

발 간 등 록 번 호

11-1543000-001733-01

식용 가능 식물잎으로부터 우수 향당노 천연 신소재 개발 및 제품화 최종보고서

2017. 04. 18.

주관연구기관 / 한국생명공학연구원
협동연구기관 / (주)인섹트바이오텍
경북대학교

농 립 축 산 식 품 부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “식용 가능 식물잎으로부터 우수 향당노 천연 신소재 개발 및 제품화”(개발기간 : 2013.12.20~ 2016.12.19)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2017. 04. 18.

주관연구기관명 : 한국생명공학연구원 (대표자) 장규태 (인)

협동연구기관명 : (주)인섹트바이오텍 (대표자) 조영진 (인)

협동연구기관명 : 경북대학교 산학협력단장 (대표자) 황의욱 (인)

주관연구책임자 : 정 태 숙

협동연구책임자 : 신 동 하

협동연구책임자 : 최 명 숙

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	313044-3	해당단계 연구기간	2013. 12. 20 ~ 2014. 12. 19	단계구분	1 / 1 (해당단계)/ (총 단계)
연구사업명	중사업명	고부가가치식품기술개발사업			
	세부사업명				
연구과제명	대과제명				
	세부과제명	식용 가능 식물잎으로부터 우수 항당뇨 천연 신소재 개발 및 제품화			
연구책임자	정태숙	해당단계 참여 연구원 수	총: 30명 내부: 13명 외부: 17명	해당단계 연구개발비	정부: 900,000천원 민간: 300,000천원 계: 1,200,000천원
		총연구기간 참여 연구원 수	총: 30명 내부: 13명 외부: 17명	총연구개발비	정부: 900,000천원 민간: 300,000천원 계: 1,200,000천원
연구기관명 및 소속부서명	한국생명공학연구원 산업바이오소재연구센터			참여기업명: (주)인섹트바이오텍	
위탁연구	연구기관명: 해당사항 없음			연구책임자: 해당사항 없음	

요약: 혈당 개선 기능성물질로 대두콩잎에는 캄페롤배당체가 많이 함유되어 있는 반면에 검정콩잎(서목태잎, 서리태잎)에는 퀘르세틴배당체와 이소람네티딘배당체가 많이 함유되어 있음을 처음으로 규명하였다. 또한 플라보놀배당체 고함유 콩잎추출물은 비만/당뇨로 인해 기능이 약해진 췌장 세포를 회복시키고 간의 지방 축적을 억제함으로써 인슐린 민감성 개선을 통해 당뇨 예방 효능을 나타내는 것을 확인하였다. 동물실험뿐만 아니라 인체시험을 통해 대사증후군 개선 효능을 입증함으로써 다수의 국제저널에 그 결과를 게재하여 콩잎으로부터 혈당 개선 식의약 소재 개발에 성공하였다. 또한 관련 효능에 대한 대두콩잎의 국내/미국특허 등록, 검정콩잎의 국내/PCT특허 출원 완료로 산업재산권을 확보하였으며, 대두콩 3품종 및 검정콩(서리태), 서목태를 농가에서 재배 및 시기별로 콩잎을 수확하여 주정농도, 주정추출물의 회수율, 유효성분의 함량, 항당뇨 생리활성 등을 종합하여 콩잎 수확시기 및 추출물의 대량생산 공정을 확립하였다. 또한 대량생산 및 제품의 품질관리를 위해 HPLC 분석을 통한 추출물의 표준화 방법 확립 및 인체시험을 통해 제품 유효농도의 기준을 제시하였다. 참여기업에서는 혈당 조절 건강기능식품인 ‘인슈파워’를 출시하여 사업화를 실현하고 있으며, 콩잎 추출물의 혈당 개선 개별인정형 기능성 원료 인정 신청을 추진하고 있다.

보고서 면수:
325

요 약 문

		코드번호	D-01			
연구의 목적 및 내용	콩잎로부터 항당뇨 기능이 탁월한 다당류 식품 신소재 개발을 위해 다당류의 항당뇨 기능성 분석, 분자구조와 항당뇨 기작과의 연관성 규명 및 인체시험을 통한 효능을 검증하고 당노식 소재로 활용 가능한 제형으로서 상품화를 실현함					
연구개발성과	<p>제1세부: 우수 항당뇨 천연 신소재 탐색, 특성분석 및 기작 규명</p> <ul style="list-style-type: none"> - 콩잎의 품종 (ESL, ESL), 수확시기, 추출방법에 따른 기능성 콩잎추출물 (PSH) 조제의 표준화 방법 확립, 지표성분(KG7, QG5) 선정 및 함량 분석 - 13개의 플라보놀배당체 분리 및 in vitro, 세포계 항당뇨, 항비만 효능 도출 - 다당류고함유(PSH) 소재(대두콩잎 70% EtOH 추출물(70ESL), 검정콩잎 70% EtOH 추출물(70EBL)의 혈당 강하 및 체지방 조절에 대한 in vitro, 세포계, 동물실험에서의 효능 검증 - PSH 소재의 혈당 강하 및 체지방 조절에 대한 생화학적, 분자생물학적 작용기작 규명 (70ESL은 췌장 베타세포기능 개선, 70EBL은 아디포넥틴에 의한 간조직 기능 개선) - PSH 소재(70ESL)와 기존의 혈당 개선 다당류 기능성 소재(귀리식이섬유)의 병행 투여에 의한 상승 효과 검증 - 개별인정 기능성원료 신청을 위한 자료 확보 <p>제1협동: 항당뇨 천연 신소재의 대량생산 체계 구축 및 당노식 제형 상품화</p> <ul style="list-style-type: none"> - 콩의 품종, 콩잎 수확시기, 유효성분의 함량 및 콩잎 생산량과 경제성을 고려하여 기능성소재 원물의 우수 품종으로 BB와 GH를 선별 - 콩잎 대량생산의 4년 평균 수확량은 0.091 ~ 0.103 kg/m² 이며, 높은 생산성을 보이는 GH는 생육환경(일기)에 영향을 크게 받는 반면에 BB는 안정적으로 생산성을 나타냄. 콩잎의 수확 시기는 생산량과 유효성분의 함량을 감안하여 파종 후 100~110일로 결정함 - GH와 BB 콩잎의 대량 공정 개발을 통해 기능성소재인 PSH 추출물의 원물대비 회수량은 25~29% 이었음. 인체적용시험을 위한 시제품을 개발하였으며, PSH는 잔류농약검사와 영양성분 검사 등을 통해 잔류농약 불검출과 관련 영양성분 자료 확보 - 혈당 조절 효능의 극대화를 위해 관련 조사 자료를 바탕으로 기능성 성분 표시 재료와 부재료와의 최적 배합 및 설정 연구 - PSH의 혈당 개선 기능성 활용 및 제품화를 위한 식품인허가를 사항을 확보하여 '인슈 파워' 브랜드의 건강기능식품 개발 <p>제2협동: 항당뇨 천연 신소재(PSH)의 인체적용 효능 평가</p> <ul style="list-style-type: none"> - 과제중 및 비만인을 대상으로 2000 mg/day 용량의 70ESL(DD) 또는 70EBL(SR)의 12주간 복용 인체시험 수행 - SR 및 DD 복용 후 허리 둘레, 엉덩이 둘레 및 혈중 지질농도, 염증성 사이토카인 농도 감소 및 항산화 대사 개선에 탁월한 효능 확인, SR 복용 후 아디포넥틴 증가 및 resistin 감소 효능 확인 - SR과 DD의 대사증후군 개선 새로운 기능성식품소재 효능 입증 					
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> - PSH 소재의 항당뇨 효능 및 작용기전을 규명하고 국내/미국특허등록 및 PCT 출원을 통해 산업재산권을 확보, 관련 분야 상위 국제 저널에 다수의 논문을 발표하여 새로운 기능성 소재로서의 글로벌 경쟁력을 제시하였음. - 콩잎 주정추출물의 인체적용시험을 통한 효능 검증으로 우수 천연 기능성 신소재로서의 인증을 받기 위한 토대를 마련하였으며, 이 인체시험 결과는 실용화에 필요한 섭취용량 결정의 근거 자료로 이용할 수 있음. - PSH의 기능성을 활용한 다양한 제형의 제품 개발을 진행할 계획임. 출시한 혈당 조절 건강기능식품인 '인슈파워' 및 생산예정인 추가 제품은 제1협동기관에서 확보하고 있는 국내외 판매 네트워크를 통해 사업화를 추진하고 있음. 					
중심어 (5개 이내)	항당뇨	다당류	혈당조절	신기능성소재	제품화	

SUMMARY

	코드번호	D-02
Purpose& Contents	<p>To develop the new health-functional ingredient for prevention and improvement of diabetes using polysaccharide-enriched fraction from soy leaves. This project was conducted through: development of functional material from soy leaf extracts for improving blood glucose levels <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>; investigation of relationship between components of extracts with glucose lowering mechanism; industrialization of flavonol glycosides-rich functional materials for regulating blood glucose in human.</p>	
Results	<p>1st Sub-project:: Development and characterization of functional materials for improving blood glucose and investigation of their mechanism</p> <p>Efficient extraction methods of polysaccharide-rich materials (PSH) were established and according varieties, culture periods, and methods for extraction. Thirteen flavonol compounds were isolated and their anti-diabetic and anti-obesity effects were investigated through <i>in vitro</i> and cell-based assay. Standardization method was set up using the main components of PSH (70ESL and 70EBL), KG7 and QG5 and their contents in ESL and EBL were analyzed. For the evaluation of anti-diabetic effects of PSH materials, we performed <i>in vitro</i>, cell-based, and animal experiments using 70ESL and 70EBL. This study suggests that the ESL improves 70ESL improved pancreatic β-cell function and 70EBL improves hepatic insulin resistance by enhancing adiponectin level. We acquired the basis information of PSH for application of functional individual approval.</p> <p>2nd Sub-project:: Industrialization and establishment mass and process product system for development of anti-diabetic functional materials</p> <p>In this study, we developed functional ingredient by industrial mass cultivation and production system from soybean leaves extracts. And we products goods use by functional ingredients. We make goods add by vehicle additions that functional food and various ingredients for improvement of reduce blood glucose. For the industrialization of mass product, we select GH and BB species tested by productivity and active components. In case of mass production, we harvest soybean leaves 0.091 ~ 0.103kg/m² during 4 years. Also, the GH are product high mass production than BB. But GH are depend on culture condition. The best harvest time of GH and BH are 100 to 110 days of age. We get PSH that industrial extraction (50 kg/batch), concentration and dry of GH and BB. We get 12.47kg of GH (35.7 Brix) and 14.36kg of (25.8 brix). it is recover of 0.25 and 0.29% than natural mass. We make clinical test sample and goods use by PSH. Also we test PSH of residual pesticide and nutrient components. We product and development of 'Insu Power' that health functional food for control and improvement reduce blood glucose. It formulated by functional ingredients and vehicle additions.</p> <p>3rd Sub-project: Investigate anti-diabetic effect of PSH material in a clinical trial</p> <p>We performed a clinical trial to investigate effects of black soybean leaf ethanol extract (SR, 2000 mg/day) and soybean leaf ethanol extract (DD, 2000 mg/day) in subjects with overweight or obesity (35~65 year, BMI > 23) for 12 weeks. Supplementation of SR and DD exhibited to play an important role in reduction of waist and hip circumference ratio, regulating lipid levels, inflammatory and antioxidant metabolism in overweight and obese subjects. Therefore, SR and DD has been proven to improve the features for metabolic syndrome and is a beneficial plant resource for a new functional food ingredient..</p>	

<p>Expected Contribution</p>	<p>This research has established a mass production of functional material, standardized functional materials, and investigated efficacy and molecular mechanism based on in vitro, in vivo, and cell-based studies. These findings have been published in patent application and prominent international journals, which has promoted the export possibility of functional materials made in Korea to an international audience.</p> <p>The efficacy of soy bean leaf extract or black soy bean extract can provide a groundwork for developing a new functional foods source. In addition, this human trial can be used as a basis for determining an effective dose for soy bean leaf extract or black soy bean extract.</p> <p>We make various products (goods) and sales use by industrial products and progression of PSH. And we sales and marketing of 'Insu Power' that domestic and overseas marketing by network of Insect Biotech.</p>				
<p>Keywords</p>	<p>antidiabetic</p>	<p>polysaccharide</p>	<p>glycemic response</p>	<p>new functional materials</p>	<p>commercialization</p>

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	13
Chapter 2. Overview of Research Development in the World and Korea ...	17
Chapter 3. Research Contents and Results	27
Chapter 4. Achievement and Contribution of the Research	309
Chapter 5. Application Plan of the Research Results	315
Chapter 6. Foreign Information of Science and Technology	317
Chapter 7. Security Level of Research Achievements	317
Chapter 8. Current Status of Research Installation and Equipment	319
Chapter 9. Performance results of Laboratory Safety Management	319
Chapter 10. Representative (Typical) Record of Research	321
Chapter 11. Other Things (or Further Information)	321
Chapter 12. References	323

목 차

제 1 장. 연구개발과제의개요	13
제 2 장. 국내·외 기술개발 현황	17
제 3 장. 연구수행 내용 및 결과	27
제 4 장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	309
제 5 장. 연구결과의 활용계획 등	315
제 6 장. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	317
제 7 장. 연구개발성과의 보안등급	319
제 8 장. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황	319
제 9 장. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	319
제 10 장. 연구개발과제의 대표적 연구실적	321
제 11 장. 기타사항	321
제 12 장. 참고문헌	323

제 1 장 연구개발과제의 개요

제1절 연구개발의 목적

본 연구진의 선행연구 결과 등을 통하여 콩잎 등 국내 자생식물에 함유된 다당류로부터 항당뇨 기능성 소재의 개발 가능성을 확인하였다. 이에 본 연구과제에서는 혈당 개선을 포함하여 이와 밀접한 관련이 있는 체지방 및 대사증후군 개선 다당류 함유 식용 가능 소재의 탐색, 새로운 기능성 소재의 도출, 대량생산 및 사업화를 위한 기능성 제품 개발을 최종 목표로 하며, 주요 연구 내용은 i) 우수 항당뇨 천연 신소재 탐색, 특성분석 및 기작 규명, ii) 항당뇨 천연 신소재의 인체적용 효능 평가, iii) 항당뇨 천연 신소재의 대량생산 체계 구축 및 당노식 제형 개발 및 상품화이다. 따라서 본 연구과제를 통해 혈당 개선 효능이 검증된 새로운 기능성 소재를 확보하고, 나아가 본 연구결과를 바탕으로 개별인정형 건강기능식품 원료성분 인정을 획득하고자 한다. 또한, 기능성 소재로부터 안전하고, 효능이 입증된 신제품을 개발하여 당뇨 예방 및 치료 효능을 통해 국민건강 증진 및 의료비 절감을 꾀하고, 안전한 먹거리인 콩잎의 활용도 및 부가가치를 높임으로써 농가 소득 증대를 꾀하고자 한다.

제2절 연구개발의 필요성

1. 경제적 측면

- 2012년 건강기능식품 생산액은 1조 4,091억원으로 전년도(1조 3,682억원, 2011년) 대비 3% 증가하였고, 개별인정형 건강기능식품은 1,807억원으로 2011년 1,436억원에 비하여 26% 증가하였고, 고령화 사회 가속화 등으로 인해 건강기능식품의 꾸준한 성장세가 이어질 것으로 전망되고 있음.
- 최근 천연물에 대한 시장의 Needs가 점차 확대되고 있으며, 농업에 있어서도 소재의 기능성에 대한 연구와 기능성을 부여한 작물의 재배를 확대하여 농가의 소득향상을 위한 많은 시도가 필요함.
- 국내자생식물 또는 식용식물자원의 기능성 확보를 통해 단순한 곡물 또는 식량자원에서 기능성원료를 개발함으로써 고부가가치 식품소재 또는 제품화를 통한 사업화가 가능함.

2. 사회적 측면

- 당뇨병학회에서 발표한 ‘2012 한국인 당뇨병 연구보고서 (2012. 11. 8)’ 에 따르면 2010년 기준으로 국내 만 30세 이상 성인 10명 중 1명(10.1%)이 당뇨병 환자였고, 그 비율은 고령일수록 증가해 65세 이상은 22.7%에 이르렀으며, 국내 당뇨병 환자 수를 320 만명으로 추산했음. 전체 성인의 당뇨병 발생 비율 (유병률)은 2001년 8.6%, 2005년 9.1%였으나, 최근의 증가 추세를 감안하면 2020년에는 424 만명, 2050년에는 591 만명에 이를 것으로 전망했음. 또한 당뇨병 전(前) 단계로 불리는 공복(空腹) 혈당 장애까지 합치면 노년 인구의 절반(47.4%)이 당뇨병 환자이거나 당뇨병 임박 환자로 나타났음. 즉 한국 성인 1000 만명이 당뇨 증세를 앓고 있는 것임.
- 특히, 2011년 국민건강보험공단의 통계에 따르면, 소아 및 청소년 당뇨병 환자수는 소아

대비 청소년의 유병률이 6배나 높은 것으로 나타났고, 임신성 당뇨병도 꾸준히 증가하고 있음.

- 우리나라의 당뇨병환자의 90%인 제2형 당뇨병은 식생활의 서구화에 따른 고열량, 고지방, 고단백의 식생활 습관으로 기인하는 것으로 의 주요인이 식생활습관에 기인하는 것으로 주로 40대에 발생하는 경우가 많지만, 최근 소아 및 청소년의 인스턴스 식품 섭취와 운동 부족으로 당뇨병 유병율이 증가되고 있음.
- 한국인의 당뇨병 발생 체형 변화: 한국인의 당뇨병 발생 체형은 체질적으로 ‘마른 비만’으로, 환자 대부분이 체중은 정상 범위이지만 복부 비만만 있는 경우였음. 하지만 최근 들어 당뇨병 환자 네 명 중 세 명이 과체중이거나 비만 계층에서 집중적으로 발생하고 있음. 특히 여성 당뇨병 환자의 복부 비만율은 56% 수준이며, 남성은 41%임. 혈당 조절은 췌장에서 분비되는 인슐린에 의해 주로 이뤄지는데, 과다하게 쌓인 지방 조직들이 인슐린을 잡아먹거나 활성도를 떨어뜨림. 한국인은 서구인에 비해 상대적으로 인슐린 분비능이 떨어지고, 고혈압, 고지혈증, 당뇨병성 신증 등 각종 합병증을 동반하는 비율이 높고, 복약 순응도가 낮음. 따라서 국가적 당뇨병 관리 사업 필요 국가 전체 의료비 부담을 줄이려면 당뇨병 조기 발견 사업과 위험 그룹에 대해 합병증 발생을 줄이는 대대적인 검진 사업이 필요함.
- 당뇨병은 심각한 합병증을 동반하기 때문에 사회적으로도 큰 문제를 일으키고 있는데 현재 개발, 판매되고 있는 항당뇨 치료 약물의 경우 정도의 차이는 있지만 대부분 많은 부작용 때문에 사용상 제약이 뒤따르고 있음. 그 일례로 최근(2013. 8. 7)에 차세대 당뇨병 치료제로 주목받으면서 급성장하고 있는 DPP-4 억제제에서 약물과의 인과관계를 부인할 수 없는 간질성 폐렴 (네시나정(다케다)과 에크아정(노바티스))과 장폐색 관련 부작용 (네시나정과 트라젠타정(일본베링거인겔하임))이 발생함에 따라 일본 후생노동성 의약식품국 안전대책과는 사용상 주의에 이들 부작용을 추가토록 지시한 바 있음.

3. 기술적 측면

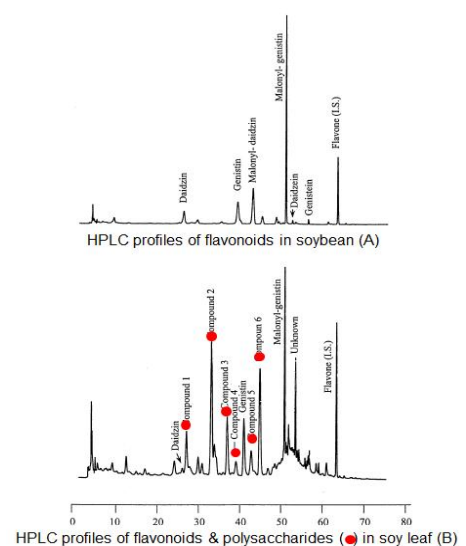
- 후천적 당뇨병은 탄수화물의 소화 및 흡수와 직접 관련이 있으며, 인슐린의 분비, 당대사 관여 효소 및 관련 신호전달체계의 이상으로 유발됨.
- 기능성 원료로 고시 또는 개별인정되어 있는 항당뇨 기능성 식품소재는 식이섬유로, 인체 내에서 소화하기 어려운 난소화성 다당체를 이용하여 콜레스테롤 개선, 식후혈당상승억제, 배변활동원활, 장내 유익균 증식과 같은 기능성을 인정받고 있음.
- 이와 같은 식이섬유의 기능성은 식후혈당상승을 억제하는 부분에 주로 초점이 맞추어져 있어서, 다당류를 포함한 천연식물 추출물의 기능적 연구를 통하여 실질적인 항당뇨 기능이 우수한 천연 다당류 신소재의 개발이 필요함.
- 당뇨 예방 및 치료의 기능성 천연물, 특히 식물에는 항당뇨 기능성 소재들이 함유되어 있고, 폴리페놀류, 테르펜류, 폴리펩타이드류, 배당체 등 다양한 구조로 존재하고 이들은 주로 당대사에 관여하는 호르몬, 효소 및 신호전달체계에 영향을 미침.
- 지금까지 항당뇨 다당류에 대한 비교적 많은 연구가 수행되고 있으나 아직까지 획기적인 제품이 개발되지 못한 실정이며, 다당류의 항당뇨 기작이 정확히 규명되어 있지 못하여 관련 기술의 개발 및 확보에 어려움이 있음.

- 국내 자생식물에는 다양한 기능의 다당류가 존재하며 항산화 및 항암에 대한 기능성은 연구되었으나, 항당뇨 및 그 관련기작에 대한 연구는 매우 부족한 상태임.
- 따라서 당뇨병의 발생이 급격히 증가하고 있는 현실에서 자생식물에서 항당뇨 기능이 우수한 천연 신소재의 발굴 및 기능성 식품으로 제품화가 이루어진다면 국민건강 및 국가경제에 크게 기여할 것으로 기대함.
- 다양한 식품유래 천연물질의 혈당 강하 및 지질저하 효능에 대한 연구도 증가되고 있음 (Goldfrank 등, 1982; Sabu 등, 2002; Mentz 등, 1989; Marles 등, 1994). 최근에 알려진 혈당 강하 소재로는 운지버섯 유래 다당체 (대한민국특허 제 852479호 대구대학교 산학협력단), α -glucosidase 저해활성을 통해 탄수화물의 소화, 흡수율을 저하시켜 대사성질환 (당뇨, 비만, 고혈압)의 예방 및 개선에 효과가 있는 것으로 알려진 당조고추, streptozotocin(STZ)으로 당뇨를 유발시킨 흰쥐에게 투여 후 혈당강하작용을 나타내는 인동초 (*Lonicerae japonica* Thunb) 추출물 (Kim 등, 한국유화학회지 29: 412-420, 2012)의 등 지금까지 국내 연구를 통해 알려진 식물 추출물 관련 혈당 개선용 원료는 혈당강하 작용이 미미하거나, 구체적인 작용 타겟과 기작이 명확하지 않은 경우가 많음. 따라서 부작용 없이 지속적인 복용이 가능하면서 효과적으로 혈당을 조절하는 기능성 소재의 도출 및 다양한 제품의 개발이 여전히 시급함.
- 이와 같은 관점에서 본 연구진의 선행연구를 통하여 콩잎 등 몇 가지 국내 자생식물에 함유된 다당류로부터 우수한 활성의 항당뇨 기능 소재 가능성을 확인하였기에 이를 중심으로 천연 다당류 식품소재를 탐색, 개발, 국내·외에서 상품화하여 당뇨예방 및 치료를 위한 안전하고, 효과적인 방안을 제공하고자 함.

우수 항당뇨 천연 신소재 개발 및 제품화 (관련 선행연구 사례 1)

천연소재의 다당류 분석 및 항당뇨 기능성 (예: 콩잎 및 천연소재 B6-5)

- ◆ 콩잎(대두, 검은콩)은 열매, 뿌리, 줄기에 비해 다양한 다당류 함유 (그림 참조)
- ◆ 또한 천연소재 B6-5는 콩잎과는 다른 다당류 함유. LDL-항산화 활성, α -glucosidase 저해활성 및 DPP-4 저해활성이 우수함
- ◆ HPLC를 이용한 대사체 분석 결과,
 - 어린잎에 다당류 함량이 높아 연간 다회 수확 가능
 - 콩 품종에 따라 서로 다른 다당류 함유 확인
 - 열수추출물 및 30~50% 주정추출물에 다당류의 함량이 높음 (안전성, 제품화에 용이함)
- ◆ 다당류 고함유 콩잎추출물의 항당뇨/항비만 효능
 - C57BL/6J 마우스에서 지방흡수 저해, 당부하 내당능 효과 확인
 - palmitic acid로 유도된 체장세포에서 인슐린 유전자의 발현을 유의적으로 증가시킴



동물실험, 인체시험을 통해 기존 보고된 항당뇨 다당류에 비해 효능이 우수한 항당뇨 신소재 도출



작용기작 규명과 함께, 효능이 우수한 혈당 조절 천연 신소재 개발 및 제품화

제3절 연구개발의 범위

1. 연구개발의 최종목표 및 주요내용

국내 자생식물로부터 항당뇨 기능이 탁월하고 안전한 천연 신소재 개발을 위해 활성 다당류의 탐색, 선발, 구조 및 기능성 분석, 분자구조와 항당뇨 기작과의 관련성 규명 및 인체시험을 통한 효능을 검정하고 당뇨식 소재로 활용 가능한 제형을 완성하여 국내·외에 상품화를 실현함

- 제 1세부과제: 우수 항당뇨 천연 신소재 탐색, 특성분석 및 기작 규명
- 제 1협동과제: 항당뇨 천연 신소재의 대량생산 체계 구축 및 당뇨식 제형 상품화
- 제 2협동과제: 항당뇨 천연 신소재의 인체적용 효능 평가

2. 과제별(세부·협동) 연구개발의 목표 및 내용

제 1세부과제 : 우수 항당뇨 천연 신소재 탐색, 특성분석 및 기작 규명

- 콩잎 등 국내 자생식물의 in vitro 항당뇨 기능성 분석 및 스크리닝
- 다당류의 분리·정제 및 구조 분석
- 다당류의 in vitro, 세포계 항당뇨 기능 분석
- In vivo 동물실험을 통한 항당뇨 기능 분석 및 작용기작 규명
- 항당뇨 다당류 신소재의 인체 안전성 확보
- 기존 보고된 다당류와 도출된 신소재 다당류의 활성비교 및 우수성 입증

제 1협동과제 : 항당뇨 천연 신소재의 대량생산 체계 구축 및 당뇨식 제형 상품화

- 콩잎(대두, 검은콩) 등 자생식물 재배 및 인체시험/제품화를 위한 대량 수확
- 다당류 기능성소재의 표준화, 대량생산 공정 확립 및 제형 개발
- 항당뇨 다당류 신소재의 시제품(인체시험용) 제작 및 제품화

제 2협동과제 : 항당뇨 천연 신소재의 인체적용 효능 평가

- 인체시험을 위한 인체시험심의위원회(IRB) 구성 및 승인 요청
- 인체시험을 통한 다당류 고함유 콩잎의 혈당강하 효능 검정 및 기작 연구

제 2 장 국내·외 기술개발 현황

제1절 국내 연구 현황

○ Incretin 기반의 DPP-4 저해제는 치료효과 및 부작용 측면에서 가장 각광받는 치료제 타겟이며, 췌장베타세포의 기능 강화 측면의 unmet need도 해결할 수 있는 기전으로 알려져 있다. 국내에서는 DPP-4 저해활성을 타겟으로 개발된 개별인정 기능성 원료는 보고된 것이 없으며, 학위논문 등에 한약재인 계각, 대두황권, 소복, 울금 등의 DPP-4 저해활성을 보고하고 있으나, 저해활성은 매우 낮은 수준이다. 2012년 6월에 국내 최초 개발 DPP-4 억제제인 제미글로(제미글립틴, LG 생명과학)가 시장에 출시되었으며, LG생명과학은 자체 개발한 당뇨병신약 '제미메트'에 '메트포르민'을 복합한 '제미메트서방정'을 개량신약으로 허가받았다. 한독은 DPP-4 억제제 '테넬리아'에 메트포르민을 더한 서방형 복합제인 당뇨병약 '테넬리아서방정'을 개량신약으로 출시하였다. 또한 동아ST는 자체개발한 DPP-4 저해기전의 당뇨병치료제 '슈가논(에보그립톤)'을 출시 후 '슈가논'과 '메트포르민'의 복합제인 슈가메트서방정을 개량신약으로 허가받았다. 슈가논은 체중감소 효과와 제형이 가장 작아 복용편리성이 높은 장점도 있는 것으로 알려져 있다.

○ 전남대학교 최홍식 교수 연구팀에서는 ERR γ 단백질이 당 수식화 과정을 통해 체내 혈당 조절에 영향을 미친다는 분자기전을 규명하였다. 세포내 많은 단백질들의 전사 후 번역 과정은 주로 인산화 과정을 거치고 이로 인해 단백질의 기능이 변화되는 것으로 알려져 있으나, 특이하게도 절식 상태에서 활성화되는 당 수식화 효소(O-GlcNAc transferase)를 통해 ERR γ 유전자의 발현과 더불어 당 수식화라는 전사 후 번역과정을 겪음으로써 안정화되고 간의 포도당 생합성을 촉진한다고 밝혔고, 인슐린 저항성이 원인인 제2형 당뇨병 및 대사질환은 세포내 ERR γ 단백질의 당 수식화가 정상적으로 조절되지 않아 나타난 것으로 ERR γ 단백질 전사활성을 조절하는 물질이 추후 인슐린 저항성을 개선하는 신약후보 물질이 될 수 있고 밝혔다(Misra *et al.*, 2016).

○ 경희대병원 내분비과 우정택·이상열 교수팀은 60세 이상 당뇨병 환자 중 저혈당증과 인지 기능장애 병력이 없는 1975명을 대상으로 관찰 조사한 결과 혈당강하제 또는 인슐린을 맞고 저혈당(≤ 70 mg/dL) 증세까지 보이면 치매 발생 위험률이 저혈당을 경험하지 않은 환자에 비해 3배 가까이 증가한다고 밝혔다. 이에 이상열 교수는 지나치게 혈당을 낮추려고만 한다면 오히려 저혈당으로 인해 또 다른 합병증이 발생할 수 있다고 밝혔다.

○ 포항공대의 류성호 교수팀이 카롤린스카 연구소와 공동연구로 당뇨 치료 부작용을 낮춰 인슐린을 대체할 핵산물질 IR-A48을 최초로 개발하였다. IR-A48은 인슐린 수용체에 대한 뚜렷한 활성에도 불구하고 수용체에서 인슐린과는 다른 위치에 결합하고, 특정 활성화 잔기만을 특이적으로 인산화시키는 선택적 활성을 통해 PI3K-AKT 경로의 활성화를 증가시켰으나, 반대로 MAPK 경로는 거의 증가시키지 않았다. 이 연구는 당뇨병과 같은 중요 질병에 대한 진보된 치료전략을 제시할 수 있음을 보여 주었다(Yunn *et al.*, 2015).

○ 국립보건연구원 유전체센터 형질연구과에서는 당뇨 관련 참조에피유전체 지도 11종을 IHEC

과 국제협력연구를 통해서 공개하였다. 이는 다양한 질병에 대한 진단과 치료에 새로운 돌파구를 제공할 것이며, 궁극적으로는 건강증진에 기여할 것이라고 밝혔다. 참조에피유전체 데이터를 바탕으로 환경과 질병에 의한 에피유전체의 변이를 밝혀 궁극적으로는 이를 활용한 한국인 정밀의료를 위한 에피유전체 연구를 추진하고 있다. 한국인 에피유전체 사업은 IHEC과 협력연구를 통하여 2018년까지 50종의 당뇨병만 참조에피유전체 데이터를 생산 기탁하는 것을 목표로 하고 있으며, 이를 위하여 15년 11종 데이터 공개, 16년 13종 데이터 공개를 추진하며, 향후 2년간 26종의 데이터를 추가로 공개할 예정이다.

○ 질병관리본부의 형질연구과에서 최근 연구 중인 비만·당뇨 관련 유전변이 유전자형에 따른 대사체 데이터 연관 분석 연구를 시행하였고, 전체-대사체 연관분석을 통해 FTO 유전변이가 비만 및 당뇨 유발 기작과 관련성이 있을 것으로 예측되는 인지질과 아미노산 물질대사 변화에 유의한 연관성이 있음을 규명하였다. 이와 같은 유전체-대사체간의 연관분석을 통한 유전체-대사체-질병 간 상호 조절관계의 확인은 질병 유발에 중요한 생체 표지자를 선별하고, 복합 만성질환뿐만 아니라 암과 같은 다양한 질환에서 그 작용기전을 이해하는데 중요한 역할을 할 것이며, 질병의 조기진단 및 환자치료를 위한 정밀의학에 중요한 정보를 제공할 것으로 기대된다.

○ 고려대학교 생명공학부 고영규 교수팀이 인슐린의 신호전달을 조절하는 MG53이라는 새로운 단백질을 발견하였다. MG53을 억제하면 IRS-1 단백질이 증가하고, 이 증가된 단백질이 인슐린 신호전달체계를 강화해 당뇨증상을 억제함을 발견했다. 또한 MG53과 IRS-1의 상호작용을 깨뜨리는 신약 후보물질을 발견하였으며, 근육세포에서 이 후보물질을 작용시키면 IRS-1 단백질의 양이 증가해 인슐린에 의한 포도당 유입이 증가했다. 현재 이 신약 후보물질을 제 2형 당뇨 치료제로 개발하기 위한 연구가 진행 중이다.

○ 연세대학교 식품영양학과 박태선 교수는 후추덩굴식물 열매에서 주로 발견되는 화합물인 ‘피페린’을 활용하여 탁월한 효과와 함께 안전성을 갖춘 체중조절용 건강기능식품을 개발 중이다. 후추의 매운맛을 내는 물질로 알려진 피페린은 항산화, 항돌연변이, 항암작용을 하는 것으로 알려져 있으며, 박 교수 연구팀에서는 피페린을 체중저하, 내장지방 감소, 혈중 콜레스테롤 농도 정상화 등의 대사증후군 개선 기능을 가진 건강기능식품 원료로 개발 중이다. 박 교수와 화장품·의약품 제조업체 라파스는 미래창조과학부 ‘연구성과 사업화 지원사업’의 지원을 받아 후추추출물 최적 생산조건 확립과 표준화, 인체시험을 통한 효능 확인과 작용기작 연구 등을 거쳐 사업화를 추진할 계획이다.

제2절 국외 연구 현황

○ 워싱턴 의과 대학 (Washington University School of Medicine)의 Kyle S. McCommis가 이끄는 연구진은 간세포에서 포도당의 원천인 피루브산을 미토콘드리아라는 간세포의 에너지 공장으로서 전달하는 과정에 관련된 중요 단백질을 억제시킴으로써 포도당 생산을 지연시켜 제2형 당뇨를 치료하는 새로운 전략을 제시하였다 (McCommis et al., 2015).

○ 뉴욕대학교 (NYU Langone Medical Center)의 Margaret Rice 연구팀은 뇌에 인슐린이 더 많

으면 분비된 도파민이 증가하고, 고열량식을 먹은 생쥐는 뇌 인슐린 반응성을 모두 상실하여 더 많은 도파민으로 이어지는 음료수 주입 조합을 항상 선호한다고 보고하였다. 이번 결과로 인슐린이 뇌 보상 시스템의 일부이라는 새로운 역할을 확인하였다. Rice 연구팀은 인슐린이 음식물 동기 부여와 보상 경로에 대한 포유류의 뇌 제어에 어떻게 영향을 미치는지, 그리고 비만에 의한 인슐린 감수성에 대한 변화가 역전되거나 차단될 수 있는지에 대해 연구를 진행하고 있다 (Stouffer *et al.*, 2015).

○ 뉴질랜드 오클랜드 대학 피터 셰퍼드 교수와 연구진은 단백질인 베타-카테닌이 안정적인 혈당 수치가 유지될 수 있도록 췌장의 인슐린 분비를 조절해준다는 사실을 보고하였다. 제2형 당뇨병은 충분한 양의 인슐린이 분비되지 않거나 몸속의 세포가 분비되는 인슐린을 제대로 인지하지 못해 생기는 것으로 전체 당뇨병의 90% 이상을 차지한다. 셰퍼드 교수는 “가장 흥미 있는 것은 이 단백질이 어떤 사람들을 다른 사람들보다 당뇨병에 더 잘 걸리도록 만드는, 최근 발견된 유전자 변형 중 하나와도 밀접한 관련이 있다는 사실”이라고 말했다. 이 연구 결과와 관련해 당뇨병의 새로운 치료법을 개발하거나 예방적 조치를 할 수 있을 것으로 기대하고 있다 (2016. 12. 5, 연합뉴스 보도 자료).

○ 일본 당뇨병학회가 당뇨병환자의 진료정보를 수집하는 대규모 데이터베이스 운영에 들어갔다. 일본당뇨병학회와 국립국제의료연구센터는 전국의 병원으로부터 당뇨병환자의 진료정보를 수집하고, 합병증 예방에 효과적인 약물과 생활습관, 부작용을 유발하는 사람의 특징 등을 탐색하는 연구에 활용할 계획이라고 발표했다. 현재는 윤리심사를 마친 29개 병원이 참여하고 있으며 오는 2019년까지 100개 병원 10만~20만명 규모로 확대할 계획이다. 지금까지도 수 천명을 대상으로 한 연구는 있었지만 인원수를 크게 늘림에 따라 환자의 연령대, 중등도별 자세한 분석도 가능해질 전망이다. 혈액이나 소변검사 등 수십 항목 외에 약물의 처방에 대해 매일 입력되는 전자카테터 데이터를 익명화해 수집한다. 국립국제의료연구센터는 “전국의 실태를 보다 정확하게 파악할 수 있고 어떤 사람에게 어떤 치료가 필요한지 분명히 알 수 있을 것으로 기대하고 있다”고 밝혔다 (2016. 2. 15, 의학신문 보도 자료).

제3절 국내·외 연구 및 제품개발 현황 비교 및 필요 연구 분야

1. 국내 연구 및 제품 개발 현황

○ 우리나라는 2018년이면 고령사회로 진입하고 2026년엔 노인비중이 21%에 달하는 초고령 사회에 들어설 것으로 예상되고 있다. 한편 기대수명도 점차 증가 (2014년 출생자의 경우 남자 78.5세, 여자 85.1세)하고 있으나, 서구화된 식습관으로 암, 심혈관질환, 대사증후군 (당뇨 등)의 발병위험도 함께 높아졌다. 따라서 헬스케어산업 규모가 더욱 커질 것으로 예상된다. 2013년 건강기능식품 생산액은 1조 4,820억원으로 전년도 (1조 4,091억원, 2012년) 대비 5.2% 증가하였고, 개별인정형 건강기능식품은 2,323억원으로 2012년 1,807억원에 비하여 26.6% 증가하였고 (13.12.31 기준, 출처: 식품의약품안전처), 고령화 사회 가속화 등으로 인해 건강기능식품의 꾸준한 성장세가 이어질 것으로 전망되고 있다.

○ 국내의 경우 혈당 관련 소재를 찾기 위한 업체들의 경쟁이 치열한 상황이다. 현재 난소화성말토덱스트린, 바나바주정추출물, 피니톨, 씨제이홍경천등복합추출물, 구아바잎, 식이섬유 소재를 중심으로 한 혈당 관련 제품이 시장에 많이 나와 있는 실정이다. 이중 난소화성말토덱스트린이 CJ, 롯데헬스원, 태평양 등 대기업 중심으로 가장 활발히 제품화되었으나, 대부분의 난소화성말토덱스트린을 외국에서 수입하여 단순 믹스 및 간단한 제형의 변화만을 주는 형태이다. 또한 2015년도 구아검가수분해물, 귀리식이섬유, 밀식이섬유, 이눌린 치커리추출물, 호로과종자식이섬유, 옥수수겨식이섬유 등이 건강기능식품 고시형 원료로 인정되면서 당이젠, 씨젠 100, 당엔솔라 등의 제품이 출시되었으며, 기능성분은 식이섬유 (β -glucan)로 일일섭취량은 3 ~ 50 g의 과량이며, 난소화성 다당체를 이용하여 배변활동 원활, 장내 유익균 증식을 통한 혈당 조절 기능성이며, 이 또한 수입 원료가 많다. 따라서 이러한 상황으로 인해 경제성 부문은 외국의 원료 가격 구조 및 유통변화에 민감한 실정이며, 또한 새로운 제형 및 기능을 요구하는 소비자의 욕구를 충족시키지 못하는 상황이다. 국내 개발 혈당 강하 소재로는 농진청에서 개발한 동결건조누에분말이 있으며, 일일복용량은 2.7 g 이다.



표. 대표적인 혈당 저하 기능성 원료

원료명	지표성분	일일섭취량
난소화성말토덱스트린	난소화성말토덱스트린 850 mg/g	난소화성말토덱스트린 식이섬유 11.9~30 g/일
바나바잎 주정추출물	코로소린산 9~13 mg/g	고로소코린산 0.45~1.3 mg
구아바잎추출물	총 폴리페놀 250~450 mg/g	총 폴리페놀 120 mg
탈지달맞이꽃 종자추출물	Penta-O-galloyl β -D-glucose (PGG), 20~28 mg/g	PGG 4~8.4 mg
동결건조누에분말	데옥시노지리마이신 (1-Deoxynojirimycin)	동결건조누에분말 2.7 g
귀리식이섬유	식이섬유	귀리식이섬유로서 0.8 g 이상
구아검/구아검가수분해물	식이섬유	구아검/구아검가수분해물 식이섬유로서 4.6~27 g
목이버섯식이섬유	식이섬유	목이버섯식이섬유로서 12 g
밀식이섬유	식이섬유	밀식이섬유로서 36 g
대두식이섬유	식이섬유	대두식이섬유로서 10~60 g

식물추출물을 활용한 혈당개선용 기능성 원료는 바나바잎추출물, 구아바잎추출물, 탈지달맞

이꽃종자추출물 등이 있으며, 일일 섭취량이 상대적으로 적은 기능성 성분이다. 따라서, 주로 환, 정제, 캡슐 형태의 소비자가 간편하게 휴대하고 섭취할 수 있는 제품으로 개발되어 있다.



○ 대상웰라이프에서 어려운 혈당 관리를 간편하게 도와주고 원활한 배변활동에 도움을 주는 식이섬유 고함량 건강기능식품 '장쾌한 아침 플러스'를 개발하였다. 1일 섭취 시, 12.75 g의 식이섬유를 섭취 (성인남녀 1일 식이섬유 권장량 25 g)할 수 있으며, 배변활동과 식후 혈당상승 억제, 혈중 중성지방 개선에 도움을 줄 수 있다고 알렸으며, 주원료는 난소화성말토덱스트린 (화이버솔2)으로 수수에서 유래해 미국 GRAS에 등재됐고, 일본 후생성에서 특정보건용식품으로 인정한 만큼 안전하고 신뢰도가 높은 물질이다. 이는 장내 연동운동을 촉진시켜 원활한 배변활동에 도움을 줄 수 있으며, 배변량과 횟수를 증가시키는 것으로 알려졌다. 또한 소화 과정에서 생기는 포도당의 체내 흡수를 막고, 식후 혈당과 인슐린 분비 상승을 억제하며, 혈중 콜레스테롤 및 중성 지방을 저하해 혈중 중성지방 개선에도 도움을 줄 수 있다고 밝혔다.

○ 바쁜 현대인들에게 대사증후군에 도움이 될 수 있는 '프로디케어 프리미엄' 이 출시됐다. 송문기 박사가 개발한 제품 프로디케어 프리미엄에는 탄수화물의 장내 흡수를 억제하여 식후 혈당상승을 낮추는 달맞이꽃 종자추출물과 아연이 함유되어 있는데 일반적인 아연은 체내에서 10% 정도만 흡수되고 체내 이용률 또한 낮지만 본 제품의 아연 포물러 (Formula 성분배합)는 체내 흡수율 및 이용률을 높여 아연의 고유 효능인 정상적인 면역기능과 인슐린 대사를 원활하게 하는 핵심 역할을 한다고 밝혔다.



○ 혈당 조절 이외에 몸무게, 혈압, 지질, 염증 개선 등 다방면에서 효과를 나타내는 '멀티플레이어' 당뇨병 약(혈당강하제)이 각광을 받고 있다. 가장 많이 처방되는 DPP-4 (Dipeptidyl peptidase-4) 억제제는 혈당 강하와 함께 지방혈중 개선, 내피세포 기능 개선 등의 효과를 거두고 있다. 최신 혈당강하제인 SGLT-2 (나트륨 포도당 공동 수용체) 억제제의 경우 혈당 조절뿐만 아니라 몸무게와 혈압, 지질까지 줄이는 것으로 알려져 있다.

○ 혈당 조절과 밀접한 관계가 있는 체지방 조절 관련, 가르시니아캄보지아추출물 제품의 생산량은 2013년도 541억원이며, 마테열수추출물 제품의 생산량은 2013년도 229억원이며, 최근 5년간 마테차의 수입은 18배 가량 급증하였다 (2015. 06. 30일자 한국스포츠경제). 하지만 가르시니아캄보지아추출물과 마테열수추출물 등은 그 원료를 외국에서 전량 수입하고 있다.

○ 농촌진흥청은 을지대학교, 고려대학교와 함께 세포, 동물(쥐) 실험에 이어 갱년기 여성을 대상으로 한 시험에서도 흑미 호분층 추출물이 체지방 감소에 효과가 우수한 것으로 나타났다고 보고하였다. 호분층은 현미의 쌀겨층에 있는 세포층으로 기능성 물질을 다량 함유하고 있다. 새로 개발한 기능성물질 추출법을 ‘흑미 호분층’에 이용하면 기존 방법인 흑미를 사용했을 때보다 8.6배 많은 기능성물질 (안토시아닌 등)을 얻을 수 있다. 흑미 호분층 추출물은 지방세포뿐만 아니라 비만 모델의 흰쥐와 경도 비만여성의 체지방을 효과적으로 줄이는 효과가 있어 기술이전을 통해 실용화를 추진하고 있다. 아울러, 흑미 호분층에서의 기능성물질 추출 방법과 체지방 감소효과에 대해서 특허출원했고, 흑미 호분층 추출물을 식품의약품안전처에 건강기능식품 원료로 등록하기 위한 절차를 진행 중이다.

○ 2016년 건강기능 식품 시장 동향 조사를 살펴보면 체지방 감소 기능성 원료 중 가르시니아 캄보지아 추출물, 공액리놀레산, 녹차 추출물이 대표적이며, 가르시니아 캄보지아 추출물은 체지방 감소 기능성 원료 중 가장 큰 비중 (점유율 47.1%)을 차지하고 있다 (2014년 기준). 또한 공액리놀레산은 가르시니아 캄보지아 추출물과 비슷한 효능을 가지고 있으나 상대적으로 가격이 비싸 가르시니아 캄보지아 추출물 출시 이후 점유율이 점차적으로 감소하는 경향을 보였으며, 녹차 추출물은 0.7%의 점유율(2010년)을 차지하였으나 꾸준히 생산량이 증가하여 2014년 23.3%로 공액리놀레산보다 높은 점유율을 차지하고 있다. 체지방 감소 건강기능식품은 가르시니아 캄보지아 추출물을 원료로 한 제품이 가장 많이 등록되어 있으며 (출처: 식품의약품안전처 홈페이지), 개별인정형 건강기능식품 중에서는 그린 커피빈추출물, 그린마테추출물, 돌외잎주정추출 분말, 미역 등 복합추출물, 와일드망고 종자추출물, 콜레우스포스폴리 추출물을 원료로 한 제품이 다수 출시되어 있으며, 미역 등 복합추출물과 풋사과 폴리페놀을 원료로 한 제품은 OEM 업체인 (주)노바렉스와 (주)서흥에서 거의 대부분 제조되고 있다.

〈표〉 체지방 감소 기능성 인정 현황(2015년 12월 기준)

구분	기능성 원료
인정형 (22개)	<i>Lactobacillus gasseri</i> BNR17, L-카르니틴 타르트레이트, 그린마테 추출물, 그린 커피빈 추출물, 깻잎 추출물, 대두배아 추출물 등 복합물, 돌외잎주정 추출 분말, 락토펜(우유정제 단백질), 레몬밤 추출물 혼합분말, 마테열수 추출물, 미역 등 복합 추출물(잔티젠), 발효식초 식류 복합물, 보이차 추출물, 식물성 유지 디글리세라이드, 와일드망고 종자 추출물, 중쇄지방산 함유 유지, 콜레우스포스폴리 추출물, 키토올리고당, 핑거루트 추출분말, 히비스커스등 복합 추출물, 서목태(쥐눈이콩) 펩타이드 추출물, 풋사과추출 폴리페놀
고시형 (5개)	가르시니아 캄보지아 껍질 추출물, 공액리놀레산(트리글리세라이드), 공액리놀레산(유리 지방산), 녹차 추출물, 키토산

(출처 : 1. 건강기능식품의 기능성원료 인정 현황, 식품의약품안전처, 2015, 2. 식품의약품안전처 홈페이지)

○ 2016년 건강기능 식품 시장 동향 조사를 살펴보면 대사성 질환과 관련된 기능성 원료는 2004년 이후 지속적으로 개별인정 승인을 받고 있다. 이는 대사성 질환 예방에 대한 꾸준한 관심 및 다양한 원료에 대한 관심이 반영된 것으로 보인다. 또한 체지방 감소의 경우 인정 원료수는 27개인 반면 인정 건수는 88건으로 중복된 원료에 대한 인정 비율이 높은 것으로 분석되며, 혈중 콜레스테롤 개선의 경우 인정 원료수는 16개이며 인정 건수는 19건으로 다양한 원료들이 기능성을 인정받았다.

〈표〉 년도별 대사성 질환 관련 기능성원료 인정 건수(2004년~2015년)

기 능 성		인정 원료수	인정 건수												
			2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	계
체지방 감소	체지방 감소에 도움	27	1	9	4	1	12	27	8	6	3	8	7	2	88
혈당 조절	식후 혈당 상승 억제에 도움	22	1	3	3	8	3	3	5	5	4	1	5		41
혈중 콜레스테롤 개선	혈중 콜레스테롤 개선에 도움	16	2	2	2	1	1	4	2		1	1	3		19
혈압 조절	높은 혈압 감소에 도움	11	1		4		8	4	3		1	1	1		23
혈행 개선	혈행 개선에 도움	11			1	1	3	2	11	2	2	1	1	1	25
간 건강	간 건강에 도움	7			1		1	11	12	1	5	2			33
	알콜성 손상으로부터 간 보호에 도움	2			1		1	1		2			1		6

(출처 : 1. 건강기능식품의 기능성원료 인정 현황, 식품의약품안전처, 2015, 2. 식품의약품안전처 홈페이지 재가공)

2. 국외 연구 및 제품 개발 현황

○ 국가별 건강기능식품의 경우 미국이 세계에서 가장 큰 시장을 형성하고 있으며, 영양과 기능성식품에 대한 인식 및 지식이 높은 수준으로서 섭취 기간도 상대적으로 긴 편에 속하며, 건강을 지키기 위한 예방차원의 섭취라는 인식이 강하다. 비타민, 무기질 관련 품목이 주를 이루고 있으며 2009년에는 오메가3, 코엔자임 Q10의 성장이 특색을 보였다. 일본의 경우 초 고령화 사회의 도래로 건강에 대한 관심이 매우 높으며, 이로 인해 건강기능식품에 대한 소비자 1인당 지출 비용은 전 세계에서 가장 높다 (출처: 건강기능식품 산업 동향, (사)한국친환경농산물가공생산자협회).

○ 혈당과 관련된 소재들을 개발하기 위한 다국적 기업, 대학, 연구소 등의 꾸준한 노력이 계속되고 있다. 소재의 종류도 다양해 포도 등에 많이 함유되어 있는 resveratrol (레스베라트롤), 엉겅퀴 추출물, 위스키분말, 계피 추출물, 비파차, 석류주스, 고추 등을 대상으로 다양한 실험이 이루어지고 있다.

○ 이밖에도 아세로라, 크롬복합물, 케일청즙, 굴추출물, 알로에베라 등이 혈당관리에 도움을 준다는 연구결과들이 나오고 있으며, 다양한 원료로부터 다국적 기업을 중심으로 빠르게 원료물질의 개발 및 제품화를 진행하고 있는 실정이다.

표. 혈당 조절 기능성소재 관련 주요 해외 연구기관의 연구

소재	효능 연구 결과	연구팀	비고
레스베라트롤	레스베라트롤의 혈당강하 효과	미국 국립노화연구소(NIA)의 라파엘 드 카보 박사, 하버드의대의 조셉 바우어, 데이비드 싱클레어교수	Nature
영경귀추출물	영경귀 추출물의 혈당강하 기능	이란 테헤란 소재 생약연구소 팔라 후세이니 박사	Phytother Res.
위스키 분말	알코올을 제거한 위스키분말의 혈당 억제 효과	일본 산토리와 교토부립대학 치히로야베 교수 공동 연구	
비파차	비파차의 혈당강하 효과	일본 가고시마대학	
석류주스	석류주스의 혈당 강하 효과	이스라엘 람밤 메디컬센터 마이클 아비람 박사	Atherosclerosis
고추	매운 고추의 혈당 강하 효과	호주 태즈매니아대학 Madeleine J Ball 박사팀	Am. J. Clin. Nutr.
참깨성분 세사민	세사민 섭취군은 고지방식이 섭취군에 비해 공복시와 당부하 시험시 모두 혈당치의 상승을 유의하게 억제	일본 산토리 건강과학연구소와 오차노미즈여자대학 공동 연구	
치자나무 열매추출물	치자나무의 게니핀(genipin)이 UCP2 효소 작용 저해	미국 베스 이스라엘 여전도병원, 하버드대학 의대 공동 연구	Cell Metabolism

○ Sulfonyl urea, metformin, glitazone, α -glucosidase 등의 여러 기전의 제2형 당뇨병 치료제가 있으나, 대부분 저혈당, 위장장애, 심장부작용, 부종, 체중증가 등의 부작용이 있다. 대표적인 2형 당뇨병 치료제인 metformin과 glitazone 계열 약물은 유용성은 있으나, 당화헤모글로빈(HbA1c)의 조절과 췌장 베타세포의 기능 강화 효능을 나타내지 못하고 있다.

○ 건강기능식품의 세계시장 규모는 2012년 세계 건강식품 시장규모는 3,464억 달러(약 350조 원)로 2009년부터 연평균 6% 성장률을 기록했다 (2015. 12. 17, 한국건강기능식품협회와 KB투자증권 발표 자료). 세계 건강기능식품의 품목은 Supplementations, Natural/Organic food, N. & OPC household product, Functional food로 구분되며, 건강기능식품에 대한 국가별 용어와 범위는 규정에 따라 차이가 있으나, Supplements를 국내 건강기능식품과 대응하는 것으로 사용한다. 국가별 Supplements를 기준으로 세계 건강기능식품 시장규모는 2012년 기준으로 약 961억 달러 규모로 2011년 902억 달러 대비 6.5% 성장하였다. 미국 325억 달러로 전 세계 시장의 33.8%를 점유하고 있고, 그 다음으로 서유럽 159억 달러 (16.5%), 중국 119억 달러 (12.4%), 일본 106억 달러 (14.2%)로 이들 4개 국가 또는 지역이 전체의 73.7%를 차지하고 있다. 반면 우리나라의 경우 약 7억 달러 수준으로서 매우 미미한 수준이다 (출처 NBJ's Global Supplement & Nutrition Industry Report 2014).

○ Global data의 자료에 의하면, 전 세계 비만 치료제 시장 규모는 2009년 11억 달러로 연평균 성장률 7%로 성장을 지속하여 2017년에는 약 20억 달러 규모에 이를 것으로 전망되며, 제약 산업에서 가장 빠르게 성장하고 있는 시장 중 하나인 전 세계 당뇨병 치료제 시장은 2009년 263억 달러에서 2016년에는 443억 달러로 성장이 예상된다 (Datamonitor, Diabetes Market to 2016, 2010). 또한 당뇨병 치료제 시장 내 인슐린 및 Incretin 유도체 제품 시장이 큰 폭으로

성장하여 시장 내 강세를 유지할 것으로 전망하였으며, 2010-2019년도 가장 큰 폭의 성장세를 나타내는 약물은 GLP-1 agonist class로, Once weeklies (일주일 내 1회 복용 제형) 제품 출시 이후 약 18.3%의 연평균성장률을 보이면서 큰 폭으로 성장할 것으로 전망하였다.

○ DPP-4 억제제 제품에는 자누비아 (시티그립틴, 한국 MSD) 가브스 (빌리글립틴, 한국노바티스), 트라젠타 (리나그립틴, 한국베링거인겔하임-일라이릴리), 온글라이자 (삭사글립틴, 한국 BMS-한국아스트라제네카), 제미글로 ((제미글립틴, LG 생명과학, 국내 최초 개발 DPP-4 억제제)가 시장에 출시되었다. 한편 bigunide계 약물인 ‘메트포민(metformin)’은 주로 간에 작용해서 인슐린 저항성을 개선시키는 2형 당뇨 치료 약물이며, 다른 당뇨병 치료제보다 사망 위험을 낮춰주고, 유방암, 전립선암, 췌장암, 간암, 구강암, 흑색종 등의 발병을 줄이는 데 도움이 된다고 알려져 있다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절	우수 향당노 천연 신소재 탐색, 특성분석 및 기작 규명 (제1세부과제) · 29
1.	연구개발 수행 내용 및 방법 29
2.	연구개발 수행 결과 42
제 2 절	향당노 천연 신소재의 대량생산 체계 구축 및 당노식 제형 상품화 (제1협동과제) 199
1.	연구개발 수행 내용 및 방법 199
2.	연구개발 수행 결과 204
제 3 절	향당노 천연 신소재의 인체적용 효능 평가 (제2협동과제) 263
1.	연구개발 수행 내용 및 방법 263
2.	연구개발 수행 결과 272
제 4 절	연구개발 성과 295
제 5 절	연구결과의 종합 분석 및 고찰 306

제 1 절 우수 향당뇨 천연 신소재 탐색, 특성분석 및 기작 규명 (제1세부과제)

1. 연구개발 수행 내용 및 방법

가. 품종별, 재배기간별 콩잎 추출물의 조제 및 HPLC 분석

(1) 품종별, 재배기간별 콩잎 표준 추출물의 조제

제1협동과제에서 대두콩, 검정콩(서리태), 서목태를 5월말~6월초에 파종하여 생육기간이 50일 이후에 일정 기간 간격으로 수확한 콩잎을 열풍건조 또는 동결건조하였다. HPLC 분석 및 생리활성 검색을 위해 건조하여 분쇄한 콩잎 100 mg에 50% EtOH, 70% EtOH, 95% EtOH 또는 EtOAc를 가하고 48 시간 동안 vortex mixer를 사용하여 실온에서 진탕하면서 추출하였다. 0.45 μ m membrane filter로 여과하여 각 용매의 가용부를 회수하고 부피를 측정 후 일정량을 감압 하에 농축·건조하여 건조물의 무게를 측정하였으며 (n = 3), 이 건조된 추출물을 HPLC 분석에 사용하였다.

나. 고성능 액체 크로마토그래피 (high-performance liquid chromatography, HPLC) 분석 방법

(1) HPLC 분석 조건 1

본 연구에서 사용한 HPLC system은 Shimadzu 10A vp series를 사용하였고, Brownlee SPP C18 column (4.6 \times 100 m, 2.7 μ m)을 사용하여 분석하였다. HPLC 용출 조건은 아래 표 1에 표시하였다.

Table 1. Analytical HPLC condition and solvent elution method 1

Analytical HPLC condition 1	Solvent elution method 1			
HPLC apparatus : Shimadzu 10A vp	Time	A (%)	B (%)	
Pump system: Shimadzu LC-10A vp with binary pump	0.0	95	5	Isocratic
Auto injector: Shimadzu SIL-10A vp	15.0	70	30	Gradient
PDA Detector: Shimadzu SPD-M10A vp (254 & 345 nm)	20.0	20	80	Gradient
Column: Brownlee SPP C18 (4.6 \times 100 m, 2.7 μ m)	23.0	0	100	Gradient
Flow rate: 1.8 ml/min	27.5	0	100	Isocratic
Flow solvent A: 0.1% Acetic acid in Water	30.0	95	5	Gradient
Flow solvent B: Acetonitrile				

(2) HPLC 분석 조건 2

HPLC 분석 조건 1을 다소 변경하고 보다 긴 HPLC column (Brownlee SPP C18, 4.6 \times 100 m, 2.7 μ m)을 사용하여 콩잎 추출물에 다량 함유된 플라보놀 배당체들이 잘 분리될 수 있는 HPLC 분석 조건 2를 확립하였으며, HPLC 용출 조건은 아래 표 2에 표시하였다.

Table 2. Analytical HPLC condition and solvent elution method 2

Analytical HPLC condition 2	Solvent elution method 2			
HPLC apparatus : Shimadzu 10A vp	Time	A (%)	B (%)	
Pump system: Shimadzu LC-10A vp with binary pump	0.0	95	5	Isocratic
Auto injector: Shimadzu SIL-10A vp	40.0	29	71	Gradient
PDA Detector: Shimadzu SPD-M10A vp (254 & 345 nm)	50.0	0	100	Gradient
Column: Brownlee SPP C18 (4.6×100 m, 2.7 μm)	55.0	95	5	Gradient
Flow rate: 1.0 ml/min	60.0	95	5	Isocratic
Flow solvent A: 0.1% Acetic acid in Water				
Flow solvent B: Acetonitrile				

다. HPLC를 이용한 PSH의 지표성분 함량 분석의 validation 방법

표준 추출물의 품질관리를 위해 HPLC를 이용하여 ICH 가이드라인 (International Conference of Harmonization (ICH)-Q2 guidelines, 2005)에 제시된 validation parameter들을 검증함으로써 시험방법의 타당성을 제시하였다.

(1) 정량법의 직선성 (Linearity): 지표물질을 가지고 일정 범위의 농도로 조제하여 위에 제시된 HPLC 분석조건에 따라 시험하여 지표물질의 농도를 X축에 대응시키고 그 농도에 대한 크로마토그램으로부터 얻은 peak 면적을 Y축에 대응시켜 검량선 (Calibration curve)를 작성하였다. 이 때, 상관계수 (Correlation of coefficient, r^2)의 값이 0.999 이상일 때 직선성을 나타내는 것으로 판정했다.

(2) 정량법의 검출한계: 표준 추출물에서 지표물질을 확실히 검출할 수 있는 최저의 농도를 확인함으로써 결정하였다.

(3) 정량법의 범위: 적절한 정밀성, 정확성 및 직선성을 충분히 제시할 수 있는 검체 중 분석대상물질 양 (또는 농도)의 하한값 및 상한값 사이의 영역을 말하며, 직선성 평가 시 함께 결정하였다.

(4) 정량법의 정밀성 (Precision): 일반적으로 일정한 지표물질 농도로 정해진 조건에 따라 측정하였을 때 각각의 측정값들 사이의 근접성 (분산정도)를 말한다. 규정된 정량법에 따라 표준 추출물과 지표물질 모두 표준편차 (Relative standard deviation, RSD) 값이 5% 이내로 재현 정밀성을 충족하는지를 확인하였다.

(5) 정량법에 대한 고찰: 상기의 분석 파라미터들을 검증하여 직선성과 검출한계, 범위 및 정밀성을 충족함으로써 분석법의 타당성을 제시하였다.

라. PSH로부터 플라보놀 배당체 (Flavonol glycosides)의 분리 및 구조 확인 방법

(1) PSH로부터 플라보놀 배당체 (Flavonol glycosides) 및 코우메스탄 (Coumedstan)계 화합물의 분리

분쇄한 건조 콩잎 (대두콩잎, 검정콩잎)으로부터 50% EtOH 추출물을 조제하였다. 우선 Analytical HPLC를 이용하여 이 50% EtOH 추출물이 함유하는 플라보놀 배당체를 탐색하였다 (그림 6 & 7 참조). 얻어진 50% EtOH 추출물을 조추출물 상태로 각종 컬럼크로마토그래피 (Diaion HP-20, ODS, Sephadex LH-20, preparative HPLC)를 수행하여 15종의 플라보놀 배당체를 분리·정제하였다 (연구개발 수행 결과의 항목 다. 참조).

코우메스탄 (Coumedstan)계 화합물은 건조된 대두콩잎의 EtOAc 추출물로부터 반복적인 silica-gel column chromatography 및 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행하여 2개의 화합물을 분리·정제하였다.

시약 및 기기. Diaion HP-20 resin (250-850 μ m, Mitsubishi Chemical Corp., Tokyo, Japan), silica gel (200-300 mesh, Merck, Germany), octadecyl silica-gel (ODS-A, 12 nm, S-150 μ m; Merck), Sephadex LH-20 (25-100 μ m, GE Healthcare Biosciences, Uppsala, Sweden), Sep-Pak C18 (Waters Co., Milford, MA, USA). preparative HPLC (Shimadzu LC-8A vp series, YMC-Pack Pro SPP C₁₈ column (20 x 250 mm, I.D. S-5 μ m, 12 nm), medium pressure liquid chromatography (MPLC, Biotage AB, Uppsala, Sweden), flash SiO₂ Cartridge (SNAP Cartridge Silica-gel FLASH 40+M, 4.0x15.0 cm, Biotage), Thin layer chromatography (TLC)는 Silica gel plate와 RP-18 plate (0.25 μ m, Merck)를 사용하였다. 추출 및 분획 시에는 1급 용매 (SK chemical, Suwon, Korea)를 사용하였고, HPLC에는 HPLC급 용매를 사용하였다.

(2) 플라보놀 배당체 및 코우메스탄계 화합물의 구조분석 방법

순수 분리된 화합물들의 구조는 NMR, Mass, UV 등의 분광학 기기를 사용하여 분석하였다. ¹H NMR과 ¹³C NMR은 각각 600MHz FT-NMR spectrometer (JEOL JNM-ECA600 600MHz, Tokyo, Japan)로 측정하였고, 수소와 탄소의 개수와 화학적 이동 (Chemical shift) 값으로 기본 골격을 예상하고, 2D-NMR spectra (¹H-¹H COSY, HMQC, HMBC) 확인을 통해 수소-수소와 수소-탄소의 연관관계를 확인하였다. 또한 electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) 분석은 Agilent 6410 triple quadrupole LC/MS 시스템 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)을 사용하여 질량 대 전하 (m/z) 값으로 화합물의 분자량을 확인하고, 기 보고된 자료와 문헌의 결과를 종합하여 최종적으로 화합물 구조를 결정하였다.

(3) 총 플라보노이드 (Total flavonoid), 총 페놀 (Total phenol) 함량 측정 방법

총 플라보노이드 함량은 Zhishen 등 (1999)이 보고한 분광분석법을 일부 수정하여 측정하였다 (Zhishen et al., 1999). Test tube에 샘플 0.2 ml과 H₂O 1.3 ml, 5% NaNO₂ 0.0075 ml를 각각 첨가하여 5분 동안 상온에서 반응시킨 후 10% AlCl₃·6H₂O 0.15 ml를 첨가하여 다시 6분 동안 상온에서 반응시킨다. 다음 1 M NaOH 0.5 ml 첨가하고, UV/Visible spectrophotometer를 이용하여 510 nm에서 흡광도를 측정한다. Quercetin을 표준물질로 사용하여 quercetin equivalents (mg quercetin/g sample)로 표시하였다.

총 페놀 함량은 Singleton & Rossi (1965)가 보고한 Folin-Ciocalteu법을 일부 수정하여

측정하였다. 시험관에 시료 0.125 ml과 H₂O 0.5 ml, Folin & Ciocalteu's phenol Reagent 0.125 ml를 첨가하여 실온에서 6분 동안 반응시킨다. 다음 7% Na₂CO₃ 1.25 ml과 H₂O 1 ml을 첨가하고 실온에서 90분 동안 반응 시킨 후 UV/Visible spectrophotometer를 이용하여 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. gallic acid을 표준물질로 사용하여 gallic acid equivalents (mg gallic acid/g sample)로 표시하였다.

마. Yeast α -glucosidase 저해활성 측정 방법

α -Glucosidase 활성의 측정은 Kim 등 (2008)의 방법을 일부 수정하여 사용하였다. 96 well plate를 사용하여 α -glucosidase 저해활성을 측정하였다. DMSO에 녹인 시료 10 μ l, 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.8) 90 μ l, 0.1 unit/ml의 yeast α -glucosidase (maltase from *Saccharomyces cerevisiae*, G5003, Sigma) 50 μ l를 넣고 5 분간 예비반응시켰다. 이 반응액에 기질인 2.5 mM *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (pNPG, Sigma) 50 μ l를 첨가하여 37 °C에서 30 분간 반응시킨 후, 100 mM Na₂CO₃ 100 μ l를 첨가하여 반응을 정지시켰다. Microplate Reader 680 (Bio-Rad, Co., Hercules, CA, USA)를 사용하여 415 nm에서 pNPG의 가수분해로 생성된 발색단인 *p*-nitrophenol의 흡광도를 측정하여 α -Glucosidase 활성을 계산하였다. 저해활성 측정을 위한 양성대조군으로는 α -glucosidase 저해제인 coumestrol (Sigma) (Yuk *et al.*, 2011)를 사용하였다.

바. Rat α -glucosidase 저해활성 측정 방법

96 well plate에 Potassium buffer (100 mM, pH 6.8) 98 μ l를 넣었다. 그리고 여기에 측정하고자 하는 시료 2 μ l와 Rat α -glucosidase (1.0 mg/ml) 50 μ l를 넣었다. 37°C에서 10분간 incubation 시킨 뒤 기질 (2.5 mM *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside)를 첨가하여 37 °C에서 60분간 반응 시킨 후, 반응의 종결을 위해 100 mM Na₂CO₃를 가하였다. 생성된 발색단의 양을 Microplate Reader (680, Bio-Rad, co., Hercules, CA, USA)를 사용하여 흡광도 415 nm 에서 측정하였다. 양성대조군으로 Acarbose를 사용하였다 (Mohamed *et al.*, 2011).

사. 저밀도지질단백질 (low-density lipoprotein, LDL)-산화 저해활성 측정 방법

(1) 사람 혈장으로부터 초원심분리기를 이용하여 LDL의 분리

적십자 혈액원에서 가져온 사람의 혈장으로부터 초원심분리기 (Beckman Optima L-100K Ultracentrifuge)를 이용하여 LDL을 분리한다. 먼저 혈장에 0.04% EDTA, 0.05% NaN₃, 0.015% phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)를 넣어 혈장에 있는 지단백질의 변성을 막는다. 100,000 x g, 4°C에서 20 시간 동안 초원심분리를 한다. 상층에 떠있는 chylomicron과 VLDL을 걷어내고 나머지 하층은 다음과 같은 식에 의해 NaBr (heavy density solution)을 이용해서 밀도를 1.063 g/ml로 맞추었다. 다시 100,000 x g, 4°C에서 24 시간 동안 초원심분리한 후 최상층의 yellow top layer에 분리된 LDL을 수거한다. 분리된 LDL을 10 mM, pH 7.4 PBS로 투석하여 고농도의 NaBr을 제거하고, 4°C에서 보관하면서 1 개월 이내에 사용하였다.

(2) Thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) assay

Cu^{2+} 은 LDL의 산화를 유도 (Cu^{2+} -mediated LDL-oxidation)한다. 따라서 이 때 생성된 불포화 지방산의 산화산물인 디알데하이드 (dialdehyde)를 TBA (thiobarbituric acid)법으로 측정하여, 생리활성물질의 LDL-항산화 활성을 측정하였다 (Ahn *et al.*, 2001).

측정하고자 하는 시료 10 μl , 사람의 혈액으로부터 초원심분리기를 이용해 분리한 LDL 10 μl (100-120 μg protein), 10 mM, pH 7.4 PBS 230 μl 를 혼합한 후에 0.125 mM CuSO_4 10 μl 를 첨가함으로써 반응을 시작한다. 37°C에서 4 시간 동안 반응시간 후, 20% trichloroacetic acid (TCA) 용액 1 ml을 첨가하여 반응을 중단시켰다. 0.05 N NaOH 용액에 녹인 0.67% thiobarbituric acid (TBA) 1 ml을 첨가하고 교반한 후, 발색반응이 일어나도록 95°C에서 15 분간 가열하고 얼음물에 냉각했다. 3,000 rpm에서 15 분 동안 원심분리한 후, 상등액의 흡광도를 540 nm에서 측정하여 생성된 malondialdehyde (MDA)의 양을 계산했다. 한편, tetramethoxypropane malonaldehyde bis (dimethylacetal)의 저장용액을 이용하여 0~10 nmol MDA를 포함하는 PBS 표준용액 250 μl 씩 만들었다. 이 표준용액을 상기와 같은 방법으로 발색시켜 540 nm에서의 흡광도를 측정하고, MDA의 표준곡선을 구했다. 양성 대조군으로는 buthylated hydroxytoluene (BHT)을 사용하였다.

아. DPPH radical 소거 활성 측정 방법

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 소거 활성의 측정은 Jeong 등 (2004)의 방법을 일부 수정하여 사용하였다. 우선, DPPH를 0.15 mM이 되도록 EtOH에 용해하여 DPPH 용액을 제조하였다. 96 well plate에 EtOH로 희석된 시료 10 μl 와 0.15 mM의 DPPH 용액을 함께 첨가한 후, 25 °C에서 40 분간 반응시켰다. 반응액은 microplate reader (680, Bio-Rad, Co., Hercules, CA, USA)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하고 DPPH 라디칼 소거능을 계산하였다. 양성대조군은 L-Ascorbic acid를 사용하였다.

자. Dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) 저해활성 측정 방법

DPP-4 저해 활성의 측정은 Kim 등 (2005)의 방법을 일부 수정하여 사용하였다. 실험에는 black 96 well plate, 50 mM Tris buffer (pH 7.5), human recombinant DPP-4 (ENZ375, Prospec Co.), H-Ala-Pro-7-amino-4-rifluoromethylcoumarin (AFC) (24126, AnaSpec co.), KR-62436(6-{2-[2-(5-cyano-4,5-dihydropyrazol-1-yl)-2-oxoethylamino]ethylamino}nicotinonitrile) (K4264, Sigma)을 사용하여 DPP-4 저해활성을 측정하였다. 측정하고자 하는 시료 2 μl 를 50 mM Tris buffer 78 μl 에 넣었다. 이 반응액에 50 mM Tris buffer에 녹인 효소인 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DPP-4 10 μl 과 50 mM Tris buffer에 녹인 기질인 0.4 mM H-Ala-Pro-AFC를 10 μl 첨가하여 실온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 반응액은 Fluorometer (Victor 2, Perkin Elmer)를 사용하여 DPP-4에 의해 dipeptide로부터 분해된 AFC의 형광값을 측정(excitation—355 nm, emission—510 nm)하여 DPP-4 활성을 계산하였다. 양성대조군으로는 DPP-IV 저해제인 KR-62436을 사용하였다 (Kim KR *et al.*, 2005).

차. *in vitro* 세포 실험 방법

(1) MIN6 췌장베타세포 실험

(가) 세포독성 측정

96 well plate에 well 당 배지와 마우스 췌장 베타 세포주인 MIN6 세포를 1×10^5 세포/100 μl 씩 넣고 37°C, 습윤한 5% CO₂ 배양기에서 24 시간 동안 배양한다. 미리 DMEM 배지에 다양한 농도의 시료를 넣어 준비 한다 (대조군은 DMSO). 각 well에서 배지를 제거한 후 시료를 처리한 DMEM 배지를 well 당 100 μl 씩 넣고 24시간 배양한 뒤, 각 well에서 배지를 100 μl 씩 제거하고 Cyto X™ (LPS solution, Korea)를 10 μl 씩 첨가하여 1 시간 동안 반응시킨 다음 Microplate Reader을 사용하여 460 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(나) 인슐린 분비능 측정

24 well plate에 MIN6 세포를 2×10^5 세포/well 씩 분주하고 37°C, 습윤한 5% CO₂ 배양기에서 24 시간 동안 배양하였다. Glucose를 함유하지 않은 Krebs buffer로 60 분간 예비반응시킨 후, 25 mM glucose를 포함한 Krebs buffer에 다양한 농도의 시료를 첨가한 배지 또는 시료를 첨가하지 않은 배지 (대조군)로 교환하여 30 분간 반응시킨 후 배지로 분비된 인슐린을 ELISA insulin kit (Alpco diagnostics)를 사용하여 측정하였다.

(2) RAW264.7 세포 실험

(가) 세포독성 측정

96 well plate에 well 당 배지와 세포를 5×10^4 세포/100 μl 씩 넣고 37°C, 습윤한 5% CO₂ 배양기에서 24 시간 동안 배양한다. 미리 DMEM 배지에 다양한 농도의 시료를 넣어 준비 한다 (대조군은 DMSO). 각 well에서 배지를 제거한 후 시료를 처리한 DMEM 배지를 well 당 200 μl 씩 넣는다. 24 시간 배양한 뒤, 각 well에서 배지를 100 μl 씩 취하고 Cyto X™ (LPS solution, Korea)를 10 μl 씩 첨가하여 30 분 동안 반응시킨 다음 Microplate Reader을 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(나) Nitric oxide (NO)의 생성량 측정

NO의 생성량은 세포 배양액을 이용하여, NO의 반응 산물인 NO₂⁻를 측정하는 방법으로 정량하였다. 96 well plate에 1×10^4 개의 cell을 넣어 키운 후 80% 이상 채워지게 되면 시험물질을 상승 농도 순으로 처리한다. 이 후, 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 lipopolysaccharide (LPS)로 16 시간 세포를 자극한 후, 배양액 50 μl 를 새로운 96 well plate에 옮긴다. 동일한 부피의 Greiss 시약 [0.5% sulfanilyamide, 0.05% N-(1-naphthyl) ethylene diamine dihydrochloride/2.5% H₃PO₄]을 첨가하여 상온에서 10 분간 반응시킨 후 540 nm에서 Microplate Reader로 시료의 흡광도를 측정하였다. NO₂⁻의 농도는 NaNO₃를 이용하여 표준곡선을 만들고, 이와 비교하여 NO의 생성량을 측정하였다.

(다) Reactive oxygen species (ROS)의 축적량 측정

ROS의 측정은 외부자극에 의해 대식세포에 축적되는 hydroxyl peroxidase의 양을 조사하기 위해 2',7' -dichlorofluorescein diacetate (DCFH₂-DA)를 사용하여 측정하였다. DCFH₂-DA는

세포 침투성이 있고 형광성을 갖고 있지 않지만, 세포 안으로 들어오면 세포 esterases에 의해 DCFH₂로 쪼개진다. 쪼개진 DCFH₂는 peroxidases, cytochrome c, Fe²⁺ 등 ROS에 의해 형광을 띠는 DCF로 산화된다. 이때 DCF를 측정하는 방법으로 ROS 축적량을 측정한다. 96 well plate에 well 당 배지와 세포를 5 x 10⁴ 세포/100 μl 씩 넣고 37°C, 습윤한 5% CO₂ 배양상자에 넣고 세포수가 80% 이상 될 때까지 배양한다. 다음 DMEM 배지를 이용하여 농도별 시료를 준비하여 100 μl/well 씩 넣고 2 시간 동안 반응시킨다. 다음 LPS (1 μg/ml)을 처리하고 18 시간 동안 세포를 자극시킨 후 DCFH₂-DA를 최종농도 15 μM로 넣어준 후 30분 동안 반응시킨다. 반응이 끝나면 PBS로 5회 수세한 후, Fluorometer (480/530, ex/em)를 사용하여 DCF의 형광 값을 측정하였다.

(3) 3T3-L1 세포 실험

(가) 세포독성 측정

96 well plate에 well 당 배지와 세포를 5 x 10³ 세포/100 μl 씩 넣고 37°C, 습윤한 5% CO₂ 배양기에서 24 시간 동안 배양한다. 24시간이 지난 후, 먼저 DMEM 배지에 다양한 농도의 시료를 넣어 준비 한다 (대조군은 DMSO). 시료를 처리한 DMEM 배지를 well 당 100 μl 씩 넣는다. 24 시간 배양한 뒤, 각 well에서 배지를 100 μl씩 제거한 후 Cyto XTM (LPS solution, Korea)를 10 μl 씩 첨가하여 60 분 동안 반응시킨 다음 Microplate Reader (680, Bio-Rad, co., Hercules, CA, USA)을 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(나) 지방축적 저해능 측정

지방세포인 3T3-L1 세포를 사용하여 adipogenesis assay를 실시하였다. 먼저 3T3-L1 세포는 10% calf serum (CS, Gibco-BRL, Gaithersberg, MD), 2 mM L-glutamine, 100 units/ml penicillin, 그리고 100 μg/ml streptomycin이 포함된 DMEM 배지에서 배양한다. 48 well plate에 2 × 10⁴ cells/500 μl씩 첨가하여 이틀간 배양한 후 세포를 100% confluent한 상태가 되면 FBS (Hyclone)로 serum이 교환된 DMEM 배지에 시료와 0.25 μM dexamethasone (DEX), 5 μg/ml insulin, 0.5 mM 1-methyl- 3isobutylxanthine (IBMX)을 첨가하여 2 일간 지방세포로의 분화를 촉진하였다. 이후에는 IBMX와 DEX를 제외하고 Insulin만을 첨가하여 위와 같은 배지 조건으로 이틀 간격으로 배지를 갈아주면서 지방이 축적될 수 있도록 8일에서 10일 까지 더 배양하였다. 이 후 Oil red O로 염색하여 세포내에 생성된 중성지방을 육안으로 관찰하고 현미경 촬영을 한다. 다음 100 μl의 isopropanol로 세포에 염색된 Oil red O 색소를 추출하여 Microplate Reader를 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정함으로써 지방축적의 정도를 정량화하였다.

(4) 유전자 발현량의 측정

각각의 시료를 처리한 세포군에서 TRI reagent (Ambion)을 이용하여 총 RNA를 분리한 다음, High-capacity cDNA Reverse Transcription kit (4368814, Applied Biosystems, USA)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 지방생합성 (adipogenesis)와 지방분해 (lipolysis)와 관련된 유전자 및 GAPDH의 발현양상을 보기 위하여 아래에 열거한 primer를 사용하였다 (Table 3). 각각의 유전자를 증폭시킬 수 있도록 합성된 oligo들과 함께 double strand deoxyribonucleic acid (dsDNA)에 끼어들어가는 SYBR Green의 특성을 이용한 QuantiTect SYBR Green PCR kit (AB science)를 사용하여 7500-Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Foster City,

CA)에서 실시간으로 cDNA의 증폭과정을 확인하였다. 결과는 GAPDH의 발현으로 정량화하여 표시하였다.

Table 3. Sequences of primer used for real-time qRT-PCR

Gene	Forward primer	Reverse primer
Pancreatic cell development and insulin sensitivity (MIN6 cells)		
Pax4	CCCAGTGTGTCTCTATCAATCG	GGGAAGAACTGGAGCCAACA
Ngn3	CACTCAGCAAACAGCGAAGAAG	GTCAGTGCCCAGATGTAGTTGTG
Ins1	TTTCTCACCTGGAAGACAGC	TGATGCTCTTCACCTTCCTG
Ins2	CCCCACCCAGGCTTTTGT	GCGGGACATGGGTGTGTAG
IRS1	GAGAAGAGACTGGCTCGGAAGA	GCCTATTCTGCCAACTCAACT
IRS2	GGCCCGAACCTCAATAACAA	CCGCGCAACACGAAAAAG
MafA	GAACCGGAGGAGAATAAGAGG	AGTCAAGTTGAGCATCACTGC
PKA	GGTTTTGCCAAGCGTGTGA	CAGCCTTGTGTAGCCTTTGC
Inflammation (RAW264.7 cells)		
CCL3	CACCCTCTGTACCTGCTCAA	TGGCGCTGAGAAGACTTGGT
COX-2	AACCGTGGGAATGTATGAGCA	AACTCTCTCCGTAGAAGAACCTTTTCCA
IL-1 β	ATGAGGACATGAGCACCTTC	CATTGAGGTGGAGAGCTTTC
IL-6	GCTACCTGGAGTACATGAAG	CTGTGACTCCAGCTTATCTG
iNOS	CTTTAGACCTCAACAGAGCC	GTAGGACAATCCACAACCTCG
Adipogenesis and lipolysis (3T3L1 cells)		
aP2	TTTCTCACCTGGAAGACAGC	TGATGCTCTTCACCTTCCTG
C/EBP α	CAAGAAGTCGGTGGACAAGA	TCAACTCCAGCACCTTCTGT
C/EBP δ	GTTTCCTCGCGGTCTCTATT	GAGGCAACGAGGAATCAAGT
C/EBP β	AAGCTGAGCGACGAGTACAA	AGCTGCTTGAACAAGTTCCG
DGAT1	ACAACCTGACCTACCGAGAT	AGTAGGGACCATCCACTGTT
DGAT2	GCTGGCATTGACTGGAACA	TGGTCAGCAGGTTGTGTGTCTT
FAS	TGTGAGTGGTTCAGAGGCAT	TTCTGTAGTGCCAGCAAGCT
PPAR γ	TGGGAGATTCTCCTGTTGAC	AGGTGGAGATGCAGGTTCTA
SREBP-1	GAGCGAGCGTTGAACTGTAT	ATGCTGGAGCTGACAGAGAA
GAPDH	ACATCATCCCTGCATCCACT	AGATCCACGACGGACACATT

Pax4, paired box 4; Ngn3, neurogenin 3; Ins1, insulin 1; Ins2, insulin 2; IRS1, insulin receptor substrate 1; IRS2, insulin receptor substrate 2; MafA, v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein A; PKA, protein kinase; Proinsulin; Cox-2, cyclooxygenase 2; IL-1 β , interleukin-1 beta; IL-6, interleukin-6; iNOS, induced nitric oxide synthase 2; ACC1, acetyl-CoA carboxylase 1; aP2, adipocyte protein 2; C/EBP α , CCAAT/enhancer binding protein alpha; C/EBP δ , CCAAT/enhancer binding protein delta; DGAT1, diacylglycerol O-acyltransferase 1; FAS, Fatty acid synthase; FATP4, fatty acid transport proteins; HSL, hormone-sensitive lipase; PGC1, PPARcoactivator 1; PPAR γ , Peroxisome proliferator-activated receptor gamma; SREBP1, Sterol regulatory element-binding protein 1; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

(5) 단백질 발현량의 측정

(가) MIN6 세포: MIN6 세포를 100 mm plate에 분주하여 24 시간 배양한 후 각 농도의 시료를 첨가한 배지로 48 시간 배양한다. 그 다음 MIN6 세포를 수확하여 단백질을 정량한다.

(나) HepG2 세포: HepG2 세포를 100 mm plate에 분주하여 24 시간 배양한 후 0.2 mM PA와 함께 각 농도의 시료를 첨가한 배지로 24 시간 배양한다. 그 다음 HepG2 세포를 수확하여 단백질을 정량한다.

(다) RAW264.7 세포: RAW264.7 세포를 24시간 배양한 후 시료를 2 시간 동안 처리 한 뒤, LPS를 24 시간 또는 15 분간 처리하였다. 그 다음 RAW264.7 세포를 수확하여 단백질을 정량한다.

(라) 3T3-L1 세포: 3T3-L1 세포는 10% CS가 포함된 DMEM 배지에서 배양한다. 세포를 100% confluent하게 깔고 2 일간 배양한 후 FBS으로 serum이 교환된 DMEM 배지에 시료와 0.25 μ M DEX, 5 μ g/ml insulin, 0.5 mM IBMX을 첨가하여 지방세포로의 분화를 촉진한 다음 3T3-L1 세포를 수확하여 단백질을 정량한다.

40 μ g의 단백질을 SDS-PAGE로 분리한 다음 PVDF로 transfer하고 transfer가 완료된 PVDF membrane을 BSA-block (CANDOR bioscience, Germany)으로 비특이적 단백질을 차단하기 위하여 한 시간 반응 시킨다. 이 후 primary PPAR γ , C/EBP α , SREBP-1, UCP, 그리고 HSL 또는 phospho-HSL 항체와 overnight 반응시킨 후, 각 항체에 대한 이차항체인 anti-goat, rabbit, mouse IgG 에 1 시간 반응시켰다. 각 반응 사이 TBST로 15분씩 4번 washing 하였다. 마지막 세척 후 각 항체에 대한 대응 단백질 band를 알아보기 위하여 ECL 용액 (Elpis biotech, Korea)으로 반응시킨 후, LAS-4000 imaging system (FujiPhoto Film, Tokyo, Japan)으로 감광하여 band를 분석하였다.

카. 지질흡수 저해 시험 (Lipid absorption test)

C57BL/6J (의생명마우스, 오창) 4 주령 음성 마우스를 1 주일간 순화시킨 후 실험에 사용했다. 지질흡수 저해 시험을 시행하기 위해 18 시간 동안 절식시켰다. 콩잎추출물 시료 (500 mg/kg body wt)는 10% PEG와 0.5% Tween 80을 포함하는 용매에 용해시킨 후 경구 투여하였다. 양성대조군으로는 Xenical (50 mg/kg body wt)을 사용하였다. 시료 투여 30 분 뒤에 corn oil (2 g/kg body wt, C8267, Sigma) 250 μ l을 경구 투여하여 지질 흡수를 유도한 후 0, 1, 2, 4 시간 후에 후안와 정맥총에서 혈액을 채취하여 혈장 TG를 측정하였다.

타. 인슐린 내성 시험 (Insulin tolerance test, ITT)

C57BL/6J (의생명마우스, 오창) 6~7 주령 음성 마우스를 3 주일간 순화시킨 후 실험에 사용하였다. 인슐린 내성 시험을 시행하기 위해 18 시간 동안 절식시켰다. 콩잎추출물 시료 (200~500 mg/kg body wt)는 10% PEG와 0.5% Tween 80을 포함하는 용매에 용해시킨 후 경구 투여하였다. 양성대조군으로는 Metformin (100 mg/kg body wt)을 사용하였다. 10 일간 시료 투여 후에 inulin (0.5 U/kg body wt, I2643, Sigma)을 복강 주사하고 0, 30, 60, 90 분 및 120

분에 각각 혈당을 측정하였다. 혈액 샘플은 마우스의 꼬리에서 채혈하여 Accu-check active test strips (Roche)을 사용하여 혈당을 측정하였다.

파. 당 부하 내당능 시험 (Oral glucose tolerance test, OGTT)

(1) 콩잎 추출물의 당부하 내당능 시험

C57BL/6J (의생명마우스, 오창) 4 주령 웅성 마우스를 3 주일간 순화시킨 후 실험에 사용하였다. 동물 사육실의 환경은 항온 ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), 항습 ($50 \pm 5\%$) 및 12시간 간격 (light on 07:00 ~ 19:00)의 광주기로 일정한 조건을 유지하였고, 동물들은 2 ~ 3마리씩 분리하여 사육하였으며, 식이와 식수는 자유롭게 섭취 (*ad libitum*) 하도록 하였다. OGTT를 시행하기 위해 18 시간 동안 절식시켰다. 콩잎추출물 시료 (500 mg/kg body wt)는 10% PEG와 0.5% Tween 80을 포함하는 용매에 용해시킨 후 경구 투여했다. 10일간 시료 투여 후에 glucose (2 g/kg body wt, G7021, Sigma)를 경구 투여하고 0, 15, 30, 60, 90 분 및 120 분에 각각 혈당을 측정하였다. 혈액 샘플은 마우스의 꼬리에서 채혈하여 Accu-check active test strips (Roche)을 사용하여 혈당을 측정하였다.

(2) 콩잎 추출물과 귀리식이섬유의 당부하 내당능 시험

C57BL/6J (의생명마우스, 오창) 4 주령 웅성 마우스를 3 주일간 순화시킨 후 실험에 사용하였다. 동물 사육실의 환경은 항온 ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), 항습 ($50 \pm 5\%$) 및 12시간 간격 (light on 07:00 ~ 19:00)의 광주기로 일정한 조건을 유지하였고, 동물들은 2 ~ 3마리씩 분리하여 사육하였으며, 식이와 식수는 자유롭게 섭취 (*ad libitum*) 하도록 하였다. 콩잎 추출물과 귀리식이섬유의 당부하 내당능 비교 및 함께 투여 시 synergistic effect를 확인하기 위하여 순화 후, 건강상태가 양호한 7주령의 마우스를 실험에 사용하였다. 고지방식이 대조군 (HFD), Oatwell (OW), Low ESL (LESL), High ESL (HESL) 및 OW+LESL군 총 5 개의 군으로 나누어 8 주간의 실험을 진행하였다 (Table 4).

Table 4. Experimental design of the anti-diabetic synergic effects of Oatwell and ESL

Groups	n	Dose of samples in diet (wt %/wt diet)
HFD ¹	5	60 kcal% high-fat diet (HFD)
Oatwell (OW)	5	HFD + 2% Oatwell ²
Low ESL (LESL)	5	HFD + 0.5% ESL
Hgih ESL (HESL)	5	HFD + 1% ESL
Oatwell + Low ESL (OW+LESL)	5	HFD + 2% Oatwell + 0.5% ESL

¹Rodent Diet with 60 kcal% fat (#D12492, powder type, Research Diets, Inc. New Brunswick, USA).

²Oatwell (β -glucan 14%, DSM Nutritional Products Ltd, Sweden)

하. 질환모델동물을 이용한 체지방 조절 및 혈당 강하 효능 검증 실험

(1) 실험동물 및 식이조성

C57BL/6J (의생명마우스, 오창) 4 주령 음성 마우스를 3 주간 정상식이 (2018S, powder type, Harlan Laboratories, Inc.) 분말사료와 물을 자유롭게 공급하면서 순화시킨 후, 건강상태가 양호한 7 주령의 마우스를 실험에 사용하였다. 실험군은 ND군, 고지방식이 대조군 (HFD), 대두콩잎 70% EtOH 추출물군 (70ESL), 검정콩(서리태)잎 70% EtOH 추출물군 (70EBL), Pinitol군 (양성대조군)의 5군으로 나누어 12 주간의 실험을 진행하였다 (Table 5). 피니톨 (D-pinitol)은 혈당조절 생리활성기능 3등급의 개별인정을 받았으며 (제2005-15호, 제2007-12호), 하루섭취량은 1.2 g/day 이다. 피니톨 또는 카이로-이노시톨의 보충이 인슐린 저항성을 해소함으로써 혈당조절에 도움을 주며, 인체시험 및 동물실험에서 혈당조절에 도움을 준다는 연구결과가 보고되었고, 특히 피니톨은 콩으로부터 추출 가능하므로 양성대조군으로 사용하였다. C57BL/6J mice에 70ESL과 70EBL이 1%씩 포함된 식이를 섭취시킨 후, 혈당 관련 인자들을 비교·분석함으로써 콩으로부터 도출된 PSH 소재에 대한 기능성을 입증하고자 실험을 진행하였다. 동물 사육실의 환경은 항온 (25 ± 2°C), 항습 (50 ± 5%) 및 12 시간 간격 (light on 07:00~19:00)의 광주기로 일정한 조건을 유지하였고, 동물들은 2~3 마리씩 분리하여 사육하였으며, 식이와 식수는 자유롭게 섭취 (*ad libitum*) 하도록 하였다.

Table 5. Experimental design of the anti-diabetic effects of 70ESL and 70EBL

Groups	n	Dose of samples in diet (wt %/wt diet)
ND ¹	10	Normal diet ¹ only
HFD ²	10	High fat diet ² (HFD) only
70ESL	10	HFD + 1% ESL (70% EtOH extracts of soy leaf)
70EBL	10	HFD + 1% EBL (70% EtOH extracts of soy leaf)
Pinitol	10	HFD + 0.15% Pinitol (CnF Co.)

¹Rodent Diet with 10% kcal fat (#D12450J, powder type, Research Diets, Inc. New Brunswick, USA);

²Rodent Diet with 60% kcal fat (#D12492, powder type, Research Diets, Inc. New Brunswick, USA).

(2) 체중 측정 및 혈액 분석 방법

체중은 매주 일정한 시간에 측정하여 기록하였으며, 4 주마다 후안와 정맥총에서 capillary tube를 사용하여 채혈한 후 heparin을 사용하여 응고를 방지하였고, 혈액 생화학적 검사를 실시하기 위하여 채혈 후 30 분 이내에 800 g (4°C)에서 15 분간 원심분리하여 혈장 (plasma)을 분리하였고, 분석 시까지 -70°C에 보관하였다. 체중 변화 및 장기무게를 측정하였고, 분리한 혈장을 이용하여 당뇨 지표인 포도당 (glucose), 간기능의 지표인 glutamate oxaloacetate transaminase (GOT)와 glutamate pyruvate transaminase (GPT) 농도는 생화학 자동분석기 (Hitachi-720, Hitachi Mecidal, Japan)를 이용하여 측정하였다. 또한 총 콜레스테롤 (total cholesterol, TC), HDL-콜레스테롤 (HDL-C), 혈장 중성지방 (Triglyceride, TG) 농도는 측정 kit (아산제약)를 사용하여 정량하였다. 혈장 인슐린 농도는 Insulin kit (ELISA kit, Alpco diagnostics)를 사용하여 측정하였다.

(3) 조직의 hematoxylin & eosin (H&E) 및 immunohistochemical (IHC) 염색 방법

적출한 췌장 조직을 10% 중성 포르말린에 고정하여 탈수한 후 침투 과정을 거쳐 파라핀에 포매하고 5 μm의 박절편을 만들어 H&E 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다. 췌장에서의

인슐린 면역조직염색 과정은 VECTASTAIN Elite ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)와 diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) peroxidase substrate kit (Vector Laboratories)의 방법을 보완하여 실시하였다.

(4) 조직에서의 유전자 발현의 측정 방법

소장, 췌장, 간, 지방조직의 유전자 발현 변화를 실시간 역전사 중합효소 연쇄 반응법 (real-time qRT-PCT)을 사용하여 관찰하였다. 간, 지방 조직은 TRI reagent (Ambion) 용액을 사용하여 각 조직으로부터 RNA를 추출한 뒤 High-capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, USA)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 각 조직에서 베타세포 기능, 지질 생합성, 인슐린 신호전달 관련 유전자들의 발현 변화를 측정하였으며, 이들 유전자들의 primer를 표 6에 표시하였다. 각각의 유전자를 증폭시킬 수 있도록 합성된 oligo들과 함께 double strand deoxyribonucleic acid (dsDNA)에 끼어 들어가는 SYBR Green의 특성을 이용한 SYBR Green Master (Roche, Germany)를 사용하여 7500-Real-Time PCR system (Applied Biosystems, USA)에서 실시간으로 cDNA의 증폭과정을 확인하여, 결과는 GAPDH의 발현량으로 정량화하여 표시하였다.

Table 6. Sequences of primer used for real-time qRT-PCR

Gene	Forward primer	Reverse primer
ACC1	AGTTTCCCAGCCAGCAGATT	ATCCATCACCACAGCCTTCA
ACC2	CCCATCACCCTCCTTCTGA	GTCCGAGTCTCCACAGCAAT
Adiponectin	CATGCCGAAGATGACGTTAC	CGATACACATAAGCGGCTTC
AdipoR1	CTCATCTACCTCTCCATCGT	GAACACTCCTGCTCTTGTCT
AdipoR2	GATTGTCATCTGTGTGCTGG	TAGGGATGATTCCACTCAGG
AMPK	GTTGCTGAGTTGTGTTCTGC	AACTTCTTCTGCTCGGTCTG
ATF3	TTTTGCTAACCTGACACCCCTTTG	CCGATGGCAGAGGTGTTTATTC
ATF4	CCTTATGACCCACCTGGAGTTAGTT	CTTGTTTTGCTCCATCTTTTTTCAG
Bip	AGGAGACTGCTGAGGCGTATTT	TCGCTGGGCATCATTGAAG
CHOP	GGAAACGAAGAGGAAGAATCAAAA	ATGTGCGTGTGACCTCTGTTG
CPT-1	CTGCACTCCTGGAAGAAGAA	GTTCTTCGTCTGGCTTGACA
Erp72	TTTGAGGGTGGCAACAGAGAT	TTGGTCCTGCTCCTCTTTGTG
FAS	TGTGAGTGGTTCAGAGGCAT	TTCTGTAGTGCCAGCAAGCT
Fkbp11	GCCAAAAGCAGGTGATTCCA	TCGCTTCTCTCCCACACACA
Foxa2	CCTTCAACCACCCCTTCTCTATC	GTGGCTGTGGTGATGTTGCT
FoxO1	TGGGCCCTAATTCGGTCAT	TTGGGTCAGGCGGTTTCATAC
GLP-1	ATAATGCTGGTGCAAGGCAG	TTGCTGTAGTCGCTGGTGAA
GLP-1R	CGCCCTCAGGGTACCACGGT	AGGAAACGCTGGCACTGCCG
GLUT-2	TTTGTCTATCGCCCTCTGCTT	GCAGCGATTTCTCAAAGACT
GLUT4	GCCCCACAGAAGGTGATTGA	AGCGTAGTGAGGGTGCCTTGT
GAPDH	ACATCATCCCTGCATCCACT	AGATCCACGACGGACACATT
Grp94	ACATCATCCCTGCATCCACT	AGATCCACGACGGACACATT
HSL	TTCGAGGGTGATGAAGGACT	ACTCTGGGTCTATGGCGAAT
IL-6	GCTACCTGGAGTACATGAAG	CTGTGACTCCAGCTTATCTG
Ins1	ACCCACCCAGGCTTTTGTGTC	CGGGACTTGGGTGTGTAGAAG
Ins2	CCCCACCCAGGCTTTTGTGTC	GCGGGACATGGGTGTGTAG
Insr	CTGAACAAAAGATGACAACGAGGAA	CTTACAGATGGTTGGGCAAACCTT

IRS1	GAGAAGAGACTGGCTCGGAAGA	GCCTATTCTGCCAACTCAACT
IRS2	GGCCCGAACCTCAATAACAA	CCGCGCAACACGAAAAAG
MafA	GAACCGGAGGAGAATAAGAGG	AGTCAAGTTGAGCATCACTGC
Neurod1	GAGGAACACGAGGCAGACAAG	TCCTCTCCCCCGTTTTCTCA
Ngn3	CACTCAGCAAACAGCGAAGAAG	GTCAGTGCCCAGATGTAGTTGTG
p58	ACATCATCCCTGCATCCACT	AGATCCACGACGGACACATT
Pax4	CCCAGTGTGCCTCTATCAATCG	GGGAAGAACTGGAGCCAACA
PCSK1/3	CTGCTTTTCGCCTTCTTTTGC	CCGCCGCCCATTCATTA
PCSK2	GAAGACGCAGCCTACACCATAA	CTCTCTTTTTACGGTCAAATCCTTCT
PDX-1	CGGAACCCGAGGAAAAACAA	TCTCTCGGTCAAGTTCAACATCA
PKA	GGTTTTGCCAAGCGTGTGA	CAGCCTTGTTGTAGCCTTTGC
PPAR α	CCTGAACATCGAGTGTCAA	GTAAGTGGCATTGTTCCGGT
PPAR γ	TGGGAGATTCTCCTGTTGAC	AGGTGGAGATGCAGGTTCTA
PPAR δ	GCAGCCTCAACATGGAATGT	GTTGCGGTTCTTCTTCTGGA
SCD1	ACGCCGACCCTCACAAATTC	AGTTTTCCGCCCTTCTCTTTG
SCD2	CCGTGGCTTCTTTTTCTCTCA	TTCCGCCCTTCTCTTTGACA
TNF α	CTCAGATCATCTTCTCAAATTCGAGTGACA	CTTCACAGAGCAATGACTCCAAAAGT
Trib3	GCTGCTTCTGCTGATGTTTCC	TCACTCGTTTTAGGACTGGACACT
UCP2	GCCTCTACGACTCTGTCAA	CTTCGACAGTGCTCTGGTAT
UCP3	AGACCCGATACATGAACGCT	TAAGGCCCTCTTCAAGTTGCT
Xbp1s	GGACTCTGACACTGTTGCCTCTT	GGTCCAACCTGTCCAGAATGC

ACC, Acetyl-CoA carboxylase; AdipoR, adiponectin receptor; ATF3, Activating transcription factor 3; Bip, Binding immunoglobulin protein; CHOP, C/EBP homologous protein; C/EBP α , CCAAT/enhancer binding protein alpha; FoxO1, forkhead box O1; GLP-1, Glucagon-like peptide 1; GLUT2, Glucose transporter type 2; G6Pase, Glucose 6-phosphatase; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; Ins1, insulin 1; Insr, insulin receptor; IRS1, insulin receptor substrate 1; IRS2, insulin receptor substrate 2; interleukin-6; MafA, v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein A; Ngn3, neurogenin 3; p58, Tumor protein p53; Pax4, paired box 4; PKA, protein kinase; PPAR α , Peroxisome proliferator-activated receptor alpha; SCD1, Stearoyl-CoA desaturase-1; TNF α , Tumor necrosis factor alpha. UCP2, Uncoupling protein 2; Xbp1s, X-box binding protein.

2. 연구개발 수행 결과

가. 배당체 고탍유 콩잎 추출물의 항당뇨 기능성 비교 분석

(1) 콩품종, 재배지역 및 수확시기별 콩잎의 여러 가지 용매 추출물 제조 및 건조 중량 비교

(가) 2012년도 수확 콩잎의 표준추출물 제조 및 건조 중량 비교

대두콩(이하 GH)을 파종하여 생육기간이 30일 이후에 15일 간격으로 수확한 콩잎을 건조하여 분쇄한 콩잎 100 mg에 70% EtOH과 95% EtOH 가하고 48 시간 동안 vortex mixer를 사용하여 진탕하면서 실온에서 추출한 후, 여과지를 사용하여 70% EtOH과 95% EtOH 가용부를 회수하고, 일정량 (50 μ l, 100 μ l, 200 μ l)을 감압 하에 농축·건조하여 건조물의 무게를 측정하였다. 성숙한 콩잎(파종 후 100일 이후에 수확한 콩잎) 추출물의 회수량은 논산(이하 NS)에서 재배한 콩잎에 비해 증평(이하 JP)에서 재배한 콩잎이 다소 많은 것으로 나타났다 (Table 7).

Table 7. Dry weights of 70%-EtOH and 95%-EtOH extracts of 2012-harvested GH soy leaves having different cultivating duration

2012-harvested soy leaves	Dry weight of soy-leaf extract (mg/ml)	
	70% EtOH	95% EtOH
2012-NS-GH-50d	29.7 \pm 0.0	15.0 \pm 0.0
2012-NS-GH-65d	26.2 \pm 0.1	11.0 \pm 0.3
2012-NS-GH-80d	38.9 \pm 0.1	18.9 \pm 0.1
2012-NS-GH-94d	28.4 \pm 0.0	14.3 \pm 0.1
2012-NS-GH-112d	27.8 \pm 0.1	15.8 \pm 0.1
2012-NS-GH-128d	28.8 \pm 0.0	15.5 \pm 0.1
2012-JP-GH-50d	23.1 \pm 0.0	12.6 \pm 0.1
2012-JP-GH-65d	32.5 \pm 0.1	18.2 \pm 0.0
2012-JP-GH-79d	27.1 \pm 0.1	15.6 \pm 0.1
2012-JP-GH-93d	35.5 \pm 0.1	19.4 \pm 0.1
2012-JP-GH-109d	34.8 \pm 0.0	21.0 \pm 0.3
2012-JP-GH-123d	32.5 \pm 0.1	17.4 \pm 0.1

Values are presented as mean \pm SD (n = 3).

(나) 2013년도 수확 콩잎의 표준추출물 제조 및 건조 중량 비교

2013년에 검정콩(서리태, BB)과 두 품종의 대두콩(WD와 GH)을 파종하여 생육기간 50일 이후에 10~15일 간격으로 수확한 50일령, 60일령, 75일령, 90일령 및 107일령 콩잎을 열풍건조 또는 동결건조하였다. 분쇄한 건조콩잎 100 mg 또는 생물콩잎 100 mg에 70% EtOH, 95% EtOH 또는 EtOAc를 1 ml 씩 첨가하고 48 시간 동안 진탕하면서 실온에서 추출한 후, 여과지를 사용하여 각 용매 추출액을 회수하고, 일정량 (70% EtOH ex. 50 μ l, 95% EtOH ex. 100 μ l, EtOAc ex. 200 μ l)을 감압 하에 농축 및 건조하여 건조물의 무게를 측정하였다.

50일령, 60일령, 75일령, 90일령 및 107일령의 열풍건조 콩잎, 107일령의 동결건조 콩잎, 107일령의 생물콩잎 추출물의 건조 중량은 모두 70% EtOH 추출물 > 95% EtOH 추출물 > EtOAc 추출물 순으로 높았으며, 이중 70% EtOH 추출물의 건조중량이 월등히 높았다. 또한 재배기간이 길어질수록 (90일령 이후부터) 추출물의 건조중량이 다소 증가하였으며, 107일령의 열풍건조콩잎과 동결건조콩잎 추출물의 건조 중량은 큰 차이를 나타내지는 않았다. 또한 품종별로 비교할 때 각 추출물의 건조중량에 두드러진 차이는 없었다. 반면에 수분을 다량 함유하고 있는 생물콩잎(평균적으로 수분 함량은 30% 내외임) 추출물의 건조 중량은 BB > WD > GH 순으로 현저하게 감소하였다 (Table 8).

Table 8. Dry weights of 70%-EtOH, 95%-EtOH, and EtOAc extracts of 2013-harvested BB, WD, and GH soy leaves having different cultivating duration

Drying method	2013-harvested soy leaves		Dry weight of soy-leaf extract (mg/ml)		
	Cultivating duration	Extraction solvent	BB	WD	GH
Hot air-dry	50 days	70% EtOH	22.0 ± 1.0	25.0 ± 1.0	21.0 ± 1.0
		95% EtOH	12.0 ± 0.0	11.0 ± 0.0	10.0 ± 0.0
		EtOAc	3.8 ± 0.3	4.0 ± 0.5	3.5 ± 0.0
	60 days	70% EtOH	26.0 ± 0.0	25.0 ± 1.0	19.0 ± 1.0
		95% EtOH	11.5 ± 0.5	11.5 ± 0.5	11.0 ± 0.0
		EtOAc	3.5 ± 1.0	3.8 ± 0.2	4.8 ± 0.3
	75 days	70% EtOH	28.0 ± 0.0	34.0 ± 2.0	24.0 ± 2.0
		95% EtOH	13.5 ± 0.5	15.5 ± 0.5	14.0 ± 1.0
		EtOAc	4.0 ± 1.0	4.7 ± 0.2	5.0 ± 1.0
	90 days	70% EtOH	34.0 ± 0.0	32.0 ± 0.0	27.0 ± 1.0
		95% EtOH	17.5 ± 0.5	18.0 ± 0.0	15.0 ± 0.0
		EtOAc	6.0 ± 0.5	5.7 ± 0.3	6.0 ± 0.5
	107 days	70% EtOH	28.0 ± 0.0	31.0 ± 1.0	29.0 ± 1.0
		95% EtOH	16.5 ± 0.5	18.5 ± 0.5	14.0 ± 0.0
		EtOAc	6.5 ± 0.5	6.5 ± 0.0	6.5 ± 0.5
Freeze-dry	107 days	70% EtOH	32.0 ± 0.0	28.0 ± 2.0	30.0 ± 0.0
		95% EtOH	19.5 ± 0.5	16.0 ± 0.0	15.5 ± 0.5
		EtOAc	7.0 ± 0.5	7.0 ± 0.0	7.0 ± 0.5
Wet	107 days	70% EtOH	20.0 ± 0.0	14.0 ± 0.0	10.0 ± 0.0
		95% EtOH	13.0 ± 0.0	8.0 ± 0.0	8.5 ± 0.5
		EtOAc	6.3 ± 0.3	6.5 ± 0.0	6.3 ± 0.3

Values are presented as mean ± SD (n = 3).

(다) 2014년도 수확 콩잎의 표준추출물 제조 및 건조 중량 비교

2014년 6월 초에 NS 지역에 대두콩(GH)와 검정콩(서리태, BB)을 파종하고 생육기간 50일 이후부터 15일 간격으로 콩잎을 수확하였다. 수확한 50일령, 65일령, 80일령, 95일령 및 115일령 콩잎은 열풍건조 후 저온실에 보관하였다. 분쇄한 건조콩잎 100 mg에 30%, 50%, 70%

또는 95% EtOH을 1 ml 씩 첨가하고 48 시간 동안 실온에서 진탕하면서 추출하였다. 여과지를 사용하여 각 용매의 추출물을 회수하고, 감압 하에 농축 및 건조하여 건조물의 무게를 측정하였다 (Table 9).

Table 9. Dry weights of 30%, 50%, 70%, and 95% EtOH extracts of 2014-harvested soy leaves having different cultivating duration

2014-harvested soy leaves		Dry weight of soy-leaf extract (mg/ml)	
Cultivating duration	Extraction solvent	GH	BB
50 days	30% EtOH	18.8 ± 1.0	21.4 ± 0.2
	50% EtOH	14.3 ± 0.4	22.0 ± 0.8
	70% EtOH	17.4 ± 0.0	19.8 ± 0.2
	95% EtOH	11.6 ± 0.2	14.3 ± 0.1
65 days	30% EtOH	15.4 ± 0.9	16.6 ± 0.6
	50% EtOH	12.8 ± 0.7	16.4 ± 0.8
	70% EtOH	23.3 ± 0.1	18.5 ± 0.1
	95% EtOH	12.0 ± 0.0	10.4 ± 0.2
80 days	30% EtOH	17.6 ± 0.5	16.9 ± 0.3
	50% EtOH	18.5 ± 0.4	13.1 ± 0.5
	70% EtOH	16.7 ± 0.3	16.3 ± 0.4
	95% EtOH	9.5 ± 1.0	9.6 ± 0.1
95 days	30% EtOH	22.6 ± 0.6	25.4 ± 0.8
	50% EtOH	21.5 ± 1.2	21.2 ± 0.5
	70% EtOH	22.7 ± 0.3	25.4 ± 0.2
	95% EtOH	12.5 ± 0.8	16.9 ± 0.4
115 days	30% EtOH	22.4 ± 0.9	30.0 ± 0.1
	50% EtOH	23.1 ± 2.5	28.0 ± 0.9
	70% EtOH	24.1 ± 0.4	31.8 ± 1.6
	95% EtOH	11.3 ± 0.8	16.2 ± 0.5

Values are presented as mean ± SD (n = 4).

GH와 BB 모두 50일령, 65일령, 80일령 콩잎에 비해 95일령과 115일령 콩잎 EtOH 추출물의 회수율이 현저하게 증가하였으며, 추출 용매별로는 70% EtOH 추출물의 수율이 가장 높고, 95% EtOH 추출물의 수율이 가장 낮았다.

품종별로는 95일령과 115일령 BB 추출물의 수율이 GH 추출물에 비해 월등히 높았다. 재배 기간별로 추출 용매를 달리한 추출물의 수율을 비교한 결과, BB는 115일령의 70% EtOH 추출물의 수율이 31.8%로 가장 높았고, GH는 115일령의 70% EtOH 추출물의 수율이 24.1%로 가장 높았다.

상기 표 8에 표시한 바와 같이 2013년도에 수확한 BB는 90일령의 70% EtOH 추출물의 수율이 34%로 가장 높고, GH는 107일령의 70% EtOH 추출물의 회수율이 29%로 가장 높았다. 반면에 같은 지역의 2014년도에는 여름 장마 기간이 길어서 상대적으로 일조량이 적었다. 이에 따라 2014년도에 수확한 콩잎은 2013년도에 수확한 콩잎에 비해 재배기간이 길어진 것으로

판단되며, HPLC 분석을 통해 추출물 조성을 비교하고자 하였다.

(라) 2015년도 수확 콩잎의 표준추출물 제조 및 건조 중량 비교

2015년도에는 NS 지역에 대두콩(GH), 검정콩(서리태, BB) 및 쥐눈이콩(서목태, NG)을 파종하여 생육기간 55일 이후부터 평균 20일 간격으로 콩잎을 수확하였다. 수확한 55일령, 75일령, 95일령, 104일령, 118일령 및 132일령 콩잎은 열풍건조 후 저온실에 보관하였다. 분쇄한 건조콩잎 100 mg에 50%, 70% 및 95% EtOH을 1 ml 씩 첨가하고 48 시간 동안 실온에서 진탕하면서 추출하였다. 여과지를 사용하여 각 용매의 추출물을 회수하고, 감압 하에 농축 및 건조하여 건조물의 무게를 측정하였다 (Table 10).

Table 10. Dry weights of 30%, 50%, 70%, and 95% EtOH extracts of 2015-harvested soy leaves having different cultivating duration

2015-harvested soy leaves		Dry weight of soy-leaf extract (mg/ml)		
Cultivating duration	Extraction solvent	GH	BB	NG
55 days	50% EtOH	20.6 ± 0.1	21.1 ± 0.1	
	70% EtOH	18.8 ± 0.7	18.6 ± 0.5	
	95% EtOH	9.7 ± 0.6	10.3 ± 0.6	
75 days	50% EtOH	23.5 ± 0.7	24.3 ± 0.3	22.5 ± 0.4
	70% EtOH	21.3 ± 0.6	21.4 ± 0.4	20.7 ± 0.5
	95% EtOH	10.5 ± 0.5	12.4 ± 0.2	12.0 ± 0.2
95 days	50% EtOH	24.2 ± 0.2	23.0 ± 0.2	23.4 ± 0.1
	70% EtOH	22.1 ± 0.2	21.3 ± 0.2	20.7 ± 0.5
	95% EtOH	10.9 ± 0.1	11.7 ± 0.8	12.0 ± 0.3
104 days	50% EtOH	28.3 ± 0.4	26.3 ± 0.7	26.6 ± 0.3
	70% EtOH	24.3 ± 0.2	23.4 ± 0.3	23.6 ± 0.3
	95% EtOH	13.6 ± 1.1	12.8 ± 0.5	12.6 ± 0.5
118 days	50% EtOH	27.7 ± 0.2	27.7 ± 1.8	27.2 ± 0.4
	70% EtOH	24.0 ± 0.5	25.5 ± 1.0	23.6 ± 0.2
	95% EtOH	12.4 ± 0.3	13.4 ± 0.3	15.3 ± 1.1
132 days	50% EtOH	28.2 ± 1.0	28.0 ± 1.1	21.6 ± 0.2
	70% EtOH	26.3 ± 1.1	24.7 ± 0.4	17.4 ± 0.8
	95% EtOH	10.3 ± 0.6	13.0 ± 0.6	10.1 ± 0.6

Values are presented as mean ± SD (n = 4).

서로 다른 3가지 품종 모두 100일 이후에 수확한 성숙한 콩잎의 추출물 회수율이 현저하게 증가하였으며, 추출 용매별로는 추출물의 회수율은 50% EtOH > 70% EtOH > 95% EtOH 순이었다. 품종별로 추출물의 회수율은 큰 차이를 나타내지 않았으며, 성숙한 콩잎에서 추출물의 회수율이 증가하는 것은 2013, 2014년도와 같은 현상을 나타내었다. 즉, 104-132일령 GH와 BB의 50%, 70% EtOH 추출물의 회수율이 각각 24.0-28.3%, 23.4-28.0%로 높게 나타났다. 한편 104일령과 118일령 NG의 50%, 70% EtOH 추출물의 회수율이 23.6-27.2%로 높은 반면에 132일령 NG의 50%, 70% EtOH 추출물의 회수율은 17.4-21.6%로 현저히 낮았다.

(마) 2016년도 수확 콩잎의 표준추출물 제조 및 건조 중량 비교

2016년에는 대두콩(GH)과 검정콩(검정콩1호, BB), 검정콩-청자3호(서리태-청자3호, BB-CJ), 쥐눈이콩(서목태, NG)을 과종하여 각각의 콩잎을 수확하였다. 수확한 55일령, 70일령, 90일령, 102일령 콩잎은 열풍건조 후 저온실에 보관하였다. 분쇄한 건조콩잎 100 mg에 50-95% EtOH을 1 ml 씩 첨가하고 48 시간 동안 실온에서 진탕하면서 추출하였다. 여과지를 사용하여 각 용매의 추출물을 회수하고, 감압 하에 농축 및 건조하여 건조물의 무게를 측정하여 정리하였다 (Table 11).

4 품종 모두 70일령 콩잎의 70% EtOH 추출물과 90일령 콩잎의 50% EtOH, 70% EtOH 추출물에서 회수율이 높은 경향을 나타냈으며, 95% EtOH 추출물의 경우 50% EtOH 또는 70% EtOH 추출물의 회수율의 절반 정도로 낮았다. 2015년도에 수확한 55-104일령 콩잎 GH, BB와 비교하였을 때, 2016년도에 수확한 콩잎 추출물의 회수율이 다소 증가하여 27.2-30.8% 이었다. 70일령 BB-CJ의 70% EtOH 추출물의 회수율이 30.8%로 가장 높았다. BB-CJ는 BB와 비교하기 위해 2016년도에 처음으로 재배하여 콩잎을 수확한 품종이며, BB 추출물에 비해 회수율은 큰 차이를 나타내지 않았다.

Table 11. Dry weights of 50%, 70%, and 95% EtOH extracts of 2016-harvested soy leaves having different cultivating duration

2016-harvested soy leaves		Dry weight of soy-leaf extract (mg/ml)			
Cultivating duration	Extraction solvents	GH	BB	BB-CJ	NG
55 days	50% EtOH	22.5 ± 0.6	21.2 ± 0.2	19.9 ± 0.3	21.3 ± 0.2
	70% EtOH	24.8 ± 0.2	24.1 ± 0.5	25.7 ± 0.3	21.6 ± 1.0
	95% EtOH	11.0 ± 0.9	10.7 ± 0.3	12.7 ± 1.0	11.4 ± 0.3
70 days	50% EtOH	23.6 ± 0.8	23.1 ± 0.4	24.8 ± 0.6	24.9 ± 0.7
	70% EtOH	28.4 ± 1.0	28.4 ± 0.3	30.8 ± 0.8	24.1 ± 0.9
	95% EtOH	12.1 ± 0.6	14.0 ± 0.9	13.7 ± 0.9	14.9 ± 0.7
90 days	50% EtOH	24.6 ± 0.4	29.4 ± 0.4	28.4 ± 0.8	30.2 ± 0.5
	70% EtOH	27.5 ± 0.8	29.5 ± 0.5	28.1 ± 0.2	29.9 ± 0.2
	95% EtOH	12.1 ± 0.3	15.2 ± 0.9	13.7 ± 0.8	15.1 ± 0.9
102 days	50% EtOH	23.9 ± 0.2	23.3 ± 0.4	23.5 ± 1.1	21.5 ± 0.6
	70% EtOH	27.2 ± 0.9	21.4 ± 0.2	23.3 ± 0.9	20.4 ± 0.2
	95% EtOH	11.3 ± 0.3	10.5 ± 0.4	10.7 ± 0.3	11.6 ± 0.5

Values are presented as mean ± SD (n = 4).

(2) 콩잎 수확시기, 건조방법 및 추출용매에 따른 총 페놀 및 플라보노이드 함량 분석

(가) 2014년도 수확 콩잎의 총 페놀 및 플라보노이드 함량 분석

총 페놀 함량은 GH와 BB 콩잎 추출물 모두 추출 용매에 따른 총 페놀 함량의 두드러진 차이는 나타나지 않았다. 즉, GH 추출물의 총 페놀 함량은 25.3-56.4 mg gallic acid equivalents/g extract 이었고, BB 추출물의 총 페놀 함량은 24.0-56.6 mg gallic acid equivalents/g extract 이었다. 이 중 115일령 GH와 BB 콩잎 추출물의 총 페놀 함량이 추출 용매와 무관하게 다소 증가하는 양상을 나타내었다.

총 플라보노이드 함량은 GH와 BB 콩잎 추출물 모두 재배 기간에 따른 일정한 양상은 나타나지 않았으며, 품종에 관계없이 95% EtOH 추출물의 총 플라보노이드 함량이 다른 용매 추출물에 비해 1.5-8.8배로 현저하게 높았다. 이는 HPLC profile로부터 고농도의 EtOH로 추출할수록 GH와 BB 콩잎 추출물이 함유하는 플라보놀 배당체와 함께 이들의 aglycon 성분이 더 많이 추출되고, 한편으로는 엽록소의 분산물인 pheophorbide계 화합물의 함량이 증가한 것으로 판단되었다 (Table 12).

Table 12. Contents of total phenolics and total flavonoids of 30%, 50%, 70%, and 95% EtOH extracts from the 2014-harvested GH and BB soy leaves having different cultivating duration

2014-harvested soy leaves		Total phenols (mg gallic acid equivalents/g extract)		Total flavonoids (mg quercetin equivalents/g extract)	
Cultivating duration	Extraction solvent	GH	BB	GH	BB
50 days	30% EtOH	25.3 ± 0.3	34.3 ± 0.8	15.7 ± 0.3	28.5 ± 0.3
	50% EtOH	28.7 ± 1.1	34.4 ± 0.0	15.7 ± 0.3	31.3 ± 0.3
	70% EtOH	25.5 ± 0.1	29.9 ± 0.9	24.2 ± 1.1	34.8 ± 1.1
	95% EtOH	35.6 ± 1.4	24.0 ± 0.7	138.3 ± 0.8	122.0 ± 1.7
65 days	30% EtOH	33.9 ± 0.2	40.0 ± 0.6	25.6 ± 1.0	44.4 ± 1.4
	50% EtOH	33.9 ± 0.8	41.4 ± 1.0	30.3 ± 1.0	52.9 ± 1.7
	70% EtOH	32.4 ± 1.0	43.8 ± 1.4	49.8 ± 1.1	75.3 ± 1.0
	95% EtOH	37.0 ± 1.7	37.9 ± 1.2	152.2 ± 3.6	243.5 ± 1.8
80 days	30% EtOH	48.6 ± 1.2	44.7 ± 0.9	27.6 ± 0.6	55.9 ± 1.9
	50% EtOH	34.5 ± 0.6	49.6 ± 0.7	34.0 ± 0.3	74.2 ± 1.5
	70% EtOH	34.4 ± 1.0	50.2 ± 0.8	49.6 ± 1.2	100.5 ± 0.6
	95% EtOH	31.3 ± 0.7	47.1 ± 2.6	159.2 ± 2.5	202.8 ± 3.3
95 days	30% EtOH	28.7 ± 0.4	29.3 ± 1.0	25.0 ± 0.3	33.3 ± 0.8
	50% EtOH	31.1 ± 0.6	42.0 ± 1.0	31.1 ± 0.3	67.2 ± 0.8
	70% EtOH	28.8 ± 1.0	46.0 ± 1.0	36.6 ± 0.3	86.4 ± 1.1
	95% EtOH	26.9 ± 2.0	40.9 ± 1.2	106.6 ± 1.8	139.4 ± 2.5
115 days	30% EtOH	46.8 ± 1.2	43.7 ± 0.8	43.3 ± 0.3	60.0 ± 0.3
	50% EtOH	53.2 ± 0.9	56.5 ± 2.0	55.3 ± 1.0	99.2 ± 1.6
	70% EtOH	55.5 ± 0.1	51.3 ± 1.2	66.4 ± 1.0	98.5 ± 1.2
	95% EtOH	56.4 ± 1.6	46.9 ± 1.3	124.0 ± 1.8	144.8 ± 1.6

Values are presented as mean ± SD (n = 3).

(나) 2015년도 수확 콩잎의 총 페놀 및 플라보노이드 함량 분석

2015년도 수확한 GH, BB, NG 콩잎 모두 재배 기간 및 추출 용매에 따른 총 페놀 함량 변화의 두드러진 양상을 나타나지 않았다 (Table 13). 그러나 GH 또는 BB 추출물의 총 페놀 함량은 각각 19.3-47.6 mg gallic acid equivalents/g extract of GH, 18.5-37.9 mg gallic acid equivalents/g extract of BB인 반면에 NG 추출물의 총 페놀 함량은 31.1-51.6 mg gallic acid equivalents/g extract of NG로 다소 높았다.

Table 13. Contents of total phenolics of 50%, 70%, and 95% EtOH extracts from the 2015-harvested GH, BB, and NG soy leaves having different cultivating duration

2015-harvested soy leaves		Total phenols (mg gallic acid equivalents/g extract)		
Cultivating duration	Extraction solvent	GH	BB	NG
55 days	50% EtOH	22.6 ± 0.2	29.7 ± 0.1	
	70% EtOH	25.5 ± 1.9	34.7 ± 0.2	
	95% EtOH	40.8 ± 0.7	29.4 ± 2.1	
75 days	50% EtOH	19.3 ± 1.2	26.8 ± 2.4	31.1 ± 0.9
	70% EtOH	25.0 ± 1.2	30.0 ± 1.1	38.5 ± 0.9
	95% EtOH	36.2 ± 1.0	18.5 ± 0.1	43.3 ± 1.3
95 days	50% EtOH	21.7 ± 1.7	31.9 ± 1.2	37.3 ± 2.3
	70% EtOH	28.4 ± 0.8	32.9 ± 3.1	38.6 ± 2.6
	95% EtOH	29.6 ± 0.0	33.9 ± 1.6	33.9 ± 1.6
104 days	50% EtOH	31.8 ± 0.5	34.3 ± 1.6	37.1 ± 0.2
	70% EtOH	34.1 ± 0.6	34.4 ± 2.4	43.3 ± 2.3
	95% EtOH	33.6 ± 0.0	24.7 ± 0.3	40.1 ± 0.3
118 days	50% EtOH	30.5 ± 1.2	40.4 ± 0.3	40.0 ± 3.1
	70% EtOH	34.9 ± 0.3	38.7 ± 1.9	48.2 ± 0.1
	95% EtOH	32.3 ± 0.9	33.2 ± 0.1	51.6 ± 0.6
132 days	50% EtOH	36.8 ± 0.2	34.7 ± 0.3	35.8 ± 0.7
	70% EtOH	40.0 ± 0.3	37.9 ± 2.1	47.6 ± 0.8
	95% EtOH	47.6 ± 0.3	31.9 ± 0.0	46.8 ± 0.6

Values are presented as mean ± SD (n = 3).

총 플라보노이드 함량 또한 재배 기간에 따른 두드러진 함량 변화를 보이지 않았으나, GH, BB, NG 콩잎 모두 2014년도 수확 콩잎의 결과와 같은 양상으로 추출 용매인 EtOH 비율의 높아질수록 총 플라보노이드 함량은 증가하는 양상을 나타내었다. 특히 NG콩잎 95% EtOH 추출물의 총 플라보노이드 함량이 GH콩잎 또는 BB콩잎 95% EtOH 추출물에 비해 높은 양상을 나타냈으며, 특히 118일령과 132일령 NG콩잎의 95% EtOH 추출물의 총 플라보노이드 함량은 각각 242.2, 255.6 mg quercetin equivalents/g extract로 현저히 높은 함량을 나타내었다 (Table 14).

Table 14. Contents of total flavonoids of 50%, 70%, and 95% EtOH extracts from the 2015-harvested GH, BB, and NG soy leaves having different cultivating duration

2015-harvested soy leaves		Total flavonoids (mg quercetin equivalents/g extract)		
Cultivating duration	Extraction solvents	GH	BB	NG
55 days	50% EtOH	15.4 ± 0.1	34.8 ± 2.1	
	70% EtOH	21.4 ± 0.8	49.5 ± 2.0	
	95% EtOH	166.6 ± 0.9	179.4 ± 3.2	
75 days	50% EtOH	14.2 ± 0.1	31.0 ± 2.2	32.5 ± 1.7
	70% EtOH	27.7 ± 1.3	40.1 ± 1.7	53.6 ± 2.3
	95% EtOH	136.1 ± 0.9	81.2 ± 2.6	200.7 ± 0.9
95 days	50% EtOH	16.0 ± 0.3	45.7 ± 1.7	46.1 ± 1.8
	70% EtOH	31.4 ± 1.4	47.6 ± 0.8	55.6 ± 1.3
	95% EtOH	145.9 ± 0.9	169.6 ± 1.7	189.8 ± 3.0
104 days	50% EtOH	28.8 ± 2.1	51.9 ± 0.4	51.2 ± 1.4
	70% EtOH	36.0 ± 1.6	52.5 ± 2.6	77.6 ± 0.3
	95% EtOH	117.2 ± 1.7	112.9 ± 2.6	193.4 ± 3.8
118 days	50% EtOH	25.5 ± 1.4	66.3 ± 0.8	60.1 ± 0.3
	70% EtOH	35.4 ± 0.9	58.2 ± 1.9	86.5 ± 1.1
	95% EtOH	193.4 ± 3.8	183.0 ± 1.7	242.2 ± 0.9
132 days	50% EtOH	37.7 ± 0.3	49.1 ± 0.4	44.9 ± 1.4
	70% EtOH	47.4 ± 0.1	57.2 ± 0.8	121.2 ± 0.5
	95% EtOH	104.4 ± 0.9	129.4 ± 3.4	255.6 ± 0.9

Values are presented as mean ± SD (n = 3).

