

최 종
연구보고서

비만억제 및 신경재생효과를 가지는 기능성
콩발효식품 개발에 관한 연구
Development of Functional Soybean Food
Modulating Obesity and Enhancing
Neurogenesis

연구기관
부 산 대 학 교

농 립 수 산 식 품 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “비만억제 및 신경재생효과를 가지는 기능성 콩 발효식품 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2008 년 4 월 11 일

주관연구기관명 : 부산대학교
총괄연구책임자 : 정 해 영
세부연구책임자 : 박 건 영
세부연구책임자 : 이 재 원
연 구 원 : 최 재 훈
연 구 원 : 고 은 경
연 구 원 : 김 지 영
연 구 원 : 조 훈
연 구 원 : 박 희 라
연 구 원 : 박 미 경

요 약 문

I. 제 목

비만억제 및 신경재생 효과를 가지는 기능성 콩발효 식품 개발에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

비만억제 및 신경재생 효과를 보이는 콩발효 식품을 탐색하고, 이들로부터 유용물질 성분들을 분리·정제하여 기능성 건강증진 식품으로 개발하여 농가 소득증대, 농촌경제 활성화 및 수출산업 창출에 기여하고자 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 콩발효식품의 비만 억제물질의 분리와 제품화연구

- 콩발효식품의 항 비만 효과 검증 및 그 성분의 분리
- 비만 억제효과가 있는 콩발효식품의 항비만 효과 증진 연구
- 비만억제 효과가 있는 콩발효식품의 제품화

2. 콩발효식품 성분의 항비만 효과 탐색, 기전규명

- 지방 세포 배양계에서의 비만억제 효과 검토 : 활성 콩 발효 성분에 의한 비만 관련 유전자 (TNF- α , leptin, resistin, adiponectin)의 발현 검토
- 비만동물모델에서의 활성 콩 발효 분획 및 성분의 비만억제 분자기전 규명 및 활성성분 함량검토
- 콩성분 활성 증진에 기여하는 물질 탐색 및 효과 검토

3. 콩발효식품 성분의 신경세포 보호효과 및 신경재생성 효능 연구

- 콩 발효 성분의 신경세포보호 및 신경재생성활성에 영향을 미치는 생리활성 물질의 탐색
- 동물실험모델에서 콩 발효 성분의 생리활성 물질이 신경세포 재생성에 미치는 영향 연구
- 개선된 콩발효식품의 신경재생성 효능 검증

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

o 연구개발 결과

1. 콩발효 식품의 비만억제물질의 분리와 제품화 연구

1) 콩발효 식품의 항비만효과 검증 및 그 성분의 분리

① 콩발효 식품(된장, 청국장, 쌈장 등)의 *in vitro* 및 *in vivo* 항비만 효과 탐색

-고지방 식이 모델에 청국장, 된장, 쌈장, 고추장, 콩을 10% 섭취한 결과 청국장을 제외한 된장, 쌈장, 고추장에서 항비만 효과를 보였다.

-고지방 식이 모델에 전통식 된장과 공장식 된장을 먹인후 체중 체중을 비교한 결과, 오래발효된 전통식 된장의 효과가 가장 컸으며, 혈청중성지방, 콜레스테롤 함량이 가장 낮았다.

-16% 고지방식이에 25g 제한 식이를 한경우, 전통식 청국장도 항비만 활성을 나타내었다.

-세포배양계에서 청국장은 렘틴을 낮추는 효과를 보였다.

② 활성 콩발효 식품의 물질 추출 분획, 정제 및 활성검토

-Isoflavone과 안토시아닌 활성 검토: 청국장의 Isoflavone과 비교시 genistein은 균주로 *B.subtilis*가 적합하였다. 된장의 Isoflavone과 비교시 콩,증자콩, 된장중 콩이 Isoflavone 함량이 높았다. 제니스테인의 아글리콘인 제니스테인은 된장이 가장 높았다.

-안토시아닌은 동물모델계에서 항비만 효과를 나타내었다.

2) 비만 억제효과가 있는 콩발효 식품의 항비만 효과 증진 연구

① 콩 종류(검정콩), 미생물 및 활성물질 첨가에 의한 항비만 효과가 증진된 콩발효 식품의 개발

② 항비만 효과 증진 콩발효 식품의 *in vitro* 및 *in vivo* 항비만 효과 검증

-검정콩 된장의 제조법 개발: 체중 및 지방무게, 중성지방, LDL-콜레스테롤, DML 함량이 낮았다.

3) 비만억제 효과가 있는 콩발효 식품의 제품화

① 비만억제 콩발효 식품의 맛 증진 연구

-항비만 효과를 증진시킨 기능성 청국장, 된장의 맛 증진 연구 시에 기능성 차(뽕잎, 솔잎, 녹차,생강) 중에는 녹차가 가장 관능적으로 좋았다.

② 다양한 응용제품(분말, 환, 캡슐) 개발연구

-검정콩 청국장과 노란콩 청국장을 환으로 제조하였다

-검정콩 된장을 분말,과립으로 제조하였다.

-맛 증진 검정콩 된장으로 녹차와 마늘을 1% 첨가한 된장을 환으로 제조하였다.

③ 개발된 제품의 항비만 효과 확인

-고지방 식이와 함께 검정콩 된장을 첨가한 군은 정상식이군의 몸무게 증가량과 비교하였을때 더욱더 감소하였으며 높은 칼로리를 섭취하였음에도 불구하고 내장지방, 중성지방, 콜레스테롤을 감소시킴으로써 검정콩 된장의 항비만 활성을 증명하였다.

2. 콩발효 식품 성분의 항비만효과 탐색, 기전규명

1) 콩발효 식품의 비만 및 염증 억제 효과

-된장, 청국장, 재래된장이 지방대사에 중요한 역할을 하는 PPAR α 를 뚜렷히 활성화시켰다.

-된장, 청국장, 재래된장이 염증관련 전사인자인 NF- κ B의 활성화를 억제하였다.

-된장, 청국장, 재래된장이 NF- κ B활성화 기전에 관여하는 정보전달계를 억제하였다.

2) 콩발효 분획 및 성분의 비만 및 염증 억제기전

-콩발효 유래 지방산 (nonanoic acid, NA; undecanoic acid, UA)은 지방분해를 촉진하는 전사인자 PPAR α 및 adiponectin을 활성화하였다.

-콩발효 유래 지방산 (nonanoic acid, NA; undecanoic acid, UA)은 NF- κ B 및 그 유전자를 억제시켰다.

-Isoflavone의 일종인 genistein 또한 노화관련 비만쥐에서 PPAR α 및 염증관련 NF- κ B활성화경로를 조절하였다.

-콩발효 식품의 활성성분인 ferulate가 PPAR γ 와 NF- κ B를 조절하였다.

3) 콩발효 식품의 항비만 효능 및 활성증강 성분의 작용기전

-노란콩된장과 검은콩된장이 고지방식이 비만쥐에서 현저한 비만억제 효과를 나타내었다.

-노란콩된장과 검은콩된장이 지방 축적에 의한 산화스트레스를 억제하였다.

-노란콩된장과 검은콩된장이 지방축적에 관여하는 전사인자 SREBP-1의 활성화를 현저히 억제하였다.

-활성 증강 식품인 생강의 유효성분인 zingerone이 비만관련 PPAR활성을 조절하였고, 비만에 의한 염증반응관련 전사인자 NF- κ B도 조절하였다.

3. 콩발효 식품 성분의 신경세포 보호효과 및 신경재생성 효능연구

1. 콩발효 식품의 신경세포 보호 및 신경재생성 활성화에 영향을 미치는 생리활성 물질의 탐색

1) 콩발효 성분으로부터 얻어지는 생리활성물질 효과 검토를 위한 *in vitro* 모델의 확립

콩발효 식품의 주요 생리활성물질로 알려진 Isoflavone과 Anthocyanidin 계열 물질이 미치는 영향을 신경줄기세포의 신경재생성과 신경세포의 보호효과 측면으로 조사하였다.

2) 신경세포주를 이용한 세포보호활성 검증

Isoflavone과 Anthocyanidin 계열 물질은 신경줄기세포와 신경세포에서 산화스트레스와 신경흥분독성에 대하여 큰 보호효과를 나타내지 않았다.

3) 신경줄기세포를 사용한 *in vitro* 모델에서 활성 콩발효성분에 대한 신경재생성 조

사

Isoflavone과 Anthocyanidin, 그리고 피틴산 계열 콩발효 식품의 생리활성물질이 신경줄기세포의 증식에 대한 큰 효과는 없었으며 고농도의 Isoflavone과 soy 사포닌에서는 세포증식을 억제하는 경향을 나타내었다.

2. 동물실험모델에서 콩발효성분의 생리활성 물질이 신경세포 재생성에 미치는 영향 연구

1) 활성물질들에 대한 쥐의 해마체의 신경재생성 활성 조사

2) 콩발효 성분의 생리활성물질에 의한 비만제어효능이 뇌 조직에 미치는 영향 검증
-고지방식이를 섭취한 흰 쥐의 해마를 분리하여 신경세포생장인자인 BDNF와 그 수용체인 TrkB의 발현을 조사한 결과 정상식이군에 비해 고지방식이군에서 BDNF의 발현이 감소되고 콩발효 식품을 섭취한 군에서 발현 정도가 회복되는 것을 볼 수 있었다.

-생쥐비만모델에서 수행한 해마신경재생성 연구에서 성체줄기세포에서 새로이 만들어지는

세포의 증식이 정상식이군에 비해 고지방식이군에서 유의성있게 감소되는 것을 확인하였으며 단기간의 비만모델에서 새로 형성된 신경세포의 생존이 감소하는 것을 관측하였다.

3. 개선된 콩발효 식품의 신경재생성 효능 검증

1) 신경재생성 효능 검증의 동물 실험모델의 확립 (해마신경재생성, 행동양식 검사)
생쥐의 해마신경재생성을 정량하는 방법과 Morris water maze를 사용하여 공간기억력을 측정하는 실험모델을 확립하였다.

2) 동물실험모델을 이용하여 개선된 콩발효 식품의 신경재생성의 활성을 검증

-해마신경재생성에 미치는 영향과 공간기억력을 살펴본 결과 식이군에 따른 유의성 있는 차이가 보이진 않았지만 훈련기간에 따른 latency의 감소는 볼 수 있었다.

-본 연구에서 검정콩된장의 항비만 효과는 여전히 확인할 수 있었음에도 콩발효 식품이 고지방식이에 따른 해마신경재생성의 감소를 복구시키지는 못하였다. 이는 식이 섭취의 기간이 짧았기 때문이라고 사료된다. 최종적으로 본 연구결과는 장,단기간의 고지방식이 섭취에 따른 비만 자체가 해마신경재생성에 영향을 미칠 수 있음을 시사하며 또한 장기간의 고지방식이와 콩발효 식품의 섭취에 따른 연구의 필요성을 제시한다.

o 연구개발 활용

-콩발효 식품의 비만 및 치매 억제 제품개발

-콩발효 식품의 작용기전 규명을 통해 새로운 비만 혹은 치매 관련 유전자 발굴

-콩발효 식품의 항비만 활성성분 및 작용기전 규명

- 콩발효 식품의 신경 보호 성분 규명 및 작용기전 규명
- 비만에 의해 유도되는 질환(성인병, 소아비만 및 신경계 관련 질환들)의 예방 및 치료에 활용
- 연구과정에서 확립, 확보된 연구모델을 성인병 질환 발병 및 그 분자기전을 이해하는데 활용
- 산업적 이용이 가능한 이론 및 응용기술을 갖춘 전문 석·박사 인력배출

SUMMARY

(영문요약문)

I. Subject

:Development of Functional Soybean Food Modulating Obesity and Enhancing Neurogenesis

II. Purpose

: The purpose of this study is to search the soybean fermented food that has effect of anti-obesity and neurogenesis. The bioactive components of soybean fermented food is purified and characterized for health functional food. After all, the proposed study will contribute to increase the income of former, rural economy and export industry.

III. Contents

1. Isolation of soybean fermented food and investigation of manufactured goods
 - Purification and verification of anti-obesity effects of soybean fermented food
 - Exploration of anti-obesity effects of soybean fermented food
 - Manufacture of superior soybean fermented food against obesity

2. Investigation of anti-obesity effects and the action mechanism
 - Exploration of anti-obesity effects in adipocyte (in vitro) : evaluation of expressions of obesity related genes (TNF- α , leptin, resistin, adiponectin)
 - Evaluation of anti-obesity action mechanism of soybean fermented food in obesity animal models and examination of bioactive compound contents
 - Exploration of active components contributive to increase of activity of soybean components

3. Evaluation of the neuroprotective and neurogenesis mechanism of soybean fermented food
 - Identification of bioactive components for neuroprotective and neurogenesis
 - Study on neuroprotective and neurogenesis mechanism of soybean fermented food in animal models
 - Verification of effects for neurogenesis from improved soybean fermented food.

IV. Result and Expected contribution

○ Result

1. Isolation of soybean fermented food and investigation of manufactured goods

- ① Among the treatment group (a normal diet, a high fat diet, and the 10% diet of Chungkukjang, Doenjang, soybean, Kochujang and Samjang), the reduction of weight was occurred with 10% Doenjang diet close to that of the normal diet.
- ② Various types of Doenjang, among the treatment group (a normal diet, a high fat diet and the 5% diet of soybean, traditional Doenjang, commercial Doenjang, and the traditional Doenjang fermented for long period), the traditional Doenjang fermented for long period effectively reduced the weight whereas the soybean had no effect.
- ③ The traditional Doenjang fermented for long period significantly lowered the serum triglyceride and the cholesterol content.
- ④ In a restricted diet (25g/rat/day) and 16% high fat diet, the traditional Chungkukjang had the highest antiobesity activity both *in vivo* and *in vitro*.
- ⑤ Bacterial strains for Chungkukjang: *B. subtilis* was demonstrated to show the highest level in amino-type nitrogen, isoflavone content and sensory test, but lowest in the ammonia-type nitrogen.
- ⑥ To develop the recipe of the functional Chungkukjang to improve antiobesity effects, green tea was selected because it showed the best sensory in various types of teas tested in this study.
- ⑦ The soybean showed the highest level in total isoflavone content and Doenjang had the highest genistein level.

2. Investigation of anti-obesity effects and the action mechanism

- ① Doenjang, Chungkukjang and traditional Doenjang showed increased PPAR α activity and decreased NF- κ B activity.
- ② Doenjang, Chungkukjang and traditional Doenjang decreased NF- κ B dependent genes as well as upstream kinases.
- ③ Nonanoic acid and undecanoic acid activates PPAR α concerning fatty acid oxidation and adiponectin.
- ④ Nonanoic acid and undecanoic acid decreased NF- κ B activity and expression of NF- κ B dependent genes
- ⑤ Genistein known as one of Isoflavone modulated PPAR α activity and NF- κ B action mechanism in age-related obesity rat models.

- ⑥Ferulate, bioactive components of soybean fermented food modulated PPAR γ and NF- κ B activity.
- ⑦Soybean Deanjang and Black soybean Deanjang showed obvious anti-obesity effect in obesity mice models
- ⑧Soybean Deanjang and Black soybean inhibit oxidative stress and SREBP-1 activity associated with lipid accumulation
- ⑨Zingerone as active increase components modulated PPAR and NF- κ B activity concerning lipid oxidation and inflammation

3.Evaluation of the neuroprotective and neurogenesis mechanism of soybean fermented food

- ①Establish of *in vitro* models for the effects of bioactive components from soybean fermented food : neural stem cells and primary cultured neuron
- ②None of bioactive components we have tested, were effective in enhancing the proliferation of neural stem cells, and protecting neurons.
- ③HFD-mediated obesity decreased levels of BDNF and soybean fermented food modulated BDNF in HFD-rats.
- ④Long-term HFD (7 weeks) decreased the numbers of newly generated cells in the dentate gyrus of adult mice, and short-term HFD (2 weeks) was enough to affect the survival of newly-generated neurons from adult hippocampus, indicating that HFD adversely affect the hippocampal neurogenesis in adult mice.
- ⑤Bioactive components of soybean fermented food and soybean fermented food supplements were failed to reverse the decreased neurogenesis mediated by HFD

○ Expected contribution

- Provide the basis for the development of novel therapeutic drugs for the anti-obesity and neurogenesis
- Examine the anti-obesity and neurogenesis mechanism of soybean fermented food
- Therapeutical application of disease (adult disease, young obesity and neuro-related disease) induced by obesity
- Provide the possibility for high-quality life through intervention of obesity

CONTENTS

(영 문 목 차)

Chapter 1	Summary of research	12
Chapter 2	The present condition of technical development of the inside and outside of the country	61
Chapter 3	The contents and results of research development accomplishment	91
Chapter 4	Aim attainment and contribution of relation field	118
Chapter 5	Application plan of research and development result	111
Chapter 6	The overseas scientific and technical information which it collects from research and development process	118
Chapter 7	Reference	115

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	12
1. 연구개발의 목적	12
2. 연구개발의 필요성	12
3. 연구 개발의 범위	14
제 2 장 국내외 기술 개발의 현황	16
1. 국내·외 관련기술의 현황과 문제점	16
2. 앞으로의 전망	17
3. 기술도입의 타당성	18
4. 연구결과가 국내외 기술개발현황에서 차지하는 위치	18
제 3 장 연구 개발 수행 및 내용 및 결과	19
1. 콩 발효 식품의 비만 억제 물질의 분리와 제품화 연구	19
2. 콩 발효 식품 성분의 항비만 효과 탐색 및 기전 규명	106
3. 콩 발효 식품의 신경 세포 보호 효과 및 신경 재생성 효능 연구	146
제 4 장 목표 달성도 및 관련 분야에의 기여도	188
1. 1차년도 (2005)	188
2. 2차년도 (2006)	189
3. 3차년도 (2007)	190
제 5 장 연구 개발 결과의 활용 계획	191
1. 추가 연구의 필요성과 기대적 측면	191
2. 타 연구에의 응용과 활용 방안	192
제 6 장 연구 개발 과정에서 수집한 해외과학기술정보	193
제 7 장 참고문헌	195

제 1 장 연구개발과제의 개요

1. 연구개발의 목적

비만억제 및 신경재생 효과를 보이는 콩 발효 식품을 탐색하고, 이들로부터 유용 물질 성분들을 분리·정제하여 기능성 건강증진 식품으로 개발하여 농가 소득증대, 농촌경제 활성화 및 수출산업 창출에 기여하고자 한다.

2. 연구개발의 필요성

가. 기술적 측면

- 예방 가능한 사망원인 2위인 비만은 건강을 해칠 정도로 체내지방이 과도하게 축적된 상태로 치매의 가장 큰 위험요소이자, 당뇨, 고혈압, 동맥경화, 신장질환, 고지혈증 등을 유발하며, 자궁암, 신장암 등 각종 암과도 관련되어 있는 (2배 이상 위험률) 만성질환이다.
- 의료수준의 향상으로 전 세계적으로 노인인구가 급증하고 있고, 이에 비례한 노인성질환 급증이 사회문제로 대두되고 있는데, 그 대표적 질환인 치매 (dementia)는 기억력 장애, 판단력 상실 등 정신기능의 전반적인 장애가 나타나며, 인간의 삶을 비참하게 마감시키는 질환이다.
- 치매는 기억 및 학습능력을 관장하는 해마체의 손상으로 인해 발생하는 것으로 추정되며, 해마체 신경세포의 생성은 BDNF라는 신경세포 활성화자가 중요한 신경재생능 증진에 중요한 것으로 보고되어 있다. 특히 이 물질이 결핍될 때 동물모델의 비만이행이 관찰되었으며, 이는 역으로 비만이 해마체 신경재생성에 부정적 영향을 미치는 것으로 사료된다.
- 전 세계 비만인구는 약 3억이고, 연 400만 명의 치매환자가 미국에서 발생하며, 연 27만여 명의 환자가 한국에서 발생된다. 이러한 비만과 치매는 올바른 식생활을 통해 예방하는 것이 중요하다.
- 비만과 치매의 의약품에 의한 예방조치는 일반적으로 사용되어지기 힘들으나 기능성 식품을 이용한 치매예방의 접근방식은 상대적으로 용이하므로 관련 활성물질발굴이 시급하다.
- 미국 FDA가 승인한 비만치료제인 Reductil 및 Xenical은 장기사용이 승인은 되었으나, 실제적인 장기사용시의 안정성이 확보되어 있으며, 다양한 부작용을 초래하고 있다.
- 비만과 치매의 치료를 위하여 최근 유전자요법 및 신경간세포의 이식 방법 등이

개발되고 있으나 여러 현실적, 기술적, 윤리적 문제가 존재하며, 손상된 부위로의 이식이 불가능한 경우도 존재하며 이식후 종양으로의 전이 가능성 등도 있어 극복해야 될 문제들이 많다.

- 콩 발효식품인 된장, 청국장, 쌈장 등에 존재하는 생리활성물질들인 triterpene, flavonoid, lignan, carotenoids, coumarin, protease inhibitor, 피틴산, 사포닌, 안토시아닌 등은 비만억제, 항치매, 노화억제, 항알러지, 심혈관계 질병 예방 등의 효과를 나타내며, 장기간 섭취시도 부작용 등이 없는 등 안정성이 확보되어 있다.
- 본 연구에서는 전통 콩 발효 식품으로부터 비만, 치매 등의 질병제어 효과를 나타내는 새로운 활성물질들을 분리하고, 이들의 제어기전을 분자수준에서 규명하여, 이들을 비만제어, 치료, 예방과 뇌기능개선 및 신경재생 효능을 가진 기능성 식품들로 개발함으로써 콩발효식품 소비증대 및 국산 콩재배 농가소득 증대를 꾀하고자 한다. 이는 1조 17억 원에 이르는 한국의 비만관련 경제비용 감소 및 80억 달러에 달할 세계 비만치료제 시장에 진출할 수 있는 계기가 될 것이다.

나 경제·산업적 측면

- 미국의 경우 비만으로 인해 매년 약 2,300억 달러의 직간접 경비가 지출되었고, 우리나라의 경우에도 1조 17억 원의 경비가 지출되었다.
- 2000년 기준 전 세계 비만치료제 시장은 약 13억 달러규모이며, 2010년에는 80억 달러에 달하는 것으로 전망되고 있다.
- 치매의 경우, 연간 400만 명 이상의 환자가 미국에서 발생되며, 이로 인해 1000억 달러 이상이 치료 간호 등의 목적에 소비되고 있다. 우리나라는 현재 27만 명의 이상 환자가 존재하며, 이들의 수는 2020년 60여만 명에 이를 것으로 예상되고 있다. 또한 전 세계적으로 2025년에는 2200만 명의 환자가 발생할 것으로 보여진다.
- 현재 우리나라에서 판매되는 대부분의 콩발효식품의 주원료인 콩은 수입에 의존하고 있으며, 특히 유전자 변형콩의 수입도 이루어지고 있으며, 장기보존을 위해 방부제 및 화학조미료를 첨가하고 있어 한국민 건강을 대단히 위협하고 있으며, 이로 인한 농가의 피해도 대단히 크다.
- 많은 보고들에서 전통재래식으로 만들어진 콩발효식품에서 생리활성도가 대단히 높은 것으로 보고되고 있으며, 이는 재래콩 재배 등을 통해 한국 농가소득을 증대시킬 수 있는 훌륭한 기반이 될 뿐만 아니라, 새로운 활성소재의 개발을 통한 비만, 치매 및 성인병 치료제, 그 관련 건강식품 시장에 참여할 수 있는 경제적인 기반을 마련할 수 있다.

다 사회·문화적 측면

- 의료기술 및 생활환경의 발전으로 인해 인구는 증가하고 있고, 비만과 치매환자들도 꾸준히 늘어나고 있으며, 이로 인한 수명단축 및 삶의 질 저하 등의 사회적 문제가 발생하고 있다.
- 비만으로 인해 전 세계 3억 인구가 영향을 받고 있으며, 비만으로 인한 당뇨질환은 1억9천4백만 명이 고통을 받고 있으며, 우리나라의 경우, 2003년 752만 명이 생활습관 관련 질환으로 치료를 받았으며, 이 중 362만8천명이 고혈압, 당뇨 182만 명, 심장병 97만 명, 고콜레스테롤증 34만 명이었고 모두 비만과 밀접한 관련이 있다.
- 치매는 연간 400만 명 환자가 미국에서 고통을 받으며, 우리나라는 현재 27만 명의 이상이 비참한 삶을 살고 있다. 또한 전 세계적으로 2025년에는 2200만 명의 환자가 발생할 것으로 보여진다. 따라서 삶의 질 개선을 위한 치매제어 효능을 가지는 물질의 개발이 시급하다.
- 우리나라 비만 환자 중 12%가 아동비만이다. 아동비만은 성인기의 심장비대, 부정맥을 야기하며, 당뇨병 발병율이 30% 이상이나 되는 등 장차 심각한 잠재 성인병군이다.
- 우리나라 건강보험자 중 16%가 비만, 고혈압, 당뇨 등의 질환을 가지고 있으며, 40대 이상이 90% 가까이 차지하며, 이를 개선시킬 새로운 계기가 필요하다. 치매 또한 비만과 밀접한 관련이 있으며, 이에 대한 제어기능을 가지는 생리활성 효능이 규명된다면, 전통식품 섭취의 붐 및 이로부터 개발된 다양한 생리활성물질의 소비를 촉진시킬 수 있다.
- 생리활성물질 발굴로 인해 새로운 치매 및 비만치료 물질이 개발되면, 평균수명을 10년 이상 연장시키는 효과가 예측된다. 또한 비만으로 인한 당뇨, 혈관질환, 치매 등에 대한 질환의 예방과 치료분야에 적용되어 복지·의료분야의 발전이 예상된다.

3. 연구 개발의 범위

가 연구개발의 내용

- 1) 콩발효식품의 비만 억제물질의 분리와 제품화연구
 - 콩발효식품의 항비만효과 검증 및 그 성분의 분리
 - 비만 억제효과가 있는 콩발효식품의 항비만 효과 증진 연구
 - 비만억제 효과가 있는 콩발효식품의 제품화
- 2) 콩발효식품 성분의 항비만효과 탐색 및 기전규명
 - 비만억제 효과 검토 : 활성 콩발효성분에 의한 비만 관련 유전자 (TNF- α , leptin,

resistin, adiponectin)의 발현 검토

- 비만동물모델에서의 활성 콩발효분획 및 성분의 비만억제 분자기전 규명

- 활성 콩발효성분을 함유한 제품의 함량 및 비만억제 기전 검토

3) 콩발효식품 성분의 신경세포 보호효과 및 신경재생성 효능연구

- 콩발효성분의 신경세포보호 및 신경재생성활성에 영향을 미치는 생리활성 물질의 탐색

- 동물 실험모델에서 콩발효성분의 생리활성 물질이 신경세포 재생성에 미치는 영향 연구

- 개선된 콩발효식품의 신경재생성 효능 검증

제 2 장 국내외 기술 개발의 현황

1. 국내외 관련기술의 현황과 문제점

가) 국외의 경우

- 현재 세계적으로 많은 종류의 혈압 강화제나 고지혈증 억제제, 혈관 염증 억제제 등이 개발되고 있으나 대부분 화학적 합성을 통하여 개발한 제품으로 부작용 많다.
- 미국 FDA가 승인한 비만치료제인 Reductil 및 Xenical은 장기사용이 승인은 되었으나, Reductil은 혈압상승, 불면증, 구강건조, 현기증 등의 부작용이 빈번하며, 심혈관질환, 고혈압 환자에게는 사용할 수 없다. Xenical은 설사, 지방변, 분실금의 부작용과 함께 지방섭취가 낮은 한국인에서는 효과가 뚜렷이 나타나지 않으며, 실제적인 장기사용에 대한 안정성이 확보되어 있지 않다.
- 치매 등의 퇴행성 신경질환의 치유법 및 예방법에 관한 연구가 활발히 진행되고 있으나 대부분 치료제 개발에 집중되어 있으며, 그 효과 역시 사후처리방법으로 사전처리보다 효과가 상대적으로 떨어지는 경향이 있다.
- 비만치료제의 경우 각종 대사질환의 이환률 및 사망률을 감소시키고 사회·경제적 파급효과가 엄청나 세계적으로 비만치료제 개발에 국가적 지원이 적극적으로 이루어지고 있다.
- 막대한 비용을 투자하여 새로운 물질들을 개발하고 있지만, 비교적 부작용이 적은 천연물로부터 비만의 예방과 치료 및 치매에 효과가 있는 신약을 개발하지 못하고 있는 형편이다.

나) 국내의 경우

- 외국 제약사들의 상당수가 시장진입 초기에 국내 시장 지배력 확대 차원에서 판권 이전을 해주고 있지만 제품의 영업력과 인지도가 확보된 이후에는 이를 다시 회수하는 경우가 대부분이다.
- 국내 극소수의 제약회사 및 벤처기업에서 비만, 치매 등의 치료제를 개발하였으나, FDA의 허가에는 여러 임상시험 및 막대한 비용이 소요되어 최종개발까지 많은 시간이 걸린다.
- 비만, 고혈압, 동맥경화에 효과가 있는 것으로 알려진 콩발효식품은 한국 고유의 발효식품이고, 그 생리활성 연구가 잘 되어 있기 때문에, 연구 및 상품화에 있어 대단히 유리하다.
- 콩 발효 식품에서 유래된 활성물질에 대한 치매제어 효과 및 신경재생성에 관한

연구는 현재 전무하다.

- 콩 발효 식품에 대한 관심은 높으나, 시판중인 대부분의 콩발효식품들은 수입농산물로 제조되고 있기 때문에, 한국 농민들에게 돌아가는 수입은 전혀 없으며, 오히려 유전자변형 수입농산물에 의한 국민건강이 위협받고 있다.
- 재래콩을 이용한 콩 발효 식품에서의 생리활성도가 높기 때문에, 본 연구에 의한 연구결과들은 국산 재래콩의 재배 및 소비를 증대시키고, 이를 통한 한국농민의 수입증대에 일조할 것이다.
- 다양한 생리활성 능력을 앞세워 우후죽순식의 콩 발효 건강식품들이 판매되고 있지만, 실제로 이들 회사에서 광고하는 활성기능들이 과학적으로 규명되어졌는지에 대한 증거자료는 희박하며, 과학적인 검증을 거쳐 작용기전이 과학적으로 규명된 새로운 생리활성 물질 발굴과 이의 상품화가 시급하다.
- 항비만 및 항치매 효능이 있을 것으로 생각되는 한국 전통식품인 된장, 청국장, 쌈장 등에 대한 관심은 대단히 높으나, 이들을 이용한 생리활성 물질에 관한 상품화는 되어 있지 않다.

2. 앞으로의 전망

- 식생활의 서구화 및 고콜레스테롤의 외식사업이 증가하면서 지방과 육류 섭취가 증가하고 이에 의한 비만환자가 급증하고 있다.
- 이러한 이유로 전 세계 비만치료제 시장은 거대화하고 있으며, 미국의 경우 2006년 약 2천억 원대, 2010년에는 8천억 원대로 성장할 것으로 추정되고 있다. 이러한 시장에 참여할 수 있는 새로운 치료효과가 있는 물질개발이 시급하다.
- 식생활의 서구화는 우리나라의 아동비만인구를 급증시키고 있으며, 아동비만은 대부분 성인질환을 유발시킨다. 그러나 대부분의 아동들은 재래식품에 대한 거부반응이 크기 때문에, 이를 해결하고 효과적인 생리활성물질을 섭취할 수 있는 새로운 상품들의 개발이 시급히 요구된다.
- 비만, 치매에 관한 치료제들은 현재 거의 외국계 제약회사들이 독점하고 있는 상황이며, 이에 대응할 새로운 생리활성물질 및 건강식품의 개발이 필요하다.
- 한정된 콩 발효 식품의 산업적 용도를 음료, 차, 식품 및 주류기업과 연계하여 다양한 식음료를 개발함으로써, 산업적 부가가치 증대도 가능하다.
- 건강식품류는 해외 수출이 의약품에 비해 비교적 용이하기 때문에, 연 1500억 달러에 이르는 건강식품시장에 쉽게 진출할 수 있어 새로운 부가가치상품의 개발이 용이하다.
- 치료제 및 건강 식품류의 개발을 통해 우리나라 콩발효식품의 우수성과 함께 농가 소득의 증대를 가져올 수 있다.

3. 기술도입의 타당성

- 비만 및 치매 치료제에 대한 원천기술은 기술도입 자체가 불가능하다.
- 콩 발효 식품을 통한 비만 및 치매 제어 활성물질의 발굴에는 관련 전공자들로 구성된 연구진에 의해 연구개발이 가능하므로 특별한 기술도입이 요구되지 않는다.

4. 연구결과가 국내외 기술개발현황에서 차지하는 위치

- 막대한 비용을 투자하여 새로운 물질들을 개발하고 있지만, 비교적 부작용이 적은 천연물로부터 비만의 예방과 치료 및 치매에 효과가 있는 신약을 개발하지 못하고 있는 형편이다.
- 만주 및 한국이 원산지인 대두를 이용하여 항 비만효과를 밝혀낸 이번 연구결과는 비교적 부작용이 적은 천연물로부터 밝혀냈다는데 의미를 둘 수 있다. 또한 검은 색소에 포함된 안토시아닌 계열에서 항 비만 효과가 있는 것으로 이번 연구결과 밝혀낸바 앞으로 안토시아닌 계열에서 항 비만에 관한 좀 더 심화 연구를 할 수 있는 길을 열었다.

제 3 장 연구 개발 수행 및 내용 및 결과

1. 콩 발효 식품의 비만 억제 물질의 분리와 제품화 연구

1. 이론적 접근방법

가. 콩발효식품과 청국장 제조

1) 전통콩발효식품과 공장식 된장의 구입 및 전처리

동물실험에 사용한 전통 콩발효식품은 순창지역의 M사(문옥례 식품, 2년 발효)에서 제공받아 동결건조 하여 사용하였으며, 공장식 된장은 대전 지역의 J사(진미 된장, 콩100% 전통식된장과 콩과 밀이 혼합된 공장식된장 : 발효기간 6개월)에서 제공받아 동결건조 후 사용하였다. S사(샘표, 6개월 공장식 된장) 된장과 C사 된장(청정원, 6개월 공장식 된장)도 제공받아 동결건조 후 사용하였다.

2) 콩발효식품과 된장의 품질특성 및 분석

가) 총균수

시료를 멸균생리식염수를 이용한 10배 희석법으로 희석하고 plate count agar 에 도말한 후 30℃에서 48시간 배양한 다음 나타난 colony를 계수하여 호기성 균수(CFU/ml)로 나타내었다.

나) 질소화합물 측정 - 아미노태질소

된장의 아미노태 질소 함량은 시료 2 g을 취하여 formol 법으로 측정하였다. 즉, 시료 2 g에 증류수 100 ml를 가하여 1시간 동안 상온에서 교반한 후, 중성 formalin(pH 8.4) 용액 20 ml를 가한 다음, pH 8.4가 될 때까지의 0.1N-NaOH 로 적정하여 적정 ml 수를 측정하여 아미노태 질소의 함량을 계산하였다.

다) 일반성분

일반성분은 A.O.A.C.법에 준하여, 수분은 105℃ 건조법, 조단백질은 Micro-Kjeldahl법, 조지방은 Soxhlet 추출법으로 분석하였다.

라) 관능검사

제조된 된장과 청국장을 반복된 랜덤화 완전 블록 계획(replicated randomized complete block design)에 따라서 훈련된 7명의 관능요원이 관능검사를 실시하였으며, 평가 항목은 주관적인 평가로 색(color), 점질성(viscous material), 종합적인 평가(overall acceptability)로 하고, 1에서 9까지 분류한 등급을 사용

하여 평가하였으며, 1에 가까울수록 싫고, 9에 가까울수록 좋은 것으로 나타내었다. 또 객관적인 평가로는 후각적 지각인 청국장 특유의 냄새(smell)와 미각적 지각인 단맛(sweetness), 쓴맛(bitterness), 감칠맛(savory taste), 종합적인 맛(overall flavor), 그리고 질감을 평가하였으며, 그 정도는 1에 가까울수록 감지 불가능하고, 9에 가까울수록 극도로 강하게 감지하는 것으로 나타내었다. 후각적 지각으로 코로 감지되는 것으로 평가하였고, 미각적 지각은 여러 차례 어금니로 씹은 후 입과 코로 감지되는 것으로 평가하였으며, 질감은 앞니를 사용하여 2~3회 씹는데 드는 힘의 정도로 평가하였다. 이때 단맛이나 감칠맛은 먹은 뒤에 나타나는 구수한 뒷맛의 정도, 쓴맛은 청국장 발효에 의해 나타나는 불쾌한 정도로 정의하였다.

마) 된장에 함유된 이소플라본의 분석

이소플라본의 분석(311)은 동결건조(SFDSM12L, SAMWON Freezing Engineering Co.)된 시료 1g을 마쇄하고, 0.1N HCl (2ml) 및 acetonitrile(HPLC Grade, 99.9%, TEDIA Company, Inc. USA) 10ml를 첨가하였다. 실온에서 2시간 교반한 후, 여과지(NO 42)로 여과하였다. 30℃ 이하에서 진공농축건조(EYELA, Tokyo Rikakikai Co.)시키고, 80% methanol(HPLC Grade, 99.9%, TEDIA Company, Inc. USA) 10ml에 용해시켰다. 0.45µm membrane filter로 여과시켜서 HPLC에 주입시켜 분석하였다. 즉, 시료 중 12가지 isoflavone isomer 함량 및 조성의 분석은 HPLC (LC-10AD, Liquid Chromatograph)를 사용하였으며, 칼럼을 YMC-pack ODS-AM-303 HPLC칼럼(5µm, 25cm×4.6mm i.d)을 이용하였고, UV-VIS Detector (SPD-10A), 유속은 solvent 1ml/min으로 하였다. 파장 254nm에서 3차 증류수의 0.1% glacial acetic acid (99.5%, 약리 순약 주식회사, Tokyo, Japan)를 용매로 하여 0.1% glacial acetic acid/acetonitrile linear을 이동상으로 하여 linear gradient법 {15%-(50분)-35%(10분)-35%} 으로 분석하였다. 이소플라본의 표준품은 일본 후지코주식회사에서 구입하였으며, 그 순도는 다이드진과 제니스틴(99%), 글라이시테인, 다이드제인, 제니스테인과 글라이시틴(95%), 각각의 acetyl group과 malonyl group(90%) 순이었다.

나. 검정콩 된장의 제조

1) 재료

검정콩 콩알메주 제조용의 콩은 충남 괴산의 괴산군자농협에서 시판중인 대두(황금콩 대립종)을 대조구로 하였고, 검정콩은 대립종(서리태·속 파란콩)과 소립종(귀눈이콩·다원콩, 약콩)으로 충남 괴산군자농협에서 시판중인 것으로 구

입하여 사용하였다. 된장제조용의 소금은 천일염, 한주소금, 죽염, KCl 1회 구운 죽염을 사용하였고, 기능성 부가재료로서는 녹차 및 겨우살이추출물, 고춧가루와 마늘을 혼합한 시료를 사용하였다.

2) 검정콩 콩알메주 제조용의 종균 및 배양

메주 발효에 사용한 *Asp. oryzae*는 (주)충무발효(울산 울주군)에서 제공받아 사용하였고, 공시균주는 *B. subtilis*(KCCM 11315)로 한국 미생물 보존센터에서 분양받아 사용하였으며 메주에서 분리한 *Bacillus licheniformis* CN-15 균주는 영남대 식품가공학과에서 분양받아 사용하였다. 균은 glucose 0.5%를 첨가한 NB 배지(Difco, nutrient broth : beef extract 0.3%, peptone .0.5%)에 균을 각각 접종하여 37℃에서 24시간 배양한 후, 균체 농도를 조절(흡광도 600nm = 0.8)하여 종균액으로 사용하였다.

3) 수침 및 침지물량별, 증자조건별 검정콩 메주의 제조

대립 검정콩(서리태)을 불리는 물의 양을 1.5배 2배 3배로 하고 수침시간을 6시간, 12시간으로 각각 조절하여 증자시간을 45분, 60분으로 하여 콩알메주를 제조하고 pH와 산도, 총균, 아미노태 질소와 암모니아태 질소 환원당 함량 등의 품질 특성을 살펴보았다.

4) 균 종류를 달리하여 제조한 검정콩 메주의 제조

증자한 검정콩(서리태)을 침지, 증자후에 40℃로 냉각하여 균의 종류를 달리한 전배양한 종균액을 원료 콩 무게의 0.2%(v/w) 로 접종하여 콩알메주를 제조하였다. 사용된 종균은 *Asp. oryzae*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *Asp. oryzae* + *B. subtilis*, *Asp. oryzae* + *B. licheniformis*를 사용하였다. 제조 후 pH와 산도, 아미노태 질소와 암모니아태 질소 함량, 총 균수 등의 품질 특성을 살펴보았다.

5) 검정콩(서리태) 된장의 제조

검정콩의 된장의 제조는 앞의 처리에 따른 검정콩 콩알메주를 각각 제조한 후 소금 및 물을 첨가하여 혼합한 후 32℃ incubator에서 60일간 발효 및 숙성 시키면서 품질 특성을 살펴보았다.

다. 항비만 실험

1) *in vivo* 항비만 실험

가) 실험동물 사육 조건

1차 동물실험은 음성 Sprague-Dawley rat(대한실험동물 센터, 대구)으로, 체중이 80 g 전후의 것을 사용하였으며, 1 주일간 표준사료로 사육하여 적응시킨 후 식이를 조절하여 공급하였고, 동물실험실은 온도 $22\pm 1^{\circ}\text{C}$, 습도 $55\pm 5\%$ 를 유지하였으며, 12시간 간격으로 light-dark cycle을 유지하였다.

식이의 제조는 항비만 실험을 위해 Lard을 12% 첨가한 고지방식이를 사용하였고, 동결건조한 콩 발효식품을 식이에 각각 10%씩 첨가하여 항비만 효과를 비교하였다. 일반 조성 중 단백질, 지방, 탄수화물, 섬유소 양을 고려하여 AIN-93 식이를 바탕으로 제조하였다. 시판된장, 청국장, 검정콩 된장 등은 전체식이에 각 10% 수준으로 고지방식이에 첨가하여 자유식으로 30일 동안 공급하였다.

2차 동물실험에 사용한 동물은 음성 Sprague-Dawley rat (대한실험동물 센터, 대구)으로, 체중이 80 g 전후의 것을 사용하였으며, 1 주일간 표준사료로 사육하여 적응시킨 후 식이를 조절하여 공급하였고, 동물실험실은 온도 $22\pm 1^{\circ}\text{C}$, 습도 $55\pm 5\%$ 를 유지하였으며, 12시간 간격으로 light-dark cycle을 유지하였다. 그리고, 식이의 제조는 항비만 실험을 위해 Lard을 16% 첨가한 고지방식이를 사용하였고, 동결건조한 콩 발효식품을 식이에 각각 5%씩 첨가하여 항비만 효과를 비교하였다. 일반 조성 중 단백질, 지방, 탄수화물, 섬유소 양을 고려하여 AIN-93 식이를 바탕으로 제조하였고, 전통청국장 (문옥례식품, 순창), 전통된장(문옥례식품, 순창), 공장식용 콩 (진미식품, 대전)과 공장된장(진미식품, 대전)의 시료를 전체식이에 각 5% 수준으로 고지방식이에 첨가하여 25g 제한식으로 45일간 공급하였다.

또한 제 3차 동물실험에서는 음성 Sprague-Dawley rat(대한실험동물 센터, 대구)으로, 체중이 80 g 전후의 것을 사용하였으며, 1 주일간 표준사료로 사육하여 적응시킨 후 식이를 조절하여 공급하였고, 동물실험실은 온도 $22\pm 1^{\circ}\text{C}$, 습도 $55\pm 5\%$ 를 유지하였으며, 12시간 간격으로 light-dark cycle을 유지하였다. 식이의 제조는 항비만 실험을 위해 Lard을 16% 첨가한 고지방식이를 사용하였고, 동결건조한 콩 발효식품을 식이에 각각 5%씩 첨가하여 항비만 효과를 비교하였다. 일반 조성 중 단백질, 지방, 탄수화물, 섬유소 양을 고려하여 AIN-93 식이를 바탕으로 제조하였고, 검정콩을 전체식이에 각 5% 수준으로 고지방식이에 첨가하였고, 식이에 넣은 검정콩의 양에서 추출한 안토시아닌을 고지방식이에 첨가하여 25g 제한식으로 30일간 공급하였다.

제 4, 5차 동물실험에서는 비만을 유발하기 쉬운 생후 5주령의 체중 14-16g 가량의 C57BL/6 마우스 60마리를 (주)오리엔트사에서 구입하여 실험하기 전 시판 고형사료를 먹이면서 1주일 동안 환경에 적응 시켰다. 정상식이(ND)는 AIN-93 diet 정상식이에 준하여 제조한 일반식이와 비만의 효과를 높이기 위

하여 에너지의 16%의 고지방식이를 6주 실시하여 비만유도를 하였다. 그리고, 7주부터 식이에 따른 된장의 체중감량 및 지질 개선효과를 알아보기 위하여 4차 동물실험에는 고지방식이에 된장을 동결건조하여 만든 분말을 일반성분을 고려한 5% 된장함유 사료와 정상식이에 된장의 일반성분을 고려한 5% 된장함유 사료(ND-D), 그리고, 검정콩 된장함유 사료를 만들어 식이하였다.

제 5차 동물실험에서는 5% 된장함유 고지방식이 사료와 그에 함유되어 있는 소금을 함유한 고지방 식이 사료를 만들어 식이하였다. 사육 기간동안 식이와 물은 자유 급식하였으며 체중증가량은 매주 1회 측정하였고, 식이섭취량은 매일 시행하였다. 식이를 위하여 된장사료의 일반성분을 분석한 결과 된장의 일반성분은 수분 2.59 ± 0.15 , 지질 17.59 ± 0.26 , 단백질 33.96 ± 0.05 , 회분 26.29 ± 0.01 이었으며, 섬유소가 6.31 ± 1.42 이었다. 사육은 한 그룹당 5마리로 사육용 cage 속에서 6주간 사육후 다시 몸무게가 동일하게 분류한 다음 8주 후 희생시켰다. C57BL/6 마우스 모델의 마우스는 검은색으로, 나이를 먹어감에 따른 세포성 면역기능 저하가 적고, 자연발생종양이 적게 발생하는 특징을 가지고 있다. 실험동물의 체중은 2주에 한번씩 측정하여 체중의 증가를 확인하였고 희생전에 최종 무게를 측정하였다. 해부한 후 각 장기 및 조직의 무게를 정밀 저울로 측정하고 15ml conical centrifuge tube에 넣어 분석시까지 -70°C 에 보관하였다.

나) 총지질 함량 측정

각 지방조직과 간조직의 경우는 Folch법(316)을 사용하였다. 시료를 각 2 g 씩과 $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH}(2:1)$ solution 40 ml를 넣고 균질화 한 후 다시 기구를 한 $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH}(2:1)$ solution 10 ml를 다시 합한 다음 filter paper로 찌꺼기를 걸러내었다. 다시 0.88% KCl 10 ml를 첨가한 뒤 separate funnel에서 shaking 후 정치시켰다. 아래층을 취해 비이커에 담고 상층액은 버린다. $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} : \text{H}_2\text{O} = 8:4:3$ 용액을 15~20 ml 첨가하고 shaking 후 정치시키고 아래층을 취하여 45°C 에서 evaporation 시킨 후 CHCl_3 를 첨가하여 25 ml로 정용하였다. 먼저 aluminium weighing dish를 80°C dry oven에서 20분간 말려 desicator에서 10분간 방냉한 뒤 무게를 측정하고(A) 25 ml로 정용하였던 sample을 5 ml씩 dish에 넣고 후드 안에서 hot plate 위에 놓고 CHCl_3 를 증발시킨다. CHCl_3 가 모두 증발되면 dish를 다시 80°C dry oven에서 20분간 둔 뒤 꺼내어 decicator에서 10분간 방냉하고 dish의 무게를 측정한 뒤(B) 아래 공식에 의해 총 지방량을 계산하였다.

$$\text{Total lipids of feces(g)} = (B-A) \times 25 \text{ ml} / 5 \text{ ml} \times 100$$

$$\text{Total lipids of liver(g)} = [(B-A) \times 500] / \text{liver weight}$$

다) 중성지방 함량 측정

각 실험군 흰쥐의 심장에서 채혈한 혈액을 원심 분리(3,000 rpm, 4°C, 10 min) 하여 혈청을 분리하여 시료로 사용하였다. 시료 0.02 ml를 취하여 중성지방 측정용 시액(AM 157S-K, 아산제약, 경기도)을 사용하여 측정하였다(317). 혈장 0.02 ml에 조제한 반응시약 3 ml씩을 첨가하여 vortex mixer로 혼합하고 37°C의 water bath에서 5분간 반응시켜 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 중성지방 표준용액을 이용하여 위의 방법과 동일하게 발색시켜 흡광도를 측정한 후 시료의 흡광도 값을 다음 식에 대입하여 혈장의 중성지방 농도 값을 구했다.

$$\text{중성지방(mg/dl)} = \frac{\text{검체의 흡광도}}{\text{표준액의 흡광도}} \times 300$$

라) 콜레스테롤 함량 측정

각 실험군 흰쥐의 심장에서 채혈한 혈액을 원심 분리(3,000 rpm, 4°C, 10 min) 하여 혈청을 분리하여 시료로 사용하였다. 시료 0.02 ml를 취하여 콜레스테롤 효소시약(BC 108-E, 아산 제약, 경기도)을 사용하여 측정하였다(318). 실험 방법은 중성지방 측정시와 동일하고 콜레스테롤 표준용액을 이용하여 위의 방법과 동일하게 발색시켜 500 nm에서 흡광도를 측정한 후 시료의 흡광도 값을 다음 식에 대입하여 혈장의 콜레스테롤 농도 값을 구했다.

$$\text{콜레스테롤(mg/dl)} = \frac{\text{검체의 흡광도}}{\text{표준액의 흡광도}} \times 300$$

마) HDL-콜레스테롤 함량 측정

HDL-콜레스테롤 농도는 효소법에 의한 정량용 HDL-콜레스테롤 kit(HDL-콜레스테롤 AM 203-K, 아산제약, 경기도)로 측정하였다. 실험방법은 혈장 0.2 ml에 분리시액 0.2 ml를 넣어 잘 혼합하여 10분간 실온에 방치한 후, 4°C에서 3,000 rpm으로 10분간 원심 분리한 뒤 상층액을 0.1 ml씩 취하여 조제한 반응시약 3 ml씩을 첨가하여 만들고 표준액은 중성지방과 동일한 방법으로 만들어 vortex mixer로 혼합하고 37°C의 water bath에서 5분간 반응시켜 60분 이내에 파장 500 nm에서 흡광도를 측정하고, 시료의 흡광도 값을 다음 식에 대입하여 HDL-콜레스테롤 농도를 구하였다.

$$\text{HDL-콜레스테롤(mg/dl)} = \frac{\text{검체의 흡광도}}{\text{표준액의 흡광도}} \times 50 \times 2$$

바) 수분정량

평량병을 105°C로 2시간 건조한 후 desicator에 옮겨 30분간 냉각한 후 정확히 평량하여 항량을 구하였다. 시료 2~3 g을 정확하게 평량하고 105°C로 조절된 건조기에서 1~3시간 건조한 후 desicator에 옮겨 30분간 방냉하여 항량이 될 때까지 건조한 후 중량과 건조전의 중량 차이를 구하였다(319,320).

$$\text{수분함량} = \frac{W_2 - W_3}{W_2 - W_1} \times 100$$

W_1 : 평량병의 항량

W_2 : 평량병 항량 + 채취시료의 중량

W_3 : W_2 를 건조한 후의 중량

2) *in vitro* 항비만 실험

가) 시료추출

콩 종류 및 제조법을 달리하여 만든 시료를 마쇄하여 시료에 20배(v/w)의 메탄올을 첨가하여 12시간 교반을 3회 반복한 후 여과하여 회전식 진공 농축기 (EYELA, Tokyo Rikakikai Co. Japan)로 농축하여 메탄올추출물을 얻었다. 이들 추출물을 DMSO(Dimethyl sufoxide)에 희석하여 실험에 사용하였다.

나) Primary preadipocyte의 배양과 분화

2주령의 Sprague-Dawley 랫트의 피하로부터 지방을 채취하여 1% albumin buffer(0.135M NaCl, 4.7 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 1.25 mM MgSO₄, 10 mM HEPES, 1.25 mM NaH₂PO₄, 1.25 mM Na₂HPO₄, 1%(W/V) bovine serum albumin)로 washing한 뒤 수술용 메스로 조직을 잘게 잘랐다. 이를 collagenase buffer (collagenase type II 1 mg/ml; Sigma, 3.5%(W/V) bovine serum albumin, 5 mg/ml glucose) 에서 1시간 동안 반응시켜 조직으로부터 세포를 얻은 다음 250 μm nylon mesh로 분해되지 않은 조직을 걸러낸 후 1000 rpm으로 10분간 원심분리하여 mature fat cell과 stromal vascular cell을 분리한 뒤 불필요한 상층액을 제거하였다. Serum이 포함되지 않은 Med 199 용액 10 ml로 세포를 suspension한 뒤 다시 250 μm mesh로 걸러 내었다. 다시 1000 rpm에서 10분간 원심분리한 다음 상층액을 버리고 다시 serum이 포함되지 않은 medium 199.5 ml을 넣었다. 세포를 suspension한 다음 3차 증류수 18 ml를 넣어 적혈구를 용혈시키고, 삼투압 조절을 위해 10× PBS를 넣고 다시 1000 rpm에서 10분간 원심 분리하였다. 상층액을 버린 다음 5 ml Med 199로 세포를 suspension한 뒤 cell을 계수하였다. 12 well plate에 2.5×10⁵/well의 세포를 분주하고 10% FCS, 100 Unit/ml penicillin, 100 ng/ml streptomycin, 2.5

$\mu\text{g/ml}$ fungizone(Sigma Co., U.S.A.)이 포함된 Med 199로 배양하였다. 이를 후 세포를 융합한 후 $10 \mu\text{g/ml}$ Insulin, $0.25 \mu\text{M}$ dexamethasone (Sigma Co., U.S.A.), 0.5 mM IBMX(Sigma Co., U.S.A.), 10% FCS, 100 Unit/ml penicillin, $0.1 \mu\text{g/ml}$ streptomycin, $2.5 \mu\text{g/ml}$ fungizone이 포함된 Med 199로 분화를 유도하였다. 분화 시작 후 2일째부터는 $10 \mu\text{g/ml}$ Insulin, 10% FCS, 0.1 Unit/ml penicillin, $0.1 \mu\text{g/ml}$ streptomycin, $2.5 \mu\text{g/ml}$ fungizone이 포함된 Med 199로 배양하였고, 분화를 시킨 후 7~14일이 경과하여 세포가 최대로 분화되었을 때 고추장과 관련된 시료들을 1 mg/ml 의 농도로 처리하고 24시간 후에 배지를 collect 하였다.

다) 렙틴 함량의 측정

지방세포에서 분비된 렙틴의 양은 collect한 배지를 사용하여 ELISA(R&D systems)방법을 이용하여 측정하였다. 먼저 $100 \mu\text{l}$ 의 Rabbit anti-rat leptin IgG($2 \mu\text{g/ml}$)를 Maxisorb ELISA plate에 넣어 overnight 시킨 후 0.05% Tween 20이 포함된 PBS(PBS-T)로 3회 세척한 plate에 sample을 1시간 동안 처리하고, PBS-T로 씻어낸 후 $100 \mu\text{l}$ 의 biotinylated rabbit anti rat leptin IgG(200 ng/ml)을 1시간 동안 RT에서 처리한 후 다시 PBS-T로 3회 세척하였다. 그 후 다시 Extravidin-horse radish peroxidase(1:200)를 RT에서 1시간 동안 incubation 시킨 후 3회 세척하였다.

라) 글라이세롤 함량의 측정

Glycerol assay reagents를 50 ml 의 3차 증류수에 용해시킨 후 1 ml 를 취해 37°C 에서 가열하였다. 각 aliquot reagent는 $10 \mu\text{l}$ 의 sample과 반응하고 37°C 에서 5분간 반응한 다음 ice에서 냉각시킨 후 540 nm 에서 흡광도를 측정하였다.

2. 연구내용

가. 콩발효식품의 항비만효과 검증 및 그 성분의 분리

- 1) 콩발효식품(된장, 청국장, 쌈장 등)의 *in vitro* 및 *in vivo* 항비만효과 탐색
- 2) 활성 콩발효식품의 물질 추출 분획, 정제 및 활성검토

나. 비만 억제효과가 있는 콩발효식품의 항비만 효과 증진 연구

- 1) 콩 종류(검정콩), 미생물 및 활성물질 첨가의 의한 항비만 효과가 증진된 콩발효식품의 개발
- 2) 항비만 효과 증진 콩발효식품의 *in vitro* 및 *in vivo* 항비만 효과 검증

다. 비만억제 효과가 있는 콩발효식품의 제품화

- 1) 비만억제 콩발효식품의 맛 증진 연구

- 2) 다양한 응용제품(분말, 환, 캡슐) 개발연구
- 3) 개발된 제품의 항비만 효과 확인

3. 연구결과

가. 콩발효식품의 항비만효과 검증 및 그 성분의 분리(2005)

1) 콩발효식품(된장, 청국장, 쌈장 등)의 *in vitro* 및 *in vivo* 항비만효과 탐색

가) 콩발효식품의 *in vivo* 항비만 효과 탐색

(1) 식이 동물 및 식이조성표

본 실험에 사용한 동물은 웅성 Sprague-Dawley rat(대한실험동물 센터, 대구)으로, 체중이 80 g 전후의 것을 사용하였으며, 1 주일간 표준사료로 사육하여 적응시킨 후 식이를 조절하여 공급하였고, 동물실험실은 온도 $22\pm 1^{\circ}\text{C}$, 습도 $55\pm 5\%$ 를 유지하였으며, 12시간 간격으로 light-dark cycle을 유지하였다.

<표> Proximate analysis of freeze dried Korean soy-fermented foods

Item	Water	Crude fat	Crude protein	Crude ash	Crude fiber
Doenjang ¹⁾	2.6 ± 0.2	17.6 ± 0.3	34.0 ± 0.1	26.3 ± 0.01	6.3 ± 1.4
Chungkukjang ²⁾	1.1 ± 0.1	16.1 ± 0.8	45.2 ± 0.9	15.5 ± 0.2	5.9 ± 0.4
Kochujang ³⁾	13.9 ± 0.2	2.6 ± 0.3	9.1 ± 0.1	14.5 ± 0.1	8.2 ± 2.2
Samjang ⁴⁾	9.4 ± 0.5	8.5 ± 0.02	21.0 ± 0.3	14.7 ± 0.2	4.0 ± 1.3

¹⁾M-traditional Doenjang (Moon-Ok-Rae Co), ²⁾M-traditional Chungkukjang (Moon Co), ³⁾M-traditional Kochujang (Moon Co), ⁴⁾M-traditional Samjang (Moon Co)

식이의 제조는 항비만 실험을 위해 lard oil을 12% 첨가한 고지방食이를 사용하였고, 동결건조한 콩 발효食품을 식이에 각각 10%씩 첨가하여 항비만 효과를 비교하였다. 일반 조성 중 단백질, 지방, 탄수화물, 섬유소 양을 고려하여 AIN-93 식이를 바탕으로 제조하였다. 실험동물의 체중은 2주에 한번씩 측정하여 체중의 증가를 확인하였고 희생전에 최종 무게를 측정하였다. 해부한 후 각 장기 및 조직의 무게를 정밀 저울로 측정하고 15 mL conical centrifuge tube에 넣어 분석시까지 -70°C 에 보관하였다.

<표> Preparation and compositions of normal diet, high fat diet and Korean soy – fermented foods with high fat diets in SD rat

	ND ¹⁾	HFD ²⁾	HFD + Doenjang ³⁾	HFD + Chungkukjang ⁴⁾	HFD + Kochujang ⁵⁾	HFD + Samjang ⁶⁾
Casein	14.0	14.0	10.32*	9.64	12.9*	11.74
L-cystein	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18
Corn starch	46.6	34.6	32.8*	33.3*	28.6*	30.5*
Dextrinized corn starch	15.5	15.5	15.5	15.5	15.5	15.5
Sucrose	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Fiber	5.0	5.0	4.65*	4.35*	5.45*	4.57*
Soybean oil	4.0	4.0	3.2*	1.6*	3.5*	3.4*
AIN-93 mineral Mix.	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
AIN-93 vitamin Mix.	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Cholin bitartrate	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
TBHQ(mg)	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
Lard		12.0	12.0	12.0	12.0	12.0
Doenjang			10.0			
Chungkukjang				10.0		
Kochujang					10.0	
Samjang						10.0
Total	100.8	100.8	104.2	102.1	103.7	103.4

¹⁾Normal diet is based on the AIN-93M diet. ²⁾High fat diet contains 12% Lard added to the normal diet. ³⁾High fat diet+10% Doenjang (Moon Ok Rae Co).

⁴⁾High fat diet+10% Chungkukjang (Moon Ok Rae Co), ⁵⁾High fat diet+10% Kochujang (Moon Ok Rae Co). ⁶⁾High fat diet+10% Samjang(Moon Ok Rae Co).

*Adjusted quantities from the proximate analysis of 10% Korean soy fermented foods, respectively.

(2) 쥐의 몸무게 변화

정상군, 고지방 식이군 및 전통콩발효식품 중 된장, 청국장, 고추장, 쌈장을 첨가한 고지방식이를 급여한 군들의 체중 및 식이효율의 변화를 보여주고 있는데, 사육초기의 각 군간의 흰쥐의 평균체중은 군간에 차이가 없었고 30일 후에는 모든 처리군의 쥐의 체중이 증가하였다. 최종무게에서 정상군의 경우 262.6 ± 16.0 인 것이 고지방 식이 급여군의 경우 291.2 ± 14.1 으로 증가하였다. 모든 시료 첨가군에서 체중 감소 효과를 보여주었는데 그 중에서 된장 급여군(256.3 ± 23.4)에서 가장 높은 체중감소효과를 보여 정상군보다 낮은 값을 나타내었다. 식이효율도 체중과 비슷한 형태의 감소효과를 보여 주었으며 된장, 고추장, 쌈장 청국장 첨가군에서는 고지방식이군에 비해 식이효율이 감소하는 경향을 보여 주었다. 지금까지 알려진 바에 의하면 고추장의 섭취는 항비만 효과를 보여 체지방의 축적을 방지할 수 있는 것으로 보고되고 있다(325). 하지만 본 실험에서는 고추장을 먹인 그룹뿐만 아니라 모든 콩발효식품을 먹인 쥐에서 체중 감소 효과를 가져왔다. 이 실험 결과에서는 된장이 항비만 효과가 가장 높았으며 쌈장 그리고 청국장, 고추장 순이었다. 일반적으로 고추장, 청국장이 다이어트 효과가 클 것으로 기대되었으나 오히려 된장과 된장이 들어있는 쌈장이 효과가 크게 나타났은 매우 흥미로운 결과라 할 수 있다.

