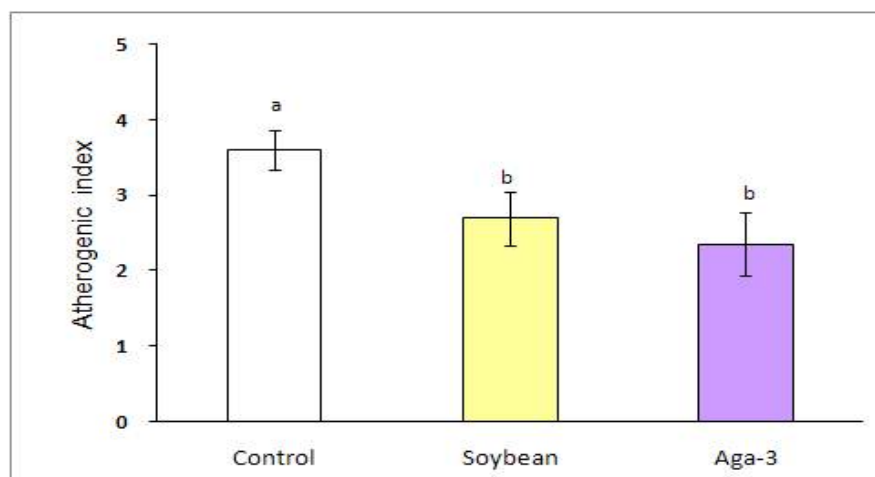
당뇨병의 경우 HDL-콜레스테롤 농도가 감소하는 이상지혈증이 나타나며, 이는 당뇨합병증의 중요 위험인자가 된다. 따라서 대두 및 아가-3의 섭취는 HDL-콜레스테롤 농도를 증가시켜, 당뇨합병증을 개선시키는 효과를 나타낼 것으로 사료된다.



$p < 0.05$

Fig. 7. Plasma HDL-cholesterol levels of db/db mice fed soybean and *Aga-3*.

동맥경화지수(중성지방/HDL-콜레스테롤)는 대두군 및 아가-3군이 각각  $2.55 \pm 0.27$ ,  $2.23 \pm 0.28$ 로 나타나, 대조군( $3.29 \pm 0.42$ )에 비해 유의적으로 감소하였다. ( $p < 0.05$ , Fig. 8). 당뇨환자의 주된 사망요인은 심혈관계 합병증이며, 이상지혈증은 심혈관계 합병증의 주요 위험요인이다. 따라서 아가-3군의 섭취는 혈장 중성지방과 콜레스테롤 농도 및 동맥경화지수를 저하시키고, HDL-콜레스테롤을 증가시켜 심혈관계질환을 포함한 당뇨합병증 예방에 도움이 되는 것으로 사료된다.



$p < 0.05$

Fig. 8. Atherogenic index of db/db mice fed soybean and *Aga-3*.



(라) 간조직의 지질과산화물 농도 및 항산화 효소계 활성

간조직의 지질과산화물 농도를 측정한 결과 대두군 및 아가-3군의 경우  $6.5 \pm 1.4$  및  $5.8 \pm 0.8$  nmol MDA/mg protein으로 나타나, 대조군( $8.6 \pm 1.4$  nmol MDA/mg protein)에 비하여 유의적으로 감소하였다( $p < 0.05$ , Fig. 9). 이는 대두 및 아가-3에 함유된 isoflavone의 효과로 사료된다. 아가-3는 대두에 비해 isoflavone 함량이 높으나, 아가-3군의 간 조직 지질과산화물 농도는 대두군에 비해 낮은 경향을 나타내었으며, 두 군 사이에 유의적인 차이는 없었다.

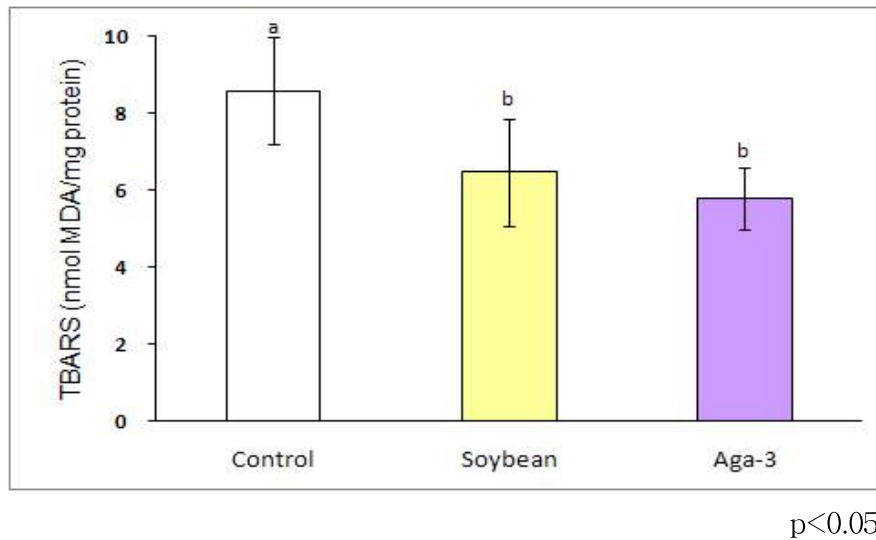


Fig. 9. Hepatic TBARS levels of db/db mice fed soybean and *Aga-3*.

대두군, 아가-3군의 간조직 SOD 활성은  $36.7 \pm 4.0$ ,  $38.7 \pm 3.1$  U/mg protein로 나타나, 대조군( $26.2 \pm 3.4$  U/mg protein)에 비하여 유의적으로 증가하였다( $p < 0.05$ , Table 5). Catalase 활성은 대조군, 대두군, 아가-3군이 각각  $19.9 \pm 2.8$ ,  $27.7 \pm 3.3$ ,  $32.01 \pm 3.2$  U/mg protein으로 나타났다. 대두군의 catalase 활성은 대조군에 비해 유의적으로 증가하였고, 아가-3군은 대두군에 비해 유의적으로 증가하였다( $p < 0.05$ ). 당뇨병의 경우 산화적 스트레스가 증가하고, 과산화는 당뇨합병증을 악화시킨다. 대두와 아가-3의 섭취는 항산화 효소계 활성을 증가시키고 지질 과산화물을 감소시켜, 당뇨합병증 예방에 도움이 될 것으로 사료된다.

Table 5. Effect of Soybean and *Aga-3* on hepatic SOD and catalase activities of db/db mice

	SOD (U/mg protein)	Catalase (U/mg protein)
Control group	$26.2 \pm 3.4^a$	$19.9 \pm 2.8^a$
Soybean group	$36.7 \pm 4.0^b$	$27.7 \pm 3.3^b$
<i>Aga-3</i> group	$38.7 \pm 3.1^b$	$32.07 \pm 3.2^c$

$p < 0.05$

나) 제2형 당뇨병 동물 모델에 있어서 아가콩 및 발효 아가콩의 항당뇨 효과 규명

(1) 대두, 아가콩 및 발효 아가콩 주정 추출물 수율

대두, 노란아가콩, 검정아가콩, 발효 대두, 발효 노란아가콩, 발효 검정아가콩 주정 추출물의 수율(yield)은 각각 12.6%, 12.1%, 10.0%, 10.7%, 11.1%, 7.9%로 나타났다 (Table 6).

Table 6. Yields of ethanol extracts of raw and fermented soybean and *Aga*-beans

	%
Soybean	12.6
Yellow <i>Aga</i>	12.1
Black <i>Aga</i>	10.0
Fermented soybean	10.7
Fermented yellow <i>Aga</i>	11.1
Fermented black <i>Aga</i>	7.9

(2) In vitro에서 탄수화물 소화효소 및 지질 소화효소 저해활성

콩 및 발효 콩 추출물(0.5 mg/mL)의 yeast  $\alpha$ -glucosidase 저해활성을 측정한 결과, 대두, 노란아가콩, 검정아가콩의 저해활성이 각각 33.2%, 36.9%, 38.2%로 나타났다, 발효 대두, 발효 노란아가콩, 발효 검정아가콩의 저해활성은 각각 23.2%, 40.9%, 30.1%로 나타났다(Table 7). 당뇨병 치료제로 사용되고 있는  $\alpha$ -glucosidase 저해제인 acarbose는 43.7% 저해활성을 나타내었다.

대두, 아가콩 및 발효 아가콩(0.25 mg/mL)의 porcine pancreatic lipase 저해활성을 측정한 결과, 대두, 노란아가콩, 검정아가콩의 저해활성이 각각 30.3%, 46.9%, 57.3%로 나타났고, 발효 대두, 발효 노란아가콩 및 발효 검정아가콩의 저해활성은 각각 25.1%, 44.5%, 40.7%로 나타났다(Table 7). 비만치료제인 Xenical은 97.2% 저해활성을 나타내었다.

Table 7. ~Inhibitory activities of raw and fermented soybean and *Aga*-beans against yeast  $\alpha$ -glucosidase and pancreatic lipase

	Yeast $\alpha$ -glucosidase inhibition (%)	Pancreatic lipase inhibition (%)
Soybean	33.2	30.3
Yellow <i>Aga</i>	36.9	46.9
Black <i>Aga</i>	38.2	57.3
Fermented soybean	23.2	25.1
Fermented yellow <i>Aga</i>	40.9	44.5
Fermented black <i>Aga</i>	30.1	40.7
Acarbose	43.7	-
Xenical	-	97.2

(3) 대두, 노란아가콩, 발효 대두 및 발효 노란아가콩의 일반성분

가압증자한 후 동결건조한 대두, 노란아가콩, 발효 대두 및 발효 노란아가콩의 일반성분 분석결과는 Table 8에 나타내었다. 대두의 수분 함량은 6.9%, 단백질 34.1%, 지방 17.8%, 회분 4.8%, 그리고 총 식이섬유는 18.2%로 나타났다. 노란아가콩의 수분함량은 6.5%, 단백질 33.4%, 지방 16.0%, 회분 5.2%, 그리고 총 식이섬유는 18.7%로 나타났다. 발효 대두의 수분함량은 7.6%, 단백질, 지방, 회분, 총 식이섬유는 각각 39.2%, 22.5%, 5.0%, 19.8%로 나타났다. 발효 노란아가콩의 수분함량은 7.3%, 단백질 36.9%, 지방 21.3%, 회분 4.1%, 총 식이섬유는 20.1%로 나타났다.

Table 8. Proximate compositions of autoclaved and fermented soybean and *Aga*-bean

	Soybean (%)	Yellow <i>Aga</i> (%)	Fermented soybean (%)	Fermented yellow <i>Aga</i> (%)
Moisture	6.9	6.5	7.6	7.3
Crude protein	34.1	33.4	39.2	36.9
Crude lipid	17.8	16.0	22.5	21.3
Crude ash	4.8	5.2	5.0	4.1
Total dietary fiber	18.2	18.7	19.8	20.1

(4) 제2형 당뇨병 동물 모델에 있어서 항당뇨 효능

(가) 체중 및 식이섭취량 측정

db/db mouse에게 대두, 노란아가콩, 발효 대두 및 발효 노란아가콩이 함유된 식이를 6주간 섭취시킨 결과 체중과 식이섭취량은 유의적인 차이가 없었다(Table 9).

Table 9. Body weight and food intake of db/db mice

	Control	Soybean	Yellow <i>Aga</i>	Fermented soybean	Fermented yellow <i>Aga</i>
Body weight (g)	39.2±4.1	39.3±3.6	42.3±2.9	40.7±5.0	41.9±4.1
Food intake (g/d)	4.8±0.3	4.6±0.2	4.8±0.4	4.7±0.3	4.5±0.5

(나) 혈당개선 효과

db/db mouse에게 대두, 노란아가콩, 발효 대두 및 발효 노란아가콩을 함유한 식이를 6주간 공급한 후 공복혈당을 측정된 결과를 Fig. 10에 나타내었다. 공복 혈당은 대조군 531.4±41.0 mg/dL, 대두군 473.6±29.7 mg/dL, 노란아가콩군 410.2±26.4 mg/dL, 발효 대두군 439.9±35.2 mg/dL, 발효 노란아가콩군 331.8±31.0 mg/dL로 나타났다. 노란아가콩군과 발효 대두군의 혈당은 대조군에 비해 유의적으로 감소하였고( $p<0.05$ ), 대두군의 혈당은 대조군, 발효 대두군과 유의적인 차이가 없었다. 발효 노란아가콩군의 혈당은 노란아가콩군에 비해 유의적으로 감소하였다( $p<0.05$ ). 따라서 대두군에 비해 노란아가콩의 혈당저하효과가 더 우수하게 나타났고, 발효 노란아가콩의 혈당저하효과가 가장 우수하게 나타났다. 콩은 발효과정 중에 단백질이 펩타이드로 일부 전환되고 이소플라본은 배당체 형에서 aglycone 형태로 일부 변화된다. 펩타이드와 aglycone 형태의 이소플라본이 발효 아가콩의 혈당 개선효과에 기여한 것으로 사료된다.

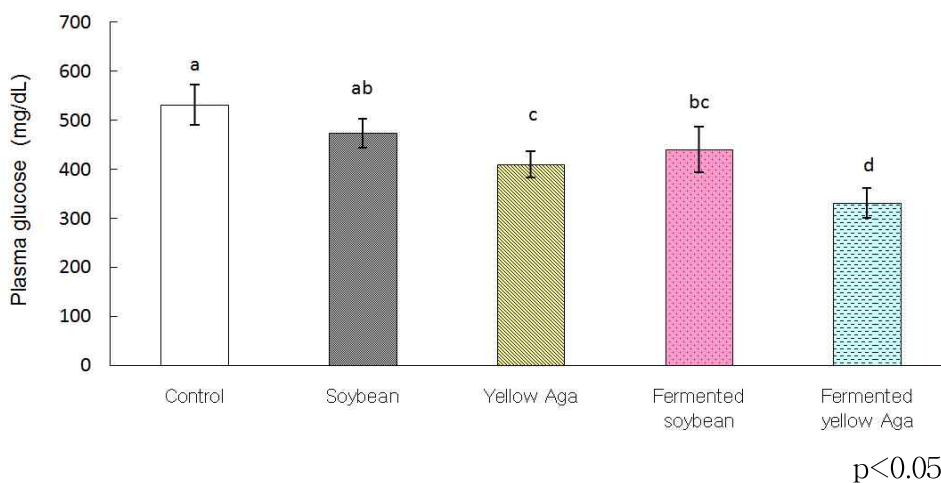


Fig. 10. Fasting plasma glucose levels of db/db mice.

대조군, 대두군, 노란아가콩군, 발효 대두군, 발효 노란아가콩군의 혈장 인슐린 농도는 각각  $6.2 \pm 0.5$ ,  $6.3 \pm 0.7$ ,  $5.9 \pm 0.5$ ,  $5.0 \pm 0.3$ ,  $4.9 \pm 0.3$  ng/mL로 나타났다(Fig. 11). 노란아가콩군 및 발효 노란아가콩군의 인슐린 농도는 대조군, 대두군, 발효 대두군에 비해 유의적으로 낮게 나타났다( $p < 0.05$ ).

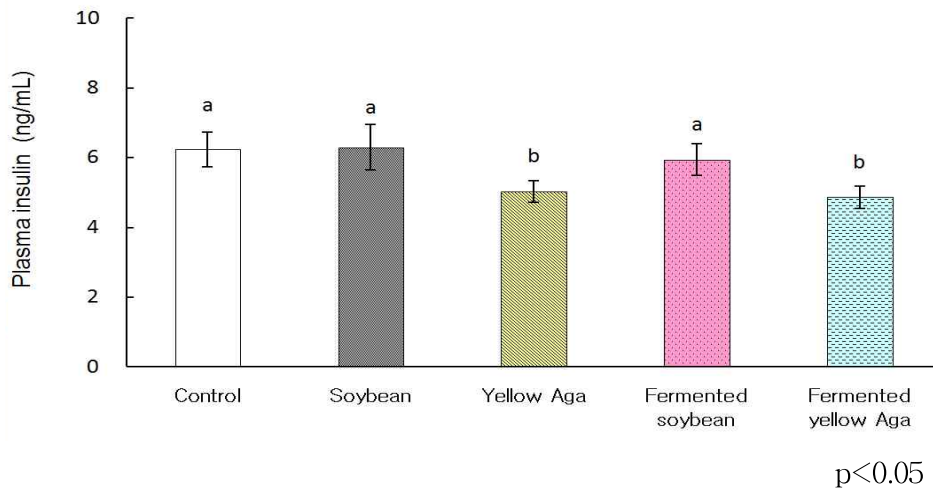


Fig. 11. Plasma insulin levels of db/db mice.

혈액 당화헤모글로빈 농도는 대조군, 대두군, 노란아가콩군, 발효 대두군 및 발효 노란아가콩군이 각각  $7.8 \pm 0.84\%$ ,  $7.5 \pm 0.5\%$ ,  $7.1 \pm 0.4\%$ ,  $6.8 \pm 0.4\%$ ,  $6.2 \pm 0.3\%$ 로 나타났다(Fig. 12). 아가콩군과 발효 대두군의 혈액 당화헤모글로빈 농도는 대조군에 비해 유의적으로 감소하였고( $p < 0.05$ ), 대두군의 경우 아가콩군 및 발효 대두군과는 유의적인 차이가 없었다. 발효 노란아가콩군의 경우 아가콩군 및 발효 대두군에 비해 유의적으로 감소하였다( $p < 0.05$ ). 따라서 발효 노란아가콩의 장기간 섭취는 혈당, 당화헤모글로빈 및 인슐린 농도를 유의적으로 감소시켜 혈당조절에 효과가 있는 것으로 사료된다.

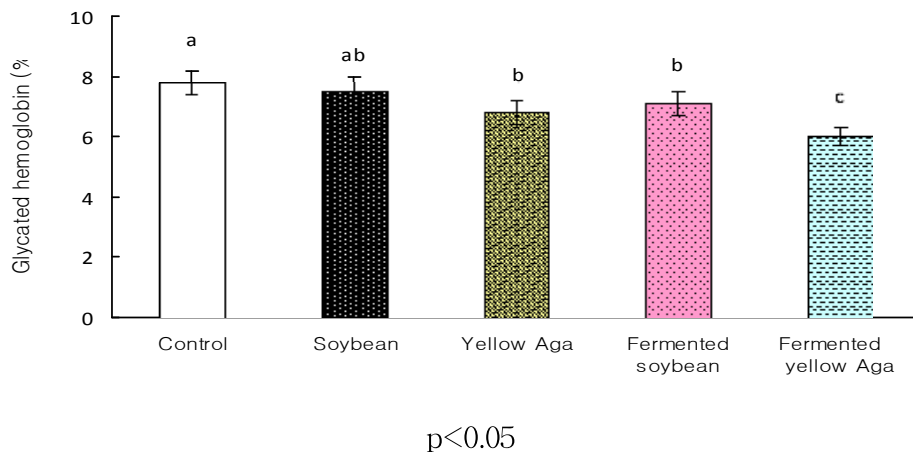


Fig. 12. Blood glycated hemoglobin levels of db/db mice.

(다) 지질대사 개선 효과

db/db mouse에게 대두, 노란아가콩, 발효 대두, 발효 노란아가콩을 장기간 섭취시킨 후 혈장 중성지방 농도를 측정된 결과를 Fig. 13에 나타내었다. 노란아가콩군 및 발효 노란아가콩군의 혈장 중성지방 농도는 각각  $139.9 \pm 9.1$ ,  $136.5 \pm 12.5$  mg/dL로 나타나 대조군( $170.2 \pm 15.4$  mg/dL)에 비해 유의적으로 감소하였으며( $p < 0.05$ ), 대두군( $158.7 \pm 14.2$  mg/dL)과 발효 대두군( $152.0 \pm 11.9$  mg/dL)과는 유의적인 차이가 없었다. 대두군과 발효대두군의 중성지방 농도는 대조군 및 노란아가콩군과 유의적인 차이가 없었다.



Fig. 13. Plasma triglyceride levels of db/db mice.

대두군, 노란아가콩군, 발효 대두군, 발효 노란아가콩군의 콜레스테롤 농도는  $131.5 \pm 10.7$ ,  $126.5 \pm 14.0$ ,  $127.9 \pm 14.0$ ,  $119.8 \pm 13.6$  mg/dL로 나타나 대조군( $157.3 \pm 11.5$  mg/dL)에 비해 유의적으로 감소하였다( $p < 0.05$ , Fig. 14). 당뇨병에 있어서 이상지혈증의 개선은 심혈관계질환 등의 당뇨합병증을 예방하는데 도움이 될 수 있다. 따라서 노란아가콩 및 발효 노란아가콩의 섭취는 지질대사를 개선시켜 당뇨합병증 예방에 도움이 될 것으로 사료된다.

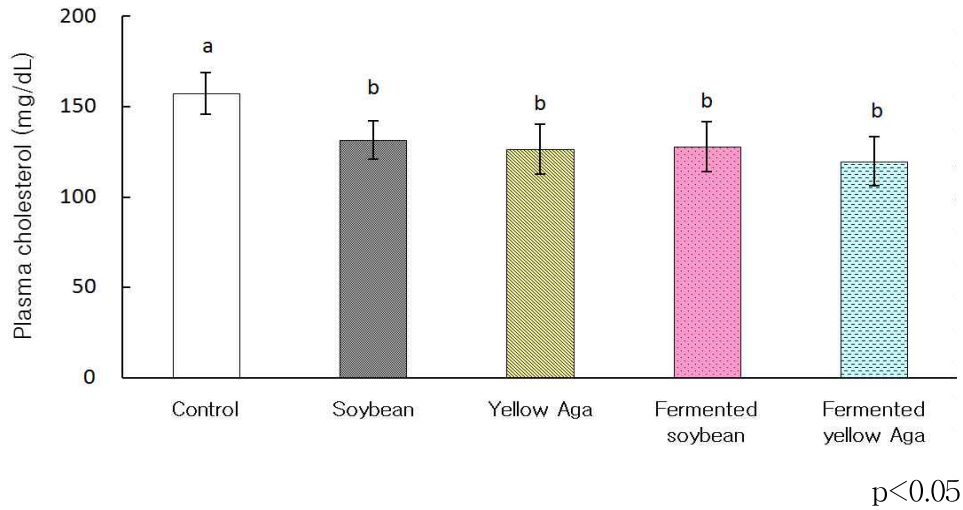


Fig. 14. Plasma cholesterol levels of db/db mice.

(라) 간기능 개선효과

노란아가콩군, 발효 대두군 및 발효 노란아가콩군의 혈장 GOT 활성은 각각  $82.8 \pm 21.9$ ,  $70.6 \pm 19.2$ ,  $73.8 \pm 18.6$  U/L로 나타나 대조군( $127.4 \pm 25.9$  U/L)에 비해 유의적으로 감소하였다( $p < 0.05$ , Fig. 15). 대두군의 GOT 활성은  $97.8 \pm 24.2$  U/L로 나타나 대조군, 노란아가콩군, 발효 대두군 및 발효 노란아가콩군과 유의적인 차이가 없었다.

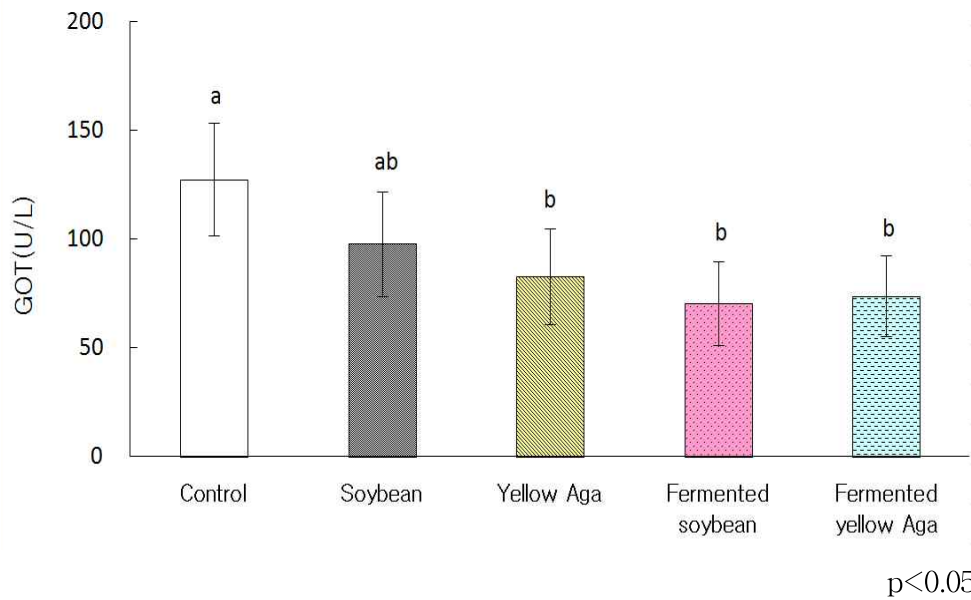


Fig. 15. Plasma GOT activities of db/db mice.

대두군, 노란아가콩군, 발효 대두군 및 발효 노란아가콩군의 GPT 활성은 각각  $75.4 \pm 9.3$ ,  $67.4 \pm 9.8$ ,  $73.8 \pm 9.8$ ,  $62.4 \pm 10.3$  U/L로 나타나 대조군( $97.0 \pm 13.4$  U/L)에 비해 유의적으로 감소하였다( $p < 0.05$ , Fig. 16). 따라서 대두, 노란아가콩, 발효 대두, 발효 노란아가콩의 섭취는 간 기능을 개선시키는 것으로 사료된다.

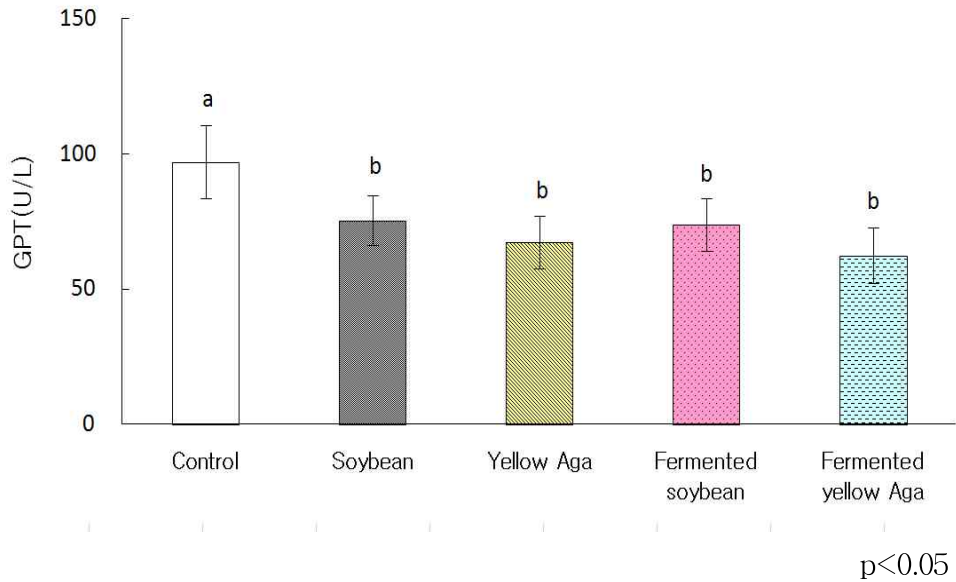


Fig. 16. Plasma GPT activities of db/db mice.

#### (마) 간조직의 지질과산화물 농도 및 항산화 효소계 활성

간조직의 지질과산화물 농도를 측정된 결과 대두군, 노란아가콩군, 발효 대두군, 발효 노란아가콩군의 경우  $4.4 \pm 0.4$ ,  $3.4 \pm 0.5$ ,  $4.0 \pm 0.3$ ,  $3.2 \pm 0.4$  nmol MDA/mg protein으로 나타나, 대조군( $5.5 \pm 0.6$  nmol MDA/mg protein)에 비하여 유의적으로 감소하였다( $p < 0.05$ , Table 10). 노란아가콩군 및 발효 노란아가콩군의 지질과산화물 농도는 대두군에 비해 유의적으로 감소하였고( $p < 0.05$ ), 발효 대두군과는 유의적인 차이가 없었다.

대두군, 노란아가콩군, 발효 대두군, 발효 노란아가콩군의 SOD 활성은  $30.8 \pm 3.1$ ,  $38.0 \pm 3.2$ ,  $34.0 \pm 3.5$ ,  $38.3 \pm 3.0$  U/mg protein으로 대조군( $23.4 \pm 3.9$  U/mg protein)에 비해 유의적으로 증가하였다( $p < 0.05$ ). 노란아가콩군 및 발효 노란아가콩군의 SOD 활성은 대두군에 비해 유의적으로 증가하였고( $p < 0.05$ ), 발효 대두군과는 유의적인 차이가 없었다.

대두군, 노란아가콩군, 발효 대두군, 발효 노란아가콩군의 catalase 활성은  $23.7 \pm 2.4$ ,  $29.4 \pm 2.9$ ,  $24.9 \pm 2.9$ ,  $30.6 \pm 2.7$  U/mg protein으로 대조군( $17.1 \pm 3.1$  U/mg protein)에 비해 유의적으로 증가하였다( $p < 0.01$ ). 노란아가콩군의 catalase 활성은 대두군에 비해 유의적으로 증가하였고( $p < 0.05$ ), 발효 대두군과는 유의적 차이가 없었다. 발효 노란아가콩군의 catalase 활성은 대두군, 발효 대두군에 비해 유의적으로



증가하였고( $p < 0.05$ ), 노란아가콩군과는 유의적 차이가 없었다.

Table 10. Hepatic TBARS levels and SOD and catalase activities of db/db mice

	TBARS (nmol/mg protein)	SOD (U/mg protein)	Catalase (U/mg protein)
Control	5.5±0.6 <sup>a</sup>	23.4±3.9 <sup>a</sup>	17.1±3.1 <sup>a</sup>
Soybean	4.4±0.4 <sup>b</sup>	30.8±3.1 <sup>b</sup>	23.7±2.4 <sup>b</sup>
Yellow <i>Aga</i>	3.4±0.5 <sup>c</sup>	38.0±3.2 <sup>c</sup>	29.4±2.9 <sup>cd</sup>
Fermented soybean	4.0±0.3 <sup>bc</sup>	34.0±3.5 <sup>bc</sup>	24.9±2.9 <sup>bc</sup>
Fermented yellow <i>Aga</i>	3.2±0.4 <sup>c</sup>	38.3±3.0 <sup>c</sup>	30.6±2.7 <sup>d</sup>

$p < 0.05$

다) ob/ob mouse에 있어서 아가콩 및 발효 아가콩의 혈당조절 및 지방간 개선효과 규명

(1) 체중 및 식이섭취량

ob/db mouse에게 아가콩 및 발효 아가콩이 함유된 식이를 10주간 섭취시킨 결과 체중과 식이섭취량은 유의적인 차이가 없었다(Table 11).

Table 11. Body weight and food intake of ob/ob mice

	Control	<i>Aga</i>	Fermented <i>Aga</i>
Body weight (g)	43.4±2.8	44.0±2.7	41.8±2.7
Food intake (g/d)	4.4±0.3	4.6±0.4	4.6±0.3

(2) 혈당 및 인슐린저항성 개선효과

ob/db mouse에게 대두, 아가콩, 발효 아가콩을 함유한 식이를 10주간 공급한 후 공복혈당을 측정된 결과를 Fig. 17에 나타내었다. 공복혈당은 대조군 374.3±39.8 mg/dL, 아가콩군 336.9±22.9 mg/dL, 발효 아가콩군 293.3±24.6 mg/dL로 나타나, 대조군에 비해 아가콩군이 유의적으로 감소하였고( $p < 0.05$ ), 발효 아가콩군의 혈당은 아가콩군에 비해 유의적으로 감소하였다( $p < 0.05$ ).

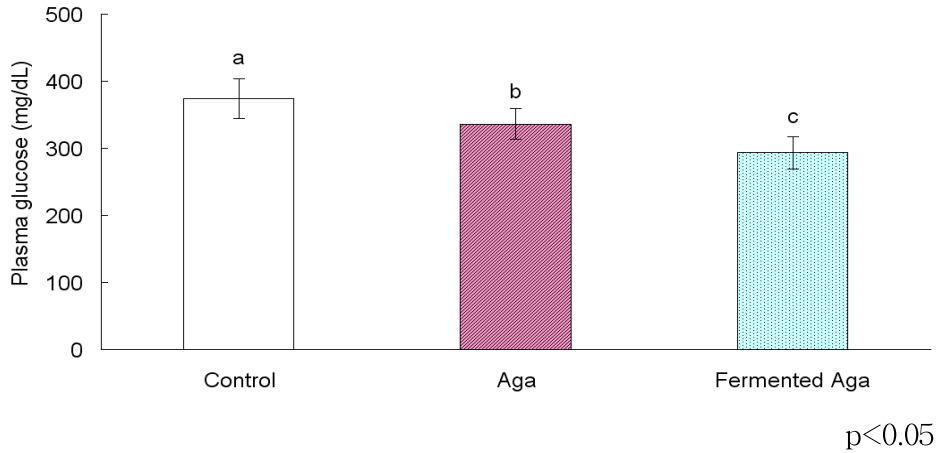


Fig. 17. Fasting plasma glucose levels of ob/ob mice.

혈장 프락토사민 농도는 대조군, 아가콩군, 발효 아가콩군이 각각  $387.8 \pm 32.4$ ,  $349.2 \pm 27.5$ ,  $308.6 \pm 23.7 \mu\text{mol/L}$ 로 나타났다(Fig. 18). 아가콩군의 프락토사민 농도는 대조군에 비해 유의적으로 감소하였고( $p < 0.05$ ), 발효 아가콩군의 프락토사민 농도는 아가콩군에 비해 유의적으로 감소하였다( $p < 0.05$ ). 따라서 발효 아가콩은 아가콩에 비해 혈당, 혈장 프락토사민 농도를 유의적으로 감소시켜 혈당조절 효과가 더 우수한 것으로 사료되며, 이는 발효시 생성된 펩타이드와 유리형 이소플라본이 부분적으로 기인한 것으로 사료된다.

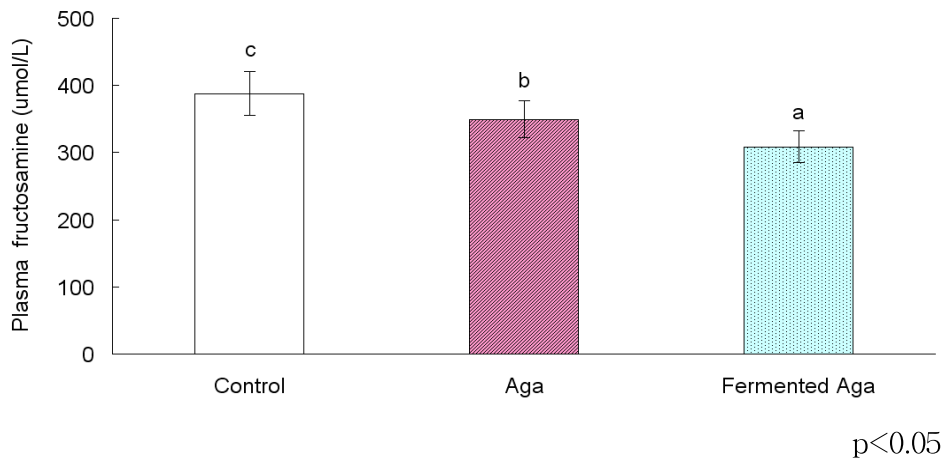


Fig. 18. Plasma fructosamine levels of ob/ob mice.

대조군, 아가콩군, 발효 아가콩군의 혈장 인슐린 농도는 각각  $18.8 \pm 2.6$ ,  $15.5 \pm 3.0$ ,  $16.2 \pm 3.1 \text{ ng/mL}$ 로 나타나 세 군간 유의적인 차이가 없었다(Fig. 19).

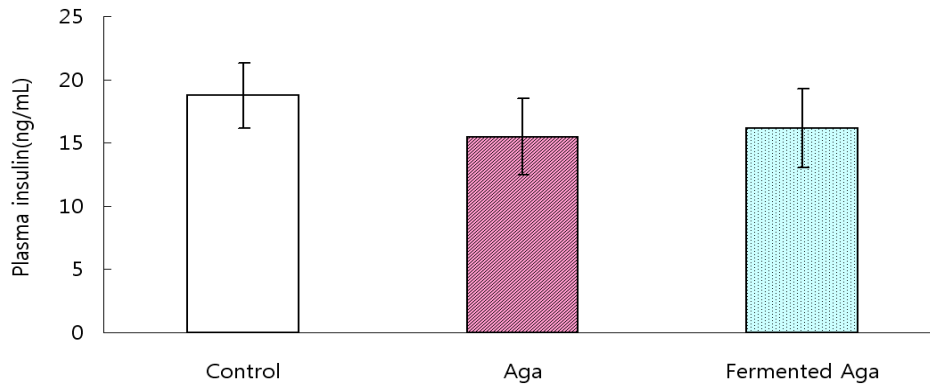


Fig. 19. Plasma insulin levels of ob/ob mice.

대조군, 아가콩군, 발효 아가콩군의 혈장 adiponectin 농도는 각각  $7.2 \pm 1.2$ ,  $9.5 \pm 1.4$ ,  $11.4 \pm 1.5$   $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났다(Fig. 20). 아가콩군의 adiponectin 농도는 대조군에 비해 유의적으로 증가하였고, 발효 아가콩군은 아가콩군에 비해 유의적으로 증가하였다( $p < 0.05$ ). 아디포넥틴은 지방세포에서 분비되는 아디포카인(adipokine)의 일종으로, 아디포넥틴과 인슐린저항성과는 강한 역상관관계가 있다. 따라서 아가콩과 발효 아가콩은 인슐린저항성을 개선하여 혈당조절효과를 나타내었으며, 발효 아가콩의 인슐린저항성 개선효과가 더 우수한 것으로 사료된다. 따라서 발효 아가콩은 고혈당을 개선하는 우수한 항당뇨제품으로 사료된다.

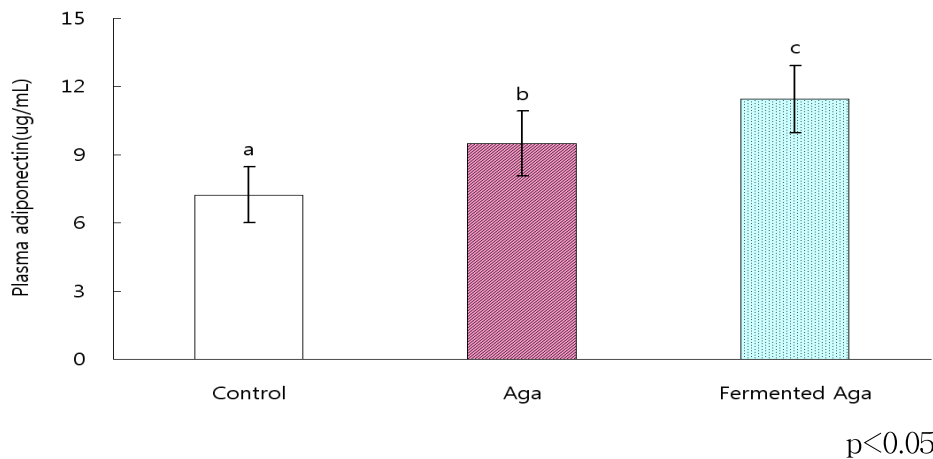


Fig. 20. Plasma adiponectin level in ob/ob mice.

### (3) 지질대사 개선 효과

ob/ob mouse에게 아가콩, 발효 아가콩을 장기간 섭취시킨 후 혈장 중성지방 농도를 측정된 결과를 Fig. 21에 나타내었다. 아가콩군 및 발효 아가콩군의 혈장 중성지방 농도는 각각  $119.8 \pm 13.4$ ,  $107.2 \pm 13.9$   $\text{mg/dL}$ 로 나타나 대조군( $141.8 \pm 17.4$

mg/dL)에 비해 유의적으로 감소하였다( $p < 0.01$ ). 아가콩군과 발효 아가콩군의 혈장 중성지방 농도는 유의적인 차이가 없었다.

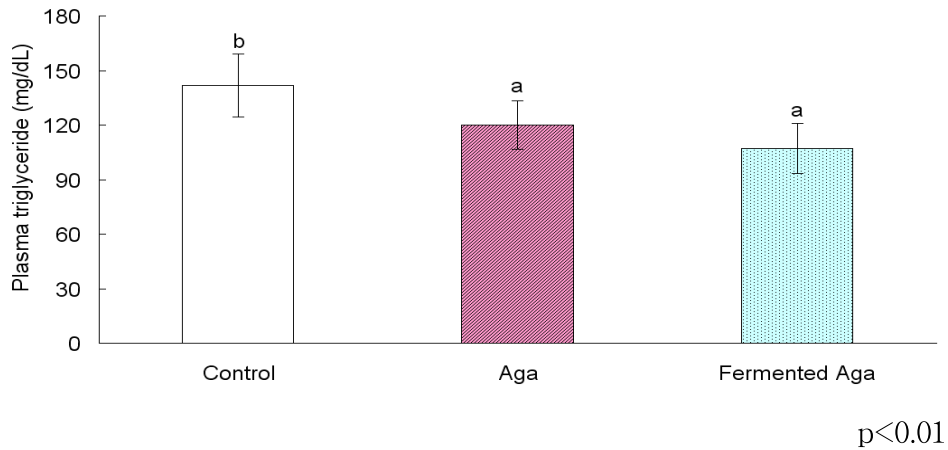


Fig. 21. Plasma triglyceride levels of ob/ob mice.

대두군, 아가콩군, 발효 아가콩군의 혈장 콜레스테롤 농도는  $140.1 \pm 16.8$ ,  $124.8 \pm 16.5$  mg/dL로 나타나 대조군( $174.2 \pm 18.8$  mg/dL)에 비해 유의적으로 감소하였다(Fig. 22). 아가콩군과 발효 아가콩군의 혈장 콜레스테롤 농도는 유의적인 차이가 없었다. 따라서 아가콩 및 발효 아가콩의 섭취는 혈장 지질 profile을 개선시켜 심혈관계질환을 포함한 당뇨병병증 예방에 도움이 될 것으로 사료된다.

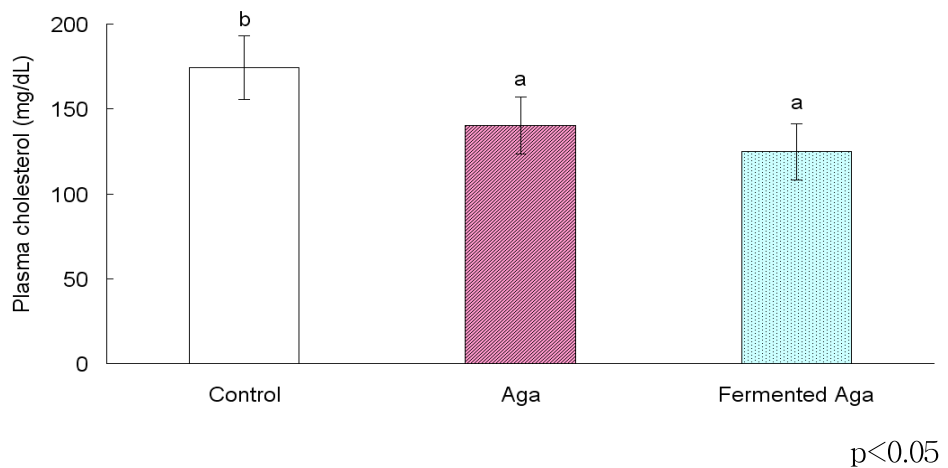


Fig. 22. Plasma cholesterol levels of ob/ob mice.

대조군, 아가콩군, 발효 아가콩군의 혈장 HDL-콜레스테롤 농도는 각각  $57.3 \pm 7.4$ ,  $62.3 \pm 5.7$ ,  $63.8 \pm 6.1$  mg/dL로 나타나, 아가콩군, 발효 아가콩군의 HDL-콜레스테롤 농도가 대조군에 비해 유의적으로 증가하였다( $p < 0.05$ , Fig. 23).

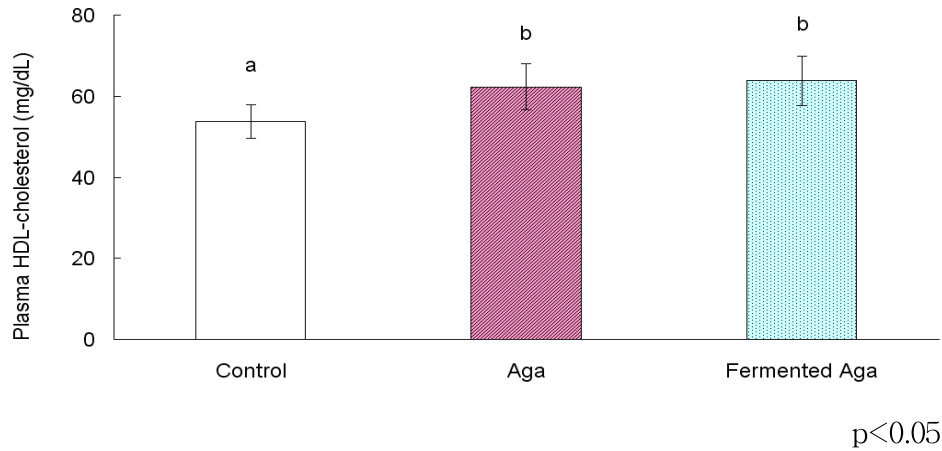


Fig. 23. Plasma HDL-cholesterol levels of ob/ob mice.

(4) 간조직의 지질 및 지질과산화물 농도

아가콩군, 발효 아가콩군의 간조직 콜레스테롤 농도는  $3.3 \pm 0.7$ ,  $2.7 \pm 0.7$  mg/g liver로 나타나 대조군( $5.0 \pm 0.9$  mg/g liver)에 비해 유의적으로 감소하였다( $p < 0.01$ , Fig. 24). 아가콩군과 발효 아가콩군의 간조직 콜레스테롤 농도는 유의적인 차이가 없었다.

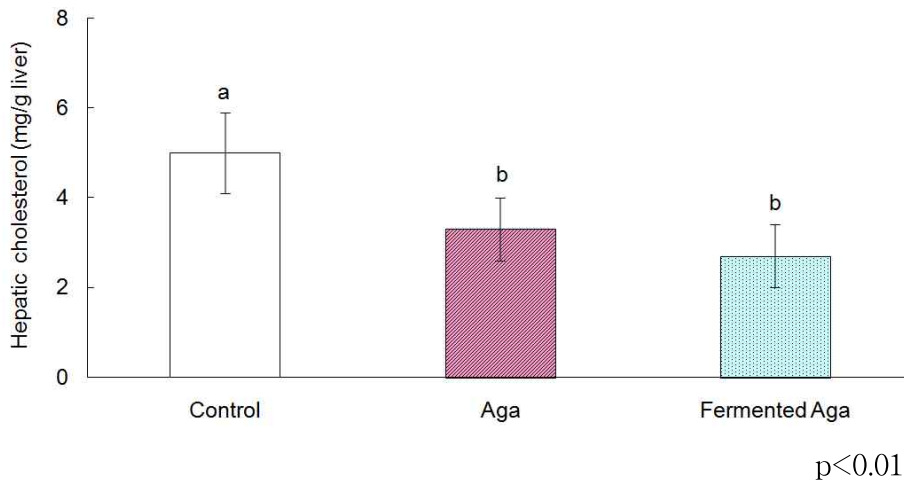


Fig. 24. Hepatic total cholesterol levels of ob/ob mice.

아가콩군, 발효 아가콩군의 간조직 중성지방 농도는  $129.2 \pm 16.2$ ,  $119.5 \pm 15.0$  mg/g liver로 나타나 대조군( $156.6 \pm 23.6$  mg/g liver)에 비해 유의적으로 감소하였다 ( $p < 0.05$ , Fig. 25). 아가콩군과 발효 아가콩군의 간조직 중성지방 농도는 유의적인 차이가 없었다. 따라서 아가콩과 발효아가콩은 고지혈증을 개선하고 지방간 억제 효과를 나타낸 것으로 사료된다.

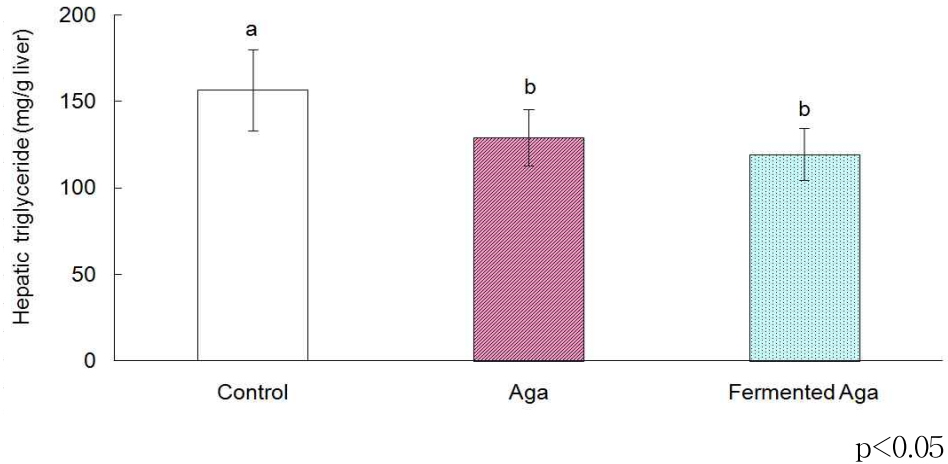


Fig. 25. Hepatic triglyceride levels of ob/ob mice.

간조직의 지질과산화물 농도를 측정된 결과 대조군, 아가콩군, 발효 아가콩군의 경우 각각  $5.3 \pm 0.7$ ,  $4.5 \pm 0.4$ ,  $3.8 \pm 0.4$  nmol MDA/mg protein으로 나타났다. 아가콩군의 지질과산화물 농도가 대조군에 비해 유의적으로 감소하였고, 발효 아가콩군의 경우 아가콩군에 비해 유의적으로 감소하여 ( $p < 0.05$ ), 우수한 항산화 효과를 나타내었다. 발효 아가콩은 아가콩에 비해 항산화효과가 우수하여 당뇨병증의 개선에 기여할 것으로 사료된다.

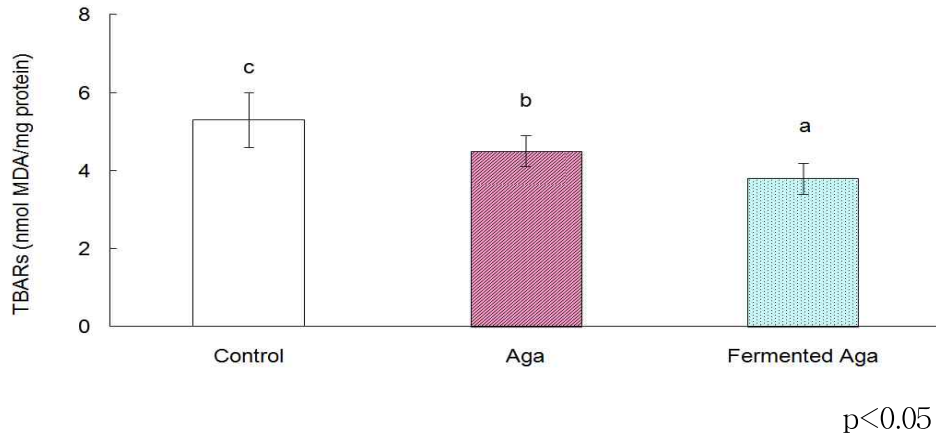


Fig. 26. Hepatic TBARS levels of ob/ob mice

#### (5) 간조직의 GLUT4 gene expression

아가콩 및 발효 아가콩의 장기간 섭취가 간 조직 glucose transporter (GLUT4)의 protein expression에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 27에 나타내었다. 대조군, 아가콩군, 발효 아가콩군의 GLUT4 protein expression은 각각 100.0%, 125.1%, 103.1%로 나타났으나, 아가콩군의 경우 GLUT4 단백질 발현이 다소 증가한 것으로 나타났다.

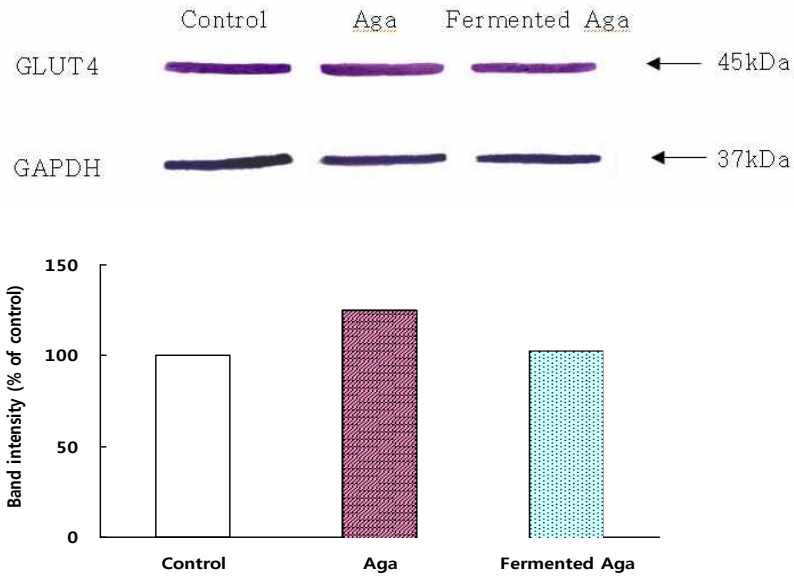


Fig. 27. Effect of *Aga* and fermented *Aga* on protein expression of GLUT4 of liver in ob/ob mice.

### 3) 면역활성 및 항암소재와 제품개발

#### 가) 아가콩 추출물의 항염증 효능

##### (1) U937 세포의 증식에 미치는 PMA와 FBA, YBA 및 FS의 영향

실험 조건의 설정을 위하여 준비된 에탄올 추출물들을 U937 세포에 6시간 동안 다양한 농도로 처리한 후, MTT assay에 준하여 세포증식 변화 여부를 조사하였다. Fig. 1에서 알 수 있듯이 본 실험에 사용한 3가지 종류의 에탄올 추출물 처리군 중, 3  $\mu$ g/ml 처리군까지는 모두 대조군에 비하여 90% 이상의 증식율을 보여 주었으며, 고농도 처리군에서는 다소 세포의 증식이 억제되었다. 따라서 본 실험에서는 3  $\mu$ g/ml 처리군을 실험군으로 설정하여 다음 실험을 진행하였다.

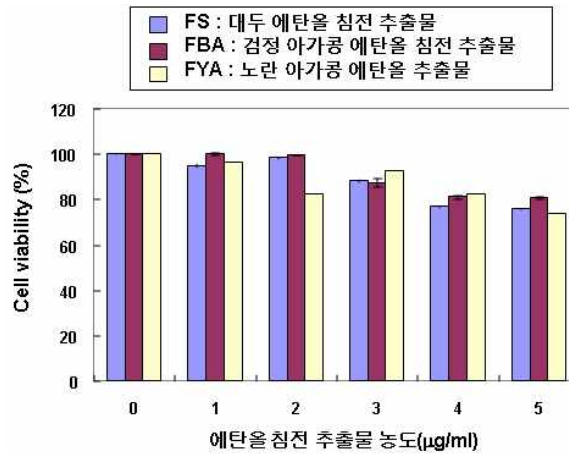


Fig. 1. U937 세포의 증식에 미치는 PMA와 FBA, YBA 및 FS의 영향. 실험 조건의 설정을 위하여 준비된 에탄올 추출물들을 U937 세포에 6시간 동안 처리한 후, MTT assay에 준하여 세포증식 변화 여부를 조사하였음 - 본 실험에 사용한 3가지 종류의 에탄올 추출물 처리군 중, 3 µg/ml 처리군까지는 90% 이상의 증식율을 보였으나, 고농도 처리군에서는 다소 세포의 증식이 억제되었기에 3 µg/ml 처리군을 실험군으로 설정하였음.

#### (2) PMA에 의한 COX-2 및 Egr-1의 발현 증가와 NF-κB의 활성화

대부분의 세포에서 COX-2 발현 증가에 따른 prostaglandin E2 (PGE2)의 생성 증가가 다양한 질병의 원인이 되는 것으로 밝혀지면서 이러한 염증매개인자의 억제에 관한 연구가 많이 진행되고 있다. 따라서 본 연구에서는 PGE2의 생성에 미치는 FBA, YBA 및 FS의 영향을 조사하기 위하여 U937 세포에서 PMA 처리에 의한 COX-2의 발현 증가 여부를 관찰하였다. 이를 위하여 U937 세포의 증식에 영향을 주지 않았던(data not shown) PMA 농도 범위에서 농도별 혹은 시간별로 처리된 배지에서 자란 U937 세포들을 모아 Western blotting을 실시하였다. Fig. 2A에서 보는 바와 같이 PMA를 농도별로 6시간 처리했을 때 처리되지 않은 세포의 경우 COX-2의 발현이 매우 적은 반면 PMA가 처리된 배지에서 자란 U937 세포에는 COX-2 단백질의 발현이 증가하는 것을 관찰할 수 있었으나, COX-1의 발현에는 큰 변화가 없었다. Fig. 2A의 결과를 바탕으로 PMA 농도를 40 nM로 고정하고 처리 시간의 증가에 따라서 COX-2의 발현 변화에 대하여 조사해 본 결과, Fig. 2B에서 나타낸 바와 같이 COX-1의 발현은 PMA 처리 시간의 증가에 의해서도 큰 변화가 없었으나, COX-2의 발현은 처리 시간 의존적으로 6시간째까지 지속적으로 증가되었다.

최근 COX-2의 발현이 몇 가지 중요한 전사조절인자들의 활성화와 밀접한 연관성이 있다는 연구결과들이 다양한 실험 방법들에 의하여 밝혀지고 있는데, 특히 다양한 조건에서 COX-2의 발현 조절에 NF-κB 전사조절인자의 연관성이 밝혀지고 있



으며, Egr-1 역시 다양한 염증매개 산물들의 발현에 중요한 역할을 하고 있음이 알려지고 있다. 따라서 본 연구에서는 PMA가 처리된 U937 세포를 대상으로 NF- $\kappa$ B와 Egr-1 발현 변화 가능성에 대하여 조사해보았으며, Fig. 2B 및 C에 나타낸 바와 같이 Egr-1 단백질 발현이 PMA 처리 30분 이내에 현저하게 증가되었고, 이는 PMA 처리 농도의 증가에 의하여 따라 더욱 높게 나타났음을 알 수 있었다. 또한 NF- $\kappa$ B 전사인자 단백질은 PMA 처리에 의하여 1시간 전후에 세포질로부터 핵 속으로 이동하는 것을 확인할 수 있었으며, NF- $\kappa$ B 단백질의 핵 내 이동에 따라 세포질의 I $\kappa$ B 단백질의 분해가 매우 빠르게 일어나고 있음을 알 수 있었다.

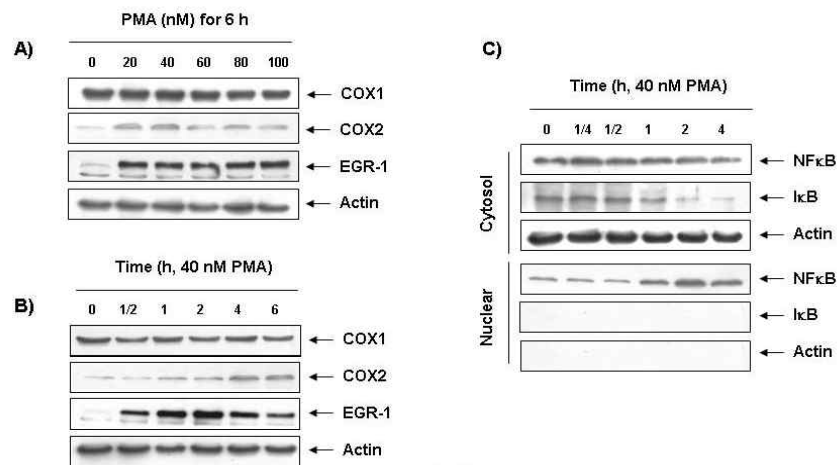


Fig. 2. PMA에 의한 COX-2 및 Egr-1의 발현 증가와 NF- $\kappa$ B의 활성화. 세포의 증식에 영향을 주지 않았던 PMA 농도 범위에서 PMA가 처리된 배지에서 자란 세포에서는 COX-2 및 Egr-1의 발현은 증가되었으나 COX-1은 큰 변화가 없었고, NF- $\kappa$ B 전사인자 단백질은 PMA 처리 1시간 전후에 핵 속으로 이동하는 것을 확인할 수 있었으며, NF- $\kappa$ B 단백질의 핵 내 이동에 따라 세포질의 I $\kappa$ B 단백질의 분해가 매우 빠르게 일어났음.

### (3) PMA에 의한 COX-2의 발현 증가에 미치는 FBA, YBA 및 FS의 영향

PMA가 COX-2 단백질의 발현만을 선택적으로 유도한 상기 실험의 결과를 바탕으로 PMA에 의한 COX-2의 발현이 FBA, YBA 및 FS에 의하여 차단될 수 있을지의 여부를 조사하였다. 이를 위하여 3  $\mu$ g/ml의 FBA, YBA 및 FS를 1시간 동안 선처리한 후 PMA 40 nM을 추가적으로 처리하여 각각을 단독으로 처리한 U937 세포를 대상으로 COX-2의 mRNA 및 단백질의 발현 변화를 비교하였다. Fig. 3 및 4의 결과에서 볼 수 있듯이 PMA를 단독 처리한 경우 COX-2 mRNA와 단백질의 발현이 매우 증가되었으나 FBA, YBA 및 FS를 선 처리한 경우 PMA에 의한 COX-2 mRNA 및 단백질의 발현이 유의적으로 차단되었으며, 이러한 효과는 FS보다 FBA 및 FYA에서 더 강하게 나타났다.

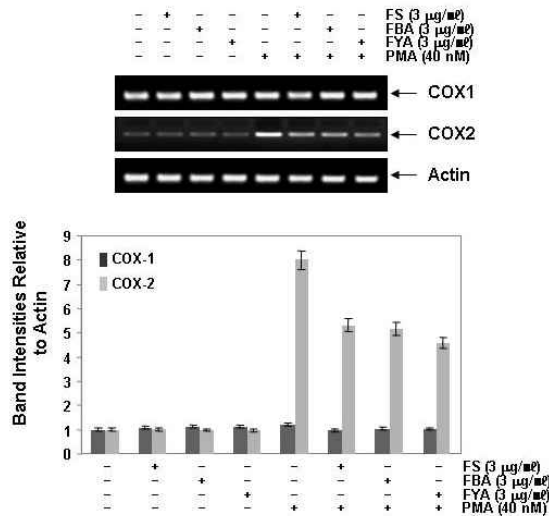


Fig. 3. PMA에 의한 COX-2 mRNA의 발현 증가에 미치는 FBA, YBA 및 FS의 영향. PMA에 의한 COX-2 mRNA의 발현이 FBA, YBA 및 FS에 의하여 차단될 수 있을 지의 여부를 조사한 결과, PMA를 단독 처리한 경우 COX-2 mRNA의 발현이 매우 증가되었으나 FBA, YBA 및 FS를 선 처리한 경우 PMA에 의한 COX-2 mRNA의 발현이 유의적으로 차단되었으며, 이러한 효과는 FS 보다 FBA 및 FYA에서 더 강하게 나타났음

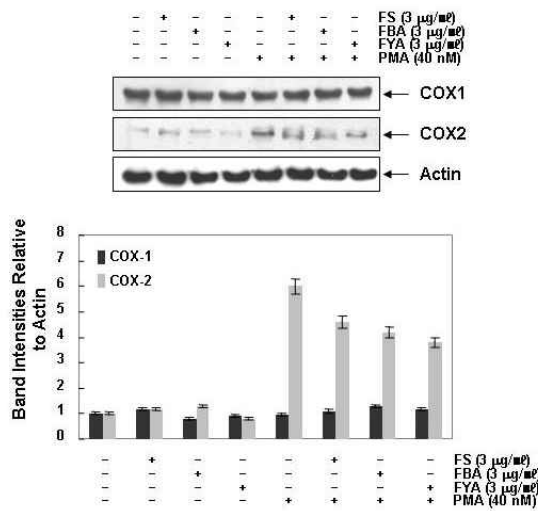


Fig. 4. PMA에 의한 COX-2 단백질의 발현 증가에 미치는 FBA, YBA 및 FS의 영향. PMA에 의한 COX-2 단백질의 발현이 FBA, YBA 및 FS에 의하여 차단될 수 있을 지의 여부를 조사한 결과, PMA를 단독 처리한 경우 COX-2 단백질의 발현이 매우 증가되었으나 FBA, YBA 및 FS를 선 처리한 경우 PMA에 의한 COX-2 단백질의 발현이 유의적으로 차단되었으며, 이러한 효과는 FS 보다 FBA 및 FYA에서 더 강하게 나타났음.

(4) FBA, YBA 및 FS에 의한 PMA 유도 PGE2 생성의 저해 효과

이상의 결과에서 PMA에 의하여 유도된 COX-2의 발현이 FBA, YBA 및 FS의 선 처리에 의하여 매우 효과적으로 억제되었으며, 이러한 COX-2 선택적 발현 저해 효과가 FS 보다 FBA 및 FYA에서 더 높게 나타났으므로, 이러한 결과는 PGE2 생성의 저해와 연관될 수 있는지를 조사하였다. Fig. 5에 나타낸 바와 같이 U937 세포에서 PMA에 의하여 유도된 PGE2의 생성이 FBA, YBA 및 FS의 선 처리에 의하여 매우 효과적으로 억제되었으며, 이러한 PGE2 생성 저해 효과는 FS 보다 FBA 및 FYA에서 더 높게 나타나 PMA에 의한 COX-2의 발현 저해 효과와 매우 일치되었으며, FBA 및 FYA에 의한 강력한 PGE2의 생성 저해는 COX-2의 선택적 발현 억제에 의한 것임을 알 수 있었다.

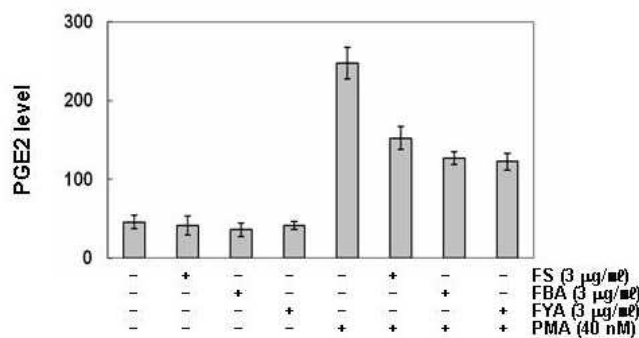


Fig. 5. PMA에 의한 PGE2의 생성에 미치는 FBA, YBA 및 FS의 영향. PMA에 의한 PGE2의 생성 증가가 FBA, YBA 및 FS에 의하여 차단될 수 있을지의 여부를 조사한 결과, PMA를 단독 처리한 경우 증가된 PGE2의 생성이 FBA, YBA 및 FS를 선 처리한 경우 유의적으로 차단되었으며, 이러한 효과는 FS 보다 FBA 및 FYA에서 더 강하게 나타났음.

(5) PMA에 의한 NF-κB의 활성화에 미치는 FBA, YBA 및 FS의 영향

이상과 같은 동일 조건에서 FBA, YBA 및 FS가 PMA에 의해 증가 및 활성화된 Egr-1 및 NF-κB 두 전사조절인자의 발현에 어떠한 변화가 일어나는지를 조사하였다. Fig. 6에 나타낸 바와 같이 PMA 처리에 의하여 빠르게 분해되었던 세포질 내에 존재하는 IκB 단백질의 경우 FBA, YBA 및 FS의 선 처리에 의하여 부분적으로 분해가 차단되었으며, PMA에 의한 핵 내로의 NF-κB 전이도 FBA, YBA 및 FS의 선 처리에 의하여 매우 유의적으로 차단되었음을 알 수 있었다. 또한 PMA에 의한 Egr-1의 발현 증가도 FBA, YBA 및 FS에 의하여 어느 정도 차단되었는데, 이는 PMA에 의한 COX-2 발현 증가와 연관된 PGE2 생성의 증가를 억제하는 FBA, YBA 및 FS의 효과에 두 전사인자들의 관련성이 매우 높다는 것으로 의미하는 결과이다. 또한 PMA에 의해 유도되는 Egr-1의 발현 증가 및 NF-κB의 활성화 억

제에 미치는 효과도 FS 보다 FBA 및 FYA에서 더 높게 나타났다.

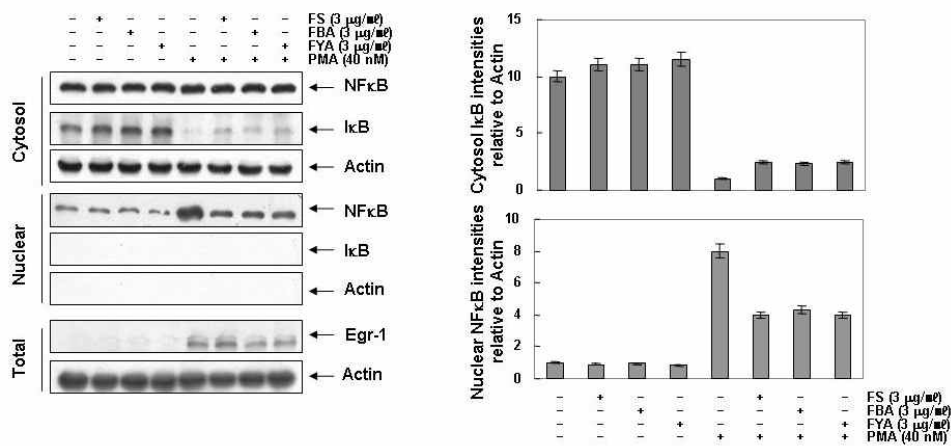


Fig. 6. PMA에 의한 NF-κB의 활성화에 미치는 FBA, YBA 및 FS의 영향. FBA, YBA 및 FS가 PMA에 의해 증가 및 활성화된 Egr-1 및 NF-κB의 발현에 어떠한 영향을 주는지를 조사한 결과, NF-κB의 핵 내 전이가 FBA, YBA 및 FS의 선처리에 의하여 유의적으로 차단되었고, Egr-1의 발현 증가도 어느 정도 차단되었는데, 이러한 효과는 FS 보다 FBA 및 FYA에서 더 높게 나타났다.

#### 나) 유방암세포에서 genistein의 항전이 효능

##### (1) Genistein에 의한 인체유방암세포의 TER 증가 및 paracellular permeability의 감소

Genistein에 의한 유방암세포의 전이 억제에 tight junction (TJ)의 조절 변화가 관여하는지를 조사하기 위하여 genistein이 처리된 조건에서 자란 유방암세포를 대상으로 TJ의 형성 측정 기준이 되는 TER의 변화 여부를 조사하였다. Fig. 7A의 결과에서 볼 수 있듯이 두 유방암세포 모두에서 genistein 처리 농도의 증가에 따라 TER의 증가가 동반되었다. 이는 genistein 처리에 따라 유방암세포 TJ의 형성 또는 활성(formation 또는 activity)이 증가되었음을 의미한다. 따라서 genistein에 의한 TJ 변화 특성을 좀 더 조사하기 위하여 방사선으로 표시된 mannitol을 사용하여 paracellular permeability (Papp mannitol)에 미치는 genistein의 영향을 조사한 결과, Fig. 7B에서 알 수 있듯이 genistein의 처리에 따라 점차 감소되었다. 이 결과는 TER의 증가와 함께 genistein이 TJ의 leakiness를 차단함으로써 TJ의 기능을 더욱 강화시켰음을 의미한다. 즉, TJ의 leakiness는 암의 진행과정과 연관되어 있으며, 특정 물질이나 조건에 의한 TJ의 tightening은 항암활성 중 암세포의 전이 억제와 연계성이 있으므로 genistein은 유방암세포의 항전이 효능이 매우 우수할 수 있음을 시사하는 것이다.

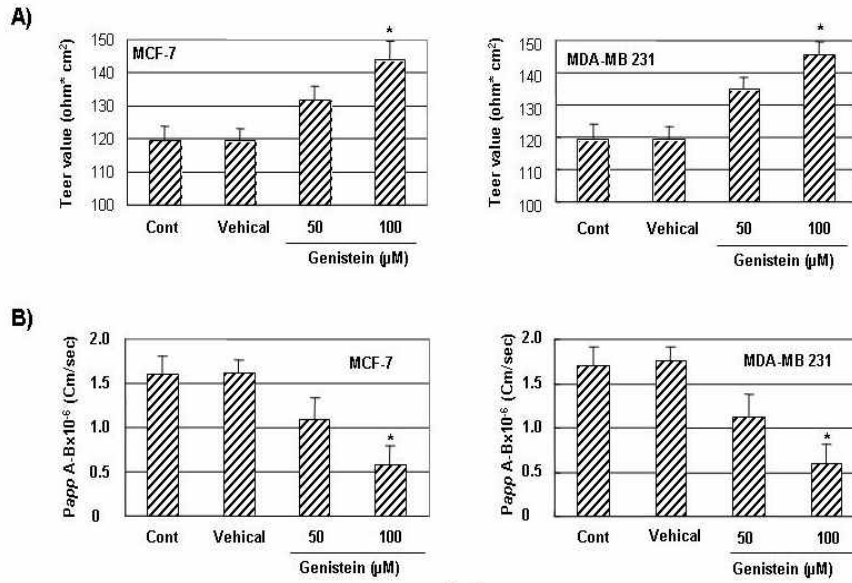


Fig. 7. Genistein에 의한 유방암세포 TER 증가 및 paracellular permeability의 감소. Genistein에 의한 유방암세포 전이 억제에 TJ 조절 변화가 관여하는지를 조사하기 위하여 TJ의 형성 측정 기준이 되는 TER (A) 및 paracellular permeability (Papp mannitol) 변화 여부(B)를 조사한 결과, TER의 증가 및 paracellular permeability의 감소가 관찰되었으며, 이는 genistein이 TJ의 leakiness를 차단함으로써 TJ의 기능을 더욱 강화시켰음을 의미함.

(2) 전이 및 TJ 기능과 연관된 단백질들의 발현에 미치는 genistein의 영향

Genistein에 의한 TJ 활성 증가와 연관된 기전의 해석을 위하여 TJ의 기능과 암세포 침윤과 연관된 주요 단백질들의 변화를 MCF-7 및 MDA-MB 231 유방암세포를 대상으로 Western blotting 법으로 조사하였다. Fig. 8의 결과에서 알 수 있듯이, 대부분의 암세포에서 높은 증가를 보이는 IGF-1과 Snail의 발현은 genistein 처리 시간의 증가에 따라 매우 감소되었으며, 비교적 암세포에서 낮은 수준을 보이는 TSP-1 및 E-cadherin의 발현은 genistein의 처리에 따라 매우 증가되는 반대적인 현상은 genistein이 유방암세포의 이동성(motility) 및 침윤성(invasion) 억제와 연관성을 가지는 것으로 나타났다. 한편 TJ의 대표적인 조절 단백질인 claudin-3과 -4의 발현은 genistein 처리에 따라 감소되었으며, 감소폭은 claudin-3에서 높게 나타났다. 따라서 TJ-복합체에서 claudin-3 및 -4의 발현 저하에 의하여 TER의 증가 및 paracellular permeability 감소에 어느 정도 관여할 것으로 추정된다.

