

발 간 등 록 번 호

11-1543000-000505-01

**Omics 기술을 기반으로 한
된장의 항염증 및 항산화 기능성 연구**

Anti-inflammatory and anti-oxidant functional study of
deonjang (fermented soybean paste) based
on the Omics technology

호서대학교

농 립 축 산 식 품 부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “OmicS 기술을 기반으로 한 된장의 항염증 및 항산화 기능성 연구” 과제의
보고서로 제출합니다.

2014년 7월 일

주관연구기관명 : 호서대학교
자연과학대학 생명공학과

주관연구책임자 : 정 영 신

연 구 원 : 조 민 수

협동연구기관명 : 서울대학교
노화고령사회연구소

협동연구책임자 : 곽 충 실

연 구 원 : 손 다 희

협동연구기관명 : 서울대학교
생활과학대학 식품영양학과

협동연구책임자 : 권 영 혜

연 구 원 : 원 새 봄

연 구 원 : 고 제 원

연 구 원 : 남 예 림

요 약 문

I. 제 목

Omics 기술을 기반으로 한 된장의 항염증 및 항산화 기능성 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

전통 장류인 된장의 항산화, 항비만, 항염증효과를 *in vitro* 및 *in vivo* 모델에서 입증하고자 하며, 특히 침단의 기능성 평가기술인 “Omics“ 기술을 활용하여 비만관련 염증을 억제하는 작용기전을 규명함으로써 한식세계화를 위한 경쟁력 있는 자료를 제공하고자 함

2. 연구의 필요성

- 식생활의 서구화로 인하여 국내의 비만 인구가 증가하고 있으며, 이에 따라 우리나라의 대표적인 대두발효식품인 고추장, 된장, 청국장에 대한 중요성이 재인식되고 있음
- 최근 전통발효식품에 대한 기능성 연구들이 활발히 진행되고 있으나 발효장류섭취에 따른 항비만과 항염증효과에 의한 작용기전 연구는 미진한 상황으로 이에 대한 심도 있는 연구가 필요함

III. 연구개발 내용 및 범위

- 생리활성 물질에 대한 기본정보를 확보하기 위하여 찌대두와 메주 및 된장의 숙성기간에 따른 성분 (총폴리페놀 및 플라보노이드, isoflavone)의 함량 및 β -glucosidase 활성의 변화를 확인하고, 항산화활성 (FRAP, DPPH 라디칼 및 ABTS 라디칼생성억제효과)을 측정 비교함
- 된장의 숙성기간에 따른 항염증효과를 연구하고자 LPS를 처리한 RAW 264.7 대식세포에 찌대두와 숙성기간이 다른 된장의 추출물을 투여하여 염증반응 관련인자인 NO, PGE2, TNF- α , IL-6, MCP-1 농도와 iNOS, COX-2, NF- κ B) 등의 단백질 생성량을 측정 비교함

- 식이유도 비만 (DIO) 동물모델에서 된장의 항산화 · 항염 · 항비만 기능성 (혈액의 항산화 · 항염증 · 지질대사지표 및 조직슬라이드분석 등)을 평가하고, 관련질병으로의 확산을 억제하는지를 검증하기 위하여 간에서의 염증지표와 혈액의 인슐린저항성지표를 평가함
- 국제적 첨단 생명과학 기법인 miRNA array를 활용하여 DIO 동물 모델의 adipocyte에서 유전자 발현을 분석하여 항산화 · 항염 · 항비만 기능성과 작용기전에 관한 분자수준의 역할을 밝히므로서 우수한 기능성에 대한 과학적 근거를 제공함.

IV. 연구개발결과

1. 전대두, 메주, 된장의 숙성기간에 따른 총폴리페놀과 총플라보노이드 함량, isoflavone 함량 및 구성변화 분석과 β -glucosidase 활성 및 항산화활성 평가

- 한식된장과 전통된장의 총 폴리페놀 함량은 숙성초기 3개월에서는 한식된장이 전통된장보다 높았지만 6개월 이후에는 전통된장이 다소 높은 것으로 나타났음($p < 0.001$). 총 플라보노이드 함량은 숙성초기 3개월에서는 한식된장과 전통된장에서 비슷한 수준이었으나 6개월 이후에는 전통된장이 더 높은 것으로 나타났음($p < 0.001$). Isoflavone의 함량은 한식된장과 전통된장에서 비슷한 패턴을 보였으며, 숙성기간 3개월 후에는 대두의 glycoside isoflavone이 거의 대부분 aglycone으로 전환되었음.
- 한식된장의 경우, β -glucosidase는 전대두, 메주, 숙성기간에 따라 활성이 다르게 나타남. 메주발효와 숙성 8개월에 상승하였고 12개월에 가장 높은 활성(3.80 U/g dry wt)을 보임 ($p < 0.001$). 전통된장의 β -glucosidase 활성 0.20 U/g dry wt 으로 3~27개월의 숙성기간 동안 거의 변함이 없었음.
- DPPH 라디칼을 50% 제거하는 한식된장의 에탄올 추출시료의 농도(IC₅₀)는 전대두에 비하여 메주에서 유의하게 감소하여 항산화효과가 상승하였음을 알 수 있었고($p < 0.001$), 숙성 초기에 증가하여 12개월까지 IC₅₀는 비슷한 수준을 유지하고 있었음. 전통된장의 DPPH 라디칼 소거효과 역시 숙성 3개월부터 27개월까지는 차이가 없었음. DPPH 라디칼 소거효과는 시료의 총 폴리페놀 함량과 유의한 음의 상관관계($r = -0.8725$, $p < 0.001$)를 보인 반면, 총 플라보노이드 함량과는 상관성이 없었음.
- 한식된장의 에탄올 추출시료의 환원력(FRAP)은 전대두=메주<한식0<한식1=한식3=한식6<한식8<한식12($p < 0.001$)이었고, 전통된장은 전대두<전통27<전통3=전통6=전통15($p < 0.001$)으로 된장의 환원력은 메주발효과정에서보다는 숙성과정에서 증가하는 것으로 보임.

- 에탄올 추출시료의 ABTS+ 라디칼 소거능은 발효기간보다는 숙성기간에 증가하였음. 한식된장은 숙성 6개월까지 빠르게 증가하였다가 이후 감소하는 패턴을 보였으나, 전통된장은 숙성 15개월에서 가장 높은 효과를 보였다가 이후 감소하였음.
- 된장의 디클로로메탄(DM) 분획과 에틸아세테이트(EA) 분획이 핵산, 부탄올 및 물 분획에 비하여 월등하게 DPPH 라디칼 소거 효과가 우수하였고 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 또한 가장 높았음. 한식된장 시료 중 한식12의 DM, EA 분획의 총 폴리페놀 함량, 플라보노이드 함량 및 항산화효과가 가장 높았음

2. LPS 처리한 RAW 264.7 대식세포에서 한식된장의 항염증 효과 및 기전연구

- 찌대두, 한식0, 한식6, 한식12로부터 얻은 DM, EA분획을 이용하여 세포를 이용하여 항염증 실험을 한 결과 DM 분획(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)에서는 한식12만이 대조군의 55.6% 수준으로 NO 생성을 유의하게 감소시켰으며($p < 0.001$), EA분획에서는 한식6과 한식12가 NO생성을 각각 대조군의 88.8%, 55.6% 수준으로 유의하게 감소시켰음($p < 0.001$)
- DM 분획과 EA 분획 모두 된장의 숙성기간이 길어질수록 PGE2 생성을 더 많이 감소시켰음. 또한, DM 분획에서는 한식12만이 IL-6와 TNF- α 생성억제효과를 보였으며, 한식6과 한식12가 MCP-1 생성억제효과를 보였음. EA 분획에서는 한식0과 한식6도 IL-6와 MCP-1 생성억제효과가 약간 있었으나 한식12의 효과가 더 뚜렷하였고, TNF- α 생성억제효과는 없었음. 한식12만 DM과 EA분획 모두 염증촉진물질인 NO, PGE2, IL-6, MCP-1의 생성을 억제시키는 효과가 있었음. 따라서, 된장의 항염증효과는 발효 및 숙성과정을 거치면서 증가하여 12개월 숙성된장의 효과가 가장 우수하였음.
- 한식12의 DM 분획은 LPS 처리에 의하여 촉진된 NF- κ B의 활성화로 인하여 증가된 iNOS와 COX-2 합성을 효과적으로 감소시킨 반면, EA 분획은 iNOS 합성만 감소시켰음.
- 된장의 항염증효과는 DM과 EA분획 중 비교적 비극성에 속하는 폴리페놀이나 플라보노이드계의 어떤 물질에 의한 직접적인 효과와 항산화효과를 통한 간접적인 효과가 함께 작용하여 나타난 것으로 추정됨. 유효성분을 찾기 위한 추가적인 연구가 필요함.

3. 식이유도 비만 (DIO) 동물모델의 혈액과 간조직에서 된장의 항산화 · 항염 · 항비만 기능성 평가

- 된장의 기능성 평가를 위하여 C57BL/6 마우스에 4가지 다른 식이(10% kcal 저지방식이, 45% 고지방식이, 45% 고지방식이 + 15% 된장, 45% 고지방식이 + 11.8% 찐대두)를 11주 동안 급이하였음.
- 저지방식이와 비교하여, 고지방식은 체중을 유의적으로 증가시켰고 된장은 체중의 증가를 억제하였으며 찐대두는 체중의 증가를 억제하지 못한 것으로 관찰됨.
- 고지방식으로 인해 지방이 간조직과 지방조직에 축적되었고($p < 0.05$), 고지방식이와 비교할 때 된장급이 군에서는 지방축적이 유의적으로 감소하였음. 이에 따라 된장의 항비만 효과가 인정됨. 또한, 비만에 의하여 증가하는 혈중 leptin 농도가 된장섭취에 의해 유의적으로 억제되었고, 인슐린 저항성에 의해 증가하는 혈당 및 인슐린의 농도도 된장섭취에 의해 감소되는 경향이 관찰되었음.
- 간조직의 염증을 나타내는 혈액 생화학적 지표인 AST와 ALT 및 MCP-1 염증매개 인자는 고지방식이에 의해 유의적으로 증가하였으나, 된장섭취에 의해 염증지표들의 증가가 억제되었고, ELISA 방법으로 혈중 TNF- α 와 CRP 농도는 식이군 간의 유의적인 차이를 나타내지 않았음.
- 간조직에서 항산화 효소의 활성과 지질과산화 지표인 MDA는 식이군 간에 유의한 차이를 보이지 않았음. Total antioxidant potential를 나타내는 혈중 환원력(FRAP)도 식이군 간에 유의적인 변화가 관찰되지 않음.
- 간조직의 조직병리 결과에 따르면 모든 동물의 간조직에 지방이 축적되었는데, 고지방식이 섭취에 의해 지방 droplet이 커지고 많아졌으나 된장을 함께 섭취한 결과 지방축적이 다소 감소하였음. 고지방식이에 의해 간조직에서 유의하게 증가한 지방축적은 중성지방과 콜레스테롤의 축적에 의한 것으로 추정됨. 된장군은 고지방 대조군에 비하여 간조직의 중성지방 함량이 유의적으로 낮았으며 콜레스테롤은 차이가 없었음.

4. 식이유도 비만동물의 비만세포에서 ‘Omics “ 테크닉을 활용한 miRNA microarray 분석 및 항산화 · 항염 · 항비만 작용기전의 분자수준 연구

- 지방조직의 global miRNA profile을 microarray 분석을 통해 진행하였으며, 분석에 사용된 실험식이섭취군의 샘플 모두에서 발견된 272개의 miRNA 가운데 33개 miRNA가 식이에 의하여 유의적인 발현 차이가 나타남. 저지방식이와 고지방식이 섭취군간 8개의 miRNA (고지방식이군에서 감소: miR-378a-5p, miR-378c, miR-193b-3p, miR-107-3p, miR-3069-3p; 고지방

식이군에서 증가: miR-146b-5p, miR-16-5p, miR-155-5p)가 유의적인 차이 (기준: fold change $\geq \pm 1.5$)를 보였음. miR-378, miR-107, miR-146은 선행연구와 동일한 결과를 보여서 본 연구에 사용된 실험모델이 고지방식이에 의한 지방축적 및 지방세포의 분화를 유도하는데 적합함을 확인함.

- 고지방+된장식이 섭취군은 고지방식이군과 비교시 1.5배 이상의 발현량 변화가 유의적 차이를 보인 miRNA는 없었으며, miR-664-3p, miR-378c, miR-30c-2-3p, miR-150-5p, miR-193a-3p는 고지방+대두식이 섭취군에서 고지방+된장식이 섭취군에 비하여 감소되었고, miR-211-3p는 고지방+대두식이 섭취군에서 증가됨.
- 특히, 저지방식이와 고지방식이 섭취군간 (miR-193b-3p, miR-3069-3p, miR-16-5p, miR-155-5p), 고지방식이와 고지방+대두식이 섭취군간 (miR-362-5p)와 고지방+된장식이와 고지방+대두식이 섭취군간 (miR-664-3p, miR-150-5p, miR-211-3p) 차이를 보인 miRNA들은 아직 동물 지방조직에서의 역할이 규명되지 않은 새로운 miRNA들로 확인됨.
- 저지방식이 섭취군과 비교 시 고지방식이 섭취군들은 지방조직무게가 유의적으로 증가하였지만, 고지방+된장식이 섭취군은 고지방식이와 고지방+대두식이 섭취군에 비해서 지방조직무게의 증가가 유의적으로 낮았음. 지방세포 형태 (Adipocyte morphology)는 저지방식이 섭취군에 비해서 고지방식이 섭취군들은 유의적으로 단위면적당 지방세포수가 적고 지방세포 사이즈가 컸지만, 고지방식이 섭취군들간에는 차이가 없었음.
- 항산화 및 항염증, 섬유화 지표 분석에서 산화스트레스 marker인 HO-1 mRNA 발현량과 항염증과 관련된 macrophage infiltration 및 phenotype switch 지표인 CD68, CD11c와 염증 adipokine 지표인 TNF α , MCP-1, 그리고 섬유화 지표인 TGF β mRNA 발현량은 저지방식이 섭취군 및 고지방+된장식이 섭취군이 고지방식이 섭취군보다 유의적으로 감소하였음. 하지만, adipogenesis 관련 지표들은 실험식이섭취군간에 유의적인 차이를 보이지 않았음. 고지방식이 섭취는 지방조직에서 산화스트레스, 염증반응, 섬유화를 촉진시키는데, 된장을 섭취할 경우 이러한 증상이 억제 또는 완화되는 잠재적 효과가 있는 것으로 사료됨.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 연구성과 (예정)

○ 학술발표 성과

구분	연구논문	학술발표	계
연구종료 1년도(2015)	1	2	3
연구종료 2년차(2016)	2	1	3

○ 연구인력 양성 : 4명

2. 연구성과 활용계획

- 항산화효과 및 항염증효과가 가장 우수한 된장 숙성기간에 대한 참고자료를 제시함으로써 된장 제조 시 적절한 숙성기간, 권장유통기간 및 권장 섭취기간 등을 제시하는데 활용할 수 있음.
- 국내 장류 산업의 육성화를 위한 과학적 근거자료로 활용
- 처음으로 된장의 항염증효과와 작용기전을 밝힘으로써 된장의 우수성을 구체적으로 홍보 및 교육할 수 있는 근거자료로 활용함.
- 전통식품에 대한 인식전환 및 우수한 식재료에 대한 대국민 홍보자료로 활용함
- 연구결과를 국내외 전문학술지에 보고하여 널리 홍보함으로써 한식세계화를 촉진할 것임.

SUMMARY

I. Title

Anti-inflammatory and anti-oxidant functional study of deonjang (fermented soybean paste) based on the Omics technology

II. Purpose and necessity of the studies

1. Purpose of the research

The purpose of this research project was to evaluate the antioxidant and anti-inflammatory effects of doenjang in vitro and in vivo and to investigate the mode of action using “Omics “ technology in order to validate the doenjang’ s functional activity in the world.

2. Necessity of the studies

- According to the epidemiology studies, the population in the obesity are increasing in our country due to the westernized diets and the values of traditional fermented doenjang, kochujang, cheonkookjang are recognized.
- Recently, the many researches are focused on the physiological functions of fermented jangs, however, the mode of action related to antioxidant and anti-inflammatory activities of doenjang has not been studied.

III. Study contents and scopes

- To analyze and compare β -glucosidase activity, antioxidant ability and some known biologically active components of steamed soybean, meju(fermented soybeans) and doenjang(fermented and aged soybean product) aged for various periods.

- To estimate the effects of doenjang on the synthesis of proinflammatory mediators and the mechanism in RAW 264.7 macrophage cells treated with LPS by measuring NO, PGE₂, TNF- α , IL-6, MCP-1, iNOS, COX-2 and NF- κ B synthesis.
- To investigate the effects of doenjang on the antioxidant and anti-inflammatory activity in blood, liver tissues and adipose tissue of diet-induced obesity mice (C57BL/6).
- To analyze the miRNA monitoring the obesity-related gene expression using “Omics” technology and to measure the RNA levels of marker proteins expressed in the oxidative and inflammatory stress.

IV. Study results

1. Changes in some active components, β -glucosidase activity and antioxidant ability during fermentation and aging process from steamed soybean to doenjang

- Total polyphenol content in meju (6.04 mg tannic acid/g dry wt) was significantly higher than that in steamed soybeans(3.07 mg/g dry wt), and it was increased gradually during aging. In Hansik doenjang(fermented by inoculated *Aspergillus Oryzae* and *Bacillus licheniformis*), 3 month-aged doenjang(14.61 mg/g dry wt) contained highest total polyphenol contents, and it had been maintained until 12 months of aging. In Traditional doenjang(fermented by natural microorganism), 6 month-aged doenjang contained the highest total polyphenol contents(15.59 mg/g dry wt).
- Total flavonoid content of meju(0.84 mg rutin/g dry wt) was significantly reduced compare to steamed soybeans (1.00 mg/g dry wt), but it was decreased at the beginning period of aging in Hansik doenjang and then recovered to the level as much as that in meju after 3 months of aging. In Traditional doenjang, it was gradually increased with aging until 15 months, and maintained thereafter. Total isoflavone content was the highest in steamed soybean(3.01 mg/g dry wt) in samples, however, it was significantly decreased during the fermentation and then decreased further very slowly during the aging in Hansik doenjang.
- Glycoside isoflavone in steamed soybeans was converted to aglycone by the fermentation and aging process. Aglycone isoflavone content was more than 95% of total isoflavone

content in doenjang after 3 month of aging in both of Hansik and traditional doenjang, and it had been maintained thereafter.

- β -glucosidase activity was very low in steamed soybean(0.02 U/g dry wt), however, it was increased in meju (1.60 U/g dry wt), then slowly decreased until 6 months of aging and increased up to 0.83U/g dry wt at 8 months and 3.80 U/g dry wt at 12 months(Hansik doenjang), respectively. β -glucosidase activity in traditional doenjang was not changed during 3-27 months of aging.
- DPPH radical scavenging effect were higher in meju than steamed soybeans. DPPH radical scavenging effect was increased gradually during the fermentation and the beginning 3 months of aging, and maintained thereafter. $IC_{50}(\mu\text{g/mL})$ for DPPH radical scavenging effect was significantly negative correlated with total polyphenol content in samples, but not with total flavonoid content.
- Reducing power and ABTS+ radical scavenging effect were not changed by fermentation, but increased by aging. Reducing power was increased with longer aging in Hansik doengang, however, ABTS+ radical scavenging effect was highest in 6 month-aged doenjang.
- Dichloromethan(DM) or ethylacetate(EA) soluble fraction in sequentially solvent extracted various fractions from doenjang ethanol extract showed the strongest antioxidant effect with higher polyphenol and flavonoid content than the others.

2. Antiinflammatory effects of doenjang in RAW 264.7 cells treated with LPS and its mechanism of the action

- DM fraction from 12 month-aged Hansik doenjang(D12) reduced NO synthesis to 55.6% of control in LPS-treated RAW 264.7 macrophage cell, and EA fraction from 6 month-aged Hansik doenjang(D6) and D12 inhibited to 88.0% and 55.6% of control.
- PGE2 synthesis inhibition effect of DM or EA fraction was higher with longer aging. In DM fraction, only D12 inhibited IL-6 and TNF- α synthesis effectively, and D6 and D12 inhibited MCP-1 synthesis. In EA fraction, D12 only obviously inhibited IL-6 and MCP-1 synthesis.

- DM or EA fraction from D12 mildly reduced LPS-activated NF- κ B nuclear translocation, and DM fraction significantly reduced synthesis of iNOS and COX-2 protein, but EA fraction reduced only iNOS synthesis.
- Further study is needed to find the effective component in DM and/or EA fraction showing antioxidant and/or antiinflammatory activity of doenjang.

3. Evaluation of activities of antioxidation, anti-inflammation and anti-obesity in blood and liver of DIO mice

- For the in vivo animal studies, four different diets were synthesized and fed to 12 animals (C57BL/6, male) per each diet for 11 weeks; low-fat (10% kcal), high-fat (45% kcal), high-fat+doenjang (15% wt/wt), high-fat+steamed soy.
- Compared with low-fat, high-fat diet increased significantly the body weights and those were significantly lower in doenjang diet than high-fat.
- Due to high-fat diet, fats were accumulated in liver tissue and adipose tissue ($p < 0.05$) and fats accumulation significantly decreased in doenjang diet. Leptin levels in blood were significantly lower in doenjang than in high-fat and insulin resistance was observed in high-fat and alleviated in doenjang.
- AST and ALT as a biochemical parameter for liver inflammation and MCP-1 as a inflammation mediator increased in blood of high-fat. Doenjang caused the significant decrease in AST, ALT and MCP-1. However, TNF-alpha and CRP were not significantly different in different diets.
- The differences in antioxidant enzyme activities of liver tissue homogenates were not observed among the different diets. MDA levels in liver homogenates were not significantly different among groups. No changes in total antioxidant potential (FRAP) were observed in blood of animals.
- From the liver tissue slides stained with H&E, the fat accumulation was observed in all animals. Fat accumulation was highest in the liver of high-fat group and lowered in

doenjang. Similar results were confirmed in the TG contents measurement of liver. TG accumulation were highest in the liver of high-fat group and lowered in doenjang. Cholesterol contents were not changed with high-fat and doenjang diets.

4. Analysis of miRNA microarray in adipocytes of diet induced mice using ‘Omics’ technology and study in mode of action at molecular levels against antioxidation, antiinflammation and antiobesity

- Microarray analysis was used to compare global miRNA profiling among the dietary treatment groups in mouse epididymal adipose tissue. 272 miRNAs were identified through the data processing, and 33 miRNAs were significantly affected by the dietary treatment. 5 miRNAs (miR-378a-5p, miR-378c, miR-193b-3p, miR-107-3p, and miR-3069-3p) were significantly down-regulated in the high-fat diet group compared to the low-fat diet group (criteria: $p\text{-value} < 0.05$ & $\text{fold change} \geq \pm 1.5$), whereas 3 miRNAs (miR-146b-5p, miR-16-5p, and miR-155-5p) were significantly up-regulated in the high-fat diet group. The previous studies showed that the expression of miR-378 and miR-107 was decreased according to the adipogenesis, whereas that of miR-146 was increased. These results suggest that the present study model is suitable for inducing the fat accumulation and the fat differentiation.
- There was no difference in miRNA levels between the high-fat diet group and the high-fat+Doenjang (DJ) diet group. On the contrary, 5 miRNAs (miR-664-3p, miR-378c, miR-30c-2-3p, miR-150-5p, and miR-193a-3p) were significantly down-regulated in the high-fat+Steamed soy (SS) diet group compared to the high-fat+DJ diet group, whereas 1 miRNA (miR-211-3p) was up-regulated.
- In particular, we observed that levels of several novel miRNAs, which functions have not been identified in animal adipose tissues, were significantly different between the low-fat diet group and the high-fat diet group (miR-193b-3p, miR-3069-3p, miR-16-5p, and miR-155-5p), between the high-fat diet group and the high-fat+SS diet group (miR-362-5p), and between the high-fat+DJ diet group and the high-fat+SS diet group (miR-664-3p, miR-150-5p, and miR-211-3p).
- Epididymal adipose tissue weight in the high-fat+DJ diet group was significantly lower than that in the high-fat diet group and the high-fat+SS diet group. The number of adipocytes

per unit area significantly was decreased in the high-fat diet group compared to the low-fat diet group, whereas adipocyte size was significantly increased in the high-fat diet group.

- The mRNA expression of the oxidative stress marker (HO-1), macrophage markers (CD68 and CD11c), pro-inflammatory adipokines (TNF α and MCP-1), and a fibrosis indicator (TGF β) was significantly decreased in the low-fat diet group and the high-fat+DJ diet group compared to the high-fat diet group. However, the expression of adipogenesis-related genes was not difference among the dietary treatment groups. These results suggest that the high-fat intake exacerbates the oxidative stress, inflammation, and fibrosis action in adipose tissue, but DJ may contribute to suppress or alleviate these responses.

CONTENTS

SUMMARY (English) -----	9
Chapter 1. Outline of the research -----	17
Chapter 2. Domestic and international R&D status -----	21
Chapter 3. Research contents and results -----	26
Chapter 4. Accomplishment of purpose and contribution in related research field -----	103
Chapter 5. R&D products and the application plan of the results -----	104
Chapter 6. Technological information abroad collected during the R&D process -----	105
Chapter 7. References -----	107
ABSTRACT -----	117

목 차

제 출 문	2
국문 요약문	3
영문 요약문	9
영문 목차	15
국문 목차	16
제 1 장 연구개발과제의 개요	17
제 2 장 국내외 기술개발 현황	21
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	26
제 1 절 주관연구기관의 연구 내용 및 결과	26
제 2 절 제 1 협동 연구기관의 연구 내용 및 결과	39
제 3 절 제 2 협동 연구기관의 연구 내용 및 결과	69
제 4 절 결론 및 제언	99
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	103
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	104
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	105
제 7 장 참고문헌	107
연구개발보고서 초록	117

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 필요성 및 배경

1. 세계적인 비만 인구의 추세는 국가 문제로 대두됨.

- 세계보건기구(WHO)가 비만을 ‘세계에서 가장 빨리 확산되는 만성질환’으로 규정함과 함께 향후 10년 동안 50% 비만인구가 증가하여 15억 세계 비만 인구를 예측하고 있음. 국내 비만인구도 2010년 국민건강통계(보건복지부 질병관리본부, Figure 1)에 따르면 2010년 남자 36.3%, 여자 24.8%로 전체 30.8%가 비만으로 조사되었으며 이것은 3명 중 1명이 비만인 것을 나타내고 있으며, 우리나라의 경제적인 성장과 함께 생활패턴 및 문화가 서구화되면서 서구적인 식생활과 체형의 변화에 의한 것이라 할 수 있음. 비만은 국가 재정부담을 늘리고 생산성을 저하하는 요인으로 2011년 성인비만으로 인한 사회경제적 비용이 3조 4천억으로 추정되며 2005년 1조 8천억에 2배 증가를 기록하였음.
- 비만은 체내에 지방이 과다하게 축적된 상태로서 다른 질병의 원인이 됨. 당뇨병, 고혈압, 지방간, 고지혈증, 퇴행성관절염, 일부 암과 같은 질환 등 다양한 만성 퇴행성 질환들이 비만의 병증과 연결되어 있으며 비만에 의한 만성염증이 인슐린저항성을 유발시키며 인슐린 저항성으로 인해 당뇨, 고지질혈증, 지방간, 혈액응고저하 등이 야기되는 것으로 보고됨 (Boden, 2011).

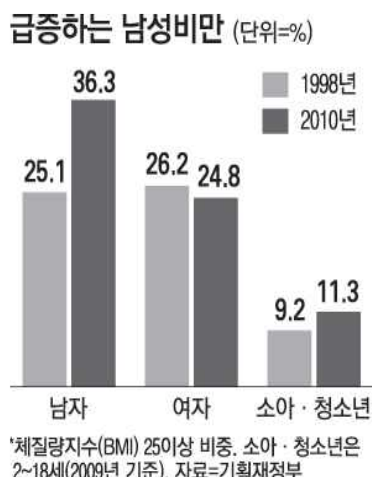


Figure 1. 2010년의 비만인구 증가

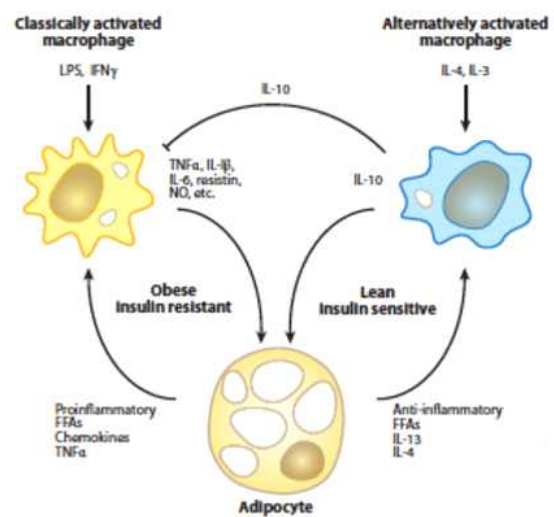


Figure 2. 지방세포의 지방축적과 염증지표의 분비

2. 비만에 의한 또 다른 질병 유발의 원인은 만성염증임

- 지방세포는 지방의 저장고 역할과 endocrine 기능을 가지고 있으며, 에너지 섭취와 소비의 불균형에 의해 초과에너지가 adipocyte에 축적되면 adipocyte의 크기와 수를 증가시킴. 이에 따라 adipocyte의 지방대사 불균형 (아디포넥틴의 감소 및 렙틴의 증가), FFA 과다 분비, 염증관련 cytokine 분비 (IL-1 β , IL-6, TNF α 등) 등이 야기되며 (Figure 2) 만성염증 및 인슐린 저항성이 생기게 됨. 동물실험에서 과도하게 체지방이 축적되면 지방세포는 저산소증, 산화적 스트레스, ER 스트레스 등이 증가하며, 염증을 매개하는 cytokine의 생성이 증가하고 대식세포의 유입이 증가하면서 대식세포들에 의한 NO, PGE2, CD68 등이 분비된다고 보고하고 있음. 백색 지방세포에서 시작된 만성염증은 비만증의 증가 또는 인슐린저항성의 지속적인 증가와 이에 따른 전신적인 염증의 증가로 이어짐 (Hotamisligil 2006, Maury 2010, Rosen 2006).

3. 첨단 생명과학 기술 “오믹스” 를 이용한 비만과 만성염증에 기전 연구가 활발히 진행됨.

- 첨단 생명과학 기술인, 다양한 “오믹스 (Omics)” 기술이 생체 대사 기전 및 식품성분의 기능성 기전 연구에 활용되고 있음. Transcriptomics 기술을 활용한 지방세포의 지방 축적, 염증반응, 섬유화의 관계가 연구 보고되고 있음. DIO 동물모델에서 CD 항원유전자에 의해 TLR 중개 염증 신호단계가 초기에 활성화되었고, pro-inflammatory 사이토카인과 케모카인의 발현이 증가되었으며 콜라겐과 ECM 구성요소가 축적되는 결과가 야기됨을 보고하면서 질병의 호전을 위해서 지방조직에 관련 유전자를 target으로 하는 치료접근을 제안되고 있음 (Kwon 2012, Stanton 2011).
- 최근 연구에 의하면, miRNA는 약 ~22개 뉴클레오티드로서 단백질을 암호화하지 않으며, multiple target에 작용하여 post-transcriptional하게 유전자의 발현조절에 참여함. 모든 식물, 동물, 인체에서 발견되며, 종간에 보존되고 성장, 분화, 발달 및 에너지 대사를 포함한 다양한 생리학적 반응에 관여하기 때문에 정상적인 세포기능을 위해 중요한 조절인자로 작용함 (van Rooij, 2011). 최근 10년간 miRNA는 만성 질환에 대한 새로운 잠재적인 biomarker로서 다양한 암과 당뇨병에서 활발한 연구가 진행되고 있음.
- 지방조직의 지방세포 생성, 인슐린 저항증 및 염증반응에서 miRNA의 역할이 중요한 것으로 보고되었음 (Figure 3. Hilton 등, 2013; McGregor & Choi, 2001; Hulsmans 등, 2011). 따라서 miRNA가 비만에 대한 잠재적 치료 효과의 가능성을 가지는 조절자로서 제시되고 있음 (Bengestrate 등, 2011; Chartoumpekis 등, 2012).

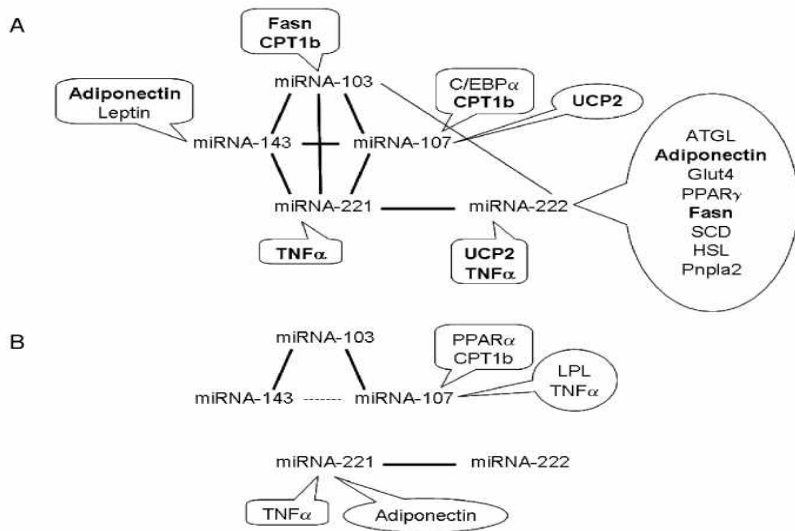


Figure 3. Schematic representation of the correlations between the expression of adipose miRNAs and of key markers of adipocyte metabolism. Correlations were found in mice fed a standard fat diet(A) and a high-fat diet(B). (Parra 등, 2010)

4. 한식 세계화를 위하여 전통 장류에 대한 심도 있는 기능성 연구를 통한 과학적인 자료의 축적과 홍보가 시급함

- 우리나라의 대표적인 대두발효식품인 고추장, 된장, 청국장의 기능성에 대한 연구가 최근 증가하고 있으며, 미생물억제, 돌연변이 억제, 섬유화억제, 혈압강하, 항산화 및 항당뇨, 항암효과 등이 보고 되었다. 또한, 식이로 유도된 비만동물모델(DIO 모델)에서 고추장, 청국장, 된장에 의한 체지방 감소 효과 및 혈액과 간조직에서 지질저하 효과가 있는 것으로 보고된 바 있으나 양적으로나 질적으로 부족할 뿐 아니라 대부분 국내 학술지에 발표되어 세계적으로 우리나라의 전통발효식품의 우수성을 널리 홍보하고 인정받기에는 턱없이 부족하다. 또한, 대두발효식품의 주요생리활성 성분의 하나인 이소플라본과 대두단백질에 의한 염증억제 및 기전연구가 일부 보고되었으나 된장의 항염증효과에 대한 연구는 거의 없다.
- 우리나라 전통식품이면서 slow food의 대표적인 된장의 제조방법을 재정비하여 표준화할 필요가 있으며, 그 제조과정을 1차 발효(메주 띄우기), 2차 발효(소금물에 넣어 발효), 그리고, 간장 분리 후 된장의 3차 발효 및 숙성과정으로 나누어 국제적으로 공인된 기법을 이용하여 다양한 생리활성의 변화를 체계적이고 종합적으로 연구하여 신뢰할만한 자료를 축적해야 할 필요가 있다.

제 2 절 연구개발의 목적

전통 장류인 된장의 항산화, 항비만, 항염증효과를 *in vitro* 및 *in vivo* 모델에서 입증하고자 하며, 특히 첨단기술인 “Omics” 기술을 활용하여 비만관련 염증을 억제하는 작용기전을 규명함으로써 한식세계화를 위한 경쟁력 있는 자료를 제공하고자 함

- 전통된장의 항산화·항염·항비만효과 및 그 작용기전을 식품학 및 분자생물학적 기술을 사용하여 *in vitro* 및 *in vivo*에서 입증함.
- 된장의 숙성기간에 따른 생리활성효과와 주요 기능성 물질의 함량 변화 탐색을 통한 발효 숙성과정이 된장의 항산화 및 항염증효과에 미치는 작용을 확인함으로써 전통발효식품의 우수성을 입증함.
- 한식의 세계화를 위해 된장의 생리기능에서의 우수성을 국제학술지에 게재하여 홍보함.
- 장류의 향상된 기능성 평가 기술 확보함으로써 국제 경쟁력을 강화함.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 전통 장류의 기능성 연구

- 대두는 phenolic acids, flavonoids, isoflavone, saponins, phytosterol 등의 다양한 phytochemicals을 함유하고 있다. 이들 중 phenol 화합물은 항산화효과와 관계가 깊고, genistein과 daidzein 같은 aglycone isoflavone은 골다공증, 암, 심혈관질환 등 만성질환을 예방하는 생리적 활성이 우수한 것으로 알려져 있다. 대두 saponins 중 triterpenoid aglycon(sapogenol A, B)은 암세포의 apoptosis를 유도하여 항암효과를 나타낸다고 알려졌다. 이 밖에 대두에 함유되어 있거나 발효과정에서 분해 생성된 protein과 peptides도 생리적 활성을 갖는데 예를 들면 Bowman-Birk inhibitor(BBI), Kunitz inhibitor, lunasin 등이 있다고 보고되었다 (Dia 등, 2008; Chai 등, 2012).
- 우리나라의 전통적 대두발효식품인 고추장, 된장, 청국장에 대한 국내 연구가 최근 크게 증가하고 있으며, 그 결과 미생물억제, 돌연변이 억제, 섬유화억제, 혈압강하, 항산화 및 항당뇨 기능성 등이 보고되었다. 또한, 고지방식으로 유도된 비만동물모델(DIO 모델)에서 고추장 (주, 2000; 이 등, 2003; 권 등, 2006; Koo 등, 2008), 청국장 (Kwon 등, 2006; Soh 등, 2008; Choi 등, 2011; Kim 등, 2013), 된장 (권 등, 2006; Kwak 등, 2012; Park 등, 2012)에 의한 체지방 감소 효과 및 혈액과 간조직에서 지질저하 효과가 있는 것으로 보고된 바 있다.
- 청국장은 발효기간이 짧고 발효균주가 다양하지 않아 품질관리가 가능하므로 많은 연구가 진행되어 분획 및 유효성분에 대한 분자생물학적 연구로 확대되어 활발한 연구결과가 보고되고 있으나, 전통된장은 발효 및 숙성, 각 단계마다 발효 균주 포함하여 환경조건을 조절하기 어렵고, 소금 등 첨가 재료들도 관리가 어려워서 연구가 쉽지 않은 실정이다.
- 최근까지 보고된 된장 관련 기능성 연구 내용은 다음과 같다. 2006년 권 등이 흰쥐에서 된장, 고추장, 청국장, 찜장의 효능을 비교하였고 된장 섭취에 따라 **체중이 감소**하였고 고지방 식이에 의한 간 지방(중성지방 및 콜레스테롤) 축적을 유의적으로 억제하는 효능이 있음을 보고하였다. 검정콩으로 만든 된장을 메탄올로 추출하고 용매 분획을 만들어 비장세포에 처리하였을 때, cytokine(IL-2, IL-6) 생성을 증가시켜 **암세포 성장을 억제**하는 것으로 보고하였고 마우스에 이식된 암의 전이가 억제됨을 관찰하여 보고하였다(임 등, 2009). 대두로 만든 된장과 흑미 또는 흑미겨 등으로 제조한 된장의 효능 비교 검증시험에서 된장으로 인한 **지방조직 및 간조직에서 지방합성 효소 활성의 감소**와 지방분해 효소활성의

감소를 보고하였다(Park 등, 2012).

- **항염효과**에 대한 보고에서 Choi 등(2011)은 된장과 청국장의 효능을 흰쥐의 신장에서 비교하였다. 지방식이 섭취에 의해 체중이 증가하였고 신장 균질액에서 RS(reactive species, 산화지표)가 증가하였고 염증지표인 nitrite 및 NF- κ B 가 증가하였는데 청국장 섭취로 인해 체중, RS 및 염증지표가 유의적으로 감소하였지만, 된장 섭취 동물에서는 염증지표가 유의적으로 감소하였고 체중 및 RS 는 감소하지 않았다.
- **면역증강효과**는 이 등(2011)에 의해 마우스의 대장과 직장에서 연구되었고 저지방 식이에 된장을 0.5~5% 첨가하여 섭취시켰을 때, nitric oxide 발현증가 및 PKC- α , stell cell factor 증가가 관찰되어, GI tract 의 mucosal immune reaction 을 증가시키는 효능을 보고하였다.
- **항당뇨 효과**는 Kwon 등(2006, 2007, 2010)에 의해 보고 되었는데, 청국장, 청국장의 aglycon-rich 분획 및 small peptide 가 인슐린 발현 시그널인 PPAR- γ factor 발현의 증가, GLUT4 translocation 촉진 및 insulin 분비 활성 효능을 가지고 있음을 보고하였다. 그러나, 된장의 직접적인 실험결과를 제시하지는 않았다.
- 된장의 유효성분(6,7,4-trihydroxyisoflavone)에 대한 기능성은 3T3-L1 세포주에 처리하였을 때, 지방축적이 억제되는 효능과 유효성분의 **항산화 효능**(DPPH scavenging, superoxide scavenging effects)이 Roh 등(2011)에 의해 보고되었다. Sung 등(2004)은 된장에서 isoflavone을 추출하여 aglycone 임을 확인하였고 **HMG-CoA reductase 억제 효과**를 보고하였다.
- 된장의 항산화 효과는 isoflavone 등의 유효물질에 대하여 DPPH, trolox equivalent 등의 항산화 효과가 보고 되었으나(Roh 등, 2011), 된장에 대한 유의적인 항산화효과가 보고되지는 않았다. 청국장의 항산화 효과는 in vivo (Kwak 등, 2007) 및 in vitro에서 보고되었고 분획 및 유효물질에서도 항산화효과가 확인되었다(Kim 등, 2008; Lee 등, 2013).
- 하지만, 장류 섭취에 따른 항비만 효과에 대한 작용기전 연구는 미진한 상황이며, 비만 발생에서 지방조직의 증가는 염증인자의 분비증가와 호르몬대사 변화 등 다양한 대사과정에 관여하므로 중요하게 다루어져야 함에도 불구하고, 대부분의 장류의 항염증 연구는 혈액과 간조직의 생화학 지표를 중심으로 분석되었고 지방조직에서 관찰하지 않았고 아직 비만 기능성에 대한 기전 연구 및 비만 관련 질병으로의 확산의 핵심에 있는 만성염증에 대한 영향을 연구한 보고는 미진한 상황이며 생리활성 성분에 대한 규명이 연구과제로 남아있다.