고추장(식이증량의9.5% 첨가)은 3주간의 고지방식이를 공급한 흰쥐에서 체중은 13%, 체지방은 약30% 감소를 나타낸다고 하였는데(325), 본실험의 결과 고지방 식이에 10%의 전통 고추장의 첨가는 유의적인 차이는 있었지만 약6%의 체중감소를 보여 다소 체중 감소효과가 낮았다. 그러나 된장과 쌈장은 고지방식이에 비해 각각 15%, 12%의 체중 감소 효과를 나타 내었고($p < 0.05$), 청국장은 고지방식으로 증가된 체중의 감소에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 이 연구에서는 된장, 쌈장, 고추장이 효과가 있었으며, 특히 된장은 고지방식으로 증가된 체중을 가장 많이 감소시켜, 된장 식이는 고지방식으로 인한 체중증가를 정상쥐 수준으로 억제하는 효과를 나타내었다. 쌈장은 된장과 고추장을 2:1의 비율로 혼합하여 마늘, 참기름 등의 부재료를 첨가한 것이다. 이상의 결과에서 청국장에 비해 된장에서 체중 감소효과가 높은 것에는 콩의 발효 숙성 기간이 영향을 미치는 것으로 생각 된다. 콩단백질은 지질대사에 영향을 주어 체중의 감소를 나타내며, 성분들 중 이소플라본이 중요한 역할을 한다. 된장은 장기간 발효에 의해 제니스틴과 다이드진이 각각의 아글리콘인 제니스테인과 다이드제인으로 많이 전환됨으로 써 항비만 활성화에도 영향을 미친 것으로 생각되며, 그 외의 항비만 활성 물질에 대한 연구가 더 필요하다.

(3) 장기무게 변화

된장, 청국장, 고추장, 쌈장을 첨가한 고지방식이를 급여한 군들의 장기무게 및 지방조직 무게의 변화를 보여 주고 있는데, 장기무게는 고지방식이군의 경우는 증가한 경향을 보여 주고 콩발효식품 첨가군은 무게가 감소되었다. 고지방 식이섭취

로 쥐의 내장 지방조직은 크게 증가하였음을 볼 수 있다. 부고환지방의 중량은 정상군이 0.82g이었으나 고지방식이군은 1.57g으로 2배가량 증가하였고 신장지방은 0.93g에서 1.29g으로 1.5배 증가하였는데 이는 고지방에 식이로 인한 지방축적으로 생각된다. 각종 콩발효식품을 첨가한 군의 지방조직의 무게는 부고환지방과 신장주위 지방 모두 싹장과 된장을 첨가한 군에서 가장 큰 감소효과를 보여 주었으며(25%이상) 청국장을 첨가한 군에서는 가장 낮은 지방조직의 감소를 나타내었다. 이로써 된장과 싹장은 체중 뿐 아니라 내장지방의 축적도 감소시키는 효과가 있음을 알 수 있다.

그리고, 고추의 매운 맛성분인 capsaicin은 고지방 식이에 의한 체지방의 증가를 정상 식이수준으로 억제하는데, 이는 capsaicin이 갈색 지방 조직의 β -adrenergic activity 증가에 의한 것으로 보고 하였다(330). 고추장은 capsaicin 외에도 고추장 메주에 사용되는 전분 및 콩발효물에서 이러한 효과를 나타내는 물질이 있을 것으로 생각되며, 된장이나 싹장은 오랜 발효로 인해 증가 되어진 체니스테인 및 발효산물 등이 체지방의 감소를 나타내는 것으로 생각된다.

(4) 간, 부고환지방, 신장주위지방의 중성지방 함량 변화

간, 부고환지방, 신장주위지방에 함유된 중성지방 함량의 변화를 나타내었는데, 일반적으로 지방의 과잉섭취는 지질대사의 이상을 초래하여 간 등 장기조직에 지방침착을 일으킴으로서 비만증, 고지혈증, 지방간 등을 유발한다. 전체적으로 고지방식이군이 정상군에 비해 높은 중성지방의 수치를 보이며 콩발효식품을 첨가한 식이군의 간의 중량은 된장을 첨가한 군에서 정상군의 수준에 가깝게 낮아지고 있음을 알 수 있다. 그런데 부고환지방의 경우 중성지방의 함량은 모든 콩발효식품 첨가군에서 고지방군 보다 50% 이상 감소하였으며 정상군보다도 낮은 중성지방 함량을 보여 주고 있다. 고지방 식이 급여군의 중성지방이 1080.3 mg/dl인데 비해 된장과 고추장 첨가 식이군은 각각 277.7 mg/dl, 374.3 mg/dl이며 싹장 식이 첨가군은 299.4 mg/dl, 청국장 식이 첨가군은 528.0 mg/dl의 낮은 수치를 보여 주고 있다. 특히 된장과 싹장, 고추장을 첨가한 군에서 가장 많은 감소를 보였다.

그리고 간에서의 콜레스테롤 함량은 정상군 39.67mg/dl에 비해 고지방 식이군에서는 68.2mg/dl이었으나 된장, 고추장, 싹장 식이군에서는 각각 46.2mg/dl, 56.3mg/dl, 54.2mg/dl로 감소하였으나 청국장 식이군에서는 68.3mg/dl로서 고지방 식이 처리군의 콜레스테롤 함량을 나타내었다. 부고환지방에서는 모든 콩발효식품 첨가 식이군에서 콜레스테롤 함량 감소의 효과를 보였다. 된장을 첨가한 식이군에서 가장 많은 감소를 보였으며 간과 부고환지방에서는 된장 첨가 식이에 의한 콜레스테롤의 감소 경향이 가장 뚜렷한데 반해 신장주위 지방에서는 된장 첨가 식이군에서는 콜레스테롤의 감소가 다소 미약했다. 그러나 다른 콩발효식품 첨가군에서는 30%이상의 콜레스테롤 감소 효과를 보여 주었다.

그리고, 다른 실험에서 된장식이군과 고지방 식이군과 된장-고지방 병합식

이군에서 된장을 섭취한 군에서 가장 낮은 경향을 보였고 다른 군은 모두 된장군보다 높은 경향을 나타내었다고 하였는데, 이는 본 실험 결과와도 같은 경향이였다 (331), 또한 본 항비만 효과를 가진다고 알려져 있는 고추장 보다는 된장과 쌈장의 중성지방 및 콜레스테롤에 대한 감소 효과가 높아 된장에서 이러한 항비만 효과에 대한 계속된 연구가 필요하다고 하겠다.

(5) 혈청 중성지방, LDL-콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 함량

혈청에서의 중성지방, 콜레스테롤 함량의 변화를 측정하였는데, 중성지방의 함량은 정상군의 몸무게 100g당 56.8mg/dl 비해 고지방식이군에서는 114.9mg/dl이었으나 된장, 청국장, 고추장, 쌈장을 첨가한 식이군에서는 각각 61.0, 104.9, 78.0, 61.5mg/dl으로 감소하였다. 그리고 혈액내의 콜레스테롤의 함량 또한 정상군의 38.9mg/dl인 것에 비해 고지방식이군에서는 73.7mg/dl이었으나 된장, 청국장, 고추장, 쌈장을 첨가한 식이군에서는 각각 52.7, 59.0, 53.9, 53.1mg/dl으로 감소하였고 그 중 된장을 첨가한 식이군이 가장 낮은 콜레스테롤 함량을 나타내었다.

<표> Changes of Body weight, food intake and food efficiency ratio(FER) of SD rats fed experimental diets for 4weeks

	ND ¹⁾	HFD ²⁾	HFD + Doenjang ³⁾	HFD + Chungkukjang ⁴⁾	HFD + Kochujang ⁵⁾	HFD + Samjang ⁶⁾
Body weight						
Initial weight(g)	143.7± 3.9 ^{ns7)}	143.7± 3.9 ⁸⁾	143.8± 4.1	143.7± 3.9	143.9± 4.5	143.7± 5.0
Final weight	262.6±16.0 ^b	291.2±14.1 ^a	256.3±23.3 ^b	272.2±17.4 ^{ab}	272.4±6.6 ^{ab}	262.8±15.8 ^b
Weight gain(g/day)	4.0± 0.6 ^b	4.7± 0.5 ^a	3.9± 0.4 ^b	4.3± 0.5 ^{ab}	4.2± 0.2 ^{ab}	4.1± 0.3 ^b
Food intake(g/day) & FER						
Food intake(g/day)	19.7± 1.3 ^a	19.0± 2.5 ^{ab}	17.3± 0.8 ^b	18.1± 0.5 ^{ab}	17.6± 1.8 ^b	17.1± 0.8 ^b
Food efficiency ratio(FER)	0.20± 0.02 ^b	0.25± 0.03 ^a	0.22± 0.02 ^{ab}	0.24± 0.03 ^a	0.24± 0.01 ^a	0.23± 0.01 ^a

¹⁾Normal diet is based on the AIN-93M diet. ²⁾High fat diet contains 12% Lard added to the normal diet. ³⁾High fat diet+10% Doenjang (Moon Ok Rae Co). ⁴⁾High fat diet+10% Chungkukjang (Moon Ok Rae Co), ⁵⁾High fat diet+10% Kochujang (Moon Ok Rae Co). ⁶⁾High fat diet+10% Samjang(Moon Ok Rae Co). ⁷⁾NS: Not significant.

⁸⁾Means with different letters in the same row are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

<표> The weight ratio(g/100g Body weight) of liver, spleen, kidney and adipose tissue in SD rats fed with experimental diets for 4 weeks

Organ weight (g/100g BW)	ND ¹⁾	HFD ²⁾	HFD + Doenjang ³⁾	HFD + Chungkukjang ⁴⁾	HFD + Kochujang ⁵⁾	HFD + Samjang ⁶⁾
Liver	3.79±0.41 ^{7)NS}	3.83±0.38	3.53±0.36	3.70±0.39	3.65±0.30	3.64±0.31
Spleen	0.22±0.04 ^{NS}	0.24±0.03	0.24±0.04	0.25±0.04	0.23±0.08	0.23±0.08
Kidney	0.89±0.19 ^{NS}	0.87±0.07	0.85±0.12	0.93±0.11	0.91±0.08	0.89±0.12
Epididymal fat pad	0.82±0.05 ^c	1.57±0.04 ^a	1.34±0.05 ^{ab}	1.47±0.04 ^{ab}	1.33±0.04 ^{ab}	1.20±0.04 ^b
Perirenal fat pad	0.93±0.06 ^c	1.29±0.05 ^a	1.09±0.05 ^b	1.26±0.02 ^a	1.25±0.06 ^a	1.09±0.04 ^b

¹⁾Normal diet is based on the AIN-93M diet. ²⁾High fat diet contains 12% Lard added to the normal diet. ³⁾High fat diet+10% Doenjang (Moon Ok Rae Co). ⁴⁾High fat diet+10% Chungkukjang (Moon Ok Rae Co), ⁵⁾High fat diet+10% Kochujang (Moon Ok Rae Co). ⁶⁾High fat diet+10% Samjang(Moon Ok Rae Co). ^{7)NS}: Not significant.

⁸⁾Means with different letters in the same row are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

<표> The effect of soy-fermented foods diets on triglyceride (g/100g Body weight) on liver, epididymal fat pad, perirenal fat pad in SD rats fed experimental diets for 4 weeks

	ND ¹⁾	HFD ²⁾	HFD + Doenjang ³⁾	HFD + Chungkukjang ⁴⁾	HFD + Kochujang ⁵⁾	HFD + Samjang ⁶⁾
Liver (mg/dl)						
Triglyceride	134.2±5.8 ^{e7)}	286.4±48.0 ^a	165.9±22.5 ^d	249.0± 7.5 ^b	211.6±19.3 ^c	201.1±31.5 ^c
Cholesterol	39.4±2.2 ^d	68.2±7.0 ^a	46.2±4.3 ^c	68.3±7.5 ^a	55.3±7.4 ^b	54.2± 3.3 ^b
Epididymial fat pad (mg/dl)						
Triglyceride	598.5±40.7 ^b	1080.3±149.2 ^a	277.7±24.5 ^c	528.0±47.8 ^c	374.3±21.1 ^c	299.4±24.8 ^c
Cholesterol	44.6±12.0 ^b	78.8±14.8 ^a	45.9±10.2 ^b	53.5±10.6 ^b	49.6± 5.2 ^b	46.8±10.8 ^b
Perirenal fat pad (mg/dl)						
Triglyceride	299.8±33.5 ^b	434.4±67.4 ^a	325.6±69.0 ^{ab}	422.3±99.9 ^{ab}	351.1±48.3 ^{ab}	339.1±72.4 ^{ab}
Cholesterol	32.1±4.0 ^b	39.9±2.4 ^a	22.9±6.6 ^c	32.5±3.1 ^b	27.6±9.2 ^{bc}	25.0±3.8 ^c

¹⁾Normal diet is based on the AIN-93M diet. ²⁾High fat diet contains 12% Lard added to the normal diet. ³⁾High fat diet+10% Doenjang (Moon Ok Rae Co). ⁴⁾High fat diet+10% Chungkukjang (Moon Ok Rae Co), ⁵⁾High fat diet+10% Kochujang (Moon Ok Rae Co). ⁶⁾High fat diet+10% Samjang(Moon Ok Rae Co). ⁷⁾NS: Not significant.

⁸⁾Means with different letters in the same row are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

<표> The effect of soy-fermented foods diets on serum lipid concentrations in SD rats fed experimental diets for 4 weeks

(mg/dl)	ND ¹⁾	HFD ²⁾	HFD + Doenjang ³⁾	HFD + Chungkukjang ⁴⁾	HFD + Kochujang ⁵⁾	HFD + Samjang ⁶⁾
Triglyceride	56.8±4.9 ^d	114.9±16.9 ^a	61.0±4.7 ^d	104.9±5.4 ^b	78.0±7.9 ^c	61.5±3.6 ^d
Cholesterol	38.9±4.7 ^c	73.7±7.4 ^a	52.7±5.8 ^b	59.0±7.6 ^b	53.9±1.3 ^b	53.1±6.8 ^b

¹⁾Normal diet is based on the AIN-93M diet. ²⁾High fat diet contains 12% Lard added to the normal diet. ³⁾High fat diet+10% Doenjang (Moon Ok Rae Co). ⁴⁾High fat diet+10% Chungkukjang (Moon Ok Rae Co), ⁵⁾High fat diet+10% Kochujang (Moon Ok Rae Co). ⁶⁾High fat diet+10% Samjang(Moon Ok Rae Co). ⁷⁾NS: Not significant.

⁸⁾Means with different letters in the same row are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

나) 제한 식이에서 된장과 청국장의 *in vivo* (SD 랫트) 항비만 효과 비교

(1) 체중의 변화

정상군, 고지방 식이군 및 M사 청국장, M사 된장(전통식 된장), J사 된장(공장식 된장) 및 J사 된장의 원료콩(대두)를 첨가한 고지방식이를 급여한 군들의 체중 및 식이효율의 변화를 보았다. 사육초기의 각 군간의 흰쥐의 평균체중은 군간에 차이가 없었고 6주 후에는 모든 처리군의 쥐의 체중이 증가하였다. 최종무게에서 정상군의 경우 234.9 ± 10.8 인 것이 고지방 식이 급여군의 경우 500.6 ± 1.0 으로 증가하였으며 여기 실험군 중 M사 청국장군과 M사 된장군이 가장 많은 체중 감소효과를 보였다. 앞의 실험에서는 청국장이 항비만 효과를 나타내지 않았으나 본 실험에서는 청국장이 가장 높은 효과를 나타내었는데, 이는 앞의 실험에서 식이섭취를 자유식이를 하여 청국장을 섭취한 식이군에서 과다한 양을 섭취한 것으로 사료되어 본 실험에서는 식이량을 25g으로 제한, 조절하여 섭취 시켰는데, M사의 청국장이 효과가 있는 것으로 나타났다. 그러므로, 지금까지 연구된 결과 된장의 항비만 효과와 더불어 청국장의 항비만 효과 및 그 품질 특성 또한 살펴 볼 필요성이 있다고 생각되어진다.

또한 M사 된장은 전통된장으로 발효기간이 2년이고, J사 전통식 된장은 6개월 정도로 발효된 된장으로 발효정도에 따른 발효산물과 그 외 물질이 항비만효과에 영향을 주었다고 사료된다. 이는 J사의 증자콩과 J사의 된장을 비교하여서도 잘 나타나 있는데, 증자한 콩은 체중 감소효과가 없는 것에 비하여 J사 발효 된장은 체중 감소효과가 있는 것으로 나타나 발효과정이 항비만 효과를 증진시키는 중요한 요인으로 보인다.

(2) 장기무게 함량변화

정상군, 고지방 식이군 및 M사 청국장, M사 된장(전통식 된장), J사 된장(공장식 된장) 및 J사 된장의 원료콩(대두)를 급여한 군들의 장기무게 및 지방조직 무게의 변화를 보았는데, 장기무게는 고지방식이군의 경우 대체로 증가한 경향을 보여 주고 콩발효식품 첨가군은 무게가 감소되었다. 고지방 식이섭취로 쥐의 내장 지방조직은 크게 증가하였음을 볼 수 있다. 특히 부고환지방의 중량은 정상군이 1.76 ± 0.83 g이었으나 고지방식이군은 2.51 ± 0.60 g으로 현저히 증가하였고, 신장지방은 0.83 ± 0.89 g에서 2.69 ± 0.72 g으로 증가하였는데 이는 고지방 식이로 인한 지방축적으로 생각되어진다. 그러나 M사의 청국장군과 된장은 각각 2.01 ± 0.66 g 및 2.23 ± 0.96 g로 지방량이 감소됨에 따라 M사의 청국장이 가장 높은 지방축적 감소 효과를 보였다.

(3) 혈청 중성지방, 총콜레스테롤 및 HDL-콜레스테롤 함량

정상군, 고지방 식이군 및 M사 청국장, M사 된장(전통식 된장), J사 된장(공장식 된장) 및 J사 된장의 원료콩(대두)를 첨가한 고지방식이를 급여한 군들의 중성지방, 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 함량의 변화는 다음과 같은데, 중성지방 함량은 정상군 271.1 ± 6.0 g에 비하여 고지방식이군은 324.4 ± 48.2 g으로 중성지방 함량이

20% 증가하였고, 고지방식이군에 비하여 M사의 청국장과 M사의 된장은 각각 $231.7 \pm 3.9\text{g}$ 과 $259.2 \pm 8.7\text{g}$ 으로 고지방식이군의 71%, 80% 수준로 감소하였다. 그리고, J사의 증자콩과 J사의 된장 또한 $250.0 \pm 15.1\text{g}$, $288.3 \pm 22.6\text{g}$ 으로 고지방식이의 77%, 89% 수준으로 감소하였다. 그리고, 콜레스테롤 함량은 정상군이 $94.6 \pm 5.4\text{g}$ 에 비하여 고지방식이군은 $110.6 \pm 5.8\text{g}$ 으로 15% 증가하였고, M사 청국장과 M사 된장 또한 중성지방과 같은 경향으로 감소하였다. 그리고, J사의 증자콩과 J사의 된장은 중성지방이 증자콩이 낮은 값을 나타낸 것과 다르게 J사의 된장이 증자콩보다 낮은 총콜레스테롤 값을 나타내었다. HDL콜레스테롤은 정상군이 $206.0 \pm 8.4\text{g}$ 로 가장 높은 값을 나타내었고, 다음은 M사의 청국장이 $164.2 \pm 3.1\text{g}$ 으로 그 다음을 나타내었다.

<표> Preparation and compositions of normal diet, high fat diet and commercial Chungkukjang, and Doenjang with 25g restricted high fat diets in SD rat

	ND ¹⁾	HFD ²⁾	HFD + M-Chungkukjang ³⁾	HFD + M-Doenjang ⁴⁾	HFD + J - Soybean ⁵⁾	HFD + J - Doenjang ⁶⁾
Casein	14	14	11.741	12.302	12.19	12.302
L-cystein	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18
Corn starch	46.57	30.57	29.762	29.705	29.285	29.705
Dextrinized corn starch	15.5	15.5	15.5	15.5	15.5	15.5
Sucrose	10	10	10	10	10	10
Fiber	5	5	4.704	4.685	4.75	4.685
Soybean oil	4	4	3.194	3.121	3.11	3.121
AIN-93 mineral Mix.	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
AIN-93 vitamin Mix.	1	1	1	1	1	1
Cholin bitartrate	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
TBHQ(mg)	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
Lard		16	16	16	16	16
M-Chungkukjang			5			
M-Doenjang				5		
J- Cooked Soybean					5	
J-Traditional Doenjang						5
Total	100.8	102.8	101.6	102.0	101.6	102.0

¹⁾Normal diet is based on the AIN-93M diet. ²⁾High fat diet contains 16% Lard added to the normal diet. ³⁾High fat diet+5% M - Chungkukjang ⁴⁾High fat diet+5% M.- Doenjang (Moon Ok Rae Co), ⁵⁾High fat diet+5% J - Soybean (Jin Mi Co), ⁶⁾High fat diet+5% J - Doenjang (Jin Mi Co).

<표> Changes of body weight, food intake and food efficiency ratio(FER) of SD rats fed restricted diets¹⁾ for 6 weeks in SD rat

	ND ²⁾	HFD ³⁾	HFD + M-Chungkukjang ⁴⁾	HFD + M-Doenjang ⁵⁾	HFD + J - Soybean ⁶⁾	HFD + J-Doenjang ⁷⁾
Body weight						
Initial weight(g)	234.7±9.2	242.8±14.5	237.8±10.7	237.6±10.6	238.2±11.6	234.9±16.1
Final weight	361.8±53.8 ^{c8)}	500.7±2.2 ^a	426.5±35.8 ^b	439.9±73.9 ^b	475.1±39.5 ^{ab}	450.6±36.7 ^{ab}
Weight gain(g/day)	2.8±1.0 ^c	5.7±0.3 ^a	4.2±0.6 ^b	4.5±1.4 ^b	5.3±0.6 ^{ab}	4.8±0.5 ^{ab}
Food intake(g/day) & FER						
Food intake(g/day)	20.3±3.1	20.3±6.0	21.4±1.7	20.8±2.0	21.3±3.6	19.9±1.3
Food efficiency ratio	0.14±0.02 ^d	0.28±0.05 ^a	0.20±0.03 ^c	0.22±0.01 ^c	0.25±0.01 ^b	0.24±0.03 ^b

¹⁾25g restricted diets/day ²⁾Normal diet is based on the AIN-93M diet. ³⁾High fat diet contains 16% Lard added to the normal diet. ⁴⁾High fat diet+5% M - Chungkukjang (Moon Ok Rae Co) ⁵⁾High fat diet+5% M- Doenjang (Moon Ok Rae Co), ⁶⁾High fat diet+5% J - Soybean (Jin Mi Co), ⁷⁾High fat diet+5% J - Doenjang (Jin Mi Co) ⁸⁾Means with different letters in the same row are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

<표> The weight ratio(g/100g) body weight of liver, spleen, kidney and adipose tissue in SD rats fed with restricted diets¹⁾ for 6 weeks

Organ weight	ND ¹⁾	HFD ²⁾	HFD + M-Chungkukjang ³⁾	HFD + M-Doenjang ⁴⁾	HFD + J - Soybean ⁵⁾	HFD + J-Doenjang ⁶⁾
Liver	2.36±0.63 ^{NS7)}	2.20±0.50	2.80±0.41	3.03±0.74	2.51±0.48	2.45±0.30
Spleen	0.24±0.03 ^{a8)}	0.17±0.03 ^b	0.18±0.03 ^b	0.18±0.04 ^b	0.17±0.02 ^b	0.15±0.02 ^b
Kidney	1.02±0.28 ^a	0.75±0.15 ^a	0.88±0.32 ^a	0.80±0.13 ^a	0.69±0.05 ^a	0.71±0.09
Epididymal fat pad	1.76±0.83 ^{ab}	2.51±0.60 ^a	2.01±0.66 ^{ab}	2.20±0.41 ^{ab}	2.40±0.72 ^{ab}	1.24±0.30 ^b
Perirenal fat pad	0.89±0.83 ^c	2.69±0.72 ^a	2.23±0.96 ^{abc}	2.41±0.78 ^{ab}	2.48±0.72 ^a	1.03±0.43 ^{b,c}

¹⁾25g restricted diets/day ²⁾Normal diet is based on the AIN-93M diet. ³⁾High fat diet contains 16% Lard added to the normal diet. ⁴⁾High fat diet+5% M - Chungkukjang (Moon Ok Rae Co) ⁵⁾High fat diet+5% M- Doenjang (Moon Ok Rae Co), ⁶⁾High fat diet+5% J - Soybean (Jin Mi Co), ⁷⁾High fat diet+5% J - Doenjang (Jin Mi Co) ⁸⁾Means with different letters in the same row are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

<표> The effect of soybean products diets on lipids contents of serum in SD rats fed restricted diets¹⁾ for 6weeks

	ND ¹⁾	HFD ²⁾	HFD + M-Chungkukjang ³⁾	HFD + M-Doenjang ⁴⁾	HFD + J - Soybean ⁵⁾	HFD + J-Doenjang ⁶⁾
Serum (mg/dl)						
Triglyceride	271.1±6.0 ^{bc7)}	324.4±48.2 ^a	231.7±3.9 ^c	259.2±8.7 ^{bc}	250.0±15.1 ^{bc}	288.3±22.6 ^{ab}
Cholesterol	94.6±5.4 ^b	110.6±5.8 ^a	68.7±3.1 ^d	77.4±5.7 ^{cd}	82.2±4.8 ^c	79.9±5.4 ^c
HDL-cholesterol	206.0±8.4 ^a	164.2±3.1 ^b	196.6±9.1 ^a	159.2±7.5 ^{bc}	152.1±4.7 ^c	151.6±1.2 ^c

¹⁾25g restricted diets/day ²⁾Normal diet is based on the AIN-93M diet. ³⁾High fat diet contains 16% Lard added to the normal diet. ⁴⁾High fat diet+5% M - Chungkukjang (Moon Ok Rae Co) ⁵⁾High fat diet+5% M - Doenjang (Moon Ok Rae Co), ⁶⁾High fat diet+5% J - Soybean (Jin Mi Co), ⁷⁾High fat diet+5% J - Doenjang (Jin Mi Co) ⁸⁾Means with different letters in the same row are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

(4) 부고환지방과 신장지방의 중성지방, 콜레스테롤의 함량 변화

정상군, 고지방 식이군 및 M사 청국장, M사 된장(전통식 된장), J사 된장(공장식 된장) 및 J사 된장의 원료콩(대두)을 첨가한 지방식이를 급여한 군들의 부고환지방에 함유된 총콜레스테롤 함량, 중성지방 및 총지질의 함량 변화는 다음과 같은데, 간의 총지질 함량은 정상군이 $4.4 \pm 0.4\text{g}$, 고지방식이군이 $15.4 \pm 0.4\text{g}$ 으로 높아졌으며, M사의 청국장은 $5.0 \pm 0.1\text{g}$, M사의 된장은 $6.7 \pm 0.0\text{g}$ 으로 낮아졌으며, J사 된장과 증자콩은 각각 $7.5 \pm 0.0\text{g}$, $8.2 \pm 0.2\text{g}$ 으로 나타났다. 그리고, 중성지방은 정상군은 $76.3 \pm 9.1\text{g}$, 고지방식이군은 $151.5 \pm 19.2\text{g}$ 으로 높아지고, M사 청국장, M사 된장, J사 증자콩, J사의 된장이 고지방 식이군보다 낮은 값을 나타내었으며($P < 0.05$), 콜레스테롤 또한 같은 경향을 보였다.

한편, 부고환지방의 총지질함량의 변화를 보면, 정상군은 $51.6 \pm 6.8\text{g}$ 인 것에 비하여 고지방식이군은 $115.0 \pm 1.0\text{g}$ 으로 2배이상으로 증가하였으며, M사의 청국장과 M사의 된장은 각각 $51.1 \pm 0.5\text{g}$, $84.6 \pm 2.3\text{g}$ 으로 낮아졌다. 그리고, J사의 증자콩과 J사의 된장 또한 각각 $91.3 \pm 2.2\text{g}$ 과 $96.5 \pm 1.7\text{g}$ 으로 낮아졌다. 부고환 지방의 중성지방함량은 정상군은 $152.5 \pm 20.0\text{g}$ 이었고, 고지방식이군은 $297.1 \pm 25.0\text{g}$ 으로 증가하였으며, M사의 청국장과 된장, J사의 된장 모두 고지방식이군에 비하여 감소하였고, 총콜레스테롤 함량도 같은 경향을 보였다.

신장지방의 총지질 함량의 변화를 보면, 정상군이 $81.7 \pm 4.2\text{g}$ 인데 반하여 고지방 식이군은 $161.6 \pm 6.8\text{g}$ 으로 높아졌으며, M사의 청국장($60.8 \pm 36.1\text{g}$)과 M사의 된장($81.4 \pm 0.1\text{g}$), J사의 증자콩($88.6 \pm 1.4\text{g}$), J사의 된장($93.8 \pm 0.2\text{g}$) 모두 낮아졌으며, 신장지방의 중성지방과 총콜레스테롤함량 또한 같은 경향을 보였다. 이러한 결과는 제한된 식이를 섭취시켰을 때 청국장은 된장 못지 않게 항비만 효과가 있었으며 콩과 된장, 청국장 등은 in vivo 실험을 통해 비만 억제 효과가 있음을 알 수 있었다.

<표> The effect of soybean products diets on total lipids on liver, epididymal fat pad and perirenal fat pad in SD rats fed 25g restricted diets¹⁾ for 6 weeks

	ND ¹⁾	HFD ²⁾	HFD + M-Chungkukjang ³⁾	HFD + M-Doenjang ⁴⁾	HFD+ J. Soybean ⁵⁾	HFD + J-Doenjang ⁶⁾
Liver						
Total lipid (mg/g.Wet wt)	4.4±0.4 ^{f7)}	15.4±0.4 ^a	5.0±0.1 ^e	6.7±0.0 ^d	7.5±0.0 ^c	8.2±0.2 ^b
Triglyceride (mg/dl)	76.3±9.1 ^b	151.5±19.2 ^a	76.2±18.4 ^b	92.0±8.4 ^b	90.0±6.8 ^b	91.6±12.0 ^b
Cholesterol (mg/dl)	13.7±18.0 ^{NS8)}	26.7±22.5	15.3±2.8	18.2±24.1	17.8±22.5	18.5±18.7
Epididymal fat pad						
Total lipid (mg/g.Wet wt)	51.6±6.8 ^d	115.0±1.0 ^a	51.1±0.5 ^d	84.6±2.3 ^c	91.3±2.2 ^b	96.5±1.7 ^b
Triglyceride (mg/dl)	152.5±20.0 ^c	297.1±25.0 ^a	170.1±3.2 ^{bc}	202.6±26.7 ^b	197.7±21.7 ^b	205.7±20.8 ^b
Cholesterol (mg/dl)	20.7±2.7 ^d	43.7±0.5 ^a	25.7±2.0 ^c	29.2±0.3 ^b	32.1±2.1 ^b	32.5±2.0 ^b
Perirenal fat pad						
Total lipid (mg/g. Wet wt)	81.7±4.2 ^{bc}	161.6±6.8 ^a	60.8±36.1 ^c	81.4±0.1 ^{bc}	88.6±1.4 ^{bc}	93.8±0.2 ^b
Triglyceride (mg/dl)	66.4±7.9 ^b	131.8±16.7 ^a	66.3±16.0 ^b	80.0±7.3 ^b	78.3±5.9 ^b	79.6±10.4 ^b
Cholesterol (mg/dl)	16.7±4.4 ^c	31.5±0.2 ^a	17.5±1.3 ^c	22.3±2.4 ^b	29.2±1.4 ^a	28.1±2.0 ^a

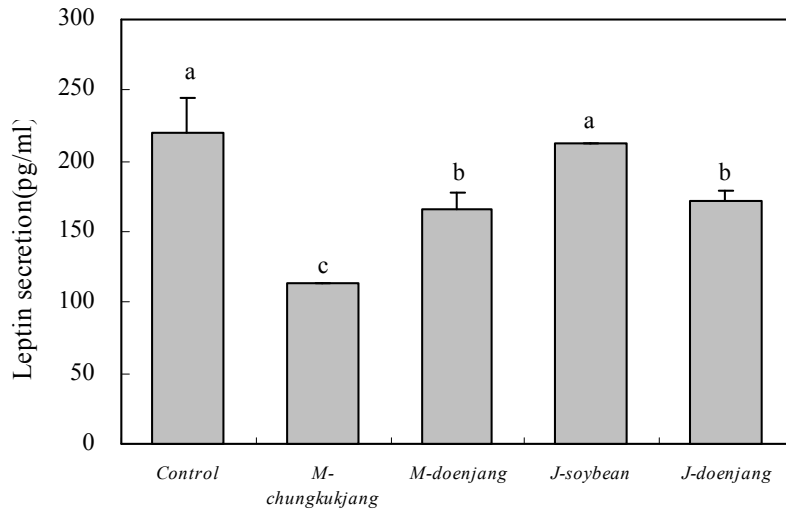
¹⁾25g restricted diets/day ²⁾Normal diet is based on the AIN-93M diet. ³⁾High fat diet contains 16% Lard added to the normal diet. ⁴⁾High fat diet+5% M - Chungkukjang (Moon Ok Rae Co) ⁵⁾High fat diet+5% M- Doenjang (Moon Ok Rae Co), ⁶⁾High fat diet+5% J - Soybean (Jin Mi Co), ⁷⁾High fat diet+5% J - Doenjang (Jin Mi Co) ⁸⁾Means with different letters in the same row are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

4) 청국장과의 전통된장(M사 된장)의 *in vitro* 항비만 효과

(1) 청국장과 전통된장의 *in vitro* 항비만효과

먼저 콩발효식품의 지방생성억제 효과를 *in vitro*에서 알아보기 위해 3T3-L1 지방전구세포를 지방세포로 분화시킨 후 8일째에 된장추출물과 콩을 1 mg/ml의 농도로 24시간 동안 처리하여 지방세포에서 분비된 렙틴의 양을 비교하여 보았다. 렙틴은 지방세포에서 독점적으로 생산되며 *in vivo*에서는 뇌의 신경계에 작용하여 식욕조절과 에너지 소비에 중요한 작용을 하는 호르몬이다. 그리고 렙틴은 지방의 양에 비례하여 분비가 되므로 지방세포내의 지방축적의 정도를 알아보기 위한 간접적인 indicator가 될 수 있다. 청국장이 *in vivo* 실험에서 자유식이일 경우에는 항비만 효과가 낮았으나 제한식이를 할 경우 항비만 효과가 높았다.

콩을 처리한 군을 제외한 M사 청국장, M사 된장, J사 재래된장, J사 대두 추출물 처리 군에서 렙틴 분비가 각각 25%, 50%, 7%, 27%가 감소하였으며 M사 청국장 추출물 처리 군에서 가장 많은 감소를 보인 것으로 보아 콩보다는 콩의 발효물인 청국장과 된장이 지방을 감소시키는 효과가 있는 것으로 사료된다. 그러나 고추장을 이용한 다른 연구에서 1개월 동안 숙성을 시킨 고추장보다 6개월 동안 충분히 숙성 시킨 고추장에서 더 큰 지방생성의 억제를 보여 준다는 보고와는 달리 비교적 짧은 기간동안(3일) 발효시킨 청국장이 2달 이상 숙성시킨 M사 된장 및 J사 전통된장보다 더 큰 지방억제효과를 보인다는 것은 특이한 결과라 할수 있다. 이와 관련하여 정확한 지방억제 효과를 비교, 관찰하기 위해 부가적인 실험이 필요한 것으로 보인다.



<그림> The secretion of leptin from 3T3-L1 adipocytes in the presence of chungkukjang, Doenjang and soybeans.

Means with different letters in the bars are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

M-Chungkukjang : Moon Ok Rea traditional Chungkukjang,

M-Doenjang : Moon Ok Rea traditional Doenjang, J-soybean : Jin Mi Soybean, J-Doenjang : Jin Mi traditional Doenjang.

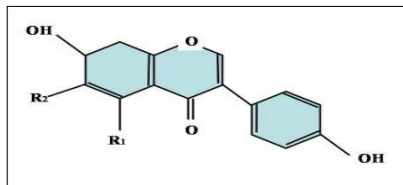
2) 활성 콩발효식품의 물질 추출 분획, 정제 및 활성검토

가) MOR된장, JM재래된장, MOR청국장, 콩의 활성성분 분석 및 동정

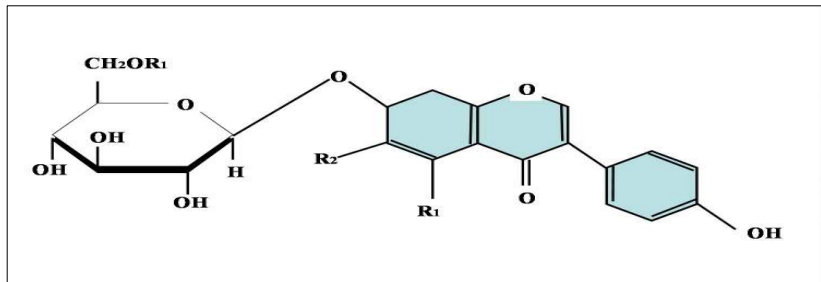
본 실험에서 장류의 기능성중 비만 억제 효과를 확인할수 있었는데, 장류의 가장 큰 기능성을 가지는 성분들의 함량을 분석할수 있었다. 콩의 이소플라본과 사포닌은 콩에 가장 많은 활성물질인데, 문헌에 보면, 이에 대한 콜레스테롤 저하능이나, 비만억제 역할을 확인 할 수 있었다.

생리활성을 나타내는 isoflavone류는 콩의 배축이나 배엽에 비교적 많이 존재하고 있으며, 화학구조로는 크게 4가지 형이 존재한다. 즉, 배당체 형태로서 daidzin, genistin 및 glycitin이 있고, 이들의 aglycone형태로서 daidzein, genistein 및 glycitein이 있으며, 그리고 malonyl유도체 형태로서 M. daidzin, M. genistin 및 M. glycitin, acetyl유도체 형태로서 A. daidzin, A. genistin 및 A. glycitin으로 전체 12개로 구성되어 있다. 이들 isoflavone 배당체는 각 배당체의

7번 위치에 glucose가 β 결합을 하고 있다. Malonyl 유도체는 열에 불안정하여 쉽게 배당체로 전환되지만 콩에 들어 있는 isoflavone은 주로 malonyl유도체 형태인 것으로 확인되었다. 그러나 isoflavone은 콩과 콩제품의 씹쓸하고 비린 좋지 않은 뒷맛에 관여하는 성분으로 그 동안 이를 제거하기 위한 노력이 시도되었으나, 생리활성에 관한 연구결과가 발표되면서 isoflavone 함량 증가가 중요한 과제로 대두되었다.



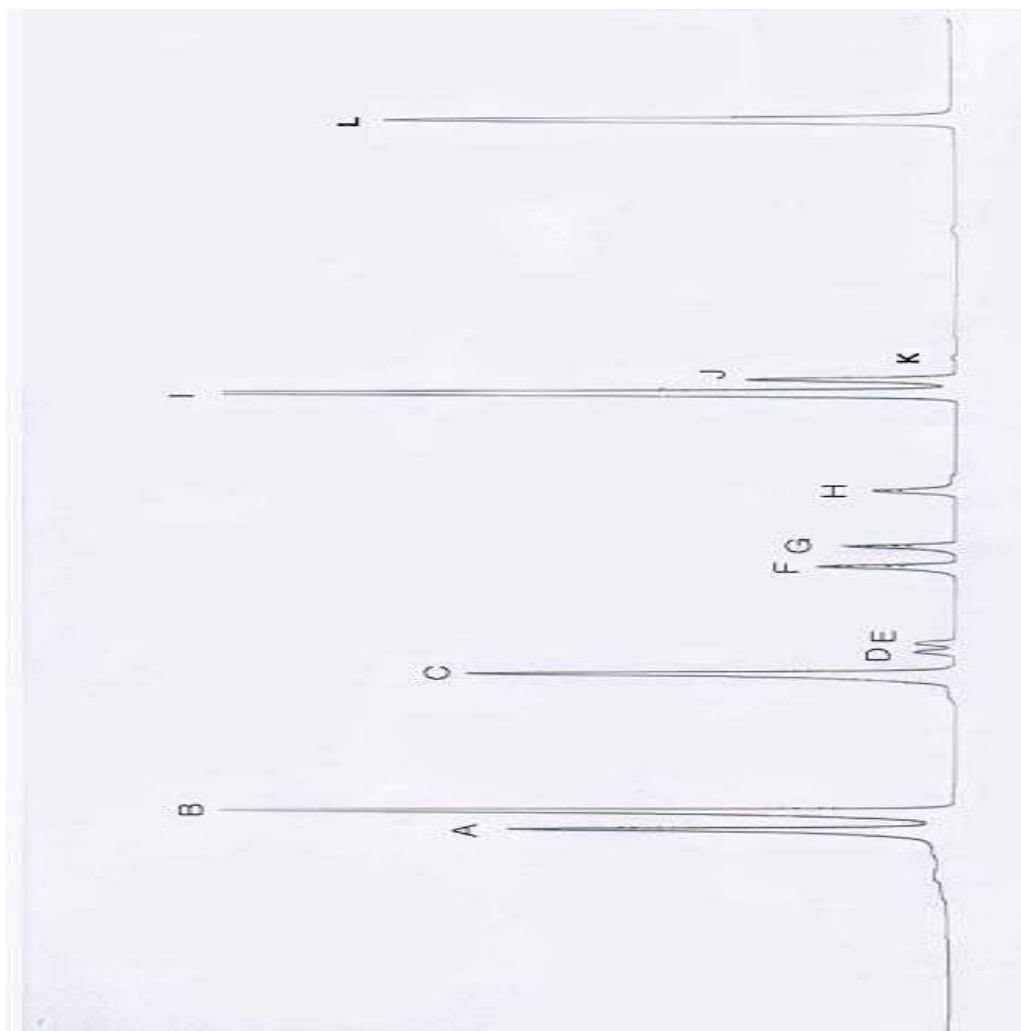
Compound	R1	R2
Daidzein	H	H
Genistein	OH	H
Glycitein	H	OCH3



<그림> Chemical structures of twelve isoflavone isomers found in soybean.

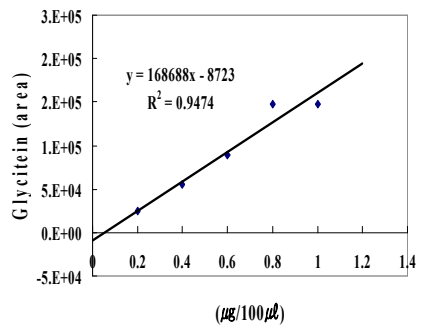
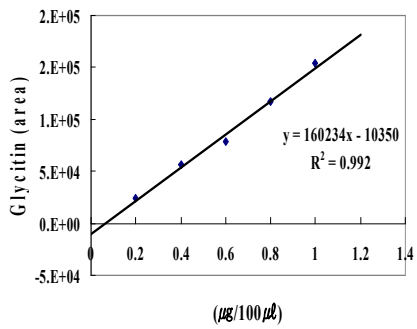
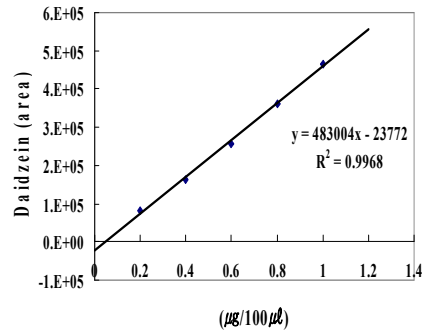
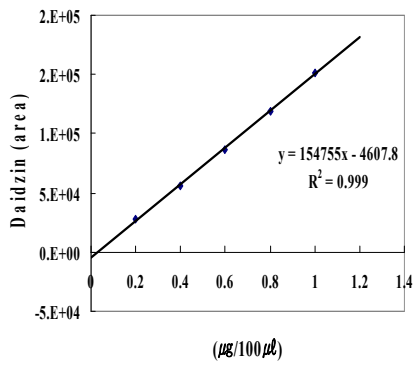
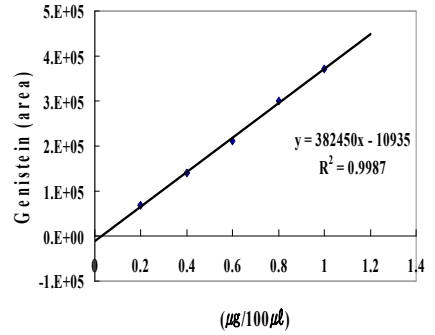
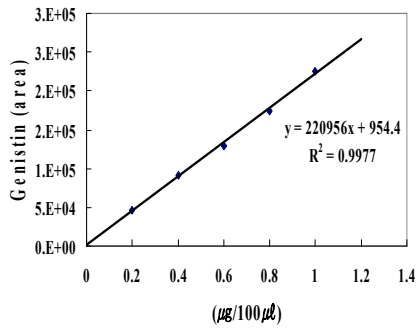
Compound	R1	R2	R3
Daidzin	H	H	H
Genistin	H	H	OH
Glycitin	H	OCH3	H
6"-O-Malonyldaidzin	COCH2COOH	H	H
6"-O-Malonylgenistin	COCH2COOH	H	OH
6"-O-Malonylglycitin	COCH2COOH	OCH3	H
6"-O-Acetyldaidzin	COCH3	H	H
6"-O-Acetylgenistin	COCH3	H	OH
6"-O-Acetylglycitin	COCH3	OCH3	H

<그림> Chemical structures of twelve isoflavone isomers found in soybean.

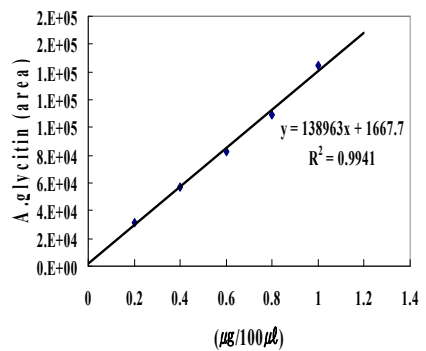
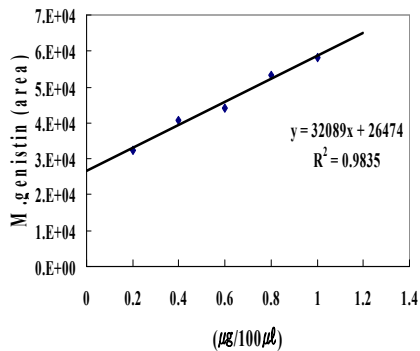
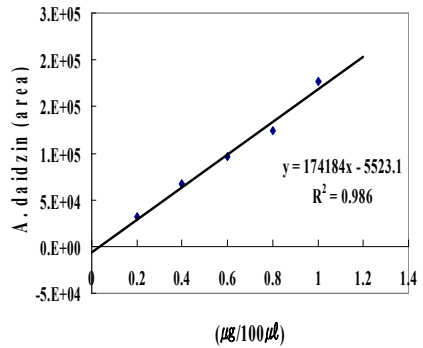
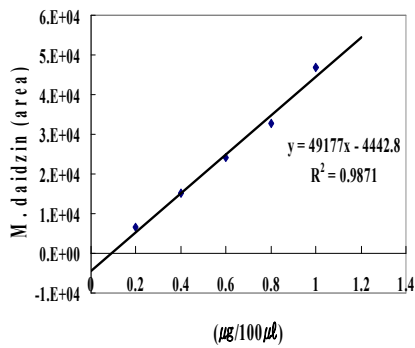
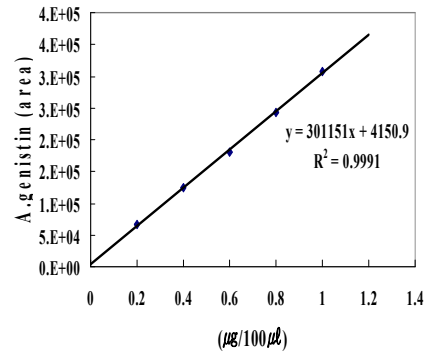
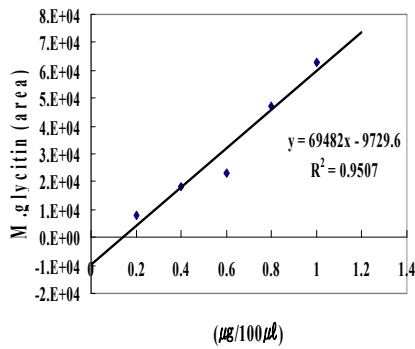


<그림> HPLC chromatogram of isoflavone standards

A : Daidzin, B: Glycitin, C: Genistin, D : Malonyl daidzin, E : Malonyl glycitin, F : Acetyl daidzin, F : Acetyl daidzin, G : Acetyl glycitin, F : Malonyl genistin, I : Daidzein, J : Glycitein, K: Acetyl genistin, L : Genistein



<그림> Standard curve of 12 components of soybean isoflavones.



<그림> Standard curve of 12 components of soybean isoflavones.

(1) 생콩, 증자콩, 된장의 이소플라본 함량 변화

Isoflavone은 12가지의 이성질체를 가지는데 이소플라본 이성질체는 다이드진, 글라이시틴, 제니스틴, 말로닐다이드진, 마로닐글라시틴, 아세틸다이드진, 아세틸다이드진, 아세틸글라시틴, 그리고, 마로닐제니스틴, 다이드제인, 글라시테인, 아세틸제니스틴, 제니스테인의 순서로 HPLC에서 분석되었다. 그리고, 대두, 증자콩, 된

장의 Isoflavone 함량을 비교 하였는데, 이소플라본의 총함량의 범위는 11,083.4~41,336.2($\mu\text{g}/\text{kg}$)였으며, 생콩인 대두가 41336.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 로서 가장 높았으며, 증자, 발효가 됨에 따라 함량이 감소하였다.

콩이 발효되면서 다이드제인, 글라시테인, 제니스테인의 아글리콘의 함량은 증가 하였는데, 특히 제니스테인은 제니스틴의 아글리콘으로서 생대두 710.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 증자콩 1001.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 인데 반하여 된장은 5741.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 으로 증가하는 폭이 컸다. 뿐만 아니라, 된장의 다이드제인(3494.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$)과 글라시테인(1634.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$)도 대두, 증자콩에 비하여 된장으로 갈수록 증가하는 경향을 나타내었다. 제니스테인과 다이드제인, 글라시테인 등의 아글리콘의 증가는 발효에 의한 것으로 제니스테인의 함량이 콩, 메주, 된장으로 진행됨에 따라 증가한다는 결과와 동일한 경향을 나타냈다는 것을 확인 할 수 있었다.

<표> Content and composition of isoflavones of soybean and Doenjang.

($\mu\text{g}/\text{kg}$, dry basis)

Isomer	Raw soybean	Steamed soybean	Doenjang
Daidzin	13709.3 \pm 438.7	3819.8 \pm 122.2	0 \pm 0.0
Glycitin	3139.5 \pm 100.5	1496.2 \pm 47.9	0 \pm 0.0
Genistin	17270.4 \pm 552.7	3300.2 \pm 105.6	192.4 \pm 6.2
M ¹⁾ . daidzin	579.7 \pm 18.6	2870.7 \pm 91.9	0 \pm 0.0
M. Glycitin	790.9 \pm 25.3	4079.5 \pm 130.5	0 \pm 0.0
M. Genistin	1854.1 \pm 59.3	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0
A ²⁾ . Daidzin	2034.7 \pm 65.1	180.4 \pm 5.8	20.6 \pm 0.7
A.Glycitin	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0	0 \pm 0.0
A. Genistin	648.9 \pm 20.8	49.5 \pm 1.6	0 \pm 0.0
Daidzein	380.6 \pm 12.2	651.0 \pm 20.8	3494.8 \pm 111.8
Glycitein	217.1 \pm 6.9	803.1 \pm 25.7	1634.7 \pm 52.3
Genistein	710.9 \pm 22.7	1001.7 \pm 32.1	5741.0 \pm 183.7
Total Isoflavone	41,336.1 \pm 1322.8	18,252.1 \pm 584.1	11,083.5 \pm 354.7

¹⁾M : Malonyl, ²⁾A : Acetyl

(2) 발효 균주별 청국장의 이소플라본 함량 측정

노란콩를 이용한 청국장 발효균으로 이용되는 주요 *Bacillus*속 세균 (*Bacillus megaterium* SMY-212, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus subtilis* HS-25)을 이용한 청국장의 이소플라본 함량 및 조성을 분석한 결과는 다음과 같은데, 총 이소플라본의 함량의 범위는 337.3~468.7 $\mu\text{g/g}$ (건조물)이었다. 총 이소플라본의 함량은 *Bacillus subtilis* HS-25 처리 청국장의 함량이 가장 높았고, *Bacillus licheniformis* 이용 청국장이 가장 낮은 값을 나타내었으나 큰 차이를 보이지는 않았다. 총 평균 값을 보았을 때, 제니스테인이 734.0 $\mu\text{g/g}$ 으로 전체의 34%를 차지하였으며, 가장 낮은 조성은 아세틸제니스테인으로 값이 나타나지 않았으며, 아세틸다이드진과 아세틸글라시틴 또한 낮은 값을 나타내었다.

제니스테인은 *Bacillus megaterium* SMY-212는 157.8, *Bacillus licheniformis*는 73.3, *Bacillus subtilis*는 164.4 *Bacillus subtilis* HS-25는 158.3 $\mu\text{g/g}$ 으로 나타났다. 그리고, 두 번째로 많은 조성인 다이드제인은 *Bacillus megaterium* SMY-212는 149.2, *Bacillus licheniformis*는 78.7, *Bacillus subtilis*는 146.1, *Bacillus subtilis* HS-25는 150.6 $\mu\text{g/g}$ 으로 나타났다.

그리고 이 값들은 균주를 접종하지 않은 전통 청국장의 함량과 비교하였을 때, 총 함량에는 유의적인 차이를 보이지 않았지만, 제니스테인과 다이드제인의 함량은 각각 180.2와 151.0 $\mu\text{g/g}$ 으로 가장 높은 값을 나타내어 아글리콘의 함량은 미생물자체에서 β -glucosidase활성화와 발효기간에 의하여 크게 증가하는 경향을 나타내었다. 균주별 제니스테인의 함량 만을 확인하면, *Bacillus subtilis* 발효균에 의하여 제조된 청국장이 가장 우수하였으며, *Bacillus licheniformis* 발효균이 제조한 청국장이 가장 낮은 함량이었다.

<표> Content and composition of isoflavones of Chungkukjang fermented by different starter cultures.

($\mu\text{g/g}$, dry basis)

Isoflavones	Strains				
	BM	BL	BS	BS-H	TC
Genistin	31.4	36.2	31.9	39.1	19.8
Daidzin	12.8	17.1	11.9	15.3	8.3
Glycitin	9.5	9.4	7.1	10.4	6.0
Malonyl genistin	5.3	28.9	5.6	16.9	8.1
Malonyl daidzin	11.9	18.0	20.9	12.8	20.6
Malonyl glycitin	25.9	36.3	23.9	24.4	24.1
Acetyl genistin	—	—	—	—	—
Acetyl daidzin	7.2	4.8	5.8	7.0	5.6
Acetyl glycitin	4.3	3.4	4.0	4.9	5.1
Genistein	157.8	73.3	164.4	158.3	180.2
Daidzein	149.2	78.7	146.1	150.6	151.0
Glycitein	30.3	31.3	32.0	29.1	30.3
Total isoflavones	445.6	337.4	453.6	468.8	459.1

BM, *Bacillus megaterium* ; BL, *Bacillus licheniformis* ; BS, *Bacillus subtilis* ; BS -H, *Bacillus subtilis* HS-25 ; TC, traditional chungkugjang (Non-inoculation)

나) 활성물질인 검정콩 안토시아닌의 SD 랫트에서 항비만 효과

안토시아닌은 천연색소로 보라, 파랑, 검은색 등으로 식품에서 나타나며 항산화 활성이 높은 것으로 알려져 있다. 본 실험에서는 콩발효식품의 주재료인 콩을 검은콩을 사용할 경우 안토시아닌에 의한 항비만효과의 증진이 가능할 것인가에 대한 실험으로 검은콩에서 안토시아닌을 분리하여 검은콩과 비교하여 그 항비만 가능성을 SD 랫트를 이용한 실험에서 검토하였다.

(1) 체중 및 FER 변화

안토시아닌을 첨가한 고지방식이를 급여한 군들의 체중 및 식이효율의 변화는 사육초기의 각 군간의 평균체중은 차이가 없었고 30일 후에 모든 군간의 체중이 증가하였으며 체중 증가(g/day)는 정상군이 3.4g인 것인데 반해 고지방식이 급여군의 경우 4.8g으로 20%가 증가하였다. 안토시아닌과 검은콩을 첨가한 두 군 모두 체중증가가 억제되었으며 정상군과 유사한 체중을 보여주었고 안토시아닌을 첨가한 군이 검은콩을 첨가한 군보다 더 많은 체중감소의 효과를 보여주었다. 식이효율은 안토시아닌과 검은콩을 첨가한 두 군 모두 정상군에 비하여 약간 높은 경향을 보여 주었다. 이로써 검은콩의 안토시아닌은 항산화효과 뿐 아니라 항비만 효과까지 나타냄을 이 실험을 통해 처음 밝혀졌다.

(2) 각 장기의 증량변화

검은콩 안토시아닌과 검은콩을 첨가한 고지방식이를 급여한 군들의 장기 및 지방조직 무게의 변화는 다음과 같은데, 장기 및 지방조직의 무게는 고지방식이군의 경우 증가하는 경향을 보여 주었다. 한편 안토시아닌을 첨가한 군에서는 간, 비장, 신장 모두 무게가 감소하였으나 검은콩을 첨가한 군은 고지방군의 장기 무게와 크게 차이가 없었다. 지방조직의 무게는 부고환지방과 신장주위 지방 모두 안토시아닌과 검은콩을 첨가한 군에서 감소를 보여 주었으며 특히 안토시아닌 첨가군은 검은콩 첨가군에서보다 더 많은 지방조직의 감소를 보여 주었다. 안토시아닌 첨가군이 검은콩 첨가 식이군보다 더 큰 체중감소를 보여주는 것과 일치한다고 볼 수 있다. 검은콩 자체와 그 안에 있는 같은 량의 안토시아닌의 항비만효과는 안토시아닌이 더 큰 것으로 보인다.

(3) 중성지방(TG) 및 콜레스테롤 함량

안토시아닌과 검은콩을 첨가한 고지방식이를 급여한 군들의 혈중 중성지방, 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 함량의 변화는 다음과 같다. 고지방식이군은 중성지방과 콜레스테롤 함량이 정상군에 비해 약 40%의 증가를 보여 주었으나 안토시아닌과 검은콩을 첨가한 군에서는 고지방식이군에 비해 현저한 감소를 보여 주었다.

역시 검은콩보다 안토시아닌을 첨가한 군에서 더 큰 감소를 보여 주었으며 중성지방함량은 안토시아닌 첨가군이 60.47g으로서 정상군 78.46g보다도 더 낮은 중성지방함량을 보여 주었다. 콜레스테롤 함량도 안토시아닌 첨가군이 정상군과 비슷한 수준으로 감소되었다. 또한 HDL-콜레스테롤의 함량도 처리군에서 크게 증가되어 정상군과 비슷한 함량을 보여주었다.

이로서 검은콩은 콩 자체의 항비만 효과보다 검은색의 안토시아닌이 이

와 같이 항비만 효과를 나타내므로 콩발효식품을 검은콩으로 제조할 경우 항비만 효과가 더 증진될 것으로 기대된다.

<표> Changes of body weight, food intake and food efficiency ratio(FER) of SD rats fed experimental diets for 4 weeks

	ND ¹⁾	HFD ²⁾	HFD + Anthocyanin ³⁾	HFD + Black soybean ⁴⁾
Body weight				
Initial weight(g)	138.8±10.0	142.9±11.3	142.7± 5.0	147.7± 3.5
Final weight	240.3±17.2 ^{b5)}	287.5± 7.8 ^a	243.6±15.5 ^b	254.4±14.9 ^b
Weight gain(g/day)	3.4± 0.3	4.8± 0.3	3.4± 0.6	3.6± 0.4
Food intake(g/day) & FER				
Food intake(g/day)	17.6± 0.2	18.9± 0.9	17.8± 0.7	17.6± 0.8
Food efficiency ratio	0.2± 0.01 ^b	0.3± 0.01 ^a	0.2± 0.02 ^b	0.2± 0.01 ^b

¹⁾Normal diet is based on the AIN-93M diet. ²⁾High fat diet contains 12% Lard added to the normal diet. ³⁾High fat diet+anthocyanin(0.37mg). ⁴⁾High fat diet+10% black soybean.

⁵⁾Means with different letters in the same row are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

<표> The weight ratio(g/100g Body weight) of liver, spleen, kidney and adipose tissue in SD rats fed with experimental diets for 4 weeks

Organ weight(g/100g BW)	ND ¹⁾	HFD ²⁾	HFD + Anthocyanin ³⁾	HFD + Black soybean ⁴⁾
Liver	3.2±0.3 ^{b5)}	4.1±0.5 ^a	3.8±0.4 ^{ab}	3.8±0.2 ^{ab}
Spleen	0.2±0.1 ^{NS6)}	0.3±0.1	0.2±0.0	0.3±0.0
Kidney	0.8±0.1 ^{NS}	0.9±0.1	0.8±0.1	0.9±0.1
Epididymal fat pad	1.1±0.2 ^b	1.6±0.1 ^a	1.2±0.3 ^b	1.4±0.4 ^a
Perirenal fat pad	1.0±0.3 ^{NS}	1.5±0.3	1.1±0.3	1.3±0.1

¹⁾Normal diet is based on the AIN-93M diet. ²⁾High fat diet contains 12% Lard added to the normal diet. ³⁾High fat diet+anthocyanin(0.37mg). ⁴⁾High fat diet+10% black soybean. ⁵⁾Means with different letters in the same row are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

⁶⁾NS: Not significant.