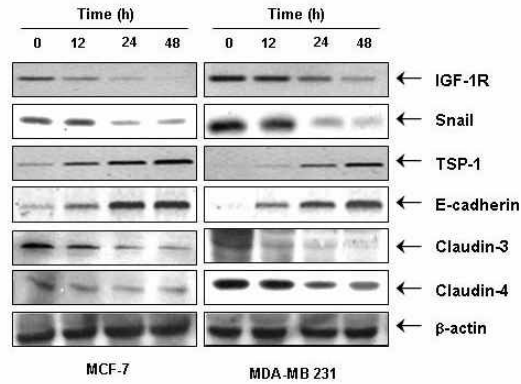


Fig. 8. 전이 및 TJ 기능과 연관된 단백질들의 발현에 미치는 genistein의 영향. Genistein에 의한 TJ 활성화 증가와 연관된 기전의 해석을 위하여 TJ의 기능 및 암세포 침윤과 연관된 주요 단백질들의 변화를 조사한 결과, IGF-1과 Snail의 발현은 genistein 처리 시간의 증가에 따라 매우 감소되었으며, TSP-1 및 E-cadherin의 발현은 매우 증가되었고, TJ의 대표적인 조절 단백질인 claudin-3과 -4의 발현은 매우 감소되었는데 감소폭은 claudin-3에서 높게 나타났음.

### (3) 유방암세포의 이동 및 침윤성에 미치는 genistein의 영향

Genistein에 의한 MCF-7 및 MDA-MB-231 세포의 이동 및 침윤성의 억제 정도를 조사하기 위하여 wound healing 및 Boyden chamber invasion assay를 실시하였다. Fig. 9에서 알 수 있듯이 genistein의 처리에 따라 두 유방암세포의 이동성과 침윤성 모두가 매우 유의적으로 감소되었다.

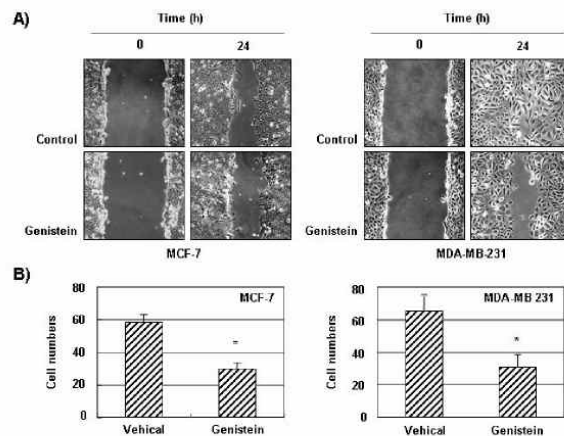


Fig. 9. 유방암세포의 이동 및 침윤성에 미치는 genistein의 영향. Genistein에 의한 유방암세포의 이동 및 침윤성의 억제 정도를 조사하기 위하여 wound healing 및 Boyden chamber invasion assay를 실시한 결과, genistein의 처리에 따라 두 유방암세포의 이동성과 침윤성 모두가 매우 유의적으로 감소되었음.

(4) siRNA에 의한 claudin-3 발현 차단이 유방암세포의 이동 및 침윤성에 미치는 영향 이상의 결과에서 genistein에 의한 유방암세포의 이동성 억제와 침윤성 차단에 특히 TJ 조절 단백질인 claudin-3의 발현 저하가 높게 나타났으므로, claudin-3의 발현 저하가 genistein에 의한 유방암세포의 이동 및 침윤성 저해에 미치는 영향을 조사하였다. 즉 genistein의 항전이 효능에 claudin-3의 관련성 여부를 조사하기 위하여 small interfering RNA (siRNA)법에 의하여 claudin-3의 발현을 차단하였을 경우(Fig. 10A), genistein에 의한 이동성의 억제 및 침윤성의 차단이 더욱 향상시켜, genistein의 항전이 활성에 claudin-3의 역할이 매우 중요함을 알 수 있었다(Fig. 10B 및 C).

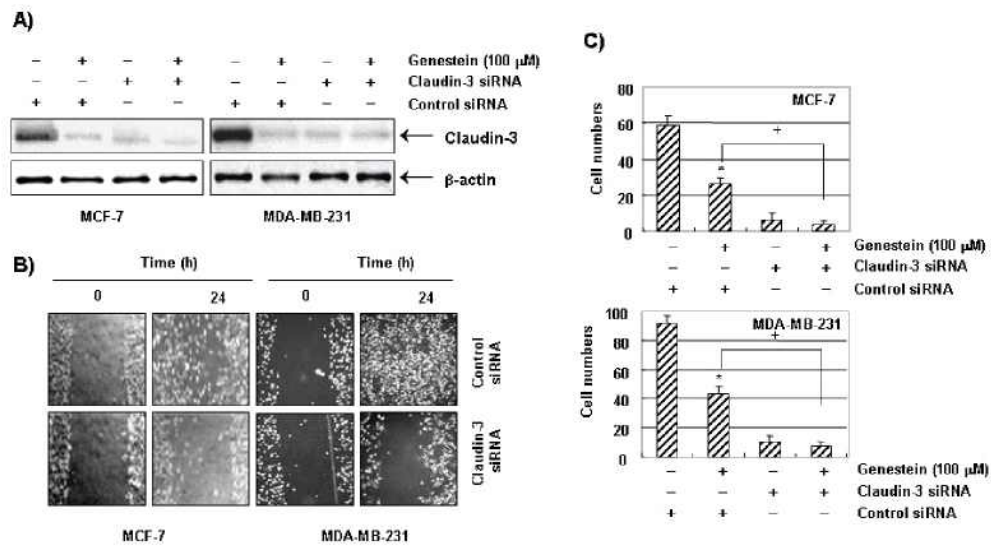


Fig. 10. Claudin-3 발현 차단이 유방암세포의 이동 및 침윤성에 미치는 영향. Genistein의 항전이 효능과 claudin-3의 관련성 여부를 조사하기 위하여 siRNA법에 의하여 claudin-3의 발현을 차단하였을 경우, genistein에 의한 이동성의 억제 및 침윤성의 차단이 더욱 향상시켜, genistein의 항전이 활성에 claudin-3의 역할이 매우 중요함을 알 수 있었음.

(5) Matrix metalloproteinases (MMPs)의 활성화에 미치는 genistein의 영향

MMPs의 활성화에 미치는 genistein의 영향을 조사하기 위하여 TPA를 선처리한 후, genistein이 처리된 배지에서 배양된 MCF-7 및 MDA-MB-231 유방암세포를 대상으로 MMP-2 및 MMP-9의 발현과 활성 정도를 비교하기 위하여 Western blotting 및 Zymographic study를 실시하였다. Fig. 11의 결과에서 볼 수 있듯이 genistein은 TPA에 의해 증가된 MMP-2 및 MMP-9의 활성을 genistein 처리 시간 의존적으로 감소시켰으며, genistein에 의한 MMP-2 및 MMP-9의 활성 저하는 두 단백질의 단백질 발현 저하와 연관성이 있음을 알 수 있었다.

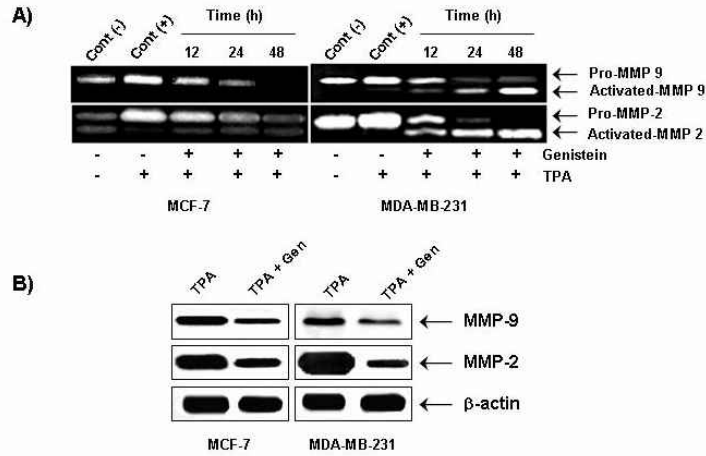


Fig. 11. Matrix metalloproteinases (MMPs)의 활성화에 미치는 genistein의 영향. MMPs의 활성화에 미치는 genistein의 영향을 조사하기 위하여 TPA를 선처리한 후, genistein이 처리된 배지에서 배양된 유방암세포를 대상으로 MMP-2 및 MMP-9의 발현과 활성화 정도를 조사한 결과, genistein은 TPA에 의해 증가된 MMP-2 및 MMP-9의 활성을 매우 감소시켰으며, 이는 두 단백질의 단백질 발현 저하와 연관성이 있었음

다) 인체 혈구암세포에서 아가콩 추출물의 항암 효능

(1) U937 세포의 증식에 미치는 FBA, YBA 및 FS의 영향

아가콩 추출물의 항암활성 실험 조건의 설정을 위하여 준비된 에탄올 추출물들을 U937 세포에 48시간 동안 처리한 후, MTT assay에 준하여 세포증식 변화 여부를 조사하였다. Fig. 12에 제시된 결과에서 알 수 있듯이 본 실험에 사용한 3가지 종류의 에탄올 추출물 처리군 중, FS에 비하여 아가콩 추출물인 FBA 및 FYA의 항암활성이 매우 높게 나타나, 대두 추출물에 비하여 아가콩 추출물의 U937 세포 증식 억제 효과가 현저하게 높게 나타났다.

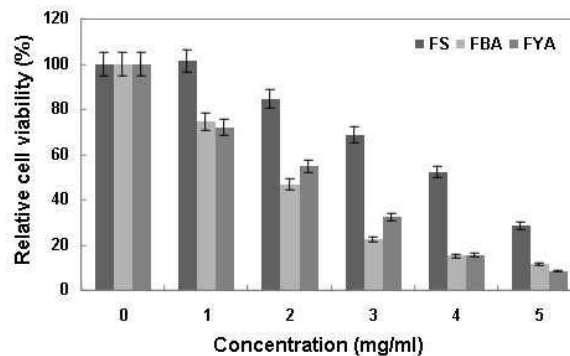


Fig. 12. U937 세포의 증식에 미치는 다양한 추출물들의 영향. U937 세포에 준비된 시료를 48시간 동안 처리한 후, MTT assay를 실시한 결과 3가지 종류의 에탄올 추출물 처리군 중, FS에 비하여 아가콩 추출물인 FBA 및 FYA의 항암활성이 매우 높게 나타났다.



(2) U937 세포의 세포주기 진행 및 apoptosis유발에 미치는 FBA, YBA 및 FS의 영향

상기에서 나타난 아가콩 추출물의 암세포 증식억제와 연관된 세포주기 진행에 미치는 영향 및 apoptosis 유발의 정도를 조사하기 위하여 DNA flow cytometry 분석을 실시하였다. Fig. 13의 결과에서 알 수 있듯이 세포주기 특이적 arrest 현상은 관찰되지 않았으나 apoptosis가 일어난 세포군에 해당하는 sub-G1기의 세포 빈도는 추출물 처리 농도가 증가함에 따라 매우 증가되었는데, 대조군의 경우 4.72% 정도였지만 노란 아가콩 추출물 3 mg/ml 처리군에서는 40.76% 정도로 관찰되어 가장 높은 apoptosis 유발 효과를 보였다. 검정 아가콩 추출물 역시 대두 추출물에 비하여 높은 apoptosis 유발 효과를 보여 Fig. 12의 증식억제 효과와 유사한 경향성을 보여 주었다.

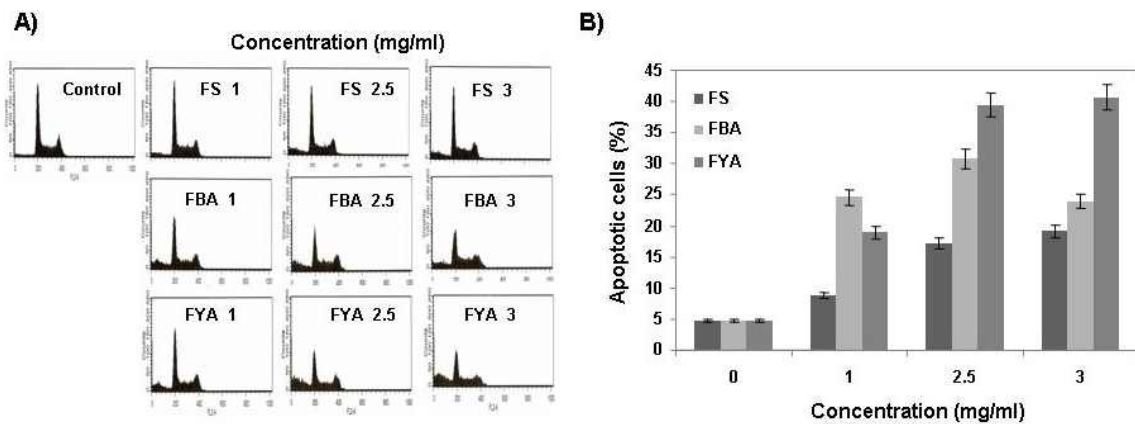


Fig. 13. U937 세포의 세포주기 진행 및 apoptosis 유발에 미치는 후보물질들의 영향. 48시간 동안 아가콩 추출물이 처리된 U937 세포에서 세포주기 진행 및 apoptosis 유발의 정도 측정을 위하여 flow cytometry 분석을 실시한 결과 세포주기 진행 특이적 arrest 현상은 없었으나 apoptosis 유발의 정도는 시료 추출물 처리 농도 증가에 따라 매우 증가되었으며 apoptosis 유발의 정도는 FS에 비하여 아가콩 추출물인 FBA 및 FYA의 항암활성이 매우 높게 나타났음.

(3) U937 세포의 형태에 미치는 FBA, YBA 및 FS의 영향

이상에서 관찰된 U937 세포의 증식억제에 미치는 영향과 연관된 암세포의 세포 형태 변화를 조사하기 위하여 도립현미경적 관찰 및 DAPI 염색에 의한 핵의 형태 변화를 조사하였다. Fig. 14A의 결과에서 알 수 있듯이 후보 추출물 처리 농도의 증가에 따라 다양한 형태적 변형이 동반되었는데 각 시료의 농도가 증가할수록 세포의 밀도는 감소하였고, 세포질이 응축되는 것을 확인할 수 있었다. 그리고 핵산에 특이적으로 결합하는 형광물질인 DAPI를 이용한 핵 염색 후 형광현미경을 통한 관

찰의 결과(Fig. 14B), 정상배지에서 자란 U937 세포의 핵은 뚜렷한 형태로 염색된 것과 비교하여 특히 아가콩 추출물 처리군에서는 apoptosis가 일어난 세포에서 전형적으로 관찰되는 apoptotic body의 출현이 처리 농도 증가에 따라 높게 나타나 아가콩 추출물 처리에 의한 U937 세포의 증식억제는 apoptosis 유발에 의한 것임을 재확인할 수 있었다.

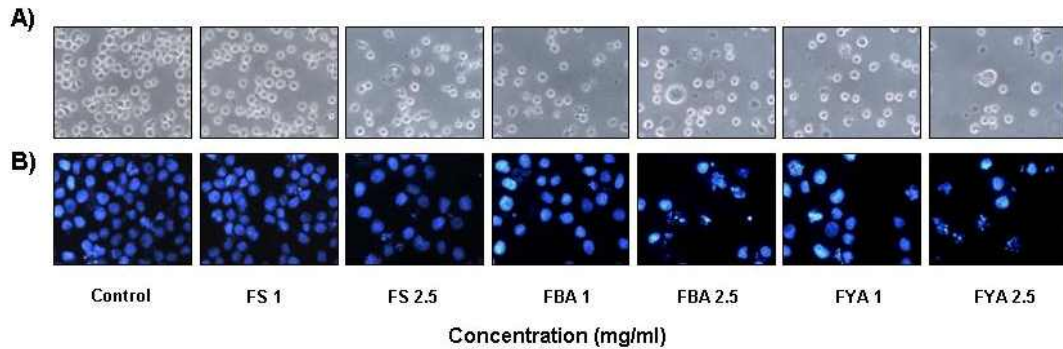


Fig. 14. U937 세포의 형태에 미치는 FBA, YBA 및 FS의 영향. 아가콩 추출물 처리에 의한 U937 세포의 증식억제에 따른 형태변화 및 apoptosis 유발의 증거 제시를 위하여 도립현미경적 관찰(A) 및 DAPI 염색에 의한 핵의 형태 변화(B)를 조사하였음.

#### (4) U937 세포에서 apoptosis 관련 인자의 발현에 미치는 FBA, YBA 및 FS의 영향

이상에서 관찰된 아가콩 추출물의 apoptosis 유발에 관한 자세한 기전 연구를 위하여 먼저 apoptosis 유발에 기본적으로 관여하는 몇 가지 유전자들의 발현에 미치는 후보물질들의 영향을 RT-PCR 및 Western blotting법에 준하여 전사 및 번역 수준에서 조사하였다. 이를 위하여 Bcl-2 및 IAP family에 속하는 유전자들의 발현 변화를 조사하였으며, 그 결과는 Fig. 15에 나타낸 바와 같다. 결과에서 알 수 있듯이 Bcl-2 family 인자 중, apoptosis 억제에 관여하는 인자들(Bcl-2, Bcl-xL)의 발현은 아가콩 추출물의 처리에 의하여 매우 감소되었고, apoptosis 유도에 관여하는 인자(Bax 및 Bad)의 발현은 증가되었음을 알 수 있었다.

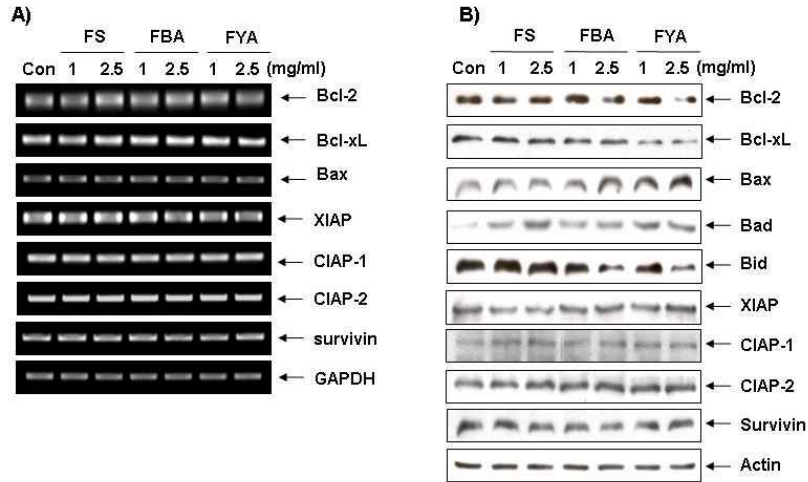
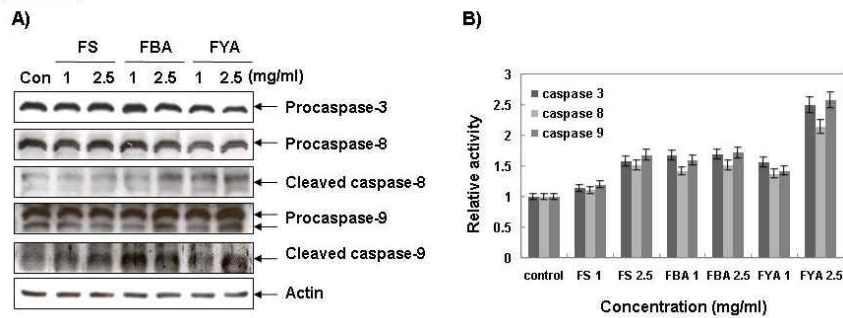


Fig. 14. U937 세포에서 apoptosis 관련 인자의 발현에 미치는 FBA, YBA 및 FS의 영향. 아가콩 추출물 처리에 의한 U937 세포의 apoptosis 유발에 연관된 기전 해석의 시도를 위하여 Bcl-2 및 IAP family 인자에 속하는 유전자들의 발현 변화를 RT-PCR (A) Western blot analysis (B)를 실시하였음.

(5) U937 세포 caspase의 발현 및 활성화에 미치는 FBA, FYA 및 FS의 영향

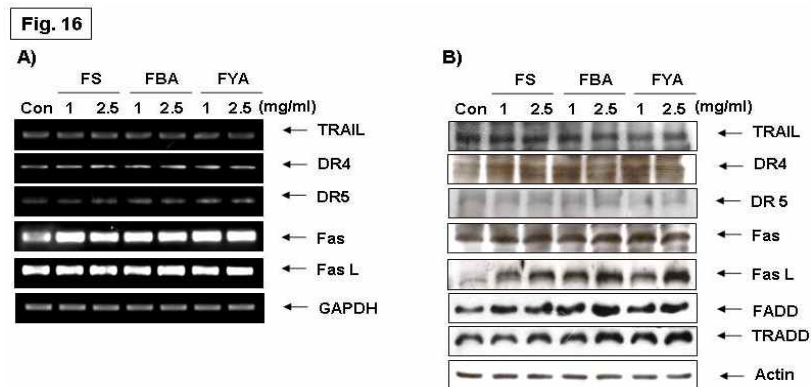
U937 백혈병세포의 세포사멸(apoptosis) 유발 과정에서 caspase의 활성화 증가 관련성을 조사하기 위하여 몇 가지 종류의 caspase의 발현 및 그들의 활성화 정도를 조사하였음 → 결과 15에 나타낸 바와 같이 조사된 3가지 종류의 caspase 모두에서 아가콩 추출물 처리에 의한 비활성 caspase의 발현이 감소되었으며, 특히 노란 아가콩 에탄올 추출물(FYA)에 의한 caspase 활성화 증가가 대두 에탄올 침전 추출물(FS)이나 검정 아가콩 에탄올 침전 추출물(FBA)에 비하여 높게 나타났음

Fig. 15



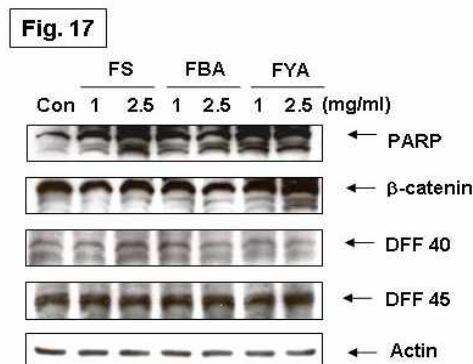
(6) U937 세포 death-receptor 연관 유전자의 발현에 미치는 FBA, FYA 및 FS의 영향

아가콩 추출물 처리에 의한 U937 백혈병 세포의 apoptosis 유도에서 death-receptor 관련 유전자들의 연관성 여부를 조사하기 위하여 동일 조건에서 배양된 U937 세포를 대상으로 몇 가지 death-receptor 관련 유전자들의 발현 변화 정도를 RT-PCR 및 Western blotting 방법으로 조사하였음 → 결과 16에 나타낸 바와 같이 TRAIL, DR4 및 DR5의 발현은 전사 및 번역 수준 모두에서 큰 변화가 없었으나, Fas 및 FasL의 발현은 콩 추출물 처리군 모두에서 증가되었으나, FS 처리군보다 FBA 및 FYA 처리군에서 더 높은 발현이 관찰되었음



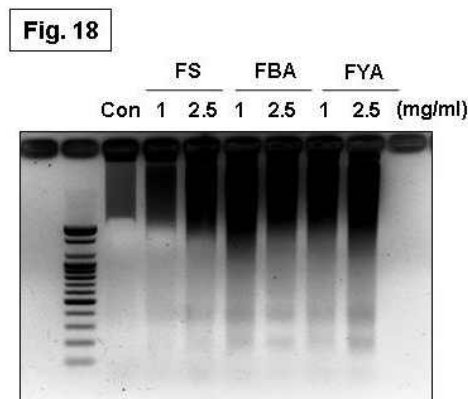
(7) U937 세포에서 caspase-3표적 단백질의 발현에 미치는 FBA, FYA 및 FS의 영향

상기 결과에서 관찰된 caspase의 활성화가 apoptosis 유도에 직접적인 영향을 미쳤는지의 여부를 조사하기 위하여 특히 apoptosis의 표지 단백질인 caspase-3의 활성화에 의하여 단편화가 일어나는 몇 가지 단백질의 발현 변화를 조사하였음 → 결과 17에 나타낸 바와 같이 조사된 4가지 단백질 중, PARP 및  $\beta$ -catenin의 발현이 처리군 모두에서 단편화가 유도되었지만, FS 처리군 보다는 FBA 및 FYA 처리군에서 단편화 유도의 정도가 더 강하게 관찰되었음



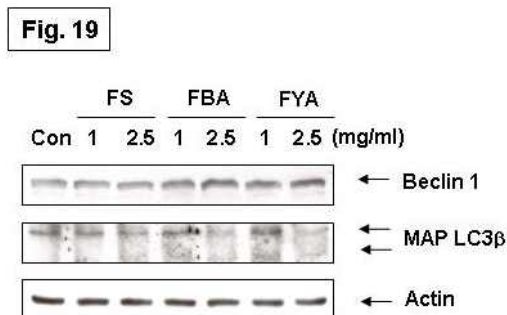
(8) U937 세포에서 FBA, FYA 및 FS에 의한 U937 세포의 DNA 단편화 유도 비교

다양한 콩 추출물의 처리에 의한 U937 세포의 apoptosis 유도에 대한 추가적인 자료의 제시를 위하여 전형적인 apoptosis가 유도된 세포에서 관찰되는 DNA 단편화 현상이 본 실험 조건에서도 관찰되는지의 여부를 조사하기 위하여 콩 추출물이 처리된 U937 세포의 DNA 단편화 여부를 agarose gel 전기영동 방법으로 확인하였음 → 정상 배지에서 배양된 세포에서 관찰되지 않았던 DNA 단편화인 laddering 현상이 FS 처리군에서보다 FBA 및 FYA 처리군에서 더욱 선명하게 관찰되었음(결과 18).



(9) U937 세포에서 autophagy 관련 표지 유전자의 발현에 미치는 FBA, FYA 및 FS의 영향

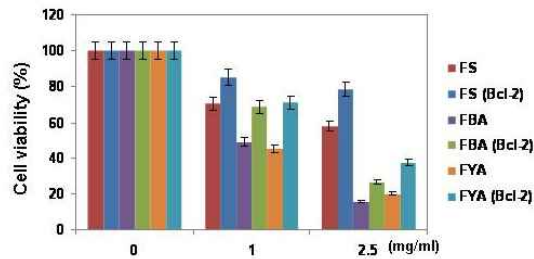
다양한 콩 추출물 처리에 의한 암세포의 apoptosis 유도과정에서 autophagy 현상이 동반되는지의 여부를 조사하기 위하여 autophagy 유도 표지 유전자인 Beclin-1 및 MAP LC3 $\beta$  유전자의 발현에 미치는 영향을 조사하였음 → FBA 및 FYA가 처리된 U937 세포에서 Beclin-1 및 MAP LC3 $\beta$ 의 발현이 다소 증가되었으나, FS 처리군에서는 유의적인 증가 현상이 크게 관찰되지 않았음(결과 19)



(10) FBA, FYA 및 FS에 의한 U937 세포의 증식억제에 미치는 Bcl-2 유전자 과발현의 영향

상기 연구 결과에서 아가콩 추출물 처리에 의한 apoptosis 유도 과정에서 anti-apoptotic 유전자에 해당되는 Bcl-2의 발현이 FBA 및 FYA 처리군에서 매우 감소되었으므로 Bcl-2 유전자가 FBA 및 FYA에 의한 apoptosis 유발에 중요한 역할을 하는지의 여부를 조사하였음 → 이를 위하여 Bcl-2 유전자가 과발현된 U937/Bcl-2 세포주 및 empty vector가 도입된 U937/vector 세포주를 이용하여 3가지 추출물에 대한 감수성의 정도를 MTT assay법으로 비교한 결과 FS, FBA 및 FYA 처리군 모두에서 Bcl-2가 과발현된 세포에서 세포의 생존율이 다소 높게 나타났다(결과 20)

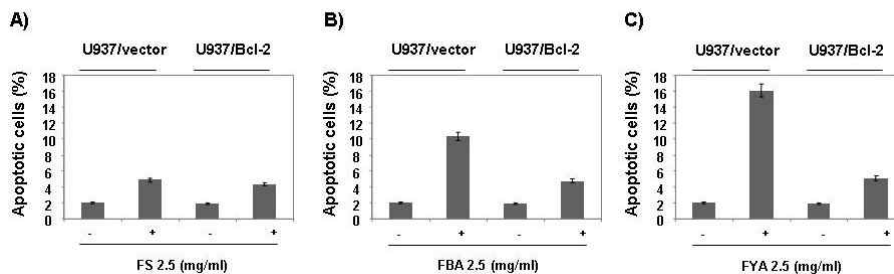
Fig. 20



(11) U937 세포에서 FBA, FYA 및 FS에 의한 apoptosis 유도에 미치는 Bcl-2 유전자 과발현의 영향

결과 20에서 관찰된 Bcl-2 유전자 과발현에 의한 U937 세포의 증식을 회복이 apoptosis 유도 억제와 연관성이 있는지의 여부를 조사하였음 → 이를 위하여 U937/vector 및 U937/Bcl-2 세포를 대상으로 3가지 추출물이 처리된 세포들을 대상으로 flow cytometry 분석을 실시한 결과 FS 처리군에서는 큰 유의적인 차이가 관찰되지 않았지만, FBA 및 FYA 처리군에서는 U937/Bcl-2세포에서 FBA 및 FYA 처리에 의한 apoptosis 유도의 정도가 현저하게 감소되었음(결과 21)

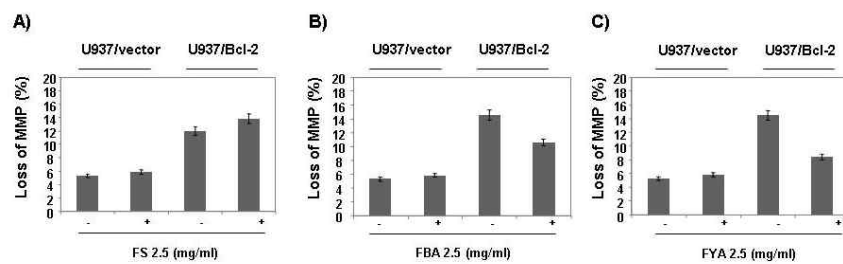
Fig. 21



(12) U937 세포에서 FBA, FYA 및 FS에 의한 apoptosis 유도에 미치는 Bcl-2 유전자 과발현의 영향

이상의 결과들에서 관찰된 Bcl-2의 과발현에 의한 apoptosis 유도 억제 정도가 미토콘드리아 기능 회복과의 연관성에 의한 것인지를 조사하기 위하여 3가지 추출물이 처리된 U937/vector 및 U937/Bcl-2 세포를 대상으로 mitochondrial membrane potential (MMP)의 변화 정도를 조사하였음 → 결과 22에 나타난 바와 같이 FS 처리군에서는 U937/vector 및 U937/Bcl-2 두 세포에서 큰 차이를 보이지 않았으나, FBA 및 FYA 처리군에서는 Bcl-2 유전자가 과발현된 U937 세포에서 MMP의 loss의 정도가 다소 회복되었음을 알 수 있었음.

Fig. 22



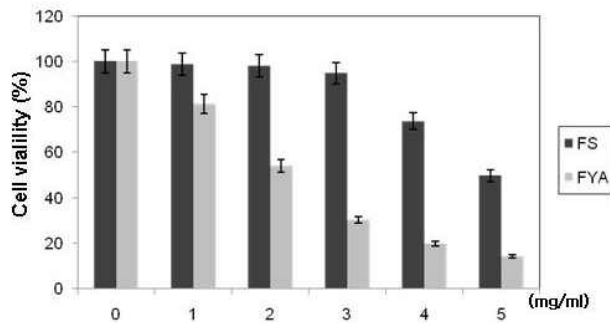
→ 이상의 결과에서 두 가지 종류의 아가콩 추출물(FBA 및 FYA)이 대두 추출물(FS)에 비하여 인체 백혈병세포의 apoptosis 유도 효과가 매우 높게 나타났으며, 이러한 apoptosis 유도 현상은 death-receptor를 경유한 caspase-8의 활성화 증가, MMP의 감소, caspase-9 및 caspase-3의 활성화에 의한 표적 단백질들의 단편화 및 DNA 단편화 과정을 거쳐서 일어나는 것이며, Bcl-2 유전자가 이 과정에서 증용한 역할을 하고 있음을 알 수 있었음. 아울러 아가콩 추출물에 의한 암세포의 apoptosis 과정에는 autophagy가 연관되어 있음을 확인하였음

(13) FS 및 FYA에 의한 AGS 인체 위암세포의 증식억제

아가콩 추출물에 의한 암세포의 효과적인 증식억제 및 apoptosis 유도 현상이 혈구암세포에서 뿐만 아니라 고형암세포에서도 유사하게 나타나는지의 여부를 확인하기 위하여 인체위암세포(AGS)를 대상으로 조사하였음. AGS 위암세포의 증식에 미치는 아가콩 추출물의 영향을 조사하기 위하여 노란 아가콩 에탄올 추출물(FYA) 및 대두 에탄올 침전 추출물(FS) 처리에 의한 AGS 세포의 생존율을 비교하였음 → 결과 23에 나타난 MTT assay 결과에서 알 수 있듯이 FS 처리군보다 FYA 처리군이 AGS 위암세포의 증식을 매우 억제시켰음



**Fig. 23**



AGS 인체 위암세포의 세포주기 진행에 미치는 FS 및 FYA의 영향  
 FYA에 의한 AGS 위암세포의 증식억제가 세포주기 진행과의 연관성이 있는지의 여부를 조사하였음 → 이를 위하여 FS 및 FYA가 처리된 암세포를 대상으로 세포주기 각 시기에 해당되는 세포의 빈도 정도를 flow cytometry를 이용하여 분석한 결과, 세포주기 G2/M기에 해당되는 세포의 빈도가 정상 배지에서 배양된 암세포 (32.9%)에 비하여 FS 및 FYA 처리군 모두에서 매우 증가되었으며(최고 63.9% 및 65.6%), 상대적으로 G1 및 S기에 해당되는 세포의 빈도는 감소되어, FS 및 FYA 처리는 세포주기 G2/M arrest를 유발시켰음을 알 수 있었음(결과 24)

**Fig. 24**

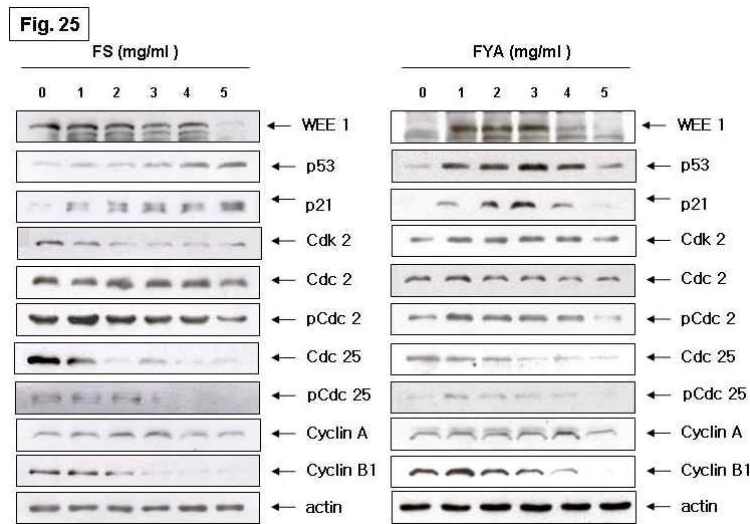
FS	G1	S	G2/M	FYA	G1	S	G2/M
0	47.1	20	32.9	0	47.1	20	32.9
1	43.3	20.1	36.6	1	21.1	17.4	61.5
2	20.3	21.3	58.4	2	17.3	17.1	65.6
3	17.6	18.5	63.9	3	18.6	18.6	62.8
4	21.6	15	63.4	4	53	26.4	20.6
5	26.1	18.4	55.5	5	45	34.7	20.3

(14) AGS 인체 위암세포의 세포주기 조절인자의 발현에 미치는 FS 및 FYA의 영향

결과 2-2에서 나타난 FS 및 FYA 처리에 의한 AGS 위암세포의 G2/M arrest 유발 현상에 관여하는 기전의 해석을 위하여 세포주기 G2/M기 및 세포주기 전반에 걸친 중요한 조절인자들의 발현에 미치는 FS 및 FYA의 영향을 조사하였음 → 결과 25에 나타낸 바와 같이 FS 및 FYA 처리에 의한 Wee1의 발현에 대한 변화의 정도가 매우 다르게 관찰되었으나, 종양억제 유전자 p53 및 대표적인 cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor인 p21의 발현은 매우 증가되었음. 아울러 G2/M기 전이에 중요한 역할을 하는 대부분 유전자들의 발현은 매우 감소되었음을 알 수 있었음



→ 이상의 결과에서 FS 및 FYA 처리에 의한 AGS 위암세포의 증식억제는 세포주기 G2/M arrest에 의한 것이며, AGS 세포의 증식억제 효과는 FYA가 높게 나타났으나, G2/M arrest의 정도는 유사하게 관찰되었음. 그러나 고농도 처리군에서 오히려 G2/M arrest 현상이 다소 낮게 관찰된 것은 FS 및 FYA 처리에 의한 apoptosis 유도 때문인 것으로 추측됨. 아울러 G2/M arrest에 관련된 기전 연구 및 apoptosis 조절에 대한 기전 연구는 지속적으로 실시하고 있음



라) Cyclooxygenase-2 및 telomerase의 활성화에 미치는 대두의 대표적인 phytochemical인 isoflavone genistein의 영향

(1) 몇 가지 암세포의 증식에 미치는 genistein의 영향

Genistein에 의한 몇 가지 인체 암세포에서 COX-2 및 telomerase 활성화 연관 실험을 수행하기 위한 조건의 설정을 위하여, 48시간 동안 다양한 농도의 genistein을 처리한 후 MTT assay를 실시하였다. Fig. 26에 나타난 결과에서 알 수 있듯이 조사된 4가지 암세포에 모두는 genistein 처리 농도의 증가에 따라 증식이 억제되었으나, genistein에 대한 감수성은 백혈병 세포주인 U937에서 가장 높게 나타났으며, 방광암세포인 T24에서 가장 낮게 나타났다. 이러한 genistein 처리에 따른 암세포들의 증식억제는 다양한 형태적 변형을 동반하였다. 선행연구들의 결과에 의하면 genistein에 의한 암세포의 증식억제는 모두 세포주기의 G2/M arrest와 연관된 apoptosis에 의한 것이었으므로 본 연구에 의해 나타난 다양한 암세포의 증식억제도 G2/M arrest 및 apoptosis와 연관성이 있을 것으로 기대되며 선행 연구 및 몇 가지 실험을 통하여 이를 이미 확인한 바 있다.

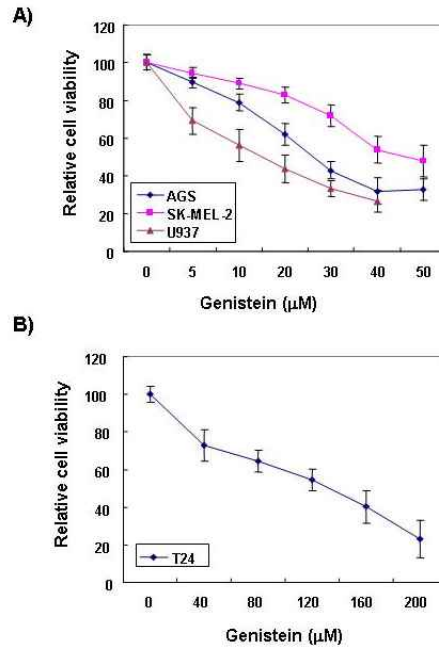


Fig. 26. 몇 암 세포(T24, human bladder carcinoma; U937, human leukemic; AGS, human stomach adenocarcinoma and SK-MEL-2, human skin melanoma cells)의 증식에 미치는 genistein의 영향

(2) Telomere 조절인자들의 발현에 미치는 genistein의 영향

진핵세포의 염색체 말단 부위에 존재하는 telomere는 repeat sequences [(TTAGGG) $n$ ]로 이루어져 있으며, 이런 반복구조의 형성 및 유지에 관여하는 효소가 telomerase이다. 정상 체세포에서는 telomerase의 활성이 없기 때문에 세포가 분열할수록 telomere의 길이는 짧아지게 되지만, 암세포의 90% 이상에서는 telomerase의 catalytic subunit 단백질을 coding하는 human telomerase reverse transcriptase (hTERT)가 과발현되어 있고 이로 인한 높은 telomerase의 활성을 나타내고 있다. 따라서 telomerase 활성 변화는 노화, 혈관신생 및 면역계질환 등에서 뿐만 아니라 암의 발생과 진행과도 밀접한 연관성이 있으며, 암의 진단과 진행의 정도를 나타내는 지표로 사용될 수 있음을 시사하여 준다. 노화의 개념에서 결국 telomere의 소실은 염색체의 안정성이 상실되는 것이며 이는 DNA damaging agent에 의한 p53 및 Cdk inhibitor p21의 발현증가로 인한 세포주기 교란으로 설명되어지고 있다. 특히 암과 연관된 부분에서 telomerase의 활성은 hTERT 유전자의 발현 조절에 의한 것이고, hTERT 유전자의 promoter 부위에는 다른 유전자의 promoter보다 훨씬 더 많은 전사조절인자의 결합부위를 보유하고 있어 activator 또는 repressor로 작용할 수 있다. 따라서 암세포에서 높은 활성을 지니는 telomerase의 활성을 선택적으로 억제함으로써 암세포의 성장과 분열을 억제하고자하는 시도 역시 새로운 항암제 개발을 위한 표적이 되고 있다.

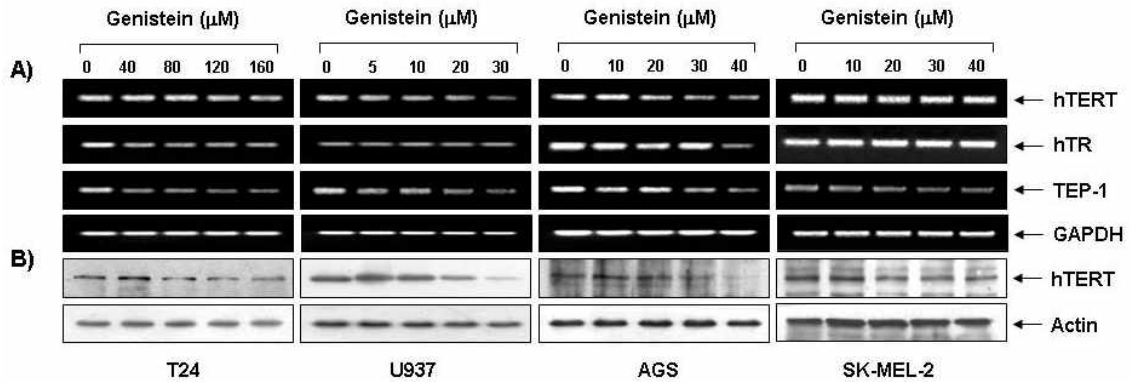


Fig. 27. 몇 가지 암세포의 telomere regulatory 유전자들의 발현에 미치는 genistein의 영향

Genistein에 의한 암세포들의 증식억제가 telomere 조절인자들의 발현과 어떤 연관성을 지니는지를 조사하기 위하여 telomere 길이에 조절에 가장 중요한 역할을 하는 3가지 유전자인 hTERT, human telomerase RNA (hTR) 및 telomerase-associated protein (TEP)-1의 발현에 미치는 genistein의 영향을 먼저 조사하였다. 이를 위하여 정상 및 genistein이 처리된 배지에서 48시간 동안 배양된 세포들을 대상으로 RT-PCR 및 Western blot 분석을 실시하였다. Fig. 27의 결과에서 알 수 있듯이 T24, U937 및 AGS 세포에서 genistein의 처리에 의하여 조사된 유전자 중 hTERT의 mRNA 발현이 genistein 처리 농도가 증가될수록 다소 감소되는 경향성을 보여 주었으나, SK-MEL-2 세포에서는 큰 변화가 없었으며, hTERT의 단백질 수준의 변화도 이와 유사하게 나타났다. hTR의 경우 U937 및 SK-MEL-2 세포에서는 큰 변화가 없었으나, T24 및 AGS 세포에서는 genistein 처리 농도 의존적으로 감소되었으며, TEP-1의 경우 조사된 4가지 세포 모두에서 genistein의 농도가 증가할수록 매우 감소되었음을 알 수 있었다. 즉 조사된 암세포의 종류에 따라 genistein에 대한 telomere 조절인자들의 발현은 다양하게 나타났으며, 최소한 한 두 가지 인자 이상의 발현이 감소되었음을 알 수 있었다. 이러한 telomere 조절인자들의 발현 변화는 telomere 길이 조절에 직접적으로 중요한 조절 역할을 하는 telomerase 효소의 활성 변화와 연관성이 있을 것으로 추정되므로 이를 확인하기 위하여 genistein이 처리된 암세포들을 대상으로 telomerase 효소 활성의 정도를 정상 배지에서 자란 세포와 비교 조사하였다. 이를 위하여 AGS 및 SK-MEL-2 세포를 대상으로 실험 방법에 기술한 바와 같이 TRAP-ELISA를 통한 telomerase 활성을 조사하였으며, 그 결과는 Fig. 28A에 나타난 바와 같다. Fig. 28A의 결과에서 볼 수 있듯이 genistein이 함유된 배지에서 자란 암세포들의 telomerase 활성은 genistein의 농도가 증가될수록 점차 감소되는 경향성을 보여주어 genistein에 의한 암세포들의 증식 억제가 telomerase 활성 저하와 어느 정도 연관성이 있음을 알 수 있었다.

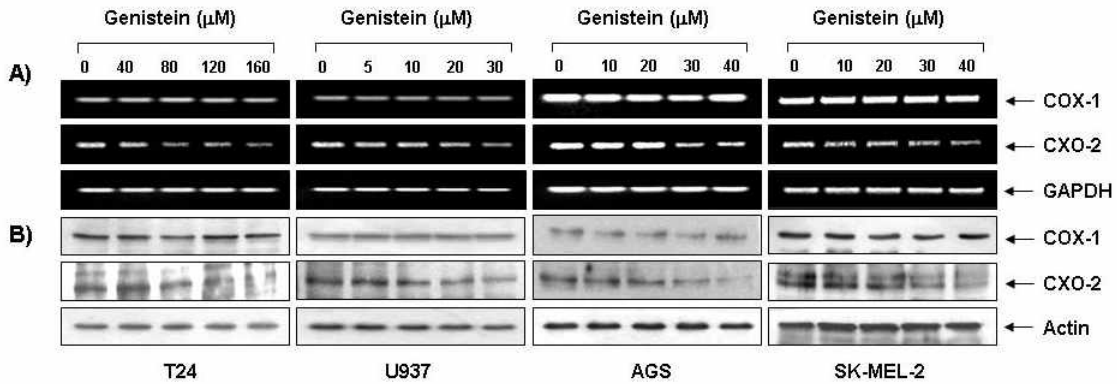


Fig. 28. 몇 가지 암세포에서 COX-1 및 COX-2의 발현에 미치는 genistein의 영향

### (3) COX-2 발현 및 PGE2의 생성에 미치는 genistein의 영향

다양한 질환의 매개체로 작용할 수 있는 PG은 세포분열이나 증식에 영향을 줌으로서 각종 인체 질병의 유발과 진행에 중요한 역할을 함이 최근 밝혀지고 있다. PG의 합성에서 2가지 COX isoform이 관여하고 있는데, 대부분의 조직에서 일정한 수준으로 발현되는 COX-1의 경우 인체의 항상성 유지와 연관된 기능수행에 관여하고 있으나, COX-2는 다양한 성장인자, cytokines, 종양 촉진인자들 등의 자극에 의한 유도성 isoform으로서 세포 증식을 촉진하고 apoptosis를 억제하며 세포의 이동성 및 부착성을 강화시킴으로서 각종 퇴행성 질환의 발병과 진행에 중요한 역할을 한다. 역학적 조사와 여러 종류의 암 조직에서 COX-2가 높은 발현을 유지하는 것이 apoptosis에 대한 저항성 획득과 염증반응과 연관된 세포의 암화에 밀접한 관련이 있을 것으로 보고되어 지고 있다. 또한 COX-2의 과발현에 의해 암조직에서의 혈관신생 및 전이능이 높아지고, COX-2의 선택적 억제제에 의한 angiogenesis와 종양형성 억제 등의 결과에서 COX-2의 선택적 조절에 의한 암예방 및 항암전략이 대두되고 있다.

따라서 genistein이 처리된 몇 가지 암세포의 증식 억제에 COX-2의 발현 저하 및 PG의 생성 변화와의 연관성이 있는지의 여부를 조사하기 위하여 COX-1 및 -2의 발현 변화를 먼저 조사하였다. Fig. 3의 결과에서 알 수 있듯이 조사된 4가지 암세포주의 COX-1의 mRNA 및 단백질 발현에는 genistein이 별다른 영향을 미치지 못하였으나, COX-2의 경우 전사 및 번역 수준에서 genistein의 처리 농도 증가에 따라 점차적인 발현의 감소를 보여주었다. 이러한 genistein에 의한 COX-2의 선택적 발현 저하가 PGE2의 생성 저하와 연관성이 있는지를 조사하기 위하여 PGE2의 생성에 미치는 genistein의 영향을 조사한 결과는 Fig. 28B에 나타낸 바와 같다. Fig. 28B에서 조사된 2가지 세포주 AGS 및 SK-MEL-2 세포 모두에서 genistein의 처리 농도가 증가할수록 PGE2의 생성이 매우 감소되었으며, PGE2의 생성 감소 경향성은 COX-2의 발현 저하와 유사한 경향성을 보여주었다. 따라서 genistein 처리에 의한 암세포의 증식 억제에는 COX-2의 선택적 발현 억제에 의한 PGE2의 생성

저해와 연관성이 있음을 알 수 있었다.

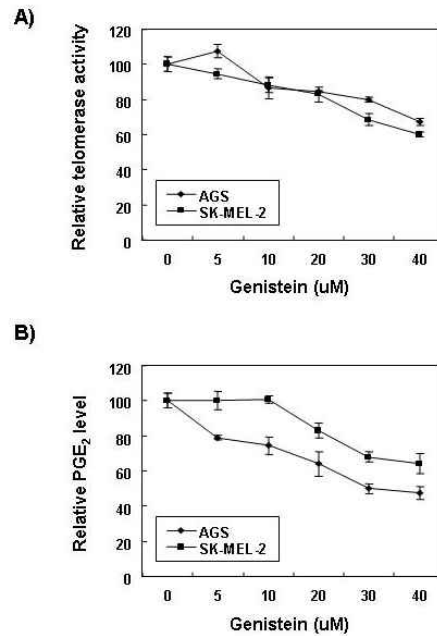


Fig. 28. AGS 및 SK-MEL-2 세포에서 telomerase의 활성과 PGE<sub>2</sub> 생성에 미치는 genistei의 영향

#### 4) 대두의 식용 사포닌을 이용한 항비만 음료시제품 개발

##### 가) 대두박으로부터 식용 사포닌의 제조

##### (1) 대두박으로부터 식용사포닌의 분리

대두박으로부터 식용사포닌을 분리하는 방법은 그림. 1과 같다. 항비만 활성 물질을 추출하기 위해 20 L의 환류추출장치를 제작하여 탈지된 대두박(40 kg)에 80% 에탄올(주정)을 360 L 첨가하여 대두박 추출물을 취하였으며, 그 추출물을 대형 감압농축장치를 사용하여 농축하였다. 그리고 그 농축액을 정제수를 첨가하여 묽은 상태로 희석하고 대형 칼럼(1300×15cm)을 제작하여 크로마토그래피(Diaion HP-20)을 통해 많은 양의 대두박 사포닌을 분리할 수 있도록 하였다.

따라서 대두박 40 kg로부터 항비만 활성물질인 식용 사포닌을 분리하였을 때 약 640 g을 얻을 수 있었다.

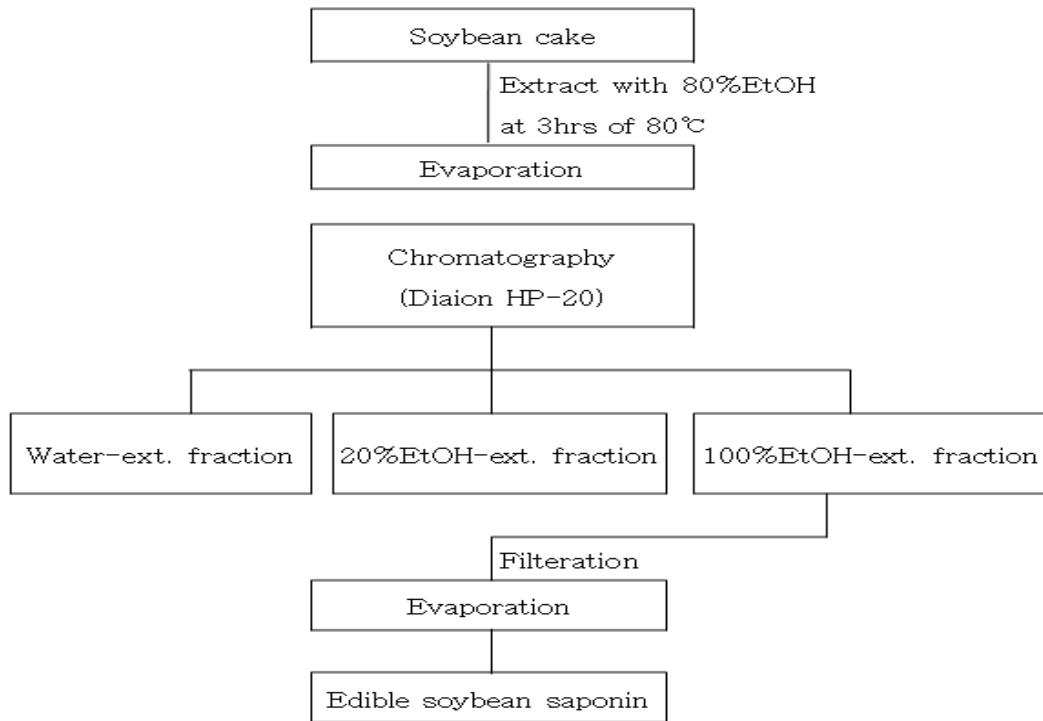


그림. 1. 대두박으로부터 식용 사포닌 분리 방법.

나) 대두 사포닌을 이용한 시제품 제조 공정도

(1) 대두 사포닌의 최적 항비만 활성 조건 확립 및 배합비 선정

대두 사포닌과 가르시니아 캄보지아(GC)의 항비만 활성 농도를 정하기 위해 고지방 식이를 시킨 마우스에 사포닌(0.5, 1.0, 1.5%), GC(1.0, 1.8%)를 5주 동안 급여한 결과 사포닌은 0.5%이상, GC는 1.8%에서 비만억제효과가 있는 것으로 검증되었으며(그림. 2, 3, 4), 이를 바탕으로 표 1과 같이 배합한 3종의 다이어트 시제품음료를 제조하였다.

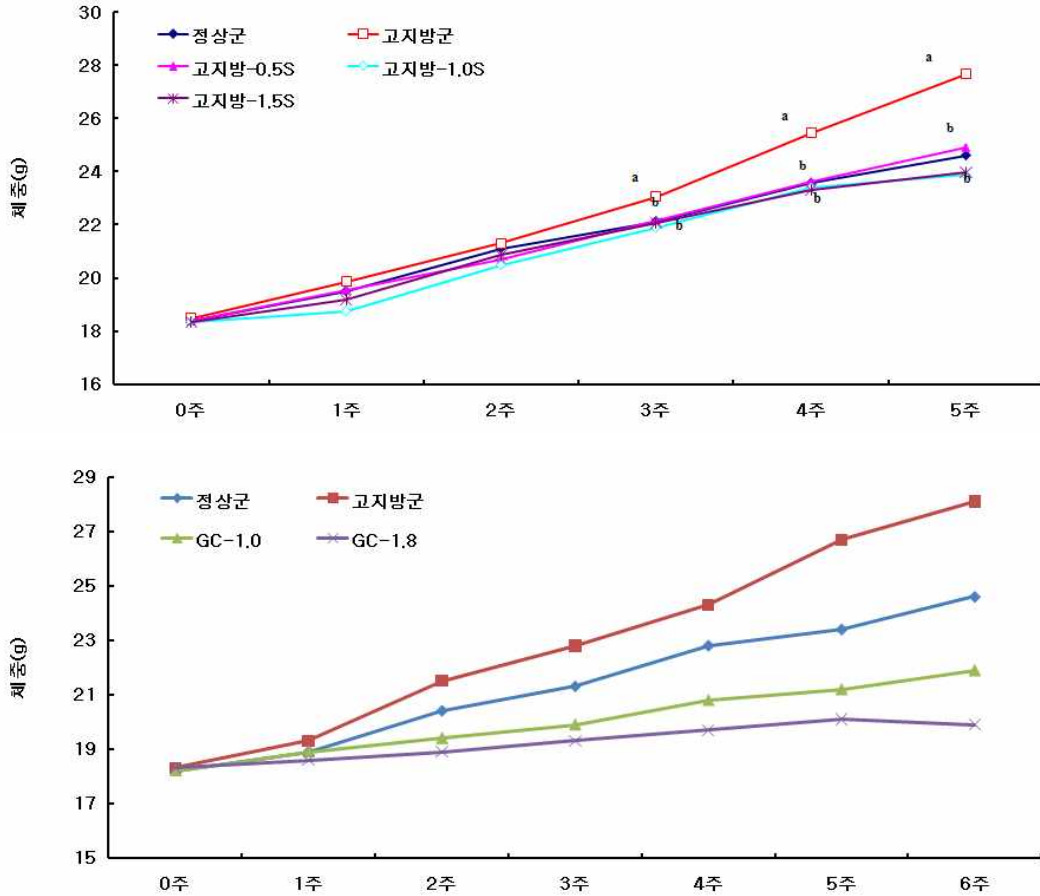


그림. 2. 실험기간 5주 동안의 체중변화.

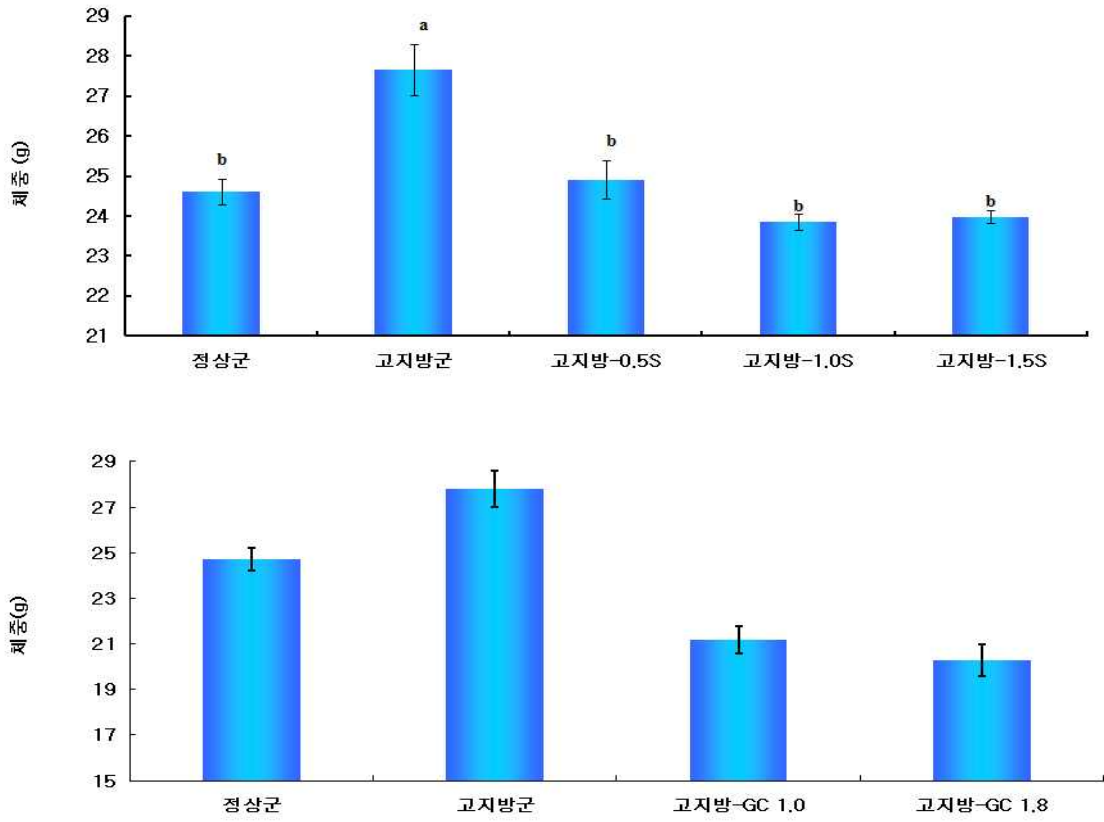


그림. 3. 실험 5주째 체중 변화.

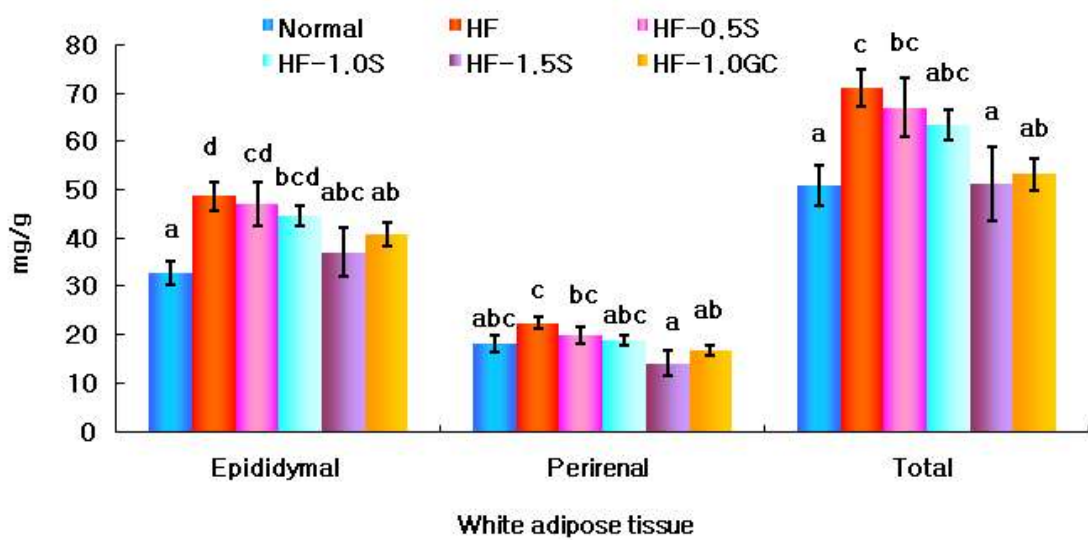


그림. 4. 대두 사포닌의 비만 유발 마우스의 지방무게 변화.



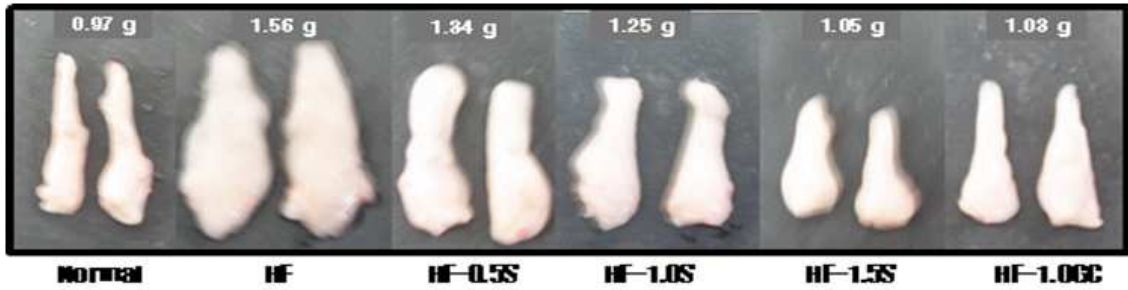


표 1. 대두 사포닌을 이용한 다이어트 3종 시제품의 배합비

시제품	대두 사포닌의 함량(%)	GC(%)	보조 부용제 물질(%)
A	0.5	1.8	16.1
B	1.0	1.8	15.6
C	1.5	1.8	15.1

#### (2) 보조 부용제 원료 선정

보조 부용제 원료로는 건강기능식품 및 식품 및 식품첨가물의 원료로 적합한 것으로서 원료로 사용하기전에 엄선된 품질관리를 거쳐 규격에 적합한 원료만을 사용하였다(표 2). 또한 대부분의 원료는 분말로 수분함량이 10%이내의 건조된 상태의 원료들로서 보관 시 미생물등의 발육이 어려워 자체적으로 쉽게 부패되거나 변질되지 않은 성분들로 구성되어 상당한 보조성을 가지고 있으므로 품질의 변화가 거의 없으며 제조과정에서 쉽게 물리적, 화학적인 성분변화가 일어나지 않은 특징 있다.

표 2. 보조 부용제의 조성물

폴리텍스트로스	자일리톨	자몽과즙
액상과당	대두섬유분말	L-카르니틴
드링크향	대두단백혼합분말	
수크랄로스	규소수지	

(3) 시제품의 제조 공정도

- 원료검수 : 모든 사용원료는 식품 및 식품 첨가물공정 규격에 적합한 원료만을 검수해서 사용하였다
- 정 수 : 순수 제조장치로 정수 처리하여 정제수로 사용하였다
- 배 합 : 주원료(대두사포닌+GC)와 부원료(부용제 18종)를 정제수와 같이 배합비율에 따라 첨가하였다
- 교 반 : 배합된 액을 50℃에서 30분간 교반하여 용해시켰다
- 살균·여과 : 완전히 용해시킨 배합액을 열교환기로 95℃에서 10초간 순간 살균시킨 후 1마이크로 여과기를 통과시켜 깨끗이 여과하였다
- 충 진 : 살균·여과된 액을 일정량씩 용기에 충전하였다
- 캡 핑 : 충전된 용기에 캡을 덮고 캡핑하였다
- 후살균·냉각 : 충전 캡핑된 시제품을 85℃에서 4분간 후살균한 후 35℃가 되도록 냉각시켰다

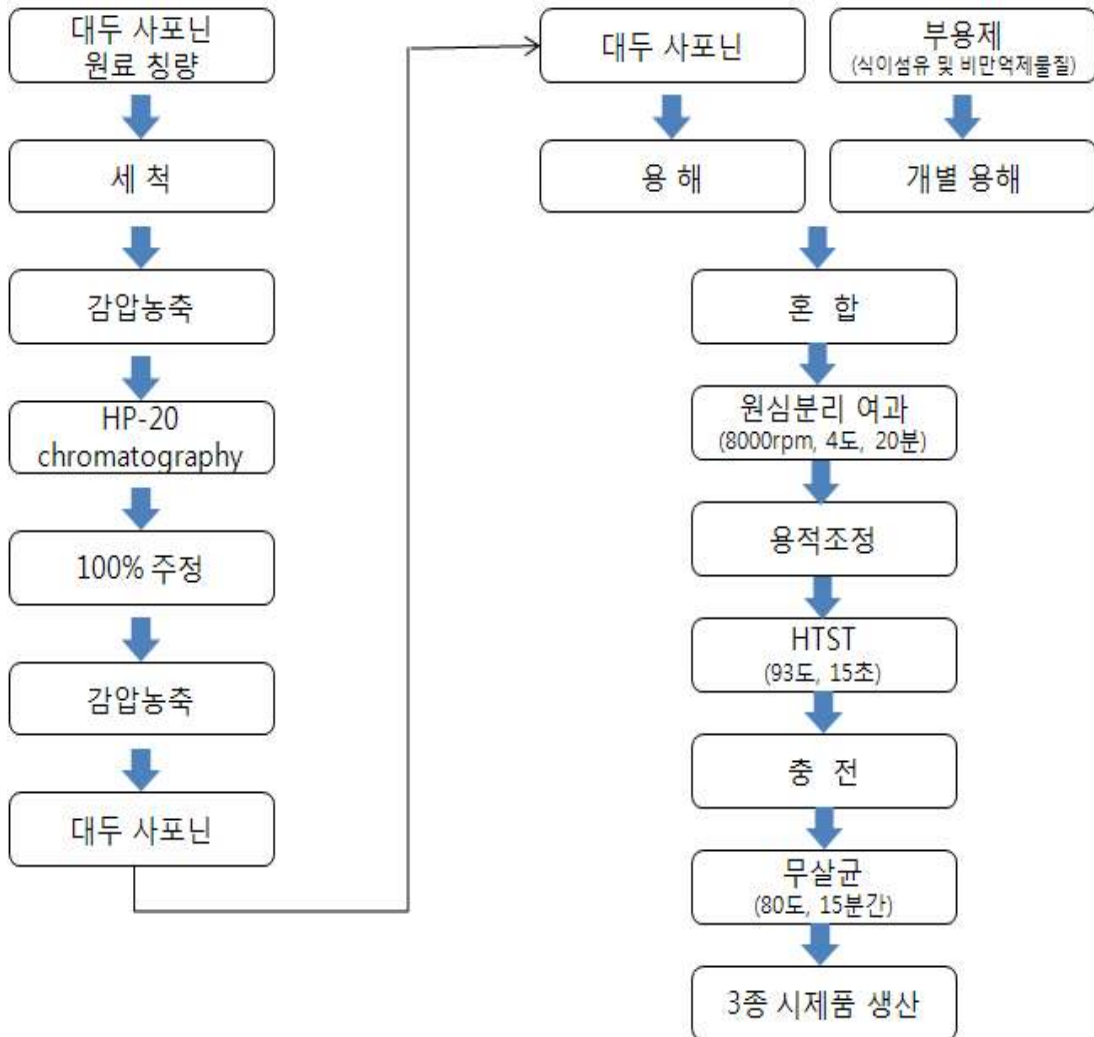


그림. 5. 대두 사포닌을 이용한 시제품 제조공정도.

#### (4) 시제품의 제조 방법

- 제품의 유형 : 영양보충용제품
- 제품의 형태 : 미황색의 액상제품으로 고유의 향미를 가지며, 이미·이취가 없음
- 포장재질 : 용기(폴리에틸렌 테레프탈레이트, 알루미늄, 나일론, 저밀도 폴리에틸렌) 뚜껑(폴리에틸렌)
- 포장방법 및 포장단위 : 100mL 파우치
- 보존 및 유통기준 : 직사광선을 피하고 실온에서 보관 유통 가능
- 섭취량 및 섭취방법 : 1일 1회, 1회 1포를 섭취하여야 함
- 섭취 시 주의사항 : 특히 체질이나 민감하신 분, 대두 알레르기가 있으신 분은 메스꺼움, 설사, 어지러움, 피부 두드러기, 답답한 증상이 나타날 수 있음. 이런 증상이 지속될 경우, 섭취를 중단하고 의사와 상담하시거나 고객상담실로 연락요망. 섭취 시 위장장애, 소화불량의 증상이 있을 경우 섭취를 중단하여야 함. 임산부 및 수유부께서는 섭취 전 의사와 상담하시거나 고객상담실로 연락요망. 본 시제품의 섭취량은 성인기준으로 표시되어 있음.

선행 동물실험 결과를 통해 모든 시제품의 GC 함유량은 사람이 섭취했을 때 부작용을 유발하지 않을 만큼의 조성물과 대두 사포닌의 항비만 활성 농도를 각각 용해하였으며, 또한 보조 부용제의 조성 배합을 첨가한 3 종류의 시제품을 제조하였다.



그림. 6. 대두 사포닌을 이용한 비만억제 시제품 음료 제조.

#### 다) 대두음료 시제품의 in vivo 항비만 효능 검증

##### (1) 실험동물 사육

실험동물은 4주령의 수컷 C57BL/6 마우스 48 마리를 바이오제노믹스(Biogenomics, Seoul, Korea)로부터 구입하였다. 마우스는 1주간 고형식으로 적응시킨 후 난피법에 의하여 정상군(N), 고지방대조군(HF), 시제품A-대두S:a GC:d%, 시제품B-대두S:b GC:e%, 시제품C-대두S:c GC:f%으로 나누어 6주간 사육하였다 (그림. 7). 동물사육실의 환경은 항온(20±2℃), 항습(50± 5%), 12시간 간격(08:00~20:00)의 광주기로 일정

한 조건을 유지하고 동물들은 polycarbonate cage에 두 마리씩 분리하여 사육하였다.

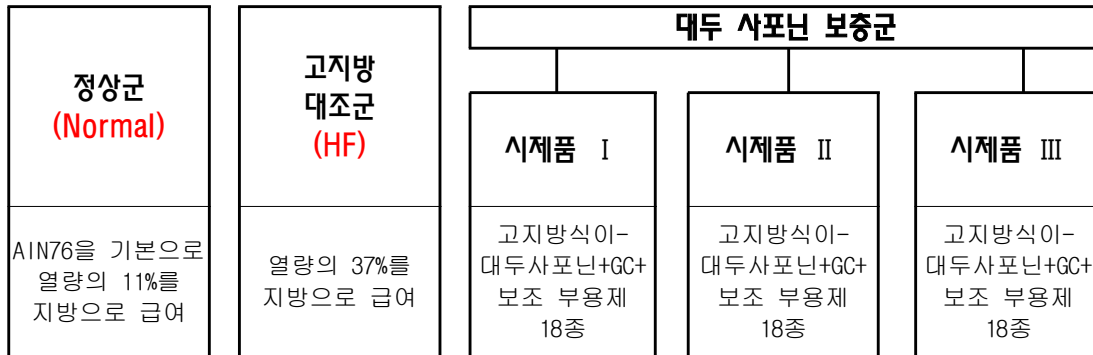


그림. 7. Experimental groups.

### (2) 실험동물의 식이급여

본 실험에 사용한 기본식이는 AIN-76(표 3)의 식이조성에 준하였으며 단백질 급원으로는 카제인(Murray, UK)을 공급하고, 탄수화물 급원은 옥수수 전분(신동방), 지방 급원으로는 옥수수유(제일제당)을 사용하였다. 비만 유발군들은 포화지방산 함량이 높은 쇠기름(17%, wt/wt)과 필수지방산 공급을 위해 옥수수유(3%, wt/wt)을 공급열량의 37% 수준으로 급여하였다. 식이와 식수는 자유롭게 섭취(ad libitum)하도록 하였고, 모든 실험 식이는 사육기간 동안 냉장 보관하였다. 사육기간 마지막 5일 동안 분변을 수집하여 건조시킨 후 지질측정에 사용하였다.

