

발간등록번호

11-1543000-000649-01

체지방 및 혈당 개선용 테로카판 강화 기능성소재 개발  
(Development of Pterocarpan-Enriched Functional Materials  
for Regulation of Body Fat and Blood Glucose)

한국생명공학연구원

농림축산식품부

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “체지방 및 혈당 개선용 테로카관 강화 기능성소재 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2014년 10월 22일

주관연구기관명 : 한국생명공학연구원

주관연구책임자 : 정 태 숙

세부연구책임자 : 정 태 숙

연 구 원 : 조한영, 이 화, 강지현,  
김언희, 윤정현, 원효준,  
지현선, 박찬영

협동연구기관명 : (주)인섹트바이오텍

협동연구책임자 : 신 동 하

연 구 원 : 구분환, 오진우, 안승명,  
유민주, 길지영, 김희윤

협동연구기관명 : 경북대학교

협동연구책임자 : 최 명 숙

연 구 원 : 권은영, 최지영, 김영제,  
김예진, 류 리, 한영지,  
한혜진, 김애향

# 요 약 문

## I. 제 목

체지방 및 혈당 개선용 테로카판 강화 기능성소재 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

### (1) 연구개발의 목적

본 연구과제에서는 체지방 및 혈당 개선 테로카판 강화 기능성 소재의 도출, 대량생산 및 사업화를 위한 기능성 제품 개발을 최종 목표로 하며, 주요 연구 내용은 i) 테로카판 강화 기능성소재 개발을 위한 지표물질 선정 및 표준화, ii) 효능 및 기작 규명: 테로카판 강화 소재의 체지방 조절 및 혈당 강하 효능에 대한 in vitro, in vivo, 인체시험 효능 검정 및 작용기작 규명, iii) 대량생산, 안전성: 기능성소재의 대량생산 공정 개발 및 품질관리 방법 확립, iv) 제품, 제형: 기능성소재의 제형 개발을 통한 체지방 조절 및 혈당 강하 건강기능식품(식품) 개발, v) 가능강화 및 차별화된 기능성 제품의 생산 및 사업화이다. 따라서 본 연구과제를 통해 체지방 및 혈당 개선 효능이 검증된 기능성 소재를 확보하고, 나아가 본 연구결과를 바탕으로 개별인정형 건강기능식품 원료성분 인정을 획득하고자 한다. 또한, 식용 가능하고 대량 생산이 가능한 장점이 있는 콩잎이 개별인정 기능성 원료로 등재되면 비만 및 당뇨 예방으로 국민건강 증진 및 의료비 절감, 농가소득 향상 및 부가가치 창출을 통한 관련기술의 산업화 증진에 기여할 것으로 판단된다.

### (2) 연구개발의 필요성

생활 습관병으로 일컬어지고 있는 대사증후군은 질환의 명확성 및 다수성과 효능의 실현성 등의 특징이 있어 국내외 관련 연구가 활발하게 추진되고 있다. 최근 발표된 조사 결과에 따르면 우리나라 당뇨병 환자 수가 2010년 320 만명에서 2050년도에는 501 만명으로 증가될 것으로 전망했으며, 우리나라의 대사증후군 유병률은 지난 10년간 급격히 증가되었다. 따라서 이를 예방하기 위한 국가정책도 확립되어야 할 것이다. 특히, 이들 대사증후군 요인들 중에서도 우선적으로 고려해야 될 것은 복부비만, 이상지질혈증 및 고혈당이다. 아울러 우리나라 인구의 고령화와 함께 소비자들의 건강에 대한 관심이 고조되고 있다. 한편 국내의 건강기능식품 소재의 대부분은 주로 미국, 중국, 일본으로부터 수입되고 있는 실정이므로 국내 자원을 이용한 기능성 소재의 개발이 절실히 필요하며, 기능성 국산 농산자원을 이용한 대사증후군 예방 및 개선용 건강기능식품 및 관련 제품의 개발이 요구된다.

### III. 연구개발 내용 및 범위

(1) 제1세부: 체지방 및 혈당 개선 기능성 소재의 도출

- 테로카판 강화 소재의 표준화를 위한 대사체 분석, 지표성분 선정 및 함량 분석
- 기능성 소재의 체지방 조절 및 혈당 강하 효능에 대한 *in vitro*, 세포계 및 *in vivo* 효능 검색
- 기능성 소재의 체지방 조절 및 혈당 강하 효능에 대한 생화학적, 분자생물학적 작용기작 규명
- 개별인정 기능성 원료 신청을 위한 자료 확보

(2) 제1협동: 체지방 및 혈당 개선 기능성 원료의 제품화

- 시기별 기능성원료(콩잎) 확보 및 인체시험/제품화를 위한 콩잎 대량 수확
- 콩잎으로부터 테로카판 강화 소재의 산업적 대량 추출법의 표준화 연구
- 기능성 소재의 안전성 시험
- 기능성소재의 대량 생산공정 개발 및 임상시험을 위한 시제품 제작
- 제형 및 제품 개발을 위한 콩잎 대량 수확, 원료 생산공정 표준화 확립
- 기능성소재 및 부재료와의 최적 배합 및 제형 설정 연구 및 품질관리 방법 확립
- 기능성소재를 이용한 체지방 조절 및 혈당 강하 기능성 제품 개발