다만, 장류의 소재인 soy protein과 이의 생리활성물질 가운데 하나인 이소플라본의 작용기전에 관한 연구는 다양한 분석기법을 이용하여 비만동물모델에서 진행되었고, 오믹스 기술을 이용한 선행연구에는 soy protein (Frigolet 등, 2011)에 의한 지방조직에서의 global 유전자 발현변화와 isoflavone (Kim 등, 2011)에 의한 간조직에서의 global 유전자 발현 변화가 보고되었다.

- 본 연구진도 청국장과 된장의 항산화 또는 항비만효과 관련 연구 결과를 국제 논문에 발표한 바 있는데(Kwak 등, 2007; Kwak 등, 2012), 청국장은 3일간의 발효과정에서 aglycone과 malonylglycoside isoflavone 함량 및 총 폴리페놀 함량이 크게 증가하였고, DPPH 라디칼을 제거하는 항산화효과가 증가하였다. 또, 청국장 가루를 고지방 식이에 10% 정도 섞어 흰쥐에게 먹었을 때 간조직의 TBARS 함량이 감소하였고, 항산화효소의 하나인 superoxide dismutase (SOD) 활성이 증가함을 관찰하였다(Kwak 등, 2007). 또한, 전통식으로 제조한 한식된장 가루 또는 찐대두를 고지방 식이에 20% 정도 섞어 8주간 섭취시켰을 때 된장균과 찐대두균 모두 비슷한 수준으로 체중증가를 억제하는 효과를 보였으나, 내장지방의 축적, 동맥경화지수, 혈중 렙틴 농도는 된장균이 찐대두균 보다 더 효과적으로 감소되었음을 보고하였다(Kwak 등, 2012). 찐대두와 발효된장과의 기능성 차이는 발효에 의한 성분변화에 따른 것으로 예측하였다.
- 대두에는 β -glucosidase가 존재하지만 작용을 못하는 상태로 있는데, 메주를 만들기 위하여 대두를 찌게 되면 열에 의하여 대두의 β -glucosidase는 비활성화가 된다. 그러나, 발효 및 숙성과정에서 미생물이 분비하는 β -glucosidase에 의하여 배당체형태의 isoflavone에서 aglycone형태로 변화한다. 따라서, 발효과정 동안 총 isoflavone의 함량에는 큰 변화가 없지만 찐대두보다는 메주가, 메주보다는 숙성된 된장이 aglycone 형태의 isoflavone 비율이 크게 증가함을 볼 수 있다(Kim 등, 1999).
- 기존 연구 중에 숙성기간이 다른 전통식 된장(0, 1, 3, 5, 7, 10년)을 분석한 결과 숙성기간이 길어질수록 수분이 줄어들면서 조단백질의 비율이 조금씩 증가하였지만 총 아미노산의 함량은 오히려 감소하였고, 산도와 색도는 증가하였다는 보고가 있었다. 또한, glutamic acid에서 전환된 GABA함량은 숙성기간이 길어질수록 계속적으로 증가하였으며, 대두의 주된 isoflavone인 배당체 형태의 diadzin과 genistin의 함량은 감소하는 대신 비배당체인 daidzein과 genistein함량은 숙성기간에 따라 계속 증가하는 패턴을 보였다고 하였다(Jo 등, 2011).
- Nam 등(2011)은 전통식 된장의 제조법을 개량한 방법으로 찐대두에 *Asp oryzae*를 접종시킨 후 콩알 상태로 7일까지 발효시키면서 항산화효과와 isoflavone 함량과 구성의 변화를

실험한 결과 발효가 진행되는 동안 총 isoflavone 함량은 감소하였고, aglycone 함량은 점차 증가하여 4-5일 후에 가장 높았다가 감소하는 양상을 보였는데, FRAP과 ABTS방법으로 측정된 *in vitro* 항산화효과도 aglycone 함량의 변화패턴과 동일하였기 때문에 된장의 항산화효과는 aglycone 형태의 isoflavone의 증가 때문으로 생각된다고 하였다.

- 한편, 대두나 대두발효식품의 항염증효과에 대한 연구는 많지 않다. 대두의 8가지 생리활성 물질(genistein, daidzein, a mix of glucosides, saponin A, saponin B, sapogenol B, Bowman-Bik inhibitor(BBI), lunasin, pepsin-pancreatin glycin hydrosates)을 LPS 처리한 RAW 264.7 세포에 투여하여 NO, PGE2, iNOS 생성을 억제하는지 보았을 때 genistein, daidzein, mix of glucosides, sapogenol B, saponin B, BBI가 이들을 모두 감소시키는 효과가 있었는데 이 중 BBI와 sapogenol B의 효과가 가장 높았고, saponin A는 NO/iNOS 만 감소시켰다(Chai 등, 2012). Kang 등(2005)은 대두 saponin을 LPS-처리한 복강대식세포에 투여하였을 때 NO, TNF- α , PGE2, MCP-1의 생성을 유의하게 감소시켰다고 하였으며, Davis 등(2001)은 사람에게 대두 isoflavone을 복용시켰더니 lymphocyte에서 TNF- α 에 의한 NF- κ B의 활성화가 억제되었다고 하였다. RAW 264.7(Ji 등, 2012) 또는 J774 대식세포(Hamalainen 등, 2007)에 LPS 처리하여 염증반응을 유도하면 NF- κ B와 STAT-1이 활성화 되는데 genistein이나 daidzein 처리 시 이들 경로의 활성화가 감소됨으로써 iNOS 발현이 억제되고 결국 NO 생성이 억제되어 항염증효과를 나타낸다는 보고가 있었다.
- Hamalainen 등(2007)은 LPS를 처리한 J774 macrophage 세포에 genistein과 daidzein을 10 μ M 투여 시 NO 생성을 각각 11.3%, 11.6% 감소시켰으며 100 μ M에서는 각각 70.3%와 97.4% 감소시키는 농도 의존적으로 우수한 효과를 보였으나 glucoside인 genistin은 10 μ M과 100 μ M에서 각각 9.7%와 13.3%의 낮은 감소효과를 보였다고 하였다. 연구자들은 genistein과 daidzein은 iNOS의 중요한 전사인자인 NF- κ B와 STAT(significant transducer and activator of transcription)-1의 활성을 억제함으로써 iNOS 발현을 억제함으로써 NO생성을 억제한다고 하였다. Ji 등(2012)도 genistein이 LPS를 처리한 RAW 264.7 세포에서 TNF- α 와 IL-6의 mRNA합성을 감소시켰으며 NF- κ B가 핵으로 이동되는 것을 억제하였고, AMPK 인산화를 억제시키는 기전을 통하여 항염증효과를 나타낸다고 하였다. 반면, Nakaya 등(2005)은 genistein과 daidzein의 생리적 농도범위(10^{-8} ~ 10^{-6} M)에서는 estrogen receptor와 결합함으로써 iNOS를 활성화하여 NO 생성을 증가시킨다고 하였다.
- 최근, Jeong 등(2014)은 genistein이 LPS를 처리한 BV2 microglial 세포에서 NF- κ B의 핵으로의 이동을 억제함으로써 iNOS, COX-2의 합성을 억제시켜 NO, PGE2의 생성과 IL-1

β , TNF- α 생성을 감소시켰고, LPS로 인한 ROS도 감소시켜 항염증효과를 나타내었다고 하였다. 그 기전으로는 genistein이 toll-like receptor(TLR) 4에 대하여 LPS의 antagonist로 작용함으로써 LPS가 TLR4와 결합하는 것을 막아 NF- κ B를 활성화시키는 신호전달을 억제하기 때문이라고 밝혔다.

- 현재까지 단일 성분이 아닌 대두발효식품의 추출물을 이용한 항염증관련 연구는 거의 없는 실정이다. 국내 연구보고로 청국장 에탄올 추출물이 RAW 264.7 세포에서 iNOS나 COX-2의 합성과 이들 효소들의 최종생산물인 NO와 PGE2의 생성을 억제하지는 못하였으나 A23187을 처리한 RBL-1 세포에 투여하였을 때 leukotriene을 생성하는 5-lipoxygenase 효소의 활성을 효과적으로 억제시켰으며 흰쥐에게 5일간 섭취시켰을 때 IgE로 유도한 피부 알러지 반응 및 arachidonic acid로 유도한 귀의 부종을 효과적으로 억제시켰으므로 천식이나 아토피성 피부염과 같은 알러지 질환에 도움이 될 것이라 하였다(Choi 등, 2008). 일본의 연구보고로 간장에 함유되어 있는 다당류가 염증반응과 알러지반응과 관련이 있는 것으로 알려진 hyaluronidase 활성을 억제시켰고, RBL-2H3 세포에서 히스타민의 생성분비를 억제시켰으며, 흰쥐에게 먹였을 때 귀의 부종과 감각반응을 억제시켰으므로 항알러지효과가 있다고 한 것이 있었다(Kobayashi 등, 2004).
- 그러나, 된장추출물을 이용한 항알러지 또는 항염증효과에 대한 *in vitro* 연구보고는 전무하며, *in vivo* 항염증효과에 대한 연구는 흰쥐의 신장에서의 연구가 한 건(Choi 등 2011) 보고되었을 뿐이다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 주관기관 연구내용 및 결과

주관기관과 제 2 협동기관에서 *in vivo* 동물모델을 사용하여 된장섭취로 인한 항비만, 항산화, 항염증 효과를 검증하였고, 제 1 협동기관에서는 항산화효과와 항염증효과를 *in vitro* 및 세포 모델에서 연구하였다. 주관기관에서는 식이 유도 비만 동물모델을 셋업하고 동물부검 후 혈액과 간을 분석하였으며 제 2 협동기관에서는 Omics 실험기술을 사용하여 지방조직을 분석하였다. 아래의 연구내용, 방법 및 결과는 주관기관의 연구수행내용이다.

1. 연구수행 내용 및 방법

가. 실험식이 제조

비만유도 마우스에서 고지방식이에 의한 비만, 산화적 스트레스 및 염증이 된장에 의해 억제될 수 있는지를 평가하기 위하여 4가지 서로 다른 식이를 제조하였다. 정상식이(저지방식이 LF, 고지방식이 HF, 고지방식이+된장 DJ, 고지방식이+찐대두 SS)를 제조하였다.

(1) 전통된장과 찐대두 시료 확보, 전처리 및 기본성분 분석

- 순창군 장류 사업소를 통해 순창고추장 전통마을에 소재하고 있는 전통장류제조업체 중 규모와 품질을 인정할 수 있는 업체를 소개 받았고 2가지 된장을 구입하였다. 직접 순창고추장 전통마을에 있는 여러 업체를 방문하여 전통된장 제조 실태를 파악하였다. 순창전통 오순이 대덕식품 (www.osuni.co.kr)에서 15개월 숙성된장(2011년 국내산 콩을 재료로 함)과 원조 김점례할머니 고추장식품에서 6개월 숙성된장(2012월 국내산 콩을 재료로 함)을 구입하였다. 2013년 3,4월에 평년보다 기온이 낮아 장분리가 다소 늦어졌으며 6개월 숙성된장을 10월에 구입할 수 있었다.
- 전통된장과 찐대두를 동결건조하고 일반성분을 분석하였다. 한국식품연구원에서 수분, 단백질, 회분, 탄수화물 및 식염을 분석하였고 (주)옵티팜솔루션에서 지방 및 식이섬유소를 분석하였다. 분석방법은 대부분 식품공전의 방법을 사용하였다.
- 찐대두 : 순창군 장류 사업소에서 국내산 대두를 찌서 메주를 만드는 과정 속에서 얻어진 찐대두를 구입하였음(2012년 수확한 국산 콩을 원료로 함).

(2) 실험식이 조성

- 저지방식이, 고지방식이, 고지방 + 된장, 고지방 + 찐대두를 실험동물에게 급여하기 위하여

Table 1-1과 같이 4가지 식이에 대한 재료의 조성을 결정하였다.

- 된장 및 대두에 단백질, 지방, 탄수화물 및 섬유소에 성분량에 따라 각각의 성분이 동일량 함유되도록 casein, soybean oil, corn starch, cellulose 로 각각 조정함에 따라서 고지방 식이 3가지에 대하여 동일한 에너지를 함유하도록 하였다.
- **된장의 비율을 15%** 하였고, 된장과 찐대두의 단백질 함유량이 동일하도록 환산하여 찐대두량을 결정하였다.
- 각각 성분을 구입하여 2회 분량으로 나누어 사료를 조제하는 것으로 하였고 성분배합 후 펠렛으로 제조하여 1주 섭취분량씩 지퍼백에 나누어서 감마멸균 후 냉동 보관하였다.

Table 1-1. Experimental diet composition for mice

	Low-fat	High-fat	High-fat+DJ	High-fat+SS
Casein(g)	200	200.0	152.9	152.9
L-cystine(g)	3	3.0	3	3
Corn starch(g)	376.7	151.0	131.95	132.71
maltodextrin(g)	100	100.0	100	100
Sugar(sucrose)(g)	172.8	200.0	200	200
Lard(g)	0	188.5	188.5	188.5
Soybean oil(g)	50	50.0	22.7	26.75
Cholesterol(g)	0	10.0	10	10
Cellulose(g)	50	50.0	36.05	27.46
AIN 93 mineral mix(g)	35	35.0	35	35
AIN 93 vitamin mix(g)	10	10.0	10	10
Choline bitartrate(g)	2.5	2.5	2.5	2.5
DJ, 동결건조(g)			150	
SS, 동결건조(g)				118
Total weight(g)	1000	1000	1042	1006
Protein (kcal)	800	800.0	800.0	800.0
Carbohydrate (kcal)	2598	1804.0	1804.0	1804.0
Lipid (kcal)	450	2146.5	2146.5	2146.5
Energy (kcal)	3848	4750	4750	4750
Protein(%kcal)	20.8	16.8	16.8	16.8
CHO(%kcal)	67.5	38.0	38.0	38.0
Lipid(%kcal)	11.7	45.2	45.2	45.2
kcal/g	3.85	4.75	4.56	4.72

* DJ: Doenjang; SS: Steamed soy. Data are shown as the means \pm SEM, and the different superscripts are significantly different at $P < 0.05$.

나. 동물 실험

(1) 동물윤리위원회 실험계획서 승인

충북대학교 동물실험윤리위원회 실험계획을 승인받음(CBNUA-636-13-01).

(2) 시험계

- 종 및 계통 : 특정병원균 부재(SPF) C57BL/6 마우스
- 성별 및 구입 동물수 : 수컷 48 마리 4 주령
- 공급원 : (주)나라바이오텍(경기도 평택시 세교동 536-11)
- 입수일 : 2013년 11월 25일

(3) 사육 관리 조건 및 음수

- 실험 동물실 : 충북대학교 실험동물지원센터 동물실 사용함
- 사육관리 조건 :
 - 온도 및 습도 범위 : $21 \pm 2^\circ \text{C}$, 상대습도 30-70%(최적 50%)
 - 환기 : 10-15/hr(최소 6회 이상)
 - 조명 : 150-300lux(85cm: 200lux)
 - 명암주기 : 08:00 ~ 20:00 조명 (12시간 점등/12시간 소등)
 - 소음 : 40-50phon(실외에서는 50-60phon이하)
 - 사육상자 종류 및 크기 : polycarbonate 케이지(280W x 500L x 200H mm)

(4) 동물 적응 및 음수사료섭취

- 동물 적응 : 환경적응을 위하여 모든 마우스를 4일간 chow diet로 급이함. 그 후 합성사료 적응을 위하여 5일 동안 저지방 합성사료를 급이함
- 사료 : 자체 제조 합성사료를 사용하였고 chow diet 는 구입하여 사용함.
- 음수 : 상수도수를 필터 및 UV 멸균을 이용하여 여과한 정제수 공급함
- 급이기간 : 적응 후 균당 맞춤 사료를 11개월 급이함.

(5) 관찰항목 : 모든 동물에 대하여 주 1회 일반증상을 관찰하였고, 체중 및 식이섭취량을 측정함.

(6) 부검

- 계획부검 종물을 부검 전날 절식시키고 부검 당일 에테르로 흡입마취시킨 후 마취가 확인 되면 회복하여 후대정맥에서 혈액관련 검사를 위한 채혈을 실시하였고 복대동맥 및 후대정

맥을 절단하여 방혈 치사시켰다.

- 채혈한 혈액을 clot activator가 들어있는 vacutainer tube (Insepack, Sekisui, Japan 혹은 동등품)에 주입하고 30 분간 상온에 방치하여 응고시킨 후 10 분간 원심분리하여 얻은 혈청 분주하여 -70℃ 에 냉동보관하였다.
- 지방조직(협동기관), 간조직, 신장 및 비장을 적출하였고 무게를 측정하였으며 간, 신장, 비장의 일부를 절단하여 formaline 에 고정하였고 그 외 조직은 -70 ℃에 냉동보관하였다.

다. 혈액 및 간조직에서 비만·염증·항산화·지질대사 관련 생화학적 지표 평가

- (1) 혈액의 생화학적 분석 : 냉동 혈청을 사용하여 AST, ALT, glucose, cholesterol, HDL-cholesterol, TG, albumin을 자동분석기 (AU400 혈액생화학분석기. Olympus, Japan)를 활용하여 측정하였다.
- (2) 비만 지표 평가 : Leptin은 EMD Millipore mouse ELISA kit(Cat. #EZML-82K)를 사용하였고, insulin은 동일제조사 rat/mouse insulin ELISA Kit(Cat. #EZRMI-13K)을 사용하여 혈청에서 측정하였다.
- (3) 항산화 지표 평가 : 혈청에서 Total antioxidant potential을 FRAP(ferric reducing ability) 방법(Bwenzie IFF & Strain JJ, 1996)을 사용하여 trolox equivalent로 평가하였다. 간에서 항산화 지표 평가를 위하여 SOD, catalase, glutathione peroxidase 및 TBARS를 측정하였는데 각각을 간균질액의 분획에서 측정하였다. 10% 간 균질액을 Tris-HCl buffer(pH 7.4, EDTA 포함)으로 만들었고 600g에서 10분 원심분리하여 얻어진 상층액(S1 fraction)을 TBARS와 catalase 활성측정에 사용하였고, S1 fraction을 다시 10,000g에서 30분 원심분리한 상층액에서는 glutathione peroxidase를, 10,000g에서 1시간 원심분리한 상층액에서는 SOD를 측정하였다. SOD는 Dojindo kit (SOD assay kit-WST)을 사용하였고 glutathione peroxidase는 Cayman 의 assay kit (item no. 703102)를 사용하였으며 catalase는 H₂O₂의 환원력을 240 nm에서 평가하였다.
- (4) 염증 지표 평가 : 혈청에서 염증지표로 MCP-1(Cat. #MJE00), CRP(Cat. #MCRP00), TNF- α (Cat. #MTA00B)농도를 Mouse ELISA kit(R&D Systems, Inc)을 이용하여 측정하였다.

라. 조직 구성세포의 형태 및 병변 관찰

- (1) 간조직 병리 검사
 - 간조직 슬라이드 제작 : 10% 중성 완충 포르말린 용액에 고정된 조직을 파라핀에 포매하

고 얇게 박편을 떼서 슬라이드 위에 올려 Giemsa 용액으로 염색하였다. 현미경으로 간조직의 지방생성, 분포 및 병변 등을 관찰하였다.

- 간조직에서 지질 측정 : 고지방식으로 인한 간조직의 지방간 형성을 정량적으로 측정하기 위하여 간조직에서 Folch 방법(1957)을 사용하여 지질을 추출하였고 isopropanol과 0.1% NP-40 에 용해시켜 아산제약의 TG 및 콜레스테롤 측정시약을 사용하여 각각 측정하였다.

(2) 지방조직, 신장 및 비장 병리 검사

- 지방조직의 병리검사 및 분석은 제 2 협동과제에서 수행하였다.
- 신장 및 비장은 10% 중성 완충 포르말린 용액에 고정하고 슬라이드를 제작하였고 현미경으로 조직의 병변을 각각 관찰하였다.

마. 통계분석

각 실험군의 동물은 12마리로 하였고 실험결과 측정치는 평균±SD로 표시하였으며, 각 실험군 간에 평균값이 통계적으로 유의한 차이가 있는지를 Statistics Analysis Systems(SAS)통계 프로그램(ver 9.2)을 이용하여 ANOVA test 후 Tukey' s studentized range test 와 duncan' s multiple range test에 의하여 검증하였음.

2. 연구수행 결과

가. 전통 된장 제조과정 조사

(1) 전통 된장 제조과정 (Figure 1-1)

- 당해 11월 경 수확된 햇 대두를 찌서 메주를 만들어 걸어서 3개월 정도 숙성시킴
- 이듬해 구정을 지내고 2, 3월 정도에 소금물을 만들어 메주를 담금
- 40~60일 정도 지난 후 장을 분리하고 메주를 건져 된장을 담그고 숙성시킴

(2) 전통 된장 품질관리

- 제조규격 : 식품위생법에는 기준이 없고 전통식품기준법에 따라 제조하고 있음.
- 품질관리 항목 : 질소 성분에 따라 장을 분리를 함(기준은 0.7% 임). 그 외 미생물(바실러스 세리우스 등에 미생물을 측정함), 보존료, 맛 등을 측정함
- 고전적인 장분리 시기 결정 : 된장 맛을 좋게 하려면 장분리를 일찍하고 간장 맛을 좋게 하려면 장숙성기간을 연장한다고 함
- 염도: 메주를 담글 때의 소금물의 염도(22 ~ 29%)에 따라 최종된장의 염도가 결정됨. 소금의 질이 된장과 간장 맛에 영향을 주기 때문에 국산 천일염으로 3년 이상 간수를 뺀 것을

사용함.

- 품질관리사 : 순창고추장 전통마을 내 40개 정도의 업체 중 성가정, 정가본 등 3 ~ 4개 정도 업체만 품질관리사를 고용하고 있었고, 여러 업무를 함께 하는 직원이었음.

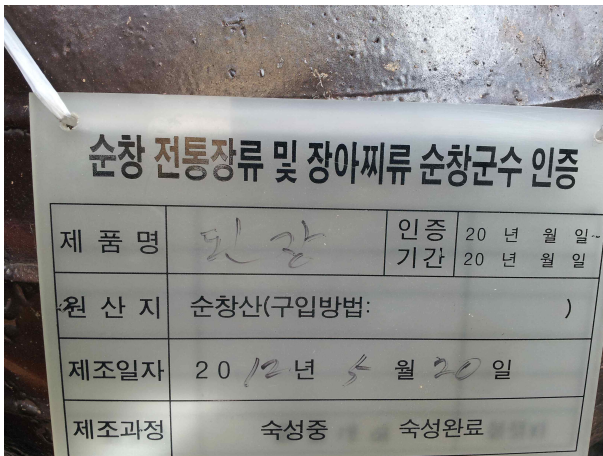


Figure 1-1. Pictures of master and crocks for Doenjang fermentation

(3) 원료 사용 및 전통된장 제조법의 변화

- 원료에 변화 : 국산콩 재배가 줄어들고 구입이 어려워 미생물을 접종시켜 발효한 한식메주를 구입하여 사용하거나 콩이 적게 들어가는 찐된장을 단체급식용으로 개발하고 있음
- 장을 담그는 용기의 변화: 장독을 순창군 연구소와 함께 개발한 것으로 사용함. 먼지 및 벌레 방지를 위해 플라스틱이면서 호흡이 가능한 독을 개발하였음.
- 숙성방법의 변화 : 여름 해가 좋을 때, 가을 해가 좋을 때에만 실외에서 숙성 후 실내에서 숙성 보관함.

나. 전통된장 및 찌대두의 성분 분석

식이 조성을 결정하기 위해 된장과 찌대두의 성분을 분석하기 위해 동결건조 파우더를 제조하였고 동결건조 파우더의 수율과 성분 분석결과를 **Table 1-2**에 제시하였다. 찌대두와 비교하였을 때, 된장에 수분이 더 적은 것으로 평가되었고, 건조된장에 지방, 단백질, 탄수화물 및 식이 섬유소의 함량 적은 것으로 보아 발효에 의해 유기고분자들이 일부 분해된 것으로 사료된다.

Table 1-2. Freeze-drying yield of steamed soybeans and doenjang and analyzed basic compositions of dried samples

	Doenjang	Steamed soybeans
Yield (%)	44.9~45.3	41.5~46.1
water (g/100g건조물)	2.8	0.5
lipid (g/100g건조물)	18.2	19.7
Protein (g/100g건조물)	31.4	39.9
Carbohydrate (g/100g건조물)	12.7	15.5
Dietary fiber (g/100g건조물)	9.3	19.1
Mineral (g/100g건조물)	25.6	5.3
Salts (g/100g건조물)	22.8	0.5

다. 체중 변화 및 조직 무게

- 각각의 식이를 급여 하는 동안 체중변화를 측정하였고 체중의 변화를 **Figure 1-2**에 제시하였다. 급여 시작 후 1주부터 군간 체중의 차이가 유의적으로 나타나기 시작하였다. 저지방 군과 비교하였을 때, 고지방 군과 찌대두 군의 체중이 급여 시작 1주 후부터 유의적으로 증가하였고, 된장 군은 6주 후부터 유의적으로 증가하기 시작하였다. 고지방 군과 비교했을 때, 된장 군은 2주 후부터 유의적으로 체중이 낮았고, 찌대두 군은 전 기간 동안 고지방 군과 차이를 보이지 않았다
- 급여 시작 시에는 군간 체중의 차이가 없었으나, 부검 시, 체중측정을 통해 고지방으로 비만이 잘 유도 되었고 된장에 의해 비만이 유의적으로 억제되었으며 찌대두는 체중에 유의적인 변화를 도출하지 않았다. 부검 시, 간에 무게는 고지방 섭취에 의해 늘어났고, 된장섭취로 인하여 억제 되었으며 찌대두는 고지방 군과 유사한 것으로 나타났다(**Table 1-3**). 콩팥과 비장의 무게변화에 있어서 현저한 차이가 관찰되지 않았고, 지방조직은 제 2협동에서 분석하였다.

- Kwak 등(2012)은 고지방 또는 고지방+된장섭취(20%)을 섭취시킨 흰쥐의 체중, 간 및 지방조직의 변화는 유의적으로 본 연구 결과와 유사한 경향을 보고하였다. Choi 등(2011)의 연구 결과, 고지방 식이와 비교하였을 때, 된장 섭취(5%)에 의한 흰쥐의 체중 변화가 관찰되지 않았고, 청국장 섭취에 의한 유의적인 감소가 관찰되었다. Park 등(2012)의 연구에서는 마우스에 10% 된장섭취로 인해 대두된장과 흑미겨된장 모두 유의적인 체중감소를 관찰하였고, 심장, 신장 조직 무게는 저지방식이와 비교하였을 때, 고지방 또는 된장섭취에 의한 변화가 유의적이지 않았고 고지방식이에 의해 지방조직이 유의적으로 증가하였으며, 된장섭취에 의해 지방조직의 유의적 감소가 관찰되지 않았다.
- 따라서, 고지방식이 및 된장섭취는 섭취량에 따라 체중 및 조직 무게에 영향을 주는 것으로 사료된다.



Figure 1-2. Body weight changes. data are averages for twelve mice per group. Significantly different compared with HF, determined by t-test: * $P < 0.05$

Table 1-3. Body and tissue weights of mice

	Low-fat	High-fat	High-fat + DJ	High-fat + SS
Initial body weight (g)	18.69±0.71 ^a	18.65±1.16 ^a	18.67±0.72 ^a	18.71±0.80 ^a
Final body weight (g)	29.25±2.42 ^a	37.98±3.54 ^b	31.79±2.53 ^c	38.76±2.50 ^b
Weight gain (g/day)	0.18±0.03 ^a	0.28±0.05 ^b	0.19±0.07 ^a	0.29±0.07 ^b
Liver weight (g)	1.03±0.11 ^a	2.05±0.74 ^b	1.56±0.20 ^c	2.07±0.37 ^b
Kidney weight: left (g)	0.21±0.03 ^a	0.21±0.02 ^a	0.20±0.01 ^a	0.21±0.02 ^a
Kidney weight: right (g)	0.20±0.03 ^a	0.18±0.02 ^a	0.19±0.01 ^a	0.21±0.03 ^a
Spleen weight (g)	0.05±0.02 ^a	0.06±0.01 ^a	0.06±0.01 ^a	0.06±0.03 ^a

* DJ: Doenjang; SS: Steamed soy. Data are shown as the means±SD, and the different superscripts are significantly different at $P < 0.05$.

라. Food intake and FER of animals

- 각각의 식이를 급여하는 동안 주 1회 식이섭취량을 측정하였고 그 결과를 Table 1-4에 제시하였다. 하루 식이섭취량(g)은 저지방 군이 가장 많았고, 에너지 섭취량으로 환산했을 때도 동일 경향으로 나타났다. 저지방 식이 섭취량이 유의적으로 높은 경향을 보였고 고지방, 된장, 찐대두 군은 칼로리 섭취에 유의적인 차이를 나타내지 않았다. FER 은 고지방 군과 대두 군이 가장 높았고 저지방 군이 가장 낮았다.
- 저지방식이와 비교하여 고지방식이 섭취량이 유의적으로 낮은 것은 지방이 많이 섞여 있는 사료의 경도와 고에너지로 인해 섭취량이 감소한 것으로 사료되며 대부분의 고지방식이 섭취 연구에서 일반적으로 관찰되는 것이다. 그러나 칼로리 섭취량으로 환산해 보면 군 간에 유의적인 차이가 관찰되지 않지만, 동일한 에너지 섭취에도 에너지 급원은 다른 것으로 관찰되었다. 저지방식은 탄수화물에서 에너지를 섭취하였고, 고지방식이군은 지방에서 에너지를 섭취하였다.

Table 1-4. Food intake and food efficiency ratio of mice

	Low-fat	High-fat	High-fat + DJ	High-fat + SS
Food intake (g/day)	4.04±0.75 ^a	2.58±0.34 ^b	2.47±0.10 ^b	2.73±0.80 ^b
Calorie intake (kcal/day)	15.54±2.28 ^a	12.03±1.57 ^a	11.52±0.44 ^a	13.69±1.16 ^a
FER (%)	2.61	7.49	5.31	7.34

* DJ: Doenjang; SS: Steamed soy; FER:body weight gain(g)/diet intake (g) x 100. Data are shown as the means±SD, and the different superscripts are significantly different at $P < 0.05$.

마. 혈액 생화학적 분석

- 부검시 채취하여 분리한 혈청에서 다음의 혈액 생화학적 분석을 수행하였다. 간에 염증 지표로 ALT와 AST를 분석하였고 비만의 간접지표로 Glucose 와 TG 및 콜레스테롤을 측정하였고 결과는 **Table 1-5**에 제시하였다. 고지방식이에 의해 ALT, AST 가 유의적으로 증가하였고 혈당과 콜레스테롤이 유의적으로 증가하였으며 중성지방과 알부민은 영향이 없는 것으로 나타났다. 고지방식이와 비교하여 된장은 AST와 ALT를 유의적으로 감소시켰고 혈당과 콜레스테롤을 감소시키는 경향이 관찰되었다. 된장식이는 중성지방도 유의적으로 감소시키는 효과를 나타냈다. 찌대두는 고지방식으로 인한 염증과 비만관련 지표들을 억제하는 효과가 없는 것으로 관찰되었다.
- 기존에 연구에서 Kwak 등(2012)은 혈액의 TG, TC, HDL-C, Glucose, AST, ALT의 농도가 고지방식이 또는 된장섭취(20%)에 의해 유의적인 변화가 없음을 보고하였다. Park 등(2012)의 연구에서는 혈액의 TG 농도가 고지방식에 의해 유의적으로 증가하였고, 된장섭취(10%)에 의해 증가가 억제되었으며, 콜레스테롤 농도 변화는 관찰되지 않았으나, atherogenic index((Tatal cholesterol-HDL-C)/HDL-C)는 고지방식에 의해 유의적으로 높아지고 된장섭취에 의해 증가가 억제되었다. 권 등(2006)의 연구에서는 고지방식이 섭취와 비교하였을 때, 10% 된장을 섭취시킨 흰쥐에서 혈액의 TG와 cholesterol 농도에서 유의적인 감소를 관찰하였다.

Table 1-5. Serum basic biochemical data of mice

	Low-fat	High-fat	High-fat+DJ	High-fat+SS
ALT (U/L)	70.1±9.4 ^a	129.5±51.9 ^b	86.8±18.6 ^a	100.5±14.4 ^{a,b}
AST (U/L)	23.6±9.0 ^a	105.5±82.3 ^b	46.8±13.9 ^a	88.1±35.7 ^b
Glucose (mg/dl)	145.3±35.7 ^a	194.5±39.1 ^b	162.2±13.0 ^{a,b}	184.0±23.0 ^b
T-cholesterol (mg/dl)	103.7±27.0 ^a	204.8±39.3 ^b	172.8±10.9 ^b	200.2±37.7 ^b
HDL-cholesterol (mg/dl)	81.9±22.6 ^a	156.8±24.4 ^b	133.8±7.7 ^b	150.6±24.4 ^b
TG (mg/dl)	77.7±13.5 ^a	69.5±10.2 ^a	59.6±7.2 ^b	64.9±7.9 ^b
Abumin (g/dl)	2.6±0.2 ^a	2.7±0.2 ^a	2.7±0.1 ^a	2.7±0.2 ^a

* DJ: Doenjang; SS: Steamed soy. Data are shown as the means±SD, and the different superscripts are significantly different at $P < 0.05$.

바. 혈액의 항비만, 항산화 및 항염 지표 분석

- 부검시 채취한 혈액에서 비만관련 지표로 leptin, insulin을 측정하였고, 항산화 지표로 trolox

equivalent, 항염증 효과를 검증하기 위하여 MCP-1, TNF-alpha, CRP를 ELISA kit을 사용하여 정량하였고 그 결과를 **Table 1-6**에 제시하였다. 고지방식이에 의하여 MCP-1 및 CRP 지표 수치가 유의적으로 증가하여 체중증가와 함께 체내 염증이 증가하는 것으로 평가되며, 된장과 찐대두가 염증 지표 증가를 유의적으로 억제하지 못하는 것으로 나타났다. Leptin은 고지방식이에 의한 증가가 된장에 의해 유의적으로 감소하였고 insulin도 고지방식이에 의한 증가를 된장이 감소시키는 경향을 보였다. 염증 지표인 TNF- α 와 항산화 지표인 FRAP에서 군간에 의미 있는 차이가 관찰되지 않았다.

- 된장에 항염증 효과를 in vivo에서 관찰한 논문은 한건으로 Choi 등(2011)이 흰쥐에 고지방 식이와 된장 또는 청국장을 5%씩 각각 섭취시켰을 때, 혈액에서 nitric oxide 가 감소하였고 신장 균질액에서 항산화지표인 RS 및 염증지표인 NF-kB 가 감소하였다. 혈액의 염증지표에 대한 연구는 한건도 발표되지 않았고 Kwak 등(2012)은 고지방식이에 의해 leptin 농도가 유의적으로 증가하였고, 된장에 의해 유의적인 감소를 관찰하였다.

Table 1-6. Adipokind levels and total antioxidant power in serum

	Low-fat	High-fat	High-fat + DJ	High-fat + SS
MCP-1 (pg/ml)	38.3±13.9 ^a	86.7±50.4 ^b	78.7±31.0 ^{a,b}	103.5±43.4 ^b
TNF-alpha (pg/ml)	2.0±1.3 ^a	3.1±1.9 ^a	3.2±1.8 ^a	8.2±9.1 ^b
CRP (ug/ml)	14.0±2.0 ^a	16.8±1.0 ^b	16.3±0.9 ^b	16.4±1.1 ^b
Leptin (ng/ml)	4.5±2.5 ^a	13.0±1.9 ^b	9.7±2.2 ^a	14.0±2.0 ^b
Insulin (ng/ml)	0.5±0.3 ^a	1.6±1.2 ^{bc}	1.0±0.5 ^{ab}	2.0±1.0 ^c
FRAP (uM)	18.9±1.9 ^a	19.4±3.1 ^a	18.9±3.3 ^a	22.6±4.8 ^a

* DJ: Doenjang; SS: Steamed soy. Data are shown as the means±SD, and the different superscripts are significantly different at $P < 0.05$.

사. 간 조직에서 항산화 지표 및 지질 분석

- 고지방식이 및 된장에 의한 간조직의 산화적 스트레스를 평가하기 위하여 항산화 지표들을 분석하였고 **Table 1-7**에 그 결과를 제시하였다. 고지방식이, 된장 및 찐대두에 의한 Catalase 활성에 변화가 관찰되지 않았고 GPx 의 활성은 고지방 식이에서 유의적으로 증가하였다. 지방 산화물 측정방법인 TBARS tests 에서도 군간에 차이가 관찰되지 않았다.

Table 1-7. Activities of antioxidant enzymes in liver

	Low-fat	High-fat	High-fat + DJ	High-fat + SS
Catalase (nmol/min/mgprotein)	184±100 ^a	182±70 ^a	175±60 ^a	172±79 ^a
GPx (nmol/min/mgprotein)	2090±259 ^a	2464±227 ^b	2509±172 ^b	2503±213 ^b
TBARS (nM)	0.71±0.13 ^a	0.64±0.10 ^a	0.73±0.12 ^a	0.70±0.13 ^a

* DJ: Doenjang; SS: Steamed soy. Data are shown as the means±SD, and the different superscripts are significantly different at $P < 0.05$.

아. 간조직의 지방 축적 및 병변 관찰

(1) 간조직의 지방 축적

- 간조직에서 지방의 축적정도를 평가하기 위하여 지질을 추출하였고 추출지질 내에 중성지방과 콜레스테롤 함량을 측정하여 **Table 1-8**에 제시하였다. 고지방식이에 의해 간에서 중성지방과 콜레스테롤이 증가하였고 된장에 의해서 중성지방 증가가 억제되었으나 콜레스테롤에서는 유의적인 변화가 없었다. 대두에 의해서도 고지방의 지방축적이 억제되지 않는 것으로 나타났다.
- 권 등(2006)의 실험에서는 고지방 식이 섭취와 비교했을 때, 된장섭취에 의해 간조직의 중성지방과 콜레스테롤이 유의적으로 감소하였고, Kwak 등(2012)도 된장섭취에 의해 간의 중성지방과 콜레스테롤이 감소하였는데 그것은 지방 합성 효소인, FAS 활성이 감소하였고 지방 산화효소인 CPT-1 활성이 증가한 것 때문으로 평가하고 설명하였다. Park 등(2012)은 마우스 간의 무게가 고지방 및 된장섭취에 의해 변화가 없었고 간에서의 중성지방과 콜레스테롤 함량에 대한 결과를 보고하지 않았으며 된장의 섭취가 간에서 지방합성 효소인 FAS 활성 감소를 보고하였다.

Table 1-8. Activities of antioxidant enzymes in liver

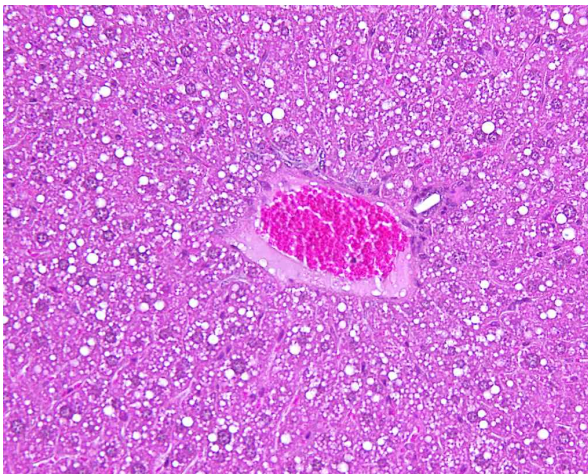
	Low-fat	High-fat	High-fat + DJ	High-fat + SS
TG (mg/g liver)	22.2±6.3 ^a	49.9±19.3 ^b	33.0±5.5 ^a	38.0±5.7 ^b
Cholesterol (mg/g liver)	2.9±0.8 ^a	14.0±3.2 ^b	13.8±2.3 ^b	16.3±3.2 ^b

* DJ: Doenjang; SS: Steamed soy. Data are shown as the means±SD, and the different superscripts are significantly different at $P < 0.05$.