표 3. 실험식이 조성

(g/100g diet)

Groups Ingredients	정상군	비만유도군	시제품 A	시제품 B	시제품 C
Casein	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
Corn starch	50.0	34.0	32.0	31.5	31.0
Sucrose	15.0	15.0	15.0	15.0	15.0
Cellulose	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Corn oil	5.0	3.0	3.0	3.0	3.0
Beef tallow	-	18.0	18.0	18.0	18.0
AIN-mineral mixture <sup>1)</sup>	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
AIN-vitamin mixture <sup>2)</sup>	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
DL-Methionine	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
대두S+GC	-	-	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>c</b>
Calorie from fat(%)	11.0	37.0	37.0	37.0	37.0

<sup>1)</sup>Mineral mixture according to AIN-76

<sup>2)</sup>Vitamin mixture according to AIN-76

### (3) 체중 및 식이섭취량 측정

체중은 매주 1회 일정시각에 측정하였으며 식이섭취량은 매일 일정시각에 측정 한 후 급여량에서 잔량을 감하여 계산하였다.

### (4) 혈장 및 장기 채취

사육이 끝난 실험동물은 희생 전 12시간 동안 절식시킨 후 에테르를 흡입시켜 마취시킨 다음 복부 하대정맥(inferior vena cava)으로부터 공복혈액을 채취하였다. 채취한 혈액은 3,000 rpm(4℃)에서 15분간 원심분리하여 혈장을 분리하고 분석시까지 -70℃에 보관하였다.

### (5) 지방조직의 무게 측정

각 실험동물의 장기조직(간, 심장, 신장, 지방조직)은 혈액 채취 후 즉시 적출하여 PBS(phosphate buffered saline) 용액으로 수차례 헹군 후 표면의 수분을 제거하여 칭량하였다. 장기조직은 분리 후 즉시 액체질소로 급냉시켜 -70℃에 보관하였다.

### (6) 혈장의 지질농도 분석

혈장 중성지질은 McGowan 등(1983)의 효소법을 이용한 발색법 원리에 따라 중성 지질 측정용 시액(Asan kit)을 사용하여 측정하였다. 우선 혈장 중성지질을 lipoprotein lipase를 이용하여 글리세롤과 지방산으로 분해시킨 후 ATP와 glycerol kinase를 첨가하여 L- $\alpha$ -glycerophosphate로 변형시켰다. 여기에 glycerophospho-oxidase를 첨가하여 반응시키면 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 발생한다. 이를 peroxidase와 4-amino antipyrin을 처리하여 적색으로 발색시킨 후 550 nm에서 흡광도를 측정하여 글리세롤 표준곡선과 비교하여 정량하였다.

혈장 총 콜레스테롤은 Allain 등(1974)의 효소법을 응용한 총 콜레스테롤 측정용 시액(Asan kit)을 사용하여 정량하였다. 혈장 콜레스테롤은 유리 콜레스테롤(FC) 및 에스테르형 콜레스테롤(CE) 두 형태로 존재하므로 이들 모두를 정량하기 위해 CE를 cholesterol esterase에 의해 FC와 지방산으로 전환시켰다. 이렇게 전환된 콜레스테롤과 혈장 중의 유리형 콜레스테롤을 cholesterol oxidase에 의해  $\Delta^4$ -cholestenon로 바꾸고 이 생성물과 기질인 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 peroxidase, phenol, 그리고 4-amino- antipyrine과 반응시켜 적색의 발색 물질을 얻은 후 500 nm에서 흡광도를 측정고 흡광도 측정치를 콜레스테롤 표준곡선과 비교하여 정량하였다.

### (7) 간조직 중의 지질 분석

간조직 중의 지질은 Folch 등(1957)의 방법으로 추출하였으며 간조직 중의 중성 지질 및 콜레스테롤 농도는 혈장에서와 같은 방법으로 정량하였다. 우선 간조직 0.1g을 잘게 자른 후 2 mL chloroform:methanol(2:1) 용액으로 균질화시켜 조직 지질을 추출하였다. 추출액은 Whatman 여과지(No. 2)로 걸러내고 질소 가스로 건조

시킨 후 동일 추출용매 1 mL에 다시 녹여, 이 중 중성지질과 총 콜레스테롤 측정용으로 각각 100  $\mu$ L를 취하여 다시 질소 가스로 건조시켰고 5 mL의 ethanol로 용해시켰다. 중성지질의 경우 이 중 50  $\mu$ L를 취하여 유화액 0.65 mL, 효소 시액 0.8 mL을 첨가하여 혈장 중성지질 정량법과 동일한 효소 반응법으로 정량하고 콜레스테롤의 경우 ethanol 용해액 100  $\mu$ L에 유화액 600  $\mu$ L, 효소 시액 0.8 mL을 첨가하여 혈장 총 콜레스테롤 정량법과 동일하게 정량하였다. 이때 유화액 5 mM Manodinium cholate와 0.5% Triton X-100를 혼합하여 사용하였는데 이 중 sodium cholate는 유화 성분이며, Triton X-100은 에탄올에 용해된 조직지질의 발색시 발생하는 혼탁성을 제거하는 역할을 한다.

#### (8) 통계처리

본 실험에서 나온 모든 결과는 컴퓨터 통계 프로그램 중의 하나인 SPSS package program을 이용하였다. 각 군간의 평균차이에 대한 유의성 검정을 위해 ANOVA를 실시한 후 다군간의 사후검정은 Duncan's multiple range test에 의해  $P < 0.05$  이상의 수준에서 검정하며 그 결과를 표준 오차(S.E)와 함께 표시하여 나타내었다.

#### 라) 대두음료 시제품에 대한 비만 억제 효과 검증

##### (1) 대두음료 시제품이 비만유도 동물의 체중 변화에 미치는 영향

실험식이 급여 전 실험군간의 체중은 유사하였다(그림. 8). 그러나 실험종료 6주 때 대두음료 시제품들의 급여에 따른 영향을 살펴보면 고지방대조군에 비하여 각각 시제품 I 은 4.5%, 시제품 II는 9.4%, 시제품 III은 8.2%의 체중감량효과를 보였다. 특히, 시제품 II, III의 체중감소 효과는 통계적인 유의성을 나타내었다(그림. 8).

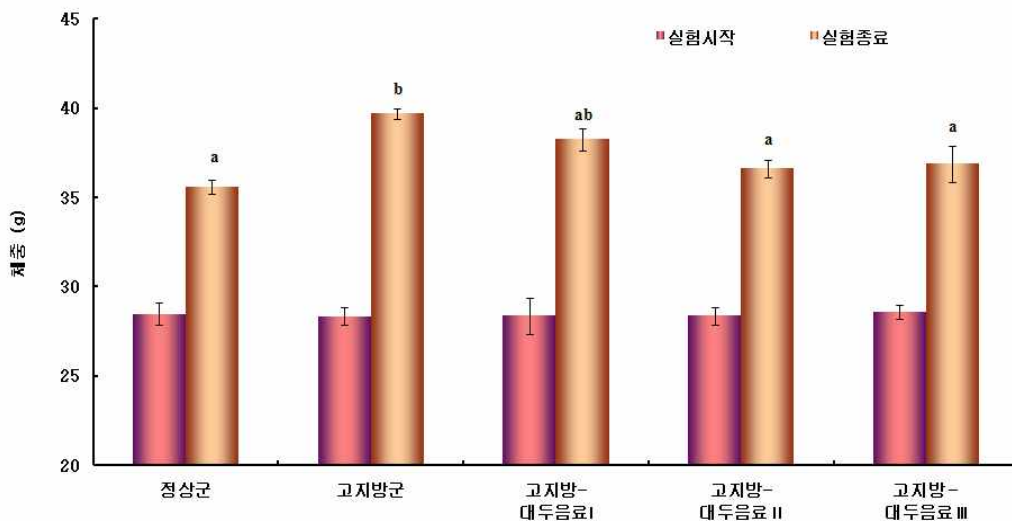


그림. 8. 대두음료 시제품들이 고지방식으로 유도된 비만 마우스의 체중에 미치는 영향.

### (2) 대두음료 시제품이 비만유도 동물의 일일섭취량에 미치는 영향

일일 식이섭취량은 고지방식이군이 정상군보다 낮았다(그림. 9). 이는 고지방식이 가 정상식에 비해 열량밀도가 높은 이유로 열량 섭취의 증가로 인하여 식이섭취 감소가 유도된 것으로 사료된다. 그리고 대두음료 시제품은 일일 식이섭취량에 는 영향을 미치지 않았다(그림. 9).

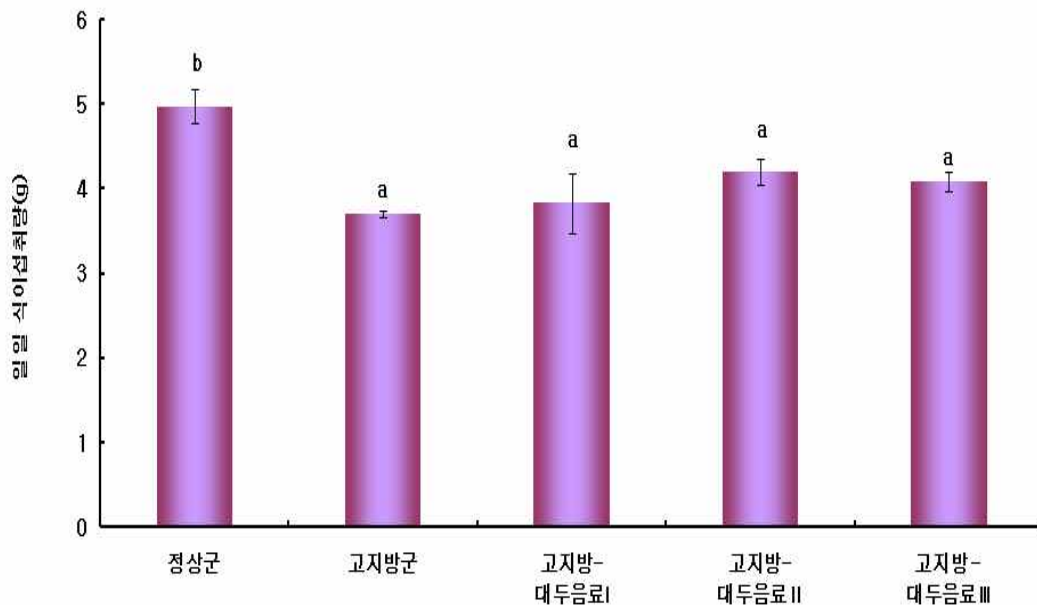


그림. 9. 대두음료 시제품들이 고지방식이로 유도된 비만 마우스의 일일 식이 섭취량에 미치는 영향.

### (3) 대두음료 시제품이 비만유도 동물의 내장 지방 변화에 미치는 영향

일반적으로 내장 지방량이 대사성증후군을 일으키는 주요 요인으로 알려지고 있으므로 본 실험에서는 대두음료 시제품들이 식이성 유도 비만마우스의 내장지방 무게 변화에 미치는 영향을 살펴본 결과 고지방대조군이 정상군에 비하여 부고환, 복부, 장간막 및 신장주변의 내장지방 무게가 유의적으로 증가되었다(그림. 10).

따라서 고지방식은 총 내장지방 무게를 1.5배 증가시켰다(그림. 10). 또한, 체중 g당 내장 지방량으로 나타내었을 때 부고환지방량과 장간막 지방량은 대두음료Ⅲ군만 대조군에 비하여 유의적으로 감소되었으나, 총 내장 지방량은 각각 시제품Ⅰ은 20%, 시제품Ⅱ는 24%, 시제품Ⅲ은 30%의 감소효과를 보였다. 특히, 시제품Ⅱ,Ⅲ의 내장 지방량 감소효과는 통계적인 유의성을 나타내었으며(그림. 10), 이는 체중변화와 유사한 양상이다.

이와 같이 대두음료 시제품들은 비만이 유도된 마우스의 내장 지방량을 효과적으로 낮추었으며, 특히, 시제품Ⅱ와Ⅲ의 효과가 우수한 것으로 나타났다(그림. 10).

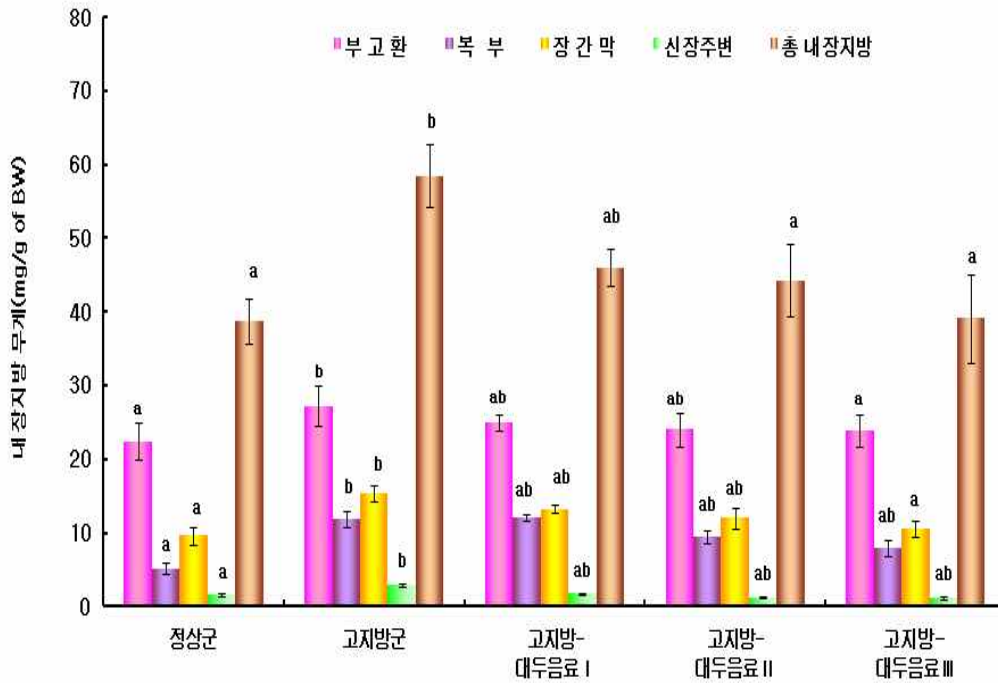


그림. 10. 대두음료 시제품들이 고지방식으로 유도된 비만 마우스의 내장 지방무게에 미치는 영향.

(4) 대두음료 시제품이 비만유도 동물의 혈장 중의 지질 함량에 미치는 영향  
 혈장 중의 중성지질 함량은 정상군에 비하여 고지방 대조군에서 36% 유의적으로 높았으나 대두음료 시제품 I, II, III 급여 시 고지방 대조군에 비하여 각각 19%, 26%, 29% 감소되었다(그림. 11). 시제품 I의 경우 체중감소에는 유의적인 영향을 미치지 않았으나 혈중 중성지질 저하효과는 우수하게 나타났으며 혈장 중의 총 콜레스테롤 함량은 시제품 II만 고지방대조군에 비하여 23%의 유의적인 감소효과를 보였다(그림. 12).

이와 같이 대두음료 시제품들은 고지방식으로 섭취로 인한 혈중 중성지질 증가를 효과적으로 개선하였으며 특히, 시제품 II가 가장 효과가 우수한 것으로 평가되었다.



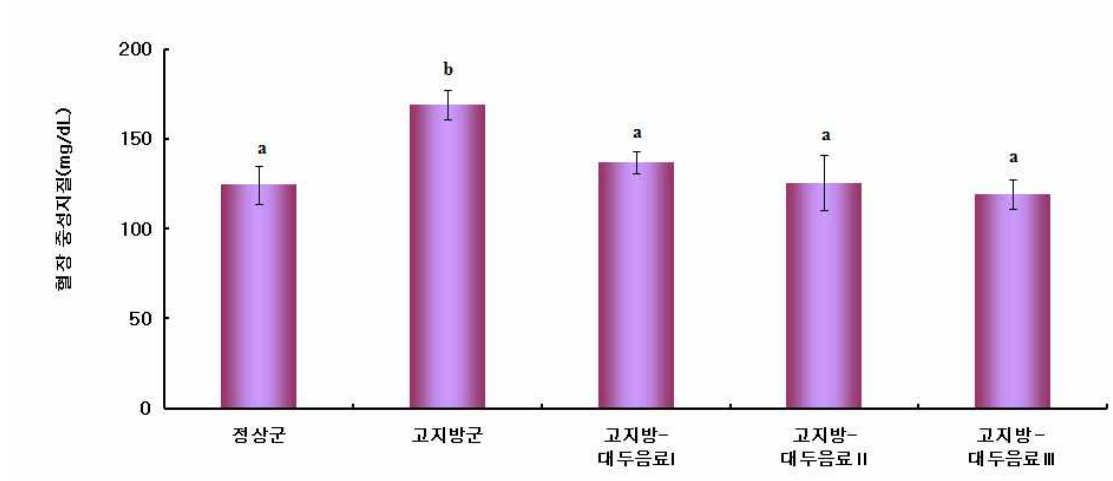


그림. 11. 대두음료 시제품들이 고지방식으로 유도된 비만 마우스의 혈장중의 중성지질 함량에 미치는 영향.

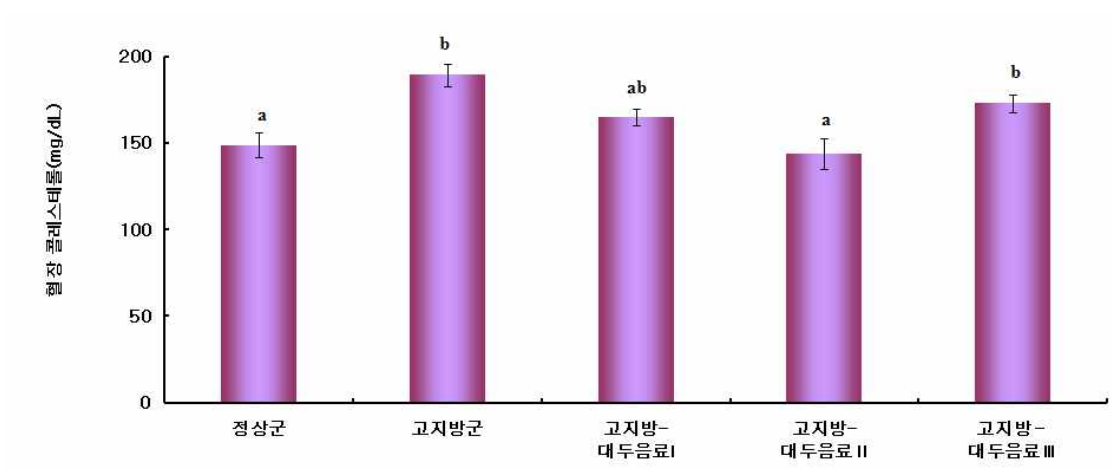


그림. 12. 대두음료 시제품들이 고지방식으로 유도된 비만마우스의 혈장 콜레스테롤 함량에 미치는 영향.

(5) 대두음료 시제품이 비만유도 동물의 간조직 중의 지질 함량에 미치는 영향  
 간조직 중의 중성지질 함량은 고지방대조군이 정상군에 비하여 50%의 유의적인 증가를 보였다. 반면, 시제품 II와 III 급여는 고지방식으로 증가된 간조직내 중성지질 함량을 유의적으로 34%와 30% 낮추었다(그림. 13). 간조직의 콜레스테롤 함량 역시 고지방대조군에 정상군에 비하여 유의적으로 높았다(그림. 14). 대두음료 시제품들을 비만유도 마우스에게 급여한 결과 간조직의 콜레스테롤 함량이 고지방대조군에 비하여 유의적으로 개선되었다(그림. 14).

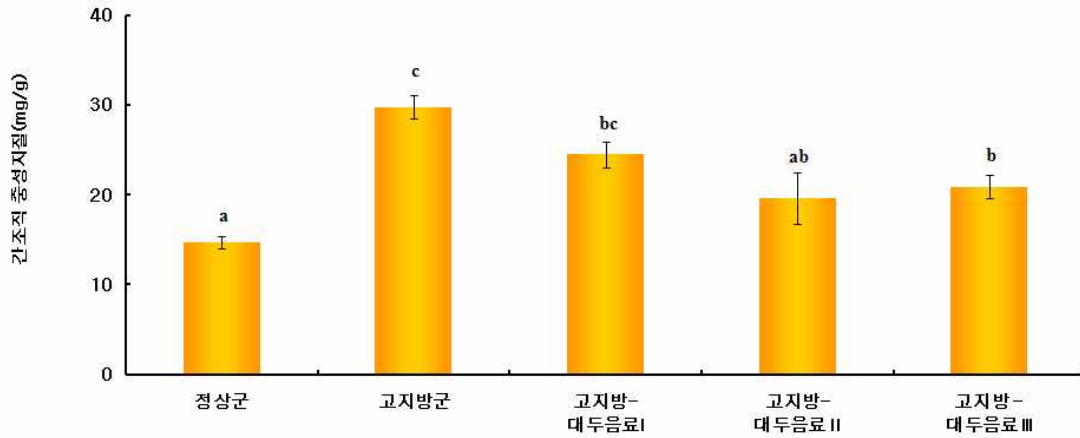


그림. 13. 대두음료 시제품들이 고지방식으로 유도된 비만마우스의 중의 간 조직 중성지질 함량에 미치는 영향.

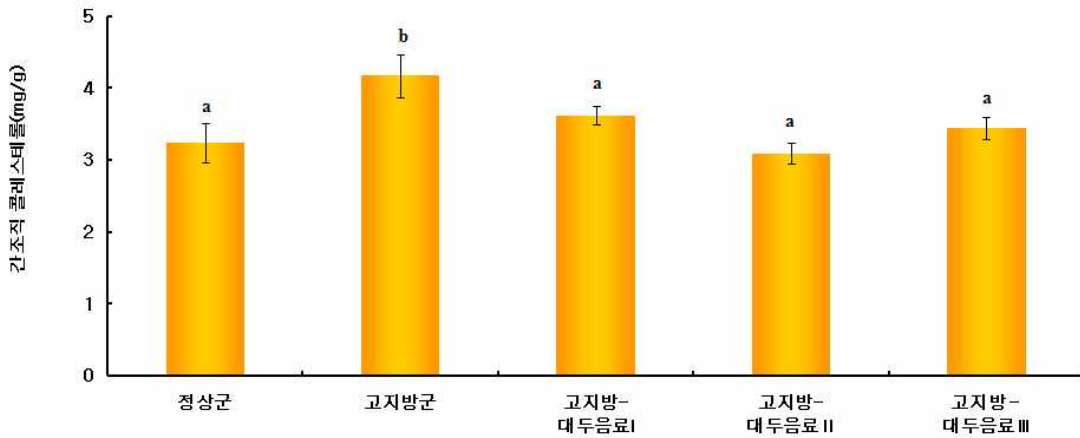


그림. 14. 대두음료 최종시제품이 고지방식으로 유도된 비만마우스의 간 조직중의 콜레스테롤 함량에 미치는 영향.

마) 대두음료 최종시제품에 대한 비만 억제 효과 검증

(1) 대두음료 최종시제품이 비만유도 동물의 체중 변화에 미치는 영향

실험식이 급여 전 실험군간의 체중은 유사하였다(그림. 15). 그러나 대두음료 최종시제품들과 타사제품의 급여에 따른 영향을 살펴보면 각 군에서 고지방군과 비교하였을 때 체중감량효과를 나타냈으며, 특히, 최종시제품의 체중감소 효과가 타사제품에 비해 높은 것으로 나타났다(그림. 15).

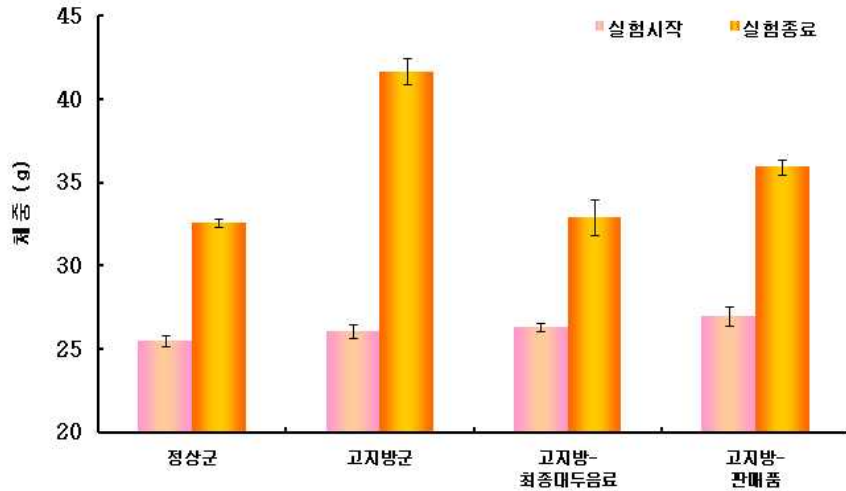


그림. 15. 대두음료 최종 시제품이 고지방식으로 유도된 비만마우스의 체중에 미치는 영향.

(2) 대두 최종 음료 제품이 비만유도 동물의 식이섭취량에 미치는 영향

일일 식이섭취량은 고지방식이군이 정상군보다 낮았다(그림. 16). 이는 고지방식이 정상식에 비해 열량밀도가 높은 이유로 열량 섭취의 증가로 인하여 식이섭취 감소가 유도된 것으로 사료된다. 그리고 최종시제품과 타사제품은 일일 식이섭취량에는 영향을 미치지 않았다(그림. 16).

따라서, 대두음료 최종시제품은 고지방식으로 비만을 유발한 마우스의 식이섭취량을 증가함에도 불구하고 체중을 조절하였다(그림. 16).

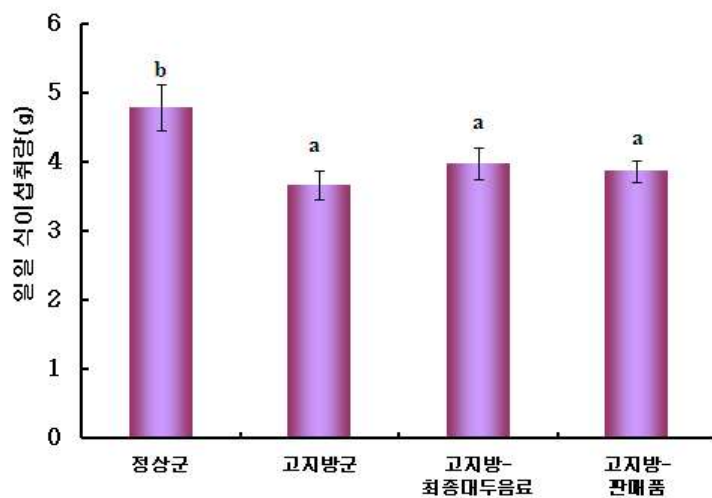


그림. 16. 대두음료 최종 시제품이 고지방식으로 유도된 비만마우스의 일일 식이섭취량에 미치는 영향.

(3) 대두음료 최종시제품이 비만유도 동물의 내장 지방 변화에 미치는 영향  
 내장 지방에 미치는 영향을 알아보기 위하여 대두음료 최종시제품과 타사제품을 고지방 대조군과 비교한 결과 최종시제품에서는 대조군에 비해 모든 부위에서 유의적으로 감소시켰으며 총 내장 지방수치는 정상군의 수치와 유의적으로 유사하게 나타났으나 타사제품은 복부와 신장주변에서만 감소하는 것으로 나타났다

따라서, 대두음료 최종시제품은 비만이 유도된 마우스의 내장 지방량을 효과적으로 낮추었으며, 타사제품보다 효과가 우수한 것으로 나타났다(그림. 17).

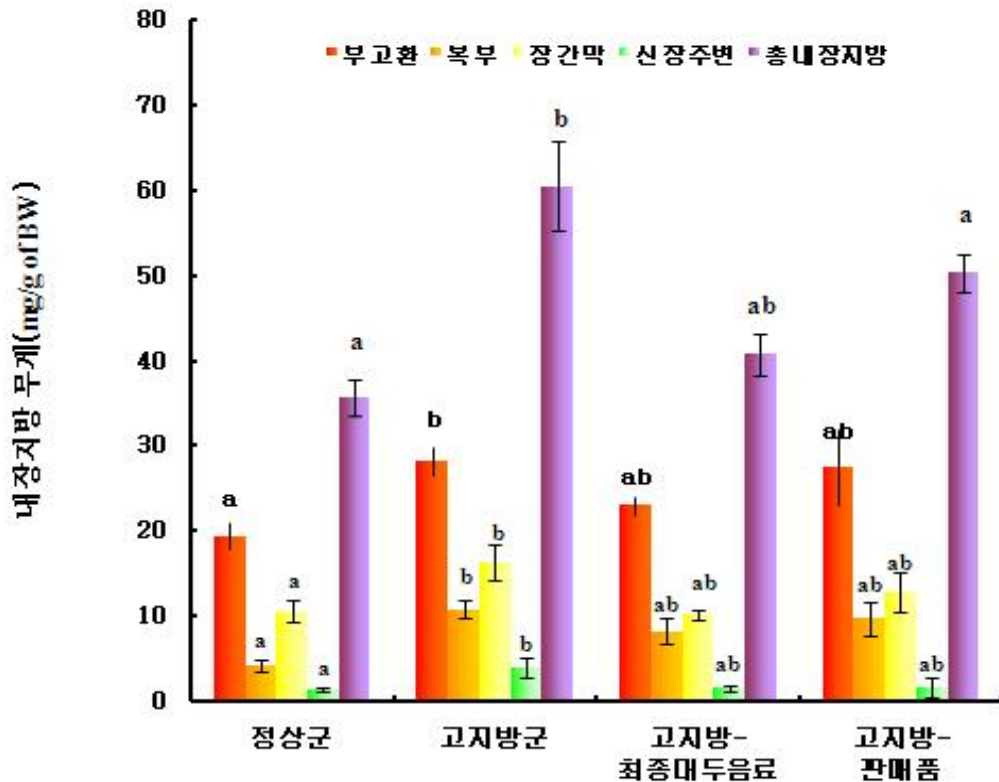


그림. 17. 대두음료 최종시제품이 고지방식으로 유도한 비만마우스의 내장지방무게에 미치는 영향.

(4) 대두음료 최종시제품이 비만유도 동물의 혈장 중의 지질 함량에 미치는 영향

혈장 중의 중성지질 함량은 정상군에 비하여 고지방대조군에서 36% 유의적으로 높았으나, 대두 다이어트 최종음료 및 타사제품 급여군은 고지방 대조군에 비하여 각각 25%, 10% 감소시켰다(그림. 18). 혈장 중의 콜레스테롤 함량은 중성지질 함량 결과(그림. 18)와 유사하게 나타났다(그림. 19).

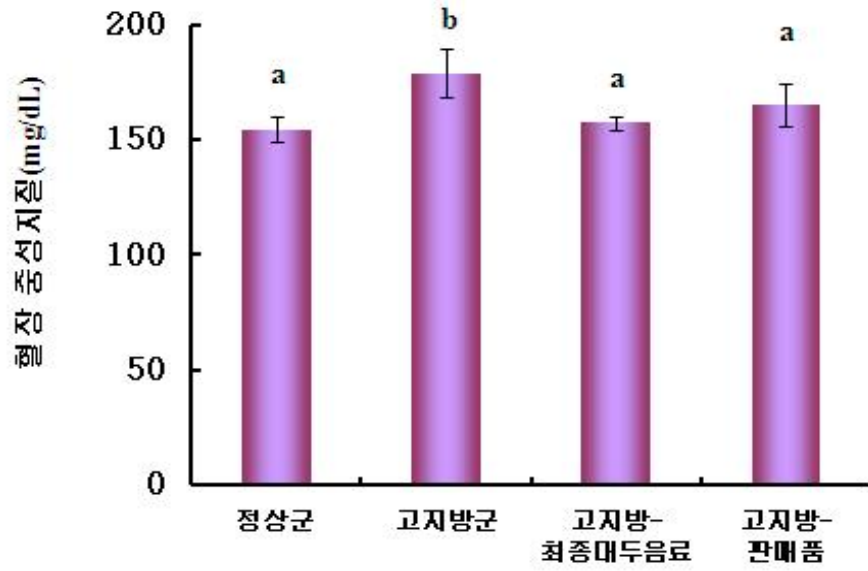


그림. 18. 대두음료 최종시제품이 고지방식으로 유도된 비만마우스의 혈장중의 중성 지질 함량에 미치는 영향.

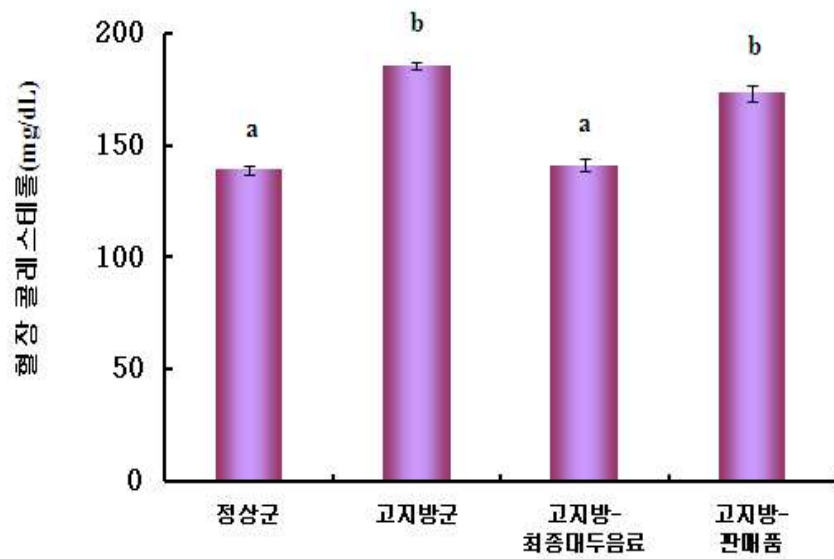


그림. 19. 대두음료 최종시제품이 고지방식으로 유도된 비만마우스의 혈장중의 콜레스테롤 함량에 미치는 영향.

(5) 대두음료 최종시제품이 비만유도 동물의 간조직 중의 지질 함량에 미치는 영향

비만유도 동물의 간조직 중 중성지질 함량은 고지방식이 대조군은 정상군에 비하여 50%의 유의적인 증가를 보였으며, 대두음료 최종시제품은 고지방대조군에 비하여 감소 경향을 보였음. 한편 타사제품의 간조직 중 중성지질 함량은 고지방대조군 보다 높게 나타났다(그림. 20). 간조직중 콜레스테롤 함량은 대두음료 최종시제품만이 개선시킨 것으로 나타났다(그림. 21).

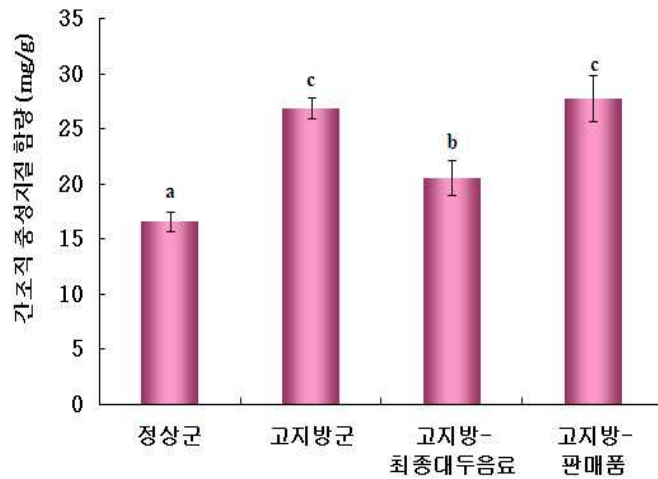


그림. 20. 대두음료 최종시제품이 고지방식으로 유도된 비만마우스의 간 조직중의 중성지질 함량에 미치는 영향.

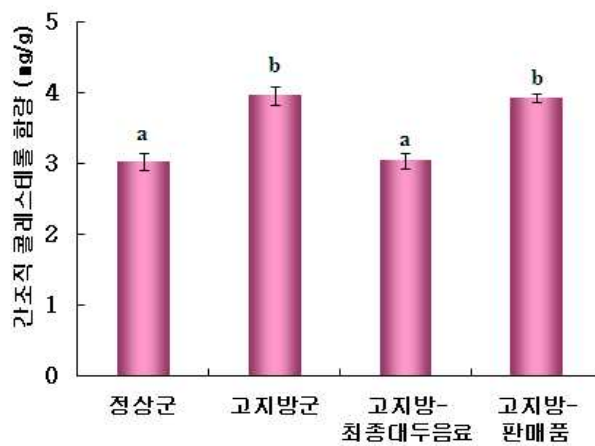


그림. 21. 대두음료 최종시제품이 고지방식으로 유도된 비만마우스의 간 조직중의 콜레스테롤 함량에 미치는 영향.

5) 고품질 검은콩 계통선발 및 안토시아닌의 생리활성 연구

가) 비린내 및 소화억제단백질 제거 F2 개체 선발

(1) 비린내가 나지 않는 검정종피 F3 계통의 형질 평가

“개척1호” x “국내재래수집검정콩” 집단 Kunitz Trypsin Inhibitor (KTI) 단백질 결핍 검정종피 F3 계통의 형질 평가 포장 평가 결과 비린내가 나지 않는 검정콩 4 계통중에서 2 계통은 형질이 좋지 못하여 선발에서 제외되었고, KTI 단백질이 결핍된 검정콩 15 계통중에서 형질이 다소 우수한 9계통이 선발되었다.

선발 계통에 대한 형질은 아래 표와 같다.

계통명	선발목표	종피색	과종일	수확일	세대
07B11	비린내 제거	검정	5월18일	10월1일	F4 seed
07B13	비린내 제거	검정	5월18일	10월8일	F4 seed
07B23	KTI 단백질 결핍	검정	5월18일	10월1일	F4 seed
07B24	KTI 단백질 결핍	검정	5월18일	10월8일	F4 seed
07B27	KTI 단백질 결핍	검정	5월18일	10월8일	F4 seed
07B28	KTI 단백질 결핍	검정	5월18일	10월8일	F4 seed
07B30	KTI 단백질 결핍	검정	5월18일	10월8일	F4 seed
07B31	KTI 단백질 결핍	검정	5월18일	10월8일	F4 seed
07B33	KTI 단백질 결핍	검정	5월18일	10월1일	F4 seed
07B34	KTI 단백질 결핍	검정	5월18일	10월1일	F4 seed
07B41	KTI 단백질 결핍	검정	5월18일	10월1일	F4 seed

(2) 비린내가 나지 않는 검정종피 F2 계통의 형질 평가

“국내재래수집검정콩” x “개척1호” 집단

Kunitz Trypsin Inhibitor (KTI) 단백질 결핍 검정종피 F2 계통의 형질 평가 평가 결과 비린내가 나지 않는 11계통, KTI 단백질이 결핍된 8계통을 최종적으로 선발하였다. 아래 그림은 2008년 포장에서 선발 수확된 계통중의 일부 종자 사진을 나타낸다.



07B13 계통

08E33 계통

선발된 계통에 대한 형질은 아래와 같다.

계통명	선발목표	종피색	과종일	수확일	세대
08E21	비린내 제거	검정	6월4일	9월26일	F4 seed
08E22	비린내 제거	검정	6월4일	9월26일	F4 seed
08E23	비린내 제거	검정	6월4일	10월8일	F4 seed
08E25	비린내 제거	검정	6월4일	9월26일	F4 seed
08E27	비린내 제거	검정	6월4일	10월8일	F4 seed
08E30	비린내 제거	검정	6월4일	10월8일	F4 seed
08E31	비린내 제거	검정	6월4일	10월8일	F4 seed
08E33	비린내 제거	검정	6월4일	10월8일	F4 seed
08E34	비린내 제거	검정	6월4일	10월8일	F4 seed
08E35	비린내 제거	검정	6월4일	9월26일	F4 seed
08E39	비린내 제거	검정	6월4일	10월8일	F4 seed
08E51	KTI 단백질 결핍	검정	6월4일	10월8일	F4 seed
08E56	KTI 단백질 결핍	검정	6월4일	10월8일	F4 seed
08E59	KTI 단백질 결핍	검정	6월4일	10월8일	F4 seed
08E60	KTI 단백질 결핍	검정	6월4일	10월8일	F4 seed
08E63	KTI 단백질 결핍	검정	6월4일	10월8일	F4 seed
08E65	KTI 단백질 결핍	검정	6월4일	10월8일	F4 seed
08E66	KTI 단백질 결핍	검정	6월4일	10월8일	F4 seed
08E67	KTI 단백질 결핍	검정	6월4일	10월8일	F4 seed

#### 나) 안토시아닌 정제 및 분리

진주 경상대학교 농경지에서 재배된 검은콩(*Glycine max* (L) Merr.) 껍질 200g을 이용하여 4℃에서 24시간동안 메탄올로 3회 반복하여 추출하였다. 이 추출액을 감압 농축하여 최종 부피가 200ml이 되게 희석하였다. 상기 안토시아닌이 포함된 용액을 100ml로 농축한 다음, Amberlite XAD-7 컬럼과 Sephadex LH-20을 이용하여 안토시아닌을 정제하였다. 정제된 안토시아닌은 시아니딘-3-글루코시드(cyanidin-3-glucoside) 72%, 델피니딘-3-글루코시드(delphinidin-3-glucoside) 20% 및 피투니딘-3-글루코시드(petunidin-3-glucoside) 6%를 함유하여 구성되어 있었다

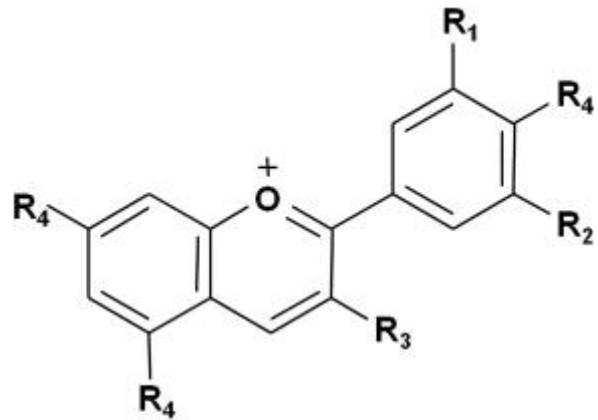
#### 다) 안토시아닌의 생리활성 규명

##### (1) 상처재생과 관련한 안토시아닌 효과

##### (가) 상처재생과 관련한 cell migration에 대한 효과



상처재생에 미치는 안토시아닌 효과를 좀더 confirm 하기 위해 fibroblast 및 keratinocyte에서 cell migration assay를 수행하였다. Fibroblast에서는 24시간 처치시 100 µg/ml의 농도에서, 48시간 처치에서는 50, 100 µg/ml의 농도에서 유의성있게 cell migration이 증가됨을 확인할 수 있었고 (figure 3), keratinocyte에서 안토시아닌을 24시간 및 48시간에서 50, 100 µg/ml의 농도로 처치시 유의성 있는 migration 증가를 나타냈다 (figure 1). Fibroblast 및 keratinocyte 모두 72시간에서는 유의성있는 차이를 나타내지 못하였고, fibroblast보다는 keratinocyte에서 cell migration이 유의성있게 증가됨을 알 수 있었다.



Anthocyanins

R<sub>1</sub> and R<sub>2</sub> are H, OH, or OCH<sub>3</sub>

R<sub>3</sub> is a glycosyl or H

R<sub>4</sub> is OH or a glycosyl

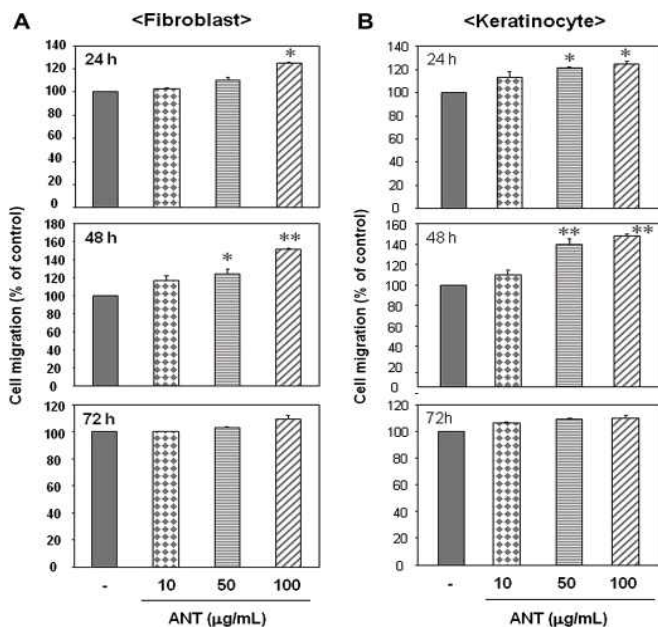


Fig. 1. Effect of anthocyanins on fibroblast (A) or keratinocyte (B) migration. Migrated cells were presented as a percentage of wound control. Data are presented as the means  $\pm$  SD of three independent experiments. Significance compared to wound control, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

(나) 상처재생과 관련한 VEGF의 생성에 미치는 효과 및 기전

상처재생 (wound healing)에 안토시아닌이 미치는 효과 및 기전을 연구하기 위해, 먼저 피부각질세포인 HaCaT 및 fibroblast에서 wound를 준 후, wound healing에 관여하는 cytokine의 하나인 VEGF의 생성을 측정하였다.

Fibroblast에서 wound를 준 후 안토시아닌을 24시간, 48시간 및 72시간 처치하

였을 때, 안토시아닌 10, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$ 에서 농도 의존적으로 wound에 의한 VEGF 생성을 촉진시켰다. 24시간 처치한 경우는 비교적 그 효과가 미약하였고, 48시간 처치한 경우는 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 안토시아닌 처치군에서 유의성 있는 증가를 나타냈고, 72시간 처치하였을 때는 50 및 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 유의성 있는 증가를 나타냈다 (그림 2A,B).

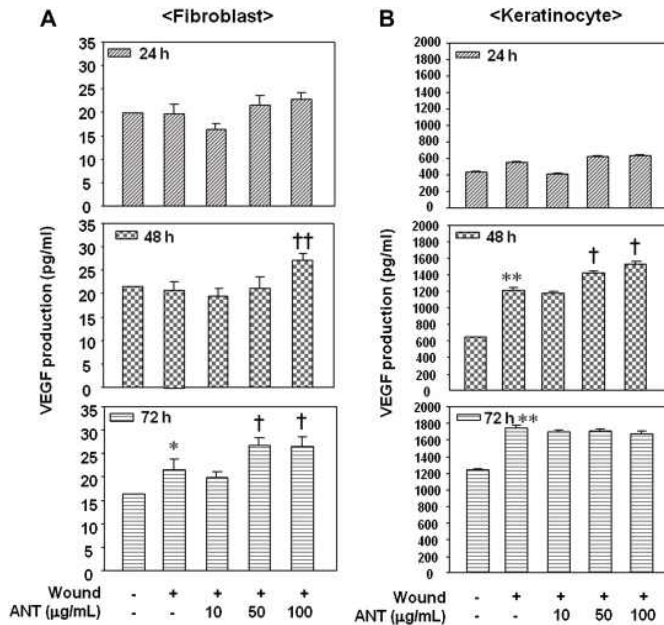


Fig. 2. Effect of anthocyanins on VEGF production in fibroblasts (A) and keratinocytes (B) after scratch-wound induction. Anthocyanins were subsequently added at increasing concentrations (10, 50, 100  $\mu\text{g/mL}$ ) for 24, 48, and 72 h. The results were reproducible in three experiments ( $n = 6$ ). Significance compared with the control,  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ; significance compared to wound,  $†P < 0.05$ ,  $††P < 0.01$ .

(다) 농도와 시간에 따른 VEGF의 생성에 미치는 효과 및 기전

Keratinocyte (HaCaT)에서도 wound를 준 후 안토시아닌을 24시간, 48시간 및 72시간 처치하였을 때, 안토시아닌 10, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$ 에서 농도 의존적으로 wound에 의한 VEGF 생성을 촉진시켰고, VEGF 생성량이 fibroblast에 비해 월등히 높음을 확인할 수 있었다. 안토시아닌 24시간 처치는 50, 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 wound에 의한 VEGF 생성을 증가시켰고, 안토시아닌 48시간 처치 역시 50, 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 wound에 의한 VEGF 생성을 유의성 있게 증가시켰다. 안토시아닌 72시간 처치는 wound 자체에 의한 VEGF 생성을 촉진시키지는 못하였다 (그림 2A, 2B). 요약하면, wound에 의해 VEGF가 증가되는데, 안토시아닌을 처치하면 VEGF 생성이 촉진됨을 알 수 있었고, 48시간 처치시, 그리고 50, 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 VEGF 생성이 유의성 있게 증가됨을 알 수 있었다.

(라) VEGF mRNA의 생성에 미치는 효과 및 기전

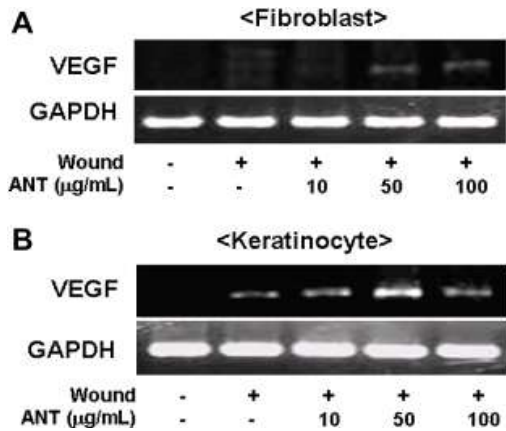


Fig. 3. Effect of anthocyanins on mRNA level of VEGF in fibroblasts (A) and keratinocytes (B) after scratch-wound induction. The results were presented from three independent experiments.

(마) TNF- $\alpha$ 에 의한 활성산소 생성에 대한 효과

- 1) Wound에 의해 VEGF 생성 증가됨 안토시아닌 처치시 농도 의존적으로 VEGF 생성이 촉진됨.
- 2) Fibroblast보다는 keratinocyte에서 VEGF 생성량이 높음
- 3) 안토시아닌 처치 48시간에서, 50 및 100 g/ml의 농도에서 VEGF 생성이 유의성 있게 증가됨.
- 4) Migration assay 결과, fibroblast보다 keratinocyte에서 안토시아닌이 더 효과적으로 migration을 유도함.
- 5) Cell migration 역시 안토시아닌 처치 48시간에서, 50 및 100 g/ml의 농도에서 유의성있는 증가를 나타냄.

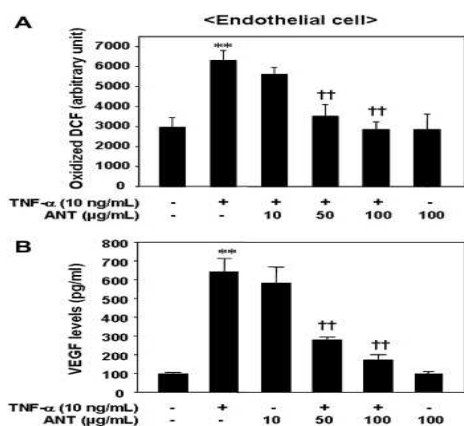
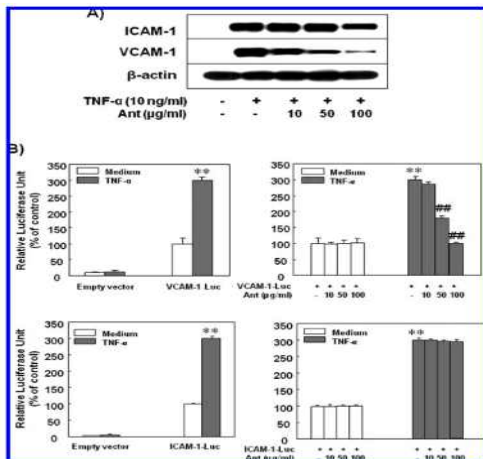


Fig. 4. Effect of anthocyanins on TNF- $\alpha$ -mediated ROS accumulation or VEGF production in endothelial cells. (A) HUVECs were pretreated with anthocyanins (10, 50, and 100 µg/mL) and then co-treated with TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) for 24 h. (B) HUVECs were pretreated with anthocyanins (10, 50, and 100 µg/mL) for 24 h and subsequently stimulated with or without TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) for 24 h. Data are presented as means  $\pm$  SD of three independent experiments. Significance compared to control, \*\* $P$  < 0.01; significance compared with TNF- $\alpha$ , ++ $P$  < 0.01.

(2) 안토시아닌이 동맥경화관련 접착인자 발현에 미치는 영향 및 기전

(가) 안토시아닌에 의한 선택적 VCAM-1 발현 억제 효과

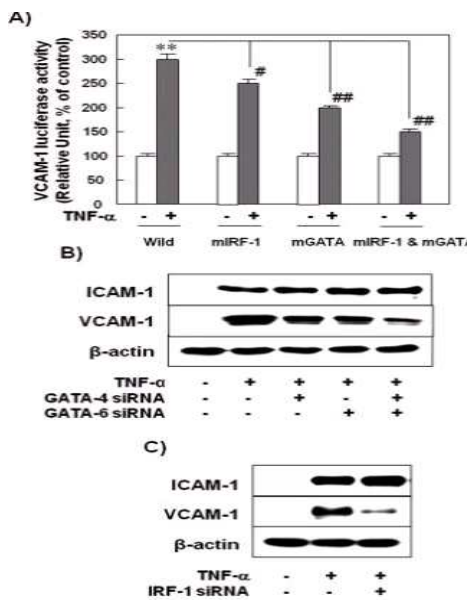
안토시아닌을 10,50, 100 mg/ml 24 시간 전처리한 HUVEC에 TNF- $\alpha$  (10 ng/ml)을 처리 후 6 시간 뒤 발현되는 VCAM-1 과 ICAM-1의 발현을 본 것이다. 그림1에서와 같이 안토시아닌은 농도 의존적으로 VCAM-1의 발현을 선택적으로 억제 하였다.



**Figure 1.** Preferential inhibition of TNF- $\alpha$ -mediated induction of VCAM-1 over ICAM-1 by anthocyanins. HUVECs were treated with anthocyanins for 24 h and then cotreated with TNF- $\alpha$  for 6 h. (A) The protein level of ICAM-1 and VCAM-1 was detected by Western blot analysis, as detailed in Materials and Methods. Data were confirmed by three independent experiments. (B) Cells were transfected with an empty vector or 1  $\mu$ g of VCAM-1- or ICAM-1-luciferase + 0.5  $\mu$ g of pRL-TK-luciferase. Cells were allowed to recover for 24 h and then treated with 10 ng/mL of TNF- $\alpha$  with/without anthocyanins (Ant) (10, 50, and 100  $\mu$ g/mL). Luciferase activities are presented as the fold activation relative to that of the untreated cells. Data are presented as means  $\pm$  SD from three independent experiments. Significance compared with control, \*\* $P$  < 0.01; significance compared with TNF- $\alpha$ , ## $P$  < 0.01.

(나) VCAM-1 발현억제의 작용기전

이러한 VCAM-1 선택적 억제 효과에 대한 분자 기전을 알아보기 위하여 VCAM-1에 만 존재하는 promoter 인 GATA와 IRF에 대한 영향을 확인 한결과 GATA와 IRF-1이 중요한 target임을 알 수 있었다 (그림 2).

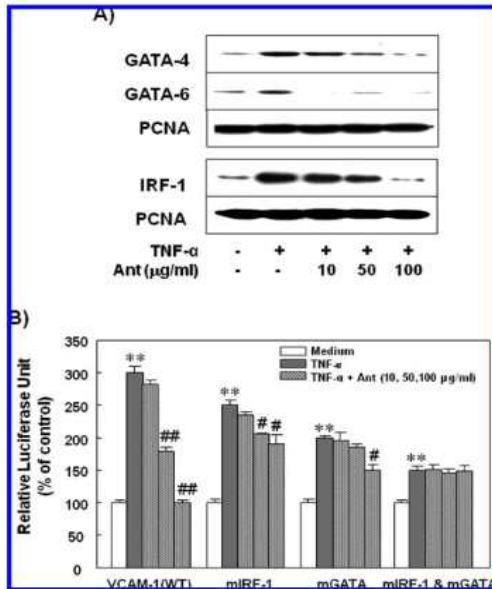


**Figure 2.** GATA and IRF-1 motifs are important for the full induction of TNF- $\alpha$ -stimulated VCAM-1. (A) Cells were transfected with 1  $\mu$ g of wild type VCAM-1-luciferase or VCAM-1-luciferase containing an IRF-1 motif mutant (mIRF-1), a GATA motif mutant (mGATA), or both. Cells were allowed to recover for 24 h and then stimulated with TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) for 6 h. Data are presented as means  $\pm$  SD from three independent experiments. Significance compared with control, \*\* $P$  < 0.01; significance compared with TNF- $\alpha$ , # $P$  < 0.05; ## $P$  < 0.01). (B) Cells were stimulated in a time-dependent manner with TNF- $\alpha$ . Thereafter, the nuclear fraction was extracted, and the GATA-4, GATA-6, or IRF-1 level was determined by Western blot analysis. Then, cells were pretreated anthocyanins for 24 h and treated with TNF- $\alpha$  for either 30 min (for the detection of GATA-4 or GATA-6) or 2 h (for the detection of IRF-1). (C) To confirm the role of GATA-4, GATA-6, or IRF-1 in VCAM-1 induction by TNF- $\alpha$ , GATA-4, GATA-6, or IRF-1 was knocked-down with siRNA. Induction of VCAM-1 and ICAM-1 by TNF- $\alpha$  was determined by Western blot analysis. Data were confirmed by three independent experiments.



(다) GATA-4 와 GATA-6의 중요성

상기의 작용기전을 더능 자세히 살펴보기 위하여 GATA-4, GATA-6, IRF-1중 어떤 것이 가장 중요한 역할을 하는지를 확인 한 결과 GATA-6가 가장 반응이 민감함을 확인하였고 이어서GATA-4, IRF-1 순이 었다 (그림 3).

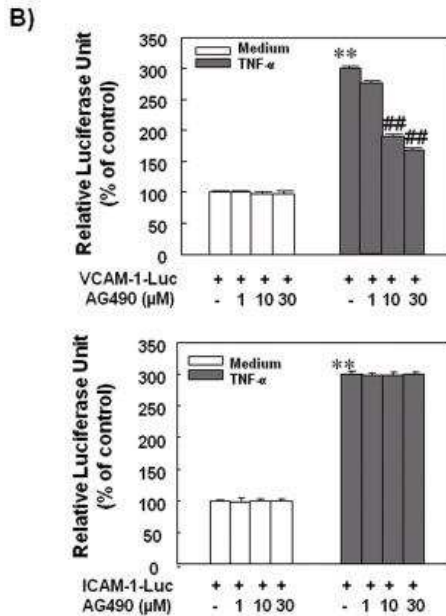
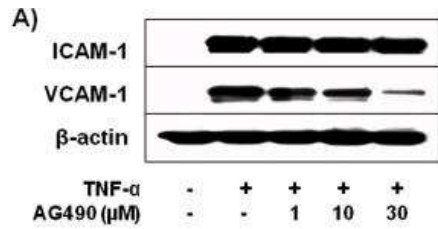


**Figure 3.** Inhibitory effect of anthocyanins on TNF- $\alpha$ -mediated VCAM-1 induction through the regulation of GATA-4, GATA-6, and IRF-1. (A) Cells were stimulated in a time-dependent manner with TNF- $\alpha$ . Thereafter, the nuclear fraction was extracted, and the GATA-4, GATA-6, or IRF-1 level was determined by Western blot analysis. Then, cells were pretreated with anthocyanins for 24 h and treated with TNF- $\alpha$  for either 30 min (for the detection of GATA-4 or GATA-6) or 2 h (for the detection of IRF-1). (B) Cells were transfected with 1  $\mu$ g of wild type VCAM-1-luciferase or VCAM-1-luciferase containing an IRF-1 motif mutant (mIRF-1), a GATA motif mutant (mGATA), or both as described in Figure 2A. Cells were stimulated with TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) for 6 h with or without anthocyanins (10, 50, and 100  $\mu$ g/mL). Data are presented as means  $\pm$  SD from three independent experiments. Significance compared with control, \*\* $P$  < 0.01; significance compared with TNF- $\alpha$ , # $P$  < 0.05; ## $P$  < 0.01).

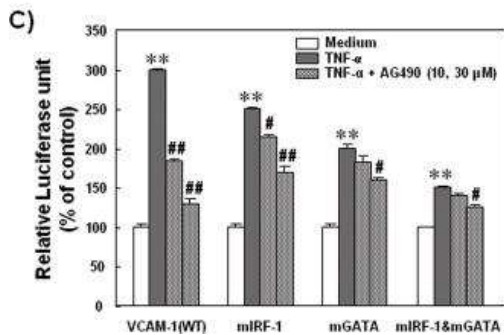
(라) VCAM-1의 선택적 억제에 대한 그 밖의 신호전달계의 중요성

상기의 작용이 안토시아닌에 의한 특이한 현상인지를 확인하기위해 JAK/STAT 억제제인 AG490을 사용하여 TNF-a 에 의한 ICAM-1 과 VCAM-1의 발현을 보았다.

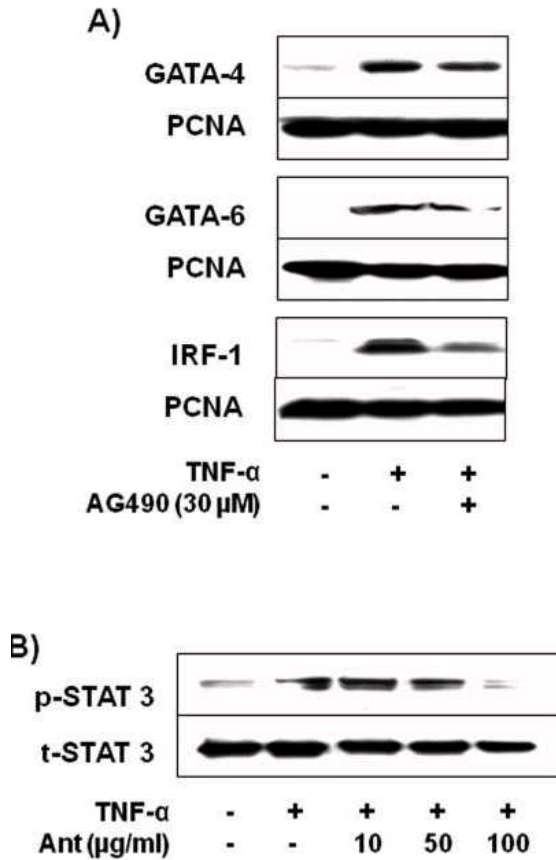
그림 4에서 와 같이 AG490 역시 VCAM-1만을 선택적으로 억제하였으며 이 역시 IRF-1과 GATA 가 관여 함을 확인할 수 있었다 (그림4).



**Figure 4.** Differential role of the Jak/STAT pathway on ICAM-1 and VCAM-1 production induced by TNF- $\alpha$ . **(A)** Cells were pretreated with the Jak kinase inhibitor AG490 (1, 10, and 30  $\mu$ M) for 1 h and later cotreated with TNF- $\alpha$  for 6 h for the detection of ICAM-1 and VCAM-1 protein expression by Western blot analysis. Data were confirmed by three independent experiments. **(B)** VCAM-1 or ICAM-1 luciferase activity was determined as described in the legend for **Figure 1B**. Cells were pretreated with the Jak kinase inhibitor AG490 (1, 10, and 30  $\mu$ M) for 1 h before treatment with anthocyanins. Data are presented as means  $\pm$  SD from three independent experiments. Significance compared with control, \*\* $P$  < 0.01; significance compared with TNF- $\alpha$ , ## $P$  < 0.01. **(C)** Cells were transfected with 1  $\mu$ g of wild type VCAM-1 or VCAM-1 containing an IRF-1 motif mutant (mIRF-1), GATA motif mutant (mGATA), or both as described in **Figure 2A**. Before stimulation with TNF- $\alpha$ , cells were pretreated with AG490 (10 or 30  $\mu$ M). Data are presented as means  $\pm$  SD from three independent experiments. Significance compared with control, \*\* $P$  < 0.01; significance compared with TNF- $\alpha$ , # $P$  < 0.05; ## $P$  < 0.01.



(마) JAK/STAT 경로를 통한 GATA-4, GATA-6 및 IRF-1 발현의 영향  
 AG490과 안토시아닌의 효과가 VCAM-1의 발현만을 억제 하므로 JAK/STAT  
 경로가 GATA와 IRF활성에 어떤 영향을 주는지를 확인 한 결과 GATA-6,  
 GATA-4, IRF-1 모두 AG490에 의해 억제됨을 확인하였다 (그림5).



**Figure 5. (A)** Effects of the Jak/STAT signaling pathways on GATA-4, GATA-6, and IRF-1 activation by TNF- $\alpha$  in HUVECs. Cells were pretreated with AG490 (30  $\mu$ M) for 1 h and later cotreated with TNF- $\alpha$  for either 30 min (for the detection of GATA-4 and GATA-6) or 2 h (for the detection of IRF-1). **(B)** Effect of anthocyanins on STAT-3 activation by TNF- $\alpha$  in HUVECs. Cells were pretreated with anthocyanins (10, 50, and 100  $\mu$ g/mL) for 24 h and then treated with TNF- $\alpha$  for 1 h (for the detection of phospho-STAT-3). The nuclear fraction or cell lysate was extracted, and protein levels were determined by Western blot analysis. Data were confirmed by three independent experiments.

### (3) 안토시아닌이 당뇨병 동물모델 쥐의 심혈관계에 미치는 영향

#### (가) 당뇨 동물모델

6주령의 Sprague-Dawley 수컷 흰쥐를 streptozotocin (STZ)을 사용하고 당뇨병 질환 모델쥐 실험을 수행하였다. 5마리씩 5그룹으로 나누고 첫번째 그룹은 control 그룹, 두 번째 그룹은 streptozotocin (50mg/kg)을 투여 후 30일간 매일 물을 먹였으며, 세 번째 그룹은 streptozotocin (50mg/kg)을 투여하기 전 1시간 전에 안토시아닌(50mg/kg)을 투여하고 30일간 안토시아닌(50mg/kg)을 매일 투여하였다, 네 번째 그룹과 다섯 번째 그룹(대조군)은 streptozotocin (50mg/kg)을 투여 후 5일이 지난 후 30일간 안토시아닌(50mg/kg)과 glibenclamide (1mg/kg)을 매일 투여하였다. 몸무게와 혈당 수치는 5, 10, 15, 20, 25 30일날 각각 측정을 하였다.

#### (나) 혈액학적 파라미터 측정

각 그룹에서 millar catheter를 이용하여 심장 기능(LVEDP, HR,  $\pm dp/dt$ )을 측정하였다.

#### (다) 몸무게 측정

STZ에 의해 유도된 당뇨쥐는 10일째에 control그룹에 비해 몸무게의 차이 (220±12, 275±15g, 각각)가 나타났으며, 30일째는 거의 50%이상의 몸무게 차이 (175±12, 335±20g, 각각)를 보였다. 안토시아닌을 처리그룹(3,4번째 그룹)은 30일째에 STZ에 의해 유도된 당뇨쥐 그룹의 몸무게(175g)에 비해 각각 275, 280g으로 30% 또는 31% 증가를 하였다. 그리고 타입 2 당뇨병의 의약품으로 사용 중인 glibenclamide(5번째 그룹) 역시 3, 4번째 그룹과 비슷한 회복력을 보였다.

Table 1. Body weight in control, STZ-induced diabetic rats, and anthocyanins before and after STZ treatment or GLB after STZ treatment

	Day 5	Day 10	Day 15	Day 20	Day 25	Day 30
Body weight (g)						
Control (n = 5)	255±15	275±15	295±20	305±16	325±18	335±20
STZ (n = 5)	254±13	220±12**	198±12**	185±12**	180±10**	175±12**
STZ+ANT (same-day, n = 5)	255±10	254±12†	256±17††	255±10††	268±10††	275±14††
STZ+ANT (post, n = 5)	255±10	255±14†	258±15††	265±12††	272±10††	280±12††
STZ+GLB (post, n = 5)	257±14	256±12†	260±14††	268±14††	275±15††	282±12††

Data are presented as means±SD of three independent experiments. One-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare multiple group means and was followed by a Newman-Keuls test (significance compared with control, \*\* $p < 0.01$ ; significance compared with STZ-treated rats, † $p < 0.05$  or †† $p < 0.01$ ).

#### (라) 혈당 수치

STZ에 의해 유도된 당뇨쥐 그룹은 control 그룹(105±7mg/dL)에 비해 STZ 투여 후 5일째부터 혈당수치가 증가하기 시작하여 30일째 5.6배로 증가 (585±16mg/dL)하였다. 하지만 STZ에 의해 증가된 혈당수치(585±16mg/dL)는 안토시아닌을 처리한 그룹(3, 4번째 그룹)에서는 10일째부터 혈당수치가 감소하기 시작하여 30일째에 각각 260mg/dL(3번째 그룹), 255mg/dL(4번째 그룹)까지 효과적으로 감소하였다. glibenclamide(5번째 그룹)역시 265mg/dL로 나타났다.

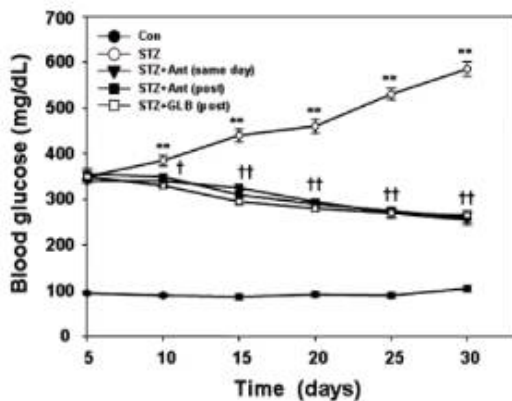


Figure 1. ANT down-regulate blood glucose concentrations that are increased in STZ-induced diabetic rats. The STZ-induced diabetic model and ANT (same-day or post-treatment) or glibenclamide treatment were performed as described in Section 2. Every 5th day after the induction of diabetes (measured blood glucose levels  $\geq 300$  mg/dL) by STZ injection, blood glucose levels were measured by a glucometer in each group (n = 5). Bars represent mean±SD of three independent experiments (significance compared with control, \*\* $p < 0.01$ ; significance compared with STZ-treated rats, † $p < 0.05$  or †† $p < 0.01$ ).



(마) 심장기능에 미치는 효과

Table 2. Summary of hemodynamic measurements in control, STZ-induced diabetic rats, and STZ+ANT or GLB-treated rats

	Control (n = 4)	STZ (n = 5)	STZ+ANT (same-day, n = 5)	STZ+ANT (post, n = 5)	STZ+GLB (post, n = 5)
LVSP (mm/Hg)	132.4 ± 13.7	97.5 ± 6.4*	122.3 ± 13.0 <sup>†</sup>	128.08 ± 12.4 <sup>†</sup>	123.7 ± 7.4 <sup>†</sup>
LVEDP (mmHg/sec)	16.2 ± 1.3	12.6 ± 1.0**	14.6 ± 0.6 <sup>†</sup>	14.9 ± 0.8 <sup>†</sup>	6.5 ± 1.1 <sup>††</sup>
HR (bpm)	269.9 ± 17.6	257.2 ± 38.4	261.2 ± 15.8	257.4 ± 7.2	278.6 ± 25.3
+dp/dt (mmHg/s)	4670.7 ± 360.6	3202.2 ± 218.7**	4533.1 ± 227.1 <sup>††</sup>	4491.4 ± 98.4 <sup>††</sup>	4627.4 ± 456.5 <sup>††</sup>
-dp/dt (mmHg/s)	-4317.3 ± 584.3	-2396.1 ± 216.5**	-3780.8 ± 386.6 <sup>††</sup>	-3991.9 ± 258.4 <sup>††</sup>	-4035.95 ± 452.2 <sup>††</sup>
Systolic blood pressure (mmHg)	127.8 ± 15.8	94.9 ± 7.0*	118.0 ± 14.1	125.1 ± 13.2 <sup>†</sup>	123.9 ± 15.4 <sup>†</sup>
DBP (mmHg)	97.1 ± 9.4	69.3 ± 9.7*	90.5 ± 9.1	93.1 ± 10.3 <sup>†</sup>	89.4 ± 8.4
Mean arterial pressure (mmHg/s)	107.3 ± 11.4	77.8 ± 8.7*	99.7 ± 10.8	103.7 ± 10.9 <sup>†</sup>	100.8 ± 3.5 <sup>†</sup>

Data are presented as means ± SD of three independent experiments (significance compared with control \* $p < 0.01$  and \*\* $p < 0.01$ ; significance compared with STZ-treated rats, <sup>†</sup> $p < 0.05$  or <sup>††</sup> $p < 0.01$ ).

(바) 당뇨병의 당이용에 관여하는 GLU4 발현에 대한 안토시아닌의 효과

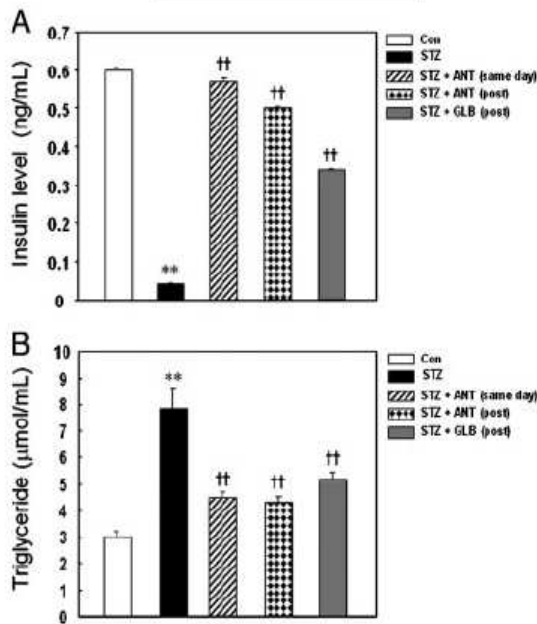
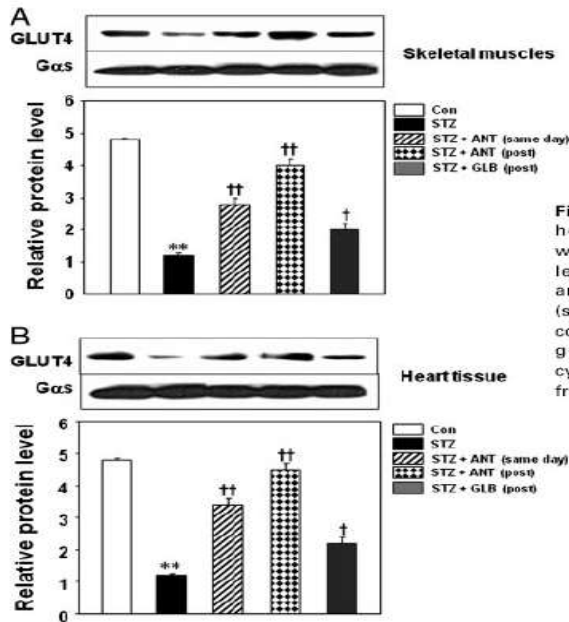


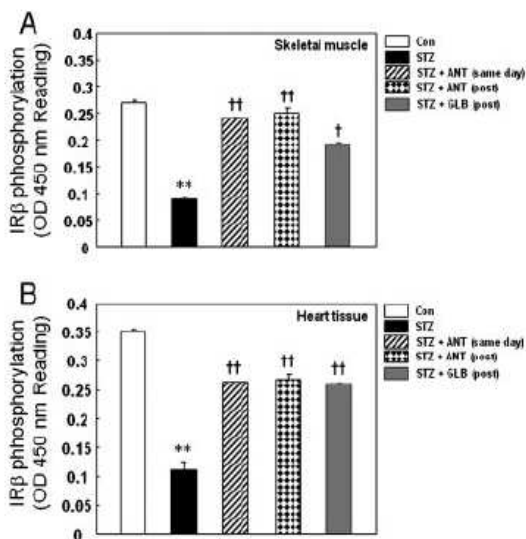
Figure 2. The effect of ANT on insulin (A) and triglyceride (B) concentrations in serum from STZ-induced diabetic rats. Serum was collected on the 30th day of the experiment, and insulin levels and triglyceride concentrations were determined by commercial kits as described in Section 2. Data are presented as means ± SD of three independent experiments (significance compared with control, \*\* $p < 0.01$ ; significance compared with STZ-treated rats, <sup>†</sup> $p < 0.05$  or <sup>††</sup> $p < 0.01$ ).