(다) 2016년도 수확 콩잎의 총 페놀 및 플라보노이드 함량 분석

2016년도 수확한 GH, BB, BB-CJ, NG 콩잎 모두 재배 기간에 및 추출 용매에 따른 총 페놀 함량 변화의 두드러진 양상을 나타나지 않았다 (Table 15). 그러나 GH 추출물의 총 페놀 함량은 15.3-35.8 mg gallic acid equivalents/g extract of GH, BB-CJ 추출물의 총 페놀 함량은 14.6-34.3 mg gallic acid equivalents/g extract of BB-CJ)-인 반면에 NG 추출물의 총 페놀 함량은 19.5-43.3 mg gallic acid equivalents/g extract of NG, BB 추출물의 총 페놀 함량은 22.3-51.8 mg gallic acid equivalents/g extract of BB로 다소 높았다. 따라서 BB와 BB-CJ는 그 함유성분의 조성이 다소 다를 것으로 예측되었다.

총 플라보노이드 함량 또한 재배 기간에 따른 두드러진 함량 변화를 보이지 않았으나, GH, BB, BB-CJ, NG 콩잎 모두 2014년도, 2015년도 수확 콩잎의 결과와 같은 양상으로 추출 용매인 EtOH 비율의 높아질수록 총 플라보노이드 함량은 증가하는 양상을 나타내었다. 하지만 102일령 콩잎 추출물의 경우 70% EtOH 추출물의 총 플라보노이드 함량에 비해 95% EtOH 추출물의 총 플라보노이드 함량이 현저하게 낮아졌다. 또한 품종에 무관하게 55일령 어린 콩잎의 95% EtOH 추출물의 총 플라보노이드 함량이 70일령, 95일령, 102일령의 95% EtOH 추출물에 비해 다소 높았다 (Table 16). 또한 모든 일령 콩잎추출물에서 GH콩잎에 비해 검정콩잎인 BB, BB-CJ, NG의 총 플라보노이드 함량이 높게 나타났다 (Table 16)/.

Table 15. Contents of total phenolics of 50%, 70%, and 95% EtOH extracts from the 2016–harvested GH, BB, BB(CJ), and NG soy leaves having different cultivating duration

2016–harvested soy leaves		Total phenols (mg gallic acid equivalents/g extract)			
Cultivating duration	Extraction solvents	GH	BB	BB(CJ)	NG
55 days	50% EtOH	18.8 ± 0.6	29.8 ± 0.6	27.4 ± 0.4	29.1 ± 0.0
	70% EtOH	19.5 ± 0.0	34.7 ± 0.5	27.8 ± 0.3	29.0 ± 0.3
	95% EtOH	12.8 ± 0.0	22.9 ± 0.4	16.3 ± 0.1	22.2 ± 0.0
70 days	50% EtOH	27.9 ± 0.0	29.8 ± 0.6	31.6 ± 0.4	31.7 ± 0.6
	70% EtOH	21.1 ± 0.5	25.1 ± 0.2	20.4 ± 0.2	28.3 ± 0.5
	95% EtOH	15.3 ± 0.1	22.3 ± 0.1	14.6 ± 0.0	20.2 ± 0.1
90 days	50% EtOH	29.9 ± 0.1	38.3 ± 0.4	30.0 ± 0.3	36.2 ± 0.4
	70% EtOH	19.5 ± 0.0	31.7 ± 0.2	23.4 ± 0.2	32.4 ± 0.0
	95% EtOH	16.2 ± 0.0	22.8 ± 0.3	13.5 ± 0.1	19.5 ± 0.3
102 days	50% EtOH	35.8 ± 0.1	51.8 ± 0.3	34.3 ± 0.1	43.3 ± 0.1
	70% EtOH	22.4 ± 0.3	48.9 ± 0.2	30.7 ± 0.0	43.3 ± 0.3
	95% EtOH	16.2 ± 0.0	29.2 ± 0.4	14.9 ± 0.1	24.8 ± 0.0

Values are presented as mean ± SD (n = 2).

Table 16. Contents of total flavonoids of 50%, 70%, and 95% EtOH extracts from the 2016–harvested GH, BB, BB(CJ), and NG soy leaves having different cultivating duration

2016–harvested soy leaves		Total flavonoids (mg quercetin equivalents/g extract)			
Cultivating duration	Extraction solvents	GH	BB	BB–CJ	NG
55 days	50% EtOH	7.3 ± 0.0	22.5 ± 0.7	23.9 ± 0.0	20.0 ± 0.0
	70% EtOH	37.6 ± 1.9	69.6 ± 1.9	46.9 ± 0.0	60.3 ± 0.0
	95% EtOH	195.7 ± 5.1	222.7 ± 0.1	222.7 ± 0.1	230.7 ± 3.4
70 days	50% EtOH	19.0 ± 0.0	23.4 ± 0.7	29.8 ± 1.4	25.4 ± 0.7
	70% EtOH	32.3 ± 0.0	45.6 ± 0.0	32.3 ± 0.0	55.6 ± 0.9
	95% EtOH	161.6 ± 1.1	216.4 ± 2.7	197.1 ± 0.6	214.6 ± 1.6
90 days	50% EtOH	18.5 ± 0.7	35.2 ± 0.7	26.4 ± 0.7	31.8 ± 0.0
	70% EtOH	22.9 ± 0.0	54.9 ± 0.0	33.6 ± 0.0	55.6 ± 0.9
	95% EtOH	167.5 ± 1.2	204.9 ± 2.7	201.6 ± 4.0	203.5 ± 4.3
102 days	50% EtOH	22.0 ± 2.8	55.3 ± 0.0	30.8 ± 0.0	46.0 ± 6.2
	70% EtOH	21.6 ± 0.0	86.9 ± 0.0	46.3 ± 0.9	74.3 ± 0.9
	95% EtOH	71.1 ± 0.1	142.1 ± 2.0	213.3 ± 2.5	234.2 ± 0.1

Values are presented as mean ± SD (n = 2).

(3) Yeast α -glucosidase 저해 활성 비교

(가) 2013년도 수확 콩잎의 재배기간 및 추출용매에 따른 yeast α -glucosidase 저해활성 비교

① 용매별 건조콩잎 추출물의 α -glucosidase 저해활성 비교: α -glucosidase 저해제는 식후 혈당을 낮추고, 각종 당뇨 합병증을 억제하는 당뇨병 치료제의 좋은 타겟이다. 재배기간별 건조콩잎 시료 (BB, WD, GH)로부터 조제한 70% EtOH, 95% EtOH, EtOAc 추출물의 yeast α -glucosidase의 저해활성을 50 μ g/ml 농도에서 측정하였다 (Table 17). 전반적으로 추출 용매인 70% EtOH < 95% EtOH < EtOAc의 순으로 yeast α -glucosidase의 저해활성이 증가하였다. 또한 콩잎의 일령이 증가함에 따라 추출물의 yeast α -glucosidase 저해활성이 증가하였다. 특히 검정콩잎인 BB에 비해 대두콩잎인 WD와 GH의 EtOAc 추출물이 각각 56.6%, 73.3%의 높은 α -glucosidase 저해활성을 나타냈다. 선행 연구를 통해 강한 α -glucosidase의 저해활성을 갖는 coumestan계 화합물(또는 pterocarpan계 화합물이라고도 함)인 coumestrol, isotrifoliol, phaseol의 함량이 콩잎의 재배기간이 길어짐에 따라 증가하는 것을 보고한 바 있다 (Yuk *et al.*, 2011). 따라서 대두콩잎인 WD와 GH의 EtOAc 추출물이 높은 α -glucosidase 저해활성을 나타내는 것은 coumestan계 화합물의 함량 증가로 설명할 수 있다. 검정콩잎인 BB는 상대적으로 coumestan계 화합물의 함량이 매우 낮다.

Table 17. Yeast α -glucosidase inhibitory activities of 70% EtOH, 95% EtOH, and EtOAc extracts from the wet and hot-air dried 2013-harvested BB, WD, and GH soy leaves

2013-harvested soy leaves		Inhibition of yeast α -glucosidase at 50 μ g/ml (%)		
Cultivating duration	Extraction solvent	BB	WD	GH
50 days-dried	70% EtOH	0	0	0
	95% EtOH	0	0	0
	EtOAc	6.4 \pm 3.4	10.2 \pm 2.9	1.8 \pm 0.7
60 days-dried	70% EtOH	0	0	0
	95% EtOH	0	0	0
	EtOAc	1.6 \pm 2.5	7.3 \pm 2.6	14.5 \pm 0.7
75 days-dried	70% EtOH	0	3.3 \pm 0.4	12.5 \pm 1.1
	95% EtOH	2.3 \pm 1.4	8.3 \pm 0.2	12.1 \pm 0.7
	EtOAc	8.5 \pm 0.5	28.6 \pm 2.0	30.7 \pm 0.4
90 days-dried	70% EtOH	0	25.0 \pm 0.5	28.5 \pm 0.2
	95% EtOH	0	23.9 \pm 0.6	29.2 \pm 0.5
	EtOAc	6.5 \pm 1.5	44.2 \pm 2.2	54.6 \pm 0.1
107 days-dried	70% EtOH	0	27.6 \pm 0.8	38.2 \pm 0.3
	95% EtOH	12.6 \pm 1.7	40.2 \pm 0.2	36.7 \pm 0.2
	EtOAc	22.3 \pm 0.1	56.6 \pm 0.2	73.3 \pm 1.3
107 days-Wet	70% EtOH	17.0 \pm 1.2	44.0 \pm 1.0	49.9 \pm 0.4
	95% EtOH	23.8 \pm 0.3	66.3 \pm 1.1	50.8 \pm 1.1
	EtOAc	29.9 \pm 1.7	73.2 \pm 0.2	65.2 \pm 0.2
Positive control (Coumestrol 5 μ M)		46.8 \pm 2.7	51.0 \pm 1.1	46.5 \pm 0.6

Values are presented as mean \pm SD (n = 3).

② 생물콩잎과 건조콩잎 추출물의 α -glucosidase 저해활성 비교: yeast α -glucosidase 저해활성이 높은 107일령 생물콩잎과 건조콩잎으로부터 제조한 70% EtOH, 95% EtOH, EtOAc 추출물의 yeast α -glucosidase 저해 활성을 50 μ g/ml 농도에서 측정하여 비교하였다 (Table 17). 전반적으로 콩품종과 용매 조건에 상관없이 생물콩잎 추출물의 α -glucosidase 저해활성이 열풍건조 콩잎에 비해 높은 것으로부터 열풍건조 과정에서 α -glucosidase 저해활성을 나타내는 생리활성물질 일부가 소실 또는 변성되거나, 또는 수분이 있는 상태에서 추출 효율이 증가하는 기능성물질이 있는 것으로 추측된다.

③ 추출 기간에 따른 α -glucosidase 저해활성 비교: 110일령 생물콩잎을 50% EtOH, 70% EtOH, 95% EtOH, EtOAc를 사용하여 각각 2일, 5일, 8일 동안 추출하여 제조한 추출물들의 yeast α -glucosidase 저해활성을 50 μ g/ml 농도에서 측정하였다 (Table 18). 추출 기간에 따른 추출물의 저해활성이 콩품종별로 차이가 있는 것을 확인하였다. 즉, BB-추출물은 2일 또는 5일 동안 추출한 추출물에 비해 8일 동안 추출한 추출물의 α -glucosidase 저해활성이 현저하게 증가하였다. 또한 WD-추출물은 추출 기간에 큰 영향을 받지 않는 반면에, GH-추출물은 2일 또는 5일 동안 추출한 추출물에 비해 8일 동안 추출한 추출물의 α -glucosidase 저해활성이 현저하게 낮아졌다. 또한 앞서 설명한 것과 같이 같은 추출 기간 내에서는 50% EtOH < 70% EtOH < 95% EtOH < EtOAc 순으로 상대적으로 추출 용매의 극성이 낮아짐에 따라 추출물의 α -glucosidase 저해활성이 증가하는 경향을 나타내었다 (Table 18).

Table 18. Comparison of yeast α -glucosidase inhibitory activities on extraction duration of the wet-2013-harvested BB, WD, and GH soy leaves

Wet-2013-110d soy leaf		Inhibition of Yeast α -glucosidase at 50 μ g/ml (%)		
Extraction duration	Extraction solvent	BB	WD	GH
2 days	50% EtOH	5.7 \pm 2.0	27.8 \pm 0.6	26.5 \pm 0.1
	70% EtOH	7.0 \pm 1.7	41.3 \pm 0.8	28.7 \pm 0.0
	95% EtOH	6.1 \pm 2.0	40.2 \pm 0.2	40.5 \pm 0.1
	EtOAc	43.8 \pm 1.2	75.7 \pm 0.1	76.3 \pm 0.0
5 days	50% EtOH	0	26.9 \pm 0.1	24.6 \pm 0.3
	70% EtOH	7.5 \pm 0.3	28.4 \pm 0.3	23.6 \pm 0.3
	95% EtOH.	6.3 \pm 0.5	41.4 \pm 0.9	38.6 \pm 0.9
	EtOAc	49.1 \pm 0.2	83.3 \pm 0.2	80.9 \pm 0.6
8 days	50% EtOH	25.1 \pm 0.3	22.1 \pm 2.5	16.3 \pm 1.3
	70% EtOH	39.1 \pm 0.8	26.7 \pm 1.3	11.2 \pm 0.5
	95% EtOH	40.4 \pm 0.8	21.4 \pm 2.7	10.7 \pm 0.5
	EtOAc	81.5 \pm 0.1	73.9 \pm 0.3	44.7 \pm 0.0
Positive control (Coumestrol 5 μ M)		49.1 \pm 2.0	49.1 \pm 2.0	51.8 \pm 2.3

Values are presented as mean \pm SD (n = 3).

(나) 2014년도 수확 콩잎의 재배기간 및 추출용매에 따른 yeast α -glucosidase 저해활성 비교

재배기간별 건조콩잎 시료(GH, BB)로부터 조제한 30% EtOH, 50% EtOH, 70% EtOH, 95% EtOH 추출물의 yeast α -glucosidase의 저해활성을 100 μ g/ml 농도에서 측정하였다 (Table 19). 전반적으로 2013년도 수확 콩잎에 비해 α -glucosidase의 저해활성이 낮게 나타났다. 이중 GH-115일령 콩잎의 50%, 70%, 95% EtOH 추출물에서 각각 37.6%, 44.6%, 47.8%씩 비교적 높은 yeast α -glucosidase 저해활성을 나타냈다 (Table 19). 이는 앞서 설명한 바와 같이 coumestan계 화합물의 yeast α -glucosidase 저해활성에서 기인한 것으로 판단되며, 콩잎이 함유하는 플라보놀 배당체들은 대부분 yeast 약한 α -glucosidase 저해활성을 나타낸다 (Table 59 참조). 따라서 coumestan계 화합물의 함량이 낮은 BB-콩잎 추출물은 전반적으로 α -glucosidase 저해활성이 매우 낮았다 (Table 19).

Table 19. Yeast α -glucosidase inhibitory activities of the EtOH extracts from the 2014-harvested GH and BB soy leaves having different cultivating duration

2014-harvested soy leaves		Inhibition of yeast α -glucosidase at 100 μ g/ml (%)	
Cultivating duration	Extraction solvent	GH	BB
50 days	30% EtOH	0	2.8 \pm 1.1
	50% EtOH	0	4.3 \pm 0.1
	70% EtOH	3.0 \pm 0.0	9.1 \pm 0.1
	95% EtOH	0.7 \pm 0.1	12.7 \pm 0.1
65 days	30% EtOH	0	0.7 \pm 3.1
	50% EtOH	0.1 \pm 0.2	3.0 \pm 0.9
	70% EtOH	4.2 \pm 0.5	8.5 \pm 0.8
	95% EtOH	0	12.2 \pm 0.2
80 days	30% EtOH	0	0
	50% EtOH	2.2 \pm 0.1	11.0 \pm 0.7
	70% EtOH	1.2 \pm 0.3	8.7 \pm 0.1
	95% EtOH	0	10.2 \pm 0.1
95 days	30% EtOH	0	0
	50% EtOH	5.5 \pm 0.2	14.9 \pm 0.3
	70% EtOH	0	8.1 \pm 0.8
	95% EtOH	0	10.6 \pm 0.5
115 days	30% EtOH	0	0
	50% EtOH	37.6 \pm 0.0	14.0 \pm 0.3
	70% EtOH	44.6 \pm 0.6	12.3 \pm 0.9
	95% EtOH	47.8 \pm 0.3	9.5 \pm 0.7
Positive control (Coumestrol 5 μ M)		49.9 \pm 1.0	

Values are presented as mean \pm SD (n = 3).

(다) 2015년도 수확 콩잎의 재배기간 및 추출용매에 따른 yeast α -glucosidase 저해활성 비교

재배기간별 건조콩잎 시료(GH, BB, NG)로부터 조제한 50% EtOH, 70% EtOH, 95% EtOH 추출물의 yeast α -glucosidase의 저해활성을 100 μ g/ml 농도에서 측정하였다 (Table 20).

배당체 고함유 추출물 대상으로 yeast α -glucosidase의 저해활성을 측정하기 위해 건조콩잎 시료(BB, WD, GH)의 50% EtOH 추출물과 70% EtOH 추출물만의 yeast α -glucosidase의 저해활성을 100 μ g/ml 농도에서 측정하였다 (Table 20). GH와 BB의 50% EtOH과 70% EtOH 추출물에서 콩잎 재배기간이 길어질수록 yeast α -glucosidase의 활성이 증가하였으며, 132일령의 70% EtOH 추출물에서 각각 36.6%와 37.1%의 yeast α -glucosidase 저해활성을 나타냈다. 반면에 NG-콩잎의 추출물은 재배기간 및 용매 조건과 무관하게 전반적으로 24.0-29.9%의 yeast α -glucosidase 저해활성을 나타냈다.

Table 20. Yeast α -glucosidase inhibitory activities of the EtOH extracts from the 2015-harvested GH, BB, and NG soy leaves having different cultivating duration

2015-harvested soy leaves		Inhibition of yeast α -glucosidase at 100 μ g/ml (%)		
Cultivating duration	Extraction solvent	GH	BB	NG
55 days	50% EtOH	27.6 \pm 1.2	11.4 \pm 0.5	
	70% EtOH	17.4 \pm 0.5	4.6 \pm 0.4	
75 days	50% EtOH	17.4 \pm 0.8	7.5 \pm 0.7	32.2 \pm 1.4
	70% EtOH	15.8 \pm 0.9	8.5 \pm 1.0	29.9 \pm 0.6
95 days	50% EtOH	13.8 \pm 0.5	13.2 \pm 1.2	28.8 \pm 0.5
	70% EtOH	22.7 \pm 0.7	17.9 \pm 0.3	24.0 \pm 1.4
104 days	50% EtOH	15.6 \pm 0.3	20.4 \pm 0.4	26.7 \pm 0.4
	70% EtOH	26.6 \pm 0.8	19.2 \pm 0.9	24.0 \pm 0.7
118 days	50% EtOH	17.3 \pm 0.6	27.1 \pm 0.6	24.4 \pm 0.6
	70% EtOH	23.3 \pm 0.5	26.8 \pm 0.1	25.2 \pm 0.3
132 days	50% EtOH	26.0 \pm 1.3	30.7 \pm 0.4	28.2 \pm 0.5
	70% EtOH	36.6 \pm 1.0	37.1 \pm 1.7	28.5 \pm 0.2
Positive control (Coumestrol 5 μ M)		56.7 \pm 3.0		

Values are presented as mean \pm SD (n = 3).

(4) LDL-oxidation 저해활성 비교

(가) 2013년도 수확 콩잎의 재배기간 및 추출용매에 따른 LDL-oxidation 저해활성 비교

① 용매별 건조콩잎 추출물의 LDL-oxidation 저해활성 비교: 재배기간별 건조콩잎 시료 (BB, WD, GH)로부터 조제한 70% EtOH, 95% EtOH, EtOAc 추출물의 LDL-oxidation 저해활성을 40 μ g/ml 농도에서 측정하였다 (Table 21). LDL-oxidation은 동맥경화 초기에 동맥병변 형성에 작용하는 주요한 인자이다. 모든 품종에서 재배기간이 길어질수록 LDL-항산화 활성이 다소 높아지는 경향을 나타내었다. BB 추출물의 경우, 모든 수확 시기에서 70% EtOH과 95% EtOH 추출물의 LDL-oxidation 저해활성이 매우 높은 반면에, EtOAc 추출물의 LDL-항산화 활성은 상대적으로 매우 낮은 편이었다. 또한 70% EtOH 추출물의 LDL-oxidation 저해활성이 95% EtOH 추출물에 비해 높은 것으로부터 LDL-항산화 활성을 나타내는 물질이 비교적 극성물질일 것으로 판단된다. WD와 GH 추출물의 경우, EtOH 추출물보다 EtOAc 추출물에서 높은 LDL-항산화 활성이 관찰되었다. 따라서 BB 추출물과 달리 WD와 GH 추출물의 LDL-항산화 활성을 나타내는 물질은 상대적으로

비극성물질일 것으로 추측된다. 또한 WD와 GH 추출물은 재배기간이 길어짐에 따라 LDL-항산화 활성이 현저하게 높아졌으며, 107일령 GH콩잎의 추출물은 용매 조건에 관계없이 LDL-항산화 활성이 매우 높았다 (Table 21). 강한 LDL-항산화 활성을 갖는 테로카판계 화합물의 함량이 콩잎의 재배기간이 길어짐에 따라 증가하는 것을 보고한 바 있다 (Lee *et al.*; Yuk *et al.*, 2011). 이는 BB 추출물과 달리 107일령의 WD와 GH 추출물에서 높은 DL-항산화 활성을 나타내는 것은 coumestrol의 함량 증가로 설명할 수 있다.

Table 21. LDL-oxidation inhibitory activities of 70% EtOH, 95% EtOH, and EtOAc extracts from the wet and hot-air dried 2013-harvested BB, WD, and GH soy leaves

2013-harvested soy leaves		Inhibition of LDL-oxidation at 40 µg/ml (%)		
Cultivating duration	Extraction solvent	BB	WD	GH
50 days-dried	70% EtOH	84.6 ± 0.0	3.2 ± 0.5	12.7 ± 0.9
	95% EtOH	61.4 ± 0.6	10.3 ± 0.6	11.2 ± 0.4
	EtOAc	14.3 ± 0.5	17.2 ± 1.3	15.9 ± 0.3
60 days-dried	70% EtOH	78.5 ± 0.2	6.2 ± 0.0	3.1 ± 0.1
	95% EtOH	66.5 ± 0.3	3.7 ± 0.5	5.2 ± 0.4
	EtOAc	18.8 ± 0.2	14.5 ± 0.4	13.9 ± 0.6
75 days-dried	70% EtOH	88.9 ± 0.7	15.3 ± 0.7	42.1 ± 1.0
	95% EtOH	76.5 ± 0.6	21.2 ± 0.6	29.0 ± 0.2
	EtOAc	13.3 ± 0.3	39.2 ± 0.6	35.6 ± 0.6
90 days-dried	70% EtOH	92.3 ± 0.1	52.8 ± 0.5	68.7 ± 0.2
	95% EtOH	93.8 ± 0.3	33.3 ± 0.9	44.8 ± 0.2
	EtOAc	7.3 ± 0.5	69.2 ± 0.3	65.2 ± 0.4
107 days-dried	70% EtOH	94.9 ± 0.4	48.2 ± 0.1	79.2 ± 0.1
	95% EtOH	93.7 ± 0.6	50.9 ± 0.0	71.2 ± 0.0
	EtOAc	20.6 ± 0.3	75.8 ± 0.8	80.1 ± 0.3
107 days-Wet	70% EtOH	84.9 ± 0.1	44.7 ± 0.2	44.4 ± 0.3
	95% EtOH	82.7 ± 0.6	43.1 ± 0.6	48.6 ± 0.5
	EtOAc	44.4 ± 0.6	39.9 ± 0.5	57.4 ± 0.2
Positive control (BHT 2 µM)		43.0 ± 0.9		

Values are presented as mean ± SD (n = 3).

② 생물콩잎과 건조콩잎 추출물의 LDL-oxidation 저해활성 비교: LDL-oxidation 저해 활성이 높은 107일령 생물콩잎과 건조콩잎으로부터 제조한 70% EtOH, 95% EtOH, EtOAc 추출물의 LDL-oxidation 저해 활성을 40 µg/ml 농도에서 측정하여 비교하였다 (Table 21). BB 생물콩잎 추출물의 경우, 70% EtOH과 95% EtOH 추출물의 LDL-항산화 활성은 건조콩잎 추출물에 비해 다소 낮아진 반면, EtOAc 추출물의 LDL-항산화 활성은 건조콩잎 추출물에 비해 증가되었다. WD와 GH 생물콩잎 추출물의 경우, 용매조건에 상관없이 LDL-항산화 활성이 건조콩잎 추출물에 비해 현저하게 낮은 것으로부터 열풍건조 과정에서 LDL-항산화 활성을 나타내는 생리활성물질이 생성된 것으로 추측된다.

③ 추출 기간에 따른 LDL-oxidation 저해활성 비교: 110일령 생물콩잎을 50% EtOH, 70% EtOH, 95% EtOH, EtOAc를 사용하여 각각 2일, 5일, 8일 동안 추출하여 제조한 추출물들의 LDL-oxidation 저해활성을 40 μ g/ml 농도에서 측정하였다 (Table 22). 추출 기간에 상관없이 전반적으로 95% EtOH < 70% EtOH < 50% EtOH \leq EtOAc 순으로 LDL-항산화 활성이 높아지는 경향을 나타내었다. BB추출물은 2일과 5일간 추출할 경우 전반적으로 매우 높은 LDL-항산화 활성을 나타내는 반면에, 70% EtOH과 95% EtOH로 8일간 추출할 경우 LDL-항산화 활성이 40% 이하로 현저하게 낮아지는 현상을 나타내었다. WD추출물과 GH추출물은 추출 기간이 길어짐에 따라 LDL-항산화 활성이 다소 증가하지만 큰 영향을 받지 않는 것으로 판단된다.

Table 22. Comparison of LDL-oxidation inhibitory activities on extraction duration of the wet-2013-harvested BB, WD, and GH soy leaves

Wet-2013-110d soy leaf		Inhibition of LDL-oxidation at 40 μ g/ml (%)		
Extraction duration	Extraction solvent	BB	WD	GH
2 days	50% EtOH	95.0 \pm 0.0	82.2 \pm 0.5	91.5 \pm 0.4
	70% EtOH	91.0 \pm 0.7	56.6 \pm 0.8	85.6 \pm 0.3
	95% EtOH	88.9 \pm 0.3	33.9 \pm 0.2	28.9 \pm 0.0
	EtOAc	94.3 \pm 0.0	89.2 \pm 0.6	90.5 \pm 0.2
5 days	50% EtOH	95.4 \pm 0.1	81.7 \pm 0.0	91.4 \pm 0.4
	70% EtOH	89.5 \pm 1.6	59.2 \pm 0.1	70.1 \pm 0.7
	95% EtOH	85.3 \pm 0.1	31.3 \pm 0.5	32.2 \pm 1.2
	EtOAc	93.1 \pm 0.6	93.7 \pm 1.2	95.0 \pm 0.4
8 days	50% EtOH	82.8 \pm 0.4	75.7 \pm 0.1	94.2 \pm 0.7
	70% EtOH	35.6 \pm 0.2	66.5 \pm 0.3	88.6 \pm 1.8
	95% EtOH	28.0 \pm 0.6	55.7 \pm 1.5	35.8 \pm 0.0
	EtOAc	94.3 \pm 0.0	93.4 \pm 0.4	93.7 \pm 1.3
Positive control (BHT 2 μ M)		56.3 \pm 1.4		

Values are presented as mean \pm SD (n = 3).

(나) 2014년도 수확 콩잎의 재배기간 및 추출용매에 따른 LDL-oxidation 저해활성 비교

재배기간별 건조콩잎 시료(GH, BB)로부터 조제한 30% EtOH, 50% EtOH, 70% EtOH, 95% EtOH 추출물의 LDL-oxidation 저해활성을 40 μ g/ml 농도에서 측정하였다 (Table 23). GH-115일령 콩잎 추출물의 LDL-항산화 활성이 현저하게 증가하였으며, 이는 앞에서 설명한 것처럼 테로카판계 화합물의 강한 LDL-항산화 활성에서 기인한 것으로 판단된다. 반면에 GH콩잎 추출물이 함유하는 kaempferol glycoside (KG)들은 대부분 LDL-항산화 활성이 매우 낮다. BB콩잎의 경우 재배 기간이 길어질수록 LDL-항산화 활성이 증가하는 양상을 나타내었다. 특히, 40 μ g/ml의 농도에서 BB-115일령 콩잎의 70% EtOH > 50% EtOH > 30% EtOH > 95% EtOH 추출물 순으로 강한 LDL-항산화 활성을 나타내었다. 이는 BB콩잎 추출물이 함유하는 quercetin glycoside (QG)들의 강한 LDL-항산화 활성에 기인한 것으로 판단된다.

Table 23. LDL-oxidation inhibitory activities of the EtOH extracts from the 2014-harvested GH and BB soy leaves having different cultivating duration

2014-harvested soy leaves		Inhibition of LDL-oxidation at 40 $\mu\text{g/ml}$ (%)	
Cultivating duration	Extraction solvent	GH	BB
50 days	30% EtOH	15.5 \pm 0.1	0.8 \pm 0.4
	50% EtOH	6.9 \pm 0.1	10.8 \pm 0.2
	70% EtOH	11.6 \pm 2.0	31.7 \pm 1.7
	95% EtOH	7.6 \pm 0.5	8.4 \pm 1.5
65 days	30% EtOH	1.0 \pm 1.8	2.5 \pm 1.8
	50% EtOH	4.0 \pm 1.1	22.5 \pm 0.7
	70% EtOH	8.5 \pm 2.5	77.8 \pm 0.4
	95% EtOH	0	15.9 \pm 0.6
80 days	30% EtOH	8.2 \pm 2.7	4.5 \pm 2.9
	50% EtOH	17.7 \pm 1.7	80.8 \pm 0.9
	70% EtOH	21.4 \pm 0.2	91.2 \pm 0.0
	95% EtOH	3.4 \pm 2.9	29.8 \pm 0.3
95 days	30% EtOH	2.7 \pm 0.5	11.3 \pm 0.1
	50% EtOH	5.3 \pm 1.0	69.8 \pm 0.4
	70% EtOH	8.8 \pm 1.5	86.3 \pm 0.3
	95% EtOH	0	11.3 \pm 0.5
115 days	30% EtOH	39.2 \pm 0.2	61.2 \pm 0.1
	50% EtOH	57.7 \pm 0.4	88.2 \pm 0.9
	70% EtOH	66.8 \pm 1.1	100
	95% EtOH	64.7 \pm 0.2	51.6 \pm 0.2
Positive control (BHT 2 μM)		48.0 \pm 0.5	

Values are presented as mean \pm SD (n = 3).

(다) 2015년도 수확 콩잎의 재배기간 및 추출용매에 따른 LDL-oxidation 저해활성 비교

재배기간별 건조콩잎 시료(GH, BB, NG)로부터 조제한 50% EtOH, 70% EtOH, 95% EtOH 추출물의 LDL-oxidation 저해활성을 40 $\mu\text{g/ml}$ 또는 20 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 측정하였다 (Table 24). GH 추출물의 경우 재배기간이 길어질수록 LDL-항산화 활성이 증가하는 양상을 나타내었으며, 특히 GH-132일령 70% EtOH 추출물의 LDL-항산화 활성이 현저하게 증가하였다. BB와 NG 추출물의 경우 40 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 모두 우수한 LDL 항산화 활성을 보여 20 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 재검색하였다 (Table 24). 그 결과, BB 추출물은 104일령과 118일령 사이의 LDL-항산화 활성이 우수하였으며, 특히 118일령의 50% EtOH 추출물이 20 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 52.7%로 가장 높은 LDL-항산화 활성을 나타내었다. NG 추출물도 104일령과 118일령 사이에서 우수한 LDL-항산화 활성을 보였으며, 특히 118일령의 70% EtOH 추출물은 20 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 98.1%의 가장 우수한 LDL-항산화 활성을 보였다. 이는 BB콩잎 추출물이 함유하는 quercetin glycoside (QG)들의 강한 LDL-항산화 활성에 기인한 것으로 판단되며 Table 60 참조), 특히 104일령과 118일령에서 지표성분인 QG5의 함량과 관계있음을 HPLC 분석을 통해 확인하였다 (Figs. 19 & 20 참조).

Table 24. LDL-oxidation inhibitory activities of the EtOH extracts from the 2015-harvested GH, BB, and NG soy leaves having different cultivating duration

2015-harvested soy leaves		Inhibition of LDL-oxidation at 40 $\mu\text{g/ml}$ (%)			Inhibition of LDL-oxidation at 20 $\mu\text{g/ml}$ (%)	
Cultivating duration	Extraction solvents	GH	BB	NG	BB	NG
55 days	50% EtOH	0.6 \pm 3.6	83.6 \pm 1.7		6.6 \pm 0.8	
	70% EtOH	4.6 \pm 0.9	87.0 \pm 0.8		32.4 \pm 0.3	
	95% EtOH	5.2 \pm 0.3	32.5 \pm 0.3		12.8 \pm 0.1	
75 days	50% EtOH	1.2 \pm 0.1	68.4 \pm 0.1	33.1 \pm 0.2	0.5 \pm 0.7	0
	70% EtOH	8.0 \pm 0.7	74.3 \pm 1.4	84.3 \pm 0.2	5.8 \pm 0.6	12.0 \pm 0.3
	95% EtOH	9.7 \pm 0.3	39.1 \pm 0.1	39.2 \pm 0.0	20.1 \pm 0.2	21.1 \pm 0.6
95 days	50% EtOH	0	92.6 \pm 0.5	85.0 \pm 0.0	34.7 \pm 0.1	9.0 \pm 0.5
	70% EtOH	0	86.8 \pm 0.2	92.5 \pm 0.3	31.1 \pm 0.1	23.1 \pm 0.6
	95% EtOH	5.4 \pm 0.0	33.3 \pm 0.2	41.5 \pm 0.1	14.3 \pm 0.2	23.5 \pm 0.6
104 days	50% EtOH	5.8 \pm 0.1	92.1 \pm 0.4	92.0 \pm 0.0	19.7 \pm 3.2	15.7 \pm 0.3
	70% EtOH	19.6 \pm 0.0	87.3 \pm 1.9	91.6 \pm 0.0	47.5 \pm 0.2	80.0 \pm 1.4
	95% EtOH	29.5 \pm 1.4	23.2 \pm 0.1	48.1 \pm 0.2	9.7 \pm 0.1	32.7 \pm 0.5
118 days	50% EtOH	2.3 \pm 0.6	93.1 \pm 0.6	93.0 \pm 0.0	52.7 \pm 0.3	77.1 \pm 1.6
	70% EtOH	18.7 \pm 1.0	91.1 \pm 0.4	91.9 \pm 0.4	33.8 \pm 0.6	98.1 \pm 0.1
	95% EtOH	19.9 \pm 0.5	30.7 \pm 0.2	70.2 \pm 0.2	12.2 \pm 0.7	64.8 \pm 0.3
132 days	50% EtOH	38.6 \pm 1.6	89.0 \pm 1.5	63.4 \pm 1.9	25.1 \pm 0.1	0
	70% EtOH	57.1 \pm 1.3	91.3 \pm 0.7	91.2 \pm 0.3	12.6 \pm 1.0	37.6 \pm 1.8
	95% EtOH	33.6 \pm 0.1	35.4 \pm 0.2	75.9 \pm 1.0	28.1 \pm 0.1	58.7 \pm 0.0
Positive control (BHT 2 μM)		48.4 \pm 0.4			48.0 \pm 0.4	

Values are presented as mean \pm SD (n = 3).

(라) 2016년도 수확 콩잎의 재배기간 및 추출용매에 따른 LDL-oxidation 저해활성 비교

재배기간별 건조콩잎 시료(GH, BB, BB-CJ, NG)로부터 조제한 50% EtOH, 70% EtOH, 95% EtOH 추출물의 LDL-oxidation 저해활성을 40 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 측정하였다 (Table 25). GH 추출물 중 GH-102일령의 50% EtOH 추출물에서 가장 높은 LDL-항산화 활성을 보였으나, 전체적으로 다른 세 가지 품종에 비하여 낮은 활성을 보였다. 위에서 언급한 것처럼 GH 추출물이 함유하는 kaempferol glycoside (KG)들은 대부분 LDL-항산화 활성이 매우 낮다. BB, BB-CJ, NG의 50% EtOH, 70% EtOH 추출물의 경우 40 $\mu\text{g/ml}$ 에서 우수한 LDL-항산화 활성을 보였다. 이는 BB, BB-CJ, NG 콩잎이 함유하는 quercetin glycoside (QG)들의 강한 LDL-항산화 활성에서 기인한 것으로 판단된다.

Table 25. LDL-oxidation inhibitory activities of the EtOH extracts from the 2015-harvested GH, BB, BB-CJ, and NG soy leaves having different cultivating duration

2016-harvested soy leaves		Inhibition of LDL-oxidation at 40 µg/ml (%)			
Cultivating duration	Extraction solvent	GH	BB	BB-CJ	NG
55 days	50% EtOH	16.0 ± 1.7	78.1 ± 0.1	55.7 ± 2.0	49.5 ± 1.1
	70% EtOH	43.1 ± 0.1	90.8 ± 0.8	72.6 ± 4.1	75.9 ± 0.8
	95% EtOH	25.3 ± 0.1	42.4 ± 0.0	27.4 ± 0.2	46.4 ± 0.0
70 days	50% EtOH	45.0 ± 0.3	51.3 ± 0.5	89.5 ± 0.1	72.5 ± 0.2
	70% EtOH	41.7 ± 0.2	80.1 ± 2.4	67.3 ± 0.4	85.2 ± 0.0
	95% EtOH	12.6 ± 0.4	25.7 ± 0.0	17.8 ± 0.1	23.8 ± 0.3
90 days	50% EtOH	57.0 ± 0.3	91.6 ± 2.3	64.1 ± 1.6	82.9 ± 0.6
	70% EtOH	32.1 ± 3.6	75.1 ± 0.1	50.9 ± 1.4	90.0 ± 0.6
	95% EtOH	28.6 ± 0.1	20.4 ± 0.0	8.4 ± 0.0	37.7 ± 2.9
102 days	50% EtOH	61.5 ± 0.0	99.4 ± 0.1	61.6 ± 0.2	89.8 ± 0.0
	70% EtOH	48.3 ± 0.2	97.2 ± 0.2	78.1 ± 1.2	95.7 ± 0.4
	95% EtOH	45.3 ± 0.0	57.0 ± 0.0	14.7 ± 0.2	73.6 ± 0.1
Positive control (BHT 2 µM)		53.8 ± 0.2			

Values are presented as mean ± SD (n = 3).

(5) DPPH 자유라디칼 소거 활성 비교

(가) 2015년도 수확 콩잎의 재배기간 및 추출용매에 따른 DPPH 자유라디칼 소거 활성 비교

재배기간별 건조콩잎 시료(GH, BB, NG)로부터 조제한 50% EtOH, 70% EtOH, 95% EtOH 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성을 측정하였다 (Table 26). 추출 용매에 따른 DPPH 라디칼 소거능 활성을 비교해 보았을 때 GH, BB, NG 콩잎 모두 50% EtOH, 70% EtOH 추출물에 비해 95% EtOH 추출물의 활성이 감소하는 양상을 나타내었다. 전반적으로 70% EtOH 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성이 상대적으로 높았다.

GH콩잎 추출물의 경우 재배 기간이 늘어남에 따라 DPPH 라디칼 소거능도 증가하였으나, 200 µg/ml에서 비교적 낮은 라디칼 소거능 활성을 보여주었다. 이는 LDL-항산화 활성 결과와 같은 양상이다. 대두콩잎(GH)이 함유하는 kaempferol glycoside (KG)들은 대부분 DPPH라디칼 소거 활성이 매우 낮다 (Table 61 참조).

BB콩잎과 NG콩잎 추출물의 DPPH 라디칼 소거능도 LDL-항산화 활성 결과와 유사한 경향을 보였다. BB콩잎과 NG콩잎 추출물은 95일령, 104일령, 118일령 사이에서 40% 이상의 DPPH 라디칼 소거 활성을 보였으며, 특히 118일령-NG의 70% EtOH 추출물이 64.6%로 가장 우수한 DPPH 라디칼 소거 활성을 보였다. 이는 BB콩잎 추출물이 함유하는 quercetin glycoside (QG)들의 강한 DPPH 라디칼 소거 활성에 기인한 것으로 판단되며, 특히 104일령과 118일령에서 지표성분인 QG5의 함량과 관계있음을 HPLC 분석을 통해 확인하였다 (Figs. 19 & 20 참조).

Table 26. DPPH radical scavenging activities of the EtOH extracts from the 2015-harvested GH, BB, and NG soy leaves having different cultivating duration

2015-harvested soy leaves		DPPH radical scavenging activity at 200 µg/ml (%)		
Cultivating duration	Extraction solvents	GH	BB	NG
55 days	50% EtOH	10.5 ± 0.7	30.2 ± 2.8	
	70% EtOH	17.3 ± 0.7	42.0 ± 1.7	
	95% EtOH	6.5 ± 0.9	8.3 ± 1.0	
75 days	50% EtOH	10.3 ± 0.6	30.5 ± 1.6	28.0 ± 1.3
	70% EtOH	16.4 ± 0.3	36.3 ± 0.4	40.5 ± 1.6
	95% EtOH	7.5 ± 1.2	9.0 ± 0.5	14.1 ± 0.7
95 days	50% EtOH	16.1 ± 1.3	42.3 ± 0.5	42.6 ± 0.5
	70% EtOH	19.2 ± 0.5	41.7 ± 1.0	42.2 ± 1.3
	95% EtOH	9.8 ± 0.5	10.8 ± 1.1	15.5 ± 0.7
104 days	50% EtOH	21.4 ± 0.5	42.6 ± 0.8	41.5 ± 1.6
	70% EtOH	24.7 ± 0.4	48.9 ± 1.1	52.3 ± 1.4
	95% EtOH	7.8 ± 0.7	11.1 ± 0.8	18.7 ± 1.0
118 days	50% EtOH	20.0 ± 0.5	48.4 ± 1.1	54.2 ± 1.5
	70% EtOH	23.8 ± 0.3	48.4 ± 0.9	64.6 ± 1.3
	95% EtOH	10.0 ± 1.1	11.2 ± 0.5	21.9 ± 0.7
132 days	50% EtOH	24.0 ± 0.5	43.7 ± 1.2	26.3 ± 1.4
	70% EtOH	26.1 ± 0.4	42.3 ± 0.6	42.5 ± 1.6
	95% EtOH	13.1 ± 0.6	11.1 ± 0.5	15.1 ± 0.6
L-Ascorbic acid 28 µM		38.7 ± 1.5		

Values are presented as mean ± SD (n = 2).

(나) 2016년도 수확 콩잎의 재배기간 및 추출용매에 따른 DPPH 자유라디칼 소거 활성 비교

재배기간별 건조콩잎 시료(GH, BB, BB-CJ, NG)로부터 조제한 50% EtOH, 70% EtOH, 95% EtOH 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성을 측정하였다 (Table 27). 같은 일열을 콩잎 추출물을 비교했을 때 GH < BB-CJ < BB < NG 순으로 DPPH 라디칼 소거 활성이 높게 나타났다.

GH콩잎 추출물은 전반적으로 20.5% 이하의 낮은 DPPH 라디칼 소거 활성을 나타냈다. BB와 NG 추출물들은 재배 기간이 늘어남에 따라 DPPH 라디칼 소거능도 증가하였으나, 2015년도 콩잎의 추출물과 같은 양상으로 50% EtOH, 70% EtOH 추출물에 비해 95% EtOH 추출물의 PPH 라디칼 소거 활성이 매우 낮았다. BB와 NG 콩잎 모두 90일령, 102일령 콩잎 50%, 70% EtOH 추출물에서 비교적 높은 활성을 나타내었다. BB 콩잎 102일령의 70% EtOH 추출물은 200 µg/ml 농도에서 52%의 활성을 보였으며, NG 콩잎의 경우 102일령의 50% 추출물에서 56.5%의 가장 높은 활성을 보였다.

BB-CJ 콩잎은 BB콩잎과 NG콩잎과 같이 quercetin glycoside (QG)을 함유하고 있으나, 그 함량은 BB콩잎과 NG콩잎에 비해 낮기 때문에 BB-CJ 콩잎 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성이 상대적으로 낮은 것으로 판단된다 (Table 49 참조).

Table 33. DPPH radical scavenging effects of 50%–95% EtOH extracts from the leaves of 4 soybean cultivars, GH, BB, BB(CJ) and NG having different cultivating duration on 2016

2015-harvested soy leaves		DPPH radical scavenging activity at 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (%)			
Cultivating duration	Extraction solvents	GH	BB	BB-CJ	NG
55 days	50% EtOH	11.6 \pm 0.8	32.2 \pm 1.2	21.8 \pm 0.9	28.1 \pm 1.4
	70% EtOH	14.2 \pm 0.1	37.0 \pm 0.2	22.8 \pm 0.3	28.5 \pm 0.4
	95% EtOH	6.7 \pm 1.0	13.2 \pm 1.2	6.1 \pm 1.4	11.1 \pm 1.3
70 days	50% EtOH	19.1 \pm 0.6	35.1 \pm 1.5	29.5 \pm 1.8	41.3 \pm 0.3
	70% EtOH	15.5 \pm 0.7	31.4 \pm 0.3	23.6 \pm 0.2	38.3 \pm 0.4
	95% EtOH	10.3 \pm 0.5	14.3 \pm 2.2	10.2 \pm 0.6	18.8 \pm 1.7
90 days	50% EtOH	18.7 \pm 0.8	48.6 \pm 0.4	26.2 \pm 0.7	55.6 \pm 1.4
	70% EtOH	16.1 \pm 0.4	39.1 \pm 0.5	25.6 \pm 0.2	40.9 \pm 0.9
	95% EtOH	11.8 \pm 1.3	19.0 \pm 1.2	25.6 \pm 0.2	22.0 \pm 0.4
102 days	50% EtOH	20.5 \pm 1.8	48.2 \pm 0.7	27.3 \pm 0.1	56.5 \pm 0.6
	70% EtOH	14.2 \pm 0.4	52.0 \pm 0.4	31.4 \pm 0.9	50.4 \pm 0.9
	95% EtOH	12.0 \pm 1.3	25.3 \pm 1.4	12.6 \pm 1.7	25.6 \pm 0.8
L-Ascorbic acid 28 μM		46.7 \pm 0.5			

Values are presented as mean \pm SD (n = 3).

나. 콩잎추출물로부터 다당류 화합물 및 코우메스탄 화합물의 분리 및 구조 분석

(1) 콩잎추출물에 함유된 다당류(배당체)의 HPLC 분석

2013년도에 110일령 콩잎으로부터 추출한 50ESL과 50EBL에 함유된 다당류 및 flavonoids를 HPLC를 이용하여 분석하였다. 지표물질로는 Sigma사에서 구입한 Dadzin, Dadzein, Genistin, Genistein, 6-O-malonylgenistin, Kaempferol, Quercetin, Rhamnetin, Isorhamnetin 등을 사용하였다. 본 연구에서 사용한 HPLC는 Shimadzu 10A vp series를 사용하였고, column은 Brownlee SPP C18 (4.6 x 100 mm, 2.7 μm)을 사용하여 분석하였다. HPLC 용출 조건은 아래 표 34에 표시하였다.

Table 34. Analytical HPLC condition and solvent elution method

Analytical HPLC condition	Solvent elution method			
	Time	A (%)	B (%)	
HPLC apparatus : Shimadzu 10A vp	0	95	5	isocratic
Pump system: Shimadzu LC-10A vp with binary pump	60	60	40	gradient
Auto injector: Shimadzu SIL-10A vp	80	0	100	gradient
Detector: Shimadzu SPD-M10A vp (PDA detector, 254 nm)	90	0	0	gradient
Column: Brownlee SPP C18 (4.6x100 m, 2.7 μm)	100	0	0	isocratic
Flow rate: 1.0 ml/min				
Sample injection volume: 10 μl				
Flow solvent A: 0.1% Acetic acid in Water				
Flow solvent B: Acetonitrile				

(2) 대두콩잎 50% EtOH 추출물로부터 화합물 7종 분리

2013년도에 재배한 107일령 건조 대두콩잎 (WD) 1.6 kg에 50% 에탄올 16 L를 첨가하고 실온에서 96 시간 동안 진탕하면서 추출하였다. GH 50% 에탄올 추출물을 여과하고 감압 하에 농축하여 조추출물 (50ESL) 280.2 g을 얻었다. 이 추출물을 HPLC로 분석하여 12 개 이상의 배당체가 존재함을 확인하였다 (Fig. 1).

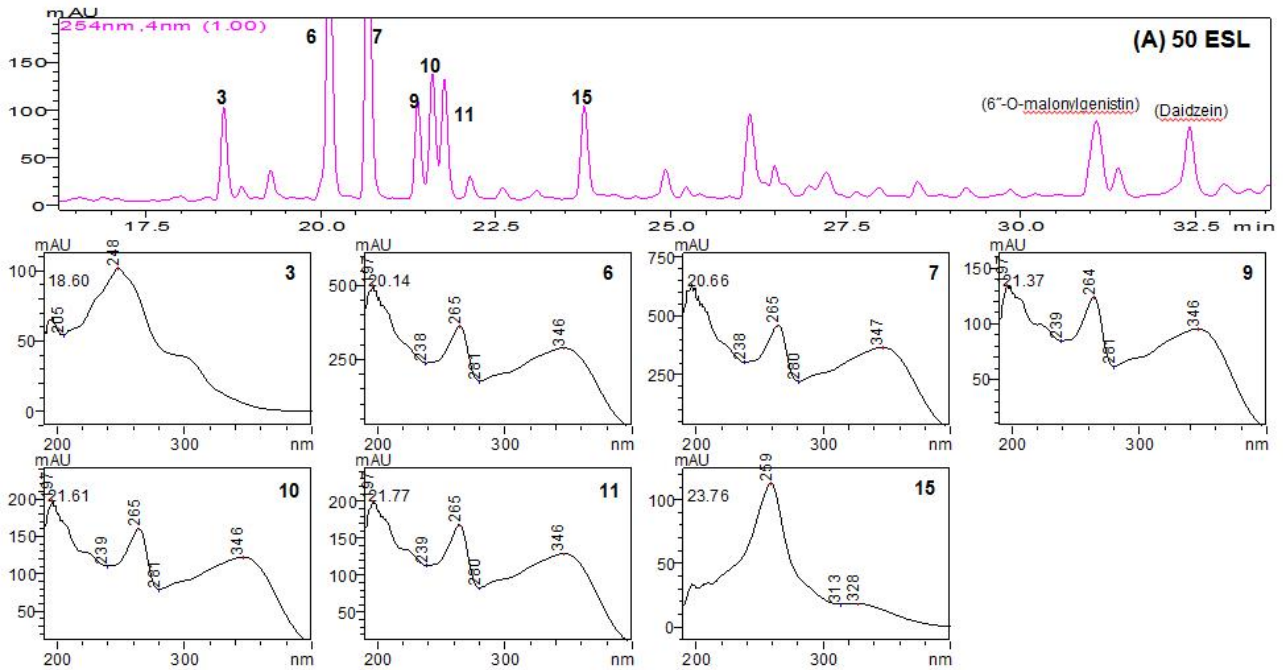
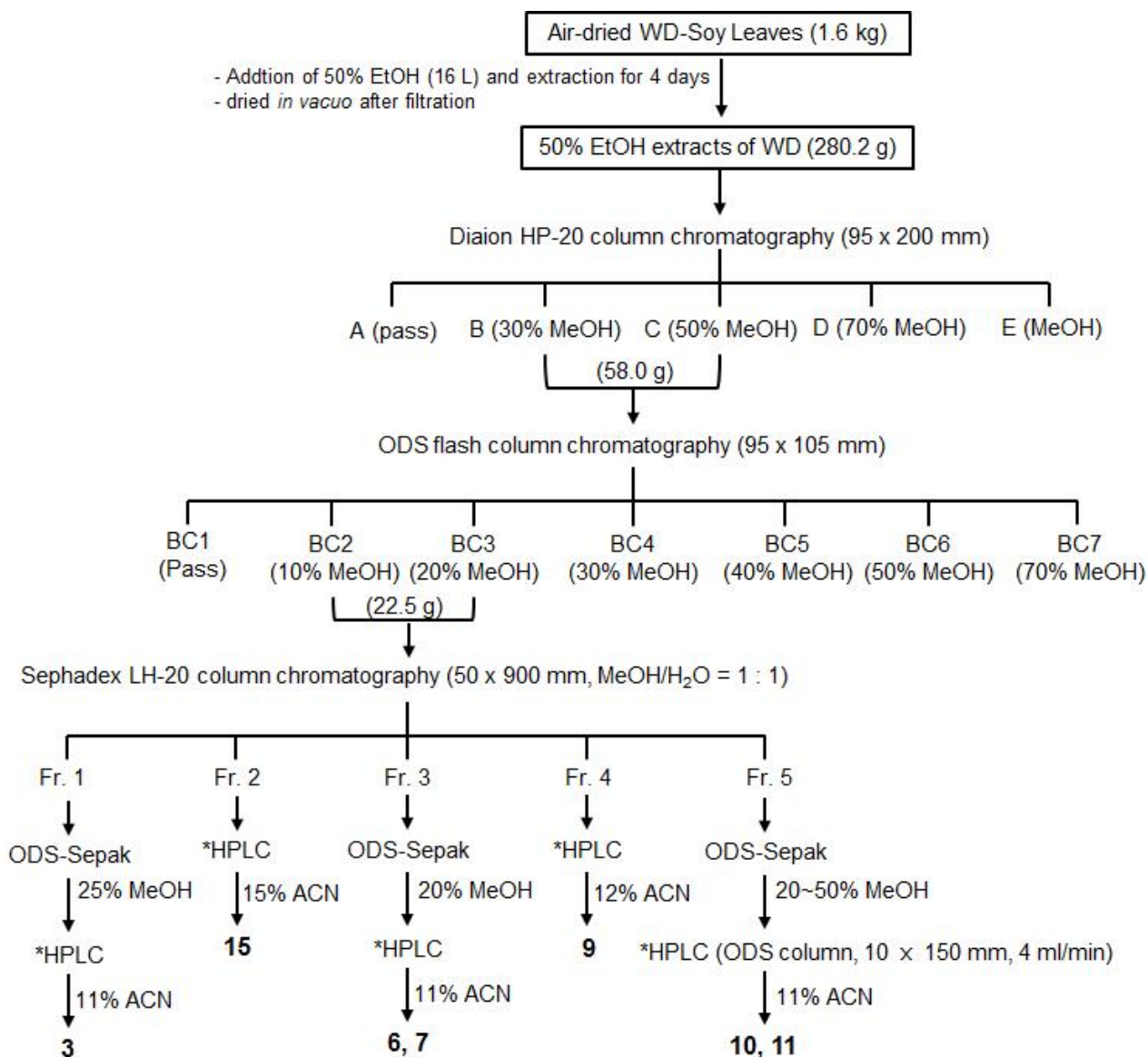


Fig. 1. HPLC profiles of 50ESL contained several glycosides and flavonols.

50ESL을 합성 흡착제인 Diaion HP-20 column (95×200 mm)에 흡착시킨 후 메탄올/물 혼합용액 (MeOH/H₂O = 0 : 10 → 3 : 7 → 5 : 5 → 7 : 3 → 10 : 0)으로 순차적으로 용출하는 단계인 흡착컬럼크로마토그래피를 수행하여 5 개의 분획물 (A~E)을 얻었다. 다음 단계로 B와 C 분획물을 사용하여 역상컬럼크로마토그래피 (RP-C18, 95×150 mm)를 수행하였다. 이동상 용매인 메탄올/물 혼합용액 (MeOH/H₂O = 0:10 → 1:9 → 2:8 → 3:7 → 4:6 → 5:5 → 7:3)을 순차적으로 용출하여 다시 7 개의 분획물 (BC1~BC7)을 얻었다. TLC를 이용하여 BC2와 BC3 분획물의 조성이 비슷한 것을 확인하였기 때문에 연이어 BC2와 BC3를 합쳐서 Sephadex LH-20 크기분배 컬럼크로마토그래피 (50×900 mm, 메탄올/물=1:1)를 수행하여 5 개의 소분획 (Fr. 1 - Fr. 5)으로 분류하고, 분취용 HPLC를 통해 최종적으로 화합물 3 (15.2 mg), 화합물 6 (17.5 mg), 화합물 7 (19.2 mg), 화합물 9 (15.6 mg), 화합물 10 (14.9 mg), 화합물 11 (8.0 mg), 화합물 15 (9.9 mg)을 분리·정제하였다 (Scheme 1).



Scheme 1. Isolation and purification scheme of flavonol glycosides from 50ESL.

(가) 화합물 3 분리

상기의 Fr. 1이 함유하는 물질들을 분리하기 위해 이동상으로 메탄올/물 혼합용매를 사용하여 역상컬럼크로마토그래피 (ODS-Sepak)를 수행하였다. 이어 25% 메탄올로 용출된 분획물을 정제하기 위해 preparative HPLC를 사용하였으며, H₂O/acetonitrile(ACN) = 89:11의 이동상 용매 조건에서 용리되는 화합물 15.2 mg을 얻었다 (Scheme 1).

분취용 HPLC (Preparative HPLC) system은 Shimadzu LC-8A vp series with binary pump, 분취용 HPLC column은 YMC-Pack Pro SPP C₁₈ (10 x 150 mm, I.D. S-5 μm, 12 nm), Detector는 Shimadzu SPD-M20A vp (PDA를 사용하였으며, 흡광도는 254 nm에서 측정하였다. 분당 4 ml의 속도로 0.1 % acetic acid in water (Solvent A)와 acetonitrile (ACN, Solvent B)의 용매 기울기로 수행되었다.

(나) 화합물 6 분리

상기의 Fr. 3에 함유된 물질들을 분리하기 위해 이동상으로 메탄올/물 혼합용매를 사용하여 역상컬럼크로마토그래피 (ODS-Sepak)를 수행하였다. 이어 20% 메탄올로 용출된 분획물을 정제하기 위해 상기의 분취용 HPLC system을 사용하였으며, H₂O/ACN = 85:15의 이동상 용매 조건에서 용리되는 화합물 17.5 mg을 얻었다 (Scheme 1).

(다) 화합물 7 분리

상기의 Fr. 3에 함유된 물질들을 분리하기 위해 이동상으로 메탄올/물 혼합용매를 사용하여 역상컬럼크로마토그래피 (ODS-Sepak)를 수행하였다. 이어 20% 메탄올로 용출된 분획물을 정제하기 위해 상기의 분취용 HPLC system을 사용하였으며, H₂O/ACN = 89:11의 이동상 용매 조건에서 용리되는 화합물 6 이외의 다른 화합물 19.2 mg을 얻었다 (Scheme 1).

(라) 화합물 9 분리

상기의 Fr. 4에 함유된 물질들을 분리하기 위해 상기의 분취용 HPLC system을 사용하였으며, H₂O/ACN = 88:12의 이동상 용매 조건에서 용리되는 화합물 15.6 mg을 얻었다 (Scheme 1).

(마) 화합물 10 분리

상기의 Fr. 5에 함유된 물질들을 분리하기 위해 이동상으로 메탄올/물 혼합용매를 사용하여 역상컬럼크로마토그래피 (ODS-Sepak)를 수행하였다. 이어 20-50% 메탄올로 용출된 분획물을 정제하기 위해 상기의 분취용 HPLC system을 사용하였으며, H₂O/ACN = 89:11의 이동상 용매 조건에서 용리되는 화합물 14.9 mg을 얻었다 (Scheme 1).

(바) 화합물 11 분리

상기의 Fr. 5에 함유된 물질들을 분리하기 위해 이동상으로 메탄올/물 혼합용매를 사용하여 역상컬럼크로마토그래피 (ODS-Sepak)를 수행하였다. 이어 20-50% 메탄올로 용출된 분획물을 정제하기 위해 상기의 분취용 HPLC system을 사용하였으며, H₂O/ACN = 89:11의 이동상 용매 조건에서 용리되는 화합물 10 이외의 다른 화합물 18.0 mg을 얻었다 (Scheme 1).

(사) 화합물 15 분리

상기의 Fr. 2에 함유된 물질들을 분리하기 위해 상기의 분취용 HPLC system을 사용하였으며, H₂O/ACN = 85:15의 이동상 용매 조건에서 용리되는 화합물 9.9 mg을 얻었다 (Scheme 1).

(3) 검정콩잎 50% EtOH 추출물로부터 화합물 10종 분리

2013년도에 재배한 107일령 건조 검정콩잎 (BB) 1.6 kg에 50% 에탄올 16 L를 첨가하고 실온에서 96 시간 동안 진탕하면서 추출하였다. BB 50% 에탄올 추출물을 여과하고 감압 하에 농축하여 조추출물 (50EBL) 264 g을 얻었다. 이 추출물을 HPLC로 분석하여 12 개 이상의 배당체가 존재함을 확인하였다 (Fig. 2).

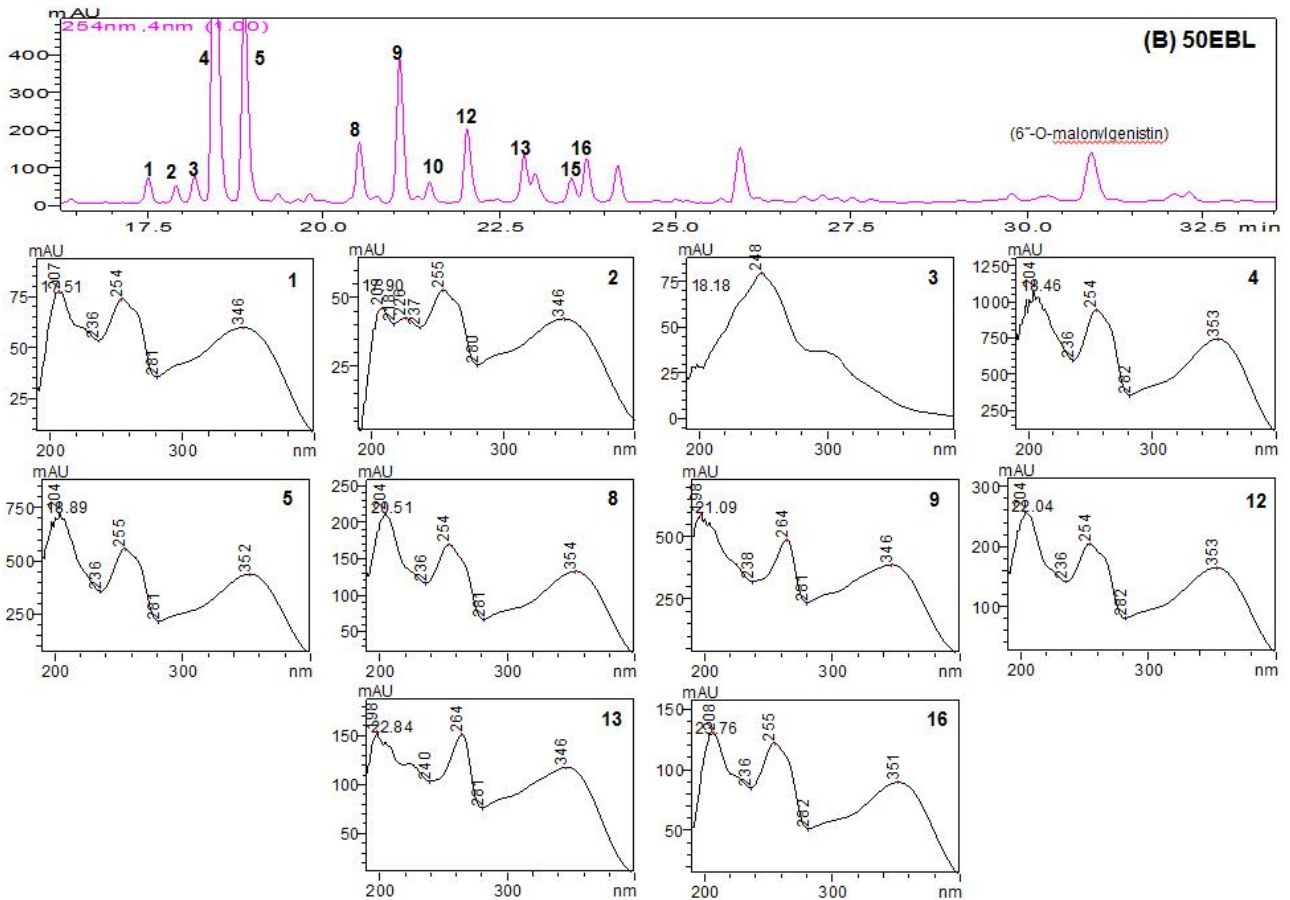
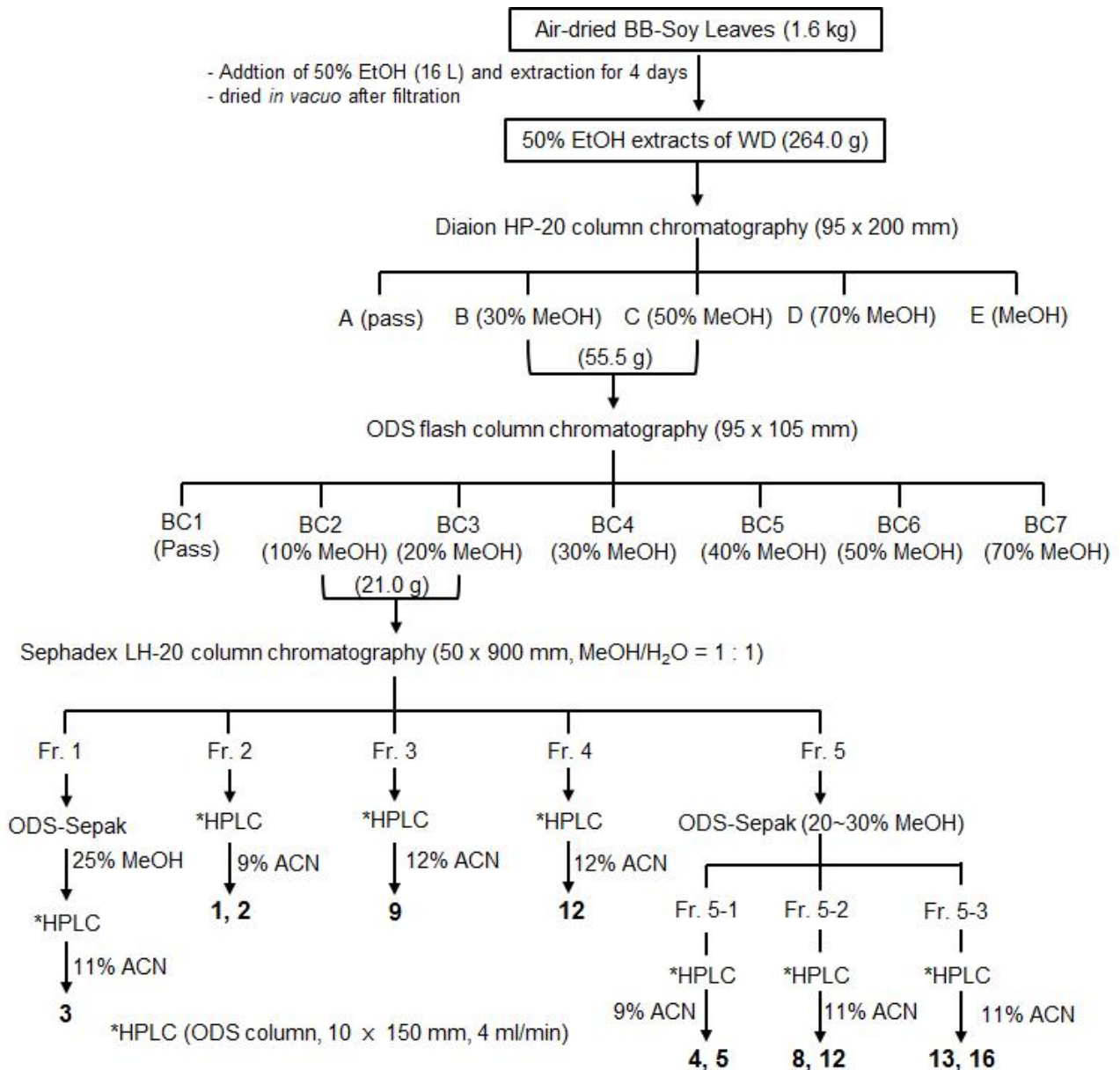


Fig. 2. HPLC profiles of 50EBL contained several glycosides and flavonols.

50EBL을 합성 흡착제인 Diaion HP-20 column (95×200 mm)에 흡착시킨 후 메탄올/물 혼합용액 (MeOH/H₂O = 0 : 10 → 3 : 7 → 5 : 5 → 7 : 3 → 10 : 0)으로 순차적으로 용출하는 단계인 흡착컬럼크로마토그래피를 수행하여 5 개의 분획물 (A~E)을 얻었다. 다음 단계로 B와 C 분획물을 사용하여 역상컬럼크로마토그래피 (RP-C18, 95×150 mm)를 수행하였다. 이동상 용매인 메탄올/물 혼합용액 (MeOH/H₂O = 0:10 → 1:9 → 2:8 → 3:7 → 4:6 → 5:5 → 7:3)을 순차적으로 용출하여 다시 7 개의 분획물 (BC1~BC7)을 얻었다. TLC를 이용하여 BC2와 BC3 분획물의 조성이 비슷한 것을 확인하였기 때문에 연이어 BC2와 BC3를 합쳐서 Sephadex LH-20 크기분배 컬럼크로마토그래피 (50×900 mm, 메탄올/물=1:1)를 수행하여 5 개의 소분획 (Fr. 1 - Fr. 5)으로 분류하고, 분취용 HPLC를 통해 최종적으로 화합물 1 (6.8 mg), 2 (5.7 mg), 4 (15.3 mg), 5 (11.0 mg), 8 (11.9 mg), 12 (16.3 mg), 13 (12.9 mg), 16 (9.0 mg), 그리고 앞서 WD 50% EtOH 추출물에서 분리한 화합물 3과 화합물 9를 포함해서 총 10종의 화합물을 분리·정제하였다 (Schem 2).



Scheme 2. Isolation and purification scheme of flavonol glycosides from 50EBL.

(가) 화합물 1 분리

상기의 Fr. 2에 함유된 물질들을 분리하기 위해 상기의 분취용 HPLC를 사용하였으며, H₂O/ACN = 91:9의 이동상 용매 조건에서 용리되는 화합물 6.8 mg을 얻었다 (Scheme 2).

(나) 화합물 2 분리

상기의 Fr. 2에 함유된 물질들을 분리하기 위해 상기의 분취용 HPLC를 사용하였으며, 정제하기 위해 상기의 분취용 HPLC system을 사용하였으며, H₂O/ACN = 91:9의 이동상 용매 조건에서 용리되는 화합물 1 이외의 다른 화합물 5.7 mg을 얻었다 (Scheme 2).

(다) 화합물 4 분리

상기의 Fr. 5에 함유된 물질들을 분리하기 위해 이동상으로 메탄올/물 혼합용매를 사용하여

역상컬럼크로마토그래피 (ODS-Sepak)를 수행하였다. 이때 20-30% 메탄올로 용출된 3 개의 분획물(Fr. 5-1, Fr. 5-2, Fr. 5-3)을 얻었고, 이어 Fr. 5-1을 정제하기 위해 상기의 분취용 HPLC system을 사용하였으며, H₂O/ACN = 91:9의 이동상 용매 조건에서 용리되는 화합물 15.3 mg을 얻었다 (Scheme 2).

(라) 화합물 5 분리

상기의 Fr. 5에 함유된 물질들을 분리하기 위해 이동상으로 메탄올/물 혼합용매를 사용하여 역상컬럼크로마토그래피 (ODS-Sepak)를 수행하였다. 이때 20-30% 메탄올로 용출된 3 개의 분획물(Fr. 5-1, Fr. 5-2, Fr. 5-3)을 얻었고, 이어 Fr. 5-1을 정제하기 위해 상기의 분취용 HPLC system을 사용하였으며, H₂O/ACN = 91:9의 이동상 용매 조건에서 용리되는 화합물 4 이외의 다른 화합물 11.0 mg을 얻었다 (Scheme 2).

(마) 화합물 8 분리

상기의 Fr. 5에 함유된 물질들을 분리하기 위해 이동상으로 메탄올/물 혼합용매를 사용하여 역상컬럼크로마토그래피 (ODS-Sepak)를 수행하였다. 이때 20-30% 메탄올로 용출된 3 개의 분획물(Fr. 5-1, Fr. 5-2, Fr. 5-3)을 얻었고, 이어 Fr. 5-2를 정제하기 위해 상기의 분취용 HPLC system을 사용하였으며, H₂O/ACN = 89:11의 이동상 용매 조건에서 용리되는 화합물 11.9 mg을 얻었다 (Scheme 2).

(바) 화합물 12 분리

상기의 Fr. 5에 함유된 물질들을 분리하기 위해 이동상으로 메탄올/물 혼합용매를 사용하여 역상컬럼크로마토그래피 (ODS-Sepak)를 수행하였다. 이때 20-30% 메탄올로 용출된 3 개의 분획물(Fr. 5-1, Fr. 5-2, Fr. 5-3)을 얻었고, 이어 Fr. 5-2를 정제하기 위해 상기의 분취용 HPLC system을 사용하였으며, H₂O/ACN = 91:9의 이동상 용매 조건에서 용리되는 화합물 8 이외의 다른 화합물 16.3 mg을 얻었다 (Scheme 2).

(사) 화합물 13 분리

상기의 Fr. 5에 함유된 물질들을 분리하기 위해 이동상으로 메탄올/물 혼합용매를 사용하여 역상컬럼크로마토그래피 (ODS-Sepak)를 수행하였다. 이때 20-30% 메탄올로 용출된 3 개의 분획물(Fr. 5-1, Fr. 5-2, Fr. 5-3)을 얻었고, 이어 Fr. 5-3을 정제하기 위해 상기의 분취용 HPLC system을 사용하였으며, H₂O/ACN = 91:9의 이동상 용매 조건에서 용리되는 화합물 12.9 mg을 얻었다 (Scheme 2).

(아) 화합물 16 분리

상기의 Fr. 5에 함유된 물질들을 분리하기 위해 이동상으로 메탄올/물 혼합용매를 사용하여 역상컬럼크로마토그래피 (ODS-Sepak)를 수행하였다. 이때 20-30% 메탄올로 용출된 3 개의 분획물(Fr. 5-1, Fr. 5-2, Fr. 5-3)을 얻었고, 이어 Fr. 5-3을 정제하기 위해 상기의 분취용 HPLC system을 사용하였으며, H₂O/ACN = 91:9의 이동상 용매 조건에서 용리되는 화합물 13 이외의 다른 화합물 9.0 mg을 얻었다 (Scheme 2).

(3) 분리된 배당체들의 구조 분석

순수 분리·정제된 배당체들의 구조를 동정하기 위해 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, Mass 등의 분광학적인 기기를 이용하여 이들의 구조를 동정하였다. 구체적으로 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ 과 2D-NMR (COSY, HMBC, HMQC)를 이용하여 구조를 예상하고, ESI-MS 분석으로 분자량을 확인하였고, 참고문헌 또는 데이터베이스를 참고하여 배당체의 구조를 결정하였다. 구조 분석 결과, 대두콩잎 추출물인 50ESL과 검정콩잎 추출물인 50 EBL로부터 퀘르세틴 배당체 (Quercetin glycoside) 5종, 캄페롤 배당체 (Kaempferol glycoside) 6종, 이소람네티ن 배당체 (isorhamnetin glycoside) 2종과 기타 isoflavone glycoside 2종이 함유되어 있는 것을 확인하였다 (Tables 35-40 및 Figs. 3-5). 분리한 배당체 중 화합물 **4, 5, 8, 11, 12, 13, 16**은 콩잎으로부터 처음 분리한 화합물들이다.

Table 35. Physico-chemical data of flavonol glycosides isolated from the 50ESL and 50EBL

Compounds		Physical properties	UV λ_{max} (nm)	Molecular weight (Molecular formula)
Quercetin glycosides	QG1	Yellow green powder	202, 255, 353	772.6 ($\text{C}_{33}\text{H}_{40}\text{O}_{21}$)
	QG2	Yellow green powder	202, 255, 353	772.66 ($\text{C}_{33}\text{H}_{40}\text{O}_{21}$)
	QG4	Yellow green powder	203, 255, 352	626.52 ($\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{17}$)
	QG5	Yellow green powder	201, 255, 353	626.52 ($\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{17}$)
	QG8	Yellow green powder	203, 254, 354	610.52 ($\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$)
Kaempferol glycosides	KG6	Brown powder	196, 265, 346	756.66 ($\text{C}_{33}\text{H}_{40}\text{O}_{20}$)
	KG7	Yellow powder	195, 265, 347	756.66 ($\text{C}_{33}\text{H}_{40}\text{O}_{20}$)
	KG9	Brown powder	196, 265, 346	740.66 ($\text{C}_{33}\text{H}_{40}\text{O}_{19}$)
	KG10	Yellow green powder	196, 264, 346	610.52 ($\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$)
	KG11	Yellow powder	194, 264, 347	610.52 ($\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$)
	KG13	Yellow powder	195, 264, 347	594.52 ($\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{15}$)
Isorhamnetin glycosides	IRG12	Yellow green powder	202, 254, 354	640.55 ($\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{O}_{17}$)
	IRG16	Yellow green powder	201, 253, 354	624.55 ($\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{O}_{16}$)
Isoflavone glycosides	IFG3	White powder	194, 248	416.38 ($\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_9$)
	IFG15	White powder	194, 258, 325	432.11 ($\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$)

Table 36. ¹H-NMR and ¹³C-NMR spectroscopic data of quercetin glycoside compounds from the 50ESL and 50EBL

Compounds	Data of spectra	
[QG1] (Murai <i>et al.</i> 2013)	¹ H-NMR	(600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 1.04 (3H, d, <i>J</i> = 6.2 Hz, H-6'''), 3.07 (1H, m, H-4'''), 3.08 (1H, m, H-2'''), 3.14 (1H, m, H-3'''), 3.15 (1H, m, H-6''), 3.17 (1H, m, H-4''), 3.18 (1H, m, H-5'''), 3.29 (1H, m, H-3'''), 3.34 (1H, m, H-5'''), 3.36 (1H, m, H-2'''), 3.48 (1H, m, H-6'''), 3.54 (1H, m, H-5'', 6''), 3.57 (1H, dd, <i>J</i> = 7.3, 4.6 Hz, H-6'''), 3.63 (1H, m, H-4''), 3.64 (1H, m, H-3''), 3.78 (1H, t, <i>J</i> = 17.2 Hz, H-2''), 4.37 (1H, s, H-1'''), 4.56 (1H, d, <i>J</i> = 7.6 Hz, H-1'''), 5.58 (1H, d, <i>J</i> = 7.6 Hz, H-1''), 6.10 (1H, br s, H-6), 6.30 (1H, br s, H-8), 6.81 (1H, d, <i>J</i> = 8.3 Hz, H-5'), 7.51 (1H, d, <i>J</i> = 2.1 Hz, H-2'), 7.64 (1H, dd, <i>J</i> = 8.3, 2.1 Hz, H-6')
	¹³ C-NMR	(150 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 17.9 (C-6'''), 60.7 (C-6'''), 64.6 (C-6''), 67.6 (C-4'''), 68.2 (C-5'''), 69.6 (C-4'''), 70.4 (C-2'''), 70.6 (C-3'''), 71.9 (C-4'''), 73.1 (C-3''), 73.4 (C-5''), 74.3 (C-2'''), 76.6 (C-5'''), 76.8 (C-3'''), 80.5 (C-2''), 93.7 (C-8), 98.6 (C-1''), 99.2 (C-6), 99.8 (C-1'''), 103.1 (C-10), 104.2 (C-1'''), 115.4 (C-5'), 115.8 (C-2'), 120.9 (C-1'), 122.0 (C-6'), 132.8 (C-3), 145.0 (C-3'), 149.6 (C-4'), 155.4 (C-2), 156.4 (C-9), 161.2 (C-5), 165.9 (C-7), 177.1 (C-4)
[QG2] (Murai <i>et al.</i> 2013)	¹ H-NMR	(600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 0.94 (3H, d, <i>J</i> = 6.2 Hz, H-6'''), 3.04 (1H, m, H-4'''), 3.05 (1H, m, H-2'''), 3.11 (1H, m, H-H-4'', 3'''), 3.16 (1H, m, 4'', 5''), 3.17 (1H, m, H-5'''), 3.21 (1H, m, H-6''), 3.22 (1H, m, H-5'', 3'''), 3.32 (1H, m, H-2'''), 3.44 (1H, m, H-3''), 3.45 (1H, m, H-6'''), 3.51 (1H, t, <i>J</i> = 15.8 Hz, H-2''), 3.54 (1H, dd, <i>J</i> = 7.3, 4.6 Hz, H-6'''), 3.63 (1H, m, H-6''), 4.31 (1H, s, H-1'''), 4.57 (1H, d, <i>J</i> = 7.6 Hz, H-1'''), 5.54 (1H, d, <i>J</i> = 7.6 Hz, H-1''), 6.17 (1H, br s, H-6), 6.36 (1H, br s, H-8), 6.85 (1H, d, <i>J</i> = 8.3 Hz, H-5'), 7.51 (1H, d, <i>J</i> = 2.1 Hz, H-2'), 7.54 (1H, dd, <i>J</i> = 8.3, 2.1 Hz, H-6')
	¹³ C-NMR	(150 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 17.7 (C-6'''), 60.7 (C-6'''), 66.2 (C-6''), 68.2 (C-5'''), 69.5 (C-4'', 4'''), 70.3 (C-2'''), 70.5 (C-3'''), 71.8 (C-4'''), 75.8 (C-5''), 76.4 (C-3''), 74.3 (C-2'''), 76.6 (C-5'''), 76.8 (C-3'''), 82.6 (C-2''), 93.8 (C-8), 98.3 (C-1''), 98.6 (C-6), 100.1 (C-1'''), 103.9 (C-10), 104.1 (C-1'''), 115.4 (C-5'), 116.2 (C-2'), 121.1 (C-1'), 121.8 (C-6'), 132.9 (C-3), 144.7 (C-3'), 148.4 (C-4'), 156.0 (C-2), 156.3 (C-9), 161.2 (C-5), 164.0 (C-7), 177.4 (C-4)
[QG4] (Cui <i>et al.</i> 2012)	¹ H-NMR	(600 MHz, D ₂ O + CD ₃ OD) δ 3.33 (1H, m, H-5'''), 3.40 (1H, m, H-2'''), 3.41 (1H, m, H-4'''), 3.43 (1H, m, H-5'', 3'''), 3.53 (1H, m, H-6''), 3.60 (1H, m, H-6''), 3.70 (1H, m, H-3''), 3.72 (1H, m, H-6'''), 3.80 (1H, m, H-6'''), 3.84 (1H, m, H-4''), 4.05 (1H, t, <i>J</i> = 16.5 Hz, H-2''), 4.75 (1H, d, <i>J</i> = 5.5 Hz, H-1'''), 5.24 (1H, d, <i>J</i> = 7.3 Hz, H-1''), 6.19 (1H, br s, H-6), 6.38 (1H, br s, H-8), 6.87 (1H, d, <i>J</i> = 7.3 Hz, H-5'), 7.54 (1H, d, <i>J</i> = 7.3 Hz, H-6'), 7.73 (1H, br s, H-2')
	¹³ C-NMR	(150 MHz, D ₂ O + CD ₃ OD) δ 61.9 (C-6''), 62.2 (C-6'''), 70.0 (C-4''), 71.0 (C-4'''), 75.4 (C-2'''), 76.9 (C-3'''), 77.9 (C-5'''), 78.1 (C-5'''), 80.6 (C-2''), 94.6 (C-8, 3''), 99.8 (C-6), 101.8 (C-1''), 105.0 (C-1'''), 105.7 (C-10), 116.2 (C-5'), 117.8 (C-2'), 122.8 (C-1'), 123.0 (C-6'), 135.1 (C-3), 145.9 (C-3'), 149.9 (C-4'), 158.5 (C-9), 158.8 (C-2), 163.1 (C-5), 165.9 (C-7), 179.9 (C-4)

[QG5] (Cui <i>et al.</i> 2012)	¹ H-NMR	(600 MHz, D ₂ O + CD ₃ OD) δ 3.18 (1H, m, H-5'''), 3.31 (1H, m, H-5''), 3.37 (1H, m, H-2'''), 3.38 (1H, m, H-4''), 3.39 (1H, m, H-4'''), 3.40 (1H, m, H-3'''), 3.52 (1H, dd, <i>J</i> = 7.3, 4.6 Hz, H-6'''), 3.58 (1H, m, H-3''), 3.69 (1H, m, H-6'''), 3.71 (1H, m, H-6''), 3.77 (1H, t, <i>J</i> = 15.8 Hz, H-2''), 3.79 (1H, m, H-6''), 4.75 (1H, d, <i>J</i> = 7.6 Hz, H-1'''), 5.34 (1H, d, <i>J</i> = 7.6 Hz, H-1'), 6.19 (1H, br s, H-6), 6.38 (1H, br s, H-8), 6.88 (1H, d, <i>J</i> = 7.3 Hz, H-5'), 7.54 (1H, d, <i>J</i> = 7.3 Hz, H-6'), 7.73 (1H, br s, H-2')
	¹³ C-NMR	(150 MHz, D ₂ O + CD ₃ OD) δ 62.3 (C-6''), 62.4 (C-6'''), 70.9 (C-4''), 71.1 (C-4'''), 75.5 (C-2'''), 77.9 (C-3''', 3'''), 78.1 (C-5''), 78.3 (C-5'''), 82.9 (C-2''), 94.6 (C-8), 99.8 (C-6), 105.0 (C-1'''), 105.8 (C-10), 116.1 (C-5'), 117.7 (C-2'), 123.0 (C-1', 6'), 135.1 (C-3), 145.9 (C-3'), 149.8 (C-4'), 158.5 (C-9), 158.9 (C-2), 163.1 (C-5), 165.9 (C-7), 179.9 (C-4)
[QG8] (Sikorska, M. 2003)	¹ H-NMR	(600 MHz, D ₂ O + CD ₃ OD) δ 0.92 (3H, d, <i>J</i> = 6.4 Hz, H-6'''), 3.32 (1H, m, H-4'''), 3.50 (1H, m, H-5''), 3.61 (1H, m, H-6''), 3.64 (1H, m, H-6''), 3.72 (1H, m, H-2''), 3.77 (1H, m, H-3'''), 3.85 (1H, m, H-4''), 3.96 (1H, t, <i>J</i> = 15.8 Hz, H-2''), 3.99 (1H, m, H-2'''), 4.01 (1H, m, H-5'''), 5.21 (1H, s, H-1'''), 5.75 (1H, d, <i>J</i> = 7.4 Hz, H-1'), 6.16 (1H, br s, H-6), 6.36 (1H, br s, H-8), 6.86 (1H, d, <i>J</i> = 8.9 Hz, H-5'), 7.57 (1H, dd, <i>J</i> = 8.9, 2.0 Hz, H-6'), 7.69 (1H, br s, H-2')
	¹³ C-NMR	(150 MHz, D ₂ O + CD ₃ OD) δ 17.3 (C-6'''), 62.1 (C-6''), 69.8 (C-5'''), 70.9 (C-4''), 72.3 (C-3'''), 72.4 (C-2'''), 74.0 (C-4'''), 75.7 (C-3'), 77.1 (C-5''), 77.5 (C-2''), 94.4 (C-8), 99.6 (C-6), 100.8 (C-1''), 102.6 (C-1'''), 105.9 (C-10), 116.1 (C-5'), 117.3 (C-2'), 123.0 (C-6'), 123.3 (C-1'), 134.6 (C-3), 145.9 (C-3'), 149.6 (C-4'), 158.2 (C-2), 158.3 (C-9), 163.2 (C-5), 165.6 (C-7), 179.4 (C-4)

Table 37. Spectroscopic data of kaemferol glycoside compounds from the 50ESL and 50EBL

Compounds	Data of spectra	
[KG6] (Zang <i>et al.</i> 2011)	¹ H-NMR	(600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 1.04 (3H, d, <i>J</i> = 6.4 Hz, H-6'''), 3.08 (1H, m, H-4'''), 3.09 (1H, m, H-2'''), 3.14 (1H, m, H-3'''), 3.16 (1H, m, H-6'', 4''), 3.19 (1H, m, H-5'''), 3.29 (1H, m, H-3'''), 3.34 (1H, m, H-5'''), 3.35 (1H, m, H-2'''), 3.49 (1H, m, H-6'''), 3.55 (1H, m, H-5'', 6''), 3.60 (1H, d, <i>J</i> = 11.0 Hz, H-1'''), 3.63 (1H, m, H-4''), 3.64 (1H, m, H-3''), 3.76 (1H, t, <i>J</i> = 16.5 Hz, H-2''), 4.35 (1H, s, H-1'''), 4.57 (1H, d, <i>J</i> = 7.3 Hz, H-1'''), 5.60 (1H, d, <i>J</i> = 7.6 Hz, H-1'), 6.19 (1H, br s, H-6), 6.42 (1H, br s, H-8), 6.88 (1H, d, <i>J</i> = 8.2 Hz, H-3', 5'), 8.06 (1H, d, <i>J</i> = 9.2 Hz, H-2', 6'), 10.18 (1H, s, 4'-OH), 10.85 (1H, s, 7-OH), 12.65 (1H, s, 5-OH)
	¹³ C-NMR	(150 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 17.9 (C-6'''), 60.8 (C-6''), 64.7 (C-6''), 67.6 (C-4''), 68.2 (C-5'''), 69.7 (C-4'''), 70.4 (C-2'''), 70.6 (C-3'''), 71.9 (C-4'''), 73.1 (C-3''), 73.5 (C-5''), 74.3 (C-2''), 76.6 (C-5'''), 77.0 (C-3'''), 80.1 (C-2''), 93.6 (C-8), 98.5 (C-1''), 98.7 (C-6), 99.9 (C-1'''), 103.8 (C-10), 104.1 (C-1'''), 115.2 (C-3', 5'), 120.8 (C-1'), 131.0 (C-2', 6'), 132.8 (C-3), 155.9 (C-2), 156.3 (C-9), 160.0 (C-4'), 161.2 (C-5), 164.0 (C-7), 177.4 (C-4)
[KG7] (Zang <i>et al.</i> 2011)	¹ H-NMR	(600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 0.93 (3H, d, <i>J</i> = 6.4 Hz, H-6'''), 3.06 (1H, m, H-4'''), 3.07 (1H, m, H-2'''), 3.13 (1H, m, H-3''', 4''), 3.18 (1H, m, H-5''', 5'''), 3.19 (1H, m, H-6''), 3.21 (1H, m, H-5'', 3'''), 3.33 (1H, m, H-2'''), 3.45 (1H, t, <i>J</i> = 11.0 Hz, H-2''), 3.46

		(1H, m, H-3''), 3.49 (1H, dd, $J = 7.3, 4.6$ Hz, H-6'''), 3.61 (1H, d, $J = 11.0$ Hz, H-6'', 6'''), 4.30 (1H, s, H-1'''), 4.58 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-1''), 5.53 (1H, d, $J = 7.3$ Hz, H-1'), 6.18 (1H, br s, H-6), 6.39 (1H, br s, H-8), 6.89 (1H, d, $J = 9.2$ Hz, H-3', 5'), 7.99 (1H, d, $J = 9.1$ Hz, H-2', 6'), 10.10 (1H, s, 4'-OH), 10.80 (1H, s, 7-OH), 12.60 (1H, s, 5-OH)
	¹³ C-NMR	(150 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 17.6 (C-6'''), 60.8 (C-6'''), 66.0 (C-6''), 68.2 (C-5'''), 69.5 (C-4''), 69.7 (C-4'''), 70.3 (C-2'''), 70.5 (C-3'''), 71.8 (C-4'''), 74.3 (C-2''), 75.6 (C-5''), 76.4 (C-3''), 76.5 (C-5''), 76.4 (C-3''), 77.1 (C-3'''), 82.3 (C-2''), 93.7 (C-8), 98.2 (C-1''), 98.7 (C-6), 100.3 (C-1'''), 103.9 (C-10), 104.0 (C-1''), 115.2 (C-3', 5'), 120.9 (C-1'), 131.0 (C-2', 6'), 132.7 (C-3), 156.3 (C-9), 156.4 (C-9), 159.8 (C-4'), 161.2 (C-5), 164.0 (C-7), 177.4 (C-4)
[KG9] (Zang <i>et al.</i> 2011)	¹ H-NMR	(600 MHz, D ₂ O + CD ₃ OD) δ 1.17 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-6'''), 0.97 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, H-6''), 3.26 (1H, m, H-4'''), 3.33 (1H, m, H-4''), 3.44 (1H, m, H-6''), 3.50 (1H, m, H-3'''), 3.52 (1H, m, H-5'''), 3.60 (1H, m, H-2'''), 3.63 (1H, m, H-5''), 3.69 (1H, m, H-3''), 3.71 (1H, m, H-6''), 3.76 (1H, m, H-4''), 3.79 (1H, m, H-3''), 3.92 (1H, m, H-2''), 3.99 (1H, m, H-2''), 4.05 (1H, m, H-5''), 4.51 (1H, s, H-1'''), 5.21 (1H, s, H-1''), 5.60 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-1'), 6.17 (1H, br s, H-6), 6.37 (1H, br s, H-8), 6.89 (1H, d, $J = 9.2$ Hz, H-3', 5'), 8.05 (1H, d, $J = 9.2$ Hz, H-2', 6')
	¹³ C-NMR	(150 MHz, D ₂ O + CD ₃ OD) δ 17.5 (C-6'''), 17.9 (C-6'''), 67.1 (C-6''), 69.7 (C-5'''), 69.8 (C-5'''), 70.7 (C-4''), 72.1 (C-2'''), 72.2 (C-3'''), 72.3 (C-3'''), 72.4 (C-2''), 73.9 (C-4'''), 74.1 (C-4'''), 75.3 (C-5''), 75.7 (C-3''), 77.5 (C-2''), 94.6 (C-8), 99.7 (C-6), 100.9 (C-1''), 101.8 (C-1'''), 102.6 (C-1''), 106.0 (C-10), 116.2 (C-3', 5'), 123.0 (C-1'), 132.2 (C-2', 6'), 134.4 (C-3), 158.4 (C-9), 158.7 (C-2), 161.3 (C-4'), 163.1 (C-5), 165.6 (C-7), 179.4 (C-4)
[KG10] (Liu <i>et al.</i> 2009)	¹ H-NMR	(600 MHz, D ₂ O + CD ₃ OD) δ 3.30 (1H, m, H-5'''), 3.37 (1H, m, H-4'''), 3.40 (1H, m, H-2'', 3''), 3.42 (1H, m, H-5''), 3.51 (1H, m, H-6''), 3.59 (1H, m, H-6''), 3.69 (1H, m, H-6''), 3.79 (1H, dd, $J = 9.7, 2.8$ Hz, H-6'''), 3.83 (1H, m, H-4''), 4.05 (1H, t, $J = 17.2$ Hz, H-2''), 4.74 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-1''), 5.32 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-1'), 6.15 (1H, br s, H-6), 6.34 (1H, br s, H-8), 6.88 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-3', 5'), 8.07 (1H, d, $J = 8.9$ Hz, H-2', 6')
	¹³ C-NMR	(150 MHz, D ₂ O + CD ₃ OD) δ 61.9 (C-6''), 62.6 (C-6'''), 70.1 (C-4''), 71.3 (C-4'''), 74.8 (C-3''), 75.4 (C-2'''), 76.9 (C-5''), 77.9 (C-3'''), 78.2 (C-5'''), 80.2 (C-2''), 95.1 (C-8), 100.4 (C-6), 101.5 (C-1''), 104.7 (C-1''), 105.2 (C-10), 116.3 (C-3', 5'), 122.7 (C-1'), 132.4 (C-2', 6'), 134.8 (C-3), 161.6 (C-4'), 158.6 (C-2, 9), 163.0 (C-5), 167.8 (C-7), 179.6 (C-4)
[KG11] (Schliemann <i>et al.</i> 2006)	¹ H-NMR	(600 MHz, D ₂ O + CD ₃ OD) δ 3.19 (1H, m, H-5''), 3.29 (1H, m, H-5'''), 3.30 (1H, m, H-2'''), 3.34 (1H, m, H-4''), 3.36 (1H, m, H-4'''), 3.39 (1H, m, H-3'''), 3.48 (1H, m, H-6''), 3.59 (1H, t, $J = 17.9$ Hz, H-3'), 3.68 (1H, m, H-6'''), 3.69 (1H, m, H-6'''), 3.73 (1H, t, $J = 16.5$ Hz, H-2''), 3.78 (1H, d, $J = 9.6, 2.8$ Hz, H-6'''), 4.75 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-1''), 5.42 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-1'), 6.18 (1H, br s, H-6), 6.37 (1H, br s, H-8), 6.89 (1H, d, $J = 8.9$ Hz, H-3', 5'), 8.03 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-2', 6')
	¹³ C-NMR	(150 MHz, D ₂ O + CD ₃ OD) δ 62.5 (C-6''), 62.6 (C-6'''), 71.3 (C-4'''), 71.7 (C-4''), 75.5 (C-3'''), 77.9 (C-3'', 3'''), 78.2 (C-5'''), 78.3 (C-5''), 82.5 (C-2''), 94.8 (C-8), 100.0 (C-6), 101.0

		(C-1''), 104.7 (C-1'''), 105.7 (C-10), 116.2 (C-3', 5'), 122.8 (C-1'), 132.3 (C-2', 6'), 134.9 (C-3), 161.6 (C-4'), 158.5 (C-9), 158.8 (C-2), 163.1 (C-5), 166.3 (C-7), 179.7 (C-4)
[KG13] (Zhu <i>et al.</i> 2001)	¹ H-NMR	(600 MHz, D ₂ O + CD ₃ OD) δ 0.92 (3H, d, <i>J</i> = 6.2 Hz, H-6'''), 3.32 (1H, m, H-4'''), 3.49 (1H, m, H-5''), 3.58 (1H, m, H-6''), 3.63 (1H, m, H-6''), 3.70 (1H, m, H-3''), 3.77 (1H, m, H-3'''), 3.82 (1H, m, H-4''), 3.93 (1H, t, <i>J</i> = 17.2 Hz, H-2''), 3.98 (1H, m, H-2'''), 4.02 (1H, m, H-5'''), 5.20 (1H, s, H-1'''), 5.70 (1H, d, <i>J</i> = 7.6 Hz, H-1''), 6.16 (1H, br s, H-6), 6.36 (1H, br s, H-8), 6.88 (1H, d, <i>J</i> = 8.9 Hz, H-3', 5'), 8.07 (1H, d, <i>J</i> = 8.9 Hz, H-2', 6')
	¹³ C-NMR	(150 MHz, D ₂ O + CD ₃ OD) δ 17.5 (C-6'''), 62.1 (C-6''), 69.8 (C-5'''), 70.8 (C-4''), 72.3 (C-3'''), 72.4 (C-2'''), 74.0 (C-4'''), 75.7 (C-3''), 77.0 (C-5''), 77.7 (C-2''), 94.5 (C-8), 99.7 (C-6), 100.6 (C-1''), 102.6 (C-1'''), 105.9 (C-10), 116.1 (C-3', 5'), 123.0 (C-1'), 132.2 (C-2', 6'), 134.5 (C-3), 161.3 (C-4'), 158.4 (C-2, 9), 163.2 (C-5), 165.6 (C-7), 179.5 (C-4)

Table 38. Spectroscopic data of isorhamnetin glycoside compounds from the 50ESL and 50EBL

Compounds	Data of spectra	
[IRG12] (Marco <i>et al.</i> 1989)	¹ H-NMR	(600 MHz, D ₂ O + CD ₃ OD) δ 3.26 (1H, m, H-5'''), 3.34 (1H, m, H-4'''), 3.36 (1H, m, H-3'''), 3.37 (1H, m, H-2'''), 3.48 (1H, m, H-5''), 3.56 (1H, m, H-6''), 3.62 (1H, m, H-6''), 3.65 (1H, m, H-6'''), 3.74 (1H, m, H-6'''), 3.76 (1H, m, H-3''), 3.86 (1H, m, H-4''), 3.96 (3H, s, 3'-OCH ₃), 4.08 (1H, t, <i>J</i> = 16.5 Hz, H-2''), 4.76 (1H, d, <i>J</i> = 7.6 Hz, H-1'''), 5.54 (1H, d, <i>J</i> = 7.6 Hz, H-1''), 6.18 (1H, br s, H-6), 6.39 (1H, br s, H-8), 6.90 (1H, d, <i>J</i> = 8.3 Hz, H-5'), 7.61 (1H, dd, <i>J</i> = 8.3, 2.1 Hz, H-6'), 7.93 (1H, br s, H-2')
	¹³ C-NMR	(150 MHz, D ₂ O + CD ₃ OD) δ 57.1 (3'-OCH ₃), 62.1 (C-6''), 62.5 (C-6'''), 70.0 (C-4''), 71.2 (C-4'''), 74.7 (C-3''), 75.2 (C-2'''), 77.1 (C-5''), 77.8 (C-3'''), 78.2 (C-5'''), 79.7 (C-2''), 94.7 (C-8), 99.8 (C-6), 101.3 (C-1''), 104.2 (C-1'''), 105.8 (C-10), 114.4 (C-2'), 116.1 (C-5'), 123.7 (C-1'), 124.0 (C-6'), 134.8 (C-3), 148.5 (C-3'), 150.9 (C-4'), 158.4 (C-9), 158.8 (C-2), 163.1 (C-5), 165.9 (C-7), 179.6 (C-4)
[IRG16] (Kaouadji, M. 1990)	¹ H-NMR	(600 MHz, D ₂ O + CD ₃ OD) δ 0.85 (3H, d, <i>J</i> = 6.2 Hz, H-6'''), 3.29 (1H, m, H-4'''), 3.52 (1H, m, H-5''), 3.65 (2H, m, H-6''), 3.72 (1H, m, H-3''), 3.75 (1H, m, H-3'''), 3.84 (1H, m, H-4''), 3.96 (1H, t, <i>J</i> = 16.5 Hz, H-2''), 3.98 (1H, m, 3'-OCH ₃ , H-2''), 4.01 (1H, m, H-5'''), 5.15 (1H, s, H-1'''), 5.86 (1H, d, <i>J</i> = 7.6 Hz, H-1''), 6.10 (1H, br s, H-6), 6.29 (1H, br s, H-8), 6.89 (1H, d, <i>J</i> = 8.2 Hz, H-5'), 7.50 (1H, d, <i>J</i> = 8.2 Hz, H-6'), 8.08 (1H, d, <i>J</i> = 2.1 Hz, H-2')
	¹³ C-NMR	(150 MHz, D ₂ O + CD ₃ OD) δ 17.5 (C-6'''), 57.1 (3'-OCH ₃), 62.3 (C-6''), 69.8 (C-5'''), 70.7 (C-4''), 72.3 (C-3'''), 72.4 (C-2'''), 74.0 (C-4'''), 75.7 (C-3''), 77.1 (C-5''), 77.9 (C-2''), 95.2 (C-8), 100.6 (C-1''), 101.4 (C-6), 102.8 (C-1'''), 105.1 (C-10), 114.6 (C-2'), 115.9 (C-5'), 123.1 (C-6'), 123.5 (C-1'), 134.2 (C-3), 148.5 (C-3'), 150.5 (C-4'), 157.6 (C-2), 158.6 (C-9), 162.9 (C-5), 168.8 (C-7), 179.1 (C-4)

Table 39. Spectroscopic data of isoflavone glycoside compounds from the 50ESL and 50EBL

Compounds	Data of spectra	
[IFG3] (Al-Maharik & Botting, 2008)	¹ H-NMR	(600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 3.18 (1H, m, H-4''), 3.30 (1H, m, H-2'', 3''), 3.46 (1H, m, H-5''), 3.46 (1H, d, <i>J</i> = 7.6 Hz, H-6''), 5.10 (1H, d, <i>J</i> = 6.8 Hz, H-1''), 6.82 (1H, d, <i>J</i> = 7.6 Hz, H-3', 5'), 7.14 (1H, d, <i>J</i> = 8.3 Hz, H-6), 7.23 (1H, br s, H-8), 7.41 (1H, d, <i>J</i> = 7.6 Hz, H-2', 6'), 8.05 (1H, d, <i>J</i> = 8.3 Hz, H-5)
	¹³ C-NMR	(150 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 60.6 (C-6''), 69.6 (C-4''), 73.1 (C-2''), 76.5 (C-3''), 77.2 (C-5''), 100.0 (C-1''), 103.4 (C-8), 115.0 (C-3', 5'), 115.6 (C-6), 118.5 (C-10), 122.3 (C-1'), 123.7 (C-3), 126.9 (C-5), 130.1 (C-2', 6'), 153.3 (C-2), 157.0 (C-9), 157.3 (C-4'), 161.4 (C-7), 174.7 (C-4)
[IFG15] (Al-Maharik & Botting, 2008)	¹ H-NMR	(600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 3.31 (1H, m, H-5''), 3.40 (1H, m, H-4''), 3.46 (1H, m, H-6''), 3.48 (1H, m, H-2'', 3''), 3.71 (1H, d, <i>J</i> = 7.6 Hz, H-6''), 5.04 (1H, br s, H-1''), 6.51 (1H, br s, H-6), 6.69 (1H, br s, H-8), 6.84 (1H, d, <i>J</i> = 6.4 Hz, H-3', 5'), 7.38 (1H, br s, H-2', 6')
	¹³ C-NMR	(150 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 62.4 (C-6''), 71.2 (C-4''), 74.7 (C-2''), 77.8 (C-3''), 78.4 (C-5''), 95.8 (C-8), 101.1 (C-1''), 101.6 (C-6), 108.0 (C-10), 116.3 (C-3', 5'), 123.1 (C-1'), 125.0 (C-3), 131.4 (C-2', 6'), 155.3 (C-2), 158.9 (C-9), 159.3 (C-4'), 163.6 (C-5), 164.8 (C-7), 182.5 (C-4)

Table 40. Classification list of flavonol glycosides isolated from the 50ESL and 50EBL

Compounds	Common name	Chemical names
Quercetin glycosides	QG1	(Flavonol triglycoside) Peruvianoside III Quercetin 3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→2)-[α-L-rhamnopyranosyl-(1→6)]-β-D-galactopyranoside
	QG2	(Flavonol triglycoside) Quercetin 3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→2)-[α-L-rhamnopyranosyl-(1→6)]-β-D-glucopyranoside
	QG4	(Flavonol diglycoside) Quercetin 3-glucosylgalactoside Quercetin 3-O-(2-β-D-glucopyranosyl)-β-D-galactopyranoside
	QG5	(Flavonol diglycoside) Quercetin 3-glucosylglucoside Quercetin 3-O-(2-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranoside
	QG8	Isobioquercetin Quercetin 3-O-(2-α-D-rhamnopyranosyl)-β-D-galactopyranoside
Kaempferol glycosides	KG6	(Flavonol diglycosides) Kaempferol 3-O-β-D-glucopyranosyl(1→2)-O-[α-L-rhamnopyranosyl(1→6)]-β-D-galactopyranoside
	KG7	(Flavonol diglycosides) Kaempferol 3-O-β-D-glucopyranosyl(1→2)-O-[α-L-rhamnopyranosyl(1→6)]-β-D-glucopyranoside
	KG9	(Flavonol triglycoside) Mauritianin Kaempferol 3-O-(2,6-di-α-D-rhamnopyranosyl)-β-D-galactopyranoside
	KG10	Panasenoside, Lilyn (Kaempferol 3-glucosylgalactoside) Kaempferol 3-O-(2-β-D-glucopyranosyl)-β-D-galactopyranoside
	KG11	Sophoraflavonol (Kaempferol 3-O-sophoroside) Kaempferol 3-O-β-D-glucopyranosyl-(1→2)-β-D-glucopyranoside
	KG13	Isobiorobin Kaempferol 3-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-β-D-galactopyranoside
Isorhamnetin glycosides	IRG12	(Flavonol diglycoside) Isorhamnetin 3-glucosylgalactoside Isorhamnetin 3-O-(2-β-D-glucopyranosyl)-β-D-galactopyranoside
	IRG16	(Flavonol diglycoside) Isorhamnetin 3-glucosylgalactoside Isorhamnetin-3-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-β-D-galactopyranoside
Isoflavone glycosides	IFG3	Daidzin Daidzein-7-O-glucoside
	IFG15	Genistin Genistein 7-glucoside

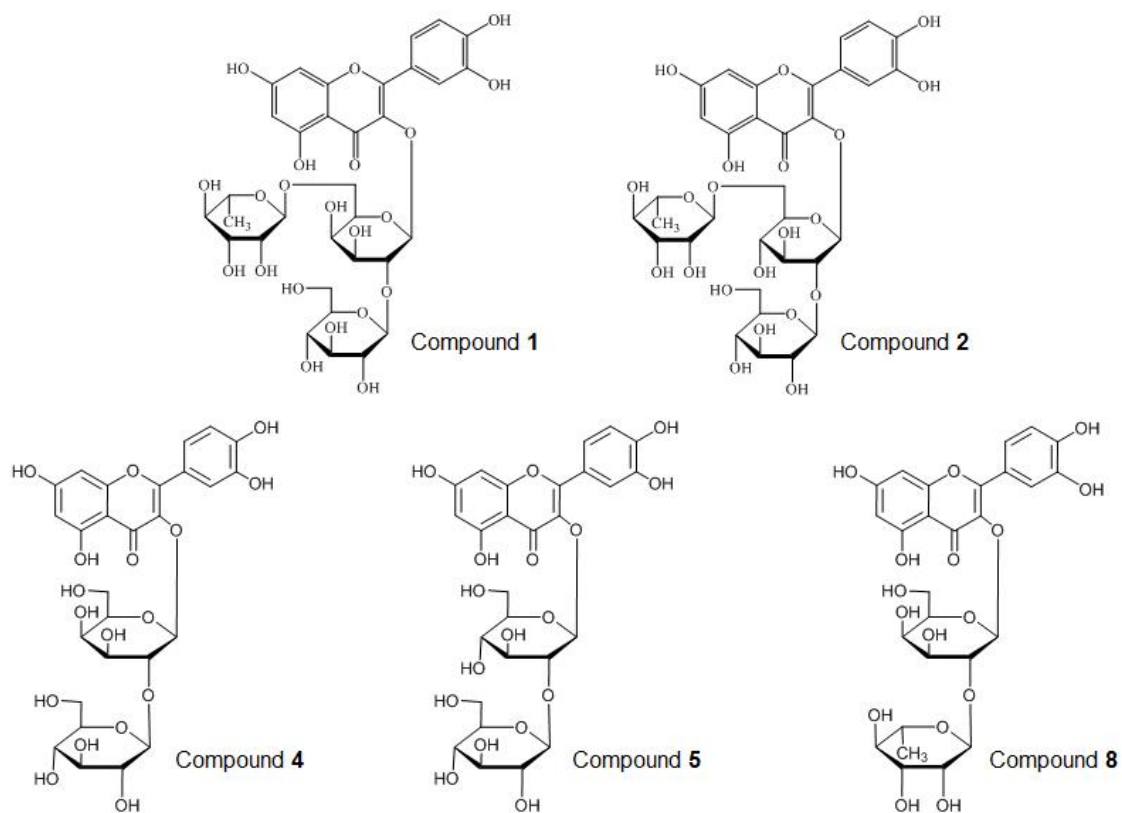


Fig. 3. Quercetin glycosides isolated from the 50ESL and 50EBL,

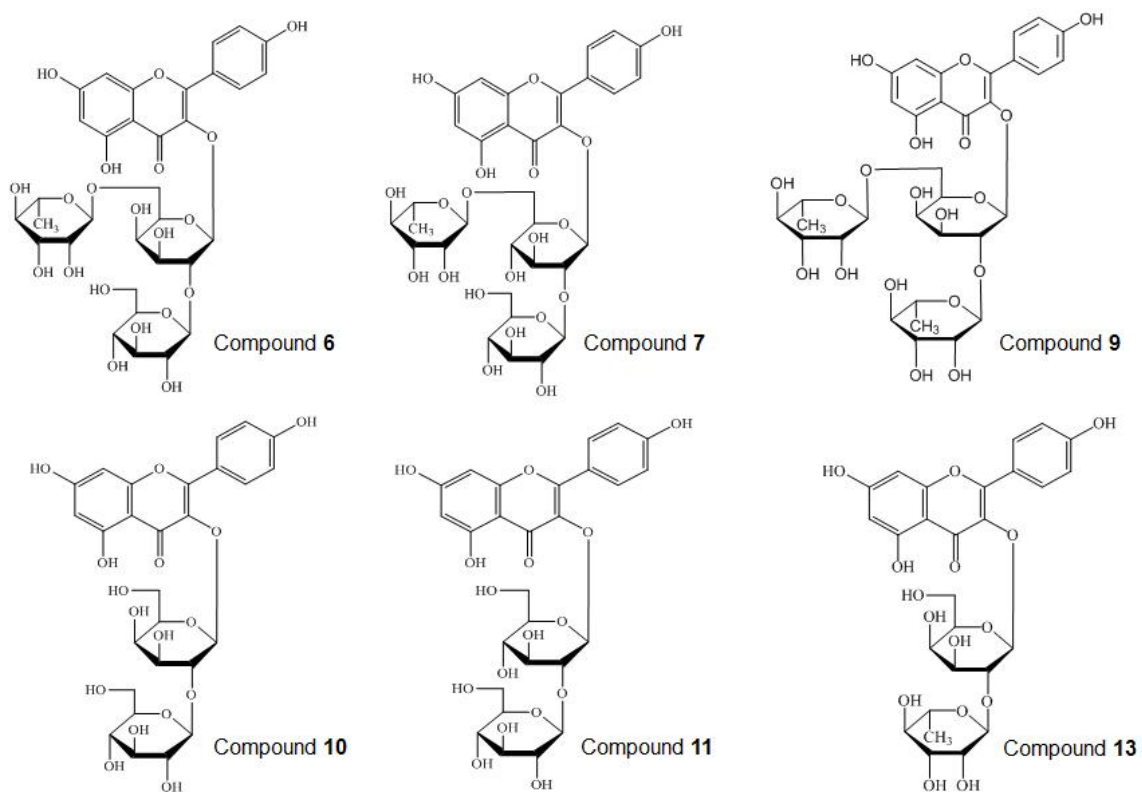


Fig. 4. Kaempferol glycosides isolated from the 50ESL and 50EBL,

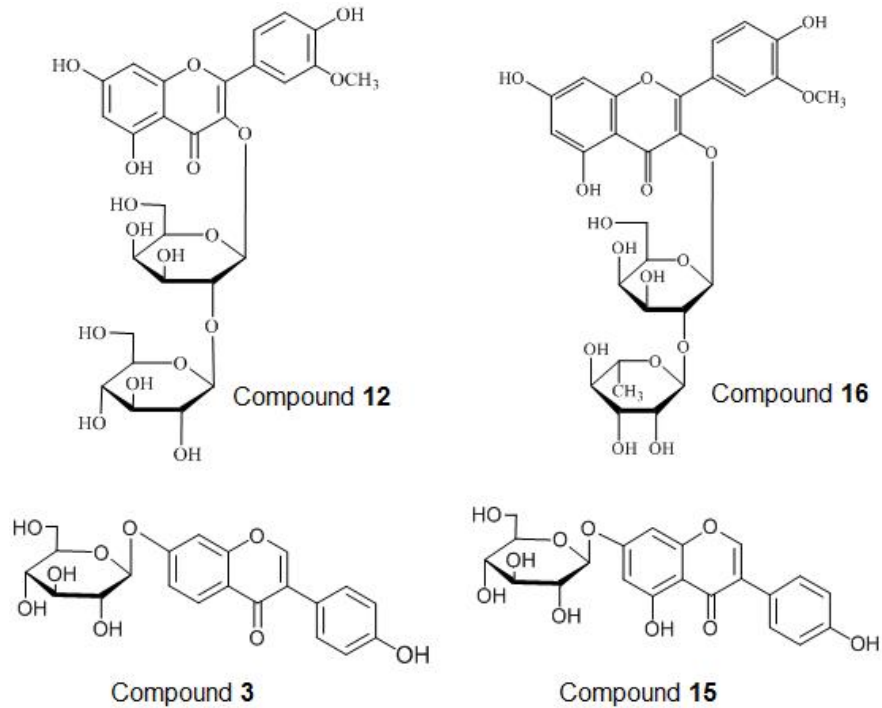


Fig. 5. Isorhamnetin glycosides and isoflavone glycosides isolated from the 50ESL and 50EBL.

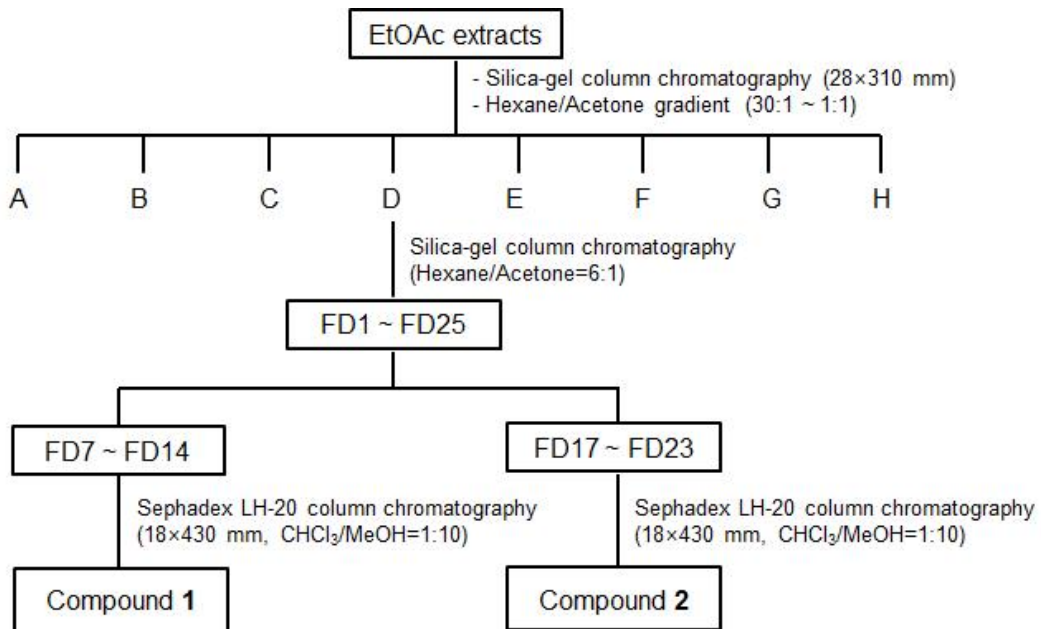
(4) 대두콩잎으로부터 코우메스탄(coumestan)계 화합물의 분리

충청남도 일대에서 대두콩을 파종하여 생육기간이 110일 이후에 수확한 콩잎을 열풍 건조하였다. 건조된 콩잎 1 Kg을 분쇄한 후 EtOAc 10 L를 첨가하고 4 일 동안 실온에서 추출한 후, 여과지를 사용하여 EtOAc 가용부만을 회수하고 감압·농축하여 25 g의 EtOAc 추출물을 수득하였다. 이 EtOAc 추출물은 hexane-acetone 혼합용액을 사용하여 silica-gel column chromatography (hexane/acetone = 30 : 1 (4 L), 20 : 1 (2 L), 10 : 1 (2 L), 8 : 1 (2 L), 6 : 1 (2 L), 3 : 1 (2 L), 1 : 1 (1 L))를 수행하여 총 8 개의 분획물 (A~H)을 얻었다. 상기 D 분획물 (hexane:acetone = 10 : 1, 1.0 g)을 hexane/acetone = 6 : 1의 혼합 농도구배 용액을 사용하여 2차 silica-gel column chromatography를 수행하여 25 개의 분획물 (FD1~FD25)을 얻었다. 다음 단계로 상기 분획물 중 FD7~FD14의 분획물을 합쳐서 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 1 : 10$ 을 유출용매로 사용하여 Sephadex LH-20 (18 x 430 mm, Pharmaciaiotech AB, Uppsala, Sweden) column chromatography를 수행하여 신규 화합물 1 (7 mg)을 얻었다 (Scheme 3).

상기 2차 silica-gel column chromatography의 분획인 FD17~FD23을 합쳐서 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 1 : 10$ 을 유출용매로 사용하여 Sephadex LH-20 column chromatography (18 x 430 mm)를 수행하여 화합물 2 (10 mg)를 얻었다 (Scheme 3).

분리한 화합물 1과 화합물 2의 구조분석을 위하여 NMR 분석 및 질량분석을 수행하였다. 그 결과 및 기 보고된 문헌 (Lee *et al.*, 2006)을 참고한 결과, 화합물 1은 신규화합물 (11-hydroxy-4,4-dimethylbenzofuro[3,2-c]pyrano[2,3-h]chromen-8(4H)-one)이며, 화합물 2는

plicadin (9-hydroxy-2-(prop-1-en-2-yl)-1H-benzofuro[3,2-c]furo[3,2-g]chromen- 6(2H)-one)으로 확인되어 (Fig. 11) 신규물질 및 용도에 대한 특허출원을 완료하였다.



Scheme 3. Isolation scheme of compounds, PD-1 and PD-2 from 95ESL.

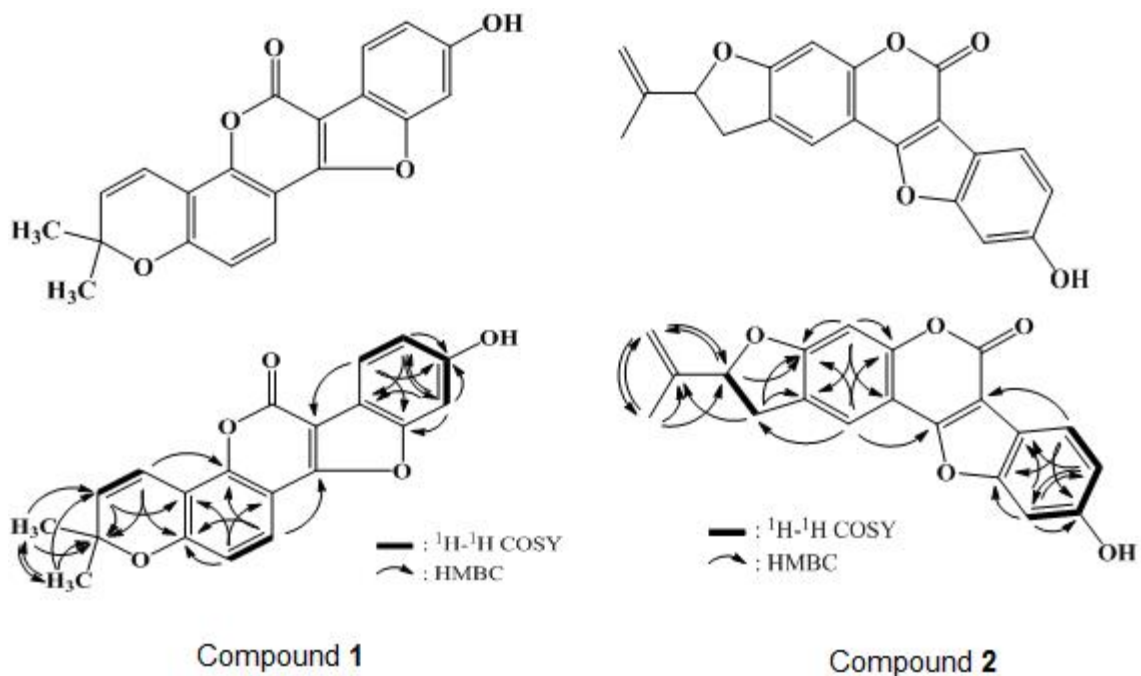


Fig. 6. Chemical structures and ^1H - ^1H COSY and HMBC correlation of compounds 1 and 2.

다. 콩잎 추출물부터 배당체 고함유 분획 (polysaccharide-high fraction, PSH) 제조 및 분석

(1) 콩잎 추출물부터 배당체 고함유 분획 (PSH) 제조

대두콩잎(GH) 및 검정콩잎(서리태잎, BB)의 함유성분인 플라보놀 배당체들의 활성을 규명하기 위해 조추출물 (ESL: GH 추출물; EBL: BB 추출물)로부터 배당체 화합물을 높은 농도로 함유하는 분획을 얻기 위하여 용매 분획 및 컬럼크로마토그래피를 수행하였다.

2013년도에 수확한 107일령 GH와 BB를 건조 후 분쇄하여 각각 콩잎 50 g에 70% EtOH 500 ml를 넣고 실온에서 48 시간 동안 진탕하면서 추출하였으며, 여과지로 여과하고 감압 하에 농축하여 각각 12.3 g, 9.9 g의 70ESL과 70EBL을 얻었다.

농축 된 추출물을 극성 차이를 이용하여 chloroform (CHCl₃)과 30% MeOH을 1:1 비율로 분획갈때기에 넣고 층 분리를 통해 분획하였다. 이 과정을 3회 반복 수행하여 70ESL과 70EBL 추출물로부터 각각 9.7 g, 8.4 g의 30% MeOH 분획물을 얻었다.

다음 단계로 1차 흡착제인 Diaion HP-20을 사용하여 컬럼크로마토그래피를 수행하였다.

70ESL과 70EBL의 30% MeOH 분획물을 각각 농축액 상태에서 Diaion HP-20 컬럼 (45 × 200 mm)에 흡착시킨 후 MeOH-H₂O gradient (0 → 20 → 40 → 60 → 80 → 100% MeOH)를 이동상으로 컬럼크로마토그래피를 수행하였다. 각각 제조된 용매는 1 L씩 흘려주었으며, 각각의 분획물은 감압 하에 농축하였으며, 얻은 각 분획들의 중량은 그림 7과 그림 8에 표시하였다. HPLC 분석을 통해 40% MeOH 용출 분획에 배당체의 함량이 높은 것을 확인하였으며, 70ESL과 70EBL로부터 각각 PSH인 70ESL-Fr. 3 (2.2 g)과 70EBL-Fr. 3 (1.02 g)을 얻었다.

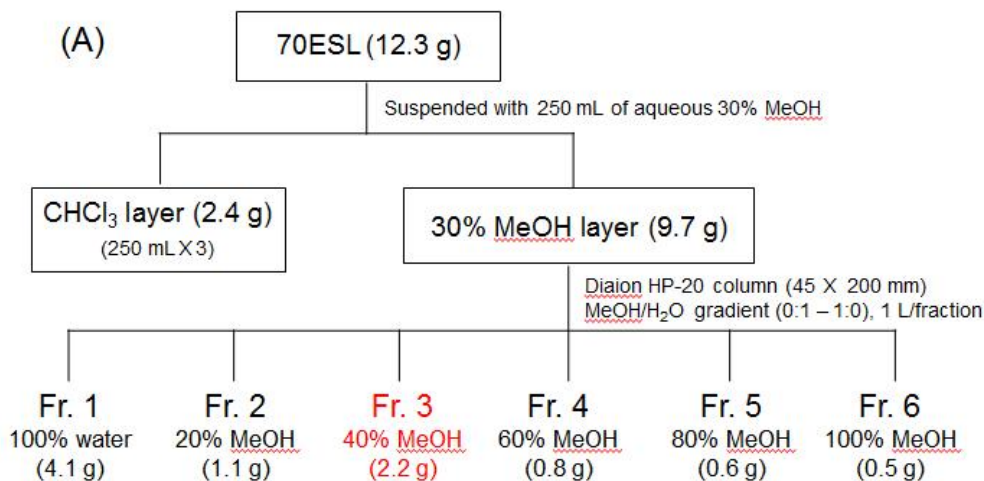


Fig. 7. Isolation schemes of PSH from 70ESL.

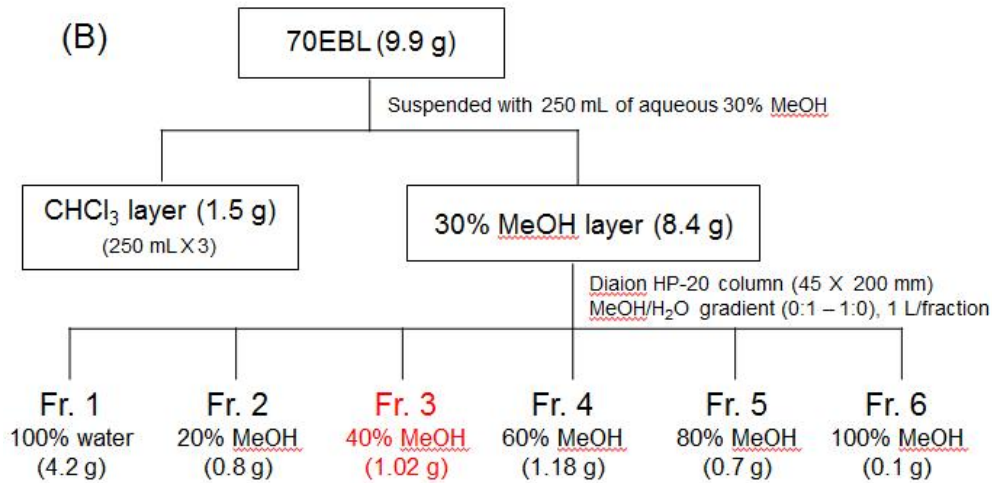


Fig. 8. Isolation schemes of PSH from 70EBL.

(2) Diaion HP-20 컬럼크로마토그래피로부터 얻은 분획의 HPLC 분석

HPLC를 통해 70ESL과 70EBL 및 Diaion HP-20 컬럼크로마토그래피를 통해 얻은 분획물을 분석하였다.

먼저, 70ESL과 Diaion HP-20 컬럼크로마토그래피를 통해 얻은 6개 분획물의 HPLC profile을 비교해 본 결과, 40% MeOH로 용출된 Fr. 3과 60% MeOH로 용출된 Fr. 4가 플라보놀 배당체 고함유 분획(파란색 박스로 표시)이었으며, kaempferol 배당체 화합물인 6, 7, 9, 10, 11이 고농도로 함유되어 있음을 확인하였으며, 이소플라본 배당체인 화합물 3, 15도 함유되어 있었다 (Fig. 9A).

또한, 70EBL과 Diaion HP-20 컬럼크로마토그래피를 통해 얻은 6개 분획물의 HPLC profile을 비교해 본 결과, 40% MeOH로 용출된 Fr. 3과 60% MeOH로 용출된 Fr. 4가 플라보놀 배당체 고함유 분획(초록색 박스로 표시)이었으며, quercetin 배당체인 4, 5, 8, 9와 isorhamnetin 배당체인 12, 16이 고농도로 함유되어 있음을 확인하였다 (Fig. 9B).

70ESL과 70EBL로부터 분리한 Fr. 3과 Fr. 4 각각을 배당체 고함유 분획물 (glycosides-rich fractions) GR1과 GR2로 명명하고, 더 나아가 Fr. 3과 Fr. 4를 1:1로 혼합하여 HPLC profile 분석 (Fig. 10)과 70ESL과 70EBL에 비해 *in vitro* 활성 및 총플라보노이드와 총페놀 함량도 비교·분석하였다. 또한 지표물질 함량분석을 통해 70ESL과 70EBL에 비해 플라보놀 배당체의 함량이 어느 정도 증가하였는지 측정하고자 하였다.