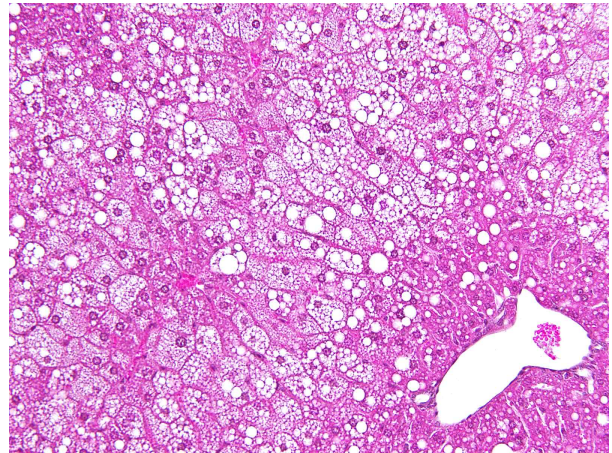
(2) 조직 병리 분석

○ 실험에 사용된 모든 마우스에 대하여 간, 신장, 비장에 조직을 고정하여 슬라이드제작하고 현미경으로 관찰하였다. 신장과 비장에서는 지방 축적 및 병변이 관찰되지 않아서 더 이상 분석하지 않았다. 간 조직에서는 대부분의 동물에서 지방의 축적이 관찰되었다. 저지방 식이에서도 간의 지방 축적이 관찰되었고 고지방식으로 인하여 지방드롭이 더 커지고 더 많이 축적되는 것을 관찰하였다. 된장식이에서도 지방축적이 관찰되었으나 고지방식이 또는 찌대 두 보다는 다소 적은 것으로 관찰되었다. 대표적인 조직 사진을 **Figure 1-3**에 제시하였다.

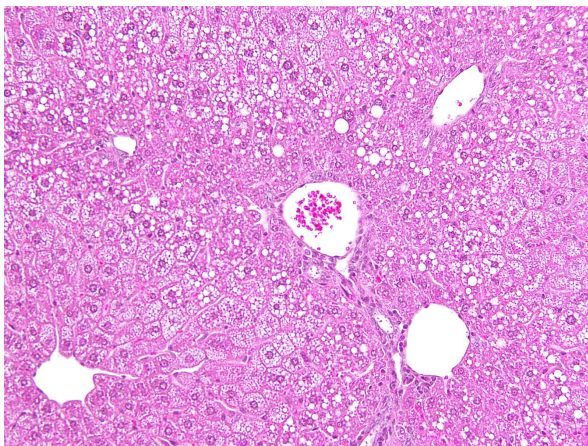
(A) Low fat (x200)



(B) High fat (x200)



(C) High fat + Deonjang (x200)



(D) High fat + Steamed soy (x200)

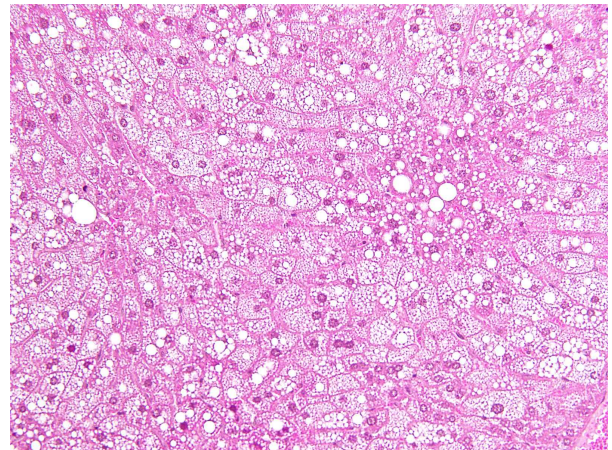


Figure 1-3. Morphology of hepatocytes from liver

제 2 절 제 1 협동과제 연구내용 및 결과

1. 연구내용 및 범위

- (1) 찐대두, 메주, 숙성기간을 달리한 된장들 (미생물접종 한식된장 0, 1, 3, 6, 8, 12개월; 전통식 된장 3, 6, 15, 27월)의 총폴리페놀, 플라보노이드함량 측정 비교
- (2) 대두에서 발효 숙성 과정을 거쳐 된장이 되어가는 과정에서의 β -glucosidase 활성 및 isoflavone 구성 변화 측정
- (3) 된장의 *in vitro* 항산화효과
 - ① 찐대두, 메주, 한식된장, 전통된장 에탄올추출물의 환원력(FRAP), DPPH 라디칼 소거능, ABTS+ 라디칼 생성 억제효과 측정
 - ② 한식된장 에탄올추출물로부터 순차적 용매분획추출을 하여 항산화효과가 가장 우수한 분획 탐색
- (4) 된장의 항염증 효과
 - ① LPS를 처리하여 염증반응을 활성화시킨 RAW 264.7 세포에 항산화효과가 가장 우수한 분획을 선택하여 대두, 한식0, 한식6, 한식12를 처리하여 염증반응 관련물질인 NO, IL-6, TNF- α , PGE2, MCP-1의 생성에 대한 영향을 측정하여 된장의 항염증효과 및 숙성기간에 따른 차이를 알아본다.
 - ② 된장의 항염증효과 기전 연구 : 염증성물질의 생성을 가장 효과적으로 억제하는 된장시료의 분획을 선택하여 LPS를 처리한 RAW 264.7 세포에 투여했을 때 iNOS, COX-2, p-p65 생성량에 영향을 주었는지와 NF- κ B p65의 핵으로의 이동(nuclear translocation)을 감소시켰는지를 확인하여 된장의 항염증 작용의 기전이 NF- κ B의 활성화를 억제하는 것인지 알아본다.

2. 연구방법

가. 시료의 확보

- (1) 한식 된장(미생물 접종된장)
 - 전북 순창군에 있는 농업회사 법인 순창장류에서 찐대두, 메주 및 0, 1, 3, 6, 8, 12개월 숙

성시킨 한식된장을 구입하였음.

- 제조법: 순창산 대두(품종: 대원)를 세척 후 12시간 이상 물에 침지한 후 증자기에 넣고 110℃ 이상에서 10분간 스팀으로 쪄서 식힌 다음 *Aspergillus Oryzae*와 *Bacillus licheniformis*를 대두무게의 0.01% 투입하고 섞어 준 다음 대두를 찢어 메주모양으로 성형함. 메주를 고온건조실(55-60℃)에서 24시간 동안 걸말림한 후 다시 발효실(28-30℃)에서 2-3 주간 발효시켜 국내산 천일염으로 만든 16% 염수에 메주를 2.25:1의 비율로 담그고 메주가 떠오르지 않도록 눌러 뚜껑을 닫은 후 발효실에서 30-40일 동안 발효시켜서 간장의 total nitrogen 함량이 1.0 이상인 것을 확인하고 메주와 간장을 분리하였음. 분리한 메주를 분쇄하여 숙성탱크에 넣고 잘 다진 후 3개월간 발효실(28-30℃)에 두었다가 이후 항온실(20-25℃)에서 계속 보관함

(2) 전통식 된장

- 순창군 민속마을 내에 있는 전통식 장류 판매업소에서 전통 가정식 방법으로 제조한 된장을 숙성기간별 (3, 6, 15, 27개월)로 구입하였음.
- 제조법: 전통적으로 가정에서 된장 담그는 방법을 이용. 11월 중순에 국산 대두를 하루 밤 침지하였다가 증자기에서 쪄 다음 식혀서 메주를 만든 다음 2일간 건조시켜서 길이 어느 정도 마르면 짚으로 묶어 통풍이 잘 되는 곳에 매달아 2개월 동안 자연발효 시킴. 곰팡이가 잘 뜨면 발효된 메주 표면을 물로 씻어서 항아리에 넣고 소금물을 부은 후 건고추와 숯을 5~6개씩 띄워서 햇볕이 잘 드는 곳에 두어 2개월 정도 2차 발효시킨 다음 액체(간장)와 고체(메주덩어리)를 분리함. 메주 덩어리를 잘 부수어 다른 항아리에 담고 뚜껑을 닫은 후 햇볕이 잘 드는 실외에 두고 숙성 보관함.

나. 시료의 전처리

- (1) 동결건조 : 일정량의 된장샘플을 측정하여 냉동하였다가 동결건조기에서 3일간 동결건조한 후 꺼내어 무게를 측정하여 건조수율을 계산하였고, 가정용 분쇄기로 분쇄하여 냉동보관하면서 실험에 이용하였음.

(2) 시료의 에탄올 추출

건조시료 30 g에 에탄올 300 mL을 부어 24시간 실온에서 stirring 하면서 추출한 후 2-3 시간 두었다가 상층액을 whatman paper(No.2)를 이용하여 여과함. 잔여물에 다시 에탄올 300 mL을 부어 24시간 추출 후 상층액을 여과하여 1차 여과액과 합쳐서 감압농축기를 이용하여 농축시킨 후 DMSO로 200 mg/mL 농도로 용해시켜 냉동보관하면서 실험에 이용하였음.

(3) 극성을 달리한 용매에 의한 순차적 분획추출

대두, 한식0, 한식6, 한식12 건조시료 100 g에 에탄올 1L를 부어 24시간 실온에서 stirring 하면서 추출한 후 상층액을 여과하고, 다시 잔여물에 1L 에탄올을 부어 24시간 추출하여 추출액을 모아 감압농축기로 농축시켰음. 에탄올 농축액을 300 mL 증류수로 용해시킨 후 분액깔때기에 옮기고, 300 mL 핵산을 부어 잘 흔든 다음 두 층이 분리될 때까지 세워 두었다가 상층액(핵산)을 분리하였음. 남은 하층액에 다시 300 mL 핵산을 부어 동일한 방법으로 2회 더 반복 실시하여(총 3회) 핵산층을 모았음. 이어 동일한 방법으로 분액깔때기에 차례로 디클로로메탄, 에틸아세테이트, n-부탄올을 각각 300 mL씩 부어 분획추출물을 얻었음(2회 반복). 최종적으로 획득한 핵산, 디클로로메탄, 에틸아세테이트, n-부탄올, 물 분획물을 감압농축기로 농축한 다음 동결건조기에서 건조시켜 얻은 각각의 농축 분획추출물을 DMSO 또는 DW에 녹여 실험에 이용하였음.

다. 총폴리페놀과 총플라보노이드 함량 분석

전대두와 메주, 숙성기간별 한식된장(0, 1, 3, 6, 8, 12개월)과 전통된장(3, 6, 15, 27개월)의 분말시료 1 g에 50 mL의 80% 에탄올을 가하고 18시간 동안 교반하여 추출한 다음 Whatman paper로 여과하여 폴리페놀과 플라보노이드 함량 측정에 사용하였음.

- (1) 총 폴리페놀 함량: Singleton 등의 방법(1999)에 따라 Folin-ciocalteau 용액을 이용하여 725 nm에서 흡광도를 측정하였음. 표준시약으로는 tannic acid (Sigma, USA)를 사용.
- (2) 총 플라보노이드 함량: AOAC에서 공인된 방법을 약간 수정한 Chae 등(2002)의 방법에 따라 측정하였음. 에탄올 추출액에 diethylene glycol 용액을 첨가하고, 다시 1N NaOH를 넣고 37°C water bath에서 1시간 동안 incubation한 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였음. 표준시약으로는 rutin (Sigma, USA)을 사용.

라. β -glucosidase 활성 측정 및 isoflavonoid 함량 측정

(1) β -glucosidase 활성 측정

Peralta 등의 방법(1997)을 이용하여 측정하였음. 동결건조한 시료 500 mg에 50 mM potassium phosphate buffer(pH 6.0) 10 mL 넣고 2시간 동안 흔들어 준 다음 4°C, 5000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액을 취한 다음 0.45 μ m syringe filter로 여과하여 여과액을 얻어 시료로 사용함. 기질인 2 mM p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside(pNPG) 용액과 시료를 섞은 후 50°C에서 10분간 반응시킨 다음 20% sodium carbonate 용액을 넣어 반응을 정지시키고 405 nm에서 흡광도를 측정하였음. 표준시약으로 p-nitrophenol(pNG)을 이용하여 농도와 흡광

도 간의 표준 방정식을 구하였음.

1 unit(U) of β -glucosidase = amount of enzyme

that 1 μ mol of the pNG from pNPG/min

(2) Isoflavone 분석

에탄올 추출물을 70% 에탄올에 녹여 10,000g에서 5분간 원심분리한 다음 상층액을 0.45 μ m membrane(PVDF syringe filter)으로 여과하여 ODS A303 컬럼이 장착된 reversed-phase HPLC를 이용하여 254 nm에서 흡광도를 측정하여 isoflavone 함량을 측정하였음. 0.1% acetic acid를 함유하는 acetonitrile용액과 0.1% acetic acid 용액을 사용하였고, flow rate는 1.0 mL/min. 표준물질로 genistein, daidzein, glycitein, genistin, daidzin, glycitin, malonylgenistin, malonyldaidzin, malonylglycitin, acetylgenistin, acetyldaidzin, acetylglycitin 등 12개를 이용하여 각 시료마다 각 성분의 함량을 계산하였음.

마. *in vitro* 항산화효과 측정

(1) 환원력: Ferric reducing antioxidant power(FRAP) 측정

Yildirim 등(2001)의 방법에 따라 철 이온을 Fe^{2+} 에서 Fe^{3+} 로 환원시키는 강도가 클수록 발색의 정도가 증가하는 원리를 이용하여 흡광도를 측정하였음. 각 시료를 0.2 M phosphate buffer (pH 6.6)로 희석하여 여러 농도로 준비한 다음 1% potassium ferricyanide를 섞고 50°C water bath 에서 30분간 두었다가 식혀서 10% trichloroacetic acid(TCA)을 첨가한 후 3000 rpm 에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액에 0.1% $FeCl_3$ 를 섞고 700 nm에서 흡광도를 측정하였음. 표준시약은 ascorbic acid를 사용하였고, 결과는 μ g ascorbic acid(AA) equivalent로 나타내었음.

(2) DPPH 라디칼 제거효과

Yasushi 등(1999)의 방법을 이용하여 측정함. 일정농도의 DPPH 용액 800 μ L에 시료 200 μ L를 농도별로 섞고 37°C water bath에 30 분간 두었다가 517 nm에서 흡광도를 측정하여 시료를 넣지 않은 대조군의 흡광도에 대한 흡광도의 감소율을 계산하였고, 농도와 감소율과의 관계식을 이용하여 감소율이 50%에 해당하는 시료농도(IC₅₀)를 계산하였음. 양성대조군 시약으로 ascorbate를 사용하였음.

(3) ABTS 라디칼 생성 억제 효과

Re 등(1999)의 방법에 따라 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS)용액과 potassium persulfate 용액을 섞어 최종농도가 각각 7 mM 과 2.46 mM이 되도록 한 후 실온의 어두운 곳에서 12시간 이상 두어 ABTS 라디칼이 생성되도록 하였음. ABTS+ 용액을 에탄올로 희석하여 734 nm에서 흡광도가 0.7 정도 나오도록 준비한 다음 ABTS 용액 1 mL에 시료를 농

도별로 50 μ L 섞어 실온의 어두운 곳에 30분간 두었다가 734 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군에 대한 흡광도의 감소율을 계산하였음. 표준시약으로 ascorbic acid 사용하였고, 결과는 μ g ascorbic acid(AA) equivalent로 나타내었음.

바. RAW 264.7 세포를 이용한 항염증 효과 측정

(1) 세포배양 및 시료준비

마우스 대식세포주인 RAW 264.7세포를 100 ϕ 세포배양접시에서 10% FBS(v/v), 100 units/mL penicillin과 100 μ g/mL streptomycin을 함유하는 DMEM 배지를 이용하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 세포배양기에서 계대배양하였음. 추출시료를 DMSO(100 mg/mL)에 용해시킨 다음 0.2 μ m syringe filter로 여과하고 멸균한 DMEM 배지로 희석하여 다양한 농도의 시료를 준비하였음.

(2) 추출시료의 세포독성 측정

Mosmann의 방법(1983)에 따라 96 well plate에 RAW 264.7 세포를 심고 10% FBS를 함유하는 DMEM 배양액으로 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 세포 배양기에서 24시간 배양 후 serum-free DMEM에 추출시료를 농도별로 처리하고 다시 24시간 배양한 다음 배양액을 제거하였음. 각 well에 MTT 시약 (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide, 5 mg/mL) 20 μ L와 배양액 180 μ L를 넣고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 4 시간 배양시킨 후 MTT 시약을 포함한 DMEM 배양액을 제거하고 DMSO 200 μ L 넣어 세포를 용해시키고 10분 후 ELISA reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도 측정하였음.

(3)염증반응 관련 물질들의 생성량 측정

10% FBS 함유 DMEM 배양액으로 키운 세포를 24 well plate에 심어 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 세포배양기에서 24 시간 배양 후 1% FBS를 함유하는 phenol-red free DMEM 배양액으로 갈아 주면서 DMSO에 녹인 추출시료를 세포독성이 나타내지 않는 농도 범위에서 처리하고, 2 시간 배양 후 LPS(1 μ g/mL)를 투여하여 염증반응을 활성화시켰음. 22시간 세포 배양기에서 배양한 후 배양액을 취하여 nitrite(NO), prostaglandin(PG) E₂, interleukin(IL)-6, tumor necrosis factor(TNF)- α , Monocyte chemotactic protein(MCP)-1 농도를 측정하였음.

(가) NO 생성량 측정

세포의 배양액에서 Green 등(1982)의 방법으로 NO 농도를 측정하였음. 배양액 100 μ L를 취하여 96 well plate에 넣고, Griess 용액(1% SULF in 5% HCl과 0.1% NEDD를 1:1로 혼합) 100 μ L를 넣은 다음 실온의 어두운 곳에서 20분간 두었다가 plate reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였음. 표준시약으로는 sodium nitrite를 사용하였음.

(나) TNF- α , PGE₂, IL-6, MCP-1의 농도 측정

세포의 배양액을 사용하여 enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kit(R&D system)를

이용하여 각각의 흡광도를 측정한 후 표준곡선에 적용하여 농도를 계산하였음.

사. 된장의 염증억제효과의 기전연구

(1) 세포배양 및 western blot용 시료 준비

6 well plate 또는 100 ϕ dish에 RAW 264.7 세포를 심고 세포배양기에서 24시간 배양한 다음 1% FBS를 함유하는 DMEM 배양액으로 갈아주면서 추출시료를 여러 농도로 처리하고 2시간 배양 후 LPS (1 μ g/mL)를 투여하여 염증반응을 활성화함. 세포배양기에서 22시간 더 배양한 후 배양액을 제거하고 PBS로 세척하고 protease inhibitor & phosphatase inhibitor (Roche)와 2 mM EDTA를 포함하는 lysis buffer(RIPA buffer, Sigma)를 가한 다음 세포를 살살 긁어모은 후 4 $^{\circ}$ C, 13,000 rpm에서 5 분간 원심분리하여 상층액을 취하여 Bradford 법(1976)으로 단백질 농도를 측정하였음. 상층액과 SDS를 섞어 5분간 끓는 물에 넣고 가열하였다가 냉동 보관하면서 western blot analysis에 사용하였음.

(2) nuclear/cytosol fractionation

LPS에 의한 염증반응 활성화 초기에 작동하여 염증관련 유전자 발현을 유도시키는 조절인자인 NF- κ B가 핵 안으로 이동하는 현상을 된장 추출시료가 억제시켰는지를 알아보기 위하여 시료와 LPS 처리한 세포를 30분간 배양 한 다음 배양액을 제거하고 세포를 수집하여 nuclear/cytosol fractionation kit(Biovision, USA)를 이용하여 핵과 세포질의 단백질을 분리 추출하였음.

(3) western blot analysis

10% SDS-polyacrylamide gel에 세포에서 추출한 단백질 시료를 40-60 μ g/well 접종하여 전기영동을 실시한 후 polyvinylidene difluoride(PVDF) membrane (Immobilon-P, Millipore)에 90분간 transfer 하고, membrane을 5% nonfat dry milk에 담가 실온에서 1시간 blocking 하였음. 1차 항체로 iNOS 항체 (cell signaling, 1:1000), COX-2 항체(cell signaling, 1:1000), NF- κ B p-p65 항체(cell signaling, 1:500), NF- κ B p65 항체(cell signaling, 1:500), β -actin 항체(cell signaling, 1:1000), Lamin B1 항체(cell signaling, 1:500)을 4 $^{\circ}$ C에서 overnight 시켜 결합시킨 다음 비결합항체를 제거하고, 2차 항체로 anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody(cell signaling, 1:1000)를 실온에서 1시간 동안 결합시켰음. membrane에 ECL용액(GE healthcare)을 뿌리고 Luminiscent Image Analyzer(Fujifilm)에 넣고 현상한 다음 Multigauge 프로그램을 이용하여 band의 면적을 정량하였음.

아. 통계분석

각 실험은 3회 이상 수행하여 그 결과는 평균 \pm SD로 표시하였으며, 각 실험군 간에 평균값

이 통계적으로 유의한 차이가 있는지를 Statistics Analysis Systems(SAS)통계 프로그램(ver 9.4)을 이용하여 ANOVA test 후 duncan' s multiple range test에 의하여 검증하였음.

3. 연구결과

가. 총 폴리페놀 및 플라보노이드함량

(1) 총 폴리페놀 함량

■ 한식된장: 총 폴리페놀 함량은 찌대두(3.07 ± 0.05 mg tannic acid(TA)/g dry wt)에 비하여 발효과정을 거친 메주(6.04 ± 0.09 mg TA/g dry wt)에서 2배 정도로 높아졌다($p < 0.001$). 한식된장의 경우 간장으로 일부 폴리페놀 함량이 빠져나갔을 것으로 추정됨에도 불구하고 바로 담근 된장(한식0)의 총 폴리페놀 함량이 메주보다 유의하게 높았고(7.05 mg TA/g dry wt), 3개월까지 크게 증가하여 최고수준(14.61 ± 0.19 mg TA/g dry wt)을 보였다가 6개월부터는 조금 감소하였고($p < 0.001$) 이후 12개월까지는 비슷하게 유지하고 있었다.

■ 전통된장: 전통된장의 총 폴리페놀 함량은 3, 6, 15, 27개월 숙성된 것 중 3개월 숙성 된장(11.24 mg TA/g dry wt)이 가장 낮았고 6개월(15.59 mg/g dry wt)에서 가장 높았으며 이후 아주 서서히 감소하여($p < 0.001$) 15개월에는 15.01 mg TA/g dry wt, 27개월에는 14.61 ± 0.08 mg TA/g dry wt였다.

■ 한식된장과 전통된장의 총 폴리페놀 함량을 비교하면 숙성초기인 3개월에서는 한식된장이 전통된장보다 높았지만 6개월 이후에는 전통된장이 다소 높은 것으로 나타났다($p < 0.001$).

(2) 총 플라보노이드 함량

■ 발효 및 숙성기간에 따른 총 플라보노이드 함량은 총 폴리페놀과 다른 패턴을 보였다.

■ 한식된장: 대두(1.00 ± 0.14 mg/g dry wt)에 비하여 메주(0.84 ± 0.10 mg/g dry wt)에서 총 플라보노이드 함량이 유의하게 감소하였으며($p < 0.001$), 간장을 빼고 바로 담근 한식된장(한식0)이 메주에 비하여 감소한 결과(0.66 mg/g dry wt)를 보여 그 차이만큼 간장으로 빠져나갔을 것으로 생각된다. 이후 숙성 1개월(0.64 ± 0.16 mg/g dry wt)까지는 변화가 없다가 이후 다시 증가하여 3개월부터 12개월까지는 비슷한 수준으로 유지하고 있었다(3개월; 0.77 ± 0.05 mg/g dry wt, 6개월; 0.91 ± 0.06 mg/g dry wt, 8개월; 0.86 ± 0.10 mg/g dry wt, 12개월; 0.90 ± 0.10 mg/g dry wt).

■ 전통된장: 15개월까지는 숙성기간이 증가할수록 총 플라보노이드 함량이 유의하게 증가하다가 그 이후에는 유지하는 결과를 보였다($p < 0.001$). 총 플라보노이드 함량은 3개월이 0.96 ± 0.05 mg/g dry wt, 6개월이 1.28 ± 0.06 mg/g dry wt, 15개월이 1.49 ± 0.03 mg/g dry wt, 27개월이 1.52 ± 0.05 mg/g dry wt이었다.

■ 한식된장과 전통된장의 총 플라보노이드 함량을 비교해 보면 숙성초기 3개월에서는 비슷한 수준이었으나 6개월 이후에는 전통된장이 더 높은 것으로 나타났다($p<0.001$).

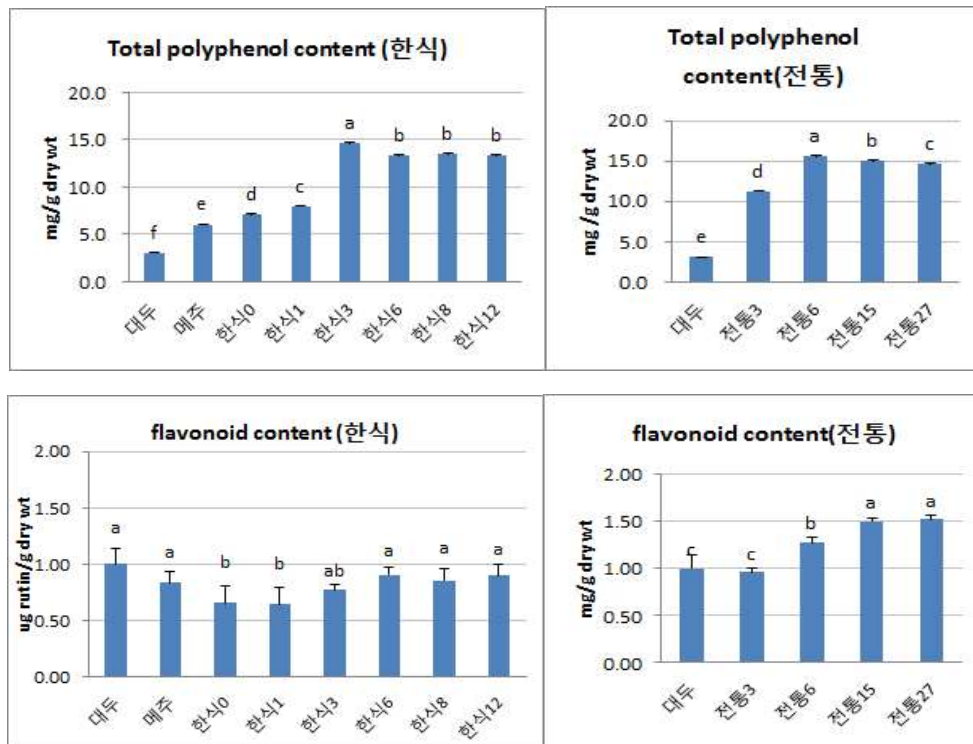


Figure 2-1. Total polyphenol and flavonoid content of dried samples

Means sharing the same alphabet in superscript are not significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

▶ Chai 등(2012)은 대두, 메주, 전통된장의 총 단백질 함량은 각각 5.49 mg BSA(BE) eq./g dry wt, 15.8 mg BE/g dry wt, 77.24 mg BE/g dry wt로 발효숙성과정에서 진행되면서 급격하게 증가하였으며, 총 폴리페놀 함량은 각각 1.97 mg gallic acid(GAE) eq./g dry wt, 4.15 mg GAE/g dry wt, 9.42 mg GAE/g dry wt으로 역시 점차 증가하였으며, 총 플라보노이드 함량은 각각 1.78 mg quercetin(QE) eq./g dry wt, 2.25 mg QE/g dry wt, 2.09 mg QE/g dry wt으로 대두에 비하여 메주와 된장의 총 플라보노이드 함량은 높았지만 메주와 된장 간의 차이는 없었다고 하였다. 그런데, 이 연구에서 사용한 전통된장의 숙성기간을 밝히지 않아 본 연구결과와 비교하기에는 한계가 있으나 폴리페놀의 함량이 발효과정과 숙성과정을 거치면서 증가하는 결과는 본 연구결과와 일치하였다.

나. β -glucosidase 활성

■ 찌대두는 가열과정에서 대두의 β -glucosidase 활성이 불활성되기 때문에 측정 결과 0.02 ± 0.02 U/g dry wt였으나, 발효과정에서 크게 증가하여 메주에서는 1.60 ± 0.12 U/g dry wt

로 유의하게 상승하였음($p < 0.001$). 그러나, 간장을 빼고 담근 한식된장의 숙성초기에는 찢대두와 비슷한 수준으로 다시 감소하였다(0개월; 0.07 ± 0.02 U/g dry wt, 1개월; 0.06 ± 0.02 U/g dry wt), 6개월까지 조금 증가하는 패턴을 보였고(3개월; 0.17 ± 0.02 U/g dry wt, 6개월; 0.09 ± 0.03 U/g dry wt), 이후 빠르게 상승하여 8개월에는 0.83 ± 0.05 U/g dry wt이 되었고, 12개월에는 3.80 ± 0.12 U/g dry wt으로 현저하게 높아졌음($p < 0.001$). 따라서, 메주 발효기간 동안 미생물의 작용에 의하여 β -glucosidase 활성이 크게 증가하였고, 간장을 빼고 담근 된장의 숙성초기에는 매우 낮게 유지하다가 8개월 이후 빠르게 그 활성이 다시 증가하기 시작하여 12개월에 매우 높게 상승하는 패턴을 보임으로써 8개월 이후 된장 내 미생물들의 profile에 어떤 변화가 있을 가능성이 있음.

■ 한편, 3, 6, 15, 27개월 숙성시킨 전통된장의 β -glucosidase 활성은 15개월(0.26 ± 0.04 U/g dry wt)에서 가장 높았고, 3개월(0.20 ± 0.02 U/g dry wt)과 27개월(0.21 ± 0.04 U/g dry wt)에서 서로 비슷한 수준이었으며 6개월에서 가장 낮았음(0.03 ± 0.02 U/g dry wt). 그러나, 전통된장은 3개월부터 27개월까지의 숙성기간 동안 β -glucosidase 활성은 크게 변하지 않는 것으로 판단됨.

▶ Lee 등(2010)은 채래식 12종(3개 업체, 1~6년 숙성)과 개량식 된장 4종에서 β -glucosidase 활성을 측정하여 보고하였는데 생대두와 찢대두의 β -glucosidase 활성은 각각 8.22와 0.71 U/g 이었고 된장시료는 0.61~ 3.53 U/g이라 하였다. 그러나, 채래식 된장의 경우 제조업체에 따라 활성의 차이가 컸고, 숙성기간에 따른 일관된 변화를 확인할 수 없었다고 하였다. 이와 비교하면 본 연구에서 전통식 된장의 β -glucosidase 활성은 0.03 ~ 0.26 U/g 으로 더 낮았다.

▶ Kim 등(1999)은 메주와 4개월 숙성한 전통된장의 β -glucosidase 활성을 측정한 결과 각각 2.04 U/mg protein, 0.69 U/mg protein으로 본 연구결과와 단위의 차이가 있어 직접적인 비교는 어려우나 메주보다 된장에서 낮은 것은 일치하였다. 또한, 메주와 된장의 β -glucosidase 활성은 pH 6.5~ 7.0에서 가장 높았으며, 40~60°C에서 비교적 높은 활성을 보였으나 50°C에서 가장 높은 활성을 보인다고 하였다. 따라서, 된장의 발효 및 숙성기간 동안 작용하는 미생물의 종류와 성장률, 온도 등이 β -glucosidase 활성에 영향을 미쳤을 것으로 생각된다.

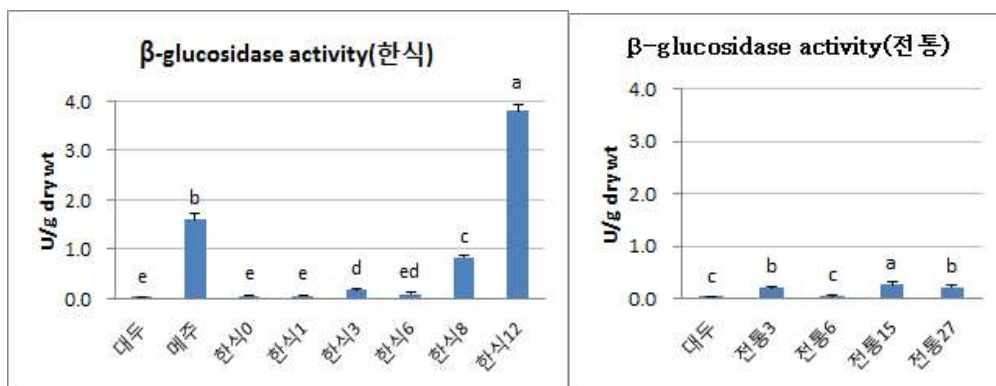


Figure 2-2 . β -glucosidase activity in samples

Means sharing the same alphabet in superscript are not significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

다. isoflavone content

■ 된장의 발효숙성과정에서 대두에 함유되어 있는 주된 3가지 isoflavone의 함량과 구조적 변화에 대하여 알아보하고자 각 분말시료별로 aglycone-isoflavone(genistein, daidzein, glycitein), glycoside (genistin, daidzin, glycitin), malonyl-glycoside (malonylgenistin, malonyldaidzin, malonylglycitin), acetyl-glycoside(acetylgenistin, acetyldaidzin, acetylglycitin)의 함량을 각각 분석한 결과 원료인 찢대두에 있는 이들 3가지 isoflavone의 총 함량은 3.01 mg/g dry wt 이었는데 glycoside가 대부분인 95.7%(2.88 mg/g dry wt)이었고, aglycone은 4.3%(0.13 mg/g dry wt)밖에 되지 않았으며, malonyl-glycoside(1.6 mg/g dry wt)가 glycoside의 대부분을 차지하고 있었음.

■ 메주의 총 isoflavone 함량은 1.46 mg/g dry wt으로 찢대두와 비교하면 50% 수준으로 감소하였음. 그 중 glycoside와 aglycone의 함량은 각각 1.14 mg/g, 0.32 mg/g dry wt으로 총 isoflavone함량에 대한 비율은 각각 78.1%, 21.9%였음. 즉, 찢대두에 비하여 메주의 glycoside isoflavone 함량과 비율은 감소하는 동시에 aglycone의 함량과 비율은 증가하였음. 이는 메주의 발효과정 동안 미생물에 의하여 분비된 β -glucosidase에 의하여 glycoside형의 isoflavone이 빠르게 분해되어 aglycone 형태로 전환되었을 것으로 추정되며 이는 본 연구에서 측정된 β -glucosidase 활성이 찢대두에서는 거의 0에 가깝다가 메주에서 매우 높아졌다는 결과와 일치함.

■ 0~12개월간 숙성시킨 한식된장의 총 isoflavone 함량은 숙성기간이 증가함에 따라 아주 조금씩 감소하는 경향을 보였음. 그 중 glycoside 함량과 그 비율은 숙성초기에 빠르게 감소하여 한식3에서 0.05 mg/g dry wt(4.4%)의 낮은 수준을 보인 반면 aglycone은 1.08 mg/g dry wt(95.6%)으로 메주, 한식0, 한식1에 비하여 그 함량과 비율이 높아졌고, 이후 12개월까지 비슷한 상태를 유지하고 있었음.

■ 전통된장 역시 한식된장과 동일한 패턴을 보였음. 총 isoflavone함량은 3개월 숙성된 한식된장(한식3)과 전통된장(전통3)이 각각 1.13 mg/g dry wt와 0.91 mg/g dry wt였고, 6개월 숙성된 한식된장(한식6)과 전통된장(전통6)은 각각 1.09 mg/g dry wt과 1.10 mg/g dry wt으로 차이가 없었음. glycoside와 aglycone의 비율은 한식3과 전통3이 4.4%:95.6%로 일치하고 있었으며, 한식6과 전통6은 각각 2.8%:97.2%, 3.6%:95.6%로 비슷한 수준이었음. 15개월과 27개월 숙성시킨 전통15와 전통27의 isoflavone의 총 함량은 각각 1.05 mg/g dry wt, 1.01 mg/g dry wt이었고, glycoside와 aglycone의 비율은 각각 2.9%:97.1%, 3.0%:97.0%로 숙성 3개월에서 27개월까지 비슷한 수준으로 유지되고 있었음.

▶ 본 연구결과 찢대두의 발효(메주) 및 된장의 숙성기간 동안 β -glucosidase활성의 변화와 총 isoflavone 함량 및 aglycone형의 비율 간에 어떤 상관성도 보이지 않았음. 메주 발효기간 동안 미생물이 합성한 β -glucosidase의 작용에 의하여 찢대두에 함유되어 있던 glycoside isoflavone

이 aglycone 형태로 전환되면서 최종적으로 메주의 aglycone isoflavone은 전체 isoflavone의 20% 정도로 증가하였음. 된장숙성기간 동안의 효소활성은 메주에서의 활성보다는 훨씬 낮았지만 지속적으로 작용이 일어나 3개월 이상 숙성된 한식된장에서는 aglycone의 비율이 전체 isoflavone함량의 95% 이상으로 나타내었는데 이는 전통된장에서도 마찬가지였음. β -glucosidase는 된장의 숙성기간 초기에는 매우 낮은 활성을 보이다가 8개월 이후 다시 상승하기 시작하여 12개월 후에는 메주보다도 훨씬 더 높아졌지만, 이때는 이미 작용대상 기질인 glycoside isoflavone이 거의 없는 상태이기 때문에 된장의 aglycone의 비율에 더 이상 영향을 미치지 않는 것으로 생각됨.

▶ 대두의 isoflavone은 항산화효과, 에스토로젠 활성, 골다공증예방효과, 항암효과 등 다양한 생리활성을 나타낸다(Izumi 등, 2000). 대두에 존재하는 isoflavone은 대부분 glucoside 형태이고 aglycone 형태는 극히 일부분이다. 그러나, 대두를 발효시켜 만든 간장, 된장, 청국장 등에는 대부분 aglycone 형태의 isoflavone이 존재한다고 알려져 있다.

▶ 대두에 함유된 isoflavone의 형태로는 unconjugated aglycone형의 genistein, daidzein, glycitein이 있고, conjugated glucoside 형의 genistin, daidzin, glycitin, 그리고 acetyl glucoside, malonyl-glucoside, methyl-유도체 등이 있다. 섭취한 isoflavone은 장내 미생물에 의하여 가수분해되고 탈메틸화되어 free aglycone과 demethyl product로 전환되거나 더 대사되어 흡수된다. 대두의 isoflavone 함량은 1.2~ 4.2 mg/g dry wt으로 알려져 있다(Lee 등, 2005).

▶ Izumi 등(2000)은 사람에게 glucoside isoflavone(genistin, daidzin)과 aglycone isoflavone(genistein, daidzein)을 각각 동일한 양 섭취시켰을 때 aglycone이 glucoside보다 더 빨리 더 높은 농도로 혈액에서 검출되어 aglycone형이 더 빠르고 효과적으로 흡수되었음을 알 수 있었다. 따라서, 실제로 대두보다는 대두발효식품인 된장을 섭취하였을 때 isoflavone으로 인한 생리활성효과를 더 많이 기대할 수 있다.

▶ 된장의 숙성기간에 따른 isoflavone함량변화에 대한 연구보고는 대부분 1년 단위로 장기간의 변화를 측정된 것이었다. Lee 등(2010)의 보고에 따르면 1~6년 숙성된 재래식 된장과 마트에서 구입한 개량식 된장의 총 isoflavone 함량을 비교한 결과 재래식 된장이 더 높은 경향이 있었고, 재래식 된장의 숙성기간에 따른 β -glucosidase 활성과 isoflavone함량과의 상관관계는 없었다고 하였다. 또 Jo 등(2011)도 0~10년 숙성된 전통된장의 isoflavone 함량변화를 측정한 결과 숙성기간이 증가할수록 aglycon isoflavone 함량은 지속적으로 증가한 반면 glucoside isoflavone은 1년까지 감소하였다가 이후에는 거의 변함이 없었다고 하였다.