상기 표2는 당뇨병에서 ANT 및 GLB 투여가 심장의 기능에 대한 효과를 보이는 것으로 당뇨병 쥐에서는 control에 비해 심근수축력과 이완력의 저하와 혈압의 하강 등이 나타났으나 ANT, GLB 투여군에서 현저히 회복됨을 알 수 있다.

그림3 및 4는 골격근에서 당의 이용에 관련있는 GLU4의 발현을 조사한 것으로 당뇨병 쥐에서는 GLU4의 발현이 현저히 줄어 있으나 ANT, GLB 투여 군에서는 발현이 증가 되어 있다. 동일한 결과는 심장근육에서도 볼 수 있었다. 한편 인슐린수용체의 인산화가 당의 이용에 있어 중요하므로 인슐린수용체 (IR)인산화를 골격근과 심장에서 확인한바 당뇨병 쥐에서 현저히 저하된 인산화를 ANT, GLB가 회복시킴을 알 수 있다.



**Figure 3.** ANT increase the expression of GLUT4 in skeletal and heart tissues in STZ-induced diabetic rats. Membrane fractions were extracted as described in Section 2, and GLUT4 protein levels were determined in skeletal (A) and heart (B) tissues. Data are presented as means  $\pm$  SD of three independent experiments (significance compared with control, \*\* $p < 0.01$ ; significance compared with STZ-treated rats, † $p < 0.05$  or †† $p < 0.01$ ) (Gαs, guanine nucleotide-binding protein G(s),  $\alpha$  subunit (Adenylate cyclase-stimulating G  $\alpha$  protein), a loading control for membrane fractionation).



**Figure 4.** Administration of ANT restores IR $\beta$  phosphorylation decreased in STZ-induced diabetic condition. After the rats were treated with ANT for 30 days, they were anesthetized and skeletal (A) and heart (B) tissues were removed. Membrane fractionations were performed according to the manufacturer's protocol, and the level of IR $\beta$  tyrosine kinase phosphorylation was determined in the protein extracts. Data are presented from three independent experiments (significance compared with control, \*\* $p < 0.01$ ; significance compared with STZ-treated rats, † $p < 0.05$  or †† $p < 0.01$ ).

전체적으로 STZ에 의해 유도된 당뇨쥐 그룹의 나빠진 수치들이 안토시아닌과 glibenclamide의 투여로 인해 매우 향상되었던 것 알 수가 있었다. 안토시아닌은 당뇨쥐 그룹에서 glibenclamide 만큼이나 심장기능을 향상시킨다는 것을 알 수가 있었다.

#### (사) 안토시아닌의 당뇨쥐 췌장세포 apoptosis 억제효과

이러한 효과는 결국 췌장세포의 apoptosis를 억제하기 때문인지를 western (그림5), TUNEL방법(그림6)으로 확인한바 당뇨쥐에서는 Bcl-2감소, BAX증가, caspase 3증가가 나타났으나 약물처리로 인해 이들이 억제됨을 확인하였다. TUNEL결과에서도 같은 결과를 얻었다.

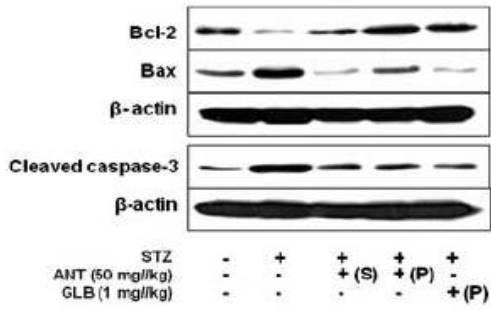


Figure 5. ANT protect the pancreas of STZ-induced diabetic rats from apoptosis through the inhibition of caspase 3 cleavage and proapoptotic protein Bax, and the up-regulation of antiapoptotic protein Bcl-2. On the 30th day of the experiments, rats were sacrificed and pancreatic tissues were removed and homogenized. Total proteins were extracted as described in Section 2. The levels of Bcl-2, Bax, and cleaved caspase-3 were determined by Western blot analysis. These data were confirmed by three independent experiments (ANT (S), anthocyanins same-day treatment; ANT (P), anthocyanins post-treatment; and GLB (P), glibenclamide post-treatment).

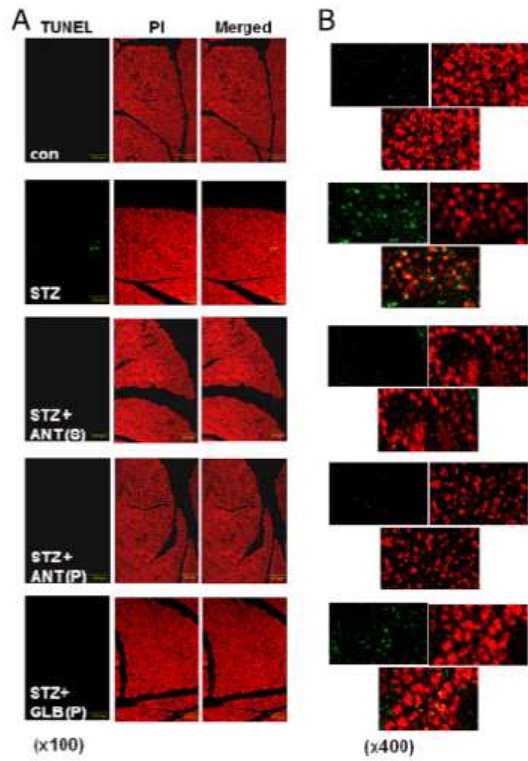


Figure 6. ANT protect pancreatic tissue (including  $\beta$ -islet cells) from STZ-induced apoptotic cell death, as shown by a TUNEL assay. Representative micrographs of TUNEL staining of pancreatic tissues are shown ((A)  $\times 100$  magnification; (B)  $\times 400$  magnification). ANT exhibited marked protective effects compared with glibenclamide and decreased the positive nuclei (green) in pancreatic tissues (including  $\beta$ -islet cells). Data were confirmed by three independent experiments.

(아) 안토시아닌의 항산화 효과

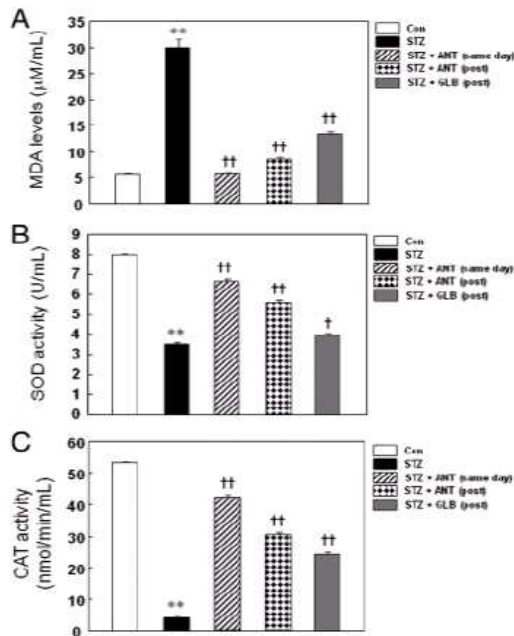


Figure 7. Administration of ANT prevents changes in the levels of MDA, SOD, and CAT in STZ-induced diabetic rats. MDA (A), SOD (B), and CAT (C) levels were measured in serum extracted by cardiac punctures on the 30th day of the experiment. Data are presented as means  $\pm$  SD of three independent experiments (significance compared with control, \*\* $p < 0.01$ ; significance compared with STZ-treated rats, † $p < 0.05$  or †† $p < 0.01$ ).

그림 7에서 보이는바와 같이 안토시아닌의 처리는 STZ유발 당뇨쥐의 혈중에서 MDA 수치는 낮추는 반면 SOD와 CAT 활성도는 control에 비해 유의하게 올림을 알 수 있다.

이상의 결과로 안토시아닌은 당뇨성 질환의 치료에도 효과가 있음을 증명하였다.

(4) 안토시아닌이 UV에 의한 피부염증억제에 미치는 영향

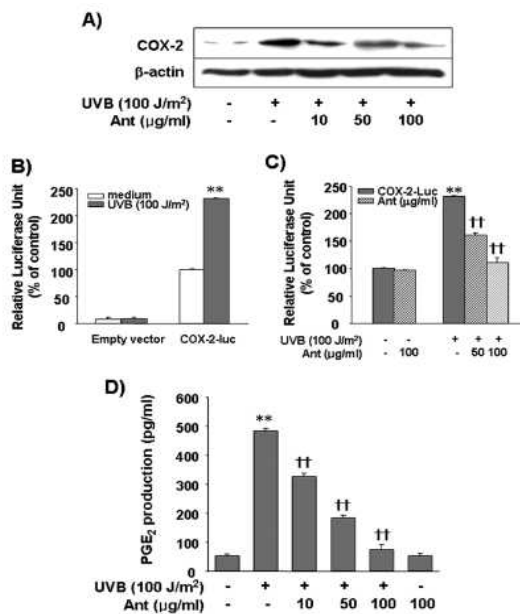


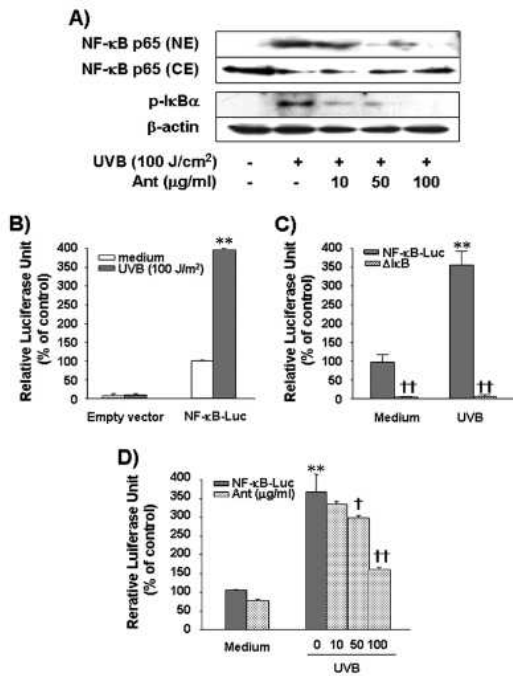
Figure 1. Effect of anthocyanins on UVB-mediated COX-2 gene expression and PGE<sub>2</sub> production in human keratinocyte cell line, HaCaT. (A) Cells were pretreated with anthocyanins (10, 50, and 100 µg/mL) for 24 h and then stimulated with UVB irradiation (100 J/m<sup>2</sup>). Thereafter, media were replaced with fresh media containing anthocyanins, and cells were further incubated for 16 h. The COX-2 protein level was determined by Western blot analysis. The results were confirmed by three experiments ( $n = 3$ ). (B and C) Cells were transiently cotransfected with empty vector or COX-2 promoter-luciferase + pRL-TK-luciferase. Transfected cells were pretreated with anthocyanins and stimulated with UVB irradiation as described in panel A. After further incubation with anthocyanins for 16 h, luciferase activities were determined from cell lysates and presented as percentage activation relative to untreated cells. The results were confirmed by three experiments ( $n = 6$ ). (D) Cells were pretreated with anthocyanins and stimulated with UVB irradiation as described in panel A. After further incubation for 24 h, the supernatant was collected, and PGE<sub>2</sub> production was determined as described in the Materials and Methods. The results were confirmed by three experiments ( $n = 6$ ). Significance as compared with the control, \*\* $p < 0.01$ ; significance as compared with UVB, † $p < 0.01$  (control level = 1).

(가) COX-2 발현 및 prostaglandin E2 생성에 대한 효과

안토시아닌의 항염작용을 확인하기 위해 UV에 의해 발현되는 COX-2와 prostaglandin E2 생성에 대한 영향을 human keratinocyte에서 살펴본 것이다. 그림 1에서와 같이 안토시아닌은 용량 의존적으로 UV에 의한 COX-2의 발현과 COX-2 luciferase 활성 및 PGE2의 양을 감소 시켰다.

(나) COX-2 발현억제에 관한 작용기전연구

UV에 의한 COX-2의 발현은 NF- $\kappa$ B의 활성화에 의한다는 것은 잘 알려져 있다. 따라서 안토시아닌이 NF- $\kappa$ B의 활성을 억제하므로 COX-2 발현이 줄어드는지를 확인한 결과 그림 2에서 보이는 바처럼 UV에 의한 NF- $\kappa$ B의 핵으로의 이동을 안토시아닌처리로 줄어듦을 알 수 있다 (A). 이것을 다시 한번 확인하기 위해 Luciferase로 transfectin 시킨후 활성도를 측정하여 (B, C) 본 결과 UV 조사는 확실하게 NF- $\kappa$ B의 활성을 나타내었으나 mutant NF- $\kappa$ B가 들어있는 세포에서는 NF- $\kappa$ B 활성이 일어나지 않음을 알 수 있다. 따라서 안토시아닌에 의한 NF- $\kappa$ B luciferase를 측정한 결과 D에서와 같이 용량 의존적으로 NF- $\kappa$ B 활성이 줄어들었음을 확인하였다.

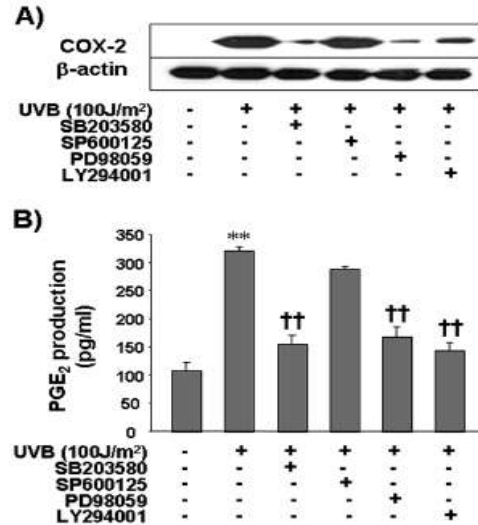


**Figure 2.** Inhibition of UVB-induced NF- $\kappa$ B translocation into the nucleus, I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation, and NF- $\kappa$ B-luciferase activity by anthocyanins in HaCaT. (A) Cells were pretreated with anthocyanins for 24 h and then stimulated with UVB irradiation. After 1 h of incubation with anthocyanins, nuclear and cytoplasmic fractions or total cell lysates were extracted, and the protein level was determined by Western blot analysis. Data were confirmed from two independent experiments ( $n = 2$ ). (B–D) Cells were transfected with 1  $\mu$ g of NF- $\kappa$ B-luciferase, allowed to recover for 24 h, and then stimulated with UVB. After irradiation, cells were incubated in the presence or absence of anthocyanins. Cells were harvested 6 h after treatment, and luciferase activities were determined. The results were confirmed by three experiments ( $n = 6$ ). Significance as compared with control, \*\* $P < 0.01$ ; significance as compared with UVB, † $P < 0.05$  and †† $P < 0.01$ .

(다) COX-2 발현억제에 관여하는 신호전달계 연구

UV에 의한 COX-2 발현에 관여하는 신호전달계를 연구하기 위해 MAPKinase 억제제를 사용하여 본 것이다. 그림 3에서 SB203580, PD98059 및 LY294001은 UV에 의한 COX-2의 발현을 줄였다 (그림 3).

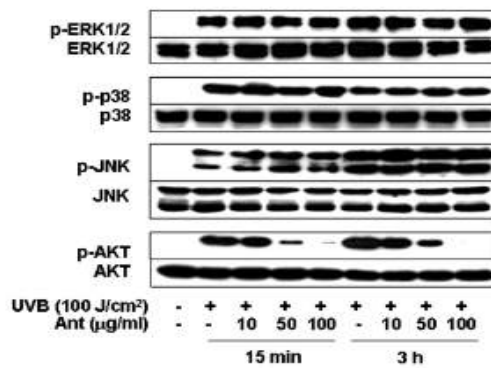
COX-2의 산물인 PGE2를 확인하여 본 결과 동일한 결과를 얻었다 (B).



**Figure 3.** Signaling pathway involved in COX-2 expression and PGE<sub>2</sub> production by UVB in HaCaT. Cells were pretreated with PD98059 (an ERK1/2 inhibitor, 40 μmol/L), SB203580 (a p38 inhibitor, 5 μmol/L), SP600125 (a JNK inhibitor, 50 μmol/L), or LY294002 (a PI3 kinase inhibitor, 10 μmol/L) and then irradiated with UVB (100 J/m<sup>2</sup>). The COX-2 protein level (A) or PGE<sub>2</sub> production (B) was detected 16 or 24 h after UVB irradiation, respectively. The results were confirmed by three experiments (*n* = 3 for A, and *n* = 6 for B, respectively). Significance as compared to the control, \*\**p* < 0.01; significance as compared with UVB, ††*p* < 0.01 (control level = 1).

(라) 안토시아닌에 의한 Akt의 인산화 억제

따라서 안토시아닌이 이러한 신호체계 중 어떠한 것과 관련이 있는지를 확인하기 위하여 ERK, p38, JNK 및 Akt 인산화를 확인하였다. 그림4에서 보이는 것처럼 Akt 인산화를 줄임을 확인하였다.

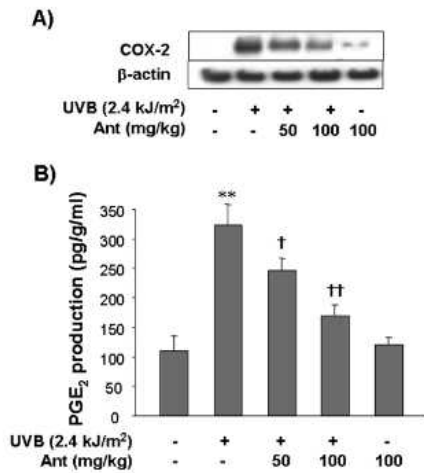


**Figure 4.** Effect of anthocyanins on UVB-mediated mitogenic signaling pathways (MAPKs and Akt) in HaCaT. To determine the effect of anthocyanins on the UVB-activated signaling pathway, cells were pretreated with anthocyanins at various concentrations (10, 50, or 100 μg/mL) for 24 h and then irradiated with UVB. At 15 min or 3 h of incubation with anthocyanins after UVB irradiation, phosphor-MAPKs and total-MAPK or phosphor-Akt and total-Akt protein levels were determined by Western blot analysis. Data were confirmed by three independent experiments (*n* = 3).

(마) 동물에서 안토시아닌의 COX-2억제확인

이상은 in vitro 실험이었는데 실제로 안토시아닌의 작용이 동물피부에서도 COX-2 발현억제 및 이의 산물인 PGE2의 생성이 줄어드는지를 hairless mice의 skin에 UV를 조사한 후 조직에서 COX-2의 발현과 PGE2의 생성량을 측정하였다. 그림 5A에서 보이는 것처럼 안토시아닌의 처리는 확실하게 COX-2 발현을 억제하였고 이에 해당하는 PGE2의 양도 줄어들었음을 (B) 확인할 수 있었다.

이상의 결과로부터 안토시아닌은 항염작용이 있음을 확인하였다.



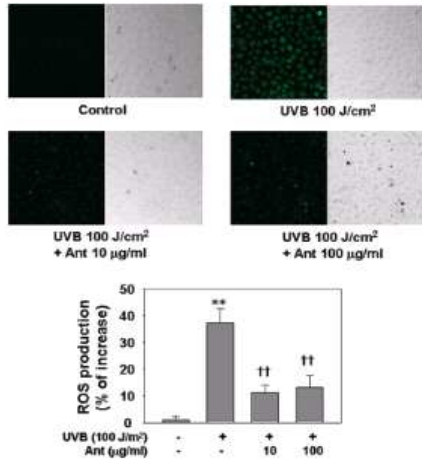
**Figure 5.** Effect of anthocyanins on COX-2 expression (A) and PGE<sub>2</sub> production (B) in UVB-irradiated hairless mouse skin. Fifteen hairless mice were divided into five groups of three animals each and exposed to UVB irradiation (2.4 kJ/m<sup>2</sup>). Immediately after UVB irradiation, anthocyanins (50 or 100 mg/kg) were applied to mice. The dorsal skin was excised from each mouse, and Western blotting (A) and ELISA assay (B) were performed. The results were confirmed by three experiments (n = 9). Significance as compared with the control, \*\*P < 0.01; significance as compared with UVB irradiation, ††P < 0.01.

(5) 안토시아닌의 UV조사에 의한 피부조직의 apoptosis 억제효과

(가) 안토시아닌의 활성산소억제 효과

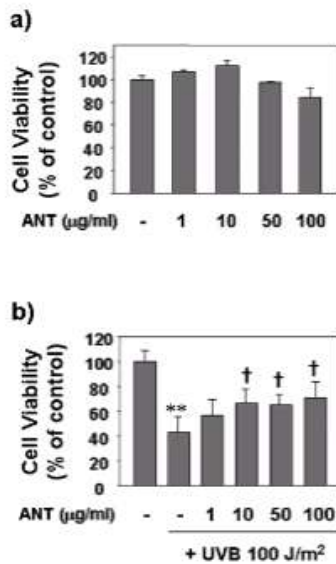
상기연구에서 안토시아닌은 UV조사에 의한 피부조직에서 COX-2의 발현과 PGE2의 생성을 줄였음을 확인하였기에 본 연구에서는 피부조직세포의 apoptosis에 어떤 영향을 주는 지를 확인하고자 하였다. 그림1에서와 같이 UVB의 조사는 피부 세포에서 활성산소를 발생시킴을 확인하였다. 그러나 안토시아닌이 처리된 후 UVB를 조사하였을 때 활성산소의 발생이 유의하게 줄어들었음을 알 수 있다 (그림1).





**Figure 1.** Effect of anthocyanins on ROS production induced by UVB in HaCaT. Cells were pretreated with anthocyanins (10 or 100 µg/mL) for 24 h and then irradiated with UVB (100 J/m<sup>2</sup>). After 1 h of incubation with/without anthocyanins, ROS production by confocal microscopy (bright green) analysis was performed as described in the Materials and Methods. The experiments were performed three times ( $n = 3$ ). \*\* $P < 0.01$ , significance as compared with the control; †† $P < 0.01$ , significance as compared with UVB irradiation.

(나) HaCaT 세포에서 UVB에 의한 세포독성에 미치는 안토시아닌의 영향  
 그림2에서 보이는 것처럼 안토시아닌 자체로는 100 µg/ml 까지 세포에 전혀 영향을 주지 않았다. 그러나 UVB를 조사 시 세포의 생존률이 유의하게 감소하였고 안토시아닌을 처리 후 생존률이 유의하게 증가 됨을 알 수 있었다.

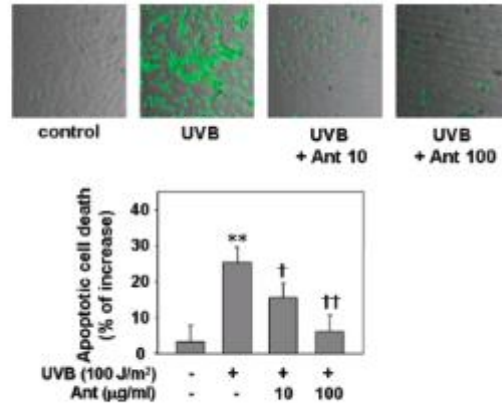


**Figure 2.** Effects of anthocyanins on UVB-mediated cytotoxicity in HaCaT. (A) Cells were incubated with various concentrations of anthocyanins (1, 10, 50, and 100 µg/mL) for 24 h, and the cell viability was measured by trypan blue analysis. (B) Cells were treated with anthocyanins as described in Materials and Methods. After incubation, cells were subjected to trypan blue analysis. Data represent means  $\pm$  SEMs of three independent experiments (\*\* $P < 0.01$ , significance as compared with the control; † $P < 0.05$  and †† $P < 0.01$ , significance as compared with UVB irradiation) ( $n = 3$ ).

(다) 안토시아닌의 UVB에 의한 apoptosis 억제 효과:TUNEL 연구

그림2에 보인 생존률 증가 효과를 apoptosis억제와 관련이 있는 지를 TUNEL로 확인 한 것이다. 그림3에서 보이는 것처럼 UVB는 apoptosis가 진행되었음을 보이는 반면 안토시아닌의 처리에 의해 apoptosis가 현저하게 줄어들었음을 보여 주고 있다.





**Figure 3.** Protective effect of anthocyanins on UVB-induced apoptotic cell death in HaCaT by TUNEL assay. Cells were treated the same as described in the Materials and Methods, and then, the TUNEL assay was performed according to the manufacturer's protocol. The experiments were performed three times; data represent means  $\pm$  SEMs of three independent experiments as a bar graph, and representative figures are presented (\*\* $P < 0.01$ , significance as compared with the control;  $\dagger P < 0.05$  and  $\dagger\dagger P < 0.01$ , significance as compared with UVB irradiation).

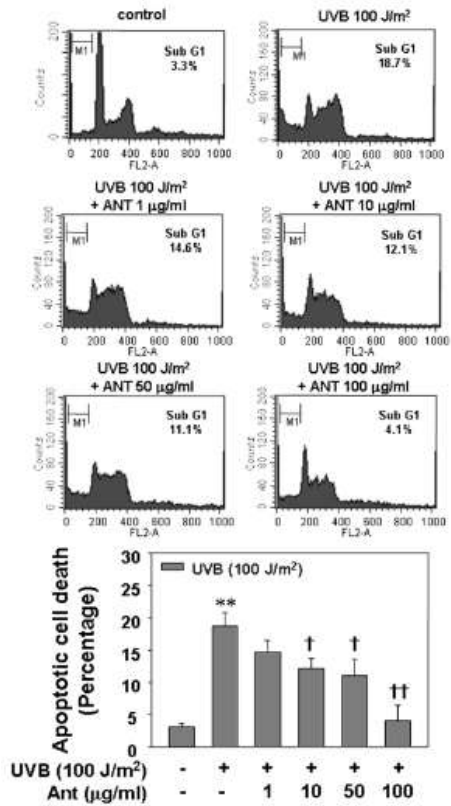
(라) 안토시아닌의 UVB에 의한 apoptosis 억제 효과: FACS 연구

그림4에서 보이는 것처럼 UVB는 apoptosis가 진행되었음을 보이는 반면 안토시아닌의 처리에 의해 apoptosis가 현저하게 줄어들었음을 보여 주고 있다.

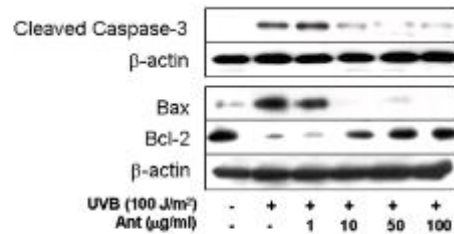
(마) 안토시아닌의 UVB에 의한 apoptosis 억제 효과: Western blot 연구

그림2-4에서 보이는 것처럼 UVB는 apoptosis가 진행되었음을 보이는 반면 안토시아닌의 처리에 의해 apoptosis가 현저하게 줄어들었음을 보여 주고 있다. 이를 더욱 확인하기 위해 caspase-3, Bcl-2, Bax 발현을 western으로 확인하였다.

안토시아닌처리로 인해 caspase-3의 발현이 줄어들었으며 아울러 Bcl-2의 발현은 증가하였으나 Bax 발현은 줄어들었다. 이로서 in vitro에서 UV에 의한 HaCaT 세포가 apoptosis에 의해 생존률이 줄어들었으나 안토시아닌은 apoptosis를 억제하여 생존율을 증가 시켰다.



**Figure 4.** Protective effect of anthocyanins on UVB-induced apoptotic cell death in HaCaT by FACS analysis. Cells were treated with anthocyanins, and then, FACS analysis was performed as described in the Materials and Methods. Data represent means  $\pm$  SEMs of three independent experiments (\*\* $P < 0.01$ , significance as compared with the control; † $P < 0.05$  and †† $P < 0.01$ , significance as compared with UVB irradiation).

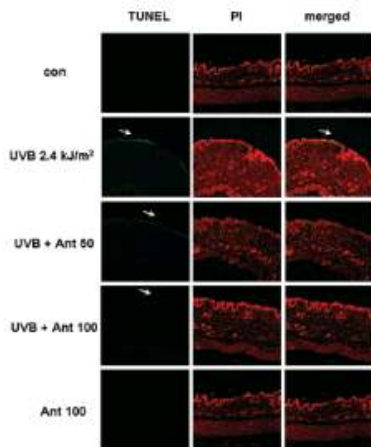


**Figure 5.** Immunodetections of cleaved caspase-3, Bcl-2, or Bax in the UVB-irradiated cells with/without anthocyanins. Cells were treated as described in Figures 3 and 4. After treatment, total cell lysates were extracted, and 30  $\mu$ g of the total protein for caspase-3, Bcl-2, or Bax was electrophoresed on 12% polyacrylamide gels. Western blot analysis was performed using the anticlaved caspase-3 (cpp20), anti-Bcl-2, or anti-Bax antibodies. The results were confirmed by three independent experiments.

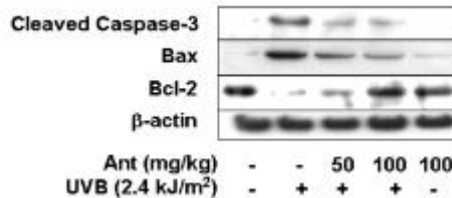
(바) in vivo에서 안토시아닌의 UVB에 의한 apoptosis 억제 효과: TUNEL 연구 in vitro에서 UVB는 apoptosis가 진행되었음을 보이는 반면 안토시아닌의 처리에 의해 apoptosis가 현저하게 줄어들었음을 보여 주고 있다. in vitro의 효과가 in vivo에서도 재현이 되는지를 더욱 확인하기 위해 hairless mice의 skin에 UVB를

조사한 후 조직에서 메카세난억제 양상을 TUNEL과 caspase-3, Bcl-2, Bax 발현을 western으로 확인하였다.

그림 6과 7은 안토시아닌처리로 인해 caspase-3의 발현이 줄어들었으며 아울러 Bcl-2의 발현은 증가하였으나 Bax 발현은 줄어들었다. 이로써 안토시아닌의 효과는 in vitro와 in vivo에서 동일하게 보호효과가 있음을 확인하였다.



**Figure 6.** Effect of anthocyanins on UVB-induced apoptotic cell death in hairless mice. Immediately after UVB irradiation, anthocyanins were applied to the hairless mice, and 24 h later, the dorsal skin (ca. 1 cm × 2 cm) was excised from each mouse as described in the Materials and Methods. The TUNEL assay was performed as described in the Materials and Methods. Results were confirmed by three independent experiments ( $n = 9$ ). All photographs were taken at a magnification of 100× (scale bar = 50  $\mu\text{m}$ ).



**Figure 7.** Effect of anthocyanins on UVB-activated apoptotic-related pathways. Western blot analysis was of hairless mice exposed as described in Figure 6, and Western blot analysis was performed using the dorsal skin (ca. 1 cm × 2 cm) excised from each mouse. Results were confirmed by three independent experiments ( $n = 9$ ).

## 2. 신제품종 콩을 이용한 고혈압 개선 제품개발

### 가. 연구개발 과제에의 연구 수행 방법

#### 1) 실험재료

##### 가) 대두(Soybean)

대두는 중국을 중심으로 한 동북아시아가 원산지이며, 우리나라는 약 1,500년 전부터 재배되었다. 주산지는 경기도의 화성·가평·장단, 충북의 보은, 충남의 당

진·보령, 전북의 임실, 전남의 신안·완도, 경북의 안동지방이다. 특히 전남과 경북 지방이 전국 생산량의 40%를 차지하고 있다. 콩의 가식부는 종실의 자엽(떡잎)으로, 자엽은 약 90-92%를 차지하고, 배아는 2장의 자엽 사이에 존재하며 약 2%로 되어있다. 콩의 표면은 각피층으로 되어 있어 물을 잘 통과시키지 않는다. 콩은 수확시기에 따라 여름콩, 중간콩, 가을콩으로 구분하며, 색에 따라서 황대두(누런콩)는 종피와 자엽의 색이 황색인 것, 흰콩은 백색, 밤콩은 붉은색, 흑대두(검정콩)는 종피의 색이 흑색, 청대두(푸른콩)는 종피의 색이 녹색으로 되어 있다. 우리나라 콩의 대부분은 흰콩이나 누런콩에 속한다.

일반적으로 대두의 일반성분은 수분 9.2%, 회분 5.8%, 단백질 41.3%, 지방 17.6%, 당질 26.1% 로 구성되어 있다. 대두의 영양성분은 대부분 자엽으로 함유되어 있고 단백질 함량이 40% 정도로 많고, 유지는 18-22%로 많은 부분을 차지하고 있다. 대두 단백질의 대부분은 수용성으로 글로불린(globulin)에 속하는 글리시닌(glycinin)이 전체 단백질의 84%를 차지하고, 이외에 알부민(albumin), 프로테오스(proteose), 글루테린(glutelin), 비단백질로 구성되어 있다.

#### 나) 아가 콩 (Aga soybean)

경북대학교 황영현 교수님께서 개발한 품종인 아가 3호, 4호를 사용하였다.

#### 다) 가수분해 효소

가수분해에 사용할 단백질 분해효소는 총 7 종으로 Flavourzyme 500 MG, Protamex, Papain 30,000, GC 106, Multifect Neutral, Neutrase 0.8 L, Alcalase 2.4 L을 사용하였다. 효소의 특성은 Table 1. 과 같다.

Table 1. Characteristics of enzyme used in protein hydrolysis

Enzyme	Optimum pH	Optimum Temp. °C	Manufacturer	Origin	Type
Flavourzyme 500 MG	5-7	50	Novo	<i>Aspergillus oryzae</i>	Endo Exo
Protamex	5.5-7.5	35-60	Novo	<i>Bacillus</i>	Endo
Papain 30,000	5-7	65-80	Oka zone international	<i>Carica papaya</i>	Endo
GC 106	4	55	Oka zone international	<i>Aspergillus niger</i>	Endo
Multifect Neutral	5.5-6	40-60	Oka zone international	<i>Bacillus amyloliquetaciens</i>	Endo
Neutrase 0.8 L	5.5-7.5	45-55	Novo	<i>Bacillus amyloliquetaciens</i>	Endo
Alcalase 2.4 L	6.5-8.5	55-70	Novo	<i>Bacillus licheniformi</i>	Endo

## 2) 실험방법

### 가) 일반성분

AOAC방법에 따라 수분은 105°C 상압 가열 건조법으로, 회분은 550°C 건식 회화법으로, 조단백질 함량은 semi-micro Kjeldahl법으로 실시하였으며, 지방은 Soxhlet으로 추출하여 측정하였다. 당질은 100 - (수분 + 조단백질 + 조지방 + 회분)으로 계산하여 일반성분을 구하였다.

### 나) 대두의 단백질 분리 제조

일반적으로 분리대두단백질을 제조하기 위해서는 탈지 대두분에 5 배의 증류수를 가하여 1 M NaOH로 pH 8.0에서 상층액을 취하고, 1 M HCl로 pH 4.5로 조정하여 침전물을 취한 건조물을 구한다. 이는 단백질이 아미노산과 마찬가지로 양성 전해질이며 단백질 분자를 구성하는 아미노산 잔기가 어떤 것이라도 분자 전체의 전하를 0으로 하는 수용액의 pH 값으로 표시되는 등전점을 가지는데, 이 등전점의 차이를 이용하여 다른 단백질을 분리하거나 정제할 수 있는 원리를 이용한 것이다. 보통의 단백질은 ovalbumin(pH 4.6), casein(pH 4.7), serum albumin(pH 4.8), gelatin(pH 4.8), fibrinogen(pH 5), insulin(pH 5.3), serum globulin(pH 5.4), edestin(pH 6.6), hemoglobin(pH 6.8), globin(pH 7.5)로서 등전점이 pH 4.5-8 내에 있어 등전점에 있는 단백질만을 pH 만으로 침전시켜 얻을 수 있다.

대두의 단백질은 비교적 물이나 pH 값이 등전점 부근인 묽은 염용액에서 용해도가 높다. 이는 대두의 주단백질이 글로불린(globulin)의 등전점 부근이며, 글로불린 중에서 분자량 186,000-210,000을 가진 7S 글로불린과 분자량 350,000을 가진 11S 글로불린이 가장 중요하다.

### 다) 대두단백질의 가수분해물의 제조

대두단백질의 일정량을 증류수를 가하여, 효소의 최적 분해 조건에서 가수분해 후, 아미노산의 양을 측정할 수 있는 280 nm에서의 흡광도와 Brix에 의한 최적 가수분해조건을 설정한다.

### 라) ACE 저해 활성 측정

ACE저해활성은 Cushman등(1971)의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 0.3 M NaCl을 함유한 0.1 M sodium borate buffer(pH 8.3)에 rabbit lung acetone powder (Sigma Chemical Co. Ltd., USA)를 1 g/10 mL(w/v)의 농도로 4°C에서 24시간 동안 추출한 다음 4°C, 4,000 rpm에서 40분간 원심분리하여 ACE 조효소액을 얻었다. ACE저해 활성은 10 mg/mL의 농도로 제조한 시료 50  $\mu$ L에 0.1M sodium borate buffer(pH 8.3) 100  $\mu$ L와 ACE 조효소액 50  $\mu$ L를 가한 다음 37°C에서 5분간 예비반응 시킨 후 0.3 M NaCl이 함유된 0.1 M sodium borate buffer(pH 8.3) 5mL에 HHL (hippuryl-histidyl-leucine) 25 mg을 첨가하

여 만든 기질 50  $\mu\text{L}$ 를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 이때 1 N HCl 250  $\mu\text{L}$ 를 가하여 반응을 정지시킨 후, ethyl acetate 1.5 mL를 가해 15 sec 교반한 후 원심분리(3000 rpm/5 min, 4°C)하여 상층액 1 mL을 얻었다. 이 상층액을 120°C에서 30분간 완전히 건조시켜 증류수 3 ml를 가한 다음 다시 용해한 후 228 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 추출물 대신 추출용매 50  $\mu\text{L}$ 를 가해서 실험하였다. ACE 저해활성은 다음 계산식을 이용하였다.

$$\text{ACE inhibition (\%)} = 1 - \left( \frac{S - SB}{C - CB} \right) \times 100$$

S: sample absorbance SB: absorbance of sample blank

C: control absorbance CB: absorbance of control blank

#### 마) 관능검사

시료의 관능평가는 갈색도(갈색의 진한 정도), 향(잡냄새가 없고 구수한 정도), 쓴맛이 정도(쓴맛이 없고 구수한 정도)에 대한 3가지 항목을 실시하였으며 훈련 받은 8명의 심사원에 의하여 수행되었다. 기호도는 5점 척도를 이용하여 5점은 아주 좋다, 3점은 보통이다, 1점은 아주 싫다. 로 평가하였다.

#### 바) 가수분해물의 분리 및 정제

SPI (soybean protein isolate) 가수분해물에서 ACE 저해 물질을 분리, 정제하기 위하여 다음과 같이 단계별 column chromatography 및 HPLC (AKTA explorer 100, pharmacia, sweden)를 행하였다. ACE 저해 물질의 분획은 AKTA explorer 100 (pharmacia Biotech)을 사용하여 수행하였으며, peptide 성분의 검출은 AKTA explorer 100에 장착된 UV detector를 사용하여 215 nm와 280 nm에서 실시하였다.

##### (1) 한외여과(Ultrafiltration)

SPI 가수분해물을 cut-off 1,000 dalton, 3,000 dalton, 10,000 dalton의 membrane (YM10, Amicon Co.)을 장착한 한외여과장치 (Amicon Co.)로 10,000 dalton이상의 획분과 10,000-3,000 dalton, 3,000-1,000 dalton, 1,000 dalton이하의 획분으로 분리하고 감압농축 후 진공동결 건조하여 대두 peptide를 제조하였다.

##### (2) ODS AQ column 에 의한 reverse-phase chromatography

Ultrafiltration에 의해 분리한 SPI 가수분해물을 ODS AQ를 충전한 column (26×300 mm, Vt : 170 ml)으로 분리, 정제하였다. 이때 용출액은 HPLC용 water를 A용매, HPLC용 ethanol을 B용매로하여 gradient 조건에서 분리하였다. 유속은 10 ml/min로 용출시켜 10 ml씩 분취하였으며, 215 nm, 280 nm에서 detection 하고, 각 peak를 모아 감압농축한 후 진공동결건조 하였다.

##### (3) Vydac C18 column에 의한 reverse-phase chromatography

ODS AQ column으로 분획한 peptide를 Vydac column (10×250 mm, Vt : 19.6 ml)으로 분리정제하였다. 이때 용출액은 0.1% TFA in water를 A용매, 0.1% TFA

in acetonitrile (ACN)을 B용매로 하여 gradient 조건에서 분리하였다. 유속은 2 ml/min로 용출시켜 2ml씩 분취 하였으며, 215 nm, 280 nm에서 detection하고, 각 peak를 모아 감압농축한 후 진공동결건조 하였다.

(4) Superdex peptide column에 의한 gel permeation chromatography

Vydac C18 column으로 분획한 peptide를 Superdex peptide column (10×30 mm, Vt : 24 ml)을 이용하여 분리정제하였다. 이때 용출액은 HPLC용 water, 유속은 0.5 ml/min로 용출시켜 1 ml/Tr 분취하였으며, 215 nm, 280 nm에서 detection하고, 각 peak를 모아 감압농축한 후 진공동결건조 하였다.

나. 연구 결과

1) 대두 단백질 (SPI, soybean protein isolate) 제조

가) 대두의 품종별 일반성분

대두의 품종별 일반성분 조성 비교한 김의 자료 중 단백질의 함량을 살펴보면, 의성태 37.8%, 제주태 38.1%, 영광태 37.8%, 고흥태 39.7%, 오리알태 39.2%로서 고흥태의 단백질 함량이 가장 높았으나, 품종별 큰 차이는 없었다.

Table 2. Chemical composition of soybean

Soybean	Moisture (%)	Crude ash (D.B. %)	Crude fat (D.B. %)	Crude protein (D.B. %)	Crude fiber (D.B. %)	Crude sugar (D.B. %)
Euiseong	16.1	4.6	14.9	37.8	5.7	20.9
Cheju	19.1	4.6	14.0	38.1	5.3	18.9
Yougkwang	17.0	5.2	14.8	37.8	6.6	18.6
Koheung	18.2	4.7	13.4	39.7	6.0	17.9
Orial	18.1	4.7	14.1	39.2	6.2	17.8

나) 대두의 처리방법에 따른 일반성분

대두의 처리방법에 따른 일반성분을 비교한 김 등의 자료 중 강원도 삼척산 시판대두의 단백질 함량을 살펴보면, 생콩은 37.7%, 수침하여 탈각한 콩은 37.2%, 건열 처리한 콩은 38.3%, 습열 처리한 콩은 38.9%로 습열 처리하였을 때 단백질 함량이 가장 높았으나, 처리방법에 따른 단백질 함량의 차는 크게 나타나지 않았다.

Table 3. Changes in the chemical composition of soybean by raw material treatments

Treatment	Moisture	Crude ash	Crude fat	Crude protein	Crude fiber	Unit : %(dry base)
						Nitrogen free extract
Raw	8.2	6.1	19.6	37.7	4.5	24.0
Soaked	6.2	6.5	19.6	37.2	4.1	26.4
Roasted	5.1	6.5	17.6	38.3	4.4	28.1
Steamed	7.7	6.5	17.0	38.9	4.4	25.5

다) 대두의 일반성분

아가 3호, 4호와 탈지대두의 분말을 AOAC방법에 따라 일반성분을 분석한 결과는 Table 4.와 같다. 탈지대두의 일반성분은 단백질 49.9%, 수분 7.8%, 회분 5.2%, 지방 0.6%, 당질 36.5% 로 구성되어 앞서 조사한 품종별 대두의 일반성분 중 단백질 함량보다 높았다. 대두의 품종을 새롭게 개발한 아가 3호, 아가 4호의 분말은 각각 연두색과 검보라색을 띤 노란색을 가지고 있다. 황대두의 일반성분을 비교하면, 아가 4호는 수분 6.5%, 회분 5.5%, 단백질 4%, 지방 16.1%, 당질 28.8%로 구성, 황대두의 수분 9.2%, 회분 5.8%, 단백질 41.3%, 지방 17.6%, 당질 26.1% 구성성분과 크게 다르지 않았으나, 아가3호는 수분 6.7%, 회분 4.7%, 단백질 33.6%, 지방 19.3%, 당질 35.9%로 황대두 보다 단백질 함량이 낮고, 당질의 함량이 높았다.

Table 4. Chemical composition of defatted soybean

Soybean	Moisture	Crude ash	Crude fat	Crude protein	Unit : %(dry base)
					Carbohydrate
Defatted soybean	7.8	5.2	0.6	49.9	36.5
Aga 3	6.5	5.5	43.0	16.1	28.8
Aga 4	6.7	4.7	33.5	19.3	35.9

라) 분리대두단백질 (SPI, soybean protein isolate) 제조

탈지 대두분을 이용한 대두 단백질을 좀더 높은 수율에서 얻기 위하여 pH에 따른 수율을 조사하여 보았다. 첫 번째로 대두분의 pH 7.5, 8, 8.5, 9 로 조절하여 상층액을 얻어 pH 4.5에서의 대두 단백질의 수율은 Fig. 1.과 같이 나타났다. pH에 따른 수율은 pH 7.5에서 16.3%, pH 8에서 17.8%, pH 8.5에서 19.9%, 그리고 pH 9에



서는 20.5%를 나타내어 pH가 증가할수록 수율도 조금씩 높아지나 적정 pH로는 pH 8.5를 선정하였다.

두 번째로 대두분을 pH 8.5에서 상층액을 얻어 pH 3.5, 4, 4.5 로 조절하여 침전물을 동결건조하여 얻은 대두 단백질의 수율은 Fig. 2와 같이 나타났다. pH에 따른 수율은 pH 3.5에서 19.7%, pH 4에서 19.7%, pH 4.5에서 19.6%로 나타나 큰 차이를 나타내지 않아 pH 4.5를 대두 단백질 제조의 적정 pH로 선정하였다.

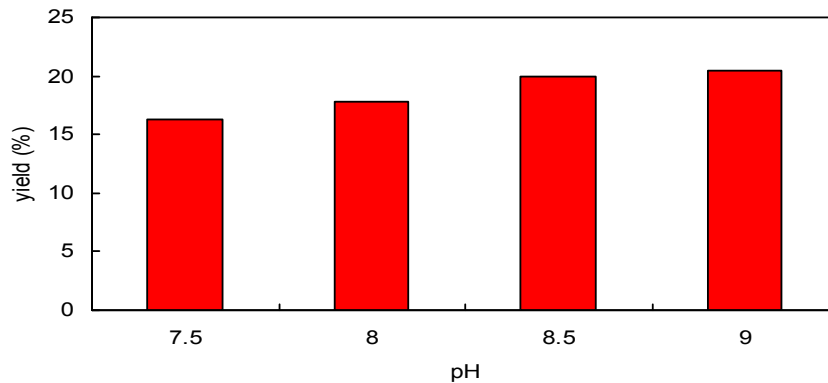


Fig. 1. Effect of alkali pH on SPI yield.

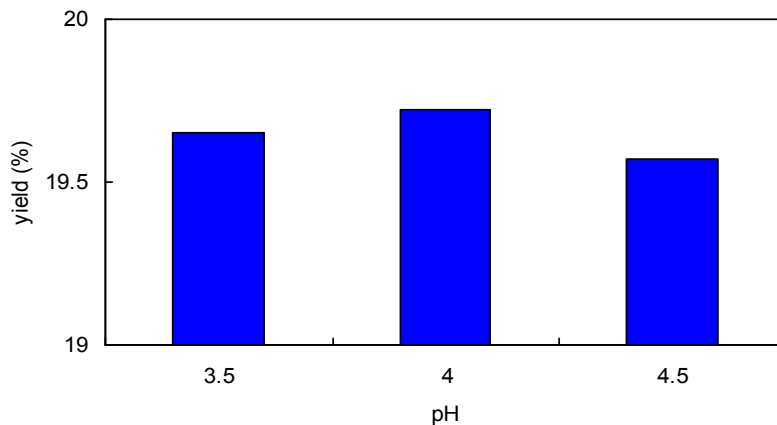


Fig. 2. Effect of acid pH on SPI yield.

#### 마) 분리대두단백질 (SPI, soybean protein isolate) 제조공정

분리대두단백을 제조하기 위하여 대두 분말 1 kg을 5 배의 증류수를 가하여 균일하게 분산시키고 1 M NaOH로 pH 8.5를 맞추어 55℃에서 3시간동안 교반하여 원심분리 한다. 상층액을 취하여 1 M HCl로 pH 4.5로 조정하여 원심분리 하고, 침전물을 취한 후 이를 3번 반복한다. 침전물을 증류수로 세척한 뒤 동결건조 한다. 이러한 방법으로 황대두, 아가 3호, 아가 4호를 분리대두단백질을 제조한 결과, 각각의 수율은 아가3호 19.5%, 아가4호 19.4%와 황대두 19.7%로 나타났다.

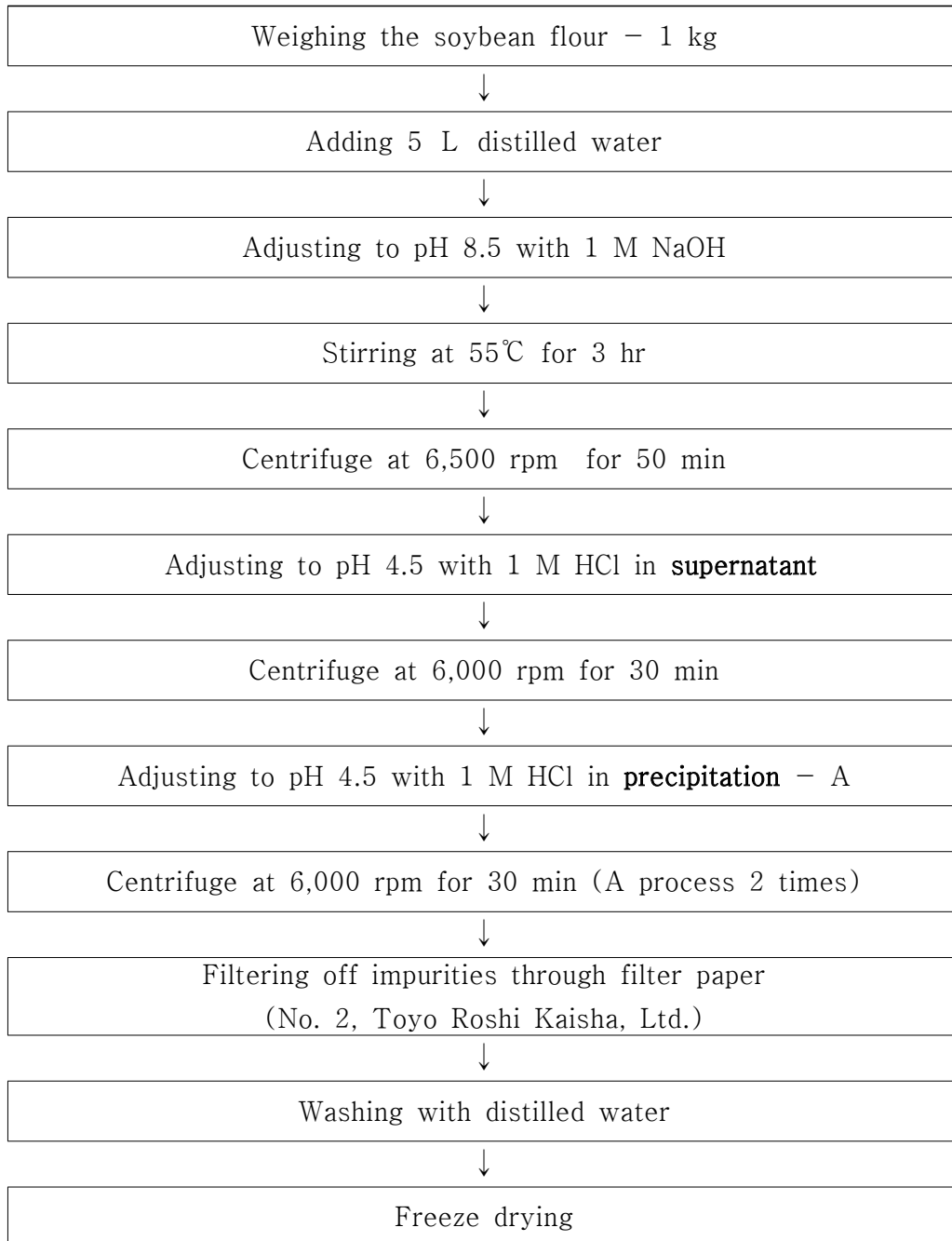


Fig. 3. Product procedure of soybean protein isolate (SPI)

바) 대두 단백질(SPI)의 일반성분

대두 단백질(SPI) 분말을 AOAC방법에 따른 일반성분을 분석한 결과는 Table 5와 같다. 황대두 분리 단백질의 일반성분은 단백질 87.5%, 수분 3.3%, 회분 3.5%, 지방 0.1%, 당질 5.5% 로 구성되어 탈지대두의 일반성분과 비교하면 단백질 함량이 49.9%에서 87.5%로 증가하였고, 다른 성분은 모두 감소하였다. 아가 3호 분리 단백

질의 일반성분은 단백질 77.7%, 수분 1.2%, 회분 0.6%, 지방 7.2%, 당질 13.3% 로 구성되어 다른 분리 단백질의 일반성분과 비교하면 단백질 함량이 낮다. 아가 4호 분리 단백질의 일반성분은 단백질 91.7%, 수분 1.2%, 회분 0.6%, 지방 0.4%, 당질 6.1% 로 구성되어 단백질 함량이 매우 높다.

Table 5. Chemical composition of SPI

Unit : %(dry base)					
SPI	Moisture	Crude ash	Crude fat	Crude protein	Carbohydrate
Soybean	3.3	3.5	0.1	87.5	5.5
Aga 3	1.2	0.6	7.2	77.7	13.3
Aga 4	1.2	0.6	0.4	91.7	6.1

## 2) SPI의 효소 가수 분해물 제조

### 가) 가수분해 효소선정

분리대두단백질(SPI, soybean protein isolate) 가수분해물을 제조하기 위한 가수 분해효소 선정을 위해 분말시료에 증류수 100 배를 가한 다음, 각 효소를 기질의 1% 넣어 혼합하여 효소의 최적온도와 pH에서 4 시간 동안 가수분해 하였다. 가수 분해물 3 mL를 취해 가수분해물에 단백질 및 효소를 침전 제거시키기 위해 20% TCA(Trichloroacetic acid) 3 mL를 가하여 원심분리(3000 rpm, 10 min)해서 상층액 만 취하였다. 그리고 상층액으로 280 nm의 흡광도 및 Brix를 측정하여 분리대두단 단백질(SPI, soy protein isolate) 분말의 가수분해효소를 선정하였다. SPI의 280 nm 흡광도와 Brix 측정결과는 Fig. 4.와 같이 나타났다.

SPI의 280 nm의 흡광도 측정결과 GC 106 효소처리에서 2.5으로 효과가 가장 좋았으며, Alcalase 2.4 L, Protamex 순으로 효과가 좋았다. Brix 측정결과는 Protamex 효소처리에서 8.6로 Brix가 가장 높으며 그 다음으로 Alcalase 2.4 L, Multifect Neutral이 높았다. 대두분말에 효소처리 가수분해하여 280 nm의 흡광도 측정과 Brix를 측정한 결과로 최적 가수분해 효소를 순위별로 선정한 결과, Alcalase 2.4 L, Protamex, Multifect Neutral을 정하였다.

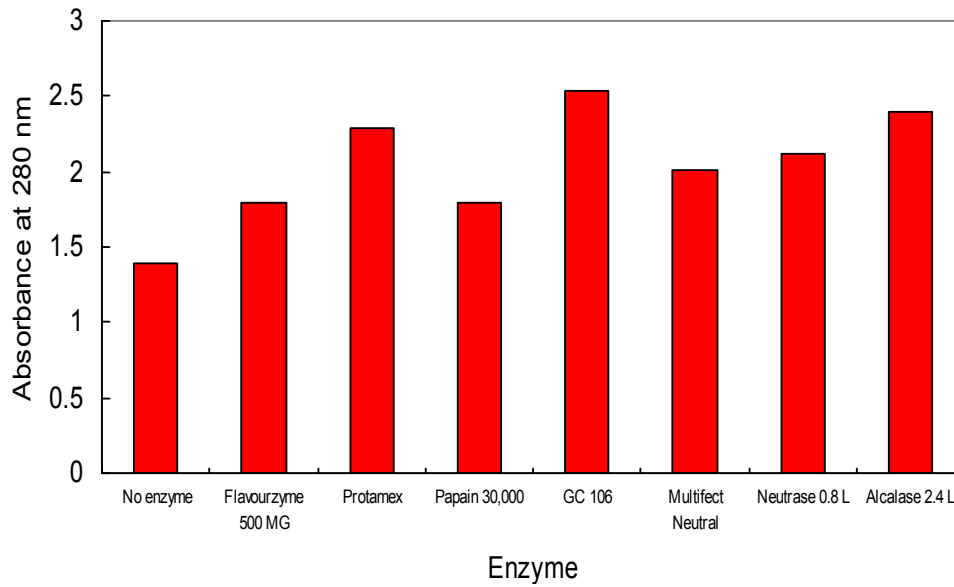


Fig 4. Effects of enzyme on the SPI hydrolysate in absorbance at 280 nm.

\* Substrate concentration : 1% \* Enzyme concentration : 1%

\* Hydrolysis time : 4 hour

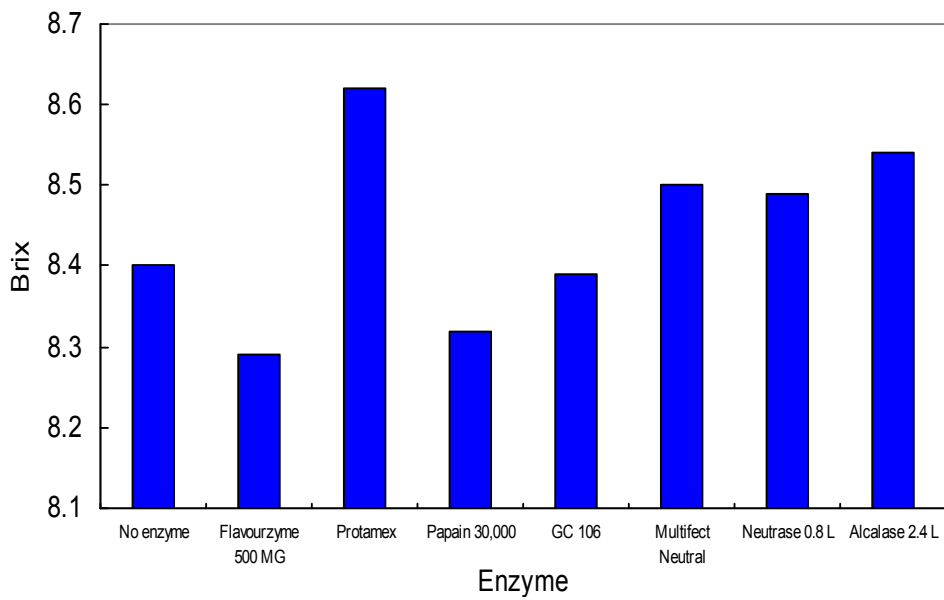


Fig 5. Effects of enzyme on the SPI hydrolysate in brix.

\* Substrate concentration : 1% \* Enzyme concentration : 1%

\* Hydrolysis time : 4 hour

## 나) 가수분해 효소 농도선정

선정된 효소의 최적 효소농도를 선정하기 위하여 0, 0.5, 1, 1.5%의 효소농도별 가수분해물의 280 nm에서의 흡광도와 Brix를 측정하였으며, 관능검사를 통해 각 가수분해물의 향, 색과 맛에 관하여 7점 척도를 이용하여 관능평가 한 결과는 Fig. 6., 7. 과 Table 6.과 같다. 효소의 농도를 0, 0.5, 1, 1.5% 범위에서 가수분해 했을 때, 효소의 처리 농도가 높을수록 280 nm에서의 흡광도와 Brix 값이 증가되는 것으로 나타났다. 280 nm에서의 흡광도에서는 Alcalase 2.4 L 1.5%에서 가장 높았으며, Brix에서는 Protamex 1.5%에서 효과가 좋게 나타났다. 관능검사에서 향은 보통인 4점 이었으며, 탁도는 반응물이 불투명하여 낮은 점수를 받았다. 색은 Alcalase 2.4 L의 경우 약한 갈색이 나타났는데 이는 65°C에서 가수분해하는 과정 중 갈변현상이 생긴 것으로 판단된다. 맛은 Alcalase 2.4 L에서 쓴맛이 강했고, Multifect Neutral는 관능 평가 중 가장 좋은 점수를 나타내었다. SPI에 효소처리 가수분해에서 최적 분해 효소 농도를 선정한 결과 효소의 농도는 많이 첨가할수록 가수분해도는 커지나, 경제적이고 효과가 높은 효소 1% 첨가를 선정하였다.

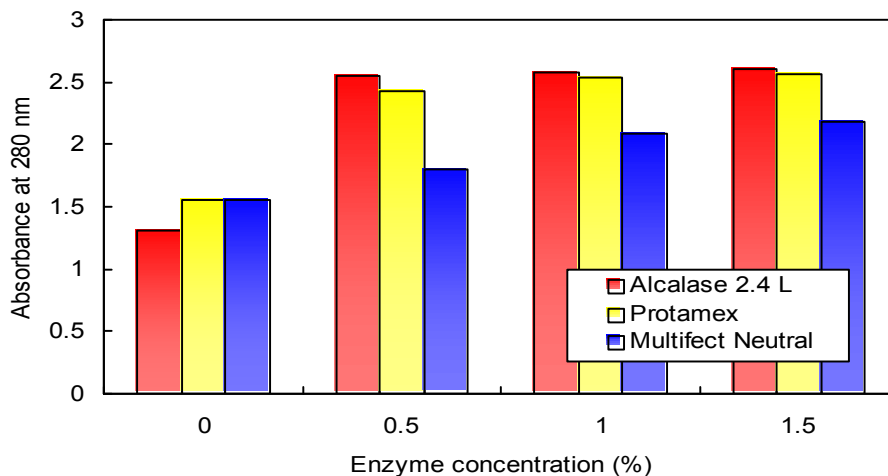


Fig. 6. Effects of enzyme concentration on the SPI hydrolysate in absorbance at 280 nm.

\* Substrate concentration : 1% \* Hydrolysis time : 4 hour

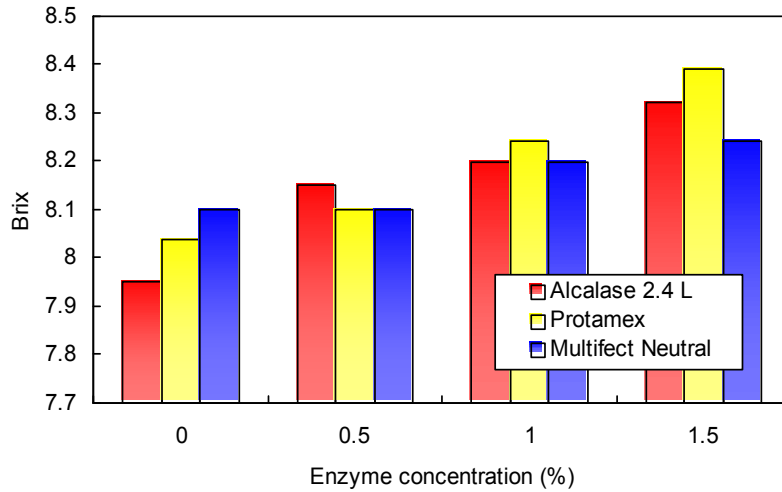


Fig. 7. Effects of enzyme concentration on the SPI hydrolysate in brix.

\* Substrate concentration : 1% \* Hydrolysis time : 4 hour

Table 6. Sensory attribute of enzyme concentration on the SPI hydrolysate

Enzyme	Temp. (°C)	Enzyme concentration (%)	Sensory attribute		
			Flavor	Color	Taste
Alcalase 2.4 L	65	0	5.25 ± 1.77	4	5.5 ± 0.7
		0.5	4	1.8 ± 0.4	3.5 ± 0.7
		1	4	1.8 ± 0.4	3
		1.5	3.75 ± 0.35	1.8 ± 0.4	2.8 ± 0.4
Protamex	55	0	4	4	5.5 ± 0.7
		0.5	4	1.8 ± 0.4	3.5 ± 0.7
		1	4	1.8 ± 0.4	3.3 ± 1.1
		1.5	4	1.8 ± 0.4	3 ± 1.4
Multifect Neutral	55	0	5.25 ± 1.77	4	5.5 ± 0.7
		0.5	4	2.3 ± 1.1	5 ± 0.7
		1	4	2.3 ± 1.1	4.3 ± 1.8
		1.5	4	2.3 ± 1.1	3.5 ± 2.1

\* Substrate concentration : 1% \* Hydrolysis time : 4 hour

다) 효소 1% 첨가한 가수분해물의 ACE 저해

효소 1%를 첨가한 가수분해물의 ACE 저해활성 측정을 하고자 한다. ACE저해활성은 Cushman 등의 방법에 따라 측정하였다.

SPI 분말 1%에 각 효소를 1%씩 첨가하여 가수분해한 가수분해물의 ACE 저해활성도를 살펴본 결과, ACE 저해 활성도가 가장 높은 효소는 Alcalase 2.4 L로

59.5%를 나타내었고, 그 다음은 Protamex로 40.6%를 나타내었다. Multifect Neutral은 17.9%로 효소의 가수분해가 거의 이루어지지 않아 ACE 저해 활성도 역시 낮다고 판단되어 진다.

SPI의 가수분해 효소는 280 nm의 흡광도와 Brix를 측정 한 값, 관능검사를 통한 결과와 ACE 저해 활성도 모두 높은 값을 나타낸 Alcalase 2.4L로 선정하였다.

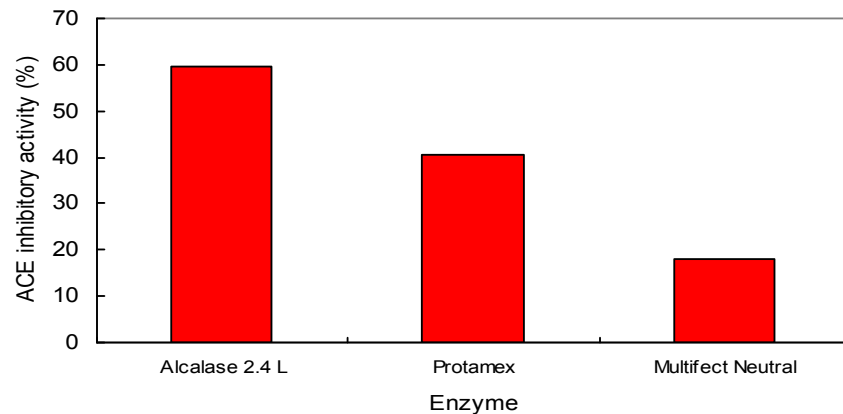


Fig. 8. ACE inhibitory activity on the SPI hydrolysate.

\* Substrate concentration : 1%

\* Enzyme concentration : 1%

\* Hydrolysis time : 4 hour

#### 라. 가수분해 시간선정

SPI에 Alcalase 2.4 L 1%를 첨가하여 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 시간으로 가열하여 최적 가수분해 시간을 선정을 위한 가수분해 시간별 가수분해물의 280 nm에서의 흡광도, Brix 측정과 7점(매우우수) 평점 범으로 하여 관능평가를 한 결과는 Fig. 9.와 Table 7.과 같다. 280 nm에서의 흡광도 측정결과는 0시간에서 2.1, 30분 가수분해 해서 2.6이며, 5, 6시간 가수분해 하였을 때 2.8로 가장 높았다. Brix는 6시간 가수분해 했을 때 9로 가장 높았고, 그 다음이 4시간과 5시간 가수분해에서 8.9였다. 관능검사 결과, 향은 6시간 가수분해 했을 때 4.3으로 가장 높았고, 탁도는 전체적으로 탁해 3-5.3의 범위를 나타내었다. 맛은 1시간 가수분해 하였을 때, 2.7로 가장 높았으나, 쓴맛이 강해 전체적으로 1.3-2.7의 범위를 나타내었다.

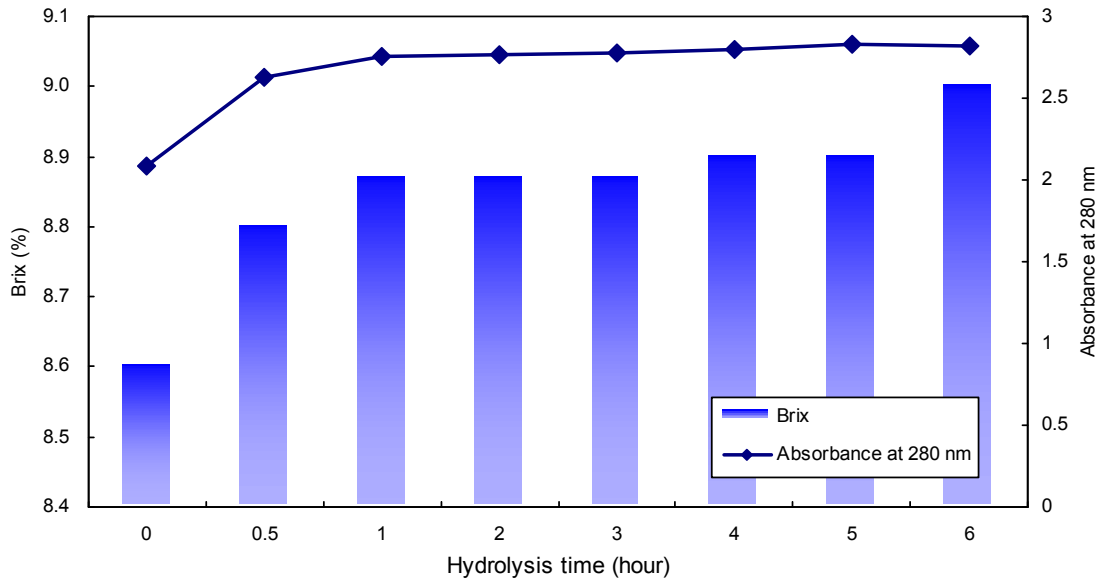


Fig. 9. Effects of enzyme on the hydrolysis time of SPI.

\* Substrate concentration : 1%

\* Enzyme concentration : 1%

Table 7. Sensory attribute of enzyme concentration on the hydrolysis time of SPI

Sensory attribute	Hydrolysis time (hour)					
	1	2	3	4	5	6
Flavor	2.3	2.7	2.7	3.3	4	4.3
Color	3	3.7	4.7	5	5.3	5.3
Taste	2.7	2	1.67	1.7	1.7	1.3

\* Substrate concentration : 1%

\* Enzyme concentration : 1%

위의 결과, 각 식품 단백질의 가수분해 시간으로 효과는 4시간에서 높았고, 경제적인 면을 고려했을 때 1시간이 적당한 것으로 나타나, 각 가수분해물의 ACE 저해 활성을 측정하였다. 가수분해물의 ACE 저해 활성 측정결과, 1시간 가수분해한 가수분해물은 33.3%, 4시간 가수분해한 가수분해물은 59.5%의 효과를 나타내어 최적 가수분해 시간은 4시간으로 선정하였다.



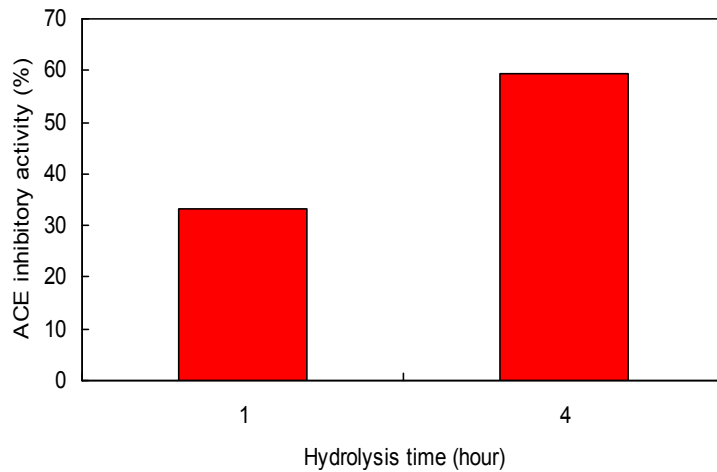


Fig. 10. ACE inhibitory activity on the hydrolysis time of SPI.

\* Substrate concentration : 1%

\* Enzyme concentration : 1%

마) 기질에 대한 농도 선정

SPI의 농도를 선정하기 위한 최적 기질의 농도는 1, 5, 7, 10, 15% 범위로 정하였고, 이에 Alcalase 2.4 L 1%를 첨가하여 65°C에서 4시간 가수분해 하였다. 가수분해 결과 기질 농도가 증가함에 따라 280 nm에서의 흡광도와 Brix가 증가하는 것으로 나타났다. SPI의 280 nm에서의 흡광도는 1% 2.8에서 5% 3.5로 증가한 후 큰 차이를 나타내지 않아 SPI의 최적 농도를 5%로 정하였다.

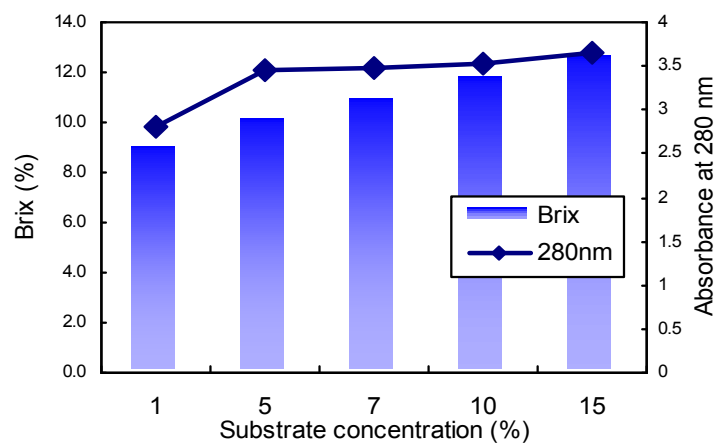


Fig. 11. Effect of substrate concentration on the hydrolysis of SPI.