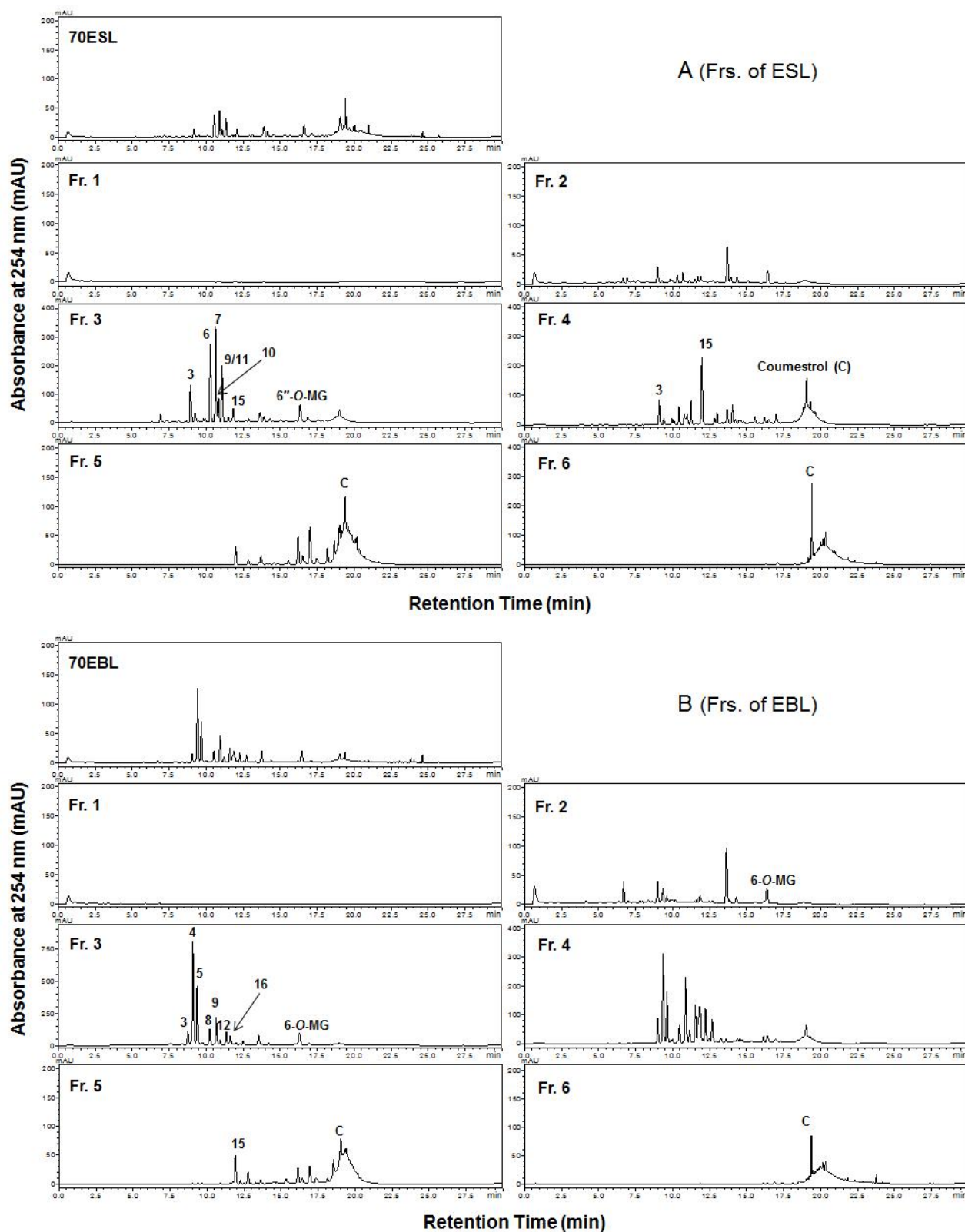


Fig. 9. HPLC profiles of 70ESL, 70EBL, and Diaion HP-20 column fractions (5 mg/ml). Fractions of Diaion HP-20 column (Fr. 1: H₂O eluent; Fr. 2: 20% MeOH eluent; Fr. 3: 40% MeOH eluent; Fr. 4: 60% MeOH eluent; Fr. 5: 80% MeOH eluent; Fr. 6: 100% MeOH eluent). HPLC analysis condition was method 2.

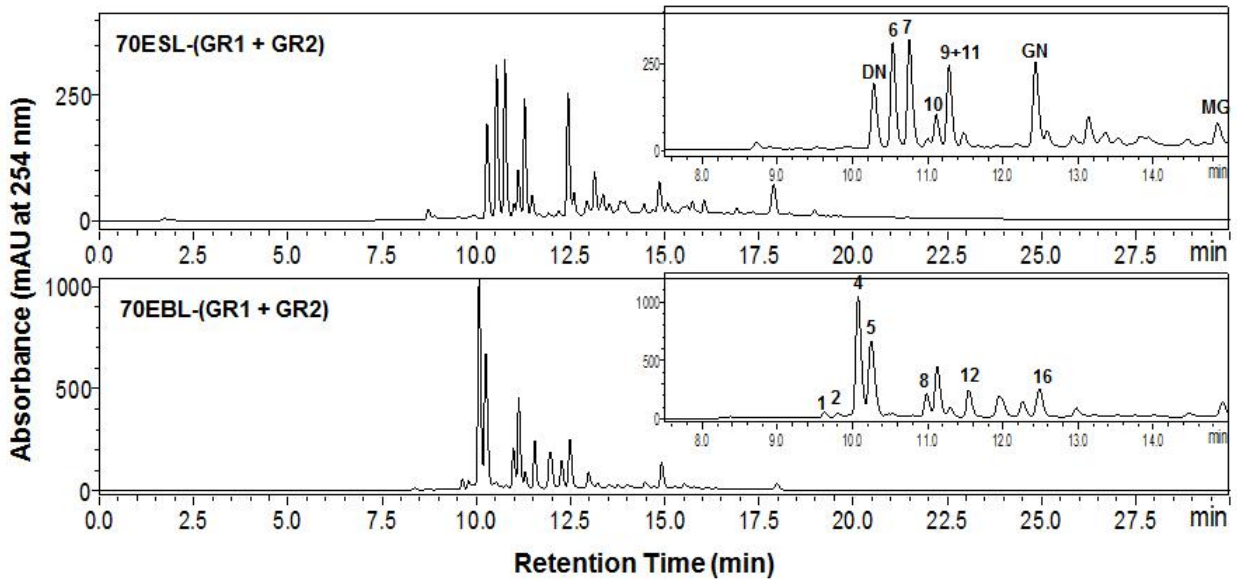


Fig. 10. HPLC profiles of 70ESL-(GR1 + GR2) and 70EBL-(GR1 + GR2). The sample concentrations were 1 mg/ml. HPLC analysis condition was method 2.

(3) PSH의 총 페놀, 총 플라보노이드 함량 측정

70ESL과 70EBL의 Diaion HP-20 Fr. 3 (GR-1)과 Fr. 4 (GR-2)의 총 페놀 함량은 조추출물 (Crude extract, 70ESL과 70EBL)에 비해 두드러지게 증가하였다 (Table 41). 특히 70ESL-GR-1은 70ESL에 비해 2배가량 증가하였고, 70EBL-GR-1은 70EBL에 비해 3배가량 증가하였다.

70EBL-GR-1과 70EBL-GR-2의 총 플라보노이드 함량은 70EBL에 비해 각각 3.6배, 2.6배씩 현저하게 증가하였다. 반면에 70ESL-GR-1과 70ESL-GR-2의 총 플라보노이드 함량은 70ESL에 비해 각각 1.2배, 1.6배씩 증가하였다 (Table 41).

Table 41. Contents of total phenolics and total flavonoids of 70ESL, 70EBL, and their Diaion HP-20 fractions

Samples	Total phenolics (mg gallic acid equivalents /g sample)		Total flavonoids (mg quercetin equivalents /g sample)	
	70ESL	70EBL	70ESL	70EBL
Crude extracts	67.4 ± 0.2	67.8 ± 3.5	76.0 ± 1.3	119.6 ± 0.1
Diaion HP-20 Fr. 1	14.7 ± 0.7	14.8 ± 0.3	7.5 ± 2.2	12.7 ± 0.4
Diaion HP-20 Fr. 2	64.2 ± 0.4	48.2 ± 1.7	65.7 ± 0.7	46.0 ± 1.2
Diaion HP-20 Fr. 3 (GR1)	120.9 ± 0.5	183.0 ± 5.4	94.3 ± 0.0	431.8 ± 2.4
Diaion HP-20 Fr. 4 (GR2)	105.1 ± 1.4	160.3 ± 2.0	117.9 ± 2.5	305.6 ± 1.0
Diaion HP-20 Fr. 5	78.4 ± 0.6	71.3 ± 0.9	103.6 ± 3.6	103.8 ± 3.3
Diaion HP-20 Fr. 6	64.0 ± 2.5	32.3 ± 1.1	79.4 ± 1.8	31.1 ± 1.5

Values are presented as mean ± SD (n = 3).

(4) Diaion HP-20 분획물들의 *in vitro* 활성 비교

(가) Yeast α -glucosidase 저해활성

70ESL과 70EBL로부터 Diaion HP-20 컬럼 크로마토그래피를 통해 분리한 각각 6개의 분획물들의 yeast α -glucosidase 저해활성 (100 μ g/ml) 측정하였다 (Table 42). 70ESL의 Diaion HP-20 분획물의 yeast α -glucosidase 저해활성은 pterocarpan계 화합물(특히 coumestrol)이 함유된 Fr. 4-6에서 높게 나타났으며 (Fig. 9A), 70EBL의 Diaion HP-20 분획물의 yeast α -glucosidase 저해활성은 Fr. 5-6에서 매우 높게 나타났다 (Table 39). 조추출물인 70EBL에서는 coumestrol이 거의 검출되지 않았으나, 70EBL의 Diaion HP-20 분획물 Fr. 5-6에서는 coumestrol이 검출되었다 (Fig. 9B).

Table 42. Inhibitory activities of Diaion HP-20 fractions from 70ESL and 70EBL on yeast α -glucosidase

Samples	Inhibition of yeast α -glucosidase at 100 μ g/ml (%)	
	ESL	EBL
Crude extracts	72.7 \pm 1.4	27.0 \pm 0.2
Diaion HP-20 Fr. 1	13.2 \pm 1.8	14.8 \pm 0.6
Diaion HP-20 Fr. 2	12.7 \pm 0.6	13.2 \pm 1.2
Diaion HP-20 Fr. 3 (GR1)	36.6 \pm 0.2	14.5 \pm 0.6
Diaion HP-20 Fr. 4 (GR2)	71.4 \pm 0.8	28.2 \pm 0.3
Diaion HP-20 Fr. 5	100	85.5 \pm 0.4
Diaion HP-20 Fr. 6	99.9 \pm 0.4	80.5 \pm 0.3
Positive control (Coumestrol 5 μ M)	50.8 \pm 0.6	

Values are presented as mean \pm SD (n = 3).

(나) LDL-항산화 활성

70ESL의 모든 Diaion HP-20 분획물에서 LDL-항산화 활성이 나타났으며, 이 중 Fr. 3과 4에 비해 Fr. 5와 Fr. 6에서 ESL에 보다 강한 LDL-항산화 활성을 나타냈다 (Table 43). 반면에 70EBL의 Diaion HP-20 분획물은 Fr. 3-5에서 강한 LDL-항산화 활성을 나타냈다. 70EBL의 Diaion HP-20 Fr. 3-4에는 LDL-항산화 활성이 높은 quercetin 배당체가 많이 함유되어 있었고, 70EBL의 Diaion HP-20 Fr. 5에는 LDL-항산화 활성이 높은 coumestrol이 많이 함유되어 있었다 (Fig. 9B).

70EBL의 Diaion HP-20 Fr. 3 (이하 GR1), Fr. 4 (GR2)을 1:1로 혼합한 GR Fr.에 대한 LDL-항산화 활성을 측정한 결과, 각각 분획인 GR1과 GR2보다 높은 LDL-항산화 활성을 나타냈다. 농도별 LDL-항산화 활성을 알아보기 위하여 crude extracts를 포함하여 GR1, GR2, GR Fr.에 대하여 20, 10, 5 μ g/ml에서 LDL-항산화 활성을 측정하였다. 10 μ g/ml에서 GR1, GR2, GR Fr. 모두 95% 이상의 높은 LDL-항산화 활성을 나타내어 큰 차이가 없었으나, 5 μ g/ml에서 GR Fr.의 LDL-항산화 활성은 35.2%인 반면에 GR1 과 GR2는 LDL-항산화 활성이 매우 낮았다 (Table 43).

Table 43. Inhibitory activities of Diaion HP-20 fractions from 70ESL and 70EBL on LDL-oxidation

Samples	Inhibition of LDL-oxidation (%)				
	ESL	EBL			
	at 40 µg/ml	at 40 µg/ml	at 20 µg/ml	at 10 µg/ml	at 5 µg/ml
Crude extracts	66.1 ± 0.2	89.7 ± 0.0	54.7 ± 0.2	49.5 ± 0.0	0
Diaion HP-20 Fr. 1	0	0	-	-	-
Diaion HP-20 Fr. 2	48.4 ± 0.6	38.9 ± 0.1	-	-	-
Diaion HP-20 Fr. 3 (GR1)	53.3 ± 1.8	94.0 ± 1.8	99.6 ± 0.3	95.8 ± 1.6	0
Diaion HP-20 Fr. 4 (GR2)	61.4 ± 0.7	92.3 ± 2.8	100 ± 0.1	95.8 ± 0.2	8.8 ± 0.6
Diaion HP-20 Fr. 5	88.9 ± 0.0	81.4 ± 0.7	-	-	-
Diaion HP-20 Fr. 6	95.4 ± 0.0	46.3 ± 0.7	-	-	-
GR1+ GR2 (GR Fr.)	97.1 ± 0.3	103.3 ± 0.1	98.4 ± 0.1	96.0 ± 1.0	35.2 ± 0.6
Positive control (BHT 2 µM)	48.0 ± 0.5		51.4 ± 0.7		44.0 ± 0.2

Values are presented as mean ± SD (n = 3).

(다) DPPH 자유라디칼 소거 활성

70ESL의 GR1과 GR2 및 GR Fr. (GR1+GR2)의 DPPH 라디칼 소거 활성은 100 µg/ml에서 70ESL에 비해 증가하였으나, 큰 차이는 없었다. 반면에 70EBL의 R1과 GR2 및 GR Fr.의 DPPH 라디칼 소거 활성은 100 µg/ml에서 70EBL에 비해 2배 이상 증가하였다. 또한 70EBL-GR Fr.은 50 µg/ml에서 70EBL-GR1, 70EBL-GR2에 비해 DPPH 라디칼 소거활성을 측정하기 위하여 추가 실험을 진행하였다. GR1, GR2보다 GR Fr.에서 DPPH 라디칼 소거 활성이 각각 1.5배, 2배 증가하였다 (Table 44).

Table 44. DPPH radical scavenging effects of 70ESL, 70EBL, and their diaion HP-20 column fraction

Samples	DPPH radical scavenging activity		
	ESL	EBL	
	at 100 µg/mL	at 100 µg/mL	at 50 µg/mL
Crude extracts	21.0 ± 0.5	40.8 ± 1.0	9.0 ± 0.3
Diaion HP-20 Fr. 1	9.2 ± 0.9	8.8 ± 0.8	-
Diaion HP-20 Fr. 2	30.9 ± 1.7	18.4 ± 0.5	-
Diaion HP-20 Fr. 3 (GR1)	25.7 ± 0.7	88.9 ± 0.4	37.6 ± 0.1
Diaion HP-20 Fr. 4 (GR2)	29.9 ± 0.2	75.3 ± 1.0	28.5 ± 1.0
Diaion HP-20 Fr. 5	27.5 ± 0.2	30.8 ± 1.1	-
Diaion HP-20 Fr. 6	19.4 ± 1.1	9.9 ± 1.0	-
GR1+ GR2 (GR Fr.)	30.9 ± 0.2	93.1 ± 0.1	57.1 ± 0.2
Positive control (L-Ascorbic acid 28 µM)	42.1 ± 0.4		

Values are presented as mean ± SD (n = 3).

라. 콩잎 추출물의 지표물질 함량 분석

(1) HPLC 분석 조건

연구개발 수행 내용 및 방법에서 설명한 바와 같이 HPLC 분석을 위해 Shimadzu HPLC system (Pump: Shimadzu LC-10A vp with binary pump; Detector: Shimadzu SPD-M10A vp PDA detector, 254 nm & 345 nm; Auto injector: Shimadzu SIL-10A vp; injection volume, 5-10 μ l)을 사용하였고, HPLC column은 Brownlee SPP C18-MS-II column (4.6 x 100 mm, 2.7 μ m), 유속 1.0 ml/min, 이동상은 0.1% acetic acid (용매 A)과 acetonitrile (CH₃CN, 용매 B), 프로그램된 용출 조건 (a linear gradient elution program: 5-71% B for 0~40 min, 71-100% B for 40~50 min, 100 - 5% B for 50~55 min; 5% B for 55~60 min)을 사용하였다.

(2) 콩잎 수확시기, 건조방법 및 추출용매에 따른 HPLC profile 비교

(가) 2013 수확콩잎의 HPLC profile 분석

① GH 콩잎 70% EtOH 추출물: GH 콩잎의 수확 시기별 70% EtOH 추출물인 경우, 파종 후 75일 이후에 6"-O-malonyl genistin의 함량이 급격히 증가하다가 107일 이후에는 다시 감소하였으며, 반면에 재배기간이 길어질수록 coumestrol의 함량은 증가하였다 (Fig. 11).

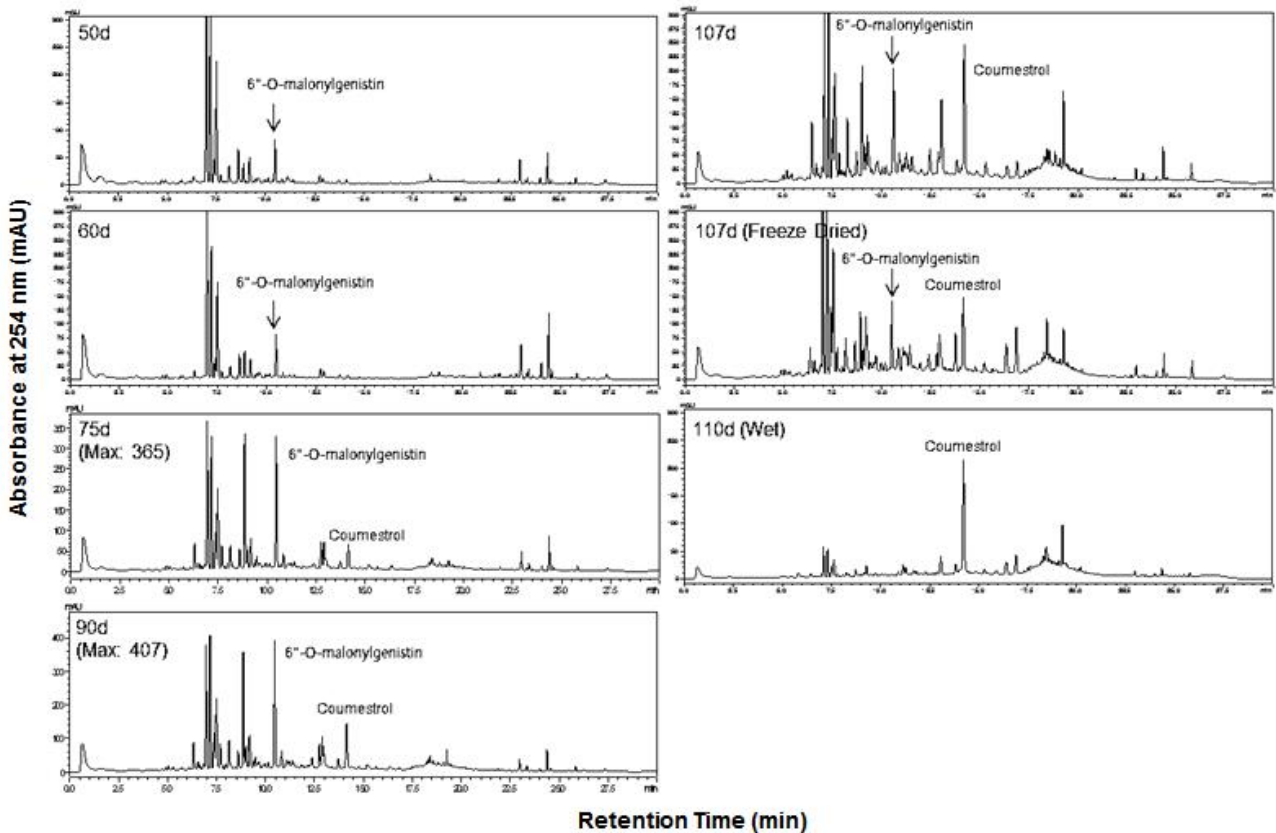


Fig. 11. HPLC profiles of 70% EtOH of 50d, 60d, 75d, 90d, and 107d-GH soy leaves (254 nm).

② BB와 GH 콩잎 추출물의 EtOH 농도에 따른 플라보놀 배당체의 함량 비교 분석: 107일령 콩잎 BB와 GH 건조분말 100 mg에 추출용매로 30% EtOH, 50% EtOH 및 70% EtOH을 각각 1 ml씩 첨가하고 실온에서 48 시간 동안 진탕하면서 추출하였다. 추출물을 syringe filter (0.45 μ m, Whatman)로 여과한 추출액 (5 μ l)을 HPLC에 주입하여 상기의 HPLC 조건에서 EtOH 농도에 따른 플라보놀 배당체 (주로 Rt = 12 분 이전의 peak들)의 함량 변화를 관찰하였다.

BB와 GH 건조콩잎 모두 30% EtOH에 비해 50% EtOH과 70% EtOH에 의해 효과적으로 플라보놀 배당체를 추출할 수 있었다. 앞서 설명한 것처럼 BB 건조콩잎과 GH 건조콩잎의 플라보놀 배당체의 함유성분은 상당히 다른 것을 알 수 있고, BB 콩잎은 플라보놀 배당체 위주의 peak가 관찰되는 반면에, GH 콩잎은 플라보놀 배당체와 함께 많은 isoflavonoids의 peak가 관찰되었다 (Fig. 12).

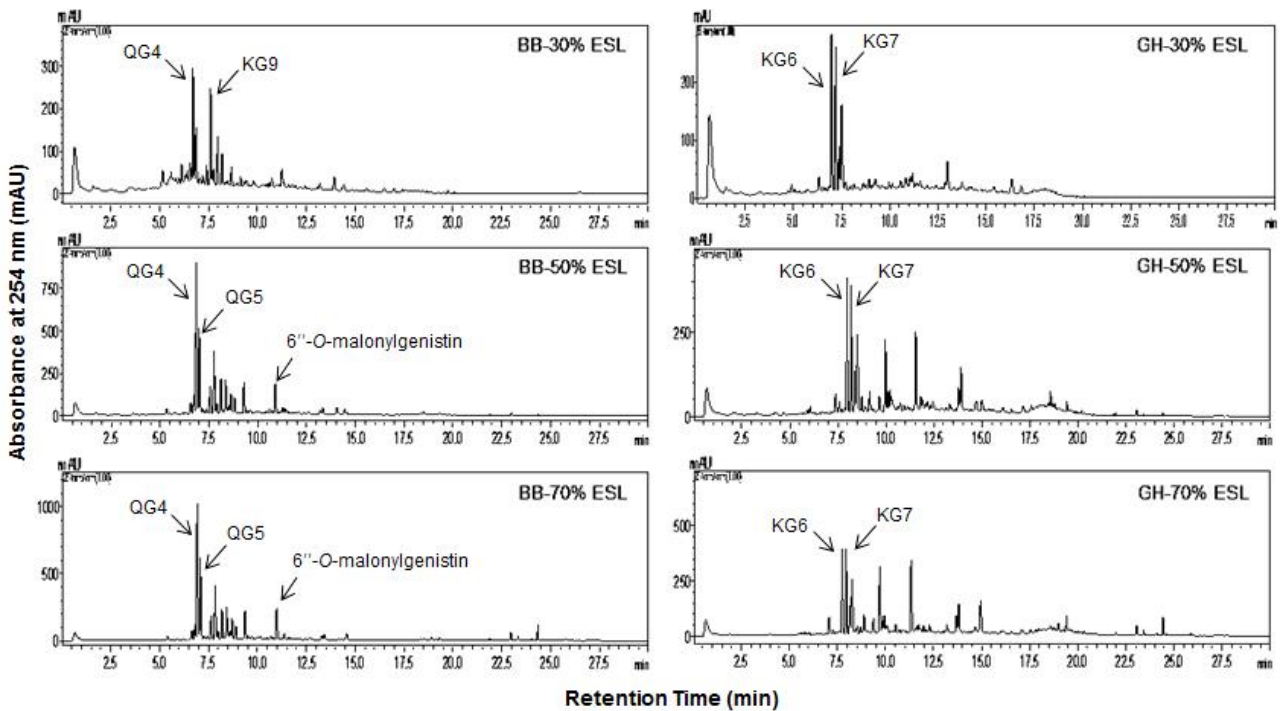


Fig. 12. HPLC profiles of 110d-BB and 110d-GH soy-leaf extracts of 30% EtOH, 50% EtOH, and 70% EtOH at UV 254 nm. ESL; soy-leaf extract.

③ 콩 품종별 콩잎 추출물의 EtOH 농도와 추출기간에 따른 플라보놀 배당체 및 테로카판 화합물의 함량 비교 분석: 건조되지 않은 최종 수확 콩잎 110일령 (BB, WD 및 GH)을 3 가지 추출용매 (50% EtOH, 70% EtOH, 95% EtOH)를 첨가하여 진탕하면서 실온에서 각각 2일, 5일 및 8일간 추출하였다. 각각의 추출물을 분석용 HPLC로 분리한 후 HPLC 양상과 maximum intensity를 비교해 본 결과, 모든 콩잎에서 공통적으로 2일에 비해 5일, 8일 동안 추출한 것이 플라보놀 배당체의 함량이 높았으며, 5일과 8일의 추출물을 비교하면 플라보놀 배당체의 함량에 큰 차이가 없었다.

반면에 콩 품종에 따라 추출물이 함유하는 플라보놀 배당체의 함량 (HPLC profile의

maximum intensity로 비교)은 WD < GH < BB 순으로 검은콩잎 추출물에 상대적으로 가장 많은 플라보놀 배당체가 함유되어 있는 것으로 나타났다 (Figs. 13~15). 이 HPLC profile을 바탕으로 분리한 배당체 화합물 중 표지물질을 선정하여 배당체 고함유 분획 (PSH) 또는 추출물에 함유된 flavonoids 배당체들의 함량을 측정하고자 한다.

13.5 분 이후에 나타나는 pterocartan계 화합물은 BB 콩잎 추출물에서는 거의 검출되지 않았다 (Fig. 13). WD 콩잎과 GH 콩잎을 비교해 본 결과, 2일에 비해 5일, 8일 동안 추출한 것이 더 효과적이며, WD 콩잎에 비해 GH 콩잎이 더 많은 테로카판 (pterocartan)계 화합물을 함유하는 것으로 나타났다 (Figs. 14 & 15).

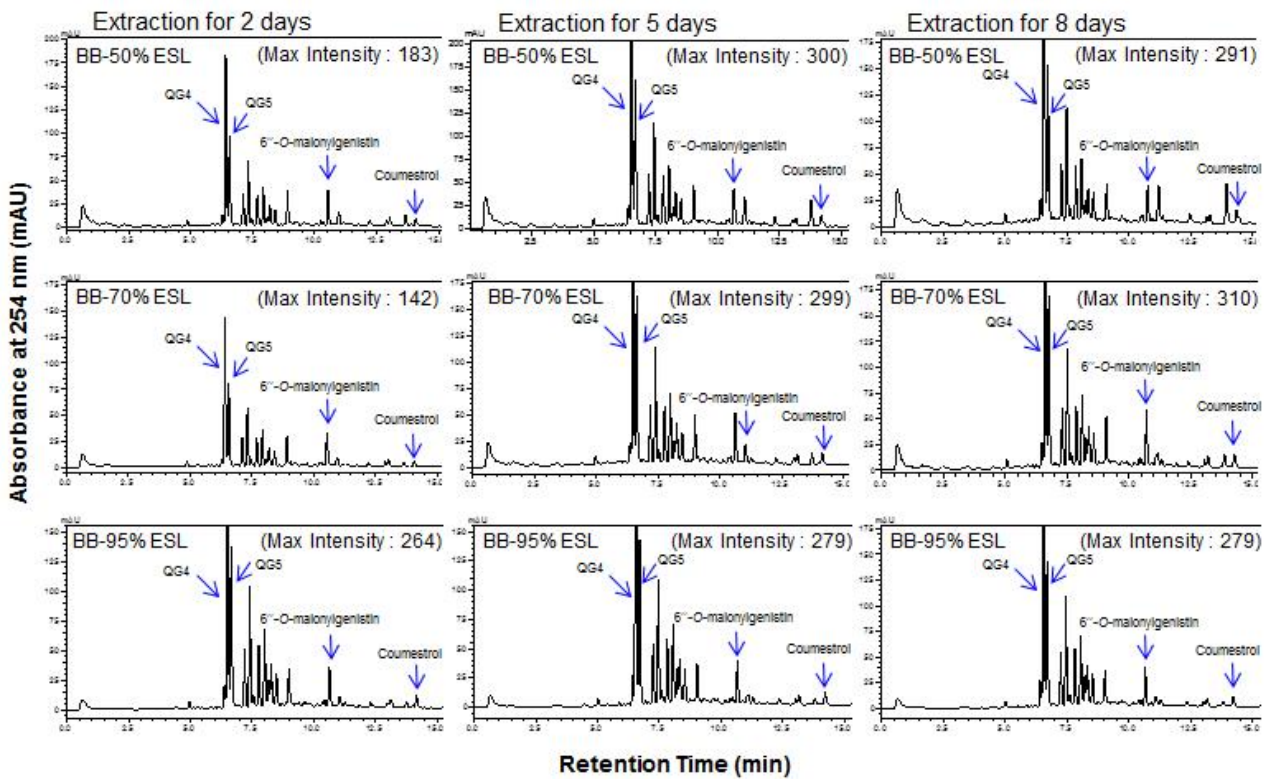


Fig. 13. HPLC profiles of 110d-BB soy-leaf extracts of 50% EtOH, 70% EtOH, and 95% EtOH for 2, 5, and 8 days at UV 254 nm.

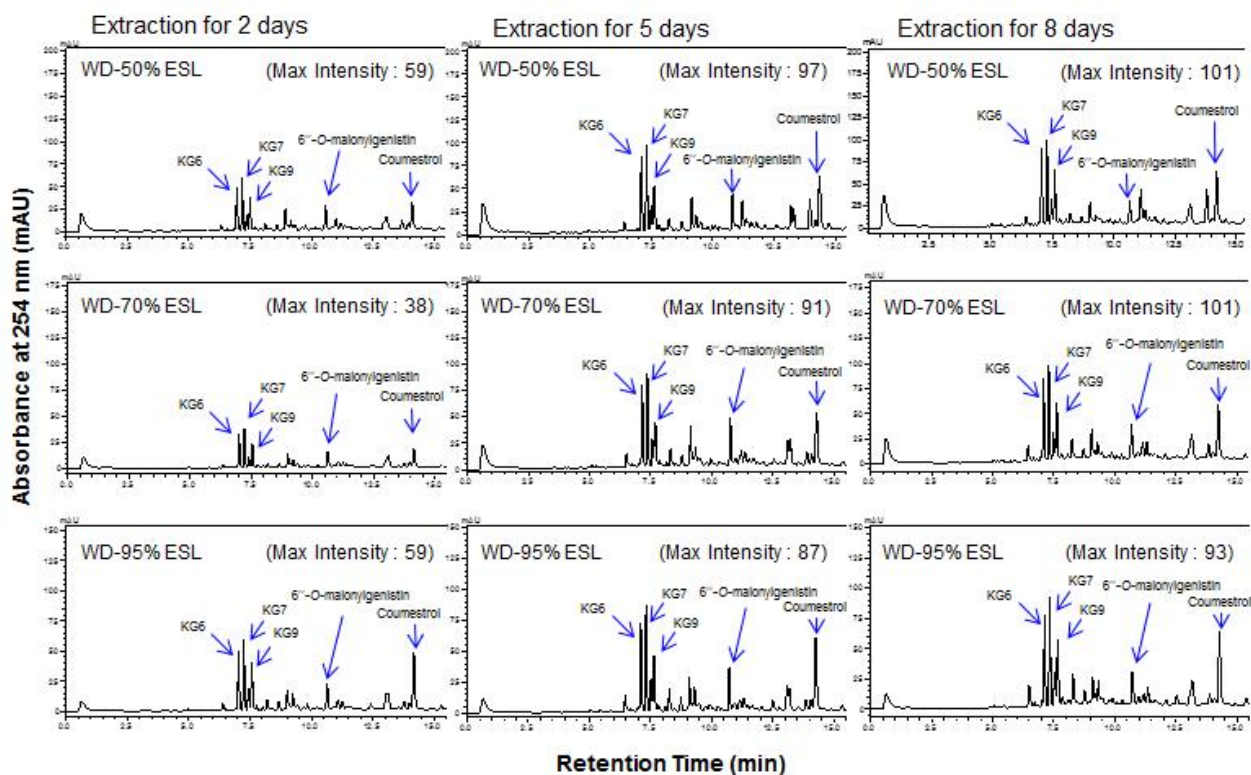


Fig. 14. HPLC profiles of 110d-WD soy-leaf extracts of 50% EtOH, 70% EtOH, and 95% EtOH for 2, 5, and 8 days at UV 254 nm.

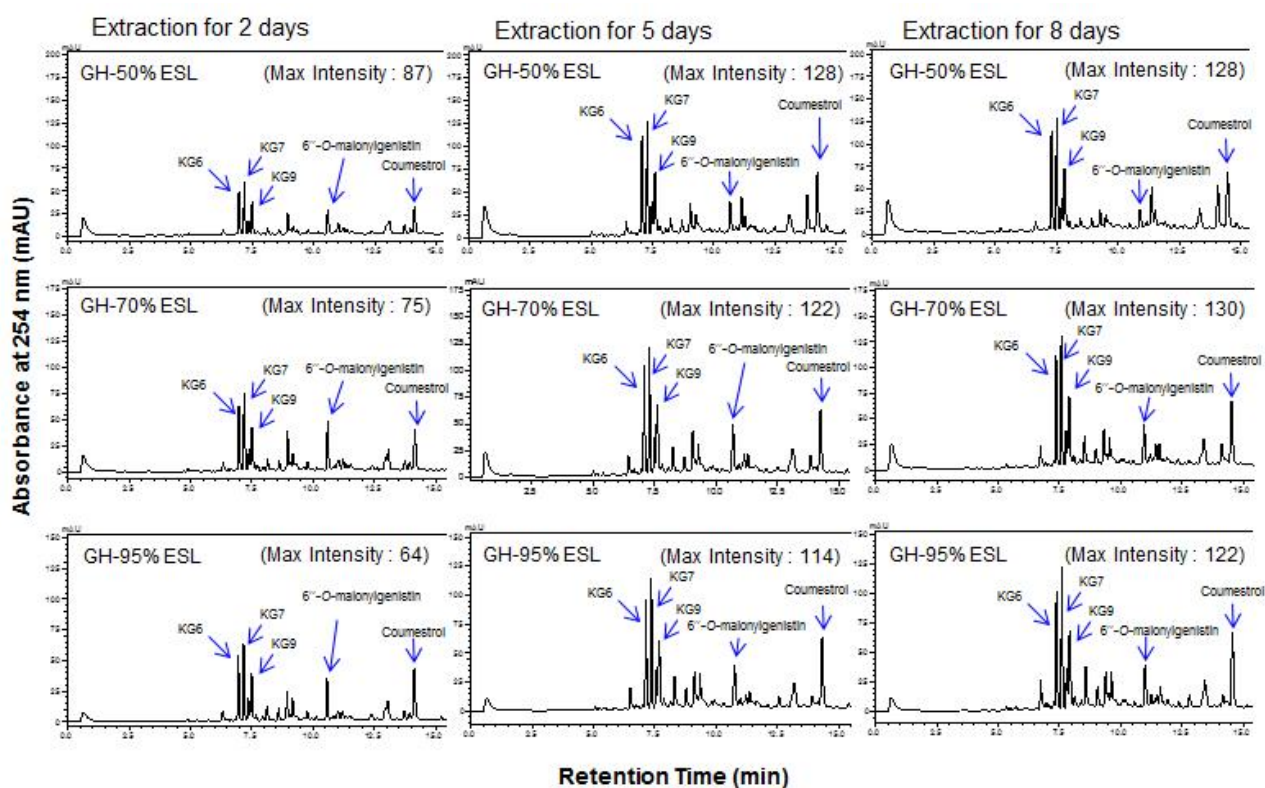


Fig. 15. HPLC profiles of 110d-GH soy-leaf extracts of 50% EtOH, 70% EtOH, and 95% EtOH for 2, 5, and 8 days at UV 254 nm.

(나) 2014 수확콩잎의 HPLC profile 분석

GH-50일령과 GH-115일령의 50% MeOH와 70% MeOH 추출물에서 KG6 peak가 두드러지게 관찰되었다. 65, 80, 95일령 추출물들에서 KG6의 peak area이 현저하게 감소하였고, 반면 KG9 또는 KG11 (위의 HPLC 조건에서 두 물질의 retention time이 같음)에 해당하는 큰 peak가 검출되었고, 12-13분대에 UV spectrum을 통해 캄페롤 배당체로 추정되는 두 개의 peak도 추가로 검출되었다. GH-115일령은 다시 KG6의 함량이 높아지고, KG9 또는 KG11 peak와 12-13분대어의 캄페롤 배당체의 두 peak가 사라지면서 테로카판 (pterocarpan)계 화합물들에 해당하는 peak가 급격히 생성되었다 (Fig. 16). GH 콩잎의 재배기간에 따라 배당체의 성분과 함량이 두드러지게 변화하는 것은 2014년도 일기 변화와도 큰 관련이 있을 것으로 추측된다.

반면에 BB 콩잎의 모든 추출물에서 QG5 peak가 관찰하였으며, 재배기간이 길어짐에 따라 QG5의 peak area가 증가하였다. 추출용매는 50% EtOH, 70% EtOH이 적당하며, 그 다음이 95% EtOH이고, 30% EtOH은 BB콩잎에 함유된 배당체에 대한 추출 효율이 매우 낮았다 (Fig. 17).

반복되는 표준 추출물의 제조 및 HPLC profile을 검토한 결과, 플라보놀 배당체 고함유 추출물을 얻기 위한 추출용매로는 50% EtOH, 70% EtOH이 적당하며, 그 다음이 95% EtOH이고, 30% EtOH은 BB콩잎에 함유된 배당체에 대한 추출 효율이 매우 낮았다. 따라서 50% EtOH 추출물과 70% EtOH 추출물의 플라보놀 배당체 함유량, 추출물의 건조중량, 다양한 in vitro 또는 cell-based assay를 통한 활성 검색을 수행하여 대량 생산 시에 가장 효율적인 추출용매를 선택하고자 한다.

반면에 coumestrol을 포함하는 테로카판 화합물 고함유 추출물을 얻기 위해서는 95% MeOH이 가장 좋으며, 그 다음으로 70% EtOH 순으로 적합하다.

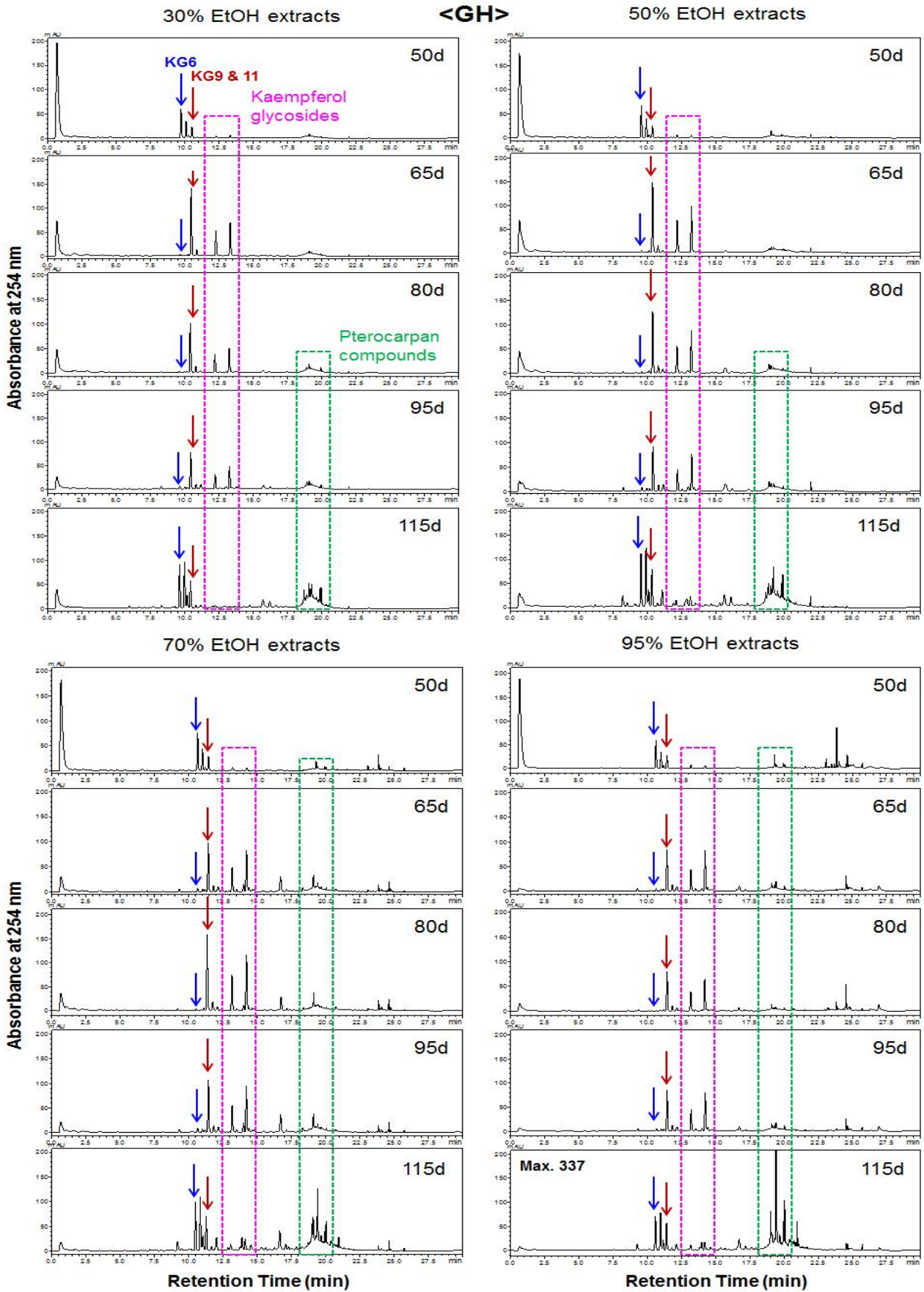


Fig. 16. HPLC profiles of 30%, 50%, 70%, and 95% EtOH extracts (10 mg/ml) of 2014-GH soy leaf.

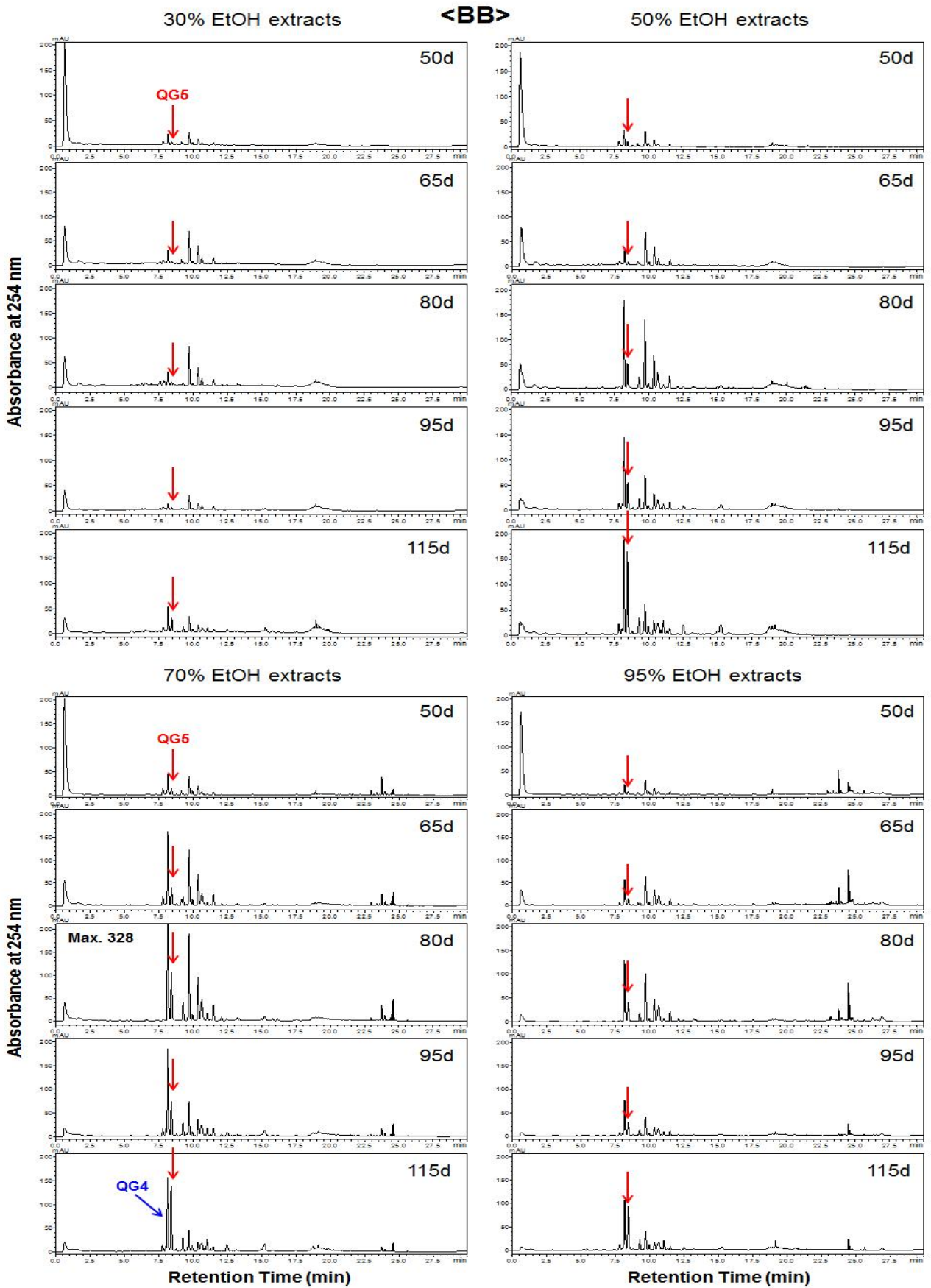


Fig. 17. HPLC profiles of 50% and 70% EtOH extracts (10 mg/ml) of 2014-BB soy leaf.

(다) 2015 수확콩잎의 HPLC profile 분석

2015년도에 재배한 GH 콩잎의 수확일령 및 추출용매 (50% EtOH, 70% EtOH)에 따른 HPLC profile을 나타내었다 (Fig. 18). 수확일령에 따른 함유 성분은 큰 변화가 없었으나, 함유량은 크게 차이가 나는 것을 알 수 있었다. 이에 GH 추출물의 표준화를 위해 GH 추출물에 늘 함유되어 있으면서, 수확일령 및 추출 조건에 따라 함유량의 차이를 보이는 KG7을 지표물질로써 선정하였다.

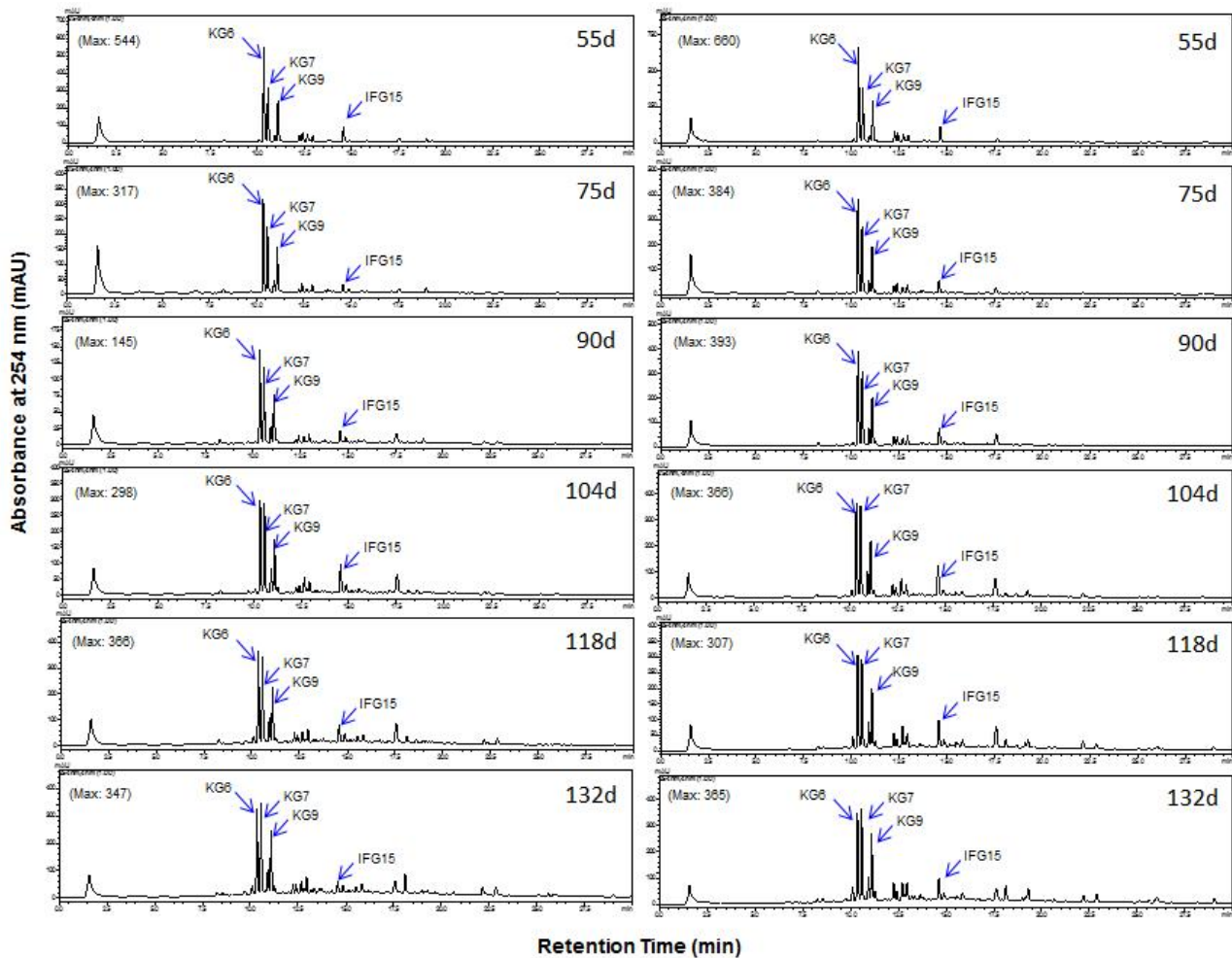


Fig. 18. HPLC profiles of 50% and 70% EtOH extracts (10 mg/ml) of 2015-GH soy leaf.

2015년도에 재배한 BB 콩잎의 수확일령 및 추출용매(50% EtOH, 70% EtOH)에 따른 HPLC profile을 나타내었다 (Fig. 19). 수확일령에 따른 함유 성분은 큰 변화가 없었으나, 함유량은 크게 차이가 나는 것을 알 수 있었다. 이에 BB 추출물의 표준화를 위해 BB 추출물에 늘 함유되어 있으면서, 수확일령 및 추출 조건에 따라 함유량의 차이를 보이는 QG5를 지표물질로써 선정하였다.

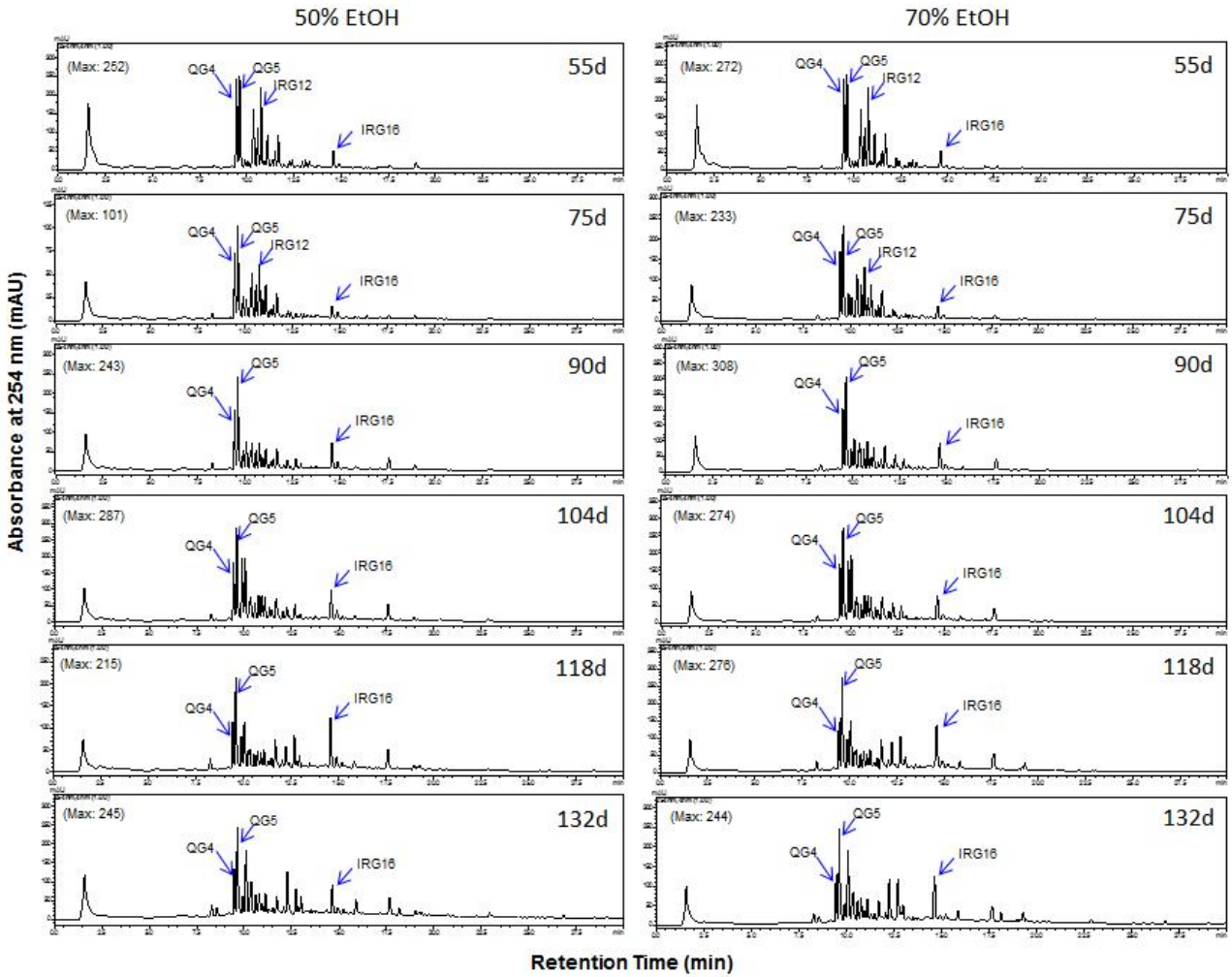


Fig. 19. HPLC profiles of 50% and 70% EtOH extracts (10 mg/ml) of 2015-BB soy leaf.

2015년도에 재배한 NG 콩잎의 수확일령 및 추출용매(50% EtOH, 70% EtOH)에 따른 HPLC profile을 나타내었다 (Fig. 20). 수확일령에 따른 함유 성분은 큰 변화가 없었으나, 함유량은 크게 차이가 나는 것을 알 수 있었다. 이에 NG 추출물의 표준화를 위해 NG 추출물에 늘 함유되어 있으면서, 수확일령 및 추출 조건에 따라 함유량의 차이를 보이는 QG5를 지표물질로써 선정하였다.

다만 2015년도에 수확한 시기별 BB콩잎과 NG콩잎의 50% EtOH 및 70% EtOH 추출물을 비교할 때 BB콩잎 추출물에 비해 NG콩잎에 함유된 성분들의 함량이 동일 농도에서 전반적으로 2배 이상 높은 것을 (HPLC intensity를 비교하여) 확인하였다 (Figs. 19 & 20).

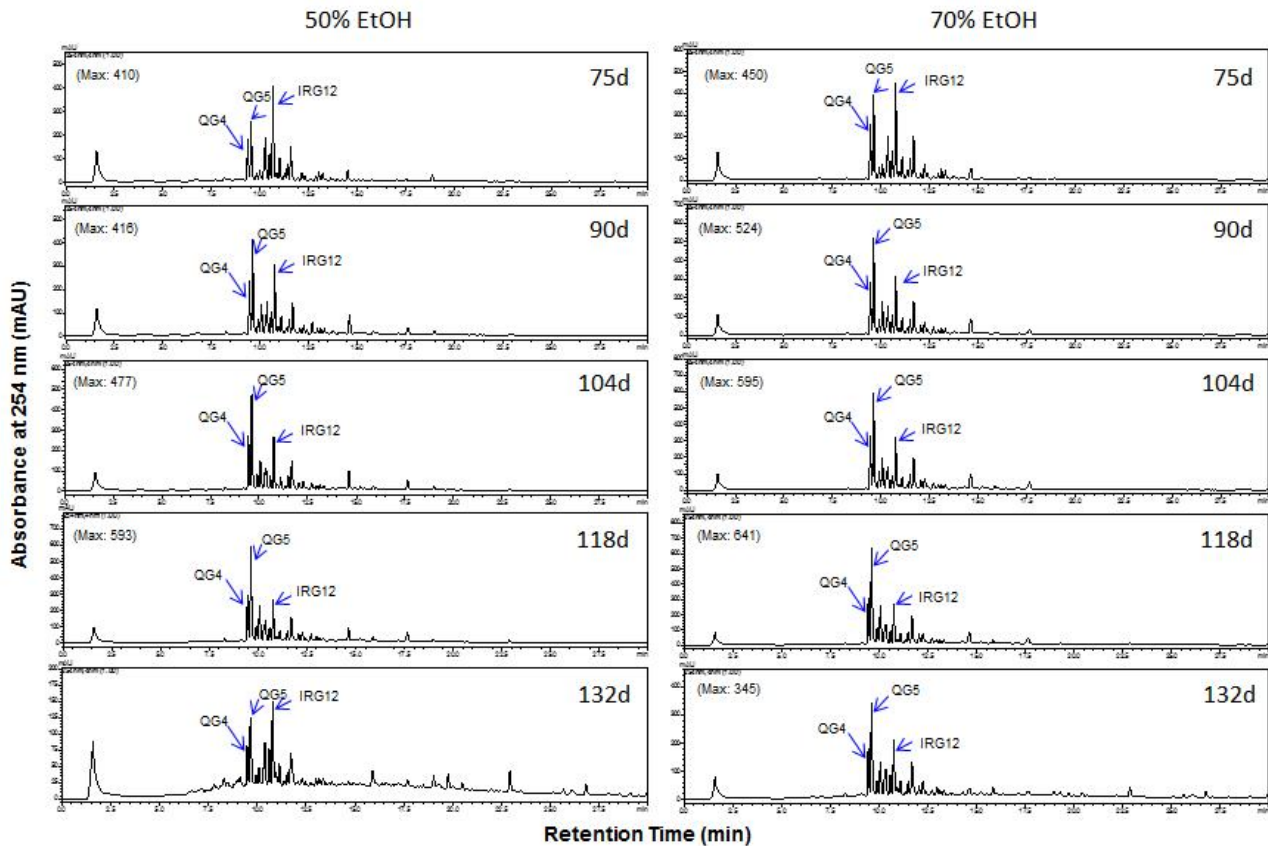


Fig. 20. HPLC profiles of 50% and 70% EtOH extracts (10 mg/ml) of 2015-NG soy leaf.

(라) 2016 수확콩잎의 HPLC profile 분석

2016년도에 재배한 GH, BB, BB-CJ, NG 콩잎의 수확일령 및 추출용매 (50% EtOH, 70% EtOH)에 따른 HPLC profile을 나타내었다 (Figs. 21-24). 2015년도와 마찬가지로 GH 추출물은 수확일령에 따른 함유 성분은 큰 변화가 없었다. BB-CJ 추출물은 BB 추출물과 비교할 때 HPLC profile이 다소 다른 것을 알 수 있었다 (Figs. 22-23). 개별적으로 BB-CJ 추출물은 BB 추출물은 수확일수 및 추출용매에 따른 HPLC profile의 차이는 없었다. 반면에 NG 추출물 2015년도 수확한 콩잎 추출물과 다소 상이한 HPLC profile을 보여 주었으나, 수확일수 및 추출용매에 따른 HPLC profile의 차이는 보이지 않았다 (Fig. 24).

따라서 2014-2016년도 수확 콩잎 추출물의 HPLC profile을 비교, 분석한 결과, GH 추출물의 표준화를 위해 KG7을, BB, BB-CJ, NG 추출물의 표준화를 위해 QG5를 지표물질로써 선정하였다.

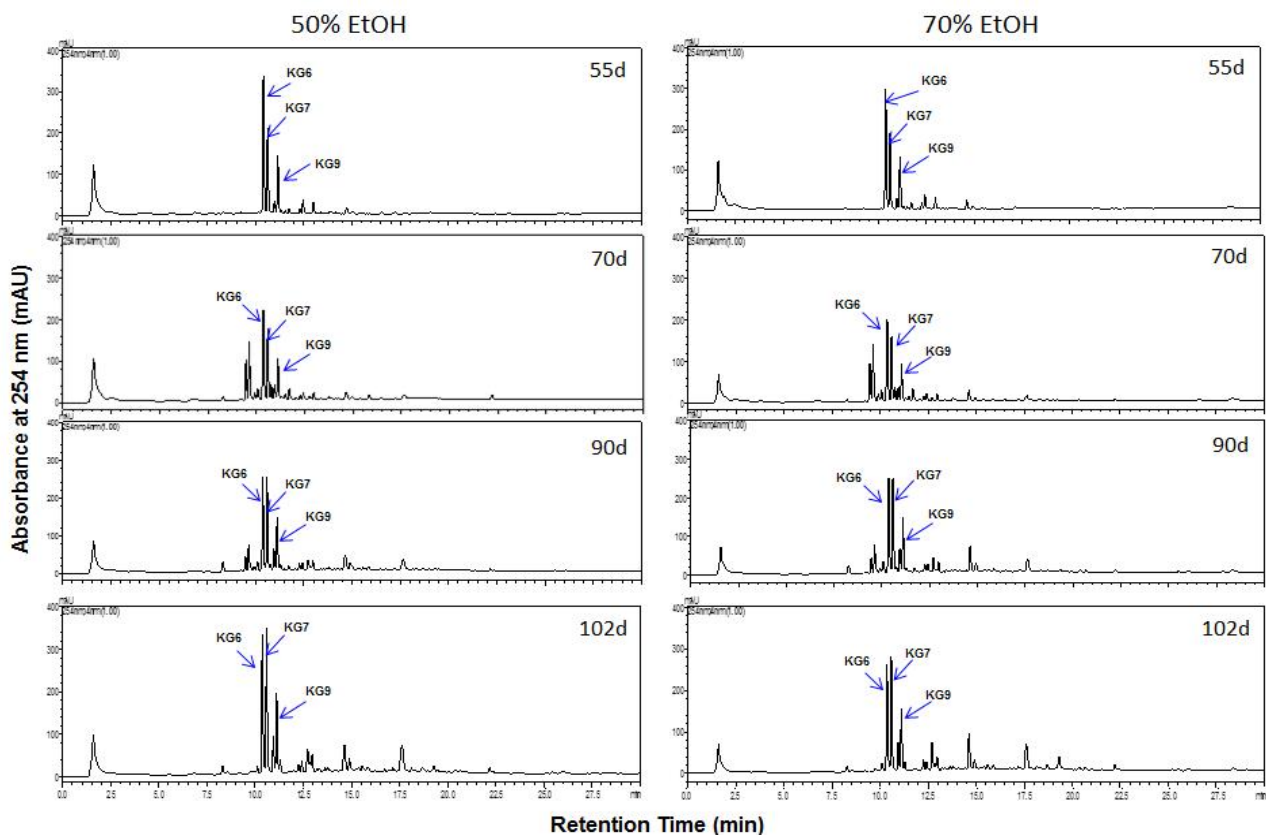


Fig. 21. HPLC profiles of 50% and 70% EtOH extracts (10 mg/ml) of 2016-GH soy leaf.

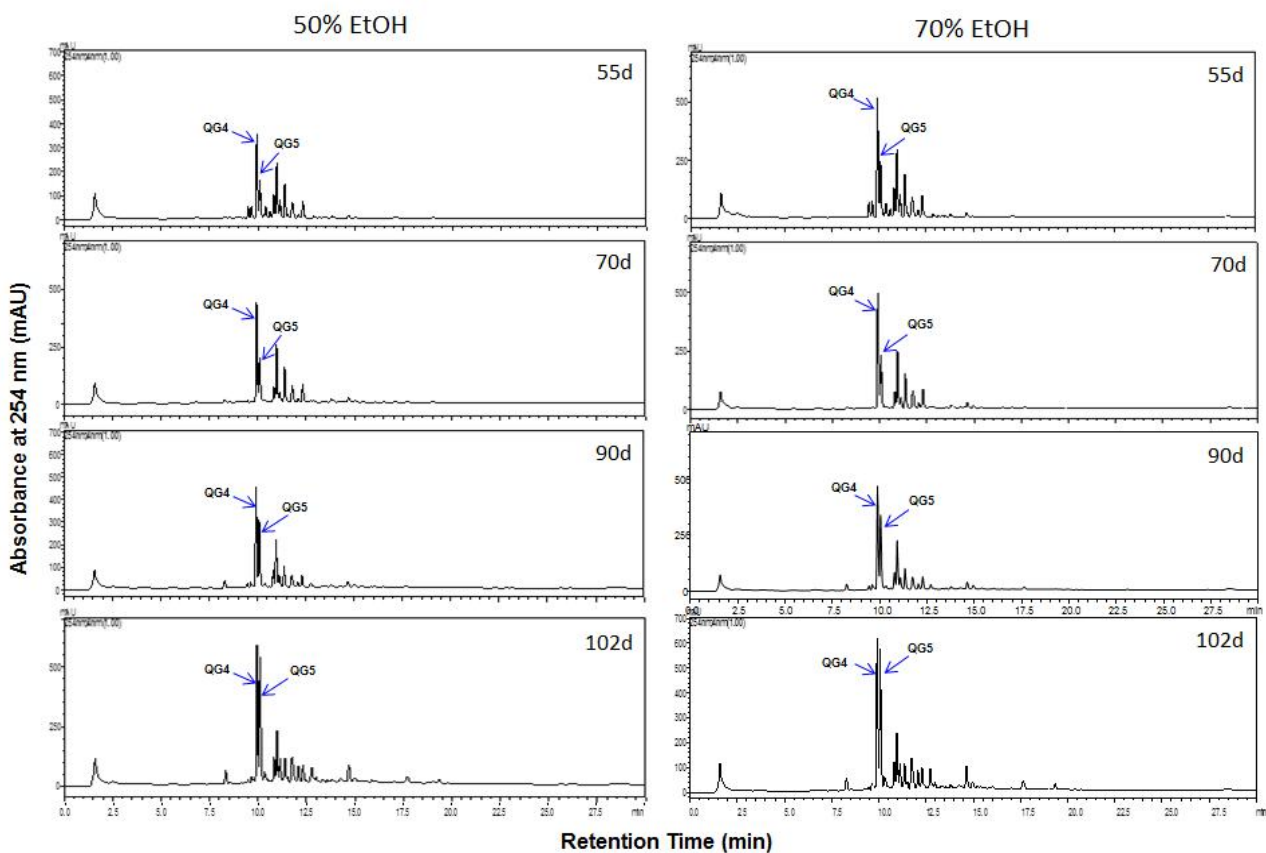


Fig. 22. HPLC profiles of 50% and 70% EtOH extracts (10 mg/ml) of 2016-BB soy leaf.

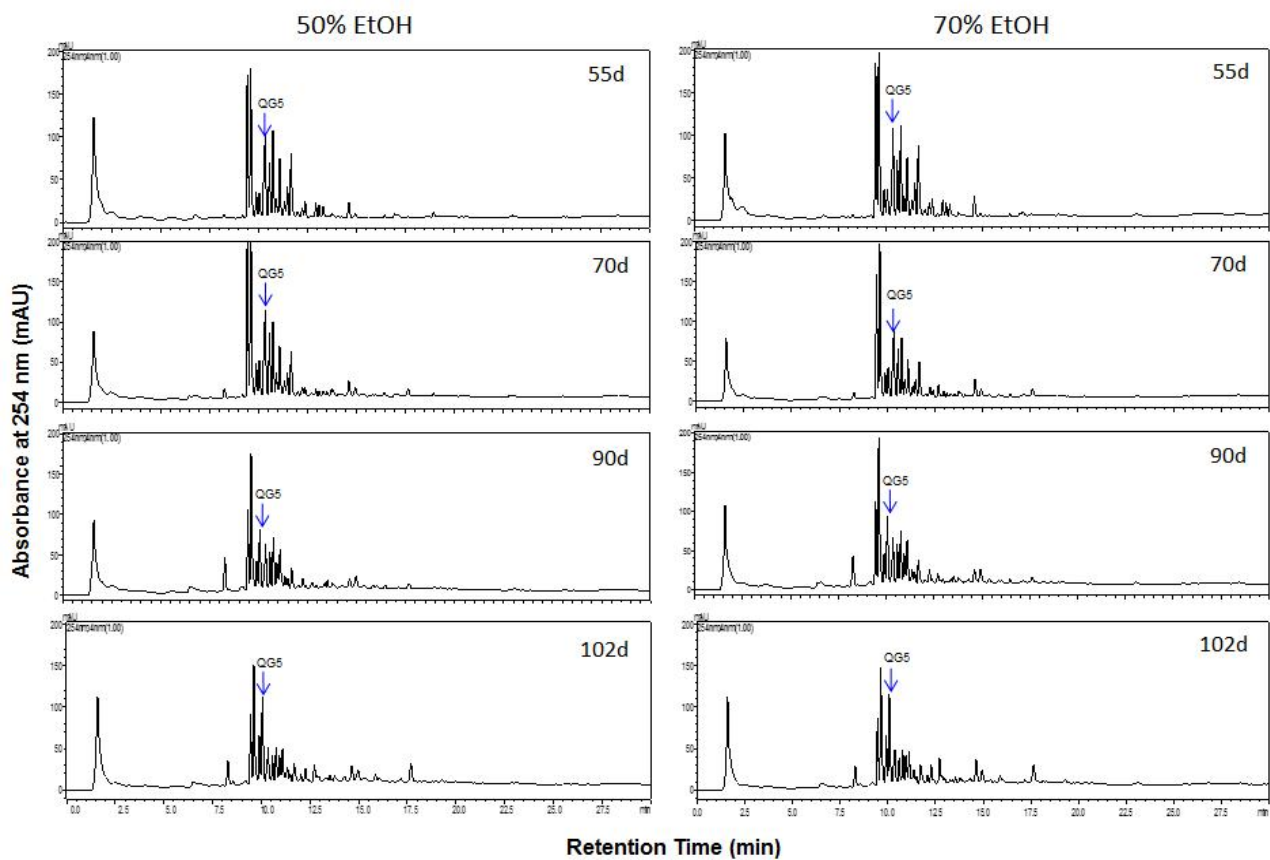


Fig. 23. HPLC profiles of 50% and 70% EtOH extracts (10 mg/ml) of 2016-BB-CJ soy leaf.

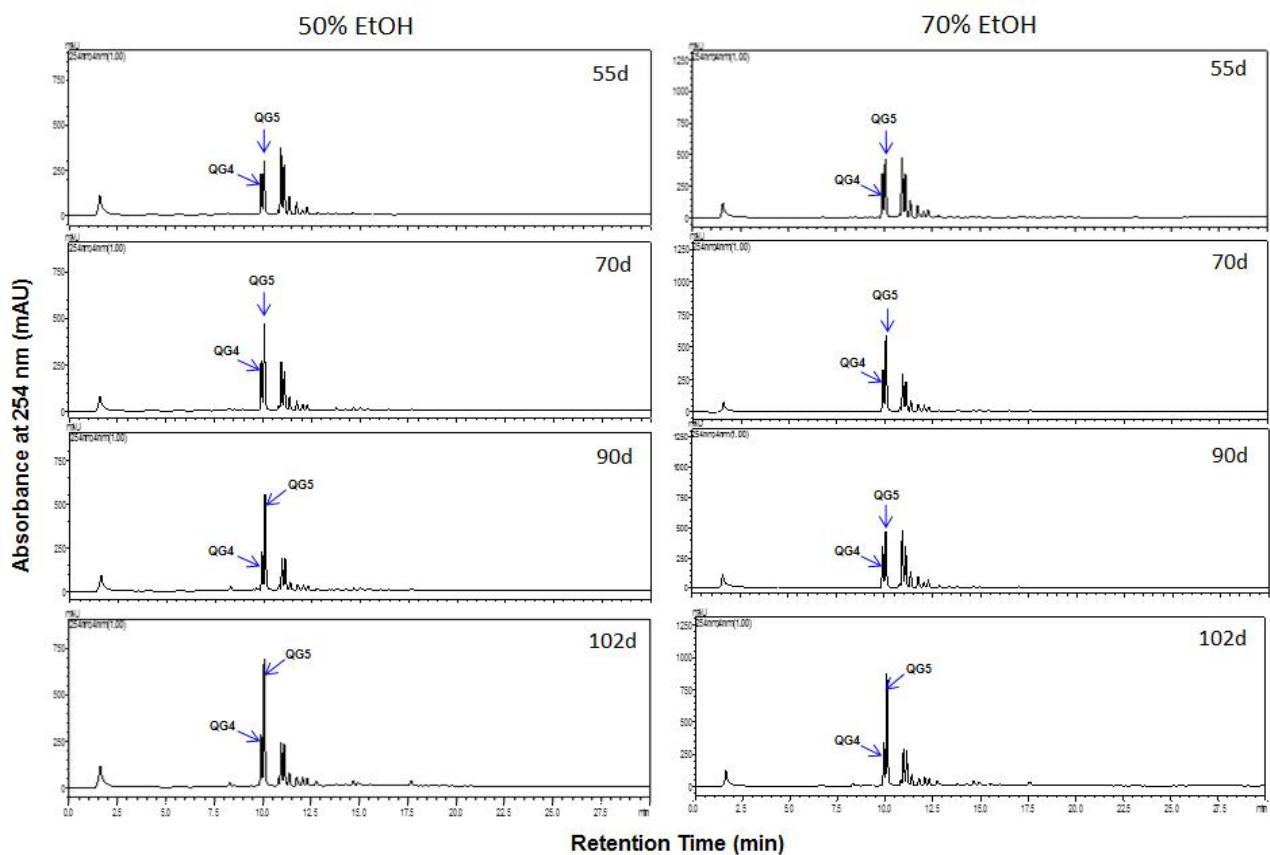


Fig. 24. HPLC profiles of 50% and 70% EtOH extracts (10 mg/ml) of 2016-NG soy leaf.

(3) 콩잎추출물의 KG7 또는 QG5의 함량 측정

(가) 2012-2016 수확 콩잎의 KG7 함량 측정

대두콩잎과 검정콩잎이 함유하는 주된 플라보놀배당체는 차이가 있다. 즉, 대두콩잎은 대부분 캠페롤 배당체 (Kaempferol glycoside)를 함유하는 반면에 검정콩잎은 퀘세틴 배당체 (Quercetin glycoside)와 이소람네티닌 배당체 (isorhamnetin glycoside)를 함유한다. 따라서 대두콩잎의 지표물질로 캠페롤 배당체 중 KG7을 선택하였다.

2012년도와 2013년도 재배하여 수확한 GH콩잎의 70% EtOH 추출물 (70ESL)의 KG7 함량을 측정하였다 (Table 45). 전반적으로 70ESL의 KG7 함량은 재배기간에 큰 영향을 받지 않은 것으로 분석되었다. 그러나 2012년도 재배콩잎의 KG7 함량은 평균값은 34.8 mg/g extract인 반면에, 2013년도 재배콩잎의 KG7 함량은 평균값은 24.9 mg/g extract로 2012년도에 비해 28% 감소하였다.

Table 45. Comparison of KG7 contents in 70ESL from the 2012- and 2013-GH soy leaves having different cultivating duration

	2012-harvested GH soy leaves	KG7 in ESL (mg/g extract)	2013-harvested GH soy leaves	KG7 in ESL (mg/g extract)
70ESL	50 days	25.8 ± 0.5	50 days	27.3 ± 0.1
	65 days	39.2 ± 0.3	60 days	22.3 ± 0.2
	79 days	34.5 ± 0.1	75 days	24.8 ± 0.1
	93 days	39.2 ± 0.3	90 days	28.1 ± 0.3
	109 days	30.9 ± 0.3	107 days	22.2 ± 0.5
	123 days	39.2 ± 1.4		

Values are presented as mean ± SD (n = 3). 70ESL: 70% EtOH extract from soy leaf.

2014, 2015, 2016년도에 수확한 GH콩잎의 50ESL과 70ESL의 KG7 함량을 측정하였다 (Table 46). 전반적으로 50ESL과 70ESL의 모두 재배기간이 길어짐에 따라 다소 KG7 함량이 증가하는 것으로 분석되었다.

2014년도에 수확한 50일령 콩잎의 50ESL과 70ESL의 KG7 함량은 10 mg/g extract 정도였으나, 60, 80, 95일령의 50ESL과 70ESL의 KG7 함량은 정량 한계 (LOQ) 미만이거나 매우 낮았다가 115일령 콩잎의 50ESL과 70ESL의 KG7 함량이 각각 30.2 mg/g extract, 26.6 mg/g extract로 증가되었다.

2015년도에 수확한 GH콩잎의 50ESL과 70ESL의 KG7 함량은 10.9-22.5 mg/g extract 수준으로 재배기간 및 추출용매에 큰 영향을 받지 않은 것으로 나타났다.

반면에 2016년도에 수확한 GH콩잎의 50ESL과 70ESL의 KG7 함량은 재배기간이 길어짐에 따라 점차 증가하였고, 9.7-20.7 mg/g extract로 추출용매에는 큰 영향을 받지 않은 것으로 나타났다. 따라서 캠페롤 배당체의 함량은 콩잎이 성숙하는 시기의 일기 및 대사체의 변화에 매우 민감한 것으로 판단되며, 약 100일령 이상 콩잎에서 KG7 함량이 보다 안정적으로 유지될 것으로 판단된다.

Table 46. Comparison of KG7 contents in 50ESL and 70ESL from the 2014-, 2015-, and 2016-GH soy leaves having different cultivating duration

	2014-GH	KG7 in ESL (mg/g extract)	2015-GH	KG7 in ESL (mg/g extract)	2016-GH	KG7 in ESL (mg/g extract)
50ESL	50 days	10.4 ± 0.2	55 days	18.3 ± 0.3	55 days	13.0 ± 0.2
	65 days	< LOQ (0.63)				
	80 days	< LOQ (0.63)	75 days	10.9 ± 0.3	70 days	10.5 ± 0.2
	95 days	1.3 ± 0.0	95 days	14.9 ± 0.2	90 days	15.6 ± 0.8
			104 days	17.7 ± 0.3	102 days	20.7 ± 0.8
	115 days	30.2 ± 0.6	118 days	18.2 ± 0.5		
			132 days	17.2 ± 0.4		
70ESL	50 days	10.1 ± 0.5	55 days	18.8 ± 0.7	55 days	12.4 ± 0.6
	65 days	1.1 ± 0.0				
	80 days	< LOQ (0.63)	75 days	12.7 ± 0.4	70 days	9.7 ± 0.1
	95 days	1.3 ± 0.1	95 days	12.7 ± 0.4	90 days	15.1 ± 0.6
			104 days	20.9 ± 0.5	102 days	17.4 ± 0.1
	115 days	26.6 ± 0.9	118 days	16.5 ± 0.0		
			132 days	22.5 ± 0.3		

Values are presented as mean ± SD (n = 3). LOQ: limit of quantification. 50ESL: 50ESL: 50% EtOH extract from soy leaf; 70ESL: 70% EtOH extract from soy leaf.

(나) 2013-2016 수확 콩잎의 QG5 함량 측정

검정콩잎은 퀘세틴 배당체 (Quercetin glycoside)와 이소람네티 배당체 (isorhamnetin glycoside)를 함유하며, 대두콩잎의 지표물질로 퀘세틴 배당체 중 QG5를 선택하였다.

2013년도 재배하여 수확한 BB콩잎의 70% EtOH 추출물 (70EBL)의 QG5 함량을 측정하였다 (Table 47). 전반적으로 70EBL의 QG5 함량은 재배기간에 길어짐에 따라 증가하였으며, 107일령 70EBL의 QG5 함량은 19.7 mg/g extract이었다.

Table 47. Comparison of QG5 contents in 70EBL from the 2013-BB soy leaves having different cultivating duration

	2013-harvested BB soy leaves	QG5 in ESL (mg/g extract)
70EBL	50 days	11.6 ± 0.4
	60 days	13.2 ± 0.2
	75 days	15.0 ± 0.3
	90 days	17.3 ± 0.2
	107 days	19.7 ± 0.4

Values are presented as mean ± SD (n = 3). 70EBL: 70% EtOH extract from black bean leaf.

2014년도 재배하여 수확한 BB콩잎의 50% EtOH 추출물 (50EBL)과 70% EtOH 추출물

(70EBL)의 QG5 함량을 측정하였다 (Table 48). 전반적으로 50EBL과 70EBL의 QG5 함량은 재배기간에 길어짐에 따라 증가하였으며 (95일령은 예외), 115일령 검정콩잎의 50EBL과 70EBL의 QG5 함량은 각각 21.4 mg/g extract와 16.3 mg/g extract이었다.

Table 48. Comparison of QG5 contents in 50ESL and 70ESL from the 2014-BB soy leaves having different cultivating duration

2014-harvested GH soy leaves	QG5 in 50EBL (mg/g extract)	QG5 in 70EBL (mg/g extract)
50 days	1.9 ± 0.1	2.0 ± 0.1
65 days	5.4 ± 0.2	5.6 ± 0.1
80 days	12.8 ± 0.6	15.2 ± 0.3
95 days	8.8 ± 0.2	9.0 ± 0.5
115 days	21.4 ± 0.3	16.3 ± 0.5

Values are presented as mean ± SD (n = 3).

50EBL: 50% EtOH extract from black bean leaf; 70EBL: 70% EtOH extract from black bean leaf.

2016년도 재배하여 수확한 검정콩잎(서리태) 두 품종 (BB, BB-CJ)과 서목태(NG) 콩잎의 50% EtOH 추출물 (50EBL)과 70% EtOH 추출물 (70EBL)의 QG5 함량을 측정하였다 (Table 49). BB콩잎의 50EBL과 70EBL의 QG5 함량은 재배기간에 길어짐에 따라 증가하는 경향을 보이다가 102일령에서 QG5 함량이 급격히 증가하여 50EBL은 14.2 mg/g extract이고, 70EBL은 16.2 mg/g extract이었다. 반면에 BB-CJ 콩잎의 50EBL과 70EBL의 QG5 함량은 재배기간에 길어짐에 따라 증가하는 경향을 보이기는 하나 전반적으로 QG5 함량이 매우 낮은 수준(3.1 mg/g extract 이하)으로 측정되었다. 한편 NG콩잎의 50EBL과 70EBL의 QG5 함량도 재배기간에 길어짐에 따라 증가하는 경향을 보였으며, 102일령에서 50EBL의 QG5 함량은 20.0 mg/g extract이었고, 70EBL의 QG5 함량은 26.9 mg/g extract이었다. 결론적으로 QG5 함량은 콩잎의 재배기간이 길어짐에 따라 증가하는 양상을 나타내었고, BB-CJ < BB < NG 순으로 많았으며, 50EBL 비해 70 EBL에서 많았으며, 약 100일령 이상 콩잎에서 QG5 함량이 보다 안정적으로 유지될 것으로 판단된다.

Table 49. Comparison of QG5 contents in 50EBL and 70EBL from the 2015-GH and 2015-NG soy leaves having different cultivating duration

	2016-harvested soy leaves	QG5 in BB (mg/g extract)	QG5 in BB-CJ (mg/g extract)	QG5 in NG (mg/g extract)
50EBL	55 days	4.6 ± 0.1	0.9 ± 0.0	8.8 ± 0.6
	70 days	5.6 ± 0.3	1.5 ± 0.0	13.4 ± 0.3
	90 days	8.1 ± 0.4	2.1 ± 0.1	16.0 ± 0.2
	102 days	14.2 ± 0.1	3.0 ± 0.1	20.0 ± 0.2
70EBL	55 days	7.1 ± 0.1	1.1 ± 0.0	14.5 ± 0.1
	70 days	6.6 ± 0.1	1.3 ± 0.1	18.0 ± 0.2
	90 days	9.6 ± 0.2	2.6 ± 0.0	21.6 ± 0.8
	102 days	16.2 ± 0.4	3.1 ± 0.0	26.9 ± 0.6

Values are presented as mean ± SD (n = 3).

50ESL: 50% EtOH extract from soy leaf; 70ESL: 70% EtOH extract from soy leaf.

(다) 배당체 고함유 분획의 지표물질(KG7, QG5) 함량 측정

70ESL과 70EBL의 Diaion HP-20 컬럼크로마토그래피를 수행하여 얻은 배당체 고함유 분획인 GR1, GR2에 대해 지표물질인 KG7 (ESL)과 QG5 (EBL)의 함량을 측정하여 조추출물 (ESL 또는 EBL)의 함량과 비교하였다 (Table 50). 그림 10의 HPLC profile을 통해 예측할 수 있는 것처럼 70ESL-GR1의 KG7 함량 (173.5 mg/g sample)이 ESL에 비해 6.3배 많았다. 또한 70EBL-GR1의 QG5 함량 (137.0 mg/g sample)이 EBL에 비해 6.5배 많았으며, 70EBL-GR2에 비해 2.3배 많았다.

Table 50. Contents of KG7 and QG5 in glycoside rich fractions of 70ESL and 70EBL

Samples	Contents of KG7 and QG5 (mg/g sample)	
	KG7 from ESL	QG5 from EBL
Crude extracts	27.5 ± 0.9	21.2 ± 0.2
Diaion HP-20 Fr. 3 (GR1)	173.5 ± 0.4	137.0 ± 6.2
Diaion HP-20 Fr. 4 (GR2)	16.3 ± 0.8	60.8 ± 6.0

Values are presented as mean ± SD (n = 3).

마. HPLC를 이용한 플라보놀 배당체 지표성분의 함량분석 검증 (Validation)

추출물의 품질관리를 위해 HPLC를 이용한 지표성분인 KG7과 QG5의 함량분석 방법에 대한 ICH 가이드라인에 제시된 validation parameter들을 검증함으로써 시험방법의 타당성을 제시하였다.

(1) 순도 (Purity)

본 연구실의 HPLC 시스템에서 표준품의 순도를 측정하기 위해 500 µg/mL의 농도로 조제된 샘플을 설정된 HPLC 조건하에서 6회 반복 주입하였다. 크로마토그램 상에서의 피크 대면적비 (Area%)를 통해 순도를 계산하였다 (Table 51).

Table 51. Purity data of standard compounds, QG5 and KG7

	QG5 (0.5 mg/mL)		KG7 (0.5 mg/mL)	
	Retention Time (min)	Purity (Area%)	Retention Time (min)	Purity (Area%)
1	10.04	95.02	10.71	97.88
2	10.08	94.88	10.85	97.88
3	10.07	94.86	10.84	97.90
4	10.08	94.93	10.85	97.21
5	10.08	95.00	10.77	97.33
6	10.07	94.97	10.60	97.45
AVE	10.07	94.94	10.77	97.61
SD	0.02	0.07	0.10	0.29
RSD%	0.17	0.07	0.93	0.30

(2) 직선성 (Linearity)

표준품을 6.25 $\mu\text{g/mL}$ ~ 250.0 $\mu\text{g/mL}$ (표준품의 순도가 적용된 값)의 농도로 조제하여 HPLC 분석조건에 따라 시험하여 표준품의 농도를 X축에 대응시키고 그 농도에 대한 크로마토그램으로부터 얻은 면적을 Y축에 대응시켜 검량선을 작성하였다 (Fig. 25).

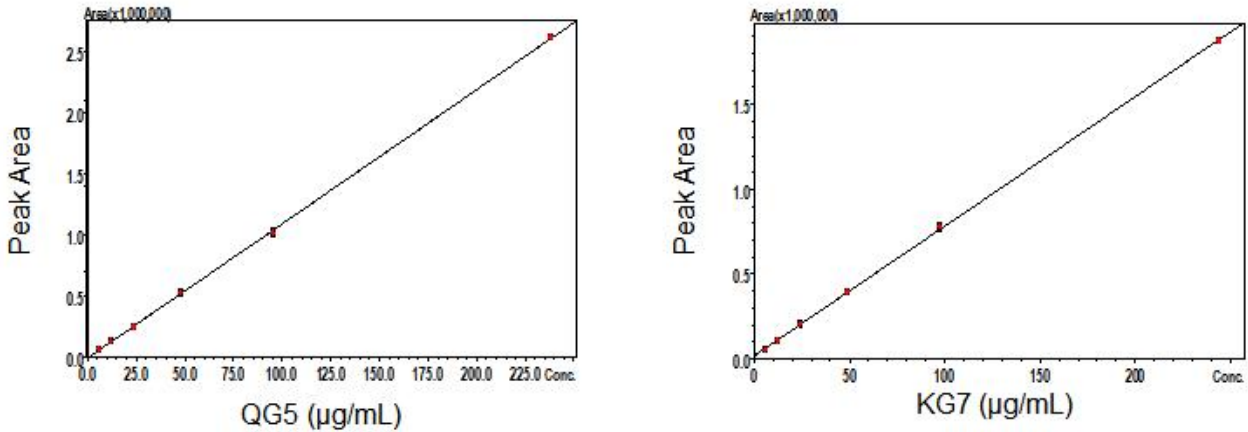


Fig. 25. Linearity of standard compounds, QG5 and KG7.

Table 52. Linearity data of standard compounds, QG5 and KG7

Level	QG5				KG7			
	Conc.	Mean Area	SD	%RSD	Conc.	Mean Area	SD	%RSD
1	6.0	66517	79.09	0.12	6.1	55409	1022.67	1.85
2	11.9	129179	2274.85	1.76	12.2	106711	2428.60	2.28
3	23.8	249090	3910.82	1.57	24.4	205978	3729.88	1.81
4	47.6	524881	8716.35	1.66	48.8	395473	2499.93	0.63
5	95.3	1016705	15418.57	1.52	97.6	779127	14935.21	1.92
6	238.2	2617207			244.0	1874914		

분석법에 따라 표준품의 농도를 6.25 $\mu\text{g/mL}$ ~ 250.0 $\mu\text{g/mL}$ 인 범위에서 calibration curve가 양호한 직선 ($r^2 \geq 0.99$)을 나타내었다. 이로부터 계산된 검출할 수 있는 최소 농도인 검출한계 (Limit of detection, LOD)와 정량할 수 있는 최소농도인 정량한계 (limit of quantification, LOQ)를 정하였다.

Table 53. Linear regression, LOD, and LOQ data of standard compound, QG5 and KG7

Compound	Linear range ($\mu\text{g/mL}$)	Linear regression data				LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)
		Regression equation	r^2	SD	RSD%		
QG5	LOD - 238.2	$Y = 10983.21X - 6687.02$	0.9999	259.85	2.40	0.08	0.24
KG7	LOD - 244.0	$Y = 7636.15X + 18399.34$	0.9999	482.84	5.75	0.21	0.63

The limit of detection (LOD) and quantification (LOQ) were determined based on the method recommended by International Conference on Harmonization (ICH) ($\text{LOD} = 3.3 \delta/S$, $\text{LOQ} = 10 \delta/S$, δ = standard deviation of the response, S = slope of the calibration curve).

(3) 범위 (Range)

직선성 및 검출한계의 결과에 따라 표준품의 범위 시험은 QG5는 0.08 $\mu\text{g/mL}$ ~ 238.2 $\mu\text{g/mL}$ 으로, KG7은 0.21 $\mu\text{g/mL}$ ~ 244.0 $\mu\text{g/mL}$ 으로 결정되었다.

(4) 정확성 (Accuracy)

정확성은 표준품의 직선성 범위 내에 있는 각 3가지 농도 (이미 알고 있는 양, spiked amount)를 각각 3회 반복 주입하여 측정된 양 (detected amount)을 표준용액의 양과 비교하여 회수율 (recovery%)로 나타내었다. 회수율의 판정 범위는 ICH 가이드라인을 참고하여 80% ~ 120%, RSD 5% 이하로 정하였고, 측정된 모든 회수율은 판정범위 기준 이내의 값으로 확인되어 타당한 정확성을 나타냈다 (Table 54).

Table 54. Accuracy data of QG5 and KG7

Compound	Spiked amount ($\mu\text{g/mL}$)	Detected amount ($\mu\text{g/mL}$)	Recovery % ^a	RSD% ^b
QG5	35.7	41.8 \pm 0.6	117.0 \pm 1.3	1.1
	71.5	81.8 \pm 0.6	114.5 \pm 0.8	0.7
	142.9	161.4 \pm 0.8	112.9 \pm 0.6	0.5
KG7	36.6	32.4 \pm 0.3	88.6 \pm 0.9	1.0
	73.2	65.1 \pm 0.5	89.0 \pm 0.7	0.8
	146.4	128.6 \pm 0.6	87.9 \pm 0.4	0.4

Values are presented as mean \pm SD (n = 3).

^a Recovery (%) = Detected amount / Spiked amount \times 100 (n = 3).

^b RSD% (SD of amount detected / mean of amount detected) \times 100.

(5) 정밀성 (Precision)

정밀성은 표준품의 직선성 범위 내에 있는 각 3가지 농도에서 하루 5회 반복실험하여 일내 (Intra-day) 정밀성을 구하였고, 5일간 반복 측정하여 일간 (Inter-day) 정밀성을 평가하였다. 분석을 통해 산출된 값은 상대표준편차 (relative standard deviation, RSD%)로 나타내었고, 그 한계는 5% 이내로 정하였다. 정밀성 시험 결과 일내 정밀성의 RSD는 0.6 ~ 1.1%의 범위로 측정되었고, 일간 정밀성 역시 1.1 ~ 3.4% 범위의 RSD값을 보였으며, 측정된 모든 값은 5% 이내로 분석조건이 적합한 정밀성을 가지는 것으로 확인되었다 (Table 55).

Table 55. Precision data of QG5 and KG7

Compound	Spiked amount ($\mu\text{g/mL}$)	Intra-day (n = 5)		Inter-day (n = 5)	
		Detected amount ($\mu\text{g/mL}$)	RSD%	Detected amount ($\mu\text{g/mL}$)	RSD%
QG5	35.7	41.9 \pm 0.4	0.8	41.2 \pm 0.53	1.3
	71.5	82.2 \pm 0.7	0.9	80.5 \pm 1.8	2.2
	142.9	162.1 \pm 1.1	0.7	158.5 \pm 5.4	3.4
KG7	36.6	32.5 \pm 0.3	0.9	32.1 \pm 0.3	1.1
	73.2	65.6 \pm 0.7	1.1	64.7 \pm 0.9	1.3
	146.4	129.1 \pm 0.7	0.6	129.0 \pm 2.1	1.6

바. *In vitro* 세포계에서 배당체 콩잎 추출물의 활성 검색

(1) MIN6 세포에서의 항당뇨 효과

(가) 콩잎 추출물의 MIN6 세포에서 세포독성

30, 50, 70ESL과 30, 50, 70EBL을 농도별(10, 50 및 100 $\mu\text{g/ml}$)로 처리한 결과, MIN6 세포에 농도별로 처리하여 독성실험을 수행한 결과, 50ESL과 70ESL은 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 약간의 독성을 나타내었고, EBL은 100 $\mu\text{g/ml}$ 까지 독성을 나타내지 않았다 (Fig. 26).

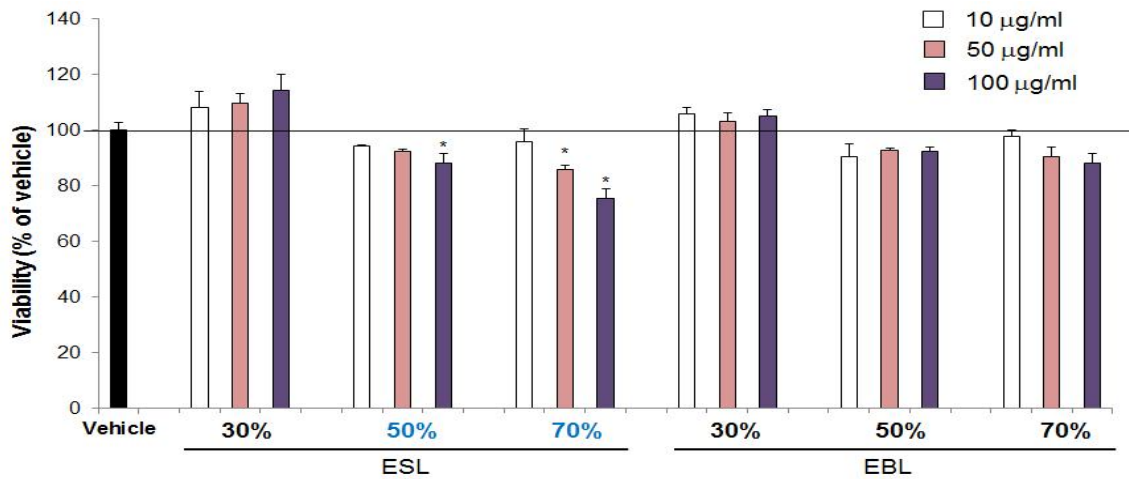


Fig. 26. Cell viability of soy leaf extracts in MIN6 beta-cells. Cells were treated with vehicle (DMSO) or indicated concentrations of samples. Twenty four hours after treatment of extracts, cell viability was measured by Cyto X™ cell viability assay kit (LPS solution, Korea). * $P < 0.05$, compared with vehicle.

50%, 70% ESL의 독성을 나타내는 농도구간을 더 세밀하게 확인하기 위하여 50ESL과 70ESL 10, 20, 40, 50, 60, 80, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서의 세포독성을 재확인하였다. 결과 50ESL은 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도까지 독성을 나타내지 않았고, 70ESL은 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도까지는 세포독성을 나타내지 않았다 (Fig. 27).

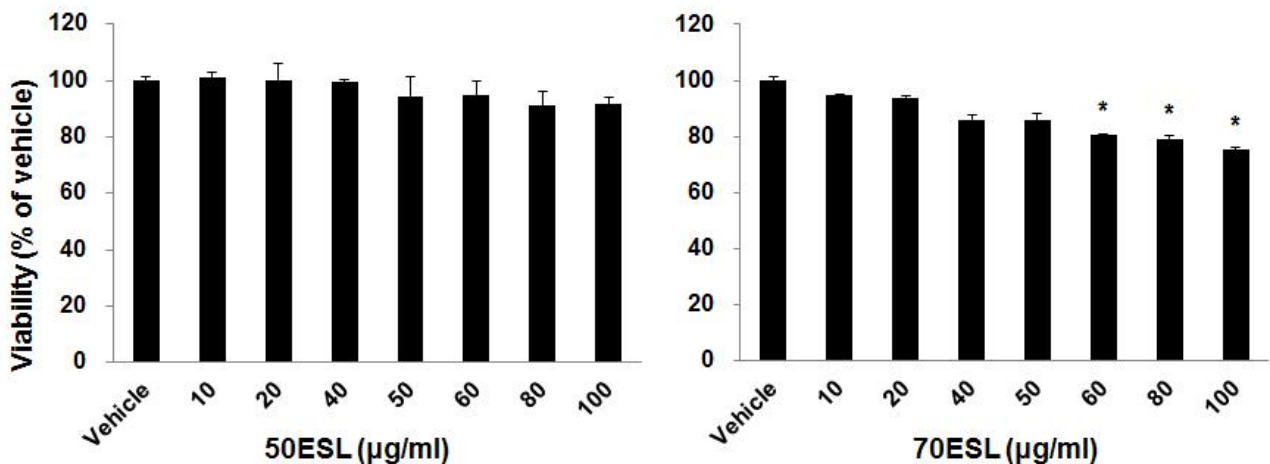


Fig. 27. Cell viability of soy leaf extracts in MIN6 beta-cells. Cells were treated with vehicle (DMSO) or indicated concentrations of samples. Twenty four hours after treatment of extracts, cell viability was measured by Cyto X™ cell viability assay kit (LPS solution, Korea). * $P < 0.05$, compared with vehicle.

70ESL과 70EBL 및 각각의 배당체 고함유 분획물 (glycosides-rich fraction, GR)인 ESL-GR1, ESL-GR2, EBL-GR1, EBL-GR2의 MIN6 세포에서의 세포독성 및 인슐린 분비능을 측정하였다. 먼저 각 추출물 및 GR들을 50 ~ 200 µg/ml의 농도로 48 시간 동안 전처리 후 MIN6 세포에서의 세포독성을 확인한 결과, 70EBL과 GR들(ESL-GR1, ESL-GR2, EBL-GR1, EBL-GR2)은 모두 200 µg/ml까지 세포독성을 나타내지 않았고, 70ESL만은 100, 200 µg/ml에서 세포 생존율이 각각 77.3%, 60.2%로 세포독성을 나타냈다 (Fig. 28).

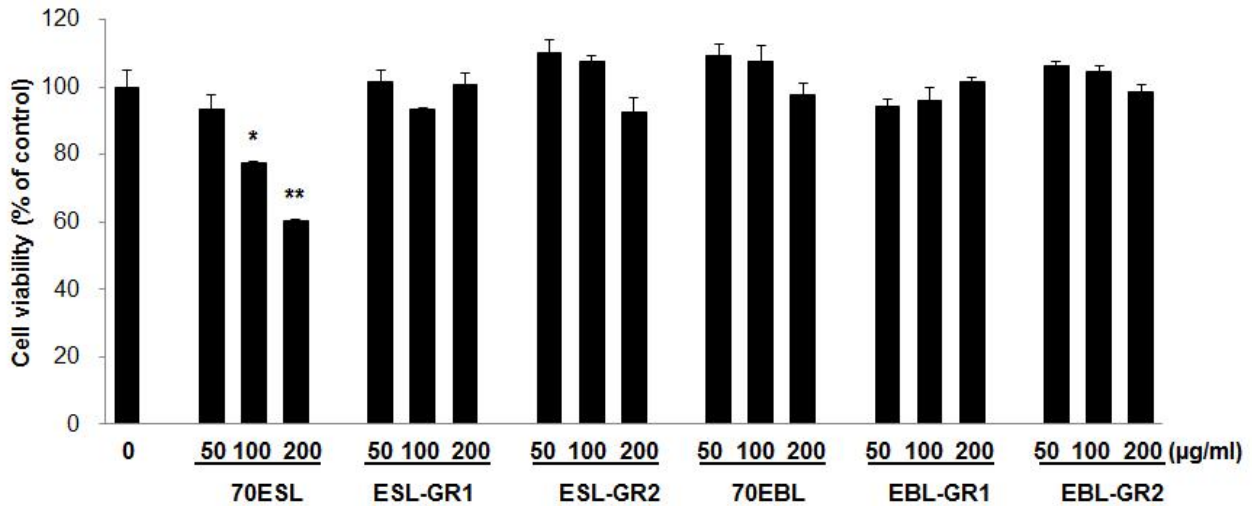


Fig. 28. Cell viabilities of 70ESL, 70EBL and their glycoside-rich fractions (GRs) in pancreatic MIN6 cells. Cells were treated with vehicle (DMSO) or indicated concentrations of compounds for 48 h. Cell viability was measured by Cyto X™ cell viability assay kit (LPS solution, Korea). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with control.

(나) 콩잎 추출물의 MIN6 세포에서 인슐린 분비능

0, 50, 70ESL과 30, 50, 70EBL (50 µg/ml)의 MIN6 세포에서의 인슐린 분비능을 측정·관찰한 결과, glucose-free한 상태에서는 30ESL을 제외한 모든 시료에 의한 인슐린 분비가 증가되었고, glucose로 인슐린 분비를 유발한 상태에서는 70ESL 및 30EBL, 70EBL에서 유의적이지는 않지만 인슐린의 분비를 증가시켰다. 결과적으로 70ESL과 70EBL에서 보다 효과적으로 인슐린의 분비가 증가되는 것을 알 수 있었다 (Fig. 29).

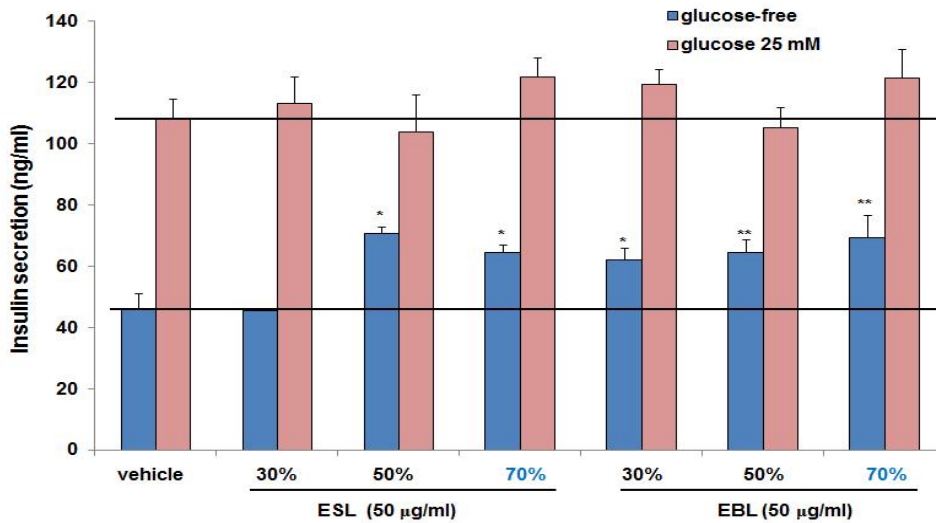


Fig. 29. Glucose-induced insulin secretion test performed in pancreatic MIN6 β -cells. MIN6 cells were seeded into a 24-well plate at a density of 1×10^5 cells per well and grown for 48 h. The cells were washed twice and pre-incubated for 60 min in glucose-free Krebs buffer. Then cells were treated with or without 25 mM glucose, and 50 μ g/ml samples incubated for 30 min at 37°C. After incubation, measured the insulin concentration of the media (Alpco diagnostics, insulin ELISA kit). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with vehicle.

50ESL과 70ESL의 시기별 수확시료 (50d, 65d, 80d, 95d, 115d)의 인슐린 분비능을 확인하였다. 각 시료 100 μ g/ml의 농도에서 MIN6 세포에서의 인슐린 분비능을 측정한 결과, 같은 시기 시료로는 70ESL에서 더 효과적인 인슐린 분비능을 나타내었고, 시기별로 수확한 시료는 80d가 가장 효과적인 인슐린 분비능을 나타내었다 (Fig. 30).

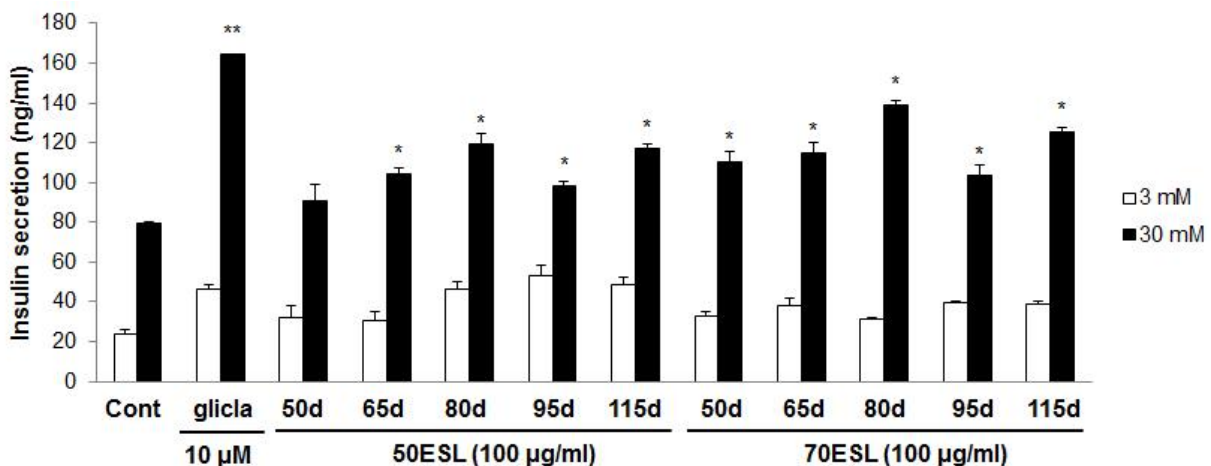


Fig. 30. the glucose-induced insulin secretion test of ESL and EBL extracts performed in pancreatic MIN6 β -cells. MIN6 cells were seeded into a 24-well plate at a density of 1×10^5 cells per well and grown for 48 h. The cells were washed twice and preincubated for 60 min in glucose-free medium. Then cells were treated with 3 or 30 mM glucose, and soy leaf extracts (100 μ g/ml) incubated for 30 min at 37°C. After incubation, the insulin concentration of the media were measured (Alpco diagnostics, insulin ELISA kit). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with control.

다음으로 50EBL과 70EBL의 시기별 수확시료 (50d, 65d, 80d, 95d, 115d)의 인슐린 분비능을 확인하였다. 각 시료 100 µg/ml의 농도에서 MIN6 세포에서의 인슐린 분비능을 측정된 결과, 같은 시기 시료로는 70ESL에서 더 효과적인 인슐린 분비능을 나타내었고, 시기별로 수확한 시료는 115d이 가장 효과적인 인슐린 분비능을 나타내었다(Fig. 31).

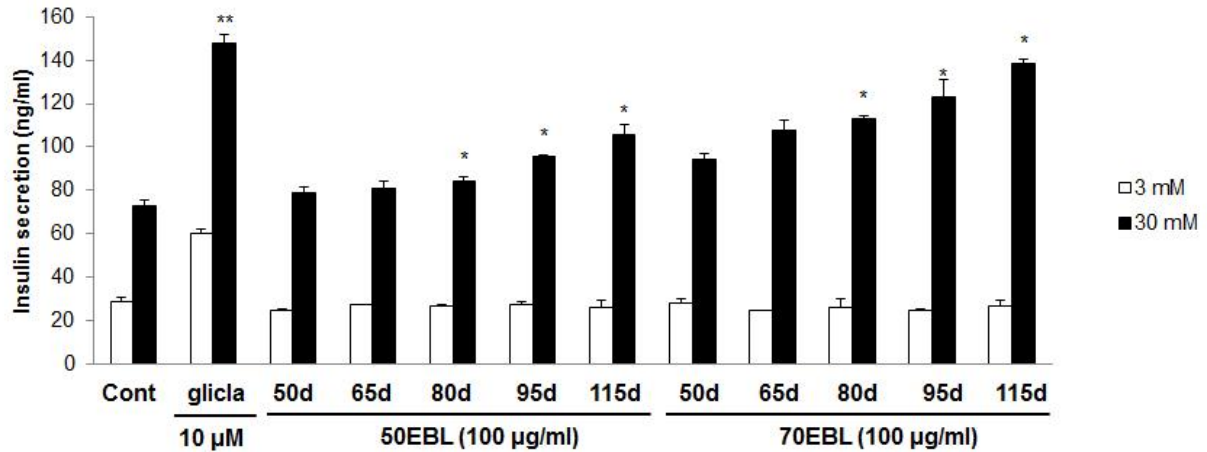


Fig. 31. the glucose-induced insulin secretion test of EBL extracts performed in pancreatic MIN6 β -cells. MIN6 cells were seeded into a 24-well plate at a density of 1×10^5 cells per well and grown for 48 h. The cells were washed twice and preincubated for 60 min in glucose-free medium. Then cells were treated with 3 or 30 mM glucose, and soy leaf extracts (100 µg/ml) incubated for 30 min at 37°C. After incubation, the insulin concentration of the media were measured (Alpco diagnostics, insulin ELISA kit). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with control.

(다) 콩잎 추출물의 MIN6 세포에서 유전자 발현 변화

혈당조절에 있어서 인슐린 분비능을 갖고 있는 췌장 베타세포는 가장 중요한 역할을 한다. 베타세포의 파괴는 제 1형과 제 2형 당뇨병에서 모두 중요한 병인으로 알려져 있다. 베타세포의 양적 조절은 베타세포의 복제, 신생과 세포사의 균형에 의해 조절되는데, 당뇨병 환자의 베타세포는 베타세포의 복제 및 신생이 불충분하고 세포사멸이 상대적으로 많아 베타세포의 양적 감소가 일어난다고 보고되어 있다 (Rhodes, 2005). 따라서 베타세포를 타겟으로 하는 당뇨병 연구에 있어서 베타세포의 양적 증가와 기능 향상이 주로 연구되었다. 최근에는 베타세포를 타겟으로 하는 연구 중에 췌장 알파세포에서 paired box 4 (Pax4) 유전자가 과발현 될 때 reprogramming되어 베타세포로 transdifferentiation이 일어난다고 보고되었으며 (Collombat *et al.*, 2009), 그 외에도 전사인자인 pancreatic and duodenal homeobox protein 1 (PDX1), neurogenin 3 (Ngn3) 및 Maf transcription factor A (MafA) 유전자가 acinar cells에서 과한 발현이 이루지게 되면 세포의 reprogramming을 일으켜 베타세포로 transdifferentiation이 일어난다고 보고되었다 (Vetere *et al.*, 2014). 또한 Pdx1, Ngn3, Pax4, 및 MafA 유전자는 베타세포의 분화과정을 조절하는 전사인자로서, 당뇨병과 관련된 많은 연구에 Target 유전자로 사용되어지고 있다.

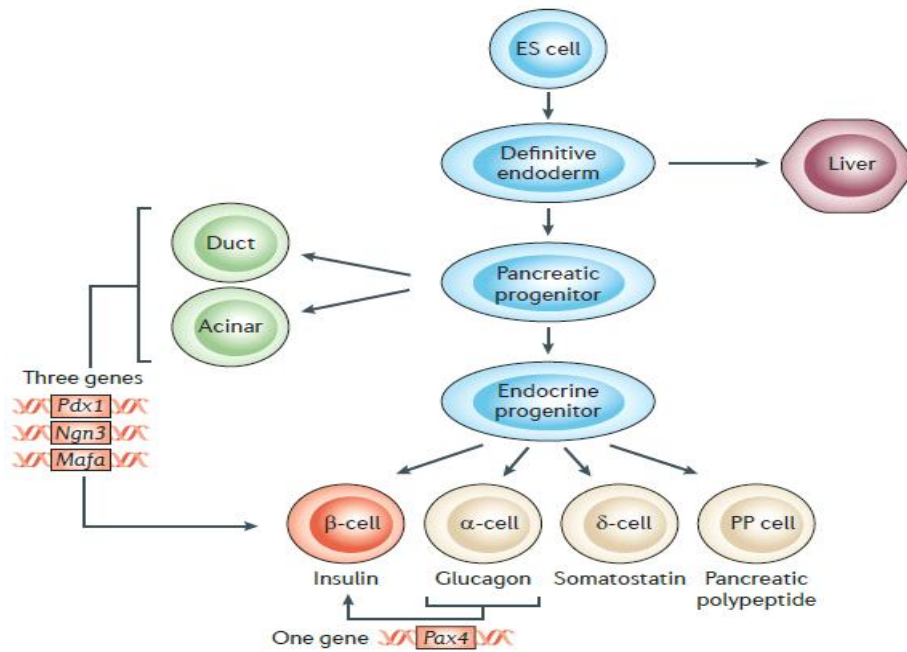


Fig. 32. Potential β -cell reprogramming targets from the development of pancreatic lineages (Vetere A, *et al.*, Nat. Rev. Discov. 13: 278–89, 2014).

다음으로 인슐린 분비능이 보다 높은 70ESL, 70EBL이 PA 유도 독성에 따른 MIN6 세포에서의 유전자 발현변화를 살펴본 결과, 70ESL의 처리로 베타세포의 분화 및 reprogramming을 유도하는 Ngn3, Pax4 유전자의 발현이 유의적으로 증가되었다. 이에 비해 70EBL의 투여군에는 큰 변화가 없었다 (Fig. 33). 따라서 70ESL은 Ngn3, Pax4 유전자의 발현을 증가시켜 췌장 베타세포의 증식에 기여할 것으로 추측된다.

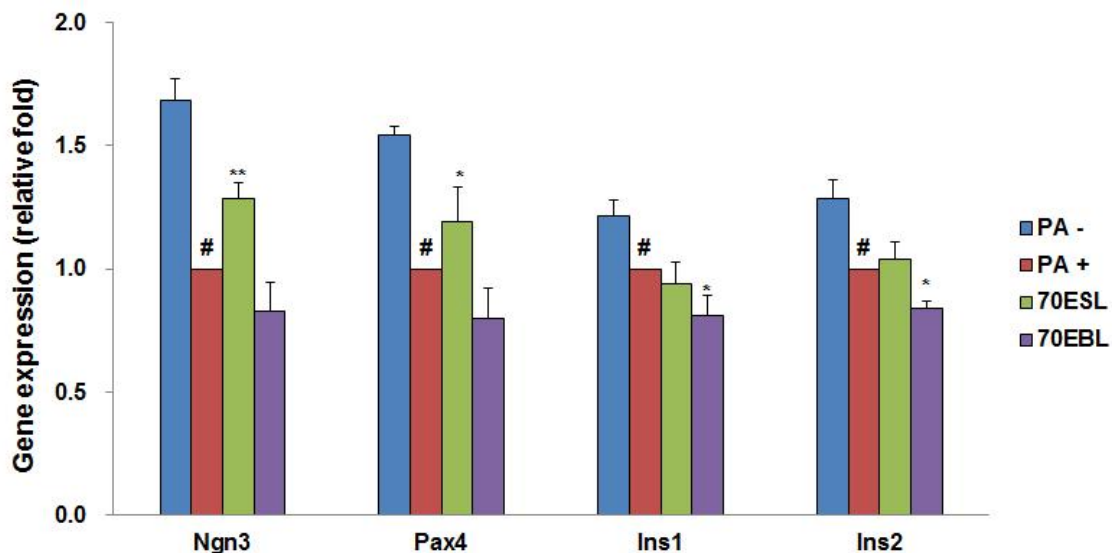


Fig. 33. 70ESL and 70EBL (50 μ g/ml) changed the gene expression in palmitate (PA)-induced MIN6 beta-cells. Cells were administrated 0.3 mM PA with or without of 70ESL and 70EBL for 8 h and then harvested mRNA to be used in qRT-PCR. # $P < 0.01$ compared with non-PA group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with PA alone-treated group.

(2) HepG2 세포에서 항당뇨 효과

(가) 콩잎 추출물의 HepG2 세포에서 세포독성 평가

우선 70ESL과 70EBL 및 배당체 고함유 분획(ESL-GR1, ESL-GR2, EBL-GR1, EBL-GR2)의 HepG2세포에서의 세포독성을 관찰하였다. 결과 배당체 고함유 분획인 ESL-GR1, ESL-GR2, EBL-GR1, EBL-GR2 모두 200 µg/ml까지도 세포독성을 나타내지 않았다. 이에 비해 70ESL은 200 µg/ml에서 세포독성을 나타내고 70EBL은 200 µg/ml까지 독성을 나타내지 않았다 (Fig. 34).

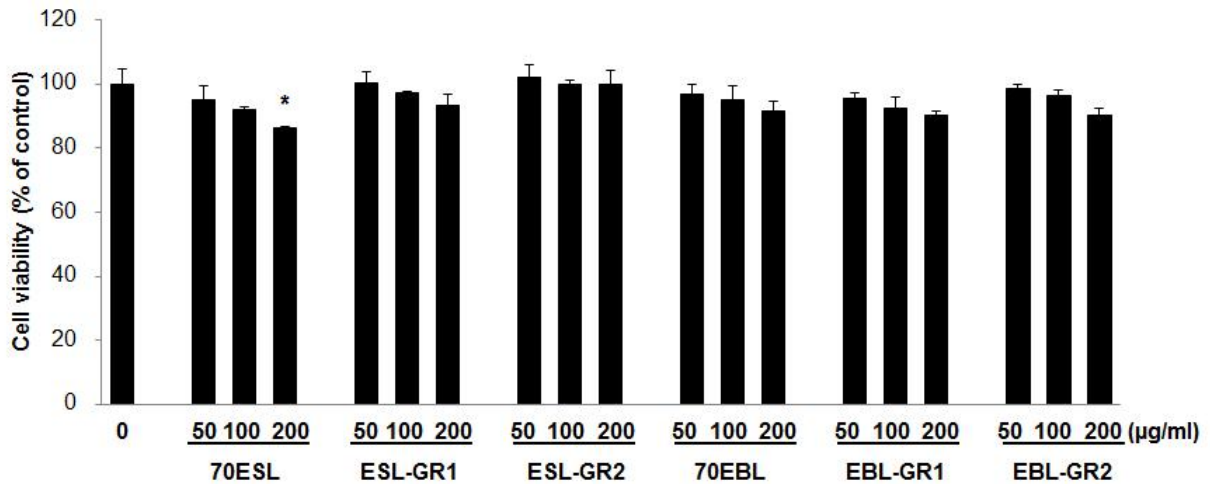


Fig. 34. Cell viability of soy leaf extracts (70ESL, 70EBL) and its glycoside rich fraction HepG2 cells. Cells were treated with the indicated concentration of compounds for 24 h. Cell viabilities were assessed using Cyto X™ cell viability assay kit (LPS solution, Korea). * $P < 0.05$, compared with control.

(나) 콩잎 추출물의 HepG2 세포에서 지질축적

간세포에서 EBL, EBL-GR의 투여가 palmitate (PA)로 유도한 지질축적에 대한 조절작용을 Oil red O 및 TG contents를 측정하여 확인하였다. 24시간 PA의 투여는 HepG2 간세포의 지질축적을 유도한 반면, EBL, EBL-GR의 투여는 지질축적을 저해하였다. 이러한 결과는 Oil red O 및 TG contents에서 모두 동일한 결과를 확인하였다 (Fig. 34).

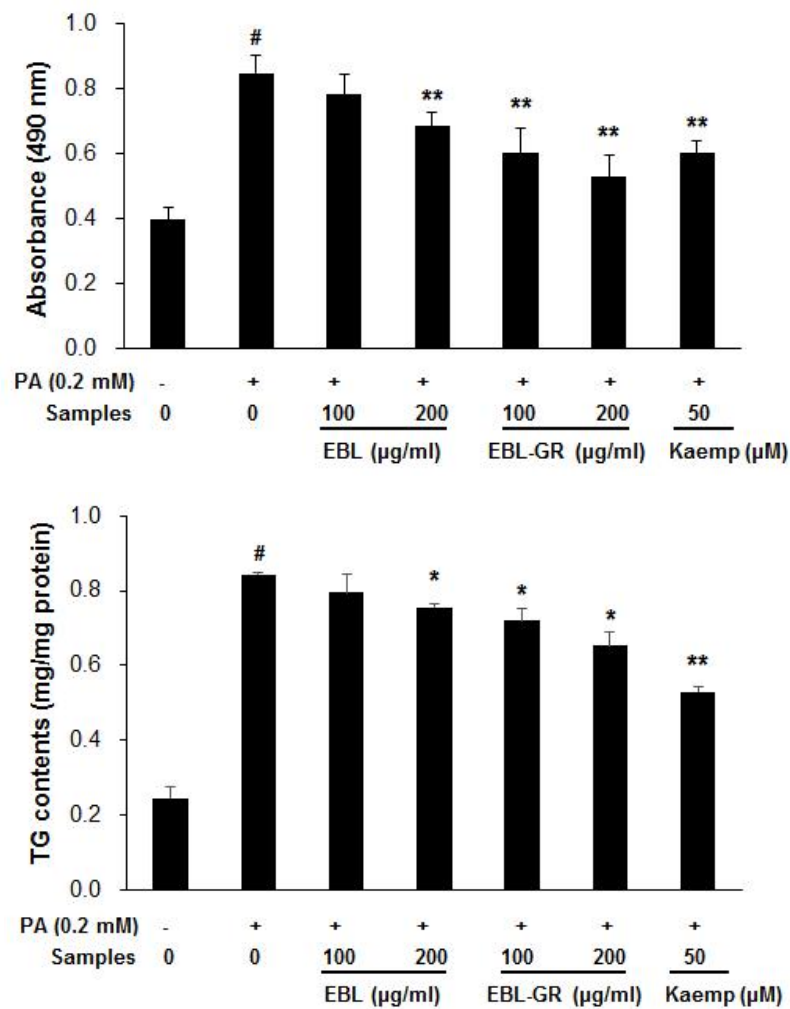
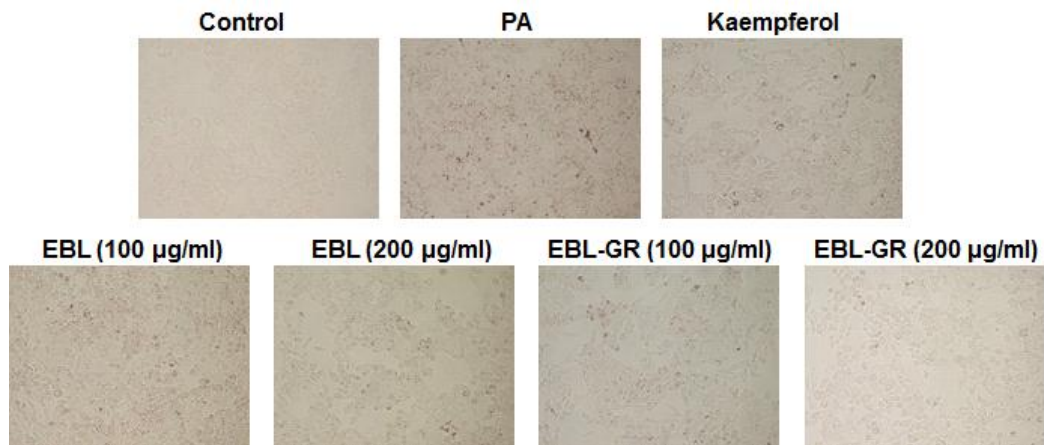


Fig. 35. Effect of EBL and EBL-GR on palmitate (PA)-induced lipid accumulation in HepG2 cells. HepG2 cells were seeded into a 24-well plate at a density of 1×10^5 cells per well and grown for 24 h. HepG2 cells were treated with PA (0.2 mM) for 24 h. quantification of TG contents in HepG2 cells. Values are presented as mean \pm SD. [#] $p < 0.01$ versus media alone-treated group. ^{*} $p < 0.05$, ^{**} $p < 0.01$ versus PA alone-treated group. Kaemp: kaempferol.

그 외 ESL 및 ESL-GR의 HepG2 세포에서 지질축적 조절 효능을 관찰한 결과, ESL 및 ESL-GR 모두 100 µg/ml까지 HepG2 세포내 PA에 의한 지질축적을 조절하지 않았다 (Fig. 36).

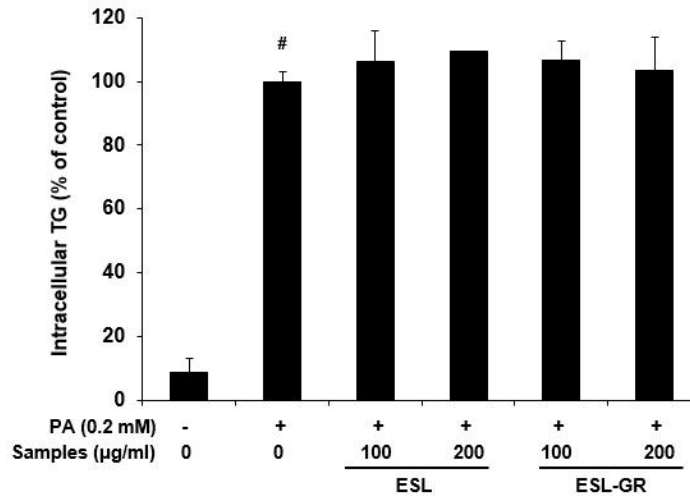


Fig. 36. Effect of ESL and ESL-GR on TG accumulation in palmitate (PA)-induced HepG2 cells . HepG2 cells were seeded into a 12-well plate at a density of 5×10^5 cells per well and grown 24 h. HepG2 cells were treated with EBL-GR1, and PA (0.2 mM) for 24 h. Triglyceride contents were measured by triglyceride kit (ASAN, Korea). Values are expressed as mean \pm SD. [#] $p < 0.05$ versus the media alone-treated group. * $p < 0.05$ versus the PA alone-treated group.

(3) 3T3-L1세포에서 지질축적 억제 효과

(가) 콩잎 추출물의 3T3-L1 세포에서 세포독성 평가

지방전구세포인 3T3-L1 섬유아세포를 이용하여 서로 다른 농도의 EtOH추출물(30, 50, 70ESL과 30, 50, 70EBL)의 세포독성 및 성장에 대한 영향을 관찰하였다. 30, 50, 70ESL과 30, 50, 70EBL을 농도별(10, 25, 50 및 100 µg/ml)로 처리한 결과, 30, 50, 70ESL과 30, 50, 70EBL은 100 µg/ml까지 독성을 나타내지 않았다 (Fig. 37).

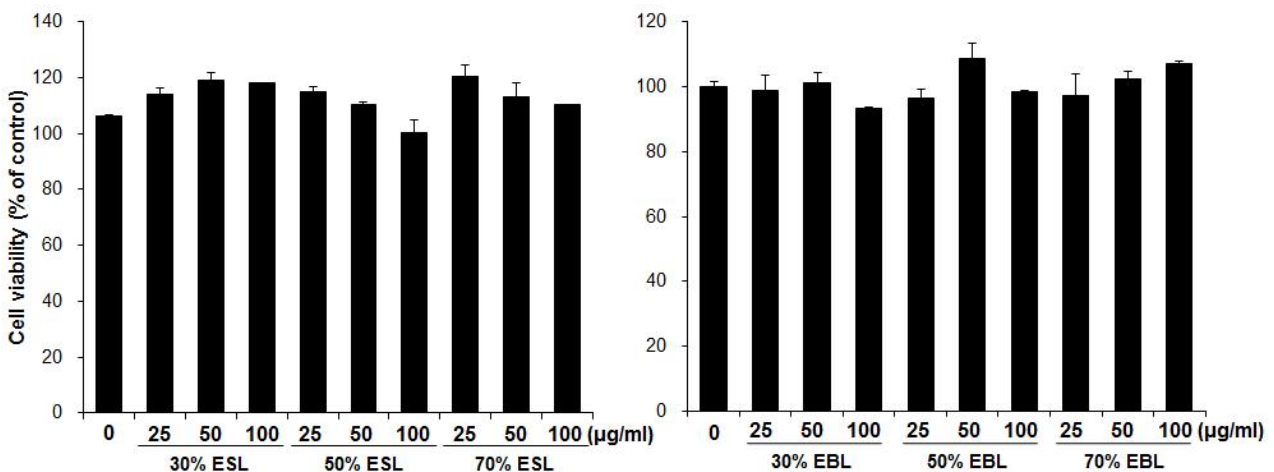


Fig. 37. Cell viability of soy leaf extracts in 3T3-L1 cells. Cells were treated with vehicle (DMSO) or indicated concentrations of samples. Forty eight hours after treatment of extracts, cell viability was measured by Cyto XTM cell viability assay kit (LPS solution, Korea). * $P < 0.05$, compared with vehicle.

(나) 콩잎 추출물의 3T3-L1 세포에서 세포분화 및 지질축적 개선 효능

30, 50, 70ESL과 30, 50, 70EBL의 전처리로 adipocytes의 지방축적을 조절하는 효과를 현미경으로 관찰하고, 이에 축적된 지방을 isopropanol로 추출하여 490 nm에서 흡광도(OD) 값을 측정하여 그 값을 그래프로 표시하였다 (Fig. 37). 그 결과, 30, 50, 70ESL과 30, 50, 70EBL 100 µg/ml까지 투여는 지방축적을 조절하지 않았다.