(3) 제2협동: 기능성 소재의 체지방 및 혈당 조절 효능 검정을 위한 인체시험

- 인체시험을 위한 인체시험심의위원회 (IRB) 구성 및 승인 요청
- 인체시험을 통한 테로카판 고함유 분획의 체지방 조절 및 혈당 강하 효능 검정

### IV. 연구개발 결과

(1) 제1세부: 콩잎추출물 (70% ethanol extracts of soy leaves; 70ESL; 95% ethanol extracts of soy leaves:95ESL; ethyl acetate extracts of soy leaves: EASL) 및 이로부터 분리한 테로카판계 화합물의 *in vitro* 항비만, 항당뇨, 항산화 활성 및 세포계에서 인슐린 분비능, 지방축적 억제, 항염증 활성을 통해 항비만, 항당뇨 효능을 갖는 테로카판 강화 (pterocarpans-high; PTH) 기능성 소재를 도출하였다.

콩잎추출물의 HPLC 분석 방법을 확립하였고, 콩잎이 함유하는 물질의 UV spectra 분석을 통해 유효성분이면서 동시에 지표물질로 coumestrol을 선정하였다. 시기별 수확 콩잎의 지표물질의 함량 측정 및 수확량을 비교·분석한 결과, 약 110~125일 경에 수확한 콩잎이 테로카판 화합물의 함량도 높고, 추출 수율도 높음을 확인하였다. 또한 3 콩품종인 WD, YS, GH 중 GH 품종의 콩잎이 PTH 기능성소재로 활용하기에 가장 적합했다.

당뇨유발 동물모델에서 PTH (95ESL과 EASL)의 체지방 감소 및 혈당 조절 효능을 검증하였으며, 동물실험 후에 얻은 간, 췌장, 지방 조직의 분석 및 췌장 베타세포, 섬유아세포, 대식세포에서 PTH 및 테로카판계 화합물 (coumestrol, phaseol, isotrifoliol)의 생리활성, 유전자 및 단백질의 발현 변화를 측정하여 분자생물학적 작용기작을 규명하였다.

95ESL 및 EASL은 췌장조직의 기능 개선, 간조직에서의 당신생 조절 및 지방조직에서 인슐

린의 반응성을 높임으로서 항당뇨 작용을 나타내는데, 이는 주로 테로카판계 화합물 (isotrifoliol, phaseol)이 베타세포에서 GLP-1R, IRS1, IRS2 유전자 및 PKA 단백질에 대한 조절을 통해 인슐린 분비를 증가시키고, 베타세포의 기능을 향상시킨 것으로 분석되었다. 그 외 95ESL, EASL 및 isotrifoliol은 NF- $\kappa$ B 및 MAPKs에 대한 조절을 통한 항염증 활성을 나타냈으며, 이 항염증 작용이 염증을 동반한 당뇨병 치료에 중요한 역할을 할 것으로 판단된다.

실험동물(C57BL/6J 마우스)에 95ESL 또는 EASL의 투여로 대조군에 비해 지방조직에서 지방의 축적을 억제하였으며, 특히 EASL은 항비만 치료제인 Xenical과 같은 작용으로 지방 흡수 억제 효능을 나타내었다. 95ESL과 EASL은 3T3-L1 지방세포에서 농도 의존적으로 지방생합성 억제 효능을 나타내었고, EASL이 더 효과적으로 지방생합성을 억제하였으며, 테로카판계 화합물 중 coumestrol과 phaseol은 3T3-L1 지방세포에서 농도의존적인 지방생합성 억제 효능을 나타내었다. Coumestrol과 phaseol의 지방생합성 억제 효능은 지방생합성을 조절하는 전사인자인 c/EBP $\alpha$ , PPAR $\gamma$  유전자의 발현을 억제함으로써 다음 단계의 발현인자인 FAS, aP2 등의 유전자의 발현 억제하여 지방 생합성을 저해시킴을 알 수 있었다. 이러한 결과들을 토대로 개별인정 기능성 원료 신청을 위한 기능성 자료를 확보하였다.