Table 2-1. Three major isoflavone content and composition of isoflavone in samples

Isoflavone (mg/g dry wt)	전대두	메주	한식0	한식1	한식3	한식6	한식8	한식12	전통3	전통6	전통15	전통27
Daidzin	0.42	0.27	0.1	0.03	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Glycitin	0.2	0.11	0.06	0.03	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Genistin	0.52	0.36	0.2	0.07	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	1.14	0.74	0.36	0.13	0	0	0	0	0	0	0	0
malonyl-daidzin	0.53	0.1	0.02	0.01	ND	ND	0.06	ND	ND	ND	ND	ND
malonyl-glycitin	0.17	0.02	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
malonyl-genistin	0.9	0.22	ND	0.07	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	1.6	0.34	0.02	0.08	0	0	0.06	0	0	0	0	0
acetyl-daidzin	0.06	0.03	0.04	0.04	0.03	0.03	0.03	0.04	0.04	0.04	0.03	0.03
acetyl-glycitin	0.01	ND	0.04	ND	0.01	ND	0.01	0.01	ND	ND	ND	ND
acetyl-genistin	0.07	0.03	0.01	0.01	0.01	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	0.14	0.06	0.09	0.05	0.05	0.03	0.04	0.05	0.04	0.04	0.03	0.03
glucoside	2.88	1.14	0.47	0.26	0.05	0.03	0.10	0.05	0.04	0.04	0.03	0.03
Daidzein	0.05	0.13	0.31	0.34	0.37	0.37	0.33	0.27	0.35	0.39	0.37	0.37
Glycitein	0.02	0.07	0.15	0.17	0.2	0.2	0.17	0.11	0.13	0.16	0.15	0.14
Genistein	0.06	0.12	0.3	0.38	0.51	0.49	0.45	0.32	0.39	0.51	0.5	0.47
aglycone	0.13	0.32	0.76	0.89	1.08	1.06	0.95	0.70	0.87	1.06	1.02	0.98
Total isoflavone	3.01	1.46	1.23	1.15	1.13	1.09	1.05	0.75	0.91	1.10	1.05	1.01

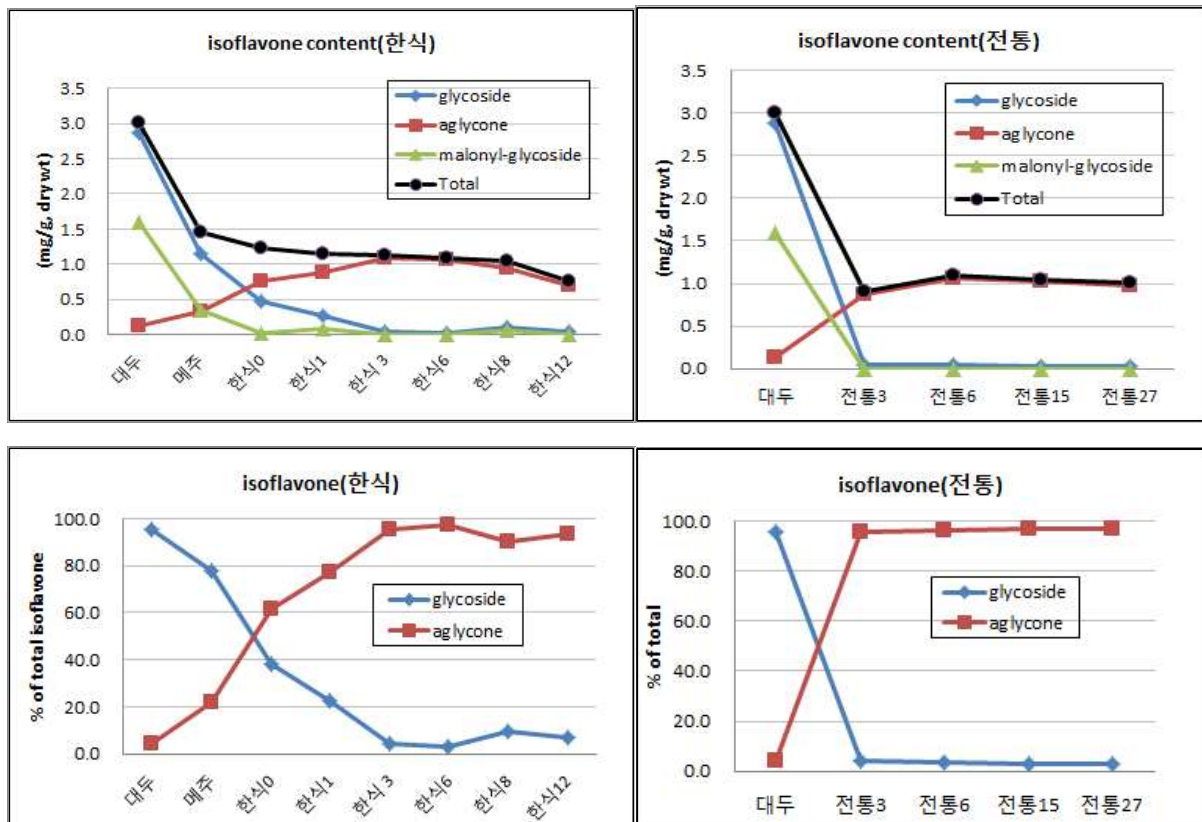


Figure 2-3. Distribution of glycoside and aglycone isoflavone in samples

라. 된장 에탄올 추출물의 *in vitro* 항산화효과

(1) DPPH 라디칼 소거효과 및 총 폴리페놀 함량

- DPPH 라디칼 소거효과를 측정한 결과 찢대두에 비하여 발효 및 숙성기간이 증가함에 따라 점차 그 효과가 증가하는 패턴을 보였음.
- DPPH 라디칼을 50% 제거하는 시료의 에탄올 농도를 나타내는 IC₅₀를 보면 찢대두(4262.4 µg/mL)에 비하여 메주(3248.9 µg/mL)에서 유의하게 감소하여 항산화효과가 상승하였음을 알 수 있었고(p<0.001), 담근 직후의 한식된장(한식0)과 1개월 숙성된 한식된장(한식1)의 IC₅₀는 각각 2207.8 µg/mL, 1339.4 µg/mL으로 계속 더 감소하였음. 그러나, 숙성1개월부터 12개월까지 한식된장의 IC₅₀는 비슷한 수준을 유지하고 있었음.
- 전통된장의 DPPH 라디칼 소거효과 역시 숙성 3개월부터 27개월까지는 차이가 없었음.
- 시료의 총 폴리페놀 함량 및 총 플라보노이드 함량과 DPPH 라디칼 소거 IC₅₀와 상관관계를 분석한 결과 총 폴리페놀 함량은 DPPH 라디칼 소거 IC₅₀와 유의한 음의 상관관계(r=-0.8725, p<0.001)를 보인 반면, 총 플라보노이드 함량과는 상관성이 없었음.

▶ Choi 등 (2012)은 대두, 메주, 된장, 막장, 간장, 청국장 등의 DPPH 라디칼 소거에 대한 IC₅₀는 대두>메주>된장>간장으로 된장과 간장이 대두, 메주에 비하여 항산화효과가 더 우수하였으며, IC₅₀와 총 폴리페놀함량, 총 플라보노이드 함량, 총 단백질 함량 사이에 모두 음의 상관관계를 나타냈다고 하였다. 그러나, 이들 연구에서 사용한 된장은 한 가지였으며 숙성기간이 얼마인지 설명되지 않았다.

Table 2-2. IC₅₀ for DPPH radical scavenging effect of samples

	IC ₅₀ (µg EtOH ext/mL)	IC ₅₀ (mg dry wt/mL)
ascorbic acid	2.9±0.3	
찢대두	4262.4±478.2 ^a	21.0±2.4
메주	3248.9±306.5 ^b	15.5±1.5
한식0	2207.8±258.9 ^c	9.3±1.1
한식1	1339.4±70.2 ^d	4.5±0.2
한식3	1264.2±118.2 ^d	6.0±0.6
한식6	1230.6±87.9 ^d	4.1±0.3
한식8	1152.9±13.9 ^d	4.3±0.1
한식12	1009.9±6.5 ^d	3.9±0.0

	IC50($\mu\text{g EtOH ext/mL}$)	IC50(mg dry wt/mL)
전대두	4262.4 \pm 478.2 ^a	21.0 \pm 2.4
전통3	970.0 \pm 32.0 ^b	3.7 \pm 0.1
전통6	1221.5 \pm 35.8 ^b	4.3 \pm 0.1
전통15	939.2 \pm 52.2 ^b	3.3 \pm 0.2
전통27	1371.5 \pm 159.5 ^b	4.9 \pm 0.6

Means sharing the same alphabet in superscript are not significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

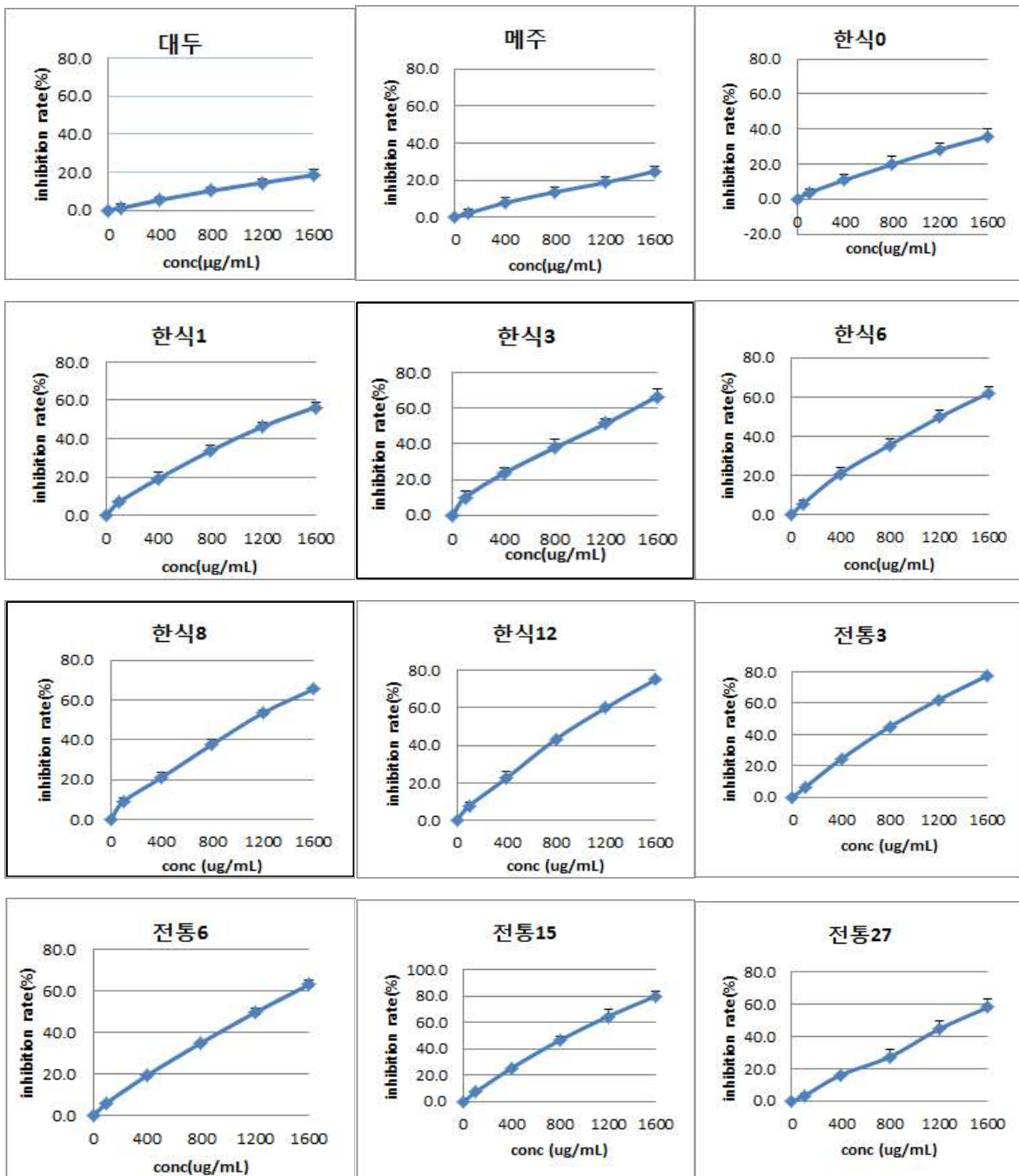


Figure 2-4. DPPH radical scavenging effect at various concentration of samples

(2) 환원력

- 본 연구에서는 각 시료의 에탄올 추출물이 Fe⁺⁺⁺을 Fe⁺⁺로 환원시키는 정도를 실험한 결과 500, 1000, 2000 μg/mL 농도 모두에서 비슷한 패턴을 보였음. 찌대두와 메주의 효과는 서로 차이가 없이 비슷하게 낮았고, 한식된장이나 전통된장 모두 메주보다 유의하게 그 효과가 높았음(p<0.001).
- 1000 μg/mL 농도에서 시료의 환원력을 비교하면 한식된장은 대두=메주<한식0<한식1=한식3=한식6<한식8<한식12(p<0.001)이었고, 전통된장은 대두<전통27<전통3=전통6=전통15(p<0.001)으로 메주발효과정에서보다는 숙성과정에서 증가하는 것으로 보이나 전통된장의 결과를 보면 27개월에서 감소하는 패턴을 보여 숙성 2년 이후에는 항산화효과가 감소할 가능성이 있음.

Table 2-3. Reducing power of ethanol extract of samples (μg ascorbic acid eq./mL)

	500 μg/mL	1000 μg/mL	2000 μg/mL
찌대두	0.8±1.2 ^e	3.1±1.6 ^e	8.5±1.6 ^f
메주	1.5±1.6 ^e	4.8±1.2 ^e	10.2±0.9 ^f
한식0	5.0±0.6 ^d	9.4±1.0 ^d	19.9±1.2 ^e
한식1	8.3±1.0 ^c	15.8±1.6 ^c	32.1±2.1 ^d
한식3	9.1±0.4 ^c	18.1±0.6 ^c	37.4±1.4 ^c
한식6	8.7±1.1 ^c	16.9±1.7 ^c	35.4±2.7 ^{cd}
한식8	11.0±1.1 ^b	21.8±1.6 ^b	44.1±2.7 ^b
한식12	13.1±1.5 ^a	26.5±2.2 ^a	53.5±4.3 ^a

	500 μg/mL	1000 μg/mL	2000 μg/mL
찌대두	0.8±1.2 ^c	3.1±1.6 ^c	8.5±1.6 ^c
전통3	13.2±1.3 ^a	26.1±2.4 ^a	53.5±4.2 ^a
전통6	13.4±1.6 ^a	26.4±2.8 ^a	51.2±4.5 ^{ab}
전통15	12.3±1.6 ^a	23.8±3.0 ^a	45.8±4.5 ^b
전통27	9.4±1.2 ^b	18.8±1.5 ^b	37.1±2.1 ^c

Means sharing the same alphabet in superscript are not significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

(3) ABTS+ 라디칼 소거효과

- 각 시료의 에탄올 추출물의 ABTS+ 라디칼 소거능은 500, 1000, 2000 μg/mL 농도 모두에서 비슷한 패턴을 보였음. 한식된장은 숙성 6개월까지 빠르게 그 효과가 증가하였다가 이후 감소하는 패턴을 보였으나, 전통된장은 숙성 15개월에서 가장 높은 효과를 보였다가 이후 감소하였음.
- 1000 μg/mL 농도에서의 효과를 비교해 보면 한식된장은 대두=메주<한식0=한식8=한식12<한식1=한식3<한식6(p<0.001)으로 발효기간보다는 숙성기간에 증가하였는데 6개월 숙성 시 가장 효과가 우수하였음. 전통된장의 효과는 전통3=전통6=전통27<전통15로 15개월 숙성 시 가장 우수

하였음(p<0.001). 따라서, ABTS+ 소거효과는 메주발효과정에서보다는 숙성과정에서 증가하였음.

▶ ABTS는 비교적 안정한 free radical로서 DPPH와 함께 항산화활성 측정에 널리 사용되고 있는데 이 방법은 lipophilic 또는 hypophilic 물질도 측정 가능하다. ABTS는 양이온 라디칼을, DPPH는 음이온 라디칼을 생성하는 차이가 있다. 따라서, 이 두 가지 방법은 기질과 반응물질의 결합정도가 서로 달라 측정결과가 상이할 수도 있다고 알려져 있다(Lee 등, 2012). 본 연구에서도 한식된장의 DPPH 라디칼 소거능은 숙성 1개월 이후 12개월까지 비슷하였지만, ABTS 라디칼 소거능은 숙성 6개월까지 계속 증가하다가 8개월 이후 감소하는 것으로 나타났다.

Table 2-4. ABTS+ radical scavenging effect of ethanol extract of samples($\mu\text{g AA eq./mL}$)

	500 $\mu\text{g/mL}$	1000 $\mu\text{g/mL}$	2000 $\mu\text{g/mL}$
대두	1.1 \pm 0.4 ^d	5.4 \pm 1.1 ^d	12.1 \pm 1.2 ^e
메주	5.1 \pm 0.8 ^d	10.2 \pm 0.9 ^d	19.6 \pm 1.5 ^d
한식0	10.8 \pm 2.3 ^c	20. \pm 5.1 ^c	37.1 \pm 5.2 ^{bc}
한식1	15.6 \pm 3.2 ^b	29.6 \pm 4.3 ^b	43.4 \pm 5.0 ^{ab}
한식3	15.2 \pm 4.6 ^b	27.9 \pm 4.5 ^b	41.9 \pm 4.6 ^{ab}
한식6	21.7 \pm 3.5 ^a	34.8 \pm 5.8 ^a	46.8 \pm 5.6 ^a
한식8	10.6 \pm 1.8 ^c	19.8 \pm 3.3 ^c	33.0 \pm 4.1 ^c
한식12	11.0 \pm 2.8 ^c	19.0 \pm 3.5 ^c	33.0 \pm 5.2 ^c

	500 $\mu\text{g/mL}$	1000 $\mu\text{g/mL}$	2000 $\mu\text{g/mL}$
대두	1.1 \pm 0.4 ^c	5.4 \pm 1.1 ^c	12.1 \pm 1.2 ^c
전통3	14.8 \pm 4.4 ^b	28.8 \pm 3.0 ^b	44.2 \pm 6.1 ^{ab}
전통6	13.3 \pm 2.6 ^b	24.5 \pm 2.7 ^b	36.3 \pm 5.5 ^b
전통15	20.7 \pm 6.0 ^a	35.6 \pm 6.8 ^a	50.1 \pm 8.2 ^a
전통27	14.2 \pm 1.3 ^b	25.4 \pm 4.1 ^b	39.9 \pm 5.2 ^b

Means sharing the same alphabet in superscript are not significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

▶ 이상 3가지 방법의 항산화효과 실험 결과를 비교해 보면 DPPH 라디칼 소거능은 전대두로부터 메주발효기간 및 한식된장 숙성 초기 1개월까지 빠르게 증가하다가 이후 12개월까지는 별 변화 없이 유지한 반면, 환원력은 메주발효기간에는 차이가 없다가 숙성기간 12개월까지 지속적으로 상승하였고, ABTS+ 라디칼 소거능은 역시 메주발효기간에는 차이가 없다가 숙성기간 6개월까지 증가하였고 이후 감소하는 패턴을 보였다.

▶ Kwon과 Shon(2004) 등은 1, 2, 3년 숙성된 전통된장의 메탄올 추출물을 이용하여 지질과산화억제효과를 측정한 결과 숙성기간이 길어질수록 항산화력이 감소하였다고 하였다. 본 연구에서도 27개월 숙성된 전통된장이 3, 6, 15개월 숙성된장에 비하여 환원력과 ABTS라디칼 억제효과가 낮은 결과를 보였으나 샘플이 1개라는 한계점이 있다.

▶ 메주나 된장의 항산화효과는 발효숙성과정 중에 증가된 페놀화합물이나 갈변반응 과정에서 생성된 물질들 때문으로 알려져 있으며, Jeong 등(2010)은 메주나 된장발효에 관여하는 우세균

중의 하나인 유산균을 분리하여 DPPH 라디칼 소거능을 측정한 결과 매우 우수한 효과를 보였다고 보고하였다.

▶ 항산화효과와 밀접한 상관성을 보인 총 폴리페놀 함량은 찌대두보다 메주에서 더 높았고 이후 된장숙성기간동안 계속 증가하여 3~6개월이 되면 최고점에 이르러 유지하고 있었는데, 전통된장의 경우 27개월에서 감소하였다. 항산화효과도 이와 비슷한 패턴을 보였으나 한식된장은 12개월, 전통된장은 15개월 숙성 시 가장 우수하였고, 전통된장은 27개월에서 감소하였기 때문에 된장은 최소 6개월 이상 숙성시키고 2년 이내에 섭취하는 것이 항산화효과 면에서는 바람직할 것으로 생각된다.

마. 된장 에탄올 추출물의 NO 생성에 미치는 영향

(1) Cell viability

■ RAW 264.7 세포에 대두, 메주, 한식된장0, 한식된장6, 한식된장12, 전통된장6의 에탄올 추출시료 0, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리하고 24시간 후에 MTT 방법으로 cell viability를 측정한 결과 모든 시료와 농도에서 90% 이상을 나타내어 세포독성은 없는 것으로 나타남. 한편, 메주와 한식0 에탄올 추출물의 경우 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이하의 농도에서 세포생장이 대조군에 비하여 157.7~ 192.5 %로 크게 증가하는 문제점이 있었음.

(2) NO 생성

■ RAW 264.7 세포에 에탄올 추출시료를 0, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 투여하고 2 시간 후 LPS(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 처리하고 다시 22시간 배양한 다음 배양액에서 NO 농도를 측정하여 대조군에 대한 비율을 계산한 결과 모든 시료에서 NO 생성을 감소시키는 비율이 낮았으며 농도 의존적인 경향을 보이지도 않아 본 연구에서 사용한 된장시료의 에탄올 추출물은 NO 생성을 감소시키는 효과가 없는 것으로 나타남.

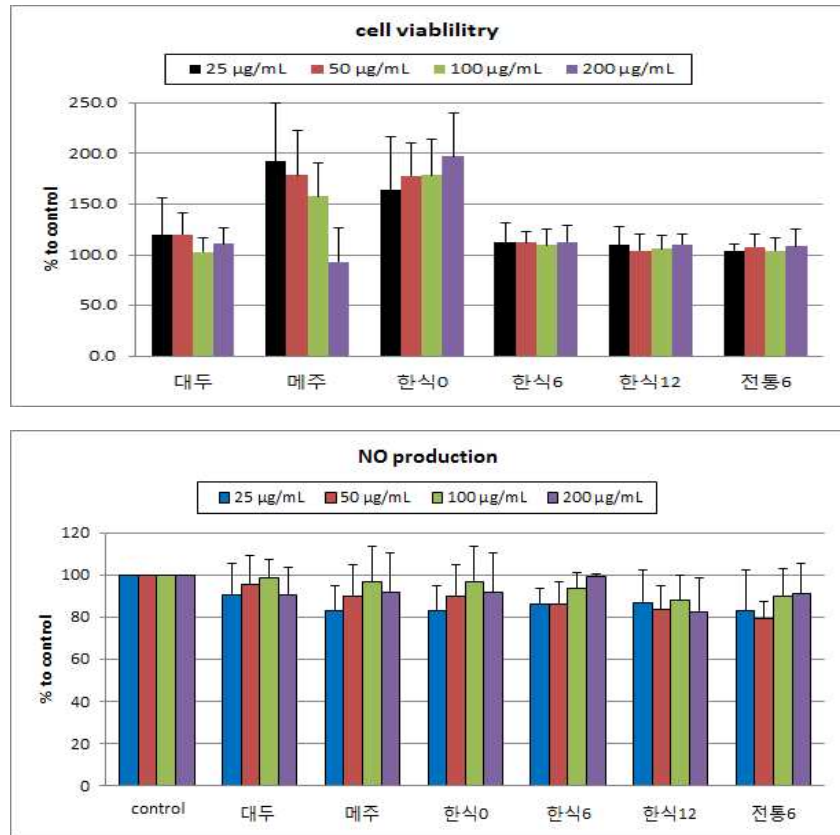


Figure 2-5. Effect of ethanol extracts of samples on cell viability and NO synthesis in RAW 264.7 cells

바. 한식된장의 순차적 분획추출물 중 항산화효과 우수 분획 탐색

■ 된장시료의 에탄올 추출물 투여에 의한 RAW 264.7 세포에서의 NO 생성 억제효과가 뚜렷하게 나타나지 않아 이를 여러 용매에 용해되는 분획으로 세분화하여 그 효과가 우수한 분획을 찾고자 하였음. 이를 위하여 대두, 한식0, 한식6, 한식12를 선택하여 에탄올 추출 후 비극성에서 극성방향으로 단계적으로 5종의 용매(헥산, 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 부탄올, 물)를 이용하여 순차적 분획추출물을 수행하여 얻은 각 분획물의 총 폴리페놀, 플라보노이드 함량을 비교하고 항산화효과가 가장 우수한 분획물을 선정한 다음 그 분획물을 이용하여 염증억제효과 실험을 수행하기로 하였음.

(1) 한식된장 분획별 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 비교

■ 에탄올 추출물의 항산화효과가 가장 우수하였던 한식12를 선택하여 헥산(HX), 디클로로메탄(DM), 에틸아세테이트(EA), 부탄올(BT), 물(DW) 추출물에서 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 측정된 결과 총 폴리페놀 함량은 DM > EA > SW > BT > Hx 분획순 이었고, 총 플라보노이드 함량은 DM=EA > BT > DW=Hx이었다. 결과적으로 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량은 DM과

EA분획이 다른 분획에 비하여 월등하게 높았다.

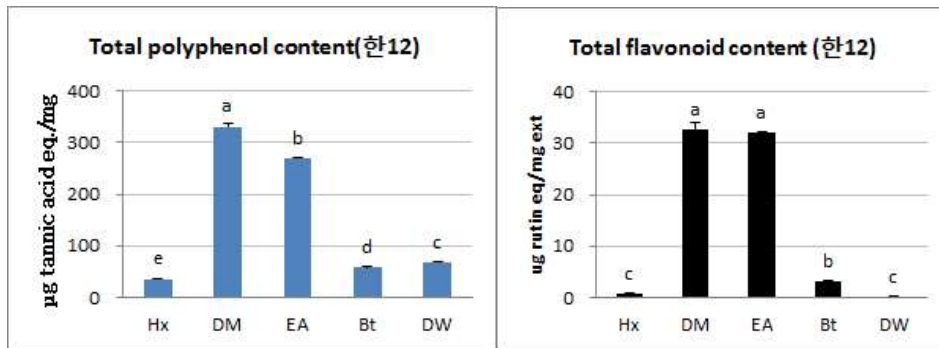


Figure 2-6. Total polyphenol content and flavonoid content in various fractions from Hansik doenjang12 ethanol extract Hx: hexane, DM:dichloromethane, EA:ethylacetate, Bt:butanol, DW:distilled water Means sharing the same alphabet in superscript are not significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

(2) 한식된장 DM, EA분획의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 비교

■ 한식12의 DM과 EA분획에 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량이 다량 들어 있었기 때문에 발효 숙성 기간의 영향을 알아보기 위하여 대두, 한식0, 한식6, 한식12의 DM, EA 분획에서 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 측정하여 비교하였음. 그 결과 DM 분획의 총 폴리페놀 함량은 대두 < 한식0 < 한식6 = 한식12였고, 총 플라보노이드 함량은 대두 = 한식0 < 한식6 < 한식12였으며, EA 분획의 총 폴리페놀 함량은 대두 < 한식0 = 한식6 < 한식12였고, 총 플라보노이드 함량은 대두 < 한식0 = 한식6 < 한식12으로 두 분획에서 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량 모두 발효 및 숙성기간에 따라 점차 증가하여 한식 12에서 가장 높았음.

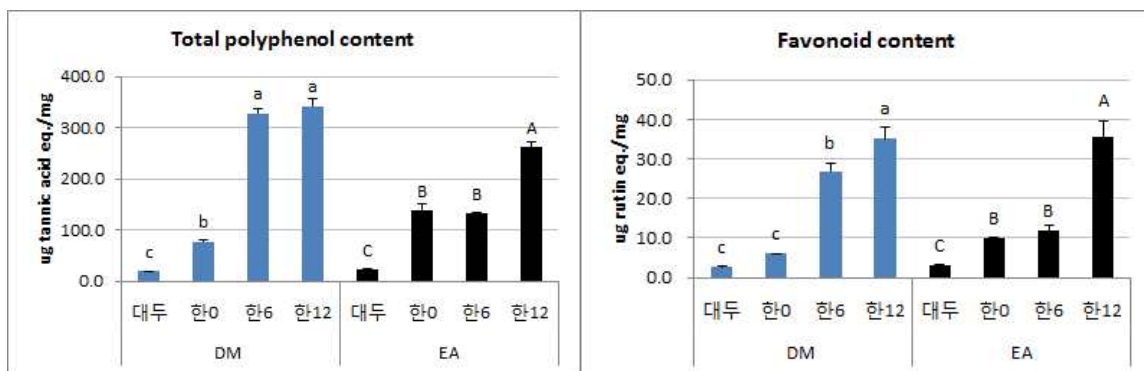


Figure 2-7. Total polyphenol and flavonoid content in DM and EA fractions from samples Means sharing the same alphabet in superscript within the same fraction are not significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

(3) 한식된장 분획별 항산화효과 비교

■ 에탄올 추출물의 항산화효과가 가장 우수하였던 한식된장12를 선택하여 hexan(HX), 디클로로메탄(DM), 에틸아세테이트 (EA), 부탄올(BT), 물(DW) 추출물을 이용하여 100 µg/mL와 200 µg/mL 농도에서 DPPH라디칼 소거효과를 측정 비교한 결과 두 농도 모두에서 DM과 EA 분획층의 효과가 가장 우수하였음.

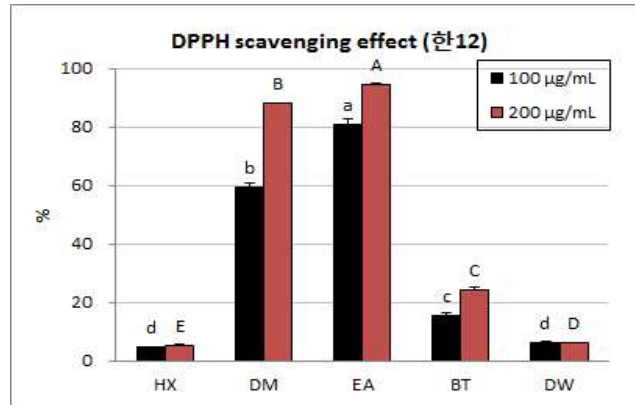


Figure 2-8. Antioxidant effect of various fractions from Hansikdoenjang12 ethanol extract

Hx: hexane, DM:dichloromethane, EA:ethylacetate, Bt:butanol, DW:distilled water

Means sharing the same alphabet in superscript within the same concentration are not significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

(4) 한식된장 DM, EA 분획의 항산화효과 비교

■ DM과 EA 분획물이 다른 분획물보다 DPPH 라디칼 소거능이 월등하게 우수하였기 때문에 대두, 한식0, 한식6, 한식12, 전통3, 전통6, 전통15, 전통27의 DM과 EA 분획물을 이용하여 100 µg/mL 농도에서 DPPH 라디칼 소거능을 측정한 결과 숙성기간에 따른 DM과 EA 분획의 DPPH 라디칼 소거효과는 비슷한 패턴을 나타냈다. 시료별 효과를 비교하면 DM 분획은 대두 < 한식0 < 전통27 < 한식6 = 전통3 = 전통6 = 전통15 < 한식12, EA 분획은 대두 < 한식0 = 전통27 < 한식6 = 전통3 = 전통6 = 전통15 < 한식12 으로 두 분획 모두 한식12의 효과가 가장 좋았음.

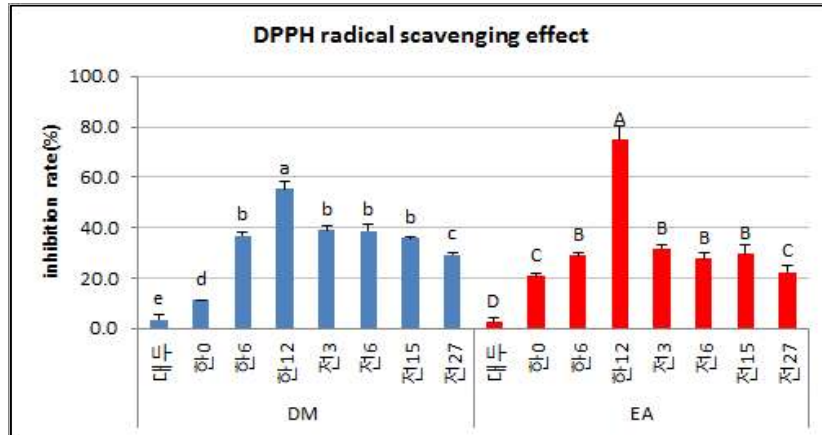


Figure 2-9. Antioxidant effect of EA and DM fractions(100 $\mu\text{g/mL}$) from ethanol extract of samples Means sharing the same alphabet in superscript within the same fraction are not significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

사. 된장의 항염증 효과

(1) cell viability

RAW 264.7 세포에 대두, 한식0, 한식6, 한식12로부터 얻은 DM 및 EA 분획물을 농도별(0~200 $\mu\text{g/mL}$)로 24시간 처리한 후 세포독성을 확인한 결과 100 $\mu\text{g/mL}$ 까지는 독성이 없는 것으로 판단되었음.

(2) NO 생성에 미치는 효과

- 본 연구에서 RAW 264.7 세포에 대두, 한식0, 한식6, 한식12의 DM 및 EA 분획물을 0, 10, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 투여하고 2 시간 후에 LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) 처리 후 22시간 배양한 다음 배양액에서 NO 농도를 측정하여 LPS 처리 대조군에 대한 비율을 계산하였음.

- DM 분획물은 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 처리 시 모든 시료가 NO 생성에 미치는 영향이 없었고, 50 $\mu\text{g/mL}$ 과 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서는 한식12만이 대조군과 비교하여 각각 83.3%와 55.6%의 NO 농도를 나타내어 유의한 감소효과를 보였음($p < 0.001$).

- EA 분획물은 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 저농도 처리 시 모든 시료가 NO 생성에 미치는 영향이 없었고, 50 $\mu\text{g/mL}$ 농도 처리 시에는 대두와 한식0에 의한 차이는 없었고, 한식6과 한식12은 각각 대조군 과 비교하여 94.2%와 83.3%의 NO 농도를 나타내어 유의한 감소효과를 보였음($p < 0.001$). 고농도 인 100 $\mu\text{g/mL}$ 처리 시에는 대두는 효과가 없었고, 한식0, 한식6, 한식12의 NO 농도는 각각 대 조군의 93.4%, 88.8%, 55.6%로 유의한 차이를 나타내었음($p < 0.001$)

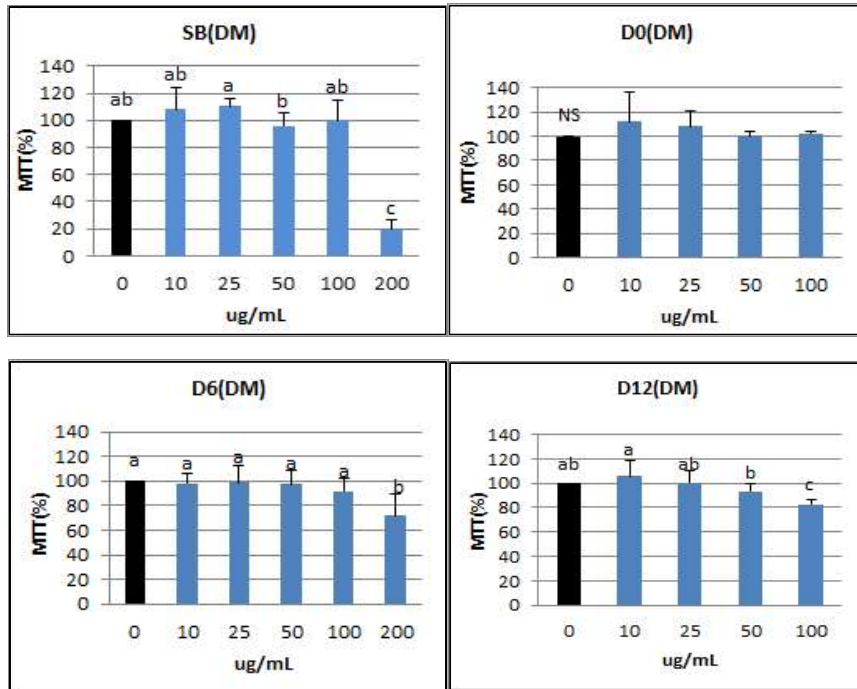


Figure 2-10. Cell viability in RAW 264.7 treated with dichloromethane soluble fraction SB:Steamed soybean, D0: Doenjang without aging, D6:Doenjang aged for 6 months, D12:Doenjang aged for 12 months. Means sharing the same alphabet in superscript are not significantly different among samples at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

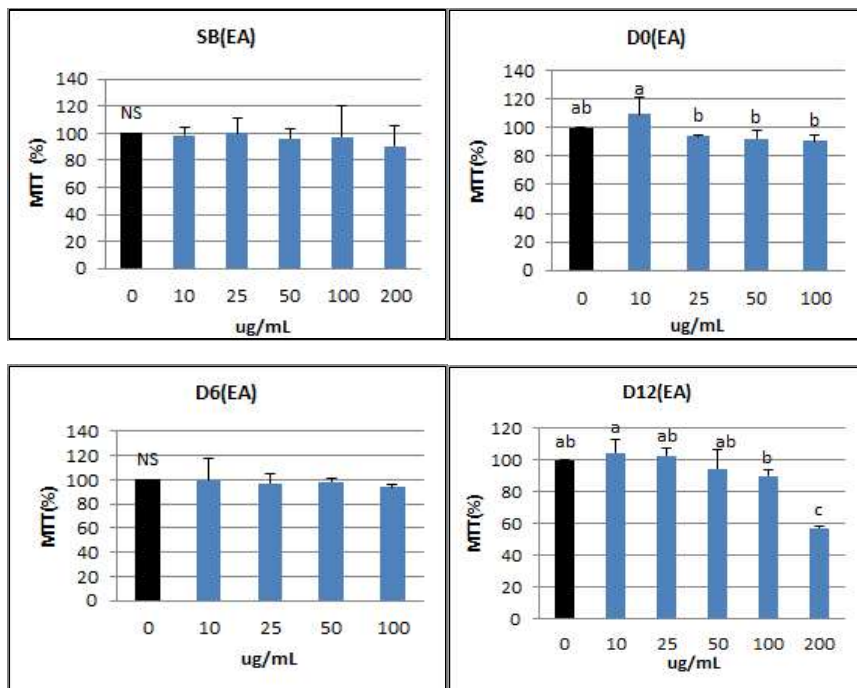


Figure 2-11 . Cell viability in RAW 264.7 treated with ethylacetate soluble fraction SB: Steamed soybean, D0: Doenjang without aging, D6:Doenjang aged for 6 months, D12:Doenjang aged for 12 months. Means sharing the same alphabet in superscript are not significantly different among samples at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

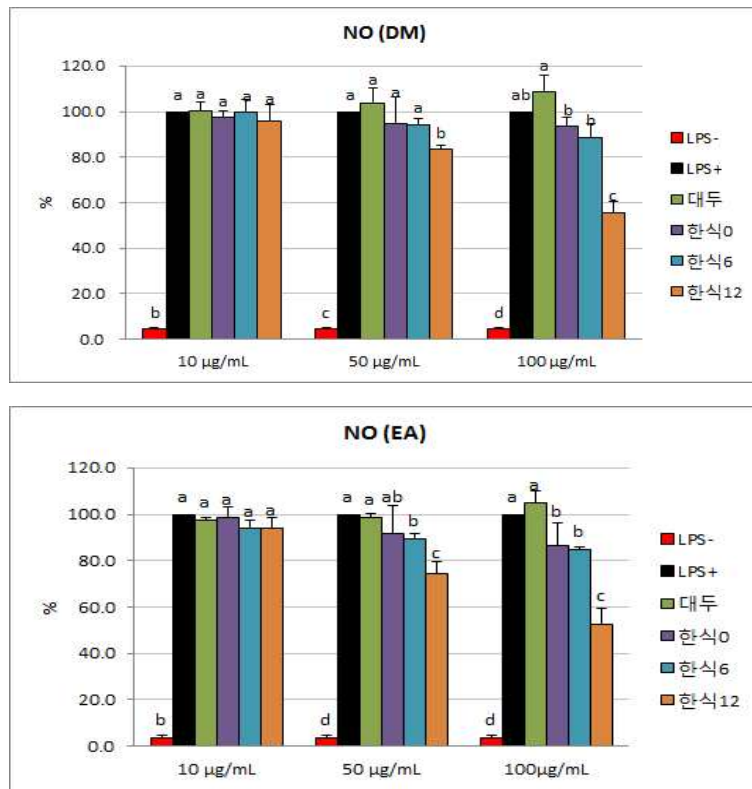


Figure 2-12. Effect of EA and DM fractions on NO synthesis in LPS-treated RAW 264.7 cells

Means sharing the same alphabet in superscript within the same concentration are not significantly different among samples at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

▶ 대식세포(macrophage)는 염증반응에서 매우 중요한 역할을 한다. 어떤 자극에 의하여 대식세포가 활성화되면 NO, cytokines, prostaglandin 등을 분비하고, 이들 물질들은 목표지점으로 세포이동을 유도함으로써 염증반응을 가속화시킨다. 본 연구실험에서 염증유도물질로 사용한 LPS는 그람 음성 박테리아 세포막의 주성분으로 단핵구와 대식세포, 내피세포 등의 포유동물의 여러 세포들은 이 물질을 인지하게 되면(Guha & Mackman 2001) NO, PGE2, TNF- α , IL-1, IL-6와 같은 염증촉진물질들의 생성을 빠르게 증가시킨다(Shan 등, 2009).

▶ 염증반응은 광범위한 외부 자극에 대하여 신체를 보호하기 위한 가장 중요한 면역 작용 중의 하나이지만 그 정도가 과도하거나 장기화되면 여러 가지 질환을 유발하게 되는데 염증상태에서는 대식세포가 활성화되어 과도한 NO(산화질소)와 PGE2, TNF- α 등의 염증촉진성 interleukin, MCP-1과 같은 부착성 유도물질 등의 분비를 증가시키는 것이 특징이다(Kumar 등, 2002).

▶ NO는 NOS에 의하여 L-arginine으로부터 생성되는 물질로 체내방어기능, 신호전달기능, 혈관확장 등 다양한 생리기능을 나타낸다. 그러나, NO의 생성량이 정상 이상으로 지속적으로 상승하게 되면 염증성 질환이 발생할 수 있고, 산소와 결합하여 생성된 peroxynitrite(ONOO⁻)은 세포와 조직에 산화적 손상을 주고 유전자 변이, 패혈성 쇼크 및 신경손상 등을 일으키는 경우도 있기 때문에 생리적 수준의 NO 농도를 유지하는 것은 매우 중요하다(Epe 등, 1996;

Bordan, 2001). 또한, 염증반응에서 중요한 역할을 하는 cyclooxygenase (COX)-2는 정상상태에서는 거의 검출되지 않다가 염증을 자극하는 신호가 오면 빠르게 발현이 유도되어 염증촉진물질인 PGE2를 생성한다(Jung 등, 2013).