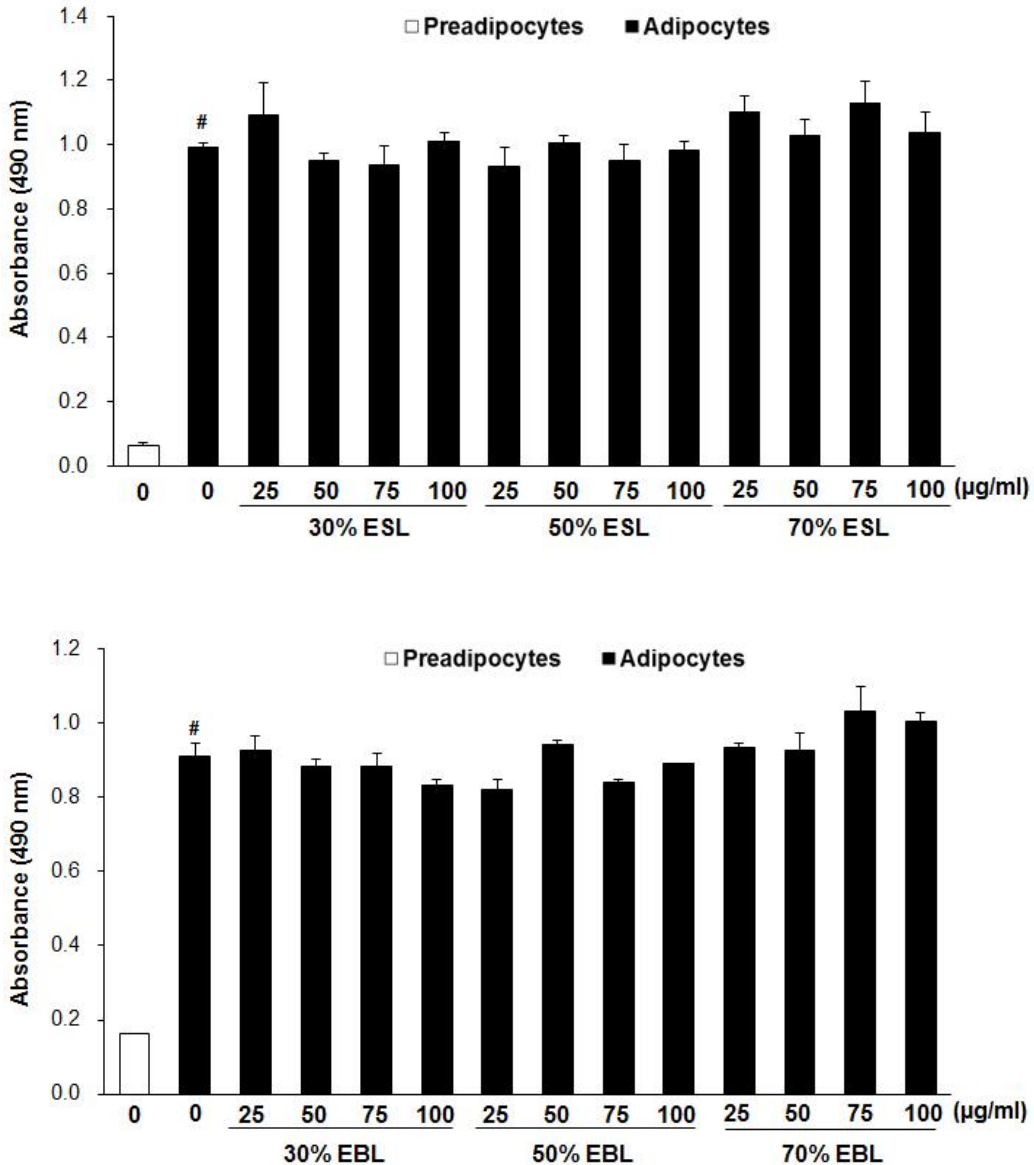


Fig. 38. Anti-adipogenic effects of 30, 50, 70ESL and 30, 50, 70EBL on 3T3-L1 adipocytes. Lipid accumulation in differentiated adipocytes was assessed by Oil Red O staining. The stained lipid droplets in the cells were dissolved in isopropanol and quantified by measuring the absorbance at 490 nm. Data are expressed as the mean \pm SD. [#] $P < 0.01$ versus preadipocytes.

선행연구에서 95ESL의 3T3-L1세포에서 지질 축적 억제 효능을 보고(Li *et al.*, 2015)한 바 있으므로 70ESL에도 지질축적 억제 효능을 나타내는 물질이 함유되어 있을 것으로 판단된다. 70ESL 및 70EBL을 농도를 200 µg/ml까지 투여하여 adipocytes에서 지질축적 억제 효능을 관찰한 결과, 70ESL 200 µg/ml에서 adipocytes에 비해 유의적으로 57.5% 지질축적이 감소되었고, 이에 비해 70EBL은 200 µg/ml까지 지질축적 억제 효능은 나타내지 않았다 (Fig.

39). ESL과 EBL의 서로 다른 세포에서 지질축적을 조절하는 효능은 다르게 나타난다. 즉, ESL은 MDI에 의해 분화된 3T3-L1 세포의 분화 및 지질축적을 억제하고, EBL은 HepG2세포에서 PA에 의해 유도된 세포내 지질축적을 저해한다.

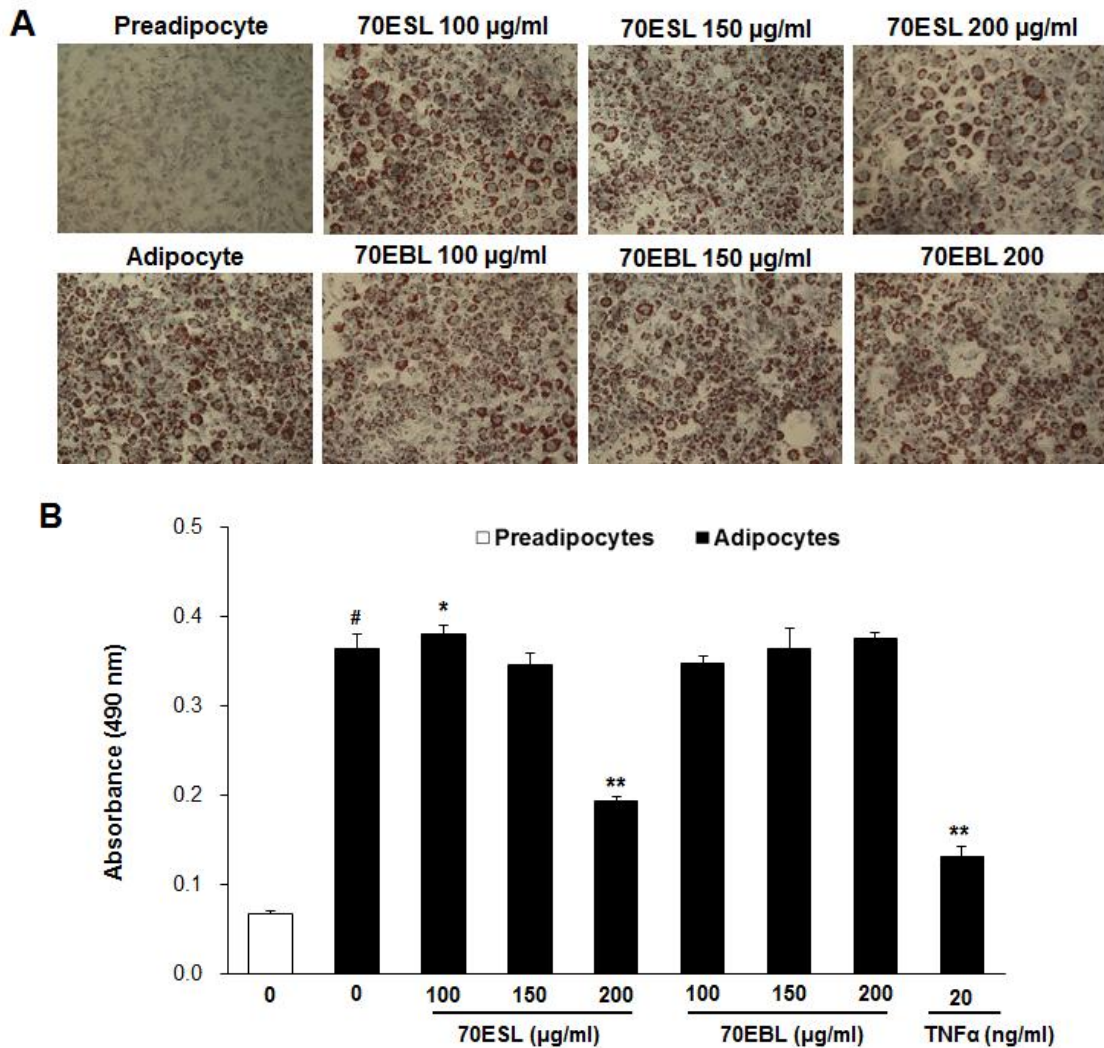


Fig. 30. Anti-adipogenic effects of 70ESL and 70EBL on 3T3-L1 adipocytes. (A) Lipid accumulation in differentiated adipocytes was assessed by Oil Red O staining. 3T3-L1 cells were photographed at magnification $\times 200$. (B) The stained lipid droplets in the cells were dissolved in isopropanol and quantified by measuring the absorbance at 490 nm. Data are expressed as the mean \pm SD. [#] $P < 0.01$ versus preadipocytes. ^{*} $P < 0.05$ versus adipocytes. ^{**} $P < 0.01$ versus adipocytes.

(4) RAW264.7 세포에서의 항염증 효과

(가) RAW264.7 세포에서의 세포독성 평가

대식세포주인 RAW264.7 세포에서 30, 50, 70ESL과 30, 50, 70EBL을 농도별 (25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$)로 처리하여 세포독성을 살펴보았다. 전반적으로 EBL과 ESL 모두 세포독성을 나타내지 않았지만, 70 ESL은 10% 이하의 독성을 나타내었다 (Fig. 40).

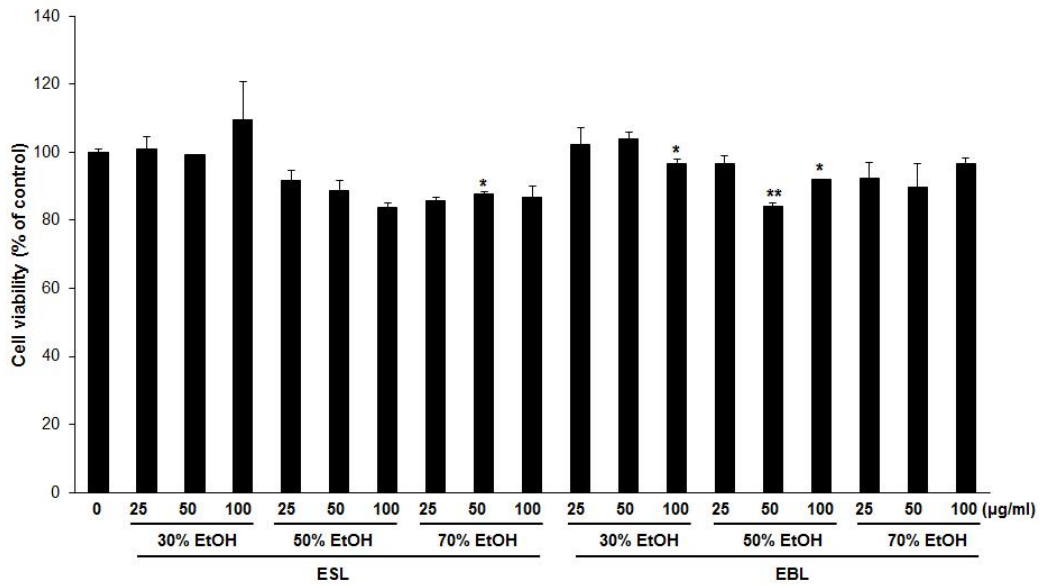


Fig. 40. Cell viabilities of ESL and EBL in RAW264.7 cells. Cells were treated with the indicated concentration of extracts for 24 h. Cell viabilities were assessed using Cyto X™ cell viability assay kit (LPS solution, Korea). * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ versus control. ESL: 2013-JP-GH-107d soy leaves; EBL: 2013-JP-BB-107d soy leaves.

그 외에 2015년에 시기별 (90, 104, 118일령)로 수확한 GH, BB 및 NG 콩잎의 50%, 70% EtOH 추출물의 RAW264.7 세포에서 세포독성을 확인한 결과, 모든 품종, 시기별 추출물 모두 200 µg/ml까지 독성을 나타내지 않았다 (Fig. 41).

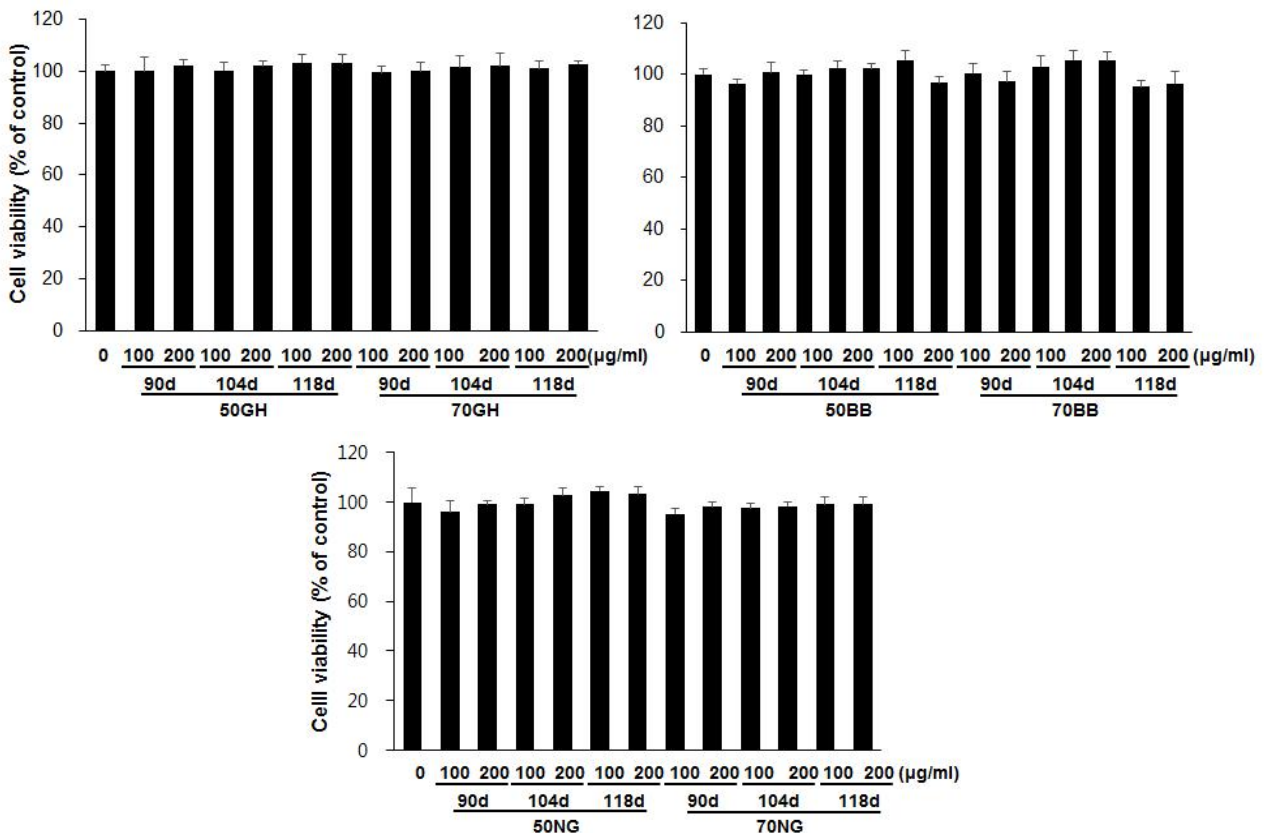


Fig. 41. Cell viabilities of soy leaf extract (GH, BB, NG) in RAW264.7 cells. Cells were treated with the indicated concentration of extracts for 24 h. Cell viabilities were assessed using Cyto X™ cell viability assay kit (LPS solution, Korea).

또한 70ESL과 70EBL 및 배당체 고함유 분획(ESL-GR1, ESL-GR2, EBL-GR1, EBL-GR2)의 RAW264.7 세포에서의 세포독성을 관찰하였다. 그 결과, 배당체 고함유 분획인 ESL-GR1, ESL-GR2, EBL-GR1, EBL-GR2 모두 200 $\mu\text{g/ml}$ 까지도 세포독성을 나타내지 않았다 (Fig. 42).

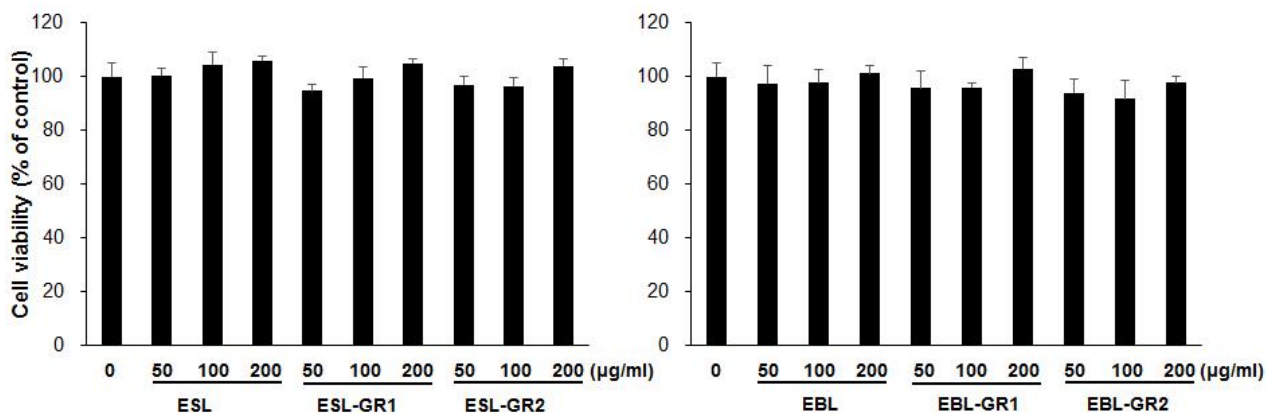


Fig. 42. Cell viabilities of soy leaf extract (70ESL, 70EBL) and its glycoside rich fraction in RAW264.7 cells. Cells were treated with the indicated concentration of extracts for 24 h. Cell viabilities were assessed using Cyto X™ cell viability assay kit (LPS solution, Korea).

(나) RAW264.7 세포에서 배당체 고함유 후보식물의 NO와 ROS의 생성 억제 효과

LPS 유도 독성에 의해 증가되는 염증인자인 NO (nitric oxide)와 ROS (reactive oxygen species)의 생성에 미치는 EBL과 ESL의 효과를 살펴보았다. 각 시료를 50 $\mu\text{g/ml}$ 와 100 $\mu\text{g/ml}$ 로 전처리한 결과, ESL과 EBL 모두 30% EtOH < 50% EtOH < 70% EtOH 추출물 순으로 NO 생성 억제 효과가 증가하였으며, 상대적으로 EBL에 비해 ESL의 NO 생성 억제 효과가 좋았으며 (Fig. 43), ROS 축적도 같은 양상으로 나타났다 (Fig. 43).

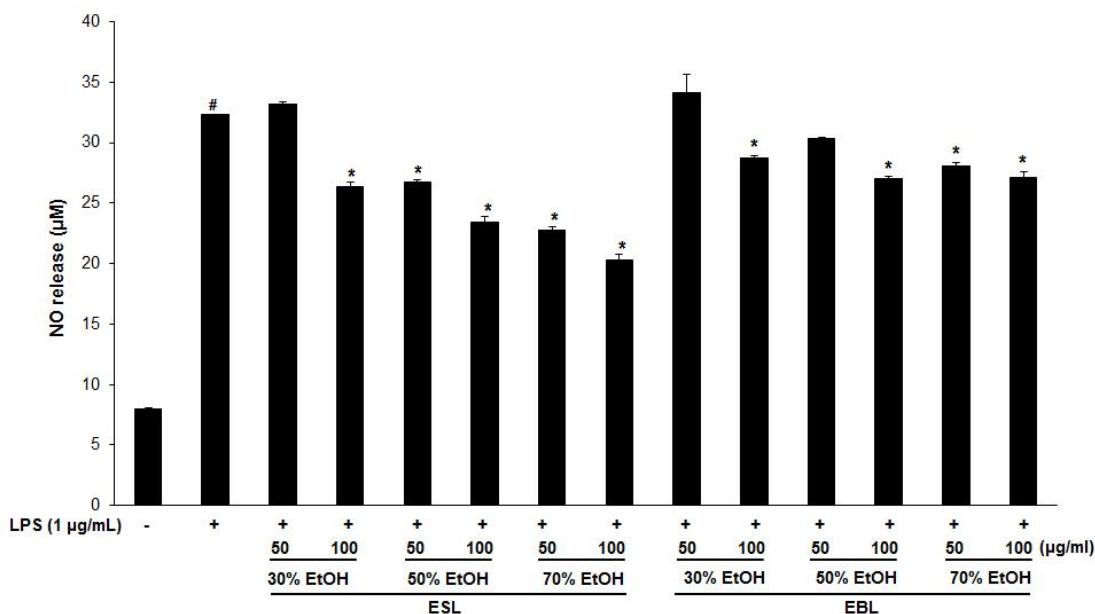


Fig. 43. ESL and EBL extracts inhibit LPS-induced NO production in RAW264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with various concentrations of compounds dissolved in DMSO for 3 h prior to the addition of LPS (1 $\mu\text{g/ml}$), and the cells were further incubated for 18 h. The culture medium was subsequently collected, and the nitrite concentration was measured by Griess reaction. [#] $P < 0.01$ compared with media alone-treated group (LPS -). ^{*} $P < 0.05$ and ^{**} $P < 0.01$ compared with LPS alone-treated group

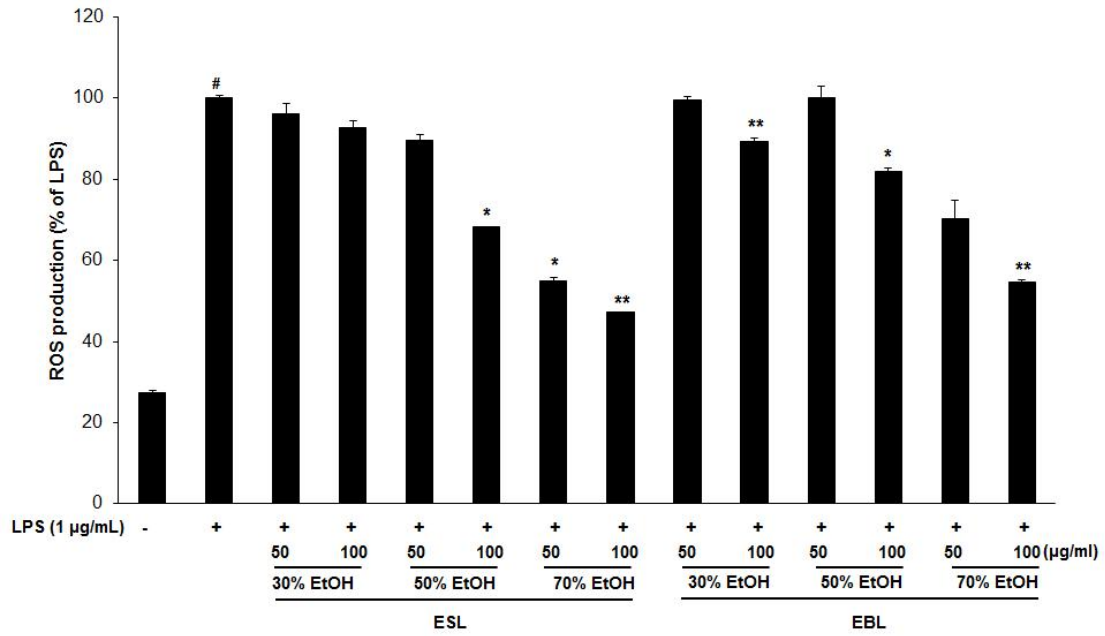


Fig. 44. ESL and EBL extracts inhibit LPS-induced ROS production in RAW264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with various concentrations of compounds dissolved in DMSO for 3 h prior to the addition of LPS (1 µg/ml), and the cells were further incubated for 18 h. [#]*P* < 0.01 compared with media alone-treated group (LPS -). ^{*}*P* < 0.05 and ^{**}*P* < 0.01 compared with LPS alone-treated group.

2015년 90, 104, 118일령에 수확한 GH, BB, NG 콩잎의 50% 및 70% EtOH추출물의 RAW264.7세포에서 LPS에 의해 유도된 NO 및 ROS 생성에 대한 영향을 관찰하였다. 결과 GH, BB, NG 모두 50% 추출물보다는 70%추출물이 더 효과적으로 NO 생성 및 ROS 축적을 저해하고 GH는 118일령, BB와 NG는 104일령이 가장 효과적인 NO 및 ROS에 대한 저해 효능을 나타내고 있다 (Table 56).

Table 56. Effects of soy leaf extracts on NO production and ROS accumulation in LPS-induced RAW264.7 cells

Samples		Inhibition of NO production at 100 µg/ml (%)	Inhibition of ROS accumulation at 100 µg/ml (%)
GH-50ESL	90d	0	4.6 ± 1.6
	104d	7.4 ± 2.9	8.1 ± 1.8
	118d	25.8 ± 1.4	22.9 ± 2.1
GH-70ESL	90d	22.1 ± 1.9	36.1 ± 2.0
	104d	28.2 ± 1.5	36.2 ± 2.8
	118d	30.6 ± 1.2	47.4 ± 4.6
BB-50EBL	90d	0	20.7 ± 2.9
	104d	5.5 ± 0.9	19.9 ± 4.9
	118d	9.3 ± 1.1	23.4 ± 4.7
BB-70EBL	90d	17.5 ± 2.9	37.2 ± 3.1
	104d	24.4 ± 1.1	45.0 ± 0.6
	118d	12.4 ± 1.6	41.1 ± 2.6
NG-50EBL	90d	0	20.6 ± 2.7
	104d	10.5 ± 1.9	25.4 ± 4.2
	118d	13.7 ± 2.2	29.4 ± 3.6
NG-70EBL	90d	17.2 ± 1.3	39.6 ± 2.1
	104d	28.2 ± 1.1	45.2 ± 0.1
	118d	16.2 ± 0.1	43.3 ± 3.2

Values are presented as mean ± SD (n = 3).

ESL과 EBL 및 배당체 고함유 분획(ESL-GR1, ESL-GR2, EBL-GR1, EBL-GR2)의 RAW264.7 세포에서의 항염증효능을 관찰하였다. 배당체 고함유 분획이 조추출물인 ESL 및 EBL보다 더 효과적인 NO 및 ROS에 대한 저해 효능을 나타내지 않았다 (Table 57). 이는 배당체 물질 이외의 콩잎 추출물에 함유되어 있는 pheophorbides 등과 같은 물질이 더 강한 NO 생성 및 ROS 축적에 대한 저해효능을 갖고 있음을 시사한다 (Islam *et al.*, 2013).

Table 57. Effects of soy leaf extracts on NO production and ROS accumulation in LPS-induced RAW264.7 cells

	Inhibition of NO production at 100 µg/ml (%)	Inhibition of ROS accumulation at 100 µg/ml (%)
ESL	37.6 ± 2.6	54.5 ± 1.7
ESL-GR1	13.4 ± 2.2	34.4 ± 0.7
ESL-GR2	22.9 ± 2.5	36.9 ± 0.4
EBL	8.9 ± 1.1	23.8 ± 2.6
EBL-GR1	10.4 ± 1.9	19.4 ± 3.2
BLR-GR2	0	16.3 ± 2.5

Values are presented as mean ± SD (n = 3).

(다) 70EBL과 70ESL의 iNOS와 COX-2의 유전자 및 단백질 발현

위의 결과에서 70ESL과 70EBL의 NO 및 ROS 저해활성을 확인하였으므로, 다음으로 염증성 인자를 조절하는 효소인 iNOS와 COX-2, 염증성 사이토카인(cytokine)인 IL-6와 IL-1 β , 케모카인 (chemokine)인 CCL3의 유전자 및 iNOS와 COX-2의 단백질의 발현을 확인하고자 하였다. 그 결과, 70ESL과 70EBL 모두 COX-2와 CCL3 유전자의 발현을 억제하였으며, 70ESL에서 보다 강한 효과를 나타내었고, 70ESL은 그 외에도 iNOS의 발현도 유의적으로 억제하였다 (Fig. 45). 또한 단백질 발현에서도 70ESL이 70EBL보다 효과적으로 iNOS단백질의 발현을 억제하였다 (Fig. 46).

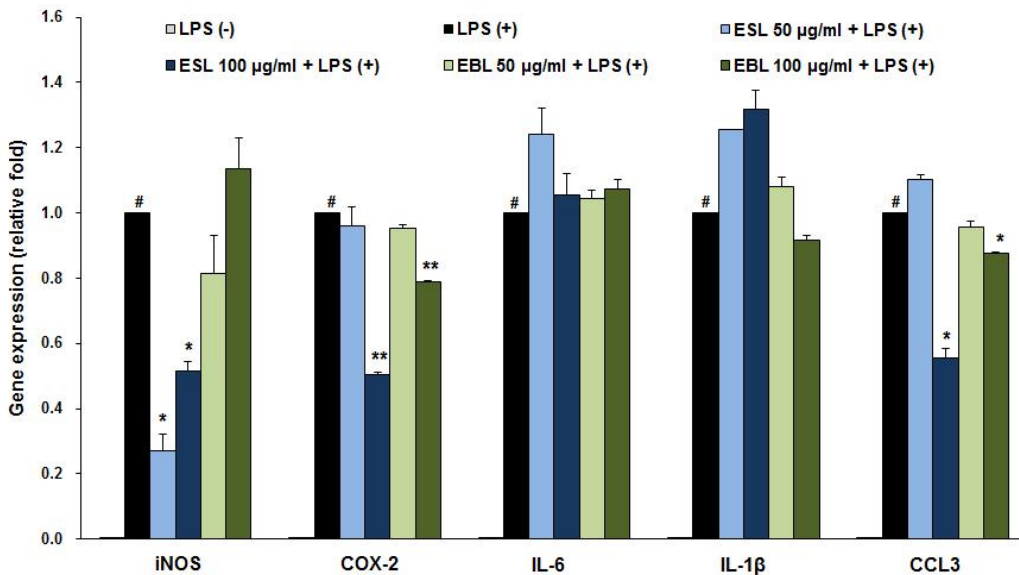


Fig. 45. Relative expression of proinflammatory mediators. Cells were treated with vehicle (DMSO) or 50 and 100 μ g/ml extracts. After 3 hours treated LPS (1 mg/ml) and 8 hours after treatment of LPS harvested. # $P < 0.01$ compared with media alone-treated group (LPS -). * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ compared with LPS alone-treated group.

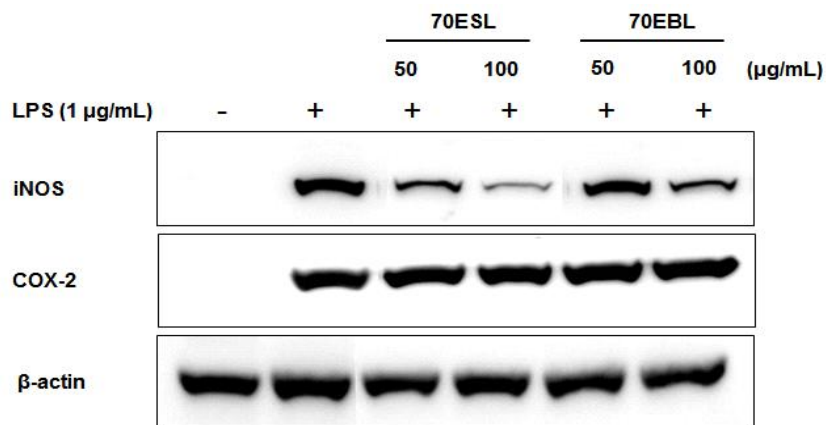


Fig. 46. Effect of 70EBL and 70ESL on LPS-induced proinflammatory enzymes of iNOS and COX-2 in RAW264.7 cells. The total lysates of the proteins were subjected to Western blot analysis, as described in Materials and Methods.

Nuclear factor κ B (NF- κ B)는 세포질 속에 p50과 p65의 heterodimer와 저해 단백질인 I κ B와 함께 불활성형으로 존재하나 염증성 자극에 의해 I κ B kinase가 활성화되어 I κ B가 분해되면, NF- κ B는 활성화된 후 핵 안으로 이동하게 되어 염증반응을 유도하는 유전자 발현을 촉진시킨다. 본 실험에서는 70ESL과 70EBL이 LPS에 의한 NF- κ B의 활성화 억제에 관여하는지를 알기 위하여 Western blot analysis를 시행하였다. 그 결과, 70ESL과 70EBL 모두 NF- κ B와 I κ B의 인산화를 억제시킴을 볼 수 있었으며, 70ESL과 70EBL 100 μ g/ml의 투여는 NF- κ B의 인산화된 단백질의 발현양이 70ESL에 비해 70EBL에 의한 현저하게 감소되었으며, I κ B의 인산화는 70ESL이 더 효과적으로 억제하였다 (Fig. 47).

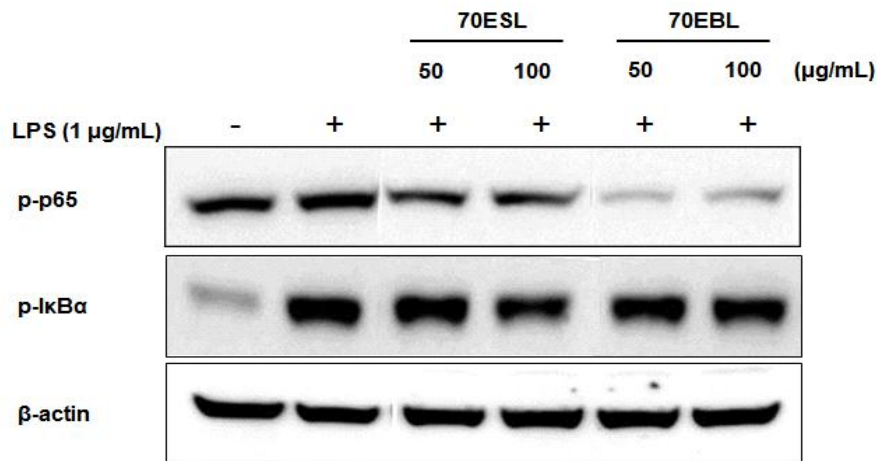


Fig. 47. Effects of 70EBL and 70ESL on LPS induced phosphorylation of NF- κ B/I κ B α in RAW264.7 cells. The total lysates of the proteins were subjected to Western blot analysis, as described under Materials and Methods. Cells were pretreated with samples at the indicated concentrations for 3 h and then exposed to LPS (1 μ g/ml) for 2 h. The ratio of immunointensity between NF- κ B/I κ B α and β -actin was calculated.

사. 분리한 플라보놀배당체 화합물들의 *in vitro*, 세포계 항당뇨 기능 분석

(1) 화합물들의 α -amylase 저해활성

콩잎에서 분리한 배당체 화합물들의 α -amylase 저해활성을 100 μ M 농도에서 측정하였다 (Table 58). 화합물 QG4가 44.0%로 가장 높은 활성을 보였으며, 화합물 KG9와 KG13이 각각 28.7과 28.2%로 다음으로 높은 활성을 보였다. 이 결과는 이들의 aglycone 화합물인 kamferol과 quercetin보다도 더 높은 활성을 보여주었으며, 반면, isorhamnetin의 배당체 화합물 IRG12와 IRG16은 23.2%의 저해활성을 보였던 isorhamnetin과는 달리 α -amylase 저해활성을 보이지 않았다. 또한 화합물 IFG3도 이들의 aglycone인 daidzein은 59.1%의 저해활성을 보였지만 배당체 형태에서는 활성이 감소하였다. 이러한 결과들은 aglycon과 결합된 당의 구조에 따라 일관된 활성을 보여주는 것 같지는 않지만, quercetin 골격의 3번의 하이드록시기 (-OH)와 결합된 2탄당의 조합이 콩잎 배당체들 중에서 α -amylase 저해활성에 중요한 구조로써 생각되어진다.

Table 58. Porcine pancreatic α -amylase inhibitory effects of isolated compounds

Compounds	Inhibition of porcine α -amylase at 25 μ M (%)
QG1	1.4 \pm 1.2
QG2	8.5 \pm 2.0
IFG3	0
QG4	44.0 \pm 0.3
QG5	0
KG6	0
KG7	0
QG8	0
KG9	28.7 \pm 0.1
KG10	1.0 \pm 0.5
KG11	0
IRG12	0
KG13	28.2 \pm 0.7
IFG15	0.4 \pm 0.2
IRG16	0
Daidzein	59.1 \pm 0.1
Genistein	3.5 \pm 0.1
Kaempferol	17.8 \pm 0.5
Quercetin	12.0 \pm 0.0
Rhamnetin	22.7 \pm 0.5
Isorhamnetin	23.2 \pm 0.4
Positive control	Acarbose 2.7 μ M: 56.8 \pm 1.3

Values are presented as mean \pm SD (n = 3).

KG: kaempferol glycoside; QG: quercetin glycoside; IRG: isorhamnetin glycoside.

(2) 화합물들의 α -glucosidase 저해활성

콩잎에서 분리한 화합물들의 rat α -glucosidase와 yeast α -glucosidase의 저해활성을 100 μ M 농도에서 측정하였다 (Table 59).

화합물 IFG3, QG8, KG13, IRG15, IFG16이 20% 이상의 rat α -glucosidase 저해활성을 나타내었으며, 이 화합물들의 aglycone에 비해 높은 α -glucosidase 저해활성을 나타내었다.

전반적으로 모든 화합물이 α -glucosidase 저해활성을 나타내었으며, 특히 quercetin 배당체인 QG4가 63.9%로 가장 높았고, 이어 kaempferol 배당체인 KG6이 44.6%의 α -glucosidase 저해활성을 나타냈다. 그러나 이 화합물들의 aglycone이 매우 높은 α -glucosidase 저해활성을 나타낸 것에 비해 (kaempferol과 quercetin은 같은 농도에서 100% inhibition) 이들의 배당체의 α -glucosidase 저해활성은 낮은 수준이다 (Table 59).

Table 59. Rat and yeast α -glucosidase inhibitory activities of isolated compounds

Compounds	Inhibition at 100 μ M (%)	
	Rat α -glucosidase	Yeast α -glucosidase
QG1	17.4 \pm 1.0	10.8 \pm 0.8
QG2	18.1 \pm 1.4	8.7 \pm 2.0
IFG3	24.1 \pm 2.0	15.2 \pm 0.6
QG4	11.5 \pm 0.7	63.9 \pm 0.2
QG5	16.6 \pm 0.4	23.4 \pm 2.3
KG6	15.6 \pm 0.2	44.6 \pm 0.1
KG7	16.2 \pm 0.3	13.2 \pm 0.8
QG8	23.6 \pm 0.1	17.6 \pm 2.3
KG9	20.0 \pm 0.0	20.7 \pm 0.1
KG10	10.4 \pm 0.2	15.1 \pm 2.0
KG11	13.6 \pm 1.0	10.3 \pm 1.5
IRG12	15.8 \pm 0.6	26.2 \pm 1.7
KG13	24.3 \pm 0.8	15.0 \pm 0.8
IFG15	23.9 \pm 0.4	3.0 \pm 0.6
IRG16	23.5 \pm 0.1	22.7 \pm 0.9
Daidzein	3.4 \pm 1.0	90.7 \pm 0.9
Genistein	3.8 \pm 0.4	100
Kaempferol	0.6 \pm 0.7	100
Quercetin	0	100
Rhamnetin	0	97.7 \pm 0.2
Isorhamnetin	5.4 \pm 1.8	100
Positive control	Acarbose 55 μ M : 50.9 \pm 0.5	Coumestrol 5 μ M: 48.8 \pm 0.4

Values are presented as mean \pm SD (n = 3).

(3) 화합물들의 LDL-oxidation 억제활성

콩잎에서 분리한 화합물들의 LDL-oxidation 저해 활성을 100 μ M에서 측정하였다 (Table 60). Quercetin 배당체 (QG1, 2, 4, 5, 8)와 quercetin은 매우 높은 LDL-산화 억제활성 (IC_{50} = 0.4 - 1.8 μ M)을 나타냈다. 이중 QG8 (IC_{50} = 0.4 μ M)은 quercetin (IC_{50} = 1.2 μ M) 보다 높은 LDL-산화 억제활성을 나타냈다. Kaempferol 배당체 (KG 6, 7, 9, 10, 11, 13)는 100 μ M에서 28.4 - 95.3%의 LDL-산화 억제활성을 나타내었으며, 이중 KG13이 95.3% (IC_{50} = 42.9 μ M)로 가장 높은 LDL-산화 억제활성을 나타내었지만, 이들의 aglycon인 kaempferol의 LDL-산화 억제활성 (IC_{50} = 10.0 μ M) 보다는 낮았다. Isorhamnetin 배당체인 IRG12와 IRG16은 각각 65.7%와 55.7%의 LDL-산화 억제활성을 나타내었으며, 이들의 aglycone인 isorhamnetin의 LDL-산화 억제활성과 비슷한 수준이었다. 한편 rhamnetin의 LDL-산화 억제활성 (IC_{50} = 1.1 μ M)은 isorhamnetin에 비해 월등히 높았다. 이러한 결과들은 quercetin 골격의 3번의

하이드록시기 (-OH)와 결합된 2탄당 또는 3탄당의 조합이 콩잎 배당체들 중에서 LDL-산화 억제활성에 중요한 구조로써 판단되며, 특히 QG8의 Quercetin 3-O-(2- α -D-rhamnopyranosyl)- β -D-galactopyranoside 구조가 LDL-항산화 활성에 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다. 또한 QG8의 강력한 LDL-산화 억제활성에 대해 아직까지 보고된 적이 없다.

Table 60. LDL-oxidation inhibitory effects of isolated flavonol glycosides and their aglycones

Compounds	Inhibition of LDL-oxidation at 100 μ M (%)	IC ₅₀ Values (μ M)
QG1	100	1.8
QG2	100	1.9
IFG3	0	-
QG4	100	2.1
QG5	100	2.3
KG6	28.4 \pm 0.3	-
KG7	0	-
QG8	100	0.4
KG9	77.1 \pm 1.6	-
KG10	0	-
KG11	27.1 \pm 0.4	-
IRG12	65.7 \pm 0.1	-
KG13	95.3 \pm 0.5	42.9
IFG15	41.3 \pm 0.2	-
IRG16	55.7 \pm 0.5	-
Daidzein	77.8 \pm 0.0	-
Genistein	100	24.8
Kaempferol	100	10.0
Quercetin	100	1.2
Rhamnetin	100	1.1
Isorhamnetin	100	28.3
Positive control	BHT 2 μ M: 49.9 \pm 1.3	

Values are presented as mean \pm SD (n = 3).

(4) 화합물들의 DPPH-라디칼 소거 활성

콩잎에서 분리한 화합물들의 DPPH-라디칼 소거 활성을 측정하였다 (Table 61). Quercetin 배당체 (QG 1, 4, 5, 8)가 높은 DPPH-라디칼 소거능을 보였으며, isoflavone 배당체 (IFG 3, 15), kaempferol 배당체 (KG 6, 7, 9, 10, 11, 13), isorhamnetin 배당체 (IFG 12, 16)들은 전체적으로 DPPH-라디칼 소거능이 매우 약했다. 이러한 결과들은 LDL-항산화 활성과 유사하게 quercetin 골격의 3번의 하이드록시기 (-OH)와 결합된 2탄당 또는 3탄당의 조합이 콩잎 배당체들 중에서 DPPH-라디칼 소거능에 중요한 구조로써 판단된다.

Table 61. DPPH radical scavenging effects of isolated compounds

Compounds	DPPH radical scavenging effects (%)	
	25 μ M	50 μ M
QG1	36.1 \pm 0.6	60.3 \pm 1.4
QG2	15.4 \pm 0.4	52.0 \pm 0.1
IFG3	2.5 \pm 0.8	0.3 \pm 0.5
QG4	37.8 \pm 0.8	64.8 \pm 0.9
QG5	34.5 \pm 0.2	59.5 \pm 0.5
KG6	7.0 \pm 0.6	8.0 \pm 0.7
KG7	0.8 \pm 1.8	0
QG8	34.9 \pm 0.8	85.9 \pm 0.4
KG9	3.4 \pm 1.1	4.0 \pm 0.6
KG10	1.9 \pm 0.3	2.5 \pm 1.2
KG11	1.1 \pm 0.3	0.8 \pm 1.0
IRG12	5.3 \pm 0.6	11.5 \pm 0.5
KG13	3.6 \pm 1.6	5.2 \pm 1.0
IFG15	3.3 \pm 0.9	3.4 \pm 0.7
IRG16	5.7 \pm 0.9	7.5 \pm 0.6
Daidzein	1.0 \pm 0.94	0.3 \pm 0.6
Genistein	1.3 \pm 0.7	1.4 \pm 0.9
Kaempferol	41.5 \pm 0.7	75.2 \pm 3.0
Quercetin	59.8 \pm 2.0	80.6 \pm 1.3
Isorhamnetin	46.7 \pm 0.6	99.3 \pm 0.2
Positive control	L-Ascorbic acid 28 μ M: 43.2 \pm 0.6	

Values are presented as mean \pm SD (n = 3).

(5) 화합물들의 DPP-4 저해활성

콩잎에서 분리한 화합물들의 DPP-4 저해활성을 측정하였다 (Table 62). 모든 플라보놀배당체 화합물은 그들의 aglycon (kaempferol, quercetin, isorhamnetin)보다 더 높은 DPP-4 저해활성을 나타냈다. 이들 중에서 QG1, QG8, KG11, IRG16이 48% 이상의 상대적으로 높은 DPP-4 저해활성을 나타내었다. 반면에, isoflavone 배당체인 IFG 3과 IFG15는 DPP-4 저해활성이 매우 낮았다.

Table 62. DPP-4 inhibitory activities of isolated compounds

Compounds	Inhibition of DPP-4 at 200 μ M (%)
QG1	48.4 \pm 1.0
QG2	42.4 \pm 0.9
IFG3	13.5 \pm 2.5
QG4	46.7 \pm 1.5
QG5	42.5 \pm 1.5
KG6	38.4 \pm 2.5
KG7	38.9 \pm 1.0
QG8	48.7 \pm 0.4
KG9	43.7 \pm 1.5
KG10	43.8 \pm 1.2
KG11	48.0 \pm 0.3
IRG12	39.4 \pm 2.5
KG13	45.8 \pm 1.4
IFG15	7.0 \pm 0.6
IRG16	48.1 \pm 3.1
Daidzein	7.3 \pm 1.5
Genistein	24.7 \pm 1.4
Kaempferol	21.5 \pm 1.6
Quercetin	14.5 \pm 1.5
Rhamnetin	48.9 \pm 1.6
Isorhamnetin	38.1 \pm 1.3
Positive control	KR-62436 0.4 μ M: 40.0 \pm 2.7

Values are presented as mean \pm SD (n = 3).

(6) 화합물들의 MIN6 세포에서 항당뇨 활성

(가) 화합물들의 MIN6 세포에서 세포독성

콩잎에서 분리한 플라보놀배당체 및 이들의 aglycone인 kaempferol, quercetin, isorhamnetin의 세포독성을 MIN6 세포에서 측정한 결과, 모든 화합물이 100 μ M의 농도까지 세포독성을 나타내지 않았다 (Fig. 48).

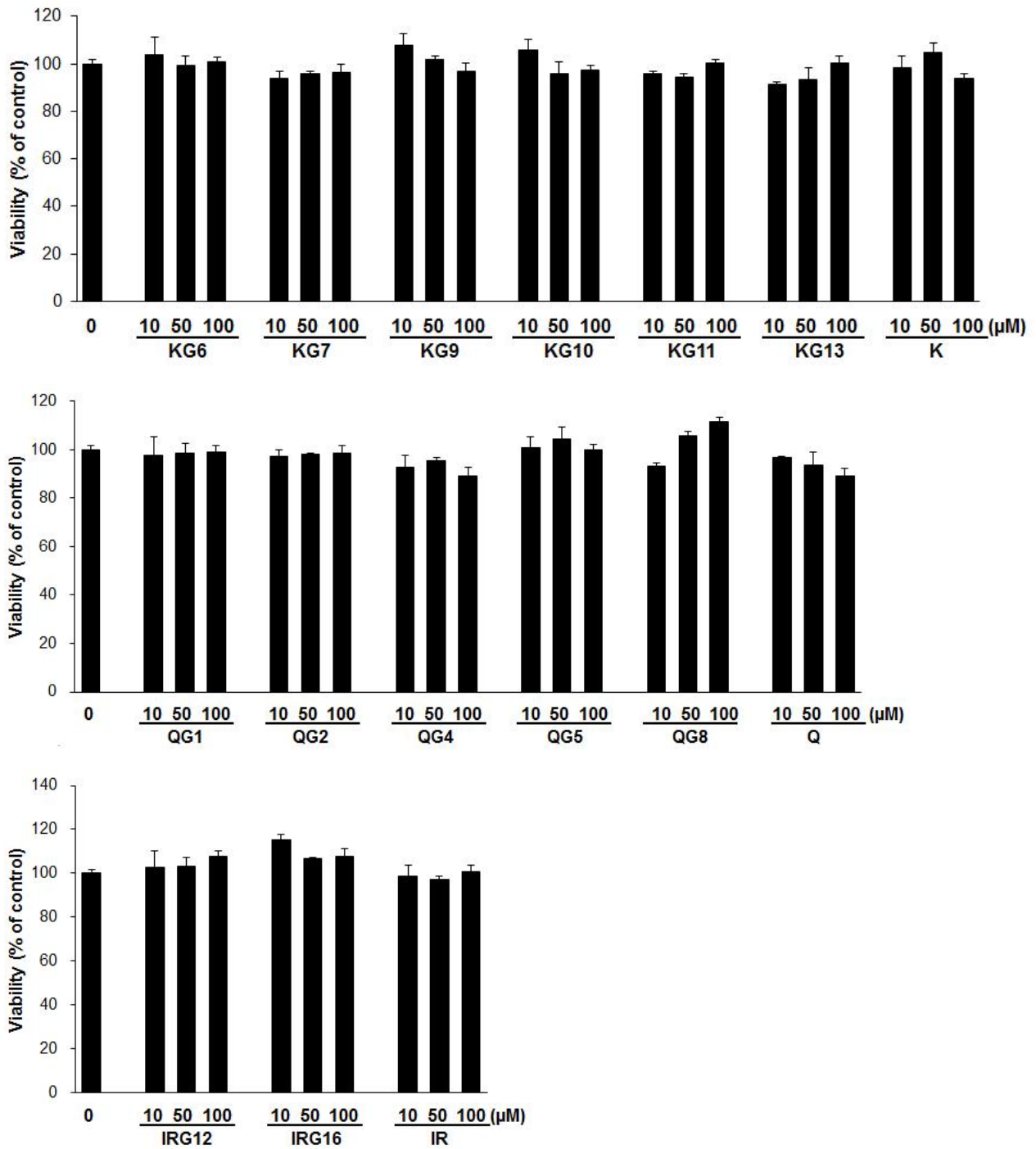


Fig. 48. Cell viability of kaempferol glycosides (KGs), quercetin glycosides (QGs), and isorhamnetin glycosides (IRGs) in MIN6 cells. Cells were treated with the indicated concentration of compounds for 24 h. Cell viabilities were assessed using Cyto X™ cell viability assay kit (LPS solution, Korea). Values are presented as mean \pm SD, n = 3.

(나) 화합물들의 MIN6 세포에서 인슐린 분비능 측정

콩잎에서 분리한 플라보놀배당체들의 MIN6 베타세포에서 인슐린 분비능에 미치는 영향을 측정하였다. Kaempferol 배당체 중에서 KG9와 KG10은 50 μ M 농도에서 MIN6 세포의 인슐린 분비능을 효과적으로 증가시켰다. 또한 Quercetin 배당체 중 QG4와 QG5, isorhamnetin 배당체 중 IRG16도 50 μ M 농도에서 MIN6 세포의 인슐린 분비능을 효과적으로 증가시켰고, 특히

IRG16은 aglycone인 isorhamnetin보다 높은 인슐린 분비능을 나타냈다 (Fig. 49).

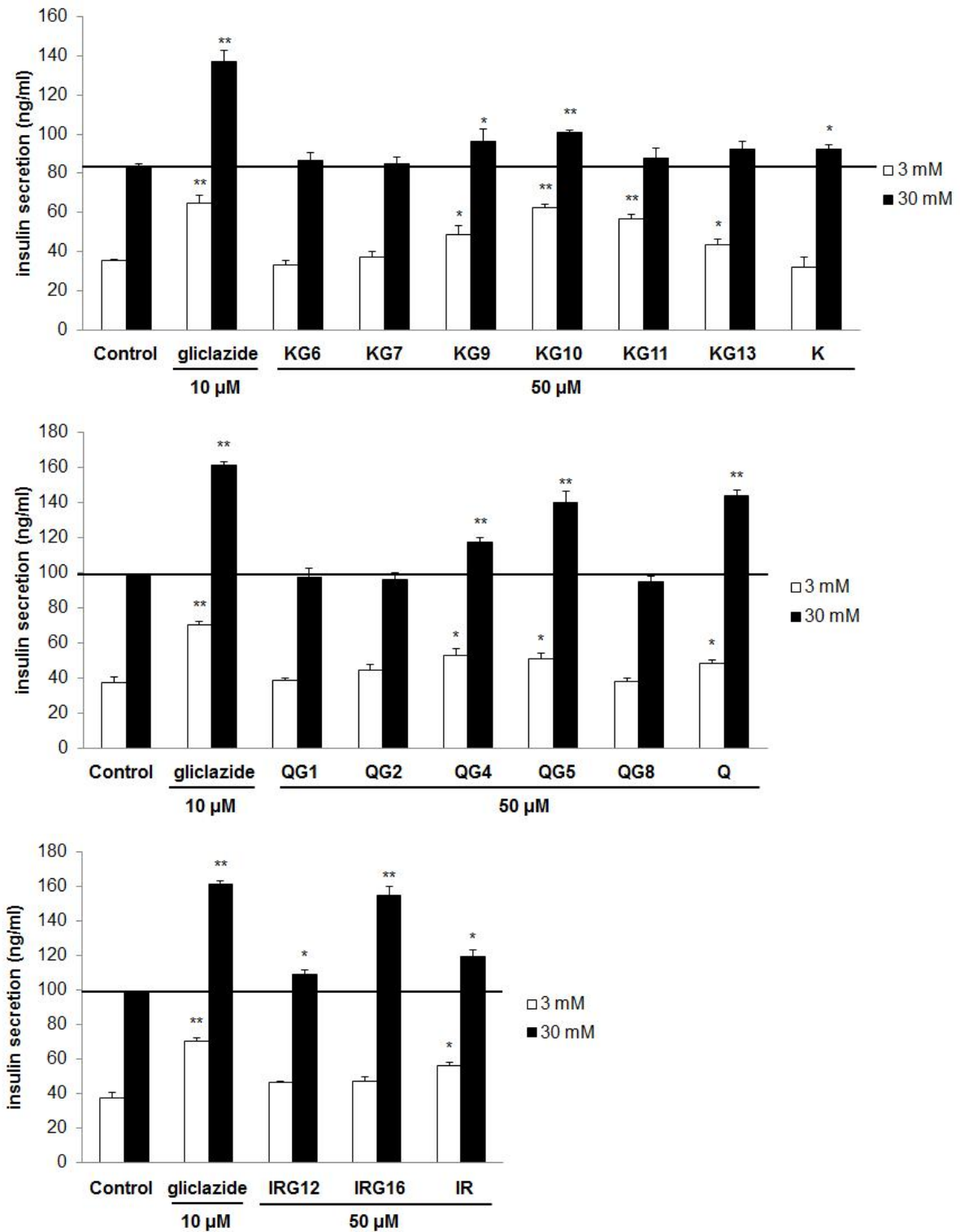


Fig. 49. Glucose-induced insulin secretion test of isolated compounds in pancreatic MIN6 β-cells. MIN6 cells were seeded into a 24-well plate at a density of 1×10^5 cells per well and grown for 48 h. The cells were washed twice and preincubated for 60 min in glucose-free Krebs buffer. Then cells were treated with or without 25 mM glucose and 100 μg/ml samples incubated for 30 min at 37°C. After incubation, measured the insulin concentration of the media (Alpco diagnostics, insulin ELISA kit). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with vehicle.

더 나아가 KG10과 QG5의 인슐린 분비능을 재확인하기 위하여 10, 50, 100 μM 의 농도로 처리한 결과, KG10과 QG5 모두 농도 의존적으로 인슐린 분비능이 증가하였으며, QG5가 보다 효과적으로 인슐린 분비능을 증가시켰다 (Fig. 50).

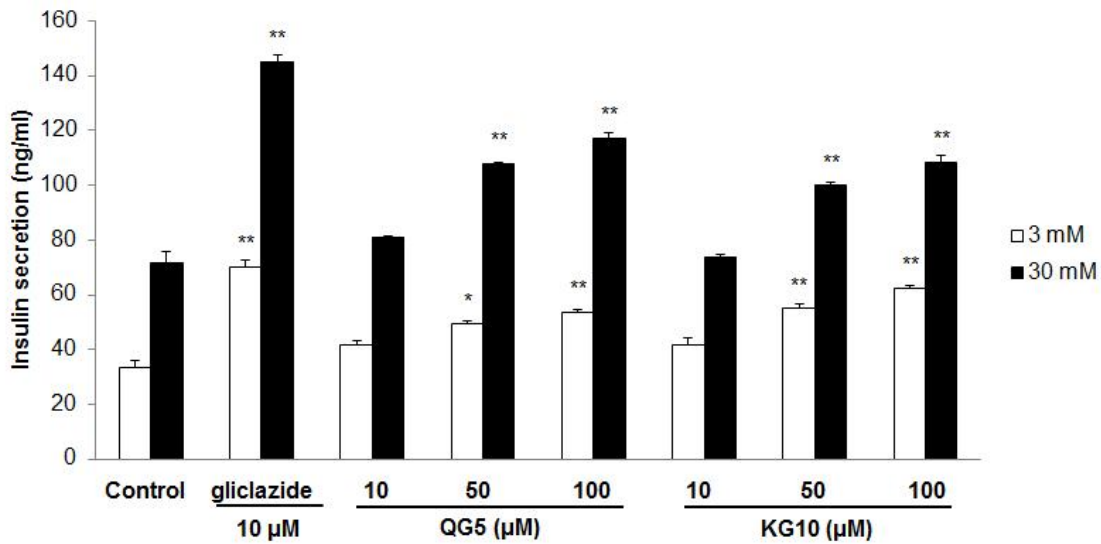


Fig. 50. The glucose-induced insulin secretion test performed in pancreatic MIN6 β -cells. MIN6 cells were seeded into a 24-well plate at a density of 1×10^5 cells per well and grown for 48 h. The cells were washed twice and preincubated for 60 min in glucose-free medium. Then cells were treated with 3 or 30 mM glucose, and QG5 and KG10 (10~100 μM) incubated for 30 min at 37 $^{\circ}\text{C}$. After incubation, measured the insulin concentration of the media (Alpco diagnostics, insulin ELISA kit). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with control.

IRG16의 인슐린 분비능을 재확인하기 위하여 10, 50, 100 μM 의 농도로 처리한 결과, 농도 의존적인 인슐린 분비능의 증가를 보여주어 베타세포의 기능개선 효능이 있음을 알 수 있었다. (Fig. 51).

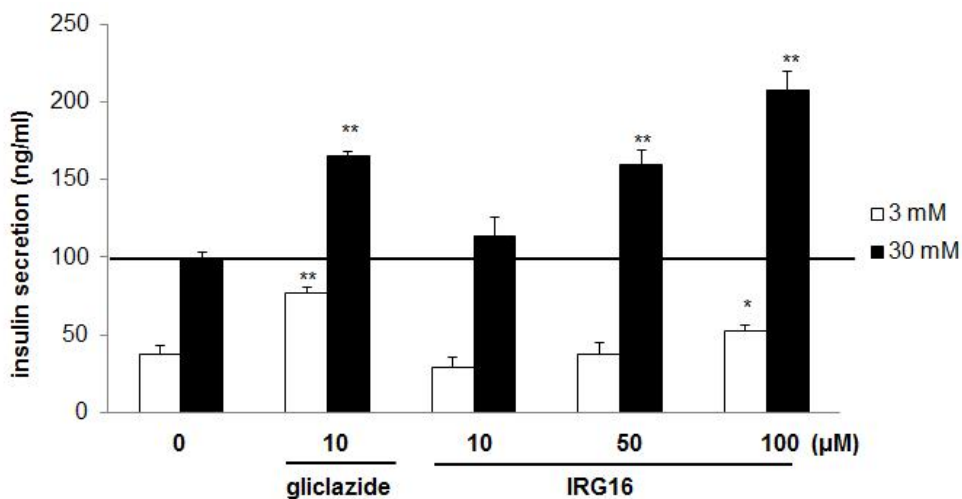


Fig. 51. The glucose-induced insulin secretion test of isorhamnetin glycosides (IRG16) performed in pancreatic MIN6 β -cells. MIN6 cells were seeded into a 24-well plate at a density of 1×10^5 cells per well and grown for 48 h. The cells were washed twice and preincubated for 60 min in glucose-free medium. Then cells were treated with 3 or 30 mM glucose, and IRG16 (10, 50, 100 μM) incubated for 30 min at 37 $^{\circ}\text{C}$. After incubation, the insulin concentration of the media were measured (Alpco diagnostics, insulin ELISA kit). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with control.

(7) 화합물들의 HepG2 세포에서 지질축적 억제 활성

(가) 화합물들의 HepG2 세포에서 세포독성 측정

콩잎에서 분리한 quercetin 및 isorhamnetin 배당체들의 HepG2 세포에서의 세포독성을 확인하였다. 이 화합물들은 그들의 aglycone과 함께 모두 100 μ M까지 세포독성을 나타내지 않았다 (Fig. 52).

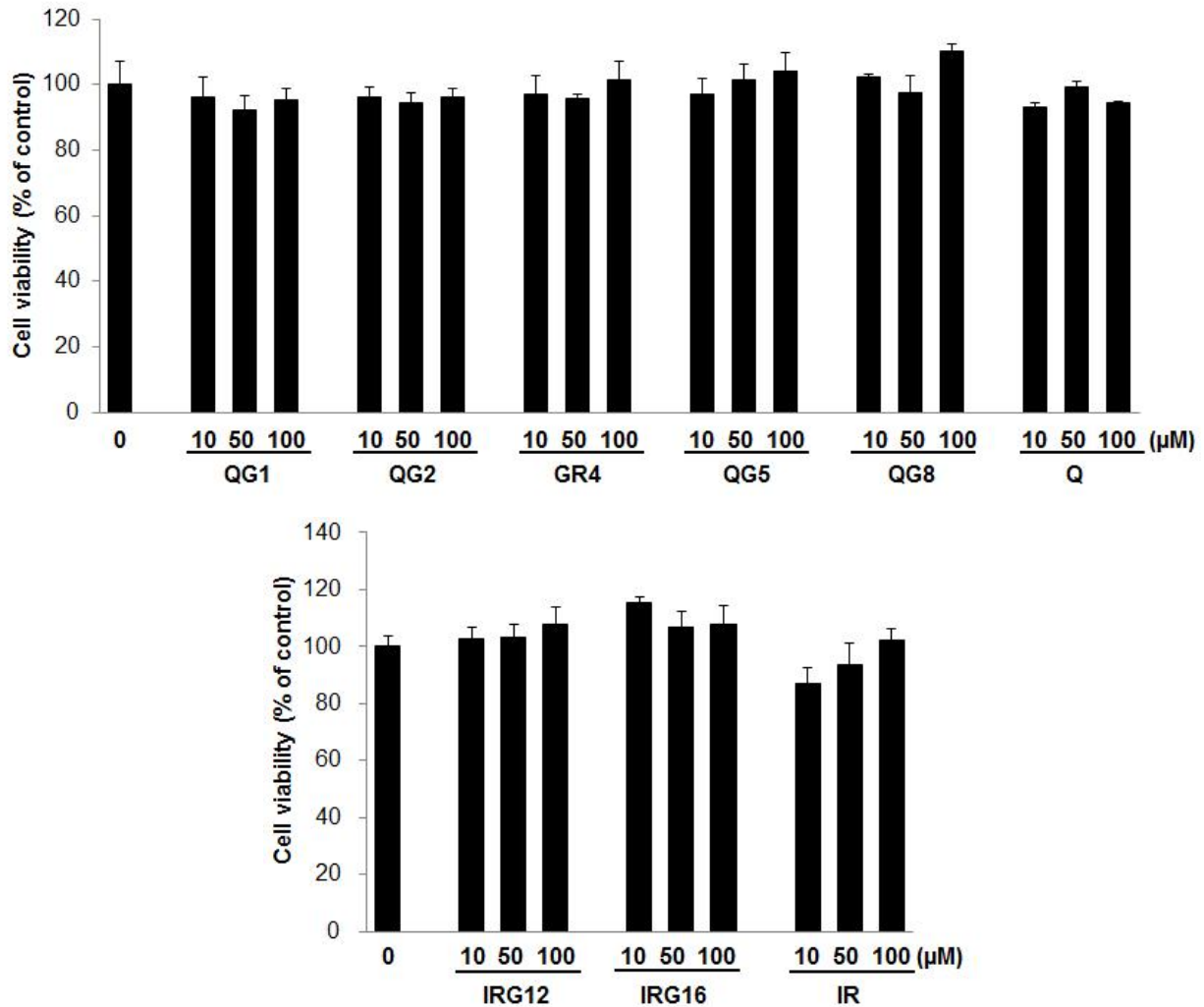


Fig. 52. Cell viability of quercetin glycosides (QGs) and isorhamnetin glycosides (IRGs) in HepG2 cells. Cells were treated with the indicated concentration of compounds for 24 h. Cell viabilities were assessed using Cyto X™ cell viability assay kit (LPS solution, Korea).

(나) 화합물들에 의한 HepG2 세포에서 지질축적 억제 효능 측정

Quercetin 배당체 및 isorhamnetin 배당체들을 전처리하여 HepG2 세포에서 palmitic acid (PA)에 의해 유도된 지질축적에 미치는 영향을 측정하였다. 그 결과, quercetin 배당체 중 QG4, QG8이 각각 41.9%, 56.6%씩 세포내 지질 축적을 유의적으로 억제하였고, aglycone인 quercetin은 39.4% 지질축적을 억제하였다 (Fig. 53). Isorhamnetin 배당체인 IRG12와 IRG16은 각각 17.1%, 18.4%씩 세포내 지질 축적을 억제하였고, 이에 비해 aglycone인 isorhamnetin은 지질축적을 51.5% 억제하여 보다 효능이 높음을 알 수 있었다.

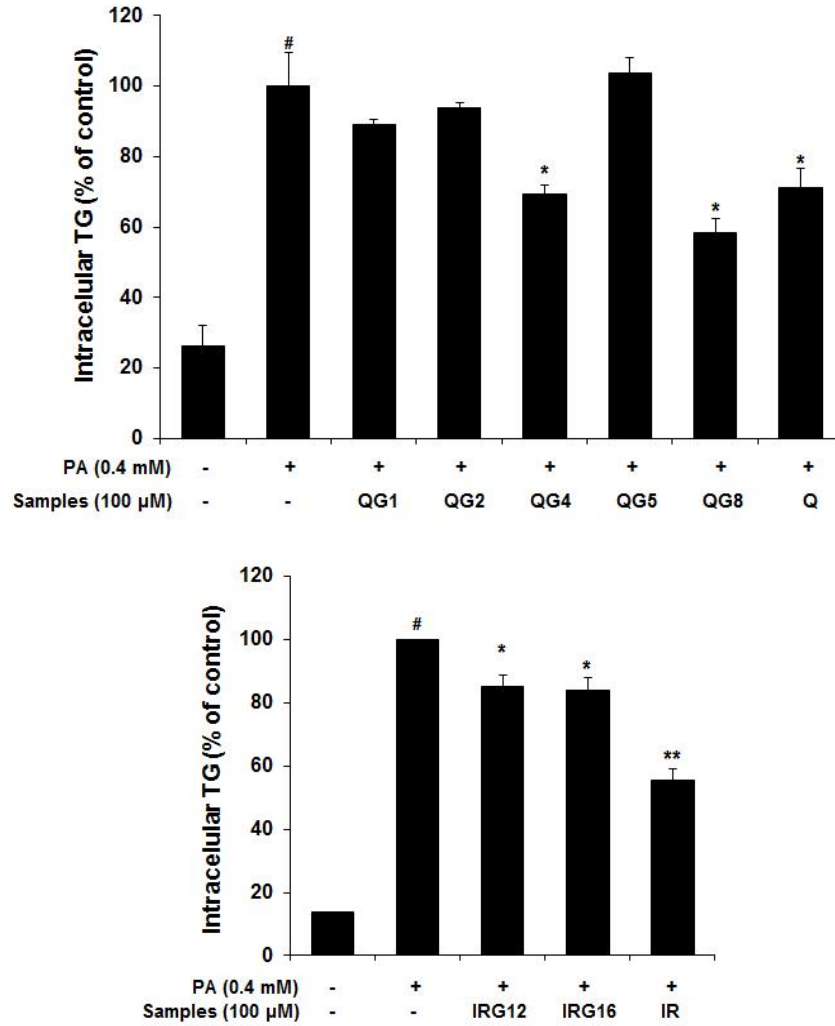


Fig. 53. Effect of QGs and IRGs on TG accumulation in palmitate (PA)-induced HepG2 cells . HepG2 cells were seeded into a 12-well plate at a density of 5×10^5 cells per well and grown 24 h. HepG2 cells were treated with QGs, IRGs, and PA (0.4 mM) for 24 h. Triglyceride contents were measured by triglyceride kit (ASAN, Korea). Values are expressed as mean \pm SD. # $p < 0.05$ versus the low glucose media alone-treated group. * $p < 0.05$ versus the 0.4 mM PA with low glucose media alone-treated group.

(8) 화합물들의 3T3-L1 세포에서 지질축적 억제 활성

(가) 화합물들의 3T3-L1 세포에서 세포독성 측정

지방전구 세포 3T3-L1 세포에서 플라보놀배당체들의 항비만 효능을 측정하기 위해 우선 세포독성을 측정하였다. 모든 플라보놀배당체들이 100 μM까지 독성을 나타내지 않았으며, aglycone 중 quercetin만 100 μM에서 76.7%의 생존율을 나타내어 3T3-L1 세포에 대한 독성이 있음을 알았다 (Fig. 54).

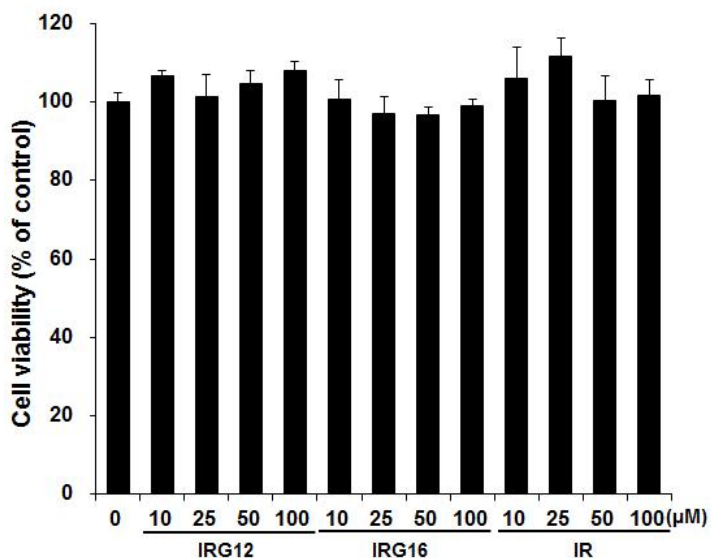
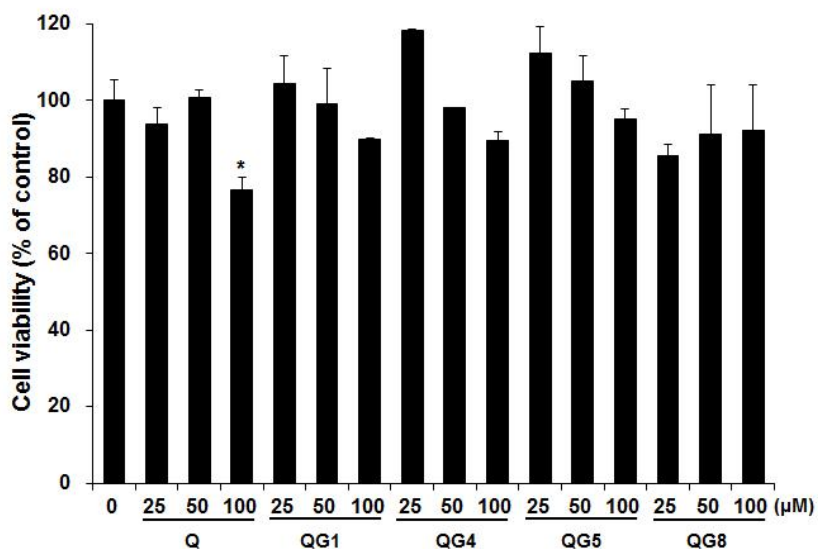
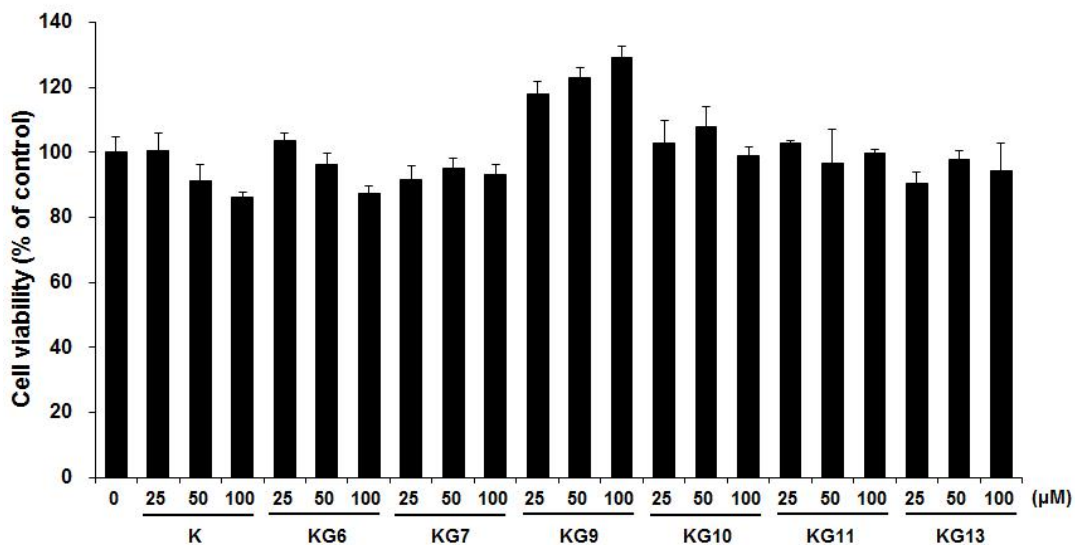


Fig. 54. Cell viability of KGs, QGs, and IRGs in 3T3-L1 cells. Cells were treated with the indicated concentration of compounds for 24 h. Cell viabilities were assessed using Cyto X™ cell viability assay kit (LPS solution, Korea).

그 외에 콩잎 추출물에서 분리한 coumestan 화합물인 isotrifoliol, coumestrol, phaseol의 3T3-L1 세포에서 세포독성을 측정된 결과, 3종 화합물 모두 50 μM 까지 세포독성을 나타내지 않았다 (Fig. 55).

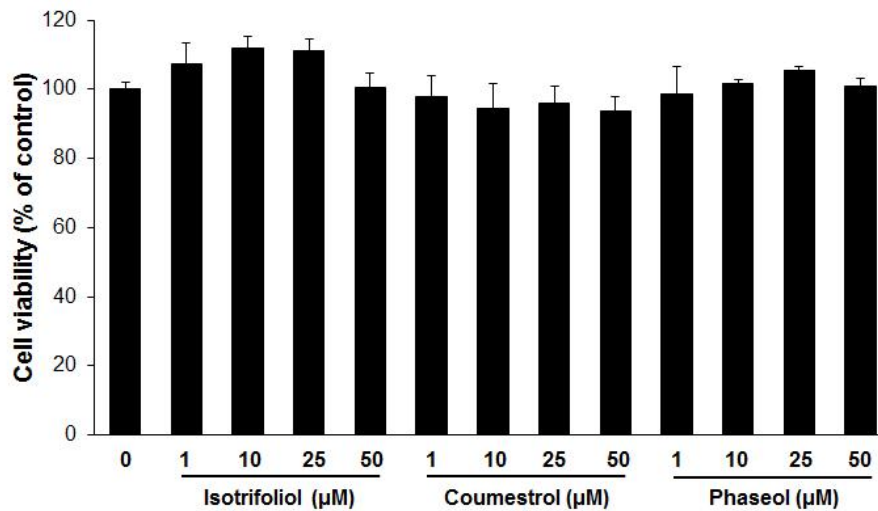


Fig. 55. Cell viability of coumestans in 3T3-L1 cells. Cells were treated with the indicated concentration of compounds for 24 h. Cell viabilities were assessed using Cyto XTM cell viability assay kit (LPS solution, Korea).

(나) 화합물들에 의한 3T3-L1 세포에서 지질축적 억제 효능 측정

플라보놀배당체를 지방세포 분화유도 물질(MDI)과 함께 전처리하여 3T3-L1 세포에서 세포분화 및 지질축적에 미치는 영향을 측정하였다. 콩잎에서 분리한 플라보놀배당체는 모두 100 μM 까지 효과적인 지질축적을 억제하지 않았다. 반면에 이들의 aglycone인 kaempferol (Li *et al.*, 2015)과 isorhamnetin (Zhang *et al.*, 2016)은 문헌에 보고된 바와 같이 3T3-L1 세포에서 세포분화 및 지질축적을 억제하였다 (Fig. 55).

그 외에 콩잎에서 분리한 coumestan 화합물인 isotrifoliol, coumestrol, phaseol을 처리하여 3T3-L1 지방세포에서 세포분화 및 지질축적 억제 효능을 측정하였다. 분화 과정에 축적된 지질을 Oil red O 염색을 통해 관찰한 결과, isotrifoliol은 10, 25, 50 μM 에서 모두 adipocytes에 비해 유의적으로 지질축적을 감소시켰고, phaseol은 25, 50 μM 에서 유의적으로 지질축적을 감소시켰으며, coumestrol은 오직 50 μM 에서만 유의적으로 지질축적을 억제하였다 (Fig. 57). Isotrifoliol은 10 μM 에서 약 50% 정도 지질축적을 억제하는 것으로부터 하비만 효능이 높을 것으로 예측된다.

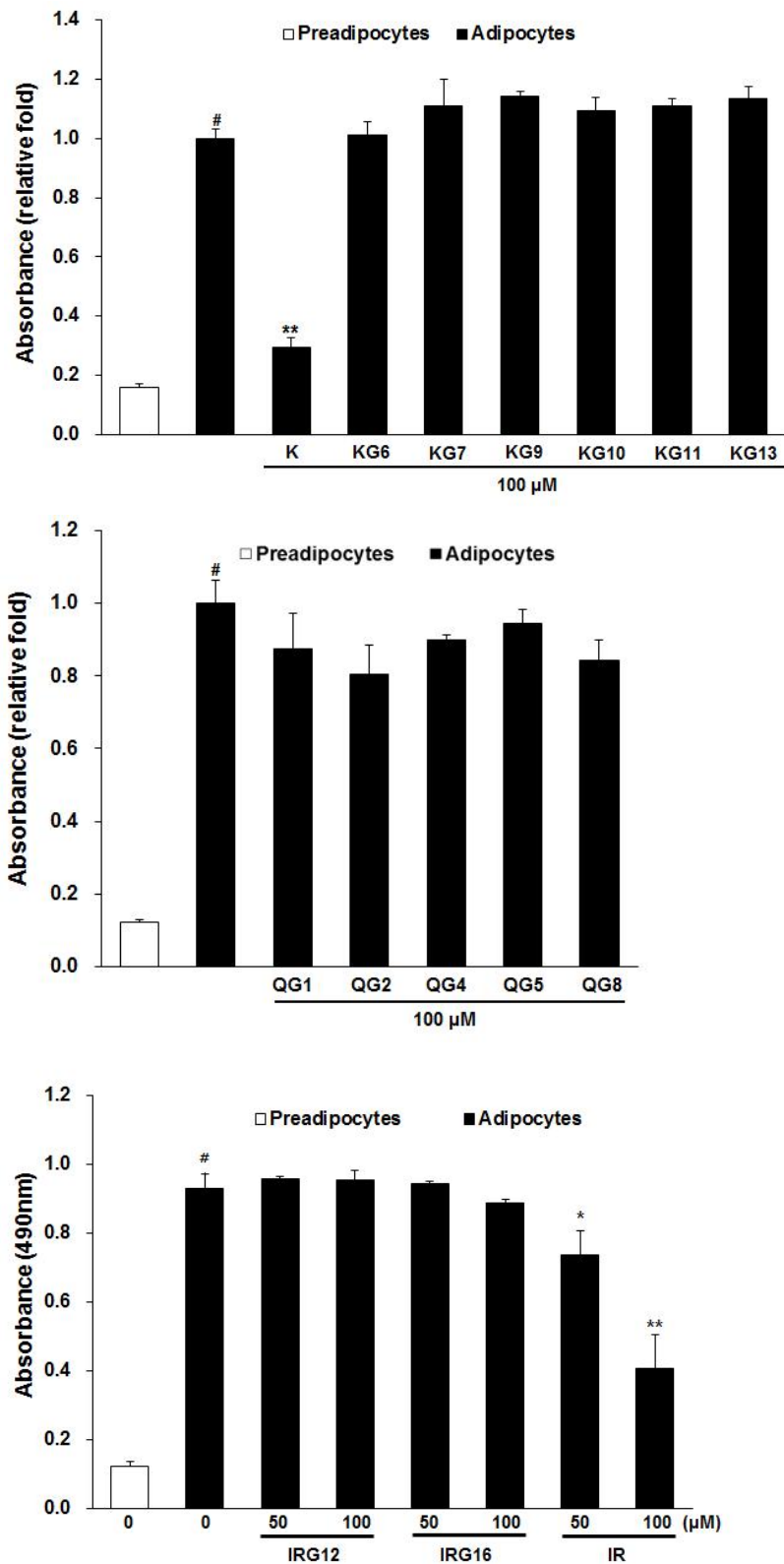


Fig. 56. Effects of KGs, QGs, and IRGs on lipid accumulation in 3T3-L1 cells. Two day post-confluent 3T3-L1 preadipocytes (day 0) were treated with indicated concentration of compounds every other day for 4 days. Cells treated with 0.1% DMSO were used as controls (adipocytes). The assays were performed on fully differentiated adipocytes (day 8). Lipid accumulation in differentiated adipocyte was assessed by Oil Red O staining. The staining lipid droplets in the cells were dissolved in isopropanol and quantified by measuring the absorbance at 490 nm. Data are expressed as the means \pm SD. [#] $P < 0.05$ versus preadipocytes. ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ versus adipocytes.

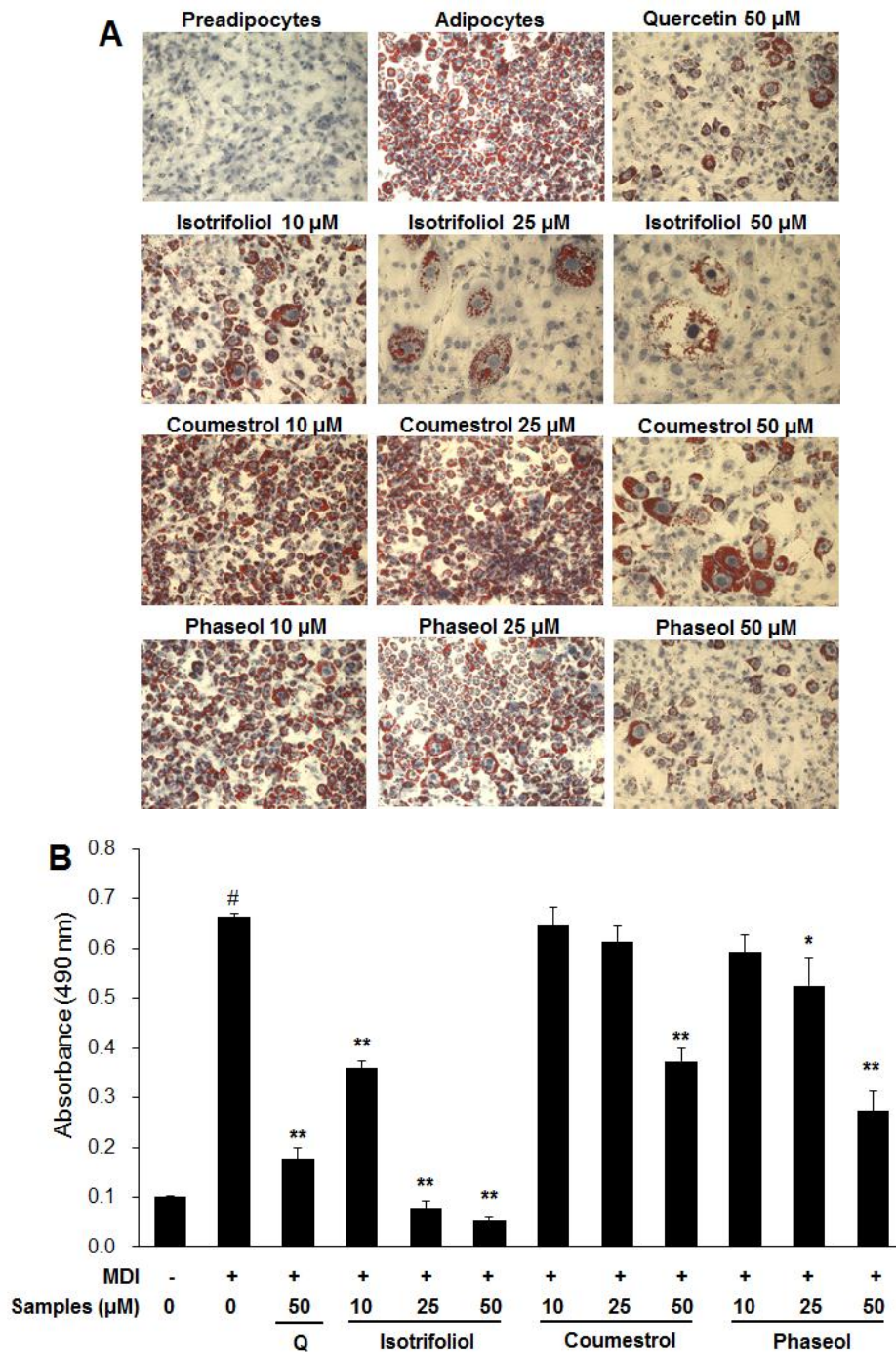


Fig. 57. Effects of coumestans on lipid accumulation in 3T3-L1 cells. Two day post-confluent 3T3-L1 preadipocytes (day 0) were treated with indicated concentration of compounds every other day for 4 days. Cells treated with 0.1% DMSO were used as controls (adipocytes). The assays were performed on fully differentiated adipocytes (day 8). Lipid accumulation in differentiated adipocyte was assessed by Oil Red O staining. The staining lipid droplets in the cells were dissolved in isopropanol and quantified by measuring the absorbance at 490 nm. Data are expressed as the means \pm SD. # P < 0.05 versus preadipocytes, * P < 0.05, ** P < 0.01 versus adipocytes. Q: quercetin.

(다) 코우메스탄 화합물의 3T3-L1 세포에서의 유전자 및 단백질 발현 조절 효능

앞서 3T3-L1 세포에서 가장 효과적인 adipogenesis 억제 효능을 나타내었던 isotrifoliol의 adipogenesis 관련 유전자 및 단백질 발현에 대한 조절작용을 측정하였다. 결과, adipogenesis를

일으키는 transcription factor 인 PPAR γ , SREBP-1, C/EBP α , C/EBP β 및 C/EBP δ 의 발현은 분화된 지방세포에서 지방전구세포에 비해 유의적으로 증가되는 반면, isotrifoliol의 처리로 PPAR γ , SREBP-1, C/EBP α , C/EBP β 및 C/EBP δ 의 발현이 유의적으로 억제되었다 (Fig. 58A). 이에 따른 transcription factor의 타겟 유전자인 aP2, FAS, DGAT1, DGAT2의 발현도 isotrifoliol의 처리에 의해 농도 의존적으로 그 발현이 감소되었다. 또한 isotrifoliol의 처리로 SREBP-1, PPAR γ , C/EBP α 의 단백질 발현이 효과적으로 감소되었다 (Fig. 58B).

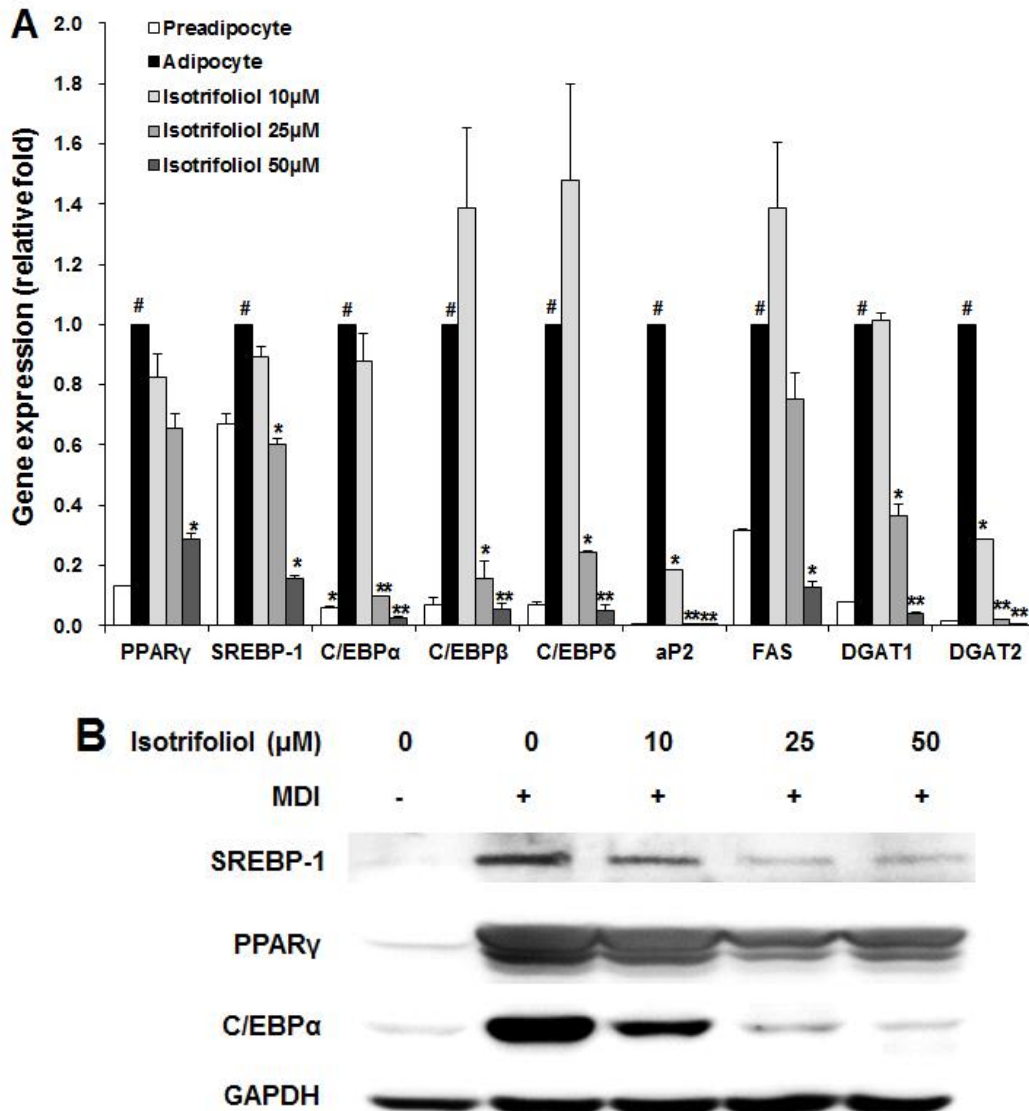


Fig. 58. Isotrifoliol regulated adipogenesis related gene and protein expression in 3T3-L1 cells. Two day post-confluent 3T3-L1 preadipocytes (day 0) were treated with indicated concentration of compounds every other day for 4 days. Cells treated with 0.1% DMSO were used as controls (adipocytes). After 4 day incubation, the cells were harvested. (A) The levels of mRNA were measured by real-time qRT-PCR and normalized to GAPDH. Values are represented the mean \pm SD of triplicated experiments. # P <0.05 versus preadipocytes, * P <0.05, ** P <0.01 versus adipocytes. (B) The protein expressions were detected by Western blot analysis. Cell lysates were prepared and subjected to Western blotting using their specific antibodies.

이와 동시에 지방세포 분화과정에 발현되는 ER stress 관련 유전자들의 발현을 측정해 본 결과, 분화된 adipocytes에서 preadipocytes에 비해 adaptive UPR 중 중요한 chaperone을 발현하는 Grp78과 Dnajc3의 유전자 발현이 감소되어 UPR의 homeostasis가 일어난 것을 확인하였으며, isotrifoliol을 전처리한 경우 이들 유전자의 발현이 농도 의존적으로 회복되었다. 또한 Xbp1s의 발현도 분화된 지방세포에서 현저하게 증가된 (세포의 분화과정 또는 지질축적 과정이 증가됨) 반면에, isotrifoliol을 전처리한 경우 Xbp1s의 발현이 농도 의존적으로 감소되었다 (Fig. 59). 그러나, 세포 사멸을 일으키는 Atf4는 지방세포 분화 과정에서 발현 변화를 나타내지는 않았다.

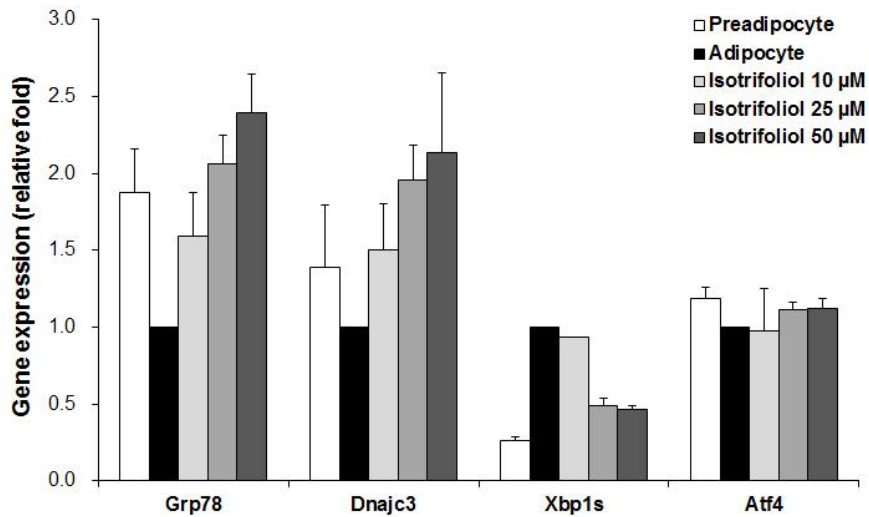


Fig. 59. Isotrifoliol regulated ER stress related gene expression in 3T3-L1 cells. Two day post-confluent 3T3-L1 preadipocytes (day 0) were treated with indicated concentration of compounds every other day for 4 days. Cells treated with 0.1% DMSO were used as controls (adipocytes). After 4 day incubation, the cells were harvested. The levels of mRNA were measured by real-time qRT-PCR and normalized to GAPDH. Values are represented the mean \pm SD of triplicated experiments.

이상의 결과로부터 콩잎 추출물에서 분리한 coumestan 화합물 특히 isotrifoliol은 3T3-L1 세포에서 강력한 adipogenesis 억제 효능을 나타내었고, 이는 adipogenesis를 조절하는 transcription factor인 SREBP-1, PPAR γ , C/EBP α 및 UPR 관련 유전자인 Grp78, Dnajc3, Xbp1s의 조절을 통해 이루어지는 것으로 판단된다.

(9) 화합물들의 RAW264.7 세포에서 항염증 효능

(가) 화합물들의 RAW264.7 세포에서 세포독성 평가

콩잎에서 분리한 배당체들의 RAW264.7 세포에서 항염증 효능을 확인하기 위해 세포독성을 측정하였다. 플라보놀배당체 모두 100 μ M까지 RAW264.7 세포에서 독성을 나타내지 않았지만, 반면에 이들의 aglycones인 kaempferol, quercetin, isorhamnetin, rhamnetin은 각각 100 μ M, 50 μ M, 50 μ M, 20 μ M에서 세포 독성을 나타내었다 (Fig. 60).

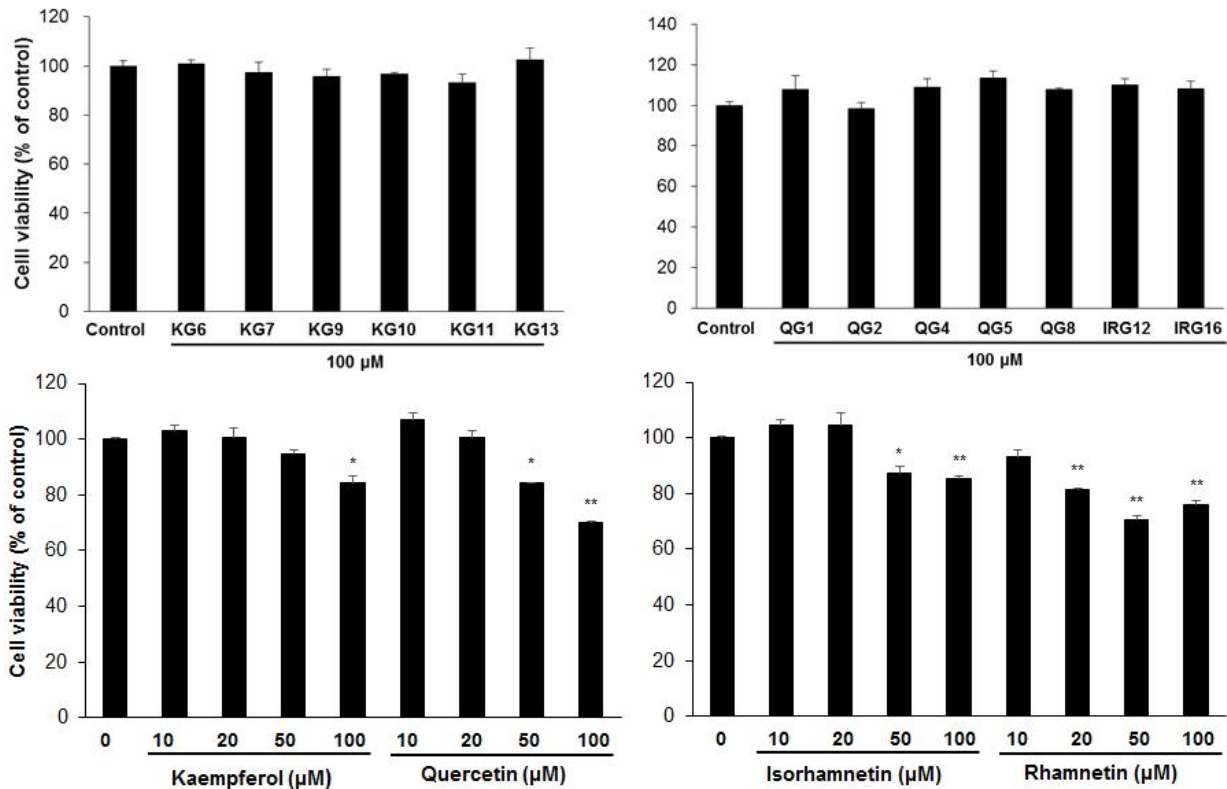


Fig. 60. Cell viability of KGs, QGs, IRG, kaempferol, quercetin, isorhamnetin, and rhamnetin in RAW264.7 cells. Cells were treated with the indicated concentration of compounds for 24 h. Cell viabilities were assessed using Cyto X™ cell viability assay kit (LPS solution, Korea). * p < 0.05, ** p < 0.01 versus control.

(나) 화합물들의 RAW264.7 세포에서 NO 생성 및 ROS 축적 저해 효과

세포독성 시험에 이어 콩잎 배당체들의 RAW264.7 세포에서 LPS로 유도한 NO 생성 및 ROS 축적에 대한 저해 효과를 측정하였다 (Table 63). Quercetin 배당체 중에 QG4, kaempferol 배당체 중에 KG6, isorhamnetin 배당체 중에 IRG12이 가장 효과적으로 NO 생성 및 ROS 축적을 억제하였다. 또한 플라보놀배당체에 비해 이들의 aglycone인 quercetin, kaempferol, isorhamnetin은 LPS로 유도된 NO 생성 및 ROS 축적 억제 활성이 더 우수하였다. 당뇨병 자체는 염증을 동반하는 질환으로 플라보놀배당체들의 항염증 효능은 염증 개선을 통한 인슐린 저항성 개선에도 효과적일 것으로 판단된다.

Table 63. Effects of soy leaf compounds on NO production and ROS accumulation in LPS-induced RAW264.7 cells

Samples	Inhibition at 100 μ M (%)	
	NO production	ROS accumulation
QG1	25.5 \pm 2.1	37.3 \pm 2.8
QG2	20.9 \pm 2.0	31.8 \pm 1.7
QG4	43.0 \pm 3.3	44.1 \pm 4.8
QG5	27.5 \pm 1.9	26.0 \pm 3.9
QG8	32.4 \pm 2.4	23.7 \pm 2.4
KG6	39.2 \pm 0.7	27.5 \pm 2.9
KG7	4.5 \pm 0.4	9.5 \pm 2.5
KG9	20.0 \pm 1.8	23.9 \pm 2.7
KG10	16.8 \pm 3.2	23.2 \pm 1.8
KG11	22.8 \pm 3.2	9.5 \pm 2.8
KG13	20.8 \pm 3.5	5.9 \pm 1.2
IRG12	47.1 \pm 4.7	58.8 \pm 0.9
IRG16	35.8 \pm 3.3	21.9 \pm 0.6
Quercetin(20 μ M)	51.1 \pm 1.1	65.7 \pm 3.5
Kaempferol (50 μ M)	58.8 \pm 0.0	100
Isorhamnetin (20 μ M)	52.2 \pm 1.9	100
Rhamnetin (10 μ M)	78.4 \pm 1.2	100

Values are presented as mean \pm SD (n = 3).

아. 배당체 고함유 콩잎추출물의 지방흡수 저해, 당부하 내당능 및 인슐린 저항성에 대한 효능 검증

(1) 콩잎 추출물의 지방 흡수 (lipid absorption) 저해 효능

C57BL/6J 웅성 마우스를 대조군, 70ESL군, Xenical군의 세 그룹으로 나누고 18시간 동안 절식시켰다. ESL군은 500 mg/kg body wt, Xenical군은 50 mg/kg body wt으로 경구 투여하고 30분 뒤 corn oil (C8267, Sigma) 250 μ l을 경구 투여하여 지질 흡수를 유도하였다. 이로부터 각각 0, 1, 2, 4 시간 후에 후안와 정맥총에서 혈액을 채취하여 혈장 TG를 측정하였다. 70ESL군이 대조군에 비해 corn oil을 투여하고 1 시간 후에 혈액속의 중성지방 농도를 유의적으로 16.3% 감소시켰다 (Fig. 62). 양성대조군인 Xenical은 콩잎추출물과 달리 corn oil을 투여하고 1 시간 후에 혈액속의 중성지방 농도가 대조군보다 11.1% 상승하였다가 2 시간 이후에는 대조군에 비해 다소 낮았다. 따라서 본 실험을 통해 70ESL이 본 실험 조건에서 Xenical보다 더 효과적으로 중성지방 흡수를 억제하였다 (Fig. 61).

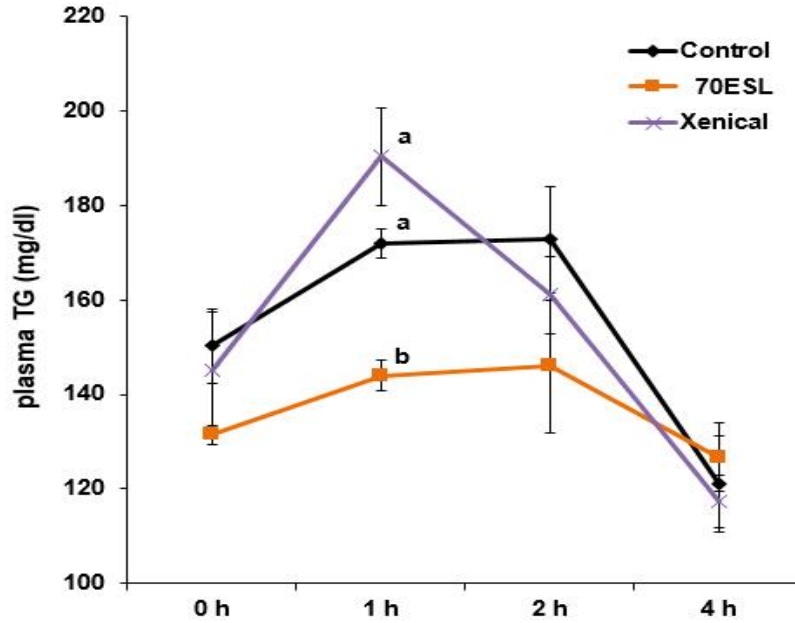


Fig. 61. Effects of 70ESL and Xenical on lipid absorption in C57BL/6J mice. Eight-week old C57BL/6J male mice were pretreated with 70ESL (500 mg/kg body weight) or Xenical (50 mg/kg body weight, n = 5) and then administered orally an corn oil (C8267, Sigma) 250 μ l. Values were represented the means \pm S.E. ^{a,b}Means not sharing a common letter are significantly different between groups ($P < 0.05$).

(2) 콩잎 추출물의 당부하 내당능 (glucose tolerance) 효능

C57BL/6J 4 주령 웅성 마우스를 3 주일간 실험환경에 적응시킨 후 대조군, 70ESL, 70EBL의 3군으로 나누었다 (n = 5). 대조군과 실험군 모두 실험 기간 동안 고지방식이를 섭취하였다. 대조군은 vehicle만을 경구 투여하였고, 70ESL군과 70EBL군에는 500 mg/kg body wt으로 시료를 17 일 동안 (하루 1회) 경구 투여하였다. 당부하 내당능을 측정하기 전 16 시간 동안 절식시킨 후, glucose (G7021, Sigma)를 2 g/kg body wt으로 구강 투여 후 0, 15, 30, 60, 90 분 및 120 분 후에 마우스 꼬리에서 채혈하여 glucometer를 이용하여 혈당을 측정하였다.

Glucose의 투여 후 대조군, 70ESL군 및 70EBL군 모두 혈당 농도는 급격히 증가되어 15 분 뒤의 혈당 농도가 0 분 혈당 농도에 비해 3.0배 증가되었고, 이후 대조군과 70EBL군은 30 분 뒤까지 혈당 농도가 증가되었다. 반면, 70ESL군은, 30 분 뒤에 대조군에 비하여 유의적으로 13.9% 낮은 혈당 수치를 보였다. 이후 모든 군에서 혈당 농도는 120 분까지 지속적으로 감소되었다. 이 과정에서 70ESL군과 70EBL군은 60 분 뒤 혈당 농도에서 대조군에 비해 각각 17.1%, 14.9%로 유의적인 저하를 보였다. 70ESL군은 glucose 구강 투여 90 분 뒤까지 혈당 농도가 대조군과 지속적으로 유의적인 차이를 보였다. 120 분 뒤 혈당 농도는 70ESL군과 70EBL군 모두 대조군과 같은 수준으로 감소되었다 (Fig. 62).

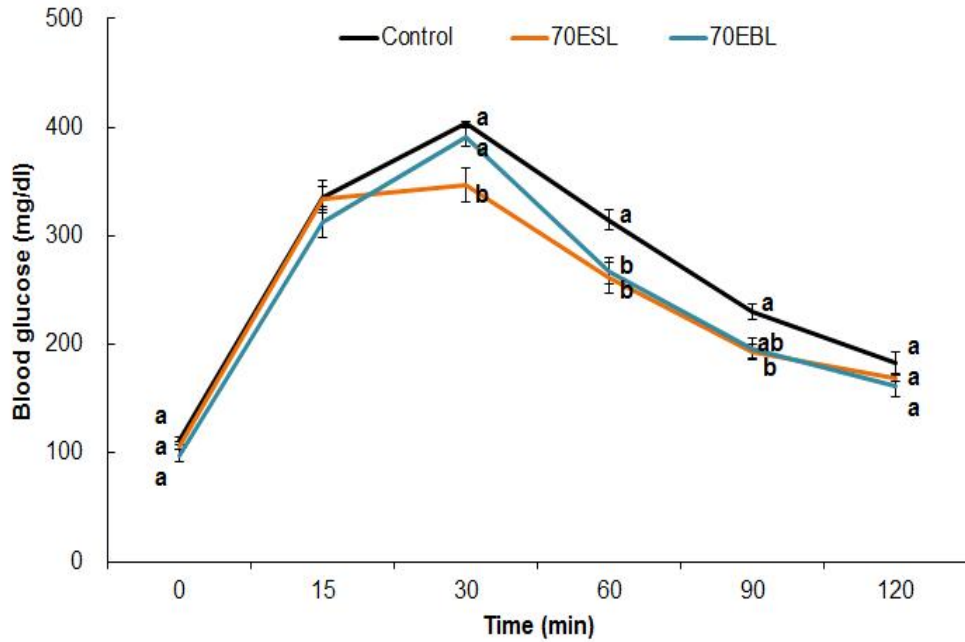


Fig. 62. Glucose tolerance test by 70ESL and 70EBL. 15-week old male C57BL/6J Mice were orally supplemented 500 mg/kg bw·day of 70ESL, 500 mg/kg bw·day of 70EBL for 10 days. After fasted overnight for 16 h, orally administered with glucose (G7021, Sigma) at a dose of 2 mg/g body weight. Venous plasma glucose was checked 0, 15, 30, 60, 90, and 120 min after the glucose injection. Data are expressed as the means \pm SE. ^{a,b} Means not sharing a common letter are significantly different between groups ($P < 0.05$).

(3) 콩잎 추출물의 인슐린 저항성 (insulin tolerance) 개선 효능

C57BL/6J 4주령 음성 마우스를 2주일간 실험환경에 적응시킨 후 대조군, 70ESL 및 70EBL의 3군으로 나누었다 (n = 5). 대조군과 실험군 모두 실험 기간 동안 고지방식이를 섭취하였다. 대조군은 vehicle만을 경구 투여하였고, 70ESL군과 70EBL군에는 500 mg/kg body wt으로 시료를 24일 동안 (하루 1회) 경구 투여하였다. 인슐린 저항성을 측정하기 전 12 시간 동안 절식시킨 후, insulin (I2643, Sigma) 0.5 U/kg body wt을 복강 투여 후 0, 30, 60, 90, 120 분 및 150 분에 마우스 꼬리에서 채혈하여 glucometer를 이용하여 혈당을 측정하였다.

고지방식이만을 섭취한 대조군은 절식 후 가장 높은 혈당 수치를 나타냈다. 이에 반해 70ESL군은 대조군에 비해 유의적으로 34.3% 낮은 혈당 수치를 보였으며, insulin 투여 후 모든 시간에서 대조군에 비해서 유의적으로 낮은 혈당 농도를 나타냈다. 또한 절식 후 0 분 혈당 수치를 기준으로 하여 분석한 결과, 60 분 뒤 70ESL군의 혈당 농도가 대조군에 비해서 26.6% ($P < 0.05$) 감소된 것을 확인하였다. 70EBL군은 70ESL군과 같은 정도의 강한 인슐린 개선 효능을 나타내지는 않으나, 60 분 뒤 70EBL군의 혈당 농도가 대조군에 비해서 13.9% 감소된 것을 확인하였다 (Fig. 63).

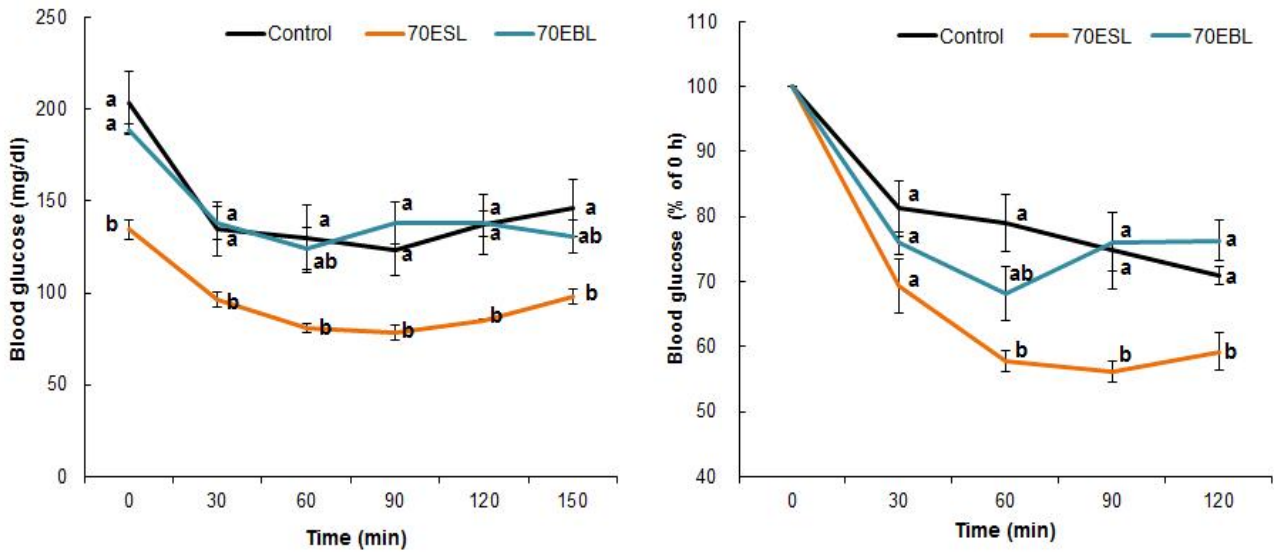


Fig. 63. Insulin tolerance test 70ESL and 70EBL. 16-week old male C57BL/6J Mice were orally supplemented 500 mg/kg body wt·day of 70ESL, 500 mg/kg body wt·day of 70EBL for 10 days. After fasted overnight for 12 h, intraperitoneally administered with insulin (I2643, Sigma) at a dose of 0.5 U/kg body wt. Venous plasma glucose was checked 0, 30, 60, 90, 120, and 150 min after the insulin injection. Data are expressed as the means \pm SE. ^{a,b} Means not sharing a common letter are significantly different between groups ($P < 0.05$).

자. 배당체 고함유 콩잎추출물의 *in vivo* 동물실험을 통한 혈당강하 효능 실험

(1) 배당체 고함유 콩잎추출물의 제조 및 지표물질 함량 분석

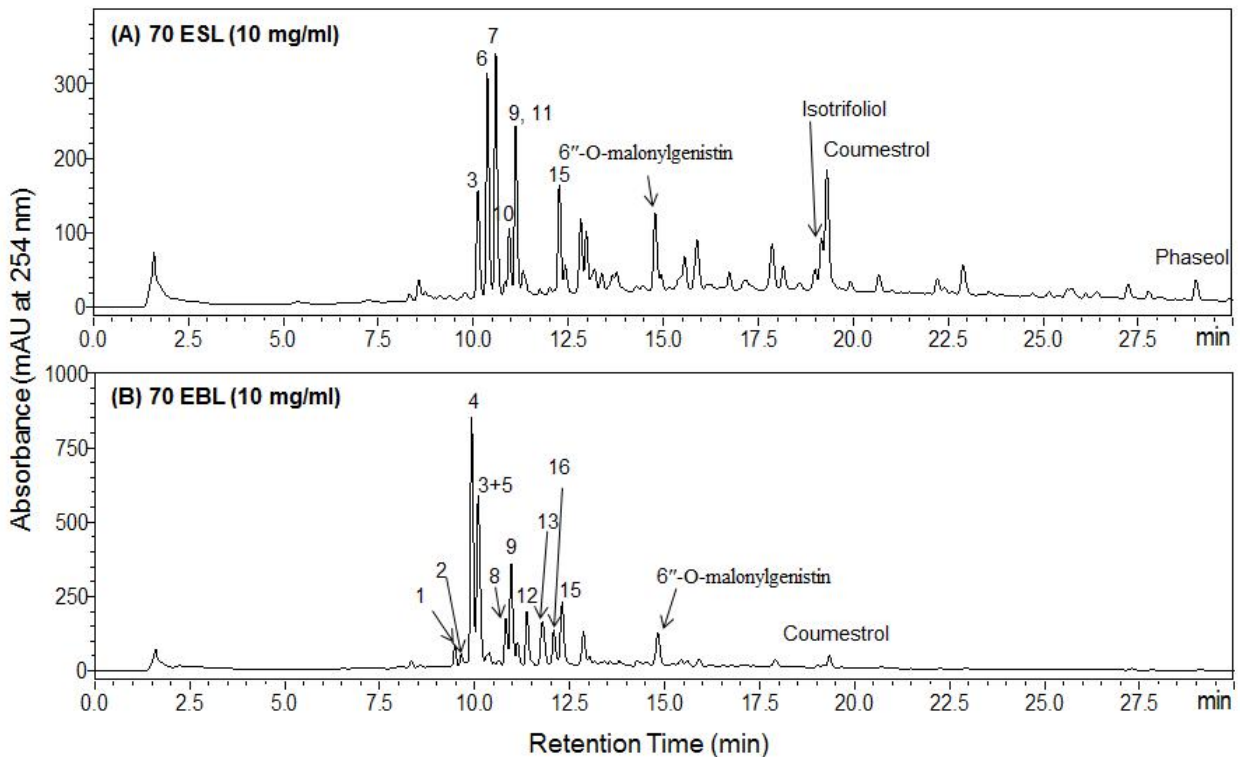


Fig. 64. HPLC profiles of 70ESL and 70EBL for *in vivo* animal experiment at 254 nm.

건조된 대두콩잎과 검정콩잎을 분쇄하여 각각 150 g과 200 g을 준비하고, 각각 1.5 L와 2.0 L의 70% EtOH을 첨가하고 실온에서 48 시간 진탕하면서 추출하였다. 추출물을 여과하여 감압하에 농축하였다. 70ESL의 회수율은 20.5 ± 0.5%이었고, 70EBL의 회수율은 26.5 ± 0.1%이였으며, 앞서 설명한 것처럼 HPLC profile을 통해 70ESL은 kaempferol 배당체가 많이 함유되어 있으며, 70EBL은 quercetin 배당체와 isorhamnetin 배당체가 많이 함유되어 있음을 알 수 있었다 (Fig. 65). 확립된 지표물질 분석 방법으로 HPLC를 이용하여 70ESL과 70EBL의 지표물질을 측정 한 결과, 70ESL에는 KG7이 20.4 mg/g extract로 함유되어 있었고, 70EBL에는 QG5가 23.3 mg/g extract로 함유되어 있었다.

(2) 체중 및 장기 무게 변화

실험 방법에서 설명한 바와 같이 C57BL/6J (의생명마우스, 오창) 4 주령 웅성 마우스를 3 주간 정상식이 (2018S, powder type, Harlan Laboratories, Inc.) 분말사료와 물을 자유롭게 공급하면서 순화시킨 후, 건강상태가 양호한 7 주령의 마우스를 실험에 사용하였다. 실험군은 ND군, 고지방식이 대조군 (HFD), 대두콩잎 70% EtOH 추출물군 (70ESL), 검정콩(서리태)잎 70% EtOH 추출물군 (70EBL), Pinitol군 (Pinitol, 양성대조군)의 5 군으로 나누어 12 주간 실험을 진행하였다 (Table 64).

Table 64. Experimental design of the anti-diabetic effects of 70ESL and 70EBL

Groups	n	Dose of samples in diet (wt %/wt diet)
ND ¹	10	Normal diet ¹ only
HFD ²	10	High fat diet ² (HFD) only
70ESL	10	HFD + 1% ESL (70% EtOH extracts of soy leaf)
70EBL	10	HFD + 1% EBL (70% EtOH extracts of soy leaf)
Pinitol	10	HFD + 0.15% Pinitol (CnF Co.)

¹ Rodent Diet with 10% kcal fat (#D12450J, powder type, Research Diets, Inc. New Brunswick, USA);

² Rodent Diet with 60% kcal fat (#D12492, powder type, Research Diets, Inc. New Brunswick, USA).

C57BL/6J mice 를 이용하여 건조분말 콩잎의 70ESL과 70EBL을 섭취시킨 혈당조절 및 비만 예방 실험에서 12 주간의 체중 변화를 관찰하였다. 0 주차의 C57BL/6J mice의 체중은 평균 24.4 g 이었고, 12주 동안 식이만을 섭취한 정상마우스인 ND군의 체중은 36.2 ± 1.2 g으로 12.5 ± 1.1 이 증가하였고, 고지방 식이를 섭취한 HFD군 12 주 후에 23.6 ± 0.5 g으로 ND 군에 비해 2배 가량의 높은 체중 증가를 보였다. 이에 비해 70ESL군과 70EBL군의 체중 증가량은 각각 17.5 ± 1.3 g과 19.4 ± 1.3 g으로 HFD군과 비교하여 체중 증가율이 각각 25.8% ($P < 0.05$)와 17.8% 씩 낮았다 (Table 65).

부검 시 복부지방 (abdominal fat), 간 (liver), 췌장 (pancreas), 근육 (muscle) 등 여러 장기의 무게를 측정하였다 (Fig. 65).

HFD군의 지방조직 무게는 ND군에 비해 현저히 증가되었다 ($P < 0.05$). 70ESL군과 70EBL군, Pinitol군의 지방조직 무게는 HFD군에 비해 감소하는 경향을 보였다.

HFD군의 간조직의 중량은 ND군에 비해 현저히 증가되었다. 70ESL군과 70EBL군에서 간조직의 중량의 무게가 각각 19.9%, 28.2% 유의적으로 감소하였다. Pinitol군에서도 유의적으로 간 조직의 중량이 감소되었다.

HFD군, 70ESL군, 70EBL군, Pinitol군 간의 췌장과 근육 조직의 중량에 유의적인 차이는 없었다.

Table 65. The effect of the supplementation of 70ESL and 70EBL on body weight gain and organ weight in C57BL/6J mice

	ND	HFD	70ESL	70EBL	Pinitol
Body weight (g)					
Initial	23.8 ± 0.4 ^a	24.5 ± 0.4 ^a	25.2 ± 0.4 ^a	24.4 ± 0.3 ^a	24.1 ± 0.4 ^a
Final	36.2 ± 1.2 ^c	48.7 ± 0.7 ^a	42.4 ± 1.0 ^b	43.6 ± 1.2 ^b	41.3 ± 1.3 ^b
Weight gain (g/12 week)	12.5 ± 1.1 ^c	23.6 ± 0.5 ^a	17.5 ± 1.3 ^b	19.4 ± 1.3 ^{ab}	16.7 ± 1.2 ^{bc}
Organ weight (g)					
Abdominal adipose tissue	0.60 ± 0.06 ^b	1.06 ± 0.07 ^a	0.96 ± 0.08 ^a	0.98 ± 0.10 ^a	0.57 ± 0.06 ^b
Pancreas	0.19 ± 0.01 ^b	0.23 ± 0.03 ^{ab}	0.25 ± 0.01 ^a	0.21 ± 0.01 ^{ab}	0.20 ± 0.01 ^b
Liver	1.29 ± 0.05 ^b	1.56 ± 0.10 ^a	1.25 ± 0.12 ^b	1.12 ± 0.04 ^b	1.14 ± 0.02 ^b
Muscle	0.29 ± 0.01 ^b	0.32 ± 0.01 ^{ab}	0.35 ± 0.01 ^a	0.34 ± 0.00 ^a	0.34 ± 0.01 ^a

Values are presented as mean ± SE, n=10. ^{a,b,c}Means in the same row not sharing a common letter superscript are significantly different ($P < 0.05$) between groups

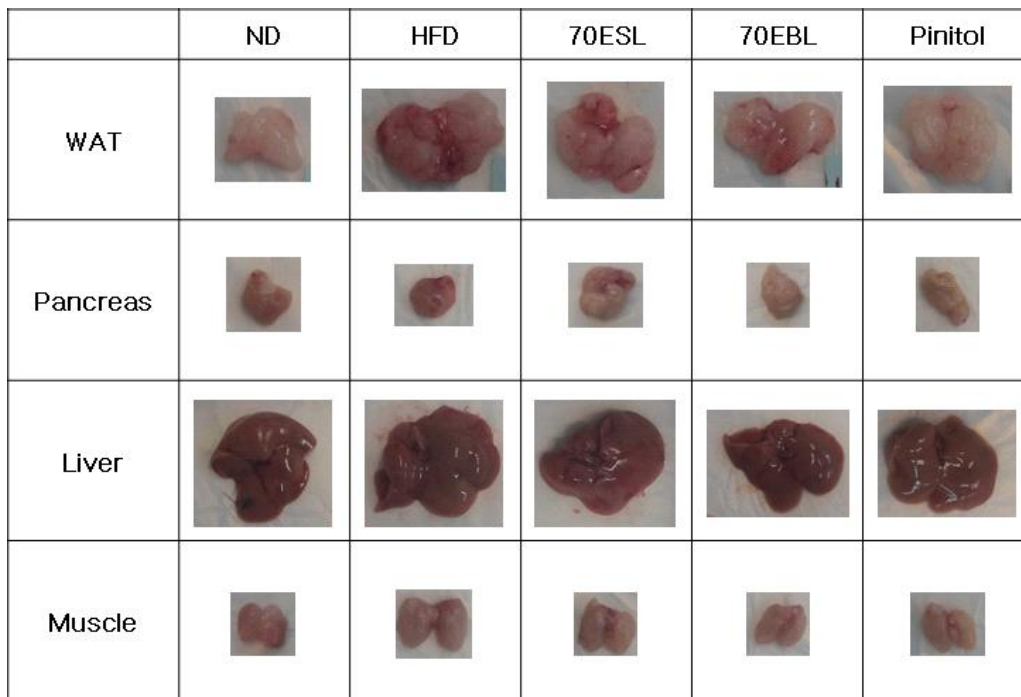


Fig. 65. Representative photographs of WAT, pancreas, liver, and muscle from each group.

(3) 혈액, 췌장, 간, 소장, 지방 조직의 바이오마커 분석

(가) 혈액의 지질 생화학적 분석

C57BL/6J mice를 이용한 항당뇨 동물 실험의 종료 시점에서 절식 후 채혈하여 분리한 혈장으로부터 지질조성 지표인 glucose, 당화혈색소, 인슐린, 유리지방산 (nonesterified fatty acid, NEFA), 그리고 지질조성 지표인 혈장 중성지방 (TG), 총콜레스테롤 (TC), HDL-콜레스테롤 (HDL-C), 간 기능의 지표인 GOT와 GPT 농도를 측정하였고, 그 결과를 종합하여 표 66에 표시하였다.

Table 66. Effects of the supplementation of 70ESL and 70EBL on plasma parameters in C57BL/6J mice on 12-week

	ND	HFD	70ESL	70EBL	Pinitol
Non fasting glucose (mg/dl)	177.4 ± 10.3 ^b	216.3 ± 13.5 ^a	164.1 ± 4.5^{bc}	139.7 ± 3.3^c	150.1 ± 7.4 ^{bc}
Glucose (mg/dl)	106.0 ± 3.4 ^b	143.7 ± 4.6 ^a	138.6 ± 8.6 ^a	135.7 ± 9.7 ^a	123.6 ± 5.4 ^{ab}
HbA1c (%)	4.4 ± 0.0 ^b	4.6 ± 0.1 ^a	4.4 ± 0.1^b	4.2 ± 0.0^b	4.4 ± 0.1 ^b
Insulin (ng/ml)	0.3 ± 0.0 ^c	3.4 ± 0.3 ^a	1.4 ± 0.3^b	0.9 ± 0.2^{bc}	0.5 ± 0.2 ^{bc}
HOMA-IR	1.8 ± 0.4 ^c	28.6 ± 3.4 ^a	11.4 ± 2.6^b	6.8 ± 1.6^{bc}	4.1 ± 1.8 ^{bc}
TC (mg/dl)	103.2 ± 1.6 ^b	165.5 ± 6.6 ^a	124.7 ± 8.5^{ab}	151.8 ± 14.2 ^a	126.6 ± 13.7 ^{ab}
TG (mg/dl)	139.8 ± 10.5 ^a	88.2 ± 5.7 ^b	59.3 ± 6.2^c	59.2 ± 3.0^c	51.5 ± 5.2 ^c
NEFA (mEq/L)	2.3 ± 0.1 ^a	1.9 ± 0.1 ^b	1.5 ± 0.0^c	1.4 ± 0.1^c	1.7 ± 0.1 ^{bc}
GOT (IU/L)	56.2 ± 1.3 ^{bc}	69.8 ± 2.7 ^a	54.6 ± 3.2^{bc}	62.9 ± 2.3 ^{ab}	48.7 ± 2.7 ^c
GPT (IU/L)	16.6 ± 1.7 ^b	28.2 ± 2.1 ^a	15.3 ± 2.3^{bc}	8.0 ± 1.6^c	8.1 ± 2.1 ^c

Values are presented as mean ± SE, n=10. ^{a,b,c}Means in the same row not sharing a common letter superscript are significantly different ($P < 0.05$) between groups.

HFD대조군은 ND군에 비해 유의적인 수준으로 plasma profile (non fasting glucose, glucose, HbA1c, Insulin, TC)이 증가하였다. 반면에 70ESL군과 70EBL군에서는 12 주 동안 시료 투여에 의해 당뇨질환모델 마우스에서 혈당조절이 일어나는 것을 확인하였다.

70ESL군, 70EBL군의 절식 후 glucose 농도는 유의적이지 않지만 HFD대조군보다 각각 3.5%, 5.6%씩 감소되었고, 절식 전 혈당 농도는 절식 후 혈당 농도와 같은 경향으로 유의적인 수준으로 감소하였다. 절식 전, 즉 식사 후 혈당 농도는 본 실험에 사용한 70ESL과 70EBL 식이가 고지방식으로 인한 혈당 상승을 충분히 조절해주었는지를 확인하기 위한 지표로서 활용되었다.

혈장 인슐린 농도는 HFD대조군에 비해 70ESL군, 70EBL군에서 유의적으로 감소되었으며, 특히 70EBL군의 경우 ND군과 비슷한 수준까지 감소하였다. 이러한 혈액 분석 결과를 바탕으로 인슐린 감수성 지표인 HOMA-IR을 계산한 결과, 70ESL과 70EBL이 대조군과 유의적인 차이를 보이면서 감소하였다.

또한 인슐린 저항성을 발생시키는 NEFA의 농도도 70ESL군과 70EBL군에서 유의적으로 감소되었다. 이를 통해 70ESL과 70EBL 식이 모두 인슐린 감수성을 향상시켜주며, 이러한 결과와 상응하게 당화혈색소 (HbA1c) 농도는 70ESL군과 70EBL군 모두 유의적으로 각각 4.3%, 8.7% 감소되었으며, 특히 70EBL군이 모든 당뇨 지표에서 70ESL군에 비하여 더 강한 혈당 조절 효과를 보였다.

지질조성 지표인 TC는 유의적이지는 않으나, 두 실험군에서 TC 농도가 감소하는 경향을 보였으며, TG의 경우에는, 두 실험군에서 HFD대조군에 비해 각각 32.8%, 32.9%씩 유의적으로 감소하였다. HFD대조군에 비해 70ESL군의 간 기능의 지표인 GOT 농도와 GPT 농도는 유의적으로 감소하였으며, 70EBL군에서는 GPT 농도만 유의적으로 감소하였다 (Table 66).

(나) 혈장의 glucagon-like peptide-1 (GLP-1) 측정

GLP-1은 장의 L 세포에서 장관 내 영양분 또는 혈당 농도에 자극을 받아 분비되는 호르몬으로서 췌장 베타세포에서 인슐린 분비를 자극하고, 포도당 농도에 영향을 받아 인슐린 분비를 강화하는 성질을 가지고 있어 저혈당이 발생하지 않도록 한다. 또한 GLP-1은 베타세포의 세포사멸을 억제시켜 베타세포의 증식과 분화를 증진시키므로 당뇨병 치료의 target으로 각광받고 있다 (Moritoh *et al.*, 2010). 혈장 내의 GLP-1 수준을 측정해 본 결과, HFD군에 비해 70ESL군에서 유의적으로 총GLP-1 및 활성화된 GLP-1의 농도가 증가하였다. 70EBL군도 HFD군에 비해 총GLP-1의 농도는 유의적으로 증가하였고, 활성화된 GLP-1의 농도는 HFD군에 비해 증가하였으나 유의성은 나타나지 않았다 (Fig. 66). 즉, 70ESL이 70EBL에 비해 보다 효과적으로 장내 GLP-1의 활성을 향상시킴으로써 인슐린 분비 증가 및 베타세포의 증식과 분화를 증진시켜서 항당뇨 효과를 나타낼 것으로 기대된다. 반면에 Pinitol은 GLP-1의 농도 및 활성화에 영향을 미치지 않았다.