\* Alcalase 2.4 L concentration : 1%

\* Hydrolysis time : 4 hour

바) SPI 가수분해물의 제조과정

SPI 가수분해물을 제조하기 위해, SPI 분말 100 g에 증류수 2 L (5%)를 첨가하였다. pH 6.84 인 SPI 용액에 Alcalase 2.4 L을 1% (v/w) 첨가하여 65°C 에서 4시간 가열하여 가수분해하였다. 가열시간이 지날수록 붉은 갈색이 나타났다. 가수분해를 마친 후 효소의 반응정지를 위하여 80°C에서 5분간 열처리하였다. 4°C에서 냉각시킨 후 가수분해 잔여물이 가라앉아 층이 분리된 것을 관찰할 수가 있어 이를 7,000 RPM (7,519×g)에서 40분 동안 원심 분리하였다. 원심분리 한 상등액을 취하여 Filter paper(No. 2, Toyo Roshi Kaisha, Ltd.)로 잔여물을 제거한 후, 60°C에서 농축하였다. 농축액을 냉동시켜, 진공 동결 건조하여 SPI 가수분해물을 제조하였고 수율은 38.3%로 나타났다.

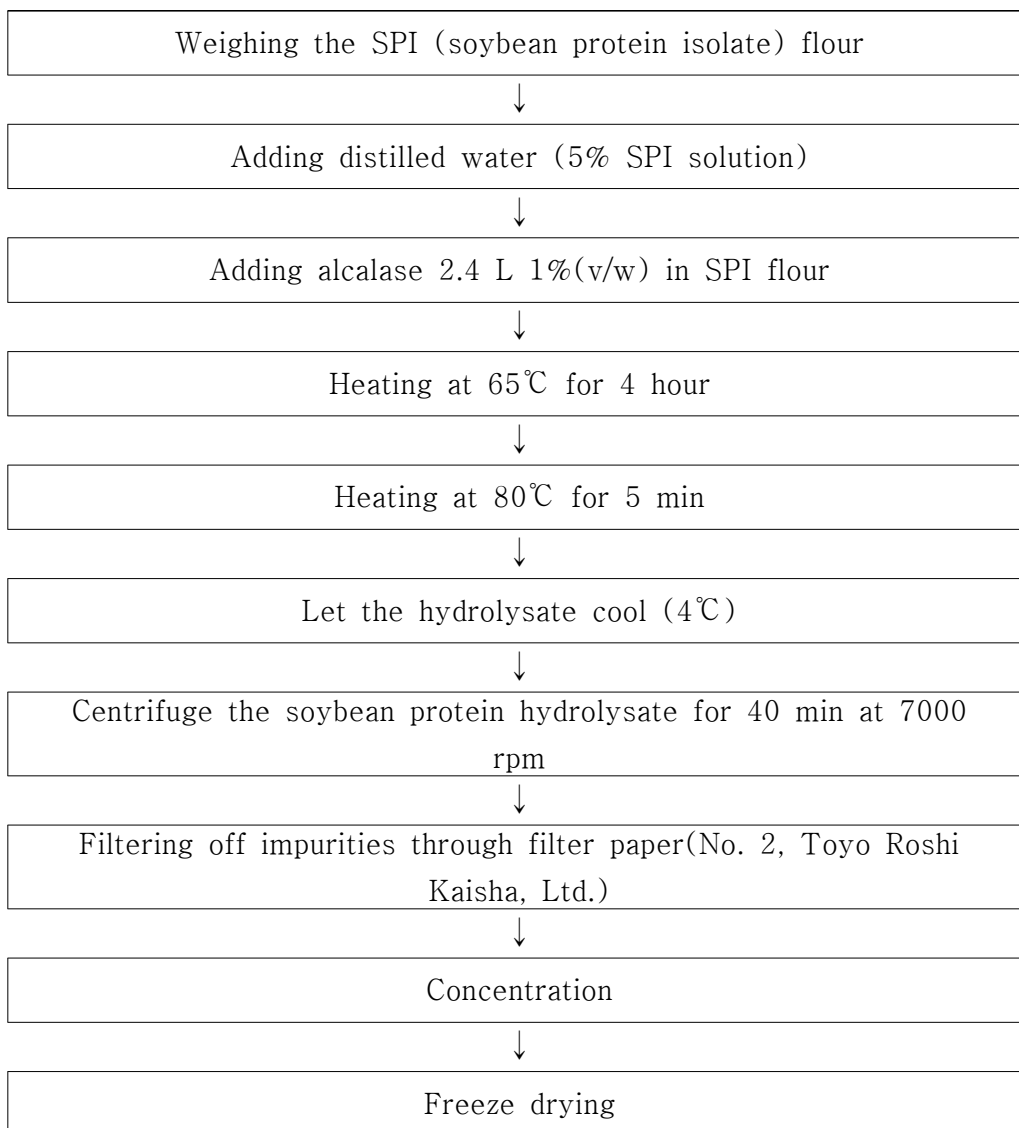


Fig. 12. Product procedure of SPI hydrolysate.

사) SPI 가수분해물의 일반성분

SPI 가수분해물의 일반성분은 AOAC방법에 따라 일반성분을 분석한 결과는 Table 7. 과 같다. SPI 가수분해물의 일반성분은 단백질 83.4%, 수분 5.6%, 회분 5.8%, 지방 0.1%, 당질 5.1% 로 구성되었다.

Table 7. Chemical composition of SPI hydrolysate

Sample	Moisture	Crude ash	Crude fat	Unit : %(dry base)	
				Crude protein	Carbohydrate
SPI hydrolysis	5.6	5.8	0.1	83.4	5.1

아) SPI 가수분해물의 ACE 저해 활성 측정

SPI를 가수분해 제조한 가수분해물의 농도를 다르게 하여 ACE저해 활성과 IC<sub>50</sub>을 측정하였다. 그 결과 SPI 가수분해물의 IC<sub>50</sub>은 79.9  $\mu$ g를 나타냈다.

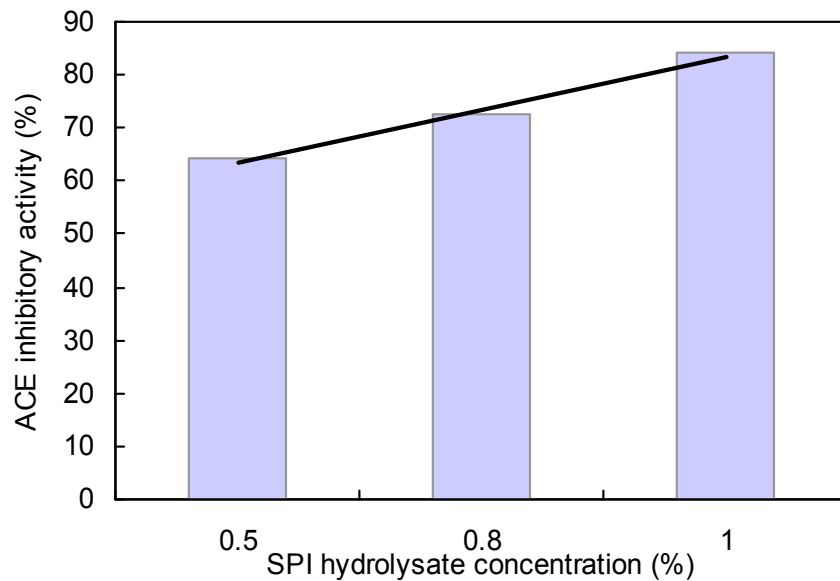


Fig. 13. ACE inhibitory activity on SPI hydrolysate.

자) SPI 가수분해물의 관능평가

SPI 가수분해물을 물에 녹여 1%의 가수분해물 용액을 만들어 색, 향과 쓴맛의 강도에 3가지를 5점 척도를 이용하여 관능평가를 하였다. 패널은 총 7명이 하였고, 색, 향과 쓴맛의 강도 3가지 항목에 대하여 5점 가장 좋다, 3점 보통, 1점 나쁘다. 라고 평가하였다. 평가결과, 향은 약한 단향이 나서 3.9점을 나타냈고, 색은 탁한 정도가 약하여 3.9점을 얻었다. 쓴맛의 강도는 가수분해물의 특유의 쓴맛이 약하고 단 맛이 느껴져 3.7점을 얻었다.

Table 8. Sensory attribute on SPI hydrolysate

Sensory attribute	SPI hydrolysis
Color	3.9 ± 0.7
Flavor	3.9 ± 0.7
Taste bitter	3.7 ± 0.5

3) SPI (soybean protein isolate) 가수분해물의 분리 및 정제

가) 분자량에 따른 SPI (soybean protein isolate)의 가수분해물

효소로 가수분해하여 진공동결 건조한 SPI 가수분해물을 Amincon 장치를 이용하여 분획하여 진공동결 건조하여 분자량 분포도를 조사하였다. 대두단백질 분말에 Alcalase 2.4 L 1%를 첨가하여 65℃에서 4시간 가수분해하여 동결건조 하였다. 분획에 cut-off 1,000 dalton, 3,000 dalton, 10,000 dalton의 membrane (YM10, Amicon Co.)을 장착한 한외여과장치 (Amicon Co.)를 사용하였다. SPI 가수분해물을 membrane으로 분획한 결과, 10,000 dalton이상이 31.9%, 10,000 - 3,000 dalton이 24.2%, 3,000 - 1,000 dalton이 26.8%, 그리고 1,000 dalton이하의 획분이 17.2%의 수율을 나타내었다. 또한 SPI 가수분해물의 분획별 ACE 저해활성의 IC<sub>50</sub>을 측정 한 결과, 10,000 dalton이상이 355.1 μg, 10,000 - 3,000 dalton이 94.8 μg, 3,000 - 1,000 dalton이 94.2 μg, 그리고 1,000 dalton이하의 획분이 81.9 μg을 나타내었다.

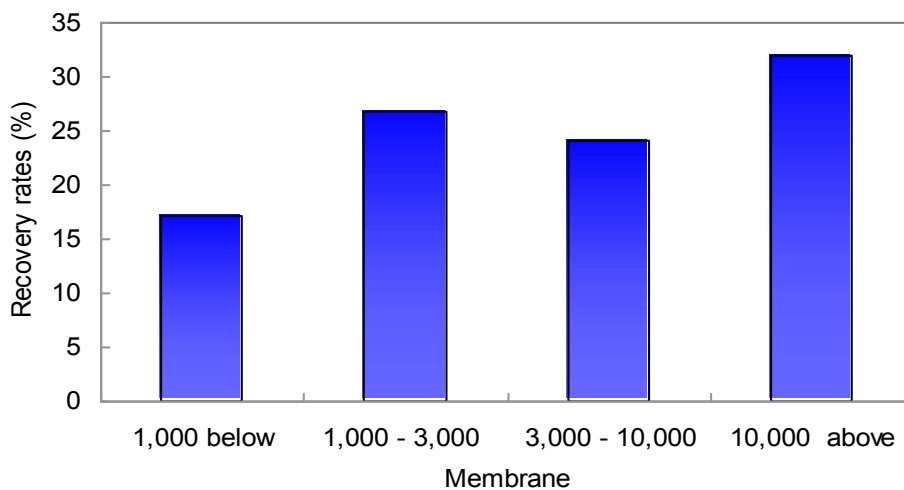


Fig. 14. Recovery rates of SPI hydrolysate fractionated by membrane.

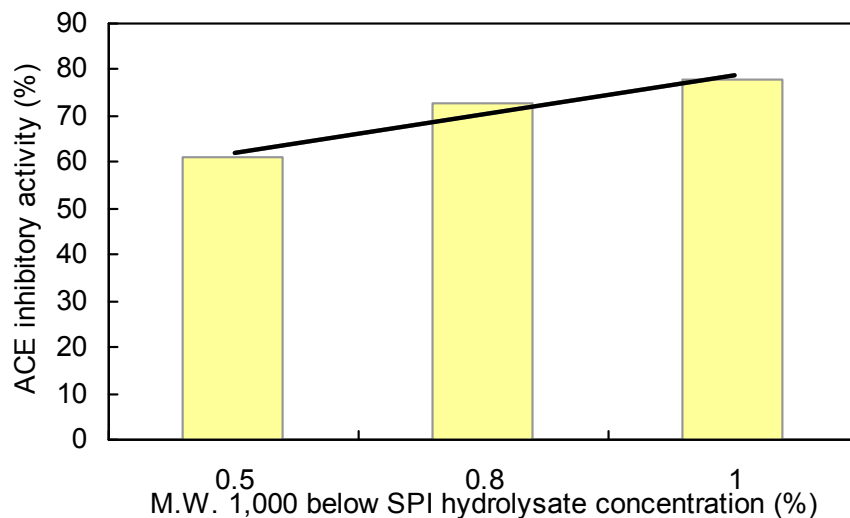


Fig. 15. ACE inhibitory activity of SPI hydrolysate (M.W. 1,000 below)

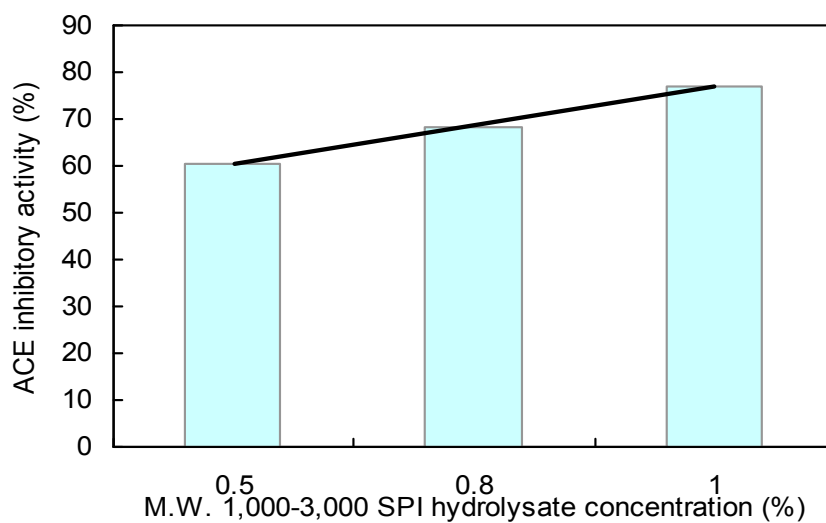


Fig. 16. ACE inhibitory activity of SPI hydrolysate (M.W. 1,000-3,000)

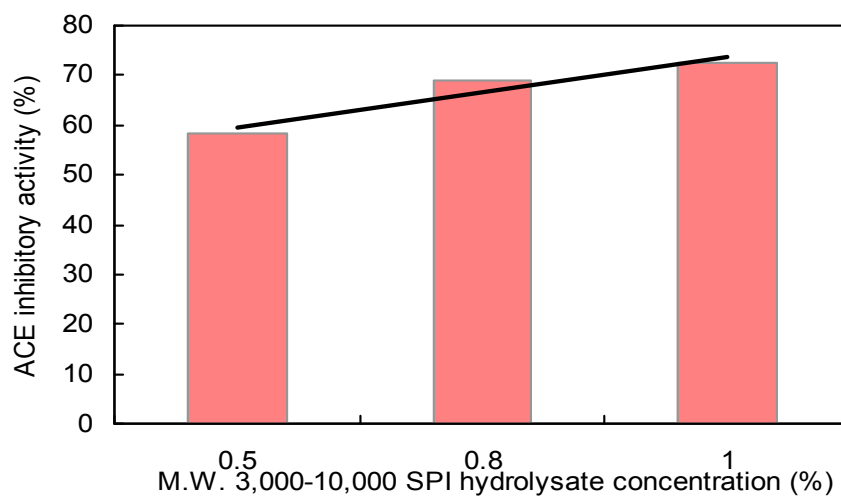


Fig. 17. ACE inhibitory activity of SPI hydrolysate (M.W. 3,000-10,000)

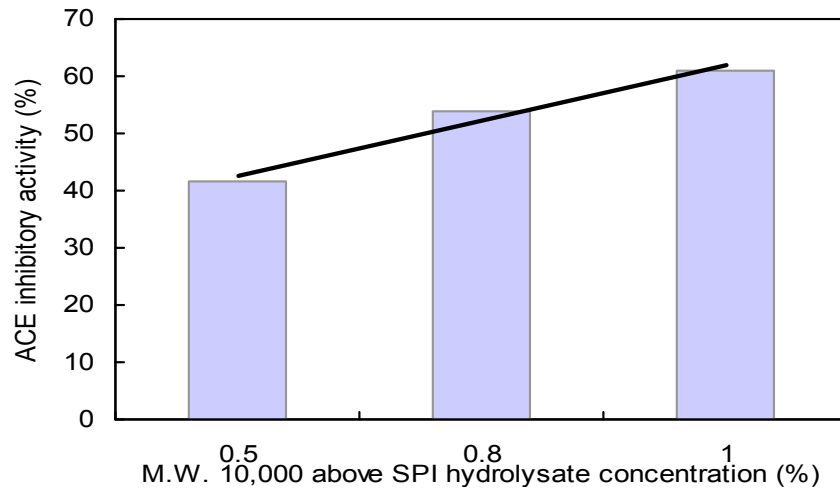


Fig. 18. ACE inhibitory activity of SPI hydrolysate (M.W. 10,000 above)

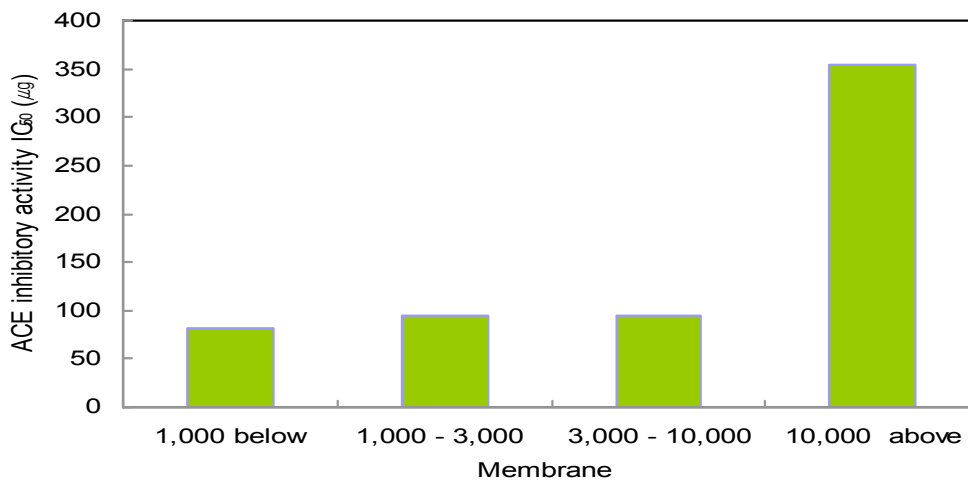


Fig. 19. ACE inhibitory activity IC<sub>50</sub> of SPI hydrolysate fractionated by membrane.

#### 나) ODS AQ column에 의한 reverse-phase chromatography

한외여과로 얻은 SPI 가수분해물 중 ACE 저해 효과가 뛰어난 분자량 1,000 Da 이하의 저분자 peptide를 염의 제거와 peptide분획을 동시에 실시할 수 있는 ODS AQ를 충전한 column (26 × 300 mm, Vt: 170 mL)을 사용하여 분리정제 하였다. 이때 용출액은 HPLC용 water를 A용매, HPLC용 ethanol을 B용매로 하여 gradient 조건에서 분리하였다. 유속은 10 mL/min로 용출시켜 10 mL씩 분취하였으며, 215 nm, 280 nm에서 detection 하고, 각 peak를 모아 감압농축한 후 진공 동결건조 하였다. 이 chromatogram을 elution volume 330 mL까지 ethanol 농도를 0-60%까지 gradient 하여 7개로 분획하여, SO1 (tube no. 11-13), SO2 (17-18), SO3 (19-20), SO4 (21-22), SO5 (23-24), SO6 (25-26), SO7 (27-28)의 분획물을 얻었다.

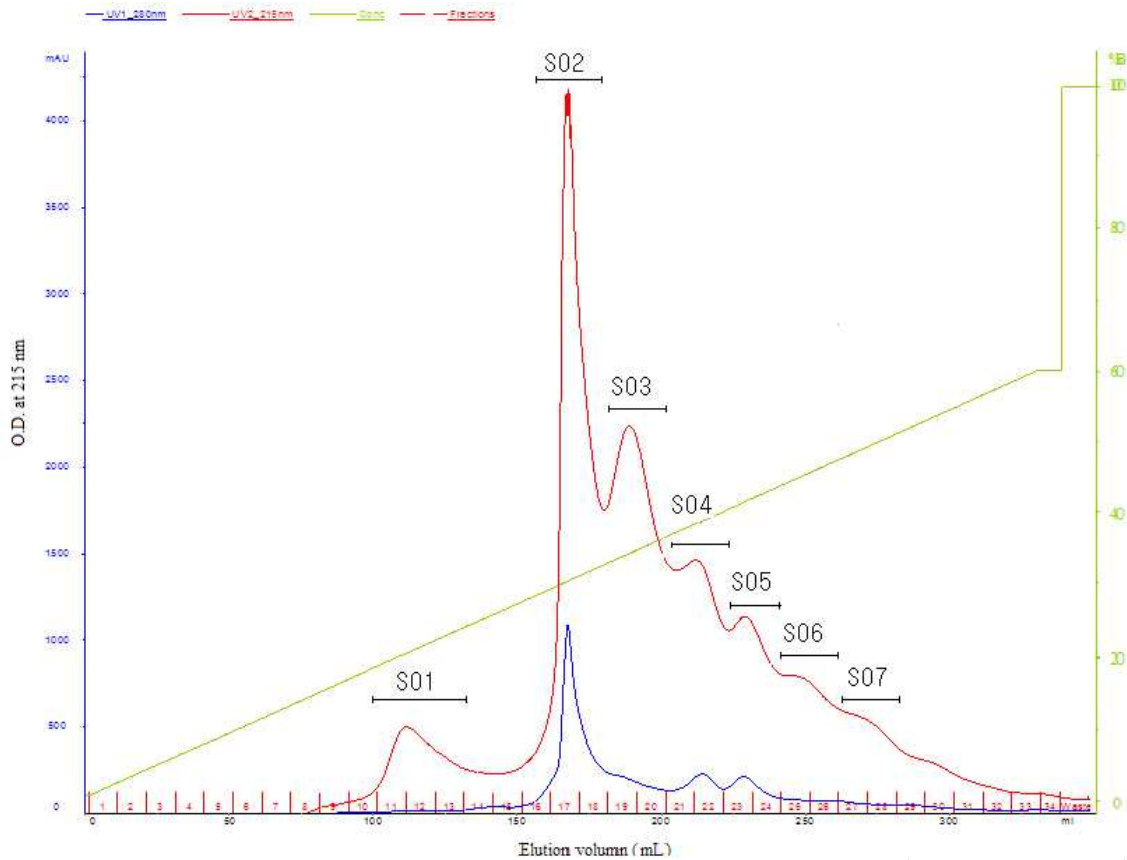


Fig 20. Reverse-phase HPLC chromatogram of SPI hydrolysate (1,000 Da below) on ODS AQ column (26×300 mm).

Eluent: A solution (water), B solution (ethanol). Gradient: 0-60% B solution (330 mL). Flow rate: 10 mL/min, Fraction: 10 mL/tube. Monitoring absorbance: 215 nm, 280 nm. Fractionation: S01 (tube no. 11-13), S02 (17-18), S03 (19-20), S04 (21-22), S05 (23-24), S06 (25-26), S07 (27-28)

분획물의 수율은 S01 (20.6%), S02 (26.2%), S03 (18.1%), S04 (6.0%), S05 (16.6%), S06 (5.3%), S07 (7.2%)로 나타났다. ACE 저해활성은 S01 (67.0%), S02 (79.8%), S03 (81.0%), S04 (84.5%), S05 (86.5%), S06 (83.7%), S07 (69.5%)로 나타났다.

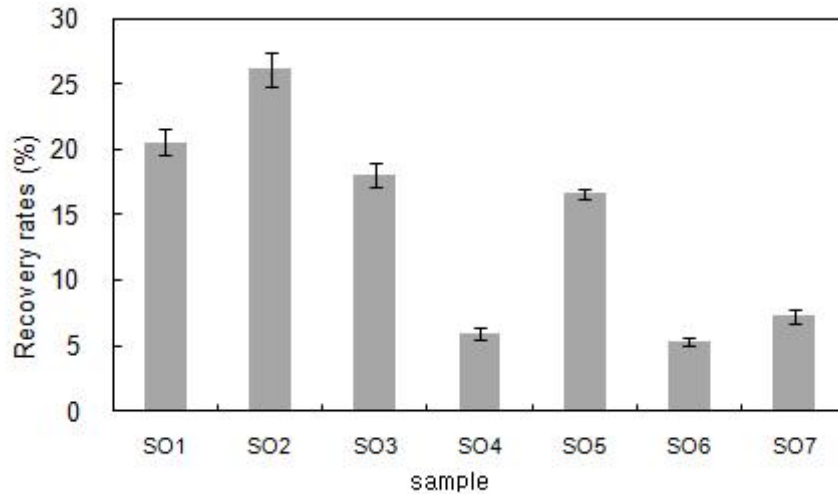


Fig. 21. Recovery rates of active fractions on ODS AQ column chromatography.

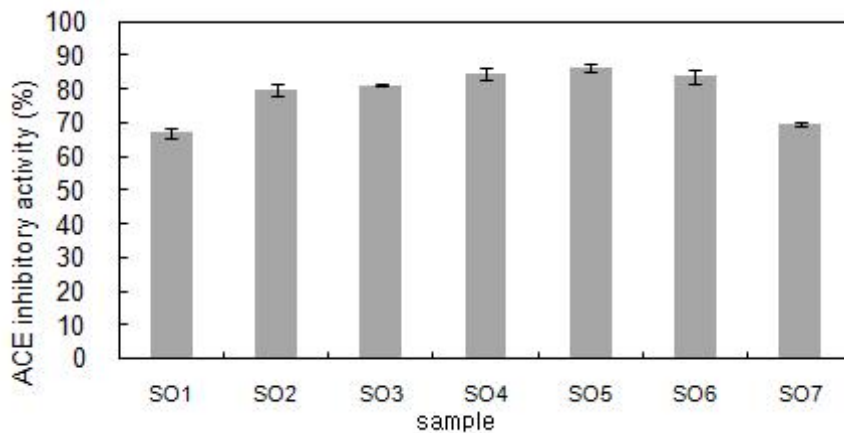


Fig. 22. ACE inhibitory activity of active fractions on ODS AQ column chromatography.

다) Vydac C18 column에 의한 reversed-phase chromatography (RPC)

ODS AQ column을 통해 분리한 획분 중 ACE저해활성과 수율 모두 뛰어난 SO5 획분을 Vydac C18 column (10 × 250 mm, Vt: 19.6 mL)을 사용하여 분리정제 하였다. 이때 용출액은 0.1% TFA in water를 A용매, 0.1% TFA in acetonitrile (ACN)을 B용매로 하여 0-10%까지 gradient 조건에서 분리하였다. 유속은 2 mL/min로 용출시켜 2 mL씩 분취하였다. 이 chromatogram을 elution volume 80 mL에서 SO5 획분을 SO5V1 (tube no. 6)과 SO5V2 (7-8) 로 분취하였다. 이를 1 mL로 농축하여 50  $\mu$ L를 첨가하여 ACE저해효과를 측정한 결과, SO5V1 (8.9%)과



SO5V2 (13.6%)으로 나타났다.

다시, SO5V1과 SO5V2 획분을 용매 3% ACN, 0.07% TFA in water에 재분획하여 단일 peak SO5V1V1, SO5V1V2과 SO5V2V1, SO5V2V2를 각각 얻었다. 이들을 1 mL로 농축하여 50  $\mu$ l를 첨가하여 ACE저해효과를 측정한 결과, SO5V2V2 획분이 12.2%로 가장 높게 나타났다.

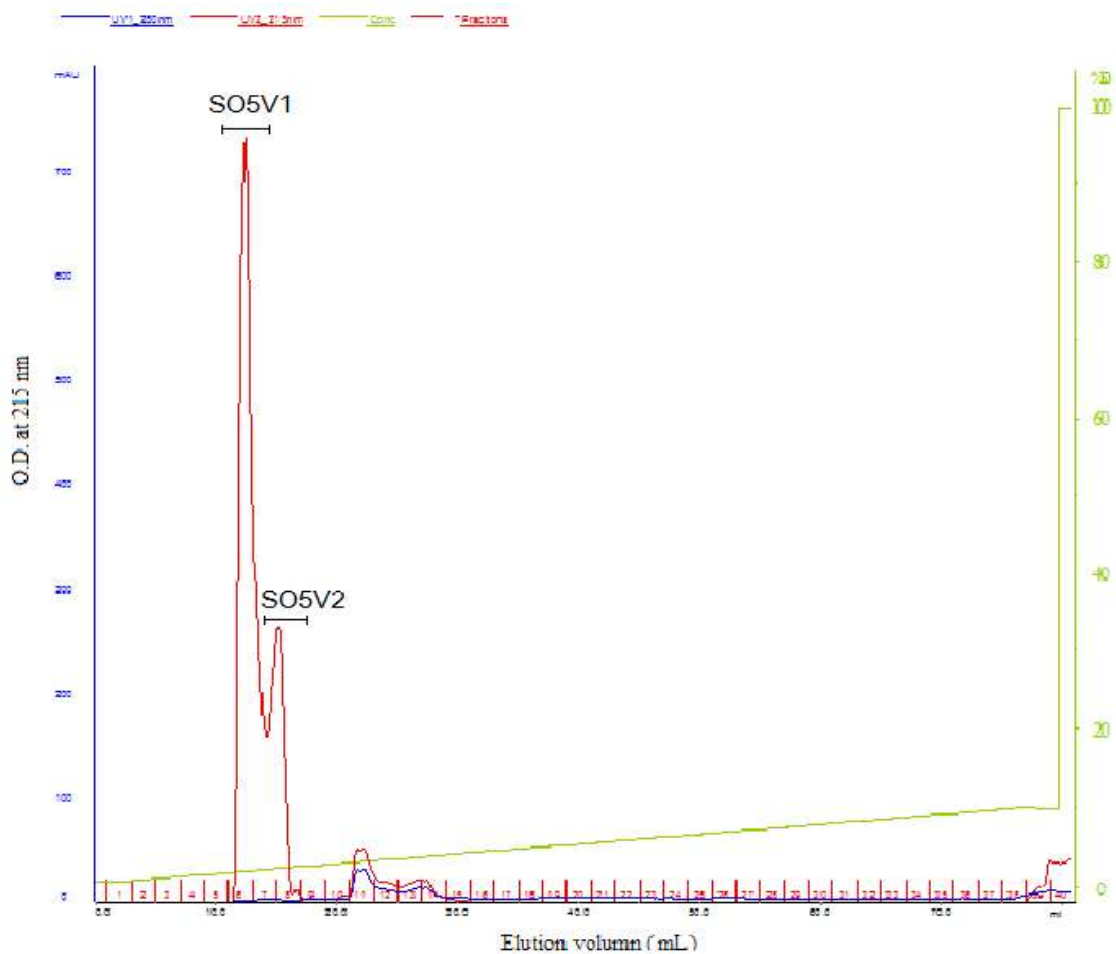


Fig 23. Reverse-phase HPLC chromatogram of SPI peptide (SO5) on Vydac C18 column (10 × 250 mm).

Eluent: A solution (0.1% TFA in water), B solution (0.1% TFA in ACN). Gradient: 0-10% B solution (80 mL). Flow rate: 2 mL/min, Fraction: 2 mL/tube. Monitoring absorbance: 215 nm, 280 nm. Fractionation: SO5V1 (tube no. 6), SO5V2 (7-8)

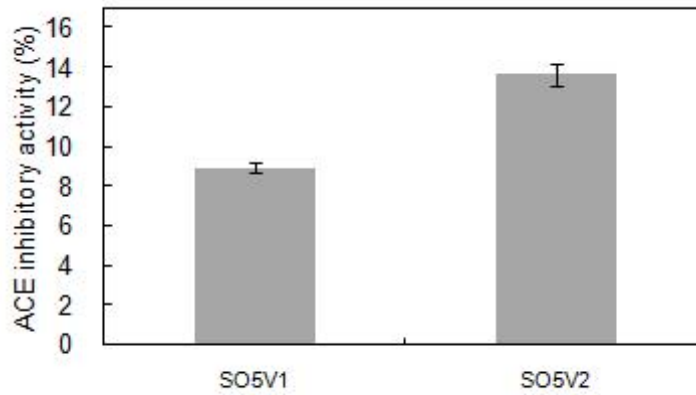


Fig. 24. ACE inhibitory activity of active fractions on Vydac C18 column chromatography.

\*Sample: adding 50  $\mu$ l among each fraction 1 mL

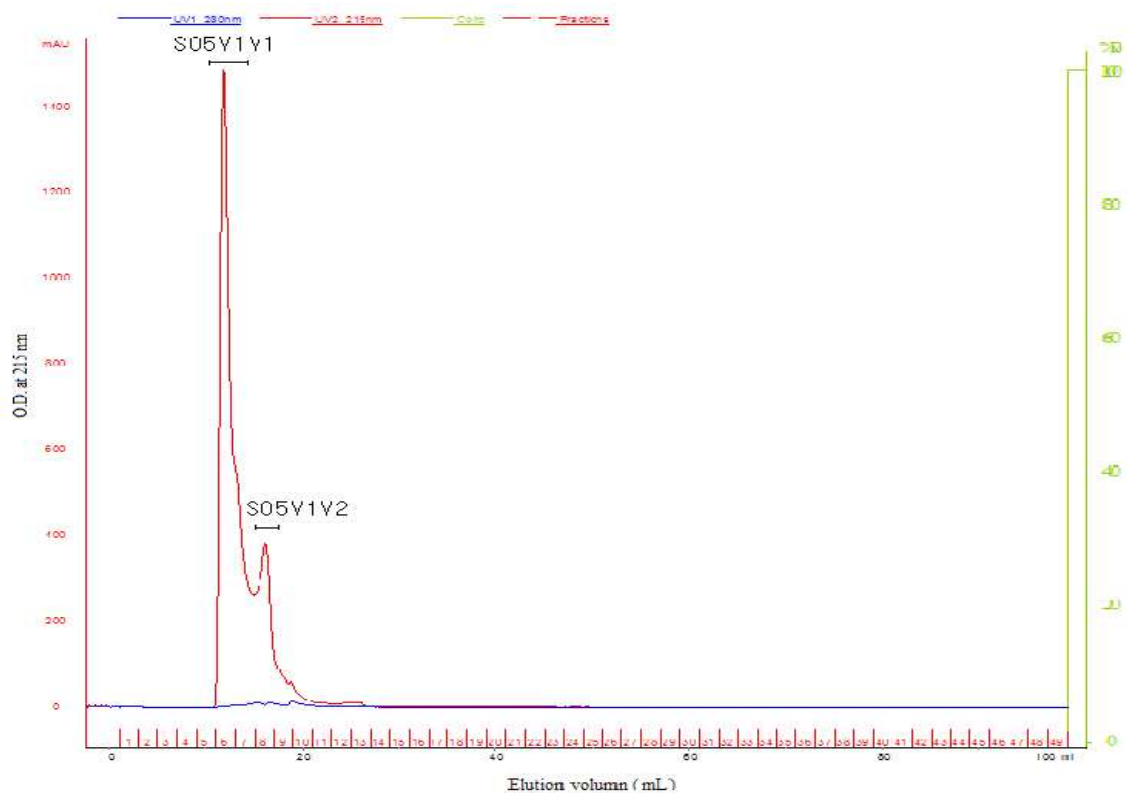


Fig 25. Reverse-phase HPLC chromatogram of SPI peptide (SO5V1) on Vydac C18 column (10  $\times$  250 mm).

Eluent: 3% ACN and 0.07% TFA in water. Flow rate: 2 mL/min, Fraction: 2 mL/tube. Monitoring absorbance: 215 nm, 280 nm. Fractionation: SO5V1V1 (tube no. 6-7), SO5V1V2 (8)

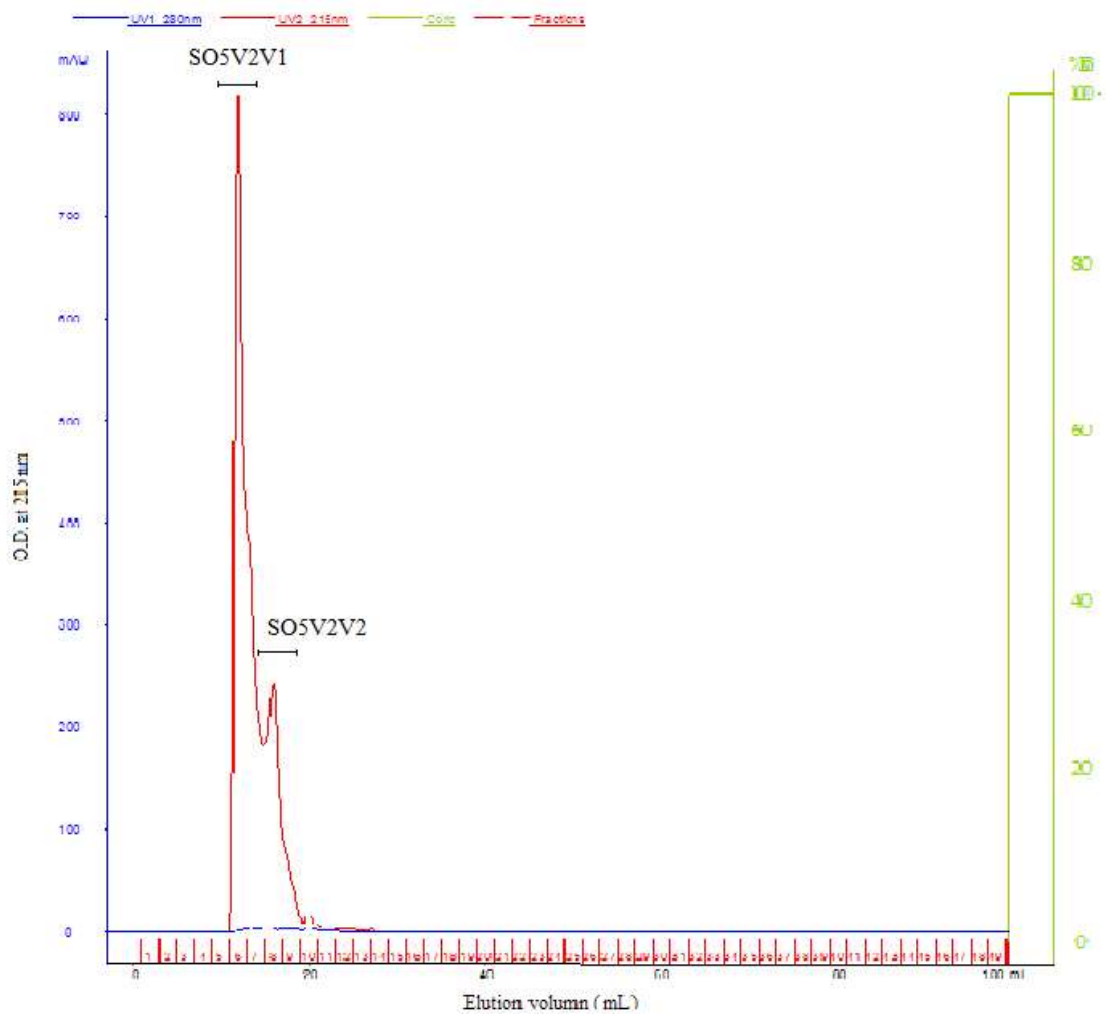


Fig 26. Reverse-phase HPLC chromatogram of SPI peptide (SO5V2) on Vydac C18 column (10 × 250 mm).

Eluent: 3% ACN and 0.07% TFA in water. Flow rate: 2 mL/min,  
 Fraction: 2 mL/tube. Monitoring absorbance: 215 nm, 280 nm.  
 Fractionation: SO5V2V1 (tube no. 6-7), SO5V2V2 (8-9)

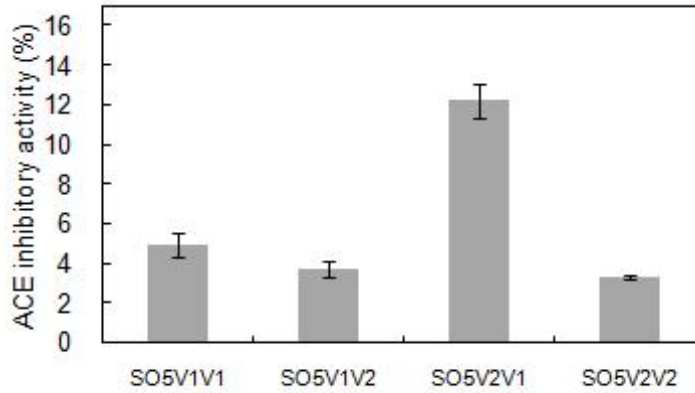


Fig. 27. ACE inhibitory activity of active fractions on Vydac C18 column chromatography.

\*Sample: adding 50  $\mu$ l among each fraction 1 mL

라) Superdex peptide HR column에 의한 gel permeation chromatography

Vydac C18 column을 통해 분리한 획분 중 ACE저해활성이 뛰어난 SO5V2V1 획분을 Superdex peptide HR column (10 × 300 mm, Vt: 24 mL)으로 분리정제 하였다. 이때 용출액은 3차 증류수로 유속은 0.5 mL/min로 용출시켜 1 mL씩 분취하였다. 이 chromatogram을 elution volume 35 mL에서 SO5V2V1 획분을 SO5V2V1P1 (tube no. 17)과 SO5V2V1P2 (18-19) 로 분취하였다. 이를 1 mL로 농축하여 50  $\mu$ l를 첨가하여 ACE저해효과를 측정한 결과, SO5V2V1P1 (1.6%)과 SO5V2V1P2 (6.2%)로 나타났다.

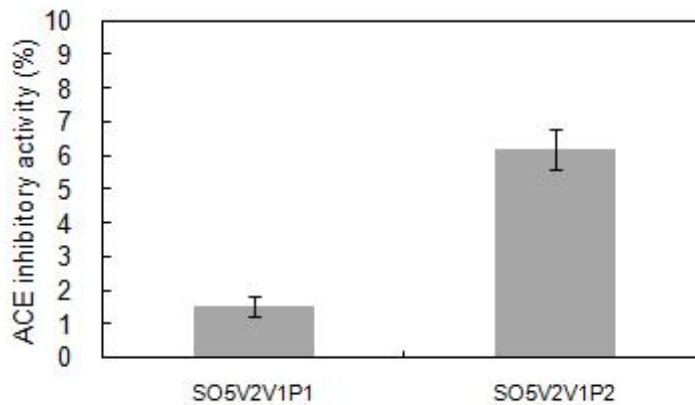


Fig. 28. ACE inhibitory activity of active fractions on Superdex peptide HR column chromatography.

\*Sample: adding 50  $\mu$ l among each fraction 1 mL

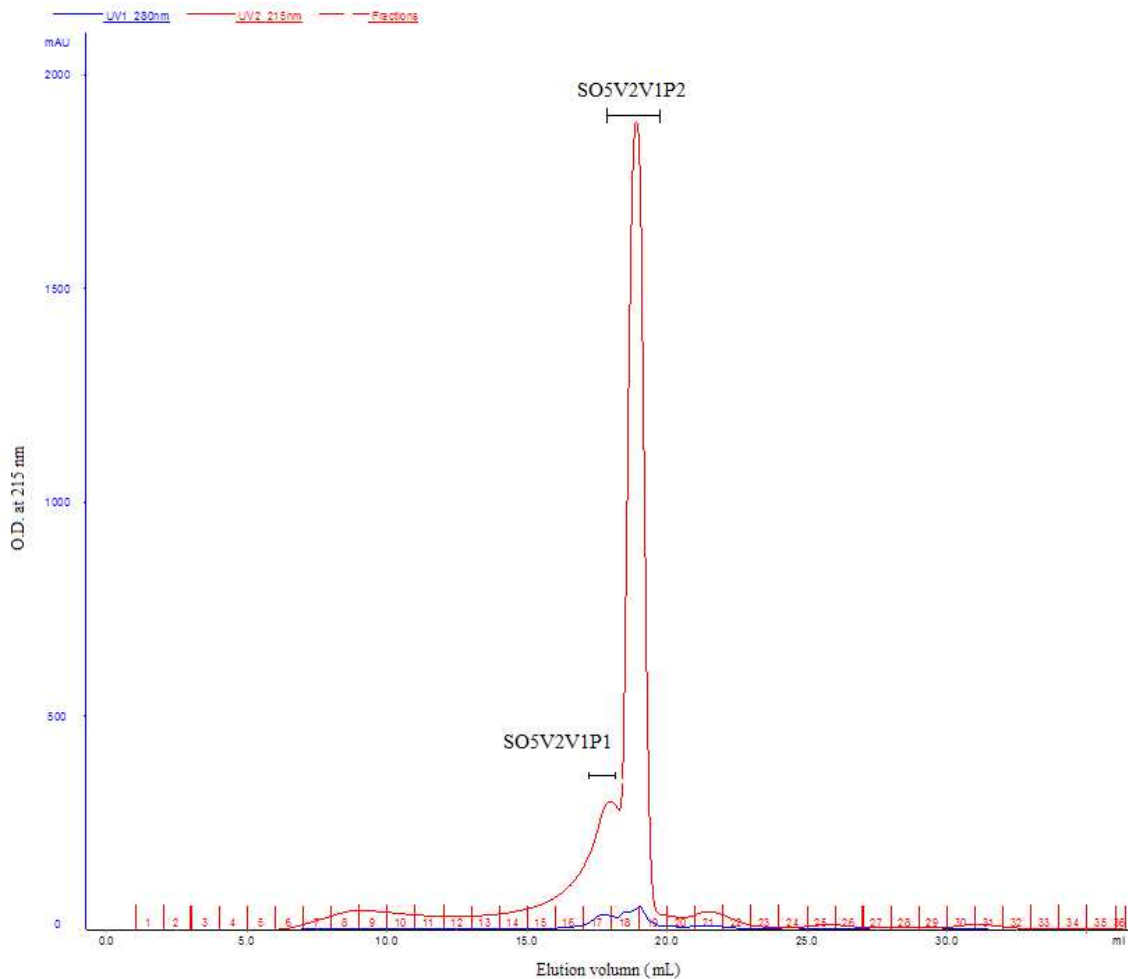


Fig 29. Gel permeation chromatogram of SPI peptide (SO5V2V1) on Superdex peptide HR column (10 × 300 mm).

Eluent: water. Flow rate: 0.5 mL/min, Fraction: 1 mL/tube. Monitoring absorbance: 215 nm, 280 nm. Fractionation: SO5V2V1P1 (tube no. 17), SO5V2V1P2 (18-19)

#### 4) 파일럿 규모의 SPI (soybean protein isolate) 가수분해물의 제조

##### 가) 파일럿 규모의 SPI 가수분해물의 제조공정

SPI 가수분해물을 대용량 제조하기 위해, SPI 분말에 증류수를 첨가하였다. pH 6.84 인 SPI 용액에 Alcalase 2.4 L을 1% (v/w) 첨가하여 65°C 에서 4시간 가열하여 가수분해하였다. 가열시간이 지날수록 붉은 갈색이 나타났다. 가수분해를 마친 후 효소의 반응정지를 위하여 80°C에서 5분간 열처리하였다. 4°C에서 냉각시킨 후 가수분해 잔여물이 가라앉아 층이 분리된 것을 관찰할 수가 있어 이를 7,000 RPM (7,519×g)에서 40분 동안 원심 분리하였다. 원심분리 한 상등액을 취하여 잔여물을 제거한 후, 60°C에서 농축하였다. 농축액을 냉동시켜, 진공 동결 건조하였다.

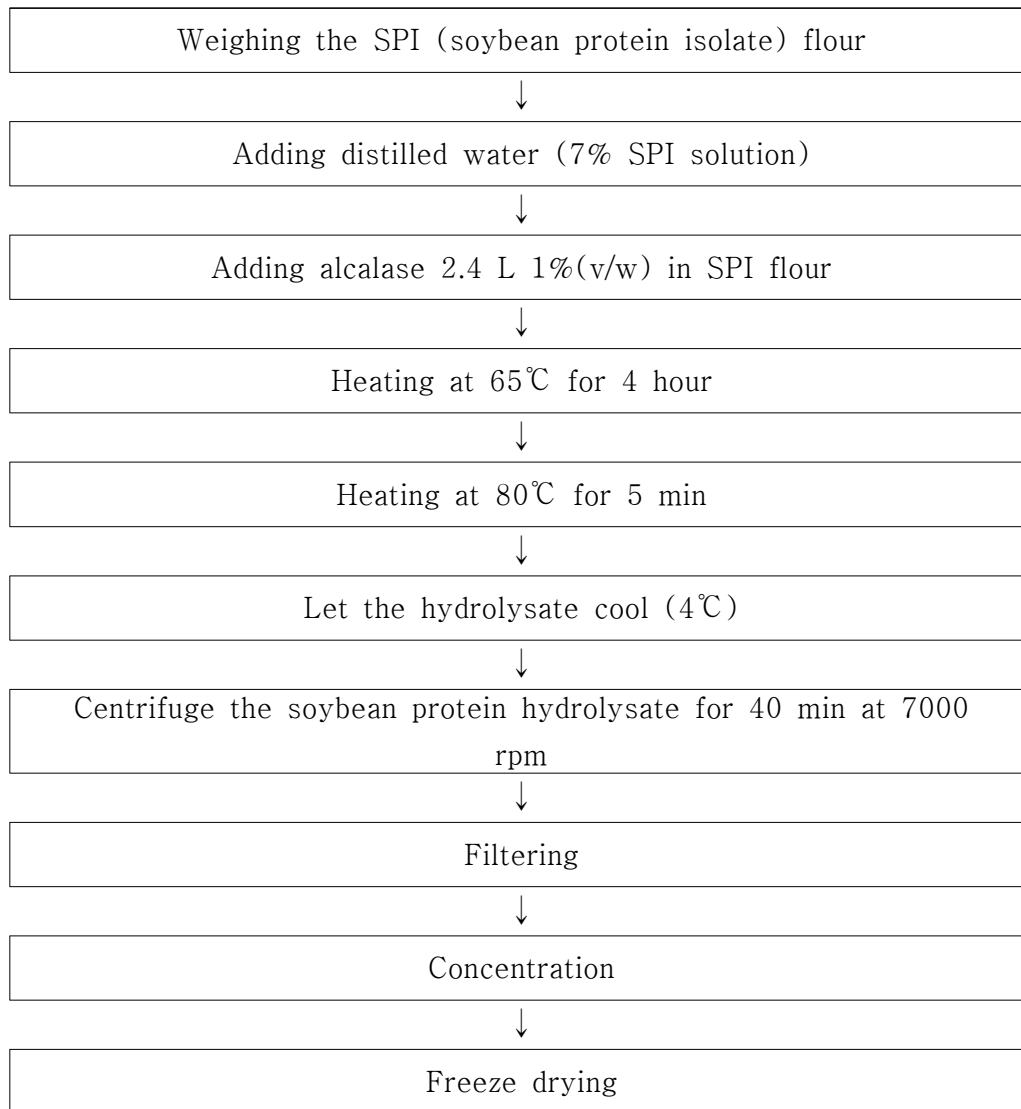


Fig. 30. Product procedure of SPI hydrolysate.

나) 파일럿 규모의 SPI의 가수분해물 수율  
 파일럿 규모의 SPI를 가수분해하여 그 수율을 측정하였더니 50.4%로 나타났다.

Table 9. Yield of SPI hydrolysate

Sample	Yield (%)
SPI hydrolysate	50.4 %

다) 대용량 SPI 가수분해물의 ACE 저해 활성 측정  
 대용량 SPI를 가수분해하여 제조한 가수분해물과 역시 대용량으로 제조한 대두, 난백, 황태, 쇠고기의 가수분해물의 ACE저해 활성을 비교 측정하였다. 그

결과 SPI 가수분해물의 활성이 83.7%로 높게 나타났다.

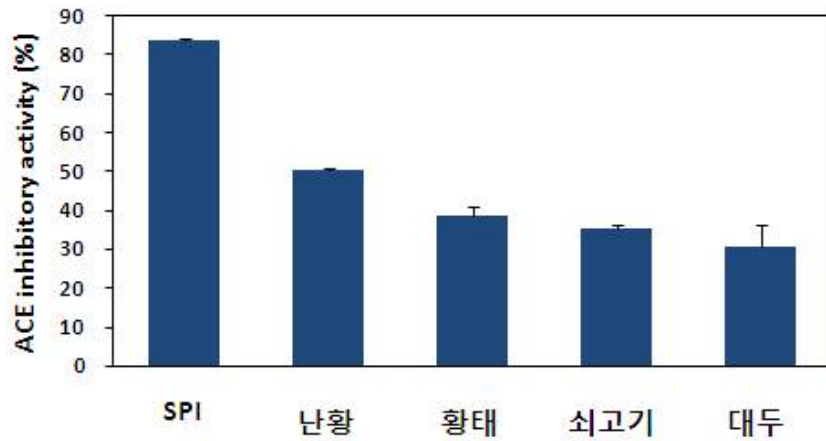


Fig 31. ACE inhibitory activity on SPI hydrolysate

#### 5) SPI 가수분해물을 이용한 제품화

SPI 가수분해물의 항고혈압효과를 이용하여 건강기능성식품으로서 제품화 하기 위하여 조사한 결과 시중에서 주로 판매되는 형태인 타블렛, 환, 캡슐의 형태로 제품화 시키는 것이 가장 적절하다고 사료되며 제조 시 SPI 가수분해물 단일성분보다는 복합적으로 항고혈압과 건강증진 작용이 있는 부재료들을 혼합해 주는 것이 혹시 모를 단일성분의 부작용도 줄일 수 있고 부재료들의 상승작용도 기대할 수 있다. SPI 가수분해물을 이용한 제품원료에는 혈압강화작용을 가진 표고버섯 분말과 양파 분말, 향균, 항고혈압과 항암기능을 가진 마늘 분말 그리고 영양강화제로 비타민 C와 B 를 첨가하고 각각의 제품의 물성을 갖게 하기위하여 텍스트린, 전분, 꿀 (점도증진제)과 스테아린산마그네슘 (유화제,고결방지제), Hydroxy prophyll methyl cellulose (HPMC, 코팅제)를 각각의 제품의 특성에 맞게 사용한다.

#### 가) SIP 가수분해물을 첨가한 타블렛 제조

##### (1) 원료의 배합비

원료는 SPI 가수분해물 중량비 30%와 표고버섯 분말 중량비 20%, 마늘 분말 중량비 15%, 양파 분말 중량비 15%, 텍스트린 중량비 11%, 비타민C 중량비 5%, 스테아린산 마그네슘 중량비 1%, HPMC 중량비 3%로 배합비를 설정하였다. 원료는 1kg을 기준으로 하여 그 배합비를 구성하였으며 배합비는 관능과 원료의 특성에 따라 조정하고 비타민 C 는 한국영양학회(한국인 영양섭취기준 2005)기준을 준수하였다.

Table 10. 원료 1 kg기준 타블렛 배합비율

원료	비율% (g)
SPI 가수분해물	30 (300)
표고버섯분말	20 (200)
마늘분말	15 (150)
양파분말	15 (150)
텍스트린	11 (110)
비타민 C	5 (50)
스테아린산 마그네슘	1 (10)
HPMC	3 (30)
합계	100 (1000)

(2) 타블렛의 제조공정

SPI 가수분해물을 이용한 타블렛 제품의 제조 공정을 상세하게 설명하면 다음과 같다.

(가) 원료: 주원료는 SPI 가수분해물을 이용하며, 부원료는 표고버섯 분말, 마늘 분말, 양파 분말, 비타민 C, 텍스트린, 스테아린산마그네슘 등 식품용 재료로서 품질이 우수한 것을 선별하여 사용한다.

(나) 혼합: 상기 원료들을 혼합하여 반죽한다.

(다) 숙성: 상기 혼합한 원료를 5-25℃에서 2-15시간 숙성하여 원료의 수분이 평형이 되게 한다.

(라) 정제 제조: 상기 혼합한 원료로 정제 제조기를 이용하여 0.15-2 g의 타블렛 제품을 제조한다.

(마) 코팅: 탈지분유를 주원료로 만든 정제 제품은 Hydroxy propyl methyl cellulose (HPMC) 3%용액, 또는 셀락 2%용액으로 코팅한다.

(바) 포장 : 산소 및 수분 투과도가 낮은 포장 용기를 사용하여 일정량씩 포장한다.



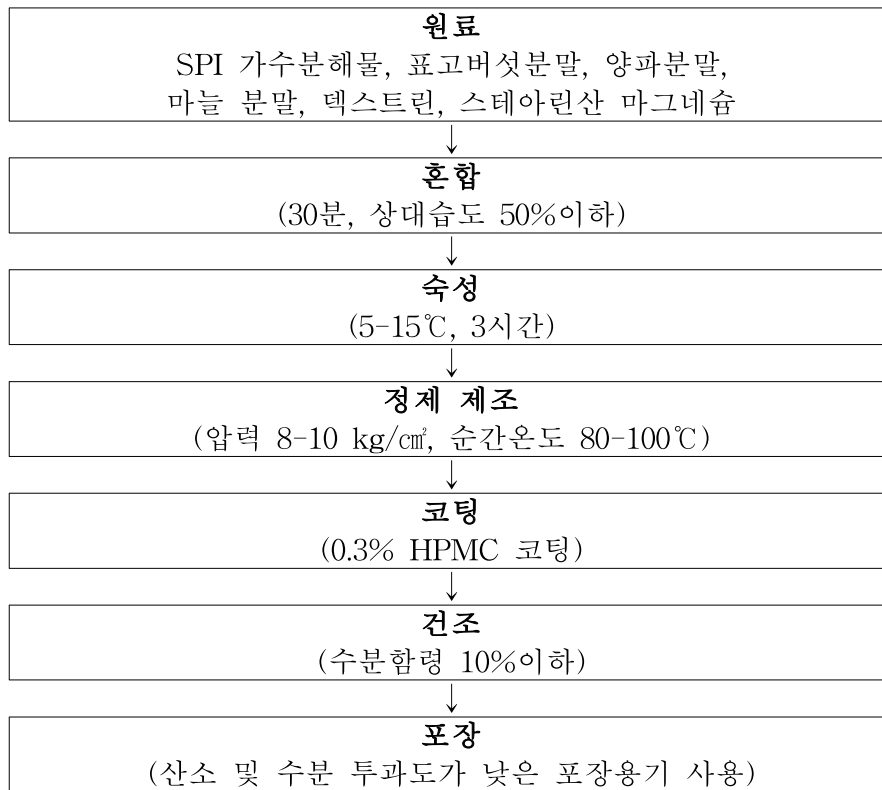


Fig 32. 타블렛 제조과정



Fig. 33. SPI 가수분해물을 첨가한 타블렛 제품

나) SIP 가수분해물을 첨가한 환 제조

(1) 원료의 배합비

원료는 SPI 가수분해물 중량비 30%와 표고버섯 분말 중량비 20%, 양과 분말 중량비 15%, 마늘 분말 중량비 15%, 전분 중량비 10%, 꿀 중량비 10%로 된 배합비의 혼합물에 이 혼합물에 비례하여 물을 중량비로 30-50% 넣어 반죽한다.

원료는 1kg을 기준으로 하여 그 배합비를 구성하였으며 배합비는 관능과 원료의 특성에 따라 조정하고 환의 특성상 식품 첨가물은 사용하지 않는다.

Table 11. 원료 1kg기준 환 배합비율

원료	비율% (g)
SPI 가수분해물	30 (300)
표고버섯분말	20 (200)
마늘분말	15 (150)
양과분말	15 (150)
꿀	20 (200)
합계	100 (1000)

(2) 환의 제조공정

SPI 가수분해물을 이용한 환 제품의 제조 공정을 상세하게 설명하면 다음과 같다.

(가) 원료: 주원료는 SPI 가수분해물을 이용하며 부 원료에는 표고버섯 분말, 마늘 분말, 양과분말, 전분, 꿀 등은 식품용 재료로써 품질이 우수한 것을 선별하여 사용한다.

(나) 혼합: 상기 원료들에 물을 혼합하여 반죽한다.

(다) 장완: 반죽을 장완기에 넣어 국수처럼 뽑고, 10-15 cm크기로 잘라낸다.

(라) 제환: 상기 재료를 제환기에 넣어 공처럼 환으로 제조한후 불량을 선별한다.

(마) 건조: 열풍건조기를 이용하여 환을 건조하여 수분양을 적절히 조절하여 먹기 좋은 형태로 제조한다.

(바) 포장 : 산소 및 수분 투과도가 낮은 포장 용기를 사용하여 일정량씩 포장한다.

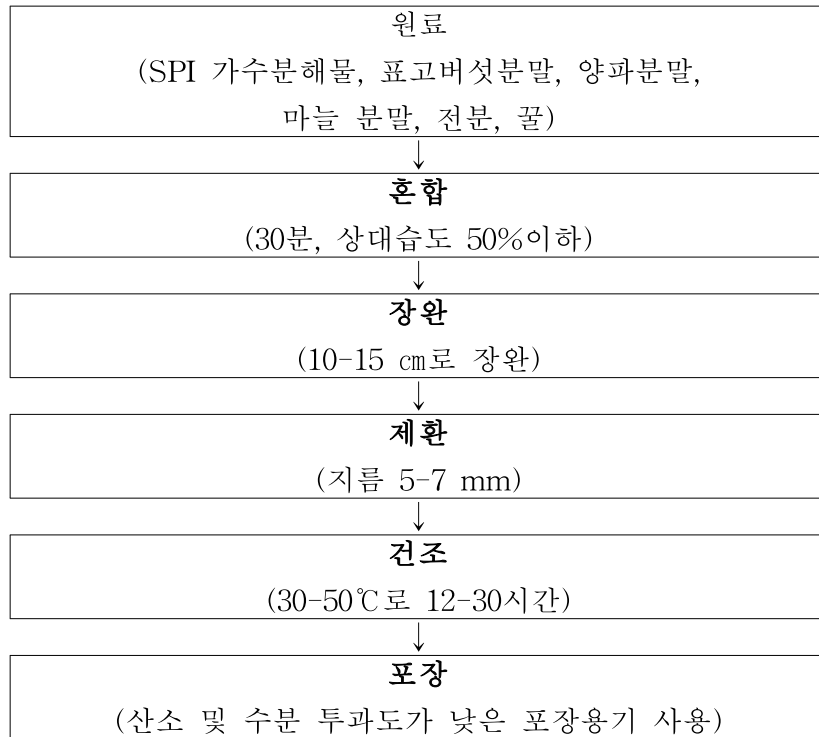


Fig. 34. 환 제조과정



Fig. 35. SIP 가수분해물을 첨가한 환 제품

다) SIP 가수분해물을 첨가한 캡슐 제조

(1) 원료의 배합비

원료는 SPI 가수분해물 중량비 30%와 표고버섯 분말 중량비 24%, 마늘 분말 중량비 20%, 양파 분말 중량비 20%, 비타민 C 중량비 5.5%, 비타민 E 중량비 0.5%로 배합비를 설정하였다.

원료는 1kg을 기준으로 하여 그 배합비를 구성하였으며 배합비는 관능과 원료의 특성에 따라 조정하고 비타민 C 는 한국영양학회(한국인 영양섭취기준 2005)기준을 준수하였다.

Table 12. 원료 1kg기준 타블렛 배합비율

원료	비율% (g)
SPI 가수분해물	30 (300)
표고버섯분말	24 (240)
마늘분말	20 (200)
양파분말	20 (200)
비타민 C	5.5 (55)
비타민 E	0.5 (5)
합계	100 (1000)

(2) 캡슐의 제조공정

캡슐의 제조는 SPI 가수분해물을 이용한 제품의 특성에 맞는 캡슐제조 공정을 선택하며 우선 경캡슐 또는 연캡슐 두 가지 중 한 가지를 선택하고 제품에 들어있는 원료들의 특성을 최대한 고려하여 침지법, 타발법, 적하법 등의 세부 공정을 정한다. 캡슐제의 제조 방법은 다음과 같다.

캡슐은 경캡슐과 연캡슐이 있다. 전자는 젤라틴에 글리세린이나 솔비톨을 첨가해 가소성을 향상시킨 것으로, 페이스트 상약제를 피복 성형할 때 이용한다. 캡슐의 두께는 0.1-0.2 mm로, 충전용량에 따라 8종으로 세분한다.

① 경캡슐제 : 젤라틴 셀은 용해성이 좋아 약제의 속방성 체제나 맛, 냄새가 나쁜 약제에 사용한다. 12-13%의 수분이 적합하며, 10% 이하는 탐약하고 15% 이상이 되면 연약해 진다. 약제 형태는 분말과 과립상이 대부분이다. 제조 공정은 젤라틴 셀의 방향 규제와 분리, 약제의 충전과 결합 등으로 구성된다.

② 연캡슐제 : 캡슐의 성형과 내용 약제의 충전을 동시에 실시한다. 제조법으로는 침지법, 타발법, 적하법 등이 있다. 타발법에는 수동 평판법과 연속 자동법이 있다. 젤라틴에 다량의 글리세린이나 솔비톨 등의 가소제를 첨가하면 탄성과 유연성이 향상된다.

- 침지법 : 젤라틴액을 침지용기 중에서 40-45℃로 유지하면서 와세린과 같은 이형제를 도포한 금형을 침지하여 꺼낸 후, 20℃ 이하로 냉각하며 겔화한다.
- 타발법 : 평판법은 젤라틴액을 얇게 펴서 냉각 및 겔화하여 젤라틴 시트로 만든 후, 시트 두 장 사이에 약제를 삽입하고, 금형의 양쪽에서 눌러 약제를 젤라틴 내부로 집어넣음과 동시에 젤라틴을 결합시킨다.
- 적하법 : 젤라틴액을 자동밸브로 자연 낙하시키면 일정량씩 이중 노즐 외벽의 노즐로 이송되어, 약제라 펌프를 통해 안 쪽 노즐에 공급된다. 유출액은 젤라틴과 혼합되지 않는 유동 파라핀처럼 냉매 중에 방출된다. 노즐 아래의 팔세터에서 간헐적으로 냉매의 일부가 절단되면서 적하, 냉각, 응고가 이루어진다. 이것을 세정한 후에 건조한다.



Fig. 36. SIP 가수분해물을 첨가한 환 제품

라) SIP 가수분해물을 첨가한 정제, 환, 캡슐 제품



Fig. 37. SIP 가수분해물을 첨가한 정제, 환, 캡슐 제품

## 제 8 절 대량수요를 창출하는 제품개발

### 1. 실험방법

가. 실험재료

콩류 - 백태, 개척1호, 개척2호, 약콩, S-09, 검유178

백태는 시중에서 구입, 나머지 콩은 경상대학교 정종일 교수로부터 제공받았음.

과일 - 토마토, 바나나, 딸기, 키위, 골든키위, 배, 사과

나. 기능성 분석을 위한 두유액 제조

- ① 기능성 분석을 위한 전두유액 제조를 위해 20g의 대두를 3회 수세한다.
- ② 대두의  $\times 2$  volume의 증류수를 넣은 후 8시간 이상(overnight) 불린다.
- ③ 물에 불린 대두에( $\times 6 \sim 8$ volme) 증류수를 넣고, 믹스기(homogenizer)를 이용하여 10분동안 충분히 마쇄한다.
- ④ 마쇄된 대두에 protease(0.2%), 혹은 protease 와  $\alpha$ -amylase 동시처리 균으로 나누어 50℃에서 1시간동안 진탕한다. (원활한 반응을 위해 10분 간격으로 섞어준다.)
- ⑤ 반응 후에 100℃에서 5 min간 불활성화(Enzyme Inactivation)시킨 후 총페놀 함량, DPPH 프리 라디칼 소거능, 칼슘 결합능 등을 분석하였다.

다. 총 페놀 함량 측정 (Standard Curve 이용)

- ① 위의 방법으로 제조된 전두유액을 10,000rpm으로 30min 동안 원심분리하여 상등액(supernatant) 준비한다.
- ② Gallic acid 30mg을 EtOH 300ul에 용해시킨 후, 증류수 2.7ml를 가하여 (10mg/ml gallic acid) 0, 10ug/ml, 20ug/ml, 50ug/ml, 100ug/ml, 200ug/ml, 400ug/ml의 표준용액을 제조한다.
- ③ 6개의 3ml Tube에 증류수 1.58 ml를 넣고, ②에서 제조한 각 농도의 gallic acid 표준용액을 20uL 가하여 잘 혼합한다. 이때 blank(0ug/ml)에는 증류수 1.6ml를 넣는다.
- ④ ①에서 얻어진 샘플용액 20ul 넣어 잘 혼합시킨다.
- ⑤ 각 표준용액과 샘플용액에 100ul 의 folin-ciocalteau 시약을 가하고 잘 혼합하여 실온에서 8분간 방치한다.
- ⑥ 각 표준용액과 샘플용액에 10% 탄산소듐( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 수용액 300ul를 가하여 잘 혼합하고 실온에서 2시간 방치한다.
- ⑦ 각 용액을 765nm에서 흡광도를 측정하여 검량선(Standard Curve)을 구한 후, 총 폴리페놀 함량을 구하도록 한다.

라. DPPH 프리 라디칼 (free radical) 소거활성 측정

- ① 0.04%DPPH를 10배 희석하여 (DPPH 4ml +D.W. 36ml), 40ml DPPH를 제조한다.
- ② Methanol 을 OD값 0을 기준으로, 전두유 상등액 200ul + DPPH 800ul하여 Voltex후에 1~10분 동안 방치한다.
- ③ 517nm 흡광도(Spectrophotometer)를 측정한다. (단 C의 경우 D.W. 200ul을 대신 첨가한다)

\* DPPH free radical 소거활성(%) =  $(1 - A_s/A_c) \times 100$

As: 시료 첨가구의 흡광도

Ac: 시료 무첨가구의 흡광도

마. 가수분해도(Degree of hydrolysis) 측정

1) 총단백질 함량 측정(LOWRY 정량분석법)

- ① Reagent A 50ml과 reagent B 1ml를 혼합하여 Reagent D를 만든다.
- ② Sample protein을 단계적으로 희석하여 준비한다.
- ③ Protein 200ul + Reagent D 1ml 섞어 10min간 실온에서 방치한다.
- ④ Phenol reagent (C) 0.1ml 첨가하여 즉시 섞어, 30min이상 실온에서 방치한다.
- ⑤ 500nm에서 흡광도를 측정한다.

Reagent A: 10g  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  in 500ml 0.1N NaOH (2%  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )

Reagent B: 0.5g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  in 100ml of a 1% NA· Citrate(Trisodium citrate dihydrate)

Reagent C: Phenol reagent 1N

표준단백질 : Albumin 200mg/ml (Standard Curve 용)

2) 10% TCA 가용성단백질 측정

- ① 각 시료 가수분해물 1.5ml를 취하여, 10%(w/v) TCA 1.5ml과 혼합하여 원심분리 (3,000×g, 10min)한다.
- ② 원심분리한 상층액을 일정량 취하여 500nm에서 흡광도를 측정하고 식을 이용하여 가수분해도를 구하였다.

\* 가수분해도 (%) =  $10\% \text{ TCA 가용성단백질량} / \text{총단백질량} \times 100$

바. 칼슘결합능

- ① 가수분해물의 상등액에 30mM  $\text{CaCl}_2$  동량(750ul:750ul)을 첨가한 후 25℃에서 30분간 반응시킨다.



- ② 8,000 rpm에서 10min간 원심분리하여, 유리분해산물과 결합한 칼슘을 침전시킨다.
- ③ 280nm에서 흡광도를 측정하여, D.W.와 CaCl<sub>2</sub> 각각의 반응을 비교하여 칼슘과의 결합능을 측정하였다.

#### 사. 실험재료

본 연구에 사용된 콩은 롯데마트에서 시판중인 백태를 사용하였고, 기능성 콩인 아가콩 (노란, 검정)으로서는 경북대학교 벤처기업인 소이벤처로부터 구입하여 본 실험의 재료로 사용하였으며, 기능성 첨가물로서는 주식회사 일신웰스로부터 바나바 (*Lagerstroemia speciosa*)잎의 에탄올 추출물을 구입하여 사용하였다.

#### 아. 전두유 제조

전두유 제조 공정은 1차년도에 전두유 제조 공정을 수정하여 본 차년도에 전두유 제조를 수행하였다.

#### 자. 대두(대조구)를 이용한 전두유 제조

원료인 대두 콩을 30 g씩 3회에 걸쳐 수세한 후 콩의 5배 가량의 물을 가하여 8시간 이상(overnight) 침지한다. 침지과정을 거친 대두 콩의 껍질과 콩 눈을 분리하였으며, 분리 과정을 거친 대두 콩에 6배의 물을 가하여 100 °C에서 30분간 가열하여 이를 마쇄하였다. 마쇄한 전두유 액을 본 실험에 사용하였다.

#### 차. 아가콩을 이용한 전두유 제조

원료인 노란 아가콩과 검정 아가콩을 30 g씩 3회에 걸쳐 수세한 후 콩의 5배 가량의 물을 가하여 8시간 이상(overnight) 침지한다. 침지과정을 거친 노란 아가콩과 검정 아가콩의 껍질과 콩 눈을 분리하였으며, 분리 과정을 거친 노란 아가콩과 검정 아가콩에 6배의 물을 가하여 100 °C에서 30분간 가열하여 이를 마쇄하였다. 마쇄한 전두유 액을 본 실험에 사용하였다.

#### 카. 혈당조절관련 물질이 함유된 전두유 제조

앞선 실험에서 준비된 3가지 전두유액(대두, 노란아가콩, 검정아가콩)에 혈당 조절 식물로 알려져 있는 바나바(*Lagerstroemia speciosa*)추출물을 전두유 용액 100 ml 당 0.1, 1%의 농도로 첨가하여 혈당 조절 기능성 전두유 시제품을 제조하였다.

#### 타. 전두유의 관능 검사

관능 검사는 Table. 1와 같이 설문지를 사용하여 시제품 두유에 대한 아가콩 전두유와 기능성 바나바 추출물 함유 전두유의 색, 점성, 풍미를 평가하였다.

Table. 1. 관능 검사표

관 능 검 사 표						
		평 가				
		적다(연하다)			많다(진하다)	
1. 외관	색	1	2	3	4	5
	뭉은 정도	1	2	3	4	5
2. 입안에서 느낌	뭉은 정도	1	2	3	4	5
	미끈거림	1	2	3	4	5
3. 맛	고소한 맛	1	2	3	4	5
	콩 비린 맛	1	2	3	4	5
	쓴 맛	1	2	3	4	5
	금속 맛	1	2	3	4	5
	전체적 풍미 강도	1	2	3	4	5
4. 전체적인 수용도		1	2	3	4	5

과. 대두전두유, 노란아가콩(아가-3)전두유 및 검정아가콩전두유의 성분분석

대두전두유, 노란아가콩전두유 및 검정아가콩전두유를 동결건조한 후, 일반성분 분석은 AOAC법에 의하여 분석하였고, 식이섬유는 Prosky법으로 분석하였다.