(3) 염증매개인자들의 생성에 미치는 효과

(가) PG E2

- 본 연구에서 대두와 한식된장시료 한식0, 한식6, 한식12로부터 얻은 DM 분획물을 0, 10, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하였을 때 대두는 모든 처리농도에서 PGE2 농도에 영향을 미치지 못한 반면, 한식0과 한식6은 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 PGE2 농도를 유의하게 감소시켰고 ($p < 0.01$, $p < 0.001$), 한식12는 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 농도 의존적으로 유의하게 감소시켰음($p < 0.001$).

- EA 분획물 역시 0, 10, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리한 세포의 배양액에서 PGE2 농도를 측정한 결과 대두는 모든 처리농도에서 영향을 미치지 못한 반면, 한식0과 한식6은 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 PGE2 농도를 유의하게 감소시켰고($p < 0.05$), 한식12는 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 농도 의존적으로 유의하게 감소시켰음($p < 0.001$).

▶ PGE2는 NO와 함께 염증성 질환의 병리기전에서 가장 중요한 염증촉진물질 중의 하나임. 인체는 염증을 유도하는 어떤 자극이나 물질에 노출되면 대식세포에서 iNOS와 COX-2의 발현이 크게 유도되어 매우 빠르게 NO와 PGs의 분비가 증가함(Rice-Evance 등, 1997; Guo 등, 2006). NO는 백혈구가 염증부위로 이동하는 초기단계에 많은 역할을 하는 반면 PGE2는 발열과 통증이 나타나는 후반부에 주로 작용한다고 알려져 있다(Chang 등, 2001, Monzon 등, 2006). COX-2의 작용과정은 여러 염증반응 경로의 후반부에 공통적으로 포함되는 경로이기 때문에 급성적이든 만성적이든 대부분의 항염증 약물개발 과정에서는 COX-2를 선택적으로 억제함으로써 PGE2의 생성을 억제하는 것을 목표로 한다(Shan 등, 2009).

(나) IL-6

- 대두, 한식0, 한식6, 한식12로부터 얻은 DM 분획물을 0, 10, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하였을 때 대두는 10 $\mu\text{g/mL}$ 에서 대조군의 89.5% 수준으로 유의하게 감소시켰으나($p < 0.05$), 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서는 감소효과가 없었고, 한식0은 10, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서, 한식6은 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 오히려 IL-6 생성을 증가시키는 결과를 보였고, 한식12는 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 대조군의 70.6% 수준으로 유의하게 감소시켰음($p < 0.001$).

- EA 분획물을 0, 10, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리한 세포의 배양액에서 IL-6 농도를 측정한 결과 대두는 10, 50 $\mu\text{g/mL}$ 에서 유의하게 감소시키는 결과($p < 0.001$)를 보인 반면, 한식0, 한식6, 한식12는 10, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 IL-6 농도를 유의하게 감소시켰음($p < 0.001$). 특히 한식12를 100 $\mu\text{g/mL}$ 로 처리하였을 때의 IL-6 농도는 대조군의 40.1%로 나타나 60% 정도 가장 크게 감소되었음.

▶ TNF- α , IL-6, IL-1 β 등은 선천적 면역반응에서 나타나는 가장 중요한 염증매개물질로 과도하게 생성되면 전신적인 염증질환을 초래할 수 있다고 알려져 있다.

(다) TNF- α

■ 대두, 한식0, 한식6, 한식12로부터 얻은 DM 분획물을 0, 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리한 경우 대두, 한식0, 한식6은 TNF- α 생성을 억제시키는 효과가 없었고, 한식12만 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 TNF- α 생성을 대조군의 86.9% 수준으로 감소시키는 효과를 보였음($p < 0.001$). 따라서, DM 추출분획물에 의한 TNF- α 생성 억제효과는 12개월간 숙성시킨 된장인 한식12에서만 약하게 있는 것으로 볼 수 있음.

■ EA 분획물을 0, 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리한 세포의 배양액에서 TNF- α 농도를 측정한 결과 대두 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리 시 대조군의 91.2% 수준으로 유의하게 감소된 결과($p < 0.05$)를 보였고, 한식0은 10, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 처리 시 대조군의 90.4%, 90.3% 수준으로 유의하게 감소되었으며($p < 0.001$), 한식6과 한식12는 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 대조군의 89.2%와 86.8%로 유의하게 감소시켰음($p < 0.001$). 따라서, EA 추출분획물에 의한 TNF- α 생성 억제효과는 대두 및 숙성 기간이 서로 다른 된장인 한식0, 한식6, 한식12 모두에서 저농도인 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 공통적으로 나타났고, 그 억제 비율도 10% 내외로 크지 않았기 때문에 된장이 TNF- α 생성을 억제한다고 볼 수는 없음.

(라) MCP(monocyte chemotactic protein)-1

■ EA 분획물을 0, 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리한 세포의 배양액에서 MCP-1 농도를 측정한 결과 모든 시료가 유의하게 감소시키는 효과를 보였음($p < 0.001$). 그러나, 대두와 한식0에 의한 MCP-1 감소효과는 농도 의존적이지는 않은 반면, 한식6과 한식12는 농도가 증가할수록 감소효과가 증가하였음. 한식6 EA 분획물을 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리 시 대조군에 대한 MCP-1농도의 비율은 각각 79.0%, 78.0%, 73.7%였으며, 한식12 EA 분획물은 각각 90.4%, 70.5%, 55.8%였음. 따라서, 대두 EA 분획물은 MCP-1 생성을 억제시키는 효과가 있었고, 된장으로의 발효숙성과정을 거치면서 점차 그러한 효과가 증가하여 12개월 숙성 후에는 MCP-1 생성억제 효과가 더욱 뚜렷해짐을 알 수 있었음.

■ DM 분획물을 0, 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리한 경우 대두, 한식6, 한식12는 모든 처리 농도에서 유의하게 MCP-1농도를 유의하게 감소시키는 효과를 보였는데($p < 0.001$), 한식6과 한식12는 처리 농도가 높아질수록 감소효과가 증가하는 농도 의존적인 경향을 보였음. 한식6 DM 분획물을 10, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 처리 시 대조군에 대한 MCP-1농도의 비율은 각각 74.2%, 62.7%, 47.1%였으며, 한식12는 각각 72.5%, 61.2%, 51.5%였음. 그러나, 한식0은 오히려 MCP-1농도를 상승시키는 결과를 보였음($p < 0.01$). 본 연구결과 DM 분획물은 대두와 한식6, 한식12에 의한 MCP-1 생성억제효과가 거의 비슷하였고, 한식0은 오히려 증가시켰기 때문에 대두가 된장으로 발효숙성되는 과정이 대두의 MCP-1 생성억제효과를 더 증가시키지는 못한 것으로 보임.

■ 염증반응과 연관되어 있는 PGE2, IL-6, TNF- α , MCP-1 생성에 미치는 본 실험 결과들을 종합해보면, DM 분획물의 PGE2 생성에 대한 영향은 EA와 동일한 양상을 보였고, IL-6와 TNF- α 생성억제효과는 12개월 숙성된 된장에서만 나타났으며, MCP-1에 대한 억제효과는 대두에서도 유의하게 나타났는데 6개월 이상 숙성된 된장에서 좀 더 확실하게 나타났음. 특이한 점은 한식0의 DM 분획물이 PGE2 생성에 있어서는 농도 의존적으로 억제시키는 효과를 보인 반면, IL-6, TNF- α , MCP-1 생성에 대하여는 오히려 농도 의존적으로 증가시키는 효과를 보였음. 이 부분에 대하여는 추가적인 실험연구가 요구됨.

한편, EA 분획물의 경우 대두에는 없었던 PGE2 생성억제효과가 발효과정을 거쳐 된장의 숙성기간이 길어질수록 더 높아졌고, IL-6와 MCP-1 생성억제효과는 대두에서도 어느 정도 있었지만 12개월 숙성된 된장에서 더 확실하게 나타났으며, TNF- α 생성억제효과는 대두나 된장 모두 없는 것으로 판단됨.

▶ MCP-1은 macrophage를 활성화시켜 염증반응 과정에 관여하는 것으로 잘 알려져 있다. MCP-1 을 비롯한 체내 여러 chemokine들은 monocyte/ macrophage 정보교환과 활성화에 있어서 중요한 역할을 한다. Chemokine은 macrophage에서 주로 분비되지만 지방세포에서도 분비되기 때문에 비만으로 인한 MCP-1의 증가가 동맥경화증이나 인슐린저항성의 발병기전에 관련되어 있다고 보고 되었다(Xu 등, 2003; Linton 등, 2003). Yu 등(2006)은 고지방식이 섭취로 유도한 비만 쥐의 mesenteric 지방조직에서 MCP-1 mRNA 발현 및 단백질 수준이 크게 증가함을 관찰하였고, 이 지방조직을 세포배양하여 얻은 배양액 처리 시 RAW 264.7 세포와 복강대식세포의 이동이 크게 유도된 결과를 근거로 NO와 TNF- α 와 같은 염증촉진매개물질들의 증가와 함께 MCP-1의 증가는 macrophage를 지방조직으로 유입되도록 하여 염증반응을 활성화시킴으로써 여러 만성질환들의 발생을 촉진한다고 하였다.

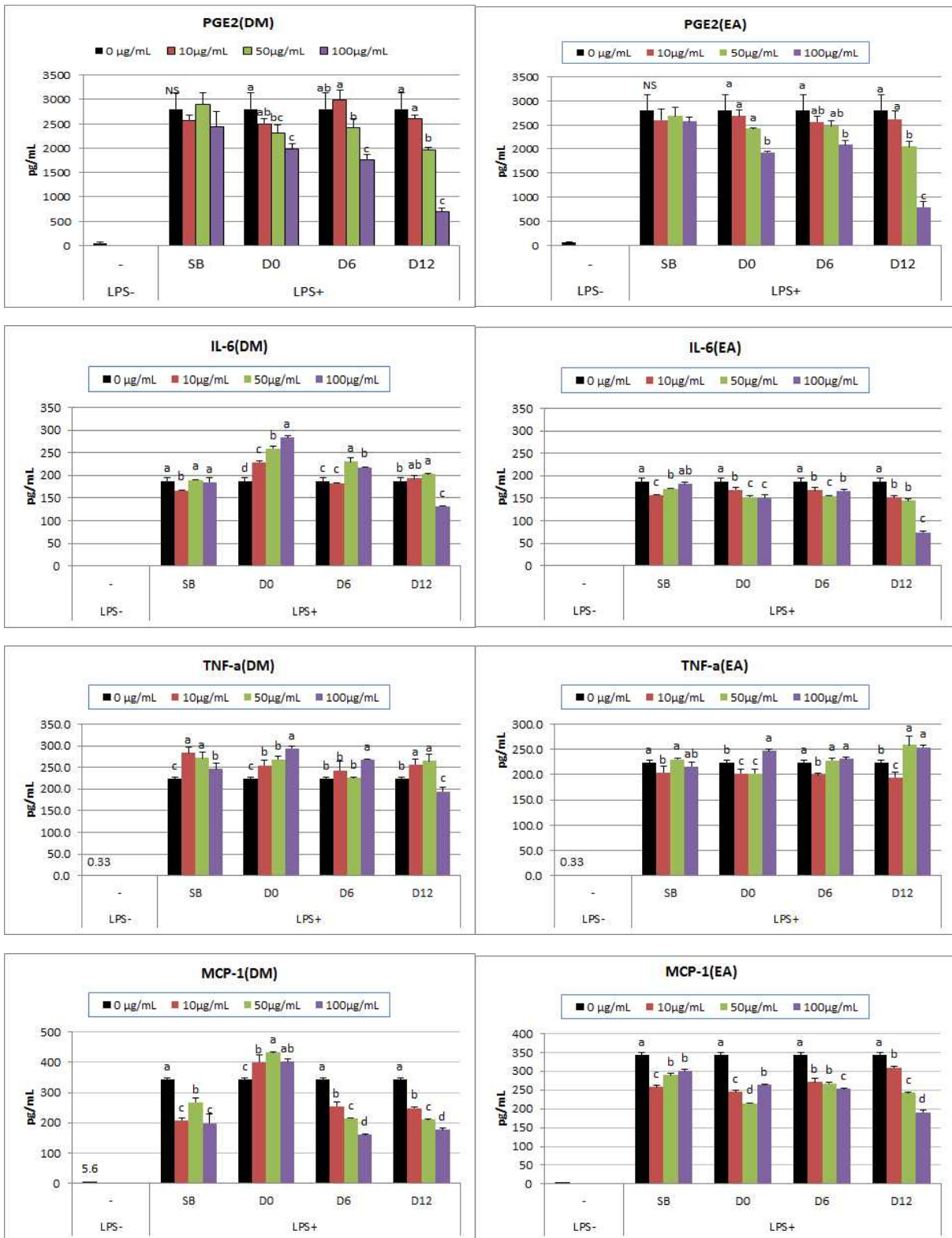


Figure 2-13. Effect of EA and DM fractions from Doenjang on PGE2, IL-6, TNF- α and MCP-1 synthesis in LPS-treated RAW 264.7 cells

SB: steamed soybean, D0: Doenjang without aging, D6: Doenjang aged for 6 months, D12: Doenjang aged for 12 months. Means sharing the same alphabet in superscript within each sample are not significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

▶ 한편, 활성산소는 NF- κ B를 활성화시켜 염증을 촉진시키는 cytokines, chemokines 및 성장 인자들의 발현을 촉진하고, 저밀도지단백의 과산화(oxidized-LDL)를 증가시켜 여러 조직에서 tumor necrosis factor(TNF)- α 와 interleukin (IL)-6 등의 염증촉진 물질들을 증가하게 한다고 알려졌다(Boden, 2011). 따라서, 본 연구에서 된장의 항염증효과는 직접적인 효과와 함께 항산화효과가 간접적으로 작용한 것으로 생각된다.

(4) 된장의 항염증효과의 기전: NF- κ B 활성화에 대한 영향

■ 한식12 디클로로메탄(DM)과 에틸아세테이트(EA)분획이 NF- κ B 활성화를 억제함으로써 염증 매개물질인 NO, PGE2, IL-6 등의 생성을 억제하였는지를 확인하기 위하여 수행한 Western blot 실험결과는 다음과 같다.

(가) 된장의 DM 분획

■ 대두와 한식12의 DM 분획을 LPS-처리한 RAW 264.7에 투여하였을 때 LPS에 의하여 증가한 iNOS 합성량을 대두(100 μ g/mL)는 더 증가시킨 반면, 한식12는 50, 100 μ g/mL에서 각각 대조군의 28.0%, 20.3% 까지 크게 감소시켰음.

■ 대두는 COX-2 생성 억제효과가 없었으나, 한식12는 50, 100 μ g/mL에서 각각 대조군의 45.9%, 28.8%까지 농도 의존적으로 크게 감소시켰다.

■ 대두는 NF- κ B 인산화(p-p65)를 억제하는 효과가 없었으나, 한식12는 50, 100 μ g/mL에서 각각 대조군의 86.1%, 77.1% 까지 농도 의존적으로 감소시켰음.

■ 대두는 LPS에 의하여 유도된 NF- κ B(p65)의 핵으로의 이동을 오히려 증가시켰으나, 한식12는 100 μ g/mL 투여 시 대조군의 91.6%로 약간 감소시켰음.

(나) 된장 EA 분획

■ 대두와 한식12의 EA 분획을 LPS-처리한 RAW 264.7에 투여하였을 때 LPS에 의하여 증가한 iNOS 합성량을 대두(100 μ g/mL)는 약간 감소시킨 반면 한식12는 50, 100 μ g/mL에서 각각 대조군 생성량의 45.9%, 28.8%까지 농도 의존적으로 크게 감소시켰음.

■ COX-2와 p-p65의 생성량에 대하여는 대두와 한식12 모두 감소효과를 보이지 않았음.

■ 대두는 LPS에 의하여 유도된 NF- κ B(p65)의 핵으로의 이동을 감소시키지 못하였으나 한식12는 대조군의 79.7% 로 감소시켰음.

▶ 된장 DM분획과 EA분획은 모두 RAW 264.7 세포에서 LPS에 의한 NO와 PGE2, IL-6를 유의하게 감소시켰다. Western blot 결과 예상대로 이 두 분획은 모두 iNOS의 생성을 효과적으로 감소시켰으나, COX-2 생성 억제효과는 DM 분획에서는 나타났지만, EA분획에서는 나타나지 않았다. 또한, 두 분획 모두 NF- κ B가 핵으로 이동하는 것을 억제하는 효과도 약하였다. 따라서, DM과 EA 분획에서 항염증효과를 나타내는 유효성분은 한 가지가 아닌 여러 가지로 생각

되며 그 작용기전은 NF- κ B 경로를 억제하는 것 이외에 또 다른 경로를 통하여 작용하는 물질도 있을 것으로 예상된다.

▶ EA분획이 COX-2의 합성을 감소시키지 못하였음에도 불구하고 PGE2생성은 유의하게 감소되었기 때문에 EA분획이 micosomal PGE2 synthase(mPGES)의 활성을 직접적으로 억제시키거나 PGs를 비활성형으로 전환시키는 효소인 15-OH PG dehydrogenase의 활성을 증가시킴으로써 PGE2를 감소시킬 가능성을 생각할 수 있다. 이 부분을 확인하기 위해서는 추가적인 실험연구가 필요하겠다. Koeberle 등(2009)은 curcumin이 COX-2의 발현을 억제시킴으로써 PGE2 생성을 감소시키는 것으로 잘 알려져 있지만 COX-2의 영향을 받지 않고 직접적으로 mPGES의 활성을 촉진시키는 작용도 있다고 보고하였다.

▶ 염증반응의 기전으로 가장 잘 알려진 NF- κ B는 p65와 p50 heterodimer형태로 세포질에 존재하며 안정 시에는 I κ B와 결합되어 불활성화 되어 있다가 활성산소, LPS, 염증성 cytokine 등과 같은 염증자극물질에 노출되면 I κ B kinase 가 인산화 되면서 I κ B와 분리된 NF- κ B는 활성화가 되어 핵 안으로 들어가서 iNOS, COX-2, 5-lipoxygenase, IL-6, TNF- α , adhesion molecule 유전자의 상위 promoter region에 결합함으로써 이들 유전자들의 발현을 유도하고 그로부터 NO, PGE2, IL-6, IL-1 β , TNF- α , MCP-1, VCAM-1, ICAM-1 등의 염증촉진물질들이 빠르게 생성 분비되어 염증반응이 증폭되는 것으로 알려져 있다(Lawrence, 2001).

▶ iNOS gene promoter는 NF- κ B이외에 activator protein(AP)-1, CCAAT/enhancer binding protein(C/EBP) 와 같은 전사인자들의 결합을 위한 homologous consensus sequence 들이 있다. 또한, stress-responsive protein인 heme-oxygenase(HO)도 iNOS발현과 NO생성을 억제한다고 알려져 있으므로(Cho 등, 2012) 본 연구결과에서 밝혀진 된장의 DM과 EA 분획의 iNOS 및 NO의 감소효과가 AP-1, C/EBP, HO-1 경로를 통한 것인지에 대한 추가적인 연구가 필요하다고 본다.

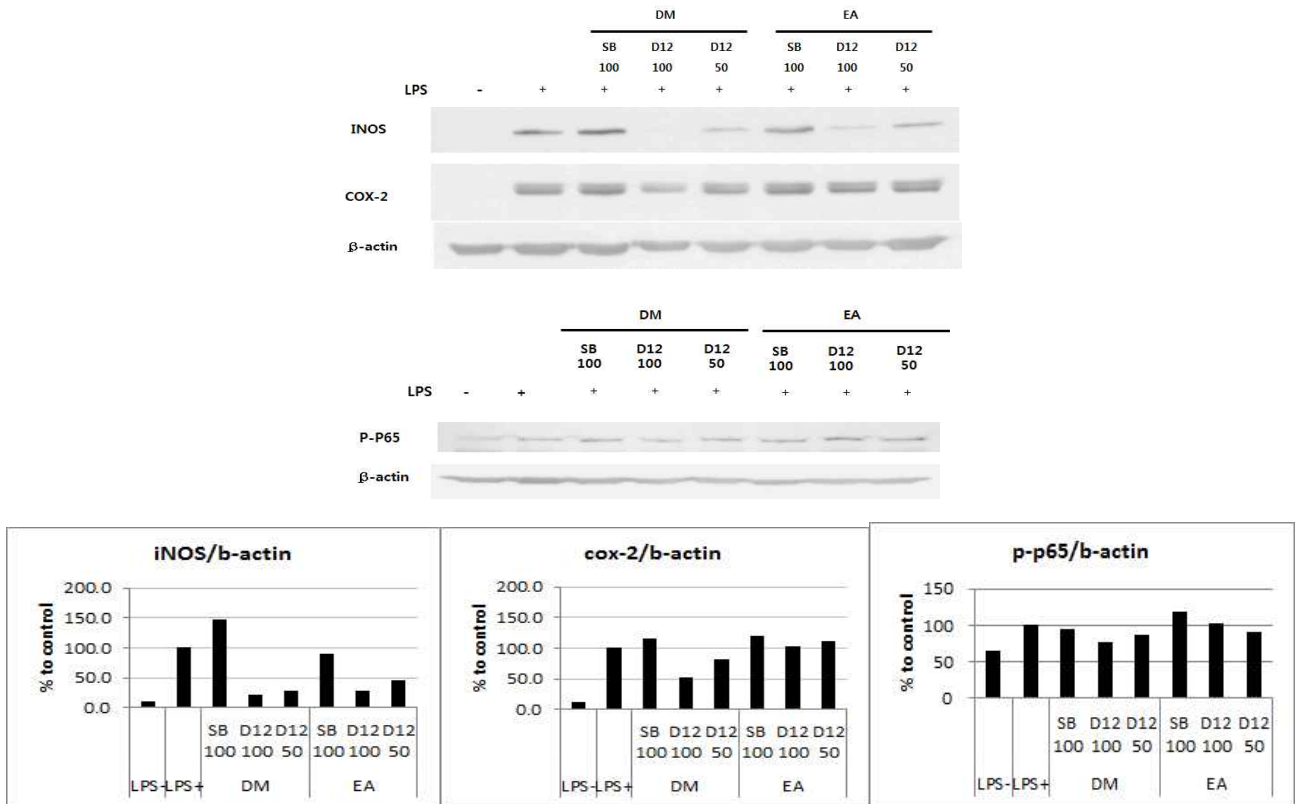


Figure 2-14. Inhibitory effects of DM and EA fractions from doenjang12 on iNOS, COX-2 and p-p65(NF- κ B) synthesis in LPS-treated RAW 264.7 macrophage cell. Western blot and quantification result of bands. SB 100: 100 μ g/mL of steamed soybean, D12 100, D12 50:100 μ g/mL or 50 μ g/mL of Doenjang aged for 12 months

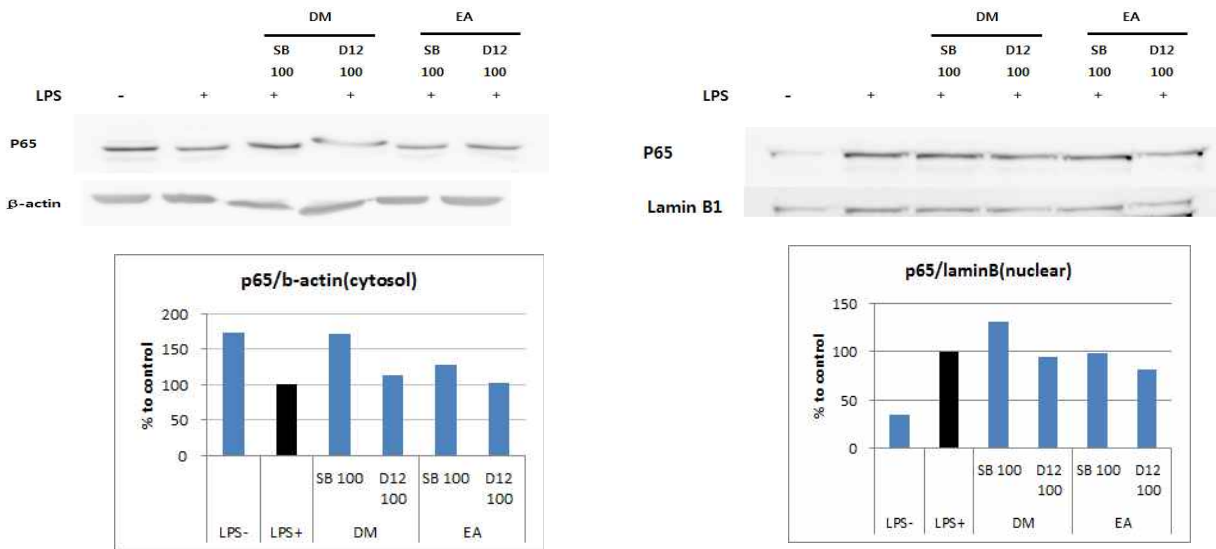


Figure 2-15. Inhibitory effects of DM and EA fractions from doenjang12 on nuclear translocation of NF- κ B in LPS-treated RAW 264.7 macrophage cell. Western blot and quantification result of bands. SB 100: 100 μ g/mL of steamed soybean, D12 100:100 μ g/mL of Doenjang aged for 12 months

제 3 절 제 2 협동과제 연구내용 및 결과

1. 연구수행 방법

가. 선행연구문헌고찰 및 동물실험모델 확립

(1) 선행연구 문헌고찰

- 동물(마우스 및 랫드) 지방조직 및 지방세포에서 진행된 miRNA의 발현 및 miRNA의 target gene들에 대한 최신 연구동향을 조사하고 miRNA를 microarray로 분석한 연구들을 문헌고찰함. 특히, in vitro 및 in vivo 연구에서 adipogenesis 조절 및 항염증인자로 보고된 miRNA를 분류하고 기능적 특징 및 작용기전에 대해서 고찰함.

(2) 동물실험조건 확립

- 마우스와 랫드에서 진행된 고지방식이 비만유도 선행연구 문헌고찰 및 본 연구실에서 진행된 선행연구의 노하우를 바탕으로 동물실험의 조건, 실험식이, 실험기간, 샘플링 부위 등을 확인하였고 동물실험 진행과정은 주관기관부분에서 언급됨.
- 과제 분석에 앞서 마우스 지방조직에서 total RNA 및 단백질 추출 등에 대한 분석방법을 검토하고 예비실험을 진행하여 확립함.

나. 동물실험 및 분석

(1) 지방조직 적출 및 무게측정

- 주관기관에서 언급한 동물실험에 따라 실험식이섭취기간 후 16시간 공복 후 마우스를 희생하여 epididymal, perirenal, retroperitoneal adipose tissue를 적출하여 무게 측정 후 분석시까지 -80°C 에서 보관함.

(2) miRNA microarray 분석

① Total mRNA 추출

- 11주간 동물사육 후 적출된 epididymal adipose tissue에서 total RNA를 RNAiso-plus (Takara, Japan)를 사용하여 추출함. 추출된 total RNA는 Nanodrop (ND-1000)을 사용하여 농도 및 A260/280 ratio를 측정함
- Total RNA의 purity는 Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer로 측정하여 28S/18S rRNA 값을 측정하여 샘플 QC를 진행하고 microarray 분석에 적합한 criteria를 통과한 샘플들을 선별하여 수행함 (실험식이군당 3마리씩).

② miRNA microarray hybridization

- Agilent miRNA chip인 Mouse V19.0 8 x 60K (Agilent Technologies, USA)를 사용하여 제조사의 방법에 따라서 분석함. 간략히 살펴보면, 100 ng의 total RNA를 37°C에서 30분간 calf intestinal phosphatase로 탈인산화한 후 7분간 100°C에서 100% DMSO에 의해 변성시켜서, 샘플을 16°C에서 2시간 동안 배양하며 T4 ligase를 사용하여 pCp-Cy3를 라벨링함. 라벨링된 RNA 샘플은 1시간동안 vacuum concentrator에서 건조시켰으며, 건조가 완료되면 샘플은 hybridization을 위한 nuclease-free water, Hyb Spike-In solution, 10X GE blocking agent, 2X Hi-RPM로 mixture을 만들어서 array에 mixture을 45ul씩을 넣어서 hybridization시켜 55°C에서 20시간 동안 rotate시킴.
- Agilent miRNA Microarray System에 권장되는 Hybridization을 한 후, Agilent Technologies G4900DA SureScan scanner로 스캔하여 Agilent Feature Extraction software version 11.0.1.1으로 데이터를 획득함.

③ Raw data processing 및 통계처리

- Agilent feature extraction protocol에 따라서 샘플의 data processing을 진행함. Microarray 위의 probe 중 기준을 만족하는 것만을 filtering하여 분석에 사용함.
- Filtering되어 선택된 miRNA들은 Quantile method를 적용하여 샘플들에 logarithm과 normalization을 진행하여 raw data에 대한 보정을 수행함.
- 실험식이그룹간의 비교는 1-way ANOVA와 independent t-test를 통하여 fold change와 p-value를 구하였고, p-value는 FDR로 보정함.
- 유사한 기능을 가진 miRNA은 유사한 발현 경향을 보인다는 것을 근거로 샘플 miRNA의 발현정도를 기준 (fold change와 p-value)으로 그룹화하여 계층군집분석(Hierarchical cluster analysis)을 수행하여, 실험식이군내 샘플간의 평균으로 표현됨.
- 모든 데이터 분석은 R 3.0.2 (www.r-project.org)을 사용하여 miRNA 발현을 수행함. miRNA의 target gene들은 miRDB (mirdb.org/miRDB)을 통하여 분류함.
- 추후 miRNA의 기능 분류는 Gene Ontology (GO) pathway에서 확인하고, DAVID 프로그램 사용하여 통계적으로 유의한 차이를 보인 유전자들을 도출함.

(3) Adipocyte morphology 분석

- Epididymal adipose tissue 중 일부분을 10% formalin에 고정시켜 H&E 염색을 진행함.
- Section field의 adipocyte 수와 길이를 측정함.

(4) Western blotting 분석

- 지방조직 0.1g에 protein lysis buffer (50mM HEPES-KOH (pH 7.5), 150mM NaCl, 1mM

EDTA (pH 8.0) 2.5mM EGTA (pH 8.0), 1mM NaF, 10mM β -glycerophosphate, 0.1mM Na_3VO_4 , 1mM DTT, 1% NP-40, 10% glycerol, 0.2mM PMSF, Protease inhibitor cocktail)을 넣어 Tissue Lyser II (Quiagen, USA) 기기로 5 mm beads를 사용하여 균질화함. 균질화된 지방조직은 10,000 x g에서 30분 동안 centrifugation시켜 지방층인 상층액을 제외한 단백질을 추출하여 Brad Ford법으로 단백질을 정량함.

- Anti-HO-1 (sc-10789, Santa-cruz, USA), anti-DNPH (S7150, Millipore, USA), anti-p-JNK (9251s, Cell signaling, USA), anti-PPAR γ (sc-7196, Santa-cruz, USA) primary antibody를 붙여 incubation한 후 secondary antibody 후에 HRP conjugated substrate를 사용하여 수행함. Anti-HSC70 (sc-7298, Santa-cruz, USA)를 loading control로 사용함.

(5) Quantitative realtime-PCR 분석

- 1 μ g of total RNA로 random hexamer primer를 이용하여 Superscript II (Invitrogen, USA)로 cDNA를 합성하였다. qRT-PCR은 StepOne Real time PCR (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 다음의 cycling parameter 조건으로 진행하였음: 10분간 denaturation 40cycle annealing, 1분간 extension. Mouse ribosomal protein 19 (RPL 19)를 reference gene으로 사용하였으며, target gene의 상대적인 발현량은 $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ 방법으로 계산하였음. PPAR γ , PGC α , TNF α , MCP-1, TLR4, CD68, CD11c, TGF β , Col1a1, LPL, CPT1b, HO-1, Adiponectin, Lpin1을 측정함.

(6) 통계 처리

- 실험결과는 SPSS 통계 프로그램 (version 19)을 이용하여 분석하였으며, 1-way ANOVA 와 Duncan's multiple range test로 사후검정한 후 실험식이섭취군간의 유의성을 $P < 0.05$ 수준에서 검증하였고 실험식이섭취군당 mean \pm SEM으로 표시함.

2. 연구수행 결과

가. 선행연구문헌고찰

(1) 선행연구 문헌고찰

- 본 연구에서는 먼저 선행연구 문헌고찰을 통하여 고지방식이 섭취나 유전적으로 비만이 유도된 동물모델의 지방조직 및 지방세포에서 지방축적, 지방대사 및 항염증관련 miRNA의 발현변화 여부를 확인함 (Table 3-1). 선행연구 문헌고찰을 통해 보고된 miRNA들은 추후 11주간 고지방식을 섭취한 마우스에 된장 및 대두를 섭취시켜 epididymal adipose tissue에서 수행한 microarray 분석결과와 miRNA 발현변화여부를 비교하여 본 연구를 통해 새롭게

밝혀진 miRNA를 확인하기 위한 자료로 활용함.

- 현재 선행연구에서 장류를 이용하여 생리활성을 microarray 분석기법을 포함한 분자생물학적 분석연구방법들을 활용하여 효능을 규명하는데 주로 진행된 장류소재는 청국장이었음. 청국장의 항비만이나 항암효과와 연관지어서 간조직과 MCF7 cell에서 microarray 분석을 사용하여 알아봄. 또한, 장류의 주요 생리활성물질로 알려진 soy protein, genistein, daidzein 등을 비만이 유도된 동물모델의 간, 지방조직에서 mRNA microarray 분석을 이용하여 효능을 비교하였으나, 지방조직에서 miRNA 지표를 알아본 연구는 전무한 실정임. 된장을 섭취한 경우는 주로 항비만 또는 항산화 효능을 보기위하여 효소활성도를 측정하는 연구로 진행되었으며 Omics 분석기법을 활용하여 mRNA 및 miRNA 발현변화를 분석한 연구는 지방조직을 포함한 모든 조직에서 아직 보고되지 않았음.

Table 3-1. miRNAs associated with adipogenesis, obesity, and inflammation
in vivo and *in vitro* adipose model system

miRNA	Model system	Expression in adipose tissue	Functional work	Targets	Reference
Let-7	In vitro: 10d of differentiation	↑	Promotes adipogenesis	(mRNA) HMGA2, AP2, PPARg (protein) HMGA2	Sun et al., 2009
miR-103	ob/ob or C57BL/6 mice / subcutaneous and visceral fat / HFD / 8w	↑ in obese mice	Decreases glucose homeostasis and insulin sensitivity	(RNA) C/EBP β , PPARg, FABP4	Trajkovs-k i et al., 2011
	B6.V- <i>Lepob/J</i> (<i>ob/ob</i>) mice / epididymal fat / control	↓ in ob/ob mice	Increases adipogenesis		Xie et al., 2009b
	In vitro: 9d of differentiation	↓	Promotes adipocyte differentiation		
miR-107	ob/ob or C57BL/6 mice / subcutaneous and visceral fat / HFD / 8w	↑ in obese mice	Decreases glucose homeostasis and insulin sensitivity	(RNA) C/EBP β , PPARg, FABP4	Trajkovs-k i et al., 2011

	B6.V- <i>Lepob/J</i> (<i>ob/ob</i>) mice / epididymal fat / control	↓ in <i>ob/ob</i> mice	Increases adipogenesis		Xie et al., 2009b
	In vitro: 9d of differentiation	↓	Promotes adipocyte differentiation		
miR-122	C57BL/6 mice / epididymal fat / HFD / 5month	↓ in HFD mice	Increases adipogenesis		Chartou-mpekis et al., 2012
miR-125b	In vitro: 9d of differentiation	↑	inhibits adipocyte differentiation		Xie et al., 2009b
	B6.V- <i>Lepob/J</i> (<i>ob/ob</i>) mice / epididymal fat / control	↓ in <i>ob/ob</i> mice	Increases adipogenesis		
miR-130a	C57BL/6 mice / WAT / HFD / 8w	↑ in HFD mice	Adipocyte dysfunction by increasing inflammation	(RNA) TNF α , PPARg, Adipsin, AP2, LPL	Kim et al., 2013
	<i>ob/ob</i> mice / epididymal fat / HFD / 10w	↓ in <i>ob/ob</i> mice			Bengestr-ate et al., 2011
	C57BL/6 mice / epididymal fat / HFD / 5month	↓ in HFD mice	Increases adipogenesis		Chartou-mpekis et al., 2012
miR-130b	C57BL/6 mice / WAT / HFD / 8w	↑ in HFD mice	Induces adipocyte dysfunction by increasing inflammation	(RNA) TNF α , PPARg, Adipsin, AP2, LPL	Kim et al., 2013
	<i>ob/ob</i> mice / epididymal fat / HFD / 10w	↑ in <i>ob/ob</i> mice			Bengestr-ate et al., 2011
miR-143	B6.V- <i>Lepob/J</i> (<i>ob/ob</i>) mice /	↓ in <i>ob/ob</i> mice	Increases adipocyte differentiation		Xie et al., 2009b

	epididymal fat / control				
	C57BL/6 mice / mesenteric fat / HFD / 8-9w	↑ in HFD mice	Increases adipogenesis	(RNA) PPARg, AP2	Takanabe et al., 2008
	In vitro: 14-16d until cell differentiated into mature adipocyte	↑	Promotes adipocyte differentiation	(mRNA, protein) PTN	Yi et al., 2011
	In vitro: 9d of differentiation	↓	Promotes adipocyte differentiation		Xie et al., 2009b
miR-146b	In vitro: 9d of mature adipocyte	↑	Promotes adipogenesis	(mRNA) SIRT1 (protein) C/EBP α , PPARg, AP2, SIRT1, FOXO1	Ahn et al., 2013
	B6.V- <i>Lepob/J</i> (<i>ob/ob</i>) mice / epididymal fat / control	↑ in <i>ob/ob</i> mice	Increases adipocyte differentiation		Xie et al., 2009b
	C57BL/6 mice / epididymal fat / HFD / 5month	↑ in HFD mice	Increases adipogenesis		Chartoumpakis et al., 2012
	In vitro: 9d of differentiation	↓	Promotes adipocyte differentiation		Xie et al., 2009b
miR-148a	B6.V- <i>Lepob/J</i> (<i>ob/ob</i>) mice / epididymal fat / control	↓ in <i>ob/ob</i> mice	Increases adipocyte differentiation		Xie et al., 2009b
	In vitro: 9d of differentiation	↓	Promotes adipocyte differentiation		
miR-15a	In vitro: 3, 6, 9, 12, 15d of adipogenesis	↑	Promotes cell size and proliferation	(mRNA, protein) DLK1	Andersen et al., 2010

miR-17-5p	ob/ob mice / epididymal fat	↓ in ob/ob mice	Increases adipogenesis		Lin et al., 2009
miR-17-92	In vitro: 7d of differentiation	↑	Promotes adipocyte differentiation	(mRNA, protein) Rb2/p130	Wang et al., 2008
miR-210		↓	Promotes adipogenesis	(mRNA) Cyclin D1, c-Myc (protein) β -Catenin	Qin et al., 2010
miR-221	B6.V- <i>Lepob/J</i> (<i>ob/ob</i>) mice / epididymal fat / control	↑ in ob/ob mice	Increases adipogenesis		Xie et al., 2009b
	In vitro: 9d of differentiation	↑	inhibits adipocyte differentiation		
miR-222	B6.V- <i>Lepob/J</i> (<i>ob/ob</i>) mice / epididymal fat / control	↑ in ob/ob mice	Increases adipogenesis		Xie et al., 2009b
	C57BL/6 mice / epididymal fat / HFD / 5month	↑ in HFD mice	Increases adipogenesis		Chartou-mpekis et al., 2012
	In vitro: 9d of differentiation	↑	inhibits adipocyte differentiation		Xie et al., 2009b
miR-223	-/-miR-223 mice / adipose tissue / HFD / 12w	↓ in HFD mice	decreases inflammation & insulin resistance	(protein) Akt, p65, Pknx1 (RNA) IL-1b, IL-6, TNF α , MCP1	Zhuang et al., 2012
miR-20a	ob/ob mice / epididymal fat	↑ in ob/ob mice	Increases adipogenesis		Lin et al., 2009
miR-21	In vitro: 10-12d of differentiation induction	↑	Promotes adipocyte differentiation	(mRNA, protein) Adiponectin	Kang et al., 2013

				(protein) AP1	
miR-27a	ob/ob mice / epididymal fat	↑ in ob/ob mice	Increases adipogenesis		Lin et al., 2009
	C57BL/6 mice / epididymal fat / HFD	↓ in HFD mice	Increases adipogenesis		Kim et al., 2010
	In vitro: adipogenesis	↓	Inhibits adipocyte differentiation	(mRNA) PPAR γ , AP2, Adiponectin, CD36, LPL (protein) PPAR γ , C/EBP α , Adiponectin	
		↓	Inhibits adipocyte differentiation	(mRNA, protein) PPAR γ , C/EBP α , C/EBP β	Lin et al., 2009
miR-27b	ob/ob mice / epididymal fat	↑ in ob/ob mice	Increases adipogenesis		Lin et al., 2009
		↓	Inhibits adipocyte differentiation	(mRNA, protein) PPAR γ , C/EBP α , C/EBP β	
miR-335	ob/ob, KKAY, db/db mice / WAT	↑ in obese mice	Increases adipogenesis		Nakanishi et al., 2009
miR-375	In vitro: 9d of differentiation	↑	Promotes adipocyte differentiation	(mRNA) PPAR γ 2, AP2, C/EBP α (protein) ERK1/2, PPAR γ 2, AP2	Ling et al., 2011
miR-378	C57BL/6 mice /	↓ in HFD mice	Increases		Chartou-m

	epididymal fat / HFD / 5month		adipogenesis		pekis et al., 2012
miR-378/378*		↑	Promotes adipocyte differentiation	(protein) C/EBP α , C/EBP β , C/EBP δ , PPARg1, PPARg2	Gerin et al., 2010
miR-30a-5p	B6.V- <i>Lepob/J</i> (<i>ob/ob</i>) mice / epididymal fat / control	↓ in <i>ob/ob</i> mice	Increases adipogenesis		Xie et al., 2009b
	In vitro: 9d of differentiation	↓	Promotes adipocyte differentiation		
miR-30c	B6.V- <i>Lepob/J</i> (<i>ob/ob</i>) mice / epididymal fat / control	↓ in <i>ob/ob</i> mice	Increases adipogenesis		Xie et al., 2009b
	In vitro: 9d of differentiation	↓	Promotes adipocyte differentiation		
miR-422b	B6.V- <i>Lepob/J</i> (<i>ob/ob</i>) mice / epididymal fat / control	↓ in <i>ob/ob</i> mice	Increases adipogenesis		Xie et al., 2009b
	In vitro: 9d of differentiation	↓	Promotes adipocyte differentiation		
miR-448	In vitro: 8d of differentiation	↑	Inhibits adipocyte differentiation	(mRNA) KLF5, PPARg, AP2, LPL, C/EBP β (protein) KLF5, PPARg	Kinoshita et al., 2010
miR-99b	B6.V- <i>Lepob/J</i> (<i>ob/ob</i>) mice / epididymal fat / control	↓ in <i>ob/ob</i> mice	Increases adipogenesis		Xie et al., 2009b
	In vitro: 9d of differentiation	↑	inhibits adipocyte differentiation		

나. 조직무게

○ 저지방식이 섭취그룹 (12마리), 고지방식이 섭취그룹 (12마리), 고지방+된장식이 섭취그룹 (11마리), 고지방+대두식이 섭취그룹 (12마리)의 지방무게는 Table 3-2와 같음. 고지방식이에 의해서 지방이 축적되었는데, 고지방+된장식이 섭취그룹이 적은 지방축적 경향을 보였음. 선행연구에 의하면 고지방식이에 된장을 첨가한 경우 absolute adipose tissue weight가 고지방식이군에 비해서 유의적으로 감소됨을 확인하였으며 지방조직무게 감소는 된장 발효과정 중 aglycone 형태의 genistein, daidzein이 증가와 연관성이 있는 것으로 보인다고 언급함 (Kwak et al., 2012). 또한, genistein 및 daidzein을 단일성분으로 고지방식이에 첨가하여 항비만 효과를 알아본 연구에서도 동일하게 daidzein를 섭취한 경우 고지방식이보다 지방조직의 무게가 유의적으로 감소됨 (Guo et al., 2009, Lee et al., 2006).