<표> The effect of various diet intake on lipid contents of serum in SD rat fed with experimental diet for 4 weeks

Organ weight(g/100g BW)	ND ¹⁾	HFD ²⁾	HFD + Anthocyanin ³⁾	HFD + Black soybean ⁴⁾
Triglyceride (TG)	78.5±14.5 ^{bc5)}	110.4±8.9 ^a	60.5±15.6 ^c	85.1± 4.5 ^b
Cholesterol	76.5± 5.7 ^c	108.6±2.7 ^a	80.3± 5.3 ^{bc}	87.5± 6.3 ^b
HDL-cholesterol	48.0± 4.6 ^a	38.5±1.7 ^b	49.4± 6.2 ^a	53.0± 4.4 ^a

¹⁾Normal diet is based on the AIN-93M diet. ²⁾High fat diet contains 12% Lard added to the normal diet. ³⁾High fat diet+anthocyanin(0.37mg). ⁴⁾High fat diet+10% black soybean.

⁵⁾Means with different letters in the same row are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.\

나. 비만 억제효과가 있는 콩발효식품의 항비만 효과 증진 연구(2006)

1) 콩 종류(검정콩), 미생물 및 활성물질 첨가의 의한 항비만 효과가 증진된 콩발효식품의 개발

가) 검정콩 된장의 제조조건에 따른 품질특성

검정콩 된장에 균주를 달리하거나, 수침시간, 수침양, 증자시간을 달리하여 된장의 공정조건을 잡았으며, 검정콩 메주에 소금의 종류를 하거나, 활성물질의 부재료를 첨가하여 제조한 된장을 비교 분석하였다.

수침량, 수침시간, 증자시간에 따른 검정콩 메주의 총균, 아미노태 질소의 값은 수침량은 1.5배, 수침시간은 12시간, 증자시간은 60분이 가장 높은 값을 나타내었다. 또한 pH와 산도 또한 같은 경향을 나타내었으며, 이는 검정콩 된장의 발효정도에도 관련이 높을 것으로 생각된다.

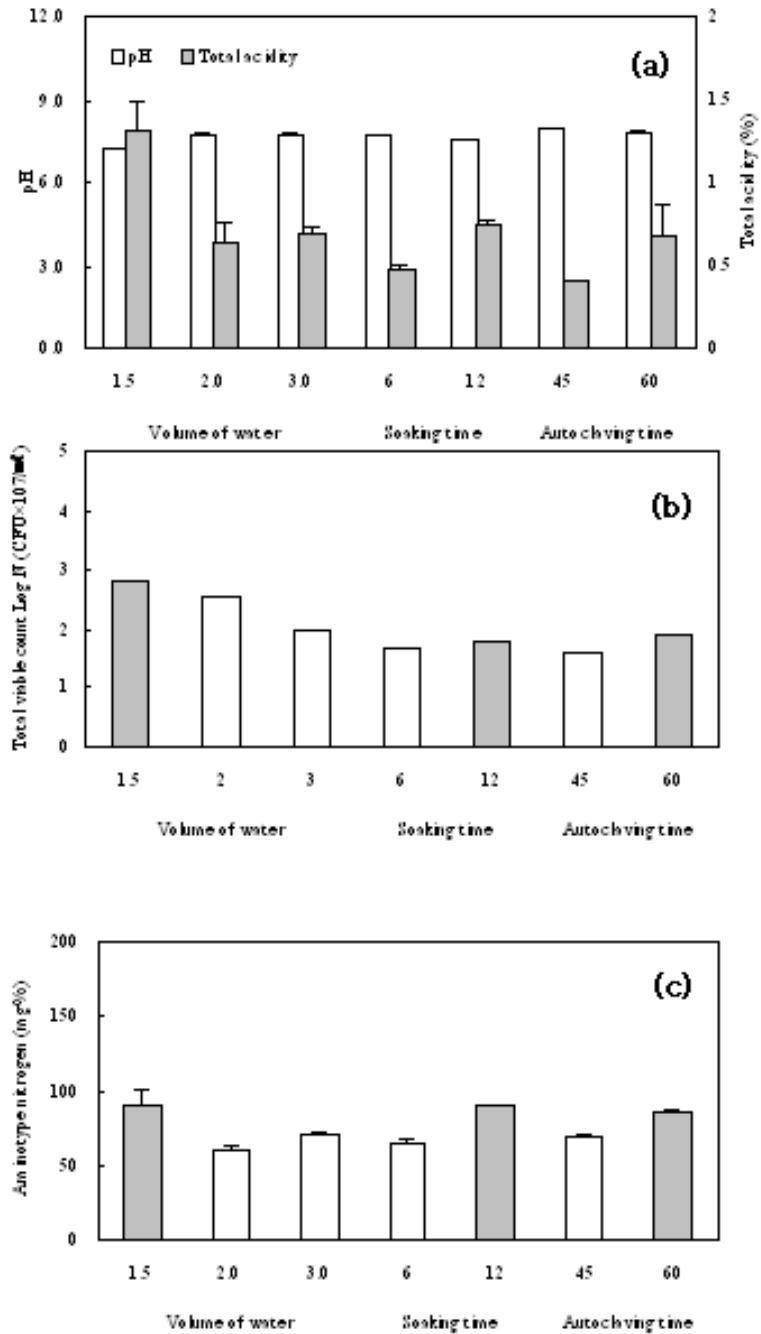
과거의 된장은 볏짚을 이용하여 메주의 종균 역할을 하도록 하였으나, 최근에는 *Koji* 즉 종균의 역할로서 균주를 접종하는 속성 개량적인 방법을 사용하고 있다. 이는 다른 오염균(푸른곰팡이)의 침투를 막고, 이로 인한 된장의 품질이 우수하여지고, 맛이 깔끔한 형태를 보여지며, 발효기간도 과거의 볏짚을 이용한 된장보다 빨라 농가에서의 출하에도 도움을 줄 것으로 보여진다. 특히, 검정콩은 종피가 두꺼워 발효정도가 적게 되어 종균 *Koji*의 접종은 필수적인 것으로 보여진다.

Asp. oryzae, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *Asp. oryzae* + *B. subtilis*, *Asp. oryzae* + *B. licheniformis* 등의 종균의 종류를 달리하여 pH, 총균과 산도의 값을 비교하였을 때, 산도는 단일균주보다 혼합균주에서 높은 값을 나타내었으나, 발효지표를 나타내는 아미노태질소는 단일 균주인 *Asp. oryzae*가 가장 높은 값을 나타내었고, 총균도 *B. subtilis*와 함께 *Asp. oryzae*가 높은 값을 나타내어 검정콩 된장에는 *Asp. oryzae*를 *Koji* 로 첨가하는 것이 가장 좋은 것으로 생각되어진다.

된장은 메주를 발효 후에 소금물을 첨가하거나 소금과 물을 따로 첨가하여 된장으로 숙성을 하게 된다. 소금의 종류와 소금물의 농도에 따라 된장의 품질 또한 큰 영향을 미치게 되며, 소금의 종류에 따라 발효양상과 기능성에 차이가 있는 것으로 보인다. 소금 중에는 천일염, 정제염, 1회구운 죽염, KCl+1회구운 죽염을 비교 대상으로 실험하였을 때, KCl+1회구운 죽염이 pH와 산도의 함량은 차이를 보이지 않았지만, 총균과 아미노태질소 함량에서 가장 높았다.

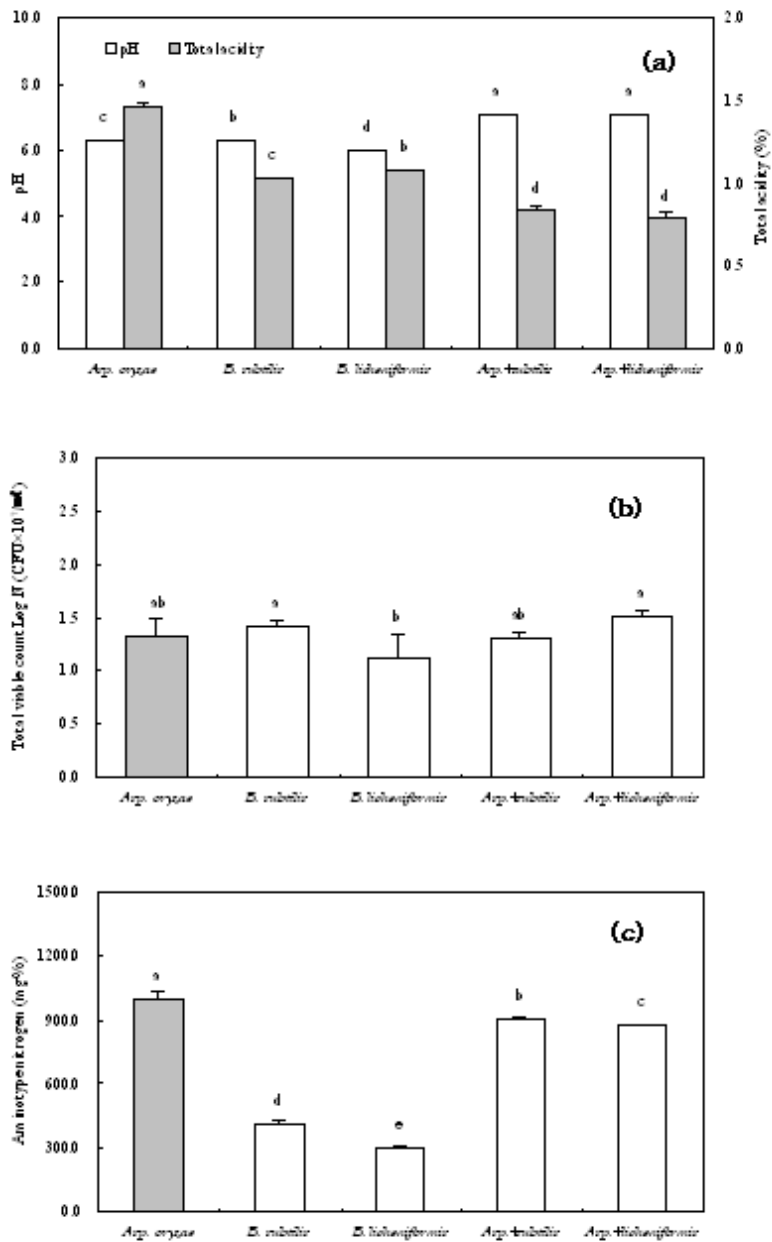
활성성분의 첨가에 따른 된장의 pH, 산도, 아미노태 질소의 값은 녹차를 첨가한 된장이 총균에서는 다소 낮은 값을 나타내었으나 pH, 산도와 아미노태질소에서 값에서 높은 값을 나타내었는데, 이는 녹차의 성분인 카테킨이 항균작용으로 작용하여 총균의 성장을 억제하는 것으로 생각되어진다. 그리고, 검정콩 된장에 아무것도 첨가하지 않은 된장과 겨우살이를 첨가한 검정콩 된장 또한 높은 아미노태질소의 값을 나타낸 것으로 보아, 검정콩 된장에 녹차나 겨우살이를 첨가하는 것이 바람직하다고

보여진다.

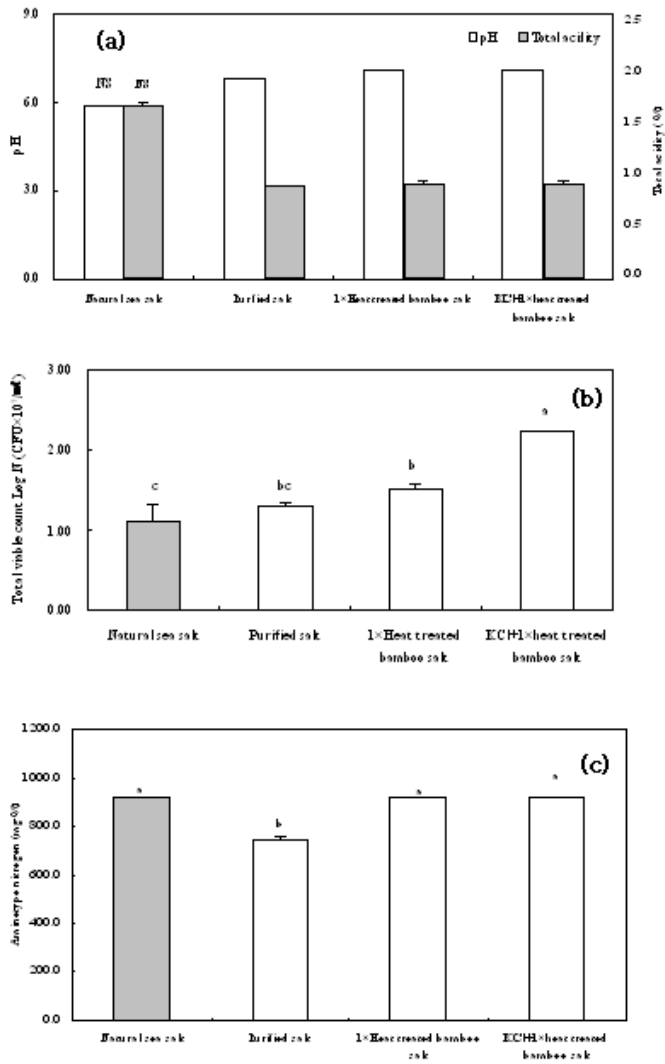


<그림> The changes of pH and total acidity(a), total viable count (b) and content of amimotype nitrogen(c) during the preparation of volume of water,

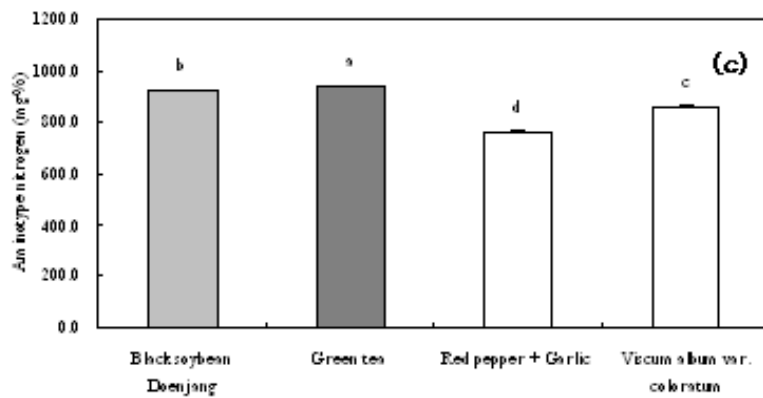
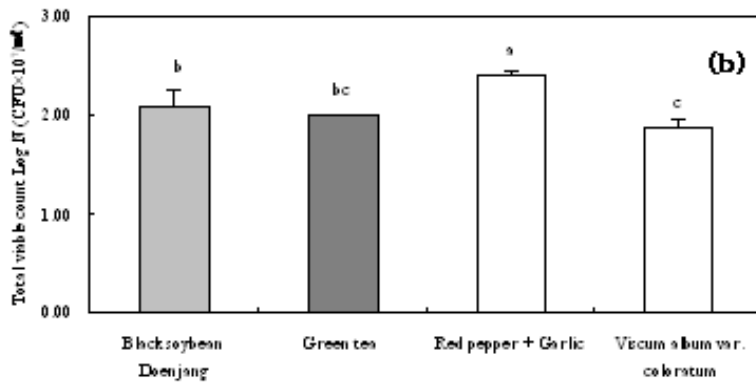
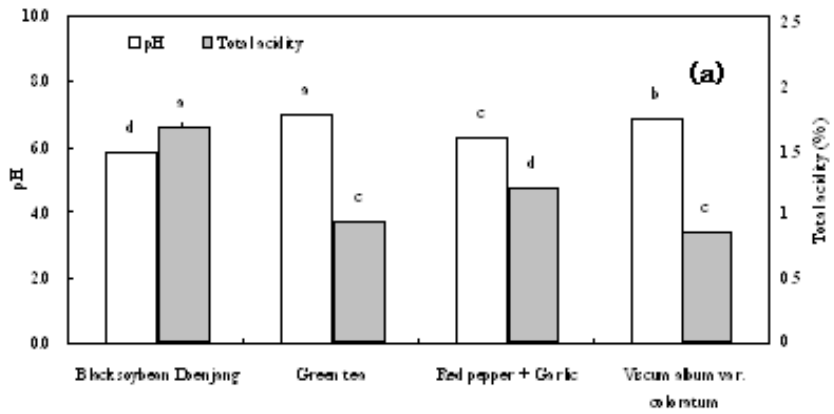
soaking time and autoclaving time of *Seoritae* black soybean Meju.



<그림> The changes of pH and total acidity(a), total viable count (b) and content of amimotype nitrogen(c) in *Seoritae* Doenjang that fermented with different kinds of starter for 2 months at room temperature.



<그림> The changes of pH and total acidity(A), total viable count (b) and content of amonotype nitrogen(c) in *Seoritae* Doenjang prepared with different kinds of salt.



<그림> The changes of pH and total acidity(A), total viable count (b) and content of amintype nitrogen(c) in *Seoritae* Doenjang prepared with different kinds of functional compound foods.

<표> Content and composition of isoflavones of black soybean and black Doenjang.

($\mu\text{g}/\text{kg}$)

	Black Soybean	Cooked Black Soybean	Black Soybean Doenjang
Daidzin	13535.2 \pm 460.2	2303.1 \pm 78.3	242.6 \pm 8.2
Glycitin	6256.4 \pm 55.6	1636.3 \pm 212.7	104.2 \pm 54.5
Genistin	251.2 \pm 1.2	164.8 \pm 1.4	130.2 \pm 2.0
M.Daidzin	0.0 \pm 0.0	507.7 \pm 17.3	770.0 \pm 26.2
M.Glycitin	0.0 \pm 0.0	144.7 \pm 4.9	583.0 \pm 19.8
M.Genistin	3788.3 \pm 151.5	3057.4 \pm 122.3	139.3 \pm 5.6
A.Daidzin	2913.9 \pm 99.1	412.1 \pm 14.0	175.8 \pm 6.0
A.Glycitin	280.9 \pm 9.6	4799.3 \pm 163.2	359.8 \pm 12.2
A.Genistin	2.0 \pm 0.1	378.2 \pm 12.9	91.4 \pm 2.8
Daidzein	50.4 \pm 1.7	264.7 \pm 9.0	2698.6 \pm 91.8
Glycitein	99.6 \pm 3.4	141.6 \pm 4.8	754.8 \pm 20.2
Genistein	433.7 \pm 17.3	723.8 \pm 29.0	7254.0 \pm 250.2
Total Isoflavone	27,611.6 \pm 910.8	14,533.7 \pm 761.0	13,303.7 \pm 542.2

나) 김정콩 된장의 제조조건에 따른 *in vitro* 항비만 효과

콩종류에 따른 항비만 효과가 증진된 김정콩 된장과 미생물 및 활성물질의 첨가에 의한 항비만 효과 증진 콩발효식품의 개발을 위하여 *in vitro*에서 항비만 효과를 검증하였다.

비만 환자에서 다양한 대사성 질환이 나타나는 것은 지방세포의 형태적 변화가 일어나기 때문으로 보는 연구자가 많아지고 있다. 그리고, 이 세포의 형태적 변화라고 함은 세포가 지방을 많이 함유하게 되어 커지는 것을 의미하고, 지방세포의 크기는 다양한데, 실제 지방세포의 직경이 20배 변화하면 수천배의 지방함량의 양적 변화가 일어난다고도 한다. 이러한 다양한 크기의 지방세포는 여러 가지 물질들을 분비하는데, 그것을 통틀어 아디포카인이라고 부르고, 이중 가장 대표적인 것이 렙틴이다. 실험에서 렙틴 분비는 지방세포의 크기를 반영하고 피하지방보다는 내장지방

에서 2~3배 더 많이 분비되는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서는 *in vitro*에서 렙틴의 양을 측정하여 지방세포의 크기를 예상하고, 또한 지방세포를 구성하는 것(중성지방 + 글라이세롤) 중에 글라이세롤을 측정함으로써 항비만 효과를 확인하였다.

콩발효식품의 지방생성억제 효과를 *in vitro*에서 알아보기 위해 3T3-L1 지방전구세포를 지방세포로 분화시킨 후 8일째에 노란콩, 검정콩 된장과 시판된장(진미된장(J. Co.), 샘표된장(S. Co.), 청정원 된장(C. Co.))을 1mg/ml의 농도로 24시간 동안 처리하여 지방세포에서 분비된 렙틴의 양을 비교하여 보았다. 렙틴은 지방세포에서 독점적으로 생산되며 *in vivo*에서는 뇌의 신경계에 작용하여 식욕조절과 에너지 소비에 중요한 작용을 하는 호르몬이다. 그리고 렙틴은 지방의 양에 비례하여 분비가 되므로 지방세포내의 지방축적의 정도를 알아보기 위한 간접적인 지표가 될 수 있다.

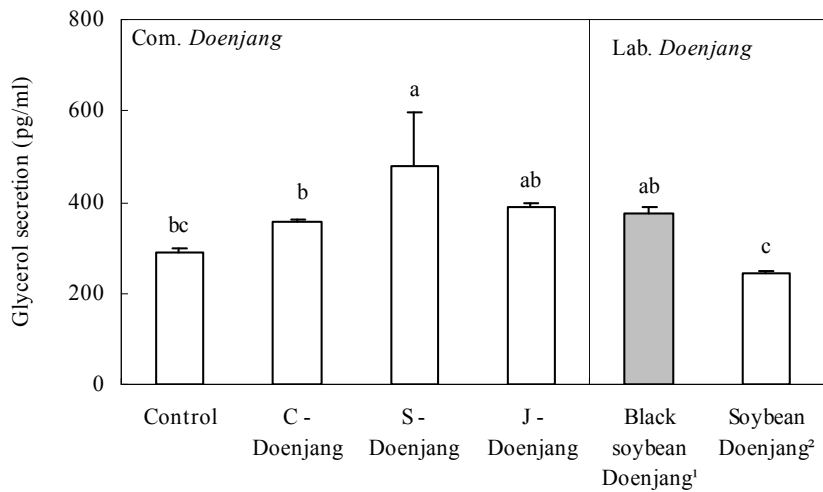
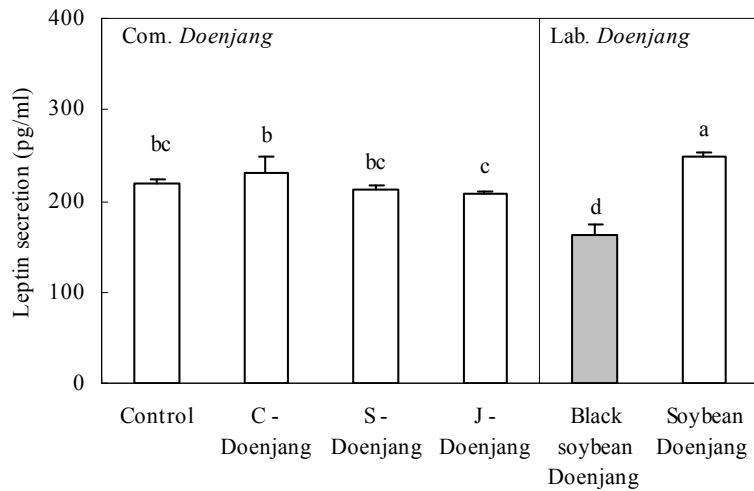
그리고 검정콩, 노란콩 된장과 시판된장의 렙틴과 글라이세롤의 비교에서는 렙틴의 분비는 검정콩 된장이 가장 낮았으며, 시판된장 중에서는 진미된장이 가장 낮은 값을 나타내어 비만세포의 생성이 적게 되는 것으로 생각된다.

글라이세롤의 경우 시판된장 중 샘표 된장이 가장 높게 나타났으며, 검정콩 된장이 그 다음으로 나타났으며 진미된장과 비슷했다. 하지만, 샘표된장은 표준편차 또한 높아 통계적으로 유의성은 없었다.

종균의 종류를 달리한 검정콩 된장의 렙틴의 분비와 글라이세롤의 함량을 측정한 결과, 렙틴의 경우, *Asp. oryzae*를 첨가한 된장이 가장 낮은 값을 나타내었고, 글라이세롤은 가장 높은 값을 나타내었다. 이것은 *Asp. oryzae*를 첨가한 검정콩 된장이 지방세포의 생성과 지방세포의 분해에 가장 잘 관여한다고 보여진다. 그리고, 글라이세롤은 3개의 지방산과 결합하고, 지방세포에서 중성지방로 존재하므로 글라이세롤의 양을 측정하면 축적된 지방이 얼마만큼 분해되었는가 하는 지표가 될 수 있다.

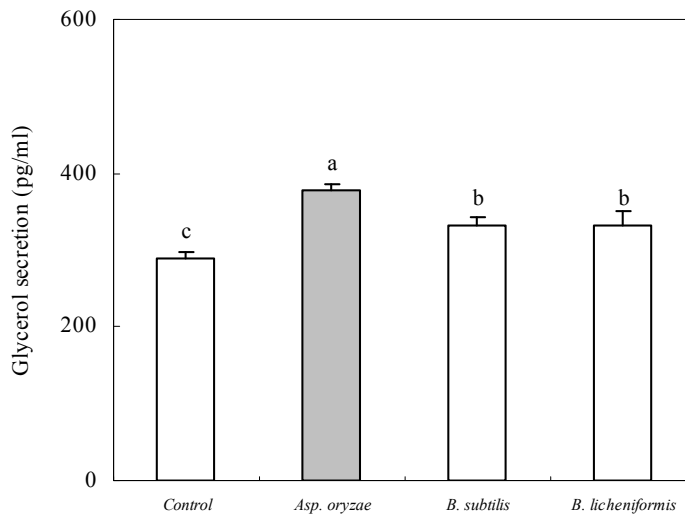
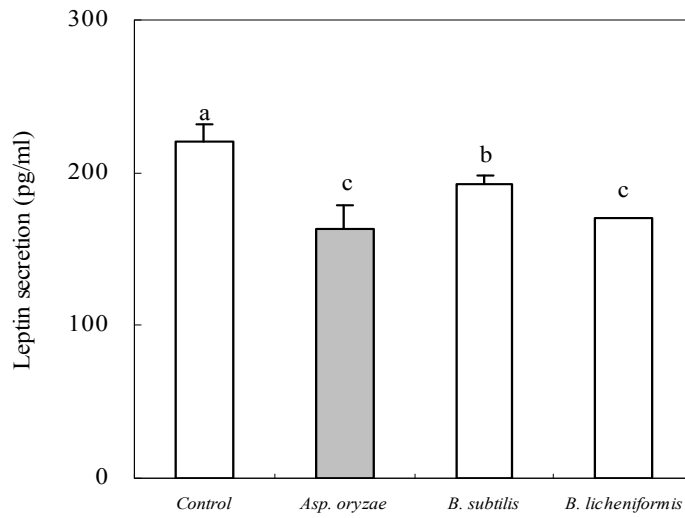
소금의 종류에 따른 검정콩 된장의 렙틴의 분비를 보았을 때, 한주소금이 가장 높은 값을 나타내었고, KCl + NaCl 1회 구운 죽염이 가장 낮은 값을 나타내었다. 반면, 글라이세롤의 함량은 비슷한 값을 나타내어 소금의 종류에 따라 지방세포의 생성에는 영향을 미치나 분해에는 영향이 크게 없는 것으로 생각되어진다.

검정콩 된장에 녹차와 고춧가루+마늘, 겨우살이를 첨가한 된장에서 렙틴의 분비는 녹차를 첨가한 된장에서 가장 낮은 값을 나타내었고, 글라이세롤의 경우 또한 녹차가 가장 높은 값을 나타내어 녹차 검정콩 된장이 지방세포의 생성억제와 지방세포의 분해에 효과가 있는 것으로 나타났다. 그리고, 본 실험 결과로 항비만 효과가 있는 검정콩(서리태)된장을 표준화 할 수 있었다.

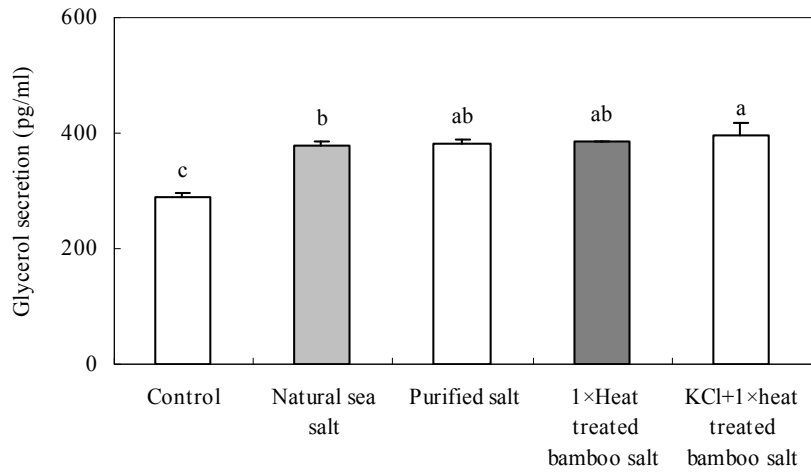
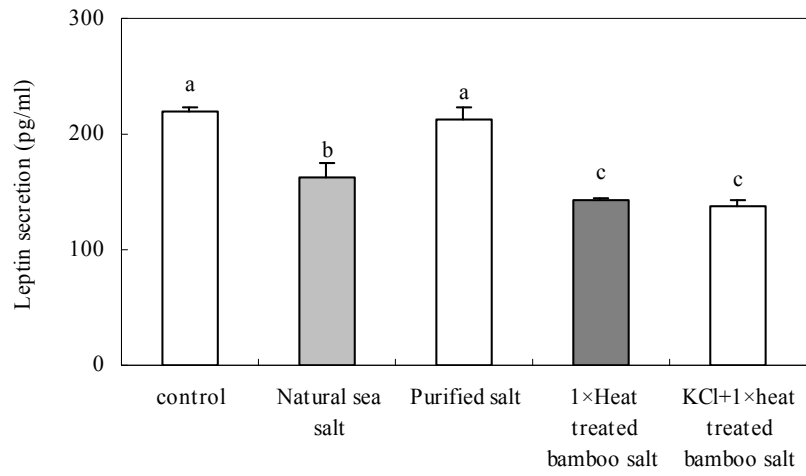


<그림> The secretions of leptin and glycerol from 3T3-L1 adipocytes in commercial Doenjang and black soybeand and soybean Doenjang prepared at laboratory.

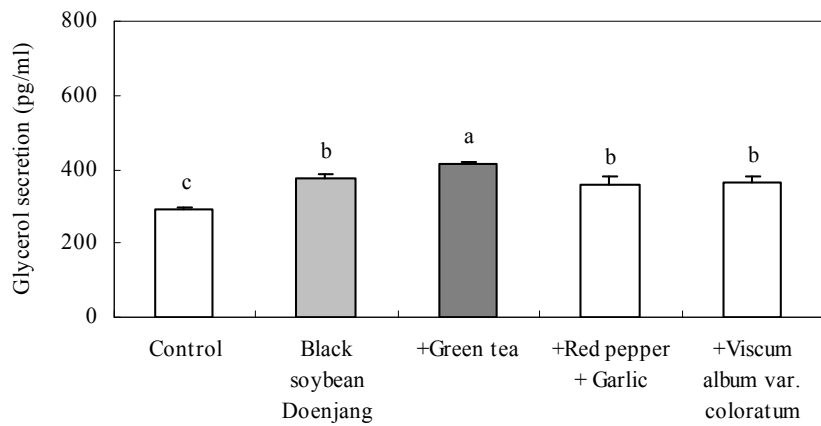
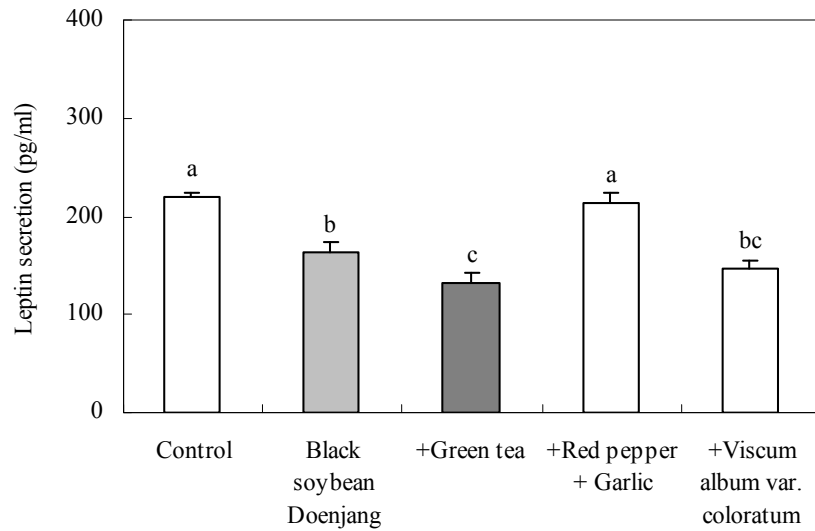
C-Doenjang : Chungjuangwon Doenjang, S-Doenjang : Sampoo 6months Doenjang, J-Doenjang : Jin Mi 6months Doenaj, ¹Seoritae, ²Hwangkeumkong



<그림> The secretion of leptin and glycerol from 3T3-L1 adipocytes in black soybean Doenjang that fermented with different kinds of starters for 2 months fermentation.



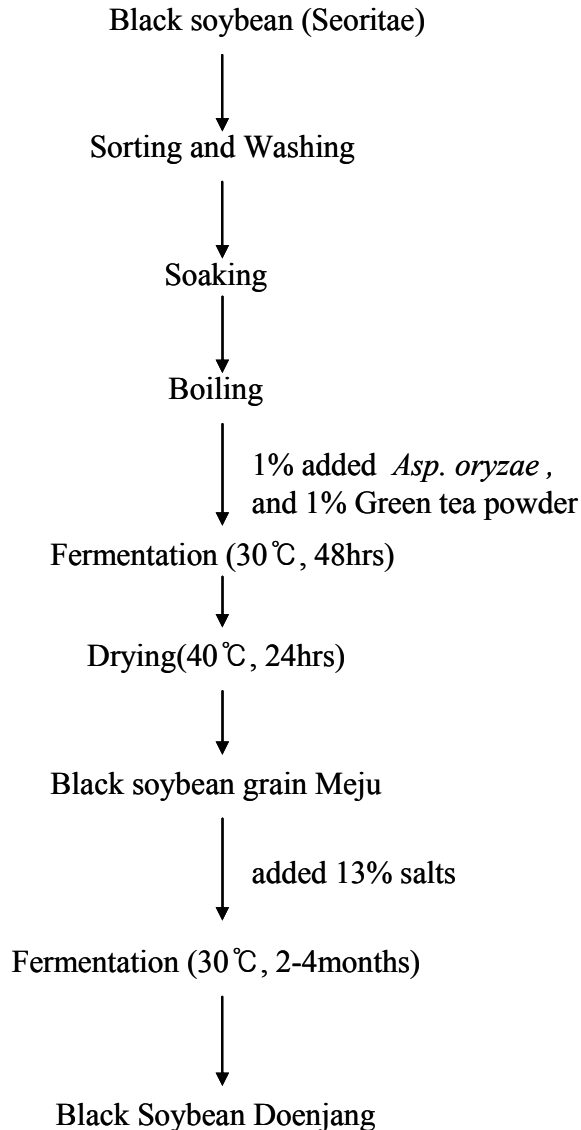
<그림> The secretions of leptin and glycerol from 3T3-L1 adipocytes in black soybean Doenjang that fermented with different kinds of add salts for 2 months fermentation incubator.



<그림> The secretion of leptin and glycerol from 3T3-L1 adipocytes in black soybean Doenjang that fermented with different kinds of functional compound foods for 2 months fermentation incubator.

다) 최종 항비만 효과 증진된 된장의 제조 공정 확립

일반 된장을 담구는 제조공정은 노란콩을 세척 수침 후 증자하여 코지를 첨가하여 메주를 성형하게 되고 소금이나 소금물을 첨가하여 발효하여 된장을 담구게 된다. 하지만 이는 발효기간이 너무 많이 걸리고, 또한 기능성 또한 떨어지는 것으로 나타났었다. 그래서 본 실험실에는 검정콩으로 콩알메주를 만들어 제조한 검정콩 콩알메주로 담군 된장의 제조공정을 확립하였고, 이에 항비만 효과를 검증하였다.



<그림> Standardized manufacturing methods of Black soybean Doenjang that shows antiobesitic effect.

2) 항비만 효과 증진 콩발효식품의 *in vivo* 항비만 효과 검증

가) 검정콩 된장의 *in vivo* 항비만 효과 탐색

항비만 효과를 가지는 검정콩 된장의 항비만 효과를 *in vivo*에서 살펴보기 위하여 비만을 유발하기 쉬운 생후 5주령의 체중 14-16g 가량의 C57BL/6 마우스를 실험하기 전 시판 고형사료를 먹이면서 1주일 동안 환경에 적응 시켰다. 정상식이 (ND)는 AIN-93 diet 정상식이에 준하여 제조한 일반식이와 비만의 효과를 높이기 위하여 에너지의 16%의 고지방식이를 6주 실시하여 비만유도를 하였다. 그리고 7주 부터 식이에 따른 된장의 체중감량 및 지질 개선효과를 알아보기 위하여 고지방식이에 된장을 동결건조하여 만든 분말을 일반성분을 고려한 10% 된장함유사료 (HFD-D)와 정상식이에 된장의 일반성분을 고려한 10% 된장함유 사료(ND-D)를 만들어 식이하였는데, 사육 기간동안 식이와 물은 자유 급식하였으며 체중증가량은 매주 1회 측정하였고, 식이섭취량은 매일 시행하였다. 식이를 위하여 된장시료의 일반성분을 분석한 결과 된장의 일반성분은 수분 2.59 ± 0.15 , 지질 17.59 ± 0.26 , 단백질 33.96 ± 0.05 , 회분 26.29 ± 0.01 이었으며, 섬유소가 6.31 ± 1.42 이었다. 사육은 한 그룹당 5마리로 사육용 cage 속에서 6주간 사육후 다시 몸무게가 동일하게 분류한 다음 8주 후 희생시켰다. C57BL/6 마우스 모델의 마우스는 검은색으로, 나이를 먹어감에 따른 세포성 면역기능 저하가 적고, 자연발생종양이 적게 발생하는 특징을 가지고 있다.

(1) 비만유도 마우스 체중의 변화

본 실험은 C57BL/6 마우스를 비만유도 6주후에 실험하였으며, 상품용 J사의 전통식 된장 10%를 8주간 섭취시켜 적응기간을 제외한 총실험 기간 14주간 식이 하였다. 8주간 고지방식이를 한 실험군에서는 일반식이를 한 실험군에 비하여 높은 몸무게를 나타내었다.

(2) 최종체중의 변화와 식이섭취율

정상군, 고지방 식이군 및 정상식이와 J사의 전통식 된장을 첨가한 식이군, 고지방식이에 전통 된장을 첨가한 식이군 그리고, 고지방식이에 검정콩 된장을 첨가한 식이군으로 구성하여 체중 및 식이효율의 변화는 다음과 같은데, 사육초기의 일반식이를 제외한 각 군간의 마우스의 평균체중은 군간에 차이가 크게 없었고, 6주 후에는 모든 처리군의 마우스의 체중이 증가하였다. 최종무게에서 정상군의 경우 $29.0 \pm 2.5g$ 인 것이 고지방 식이 급여군의 경우 $32.7 \pm 2.3g$ 으로 증가하였으며 처리 실험군중 검정콩 된장군이 가장 많은 체중저하효과를 보였다. 그리고, 정상식이군에서 된장을 섭취한 실험군과 정상식이군의 차이를 보았을 때, 비슷한 몸무게로 이 또한 체중이 감소하는 것을 확인할 수 있어 된장의 항비만 효과를 확인 할 수 있었다.

(3) 장기무게 및 지방무게

정상군, 고지방 식이군 및 정상식이와 J사의 전통식 된장을 첨가한 식이군, 고지방식이에 J사의 전통식 된장을 첨가한 식이군 그리고, 고지방식이에 검정콩 된장을 첨가한 식이군으로 구성하여 장기무게 및 지방조직 무게의 변화를 보여준다. 부고환 지방의 무게는 고지방식이군의 경우 대체로 증가한 경향을 보여 주고 검정콩 된장이 $3.2 \pm 0.2\text{g}$ 로 가장 무게가 많이 감소되었다. 고지방 식이섭취로 쥐의 내장 지방 조직은 크게 증가하였음을 볼 수 있다. 부고환지방의 중량은 정상군이 $0.56 \pm 0.25\text{g}$ 이었으나 고지방식이군은 $1.14 \pm 0.27\text{g}$ 으로 2배이상 증가하였고 신장주위지방은 $0.61 \pm 0.28\text{g}$ 에서 $1.28 \pm 0.34\text{g}$ 으로 증가하였는데 이는 고지방 식이로 인한 지방축적으로 생각된다.

(4) 혈액의 총지질, 중성지방, 총콜레스테롤, HDL-콜레스테롤

정상군, 고지방 식이군 및 정상식이와 전통 된장을 첨가한 식이군, 고지방식이에 전통 된장을 첨가한 식이군 그리고, 고지방식이에 검정콩 된장을 첨가한 식이군으로 구성된 실험에서 중성지방, 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 함량의 변화는 다음과 같은데, 고지방식이군은 중성지방과 콜레스테롤 함량이 정상군에 비해 약 40%의 증가를 보여 주었으나 검정콩 된장을 첨가한 군에서는 고지방식이군에 비해 감소를 보여 주었다.

(5) 간, 부고환지방, 신장지방에서의 총지질, 중성지방, 총콜레스테롤 함량

정상군, 고지방 식이군 및 정상식이와 전통 된장을 첨가한 식이군, 고지방식이에 전통 된장을 첨가한 식이군 그리고, 고지방식이에 검정콩 된장을 첨가한 식이군으로 구성된 실험에서 간에 함유된 총콜레스테롤 함량, 중성지방 및 총지질의 함량 변화는 다음과 같은데, 고지방식이에 비하여 검정콩 된장을 첨가한 식이군에서 총지질, 중성지방 및 총 콜레스테롤 모두 감소효과를 보였다.

그리고, 부고환지방과 신장지방에 함유된 총콜레스테롤 함량, 중성지방 및 총지질의 함량 변화도 고지방식이에 비하여 검정콩 된장을 첨가한 식이군에서 총지질, 중성지방 및 총콜레스테롤 모두 감소효과를 보였다.

<표> Changes of Body weight, food intake and food efficiency ratio(FER) of rats fed experimental diets for 8week in C57BL/6 mice

	ND	HFD			
	ND ¹⁾	ND+ T-J - Doenjang ²⁾	HFD ³⁾	HFD+ T- J- Doenjang ⁴⁾	HFD + Black soybean Doenjang ⁵⁾
Body weight					
Initial weight(g)	25.9±1.8 ^{NS6)}	29.3±2.1	29.2±1.4	29.3±3.7	29.4±2.7
Final weight	29.0±2.5 ^{d7)}	30.3±2.2 ^b	32.7±2.3 ^a	30.5±3.1 ^b	29.6±2.8 ^c
Weight gain(g/day)	0.05±0.01 ^a	0.02±0.00 ^b	0.06±0.02 ^a	0.02±0.01 ^b	0.004±0.001 ^b
Food intake(g/day) & FER					
Food intake(g/day)	3.72±0.04 ^{NS}	3.71±0.07	3.76±0.24	3.71±0.31	3.73±0.22
Food efficiency ratio	0.02±0.01 ^a	0.01±0.00 ^{ab}	0.02±0.01 ^a	0.01±0.00 ^{ab}	0.001±0.002 ^b

¹⁾Normal diet is based on the AIN-93M diet. ²⁾Normal diet + 5% Traditional J.-Doenjang (Jin Mi Co), ³⁾High fat diet contains 16% Lard added to the normal diet. ⁴⁾High fat diet + 5% Traditional J-Doenjang (Jin Mi Co), ⁵⁾High fat diet + 5% Black soybean Doenjang. ⁶⁾NS: Not significant.

⁷⁾Means with different letters in the same row are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

<표> The weight ratio of liver, spleen, kidney and adipose tissue in rat fed with experimental diets for 8 weeks in C57BL/6 mice

Organ weight	ND	HFD			: 6wk
	ND ¹⁾	ND+ T-J - Doenjang ²⁾	HFD ³⁾	HFD+ T- J- Doenjang ⁴⁾	HFD + Black soybean Doenjang ⁵⁾
Liver	1.3±0.1 ^{NS6)}	1.4±0.2	1.8±0.4	1.6±0.2	1.4±0.3
Spleen	0.1±0.02 ^{NS}	0.1±0.03	0.1±0.02	0.1±0.02	0.1±0.02
Kidney	0.4±0.04 ^{NS}	0.4±0.1	0.4±0.04	0.5±0.07	0.4±0.1
Epididymal fat pad	0.6±0.3 ^{ab7)}	0.9±0.4 ^{ab}	1.1±0.3 ^a	0.8±0.5 ^{ab}	0.4±0.2 ^b
Perirenal fat pad	0.6±0.3 ^a	1.0±0.4 ^{ab}	1.3±0.3 ^a	0.7±0.4 ^{ab}	0.5±0.1 ^b

¹⁾Normal diet is based on the AIN-93M diet. ²⁾Normal diet + 5% Traditional J.-Doenjang (Jin Mi Co), ³⁾High fat diet contains 16% Lard added to the normal diet. ⁴⁾High fat diet + 5% Traditional J.-Doenjang (Jin Mi Co), ⁵⁾High fat diet + 5% Black soybean Doenjang (Lab). ⁶⁾NS: Not significant. ⁷⁾Means with different letters in the same row are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

<표> The effect of Doenjang diets on serum lipid concentrations in rat fed with experimental diets for 8 weeks in C57BL/6 mice

	ND	HFD				: 6wk
	ND ¹⁾	ND+ T-J - Doenjang 2)	HFD ³⁾	HFD+ T- J- Doenjang ⁴⁾	HFD + Black soybean Doenjang ⁵⁾	: 8wk
Serum (mg/dl)						
Triglyceride	250.1±6.0 ^{b6)}	236.4±2.3 ^b	331.2±26.3 ^a	248.0±8.3 ^b	212.1±1.6 ^c	
Total cholesterol	88.6±3.2 ^c	78.5±2.3 ^a	130.2±3.8 ^a	88.3±3.6 ^b	64.7±3.1 ^d	
HDL-cholesterol	214.0±6.6 ^a	175.1±6.2 ^c	132.0±4.1 ^e	161.3±3.5 ^d	200.3±7.7 ^b	

¹⁾Normal diet is based on the AIN-93M diet. ²⁾Normal diet + 5% Traditional J.-Doenjang (Jin Mi Co), ³⁾High fat diet contains 16% Lard added to the normal diet. ⁴⁾High fat diet + 5% Traditional J-Doenjang (Jin Mi Co), ⁵⁾High fat diet + 5% Black soybean Doenjang. ⁶⁾Means with different letters in the same row are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

<표> The effect of Doenjang diets on triglyceride and cholesterol of liver and perirenal fat pad in rat fed with experimental diets for 8 weeks in C57BL/6 mice

	ND	HFD			: 6wk	
	ND ¹⁾	ND+ T-J - Doenjang 2)	HFD ³⁾	HFD+ T- J- Doenjang ⁴⁾	HFD + Black soybean Doenjang ⁵⁾	: 8wk
Liver						
Total lipid (mg/g.Wet wt)	3.3±0.2 ^d	4.2±1.0 ^c	8.3±0.2 ^a	6.3±0.2 ^b	3.2±0.2 ^d	
Triglyceride (mg/dl)	96.2±6.0 ^d	162.1±15.1 ^b	196.3±13.7 ^a	175.1±10.4 ^b	143.0±1.2 ^c	
Cholesterol (mg/dl)	29.6±3.2 ^c	38.3±6.3 ^b	98.0±8.3 ^a	41.5±4.6 ^b	30.4±7.4 ^b	
Epididymal fat pad						
Total lipid (mg/g.Wet wt)	44.9±2.5 ^c	79.4±4.6	100.1±12.0 ^a	84.0±7.4 ^b	54.5±5.8 ^c	
Triglyceride (mg/dl)	132.7±11.2 ^c	172.0±7.9	258.5±19.3 ^a	179.0±7.0 ^b	148.0±5.2 ^c	
Cholesterol (mg/dl)	18.0±1.3 ^d	27.9±2.5 ^b	38.1±3.3 ^a	28.3±2.8 ^b	22.4±1.3 ^c	
Perirenal fat pad						
Total lipid (mg/g.Wet wt)	34.2±3.9 ^b	64.4±5.1 ^a	75.1±6.8 ^a	68.7±4.5 ^a	44.1±8.3 ^b	
Triglyceride (mg/dl)	54.4±3.7 ^b	64.2±6.4 ^b	108.0±12.4 ^a	65.3±4.3 ^b	54.4±2.4 ^b	
Cholesterol (mg/dl)	13.7±1.1 ^b	24.0±1.6 ^a	25.8±3.4 ^a	23.0±2.8 ^a	14.3±1.0 ^b	

¹⁾Normal diet is based on the AIN-93M diet. ²⁾Normal diet + 5% Traditional J.-Doenjang (Jin Mi Co), ³⁾High fat diet contains 16% Lard added to the normal diet. ⁴⁾High fat diet + 5% Traditional J.-Doenjang (Jin Mi Co), ⁵⁾High fat diet + 5% Black soybean Doenjang. ⁶⁾Means with different letters in the same row are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

3) C57BL/6 마우스를 이용한 된장의 항비만 효과

가) 된장과 소금의 항비만 효과 검증

(1) 체중의 변화

C57BL/6 마우스는 항비만 실험에 사용되는 마우스로서, 본 실험에서는 6주간 고지방식을 처리하여 지방축적을 한 후 된장 등을 식이로 8주간 처리하여 지방을 제거하는 항비만 효과가 있는지를 검토하였다. 정상군, 고지방 식이군과 정상식이와 J사의 전통 된장, J사의 공장식 된장과 전통 된장에 함유되어 있는 소금의 양을 첨가한 식이군으로 구성하여 체중 및 식이효율의 변화 Table 18에 보여주고 있다. 일반식을 제외한 사육초기의 각 군간의 마우스의 평균체중은 군간에 차이가 없었고 1주 적응기간 후 6주 고지방식이 처리군은 체중이 증가하였다. 최종무게에서 정상군의 경우 29.0 ± 2.5 인 것이 고지방 식이 급여군의 경우 32.7 ± 2.3 으로 증가하였다. 그리고, 고지방식을 섭취를 계속유지하며 전통 J사의 된장을 섭취한 실험군에서 가장 체중이 증가량이 낮았고, 된장에 함유되어 있는 소금 만을 섭취한 군에서는 차이를 보이지 않았다. 일반된장(J사)보다 전통식 된장(J사)이 유의적인 항비만 활성을 보였다 ($p < 0.05$).

(2) 장기무게 및 지방무게

정상군, 고지방 식이군 및 정상식이와 J사의 전통 된장과 J사의 공장식 된장과 전통 된장에 함유되어 있는 소금의 양을 첨가한 식이군으로 구성하여 장기무게 및 지방조직 무게의 변화를 보여 주고 있다(Table 19). 장기무게는 고지방식이군의 경우 대체로 증가한 경향을 보여 주고 있으며, 고지방 식이섭취로 마우스의 내장 지방조직은 크게 증가하였음을 볼 수 있다. 부고환지방의 중량은 정상군이 0.56 ± 0.25 g이었으나 고지방식이군은 1.14 ± 0.27 g으로 2배이상 증가하였고 신장지방은 0.61 ± 0.28 g에서 1.28 ± 0.34 g으로 증가하였는데 이는 고지방 식이로 인한 지방축적으로 생각된다. 그리고, J사의 공장식 된장의 1.0 ± 0.4 g인데 반하여 J사의 전통식 된장은 0.8 ± 0.5 g으로 지방조직의 무게가 낮은 값을 나타내었고, 된장에 함유되어 있는 소금을 첨가한 식이군에서는 1.2 ± 0.6 g으로 고지방식이군과 차이를 보이지 않아 소금에 따른 지방조직 감소효과를 보이지 않았다. 신장지방은 정상식이군이 0.6 ± 0.3 g이었고, 고지방식이군이 1.3 ± 0.4 g으로 증가하였고, J사의 공장식된장은 0.8 ± 0.4 g으로 나타났으나, J사의 전통식 된장은 0.7 ± 0.4 g으로 정상식이군을 제외하고, 가장 낮은 값을 나타내었다.

(3) 혈액의 총지질, 중성지방, 총콜레스테롤, HDL-콜레스테롤

또한 혈액의 총지질, 중성지방, 총콜레스테롤, HDL-콜레스테롤의 함량또한 확인하였는데(Table 20), 정상군, 고지방 식이군 및 정상식이와 J사의 전통 된장, J사의 공장식 된장과 전통 된장에 함유되어 있는 소금의 양을 첨가한 식이군으로 구성된 실험에서 고지방식이군은 중성지방과 콜레스테롤 함량이 정상군에 비해 증가를

보여 주었고 J사의 공장식된장보다 J사의 전통식 된장이 낮은 값을 나타내었다. 그리고, 소금을 첨가한 고지방 식이군은 고지방식이군만을 섭취시킨 군에서와 비슷하게 높은 값을 나타내어 소금의 첨가는 혈액 지질 성분들에게 영향이 전혀 없었다.

(4) 부고환지방, 신장지방에서의 총지질, 중성지방, 총콜레스테롤 함량

정상군, 고지방 식이군 및 정상식이와 J사의 전통 된장, J사의 공장식 된장과 전통 된장에 함유되어 있는 소금의 양을 첨가한 식이군으로 구성된 실험에서 간에 함유된 총콜레스테롤 함량, 중성지방 및 총지질의 함량 변화는 Table 21과 같은데, 고지방식이에 비하여 전통 된장을 첨가한 식이군에서 총지질, 중성지방 및 총 콜레스테롤 모두 감소효과를 보였다. 그러나 소금을 첨가한 HFD 실험군에서는 총지질, 중성지방 및 총 콜레스테롤의 감소효과는 보이지 않았으며, 고지방식이군과 큰 차이가 없었다. 그리고, 부고환지방과 신장지방에 함유된 고지방식이에 비하여 전통 된장을 첨가한 식이군에서 총지질, 중성지방 및 총 콜레스테롤 모두 감소효과를 보였다. 그러나 소금을 첨가한 실험군에서는 총지질, 중성지방 및 총 콜레스테롤의 감소효과는 보이지 않아 역시 고지방식이 군과 비슷한 효과를 보였다.

이로 인하여 소금의 첨가는 HFD의 항비만 효과가 없는데 반하여 된장안에 들어가면 전통식 된장은 효과가 있어서 된장이 중요한 역할을 한다고 할수 있겠다.

<표> Changes of Body weight, food intake and food efficiency ratio(FER) fed experimental diets for 8 weeks in C57BL/6 mice after 6 week fed with high fat diet(HFD).

	ND	HFD				6wk
	ND ¹⁾	HFD ²⁾	HFD+ G-J-Doenjang ³⁾	HFD+ T-J-Doenjang ⁴⁾	HFD + J-Salt ⁵⁾	8wk
Body weight						
Initial weight (g)	25.9±1.8 ^{NS6)}	29.2±1.4	29.2±1.9	29.3±3.7	29.1±1.8	
Final weight	29.0±2.5 ^{d7)}	32.7±2.3 ^a	32.4±3.0 ^a	30.5±3.1 ^c	31.5±2.2 ^b	
Weight gain (g/day)	0.05±0.01 ^a	0.06±0.02 ^a	0.06±0.02 ^a	0.02±0.01 ^b	0.04±0.01 ^{ab}	
Food intake (g/day) & FER						
Food intake (g/day)	3.72±0.04 ^{NS}	3.76±0.24	3.79±0.23	3.71±0.31	3.73±0.19	
Food efficiency ratio	0.02±0.01 ^b	0.02±0.01 ^b	0.15±0.09 ^a	0.01±0.00 ^b	0.11±0.04 ^a	

¹⁾Normal diet is based on the AIN-93M diet. ²⁾High fat diet contains 16% Lard added to the normal diet. ³⁾High fat diet + 5% General J -Doenjang (Jin Mi Co), ⁴⁾High fat diet +5% Traditional J Doenjang (Jin Mi Co), ⁵⁾High fat diet + J-Salt (13% salt, Jin Mi Co), ⁶⁾NS: Not significant. ⁷⁾Means with different letters in the same row are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

<표> The weight ratio of liver, spleen, kidney and adipose tissue on commercial Doenjang and added salts diets fed with experimental diets for 8 weeks in C57BL/6 mice after 6 weeks fed with high fat diet (HFD).

Organ weight	ND	HFD				6wk
	ND ¹⁾	HFD ²⁾	HFD+ G-J-Doenjang ³⁾	HFD+ T-J-Doenjang ⁴⁾	HFD + J-Salt ⁵⁾	8wk
Liver	1.3±0.1 ^{NS}	1.4±0.2	1.5±0.2	1.6±0.2	1.3±0.2	
Spleen	0.1±0.02 ^{NS}	0.1±0.02	0.1±0.02	0.1±0.02	0.1±0.02	
Kidney	0.4±0.04 ^{NS}	0.4±0.04	0.5±0.07	0.5±0.07	0.4±0.1	
Epididymal fat pad	0.6±0.3 ^{NS}	1.1±0.3	1.0±0.4	0.8±0.5	1.2±0.6	
Perirenal fat pad	0.6±0.3 ^c	1.3±0.3 ^a	0.8±0.4 ^c	0.7±0.4 ^c	1.0±0.3 ^b	

¹⁾Normal diet is based on the AIN-93M diet. ²⁾High fat diet contains 16% Lard added to the normal diet. ³⁾High fat diet + 5% General J -Doenjang (Jin Mi Co), ⁴⁾High fat diet +5% Traditional J Doenjang (Jin Mi Co), ⁵⁾High fat diet + Traditional J-Salt (13% slats, Jin Mi Co), ⁶⁾NS: Not significant. ⁷⁾Means with different letters in the same row are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

<표> The serum lipid concentration (mg/dL) effect of commercial Doenjang and added salts diets fed with experimental diets for 8 weeks in C57BL/6 mice after 6 weeks fed with high fat diet (HFD).

	ND	HFD			
	ND ¹⁾	HFD ²⁾	HFD + G-J-Doenjang ³⁾	HFD + T- J - Doenjang ⁴⁾	HFD + J- Salt ⁵⁾
Triglyceride	250.1±6.0 ^a	331.2±26.3 ^b	306.5±12.6 ^b	248.0±8.3 ^a	321.7±2.9 ^b
Total cholesterol	88.6±3.2 ^b	130.2±3.8 ^a	94.6±3.9 ^b	88.3±3.6 ^b	125.4±2.8 ^a
HDL-cholesterol	214.0±6.6 ^a	132.0±4.1 ^c	158.8±2.4 ^b	161.3±3.5 ^b	126.7±5.9 ^c

¹⁾Normal diet is based on the AIN-93M diet. ²⁾High fat diet contains 16% Lard added to the normal diet. ³⁾High fat diet + 5% General J -Doenjang (Jin Mi Co), ⁴⁾High fat diet + +5% Traditional J Doenjang (Jin Mi Co), ⁵⁾High fat diet + Traditional J-Salt (Doenjang added 13%, Jin Mi Co), ⁶⁾NS: Not significant. ⁷⁾Means with different letters in the same row are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

<표> The effect of Doenjang and added salts diets on triglyceride and cholesterol of liver and perirenal fat pad fed with experimental diets for 8 weeks in C57BL/6 mice after 6 weeks fed with high fat diet (HFD).

	ND	HFD			6wk	
	ND ¹⁾	HFD ²⁾	HFD + G-J-Doenjang ³⁾	HFD + T-J-Doenjang ⁴⁾	HFD + J-Salt ⁵⁾	8wk
Liver						
Total lipid (mg/g. Wet wt)	3.3±0.2	8.3±0.2 ^a	7.3±0.5 ^b	6.3±0.2 ^c	8.0±0.6 ^{ab}	
Triglyceride (mg/dl)	96.2±6.0 ^{c6)}	196.3±13.7 ^a	188.2±9.2 ^{ab}	175.1±10.4 ^b	190.5±7.3 ^{ab}	
Cholesterol (mg/dl)	29.6±3.2 ^d	98.0±8.3 ^a	84.4±7.3 ^b	41.5±4.6 ^c	93.5±5.2 ^{ab}	
Epididymal fat pad						
Total lipid (mg/g. Wet wt)	44.9±2.5	100.1±12.0 ^a	91.4±6.3 ^{ab}	84.0±7.4 ^b	99.2±6.3 ^a	
Triglyceride (mg/dl)	132.7±11.2 ^c	258.5±19.3 ^a	190.6±7.3 ^b	179.0±7.0 ^b	248.3±3.7 ^a	
Cholesterol (mg/dl)	18.0±1.3	38.1±3.3 ^a	30.2±2.2 ^{bc}	28.3±2.8 ^c	35.3±4.1 ^{ab}	
Perirenal fat pad						
Total lipid (mg/g. Wet wt)	34.2±3.9 ^b	75.1±6.8 ^a	70.2±5.3 ^a	68.7±4.5 ^a	74.2±6.2 ^a	
Triglyceride (mg/dl)	54.4±3.7 ^c	108.1±12.4 ^a	87.0±3.6 ^b	65.3±4.3 ^c	100.2±9.3 ^{ab}	
Cholesterol (mg/dl)	13.7±1.1	25.8±3.4 ^a	23.5±1.1 ^a	23.0±2.7 ^a	25.5±2.5 ^a	

¹⁾Normal diet is based on the AIN-93M diet. ²⁾High fat diet contains 16% Lard added to the normal diet. ³⁾High fat diet + 5% General J -Doenjang (Jin Mi Co), ⁴⁾High fat diet + 5% Traditional J Doenjang (Jin Mi Co), ⁵⁾High fat diet + Traditional J-Salt (13% salts, Jin Mi Co), ⁶⁾Means with different letters in the same row are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

다. 비만억제 효과가 있는 콩발효식품의 제품화 (2007)

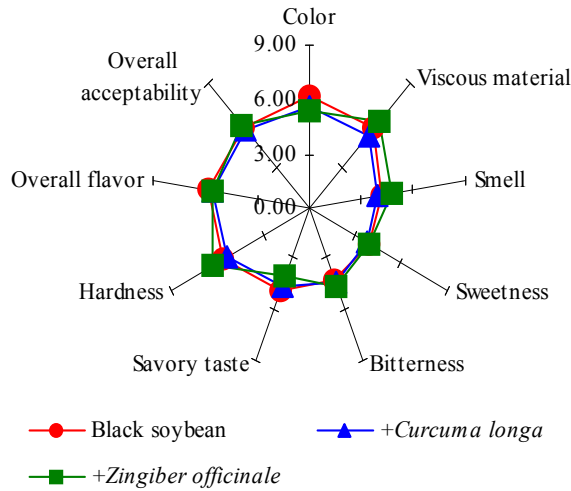
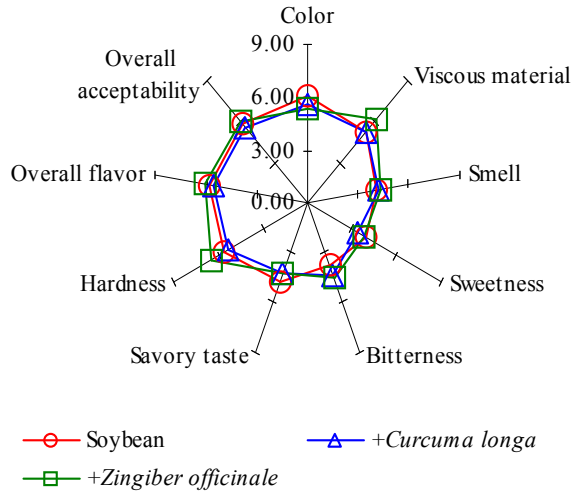
1) 비만억제 콩발효식품의 맛 증진 연구

본 연구는 1차년도와 2차년도 과제 수행으로 개발된 검정콩 된장의 맛 증진을 위한 연구로 관능검사 특성에 관한 연구결과를 나타내었다. 본 연구는 노란콩 된장과 검정콩 된장을 비교하였으며, 이의 구성은 항비만 효과를 가지는 식품을 첨가한 것인데, 울금과 생강을 첨가한 된장, 기능성 차를 첨가한 된장, 미역과 다시마를 첨가한 된장이다.