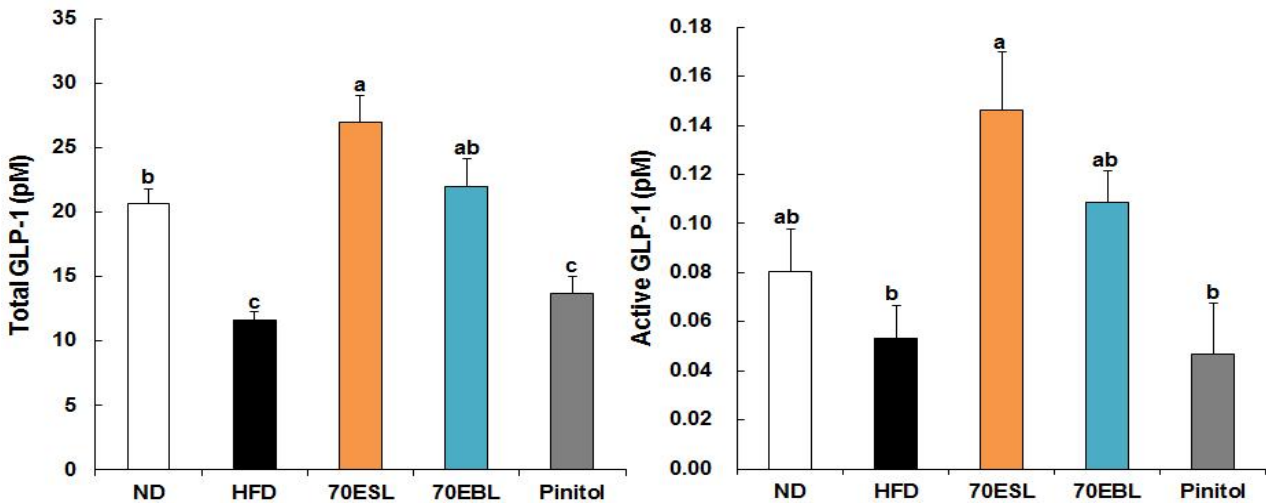


Fig. 66. Effects of 70ESL and 70EBL on plasma total GLP-1 and active GLP-1 level in HFD-fed C57BL/6J mice. Values are presented as mean \pm SE, n = 10. ^{a,b,c} Means not sharing a common letter are significantly different between groups ($P < 0.05$).

(다) 혈장의 adiponectin 측정

Adiponectin은 지방 세포에서 분비되는 대표적인 호르몬이다. 체내 다른 기관의 인슐린 민감성을 높여주고, 죽상경화증 및 염증 반응을 억제한다. 혈액을 순환하는 adiponectin 은

간이나 근육에서 지방산 및 탄수화물의 대사에 큰 영향을 미친다. 특히, 간세포에서 지방산 합성과 포도당 신생합성을 저해하고, 근육과 간으로의 포도당 유입과 이화작용을 자극한다. 본 실험에서 혈장의 adiponectin 함량을 측정된 결과, HFD군에 비해 70ESL군과 70EBL군 모두 adiponectin 함량이 증가되었고, 70EBL군에서 보다 유의적인 결과를 나타내었다 (Fig. 67). 또한 Pinitol군의 adiponectin 함량도 유의적으로 증가되었다.

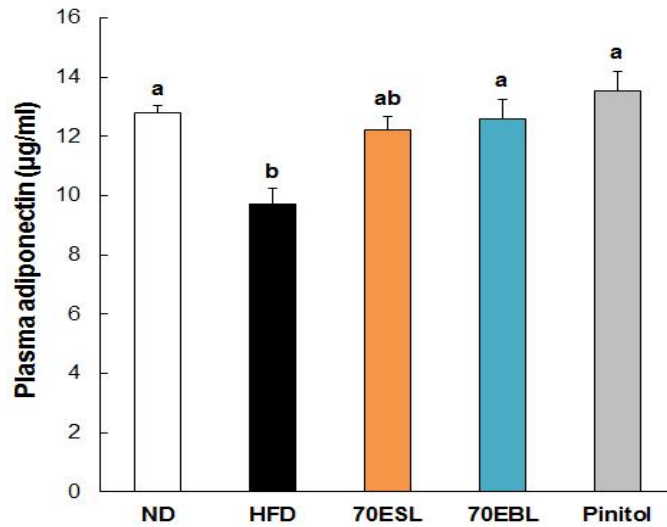


Fig. 67. Effects of 70ESL and 70EBL on plasma adiponectin level in HFD-fed C57BL/6J mice. Values are presented as mean \pm SE, n = 10. ^{a,b,c} Means not sharing a common letter are significantly different between groups ($P < 0.05$).

(라) 간의 glycogen 함량 측정

체내 당이 많이 존재 할 경우, 인슐린이 여분의 당을 저장형태인 glycogen의 형태로 전환하여 체내의 당 항상성을 조절한다. ND군에 비해 HFD군에서 glycogen의 함량이 월등히 증가하였으며 ($P < 0.05$), 70ESL과 70EBL의 투여로 간의 glycogen의 함량이 유의적으로 낮아졌다 (Fig. 68). 즉, 70ESL과 70EBL을 고지방식사와 함께 섭취시킴으로써 당의 대사 조절이 개선되었음을 알 수 있다.

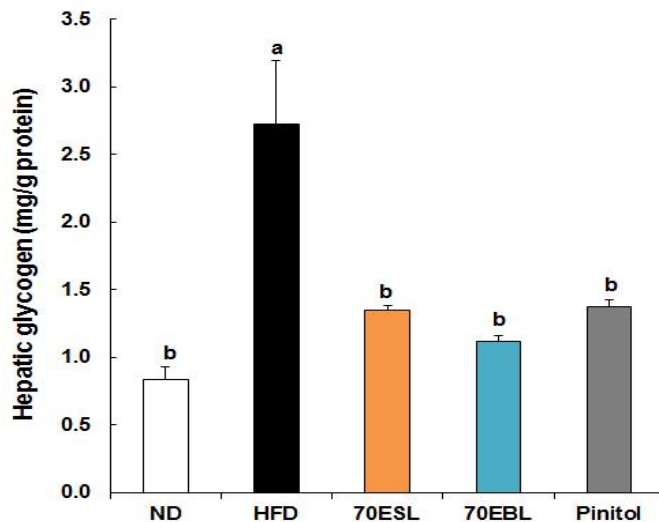


Fig. 68. Hepatic glycogen content in HFD-fed C57BL/6J mice. Vs are presented as mean \pm SE, n = 10. ^{a,b} Means not sharing a common letter are significantly different between groupalues ($P < 0.05$).

(마) 간 조직의 TG 및 TC 함량 측정

간 조직에서의 지방축적은 비만 및 대사증후군과 밀접하게 관련되어 있다. 앞서 70ESL군과 70EBL군에서 HFD군에 비해 간의 중량이 유의적으로 감소된 결과를 관찰하였다 (Table 76). 따라서 간의 중량에 영향을 미치는 총콜레스테롤 (TC) 및 중성지방 (TG)의 함량을 측정하였다. HFD군에 비해 70ESL군과 70EBL군에서 유의적으로 간의 TC 함량이 감소되었다. 또한 70EBL군에서 간의 TG 함량이 HFD군에 비해 50% 이상 현저하게 감소되었다 ($P < 0.05$) (Fig. 69). 이러한 결과는 아래 설명한 간의 형태학적 분석과도 일치한다 (Fig. 70 참조). 즉, 70EBL은 간에서의 지질 대사에 작용을 함으로써 항당뇨 뿐만 아니라 항비만 효과를 나타낼 것으로 기대된다.

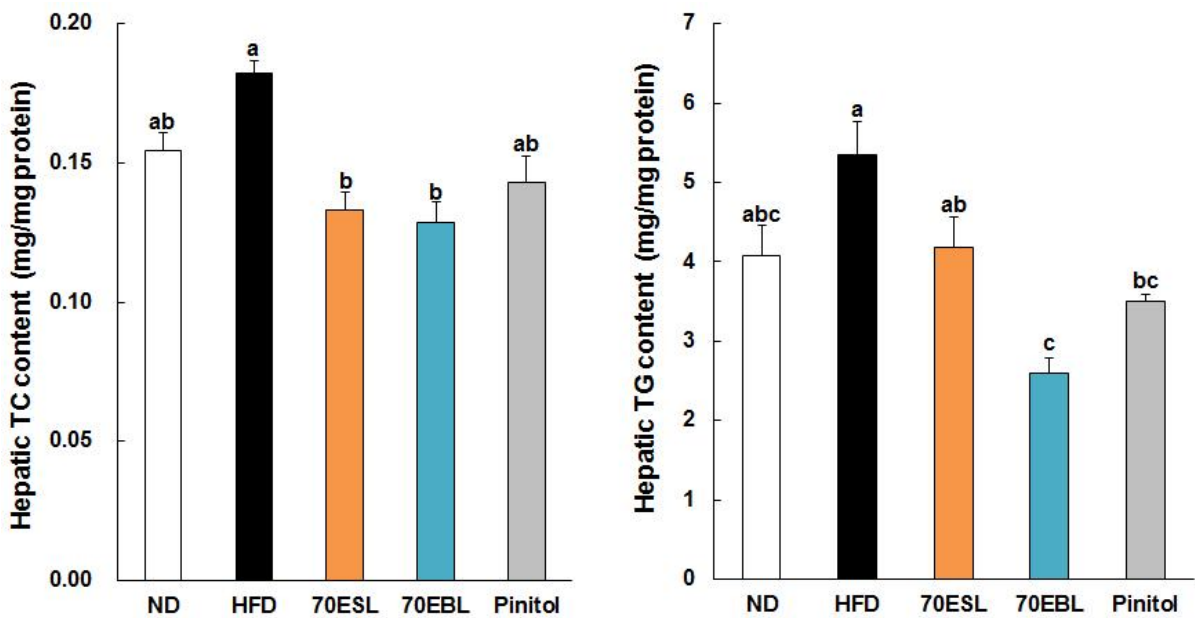


Fig. 69. Effects of the supplementation of 70ESL and 70EBL on hepatic TC and TG contents in HFD-fed C57BL/6J mice. Values are presented as mean \pm SE, n = 10. ^{a,b,c} Means not sharing a common letter are significantly different between groups ($P < 0.05$).

(4) 조직의 형태학적 분석

(가) 간 조직의 형태학적 분석

간 조직의 H&E 염색을 통한 형태학적 관찰에서 ND군에 비해 HFD군에서 지방간의 양상이 관찰되었다. 이에 비해 12주 동안 고지방식이와 함께 70ESL, 70EBL 또는 Pinitol을 투여한 군에서는 HFD군에 비해 지방축적이 효과적으로 억제된 것을 확인하였다 (Fig. 70). 이러한 결과는 앞서 그림 69에서 HFD군에 비해 70ESL군과 70EBL군에서 간의 TC와 TG 함량이 감소한 결과와 상응한다.

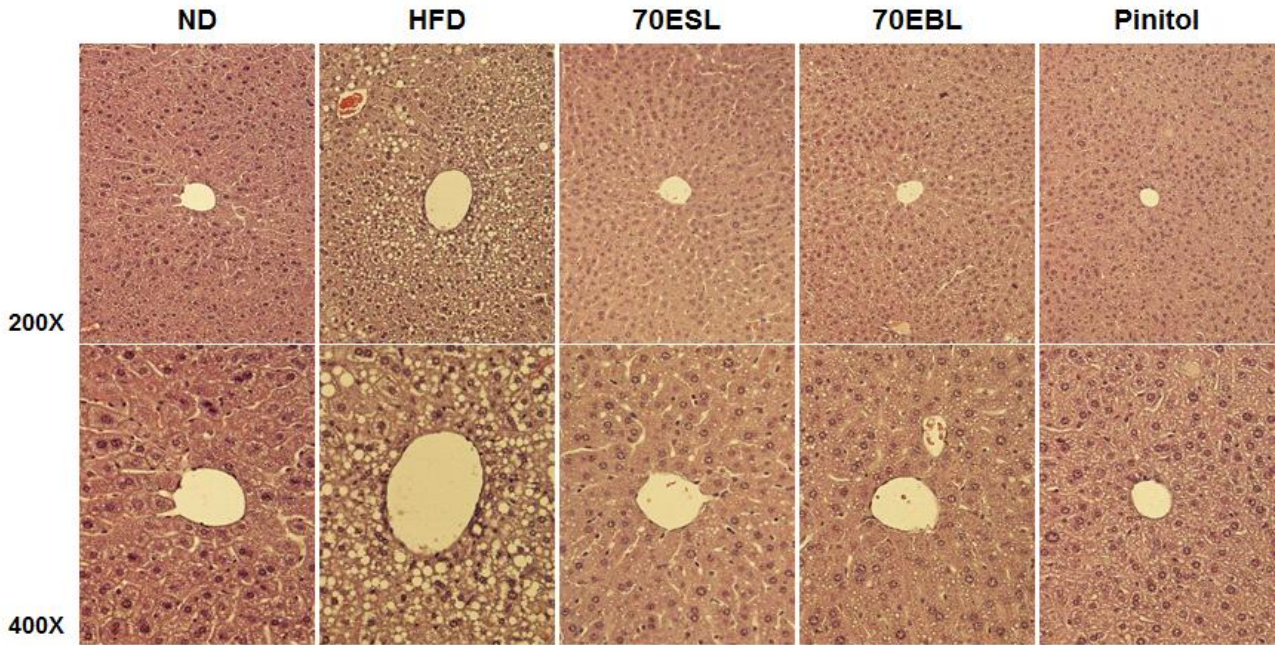


Fig. 70. Histologic analysis of the liver with hematoxylin and eosin (H&E) in HFD-fed C57BL/6J mice. Liver were fixed overnight in 10% formalin, embedded in paraffin, and 5 μ m thick sections were mounted on slides and stained with H&E. Original magnification: 200x and 400x.

(나) 췌장 조직의 형태학적 분석 및 인슐린 함량 측정

일반적으로 비만인 개체에서 췌장조직의 islet 크기 및 수량은 베타세포의 비대와 증식에 따라 증가된다 (Slavin *et al.*, 2010). 본 실험에서 비만을 동반한 당뇨 마우스의 췌장조직 내 islet 크기 및 베타세포의 수량을 확인하기 위해 췌장 조직의 H&E 염색을 진행하였고, Metamorph imaging 프로그램을 이용하여 islet 크기를 측정하였다 (Fig. 71).

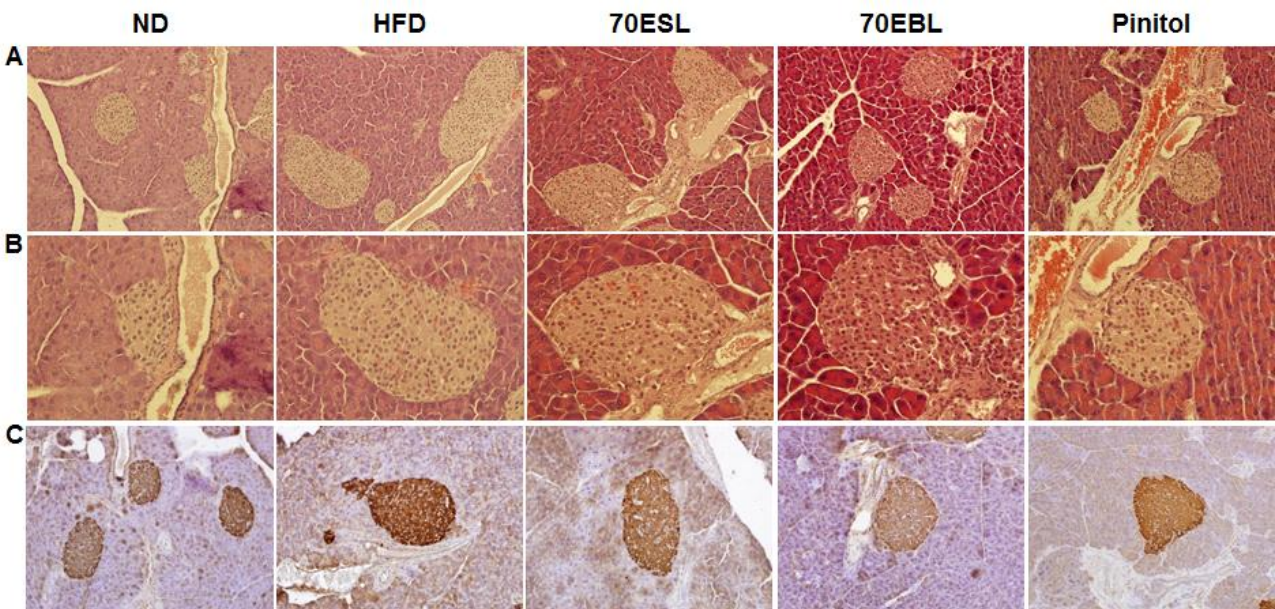


Fig. 71. Histologic analysis of the pancreas with H&E (A and B) and insulin IHC (C) staining in HFD-fed C57BL/6J mice. Pancreas were fixed overnight in 10% formalin, embedded in paraffin, and 5 μ m thick sections were mounted on slides. Original magnification (A, C) 200x and (B) 400x.

그 결과, 고지방식이에 의해 비만이 유도된 HFD군의 islet 크기가 2 배 이상 현저하게 증가되었고, 이에 비해 70ESL군과 70EBL군의 islet 크기는 HFD군에 비해 유의적으로 작아졌으며, 70ESL에 비해 70EBL이 보다 효과적이었다 (Fig. 71A and B).

더 나아가 islet 베타세포에서 분비되는 인슐린의 발현량을 비교하기 위해 인슐린 면역 염색 (Fig. 71C)과 분비된 인슐린 함량 측정 (Fig. 71B)을 수행하였다. ND군에 비해 HFD군의 인슐린 발현이 2.6 배 증가한 반면, 70ESL군과 70EBL군의 인슐린 발현은 HFD군에 비해 감소되었고 (Fig. 71C), 70ESL군과 70EBL군에서 췌장조직의 인슐린 함량은 HFD군에 비해 감소된 인슐린의 발현량 및 islet 크기와 상응하게 감소하였다 (Fig. 71A).

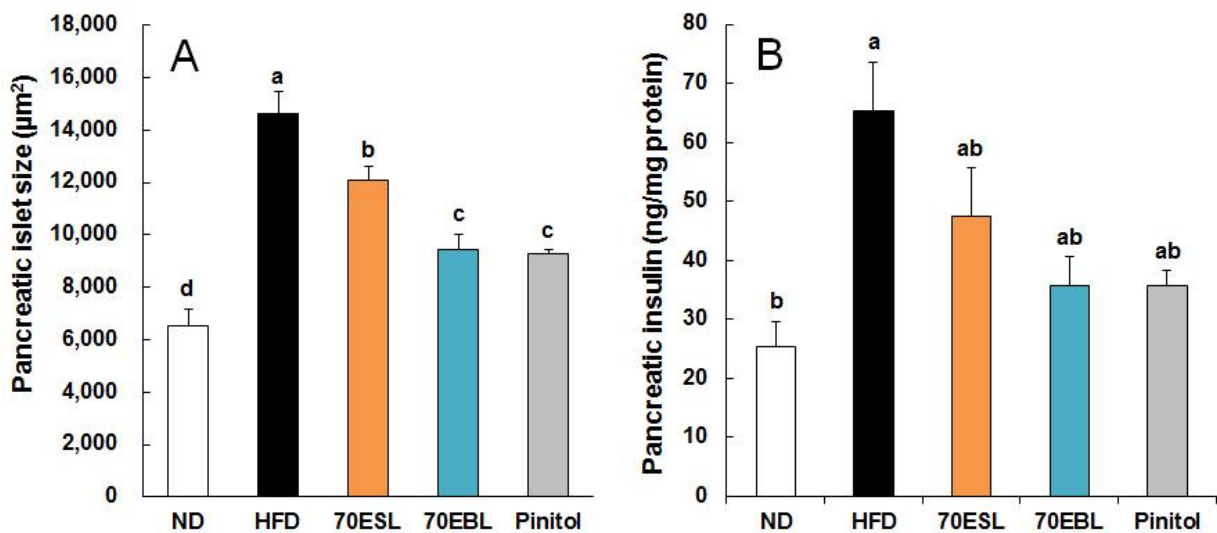


Fig. 72. Pancreatic islet size (A) and insulin content (B) in HFD-fed C57BL/6J mice. A) The mean size of pancreatic islet were measured using MetaMorph Imaging System. (B) The pancreas was isolated and homogenized to measure pancreatic insulin levels. Values are presented as mean \pm SE, n = 6. ^{a,b} Means not sharing a common letter are significantly different between groups ($P < 0.05$).

(다) 지방 조직의 형태학적 분석 및 지방세포 크기 측정

비만인의 지방조직은 NEFA와 호르몬 및 염증 관련 사이토카인 등을 분비하고, 이것들은 인슐린 저항성을 유도한다 (Karpe *et al*, 2011). 본 실험에서 HFD군에 비해 시험군인 70ESL군과 70EBL군의 체중이 감소되었지만 복부지방 조직의 중량은 유의적인 차이를 보이지 않았다 (Table 65). 따라서 70ESL군과 70EBL군의 체중 감소는 복부지방 조직이 아닌 다른 지방조직에 지방 세포의 축적이 감소되었거나, 또는 지방 세포의 비대를 억제한 것으로 판단된다. 따라서 형태학적 분석과 더불어 이들의 지방 세포 크기를 분석한 결과, 70ESL군과 70EBL군에서 지방 세포의 크기가 HFD군에 비해 유의적으로 감소된 것을 관찰하였다 (Fig. 73A and B).

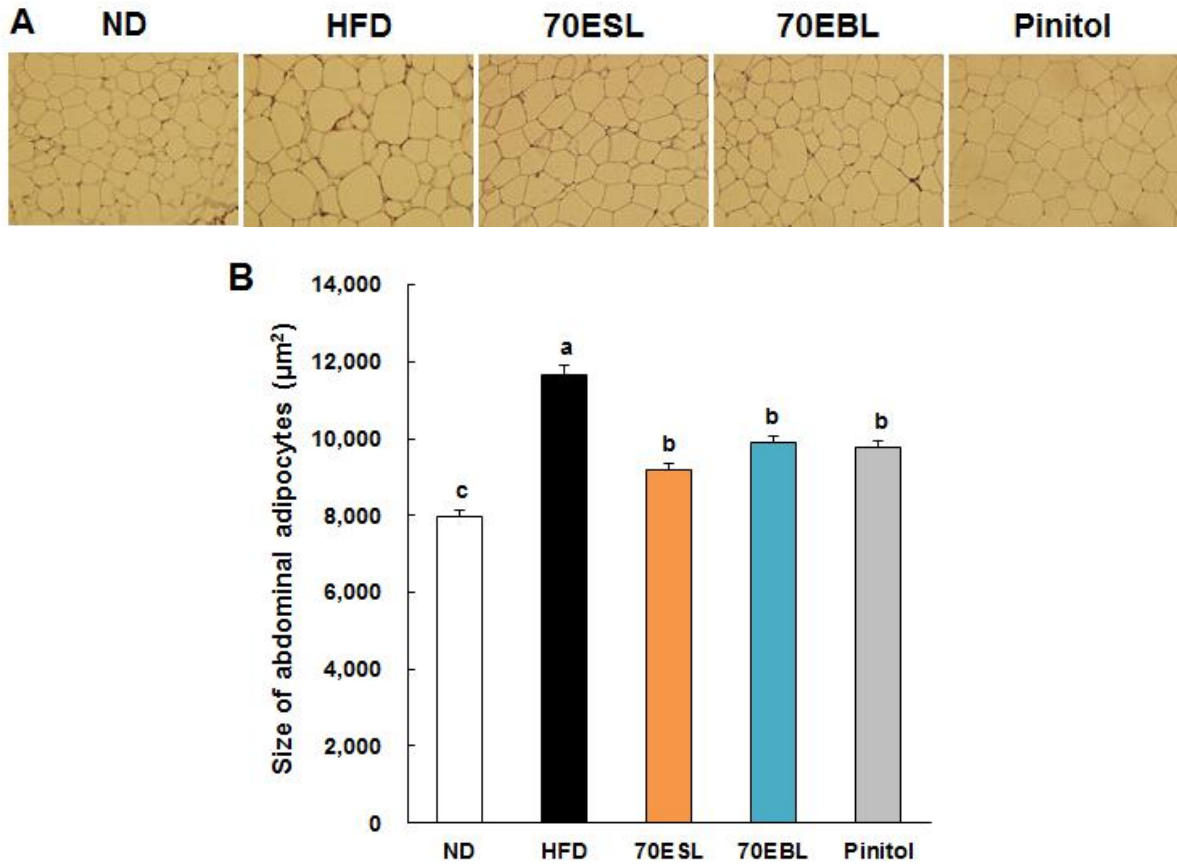


Fig. 73. Histology of abdominal adipose tissue with H&E staining (A) and size of adipocyte (B) in HFD-fed C57BL/6J mice. The mean size of abdominal adipocytes were determined for 200 ~ 300 adipocytes per section using MetaMorph Imaging System. Values are presented as mean \pm SE, n = 10. ^{a,b,c} Means not sharing a common letter are significantly different between groups ($P < 0.05$).

차. 췌장, 간, 소장 및 지방 조직의 분자생물학적 분석을 통한 PSH의 항당뇨 작용 기작 규명

(1) 췌장, 간, 소장, 지방 조직의 유전자 발현 변화 분석

(가) 소장 및 췌장 조직에서 GLP-1 관련 유전자 발현 변화 분석

앞서 70ESL과 70EBL의 투여로 혈중 GLP-1 농도와 활성이 증가됨을 확인하였다 (Fig. 67). 이에 소장 조직에서 GLP-1 합성 및 분비를 조절하는 유전자인 GLP-1, PKA, PCSK1/3의 발현을 측정하였다. 그 결과, 70ESL군과 70EBL군에서 HFD군보다 효과적으로 GLP-1, PKA, PCSK1/3의 발현이 증가되었고, 혈중 GLP-1의 농도와 활성도 증가에 상응하게 70ESL군에서 보다 유의적인 발현 증가를 나타내었다 (Fig. 74).

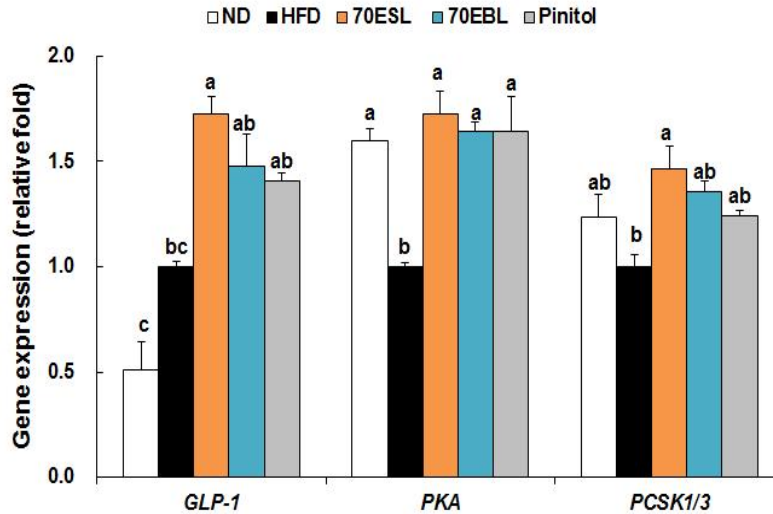


Fig. 74. Effects of 70ESL and 70EBL on the relative mRNA expression levels of intestinal genes related to GLP-1 synthesis. The levels of mRNA in tissue were measured by qRT-PCR and normalized to GAPDH expression. Values are presented as mean \pm SE, n = 10. ^{a,b,c} Means not sharing a common letter are significantly different between groups ($P < 0.05$).

더 나아가 소장에서 분비된 GLP-1이 췌장 조직의 베타세포에 작용하여 베타세포의 기능을 향상시키는지 확인하기 위해 췌장 조직에서 인슐린 분비 및 합성에 관련된 유전자들의 발현을 측정하였다. GLP-1에 의한 신호전달에 관련된 GLP-1R, PKA, Insr, IRS-1, IRS-2 유전자들 중 HFD군에 비해 70ESL군에서 GLP-1R, PKA, Insr, IRS-2의 발현이 유의적으로 증가되었고, 70EBL군에서는 IRS1과IRS-2의 발현만이 유의적으로 증가되었다 (Fig. 75).

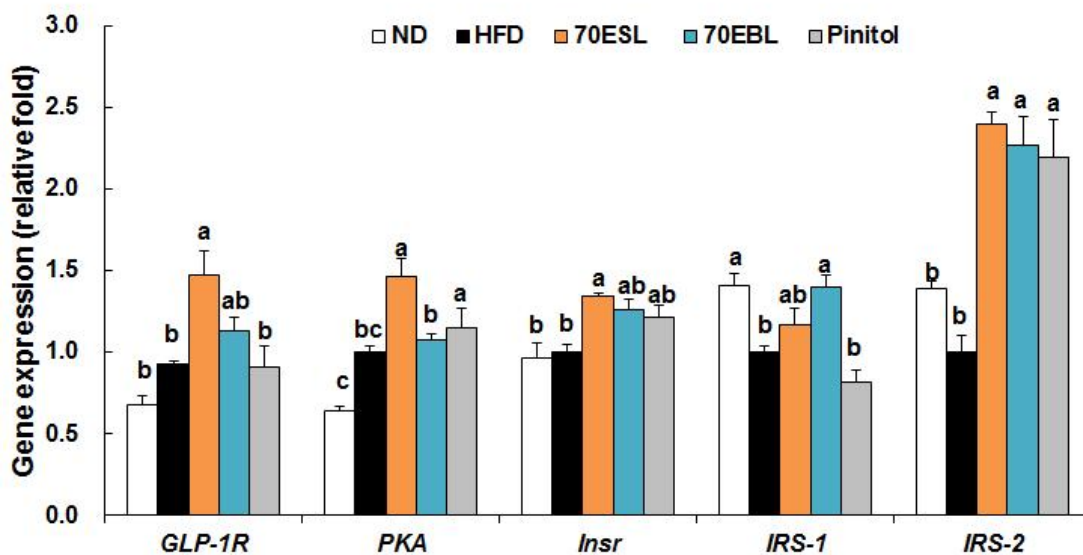


Fig. 75. Effects of 70ESL and 70EBL on the relative mRNA expression levels of pancreas genes related to GLP-1 pathway. The levels of mRNA in tissue were measured by qRT-PCR and normalized to GAPDH expression. Values are presented as mean \pm SE, n = 10. ^{a,b,c} Means not sharing a common letter are significantly different between groups ($P < 0.05$).

췌장 조직에서 인슐린 합성에 관련된 유전자인 PCSK1/3, PCSK2, Ins1, Ins2 유전자들 중 HFD군에 비해 70ESL군에서 PCSK1/3, PCSK2, Ins2 유전자의 발현이 유의적으로 증가되었고, 70EBL군에서는 유의적인 발현 변화를 나타내지 않았다 (Fig. 76).

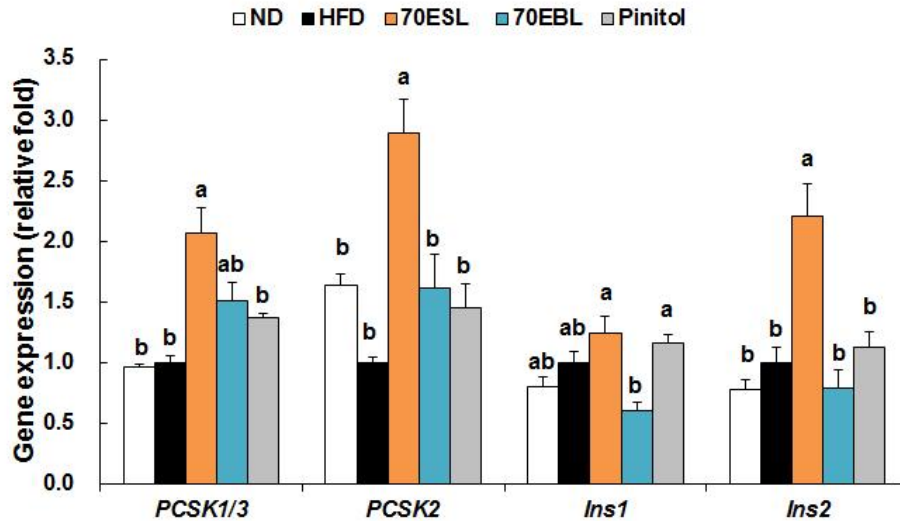


Fig. 76. Effects of 70ESL and 70EBL on the relative mRNA expression levels of pancreas genes related to insulin synthesis. The levels of mRNA in tissue were measured by qRT-PCR and normalized to GAPDH expression. Values are presented as mean \pm SE, n = 10. ^{a,b,c} Means not sharing a common letter are significantly different between groups ($P < 0.05$).

다음으로 췌장 조직에서 향상된 베타세포의 기능이 베타세포의 증식과 연관되어 있는지 확인하기 위해 베타세포의 증식을 조절하는 Ngn3, Neurod1, MafA, Pax4, PDX-1 및 FoxO1 유전자들의 발현을 측정하였다 (Fig. 77). 70ESL군에서 HFD군에 비해 Ngn3, Neurod1, MafA, Pax4, PDX-1 유전자들의 발현이 유의적으로 증가된 반면, 70EBL군에서는 HFD군에 비해 유의적인 발현 변화를 나타내지 않았다. 한편 베타세포의 세포사멸을 유발하는 FoxO1의 발현은 HFD군에 비해 70ESL군과 70EBL군에서 모두 유의적으로 감소되었다. 이상의 결과로부터 GLP-1에 의한 신호전달 및 이에 따른 베타세포의 기능에 관련된 유전자들이 70ESL의 투여로 효과적으로 조절되는 것을 알았다.

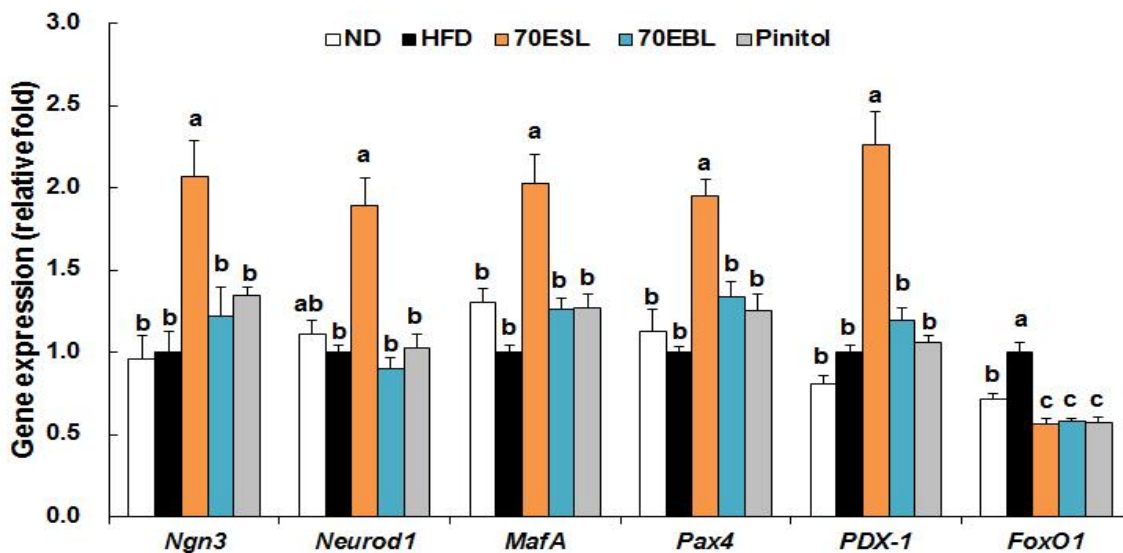


Fig. 77. Effects of 70ESL and 70EBL on the relative mRNA expression levels of pancreas genes related to β -cell proliferation. The levels of mRNA in tissue were measured by qRT-PCR and normalized to GAPDH expression. Values are presented as mean \pm SE, n = 10. ^{a,b,c} Means not sharing a common letter are significantly different between groups ($P < 0.05$).

또한 GLP-1을 통한 베타세포 증식의 향상은 베타세포에서 소포체 스트레스 (ER stress)를 조절한다. 소포체 스트레스가 발생하면 소포체 샤페론인 Erp72, Grp94, Fkbp11 등의 발현이 증가되어 단백질의 접힘(folding)을 도와준다. 또한 ATF6, PERK, 및 ERE1 α 등에 의해 소포체 샤페론 (chaperone)을 증가시키거나, 단백질의 전사 감소, 또는 잘못 만들어진 단백질을 없애는 과정이 일어난다 (Back *et al.*, 2012). 따라서 췌장조직에서 GLP-1을 통한 베타세포 증식과 소포체 스트레스와의 연관성을 확인하고자 하였다. Adaptive UPR 유전자인 Xbp1s, Bip, p58, Erp72, Fkbp11, Grp94 들 중 HFD군에 비해 70ESL군과 70EBL군에서 Xbp1s, Bip, Erp72, Fkbp11 유전자들의 발현이 유의적으로 증가되었고, 이중 Xbp1s, Bip, Fkbp11 유전자의 발현은 70EBL군에 비해 70ESL군에서 보다 효과적으로 증가되었다 (Fig. 78).

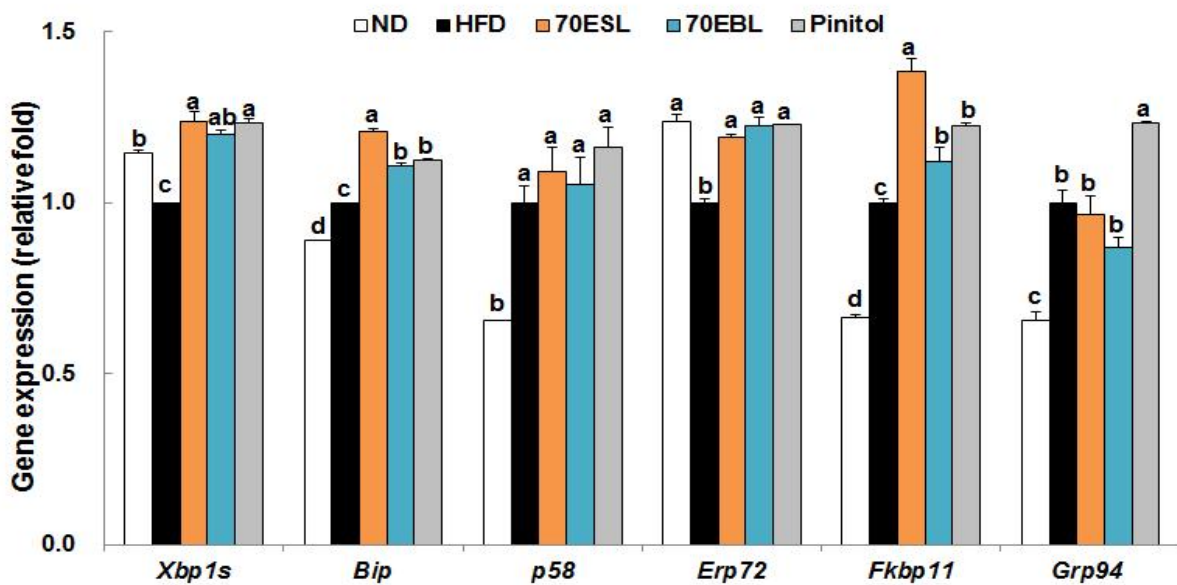


Fig. 78. Effects of 70ESL and 70EBL on the relative mRNA expression levels of pancreas genes related to UPR response. The levels of mRNA in tissue were measured by qRT-PCR and normalized to GAPDH expression. Values are presented as mean \pm SE, n = 10. ^{a,b,c,d} Means not sharing a common letter are significantly different between groups ($P < 0.05$).

그 외에 베타세포의 사멸을 일으키는 UPR 유전자인 ATF3, ATF4, CHOP, Trib3의 발현은 HFD군에 비해 70EBL군에서 유의적인 차이가 없었다. HFD군에 비해 70EBL군에서 ATF4와 Trib3 유전자의 발현은 유의적인 차이가 없었고, ATF3 유전자의 발현은 오히려 유의적으로 증가하였고, CHOP 유전자의 발현은 유의적으로 감소하였으나, 감소량이 매우 적었다 (Fig. 79).

이상의 결과로부터 70ESL의 투여에 의해 GLP-1의 분비가 촉진되고, GLP-1이 활성화되어 췌장 베타세포의 인슐린 합성과 분비 및 소포체 스트레스의 조절을 통해 베타세포의 기능이 향상되는 것으로 판단된다.

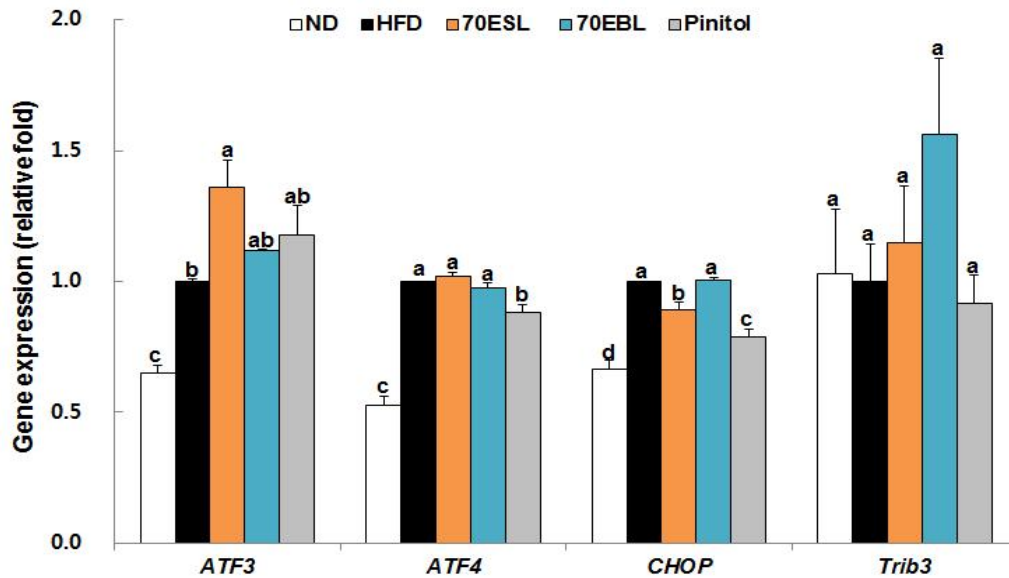


Fig. 79. Effects of 70ESL and 70EBL on the relative mRNA expression levels of pancreas genes related to UPR response. The levels of mRNA in tissue were measured by qRT-PCR and normalized to GAPDH expression. Values are presented as mean \pm SE, $n = 10$. ^{a,b,c,d} Means not sharing a common letter are significantly different between groups ($P < 0.05$).

(나) 간 조직에서 adiponectin에 의한 유전자 발현 및 AMPK 활성 변화 분석

앞서 지방조직에서 분비되는 adiponectin의 혈중 농도가 70ESL군과 70EBL군에서 효과적으로 증가되는 것을 확인하였다 (Fig. 2). 이에 간 조직에서 adiponectin receptor 유전자인 AdipoR1과 AdipoR2의 발현을 측정하였다. 70ESL군과 70EBL군에서 HFD군에 비해 AdipoR1 ($P < 0.05$)과 AdipoR2의 발현이 증가되었고, 특히 70EBL군에서 더 효과적으로 증가되었다 (Fig. 80).

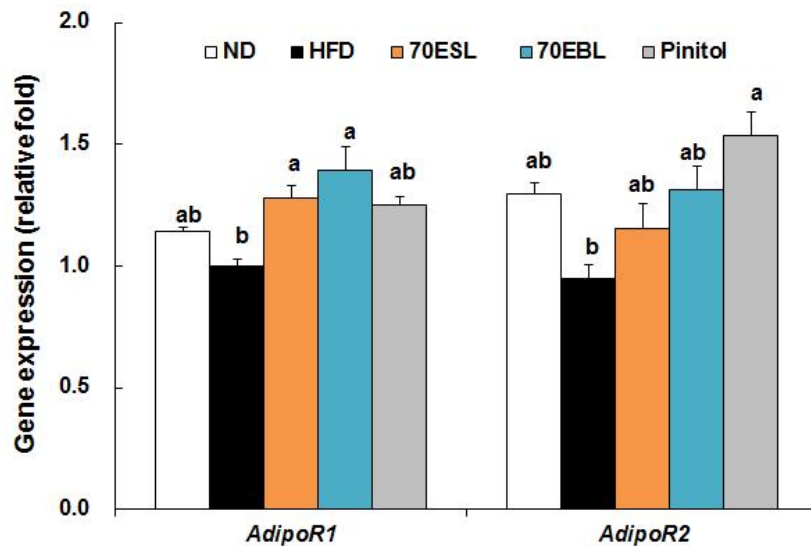


Fig. 80. Effects of the supplementation of 70ESL and 70EBL on gene expression in liver. The levels of mRNA in liver were measured by qRT-PCR and normalized by GAPDH. Values were represented the means \pm S.E, $n = 10$. ^{a,b,c} Means not sharing a common letter are significantly different between groups ($P < 0.05$).

또한, 간 조직에서 AdipoR1에 의해 AMP-activated protein kinase (AMPK)가 활성화되며,

AMPK는 일종의 serine/threonine kinase로 ATP에 비하여 AMP가 증가하는 스트레스 상황에서 활성화되어 세포 내 에너지 생산을 증가시키는 효소이다. 또한 AMPK의 활성화는 포도당 유입 및 지방산 산화를 촉진하는 것으로 알려져 있다. 이에 AMPK의 효소활성을 측정된 결과, 70ESL군과 70EBL군에서 HFD군에 비해 AMPK 효소활성이 월등하게 증가되었고, 70EBL군에서 보다 유의적으로 활성이 증가되었다 (Fig. 81).

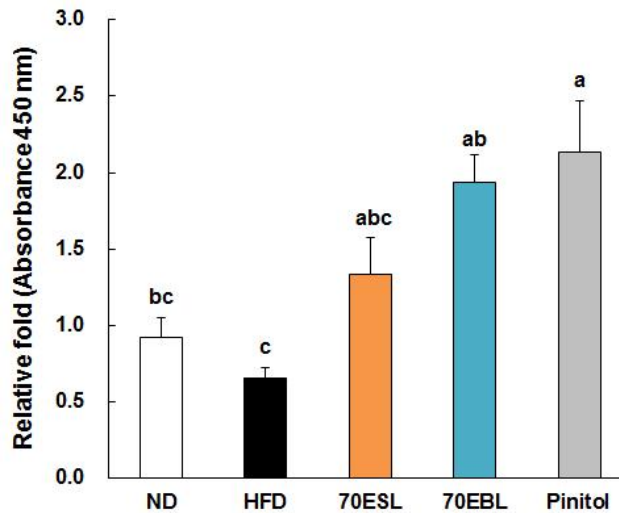


Fig. 81. Effect of 70ESL and 70EBL on AMPK activity in liver. AMPK activity was measured by AMPK kinase assay kit and expressed as absorbance at 450 nm and normalized to the protein content of the samples. Values were represented the means \pm S.E, n = 10. ^{a,b,c} Means not sharing a common letter are significantly different between groups ($P < 0.05$).

다음으로 간 조직에서 AMPK의 하위 유전자인 IRS-2, GLUT-2, FoxO1, Foxa2의 발현을 측정하였다. 70EBL군에서 인슐린 신호전달에 관련된 GLUT-2와 IRS-2 유전자들의 발현이 HFD군에 비해 유의적으로 증가되었고, 간 조직에서 당신생 (gluconeogenesis) 과정에 중요한 작용을 하는 FoxO1과 Foxa2의 발현도 HFD군에 비해 70EBL군에서 유의적으로 감소되었다 (Fig. 82).

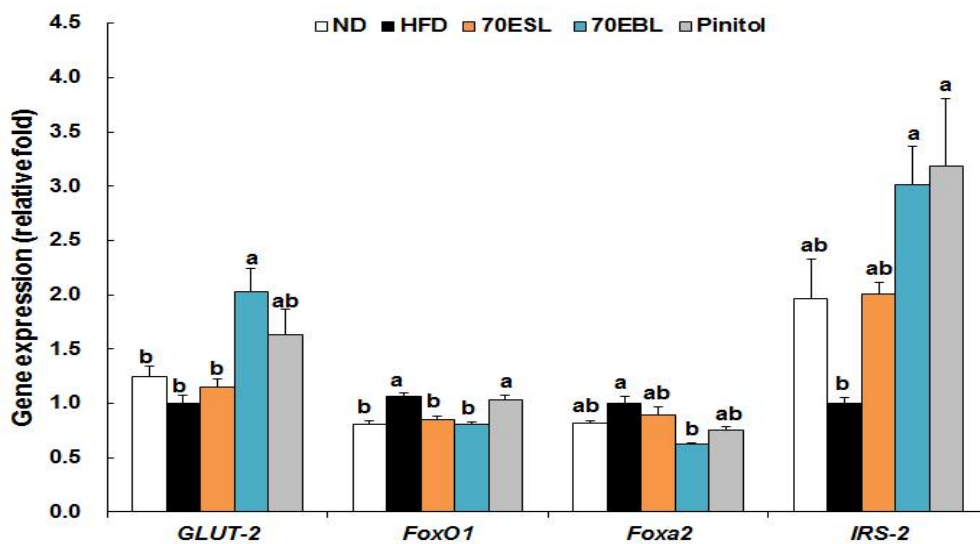


Fig. 82. Effects of the supplementation of 70ESL and 70EBL on gene expression in liver. The levels of mRNA in liver were measured by qRT-PCR and normalized by GAPDH. Values were represented the means \pm S.E, n = 10. ^{a,b} Means not sharing a common letter are significantly different between groups ($P < 0.05$).

또한 간 조직에서 AdipoR2에 의해 조절되는 PPARs 전사인자의 발현을 측정하였다. 지방산 분해 및 산화를 조절하는 PGC-1, PPAR α , PPAR δ 유전자들의 발현은 70EBL군에서 HFD군에 비해 유의적으로 증가되었다. 지방산 합성 및 축적을 조절하는 PPAR γ 유전자의 발현은 70ESL군과 70EBL군에서 모두 유의적으로 현저하게 감소되었다 (Fig. 83A). 또한 이에 따른 지방산 산화를 조절하는 하위 유전자인 CPT-1의 발현도 70EBL군에서 HFD군에 비해 유의적으로 증가되었고, 지방산 합성을 조절하는 하위 유전자인 ACC1, ACC2, FAS 유전자들의 발현도 70EBL군에서 모두 유의적으로 감소되었다 (Fig. 84B). 70ESL군에서는 ACC1, ACC2 유전자들의 발현이 유의적으로 감소되었다 (Fig. 83B).

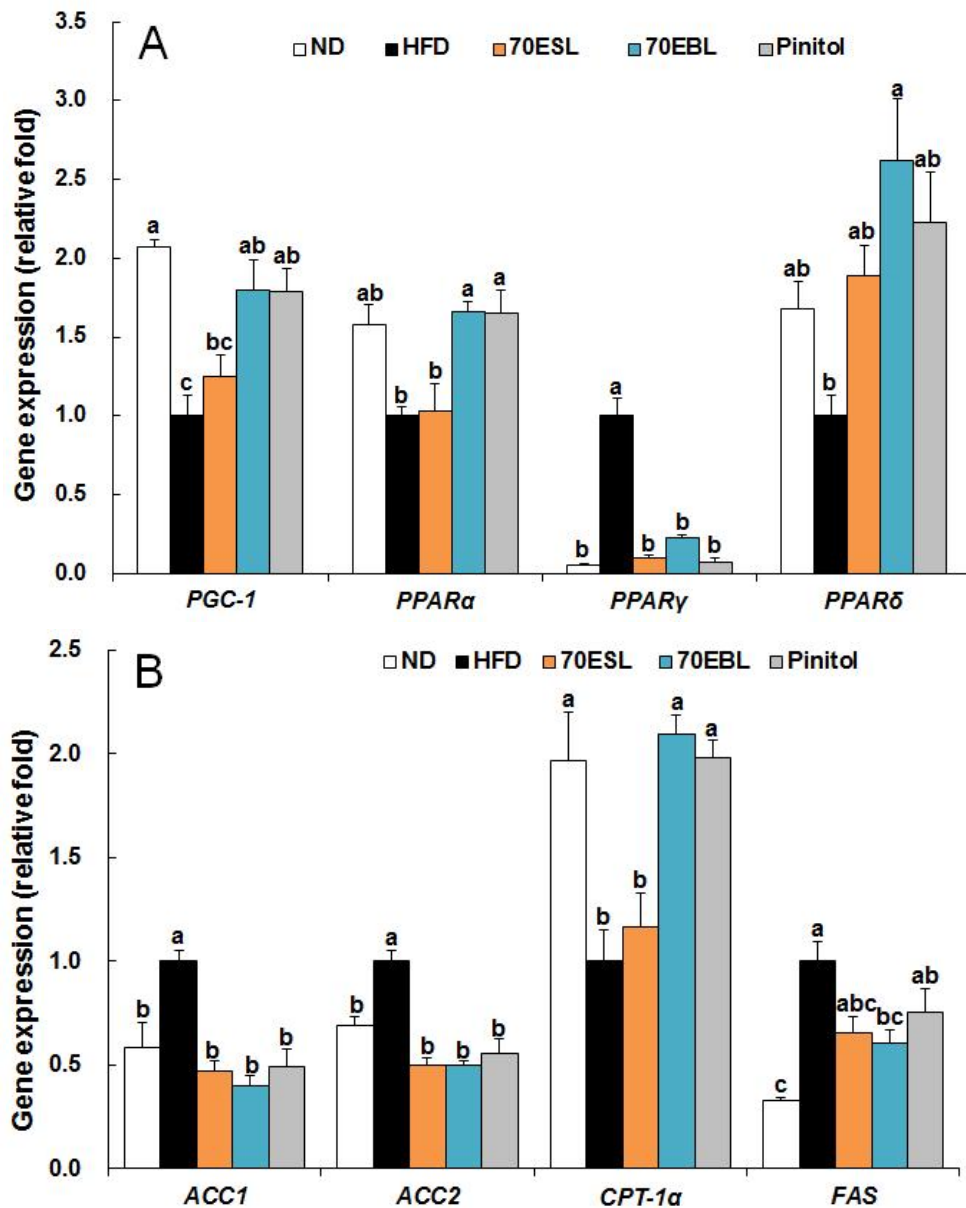


Fig. 83. Effects of the supplementation of 70ESL and 70EBL on gene expression in liver. The levels of mRNA in liver were measured by qRT-PCR and normalized by GAPDH. Values were represented the means \pm S.E, n = 10. ^{a,b,c} Means not sharing a common letter are significantly different between groups ($P < 0.05$).

이상의 결과로부터 70EBL은 혈중 adiponectin 농도를 증가시키고, 이는 간 조직에서 adiponectin receptor 유전자인 AdipoR1, AdipoR2를 통한 AMPK 활성화와 이에 따른 인슐린 신호전달 민감성 및 지방 생성과 분해에 대한 조절을 통해 효과적으로 혈당을 개선시킨 것으로 파악된다.

(다) 지방 조직에서 cytokine 및 인슐린 신호전달에 관련된 유전자 발현 변화 분석

혈중에서 작용하는 adiponectin은 주로 지방세포에서 분비되는 호르몬으로 인슐린 신호전달의 민감성을 증가시키고, 염증반응을 억제한다. 이에 지방 조직에서 adiponectin 및 염증 유도 cytokine인 TNF α 와 IL-6 유전자들의 발현을 측정하였다. HFD군에 비해 70ESL군에서 adiponectin의 발현이 현저하게 증가하였으며 ($P < 0.05$), 70EBL군에서도 adiponectin의 발현이 증가하였으나 유의성은 낮았다 (Fig. 84). 또한 HFD군에 비해 70ESL군과 70EBL군에서의 TNF α 의 발현이 유의적으로 감소되었다 (Fig. 84).

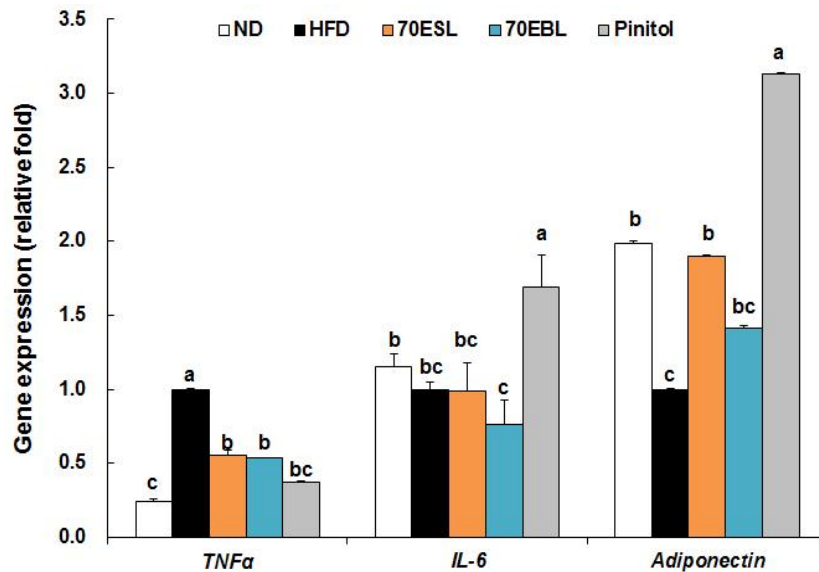


Fig. 84. Effects of 70ESL and 70EBL on the relative mRNA expression levels of genes in abdominal adipose tissue. The levels of mRNA in abdominal adipose tissue were measured by qRT-PCR and normalized to GAPDH expression. Values are presented as mean \pm SE, n = 10. ^{a,b,c} Means not sharing a common letter are significantly different between groups ($P < 0.05$).

다음으로 지방 조직에서 인슐린 민감성을 조절하는 유전자의 발현을 측정하였다. HFD군에 비해 70ESL군에서 Insr, IRS-1($P < 0.05$), IRS-2, GLUT-4($P < 0.05$) 유전자들의 발현이 효과적으로 증가되었고, HFD군에 비해 70EBL군에서는 Insr와 GLUT-4($P < 0.05$) 유전자들의 발현이 증가되었다 (Fig. 85).

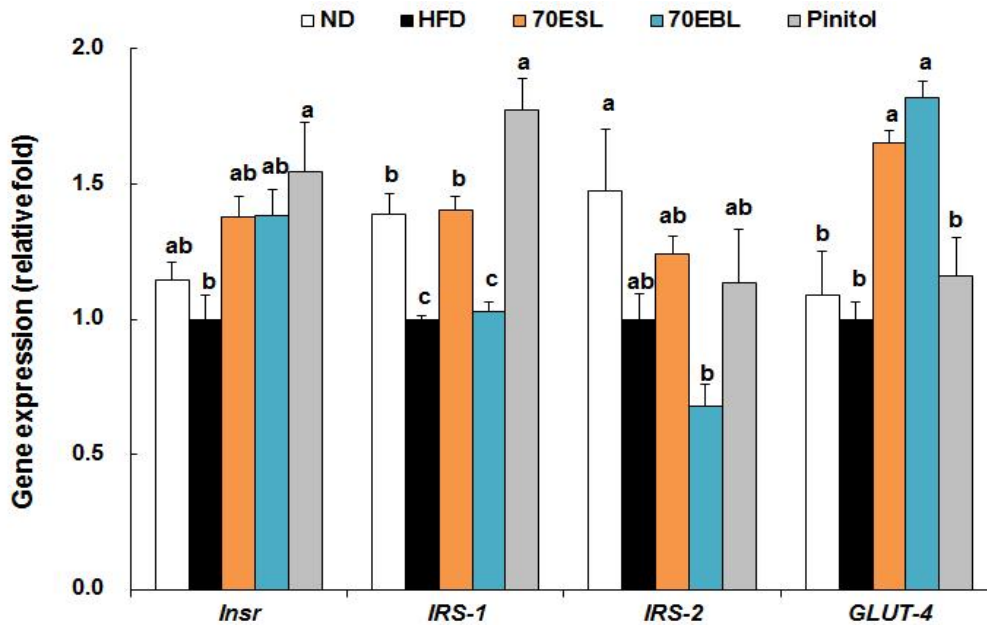


Fig. 85. Effects of 70ESL and 70EBL on the relative mRNA expression levels of genes in abdominal adipose tissue. The levels of mRNA in abdominal adipose tissue were measured by qRT-PCR and normalized to GAPDH expression. Values are presented as mean \pm SE, n = 10. ^{a,b,c} Means not sharing a common letter are significantly different between groups ($P < 0.05$).

그 외에 지방 조직에서 지방의 산화 및 분해를 조절하는 UCP2, UCP3, CPT-1, HSL 유전자들의 발현을 측정하였다. HFD군에 비해 70ESL군에서 UCP3의 발현이 유의적으로 증가하였으며 ($P < 0.05$), UCP2의 발현은 증가하는 경향을 보였다 (Fig. 86). 반면에 CPT-1과 HSL 유전자들의 발현은 HFD군에 비해 70ESL군과 EBL군에서 유의적인 차이가 없었다.

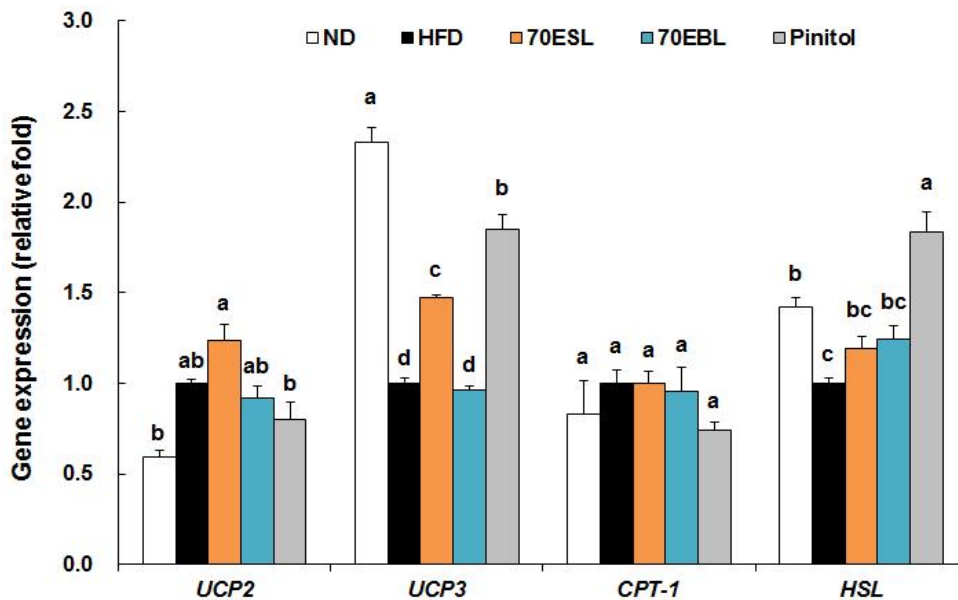


Fig. 86. Effects of 70ESL and 70EBL on the relative mRNA expression levels of genes in abdominal adipose tissue. The levels of mRNA in abdominal adipose tissue were measured by qRT-PCR and normalized to GAPDH expression. Values are presented as mean \pm SE, n = 10. ^{a,b,c} Means not sharing a common letter are significantly different between groups ($P < 0.05$).

(2) 췌장, 간, 소장, 지방 조직의 단백질 수준 변화 분석

(가) 소장 조직에서 GLP-1의 분비를 조절하는 PKA 단백질의 수준 변화 분석

소장 조직에서 GLP-1의 분비는 PKA 단백질의 인산화를 통해 활성화된다. 따라서 70ESL군과 70EBL의 투여로 혈장에서 증가된 GLP-1의 농도 (Fig. 65)가 소장 조직의 PKA 단백질 인산화와 연관되어 있는지 규명하고자 하였다. HFD군에 비해 70ESL군과 70EBL군에서 PKA 단백질의 인산화가 증가되었다 (Fig. 87). 즉, 소장에서 PKA 단백질이 활성화됨에 따라 생성된 GLP-1의 분비가 촉진된 것으로 판단된다.

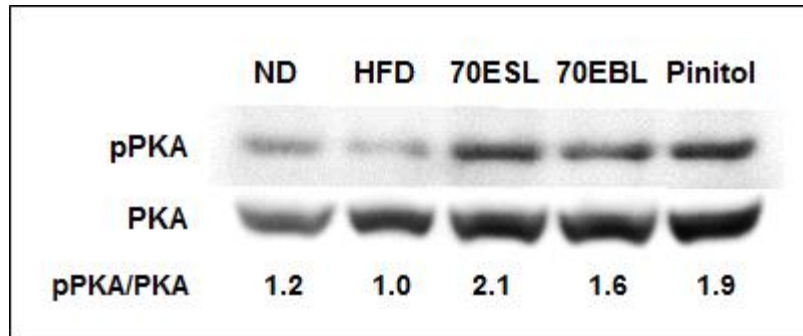


Fig. 87. Effects of 70ESL and 70EBL on protein expression of PKA and its phosphorylated form in intestine. The intestine tissue of each group was pooled and used for protein extraction, simultaneously. Tissue lysates were prepared and subjected to Western blotting using their specific antibodies.

(나) 췌장 조직에서 베타세포 기능을 조절하는 단백질의 수준 변화 분석

췌장 조직에서 베타세포의 기능을 조절하는 AKT와 FoxO1 단백질의 인산화 정도를 측정하여 비교하였다. ND군에 비해 HFD군에서 인산화된 AKT와 FoxO1 단백질의 발현이 현저하게 감소되었다. 반면에 70ESL과 70EBL의 투여로 인산화된 AKT와 FoxO1 단백질의 발현이 HFD군에 비해 증가되었으며, 이를 통해 췌장에서 베타세포의 기능이 향상된 것으로 판단된다 (Fig. 88).

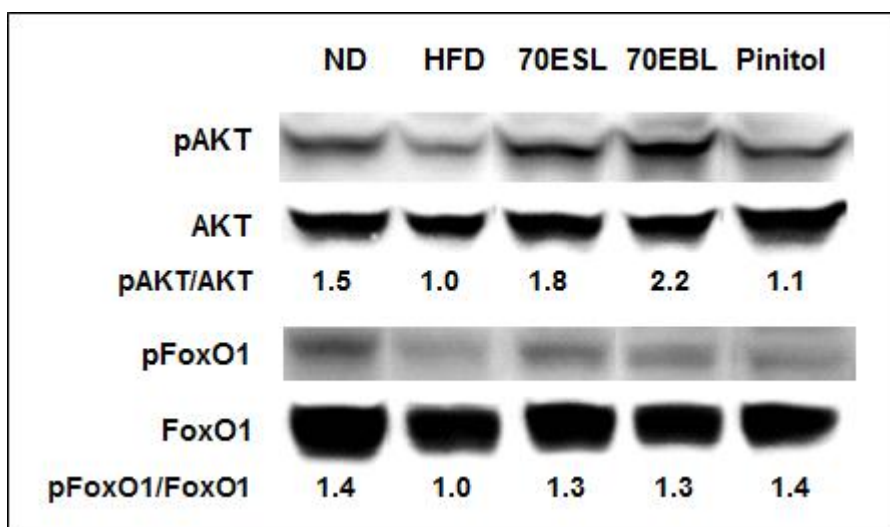


Fig. 88. Effects of 70ESL and 70EBL on protein expression of Akt, FoxO1, and their phosphorylated forms in pancreas. The intestine tissue of each group was pooled and used for protein extraction, simultaneously. Tissue lysates were prepared and subjected to Western blotting using their specific antibodies.

(다) 간 조직에서 인슐린 신호전달 단백질의 수준 변화 분석

앞서 간 조직에서 70ESL과 70EBL의 투여로 AMPK 효소활성이 증가됨에 따라 인슐린 신호전달의 민감성이 개선된 것을 확인하였다. ND군에 비해 HFD군에서 인산화된 AMPK와 인슐린 신호전달 인자인 IRS1, AKT 단백질의 발현이 현저하게 감소되었다. 반면에 70ESL과 70EBL의 투여로 HFD군에서 감소되었던 인산화된 AMPK 및 IRS1과 AKT 단백질의 발현이 효과적으로 회복되었다 (Fig. 89). 따라서 70ESL과 70EBL의 투여로 인해 간 조직에서의 인슐린 신호전달의 민감성을 향상시킴으로써 항당뇨 효능을 나타낼 것으로 기대된다.

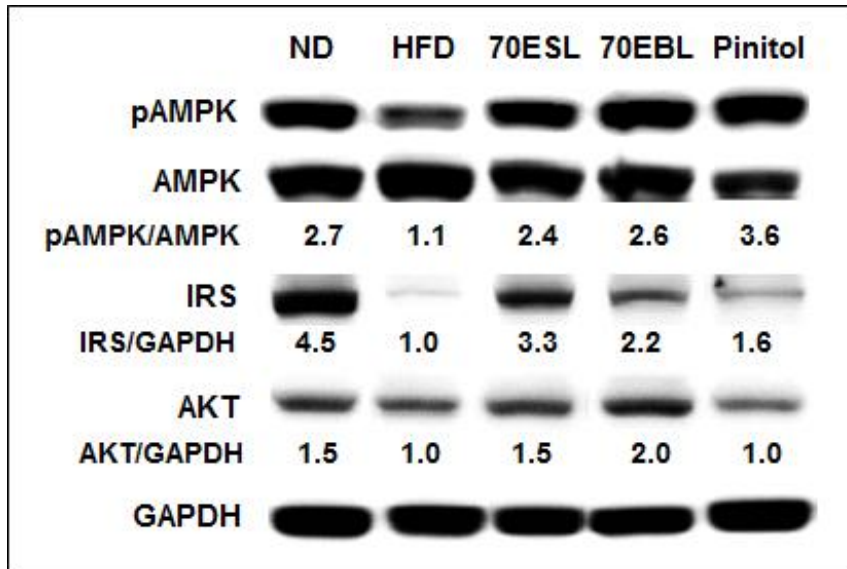


Fig. 89. Effects of 70ESL and 70EBL on protein expression of AMPK and its phosphorylated forms, IRS1, and AKT in liver. The liver tissue of each group was pooled and used for protein extraction, simultaneously. Tissue lysates were prepared and subjected to Western blotting using their specific antibodies.

(3) PSH의 MIN6 세포에서 베타세포 기능 개선

앞서 여러 조직에서 70ESL과 70EBL이 다르게 작용하는 것을 확인하였다. 그중 췌장 조직에서는 70ESL이 보다 효과적으로 베타세포의 기능(PCSK1/3, PCSK2, Ins1, Ins2, Ngn3, Neurod, MafA, Pax4, PDX-1)을 조절하는 것을 확인하였다. 따라서 MIN6 베타세포에서 70ESL과 70EBL의 배당체 고함유 분획(GR)의 인슐린 분비능에 대한 조절작용을 확인하였다. 그 결과, 70ESL, 70EBL보다 그들의 배당체 고함유 분획들이 더 높은 인슐린 분비능을 나타내었고, ESL-GR이 EBL-GR보다 높은 인슐린 분비능을 나타내었다 (Fig. 90).

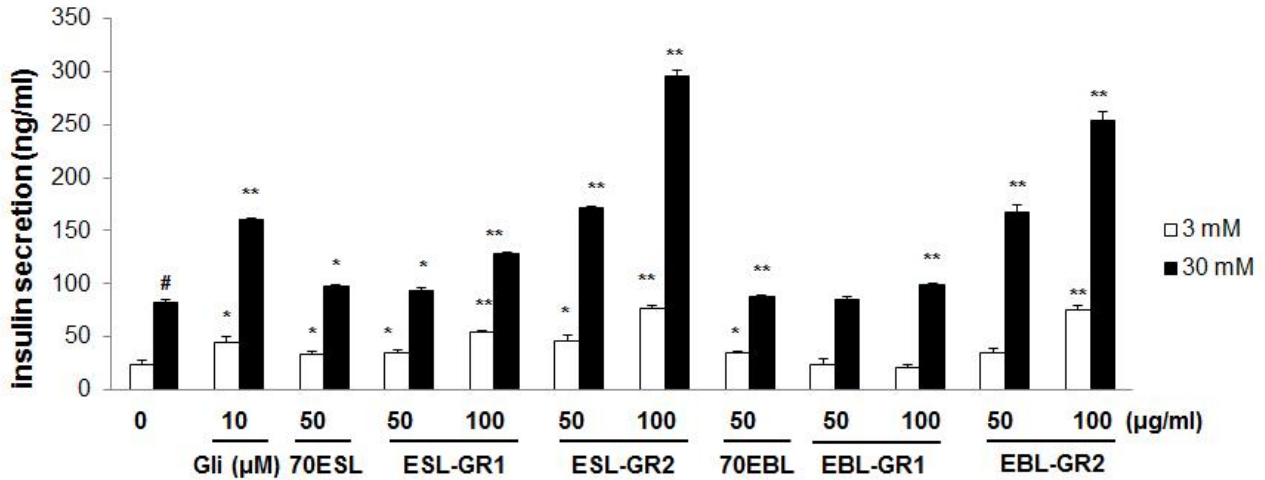


Fig. 90. the glucose-induced insulin secretion test performed in pancreatic MIN6 β -cells. MIN6 cells were seeded into a 24-well plate at a density of 1×10^5 cells per well and grown for 48 h. The cells were washed twice and preincubated for 60 min in glucose-free medium. Then cells were treated with 3 or 30 mM glucose, and compounds (50, 100 μ g/ml) incubated for 30 min at 37°C. After incubation, measured the insulin concentration of the media (Alpco diagnostics, insulin ELISA kit).

당뇨 질환에서 췌장의 베타세포는 장기간의 고혈당의 환경에 놓이게 되고 고혈당에 의한 베타세포의 기능저하와 사멸을 초래하게 된다. 본 실험에서는 고혈당에 의한 베타세포 내 유전자의 변화를 관찰하여 베타세포의 기능조절 기작을 연구하고자 하였다. MIN6 베타세포는 25 mM glucose와 15% FBS를 함유한 DMEM culture media (CM)를 사용하여 유지하였고, CM에 직접 샘플을 처리하여 샘플들의 유전자 발현에 대한 조절을 관찰하였다 (Fig. 91).

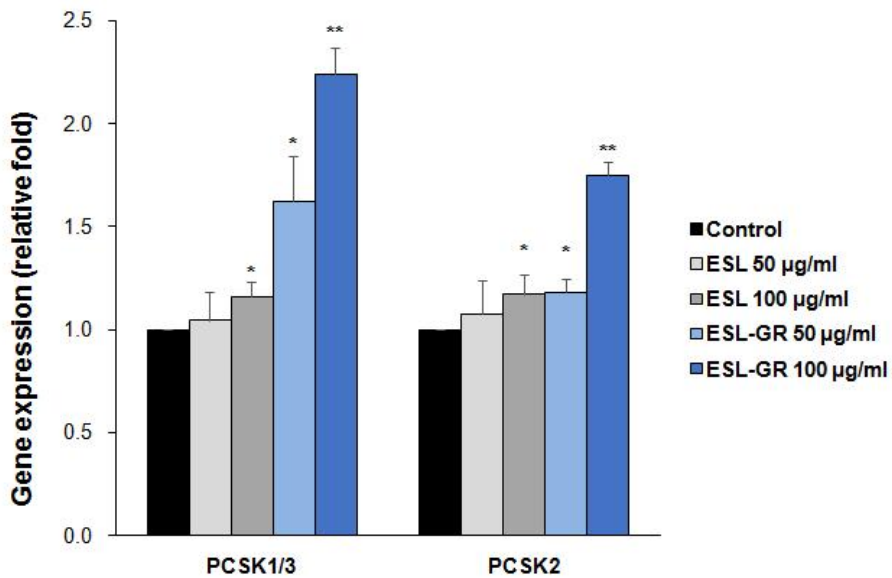


Fig. 91. ESL regulated gene expression in MIN6 beta-cells. Cells were grown in culture media (25 mM glucose and 15% FBS in DMEM) with ESL or ESL-GR for 48 h, and then harvested mRNA to be used in qRT-PCR. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with control.

앞서 동물실험 결과에서 70ESL은 췌장기능의 향상에 큰 역할을 하는 것을 확인하였고, 이에 따른 배당체 고함유 분획(ESL-GR)도 MIN6 베타세포에서 인슐린 분비능을 증가하는 것을 확인하였다. 이에 ESL 및 ESL-GR이 베타세포에서의 유전자의 변화를 관찰하였다. 결과 췌장

조직에서의 결과와 상응하게 ESL-GR에 의한 인슐린 단백질의 합성을 조절하는 PCSK1/3 와 PCSK2 유전자의 발현이 유의적으로 증가되는 것을 확인하였다. 이로부터 배당체 고함유 분획이 베타세포의 기능을 향상시킨다는 것을 추측할 수 있다.

(4) PSH의 HepG2 세포에서 간세포 기능 개선

간세포는 비만을 동반한 당뇨 개체에서 혈중 높은 농도의 free fatty acid에 의해 인슐린 저항성을 나타내게 된다. 따라서 HepG2 세포에서 인슐린 신호전달에 대한 조절 작용을 확인하기 위하여 0.2 mM palmitate (PA) 투여에 의해 인슐린 저항성이 나타나는지 확인하였다. 그 결과 PA의 투여에 의해 인슐린 저항성이 나타남으로써, 인슐린 신호전달에서 중요한 작용을 일으키는 AKT 및 IRS 단백질의 인산화가 모두 감소되는 것을 확인하였다 (Fig. 92). 이상의 조건을 이용하여 간 조직에서 더 효과적인 조절작용을 나타내었던 70EBL의 배당체 고함유 분획 및 배당체의 인슐린 신호전달에 대한 조절작용을 확인하였다.

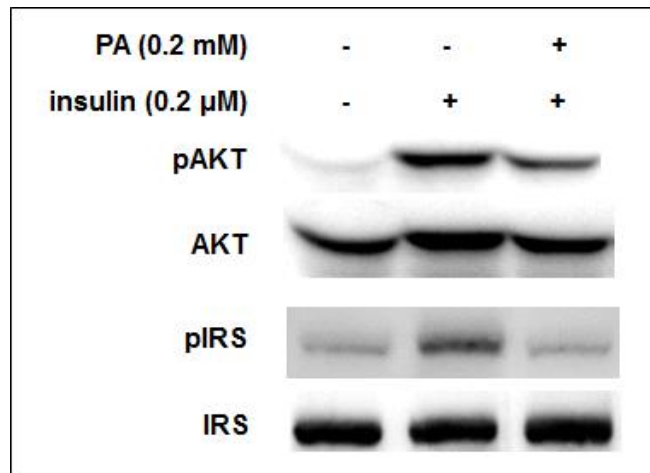


Fig. 92. PA (palmitate) induced insulin resistance in HepG2 cells. Cells were grown in culture media (low/high glucose) with 0.2 mM PA for 24 h. And then induced by 0.2 μM insulin for 20 min. The protein expression were detected by Western blot analysis. Cell lysates were prepared and subjected to Western blotting using specific antibodies.

간세포에서 EBL, EBL-GR의 투여가 palmitate (PA)로 유도한 인슐린 신호전달인자에 대한 조절 작용을 확인하였다. 결과 PA에 의해 저해된 AMPK, AKT 및 IRS의 인산화가 EBL 및 EBL-GR의 100, 200 μg/ml 투여에 의해 다시 회복되었고, EBL-GR이 더 효과적인 인산화를 일으켰다 (Fig. 93). 이는 EBL중 Glycosides 들에 의한 간세포에서의 기능 개선이 혈당 조절에 기여함을 시사한다.

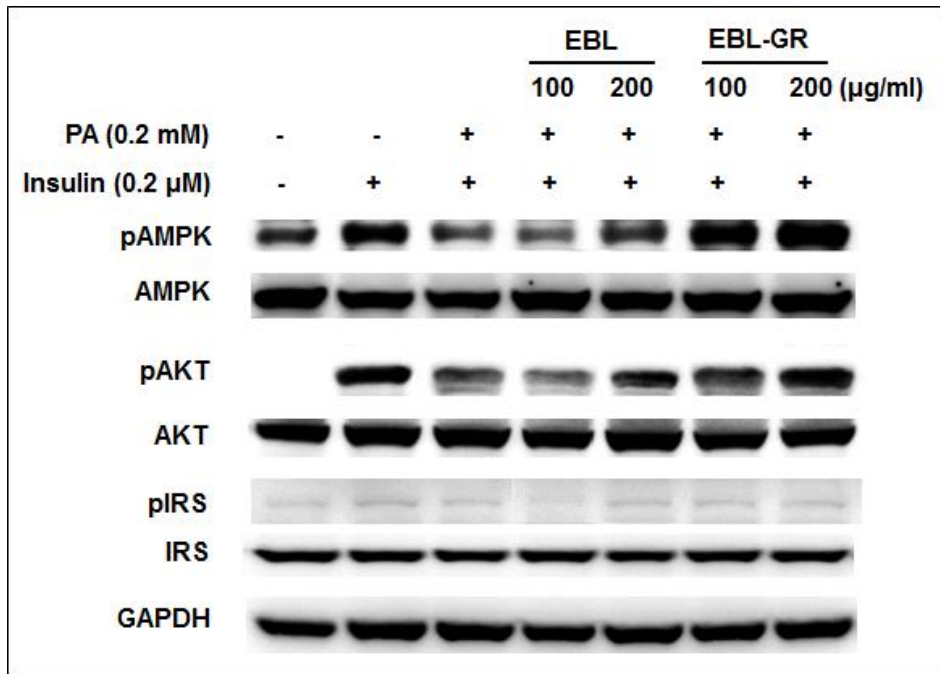


Fig. 93. Effects of EBL on PA (palmitic acid) induced insulin resistance in HepG2 cells. Cells were grown in culture media with 0.2 mM PA and compounds for 24 h. And then induced by 0.2 µM insulin for 20 min. The protein expressions were detected by Western blot analysis. Cell lysates were prepared and subjected to Western blotting using their specific antibodies.

EBL의 주성분인 QGs 및 IRGs들의 HepG2 세포에서 인슐린 신호전달에 대한 조절 작용을 확인하였다. 그 결과, QG들 중에서 QG4와 QG8이, IRG들 중에서도 IRG16이 보다 효과적으로 AKT의 인산화를 증가시키는 것을 확인하였다 (Fig. 94).

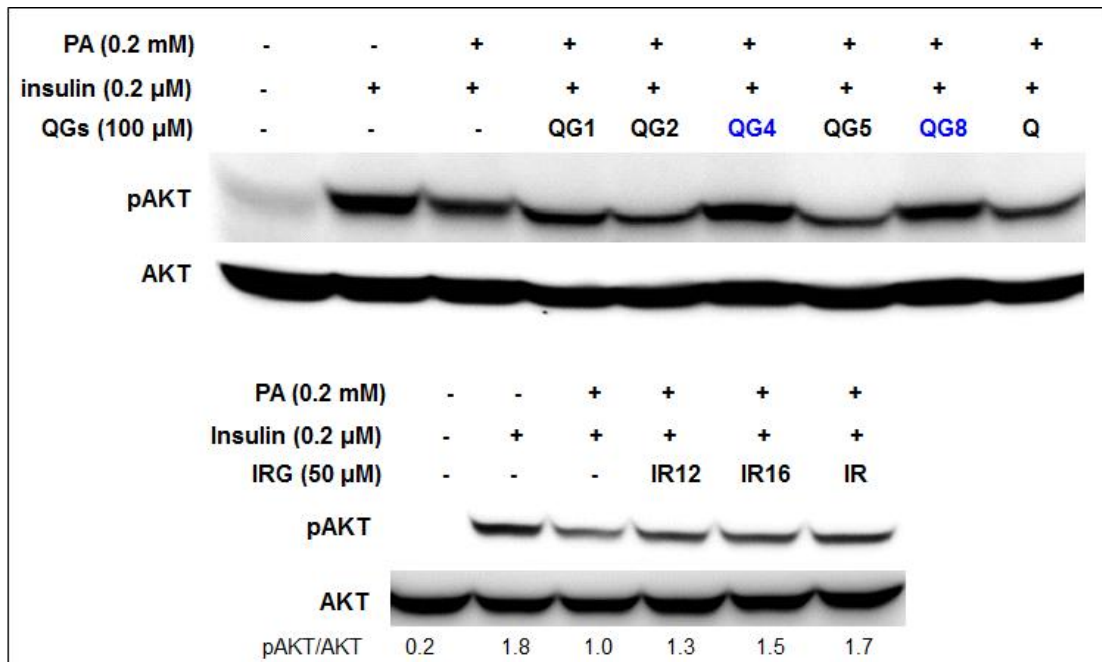


Fig. 94. PA (palmitate) induced insulin resistance in HepG2 cells. Cells were grown in culture media with 0.2 mM PA and compounds for 24 h. And then induced by 0.2 µM insulin for 20 min. The protein expression were detected by Western blot analysis. Cell lysates were prepared and subjected to Western blotting using specific antibodies.

이상의 결과로부터 70EBL이 간조직에서 AKT를 통한 인슐린 신호전달에 대한 조절작용은 70EBL의 주성분인 QGs, IRGs들 중에서도 QG4, QG8, IRG16에 의해 이루어짐을 추측할 수 있었다.

다음으로 앞서 인슐린 신호전달을 향상시키는 QG4와 QG8의 효능을 여러 농도로 재확인 하였다. 결과, QG4와 QG8은 모두 50, 100 μM 에서 농도 의존적으로 AKT 및 AMPK의 인산화를 활성화시킴으로써 인슐린신호전달을 향상시켰다 (Fig. 95).

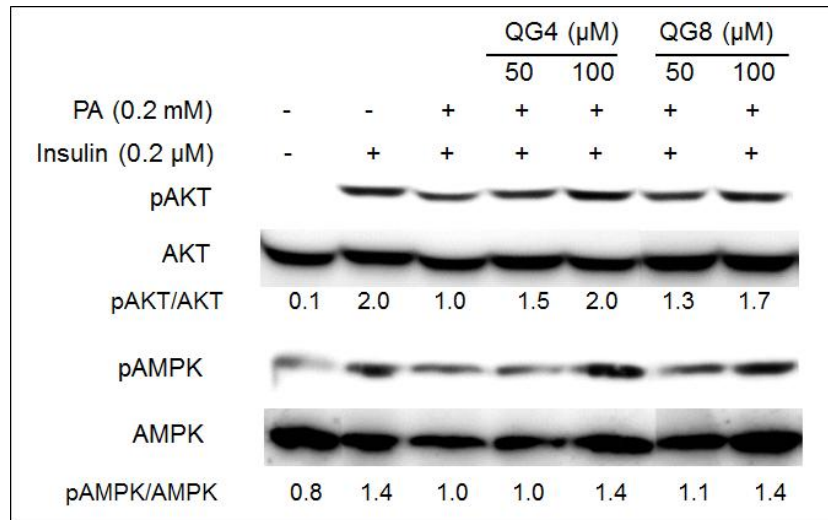


Fig. 95. PA (palmitate) induced insulin resistance in HepG2 cells. Cells were grown in culture media with 0.2 mM PA and compounds for 24 h. And then induced by 0.2 μM insulin for 20 min. The protein expression were detected by Western blot analysis. Cell lysates were prepared and subjected to Western blotting using specific antibodies.

더 나아가 IR16의 인슐린 신호전달 향상효능의 농도의존적인 결과를 확인하였다. IR16을 10, 20, 50 μM 의 농도로 HepG2 세포에 투여 시 PA에 의한 인슐린 저항성이 농도 의존적으로 개선되는 것을 관찰하였다 (Fig. 96). 즉 AKT 및 AMPK의 인산화가 IR16의 투여에 의해 효과적으로 증가되는 것을 확인하였다.

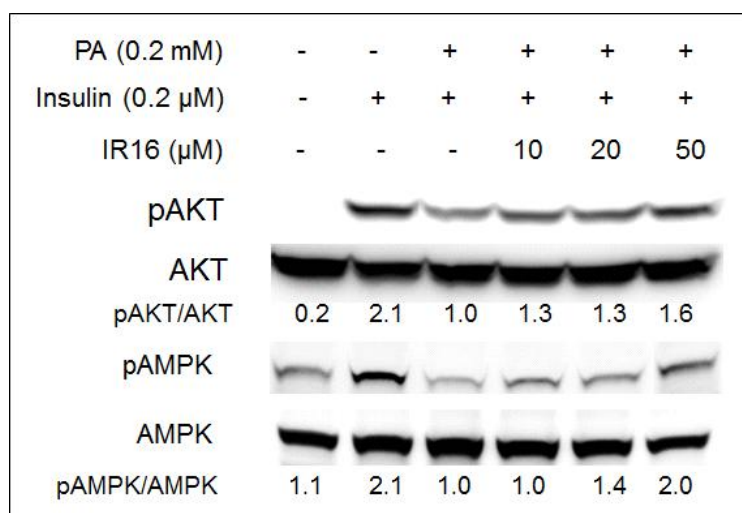


Fig. 96. Effects of IR12 and IR16 on PA (palmitate) induced insulin resistance in HepG2 cells. Cells were grown in culture media with 0.2 mM PA and compounds for 24 h. And then induced by 0.2 μM insulin for 20 min. The protein expressions were detected by Western blot analysis. Cell lysates were prepared and subjected to Western blotting using their specific antibodies.

이상의 결과로부터 동물모델에서 70ESL과 70EBL의 투여는 체중, 혈당, 인슐린을 조절하는 항당뇨 및 항비만 효능을 나타내었으며, 두 다당류 고함유 추출물은 작용 기전이 다른 것으로 나타났다.

70ESL은 주로 혈중 GLP-1의 농도 및 활성을 증가시키고 이에 따른 소장 조직에서 GLP-1의 분비를 조절하는 GLP-1, PKA, PCSK1/3의 발현을 향상시켰고, GLP-1의 타겟 조직인 췌장에서는 GLP-1에 의한 신호전달 유전자인 GLP-1R, PKA, IRS2의 발현을 증가시켜 베타세포의 인슐린 합성 (PCSK1/3, PCSK2, Ins1, Ins2)과 베타세포의 증식(Ngn3, Neurod1, MafA, Pax4, PDX-1)을 향상시켰고, 그 외 소포체 스트레스에 관련된 adaptive UPR 유전자 (Xbp1s, Bip, Fkbp11)의 발현을 조절하여 베타세포의 기능을 향상시킨다.

반면에 70EBL은 주로 QGs와 IRGs 화합물에 의한 혈중 adiponectin을 증가시키고 이에 따른 간 조직에서 adiponectin 수용체로 시작되는 신호전달을 조절한다. 즉, AdipoR1과 AdipoR2의 발현을 증가시켜 이에 따른 AMPK의 활성을 향상시키고 그 하위의 인슐린 신호전달 유전자 (GLUT-2, IRS-2, FoxO1, Foxa2) 및 지질대사 조절인자 (PGC-1, PPAR α , PPAR δ)를 조절함으로써 최종적으로 간 조직의 혈당조절 기능과 지방축적 억제 효능을 향상시킨다.

카. 기존 보고된 소재와 PSH 신소재 활성 비교 및 우수성 입증

(1) *in vivo* 동물실험을 통한 활성 비교 및 Synergistic effect(OW+LESL) 분석

(가) 당부하 내당능의 Synergistic effect

기존 보고된 혈당조절 소재인 귀리섬유(Oatwell, OW)와 PSH신소재의 혈당조절 효능 비교 및 함께 투여시 Synergistic effect를 우선 당부하 내당능 시험을 통해 확인하였다. 6주동안 HFD, OW, LESL, HESL, OW+LESL군으로 나누어 식이와 함께 시료 투여 후 내당능 측정된 결과, OW 및 LESL 함께 투여군에서 synergistic 작용을 나타내었다. Glucose 투여 후 HFD군의 혈당 농도는 급격히 증가하여 30 분 뒤의 혈당 농도는 0 분 혈당농도의 4.3배 증가하여 최고치에 달하였다. 이후 혈당 농도는 120 분까지 지속적으로 감소하였다 (Fig. 97).

Glucose 투여 후 30 분 시점에서 HFD군에 비해 HESL군과 OW+LESL군의 혈당치는 각각 14.1%, 22.0% 씩 유의적으로 낮았으며, 45 분 시점에서도 HFD군에 비해 혈당치가 각각 15.4%, 23.6% 유의적으로 낮았다. 또한 OW+LESL군은 glucose 투여 후 60 분과 90 분 시점에서의 혈당치가 각각 25.2%, 27.6%씩 유의적으로 낮았다. 즉, 고농도 콩잎추출물 및 OW+LESL군은 모두 효과적인 내당능을 나타내었다. 또한 glucose 그래프에 대한 area under the curve (AUC)를 측정한 결과에서도 HFD군에 비해 OW, HESL, OW+LESL 군에서 각각 12.2%, 18.2%, 25.3%씩 유의적으로 감소하였다. 즉 $25.3 > 12.2 + 9.8$ 로 OW및 LESL의 투여는 synergistic effect를 나타내었다. 이상의 결과로부터 ESL은 OW보다 효과적인 내당능 조절 효능을 나타내고, LESL과 OW의 투여는 synergistic effect를 나타내어 향후 제품화 단계에서 fomulation에 참고자료가 될 것이다.

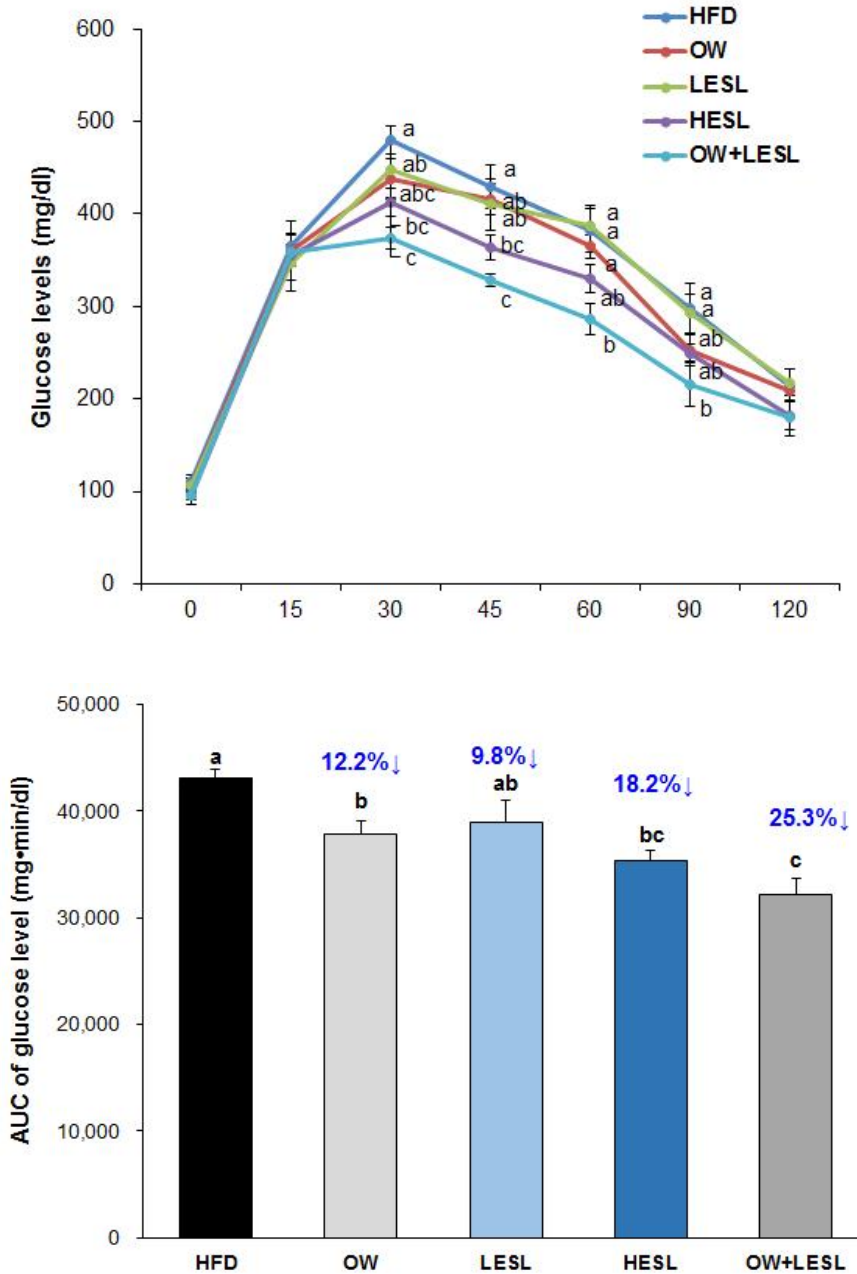


Fig. 97. Effects of the supplementation ESL and Oatwell on oral glucose tolerance test in HFD-fed C57BL/6J mice. C57BL/6J mice were supplemented with ESL (0.5% or 1% wt/wt diet) and Oatwell (2% wt/wt diet) for 6 weeks. After fasted for 12 h, the C57BL/6J mice were orally injected with glucose (G7021, Sigma) at a dose of 2 g/kg bw. Tail venous blood glucose concentration was checked at 0, 15, 30, 45, 60, 90, and 120 min after the glucose injection. Area under the curve (AUC) of plasma glucose levels during the OGTT. Data are expressed as the means \pm SE, $n = 6$. ^{a,b,c} Means not sharing a common letter are significantly different between groups ($P < 0.05$).

(나) 체중 장기(간, 췌장) 무게 변화

HFD, OW, LESL, HESL 및 OW+LESL군에 대해 8 주 동안 매주 마우스의 체중 변화를 관찰하였다. 0 주차에 마우스의 평균 체중은 20.7~21.9 g 이었고, 8주 후에 HFD군의 체중은 39.8 g으로 증가하였으며, 이에 비해 OW, LESL, HESL 및 OW+LESL군의 체중은 각각 35.9, 36.2, 36.8, 35.4 g으로 HFD군의 체중에 비해 유의적으로 감소하였다 ($P < 0.05$). 한편, 8주 동안의 체중 증가량을 계산해 본 결과, HFD군의 체중은 18.6 g 증가하였고, OW, LESL, HESL

및 OW+LESL군은 각각 15.8 g, 16.1 g, 15.5 g 및 15.0 g 씩 증가하여 HFD군과 비교할 때 유의적으로 감소하였다 ($P < 0.05$, Fig. 98, Table 67).

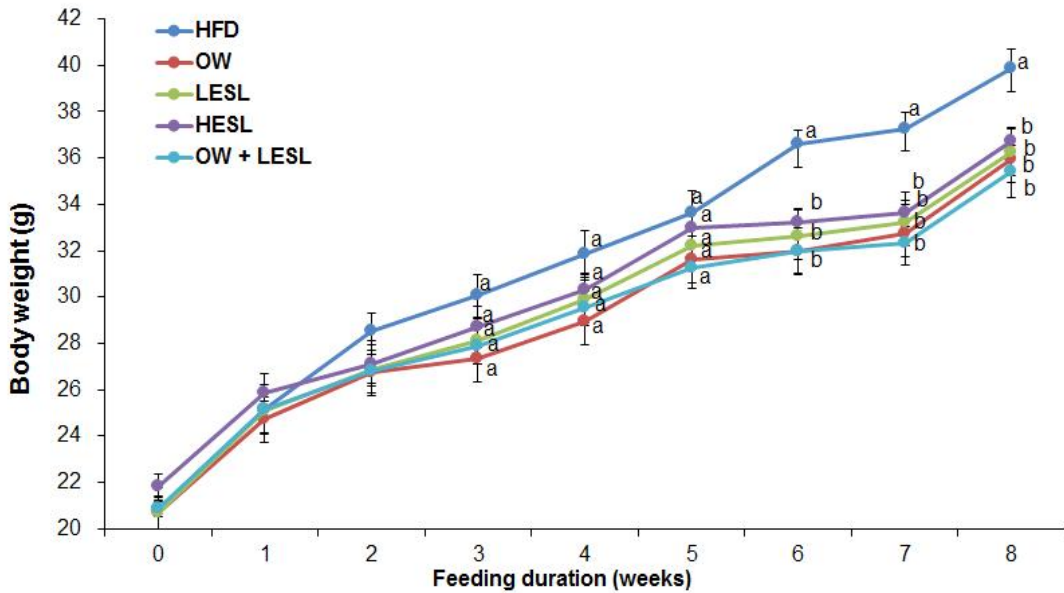


Fig. 98. Effects of ESL or Oatwell on body weight gain in HFD-fed C57BL/6J mice. Values are presented as mean \pm SE, $n = 5$. ^{a,b} Means not sharing a common letter are significantly different between groups ($P < 0.05$).

Table 67. Effects of ESL or Oatwell on body weight gain in HFD-fed C57BL/6J mice

	HFD	OW	LESL	HESL	OW+ LESL
Initial (g)	20.8 \pm 0.4 ^a	20.7 \pm 0.7 ^a	20.7 \pm 0.7 ^a	21.9 \pm 0.5 ^a	20.9 \pm 0.3 ^a
Final (g)	39.8 \pm 0.9 ^a	35.9 \pm 1.3 ^b	36.2 \pm 1.1 ^b	36.8 \pm 0.5 ^b	35.4 \pm 1.1 ^b
Weight gain (g)	18.6 \pm 0.5 ^a	15.8 \pm 0.9 ^b	16.1 \pm 1.6 ^b	15.5 \pm 0.7 ^b	15.0 \pm 1.4 ^b

Values are presented as mean \pm SE, $n = 5$.

그 외 부검 시간 (liver)과 췌장 (pancreas) 조직의 무게를 측정하였다. HFD군의 간 및 췌장 조직의 무게에 비해 OW, LESL, HESL 및 OW+LESL군의 간 및 췌장 조직 무게는 큰 변화를 나타내지 않았다 (Fig. 99, Table 68).

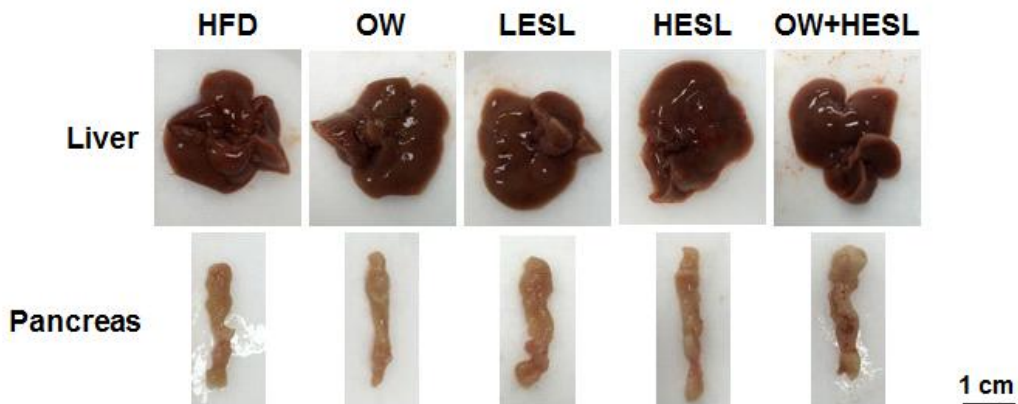


Fig. 99. Representative photographs of liver and pancreas from each groups.

Table 68. Effect of ESL and OW on organ weights in HFD-fed B6 mice

	HFD	OW	LESL	HESL	OW+ LESL
Liver (g)	1.07 ± 0.05	1.07 ± 0.13	1.08 ± 0.08	1.09 ± 0.04	1.06 ± 0.04
Pancreas (g)	0.16 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.18 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.16 ± 0.02

Values are presented as mean ± SE, n = 5.

(다) 혈액의 생화학적 분석

8주 후 OW, LESL, HESL 및 OW+LESL군의 HOMA-IR 수준이 HFD군에 비해 각각 21.2%, 31.8%, 35.1%, 49.7% 감소하였고, 혈중 TG가 HFD군에 비해 각각 21.8%, 12.4%, 23.9%, 25.8% 씩 유의적으로 감소되었으며, 혈중 TC도 HFD군에 비해 각각 13.2%, 10.0%, 18.4%, 22.3% 씩 유의적으로 감소되었다 (Table 69). 그 외에 간기능 지표인 GOT 및 GPT 혈중 농도를 측정된 결과 모든 시험군 사이 차이를 나타내지 않았다 (Table 69).

Table 69. Effect of ESL and OW on plasma profiles in HFD-fed B6 mice

	HFD	OW	LESL	HESL	OW+LESL
Glucose (mg/dl)	186.8 ± 4.7 ^a	171.6 ± 4.5 ^a	166.0 ± 12.8 ^a	161.6 ± 7.2 ^a	159.0 ± 15.9 ^a
Insulin (ng/ml)	1.4 ± 0.1 ^a	1.4 ± 0.3 ^a	1.0 ± 0.2 ^a	1.0 ± 0.1 ^a	0.8 ± 0.1 ^a
HOMA-IR	15.1 ± 1.3 ^a	11.9 ± 2.6 ^{ab}	10.3 ± 2.0 ^{ab}	9.8 ± 0.8 ^b	7.6 ± 0.5 ^b
TG (mg/dl)	174.6 ± 14.1 ^a	136.6 ± 13.1 ^b	153.0 ± 23.2 ^{ab}	132.9 ± 9.1 ^b	129.7 ± 5.4 ^b
TC (mg/dl)	225.1 ± 14.3 ^a	195.4 ± 5.2 ^{ab}	202.6 ± 10.3 ^{ab}	188.6 ± 18.1 ^{ab}	174.9 ± 15.7 ^b
HDL-C (mg/dl)	97.3 ± 10.6 ^a	103.3 ± 3.0 ^a	103.4 ± 7.2 ^a	98.9 ± 6.2 ^a	99.8 ± 7.4 ^a
HDL/TC (%)	49.6 ± 3.0 ^a	53.3 ± 2.4 ^a	54.3 ± 2.7 ^a	51.9 ± 4.4 ^a	56.8 ± 7.6 ^a
GOT (IU/L)	24.7 ± 1.2 ^a	28.8 ± 0.9 ^a	25.7 ± 2.2 ^a	23.9 ± 2.2 ^a	24.1 ± 2.3 ^a
GPT (IU/L)	11.9 ± 0.6 ^a	13.3 ± 2.1 ^a	10.7 ± 1.0 ^a	9.9 ± 0.9 ^a	10.1 ± 0.8 ^a

Values are presented as mean ± SE, n = 5. ^a, ^bMeans not sharing a common letter are significantly different between groups ($P < 0.05$).

(라) 췌장의 인슐린 함량 측정

ESL의 투여는 HOMA-IR을 조절하는 것을 확인하였다. 따라서 ESL 및 OW의 투여가 췌장조직에서도 변화를 나타내는지 췌장 조직의 인슐린 함량을 측정하였다. 결과 OW, LESL, HESL 및 OW+LESL군의 인슐린 함량이 HFD군에 비해 각각 17.6%, 21.1%, 23.5%, 24.1% 감소하였다 (Fig. 100).

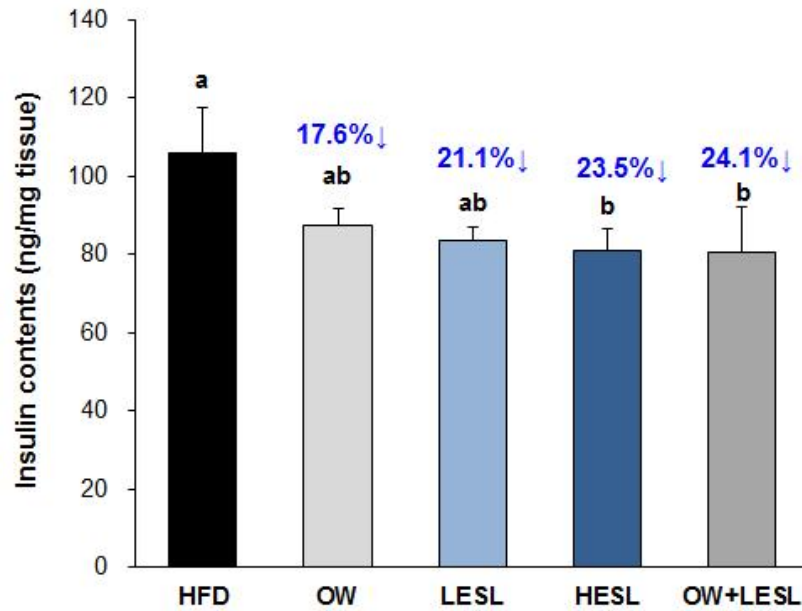


Fig. 100. The pancreas was isolated and homogenized to measure pancreatic insulin content. Values are presented as mean \pm SE, n = 5. ^{a,b} Means not sharing a common letter are significantly different between groups ($P < 0.05$).

(마) 간 조직의 TG, TC함량 측정

고지방식이의 투여는 간 조직에서 지질축적을 일으킨다. 이에 간 조직의 TG, TC함량을 측정하였다. 결과 OW, LESL, HESL 및 OW+LESL군의 TG 함량이 HFD군에 비해 각각 25.2%, 2.6%, 38.3%, 60.1% 감소하였다 (Fig. 101). 즉 $60.1 > 25.2 + 2.6$ 으로 OW과 LESL을 함께 투여는 synergistic 작용을 나타내었다. 이에 비해 간 조직 내 TC함량은 HESL군에서 대조군에 비해 유의적으로 감소하였으나, OW+LESL군에서의 synergistic effect는 나타나지 않았다. 따라서 더 나아가 ESL과 OW의 투여가 간 조직의 어떤 유전자를 조절하여 지질축적을 개선하였는지 확인하였다.

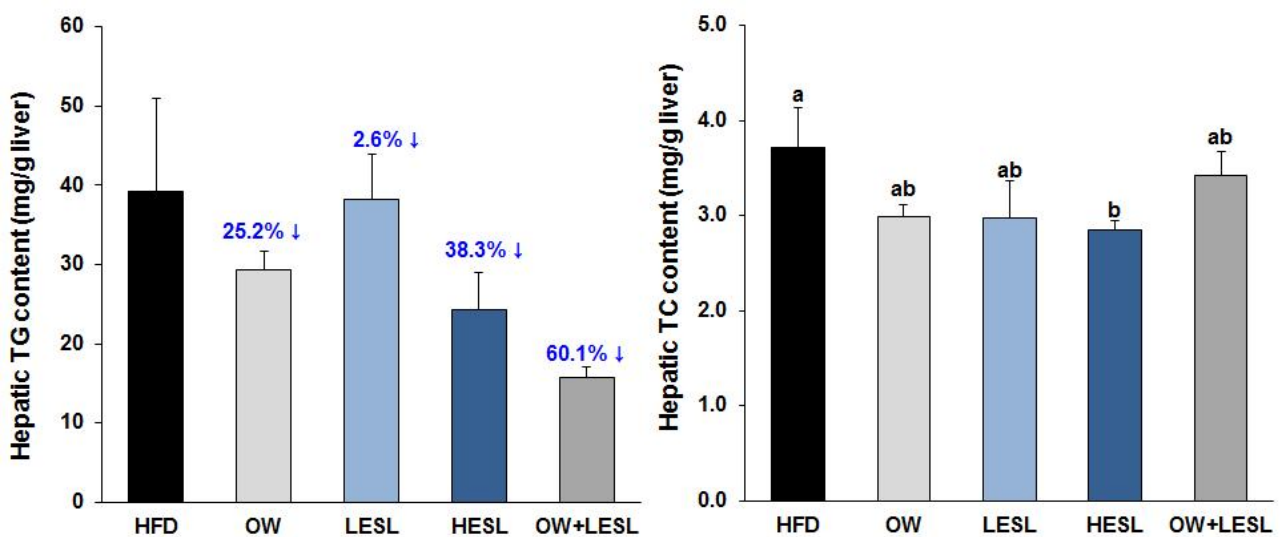


Fig. 101. Effects of the supplementation of ESL and Oatwell on TG and TC contents in liver. Values are presented as mean \pm SE, n = 5.

(바) 간 조직에서 유전자 발현 변화에 따른 Synergistic effect 분석

LESL과 OW의 투여에 의한 간 조직에서 TG 축적 억제에 대한 synergistic effect가 조직 내 어떠한 유전자 발현을 조절하여 이루어 졌는지 지질대사에 관련된 유전자들의 발현을 확인해 보았다. 그 결과, 간 조직 내 지질축적을 조절하는 transcription factor인 SREBP-1의 발현에 대한 LESL과 OW의 투여에 의한 synergistic effect를 나타내었고, 이에 따른 타겟 유전자들인 SCD1, SCD2, FAS 및 ACC1 유전자 발현 억제에 대한 synergistic effect를 나타내었다. 그 외에 SCD1의 억제에 의해 활성화 된다고 알려진 AMPK (Ntambi *et al.*, 2004)의 발현은 LESL과 OW의 투여에 의해 Synergistic하게 증가되었다 (Fig. 102).

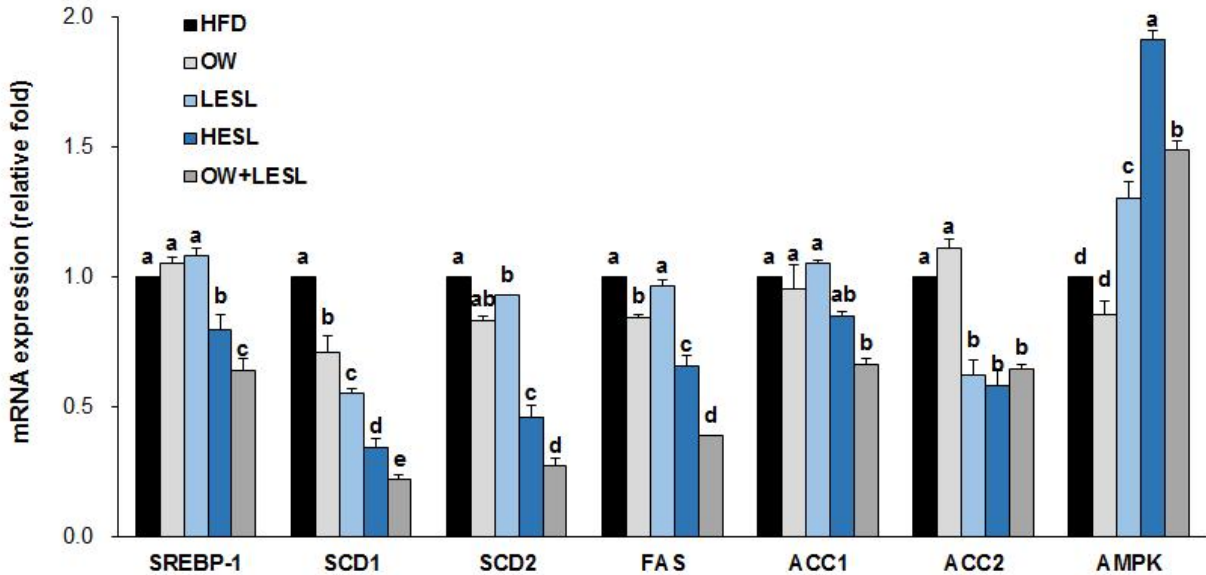


Fig. 102. Effects of the supplementation ESL and Oatwell on gene expression in liver. The levels of mRNA in liver were measured by qRT-PCR and normalized by GAPDH. Values were represented the means \pm S.E, n = 5. ^{a,b,c,d} Means not sharing a common letter are significantly different between groups ($P < 0.05$).

이상의 결과로부터 시료의 단독투여에서는 췌장 조직에 더 효과적인 조절작용을 나타내었던 ESL이 기존에 알려진 혈당조절 소재인 OW와 함께 투여 시 내당능에 대한 synergistic한 개선 효능을 나타내는데 이는 간 조직에서 SREBP-1 및 그 타겟 유전자 SCD1, SCD2, FAS, ACC1 및 AMPK의 발현을 조절하여 지질축적을 Synergistic하게 억제함으로써 이루어지는 것으로 보인다. 따라서 OW과 함께 제품을 제작 시 혈당 조절에 대한 상승 효능을 나타낼 것이다.

타. 배당체 고함유 분획의 독성/안전성 검사

대두콩잎의 70ESL의 독성/안전성 시험 결과는 이미 선행 연구를 통해 확보하였고, 본 과제에서는 검정콩잎의 70EBL의 독성/안전성 검사를 수행하였다.

- i) 단회 투여독성시험,
 - ii) 2 주간 반복 경구투여 DRF 독성시험 및
 - iii) 복귀돌연변이시험을 실시하였으며,
- 독성시험 공인기관인 (주)캠온 비임상연구소에 의뢰하여 수행하였다.

최종보고서(안)

201407-EBL의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한
단회 경구투여 독성시험

시험번호: 14-RA-281

시험의뢰기관: 한국생명공학연구원

(주)케온 비임상연구소



Nonclinical Research Institute, Chemon Inc.
240, Nambyeong-ro, Yangji-myeon, Cheoin-gu, Yongin-si, Gyeonggi-do,
449-826, Republic of Korea

요약

본 시험은 시험물질 201407-EBL을 Sprague-Dawley 랫드에 단회 경구투여하였을 때 나타나는 독성을 알아보기 위하여 수행하였다. 시험물질의 투여량은 500, 1000, 2000 mg/kg으로 설정하여 군당 알수 각 5 마리에 단회 경구투여하였다. 또한 발균주사용수만을 투여하는 부정제대조군을 두었다.

사망률, 일반증상, 체중변화 및 육안적 부검소견을 관찰하여 부정제대조군과 비교하였다. 그 결과는 다음과 같다.

1. 사망동물은 관찰되지 않았다.
2. 일반증상 관찰결과, 시험물질과 관련된 변화는 관찰되지 않았다.
3. 체중변화 관찰결과, 시험물질과 관련된 변화는 관찰되지 않았다.
4. 부검소견 확인결과, 시험물질과 관련된 변화는 관찰되지 않았다.

이상의 결과로 보아, 시험물질 201407-EBL을 Sprague-Dawley 랫드에 단회 경구투여하였을 때, 본 시험조건 하에서 개략의 치사량(Approximate Lethal Dose: ALD)은 알수 모두 2000 mg/kg을 상회하는 것으로 판단한다.

최종보고서(안)

201407-EBL의 Sprague-Dawley 랫드를 이용한
2 주간 반복 경구투여 DRF 독성시험

시험번호: 14-RR-282

시험의뢰기관: 한국생명공학연구원

(주)케온 비임상연구소



Nonclinical Research Institute, Chemon Inc.
240, Nampyeong-ro, Yangji-myeon, Cheoin-gu, Yongin-si, Gyeonggi-do,
449-826, Republic of Korea

요 약

본 시험은 시험물질 201407-EBL을 Sprague-Dawley 랫드에 2 주간 반복 경구투여하여 추후 실험 13 주 반복 경구투여 독성시험의 투여용량을 설정하기 위하여 수행하였다.

201407-EBL을 320, 800, 2000 및 5000 mg/kg/day 용량으로 투여하는 시험물질 투여군과, 멸균 주사용수를 투여하는 부정제대조군을 설정하였고, 군당 10 마리(암수 각 5 마리)에 2 주간 반복 경구투여하였다. 일반증상관찰, 체중측정, 사료 및 물섭취량 측정, 안과학적 검사, 요검사, 혈액학적 및 혈액생화학적 검사, 장기중량측정, 부검소견관찰을 실시하였다. 그 결과는 다음과 같다.

1. 사망동물은 관찰되지 않았다.
2. 일반증상 관찰 결과, 2000 mg/kg/day 이상 투여군에서 시험물질색변이 Day 3 또는 Day 2 부터 실험종료일까지 관찰되었고, 5000 mg/kg/day 투여군에서 유연이 산발적으로 관찰되었다.
3. 체중변화 관찰 결과, 시험물질에 의한 변화는 관찰되지 않았다.
4. 사료섭취량 측정 결과, 시험물질에 의한 변화는 관찰되지 않았다.
5. 물섭취량 측정 결과, 시험물질에 의한 변화는 관찰되지 않았다.
6. 안과학적 검사 결과, 시험물질에 의한 변화는 관찰되지 않았다.
7. 요검사 결과, 시험물질에 의한 변화는 관찰되지 않았다.
8. 혈액학적 검사 결과, 시험물질에 의한 변화는 관찰되지 않았다.
9. 혈액생화학적 검사 결과, 시험물질에 의한 변화는 관찰되지 않았다.
10. 장기중량 측정 결과, 간장의 상대중량이 용량-반응 상관성 있게 증가하는 경향이 관찰되었다.
11. 부검소견 관찰 결과, 5000 mg/kg/day 투여군 수컷 1 레에서 간장 좌엽의 노란색조 변색이 관찰되었다.

이상의 결과로 보아, 201407-EBL을 Sprague-Dawley 랫드에 2 주간 반복 경구투여하였을 때, 2000 mg/kg/day 이상 투여군에서 시험물질색변, 유연, 간장의 상대중량 증가가 관찰되었으나 5000 mg/kg/day 투여군 1 레에서 간장의 부검소견 외에는 임상증상 및 부검소견이 관찰되지 않았다. 따라서 추후 13 주 반복경구투여 독성시험이 수행된다면 5000 mg/kg/day를 고용량으로 하고, 아래로 공비 2 이상의 3 개 군을 설정하는 것이 적절할 것으로 판단한다.

최종보고서(안)

201407-EBL의 세균을 이용한 복귀돌연변이시험

시험번호: 14-VG-284

시험의뢰기관: 한국생명공학연구원

㈜켄온 비임상연구소



Nonclinical Research Institute, Chemon Inc.
240, Nampyeong-ro, Yangji-myeon, Cheoin-gu, Yongin-si, Gyeonggi-do
449-826, Republic of Korea

요 약

본 시험은 시험물질 201407-EBL이 대사활성계 적응 및 비적응 하에 *Salmonella typhimurium*의 히스티딘 요구성 4 균주(TA100, TA1535, TA98, TA1537)와 *E. coli*의 트립토판 요구성 균주(WP2 *uvrA*)에 복귀돌연변이를 유발하는가를 알아보기 위하여 실시하였다.

대사활성계로는 Aroclor-1254로 유도한 랫드의 간균질액에 보조소(cofactor)를 첨가한 것을 사용하였다. 시험은 direct plate incorporation 방법으로 실시하였다.

처리용 시험물질은 Dimethylsulfoxide에 용해하여 조제하였다. 아래 표와 같이 설정한 농도군과 부형제(음성)대조군 및 양성대조군으로 시험군을 구성하였으며, 농도군당 3 개의 평판을 사용하였다.

균주명	S9 mix	농도군(µg/plate)					
		15	50	150	500	1500	5000
TA strains	+/-	15	50	150	500	1500	5000
WP2 <i>uvrA</i>	+/-	15	50	150	500	1500	5000

시험결과, 모든 균주의 시험물질 처리농도에서 음성대조군에 비해 집락 수의 증가는 관찰되지 않았으며, 세포독성도 관찰되지 않았다.

한편 모든 양성대조군에서는 해당 음성대조군에 비해 집락수의 확실한 증가가 관찰되었다.

이상의 결과로, 시험물질 201407-EBL은 본 시험조건 하에서 사용한 시험균주에 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 사료된다.

파. PSH의 개별인정 기능성 원료 신청을 위한 자료 확보

(1) 기원, 개발경위, 국내·외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료

(가) 기원

콩 [*Glycine max* (L.) Merr.] 은 기원전 3 천년 전 부터 식품으로 이용된 이래 중요한 단백질과 식물성 식용유지의 원료로 활용되어 왔다. 콩의 원산지는 중국 동북부인 옛 고구려 만주 지방으로서 콩 단백질의 유용성과 산업적 활용이 커지면서 미국과 우리나라를 포함하여 전 세계에서 생산 되고 있다. 콩은 한해살이 쌍떡잎 식물로서 잎, 줄기, 뿌리, 그리고 종실과 꼬투리로 구분하며, 따뜻하고 습한 기후를 좋아해 세계적으로 널리 분포되어 있으며 우리나라에서는 쌀 다음으로 많이 재배되는 작물이다. 한반도와 만주를 중심으로 재배되던 콩은 18세기에 서양

으로 전파되었으며, 특히 1920 ~1940년대 미국 정부의 증산정책에 따라 콩 생산과 소비는 폭발적으로 증가하였다. 이후 브라질과 아르헨티나 등의 남미로 확산되었다. 동양의 전통식품의 원료였던 콩은 세계로 뻗어나가 다양한 문화권에서 식품으로 개발되어 세계적인 식품 원료로서 자리매김하였다. 반면에 콩잎을 나물로 키워 먹는 지역은 아시아가 유일하며, 우리나라에서는 전통 장류와 두부 요리 이외에 콩잎 장아찌, 콩잎 김치 등 다양한 콩잎 요리가 존재한다. 지금까지 연구된 바에 의하면 콩은 이소플라본, 사포닌, 레시틴, 피틴산 등의 매우 다양한 기능성을 가진 물질이 존재하며, 특히 콩잎은 콩 종실만큼이나 기능성 물질이 풍부한 동시에 콩 종실에는 없는 다양한 기능성 물질이 존재한다 (참고 1).

<원재료의 기원에 관한 정보>

원재료명	콩	비고 (참고)
학명	<i>Glycine max</i> (L.) Merr.	
원산지	중국 동북부	
사용부위	잎	

(나) 개발 경위

콩은 두부와 콩나물, 그리고 세계인들이 주목하는 발효식품인 장류 등의 원재료로서 한국인의 식탁을 책임져 왔다. 콩은 18세기에 서양에 전파되기 시작하며 인류의 영양 공급원 역할 뿐만 아니라, 다양한 산업 소재와 기능성 식품 소재로서 그 역할이 커지고 있다. 한편, 최상의 기능성 식품 소재로 알려진 콩 종실보다 콩의 부산물인 콩잎에 다양한 건강 기능성 성분이 존재한다는 새로운 사실이 밝혀졌다 (참고 1).

우리나라에서는 콩잎은 예로부터 나물, 장아찌용 및 씹용으로서 즐겨 먹어왔다. 현재까지 보고된 바에 의하면, 햄스터와 쥐를 통한 실험에서 콩잎 가루와 주정 추출물이 HDL-콜레스테롤 비율 향상에 효과적이며 (참고 2), 콩잎 주정추출물에 풍부하게 함유된 캄페롤 배당체가 혈당 조절에 효과를 보였다 (참고 3). 콩 종실에 비하여 콩잎에 풍부하게 함유되어 있는 테로카판계 화합물은 혈액 내 LDL-산화를 강력히 억제하여 동맥경화증 예방 (참고 4)에 도움을 줄 수 있을 뿐만 아니라, 소장에서 탄수화물의 흡수를 지연시킴으로써 식후 혈당을 조절해줄 수 있는 알파 글루코시다아제 저해 효능을 가진다 (참고 5~6). 또한 인체 실험을 통해서 콩잎 추출물을 10 주간 섭취시켰을 때, 총 콜레스테롤 수치는 낮아지고 총 콜레스테롤에 대한 HDL-콜레스테롤 비율이 증가하는 긍정적인 효과를 보여주었다 (참고 7). 또한 최근 보고된 인체 실험에 따르면, 콩잎 주정 추출물이 혈당과 당화혈색소 수치 및 인슐린 저항성을 개선하는 것으로 나타났다. 더불어 체중과 중성지방 수치, HDL-콜레스테롤 수치까지도 개선함으로써 항비만 효과도 나타내었다 (참고 8).

혈당 개선 기능성물질로 대두콩잎에는 캄페롤배당체가 많이 함유되어 있는 반면에 검정콩잎(서목태잎, 서리태잎)에는 퀘르세틴배당체와 이소람네티딘배당체가 많이 함유되어 있다. 또한 플라보놀배당체 고함유 콩잎추출물은 비만/당뇨로 인해 기능이 약해진 췌장 세포를 회복시키고 간의 지방 축적을 억제함으로써 인슐린 민감성 개선을 통해 당뇨 예방 효능을 나타내었다.

따라서 동물실험뿐만 아니라 인체시험을 통해 대사증후군 개선 효능을 입증함으로써 다수

의 국제저널에 그 결과를 게재하여 콩잎으로부터 혈당 개선 식·의약 소재 개발에 성공하였다.

(다) 국내·외 인정·허가 현황

○ 원재료 ‘대두’의 씨와 잎은 식품의 원료로 사용 가능

○ 신청원료

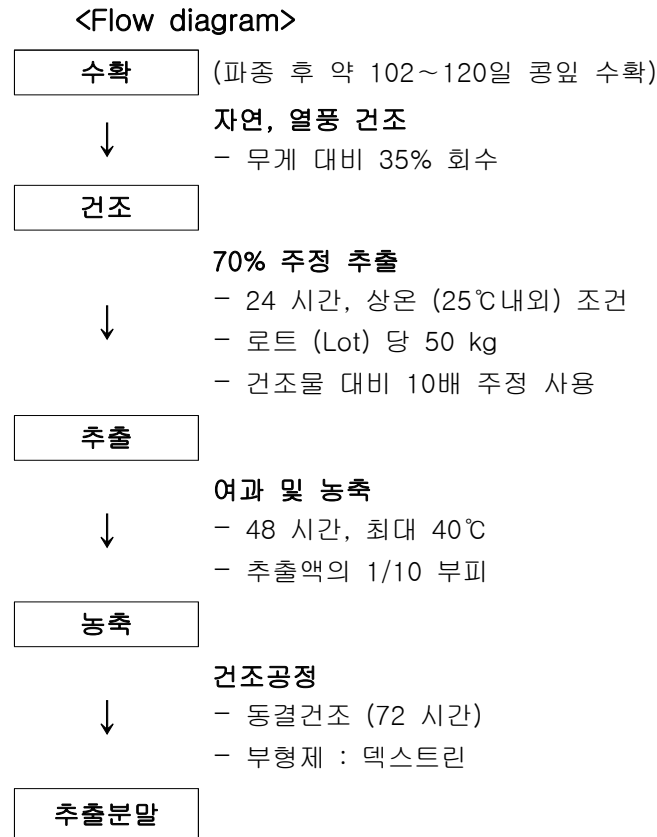
- 「식품공전」: 등재되어 있지 않으나, 식품원재료 DB 검색 결과 ‘대두’ 로 등재

<유통 판매 현황 표>

섭취 용도	건강기능성식품	건강기능식품	기타 김치류/비살균제품
섭취 시 주의사항	1. 알러지 체질이신 분은 원료 성분을 확인 후 섭취하시기 바랍니다. 2. 개봉 후 즉시 드십시오. (장기간 방치 시 눅눅해 집니다)	특이체질, 알레르기 체질은 원료 성분을 확인하신 후 섭취하십시오.	특이체질, 알레르기 체질은 원료 성분을 확인하신 후 섭취하십시오.
표시내용	콩잎추출분말[(고형분기준 9.09%, 국산), 덱스트린] 4%, 무수결정포도당, 유당(우유), 폴리덱스트로스, 난소화성말토덱스트린, 대두분리단백(대두), 비타민미네랄믹스, 합성착향료(레몬향분말), 치자청색소, 유단백 가수분해물(우유), 프로테아제(45,000 IU/set)	D-솔비톨, 폴리덱스트로스, 비타민C, 파인애플향분말9덱스트린 65.7%, 유당 20%, 파인애플향키베이스 #1 7.6%, 파인애플향키베이스 #2 5.7%, 에틸말톨 0.6%, 펙틴 0.4%), 구연산, 콩잎추출분말(국산), 이산화규소, 분말비타민E혼합제제, 초유 (우유, 미국), 유청칼슘(미국), 스테아린산마그네슘, 유기농채소혼합분말, 혼합유산균, 어류콜라겐, 산화아연, 아스파탐 (합성감미료, 페닐알라닌함유), 분말비타민A혼합제제, 판토텐산칼슘, 황산망간, 프로테아제, 비타민D3 혼합제제, 비타민B2, 엽산	국산-콩잎 41.5%, 멸치젓 16.8%, 고춧가루, 마늘, 생강, 매실, 산초(제피)가루
일일 섭취량	2포 (5 g/포)	기호에 따라 섭취하십시오. 8정 (8 g)	
제조사	(주)태웅식품	(주)유유헬스케어	군위윤팔선 콩잎김치 영농조합법인
제품명	콩잎미인	콩잎 멀티 효소 비타민	윤팔선 콩잎김치
제품사진			

(2) 제조방법 및 그에 관한 자료

(가) PSH 제조공정도



(나) 제조공정 세부 설명

① 원료, 선별, 건조: 재배기간 120일령 이후의 콩잎 색깔이 누렇게 변하면서 낙엽이 많이 생겨 콩잎 수확량이 급격히 감소하므로 102일 전후 (추석 이후)가 콩잎 수확의 적정시기이다. 자연건조, 열풍건조 (50~60℃), 태양광건조에 따른 콩잎 건조 후의 추출물의 무게 및 이들에 대한 LDL-산화 및 알파 글루코시다아제 저해활성에 미치는 영향을 조사한 결과 건조방법에 따른 활성에 차이를 보이지 않았다. 따라서 대량 공정의 경제성을 고려하여 하루 자연건조 후 18시간 열풍 건조하는 방법으로 진행한다.

② 추출, 여과 및 농축: 추출 조건으로 1차 70% 주정을 용매로 사용하며, 추출 시 25℃ 조건으로 24 시간 동안 추출한다. 추출 후 용매 제거를 위한 농축기 온도 40℃ 내외로 진행하며 농축 후 동결건조기를 이용하여 추출물의 건조분말을 회수한다.

③ 부원료 첨가: 가장 많이 사용하고 있는 부형제로서 Lactose, Dextrin, Glucose, Starch가 대표적이거나, 본 연구의 대상 기능성소재인 PTH의 주요 효능이 체지방 및 혈당개선인 점을 감안하여 Dextrin을 부형성분으로 선택하였다.