Table 3-2. Adipose tissue weight in mice

Absolute adipose tissue weight (g)			
Diet	Epididymal fat	Retroperitoneal fat	Perirenal fat
Low-fat	0.87±0.29 ^a	0.21±0.11 ^a	0.09±0.05 ^a
High-fat	2.04±0.23 ^c	0.56±0.13 ^c	0.20±0.05 ^c
High-fat+DJ*	1.65±0.40 ^b	0.43±0.12 ^b	0.14±0.03 ^b
High-fat+SS*	2.14±0.28 ^c	0.55±0.11 ^c	0.19±0.05 ^c
Relative adipose tissue weight (% of body weight)			
Diet	Epididymal fat	Retroperitoneal fat	Perirenal fat
Low-fat	2.91±0.80 ^a	0.68±0.34 ^a	0.30±0.15 ^a
High-fat	5.38±0.53 ^b	1.45±0.22 ^b	0.51±0.10 ^b
High-fat+DJ	5.12±0.96 ^b	1.35±0.30 ^b	0.42±0.08 ^b
High-fat+SS	5.50±0.50 ^b	1.41±0.21 ^b	0.49±0.11 ^b

* DJ: Doenjang; SS: Steamed soy. Data are shown as the means ± SEM, and the different superscripts are significantly different at $P < 0.05$.

다. miRNA microarray 분석

(1) Global miRNA profilin

○ Microarray 분석을 통해 1,247개의 마우스 miRNA 중에서 샘플 모두 발현된 경우의 miRNA만을 data processing하여 272개의 miRNA가 선택되었고, 이중 통계학적으로 유의

적인 것은 33개로 확인되었음 (p-value < 0.05).

- 유사한 miRNA들은 유사한 발현 경향을 보인다는 가정하에 miRNA 발현정도를 기준 (p-value)으로 그룹화하여 계층군집분석 (Hierarchical clustering)을 진행하였고, Figure 3-1은 실험식이그룹간의 p-value 값이 0.05 이하로 유의적인 차이를 보인 miRNA만을 사용해서 샘플간의 발현을 heat-map으로 시각화하여 계층군집화함. 계층군집화는 실험식이군내의 샘플들의 평균값으로 수행하였으며, 고지방+대두식이 섭취군은 고지방식이 섭취군과 유사하게 묶여졌고 이에 고지방+된장식이, 저지방식이 섭취군순으로 miRNA들이 유사하게 군집화를 확인함.

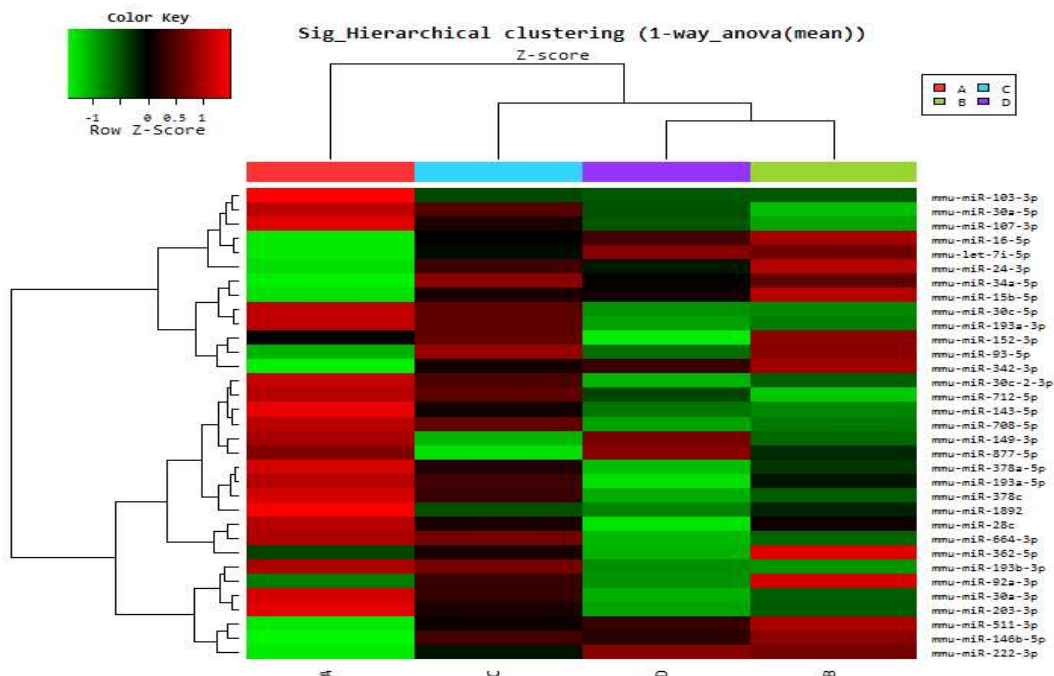


Figure 3-1. Analysis of miRNA expression in epididymal adipose tissue.

The microarray heat-map of 33 differentially expressed miRNAs among the dietary treatment groups (P<0.05 in one-way ANOVA). Each miRNA column reports to the sample mean (n=3). A: low-fat diet group, B: High-fat diet group, C: high-fat+DJ diet group, D: high-fat+SS diet group. DJ: Doenjang; SS: Steamed soy.

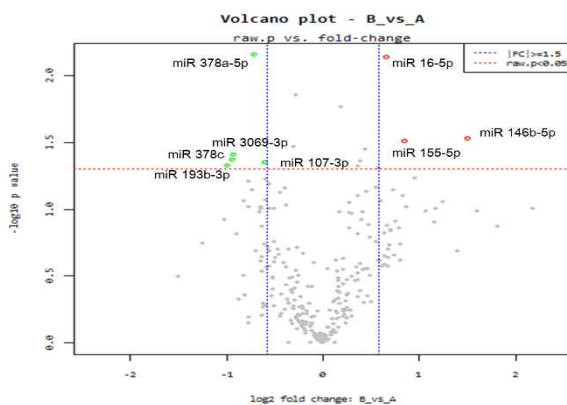
(2) DEG (Differentially expressed genes)

- 차별발현유전자들 (DEG, differentially expressed genes)은 Fold change와 p-value를 시각화한 volcano plot 분석을 진행하였고, 2개의 식이섭취 그룹간에서 유의적인 차이를 보인 miRNA를 확인함. 전체 miRNA를 대상으로 volcano plot을 그린 후 비교군간의

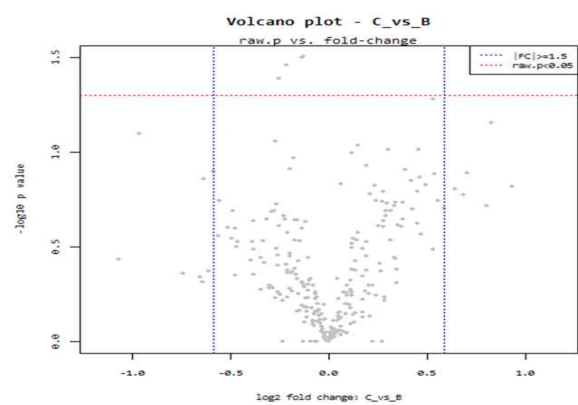
t-test에서 유의적으로 발현된 경우 ($p\text{-value} < 0.05$, $\text{fold change} \geq \pm 1.5$)는 추출하여 빨간색 ($p\text{-value} < 0.05$, $\text{fold change} \geq +1.5$)과 초록색 ($p\text{-value} < 0.05$, $\text{fold change} \geq -1.5$)으로 관련 miRNA를 표시함.

- 본 연구를 통해 저지방식이 섭취그룹과 고지방식이 섭취그룹간에서 8개 miRNAs가 유의적인 발현차이를 보였음 (Figure 3-2A & Table 3-3A). miR-378a-5p, miR-378c, miR-193b-3p, miR-107-3p, miR-3069-3p는 저지방식이 섭취그룹에 비해서 고지방식이 섭취그룹에서 유의적으로 감소된 반면, miR-146b-5p, miR-16-5p, miR-155-5p는 유의적으로 고지방식이 섭취그룹에서 증가되었음. 특히, 유의적인 차이를 보인 miRNA를 선행 연구의 비만유도 동물모델과 비교시 비만시에 영향을 받는다고 보고된 miRNA들이 본 연구에서도 동일하게 저지방식이 섭취군과 고지방섭취군에서 발현량의 변화를 보인 것을 확인하므로써 적합한 동물실험모델임을 확인함. 흥미롭게도, 본 연구를 통해서 아직 선행연구에도 miRNA 및 그 역할이 명확히 알려지지 않은 새로운 miRNA들이 발견됨. 고지방식이 섭취에 의한 비만유도모델의 지방조직에서 감소된 miR-3069-3p는 아직 모든 조직에서 그 역할 및 target gene에 대한 정보가 없으며, 고지방식이 섭취에 의해 증가된 miR-16-5p도 review 논문에서만 비만조직에서 증가된다고 보고될 뿐 직접적으로 분석되거나 언급된 적이 없는 miRNA로 지방조직 내에서 역할 확인이 전혀 진행되고 있지 않음. 또한, 비만상태에서 증가된 miR-155-5p도 인체 지방조직에서만 연구가 진행되었고, miR-193b-3p와 더불어 아직 동물 지방조직에서는 규명되지 않은 miRNA로 밝혀짐.

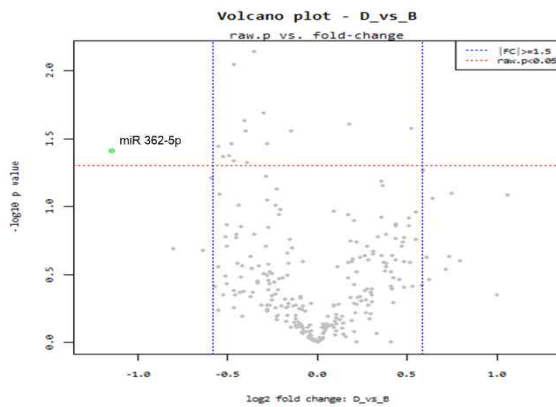
(A)



(B)



(C)



(D)

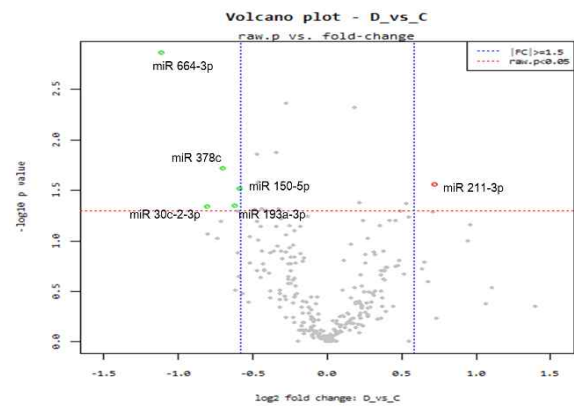


Figure 3-2. Volcano plots showing the change in miRNA expression between two experimental groups after 11 weeks of high-fat diet (n=3).

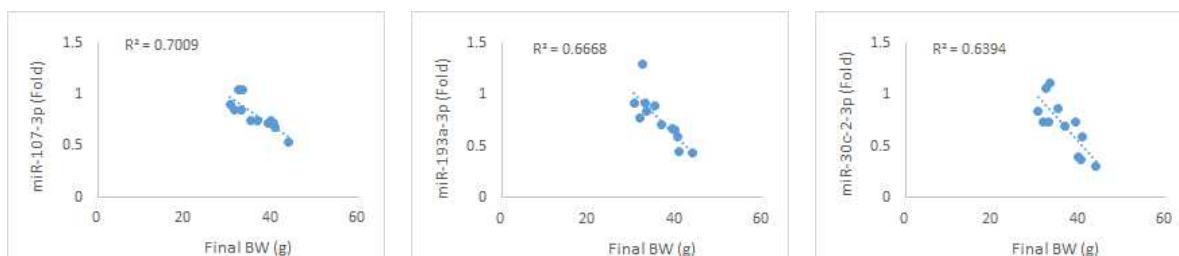
A: low-fat diet group, B: High-fat diet group, C: high-fat+DJ diet group, D: high-fat+SS diet group. DJ: Doenjang; SS: Steamed soy.

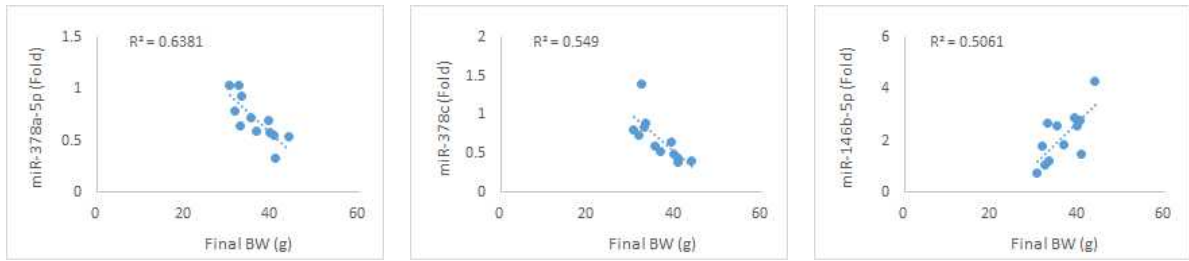
- t-test 분석에서 고지방식이 섭취그룹과 고지방+된장식이 섭취그룹간에서는 유의적인 차이를 보이는 miRNA가 없었고, 고지방식이 섭취그룹과 고지방+대두식이 섭취그룹간에서도 miR-362-5p만이 고지방+대두식이 섭취그룹에서 유의적으로 감소됨 (Figure 3-2B&C & Table 3-3B). 특히, miR-362-5p는 동물실험모델의 모든 조직에서 역할 및 target gene에 대한 정보가 알려져 있지 않아서 추후 대두의 효능지표로 활용할 수 있을 것으로 보임.
- 고지방+된장식이 섭취그룹과 고지방+대두식이 섭취그룹간에서는 5개의 miRNAs (miR-664-3p, miR-378c, miR-30c-2-3p, miR-150-5p, miR-193a-3p)들이 고지방+대두식이 섭취그룹에서 유의적으로 감소되었고, miR-211-3p만이 유의적으로 증가되었음 (Figure 3-2D & Table 3-3C). 본 연구에서 고지방+대두식이 섭취는 지방조직무게 및 간 조직 지질지표분석에서 고지방식이 섭취군과 유사한 결과를 보였는데, 고지방+된장식이 섭취군과 고지방+대두식이 섭취군에서 유의적인 차이를 보인 miRNA들은 대두와 구별되는 된장의 효능지표로서 사용할 수 있는 가능성을 보여주었음. 유의적인 차이를 보인 miRNA 중 고지방+대두식이 섭취군에서 감소된 miR-664-3p와 miR-150-5p 및 증가된 miR-211-3p는 비만동물모델의 지방조직에서 역할이 규명되지 않은 새로운 miRNA로 확인되었는데, 이는 추후 된장을 대두와 구별하는 miRNA 지표로 사용할 수 있는 것과 된장의 효능을 확인하기 위한 신규 miRNA로의 가능성을 제시함.

(3) miRNA와 체중 및 지방조직무게와의 상관관계

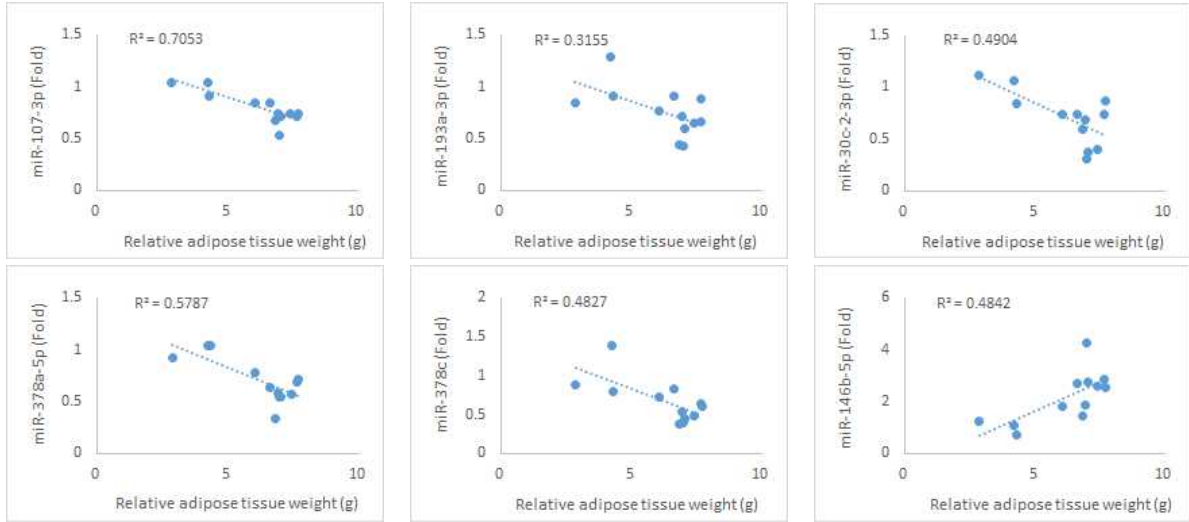
- 앞서 언급했듯 고지방+된장식이 섭취군은 체중 및 지방조직무게가 고지방식이 섭취군보다 유의적으로 감소되었는데 이들 지표가 유의적인 차이를 보인 miRNA들과 상관성을 확인할 필요가 있었음. 이에 두 실험식이군간에 유의적인 차이를 보인 miRNA들과 체중 (11주 실험식이 제공 후 final body weight) 및 지방조직무게 (epididymal + perirenal + retroperitoneal)와의 상관관계를 비교함.
- 선행연구를 통해 비만유도동물모델에서 영향을 받는다고 밝혀진 miRNAs를 비교시 miR-107-3p, miR-193a-3p, miR-30c-2-3p, miR-378a-5p, miR-378c은 고지방식이에 의해 체중이 증감됨에 따라서 음의 상관관계를 보인 반면, miR-146b-5p은 양의 상관관계를 보였음 (Figure 3-3A). 지방조직무게와의 연관성도 체중과 동일한 경향으로 나타났음 (Figure 3-3B). 하지만, miR-211-3p는 저지방식이와 고지방식이 섭취군간 사이에 유의적인 차이를 보였으나 체중이나 지방조직무게와는 연관성이 없는 것으로 나타남.
- 비만이 유도된 동물의 지방조직에서 역할이 아직 규명되지 않은 miRNA인 miR-664-3p, miR-3069-3p은 체중과 지방조직무게와 음의 상관관계를 보였으며, miR-150-5p, miR-16-5p, miR-362-5p은 고지방식이에 의해 비만이 증가함에 따라 발현량이 증가하는 양의 상관관계를 보였음 (Figure 3-3 C&D). 특히, 본 연구에서 된장식이 섭취에 의해서 유의적인 miRNA로 확인된 miR-664-3p와 miR-150-5p의 체중이나 지방조직무게의 상관관계는 식이에 의한 비만유도의 확인 또는 지방조직에 의해 유도되는 염증반응에서의 역할을 가늠할 수 있는 지표가 될 수 있을 뿐만 아니라 된장의 기능성 효능을 규명하기 위한 marker로 활용될 수 있을 것으로 사료됨. 또한, 추후 연구를 통해 다른 종류의 비만모델에서 기능성 효능에 대한 대사기전을 규명하는 척도로 사용될 수 있다는 것을 제시함.

(A)

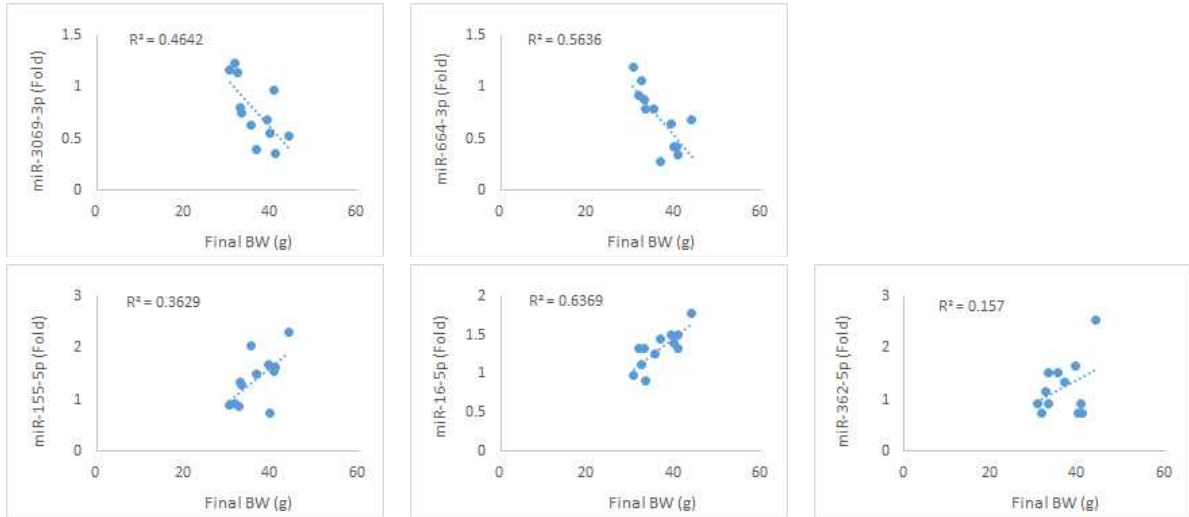




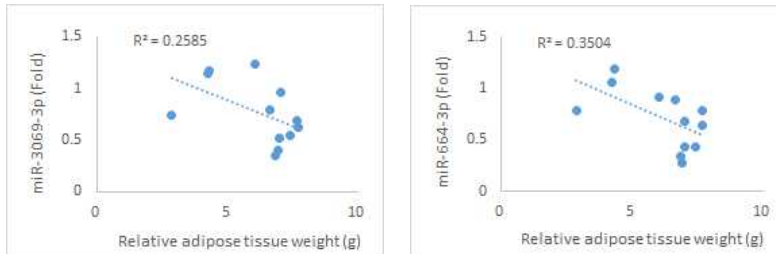
(B)



(C)



(D)



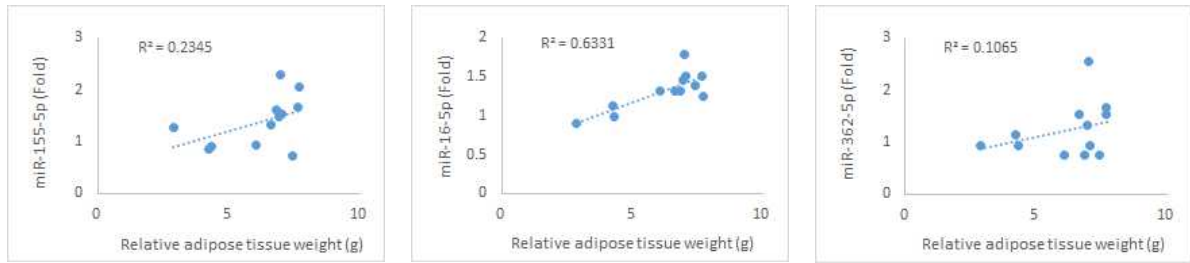


Figure 3-3. Correlation between the miRNA levels and body weight (A and C) and between the miRNA levels and relative adipose tissue weight (sum of epididymal, perirenal, and retroperitoneal; B and D). n=12

(4) target gene 검토

- miRNA의 프로그램을 통해 유의적으로 발견된 miRNA의 target gene 및 지방조직에서의 역할을 선행연구들과 비교하여 확인함 (Table 3-3). 본 연구를 통해 miR-378, miR-107들은 고지방식이그룹에서 지방축적이 증가됨에 따라서 유의적으로 감소된 반면, miR-146는 증가되었는데, 이는 선행연구 비교 시 동일한 경향으로 본 연구의 실험 모델이 고지방식이 섭취에 의한 지방축적 및 지방세포 분화를 유도하는데 적합한 실험 모델이었음이 확인됨.
- 본 연구에서 고지방식이와 저지방식이군간 및 된장식이 섭취를 통해 유의적인 차이를 보인 miRNAs의 target gene들은 지방조직에서 항염증 및 항비만 대사에 관여한다고 보고된 지표들을 중심으로 RNA 및 protein 수준에서 아래와 같이 진행함. 또한, target gene으로 보고된 정보가 부족하여 비만으로 증가되는 염증관련 지표들을 추가적으로 분석함.
- 이를 통하여 추가적인 연구가 필요하지만 저지방식이군과 고지방식이군간 및 된장식이 섭취군에서 새롭게 발견된 miRNAs는 지방조직에서는 adipogenesis에 관여하는 것보다는 산화스트레스나 염증 대사기전에 관여하는 miRNA로의 가능성을 제시하였음. 이는 현재까지 보고되지 않은 된장의 항염증효과를 확인하는데 유용한 miRNA 및 이의 target gene으로서 사용할 수 있으며, 다른 장류를 포함한 항염증물질의 기능성 효능을 확인할 수 있는 지표로 활용할 수 있음을 보여줌.

Table 3-3. Significantly regulated miRNAs between two groups in volcano plot

(A) high-fat diet vs. low-fat diet

miRNA	Gene expression	Expression in obesity	Function work	Target gene	Reference
miR-378a-5p	-1.6477	Decrease	Increases adipogenesis in HFD mice adipose (as miR-378)	PPAR γ	Chartoum-pekis, et al. 2012
		Increase	in 3T3L1 adipocyte (as miR-378)	C/EBP α , C/EBP β , C/EBP δ , PPAR γ 1, PPAR γ 2, PGC1 β	Gerin, et al. 2010
miR-378c	-1.6294	Decrease	Increases adipogenesis in HFD mice adipose (as miR-378)		Chartoum-pekis, et al. 2012
		Increase	in 3T3L1 adipocyte (as miR-378)	C/EBP α , C/EBP β , C/EBP δ , PPAR γ 1, PPAR γ 2, PGC1 β	Gerin, et al. 2010
miR-193b-3p	-1.9907	Decrease	Increase adipogenesis in pig adipose (as miR-193b-3p)		Ma et al. 2013
		Decrease	In human: associated with BMI (as miR-193b-3p)		Meerson, et al. 2013
		Decrease	Increases brown fat differentiation	Lrp3, C/EBP α , FABP4, PPAR γ	Sun, et al. 2011
miR-107-3p	-1.5147	Increase	Increase adipogenesis in <i>ob/ob</i> mice liver and adipose (as miR-107)	C/EBP β , PPAR γ , FABP4	Trajkovski, et al. 2011
		Decrease	- Fat cell development -> increase - obese state -> decrease (as miR-107)		Xie, et al. 2009b

		Decrease	In mice adipocyte (as miR-107)	TNF α , LPL, PPAR α , CPT1b	Parra, et al. 2010
miR-3069-3p	-1.9124	-*	Bioinformatically Predicted miRNA	HMGCS1, SCD1	
miR-146b-5p	+2.8387	Increase	Promotes adipogenesis in mature 3T3L1 adipocyte (as miR-146b)	SIRT1, C/EBP α , PPAR γ , AP2, FOXO1	Ahn, et al. 2013
		Increase	Increase adipogenesis in <i>ob/ob</i> mice adipocyte (as miR-146b)		Xie, et al. 2009b
		Increase	Increases adipogenesis in HFD mice adipose (as miR-146b)		Chartoumpekis, et al. 2012
miR-16-5p	+1.5754	Increase	Increases adipogenesis in obese mice adipocyte (as miR-16, but only mentioned in this review paper)		Xie, et al. 2009a
		-	In various human cells (as miR-16)	RARS, SLUG; SNAI2, SNX2, SPTBN1	Calin, et al. 2002
miR-155-5p	+1.7906	Increase	Increases in inflammation Associated with BMI in human (miR-155-5p)		Civelek, et al. 2013
		Increase	Increases in mice liver macrophage fed high-fat diet damage (as miR-155)	LXR α	Miller, et al. 2013
		Increase	Increases in human subcutaneous adipose tissue (as miR-155)		Klötting, et al. 2009

(B) high-fat+SS** diet vs. high-fat diet

miRNA	Gene expression	Expression in obesity	Function work	Target gene	Reference
miR-362-5p	-2.2117	-	Increases in mice renal		Liu, et al.

			ischemia/ reperfusion (I/R) injury (as miR-362-5p)		2012
--	--	--	--	--	------

(C) high-fat+SS diet vs. high-fat+DJ diet

miRNA	Gene expression	Expression in obesity	Function work	Target gene	Reference
miR-664-3p	-2.1620	-	Increases adipogenesis in the stroma of human adipose tissue (as miR-664)		Zaragosi, et al. 2011
miR-378c	-1.6294	Decrease	Increases adipogenesis in HFD mice adipose (as miR-378)		Chartoumpekis, et al. 2012
		Increase	In 3T3L1 adipocyte (as miR-378)	C/EBP α , C/EBP β , C/EBP δ , PPARg1, PPARg2, PGC1 β , PPARg	Gerin, et al. 2010
miR-30c-2-3p	-1.7460	Decrease	Increases adipogenesis in <i>ob/ob</i> mice adipocyte (as miR-30c)		Xie, et al. 2009b
		Increase	Increases adipogenesis in the stroma of human adipose tissue (as miR-30c)	RUNX2	Zaragosi, et al. 2011
		Increase	Induces ER stress in NIH-3T3 fibroblasts, MEFs, and HeLa cell (recently as miR-30c-2-3p)	PERK, XBP1	Byrd, et al. 2012
miR-150-5p	-1.5075	Decrease	in the adipose tissue of patients with NASH (as miR-150)	TNFSF14	Estep, et al. 2010
		Increase	in subcutaneous adipose tissue from obese (in human as miR-150)	PGC1 α	Martinelli, et al. 2010
miR-193a-3p	-1.5350	Decrease	Increases brown fat		Chartoum-

			differentiation Increases adipogenesis in HFD mice (as miR-193a-3p)		pekis, et al. 2012
		Decrease	In pre-adipocytes and mature adipocytes between subcutaneous fat cells from obese and lean individuals (as miR-193a-3p)		Ortega, et al. 2010
		-	In primary brown adipocytes and SVF cells (as miR-193a)	PPAR α , PGC1 α , UCO1, PRDM16, CIDEA, FABP4, PPARg	Sun, et al. 2011
		-	In human: associated with BMI (as miR-193a-3p)		Meerson, et al. 2013
miR-211-3p	+1.6461	Increase	In mice bone marrow cell (as miR-211)	RUNX2	Wang, et al. 2013
		Increase	Induces during adipocyte differentiation in C3H10T1/2, C2C12, ST2, and BMSCs cell (as miR-211)		Huang, et al. 2010

* (-) represents the unreported data

** DJ: Doenjang; SS: Steamed soy

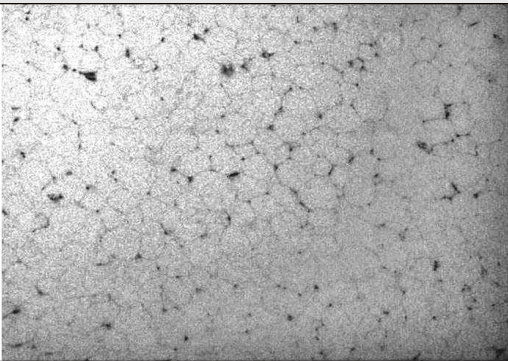
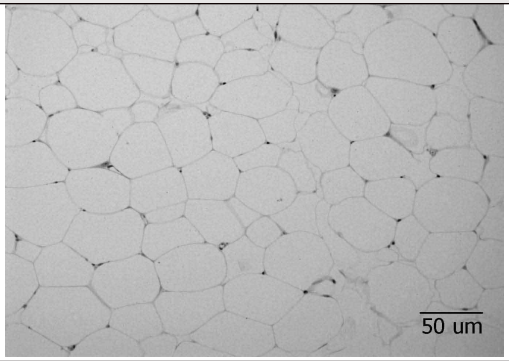
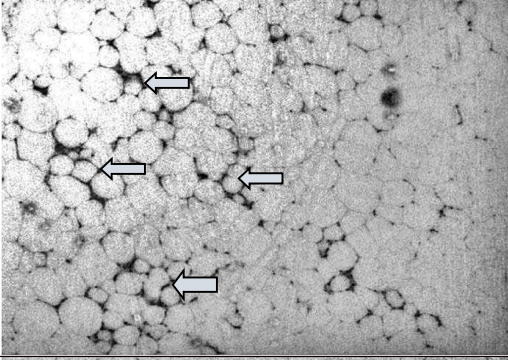
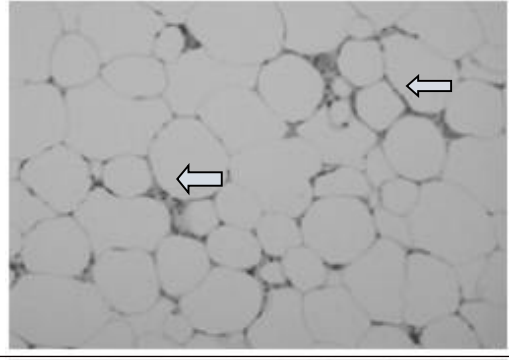
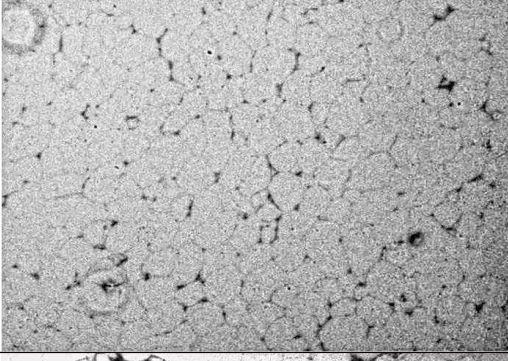
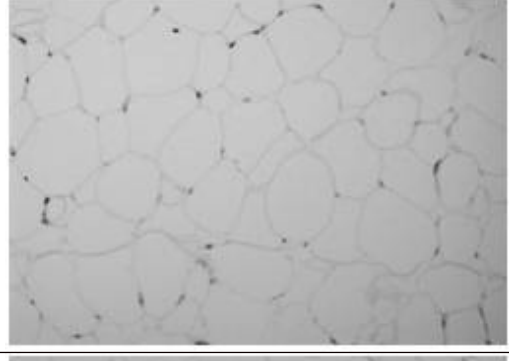
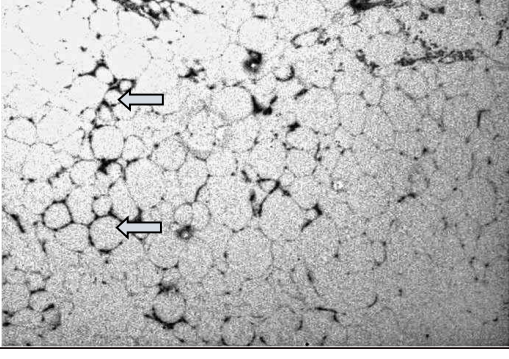
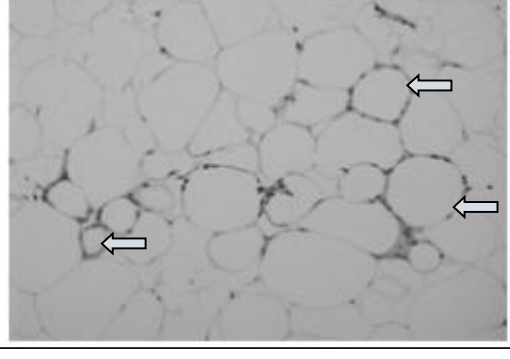
라. Adipocyte morphology

(1) H&E staining

- 저지방식이 섭취군은 고지방식이 섭취군에 비하여 지방세포 사이즈가 작고, 단면적당 지방세포 수가 많음을 확인할 수 있었음 (Figure 3-4). 그러나 고지방+된장식이나 고지방+대두식이 섭취군에 의해서는 뚜렷한 감소효과는 관찰되지 않았음. 고지방식이 섭취군과 고지방+대두식이 섭취군에서는 특히 다른 2군에 비해 CLS (crown-like

structure)가 상대적으로 많이 관찰되었으며, 이는 고지방식이 섭취군과 고지방+대두식이 섭취군에서 염증반응이 증가되었음을 의미하며 대두의 항염증효과는 미미한 것으로 사료됨.

Figure 3-4. Adipocyte morphology from epididymal adipose tissue (x40, x200 view)

Diet	x40	x200
Low-fat		
High-fat		
High-fat+DJ*		
High-fat+SS*		

* DJ: Doenjang; SS: Steamed soy

**Arrow indicates Crown-like structure

(2) 지방세포 수 및 사이즈

- 식이섭취군간 지방세포의 수와 사이즈를 측정하여 평균값을 구함 (Table 3-4). 저지방식이 섭취군에서 지방세포수가 고지방 식이를 섭취한 다른 군에 비해 많음을 확인하였음. 반면에 지방세포 사이즈는 저지방식이 섭취군에 비해 고지방식이 섭취군, 고지방+된장식이 **섭취군**, 고지방+대두식이 섭취군에서 상대적으로 증가됨이 확인됨. 선행연구에 의하면, 고지방식이에 된장을 첨가한 경우 고지방식이 **섭취군**에 비해서 유의적으로 지방조직 사이즈가 감소됨 (Kwak et al., 2012), 본 연구와 달리 된장을 함께 공급시 유의적으로 지방조직의 사이즈가 감소한 것은 선행연구의 식이 내 된장의 함량이 20%로, 본 연구보다 공급량이 더 많아 항비만 효과가 큰 것으로 판단됨. genistein 을 고지방식이와 함께 공급한 경우에서도 genistein 의 섭취량이 증가할수록 지방조직 사이즈가 감소된다고 보고함 (Nazz et al., 2003). 된장의 발효 과정 중 증가되는 aglycone 형태의 genistein 이 지방조직 사이즈 감소에 관여된다고 보고함 (Kwak et al., 2012).

Table 3-4. Adipocyte number and size among the treatment groups (x200 view, n=5)

Diet	Number	Size (μm)
Low-fat	43.4 \pm 2.6 ^b	83.3 \pm 5.8 ^a
High-fat	28.4 \pm 3.9 ^a	111.1 \pm 4.6 ^b
High-fat+DJ*	29.3 \pm 4.4 ^a	102.7 \pm 8.4 ^b
High-fat+SS*	25.6 \pm 3.1 ^a	106.2 \pm 4.8 ^b

* DJ: Doenjang; SS: Steamed soy. Data are shown as the means \pm SEM, and the different superscripts are significantly different at $P < 0.05$.

마. 산화스트레스 및 염증 지표 분석

(1) 산화스트레스 지표 관련

- HO-1 은 산화스트레스에 의해 유도되는 단백질로 산화 스트레스의 정도에 따라 세포 보호를 위해 HO-1 이 분비됨. 단백질 수준에서 HO-1 을 측정한 결과, 저지방식이 섭취군과 고지방+된장식이 섭취군이 고지방식이 섭취군보다 발현량이 감소하는 경향을 보였음 (Figure 3-5A). HO-1 mRNA 분석에서는 고지방+된장식이 섭취군이 고지방식이 섭취군에 비해서 유의적으로 감소되어서 지방조직에서 된장의 항산화스트레스 효과는

transcriptional 수준에서 더 영향을 받은 것으로 사료됨 (Figure 3-5B).