관능검사는 제조된 된장과 청국장을 반복된 랜덤화 완전 블록 계획(replicated randomized complete block design)에 따라서 훈련된 7명의 관능요원이 관능검사를 실시하였으며, 평가 항목은 주관적인 평가로 색(color), 점질성(viscous material), 종합적인 평가(overall acceptability)로 하고, 1에서 9까지 분류한 등급을 사용하여 평가하였으며, 1에 가까울수록 싫고, 9에 가까울수록 좋은 것으로 나타내었다. 또 객관적인 평가로는 후각적 지각인 청국장 특유의 냄새(smell)와 미각적 지각인 단맛(sweetness), 쓴맛(bitterness), 감칠맛(savory taste), 종합적인 맛(overall flavor), 그리고 질감을 평가하였으며, 그 정도는 1에 가까울수록 감지 불가능하고, 9에 가까울수록 극도로 강하게 감지하는 것으로 나타내었다. 후각적 지각으로 코로 감지되는 것으로 평가하였고, 미각적 지각은 여러 차례 어금니로 씹은 후 입과 코로 감지되는 것으로 평가하였으며, 질감은 앞니를 사용하여 2~3회 씹는데 드는 힘의 정도로 평가하였다. 이때 단맛이나 감칠맛은 먹은 뒤에 나타나는 구수한 뒷맛의 정도, 쓴맛은 청국장 발효에 의해 나타나는 불쾌한 정도로 정의하였다.

첫 번째로 울금과 생강을 첨가하였는데, 된장 제조 할 때 소금물을 첨가시키는 단계에서 울금과 생강 1, 2%의 동결 건조한 가루를 첨가하여 발효시켰다. 이때, 2% 된장에서 관능적으로 자극적인 맛이 많이 나고 색이 빨리 검어지는 현상을 보였다.

그리고, 울금과 생강을 각각 1% 첨가한 노란콩 된장과 검정콩 된장 중에, 콩의 종류 별로는 노란콩 된장이 검정콩 된장보다 냄새는 많이 나는 편이었고, 색도 검정콩 된장이 깨끗한 편이었으나, 단맛은 노란콩 된장이 높았다. 그리고, 울금을 첨가한 된장과 생강을 첨가한 된장 중 좋은 것은 생강을 1% 첨가한 것이었는데, 노란콩 된장과 검정콩 모두에서 같은 경향이 나타났다. 울금을 첨가한 된장은 색이 깨끗하지 못하고, 단맛도 컨트롤과 생강을 첨가한 된장에 비하여 적었으며, 향도 너무 강해 된장으로 적합하지 못하였지만, 생강을 1% 첨가한 된장은 냄새도 적고, 단맛도 있으면서, 색도 깔끔하였다. 하지만 울금 1% 첨가 된장은 맛과 색을 제품화 단계 즉 환이나 과립제조시 보완만 한다면 충분히 산업적으로 제품화가 가능하다.



<그림> 울금, 생강을 첨가한 노란콩 Bacillus subtilis 청국장과 검정콩 청국장의 관능검사 결과

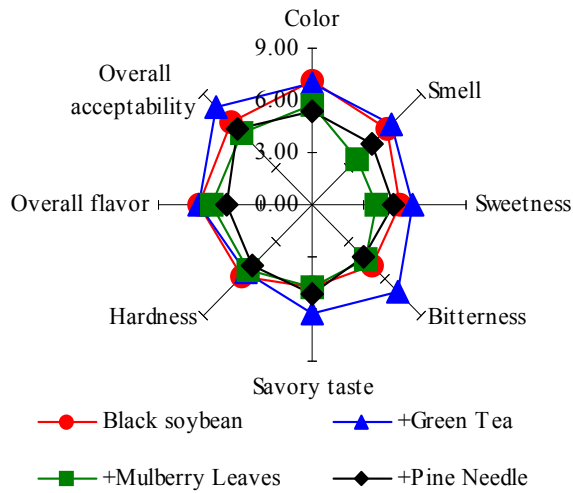
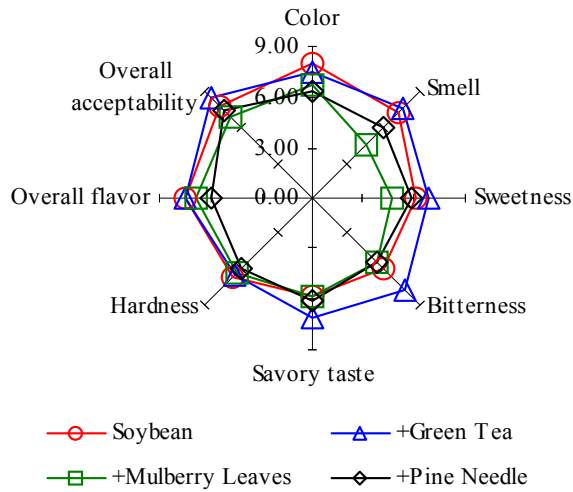
된장과 청국장에 첨가한 울금과 생강은 항비만 효과가 있다고 알려져 있는데, 특히 울금(*Curcuma longa* L)은 원산지가 인도, 중국 및 일본등으로 생강과의 다년초로서 고온다습한 남부 아시아, 아프리카 및 중남미에 자생하고 있으며 동인도 지방에서 재배가 시작되었다고 알려져 있다. 그리고, 생강과에 속하는 울금은 지표 성분으로 커큐민(curcumin)과 유사 물질에 의해 기능성 식품으로서 중요성이 알려져 있으며, 매년 적구적으로 재배농가가 급속히 증가되고 있으나 울금 특유의 독특한 이취생성에 의한 소비자의 기호성 저하와 건강 기능성 식품으로서 과학적 근거가 부족하여 산업적 실용화를 달성하지 못하고 있으며 울금의 가루나 추출액은 "본초강목

"과 "동의보감"등의 고서나 기타 동물 실험에서 이담작용, 위액 분비 촉진 작용, 이뇨작용, 해독기능, 항암작용, 항염작용 및 항산화 작용이 알려져 있다. 또한 생강과 마늘과 같은 양념류들이 항비만과 있다고 하는데, 고지방식이로 비만을 유도한 쥐에서 **마늘 착즙액**을 식이의 5%수준으로 먹인 결과 체중, 체지방 및 지방세포크기 및 식욕조절 비만단백질인 렙틴의 함량이 유의적으로 감소되는 등 항비만 효과를 가진다고 한다.

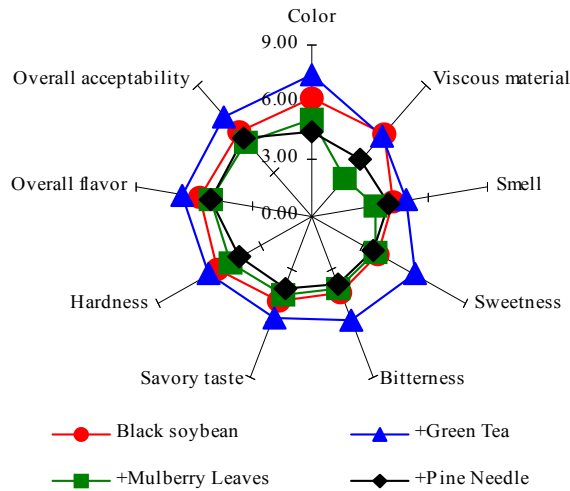
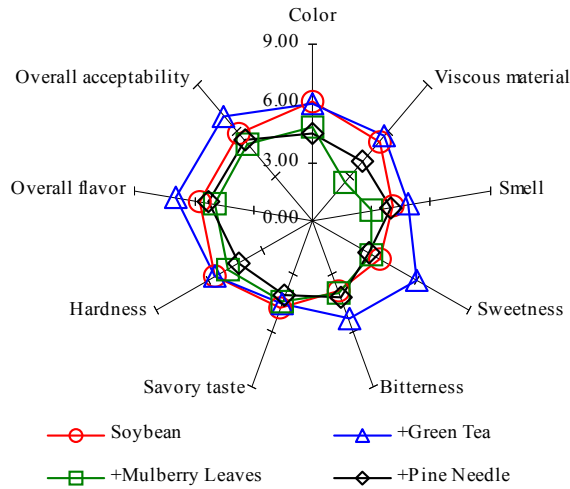


<그림> 울금과 생강

두 번째로는 항비만 효과증진 차(茶) 식품 중에 녹차와 빙잎, 솔잎을 동결건조하여 1-2% 첨가하여 제조한 된장과 청국장의 관능검사를 실시하였다. 항비만 가능성을 가지는 녹차, 빙잎, 솔잎을 1% 첨가한 된장의 관능검사 결과는 노란콩 된장보다 검정콩 된장에서 더 높은 값을 나타내었다. 특히, 녹차는 빙잎과 솔잎에 비하여 쓴맛이 높은 편이었으나, 향긋한 맛 또한 같이 포함되어 있어 전체적인 맛에서는 높은 점수를 받았다. 그리고, 솔잎과 빙잎은 가장 낮은 점수를 받았는데, 특히 빙잎은 단맛이 적고, 향이 나빠 제품화하기에는 무리가 있다고 생각되어진다.



<그림> 녹차, 뽕잎, 솔잎을 첨가한 노란콩 된장과 검정콩 된장의 관능검사 결과
 녹차, 뽕잎, 솔잎을 1% 첨가한 청국장에서의 관능검사 결과는 노란콩 청국장보다 검정콩 청국장에서 더 높은 값을 나타내었다. 특히, 검정콩 된장에서 녹차는 된장과 같은 경향의 결과로, 뽕잎과 솔잎에 비하여 쓴맛이 높은 편이었으나, 색이 우수하고, 향긋한 맛을 가지고 있으며, 전체적인 맛에서는 높은 점수를 받았다. 그리고, 솔잎과 뽕잎은 가장 낮은 점수를 받았는데, 특히 뽕잎은 단맛이 적고, 색과 향이 나빠 제품화하기에는 무리가 있었다.



<그림> 녹차, 빙잎, 솔잎을 첨가한 노란콩 *Bacillus subtilis* 청국장과 검정콩 청국장의 관능검사 결과

첨가한 녹차는 커피, 홍차 및 코코아와 함께 카페인을 함유한 비알콜성 기호음료로서 이들에 비하여 질소, 폴리페놀, 당, 유기산, 비타민 및 무기질 등을 많이 함유하고 있는 것이 특징이다. 녹차 전체 가용성분의 절반이상을 차지하는 polyphenol은 차의 색깔과 향기, 맛을 좌우하는 주요성분으로 flavonols, flavandiols, flavonoid, phenolic acid를 포함한 polyphenol류를 함유하고 있어 강한 항산화력을 나타낸다. 이러한 물질들은 건조 중량의 약 30%를 차지하며 대부분의 녹차의 polyphenol류는 catechin으로서 알려진 flavanol 류이다. 몇 가지 중요한 녹차의 catechin은 (-)-epigallocatechin 3-O-gallate (ECGC), (-)-epigallocatechin(EGC),

(-)-epicatechin 3-O-gallate (ECG), (-)-epicatechin (EC), (+)-gall catechin (GC), (+)-catechin(C) 등이다. 차에는 비타민 A, B1, B2, C, 니코틴산 등이 많이 들어 있으며, 판토텐산, 엽산, 비오틴 등과 비타민 E의 작용을 하는 토코페롤, 비타민 P의 효과가 있는 루틴 등이 들어 있다. 그 중에서 가장 많은 것은 비타민 C로 차에 들어 있는 비타민 가운데 가장 먼저 확인된 성분이다. 녹차에 들어 있는 비타민 C는 찌거나 볶는 과정에서 효소의 작용을 불활성화시켜 건조시키므로 매우 안정되어 있어 뜨거운 물을 부어도 잘 파괴되지 않으며, 카페인이나 탄닌, 당질 등의 혼합물이 산화되는 것을 막아 그 효과를 높여준다. 녹차는 항암효과, 항산화효과, 항비만효과, 피부미용 효과 등이 알려져 있다. 특히 녹차의 카테킨은 120.3~153.7mg/g의 함량이 포함되어 있으며, 혈청에서 총콜레스테롤, 중성지방 및 동맥경화지수를 감소시키고 부고환 지방의 세포수 및 크기의 감소를 유도하여 비만을 억제하는 효과가 있다고 규명되었다고 한다. 녹차는 콜레스테롤 저하 효능이 있으며 녹차를 함유한 식이를 마우스에 투여 했을 때 체중, 지방축적, 혈청과 간에서의 중성 지방 함량이 억제 되었고 혈중 렙틴 수준도 현저히 감소 하였다고 한다. 이는 녹차에 다량 함유된 카테킨과 카페인이 교감신경에 작용 해노르에피네프린의 분비의 축진을 통해 베타교감신경수용체를 활성화시켜 열발생을 통한에너지 소비를 유도하기 때문인 것으로 이해된다. 실제로 카테킨은 노르에피네프린을 분해하는 효소인 catechol-o-methyltransferase를 억제하며, 카페인은 노르에피네프린에 의해 유도된 cAMP를 분해하는 효소인 phosphodiesterase를 억제하는 것으로 알려져 있다. 그러므로 녹차 추출물의 주요 성분인 카테킨과 카페인은 노르에피네프린-cAMP축에서 상승작용을 함으로써 열발생을 효과적으로 촉진시킨다. 임상실험에서도 녹차추출물을 (카페인150 mg, 카테킨 375 mg 함유) 하루 동안 투여 하였을 때 열발생과 지방의 산화를 증가시켰으며 12 주 동안 장기적으로 투여 하였을때에는 (카페인 83mg/day, 카테킨588 mg/day) 체지방과 체중이 감소하였다. 그리고, 녹차의 항비만 효과는 비교적 잘 알려져 있으며 녹차의 주성분은 epicatechin, epicatechin, gllate, epigallocatechin, 및 epigallocatechin gallate 의 형태로 많은 양의 카테킨(cathechin)을 함유하고 있으며 이들 카테킨이 항비만 효과를 나타내는 주성분으로 알려져 있다. 그리고, 이들 카테킨은 췌장 a-amylase 나 lipase 의 활성을 저해하여 탄수화물과 지방의 소화와 흡수억제로 인한 칼로리 섭취량 제한 효과로 항비만 효과를 가진다고 알려져 있다. 이외 카페인은 교감신경을 흥분시켜 지방의 체내작용을 증가시켜 항비만 효과를 가진다고도 한다. 또한 녹차의 음용은 관상동맥질환 발생율이 줄고, 차 폴리페놀류는 LDL-산화를 억제하고, 혈중콜레스테롤 지질농도를 저하하고, 혈청과 간의 지방상승을 억제 콜레스테롤 또는 죽종형성지수를 낮춘다고 보고하고 있다. 그리고, 녹차의 종자유에는 콜레스테롤 저하 효과 또한 있다고 보고되었다.



<그림> 녹차, 뽕잎, 솔잎

최근에는 천연 기능성 식품 중에서 누에, 뽕잎, 상백피 및 동충하초 등의 잠상관련 물질이 기능성 신소재로 부각되고 있으며, 일본에서는 기능성 식품 개발과 잠업의 사양화를 막기 위한 일환으로 뽕잎을 이용한 식품을 개발하여 시판하고 있다. 뽕나무(*Morus alba* L.) 의 잎에 존재하는 성분은 크게 휘발성 성분과 비휘발성 성분으로 나눌 수 있으며 휘발성 성분으로는 guaiacol, eugenol, methyl salicylate, benzaldehyde 및 phenylacetaldehyde 등이며 비휘발성 성분으로는 플라보노이드가 주류를 이루어 그 함량이 매우 높고 종류 또한 다양하다. 즉 rutin, quercetin, isoquercetin, quercetin 3, 7 diglucoside 및 quercetin 3-triglucoside 가 존재한다. 이러한 플라보노이드 화합물의 생리활성은 이노작용, 항모세혈관 투과작용, 항알레르기 작용 및 간보호작용 등이 알려져 있고, 플라보노이드계의 골격을 갖는 화합물인 kuwanon G 의 혈압강하 작용은 매우 뛰어나다고 알려져 있다. 그리고, 20세 전후의 건강한 여자대학생을 대상으로 뽕잎 분말을 300mg씩 매 식사후 즉시 6주간 복용시켰을 때 복용후 복용전에 비해 혈중 중성지방이 유의적으로 감소하였다고 보고하였다. 또한 비만 여성에게 2주간 뽕잎 분말을 4주간 1일 3회 섭취했을 때 섭취전에 비해 LDL-콜레스테롤 치가 유의적으로 감소하였고, 뽕잎 중 Catechin의 중 *Clostridium perfringens* 에 대한 생장억제효과가 있다고 보고하였다.

소나무과(*Pinus desiflora* Sieb. et Zucc)에 속하는 솔잎은 중국, 한국을 비롯한 아시아, 유럽, 아메리카 지역 등에서 자생하고 있는 상록침엽수로, 쉽게 채취할 수 있어 저비용으로 손쉽게 얻을 수 있는 장점과 항균, 항산화 및 항암 작용 등의 생리활성이 우수하여 기능성 식품 신소재에 대한 개발 가능성과 부가가치가 매우 높은 천연물로 평가받고 있다. 솔잎은 수분 58.1%, 단백질 4.5%, 지질3.9%, 당질 19.6%, 섬유소 13.3% 로 구성되어 있으며, 주 생리활성 성분으로는 α -pinene,

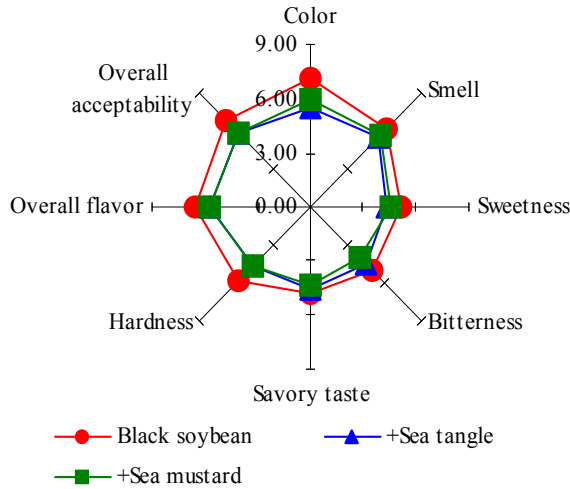
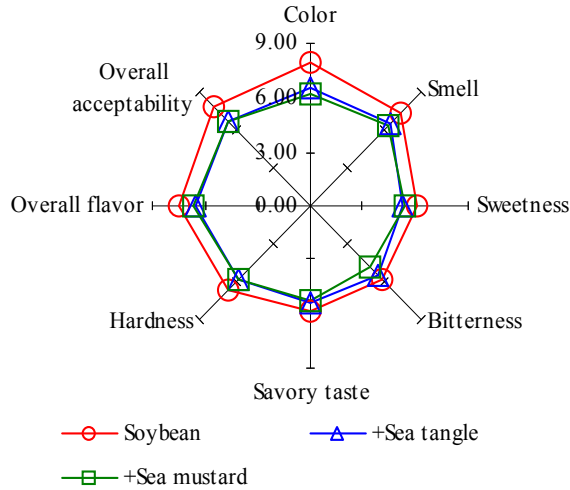
b-pinene, camphene 등의 정유 성분과 quercetin, kaempferol 등의 플라보노이드류가 있다. 또한 솔잎은 칼륨의 양이 풍부하여 강알칼리식품으로 인정받으며, 동의보감에는 모발을 나게 하고 수명연장의 효과를 가진다고 한다. 잎은 장내기생 박테리아의 생육저해와 *Listeria monocytogenes*에 대한 항균효과, 간보호 및 치주질환예방효과, 암세포 성장억제효과, 혈청지질강하 효과 등이 보고되어 있다. 솔잎의 지질저해효과와 항산화능을 알아보기 위한 콜레스테롤을 급여한 흰쥐에 솔잎 분말을 7주간 급여한 후 혈장 및 간장의 지질구성과 간장내 TBARS량 및 glutathione peroxidase의 활성치를 비교, 검토한 결과 혈장 총콜레스테롤량은 솔잎 분말처리에 의해 하락하는 경향을 보였고, 또한 간장내 TBARS량은 콜레스테롤 급여에 의해 증가하였으나 솔잎분말처리에 의해 하락하는 경향을 보여주는 결과를 나타내었다. 솔잎의 항비만 효과는 잘 알려지지 않은 것이어서 탄수화물이나 지방의 소화와 흡수를 억제할 가능성에 관한 췌장 알파아밀라아제나 리파아제의 활성 저해효과를 측정해 본 결과 유의적 차이를 보이지 않았다고 하였으며, 지금까지 알려진 솔잎의 유효한 성분들은 독특한 향을 내는 α -pinene, b-pinene, camphene 등의 정미성분, quercetin, kaempferol, 루틴 등의 플라보노이드류나 피니톨 등이 있는 것으로 알려져 있으며, 이중 루틴은 항산화 효과를 가지며, 중풍, 고혈압, 당뇨 등의 노화성 질환에 효과가 있는 것으로 알려져 있으며, 피니톨의 항-당뇨 효과도 보고되었다.



<그림> 미역과 다시마

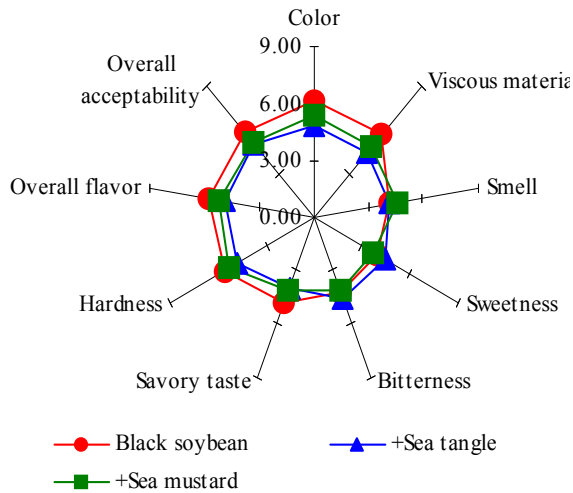
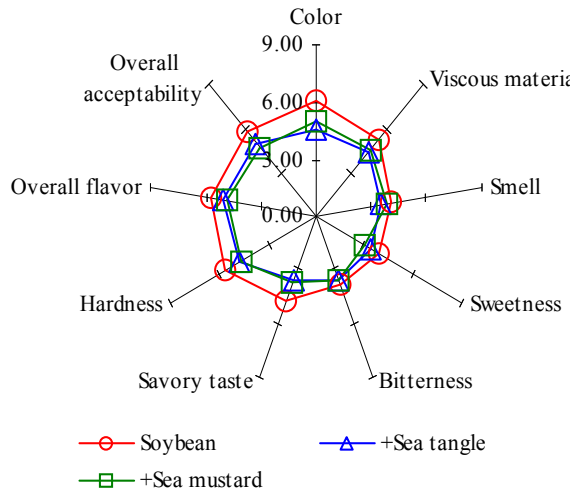
세 번째 실험으로는 항비만 효과가 있다고 알려져 있는 미역과 다시마를 동결건조하여 1% 씩 노란콩 된장과 검정콩 된장에 첨가하여 발효시켰는데, 미역, 다시마 등 갈조류의 생리활성성분인 fucoidan은 황산기를 가진 산성의 수용성 다당류로서 항종양 활성을 갖고 있다는 사실이 알려져 있다. 특히 *Coriolus versicolor*로부터 추출한 다당은 <Krestein>이란 상품명으로서 항암제로 시판되고 있다. 해조 열수 추출물의 항종양 활성은 Nakazawa 등에 의하여 처음으로 밝혀졌고, Ehrlich 암종양 세포에 항종양 활성을 나타내는 *S. thunbergii*의 열수 추출액의 활성획분이 다당임을 밝혀냄으로서 해조다당의 항종양 활성에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.

관능검사 결과, 검정콩 된장이 노란콩 된장에 비하여 관능검사에서 전체적으로 낮은 점수를 받았는데, 이는 미역과 다시마의 비릿한 향들이 영향을 주어 나타나는 결과라고 생각되어지는데, 그중 미역은 가장 낮은 점수를 받았다.



<그림> 다시마와 미역을 첨가한 노란콩 된장과 검정콩 된장의 관능검사 결과

하지만 청국장에서도 같은 경향을 보였는데, 전체적인 그림으로 봤을때 검정콩 청국장의 경우 다시마의 경우 냄새와 단맛의 경우 컨트롤 보다 약간 높은 값을 나타내긴 하였지만 큰 차이는 보이지 않았다.



<그림> 다시마와 미역을 첨가한 노란콩 Bacillus subtilis 청국장과 검정콩 청국장의 관능검사 결과

2) 다양한 응용제품(분말, 환, 캡슐) 개발연구

위의 검정콩 된장, 청국장의 개발 연구의 일환으로 다양한 응용제품을 개발하였다. 다음의 그림은 검정콩 청국장과 노란콩 청국장을 환으로 만든 것이다. 항비만 효과를 나타내려면 자주 먹는 것이 좋다. 하지만 된장은 끓여 먹어야 하는 단점이 있고, 특히 된장에 많이 포함되어 있는 유산균, *Bacillus* 계통의 몸에 좋은 균들이 끓여 먹었을 시에 감소하는 경향을 나타내기 때문에 이를 보완하기 위하여 환으로 제조하였다. 두 번째 그림은 검정콩 된장을 분말로 제조한 것이고, 세 번째는 검정콩 된장을 환과 과립으로 제조하였다. 그리고, 검정콩 된장에 녹차와 마늘을 1%

첨가시킨 된장을 환으로 제조하였다.

본 제품은 된장이라는 보편적인 제품이지만 새롭게 밝힌 비만과 항노화, 신경재생과 같은 기능성을 토대로 한 제품이기에 그 시장성이 충분히 확보된다고 보여지고, 건강보조식품과 전통발효식품의 틈새시장을 공략 가능하다고 생각되어지며, 그 공략 대상은 된장에 많이 함유되어 있고 여성 호르몬 대체 성분인 Isoflavone 이 필요한 30-50대의 비만 여성을 타겟으로 할 수 있다. 또한 검정콩 녹차 된장분말, 과일, 환의 경우 된장은 싫어하지만 골다공증의 예방과 칼슘의 보충이 절실히 필요한 10대 후반, 20대 초중반의 여성을 타겟으로 하면 비만예방과 골다공증, 항노화 예방을 할 수 있다.



<그림> 검정콩(서리태) 환청국과 노란콩(황금콩) 환청국



<그림> 검정콩(서리태) 분말된장



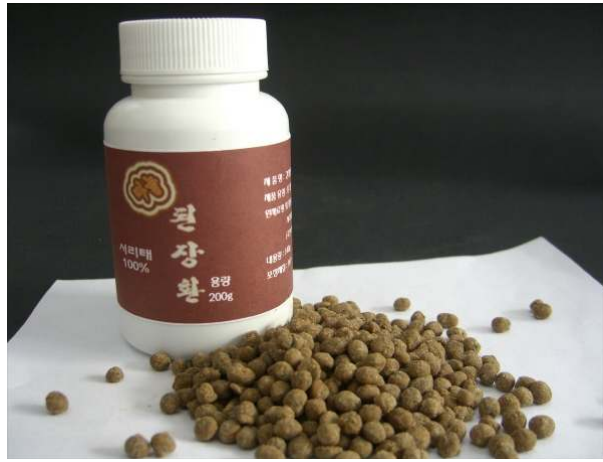
<그림> 검정콩(서리태) 된장환



<그림> 검정콩(서리태) 된장과립



<그림> 검정콩(서리태) 녹차 된장환

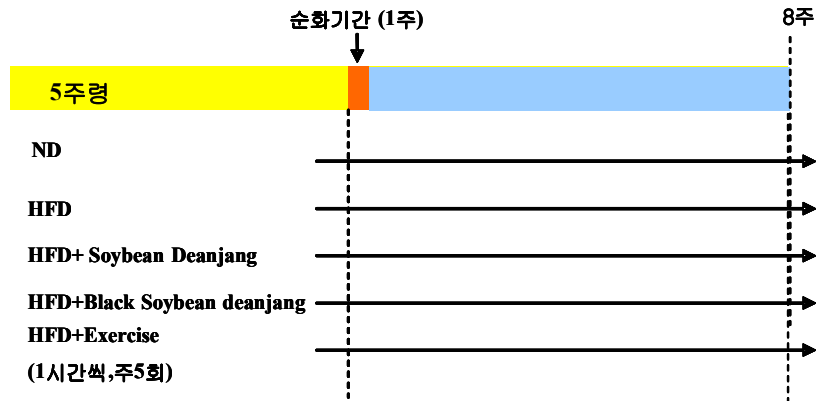


<그림> 검정콩(서리태) 마늘 된장환

3) 개발된 제품의 항비만 효과 확인

가) 식이동물 및 식이 조성표

최종적으로 개발된 제품의 항비만 효과를 확인하고자, 비만을 유발하기 쉬운 생후 5주령(male, 14-16g)된 C57BL/6 마우스를 (주)샘타코에서 구입하여 실험하기 전 시판 고형사료를 먹이면서 1주일 동안 환경에 적응 시켰다. 정상식이(ND)는 DC diet 정상식이에 준하여 제조하였고 고지방식이(HFD)는 비만의 효과를 높이기 위하여 에너지 중 지방을 23% 첨가하였다. 그리고, 식이에 따른 된장의 체중감량 및 지질 개선효과를 알아보기 위하여 고지방식이에 일반성분을 고려하여 된장을 동결 건조하여 만든 분말을 10% 첨가하여 고지방식이에 된장함유사료를 만들어 식이 하였고 운동군은 고지방식이와 함께 일주일에 5번, 하루에 한 시간씩 수영을 병행하였다. 사육 기간 동안 식이와 물은 자유 급식하였으며 체중 증가량은 매주 1회 측정하였고, 식이섭취량은 이틀에 한번씩 측정하였다.



<식이 구성에 따른 고지방식이 유도 마우스의 실험구성도>

<식이조성표>

g/kg	Normal diet	High Fat diet (HFD)	HFD + Soybean deonjang	HFD + Black soybean deonjang
Casein	189.6	233.1	219.2	219.4
L-cystine	2.8	3.5	3.5	3.5
Cornstarch	298.6	84.8	81.2	81.2
Dextrose	33.2	116.5	116.5	116.5
Sucrose	331.7	201.4	201.4	201.4
Cellulose	47.4	58.3	54.9	47.2
Soybean oil	23.7	29.1	21.1	21.8
Vitamin mix (V10001)	9.5	11.7	11.7	11.7
Mineral mix (S10026)	9.5	11.7	11.7	11.7
Choline bitartrate	1.9	2.3	2.3	2.3
Lard	19.0	206.9	206.9	206.9
Soybean Deonjang			100.0	
Black Soybean Deonjang				100.0
Dicalcium phosphate	12.3	15.1	15.1	15.1
Calcium carbonate	5.2	6.4	6.4	6.4
Potassiumcitrate,H ₂ O ₂	15.6	19.2	19.2	19.2
	1000.0	1000.0	1071.1	1064.3
Energy, KJ/g	16099.1	19791.6	19793.3	19793.3
Protein, % of energy		20.0	20.0	20.0
Carbohydrate, % of energy		35.0	35.0	35.0
Fat, % of energy		45.0	45.0	45.0

나) 체중의 변화

사육초기에 각 군간의 평균 체중은 군간에 큰 차이가 없었으나 4주 후부터 모든 군의 체중이 증가하였다.

Weight gain(g/day)는 정상군이 0.16 ± 0.01 g, 고지방식이군이 0.26 ± 0.03 g, 고지방식이에 검정콩된장을 첨가한 군은 0.15 ± 0.01 g, 고지방식이에 운동을 병행한 군은 0.13 ± 0.01 g으로 나타났다. 체중증가량은 고지방 식이에 검정콩 된장, 노란콩 된장을 첨가한 군, 그리고 운동을 병행한 군 모두 고지방식이군과 비교하였을 때 현저하게 감소하였다. 특히, 실험군중 고지방식이에 검정콩 된장을 첨가한 군과 고지방식이와 함께 운동을 병행한 군은 정상식이군보다도 더 높은 체중저하효과를 나타내었다. 그리고, 식이섭취량은 이틀에 한번, 체중은 매주 일정한 날, 일정한 시간에 측정하였다. 식이효율은 아래의 공식에 의해 계산하였다.

$$\text{Food efficiency ratio} = \text{Daily weight gain(g)} / \text{Daily dietary intake(g)}$$

식이 효율은 고지방식이에 검정콩된장, 노란콩된장을 첨가한군, 운동을 병행한 군이 고지방식이만 섭취한 군보다 낮게 나타난 것으로 보아 검정콩 된장의 안토시아닌과 제니스테인, 노란콩 된장의 제니스테인에 의해 지방축적이 감소하고 지방이 분해된 것으로 보여지고, 고지방식이에 운동을 병행한 군은 에너지 소비량이 증가하여 지질이 배출된 것으로 사료된다.

<된장종류에 따른 고지방식이 마우스의 최종몸무게와 식이섭취율>

	ND	HFD	HFD +Black soybean doenjang	HFD +Soybean doenjang	HFD +Exercise
Body weight					
Initial weight(g)	21.51±1.36	23.78±1.27	23.24±1.06	23.56±1.35	24.45±2.85
Final weight	31.32±2.28	40.41±3.33	32.94±1.99	34.29±4.53	32.83±3.11
Weight gain(g/day)	0.16±0.01	0.26±0.03	0.15±0.01	0.17±0.05	0.13±0.01
Food intake(g/day) & FER					
Food intake(g/day)	3.2±0.3	3.1±0.3	3.0±0.2	2.8±0.3	2.9±0.3
Food efficiency ratio	0.05±0.003	0.08±0.006	0.05±0.005	0.06±0.005	0.005±0.005

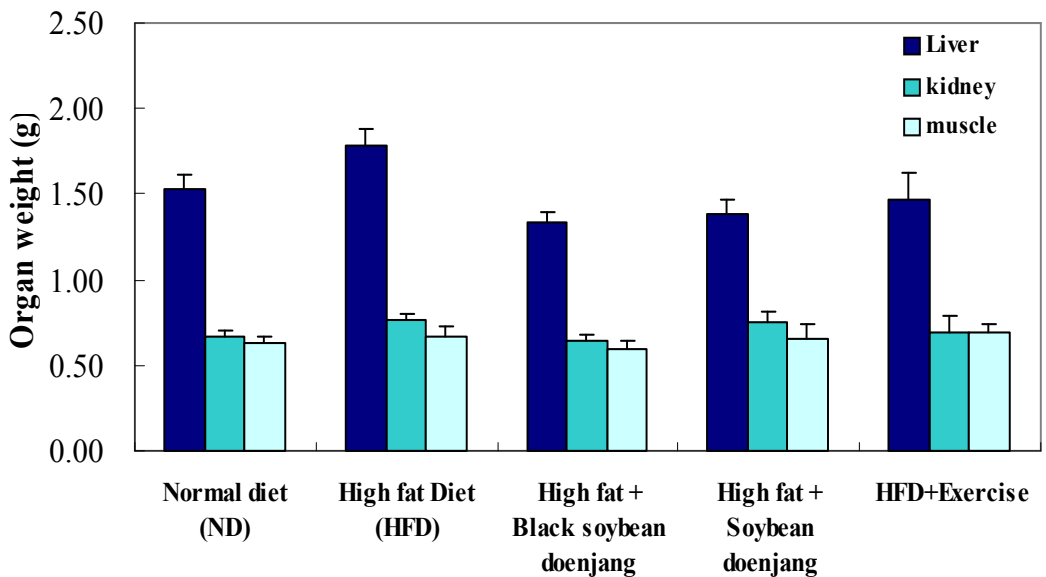
다) 장기 및 지방 무게 변화

정상군, 고지방식이군 및 고지방식이와 노란콩 된장을 첨가한 식이군, 고지방 식이에 검정콩 된장을 첨가한 식이군 그리고, 고지방식이에 운동을 병행한식이군으로 구성하여 장기무게 및 지방조직 무게의 변화를 보았다.

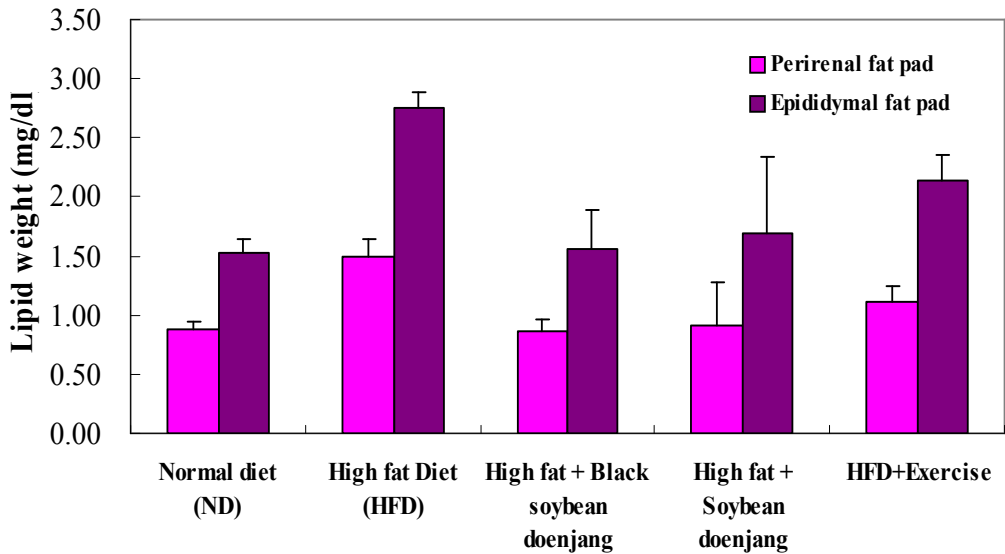
간의 무게는 고지방식이군이 1.79 g으로 가장 높게 나타났는데 이는 고지방 식이로 인해 간에 지방축적이 일어났다고 보여 진다. 검정콩 된장을 첨가한 고지방 식이군의 경우 간의 무게가 고지방식이군에 비해 유의적으로 감소하였다. 신장은 각 군간에 큰 차이는 나타나지 않았지만 이 역시 검정콩된장을 첨가한 고지방식이군에서 가장 낮게 나타났다.

지방조직 중 부고환 지방조직의 경우 정상식이군은 1.52 g인데 반해 고지방 식이군은 2.76 g으로 증가하였다. 이를 제외한 각 군은 각각 1.57 g, 1.7 g, 2.14 g으로 나타나 고지방식이군에 비해 감소하였다. 신장주위 지방조직에서도 고지방식이군의 경우 1.49 g인데 반하여 정상식이군은 0.87 g이었고 다른 각각의 군은 0.87 g, 0.92 g, 1.1 g으로 나타났다.

장기무게는 고지방식이군의 경우 내장지방의 축적정도가 심하여 간과 신장에 지방이 축적되어 있는 것을 볼 수 있었지만 고지방식이에 검정콩된장, 노란콩된장을 첨가한 군과 운동을 병행한 군의 경우는 장기가 정상식이와 비슷하였고 내장지방의 축적 정도가 크게 감소한 것을 확인할 수 있었다.



<그림> 개발된 제품(검정콩 된장, 노란콩 된장)의 장기의 무게함량

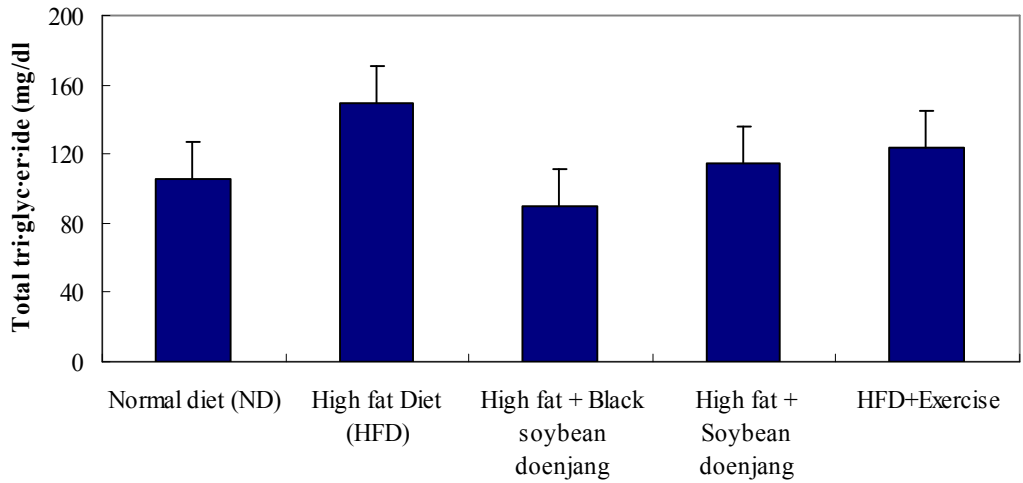


<그림> 개발된 제품(검정콩 된장, 노란콩 된장)의 지방무게함량

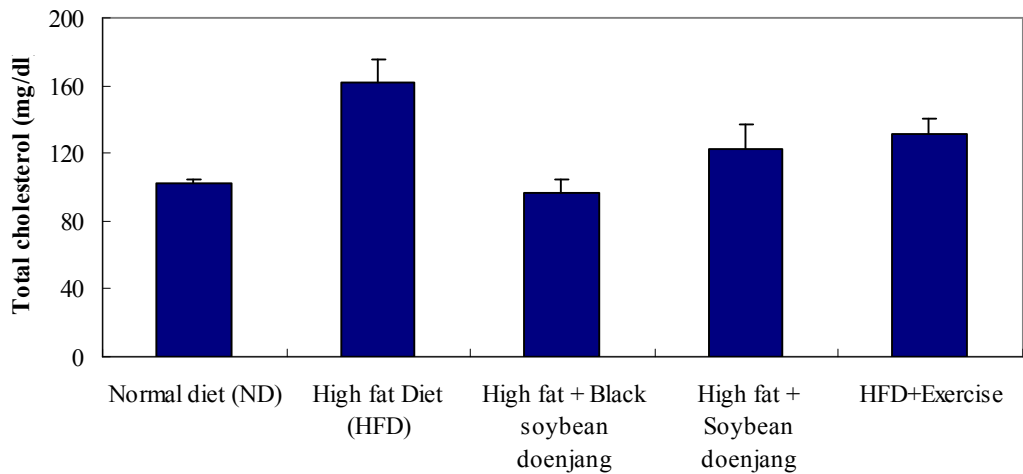
라) 혈청 중성지방, LDL-콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 함량

정상식이군, 고지방식이군 및 고지방식이에 검정콩 된장을 첨가한 식이군, 고지방식이에 노란콩 된장을 첨가한 식이군, 고지방 식이와 함께 운동을 병행한 군의 혈장 내 중성지방과 콜레스테롤 함량을 측정하였다. 고지방식이군의 경우 중성지방은 134.5 mg/dl, 콜레스테롤은 161.5mg/dl로 가장 높은 값을 나타냈고, 고지방식이에 검정콩된장, 노란콩된장을 첨가한 군, 고지방식이에 운동을 병행한 군 모두 고지방식이군에 비하여 중성지방과 콜레스테롤이 감소하였다.

특히, 고지방식이에 검정콩을 첨가한 군의 경우는 중성지방, 콜레스테롤 모두 정상식이 보다 낮은 값을 나타내었는데 이는 고지방식이에 의해 증가된 중성지방과 콜레스테롤이 검정콩 된장 속의 안토시아닌과 제니스테인에 의해 지방이 분해되면서 중성지방과 콜레스테롤 감소에 영향을 미친 것으로 사료된다. 이것으로 보아 검정콩 된장의 섭취는 고지혈증 또한 개선시킬 수 있을 것이라고 보여진다.



<그림> 개발된 제품(검정콩 된장, 노란콩 된장)의 혈액의 총 트리글리세라이드 함량



<그림> 개발된 제품(검정콩 된장, 노란콩 된장)의 혈액의 총콜레스테롤 함량

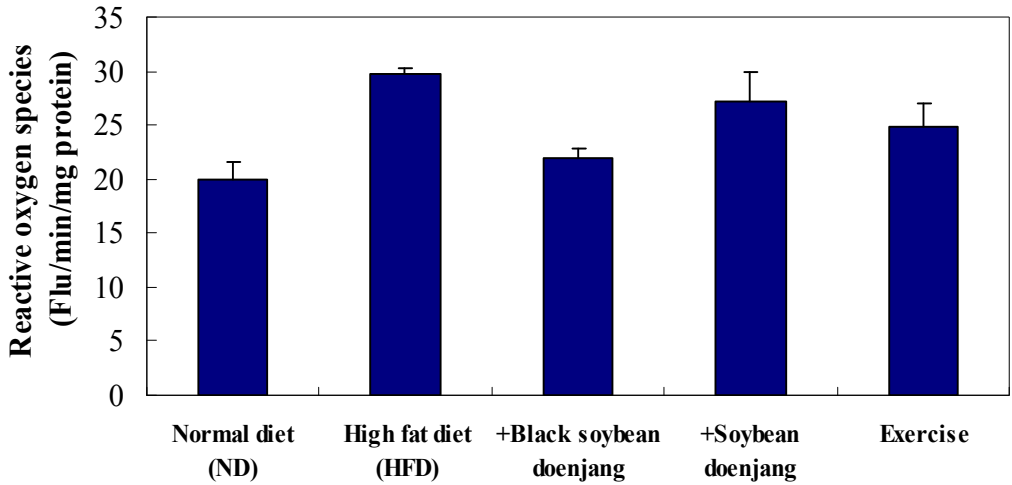
마) Reactive oxygen species (ROS) 함량

높은 농도의 활성산소종은 핵산, 지질 및 단백질 등의 생체 중요 화합물에 산화적 손상을 일으켜서 세포의 손상을 초래한다고 알려져 있다. 격렬한 운동과 같은 과도한 스트레스는 단시간에 많은 양의 활성산소종을 유발하게 되어 항산화 효소의 활성이 이들을 제한할 수 없게 된다. 그래서 다음으로는 Liver를 cytosol과

Nuclear로 분리한 후 Cytosol에서 Reactive oxygen species (ROS)를 측정하였다.

H₂O₂의 생성은 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA, Eastman Kodak, NY, U.S.A)를 이용한 방법으로, 산화체가 존재하면 DCFH가 강한 형광물질인 2',7'-dichlorofluorescein (DCF)로 전환된다.

고지방식이의 경우 29.7(Flu/min/mg protein)로 가장 높은 값을 나타내었고, 정상식이군이 20.0(Flu/min/mg protein)으로 가장 낮았으며 고지방식에 검정콩 된장을 첨가한 군은 22.0(Flu/min/mg protein)으로 정상식이군과 비슷한 수준으로 나타났다.



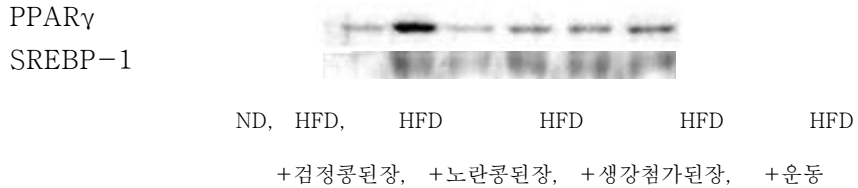
<그림> 개발된 제품의 동물실험에 의한 ROS 함량 측정

바) 지방생성에 미치는 영향

다음은 고지방식에 검정콩 된장을 10% 첨가한 군에서 몸무게, TG, Cholesterol, ROS, 장기 무게가 현저하게 감소하였는데 항비만 효과를 증명하기 위해 western blotting 방법을 이용하여 살펴보았다.

지방생성에 관여하는 유전자들의 전사를 조절하는 전사인자임 PPAR γ 와 SREBP-1c를 살펴보았는데 SREBP-1c, PPAR γ 는 지방생성에 관여하는 중요한 전사인자들이다. SREBP-1c는 지방 세포에서 PPAR γ 의 발현을 유도하며 PPAR γ 의 ligand-binding domain을 활성화 시킬 뿐 아니라 PPAR γ 의 ligand의 생산을 촉진시킨다. 또한 지방산 생성에 관여하는 효소인 FAS, ACC, Acyl-CoA synthetase (ACS) 등의 발현을 조절한다. 검정콩 된장이 지방생성 관련 효소들의 생산을 조절하는 전사인자들과 효소들의 단백질 발현에 영향을 주는지 알아보기 위하여 western

blotting을 수행하였다. 고지방식이군에서 PPAR γ 와 SREBP-1c의 발현이 가장 높았고 고지방식이에 노란콩 된장, 생강 첨가 된장, 운동군은 고지방식이만 처리한 군에 비하여 감소하였거나 발현 정도가 비슷하게 나타났다. 하지만 검정콩 된장을 처리한 고지방식이군에서는 PPAR γ 와 SREBP-1c의 발현량이 정상식이와 비슷하거나 더욱 더 감소한 것을 확인할 수 있었다.



<그림> PPAR gamma와 SREBP-1의 발현

항비만 활성이 우수할 것이라고 예상되는 검정콩 된장을 제조한 후, 항비만 효과들을 검증하기 위해서 정상식이군, 고지방식이군, 고지방식이에 검정콩 된장을 첨가한군, 고지방식이에 노란콩 된장을 첨가한군, 고지방식이와 함께 운동을 병행한 군으로 실험을 구성하여 내장 지방을 비롯하여 중성지방, 콜레스테롤 그리고 지방생성과 지방분해에 관여하는 전사인자들을 살펴보았다. 고지방 식이와 함께 검정콩 된장을 첨가한 군은 정상식이군의 몸무게 증가량과 비교하였을 때 더욱더 감소하였으며 높은 칼로리를 섭취하였음에도 불구하고 내장지방, 중성지방, 콜레스테롤, ROS, PPAR γ 와 SREBP-1c의 발현량을 감소시켰으므로써 검정콩 된장의 항비만 활성을 증명하였다.

2. 콩 발효 식품 성분의 항비만 효과 탐색 및 기전 규명

가. 콩 발효 식품의 비만 및 염증 억제 효과 검토

1) 염증관련지표 및 산화스트레스에 대한 효과 검토

비만과 산화스트레스와는 밀접한 관계를 가지고 있으며, 내장 비만 조직의 40%는 마크로파지가 함유 되어 있어 쉽게 활성화 되며 산화 스트레스와 염증을 초래한다. 그래서 본 연구에서는 염증과 산화스트레스 관련 지표들을 검토해 보았다.

(가) 산화 스트레스에 대한 효과 검토

염증관련 유전자의 발현과 활성산소의 생성과는 밀접한 관계가 있다고 잘 알려져 있다. 그래서 먼저 혈관 내피 세포인 YPEN-1 Cell 에 콩 발효식품의 Methanol 추출물 및 콩발효 유래 지방산 nonanoic acid(NA), undecanoic acid(UA)을 처리하여 ROS 생성 정도를 형광 현미경으로 검토하였다. (Fig. 1)

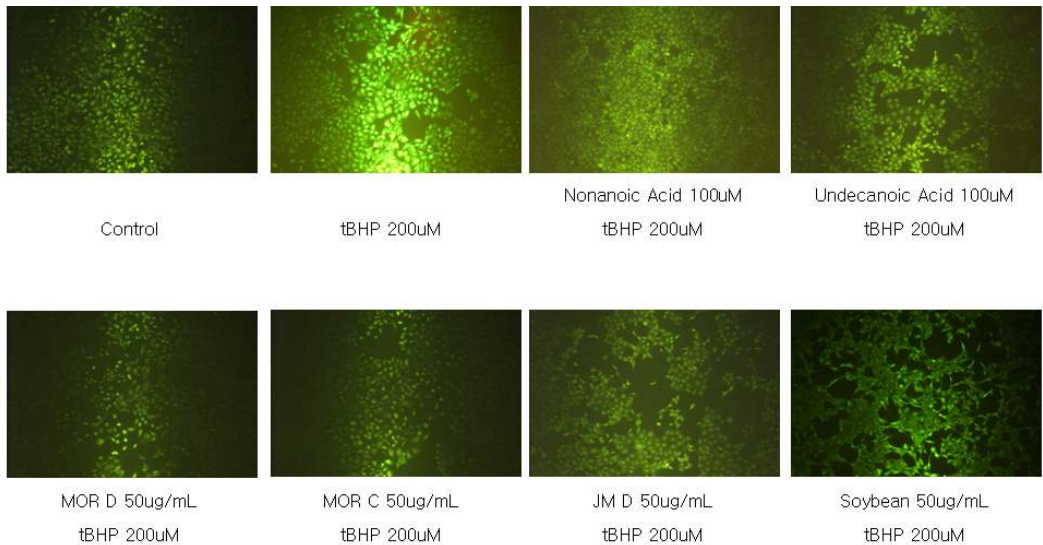


Fig. 1. 콩발효식품의 분획물과 그 유래물질의 활성산소 생성능에 미치는 영향

혈관 내피 세포를 사용하여 콩 발효식품이 인체에서 발생하여 혈관의 미세염증을 유발시키는 활성산소를 얼마만큼 저해하는지를 조사하였다. 혈관내피세포 YPEN-1 을 100T Dish에 계대배양 하여 5×10^4 Cells/well 크기로 Seeding 하였다. 하루 밤

을 5% CO₂ Incubator에 배양 한후 다음날 Serum Free Media 로 바꾼 후 콩 발효 식품에서 많이 존재한다고 알려진 지방산 NA와 UA를 100 μM로 투여하였다. 또한 제 1 세부과제에서 분획한 콩 발효식품 분획물 4종(MOR 된장, MORD; MOR 청국장, MORC; JM 재래된장, JMD; 대두, soybean)를 50μg/mL로 처리하였다. 한 시간 후 활성산소를 유발하기 위하여 tBHP (tert - butylhydroperoxide) 를 200μM 처리하였다. 한 시간을 배양 한 후 DCF-DA (2, 7 - dichlorodihydrofluorescein diacetate)를 10μM 처리하여 형광 현미경을 이용하여 활성산소 생성량을 측정하였다. tBHP에 의해 활성산소는 현저히 증가 하였다. 하지만 MOR 된장 Methanol 분획물을 50μg/mL 처리한 군과 MOR 청국장 Methanol 분획물 50μg/mL 처리군에서 활성산소 생성량이 감소하는 것을 관찰 할 수 있었다.

(나) 염증 및 비만 관련 전사인자 검토

콩유래물질(NA, UA)과 콩 발효식품 분획물질 4종, MORD, MORC, JMD, soybean을 혈관내피세포인 YPEN-1에 투여하여 지방대사 관련 단백질을 조절하는 PPARα를 Western blot을 통해 확인하였다. (Fig. 2) 혈관 내피세포인 YPEN-1을 Cell Culture 하여 Seeding 한 후 하루 밤을 5% CO₂ Incubator에 배양 하였다. 다음 날 Serum Free Media 로 바꾼 후 콩 발효식품에 다량 존재하는 지방산 nonanoic acid 와 undecanoic acid 를 100μM 투여하였다. 또한 제 1 세부과제에서 분획한 콩 발효식품 분획물 4종, MORD, MORC, JMC, soybean을 50μg/mL로 처리하였다. 한 시간 후 전사인자 유도를 위하여 tBHP를 200μM 처리하였다. 5% CO₂ Incubator에 한 시간 배양한 후 Cell Harvest 하여 Western blot 하였다.

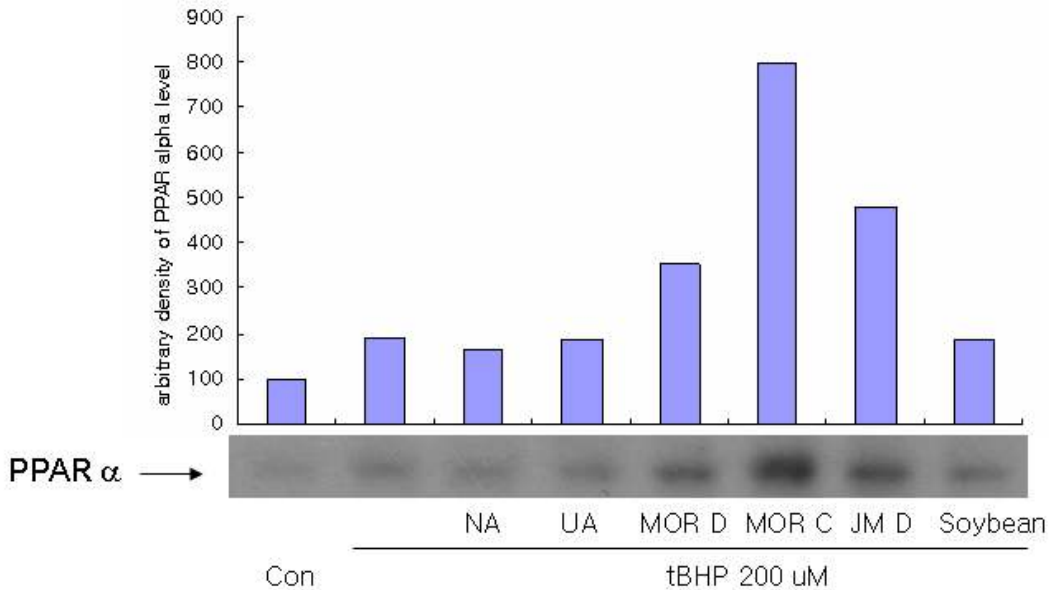


Fig. 2. 콩발효 식품 추출물과 그 유래 성분을 투여한 혈관내피세포에서의 PPAR α 발현

Con : Control

NA : Nonanoic Acid 100uM

UA : Undecanoic Acid 100uM

MOR D : MOR 된장 Methanol 분획물 50ug/mL

MOR C : MOR 청국장 Methanol 분획물 50ug/mL

JM D : JM 재래된장 Methanol 분획물 50ug/mL

Soybean : 대두 Methanol 분획물 50ug/mL

PPAR α 는 지방대사와 염증반응을 저해하는 전사인자로 PPAR α 가 활성화 되면 항비만과 항염증에 유리하다. YPEN-1 Cell을 사용하여 PPAR α 의 발현 알아보기 위해 Western Blot을 실행한 결과 MORD, MORC, JMD, 처리군에서 뚜렷한 증가를 볼 수 있었다. 특히 MORC 처리군은 대조군에 비하여 8배 이상 증가가 관찰되었다.

NF- κ B는 Inhibitory κ B (I κ B)라 불리는 저해성 분자에 의해 불활성화된 상태로 세포질에 존재하며, I κ B의 인산화와 일련의 분해과정을 통해 NF- κ B의 핵으로 이동되어 활성화 된다.(Fig. 3) NF- κ B의 활성화를 지방대사에 중요한 역할을 하는 PPARs가 억제하므로, 염증반응과 지방대사와는 밀접한 관계가 있다는 것이 잘 알려져 있다. 그래서 NF- κ B 활성화에 관련 된 핵 속의 p65와 p50을 Western blot으로 검토하였다. (Fig. 4)

활성산소를 유발하고자 처리된 tBHP 투여로 대조군에 비하여 NF- κ B가 현저히 활성화됨을 확인할 수 있었다. 이 NF- κ B 활성화를 콩발효식품 및 그 유래성분이 억

제하는 경향을 나타내었으나, 특히 UA, MORD, JMD 추출물이 현저히 억제함을 관찰할 수 있었다.