하. 실험동물의 사육 및 식이조성

생후 5주된 제 2형 당뇨병모델인 수컷 C57BL/Ks db/db 마우스(n=20)를 구입하여 1주일간의 적응기간 동안 chow를 제공하였다. 동물을 난괴법으로 평균체중이 유사하도록 5 군으로 나누었다. 대조군의 식이는 AIN-93G basal diet를 기본으로 하고 casein을 단백질 급원으로 하였으며, 대두전두유군, 아가콩전두유군, 검정아가콩전두유군, 바나바·노란아가콩전두유군은 동결건조한 대두전두유, 아가콩전두유, 검정아가콩전두유, 바나바·노란아가콩전두유를 식이의 40% 수준으로 제공하여 단백질 급원으로 하였다. 각 군의 식이별 탄수화물, 단백질, 지방, 식이섬유의 함량을 동일하게 하였고, 복합당과 단순당의 섭취 비율도 유사하도록 하였다(Table 2). 동물에게 식이는 ad libitum으로 6주간 공급하였고, 사육실의 온도 및 습도는 20~25℃, 50~60%로 유지하였으며, 명암은 12시간 간격으로 점등 및 소등하였다. 실험동물의 체중 및 식이섭취량은 주 2회 측정하였다.

Table 2. Composition of basal and experimental diets

Ingredient	대조식이 (%)	노란아가콩 전두유 식이 (%)	검정아가콩 전두유 식이 (%)	대두전두유 식이 (%)	바나바노란아가콩 전두유 식이 (%)
Corn starch	37.51	28.67	27.51	28.23	28.67
Casein	20.00	4.92	5.60	6.32	4.92
Dextrinized cornstarch	13.20	13.20	13.20	13.20	13.20
Sucrose	10.00	7.48	7.76	6.64	7.48
Alpha-cellulose	7.24	0.36	—	0.08	0.36
AIN-93G mineral mixture	3.50	3.50	3.50	3.50	3.50
AIN-93 vitamin mixture	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
L-cystine	0.30	0.30	0.30	0.30	0.30
Choline bitartrate	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Tert-butyl hydroquinone	0.0014	0.0014	0.0014	0.0014	0.0014
Soybean oil	7.00	0.32	0.88	0.48	0.32
노란아가콩전두유*	—	40.00	—	—	—
검정아가콩전두유*	—	—	40.00	—	—
대두전두유*	—	—	—	40.00	—
바나바노란아가콩전두유*	—	—	—	—	40.00

\*Freeze-dried powder

#### 거. 해부 및 시료수집

해당 식이를 섭취한지 6주가 지난 후, 동물을 14시간 절식시키고, 심장 채혈법으로 희생시켜 혈액을 채취하였다. 당화헤모글로빈 측정에 사용할 혈액을 제외한 나머지 혈액은 3,000×g에서 15분간 원심 분리한 후 혈장을 수집하였다.

#### 너. 혈당개선 효과 및 지질대사 개선효과

혈당은 효소법으로 측정하였으며, 혈장 인슐린 농도는 radioimmunoassay로 측정하였다. 혈액 당화헤모글로빈 농도는 칼럼 크로마토그래피법으로 측정하였다. 혈장의 중성지방, 총 콜레스테롤 농도는 효소법으로 측정하였고 GOT, GPT 활성을 측정하였다.

#### 더. 통계처리

실험 분석결과는 평균±표준편차(mean±SD)로 표시하였다. 각 군의 평균치의 유의성 검정은 분산분석(ANOVA)를 사용하여 실시하였고, Tukey's test를 follow-up test로 사용하였다(p<0.05).

## 2. 연구결과

### 가. 효소처리를 통한 최적 전두유 제조 조건 확립

일반적으로 전두유 제조시 기능성 강화를 위하여 단백질 분해 효소(Protease)를 처리하여 전두유를 제조한다. 지금까지 진행된 연구결과들을 분석한 결과 *E. coli*, *Bacillus sp.* *Aspergillus oryzae* 유래의 단백질 분해 효소 등을 처리 결과 이들중 *Aspergillus oryzae* 유래의 단백질 분해효소의 활성이 가장 좋은 것으로 밝혀진 바 본 연구에서는 기능성 분석을 위한 전두유 제조시 *Aspergillus oryzae* 의 단백질 분해 효소를 사용하였다.

또한 단백질 분해효소 단독처리, 혹은 단백질 분해효소 및 전분분해 효소(amylase) 동시처리를 하여 전두유액의 기능성에 미치는 영향을 조사해본 결과 protease 단독 처리시와 비교한 결과 별다른 차이점이 없었다. 그리고 단백질 분해 효소의 농도를 달리하여 제조된 전두유의 총페놀 함량, DPPH 프리 라디칼 (free radical) 소거활성, 가수분해도(Degree of hydrolysis) 측정 등의 기능성을 분석 한 결과 총페놀 함량을 제외하고는 의미있는 차이점을 발견하지 못하였다. 따라서 향후 실험은 0.2% 단백질 분해효소만을 이용하여 전두유를 제조하여 그 기능성을 분석하였다.

#### 1) 전두유액의 총 페놀 함량 측정 결과

총 페놀함량은 Standard Curve(그림 1) 제조된 전두유의 상등을 765nm에서 흡광도(OD)를 측정하여 분석하였다. 단백질 분해효소 단독처리 혹은 단백질 분해효소 및 전분분해효소 동시 처리시 총 페놀함량의 변화는 없었으며, 다만 단백질 분해효소의 농도가 높을수록 전두유액의 총페놀의 함량은 증가함을 보였다(그림 2). 0.5% 단백질 분해효소를 처리하여 제조된 전두유액의 총페놀 함량은 약 750ug/ml 이었다.

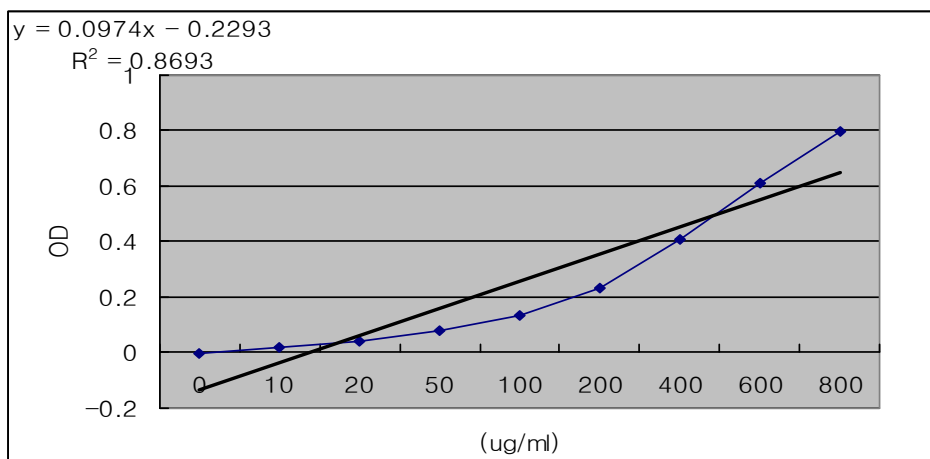


그림 1. 총페놀 함량에 대한 Standard Curve

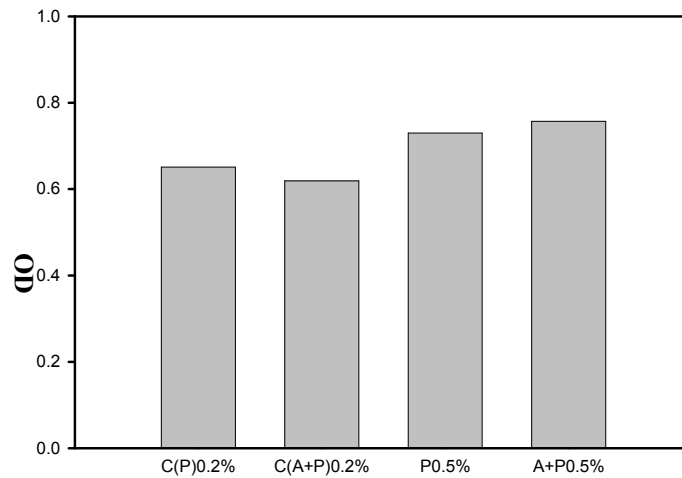


그림 2. 단백질 분해효소의 농도변화 및 전분분해효소 동시 처리를 통한 총페놀 함량에 대한 765nm에서의 흡광도

### 2) DPPH 프리 라디칼 (free radical) 소거활성 결과

제조된 전두유액을 부유물을 제거하기 위해 12,000 rpm으로 20분간 원심분리한 후 그 상등액을 취하여 DPPH 프리 라디칼 (free radical) 소거활성을 측정된 결과 유의적인 결과를 얻지 못하였다. 다만 0.5% 단백질 분해효소 처리시 가수분해효소가 첨가되었을 경우 DPPH 프리라디칼 소거활성이 약간 증가하는 양상을 보였다 (그림 2).

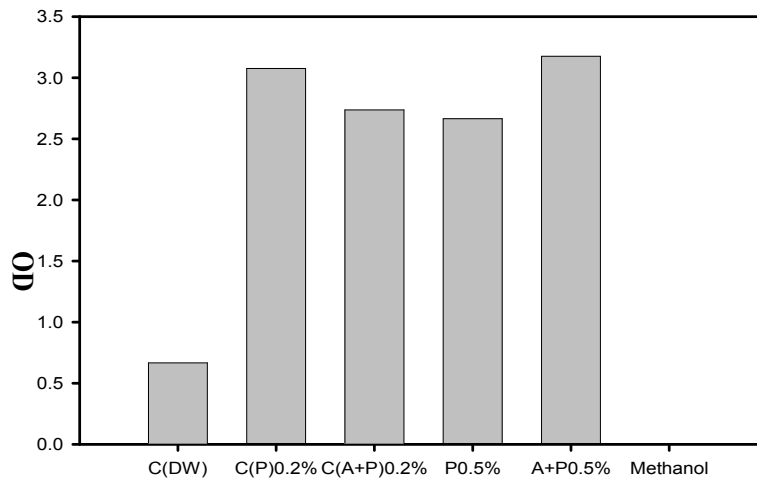


그림 3. 단백질 분해효소의 농도변화 및 전분분해효소 동시 처리를 통한 DPPH 프리 라디칼 소거활성에 대한 517nm에서의 흡광도

3) 가수분해도(Degree of hydrolysis) 결과

알부민을 단계적으로 희석하여 500 nm에서 흡광도를 측정하여 standard curve를 그렸다(그림 4).

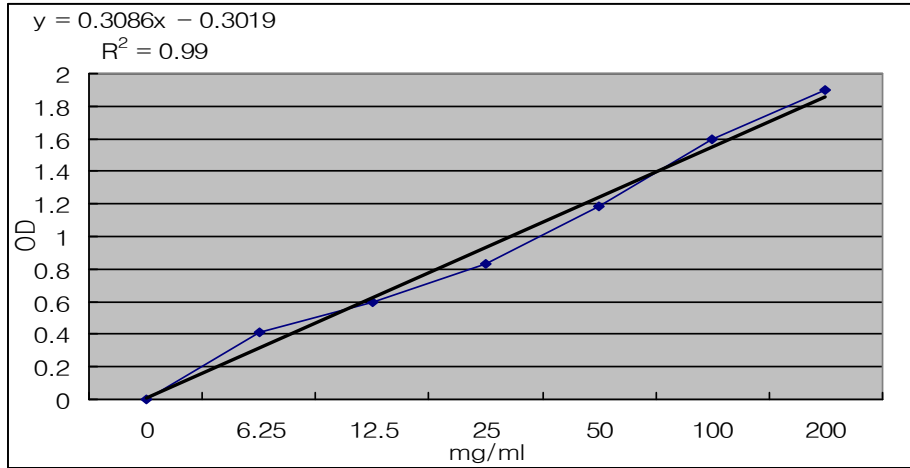


그림 4. Albumin Standard Curve

각각 제조된 전두액을 10배, 20배, 30배 희석하여 흡광도를 측정한 결과 신뢰성 있는 범위가 20배 희석 했을때 나타났으므로 20배 희석한 전두유액에 TCA를 처리하여 가용성 단백질 함량을 측정한 결과 0.5% 단백질 분해효소 처리시 0.2% 단백질 분해효소처리시 보다 가용성 단백질 함량이 약간 증가되는 양상을 보였지만 큰 차이는 없었다(그림 5).

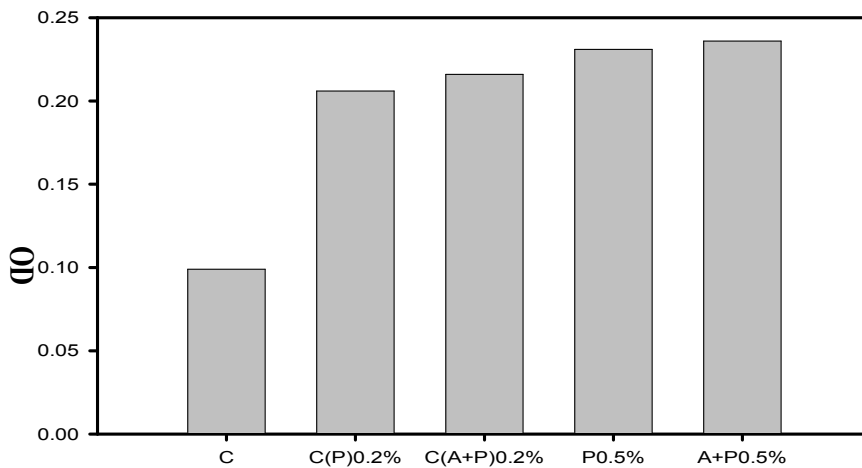


그림 5. 단백질 분해효소의 농도변화 및 전분분해효소 동시 처리를 통한 DPPH 프리 라디칼 소거활성에 대한 517nm에서의 흡광도

나. 다양한 종류의 콩을 이용한 전두유 제조액의 기능성 분석

위의 실험을 결과를 바탕으로 백태, 개척1호, 개척2호, 약콩, S-09, 검유178 등 다양한 종류의 콩을 0.2% 단백질 분해효소를 처리하여 제조된 전두유액의 기능성을 분석하였다. 백태를 제외한 콩들은 경상대학교(정종일 교수)에서 제공 받았다.

1) 불린 콩의 혼탁도 조사

백태, 개척1호, 개척2호, 약콩, S-09, 검유178등을 콩 무게의 2배 분량의 물을 첨가하여 10시간 불린 후 관찰한 결과 아래 그림 6과 표1서와 같이 다양한 혼탁도를 관찰할 수 있었다.



그림 6. 10시간 동안 물에 불린 후 혼탁도

Table 1. 혼탁도는 517nm에서 흡광도

백태	개척1	개척2	약콩	S-09	검유 178
0.084	0.441	0.739	0.133	0.333	0.391

일반 시중에서 시판되고 있는 백태를 제외한 다른 콩들에서 물에 녹아나오는 물질들이 많으며 특히, 개척2호가 다른 콩들에 비해 혼탁도가 2배정도 높게 나타났다.

각각의 콩 10g을 물에 불린 후 부피대비 8배가량의 증류수를 첨가하여 믹스기로 마쇄한 다음 0.2% protease를 첨가하여 50℃에서 1시간 반응 시킨 후 100℃에서 5분간 불활성화 시켰다. 이들을 원심분리하여 상등액을 취하여 각 다른 과장대에서 흡광도 측정하여 기능성 분석들은 이행하였다.

2) 총 페놀 함량 측정 결과

그림 7에 나타낸 바와 같이 개척1호가 가장 높았으며 다음은 S-09, 약콩, 검유 등의 순이었다.

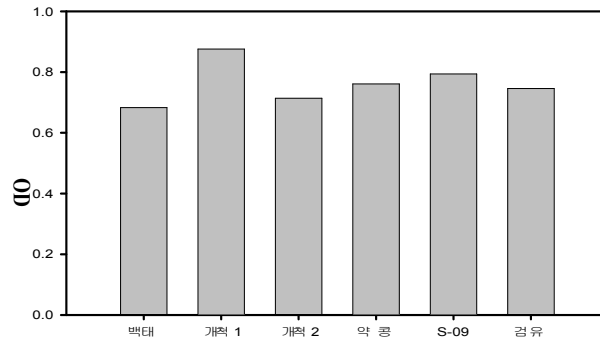


그림 7. 제조된 전두유의 765nm에서의 흡광도(총페놀 함량)

### 3) DPPH 프리 라디칼 (free radical) 소거활성 결과

제조된 전두유의 DPPH 프리 라디칼 소거활성은 S-09가 가장 높았으며 개척1 호와 비교하여 약 1.4배정도 높게 나타났다(그림 8).

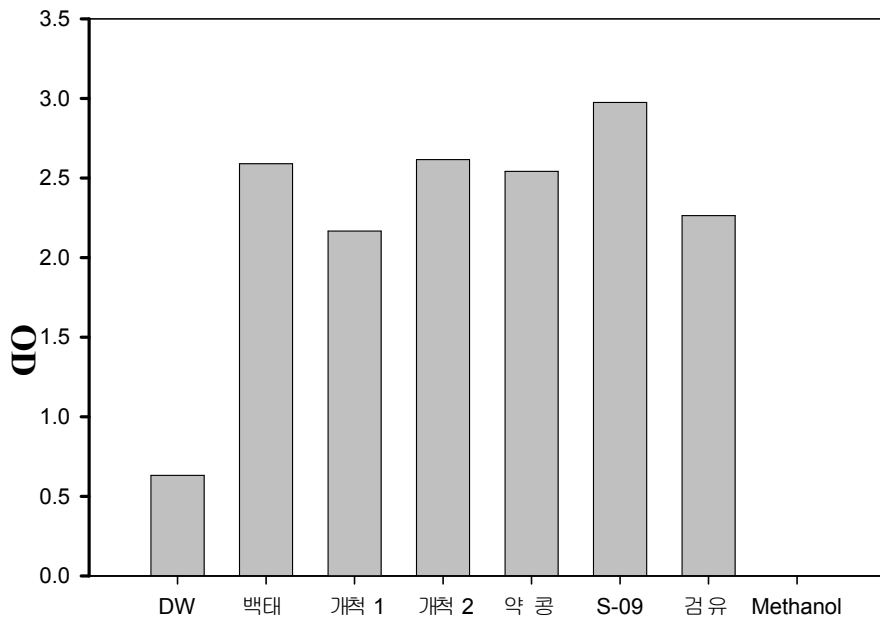


그림 8. 제조된 전두유의 517nm에서의 흡광도(DPPH 프리 라디칼 소거활성)

### 4) 가수분해도(Degree of hydrolysis) 결과

제조된 전두유의 가수분해도 역시 S-09가 가장 높았다(그림 9)



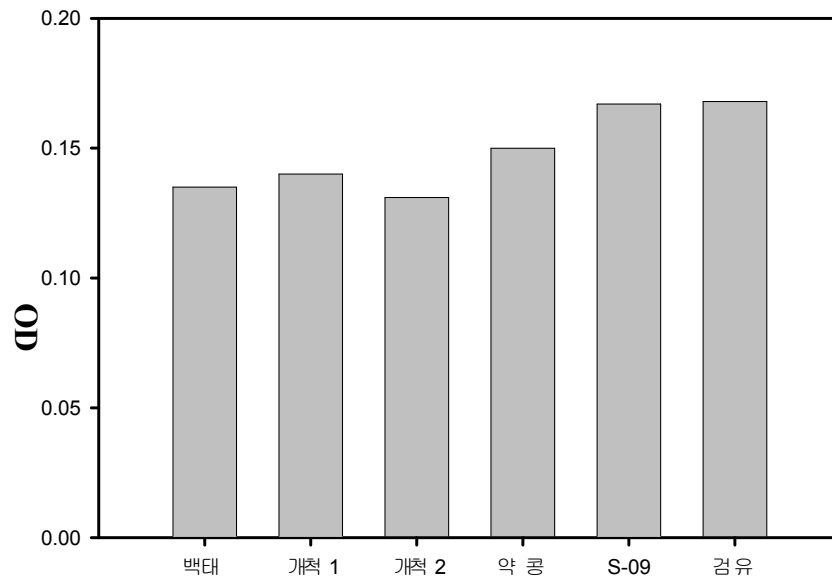


그림 9. 제조된 전두유의 500nm에서의 흡광도(DPPH 프리 라디칼 소거활성)

#### 5) 칼슘결합능 결과

각각의 전두유 제조액의 상등액을 280nm에서 흡광도를 측정하고 칼슘을 첨가하여 반응시킨다음 원심분리한 상등액의 흡광도를 측정하여 그 차이값을 칼슘결합능의 정도를 나타내었다. 표2와 그림 10에 나타난 바와 같이 개척1호가 칼슘결합능이 가장 높았으며, 가장낮은 약콩과 비교했을 경우 2배정도 높게 나타났다.

Table 2. 칼슘 결합 전 및 후의 280nm에서 흡광도

	백태	개척1	개척2	약콩	S-09	검유178
D.W	1.645	1.838	1.690	1.622	1.740	1.509
CaCl <sub>2</sub> .	1.345	1.434	1.410	1.428	1.480	1.330
D.W-CaCl <sub>2</sub>	0.30	0.40	0.28	0.19	0.26	0.18

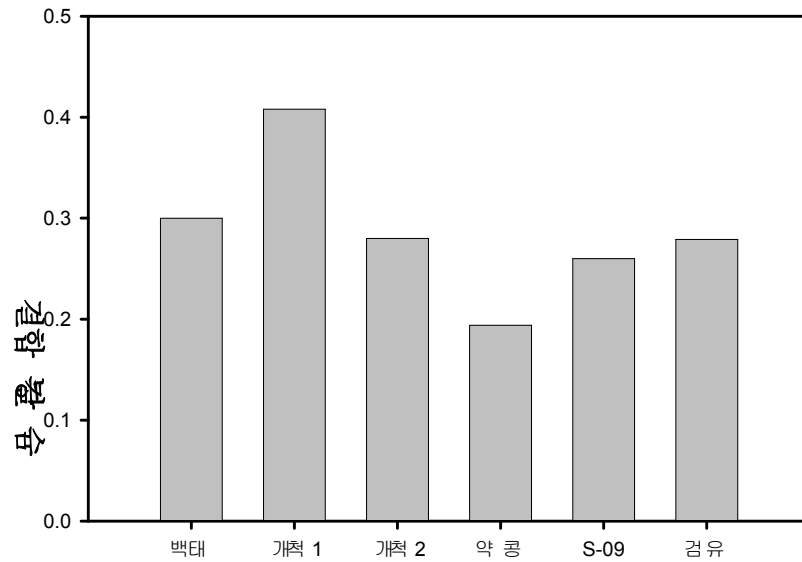


그림 10. 제조된 전두유의 280nm에서의 칼슘 결합 전 및 후의 흡광도 차이 (칼슘결합능)

위의 실험 결과를 종합해보면 개척1호가 총페놀함량과 칼슘결합능에 대한 효과가 뛰어나지만 나머지 가수분해도, DPPH 프리 라디칼에서 다른 콩들에 비해 낮은 값을 나타내었다. 하지만 S-09의 경우 가수분해도 및 DPPH 프리 라디칼 소거능에 대하여 가장 높은 활성을 보였으며 또한 총페놀함량은 두 번째로 높았고, 칼슘결합능에 대해서는 다른 콩과 비슷하게 나타났다. 따라서 S-09은 전두유 개발에 대한 강력한 후보 콩이라는 결론을 얻었다.

향후 아가3콩과 비교실험을 통해 최종 후보콩을 선정하여 전두유 제조에 이용할 계획이다.

#### 다. 다양한 과일을 첨가한 전두유 제조

제조된 전두유 90ml에 각종과일(토마토, 바나나, 딸기, 키위, 골든키위, 배, 사과) 80g을 첨가하여 믹스기로 갈아서 그림11과 같은 과일첨가 전두유를 만들었다. 이들의 맛을 평가해본 결과 바나나와 배가 첨가된 전두유가 맛이 훌륭했으며, 나머지는 오히려 전두유 자체의 맛보다 못하다는 결론을 얻었다(표 3). 따라서 향후 전두유 제조시 바나나 혹은 배를 첨가하여 제조하면 좋은 반응을 보일 것으로 판단된다.

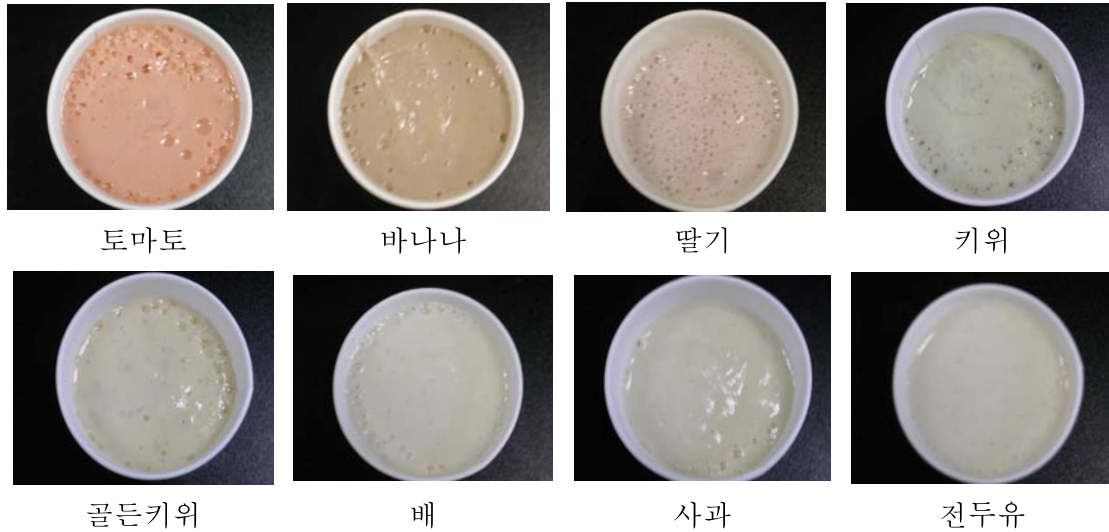


그림 11. 다양한 과일을 첨가하여 제조한 전두유

Table 3. 과일이 첨가된 전두유의 맛에 대한 관능 평가

첨가된 과일	맛의 평가	비교
토마토	3	색이 예쁨, 당도가 낮아 약간 쓴맛
바나나	5	단맛이 있음, 갈변이 생김
딸기	2	별다른 맛이 없음
키위, 골든키위	2	별다른 맛이 없음
배	5	배 특유의 시원한 맛이 있음
사과	3	콩의 맛이 강함
전두유 자체	4	두유의 고소한 맛이 있음

5; 맛이 아주 좋음. 4; 맛이 좋음, 3; 보통임, 2; 맛이 없음, 1; 맛이 나쁨.

#### 라. 전두유 제조

대두와 2종류의 아가콩 (검정, 노란)의 전두유 제조공정은 그림 1과 같이 나타내었다. 각각의 콩을 30 g씩 준비하여 이를 3회에 걸쳐 수세하여 이물질 제거한 콩에 5배 가량의 물을 가하여 8시간 이상 불려 두유 비린내의 원인이 되며 전두유의 입자감을 유도 할 수 있는 껍질과 콩눈을 제거하여 탈피한 콩의 젖은 무게 300 g에 대하여 6배의 물을 가하여 100 ℃에서 30분간 가열하였다. 이를 60-80 ℃정도로 식

힌 후 마쇄하였으며 마쇄한 용액을 여과기에 걸러 큰 입자 물질을 여과하여 본 연구에 사용된 전두유 용액을 제조하였다.

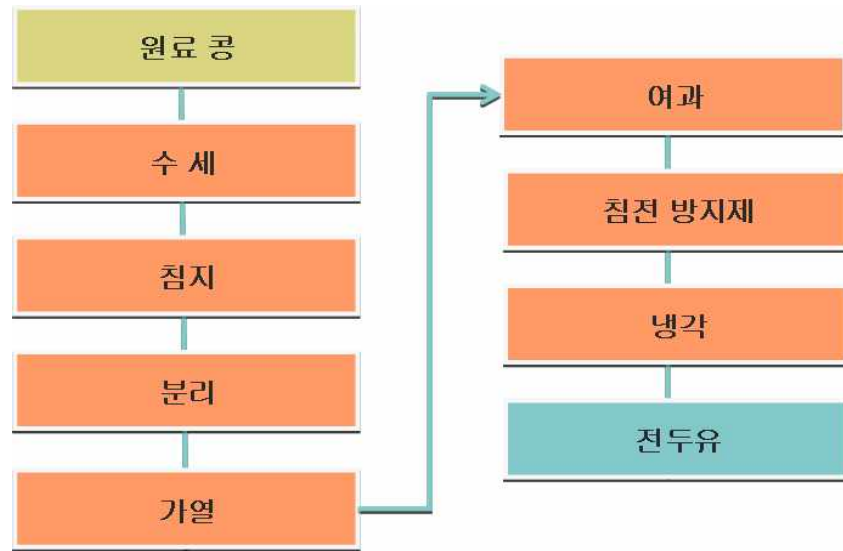


Fig. 12. 전두유 제조 공정

그림13은 대두와 검정 아가콩, 노란 아가콩을 이용한 3가지의 전두유의 사진을 나타내었다. 제조된 아가콩 전두유는 대두 전두유에 비하여 약간 어두운 노란색을 가졌으며 같은 함량에 비하여 상대적으로 고형성분이 많은 것을 알 수 있었으며, 검정 아가콩 전두유의 경우는 시중 판매되는 검은콩 두유 (J사, 검은콩 두유)에 비하여 현저히 진한 색을 확인할 수 있었다.



Fig. 13. 대두, 노란 아가콩, 검정 아가콩, 전두유 사진

마. 혈당조절관련 물질이 함유된 전두유 시제품 개발

바나바(*Lagerstroemia speciosa*)은 동남아시아와 인도 지역에서 여러 질환의 치료에 사용되던 약용식물로서 필리핀어로는 바나바(banaba)라 불린다. 최근 일련의 연구를 통해 바나바에는 혈당을 조절하고 인슐린과 비슷한 작용을 하는 성분이 다량 함유되어 있음이 밝혀졌으며, 특히 혈당조절능이 알려진 코로소린산(Corosolic acid) 1.0-1.3 %가량 함유되어 있다고 보고되어 있으며 식품으로서 안정성은 주식회사 일신웰스에서 분석한 결과를 Table.4에서 나타내었으며, 이를 첨가하여 기능성 전두유를 제조하였다.

Table. 4. 바나바 (*Lagerstroemia speciosa*)추출물의 안정성 분석결과

분석시험항목	결과	검출한계	분석법
SHC	검출안됨	0.02 ppm	GC
DDT	검출안됨	0.02 ppm	GC
앨드린(aldrin)	검출안됨	0.01 ppm	GC
딜드린(dieldrin)	검출안됨	0.01 ppm	GC
엔드린(endrin)	검출안됨	0.01 ppm	GC
파라티온(paration)	검출안됨	0.05 ppm	GC

위의 바나바 추출물을 제조한 대두, 노란 아가콩, 검정 아가콩 전두유에 0.1%와 1%를 첨가하여 기능성 두유를 제조하였다. 앞선 1년차 연구에서 아가콩의 항당뇨 활성을 보고 하였으며, 이에 이미 보고된바 있는 바나바 추출물을 가미하여 당뇨에 효능이 있는 제품을 개발하고자 하였다. 그림 3은 바나바 추출물이 함유된 전두유 시제품을 나타내었다.



0.1 % 바나바 추출물 함유

1 % 바나바 추출물 함유

Fig. 14. 바나바 추출물이 함유된 기능성 전두유 사진

바나바 추출물이 함유된 전두유는 추출물의 색이 짙은 갈색을 나타내어 색은 함량이 증가함에 따라 짙은 색을 나타내었다.

바. 전두유의 관능 검사

제조된 전두유의 시제품 제작에 있어서 관능 검사를 실시 하였다. Table. 5은 대두, 노란콩, 검정 아가콩 전두유를 시판중인 두유 (J사의 두유와 검은콩 두유)와 비교하여 나타낸 검사 결과이다. 제조된 아가콩 전두유의 경우 색은 일반 두유에 비하여 진함을 알 수 있었으며, 묽은 정도는 대두와 시판 두유에 비하여 묽은 정도가 덜한 결과를 확인하였다. 맛에서도 시판두유보다 월등히 높은 고소한 맛을 가졌으며 대조구로 사용한 대두보다도 높음을 알 수 있었다. 그 외 콩 식품에서 찾을 수 있는 특유의 비린맛과 같은 것은 적게 나타나 시판중인 다른 두유에 비하여 우수한 두유의 제품 개발이 가능하다고 사료된다.

그리고 표의 결과에서는 생략하였지만 바나바 추출물이 들어간 전두유의 경우 맛에서 크게 영향을 주지는 못했지만 약간의 떫은 맛이 나는 것을 느낄 수 있었다. 이는 바나바의 에탄올 추출물이므로 식물의 탄닌과 같은 성분으로 인하여 약간의 맛을 변화를 가져 온 것으로 사료된다. 그 외 입안에서 느낌은 바나바가 첨가되지 않은 두유와 별다른 차이를 보이지 않았으며, 색에서는 추출물의 색으로 인하여 약간 짙은 색을 나타냄을 확인할 수 있었다.

Table 5. 전두유의 관능검사 결과

(색 : 연함(1)→진함(5), 맛 : 적다(1)→많다(5), 묽은정도 : 묽다(1)→되다(5))

		대두 두유	노란아가콩 두유	검정아가 콩 두유	시판 두유	시판 검은콩두유
1. 외관	색	2	4	5	2	2
	묽은 정도	2	3	5	3	3
2. 입안에서 느낌	묽은 정도	3	3	5	2	3
	미끈거림	2	1	1	2	2
3. 맛	고소한 맛	3	5	5	2	3
	콩 비린 맛	2	1	1	2	1
	쓴 맛	1	1	1	1	1
	금속 맛	1	1	1	1	1
	전체적 풍미 강도	2	4	4	2	2
4. 전체적인 수용도		3	4	3	3	3

사. 대두전두유, 노란아가콩(아가-3)전두유 및 검정아가콩전두유의 성분분석 동결건조한 대두전두유, 노란아가콩전두유 및 검정아가콩전두유의 일반성분 분석결과는 Table 6에 나타내었다. 대두전두유의 수분 함량은 7.1%, 단백질 34.2%, 지방 16.3%, 회분 16.1%, 그리고 총 식이섬유는 17.9%로 나타났다. 노란아가콩전두유의 수분 함량은 6.8%, 단백질 37.7%, 지방 16.7%, 회분 15.3%, 총 식이섬유는 17.2%로 나타났다. 검정아가콩전두유의 수분함량은 7.0%, 단백질 36.0%, 지방 15.3%, 회분 18.0%, 총 식이섬유 함량은 18.1%로 나타났다.

Table 6. Proximate composition

Compound	대두전두유 (%)	노란아가콩전두유 (%)	검정아가콩전두유 (%)
Moisture	7.1	6.8	7.0
Crude protein	34.2	37.7	36.0
Crude lipid	16.3	16.7	15.3
Crude ash	16.1	15.3	18.0
Total dietary fiber	17.9	17.2	18.1

아. 체중 및 식이섭취량의 측정

제 2형 당뇨병 동물모델에게 아가콩전두유, 검정아가콩전두유, 대두전두유, 바나바·노란아가콩 전두유가 함유된 식이를 6주간 섭취시킨 결과 체중과 식이섭취량은 유의적인 차이가 없었다(Table 7).

Table 7. Body weight and food intake of db/db mice

	Control group	노란아가콩 전두유군	검정아가콩 전두유군	대두전두유군	바나바·노란아가콩전두유군
Body weight (g)	39.0 ± 2.3	41.4 ± 5.3	42.0 ± 4.9	39.8 ± 3.5	41.8 ± 5.0
Food intake (g/d)	4.5 ± 0.3	5.0 ± 0.6	4.6 ± 0.8	4.7 ± 0.6	4.9 ± 0.7

자. 혈당개선 효과

Db/db mouse에게 노란아가콩전두유, 검정아가콩전두유, 대두전두유, 바나바·노란아가콩전두유를 함유한 식이를 6주간 공급한 후 공복 혈당 농도를 측정한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 공복 혈당은 아가콩전두유군 357.3±29.9 mg/dL, 검정아가콩전두유군 400.1±29.1 mg/dL, 대두전두유군 420.6±34.2 mg/dL, 아가콩·바나바전두

유군  $338.3 \pm 28.1$  mg/dL 로 나타나, 대조군( $492.2 \pm 36.2$  mg/dL)에 비해 유의적으로 감소하였다( $p < 0.05$ , Fig. 15). 바나바·노란아가콩전두유군의 혈당은 대두전두유군에 비해 유의적으로 감소하였으며, 노란아가콩전두유군 및 검정아가콩전두유군과는 유의적인 차이가 없었다.

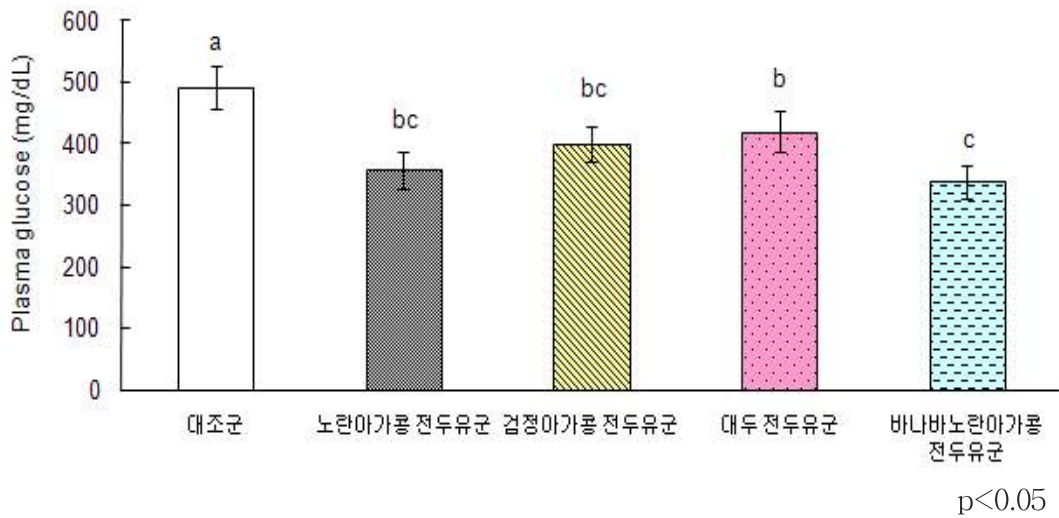


Fig. 15. Fasting plasma glucose levels of db/db mice fed various whole soy milks.

대조군, 노란아가콩전두유군, 검정아가콩전두유군, 대두전두유군, 바나바·노란아가콩전두유군의 혈장 인슐린 농도는 각각  $7.383 \pm 0.73$  ng/mL,  $6.38 \pm 0.82$  ng/mL,  $6.590 \pm 0.62$  ng/mL,  $6.74 \pm 0.74$  ng/mL,  $6.11 \pm 0.75$  ng/mL로 나타나, 각 군간에 유의적인 차이가 없었다 (Fig. 16).

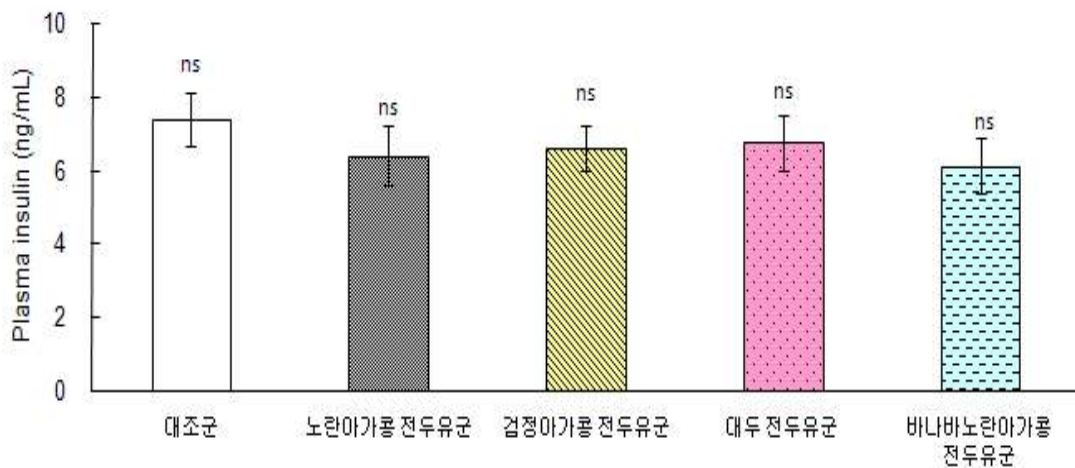
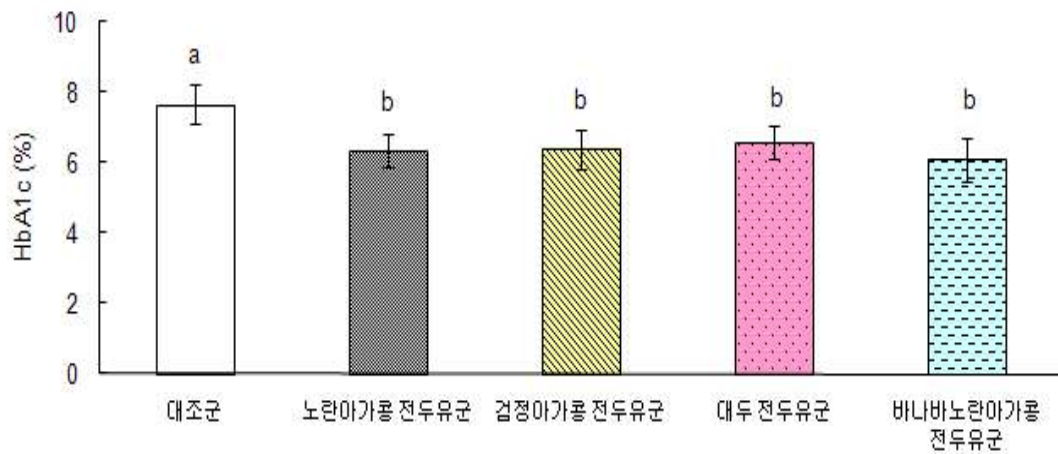


Fig. 16. Plasma insulin levels of db/db mice fed various whole soy milks.



노란아가콩전두유군, 검정아가콩전두유군, 대두전두유군, 바나바·노란아가콩전두유군의 당화헤모글로빈 농도는  $6.4\pm 0.5\%$ ,  $6.4\pm 0.6\%$ ,  $6.6\pm 0.5\%$ ,  $6.1\pm 0.6\%$ 로 나타나, 대조군( $7.7\pm 0.5\%$ )에 비해 유의적으로 감소하였다( $p < 0.05$ , Fig. 17). 따라서 제2형 당뇨병 동물에 있어서 대두전두유의 섭취는 혈당을 감소시키는 효과를 나타내었으며, 노란아가콩전두유의 섭취는 대두전두유에 비해 혈당을 더 감소시키는 경향을 나타내었다. 바나바·노란아가콩전두유군의 섭취는 대두전두유에 비해 혈당을 유의적으로 감소시키는 우수한 항당뇨효과를 나타내었다.



$p < 0.05$

Fig. 17. HbA1c levels of db/db mice fed various whole soy milks.

#### 차. 지질대사 개선효과

$30.4\pm 15.1$  mg/dL,  $136.4\pm 16.6$  mg/dL,  $140.8\pm 13.2$  mg/dL로 나타나, 대조군 ( $176.8\pm 18.2$  mg/dL) 및 대두전두유군( $163.9\pm 16.7$  mg/dL)에 비해 유의적으로 감소하였다( $p < 0.05$ , Fig. 18). 당뇨병의 경우 중성지방 농도가 증가하는 이상지혈증이 나타나며, 이는 당뇨합병증의 중요 위험인자가 된다. 따라서 아가콩전두유, 검정아가콩전두유, 바나바·노란아가콩전두유의 섭취는 중성지방 농도를 감소시켜, 당뇨합병증을 개선시키는 효과를 나타낼 것으로 사료된다.

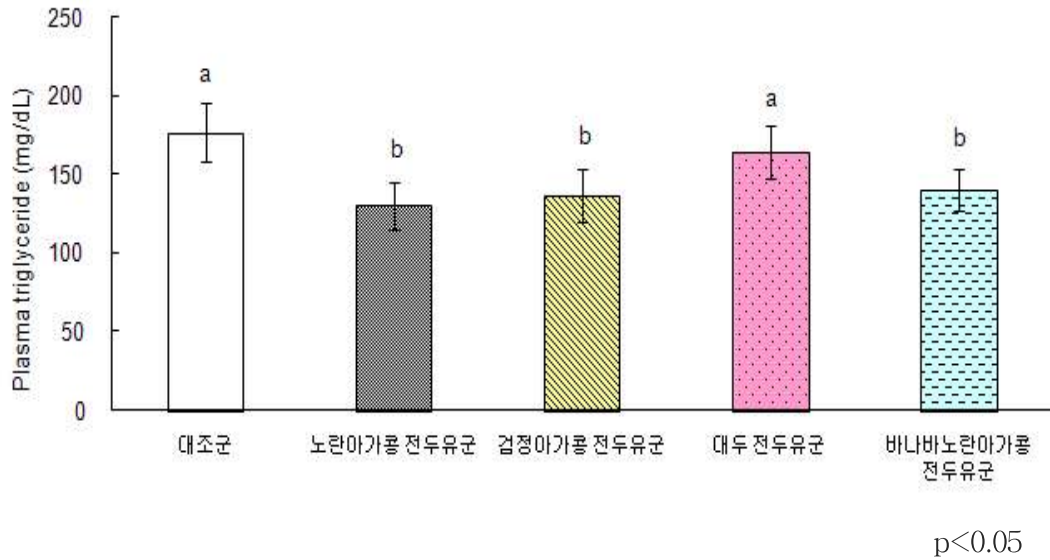


Fig. 18. Plasma triglyceride levels of db/db mice fed fed various whole soy milks.

노란아가콩전두유군, 검정아가콩전두유군, 대두전두유군, 바나바·노란아가콩 전두유군의 총 콜레스테롤 농도는 99.7±7.3 mg/dL, 118.8±13.9 mg/dL, 127.4±7.8 mg/dL, 104.0±14.4 mg/dL로 나타나 대조군(186.5±15.5 mg/dL)에 비해 유의적으로 감소하였다(p<0.05, Fig. 19). 노란아가콩전두유군의 총 콜레스테롤 농도는 대두전두유군에 비해 유의적으로 감소하였다. 총콜레스테롤의 증가는 동맥경화를 포함하는 심혈관계질환의 주요 위험인자가 되므로, 노란아가콩전두유, 검정아가콩전두유, 대두전두유, 바나바·노란아가콩전두유의 섭취는 심혈관계질환의 발생위험을 감소시키는데 기여할 수 있는 것으로 사료된다.

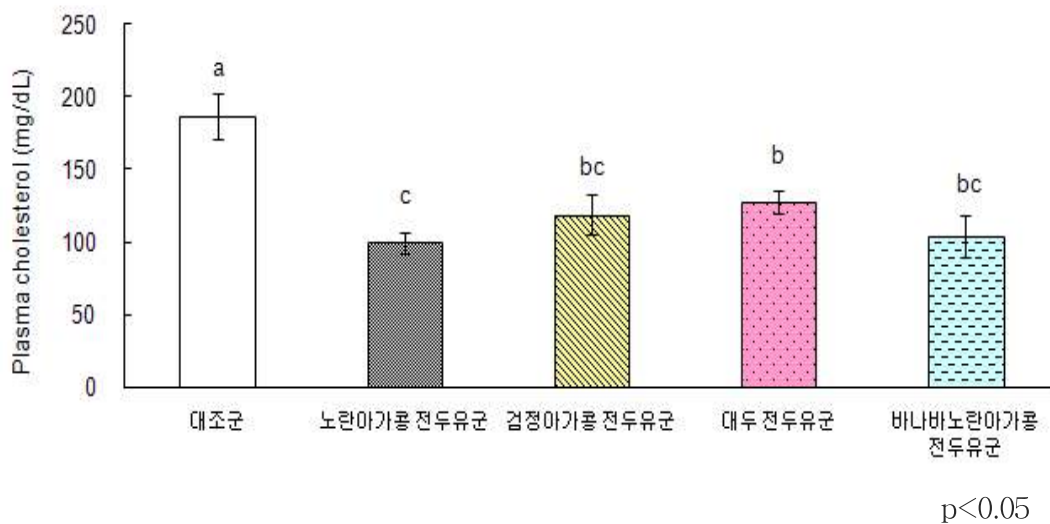


Fig. 19. Plasma total cholesterol levels of db/db mice fed fed various whole soy milks.

카. 간기능 개선효과

노란아가공전두유군, 검정아가공전두유군, 대두전두유군, 바나바·노란아가공전두유군의 혈장 GOT 활성은  $88.0 \pm 17.5$ ,  $86.8 \pm 15.8$ ,  $83.0 \pm 14.4$ ,  $81.8 \pm 14.2$  U/L로 나타나, 대조군( $132.3 \pm 20.0$  U/L)에 비해 유의적으로 감소하였다( $p < 0.05$ , Fig. 20). 노란아가공전두유군, 검정아가공전두유군, 대두전두유군, 바나바·노란아가공전두유군의 GPT 활성은  $59.30 \pm 14.8$ ,  $48.3 \pm 14.9$ ,  $54.8 \pm 12.5$ ,  $61.8 \pm 11.3$  U/L로 나타나, 대조군( $94.3 \pm 15.2$  U/L)에 비해 유의적으로 감소하였다( $p < 0.05$ , Fig. 21). 따라서 노란아가공전두유, 검정아가공전두유, 대두전두유, 바나바·노란아가공전두유의 섭취는 제2형 당뇨병동물에 있어서 간 기능을 개선시키는 것으로 사료된다.

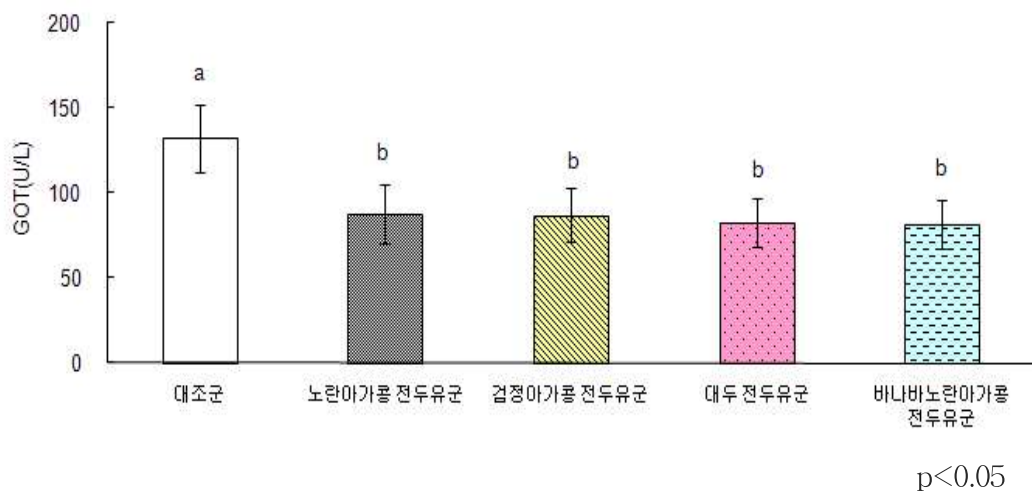


Fig. 20. Plasma GOT activities of db/db mice fed fed various whole soy milks.

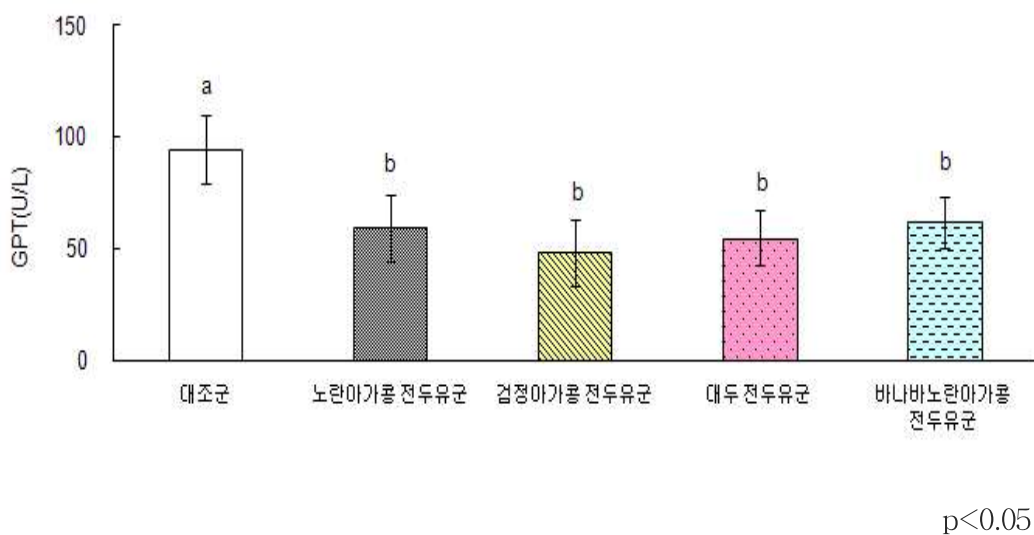


Fig. 21. Plasma GPT activities of db/db mice fed fed various whole soy milks.

타. 시제품 생산 공정



열수 마쇄



Mixing



균질



멸균



Filling

Fig. 22. 제조과정

과. 시제품 디자인 시안

1) 시안 1



맛을 위한 이소플라본이 풍부!

## 아가콩 두유

'이소플라본'이란...  
이소플라본은 테트라노드라 테트라노드라 식물에서 유래하며, 콩의 콩팥, 콩잎, 콩줄기, 콩잎, 콩줄기, 콩잎, 콩줄기 등 콩의 모든 부분에 함유되어 있다. 또한 콩잎, 콩줄기, 콩잎, 콩줄기 등 콩의 모든 부분에 함유되어 있다. 콩잎, 콩줄기, 콩잎, 콩줄기 등 콩의 모든 부분에 함유되어 있다.

주식회사 수석달래니름

맛을 위한 이소플라본이 풍부!

## 아가콩 두유

본 제품은 무균 공정으로 상온에서 4개월간 보관이 가능합니다. 아가콩은 콩 '이소플라본'의 함량이 세계 최고이며, 콩 알맹이의 크기가 국내 콩 중 가장 커서 '아가콩'이라 불리웁니다. 아가콩은 식이섬유가 풍부하고 지방산의 구성을 고려하여 만든 영양적인 콩으로 입맛에도 호감성을 초월한 맛을 자랑하는 제품입니다. 알칼리도 소금첨가가 적절하며, 풍미를 극대화했습니다.

본 제품 특색은 낮은칼로리를 가지고 기온대 별의 특색입니다.

제품명 : 아가콩두유  
식품의 유형 : 유류, 알곡제품

영양성분 :  
원재료명 : 대두(국산) 95.0%, 이소플라본, 콩알껍질, 천연방부제, 천연향료, 천연색소, 보타리쿠산  
내용량 : 195ml    포장형태(내진) : 폴리에틸렌수지  
제조원 : (주)수석달래니름    부산광역시 기장군 일안면 대평리 500 소나무 산업단지    (051)000-0000  
본 제품은 영양가치면에서 2차 소비자 판매처(유통업체)에 따라 교환 또는 보정 받을 수 있습니다.

명량 성분 (1회 분량 195ml)	
1회 분량당 함량	195kcal
탄수화물	8.7g 2%
지방	2.8g 5%
단백질	6.2g 12%
포화지방	1.7g 3%
포화지방산	0g
콜레스테롤	0mg
나트륨	19mg 0%

주식회사 수석달래니름



맛을 위한 이소플라본이 풍부!

## 아가콩 두유 검은콩

'이소플라본'이란...  
이소플라본은 테트라노드라 테트라노드라 식물에서 유래하며, 콩의 콩팥, 콩잎, 콩줄기, 콩잎, 콩줄기 등 콩의 모든 부분에 함유되어 있다. 또한 콩잎, 콩줄기, 콩잎, 콩줄기 등 콩의 모든 부분에 함유되어 있다. 콩잎, 콩줄기, 콩잎, 콩줄기 등 콩의 모든 부분에 함유되어 있다.

주식회사 수석달래니름

맛을 위한 이소플라본이 풍부!

## 아가콩 두유 검은콩

본 제품은 무균 공정으로 상온에서 4개월간 보관이 가능합니다. 아가콩은 콩 '이소플라본'의 함량이 세계 최고이며, 콩 알맹이의 크기가 국내 콩 중 가장 커서 '아가콩'이라 불리웁니다. 아가콩은 식이섬유가 풍부하고 지방산의 구성을 고려하여 만든 영양적인 콩으로 입맛에도 호감성을 초월한 맛을 자랑하는 제품입니다. 알칼리도 소금첨가가 적절하며, 풍미를 극대화했습니다.

본 제품 특색은 낮은칼로리를 가지고 기온대 별의 특색입니다.

제품명 : 아가콩두유 검은콩  
식품의 유형 : 유류, 알곡제품

영양성분 :  
원재료명 : 대두(국산) 95.0%, 이소플라본, 콩알껍질, 천연방부제, 천연향료, 천연색소, 보타리쿠산  
내용량 : 195ml    포장형태(내진) : 폴리에틸렌수지  
제조원 : (주)수석달래니름    부산광역시 기장군 일안면 대평리 500 소나무 산업단지    (051)000-0000  
본 제품은 영양가치면에서 2차 소비자 판매처(유통업체)에 따라 교환 또는 보정 받을 수 있습니다.

명량 성분 (1회 분량 195ml)	
1회 분량당 함량	195kcal
탄수화물	8.7g 2%
지방	2.8g 5%
단백질	6.2g 12%
포화지방	1.7g 3%
포화지방산	0g
콜레스테롤	0mg
나트륨	19mg 0%

주식회사 수석달래니름

2) 시안 2

두유 알곡제품

식물성 여성호르몬 **이소플라본**이 다량 함유된

## 아가콩 두유

rich isoflavones soy milk 195ml

본 제품은 무균 공정으로 상온에서 4개월간 보관이 가능합니다. 아가콩은 콩 '이소플라본'의 함량이 세계 최고이며, 콩 알맹이의 크기가 국내 콩 중 가장 커서 '아가콩'이라 불리웁니다. 아가콩은 식이섬유가 풍부하고 지방산의 구성을 고려하여 만든 영양적인 콩으로 입맛에도 호감성을 초월한 맛을 자랑하는 제품입니다. 알칼리도 소금첨가가 적절하며, 풍미를 극대화했습니다.

본 제품 특색은 낮은칼로리를 가지고 기온대 별의 특색입니다.

제품명 : 아가콩두유  
식품의 유형 : 유류, 알곡제품

영양성분 :  
원재료명 : 대두(국산) 95.0%, 이소플라본, 콩알껍질, 천연방부제, 천연향료, 천연색소, 보타리쿠산  
내용량 : 195ml    포장형태(내진) : 폴리에틸렌수지  
제조원 : (주)수석달래니름    부산광역시 기장군 일안면 대평리 500 소나무 산업단지    (051)000-0000  
본 제품은 영양가치면에서 2차 소비자 판매처(유통업체)에 따라 교환 또는 보정 받을 수 있습니다.

명량 성분 (1회 분량 195ml)	
1회 분량당 함량	195kcal
탄수화물	8.7g 2%
지방	2.8g 5%
단백질	6.2g 12%
포화지방	1.7g 3%
포화지방산	0g
콜레스테롤	0mg
나트륨	19mg 0%

주식회사 수석달래니름

두유 알곡제품

식물성 여성호르몬 **이소플라본**이 다량 함유된

## 아가콩 두유 검은콩

rich isoflavones soy milk 195ml

본 제품은 무균 공정으로 상온에서 4개월간 보관이 가능합니다. 아가콩은 콩 '이소플라본'의 함량이 세계 최고이며, 콩 알맹이의 크기가 국내 콩 중 가장 커서 '아가콩'이라 불리웁니다. 아가콩은 식이섬유가 풍부하고 지방산의 구성을 고려하여 만든 영양적인 콩으로 입맛에도 호감성을 초월한 맛을 자랑하는 제품입니다. 알칼리도 소금첨가가 적절하며, 풍미를 극대화했습니다.

본 제품 특색은 낮은칼로리를 가지고 기온대 별의 특색입니다.

제품명 : 아가콩두유 검은콩  
식품의 유형 : 유류, 알곡제품

영양성분 :  
원재료명 : 대두(국산) 95.0%, 이소플라본, 콩알껍질, 천연방부제, 천연향료, 천연색소, 보타리쿠산  
내용량 : 195ml    포장형태(내진) : 폴리에틸렌수지  
제조원 : (주)수석달래니름    부산광역시 기장군 일안면 대평리 500 소나무 산업단지    (051)000-0000  
본 제품은 영양가치면에서 2차 소비자 판매처(유통업체)에 따라 교환 또는 보정 받을 수 있습니다.

명량 성분 (1회 분량 195ml)	
1회 분량당 함량	195kcal
탄수화물	8.7g 2%
지방	2.8g 5%
단백질	6.2g 12%
포화지방	1.7g 3%
포화지방산	0g
콜레스테롤	0mg
나트륨	19mg 0%

주식회사 수석달래니름

두유 알곡제품

식물성 여성호르몬 **이소플라본**이 다량 함유된

## 아가콩 두유

rich isoflavones soy milk 195ml

본 제품은 무균 공정으로 상온에서 4개월간 보관이 가능합니다. 아가콩은 콩 '이소플라본'의 함량이 세계 최고이며, 콩 알맹이의 크기가 국내 콩 중 가장 커서 '아가콩'이라 불리웁니다. 아가콩은 식이섬유가 풍부하고 지방산의 구성을 고려하여 만든 영양적인 콩으로 입맛에도 호감성을 초월한 맛을 자랑하는 제품입니다. 알칼리도 소금첨가가 적절하며, 풍미를 극대화했습니다.

본 제품 특색은 낮은칼로리를 가지고 기온대 별의 특색입니다.

제품명 : 아가콩두유  
식품의 유형 : 유류, 알곡제품

영양성분 :  
원재료명 : 대두(국산) 95.0%, 이소플라본, 콩알껍질, 천연방부제, 천연향료, 천연색소, 보타리쿠산  
내용량 : 195ml    포장형태(내진) : 폴리에틸렌수지  
제조원 : (주)수석달래니름    부산광역시 기장군 일안면 대평리 500 소나무 산업단지    (051)000-0000  
본 제품은 영양가치면에서 2차 소비자 판매처(유통업체)에 따라 교환 또는 보정 받을 수 있습니다.

명량 성분 (1회 분량 195ml)	
1회 분량당 함량	195kcal
탄수화물	8.7g 2%
지방	2.8g 5%
단백질	6.2g 12%
포화지방	1.7g 3%
포화지방산	0g
콜레스테롤	0mg
나트륨	19mg 0%

주식회사 수석달래니름

두유 알곡제품

식물성 여성호르몬 **이소플라본**이 다량 함유된

## 아가콩 두유 검은콩

rich isoflavones soy milk 195ml

본 제품은 무균 공정으로 상온에서 4개월간 보관이 가능합니다. 아가콩은 콩 '이소플라본'의 함량이 세계 최고이며, 콩 알맹이의 크기가 국내 콩 중 가장 커서 '아가콩'이라 불리웁니다. 아가콩은 식이섬유가 풍부하고 지방산의 구성을 고려하여 만든 영양적인 콩으로 입맛에도 호감성을 초월한 맛을 자랑하는 제품입니다. 알칼리도 소금첨가가 적절하며, 풍미를 극대화했습니다.

본 제품 특색은 낮은칼로리를 가지고 기온대 별의 특색입니다.

제품명 : 아가콩두유 검은콩  
식품의 유형 : 유류, 알곡제품

영양성분 :  
원재료명 : 대두(국산) 95.0%, 이소플라본, 콩알껍질, 천연방부제, 천연향료, 천연색소, 보타리쿠산  
내용량 : 195ml    포장형태(내진) : 폴리에틸렌수지  
제조원 : (주)수석달래니름    부산광역시 기장군 일안면 대평리 500 소나무 산업단지    (051)000-0000  
본 제품은 영양가치면에서 2차 소비자 판매처(유통업체)에 따라 교환 또는 보정 받을 수 있습니다.

명량 성분 (1회 분량 195ml)	
1회 분량당 함량	195kcal
탄수화물	8.7g 2%
지방	2.8g 5%
단백질	6.2g 12%
포화지방	1.7g 3%
포화지방산	0g
콜레스테롤	0mg
나트륨	19mg 0%

주식회사 수석달래니름



### 3) 시안 3



### 하. 시제품 생산 완료



앞 면



뒷 면

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

- 새로운 기능성 품종육성은 계획보다 많은 6품종(목표 4품종)을 육성하여 모두 “품종보호 출원”을 하였다. 이들 육성된 품종들은 아가콩의 단점을 보완하였거나 검정콩(일반적으로 황색콩의 60%정도 보유)에서 황색 또는 녹색종피종 수준의 isoflavone 함량을 가진 품종을 육성하였으며 생리활성 측면에서 가장 중요한 daidzein과 genistein의 총량이 높은 황색(또는 녹색)과 흑색종피종을 육성하였는 바, 이들 함량은 지금까지 알려진 일반콩의 10배, 세계 최고수준 3-4배나 되어 콩 최고의 기능성 물질로 알려진 isoflavone 성분 육종분야에서는 세계 콩 역사에 기록 될 만하다고 생각된다.
- 육성된 품종들은 본 과제의 담당자들이 수행한 다양한 식. 의약분야의 실험에서 탁월한 효능이 입증됨으로서 품종들을 소재로 이용하는 경우 콩을 이용한 기능성 식. 의약 제품개발 분야에서 세계의 어느 나라보다 앞서갈 수 있다고 본다. 제1과제의 경우 위탁과제와 더불어 6개의 제품을 개발하고 일부는 시판 중에 있는 바, 이들은 아가콩차, 아가콩 막걸리, 아가화장품, 미백화장품셋트(Cell Activator), Dr. Ceollin 치약 및 Ceollin 가글이다.
- 아가콩을 이용한 isoflavone 및 pterocarpan의 생합성 증대는 30% 이상 생합성 증대 시켰으며 이와 더불어 우리몸에 흡수율이 배당체 보다 6배 이상 높은 비배당체 isoflavone을 손쉽게 9,000ppm까지 올리는 기술을 확립하였으며, 이는 배당체로 환산할 경우 14,400ppm에 육박한다. 또한 생합성 증대를 통한 pterocarpan을 손쉽게 분리할 수 있었으며, 이들을 이용한 미백효능 검증하여 기능성 화장품을 이용한 다양한 제품의 개발이 이루어 질 것이다.
- 생합성 증대를 이용한 고농도의 isoflavone 및 pterocarpan이 함유된 콩 분말은 현재 본사에서 시판하고 있는 아가콩플라본의 up-grade제품으로 개발되어 본 과제가 종료되는 시점 이후 소이벤처의 주요 수입원이 될 것이다.
- 한국, 중국, 미국 및 일본의 콩 유전자원 중에서 발굴된 유망자원들은 유전적 및 환경적으로 안정적인 고지방 및 양질지방산 자원들이며, 차후 국내의 고지방 및 양질 지방산 품종개발에 크게 유용하게 활용될 수 있을 것이다. 또한 이러한 유망자원들의 두유 및 두부로의 가공적성의 검토도 국산콩의 경쟁력 강화를 위한 신소재식품 개발의 기초자료로 활용될 수 있을 것이다
- 신품종 콩의 기능성물질인 isoflavone을 증대시키는 재배기술의 개발과 친환경적

재배법을 확립하는 것이다.

- 콩에서 새롭게 추출한 피토알렉신의 한 종류인 글리세올린은 폐경 이후 여성의 에스트로겐 결핍에 의한 골다공증 치료를 위해 감수해야 할 위험한 부작용인 유방암과 자궁내막암을 유발하는 호르몬제를 대체할 수 있는 중요한 물질임을 본 연구에서 동물세포모델을 통한 실험에서 골아세포의 분화와 파골세포의 분화 및 활성을 억제하여 골교체율을 감소시키고, 골다공증유도 마우스 모델에서 골다공증의 치료 효능을 가짐을 실험적으로 확인하여, 골다공증을 비롯한 다양한 골질환의 치료를 위해 보건의료분야와 식품분야에서 유용한 활성성분으로 개발될 가능성이 있음을 규명하였다.
- 아가 계통콩들에 대하여 생리활성 검증 및 기능성분 분석을 실시한 결과 아가콩이 우수한 암예방 기능성 콩임을 구명하였다. 또한 activity-guided isolation법을 통하여 항산화 활성이 우수한 이소플라본 배당체들을 항산화 활성성분으로 분리 정제 하였고 그 구조를 동정하였다.
- 콩 육종연구에 기능성 평가를 함으로써 고기능성 콩 육종연구의 방향성을 제시할 수 있고, 아가콩이 우수한 고기능성 건강 콩임을 과학적으로 입증함으로써 농산업 분야에 신수요를 창출할 수 있다.
- 우수 전통청국장에서 분리한 5종의 균주를 이용하여 청국장 제조하고 항산화기능성 평가를 수행하여 가장 우수한 균주 1개 선발하고 이를 이용하여 청국장제조
- 면역증강활성 물질에 대한 제품출시는 미흡하며, 이의 물질에 의한 인체 homeostasis의 내분비 면역체계에 어떤 영향을 유발하는지에 대한 면밀한 기전 검토가 동시에 필요한 상황임(건강기능성식품법 발효). 이에 본 연구는 콩의 유효성분인 글라이세올린과 피니톨을 이용하여 면역 및 항암활성을 실시하였다.
- 콩의 유효물질인 글라이세올린과 피니톨을 이용하여 항암 및 항염증 활성을 검증 하였으며, 이는 향후 콩을 이용한 제품개발에 유용한 데이터를 제공 할 것으로 사료된다.
- 콩으로부터 피부 기능성 소재를 발굴하기 위한 효과적인 screening system을 확립하고, 피부 보호 및 개선의 효능 및 안정성 검증을 통해 실용성과 기능이 구비된 제품을 개발한다. 또한 콩 기능성 소재의 대량 생산 기술을 확립하여 제품 생산을 위한 산업화를 모색한다.



- 육종콩의 종류별 기능성물질, 콩의 발효로부터 발효성분물의 제시를 위한 발효 균주의 선별 및 발효 그리고 항비만, 항당뇨 등의 다양한 기능성 식품소재로서 적합성 등을 기준으로 상호 비교 선별하여 각각의 발효 조건 및 추출조건을 확립하여 기능성을 검증함.
- in vitro계에서 기능성활성을 확인하고 동물 모델계를 이용하여 산업화 예정인 기능성 물질 및 발효성분물의 효과검정 실시 후, 제품형태를 확정하고 효능을 극대화 하기위한 대량 체제를 구축하여 시제품을 제작함.
- 검정콩에서 분리한 안토시아닌계 활성물질의 산화적 스트레스 및 염증에 대한 보호효과 및 세포내 보호기전을 연구하여 관련 질환에 대한 적용 및 기능성 제시
- 시장성, 소비자의 기호성을 감안한 기능성 식품 제작하고 관능검사를 통하여 제품의 기호성을 증대시킬 방법을 모색함
- 최근 건강기능식품 개발에 있어서 육고기의 대체 식품으로 콩에 대한 연구가 지속적으로 이루어지고 있다. 콩이 당뇨병, 암, 비만, 동맥경화, 고혈압 등에 유익하다고 알려지면서 콩에 대한 관심은 더욱 고조되고 있다. 아가콩은 이소플라본 함유량이 월등이 뛰어난 건강기능식품의 성장에 이바지 할 것으로 본다. 또한, 여성 폐경기에 여성호르몬의 일종인 에스트로겐의 대체 물질로 콩이 각광을 받고 있고, 그에 대한 보고도 되고 있다. 약물이 아닌 자연 식품에서의 대체물질을 찾아내는 것은 향후 우리가 나아가야 할 건강기능식품의 방향을 제시해 주는 것으로 확신한다.

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

본 연구의 주요 연구성과는 기술이전, 특허, 논문발표 및 게재, 홍보 등다양하게 성과를 활용계획에 있으며, 그 내용은 다음과 같다.

- 신종의 육성은 영구 계속사업으로서 본 과제를 통해서 아가콩의 고 isoflavone 함량을 유지하면서 결점 보완 또는 보다 다양한 기능성, 다수성 및 내 재해성의 신품종 개량을 위해 인공 교배된 23개 조합에 대하여는 관행의 육종방법에 의해 계통육성이 계속하여 이루어질 것임.
- 기존 아가콩 집단 2,000 NILs 전체에 대한 주요 농업적 특성과 isoflavone 함량검정을 통해 선발된 계통들은 품종등록을 위해 품종보호 출원된 계통 및 고세대 흑색종피 집단의 역돌연변이로부터 고함량 isoflavone 함량을 가진 선발 계통과 함께 isoflavone을 중심으로 세계 최고의 기능성 콩 품종육성에 활용코자 함.
- 품종보호 출원된 6개 계통들은 2-3년 내에 계통별로 특정 의미를 가진 품종으로 등록될 것이며 이들 신품종들은 기능성 식. 의약품의 중요한 소재로 이용될 것임.
- Isoflavon 및 pterocarpan을 함유한 기능성 아가콩 콩 분말을 이용하여, 현재 시판되고 있는 아가콩 플라본의 up-grade제품에 활용할 것임
- 순수 분리된 pterocarpan을 이용한 기능성화장품, 잇몸병 예방용 치약 및 가글을 제조하여 판매하고 있음
- 개발된 기능성 아가콩 음료(차), 아가콩 탁주(막걸리 개발) 및 화장품은 홍보와 함께 시판을 시작하고 있음.
- 고지방 육종을 위한 유망자원으로 유전적 및 환경적으로 안정된 중국자원 3종을 발굴하였으며, 차후 고지방 품종개발의 교배모본으로 활용할 예정이며, 양질지방산 육종을 위한 유망자원으로는 고 oleic acid 함량을 가진 미국자원 2종, 중국자원 1종, 일본자원 1종, 한국육성품종 2종을 발굴하였고, linoleic 함량이 낮은 자원으로 미국자원 9종과 일본자원 1종을 발굴하였으며 이들 자원의 환경변이를 평가한 결과 안정적이었으며, 콩 육종 및 기타 관련기관에 육종소재로 제공할 예정이다.