- Protein 은 산화스트레스에 의해 아미노산 잔기가 carbonyl group 으로 산화되는데, 된장의 항산화 효과를 보기 위하여 protein carbonylation 을 측정함 (Figure 3-6A). Protein carbonylation 은 고지방식이 섭취군이 저지방식이 섭취군보다 많이 발생한 것으로 나타남. 고지방+된장식이 섭취군도 고지방식이 및 고지방+대두식이 섭취군보다 protein carbonylation 이 덜 일어난 것으로 보아 된장의 잠재적 항산화 효과를 확인할 수 있음. 고콜레스테롤식이군과 된장을 첨가한 경우의 간조직에서 항산화 효소 발현정도와 산화스트레스 지표인 과산화물 생성량을 비교한 선행연구에서 된장을 섭취한 군에서 유의적으로 항산화효과가 증가됨을 확인하였고 (Lee et al., 2010), 된장의 항산화 효과는 대두 발효과정 중에 증가되는 페놀산 및 단백질 함량과 연관성이 있다고 보고함 (Chai et al., 2012).

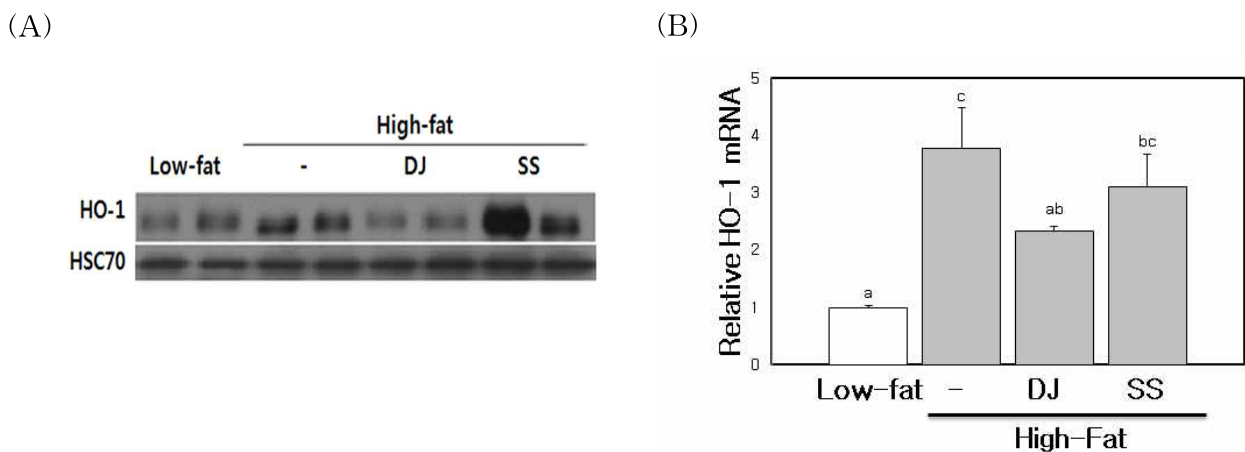


Figure 3-5. Adipose HO-1 expression by (A) Western blotting (n=4) and (B) qRT-PCR (n=3-4).

DJ: Doenjang; SS: Steamed soy. Data are shown as the means \pm SEM, and bars with different superscripts are significantly different at $P < 0.05$.

(2) 염증 지표 관련

(가) p-JNK 측정

- JNK 는 Death Receptor 에 TNF- α 등의 ligand 가 결합하고 ASK1 이 활성화되면서 활성형태인 phosphorylation 이 됨. 활성화된 p-JNK 는 adipose tissue macrophage 를 ml

macrophage polarization 로 촉진시키며, inflammatory cytokine 의 분비량을 증가시켜 염증반응을 일으킨다고 알려진 p-JNK 를 단백질 수준에서 측정함 (Figure 3-6B). 고지방식이 섭취는 지방조직에서 p-JNK 증가에 의해 염증반응을 유도하지만, 된장을 섭취할 경우 염증반응이 감소하는 경향을 보임.

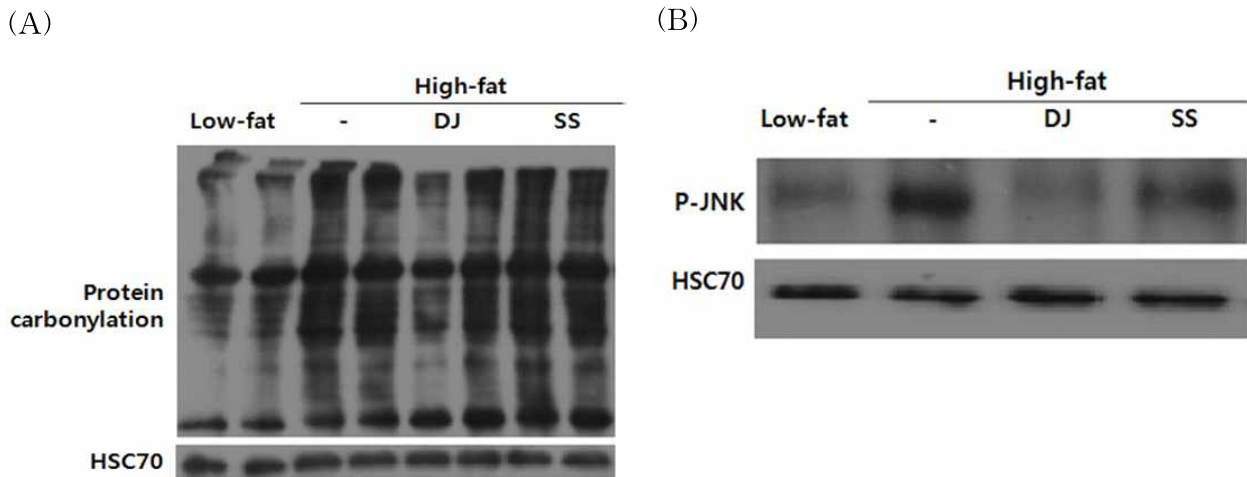


Figure 3-6. Adipose protein expression of (A) protein carbonylation and (B) p-JNK by Western blotting.

DJ: Doenjang; SS: Steamed soy.

(나) Macrophage infiltration과 phenotype switch 관련

- CD68 은 adipose tissue 내로 침투된 total macrophage 함량을 알 수 있는 total macrophage marker 로 지방조직의 염증반응이 심해질수록 macrophage infiltration 이 증가되며 이에 따라 조직 내 total macrophage 함량이 많아짐. 본 연구에서는 실험식이 섭취기간 macrophage infiltration 을 확인하기 위해 CD68 mRNA 수준을 측정함. 고지방식이 섭취군에서 저지방식이와 고지방+된장식이 섭취군보다 유의적으로 CD68 mRNA 발현량이 증가해 (Figure 3-7A), 고지방식이 섭취가 지방조직 내 macrophage infiltration 을 촉진한다는 것을 보여줌. 고지방+된장식이 섭취군과 고지방+대두식이 섭취군간에는 유의적인 차이는 없으나 고지방+된장식이 섭취군이 고지방+대두식이 섭취군에 비해 CD68 mRNA 발현량이 감소하는 경향을 보여주어서 대두보다는 된장이 고지방식이에 의해 유도된 macrophage infiltration 을 완화시키는 항염증 효과가 있는 것으로 사료됨.
- 지방조직의 염증반응이 악화되면 macrophage 의 phenotype switch 가 발생하여 m2 (alternatively activated) macrophage 에서 m1 (classically activated) macrophage 가

유도됨. CD11c는 m1 macrophage marker로 알려져 있으며, 식이별 m1 macrophage 발현량을 확인하기 위하여 mRNA 수준에서 측정하였음. CD68의 결과와 동일하게 고지방식이 섭취군이 저지방식이와 고지방+된장식이 섭취군보다 유의적으로 CD11c mRNA 발현량이 증가하였음 (Figure 3-7B). 이는 고지방식이 섭취군이 m2 type에서 m1 type으로의 macrophage phenotype switch를 더 촉진시킨다는 것을 보여줌. 고지방+된장식이와 고지방+대두식이 모두 CD11c 발현량을 유의적으로 감소를 관찰하였으며, 이는 고지방식이에 의해 유도된 macrophage phenotype switch를 억제시키는 효과가 있음을 보여줌.

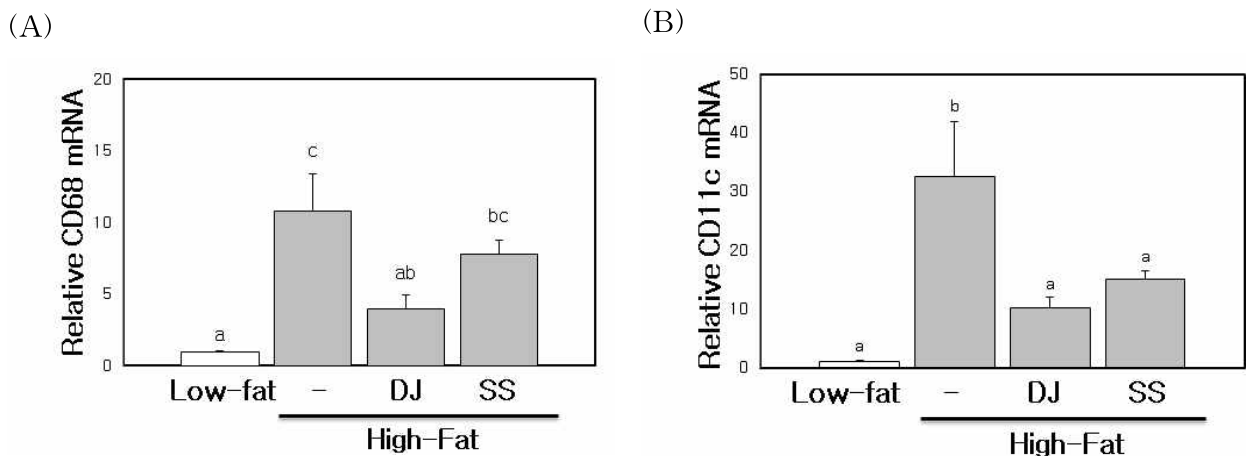


Figure 3-7. Adipose (A) CD68 and (B) CD11c mRNA expression by qRT-PCR (n=3-4).

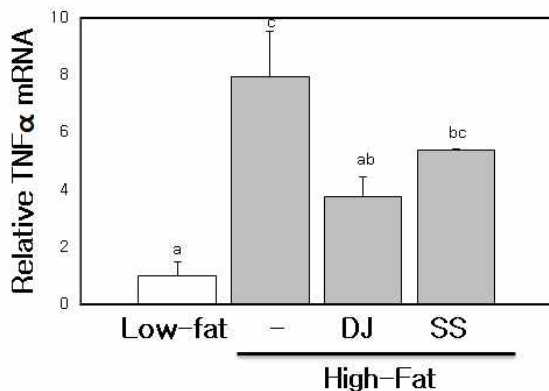
DJ: Doenjang; SS: Steamed soy. Data are shown as the means \pm SEM, and bars with different superscripts are significantly different at $P < 0.05$.

(다) Pro-inflammatory 및 anti-inflammatory adipokine 관련

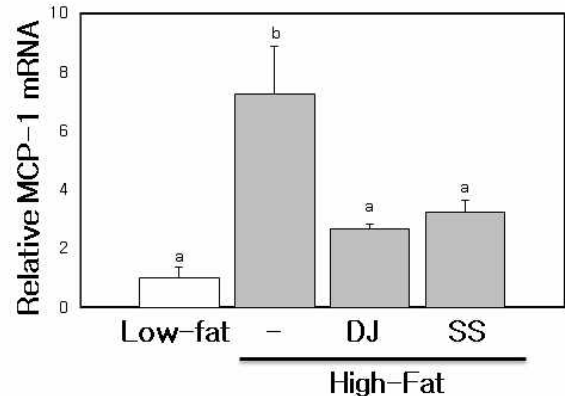
- TNF α 는 pro-inflammatory adipokine으로 지방조직의 염증반응을 촉진함. 고지방식이 섭취군은 저지방식이 섭취군과 고지방+된장식이 섭취군보다 유의적으로 TNF α mRNA 발현량이 증가함 (Figure 3-8A). 고지방+된장식이 섭취군과 고지방+대두식이 섭취군간은 유의적인 차이는 없이 고지방+대두식이 섭취군에서 낮은 경향을 보임. 고지방식이 섭취는 pro-inflammatory adipokine인 TNF α 분비를 증가시켜 염증반응을 촉진하지만, 된장을 섭취할 경우 TNF α 분비량을 완화시키는 항염증 효과가 있음을 보여줌. 지방조직이 제외된 혈장, 신장, 간 등의 조직에서 된장의 항염증 효과를 증명한 선행연구에 의하면 혈장에서 된장이 첨가된 경우 고지방식이군보다 TNF α 농도가 유의적으로 감소되었으며 (Park et al., 2012), 메주를 섭취한 경우에도 TNF α 농도가 고지방식이 섭취그룹에 비해 유의적으로 감소됨을 확인함 (Kim, 2014).

- MCP-1 은 chemokine 으로 monocyte-macrophage 의 specific receptor 인 CCR 또는 CXCR 과 결합하여 adipocyte 내로 macrophage 침투를 촉진시킴. 고지방식이 섭취군은 저지방식이 섭취군에 비해 유의적으로 MCP-1 mRNA 발현량이 증가됨 (Figure 3-8B). 고지방+된장식이 섭취군과 고지방+대두식이 섭취군도 고지방식이 섭취군과 비교시 유의적으로 MCP-1 mRNA 발현량이 감소됨. 고지방식이 섭취는 지방조직에서 MCP-1 을 증가시켜 macrophage infiltration 을 유도하고 염증반응을 촉진한다는 것을 보여주며, 된장과 대두의 섭취는 MCP-1 발현량을 완화시켜 항염증 효과를 가져올 수 있음을 보여줌.
- TLR4 는 adipocyte 와 macrophage 막에 존재하는 막단백질로 유리지방산과 TNF α 를 ligand 로 인해 활성화됨. 선행연구에 의하면 비만에서 TLR4 가 증가한다고 보고되었으나 본 연구에서는 식이섭취군간에 유의적인 차이를 보이지 않음 (Figure 3-8C).
- Adiponectin 은 anti-inflammatory adipokine 으로 혈당조절 등에 관여하며, 선행연구에 의하면, 고지방식이에 의해 비만이 유도된 경우 adiponectin 의 분비량이 감소된다고 함. 저지방식이 섭취군은 고지방식이 섭취군에 비해 유의적으로 adiponectin mRNA 발현량이 증가됨 (Figure 3-8D). 고지방+된장식이 섭취군은 유의적인 차이없이 고지방식이 섭취군에 비해 adiponectin mRNA 발현량이 증가하는 경향을 보임. 고지방식이에 된장을 첨가한 선행연구에 의하면 혈장 adiponectin 농도가 고지방식이군에 비해서 증가하는 경향을 보였음 (Park et al.. 2012).

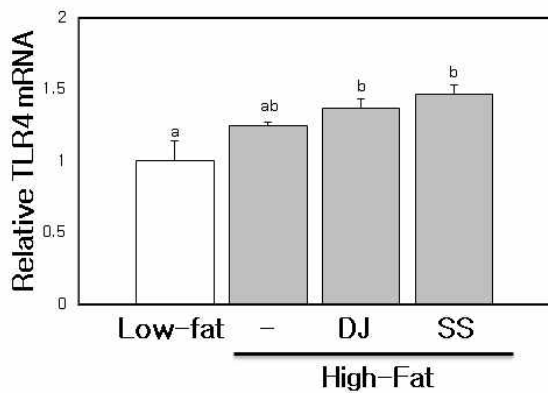
(A)



(B)



(C)



(D)

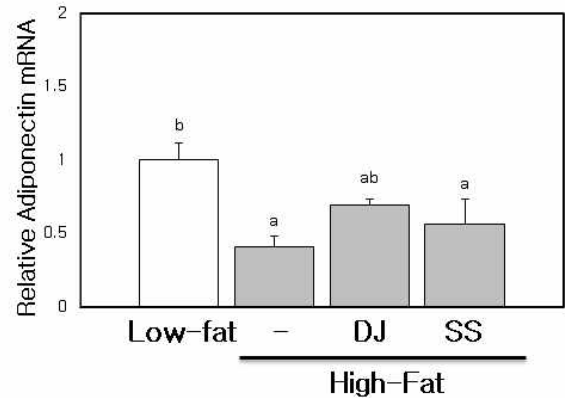


Figure 3-8 Adipose (A) $TNF\ \alpha$, (B) MCP-1, (C) TLR4, and (D) Adiponectin mRNA expression by qRT-PCR (n=3-4).

DJ: Doenjang; SS: Steamed soy. Data are shown as the means \pm SEM, and bars with different superscripts are significantly different at $P < 0.05$.

(라) Fibrosis 관련

- Fibrosis(섬유화)는 지방조직의 기능부전 (adipose tissue dysfunction)에 중요한 역할을 하며, adipocyte는 물리적 지지 및 다른 신호전달 체계에 관여하는 extracellular matrix protein에 둘러싸여 있음. 보통 지방조직은 뛰어난 extracellular matrix 유연성으로 지방조직 크기를 조절하지만 비만일 경우 과도한 extracellular matrix protein의 축적으로 인해서 유연성 및 조직 plasticity를 감소시켜 지방조직의 dysfunction을 유발함.
- $TGF\ \beta$ 는 macrophage에서 분비되는 물질로 지방조직의 섬유화를 촉진시킴. 고지방식이 섭취군은 저지방식이 섭취군과 고지방+된장식이 섭취군에 비해 유의적으로 $TGF\ \beta$ mRNA 발현이 증가됨 (Figure 3-9A). 고지방+된장식이 섭취군과 고지방+대두식이 섭취군간에는 유의적인 차이없이 된장 섭취에서 감소하는 경향을 보였음. 고지방식이 섭취는 $TGF\ \beta$ 분비를 증가하여 섬유화를 촉진하지만, 된장을 섭취하는 경우 $TGF\ \beta$ 분비를 감소시켜 지방조직의 섬유화 억제 효과가 있음을 보여줌.
- 또한, 과도한 extracellular matrix protein의 축적은 Collagen I, III, IV와 같은 섬유성 물질이 과도하게 합성되어 일어남. 고지방식이 섭취군은 저지방식이 섭취군에 비해 유의적으로 $Col1\ mRNA$ 발현량이 증가됨 (Figure 3-9B). 고지방+된장식이 섭취군은 고지방식이 섭취군보다 유의적인 차이없이 $Col1\ mRNA$ 발현량이 감소하는 경향을

보였음. 고지방식이 섭취는 저지방식이 섭취보다 지방조직의 extracellular matrix protein 축적을 증가시켜 지방조직 섬유화를 유도함을 보여줌.

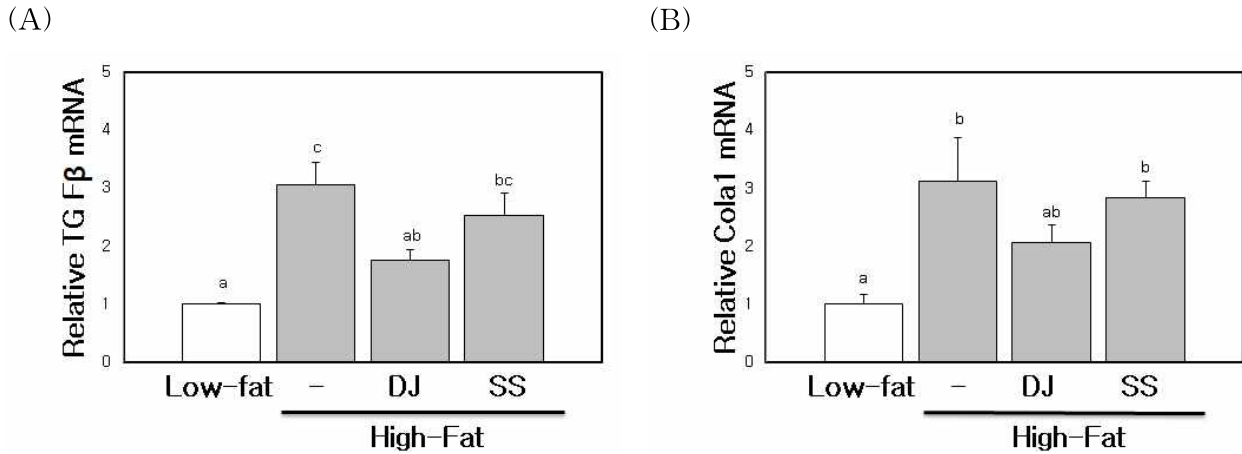


Figure 3-9. Adipose (A) TGFβ and (B) Cola1 mRNA expression by qRT-PCR (n=3-4).

DJ: Doenjang; SS: Steamed soy. Data are shown as the means ± SEM, and bars with different superscripts are significantly different at $P < 0.05$.

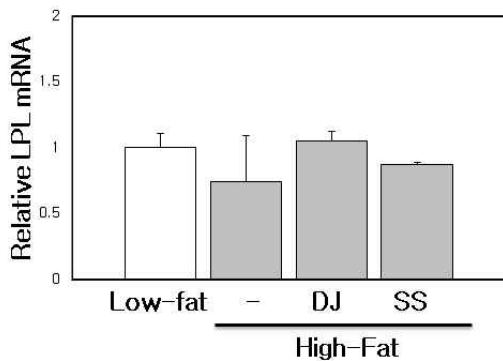
(마) Adipogenesis 관련

- 선행연구에 의하면, lipoprotein lipase (LPL)가 miR-107-3p의 target gene으로 알려짐. LPL은 비만에서 활성이 떨어져서 중성지방 clearance가 감소되는 것으로 보고되었으나 (Mitro et al., 2013), LPL 결핍의 동물실험에서는 혈중의 지표는 악화시키지만 지방조직의 중성지방 축적과는 independent하게 작용한다고 언급함 (Gokdberg et al., 2009), 또한, 지방조직에서 LPL은 식이성분에 의해 크게 영향을 받지 않는다고 보고되었음 (Shillabeer et al., 1990). 본 연구에서는 식이섭취군간 LPL mRNA 발현수준의 유의적인 차이가 나타나지 않음 (Figure 3-10A).
- 미토콘드리아에서 지방산 산화에 관여하는 CPT1b도 식이섭취군간 유의적인 차이를 보이지 않았으며, miR-107-3p의 target gene으로 알려짐 (Figure 3-10B). 고지방식이에 된장을 첨가한 선행연구의 간조직에서는 CPT1b 발현이 고지방식이군에 비해서 증가되었으며, 이는 된장 발효과정 중에 생기는 다양한 bioactive compounds에 의한 것이라고 설명함 (Kwak et al., 2012).
- Phosphatidate phosphatase activity 기능을 가지며, 정상 지방조직의 development와

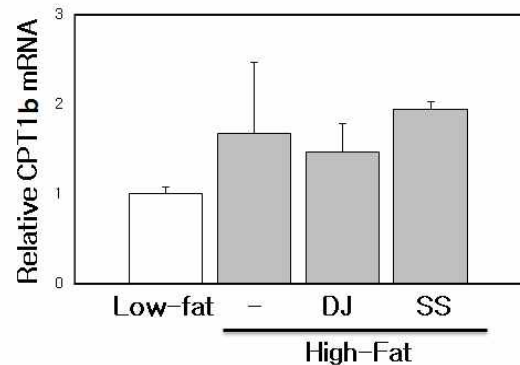
중성지방대사를 조절하는 Lipin1 은 PPAR gamma 전에 발현되는 유전자로 비만에서 Lipin1 의 감소는 지방 염증을 악화시킨다고 보고됨. Lipin1 은 miR-155-5p 의 target gene 으로 알려져 있으며, 본 연구에서는 실험식이군간에 유의적인 차이를 보이지 않음 (Figure 3-10C).

- Adipocyte differentiation 을 촉진하는 PGC1 α mRNA 발현은 비만상태에서는 감소되며 miR-150-5p 의 target gene 으로 알려져 있음. 저지방식이 섭취군이 고지방식이 섭취군에 비해 유의적으로 PGC1 α mRNA 발현량이 증가됨 (Figure 3-10D). 고지방+된장식이 섭취군과 고지방식이 섭취군간에 PGC1 α 의 발현량의 차이는 없었음. 고지방식이 섭취는 저지방식이 섭취보다 PGC1 α 발현량이 감소되어 지방조직에서 adipogenesis 및 differentiation 을 억제하는 것을 보여줌.
- PPAR gamma 는 지방조직에서 지방산을 지방으로 합성하여 저장하고, adipocyte differentiation 에 관여한다고 알려있으며, 본 연구에서는 실험식이 섭취군간 유의적인 차이를 보이지 않음 (Figure 3-10E). PPAR gamma 는 miR-378a-5p, miR-378c, miR-107-3p, miR-146b-5p 및 miR-150-5p 의 target gene 으로 알려져 있음.

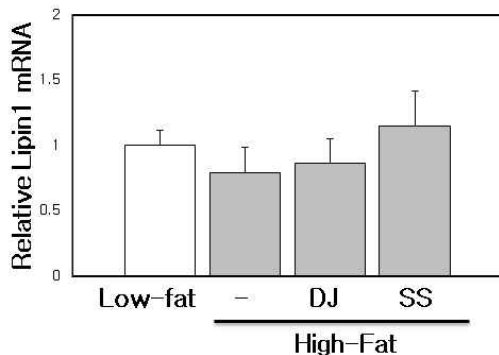
(A)



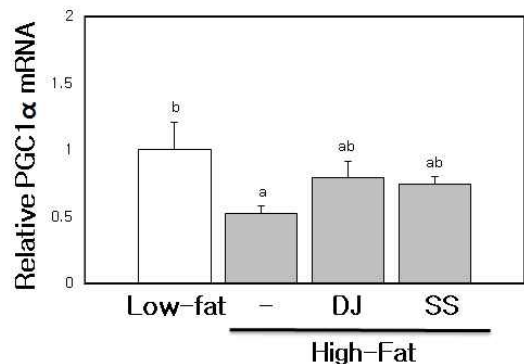
(B)



(C)



(D)



(E)

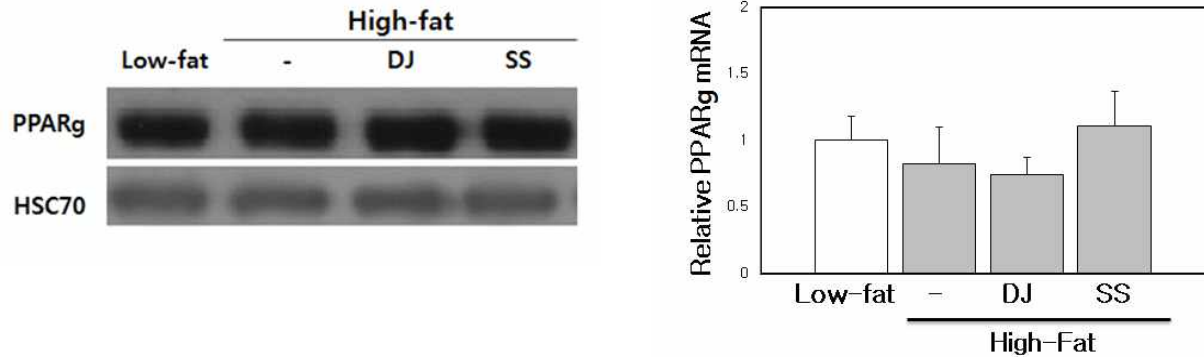


Figure 3-10. Adipose (A) LPL, (B) CPT1b, (C) Lipin1 (D) PGC1 α , and (E) PPAR gamma mRNA expression by qRT-PCR and protein expression by Western blotting (n=3-4).

DJ: Doenjang; SS: Steamed soy. Data are shown as the means \pm SEM, and bars with different superscripts are significantly different at $P < 0.05$.

제 4 절 결론 및 제언

1. 한식된장과 전통된장의 발효숙성기간에 따른 활성성분 분석 및 *in vitro* 모델에서 항산화·항염증 효과 검증

- 찐대두에 *Aspergillus Oryzae*와 *Bacillus Subtilis* 미생물을 접종하여 발효시킨 메주를 소금물에서 2차 발효시킨 후 간장을 분리하고 담근 된장을 숙성시키는 과정에서 폴리페놀함량과 aglycone isoflavone 함량이 점차적으로 증가하였으며 항산화효과도 증가하였다. 그러나, 숙성과정에서 3개월 이후 12개월까지 총 폴리페놀 함량과 aglycone isoflavone 함량은 거의 비슷함에도 불구하고 항산화효과(환원력)와 항염증효과는 12개월 숙성된 된장이 가장 높았기 때문에 폴리페놀 함량이나 aglycone isoflavone의 함량이 증가하는 것만으로는 그 효과를 설명하기에 부족하다.
- 찐대두에서는 항염증효과가 없었으나 12개월 정도 충분히 숙성된 된장의 디클로로메탄(DM) 분획추출물과 에틸아세테이트(EA) 분획추출물이 LPS를 처리한 RAW 264.7 세포에서 NF- κ B의 활성화를 억제함으로써 iNOS와 COX-2 효소의 합성을 억제하였고 결과적으로 염증반응을 증가하는 NO, PGE2 및 염증성 cytokine인 IL-6의 생성을 억제시켰음을 본 연구에서 처음으로 밝혔으며 이는 매우 의미 있는 일이라 하겠다. 또한, 이러한 결과는 한식의 세계화에 큰 도움이 될 것이며, 앞으로 보다 기능성이 향상되고 과학적인 품질관리를 통하여 질적으로 우수한 된장 제조과정의 개선에도 도움을 줄 수 있을 것이다.
- 된장의 항염증효과의 작용기전에 대하여는 여러 조건 하에서 다양한 된장샘플의 추출물 및 유효성분 후보 등을 대상으로 NF- κ B 경로 뿐 만 아니라 AP-1, C/EBP, HO-1 경로 등에 대하여도 폭넓게 연구되어야 할 것이다.
- genistein이나 daidzein과 같은 aglycone isoflavone을 제외하고는 된장에서 어떤 성분이 항산화효과 또는 항염증효과를 나타낼 가능성이 있을지 추정할 수 있는 결과를 제시한 연구보고는 없었다. 본 연구 결과를 바탕으로 항염증효과에 대한 유효성분은 DM과 EA 추출분획 중에 있는 비극성의 폴리페놀계 물질로 추정된다. 따라서, 추후 된장의 DM 및 EA 분획추출물에서 항산화 및 항염증 효과를 갖는 유효성분을 탐구하고, 발효숙성과정에서 이들 활성물질의 생성증가와 된장 미생물과의 관계에 대한 연구가 이어질 수 있기를 기대한다.

2. *in vivo* 동물모델에서 전통된장의 항산화·항염증·항비만 효과 검증

- 된장 섭취는 고지방식이에 의한 체중의 증가를 억제하는 효과가 있음을 확인하였다. 그러나 찌대두는 체중 증가를 억제하지 못하는 것으로 관찰되었다. 또한, 고지방식으로 인해 지방이 간조직과 지방조직에 축적되었고($p < 0.05$), 된장섭취 군에서는 지방축적이 유의적으로 감소하였다. 이에 따라 된장의 항비만 효과가 인정되었다.
- 비만에 의하여 증가하는 혈액의 Leptin이 된장에 의해 유의적으로 억제되었고 인슐린 저항성에 의해 증가한 혈당 및 인슐린의 변화가 된장에 의해 감소되는 경향이 관찰되었다.
- 간조직의 염증을 나타내는 혈액 생화학적 지표인 AST와 ALT 및 MCP-1 염증매개 인자는 고지방식이에 의해 유의적으로 증가하였고, 된장급이에 의해 염증지표들의 증가가 억제되었으나, TNF-alpha와 CRP의 ELISA 분석은 군 간의 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 간의 조직병리 결과 고지방식으로 인한 염증소견이 관찰되지 않은 것으로 보아 45% kcal 고지방 식이는 간에서 염증을 유발하기에 충분한 식이 조건이 아닌 것으로 판단되며 따라서, 혈액에서의 염증 매개 인자들에 있어서 변화가 충분히 일어나지 않은 것으로 사료된다. 또한, *in vitro* 실험에서 확인된 된장의 염증 효능은 ethanol 추출물에서는 미약하였으나, DM과 EA 분획에서 유효물질을 농축시켰을 때 유의적인 항염증 효능이 관찰된 것으로 *in vivo* 결과와 상이한 결과로 평가할 수 없다.
- 간조직에서 항산화 효소의 활성은 군 간에 유의적인 차이를 나타내지 않았고 지질 산화 지표인 TBARS도 간조직에서 군 간에 차이를 보이지 않았음. 환원력을 나타내는 total antioxidant potential (FRAP)도 혈액에서 군 간에 유의적인 변화가 관찰되지 않아 된장의 항산화효능은 본 실험 조건에서 인정되지 않았다. *in vitro*에서 관찰된 항산화 효과가 *in vivo*의 혈액과 간균질액에서는 관찰되지 않았다. *in vitro* 실험에서는 ethanol 추출물로 실험을 진행하였으므로 유효성분이 농축된 시료로 실험을 하였고 *in vivo* 실험에서는 된장의 동결 건조파우더를 그대로 사용하였으므로 항산화효과가 미미했던 것으로 판단된다. 된장의 항산화효과는 발효산물인 Daidzein 또는 Genistein 등에서 보고된 바 있다.
- 따라서, *in vivo* 동물실험에 된장의 항비만 효과가 확인되었고 항산화 및 항염효과를 평가하기 위해서는 된장의 분획을 사용하거나 된장의 섭취량을 늘려야 할 것으로 판단된다.
- 전통된장을 세계화하기 위해 필요한 것은 된장 제품의 품질관리인데 균주, 발효온도, 장담그는 소금물의 농도, 소금의 종류, 장담분리 기준, 숙성조건, 숙성 용기 및 숙성기간 등에 대한 지속적인 연구 필요한 것으로 사료된다. 또한, 전통된장의 개념도 재정립되어야 할 것

으로 판단된다.

3. 식이유도 비만동물의 비만세포에서 ‘Omics ‘ 테크닉을 활용한 miRNA microarray 분석 및 항산화·항염·항비만 작용기전의 분자수준 연구

- 현재 다른 기능성 물질들에서 Omics 분석기법을 활용하여 생리활성의 기전을 규명한 연구들이 진행되고 있지만, 한국 전통식품인 장류분야에서는 청국장 소재를 제외하고는 거의 전무한 실정임. 특히, 청국장을 포함한 모든 장류연구는 혈액 또는 간조직에서 항비만 및 항산화효능을 알아보는 것으로 제한적으로 진행되고 있음. 본 연구진의 연구는 된장의 기능성 효능을 지방조직에서 Omics 분석기법을 활용하여 miRNA 수준에서 항염증, 항산화 및 항염증 지표를 최초로 확인한 연구임.
- 고지방식이에 의해 유도된 비만동물모델의 지방조직에서 global miRNA profile을 microarray 분석을 통해 진행하였음. 식이에 의하여 33개 miRNA가 유의적인 차이를 보였으며, 특히, 저지방식이와 고지방식이 섭취군간에 8개 miRNA가 유의적인 차이를 보였으며, miR-378, miR-107, miR-146은 선행연구와 동일한 발현패턴을 보여서 식이에 의한 비만모델로 적합함을 확인할 수 있었음. 특히, miR-3069-3p, miR-16-5p, miR-155-5p, miR-193b-3p는 아직 비만동물모델의 지방조직에서 보고되지 않은 새로운 miRNA이며, 타연구의 식이유도동물모델의 지표로 사용될 수 있는 근거를 제시함.
- 고지방+된장식이 섭취군과 고지방식이 섭취군간에는 유의적인 차이를 보인 miRNA가 없었는데, 이는 실험샘플수가 적어서 군간의 편차가 영향을 미친 것으로 사료됨. 하지만, 고지방+대두식이 섭취군도 고지방식이 섭취군과 차이를 보이는 miRNA가 1개만 존재하므로 이는 체중과 지방조직의 무게가 된장 섭취에 의해서 유의적으로 감소되지만 지방세포 수와 사이즈는 고지방식이 섭취군간에 차이를 보이지 않으므로 식이에 의해서 비만이 유도될 시 차이를 보인 유전자들이 된장과 대두의 경우에 차이를 보이지 않은 것과 연관이 있는 것으로 사료됨.
- 본 연구에서 유의적인 차이를 보인 miRNA는 target gene 검토를 통해 염증, 산화스트레스 및 비만관련 지표로 보고된 유전자들을 중심으로 mRNA와 protein 수준에서 분석하였으나 보고된 정보가 한정적이어서 염증 및 비만대사에 관여하는 지표들을 추가적으로 분석함. 된장 섭취는 adipogenesis와 관련된 지표에 변화를 주지 못하였지만, 산화스트레스와 염증 지표를 유의적으로 감소시키므로 항염증 효과가 있음을 보여줌. 추가적인 연구가 필요하지만, 된장과 대두 섭취간에 유의적인 차이를 보인 miRNA는 염증이나 산화스트레스 대사기전에 관여하는 인자로서의 가능성을 제시함. 이것은 현재까지 보고되지 않은 miRNA의 역

할 및 target gene 확인에 활용할 수 있는 근거가 될 수 있으며, 무엇보다 유의적인 차이를 보인 miRNA는 된장과 대두의 구별 및 다른 장류의 기능성물질에 대한 항염증 효능을 확인하는 지표로 활용될 수 있음을 보여줌.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구분 (연도)	연구개발의 목표	달성도 (%)	연구개발의 내용
1차 년도 (2013- 2014)	<주관연구> 된장의 항산화·항염·항비 만 기능성 및 작용기전을 in vivo 연구를 통해 규 명함	100	○ 비만유도를 위한 식이(정상식이, 고지방식이, 고지방식이+찜대두, 고지방식이+된장) 제작
		100	○ 식이유도비만모델(DIO모델) 유도 : 마우스에 고지방 식이를 10~12주 섭취. 비만현상 모니터링
		100	○ DIO 모델에서 혈액 및 간조직에서 비만, 염증, 항산화, 지질대사 관련 생화학적 지표 평가
		100	○ 간조직과 지방조직의 구성세포 형태 및 병변 관찰
	<제 1협동> ① 된장의 숙성기간에 따른 주요생리활성물질 의 변화 ② in vitro 항산화효과 연구 ③ 대식세포 이용 항염증 효과 연구	100	○ 찜대두(대조군), 메주, 한식된장, 전통된장의 숙성 기간에 따른 총폴리페놀, 플라보노이드함량 측정 비교
		100	○ 된장의 숙성기간에 따른 β -glucosidase 활성 및 isoflavone 구성 변화 측정
		100	○ 된장 에탄올추출물의 in vitro 항산화효과 : FRAP, DPPH과 ABTS라디칼 소거효과 측정
		100	○ RAW 264.7 대식세포 이용 항염증 기능성 평가 및 기전연구 : LPS에 의해 활성화된 세포에 된장추출물 투여 시 NO, IL-6, TNF- α , PGE2, MCP-1 농도 및 iNOS, COX-2생성량과 NF-kB 활성화 억제효과 측정
	<제 2 협동> 오믹스 평가기술을 사용 하여 지방조직에서 된장 의 항비만 및 항염증 작 용기전을 규명함	100	○ 선행연구 내용 고찰 및 동물실험조건 확립
		100	○ 평가분석방법 확립 및 예비분석실험
		100	○ 샘플링 및 Histology 분석
		100	○ miRNA, RNA, 단백질 추출
		100	○ miRNA microarray profile 분석
		100	○ 기능성 target gene 확인 및 mRNA, 단백질 분석

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 연구성과(건수로 표기)

구분	연구논문	학술발표	지식재산권	기술이전/제품화	기타	계
1년도(2015)	1 (투고)	2				3
2년차(2016)	2	1				3

2. 정책활용

- 장류의 과학적인 실험자료들을 활용하여 전통장류 섭취량 향상시켜 국민 건강 촉진 : 비만 및 대사증후군 예방 또는 치료식단에 된장을 활용한 음식을 사용하도록 권장. 학교, 직장, 사업장 등에서의 급식 식단에 대두발효식품의 이용을 적극 권장함.
- 국내 장류산업 공정과정의 과학화 및 국내 장류 산업 육성 정책에 활용함 : 장류 뿐 아니라 장류를 활용한 기능성 제품 개발에서 활용할 수 있도록 정보를 공유함.
- 새로운 첨단 분석기법을 활용한 결과들을 활용하여 한식재료의 우수성을 홍보함으로써 한식 세계화 정책에 활용함

3. 언론홍보 및 대국민교육

- 전통한식된장의 항산화 및 비만으로 인한 염증증가를 억제하는 효과를 과학적으로 설명할 수 있는 근거자료를 제시함으로써 전통한식의 우수성을 국민이 인식하게 함
- 다양한 된장제품과 된장을 활용하는 음식의 개발을 촉진할 수 있음
- 전통 된장의 적정한 숙성, 보관 및 섭취기간에 대한 중요한 정보를 제공함.
- 국제학술대회에 결과를 발표하여 된장의 기능성에 대한 홍보자료로 활용 가능

4. 기타

- 한식의 세계화를 위한 홍보 방안으로 본 사업단을 통해 확인된 한식 재료의 탁월한 기능성을 공동심포지엄을 통해 공유함.
- 대학 및 산학기관에서 기능성분의 분석기술에 대한 교육 세미나 가능함.
- 된장을 포함한 장류 업체를 위해 제품개발의 과학적 근거를 위한 DB 구축 자료 확보.
- 된장 활용 건강기는 제품화 추진에 본 연구 결과를 활용할 수 있음.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 기능성식품 성분의 연구에서 Omics 기술을 사용한 국내외 사례분석