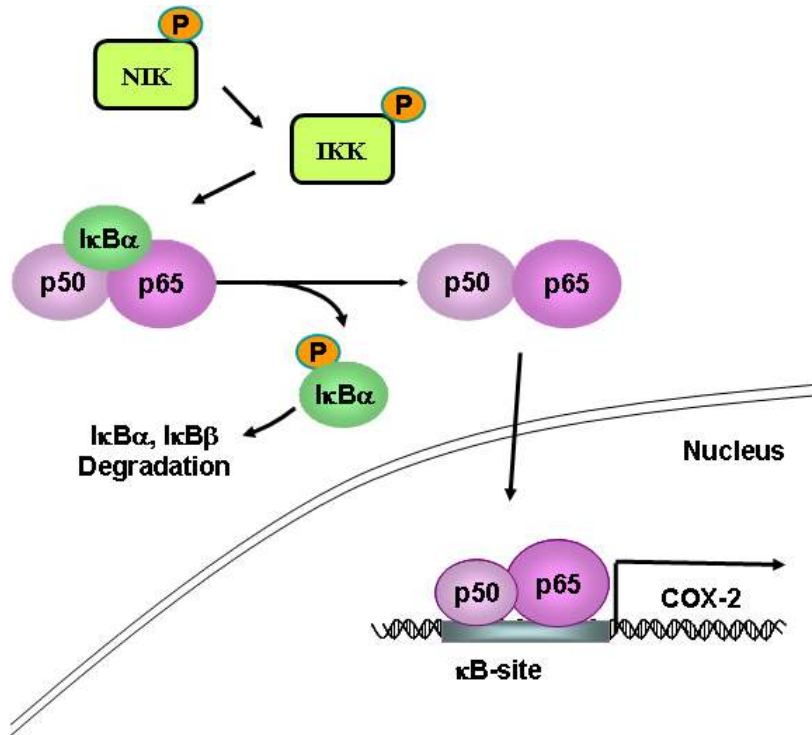


Fig. 3. 세포내에서 NF-κB 활성화의 모식도

또한 NF-κB에 의해 유도되는 COX-2의 발현이 콩 발효식품 유래 물질(UA, NA) 콩 발효식품 추출물(MORD, MORC, JMD)이 효과적으로 저해하는것을 관찰할 수 있었다. (Fig. 5)

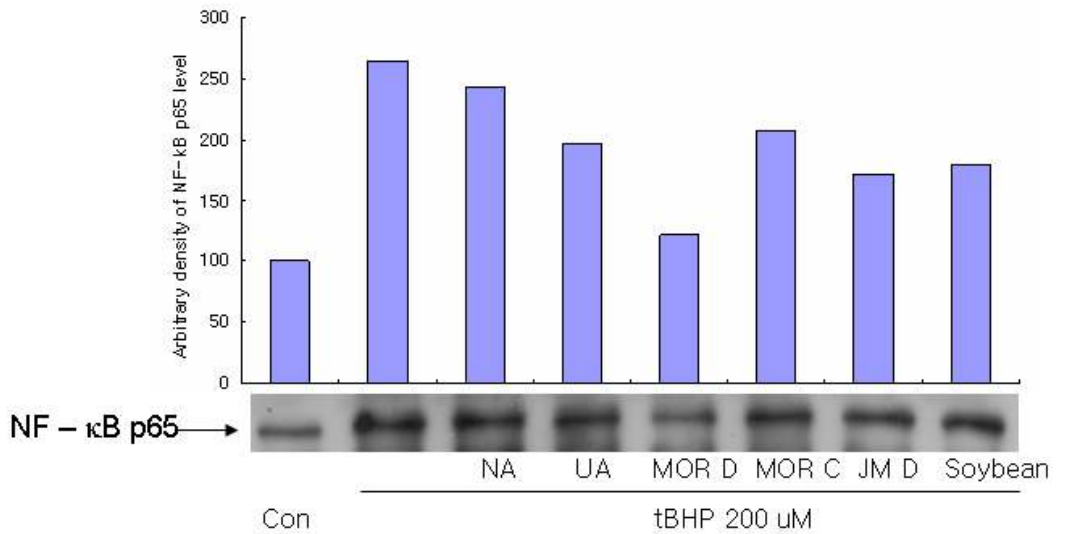


Fig. 4. 콩 발효 식품 추출물과 그 유래 성분을 투여한 혈관내피세포에서의 COX-2 발현

이러한 연구결과로 콩 발효 식품 추출물과 그 유래 성분들이 활성산소 생성을 억제할 뿐만 아니라, 그에 의해 활성화되는 전사인자 NF-κB의 활성화를 억제하며 PPARα를 활성화 시켜 염증관련 COX-2 유전자발현을 감소시킨다는 것을 시사한다.

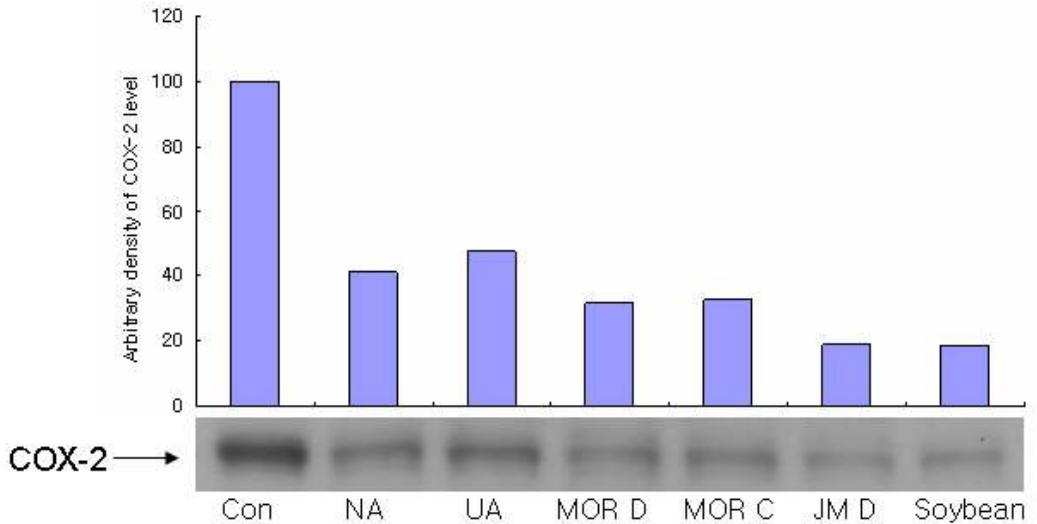


Fig. 5. 콩 발효 식품 추출물과 그 유래 성분을 투여한 혈관내피세포에서의 COX-2 발현

(다) 비만관련 유전자 발현 검토

지방세포에서 분비되는 여러가지 cytokine, hormone, lipid들이 다양한 신호전달물질로 작용하고, 이러한 물질들의 비정상적인 분비가 비만과 같은 여러 성인성 질병들의 원인으로 작용할 수 있다고 밝혀져 있다. 따라서 콩 발효 식품 추출물과 지방세포에서 생성되어 체내 에너지대사를 조절하는 "Adipocytokine"인 adiponectin과 resistin, cytokine 중 하나 인 TNF- α 의 발현조절에 영향을 미치는지를 연구하기 위하여 지방 세포 배양계에서 RT-PCR을 이용하여 유전자 발현을 확인하였다. (Fig. 6)

그 결과, 동물의 지방 분해에 관여하는 adiponectin은 대조군에 비해 그 발현량이 증가함을 확인 할 수 있었다. 그 중, MORD와 soybean 추출물 처리군에서 효과가 크다는 것을 알 수 있었다. 반면, 지방 합성에 관여하는 resistin은 큰 변화가 없음을 관찰할 수 있었으며, 또한 지방세포에서 분비하는 염증 cytokine 중 하나인 TNF- α 역시 큰 변화가 없음을 관찰하였다.

(라) 고지방식이 흰쥐에서 PPAR α 활성화검토

수컷 4주령 Fisher 344 Rat을 고지방식이를 시키며 동시에 Nonanoic acid 0.001% Undecanoic Acid 0.001%, MORD 추출물 0.6%, MORC 추출물0.6%, JMD 추출물

0.6%, 대두 추출물 0.6%를 첨가하여 6주간 식이하였다. 그 후 해부하여 신장을 적출한 후 Homogenate 하여 Western Blot을 통해 PPAR α 의 발현을 확인하였다. In vitro 실험과 동일한 결과로 MORD, MORC, NA 및 ND 식이한 군에서 PPAR α 가 활성화되어 있었다. (Fig. 7)

이상의 결과로부터 콩 발효 식품은 체내 지방대사에 관여하는 전사인자인 PPAR α 를 증가시킴으로서 지방세포에서 분비하는 adiponectin을 증가시켜 항비만에 기여할 것으로 추정된다. 게다가 PPAR α 가 증가함으로써 염증에 중요한 역할을 하는 전사인자인 NF- κ B를 억제하여 COX-2와 같은 염증성 인자를 저해하여 항염증에 기여하고, 이것 또한 비만억제와도 밀접한 관련성이 있을 것으로 사료된다.

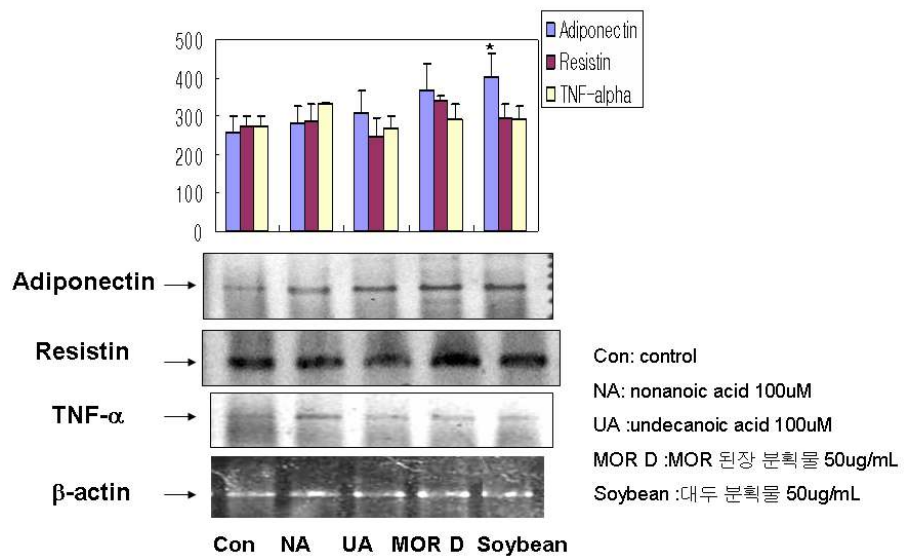
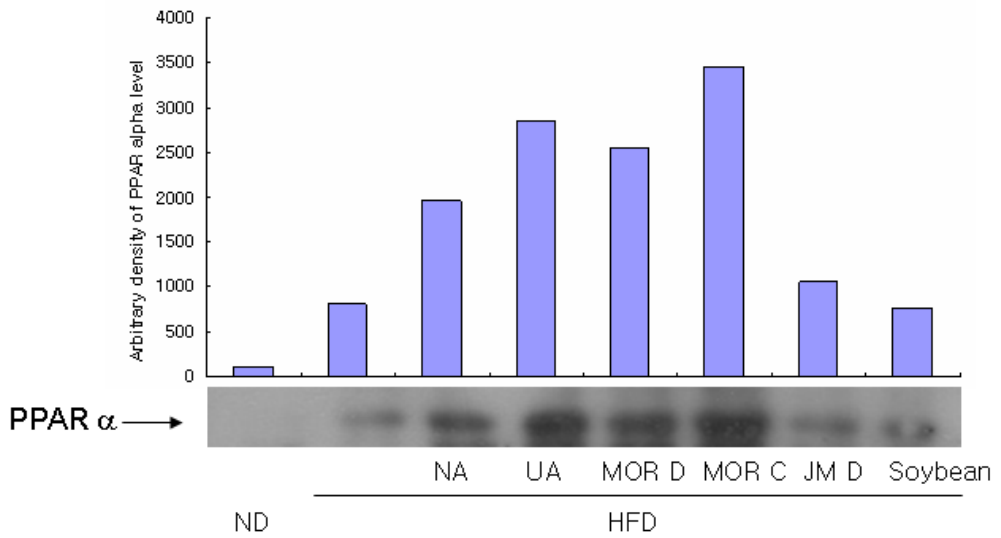


Fig. 6. 콩 발효 식품 추출물과 그 유래 성분의 비만관련 유전자 발현에 미치는 영향



ND : Normal Diet
 HFD : High Fat Diet (40% Fat)
 NA : Nonanoic Acid 100uM
 UA : Undecanoic Acid 100uM
 MOR D : MOR 된장 Methanol 분획물 50ug/mL
 MOR C : MOR 청국장 Methanol 분획물 50ug/mL
 JM D : JM 재래된장 Methanol 분획물 50ug/mL
 Soybean : 대두 Methanol 분획물 50ug/mL

Fig. 7. 고지방 식이와 함께 콩 발효식품 분획물과 콩 유래물질을 함께 6주간 식이 한 흰쥐의 PPAR α 활성화

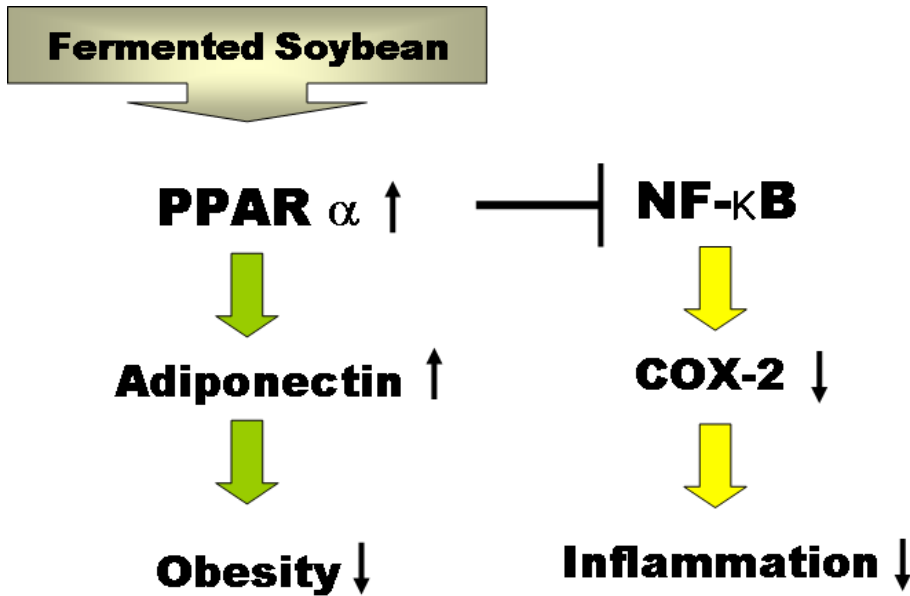


Fig. 8. 콩 발효식품과 그 유래 성분의 적용기전

나. 콩 발효 분획 및 성분의 비만 및 염증 억제 분자 기전 규명

1) 콩 발효식품 분획물 및 그 유래 물질의 혈중지질 및 ROS에 미치는 영향

(가) 시료의 투여 및 실험군

Sprague-Dawley Rat (SD rat) 4주령 수컷 쥐를 7그룹으로 나누어 6주간 식이 시켰다. 첫 번째 그룹은 AIN-93M 식이를 한 Normal Diet (ND)이며 두 번째 그룹은 High Fat Diet (AIN-93M with 12% Lard oil : HFD)를 식이하였다. 세 번째, 네 번째, 다섯 번째 그룹은 대두(Soybean), JM된장(JMD), MOR청국장(MORC)을 동결건조하여 HFD 식이에 5%(w/w)로 섞어 1g/kg/day로 식이시켰다. 여섯, 일곱째 그룹은 콩 발효 유래 지방산인 nonanoic acid (NA), undecanoic acid (UA)를 HFD 식이에 0.001%(w/w)로 섞어 6mg/kg/day로 식이 시켰다.

(나) 콩 발효분획 및 지방산 활성 성분이 고지방 식이(HFD)를 한 SD rat의 혈중 지질농도에 미치는 영향

6주간 콩 발효식품 및 콩 유래 활성물질을 식이 시킨 쥐를 해부하여 혈액을 채취한 후 Serum을 분리하여 혈중 지질 농도인 TG, Total Cholesterol을 Serum Assay

Kit를 사용하여 측정하였다. 일반식이 (ND)를 실시한 군보다 고지방식이(HFD)를 실시한 그룹에서 TG, Total Cholesterol이 증가하였다. 이는 고지방식이(HFD)의 섭취의 결과로 판단되며 고지방식이(HFD)에 콩 발효식품인 JMD를 5%(w/w)를 추가하여 1g/kg/day로 식이시킨 군에서 TG와 Total Cholesterol의 level이 가장 적게 나타나는 것으로 관찰되어 JMD가 고지방식이(HFD)로 인한 TG와 Total Cholesterol의 증가를 가장 잘 억제하는 콩 발효식품인 것을 알 수 있었다.

(다) 콩 발효분획 및 지방산 활성 성분이 고지방 식이를 한 SD rat의 Redox에 미치는 영향

활성산소는 체내에서 발생하여 혈관의 미세염증을 유발하는데, 활성 산소를 콩 발효식품 및 콩 유래물질이 체내에서 발생한 활성산소를 얼마만큼 저해하는지를 조사하였다. 6주간 고지방식이를 한 SD rat의 신장을 적출하여 Homogenate 한 후 DCF-DA (2, 7 - dichlorodihydrofluorescein diacetate)를 10 μ M 처리하여 활성산소 (Reactive Oxygen Species ; ROS)의 분당 발생량을 형광광도계를 이용하여 측정하였다.

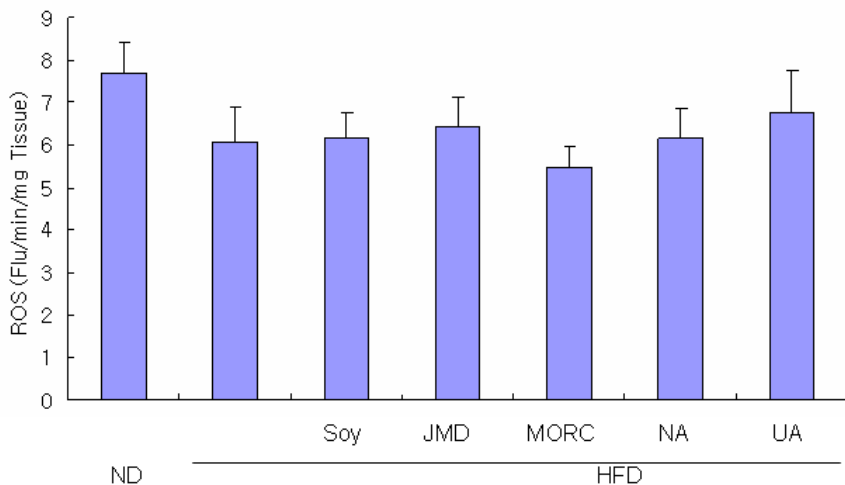


Fig. 9. ROS level in SD rat fed high fat Diet

ND : Normal Diet (AIN-93M) HFD : High Fat Diet (AIN-93M with 12% Lard oil) Soy : HFD with 5% Soybean JMD : HFD with 5% JM Deonjang MORC : HFD with 5% MOR Cheonggukjang NA : HFD with 0.001% Nonanoic Acid UA : HFD with 0.001% Undecanoic Acid

콩 발효물질인 HFD에 MORC를 5%(w/w) 첨가하여 1g/kg/day로 식이 시킨 군에서 활성산소의 분당 발생량이 가장 적게 발생하는 것이 관찰되었다.

2) 콩 발효식품 분획물 및 그 유래 물질이 유전자 전사 인자에 미치는 영향

(가) 콩 발효분획 및 지방산 활성 성분이 고지방 식이를 한 SD rat의 지질대사 관련 전사인자 PPAR에 대한 영향

6주간 고지방식이(HFD)를 실시한 SD rat을 해부하여 신장을 적출한 후 Homogenate 하였다. 이를 Western blot을 통해 지질대사를 관여하는 PPAR를 확인하였다.



Fig. 10. Regulation of PPARs by Soybean products in SD rats fed high fat diet

ND : Normal Diet (AIN-93M) HFD : High Fat Diet (AIN-93M with 12% Lard oil) Soy : HFD with 5% Soybean JMD : HFD with 5% JM Deonjang MORC : HFD with 5% MOR Cheonggukjang NA : HFD with 0.001% Nonanoic Acid UA : HFD with 0.001% Undecanoic Acid

PPAR는 지방대사와 염증반응을 저해하는 전사인자로서 PPAR가 활성화 되면 항비만과 항염증에 유리하다. 고지방식이(HFD)와 콩 발효식품 및 콩 유래 활성성분의 식이를 실시한 SD rat에서 PPAR의 발현은 PPAR alpha는 Undecanoic Acid(UA) 군에서 가장 발현이 많이 되었고, PPAR gamma의 발현은 JMD에서 가장 높았다. (Fig. 10)

(나) 콩 발효분획 및 지방산 활성 성분이 고지방 식이를 한 SD rat의 염증관련 전사인자 NF-κB에 대한 영향

NF-κB는 Inhibitory κB (IκB)라 불리는 저해성 분자에 의해 불활성화 된 상태로 세포질에 존재하며, IκB의 인산화와 일련의 분해과정을 통해 NF-κB의 핵으로 이동

되어 활성화 된다. NF- κ B의 활성화를 지방대사에 중요한 역할을 하는 PPARs가 억제하므로, 염증반응과 지방대사와는 밀접한 관계가 있다는 것이 잘 알려져 있다. 그래서 NF- κ B 활성화에 관련된 핵 속의 p65와 p50을 Western blot으로 검토하였다.

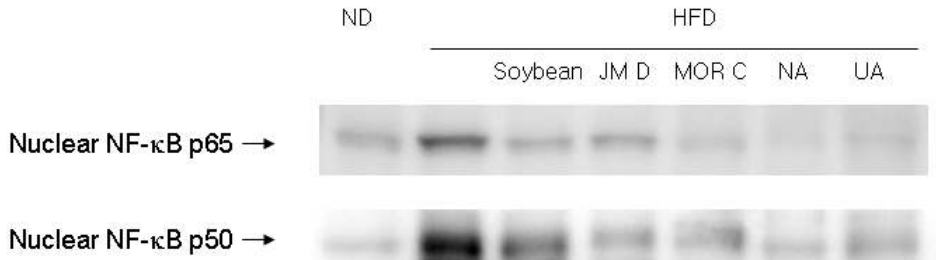


Fig. 11. Suppression of NF- κ B translocation by soybean products in SD rat fed high fat diet

ND : Normal Diet (AIN-93M) HFD : High Fat Diet (AIN-93M with 12% Lard oil) Soy : HFD with 5% Soybean JMD : HFD with 5% JM Deonjang MORC : HFD with 5% MOR Cheonggukjang NA : HFD with 0.001% Nonanoic Acid UA : HFD with 0.001% Undecanoic Acid

고지방식이(HFD)를 실시한 군에서 미세염증 발현 전사인자 NF- κ B가 현저히 활성화 됨을 확인 할 수 있었다. 이 NF- κ B 활성화를 콩 발효식품 및 콩 유래 활성성분이 억제하는 경향을 나타내었다. 특히 MORC 군과 NA군에서 가장 뚜렷하게 억제함을 관찰할 수 있었다. (Fig. 11)

3) 비만 및 염증 관련 유전자 발현 및 전사인자

(가) 콩 발효분획 및 지방산 활성 성분이 고지방 식이를 한 SD rat의 염증관련 유전자 발현에 미치는 영향

미세염증을 일으키는 NF- κ B에 의하여 유도되는 염증관련 유전자 COX-2와 iNOS와 부착분자 VCAM-1의 발현을 Western blot을 통하여 확인하였다

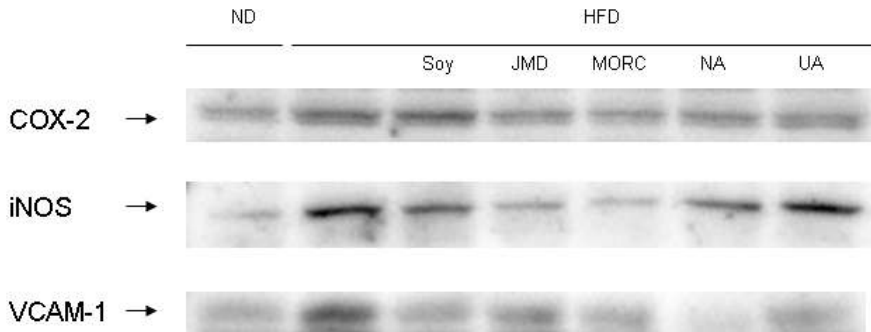


Fig. 12. Inhibition of NF- κ B dependent genes by soybean products in SD rats fed high fat diet

ND : Normal Diet (AIN-93M) HFD : High Fat Diet (AIN-93M with 12% Lard oil) Soy : HFD with 5% Soybean JMD : HFD with 5% JM Deonjang MORC : HFD with 5% MOR Cheonggukjang NA : HFD with 0.001% Nonanoic Acid UA : HFD with 0.001% Undecanoic Acid

대표적인 염증관련 유전자인 COX-2와 iNOS를 살펴본 결과 NF- κ B의 발현과 동일한 경향으로 고지방식이(HFD)를 실시한 군에서 가장 높은 경향을 나타내었다. 또한 체내의 염증반응이 발생시 혈관내의 monocyte가 염증반응 사이트로 이동하기 위해 혈관벽을 통과할 때 발현하는 부착분자인 VCAM-1 유전자 역시 고지방식이(HFD)를 실시한 군에서 가장 높게 발현되었다. 염증관련 유전자 COX-2, iNOS와 부착분자인 VCAM-1이 콩 발효식품 및 콩 유래 활성성분이 억제하는 경향을 나타냈었다. 염증관련 유전자 COX-2, iNOS는 MORC를 식이한 군에서 가장 많이 저해되었으며, 부착분자의 발현은 콩 유래 활성성분인 NA를 식이한 군에서 가장 많이 발현됨을 확인 할 수 있었다. (Fig. 12)

(나) 콩 발효분획 및 지방산 활성 성분이 고지방 식이를 한 SD rat의 비만관련 유전자 발현에 미치는 영향

지방세포에서 분비되는 여러가지 cytokine, hormone, lipid들이 다양한 신호전달물질로 작용하고, 이러한 물질들의 비정상적인 분비가 비만과 같은 여러 성인성 질병들의 원인으로 작용할 수 있다고 밝혀져 있다. 따라서 콩 발효 식품 추출물과 지방세포에서 생성되어 체내 에너지대사를 조절하는 Adipocytokine인 adiponectin의 발현 조절에 영향을 미치는지를 연구하기 위하여 RT-PCR을 이용하여 유전자 발현을 확인하였다.

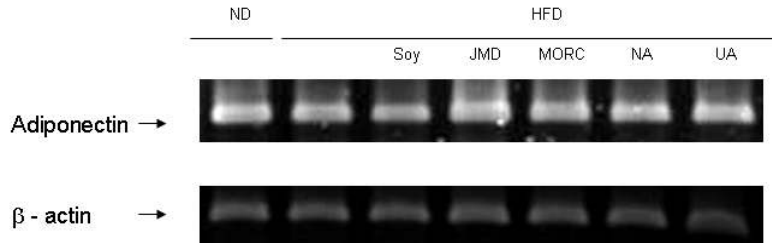


Fig. 13. Expression of adipokine by soybean products in SD rats fed high fat diet

ND : Normal Diet (AIN-93M) HFD : High Fat Diet (AIN-93M with 12% Lard oil) Soy : HFD with 5% Soybean JMD : HFD with 5% JM Deonjang MORC : HFD with 5% MOR Cheonggukjang NA : HFD with 0.001% Nonanoic Acid UA : HFD with 0.001% Undecanoic Acid

동물의 지방 분해에 관여하는 adiponectin은 콩 발효식품을 식이한 JMD군과 MORC 군에서 발현량이 증가함을 확인 할 수 있었다. (Fig. 13)

4) 콩 발효식품의 활성 성분 Isoflavone의 생리활성 및 작용기전

이소플라본은 콩이 함유하고 있는 활성 성분 으로 대표적인 것으로 genistein이 있다. 이소플라본은 에스트로겐성 스테로이드와 유사한 구조를 갖고 있는 헤테로고리 화합물(heterocyclic phenol)로 phyto estrogen으로 불리며 각종 연구에 이용되고 있다. 이러한 천연 생리 활성물질인 genistein이 지방대사 및 염증관련 전사인자에 미치는 영향을 검토하였다.

(가) 대두의 활성 성분 이소플라본이 염증관련 peroxynitrite의 제거능에 미치는 영향
 이소플라본의 peroxynitrite의 제거효과를 살펴보았다. superoxide($\cdot O_2^-$)와 NO가 결합하여 생성되는 것으로 강력한 reactive nitrogen species(RNS)의 일종으로 체내에서 염증반응을 유발한다. Peroxynitrite의 저해효과는 isoflavone 중 Daidzein, Daidzin, Genistein, Genisin을 10, 30, 90uM의 세가지 농도와 dihydrorhodamine 123 (DHR 123)를 이용하여 측정하였다. Peroxynitrite의 저해가 농도별로 감소한 효과적인 저해작용을 보여준 isoflavone은 genistein으로 관찰되었다. 이를 바탕으로 isoflavone의 지방대사 유전자와 염증성 유전자의 발현에 관한 동물실험을 진행하였다.

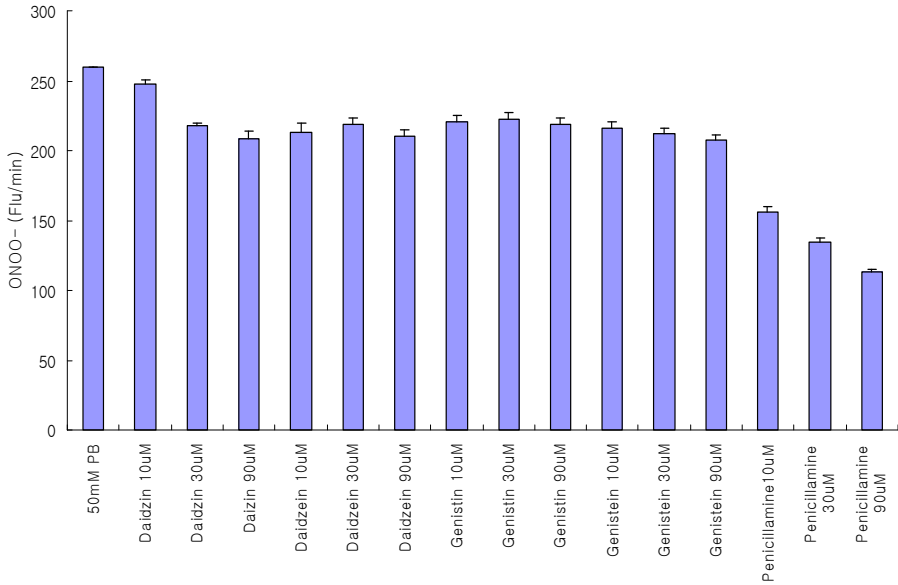


Fig. 14. Effect of isoflavone on peroxynitrite inhibition

(나) Genistein을 식이한 F344 rat에서 지방대사에 관여하는 유전자 발현

노화과정에서 지방조직 및 내부장기에 지방이 축적되는 현상이 관찰되었다. 이 모델을 이용하여 지방대사 및 염증관련 전사인자 및 정보전달 단백질을 검토하였다. PPAR는 핵에 존재하는 호르몬 수용체의 한 종류로서 지질, 포도당대사 및 에너지 항상성과 관련된 유전자를 조절하는 transcription factor로 알려져 있다. PPAR에는 α , β/δ , γ 의 세 종류가 있으며, 이들은 서로 다른 유전자에 의해 발현되고, 다른 조직에서 생성되어 각각 독특한 생물학적 기능을 가진다. PPAR α 는 지질 및 지단백질 대사에 관여하는 유전자를 조절하는 반면, PPAR γ 는 세포분화, 지방조직생성, 인슐린 작용에서 중요한 역할을 한다. 이러한 PPAR는 대사질환과의 밀접한 관련성을 나타낸다.

Genistein이 PPAR에 미치는 영향을 알아보기 위하여 genistein을 3mg/kg/day, 6mg/kg/day, 9mg/kg/day로 10일간 식이 시킨 후 해부하여 kidney 조직에서 지방대사 관련 유전자와 염증성 전사인자의 활성을 살펴보았다. 실험에 사용한 쥐은 6개월령(Young, Y) 과 24개월령 (Old, O)의 Fisher 344 rat의 Male이다.

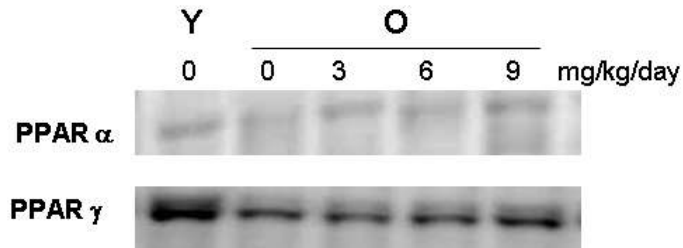


Fig. 15. Regulation of PPARs by genistein in aged rat

이러한 PPAR에 genistein이 어떠한 영향을 미치는지 확인해 본 결과 PPAR α 는 old 군에서 감소하고 genistein처리군 에서는 증가하는 것을 관찰하였으며 PPAR γ 역시 old군에서 감소하고 genistein처리군 에서는 증가하여 동일한 양상을 보였다. 특히 PPAR γ 는 genistein의 농도가 증가함에 따라 그 발현량이 증가 함을 확인할 수 있었다.

(다) Genistein을 식이한 F344 rat에서 염증성 유전자의 발현

Genistein이 핵에서 발현 되어 COX-2, iNOS와 같은 염증성 유전자들의 발현을 유도하는 염증반응의 중요한 지표인 NF- κ B를 억제하는지 확인해 보았다. NF- κ B의 subunit인 P65와 p50, phospho p65의 protein level을 western blot으로 확인해 보았다.

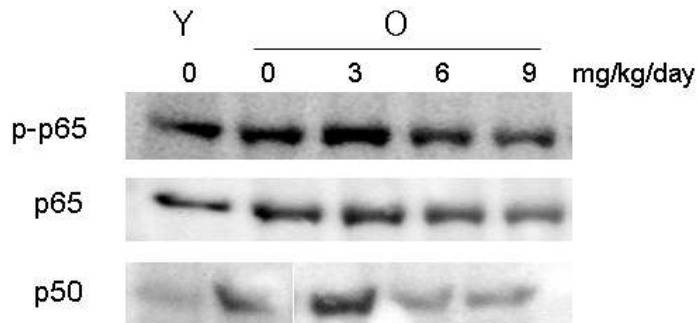


Fig. 16. Suppression of NF- κ B translocation by genistein in aged rat

Old군에서 증가하는 P65와 p50, phospho p65은 genistein을 농도별로 처리한 군에서 감소효과를 보였다. 농도가 증가 할수록 저해 효과도 증가하는 것을 알 수 있다.

Genistein이 이러한 NF- κ B를 어떠한 신호전달 경로를 통하여 억제하는지 확인해 보았다. NF- κ B의 주된 신호전달 경로인 MAPK를 확인해 본 결과 genestein은 p38과 ERK의 phosphorylation을 저해하였으며 JAK2의 phosphorylation에도 영향을 미치는 것을 확인 할 수 있었다

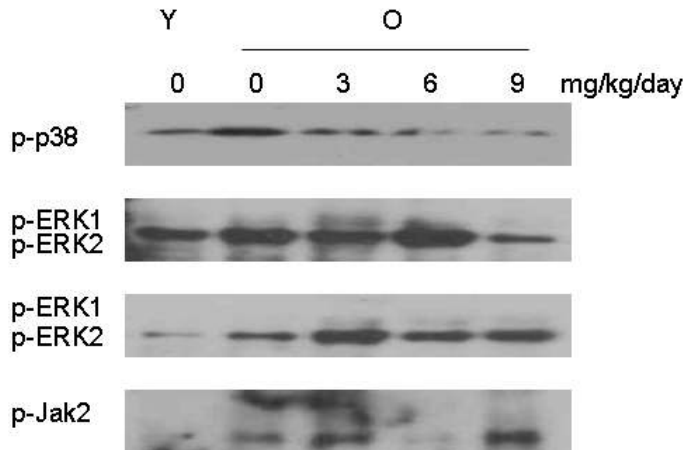


Fig. 17. Suppression of MAPK pathway by genistein in aged rat

(라) 콩 발효식품 활성성분 genistein의 함량 비교

콩 과 콩발효식품 (JM 된장, JM 청국장, MOR 청국장)에서 이소플라본의 함량을 HPLC를 이용하여 측정하였다. 이소플라본의 함량은 1,189.95~1,374.44 μ g/g, dry basis 범위였다. 대두가 genistin과 daidzin이 많은 양을 차지하는데 비하여 MORC, JMD, MORD에서는 감소하는 경향을 확인하였다. (Table .1)

Table 1. Content and composition of isoflavone of soybean product ($\mu\text{g/g}$, dry basis)

Isoflavones	soybean	J.M.D	MORD	MORC	Mean
Malonyl genistin	626.24	—	—	—	156.56
Malonyl daidzin	448.64	39.76	370.35	735.96	398.68
Malonyl glycitin	55.35	119.02	132.54	43.00	87.48
Genistin	77.39	30.29	40.46	38.37	46.63
Daidzin	64.91	224.07	61.50	120.17	117.66
Glycitin	21.64	231.41	5.13	1.82	65.00
Genistein	8.51	211.67	335.03	92.40	161.90
Daidzein	13.53	151.41	266.52	95.61	131.77
Glycitein	1.54	30.43	41.66	16.38	22.50
Acetyl genistin	0.32	60.68	82.01	20.11	40.78
Acetyl daidzin	6.20	76.96	23.13	23.34	32.41
Acetyl glycitin	—	36.30	16.11	2.79	13.80
Total isoflavones	1,324.27	1,212.00	1,374.44	1,189.95	1,275.17

(마) 콩 발효식품의 활성 성분 Ferulate의 insulin sensitizer로의 작용기전

Ferulate는 최근 콩의 구성성분으로 알려져 있으며 flavonoid가 대사되면 ferulate가 생성된다는 보고가 있다. Ferulate를 식이 시키거나 주사할 경우 당뇨병 유발 모델에서 혈중의 인슐린과 글루코즈를 저하시킨다는 보고가 된 바 있다. 또한 노화과정에서 비만현상이 나타나고 인슐린 저항성이 나타난다는 것이 관찰 되는데, 노화과정에서 높아진 혈중의 인슐린 농도와 글루코즈 농도를 낮추는 효과가 있음이 밝혀졌다. 이를 위하여 9개월령의 쥐(Young)와 21개월령의 쥐(Old), 그리고 ferulate를 농도별로 10일 동안 식이 시킨 21개월령 쥐의 serum에서 측정된 것이다.

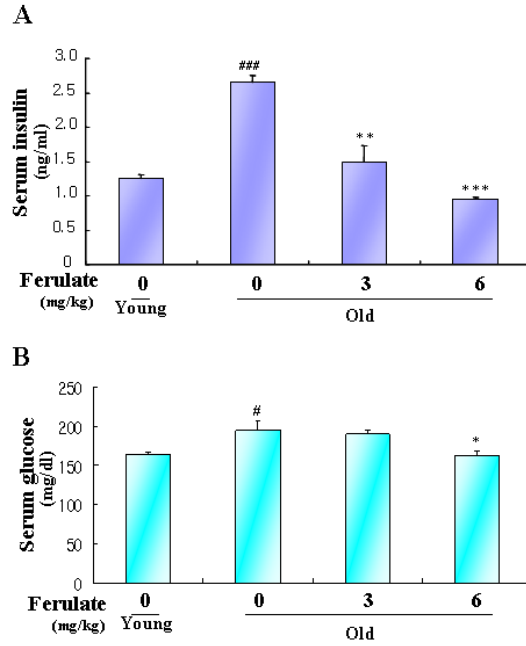
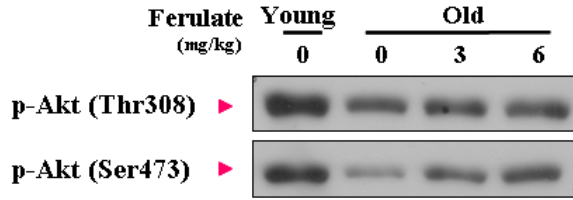


Fig. 18. Effect of ferulate on Insulin level in aged rat

혈중의 인슐린과 글루코즈가 ferulate를 식이시킴에 따라 낮아진 것으로 보아 이는 ferulate에 의해 노화 과정에서 발생하는 insulin 저항성이 개선되었다고 생각되어지므로 ferulate에 의해 인슐린 신호 전달 과정이 어떻게 변하는지 알아보았다. 인슐린 신호 전달 과정에서 중심적인 역할을 하는 Akt는 인산화 될 경우 활성을 띤다. 노화 과정에서 감소하는 근육의 Akt의 활성이 ferulate를 식이 시킬 경우 농도에 따라 증가함을 알 수 있었다. (Fig. 19)

A



B

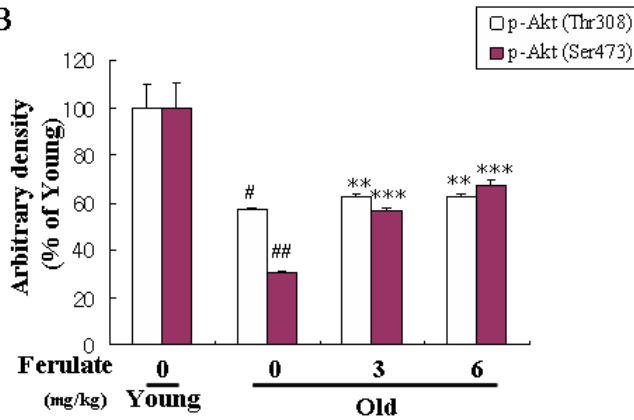


Fig. 19. Modulation of Akt activities in aged rat by ferulate

Insulin 저항성의 발생 기전으로 많은 연구자들은 혈중의 free fatty acid가 증가하는 것을 그 원인으로 생각하고 있으며, 당뇨병의 치료제로 쓰이는 thiazolidinedione계의 약물은 혈중의 free fatty acid의 농도를 낮추며 이는 Peroxisome proliferators-activated receptor gamma(PPAR γ)를 활성화 시킴에 따른 효과임이 밝혀져 있다. 그림 20은 혈중 free fatty acid를 측정된 결과로 노화 과정에서 증가하는 혈중의 free fatty acid가 ferulate를 식이시킬 경우 감소하는 것을 알 수 있었다. 또한 그림 21에서 보이는 바와 같이 세포에 ferulate를 처리하고 luciferase assay를 할 경우 thiazolidinedione과 같이 PPAR를 활성화 시키는 효과를 보임으로서 PPAR γ 의 agonist로의 가능성을 시사하고 있다.

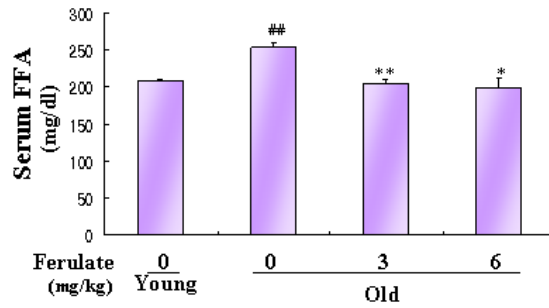


Fig. 20. Reduction of increased free fatty acid levels in serum with age by ferulate

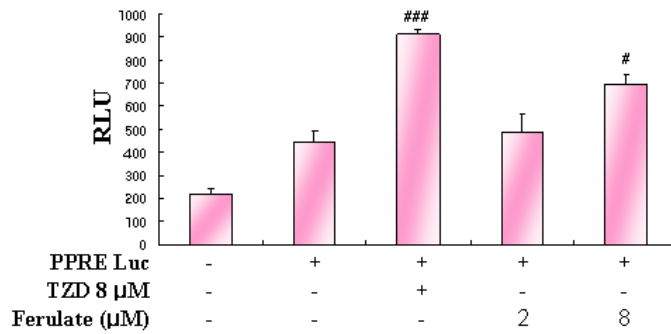


Fig. 21. Effect of ferulate on activation of PPAR γ

(바) 콩 발효식품 및 콩 활성 성분의 염증억제와 비만 제어에 대한 작용기전

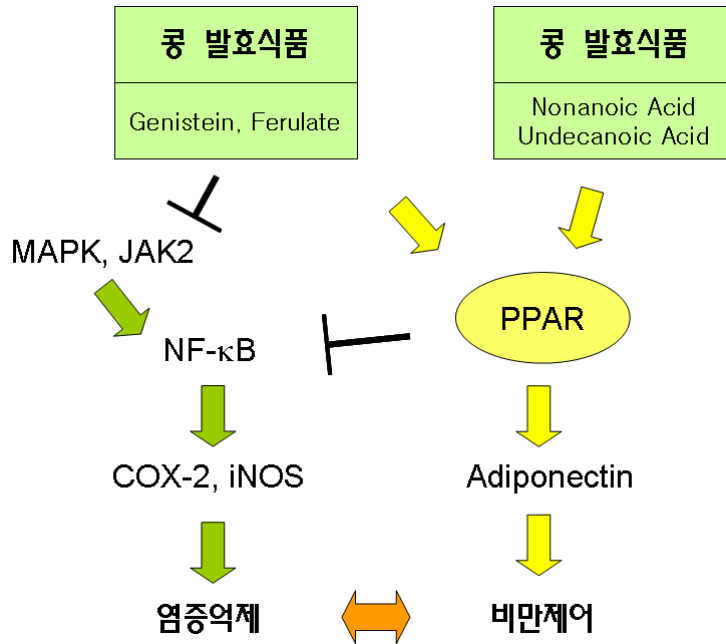


Fig. 22. Mechanism of Soybean products and compounds

이상의 결과로부터 콩 발효 식품 및 콩 유래 활성 물질은 체내 지방대사에 관여하는 전사인자인 PPAR α 을 증가시키고 adiponectin을 증가시켜 항비만에 기여할 것으로 추정된다. 또한 콩 발효식품 및 콩 유래 활성물질은 MAPK와 JAK2 signaling에 의해 NF- κ B를 저해하여 COX-2, iNOS와 같은 염증성 인자를 저해하여 항염증에 기여하고, 이것 또한 비만억제와도 밀접한 관련성이 있을 것으로 사료된다.

다. 콩 발효 식품의 항비만 효능 및 활성 증강 성분의 작용 기전 검토

1) 콩 발효성분의 항비만효과 및 ROS에 미치는 영향

(가) 시료의 투여 및 실험군

C57BL6 Mice 4주령 수컷 쥐를 5그룹으로 나누어 10주간 식이 시켰다. 첫 번째 그룹은 AIN-93M 식이를 한 Normal Diet (ND)이며 두 번째 그룹은 High Fat Diet (AIN-93M with 23% Lard oil : HFD)를 식이하였다. 세 번째, 네 번째 그룹은 노란 콩된장(Soybean Deanjang: SD), 검정콩된장(Black soybean Deanjang: BSD)을 동결 건조하여 고지방식이(HFD) 식이에 5%(w/w)로 섞어 1g/kg/day로 식이시켰다. 다섯 번째 그룹은 고지방식이(HFD) 식이한 쥐를 10주간 운동을 시켰다.

(나) 고지방 식이(HFD)를 한 Mice의 몸무게변화에 콩 발효성분과 운동의 효과

본 실험은 C57BL/6 Mice를 10주동안 비만유도를 하였으며, 비만유도와 함께 노란 된장(SD), 검정콩된장(BSD) 각 5%를 10주간 식이하고, 나머지 그룹은 10주동안 운동을 시켰다. 10주간 고지방식이를 한 실험군에서는 일반식이를 한 실험군에 비하여 높은 몸무게를 나타내었다. 반면에, 10주동안 노란콩된장(SD), 검정콩된장(BSD), 운동을 한 Mice는 고지방 식이(HFD) 만한 Mice에 비해 몸무게가 감소됨을 알 수 있다(Fig. 23).

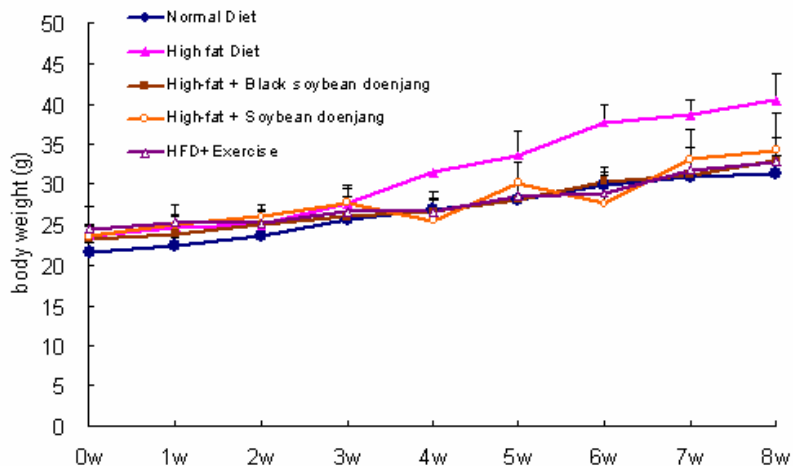


Fig. 23. 고지방과 콩 발효성분의 식이 및 운동에 의한 C57BL/6 mice의 몸무게변화

(다) 콩 발효성분 및 운동이 고지방 식이(HFD)를 한 Mice의 혈중 지질농도에 미치는 영향

10주간 콩 발효성분을 식이하고 운동을 시킨 쥐를 해부하여 혈액을 채취한 후

serum을 분리하여 혈중 지질 농도인 nonesterified fatty acids (NEFA)을 Serum Assay Kit를 사용하여 측정하였다. 일반식이(ND)를 실시한 군보다 고지방식이(HFD)를 실시한 그룹에서 NEFA이 증가하였다. 이는 고지방식이(HFD)의 섭취의 결과로 판단되며 고지방식이(HFD)에 콩 발효성분인 검정콩된장(BSD)을 5%(w/w)를 추가하여 1g/kg/day로 식이시킨 군은 노란콩된장(SD)을 식이하거나 운동을 시킨 쥐보다 NEFA의 level이 가장 적게 나타나는 것으로 관찰되는 것이 보였다. 이는검은콩된장(BSD)이 NEFA의 증가를 가장 잘 억제하는 콩 발효식품인 것을 알 수 있다 (Fig 24).

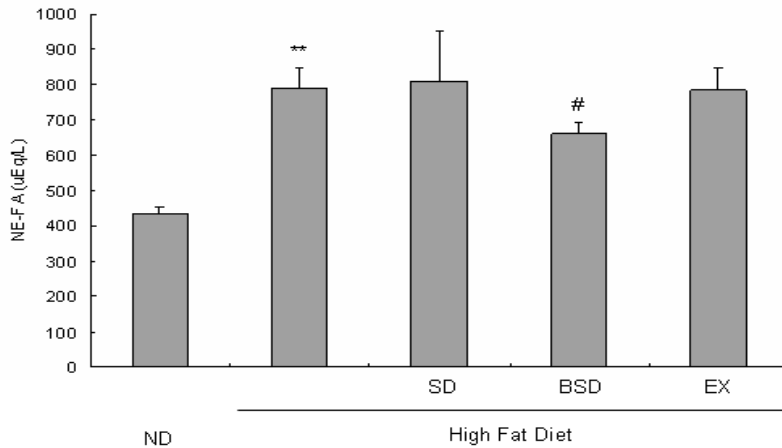


Fig. 24. 콩 발효성분의 식이 및 운동에 의한 serum내 NEFA level의 조절

(라) 콩 발효 성분 및 운동이 고지방 식이를 한 Mice의 Redox에 미치는 영향

활성산소(Reactive Oxygen Species ; ROS)는 체내에서 발생하여 혈관의 미세염증을 유발하는데, 고지방식이(HFD)로 인해 증가한 활성 산소를 콩 발효식품과 운동이 체내에서 생성된 활성산소를 얼마만큼 저해하는지를 조사하였다. 10주간 고지방 식이를 한 Mice의 신장을 적출하여 Homogenate 한 후 DCF-DA (2, 7 - dichlorodihydrofluorescein diacetate)를 10μM 처리하여 활성산소의 분당 발생량을 형광광도계를 이용하여 측정하였다. 그 결과, 고지방식이(HFD)는 신장의 활성산소의 증가를 보였으나, 콩 발효성분과 운동은 유의성있게 활성산소를 감소시키는 경향을 나타내었다(그림 25A). 하지만, $\cdot O_2^-$ 와 NO의 반응에 의해서 생성되어지며 지질 과산화물을 유도하는 peroxynitrite($ONOO^-$) 생성은 검정콩된장(BSD)에 의해서 유의성있게 감소되어지는 것을 확인하였다(그림 25B). 그림 25C는 신장내 증가한 지질 과산화물중의 하나인 malondialdehyde(MDA)를 콩 발효성분 식이와 운동에 의해서 조절되어 질 수 있는지를 확인하였다. 그 결과, 고지방식이(HFD)로 인해 증가한

MDA는 콩 발효성분인 노란콩된장(SD)과 검정콩된장(BSD)에 유의성 있게 감소함을 확인하였고 이는 운동에 의한 효과보다 큰 것을 알 수 있다.

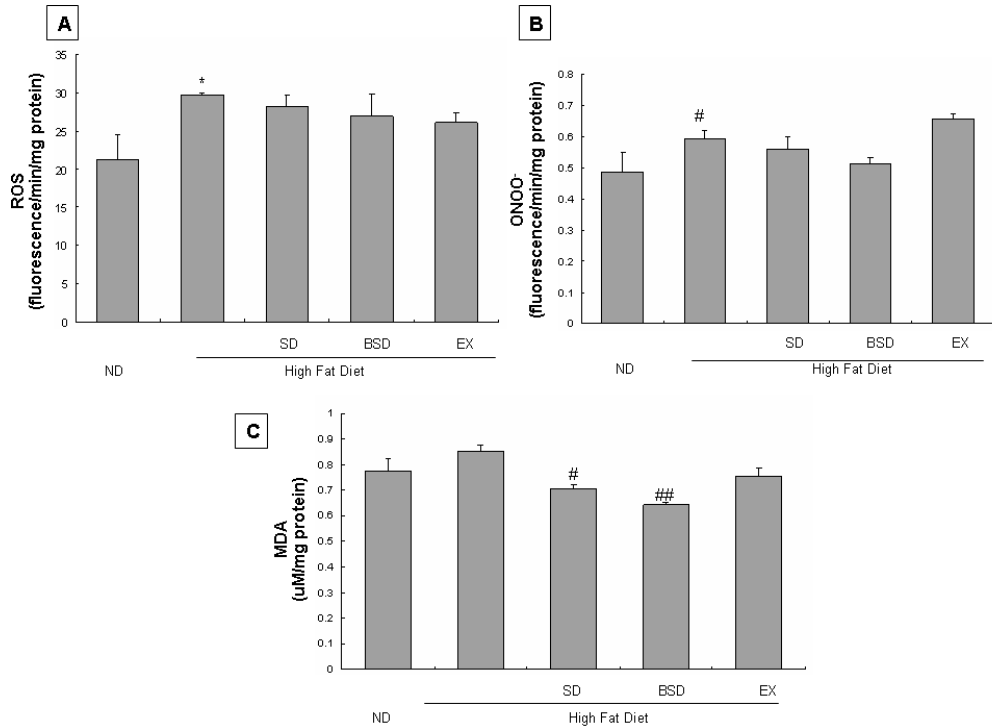


Fig. 25. 콩 발효성분의 식이 및 운동에 의한 ROS, ONOO⁻, MDA 조절

2) 콩 발효 성분 및 운동이 유전자 전사 인자에 미치는 영향

(가) 콩 발효분획 및 운동의 고지방 식이를 한 Mice의 지방대사에 관련 전사인자인 SREBP-1에 대한 영향

10주간 고지방식이(HFD)와 콩 발효분획을 먹고 운동을 실시한 Mice를 해부하여 신장을 적출한 후 Homogenate 하였다. 이를 western blot을 통해 지방대사에 중요한 역할을 하는 전사인자인 SREBP-1을 확인하였다. SREBP-1은 sterol regulatory element binding protein의 약자로서 콜레스테롤과 지질 대사를 조절하는 전사인자 단백질 패밀리아다. 핵에 존재하는 이 단백질들의 조절은 지방 합성에 중요한 역할을 한다. 지방식이(HFD)와 콩 발효성분 식이 및 운동을 실시한 Mice에서 SREBP-1의 발현을 확인한 결과, Normal Diet (ND)한 그룹에 비해 고지방식이(HFD)를 한 그룹에서 SREBP-1의 활성화가 뚜렷하게 증가하였고, 콩 발효분획을 식이한 그룹과 운동을 시킨 그룹에서의 SREBP-1의 활성화는 고지방식이(HFD)를 한

그룹에 비해 감소됨을 확인할 수 있었다. 특히 SREBP-1 활성화조절에 의해 검정콩된장(BSD)과 운동의 효과가 나타날것으로 사료된다 (Fig. 26).



Fig. 26. 콩 발효성분의 식이 및 운동에 의한 SREBP-1의 조절

(나) 콩 발효분획 및 운동의 고지방 식이를 한 Mice의 염증관련 전사인자 NF-κB에 대한 영향

10주간 고지방식이(HFD)와 콩 발효분획 을 먹이고 운동을 실시한 Mice을 해부 하여 신장을 적출한 후 Homogenate 하였다. 이를 western blot을 통해 염증에 관여 하는 전사인자인 NF-κB를 확인하였다. 이전 보고에 따르면 염증반응과 지방대사는 밀접한 관계가 있다고 잘 알려져 있으며 특히, NF-κB는 지방대사에 의해 유도되어지는 염증반응에 관여하는 중요한 전사인자 중의 하나라고 알려져있다. 그림 27는 NF-κB의 단백질 변화량을 나타낸 결과로, Normal Diet (ND)한 그룹에 비해 고지방식이(HFD)를 한 그룹에서 NF-κB가 활성화되었고, 콩 발효분획을 식이한 그룹과 운동을 시킨 그룹에서의 NF-κB의 활성화는 고지방식이(HFD)를 한 그룹에 비해 감소됨을 확인할 수 있었다 (Fig. 27).

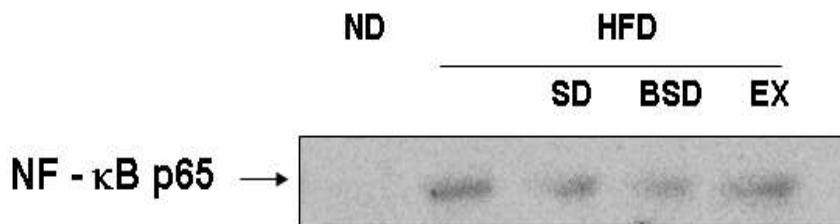


Fig. 27. 콩 발효성분의 식이 및 운동에 의한 NF-κB의 조절

3) 콩 발효 성분의 활성화 증강 성분의 비만 억제 기전 검토

(가) 생강추출물 및 성분의 ROS 제거 및 NF-κB 활성화 탐색

콩발효식품의 맛증진 연구부분에서 언급한 바와같이 생강을 첨가시에 맛이 증진되었으므로, 본연구에서는 생강성분이 비만관련된 전사인자 PPARs와 염증관련된 전사인자 NF-κB signaling에 대해 검토하였다.

① 생강 및 건강 추출물과 분획의 ROS 소거 활성

생강(*Zingiber officinale* Roscoe)은 동남아 지역에서 자생하는 생강과에 속하는 다년생의 초본식물로서 그 뿌리줄기를 식용이나 약용으로 활용하고 있다. Zingerone은 생강성분들의 기본골격성분으로 콩 발효 성분의 활성 증강 물질로서 검토하였다.

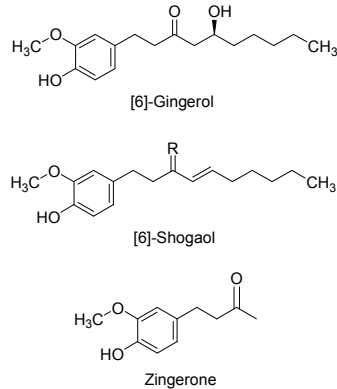


Fig. 28. 진제롤, 쇼가올 및 진제론의 화학 구조

생강 및 건강의 ROS 소거 활성을 검토한 결과, ROS 소거능이 뛰어난 양성 대조 물질인 trolox 80 μ g/ml에서 약 40%의 소거능을 보인 반면, 생강과 건강 MeOH 추출물 100 μ g/ml에서 각각 80%와 90%의 ROS 소거능을 보였다. 또한 생강분획 추출물의 ROS 소거 활성을 조사한 결과, 40 μ g/ml의 농도에서 H₂O분획의 ROS 억제능은 약 52%, BuOH 분획에서의 억제능이 약 68%인 반면 trolox는 약 68%의 억제능을 보였다. 그러나, EtOAc 분획과 CH₂Cl₂ 분획물에서 약 87%와 89%의 강한 ROS 소거능을 나타내었다.

Fraction	Dose	ROS scavenging activity
	($\mu\text{g/ml}$)	(inhibition %)
CH_2Cl_2	2.5	74.20 \pm 0.31
	10	84.80 \pm 0.18
	40	88.64 \pm 0.19
EtOAc	2.5	74.45 \pm 0.38
	10	84.78 \pm 0.22
	40	87.24 \pm 0.19
BuOH	2.5	10.52 \pm 0.66
	10	35.47 \pm 2.82
	40	67.93 \pm 1.05
H_2O	2.5	0.10 \pm 0.97
	10	13.77 \pm 2.76
	40	51.65 \pm 0.55
Trolox	2.5	52.40 \pm 1.03
	10	64.72 \pm 0.38
	40	67.59 \pm 0.54

Table 2. Effect of ginger fractions on ROS scavenging activity

ROS generation was induced by treatment with lipopolysaccharide (5 mg/kg, i.p.) into SD rats. ROS scavenging activity was measured by monitoring the oxidation of DCFDA as described in Materials and Methods. Each value is mean \pm S.E. of triplicate measurements.

② 생강 및 건강의 주성분 gingerol, shogaol 및 zingerone의 ROS 소거활성

Fig. 29에서 보는 바와 같이 생강의 주성분인 gingerol과 건강의 주성분인 shogaol과 zingerone 모두 강한 ROS 소거 활성을 나타내었다. 이는 생강의 CH_2Cl_2 분획의 주성분인 gingerol 및 shogaol의 기본골격으로 구성된 zingerone은 각각 10 μM 에서 35%, 42%, 45%의 ROS 제거활성을 보였고, trolox는 약 50%의 ROS 제거활성을 보였다. 따라서 생강성분 gingerol, shogaol 및 zingerone이 모두 ROS 소거능이 뛰어나다는 것을 알 수 있었다.

본 연구에서도 생강 및 건강의 MeOH 추출물과 생강분획의 ROS 소거능을 검토한 결과, 생강 및 건강 모두 강한 ROS 소거 작용을 나타내었다. 또한 생강분획 중 EtOAc 및 CH_2Cl_2 분

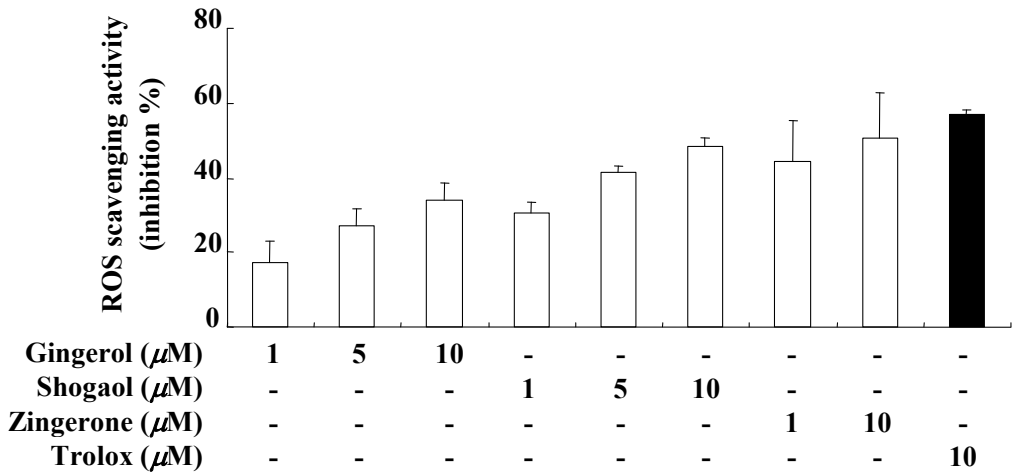


Fig. 29. Effect of ginger components on ROS scavenging activity.