④ 추출분말 건조: 식물체의 주정추출물 등을 장기보관하면서 동물실험, 인체시험, 시제품 제작과 관련된 연구를 수행할 때 또는 제품 생산 시 추출물의 보관 용이성, 안정성 등을 고려하여 완전히 건조하여 분말로 보관해야 하는데, 이 때 건조 방법인 동결건조기 또는 진공건조기 사용에 따른 추출물의 생리활성에 미치는 영향을 관찰하였을 때, 차이가 없는 점으로부터 대량 공정의 경제성을 고려하면 진공건조 방법의 사용이 가능하나, 회수율이 낮아서 동결건조 방법을 사용한다.

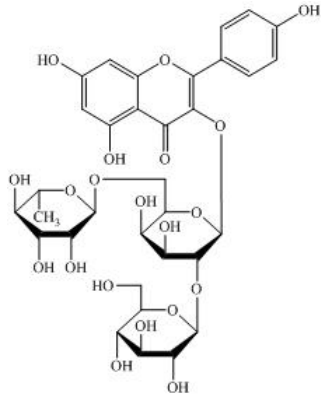
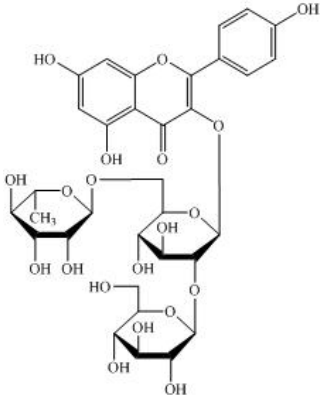
(3) 원료·성분의 특성에 관한 자료

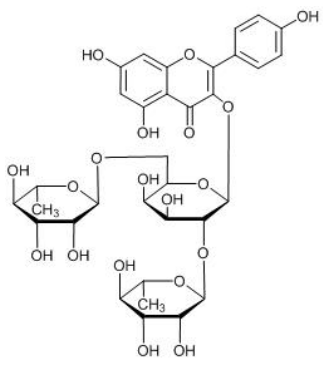
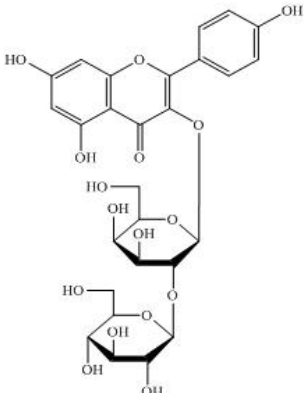
재배기간이 길어짐에 따라 콩잎에 함유된 다당류인 캄페롤 배당체 및 테로카관계 화합물인 coumestrol의 함유량이 늘어나는 것을 HPLC를 통해 분석하였으며, 이 플라보놀 배당체 및 테로카관 화합물들은 다양한 생리활성을 나타내므로 유효물질임과 동시에 지표물질로 선정하여 콩잎추출물 내의 함량을 분석하는 것이 타당한 것으로 판단된다.

(가) 기준·규격 및 함량

- ① 원료·성분명 : *Glycin max* 의 잎
- ② 원산지 : 국내산
- ③ 정의 : *Glycin max* L. 다당류 고함유 추출물 (PSH) 의 건조 분말
- ④ 지표성분 : KG7 (Kaempferol 3-O-glucosylrhamnosylglucoside), Coumestrol
- ⑤ 성상 : 분말
- ⑥ 부원료 : starch (PSH : Starch = 90:10)
- ⑦ 잔류 용매 (주정) : < 0.5% (m/m)
- ⑧ 촉진제 (carrier) : 무첨가
- ⑨ 보존제 : 무첨가
- ⑩ 중금속 : 수은, 비소, 납 및 카드뮴 불검출
- ⑪ 잔류농약 : 불검출
- ⑫ 영양성분 : 콩잎추출분말 100 g 당 탄수화물 88.3 g, 단백질 2.83 g, 지방 0.343 g, 당류 14.4 g, 총열량 368 kcal

(나) 기능성분

기능성분	KG6	KG7
구조		
일반명	Kaempferol 3-O-glucosylrhamnosylgalactoside	Kaempferol 3-O-glucosylrhamnosylglucoside
분자식	$C_{33}H_{40}O_{20}$	$C_{33}H_{40}O_{20}$
분자량	756.66	756.66
기능	<ul style="list-style-type: none"> • Yeast α-glucosidase 저해활성 • DPP-4 저해활성 • 베타세포의 인슐린 분비능 향상 • 대식세포에서 NO, ROS 저해활성 	<ul style="list-style-type: none"> • DPP-4 저해활성

기능성분	KG9	KG10
구조		
일반명	Kaempferol 3-O-dirhamnosylgalactoside	Panasenoside
분자식	$C_{33}H_{40}O_{19}$	$C_{27}H_{30}O_{16}$
분자량	740.66	610.52
기능	<ul style="list-style-type: none"> • Porcine α-amylase 저해활성 • LDL 산화 저해활성 • DPP-4 저해활성 • 베타세포의 인슐린 분비능 향상 • 대식세포에서 NO, ROS 저해활성 	<ul style="list-style-type: none"> • DPP-4 저해활성 • 베타세포의 인슐린 분비능 향상

기능성분	KG11	KG13
구조		
일반명	Sophoraflavonolloside	Isobiorobin
분자식	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅
분자량	610.52	594.52
기능	<ul style="list-style-type: none"> • DPP-4 저해활성 	<ul style="list-style-type: none"> • Porcine α-amylase 저해활성 • LDL 산화 저해활성 • DPP-4 저해활성

기능성분	Coumestrol	Phaseol	Isotrifoliol
구조			
일반명	Coumestrol	Phaseol	Isotrifoliol
분자식	C ₁₅ H ₈ O ₅	C ₂₀ H ₁₆ O ₅	C ₁₆ H ₁₀ O ₆
분자량	268.22	336.34	298.25
기능	<ul style="list-style-type: none"> • Yeast α-glucosidase 저해활성 • LDL 산화 저해활성 • DDP-4 저해활성 • hACAT1, 2 저해활성 		

(4) 기능성분(또는 지표성분)에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료

(가) HPLC를 이용한 다당류 화합물 및 Coumestrol 함량 분석 조건

- 준비물: 0.1% Acetic acid in water, Acetonitrill (HPLC용)
- 표준물질 KG7, Coumestrol
- KG7의 HPLC 분석 조건:

Analytical HPLC condition	
HPLC apparatus :	Shimadzu 10A vp
Pump system:	Shimadzu LC-10A vp with binary pump
Auto injector:	Shimadzu SIL-10A vp
Detector:	Shimadzu SPD-M10A vp (PDA detector, 254, 345 nm)
Column:	Brownlee SPP C18 (4.6×100 m, 2.7 μm)
Flow rate:	1.0 ml/min
Flow solvent A:	0.1% Acetic acid in Water
Flow solvent B:	Acetonitrile

Solvent elution method			
Time	A (%)	B (%)	
0.0	95	5	Isocratic
40.0	29	71	Gradient
50.0	0	100	Gradient
55.0	95	5	Gradient
60.0	95	5	Isocratic

- Coumestrol의 HPLC 분석 조건:

Analytical HPLC condition	
HPLC apparatus :	Shimadzu 10A vp
Pump system:	Shimadzu LC-10A vp with binary pump
Auto injector:	Shimadzu SIL-10A vp
Detector:	Shimadzu SPD-M10A vp (PDA detector, 254 nm)
Column:	Brownlee SPP C18 (4.6×50 m, 2.7 μm)
Flow rate:	1.8 ml/min
Sample injection volume:	10 μl
Flow solvent A:	0.1% Acetic acid in Water
Flow solvent B:	Acetonitrile

Solvent elution method			
Time	A (%)	B (%)	
0	95	5	isocratic
15.0	70	30	gradient
20.0	20	80	gradient
23.0	0	100	gradient
27.5	0	100	isocretic
30.0	95	5	gradient

(나) 70ESL의 KG7, Coumestrol 함량 분석

콩잎 70ESL의 지표물질 함량을 측정한 결과, 70ESL의 지표성분인 KG7의 함량 추출물 중량의 2% 이상, Coumestrol의 함량은 추출물 중량의 1% 이상을 차지한다.

(5) 안전성에 관한 자료

(가) 섭취근거 정보

① 원료의 안전성

제주도에서는 콩잎을 쌈용으로 먹으며, 콩잎장아찌, 콩잎김치 등 다양한 콩잎 요리가 있다.

식품의약품 안전처 (식품원재료 검색)

원재료명	대두	
이명	콩, Soybean, 야료두(野料豆)	
학명	Glycine max (L.) Merr.	
생약명	대두황권 (大豆黃卷)	
원재료 분류	식물	
식용가능 여부	가능	씨 / 잎
	제한적	
	불가능	
	※ 해당부위를 클릭하시면 부위별 상세정보를 확인 할 수 있습니다.	



클릭하시면 확대합니다

이미지 출처 : 식품의약품안전청

1 2

클릭하시면 원래 크기로 보실 수 있습니다.

특성/분포	콩과의 한해살이풀. 높이는 60~100cm이며, 잎은 어긋나고 세 쪽 겹잎인데 털이 있다. 7~8월에 잎겨드랑이의 짧은 가지에 흰색, 붉은색, 보라색의 작은 나비 모양 꽃이 총상(總狀) 화서로 피고, 그 가운데 몇 개의 꽃이 결실하여 꼬투리가 된다. 꼬투리 속에는 1~3개의 긴 타원형의 씨가 들어 있다. 씨는 식용하거나 기름을 짜서 쓴다. 중국이 원산지로서 한국, 만주, 아메리카, 아프리카 등지에 분포한다.[1]
주요성분(부위별)	1. 단백질 평균 40%정도 함유, glycinin, albumin, phaseolin, glutelin, antitrypsin(trypsininhibitor), hemagglutinin 2. 지방 54% linoleic acid, 23% oleic acid, 8% linolenic acid, 11% palmitic acid, 4% stearic acid, myristic acid 3. 탄수화물 자엽 - sucrose, stachyose, raffinose 세포막 - hemicellulose(arabon, galactan) 종피 - 근섬유 4. 무기질과 비타민 1,700mg% K, P, Mg, Ca, carotene, tocopherol 5. 특수성분 trypsin inhibitor, saponin 황색콩 종피 - genistin, tatoon, daidzin등의 isoflavon계 색소 흑색콩 종피 - chrysanthemins등의 anthocyan계 색소
안전성/독성	독성은 약하고 장기간 복용하지 않으면 된다.

기타	1.된장: 콩을 삶아서 누룩(국, koji)을 섞고 물을 적당히 가하여 약 55%소금으로 방부시키면서 숙성시킨 중요한 조미료의 하나이다. 누룩에는 전분단백질 분해효소, 공기 중 세균, 효모류 등 각종 효소가 있어서 쌀을 당화시킴과 동시에 콩의 단백질을 분해하고 세균, 효모에 의하여 젖산 등 여러종류의 유기산을 만들어 단맛과 독특한 향이 생긴다. 보통 쓰이는 누룩에는 사용 원료에 따라, 쌀누룩, 보리누룩, 콩누룩등으로 나눌 수 있는데 우리나라에서는 콩누룩을 이용한 된장이 가정용으로 많이 애용되고 있다. 2. 간장: 간장에는 재래식, 개량식 및 아미노산 간장이 있다.재래식은 삶은 콩으로 재래식인 메주덩어리를 만들고 자연중에 있는 곰팡이로 오랫동안 띄운 것을 소금물에 담가 만든 것이다. 개량식은 누룩 곰팡이만을 삶은 콩과 볶은 밀에 섞어 순수하게 3-4일간 제국한 것을 소금물에 담가 만든 것이다. 간장을 담그면 누룩균의 효소작용과 효모의 번식 그밖에 유용한 미생물들의 작용으로 처음에는 당화작용, 단백질 분해작용등이 일어나고 다음에는 알콜 및 산 발효에 의하여 풍미가 좋아진다. 아미노산 간장은 콩 단백질은 염산(HCL)으로 분해하여 아미노산액을 만들고 이액에 양조간장(제미)등을 첨가하여 가공한 간장인데 화학 간장이라고도 한다. 3. 청국장: 삶은 콩에다 청국장균(bacillus natto)을 번식시킨 것이다. 과거에는 각 가정에서 간단히 콩을 삶아서 짚을 적당히 싸서 보온하면 자연계의 나토균이 번식해서 청국장이 되는 것이다. 지금은 순수 배양한 나토균을 이용함으로써 빨리 좋은 것을 만들 수 있다. 청국장에는 강력한 단백 분해효소와 전분 분해효소가 함유되어 있어서 소화를 돕고 콩의 단단한 조직은 나토균으로 연화되어 소화성이 좋게 되어 있다. 점질물이므로 일명 스레디드 나토(threaded natto)또는 스레디드 퍼멘티드 소이빈(threaded fermented soybean)이라고도 한다. 4. 두부: 콩의 수용성 단백질(glycinine)을 더운물로 추출하여 여과하고 그 여액을 두유와 비지로 분리한 다음, 두유에 응고제를 가하여 단백질을 응고시킨 것이다. 응고제로는 MgCl ₂ , CaCl ₂ , 또는 CaSO ₄ 등이 사용된다. 5.콩나물: 콩을 따뜻한 어두운 곳에 두면서 발아시킨 것으로 발아한 다음 5-10일 후의 것을 식용으로 한다. 단백질의 일부가 손실되나 비타민 C가 풍부하게 들어 있다.
근거자료	국립국어원, 표준국어대사전. http://stdweb2.korean.go.kr. 2012 두산세계대백과 엔사이버 유영균 외, 식품위생학, 대학서림, p131(1993) www.tradimed.co.kr

② 독성/안전성 시험결과를 통한 안정성 확보

실험명	대두콩잎 추출물의 Chinese Hamster lung (CHL) 세포를 이용한 염색체이상 시험
<p>실험 방법</p>	<p>(주)켄온에 의뢰하여 염색체이상을 실시함. 콩잎 추출물 10~2500 µg/ml 및 음성대조군 (DMSO)를 이용하여 대사활성계 적용/비적용 시험을 실시하였다 (대사활성계: Acroclor-1254-induced rat liver S-9 및 cofactor). 처리방법은 대사활성계 적용/비적용 6 시간 처리군 및 대사 활성계 비적용 24 시간 콩잎을 처리하여 농도군당 100 개의 중기상 계수를 측정 하였다. 양성 판정 기준은 1 개 이상의 염색체이상을 가진 중기상의 출현 빈도 (백분율, %)가 5% 미만은 음성, 5~10% 미만은 의양성, 10% 이상은 양성으로 판정 하며, 용량의존성 또한 고려하여 실험을 실시하였음.</p>
<p>실험 결과</p>	<p>CHL 세포를 이용한 유전독성검사 중 가장 기본이 되는 염색체이상 시험을 실시한 결과, 콩잎 추출물은 CHL 세포에 염색체 이상을 유발하지 않는 것으로 판단되었다.</p>
<p>출처</p>	<p>농산자원을 이용한 대사증후군 예방 치료용 기능성소재 개발, 바이오그린21사업, 2010</p>
실험명	대두콩잎 추출물의 단회 경구 투여 독성 시험
<p>실험 방법</p>	<p>PTH의 Sprague-Dawley 래드에 단회 경구 투여를 하였을 때 나타나는 개략적인 독성을 비교 평가하여 안정성 실험을 시행함. 수컷, 암컷 각각 24 마리씩 7 주령에 입수하여 8 주령부터 투여를 하였으며, 투여량을 0, 1,250 mg/kg, 2,500 mg/kg 그리고 5,000 mg/kg으로 희석하여 암-수 각 5 마리에 투여를 통해 독성을 비교 평가하였음</p>
<p>실험 결과</p>	<p>사망동물이 발견되지 않았으며, 일반증상, 체중변화 및 부검소견에서 이상 소견이 발견되지 않았음. 이상의 결과로 PTH는 Sprague-Dawley 래드에 단회 경구 투여하였을 때, 치사량(Approximate Lethal Dose, ALD)은 암-수 모두 5,000 mg/kg을 상회하는 것으로 판단됨.</p>
<p>출처</p>	<p>체지방 및 혈당 개선용 테로카판 강화 기능성소재 개발, IPET, 2014</p>
실험명	대두콩잎 추출물의 복귀돌연변이시험
<p>실험 방법</p>	<p>PTH의 대사활성계 적용 및 비적용하에 <i>Salmonella typhimurium</i> 히스티딘 요구성 4 균주 (TA100, TA1535, TA98, TA1537)와 트립토판 요구성 균주인 <i>Escherichia coli</i> WP2 <i>uvrA</i> 에 복귀돌연변이를 유발하는가를 알아보기 위해 실험을 하였음. 대사활성계로는 Aroclor-1254로 유도한 랫드의 간균질액에 보호소(cofactor)를 첨가한 것을 사용함. 시험은 direct plate incorporation 방법으로 실시하였음. 처리용 시험물질은 DMSO로 조제하였고, 아래 표와 같이 설정한 농도군과 음성 및 양성 대조군으로 시험군을 구성하였으며, 농도군 당 3 개의 평판을 사용하였음.</p>
<p>실험 결과</p>	<p>시험결과, 모든 균주의 시험물질 처리농도에서 음성대조군에 비해 집락수의 증가는 관찰되지 않았으며 세포독성도 관찰되지 않았음. 또한 모든 양성대조군에서는 해당 음성대조군에 비해 집락수의 확실한 증가가 관찰되어 PTH는 사용한 시험균주에 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 판단됨.</p>
<p>출처</p>	<p>체지방 및 혈당 개선용 테로카판 강화 기능성소재 개발, IPET, 2014</p>

③ 인체시험을 통한 안정성 확보

시험명	농산자원을 이용한 대사증후군 예방 효능을 위한 인체 시험
시험방법	체질량 지수 (BMI)가 23-24.9로 과체중인 사람들을 (n=86) 대상으로 소화과정에서 초래되는 부작용을 고려하여 대조군에 제공된 전분의 양은 2 g 으로 제한하였고, 시험물질(콩잎추출물)은 GLP기관 (주)캠온에 의뢰한 결과 염색체 이상시험에서 무독성으로 판명되어 대조군과 같은 양인 2 g을 10 주 동안 공급하였다.
시험결과	시험기간 중 나타날 수 있는 부작용 및 불편사항 (설사, 장내가스 발생, 어지러움, 복통, 구토 등)을 조사함으로써 10주 동안 모니터링한 결과 이상 없었음.
출처	농산자원을 이용한 대사증후군 예방 치료용 기능성소재 개발, 바이오그린21사업, 2010
시험명	콩잎 추출물의 대사증후군 예방 효능을 위한 인체시험
시험방법	대상을 무작위 배정을 통해 각각 15 명을 위약대조군 (전분), 양성대조군 (바나나주정추출물), 콩잎주정추출물 (콩잎 70% 주정 추출물) 로 나누어 12 주 동안, 1 일 섭취용량 2 g/day가 되도록 1일 2회 식후 경구 복용 (1회 2정)하도록 하였다.
시험결과	시험기간 중 나타날 수 있는 부작용 및 불편사항 (설사, 장내가스 발생, 어지러움, 복통, 구토 등)을 조사함으로써 12주 동안 모니터링한 결과 이상 없었음.
출처	콩잎추출물의 대사증후군 예방용 건강기능식품 소재 개발, 바이오그린21사업, 2012
시험명	콩잎추출물의 체지방 및 혈당조절 효능 검증을 위한 인체 시험
시험방법	경미한 고혈당 (공복혈당이 100 mg/dl 정도)을 동반하는 과체중 또는 비만인 (BMI≥23)을 무작위로 위약대조군(전분, 18명), 대두콩잎추출물군(21명)으로 나누어 12 주 동안, 1 일 섭취용량 2 g이 되도록 1일 3회 식후 경구 복용 (1회 2정)하도록 하였다.
시험결과	시험기간 중 나타날 수 있는 부작용 또는 불편사항(설사, 장내가스 발생, 어지러움, 두통, 구토 등)을 조사함으로써 12주 동안 모니터링한 결과 이상 없었음.
출처	본 과제 제2협동과제 연구수행결과 (인체시험 결과의 IBR 승인 cnlemr)

(6) 기능성내용 및 그에 관한 자료

(가) 효능 표시 (효능 효과)

현행	제안
건강기능식품 미등재	1. 혈당조절에 도움이 됩니다. 2. 체지방감소에 도움이 됩니다.

(나) 기능성 내용에 대한 요약

본 원료인 콩잎 주정추출물은 콩잎을 주정으로 추출하여 제조하였으며 대두콩잎에 많이 함유되어 있는 생리 활성 물질인 다당류인 캄페롤 배당체 (Kaempferol glycosides)와 테로카판 (Pterocarpin) 등에 관한 체지방 감소 및 항당뇨 효능은 이미 국내외 많은 연구를 통하여 입증

되어 있다.

국내의 경우 콩잎 추출물의 체지방 감소, 혈당강하, 혈중 콜레스테롤 저하 등에 관한 효과에 대해 현재 한국생명공학연구원 정태숙 박사 연구팀과 경북대학교 최명숙 교수팀의 효능 검증 결과로 세포 실험뿐만 아니라 동물실험을 통해서 이를 입증되어 있으며 또한 최명숙 교수팀에서 실시한 인체시험에서도 콩잎추출물이 과체중 피험자와 전당뇨병 (prediabetes) 징후를 보이는 환자들을 대상으로 콩잎 추출물을 섭취시켰을 경우 혈당조절에 도움을 주는 것으로 밝혀져 그 결과를 전문학술지 (Journal of Medicinal Food, Journal of Agricultural and Food Chemistry, Molecules, Nutrition Journal, Food & Function, Nutrients)에 발표하였다. 또한 국내뿐만 아니라 국외 다수의 학회지에서 콩잎 주정 추출물의 체지방감소 및 항당뇨 효능에 대해 보고된 바 있다.

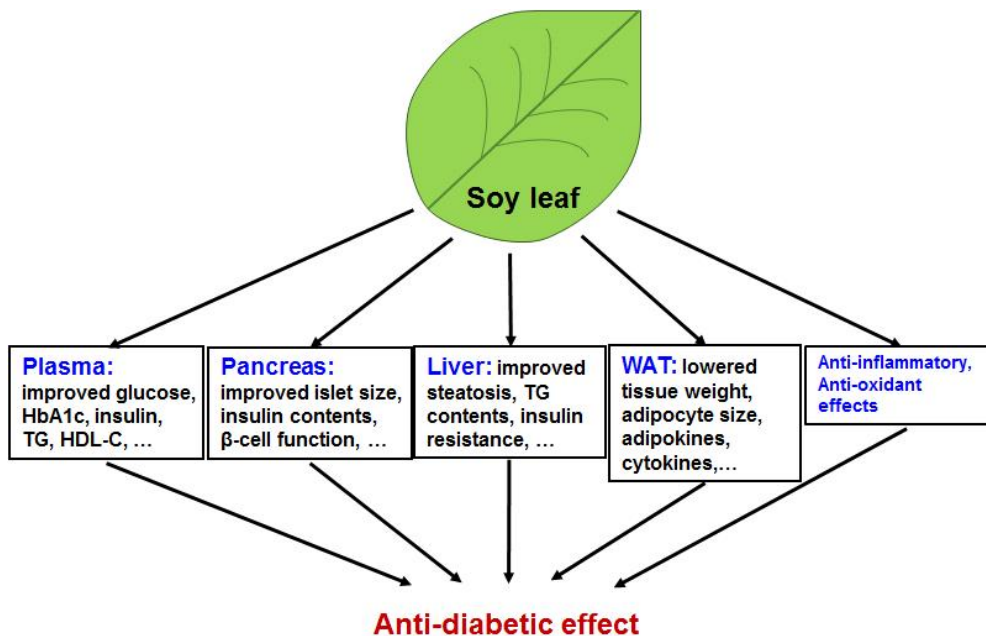


그림. 콩잎의 혈액 및 각 조직에서의 항당뇨 작용기전.

콩잎추출물에는 콩에 비해 다양한 생리 활성 물질인 이소플라본 (Isoflavone)류, 플라본 (Flavone), 플라보놀 (Flavonol), 테로카판 (Pterocarpan), 페놀성 화합물, 소야사포닌 (Soyasaponine), 당알콜 등이 함유되어 있으며, 그 중 이소플라본은 주로 콩과 식물에만 함유되어 있으며 이들은 성인병 예방에 효과적이며, 플라본 (Flavone)과 플라보놀 (Flavonol)은 강력한 항산화효능을 기반으로 고지혈증, 동맥경화, 폐암 등에 뛰어난 효과를 가진 것으로 알려졌다. 그리고 flavonoid의 경우 항당뇨 효과를 가진다는 연구결과와 α -glucosidase와 α -amylase의 활성을 효과적으로 억제한다는 연구결과도 국내외 저널을 통해서도 알 수 있다.

또한 정태숙 박사 연구팀에서 연구한 결과로 보면 콩잎에 함유된 플라보놀 화합물은 배당체의 형태로 많이 존재하는데 이는 콩잎의 품종에 따른 차이를 나타내었다. 이미 보고된 바와 같이 대두콩잎 추출물에는 기존에 알려진 이소플라본과 테로카판 외에 캄페롤 배당체들이 많이 함유되어 있었고, 췌장조직의 베타세포의 기능개선을 통해 인슐린 저항성을 개선하였다.

그 외 콩잎에 함유된 테로카판은 혈액 내 LDL-산화를 강력히 억제하여 최근 성인병에서 가장 문제가 되는 동맥경화증 예방에 도움을 주는 동시에 국내 경상대학교 박기훈 교수팀에 따르면 콩잎에서 분리한 테로카판 화합물 coumestrol, phaseol 등의 화합물이 α -glucosidase의

활성억제에 탁월한 효능을 가지고 있다는 것을 밝혔다. 본 연구에서 추가적으로 테로카판 화합물 중 isotrifoliol의 항염증 및 지질축적 저해 효능을 세포실험을 통해 검증하였다. 하지만 콩잎 다당류 및 테로카판 화합물의 이러한 활성 보고에 비해 현재 국내외에서 기능성 소재로서 많이 이용 되어있지 않으므로 향후 콩잎이 건강 기능식품소재로서 가치가 증대 될 것으로 기대한다.

(다) 콩잎 추출물의 체내 작용기전

본 연구에서 콩잎 추출물, 다당류 화합물 및 테로카판계 화합물이 α -amylase, α -glucosidase, LDL-oxidation 및 DPP-4 저해활성을 나타내었고, 이러한 저해활성의 측정을 통하여 콩잎 추출물의 수확시기, 품종, 및 추출용매를 선정하였다. Tadera 등 (참고 9) 에 따르면 콩잎추출물에 주요 성분인 flavonoid 물질이 amylase와 α -glucosidase 효소의 활성 억제에 탁월하다는 연구 결과를 이미 보고 했으며, Babu 등 (참고 10)은 flavonoid 화합물의 항당뇨 기작에 대해 Review 논문을 발표하였다. 특히 콩잎 추출물에 함유되어 있는 테로카판 화합물은 yeast α -glucosidase 저해 활성이 매우 높다 (IC₅₀ 값: coumestrol 6 μ M; phaseol 42.6 μ M) (참고 5).

본 연구팀이 발표한 콩잎추출물의 기능성에 따르면 C57BL/6J mice와 LDLR^{-/-} mice에 고지방 고콜레스테롤 식이를 섭취시켰을 경우 콩잎 추출물을 식이와 같이 섭취시킨 군이 추출물을 투여하지 않은 군에 비해 혈액 내 중성지방수치와 체지방 감소의 효과를 가진다고 보고하였고 (참고 11), C57BL/6J mice에 고지방식으로 비만을 유도한 동물모델에 캄페롤 배당체 또는 테로카판을 함유한 콩잎 추출물을 경구 투여 시 효과적인 체중, 내장지방 감소 및 혈당 조절 효과를 나타낸다고 보고하였으며 (참고 15), 그 외 *db/db* 당뇨 질환모델마우스에 캄페롤 배당체를 함유한 콩잎 추출물을 식이와 함께 섭취시켰을 경우 유의적인 혈당 조절 효능을 나타냈는데, 이는 췌장의 베타세포 기능개선 및 간 조직에서 지질축적을 조절하여 이루어졌다 (참고 16).

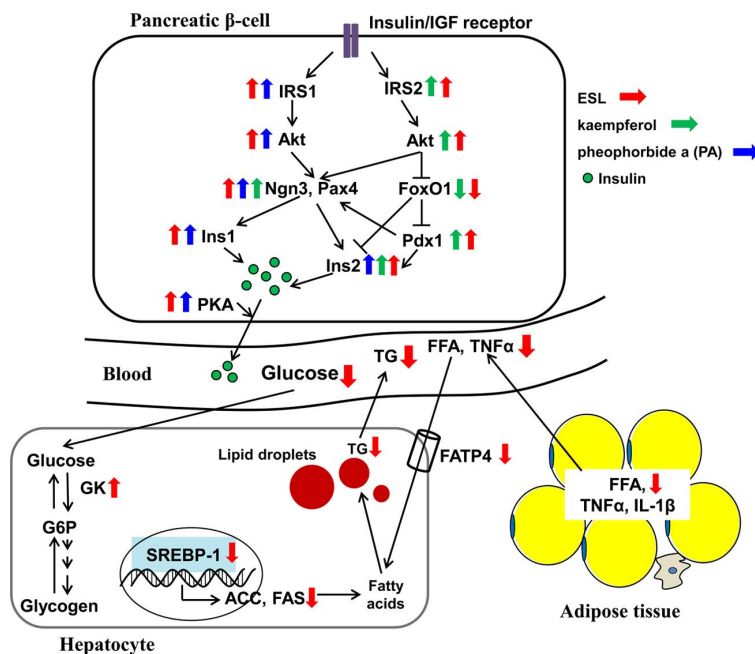


그림. 콩잎 및 콩잎 화합물의 혈당조절 및 체지방개선 작용기전 (참고 16)

본 연구팀의 인체적용시험에서 콩잎 추출물을 10 주간 섭취 시켰을 경우 placebo 그룹에 비해 혈장의 HDL 콜레스테롤의 비율을 증가 시켜준다는 결과를 보고하였고 (참고 7), 12 주간 콩잎추출물을 섭취시킨 전당뇨병 환자 (공복시 혈당 100-125 mg/dL)의 경우 혈당, 당화혈색소 (HbA1c)의 수준이 placebo에 비해 감소하였고 체지방, 허리둘레 또한 Placebo group에 비해 감소함을 보임으로써 콩잎 추출물이 혈당조절에 기여하였다 (참고 8). 테로카판을 함유한 콩잎 추출물을 12 주간 섭취시킨 과체중($27 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-2} \geq \text{BMI} \geq 23 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-2}$)의 전당뇨병(공복 시 혈당 $\geq 95 \text{ mg/dL}$) 환자의 경우 혈당, 당화혈색소, 유리지방산, 총콜레스테롤 및 Non-HDL 콜레스테롤 수준이 감소되었다고 보고하였다 (참고 18).

캄페롤 배당체를 함유한 콩잎추출물 분획을 C57BL/6J 또는 KK-A^y mice에 고지방식이와 함께 섭취시켰을 경우 체지방 및 혈당 감소 효능을 나타냈다 (참고 3, 19). 또한 콩잎을 섭취시킨 햄스터의 경우 Non-HDL 콜레스테롤의 비율이 HDL 콜레스테롤에 비해 감소되었다 (참고 2).

즉, 콩잎 추출물의 경우 체지방을 감소시켜주는 동시에 혈당을 낮춰주고 이상지질혈증을 개선시킴으로써 항비만 및 항당뇨 효과가 있음을 알 수 있다.

콩잎에는 또 콩의 주요 함유 물질인 phytoestrogen으로 불리는 주요 물질인 genistein, coumestrol 등이 있다. 이들의 풍부한 섭취가 당뇨병의 대사개선에도 유익할 수 있음을 보여주는 연구결과들이 보고되어 있다. Ali 등은 유전적으로 비만과 당뇨를 가진 SHR/N-cp 쥐에서 콩 isoflavone의 투여 결과 혈당과 중성지방 농도가 감소되었고, 혈장 insulin, leptin, glucagon 농도에 유의적인 개선효과가 있음을 보고하였다 (참고 12). 또한 genistein이 제1형과 제2형 당뇨 쥐에 genistein을 공급한 결과 공복 혈당, 내당능, HbA1c 수준이 유의적으로 개선되었다고 보고하였다 (참고 13). Seo 등에 따르면 genistein과 coumestrol를 C57BL/KsOlaHsd-db/db 마우스에 식이로 각각 섭취시킨 경우 당뇨동물의 체중변화, 식이 및 수분 섭취량 그리고 장기무게에는 유의적인 영향을 미치지 않았으나, 모든 phytoestrogen의 보충은 당뇨동물의 공복 혈당, 경구 내당능 검사 시 혈당반응곡선 아래면적 및 혈중 HbA1c 수준을 유의적으로 낮추었다 (참고 14). 또한 모든 당뇨동물의 혈장 글루카곤 수준을 유의적으로 낮추었다. 이를 통해 콩잎 추출물과 그에 함유되어있는 flavonoid 성분이 내당능 효과를 나타냄으로써 혈당조절에 기여함을 알 수 있다.

(라) 동물실험 관련 자료 요약

학술지정보	Journal of Medicinal Food					
	Vol	18	게재연도	2015	시작페이지	899
논문제목	Anti-obesity Effects of Soy Leaf via Regulation of Adipogenic Transcription Factors in Diet-induced Obese Mice and 3T3-L1 Adipocytes					
연구목적	농산자원을 이용한 비만 및 당뇨 예방, 치료용 기능성 소재 개발					
연구유형	동물시험					
Species	mouse	Age	6 주령			
Strain	C57BL/6J	Sex	<input checked="" type="checkbox"/> male <input type="checkbox"/> female			
시험물질	국내 품종 중 YS의 수확시기가 다른 (8주, 16주) 콩잎을 건조시킨 후, 분쇄하여 가루 형태로 만들었다. 이것 (각각 50 g)을 실온에서 500 ml의 95% 주정으로 추출하였다 (8W-SLE, 16W-SLE).					
투입형태	<input type="checkbox"/> 식이 <input type="checkbox"/> 음료 <input checked="" type="checkbox"/> 강제경구 <input type="checkbox"/> 기타					
시험디자인	대조군	placebo	8마리의 male C57BL/6J mice는 정상식이 (AIN-93G diet, Dyets Inc.)를 8마리의 C57BL/6J mice는 고지방식이 (45 kcal% fat diet, D0826401, Research Diets)를 섭취 하였다.			
		positive	8마리의 <i>db/db</i> mice는 고지방식이를 섭취하였고 50 mg/kg/day <i>garcinia cambogia</i> 추출물을 경구투여하였다. (GE)			
		negative				
	시험군	8마리의 C57BL/6J mice는 50 mg/kg/day 8W-SLE을 경구투여하였고 8 마리는 50 mg/kg/day 8W-SLE을 경구투여하였다.				
	디자인	총 40 마리의 mice를 5군 (ND군, HFD군, 8W-SLE군, 16W-SLE군, GE군)으로 나누어 식이와 물을 8주 동안 자유롭게 섭취	섭취량	자유 섭취		
		섭취기간	8주			
식이조절						
바이오마커	체중, 식이섭취량, 내장지방 무게, 혈장 중성지방, 콜레스테롤, 및 혈당 함량, 내장지방에서의 조직학적 분석					
통계처리	군별 8마리 mice에 대한 평균과 표준오차, One-way ANOVA 와 Student's <i>t</i> -test 수행, 유의수준은 위험율 5% 미만으로 설정					
시험결과	1. 8W-, 16W-SLE군과 양성대조군인 GE군에서 체중증가가 감소되었고 내장 지방이 유의적으로 감소되었고 조직학적 분석을 통해 지방세포의 크기가 유의적으로 감소되었다. 2. 8W-, 16W-SLE군과 양성대조군인 GE군에서 혈액내 중성지방 및 혈당 농도가 고지방식이 HFD군에 비해 효과적으로 감소되었다. 3. 8W-, 16W-SLE군에서 지방조직의 지방 생합성에 관련된 유전자들의 발현을 긍정적으로 조절하였다.					
비고						

학술지정보	Journal of Agricultural and Food Chemistry					
	Vol	63	게재연도	2015	시작페이지	7198
논문제목	Soy Leaf Extract Containing Kaempferol Glycosides and Pheophorbides Improves Glucose Homeostasis by Enhancing Pancreatic β -Cell Function and Suppressing Hepatic Lipid Accumulation in db/db Mice					
연구목적	콩잎추출물의 혈당 개선용 건강기능식품 소재 개발					
연구유형	동물시험					
Species	mouse	Age		5 주령		
Strain	C57BLKS/J lar	Sex		<input checked="" type="checkbox"/> male <input type="checkbox"/> female		
시험물질	국내 품종 중 WD 콩잎을 건조시킨 후, 분쇄하여 가루 형태로 만들었다. 이것 (500 g)을 실온에서 5 L의 70% 주정으로 추출하였다 (ESL).					
투입형태	<input checked="" type="checkbox"/> 식이 <input type="checkbox"/> 음료 <input type="checkbox"/> 강제경구 <input type="checkbox"/> 기타					
시험디자인	대조군	placebo	8마리의 male C57BLKS/J lar-m+/+Lepr ^{db} (db/+) mice와 8마리의 male C57BLKS/J lar-Lepr ^{db} /Lepr ^{db} (db/db) mice 는 정상식이 섭취 (AIN-76A diet, Research Diets) 하였다.			
		positive				
		negative				
	시험군	8마리의 db/db mice는 1% wt/wt ESL을 정상식과 함께 섭취하였다. (db/db-ESL)				
	디자인	총 24 마리의 mice를 4군 (db/+군, db/db군, db/db-ESL군)으로 나누어 식이와 물을 8주 동안 자유롭게 섭취		섭취량	자유 섭취	
			섭취기간	8주		
식이조절						
바이오마커	체중, 혈당, 당화혈색소, 혈장 중성지방 및 인슐린 함량, 췌장 및 간에서의 조직학적 분석					
통계처리	군별 8마리 mice에 대한 평균과 표준오차, One-way ANOVA 와 Student's <i>t</i> -test 수행, 유의수준은 위험율 5% 미만으로 설정					
시험결과	<ol style="list-style-type: none"> 1. db/db-ESL군에서 혈액 내 당, 당화혈색소, 인슐린 그리고 중성지방 수치가 대조군인 db/db군에 비하여 유의적으로 낮아졌다. 2. 췌장에서의 조직학적 및 면역학적 분석을 통해, db/db-ESL군에서 랑게르한스섬의 크기와 인슐린 발현이 db/db군에 비하여 크게 회복되었고, 베타세포의 증식과 분화에 관련된 유전자 및 단백질들의 발현을 긍정적으로 조절하였다. 3. 간에서 조직학적 분석을 통해, db/db-ESL군에서 간 조직내 지질축적이 db/db군에 비하여 효과적으로 감소되었고, 지질축적에 관련된 유전자 및 단백질의 발현을 효과적으로 감소하였다. 					
비고						

학술지정보	Molecules					
	Vol	19	게재연도	2014	시작페이지	18493
논문제목	Pterocarpan-enriched soy leaf extract ameliorates insulin sensitivity and pancreatic β -cell proliferation in type 2 diabetic mice					
연구목적	체지방 및 혈당 개선용 테로카판 강화 기능성소재 개발					
연구유형	동물시험					
Species	mouse	Age		4 주령		
Strain	C57BL/6J	Sex		<input checked="" type="checkbox"/> male <input type="checkbox"/> female		
시험물질	국내 품종 중 GH 콩잎을 건조시킨 후, 분쇄하여 가루 형태로 만들었다. 이것 (500 g)을 실온에서 5.0 L의 EtOAc로 추출하였다 (EASL).					
투입형태	<input checked="" type="checkbox"/> 식이 <input type="checkbox"/> 음료 <input type="checkbox"/> 강제경구 <input type="checkbox"/> 기타					
시험디자인	대조군	placebo	10마리의 male C57BL/6J mice는 정상식이 (Taklad 2018S, Harlan Laboratories)를 10마리의 C57BL/6J mice는 고지방식이 (60 kcal% fat diet, D12492, Research Diets)를 섭취 하였다.			
		positive	10마리의 C57BL/6J mice 는 0.15% wt/wt Pinitol 고지방식을 섭취하였다.			
		negative				
	시험군	EASL군의 C57BL/6J mice 10마리는 0.56% EASL 고지방식이 섭취를 섭취하였다. (EASL)				
	디자인	총 40 마리의 C57BL/6J mice를 4군 (정상군, 대조군, EASL군, Pinitol군)으로 나누어 식이와 물을 12주 동안 자유롭게 섭취		섭취량	자유 섭취	
			섭취기간	12주		
식이조절						
바이오마커	체중, 혈당, 당화혈색소, 혈장 중성지방 및 인슐린 함량					
통계처리	군별 10마리 mice에 대한 평균과 표준편차, One-way ANOVA 와 Student's <i>t</i> -test 수행, 유의수준은 위험을 5% 미만으로 설정					
시험결과	<ol style="list-style-type: none"> EASL군과 양성대조군인 AB군에서 혈액 내 당, 당화혈색소 그리고 인슐린 수치가 대조군에 비하여 유의적으로 낮아졌다. EASL군이 췌장의 랑게르한스섬의 베타세포의 증식과 분화에 관련된 유전자들의 발현을 긍정적으로 조절하였다. EASL군에서 지방조직의 인슐린 감수성에 관련된 유전자들의 발현이 대조군에 비하여 유의적으로 증가하였다. 					
비고						

학술지정보	Journal of Nutritional Biochemistry (투고 준비 중)				
	Vol		게재연도		시작페이지
논문제목	Black Soybean Leaf Extract Improves Hyperglycemia and Hepatic Steatosis by Enhancing Adiponectin Receptor Signaling				
연구목적	검은콩잎 및 대두콩잎추출물의 혈당 조절용 건강기능식품 소재 개발				
연구유형	동물시험				
Species	mouse		Age	4 주령	
Strain	C57BL/6J		Sex	<input checked="" type="checkbox"/> male <input type="checkbox"/> female	
시험물질	국내 품종 중 WD 대두콩잎과 검은콩잎을 건조시킨 후, 분쇄하여 가루 형태로 만들었다. 이것 각각 200 g을 실온에서 각각 2.0 L의 70% 주정으로 추출하였다 (ESL, EBL).				
투입형태	<input checked="" type="checkbox"/> 식이 <input type="checkbox"/> 음료 <input type="checkbox"/> 강제경구 <input type="checkbox"/> 기타				
시험디자인	대조군	placebo	10마리의 male C57BL/6J mice는 정상식이(10 kcal% diet, Research Diets, Inc.)를, 10마리의 male C57BL/6J mice는 고지방식이(60 kcal% diet, Research Diets, Inc.)를 섭취하였다.		
		positive			
		negative			
	시험군	10마리의 C57BL/6J mice는 1% wt/wt ESL을 고지방식이와 함께 섭취하였고, 10마리는 1% wt/wt EBL을 고지방식이와 함께 섭취하였다. (ESL, EBL)			
	디자인	총 40 마리의 mice를 4군 (정상식이군, 고지방식이군, ESL군, EBL군)으로 나누어 식이와 물을 12주 동안 자유롭게 섭취	섭취량	자유 섭취	
		섭취기간	12주		
식이조절					
바이오마커	체중, 혈당, 당화혈색소, 혈장 중성지방, 유리지방산, 인슐린 농도 및 간에서의 조직학적 분석				
통계처리	군별 10마리 mice에 대한 평균과 표준오차, One-way ANOVA 와 Student's t-test 수행, 유의수준은 위험율 5% 미만으로 설정				
시험결과	<ol style="list-style-type: none"> ESL군과 EBL군에서 고지방식이군에 비하여 체중 및 간 조직의 무게가 유의적으로 감소하였다. EBL군에서 ESL군보다 더 효과적으로 혈당, 당화혈색소, 인슐린 및 이에 따른 HOMA-IR의 수준을 개선하였다. EBL군의 간조직 내 지질축적이 효과적으로 감소되었는데 이는 아디포넥틴의 수용체에 따른 신호전달을 개선하여 이루어졌다. 				
비고					

학술지정보	Journal of Agricultural and Food Chemistry					
	Vol	51	게재연도	2003	시작페이지	4554
논문제목	Soy Leaf Lowers the Ratio of Non-HDL to HDL Cholesterol in Hamsters					
연구목적	콩잎 파우더 (Soy leaf powder; SLP) 와 콩잎 에탄올 추출물 (Soy leaf ethanol extract; SLEE) 의 햄스터 혈청 내 지질에 대한 효과 평가					
연구유형	동물시험					
Species	hamster		Age	3 주령		
Strain	<i>Mesocricetus auratus</i>		Sex	<input checked="" type="checkbox"/> male <input type="checkbox"/> female		
시험물질	중국 Henan province 의 Meng County 에 위치한 농장에서 얻은 Soy Leaf 를 건조시킨 후 grinding 으로 분쇄하여 powder 형태로 만들었다 (SLP). 일부 SLP (300 g) 은 50℃에서 1.8 L의 70% ethanol 로 세 번 추출하였다 (SLEE).					
투입형태	<input checked="" type="checkbox"/> 식이 <input type="checkbox"/> 음료 <input type="checkbox"/> 강제경구 <input type="checkbox"/> 기타					
시험디자인	대조군	placebo	총 36 마리의 hamster 중 12 마리는 0.1%의 콜레스테롤을 함유하는 식이 섭취 (casein 200 g, lard 100 g, coconut oil 100 g, cornstarch 418 g, sucrose 100 g, AIN-76 mineral mix 40 g, AIN-76A vitamin mix 20 g, DL-methionine 1 g, cholesterol 1 g)			
		positive				
		negative				
	시험군	SLP그룹의 hamster 12 마리는 3% SLP 식이 섭취 (그 외 성분은 대조군과 동일), SLEE그룹의 hamster 12 마리는 3% SLP의 에탄올 추출물 식이 섭취 (그 외 성분은 대조군과 동일)				
	디자인	총 36 마리의 hamster를 3 그룹 (대조군, SLP 식이군, SLEE 식이군)으로 나누어 식이와 물을 28 일 동안 자유롭게 섭취		섭취량	자유 섭취	
			섭취기간	4주		
식이조절						
바이오마커	식이섭취량, 체중, 혈청 지질 함량, 간 내 지질 함량, 분변 내 중성 및 산성 스테롤 조성 및 함량					
통계처리	그룹별 12마리 hamster에 대한 평균과 표준편차, One-way ANOVA 와 Student's t-test 수행, 유의수준은 위험을 5% 미만으로 설정					
시험결과	1. SLP 그룹에서 혈청 내 총 콜레스테롤과 non-HDL 콜레스테롤을 저하시키는데 효과가 있었지만 HDL 콜레스테롤을 상승시키는 효과는 없었다. 2. SLEE 그룹에서는 HDL 콜레스테롤 수치가 상승했고 non-HDL 콜레스테롤 수치는 감소하였지만 총 콜레스테롤에는 변화가 없었다. 3. SLP 그룹 및 SLEE 그룹 모두 HDL-C 에 대한 non-HDL-C 의 비율이 감소되었다.					
비고						

(마) 인체실험 관련 자료 요약

학술지정보		Nutrition Journal				
		Vol	10	게재연도	2011	시작페이지
논문제목		Does Glycine max leaves or <i>Garcinia Cambogia</i> promote weight-loss or lower plasma cholesterol in overweight individuals: a randomized control trial				
연구목적		과체중 환자에 대한 콩잎 추출물의 체중감소와 혈장 콜레스테롤 감소 효과 검증하고자 함				
연구유형		인체시험		IRB 구성 및 승인		Y
실험설계		Double-blind		Randomized		Placebo-controlled
대상자 특 징	대상자선정 (제외)기준	Overweight individuals with BMI > 23 and <29, exclusion criteria included: pregnancy, smoking, serious illness, current treatment with any medications for the control of blood glucose levels, clinical or biochemical evidence of acute or chronic infection, hepatic dysfunction, chronic alcohol consumption, regular functional food supplement consumption				
	특징	86 명의 과체중 환자 (남:여 = 46:40, 20~50 세, 23<BMI<29) 모집하여 무작위로 3 개의 집단으로 나눔				
시험물질		<ul style="list-style-type: none"> - 시험물질 (EGML) : 콩잎 추출물 함유 캡슐 (2000 mg/day) - 대조물질1 (GCE) : <i>Garcinia cambogia</i> 추출물 함유 캡슐 (2000 mg/day; 60% HCA) - 대조물질2 (Placebo) : starch 함유 캡슐 (2000 mg/day) 				
시험 디 자 인	대조군	placebo	starch 함유 캡슐(2 회 섭취), n = 남자 15, 여자 14			
		positive	<i>Garcinia cambogia</i> 추출물 함유 캡슐 (2 회 섭취), n = 남자 15, 여자14			
		negative	없음			
	시험군	콩잎 추출물 함유 캡슐(2 회 섭취), n = 남자 16, 여자 12				
	디자인	시험물질 장기 섭취 후, primary 결과로 %body fat, plasma total cholesterol 측정, second 결과로 plasma TG, HDL-C, non-HDL-C, %HTR, atherosclerosis index, FFA, phospholipid, Apo A-1, Apo B, Apo B/Apo A-1, antioxidant enzyme activity, adipocytokine concentration 측정			섭취량	시험물질 참조
식이조절		평상시 식이습관과 신체활동 유지, 24 시간 회상법으로 식이섭취량 측정				
바이오마커		BMI (body mass index) = weight/height ² WHR (waist and hip circumference) = dividing the measurement of waist by the hip measurement HTR (ratio of HDL cholesterol to total cholesterol) : HDL-C/Total-Cholesterol × 100 AI (Atherogenic index) : (Total-C - HDL-C)/HDL-C				
통계처리		3-way analysis of variance (ANOVA), <i>Post-hoc</i> Duncan's multiple range test				
시험결과		1. EGML 과 GCE 집단에서 체중감소와 체지방률 감소의 명확한 효과를 볼 수 는 없었다. 2. EGML 집단에서 placebo 집단보다 낮은 total cholesterol을 보였다. (p < 0.05) 3. Placebo 집단과 비교 했을 때, EGML 과 GCE 집단에서 TG, non-HDL-C, adipocytokine 그리고 antioxidant 에 분명한 차이를 볼 수 없었다. 4. Placebo 집단과 비교했을 때, EGML 집단에서 HDL-C 는 증가하였다. (p < 0.001)				
비고						

학술지정보		Food & Function				
		Vol	5	게재연도	2014	시작페이지
논문제목		The beneficial effect of soybean (<i>Glycine max</i> (L.) Merr.) leaf extracts in adults with prediabetes: a randomized placebo controlled trial				
연구목적		전당뇨병 환자에 대한 콩잎 추출물의 당뇨관련지표 개선효과를 검증하고자 함				
연구유형		인체시험			IRB 구성 및 승인	Y
실험설계		Double-blind		Randomized		
대상자특징	대상자선정 (제외)기준	individuals with fasting blood glucose level of 100–125 mg/dL, exclusion criteria included: pregnant women, those treated with insulin and any drugs, those with serious cardiac, renal, hepatic or infectious disease, those with a history of gastrointestinal surgery, those using functional food products				
	특징	45 명의 과체중 환자를 모집하여 무작위로 3 개의 집단으로 나눔				
시험물질		<ul style="list-style-type: none"> - 시험물질 (SLE): 콩잎 추출물 함유 캡슐 (2000 mg/day) - 대조물질1 (BE): 바나나 추출물 함유 캡슐 (300 mg/day; 0.3% corosolic acid) - 대조물질2 (Placebo): starch 함유 캡슐 (2000 mg/day) 				
시험디자인	대조군	placebo	starch 함유 캡슐(2 회 섭취), n = 남자 9, 여자 6			
		positive	바나나 추출물 함유 캡슐(2 회 섭취), n = 남자 6, 여자 9			
		negative	없음			
	시험군	콩잎 추출물 함유 캡슐 (2 회 섭취), n = 남자 7, 여자 8				
	디자인	시험물질 장기 섭취 후, anthropometric parameter (BMI, WHR), blood pressure, fasting blood glucose, HbA1c, plasma insulin, HOMA-IR, plasma lipid levels, plasma aminotransferase activity 측정			섭취량	시험물질 참조
식이조절		평상시 식이섭관과 신체활동 유지, 24시간 회상법으로 식이섭취량 측정				
바이오마커		<ul style="list-style-type: none"> - BMI (body mass index) = weight/height² - WHR (waist and hip circumference) = dividing the measurement of waist by the hip measurement - LDL-cholesterol (Friedewald formula) : total cholesterol - HDL-cholesterol - (triglycerides ÷ 5) - HTR (ratio of HDL cholesterol to total cholesterol) : HDL-C/Total-Cholesterol × 100 - HOMA-IR (the index of insulin resistance) : [fasting glucose (mmol/L) × fasting insulin (μU/mL)]/22.5 				
통계처리		One-way ANOVA, Student's <i>t</i> -test, <i>Post-hoc</i> Duncan's multiple range test				
시험결과		<ol style="list-style-type: none"> 1. SLE 집단, BE 집단에서 final blood glucose, HbA1c, HOMA-IR 그리고 transaminase level 이 placebo 집단에 비교하여 현저히 감소하였다. 2. body weight, BMI, WHR 은 세 집단 간에 차이가 없었다. 3. SLE 집단과 BE 집단에서 final body fat content, waist circumference 는 SLE과 BE 집단이 placebo 보다 낮았다. 4. 혈장 내 총 콜레스테롤 농도와 LDL 콜레스테롤 농도의 경우 세 집단간의 차이가 없었다. 5. placebo 집단과 비교했을 때, SLE 집단에서 혈장 내 HDL 콜레스테롤 농도와 총 콜레스테롤에 대한 HDL 콜레스테롤의 비율이 증가하였고 atherogenic index 는 감소하였다. 				
비고						

학술지정보		Nutrients				
		Vol	8	게재연도	2016	시작페이지
논문제목		Beneficial Effects of Pterocarpab-High Soybean Leaf Extract on Metabolic Syndrome in Overweight and Obese Korean Subjects: Randomized Controlled Trial				
연구목적		전당뇨병 환자에 대한 콩잎 추출물의 체지방 및 혈당 등 대사증후군에 대한 효능을 검증하고자 함				
연구유형		인체시험			IRB 구성 및 승인	Y
실험설계		Double-blind		Randomization		
대상자특징	대상자선정 (제외)기준	선정기준: 35-65세의 남녀 중 BMI가 23-27인 비만인, 혈당이 ≥ 95 mg/dl 정도의 혈당, 허리둘레 ≥ 90 cm(남성), 80 cm(여성), 중성지방 ≥ 150 mg/dl을 가진 반건강인 제외기준: 임신부, 인슐린 사용 중이거나 혈당, 지질 강하제 또는 건강기능성 제품을 복용중인 경우				
	특징	61 명의 경미한 고혈당 및 과체중 환자를 모집하여 무작위로 3 개의 집단으로 나눔				
시험물질		- 시험물질 (PT): 대두콩잎 추출물 함유 캡슐 (2000 mg/day) - 대조물질 (Placebo): starch 함유 캡슐 (3000 mg/day)				
시험디자인	대조군	placebo	starch 함유 캡슐(1일 3 회 섭취), n = 25			
		positive	없음			
		negative	없음			
	시험군	PT군: 대두콩잎 추출물 함유 캡슐 (1일 3회 섭취), n = 24				
	디자인	시험물질 장기 섭취 후, anthropometric parameter (B MI, WHR), blood pressure, fasting blood glucose, H bA1c, plasma insulin, HOMA-IR, plasma lipid levels, plasma aminotransferase activity 측정			섭취량	시험물질 참조
섭취기간	12 주					
식이조절		평상시 식이습관과 신체활동 유지, 24시간 회상법으로 식이섭취량 측정				
바이오마커		<ul style="list-style-type: none"> - BMI (body mass index) = weight/height² - WHR (waist and hip circumference) = dividing the measurement of waist by the hip measurement - LDL-cholesterol (Friedewald formula) : total cholesterol - HDL-cholesterol - (triglycerides \div 5) - HOMA-IR (the index of insulin resistance) : [fasting glucose (mmol/L) \times fasting insulin (μL U/mL)]/22.5 - AI (Atherogenic index) : (Total-cholesterol - HDL-cholesterol)/HDL-cholesterol 				
통계처리		Two-way ANOVA, Student's t-test				
시험결과		<ol style="list-style-type: none"> 1. PT 복용군에서 혈중 당화혈색소, 혈당, 유리지방산 및 총콜레스테롤 농도가 유의적으로 감소하였고, HOMA-IR도 유의적으로 감소되었다. 2. PT 복용군에서 혈중 염증관련 마커가 효과적으로 감소되었다. 3. PT 복용군에서 염증 관련 유전자의 발현이 유의적으로 감소되었다. 				
비고						

학술지정보		경북대 인체시험 결과(제2협동보고서 참조)			
		Vol		게재연도	시작페이지
논문제목		The beneficial effect of soy leaf and black soy leaf extracts in adults with prediabetes: a randomized placebo controlled trial			
연구목적		전당뇨병 환자에 대한 대두콩잎 및 검은콩잎 추출물의 혈당 조절 효능을 검증하고자 함			
연구유형		인체시험	IRB 구성 및 승인		Y
실험설계		Double-blind	Randomization		
대상자특징	대상자선정 (제외)기준	선정기준: 35세 이상 65세 미만의 남녀 중 BMI가 23 이상인 과체중 또는 BMI 25 이상인 비만인, 혈당이 100 mg/dl 정도의 혈당을 가진 반건강인 제외기준: 질환(고혈압, 천식, 알레르기, 통풍, 포르피리아, 심장, 신장, 간, 갑상선, 뇌혈관, 당뇨병, 위장관계 질환, 정신질환자, 암 진단 및 치료 또는 6개월내 수술 병력 있는 경우)			
	특징	61 명의 경미한 고혈당 및 과체중 환자를 모집하여 무작위로 3 개의 집단으로 나눔			
시험물질		<ul style="list-style-type: none"> - 시험물질1 (ESL): 대두콩잎 추출물 함유 캡슐 (2000 mg/day) - 시험물질2 (EBL): 검은콩잎 추출물 함유 캡슐 (2000 mg/day) - 대조물질 (Placebo): starch 함유 캡슐 (2000 mg/day) 			
시험디자인	대조군	placebo	starch 함유 캡슐(1일 3 회 섭취), n = 18		
		positive	없음		
		negative	없음		
	시험군	ESL군: 대두콩잎 추출물 함유 캡슐 (1일 3회 섭취), n = 21 EBL군: 검은콩잎 추출물 함유 캡슐 (1일 3회 섭취), n = 22			
	디자인	시험물질 장기 섭취 후, anthropometric parameter (BMI, WHR), blood pressure, fasting blood glucose, HbA1c, plasma insulin, HOMA-IR, plasma lipid levels, plasma aminotransferase activity 측정	섭취량	시험물질 참조	
식이조절	평상시 식이습관과 신체활동 유지, 24시간 회상법으로 식이섭취량 측정				
바이오마커		<ul style="list-style-type: none"> - BMI (body mass index) = weight/height² - WHR (waist and hip circumference) = dividing the measurement of waist by the hip measurement - LDL-cholesterol (Friedewald formula) : total cholesterol - HDL-cholesterol - (triglycerides ÷ 5) - HTR (ratio of HDL cholesterol to total cholesterol) : HDL-C/Total-Cholesterol × 100 - HOMA-IR (the index of insulin resistance) : [fasting glucose (mmol/L) × fasting insulin (μU/mL)]/22.5 - AI (Atherogenic index) : (Total-cholesterol - HDL-cholesterol)/HDL-cholesterol 			
통계처리		One-way ANOVA, Student's <i>t</i> -test, <i>Post-hoc</i> Duncan's multiple range test			
시험결과		<ol style="list-style-type: none"> 1. ESL 및 EBL 복용군에서 복용전보다 허리 둘레, 엉덩이 둘레 및 WHR이 유의적으로 감소하였고, EBL 복용군에서 수축기 혈압도 복용 전보다 유의적으로 감소하였다. 2. ESL 및 EBL 복용군에서 복용전보다 HDL-C, HTR, apo A-1, apo B 및 FFA가 유의적으로 감소하였고, 동맥경화인자인 시지수는 유의적으로 낮아졌다. 3. EBL 복용군에서 복용 전 대비 혈장 아디포카인 또는 사이토카인인 adiponectin, resistin, MCP-1 및 PAI-1이 긍정적으로 조절되었고, ESL 복용군에서 복용 전 대비 IL-6 및 PAI-1이 유의적으로 감소하였다. 4. ESL 및 EBL 복용군에서 적혈구 항산화 효소 활성(SOD, CAT 및 GR)이 증가되었고, 지질과산화물(TBARS)은 유의적으로 감소하였다. 			
비고					

(7) 섭취량, 섭취방법, 섭취 시 주의 사항 및 그 설정에 대한 자료

(가) 섭취량, 섭취방법 및 근거

콩잎 추출물의 독성/안정성 실험 결과에서 무독성으로 판단되어진 하루 섭취량 2 g/day의 용량을 바탕으로 인체시험에서 약 10~12 주간 섭취 시켰을 경우, 시험기간 중 나타날 수 있는 부작용 및 불편사항 (설사, 장내가스 발생, 어지러움, 복통, 구토 등)이 나타나지 않았으므로 이에 섭취량은 하루 2 g/day가 이루어지도록 캡슐 1일 3회 식후 경구 복용 (1회 2정)을 권장한다.

(나) 섭취 시 주의 사항 및 근거

- a. 정해진 섭취량을 지킬 것.
- b. 위장장애, 신기능 장애 등이 있는 사람은 섭취 시 주의 요망
- c. 임산부와 12세 이하의 어린이는 섭취 전 의사와 상담 요함

콩잎 추출물의 인체 실험 시험 대상자의 경우, 과체중인 사람을 대상으로 시험하였기 때문에 임산부와 12세 이하의 어린이에 대한 섭취 시 주의가 요구되어 위와 같이 설정하였다.

(8) 의약품과 같거나 유사한 건강식품이 아니라는 확인

콩잎은 식품의약품 안전처에 식품원재료로 등재되어 있으며, 콩잎은 “건강기능식품의 기준 및 규격” (식약청고시 제2011-68호), I. 공통 기준 및 규격, 1-1의 “건강기능식품 제조에 사용할 수 없는 원료”에 해당되지 않고, 원료의 특성상 심각한 독성이나 부작용이 있는 것으로 알려진 것이 아니며, 의약품의 용도로만 사용되는 원료 등 섭취방법 또는 섭취량에 대해 의·약학적 전문지식을 필요로 하지 않는다.

(9) 참고자료 목록

1. Ho HM, Chen RY, Leung LK, Chan FL, Huang Y, Chen ZY. (2002) Difference in flavonoid and isoflavone profile between soybean and soy leaf. *Biomed. Pharmacother.* 56: 289-295.
2. Ho HM, Leung LK, Chan FL, Huang Y, Chen ZY. (2003) Soy Leaf Lowers the Ratio of Non-HDL to HDL Cholesterol in Hamsters. *J. Agric. Food Chem.* 51: 4554-4558.
3. Zang Y, Sato H, Igarashi K. (2011) Anti-Diabetic Effects of a Kaempferol Glycoside-Rich Fraction from Unripe Soybean (Edamame, *Glycine max* L. Merrill. ‘Jindai’) Leaves on KK-A^y Mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75: 1677-1684.
4. Lee JH, Lee BW, Kim JH, Jeong TS, Kim MJ, Lee WS, Park KH. (2006) LDL-Antioxidant Pterocarpanes from Roots of *Glycine max* (L.) Merr. *J. Agric. Food Chem.* 54: 2057-2063.
5. Yuk HJ, Curtis-Long MJ, Ryu HW, Jang KC, Seo WD, Kim JY, Kang KY, Park KH. (2011) Pterocarpan Profiles for Soybean Leaves at Different Growth Stages and Investigation of Their Glycosidase Inhibitions. *J. Agric. Food Chem.* 59: 12683-12690.
6. Yuk HJ, Lee JH, Curtis-Long MJ, Lee JW, Kim YS, Ryu HW, Park CG, Jeong TS, Park KH. (2011) The most abundant polyphenol of soy leaves, coumestrol, displays potent α -glucosidase inhibitory activity. *Food Chem.* 126: 1057-1063.

7. Kim JE, Jeon SM, Park KH, Lee WS, Jeong TS, McGregor RA, Choi MS. (2011) Does *Glycine max* leaves or *Garcinia Cambogia* promote weight-loss or lower plasma cholesterol in overweight individuals: a randomized control trial. *Nutr. J.* 10: 94.
8. Choi MS, Ryu R, Seo YR, Jeong TS, Shin DH, Park YB, Kim SR, Jung UJ. (2014) The beneficial effect of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) leaf extracts in adults with prediabetes: a randomized placebo controlled trial. *Food Funct.* 5: 1621.
9. Tadera K, Minami Y, Takamatsu K, Matsuoka T. (2006) Inhibition of α -Glucosidase and α -Amylase by Flavonoids. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 52: 149-153.
10. Babu PV, Liu D, Gilbert ER. (2013) Recent advances in understanding the anti-diabetic actions of dietary flavonoids. *J. Nutr. Biochem.* 24: 1777-1789.
11. Han JM, Li H, Cho MH, Park JS, Baek, SH Lee CH, Jeong TS. (2010) Atheroprotective effects of ethanolic extracts of soy leaves via upregulation of kruppel-like factor 2. *The Commemorative International Symposium (KSABC)*.
12. Ali AA, Velasquez MT, Hansen CT, Mohamed AI, Bhathena SJ. (2005) Modulation of carbohydrate metabolism and peptide hormones by soybean isoflavones and probiotics in obesity and diabetes. *J. Nutr. Biochem.* 16: 693-699.
13. Lee JS. (2006) Effects of soy protein and genistein on blood glucose, antioxidant enzyme activities, and lipid profile in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci.* 79: 1578-1584.
14. Seo BH, Kim KO, Lee JH, Lee HS. (2011) Effects of Phytoestrogens on Glucose Metabolism in C57BL/KsOlaHsd-db/db Mice. *Korean J. Nutr.* 44: 275-283.
15. Li H, Kang JH, Han JM, Cho MH, Chung YJ, Park KH, Shin DH, Park HY, Choi MS, Jeong TS. (2015) Anti-Obesity Effects of Soy Leaf via Regulation of Adipogenic Transcription Factors and Fat Oxidation in Diet-Induced Obese Mice and 3T3-L1 Adipocytes. *J Med Food.* 18: 899-908.
16. Li H, Ji HS, Kang JH, Shin DH, Park HY, Choi MS, Lee CH, Lee IK, Yun BS, Jeong TS. (2015) Soy Leaf Extract Containing Kaempferol Glycosides and Pheophorbides Improves Glucose Homeostasis by Enhancing Pancreatic β -Cell Function and Suppressing Hepatic Lipid Accumulation in db/db Mice. *J Agric Food Chem.* 63: 7198-7210.
17. Kim UH, Yoon JH, Li H, Kang JH, Ji HS, Park KH, Shin DH, Park HY, Jeong TS. (2014) Pterocarpan-enriched soy leaf extract ameliorates insulin sensitivity and pancreatic β -cell proliferation in type 2 diabetic mice. *Molecules.* 19: 18493-18510.
18. Ryu R, Jeong TS, Kim YJ, Choi JY, Cho SJ, Kwon EY, Jung UJ, Ji HS, Shin DH, Choi MS. (2016) Beneficial Effects of Pterocarpan-High Soybean Leaf Extract on Metabolic Syndrome in Overweight and Obese Korean Subjects: Randomized Controlled Trial. *Nutrients.* 8: pii: E734
19. Zang Y, Zhang L, Igarashi K, Yu C. (2015) The anti-obesity and anti-diabetic effects of kaempferol glycosides from unripe soybean leaves in high-fat-diet mice. *Food Funct.* 6: 834-841.
20. Diabetes Fact Sheet in Korea 2016. (2016) Korean Diabetes Association.

제 2 절 향당노 천연 신소재의 대량생산 체계 구축 및 당노식 제형 상품화 (제1협동과제)

1. 연구개발 수행 내용 및 방법

가. 우수 향당노 천연소재 탐색을 위한 다양한 콩잎 품종 등 자생식물 다당류 원료 확보

본 연구 수행시기는 2013년 12월 20일 시점에서 시작하였기 때문에 본 연구의 원활한 수행을 위해 협동기관에서 선행연구를 위해 미리 준비한 품종별/채취 시기별 콩잎 시료를 우선 사용하였다. 2013년 6월 9일에 검정콩잎(BB, 재래종 1호), 대원콩잎(WD), 황금콩잎(GH) 품종을 파종하였다. 검정콩 재래종 1호, 대원콩, 황금콩은 농진청에 신청하여 분양받은 품종을 사용하였다. 이듬해의 콩 재배를 위해 각 품종의 콩을 수확 및 건조하여 보관한 것을 사용하였다. 또한 WD, GH는 충청남도를 중심으로 널리 사용되고 있는 대두품종이며 재배 및 품종 확보가 용이하다. BB는 검은콩 품종으로 역시 재배 및 품종 확보가 용이할 뿐만 아니라 일부 약효성분이 알려져 있어 전통적으로 사용하고 있는 품종이다. 2013년도 재배 후 수확은 107일령에서 수확을 진행하였다.

대량 수확한 콩잎을 저장하기 위한 경제적이면서 용이한 방법으로 열풍 건조기를 이용하여 건조를 선택하여 진행하였다. 건조 시 콩잎 원물에 손상이 없는 확보를 위해 12 시간 동안 열풍 건조를 통해 건조 콩잎을 확보하였다.

2014년도, 2015년도 그리고 2016년도에는 GH 품종(황금콩)과 BB 품종(검정콩 재래종 1호), BG 품종(서목태, 쥐눈이콩)을 재배하였다. BG 품종인 서목태(쥐눈이콩)은 품종이 하나이기 때문에 관련 업체를 통해 구입하여 사용하였다. 재배에 따른 변화 확인과 함께 안정적인 콩잎을 확보하기 위해 파종 후 지정된 담당자 2 주 간격으로 콩잎 시료를 확보하고 재배 상황을 파악하였다. 2 주 간격으로 콩잎을 채취하여 여러 가지 생리활성을 검색을 병행하면서 적절한 수확 시기를 결정하는 것이 중요하다. 확보된 시기별 콩잎은 자연건조를 시행한 후 제1세부과제의 HPLC를 이용한 성분 분석 및 생리활성 분석을 통해 품종별 기능성 소재의 함유량 등의 분석에 활용하였다. 또한 같은 지역에서 같은 품종을 재배하여 1 차년도의 시기별 변화를 바탕으로 기후에 따른 활성 물질의 변화에 대한 트렌드(trend) 자료로 활용하였다.

나. 콩잎 다당류 고함유 분획(PSH)의 추출 방법 표준화 연구

(1) 건조 콩잎으로부터 PSH의 추출방법

시료 준비 (Plant materials): 본 연구에서는 2013년도 6월에 파종 후 107 일 후에 수확한 BB, WD, GH 품종의 콩잎을 재료로 사용하였으며, 건조 된 잎을 분쇄하여 보관용기에 담아 4℃ 에서 보관하였다.

건조 콩잎으로부터 PSH의 추출 방법 (주정농도, 열수, 추출시간 등)

- 열수 (80℃) 추출: 분쇄 콩잎 (WD, GH, BB) 1 g 씩 glass tube에 준비하고, 3차 증류수 20

ml을 넣은 후에 미리 80°C로 가열한 heating bath에서 2 시간 동안 추출하였다.

- 70% 주정 추출 온도 비교(실온 및 45°C): 분쇄 콩잎 (WD, GH, BB) 2 g 씩 cornical tube (50 mL) 에 준비하고, 70% 주정 20 mL 을 넣어 실온 또는 45°C의 heating bath에서 2 일 동안 추출하였다. 추출물의 수율, in vitro 활성을 비교하였다.

50%, 70% 주정 추출 비교: 분쇄 콩잎 (WD, GH, BB) 2 g 씩 cornical tube (50 mL)에 준비하고 50% 주정과 70% 주정을 20 mL 씩 넣고 실온에서 2 일 동안 추출하였다. 추출물의 수율, 추출 양상을 비교하였다.

70% 주정 반복 추출 (1차, 2차, 3차) 수율 및 HPLC 분석 비교: 분쇄 콩잎 (WD, GH, BB) 10 g 씩 삼각플라스크 (250 mL)에 준비하고 70% 주정 100 mL 을 넣어 2 일 동안 추출한 후 감압 여과하여 1차 추출물을 얻었다. 1차 추출 후 남은 잔여물에 다시 70% 주정 100 mL 을 부어 2 차 반복 추출하고, 같은 방식으로 2차, 3차 추출물을 얻었다. 제조된 모든 추출물들은 여과 후의 여과 부피 (filter volume) 를 측정하였으며, 여과 후 바로 1 mL 씩 샘플링을 하였고, 건조 중량을 측정하였다 (측정된 값은 모두 2회 반복하여 얻었으며, 표준편차 값으로 나타내었다). 또한, HPLC 분석용 샘플은 0.45 μ m syringe filter로 여과하여 준비하였다.

(2) 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC) 분석

본 연구에서 사용한 analytical HPLC는 Shimadzu 10A vp series, Brownlee SPP C18 column (4.6 x 50 mm, 2.7 μ m)을 사용하여 분석하였다. 흡광도는 254 nm와 410 nm에서 측정하였다. 분당 1.8 ml의 속도로 0.1 % Acetic acid in water (Solvent B)와 Acetonitrile (Solvent C)의 용매 기울기로 수행되어 나타내었다.

(3) 건조 콩잎으로부터 PSH 의 추출 방법 (주정농도, 열수, 추출시간 등)

열수 추출 수율 및 HPLC 분석 비교는 건조 콩잎을 80°C에서 2 시간 동안 추출하여 수율을 측정하였다. 건조 콩잎을 70% 주정 추출물의 온도 조건을 확립하기 위해 45°C에서 추출하였으며, 추출 수율과 HPLC 분석, in vitro 활성측정을 통해 실온에서의 70% 주정 (70ESL) 추출물과 비교하였다. 건조콩잎의 주정 함량에 따른 수율 양상 비교는 건조 콩잎의 50% 주정 추출물 (50ESL)과 70% 주정 추출물 (70ESL)의 수율을 측정하고, HPLC로 분석하여 비교하였다.

다. 제품화를 위한 다당류 원료의 대량 재배 및 수확

본 연구에서는 콩잎을 친환경적으로 재배하기 위하여 직접 계약재배를 실시하였다. 기간별 시료의 채취와 관리를 위하여 근거리의 특정 지역을 선정하였다. 콩잎의 재배는 5월 중순에서 6월 중순에 파종하는데, 2014년도에는 6월 초에 2015년도와 2016년도는 5월 말에 파종을 실시하였다. 작형은 단작으로 실시하였고, 파종 방법은 이랑법으로 2역 식재하였다. 잡초로 인한 문제점에 대비하기 위하여 토양처리제를 활용하여 처리하였고, 기타 농약을 배재하여 친환경적으로 재배를 실시하였다. 콩의 재배에서 실시하는 순자르기는 콩의 수확량과 밀접한 연관을 가지는 것으로 잘 알려진 방법이지만, 본 연구에서는 콩잎의 성장과 수확을 위하여 배재하였다. 콩잎의 재배는 대부분 5월 중순에서 6월 중순에 파종을 하며, 2차년도 실험에서는 5월 28일에 파종하였다. 작형은 단작으로 실행하였다.

1차년도에 GH 품종은 300 평 규모, BB 품종은 200 평 규모로 설정하였고, 두 품종 간의 일정 거리를 두고 서로 다른 구역으로 구분하기 위하여 RS 품종 지역에 지춧대를 설치하고 그물망을 이용하여 구획을 나누어 재배를 실시하였다. 각각의 종자는 6월 3일에 파종하였고, 117일령이 되는 9월 27일에 최종 수확하였고 (2014년도에는 9월에 윤달이 있어서 수확 시기를 다소 늦추었음), 일정 기간별로 시료를 채취하여 즉시 건조한 건조콩잎을 4℃에 보관하면서, 분석용으로 활용하였다.

2차년도에 GH 품종은 100평 (330.58 m²), BB 품종은 400평 (1,322.31 m²) 그리고 GB 품종은 100평 (330.58 m²) 규모로 설정하였다. 재배 시 지역 및 재배 온도에 의한 편차를 줄이기 위해 근접한 지역에 재배를 실행하였으며, 각 품종 간에 일정 거리를 두고 지춧대를 설치하여 구획을 나누어 재배하였다.

3차년도에는 1차년도와 2차년도 연구결과를 바탕으로 대량생산을 위한 원료 확보를 위해 GH와 BB 그리고 GB를 재배하여 원료를 확보하였다. GH 품종은 50평 (165.25 m²), BB 품종은 300평 (991.50 m²) 그리고 GB 품종은 250평 (826.25 m²) 규모로 설정하였다.

라. PSH 시제품 생산을 위한 대량 추출, 농축 및 분말화 공정 개발

PSH 활성 보존을 위한 대량 농축 공정은 선행연구 및 제1세부과제의 연구 조건을 바탕으로 1차 70% EtOH (주정)을 용매로 사용하였으며, EtOH의 양은 건조콩잎 분말 50 kg 대비 500 L의 EtOH을 사용하였다. 추출 시 온도는 25℃ 내외 조건으로 24 시간 동안 추출조건으로 결정하였다. 특히 추출 시 건조 콩잎이 EtOH에 잘 침지될 수 있도록 6 ~ 12 시간 간격으로 혼합하여 윗부분과 아랫부분의 콩잎 혼합을 용이하게 하였다. 같은 조건에서의 EtOH 농도별 추출 결과 α -glucosidase 저해활성은 95% EtOH 추출물에서, LDL-항산화 효능은 50% EtOH에서 높은 활성효과가 나왔으나 산업적 대량생산의 용이성 및 활용성을 감안하여 70% EtOH 추출을 선택하였다.

마. 다당류 고함유 분획의 대량 생산 공정 표준화 확립

대량생산을 통해 확보한 건조콩잎 (GH와 BB 각 50 kg)은 인체시험용 시제품 제작을 위해 대량생산 공정 표준화 작업을 시행하였다. 원물(생콩잎)의 건조 조건으로 자연건조와 열풍건조를 병행하였다.

대량생산 추출공정은 1차년도 실험결과를 바탕으로 70% 주정을 용매로 사용하였다. 산업화 및 경제성을 고려하여 건조분말 콩잎과 70% 주정의 비율은 분쇄한 건조 콩잎 무게(50 kg) 대비 10배(500 L 주정)를 사용하였다.

콩잎 추출 시 사용된 70% 주정을 농축 후 회수하여 잔류 함량을 측정하였다. 회수 원액과 회수 원액을 10배 농축한 용매를 각각 제1세부과제에서 HPLC로 분석을 시행하였다.

동결건조 및 진공건조를 용이하게 진행하기 위해 텍스트린, 전분, 말토텍스트린과 같은 부형제를 혼합하는 방법을 선택하였다. 본 연구에서는 최적의 부형제로 텍스트린을 선별하였다.

바. 다당류 고함유 분획의 인체시험용 시작품 제작

인체시험의 시험소재인 70EBL과 70ESL의 섭취용량은 동물실험을 통해 당뇨 억제 효과를 검증한 제1세부과제의 실험 결과 및 지표물질(유효성분)의 함량 측정을 바탕으로 설정하였다.

제2협동연구기관에서 수행할 혈당 개선 인체적용 시험을 위해 GH와 BB 콩잎의 70% 주정 추출분말로 시작품을 제작하였다. 인체 시험을 위해 음성대조군으로는 starch를 선택하였다. 인체시험을 위해 캡슐 제형을 선택하였으며, 500 mg 용량의 캡슐을 사용하였다. 500 mg 이상의 캡슐 용량은 복용 횟수를 줄이는 장점은 있으나 국내에서 구입이 용이하지 않으며, 캡슐의 사이즈가 커서 인체 시험 대상자들이 복용 시에 거부감을 느낄 수 있으므로 일반적인 캡슐 용량인 500 mg을 선택하였다.

캡슐화는 작업장, 작업대 및 캡슐기기 등을 알콜로 철저히 소독한 후 지정된 인원에 의해 캡슐 작업을 실행하였다. 캡슐기기는 1 tray 당 250 capsule이 제작되었다. 그러나 GH와 BB 추출분말의 흡습성 때문에 3 ~ 4회 실시 후 기기에 오염된 추출물을 반드시 제거하여야 한다. 캡슐 작업 후 tray 별로 10개 정도 무작위적으로 시료를 채취하여 무게를 측정하여 캡슐 용량의 표준화를 확인하였다. 위약대조군, GH군, BB군 모두 시험대상자들이 시험 시료를 구별할 수 없도록 동일한 색상의 캡슐을 사용하였다.

인체시험을 위해 제작한 70% 주정추출물의 동결건조분말 70ESL(GH), 70EBL (BB)의 총 페놀 함량, 총 플라보노이드 함량 및 지표물질 함량을 제1세부과제에서 확립한 방법으로 측정하였다.

대량 추출 70ESL과 70EBL의 총 페놀, 총 플라보노이드 함량 측정

총 페놀 함량은 Singleton & Rossi (1965)이 개발한 Folin-Ciocalteu법을 일부 수정하여 측정하였고, gallic acid을 표준물질로 사용하여 mg gallic acid equivalents/g extract로 표시하였다.

또한 총 플라보노이드 함량은 Zhishen 등 (1999)이 개발한 분광분석법을 일부 수정하여 측정하였고, quercetin을 표준물질로 사용하여 mg quercetin equivalents/g extract로 표시하였다.

사. 시판제품에 대한 경쟁력 강화를 위한 혈당 개선용 건강기능원료/신제품 모티터링, 항당뇨 효능기작 및 소비자 선호도 파악

혈당 관련 기능성 식물 추출물에 대한 국내특허 등록 및 출원된 기능성물질 또는 기능성소재의 리스트 및 중점 사항을 조사하였다.

아. 제품화 기능성 소재인 PSH 분말의 품질안전성 검증 및 영양학적 분석

인체실험/시제품 제작을 위해 확보된 콩잎에 대한 무공해 재배 및 기타 성분 분석을 시행하였다. 위탁재배를 통해 재배기간 중 작물 보조제 및 농약 사용에 대한 정확한 분석을 위해 콩잎 주정추출 분말의 잔류 농약 검사를 시행하였다. 분석을 시행한 콩잎추출물은 GH와 BB에 대해서 각각 실험을 시행하였다.

자. 기능성소재 및 부재료와의 최적 배합 및 (시판제품에 대한 경쟁력 강화를 위한) 제형 설정 연구 및 품질관리 방법 확립

혈당개선의 효과를 증진시키기 위한 제형을 달리한 시제품을 개발하였다. 시제품의 경우 일반 소비자가 직접 사용할 수 있는 형태와 영양학적 도움을 줄 수 있는 형태로 제형 및 시제품을 개발을 시행하였다. 시제품 개발을 위해 현재 시장에 나와 있는 체지방 개선용 제품과 혈당 개선을 위한 제품에 대한 분석을 시행하였으며, 분석된 제형 및 원료성분을 바탕으로 제작하였다. 또한 시장에 출시되어 있는 제품들에 대한 조사를 실행하였다.

차. 식품(식품첨가물) 품목 등록 (제품명 결정)

본 연구의 연구결과를 중심으로 콩잎추출분말을 활용하여 혈당강하를 위한 기능성 제품개발을 진행하였다. 본 연구의 콩잎추출분말을 이용한 시제품 및 제품화의 경우 법적 행정적인 절차를 위해 인허가를 작업을 선행하였다. 또한 시제품 및 제품 개발에 콩잎추출분말을 사용하기 위해 품목제조보고서를 작성하고 이를 통해 식품첨가물로 품목 등록을 시행하였다. 유통기한 설정은 식약처 고시 식품의 유통기한 설정기준 개정고시 (식품의약품안전처 고시 제2008-53호)를 바탕으로 실행하였다.

제품명으로는 혈당개선 및 당뇨에 도움을 줄 수 있는 제품명으로 소비자의 빠른 인식과 마케팅에 효과를 줄 수 있는 명칭을 고려하여 20여가지의 제품명을 1차 선정하였으며 기존에 사용되고 있는 유사 상품명을 제외하고 선정된 제품명에 대해서는 특허법률사무소를 통해 유사 상품명에 대한 검정작업과 함께 식품의약품안전처를 통한 제품명으로 사용 가능성을 확인하였다.

카. 항당뇨 다당류 소재를 이용한 제품화

기능성 원료로는 바나바잎추출물과 아연을 혼합하여 혈당개선 및 면역에 효과를 줄 수 있는 이중 기능성 건강기능식품을 제작하였다. 특히 본 연구를 통한 소재와의 상승효과를 통한 혈당개선과 건강기능식품으로 활용을 하기 위해 바나바잎추출분말을 중심으로 제작하였다. 건강기능식품으로 제품명은 ‘인슈파워(insu Power)’로 제품명을 선정하였다. 기능성소재 및 부재료와의 최적 배합 설정 연구를 통해 확보된 제형을 바탕으로 제품화를 시행하였다.

2. 연구개발 수행 결과

가. 우수 향당노 천연소재 탐색을 위한 다양한 콩잎 품종 기능성 다당류 원료 확보

본 연구 수행시기는 2013년 12월 20일 시점에서 시작하였기 때문에 본 연구의 원활한 수행을 위해 협동기관에서 선행연구를 위해 미리 준비한 품종별/채취 시기별 콩잎 시료를 우선 사용하였다. 2013년 6월 9일에 검정콩잎(BB, 재래종 1호), 대원콩잎(WD), 황금콩잎(GH) 품종을 파종하였다. WD, GH는 충청남도를 중심으로 널리 사용되고 있는 대두품종이며 재배 및 품종 확보가 용이하다. BB는 검은콩 품종으로 역시 재배 및 품종 확보가 용이할 뿐만 아니라 일부 약효성분이 알려져 있어 전통적으로 사용하고 있는 품종이다.

BB, WD 및 GH에 대한 콩잎 파종 및 수확 시기는 표 1과 같다. 2013년도 재배 상황은 콩잎 재배에 적절한 기온이었으나, 기습적인 폭우로 인한 재배 환경은 좋지 않았다. 특히 콩잎 재배의 경우 배수가 중요한 부분을 차지하는데, 기습적인 폭우로 인한 배수 문제로 인해 수확량이 현저하게 감소하였다.

표 1. 2013년도 지역별/품종별 콩잎 파종 및 수확 시기

재배 품종	파종시기	수확 시기	수확일령
BB	6월 9일	9월 26일	107
WD	6월 9일	9월 26일	107
GH	6월 9일	9월 26일	107

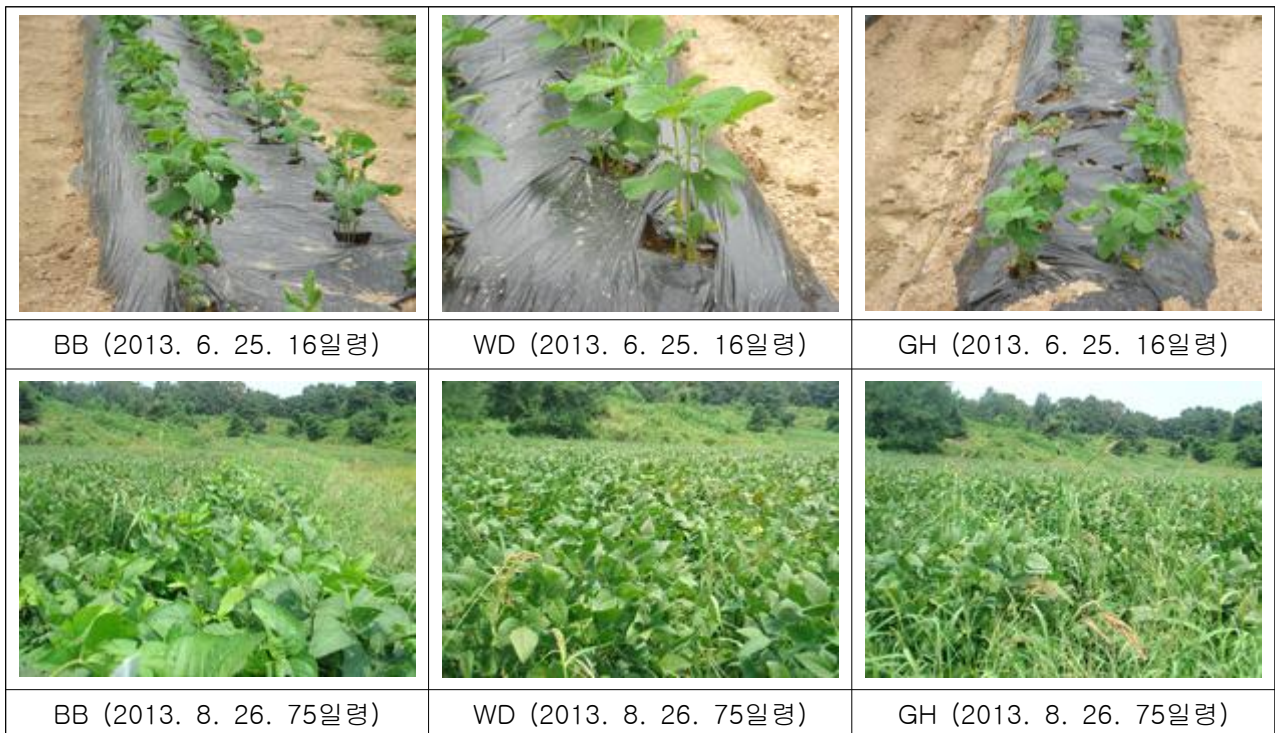


표 1. 2013년도 품종별 콩잎 재배 현황.

재배 후 수확한 107일령 건조 콩잎의 확보량은 표 2와 같다. 대량 수확한 콩잎을 저장하기 위한 경제적이면서 용이한 방법으로 열풍 건조기를 이용하여 건조를 선택하여 진행하였다. 건조 시 콩잎 원물에 손상이 없는 확보를 위해 12 시간 동안 열풍 건조를 통해 건조 콩잎을 확보하였다.

표 2. 지역별/품종별 건조 콩잎 확보량

재배 품종	재배면적 (m ²)	건조 콩잎 생산량 (kg)	면적 당 생산량 (kg/m ²)
BB	99.174	5.5	0.0555
WD	826.446	36.5	0.0441
GH	826.446	37.5	0.0454
총 량	1,752.066	79.5	0.0454

이상의 결과에서 콩 품종별 면적 당 재배 수확량은 BB > GH > WD 순으로 나타났다. 특히 BB 품종의 경우 22%로 높은 수확량을 보여 주었다. BB가 WD와 GH와 비교해 높은 면적 당 생산량을 보여 주었으나, 동일 재배 면적에서의 결과가 아니기에 오차가 있을 것으로 판단된다. 본 연구과제를 수행하기 위한 대량생산을 위한 품종으로 2013년도의 품종별 건조콩잎 확보량을 바탕으로 BB와 GH 품종을 선별하였으며 재배하였다.

2014년도, 2015년도 그리고 2016년도에는 재배에 따른 변화 확인과 함께 안정적인 콩잎을 확보하기 위해 파종 후 지정된 담당자 2 주 간격으로 콩잎 시료를 확보하고 재배 상황을 파악하였다. 2 주 간격으로 콩잎을 채취하여 여러 가지 생리활성을 검색을 병행하면서 적절한 수확 시기를 결정하는 것이 중요하다. 확보된 시기별 콩잎은 자연건조를 시행한 후 제1세부과제의 HPLC를 이용한 성분 분석 및 생리활성 분석을 통해 품종별 기능성 소재의 함유량 등의 분석에 활용하였다. 또한 같은 지역에서 같은 품종을 재배하여 1 차년도의 시기별 변화를 바탕으로 기후에 따른 활성 물질의 변화에 대한 트렌드(trend) 자료로 활용하였다.

나. 콩잎 다당류 고함유 분획(PSH)의 추출 방법 표준화 연구

(1) 건조 콩잎으로부터 PSH의 추출방법

시료 준비 (Plant materials): 본 연구에서는 2013년도 6월에 파종 후 107 일 후에 수확한 BB, WD, GH 품종의 콩잎을 재료로 사용하였으며, 건조 된 잎을 분쇄하여 보관용기에 담아 4℃ 에서 보관하였다.

건조 콩잎으로부터 PSH의 추출 방법 (주정농도, 열수, 추출시간 등)

열수 (80℃) 추출: 분쇄 콩잎 (WD, GH, BB) 1 g 씩 glass tube에 준비하고, 3차 증류수 20 ml을 넣은 후에 미리 80℃로 가열한 heating bath에서 2 시간 동안 추출하였다.

70% 주정 추출 온도 비교(실온 및 45℃): 분쇄 콩잎 (WD, GH, BB) 2 g 씩 cornical tube (50

mL) 에 준비하고, 70% 주정 20 mL 을 넣어 실온 또는 45°C 의 heating bath에서 2 일 동안 추출하였다. 추출물의 수율, in vitro 활성을 비교하였다.

50%, 70% 주정 추출 비교: 분쇄 콩잎 (WD, GH, BB) 2 g 씩 cornical tube (50 mL)에 준비하고 50% 주정과 70% 주정을 20 mL 씩 넣고 실온에서 2 일 동안 추출하였다. 추출물의 수율, 추출 양상을 비교하였다.

70% 주정 반복 추출 (1차, 2차, 3차) 수율 및 HPLC 분석 비교: 분쇄 콩잎 (WD, GH, BB) 10 g 씩 삼각플라스크 (250 mL)에 준비하고 70% 주정 100 mL 을 넣어 2 일 동안 추출한 후 감압 여과하여 1차 추출물을 얻었다. 1차 추출 후 남은 잔여물에 다시 70% 주정 100 mL 을 부어 2차 반복 추출하고, 같은 방식으로 2차, 3차 추출물을 얻었다. 제조된 모든 추출물들은 여과 후의 여과 부피 (filter volume) 를 측정하였으며, 여과 후 바로 1 mL 씩 샘플링을 하였고, 건조 중량을 측정하였다 (측정된 값은 모두 2회 반복하여 얻었으며, 표준편차 값으로 나타내었다). 또한, HPLC 분석용 샘플은 0.45 μ m syringe filter로 여과하여 준비하였다.

(2) 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC) 분석

본 연구에서 사용한 analytical HPLC는 Shimadzu 10A vp series, Brownlee SPP C18 column (4.6 x 50 mm, 2.7 μ m)을 사용하여 분석하였다. 흡광도는 254 nm와 410 nm에서 측정하였다. 분당 1.8 ml의 속도로 0.1 % Acetic acid in water (Solvent B)와 Acetonitrile (Solvent C)의 용매 기울기로 수행되었으며, Solvent elution 방법은 (표 3) 로 나타내었다.

Table 3. Analytical HPLC condition and solvent elution method

Analytical HPLC condition	Solvent elution method			
HPLC apparatus : Shimadzu 10A vp	Time	A (%)	B (%)	
Pump system: Shimadzu LC-10A vp with binary pump	0	95	5	isocratic
Auto injector: Shimadzu SIL-10A vp	15.0	70	30	gradient
Detector: Shimadzu SPD-M10A vp (PDA detector, 254 nm)	20.0	20	80	gradient
Column: Brownlee SPP C18 (4.6x50 m, 2.7 μ m)	23.0	0	100	gradient
Flow rate: 1.8 ml/min	27.5	0	100	isocratic
Sample injection volume: 5 μ l	30.0	95	5	gradient
Flow solvent A: 0.1% Acetic acid in Water				
Flow solvent B: Acetonitrile				

(3) 건조 콩잎으로부터 PSH 의 추출 방법 (주정농도, 열수, 추출시간 등)

(가) 열수 추출 (80°C) 수율 및 HPLC 분석 비교

건조 콩잎을 80°C 에서 2 시간 동안 추출하여 수율을 측정한 결과, WD, GH, BB 순서로 26.6%, 25.0%, 31.7%로 나타났으며, 또한 HPLC 분석에서도 추출물의 함량이 추출 수율과 비례하는 것으로 보였다 (Table 4, Fig. 2).

Table 4. Yields of hot water extracts from WD, GH, and BB soy leaves cultivated on 2013

Samples	Extraction condition	Filter vol. (mL)	Dry wt. (mg/ml)	Dry wt. (mg/g sample)	Yield (%)
WD-107d	1 g in 20 ml H ₂ O at 80°C for 2 h	12.5	21.3 ± 0.3	266.3 ± 3.8	26.6 ± 0.4
GH-107d		13.5	18.5 ± 0.1	249.8 ± 1.3	25.0 ± 0.1
BB-107d		15.0	21.1 ± 0.5	316.5 ± 7.5	31.7 ± 0.8

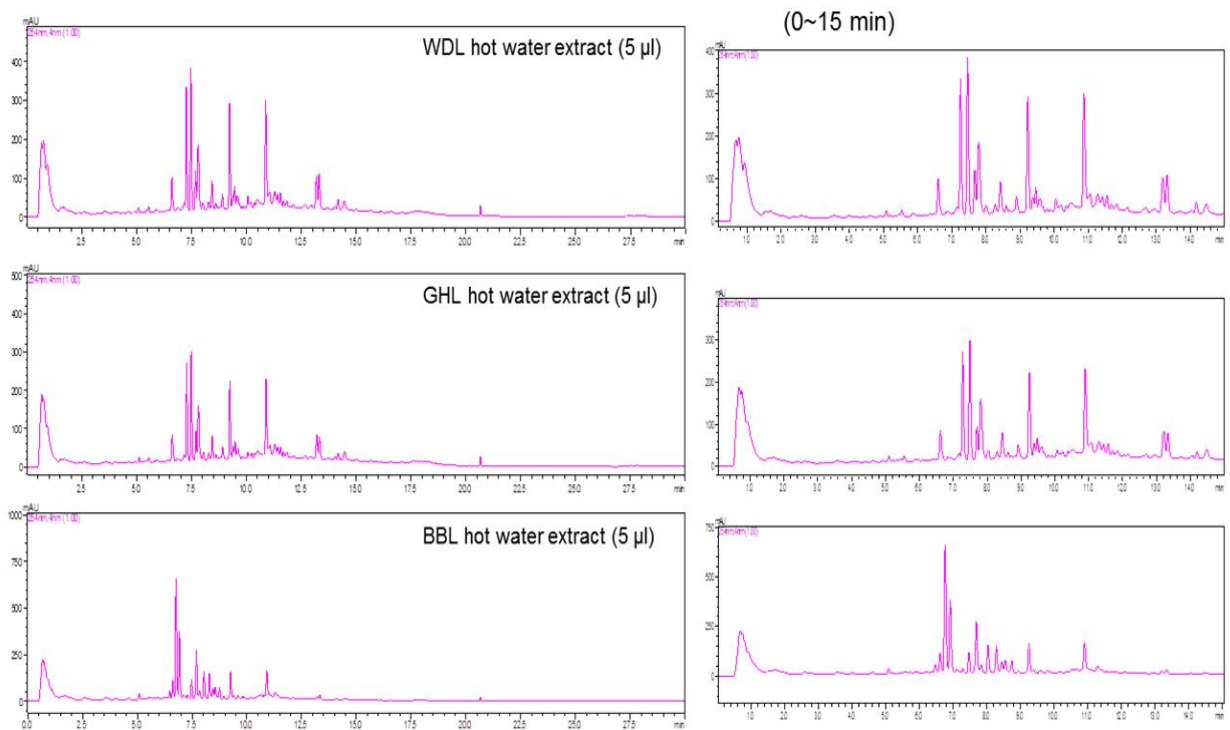


Fig. 2. HPLC profiles of hot water extracts from WD, GH, and BB soy leaves cultivated on 2013 (254 nm).

(나) 70% 주정 추출 온도 (실온 및 45°C)에 따른 수율 비교

건조 콩잎을 70% 주정 추출물의 온도 조건을 확립하기 위해 45°C 에서 추출하였으며, 추출 수율과 HPLC 분석, in vitro 활성측정을 통해 실온에서의 70% 주정 (70 ESL) 추출물과 비교하였다. 우선, 추출 수율은 WD, GH, BB 순으로 22.4%, 21.8%, 19.7% 로 비슷하게 측정되었고 (Table 5), 추출 양상 또한 실온 70 ESL과 비슷한 수준의 peak absorbance를 보였다 (Fig. 3).

Table 5. Yields of 70% EtOH extracts at 45°C from WD, GH, and BB soy leaves cultivated on 2013

Samples	Extraction condition	Filter vol. (mL)	Dry wt. (mg/ml)	Dry wt. (mg/g sample)	Yield (%)
70EWL (WD)	2 g in 70% EtOH 20 ml at 45°C for 2 days	12.5	35.9 ± 1.5	224.4 ± 9.4	22.4 ± 0.9
70EGL (GH)		12.5	34.9 ± 0.1	218.1 ± 0.6	21.8 ± 0.1
70EBL (BB)		12.5	31.5 ± 0.3	196.9 ± 1.9	19.7 ± 0.2

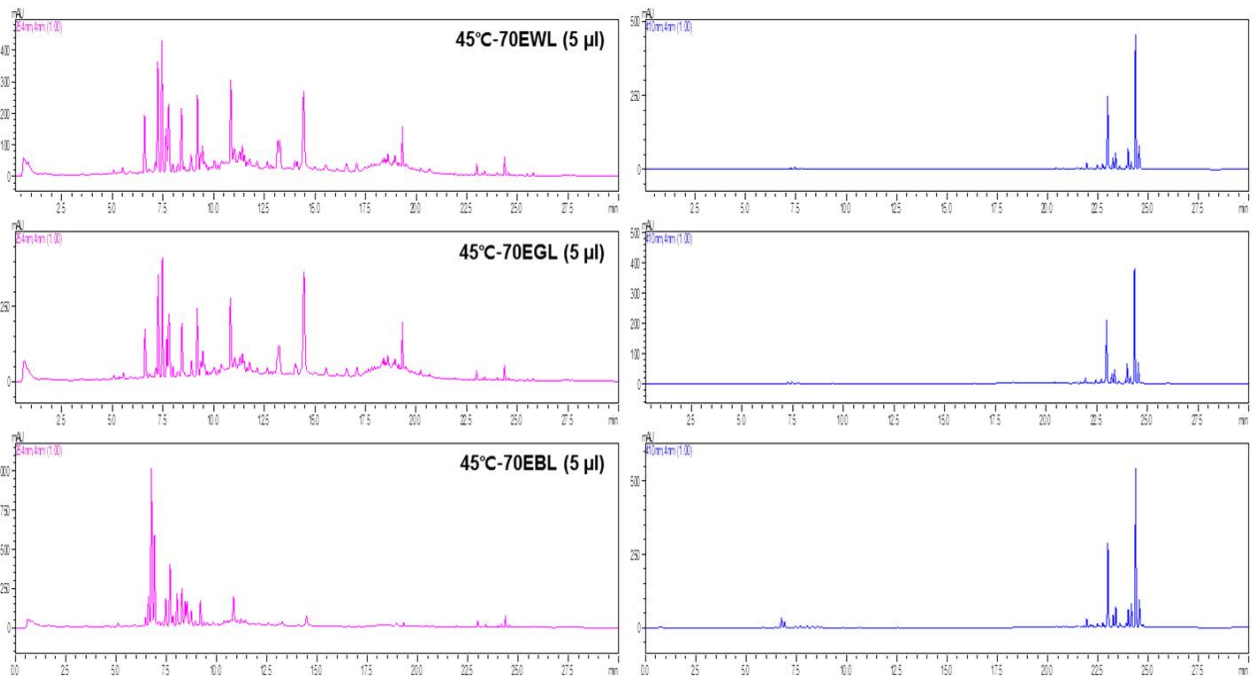


Fig. 3. HPLC profiles of 70% EtOH extracts at 45°C from WD, GH, and BB soy leaves cultivated on 2013 (Left : 254 nm, Right : 410 nm).

(다) 건조 콩잎의 주정 함량에 따른 수율 양상 비교

건조 콩잎의 50% 주정 추출물 (50ESL)과 70% 주정 추출물 (70ESL)의 수율을 측정하고, HPLC로 분석하여 비교하였다. 우선, WD의 경우 50ESL과 70ESL의 수율이 각각 20.1%와 19.0%로 측정되었고, GH는 각각 23.6%, 19.6%이었고, BB는 각각 21.0%와 17.6%로 측정되어 전체적으로 50ESL의 회수율이 70%의 회수율보다 높았다 (Table 6). HPLC 분석 결과, 254 nm에서 추출 양상과 peak 흡광도의 크기는 유사한 정도였으나, 410 nm에서는 70ESL에 비해 50ESL이 WD, GH, BB 모두에서 검출되는 peak 흡광도가 현저하게 낮아지는 경향을 보였다 (Fig 4). 즉, 주정 함량이 높아지면 410 nm에서 검출되는 peak들인 pheophorbide계열 화합물 또는 xanthophyll계열 화합물이 더 많이 추출되는 것을 알 수 있다.

또한 제1세부과제에서 소량 (100 mg)콩잎을 추출할 때와 비교할 때, 추출액의 회수율이 현저하게 낮으며, 최종 추출물의 회수율도 낮았다. 따라서 향후 대량 시료 추출 시에는 필요량 확보를 위해 이런 점을 충분히 고려해야 할 것으로 판단된다.

Table 6. Yields of 50% EtOH and 70% EtOH extracts from WD, GH, and BB soy leaves

Samples	Filter vol. (mL)	Dry wt. (mg/ml)	Dry wt. (mg/g sample)	Yield (%)
50EWL (WD)	12.5	32.1 ± 0.1	200.6 ± 0.6	20.1 ± 0.1
70EWL (WD)	12.5	30.4 ± 0.6	190.0 ± 3.8	19.0 ± 0.4
50EGL (GH)	13.0	36.3 ± 0.1	236.0 ± 0.6	23.6 ± 0.1
70EGL (GH)	13.0	30.1 ± 0.1	195.7 ± 0.6	19.6 ± 0.1
50EBL (BB)	14.0	30.0 ± 0.0	210.0 ± 0.0	21.0 ± 0.0
70EBL (BB)	12.0	29.3 ± 0.1	175.8 ± 0.6	17.6 ± 0.1

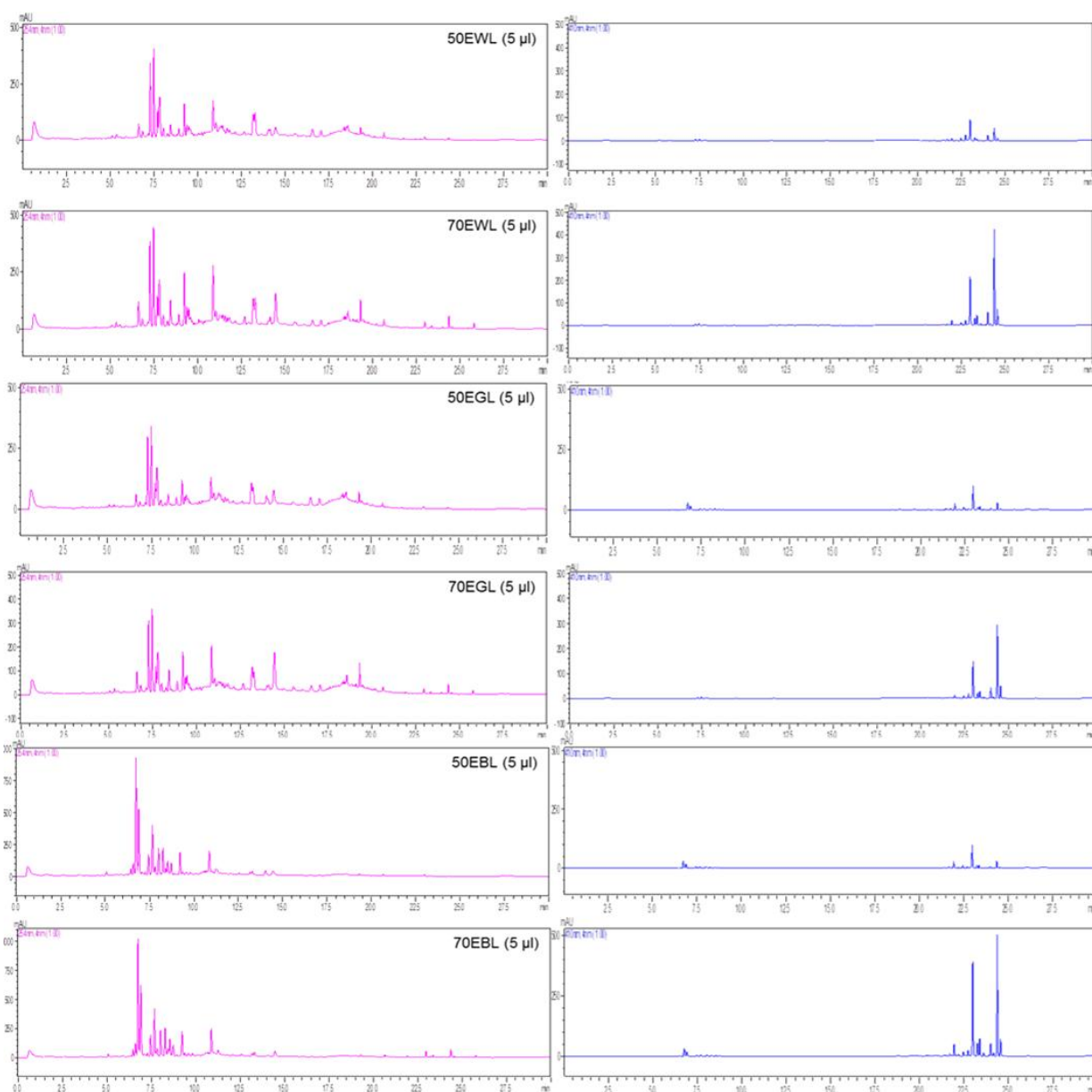


Fig. 4. HPLC profiles of 50% and 70% EtOH extracts from WD, GH, and BB soy leaves cultivated on 2013 (Left : 254 nm, Right : 410 nm).

(라) 70% 주정 반복 추출 (1차, 2차, 3차) 수율 및 HPLC 분석 비교

건조 콩잎을 70% 주정으로 1차, 2차, 3차 반복 추출을 시행하여 추출 수율과 이에 따른 추출물의 양상을 HPLC로 분석하여 유효한 추출 횟수를 설정하고자 하였다.

WD 70% 주정추출물 (EWL)의 경우, 1차 추출 수율은 26.8%이었고, 2차 추출 수율은 70% 정도 감소한 8.0%로 나타났으며, 이어 3차 추출 수율은 2차 수율 보다 50%가 감소한 4.0%로 측정되었다. 또한 HPLC 분석에서도 1차, 2차, 3차 차례로 비교하였을 때, 추출물의 함량이 추출 수율과 같은 양상으로 현저하게 낮아지는 것을 확인할 수 있었다 (Table 7, Fig. 5).

Table 7. Yields of serial extraction of WD-107d soy leaves with 70% EtOH (EWL)

Extracts	Filter vol. (mL)	Dry wt. (mg/ml)	Dry wt. (mg/g sample)	Yield (%)
70EWL-1 st Extracts	75	35.7 ± 0.7	267.8 ± 5.3	26.8 ± 0.5
70EWL-2 nd Extracts	98	8.2 ± 0.4	80.4 ± 3.9	8.0 ± 0.4
70EWL-3 rd Extracts	103	3.9 ± 0.0	40.2 ± 0.0	4.0 ± 0.0

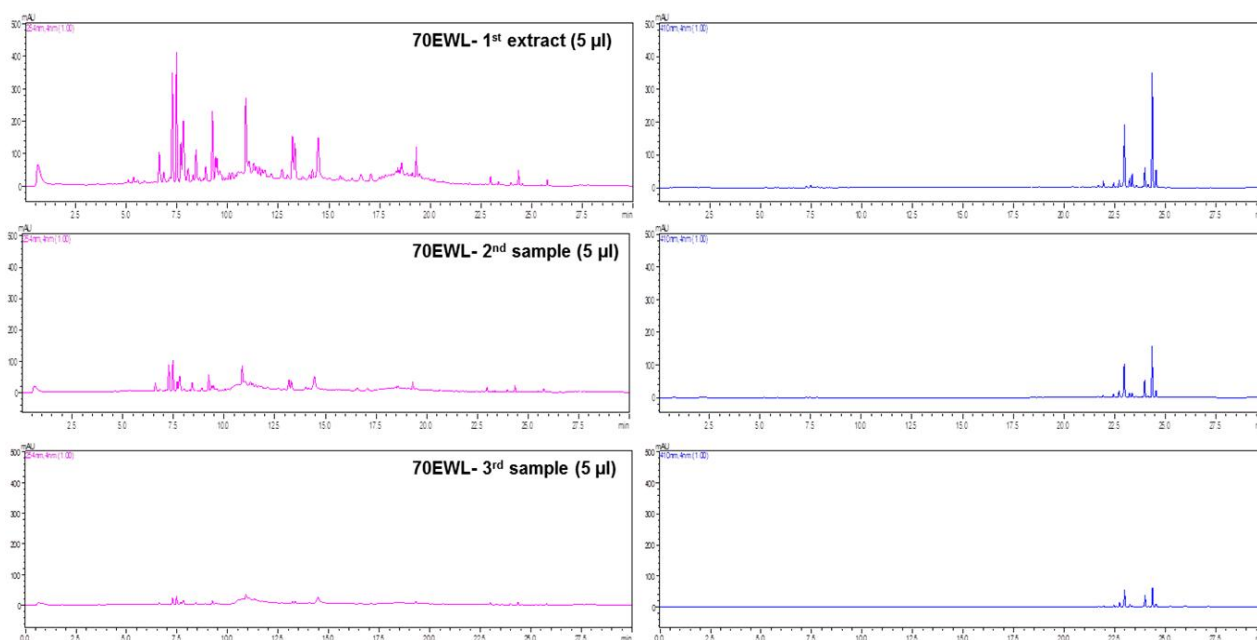


Fig. 5. HPLC profiles of serial 70% EtOH extracts of WD-107d soy leaves (Left : 254 nm, Right : 410 nm).

GH 70% 주정추출물 (EGL)의 경우, 1차 추출 수율은 20.0%이었고, 2차 추출 수율은 13.5%로 나타났으며, 이어 3차 추출 수율은 2차 수율 보다 76%가 감소한 3.2%로 측정되었다. 또한 HPLC 분석에서도 1차, 2차, 3차 차례로 비교하였을 때, 추출물의 함량이 추출 수율과 같은 양상으로 현저하게 낮아지는 것을 확인할 수 있었다 (Table 8, Fig. 6).

Table 8. Yields of serial extraction of GH-107d soy leaves with 70% EtOH (EGL)

Extracts	Filter vol. (mL)	Dry wt. (mg/ml)	Dry wt. (mg/g sample)	Yield (%)
70EGL-1 st Extracts	68	29.4 ± 0.6	199.9 ± 4.1	20.0 ± 0.4
70EGL-2 nd Extracts	99	13.6 ± 0.2	134.6 ± 2.0	13.5 ± 0.2
70EGL-3 rd Extracts	102	3.2 ± 0.2	32.1 ± 1.5	3.2 ± 0.2

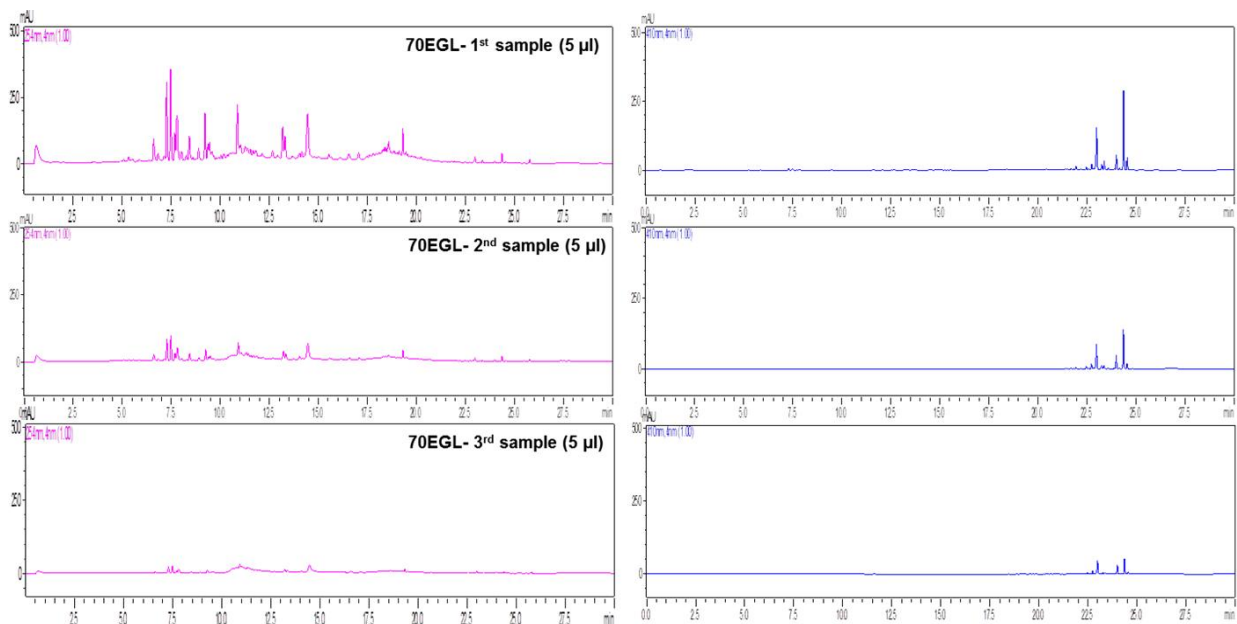


Fig. 6. HPLC profiles of serial 70% EtOH extracts of GH-107d soy leaves (Left : 254 nm, Right : 410 nm).

BB 70% 주정추출물 (EBL)의 경우, 1차 추출 수율은 22.8%이었고, 2차 추출 수율은 10.1%로 나타났으며, 이어 3차 추출 수율은 2차 수율 보다 61%가 감소한 3.9%로 측정되었다. 또한 HPLC 분석에서도 1차, 2차, 3차 차례로 비교하였을 때, 추출물의 함량이 추출 수율과 같은 양상으로 현저하게 낮아지는 것을 확인할 수 있었다 (Table 9, Fig. 7).

Table 9. Yields of serial extraction of BB-107d soy leaves with 70% EtOH (EBL)

Extracts	Filter vol. (mL)	Dry wt. (mg/ml)	Dry wt. (mg/g sample)	Yield (%)
70EBL-1 st Extracts	65	35.0 ± 0.0	227.5 ± 0.0	22.8 ± 0.0
70EBL-2 nd Extracts	106	9.5 ± 0.1	100.7 ± 1.1	10.1 ± 0.1
70EBL-3 rd Extracts	107	3.7 ± 0.0	39.3 ± 0.3	3.9 ± 0.0

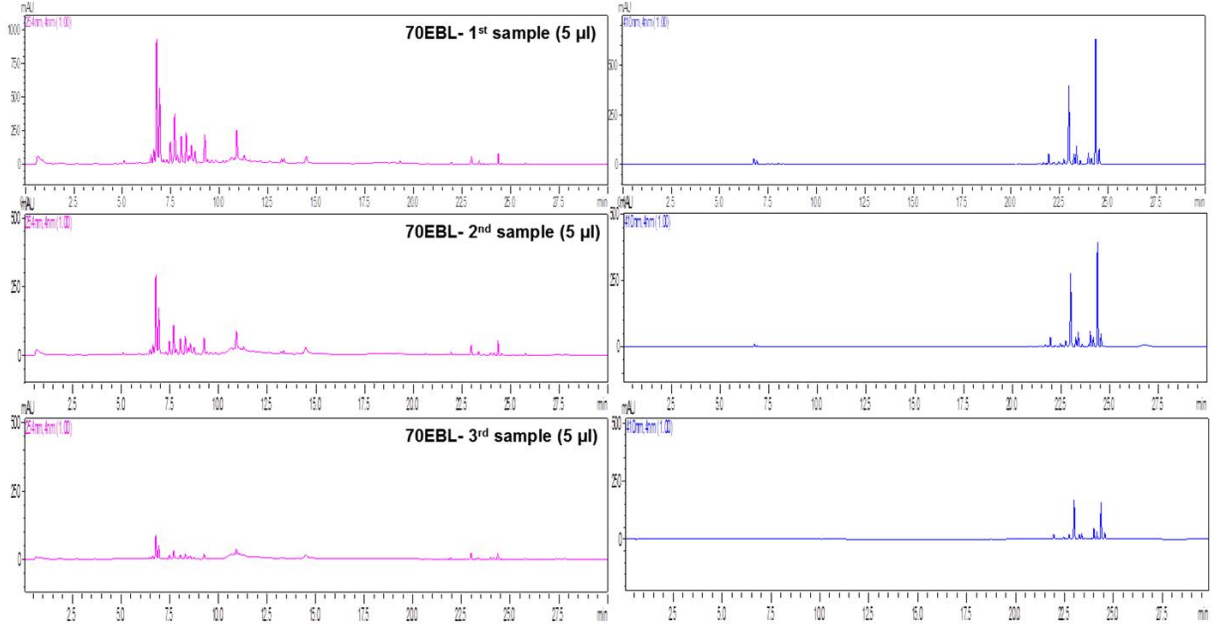


Fig 7. HPLC profiles of serial 70% EtOH extracts of BB-107d soy leaves (Left : 254 nm, Right : 410 nm).

이상의 결과를 비교하면 70% 주정 반복 추출을 통한 1차, 2차 및 3차 수율을 표 10에 정리하였다. 경제성 (주정 가격, 공정비, 주정 폐수비) 등을 고려하여 최적의 추출 조건 (반복 추출 회수)를 결정하기 위해 본 실험 결과를 검토해 본 결과, WD는 1차 추출 수율이 높고 2차 추출 수율은 낮은 반면에, GH와 BB는 2차 추출까지 실행하는 것이 효율적으로 판단되나, 1차 수율과 2차 수율은 합치면 큰 차이가 없다. 따라서 반복 실험을 통해 더 많은 결과를 확보할 것이며, 보다 구체적인 경제성을 산출해야 할 것으로 판단된다.

표 10. 품종별 추출 조건(회수)에 따른 수율

품종	추출 수율		
	1 차	2 차	3 차
WD	26.8	8.0	4.0
GH	20.0	13.5	3.2
BB	22.8	10.1	3.9

(마) 추출 공정을 달리한 콩잎 추출물의 생리활성 비교

- **Yeast α -glucosidase 저해활성:** 건조콩잎 (WD, GH, BB) 70% 주정 추출물 (실온 추출, 45°C 추출)과 열수 추출물 (80°C) 100 μ g/ml에서 yeast α -glucosidase 저해 활성을 측정하였을 때, 열수 추출물은 10% 이하의 α -glucosidase 저해활성을 나타냈고, 70% 주정 추출물의 실온 추출물과 45°C 추출물은 비슷한 α -glucosidase 저해활성을 나타냈다. 실온 70EWL과 45°C 추출 70EWL이 각각 54.0%와 51.0%의 α -glucosidase 저해활성을 나타냈고, 70EGL에서도 실온과 45°C 추출물이 각각 60.1%와 64.0%의 α -glucosidase 저해활성을 나타냈다. 70 EBL은 상대적으로 낮은 저해활성을 나타냈으며, 실온 추출물과 45°C 추출물이 각각 18.1%와 24.8%의 α -glucosidase 저해활성을 나타냈다 (Table 11).

Table 11. Yeast α -glucosidase inhibitory effects of hot water and 70% EtOH extracts from soy leaves

Samples	Extraction conditions	Inhibition of Yeast α -glucosidase at 100 μ g/ml (%)
WD-107d	Hot water extracts	7.4 \pm 0.5
	70% EtOH extracts at 45°C	51.0 \pm 0.4
	70% EtOH extracts at RT	54.1 \pm 0.5
GH-107d	Hot water extracts	6.7 \pm 0.3
	70% EtOH extracts at 45°C	64.0 \pm 0.1
	70% EtOH extracts at RT	60.1 \pm 0.1
BB-107d	Hot water extracts	10.1 \pm 1.6
	70% EtOH extracts at 45°C	24.8 \pm 0.2
	70% EtOH extracts at RT	18.1 \pm 0.8
Positive control (Coumestrol 5 μ M)		52.5 \pm 0.1

RT: room temperature.

- **LDL-산화 저해활성:** 2013-BB, WD, GH-110일령 젖은 콩잎을 45°C와 상온에서 70% 주정으로 추출한 추출물과 열수 추출물의 활성을 비교하였다 (Table 12). 품종별로 비교한 결과, BB가 월등히 높은 LDL-항산화 활성을 보였다. 열수 추출물에서 비해서 70% 주정 추출물의 LDL-항산화 활성이 높았다. GH의 경우에는, 상온보다는 45°C에서 추출하였을 때 LDL-항산화 활성이 높았다. 반면, WD의 경우에는 45°C 보다는 상온에서 추출하였을 때 LDL-항산화 활성이 높았다.

Table 12. Comparison of LDL-oxidation inhibitory effects according to solvent extracting duration from 2013-JP-BB, WD and GH soy leaves

Samples	Inhibition of LDL-oxidation at 20 µg/ml (%)		
	45°C 70% EtOH ex.	70% EtOH ex.	Hot water ex.
BB-107d	98.4 ± 0.4	98.1 ± 1.1	86.9 ± 1.8
GH-107d	79.8 ± 0.7	65.0 ± 1.4	37.1 ± 1.9
WD-107d	46.7 ± 2.5	51.0 ± 1.7	31.8 ± 1.6
Positive control (BHT 2 µM) : 51.1 ± 1.3			

제 1세부과제의 연구 결과 중 건조중량, 콩잎추출물이 함유하는 6"-*O*-malonyl genistin 함량 측정결과와 EtOH 농도에 따른 PSH 함량 분석 결과를 바탕으로 볼 경우 70% EtOH 추출을 통해 유효성분을 확보하는 것이 더 효율적으로 판단된다. 또한 2013년도 콩 품종별 재배 수확량 면에서는 BB > GH > WD 순으로 나타났으나, 전반적인 수확량을 비교해 볼 경우 2013년도 수확량과 같이 BB가 GH보다 높은 수확량을 보여 주었다. 제 1세부과제의 BB와 GH의 기능성 분석을 통해, 당부하 내당능 효능은 모두 같은 수준인 것에 비해 지방 흡수 저해 효능은 GH가 좋고, 인슐린 저항성 개선 효능은 BB가 다소 좋았다. 이상의 생리활성 결과를 바탕으로 정확한 경제성 분석을 위해 원료의 대량 재배를 비롯하여 분말화 공정 모두를 BB와 GH를 함께 진행하여 경제성 분석을 통한 최종 원료를 확보하였다.

다. 제품화를 위한 다당류 원료의 대량 재배 및 수확

본 연구에서는 콩잎을 친환경적으로 재배하기 위하여 직접 계약재배를 실시하였다. 기간별 시료의 채취와 관리를 위하여 근거리의 특정 지역을 선정하였고, 선행연구를 통하여 선별한 GH 품종(황금콩)과 BB 품종(검정콩 재래종 1호), BG 품종(서목태)을 선택하여 재배하였다. 품종은 선행연구 및 2013년도와 2014년도에 확보한 결과 분석을 통해 원료 품종을 고려하였다. 품종의 경우 당부하 내당능 효과와 지방 흡수 저해 효능을 기본으로 하였으며 산업적 대량생산의 측면도 함께 고려하였다. 산업적 대량생산의 경우, 경제성 등을 감안하여 쉽게 재배를 할 수 있으며 수급이 용한 품종으로 선별하였다. 특히 선행연구와 2014년도부터 2016년도 재배를 통해 환경에 큰 영향을 받고 있는 점을 확인하였으며 이를 바탕으로 환경에도 안정적으로 생산이 가능한 품종 선별과 생산량을 높이기 위한 조건 등을 중심으로 연구 진행하였다.

콩잎의 재배는 5월 중순에서 6월 중순에 파종하는데, 2014년도(표 13)에는 6월 초에 2015년도(표 14)와 2016년도(표 15)는 5월 말에 파종을 실시하였다. 파종 시기는 재배 환경(온도, 강우량등)을 중심으로 한 것으로 2014년도, 2005년도 그리고 2016년도의 파종시기에서 큰 차이점은 없었다. 작형은 단작으로 실시하였고, 파종 방법은 이랑법으로 2역 식재하였다. 잡초로 인한 문제점에 대비하기 위하여 토양처리제를 활용하여 처리하였고, 기타 농약을 배제하여 친환경적으로 재배를 실시하였다. 3차년도에는 재배한 콩잎 추출물에 대해서 공인기관의 농약검사를 실행하였다. 콩의 재배에서 실시하는 순자르기는 콩의 수확량과 밀접한 연관을 가지는 것으로 잘

알려진 방법이지만, 본 연구에서는 콩잎의 성장과 수확을 위하여 배재하였다. 이러한 방법을 통하여 콩의 길이 생장을 유도하는 경우에는 콩의 낱알의 크기가 작고 수확량이 감소하게 되지만, 필요한 콩잎의 확보를 위하여 배재하였다. 순자르기를 실행하지 않고 콩의 길이 생장을 유도하는 경우에는, 영양분 등이 콩과 콩잎의 분산을 통해 콩의 낱알의 크기가 작고 수확량이 감소하게 되지만, 본 연구의 해당노 신소재인 콩잎의 확보를 위하여 순자르기를 배재했다.

재배 및 수확 시 재배 환경을 최대 고려하였다. 특히 BB와 GB의 품종은 GH와는 달리 콩잎이 낙엽처럼 떨어지는 시기까지 재배하는 조건을 감안하여 1차년도에 비해 2차년도는 늦은 시기까지 재배하였다. 콩잎의 재배는 대부분 5월 중순에서 6월 중순에 파종을 하며, 2차년도 실험에서는 5월 28일에 파종하였다. 작형은 단작으로 실행하였다.

1차년도에 GH 품종은 300 평 규모, BB 품종은 200 평 규모로 설정하였고, 두 품종 간의 일정 거리를 두고 서로 다른 구역으로 구분하기 위하여 RS 품종 지역에 지춧대를 설치하고 그물망을 이용하여 구획을 나누어 재배를 실시하였다 (그림 8 & 9). 각각의 종자는 6월 3일에 파종하였고, 117일령이 되는 9월 27일에 최종 수확하였고 (2014년도에는 9월에 윤달이 있어서 수확 시기를 다소 늦추었음), 일정 기간별로 시료를 채취하여 즉시 건조한 건조콩잎을 4°C에 보관하면서, 분석용으로 활용하였다.

2차년도에 GH 품종은 100평 (330.58 m²), BB 품종은 400평 (1,322.31 m²) 그리고 GB 품종은 100평 (330.58 m²) 규모로 설정하였다(그림 10, 11 & 12). 재배 시 지역 및 재배 온도에 의한 편차를 줄이기 위해 근접한 지역에 재배를 실행하였으며, 각 품종 간에 일정 거리를 두고 지춧대를 설치하여 구획을 나누어 재배하였다. 1차년도에는 6월 3일에 파종하고 117일령(9월 27일)을 수확을 하였다. 2차년도에는 비슷한 시기인 5월 28일에 파종하였다. 제1세부과제의 2014년도 시기별 GH와 BB콩잎의 50% 또는 70% EtOH 추출물의 회수율, 지표물질의 함량, 총 페놀/총 플라보노이드 함량 등을 분석한 결과, GH와 BB콩잎 모두 117일령에서 가장 높았다. 이에 2014년도 수확 콩잎의 결과를 바탕으로 2차년도는 파종 후 118일령이 되는 9월 24일에 수확하였다. 2015년도는 콩잎을 재배하는 충청남도 지역의 경우, 2014년도 대비 약 20% 정도 가뭄 현상이 있어서 2014년도 대비 수확량이 감소하였다. 일시적으로 GH, BB 그리고 GB 품종에 제한 급수를 해주었으나 이는 수확량에 큰 효과를 주지 못하였다. 15 - 20일 간격으로 찍은 품종별 콩잎 재배 현황을 그림 2 - 4에 나타냈다.

3차년도는 1차년도와 2차년도 연구결과를 바탕으로 대량생산을 위한 원료 확보를 위해 GH와 BB 그리고 GB를 재배하여 원료를 확보하였다(그림 13, 14 & 15). GH 품종은 50평 (165.25 m²), BB 품종은 300평 (991.50 m²) 그리고 GB 품종은 250평 (826.25 m²) 규모로 설정하였다. 선행연구 및 본 연구를 통해 GH에 대해서는 타 품종대비 많은 재배에 대한 데이터와 소재를 확보하고 있는 것에 비해 BB와 GB는 상대적으로 소재의 양이 적고 관련 대단위 재배를 통한 콩잎 생산량에 대한 자료가 부족하여 시행하였다. 또한 1차년도와 2차년도에서 수확일정이 길어짐으로 인해 콩잎이 낙엽이 져서 떨어지는 현상이 발생하여 콩잎 회수량의 증대를 위해서 비교적 이른 시기인 102일령에 회수를 시행하였다. 본 연구를 통한 년도별 파종 및 재배시기는 표 13 ~ 표 15에 있으며 관련 재배 그림은 8 ~ 그림 15와 같다.