○ 선행연구분석을 통해 연구과제와의 필요성 및 연관성

(1) 최근 5년간 microarray 분석기법을 활용하여 기능성식품 성분의 생리기능활성효과를 보고한 논문들은 아래와 같으며, 기능성 식용식물, polyphenol compounds, phytochemicals 등의 생리활성물질들에 관한 유전체학연구를 통한 데이터베이스화 연구가 진행되고 있음

논문명	학술지명 (년도)	저자	기능성성분	주요효과
Global microRNA expression profiling: Curcumin (diferuloylmethane) alters oxidative stress-responsive microRNAs in human ARPE-19 cells	Molecular Vision 2013; 19:544-560	Howell et al.	Curcumin	H2O2에 의해서 유도된 스트레스에 대해 antioxidant defense과 renin-angiotensin systems 조절을 받는 miRNA들을 규명

(2) 분자생물학적 분석기술을 사용해 장류의 생리활성효과 연구를 진행한 것은 아래와 같음

저자 (년도)	장류	실험모델	분석지표
Kim 등 (2013)	청국장	고지방식/마우스	metabolic parameters
Lee 등 (2012)	청국장+노니	KK-Ay/TaJcl 마우스	mRNA, Western
Choi 등 (2011)	된장, 청국장	고지방식/쥐	EMSA, Western
Soh 등 (2008)	청국장	고지방식/마우스	mRNA, Western
Yang 등 (2013)	청국장	제2형 당뇨병 쥐	Western
Soh 등 (2011)	청국장	고지방식/마우스	microarray, mRNA
Hwang 등 (2011)	청국장	MCF7 cell	microarray, mRNA, Western
Kwon 등 (2007)	청국장	췌장절제당뇨쥐	mRNA, Western
Kim 등 (2007)	청국장	spleen, thymus mouse cell	DNA fragmentation, FACS
Kwon 등 (2006)	청국장	3T3-L1 fibroblasts	Western
Ahn 등 (2006)	고추장	3T3-L1 Adipocytes	mRNA
Park 등. (2012)	된장	고지방식/마우스	enzyme activity
Kwon 등 (2009)	고추장	췌장절제당뇨쥐	Western

(3) 장류의 주요 생리활성물질인 soy protein, isoflavone 등을 사용하여 진행된 연구들은 아래와 같음

저자 (년도)	종류	실험모델	분석지표
Ronis 등 (2009)	soy protein isolate	weaning-adult/liver	mRNA, Western, CHIP
Frigolet 등 (2011)	고지방, soy protein	rat/adipose	microarray, mRNA
Takahashi 등 (2009)	genistein, daidzein	rat/liver	microarray
Cho 등 (2010)	genistein, daidzein	3T3-L1 and C3H10T1/2 cells	mRNA, Western
Torre-Villalvazo 등 (2008)	soy protein	고지방식/rat/liver, adipose	mRNA, Western
Tovar-Palacio 등 (2011)	soy protein	obese Zucker fa/fa rat/kidney	mRNA
Kim 등 (2010)	genistein	고지방식/C57BL/6J mice/adipose	mRNA
Kim 등 (2011)	daidzein	고지방식/C57BL/6J mice/liver, adipose	microarray, mRNA, HPLC/MS
Takahashi 등 (2011)	soy protein isolate, isoflavone, tofu	rat/liver	microarray, mRNA

제 7 장 참고문헌

- Ahn, J., et al. (2013) MicroRNA-146b promotes adipogenesis by suppressing the SIRT1-FOXO1 cascade. *EMBO Mol Med* 5, 1602-12.
- Andersen, D. C., et al. (2010) MicroRNA-15a fine-tunes the level of Delta-like 1 homolog (DLK1) in proliferating 3T3-L1 preadipocytes. *Experimental Cell Research* 316, 1681-1691.
- Bengestrate, L., et al. (2011) Genome-wide profiling of microRNAs in adipose mesenchymal stem cell differentiation and mouse models of obesity. *PLoS One* 6, e21305.
- Boden G (2011) Obesity, insulin resistance and free fatty acids. *Curr Opin endocrinol Diabetes Obes.* 18(2):139-143.
- Byrd, A. E., et al. (2012) MicroRNA-30c-2* limits expression of proadaptive factor XBP1 in the unfolded protein response. *J Cell Biol* 196(6):689-98.
- Chae SK, Kang GS, Ma SJ, Bang KW, Oh MW, Oh SH (2002) Standard Food Analysis. Jigu-moonwha Sa, Seoul, p 381-382.
- Chai C, Ju HK, Kim SC, Park JH, Lim J, Kwon SW, Lee J (2012) Determination of bioactive compounds in fermented soybean products using GC/MS and further investigation of correlation of their bioactivities. *J Chromatography B* 880:42-29
- Choi J. H., et al. (2011) The anti-inflammatory action of fermented soybean products in kidney of high-fat-fed rats. *J Med Food* 14(3), 232-239.
- Calin, G. A., et al. (2002) Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(24):15524-9.
- Chang ST, Wu JH, Wang SY, Kang PL, Yang NS, Shyur LF(2001) Antioxidant activity of extracts from *Acacia coinfusa* bark and heartwood. *J Agric Food Chem.* 49(7):3420-4.
- Cho HJ, Shim JH, So HS, Park JHY (2012) Mechanism underlying the antiinflammatory action of piceatannol induced by lipopolysaccharide. *J Kor Soc Food Sci Nutr* 41(9):1226-1234
- Chartoumpekis, D. V., et al. (2012) Differential expression of microRNAs in adipose tissue after long-term high-fat diet-induced obesity in mice. *PLoS One* 7, e34872.
- Civelek, M., et al. (2013) Genetic regulation of human adipose microRNA expression and its consequences for metabolic traits. *Hum Mol Genet* 22(15):3023-37.
- Choi JH, Kwon SW, Park KY, Yu BP, Kim ND, Jung JH, Chung HY (2011) The anti-inflammatory action of fermented soybean products in kidney of high-fat-fed

rats. *J Med Food* 14(3):232-239

- Choi YH, Lim H, Heo MY, Kwon DY, Kim HP (2008) Anti-inflammatory activity of the ethanol extract of Chungukjang, Korean fermented bean:5-lipoxygenase inhibition. *J Med Food* 11(3):539-543
- Dia VP, Berhow MA, De Mejia EG (2008) Bowman-Birk inhibitor and genistein among soy compounds that synergistically inhibit nitric oxide and prostaglandin E2 pathways in LPS-induced macrophages. *J Agr Food Chem.* 56:11707-11717.
- Estep, M., et al. (2010) Differential expression of miRNAs in the visceral adipose tissue of patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 32(3):487-97.
- Friгоlet ME, Torres N, Uribe-Figueroa L, Rangel C, Jimenez-Sanchez G & Tovar AR (2011) White adipose tissue genome wide-expression profiling and adipocyte metabolic functions after soy protein consumption in rats. *J Nutr Biochem* 22, 118-129.
- Gerin, I., et al. (2010) Roles for miRNA-378/378* in adipocyte gene expression and lipogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 299, E198-206.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, (1982) Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126:131-138.
- Guha M, Mackman N (2001) LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell signal* 13:85-94.
- Guo JY, Huo HR, Yang YX, Li CH, Liu HB, Zhao BS (2006) 2-Methoxy- cinnamaldehyde reduces IL-1 beta-induced prostaglandin production in rat cerebral endothelial cells. *Biol Pharm Bull* 29:2214-2221.
- Hamalainen M, Neiminen R, Vuorela P, Heinonen M, Moilanen E (2007) Anti-inflammatory effects of flavonoids: Genistein, Kaempferol, Quercetin, and Daidzein inhibit STST-1 and NF- κ B activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin and pelargonidin inhibit only NF- κ B activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. *Mediators of Inflammation*. ID 45673, 1-10
- Huang, J., et al. (2010) MicroRNA-204 regulates Runx2 protein expression and mesenchymal progenitor cell differentiation. *Stem Cells* 28(2):357-64.
- Izumi T, Piskula MK, Osawa S, Obata A, Tobe K, Saito M, Kataoka S, Kubota Y, Kikuchi M (2000) Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. *J Nutr* 130(7):1695-1699
- Jeong JK, Zheng Y, Choi HS, Han GJ, Park KY (2010) Catabolic enzyme activities and

physiological functionalities of Lactic acid bacteria isolated from Korean traditional Meju. *J Kor Soc Food Sci Nutr* 39(2):1854-1859

- Jeong JW, Lee HH, Han MH, Kim GY, Kim WJ, Choi YH (2014) Anti-inflammatory effects of genistein via suppression of the toll-like receptor 4-mediated signal pathway in lipopolysaccharide-stimulated BV microglia. *Chemico-Biological Interactions* 212:30-39
- Ji G, Zhang Y, Yang Q, Cheng S, Hao J, Zhao X, Jiang Z (2012) Genistein suppresses LPS-induced inflammatory response through inhibiting NF- κ B following AMP Kinase activation in RAW 264.7 macrophages. *PLOS one* 7(12):e53101
- Jo SJ, Hong CO, Yang SY, Choi KK, Kim HK, Yang H, Lee KW. (2011) Changes in contents of γ -aminobutyric acid(GABA) and isoflavones in traditional Korean Doenjang by ripening periods. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40(4):557-564
- Jung KO, Park SY, Park KY. (2006) Longer aging time increases the anticancer and antimetastatic properties of doenjang. *Nutrition* 22:539-545
- Jung SH, Kim SJ, Jun BG, Lee KT, Homg SP, Oh MS, Jang DS, Choi JH (2013) α -cyperone, isolated from the rhizomes of cyperus rotundus, inhibits LPS-induced COX-2 expression and PGE2 production through the negative regulation of NF κ B signalling in RAW 264.7 cells. *J Ethnopharmacology* 147:208-214.
- Kang JH, Sung MK, Kawada T, Yoo H, Kim YK, KimJS, Yu R(2005) Soybean saponins suppress the release of proinflammatory mediators by LPS-stimulated peritoneal macrophages. *Cancer Lett* 230:219-227
- Kang, M., et al. (2013) Role of microRNA-21 in regulating 3T3-L1 adipocyte differentiation and adiponectin expression. *Molecular Biology Reports* 40, 5027-34.
- Kim, C., et al. (2013) TNF α -induced miR-130 resulted in adipocyte dysfunction during obesity-related inflammation. *FEBS Letters* 587, 3853-3858.
- Kim JS, Yoon S (1999) Isoflavone contents and β -glucosidase activities of soybeans, meju and doenjang. *Korean J Food Sci Technol* 31(6) 1405-1409
- Kim JY, Choi JN, Choi JH, Cha YS, Muthaiya MJ & Lee CH (2013) Effect of fermented soybean product (Cheonggukjang) intake on metabolic parameters in mice fed a high-fat diet. *Mol Nutr Food Res*, 1-6.
- Kim MH, Park JS, Jung JW, Byun KW, Kang KS & Lee YS (2011) Daidzein supplementation prevents non-alcoholic fatty liver disease through alternation of hepatic gene expression profiles and adipocyte metabolism. *International Journal of obesity* 35, 1019-1030.

- Kim, S.Y., et al. (2010) miR-27a is a negative regulator of adipocyte differentiation via suppressing PPAR γ expression. *Biochem Biophys Res Commun* 392, 323-328.
- Kinoshita, M., et al. (2010) Regulation of adipocyte differentiation by activation of serotonin (5-HT) receptors 5-HT2AR and 5-HT2CR and involvement of microRNA-448-mediated repression of KLF5. *Mol Endocrinol* 24, 1978-87.
- Klötting, Nora, et al. (2009) MicroRNA Expression in Human Omental and Subcutaneous Adipose Tissue. *PLoS ONE* 4(3):e4699.
- Kobayashi M, Matsushita H, Ysahida K, Tsukiyama R, Sungimura T, Yamamoto K (2004) In vitro and in vivo anti-allergic activity of soy sauce. *Int J Mol Med* 14(5):879-884
- Koeberle A, Northoff H, Werz O (2009) Curcumin blocks prostaglandin E2 biosynthesis through direct inhibition of the microsomal prostaglandin E2 synthase-1. *Mol Cancer Ther* 8(8):2348-2355
- Koo BS, Seong SH, Kwon DY, Sohn HS & Cha YS (2008) Fermented Kochujang Supplement Shows Anti-obesity Effects by Controlling Lipid Metabolism in C57BL/6J Mice Fed High Fat Diet. *Food Sci Biotechnol* 17(2), 336-342.
- Kumar MV, Shimokawa T, Nagy TR (2002) Differential effects of a centrally acting fatty acid synthase inhibitor in lean and obese mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:1921-1925
- Kwak CS, Lee MS, Park SC(2007) Higher in vitro and in vivo antioxidant activities and polyphenol contents in Chungkookjang, a fermented soybean food, than in not-fermented soybeans. *Nutr Research* 2007;27:719-727
- Kwak CS, Park SC & Song KY (2012) Doenjang, a Fermented Soybean Paste, Decreased Visceral Fat Accumulation and Adipocyte Size in Rats Fed with High Fat Diet More Effectively Than Nonfermented Soybeans. *J Med Food* 15(1), 1-9.
- Kwon DY, Jang JS, Lee JE, Kim YS, Shin DH & Park EM (2006) The isoflavonoid aglycone-rich fractions of Chungkookjang, fermented unsalted soybeans, enhance insulin signaling and peroxisome proliferator-activated receptor- γ activity *in vitro*. *BioFactoes* 26, 245-258.
- Kwon DY, Daily JW. III, Kim HJ, Park SM (2010) Antidiabetic effects of fermented soybean products on type 2 diabetes. *Nutr. Res.* 30:1-13.
- Lawrence T, Gilroy DW, Colville-Nash PR (2001) Possible new role for NF- κ B in the resolution of inflammation. *Nat Med* 7:1291-1297
- Lee EH, Son WC, Lee SE, Kim BH (2013) Anti-obesity effects of poly- γ -glutamic acid with or without isoflavones on high-fat diet induced obese mice. *Biosci. Biotechnol.*

Biochem. 77:1694-1702.

- Lee JY, Cho HK & Kwon YH (2010) Palmitate induces insulin resistance without significant intracellular triglyceride accumulation in HepG2 cells. *Metabolism* 59(7), 927-934.
- Lee SM, You Y, Kim K, Park J, Jeong C, Jhon DY, Jun W (2012) Antioxidant activities of native Gwangyang *Rubus coreanus* Muq. *J Kor Soc Food Sci Nutr* 41(3):327-332
- Lee J. J., et al. (2010). Effects of Powders of Soybean and Doenjang on Cholesterol Level and Antioxidant Activities in Rats Fed with a High Cholesterol Diet. *J Life Sci* 20(7): 1134-1142.
- Lee SW, Park YW, Chang PS, Lee JW (2010) Isoflavone distribution and β -glucosidase activity in home-made and factory-produced Doenjang. *Korean J Food Sci Technol* 42(2):125-129
- Lee YS, Jang SY, Kim KO (2005) Effects of soy isoflavone intake on nitrite content and antioxidant enzyme activities in male rats fed high-fat diet. *Korean J Nutr* 38(2):89-95
- Lee, Y. M., et al. (2006) Effects of dietary genistein on hepatic lipid metabolism and mitochondrial function in mice fed high-fat diets. *Nutrition* 22(9): 956-964.
- Lin, Q., et al. (2009) A role of miR-27 in the regulation of adipogenesis. *Febs Journal* 276, 2348-2358.
- Ling, H. Y., et al. (2011) MicroRNA-375 promotes 3T3-L1 adipocyte differentiation through modulation of extracellular signal-regulated kinase signalling. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 38, 239-246.
- Linton MF, Fazio S (2003) Macrophages, inflammation, and atherosclerosis. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27(supple3):s35-40
- Liu, F., et al. (2012) Upregulation of microRNA-210 regulates renal angiogenesis mediated by activation of VEGF signaling pathway under ischemia/perfusion injury in vivo and in vitro. *Kidney Blood Press Res* 35(3):182-91.
- Martinelli, Rosanna, et al. (2010) miR-519d Overexpression Is Associated With Human Obesity. *Obesity* 18(11):2170-2176.
- Meerson, A., et al. (2013) Human adipose microRNA-221 is upregulated in obesity and affects fat metabolism downstream of leptin and TNF-alpha. *Diabetologia* 56(9):1971-9.
- Miller, Ashley M., et al. (2013) MiR-155 has a protective role in the development of **non-alcoholic hepatosteatosis in mice**. *PLoS ONE* 8(8):e72324.
- Mitrou, P., et al. (2013). Insulin action in morbid obesity: a focus on muscle and adipose tissue. *Hormones (Athens)* 12(2): 201-213.

- Monzon ME, Casalino-Matsuda SM, Forteza RM(2006) Identification of glycosaminoglycans in human airway secretions. *Am J Respir Cell Mol Biol* 34:135-141.
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65(1-2):55-63
- Nakanishi, N., et al. (2009) The up-regulation of microRNA-335 is associated with lipid metabolism in liver and white adipose tissue of genetically obese mice. *Biochem Biophys Res Commun* 385, 492-496.
- Nakaya M, Tachibana H, Yamada K(2005) Isoflavone genistein and daidzein up-regulate LPS-induced inducible nitric oxide synthase activity through estrogen receptor pathway in RAW264.7. *Biochem Pharm* 71:108-114
- Nam DH, Kim HJ, Lim JS, Kim KH, Park CS, Kim JH, Lim J, Kwon DY, Kim IH, Kim JS. (2011) Simultaneous enhancement of free isoflavone content and antioxidant potential of soybean by fermentation with *Aspergillus oryzae*. *J Food Sci* 76:h194-h200
- Naaz, A., et al. (2003). The soy isoflavone genistein decreases adipose deposition in mice. *Endocrinology* 144(8): 3315-3320.
- Ortega, Francisco J., et al. (2010) MiRNA expression profile of human subcutaneous adipose and during adipocyte differentiation. *PLoS ONE* 5(2):e9022.
- Park KY, Jung KO, Rhee SH, Choi YH: Antimutagenic effects of Doenjang (Korean fermented soypaste) and its active compounds. *Mutation Res* 2003;523-524: 43-53.
- Park NY, Rico CW, Lee SC & Kang MY (2012) Comparative effects of doenjang prepared from soybean and brown rice on the body weight and lipid metabolism in high fat-fed mice. *J Clin Biochem Nutr* 51(3), 235-240.
- Peralta RM, Kalowaki MK, Terenzi HF, Jorge JA (1997) A highly thermostable β -glucosidase activity from the thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea*: purification and biochemical characterization. *FEMS Microbiol Lett* 146:291-295
- Parra, P., F. Serra, and A. Palou (2010) Expression of adipose microRNAs is sensitive to dietary conjugated linoleic acid treatment in mice. *PLoS One* 5(9):e13005.
- Qin, L. M., et al. (2010) A deep investigation into the adipogenesis mechanism: Profile of microRNAs regulating adipogenesis by modulating the canonical Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Bmc Genomics* 11.
- Re R, Pellegrini P, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evance C (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad Biol Med* 26:1231-1237

- Rice-Evance C, Miller N, Paganga G (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci* 2:152-159
- Roh C, Jung UJ, Jo SK (2011) 6,7,4'-Trihydroxyisoflavone from Doenjang inhibits lipid accumulation. *Food Chem.* 129:183-187.
- Shan J, Fu J, Zhao Z, Kong X, Huang H, Luo L, Yin Z(2009) Chlorogenic acid inhibits lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression in RAW 264.7 cells through suppressing NF- κ B and JNK/AP-1 activation. *Int Immunopharmacol* 9:1042-1048.
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol* 299:152-178.
- Soh JR, Shin DH, Kwon DY, Cha YS (2008) Effect of Cheonggukjang supplementation upon hepatic acyl-CoA synthase, carnitine palmitoyltransferase I, acyl-CoA oxidase and uncoupling protein 2 mRNA levels in C57BL/6J mice fed with high fat diet. *Genes Nutr* 2, 365-369.
- Sun, T., et al. (2009) MicroRNA let-7 regulates 3T3-L1 adipogenesis. *Mol Endocrinol* 23, 925-31.
- Sun, L., et al. (2011) Mir193b-365 is essential for brown fat differentiation. *Nat Cell Biol* 13(8):958-65.
- Takanabe, R., et al. (2008) Up-regulated expression of microRNA-143 in association with obesity in adipose tissue of mice fed high-fat diet. *Biochem Biophys Res Commun* 376, 728-32.
- Trajkovski, M., et al. (2011) MicroRNAs 103 and 107 regulate insulin sensitivity. *Nature* 474, 649-53.
- Wang, Q., et al. (2008) miR-17-92 cluster accelerates adipocyte differentiation by negatively regulating tumor-suppressor Rb2/p130. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 2889-94.
- Wang, J., et al. (2013) miR-30e reciprocally regulates the differentiation of adipocytes and osteoblasts by directly targeting low-density lipoprotein receptor-related protein 6. *Cell Death Dis* 4:e845.
- Xie, H., et al. (2009a) Targeting microRNAs in obesity. *Expert Opin Ther Targets* 13(10):1227-38.
- Xie, H. M., et al. (2009b) MicroRNAs induced during adipogenesis that accelerate fat cell development are downregulated in obesity. *Diabetes* 58, 1050-1057.
- Xu H, Barnes GT, Yang Q et al (2003) Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 112:1821-1830

- Yasushi S, Tsukase N, Keiko S, Hiroe Y, Hisashi Y (1999) Stopped-flow and spectrophotometric study on radical scavenging by tea catechins and model compound. *Chem Pharm Bull* 47: 1369-1374.
- Yi, C., et al. (2011) MiR-143 enhances adipogenic differentiation of 3T3-L1 cells through targeting the coding region of mouse pleiotrophin. *FEBS Lett* 585, 3303-9.
- Yildirim A, Mavi A, Kara AA (2001) Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *J Agric Food Chem* 49:4093-4089.
- Yu R, Kim CS, Kwon BS, Kawada T (2006) Mesenteric adipose tissue-derived monocyte chemoattractant protein-1 plays a crucial role in adipose tissue macrophage migration and activation in obese mice. *Obesity* 14(8):1353-1362
- Zaragosi, L. E., et al. (2011) Small RNA sequencing reveals miR-642a-3p as a novel adipocyte-specific microRNA and miR-30 as a key regulator of human adipogenesis. *Genome Biol* 12(7):R64.
- Zhuang, G., et al. (2012) A novel regulator of macrophage activation: miR-223 in obesity-associated adipose tissue inflammation. *Circulation* 125, 2892-903.
- 곽충실 김미연, 김성애, 이미숙 (2006) 청국장암세포생장억제효과 및 흰쥐에서 DMBA 투여에 의한 지방종양발생 억제효과. *한국영양학회지* 39(4):347-356,
- 권선화, 이규복, 임근숙, 김수옥 & 박건영 (2006) 전통 장류의 체중감소 및 지질저하 효과. *한국식품영양과학회지* 35(9), 1194-1199.
- 이숙희, 공규리, 정근욱 & 박건영 (2003) 고지방식이를 섭취한 흰쥐에서 고추장의 체중 및 지방조직과 혈청내의 지질감소효과. *한국식품영양과학회지* 32(6), 882-886.
- 이창현, 윤영, 송근섭, 김영수 (2011) 전통된장의 면역증강 효과. *한국식품영양과학회지* 40:1227-1234.
- 임선영, 박건영, 배명숙, 김광혁 (2009) 검정콩 된장의 사이토카인 생성 및 종양전이 억제에 미치는 영향. *생명과학회지* 19:264-270.
- 주종재 (2000) 고지방 식이를 섭취시킨 흰쥐에서 고추장의 항비만효과. *한국영양학회지* 33(8), 787-793.

<해외과학정보수집>

- Ahn I. S., et al. (2006) Antiobesity effect of *Kochujang* (Korean fermented red pepper paste) extract in 3T3-L1 adipocytes. *J Med Food* 9(1), 15-21.
- Cho K. W., et al. (2010) Daidzein and the daidzein metabolite, equol, enhance adipocyte differentiation and PPAR γ transcriptional activity. *J Nutri Biochem* 21, 841-847.
- Frigolet M. E., et al. (2011) White adipose tissue genome wide-expression profiling and adipocyte metabolic functions after soy protein consumption in rats. *J Nutri Biochem* 22, 118-129.
- Howell, J. C., et al. (2013) Global microRNA expression profiling: curcumin (diferuloylmethane) alters oxidative stress-responsive microRNAs in human ARPE-19 cells. *Mol Vis* 19:544-60.
- Hwang J. S., et al. (2011) Inflammation-Related Signaling pathways Implicating TGF are Revealed in the Expression Profiling of MCF7 Cell Treated with Fermented Soybean, Chungkookjang. *Nutr Can* 63(4), 645-652.
- Kim H. B., et al. (2007) Ethanol extract of fermented soybean, chungkookjang, inhibits the apoptosis of mouse spleen, and thymus cells. *J Microbiol* 45(3) 256-261.
- Kim M. H., et al. (2010) The inhibitory effect of genesterin on hepatic steatosis is linked to visceral adipocyte metabolism in mice with diet-induced non-alcoholic fatty liver disease. *British J Nutr* 104, 1333-1342.
- Kim M. H., et al. (2011) Daidzein supplementation prevents non-alcoholic fatty liver disease through alternation of hepatic gene expression profiles and adipocyte metabolism. *International Journal of obesity* 35, 1019-1030.
- Kim J. Y., et al. (2013) Effect of fermented soybean product (Cheonggukjang) intake on metabolic parameters in mice fed a high-fat diet. *Mol Nutr Food Res*, 1-6.
- Kwon D. Y., et al. (2006) The isoflavonoid aglycone-rich fractions of Chungkookjang, fermented unsalted soybeans, enhance insulin signaling and peroxisome proliferator-activated receptor- γ activity in vitro. *BioFactoes* 26, 245-258.
- Kwon D. Y., et al. (2007) Long-term consumption of fermented soybean-derived Chungkookjang enhances insulinotropic action unlike soybeans in 90% pancreatectomized diabetic rats. *Eur J Nutr* 44, 44-52.
- Kwon D. Y., et al. (2009) Kochujang, a Korean fermented red pepper plus soybean paste, improves glucose homeostasis in 90% pancreatectomized diabetic rats. *Nutrition* 25, 790-799.
- Lee S. Y., et al. (2012) Antidiabetic effect of morinda citrifolia (Noni) fermented by

- Cheonggukjang in KK-Ay diabetic mice. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 1-8.
- Park N. Y., et al. (2012) Comparative effects of doenjang prepared from soybean and brown rice on the body weight and lipid metabolism in high fat-fed mice. *J Clin Biochem Nutr* 51(3), 235-240.
- Ronis M. J., et al. (2009) Dietary soy protein isolate attenuates metabolic syndrome in rats via effects on PPAR, LXR, and SREBP signaling. *J Nutr* 139, 1431-1438.
- Soh J. R., et al. (2008) Effect of Cheonggukjang supplementation upon hepatic acyl-CoA synthase, carnitine palmitoyltransferase I, acyl-CoA oxidase and uncoupling protein 2 mRNA levels in C57BL/6J mice fed with high fat diet. *Gens Nutr* 2, 365-369.
- Soh J. R., et al. (2011) Hepatic gene expression profiles are altered by dietary unsalted Korean fermented soybean (Chongkukjang) consumption in mice with diet-induced obesity. *J Nutr Met*, 1-10.
- Takahashi Y., et al. (2009) A comparative analysis of genistein and daidzein in affecting lipid metabolism in rat liver. *J Clin Biochem Nutr* 44, 223-230.
- Takahashi Y. and Konishi T. (2011) Tofu (Soybean Curd) lowers serum lipid levels and modulates hepatic gene expression involved in lipogenesis primarily through its protein, not isoflavone, component in rats. *J Agric Food Chem* 59, 8976-8984.
- Torre-Vaillalvazo I., et al. (2008) Soy protein ameliorates metabolic abnormalities in liver and adipose tissue of rats fed a high fat diet. *J Nutr* 138, 462-468.
- Tovar-Palacio C., et al. (2011) Proinflammatory gene expression and renal lipogenesis are modulated by dietary protein content in obese Zucker fa/fa rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 300, F263-271.
- Yang H. J., et al. (2012) Standardized chungkookjang, short-term fermented soybeans with *Bacillus lichemiformis*, improves glucose homeostasis as much as traditionally made chungkookjang in diabetic rats. *J Clin Biochem Nutr* 52(1), 49-57.

연구개발보고서 초록

과 제 명	오믹스(Omics) 기술을 기반으로 한 장류(된장)의 항염증 및 항산화 기능성 연구 Anti-inflammatory and anti-oxidant functional study of deonjang (fermented soybean paste) based on the Omics technology		
연 구 기 관	호서대학교	연 구 책 임 자	호서대학교 생명공학과
참 여 기 관	(1) 서울대학교 노화고령사회연구소 (2) 서울대학교 식품영양학과		정영신
연 구 비	130,000,000원	총 연 구 기 간	2013. 7. ~ 2014. 7.(12개월)
참 여 연 구 원	10 명 (연구책임자: 2명, 책임연구원: 1명, 연구원: 1 명, 연구보조원 6명)		

■ 연구개발 목표 및 내용

전통 장류인 된장의 항산화, 항비만, 항염증효과를 in vitro 및 in vivo 모델에서 입증하고자 하며, 특히 첨단 기술인 “Omics” 기술을 활용하여 비만관련 염증을 억제하는 작용기전을 규명함으로써 한식세계화를 위한 경쟁력 있는 자료를 제공하고자 함.

- 생리활성 물질에 대한 정보를 확보하기 위하여 찐대두와 발효된장의 숙성기간에 따른 성분 (총폴리페놀, isoflavone)과 β -glucosidase 활성을 분석하고 항산화활성 (FRAP, DPPH와 ABTS 소거능)을 평가함
- LPS를 처리한 대식세포를 이용하여 된장의 숙성기간에 따른 항염증효과 (NO, PGE2, TNF- α , IL-6, MCP-1, COX-2, iNOS를 측정 비교함
- 식이유도 비만 (DIO) 동물모델에서 된장의 항산화·항염·항비만 기능성 (혈액의 항산화·항염증·지질대사지표 및 조직슬라이드분석 등)을 평가하고, 관련 질병으로의 확산을 억제하는지를 검증하기 위하여 간에서의 염증지표와 혈액의 인슐린저항성지표를 평가함
- 국제적 첨단 생명과학 기법인 miRNA array를 활용하여 DIO 동물 모델의 adipocyte에서 유전자 발현을 분석하여 항산화·항염·항비만 기능성과 작용기전에 관한 분자수준의 역할을 밝히므로서 우수한 기능성에 대한 과학적 근거를 제공함.

■ 연구결과

1. 찐대두와 메주 및 숙성기간이 다른 된장의 생리활성 성분 함량 분석과 β -glucosidase 활성 및 항산화효과 평가

- 한식된장과 전통된장의 총 폴리페놀 함량은 숙성초기 3개월에서는 한식된장이 전통된장보다 높았지만 6개월 이후에는 전통된장이 다소 높은 것으로 나타났음(p<0.001). 총 플라보노이드 함량은 숙성초기 3개월에서는 한식된장과 전통된장에서 비슷한 수준이었으나 6

개월 이후에는 전통된장이 더 높은 것으로 나타났음($p < 0.001$). Isoflavone의 함량은 한식된장과 전통된장에서 비슷한 패턴을 보였으며, 숙성기간 3개월 후에는 대두의 glycoside isoflavone이 거의 대부분 aglycone으로 전환되었음.

- 한식된장의 경우, β -glucosidase는 찢대두, 메주, 숙성기간에 따라 활성이 다르게 나타남. 메주발효기간에 상승하였다가 간장 짠 후 담근 된장은 감소하였지만 숙성 8개월 이후 크게 증가하여 12개월 숙성 된장이 가장 높은 활성(3.80 U/g dry wt)을 보임($p < 0.001$). 전통된장의 β -glucosidase 활성 0.20 U/g dry wt 으로 3~27개월의 숙성기간 동안 거의 변함이 없었음
- DPPH 라디칼을 50% 제거하는 한식된장의 에탄올 추출시료의 농도(IC₅₀)는 찢대두에 비하여 메주에서 유의하게 감소하여 항산화효과가 상승하였음을 알 수 있었고($p < 0.001$), 숙성 초기에 증가하여 12개월까지 IC₅₀는 비슷한 수준을 유지하고 있었음. 전통된장의 DPPH 라디칼 소거효과 역시 숙성 3개월부터 27개월까지는 차이가 없었음. DPPH 라디칼 소거효과는 시료의 총 폴리페놀 함량과 유의한 음의 상관관계($r = -0.8725$, $p < 0.001$)를 보인 반면, 총 플라보노이드 함량과는 상관성이 없었음.
- 한식된장의 에탄올 추출시료의 환원력(FRAP)은 찢대두=메주<한식0<한식1=한식3=한식6<한식8<한식12($p < 0.001$)이었고, 전통된장은 찢대두<전통27<전통3=전통6=전통15($p < 0.001$)으로 된장의 환원력은 메주발효과정에서보다는 숙성과정에서 증가하는 것으로 보임.
- 에탄올 추출시료의 ABTS+ 라디칼 소거능은 발효기간보다는 숙성기간에 증가하였음. 한식된장은 숙성 6개월까지 빠르게 증가하였다가 이후 감소하는 패턴을 보였으나, 전통된장은 숙성 15개월에서 가장 높은 효과를 보였다가 이후 감소하였음.
- 된장 에탄올 추출물로부터 순차적 용매추출 결과 디클로로메탄(DM) 분획과 에틸아세테이트(EA) 분획이 핵산, 부탄올, 물 분획에 비하여 월등하게 DPPH 라디칼 소거 효과와 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량이 높았음. 된장시료 중 한식12의 DM, EA 분획이 총 폴리페놀 함량, 플라보노이드 함량 및 항산화효과가 가장 높았음

2.. LPS 처리한 RAW 264.7 대식세포에서 한식된장의 항염증 효과 및 기전연구

- 찢대두, 한식0, 한식6, 한식12의 DM, EA분획 실험 결과(100 μ g/mL) DM 분획은 경우 한식12만이 대조군의 55.6% 수준으로 NO 생성을 유의하게 감소시켰으며($p < 0.001$), EA분획은 한식6과 한식12가 NO 생성을 각각 대조군의 88.8%, 55.6% 수준으로 감소시켰음 ($p < 0.001$)
- DM 분획과 EA 분획 모두 숙성기간이 길어질수록 PGE2 생성을 더 많이 감소시켰음.
- DM 분획은 한식12만이 IL-6와 TNF- α 생성억제효과를 보였으며, 한식6과 한식12가 MCP-1 생성억제효과를 보였음. EA 분획은 한식0과 한식6도 IL-6와 MCP-1 생성억제효과가 약간 있었으나 한식12의 효과가 더 뚜렷하였고, TNF- α 생성억제효과는 모든 시료에서 없었음. 한식12만이 DM, EA분획 모두 확실한 항염증효과를 나타내었음.
- 한식12의 DM 분획은 LPS 처리에 의하여 촉진된 NF-kB의 활성화로 인하여 증가된 iNOS와 COX-2 합성을 효과적으로 감소시켰으나, EA분획은 iNOS 합성만 감소시켰음.
- 된장의 항염증효과는 DM과 EA분획 중에 있는 비극성의 폴리페놀이나 플라보노이드 계열의 물질로 추정되며 직접적인 작용과 함께 항산화효과를 통한 간접적인 작용으로 인한

결과로 생각됨. 추후 항염증효과를 나타내는 유효성분을 찾기 위한 심도 있는 연구가 필요함.

3. 식이유도 비만 (DIO) 동물모델의 혈액과 간조직에서 된장의 항산화·항염·항비만 기능성 평가

- 된장의 기능성 평가를 위하여 C57BL/6 마우스에 4가지 다른 식이(10% kcal 저지방식이, 45% 고지방식이, 45% 고지방식이 + 15% 된장, 45% 고지방식이 + 11.8% 찌대두)를 11주 동안 급이하였음.
- 저지방식이와 비교하여, 고지방식은 체중을 유의적으로 증가시켰고 된장은 체중의 증가를 억제하였으며 찌대두는 체중의 증가를 억제하지 못한 것으로 관찰됨.
- 고지방식으로 인해 지방이 간조직과 지방조직에 축적되었고($p < 0.05$), 고지방식이와 비교할 때 된장급이 군에서는 지방축적이 유의적으로 감소하였음. 이에 따라 된장의 항비만 효과가 인정됨. 또한, 비만에 의하여 증가하는 혈중 Leptin 농도가 된장섭취에 의해 유의적으로 억제되었고 인슐린 저항성에 의해 증가한 혈당 및 인슐린의 농도도 감소되는 경향이 관찰되었음.
- 간조직의 염증을 나타내는 혈액 생화학적 지표인 AST와 ALT 및 MCP-1 염증매개 인자는 고지방식이에 의해 유의적으로 증가하였는데 된장 섭취에 의해 염증지표들의 증가가 억제되었으나, TNF- α 와 CRP 농도에 대하여는 유의적인 영향을 나타내지 않았음.
- 간조직에서 항산화 효소의 활성과 지질과산화 지표인 MDA 농도는 식이군 간에 유의적인 차이를 나타내지 않았음. Total antioxidant potential을 나타내는 혈중 환원력(FRAP)도 식이군 간에 유의적인 차이가 관찰되지 않았음.
- 간조직의 조직병리 결과에 따르면, 모든 동물의 간조직에 지방이 축적되었는데, 고지방식에 의해 지방 droplet 이 커지고 많아졌는데 된장 섭취에 의하여 다소 감소하였으며, 중성지방 함량도 유사한 결과를 보였음. 즉 고지방식이에 의해 간조직의 지방축적이 유의적으로 증가한 것은 중성지방과 콜레스테롤의 축적에 의한 것으로 확인되었으며, 된장 급이 군에서는 중성지방의 유의적인 차이는 관찰되었으나, 콜레스테롤에서의 차이는 관찰되지 않음.

4. 식이유도 비만동물의 비만세포에서 ‘Omics “ 테크닉을 활용한 miRNA microarray 분석 및 항산화·항염·항비만 작용기전의 분자수준 연구

- 지방조직의 global miRNA profile을 microarray 분석을 통해 진행하였으며, 분석에 사용된 실험식이섭취군의 샘플 모두에서 발견된 272개의 miRNA 가운데 33개 miRNA가 식이에 의하여 유의적인 발현 차이가 나타남. 저지방식이와 고지방식이 섭취군간 8개의 miRNA (고지방식이군에서 감소: miR-378a-5p, miR-378c, miR-193b-3p, miR-107-3p, miR-3069-3p; 고지방식이군에서 증가: miR-146b-5p, miR-16-5p, miR-155-5p)가 유의적인 차이 (기준: fold change $\geq \pm 1.5$)를 보였음. miR-378, miR-107, miR-146은 선행연구와 동일한 결과를 보여서 본 연구에 사용된 실험모델이 고지방식이에 의한 지방축적 및 지방세포의 분화를 유도하는데 적합함을 확인함.
- 고지방+된장식이 섭취군은 고지방식이군과 비교시 1.5배 이상의 발현량 변화가 유의적 차

이를 보인 miRNA는 없었으며, miR-664-3p, miR-378c, miR-30c-2-3p, miR-150-5p, miR-193a-3p는 고지방+대두식이 섭취군에서 고지방+된장식이 섭취군에 비하여 감소되었고, miR-211-3p는 고지방+대두식이 섭취군에서 증가됨.

- 특히, 저지방식이와 고지방식이 섭취군간 (miR-193b-3p, miR-3069-3p, miR-16-5p, miR-155-5p), 고지방식이와 고지방+대두식이 섭취군간 (miR-362-5p)와 고지방+된장식이와 고지방+대두식이 섭취군간 (miR-664-3p, miR-150-5p, miR-211-3p) 차이를 보인 miRNA들은 아직 동물 지방조직에서의 역할이 규명되지 않은 새로운 miRNA들로 확인됨.
- 저지방식이 섭취군과 비교 시 고지방식이 섭취군들은 지방조직무게가 유의적으로 증가하였지만, 고지방+된장식이 섭취군은 고지방식이와 고지방+대두식이 섭취군에 비해서 지방조직무게의 증가가 유의적으로 낮았음. 지방세포 형태 (Adipocyte morphology)는 저지방식이 섭취군에 비해서 고지방식이 섭취군들은 유의적으로 단위면적당 지방세포수가 적고 지방세포 사이즈가 컸지만, 고지방식이 섭취군들간에는 차이가 없었음.
- 항산화 및 항염증, 섬유화 지표 분석에서 산화스트레스 marker인 HO-1 mRNA 발현량과 항염증과 관련된 macrophage infiltration 및 phenotype switch 지표인 CD68, CD11c와 염증 adipokine 지표인 TNF α , MCP-1, 그리고 섬유화 지표인 TGF β mRNA 발현량은 저지방식이 섭취군 및 고지방+된장식이 섭취군이 고지방식이 섭취군보다 유의적으로 감소하였음. 하지만, adipogenesis 관련 지표들은 실험식이섭취군간에 유의적인 차이를 보이지 않았음. 고지방식이 섭취는 지방조직에서 산화스트레스, 염증반응, 섬유화를 촉진시키는데, 된장을 섭취할 경우 이러한 증상이 억제 또는 완화되는 잠재적 효과가 있는 것으로 사료됨.

■ 연구성과 및 성과활용 계획

- 연구원 양성 성과 : 4명
- 논문 발표 계획 : 2015년 1건, 2016년 2건
- 학회 발표 : 2015년 2건, 2016년 1건

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 2013 한식세계화 용역연구사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 2013 한식세계화 용역연구사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.