획이 강한 ROS 소거 작용을 나타내었으며, 이들 분획 속에는 생강의 고미성분인 gingerol, shogaol 및 zingerone이 다량 함유되어 있다. 따라서 생강의 강한 ROS 소거 작용은 gingerol, shogaol 및 zingerone의 항산화력에 기인할 것으로 사료된다.

③ 배양세포에서 ROS의 유도에 의한 NF-κB의 활성화에 대한 zingerone의 작용기전 산화스트레스에 의해 유도된 NF-κB의 활성화에 대해 κB-luciferase plasmid를 transfection한 endothelial cells에서 zingerone의 효과를 관찰하였다. Luciferase reporter와 NF-κB가 포함된 plasmid를 transfection 시킨 후 zingerone을 처리한 것과 처리하지 않은 세포에서 산화스트레스를 유발시키는 t-BHP를 처리하여 luciferase activity를 측정하였다. 그 결과, NF-κB luciferase 활성화는 transfection된 세포와 비교하여 25μM t-BHP를 6시간 처리한 세포에서 3배 증가하는 것을 볼 수 있었으며, zingerone을 처리한 결과 용량 의존적으로 감소하는 경향을 관찰할 수 있었다(Fig. 30). 따라서 산화스트레스를 유도하는 t-BHP에 의해 NF-κB가 활성화되는 것을 zingerone에 의해 억제됨을 알 수 있었다. 이러한 zingerone 처리에 의해서 t-BHP로 유도된 NF-κB 활성화가 제어되었는데, 이것은 zingerone의 ROS 제어활성에 기인할 것으로 사료된다.

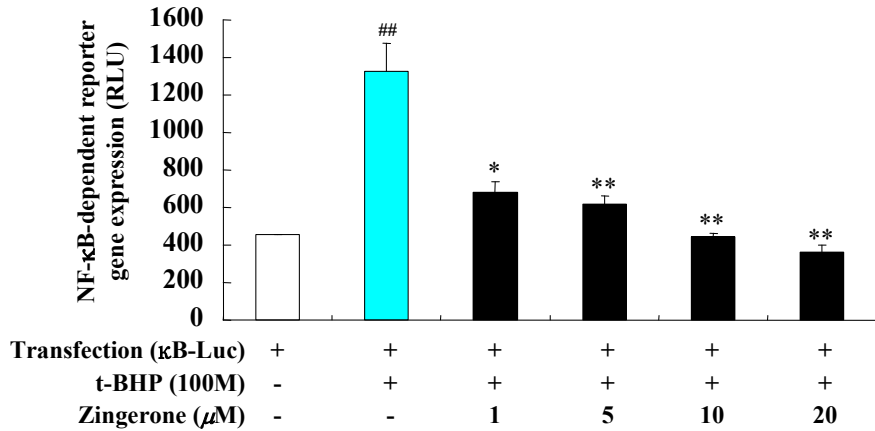


Fig. 30. t-BHP로 NF-κB를 유도한 세포에서 진제론의 NF-κB 저해능

④ Zingerone에 의한 redox status의 제어 효과

본 연구의 young군은 6개월령, old군은 24개월령이고, old군에는 2mg/kg와 8mg/kg의 zingerone을 경구 투여한 후 신장을 적출하여 여러 지표들을 검토하였다.

Redox 상태에 대한 zingerone의 효과를 검토하기 위해 ROS 생성과 지질과산화를 측정하였다. Fig. 31에서 보는 바와 같이 ROS생성은 노화과정에서 유의성 있게 증가하는 것을 관찰할 수 있었으며, 반면 zingerone을 농도별로 투여한 비만 관련 노화 쥐에서 ROS 생성이 용량 의존적으로 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 반면에 지질과산화는 비만 관련 노화쥐에서 증가하는 경향을 나타내었으나 유의성 있는 차이는 없었으며 zingerone을 투여할 경우 다소 감소하는 경향을 나타내었다. 또한 산화스트레스에 대한 방어력을 나타내고, 산화스트레스의 지표인 total-SH group의 변화는 비만과 관련한 노화과정에서 유의성 있게 감소하는 것을 관찰할 수 있었으며 zingerone을 투여한 비만 관련 노화 쥐에서 용량 의존적으로 유의성 있게 증가하는 것을 볼 수 있었다. 이들 결과는 비만 관련 노화과정에서 zingerone은 산화스트레스를 제거하고 항산화 능력을 가진다는 것을 제시해주었다.가되고, 이로 인해 NIK/IKK와 MAPK를 통한 NF-κB가 활성화 되어서 COX-2와 iNOS발현이 증가될 것으로 추정되었다. 따라서, 본 연구자는 zingerone이 비만과 관련된 노화 모델에서 NIK/IKK와 MAPK pathway에 어떠한 영향이 있는지에 대하여 연구할 필요성이 있다고 판단되었다.

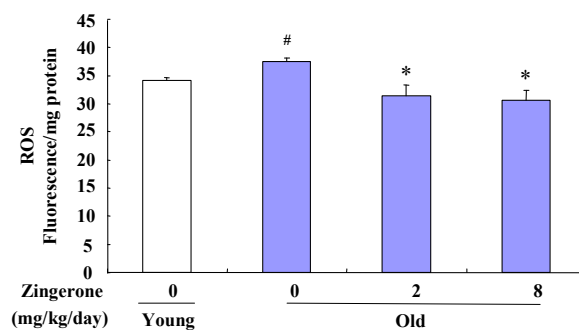


Fig. 32. Effect of zingerone on age/obesity-related ROS level.

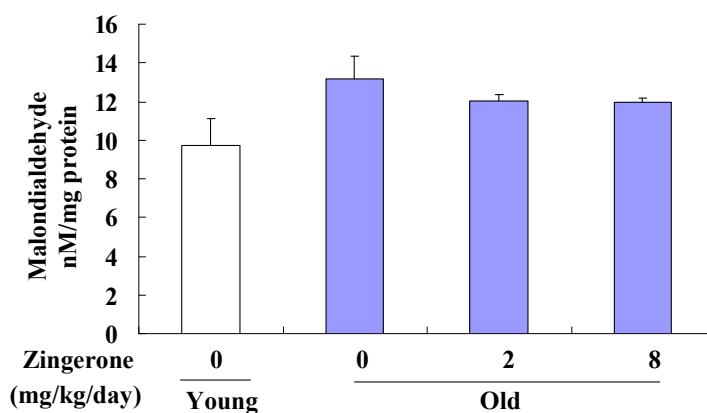


Fig. 33. Inhibition of lipid peroxidation by zingerone during aging.

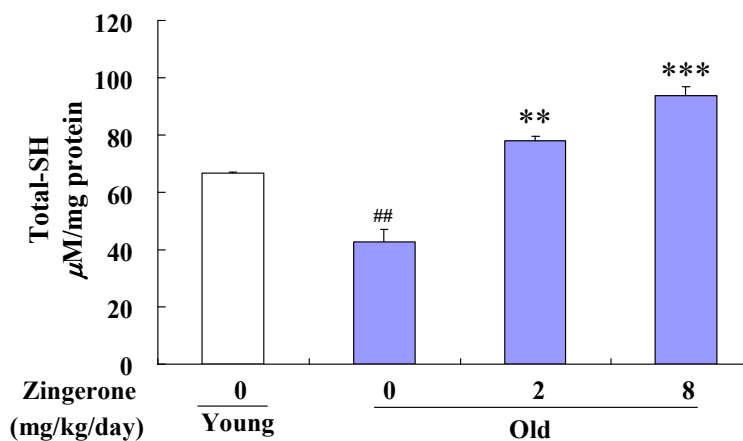


Fig. 34. Effect of zingerone on age/obesity-related total-SH level.

(나) 노화/비만과정에서 NF- κ B의 활성을 증가시키는 NIK/IKK pathway에 대한 zingerone의 효과

노화과정에서 비만현상이 동반함이 이미 잘 알려져 있어, 본 연구에서는 노화과정에서 동반되는 비만과 염증에 관련된 지표들을 검토하였다. 노화과정에서 NIK/IKK pathway를 통한 NF- κ B 활성화에 대한 zingerone의 작용을 알아보기 위해 Western blot를 이용하여 NIK/IKK의 활성화를 검토하였다. 그 결과 Fig 35에서 보여주듯이 노화 과정에서 NIK/IKK의 인산화가 young군에 비해 old/obesity군에서 약 3.5배에서 4배 정도 유의성 있게 증가하는 것을 볼 수 있었다. 반면, zingerone을 투여한 노화 쥐에서는 old 대조군에 비해 약 1.2배에서 2.3배 인산화가 유의성 있게 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 노화/비만 과정에서 활성화된 NIK/IKK경로가 zingerone투여에 의해 제어된다는 것을 시사한다.

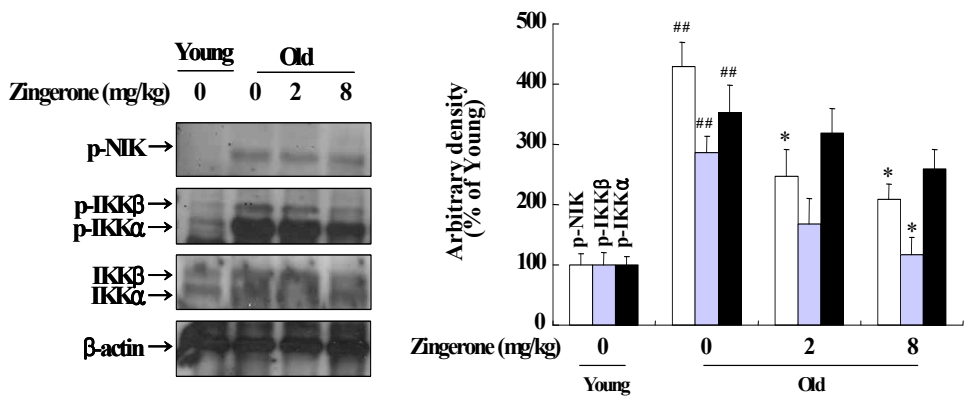


Fig. 35. Inhibition of age/obesity-related NIK/IKK activities by zingerone.

(다) Zingerone에 의한 ERK를 통한 NF- κ B 활성의 억제

MAPK는 많은 유전자의 발현을 조절하며 특히 cytokine에 의해 유도된다. ERK MAPK는 세포의 분화, 증식과 생존에 관련성이 있다고 알려져 있다. 본 연구에서도 Fig. 12에서와 같이 ERK의 인산화가 비만과 관련한 노화과정 동안 증가하였고, zingerone을 투여한 노화 쥐에서 유의하게 감소하는 경향을 나타내었다. 이들 결과는 비만과 관련한 노화과정에서 MEK/ERK pathway가 NF- κ B 활성화에 기여한다는 것을 알 수 있었다. 더욱이 zingerone은 노화과정동안 1.2배에서 3배 증가된 ERK pathway를 zingerone 8mg을 투여한 노화 쥐에서 old 대조군에 비해 1.3배에서 1.8배 억제함을 알 수 있었고, 이로 인해 zingerone은 ERK pathway를 경유한 NF- κ B의 활성을 제어한다는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 노화 쥐에 항산화물질

hesperetin 투여에 의한 ERK의 영향과 비슷한 결과로 사료된다

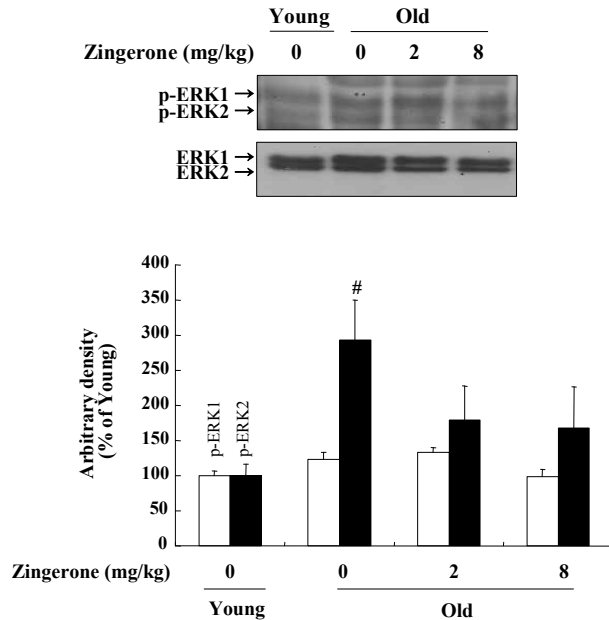


Fig. 36. Effect of zingerone on age/obesity-related ERK activities.

(라) p38 및 JNK를 통한 NF- κ B의 활성화에 대한 zingerone의 효과

p38 및 JNK MAPK는 세포의 분화, 증식 및 방어기전에 관련되어 있다고 잘 알려져 있다. 본 연구에서도 p38 및 JNK MAPK의 인산화가 비만과 관련한 노화과정에서 2~4배 증가하는 것을 확인할 수 있었으며 반면, zingerone을 투여한 노화/비만 쥐에서 old/obesity 대조군에 비해 1.1배에서 2.1배 인산화가 감소되는 것을 볼 수 있었다(Fig. 37). 이것은 노화과정에서 증가된 p38과 JNK pathway에 의한 NF- κ B가 활성화되었지만, zingerone에 의해 NF- κ B의 활성화를 억제하는 경향을 나타내었다. 이전 보고에 의하면 노화과정에서 ERK, JNK 및 p38 MAPK는 노화과정에서 활성화된다고 보고되어 있으며, hesperetin 등의 항산화물질에 의해 제어됨이 보고되어 있는데, 이러한 MAPK제어는 ROS 억제와 밀접한 관련성이 있을 것으로 사료된다. 그리고 phorbol ester를 처리한 산화스트레스 모델에서 gingerol이 MAPK를 제어함으로써 NF- κ B 활성을 조절한다는 보고는 본 연구의 연구결과와 유사한 결과로 사료된다.

(마) NF- κ B 활성화에 대한 zingerone의 효과

비만과 관련한 노화과정 및 zingerone투여에 의한 NF- κ B 활성화를 검토하기 위해

EMSA로 NF- κ B DNA binding 활성을 측정하였다. Fig 38에 나타낸 바와 같이, 노화과정에서 NF- κ B가 약 3배 활성화된 것이 zingerone투여에 의해 old/obesity 대조군에 비해 2.8배 감소됨이 확인되었다.

Zingerone이 비만과 관련한 노화과정에서 증가된 NF- κ B activation을 조절하는지를 확인하기 위해 특이적인 polyclonal antibody인 p65와 p50을 이용하여 세포질과 핵의 protein level을 측정하는 Western blotting을 실행하였다. 그 결과, 노화과정에서 세포질의 NF- κ B는 감소한 반면, 핵에서는 증가하는 것을 관찰 할 수 있었으며, 노화 쥐에 zingerone을 투여한 신장조직에서는 NF- κ B의 핵으로의 이동이 감소함을 알 수 있었다(Fig. 39). 또한 보고에 의하면 p65의 인산화로 인해 핵으로의 이동이 증가된다고 알려져 있기에 이를 확인한 결과, 세포질과 핵에서의 p65의 인산화가 노화과정에서 증가하는 것을 알 수 있었고, zingerone을 투여한 노화/비만 쥐에서는 감소됨을 확인할 수 있었다

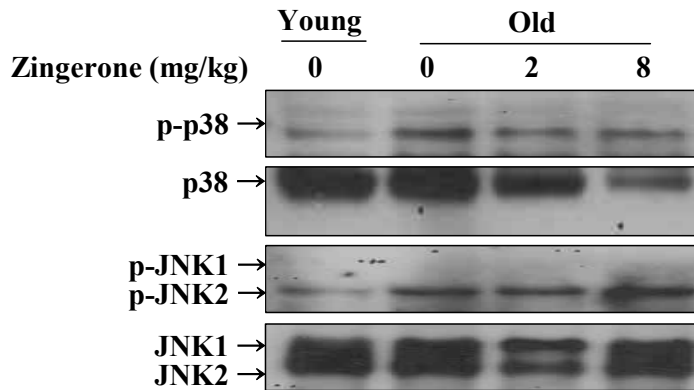


Fig. 37. Effect of zingerone on age/obesity-related p38 and JNK activities.

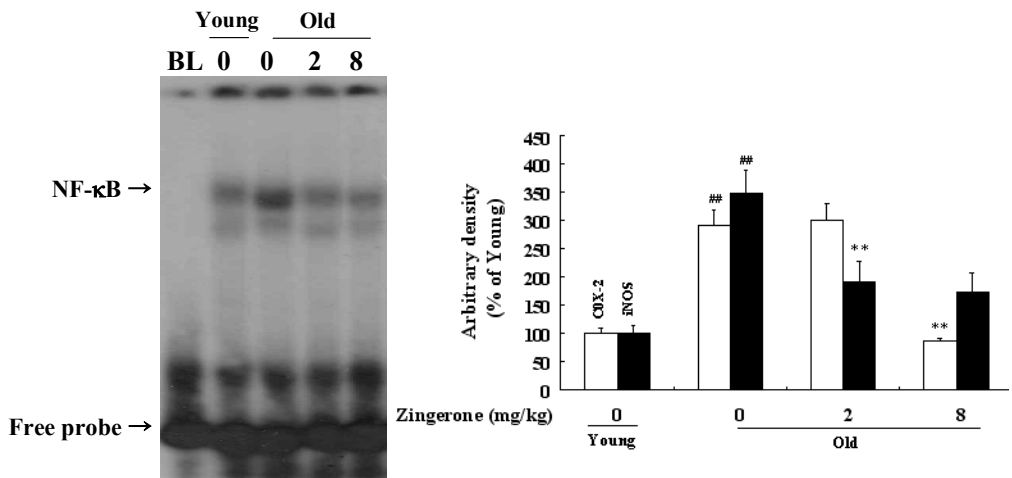


Fig. 38. Inhibition of NF-κB DNA binding activity by zingerone.

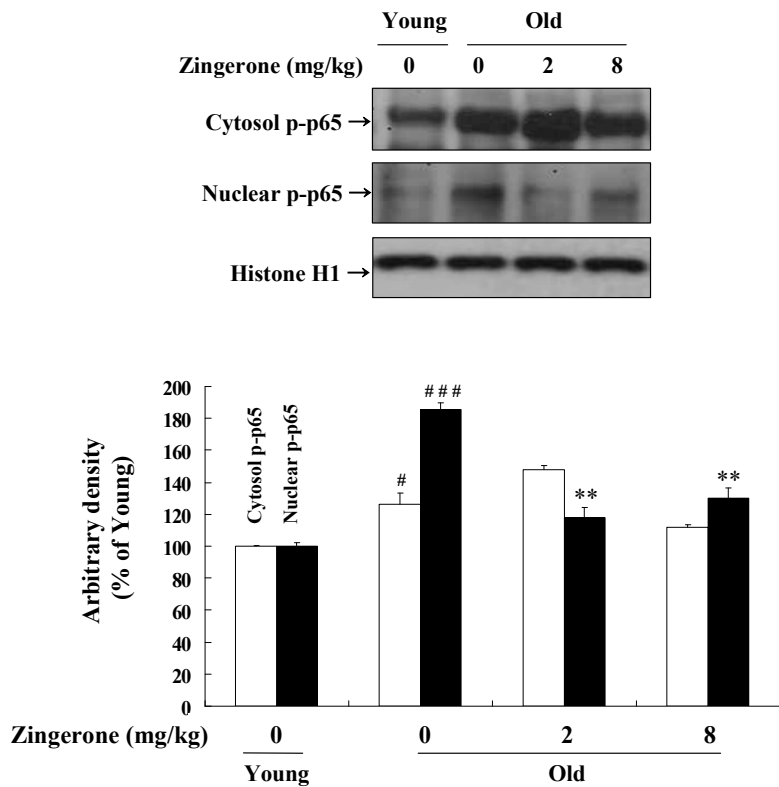


Fig. 39. Modulation of age/obesity-related NF-κB translocation by zingerone.

(바) 과발현된 NF- κ B 의존성 COX-2와 iNOS에 대한 zingerone의 작용

NF- κ B는 노화와 관련된 염증을 증가시킨다고 알려져 있기에, 본 연구에서도 NF- κ B 의존성 유전자인 COX-2와 iNOS의 protein level을 확인하였다. 이들의 upstream에는 κ B-site를 가지고 있기 때문에 이것은 NF- κ B 활성화에 의해 조절된다고 알려져 있다. Fig. 40에서 보여주듯이 노화과정에서 NF- κ B의 gene인 COX-2와 iNOS의 발현이 Young 그룹에 비해 3배에서 3.5배 증가한 반면, zingerone 8mg을 투여한 노화/비만 쥐에서는 old 그룹에 비해 2배에서 3.2배 억제되는 것을 볼 수 있었다. 이들 결과로 zingerone은 노화과정에서 활성화된 NF- κ B의 활성을 억제시키는 것을 확인할 수 있었다. 이것은 앞선 연구에서 노화/비만 쥐에 hesperetin이나 aspirin을 투여하였을 경우에도 NF- κ B 조절에 의해 COX-2 및 iNOS 발현이 조절되는 결과와 유사한 현상으로 사료된다. 그리고 향신료의 고미성분구조를 가지고 있는 생리활성 물질들(gingerol, curcumin, capsaicin등)의 NF- κ B에 의한 COX-2와 iNOS발현 증가를 제어한다는 연구보고는 본 연구의 연구결과와 일치함을 알 수 있다. (Fig. 40)

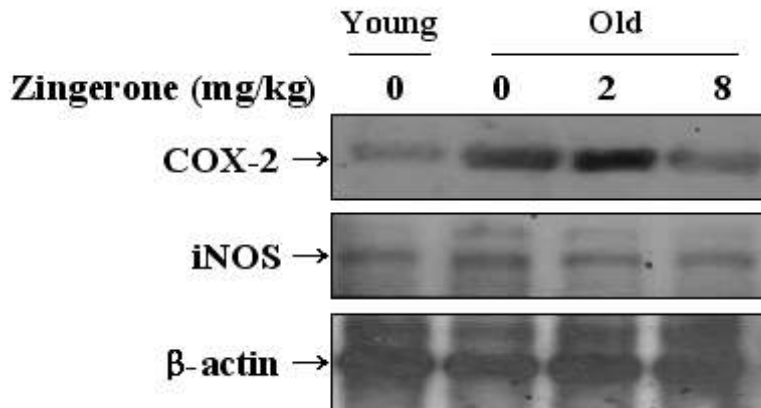


Fig. 40. Modulation of NF- κ B dependant gene expression by zingerone

(아) COX유래 ROS와 iNOS유래 NO생성에 대한 zingerone의 작용

노화/비만과정에서 COX유래 ROS생성을 검토한 결과, COX유래 ROS가 나이에 따라 증가되었으나 zingerone 투여에 의해 억제되었다(Fig. 40). 또한 iNOS유래 NO생성을 검토한 결과, iNOS유래 NO생성이 노화과정에서 Young그룹에 비해 1.7배 증가되었으나 zingerone 투여에 의해 old 대조군과 비교하여 약 1.4배 제어된 것을 관찰

할 수 있었다.

이것은 노화과정에서 활성화된 NF- κ B에 의해 COX-2, iNOS에 의해 ROS 및 NO 축적을 초래하지만 zingerone 처리에 의해 제어될 수 있다는 것을 시사하였다. 노화과정에서 ROS 및 RNS생성이 염증반응에서 과발현되는 COX-2와 iNOS에 기인하며, 이러한 결과는 이들이 발생하는 ROS와 RNS가 NF- κ B활성을 초래하여 분자염증반응을 증폭한다는 앞선 보고와 일치한다. 이들의 ROS와 RNS생성은 식이제한에 의해 제어된다는 보고는 본 연구의 연구결과를 뒷받침해준다. 그리고 최근 향신료 성분의 항산화 및 항염증에 대한 총설에서 gingerol 및 curcumin은 활성산소제거, 염증제어, PG 및 LT 합성억제능, TNF α 생성억제등의 활성을 가지고 있어서 암예방 및 노화제어로서의 가능성을 제시하였다(194). Gingerol과 curcumin 모두 zingerone의 구조를 포함하고 있으므로, 본 연구에서의 zingerone의 항산화능, COX-2 및 iNOS 발현제어, MAPK 제어등의 활성은 gingerol 및 curcumin의 생리활성과 매우 유사하므로 zingerone의 기본골격구조가 생리활성 부위로서 중요한 역할을 할 것으로 사료된다.

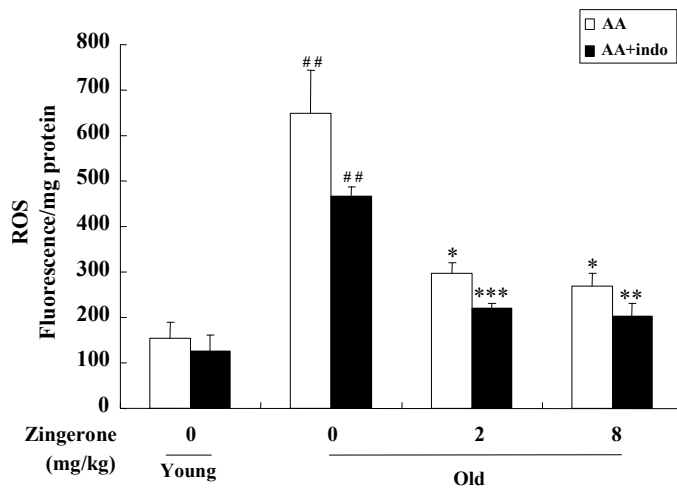


Fig. 41. Effect of zingerone on age-related COX-2-derived ROS generation.

(자) 노화/비만과정에서 zingerone의 PPAR 활성화 기전

① 세포배양계에서 zingerone의 PPAR 활성화 작용

PPAR는 지방대사에 중요한 역할을 한다는 것이 잘 알려져 있다. 그래서 본 연구에서는 Zingerone이 지방대사에 미치는 영향을 검토하기 위하여 PPAR활성에 미치는 영향을 조사해 보았다.

생강성분인 zingerone의 PPAR 활성화 효과를 알아보기 위해 세포에 PPAR gene을 transfection 시킨 후, PPAR agonist로 알려진 fibrate와 비교하였다. 그 결과 PPAR agonist인 fibrate 5 μ M에서 효과가 zingerone 10 μ M을 처리하였을 때와 같이 control에 비해 약 2.5배 증가하는 결과를 보였다. 따라서 zingerone이 PPAR agonist로서 작용을 할 것으로 사료된다(Fig. 42). 최근에 울금의 주성분인 curcumin이 천연의 PPAR γ agonist로 작용하여, 지방세포 분화에 관여하여 혈장 저하작용을 가진다는 보고와 zingerone의 dimer구조를 가지는 것을 감안하면 매우 흥미로우며 본 연구의 연구결과와 유사한 것으로 사료된다.

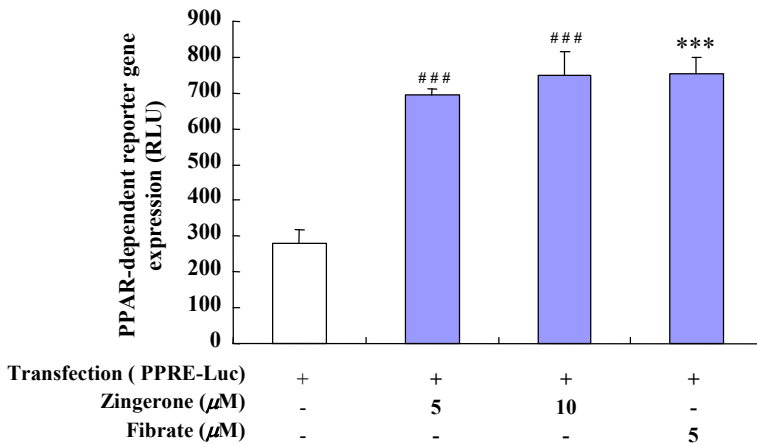


Fig. 42. Modulation of PPAR activity by zingerone in cultured cells.

② Zingerone의 PPAR 활성화 작용

PPAR가 PPRE에 결합하는 DNA binding 활성을 EMSA를 이용하여 검토하였다. 그 결과, 노화/비만과정에서 PPAR DNA binding 활성이 young 그룹에 비해 약 2.4 배 감소하였으나, zingerone투여에 의해 old/obesity 그룹에 비해 약 2.8배 증가하여 6개월 수준으로 유지하였다. 전 연구에 의하면 노화과정에서 PPAR의 DNA 결합 활성이 저하하였으나, 식이제한에 의해 회복된다는 보고는 본 연구결과를 뒷받침 해준다. 그리고 curcumin이 PPAR γ 의 agonist를 작용하여 NF- κ B 의존성 유전자 iNOS, COX-2, cytokines, chemokines 유전자 발현을 조절한다는 연구보고는 본 연구의

zingerone이 NF- κ B뿐만 아니라 PPAR의 활성을 조절한다는 것과 매우 유사하며 curcumin이 zingerone구조의 dimer라는 것을 생각하면, zingerone 구조가 NF- κ B와 PPAR를 조절하는데 중요한 활성부위라는 것을 알 수 있다.

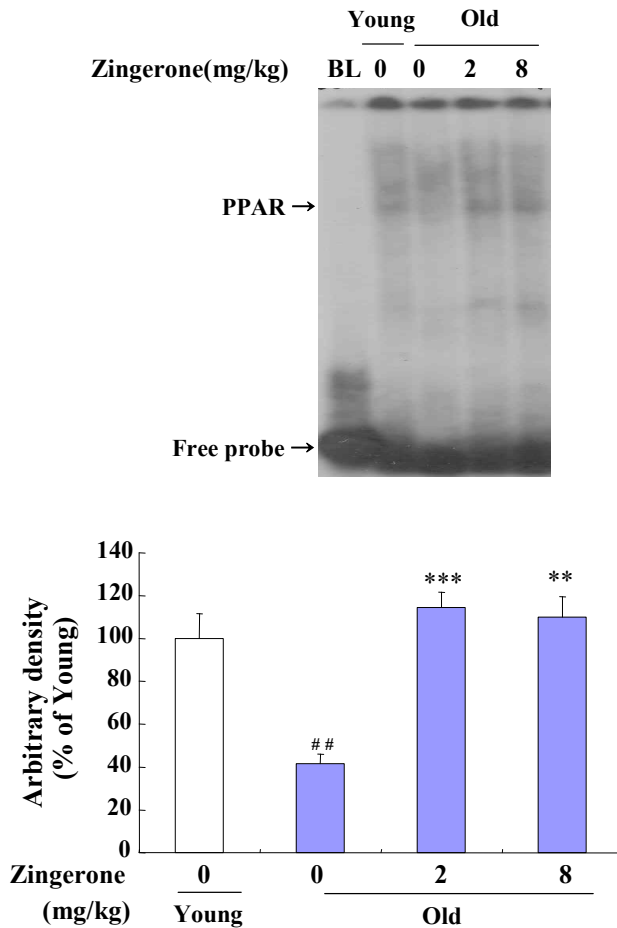


Fig. 43. Effect of zingerone on age-related PPAR DNA-binding activity.

③ Nuclear에서 PPAR α , PPAR β , PPAR γ 에 대한 zingerone의 효과

특이적인 antibody를 이용하여 PPAR α , PPAR β , PPAR γ 의 protein level을 노화과정에서의 변화를 관찰하였다. 그 결과, Fig. 44에서 보는 바와 같이 노화과정동안 PPAR α , PPAR β 및 PPAR γ 의 protein level은 young 그룹에 비해 약 1.5배에서 2.5

배 감소하는 경향을 보였지만, zingerone 투여에 의해 노화 쥐에서 감소된 PPAR α , β 및 γ 의 감소를 모두 억제하여 거의 6개월령의 수준을 유지하였다. 이러한 결과는 Fig. 43의 PPAR의 DNA결합 활성의 결과와 일치하며, 또한 앞선 연구의 결과와도 일치한다. Zingerone의 PPAR 활성화는 zingerone의 dimer구조인 curcumin이 PPAR agonist로 작용한다는 연구보고에서 본 연구의 연구결과를 뒷받침해준다.

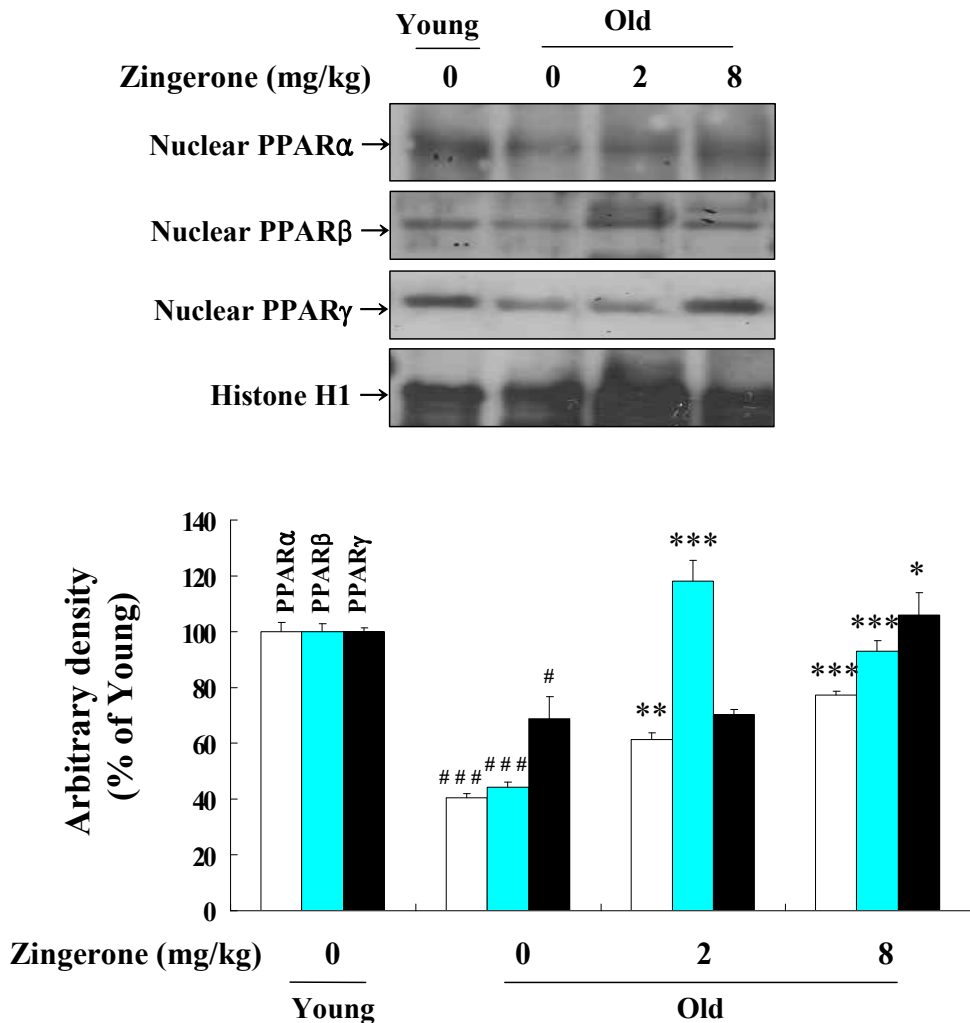


Fig. 44. Effect of zingerone on nuclear PPARs during aging

3. 콩 발효 식품의 신경 세포 보호 효과 및 신경 재생성 효능 연구

가. 콩발효식품 성분의 신경세포 보호효과 및 신경재생성 효능연구

1) 콩발효식품의 신경세포 보호 및 신경재생성 활성화에 영향을 미치는 생리활성 물질의 탐색

(가) 치매의 in vitro 신경세포 모델의 확립

① P19 세포주를 사용하여 신경세포로 분화시키는 방법의 확립 및 신경세포 분화여부 검증

P19 세포의 신경세포분화

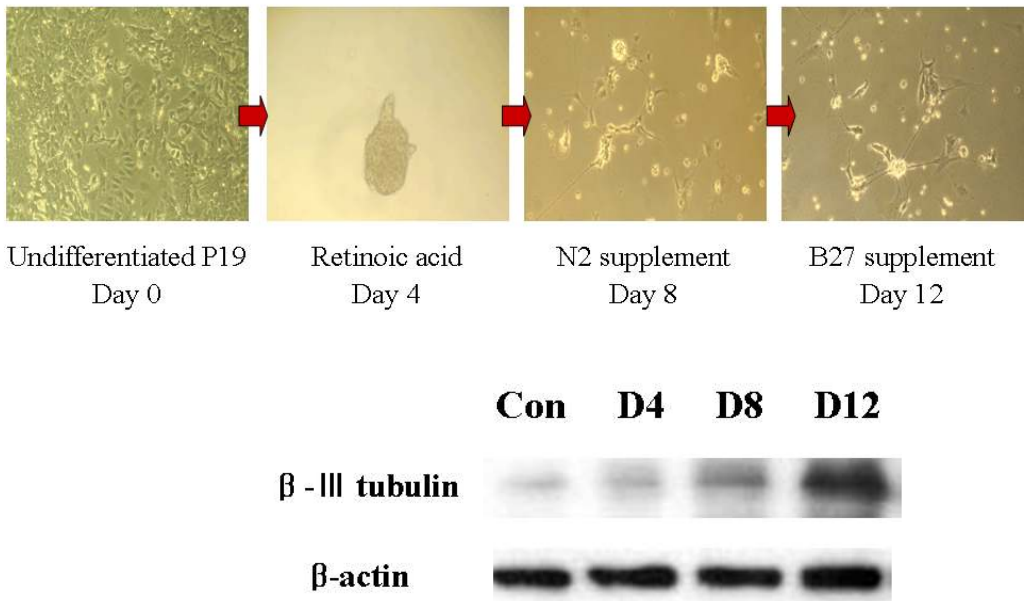


Fig. 1. P19세포주로부터 신경세포 분화과정 및 검증

P19 세포주에 1uM retinoic acid를 처리하여 4일간 배양 후 bacteriological culture dish에 옮기면 부착되지 않고 aggregates를 형성한다. 4일후 다시 poly-L-lysine-coated dish에 현탁 시킨 후 N2 supplement를 함유한 Neurobasal medium에 4일간, B27 supplemented Neurobasal에 14일까지 배양할 수 있다.

aggregates를 현탁한 이후로 7일이 지나면서 (7 DIV) 신경세포의 morphology 및 신경세포의 기능적 receptor등이 발현되며 신경세포에 특이적인 단백질에 대한 항체로 immunoblot을 한 결과 신경세포로 분화되었음을 확인하였다.

② C17.2 세포주로부터 신경세포 분화법 확립

C17.2 세포주를 poly-L-lysine-coated dish에 옮긴 후 Serum free medium (SFM)에 2일간 배양 후 N2 supplement를 함유한 Neurobasal medium에 2일간, B27 supplemented Neurobasal에 다시 2일간 배양하게 되면 neurites가 뻗어나가는 신경세포로 분화되고 있음이 확인되었다. 신경세포에 특이적인 단백질에 대한 항체로 immunoblot을 한 결과 신경세포로 분화되었음을 확인하였다.

C17.2 세포의 신경세포분화

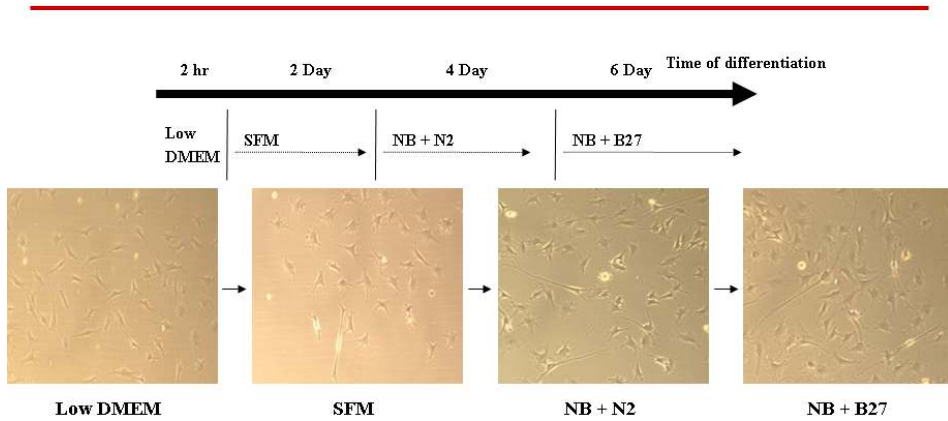
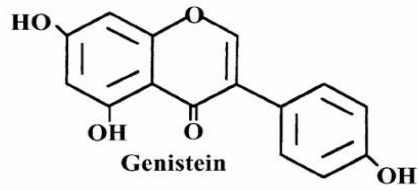


Fig. 2. C17.2 세포주로부터 신경세포 분화과정

(나) 신경세포주를 이용한 보호활성 검증

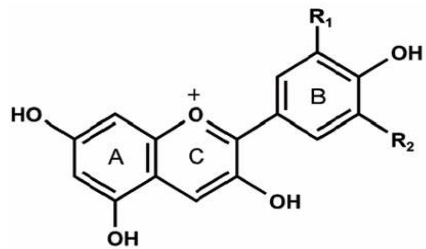
신경세포주를 사용하여 여러 가지 신경독성물질에 대하여 콩밭효식품의 신경세포 보호효과를 탐색하기 위하여 우선 콩밭효식품의 주요 생리활성물질로 잘 알려진 Genistein과 Anthocyanidin 계열 물질에 대한 보호활성을 조사해 보았다.

콩에 존재하는 주요 생리활성물질



Anthocyanidins

Anthocyanidin	R ₁	R ₂
Delphinidin	OH	OH
Cyanidin	OH	H
Pelargonidin	H	H
Malvidin	OCH ₃	OCH ₃



① 신경독성 물질에 대한 저항성 측정

세포내 LDH (lactate dehydrogenase) release를 통한 세포의 생멸정도를 정량할 수 있으며 분화가 끝난 신경세포는 더 이상의 증식 (proliferation)이 일어나지 않기 때문에 MTT assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Roche)를 이용한 방법도 보호활성 측정에 사용 가능하다.

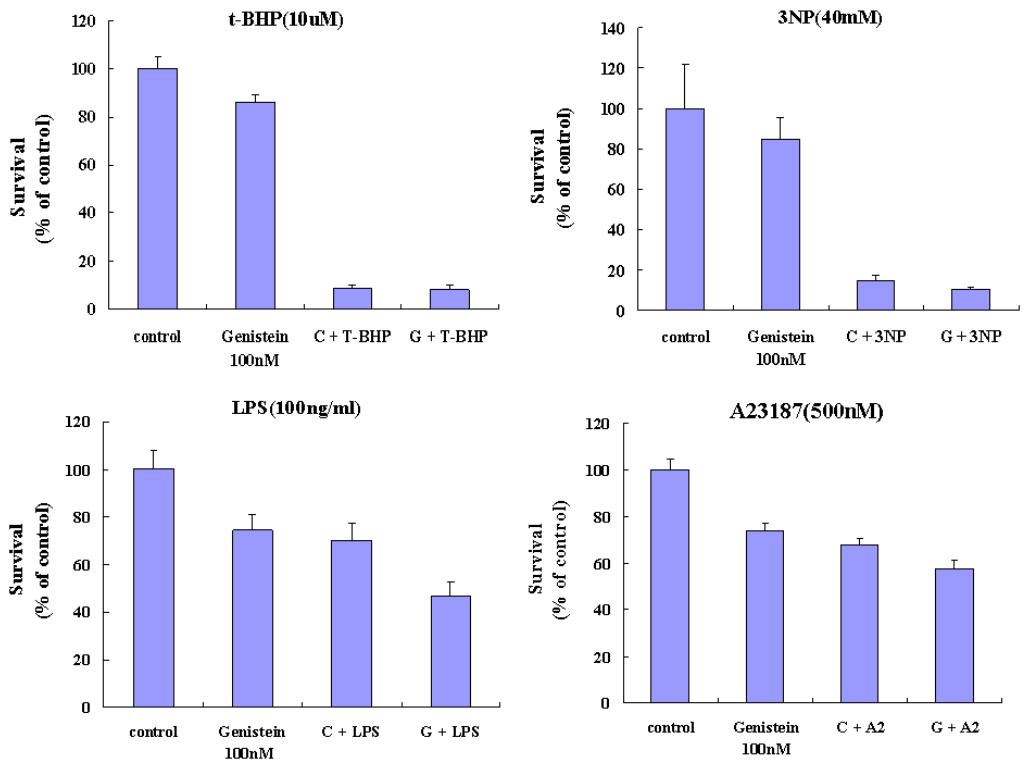


Fig. 3. 신경줄기세포인 C17.2 세포에서 genistein의 세포보호효과

C17.2 세포를 96 well culture plate (1×10^4 cells/ml)에 배양하고 24시간동안 Genistein 100nM로 전처리 (pretreatment)한 후, 10uM t-BHP (oxidative stress), 40mM 3-Nitropropionic acid (3NP: mitochondrial disruption), LPS (inflammatory stress), A23187 (calcium ionophore)를 처리하였다.

Cell viability는 여러 가지 신경독성 물질에 의해서 감소하였으며 genistein 전처리에 의한 세포보호효과는 모든 실험에서 나타나지 않았으며 오히려 LPS에 의한 세포사멸에서는 genistein에 의해서 세포사멸이 촉진되는 경향이 나타났다. 또한 신경계 세포인 astrocyte 세포주인 CTX TNA2의 실험에서도 genistein의 전처리가 세포보호에 전혀 영향을 주지 않았다. (data not shown)

(다) 신경줄기세포주 (Neural stem cell)를 사용한 *in vitro* 모델에서 콩발효식품의 활성물질이 가지는 신경재생성 조사하기 위하여 콩의 주요 생리활성물질인 Genistein과 Anthocyanidin 계열 물질에 대한 신경재생성을 조사해 보았다.

① 신경줄기세포주 (Neural stem cell)를 사용한 신경재생성 모델의 확립.

그림에서 보이는 바와 같이 신경줄기세포주를 사용한 *in vitro* 모델에서 세포증식에 영향을 미치는 물질에 대한 세포증식력을 확인할 수 있다. 신경줄기세포인 C17.2 세포를 96 well culture plate (1×10^4 cells/ml)에 배양하고 Compound A에 의한 세포 증식력을 24시간, 48시간 후에 MTT assay로 정량하였다 (B). BrdU pulse 후 compound A에 의한 세포 증식의 효과가 BrdU 면역염색법을 사용하여 확인할 수 있다 (A)

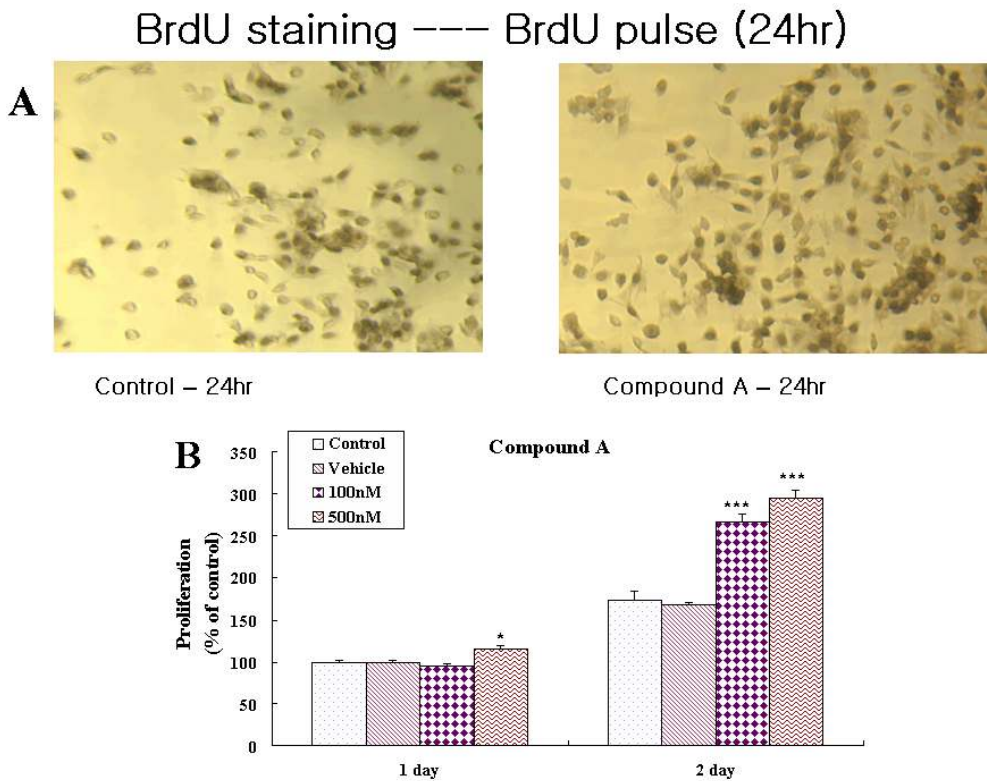


Fig. 4. 신경줄기세포주를 사용한 신경재생성 모델

② 신경줄기세포주를 사용한 *in vitro* 모델에서 콩성분의 생리활성물질이 신경재생성의 미치는 영향을 조사

- Genistein이 신경세포주의 증식력 (proliferation index)에 미치는 영향을 조사
다음의 Figure 6에서 보이는 바와 같이 여러 가지 농도의 Genistein의 세포증식력

을 조사해 본 결과 Genistein에 의한 신경줄기세포의 증식에는 큰 영향을 미치지 않는 것처럼 보이며 오히려 고농도 (10uM 이상)에서는 세포증식을 억제하는 영향이 나타났다.

Genistein (G)의 농도별 신경줄기세포 증식력에 미치는 영향

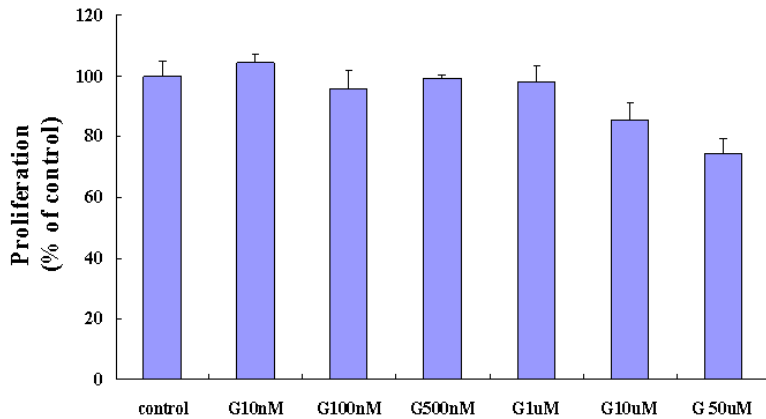
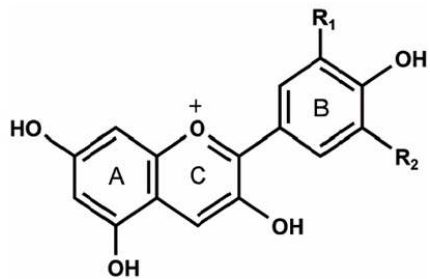


Fig. 5. 신경줄기세포에서 genistein의 세포증식에 미치는 효과

C17.2 세포를 96 well culture plate (1 x 10⁴cells/ml)에 배양하고 24시간동안 여러 농도의 Genistein에 의한 세포 증식력을 24시간 후에 MTT assay로 정량하였다.

Structure of anthocyanidins.

Anthocyanidin	R ₁	R ₂
Delphinidin	OH	OH
Cyanidin	OH	H
Pelargonidin	H	H
Malvidin	OCH ₃	OCH ₃



- Anthocyanidin계열 물질이 신경줄기세포주의 증식력 (proliferation index)에 미치는 영향을 조사

Fig. 6에서 보이는 바와 같이 Anthocyanidin 계열의 물질들에 대한 신경줄기세포의 증식에 미치는 영향을 평가해 보았다. 4종의 물질 중에서 Delphinidin (A)는 농도 의존적으로 신경줄

기세포의 증식에 영향을 주고 고농도에서는 큰 영향을 미치지 않았으며 Cyanidin (B)과 Pelargonidin (C)의 경우는 여러 농도에 걸쳐서 세포증식의 효과를 보였다. 하지만 Malvidin (D)의 경우에는 세포증식의 효과가 나타나지 않았다. 따라서 Anthocyanidin 계열 물질 전반적으로 세포증식의 효과가 나타났기 때문에 향후 연구는 Delphinidin과 Cyanidin, Pelargonidin과 같은 물질 위주로 진행해 나갈 것이다. C17.2 세포를 96 well culture plate (1×10^4 cells/ml)에 배양하고 24시간동안 여러 농도의 Anthocyanidin 계열 물질에 의한 세포 증식력을 24시간 후에 MTT assay로 정량하였다.

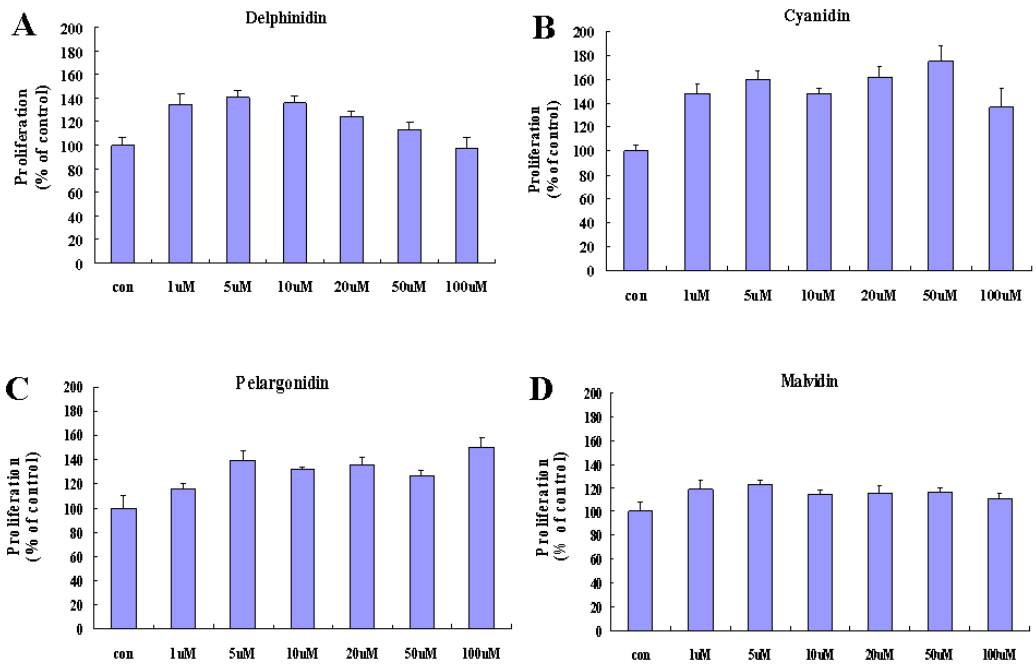


Fig. 6. 신경줄기세포에서 Anthocyanidin 계열 물질의 세포증식에 미치는 효과

(라) 향후 연구계획

① 콩 발효 생리활성 물질의 신경세포 분화성 검사

1차적으로 탐색된 여러 가지 콩 발효 생리활성 물질에 대한 신경세포 분화성 검사를 본 연구실에서 확립된 방법을 통하여 검증할 예정이다.

② 신경줄기세포에 증식의 효과를 보여준 물질에 대한 동물실험을 통하여 콩 발효 식품에 대한 해마신경재생 연구 수행할 예정이다. in vitro 신경줄기세포의 증식에 영향을 보인 Anthocyanidin 계열 물질에 대한 뇌-혈관 관문 (Blood-brain

barrier)투과 여부를 이미 preADME program을 사용하여 조사해 본 결과 Malvidin을 제외한 물질들에 대하여 in vivo 동물실험을 진행할 수 있는 가능성이 제시되었음.

(<http://preadmet.bmdrc.org/preadmet/index.php>)

Table 1. 여러 가지 콩 발효 생리활성 물질들의 뇌-혈관 관문 투과여부

Chemical	BBB 투과 예상비율 ($C_{\text{brain}}/C_{\text{blood}}$)
Delphinidin	0.218
Cyanidin	0.384
Pelargonidin	0.702
Malvidin	0.0723
Genistein	0.8098

③ 콩 발효식품을 섭취시킨 동물실험 모델에서 여러 가지 신경세포 성장인자 및 그 수용체의 발현 여부 조사 (RT-PCR)

BDNF, NGF, NT-3와 같은 여러 가지 세포 성장인자 및 TrkA, TrkB, TrkC 와 같은 성장인자에 특이적으로 신호전달을 하는 수용체들에 대한 유전자 발현이 콩 발효식품을 섭취시킨 동물에서 어떻게 변하는 지 조사하기 위하여 각 유전자에 대한 특이적인 primer를 design 하였다.

Table 2. 여러 가지 신경세포 성장인자 및 수용체 유전자의 primer

Gene	Accession number	Foward(F) and reverse(R) primer sequences(5` to 3`)	Base	Product size(bp)	Annealin temp(°C)
Trk A	M85214	F-agg gcc aca tca tgg aga ac R-cgt gca gac tcc aaa gaa gc	1,530-1,549 1,791-1,810	281	61
Trk B	M55291	F-tct cca cca cat ctc caa c R-cac aga cac cgt aga act tga c	2,101-2,119 2,462-2,483	383	59.5
Truncated Trk B	M55292	F-ctg ttg cct atc cca gga ag R-gag agg cac aat cca atg ag	1,949-1,968 2,159-2,178	230	57
Trk C	L03813	F-tcc atc aat act cat cag acc R-caa act caa tgc aat gtt cc	799-819 1,002-1,021	223	58
p75	X05137	F-tgc agt gtg cag atg tgc cta tgg c R-agg aat gag ctt gtc ggt ggt gcc g	428-452 851-875	448	55
NGF	M36589	F-gcg agg tga aca tta aca ac R-tta cag gct gag gta ggg ag	771-790 1,067-1,086	316	60
BDNF	M61178	F-tct acg aga cca agt gta atc R-cat aaa tcc act atc ttc c	676-696 870-888	213	56
NT3	M33968	F-gca acc ctt aca gta tat aag R-act gaa tgc caa ata ctg g	985-1,005 1,116-1,134	150	55
NT4	S69323	F-ctg act gtg aac tga aat aac c R-tgc tag gca acc aga aac	933-954 1,228-1,245	313	57

2) 1차년도에 선정된 활성물질들에 대한 쥐의 해마체의 신경재생성 활성조사

(가) 동물 실험모델에서 생리활성물질의 신경재생성 측정

① 생리활성물질의 주입방법: 복강 주사법

해마신경재생성 측정을 위하여 탐색된 생리활성 물질 및 신생하는 신경세포의 추적을 위한 BrdU 투여방법은 그림1과 같다. BrdU는 세포가 증식하는 S phase에서 dT와 경쟁적으로 DNA에 주입되게 되며 이후 BrdU에 대한 특이항체를 사용하여 새로 형성된 세포를 확인할 수 있다.

② 해마체의 신경재생성 측정 모델

성체에 존재하는 신경줄기세포의 신경재생성을 BrdU 면역염색법을 사용하여 그림2

와 같이 검증할 수 있다. 콩발효식품성분의 생리활성물질의 경우 1차년도 세포배양계 실험의 탐색을 통해서 큰 증식활성을 가지는 물질을 도출해내지 못했으나 새로운 CPd-A의 경우 동물실험에서 BrdU pulse 후 1일째(신경줄기세포 증식률) 및 4주째(신경세포 생존률)에도 큰 생리활성을 가짐을 알 수 있었다.

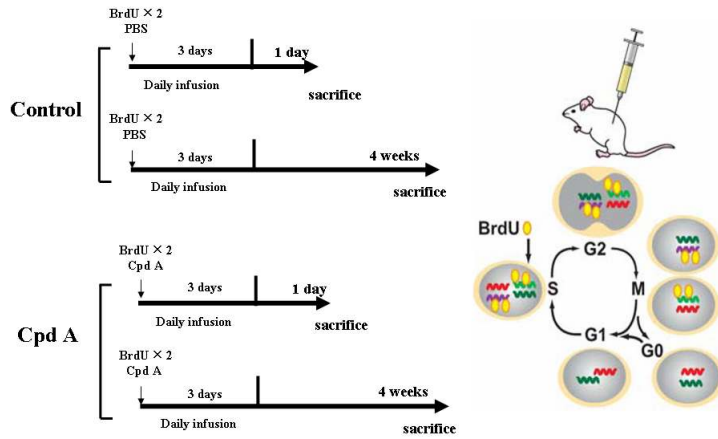


Fig. 7. 해마신경재생성 측정을 위한 생리활성 물질 및 BrdU 주입 방법

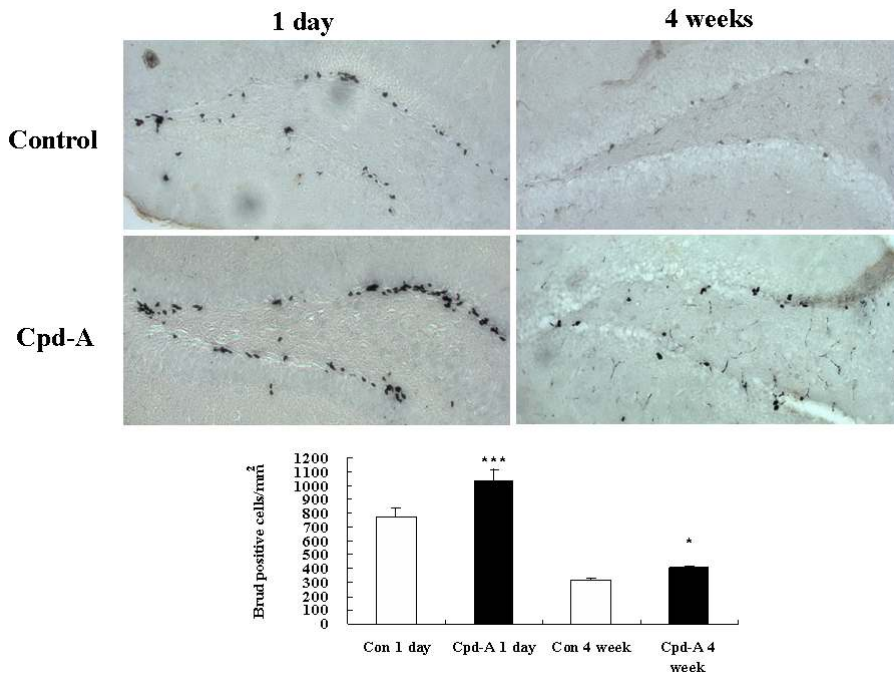


Fig. 8. Cpd-A가 투여된 생쥐의 해마체의 dentate gyrus에서 대조군에 비하여 현저하게 많은 BrdU-positive cell이 관측되었다. 이는 Cpd-A가 성체해마줄기세포의 증식을 촉진하는 활성이 있음을 시사한다.