- CS27002 등 15 교배조합의 F<sub>1</sub> 60개체 양성, CS27001 등 5교배조합의 F<sub>2</sub>세대 113개체를 선발하였고, SSD육종법에 의한 총 1492립을 선발하였으며 지속적인 세대축진과 선발을 통하여 중간모본 및 품종을 개발할 예정이다.
- 고지방 및 양질지방산 품종의 가공적성 평가를 통하여 두유 및 두부의 고품질화를 위한 육종소재를 발굴하고 차후 품종개발을 통한 신소재 식품의 산업화를 위해 활용할 예정이다.
- 중국, 미국 및 일본 도입 콩 유전자원들의 농업유전자원센터에 입고하고, 유망 유전자원들은 연구기관 및 수요자에 제공하여 국내의 고지방 및 양질지방산 육종에 활용하고자 한다.
- 콩 지방 및 지방산에 관한 본 연구의 수행과정에서 얻어진 중요결과들을 4건의 학술발표를 하였으며, 2012~2013년에 3건의 논문을 게재할 예정이다.
- 잡초생장억제물질 함유 Endophytic fungi를 이용한 친환경생물제초제 개발 연구에 응용하고, 고함량 isoflavone 생성을 위한 대사유도물질 사용과 친환경제배법의 기술을 농가에 전수시킬 예정임.
- 신품종인 아가콩에서 최초로 해충 발생 양상 및 톱다리개미허리노린재 천적의 발생에 관한 연구결과를 각각 국제학술지인 Journal Asia Pacific Entomology 와 Applied Entomology and Zoology에 2010년 게재 수락되어 발간될 예정이다.
- 톱다리개미허리노린재 천적의 발생에 관한 연구결과는 2009년 5월 전남 보성에서 개최된 한국응용곤충학회에서 우수 발표상을 연구원인 김상원이 수상하였다.
- 톱다리개미허리노린재에서의 저온저장된 기주알을 이용한 노린재깡충좀벌과 노린재검정알벌의 증식법을 최초로 개발하여 국제학술지인 Journal Asia Pacific Entomology(13: 139-143)와 Biocontrol Science and Technology(19: 315-325)에 각각 2010년과 2009년에 게재하였다.
- 유방암 치료와 함께, 글리세올린은 골다공증을 위한 치료에 효과가 있었다. 그것은 골다공증과 유방암을 함께 치료하는 치료제가 될 것이다.
- Genistein, daidzein 혹은 글리세올린 I은 RhoA/Rho-kinase 신호전달을 억제하여 혈관 수축을 완화시켰다. RhoA와 Rho-kinase는 고혈압, 관상동맥과 뇌동

맥의 혈관경련, 죽상경화증과 당뇨병을 치료하는 치료제로 중요하다. Genistein, daidzein 혹은 글리세올린 I의 혈관 이완의 효과는 심혈관계 병의 치료에 중요한 후보로 주목받는다. 우리는 많은 연구를 통해서 논문과 특허를 출판하고 있다.

- 국내 신제품 콩인 아가콩이 항산화활성, 암 예방활성을 보여주는 우수한 건강 기능성 콩임을 구명하였고 기능성 아가콩에 대한 연구결과는 SCI급 논문 (Food Sci & Biotech)에 출판되었다. 본 연구결과는 향후 아가콩이 건강기능성 식의약소재로 개발되는데 기초자료로 이용될 수 있을 것이다.
- 본 연구결과로서 우수청국장 균주에 대한 특허를 포함한 국내특허 2건을 출원하였고, 논문 2편 (SCIE급 1편 포함) 발표하였으며, 현재 2편을 투고준비중임.
- 글라이세올린과 피니톨을 포함하는 콩에 대한 산업화 추진전략으로 전체적인 수요확대(두 성분에 대한 필요성 증대를 각인), 건강기능성 식품 개발, 콩성분에 대한 적절한 분리기술의 확보 및 이를 이용한 다양한 제품군의 개발 등이 필요하다. 본 연구는 이에 기능성을 확인하기 위한 기초적인 데이터를 제공한다.
- 본 연구에서 개발된 아가3중세트(화장품)는 시중에 출시되어 판매되고 있으며, (참여기업인 에이징과 공동개발) 아가콩을 이용한 두유는 기능성 측면에서 일반 콩(흰콩, 검정콩)에 비하여 매우 우수한 기능성을 나타내고 있어 본 연구원과 두유 제조회사와 제휴하여 상품 및 제품을 시장에 출시하기 위해 노력하고 있음.
- 언론 등에 아가3중세트 개발로 산,학,연 공동개발의 연구결과로 발표됨. 본 연구에서 개발된 기초 기술들을(분리기술, 제품화 기술, 두유제조기술) 등을 바이오산업 발전을 위한 자료로 사용할 계획임.
- 아가콩을 이용한 두유제품으로 생명아가두유, 생명청자두유를 상표등록 계획 중에 있다.
- 「대두추출물을 함유한 피부미용개선용 복합 조성물」에 관한 특허를 출원 준비 중이며, 관련 시제품을 제작하여 전국 한의원을 대상으로 효능 및 만족도 조사 중에 있다. 생명과학회지 1편의 논문이 게재되었으며, 2건의 논문은 투고, 심사 중에 있으며, 3편의 논문을 추가 투고할 계획이다.
- 본 연구를 수행하면서 기능성발효제품과, 항비만 음료를 개발하였고, 총 9개의

학술논문을 발표하고 2개의 특허를 출원하였으며, 그 외 많은 학술발표를 하였다.

- 국내에서 생산되는 콩을 이용하여 콩 단백질 제조조건을 설정하였다. 그리고 콩 단백질을 가수분해하여 항고혈압 기능성 peptide를 제조하였으며, 항고혈압 기능성 콩 peptide를 이용하여 환, 캡슐, tablet 시제품을 제조하였다.
- 개발된 전두유 시제품을 바탕으로 생산수율 및 가격 경쟁성을 검토한 후 양산 과정 계획을 가지고 있다. 양산 전 On-line 및 Off-line을 통한 제품판매, 대학 병원을 판매처로 활용할 계획을 세우고 있다. 또한, On-line상의 블로그와 카페 등을 이용하여 제품의 판로를 개척해 나아갈 예정에 있다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 자연계에 존재하는 모든 식물들은 외부환경 및 병원균등의 환경변화에 적응하여 이를 대체하는 방법으로 여러 다양한 물질들을 생합성하여 이들의 외부 조건 변화에 대응한다. 대두의 경우에 이들 외부환경에 맞추어 isoflavone 및 pterocarpan 인 phytoalexin을 생성하여 자신을 보호 한다. 따라서 다양한 외부 조건 변화에 따라서 이들 물질을 생합성 증대시킬수 있으며, 본실험에서는 *Asp. Sojae* 와 같은 미생물 및 첨가제(pinitol등)를 이용하여 이들 phytoalexin을 생합성 증대시켰으며, 이들의 생합성 증대와 관련된 자료를 확보하였다. 또한, 생합성 증대를 통하여 얻어진 pterocarpan의 기능성 검증 항목중 우선 미백관련하여 실험을 행하였으며, 미백기작 및 이들의 억제능과 관련된 자료들을 모았다.
- 중국 214종, 미국 37종 및 일본 140종의 콩유전자원을 수집 및 도입
- 이 연구개발과정에서 저온저장법을 이용한 천적 증식 및 보관에 관한 해외과학기술정보를 수집하였다. 이는 크게 두 가지로 나눌 수 있으며 첫째, 천적의 직접적인 저온저장 기술과 천적의 먹이가 되는 기주의 저온저장 기술
- RhoA/Rho kinase 신호전달은 혈관경련, 동맥경화, 허혈/재관류, 고혈압, 폐동맥 고혈압, 뇌졸중, 그리고 심장발작을 일으키는 중요한 역할을 한다 (Shimokawa and Takeshita. 2005; Budzyn et al. 2006; Lai and Frishman. 2005). Rho kinase의 억제는 3가지 고혈압 모델에서 혈압을 낮춘다 (Uehata et al. 1997). 최근에는 RhoA/Rho kinase 신호의 차단은 정상혈압에는 영향을 주지 않고, 고혈압 상태에서 혈압의 증가를 막는다는 연구 결과가 있다 (Wirth et al. 2008). 그러므로 Rho kinase를 조절하면 심혈관계의 질환을 치료하는 가능성 있는 치료제로 이용 된다고 주목을 받고 있다. 본 연구에서 콩의 유도 물질인 genistein, daidzein과 글리세올린은 RhoA/Rho-kinase 신호를 억제하면서, 혈관의 수축을 완화시켰다. 이것은 콩의 유도물질이 혈압의 조절과 함께, 심혈관계의 질환을 치료하는 가능성 있는 치료제임을 시사한다.
- 미국인 보다 약 20 ~ 50배 정도 콩을 더 많이 섭취하는 아시아 국가들은 호르몬 적 암 발생, 골다공증, 폐경기 증후군, 심혈관 질환 등의 발병률이 낮게 나타났다(Barnes et al, 1998., Birt et al. 2001., Clarkson et al, 2002). 이소플라본은 phytoestrogen으로 작용하여 폐경 후 여성에게 estrogen의 효과를 나

타내어 골다공증의 억제 및 갱년기 증상 개선 작용(Somekawa et al, 2001)이 있고 만성적인 세포 증식과 분화, 혈관신생, 세포 유착, 심장질환(Taku et al, 2007) 혈액지질의 산화, 항산화 효과 등이 보고되고 있다.

- 대두(콩)은 다른 작물에 비해 비교적 많은 식물 단백질을 함유하고 있으나, 알레르기 유발물질이 함유되어 있는 경우가 있음. 이에 알레르기 관련 단백질이 제거된 LM콩이 개발중에 있고, 제초제저항성 특성을 가져 생산량을 증가시킬 수 있는 콩이 현재 가장 많이 상업화 되고 있다.
  
- 일본 아사히 신문의 보도에 따르면 딸기, 홍차, 복숭아, 군고구마 등의 여러 가지 맛을 첨가해 마시기 쉽게 제조한 두유가 호황을 누리면서 침체되었던 두유시장이 다시 활성화 될 조짐이 보인다고 보도하였다. 일본은 최근 몇 년전 부터 두유 본연의 콩 냄새를 줄이고 마시게 좋게 하는 한편 건강지향에 신경 쓰는 사람들을 위한 기능성도 중시해 상품개발에 힘을 쏟고 있다고 한다.
  
- 여성호르몬인 에스트로젠과 유사구조를 가진 이소플라본은 콩 단백질로써 피부색을 밝고 환하게 해주며 뛰어난 보습력으로 탄력있는 피부를 가꿔준다고 알려져 식품, 화장품등에 널리 사용되고 있는 소재이다. 일본의 화장품 제조사인 Sana社에서는 이소플라본을 이용한 제품으로써 미용 비누, 클렌징 크림, 스킨, 로션, 에센스, 메이크업 베이스등 화장품의 전반적인 라인에 이소플라본을 첨가한 제품을 개발 및 출시하여 대 호황을 누리고 있다.

## 제 7 장 참고문헌

1. Bell, A.A. and Weeler, M.H. (1986) Biosynthesis and function of fungal melanin. *Ann. Rev. Phytopathol.* 24, 411-451.
2. Richard A. Sturm, Neil F. Box, and Michele Ramsay. (1998) Human pigmentation genetics: the difference is only skin deep. *BioEssays.* 20, 712-721.
3. Tomita Y, Torinuki W, Tagami H. (1988) Stimulation of human melanocytes by vitamin D3 possibly mediates skin pigmentation after sun exposure. *J. Invest. Dermatol.* 90(6), 882-4.
4. Gordon PR, Gilchrist BA. (1989) Human melanogenesis is stimulated by diacylglycerol. *J Invest Dermatol.* 93(5), 700-2.
5. Aberdam E, Roméro C, Ortonne JP. (1993) Repeated UVB irradiations do not have the same potential to promote stimulation of melanogenesis in cultured normal human melanocytes. *J. Invest. Dermatol.* 106, 1015-22.
6. Hunt G, Todd C, Cresswell JE, Thody AJ. (1994) Alpha-melanocyte stimulating hormone and its analogue Nle4DPhe7 alpha-MSH affect morphology, tyrosinase activity and melanogenesis in cultured human melanocytes. *J Cell Sci.* 107, 205-11.
7. Seiberg, M., Paine, C., Sharlow, E., Andrade-Gordon, P., Costanzo, M., Eisinger, M. and Shapiro, S. S. (2000) Inhibition of melanosome transfer results in skin lightening. *J. invest. Dermatol.* 115(2), 162-167.
8. Hearing, V. J. (2005) Biogenesis of pigment granules: a sensitive way to regulate melanocyte function. *J. Dermatology sci.* 37(1), 3-14.
9. Fitzpatrick, T. B. and Breathnach, A. S. (1963) The epidermal unit system. *Dermatol Wochenschr.* 147, 481-489.
10. Weixiong, L. and Helene, Z.H. (1997) Induced melanin reduces mutations and



- killing in mouse melanoma. *Phytochem. Phytobiol.* 65,480–484.
11. Kaufman, R.J. (1991) Vectors used for expression in mammalian cells. *Meth. In. Enzymol.* 205,87–92.
  12. Kameyama, K., Takemura, T., Hamada, Y., Sakai, C., Kondoh, S., Nishiyama, S., Urabe, K. and Hearing, V.J. (1993) Pigment production in murine melanoma cells is regulated by tyrosinase, tyrosinase-related protein 1 (TRP1), DOPA chrome tautomerase (TRP2), and a melanogenic inhibitor. *J. Invest. Dermatol.* 100,126–131.
  13. del Marmol, V. and Beermann, F. (1996) Tyrosinase and related proteins in mammalian pigmentation. *FEBS Lett.* 381,165–168.
  14. Hearing, V. J. and Tsukamoto, K. (1991) Enzymatic control of pigmentation in mammals. *FASEB J.* 5,2902–2909.
  15. Jackson, I. J., Chambers, D. M., Tsukamoto, K., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A. and Hearing, V. J. (1992) A second tyrosinase-related protein, TRP-2, maps to and is mutated at the mouse slaty locus. *EMBO J.* 11,527–535.
  16. Kameyama, K., Takemura, T., Hamada, Y., Sakai, C., Kondoh, S., Nishiyama, S., Urabe, K. and Hearing, V. J. (1993) Pigment production in murine melanoma cells is regulated by tyrosinase, tyrosinase-related protein 1 (TRP1), DOPochrome tautomerase (TRP2), and a melanogenic inhibitor. *J. Invest Dermatol.* 100,126–131.
  17. Tsukamoto, K., Jackson, I. J., Urabe, K., Montague, P. M. and Hearing V. J. (1992) A second tyrosinase-related protein, TRP-2, is a melanogenic enzyme termed DOPochrome tautomerase. *EMBO J.* 11,519–526.
  18. Aroca, P., Solano, F., Salinas, C., Garcia-Borron, J. C. and Lozano, J. A. (1992) Regulation of the final phase of mammalian melanogenesis. The role of dopachrome tautomerase and the ratio between 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid and 5,6-dihydroxyindole. *Eur J Biochem.* 208,155–163.

19. Korner, A. and Pawelek, J. (1982) Mammalian tyrosinase catalyzes three reactions in the biosynthesis of melanin. *Science*. 217,1163-1165.
20. Gertrude-E. Costin, and Vincent J. Hearing. (2007) Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *The FASEB Journal Review*. 21.976-994.
21. Levy, C., Khaled, M. and Fisher, D. E., (2006) MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends Mol Med*. 12,406-414.
22. Busca, R. and Ballotti, R. (2000) Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. *Pigment Cell Res*. 13(2),60-69.
23. Tachibana, M. (2000) MITF: a stream flowing for pigment cells. *Pigment Cell Res*. 13,230-240.
24. Zawa, V. P. and Mhaskar, S. T. (2004) Exogenous ochronosis following hydroquinine for melasma. *J.cosmet dermatol*. 3(4),234-236.
25. Maeda, K. and Fukada, M. (1991) In vivo effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. *J. Soc. Cosmet. Chem*. 42, 361-368
26. Roh, J. S., Han, J. Y., Kim, J. H. and Hwang, J. k. (2004) Inhibitory effects of active compounds isolated from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seeds for melanogenesis. *Boil. Pharm. Bull*. 27,1976-1978.
27. Alt, J.L., W.R. Fehr, G.A. Welke, and J.G. Shannon. 2005. Transgressive segregation for oleate content in three soybean populations. *Crop Sci*. 45:2005-2007.
28. Buhr, T., S. Shirley, F. Ebrahim, A. Kinney, P.Staswick, and T. Clemente. 2002. Ribozyme termination of RNA transcripts down-regulate seed fatty acid genes in transgenic soybean. *Plant J*. 30:155-163.
29. Burton, J.W., and C.A. Brim. 1981. Recurrent selection of genetic variation

for oil properties and agronomic characteristics of soybean. *Crop Sci.* 24:783-787.

30. Burton, J.W., R.F. Wilson, C.A. Brim, and R.W. Rinne. 1989. Registration of soybean germplasm and with modified fatty acid composition in seed oil. *Crop Sci.* 29:1583.
31. Burton, J.W., R.F. Wilson, G.J. Rebetzke, and V.R. Pantalone. 2006. Registration of N98 - 4445A Mid-Oleic Soybean Germplasm Line. *Crop Sci* 46:1010-1012.
32. Cahoon, E.B. 2003. Genetic enhancement of soybean oil for industrial use prospects and challenges *AgBioForm* 6:11-13.
33. Cai, T.D. K.C. Chang, 1998. Characteristics of production-scale tofu as affected by soynilk coagulation method: propeller blade size, mixing time and coagulant concentration. *Food Res. Int.* 31:289-295.
34. Choung, M.G., S.T. Kang, W.Y. Han, I.Y. Baek, H.K. Kim, K.S. Kim, H.S. Park. 2005. Determination of fatty acid composition in soybean seed, using Near Infrared Reflectance Spectroscopy. *Korean J. Breed* 37(4):197-202.
35. Hwang, Y.H. Y.S. Kim, J.D Lee. 2004. Present status and future development direction of soy-related industries in Korea. *Korea Soybean Digest* 21(1):28-44.
36. Kang, Y.S. Hwang, Y.N. An, J.D. Lim, K.S. Kim, S.H. Park, and S.L. Kim. 2006. Variation of isoflavone contents in Korean soybean germplasm. *Korean J. Crop Sci.* 51: 146-151.
37. Dhakal, K.H., Y.S. Jeong, I.Y. Baek, N.S. Kang, Y.K. Yeo, and Y.H. Hwang. 2006. Composition of oil and fatty acid in sprout and wild soybeans for specific food and industrial applications. *Korean J. Breed.* 38(4) :236-241.
38. Dong, Y.S., B.C. Zhuang, L.M. Zhao, H. Sun, M.Y. He. 2001. The genetic diversity of annual wild soybeans grown in China. *Theor. Appl. Genet.* 103: 98-103.

39. Fehr, W.R. 2007. Breeding for modified fatty acid composition in soybean. *Crop Sci.* 47(S3):S72-S87.
40. Hammond, E.G., and B.A. Glatz. 1989. Biotechnology applied to fats and oils. Ch. 6. In *developments in food biotechnology*. R. King and P.S.J. Cheetham(Ed.), John Wiley & sons, New York. Vol.2 :173-217.
41. Hammond, E.G., and W.R. Fehr. 1983. Resistration of A6 germplasm line of soybean. *Crop. Sci.* 23: 192-193.
42. Heo, N.K., D.K. Park, K.M. Shim, S.Y. Lee, K.S. Kim, and N.S. Kim. 1995. Protein and lipid contents of Kangwon local soybeans and their RAPDs. *Korean J. Breed.* 27(3):215-220.
43. Kang, Y.M., and H.S. Kim. 2001. Emulsified transesterification of soybean oil into bio-diesel. *J. Korean Oil Chemists Soc.* 18(4):298-305.
44. Kim, H.R., J.H. Lee, Y.S. Kim, and K.M. Kim. 2007. Chemical Characteristics and Enzyme Activities of Icheon Ge-Geol Radish, Gangwha Turnip, and Korean Radish, *Korean J. Food Sci. Technol.* Vol. 39, No. 3, p 255~259.
45. Kim, K.C., and E.H. Park. 2005. Variation of protein, Oil Contents and Fatty Acid Composition of Korean Wild Soybean (*Glycine soja* Sieb. & Zucc.) Seed. *Korean J. Crop Sci.* 50: 118-122.
46. Kinney, A.J., and S. Knowlton. 1998. Designer oils: The high oleic acid soybean. p. 193-213. *In*. S. Roller and S. Harlander (ed.) *Genetic modification in the food industry*. Blackie Academic, London.
47. Kwon, B.S., and J.S. shin. 2002. Seed protein content and fatty acid composition of black seeded soybeans collected from southwestern islands. *Korean J. Crop Sci.*, 47(3):242-243.
48. Kwon, S.H., K.H. Im, and J.R. Kim. 1972. Diversity of protein and oil contents of the Korean soybean land race ( I ). *Korean J. Breed.* 4(1):29-32.
49. Lee, J.D., K.D. Bilyey, and J.G. Shannon. 2007. Genetics and breeding for

- modified fatty acid profile in soybean seed oil. *J. Crop Sci. Biotech.* 10(4):201-210.
50. Lim, B.T., J.M. DeMan, L. DeMan, and R.I. Buzzell. 1990. Yield and quality of tofu as affected by soybean and soymilk characteristics: Calcium sulfate coagulant. *J. Food Sci.* 55: 1088-1092.
  51. Liu, K. 1999. Soy oil modification: products, applications. *INFORM* 10: 868-878.
  52. Murphy, P.A., H.P. Chen, C.C. Hauck, L.A. Wilson, 1997. Soybean protein composition and tofu quality. *Food Technol.* 51: 86-88, 110.
  53. Neff, W.E., and R. Gary. 1999. Oxidative stability of natural and randomized high-palmitic and high-stearic acid oils from genetically modified soybean varieties. *J. American Oil Chemists' Society.* Vol 76: 825-831.
  54. Olivia, M.L., J.G. Shannon, D.A. Sleper, M.R. Ellersieck, A.J. Cardinal, R.L. Paris, and J.D. Lee. 2006. Stability of fatty acid profile in soybean genotypes with modified seed oil composition. *Crop Sci.* 46:2069-2075.
  55. Rahman, S.M., Y. Takagi, K. Kubota, K. Miyamoto, and T. Kawakita. 1994. High oleic acid mutant in soybean induced by X-ray irradiation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58:1070-1072.
  56. Ross, A.J., W.R. Fehr, G.A. Welke, and S.R. Cianzio. 2000. Agronomic and Seed Traits of 1%-Linolenate Soybean Genotypes. *Crop Sci.* 40:383-386.
  57. Saio, K. M. Komiya, T. Watanabe. 1969. Food processing characteristics of soybean 11S and 7s proteins. Part 1. Effect of difference of protein components among soybean varieties on formation of tofi-gel. *Agric. BioZ. Chern.* 33: 1301-1308.
  58. Singh, R.J., and T. Hymowitz. 1999. Soybean genetic resources and crop improvement. *Genome* 42: 605-616.
  59. Streit, L.G., W.R. Fehr, G.A. Welke, E.G. Hammond, and S.R. Cianzio. 2001.

- Family and line selection for reduced palmitate, saturates, and linolenate of soybean. *Crop Sci.* 41:63–67.
60. Takagi, Y., and S.M. Rahman. 1996. Inheritance of high oleic acid content in the seed oil of soybean mutant M23. *Theor. Appl. Genet.* 92:197–182.
  61. Wang, J. 2006. Selection of breeding materials with high linoleic acid and/or low linolenic acid content in soybean. *J. American Sci.* 2(3):29–32.
  62. Wang, H.L., E.W. Swain, W.F. Kwolek, W.R. Fehr. 1983. Effect of soybean varieties on the yield and quality of tofu. *Cereal Chem.* 60:245–248.
  63. Warner, K., and M. Gupta. 2005. Potato chip quality and frying oil stability of high oleic acid soybean oil. *J. food sci.* vol 70: S395–S400.
  64. Wilcox, J.R., J.W. Burton, G.J. Rebetzke, and R.F. Wilson. 1994. Transgressive segregation for palmitic acid in seed oil of soybean. *Crop Sci.* 34:1248–1250.
  65. Wilson, R.F. 1996. Current research on oilseeds. Presented at the institute of food technologists. Symposium; Identity preserved oils, new Orleans, LA, June 21–22.
  66. Wilson, R.F. 2004. Seed composition. In H.R. Boerman, J.E. Specht (eds.). *Soybeans: Improvement, Production and Uses*, Ed. 3. Am. Soc. Agron. Madison. pp.621–677.
  67. Yang, G.Y., H. Zhen, C. Han, and F. Ji. 1993. A preliminary study on protein and oil contents of wild soybean(*G. soja*) in Jilim Province. *Soybean Genet. Newsl.* 20: 35–38.
  68. Yoon, T.H., K.J. Im, and D.H. Kim. 1984. Fatty acid composition of lipids obtained from Korean soybean varieties. *Korean J. Food Sci. Technol.* 16(4):375–382.
  69. Yun, H.T., W.H. Kim, Y.H. Lee, and S.J. Kim. 2006. Isoflavone contents of soybean according to different planting dates. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 16(4):375–382.

70. Anderson, R.L. and Wolf, W.J. 1995. Compositional changes in trypsin inhibitors, phytic acid, saponins and isoflavones related to soybean processing. *J. Nutr* 125: 581-588.
71. Coward, S., Barnes, NC., Setchell KDR. and Barnes S. 1993. Genistein, daidzein and their glucoside conjugates: Antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets. *J Agri. Food. Chem.* 31: 394-396.
72. Kim J.S., Kim J.G. and Kim, W.J. 2004. Changes in isoflavone and oligosaccharides of soybeans during germination. *Korean J. Food. Sci. Tec.* 36(2): 294-298.
73. Kim, J.S. and Kwon, C.S. 2001. Estimated dietary isoflavone intake of Korean population based on national nutrition survey. *Nutrition Research* 21: 947-953.
74. Kitamura, K., Ijita, K., Kikuchi, A., Kudou. S. and Okubo, K. 1991. Low isoflavone content in some early maturinr cultivars. so-called "summer-type soybean" [*Glycine max*(L.) Merrill.] *Japan J. Breed* 41: 651-654.
75. Kown, T.W., Song, Y.S. and Hong J.H. 1998. Current research on the bioactive functions of soyfoods in Korea. *Korea Soybean Digest.* 15(2): 1-12.
76. Lee, H.S. and Son, J.Y. 2002. Antioxidant and synergist effect of extract isolated from commercial green, oolong and black tea. *Korean J. Food and Nutr.* 15(4): 377-381.
77. Morris, P.F., Savard, M.E. and Ward, E.W.B. 1991. Identification and accumulation of isoflavonoids and isoflavone glucosides in soybean leaves and hypocotyls in resistance to *Phytohptra megasperma* .sp. glycine. *Physiol. Molecular Plant Path.* 39(3): 229-244.
78. Tony, J. Vyn. 2002. Potassium fertilization effects on isoflavone concentrations in soybean[*Glycine max*(L.) Merrill.] *J. Agri. Food Chem.* 50: 3501-3506.
78. Yang, C.B. and Kim, Z.U. 1980. Chsnge in nitrogen compounds and nutritional evaluation of soybean sprout. Part I. Changes of amino acid

composition. Korean J. Agri. Chem, Soc. 23(1): 7-13.

80. Yun., H.T., Kim, W.H., Lee, Y.H. and Kim, S.J. 2006. Isoflavone contents of soybean according to different planting dates. Korean J. Crop. Sci. 51(5): 174-178.
81. Chen, W.L., Leopold, R.A., 2007. Progeny quality of *Gonatocerus ashmeadi* (Hymenoptera: Mymaridae) reared on stored eggs of *Homalodisca coagulata* (Hemiptera: Cicadellidae). J. Econ. Entomol. 100, 685 - 694.
82. Gautam, R.D., 1987. Cold storage of eggs of host, *Spodoptera litura* (Fabr.) and its effects on parasitism by *Telenomus remus* Nixon (Hymenoptera: Scelionidae), J. Entom. Res. 11, 161-165.
83. Kivan, M., Kilic, N., 2005. Effects of storage at low-temperature of various heteropteran host eggs on the egg parasitoid, *Trissolcus semistriatus*. BioControl 50, 589-600.
84. Larentzaki, E., Powell, G., Copland, M.J.W., 2007. Effect of cold storage on survival, reproduction and development of adults and eggs of *Franklinothrips vespiformis* (Crawford). Biol. Control 43, 265-270.
85. Lim, U.T., Mahmoud, A.M.A., 2009. Inoculation of refrigerated non-viable eggs of *Riptortus clavatus* (Heteroptera: Alydidae) to enhance parasitism by egg parasitoid in soybean field. Appl. Entomol. Zool. 44, 37 - 45.
86. Mahmoud, A.M.A., Lim, U.T., 2007. Evaluation of cold-stored eggs of *Dolycoris baccarum* (Hemiptera: Pentatomidae) for parasitization by *Trissolcus nigripedius* (Hymenoptera: Scelionidae). Biol. Control 43, 287 - 293.
87. Noda, T., 1989. Seasonal occurrence of egg parasitoids of *Riptortus clavatus* (Thunberg) (Heteroptera: Alydidae) on several leguminous plants. Jpn. J. Appl. Entomol. Zool. 33, 257 - 259.
88. Noda, T., 1993. Ovipositional strategy of *Gryon japonicum* (Hymenoptera: Scelionidae). Bull. Natl. Inst. Agro-Environ. Sci. 9, 1-51.



89. Orr, D.B., 1988. Scelionid wasps as biological control agents: a review. *Fla. Entomol.* 71, 506 - 528.
90. Strand, M.R., Vinson, S.B., 1983. Host acceptance behavior of *Telenomus heliothidis* (Hymenoptera: Scelionidae) toward *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 76, 781-785.
91. Takasu, K., Hirose, Y., 1988. Host discrimination in the parasitoid *Ooencyrtus nezarae*: the role of the egg stalk as an external marker. *Entomol. Exp. Appl.* 47, 45-48.
92. Van Driesche, R.G., Bellows, T.S., 1996. *Biological Control*. Chapman & Hall, New York. pp. 31-33.
93. Zar JH., 1999. *Biostatistical Analysis*. Fourth edition, Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.
94. Baek I, Jeon SB, Kim J, Seok YM, Song MJ, Chae SC, Jun JE, Park WH, Kim IK. 2009. A role for Rho-kinase in Ca-independent contractions induced by phorbol-12,13-dibutyrate. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 36:256-61.
95. Bendre M, Gaddy D, Nicholas RW, Suva LJ. 2003. Breast cancer metastasis to bone: it is not all about PTHrP. *Clin Orthop Relat Res.* (415 Suppl):S39-45.
96. Boue SM, Carter CH, Ehrlich KC, Cleveland TE. 2000. Induction of the soybean phytoalexins coumestrol and glyceollin by *Aspergillus*. *J Agric Food Chem* 48:2167 - 2172
97. Boyde A, Maconnachie E, Reid SA, Delling G, Mundy GR. 1986. Scanning electron microscopy in bone pathology: review of methods, potential and applications. *Scan Electron Microsc.* (Pt 4):1537-54.
98. Budzyn K, Marley PD, Sobey CG. 2006. Targeting Rho and Rho-kinase in the treatment of cardiovascular disease. *Trends Pharmacol Sci* 27:97 - 104.
99. Cohen-Solal M, de Vernejoul MC. 2003. Bone remodeling. *Therapie.*

58(5):391-393.

100. Choong PF. 2003. The molecular basis of skeletal metastases. *Clin Orthop Relat Res.* (415 Suppl):S19-31.
101. Fukata Y, Amano M, Kaibuchi K. 2001. Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends Pharmacol Sci.* 22(1):32-9.
102. Iqbal MM. 2000. Osteoporosis: epidemiology, diagnosis, and treatment. *South Med J.* 93(1):2-18.
103. Lai A, Frishman WH. 2005. Rho-kinase inhibition in the therapy of cardiovascular disease. *Cardiol. Rev.* 13: 285-92.
104. Moriki N, Ito M, Seko T, Kureishi Y, Okamoto R, Nakakuki T, Kongo M, Isaka N, Kaibuchi K, Nakano T. 2004. RhoA activation in vascular smooth muscle cells from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res.* Apr;27(4):263-70.
105. Nikov GN, Hopkins NE, Boue S, Alworth WL. 2000. Interactions of dietary estrogens with human estrogen receptors and the effect on estrogen receptor-estrogen response element complex formation. *Environ Health Perspect.* 108(9):867-72.
106. Parniske M, Ahlborn B, Werner D. 1991. Isoflavonoid-inducible resistance to the phytoalexin glyceollin in soybean rhizobia. *J Bacteriol.* 173(11):3432-9.
107. Pedras MS, Ahiahonu PW. 2005. Metabolism and detoxification of phytoalexins and analogs by phytopathogenic fungi. *Phytochemistry* 66:391 - 411.
108. Roodman GD. 2004. Mechanisms of bone metastasis. *N Engl J Med.* 350(16):1655-64.
109. Kozlow W, Guise TA. 2005. Breast cancer metastasis to bone: mechanisms of osteolysis and implications for therapy. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 10(2):169-180.

110. Palmqvist P, Persson E, Conaway HH, Lerner UH. IL-6, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M stimulate bone resorption and regulate the expression of receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand, osteoprotegerin, and receptor activator of NF- $\kappa$ B in mouse calvariae. *J Immunol.* 169(6):3353-3362.
111. Sacks FM, Svetkey LP, Vollmer WM, Appel LJ, Bray GA, Harsha D, Obarzanek E, Conlin PR, Miller ER 3rd, Simons-Morton DG, Karanja N, Lin PH. 2001. Effects on blood pressure of reduced dietary sodium and the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) diet. *N Engl J Med.* Jan 4;344(1):3-10.
112. Salvo VA, Boué SM, Fonseca JP, Elliott S, Corbitt C, et al. 2006. Antiestrogenic glyceollins suppress human breast and ovarian carcinoma tumorigenesis. *Clin Cancer Res.* 12(23):7159-64.
113. Seko T, Ito M, Kureishi Y, Okamoto R, Moriki N, Onishi K, Isaka N, Hartshorne DJ, Nakano T. 2003. Activation of RhoA and inhibition of myosin phosphatase as important components in hypertension in vascular smooth muscle. *Circ Res.* 7;92(4):411-8.
114. Seok YM, Baek I, Kim YH, Jeong YS, Lee IJ, Shin DH, Hwang YH, Kim IK. 2008. Isoflavone attenuates vascular contraction through inhibition of the RhoA/Rho-kinase signaling pathway. *J Pharmacol Exp Ther* 326:991 - 998.
115. Shimokawa H, Takeshita A. 2005. Rho-kinase is an important therapeutic target in cardiovascular medicine. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25: 1767-75.
116. Song MJ, Baek I, Jeon SB, Seo M, Kim YH, Cui S, Jeong YS, Lee IJ, Shin DH, Hwang YH, Kim IK. 2010. Effects of glyceollin I on vascular contraction in rat aorta. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 381(6):517-28.
117. Stepan JJ, Alenfeld F, Boivin G, Feyen JH, Lakatos P. 2003. Mechanisms of action of antiresorptive therapies of postmenopausal osteoporosis. *Endocr Regul.* 37(4):225-238.

118. Theill LE, Boyle WJ, Penninger JM. 2001. RANK-L and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution. *Annu Rev Immunol.* 20:795-823.
119. Rosen CJ. 2005. Clinical practice. Postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med.* 353(6):595-603.
120. Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T, Tamakawa H, Yamagami K, Inui J, Maekawa M, Narumiya S. 1997. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature.* 30:389(6654):990-4.
121. Valachovicova T, Slivova V, Sliva D. 2004. Cellular and physiological effects of soy flavonoids. *Mini Rev Med Chem.* Oct;4(8):881-7.
122. Wagner EF, Karsenty G. 2001. Genetic control of skeletal development. *Curr Opin Genet Dev.* 11:527-532.
123. Wirth A, Benyo Z, Lukasova M, Leutgeb B, Wettschureck N, Gorbey S, Orsy P, Horvath
124. B, Maser-Gluth C, Greiner E, Lemmer B, Schutz G, Gutkind JS, Offermanns S. 2008. G12-G13-LARG-mediated signaling in vascular smooth muscle is required for salt-induced hypertension. *Nat. Med.* 14: 64-8.
125. Yamaguchi A. 2005. Molecular basis of bone formation and bone regeneration. *Tanpakushitsu Kakusan Koso.* 50(6Suppl):664-669.
126. Zimmermann MC, Tilghman SL, Boué SM, Salvo VA, Elliott S, et al. 2010. Glyceollin I, a novel antiestrogenic phytoalexin isolated from activated soy. *J Pharmacol Exp Ther.* 332(1):35-45. Epub 2009 Oct 1.
127. Arai, S., H. Suzuki., M. Fujimaki., Y. Sakurai. 1966. Studies on flavor components in soybean : Par II. phenolic acids in defatted soybean flour. *Agric. Biol. Chem.* 30, 364.
128. Barnes, S. 1997. The chemopreventive properties of soy isoflavonoids in animal models of breast cancer. *Breast Cancer Res. Treatment* 46, 169-179.

129. Barrett, J.C. 1993. Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment. *Environ Health Perspect.* 100:9-20.
130. Benson, A.M., M.J. Hunkeler, and P. Talalay. 1980. Increase of NAD(P)H:Quinone reductase by dietary antioxidants; Possible role in protection against carcinogenesis and toxicity. *Proc. Natl. Acad. sci. U.S.A.* 77:5216-5220.
131. Dietz, B.M., Y.H. Kang, G. Liu, A.L. Eggler, P. Yao, L.R. Chadwick, G.F. Pauli, N.R. Farnsworth, A.D. Mesecar, R.B. van Breemen, and J.L. Bolton. 2005. Xanthohumol isolated from *Humulus lupulus* inhibits menadione-induced DNA damage through induction of quinone reductase. *Chem Res toxicol.* 18:1296-1305.
132. Doll, R. and R. Peto. 1981. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst.* 66:1191-1308.
133. Kim, M.H., W.W. Kang, N.H. Lee, D.J. Kwon, O.J. Kwon, Y.S. Chung. 2007. Changes in Quality Characteristics of Cheonggukjang Made with Germinated Soybean. *KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL.* Vol. 39, No. 6, pp. 676~680.
134. Kudou, S., K. Okubo. 1991. Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (*Glycine max Merrill*). *Agric. Biol, Chod.*, 55(9), 2227-2233.
135. Lee, J.D., Y.H. Hwang. 2005. A new Glycine soja germplasm accession with green seed-coat color. *Breeding Science* 55:21-25.
136. Lee, S.O., M.J. Kim, D.K. Kim and H.J. Choi. 2005. Antioxidative activities of temperature-stepwise water extracts from *Inonotus obliquus*. *Korean J. Soc. Food Sci. Nurt.*, 34, 139-147.
137. MARTIN, A., M, CLYNES. 1993. Comparison of 5 microplate assays for *invitro* cytotoxicity testing and cell proliferation assays. *Cytotechnology*, 11, 49-58.
138. Messina, M., S, Barnes. 1991. The role of soy products in reducing risk of cancer. *J. Natil. Cancer Inst.* 83. 2971-1875

139. Moon, G.S., T.W. Kwon, S.H. Ryu. 2003. Comparison of antioxidant activities of soybean components by different assay. *Korea soybean Digest* 20 : 28-36.
140. Pratt, D.E., C.D. Pietro., W.L. Porter., J.W. Giffie. 1982. Phenolic antioxidants of soy protein in hydrolyzates. *J. Food Sci.*, 47, 24.
141. Prochaska, H.J., A.B. Santamaria, P. Talalay. 1992. Rapid detection of inducers of enzymes that protect against carcinogens. *Proc Natl Acad Sci USA*. 89:2394-2398.
142. Radi, R., J.S. Beckman., K.M. Bush. B.A. Freeman. 1991. Peroxynitire-induced membrane lipid peroxidation; The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.*, 288, 481-485.
143. Somekawa, Y., M. Chiguchi, T. Ishibashi., T, Aso. 2001. Soy intake related to menopausal symptoms, serum lipids, and bone mineral density in postmenopausal Japanese women. *Obstet. Gynecol.*, 97: 109-115.
144. Szuster-Ciesielska, A., Daniluk, J. and Kandefr-Szerszen, M. 2001. Alcohol-related cirrosis with pancreatitis: The role of oxidative stress in the progression of the disease. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 49, 19-22.
145. Ahn YS, Kim YS, Shin DH. Isolation, identification, and fermentation characteristics of *Bacillus* sp. with high protease activity from traditional *Cheonggukjang*. *Korean J Food Sci Technol* 38: 82-87, 2006.
146. Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'antioxidant power': The FRAP assay, *Anal Biochem* 239: 70-76, 1996
147. Choe JS, Kim JS, Yoo SM, Park HJ, Kim TY, Chang CM, Shin SY. Survey on prepatation method and consumer response of *chungkukjang*. *Korea Soybean Digest* 13: 29-43, 1996.
148. Choi Y, Kim MH, Shin JJ, Park JM, Lee J. The antooxidant activities of the some commercial teas. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 32: 723-727, 2003.

149. Dewnto V, Xianzhong W, Liu RH. Processed sweet corn has higher antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 50: 4959–4964, 2002.
150. Guo Tt, Xu HI, Zhang Lx, Zhang Jp, Guo Yf, Gu Jw, He Pm. Im vivo protective effect of Porphyra yezoensis polysaccharid against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in mice. *Regul Toxicol Pharm* 49: 101–106, 2007
151. Han GH, Cho TY, Yoo MS, Kim CS, Kim JM, Kim HA, Kim MO, Kim SC, Lee SA, Ko YS, Kim SH, Kim DB. Biogenic amines formation and content in fermented soybean paste (*Cheonggukjang*). *Korean J. Food Sci. Technol.* 39: 541–545, 2007
152. Kang YH, Park YK, Lee GD. The nitrite scavenging and electron donating ability of phenolic compounds. *Korean J. Food Sci. Technol.* 28: 232–239, 1996.
153. Kilani S, Ammar RB, Bouhled I, Hayder N, Mahmoud A, Ghedira K, Chekir-Ghedira I. Investigation of extracts from (Tunisian) *Cyperus rotundus* as antimutagens and radical scavengers. *Environ. Toxicol. Phar.* 20: 478–484, 2005.
154. Kim HK, Choi YJ, Kim KH. Functional activities of microwave-assisted extracts from *Flammulina velutipes*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 34: 1013–1017, 2002.
155. Kim IJ, Kim HK, Chung JH, Jeong YK, Ryu CH. Study of functional *chungkukjang* contain fibrinolytic enzyme. *Korean J. Life Sci.* 12: 357–362, 2002.
156. Kim SS, Lee JH, Ahn YS, Kim JH, Kang DK. A fibrinolytic enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* D4-7 isolated from *cheonggukjang*: Its characterization and influence of additive on thermostability. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* 31: 271–276, 2003.
157. Lee JJ, Cho CH, Kim JY, Kee DS, Kim HB. Antioxidant activity of substance extracted by alcohol from *chungkukjang* powder. *Korean J.*

*Microbiol.* 37: 177-181, 2001.

158. Lee MY, Park SY, Jung KO, Park KY, Kim SD. Quality and functional characteristics of *cheonggukjang* prepared with various *Bacillus sp.* isolated from traditional *cheonggukjang*. *J. Food Sci.* 70: M191-M196, 2005.
159. Matsui T, Yoo HJ, Hwang JS, Lee DS, Kim HB. Isolation of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from *chungkukjang*. *Korean J. Microbiol.* 40: 355-358, 2004.
160. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio. Med.* 26: 1231-1237, 1999.
161. Seog HM, Seo MS, Kim SR, Park YK, Lee YT. Characteristics of barley polyphenol extract(BPE) separated from pearling by-products. *Korean J. Food Sci. Technol.* 34: 775-779, 2002.
162. Ue Sf, Hou Aq, Ahang Qq. Protective Effect of *Phellinus Linteus* extract against iron overload-mediated oxidative stress in cultured rat hepatocytes. *Phytother Res* 21: 948-953, 2007.
163. Weisel T, Baum M, Eisenbrand G, Dietrich H, Will F, Stockis JP, Kulling S, Rufer C, Johannes C, Janzowski C. An anthocyanin/polyphenolic-rich fruit juice reduces oxidative DNA damage and increases glutathione level in healthy probands. *J Biothechnol* 1: 388-397, 2006.
164. Youn KC, Kim JO, Park BJ, Yook HS, Cho JM, Byun MW. Quality characteristics of the *cheonggukjang* fermentated by mixture culture of *Bacillus natto* and *B. licheniformis*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 31: 204-210, 2002.
165. 이정아 , 황영현 , 황인욱 , 김숙경 , 박진순 , 정호철 , 한진희 , 정신교. 생리활성/영양/기능성/공학 분야 : 아가콩 청국장 분말 쌀쿠키의 기호성 향상 소재 첨가에 따른 품질특성. 한국식품저장유통학회 학술대회, p224, 2009
166. 송윤희, 주나미. 청국장분말 첨가 발아현미 쿠키의 품질특성 및 최적화. 한국식



생활문화학회지 24, 321-330 (2009)

167. 안상희, 이신호, 박금순. 청국장 분말 첨가 두부의 품질특성. 한국식품조리과학회지 24:258-265 (2008)
168. 이용미, 류은순. 청국장 분말 첨가 패티의 이화학적 및 관능적 특성. 한국식품조리과학회지 24: 742-747 (2008)
169. 엄상미, 정보영, 오훈일. 발아대두 청국장의 발효 중 화학성분의 변화. Journal of Applied Biological Chemistry 52:133-141 (2009)
170. Do GM, Choi MS, Kim HJ, Woo MN, Lee MK, Jeon SM. Soy pinitol acts partly as an insulin sensitizer or insulin mediator in 3T3-L1 preadipocytes. Genes Nutr. 2008 Feb;2(4):359-64.
171. Sethi G, Ahn KS, Sung B, Aggarwal BB. Pinitol targets nuclear factor- $\kappa$ B activation pathway leading to inhibition of gene products associated with proliferation, apoptosis, invasion, and angiogenesis. Mol Cancer Ther. 2008 Jun;7(6):1604-14.
172. Lee JS, Jung ID, Jeong YI, Lee CM, Shin YK, Lee SY, Suh DS, Yoon MS, Lee KS, Choi YH, Chung HY, Park YM. D-pinitol inhibits Th1 polarization via the suppression of dendritic cells. Int Immunopharmacol. 2007 Jun;7(6):791-804.
173. Kang MJ, Kim JI, Yoon SY, Kim JC, Cha IJ. Pinitol from soybeans reduces postprandial blood glucose in patients with type 2 diabetes mellitus. J Med Food. 2006 Summer;9(2):182-6.
174. Singh RK, Pandey BL, Tripathi M, Pandey VB. Anti-inflammatory effect of (+)-pinitol. Fitoterapia. 2001 Feb;72(2):168-70.
175. Zhan T, Lou H. Synthesis of azole nucleoside analogues of D-pinitol as potential antitumor agents. Carbohydr Res. 2007 May 7;342(6):865-9.
176. Heo JC, Park CH, Lee HJ, Kim SO, Kim TH, Lee SH. Amelioration of asthmatic inflammation by an aqueous extract of *Spinacia oleracea* Linn. Int

J Mol Med. 2010 Mar;25(3):409-14.

177. Heo JC, Rho JR, Kim TH, Kim SY, Lee SH. An aqueous extract of green tea *Camellia sinensis* increases expression of Th1 cell-specific anti-asthmatic markers. *Int J Mol Med*. 2008 Dec;22(6):763-7.
178. Heo JC, Son M, Woo SU, Kweon MA, Yoon EK, Lee HK, Choi WS, Cho KJ, Lee SH. A fraction of methylene chloride from *Geum japonicum* Thunberg inhibits tumor metastatic and angiogenic potential. *Oncol Rep*. 2008 Jun;19(6):1399-403.
179. Heo JC, Woo SU, Kweon MA, Park JY, Lee HK, Son M, Rho JR, Lee SH. Aqueous extract of the *Helianthus annuus* seed alleviates asthmatic symptoms in vivo. *Int J Mol Med*. 2008 Jan;21(1):57-61.
180. Heo JC, Woo SU, Son M, Park JY, Choi WS, Chang KT, Kim SU, Yoon EK, Kim YH, Shin HM, Lee SH. Anti-tumor activity of *Gastrodia elata* Blume is closely associated with a GTP-Ras-dependent pathway. *Oncol Rep*. 2007 Oct;18(4):849-53.
181. Szuhaj. B. F. 1988. *Lecithin : Sources, Manufacture & Uses*. The American Oil Chemistry' Society.
182. 홍희도, 김성란, 김성수. 2000. 대두 및 대두가공식품 중의 Bowman-Brik protease inhibitor 함량. *한국콩연구회지* 17:61-68
183. Scholfield, C. R. 1981. Composition of soybean lecithin. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 58:889-892
184. Balazs, P.E., Schmit, P.L. and Szuhaj, B.F 1996. HPLC Separation of Soy Phospholipids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73(3):193-197
185. Folch, J., Lees, M. and Stanley, G.H.S. 1957. A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipids from Animal Tissues. *J. Biol. Chem.* 266:597-509
186. 박순혜, 김일웅, 김동만, 김시관 2006. 레시틴이 강화된 인삼 추출물 제조 방법.

187. Jee-Young Kim, Young-Sun Maeng and Ki-Young Lee 1995. Antioxidative Effects of Soybean Extracts by using Various Solvents. KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. 27(5) : 635-639
188. 김천희, 박점선, 손현수, 정재원 2002. 대두 가공품 1회분량 내 이소플라본, 사포닌, 식이섬유, 대두 올리고당 및 레시틴 함량(상업용 대두 가공품 1회 분량 당의 생리활성 물질 함량 분석). KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. 34(1) : 96-102
189. 식품공전. 1998. 식품의약품안전청.
190. 김덕숙, 안명수 1988. 각종 탈검제에 의한 식물성 기름의 탈검효과. KOREAN J. SOC. FOOD SC. 4(1)
191. 장애라, 임동균, 김일준, 이무하. 반응표면 분석법을 이용한 계란 난황내 레시틴 분리
192. 김귀식, 정보영, 배태진, 오원숙 1998. 참치 내장유 중에서 레시틴의 분리, 정제 및 이용에 관한 연구. J. Korean Fsh. Soc. 31(6) : 895-900
193. Myung G. Shin, Sung H. Moon and Joon S. Rhee 1981. Process Conditions for Maximum Yield of Crude Soy Lecithins and Its Quality Improvement by Solvent Extraction. KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. 13(2)
194. Snyder. H. and Kwon. T. 1987. Soybean Utilization. Ban Nostrand Reinhold Co. New York.
195. Suk-Hoo Yoon, David B. Min, Young K. Yeo\*, and Lloyd A. Horrocks\* 1987. Analyses of Phospholipids in Soybean Oils by HPLC. Korean J. Food SCI. TECHNOL. 19
196. Elizabeth A.Kirk.et al. 1998. Dietary isoflavones reduce plasma cholesterol and atherosclerosis in C57BL/6 mice but not LDL receptor deficient mice. J Nutr. 128(6) : 954 - 959

197. Alice K.Lichenstein. 1998. Soy protein, isoflavones and cardiovascular disease risk. *J. Nutr.* 128(10) : 1589 - 1592(The effect of Cholesterol decline in bone)
198. Donghua Li et al. 1999. Soyben isoflavones reduce experimental metastasis in mice.*J Nutr.* 129(6) : 1075-1078
199. C.A. Lamartiniere. 1995. Current dietary practices may affect future health. We quote here the study, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 208(1) : 120-123
200. Akiyama T., Ishida J., Nakagawa S., Ogawara H., Watanabe S., Itoh N., Shibuya M. and Fukami Y. (1987) Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J. Biol. Chem.* 262: 5592-5595
201. Kajanne R., Miettinen P., Mehlem A., Leivonen S.-K., Birrer M., Foschi M., Kahari V.-M. and Leppa S. (2007) EGF-R Regulates MMP Function in Fibroblasts Through MAPK and AP-1 Pathways. *J. Cell. Physiol.* 212: 489 -497
202. Xu Y., Shao Y., Voorhees J.J. and Fisher G.J. (2006) Oxidative inhibition of receptor-type protein-tyrosine phosphatase kappa by ultraviolet irradiation activates epidermal growth factor receptor in human keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 281: 27389-27397
203. Park H.J., Yang J.Y., Ambati S., Della-Fera M.A., Hausman D.B., Rayalam S. and Baile C.A. (2008) Combined effects of genistein, quercetin, and resveratrol in human and 3T3-L1 adipocytes. *J. Med. Food* 11: 773-783
204. Liao Q.C., Li Y.L., Qin Y.F., Quarles L.D., Xu K.K., Li R., Zhou H.H. and Xiao Z.S. (2008) Inhibition of adipocyte differentiation by phytoestrogen genistein through a potential downregulation of extracellular signal-regulated kinases 1/2 activity. *J. Cell. Biochem.* 104: 1853-1864
205. Kim YB, Ko YT, Moon SA 1986 Growth of Lactic Acid Bacteria in Soy Milk and Flavor of Soy Yogurt *J Korean Soc Food Sci Nutr* 118-123
206. Kim Eun Su, Jung Sung Su, Cho Jae Sun, 1990 Effect of pH, Chemical Composition and Additives on Stability of Soymilk Suspension

207. Kang Jin Hoon. 2003. Studies on the Radical Scavenging Effects and the Inhibitory Effects on ACE Activity of Several Flavonoids J Korean Soc Food Sci Nutr 33 1318~1322
208. Seong HS, Kim WJ, Kim NM. 1984 Effect of Germination on Phytic Acid and Soluble Minerals in Soymilk J Korean Soc Food Sci 358-362
209. OH SH. 2003. Development of recycling technology for the production of whole soymilk from soywaste
210. Ju Hyun Yoo, Jeong Kil Park, In Deok Ryu, Hong Chul Lim. 1988. Lactic Acid Fermentation in Soymilk by Single and Mixed Cultures of Lactobacillus Casei and Kluyveromyces fragilis. Korean J. Food Sci. Technol.518-525
211. Kyung-Seok Lee, Kyung-Tae Kim, Yong-Myun Jung, Ki-Young Lee 2006 Emulsion Stability of Soymilk Produced by the Varied Homogenizing Pressure J Korean Soc Food Sci Nutr 1434~1438
212. Sung Ran Kim, Yong Kon Park, Ho Moon Seog, Seung Hoon Oh 2002 Whole Soybean Milk Produced by Enzymatic Solubilization of Soymilk Residue , and Its Nutritional Properties J Korea Soybean Soc, Vol.19, No.1 8~18
213. Zhang, G. and Bown, A. W. (1997) The rapid determination of  $\gamma$ -aminobutyric acid. *Phytochem.* 446, 1007-1009.
214. Cushman DW, Chung HS. 1971. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem Pharmacol* 20: 1637-1648.
215. Tongtong Song, Kobita Barua, Gwen Buseman, and Patricia A Murphy The American Society for Clinical Nutrition. 1998
216. Young-In I Kwon MS, Dhiraj A Vатtem Ph.D and Kalidas Shetty Ph.D Evaluation of clonal herbs of Lamiaceae species for management of diabetes and hypertension Asia Pac J Clin Nutr;15 (1):107-118

217. Chanida HANSAWASDI, JUN KAWABATA, and Takanori KASAI  $\alpha$ -Amylase Inhibitors from Roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) Tea Biosci. Biotechnol. Biochem, 64 (5), 1041-1043, 2000
218. Prachuab Kwanyuen and Joe W. A simple and rapid procedure for phytate determination in soybeans and soy products. Journal of the American Oil Chemists' Society 81-85, 2005
219. Albu J, Allison D, Boozer CN, Heymsfield S, Kissileff H, Kretser A, Krumhar K, Leibel R, Nonas C, Pi-Sunyer X, VanItallie T and Wedral E. 1997. Obesity solutions: report of a meeting. Nutr Rev. 55(5), 150-6
220. Baek SJ, Wilson LC and Eling TE. 2002. Resveratrol enhances the expression of non-steroidal anti-inflammatory drug-activated gene (NAG-1) by increasing the expression of p53. *Carcinogenesis* 23, 425-434.
221. Baek SJ, Kim JS, Moore SM, Lee SH, Martinez J and Eling TE. 2005. Cyclooxygenase inhibitors induce the expression of the tumor suppressor gene EGR-1, which results in the up-regulation of NAG-1, an antitumorigenic protein. *Mol. Pharmacol.* 67, 356-364.
222. Banerjee S, Li Y, Wang Z and Sarkar FH. 2008. Multi-targeted therapy of cancer by genistein. *Cancer Lett.* 269, 226-242.
223. Bordone L and Guarente L. 2005. Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: understanding longevity. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6(4), 298-305.
224. Braissant O, Fougelle F, Scotto C, Dauça M and Wahli W. 1996. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology.* 137(1), 354-66.
225. Constantinou AI, White BE, Tonetti D, Yang Y, Liang W, Li W and van Breemen RB. 2005. The soy isoflavone daidzein improves the capacity of tamoxifen to prevent mammary tumours. *Eur. J. Cancer* 41, 647-654.
226. Das UN. 2005. A defect in the activity of Delta6 and Delta5 desaturases

may be a factor predisposing to the development of insulin resistance syndrome Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 72(5), 343-50.

227. Harmon AW and Harp JB. 2001. Differential effects of flavonoids on 3T3-L1 adipogenesis and lipolysis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 280(4), C807-13.
228. Hsieh TC and Wu JM. 2008. Suppression of cell proliferation and gene expression by combinatorial synergy of EGCG, resveratrol and gamma-tocotrienol in estrogen receptor-positive MCF-7 breast cancer cells. *Int. J. Oncol.* 33, 851-859.
229. Kandulska K, Nogowski L and Szkudelski T. 1999. Effect of some phytoestrogens on metabolism of rat adipocytes. *Reprod Nutr Dev.* 39(4), 497-501.
230. Kelloff GJ, Boone CW, Crowell JA, Steele VE, Lubet R and Sigman CC. 1994. Chemopreventive drug development: perspectives and progress. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 3, 85-98.
231. Kopelman PG and Albon L. 1997. Obesity, non-insulin-dependent diabetes mellitus and the metabolic syndrome. *Br Med Bull.* 53(2);322-40.
232. Lamartiniere CA, Wang J, Smith-Johnson M and Eltoum IE. 2002. Daidzein: bioavailability, potential for reproductive toxicity, and breast cancer chemoprevention in female rats. *Toxicol. Sci.* 65, 228-238.
233. Lee YK, Lee WS, Hwang JT, Kwon DY, Surh YJ and Park OJ. 2009. Curcumin exerts antidifferentiation effect through AMPKalpha-PPAR-gamma in 3T3-L1 adipocytes and antiproliferatory effect through AMPKalpha-COX-2 in cancer cells. *J Agric Food Chem.*
234. Livak KJ and Schmittgen TD. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* 25, 402-408.
235. Liu RH. 2004. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention:

mechanism of action. *J. Nutr.* 134(12 Suppl), 3479S–3485S.

236. Rayalam S, Della-Fera MA, Yang JY, Park HJ, Ambati S and Baile CA. 2007. Resveratrol potentiates genistein's antiadipogenic and proapoptotic effects in 3T3-L1 adipocytes. *J. Nutr.* 137, 2668–2673.
237. Reiter E, Azzi A and Zingg JM. 2007. Enhanced anti-proliferative effects of combinatorial treatment of delta-tocopherol and resveratrol in human HMC-1 cells. *Biofactors* 30, 67–77.
238. Rosen ED. 2005. The transcriptional basis of adipocyte development. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 73(1):31–4.
239. Rosen ED, Hsu CH, Wang X, Sakai S, Freeman MW, Gonzalez FJ and Spiegelman BM. 2002. C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway. *Genes Dev.* 16(1):22–6.
240. Schlachterman A, Valle F, Wall KM, Azios NG, Castillo L, Morell L, Washington AV, Cubano LA and Dharmawardhane SF. 2008. Combined resveratrol, quercetin, and catechin treatment reduces breast tumor growth in a nude mouse model. *Transl. Oncol.* 1, 19–27.
241. Sarkar FH and Li Y. 2002. Mechanisms of cancer chemoprevention by soy isoflavone genistein. *Cancer Metastasis Rev.* 21, 265–280.
242. Surh YJ. 2003. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat. Rev. Cancer* 3, 768–780.
243. Szkudelska K, Nogowski L and Szkudelski T. 2000. Genistein affects lipogenesis and lipolysis in isolated rat adipocytes. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 75(4–5):265–71.
244. Tang QQ and Lane MD. 1999. Activation and centromeric localization of CCAAT/enhancer-binding proteins during the mitotic clonal expansion of adipocyte differentiation. *Genes Dev.* 13(17):2231–41.
245. Thomasset SC, Berry DP, Garcea G, Marczyklo T, Steward WP and



- Gescher AJ. 2007. Dietary polyphenolic phytochemicals—promising cancer chemopreventive agents in humans? A review of their clinical properties. *Int. J. Cancer* 120, 451–458.
246. Tontonoz P, Hu E and Spiegelman BM. 1994. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell*. 79(7);1147–56.
247. Qiao L and Shao J. 2006. SIRT1 regulates adiponectin gene expression through Foxo1-C/enhancer-binding protein alpha transcriptional complex. *J Biol Chem*. 281(52);39915–24.
248. Wilson LC, Baek SJ, Call A and Eling TE. 2003. Nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene (NAG-1) is induced by genistein through the expression of p53 in colorectal cancer cells. *Int. J. Cancer* 105, 747–753.
249. Gartel AL and Radhakrishnan SK. Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences. *Cancer Res* 2006;65:3980–3985.
250. Lukas J. et al. Convergence of mitogenic signalling cascades from diverse classes of receptors at the cyclin D-cyclin-dependent kinase-pRb-controlled G1 checkpoint. *Mol Cell Biol* 1996;16:6917–6925.
251. Murphree AL, Benedict WF. Retinoblastoma: clues to human oncogenesis. *Science*, 1984;223(4640):1028–1033.
252. Pierce, J.A. and Hocott, J.B., 1960. Studies on the collagen and elastin content of the human lung. *J Clin Invest* 39, pp. 8–14.
253. Phillips, D.H., Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet, *Mutat. Res.*, 443 (1999) 139–147.6.
254. Safe, S.H., Modulation of gene-expression and endocrine response pathways by 2,3,7,8-tetrachlorobenzo-p-dioxin and related compounds, *Pharmacol. Ther.*, 67 (1995) 247–281.

255. Burezyniski. M.E., Penning, T.M., Genotoxicity polycyclic aromatic ortho-quinones generated by aldo-keto reductase induce CYP1A1 via nuclear translocation of the aryl hydrocarbon receptor, *Cancer Res.*, 60 (2000) 908-915.
256. Ueno, M., Masutani, H., Arai, R.J., Yamauchi, A., Hirota, K., Sakai, T., Inamoto, T., Yamaoka, Y., Yodoi, J., Nikaido, T., Thioredoxin-dependent redox regulation of p53-mediated p21 activation, *J. Biol. Chem.*, 274 (1999) 35809-35815.
257. Hua Wang, Xiang Dong Gao, Gao Chao Zhou, Lei Cai, Wen Bing YaO. In vitro and in vivo antioxidant activity of aqueous extract from *Choerospondias axillaris* fruit. *Food Chemistry* 106 (2008) 888-895
258. Ikeda, Shiori; Ohsugi, Tadanori; Sumi, Hiroyuki, Activation of fibrinolysis (Nattokinase) induced by dipicolinic acid and related compounds, *Food Science and Technology Research* (2006), 12(2), 152-155.
259. Sim, Bo Mi, *Repub, Composition for preventing and alleviating wrinkle according to constitution of people, Korea* (2010)
260. Hu, Yongjin; Ge, Changrong; Yuan, Wei; Zhu, Renjun; Zhang, Wujiu; Du, Lijuan; Xue, Jie, Characterization of fermented black soybean natto inoculated with *Bacillus natto* during fermentation, *Journal of the Science of Food and Agriculture* (2010), 90(7), 1194-1202.
261. Nishito, Yukari; Osana, Yasunori; Hachiya, Tsuyoshi; Pependorf, Kris; Toyoda, Atsushi; Fujiyama, Asao; Itaya, Mitsuhiro; Sakakibara, Yasubumi, Whole genome assembly of a natto production strain *Bacillus subtilis natto* from very short read data, *BMC Genomics* (2010), 11
262. Junichi; Sato, Ikuo; Yamada, Yuki; Sumi, Hiroyuki, Manufacture of dipicolinic acid with *Bacillus subtilis natto*, Sato, *Jpn. Kokai Tokkyo Koho* (2006).
263. Ohsugi, Tadanori; Ikeda, Shiori; Sumi, Hiroyuki, Anti-platelet aggregation and anti-blood coagulation activities of dipicolinic acid, a sporal component

of *Bacillus subtilis* natto, Food Science and Technology Research (2005), 11(3), 308-310

264. Nina; Ferk, Franziska; Kundi, Michael; Wagner, Karl-Heinz; Misik, Miroslav; Knasmueller, Siegfried, Prevention of oxidative DNA damage in inner organs and lymphocytes of rats by green tea extract, Kager, European Journal of Nutrition (2010), 49(4), 227-234
265. Passos, Claudia P.; Silva, Rui M.; Da Silva, Francisco A.; Coimbra, Manuel A.; Silva, Carlos M. Supercritical fluid extraction of grape seed (*Vitis vinifera* L.) oil. Effect of the operating conditions upon oil composition and antioxidant capacity, Chemical Engineering Journal (Amsterdam, Netherlands) (2010), 160(2), 634-640.
266. cultivars, Wang, Wei; Bostic, Terrell R.; Gu, Liwei, Antioxidant capacities, procyanidins and pigments in avocados of different strains and Food Chemistry (2010), 122(4), 1193-1198.
267. Antioxidant Activity and Protective Effects of *Tripterygium regelii* Extract on Hydrogen Peroxide-Induced Injury in Human Dopaminergic Cells, SH-SY5Y, Choi, Bong-Suk; Sapkota, Kumar; Kim, Seung; Lee, Hyo Jeong; Choi, Han-Seok; Kim, Sung-Jun , Neurochemical Research,
268. Tian, Hong-Lei; Zhan, Ping; Li, Kai-Xiong, Analysis of components and study on antioxidant and antimicrobial activities of oil in apple seeds, International Journal of Food Sciences and Nutrition (2010), 61(4), 395-403
269. Jiang, Y.; Ng, T. B.; Wang, C. R.; Li, N.; Wen, T. Y.; Qiao, W. T.; Zhang, D.; Cheng, Z. H.; Liu, F., First isolation of tryptophan from edible lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn) rhizomes and demonstration of its antioxidant effects, International Journal of Food Sciences and Nutrition (2010), 61(4), 346-356.
270. Muntana, N.; Prasong, S.. Study on total phenolic contents and their antioxidant activities of Thai white, red and black rice bran extracts, Pakistan Journal of Biological Sciences (2010), 13(4), 170-174

271. Aguilera, P.; Chanez-Cardenas, M. E.; Ortiz-Plata, A.; Leon-Aparicio, D.; Barrera, D.; Espinoza-Rojo, M.; Villeda-Hernandez, J.; Sanchez-Garcia, A.; Maldonado, P. D. Aged garlic extract delays the appearance of infarct area in a cerebral ischemia model, an effect likely conditioned by the cellular antioxidant systems, *phytomedicine* (2010), 17(3-4), 241-247
272. Abei H. Catalase in the method of enzymatic analysis. Academic Press 2: 673-684, 1974
273. Arai I, Amagaya S, Komatsu Y. Improving effects of the extracts from *Eugenia uniflora* on hyperglycemia and hypertriglyceridemia in mice. *J Ethnopharmacology* 68: 307-314, 1999
274. Friedenwald J, Ruhrah J. The use of the soy bean as a food in diabetes. *Am J Med Sci*200: 55-58, 1990
275. Kim DJ, Jeong YJ, Kwon JH. Beneficial effect of Chungkukjang on regulating blood glucose and pancreatic  $\beta$ -cell functions in C57BL/KsJ-db/db mice. *J Med Food* 11: 215-223, 2008
276. Kim YT, Kim WK, Oh HI. Screening and identification of the fibrinolytic bacterial strain from Chungkukjang. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 23: 1-5, 1995
277. Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 47: 469-474, 1974
278. Mathes DR, Hosker JP. Homeostasis model assessment: insulin resistance and  $\beta$ -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28: 412-419, 1985
279. Morgan CR, Lazarow A. Immunoassay of insulin: Two antibody system. Plasma insulin levels in normal, subdiabetic, and diabetic rats. *Diabetes* 12: 115-126, 1963
280. Ohkawa H, Ohisi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by

- thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95: 351-358, 1979
281. Potter SM. Overview of proposed mechanisms for the hypocholesterolemic effect of soy. *J Nutr* 125: 606-611, 1995
  282. Raabo E, Terkildsen TC. On the enzyme determination of blood glucose. *Scand J Clin Invest* 12: 402-407, 1960
  283. Rahimi R, Nikfar S, Larijani B, Abdollahi M. A review on the role of antioxidants in the management of diabetes and its complications. *Biomed Pharmacother* 59:365 - 373, 2005
  284. Scifreen RS, Hickingbotham MJ, Bowers GN. Accuracy, precision and stability in measurement of hemoglobin A1c by "high performance" cation-exchange chromatography. *Clin Chem* 26: 466-472, 1980
  285. Watanabe J, Kawabata J, Kurihara H. Isolation and identification of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from Tochu-cha. *Biosci Biotechnol Biochem* 61:177-178, 1997
  286. Ana CP, Gabriel FA, Paula E. Soybean and sunflower oil-induced insulin resistance correlates with impaired GLUT4 protein expression and translocation specifically in white adipose tissue. *Cell Biochem Funct* 28: 114-121, 2010
  287. Elder, D. E. Human melanocytic neoplasms and their etiologic relationship with sunlight *J. Invest. Dermatol.* 1989, 92: 297S-303S
  288. Nomura, T. H.; Nakajima, T.; Hongyo, E.; Taniguchi, K.; Fukuda, L.; Li, Y.; Kurooka, M.; Sutoh, K.; Hande, P. M.; Kawaguchi, T.; Ueda, M.; Takatera, H. Induction of cancer, actinic keratosis, and specific p53 mutations by UVB light in human skin maintained in severe combined immunodeficient mice *Cancer Res.* 1997, 57:2081-2084
  289. Wong, G.; Gupta, R.; Dixon, K. M.; Deo, S. S.; Choong, S. M.; Halliday, G. M.; Bishop, G. E.; Ishizuka, S.; Norma, A. W.; Posner, G. H.; Mason, R. S. 1,25-Dihydroxivitamin D and three low-calcemic analogs decrease

- UV-induced DNA damage via rapid response pathway J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 2004, 89–9; 567–470
290. Morley, N.; Curnow, A.; Salter, L.; Campbell, S.; Gould, D. N-Acetyl-l-cysteine prevents DNA damage induced by UVA, UVB and visible radiation in human fibroblasts J. Photochem. Photobiol. B 2003, 72:55–60
291. Kuroda, C.; Wada, M. The colouring matter of kuromame Proc. Imp. Acad. (Tokyo) 1988 9 17(b) Manabe, T.; Kubo, S.; Kodama, M., III. Some properties of an anthocyanin pigment isolated from black soybean peels Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaish 1965, 12; 472
292. Yoshikura, K.; Hamaguchi, Y. Anthocyanins of the black soybean Eiyō To Shokuryō 1969, 22; 367
293. Taylor, B. H. Environmental and chemical evaluation of variations in hilum and seed coat colors in soybean. M.S. Thesis, University of Arkansas, Fayetteville, AR, 1976.8. Yoshida, K.; Sato, Y.; Okuno, R.; Kameda, K.; Isobe, M.; Kondo, T. Structural analysis and measurement of anthocyanin from colored seed coats of Vigna, Phaseolus, and Glycine lugumes Biosci., Biotechnol., Biochem. 1996, 60; 589–593
294. Choung, M. G.; Baek, I. Y.; Kang, S. T.; Han, W. Y.; Shin, D. C.; Moon, H. P.; Kang, K. H. Isolation and determination of anthocyanins in seed coats of black soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) J. Agric. Food Chem. 2001, 49; 5848–5851
295. Kamei, H.; Kojima, T.; Hasegawa, M.; Koide, T.; Umeda, T.; Yukawa, T.; Terabe, K. Suppression of tumor cell growth by anthocyanins in vitro Cancer Invest. 1995 13 590 594
296. Kim, H. J.; Tsoy, I.; Park, J. M.; Chung, J. I.; Shin, S. C.; Chang, K. C. Anthocyanins from soybean seed coat inhibit the expression of TNF- $\alpha$ -induced genes associated with ischemia/reperfusion in endothelial cell by NF- $\kappa$ B-dependent pathway and reduce rat myocardial damages incurred by ischemia and reperfusion in vivo FEBS Lett. 2006, 580; 1391–1397

297. Kim, H. J.; Kang, S. Y.; Kim, S. J.; Kim, S. H.; Kim, T. Y. Potentiation of UVB-induced apoptosis by novel phytosphingosine derivative, tetraacetyl phytosphingosine in HaCaT cell and mouse skin *Apoptosis* 2004, 9; 449-456
298. Telford, W. G.; King, L. E.; Fraker, P. J. Rapid quantitation of apoptosis in pure and heterogeneous cell populations using flow cytometry *J. Immunol. Methods* 1994, 172; 1-16
299. Deveraux, Q. L.; Roy, N.; Stennicke, H. R.; Van Arsdale, T.; Zhou, Q.; Srinivasula, S. M.; Alnemri, E. S.; Salvesen, G. S.; Reed, J. C. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases *EMBO J.* 1998, 17; 2215-2223
300. Kluck, R. M.; Bossy-Wetzell, E.; Green, D. R.; Newmeyer, D. D. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis *Science* 1997, 275; 1132- 1136
301. Gross, A.; Jockel, J.; Wei, M. C.; Korsmeyer, S. J. Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis *EMBO J.* 1998, 17; 3878-3885
302. Schreck, R.; Rieber, P.; Baeuerle, P. A. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF- $\kappa$ B transcription factor and HIV-1 *EMBO J.* 1991, 10; 2247-2258
303. Schreck, R.; Meier, B.; Mannel, D. N.; Droge, W.; Baeuerle, P. A. Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor kappa B activation in intact cells *J. Exp. Med.* 1992, 175; 1181- 1194
304. Fisher, G. J.; Datta, S. C.; Talwar, H. S.; Wang, Z. Q.; Varani, J.; Kang, S.; Voorhees, J. J. Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism *Nature* 1996, 379; 335-339
305. Saliou, C.; Rimbach, G.; Moini, H.; McLaughlin, L.; Hosseini, S.; Lee, J.; Watson, R. R.; Packer, L. Solar ultraviolet-induced erythema in human skin and nuclear factor-kappa-B-dependent gene expression in keratinocytes are modulated by a French maritime pine bark extract *Free Radical Biol. Med.*

2001, 30; 154-160

306. Kitazawa, M.; Nakano, T.; Chuujou, H.; Shiojiri, E.; Iwasaki, K.; Sakamoto, K. Intracellular redox regulation by a cystine derivative suppresses UV-induced NF-kappa B activation FEBS Lett. 2002, 526, 106-110
307. Zhan, M.; Han, Z. C. Phosphatidylinositide 3-kinase/AKT in radiation responses Histol. Histopathol. 2004, 19; 915-923
308. Kim SM, Seo KI, Park KW, Jeong YK, Cho YS, Kim MJ, Kim E, Lee MK. 2009. Effect of crude saponins from soybean cake on body weight and glucose tolerance in high-fat diet induced obese mice. J Korean Soc Food Sci Nutr 38: 39-46.
309. Kerckhoffs DA, Brouns F, Hornstra G, Mensink RP. 2002. Effects on the human serum lipoprotein profile of beta-glucan, soy protein and isoflavones, plant sterols and stanols, garlic and tocotrienols. J Nutr 132: 2494-2505.
310. Thompson LU. 1993. Potential health benefits and problems associated with antinutrients in foods. Food Res Int 26: 131-149.
311. Oakenfull DG, Sidhu GS. 1990. Could saponins be a useful treatment for hypercholesterolaemia? Eur J Clin Nutr 44: 79-88.
312. Wu RT, Chiang HC, Fu WC, Chien KY, Chung YM, Horng LY. 1990. Formosanin-C, an immunomodulator with antitumor activity. Int J Immunopharmacol 12: 777-786.
313. Tokuda H, Konoshima T, Kozuka M, Kimura T. 1991. Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-promoted mouse skin papilloma by saponins. Oncology 48: 77-80.
314. Kim HJ, Hahm DH, Yang DC, Kim JH, Lee HJ, Shim I. 2005. Effect of crude saponin of Korean red ginseng on high-fat diet-induced obesity in the rat. J Pharmacol Sci 97: 124-131.