표 13. 2014년도 품종별 콩잎 파종 및 재배 현황

품종	면적 (m ²)	파종시기	수확시기	수확일령
GH	991.5	6월 3일	9월 27일	117일령
BB	661.0	6월 3일	9월 27일	117일령

표 14. 2015년도 품종별 콩잎 파종 및 재배 현황

품종	면적 (m ²)	파종 시기	수확 시기	수확일령
GH	330.58	5월 28일	9월 24일	118일령
BB	1,322.31	5월 28일	9월 24일	118일령
GB	330.58	5월 28일	9월 24일	118일령

표 15. 2016년도 품종별 콩잎 파종 및 재배 현황

품종	면적 (m ²)	파종 시기	수확 시기	수확일령
GH	165.25	5월 26일	9월 05일	102일령
BB	991.50	5월 26일	9월 05일	102일령
GB	826.25	5월 26일	9월 05일	102일령

	
<p>6월 3일 (파종)</p>	<p>7월 3일 (30일령)</p>
	
<p>7월 22일 (50일령)</p>	<p>8월 6일 (65일령)</p>
	
<p>8월 21일 (80일령)</p>	<p>9월 27일 (수확)</p>

그림 8. 2014년도 시기별 콩잎 대량 재배 현장 (GH 품종).



6월 3일 (파종)



7월 3일 (30일령)



7월 22일 (50일령)



8월 6일 (65일령)



8월 21일 (80일령)



9월 27일 (수확)

그림 9. 2014년도 시기별 콩잎 대량 재배 현장 (BB 품종).

	
<p>7월 23일 (55일령)</p>	<p>8월 13일 (76일령)</p>
	
<p>8월 27일 (90일령)</p>	<p>9월 10일 (104일령)</p>
	
<p>9월 24일 (118일령)</p>	<p>10월 8일 (132일령)</p>

그림 10. 2015년도 시기별 GH 콩잎 대량 재배 현장.

	
<p>7월 23일 (55일령)</p>	<p>8월 13일 (76일령)</p>
	
<p>8월 27일 (90일령)</p>	<p>9월 10일 (104일령)</p>
	
<p>9월 24일 (118일령)</p>	<p>10월 8일 (132일령)</p>

그림 11. 2015년도 시기별 BB 콩잎 대량 재배 현장.


	
<p>7월 23일 (55일령)</p>	<p>8월 13일 (76일령)</p>
	
<p>8월 27일 (90일령)</p>	<p>9월 10일 (104일령)</p>
	
<p>9월 24일 (118일령)</p>	<p>10월 8일 (132일령)</p>

그림 12. 2015년도 시기별 GB 콩잎 대량 재배 현장.



Fig. 13. 2016년도 시기별 GH 콩잎 대량 재배 현장.

	
<p>6월 27일 (32일령)</p>	<p>7월 11일 (46일령)</p>
	
<p>7월 20일 (55일령)</p>	<p>8월 4일 (70일령)</p>
	
<p>8월 24일 (90일령)</p>	<p>9월 5일 (102일령)</p>

그림. 14. 2016년도 시기별 BB 콩잎 대량 재배 현장.

 <p>2016/06/27 11:24 AM</p>	 <p>2016/07/11 01:51 PM</p>
<p>6월 27일 (32일령)</p>	<p>7월 11일 (46일령)</p>
 <p>2016/07/20 02:19 PM</p>	 <p>2016/08/04 09:32 AM</p>
<p>7월 20일 (55일령)</p>	<p>8월 4일 (70일령)</p>
 <p>2016/08/24 10:20 AM</p>	 <p>2016/09/05 03:25 PM</p>
<p>8월 24일 (90일령)</p>	<p>9월 5일 (102일령)</p>

그림 15. 2016년도 시기별 GB 콩잎 대량 재배 현장.

2013년도, 2014년도, 2015년도 그리고 2016년도 콩잎 품종별 생산성은 다음 표 16과 같다. 2014년도 면적 당 평균 생산량은 0.1095 kg/m²로 2013년도 면적 당 평균 생산량인 0.0454 kg/m²에 비해 2.4배 수확량이 높았다. 2015년은 0.052kg/m², 2016년은 0.150kg/m²의 생산량을 보였다. 시기별로 생산량의 차이가 보인 것은 환경적인 부분이 높은 것으로 생각이 된다. 2014년도에는 2013년도와 비교해 폭우가 없었으며, 태풍의 피해도 상대적으로 적은 원인으로 생산량이 높아진 것으로 판단된다. 그러나 2015년도에는 많은 폭우와 함께 비교적 높은 온도로 콩잎의 생육에 어려움이 있었다. 이러한 환경에서 GH는 많은 영향을 받는것에 비해 BB는 상대적으로 안정적으로 성장 및 생산량을 보이고 있음을 확인할 수 있었다. 또한 해충의 피해도 생산량에 크게 작용하는 것으로 생각이 된다. 무농약 재배로 인해 2013년도, 2015년도에는 곤충으로 인한 피해가 많았으나, 2014년도와 2016년도에는 상대적으로 곤충의 피해가 적었다. 품종별 재배의 경우 2013년도에는 BB가 GH보다 높은 면적 당 생산량을 보였으나, 2014년도, 2016년도에는 GH가 높은 생산량을 보였다. 년도별 자료를 바탕으로 품종에 대한 생산량을 확인한 결과 일반적인 생산량은 GH가 BB와 GB에 비해 높으나 외부 환경에 많은 영향을 받고 있음을 확인 할 수 있었다.

표 16. 품종에 따른 면적당 콩잎 생산성

년도	품종별 면적 당 생산량 (kg/m ²)		
	BB	GB	GH
2013	0.055		0.045
2014	0.092		0.121
2015	0.105	0.036	0.015
2016	0.161	0.106	0.182
평균생산량	0.103	0.142	0.091

2014년 콩잎 재배 면적 및 확보한 콩잎 생산량은 표 15와 같으며, BB 61 kg과 GH 120 kg을 확보하여 총 181 kg을 확보하였다. 2015년도에는 BB 139 kg, GH 5kg 그리고 GB 12 kg을 확보하였으며 2016년도에는 BB 160kg, GH 30 kg, 그리고 GB는 88 kg의 원물 소재를 확보하였다. 본 연구를 통해 확보한 소재에 대해서는 무농약 재배에 대한 관련 자료를 확보하였으며 이를 이용하여 인체시험 및 제품화 연구에 사용하였다.

2013년도에서 2016년도 콩잎 성장의 경우, 파종 후 55일령까지는 GH 품종과 BB 품종의 성장 양상에 큰 차이가 없었다. 반면에 GB 품종은 GH 품종과 BB 품종에 비해 성장이 늦었으며, GB-90일령 콩잎의 성장이 GH와 BB55 일령의 성장 정도와 비슷했다. GH는 다른 품종에 비해 가장 빠르게 성장하였으며, 100일령 전후로 크고 굵은 콩잎의 형태를 유지하였다. BB는 55일령 전후까지는 GH와 성장 속도가 비슷하였으나, 118일령 전후가 되어서야 크고 굵은 콩잎의 형태를 보였다. GB는 상대적으로 성장이 가장 늦었으며 90일 - 100일령에서 비교적 굵은 상태의 콩잎

의 형태를 보여 주었으나, GH와 BB 품종에 비교하여 생성된 콩잎의 숫자가 적게 보였다. 120일령 이후 GH 콩잎은 쉽게 떨어지는 낙엽현상과 함께 콩잎의 갈변 현상을 보였다. BB 콩잎도 GH와 같이 120일령 이후 갈변된 콩잎의 낙엽현상이 보였다. 이에 비해 성장이 늦은 120일령의 GH 콩잎은 비교적 양호한 상태를 유지하였다. 콩 수확의 경우에도 BB는 추위가 오는 시기에 수확하는 반면에 GH는 상대적으로 보다 이른 시기에 수확하는 것을 감안할 때 콩잎도 콩 수확과 비슷한 양상을 보여주었다. 또한 GB 품종의 콩잎 생산량은 GH와 BB 품종에 비교해 현저하게 떨어지며, 이는 상품화를 위한 경제성 측면에서 고려해야 할 점이다.

2016년도 콩잎에 대한 잎의 변화를 확인하여 보았다. 콩잎의 크기와 건조 전 후의 무게를 살펴볼 수 있는 상태인 55일령부터 수확한 102일령 그리고 수확 후 18일이 지난 120일령에 대해서 확인하였다. 콩잎의 크기는 표 17과 같으며 콩잎의 건조 전과 건조 후의 무게는 표 18과 같다. 콩잎의 크기는 3잎 30장을 기준으로 하여 평균 값을 산출하였으며 무게의 경우에도 3잎 30장을 기준으로 하여 측정하였다.

일령별 콩잎의 크기는 대부분 90일정도에서 가장 큰 크기로 나오는 것을 확인할 수 있었다. GB의 경우에는 55일 이후에 줄어는 형태를 보였지만 이는 55일 이후부터는 성장이 없이 계속 유지되는 것으로 생각이 된다. 또한 90일 이후에는 계절적인 특성으로 인해 콩잎이 건조등으로 인해 크기가 상대적으로 줄어드는 것으로 보인다.

일령별 건조 전 무게의 경우 90일에서 102일 정도에 가장 높은 무게가 나오는 것을 확인하였다. 특히 GH의 경우 102일에서 가장 높은 무게가 나왔으며 건조 후의 무게는 시간이 지날수록 높아지는 양상을 보였다. GH의 경우에는 102일에 가장 높았으며 GB는 102일 후 무게의 변화가 없음을 확인할 수 있었다. 단 BB의 경우는 시간이 지날수록 계속 증가되는 양상을 보였는데, BB는 다른 품종에 비해 늦은 시기까지 키운 후 수확을 하는 품종으로 건조 후의 크기도 이와 같은 품종별 생태와 연관이 있는 것으로 생각이 된다. 콩잎의 크기와 건조 전 후의 무게를 고려해 볼 경우, 102일 정도에서의 수확을 하는 것이 안정적으로 수확을 할 수 있는 것으로 생각이 되어진다.

표 17. 일령별 콩잎의 크기

일령	잎 크기 mm (가로 * 세로)		
	BB	GB	GH
55	115 * 140	130 * 160	125 * 180
70	125 * 160	120 * 155	115 * 195
90	125 * 160	110 * 150	110 * 190
102	110 * 160	110 * 150	115 * 190
120	105 * 160	95 * 130	85 * 145

표 18. 일령별 콩잎의 크기

일령		BB	GB	GH
55	건조 전 (g)	170	121	190
	건조 후 (g)	43	30	48
70	건조 전 (g)	219	180	230
	건조 후 (g)	65	53	70
90	건조 전 (g)	212	172	219
	건조 후 (g)	72	56	76
102	건조 전 (g)	206	167	235
	건조 후 (g)	79	63	86
120	건조 전 (g)	184	99	161
	건조 후 (g)	84	64	75

콩잎은 2주 간격으로 시료(샘플) 채취를 시행하였으며, 시기별로 콩잎 성장을 체크하였다. 무작위로 각 품종별 콩잎을 채취하여 건조한 콩잎은 냉장고에 보관하였고, 향후 시기별, 품종별 당노 관련 유효성분에 대한 분석용으로 활용하고자 하였다. 건조는 콩잎의 오염을 막기 위해 샘플 채취 후 바로 건조기에서 60도 조건(열중건조 일반적인 조건)으로 18 시간 동안 건조하였다. 콩잎이 골고루 잘 건조되도록 3 시간 간격으로 위와 아래를 뒤섞어 주면서 건조하였다. 건조 후 콩잎은 공기층을 없애고, 공간을 덜 차지하도록 분쇄하여 냉장실에 보관하였다.

수확한 118령 콩잎은 자체 수분을 제거해 주기 위해 야외에서 하루 정도 자연 건조하였다. 건조의 경우 열풍건조를 통해 회수하는 것이 일반적이거나, 품종 당 최소 330m² 이상의 단위에서 재배하여 수확한 대량의 콩잎을 바로 건조기를 통해 건조 시 콩잎 자체의 수분이 많아 콩잎 건조에 많은 시간이 소요되며, 이로 인해 콩잎 건조 시간의 지연 등으로 콩잎 함유성분의 변성 및 경제성 측면에서 부정적인 요소가 발생할 수 있으므로 자연 건조를 통해 일차적으로 콩잎의 자체 수분을 일정량 제거하고자 하였다. 이후 자연 건조한 콩잎은 열풍 건조기를 이용하여 건조한 후 분쇄하고, 콩잎을 각 품종별로 일정량으로 나누고 제습제를 넣어 밀봉한 후 냉장실에 보관하였다. GH 품종과 달리 BB와 GB 품종의 콩은 서리가 내리고 난 이후에 수확하는 점을 감안하여 원재료 확보 및 대량공정 실험 진행을 위해 118일령에 콩잎을 수확하면서 품종별로 약 33m² 면적은 수확하지 않고 계속 재배하였으며 1주 - 2주 간격으로 계속 콩잎 시료를 채취하였다.

라. PSH 시제품 생산을 위한 대량 추출, 농축 및 분말화 공정 개발

2014년도 확보한 시료를 이용하여 인체시험을 위한 콩잎 다당류 고함유 분획(PSH)의 시제품을 생산하였다. 시기별 재배 샘플 및 수확한 콩잎 중 일부 생콩잎은 4° C cold room에 보관하였다. 보관된 시료는 자연, 열풍, 동결 건조를 진행하여 유효성분의 함량 분석을 조사하였다.

나머지 수확콩잎을 비롯한 대부분은 열풍건조를 이용하여 건조 콩잎을 확보하였다. GH를 이용한 연구에서 자연, 열풍 그리고 동결건조에 대한 건조 후 추출물의 무게(w/w)에는 큰 차이가 없었다. 유효성분의 지표가 되는 LDL-항산화 저해활성에서는 큰 차이가 없었으며, 건조 방법에 따른 항산화 활성은 비교적 안정적인 것으로 판단된다. α -glucosidase 저해활성에서도 전체적으로 큰 차이가 없음을 확인하였다. 그러나 대량 생산 후 시료 처리에서 자연건조의 경우 시간이 많이 소요되며 자연 건조 도중에 오염 발생의 우려가 있다. 동결 건조의 경우 오염이 없이 가장 원물(생콩잎)에 가까운 형태로 보관이 가능하나 동결건조 비용이 자연건조, 열풍건조와 비교하여 10배 이상이 소요되기에 경제성 측면에서 문제가 있다. 이상의 결과를 바탕으로 빠른 시간에 경제적으로 대량회수 할 수 있는 방법으로 열풍건조가 최적이기에 열풍건조를 진행하여 건조 콩잎을 확보하고 보관하였다. 제1 세부과제의 연구결과에서도 생콩잎 대비 열풍건조 과정에서 α -glucosidase 저해활성을 나타내는 생리활성 물질이 다소 변경이 됨을 확인하였으나, LDL-항산화 활성에서는 열풍 과정에서 나타내는 생리활성물질의 생성으로 인해 LDL-항산화 활성이 높아짐을 확인하였다.

PSH 활성 보존을 위한 대량 농축 공정은 선행연구 및 제1세부과제의 연구 조건을 바탕으로 1차 70% EtOH (주정)을 용매로 사용하였으며, EtOH의 양은 건조콩잎 분말 50 kg 대비 500 L의 EtOH을 사용하였다. 추출 시 온도는 25°C 내외 조건으로 24 시간 동안 추출조건으로 결정하였다. 특히 추출 시 건조 콩잎이 EtOH에 잘 침지될 수 있도록 6 ~ 12 시간 간격으로 혼합하여 윗부분과 아랫부분의 콩잎 혼합을 용이하게 하였다. 같은 조건에서의 EtOH 농도별 추출 결과 α -glucosidase 저해활성은 95% EtOH 추출물에서, LDL-항산화 효능은 50% EtOH에서 높은 활성효과가 나왔으나 산업적 대량생산의 용이성 및 활용성을 감안하여 70% EtOH 추출을 선택하였다.

추출 후 용매 제거 및 추출물의 농축을 위한 농축은 여과와 함께 진행하였다. 콩잎분말 및 찌꺼기는 여과포에 의해 모두 걸렸으며 걸러진 여과액은 40°C 내외에서 48 시간 농축을 진행하였다. 선행연구를 통해 70% 주정 추출 시 고형분 함량은 24 Brix, 95% 주정 추출 시 고형분 함량은 30 Brix이었다.

추출 농축물에 대한 활성 보존을 위한 분말화 공정은 콩잎 주정추출물의 배당체 등이 다량 함유되어 있으므로 동결건조 또는 진공 건조 등이 용이하지 않음을 확인하였다. 이에 대한 대책으로 동결건조 및 진공건조를 용이하게 하기 위해 부형제를 사용하였으며 알려져 있는 부형제로는 덱스트란, 전분, 말토 덱스트린 다당체 등이 있다. 본 연구에서 최종 제형과 용도 등을 고려하여 부형제로 많이 이용되고 있는 덱스트린을 사용하였다. 덱스트린의 경우 본 연구의 항

당뇨에도 영향을 주지 않을 뿐만 아니라 LDL-항산화 효과와 α -glucosidase 저해활성에도 영향을 미치지 않았다. 추출 농축물의 분말건조를 위해 동결건조기를 사용하였다. 진공건조기의 경우, 추출물에 10% 내외의 EtOH이 포함되어 있어 진공 건조시 역류현상이 발생하였으며, 특히 산업적 대량공정 시 역류로 인한 기기에 문제를 발생하는 점을 확인하였다. 이에 대한 해결 방법으로 동결건조기를 사용한 분말화 작업을 진행하였다. 동결건조기의 경우 진공건조기에 비해 산업적으로 비용발생이 높으나 추출물의 회수율을 높일 수 있을 것으로 판단된다. 동결건조기의 사용은 농축물에 EtOH 함량이 높아 주정추출분말이 동결되지 않는 단점을 가지고 있다. 동결되지 않으면 상대적으로 건조하기가 용이하지 않을 뿐만 아니라 건조물의 회수에 많은 어려움을 줄 수 있다. 이상의 문제점을 해결하기 위해 주정추출액에 10배의 증류수를 혼합하고 일정량의 부형제인 덱스트린을 첨가하여 동결건조를 진행하였다. 원활한 동결건조를 위해 미리 덱스트린을 충분히 주정추출농축액에 용해를 시켰다. 동결건조는 72 시간 동안 실행하였다 (그림 16). 동결 건조 후 성상은 딱딱한 형태였지만 콩잎의 다당체 성분으로 인해 쉽게 습기를 먹는 현상이 발생하였다. 동결건조물은 제습제를 넣어 밀봉한 후 4℃의 냉장고에 보관하였다. 또한 소량의 샘플은 실온에 보관을 하였다. 이상의 샘플은 주기적으로 성상 및 유효물질에 대한 분석을 시행하였다.

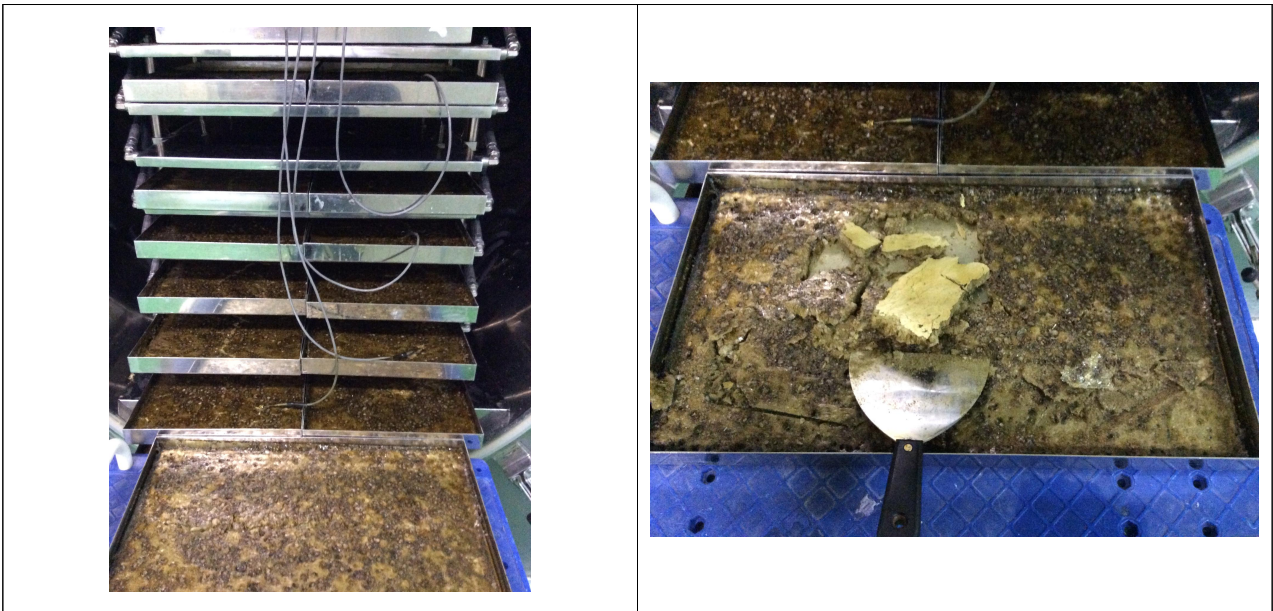


그림 16. 주정추출분말 동결건조 사진 (2013년도 GH 품종).

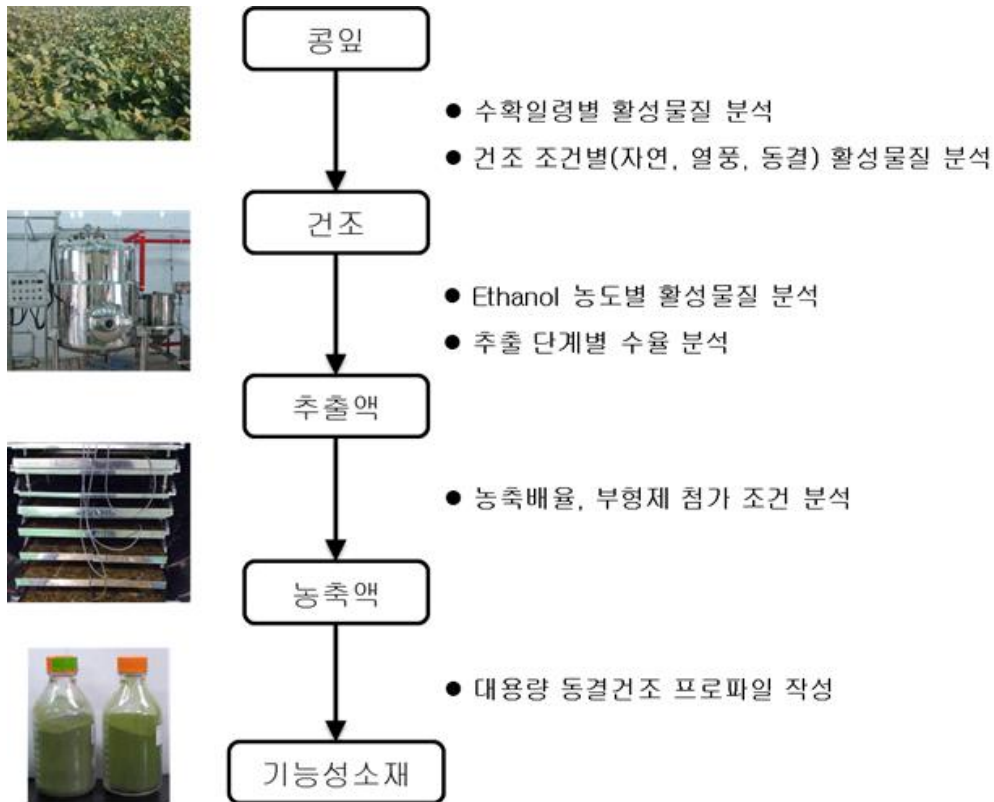


그림 17. 인체시험용 PTH 시제품 생산을 위한 공정도.

마. 다당류 고함유 분획의 대량 생산 공정 표준화 확립

대량생산을 통해 확보한 건조콩잎 (GH와 BB 각 50 kg)은 인체시험용 시제품 제작을 위해 대량생산 공정 표준화 작업을 시행하였다. 앞서 설명한 것처럼 그림 5와 같이 원물(생콩잎)의 건조 조건으로 자연건조와 열풍건조를 병행하였다. 경제성을 감안할 때 가장 경비를 줄이는 건조 방법은 자연 건조 방법이 있으나 산업적 대량 생산 시 자연건조조건은 시간이 많이 소요되며 자연 건조 도중에 미생물에 오염될 우려가 있다. 이 미생물들로 인해 콩잎에 함유된 성분들의 전환이 일어나면 유효성분 확보와 표준화 (QC)에 문제가 발생할 수 있다. 또 다른 건조 방법으로 원물 (생콩잎)의 상태를 가장 보존할 수 있는 동결 건조방법이 있으나, 동결건조 비용은 자연건조, 열풍건조와 비교하여 약 10배 이상이 소요가 되며 많은 시간이 소요되어 대량생산 콩잎의 건조 방법으로는 경제성 측면에서 적절하지 않다.



그림 18. 자연 건조를 통한 수분제거 상황.

대량생산 추출공정은 1차년도 실험 결과를 바탕으로 70% 주정을 용매로 사용하였다. 산업화 및 경제성을 고려하여 건조분말 콩잎과 70% 주정의 비율은 분쇄한 건조 콩잎 무게 (50 kg) 대비 10배 (500 L 주정)를 사용하였다. 대량 공정의 10분의 1에 해당하는 건조콩잎 5 kg을 사용한 예비실험에서 추출 시 정치 상태에서 건조 콩잎이 70% 주정을 충분히 흡수하지 않아 효과적으로 추출되지 않음을 확인하였다. 따라서 용매를 충분히 흡수한 콩잎과 흡수되지 않은 콩잎을 잘 섞어 주어야 하는데, 분쇄된 작은 콩잎 조각이 필터를 막아 작업 시간이 길어지는 문제점이 발생하였다. 이상의 문제점을 해결하기 위해 부직포에 분쇄한 건조 콩잎을 일정량씩 나누어 담고 추출을 진행하였다. 또한 효율적이고 균일한 추출을 위해 6 시간 간격으로 부직포를 뒤집어서 용매에 골고루 잠기도록 하였다. 추출 온도는 60℃ 내외로 하였고 24 시간동안 추출하였다.

24 시간 추출 후 여과하여 추출액을 회수하였으며, 부직포 이용으로 추출액의 회수를 쉽게 진행할 수 있었다. 농축은 -0.076 cmHg 진공 조건으로 60℃ 내외의 온도에서 실행하였다. 2번의 실험을 통해 평균 30.8 brix로 40.9 kg을 회수하였다. GH와 BB의 추출 양상 및 회수량은 거의 비슷하게 나왔다. Brix는 GH가 1.38배 높게 나왔으나, 회수량은 GH 보다 적은 양상을 보였다 (표 21).

콩잎 추출 시 사용된 70% 주정을 농축 후 회수하여 잔류 함량을 측정하였다. 회수 원액과 회수 원액을 10배 농축한 용매를 각각 제1세부과제에서 HPLC로 분석 결과, 원액에서는 잔류 peak가 검출되지 않았으나 10배 농축된 용매에서 미량의 잔류 peak를 확인하였으며, 이 잔류 peak는 콩잎에 함유된 유효성분으로 파악되었다. 따라서 회수된 용매는 주정 함량을 측정하여 동일 품종의 콩잎 추출 시 재사용할 수 있는 것으로 판단된다. 단, 본 연구과제에서는 회수된 주정은 사용하지 않았다.

처리 과정	
	추출공정
	
	여과기
	여과농축
	건조

그림 19. 식용 가능한 식품 원료의 추출, 농축 및 건조 과정.

대량생산 농축물의 분말화 공정은 콩잎 주정추출물에 다량의 배당체가 함유되어 있어 용이하지 않았다. 이는 1차년도에서도 공정 진행 중에 가장 어려운 부분 공정 중의 하나였다. 1차년도 연구 결과로 동결건조 및 진공건조를 용이하게 진행하기 위해 텍스트린, 전분, 말토텍스트린과 같은 부형제를 혼합하는 방법을 선택하였다. 본 연구에서는 최적의 부형제로 텍스트린을 선별하였다. 1차년도 연구결과로부터 텍스트린은 당뇨의 유발에 영향을 주지 않을 뿐만 아니라, LDL-항산화 활성과 α -glucosidase 저해활성에도 영향을 미치지 않았다. 일반적으로 천연소재 추출농축물의 분말화 방법으로 동결건조보다는 경제성 측면을 감안하여 열풍건조 (spray dry) 방법을 많이 사용하지만, 본 연구에서는 추출물에 함유된 유효성분의 변성을 막고, 회수율을 높이기 위해 우선 동결건조를 시행하였다.

예비실험을 통해 동결건조 시 콩잎의 추출농축물에 남아있는 소량의 주정이 동결건조기의 진공 펌프로 유입되는 문제점과 30 Brix 이상의 농축물에 함유된 다량의 배당체들이 서로 엉켜서 분말이 아닌 덩어리 형태로 건조되는 문제점을 파악하였다. 따라서 이러한 문제점을 해결하는 방안으로 건조물 대비 10배의 증류수를 첨가하여 희석하고 공극을 많이 만들어서 균일한 건조분말을 만들 수 있는 동결건조 공정을 확립하였다. 동결건조 조건은 초기에는 진공도 $5.7X^{-2}$, $-40^{\circ}C$ 에서 시작하여 84 시간 동안 건조하였다 (표 19). 앞에 설명한 것처럼 동결 건조 시에 가장 많이 발생하는 문제점으로 강력한 진공펌프 내에 용매 및 추출물의 일부가 유입되는 문제점을 차단하기 위해 일정비율의 부형제 (2 kg 부형제/100 L 추출농축물)를 혼합하였으며, 단계적으로 $-40^{\circ}C$ 에서 $30^{\circ}C$ 까지 서서히 동결 건조기의 설정 온도를 변경하면서 동결건조를 실행하였다 (표 20).

표 19. 건조분말 확보를 위한 추출, 농축, 건조 공정 조건 요약표

공정	온도	시간	비고
추출	$60^{\circ}C$	48 hr	1 batch: 50 kg 건조콩잎/70% 주정 500 L
농축	$60^{\circ}C$	24 hr	진공 조건: -0.076 cmHg
건조	$-40^{\circ}C$	84 hr	진공도: $5.7X^{-2} \rightarrow 2.2X^{-2}$, 온도: $-40^{\circ}C \rightarrow 30^{\circ}C$

표 20. 농축된 추출물의 동결건조 단계별 조건

단계	1	2	3	4	5
온도 ($^{\circ}C$)	-40	-15	0	20	30
설정시간 (hr)	8	2	2	2	70
동결건조기 내부 온도	-32	-27.1	-3.3	17.2	34.9

동결건조 후 BB 동결건조분말은 14.36 kg을 회수하였고, GH 동결건조분말은 12.47 kg을 회수하였으며, BB 동결건조분말의 회수량이 GH 대비 1.15배 높았다 (표 21). GH와 BB 모두 잘

분말화된 콩잎추출 동결건조분말을 회수하였으나 다량 함유된 다당체로 인해 흡습성이 강했으므로 동결건조물에 포장된 제습제를 넣어 밀봉한 후 4℃ 냉장고에 보관하였다.

표 21. 품종별 공정 단계별 회수율

품종	건조 콩잎 (kg)	추출, 농축 후			동결건조 후	
		Brix	회수량 (L)	원물 대비 (L/kg)	회수량 (kg)	원물 대비 (%)
GH	50	35.7	40.80	0.816	12.47	0.25
BB	50	25.8	41.02	0.820	14.36	0.29

바. 다당류 고함유 분획의 인체시험용 시작품 제작

인체시험의 시험소재인 70EBL과 70ESL의 섭취용량은 동물실험을 통해 당뇨 억제 효과를 검증한 제1세부과제의 실험 결과 및 지표물질(유효성분)의 함량 측정을 바탕으로 설정하였다.

표 22. 인체시험 전체 실험군 1일 복용량 설정

실험군		용량 (mg/tablet)	1일 총 복용량		비고
			capsules	mg	
제1군	위약 대조군 (placebo)	500	6	3,000 (Starch)	복용기간:12 주 1일 3회 (2 capsule/회) 식후 경구복용
제2군	BB군 (70EBL)	500	6	3,000 (70EBL 2,000 mg, Starch 1,000 mg)	
제3군	GH군 (70ESL)	500	6	3,000 (70ESL 2,000 mg, Starch 1,000 mg)	

제2협동연구기관에서 수행할 혈당 개선 인체적용 시험을 위해 GH와 BB 콩잎의 70% 주정 추출분말로 시작품을 제작하였다. 인체 시험을 위해 음성대조군으로는 starch를 선택하였다. 인체시험을 위해 캡슐 제형을 선택하였으며, 500 mg 용량의 캡슐을 사용하였다. 500 mg 이상의 캡슐 용량은 복용 횟수를 줄이는 장점은 있으나 국내에서 구입이 용이하지 않으며, 캡슐의 사이즈가 커서 인체 시험 대상자들이 복용 시에 거부감을 느낄 수 있으므로 일반적인 캡슐 용량인 500 mg을 선택하였다.

캡슐화는 작업장, 작업대 및 캡슐기기 등을 알콜로 철저히 소독한 후 지정된 인원에 의해 캡슐 작업을 실행하였다. 캡슐기기는 1 tray 당 250 capsule이 제작되었다. 그러나 GH와 BB 추출분말의 흡습성 때문에 3 ~ 4회 실시 후 기기에 오염된 추출물을 반드시 제거하여야 한다.

캡슐 작업 후 tray 별로 10개 정도 무작위적으로 시료를 채취하여 무게를 측정하여 캡슐 용량의 표준화를 확인하였다. 위약대조군, GH군, BB군 모두 시험대상자들이 시험 시료를 구별할 수 없도록 동일한 색상의 캡슐을 사용하였다.

인체시험 시료는 시험군별로 30인분을 제작하였다. 하루 6 캡슐 (아침, 점심, 저녁 각 2캡슐 복용)을 복용하며 대상자 당 84일분을 준비하였다. 위약대조군은 starch만을 사용하여 캡슐 작업을 실행하였다. GH와 BB 추출분말은 5% 이내 오차 범위내에서 평균 333 mg/capsule (콩잎추출물의 1일 복용량은 2,000 mg이며, 하루 6 capsule을 복용해야 함)이 함유되도록 설정하였으며 나머지 부분은 부형제로는 starch를 혼합하여 capsule 당 500 mg이 되도록 캡슐 작업을 하였다.

캡슐작업이 모두 끝난 후 각각 소분하였다. 소분 시 불투명 용기를 사용하였으며, 한병 당 85 capsule을 넣고 방습제를 함께 넣었다. 소분한 용기를 시료별로 다르게 표시한 상자에 담은 후 밀봉하였으며, 작업도중에 있을 수 도 있는 오염원을 방제하기 위해 감마선 조사 (radiation irradiate)를 실행한 후 제2협동연구기관에 인계하였다.

CERTIFICATE

of gamma irradiation

Certificate No. : S 150514 0463
 Customer : ㈜인섹트바이오텍

Item Specification	QTY(kg)	Product (Lot No)	Specified Dose
			KGy
IBT Capsule	48	-	5
Total	48		

Irradiated Date : 14-May-15 ~ 14-May-15
 Irradiation(Batch No.) : 150513-05
 Plant : Master Irradiation
 Irradiation Container (Tote) No : 35 ~ -
 Irradiator : Cobalt 60 gamma irradiator (JS-10000 High performance tote type)
 Dosimeters for Monitoring (Batch No) : Harwell PMMA Dosimeter (Amber 3042 W)
 Dosimetry Results : 4.82 kGy

Date : 14-May-15
 Approved : Kyou Young, Lee Signature 
 Title : Q.M.R / Director

We hereby certify that the above specified goods have been duly irradiated by gamma-ray.
 (상기에 명시된 제품은 정히 조사되었음을 확인합니다.)


 34-26, Jeyakgongdan 2-gil, Hyangnam-eup, Hwaseong-si, Gyeonggi-do, 445-937, Korea
 TEL : +82-31-353-6999 FAX : +82-31-353-6979 URL : <http://www.soyagreentec.co.kr>


 ISO 9001 & EN ISO 13485
 EN / ISO 11137-1:2006 Certified
 NO. Q4N 13 03 50558 005


 Contract sterilizer Registered
 NO. 3004525100

(Form:PQ-101-09)

(Rev:12.02.06)

Fig. 23. Certificate of gamma irradiation.

인체시험을 위해 제작한 70% 주정추출물의 동결건조분말 70ESL(GH), 70EBL (BB)의 총 페놀 함량, 총 플라보노이드 함량 및 지표물질 함량을 제1세부과제에서 확립한 방법으로 측정하였다.

- (1) 대량 추출 70ESL과 70EBL의 총 페놀, 총 플라보노이드 함량 측정

총 페놀 함량은 Singleton & Rossi (1965)이 개발한 Folin-Ciocalteu법을 일부 수정하여 측정하였고, gallic acid을 표준물질로 사용하여 mg gallic acid equivalents/g extract로 표시하였다. 그림 24에 표시한 표준검량곡선을 바탕으로 70ESL과 70 EBL의 총 페놀 함량을 측정하였다. 70ESL의 총 페놀 함량은 57.4 mg gallic acid equivalents/g ESL이며, 70EBL의 총 페놀 함량은 54.6 mg gallic acid equivalents/g EBL로 큰 차이가 없었다 (Table 23).

또한 총 플라보노이드 함량은 Zhishen 등 (1999)이 개발한 분광분석법을 일부 수정하여 측정하였고, quercetin을 표준물질로 사용하여 mg quercetin equivalents/g extract로 표시하였다. 그림 20에 표시한 표준검량곡선을 바탕으로 70ESL과 70 EBL의 총 플라보노이드 함량을 측정하였다. 70ESL의 총 플라보노이드 함량은 45.3 mg quercetin equivalents/g ESL이며, 70EBL의 총 플라보노이드 함량은 67.3 mg quercetin equivalents/g EBL로 70ESL에 비해 약 1.5배 많았다 (Table 23).

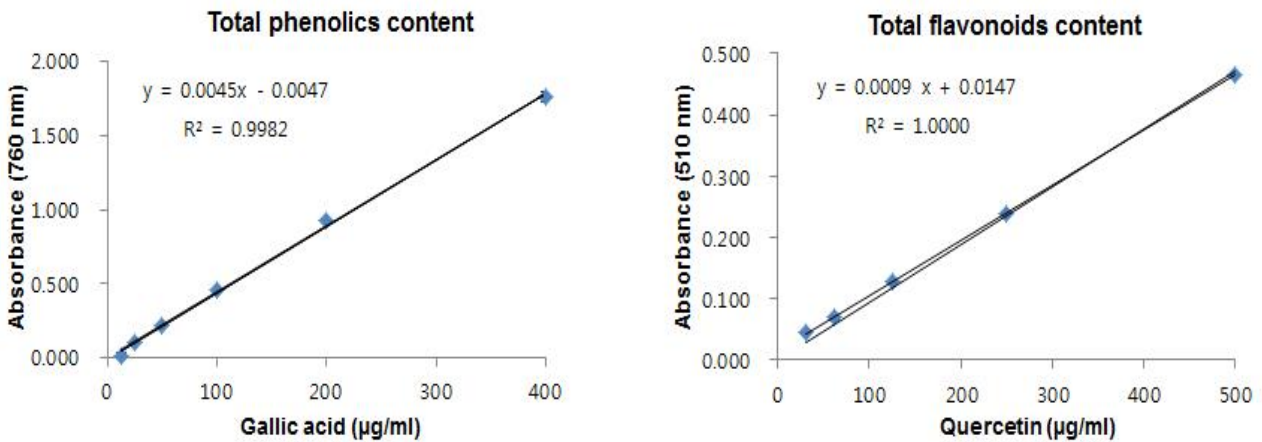


Fig. 24. Standard curves of gallic acid for total phenols and quercetin for total flavonoids.

Table 23. Contents of total phenolics and flavonoids of 70ESL and 70EBL for clinical trial

Samples	Total phenolics (mg gallic acid equivalents/g)	Total flavonoids (mg quercetin equivalents/g)
70ESL for clinical trial	57.4 ± 1.4	45.3 ± 1.0
70EBL for clinical trial	54.6 ± 0.7	67.3 ± 2.0

Values are presented as mean ± SD (n = 3).

(2) 대량 추출 70ESL과 70EBL에 함유된 표지물질의 함량 측정 조건

- HPLC 분석 조건: HPLC 분석을 위해 Shimadzu HPLC system(Pump: Shimadzu LC-10A vp with binary pump; Detector: Shimadzu SPD-M10A vp PDA detector, 254 nm & 450 nm; Auto injector: Shimadzu SIL-10A vp; injection volume: 5 µl)을 사용하였고, HPLC column은 Brownlee SPP C18-MS-II column (4.6 x 100 mm, 2.7 µm), 유속 1.4 ml/min, 이동상은 0.1%

acetic acid (용매 A)과 CH₃CN (용매 B), 프로그램된 용출 조건 (a linear gradient elution program: 5-30% B for 0~40 min, 30-80% B for 40~50 min, 80 - 100% B for 50~55 min; 100 - 5% B for 55~55.01 min; 5% B for 55.01~60 min)을 사용하였다.

표지물질의 함량을 측정하기 위해 앞서 우선 방사선 조사에 의한 70ESL과 70EBL이 함유하는 물질의 변화가 있는지를 HPLC profile로 확인하고자 하였다. 그림 25에서 나타낸 것처럼 70ESL과 방사선 조사 후의 70ESL, 그리고 70EBL과 방사선 조사 후의 70EBL의 HPLC profile은 거의 차이가 없었다.

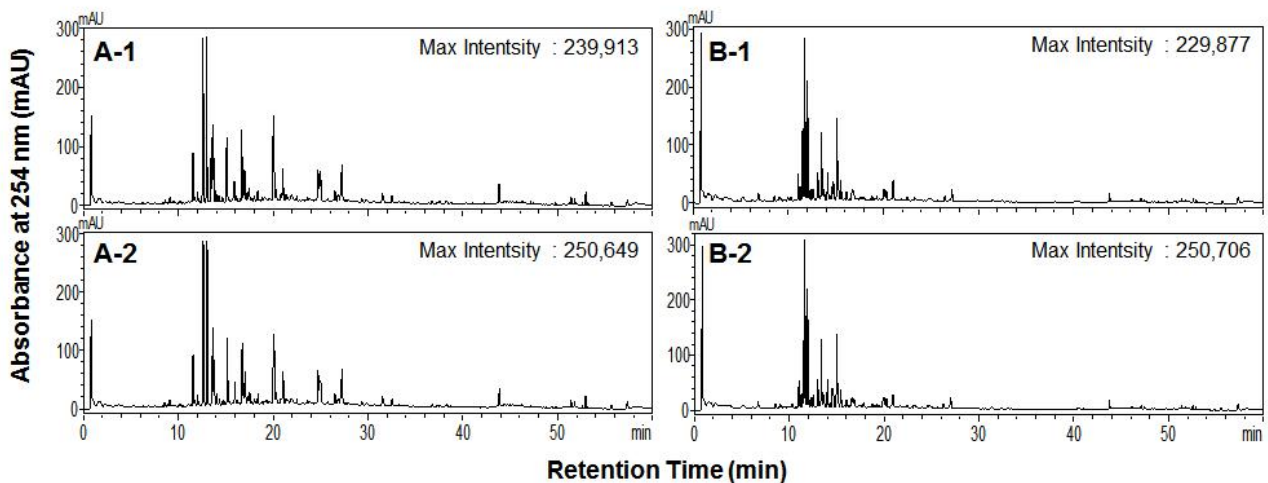
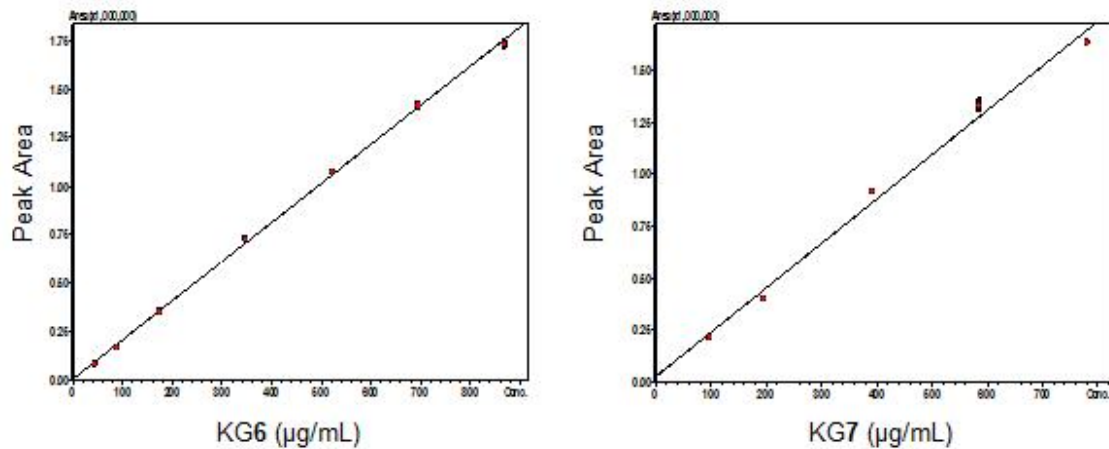


Fig. 25. HPLC profiles of (A-1) 70ESL, (A-2) 70ESL in irradiated capsules, (B-1) 70EBL, and (B-2) 70EBL in irradiated capsules.

(3) 70ESL에 함유된 지표물질 KG6와 KG7 함량 측정

표준물질로는 1차년도 연구수행을 통해 직접 분리·정제하여 확보한 KG6 (Kaempferol 3-O-β-D-glucopyranosyl(1→2)-O-[α-L-rhamnopyranosyl(1→6)]-β-D-galactopyranoside)와 KG7 (Kaempferol 3-O-β-D-glucopyranosyl(1→2)-O-[α-L-rhamnopyranosyl(1→6)]-β-D-glucopyranoside)을 사용하였다. 표준물질 KG6 (purity 85.6%)와 KG7 (purity 97.5%)를 농도 별로 조제하고 HPLC를 이용하여 각각의 표준 검량곡선을 만들었다 (Fig. 26). 이를 바탕으로 70ESL에 함유된 KG6와 KG7의 함량 분석을 실시한 결과, 인체시험용 시료인 70ESL이 함유한 KG6와 KG7의 함량은 각각 23.76 mg/g 70ESL과 26.08 mg/g 70ESL로 측정되었다 (Table 24).



Compounds	Wavelength	Regression equation	r ²
KG6	254 nm	Y = 2011.03X + 8461.08	0.9996
KG7	254 nm	Y = 2139.08X - 26052.41	0.9919

Fig. 26. Calibration curves and regression equations of standards KG6 and KG7.

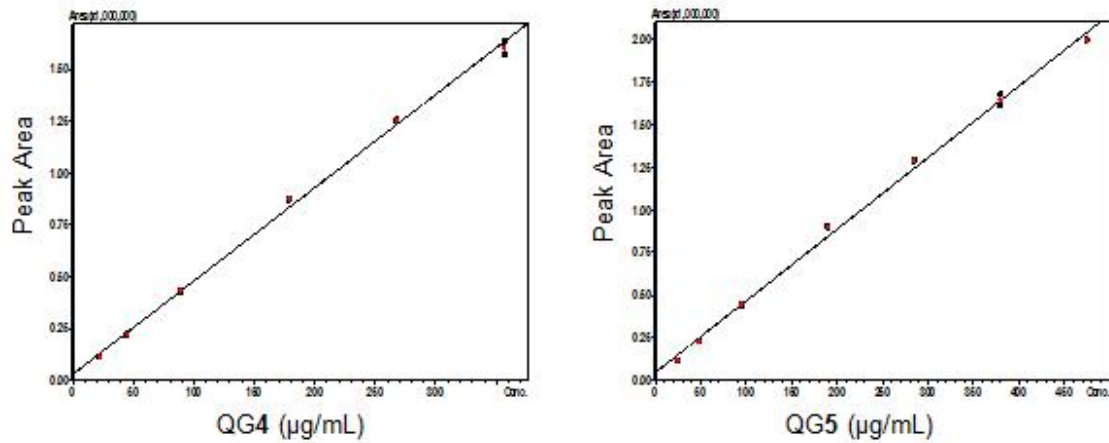
Table 24. Contents of KG6 and KG7 in 70ESL for clinical trial

Samples	KG6		KG7	
	mg/g 70ESL	RSD%	mg/g 70ESL	RSD%
70ESL for clinical trial	23.76 ± 0.04	0.18	26.08 ± 0.57	2.19

RSD (%) = (SD of amount detected / mean of amount detected) × 100, Mean ± SE (n = 3).

(4) 70EBL에 함유된 지표물질 QG4와 QG5 함량 측정

표준물질로는 1차년도 연구수행을 통해 직접 분리·정제하여 확보한 QG4 (Quercetin 3-O-(2-β-D-glucopyranosyl)-β-D-galactopyranoside)와 QG5 (Quercetin 3-O-(2-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranoside)를 사용하였다. 표준물질 QG4 (purity 89.2%)와 QG5 (purity 94.7%)를 농도별로 조제하고 HPLC를 이용하여 각각의 표준 검량곡선을 만들었다 (Fig. 27). 이를 바탕으로 70EBL에 함유된 QG4와 QG5의 함량 분석을 실시한 결과, 인체시험용 시료인 70EBL이 함유한 QG4와 QG5의 함량은 각각 12.73 mg/g 70EBL과 9.74 mg/g 70EBL로 측정되었다 (Table 25). 이는 제1세부과제에서의 소량 콩잎 추출 시의 표지물질 함량에 비해 적은 결과를 보였으며, 따라서 대량 재배한 콩잎의 수확 시기 및 대량 추출에 따른 최적 공정을 확립할 필요가 있는 것으로 판단된다.



Compounds	Wavelength	Regression equation	r ²
QG4	254 nm	Y = 4497.00X + 29330.68	0.9989
QG5	254 nm	Y = 4206.02X - 46252.23	0.9986

Fig. 27. Calibration curves and regression equations of standards QG4 and QG5.

Table 25. Contents of QG4 and QG5 in 70EBL for clinical trial

Samples	QG4		QG5	
	mg/g 70EBL	RSD%	mg/g 70EBL	RSD%
70EBL for clinical trial	12.73 ± 0.49	3.85	9.74 ± 0.23	2.39

RSD (%) = (SD of amount detected / mean of amount detected) x 100, Mean ± SE (n = 3).

사. 시판제품에 대한 경쟁력 강화를 위한 혈당 개선용 건강기능원료/신제품 모티터링, 항당뇨 효능기작 및 소비자 선호도 파악

혈당 기능성 원료를 이용한 다양한 제품이 출시되고 있으나 바나바잎추출물과 난소화성 말토덱스트린을 주원료로 이용한 제품이 가장 많이 출시되고 있다. 혈당 관련 제품 중 피니톨, nopal 추출물, 서리태 (쥐눈이콩) 펩타이드 추출물, 타가노스, 실크단백질효소 가수분해물 등은 일당 섭취량이 많아 소비자들의 섭취에 부담이 되는 단점이 있으며, 동결건조누에분말, 잔나비겉상버섯균사체 등을 주원료로 활용한 제품은 소비자들의 인식 부족과 마케팅 및 과학적인 자료 등의 홍보 부족으로 잘 알려져 있지 않다.

제품에 대한 형태는 건강기능식품과 일반식품 형태로 출시되고 있다. 건강기능식품은 앞에서 제시한 바와 같이 난소화성 말토덱스트린과 바나바잎추출물을 이용한 제품이 많았으며, 일반 식품은 혈당 개선에 도움을 주는 것으로 알려져 있는 식품을 단순 함유한 제품 등이 많았다. 식품의 형태에서도 일반 분말 형태와 함께 액상차 형태로 출시가 되어 있으며 당뇨환자용 식품(당요식)으로 출시되어 있는 것도 있다. 당뇨환자용 식품의 경우, 많은 제품이 출시되어

있으며 이는 혈당개선을 위주로 하는 환자들의 식단을 고려한 것으로 혈당에 관심을 가지고 있는 환자 및 일반인들은 식단부분에도 고려를 하고 있다는 점을 감안한 것으로 파악되었다. 주성분과 함께 포함되어 있는 성분은 다이어트를 위주로 하는 성분과 상당부분이며, 이는 당뇨 조절과 체지방 조절을 함께 병행해야 효율적인 조절이 가능함을 의미한다. 이상의 결과를 바탕으로 3차년도 연구에서 혈당조절 개선 제형개발에 참조하여 진행하였다.

표 26. 주요 혈당 개선 제품 및 제형

제품명	주요성분	식품유형	주원료 기능	영양기능
함초시대 함초즙	함초	액상차	함초: 나트륨 1.003 mg, 칼륨 650 mg, 칼슘 650 mg, 철분 40 mg 함유	
보령 꾸지뽕	꾸지뽕혼합추출물, 구연산, 호소처리스테비아	액상차	꾸지뽕혼합추출물: 고흡분 1.5% 이상, 꾸지뽕나무 2%	
지리산산청 누에한	누에가루	식품	누에가루 주요 혈당강하물질: 1-Deoxynojmycin (DNJ) 함유	
대상 뉴케어 당뇨식	덱스트린, 채종유(유채씨), 카제인나트륨, 난소화성말토덱스트린, 대두화이버 등	당뇨환자 용 식품	혈당 반응 및 인슐린 반응이 맞은 난소화성 말토덱스트린과 인슐린 함유. 당뇨환자에 필요한 이노시톨, 비타민K, 망간, 구리, 콜린, 카우린 함유	당뇨환자용 균형 영양식
두리원 여주환	여주분말(인도) 80%, 프로폴리스추출분말, 누에분말, 산화아연, 건조효모분말, 산화마그네슘	건강식품	여주: polypeptide-P와 charatin 성분이 도움. 영양성분 (비타민 C, 베타카로틴 칼륨, charantin, polypeptide-p, momordicine, peptin)	
녹심 당스탑	난소화성 말토덱스트린, 어린보리순즙분말, 신선초즙분말, 스테비아잎분말	건강식품	난소화성 말토덱스트린 (주원료/식이섬유)	식후 혈당 상승 억제, 배변 활동 원활
디팜스 혈당 & 밸런스	바나바잎주정추출물, 치커리추출물분말, 맥주효모, 이산화규소, 스테아린산마그네슘, 결정셀룰로오스, 산화아연, 돼지감자분말, 뽕나무잎 추출물 분말	건강기능 식품	바나바잎 주정추출물 (corosolic acid) 함유. Corosolic acid 표시량: 1 mg/1800 mg	식후 혈당 상승 억제에 도움을 줄 수 있음
리턴큐	정어리펩타이드, 산화아연, 결정셀룰로오스, 유당혼합분말, 히드록시프로필메틸셀룰로오스, 이산화규소, 스테아린산마그네슘	건강기능 식품	정어리펩타이드sp100n (바릴티로신0.025~0.075%) 28.4% : 각종아미노산이 풍부. 바릴티로신 펩타이드가 혈압을 낮추는 작용.	혈압 조절

혈당 및 당뇨관련 신규 조성물은 표 25 와 같이 예전부터 사용해 천연물 소재들의 대부분은 한약제를 중심으로 특허 등록 및 연구개발이 진행되고 있다. 그러나 대부분의 원료의 경우 식품 형태로 밖에 사용이 되지 않으며 일부 원료는 사용이 제한되어 있는 원료도 포함되어 있다. 당뇨의 경우 당뇨합병증을 중심으로 한 실험 결과를 바탕으로 한 것으로 당뇨 자체의 효과 보다는 이를 통해 발생할 수 있는 다양한 병증에 대한 효과를 중심으로 한 연구 결과를 바탕으로 하여 특허 등록을 진행한 것으로 확인되었다.

표 27. 식물추출물을 주원료로 하는 항당뇨 관련 등록 특허

특허명	특허등록번호	유효 성분	특허권자
혼합 생약조성물을 유효성분으로 하는 당뇨합병증의 예방 및 치료용 조성물	1005433410000 (2006.01.07.)	- 대극, 강추박, 초갈근 및 감초 - 알코올(80%)을 이용한 추출 및 여과	한국한의학연구원
한약 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 하는 당뇨합병증 예방 및 치료용 조성물	1011155050000 (2012.02.06.)	- 수양류 (<i>Homonoia riparia</i> Lour.) 추출물 - 저급 알코올 또는 혼합용매 추출	한국한의학연구원
한약 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 하는 당뇨합병증 예방 및 치료용 조성물	1014615320000 (2014.11.07.)	- 백피가 (<i>Lithocarpus dealbatus</i> Hook.) 추출물 - 저급 알코올 또는 혼합용매 추출	한국한의학연구원
까마귀쪽나무 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 하는 당뇨합병증 예방 및 치료용 조성물	1012432430000 (2013.03.07.)	- 까마귀쪽나무(<i>Litsea japonica</i>) 추출물 - 저급 알코올 또는 혼합용매 추출	한국한의학연구원
모임 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 당뇨합병증 예방 및 치료용 약학적 조성물	1013252150000 (2013.10.29.)	- 모임 (<i>Melastoma sanguineum</i>) 추출물 - 에틸아세테이트 및 n-부탄올 분획물	한국한의학연구원
마제황 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 당뇨합병증 예방 및 치료용 조성물	1012736440000 (2013.06.04.)	- 마제황 (<i>Spenceria ramalana</i>) 추출물	한국한의학연구원
브란디오사이드 또는 페리포사이드를 포함하는 당뇨합병증의 치료 또는 항노화용 조성물	101348110000 (2013.12.30.)	- 밀통화(<i>Brandisia hancei</i> Hook. f.)로부터 분리한 브란디오사이드 또는 페리포사이드	한국한의학연구원
천연 추출물을 포함하는 당뇨합병증 또는 혈관부종의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강기능식품 조성물	101498650000 (2015.02.26.)	- 아이비엽(송악) 추출물 및 황련 혼합 추출물	한국한의학연구원
차가버섯을 이용한 당뇨예방용 파우치제품과 그 제조방법	1007219310000 (2007.05.18.)	- 차가버섯을 주원료로 하고 숙지황, 산수유, 맥문동, 구기자, 하수오, 창출, 제령, 포문동, 상업, 압척초, 옥수미, 진피, 황기 함유 - 열수추출 (90~100℃, 3~6 시간)	대구한 의과대학교 산학협력단
검정콩 껍질로부터 추출한 안토시아닌을 함유하는 당뇨 예방 및 치료용 약학적 조성물	1011906240000 (2012.10.08.)	- 검정콩 껍질로부터 추출된 안토시아닌 - 메탄올 반복 추출 후 감압농축	경상대학교 산학협력단

까실썩부쟁이 추출물을 포함하는 당뇨합병증 또는 예방용 조성물	1010838320000 (2011.08.03.)	- 까실썩부쟁이 추출물 - 알코올 추출	한림대학교 산학협력단
노팔 뿌리 추출물을 유효성분으로 포함하는 당뇨 또는 당뇨합병증 치료용 조성물	1011421540000 (2012.04.25.)	- 노팔(<i>Opuntia ficus-indica</i>)뿌리 추출물	한림대학교 산학협력단
더덕추출물을 유효성분으로 포함하는 당뇨 또는 당뇨합병증 예방 또는 치료용 조성물	1011266770000 (2012.03.07.)	- 더덕(<i>Codonopsis lanceolata</i>) 추출물	한림대학교 산학협력단
다이카페오일 퀴닉산 유도체를 포함하는 당뇨합병증 예방 또는 치료용 조성물	1013866910000 (2014.04.11.)	- 창이자 추출물로부터 다이카페오일 퀴닉산 유도체	한림대학교 산학협력단
플랜타마조사이드를 유효성분으로 하는 당뇨 및 당뇨합병증 예방/치료용 조성물	1008391850000 (2008.06.11.)	- 질경이 유래 플랜타마조사이드 - 질경이를 알코올 추출 후 핵산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올을 이용하여 회수	고려대학교 산학협력단
체불릭산을 유효성분으로 하는 당뇨/당뇨합병증 예방 또는 치료용 조성물	1008143680000 (2008.0.11)	- 기자(<i>Terminalia chebula</i>)로부터 유래하는 chebulic acid - 알코올 추출을 이용하여 극성에 따라 추출	고려대학교 산학협력단
한약 추출물을 함유하는 당뇨 또는 당뇨합병증 예방 또는 치료용 조성물	1020130064882 (2013.06.19.)	- 삼철근 추출물, 당귀추출물, 오가피 추출물, 지골피 추출물, 홍화씨 추출물	우석대학교 산학협력단
강화약썩 추출물을 포함하는 당뇨병의 예방 및 치료용 조성물	1009008750000 (2009.05.27.)	- 강화약썩 추출물 - 물, 알코올을 이용 실온에서 침적 추출	강화군
순무 추출물을 포함하는 당뇨병의 예방 및 치료용 조성물	1007108180000 (2007.04.17.)	- 순무추출물 - 물, 알코올을 이용 실온에서 침적 추출	강화군
당뇨합병증 예방효과를 나타내는 소나무잔나비버섯 추출물 그 용도	1008599860000 (2008.09.18.)	- 소나무잔나비버섯(<i>Fomitopsis pinicola</i>) 자실체 - 1 N KOH로 팽윤시킨 알칼리 추출물	유진바이오 팜영농조합 법인
실크펩타이드를 유효성분으로 하는 당뇨치료 또는 예방용 조성물	1009475470000 (2010.03.08.)	- GYG(Gly-Tyr-Gly) 펩타이드와 실크펩타이드 - 실크펩타이드를 단백질 가수분해하여 추출	월드웨이 (주)

아. 제품화 기능성 소재인 PSH 분말의 품질안전성 검증 및 영양학적 분석

인체실험/시제품 제작을 위해 확보된 콩잎에 대한 무공해 재배 및 기타 성분 분석을 시행하였다. 위탁재배를 통해 재배기간 중 작물 보조제 및 농약 사용에 대한 정확한 분석을 위해 콩잎 주정추출 분말의 잔류 농약 검사를 시행하였다. 분석을 시행한 콩잎추출물은 GH와 BB에 대해서 각각 실험을 시행하였다.

대량 생산 후 수확한 콩잎과 추출 및 건조과정을 거친 콩잎 추출분말에서 농약성분과 관련된 냄새가 나지 않았으나 정확한 잔류 농약검사를 실행하였다. 각 검사항목으로는 대표적인 성분을 중심으로 공인 인증기관을 통해 분석 및 결과를 확보하였다. 검사 항목으로 농산물품질관

리와 관련하여 잔류농약 245 항목에 대해서 조사를 하였다 (표 28). 잔류 농약의 시험방법은 농산물품질관리원 다성분 동시 분석법을 통해 시행하였다. 그 결과 그림 28과 그림 29와 같이 GH와 BB는 245 항목의 농약이 검출되는 않았다.

표 28. 콩잎추출물 GH와 BB의 잔류농약 측정 항목

<p>Acetamiprid, Acrinathrin, Alachlor, Aldicard, Aldrin, Amisulbrom, Anilofos, Azinphos-Methyl, Azoxystrobin</p> <p>Bendiocarb, Bentiavalicarb-Isopropyl, Benzoximate, BHC(α, β, γ 및 δ), Bifenox, Bifenthrin, Biteranol, Boscalid, Bromobutide, Bromopropylate, Buprofezin, Butachlor,</p> <p>cadusafos, captan, carbaryl(NAC), Carbendazim, carbofuran, carbophenothion, chinomethionat(oxythioquinox), chlorantraniliprole, chlordane, chlorfenapyr, chlorfenvinphos, chlorfluazuron, chlorobenzilate, chlorothalonil, chlorpropham, chlorpyrifos, chlorpyrifos-methyl, chromafenozide, clofentezine, clothianidin, cyazofamid, cyflufenamid, cyfluthrin(beta), cyhalofop-buthyl, cyhalothrin-lambda, cymoxanil, cypermethrin, cyproconazole, cyprodinil</p> <p>DTT, Deltamethrin, Diazinon, Dichlofluanid, Dichlorvos/DDVP, Diclofop-methyl, dicloran, dicrofol, diethofencarb, difenconazole, diflubenzuron, dimepiperate, dimethenamid, dimethoate, dimethomorph(E,Z), Dimethylvinphos(z), Diniconazole, diphenamid, diphenylamine, disulfoton, dithiorpyr, diuron,</p> <p>edifenphos, endosulfan(alpha,beta,sulfate), endrin(dieldrin), EPN, esprocarb, ethaboxam, ethalfuralin, ethiofencarb, ethion, ethoprophos, ethoxazole, etofenprox, etridiazole, etrimfos fenamidone, fenamiphos, fenarimol, fenazaquin, fenbuconazole, fenitrothion : MFP, Fenobucarb, fenothiocarb, fenoxanil, fenpropathrin, fenpyroximate, fenthion: MPP, Fenvalerate, ferimzone, fipronil, fluacrypyrim, flubendiamide, flucythrinate, fludioxonil, flufenoxuron, flumioxazine, fluopicolide, fluquinconazole, flusilazole, flutolanil, folpet, forchlorfenuron, fosthiazate, fthalide, furathiocarb,</p> <p>halfenprox, heptachlor, heptachlor epoxide, hexaconazole, hexaflumuron</p> <p>imazalil, imibenconazole, imidacloprid, indanofan, indoxacarb, iprobenfos/IBP, Iprodione, iprovalicarb, isofenphos, isoprocarb:MIPC, isoprothiolane=</p> <p>kresoxim-methyl</p> <p>lufenuron</p> <p>malathion, mandipropamid, mecarbam, mefenacet, mepanipyrim, mepronil, metalaxyl, metamifop, metconazole, methabenzthiazuron, methidathion, methiocarb, methomyl, methoxychlor, methoxyfenozide, metobromuron, metolachlor, metolcarb, metribuzin, mevinphos, molinate, myclobutanil</p> <p>napropamide, novaluron, nuarimol</p> <p>Ofurace, oxadiazon, oxamyl, oxaziclomefon, oxyfluorfen</p> <p>paclobutrazole, parathion, parathion-methyl, penconazole, pencycuron, pemdimethalin, pentoxazone, permethrin, phenthoate:PAP, Phorate, phosalone, phosphamidone, piperophos, pirimicarb, pirimiphos-ethyl, pirimiphos-methyl, probenazole, prochloraz, procymidone, propenfos, prometryn, propanil, propiconazole, propoxur, prothiofos, pyraclostrobin, pyrazophos, pyribenzoxim, pyributicarb, pyrioaben, pyridalyl, pyridaphenthion, pyrimethanil, pyrimidifen, pyriminobac-metyl(E,Z), Pyriproxyfen, pyroquilon</p> <p>quinoclamine</p> <p>silafuofen, simazine, simeconazole, simetryn, spirodiclofen, spiromesifen</p> <p>tebuconazole, tebufenozide, tebufenpyrad, tebupirmfos, teflubenzuron, tefluthrin, terbufos, terbuthylazine, terbutryn, etraconazole, tetradifon, thiabendazole, thiacloprid, thiamethoxam, thiazopyr, thifluzamide, thiobencarb, thiophanate-methyl, tiadinil, tolclofos-methyl, tolyfluanid, tralomethrin, triadimefon, triadimenol, triazophos, tricyclazole, trifloxystrobin, triflumizole, triflumuron, trifluralin</p> <p>uniconazole, vinclozolin, zoxamid</p>
--



시험성적서 번호 F690101/LF-CTSAYFN16-35606

발행일 : 2016. 12. 06 페이지 : 1 / 2

고객명 : (주)인벡트바이오텍
주소 : 대전광역시 유성구 유성대로 1628번길 3

고객으로부터 제공받은 시료에 대한 정보는 다음과 같습니다.

SGS 파일 번호 : AYFN16-35606

제품명 : 콩잎추출분말()
시험기간 : 2016. 11. 28 ~ 2016. 12. 06
시험성적서의 용도 : 참고용

시험항목 : 잔류농약 245항목. 자세한 항목은 다음 장을 참고하시기 바랍니다.
시험방법 : 농산물품질관리원 다성분 동시 분석 1법
시험결과 : 245항목 불검출

한국에스지에스 (주)

장기홍 / 기술책임자

This document is issued by the Company subject to its General Conditions of Service printed overleaf, available on request or accessible at www.sgskorea.com/sgs/TermsandConditions.aspx and, for electronic format documents, subject to Terms and Conditions for Electronic Documents at www.sgskorea.com/sgs/eDocuments.aspx. Attention is drawn to the limitation of liability, indemnification and jurisdiction issues defined therein. Any holder of this document is advised that information contained herein reflects the Company's findings at the time of its intervention only and within the limits of Client's instructions, if any. The Company's sole responsibility is to its Client and this document does not exonerate parties to a transaction from ascertaining all their rights and obligations under the transaction documents. This document cannot be reproduced except in full, without prior written approval of the Company. Any unauthorized alteration, forgery or falsification of the content or appearance of this document is unlawful and offenders may be prosecuted to the fullest extent of the law. (Unless otherwise stated the results shown in this test report refer only to the sample(s).)

PG102 Version2

SGS Korea Co., Ltd

332, The G callae, 76, LG-Hi, Donggongju, Anyang-si, Gyeonggi-do, Korea 431-080
T +82 (0)2 4638 0000 F +82 (0)2 4638 0991 www.sgskorea.com

Member of the SGS Group (Incorporated Separately in Switzerland)

그림 28. 콩잎추출분말 GH의 잔류농약 분석 결과.



시험성적서 번호 F690101/LF-CTSAYFN16-35605

발행일 : 2016. 12. 06 페이지 : 1 / 2

고객명 : (주)인벡트바이오텍
주소 : 대전광역시 유성구 유성대로 1628번길 3

고객으로부터 제공받은 시료에 대한 정보는 다음과 같습니다.

SGS 파일 번호 : AYFN16-35605

제품명 : 콩잎추출분말(
시험기간 : 2016. 11. 28 ~ 2016. 12. 06
시험성적서의 용도 : 참고용

시험항목 : 잔류농약 245항목, 자세한 항목은 다음 장을 참고하시기 바랍니다.
시험방법 : 농산물품질관리원 다성분 동시 분석 1법
시험결과 : 245항목 불검출

한국에스티에스 (주)

장기훈 / 기술책임자

This document is issued by the Company subject to its General Conditions of Service (printed overleaf), available on request or accessible at <http://www.sgs.com/sgs/termsandconditions.aspx>, and, for electronic format documents, subject to Terms and Conditions for Electronic Documents at www.sgs.com/terms_electronicdocuments.aspx and http://www.sgs.com/terms_electronicdocuments.aspx. Attention is drawn to the limitation of liability, indemnification and jurisdiction issues defined therein. Any holder of this document is advised that information contained herein reflects the Company's findings at the time of its intervention only and within the limits of Client's instructions, if any. The Company's sole responsibility is to its Client and this document does not constitute parties to a transaction from exercising all their rights and obligations under the transaction documents. This document cannot be reproduced except in full, without prior written approval of the Company. Any unauthorized alteration, forgery or falsification of the content or appearance of this document is unlawful and offenders may be prosecuted to the fullest extent of the law. Unless otherwise stated the results shown in this test report refer only to the sample(s).

F6102 V0906A2

SGS Korea Co., Ltd.

332 The Daejeon, 76, U-Su, Dongan-gu, Anseong, Gyeonggi-do, Korea 431-080
T +82 (0)21 4938-0000 F +82 (0)21 4938-0911 www.sgs.com/sgs/kr

Member of the SGS Group (Controlled Companies for Surveillance)

그림 29. 콩잎추출분말 BB의 잔류농약 분석 결과.

콩잎추출분말 GH (대두콩잎)와 BB (검정콩잎)의 영양성분 및 중금속 분석에 대한 시험 결과 표는 그림 30-31에 나타내었으며, 그 결과를 요약하여 표 29에 제시하였다. 대두콩잎 와추출물과 검정콩잎 추출물은 영양성분 분석 결과가 상이하였으며, 100 g 당 단백질, 지방 및 나트륨 함량에 큰 차이가 있었다. 단백질의 경우 BB가 3.7배 많았으며, 지방은 BB가 약 42배 많았고, 나트륨은 BB가 2배 이상 많았다.

표 29. 콩잎추출물 GH와 BB의 영양성분 및 중금속 분석 결과 요약표

시험항목	단위	시험방법	정량한계	결과	
				GH	BB
열량	kcal/100 g	식품공전	-	368	420
탄수화물	g/100 g	식품공전	-	88.3	62.2
단백질	g/100 g	식품공전, Protein analyzer	-	2.83	10.5
지방	g/100 g	식품공전, HPLC/RI	-	0.343	14.4
당류	g/100 g	식품공전, HPLC/OES	0.1	19.2	28.1
나트륨	mg/100 g	식품공전, HPLC/OES	1	113	272
납	mg/kg	식품공전, HPLC/OES	0.7	불검출	불검출
카드뮴	mg/kg	식품공전, HPLC/OES	0.7	불검출	불검출
비소	mg/kg	식품공전, HPLC/OES	0.7	불검출	불검출
수은	µg/kg	식품공전	50	불검출	불검출

불검출 : 정량한계 이하; g/100g = %(w/w); -: No regulation.



시험성적서 번호 F690101/LF-CT6AYFN16-35603

발행일: 2016. 12. 06 페이지: 1 / 1

고객명 : (주)와이즈바이오텍
주소 : 대전광역시 유성구 유성대로 1628번길 3

고객으로부터 제공받은 시료에 대한 정보는 다음과 같습니다.

SGS 파일 번호 : AYFN16-35603
제품명 : 콩잎추출분말
시험기간 : 2016. 11. 28 ~ 2016. 12. 06
시험성적서의 용도 : 참고용

시험결과

시험항목	단위	시험방법	정량한계	결과
열량	kcal/100g	식품공전	-	368
탄수화물	g/100g	식품공전	-	88.3
단백질	g/100g	식품공전, Protein Analyzer	-	2.83
지방	g/100g	식품공전	-	0.343
당류	g/100g	식품공전, HPLC/RI	0.1	19.2
나트륨	mg/100g	식품공전, ICP/OES	1	113
납	mg/kg	식품공전, ICP/OES	0.7	불검출
카드뮴	mg/kg	식품공전, ICP/OES	0.7	불검출
비소	mg/kg	식품공전, ICP/OES	0.7	불검출
수은	ug/kg	식품공전	50	불검출

- 주) (1) 불검출 - 정량한계 이하
- (2) g/100g - %(w/w)
- (3) - - No Regulation
- (4) ** - 단위없음

*** 끝 ***

한국에스티에스(주)

민지홍 / 팀장

This document is issued by the Company subject to its General Conditions of Service printed overleaf, available on request or accessible at www.sgs.com/ServiceConditions.aspx and, for electronic format documents, subject to Terms and Conditions for Electronic Documents at www.sgs.com/ServiceConditions.aspx. Attention is drawn to the limitation of liability, indemnification and jurisdiction issues defined therein. Any holder of this document is advised that information contained herein reflects the Company's findings at the time of its issuance only and within the limits of Client's instructions, if any. The Company's sole responsibility is to its Client and this document does not exonerate parties to a transaction from exercising all their rights and obligations under the transaction documents. This document cannot be reproduced except in full, without prior written approval of the Company. Any unauthorized alteration, forgery or falsification of the content or appearance of this document is unlawful and offenders may be prosecuted to the fullest extent of the law. Unless otherwise stated the results shown in this test report refer only to the sample(s).

F6102 Version3

SGS Korea Co., Ltd. | 4300, 67, Wajunri-ro, G1, Songdeok, Dongjak-gu, Korea 15201
T +82 (0)2 199 8000 F +82 (0)2 4332 1999 www.sgs.com

Member of the SGS Group (Societe Generale de Surveillance)

그림 30. 콩잎추출분말 GH의 영양 성분 및 중금속 분석 결과.

자. 기능성소재 및 부재료와의 최적 배합 및 (시판제품에 대한 경쟁력 강화를 위한) 제형 설정 연구 및 품질관리 방법 확립

(1) 기능성 극대화를 위한 PSH와 부재료의 복합제형의 formulation 설정

건강기능 식품에서 혈당개선을 위해서는 인정된 기능성 원료와 고시형 원료를 사용하고 있다. 인정된 원료는 구아바잎추출물을 비롯하여 18여종이 사용되고 있는 실정이다. 기능성 원료를 사용하여 제품에 기능성 표시(혈당조절)를 통해 제품화를 진행하였다. 이는 혈당조절이라는 표현을 통해 소비자의 제품에 대한 빠른 이해(인지도)를 돕고 이를 통해 마케팅의 극대화를 꾀하려고 하였다. 또한 기능성분의 경우 식약처의 건강기능식품 기능성 원료인정현황 (발간등록번호 11-1471000-000047-14)을 바탕으로 하여 섭취량등을 고려하였다(표 30). 특히 섭취량의 경우 제품화의 성상과 복용형태와도 밀접한 관련이 있기에 이 부분에 대해 많은 고려가 필요하다. 혈당조절과 관련하여 난소화성말토덱스트린의 경우 일일 섭취량이 4.6~9.8 g/일 로서 비교적 많은 첨가량으로 인해 타정형태 보다는 과우치 형태로 복용을 해야 하는 점등이 있어 이에 대한 고려가 필요하다. 복용량이 많을 경우, 섭취하는 번거로움으로 인해 섭취를 잘 못하는 경우가 많으며 이로 인해 효과를 확보하기 어려운 부분이 많이 발생된다. PMO 알부민의 경우 식사와 함께 1일 3회 섭취로 인해 섭취에 대한 번거로움이 있으며 이는 소비자의 예방 차원에서 제품화의 어려움으로 작용할 수 있다.

일부 성분의 경우에는 섭취시 특이사항이 있으며 이는 제품화(상품화)가 되었을 경우 제한 부분이 될 수 있어 이 부분에 대한 고려가 필요하다. 특히 홍경천 추출물의 경우, 유소아, 임산부, 수유부는 사용을 금할 뿐만 아니라 혈당조절을 위한 의약품을 복용하는 분들도 주의를 주고 있어 사용상에 제한이 되는 단점이 있다. 또한 소비자의 대부분이 추출물을 비롯한 천연물에 대한 요구(need)가 높은 상황이기에 섭취량, 성분에 대한 홍보와 소비자의 need등을 고려하여 부재료와의 최적 배합 및 제형화를 고려하였다.

표 30. 혈당조절 기능성 성분

번호	원료명	인정등급	기능(지표)성분	일일섭취량
1	난소화성 말토덱스트린	생리활성 기능2등급	난소화성 말토덱스트린	난소화성말토덱스트린으로서 4.6~9.8 g/일
2	바나바주정추출물 바나바주정추출분말	생리활성 기능2등급	Corosolic acid	바나바주정추출물로서 50~100 mg/일
3	피니톨	생리활성 기능3등급	피니톨	피니톨로서 1.2 g/일
4	홍경천등 복합추출물	생리활성 기능3등급	홍경천추출물: salidroside 계피추출물: Cinnamic acid	씨제이홍경천등 복합추출물로서 900 mg/일
5	구아바잎 추출물	생리활성 기능2등급	Total polyphenol	총 폴리페놀로서 123.5 mg/일
6	탈지달맞이꽃종자 주정추출물	생리활성기 능2등급	Total polyphenol Penta-O-galloyl-beta-D- glucose	탈지달맞이꽃종자주정추출물 로서 200~300 mg/일

7	솔잎증류농축액	생리활성 기능2등급	① 3-carene ② limonene ③ terpinolene	솔잎증류농축액으로서 1,350 mg/일
8	콩발효추출물 토치대두발효추출물	생리활성 기능2등급	① α-Glucosidase 활성 억제능(IC ₅₀) ② Tris(2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol)	콩발효추출물로서 900 mg/일
9	PMO 알부민	생리활성 기능2등급	0.19-albumin	PMO 알부민으로서 1.2~1.5 g/일 (식사와 함께 1일 3회 섭취)
10	Nopal추출물	생리활성 기능2등급	수용성 식이섬유	수용성식이섬유로서 4.3 g/일
11	동결건조누에분말	생리활성 기능2등급	1-deoxynojirimycin	동결건조분말로서 2.7 g/일
12	지각상엽 추출혼합물	생리활성 기능2등급	① Narigin ② Astraglin	지각상엽 추출혼합물로서 2.8 g/일
13	서리태(쥐눈이콩) 펩타이드 복합물	생리활성 기능3등급	① Arginine ② Leucine	서리태(쥐눈이콩) 펩타이드 복합물로서 4.5 g/일
14	인삼가수분해 농축액	생리활성 기능2등급	ginsenoside Rg1	인삼가수분해 농축액으로서 960 mg/일
15	타가토스	생리활성 기능2등급	D-tagatose	D-tagatose로서 5~7.5 g/일
16	마주정추출물	생리활성 기능3등급	Allantoin	마주정추출물로서 900 mg/일
17	실크단백질 효소가수분해물	생리활성 기능3등급	Serine, Glycine, Alanine	실크단백질 효소 가수분해물로서 6 g/일
18	잔나비겉상 버섯균사체	생리활성 기능2등급	β-glucan	잔나비겉상 버섯균사체로서 1,500 mg/일

(2) 제품의 합리적인 제형 선정

제품화시 혈당조정이란은 문구사용을 위해 기능성 원료와 콩잎추출분말과의 제형에 대해 고려를 하였다. 일차적인 제형의 경우, 표 30과 표시한 것과 같이 비교적 섭취량이 많아 타정 등의 제작에 어려움을 주는 난소화성말토덱스트린 덱스트린 등을 제외하였다. 또한 소비자의 요구에 맞는 천연물 소재를 중심으로 2차적으로 기능성 원료를 선별하였다. 그리고 원료의 공급이 용이한지에 대한 부분을 검토하였다. 원료의 경우 대부분 공급이 용이하였지만, 일부 추출물의 경우 공급에 제한을 두고 있어 제품화 부분에 고려 대상으로 산정하였다. 또한 천연물 중에서 비교적 까다로운 섭취시 주의 사항을 가지고 있는 홍경천 추출물, 솔잎증류농축액, 콩발효추출물, Nopal 추출물, 지각상엽추출혼합물, 인삼가수분해분해농축액은 제외를 하였다.

이상과 같은 상황을 고려하여 표 31과 같은 3가지의 제형을 완성하였다. 기능성을 나타낼 수 있는 원료로는 기능성 지표 성분인 코로솔산 (corosolic acid), PGG (penta-O-galloylβ-D-glucos)를 함유하고 있어 식후 혈당상승 억제에 도움을 줄 수 있는 바나나잎추출분말과 달맞이꽃종자추출물을 선정하였다. 이와 함께 혈당 조절에 도움을 줄 수 있

는 기능성분으로 아연을 첨가하여 제형화 (formulation)을 완성하였다. 기능성 성분 등을 고려하여 섭취량으로 type A는 450 mg으로 1일 2회 (1회 2정)으로 type B는 500 mg 타정으로 1일 3정 그리고 type C는 500 mg으로 1일 2정 섭취로 산정하였다.

시장에 출시되어 있는 제품등에 대한 조사를 실행하여, 혈액순환개선제로 달맞이꽃종자추추물 (달맞이꽃종자유)를 이용한 제품이 많이 나와 있어 혈당제품과의 차별성이 보이지 않는 점을 확인하였다. 또한 제품화를 통해 2중 기능성 (혈당상승 억제에 도움, 정상적인 면역기능에 도움)과 효과적인 측면을 감안하여 type C를 선별하였다.

표 31. 기능성 성분을 달리한 type 별 혈당 제품

번호	Type A	Type B	Type C
1	바나나잎추출분말 (콜로솔산 1%)	달맞이꽃종자추출물(2%)	바나나잎추출분말 (콜로솔산 1.2%)
2	결정셀룰로오스	글루콘산아연(14%)	글루콘산아연(14%)
3	유당혼합제제	결정셀룰로오스	결정셀룰로오스
4	크롬강화효모	덱스트린	치커리추출물
5	콩잎추출분말	치커리추출물	밀식이성유
6	비타민 C	뽕나무잎추출물(상엽추출물)	셀레늄함유건조효모
7	IBT Protease	현미발효효소분말	콩잎추출분말
8	스테아린산마그네슘	셀레늄함유건조효모	비타민C
9	비타민 E 혼합제제	콩잎추출분말	산화마그네슘
10	글리세린	스테아린산마그네슘	스네아린산마그네슘
11	아로에아보레신스	이산화규소	이산화규소
12	녹차추출분말	바나바잎추출물	밀식이성유
13	홍삼농축액분말	히드록시프로필메틸셀룰로오스	과라나추출물
14		건조효모(크롬)	난소화성말토덱스트린
15		IBT Protease	L-아르기닌
16		글리세린지방산에스테르	히드록시프로필메틸셀룰로스
17			건조효모
18			IBT Protease
19			비타민 E
20			글리세린지방산에스테르
21			엽산

(3) 유통성을 고려한 장기저장 안정성 기술 확보

제품의 장기저장 안정성 기술을 확보하기 위하여 보관방법 및 보관기간에 따른 콩잎 유효 성분의 변화를 확인하였다. 2012년도부터 2015년도 수확 콩잎 중 비교적 유효 성분의 함량이 가장 높았던 일령의 콩잎들을 선택하여 안정성을 확인하였다. 콩잎의 보관방법으로는 냉동 보관하는 방법과 건조분말 상태로 냉장 보관하는 방법 두 가지가 있다. 추출 용매로는 배당체 추출에 가장 적합한 70% EtOH로 선택하였다. 우선 건조분말 상태로 냉장실 보관 중인 콩잎을 70% EtOH로 추출하여 이전의 건조 중량 자료와 비교하였다 (표 32). 새로 추출한 최근 자료와 비교하여 건조 중량의 안정성을 확인한 결과, 2012년도와 2013년도 수확 대두콩잎(GH)의 건조 건조 중량이 다소 감소하였으나 유의적이지 않으며, 나머지는 모두 큰 차이를 보이지 않았다.

Table 32. Comparison of dry weights in 70% EtOH extracts of various soy leaves

Sample (70% EtOH extracts)	dry wt. (mg/ml)	
	Previous data	Recent data
2012-JP-GH-109d	34.8 ± 0.0	29.9 ± 4.4
2013-JP-GH-107d	29.0 ± 1.0	24.5 ± 1.1
2014-NS-GH-115d	24.1 ± 0.4	25.0 ± 1.8
2015-NS-GH-104d	24.3 ± 0.2	25.6 ± 1.1
2013-JP-BB-107d	28.0 ± 0.0	26.2 ± 1.3
2014-NS-BB-115d	31.8 ± 1.6	30.5 ± 1.5
2015-NS-BB-102d	23.4 ± 0.3	22.5 ± 0.7

Values are presented as mean ± SD (n = 3).

우선 냉동 보관한 콩잎과와 건조 분말 상태로 저온 보관한 콩잎의 HPLC profile을 비교, 분석하여 물질의 변화가 있는지 확인하였다. 대부분 큰 차이를 보이지 않았으나 2012년도 수확 콩잎의 경우 보관 방법에 따른 함량의 차이를 보일 것으로 예상되었다. 따라서 보관 방법에 따른 콩잎 추출물의 배당체 지표물질인 KG7 (GH)과 QG5 (BB)의 함량을 측정하였다 (표 33-34).

KG7의 경우 수확 후 6개월 이내에 측정한 이전 자료보다 최근 추출한 시료의 함량 값이 대부분 감소하였다. 2012년도 수확 콩잎의 경우 2가지 보관방법에서 모두 KG7의 함량이 현저하게 감소되는 것을 확인하였으며, 그 외 수확년도 (2013-2015)의 콩잎추출물은 보관 방법에 따른 함량 값에서 큰 차이를 보이지 않았으며 이전에 측정한 값에 비해 감소량은 10% 이내이었다.

QG5의 경우 이전에 측정한 값에 비해 최근 추출한 시료의 함량 값에서 큰 차이를 보이지 않았으며 이전에 측정한 값에 비해 감소량은 10% 이내이었다.

즉, 수확한 콩잎을 건조분말 상태로 보관 시 4년 이내에 사용하는 것이 지표물질의 손실을 최소화하는 방법으로 판단되었다.

Table 33 Comparison of KG7 contents in 70% EtOH extracts of various soy leaves having different storage method

Sample (70% EtOH extracts)	Contents of KG7 (mg/g extract)		
	Previous data	Frozen storage (extracts)	Low temp. storage (dry powdered extract)
2012-GH-109d	30.9 ± 0.3	16.0 ± 0.3	17.3 ± 1.0
2013-GH-107d	22.2 ± 0.5	20.3 ± 0.0	20.6 ± 1.0
2014-GH-115d	26.6 ± 0.9	NT	22.8 ± 0.2
2015-GH-104d	20.9 ± 0.9	12.0 ± 0.1	17.6 ± 0.1

Values are presented as mean ± SD (n = 3). NT: not tested.

Table 34. Comparison of KG7 and QG5 contents in 70% EtOH extracts of various soy leaves having different storage method

Sample (70% EtOH extracts)	Contents of QG5 (mg/g extract)		
	Previous data	Frozen storage (extracts)	Low temp. storage (dry powdered extract)
2013-BB-107d	19.7 ± 0.4	16.5 ± 0.1	18.3 ± 0.3
2014-BB-115d	16.3 ± 0.5	15.2 ± 0.2	15.8 ± 0.3
2015-BB-102d	16.2 ± 0.4	14.8 ± 0.1	15.7 ± 0.2

Values are presented as mean ± SD (n = 3).

차. 식품(식품첨가물) 품목 등록 (제품명 결정)

본 연구의 연구결과를 중심으로 콩잎주정추출분말을 활용하여 혈당강하를 위한 기능성 제품개발을 진행하였다. 본 연구의 콩잎주정추출분말을 이용한 시제품 및 제품화의 경우 법적 행정적인 절차를 위해 인허가를 작업을 선행하였다. 인허가의 경우 콩잎주정추출분말이 기능성 성분으로 인정되기 않은 상황이기에 식품(식품첨가물) 품목 등록을 실행하였다. 식품첨가물 품목 등록을 위해 먼저 사업장(협동연구기관)에 대한 식품제조 가공을 위한 식품제조가공업의 영업허가 신청을 하였으며 이에 대해 2016년 4월 21일 식품제조, 가공을 실행할 수 있는 영업 허가 (영업등록번호 2016-0240348)를 확보하였다.

또한 시제품 및 제품 개발에 콩잎주정추출분말을 사용하기 위해 품목제조보고서를 작성하고 이를 통해 식품첨가물로 품목 등록을 시행하였다.

유통기한 설정은 식약처 고시 식품의 유통기한 설정기준 개정고시 (식품의약품안전처 고시 제2008-53호)를 바탕으로 실행하였다. 식품 종류의 설정에서 기존에 보고되어 있는 품목을 대상으로 식품군은 다류(식품 유형 : 침출차, 액상차, 고형차)로 고형차로 분류하였다. 분류에 따른 설정실험 지표의 경우 이화학적 지표로는 수분함량, 미생물학적 지표로는 세균수, 대장균군을 지표로 하였다. 관능적 지표로는 성상과 침전물을 지표로 하였다. 유통기한은 제조일로부터 1년을 설정하였으며 설정사유로는 기존 등록되어 있는 성분 중 원지추출분말을 대조하여 설정하였다. 유통기한 설정 사유서는 표 35와 같다.

표 35. 콩잎추출분말의 유통기한 설정 사유서

1. 제품명	콩잎추출분말
2. 성상	청녹색의 분말로서 콩잎추출분말 향미를 가지고 있으며 이취가 없다.
3. 식품유형	고형차
4 보존온도	상온보관
5. 포장재질	PE
6. 보존료 사용 여부	사용하지 않음
7. 유통처리 여부	처리하지 않음
8. 살균 여부	고압멸균
9. 유통기한	제조일로부터 1년

품목제조보고를 위한 식품제조방법 설명서는 아래의 표 36와 같이 작성하여 수행하였다. 제조 공정의 경우 본 연구를 통해 확보된 자료를 바탕으로 제조 방법을 제시하였다. 특히 산업적 대량 공정을 수행해야 하는 점을 감안하여 수율적인 측면보다는 안정적으로 확보할 수 있는 부분을 감안하였다.

표 36. 콩잎추출분말의 식품제조방법 설명서

1. 제품명	콩잎추출분말
2. 식품의 유형	고형차
3. 원재료명 또는 성분명 및 배합비율	콩잎추출물(고형분기준) 10.00%, 덱스트린 90.00%
4. 제조방법	<p>가. 원료 검사: 식품공전규격에 적합한 원료를 구입하여 검사 후 합격된 것을 사용한다.</p> <p>나. 추출 : 추출기에 콩잎을 계량하여 투입하고 콩잎 투입량의 10배의 에탄올을 용매로 사용 75~85도에서 6~8시간 추출한다. 2차, 3차, 4차 각각 4회 반복 추출한다.</p> <p>다. 건조: 동결건조기에 투입하여 동결 건조한다.</p> <p>라. 분쇄: 동결 건조한 콩잎추출물을 분쇄한다.</p> <p>마. 계량: 배합비율대로 계량한다.</p> <p>바. 혼합: 혼합기에 투입하여 균일하게 혼합한다.</p> <p>사. 검사 및 포장: 규격 검사를 실시하여 합격한 것을 포장 단위별 총진 포장한다.</p>
5. 성상	청녹색의 분말로서 콩잎추출분말 향미를 가지고 있으며 이미 이취가 없다.
6. 용도용법	식품원료 및 실험용 원료로 적량 사용
7. 포장 재질	PE

이상과 같은 협동연구기관에서 대한 식품제조가공업의 영업허가(영업등록번호 2016-0240348, 2016년 4월 21일)를 득하고 유통기한 설정 사유서와 식품제조방법 설명서 등을 통해 콩잎추출분말에 대한 식품첨가물 사용을 보고(그림 32, 2016년 5월 9일)하고 시제품 및 제품화에 사용하였다.



제 2016-0240348 호



영 업 등 록 증



법 인 명 : 주식회사 인섹트바이오텍 법 인 번 호 :

대 표 자 : 조영진 생 년 월 일 :

영업소명칭 : (주)인섹트바이오텍

소 재 지 : 대전광역시 유성구 유성대로1628번길 3, 지상1층 (전민동)

영업장면적 : 34.97㎡

영업의종류 : 식품제조·가공업 (영업의형태:식품제조가공업)

조 건 : 「산업집적활성화 및 공장설립에 관한 법률」 제16조(공장의 등록)에 의거 영업등록수리함.

식품위생법 제37조제5항, 같은 법 시행령 제26조의2 및 같은 법 시행규칙 제43조의2제2항에 따라 위와 같이 등록하였음을 증명합니다.

2016년 04월 21일

대전광역시 유성구청장



식품위생법 제42조 및 동법시행규칙 제55조에 규정된 준수사항을 이행해야함.

● 영업소 폐업시 폐업신고 미이행에 따른 면허세 부과등 불이익을 받지 아니하도록 **유성구청 위생과**로 반드시 폐업신고 하시기 바랍니다.

그림 32. 식품제조가공업 영업등록증.

식품·식품첨가물 품목제조보고서

* 뒤쪽의 유의사항을 읽고 작성하여 주시기 바라며, []에는 해당되는 곳에 √ 표를 합니다. (양쪽)

보고인	성명 조영진	생년월일
	주소 대전광역시 유성구 유성대로 1628번길 3	전화번호 휴대전화 (담당)구분원차장
영업소	명칭(상호) ㈜인섹트바이오텍	영업등록번호 2016-0240348
	소재지 대전광역시 유성구 유성대로 1628번길 3	

식품의 유형 고흡차

제품명 공알추출분말

유통기한	제조일부터	1년
품질유지기한	제조일부터	일(월, 년)

원재료명 또는 성분명 및 배합비율
뒤 쪽에 기재

용도 용법 식품원료 및 실험용 원료로 적량 사용한다

제품정보
보관방법 및 포장재질
포장방법 및 포장단위 자사포장단위

성상 청녹색의 분말로서 공알추출분말함량을 지니며 이미, 이취가 없음

고열량·저열량 식품 해당 여부
예 아니오 해당 없음

활활인증 식품 해당 여부
예 아니오

기타

「식품위생법 제53조제5항제2호는 식품의약품안전처에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다.」 수 일: 20 16. 5. 9.

대전광역시 유성구청 위생과
접수자: 직 지민호 생명보고인 한민호

16년 5월 9일
조영진 (직무인)

유성구청장 귀하

- 제출서류
1. 제조방법설명서 1부
 2. 「식품·의약품분야 시험·검사 등에 관한 법률」 제6조제3항제1호에 따라 식품의약품안전처장이 지정한 식품전문 시험·검사기관 또는 같은 조 제4항 단서에 따라 총리령으로 정하는 시험·검사기관이 발급한 식품등의 원시적 기준 및 규격 검토서 1부
 3. 식품의약품안전처장이 정하여 고시한 방법에 따라 설정한 유통기한의 설정사유서 1부
 4. 활활인증 식품 인증서 사본(활활인증 식품의 표시·광고를 하는 경우만 해당합니다)

210mm×297mm[백상지 80g/㎡(재활용품)]

그림 33. 식품제조보고서.

제품명으로는 혈당개선 및 당뇨에 도움을 줄 수 있는 제품명으로 소비자의 빠른 인식과 마케팅에 효과를 줄 수 있는 명칭을 고려하여 20여 가지의 제품명을 1차 선정하였으며, 기존에 사용되고 있는 유사 상품명을 제외하고 다음과 같은 ‘인슈파워 (Insu Power)’, ‘강비당’, ‘항비당’, ‘인슈가드 (Insu guard)’, ‘다이아라파워 (Diara Power)’, ‘디아베파워 (Diabet power)’ 그리고 ‘인슈케어 (Insu care)’ 를 선정하였다. 선정된 제품명에 대해서는 특허법률사무소를 통해 유사 상품명에 대한 검정작업과 함께 식품의약품안전처를 통한 제품명으로 사용 가능성을 확인하였다.

특허청을 통한 상표 검색과 식약처를 통한 제품명 사용 가능성을 통해 최종적으로 ‘인슈파워 (Insu Power)’와 ‘다이아라파워 (Diara Power)’가 선정이 되었으며, 이를 제품명을 결정하고 등록하였다. 본 연구를 통한 마케팅 및 제품화를 위해 기능성 건강기능식품으로 ‘인슈파워’ 를 일반식품으로는 ‘다이아라파워’ 의 제품화를 진행하였다.

카. 항당뇨 다당류 소재를 이용한 제품화

(1) 인슈파워

인슈파워 (insu Power)’ 제품의 기능성 원료로는 바나바잎추출물과 아연을 혼합하여 혈당개선 및 면역에 효과를 줄 수 있는 이중 기능성 건강기능식품을 제작하였다. 특히 본 연구를 통한 소재와의 상승효과를 통한 혈당개선과 건강기능식품으로 활용을 하기 위해 바나바잎추출분말을 중심으로 제작하였다. 소비자의 기호성과 마케팅(소비자의 호감도 측면)을 고려하여 치커리추출분말, 밀식이섬유, 건조효모를 첨가하였으며 영양성분을 감안하여 제품을 개발하였다.

기능성소재 및 부재료와의 최적 배합 설정 연구를 통해 확보된 제형을 바탕으로 제품화를 시행하였으며, 제작한 제품의 품질관리를 위해 시험 조사를 시행하였다. 이를 통해 확보된 결과는 표 37과 같다. 이 건강기능식품에 부합하는 기능성성분으로 바나바잎추출물의 코로솔산을 지표성분로 하였으며 표시량 (1,000 mg 당 1 mg)의 80~120%에 부합하였다. 또한 기타 시험항목 부분(대장균, 아연등 중금속 함량)에서 적합하여 최종 제품화를 완성하였다.

최종 완료된 제품에 대해서는 ‘기능식품연구소’ 를 통해 영양·기능정보를 확보하였으며, 영양 기능정보 자료는 표 38과 같다. %영양성분기준치는 1일 영양성분기준치에 대한 비율을 중심으로 하였다.

표 37. '인슈파워'의 영양·기능 정보

1일 섭취량	2정 (1,000 mg)
바나바잎추출물	식후 혈당상승 억제에 도움을 줄 수 있음
아연	정상적인 면역기능에 필요 정상적인 세포분열에 필요
1일 섭취량 당 함량	
열량	0 kcal
탄수화물	0 g (0%)
단백질	0 g (0%)
지방	0 g (0%)
나트륨	0 g (0%)
코로솔산	1 mg
아연	8.5 mg (100%)

표 38. 인슈파워의 시험 성적서

시험항목	기준	결과
성상	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 흑갈색의 점박이가 있는 회황색의 제피정제	적합
내용량	58.2 g 이상	59.1 g
붕해시험	60분 이내	60분 이내
대장균군	음성	음성
코르솔산(%)	표시량 (1 mg/1,000 mg)의 80.0~120.0%	118.5%
아연(%)	표시량 (8.5 mg/1,000 mg)의 80.0~150.0%	129.0%
납(mg/kg)	1.0 이하	적합
카드뮴(mg/kg)	0.5 이하	적합
총수은(mg/kg)	0.5 이하	적합
총비소(mg/kg)	1.0 이하	적합

또한 (사)한국건강기능식품협회를 통해 기능성 표시 광고에 대한 심의를 거쳤으며 이에 대한 제품의 설명 및 기본 정보와 제품사진은 표 39와 그림 34와 같다.

표 39. 인슈파워의 기본 정보

제품명	인슈파워 'Insu Power'
식품의 유형	건강기능식품
내용량	60g (500 mg X 120T)
기능성	<ul style="list-style-type: none"> · 식후 혈당상승 억제에 도움을 줄 수 있음 · 정상적인 면역기능에 필요 · 정상적인 세포분열에 필요
원료명	바나바잎추출물, 글루콘산아연, 결정셀룰로오스, 말토덱스틴, 치커리추출분말, 밀식이섬유, 콩잎추출분말, 카르복시메틸셀룰로오스칼슘, 셀레늄함유건조효모, 비타민C, 산화마그네슘, 스테아린산마그네슘, 이산화규소, 과라나추출물, 난소화성말토덱스트린, L-아르기닌, 히드록시프로필에틸셀룰로오스, 건조효모(크롬), 프로테아제, 비타민E혼합제제(DL- α -토코페릴아세테이트, 옥테닐호박산나트륨전분, 말토덱스틴, 이산화규소), 글리세린지방산에스테르, 엽산, 밀 함유
섭취량 및 섭취방법	1일 1회, 1회 2정을 물과 함께 섭취하십시오.
섭취시 주의사항	<ul style="list-style-type: none"> - 특이체질, 알레르기 체질이신 경우 성분을 확인하신 후 섭취하여 주시기 바랍니다. - 제품 개봉 또는 섭취 시 포장재에 의해 상처를 입을 수 있으니 주의하시기 바랍니다.
보관시 주의사항	<ul style="list-style-type: none"> - 직사광선 및 고온다습한 곳을 피해 습기가 적고 서늘한 곳에 보관, 유통하십시오. - 개봉 후에는 즉시 섭취하시기 바랍니다.



그림 34. '인슈파워'의 제품 사진.

(2) 다이어아파워 (일반식품/건강보조식품으로 개발 중임)

제품유형	기타가공품
제품제형	굵은 과립
포장단위	5 g X 30 포 X 3 ea
섭치방법	1일 1포
성분	귀리식이섬유 , 타피오카전분, 현미발효효소분말 , 누룽지분말 , 정제포도당, 볶음현미분말 , 누룽지맛분말 , 차전자피분말, 다시마농축액분말, 아라비아검, 치커리추출물분말, 알로에아보레센스분말, 푸룬농축액, 매실추출분말, 카르보시메틸셀룰로오스나트륨, 프락토올리고당 , 비타민C, 락토바실러스플란티움, 공익추출분말 , 아미노산혼합분말, 효소처리스테비아, IBT-프로테아제, 무수구연산
성분 구성 근거	동물실험을 통해 고시형 개별인정 혈당조절 소재인 귀리섬유(Oatwell, OW)와 공익추출물을 함께 투여 시 혈당 개선 효과를 관찰하였다. HFD군 (고지방식이), 귀리섬유군 (권장량보다 낮은 2% OW wt/wt diet), LESL군 (유효농도보다 낮은 0.5% ESL wt/wt diet), HES군 (유효농도 1% ESL wt/wt diet), (OW+LESL)군으로 나누어 식이와 함께 6주 동안 시료를 투여한 결과, (OW+LESL)군에서 혈당 개선에 대한 synergistic effect를 나타내었다.



그림 35. '다이어아파워'의 제품 사진.

제 3 절 향당노 천연 신소재의 인체적용 효능 평가 (제2협동과제)

1. 연구개발 수행 내용 및 방법

가. 인체시험 수행방법

(1) 인체시험 연구 대상 선정

본 연구는 경북대 산학협력단의 인체시험 심의위원회 심의를 거쳐 승인된 이후(승인 일자: 2015. 04. 09, 승인번호: KNU 2015-0032) 공고문을 통하여 경북대 교직원 및 일반 시민을 대상으로 신체계측, 혈액생화학 검사 및 항산화 효소 활성도 분석을 위하여 공고문을 통하여 자발적인 지원을 받았다. 시험의 피험자 선정 기준은 다음과 같다.

① 인체시험 대상자 모집

㉠ 선정 기준

- 심각한 질병이 없는 35세 이상 65세 미만의 남녀
- 체질량지수(BMI)가 23 이상인 과체중 또는 BMI가 25 이상인 비만인
- 공복혈당이 100 mg/dL 정도의 혈당을 가진 반건강인

㉡ 제외 기준

- 이뇨제를 복용하고 있는 고혈압 환자
- 경구혈당강하제, 혈중지질 강하제 또는 인슐린을 사용하고 있는 자
- 심장, 신장, 간, 갑상선, 뇌혈관 질환이 있는 경우
- 당뇨병, 위장관계 질환, 통풍, 포르피리아가 있는 경우
- 우울증, 정신분열증, 알콜중독증, 약물중독 등의 정신질환자
- 최근 5년 이내에 암의 진단 및 치료를 받은 적이 있는 경우
- 천식 및 기타 알레르기 질환이 있는 경우
- 최근 6개월 이내 수술 병력이 있는 경우
- 저녁 회식이 잦아 음주를 자주해야 하는 경우
- 직장 및 개인 일정이 다양하여 기능성식품 섭취일정을 따르기가 어려운 경우

(2) 인체시험 디자인 및 모니터링

① 인체시험 디자인

공고문을 통해 총 124명이 시험에 지원하였으며 인체시험 전 대상자 선정을 위해 신체계측, 체성분 분석을 시행하였다. 지원자 중 선정기준에 적합한 BMI가 23이상인 과체중 및 비만인이며 만 35-65세인 성인 남녀 총 66명을 대상으로 선정하였다. 또한 대상자들

은 총 3개의 그룹인 전분을 포함한 위약대조군(Control, Placebo), 콩잎 주정추출물을 포함한 검정콩(서리태)잎 주정추출물군(Black soybean leaf extract, SR), 대두콩잎 주정추출물군(Soy bean leaf extract, DD) 그룹으로 각각 22명씩 무작위 배정(randomization)하였으며, 이중맹검(double blind)으로 위약대조 연구를 시행하였다(Figure 1). 시험물질 복용량은 Table 1과 같으며, 시험기간 도중 Placebo군에서 4명, DD군에서 1명이 개인적인 사유로 인하여 시험을 중단하였다. (Figure 1, Figure 2)

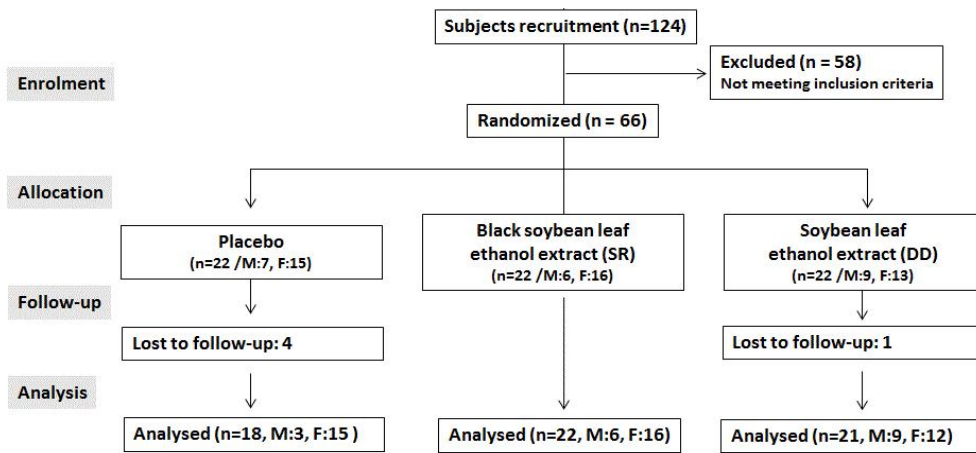


Figure 1. Process of human experiment

n, number; M, male; F, female.

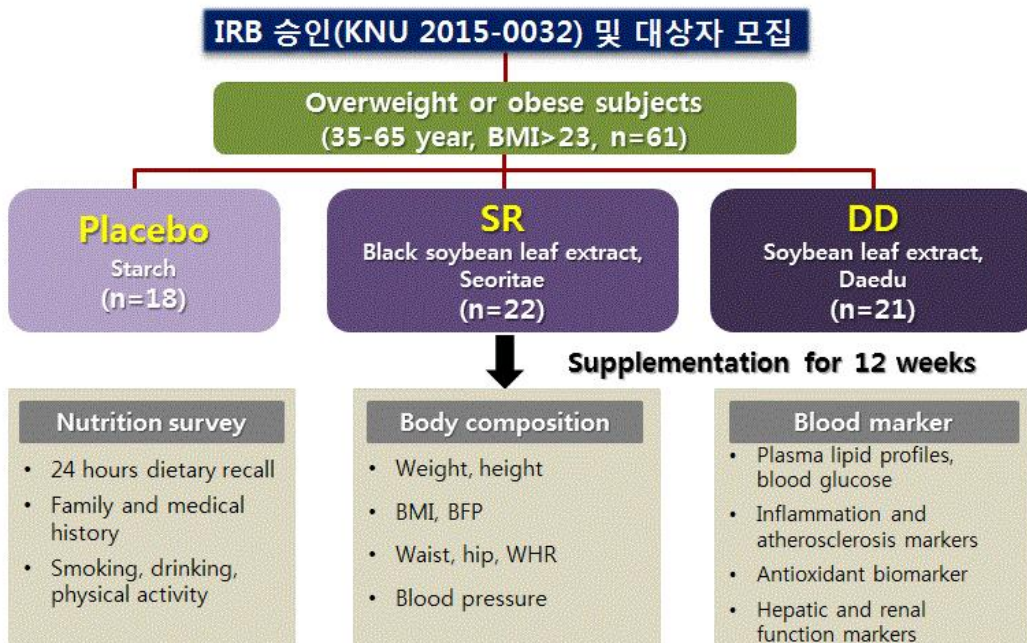


Figure 2. Experimental design for human experiment

BMI, body mass index; BFP, body fat percent; WHR, waist-to-hip ratio.

Table 1. Composition of experimental supplement

Group		용량 (g/capsule)	1일 복용량		비고
			capsules	mg	
제1군	Placebo 군	0.5	6	2,000 (starch)	복용기간:12주 1일 3회 (2 capsule/회) 식후 경구복용
제2군	SR 군	0.5	6	2,000 (검정콩잎 주정추출물)	
제3군	DD 군	0.5	6	2,000 (대두콩잎 주정추출물)	

SR, black soybean leaf ethanol extract; DD, soybean leaf ethanol extract.

② 대상자 모니터링

대상자들은 시험기간 12주 동안 정상적인 식생활 및 생활습관을 유지하도록 하였고 피험자들에게 주 1회의 전화를 통해 시험식품의 지속적인 섭취 여부, 시험기간 중 나타날 수 있는 부작용 또는 불편사항(설사, 장내가스 발생, 어지러움, 두통, 구토 등)을 조사함으로써 모니터링을 실시하였다.

(3) 인체시험 대상자 방문 및 시료수집

① 방문일정

대상자 방문은 12주간 총 4회(0, 4, 8, 12주) 이루어졌다. 방문을 통해 영양설문지와 24시간 회상법을 이용한 식사일지 작성, 신체계측, 체성분 측정, 허리 둘레와 엉덩이 둘레 측정, 혈압 측정, 공복혈당 측정, 처방식품 배분을 하였으며, 시험시작과 종료시점인 0주차와 12주차에는 추가적으로 채혈 및 소변 수집을 시행하였다.

② 시료수집

시험 전(0주) 및 시험 후(12주)에 12시간 공복 후 공복혈액과 소변을 채취하였다. 채취된 혈액은 혈액응고를 방지하기 위하여 헤파린으로 처리된 시험관에 바로 수집하였고, 3000rpm, 4° C에서 15분간 원심분리하여 혈장을 분리한 후, 시료 분석 시까지 -70° C에 보관하였다.

(4) 실험 분석 및 측정방법

① 24시간 회상법을 이용한 식사력 조사

인체시험대상자의 영양섭취상태는 24시간 회상법을 이용해 조사되었으며 설문조사 결과정리는 Can Pro 2.0프로그램(한국영양학회)과 엑셀 프로그램을 이용하여 이루어졌으며 통계처리는 ANOVA 통계 처리하였다.

② 신체계측, 혈압, 허리둘레 및 엉덩이둘레 측정

㉠ 신체계측 및 체성분 분석

체성분 분석은 전기저항을 이용한 체성분 분석기(X-SCAN PLUS II, 자원메디칼)를 이용하여 측정하였다.

㉡ 혈압 변화 분석

혈압은 안정된 상태에서 OMRON DALIAN사(중국)의 혈압계를 이용하여 수축기 혈압 및 이완기 혈압을 측정하였다.

㉢ 허리둘레 및 엉덩이둘레 측정

허리둘레는 배꼽주변의 가장 가는 부위에서 측정하였으며, 엉덩이 둘레는 대전자 위치의 가장 넓은 부위의 둘레를 측정하였다. 측정자간의 오차를 줄이기 위하여, 연구기간 내내 허리둘레 엉덩이 둘레 측정자는 동일한 측정자로 지정하였다.

③ 지질 농도 분석

㉠ Triglyceride 정량

혈장 중성지질은 McGowan et al. (1983)의 효소법을 이용한 발색법 원리에 따라 중성지방 측정용 시약(아산제약 kit)을 사용하여 측정하였다. 혈장 내 중성지질은 lipoprotein lipase (LPL)에 의해 글리세롤과 지방산으로 분해된다. 이 중 글리세롤은 ATP와 glycerol kinase (GK)의 작용으로 L- α -glycerophosphate를 형성하며, 이것은 O₂ 및 glycerophosphooxidase (GPO)와 반응하여 H₂O₂를 발생시켰다. 여기에 peroxidase와 4-amino-antipyrin을 처리하여 적색으로 발색시킨 후 550nm에서 흡광도를 측정하여 글리세롤 표준곡선과 비교하여 정량하였다.

㉡ 유리지방산 정량

혈장 유리지방산은 효소법을 이용한 발색법 원리에 따라 유리지방산 측정용 시액(Non-esterified fatty acid, NEFA kit, Wako, Osaka, Japan)을 사용하여 측정하였다. 우선 혈장 유리지방산에 acyl coenzyme A synthetase를 작용시켜 acyl-CoA, AMP 및 pyrophosphoric acid를 생성시킨 후, 여기에 acyl coenzyme A oxidase를 첨가하여 2,3-trans-enoyl-CoA 및 과산화수소를 생성시켰다. 이를 peroxidase와 4-아미노안티피린 및 N-ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulforopyl)-m-toruidine 으로 처리하여 적색으로 발색시킨 후 550nm에서 흡광도를 측정하여 유리지방산 표준곡선과 비교하여 정량하였다.

㉢ Phospholipid 정량

혈장 인지질 정량은 인지질 측정용 kit(신양화학약품주식회사, Japan)를 사용하여 측정하였다. 인지질은 phospholipase D에 의해 유리된 choline이 유리되고, 이는 choline oxidase에 의해 과산화수소와 베타인을 생성한다. 생성된 과산화수소는 과산화효소에 의해 4-Amino antipyrine, DAOS와 산화축합 되어 키논색소를 발색시킨 후 흡광도를 측정하는 방법으로 혈장 100 μ L에 PL-M-1을 1mL을 가하고 37°C에서 5분간 반응시킨

후 PL-M-2를 500 μ L 가하여 37°C 에서 5분간 반응하여 나타난 자색의 키논색소 흡광도를 600nm에서 측정하여 인지질 표준용액과 비교하여 정량하였다.

㉠ Total-cholesterol 정량

혈장 총 콜레스테롤 정량은 Allain et al. (1974)의 효소법을 응용한 측정용 시액(아산제약 kit)을 사용하였다. 혈장 콜레스테롤은 cholesteryl ester (CE) 및 유리콜레스테롤 두 형태로 존재하므로, 이들 전체를 정량하기 위하여 CE를 cholesterol esterase에 의해 지방산과 유리 콜레스테롤로 전환시켰다. 이렇게 전환된 유리콜레스테롤은 cholesterol oxidase에 의해 H₂O₂와 Δ^4 -cholestenon으로 전환시키고, 이 중 H₂O₂를 peroxidase 및 phenol, 4-amino-antipyrine과 혼합하여 적색으로 발색시킨 후, 500nm에서 흡광도를 측정하여 콜레스테롤 표준용액(300 mg/dL)과 비교하여 정량하였다.

㉡ HDL-cholesterol 정량

혈장 HDL-cholesterol (HDL-C)은 HDL-C 측정용 시액(아산제약 kit)을 사용하여 측정하였다. 혈장 100 μ L를 취하여 인텅스텐 나트륨 500 μ g과 염화마그네슘 1mg을 처리하면 인텅스텐산과 마그네슘 양이온의 작용으로 지단백질 중 apolipoprotein B를 포함하는 LDL과 VLDL이 침전된다(Warnick, 1982). 이것을 원심분리한 후 상층액에 남은 HDL-콜레스테롤을 총 콜레스테롤과 같은 방법으로 발색반응 시켜 500nm에서 흡광도를 측정하고, 콜레스테롤 표준용액(50mg/dL)과 비교하여 정량하였다.

㉢ HTR 및 AI (동맥경화지수) 계산

혈장 HTR 및 atherogenic index (AI, 동맥경화지수)은 다음 공식에 의해 계산되었다 (Yamajaki, 1990).

$$\text{HTR (\%)} = [(\text{HDL-cholesterol})/(\text{Total-cholesterol})] \times 100$$

$$\text{Atherogenic index, AI}$$

$$= [(\text{Total-cholesterol})-(\text{HDL-cholesterol})]/\text{HDL-cholesterol}$$

㉣ Apolipoprotein 정량

혈장 apolipoprotein A- I (apo A- I) 및 apolipoprotein B(apo B) 농도는 apo A- I, apo B 측정용 kit(日東紡績株式會社, Japan)를 사용하여 측정하였다. 혈장 6 μ L에 R-1 시약 600 μ L를 가하고 37° C에서 5분간 반응시키고 R-2 시약 200 μ L를 가하여 37° C에서 5분간 반응시킨 후 항원항체 반응에 의해 생성된 응집물의 탁도를 apo A-I 은 800nm에서 apo B는 600nm (VERSAmax, Molecular devices Co, USA)에서 흡광도를 측정하고 apolipoprotein 표준용액과 비교하여 정량하였다.

④ Cytokines 농도 측정

혈장으로 효소면역측정법(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)을 이용하여 cytokine 농도는 multiplex detection ELISA kits from Bio-Rad (Hercules, CA)를 사용하여 측정하였다

⑤ Adipokines 농도 측정

혈장으로 효소면역측정법(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)을 이용하여 adipokine 농도는 multiplex detection ELISA kits from Bio-Rad (Hercules, CA)를 사용하여 측정하였다.

⑥ 혈당 조절 관련 마커 분석

㉠ 공복 혈당 변화 측정

공복혈당 농도는 12시간 절식한 피험자들의 공복 정맥혈을 채취하여 혈액 자동 분석기(Cholestech LDX System, USA)를 이용하여 측정하였으며 또한 자가 혈당 측정계 (OneTouch UltraEasy Blood Glucose Monitoring System, LifeScan, Inc.)를 이용하여 12시간 절식한 피험자들의 손끝에서 공복혈당을 측정하였다.

㉡ 혈장 glucose 농도 측정

혈장 glucose 함량 측정을 위해 glucose 측정용 시액(Asan kit, Korea)을 사용하였다. Glucose는 Glucose oxidase의 작용에 의해 gluconic acid와 hydrogen peroxide가 되고 hydrogen peroxide는 peroxidase를 생성하고 phenol과 4-aminoantipyrine을 산화적으로 축합시켜 키논형 적색 색소를 생성한다. 이러한 원리를 이용하여 혈장 10 μ L에 효소 시액 1.5mL를 가하여 37 ° C에서 5분간 반응시킨 후 500nm (VERSAmax, Molecular devices Co. USA)에서 생성된 키논형 적색 색소의 흡광도를 측정하여 glucose 표준용액과 비교하여 정량하였다.

㉢ 당대사 관련 호르몬 측정

혈장 insulin 및 GIP는 Multiplex detection kit (Bio-Rad, USA)를 사용하여 측정하였으며, 혈장 C-peptide는 human insulin C-peptide kit (R&D system, USA)를 사용하여 측정하였다.

㉣ HOMA-IR 계산

인슐린 감수성 지표인 HOMA-IR (Homeostasis model assessment of insulin resistance)은 $[\text{fasting insulin concentration (mU/L)}] \times [\text{fasting glucose concentration (mg/dL)}] \times 0.05551 / 22.5$ 로 산출하였다.

⑦ 적혈구의 항산화 활성 분석

㉠ 적혈구 효소원 분리

적혈구는 McCord와 Fridovich (1969)의 방법에 준하여 헤파린 처리된 혈액을 1,000 \times g, 4°C에서 15분간 원심분리하여 혈장과 buffy coat를 완전히 제거한 후 0.9% 생리식염수로 세 번 세척하였다. 세척된 적혈구는 동량의 증류수로 용혈시키고, 용혈된 적혈구는 희석하여 항산화효소(superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione reductase (GR), glutathione peroxidase (GSH-Px))활성도 측정을 위한 효

소원으로 사용하였다. 이 때 SOD 분석용은 세포질 분획에 ethanol : chloroform (3:5, v/v)로 상층액 부피의 2/5가 되도록 첨가하여 잘 섞어 지질을 침전시킨 후 증류수를 첨가한 후 10,000×g, 4℃에서 10분간 원심분리하여 상층액을 취하여 이용하였다. 효소 활성도는 헤모글로빈 g당 고유 활성도로 나타내었다.

㉞ 헤모글로빈 정량

적혈구의 헤모글로빈(hemoglobin, Hb) 농도는 효소법을 이용한 측정용 시액(AM 503-K, Asan kit, Korea)을 사용하여 측정한 헤모글로빈 g당 고유 활성도로 나타내었다. 혈액 중 헤모글로빈은 페리시안화칼륨과 반응해서 methemoglobin으로 전환된 후 potassium cyanide과 반응하여 cyanmethemoglobin으로 전환되며, 이를 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 정색시약 5mL에 전혈 200 μL를 교반하고, 실온에서 5분간 반응시켜 발색시킨 후 표준용액을 대조로 하여 파장 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

⑧ 적혈구 항산화 효소 활성도 및 지질과산화물(TBARS) 함량 측정

㉞ Superoxide dismutase (SOD) 측정

SOD는 superoxide anion radical (O₂-•)을 H₂O₂ 및 O₂로 분해시키는 반응을 촉매하는 효소로서, 활성도는 Marklund et al. (1974)의 방법을 수정·보완하여 알칼리 상태에서 SOD가 pyrogallol의 자동산화를 억제하는 정도를 측정하였다. 10mM EDTA를 포함한 50mM Tris-hydroxymethyl-aminomethane buffer (Tris-HCl buffer, PH 8.5) 1.5mL에서 흡광도를 측정하여 효소활성을 산출하였다. 효소활성의 단위는 효소원을 넣지 않고 반응시킨 pyrogallol 용액의 자동산화를 50% 억제하는데 필요한 헤모글로빈에 대한 SOD (unit/mg hemoglobin)로 계산하였다.

㉞ Catalase (CAT) 활성도 측정

CAT는 H₂O₂를 H₂O 및 O₂로 분해시키는 역할을 하며 활성도 측정은 Aebi et al. (1974)의 방법을 수정·보완하여 측정하였다. 50mM potassium phosphate buffer (KH₂PO₄:Na₂HPO₄=1:1, pH7.0)용액 2.89mL와 증류수로 10배 희석한 적혈구 효소원 10 μL를 25℃에서 5분간 preincubation한 후 30mM H₂O₂용액 0.1mL를 첨가하여 25℃에서 5분간 흡광도 변화를 240nm에서 측정하였다.

㉞ Glutathion reductase (GR) 활성도 측정

GR 활성도는 GR의 작용으로 먼저, 산화형 glutathione (GSSG)이 GSH 형태로 환원될 때와 동시에 NADPH가 NADP⁺로 산화되면서 감소되는 NADPH 정도를 Pinto et al. (1969)의 방법을 수정·보완하여 측정하였다. 1M potassium phosphate buffer (KH₂PO₄:K₂HPO₄, pH7.4) 0.1mL에 증류수 780 μL를 첨가한 후 0.1M EDTA 10 μL, 10mM GSSG 100 μL, 효소원인 적혈구 5 μL, 그리고 NADPH 10 μL를 순서대로 첨가한 후 340nm (25℃)에서 2분 동안의 흡광도 감소량을 측정하였다.

㉞ Glutathion peroxidase (GSH-Px) 활성도 측정

GSH-Px는 GSH가 GSH-Px에 의해 GSSG로 산화될 때 생성된 beta-NADP정도를 Paglia 와 Valentine (1967)의 방법을 수정·보완하여 측정하였다. 0.1M Tris-HCl buffer (pH 7.2) 2.6mL에 30mM glutathione 용액 0.1mL, 6mM NADPH, 그리고 30mM H₂O₂를 첨가하여 25°C에서 5분간 흡광도 변화를 340nm에서 측정하였음. 활성도 단위는 1분당 적혈구 hemoglobin 1mg에 대해 산화된 NADPH nmol로 계산하였다(nmol NADPH oxidized/min/mg hemoglobin).

㉞ 지질과산화물(TBARS) 농도 측정

적혈구 지질과산화물 함량 측정은 Tarladgis et al. (1964)의 방법을 이용하였다. 적혈구 50 μ L에 5% TCA (trichloroacetic acid) 3mL와 0.06M TBA (thiobarbituric acid) 1mL를 첨가하여 80°C에서 90분 동안 반응시켰다. 이것을 실온으로 냉각시켜 2,000rpm (25°C)에서 15분간 원심 분리한 후 상층액을 취하여 535nm에서 흡광도를 측정하였다. MDA 표준용액은 tetramethoxypropane (TMP)을 가수분해하여, 267nm에서 나온 TBA 반응물질의 양은 MDA 흡광계수(equivalent)로 계산하였다. 즉, TMP 1mmol을 0.01N HCl용액 100mL에 녹여 50°C에서 60분간 반응시킨 후 실온으로 냉각시켜 MDA로 TMP를 가수분해 시켰음. 가수분해된 TMP 용액 1mL을 0.01M Na₃PO₄(pH7.0)buffer 100mL에 희석시켜 MDA 표준용액(1×10^{-4} M)을 제조하였다. 267nm에서 MDA 표준용액의 흡수 스펙트럼을 얻어 extinction coefficient로부터 정확한 농도를 계산하여 보정한 후 TBA-MDA chromopore 표준곡선을 얻고, 이 곡선으로부터 TBA 반응 물질의 양을 MDA 흡광계수로 산출하였다.

㉟ 간독성 및 신장 기능 관련 지표 측정

㉠ 혈장 GOT 및 GPT 활성도 측정

간세포 손상과 밀접한 관련이 있는 glutamic oxaloacetic transaminase (GOT)과 glutamic pyruvic transaminase (GPT) 활성도를 Reitman et al. (1957)의 비색 분석법에 준한 효소법을 응용하여 분광 광도계로 분석하였다. 혈청 GOT의 경우 L-aspartate와 α -ketoglutarate, GPT의 경우 D,L-alanine과 α -ketoglutarate를 첨가하면 혈장의 효소에 의해 기질이 pyruvate로 전환되며, 이 pyruvate를 2,4-dinitrophenylhydrazine과 반응시켜 0.4N NaOH를 가하면 비색반응으로 발색이 일어나고 이를 490-530nm에서 흡광도를 측정하여 pyruvic acid lithium의 표준곡선과 비교하여 활성도를 측정하였다. GOT 그리고 GPT용 기질액을 1mL씩 취해 37°C에서 5분간 방치한 다음 혈장 200 μ L를 넣어 GOT는 37°C에서 60분, GPT는 37°C에서 30분간 반응시킨 다음 dinitrophenyl hydrazine 발색 용액을 1mL씩 가하여 실온에 다시 20분간 반응시킨다. 0.4N NaOH용액 10mL와 혼합하여 10분간 반응시킨 다음 흡광도를 측정하였다. 이때 표준곡선은 혈청 transaminase 측정용 시약(Asan kit, Korea) 중 검량선용 시약을 사용하였다.

㉡ 혈장 알부민 농도 측정

혈장 알부민(albumin) 함량 측정은 상업용 알부민 측정용 시액(Asan kit, Korea)을 사용하였다. 알부민은 PH 4.0 부근에서 BCG와 반응하여 알부민 량에 비례하여 녹색을 나타내므로 이것을 파장 630nm에서 측정하여 알부민 량을 구한다. 이러한 원리를 이용하여 혈장 200 μ L에 정색시약 5mL을 가하여 25 ° C, 10분간 반응시킨 후 630nm에서 생성된 녹색색소의 흡광도를 측정하여 알부민 표준용액과 비교하여 정량하였다.

㉔ 뇨 중 Creatinine 정량

뇨 중 creatinine 정량은 creatinine kit (R&D system, USA)를 사용하여 측정하였으며 소변 10 μ L을 증류수 190 μ L에 희석시킨 다음 Alkaline picrate solution 100 μ L을 첨가하여 실온에서 30분간 반응시킨 다음 490nm에서 흡광도를 측정하였다.

㉕ 뇨 중 urea nitrogen 정량

신장 기능과 밀접한 관련이 있는 urea nitrogen는 BUN 측정용 시액(Asan kit, Korea)을 사용하여 측정하였다. 뇨 중 존재하는 urea는 urease에 의해 분해되어 ammonia가 생성된다. 생성된 ammonia가 Sodium Hypochlorite에 의해 크로라민(NHCl)이 되고 nitroprusside의 축매작용에 의해 sodium salicylate과 반응시켜 청색의 indophenol이 생성된다. 이러한 원리를 이용하여 증류수로 20배 희석시킨 뇨 20 μ L에 효소시액 2mL을 가하여 25 ° C, 15분간 반응시킨 후 정색시액 2mL를 가한 다음 25 ° C, 15분간 반응시킨 후 580nm 청색색소의 흡광도를 측정하여 요소 표준용액과 비교하여 요소질소량을 구한다.

(5) 통계 분석

본 연구의 모든 실험결과는 SPSS 통계 프로그램을 사용하여 각 실험군당 평균과 표준오차로 나타내었고, 각 군간의 평균차이에 대한 유의성 검정은 one-way analysis of variance (ANOVA)를 이용하였다. 다군간의 차이는 Duncan's multiple range test에 의하여 $p < 0.05$ 수준에서 검정하였다(Steel and Torrie, 1960). 또한 각 군별 시험 전·후의 수치비교 및 대조군 대비 검정콩(서리태)및 주정추출물군과 대두콩및 주정추출물군의 수치비교를 위해 paired t-test를 실시하였다. P 값이 0.05 미만일 때 통계학적으로 의미가 있는 것으로 판단하였으며, 모든 측정값은 mean \pm S.E (standard error)와 함께 표시하여 나타내었다.

(6) 연구원의 역할

제 2협동 참여 연구원은 역할을 분담하여 인체시험을 진행하였으며, 대상자 방문일정 중 영양설문조사, 혈액채취 및 소변채취가 있는 0주차방문 및 12주차 방문에는 모든 연구원들이 협력하여 진행하였다. 또한 매주 전화 또는 문자로 불편사항 등을 체크하며 모니터링을 실시하였다.

2. 연구개발 수행 결과

가. 신체 계측 및 식사력 조사

(1) 피험자 군간 신체 계측치 비교

대상자들은 무작위배정으로 Placebo, SR 및 DD 총 3개의 군으로 나누어졌으며, 콩잎 주정추출물 및 위약대조군 섭취 전의 각 군의 성별, 연령, 나이 및 신체계측치는 Table 2와 같았다. 인체시험 실시 전 대상자들의 연령, 체중, 체질량지수(body mass index, BMI), 허리, 엉덩이 둘레 및 허리/엉덩이 둘레비(waist-hip ratio, WHR), 혈압 및 공복혈당(fasting blood glucose, FBG)은 군간 유의적 차이가 없었다.