(나) 콩발효식품의 생리활성물질에 의한 비만제어효능이 뇌 조직에 미치는 영향 검증

① 비만 동물실험 모델을 사용하여 생리활성물질에 대한 비만제어효능이 뇌 조직의 신경재

생성에 미치는 영향을 검증

흰쥐모델을 사용하여 정상적인 식이군(ND)과 고지방식이(HFD)를 섭취시킨 그룹, 그리고 고지방식사와 콩발효식품을 같이 섭취시킨 후 뇌의 해마를 분리하여 해마신경재생성을 조절하는 신경세포성장인자인 BDNF와 그 수용체(TrkB), migrating neuron의 특이 마커이자 신경줄기세포의 마커인 doublecortin의 발현을 조사한 결과, HFD에서 BDNF와 doublecortin의 발현이 현저하게 감소하는 것이 확인되었다. 또한 BDNF의 high affinity receptor인 TrkB의 경우 active full length receptor (145kDa)와 내부 antagonist인 truncated form (95kDa)으로 존재하는데 HFD에서 truncated form에 비하여 active full length form이 현저하게 감소하는 것이 관측되었다. 하지

만 콩 발효식품을 같이 섭취한 흰쥐의 뇌조직에서 BDNF의 발현 및 TrkB의 발현이 회복되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 신경줄기세포의 marker인 doublecortin의 발현도 콩 발효식품을 같이 섭취한 군에서 회복되는 것이 관측되었다. 흥미롭게도 BDNF를 결핍한 생쥐에서 비만이 발생하는 것이 보고되었는데 본 연구결과와 함께 BDNF가 항비만의 좋은 target이 될 수 있음을 시사한다.

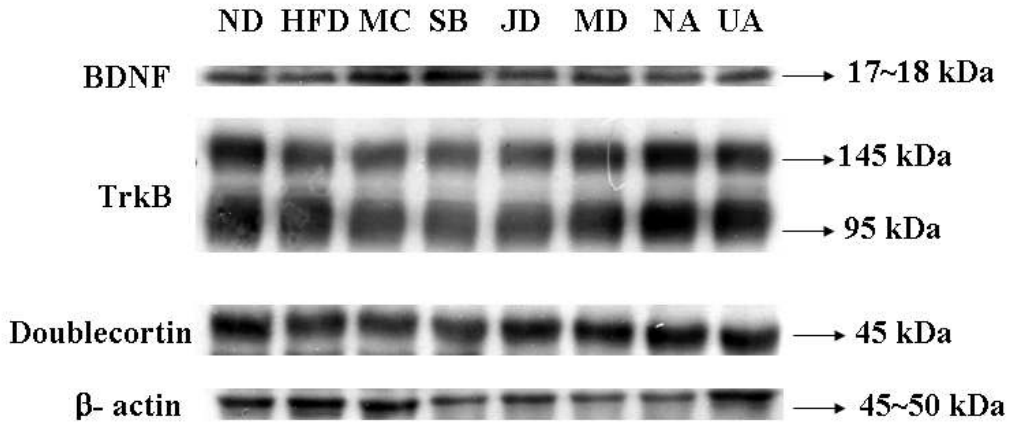
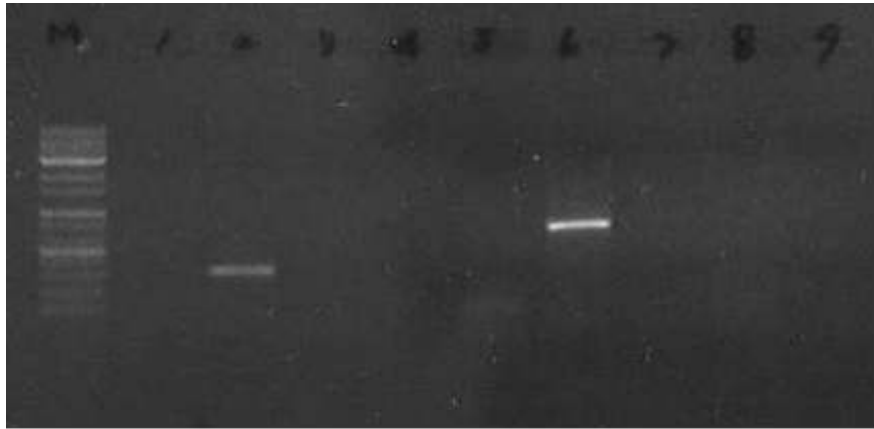


Fig. 9. 콩발효식품을 먹인 흰쥐의 해마체에서 해마신경재생에 관련된 인자들의 발현을 western blot으로 확인하였다. ND: normal diet, HFD: high fat diet, MC: MOR 청국장, SB: 대두, JD: JM된장, MD: MORD된장, NA: nonanoic acid, UA: undecanoic acid

② 비만과 신경재생에 관련한 기전 규명을 위한 여러 가지 신경세포 성장인자 및 그 수용체의 발현 여부 조사 (RT-PCR)

콩 발효식품을 섭취시킨 동물실험 모델에서 BDNF, NGF, NT-3와 같은 여러 가지 세포 성장인자 및 TrkA, TrkB, TrkC 와 같은 성장인자에 특이적으로 신호전달을 하는 수용체들에 대한 유전자 발현이 콩 발효식품을 섭취시킨 동물에서 어떻게 변하는 지 조사하기 위하여 각 유전자에 대한 특이적인 primer를 design 하였으며 1차년도에 사용한 신경줄기세포에서 그 발현여부를 우선 확인해 본 결과 신경줄기세포에는 NGF와 TrkA, 그리고 low affinity receptor인 p75가 약하게 발현되는 반면 BDNF, NT3 및 그 수용체의 유전자는 발현되지 않는 것이 관측되었다. (Fig. 10)



M BDNF NGF NT3 NT4 p75 TrkA TrkB tTrkB TrkC

Fig. 10. 신경줄기세포에서 여러 신경생장인자 및 수용체의 유전자 발현

Table 3. 여러 가지 신경세포 성장인자 및 수용체 유전자의 primer

Gene	Accession number	Foward(F) and reverse(R) primer sequences(5` to 3`)	Base	Product size(bp)	Annealin temp(°C)
Trk A	M85214	F-agg gcc aca tca tgg aga ac R-cgt gca gac tcc aaa gaa gc	1,530-1,549 1,791-1,810	281	61
Trk B	M55291	F-tct cca cca cat ctc caa c R-cac aga cac cgt aga act tga c	2,101-2,119 2,462-2,483	383	59.5
Truncated Trk B	M55292	F-ctg ttg cct atc cca gga ag R-gag agg cac aat cca atg ag	1,949-1,968 2,159-2,178	230	57
Trk C	L03813	F-tcc atc aat act cat cag acc R-caa act caa tgc aat gtt cc	799-819 1,002-1,021	223	58
p75	X05137	F-tgc agt gtg cag atg tgc cta tgg c R-agg aat gag ctt gtc ggt ggt gcc g	428-452 851-875	448	55
NGF	M36589	F-gcg agg tga aca tta aca ac R-tta cag gct gag gta ggg ag	771-790 1,067-1,086	316	60
BDNF	M61178	F-tct acg aga cca agt gta atc R-cat aaa tcc act atc ttc c	676-696 870-888	213	56
NT3	M33968	F-gca acc ctt aca gta tat aag R-act gaa tgc caa ata ctg g	985-1,005 1,116-1,134	150	55
NT4	S69323	F-ctg act gtg aac tga aat aac c R-tgc tag gca acc aga aac	933-954 1,228-1,245	313	57

(다) 콩발효식품의 생리활성물질이 초대배양 신경세포에 미치는 영향

① 초대 배양한 신경세포 확립

콩 생리활성물질의 신경세포에 미치는 영향을 알아보기 위하여 생쥐태아(E18)의 뇌에서 해마체를 분리하여 초대배양 신경세포를 배양하였다. 배양된 신경세포는 1주일 정도 지나면 neurite를 형성하며 성숙한 해마신경세포로 분화하게 되며(Fig. 11) 성숙된 신경세포는 glutamate와 같은 흥분독성에 의하여 세포독성을 가지게 되며 이는 해마를 선택적으로 손상시키는 알츠하이머 치매의 좋은 세포배양계 모델로 활용된다(Fig. 12)

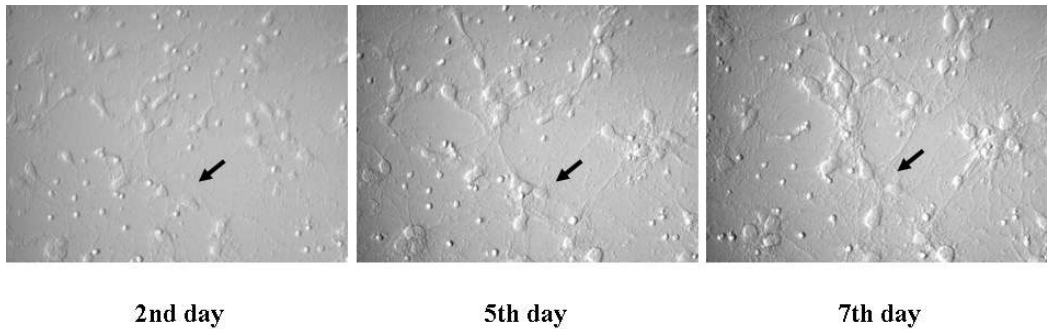


Fig. 11. 생쥐태아의 해마로부터 분리하여 배양된 신경세포의 분화과정 7일째 생리활성 물질에 대한 세포보호 활성을 실험하였음.

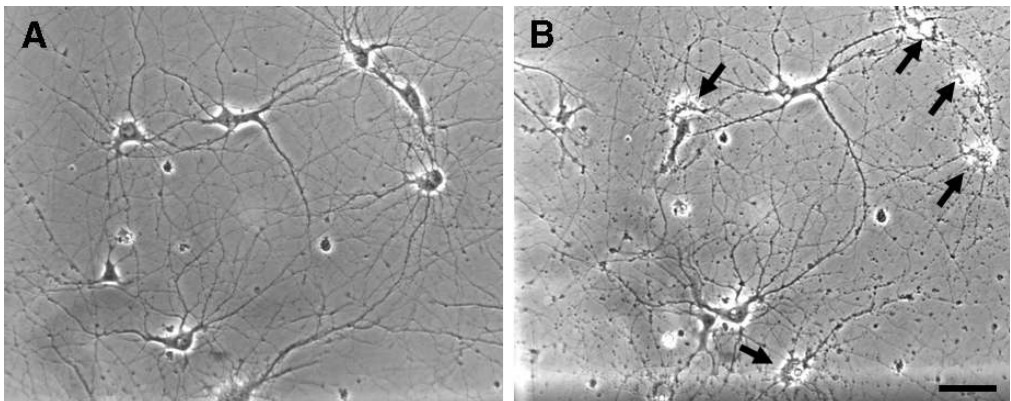


Fig. 12. 생쥐태아의 해마로부터 배양된 해마신경세포 그림(건강한 해마신경세포(A)가 glutamate 처리 후 흥분독성에 의하여 세포사멸하고 있다(B))

② 초대 배양한 신경세포를 이용한 보호활성 검증

신경세포주를 사용하여 여러 가지 신경독성물질에 대하여 콩 발효식품의 신경세포 보호효과를 탐색하기 위하여 우선 콩의 주요 생리활성물질로 잘 알려진 Anthocyanidin 계열 물질에 대한 보호활성을 조사해 보았다. 1차년도에 신경줄기세포 증식의 효과를 보여준 물질(Cyanidin 과 Delphinidin)이 초대배양한 신경세포의 모델에서 흥분독성(glutamate)와 미토콘드리아 독성(3NP)에 대한 신경세포 보호활성을 가지는 지 조사해 보았다 (Fig. 13,14).

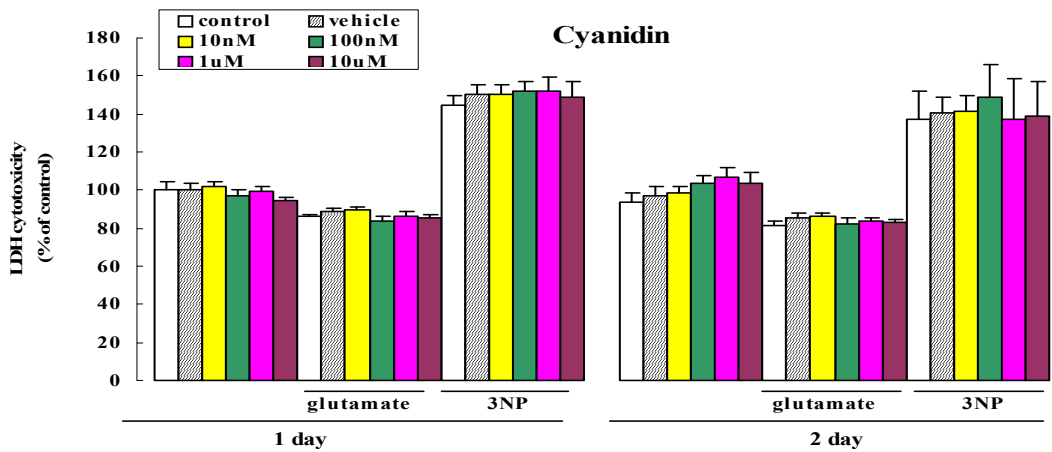


Fig. 13. 초대 배양한 신경세포를 96 well culture plate (1×10^4 cells/ml)에 배양하여 완전한 신경세포가 된 7일 후에 24시간동안 Anthocyanidin 계열 물질인 Cyanidin을 전처리 (pretreatment)한 후, 200uM의 glutamate와 40mM의 3-Nitropropionic acid (3NP)를 처리하한 뒤 1일째, 2일째 세포사멸에 따라 방출되는 LDH의 활성을 측정하였다.

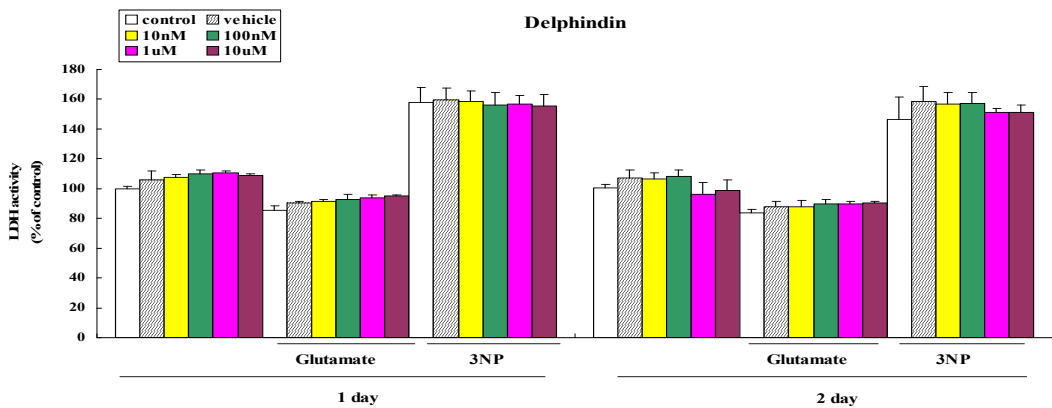


Fig. 14. 초대 배양한 신경세포를 96 well culture plate (1×10^4 cells/ml)에 배양하여 완전한 신경세포가 된 7일 후에 24시간동안 Anthocyanidin 계열 물질인 Delphinidin을 전처리 (pretreatment)한 후, 200uM의 glutamate와 40mM의 3-Nitropropionic acid (3NP)를 처리하한 뒤 1일째, 2일째 세포사멸에 따라 방출되는 LDH의 활성을 측정하였다.

Cell viability는 glutamate와 3-NP를 처리한 후 24h (1day), 48h (2day) time points에서 LDH assay를 통해서 측정하였다. 3-NP에 의해서 LDH release가 시간에 따라 증가하지만 Cyanidin과 Delphinidin이 전 처리 되었을 때 눈에 띄는 세포보호효과를 나타내지는 않았다. 또한 신경세포의 survival은 glutamate와 3-NP를 처리한 후 48h (2day) time points에서 MTT assay를 통해서 확인한 결과(그림9, 그림10) Cyanidin은 glutamate에 의한 흥분독성에 대한 신경세포의 생존이 조금 증가하였으나 Delphinidin의 신경세포 보호활성은 나타나지 않았다. 이러한 연구결과는 신경줄기세포를 사용한 1차년도 실험에서와 같이 콩 생리활성 물질들에 대한 신경보호효과는 그다지 크지 않음을 재확인하였다.

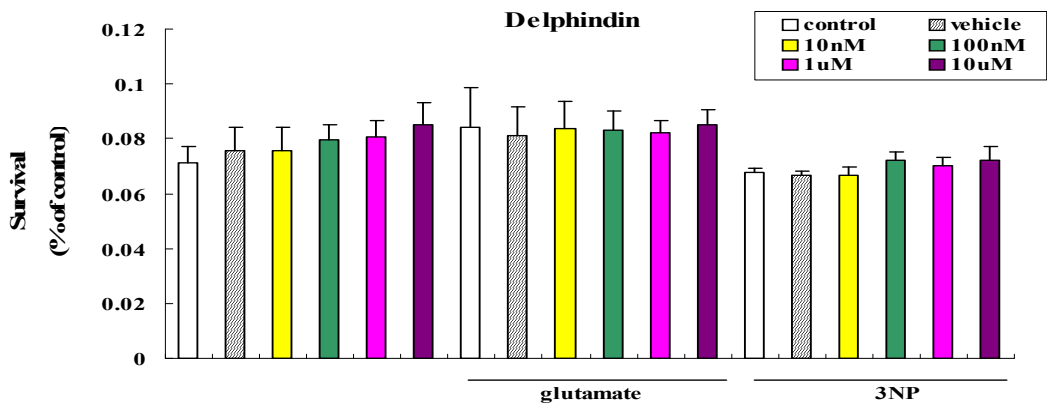


Fig. 15. 초대 배양한 신경세포를 96 well culture plate (1×10^4 cells/ml)에 배양하여 완전한 신경세포가 된 7일 후에 24시간동안 콩 발효 식품인 Delphinidin을 전처리 (pretreatment)한 후, 200uM의 glutamate와 40mM의 3-Nitropropionic acid (3NP)를 처리하였다. 신경세포의 생존은 독성물질 처리 25시간 후 MTT assay를 통해서 정량하였다.

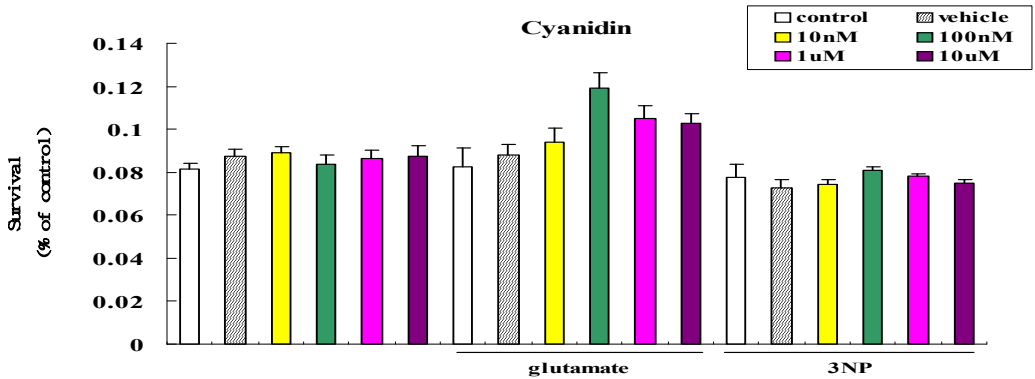
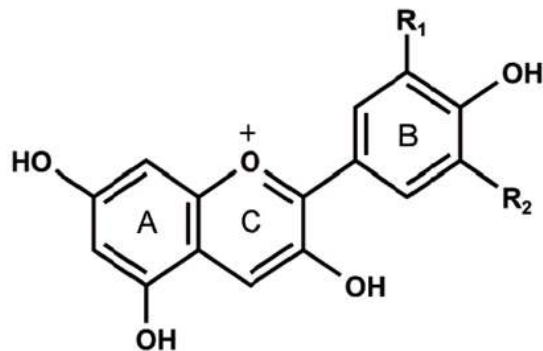


Fig. 16. 초대 배양한 신경세포를 96 well culture plate (1×10^4 cells/ml)에 배양하여 완전한 신경세포가 된 7일 후에 24시간동안 콩 발효 식품인 Cyanidin을 전처리 (pretreatment)한 후, 200uM의 glutamate와 40mM의 3-Nitropropionic acid (3NP)를 처리하였다. 신경세포의 생존은 독성물질 처리 25시간 후 MTT assay를 통해서 정량하였다.

라) 본 연구에 사용된 콩발효식품의 생리활성 물질

① Isoflavone계열 (estradiol은 대조군으로 사용되었음.)

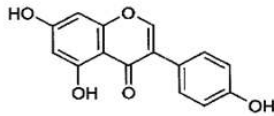
Structure of anthocyanidin



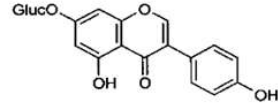
Anthocyanidin	R ₁	R ₂
Delphinidin	OH	OH
Cyanidin	OH	H
Pelargonidin	H	H
Malvidin	OCH ₃	OCH ₃

② Anthocyanidin계열

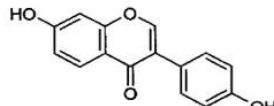
Structure of isoflavone



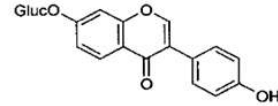
Genistein



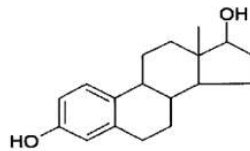
Genistin



Daidzein



Daidzin

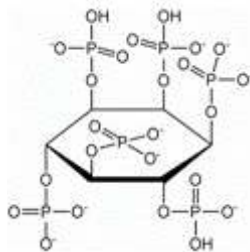


17β-estradiol

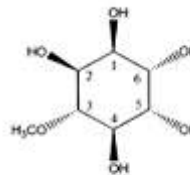
③ 피틴산 계열

Structure of phytic acid, D-pinitol

Phytic acid



D-pinitol



Pinitol

마) 신경줄기세포주를 사용한 in vitro 모델에서 콩성분의 생리활성물질이 신경줄기 세포 증식에 미치는 영향을 조사

① Isoflavone계열이 신경세포주의 증식력 (proliferation index)에 미치는 영향을 조사

다음의 Figure에서 보이는 바와 같이 여러 가지 농도의 Isoflavone계열의 콩성분의 생리활성물질이 신경줄기세포의 증식에 미치는 영향을 24, 48 시간에 걸쳐서 조사해

본 결과 신경줄기세포의 증식에는 큰 영향을 미치지 않는 것처럼 보이며 전체적으로 고농도 (50 μ M 이상)에서는 세포증식을 억제하는 영향이 나타났음. 상경대조군으로 사용된 estradiol의 경우는 고농도에서도 세포증식을 억제하지는 않았음.

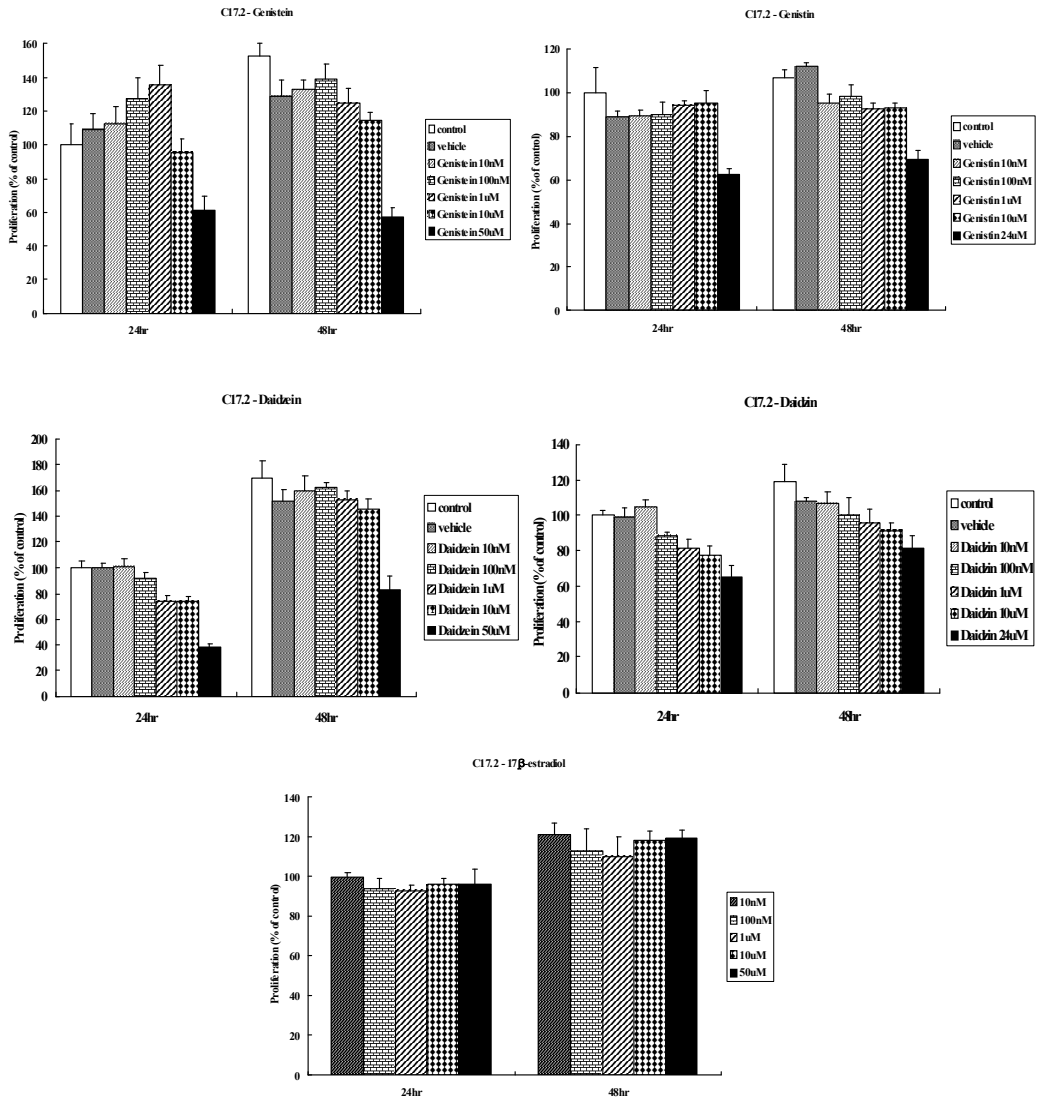


Fig. 17. 신경줄기세포에서 Isoflavone계열의 생리활성물질이 세포증식에 미치는 효과

② Anthocyanidin계열이 신경세포주의 증식력 (proliferation index)에 미치는 영향을 조사

이전의 초기 예비연구에서 Anthocyanidin 계열의 물질들에 대한 신경줄기세포의 증식에 미치는 영향 연구에서 4종의 물질 중에서 Delphinidin (A)는 농도 의존적으로 신경줄기세포의 증식에 영향을 주고 고농도에서는 큰 영향을 미치지 않았으며 Cyanidin (B)과 Pelargonidin (C)의 경우는 여러 농도에 걸쳐서 세포증식의 효과를 보였다. 하지만 Malvidin (D)의 경우에는 세포증식의 효과가 나타나지 않았다.

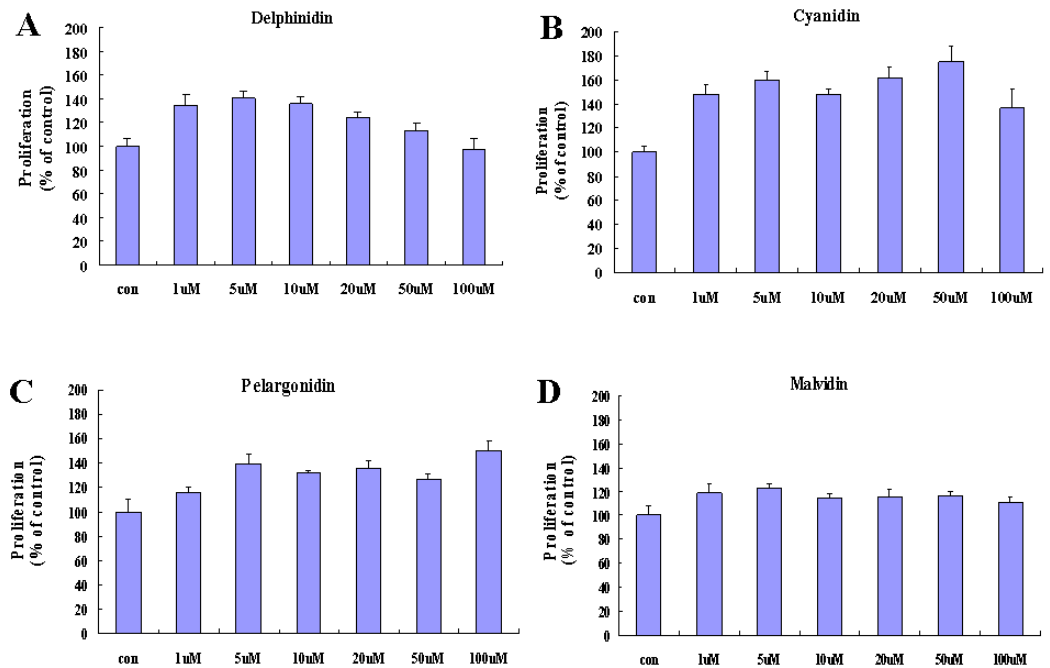


Fig. 18. 신경줄기세포에서 Anthocyanidin 계열 물질의 세포증식에 미치는 효과

따라서 이러한 신경줄기세포 증식 증진의 효과를 면밀하게 재검증하기 위하여 초기 연구에서 효능이 있었던 Delphinidin과 Cyanidin이 신경줄기세포의 증식에 미치는 영향을 24, 48, 72 시간에 걸쳐서 면밀히 조사해 보았으나 신경줄기세포의 증식에 유의성 있는 영향을 미치지 않았으며 isoflavone계열과 달리 세포독성도 관측되지 않았다.

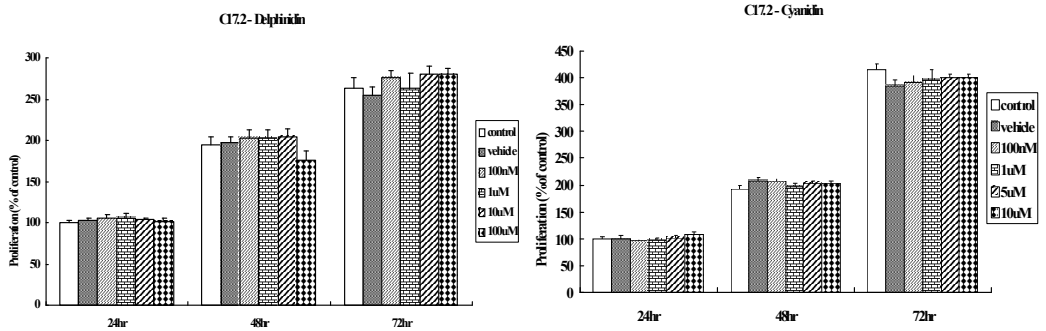


Fig. 19. 신경줄기세포에서 Delphinidin과 Cyanidin이 세포증식에 미치는 효과

③ 피틴산 계열과 soy사포닌이 신경세포주의 증식력 (proliferation index)에 미치는 영향을 조사

다음에서 보이는 바와 같이 여러 가지 농도의 피틴산계열의 콩성분의 생리활성물질이 신경줄기세포의 증식에 미치는 영향을 24, 48 시간에 걸쳐서 조사해 본 결과 신경줄기세포의 증식에는 큰 영향을 미치지 않았으며 고농도(50 μ M)에서도 세포증식을 억제하지 않았음. soy사포닌 역시 큰 증식 효과는 나타나지 않았으며 오히려 농도 의존적으로 증식을 억제하는 경향을 보였음. 이러한 연구결과는 soy사포닌의 기존의 알려진 항암효과에 좀 더 부합한다고 볼 수 있으나 신경줄기세포의 증식에는 큰 영향을 보이진 않았음을 시사한다.

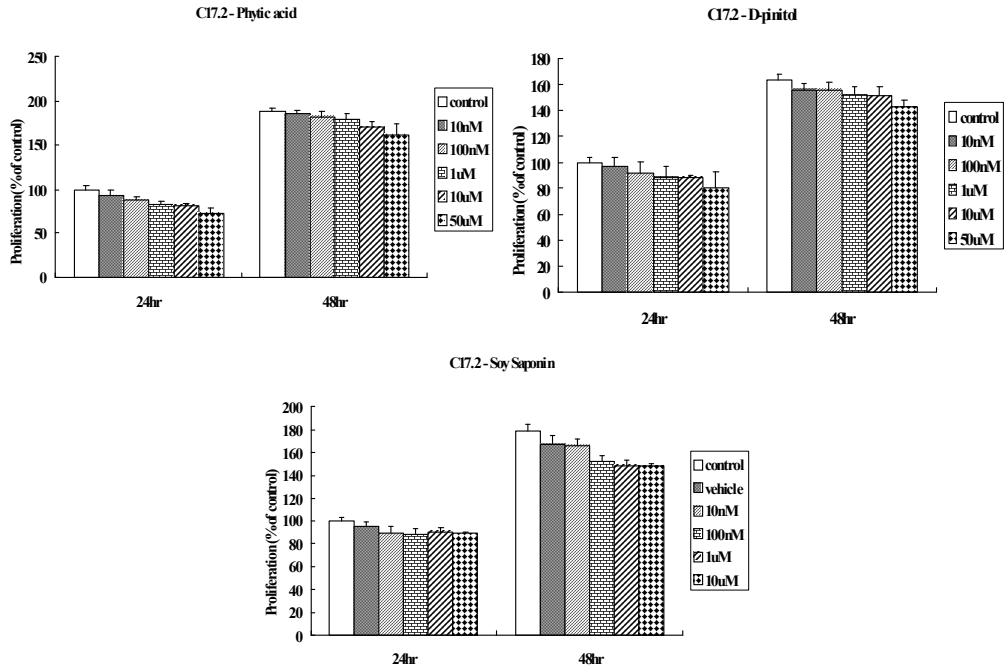


Fig. 20. 신경줄기세포에서 피틴산 계열의 생리활성물질과 soy사포닌이 세포증식에 미치는 효과

(바) 콩발효식품의 생리활성물질이 초대배양 신경세포에 미치는 영향

① 초대 배양한 신경세포 확립

콩 생리활성물질의 신경세포에 미치는 영향을 알아보기 위하여 생쥐태아(E18)의 뇌에서 해마체를 분리하여 초대배양 신경세포를 배양하였다. 배양된 신경세포는 1주일 정도 지나면 neurite를 형성하며 성숙한 해마신경세포로 분화하게 되며(그림5) 성숙된 신경세포는 glutamate와 같은 흥분독성에 의하여 세포독성을 가지게 되며 이는 해마를 선택적으로 손상시키는 알츠하이머 치매의 좋은 세포배양계 모델로 활용된다 (Fig. 21)

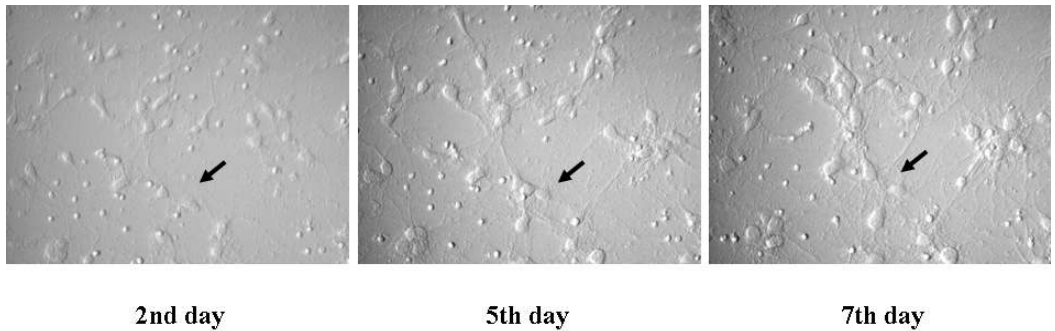


Fig. 21. 생쥐태아의 해마로부터 분리하여 배양된 신경세포의 분화과정 7일째 생리활성 물질에 대한 세포보호 활성을 실험하였음.

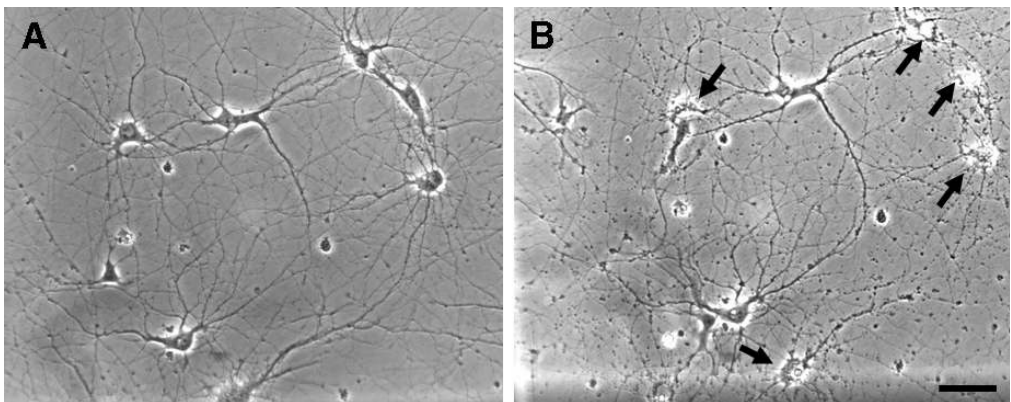


Fig. 22. 생쥐태아의 해마로부터 배양된 해마신경세포 그림(건강한 해마신경세포(A)가 glutamate 처리 후 흥분독성에 의하여 세포사멸하고 있다(B))

② 초대 배양한 신경세포를 이용한 보호활성 검증

신경세포주를 사용하여 여러 가지 신경독성물질에 대하여 콩 발효식품의 신경세포 보호효과를 탐색하기 위하여 우선 콩의 주요 생리활성물질로 잘 알려진 Anthocyanidin 계열 물질에 대한 보호활성을 조사해 보았다. 1차년도에 신경줄기세포 증식의 효과를 보여준 물질(Cyanidin 과 Delphinidin)이 초대배양한 신경세포의 모델에서 흥분독성(glutamate)와 미토콘드리아 독성(3NP)에 대한 신경세포 보호활성

을 가지는 지 조사해 보았다(Fig. 23,24).

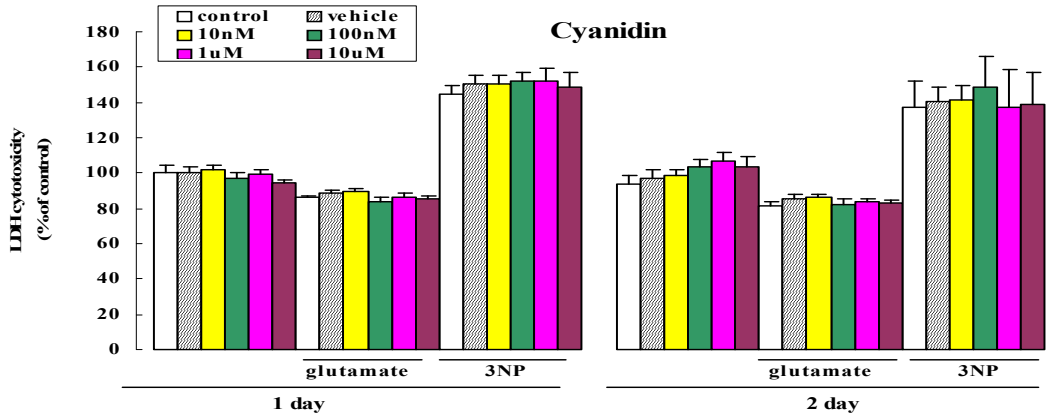


Fig. 23. 초대 배양한 신경세포를 96 well culture plate (1×10^4 cells/ml)에 배양하여 완전한 신경세포가 된 7일 후에 24시간동안 Anthocyanidin 계열 물질인 Cyanidin을 전처리 (pretreatment)한 후, 200uM의 glutamate와 40mM의 3-Nitropropionic acid (3NP)를 처리하한 뒤 1일째, 2일째 세포사멸에 따라 방출 되는 LDH의 활성을 측정하였다.

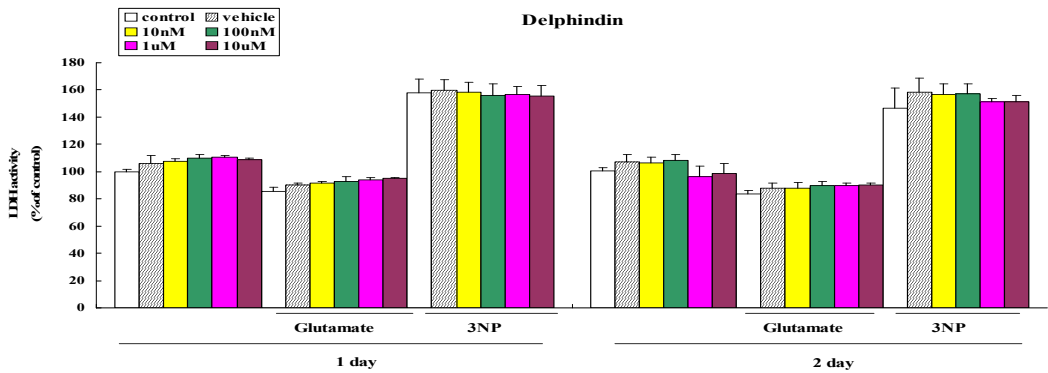


Fig. 24. 초대 배양한 신경세포를 96 well culture plate (1×10^4 cells/ml)에 배양하여 완전한 신경세포가 된 7일 후에 24시간동안 Anthocyanidin 계열 물질인 Delphinidin을 전처리 (pretreatment)한 후, 200uM의 glutamate와 40mM의 3-Nitropropionic acid (3NP)를 처리하한 뒤 1일째, 2일째 세포사멸에 따라 방출 되는 LDH의 활성을 측정하였다.

Cell viability는 glutamate와 3-NP를 처리한 후 24h (1day), 48h (2day) time points에서 LDH assay를 통해서 측정하였다. 3-NP에 의해서 LDH release가 시간에 따라 증가하지만 Cyanidin과 Delphinidin이 전 처리 되었을 때 눈에 띄는 세포보호효과를 나타내지는 않았다. 또한 신경세포의 survival은 glutamate와 3-NP를 처리한 후 48h (2day) time points에서 MTT assay를 통해서 확인한 결과(Fig. 26, 27) Cyanidin은 glutamate에 의한 흥분독성에 대한 신경세포의 생존이 조금 증가하였으나 Delphinidin의 신경세포 보호활성은 나타나지 않았다. 이러한 연구결과는 신경줄기세포를 사용한 1차년도 실험에서와 같이 콩 생리활성 물질들에 대한 신경보호효과는 그다지 크지 않음을 재확인하였다.

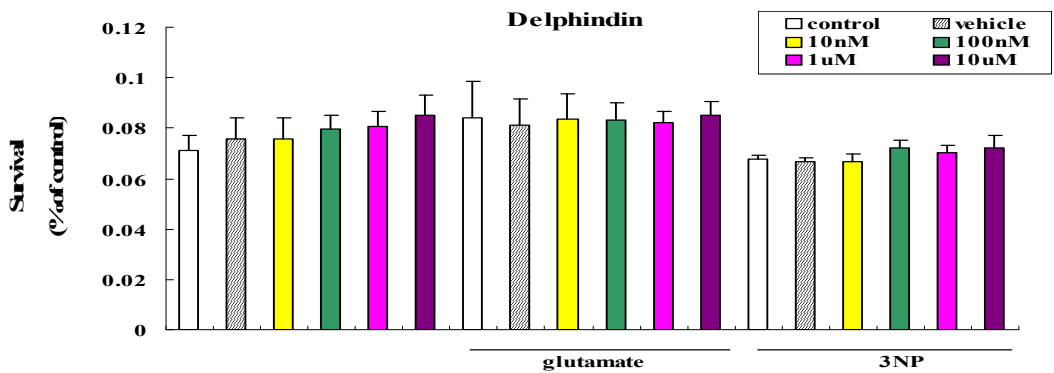


Fig. 25. 초대 배양한 신경세포를 96 well culture plate (1×10^4 cells/ml)에 배양하여 완전한 신경세포가 된 7일 후에 24시간동안 콩 발효 식품인 Delphinidin을 전처리 (pretreatment)한 후, 200uM의 glutamate와 40mM의 3-Nitropropionic acid (3NP)를 처리하였다. 신경세포의 생존은 독성물질 처리 25시간 후 MTT assay를 통해서 정량하였다.

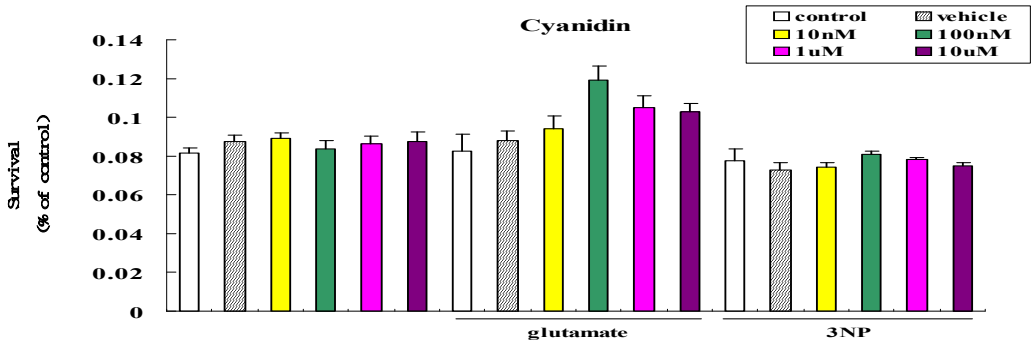


Fig. 26. 초대 배양한 신경세포를 96 well culture plate (1×10^4 cells/ml)에 배양하여 완전한 신경세포가 된 7일 후에 24시간동안 콩 발효 식품인 Cyanidin을 전처리 (pretreatment)한 후, 200uM의 glutamate와 40mM의 3-Nitropropionic acid (3NP)를 처리하였다. 신경세포의 생존은 독성물질 처리 25시간 후 MTT assay를 통해서 정량하였다.

(사) Interferon- γ 의 신경줄기세포의 분화에 미치는 영향 연구

본 연구과제 1차년도 신경줄기세포의 분화법 확립하는 단계에서 proinflammatory cytokine인 interferon- γ 가 신경세포의 분화를 촉진한다는 연구결과를 도출해 낼 수 있었으며 이러한 연구결과를 Neurochemical Research (SCI, IF: 2.187)에 발표하였음. 이러한 연구결과는 향후 본 연구과제를 수행하는데 있어서 콩 생리활성물질의 신경줄기세포로부터 신경세포 분화성 연구에 좋은 interferon- γ 가 대조군으로 사용될 수 있을 뿐만 아니라 신경세포의 분화를 촉진하는 수단으로 사용되어 질 수 있으며 관련분자기전 연구 수행에 도움이 될 수 있을 것이다. 본 연구결과는 2007년도 SCI 저널인 Neurochemical Research에 발표하였다 (Fig. 28-32)

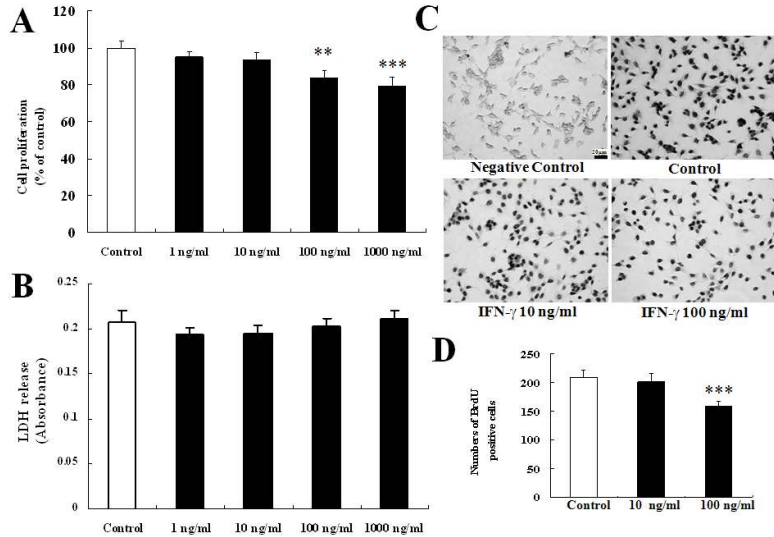


Fig. 27 IFN- γ decreases the proliferation of NPC without affecting cell viability.

C17.2 NPC were seeded into 96-well culture plates and cultured for 24 hr. The cells were pretreated with the indicated concentrations of IFN- γ for 24 hr. (A) Proliferation of the NPC was assayed by MTT analysis. High concentrations of IFN- γ have an inhibitory effect on the proliferation of NPC. (B) Cell viability was measured by LDH release into the culture medium. IFN- γ did not affect the viability of NPC. Values are the mean \pm SE (n=8). (C) 20 μ M BrdU were given to NPCs and then administered with 2 concentrations of IFN- γ for 24 hr. BrdU immunocytochemistry revealed the newly generated cells after BrdU pulse. Note that no single cells were stained with BrdU antibody in absence of BrdU pulse (negativecontrol). Scalebar=20 μ m. (D) BrdU immunostained cells were counted under the microscope field and quantified. Values are the mean \pm SE (n=4). ** P < 0.01, *** P < 0.001, compared with control (ANOVA with Fisher's protected least significant difference (PLSD) procedure).

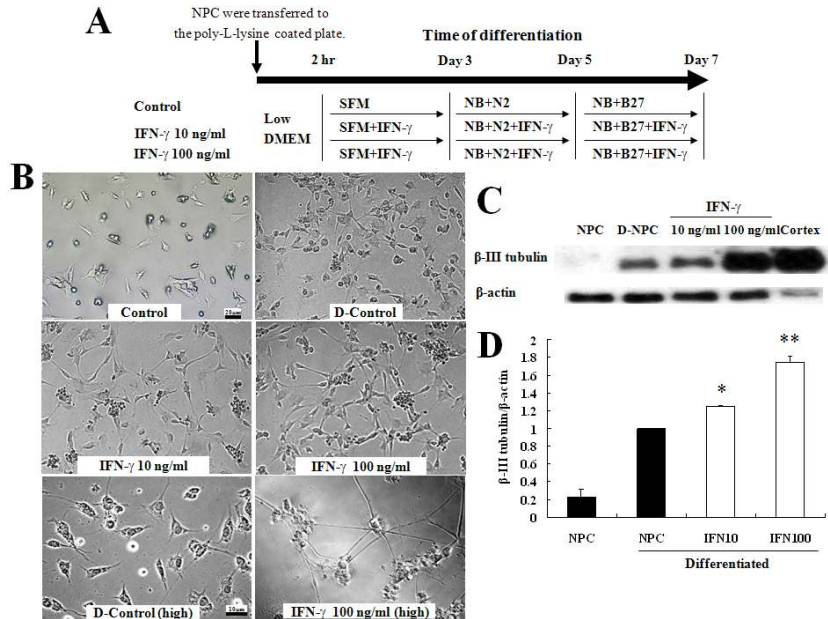


Fig. 28. IFN- γ promotes neuronal differentiation of NPC.

(A) To differentiate NPC into neurons, NPC were placed in the poly L-lysine coated dish for 3 days in serum-free medium. Then medium was replaced with Neurobasal medium supplemented with N2 for 2 days and then B27 for 2 days. The cells were treated with the indicated concentrations of IFN- γ which was present during the entire differentiation process. (B) Cells were photographed with a phase-contrast microscope revealing dense outgrowth of neurites. Scale bar = 20 μ m for Control, D-control, IFN- γ 10 ng/ml, and IFN- γ 100 ng/ml; For the high magnification images (high), Scale bar = 10 μ m. Note that more neurite outgrowth was enhanced by IFN- γ treatment. (C) Increased neuronal differentiation was confirmed by immunoblot analysis. Levels of b-III tubulin was used as a marker of the neuronal phenotype; b-actin was used as a loading control. Protein sample from adult mouse cortex was used as a positive control for b-III tubulin. (D) Values obtained from densitometric analysis (the mean \pm SE from three independent experiments). Note that higher induction was seen in treated with the IFN- γ compared to untreated cells. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with differentiated control (ANOVA with Fisher's PLSD procedure).

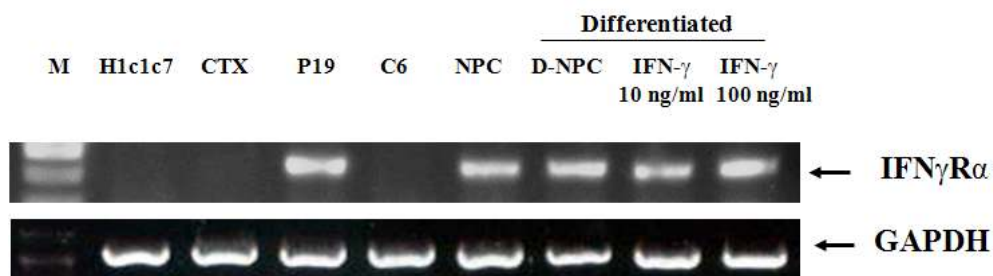


Fig. 29. IFN-g receptor is expressed in NPC.

RT-PCR analysis showed that IFN-g receptor expressed in P19 cells and C17.2 NPC. However, gene transcripts for IFN-g receptor were not detected in mouse hepatoma (H1c1c7), rat astrocytes (CTX), and C6 glioma. Primers were designed to recognize α -subtype of IFN-g receptor (IFN γ R α) in both mice and rats. GAPDH primers were used as control for the efficiency of cDNA synthesis in each sample. Note that mRNA expression levels of IFN-g receptor were not affected by differentiation. (M; size maker, D-NPC; Differentiated NPC)

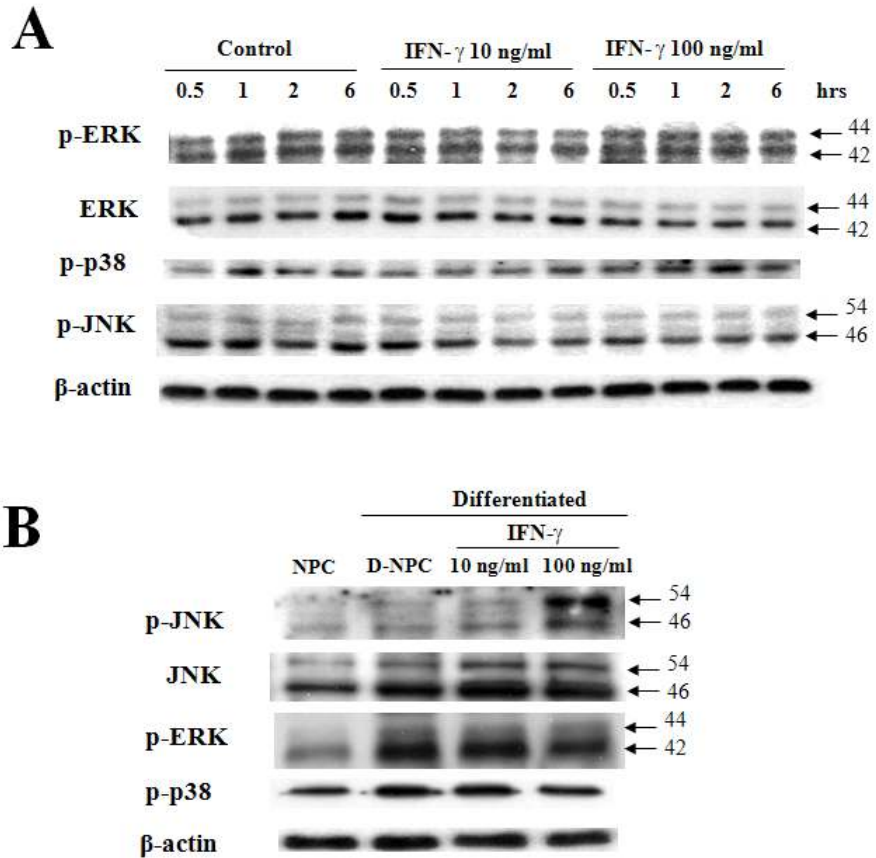


Fig. 30. JNK signaling is activated during the neuronal differentiation and phosphorylation of JNK is enhanced by IFN-g.

Whole cell extracts from treated with the indicated concentration of IFN-g and various stages of proliferation (A) and differentiation (B), were subjected to western blotting with antibodies against phospho-ERK44/42, phospho-JNK54/46, phospho-p38. Levels of β -actin, total ERK 44/42, and total JNK were used as protein loading control. A blot representative of three independent experiments is shown. (D-NPC; Differentiated NPC).

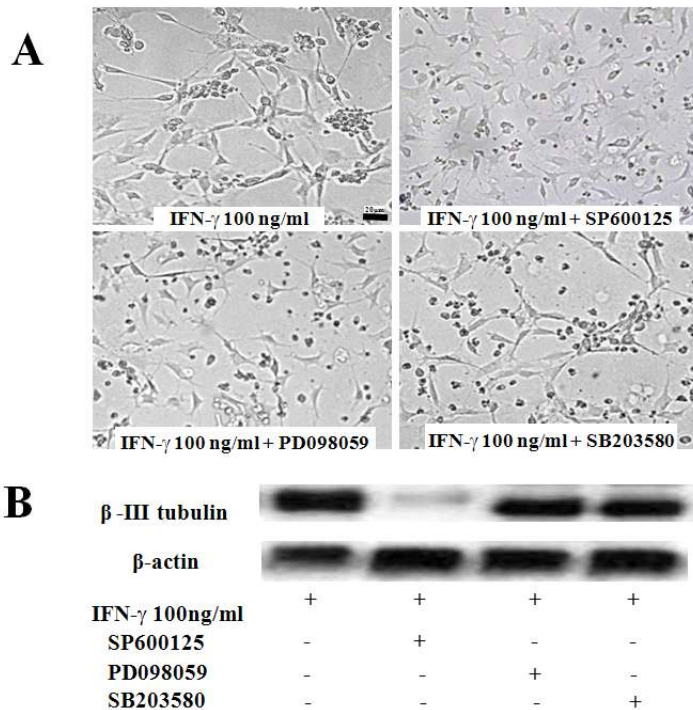


Fig. 31. JNK Inhibitors block the enhancement of the IFN- γ -mediated neuronal differentiation.

MAP kinase inhibitors were added at the third day of the neuronal differentiation process. (A) The photographs shown were taken after the seventh day of differentiation under a phase-contrast microscope to reveal neurite outgrowth, and neuronal differentiation. 10 mM of JNK inhibitor (SP600125) significantly reduced dense outgrowth of neurites. However, 10 mM of p38 inhibitor (SB203580) and 20 mM of ERK inhibitor (PD098059) showed little or inhibitory effect on neuronal differentiation of NPC. Scale bar = 20 μ m. (B) Immunoblot analysis of β -III tubulin confirmed that JNK inhibitor completely blocked the neuronal differentiation mediated by IFN- γ . Protein levels of β -actin were used as loading control.

(아) 동물실험 모델 수립

① 동물실험수행을 위한 콩 발효 생리활성 물질들의 뇌-혈관 관문 투과여부 조사
신경줄기세포에 증식의 효과를 보여준 물질에 대한 동물실험을 통하여 콩 발효 식품에 대한 해마신경재생성 연구를 수행하기 위하여, 콩 발효 생리활성 물질들에 대한 뇌-혈관 관문 (Blood-brain barrier)투과 여부를 preADME program.

(<http://preadmet.bmdrc.org/preadmet/index.php>)을 사용하여 조사해 본 결과 다음과 같은 예상치를 얻었음. 일부 물질들에 대하여 in vivo 동물실험을 진행할 수 있는 가능성이 제시되었다.

(자) 콩발효식품에 의한 비만제어효능이 뇌 조직에 미치는 영향 검증

① 비만 동물실험 모델을 사용하여 생리활성물질에 대한 비만제어효능이 뇌 조직의 신경재생성 관련 성장인자의 발현에 미치는 영향을 검증

흰쥐모델을 사용하여 정상적인 식이군(ND)과 고지방식이(HFD)를 섭취시킨 그룹, 그리고 고지방식사와 콩발효식품을 같이 섭취시킨 후 뇌의 해마를 분리하여 해마신경재생성을 조절하는 신경세포성장인자인 BDNF와 그 수용체(TrkB), migrating neuron의 특이 마커이자 신경줄기세포의 마커인 doublecortin의 발현을 조사한 결과, HFD에서 BDNF와 doublecortin의 발현이 현저하게 감소하는 것이 확인되었다. 또한 BDNF의 high affinity receptor인 TrkB의 경우 active full length receptor (145kDa)와 내부 antagonist인 truncated form (95kDa)으로 존재하는데 HFD에서 truncated form에 비하여 active full length form이 현저하게 감소하는 것이 관측되었다. 하지만 콩 발효식품을 같이 섭취한 흰쥐의 뇌조직에서 BDNF의 발현 및 TrkB의 발현이 회복되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 신경줄기세포의 marker인 doublecortin의 발현도 콩 발효식품을 같이 섭취한 군에서 회복되는 것이 관측되었다. 흥미롭게도 BDNF를 결핍한 생쥐에서 비만이 발생하는 것이 보고되었는데 본 연구결과와 함께 BDNF가 항비만의 좋은 target이 될 수 있음을 시사한다.