315. Han LK, Zheng YN, Xu BJ, Okuda H, Kimura Y. 2002. Saponins from *Platycodi radix* ameliorate high-fat diet-induced obesity mice. *J Nutr* 132: 2241-2245.
316. Karu N, Reifen R, Kerem Z. 2007. Weight gain reduction in mice fed *Panax ginseng* saponin, a pancreatic lipase inhibitor. *J Agric Food Chem* 55: 2824-2828.
317. Park KU, Wee JJ, Kim JY, Jeong CH, Kang KS, Cho YS, Seo KI. 2005. Anticancer and immuno-activities of edible crude saponin from soybean cake. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 1509-1513.
318. Song SK, Kim KH, Kim HS. 2001. Cytotoxic effects and components of lipid fractions from soybean products on cancer cell lines. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30: 1266-1271.
319. Joo HK, Shin YK, Lee MS. 1996. Effects of salt and alcohol on organic acids content during aging of *chongkukjang*. *J Food Sci Technol* 1: 13-23.
320. Suh HJ, Kim YS, Chung SH, Kim YSm Lee SD. 1996. Functionality and inhibitory effect of soybean hydrolysate on angiotensin converting enzyme. *Korean J Food Nurt* 9: 167-175.
321. Lee CH, Kim CS, Lee SP. 1984. Studies on the enzymatic partial hydrolysis of soybean protein isolates. *Korean J Food Sci Technol* 16: 228-234.
322. Jang SY, Sin KA, Park NY, Kim DH, Kim MJ, Kim JH, Jeong YJ. 2008. Changes of quality characteristics of low-molecular soymilk according to hydrolysis time. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 1287-1293.
323. Kennedy A. 1995. Cancer prevention by soy products. *J Nutr* 125: 733-741.
324. Yoon JY, Cho HK, Lee SR. 1993. Effect of phytate on the digestibility and electrophoretic pattern of soy protein isolate. *Korean J Food Sci Technol* 25: 360-365.
325. Kang JH. 1999. Functional characterization of soy protein hydrolysate. *Food*

*Industry and Nutrition* 4: 66-72.

326. Jianping WU, Xiaolin D. 2002. Characterization of inhibition and stability of soy protein derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. *Food Research International* 35: 367-375.
327. Yamamoto N, Akino Am Takano T. 1994. Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus hylverticus* CP790. *J Dairy Sci* 77: 917-922.
328. Zhu XL, Watanabe K. Shiraishi K. 2008. Identification of ACE-inhibitory peptides in salt-free soy sauce that are transportable across caco-2 cell monolayers. *Peptides* 29: 338-344.
329. Do JR. 2000. Separation and purification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from mackerel. *J Korean Fish Soc* 33: 153-157.
330. Suh HJ, Cho SJ, Whang JH, Lee H, Yang HC. 1997. Characterization of angiotensin converting enzyme inhibitor from squid hydrolysate. *Food and Biotech* 6: 122-124.
331. Park YB. 2009. Characteristics of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from Aroase AP10 hydrolysate of octopus. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 177-181.
332. Yu JS, Woo KS, Hwang IG, Lee YR, Kang TS, Jeong HS. 2008. ACE inhibitory and antioxidative activities of silkworm larvae (*Bombyx mori*) hydrolysate. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 136-140.
333. Soffer RL. 1976. Angiotensin-converting enzyme and the regulation of vasoactive peptides. *Annu Rev Biochem* 45: 73-94.
334. Ferreria SH, Diana CB, Greene LJ. 1983. Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. *Biochemistry* 9: 2583-2593.
335. AOAC. 1990. Official Methods of Analysis of AOAC. Intl. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists. Arlington, VA, USA

336. Lee SH, Jo YJ, Kim S, Ahn BJ, Choi C. 1995. Optimal conditions for the enzymatic hydrolysis of isolated sesame meal protein. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* 38: 248-253.
337. Kim SY, Park PSW, Rhee KC. 1990. Functional properties of proteolytic enzyme modified soy protein isolate. *J Agric Food Chem* 38: 651-664.
338. Cushman DW, Cheung HS. 1971. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem Pharmacol* 20: 1637-1648.
339. Bakhle YS. 1968. Conversion of angiotensin I to angiotensin II by cell-free extracts of dog lung. *Nature*. 220: 919.
340. Kim HS, Ham JS, Jeong SG, Yoo YM, Chae HS, Ahn CN, Lee JM. 2003. Production of angiotensin-I converting enzyme inhibitory hydrolysates from egg albumen. *Asian-Aus J Anim Sci* 16: 307-319.
341. Katayama K, Fuchu H, Sugiyama M, Kawahara S, Yamauch K, Kawamuura Y, Muguruma M. 2003. Peptic hydrolysates of porcine crude myosin has many active fractions inhibiting angiotensin 10converting enzyme. 16: 1384-1389.
342. Oh SJ, Kim SH, Kim SK, Baek YJ, Cho KH. 1997. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of the K-casein fragments hydrolysed by chymosin pepsin and trypsin. 29: 1316-1318.
343. Do JR, Kim KJ, Jo JH, Kim YM, Kim BS, Kim HK, Lim SD, Lee SW. 2005. Antimicrobial, antihypertensive and anticancer activities of medicinal herbs. *Korean J Food Sci Technol* 37: 206-213.
344. Hara Y, Matsuzaki T, Suzuki T. 1987. Angiotensin I converting enzyme inhibiting activity of tea components. *Nippon shobuhin kogyo Gakkaishi* 61: 803-808.
345. Marshall HG, Pomeranz Y. 1982. Buckwheat: description, breeding, production and utilization. *In Advances in Cereal science and Technology*,

346. Do JR, Heo IS, Jo JH, Kim DS, Kim HK, Kim SS, Han CK. 2006. Effect of antihypertensive peptides originated from various marine protein on ACE inhibitory activity and systolic blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Korean J Food Sci Technol* 38: 567–570.
347. Chung IK, Kim HS, Kang KT, Choi YJ, Choi JD, Kim JS, Heu MS. 2006. Preparation and functional properties of enzymatic oyster hydrolysates. *J Korean Soc Food Sci Nurt* 35: 919–925.
348. Suh HJ, Kim YS, Chung SH, Kim YSm Lee SD. 1996. Functionality and inhibitory effect of soybean hydrolysate on angiotensin converting enzyme. *Korean J Food Nurt* 9: 167–175.
349. Yeum DM, Kim YS. 1994. Antioxidative action of enzymeatic hydrolysates of mackerel muscle protein. *Korean J Food Nurt* 7: 128–136.
350. Association of Korean Standardization. 1992. General method of organoleptic test. KS A 7001, Seoul, Korea.
351. Kim KS, Chung HK, Sohn HS. 1994. Purification of oligosaccharides from soybean pastes. *J. Korean Soc. Appl. Chem.* 47: 208–215.
352. Pratt R, Dan E, Pietro WL, Giffie JW. 1981. Phenolic antioxidants of soy protein hydrolysate. *J. Food Sci.* 47: 24–31.
353. Bae, H.J. and Chun, H.J. : Changes in volatile sulfur compounds of garlic under various cooking conditions. *Korean J. Food Cookery Sci.* 18, 365–371(2002).
354. Yoon, S.H. and Kim, J.W.: Antioxidative effects of various antioxidants on the soybean oil. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 17, 19–23(1988).
355. Kim, S.H.: New trend of studying on potential activities of doenjang–fibrinolytic activity. *Korea Soybean Digest.* 15:8–15.(1998).

356. Park, S.K., Seo, K.I., Shon, M.Y., Moon, J.S., Lee, Y.H.: Quality characteristics of home-made , doenjang a traditional Korean soybean paste. *Korean J. Soc. Food Cookery Sci.* 16, 121-127(2000).
357. Kang, J.H. (1999) Functional characterization oh soy protein hydrolysate. *Food industry and Nutrition*, 4, 66-72.
358. Anthony, M.S., clarkson, T.B. and Williams, J.K.(1998) Effects of soy isoflavones on atherosclerosis potential mechanisms. *Am. J. Clin. Nutr.*, 68, 1390s-1393s.
359. Arora, A., Byrem, T.M., Nair, M.G. and Strasburg, G.M.(2000) Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. *Arch. Biochem. Biophys.*, 373, 102-109.
360. Yee, J.J., Shipe, W.F. and Kinsella, J.E. (1980) Antioxidant effects of soy protein hydrolysates on copper-catalyzed methyl linoleate oxidation. *Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 35, 1427-1433.
361. Choi, M.S. and Rhee, K.C. (2006) Production and processing of soybeans and nutrition and safety of isoflavone and other soy products for human. *J. Med. Food*, 9, 1-10.
362. Shon, H.S., Lee, Y.S., Shin, H.C. and Chung, H.K. (2000) Does soybean isoflavone have adverse effects on human. *Korean Soybean Digest*, 17, 9-19.
363. Jeong, K.H., S대, J.H. and Jeong, Y.J. (2005) Characteristics of soybean hydrolysates prepared with various protease. *Koreans J. Food Preserv.*, 12, 460-464.
364. <http://kr.blog.yahoo.com/asd123suk/30.html>.
365. 한국콩연구회 <http://www.soysos.or.kr/>.
366. Shin, J.H. (1986) Effect of ISP(Isolated soy protein) treated with enzyme on fermented soy milk. ph. D. Thesis, Kyung Hee University, Seoul, Korea.

367. 김동수, 설명훈, 김현대 : 건조방법에 따른 비지의 품질 변화, 한국영양식량학회지 25(3): 453-459 (1996).
368. Kennedy, A. (1995) Cancer prevention by soy products. J. Nutr., 125, 733-741.

<부록>. 한국, 중국, 미국 및 일본 콩 유전자원의 지방 및 지방산 함량

번호	자원명	지방 함량 (%)	지방산 조성(%)							수집 국가	충북대 번호
			Pal <sup>1)</sup>	Ste <sup>2)</sup>	Ole <sup>3)</sup>	Linl <sup>4)</sup>	Linln <sup>5)</sup>	SFA <sup>6)</sup>	USFA <sup>7)</sup>		
1	장백목	18.5	11.8	3.0	26.2	51.3	7.7	14.8	85.2	KOR	CSRV001
2	부석	18.5	10.5	2.5	28.7	51.0	7.4	13.0	87.0	KOR	CSRV002
3	충북백	17.5	10.7	2.3	32.5	47.2	7.3	13.0	87.0	KOR	CSRV004
4	익산	16.5	10.6	2.8	34.8	44.0	7.8	13.4	86.6	KOR	CSRV003
5	함안	17.7	10.8	3.1	33.7	46.1	6.2	13.9	86.1	KOR	CSRV006
6	금강대립	19.3	11.0	2.6	28.8	49.7	7.9	13.6	86.4	KOR	CSRV005
7	광두	18.7	10.8	2.4	30.4	50.0	6.4	13.1	86.9	KOR	CSRV007
8	힐	19.3	10.8	2.9	31.3	47.6	7.4	13.7	86.3	KOR	CSRV008
9	셀비	19.1	10.8	4.0	20.2	57.1	7.9	14.8	85.2	KOR	CSRV009
10	광고	18.6	11.5	2.6	27.8	49.8	8.3	14.1	85.9	KOR	CSRV010
11	봉의	15.5	7.5	2.0	50.9	32.3	7.2	9.6	90.4	KOR	CSRV011
12	강립	15.1	10.0	2.4	26.7	51.0	9.9	12.4	87.6	KOR	CSRV012
13	동북태	16.0	11.6	2.3	28.8	49.7	7.6	13.9	86.1	KOR	CSRV013
14	백천	15.9	10.1	2.5	25.1	52.7	9.7	12.6	87.4	KOR	CSRV014
15	단엽콩	19.7	10.7	2.9	24.9	53.6	7.8	13.7	86.3	KOR	CSRV015
16	장엽콩	18.4	9.4	2.6	38.0	42.8	7.1	12.1	87.9	KOR	CSRV016
17	황금콩	19.5	10.4	2.8	28.6	50.5	7.8	13.2	86.8	KOR	CSRV017
18	장백콩	20.0	11.4	2.9	22.4	54.1	9.2	14.3	85.7	KOR	CSRV019
19	남천콩	17.3	9.4	2.2	36.3	45.2	6.9	11.6	88.4	KOR	CSRV018
20	밀양콩	18.6	10.4	3.1	21.9	55.2	9.4	13.5	86.5	KOR	CSRV020
21	백운콩	17.8	10.6	3.0	31.6	48.2	6.6	13.6	86.4	KOR	CSRV022
22	방사콩	18.5	11.5	3.5	21.7	54.5	8.7	15.1	84.9	KOR	CSRV021
23	새알콩	18.5	11.1	2.8	33.1	44.1	8.9	13.9	86.1	KOR	CSRV023
24	팔달콩	17.3	10.0	3.5	27.5	50.7	8.3	13.4	86.6	KOR	CSRV024
25	단경콩	18.0	11.2	3.3	21.0	56.0	8.5	14.5	85.5	KOR	CSRV025
26	은하콩	16.3	11.2	3.3	18.8	58.8	8.0	14.5	85.5	KOR	CSRV027
27	보광콩	17.0	10.8	2.8	28.6	49.7	8.0	13.7	86.3	KOR	CSRV026
28	장경콩	18.4	10.6	2.8	25.7	52.8	8.1	13.5	86.5	KOR	CSRV030
29	무한콩	19.8	9.7	3.4	24.0	54.3	8.6	13.1	86.9	KOR	CSRV029
30	남해콩	18.3	9.6	3.4	23.9	54.5	8.7	13.0	87.0	KOR	CSRV028
31	단원콩	18.1	10.7	3.2	19.6	58.7	7.7	14.0	86.0	KOR	CSRV031
32	장수콩	19.1	10.3	3.0	29.2	50.4	7.0	13.4	86.6	KOR	CSRV032
33	만리콩	16.5	10.9	2.9	32.2	46.6	7.4	13.8	86.2	KOR	CSRV033
34	삼남콩	17.7	10.7	3.1	28.2	50.6	7.5	13.7	86.3	KOR	CSRV034
35	신팔달콩	16.9	11.5	3.5	17.8	58.6	8.6	15.0	85.0	KOR	CSRV035
36	태광콩	16.4	10.0	3.0	38.8	41.0	7.3	12.9	87.1	KOR	CSRV036
37	부광콩	17.4	11.7	3.2	24.1	52.3	8.7	14.9	85.1	KOR	CSRV037
38	신팔달콩2	16.0	11.0	3.2	23.1	54.2	8.4	14.3	85.7	KOR	CSRV038
39	단백콩	15.2	9.4	2.9	47.3	33.3	7.1	12.3	87.7	KOR	CSRV041
40	두유콩	18.5	11.3	3.5	18.0	58.5	8.6	14.8	85.2	KOR	CSRV042

번호	자원명	지방 함량 (%)	지방산 조성(%)							수집 국가	충북대 번호
			Pal <sup>1)</sup>	Ste <sup>2)</sup>	Ole <sup>3)</sup>	Linl <sup>4)</sup>	Linln <sup>5)</sup>	SFA <sup>6)</sup>	USFA <sup>7)</sup>		
41	검정콩 1호	16.9	10.4	2.7	28.9	49.7	8.3	13.1	86.9	KOR	CSRV039
42	광안콩	15.2	10.1	3.1	55.9	24.4	6.4	13.2	86.8	KOR	CSRV040
43	푸른콩	18.0	10.5	3.3	26.0	53.8	6.4	13.8	86.2	KOR	CSRV044
44	소양콩	16.7	11.6	3.6	18.5	58.2	8.1	15.2	84.8	KOR	CSRV043
45	한남콩	17.1	11.4	3.5	21.8	52.5	10.8	14.9	85.1	KOR	CSRV049
46	진품콩	17.8	12.9	3.1	24.1	50.1	9.8	16.0	84.0	KOR	CSRV048
47	익산나물콩	17.2	11.9	3.6	24.0	52.1	8.4	15.5	84.5	KOR	CSRV052
48	금강콩	18.1	11.4	3.7	17.7	58.5	8.7	15.2	84.8	KOR	CSRV050
49	명주나물콩	18.4	10.3	3.3	25.4	53.4	7.7	13.5	86.5	KOR	CSRV051
50	풍산나물콩	18.3	10.5	2.7	35.0	45.1	6.8	13.2	86.8	KOR	CSRV056
51	소백나물콩	17.6	10.2	3.1	24.6	54.9	7.2	13.3	86.7	KOR	CSRV057
52	알찬콩	19.2	11.0	3.1	18.1	57.6	10.2	14.1	85.9	KOR	CSRV053
53	다장콩	18.2	10.0	3.1	25.8	53.2	8.0	13.1	86.9	KOR	CSRV060
54	검정콩2	18.9	9.2	2.4	43.6	38.0	6.8	11.6	88.4	KOR	CSRV055
55	검정울콩	19.6	10.7	3.3	25.7	52.8	7.5	14.0	86.0	KOR	CSRV054
56	진품콩2	18.3	13.1	3.0	25.9	48.2	9.8	16.1	83.9	KOR	CSRV063
57	대원콩	19.0	10.4	2.8	24.3	55.5	7.2	13.1	86.9	KOR	CSRV058
58	일품검정콩	19.7	10.4	3.3	25.6	52.9	7.8	13.8	86.2	KOR	CSRV061
59	장미콩	17.7	10.4	2.9	25.0	52.7	8.9	13.4	86.6	KOR	CSRV062
60	다원콩	17.0	10.4	4.4	23.1	55.4	6.8	14.7	85.3	KOR	CSRV059
61	일미콩	16.7	9.1	2.9	28.1	51.5	8.4	12.0	88.0	KOR	CSRV069
62	팔도나물콩	17.6	11.0	3.4	35.0	44.7	5.9	14.4	85.6	KOR	CSRV068
63	새울콩	16.5	11.5	2.8	30.9	47.5	7.4	14.2	85.8	KOR	CSRV064
64	선희콩	18.7	9.9	2.6	34.0	46.2	7.3	12.5	87.5	KOR	CSRV067
65	소담콩	18.3	10.2	3.1	27.2	52.2	7.4	13.2	86.8	KOR	CSRV066
66	소명나물콩	16.9	11.1	3.7	17.9	57.7	9.5	14.9	85.1	KOR	CSRV065
67	송학콩	19.1	11.7	2.9	25.5	52.5	7.3	14.6	85.4	KOR	CSRV070
68	대황콩	15.9	10.9	2.8	22.7	53.4	10.2	13.7	86.3	KOR	CSRV073
69	도레미콩	16.4	11.3	3.3	23.1	53.9	8.3	14.6	85.4	KOR	CSRV074
70	흑청콩	18.9	11.7	3.2	25.7	52.3	7.1	14.8	85.2	KOR	CSRV075
71	진울콩	16.3	10.4	2.4	31.1	48.7	7.5	12.8	87.2	KOR	CSRV072
72	소원콩	16.2	10.7	2.8	23.0	53.4	10.1	13.5	86.5	KOR	CSRV071
73	청자콩	20.5	10.2	3.1	20.4	57.5	8.8	13.3	86.7	KOR	CSRV079
74	장원콩	18.2	11.2	3.1	22.9	53.9	8.9	14.3	85.7	KOR	CSRV081
75	새별콩	18.6	11.8	3.4	21.5	54.6	8.7	15.2	84.8	KOR	CSRV076
76	선녹콩	20.2	11.7	2.6	33.6	45.5	6.7	14.3	85.7	KOR	CSRV077
77	신록콩	19.0	11.8	2.4	28.0	49.4	8.4	14.2	85.8	KOR	CSRV080
78	소호콩	17.1	11.5	3.6	19.2	56.9	8.8	15.1	84.9	KOR	CSRV078
79	검정콩3	16.7	10.5	2.7	27.6	50.3	8.9	13.2	86.8	KOR	CSRV082
80	검정콩4	18.9	11.2	3.5	23.9	54.0	7.4	14.6	85.4	KOR	CSRV083



번호	자원명	지방 함량 (%)	지방산 조성(%)							수집 국가	충북대 번호
			Pal <sup>1)</sup>	Ste <sup>2)</sup>	Ole <sup>3)</sup>	Linl <sup>4)</sup>	Linln <sup>5)</sup>	SFA <sup>6)</sup>	USFA <sup>7)</sup>		
81	진미콩	19.3	12.2	3.5	25.8	51.4	7.2	15.7	84.3	KOR	CSRV084
82	소록콩	17.5	12.0	3.0	19.4	56.1	9.5	15.1	84.9	KOR	CSRV085
83	안평콩	17.6	12.1	3.7	15.2	59.9	9.0	15.8	84.2	KOR	CSRV088
84	다채콩	18.5	11.7	3.9	18.9	57.0	8.5	15.6	84.4	KOR	CSRV086
85	대풍콩	18.3	12.0	2.8	24.1	52.3	8.8	14.9	85.1	KOR	CSRV087
86	다기콩	17.7	11.5	3.5	18.9	57.7	8.4	15.0	85.0	KOR	CSRV090
87	호장콩	19.0	11.3	3.3	21.7	55.7	8.0	14.6	85.4	KOR	CSRV089
88	서남콩	15.8	11.9	3.3	17.4	57.8	9.7	15.2	84.8	KOR	CSRV091
89	신기콩	18.6	10.3	2.6	36.0	43.5	7.6	12.9	87.1	KOR	CSRV092
90	만수콩	19.9	10.9	2.7	38.1	40.8	7.5	13.6	86.4	KOR	CSRV093
91	검정새울콩	17.8	11.1	2.2	42.1	38.7	5.8	13.3	86.7	KOR	CSRV094
92	다올콩	17.4	11.9	2.4	28.6	50.1	7.1	14.2	85.8	KOR	CSRV095
93	다진(꽃)콩	19.3	11.7	2.2	37.2	42.8	6.1	14.0	86.0	KOR	CSRV096
94	단미2호	18.2	12.9	3.5	21.3	52.2	10.1	16.4	83.6	KOR	CSRV097
95	청자2호	16.6	10.3	2.8	24.7	52.9	9.3	13.1	86.9	KOR	CSRV098
96	소청콩	16.4	10.9	2.8	22.4	54.6	9.3	13.6	86.4	KOR	CSRV099
97	대망2호	19.6	11.6	3.3	19.9	56.1	9.2	14.9	85.1	KOR	CSRV100
98	단미(꽃)콩	17.8	11.1	2.2	34.5	43.9	8.3	13.2	86.8	KOR	CSRV101
99	흑미	19.9	10.7	4.0	22.0	55.2	8.1	14.7	85.3	KOR	CSRV103
100	미량콩	17.5	11.8	2.6	28.5	49.6	7.4	14.4	85.6	KOR	CSRV104
101	대망콩	20.8	11.4	3.3	21.6	55.3	8.3	14.8	85.2	KOR	CSRV105
102	일품검정콩2호	17.0	10.0	2.6	26.6	50.7	10.1	12.6	87.4	KOR	CSRV106
103	선유콩	18.7	10.9	2.8	19.9	57.6	8.7	13.7	86.3	KOR	CSRV107
104	청두1호	18.2	10.3	3.0	21.2	55.1	10.3	13.3	86.7	KOR	CSRV108
105	청자3호	17.3	9.7	2.6	22.9	56.0	8.9	12.3	87.7	KOR	CSRV109
106	녹원콩	17.8	12.0	2.8	27.7	48.5	9.0	14.8	85.2	KOR	CSRV110
107	소강콩	18.5	11.6	3.6	20.6	55.2	9.0	15.2	84.8	KOR	CSRV112
108	소진콩	18.5	11.6	3.4	16.9	58.2	9.9	15.0	85.0	KOR	CSRV114
109	풍원콩	18.6	11.1	2.9	17.9	58.1	10.0	14.0	86.0	KOR	CSRV115
110	장기콩	18.0	10.6	3.3	19.0	56.0	11.1	13.9	86.1	KOR	CSRV117
111	원황콩	17.0	9.9	3.0	22.4	55.5	9.2	12.9	87.1	KOR	CSRV118
112	보석콩	18.4	11.2	3.7	18.8	56.5	9.8	14.9	85.1	KOR	CSRV121
113	녹채콩	17.5	11.0	3.0	23.8	52.6	9.5	14.1	85.9	KOR	CSRV122
114	KLS87309	18.7	12.7	2.9	28.9	48.0	7.5	15.6	84.4	KOR	CS00271
115	푸대콩	18.5	12.1	3.2	31.4	46.3	7.1	15.3	84.7	KOR	CS00311
116	감로	19.9	11.8	2.7	35.4	43.3	6.8	14.5	85.5	KOR	CS00216
117	보국	17.1	13.0	3.0	35.9	40.8	7.3	16.0	84.0	KOR	CS00209
118	청주제래	16.0	11.2	2.7	33.0	45.8	7.3	13.9	86.1	KOR	CS00205
119	황성정립	17.0	11.3	2.9	32.8	45.7	7.4	14.2	85.8	KOR	CS00210
120	콩나물콩	15.1	11.5	3.0	30.7	47.6	7.2	14.5	85.5	KOR	CS00464

번호	자원명	지방함량(%)	지방산 조성(%)							수집국가	충북대번호
			Pal <sup>1)</sup>	Ste <sup>2)</sup>	Ole <sup>3)</sup>	Linl <sup>4)</sup>	Linln <sup>5)</sup>	SFA <sup>6)</sup>	USFA <sup>7)</sup>		
121	KAS681-29	18.1	11.2	3.0	22.4	54.4	9.0	14.2	85.8	KOR	CS00326
122	94유자61	13.3	11.9	3.3	20.4	53.9	10.6	15.2	84.8	KOR	CS00298
123	KLS87319	15.9	12.6	3.6	25.1	50.9	7.8	16.2	83.8	KOR	CS00366
124	KAS646-1	18.0	11.3	3.1	30.3	47.5	7.7	14.4	85.6	KOR	CS00324
125	불콩	17.4	12.3	3.5	20.6	53.6	9.9	15.8	84.2	KOR	CS00123
126	KAS220-27	17.2	11.7	3.4	19.6	55.1	10.2	15.1	84.9	KOR	CS00427
127	생깨다리(콩나물)	14.8	13.0	3.2	23.2	52.0	8.5	16.2	83.8	KOR	CS00243
128	KAS542-27	15.5	11.8	3.9	17.9	56.6	9.7	15.7	84.3	KOR	CS00258
129	早虫夏	18.1	9.8	3.4	25.6	54.5	6.7	13.2	86.8	CHN	CS01166
130	九農2	18.6	10.7	2.6	34.7	46.6	5.4	13.2	86.8	CHN	CS01167
131	九農4	21.4	10.8	2.2	29.4	51.4	6.3	13.0	87.0	CHN	CS01168
132	九農5	18.5	9.7	2.4	39.4	43.1	5.3	12.2	87.8	CHN	CS01169
133	九農6	20.4	9.3	2.5	41.1	41.4	5.7	11.8	88.2	CHN	CS01170
134	九農8	20.8	10.0	2.3	41.9	40.8	5.0	12.3	87.7	CHN	CS01172
135	九農9	20.2	9.9	2.8	32.4	49.6	5.3	12.7	87.3	CHN	CS01173
136	九農10	18.1	10.2	2.5	39.1	42.6	5.5	12.7	87.3	CHN	CS01174
137	九農11	18.5	11.3	2.8	25.8	53.3	6.8	14.1	85.9	CHN	CS01175
138	九農15	18.7	11.6	2.6	26.4	52.4	7.0	14.2	85.8	CHN	CS01177
139	九農16	17.8	11.4	2.7	30.3	49.9	5.6	14.2	85.8	CHN	CS01178
140	九農17	19.9	11.1	2.8	29.1	51.1	5.9	13.9	86.1	CHN	CS01179
141	九農18	18.7	11.0	3.1	21.5	56.6	7.9	14.1	85.9	CHN	CS01180
142	九農19	20.9	10.4	3.0	28.6	51.2	6.8	13.4	86.6	CHN	CS01181
143	九農21	21.5	10.1	2.4	31.0	50.9	5.6	12.6	87.4	CHN	CS01183
144	九農22	20.4	10.0	2.4	30.5	50.9	6.2	12.4	87.6	CHN	CS01184
145	九農22(特大豆)	21.9	10.6	2.6	32.2	47.7	6.9	13.1	86.9	CHN	CS01185
146	九農23	20.7	11.3	3.1	40.5	40.2	4.9	14.4	85.6	CHN	CS01186
147	九農313	20.9	12.1	3.2	31.1	47.9	5.7	15.3	84.7	CHN	CS01187
148	九農7714	23.0	9.7	2.8	32.7	49.7	5.1	12.6	87.4	CHN	CS01188
149	遼寧10	19.5	11.2	2.7	36.2	43.4	6.6	13.9	86.1	CHN	CS01189
150	遼寧11	22.6	10.0	2.6	28.6	52.8	6.0	12.6	87.4	CHN	CS01190
151	通農9號	21.9	10.2	2.6	30.3	50.1	6.8	12.8	87.2	CHN	CS01191
152	通農12號	21.6	9.9	2.6	32.6	48.6	6.3	12.6	87.4	CHN	CS01192
153	通農13號	20.4	10.3	3.0	26.0	53.9	6.9	13.2	86.8	CHN	CS01193
154	合豐23	22.1	11.2	3.1	29.9	49.8	6.1	14.3	85.8	CHN	CS01194
155	合豐33	20.8	10.9	2.8	27.2	52.7	6.4	13.8	86.2	CHN	CS01196
156	合豐36	20.1	10.7	2.6	34.7	46.6	5.4	13.3	86.7	CHN	CS01197
157	合豐39	20.3	10.3	2.6	35.0	46.6	5.5	12.9	87.1	CHN	CS01198
158	合豐40	21.6	10.2	3.1	35.5	46.8	4.5	13.3	86.7	CHN	CS01199
159	合豐43	20.8	10.3	2.9	33.3	48.3	5.2	13.3	86.7	CHN	CS01201
160	合豐47	21.8	10.5	2.6	32.3	49.1	5.4	13.1	86.9	CHN	CS01202

번호	자원명	지방 함량 (%)	지방산 조성(%)							수집 국가	충북대 번호
			Pal <sup>1)</sup>	Ste <sup>2)</sup>	Ole <sup>3)</sup>	Lin <sup>4)</sup>	Linln <sup>5)</sup>	SFA <sup>6)</sup>	USFA <sup>7)</sup>		
161	合豊93-11	21.8	10.4	2.5	27.3	53.9	5.9	12.9	87.1	CHN	CS01203
162	合豊95-873	19.9	10.6	2.3	24.7	55.4	6.9	12.9	87.1	CHN	CS01204
163	合豊95-1112	21.4	10.1	2.5	34.7	47.6	5.2	12.6	87.4	CHN	CS01205
164	合豊96-448	23.1	12.5	3.1	20.3	57.2	7.0	15.6	84.4	CHN	CS01206
165	合豊96-450	21.1	12.6	3.4	17.3	58.7	7.9	16.1	83.9	CHN	CS01207
166	吉豆1號	18.2	11.5	3.3	16.8	59.3	9.0	14.9	85.1	CHN	CS01208
167	吉豆2號	18.7	10.8	2.5	23.8	54.7	8.2	13.3	86.7	CHN	CS01209
168	綏農1	18.7	11.2	2.5	20.2	56.9	9.1	13.7	86.3	CHN	CS01210
169	綏農2	17.1	11.8	3.3	16.6	58.9	9.4	15.1	84.9	CHN	CS01211
170	綏農3	21.7	10.9	2.4	36.5	43.6	6.6	13.3	86.7	CHN	CS01212
171	綏農4	19.2	12.3	3.2	20.2	56.6	7.7	15.5	84.5	CHN	CS01213
172	綏農8	22.7	12.1	3.1	25.0	53.4	6.4	15.2	84.8	CHN	CS01214
173	綏農10	19.1	10.0	2.4	22.7	56.3	8.7	12.4	87.6	CHN	CS01215
174	綏農11	19.2	10.5	2.6	35.4	45.6	5.9	13.1	86.9	CHN	CS01216
175	綏農14	20.9	11.6	2.2	24.6	55.0	6.5	13.9	86.1	CHN	CS01217
176	綏農15	20.3	12.3	3.4	24.5	53.0	6.8	15.7	84.3	CHN	CS01218
177	綏農15(小四粒黃)	20.2	11.1	2.8	29.8	49.6	6.6	13.9	86.1	CHN	CS01219
178	綏農17	20.0	10.0	3.1	32.2	48.6	6.1	13.1	86.9	CHN	CS01220
179	綏農19	20.1	10.4	3.1	35.8	45.1	5.6	13.5	86.5	CHN	CS01221
180	綏農21	18.3	10.5	2.9	30.2	50.0	6.5	13.3	86.7	CHN	CS01222
181	綏農22	22.0	11.5	2.9	27.2	52.5	5.9	14.4	85.6	CHN	CS01223
182	綏農5832	18.9	10.3	2.7	34.6	46.3	6.0	13.0	87.0	CHN	CS01224
183	延10	18.3	9.8	2.2	30.2	50.8	7.1	12.0	88.0	CHN	CS01225
184	延12	18.1	10.2	2.8	26.8	51.9	8.3	13.0	87.0	CHN	CS01226
185	延24	19.4	9.9	2.9	30.9	49.0	7.3	12.8	87.2	CHN	CS01228
186	延25	16.9	9.7	2.7	26.4	53.4	7.8	12.5	87.5	CHN	CS01229
187	延26	16.6	10.8	2.4	27.4	52.4	7.0	13.2	86.8	CHN	CS01230
188	延27	16.7	9.7	2.2	36.8	45.1	6.1	11.9	88.1	CHN	CS01231
189	延28	17.4	10.2	2.4	30.7	49.7	7.1	12.5	87.5	CHN	CS01232
190	吉林3	18.8	9.9	2.6	31.3	50.3	5.9	12.5	87.5	CHN	CS01233
191	吉林6	18.2	9.2	2.2	42.3	41.2	5.1	11.3	88.7	CHN	CS01234
192	吉林14	17.8	8.8	2.7	52.2	32.2	4.2	11.5	88.5	CHN	CS01235
193	吉林20	19.0	10.0	2.3	38.5	43.2	6.0	12.3	87.7	CHN	CS01236
194	吉林29	16.8	9.7	2.9	39.6	42.8	5.0	12.6	87.4	CHN	CS01237
195	吉林34	23.3	10.6	2.1	31.8	49.7	5.8	12.7	87.3	CHN	CS01238
196	吉林35	19.6	11.3	2.8	30.2	48.7	7.0	14.1	85.9	CHN	CS01239
197	吉林36	19.3	11.9	2.7	27.9	50.8	6.6	14.6	85.4	CHN	CS01240
198	吉林40	17.9	10.9	2.3	28.5	51.2	7.1	13.2	86.8	CHN	CS01242
199	吉林41	17.0	9.1	2.2	39.2	42.9	6.6	11.3	88.7	CHN	CS01243
200	吉林42	17.0	9.8	2.1	40.6	42.4	5.1	11.8	88.2	CHN	CS01244

번호	자원명	지방 함량 (%)	지방산 조성(%)							수집 국가	충북대 번호
			Pal <sup>1)</sup>	Ste <sup>2)</sup>	Ole <sup>3)</sup>	Linl <sup>4)</sup>	Linln <sup>5)</sup>	SFA <sup>6)</sup>	USFA <sup>7)</sup>		
201	吉林44	17.4	10.2	2.1	34.5	47.2	6.0	12.3	87.7	CHN	CS01246
202	吉林47	20.6	9.7	1.9	36.3	46.5	5.7	11.5	88.5	CHN	CS01247
203	吉林48	20.3	11.0	2.9	33.9	45.8	6.5	13.9	86.1	CHN	CS01248
204	吉林49	19.1	11.1	2.1	42.4	39.9	4.6	13.2	86.9	CHN	CS01249
205	吉林50	17.5	10.9	2.6	25.9	53.9	6.7	13.5	86.5	CHN	CS01250
206	吉林52	18.3	10.1	2.7	30.9	50.0	6.2	12.9	87.1	CHN	CS01251
207	吉林53	18.7	10.7	2.6	21.1	57.9	7.7	13.3	86.7	CHN	CS01252
208	吉林小粒	18.9	11.0	2.5	27.6	52.7	6.2	13.5	86.5	CHN	CS01253
209	東農39	20.8	11.3	3.1	24.1	54.8	6.7	14.4	85.6	CHN	CS01254
210	東農40	22.0	10.9	2.4	27.1	54.3	5.3	13.2	86.8	CHN	CS01255
211	東農42	20.9	10.5	3.0	34.0	46.5	5.9	13.5	86.5	CHN	CS01256
212	東農49	19.9	10.6	3.1	26.9	53.0	6.3	13.7	86.3	CHN	CS01259
213	東農163	22.4	11.6	3.1	28.0	50.2	7.2	14.7	85.3	CHN	CS01260
214	東農298	19.2	9.9	2.9	35.1	45.9	6.1	12.8	87.2	CHN	CS01261
215	東農410	23.4	11.3	2.8	28.7	50.1	7.2	14.1	85.9	CHN	CS01262
216	東農434	25.7	10.9	2.9	30.0	49.3	6.9	13.9	86.1	CHN	CS01263
217	東農30367	18.6	11.6	2.7	29.9	49.8	6.0	14.3	85.7	CHN	CS01264
218	東農30533	19.1	12.5	3.2	23.7	53.6	7.1	15.7	84.3	CHN	CS01265
219	東農32151	20.0	10.5	2.2	30.7	50.8	5.8	12.7	87.3	CHN	CS01266
220	東農92-19	20.7	11.0	3.5	20.7	57.1	7.7	14.5	85.5	CHN	CS01268
221	東農96-24	21.8	9.8	2.1	32.2	49.8	6.1	11.9	88.1	CHN	CS01269
222	東農98-14	17.3	12.7	3.3	19.6	56.2	8.3	15.9	84.1	CHN	CS01270
223	東農王中王(2)	18.2	10.4	2.1	36.2	45.3	5.9	12.5	87.5	CHN	CS01271
224	豐交7607	17.7	11.3	2.9	19.0	58.2	8.5	14.3	85.7	CHN	CS01272
225	吉農2號	19.4	11.7	2.8	22.2	56.1	7.2	14.5	85.5	CHN	CS01273
226	吉農45號	20.0	11.0	2.8	28.5	51.2	6.6	13.7	86.3	CHN	CS01274
227	吉農724號	18.5	10.5	2.3	30.3	50.5	6.4	12.8	87.2	CHN	CS01275
228	黑河19	21.8	10.5	2.6	28.3	53.0	5.5	13.1	86.9	CHN	CS01277
229	黑河51	21.1	11.0	2.7	30.6	50.0	5.7	13.7	86.3	CHN	CS01278
230	黑農31	17.3	11.3	2.6	19.7	57.8	8.6	14.0	86.1	CHN	CS01279
231	黑農37	21.9	10.0	3.1	36.8	45.2	5.0	13.1	87.0	CHN	CS01282
232	黑農37(王中王)	19.3	10.0	2.6	28.2	53.0	6.2	12.6	87.4	CHN	CS01283
233	黑農40	21.0	11.0	2.6	27.2	52.8	6.4	13.6	86.4	CHN	CS01286
234	黑農41	20.4	10.4	3.0	29.2	51.5	5.8	13.4	86.6	CHN	CS01287
235	黑農44(厚)	22.6	10.2	3.1	38.7	43.0	5.1	13.2	86.8	CHN	CS01289
236	黑農47	21.2	10.8	2.9	24.9	55.2	6.2	13.7	86.4	CHN	CS01290
237	白目1號	19.0	9.9	2.4	27.4	52.9	7.4	12.3	87.7	CHN	CS01291
238	九交8604	19.8	11.4	2.7	27.8	51.2	6.9	14.1	85.9	CHN	CS01292
239	公交8975-1	17.5	9.8	2.5	35.7	46.6	5.5	12.3	87.7	CHN	CS01293
240	公交8966-25	20.0	10.0	2.8	23.4	56.4	7.5	12.8	87.2	CHN	CS01294

번호	자원명	지방 함량 (%)	지방산 조성(%)							수집 국가	충북대 번호
			Pal <sup>1)</sup>	Ste <sup>2)</sup>	Ole <sup>3)</sup>	Linl <sup>4)</sup>	Linln <sup>5)</sup>	SFA <sup>6)</sup>	USFA <sup>7)</sup>		
241	公交9010-2	18.3	10.6	2.5	19.3	59.2	8.5	13.1	86.9	CHN	CS01295
242	公交9107-1	18.2	10.9	3.2	22.6	54.7	8.6	14.1	85.9	CHN	CS01296
243	公交94147-11	18.3	11.6	2.9	23.5	53.0	9.0	14.5	85.5	CHN	CS01297
244	墾鑿4	22.3	13.0	3.8	19.1	56.5	7.7	16.8	83.2	CHN	CS01298
245	墾鑿23	18.1	11.5	2.8	28.3	50.3	7.1	14.3	85.7	CHN	CS01299
246	綠色短	22.0	10.8	2.7	24.8	54.9	6.8	13.5	86.5	CHN	CS01300
247	農農10號	20.4	10.5	2.7	37.1	42.8	6.9	13.1	86.9	CHN	CS01301
248	E9144-31	18.9	10.8	2.8	25.7	54.0	6.7	13.6	86.4	CHN	CS01302
249	NE90035-3	18.7	9.8	3.2	21.7	58.1	7.3	13.0	87.0	CHN	CS01303
250	Y71	21.2	10.0	2.6	29.9	50.3	7.2	12.6	87.4	CHN	CS01304
251	吉育58	21.2	10.7	2.4	25.7	54.8	6.5	13.1	86.9	CHN	CS01306
252	吉育78	20.8	9.6	3.1	23.6	56.7	7.0	12.7	87.3	CHN	CS01308
253	吉育82	20.0	11.4	3.1	21.1	57.7	6.8	14.4	85.6	CHN	CS01309
254	北豐14	20.2	10.8	2.9	24.5	54.8	7.1	13.6	86.4	CHN	CS01310
255	北豐9704	21.2	10.9	2.6	27.5	52.9	6.0	13.5	86.5	CHN	CS01312
256	沈豆4號	20.3	11.1	3.2	26.5	52.4	6.8	14.3	85.7	CHN	CS01313
257	長農45	18.6	10.1	2.8	25.5	54.8	6.8	12.9	87.1	CHN	CS01314
258	鐵豐27	17.4	9.7	1.9	38.7	44.4	5.3	11.6	88.4	CHN	CS01316
259	鐵豐30	19.6	11.0	3.5	17.2	60.3	8.1	14.4	85.6	CHN	CS01317
260	早密英號(三農2號)	19.7	11.4	2.7	20.3	59.3	6.3	14.1	85.9	CHN	CS01318
261	密英號(三農3號)	21.1	10.9	2.5	26.8	53.7	6.1	13.4	86.6	CHN	CS01319
262	開育10	20.6	11.5	3.3	20.4	57.7	7.2	14.8	85.2	CHN	CS01321
263	何德松	19.8	10.4	2.6	22.6	57.6	6.9	13.0	87.0	CHN	CS01325
264	石厚大豆	19.0	10.6	3.2	19.8	58.7	7.7	13.9	86.1	CHN	CS01326
265	小金夏	21.6	10.5	3.1	32.6	48.0	5.9	13.6	86.4	CHN	CS01327
266	哈99-5307	21.9	11.0	3.0	24.1	55.7	6.2	13.9	86.1	CHN	CS01328
267	延院1號	19.5	10.1	2.8	21.4	58.7	7.0	12.9	87.1	CHN	CS01329
268	墾農19號	21.2	11.1	2.5	25.6	55.2	5.7	13.6	86.4	CHN	CS01330
269	巨株4-3	19.1	9.9	2.6	29.4	51.6	6.5	12.5	87.5	CHN	CS01331
270	寶豐1號	17.3	10.9	2.5	30.4	49.4	6.8	13.4	86.6	CHN	CS01332
271	吉34	19.5	10.2	2.9	29.2	51.5	6.3	13.0	87.0	CHN	CS01333
272	意3	22.3	10.8	2.5	24.7	55.1	6.9	13.3	86.7	CHN	CS01334
273	長春4號	18.7	9.9	2.8	23.5	56.8	6.9	12.7	87.3	CHN	CS01335
274	長春6號	17.8	10.2	2.8	27.4	52.2	7.3	13.0	87.0	CHN	CS01336
275	墾豐10	20.9	10.2	2.7	29.5	51.9	5.7	12.9	87.1	CHN	CS01338
276	遼21051	21.0	10.2	2.9	27.6	51.9	7.3	13.1	86.9	CHN	CS01339
277	遼89102	18.2	10.8	2.7	40.3	39.2	7.1	13.5	86.5	CHN	CS01340
278	沈農91-44	18.2	10.6	2.9	34.4	45.4	6.7	13.5	86.5	CHN	CS01341
279	沈農9421	17.9	10.6	3.0	33.5	46.5	6.4	13.6	86.4	CHN	CS01342
280	白農2號	19.1	10.5	2.9	27.7	51.9	7.0	13.3	86.7	CHN	CS01344

번호	자원명	지방 함량 (%)	지방산 조성(%)							수집 국가	충북대 번호
			Pal <sup>1)</sup>	Ste <sup>2)</sup>	Ole <sup>3)</sup>	Linl <sup>4)</sup>	Linln <sup>5)</sup>	SFA <sup>6)</sup>	USFA <sup>7)</sup>		
281	通化小粒豆	21.9	10.8	3.2	40.6	40.6	4.8	14.0	86.0	CHN	CS01345
282	通交936	19.3	10.8	2.7	26.7	52.8	7.1	13.5	86.5	CHN	CS01346
283	北疆93-576	20.5	12.9	3.4	20.4	56.1	7.3	16.2	83.8	CHN	CS01347
284	共引94141	19.4	10.4	2.7	28.5	51.3	7.1	13.1	86.9	CHN	CS01348
285	小四粒黄	21.2	11.1	2.9	39.7	42.0	4.4	14.0	86.0	CHN	CS01349
286	富强1號	19.0	12.4	3.1	24.5	51.2	8.8	15.5	84.5	CHN	CS01350
287	大粒昔	19.2	10.2	2.6	23.3	56.2	7.7	12.8	87.2	CHN	CS01351
288	金180	14.6	12.0	2.8	17.1	58.5	9.7	14.7	85.3	CHN	CS01352
289	金197	19.9	11.7	3.2	20.6	56.3	8.1	14.9	85.1	CHN	CS01353
290	金198	19.4	11.4	3.1	23.4	54.1	8.0	14.5	85.5	CHN	CS01354
291	金200	19.9	10.2	2.7	20.9	58.3	8.0	12.8	87.2	CHN	CS01355
292	金201	20.0	11.1	2.7	28.7	51.2	6.4	13.7	86.3	CHN	CS01356
293	金202	18.9	11.0	2.4	32.5	48.1	6.0	13.4	86.6	CHN	CS01357
294	金203	21.9	11.8	3.2	22.4	55.6	7.1	14.9	85.1	CHN	CS01358
295	金205	19.5	10.2	2.9	32.9	48.4	5.5	13.1	86.9	CHN	CS01359
296	93-88	19.3	9.2	2.3	49.5	34.3	4.7	11.4	88.6	CHN	CS01361
297	93-811	18.6	11.2	2.6	25.5	53.8	6.9	13.8	86.2	CHN	CS01362
298	96-1	19.4	10.3	2.7	27.8	52.4	6.8	13.0	87.0	CHN	CS01364
299	96-2	18.5	10.5	3.2	31.3	49.0	5.9	13.7	86.3	CHN	CS01365
300	96-4	20.6	10.2	3.1	27.3	53.0	6.5	13.3	86.7	CHN	CS01366
301	98-3	19.2	12.4	3.6	21.7	54.5	7.9	16.0	84.0	CHN	CS01367
302	98(93-7)	18.6	10.5	3.0	27.9	51.9	6.7	13.6	86.4	CHN	CS01368
303	D98-14	19.7	10.7	3.1	32.0	48.3	5.9	13.8	86.2	CHN	CS01369
304	1213-2	19.2	10.3	2.6	21.0	57.8	8.3	12.9	87.1	CHN	CS01370
305	92218-44	18.5	11.2	2.6	25.4	54.4	6.3	13.8	86.2	CHN	CS01371
306	45	19.5	11.0	2.9	27.4	51.6	7.0	14.0	86.0	CHN	CS01372
307	75	17.6	9.5	2.1	48.7	34.8	4.8	11.6	88.4	CHN	CS01373
308	119	21.8	10.2	2.2	29.8	52.3	5.5	12.4	87.6	CHN	CS01374
309	196	21.5	11.4	3.4	23.0	54.8	7.4	14.8	85.2	CHN	CS01375
310	OK	18.7	10.1	2.8	27.0	53.8	6.3	12.9	87.1	CHN	CS01376
311	OK	18.0	10.0	2.9	25.3	55.1	6.7	12.9	87.1	CHN	CS01377
312	CK	18.6	10.0	2.6	30.7	50.8	5.9	12.6	87.4	CHN	CS01378
313	동농46	25.0	10.7	2.7	24.8	51.7	10.2	13.3	86.7	CHN	CS01380
314	동농47	21.3	12.9	3.3	29.2	44.3	10.2	16.2	83.8	CHN	CS01381
315	동농48	18.6	10.7	2.0	35.7	46.0	5.6	12.7	87.3	CHN	CS01382
316	수05-7288	21.2	10.4	3.1	28.0	50.0	8.5	13.5	86.5	CHN	CS01384
317	수05-7292	21.1	10.3	3.1	24.0	54.0	8.6	13.4	86.6	CHN	CS01385
318	수05-7368	20.8	12.1	2.9	23.6	52.0	9.4	15.0	85.0	CHN	CS01386
319	수05-7466	22.2	10.9	2.6	24.8	53.6	8.0	13.5	86.5	CHN	CS01387
320	수농20	21.0	10.8	2.5	28.1	51.2	7.3	13.4	86.6	CHN	CS01388

번호	자원명	지방함량(%)	지방산 조성(%)							수집국가	충북대번호
			Pal <sup>1)</sup>	Ste <sup>2)</sup>	Ole <sup>3)</sup>	Linl <sup>4)</sup>	Linln <sup>5)</sup>	SFA <sup>6)</sup>	USFA <sup>7)</sup>		
321	동농44	22.2	10.1	2.9	39.8	42.2	5.0	12.9	87.1	CHN	CS01804
322	공교95169-1	22.4	11.9	3.3	29.3	49.1	6.4	15.2	84.8	CHN	CS00883
323	공교2002-3	19.3	11.0	3.2	28.4	50.6	6.8	14.2	85.8	CHN	CS00887
324	길농9705-3	22.1	10.0	3.0	46.4	36.8	3.8	13.0	87.0	CHN	CS00918
325	합교99104A-1	23.7	9.8	3.0	34.8	46.7	5.6	12.9	87.1	CHN	CS00922
326	수00-1193	21.8	10.4	3.1	38.6	42.7	5.2	13.5	86.5	CHN	CS00931
327	수농14	26.0	11.7	2.8	34.7	46.6	4.2	14.5	85.5	CHN	CS00932
328	중황16	21.6	10.1	2.7	26.7	53.4	7.1	12.7	87.3	CHN	CS00734
329	평안1007	19.1	9.4	2.6	31.6	50.4	5.9	12.0	88.0	CHN	CS00899
330	공교96176-1	18.9	10.2	2.7	23.5	56.6	7.1	12.8	87.2	CHN	CS00888
331	흑농44	20.4	10.3	2.9	36.7	44.2	5.9	13.3	86.7	CHN	CS01383
332	중황28	21.0	10.4	2.6	27.5	52.3	7.1	13.0	87.0	CHN	CS00732
333	백교9403-114	20.3	10.6	2.9	28.7	51.0	6.7	13.5	86.5	CHN	CS00897
334	중황31	21.8	9.5	2.9	25.9	54.5	7.2	12.4	87.6	CHN	CS00733
335	공교98M3-7	21.7	10.4	2.8	30.5	48.6	7.6	13.3	86.7	CHN	CS00895
336	H-02-455	21.5	10.7	3.4	34.7	45.1	6.1	14.1	86.0	CHN	CS00915
337	합98-3964	21.0	10.1	2.1	39.8	44.0	4.1	12.2	87.8	CHN	CS00924
338	흑농34	20.7	10.4	2.8	31.3	50.0	5.6	13.2	86.8	CHN	CS01280
339	장B2000-25	20.0	11.0	2.5	27.4	52.7	6.4	13.5	86.5	CHN	CS00903
340	합풍41	21.4	10.8	3.1	27.0	52.7	6.5	13.9	86.1	CHN	CS01200
341	공교DY2004-5	19.3	10.8	2.7	28.8	50.5	7.3	13.5	86.5	CHN	CS00909
342	공교93155-13	21.8	11.2	2.6	36.1	45.1	5.1	13.8	86.2	CHN	CS00904
343	Deckmann Green-Yellow	19.4	13.0	3.8	21.0	53.4	8.8	16.9	83.1	USA	CS01389
344	Cosse Lisse	12.7	13.9	3.6	17.9	53.9	10.8	17.5	82.5	USA	CS01390
345	Zaznica	18.6	12.1	3.6	23.6	53.5	7.2	15.8	84.2	USA	CS01392
346		17.6	12.4	3.9	21.6	54.1	8.0	16.3	83.7	USA	CS01393
347	SY 9514014	16.8	11.7	2.8	35.9	42.4	7.1	14.5	85.5	USA	CS01394
348	Oh Won No. 1	18.5	10.9	2.8	37.3	42.2	6.7	13.7	86.3	USA	CS01398
349	ZDD00538	19.2	10.7	2.0	44.7	37.7	4.9	12.7	87.3	USA	CS01399
350	ZDD19262	17.1	11.5	2.8	36.7	42.8	6.2	14.3	85.7	USA	CS01400
351	Tamasudake	14.7	11.1	2.3	35.5	43.9	7.1	13.4	86.6	USA	CS01404
352	Misao	18.0	12.7	3.6	18.0	56.8	9.0	16.2	83.8	USA	CS01405
353	(Q dong guan qing dou jia)	18.6	12.0	3.0	23.5	53.8	7.7	15.0	85.0	USA	CS01406
354	KLG12073	19.4	9.5	2.7	56.0	25.1	6.7	12.2	87.8	USA	CS01407
355	KLG12074	20.1	9.6	2.7	56.0	25.1	6.7	12.3	87.7	USA	CS01408
356	KLG12075	19.2	18.1	3.6	16.5	51.8	10.0	21.7	78.3	USA	CS01409
357	KLG12076	17.9	18.0	3.4	17.5	51.8	9.5	21.3	78.7	USA	CS01410
358	KLG12077	19.5	4.5	12.7	17.9	56.1	8.9	17.2	82.8	USA	CS01411
359	KLG12079	18.6	4.5	3.0	29.5	59.1	3.9	7.4	92.6	USA	CS01412
360	KLG12080	21.6	4.9	2.6	22.9	65.6	4.0	7.4	92.6	USA	CS01413

번호	자원명	지방 함량 (%)	지방산 조성(%)							수집 국가	충북대 번호
			Pal <sup>1)</sup>	Ste <sup>2)</sup>	Ole <sup>3)</sup>	Linl <sup>4)</sup>	Linln <sup>5)</sup>	SFA <sup>6)</sup>	USFA <sup>7)</sup>		
361	KLGI2081	19.5	4.3	2.6	22.0	67.0	4.0	6.9	93.1	USA	CS01414
362	KLGI2082	20.0	4.1	2.8	23.2	65.8	4.1	6.8	93.2	USA	CS01415
363	KLGI2083	17.6	4.6	3.5	19.2	68.1	4.6	8.1	91.9	USA	CS01416
364	KLGI2085	18.6	4.1	2.5	30.0	59.6	3.8	6.6	93.4	USA	CS01418
365	KLGI2086	20.6	4.5	2.8	24.4	64.1	4.1	7.3	92.7	USA	CS01419
366	KLGI2087	19.0	4.2	2.7	32.4	56.9	3.8	6.9	93.1	USA	CS01420
367	KLGI2088	16.3	4.1	2.8	22.8	65.6	4.7	6.9	93.1	USA	CS01421
368	KLGI2089	17.5	4.3	2.7	32.5	53.0	7.5	7.0	93.0	USA	CS01422
369	KLGI2090	19.0	4.6	2.8	27.0	56.9	8.8	7.4	92.6	USA	CS01423
370	KLGI2091	20.3	5.0	3.0	27.2	58.3	6.5	7.9	92.1	USA	CS01424
371	KLGI2092	19.7	5.5	2.8	24.8	60.7	6.1	8.4	91.6	USA	CS01425
372	KLGI2093	19.7	5.3	2.7	30.5	58.0	3.4	8.0	92.0	USA	CS01426
373	KLGI2094	19.6	6.7	2.6	26.6	59.7	4.4	9.4	90.6	USA	CS01427
374	KLGI2095	20.7	7.8	2.5	26.9	59.1	3.7	10.4	89.7	USA	CS01428
375	KLGI2096	20.8	8.7	2.6	27.6	57.6	3.5	11.3	88.7	USA	CS01429
376	KLGI2097	20.3	9.4	2.7	28.0	56.4	3.6	12.1	87.9	USA	CS01430
377	KLGI2098	21.0	11.2	3.0	19.2	58.0	8.7	14.1	85.9	USA	CS01431
378	KLGI2099	19.5	9.0	2.9	26.2	56.8	5.2	11.8	88.2	USA	CS01432
379	KLGI2100	21.3	12.1	2.7	21.2	55.2	8.7	14.8	85.2	USA	CS01433
380	Misuzudaizu	14.3	9.7	2.8	34.8	44.5	8.3	12.4	87.6	JPN	CS02244
381	Moshidou Gong 503	16.1	11.7	2.0	17.9	57.6	10.7	13.7	86.3	JPN	CS02245
382	1-001	13.8	11.5	3.3	23.2	53.9	8.1	14.8	85.2	JPN	CS02246
383	1-004	16.8	9.7	2.8	42.7	38.7	6.1	12.5	87.5	JPN	CS02247
384	1-005	17.8	9.9	3.0	36.1	44.2	6.8	12.9	87.1	JPN	CS02248
385	1-006	15.5	9.7	2.4	24.2	55.0	8.8	12.0	88.0	JPN	CS02249
386	1-007	18.9	10.8	1.5	19.6	58.1	10.0	12.3	87.7	JPN	CS02250
387	1-010	15.8	11.7	2.8	26.7	50.6	8.1	14.5	85.5	JPN	CS02251
388	1-012	15.8	11.0	2.8	21.5	55.7	8.9	13.8	86.2	JPN	CS02252
389	1-013	16.0	12.2	3.1	19.3	53.5	12.0	15.3	84.7	JPN	CS02253
390	1-014	18.1	8.8	1.2	32.4	49.3	8.3	10.0	90.0	JPN	CS02254
391	1-017	17.9	10.8	2.9	24.5	53.5	8.3	13.7	86.3	JPN	CS02255
392	1-019	15.7	9.9	3.1	28.7	50.5	7.9	13.0	87.0	JPN	CS02256
393	1-020	20.5	9.0	2.0	39.6	43.0	6.3	11.1	88.9	JPN	CS02257
394	1-021	16.9	11.4	3.0	22.7	54.3	8.7	14.4	85.6	JPN	CS02258
395	1-022	17.4	10.7	3.6	27.4	50.3	8.0	14.3	85.7	JPN	CS02259
396	1-024	17.3	11.6	1.9	19.7	54.9	11.9	13.5	86.5	JPN	CS02260
397	1-026	14.0	11.1	1.6	21.6	54.4	11.3	12.7	87.3	JPN	CS02261
398	1-027	18.3	10.0	3.1	23.1	53.4	10.4	13.1	86.9	JPN	CS02262
399	1-029	17.4	9.9	1.6	31.7	48.9	7.8	11.5	88.5	JPN	CS02263
400	1-031	15.6	9.3	2.8	38.3	41.8	7.8	12.2	87.8	JPN	CS02264



번호	자원명	지방 함량 (%)	지방산 조성(%)							수집 국가	충북대 번호
			Pal <sup>1)</sup>	Ste <sup>2)</sup>	Ole <sup>3)</sup>	Linl <sup>4)</sup>	Linln <sup>5)</sup>	SFA <sup>6)</sup>	USFA <sup>7)</sup>		
401	1-034	18.8	9.4	1.8	27.2	53.1	8.5	11.2	88.8	JPN	CS02265
402	1-035	14.1	11.1	1.7	28.8	50.8	7.6	12.8	87.2	JPN	CS02266
403	1-036	21.8	10.3	1.9	34.6	46.2	7.0	12.1	87.9	JPN	CS02267
404	1-037	18.4	12.0	2.9	19.7	56.2	9.2	14.9	85.1	JPN	CS02268
405	1-039	19.7	10.3	1.9	23.4	56.0	8.4	12.2	87.8	JPN	CS02269
406	1-040	20.5	10.8	2.7	23.9	53.1	9.5	13.6	86.4	JPN	CS02270
407	1-043	17.6	10.8	2.6	24.6	53.1	8.9	13.3	86.7	JPN	CS02271
408	1-045	18.6	11.5	3.1	20.3	54.0	11.1	14.6	85.4	JPN	CS02272
409	1-047	18.6	12.4	3.1	23.8	51.5	9.1	15.5	84.5	JPN	CS02273
410	1-048	18.7	10.7	1.2	30.5	50.2	7.4	11.9	88.1	JPN	CS02274
411	1-050	16.5	11.0	2.8	30.7	47.8	7.8	13.8	86.2	JPN	CS02275
412	1-052	16.5	10.9	3.0	27.7	50.3	8.1	13.9	86.1	JPN	CS02276
413	1-053	17.4	10.6	1.8	25.5	53.9	8.2	12.5	87.5	JPN	CS02277
414	1-055	19.3	9.9	1.8	27.2	51.3	9.7	11.8	88.2	JPN	CS02278
415	1-060	16.6	12.4	3.7	23.3	50.2	10.3	16.2	83.8	JPN	CS02279
416	1-061	17.3	11.3	3.5	26.3	50.2	8.8	14.8	85.2	JPN	CS02280
417	1-062	17.5	10.2	2.7	30.5	49.4	7.2	12.9	87.1	JPN	CS02281
418	1-064	18.5	10.5	2.4	27.6	50.7	8.9	12.9	87.1	JPN	CS02282
419	1-065	20.3	11.5	2.7	27.8	49.7	8.3	14.1	85.9	JPN	CS02283
420	1-066	21.1	10.8	2.9	23.2	54.6	8.5	13.7	86.3	JPN	CS02284
421	1-067	15.9	12.2	2.8	22.2	53.1	9.7	15.0	85.0	JPN	CS02285
422	1-068	17.5	10.1	1.6	30.7	50.8	6.7	11.8	88.2	JPN	CS02286
423	1-069	17.1	9.9	2.9	36.9	43.5	6.7	12.8	87.2	JPN	CS02287
424	1-073	17.7	10.4	2.1	24.0	55.9	7.7	12.4	87.6	JPN	CS02288
425	1-075	14.6	10.7	2.0	21.7	56.7	8.9	12.7	87.3	JPN	CS02289
426	1-078	15.9	11.7	2.8	21.8	55.4	8.3	14.4	85.6	JPN	CS02290
427	1-079	19.3	11.2	2.6	22.7	53.1	10.3	13.9	86.1	JPN	CS02291
428	1-080	19.9	10.7	1.7	19.8	56.2	11.7	12.4	87.6	JPN	CS02292
429	1-081	18.4	11.6	3.0	21.1	54.0	10.3	14.6	85.4	JPN	CS02293
430	1-083	20.6	10.8	1.8	19.4	57.4	10.5	12.6	87.4	JPN	CS02294
431	1-085	18.7	10.9	1.8	20.7	55.1	11.5	12.7	87.3	JPN	CS02295
432	1-090	16.3	10.2	3.1	23.1	55.5	8.2	13.3	86.7	JPN	CS02296
433	1-092	16.4	9.6	1.5	26.0	54.7	8.2	11.1	88.9	JPN	CS02297
434	1-095	19.6	11.4	2.2	22.0	54.7	9.7	13.6	86.4	JPN	CS02298
435	1-097	17.7	11.9	3.1	22.9	52.0	10.2	15.0	85.0	JPN	CS02299
436	1-099	15.9	10.8	3.1	26.8	51.2	8.1	13.9	86.1	JPN	CS02300
437	1-101	19.9	10.9	2.0	19.0	58.9	9.1	12.9	87.1	JPN	CS02301
438	1-102	19.8	10.5	1.6	27.3	52.5	8.1	12.1	87.9	JPN	CS02302
439	1-103	17.1	10.3	1.7	21.5	57.2	9.3	12.0	88.0	JPN	CS02303
440	1-105	18.1	9.4	1.4	40.8	41.6	6.8	10.8	89.2	JPN	CS02304

번호	자원명	지방 함량 (%)	지방산 조성(%)							수집 국가	충북대 번호
			Pal <sup>1)</sup>	Ste <sup>2)</sup>	Ole <sup>3)</sup>	Linl <sup>4)</sup>	Linln <sup>5)</sup>	SFA <sup>6)</sup>	USFA <sup>7)</sup>		
441	1-106	16.2	9.4	1.6	40.9	41.3	6.7	11.1	88.9	JPN	CS02305
442	1-107	17.6	9.9	3.5	34.4	45.5	6.7	13.4	86.6	JPN	CS02306
443	1-108	18.6	9.5	2.6	26.6	52.6	8.8	12.1	87.9	JPN	CS02307
444	1-112	22.4	11.7	2.8	20.2	54.7	10.7	14.5	85.5	JPN	CS02308
445	1-114	17.5	12.8	2.7	21.9	52.1	10.6	15.5	84.5	JPN	CS02309
446	1-116	22.8	9.8	1.4	35.8	46.8	6.2	11.2	88.8	JPN	CS02310
447	1-117	13.9	11.0	2.8	22.9	54.5	8.8	13.8	86.2	JPN	CS02311
448	1-119	16.9	11.9	3.3	24.2	51.4	9.2	15.2	84.8	JPN	CS02312
449	1-120	15.7	10.5	3.2	21.1	53.7	11.4	13.7	86.3	JPN	CS02313
450	1-123	15.9	10.7	1.8	20.9	58.1	8.4	12.5	87.5	JPN	CS02314
451	1-125	16.8	10.5	2.6	26.3	52.0	8.6	13.1	86.9	JPN	CS02315
452	1-127	17.2	10.3	1.7	19.1	58.9	10.0	12.0	88.0	JPN	CS02316
453	1-128	14.2	11.5	2.9	22.3	53.4	9.9	14.5	85.5	JPN	CS02317
454	1-130	15.9	10.8	1.3	33.0	48.0	6.8	12.1	87.9	JPN	CS02318
455	1-131	16.6	9.3	0.9	43.2	40.2	6.5	10.2	89.8	JPN	CS02319
456	1-133	15.7	10.0	3.0	21.2	56.1	9.6	13.0	87.0	JPN	CS02320
457	1-134	18.8	10.0	2.2	21.4	56.5	10.0	12.2	87.8	JPN	CS02321
458	1-136	15.4	11.4	3.4	19.7	54.1	11.5	14.8	85.2	JPN	CS02322
459	1-137	17.9	10.1	1.5	27.1	52.7	8.6	11.6	88.4	JPN	CS02323
460	1-139	13.8	12.5	2.9	25.6	49.7	9.2	15.5	84.5	JPN	CS02324
461	1-140	13.2	12.2	2.7	22.3	52.3	10.5	14.8	85.2	JPN	CS02325
462	1-141	15.1	11.5	3.3	32.2	46.3	6.7	14.8	85.2	JPN	CS02326
463	1-142	16.3	10.5	3.8	22.4	53.1	10.3	14.3	85.7	JPN	CS02327
464	1-145	15.4	11.3	3.4	24.0	51.4	10.0	14.7	85.3	JPN	CS02328
465	1-146	16.3	11.4	3.2	26.3	50.9	8.2	14.6	85.4	JPN	CS02329
466	1-147	16.9	10.7	2.8	24.8	52.3	9.4	13.5	86.5	JPN	CS02330
467	1-148	18.0	12.2	3.1	19.2	55.7	9.8	15.3	84.7	JPN	CS02331
468	1-152	15.2	10.0	2.4	22.2	56.3	9.2	12.4	87.6	JPN	CS02332
469	1-153	16.6	11.9	3.2	20.3	53.7	11.0	15.0	85.0	JPN	CS02333
470	1-155	14.4	10.8	2.5	24.1	52.1	10.4	13.4	86.6	JPN	CS02334
471	1-156	16.3	9.8	1.8	34.0	46.4	8.0	11.6	88.4	JPN	CS02335
472	1-157	14.3	10.8	1.5	25.6	53.7	8.5	12.3	87.7	JPN	CS02336
473	1-159	17.2	9.5	3.1	25.4	53.9	8.0	12.6	87.4	JPN	CS02337
474	1-162	15.5	9.5	3.4	28.5	51.0	7.8	12.8	87.2	JPN	CS02338
475	1-163	18.3	9.3	1.8	23.2	56.7	9.0	11.1	88.9	JPN	CS02339
476	1-169	15.8	10.5	1.8	26.8	51.5	9.4	12.3	87.7	JPN	CS02340
477	1-170	18.2	9.4	2.0	26.0	53.9	8.6	11.4	88.6	JPN	CS02341
478	1-171	17.7	10.7	2.3	24.2	54.1	8.7	13.0	87.0	JPN	CS02342
479	1-172	17.3	11.4	2.2	18.3	57.0	11.1	13.6	86.4	JPN	CS02343
480	1-173	16.8	11.4	2.5	26.7	51.4	8.1	13.9	86.1	JPN	CS02344

번호	자원명	지방 함량 (%)	지방산 조성(%)							수집 국가	충북대 번호
			Pal <sup>1)</sup>	Ste <sup>2)</sup>	Ole <sup>3)</sup>	Linl <sup>4)</sup>	Linln <sup>5)</sup>	SFA <sup>6)</sup>	USFA <sup>7)</sup>		
481	1-174	16.0	10.5	1.5	29.8	49.4	8.8	12.1	87.9	JPN	CS02345
482	1-175	19.6	12.1	3.0	26.0	52.2	6.6	15.1	84.9	JPN	CS02346
483	1-176	16.7	10.4	2.9	19.7	57.7	9.2	13.3	86.7	JPN	CS02347
484	1-177	14.2	11.8	2.6	20.2	54.4	11.0	14.4	85.6	JPN	CS02348
485	1-178	16.8	10.3	1.9	34.1	46.5	7.2	12.2	87.8	JPN	CS02349
486	1-179	14.3	10.4	2.4	30.3	48.6	8.3	12.7	87.3	JPN	CS02350
487	1-181	16.5	10.9	3.0	23.4	53.2	9.5	13.8	86.2	JPN	CS02351
488	1-182	15.9	11.1	3.0	21.0	55.8	9.1	14.2	85.8	JPN	CS02352
489	1-183	13.6	11.4	2.9	34.1	43.2	8.3	14.4	85.6	JPN	CS02353
490	1-187	15.0	10.2	2.2	26.1	52.1	9.4	12.5	87.5	JPN	CS02354
491	1-189	18.5	10.2	2.1	19.9	59.1	8.7	12.3	87.7	JPN	CS02355
492	1-190	15.8	9.4	1.9	21.3	57.7	9.7	11.3	88.7	JPN	CS02356
493	1-192	16.5	9.7	2.8	22.2	56.6	8.8	12.4	87.6	JPN	CS02357
494	1-193	17.2	9.7	2.1	34.6	45.7	7.9	11.8	88.2	JPN	CS02358
495	1-195	17.1	9.7	1.9	31.4	49.2	7.9	11.5	88.5	JPN	CS02359
496	1-196	15.1	9.7	2.3	33.7	46.4	8.0	12.0	88.0	JPN	CS02360
497	6-003	17.4	10.5	1.9	26.4	54.3	7.0	12.4	87.6	JPN	CS02361
498	6-007	18.2	10.9	2.3	17.8	57.3	11.6	13.2	86.8	JPN	CS02362
499	6-008	17.0	10.8	2.9	19.9	54.9	11.5	13.7	86.3	JPN	CS02363
500	6-010	17.2	10.7	2.8	23.8	52.9	9.7	13.6	86.4	JPN	CS02364
501	6-011	19.3	10.4	2.2	27.5	50.5	9.3	12.7	87.3	JPN	CS02365
502	6-018	19.9	9.9	2.6	25.5	52.2	9.8	12.5	87.5	JPN	CS02366
503	6-019	17.0	10.2	2.1	26.1	52.7	8.9	12.3	87.7	JPN	CS02367
504	6-020	18.4	11.7	2.9	23.6	51.6	10.1	14.6	85.4	JPN	CS02368
505	6-024	16.3	10.5	1.4	32.8	48.2	7.1	11.9	88.1	JPN	CS02369
506	6-030	19.0	9.9	1.7	22.9	54.8	10.7	11.6	88.4	JPN	CS02370
507	6-032	12.6	11.9	2.6	25.9	49.3	10.3	14.5	85.5	JPN	CS02371
508	6-034	20.8	9.6	2.4	20.7	56.3	11.0	12.1	87.9	JPN	CS02372
509	6-036	16.1	10.5	2.3	33.6	45.4	8.2	12.8	87.2	JPN	CS02373
510	6-037	18.7	9.9	2.9	25.6	52.0	9.7	12.8	87.2	JPN	CS02374
511	6-038	19.4	11.1	2.8	16.6	58.1	11.3	13.9	86.1	JPN	CS02375
512	6-042	18.7	11.8	3.7	26.7	49.4	8.6	15.4	84.6	JPN	CS02376
513	Bay	20.9	10.2	2.8	26.3	53.6	7.1	13.0	87.0	JPN	CS02377
514	M23	16.9	8.1	3.4	55.2	25.8	7.5	11.5	88.5	JPN	CS02378
515	T2427	17.1	7.7	2.3	39.4	46.4	4.2	10.1	89.9	JPN	CS02379
516	SW2084	20.3	8.6	3.4	31.8	50.0	6.2	12.0	88.0	JPN	CS02380
517	MS382	17.9	8.3	3.0	30.5	55.2	3.0	11.3	88.7	JPN	CS02381
518	J18	17.6	8.5	3.3	28.5	55.0	4.7	11.9	88.1	JPN	CS02382
519	KK24	16.9	7.8	3.5	35.3	48.7	4.8	11.2	88.8	JPN	CS02383

\*1) Palmitic acid, 2) Stearic acid, 3) Oleic acid, 4) Linoleic acid,  
5) Linolenic acid, 6) Saturated fatty acid, 7) Unsaturated fatty acid