Table 2. Baseline characteristics

	Placebo	SR	DD
N	18	22	21
Sex	Male	6	9
	Female	15	12
Age	50.11±1.93	50.27±1.48	51.33±1.26
Body weight (kg)	66.82±1.97	66.29±1.93	68.75±2.33
BMI (kg/m ²)	26.37±0.75	25.72±0.51	26.08±0.57
Systolic BP (mmHg)	127.00±4.41	128.27±2.79	133.37±4.21
Diasolic BP (mmHg)	76.36±2.90	76.71±2.11	76.95±3.18
Waist (cm)	87.36±2.58	85.42±1.30	86.31±1.29
Hip (cm)	101.10±1.79	97.20±0.67	98.20±0.84
WHR	0.86±0.022	0.88±0.010	0.88±0.010
FBG (mg/dL)	100.50±3.29	99.40±2.56	103.76±2.58

Values are the mean±S.E. Placebo, starch (2000mg/day); SR, black soybean leaf ethanol extract (2000mg/day); DD, soybean leaf ethanol extract (2000mg/day); BMI, Body mass index; BP, Blood pressure; WHR, Waist-hip ratio; FBG, Fasting blood glucose.

(2) 피험자 시험물질 복용 전·후 영양섭취량 조사

인체시험 시작 전과 12주 인체시험 후 24시간 회상법에 의해 조사된 평균 영양소 섭취량은 각각 Table 3과 Table 4와 같았다. 한국인 1인 1일 영양섭취기준과 비교하였을 때 인체시험 피험자의 영양소섭취량은 해당연령 기준 평균인 남자 2200kcal과 여성 1767kcal 보다 높은 섭취량을 보였으며, 단백질은 역시 높은 섭취량을 보였다. 지방 및 당질은 기준 범위내의 섭취량을 보였다. 하지만 식이섬유 섭취량이 권장량보다 약 1/3정도의 적은 섭취량을 보였으며, 칼슘은 기준치와 비슷한 섭취량을 나타냈으며, 인은 기준보다 높은 섭취량을 보였다. 비타민 B군의 경우 기준치와 비슷하거나 그 이상을 섭취하였으며, 비타민 C의 경우 권장섭취량보다 높은 섭취량을 보였다. 엽산(folate)의 경우 평균필요량 기준인 320 μ g/day 보다는 높은 섭취량을 보였지만 권장섭취량 기준인 400 μ g/day 보다 낮은 섭취량을 보였다. 비타민 E의 경우 충분섭취량 기준인 12mg/day 보다 높은 섭취량을 보였으며, 콜레스테롤의 경우 섭취기준인 300 mg/day 미만보다 약 1.5~2배가량 높은 섭취량을 보였다. 인체시험 시작 전·후 모든 군의 에너지, 단백질, 지질, 탄수화물, 주요 비타민과 무기질, 콜레스테롤 및 식이섬유소 섭취량은 유의적인 차이가 없었다.

Table 3. Nutrients intake in subjects with overweight or obesity by 24h dietary recall before the trial

	Placebo	SR	DD
Energy (kcal/day)	2296.44±61.23	2232.35±38.24	2264.97±48.67
Protein (g/day)	96.12±5.84	93.38±5.38	94.07±3.31
Fat (g/day)	66.51±4.77	60.07±4.42	54.84±4.29
Carbohydrate (g/day)	331.18±13.12	327.27±9.36	340.84±9.48
Fiber (g/day)	9.58±0.99	8.96±0.59	10.75±0.88
Ca (mg/day)	718.16±50.88	657.22±50.31	762.66±100.66
P (mg/day)	1316.25±48.18	1284.15±75.71	1401.23±93.95
Fe (mg/day)	18.65±0.86	17.93±0.72	18.81±0.85
Vit. B ₁ (mg/day)	1.37±0.11	1.39±0.15	1.38±0.12
Vit. B ₂ (mg/day)	1.46±0.07	1.56±0.13	1.40±0.11
Vit. B ₆ (mg/day)	3.43±0.26	3.25±0.18	3.46±0.28
Vit. C (mg/day)	111.61±9.33	138.23±10.38	109.00±9.76
Folate (μ g/day)	340.55±21.79	347.04±20.97	366.07±30.50
Vit. E (mg/day)	18.92±1.58	16.76±1.15	18.52±1.66
Cholesterol (mg/day)	585.90±53.24	575.37±51.33	547.96±55.42

Values are the mean±S.E. Placebo, starch (2000mg/day); SR, black soybean leaf ethanol extract (2000mg/day); DD, soybean leaf ethanol extract (2000mg/day).

Table 4. Nutrients intake in subjects with overweight or obesity by 24h dietary recall after the trial

	Placebo	SR	DD
Energy (kcal/day)	2241.60±46.46	2251.40±43.51	2234.21±38.66
Protein (g/day)	85.70±3.25	92.17±2.27	94.71±3.46
Fat (g/day)	56.17±4.06	67.13±3.07	61.78±3.32
Carbohydrate (g/day)	352.63±9.33	324.65±9.61	326.88±8.40
Fiber (g/day)	10.94±1.05	8.83±0.60	9.29±0.57
Ca (mg/day)	601.73±66.63	547.69±25.92	688.46±55.50
P (mg/day)	1217.14±51.14	1221.27±34.74	1331.98±64.14
Fe (mg/day)	18.02±1.03	17.44±0.56	17.87±0.56
Vit. B ₁ (mg/day)	1.36±0.08	1.63±0.12	1.46±0.09
Vit. B ₂ (mg/day)	1.46±0.08	1.51±0.08	1.50±0.07
Vit. B ₆ (mg/day)	3.28±0.19	2.96±0.12	3.17±0.18
Vit. C (mg/day)	117.02±13.00	116.32±9.04	94.16±8.22
Folate (µg/day)	346.63±27.23	320.11±19.78	327.69±26.06
Vit. E (mg/day)	19.56±2.28	20.53±2.02	18.36±1.39
Cholesterol (mg/day)	615.07±45.96	598.76±39.45	596.92±50.15

Values are the mean±S.E. Placebo, starch (2000mg/day); SR, black soybean leaf ethanol extract (2000mg/day); DD, soybean leaf ethanol extract (2000mg/day).

(3) 피험자 임상시험 전·후 체성분분석 변화 측정

12주간의 시험물질 복용 전·후 대상자들의 체중, 체질량지수(BMI), 체지방률(Body fat percentage, BFP), 허리 둘레, 엉덩이 둘레 및 허리/엉덩이 둘레비(waist-hip ratio, WHR) 측정결과는 Table 5 및 Figure 3와 같았다. 시험물질 복용 전·후 대상자들의 체중, 체질량지수(BMI) 및 체지방률은 군간 및 군내 차이를 보이지 않았다. 허리 둘레와 엉덩이 둘레는 모든 군에서 유의적인 감소를 보였으나 허리/엉덩이 둘레비는 제시된 바와 같이 콩잎 주정추출물군인 SR군과 DD군에서만 시험물질 복용 전보다 복용 후 유의적으로 감소하였다.

Table 5. Effect of black soybean leaf ethanol extract or soybean leaf ethanol extract supplementation for 12 weeks on changes of body weight, BFP, BMI, and WHR-related body measurements in subjects with overweight or obesity

		Placebo	SR	DD	p-value* (ANOVA)
Body weight (kg)	Before	66.82±1.97	66.29±1.93	68.75±2.33	0.679
	After	66.10±2.15	66.14±2.00	68.62±2.36	0.628
	p-value**	0.153	0.467	0.711	
BFP (%)	Before	31.66±1.31	30.91±1.10	30.58±1.22	0.817
	After	32.23±1.22	30.99±1.09	30.38±1.33	0.564
	p-value**	0.082	0.739	0.413	
BMI (kg/m ²)	Before	26.37±0.75	25.72±0.51	26.08±0.57	0.743
	After	26.26±0.78	25.66±0.54	26.00±0.57	0.796
	p-value**	0.162	0.455	0.410	
Waist (cm)	Before	87.36±2.58	85.42±1.30	86.31±1.29	0.735
	After	83.92±2.75	80.42±1.15	82.35±1.49	0.403
	p-value**	0.003	0.000	0.000	
Hip (cm)	Before	101.10±1.79	97.20±0.67	98.20±0.84	0.052
	After	97.14±1.63	94.78±0.72	95.82±1.13	0.403
	p-value**	0.002	0.000	0.005	
WHR	Before	0.86±0.022	0.88±0.010	0.88±0.010	0.738
	After	0.86±0.025	0.85±0.012	0.86±0.012	0.791
	p-value**	0.967	0.001	0.022	

Values are the mean±S.E. *ANOVA among 3 groups, **Paired t-test between before and after trial in each group. Placebo, starch (2000mg/day); SR, black soybean leaf ethanol extract (2000mg/day); DD, soybean leaf ethanol extract (2000mg/day); BFP, Body fat percentage; BMI, Body mass index; WHR, Waist-hip ratio.

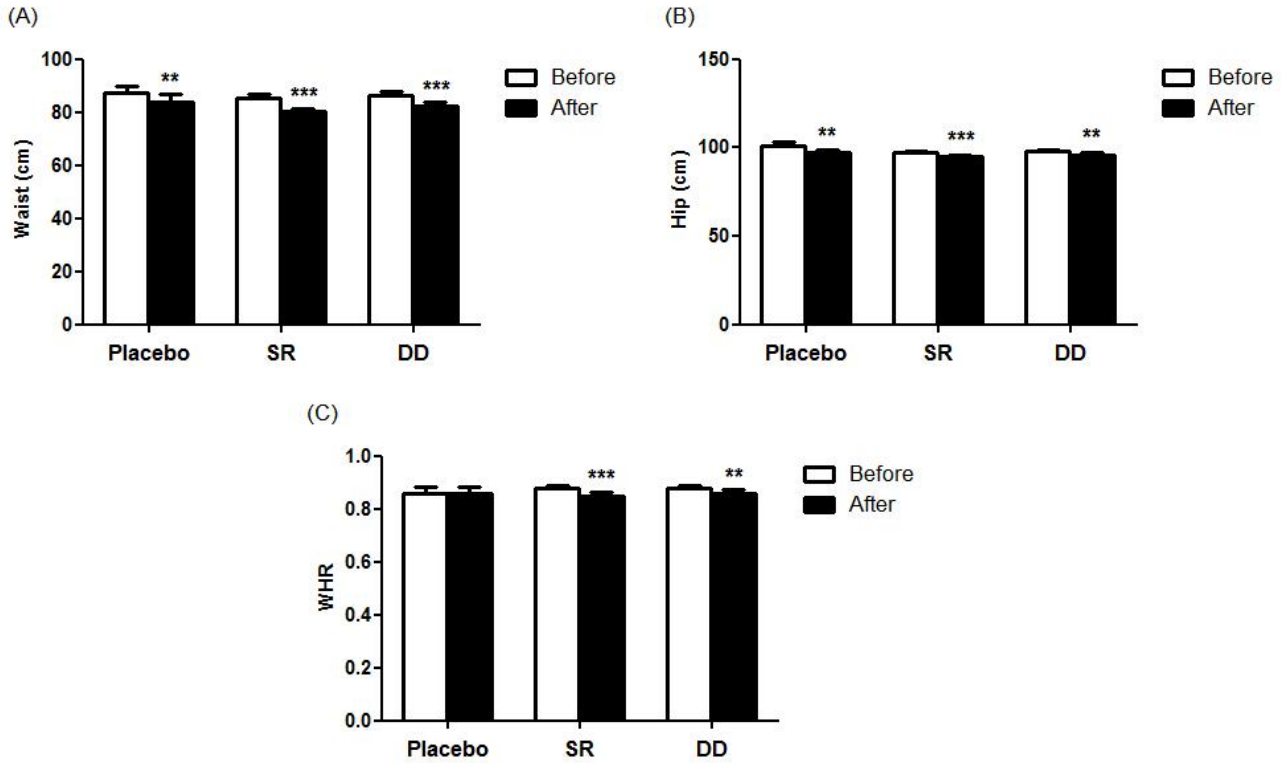


Figure 3. Effect of black soybean leaf ethanol extract or soybean leaf ethanol extract supplementation for 12 weeks on changes of waist circumference, hip circumference and WHR in subjects with overweight or obesity

Values are the mean±S.E. Paired t-test between before and after trial in each group. Significantly different between before and after trial in each group are indicated; *p < 0.05, **p < 0.01. Placebo, starch (2000mg/day); SR, black soybean leaf ethanol extract (2000mg/day); DD, soybean leaf ethanol extract (2000mg/day); FFA, free fatty acid.

나. 수축기 및 이완기 혈압

대상자들의 혈압 측정결과는 Table 6 및 Figure 4에 제시되어 있다. 수축기 혈압에서 시험 물질 복용 전·후 군간 비교에서는 유의적인 차이가 없었으며, 군내 비교에서 DD군에서 유의적으로 낮아졌다. 이완기 혈압에서는 시험물질 전·후 군간 및 군내 비교 시 유의적인 차이를 보이지 않았다.

Table 6. Effect of black soybean leaf ethanol extract or soybean leaf ethanol extract supplementation for 12 weeks on changes of blood pressure level in subjects with overweight or obesity.

		Placebo	SR	DD	p-value* (ANOVA)
Systolic BP (mmHg)	Before	127.00±4.41	128.27±2.79	133.37±4.21	0.461
	After	122.31±3.79	129.32±3.23	125.32±4.21	0.420
	p-value**	0.104	0.669	0.040	
Diastolic BP (mmHg)	Before	76.36±2.90	76.71±2.11	76.95±3.18	0.990
	After	74.21±2.57	76.81±2.29	76.48±3.26	0.809
	p-value**	0.068	0.952	0.841	

Values are the mean±S.E. *ANOVA among 3 groups, ** Paired t-test between before and after trial in each group. Placebo, starch (2000mg/day); SR, black soybean leaf ethanol extract (2000mg/day); DD, soybean leaf ethanol extract (2000mg/day); BP, Blood pressure.

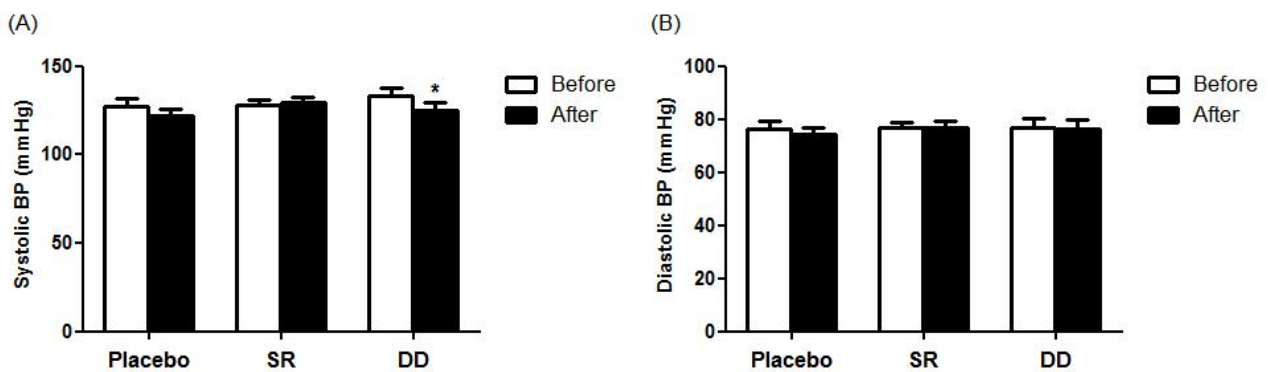


Figure 4. Effect of black soybean leaf ethanol extract or soybean leaf ethanol extract supplementation on supplementation on the levels of systolic blood pressure and diastolic blood pressure in subjects with overweight or obesity

Values are the mean±S.E. Paired t-test between before and after trial in each group. Significantly different between before and after trial in each group are indicated; *p < 0.05. Placebo, starch (2000mg/day); SR, black soybean leaf ethanol extract (2000mg/day); DD, soybean leaf ethanol extract (2000mg/day).

다. 혈장 지질 대사

(1) 혈장 중성지방, 유리지방산 및 인지질 농도

시험물질 복용 12주 전·후 혈장 중성지방, 유리지방산 및 인지질 농도는 Table 7 및 Figure 5과 같았다. 군내 비교에서 SR군 및 DD군에서 중성지방 농도는 시험물질 복용 전보다 복용 후에 유의적으로 감소하였다. 시험물질 복용 전·후 군간 비교에서는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 시험 물질 복용 전·후 군내 비교에서 혈장 유리지방산 농도는 SR군에서 복용 전보다 복용 후 유의적으로 감소하였으며, 군간 비교 시에는 유의적인 차이는 없었다. 한편 혈장 phospholipid 농도는 시험소재 복용 전·후 군간 및 군내 비교에서 유의적인 차이를 보이지 않았다.

Table 7. Effect of black soybean leaf ethanol extract or soybean leaf ethanol extract supplementation for 12 weeks on change of plasma triglyceride level in subjects with metabolic syndrome

		Placebo	SR	DD	<i>p-value*</i> (ANOVA)
Triglyceride (mmol/L)	Before	1.52±0.31	1.71±0.13	1.75±0.32	0.802
	After	1.64±0.44	1.35±0.10	1.37±0.19	0.692
	p-value**	0.450	0.003	0.043	
FFA (mmol/L)	Before	0.41±0.030	0.42±0.021	0.45±0.048	0.662
	After	0.46±0.47	0.37±0.021	0.44±0.043	0.149
	p-value**	0.312	0.046	0.727	
Phospholipid (mmol/L)	Before	1.60±0.055	1.62±0.035	1.62±0.065	0.954
	After	1.54±0.060	1.58±0.032	1.60±0.050	0.691
	p-value**	0.205	0.275	0.650	

Values are the mean±S.E. *ANOVA among 3 groups, ** Paired t-test between before and after trial in each group. Placebo, starch (2000mg/day); SR, black soybean leaf ethanol extract (2000mg/day); DD, soybean leaf ethanol extract (2000mg/day).

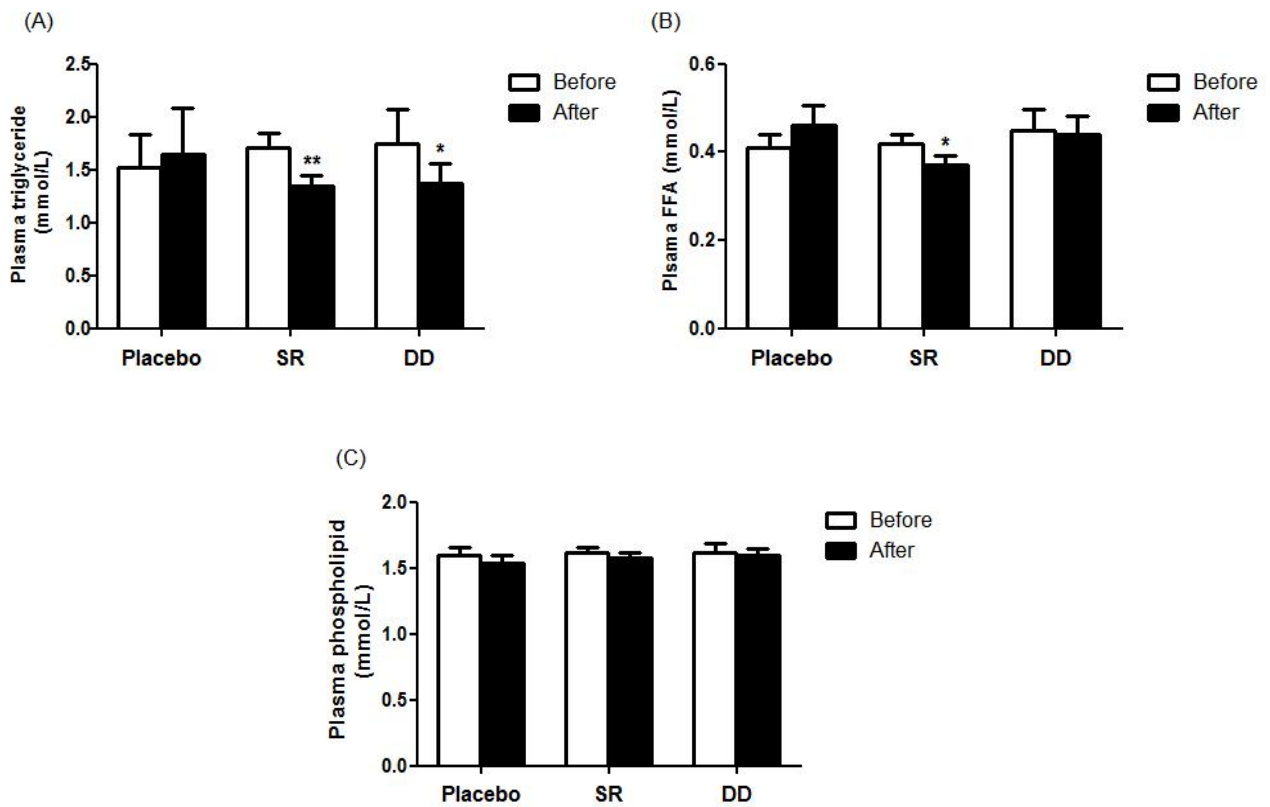


Figure 5. Effect of black soybean leaf ethanol extract or soybean leaf ethanol extract supplementation on the levels of the plasma triglyceride, free fatty acid and phospholipid in subjects with overweight or obesity

Values are the mean±S.E. Paired t-test between before and after trial in each group. Significantly different between before and after trial in each group are indicated; *p < 0.05, **p < 0.01. Placebo, starch (2000mg/day); SR, black soybean leaf ethanol extract (2000mg/day); DD, soybean leaf ethanol extract (2000mg/day); FFA, free fatty acid.

(2) 혈장 콜레스테롤 농도 및 HTR, AI 지수

시험물질 복용 12주 전·후 혈장 총 콜레스테롤 농도, HDL-콜레스테롤 농도, 총 동맥경화지수(atherogenic index, AI) 변화는 다음 Table 8 및 Figure 6과 같았다. 시험 물질 복용 전·후 혈장 총 콜레스테롤 농도는 시험물질 복용 전·후 군간 및 군내 비교에서 유의적인 차이는 없었으나, 혈장 HDL-콜레스테롤과 총 콜레스테롤에 대한 HDL-콜레스테롤의 비율(HTR)은 군내 비교시 시험물질 복용 후 SR군 및 DD군에서 유의적으로 높아졌으며, 동맥경화지수(AI) 또한 SR군 및 DD군에서 시험물질 복용 후 복용 전보다 유의적으로 감소하였다. 시험물질 복용 전·후 군간 총 콜레스테롤에 대한 HDL-콜레스테롤의 비율(HTR)과 동맥경화지수(AI) 비교에서는 유의적인 차이를 보이지 않았다.

Table 8. Effect of black soybean leaf ethanol extract or soybean leaf ethanol extract supplementation for 12 weeks on change of plasma total cholesterol, HDL-cholesterol, HTR and AI level in subjects with metabolic syndrome

		Placebo	SR	DD	<i>p-value*</i> (ANOVA)
Total-cholesterol (mmol/L)	Before	4.86±0.24	4.93±0.19	4.78±0.26	0.902
	After	4.99±0.31	4.97±0.15	4.97±0.18	0.997
	p-value**	0.570	0.780	0.400	
HDL-cholesterol (mmol/L)	Before	1.98±0.10	1.98±0.069	2.04±0.20	0.927
	After	2.04±0.12	2.21±0.071	2.34±0.19	0.260
	p-value**	0.607	0.000	0.003	
HTR (%)	Before	42.30±3.47	40.76±1.59	42.34±2.85	0.871
	After	41.99±2.69	44.89±1.78	47.05±3.52	0.424
	p-value**	0.851	0.012	0.015	
AI	Before	1.55±0.21	1.52±0.10	1.47±0.20	0.169
	After	1.53±0.22	1.28±0.081	1.22±0.17	0.134
	p-value**	0.896	0.003	0.006	

Values are the mean±S.E. *ANOVA among 3 groups, ** Paired t-test between before and after trial in each group. Placebo, starch (2000mg/day); SR, black soybean leaf ethanol extract (2000mg/day); DD, soybean leaf ethanol extract (2000mg/day); HDL, High density lipoprotein; HTR, (HDL-C/Total-C)×100; AI, Atherogenic index, [(Total-C)-(HDL-C)]/HDL-C.

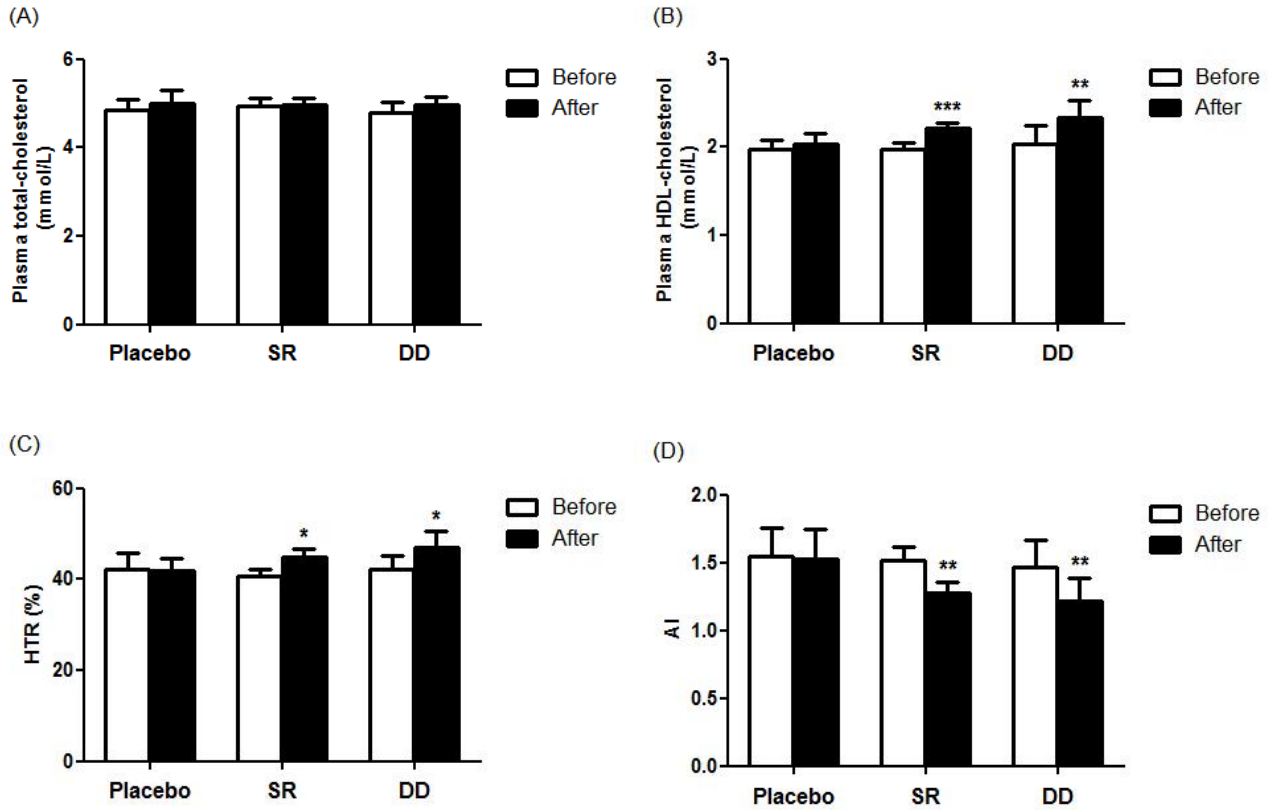


Figure 6. Effect of black soybean leaf ethanol extract or soybean leaf ethanol extract supplementation on change of plasma total-cholesterol, HDL-cholesterol, HTR and AI level in subjects with overweight or obesity.

Values are the mean±S.E. Paired t-test between before and after trial in each group. Significantly different between before and after trial in each group are indicated; *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001. Placebo, starch (2000mg/day); SR, black soybean leaf ethanol extract (2000mg/day); DD, soybean leaf ethanol extract (2000mg/day); HDL, High density lipoprotein; HTR, (HDL-C/Total-C)×100; AI, Atherogenic index, [(Total-C)-(HDL-C)]/HDL-C.

(3) 혈장 apolipoprotein A- I 및 apolipoprotein 농도

시험물질 복용 12주 전·후 혈장 apolipoprotein A- I 및 apolipoprotein B 농도 다음 Table 9 및 Figure 7와 같았다. 시험 물질 복용 전·후 군내 비교에서 apolipoprotein A- I 의 농도는 시험물질 복용 전보다 복용 후 모든 군에서 유의적으로 증가하였으며 콩잎추출물군인 SR군과 DD군에서 더 높은 유의성을 보이는 것을 확인할 수 있었다. Apolipoprotein B 농도는 군내 비교에서 SR군에서 복용 전보다 복용 후 유의적으로 감소하였다. 시험물질 복용 전·후 기간 apolipoprotein A- I 과 apolipoprotein B 농도 비교에서는 유의적인 차이를 보이지 않았다.

Table 9. Effect of black soybean leaf ethanol extract or soybean leaf ethanol extract supplementation for 12 weeks on change of plasma Apo A-1 and Apo B level in subjects with metabolic syndrome

		Placebo	SR	DD	<i>p-value*</i> (ANOVA)
Apo A I (mg/dL)	Before	129.79±3.47	118.56±2.15	128.78±5.08	0.097
	After	140.00±5.10	147.99±3.57	151.29±6.49	0.233
	<i>p-value**</i>	0.022	0.000	0.000	
Apo B (mg/dL)	Before	76.79±3.94	85.76±3.36	89.37±4.34	0.076
	After	76.26±4.06	79.07±2.44	85.06±4.42	0.252
	<i>p-value**</i>	0.752	0.040	0.088	

Values are the mean±S.E. *ANOVA among 3 groups, **Paired t-test between before and after trial in each group. Placebo, starch (2000mg/day); SR, black soybean leaf ethanol extract (2000mg/day); DD, soybean leaf ethanol extract (2000mg/day); apo A- I, apolipoprotein A- I; apo-B, apolipoprotein B.

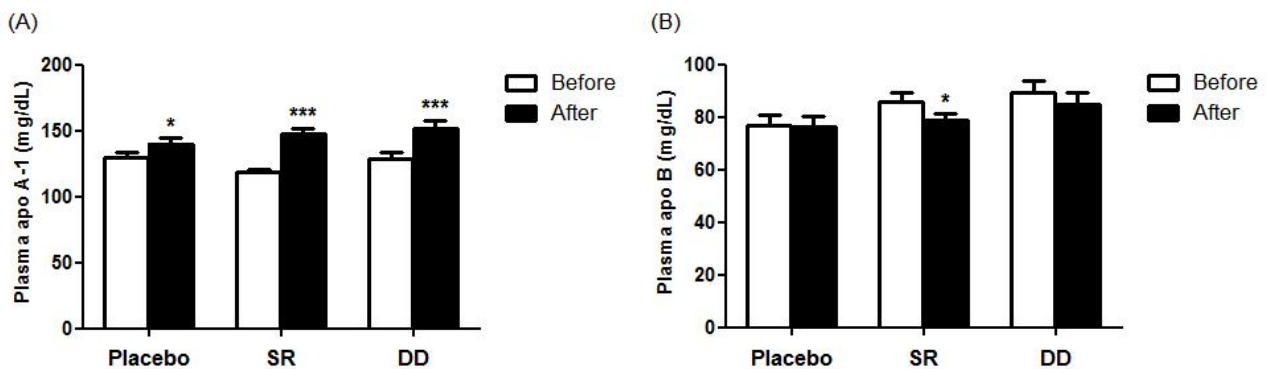


Figure 7. Effect of black soybean leaf ethanol extract or soybean leaf ethanol extract supplementation on change of plasma apolipoprotein A- I and apolipoprotein B level in subjects with overweight or obesity.

Values are the mean±S.E. Paired t-test between before and after trial in each group. Significantly different between before and after trial in each group are indicated; **p* < 0.05, ****p* < 0.001. Placebo, starch (2000mg/day); SR, black soybean leaf ethanol extract (2000mg/day); DD, soybean leaf ethanol extract (2000mg/day); apo A- I, apolipoprotein A- I; apo-B, apolipoprotein B.

(4) 혈장 cytokines 수준

시험물질 복용 12주 전·후 염증 유발 cytokine인 monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), interleukin-6 (IL-6) 및 항염증 cytokine인 interleukin-10 (IL-10) 농도는 다음 Table 10 및 Figure 8과 같았다. 시험 물질 복용 전·후 군내 비교에서 MCP-1 농도는 SR군에서 복용 전보다 복용 후 유의적으로 감소하였으며, 혈장 PAI-1은 SR군과 DD군에서 유의적으로 감소하였고, 혈장 IL-6 농도는 DD군에서 복용 전보다 복용 후 유의적으로 감소하였다. MCP-1, PAI-1 및 IL-6 의 시험물질 복용 전·후 군간 비교 시에는 유의적인 차이는 없었다. 한편 IL-10의 경우 시험물질 복용 전·후 군내 및 군간 비교에서 유의적인 차이를 보이지 않았다.

Table 10. Effect of black soybean leaf ethanol extract or soybean leaf ethanol extract supplementation for 12 weeks on change of plasma MCP-1, IL-6 and IL-10 level in subjects with metabolic syndrome

		Placebo	SR	DD	<i>p-value*</i> (ANOVA)
MCP-1 (ng/mL)	Before	0.15±0.019	0.15±0.019	0.15±0.021	0.999
	After	0.15±0.020	0.12±0.017	0.14±0.022	0.594
	p-value**	0.974	0.040	0.755	
PAI-1 (ng/mL)	Before	9.40±1.73	12.84±1.88	11.72±1.90	0.406
	After	8.69±1.72	9.26±1.12	9.63±1.95	0.917
	p-value**	0.176	0.035	0.038	
IL-6 (pg/mL)	Before	16.37±2.81	20.64±7.42	20.70±8.78	0.909
	After	11.61±3.02	15.67±5.23	12.69±7.01	0.871
	p-value**	0.184	0.206	0.040	
IL-10 (pg/mL)	Before	24.71±6.37	19.97±8.28	21.96±7.13	0.903
	After	24.06±6.13	20.58±7.89	23.04±7.31	0.939
	p-value**	0.880	0.725	0.824	

Values are the mean±S.E. *ANOVA among 3 groups, **Paired t-test between before and after trial in each group. Placebo, starch (2000mg/day); SR, black soybean leaf ethanol extract (2000mg/day); DD, soybean leaf ethanol extract (2000mg/day); MCP-1, monocyte chemotactic protein-1; PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1; IL-6, interleukin-6; IL-10, interleukin-10.

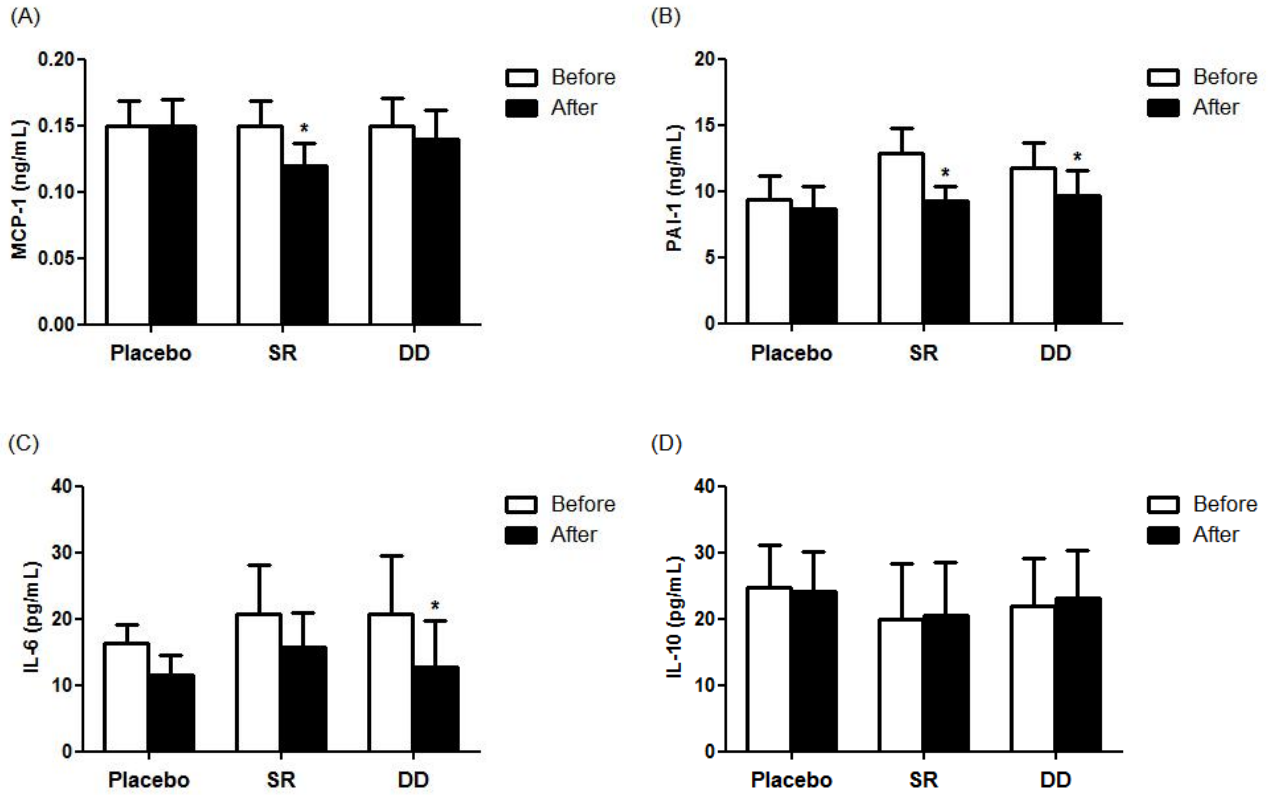


Figure 8. Effect of black soybean leaf ethanol extract or soybean leaf ethanol extract supplementation on change of MCP-1, PAI-1, IL-6 and IL-10 level in subjects with overweight or obesity.

Values are the mean±S.E. Paired t-test between before and after trial in each group. Significantly different between before and after trial in each group are indicated; *p < 0.05. Placebo, starch (2000mg/day); SR, black soybean leaf ethanol extract (2000mg/day); DD, soybean leaf ethanol extract (2000mg/day); MCP-1, monocyte chemotactic protein-1; PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1; IL-6, interleukin-6; IL-10, interleukin-10.

(5) 혈장 adipokines 수준

시험물질 복용 12주 전·후 혈장 adiponectin, resistin 및 leptin 농도는 다음 Table 11 and Figure 9와 같았다. 시험 물질 복용 전·후 군내 비교에서 혈장 adiponectin 농도는 SR군에서 복용 전보다 복용 후 유의적으로 증가하였다. 시험물질 복용 전·후 혈장 adiponectin 농도의 군간 비교에서는 유의적 차이를 보이지 않았다. 시험물질 복용 전·후 군내 비교에서 혈장 resistin 농도는 SR군에서 복용 전보다 복용 후 유의적으로 감소하였다. 시험물질 복용 전 군간 비교시 SR군이 Placebo군과 DD군에 비하여 높았으나 시험물질 복용 후 SR군의 수치가 감소되면서 군간 차이가 없어졌다. 한편 leptin의 경우 시험물질 복용 전·후 군내 및 군간 비교에서 유의적인 차이가 나타나지 않았다.

Table 11. Effect of black soybean leaf ethanol extract or soybean leaf ethanol extract supplementation for 12 weeks on change of plasma adiponectin, leptin and resistin level in subjects with metabolic syndrome

		Placebo	SR	DD	<i>p-value*</i> (ANOVA)
Adiponectin (ng/mL)	Before	35.47±3.98	28.36±2.99	31.63±4.78	0.398
	After	34.29±3.46	31.16±3.38	30.18±4.75	0.734
	p-value**	0.572	0.034	0.391	
Resistin (ng/mL)	Before	2.93±0.35 ^a	4.93±0.56 ^b	3.47±0.47 ^a	0.012
	After	2.98±0.30	4.23±0.51	3.30±0.41	0.092
	p-value**	0.769	0.009	0.227	
Leptin (ng/mL)	Before	8.41±1.50	9.33±1.27	8.10±1.58	0.847
	After	8.46±1.73	10.37±1.60	8.70±1.97	0.741
	p-value**	0.938	0.200	0.438	

Values are the mean±S.E. *ANOVA among 3 groups, **Paired t-test between before and after trial in each group. Placebo, starch (2000mg/day); SR, black soybean leaf ethanol extract (2000mg/day); DD, soybean leaf ethanol extract (2000mg/day).

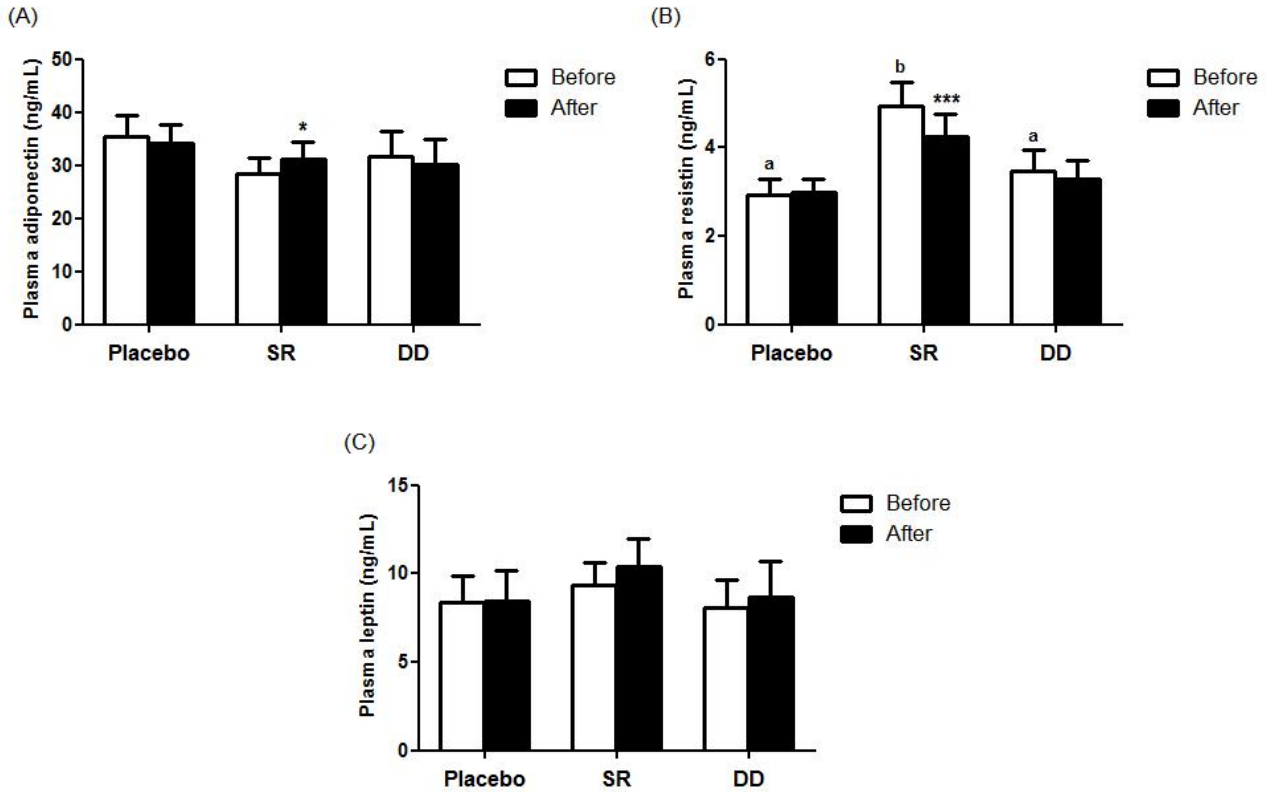


Figure 9. Effect of black soybean leaf ethanol extract or soybean leaf ethanol extract supplementation on change of MCP-1, IL-6 and IL-10 level in subjects with overweight or obesity.

Values are the mean±S.E. Paired t-test between before and after trial in each group. Significantly different between before and after trial in each group are indicated; * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. abmeans not sharing common letters that are significantly different among groups at $p < 0.05$. Placebo, starch (2000mg/day); SR, black soybean leaf ethanol extract (2000mg/day); DD, soybean leaf ethanol extract (2000mg/day).

라. 전혈 및 혈장의 당 대사 지표

(1) 공복혈당 및 혈장 glucose 농도

시험물질 복용 12주 전·후 공복혈당(fasting blood glucose, FBG) 및 혈장 glucose 농도는 다음 Table 12과 같았다. 공복혈당 및 혈장 glucose 농도는 시험물질 복용 전·후 군간 및 군내 비교에서 유의적인 차이는 없었다.

Table 12. Effect of black soybean leaf ethanol extract or soybean leaf ethanol extract supplementation for 12 weeks on change of plasma fasting whole blood glucose and plasma glucose concentrations in subjects with metabolic syndrome

		Placebo	SR	DD	<i>p-value*</i> (ANOVA)
FBG (mg/dL)	Before	100.50±3.29	99.40±2.56	103.76±2.58	0.515
	After	100.34±2.78	101.03±2.34	105.50±3.37	0.392
	p-value**	0.938	0.280	0.370	
Plasma glucose (mmol/L)	Before	5.36±0.20	5.25±0.08	5.22±0.09	0.738
	After	5.42±0.18	5.32±0.09	5.31±0.12	0.793
	p-value**	0.502	0.267	0.280	

Values are the mean±S.E. *ANOVA among 3 groups, **Paired t-test between before and after trial in each group. Placebo, starch (2000mg/day); SR, black soybean leaf ethanol extract (2000mg/day); DD, soybean leaf ethanol extract (2000mg/day); FBG, fasting blood glucose.

(2) Glucose-regulating hormone 및 HOMA-IR

시험물질 복용 12주 전·후 혈장 insulin, C-peptide, gastric inhibitory polypeptide (GIP) 및 homeostatic model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) 수치는 다음 Table 13과 같았다. 혈장 insulin, C-peptide, GIP 및 homeostatic model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) 수치는 시험물질 복용 전·후 군간 및 군내 비교에서 유의적인 차이가 없었다.

Table 13. Effect of black soybean leaf ethanol extract or soybean leaf ethanol extract supplementation for 12 weeks on change of plasma insulin, C-peptide concentrations and HOMA-IR in subjects with metabolic syndrome

		Placebo	SR	DD	<i>p-value*</i> (ANOVA)
Insulin (ng/mL)	Before	205.94±30.86	198.79±21.35	182.06±49.82	0.881
	After	214.75±42.56	189.21±22.71	186.48±48.67	0.780
	p-value**	0.694	0.634	0.644	
C-peptide (pmol/L)	Before	491.27±48.95	567.66±39.05	515.01±46.63	0.535
	After	476.49±51.93	574.77±31.52	531.86±51.52	0.387
	p-value**	0.603	0.778	0.463	
GIP (ng/mL)	Before	0.29±0.049	0.23±0.059	0.25±0.033	0.683
	After	0.32±0.065	0.25±0.056	0.25±0.028	0.525
	p-value**	0.349	0.269	0.865	
HOMA-IR	Before	1.07±0.21	1.34±0.21	1.25±0.41	0.723
	After	1.07±0.24	1.16±0.10	1.28±0.40	0.840
	p-value**	0.969	0.265	0.747	

Values are the mean±S.E. *ANOVA among 3 groups, **Paired t-test between before and after trial in each group. Placebo, starch (2000mg/day); SR, black soybean leaf ethanol extract (2000mg/day); DD, soybean leaf ethanol extract (2000mg/day); GIP, gastric inhibitory polypeptide; HOMA-IR, homeostatic model assessment of insulin resistance.

마. 적혈구의 항산화 대사 지표

(1) 적혈구 항산화 효소 활성화도

12 주간의 시험 물질 복용 전·후 적혈구 항산화 효소 활성화도 측정결과는 Table 14 및 Figure 10과 같았다. 시험물질 복용 전·후 군내 비교에서 적혈구 superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) 및 glutathione reductase (GR) 활성화도는 SR군 및 DD군에 서 시험물질 복용 전에 비해 복용 후 유의적으로 증가하였다. 특히 시험물질 복용 후 군간 비교에서 DD군은 적혈구 SOD 및 GR 활성화도가 Placebo군에 비해 유의적으로 증가하였으며, SR군은 적혈구 GR 활성화도를 위약대조군인 Placebo군에 비해 유의적으로 증가시켰다. 시험물질 복용 전·후 군내 및 군간 비교에서 적혈구 glutathione peroxidase (GSH-Px)활성도는 유의적인 차이는 없었다.

Table 14. Effect of black soybean leaf ethanol extract or soybean leaf ethanol extract supplementation for 12 weeks on changes of erythrocytic antioxidant enzymes activities in subjects with metabolic syndrome

		Placebo	SR	DD	<i>p-value*</i> (ANOVA)
SOD (unit/mg Hb)	Before	2.11±0.057	2.02±0.043	2.09±0.066	0.505
	After	2.12±0.071 ^a	2.18±0.064 ^a	2.40±0.059 ^b	0.007
	p-value**	0.926	0.029	0.003	
CAT (umol/min/mg Hb)	Before	17.71±0.50	17.83±0.30	18.05±0.30	0.764
	After	18.56±0.42	19.52±0.29	19.28±0.30	0.136
	p-value**	0.104	0.000	0.004	
GR (nmol/min/mg Hb)	Before	5.07±0.44	5.33±0.26	5.21±0.26	0.853
	After	5.83±0.33 ^a	7.80±0.28 ^b	7.28±0.24 ^b	0.000
	p-value**	0.275	0.000	0.000	
GSH-Px (nmol/min/mg Hb)	Before	8.42±0.20	8.05±0.37	8.37±0.30	0.643
	After	8.57±0.19	8.24±0.20	8.26±0.26	0.498
	p-value**	0.661	0.618	0.662	

Values are the mean±S.E. *ANOVA among 3 groups, **Paired t-test between before and after trial in each group. Placebo, starch (2000mg/day); SR, black soybean leaf ethanol extract (2000mg/day); DD, soybean leaf ethanol extract (2000mg/day); SOD, superoxidase dismutase; CAT, catalase; GR, glutathione reductase; GSH-Px, glutathione peroxidase.

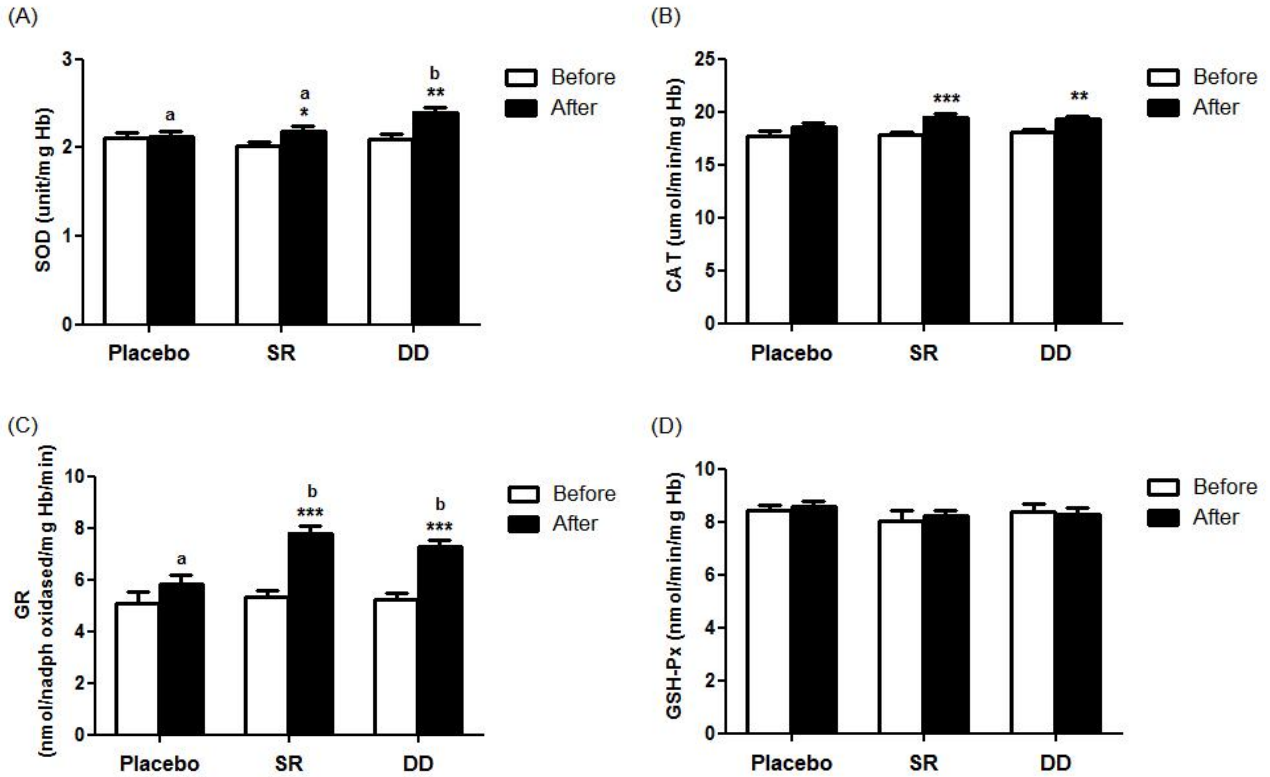


Figure 10. Effect of black soybean leaf ethanol extract or soybean leaf ethanol extract on change of erythrocytic antioxidant enzyme activities in subjects with overweight or obesity

Values are the mean±S.E. Paired t-test between before and after trial in each group. Significantly different between before and after trial in each group are indicated; *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001. ^{ab}means not sharing common letters that are significantly different among groups at p < 0.05. Placebo, starch (2000mg/day); SR, black soybean leaf ethanol extract (2000mg/day); DD, soybean leaf ethanol extract (2000mg/day); SOD, superoxidase dismutase; CAT, catalase; GR, glutathione reductase; GSH-Px, glutathione peroxidase.

(2) 지질과산화물 농도

12주간의 시험 물질 복용 전·후 적혈구 지질과산화물 함량 측정결과는 Table 15 및 Figure 11와 같았다. 시험물질 복용 전·후 군내 비교에서 thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) 수준은 시험물질 복용 후 SR군과 DD군에서 유의적으로 감소하였다. TBARS의 군간 비교에서는 시험물질 복용 전 SR군이 제일 낮고 그 다음으로 Placebo군, DD군 순으로 높았다. 하지만 시험물질 복용 후에는 Placebo군이 가장 높고, SR군과 DD군이 유의적으로 낮았다.

Table 15. Effect of black soybean leaf ethanol extract or soybean leaf ethanol extract supplementation for 12 weeks on changes of erythrocytic TBARS level in subjects with metabolic syndrome

		Placebo	SR	DD	<i>p</i> -value* (ANOVA)
TBARS (nmol/mg Hb)	Before	0.82±0.044 ^{ab}	0.86±0.048 ^b	0.72±0.025 ^a	0.045
	After	0.79±0.047 ^b	0.68±0.025 ^a	0.63±0.020 ^a	0.002
	<i>p</i> -value**	0.662	0.003	0.000	

Values are the mean±S.E. *ANOVA among 3 groups, **Paired t-test between before and after trial in each group. Placebo, starch (2000mg/day); SR, black soybean leaf ethanol extract (2000mg/day); DD, soybean leaf ethanol extract (2000mg/day); TBARS, thiobarbituric acid reactive substances.

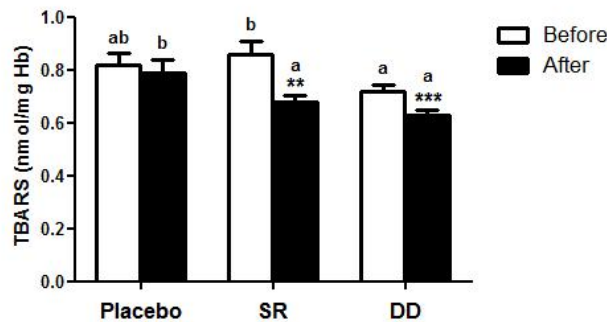


Figure 11. Effect of black soybean leaf ethanol extract or soybean leaf ethanol extract on change of erythrocytic TBARS level in subjects with overweight or obesity

Values are the mean±S.E. Paired t-test between before and after trial in each group. Significantly different between before and after trial in each group are indicated; ***p* < 0.01, ****p* < 0.001. ^{ab}means not sharing common letters that are significantly different among groups at *p* < 0.05. Placebo, starch (2000mg/day); SR, black soybean leaf ethanol extract (2000mg/day); DD, soybean leaf ethanol extract (2000mg/day); TBARS, thiobarbituric acid reactive substances.

바. 간 독성 및 신장 기능 관련 지표

12주간의 시험 물질 복용 전·후 간 독성 및 신장 기능 관련 지표 측정결과는 Table 16과 같았다. 시험소재 복용 전·후 간독성 관련지표인 혈장 glutamic oxaloacetic transaminase (GOT)는 모두 정상 기준치 이내의 수치를 보였으며, 군내 비교에서는 유의적인 변화는 없었으나 시험물질 복용 후 군간 비교에서 유의적인 차이를 보였다. 혈장 glutamic pyruvic transaminase (GPT)의 경우에도 모두 정상 기준치 이내의 수치를 보였으며, 시험소재 복용 전후 군간 비교에서는 유의적인 차이가 없었으나 군내 비교에서는 DD군에서 시험복용 전보다 후에 유의적으로 감소하였다. 혈장 albumin 농도는 시험물질 복용 후 군내 비교시 Placebo군에서 유의적으로 증가하였고, 군간 비교에서는 차이가 없었다. 신장기능 관련지표인 뇨중 크레아티닌(creatinine) 및 뇨중 요소질소(urinary urea nitrogen)은 시험소재 군간 및 군내 비교에서 변화가 관찰되지 않았다.

Table 16. Effect of black soybean leaf ethanol extract or soybean leaf ethanol extract supplementation for 12 weeks on changes of plasma GOT, plasma GPT, urine BUN and plasma albumin levels in subjects with metabolic syndrome

		Placebo	SR	DD	<i>p-value*</i> (ANOVA)
Plasma GOT (Karmen/mL)	Before	14.22±1.24	11.06±0.65	15.67±2.16	0.063
	After	15.29±0.95 ^{ab}	13.00±0.87 ^a	17.65±1.65 ^b	0.031
	p-value**	0.228	0.080	0.184	
Plasma GPT (Karmen/mL)	Before	19.13±1.52	22.07±1.29	24.89±2.48	0.093
	After	20.07±1.65	20.56±0.76	21.68±1.87	0.733
	p-value**	0.434	0.211	0.031	
Plasma Albumin (g/dL)	Before	4.80±0.041	4.86±0.032	4.85±0.042	0.491
	After	4.97±0.032	4.97±0.049	4.93±0.033	0.736
	p-value**	0.000	0.066	0.123	
Urine Creatinine (g/day)	Before	1.48±0.23	1.42±0.15	1.44±0.19	0.975
	After	1.43±0.18	1.24±0.071	1.55±0.16	0.338
	p-value**	0.707	0.174	0.442	
Urinary urea nitrogen (mmol/L)	Before	240.37±22.43	249.98±21.12	247.18±31.36	0.966
	After	220.36±26.69	230.05±14.99	251.32±27.01	0.647
	p-value**	0.187	0.111	0.739	

Values are the mean±S.E. *ANOVA among 3 groups, ** Paired t-test between before and after trial in each group. Placebo, starch (2000mg/day); SR, black soybean leaf ethanol extract (2000mg/day); DD, soybean leaf ethanol extract (2000mg/day); GOT, glutamic oxaloacetic transaminase; GPT, glutamic pyruvic transaminase.

사. 인체시험 최종보고서 생명윤리 승인 획득

[생명윤리 승인신청 심의결과 통보]

연구 과제명	국문	식용 가능 식물잎으로부터 우수 항당뇨 천연 신소재 개발 및 제품화		
	영문	Development and commercialization of excellent anti-diabetic natural materials from edible plant leaves		
연구 책임자	성명	직위		소속
	최명숙	교수		생활과학대학
심사결과	승인			
심사일자				
승인일자	20170126	승인번호		2015-0032
지속심의일정 (지속심의 보고서 일정)	해당없음			
종료보고서 일정	해당없음			
심사결과 내용				
<p>상기 연구계획을 본 위원회의 규정에 따라 심의하여 결과를 통보합니다.</p> <p>경북대학교 생명윤리심의위원회</p>				

인체시험 결과의 최종 요약 및 결론

- 본 연구과제의 검정콩잎 및 대두콩잎 주정추출물의 섭취용량은 항당뇨 및 항비만 효과를 검증한 제1세부과제의 실험결과 (*in vitro* 및 *in vivo* 동물실험)를 바탕으로 설정하였고, 이에 대한 인체유효성을 평가하고자 인체시험을 실시하였다.
- 인체시험은 경미한 고혈당을 동반하는 과체중 또는 비만인 61명을 대상으로 진행되었고, 12주간의 시험물질 복용 후 혈당과 혈중 지질 개선 및 항비만 등의 대사증후군 효능 평가를 위한 바이오마커를 측정 후 결과분석을 실시하였다.
- 신체계측 및 체지방 측정 결과, 검정콩잎 및 대두콩잎 주정추출물 복용 후 복용전보다 허리 둘레, 엉덩이 둘레 및 WHR이 유의적으로 낮아졌으며, 수축기 혈압에서 대두콩잎 주정추출물 복용한 군에서 혈압 측정 결과 복용 후 복용 전보다 유의적으로 감소하였다.
- 지질대사관련 인자에서 검정콩잎 및 대두콩잎 주정추출물 복용 후 복용전보다 HDL-콜레스테롤, HTR 및 apo A-1이 유의적으로 증가하였으며, 동맥경화 인자인 AI지수는 유의적으로 낮아졌다. 또한 검정콩잎 주정추출물을 섭취한 군에서 시험물질 복용 전 대비 복용 후 혈장 FFA 및 apo B가 유의적으로 감소하였다.
- 지방세포 분비 호르몬 분석결과에서 검정콩잎 주정추출물 복용군에서 시험물질 복용전 대비 복용 후 혈장 adiponectin이 유의적으로 상승하였으며, resistin이 유의적으로 감소하였다.
- 염증성 cytokine 분석 결과 중 MCP-1이 검정콩잎 주정추출물 복용 후, 복용 전에 비하여 유의적으로 감소하였으며, 대두콩잎 주정추출물 복용전 대비 복용후 IL-6가 유의적으로 감소하

였다. 또한 검정콩잎 및 대두콩잎 주정추출물 복용 후, 복용전 대비 PAI-1이 유의적으로 감소하였다.

○ 적혈구 항산화 효소 활성도 과산화물 측정 결과, SOD, CAT 및 GR 활성도가 검정콩잎 및 대두콩잎 주정추출물 섭취 후 증가되었으며, 지질과산화물 (TBARS)이 검정콩잎 및 대두콩잎 주정추출물을 섭취한 군에서만 유의적으로 감소하는 효과를 보였다.

○ 따라서, 본 인체시험 결과를 종합해 볼 때 콩잎 주정추출물은 혈중 지질 대사를 개선시키고, 항산화효소 활성, 지방세포 호르몬 및 염증인자분비 조절에 효과적으로 작용해 대사증후군 개선에 유효한 소재임이 입증되었으며 새로운 기능성 식품소재로 개발가능성이 크다고 판단된다.

제 4 절 연구개발 성과

1. 특허

특허 등록				
등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2014	테로카판계 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 대사성 질환 또는 이들의 합병증의 예방 또는 치료용, 또는 항산화용 조성물	한국생명공학(연)	대한민국	10-1415167
2016	Composition for preventing and treating obesity, hyperlipidemia, atherosclerosis, fatty liver, diabetes or metabolic syndrome containing extracts of Glycine max leaves or fractions isolated from the same as an active ingredient	한국생명공학(연)	미국	US 9,381,222 B2
2016	페어퍼바이드계 화합물 또는 이의 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 대사성 질환 또는 이들의 합병증의 예방 또는 치료용 조성물	한국생명공학(연)	대한민국	10-1638776

특허 출원				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호
2014	코우메스탄계 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 대사성 질환 또는 이들의 합병증의 예방 또는 치료용, 또는 항산화용 조성물	한국생명공학(연)	대한민국	10-2014-0131540
2015	로즈허브 추출물, 이의 분획물 및 이로부터 분리한 화합물을 유효성분으로 함유하는 대사증후군의 예방 또는 치료용, 또는 항산화용 조성물	한국생명공학(연)	대한민국	10-2015-0095716
2015	검정콩잎 추출물, 이의 분획물 및 이로부터 분리한 플라보놀배당체를 유효성분으로 함유하는 대사증후군의 예방 또는 치료용, 또는 항산화용 조성물	한국생명공학(연)	대한민국	10-2015-0116974
2016	검정콩잎 추출물, 이의 분획물 및 이로부터 분리한 플라보놀배당체를 유효성분으로 함유하는 대사증후군의 예방 또는 치료용, 또는 항산화용 조성물	한국생명공학(연)	PCT	PCT/KR2016/009163

2. 논문

게재연도	논문명	저자명	학술지명	Vol.(No.), page	국명	SCI구분 (IF)
2014	The adipokine Retnla modulates cholesterol homeostasis in hyperlipidemic mice	이미란, 정태숙, 오구택 외 17인	Nature Communication	5: 4410	영국	SCI (12.001)
2014	Flavonoids from <i>Lindera glauca</i> Blume as low-density lipoprotein oxidation inhibitors	허규원, 박지혜, 강지현, 정태숙, 강희철, 백남인,	Natural Product Research	28(11): 831-834	영국	SCIE (1.117)
2014	Pterocarpin-enriched soy leaf extract ameliorates insulin sensitivity and pancreatic β -cell proliferation in type 2 diabetic mice	김언희, 윤정현, 이화, 강지현, 지현선, 박기훈, 신동하, 박호용, 정태숙	Molecules	19(11): 18493-18510	스위스	SCIE (2.749)
2015	Anti-obesity effects of soy leaf via regulation of adipogenic transcription factors and fat oxidation in diet-induced obese mice and 3T3-L1 adipocytes	이화, 강지현, 한종민, 조문희, 정영진, 박기훈, 신동하, 박호용, 최명숙, 정태숙	Journal of Medicinal Food	18(8): 899-908	미국	SCI (1.864)
2015	Soy leaf extract containing kaempferol glycosides and pheophorbides improves glucose homeostasis by enhancing pancreatic β -cell function and suppressing hepatic lipid accumulation in <i>db/db</i> mice	이화, 지현선, 강지현, 신동하, 박호용, 최명숙, 이철호, 이인경, 윤봉식, 정태숙	Journal of Agricultural Food Chemistry	63(32): 7198-7210	미국	SCI (3.308)
2016	Beneficial effects of pterocarpin-high soybean leaf extract on metabolic syndrome in overweight and obese Korean subjects: randomized controlled trial	류리, 정태숙, 김예진, 최지영, 조수정, 권은영, 정운주, 지현선, 신동하, 최명숙	Nutrients	8(11): E734	스위스	SCIE (4.064)
2017	Isotrifoliol inhibits pro-inflammatory mediators by suppression of TLR/NF- κ B and TLR/MAPK signaling in LPS-induced RAW264.7 cells	이화, 윤정현, 원효준, 지현선, 육홍주, 박기훈, 정태숙	International Immunopharm- acology	Accepted on Jan 31, 2017	네덜란드	SCI (2.611)
2017	Soy-leaf extract exerts atheroprotective effects via Krüppel-like factor 2 and adhesion molecules	한종민, 이화, 조문희, 백승화, 이철호, 정태숙	International Journal of Molecular Sciences	Revised	스위스	SCIE (3.257)

3. 학술대회/심포지엄 발표

발표일시	발표제목	발표자	학술대회 또는 심포지움명	발표 장소	국명
2014. 05. 08	콩잎의 유용물질 및 비만, 당뇨 예방 효능 (구두 발표)	정태숙	제57회 (사)한국잡사학회 심포지엄 및 춘계학술대회 (Vol. 57, No. 1: 29-30)	대전 유성호텔	한국
2014. 08. 27	국내외 생물산업 이용 사업화 사례 (구두 발표)	신동하	나고야의정서 관련 산업계 세미나 (p47-58)	충북 테크노파크	한국
2014. 09. 25	제주산림자원 산업화 방향 제언 (구두 발표)	정태숙	제2차 제주 버섯자원 산업화 포럼 (2014: 33-51)	제주도 농업기술원 농어업인회관	한국
2014. 10. 01	Industrial Utilization Case of Biological Resource (구두 발표)	신동하	제12차 CBD 총회 부대행사 심포지움 (p35-46)	평창 알펜시아	한국
2014. 10. 17	Anti-Diabetic Effects of Soy Leaf Extracts and Pinitol in High-fat Diet-Fed C57BL/6J Mice	김언희	2014 International Conference on Diabetes and Metabolism (PE125)	KINTEX, 제2전시관	한국
2014. 10. 27	Kaempferol Glycosides- and Pheophorbides-rich Soybean Leaf Extract Improves Glucose Tolerance and Suppresses Lipid Accumulation in <i>db/db</i> Diabetic Mice (구두 발표)	이화	2014년도 한국식품영양과학회 국제심포지엄 및 정기학술대회 (OP-05)	대전 컨벤션센터	한국
2014. 10. 28	Isotrifoliol Inhibits LPS-induced Pre-inflammatory Cytokines expression in RAW264.7 cells by suppression of ERK1/2, p38-MAPK and NF-κB	윤정현	2014년도 한국식품영양과학회 국제심포지엄 및 정기학술대회 (P09-49)	대전 컨벤션센터	한국
2014. 10. 29	The beneficial effect of pterocarpan-rich fraction from soybean leaf on blood glucose and lipid levels in obese subjects with abnormal fasting plasma glucose and lipids	류리	2014년도 한국식품영양과학회 국제심포지엄 및 정기학술대회 (P07-06)	대전 컨벤션센터	한국
2015. 04. 11	Soy leaf extract containing kaempferol glycosides and pheophorbides improves glucose homeostasis by enhancing pancreatic β-cell function and suppressing hepatic lipid accumulation in <i>db/db</i> mice	이화	제42차 대한비만학회 춘계학술대회 (PP 1-14)	일산 킨텍스	한국
2015. 11. 06	Metabolic effects of pterocarpan-rich soy leaf extract in obese subjects: a randomized controlled trial	류리	2015 한국영양학회 추계학술대회 및 50차 정기총회 (구두발표 No. 12)	밀레니엄 서울힐튼호텔	한국

2015. 11. 22-25	Differential gene expression profile of PBMCs in response to Pterocarpan-rich fraction and Mate ethanol extract in obese subjects with mild metabolic syndrome: a randomized placebo controlled trial	류리	제6차 국제식품기능학술대회 (P-D10-0280)	서울 코엑스	한국
2015. 11. 22-25	Anti-diabetic and anti-obesity effects of black soybean leaf through enhancing adiponectin receptor signaling	이화	제6차 국제식품기능학술대회 (P-D10-0346)	서울 코엑스	한국
2015. 11. 22-25	Isotrifoliol improves pancreatic β -cell function by enhancing GLP-1 receptor signaling pathway		제6차 국제식품기능학술대회 (P-D10-0348)	서울 코엑스	한국
2015. 11. 22-25	Low-density lipoprotein-antioxidant flavonoids and phenolic acid from <i>Pectranthus tomentosus</i> Benth	지현선	제6차 국제식품기능학술대회 (P-D10-0376)	서울 코엑스	한국
2016. 04. 09	LDL-antioxidant and antidiabetic effects of flavonol glycosides, active components of black soybean leaf extract (구두발표)	이화	제44차 대한비만학회 춘계학술대회 (O-B-4)	쉐라톤 서울 디큐브 시티호텔	한국
2016. 10. 31- 11. 02	Effect of black soybean leaf ethanol extract on plasma lipid profiles and antioxidant capacity in subjects with overweight or obesity	도가영	2016년도 한국식품영양과학회 국제심포지엄 및 정기학술대회 (P07-01)	제주 국제 컨벤션센터	한국
2016. 10. 31- 11. 02	Black soybean leaf extract improves hyperglycemia and hepatic steatosis by enhancing adiponectin receptor signalling	이화	2016년도 한국식품영양과학회 국제심포지엄 및 정기학술대회 (P09-76)	제주 국제 컨벤션센터	한국
2016. 10. 31- 11. 02	Effect of flavonol glycosides from black soybean leaf extract on low-density lipoprotein (LDL) oxidation and glucose homeostasis	모은진	2016년도 한국식품영양과학회 국제심포지엄 및 정기학술대회 (P09-80)	제주 국제 컨벤션센터	한국
2016. 10. 31- 11. 02	Blueberry leaf extract improves obesity and hyperglycemia in high-fat diet-fed C57BL/6J mice	박혜미	2016년도 한국식품영양과학회 국제심포지엄 및 정기학술대회 (P09-132)	제주 국제 컨벤션센터	한국
2016. 12. 15	Blueberry leaf extract improves glucose homeostasis and suppresses hepatic lipid accumulation in high-fat diet-fed C57BL/6J mice	박혜미	2016년도 한국식품영양학회 동계학술대회 (P-21)	더케이호텔 서울	한국

4. 기술이전

(1) 기술이전명: “검정콩잎 추출물, 이의 분획물 및 이로부터 분리한 플라보놀배당체를 유효성분으로 함유하는 대사증후군의 예방 또는 치료용, 또는 항산화용 조성물” 관련 기술

- 기술이전 대상 및 일자: (주)인섹트바이오텍 (협의 중임)
- 기술이전 조건: 전용실시권; 기술료 및 총매출액의 3%에 해당하는 경상실시료 지급 (협의 중이므로 세부사항 변경 가능함)

5. 사업화(제품화) 현황

○ 사업화(제품화) 내용:

① 인슈파워 (건강기능식품)



주요성분	바나바잎추출물, 아연
영양기능 정보	식후 혈당 상승억제에 도움을 줄 수 있음 정상적인 면역기능에 필요, 정상적인 세포분열에 필요
내용량	60 g (500 mg X 120 T)
섭취량	1일 1회, 1회 2정 섭취
원료명	바나바잎추출물, 글루콘산아연, 결정셀룰로오스, 말토덱스틴, 치커리추출분말, 밀식이섬유, 콩잎추출분말 , 카르복시메틸셀룰로오스칼슘, 셀레늄함유건조효모, 비타민C, 산화마그네슘, 스테아린산마그네슘, 이산화규소, 파라나추출물, 난소화성말토덱스트린, L-아르기닌, 히드록시프로필에틸셀룰로오스, 건조효모(크롬), 프로테아제, 비타민E혼합제제(DL-α-토코페릴아세테이트, 옥테닐호박산나트륨전분, 말토덱스틴, 이산화규소, 글리세린지방산에스테르, 엽산 밀 함유
제조원	(주)한풍네이처팜 [전북 완주군 봉동읍 완주산단6로 301]

② 다이어라파워 (일반식품, 건강보조식품으로 개발 중임)

제품유형	기타가공품
제품제형	굵은 과립
포장단위	5 g X 30 포 X 3 ea
섭취방법	1일 1포
성분	귀리식이섬유, 타피오카전분, 현미발효효소분말 , 누룽지분말, 정제포도당, 볶음현미분말 , 누룽지맛분말, 차전자피분말, 다시마농축액분말, 아라비아검, 치커리추출물분말, 알로에아보레센스분말, 푸룬농축액, 매실추출분말, 카르보시메틸셀룰로오스나트륨, 프락토올리고당 , 비타민C, 락토바실러스플란티움, 콩잎추출분말 , 아미노산혼합분말, 효소처리스테비아, IBT-프로테아제, 무수구연산
성분 구성 근거	동물실험을 통해 고시형 개별인정 혈당조절 소재인 귀리섬유(Oatwell, OW)와 콩잎추출물을 함께 투여 시 혈당 개선 효과를 관찰하였다. HFD군 (고지방식이), 귀리섬유군 (권장량보다 낮은 2% OW wt/wt diet), LESL군 (유효농도보다 낮은 0.5% ESL wt/wt diet), HES군 (유효농도 1% ESL wt/wt diet), (OW+LESL)군으로 나누어 식이와 함께 6주 동안 시료를 투여한 결과, (OW+LESL)군에서 혈당 개선에 대한 synergistic effect를 나타내었다.



○ 사업화성과 및 매출실적

- 사업화 성과

항목	세부항목			성 과	
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	0.03 억원	
			향후 3년간 매출	3.5 억원	
		관련제품	개발후 현재까지	- 억원	
			향후 3년간 매출	7.0 억원	
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : - % 국외 : - %	
			향후 3년간 매출	국내 : 0.5 % 국외 : 0.05 %	
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : - % 국외 : - %	
			향후 3년간 매출	국내 : 2.0 % 국외 : 0.05 %	
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위			위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위			위

- 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목		성 과		
사업화 계획	사업화 소요기간(년)		콩잎주정추출분말을 개별인정 및 이를 이용한 사업화		
	소요예산(백만원)		85		
	예상 매출규모 (억원)		현재까지	3년후	5년후
			0.03	10.5	25
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	-	2.5	10.0
국외		-	0.05	0.05	
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		개별인정형 건강기능식품 일반 식품 형태의 제품			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)		현재	3년후	5년후
	수입대체(내수)		-	1.0	4.0
	수 출		-	0.5	2.5

6. 전시회, 제품설명회 참가

유형	행사명칭	전시품목 및 목적	장소	참가 일시
제품설명회	2014년 바이오재 토탈마케팅 사업	‘체지방 및 혈당 개선용 테로카관 강화 기능성 소재 개발’에 관한 기술 및 제품화에 대한 소개	베트남 (호치민)	2014 01. 12~15
전시회	2014년 중국 광저우 미용박람회	‘체지방 및 혈당 개선용 테로카관 강화 기능성 소재 개발’ 기술 및 제품화에 대한 국내 및 해외 소개	중국 (광저우)	2014 03. 08~12
제품설명회	2015년 중국-타이완 무역 사절단	상해 10개 업체 미팅. 신소재에 대한 소개. 원료 및 제품화 후 이에 대한 등록 부분 협의. 대만(타이베이) 5개 업체 미팅. 신소재에 대한 소개	중국 (상해) 대만 (타이베이)	2015. 04. 13~15 04. 15~17
제품설명회	2015년 대만-동남아 무역 사절단	본 연구를 통해 확보된 기술 설명, 관련 제품에 대해 마케팅 및 영업 가능 조건 및 기술이전 부분에 대한 협의. 특히 대만의 일부 업체를 바탕으로 기술이전 방식 및 제품 생산 OEM 부분 및 추후 진행에 대한 협의	인도네시아 (자카르타) 말레이시아 (쿠알라룸푸르) 대만 (타이베이)	2015. 11.30~12.01 12. 01~03 12. 03~ 05
제품설명회	2016년 대전-중동 비즈니스 상담회	본 연구를 통해 확보된 기술 설명 및 중동지역 비즈니스 마케팅	아랍에미레이트 (두바이) 요르단 (암만)	2016. 09. 19~23 09. 23~25
전시회	인코스메틱 아시아 2016	본 연구 결과와 내용 소개 및 홍보, 식품 업체 중 신규 기능성 식품 제작 업체를 중심으로 관심을 보였음	태국 (방콕)	2016. 11. 08~11

제품설명회명 : 2014년 바이오소재 토탈 마케팅 사업

상담 기간 : 2014년 1월 12일(일) ~ 1월 15일 (수)

상담 장소 : 베트남 호치민

전시 목적 : ‘체지방 및 혈당 개선용 테로카관 강화 기능성 소재 개발’에 관한 기술 및 제품화(상품화)에 대한 소개. 기술 및 제품의 베트남 진출 관련 협의



전시회명 : 2014년 중국 광저우 미용 박람회

전시 기간 : 2014년 3월 8일(토) ~ 3월 12일 (수)

전시 장소 : 중국 광저우 컨벤션 센터

전시 목적 : ‘체지방 및 혈당 개선용 테로카판 강화 기능성 소재 개발’ 에 관한 기술 및 제품화(상품화)에 대한 해외 소개



전시회명 : 2015년 중국-타이완 무역 사절단

전시 기간 : 2015년 4월 13일(월) ~ 4월 17일 (금)

전시 장소 : 중국(상해), 대만(타이베이)

전시 목적 : ‘상해 10개 업체 미팅. 신소재에 대한 소개. 원료 및 제품화 후 이에 대한 등록 부분 협의. 대만(타이베이) 5개 업체 미팅. 신소재에 대한 소개. 자료 제공.’



상해 무역사절단

대만 바이어 협의

전시회명 : 2015년 대만-동남아 무역 사절단

전시 기간 : 2015년 11월 30일(월) ~ 11월 5일(토)

전시 장소 : 인도네시아(자카르타, Hotel Shangri-La)

말레이시아(쿠알라룸푸르, Istana Hotel)

대만(타이베이, Howard Hotel)

전시 목적 : ‘본 연구를 통해 확보된 기술 관련 설명. 관련 제품에 대해 마케팅 및 영업 가능 조건 협의. 기술이전 부분에 대한 협의. 특히 대만의 일부 업체를 바탕으로 기술이전 방식 및 제품에 대한 OEM 부분에 대한 협의가 있었으며 이에 대해 추후 진행 예정’

상해 무역사절단	대만 바이어 협의

전시회명 : 2016년 대전-중동 비즈니스 상담회

전시 기간 : 2016년 9월 19일(월) ~ 9월 24일 (토)

전시 장소 : 아랍에미레이트(두바이), 요르단(암만)

전시 목적 : ‘체지방 및 혈당 개선용 테로카판 강화 기능성 소재 개발’ 에 관한 기술에 대한 설명 및 중동지역 비즈니스 마케팅 실행.

전시회명 : 인코스메틱 아시아 2016

전시 기간 : 2016년 11월 8일(화) ~ 11월 11일 (금)

전시 장소 : 태국 방콕 국제 전시장

(Bangkok International Trade & Exhibition Center)

전시 목적 : ‘체지방 및 혈당 개선용 테로카판 강화 기능성 소재 개발’ 에 관한 기술 및 제품화(상품화)에 대한 소개, 마케팅 및 홍보



7. 인력 양성

인력양성명	성과발생년도	인력양성 내용	학위	성별
조수정	2014. 02	경북대학교대학원 식품영양학 전공 박사학위 취득	박사 (이학)	여
김언희	2014. 02	과학기술연합대학원대학교(UST) KRIBB캠퍼스, 생체분자과학 전공 석사학위 취득	석사 (이학)	여
한영지	2015. 02	경북대학교대학원 식품영양학 전공 석사학위 취득	석사 (이학)	여
김애향	2015. 02	경북대학교대학원 식품영양학 전공 석사학위 취득	석사 (이학)	여
이화	2016. 02	과학기술연합대학원대학교(UST) KRIBB캠퍼스, 생체분자과학 전공 박사학위 취득	박사 (이학)	여
도아라	2016. 02	경북대학교대학원 식품영양학 전공 석사학위 취득	석사 (이학)	여
이정현	2016. 02	경북대학교대학원 식품영양학 전공 석사학위 취득	석사 (이학)	여
박효진	2016. 02	경북대학교대학원 식품영양학 전공 석사학위 취득	석사 (이학)	여
지현선	2016. 08	충남대학교대학원 약품화학 전공 석사학위 취득	석사 (약학)	여

8. 인력 채용

채용인력명	성과발생일	인력채용 내용	성별
김민지	2016. 02. 15	참여기업인 (주)인섹트바이오에서 제형 개발, 개별인정 신청 업무 등 담당을 위해 연구개발부 정규직으로 채용	여
이화	2016. 03. 14	박사학위 취득 후 한국생명공학연구원 산업바이오소재연구센터 박사후연구원으로 취업	여

9. 정책 활용

정책활용 상태	주관부처	시책 추진실적 및 계획내용	활용년도
정책 건의	농식품부	건강수명 연장을 위한 기능성식품 개발	2017년
정책 건의	농진청	농산자원을 이용한 기능성식품 개발	2017년

제 5 절 연구결과의 종합 분석 및 고찰

○ 콩잎의 품종 (GH, BB, BB-CJ, NG), 수확시기, 추출방법에 따른 기능성 콩잎추출물 (PSH) 조제의 표준화 방법 확립, 지표성분(KG7, QG5) 선정 및 함량 분석을 수행하였으며, 대두콩잎 주정추출물과 검정콩잎 주정추출물로부터 13개의 플라보놀배당체를 분리하여 구조를 규명하였으며, *in vitro*, 세포계에서 활성 검색을 통해 항당뇨, 항비만 효능을 도출하였다. 분리한 배당체 중 화합물 **4, 5, 8, 11, 12, 13, 16**은 콩잎으로부터 처음 분리한 화합물들이다.

○ 70ESL (대두콩잎 70% EtOH 추출물)은 주로 혈중 GLP-1의 농도 및 활성을 증가시키고 이에 따른 소장 조직에서 GLP-1의 분비를 조절하는 GLP-1, PKA, PCSK1/3의 발현을 향상시켰고, GLP-1의 타겟 조직인 췌장에서는 GLP-1에 의한 신호전달 유전자인 GLP-1R, PKA, IRS2의 발현을 증가시켜 베타세포의 인슐린 합성 (PCSK1/3, PCSK2, Ins1, Ins2)과 베타세포의 증식(Ngn3, Neurod1, MafA, Pax4, PDX-1)을 향상시켰고, 그 외 소포체 스트레스에 관련된 adaptive UPR 유전자 (Xbp1s, Bip, Fkbp11)의 발현을 조절하여 베타세포의 기능을 향상시킨다.

○ 70EBL (검정콩잎 70% EtOH 추출물)은 주로 QGs와 IRGs 화합물에 의한 혈중 adiponectin을 증가시키고 이에 따른 간 조직에서 adiponectin 수용체로 시작되는 신호전달을 조절한다. 즉, AdipoR1과 AdipoR2의 발현을 증가시켜 이에 따른 AMPK의 활성을 향상시키고 그 하위의 인슐린 신호전달 유전자 (GLUT-2, IRS-2, FoxO1, Foxa2) 및 지질대사 조절인자 (PGC-1, PPAR α , PPAR δ)를 조절함으로써 최종적으로 간 조직의 혈당조절 기능과 지방축적 억제 효능을 향상시킨다.

○ ESL의 단독투여에서는 췌장 조직에 더 효과적인 조절작용을 나타내었던 ESL이 기존에 알려진 혈당조절 소재인 귀리섬유 (Oatwell, OW)와 함께 투여 시 내당능에 대한 synergistic한 개선 효능을 나타내는데, 이는 간 조직에서 SREBP-1 및 그 타겟 유전자 SCD1, SCD2, FAS, ACC1 및 AMPK의 발현을 조절하여 지질축적을 synergistic하게 억제함으로써 이루어지는 것으로 보인다. 따라서 OW과 함께 제품을 제작 시 혈당 조절에 대한 상승 효능을 나타낼 것이다.

○ BMI가 23이상인 과체중 및 비만인을 대상으로 하루에 총 2000 mg/day의 용량의 검정콩잎 주정추출물 (EBL) 또는 대두콩잎 주정추출물 (ESL) 을 12주간 복용하게 하였다.

- 신체계측 및 체지방 측정 결과, EBL 및 ESL 복용 후 복용전보다 허리둘레, 엉덩이 둘레 및 WHR이 유의적으로 낮아졌으며, 수축기 혈압에서 ESL을 복용한 군에서 혈압 측정 결과 복용 후 복용 전보다 유의적으로 감소하였다.
- 지질대사관련 인자에서 EBL 및 ESL 복용 후 복용전보다 HDL-콜레스테롤, HTR 및 apo A-1이 유의적으로 증가하였으며, 동맥경화 인자인 AI지수는 유의적으로 낮아졌다. 또한 EBL을 섭취한 군에서 시험물질 복용 전 대비 복용 후 혈장 FFA 및 apo B가 유의적으로 감소하였다.
- 지질대사관련 인자에서 EBL 및 ESL 복용 후 복용전보다 HDL-콜레스테롤, HTR 및 apo A-1이 유의적으로 증가하였으며, 동맥경화 인자인 AI지수는 유의적으로 낮아졌다. 또한 EBL

을 섭취한 군에서 시험물질 복용 전 대비 복용 후 혈장 FFA 및 apo B가 유의적으로 감소하였다.

- 지방세포 분비 호르몬 분석결과에서 EBL 복용군에서 시험물질 복용전 대비 복용 후 혈장 adiponectin이 유의적으로 상승하였으며, resistin이 유의적으로 감소하였다.
- 염증성 cytokine 분석 결과 중 MCP-1이 EBL 복용 후, 복용 전에 비하여 유의적으로 감소하였으며, ESL 복용 전 대비 복용 후 IL-6가 유의적으로 감소하였다. 또한 EBL 및 ESL 복용 후, 복용 전 대비 PAI-1이 유의적으로 감소하였다.
- 적혈구 항산화 효소 활성화도 과산화물 측정 결과, SOD, CAT 및 GR 활성화도가 EBL 및 대두콩 잎 주정추출물 섭취 후 증가되었으며, 지질과산화물 (TBARS)이 EBL 및 ESL을 섭취한 군에서만 유의적으로 감소하는 효과를 보였다.

따라서, 본 인체시험 결과를 종합해 볼 때 콩잎 주정추출물은 혈중 지질 대사를 개선시키고, 항산화효소 활성화, 지방세포 호르몬 및 염증인자분비 조절에 효과적으로 작용해 대사증후군 개선에 유효한 소재임이 입증되었으며, 새로운 기능성 식품소재로 개발 가능성이 크다고 판단된다.

○ PSH 소재의 항당뇨 효능 및 작용기전을 규명하고 국내/미국특허등록 및 PCT 출원을 통해 산업재산권을 확보, 관련 분야 상위 국제 저널에 다수의 논문을 발표하여 새로운 기능성 소재로서의 글로벌 경쟁력을 제시하였다. 한편 콩잎 주정추출물의 인체적용시험을 통한 효능 검증으로 우수 천연 기능성 신소재로서의 인증을 받기 위한 토대를 마련하였으며, 이 인체시험 결과는 실용화에 필요한 섭취용량 결정의 근거 자료로 이용할 수 있다.

○ 콩의 품종, 콩잎 수확시기, 유효성분의 함량 및 콩잎 생산량과 경제성을 고려하여 기능성소재 원물의 우수 품종으로 BB와 GH를 선별하였다. GH와 BB 콩잎의 대량 공정 개발을 통해 기능성소재인 PSH 추출물의 원물대비 회수량은 25~29% 이었다. 인체적용시험을 위한 시제품을 개발하였으며, PSH는 잔류농약검사와 영양성분 검사 등을 통해 잔류농약 불검출과 관련 영양성분 자료를 확보하였다. 이를 바탕으로 혈당 조절 효능의 극대화를 위해 관련 조사를 자료하고 기능성 성분 표시 재료와 부재료와의 최적 배합 설정 연구 및 제형을 결정하였다. PSH의 혈당 개선 기능성 활용 및 제품화를 위한 식품인허가를 사항을 확보하여 ‘인슈 파워’ 브랜드의 건강기능식품을 개발하였으며, 제1협동기관에서 확보하고 있는 국내·외 판매 네트워크를 통해 사업화를 추진하고 있다. 추가로 다양한 제품 개발로 시장을 선점하기 위해 ‘다이하라 파워’ 브랜드의 일반식품(건강보조식품)을 개발 중에 있다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구목표의 달성도

1. 1차년도

세부과제명	가중치 (%)	세부연구목표 (평가의 착안점 및 기준)	달성도 (%)	연구개발 수행내용
<제1세부과제> 우수 항당뇨 천연 신소재 탐색, 특성분석 및 기작 규명		다당류 고함유 후보식물의 항당뇨 기능성 비교 분석 및 스크리닝	90	- 콩잎품종, 재배기간, 추출용매, 추출시간, 건조방법에 따른 여러 가지 추출물의 in vitro 활성 비교, 분석 - 다당류 고함유 분획 PSH (70ESL과 70EBL)의 인슐린 분비능, 항염증 활성비교
		다당류의 분리·정제 및 구조 분석	100	- 콩잎추출물(ESL, EBL)로부터 기능성 다당류(배당체)의 15 종 분리 및 구조 결정 - 다당류 지표성분 확보 - (추가 결과) 코우메스탄계 화합물 2종 분리 및 구조 결정 (1종 신규화합물)
		다당류의 in vitro, 세포계 항당뇨 기능 분석	90	- 콩잎 다당류의 in vitro 활성 비교 (α -glucosidase, α -amylase, DPP-4, LDL-oxidation 등) - 콩잎 다당류의 췌장 베타세포(MIN6) 에서 인슐린 분비능 측정 - PA로 유도된 MIN6 세포에서 콩잎다당류에 의한 유전자 발현 변화 측정
		HPLC를 이용한 콩잎 다당류 고함유 분획(PSH) profile, 함량 비교 분석 및 효율적인 추출 방법 조사	100	- 품종별 콩잎 (BB, WD, GH)에 대한 추출용매, 추출기간, 콩잎 건조 방법을 달리한 추출물 조제 - HPLC profile 및 지표물질 함량 비교·분석
		마우스모델에서 PSH (70ESL과 70EBL)의 지방 흡수저해 및 내당능 측정	150	- 지방흡수 저해 효능 확인 - 당부하 내당능 확인 - (추가 수행) 인슐린 저항성 개선 효능 검증
		PSH의 in vivo 동물실험을 통한 혈당강하 효능 실험	130	- 당뇨 유발 모델동물에서 12 주간 PSH (70ESL과 70EBL)을 식이와 함께 섭취 후, 체중, 장기 무게 변화 관찰, 혈당 및 혈액 생화학적 분석 (2년차 연구 내용 기수행함)
		다당류 고함유 분획의 독성/안전성 검사	100	- 다당류 고함유 분획의 단회 경구투여 독성시험, 2주간 반복 경구투여 DRF 독성시험 및 복귀돌연변이 시험을 수행
<제1협동과제> 항당뇨 천연 신소재의 대량생산 체계 구축 및 당노식 제형 상품화		우수 항당뇨 천연소재 탐색을 위한 다양한 콩잎 품종 등 자생식물 다당류 원료 확보	100	- 대단위 농장에서의 BB, WD, GH 재배를 시기별 50~110일령 콩잎 확보
		콩잎 다당류 고함유 분획(PSH)의 추출 방법 표준화 연구	100	- 열수 추출 (80℃) 수율 및 HPLC 분석 비교 - 70% EtOH 추출 온도 비교 - 50%, 70% EtOH 추출 비교 (수율, 추출 양상 비교) - 70% EtOH 반복 추출 (1차, 2차, 3차) 수율 및 HPLC 분석 비교
		인체시험을 위한 기능성 다당류 원료의 대량 재배 및 수확	100	- 계약재배를 통해 BB와 GH의 산업적 대량재배 및 수확을 통해 건조 콩잎 확보
		인체시험용 PSH 시제품 생산을 위한 대량 추출, 농축 및 분말화 공정 개발	80	- 산업적 대량생산 콩잎을 이용한 건조 조건 확립 - 건조 콩잎을 이용하여 대량 추출, 농축 및 분말화 공정 시스템 개발

2. 2차년도

세부과제명	가중치 (%)	세부연구목표 (평가의 착안점 및 기준)	달성도 (%)	연구개발 수행내용
<p><제1세부과제> 우수 항당뇨 천연 신소재 탐색, 특성분석 및 기작 규명</p>	20	<p>췌장, 지방조직, 간 및 혈장의 생화학적, 조직학적 분석을 통한 다당류 고함유 분획(PSH)의 항당뇨 효능 평가</p>	100	<ul style="list-style-type: none"> - 혈장 및 간조직에서 지질생화학적 인자들의 변화 측정을 통해 두 PSH 시료(70ESL과 70EBL)의 <i>in vivo</i> 혈당 및 인슐린 개선 효능 검증하였음 - 70ESL의 혈중 GLP-1 향상 효능 확인함 - 혈장 호르몬 및 cytokine에 대한 조절 활성 측정을 통해 70EBL의 혈중 아디포넥틴 활성 개선 효능 확인함 - 췌장, 간, 지방조직에서 조직학적 분석 결과, 70EBL의 투여로 간조직에서 AMPK 효소 활성이 개선되었음
	45	<p>췌장, 지방조직 및 혈장의 분자생물학적 분석을 통한 다당류 고함유 분획(PSH)의 항당뇨 작용기작 규명</p>	100	<ul style="list-style-type: none"> - 소장과 췌장조직에서 GLP-1의 작용에 연관된 유전자 및 단백질 발현 분석을 통해 70ESL의 투여로 소장에서 GLP-1 분비 증가 및 이에 따른 베타세포 기능 향상 효능 및 기작 규명함 - 간조직에서 adiponectin의 작용에 관련된 유전자 및 단백질의 발현 분석을 통해 70EBL의 투여로 간조직에서 adiponectin 증가에 따른 인슐린 신호전달 향상 및 지방축적 억제 효능 및 기작 규명함 - 지방조직에서 인슐린 민감성 및 지방산 산화, 분해를 조절하는 유전자 및 단백질 발현 분석을 통해 두 PSH 시료 (70ESL과 70EBL)의 투여로 지방조직에서 인슐린 민감성 개선 효능 및 작용기작 규명함
	25	<p>PSH로부터 지표물질 확보 및 함량 분석</p>	100	<ul style="list-style-type: none"> - 추출 방법 표준화를 위해 수확시기 및 추출용매에 따른 추출물 제조하였음 - 지표물질(ESL-KG7, EBL-GQ5) 설정 및 HPLC를 이용한 함량분석 방법 확립하였음 - 지표물질 분석 및 활성 평가를 통해 기능성 다당류 원물소재의 수확 시기 선정함 - PSH의 총 페놀, 총플라보노이드 함량 분석하였음 - ESL, EBL로부터 다당류 함유량이 높은 PSH 제조 후 지표물질 함량 분석 및 <i>in vitro</i> 및 췌장세포에서 항당뇨 활성 평가함
	10	<p>PSH의 혈당 조절 기능성에 대한 산업재산권 확보</p>	100	<ul style="list-style-type: none"> - 다당류 고함유 검정콩잎 추출물의 혈당 조절 및 대사증후군 예방 또는 치료용 조성물에 대한 특허출원 완료(10-2015-0116974) - 배당체 함유 로즈허브 추출물의 혈당 조절 및 대사증후군 예방 또는 치료용 조성물에 대한 특허출원 완료 (10-2015-0095716)
<p><제1협동과제> 항당뇨 천연 신소재의 대량생산 체계 구축 및 당노식 제형 상품화</p>	28	<p>제품화를 위한 기능성 다당류 원료의 대량 재배 및 수확</p>	100	<ul style="list-style-type: none"> - 친환경적 무농약 임차 계약재배를 통해 3가지의 다른 품종 GH, BB, GB에 대한 대량 재배 (118일령 원재료 확보) - 3가지 품종에 대한 132일령 동안 재배 및 2주 간격 시료 확보
	34	<p>다당류 고함유 분획(PSH)의 대량생산 공정 표준화 확립</p>	100	<ul style="list-style-type: none"> - 2가지 품종 (GH, BB)에 대한 공장용 규모 (50 kg/batch) 에서의 추출, 농축 및 건조 실행 - 공장 규모 공정을 통해 50 kg 원물 대비 GH 12.47 kg, BB 14.36 kg의 PSH 확보

	28	다당류 고탍유 분획(PSH)의 인체시험용 시작품 제작	100	- 인체시험을 위한 control군 (starch), GH군, BB군 제작 및 제2협동연구기관에 인계 (각각 6 capsule/일 x 30인 x 84일)
	10	시판제품에 대한 경쟁력 강화를 위해 (다당류 포함) 혈당 개선용 건강기능 원료/신제품 모니터링, 항당뇨 효능 기작 및 소비자 선호도 파악	80	- 제형 개발 및 시제품 생산을 위해 고시된 혈당 개선 기능성 원료, 출시되어 있는 제품별 기본 제형 및 특허등록 완료된 식용가능 소재에 대한 조사 완료
〈제1협동과제〉 항당뇨 천연 신소재의 대량생산 체계 구축 및 당뇨식 제형 상품화	10	경북대학교 IRB에 인체시험 실시를 위한 연구계획서 제출 및 인체시험 실시 승인 신청	100	- 인체시험 시료 조성 및 지표물질 함량에 근거한 인체적정 용량설정 - 경북대학교 생명윤리위원회 심의 신청용 인체시험 실시 계획서 작성 및 자료 제출 - 인체시험실시용 자료 발표 및 승인 획득
	40	인체시험 대상자 모집 및 인체시험 실시	100	- 대상자 선정: 대사증후군으로 분류되는 반건강인 61명 (예; 경미한 고지혈증, 고혈당, 과체중 및 비만인) - 영양섭취상태 설문조사 및 기록 - 시험대상 그룹: 음성대조군, 시험물질군-서리태잎추출물군, 시험물질군-대두잎추출물군 - 인체시험 적용시료를 제1협동연구기관 으로부터 제공받음 - 복용기간 12 주간에 걸쳐 인체시험 대상자 전화 및 방문 모니터링: 신체계측, 채혈, 기능성 물질 복용 여부와 건강상태 모니터링, 영양섭취상태 설문조사 및 기록
	40	혈당 개선용 바이오마커 측정 (동반되는 비만, 동맥경화 관련 인자 포함) 및 결과 분석	100	- Urine 관련 인자 (BUN, albumin), 공복혈당 및 당화혈색소 (HbA _{1c}) 측정: 혈장 포도당 농도는 서리태군에서 유의적으로 감소, BUN, albumin 및 HbA _{1c} 는 유의적인 차이 없었음. - 당뇨에 영향을 미치는 지질대사 관련 혈액 biomarker 분석: 서리태군에서 TG 및 LDL-C 농도 감소, HDL-C 농도는 증가함. 혈장지질 분석결과, 서리태군에서 복용전 대비 비율에서 유리지방산 비율이 감소됨. - 체중, 체지방, 체성분 및 신체계측치 변화분석: 서리태 복용 후 엉덩이둘레 및 허리둘레가 감소함. 대두군에서는 피하지방이 감소하는 경향을 보임. - 항산화 관련지표 분석: 적혈구 catalase, GSH-Px, GR 및 SOD 활성도, H ₂ O ₂ 함량 측정: 적혈구 catalase 및 SOD 활성도가 서리태 및 대두군에서 증가함. - 지방세포분비호르몬 (adiponectin) 분석: 유의적인 차이 없었음. - Cam pro와 엑셀 프로그램을 이용하여 결과 정리 및 ANOVA 통계처리
	10	최종 IRB 보고서 제출 및 연구윤리심의위원회 승인 획득	80	- 인체시험 종료 후 경북대학교 IRB제출용 결과 보고서 작성 - 최종 연구결과에 대한 경북대학교 IRB의 최종보고서 승인 및 획득

3. 3차년도

세부과제명	가중치 (%)	세부연구목표 (평가의 착안점 및 기준)	달성도 (%)	연구개발 수행내용
<p><제1세부과제> 우수 항당뇨 천연 신소재 탐색, 특성분석 및 기작 규명</p>	40	기존에 보고된 다당류와 도출된 신소재 다당류의 항당뇨 활성비교 및 우수성 입증	100	<ul style="list-style-type: none"> - α-glucosidase, DPP-4, LDL-oxidation, DPPH 등의 활성을 비교 측정함 - 마우스모델에서 PSH(ESL)와 기존 보고된 귀리식이섬유(OW)의 병용에 따른 혈당강하 효능 (내당능 및 간 TG 함량에서 synergistic effect를 나타냄 - 간 조직에서 지질대사를 조절하는 유전자발현에서 synergistic effect를 나타냄) - PSH(ESL, ESL-GR)의 췌장 베타세포 (MIN6)에서 인슐린 분비능 및 관련 유전자 발현을 증가시킴 - PSH(EBL, EBL-GR)의 간세포(HepG2)에서 인슐린 TG 함량 및 인슐린 저항성을 개선 - PSH 및 다당류의 대식세포(RAW264.7)에서 NO, ROS 억제를 통한 항염증 효능 - (추가 결과) 테로카판 화합물 isotrifoliol의 지방전구세포(3T3-L1)에서 분화과정 및 지질축적 억제 및 ER stress관련 유전자 조절 - 1차년도 in vitro, 세포계, 동물실험 및 2차년도 인체시험 결과의 종합적인 분석을 통한 혈당 강하 작용 기작의 체계적 작용점 확인 (70ESL: 췌장 베타세포 기능개선을 통한 혈당강하 효능; 70EBL: 간 조직에서 아디포넥틴/AMPK 신호전달을 통한 혈당강하 효능)
	20	제1협동과제의 대량생산 및 공정 개발 단계별로 시료의 in vitro 활성, 을 통해 공정 최적화를 위한 기초 data 제공	100	<ul style="list-style-type: none"> - 당뇨(동반되는 비만, 동맥경화 관련 인자 포함) 관련 LDL-oxidation, α-glucosidase, DPP-4 등의 활성 측정을 통해 공정 최적화를 위한 기초 data 제공 - 동물실험용, 인체시험용 추출물의 α-glucosidase, LDL-oxidation, DPP-4, DPPH 활성 및 지표물질의 함량 분석을 통한 공정의 기초 data 확보
	20	제품화 기능성소재인 PSH의 지표물질 함량 분석을 통한 표준화	100	<ul style="list-style-type: none"> - 제품화 기능성소재인 PSH의 지표물질(KG7, QG5, coumestrol) 함량 분석을 통한 표준화 방법 확립
	10	HPLC를 이용한 PSH의 지표성분 함량 분석의 validation	100	<ul style="list-style-type: none"> - 정량법에 대한 직선성(linearity) 및 검출한계 분석 - 정량법에 대한 범위(Range) 분석 - 정량법에 대한 정밀성(Precision) 분석 - 정량법에 대한 validation 완료
	10	PSH의 개별인정 기능성 원료 신청을 위한 자료 확보	100	<ul style="list-style-type: none"> - 기원, 개발 경위, 국내·외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료 - 제조방법 및 원료 특성 관련 자료 - 기능성분(또는 지표성분)에 대한 규격 및 시험 방법에 관한 자료 - 유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료 - 안전성 및 기능성 내용 및 관련 자료 - 섭취량, 섭취 시 주의 사항 및 그 설정 관련 자료 - 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료 등 확보

<제1협동과제> 향당노 천연 신소재의 대량생산 체계 구축 및 당노식 제형 상품화	30	PSH 제품화를 위한 대량 추출, 농축 및 분말화의 scale up 공정 개발 연구	100	- GH, BB, GB 품종의 대량생산을 통한 경제성 품종 및 시기 확보(3차년 재배 결과를 포함 4년결과 바탕. GH 품종, 100~110일) - 제품 제작을 위한 50kg Batch 이용 PSH(GH, BB)의 산업적 생산
	5	제품화 기능성소재인 PSH 분말의 품질안전성 검증 및 영양학적 분석	100	- PSH 분말의 245항목 잔류농약 및 중금속 분석 - PSH 분말(GH, BB)의 영양성분 분석
	25	기능성소재 및 부재료와의 최적 배합 및 (시판제품과의 차별성 및 경쟁력 강화를 위한) 제형 설정 연구 및 품질관리 방법 확립	100	- 시장 유통되고 있는 기능성 원료(건강기능식품) 및 부형원료(천연물 소재 중심)에 대한 조사 및 선별. - 건강기능식품(선별 기능성 원료)과 일반식품에 대한 제형 완성 - 기능성 소재(개별인정형소재)로 바나나잎추출분말(콜로솔산 1.2%)과 일반식품으로 귀리식이섬유(β -glucan) 선별 - PSH에 대한 유통기한 설정 및 보고
	5	식품(식품첨가물) 품목 등록 (제품명 결정)		- 원료별 제형별 산업적으로 사용 가능한 형태로 활용하기 위한 행정적 절차 완료 - 식품제조가공업 등록, PSH의 식품(첨가물) 등록
	35	향당노 다당류 신소재의 제품화 (2건)	100	- 기능성 원료를 활용한 건강기능식품 제작 및 인체시험 결과를 바탕으로 일반식품 제작 (투여량 및 복용 횟수 결정) - 건강기능식품으로 인슈파워(바나나잎추출분말, 아연)과 일반식품으로 다이아파워(일반식품) 개발 - 향당노 다당류 신소재의 국내·외 전시회를 통한 홍보 - 향당노 다당류 신소재의 개별인정등록을 위한 서류 작업 및 추진 진행 중 (제1세부와 공동 추진)

제 2 절 관련분야에의 기여도

○ 본 연구를 통해 활용도가 낮았던 콩잎을 이용한 기능성 소재 개발을 통해 농가 소득 증대를 꾀할 수 있는 계기를 마련하였다. 또한 상당 부분의 출시된 건강기능식품의 원재료를 외국으로부터 수입해오고 있는 반면에, 국내자원과 기술을 이용한 기능성 원료 개발을 통해 국내 기술력을 강화를 할 수 있었다. 특히 나고야의정서 협약 이후 생물자원에 대한 국제적인 대응이 필요한 시기에 국내 자원을 활용한 산업화에 크게 기여할 수 있을 것으로 판단된다.

○ 콩잎(대두, 서리태, 서목태)의 대량 재배, 산업적 공정 시스템을 확립하고, 품종, 수확시기, 추출방법에 따른 효능 비교 및 지표성분의 함량 분석을 통해 기능성 소재의 표준화 방법을 확립함으로써 국내 생산 기능성소재를 이용한 사업화의 중요한 근거를 확보하였다. 또한 고시형 개별인정 기능성소재와 병용 시 혈당조절에 대한 synergistic effect를 검증함으로써 제품화를 위한 효능 증강 및 경제적 formulation의 근거 자료를 제시하였다.

○ 콩의 주요성분이 이소플라본인 것에 비해 본 연구를 통해 대두콩잎에는 혈당 개선 기능성 물질로 캄페롤배당체가 많이 함유되어 있는 반면에 검정콩잎(서목태잎, 서리태잎)에는 퀘르세

틴배당체와 이소람네틴배당체가 많이 함유되어 있음을 처음으로 규명하였다. 또한 플라보놀배당체 고함유 콩잎추출물은 비만/당뇨로 인해 기능이 약해진 췌장 세포를 회복시키고 간의 지방 축적을 억제함으로써 인슐린 민감성 개선을 통해 당뇨 예방 효능을 나타내는 것을 확인하였다. 대두콩잎 및 검정콩잎(서리태)의 성분 차이에 따른 항당뇨 작용기전의 차이를 바탕으로 인체시험을 통해 과체중 및 비만인에 적용하여 허리/엉덩이둘레비 감소, 지질대사 개선 및 항산화대사 개선 기능을 확인하였으며, 또한 일부 이미 보고한 대두콩잎 주정추출물의 기능성을 재검증함과 동시에 새로이 검정콩잎 주정추출물의 기능성을 제시하였으며, 향후 콩잎 다당류 화합물을 이용한 천연물신약 개발 가능성도 제시하였다.

○ 식용 가능한 천연물로부터 도출된 콩잎 주정추출물의 대사증후군 개선 기능성을 입증함으로써 대한민국 30대 이상 성인 10명 중 3명이 겪고 있는 대사증후군에 대한 해결책으로 활용될 경우 관련 질환의 발병률 감소에 기여할 수 있다.

○ 본 연구 결과를 바탕으로 국내·외 특허등록 및 출원을 통해 지식재산권을 확보하였으며, 관련 분야 상위 20% 이내의 국제 학술지에 논문을 게재함으로써 건강기능식품 개발 및 사업화를 위한 글로벌 경쟁력 제고에 기여하였다.

제 5 장 연구결과의 활용계획

○ 본 연구 및 선행연구를 통해 확보한 자료를 바탕으로 기능성 소재의 개별인정을 신청하고자 하며, 혈당 강하 및 체지방 조절을 위한 기능성 제품을 개발 중에 있다. 제품에 대한 기존 제품과의 차별화를 위해 본 연구를 통해 확보한 과학적 근거 자료(ex: 콩잎추출물과 함께 귀리식이섬유를 소량으로 복합투여 시 혈당강하 효능 증가)를 바탕으로 진행할 계획이다.

○ 본 연구를 통해 수행한 세포계, 동물실험 및 인체시험 결과로 콩잎추출물의 혈당강하 및 체지방 조절 효능이 충분히 검증되었다. 또한 대두콩잎과 검정콩잎이 함유하는 플라보놀배당체의 성분 차이에 따른 작용기전의 차이도 규명하였으며, 이 결과를 바탕으로 동물실험 및 인체시험 결과를 통해 3편의 국제 논문이 출판되어 기능성이 공인된 자료를 확보하였고, 현재 1편의 논문은 수락, 또 다른 1편의 논문은 재심사 상태에 있으며, 2편의 논문을 추가 투고할 예정이다.

○ 인체시험을 통해 대두콩잎 뿐만 아니라 검정콩잎의 대사증후군 개선 효능도 검증하였다. 따라서 기존에 체지방 및 혈당조절에 효과가 있다고 연구되어온 대두콩잎과 새로운 기능성 소재인 검정콩잎의 효능을 비교 연구한 인체적용시험 및 동물실험 결과를 기능성식품 개발을 위한 과학적 근거 자료로 이용할 수 있다. 또한 인체시험에 적용한 용량을 고려하여 본 기능성 소재의 실용화에 필요한 섭취용량을 결정할 수 있는 근거 자료로 이용할 수 있다.

○ 본 연구 결과인 인체시험최종보고서와 이를 바탕으로 하여 작성한 개별인정 기능성 원료 신청을 위한 자료(p 166)를 이용하여 개별인정 신청을 진행할 계획이다. 개별인정 신청의 경우 식약처와의 모뎀토의 등의 절차와 이로 인한 일정기간이 소요되는 점을 감안하여, 초기에는 협동연구기관을 중심으로 시장에 출시되어 있는 고시형 개별인정 원료를 주원료로 하고 본 연구의 기능성소재인 콩잎추출물을 부원료로 하여 출시된 건강기능식품(인슈파워) 및 제형을 달리 하고, 콩잎추출물의 함량을 증가시킨 일반식품(다이하라파워)를 중심으로 시장에 소개 및 마케팅을 진행할 계획이다. 이와 함께 협동기관과 함께 CRO 기관의 도움 및 검토를 거쳐 개별인정 신청 및 승인 후에는 본 연구의 기능성소재인 콩잎추출물을 기능성 주원료로 하는 제품을 출시하여 시장에 진출할 계획이다.

○ 협동연구기관인 (주)인섹트바이오텍은 관련 유통 및 판매 라인을 보유하고 있으며, 제품 출시 후에 본격적으로 마케팅을 진행하고 있다. 또한 미국, 중국, 일본, 브라질 등 국외 10여 개국에 보유하고 있는 글로벌 네트워크 라인을 활용하여 본 연구의 기능성 소재에 대한 소개 및 홍보와 함께 소재를 활용한 신제품뿐만 아니라 소재의 2차 기술이전과 대량생산 원재료의 판매 등을 통해 매출의 극대화를 꾀할 예정이다.

○ 마케팅 및 영업 효율을 높이기 위해 국내 전시회뿐만 아니라 특화된 해외 전시회 (미국 BIO, 건강기능식품전시회 등) 참가를 통해 새로운 기능성소재의 효능 및 기술 소개를 통한 홍보와 함께 개발한 신제품의 영업, 마케팅을 시행할 계획이다. 또한 정부차원의 마케팅 지원인 해외마케팅지원사업, 지사화사업과 해외무역사절단 등을 통해 본 연구를 통해 창출한 기술 및 제품에 대한 신규 바이어 발굴을 진행할 계획이다.

○ 일부 유통 라인 및 해외 네트워크의 경우 요구하는 기술 부분이 다를 수 있으므로 이에 대해서는 제 1 세부연구기관과 제 2 협동연구기관의 도움을 받아 요구부분에 대한 조율을 진행

할 계획이다. 일부 국가마다 사용 가능한 제형에 제한이 있는 점을 감안하여, 국가별 또는 업체별로 본 연구를 통해 확보된 제형화 기술을 이용하여 신규 제품에 대한 영업 및 마케팅을 시행할 계획이다.

○ 본 연구를 통해 개발한 ‘인슈파워’ (또는 현재 신규제작 진행 중에 있는 ‘다이아라파워’ 제품)에 대한 소비자의 반응과 소비자의 요구 사항을 보다 많이 확보하여 본 연구 자료를 바탕으로 협동연구기관인 (주)인섹트바이오텍이 확보한 다양한 부형제와 원료를 이용하여 새로운 제형 개발을 통해 업그레이드된 신규 제품을 생산하여 판매의 극대화를 추구할 계획이다.

○ 출시한 신제품(인슈파워)은 주원료로 고시형 개별인정 원재료를 사용하였고, 본 연구를 통해 도출된 기능성 소재인 콩잎추출물을 부원료로 하여 제작된 제품이기에 마케팅 및 제품에 대한 소개와 설명이 제한적인 점을 감안하여 일반 소비자를 대상으로 소재의 기술적인 부분을 쉽게 소개할 수 있는 판매 유통라인을 통해 먼저 진행할 계획이며, 논문 출판 등을 통해 보고된 콩잎추출물의 효능을 간접적으로 소개하여 제품의 우수성을 홍보할 계획이다. 판매 유통라인으로 협동연구기관이 이미 보유하고 있는 네트워크 판매라인을 통해 시장 진출을 꾀할 계획이며, 또한 마케팅의 극대화를 위해 제품소개 및 기사화를 통한 홍보 활동을 병행할 계획이다. 추후 기능성소재의 개별인정 승인 후에는 해당 조절 기능성소재인 콩잎추출물을 주원료로 하는 제품을 생산하고 직접적인 기능성 소개 및 판매, 영업의 극대화를 꾀할 계획이다.

제 6 장 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

○ 중국 Heilongjiang Bayi Agricultural University의 연구팀은 캄페롤 배당체 고함유 분획을 고지방식이와 함께 C57BL/6J 마우스에 섭취시켜 효능을 평가한 결과, 체중 및 혈당 지표가 개선되었고, 간 내 중성지방과 지방산 합성을 조절하는 전사인자 SREBP-1, PPAR γ 의 발현이 감소하였다. (Zang *et al.*, 2015)

○ 콩잎 주정추출물을 전이와 연관된 세포 침입 실험 및 항산화 활성 효과를 *in vitro* 실험을 통해 연구한 결과 DPPH radical 소거활성과 환원력이 우수하게 나타났으며, OH radical을 이용한 지질과산화 억제실험에서 양성대조군인 비타민 E와 유사하게 억제한다는 보고가 있었다. 또한, 콩잎 주정추출물이 인간 암세포에서 종양형성 과정에 핵심적인 역할을 하는 MMP-9의 활성을 억제한다고 밝혔다. 이러한 결과로 콩잎 주정추출물이 MMP-9의 활성화를 억제하고 항산화 효소인 SOD-1의 발현을 증가시켜 산화적 스트레스를 감소시킴과 동시에 세포 침윤을 억제하여 암 전이를 예방할 수 있는 잠재적인 하나의 생리활성 소재로의 가능성을 제시하였다 (Song *et al.* 2016).

○ 콩의 주요성분이면서 검정콩잎 및 대두콩잎에도 함유되어 있는 genistein이 동물실험에서 TGF- β /Smad 신호 전달 경로를 막음으로써 D-GalN으로 유도된 간섬유화 및 만성 간손상을 억제한다는 연구결과가 보고되었고, Smad7으로 유도된 TGF- β /Smad2/3의 억제를 통해 Genistein이 만성 손상으로부터 간을 보호하는 중심적인 작용기전으로 제시되었다. 이 결과는 Genistein이 만성 간 손상과 간 섬유화를 치료하는 새로운 치료제 및 영양 보조제로 개발될 수 있음을 시사하고 있다 (Ganai *et al.* 2017).

○ 제넥신(대표 경한수)이 지속형 당뇨치료제 'GX-G6'의 유럽 내 임상 1상 승인을 받았다 (2017. 1. 18, 데일리팜 보도 자료). 제넥신은 독일의 임상승인기관 'The Federal Institute for Drugs and Medical Devices (Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte, BfArM)'으로부터 1상 승인을 받고 상반기 내로 임상에 들어갈 예정이다. 이번 임상은 제넥신 자체 원천기술인 hyFc에 GLP-1(Glucagon-like Peptide-1, 글루카곤유사펩타이드-1)을 융합시킨 지속형 제2형 당뇨병 치료제에 대한 임상이다. 건강한 성인 48명을 대상으로 주 1회 또는 월 2회 제형으로서의 안전성을 확인할 계획이다. 제2형 당뇨 치료제 시장 규모는 2015년 약 37조(브랜드 제품과 제네릭 모두 포함)로 예상하고 있다. 또한 GLP-1 유사체 치료제 시장은 약 4조원으로 전체 판매량의 약 9% 정도로 예측하고 있다. 글로벌데이터 (Global Data)의 제2형 당뇨 치료제 시장 예측보고서에서 2025년 GLP-1 유사체 제형은 약 13조원 규모로 연평균 약 12.2% 성장할 것이며, 전체 당뇨 치료제 시장의 약 18%까지 성장할 것으로 예측하고 있다.

제 7 장 연구개발결과의 보안등급

보안 등급 분류 (선택)	보안	일반
결정 사유	연구책임자 의견	연구기관 자체 검토결과
	일반과제에 적합함	연구책임자의 의견에 동의함

제 8 장 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황 (해당사항 없음)

제 9 장 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

제1절 기술적 위험 요소 분석

연구 과제 진행 중 추진 상황 및 추진 결과는 실험실 대외비로 관리하며, 담당자 외의 기타 인원의 공유를 금지할 통한 연구과제의 기술적 위험요소 유출을 최소화하였음.

제2절 안전 관리 대책

- 본 연구과제 참여연구원들의 안전 확보를 위한 대책으로 기관 차원에서 연구실 안전시설에 대한 정기적 점검을 시행하고 있으며, 각 연구실 마다 필수적인 안전장비를 구비하고 있음. 또한 연구실 안전 환경 조성에 관한 법률 제18조 및 보안업무 취급요령 제7조에 따른 보안, 안전 법정교육을 매년 실시하였음.
- 연구개발 활동에 있어 유해화학물질 관리법 제2조 7호와 산업안전보건법 제39조에 따라 실험실 안전 상태를 2년마다 1회 실시하였음.

제 10 장 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/ 인용횟수 등)
1	논문	Soy leaf extract containing kaempferol glycosides and pheophorbides improves glucose homeostasis by enhancing pancreatic β -cell function and suppressing hepatic lipid accumulation in <i>db/db</i> mice	한국생명공학연구원	교신 저자	미국	3.308	2015.08.19	중복사사	SCI
2	논문	Beneficial effects of pterocarpin-high soybean leaf extract on metabolic syndrome in overweight and obese Korean subjects: randomized controlled trial	경북대학교	교신 자적	스위스	4.064	2016.11.08	중복사사	SCIE
3	특허	Composition for preventing and treating obesity, hyperlipidemia, atherosclerosis, fatty liver, diabetes or metabolic syndrome containing extracts of <i>Glycine max</i> leaves or fractions isolated from the same as an active ingredient	한국생명공학연구원		미국등록		2016.07.05		
4	특허	검정콩잎 추출물, 이의 분획물 및 이로부터 분리한 플라보놀배당체를 유효성분으로 함유하는 대사증후군의 예방 또는 치료용, 또는 항산화용 조성물	한국생명공학연구원		PCT출원		2016.08.19		
5	사업 화	인슈파워 (건강기능식품)	(주)인섹트 바이오텍						신제품 출시 2016.12.

제 11 장 기타사항 (해당사항 없음)

제 12 장 참고문헌

- Ahn BT, Lee S, Lee SB, Lee ES, Kim JG, Bok SH, and Jeong TS. (2001) Low-Density Lipoprotein-Antioxidant Constituents of *Saururus chinensis*. *J. Nat. Prod.* 64: 1562-1264.
- Ahn BT, Lee S, Lee SB, Lee ES, Kim JG, Bok SH, and Jeong TS. (2001) Low-Density Lipoprotein-Antioxidant Constituents of *Saururus chinensis*. *J. Nat. Prod.* 64: 1562-1264.
- Back SH, Kaufman RJ. (2012) Endoplasmic reticulum stress and type 2 diabetes. *Annu. Rev. Biochem.* 81: 767-793.
- Song CE, Lee SG, Hong SG, Ryu ZH, Kim MM, and Oh YH. (2016) Effect of Soybean Fallen Leaves Ethanolic Extract on Expression of Proteins Related to Antioxidant Activity and Cell Invasion. *J. Life Sci.* 26: 439-445.
- Collombat P, Xu X, Ravassard P, Sosa-Pineda B, Dussaud S, Billestrup N, Madsen OD, Serup P, Heimberg H, and Mansouri A. (2009) The ectopic expression of Pax4 in the mouse pancreas converts progenitor cells into alpha and subsequently beta cells. *Cell.* 138: 449-462.
- Cui EJ, Song NY, Shrestha S, Chung IS, Kim JY, Jeong TS, and Baek NI. (2012) Flavonoid glycosides from cowpea seeds (*Vigna sinensis* K.) inhibit LDL oxidation *Food Sci. Biotechnol.* 21: 619-624.
- Ganai AA and Husain M. (2017) Genistein attenuates D-GalN induced liver fibrosis/chronic liver damage in rats by blocking the TGF- β /Smad signaling pathways. *Chem. Biol. Interact.* 261: 80-85.
- ICH. International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use; ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE; VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY Q2(R1); Current Step 4 version: October 1994/November 1996. Geneva: ICH; 2005.
- Islam MN, Ishita IJ, Jin SE, Choi RJ, Lee CM, Kim YS, Jung HA, and Choi JS. (2013) Anti-inflammatory activity of edible brown alga *Saccharina japonica* and its constituents pheophorbide a and pheophytin a in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophage cells. *Food Chem. Toxicol.* 55: 541-548.
- Jeong TS, Kim JR, Kim KS, Cho KH, Bae KH, and Lee WS. (2004) Inhibitory effects of multi-substituted benzylidenethiazolidine-2, 4-diones on LDL oxidation *Bioorg. Med. Chem.* 12: 4017-4023.
- Kaouadji M. (1990) Flavonol diglycosides from *Blackstonia perfoliata* *Phytochemistry* 29: 1345-1347.
- Karpe F, Dickmann JR, and Frayn KN. (2011) Fatty acids, obesity, and insulin resistance: time for a reevaluation. *Diabetes.* 60: 2441-2449.

- Kim KR, Rhee SD, Kim HY, Jung WH, Yang SD, Kim SS, Ahn JH, and Cheon HG. (2005) KR-62436, 6-[2-[2-(5-cyano-4,5-dihydropyrazol-1-yl)-2-oxoethylamino]ethylamino]nicotino-nitrile, is a novel dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV) inhibitor with anti-hyperglycemic activity *Eur. J. Pharmacol.* 518: 63-70.
- Kim KY, Nam KA, Kurihara H, and Kim SM. (2008) Potent alpha-glucosidase inhibitors purified from the red alga *Grateloupia elliptica*. *Phytochemistry*. 69: 2820-2825.
- Lee JH, Lee BW, Kim JH, Jeong TS, Kim MJ, Lee WS, and Park KH. (2006) *J. Agric. Food Chem.* 54: 2057-2063.
- Li H, Kang JH, Han JM, Cho MH, Chung YJ, Park KH, Shin DH, Park HY, Choi MS, and Jeong TS. (2008) Anti-Obesity Effects of Soy Leaf via Regulation of Adipogenic Transcription Factors and Fat Oxidation in Diet-Induced Obese Mice and 3T3-L1 Adipocytes. *J. Med. Food*. 18: 899-908.
- Liu C, Chen J, and Wang J. (2009) A novel kaempferol triglycoside from flower buds of *Panax quinquefolium* *Chem. Nat. Compd.* 45: 808-810.
- Marco JA, Adell J, Barbera O, Strack D, and Wray V. (1989) Two isorhamnetin triglycosides from *Anthyllis sericea* *Phytochemistry* 28: 1513-1516.
- McCommis KS, Chen Z, Fu X, McDonald WG, Colca JR, Kletzien RF, Burgess SC, and Finck BN. (2015) Loss of Mitochondrial Pyruvate Carrier 2 in the Liver Leads to Defects in Gluconeogenesis and Compensation via Pyruvate-Alanine Cycling. *Cell Metab.* 22: 682-694.
- Misra J, Kim DK, Jung YS, Kim HB, Kim YH, Yoo EK, Kim BG, Kim S, Lee IK, Harris RA, Kim JS, Lee CH, Cho JW, and Choi HS. (2016) O-GlcNAcylation of orphan nuclear receptor estrogen-related receptor γ promotes hepatic gluconeogenesis. *Diabetes*. 65: 2835-2848.
- Moritoh Y, Takeuchi K, and Hazama M. (2010) Combination treatment with alogliptin and voglibose increases active GLP-1 circulation, prevents the development of diabetes and preserves pancreatic beta-cells in prediabetic *db/db* mice. *Diabetes Obes Metab.* 12: 224-233.
- Murai Y, Takahashi R, Rodas FR, Kitajima J, and Iwashina T. (2013) New flavonol triglycosides from the leaves of soybean cultivars *Nat. Prod. Commun.* 8: 453-456.
- Ntambi JM, Miyazaki M, Dobrzyn A. (2004) Regulation of stearoyl-CoA desaturase expression. *Lipids*. 39: 1061-1065.
- Rhodes CJ. (2005) Type 2 diabetes—a matter of beta-cell life and death? *Science*. 307: 380-384.
- Schliemann W, Schneider B, Wray V, Schmidt J, Nimitz M, Porzel A, and Böhm H. (2006) Flavonols and an indole alkaloid skeleton bearing identical acylated glycosidic groups from yellow petals of *Papaver nudicaule* *Phytochemistry* 67: 191-201.
- Sikorska M. (2003) Flavonoids in the leaves of *Asclepias incarnata* L *Acta. Pol. Pharm.* 60:

471-476.

- Slavin BG, Zarow C, Warden CH, and Fisler JS. (2010) Histological, immunocytochemical, and morphometrical analyses of pancreatic islets in the BSB mouse model of obesity. *Anat. Rec.* (Hoboken). 293: 108-116.
- Stouffer MA, Woods CA, Patel JC, Lee CR, Witkovsky P, Bao L, Machold RP, Jones KT, de Vaca SC, Reith ME, Carr KD, and Rice ME. (2015) Insulin enhances striatal dopamine release by activating cholinergic interneurons and thereby signals reward. *Nat. Commun.* 6: 8543.
- Vetere A, Choudhary A, Burns SM, and Wagner BK. (2014) Targeting the pancreatic β -cell to treat diabetes. *Nat Rev Drug Discov.* 13: 278-289.
- Yuk HJ, Curtis-Long MJ, Ryu HW, Jang KC, Seo WD, Kim JY, Kang KY, and Park KH. (2011) Pterocarpan profiles for soybean leaves at different growth stages and investigation of their glycosidase inhibitions. *J. Agric. Food Chem.* 59: 12683-12690.
- Yunn NO, Koh A, Han S, Lim JH, Park S, Lee J, Kim E, Jang SK, Berggren PO, Ryu SH. (2015) Agonistic aptamer to the insulin receptor leads to biased signaling and functional selectivity through allosteric modulation. *Nucleic Acids Res.* 43: 7688-7701.
- Zang Y, Sato H, and Igarashi K. (2011) Anti-diabetic effects of a kaempferol glycoside-rich fraction from Inripe loybean (Edamame, *Glycine max* L. Merrill. 'Jindai') leaves on KK-Ay Mice *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 75: 1677-1684.
- Zang Y, Zhang L, Igarashi K, and Yu C. (2015) The anti-obesity and anti-diabetic effects of kaempferol glycosides from unripe soybean leaves in high-fat-diet mice. *Food Funct.* 6: 834-841.
- Zhang Y, Gu M, Cai W, Yu L, Feng L, Zhang L, Zang Q, Wang Y, Wang D, Chen H, Tong Q, Ji G, and Huang C. (2016) Dietary component isorhamnetin is a PPAR γ antagonist and ameliorates metabolic disorders induced by diet or leptin deficiency. *Sci Rep.* 6: 19288.
- Zhu N, Sheng S, Li D, LaVoie EJ, Karwe MV, Rosen RT, and O CT. (2001) Antioxidative flavonoid glycosides from quinoa seeds (*Chenopodium quinoa* Willd). *J. Food. Lipids* 8: 37-44.
- 농촌진흥청, 농촌진흥청 기능성식품과장 최정숙, 기능성식품과 이성현, 흑미 속 기능성 물질로 비만 물리친다
- 연구성과실용화진흥원, 건강기능 식품 시장 동향, S&T Market Report, vol. 41, 2016. 10.
- 질병관리본부, Bae Jae-beom, Yoo Jae-il, Kim Bong-jo, Data release of diabetes-related 11 Korean reference epigenome map.
- 질병관리본부, 김연정, 이현식, 김봉조, Metabolic Disturbance depending on The FTO Genotype linked with Obesity and Type 2 Diabetes.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품 기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.