(차) 콩발효식품의 생리활성물질에 의한 비만제어 효능이 해마신경재생성에 미치는 영향 검증

①비만동물 실험모델과 콩발효 생리활성 물질의 비만제어 효능

C57/BL6 mice모델을 사용하여 5주령에서 정상적인 식이군(ND)과 고지방식이(HFD: 30%)를 4주간 섭취시킨 후 콩발효식품의 생리활성물질을 정상식이군과 고지방식이군에 혼합하여 3주간 추가로 섭취시키면서 몸무게의 변화를 관측한 결과 고지방식이군은 지속적으로 몸무게가 증가하며 고지방식이군에서 증가되는 몸무게가 콩

발효식품의 생리활성물질의 섭취에 의하여 감소되는 경향을 보였음. 정상식이군(ND)에서는 soy 사포닌에 의한 체중의 감소는 관측되지 않은 반면 흥미롭게도 고농도의 D-pinitol 섭취에 의하여 정상식이군(ND)에서도 체중의 감소가 관측되었음. 이러한 연구결과는 콩발효식품의 생리활성물질 자체로 비만제어 효능이 있음을 시사하며 특히 D-pinitol 자체의 식욕억제 효능이 있음을 시사한다.

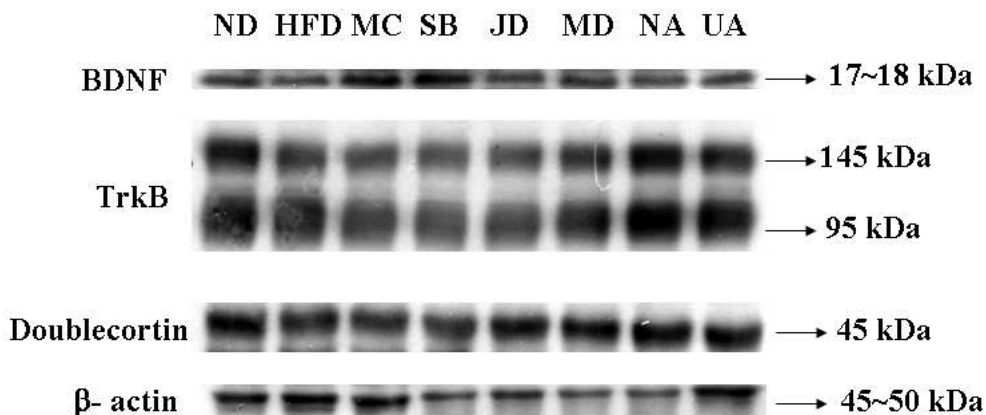


Fig. 32. 콩발효식품을 먹인 흰쥐의 해마체에서 해마신경재생성에 관련된 인자들의 발현을 western blot으로 확인하였다. ND: normal diet, HFD: high fat diet, MC: MOR 청국장, SB: 대두, JD: JM된장, MD: MORD된장, NA: nonanoic acid, UA: undecanoic acid

Body weight

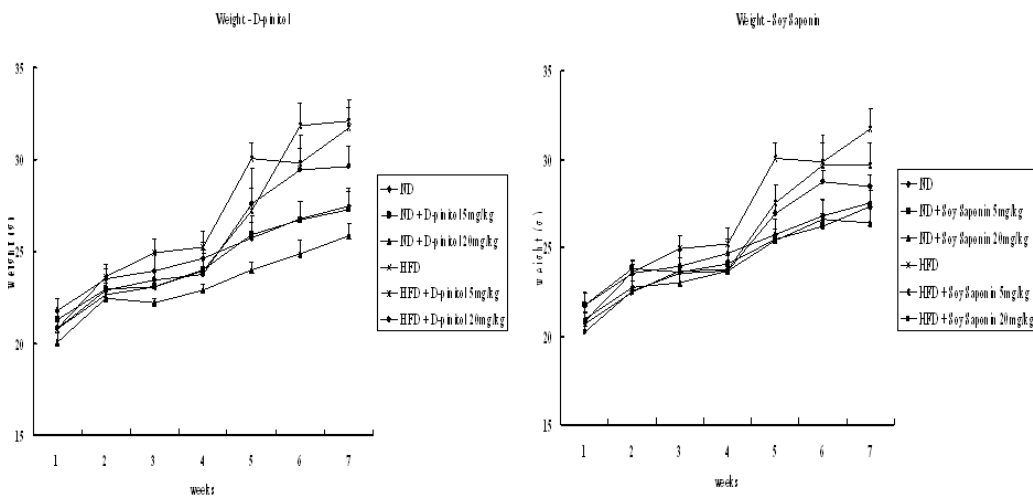


Fig. 33. 콩발효식품의 생리활성물질을 먹인 C57/BL6 mice의 몸무게 변화를 7주간 측정하였음. ND: normal diet, HFD: high fat diet

2) 비만동물 실험모델에서 콩발효 생리활성 물질이 뇌 조직에 미치는 영향 검증

뇌의 해마를 분리하여 해마신경재생성을 조절하는 신경세포생장인자인 BDNF와 그 수용체(TrkB)의 발현을 조사한 결과, 흰쥐의 비만모델과 달리 HFD에서 BDNF의 발현변화는 유의성 있게 감소하지 않았으나 고지방식이군(HFD)에서 콩발효 생리활성 물질섭취군에서 BDNF의 증가가 관측되었다. 흥미롭게도 soy사포닌 섭취된 개체에서는 정상식이군에서도 BDNF발현의 증가가 확인되었다. 또한 BDNF의 high affinity receptor인 TrkB의 경우 유의성있는 발현변화가 나타나지 않았다. 이러한 연구결과는 비만모델에서 종(mice와 rat)의 차이가 있음을 보여준다(Fig 34). 또한 실험모델의 뇌조직을 Nissl 소체 염색법으로 조사해 본 결과 고지방식이와 콩발효 생리활성 물질섭취에 따른 해마신경세포의 특별한 병변이나 뇌조직 이상은 관측되지 않았다(Fig. 35).

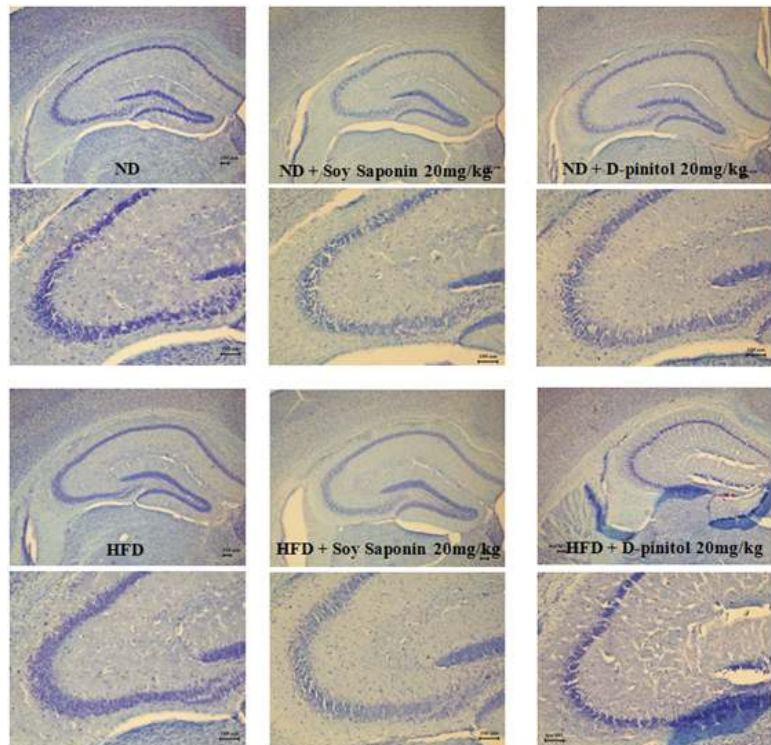


Fig. 34. 콩발효식품의 생리활성물질을 먹인 C57/BL6 mice의 해마체에서 해마 신경재생성에 관련된 인자들의 발현을 western blot으로 확인하였다. ND: normal diet, HFD: high fat diet, S: soy saponin, D: D-pinitol. 5: 5mg/kg, 20: 20mg/kg

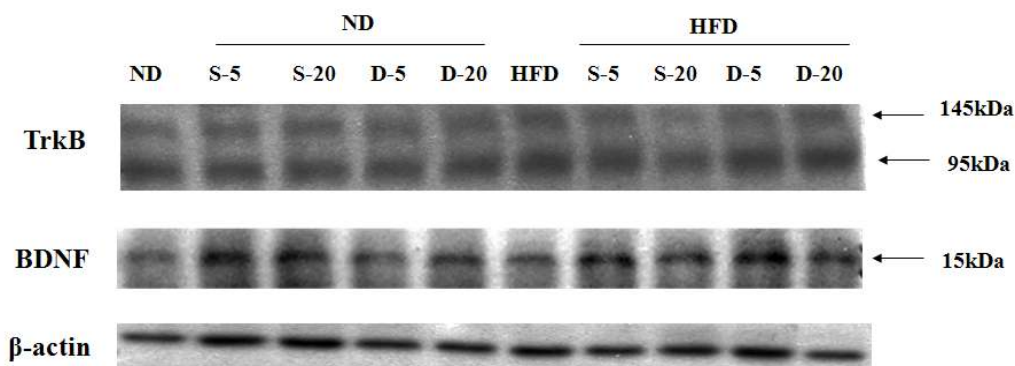


Fig. 35. 콩발효식품의 생리활성물질을 먹인 C57/BL6 mice의 해마체에서 Nissl 소체 염색법 ND: normal diet, HFD: high fat diet

3) 비만동물 실험모델에서 콩발효 생리활성 물질이 해마신경재생성에 미치는 영향 검증

C57/BL6 mice 모델에서 비만과 콩발효식품의 생리활성물질이 해마신경재생성에 미치는 영향을 검증하기 위하여 BrdU면역염색법을 수행하였다. 생쥐모델에 50mg/kg의 농도로 BrdU를 3일간 6회 복강투여하고 익일 흡입마취하고 cardiac perfusion을 통하여 혈액을 제거하고 4% paraformaldehyde로 뇌의 고정화 작업을 수행하였다. 고정화된 뇌를 freezing microtome을 이용하여 6 series로 40 μm의 두께로 coronal section의 뇌절편을 제작하여 BrdU 면역염색법에 사용되었다. 전체 hippocampus를 대표할 수 있는 8-10개의 뇌절편에 대한 BrdU 면역염색법을 수행한 후 해마에 존재하는 성체 신경줄기세포로부터 새로 형성된 세포(BrdU-labeled cell)의 정량적 연구를 수행하였다(Fig. 37). 해마의 dentate gyrus 내에서 새로이 형성된 세포를 정량한 결과 정상식이군(ND)에 비해 고지방식이군(HFD)에서 새로 형성된 BrdU-positive 세포의 수가 유의성 있게 감소하였다. 하지만 soy 사포닌이나 D-pinitol 섭취에 의하여 신경재생성이 회복되지 않았으며 더욱이 soy 사포닌 섭취군의 경우 ND에서도 유의성있는 감소(#)가 관측되었는데 이러한 연구결과는 앞서의 세포배양계 실험결과와 부합된다. 이러한 연구결과는 비만 자체가 해마신경재생성에 영향을 미칠 수 있음을 암시한다.

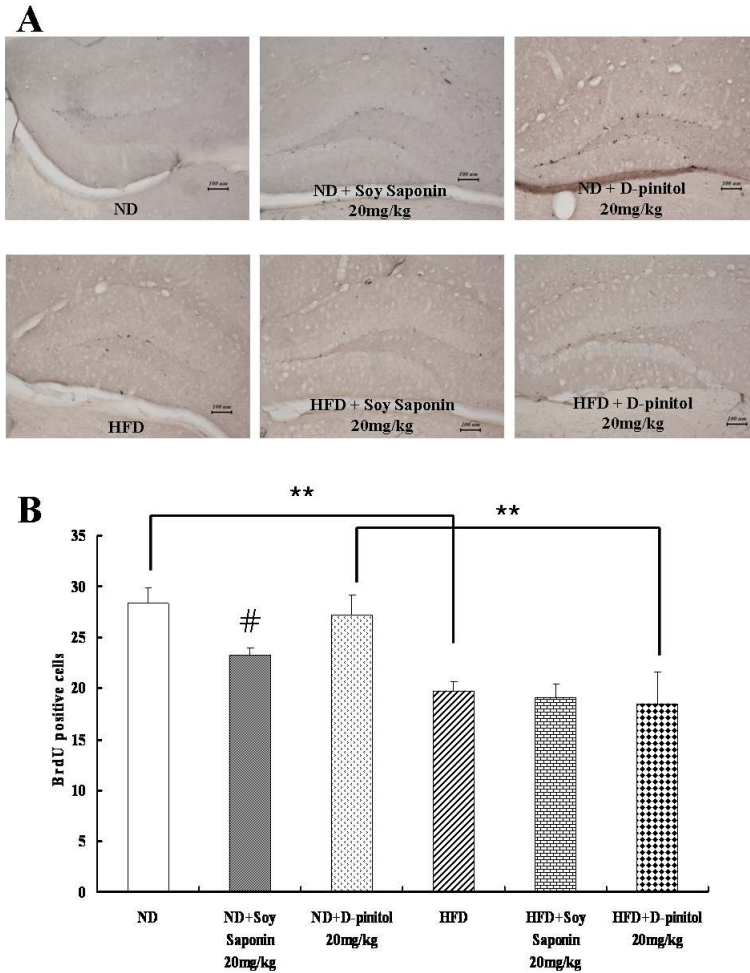


Fig. 37. 콩발효식품의 생리활성물질 섭취한 생쥐의 뇌를 perfusion 후 적출, microtome을 이용하여 절단, BrdU immunostaining을 시행한 결과. (A) Bright-field image로 BrdU-labeled cell이 염색된 부분이 해마의 dentate gyrus에 특이적으로 나타나며 이는 BrdU가 투여된 후 성체의 해마에서 새로이 형성된 세포의 존재를 보여준다. (B) 뇌절편당 해마의 dentate gyrus에 존재하는 BrdU-positive 세포의 수를 정량한 결과를 나타낸다. Scale bar : 100 μ m

(카) 개선된 콩발효식품의 해마신경재생성에 미치는 영향 검증

1) 비만동물 실험모델과 검정콩된장의 비만제어 효능

공동연구진의 연구에 따라 검정콩 된장의 항비만 효능의 우수성이 입증됨에 따라 개선된 콩발효식품이 직접적으로 뇌기능성에 미치는 영향을 C57/BL6 mice 모델을 사용하여 확인하였다. 6주령의 mice에 정상적인 식이(ND)와 고지방식이(HFD), 그리고 고지방식이에 5%검정콩 된장이 함유된 식이(검정콩)를 3주간 섭취시키면서 몸무게의 변화를 관측한 결과 고지방식이군은 지속적으로 몸무게가 증가하며 고지방식이군에서 증가되는 몸무게가 고지방식이에 5%검정콩 된장이 함유된 식이(검정콩)군에서는 유의성있게 감소되는 경향을 보였음(Fig 38). 이러한 연구결과는 다른 연구진의 연구결과와 부합하며 검정콩 된장의 항비만 효능을 C57/BL6 mice모델에서도 확인할 수 있었다.

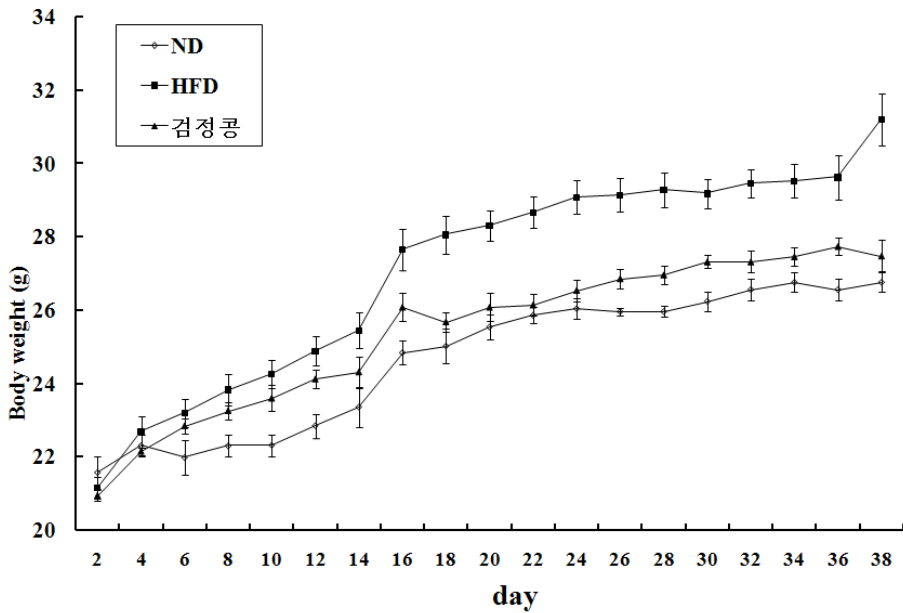


Fig. 38. 콩발효식품의 생리활성물질을 먹인 C57/BL6 mice의 몸무게 변화를 6주간 측정하였음. ND: normal diet, HFD: high fat diet, 검정콩: 고지방식이에 5%검정콩 된장이 함유된 식이

2) 비만동물 실험모델에서 검정콩된장이 뇌 조직에 미치는 영향 검증

식이 섭취 2주째 뇌의 해마를 분리하여 해마신경재생성을 조절하는 신경세포생장인자인 BDNF와 그 수용체(TrkB)의 발현을 조사한 결과, HFD에서 BDNF의 발현변화는 유의성 있게 감소하지 않았으며 검정콩된장에 의한 발현변화도 두드러지게 나타

나진 않았다. 또한 BDNF의 high affinity receptor인 TrkB의 경우 유의성있는 발현 변화가 나타나지 않았으며 이러한 연구결과는 앞서의 연구결과에서와 같이 비만모델에서 종(mice와 rat)의 차이가 있음을 보여준다. 또한 상대적으로 짧은식이섭취 기간에 의하여 유전자 발현 변화에 미치는 영향이 적었을 가능성도 시사한다.

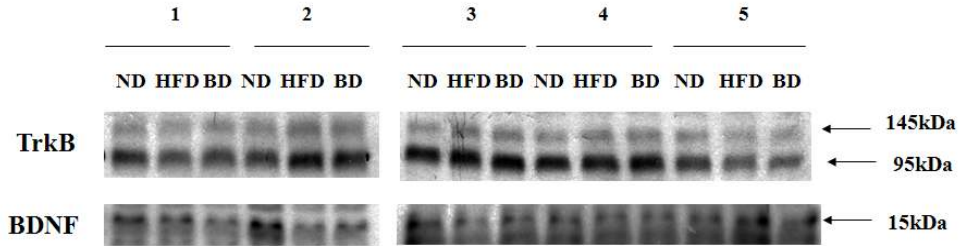


Fig 39. 2주간고지방식이와 검정콩된장 섭취에 의한 C57/BL6 mice의 해마체에서 해마신경재생성에 관련된 인자들의 발현을 western blot으로 확인하였다. ND: normal diet, HFD: high fat diet, BD: HFD+검정콩 된장

3) 비만동물 실험모델에서 검정콩된장이 해마신경재생성에 미치는 영향 검증

C57/BL6 mice 모델에서 비만과 검정콩된장이 해마신경재생성에 미치는 영향을 검증하기 위하여 BrdU면역염색법을 수행하였다. BrdU pulse는 식이섭취 시행전에 50mg/kg의 농도로 BrdU를 3일간 6회 복강투여한 군(survival index)과 희생시키기 전부터 3일간 투여한 군(proliferation index)을 흡입마취하고 cardiac perfusion을 통하여 혈액을 제거하고 4% paraformaldehyde로 뇌의 고정화 작업을 수행하였다. 고정화된 뇌를 freezing microtome을 이용하여 6 series로 40 μm의 두께로 coronal section의 뇌절편을 제작하여 BrdU 면역염색법에 사용되었다. 전체 hippocampus를 대표할 수 있는 8-10개의 뇌절편에 대한 BrdU 면역염색법을 수행한 후 해마에 존재하는 성체 신경줄기세포로부터 새로 형성된 세포(BrdU-labeled cell)의 정량적 연구를 수행하였다(Fig. 40). 해마의 dentate gyrus 내에서 새로이 형성된 세포를 정량한 결과 정상식이군(ND)에 비해 고지방식이군(HFD)에서 새로 형성된 BrdU-positive 세포의 수가 감소하는 경향이 나타났으나 통계적 유의성은 없었다. 이는 앞서의 실험과 달리 상대적으로 짧았던 식이섭취기간(2주)에 기인한다고 사료된다. 또한 식이섭취 시작과 함께 BrdU pulse를 받고 새로이 형성된 세포가 각 식이섭취에 따라 신경재생성에 영향을 받고 살아남은 세포의 생존을 정량한 결과 고지방식이군에서 유의성 있는 감소가 관측되었다. 하지만 검정콩된장이 함유된 고지방식이 섭취에 의하여 신경재생성이 회복되지 않았다. 이러한 연구결과는 고지방식이에 의하여 해마

에 존재하는 성체신경줄기세포의 증식과 생존과 같은 신경재생성에 영향을 미칠 수 있음을 시사한다. 하지만 콩발효식품에 의하여 이러한 신경재생성의 증진에 대한 근거는 희박하다고 결론내릴 수 있다. 추후 장기 복용에 대한 효능 연구가 수행될 필요성이 있다고 사료된다.

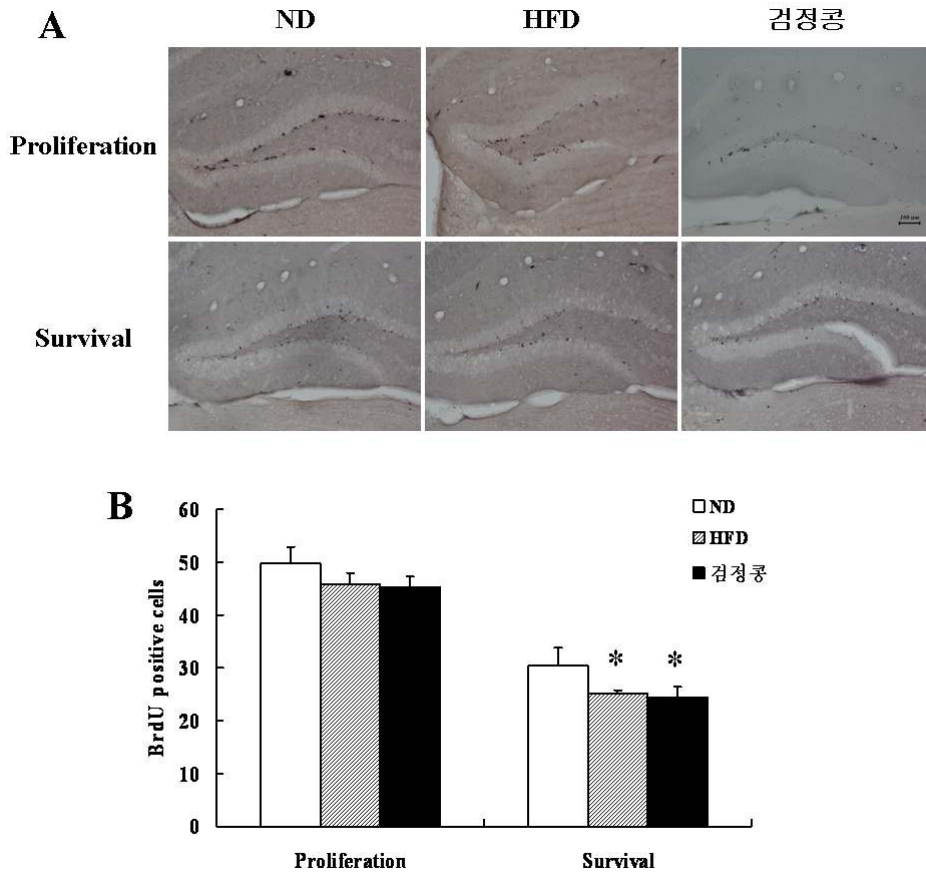


Fig. 40. 고지방식이와 검정콩된장을 섭취한 생쥐의 뇌를 perfusion 후 적출, microtome을 이용하여 절단, BrdU immunostaining을 시행한 결과. (A) Bright-field image로 BrdU-labeled cell이 염색된 부분이 해마의 dentate gyrus에 특이적으로 나타나며 proliferation에서는 식이에 의하여 성체의 해마에서 새로이 형성된 세포의 증식이 얼마나 활발한가를 보여주며 survival에서는 초기 형성된 세포가 2주에 걸쳐 얼마나 살아남았는지를 보여준다. (B) 뇌절편당 해마의 dentate gyrus에 존재하는 BrdU-positive 세포의 수를 정량한 결과를 나타낸다. Scale bar : 100 μ m

4) 행동학적 양식 검사

비만과 검정콩된장이 해마신경재생성에 미치는 영향이 실제 기억과 학습능력에 미치는 영향을 검증하기 위하여 Morris water maze를 수행하여 생쥐모델에서 공간기억력 (spatial memory)을 검증하였다. 동물실험체는 원형의 숨겨진 platform을 가지는 pool에 4방위에 랜덤하게 놓아진 후 숨겨진 platform (고정되어 있음)을 찾아나가는 훈련을 하게 되며 platform을 찾아나가는 동기(motivation)는 물에서의 탈출 (escape)이다. Image Tracking system을 통하여 임무수행 시간, target 방문 회수 등의 실험결과를 수집한 결과, 식이군에 따른 유의성있는 차이가 관측되지 않았으나 훈련기간에 따른 latency의 감소는 관측되었다. 본 행동학적 양식 검사에 사용된 개체의 경우 식이 섭취의 기간이 상대적으로 짧았기 때문에 이후 장기섭취에 따라 공간기억력에 미치는 영향을 확인하는 것이 중요하다고 사료된다. (Fig. 41)

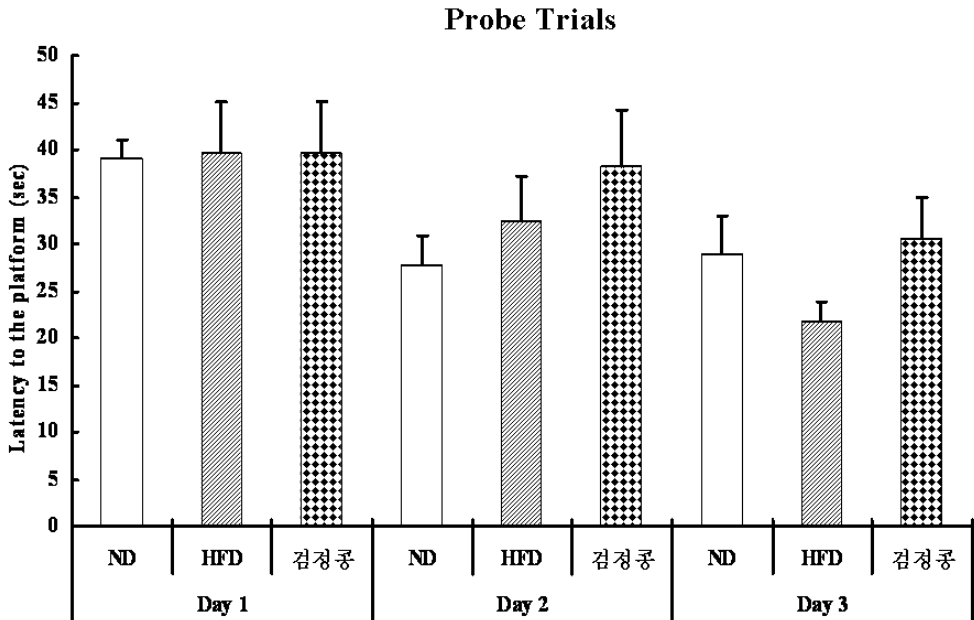


Fig 41. 고지방식이와 검정콩된장을 섭취한 생쥐의 기억과 학습능력에 미치는 영향을 검증하기 위한 probe trial. 각 식이를 섭취한 생쥐가 hidden platform을 찾아가는데 걸리는 시간을 기록하였다. 개체당 하루 6 trials을 수행하였으며 3일째는 5번의 probe trials과 6번째는 platform을 제거하고 수행하였다. 평균값은 각 날짜의 trials에 대한 평균값을 나타내었다.

제 4 장 목표 달성도 및 관련 분야에의 기여도

1. 1차년도 (2005)

목표	연구개발 수행내용	달성도
콩발효식품의 항비만 효과 검증 및 그 성분의 분리	- 콩발효식품(된장, 청국장, 쌈장 등)의 in vitro 및 in vivo 항비만효과 탐색	100 %
	- 활성 콩발효식품의 물질 추출 분획, 정제 및 활성검토	100 %
지방세포 배양계에서의 비만 억제 기전 검토	- 활성분획 성분의 세포배양계를 이용한 비만억제기전 연구 - 콩발효성분 분획 및 성분의 비만관련 유전자 발현 검토	100 %
	- 염증관련지표 및 산화스트레스에 대한 효과 검토	100 %
콩발효식품의 신경세포 보호 및 신경재생성 활성화에 영향을 미치는 생리활성 물질의 탐색	- 콩발효성분으로부터 얻어지는 생리활성물질 효과검토를 위한 in vitro 치매 신경세포 모델의 확립	100 %
	- 신경세포주를 이용한 세포보호활성 검증	100 %
	- 신경 간 세포주 (Neural stem cell)를 사용한 in vitro 모델에서 활성 콩발효성분에 대한 신경재생성 조사	100 %

2. 2차년도 (2006)

목 표	연구개발 수행내용	달 성 도(%)
비만 억제효과가 있는 콩발효식품의 항비만 효과 증진 연구	- 콩 종류(검정콩), 미생물 및 활성물질 첨가의 의한 항비만 효과가 증진된 콩 발효식품의 개발	100 %
	- 항비만 효과 증진 콩발효식품의 <i>in vitro</i> 및 <i>in vivo</i> 항비만 효과 검증	100 %
비만동물모델에서의 활성 콩발효 분획 및 성분의 비만억제 분자기전 규명	활성 콩 발효성분의 비만동물 모델계 에서의 비만억제 분자기전 검토 - 비만관련 유전자 발현 검토	100 %
	- 비만관련 유전자전사 조절 기전 검토	100 %
	- 염증관련지표 (NF- κ B, COX-2, iNOS) 및 산화스트레스에 대한 효과 검토	100 %
동물 실험모델에서 콩발효 성분의 생리활성 물질이 신경세포 재생성에 미치는 영향 연구	- 1차년도에 선정된 활성물질들에 대한 쥐의 해마체의 신경재생성 활성 조사	100 %
	- 콩발효성분의 생리활성물질에 의한 비만제어효능이 뇌 조직에 미치는 영향 검증	100 %

3. 3차년도 (2007)

목 표	연구개발 수행내용	달 성 도(%)
비만억제 효과가 있는 콩 발효식품의 제품화	- 비만억제 콩발효식품의 맛 증진 연구	100 %
	- 다양한 응용제품(분말, 환, 캡슐) 개발	100 %
	- 개발된 제품의 항비만 효과 확인	
콩 발효 식품 성분의 항비만 효과 탐색 및 기전 규명	- 콩 발효 성분의 비만 억제 효과 검토	100 %
	- 콩 발효 성분 분획 및 성분의 비만 억제 분자 기전 규명	100 %
	- 콩 발효 성분 및 활성 증강 성분의 비만 억제 기전 검토	100 %
개선된 콩발효식품의 신경재생성 효능 검증	- 신경재생성 효능 검증의 동물 실험모델의 확립 (해마신경재생성, 행동양식 검사)	100 %
	- 동물 실험모델을 이용하여 개선된 콩 발효식품의 신경재생성의 활성을 검증	100 %

제 5 장 연구 개발 결과의 활용 계획

1. 추가 연구의 필요성과 기대적 측면

가) 기술적 측면

- 장기복용 가능한 비만 및 치매 제어 의약품 및 식품개발이 가능하다.
- 전 세계 및 한국의 비만 및 치매치료제 시장에 진출할 수 있다.
- 한국인 식생활습관에 특이적인 비만 및 치매 제어 물질개발이 가능하다.
- 연 3억 인구의 건강상태를 개선할 수 있으며, 이로 인한 삶의 질 향상을 도모할 수 있다.
- 발굴된 활성물질들을 다양한 식품산업에 응용가능하다.
- 새로운 치매 혹은 비만관련 활성물질 발굴을 통해 세계 특허 취득이 가능하다.
- 활성물질들의 작용기전 규명을 통해 새로운 비만 혹은 치매 관련 유전자를 발굴하고 이의 세계 특허 취득이 가능하다.
- 전통 발효음식을 좋아하지 않는 아동들의 비만을 효과적으로 억제할 수 있는 다양한 건강식품개발이 가능하다.

나) 경제 · 산업적 측면

- 미국에서만 2006년 약 2천억 원대, 2010년에는 8천억 원대인 비만치료제 시장에 참여할 수 있는 활성물질개발이 가능하다.
- 국내뿐만 아니라 수출 가능한 건강식품개발이 가능하므로, 연 1500억 달러에 전 세계 건강식품시장에 쉽게 진출할 수 있어 새로운 부가가치 창출이 가능하다.
- 한정된 콩 발효식품의 산업적 용도를 음료, 차, 식품 및 주류기업과 연계하여 다양한 식음료를 개발함으로써, 산업적 부가가치 증대도 가능하다.
- 치료제 및 건강 식품류의 개발을 통해 우리나라 콩발효식품의 우수성과 함께 농가 소득의 증대를 가져올 수 있다.
- 연간 1조 17억 원이 소요되는 비만관련 손실을 극복할 수 있다.
- 한국에서 판매되는 수입농산물로 제조한 대부분의 콩발효식품을 국산콩 사용을 이끌어냄으로써, 국산농산물의 산업적 이용을 증대시킬 수 있고, 이로 인한 농가이익 증대가 가능하다.

2. 타 연구에의 응용과 활용 방안

우수한 비만억제 및 신경재생 효과를 가지는 후보물질이 도출되면 국내외 제약회사와 연계하여 세계시장에 진출 할 수 있는 새로운 의약품으로 개발시켜 나가고, 이를 통해 국내 의약산업의 발전, 생산성 증대, 노동력 향상뿐만 아니라, 약품의 원재료인 콩류를 재배하는 농가의 수입 증대에 기여하도록 할 것이다. 또한 비만과 비만에 의해 유도되는 여러 가지 질환, 예를들어 최근 많은 문제가 되는 성인병, 소아비만 및 신경계 관련 질환들을 예방, 치료할 수 있게 됨으로써 건강한 사회를 만드는 데 기여할 수 있다. 연구과정에서 확립, 확보된 연구모델은 관련 뇌질환 및 혈관질환 등의 성인병 질환 발병 및 그 분자기전을 이해하는데 활용이 되도록 관련 의약학 분야의 연구자에게 공개하고, 국내 제약업체에 기술을 이전하여 지속적인 신약창출이 가능하도록 할 것이다. 또한 산업적 이용이 가능한 이론 및 응용기술을 갖춘 전문 석·박사 인력배출이 가능함으로써, 관련 연구 및 산업발전에 기여하며, 이공계 실업 문제 해소에 일조할 수 있다.

제 6 장 연구 개발 과정에서 수집한 해외과학기술 정보

콩 발효 식품인 된장은 예로부터 해독, 해열에 사용되어 독벌레나 뱀, 벌 등에 물리거나 쏘여 생기는 독을 풀어주며 덴 곳, 상처난 곳에 발라 치료하는 민간약이었다. 최근 100세 이상의 장수노인을 대상으로 조사한 결과에서도 된장은 장수음식으로 나타났다. 된장은 콩에 들어있는 영양소 및 식물화합물 뿐 아니라 발효과정에서 생기는 생리활성성분에 의해 각종 퇴행성질병 특히 암예방에 중요한 역할을 한다. (최희정;경남 지역 장수 노인의 영양 섭취 형태,2002,한국식품영양학회지)

콩 자체도 항암효과가 있지만 콩의 발효과정을 거치면서 유래된 된장에 항암물질이 더 많다. 콩의 성분 중 항암 효과가 있는 제니스테인이 최근 주목받고 있는데, 콩을 바로 섭취할 때는 이 제니스테인이 항암기능을 발휘하지 못하고 된장이나 청국장으로 발효가 되면서 제니스테인 즉 제니스틴 분자에서 당이 떨어져 나간 아그리콘의 화합물이 된다. (이서래;한국의 발효식품,1992,이화여대출판부)

제니스테인은 암의 초기단계, 진행단계 등 여러 곳에서 암예방 효과를 낸다. 핀란드 대학교 Makela 교수 연구팀의 British journal of cancer지에 2008년 4월에 발표한 논문에 따르면 제니스테인은 유방암 세포에서 초기 세포 분화 단계를 조절하여 암세포 증식을 억제한다는 보고가 있었으며 미국 캘리포니아 대학교 수의과대학 Malid교수 연구팀의 2008년 cancer research지에 제니스테인은 전립선암 세포의 암 억제 유전자인 p12WAF1/CIP1 and p16INK4a를 유도하여 전립선 암 세포 증식 단계를 억제한다는 논문을 발표하였다 그 외에도 암세포가 성장하는 과정을 차단하고 암세포의 자살 및 분화를 유도하며, 동물실험에서도 항암효과가 큰 것으로 나타났다.

또한 제니스테인은 미국 벨츠빌 대학교 식품영양학과 Bathena 교수의 2002년에 American Society for Clinical Nutrition 지에 발표한 논문에 따르면 당뇨와 비만 환자에게 식물성 에스트로겐 성분인 제니스테인을 투여하면 체중 감소 효과와 혈당 하강, 인슐린 하강 효과가 있다고 보고되어 있으며 대만 양밍대학교 의과대학 Chi-Chang Juan교수팀의 2008년 obsity지에 발표한 연구에 따르면 제니스테인은 adipocyte에서 생성되는 NO를 저해한다는 보고가 있었다.

콩 속에 함유된 또 다른 이소플라본인 다이드제인은 The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 에 발표된 최근 연구에 의하면 콩 이소플라본인 다이드제인과 콜레스테롤 수치 사이의 연관성을 제시하였다. 국소빈혈 증후군 평가 연구에 모집된 여성(483명, 체질량 지수: 29.4, 평균연령: 58세, 79%가 월경 후)의 절반이 이 연구를 위해 선발되었는데 Bairey Merz 연구팀은 혈중 다이드제인 수치증가는 트리글리세라이드(TG) 수치감소 및 HDL-C수치증가와 관련이 있다는 것을 발

견했다. Bairey Merz 연구팀은 여성의 심혈관 질병을 줄일 수 있는 방법으로 혈중 다이드제인 수치를 경감시키는 콩과 같은 식품의 식이 섭취를 고려해야 한다고 결론 지었다.

또한 Liu P 등은 심혈관 질환(CHD)을 지닌 노년기 환자의 혈청 염증 유발 요인에 다이드제인이 미치는 효과를 조사하였다. CHD 노인 환자 40명을 각 20명씩 대조군과 다이드제인군으로 나누어 무작위로 선출하였다. 두 그룹 모두 의학치료를 받고 있으며, 다이드제인군에는 6주 동안 다이드제인을 주었다. 안정시 심박수(RHR), 혈압(BP), 공복시 혈당 측정법(FPG), 혈중지방과 hsCRP, IL-6, TNF- α 등의 염증 요인들을 치료 전후로 측정하였다. 그 결과 대조군에서는 치료 후 RHR, BP, hsCRP 수치가 변화되었다. 반면에 다이드제인군은 모든 변수가 감소된 것으로 나타났으며, 대조군과는 분명한 차이를 보였다.

이를 통해 다이드제인이 CHD 노인환자의 혈청 염증 요인을 감소시키는 것을 알 수 있으며, 이것은 이소플라본이 심혈관 질환을 지닌 환자에게 항 염증 효과를 나타낸다는 사실을 증명한다.

2006년도 미국의 저명잡지인 헬스(Health)지에서는 세계 5대 건강식품으로 우리나라 김치와 콩 발효식품을 선정했다 그러나 그동안 연구단체나 학계에서는 이를 뒷받침 할 만한 구체적이고 과학적인 데이터가 없어서 훌륭한 기능성이 포함되어 있음에도 불구하고 전통식품의 우수성을 입증하지 못해 우리식품을 세계화하는데 많은 어려움이 따랐었다.

이번 본 연구팀의 연구결과는 전통발효식품의 우수성과 건강기능성을 과학적으로 밝혀준 것이어서 앞으로 우리나라 전통식품의 세계화를 위한 기술기반에 크게 기여할 것으로 판단되며 이를 산업화 하는 데 매우 귀중한 역할을 할 것으로 보인다. 뿐만 아니라 우리나라 김치, 장류 이외의 또 다른 식품에도 과학화를 추진하는 계기가 돼 우리식품의 세계화를 위한 식품산업발전의 기반기술 촉매제로서 유용하게 활용될 것으로 보이며 그 산업적, 문화적, 경제적 가치가 매우 클 것으로 판단된다.

제 7 장 참고문헌

1. Philip G. Reeves : Components of the AIN-93 Diet as improvements in the AIN-76 diet. *J. Nutr.* 127, 838s-841s (1997)
2. Folch, I. L. and Staley, G. H. : A sample method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J. Biochem*, 223, 498-499 (1956)
3. Busolo, G. and David, H. : Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clin. Chem.*, 19, 476-482 (1973)
4. Yao, T., Sato, M., Kobayashi, Y. and Wasa, T. : Amperometric assays of total and free cholesterol in serum by the combined use of immobilized cholesterol esterases and cholesterol oxidant reactors and peroxidase electrode in a flow injection system. *Anal. Biochem.*, 149, 387-391 (1985)
5. 주종재 : 고지방식을 섭취시킨 흰쥐에서 고추장의 항비만효과. *한국영양학회지*. 33(8), 787-793 (2000)
6. 최선미 : 고춧가루와 김치의 항비만 및 항암효과. 부산대학교 식품영양학과 박사 논문. (2001. 8)
7. 이숙희, 공규리, 정근옥, 박건영 : 고지방식을 섭취한 흰쥐에서 고추장의 체중 및 지방조직과 혈청내의 지질감소효과. *한국식품영양과학회지*. 32(6), 882-886 (2003)
8. 황경미 : 된장의 암예방 및 항암활성 증진 연구 . 부산대학교 식품영양학과 박사 학위논문. 2004.
9. Park, K.Y., Lee, K.B. and Bullerman, L.B. : Aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* and its stability during the manufacture of Korean soy paste (*doenjang*) and soy sauce (*kanjang*) by traditional method. *J. Food Prot.*, 51, 938-945 (1988)
10. 이서래 : 한국의 발효식품, 이화여자대학교 출판부 (1992)
11. 이정민 : 된장 추출물과 linoleic acid의 항돌연변이 및 항암효과. 부산대학교 대학원, 석사학위논문 (1993)
12. Gustafson, D., Rothenberg, E., Blennow, K., Steen, B., and Skoog, I. : An 18-year follow-up of overweight and risk of Alzheimer disease. *Arch. Intern. Med.* 163, 1524-1528 (2003)
13. Nakagawa, T., Ogawa, Y., Ebihara, K., Yamanaka, M., Tsuchida, A., Taiji, M., Noguchi, H., and Nakao, K. : Anti-obesity and anti-diabetic effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent models of leptin resistance. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 27, 557-565 (2003)

14. Lee, J., Duan, W., and Mattson, M.P. : Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice. *J. Neurochem.* 82, 1367–1375 (2002)
15. Eriksson, P.S., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T., Alborn, A.M., Nordborg, C., Peterson, D.A., and Gage, F.H. : Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat. Med.* 4, 1313–1317 (1998)
16. Bruce-Keller, A.J., Umberger, G., McFall, R., and Mattson, M.P. : Food restriction reduces brain damage and improves behavioral outcome following excitotoxic and metabolic insults. *Ann. Neurol.* 45, 8–15 (1999)
17. Lee, J., Duan, W., Long, J.M., Ingram, D.K., and Mattson, M.P. : Dietary restriction increases the number of newly generated neural cells, and induces BDNF expression, in the dentate gyrus of rats. *J. Mol. Neurosci.* 15, 99–108 (2000)
18. Lee, J., Seroogy, K.B., and Mattson, M.P. : Dietary restriction enhances neurotrophin expression and neurogenesis in the hippocampus of adult mice. *J. Neurochem.* 80, 539–547 (2002)
19. Lee, Y.H., Lin, C.H., Hsu, L.W., Hu, S.Y., Hsiao, W.T., and Ho, Y.S. : Roles of ionotropic glutamate receptors in early developing neurons derived from the P19 mouse cell line. *J. Biomed. Sci.* 10, 199–207 (2003)
20. Mattson, M.P. : Impact of dietary restriction on brain aging and neurodegenerative disorders: emerging findings from experimental and epidemiological studies. *Anti-Aging Med.* 2, 331–336 (2000)
21. Peterson, D.A. : Stem cells in brain plasticity and repair. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2, 34–42 (2002)
22. van Praag, H., Schinder, A.F., Christie, B.R., Toni, N., Palmer, T.D., and Gage, F.H. : Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415, 1030–1034 (2002)
23. Nishimura, F., and Murayama, Y. : Periodontal inflammation and insulin resistance—lessons from obesity. *J. Dent. Res.* 80, 1690–1694 (2001)
24. Heilbronn, L., Smith, S.R., and Ravussin, E. : Failure of fat cell proliferation, mitochondrial function and fat oxidation results in ectopic fat storage, insulin resistance and type II diabetes mellitus. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 28, S12–S21 (2004)
25. Youn, B.S., Min, S.S., Park, K.S., Lee, H.W., Yu, R., and Kwon, B.S. : The role

- of adipocytokines in adipocyte-related pathological processes. *Drug News Perspect.* 17, 293-298 (2004)
26. Mora, S., and Pessin, J.E. : An adipocentric view of signaling and intracellular trafficking. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 18, 345-356 (2002)
 27. Faraj, M., Lu, H.L., and Cianflone, K. : Diabetes, lipids, and adipocyte secretagogues. *Biochem. Cell Biol.* 82, 170-190 (2004) 장창문 : 청국장장의 품질 특성, *농촌생활과학*, 17(4), 52-57(1996)
 28. Kune, G.A., Kune, S. and Watson, L.F. : Dietary sodium and potassium in take and colorectal cancer risk. *Nutr. Cancer*, 12, 351-359 (1989)
 29. 한국식품공업협회 : 식품공전, 제 17절 절임채소류, p.325(1997).
 30. Park, S.K. Seo, K.I., Shon, M.Y., Moon, J.S., Lee, Y.H. : Quality characteristics of home - made doenjang, a traditional Korean soybean paste, *Korean J. Soc. Food Cookery Sci.*, 16(2), 121-218 (2000)
 31. 장창문 : 청국장장의 품질향상 및 산업화 연구. 생물공학적 기법에 의한 전통 장류의 제품화 연구 제2단계 결과 보고서, 663-827(1998)
 32. Ha, J.H., Ahn, I.S., Byun, J.M., Do, H.K., Jeong, J.H., Wale, W.J.L., Park, K.Y., Do, M.S. : Effects of CLA on adipocyte secreted proteins in vitro. *J. Food Sci. Nutr.*, 8, 258-259 (2003)
 33. Soxhlet, T. : Assoc. Office. *Agar. Chemists*, 30, 597 (1947)
 34. Folch, I.L. and Staley, G.H. : A sample method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J. Biochem*, 223, 498-499 (1956)
 35. Busolo, G. and David, H. : Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clin. Chem*, 19, 476-482 (1973)
 36. Yao. T., Sato. M., Kobayashi, Y. and Wasa, T. : Amperometric assays of total and free cholesterol in serum by the combined use of immobilized cholesterol esterases and cholesterol oxidant reactors and peroxidase electrode in a flow injection system. *Anal. Biochem*, 149, 387-391 (1985)
 37. Kim, M.H., Im, S.S., Yoo, Y.B., Kim, G.E. and Lee, J.,H. : Antioxidative Materials in Domestic Meju and Doenjang 4. Separation of Phenolic compounds and Their Antioxidative Activity. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 23(5), 792-798 (1994)
 38. Lee, I.K. and Kim, J.G. : Effects of Dietary Supplementation of Korean Soybean Paste(Doen-jang) on the Lipid Metabolism in Rats Fed a High Fat and/or a High Cholesterol Diet. *J. Korean Public Health Assoc.* 28(3) 282-305 (2002)

39. Wang, H. J, Murphy, P. A. : Isoflavone content in commercial soybean foods. *J. Agric. Food Chem.* 42, 1666-1673 (1994)
40. 김창렬 : 울금, 둥글레 및 말토덱스티린을 이용한 건강기능성 식품 제조기술의 개발. 건강 기능식품 원료 성분인정신청 보고서. 식품의약품안전청, pp1-98. (2006).
41. 류가연, 노광현, 류성렬, 양효식 : 울금(*Curucuma longa*)으로부터 유효성분 분리와 생산국 및 지역별 유효성분 함량분석에 따른 커큐민 동정 연구. *Applied Chemistry.* 9, 57-60 (2005).
42. 지형준, 김현수 : 재배 울금의 커큐민 함량. *생약학회지.* 14, 67-69 (1983).
43. Aggarwal, BB, Kumar A and Bhartic AC : Anticancer potential of curcumin : preclinical and clinical studies. *Anticancer Res.* 23, 363-398 (2003).
44. Deshpande UR, Gadre SG, Raste AS, Pillai D, Bhide SV and Samuel AM : Protective effect of turmeric (*Gurcuma longa* L.) extract on carbone tetrachloride induced liver damage in rats. *Indian Journal of Experimental Biology.* 36, 573-577 (1998).
45. Chainani WN : Safety and antiinflammatory activity of curcumin : a component of tumeric(*Curcuma longa*). *J. Altern Complement Med.* 9, 161-168. (2003)
46. Mesa MD, Aguilera CM and Ramirez TCL. : Oral administration of a tumeric extract inhibits erythrocyte and liver microsome membrane oxidation in rabbits fed with an atherogenic diet. *Nutrition* 19 800-804 (2003).
47. Park EJ, Jeon CH, Ko G, Kim J and Shon DH : Protective effect of curcumin in rat liver injury induced by carbon tetrachloride. *J. of Pharmacy and Pharmacology* 52. 437-440 (2000).
48. 강우석, 김정환, 박은주, 윤광로 : 울금 에탄올 추출물의 항산화성 비교. *Korean J. Food Sci. Technol.* 30, 266-271 (1998).
49. Sharma RA, <clelland HR, Hill KA, Ireson CR, Euden SA, Manson MM, Pirmohamed M, Marnett LJ, Gescher AJ and Steward WP : Pharmacodynamic and pharmacokinetic study of oral *Curcuma* extract in patients with colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* 7, 1984-1990 (2001).
50. 김문곤 : 울금의 정유성분이 가토의 간, 현 및 순환계기능에 미치는 영향. 경희대학교학원 논문 (1990).
51. 농촌진흥청 농업과학기술원 농촌자원개발연구소, 강순아 : 마늘의 항암, 항비만 효과 ... 과학적 입증 - 쥐 실험결과 55%서 비만억제 효과, 월간성인병. 228, 5-5 (2005).

52. Nakazawa, Y., H. Kuroda, F. Abe, T. Nishino, M. Otsuki, and I. Umezaki. 1974. Antitumor effect of water-extracts from marine algae(I). *Chemotherapy* 22, 1435-1440.
53. Ito, H. and M. Sugiura : Antitumor polysaccharide fraction from *Sargassum thumbergii*. *Chem. Pharm. Bull.* 24, 114-118 (1976)
54. Yamamoto, I., T. Nagumo, M. Takahasi, M. Fujihara, Y. Suzuki and I. Iizima : Antitumor effect of seaweeds III. Antitumor effects of an extract from *Sargassum Kjellmanianum*. *J. Exp. Med.*, 51, 187-192 (1981)
55. Kim AJ, Yuh CS, Bang IS, Woo KJ. Study on preparation and quality of jelly using mulberry leaf powder. *Kor J Food Cookery Sci.* 22, 56-61 (2006).
56. Kim HB, Kim AJ, Kim SY. The analysis of functional materials in mulberry fruit and feed product development trends. *Food Sci Industry* 36, 49-60 (2003).
57. Basnet P, Kadota S, Terashima S, Simazu M, Namba T. Two new 2-arylbenzofuran derivatives from hypoglycemic activity-bearing fractions of *Morus insignis*. *Chem Pharm Bull* 41, 1238-1243 (1993).
58. Kimura M, Chen F, Nakashimqa N, Kimura I, Asano N, Koya S. Anti hyperglycemic effect of N-containing sugars delived from mulberry leaves in streptozotocin-induced diabetic mice. *J Traditional Medicine* 12, 214-219 (1995).
59. Sung GB. Recent mulberry research trend and direction ofr the improvement. *Korean J Seric Sci.* 40, 180-184 (1998).
60. Yen GC, 旣 SC, Duh PD. Extraction and identification of anti-oxidant components from the leaves of mulberry (*Marus alba* L.). *J Biol Chem.* 261, 12879-12882 (1996).
61. Fujimoto T, Nomura T. Components of root bark of cudrania tricuspidata 3. Isolation and structure studies on the flavonoids. *Planta Med* 51, 190-195 (1985).
62. Kim SH, Kim NJ, Choi JS, Park JC. Determination of flavonoids by HPLC and biological activities from the leaves of *Cudrania tricuspidata* Bureau. *J Korean Soc Food Nutr* 22, 68-72 (1993).
63. Chen F, NaIcastiating N, Kimura I, Kimura M, Asano N, Koya S. Potentiating effects on pilocarpine-induced saliva secretion by extracts and N-containing sugars derived from mulberry leaves in streptozotocin-diabetic mice. *Biol Pharm Bull* 18, 1676-1680 (1995).
64. Park SH, Jang MJ, Hong JH, Rhee SJ, Choi KH and Park MR. Effects of

- muberry leaf extract feeding on lipid status of rats fed high cholesterol diets. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 36(1), 43–50 (2007).
65. Park JK : "Hanbangdaejun", Dongyang Communication Press. Taegu. p134 (1984).
 66. Oh SR : Studies on the physiological functionality of pine–needles and mugwort extracts. *Korean J. Food Sci. Technol.* 27(6), 978–??? (1995).
 67. Lee HG, Chung RW, Cha GH : Originals : Sensory and textural characteristics of Solsulgi using varied levels of pine leave powders and different types of sweeteners. *Korean J. Soc. Food Cookery SCI.* 18(6), 661–(2002).
 68. Kim YS, Shin DH : Volatile components and antibacterial effects of pine needle (*Pinus densiflora* S. and Z.) extracts. *Food Microbiology* 22(1), 37–??? (2005).
 69. Her J : Orient Medicine Handbook, Pubin Press, Seoul (1999).
 70. Jeon HJ, Lee KS, Ahn YJ. Growth–inhibiting effects of constituents of *Pinus densiflora* leaves on human intestinal bacteria. *Food Sci. Biotechnol* 10(4), 403–??? (2001).
 71. Lim YS, Park KN, Bae MJ, Lee SH : Antimicrobial effects of ethanol extracts of *Pinus densiflora* Sieb and Zucc on *Listeria monocytogenes*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 31(2), 333–??? (2002).
 72. Lee JS, Ahn KH, Park KJ : Ameliorative effect of pine needle oil on liver protection and lipid metabolism of alcohol fed rats. *Food Sci. Biotechnol.* 14(1), 99–??? (2005).
 73. Bae KH, Lee BJ, Jang YK, Lee BR, Lee WJ, Chang DS, Moon HS, Paik DI, Kim JB : The effect of mouthrinse products containing sodium fluoride, cetylpyridinium chloride (CPC), pine leaf extracts and green tea extracts on the plaque, gingivitis, dental caries and halitosis. *J. Korean Acad Dent Health* 25(1), 51–??? (2001).
 74. Lee HJ, Cui CB, Choi HT, Kim SH, Harn YA, Lee DS, Harn SS : Biological activities of the Vaporized Liquid of Water–boiled Pine Needle. *Korean J. Food Preserv.* 12(2), 179–???? (2005).
 75. Lee E : Effect of powdered pine needle (*pinus densiflora* seib et Zucc.) on serum and liver lipid composition and antioxidative capacity in rats fed high oxidized fat. *J. Korean Soc Food Nutr.* 32(6), 926–??? (2003).
 76. 전정례, 김향희, 박금순 : 솔잎 분말과 추출물 첨가 국수의 품질특성과 저장성

- Korean *J. Food Cookery SCI.* 21(5), 685–692 (2005).
77. 이은, 최무영 : 솔잎분말이 고 콜레스테롤 급여 흰쥐의 체지방구성과 TBARS량에 미치는 영향. *Korean J. Food SCI. Technol.* 32(5), 1186–1190 (2000).
78. Bruce MS, Jeffery SF. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* 104, 531–543 (2001)
79. Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev* 14, 1293–1307 (2000)
80. Loftus TM, Lane MD. Modulating the transcriptional control of adipogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 7, 603–608 (1997)
81. Latasa MJ, Moon YS, Kim KH, Sul HS. Nutritional regulation of the fatty acid synthase promoter *in vivo*: sterol regulatory element binding protein functions through an upstream region containing a sterol regulatory element. *Proc Natl Acad Sci* 97, 10619–10624 (2000)
82. Lopez JM, Bennett MK, Sanchez HB, Rosenfeld JM, Osborne TE. Sterol regulation of acetyl coenzyme A carboxylase: a mechanism for coordinate control of cellular lipid. *Proc Natl Acad Sci* 93, 1049–1053 (1996)
83. Luong A, Hannah VC, Brown MS, Goldstein JL. Molecular characterization of human acetyl-CoA synthetase, an enzyme regulated by sterol regulatory element-binding proteins. *J Biol Chem* 275, 26458–26466 (2000)
84. Schoonjans K, Watanabe M, Suzuki H, Mahfoudi A, Krey G, Wahli W, Grimaldi P, Staels B, Yamamoto T, Auwerx J. Induction of the acyl-coenzyme A synthetase gene by fibrates and fatty acids is mediated by a peroxisome proliferator response element in the C promoter. *J Biol Chem* 270, 19269–19276 (1995)
85. Ericsson J, Jackson SM, Kim JB, Spiegelman BM, Edwards PA. Identification of glycerol-3-phosphate acyltransferase as an adipocyte determination and differentiation factor 1- and sterol regulatory element-binding protein-responsive gene. *J Biol Chem* 272, 7298–7305 (1997)
86. Cummings DE, Purnell JQ, Frayo RS, Schmidova K, Wisse BE, Weigle DS. A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 50, 1714–1719 (2001)

보완 요구 사항에 대한 조치

보완사항	보완내용
○최종보고서의 규격을 농림기술개발사업 별지 6호 최종보고서양식 (4×6배판(가로 158mm×세로259mm))에 준하여 인쇄 후 2008년 7월 4일 (금)까지 3부 제출할 것	농림기술개발사업 별지 6호 최종보고서양식 (4×6배판(가로 158mm×세로259mm))에 새로이 작성하였음
○ 제품화하기 위해서는 기존의 장류제품과의 차별화 자료를 확보할 필요가 있음	본 과제외의 제품개발의 목적은 장류제품과 같은 일반식품으로 개발이 아니라 비만예방과 노화억제, 신경재생 건강기능성 보조식품을 목적으로 개발되었다. 또한 우리나라의 전통 콩발효식품을 이용함으로써 농가의 소득을 높이고, 부작용을 가지지 않는 건강보조식품을 개발하여 다른 건강보조식품과의 차별성을 가지고, 이에 대한 자료는 연구개발의 필요성에서 다각도로 제시 됨(최종보고서 12-14쪽에 제시함)
○제시된 논문이 연구실적에 포함되기 어려운 부분이 있다고 생각됨	신경줄기세포의 신경세포 분화법을 개선한 연구 논문은 궁극적으로 신경재생성을 증진하고자 하는 본 연구의 목적과 부합한다고 사료됨
○ 된장을 활용하여 제품화하는 경우 환 이외의 제형에 관한 연구가 필요하다고 판단됨	환 제품인 검정 된장환 이외의 과립 분말 형태의 검정된장과립, 검정된장분말을 개발하였고, 비만효능을 높이는 녹차, 마늘이 첨가된 환, 과립, 분말이 함께 개발되었으며, 된장제품 뿐만이 아닌 청국장 제품도 개발됨(최종보고서 94-98쪽에 제시함)
○ 연구과제에서 제시하고 있는 비만과 신경재생효능은 상당히 동떨어진 효능이므로 사업화과정에서는 한쪽으로 효능을 집중하여 제품화하는 것이 필요함	제품화는 신경재생효능 보다는 비만예방과 항노화 효과를 가지는 제품으로써, 1세부과제에서 제품화를 3년차에 시행함 (최종보고서 84-105쪽에 제시함)

○ 된장 제조시 소금 첨가량에 대한 고려 필요	소금첨가량은 보통 전통된장은 18%가 일반적이는데, 본 제품은 비만과 관련 저염화를 위하여 1세부과제 2년차에 표준화하였으며, 된장에 함유된 소금 첨가량에 대한 동물실험을 통한 연구도 제시함(최종보고서 78-83쪽에 제시함)
○ 제품의 고부가가치 구현을 위한 고급 제형화 아이디어 개발 필요	시중에 비만 예방을 위한 약품은 많으나 우리의 식생활에서 꼭 필요한 전통콩발효식품을 이용한 비만예방을 할 수 있는 건강보조식품으로는 처음이라 사료되어 제품의 고부가가치는 그 기능성 증명을 통한 충분한 가치를 가짐. 또한 3년차 제품화 중 타블렛(과립)으로 고급 제형화가 가능하다고 봄(최종보고서 94-98쪽에 제시함)
○ 된장이라는 보편적인 제품을 어떻게 본 연구과제 관련하여 시장성을 확보할 것인지 고민할 필요성 있음	된장이라는 보편적인 제품이지만 새롭게 밝힌 비만과 항노화, 신경재생과 같은 기능성을 토대로한 제품이기애 그 시장성이 충분히 확보된다고 보여지고, 건강보조식품과 전통발효식품의 틈새시장을 공략가능함 (최종보고서 95쪽에 제시함)
○ 울금 된장의 경우 울금 함량에 대한 표준화가 산업적으로 필요할 것 같음	울금의 함량은 본 과제의 3년차 제품화에서 제시하였듯이 1%가 산업적으로 가장 좋으며, 맛과 색을 제품화 단계 즉 환이나 과립제조시 보완만 한다면 충분히 산업적으로 제품화가 가능함(최종보고서 84-86쪽 제시함)
○기존 된장에 재료의 배합을 통한 제품의 기능성적인 측면보다 비만에 적합한 된장발효 방법 등의 가공 번적인 측면에서 연구되는 것이 향후 보다 더 실용성이 높을 것 같음	본 과제는 비만의 기능성을 높이는데 그 목적이 있으나, 1세부 2년차 비만 검정콩 된장의 표준화에서 된장의 발효 방법을 확립 함(최종보고서 65-70쪽 제시함). 또한 그 최종 제조공정을 확립하여 콩알메주 단기발효 단계와 된장 발효숙성 단계로 이루어짐(최종보고서 71쪽 제시함)

2008. 6. 28.

총괄연구책임자 정 해 영 (인)

주 의

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