(2) 제1협동: 본 연구과제에서 테로카판 강화 소재를 산업적으로 생산하기 위한 대량 수확, 원료 생산 공정 시스템을 개발하였으며, 이를 이용하여 생산된 소재를 이용하여 인체시험과 제품화에 사용하였다. 기능성소재 및 부재료와의 최적 배합 및 제형설정을 통해 체지방 조절 및 혈당 강하를 목적으로 하는 제품 개발을 완성하였다. 본 연구기간 동안 콩잎재배를 통해 시기별 콩잎을 확보하였으며, 시기별 콩잎의 유효성분 자료를 바탕으로 3 콩품종인 WD, YS, GH 중 GH 품종 (110일령)을 선별하여 콩잎을 대량 수확하였다. 수확한 콩잎은 생산 공정 (추출, 농축, 분말건조)을 거쳐 인체시험과 제품화에 활용하였다. 생산된 대량 콩잎의 건조시간의 단축을 통한 단가 절감을 감안할 경우 열풍건조가 적정함을 확인하였다. 추출 시 대량생산 공정을 통해 95% EtOH 추출물 대비 EtOAc 추출물이 함유하는 지표성분인 동시에 유효성분인 coumestrol 함량은 2.92배 이었으며, 총 플라보노이드 함량은 3.21배, 총 페놀 함량은 1.17배 이었다. 그러나 추출 수율면에서는 95% EtOH 추출물이 EtOAc 추출물에 비해 3.44배 높았다. 따라서 이상의 결과로 대량생산 시 95% EtOH이 EtOAc보다 효과적인 추출용매인 것을 확인하였다. 주정추출분말의 산업적 대량생산 공정으로 건조 콩잎 건조물 무게의 10배 부피의 95% EtOH로 추출한 후 부형제로 텍스트린 또는 starch를 첨가한 후 진공건조를 통한 공정을 완성하였다. 공인기관에서의 생산된 PTH의 안전성/독성시험을 통해 단회경구투여 독성시험, 복귀돌연변이시험에서 안전성을 확인하였으며, 550  $\mu$ g/mL 이하에서는 염색체 이상이 발견되지 않았다. 또한, 공인인증기관에서의 분석 결과 잔류농약과 중금속은 검출되지 않았으며, 이를 바탕으로 무기농 재배임을 확인하였다. 대조군 (placebo), 양성대조군 (그린마테추출물) 그리고 시험군 (95% EtOH PTH)의 3가지 캡슐 샘플을 제작하여 제2협동과제의 인체시험에 사용하였다.

본 연구의 연구결과를 중심으로 95% EtOH 콩잎주정추출분말을 활용하여 체지방 조절을 위한 기능성 신제품을 개발하였다. 제품은 일반 식품이 아닌 기능성을 함유하는 체중조절용 조제 식품인 ‘슬림파워’라는 브랜드로 개발하였다. ‘슬림파워’의 효율을 극대화하기 위해 기능성 소재 및 부재료와의 최적 배합 및 제형 설정 연구를 통해 확보된 관련 부형제 및 기능성 원료를 활용하는 제품을 완성하였다.

(3) 제2협동: 경미한 대사증후군을 동반하는 반건강인을 대상으로 인체시험을 12 주간 실시하였다. 그 결과, 시험물질인 테로카판 강화 소재의 보충은 체지방 감량, 혈당과 혈중 지질 농도 개선, 당뇨 관련 바이오마커 뿐만 아니라 염증성 cytokine 농도 저하에 유효한 효과를 보였다. 따라서 테로카판 강화 기능성소재는 대사증후군 개선에 유효한 물질임이 입증되었으며, 신기능성 식품소재로의 개발 가능성이 높다고 판단된다.

## V. 연구성과 및 성과활용 계획

본 연구과제는 국내 콩잎추출물로부터 테로카판 강화 기능성소재를 도출하고, 동물실험 및 인체시험을 통해 체지방 및 혈당 개선용 기능성 소재로서의 효능을 검증하였다. 이 효능을 바탕으로 기능성식품을 개발하여 사업화에 착수하였다. 테로카판 강화 기능성소재의 효능에 대한 특허출원 및 등록으로 산업재산권을 확보하였고, 국제 저널에 발표함으로써 건강기능식품의 글로벌 경쟁력을 제시하였다. 본 연구를 통해 활용도가 낮았던 콩잎을 이용한 기능성 소재 개발을 통해 활용도를 높임으로써 농가의 소득 증대를 꾀할 수 있을 것으로 판단된다. 또한, 대부분 건강기능식품 소재를 외국으로부터 수입해오고 있는 실정에서 국내자원과 자체 기술을 이용한 기능성소재 개발을 통해 국내 기술의 경쟁력을 높일 수 있으며, 본 연구 과제를 통해 확립된 산업적 대량생산 공정을 통해 개발된 기능성 제품은 제 1 협동기관에서 이미 확보하고 있는 국내 및 해외 판매 네트워크를 통한 글로벌 사업화를 시행하고자 한다.

# SUMMARY

## I. The title

Development of pterocarpan-enriched functional materials for regulation of body fat and blood glucose

## II. Purpose of Research

To develop the new health-functional ingredient for prevention and improvement of obesity and diabetes using pterocarpan-enriched fraction from soy leaves, three sub-projects were performed.

- 1) Development of functional materials from the extracts of soy leaves for reducing body fat and improving blood glucose,
- 2) Industrialization of pterocarpan-enriched functional materials of improving body fat and blood glucose,
- 3) Investigation of efficacy of pterocarpan-enriched functional materials for regulating body fat and blood glucose in human

Regarding metabolic syndrome, classified as lifestyle diseases, many researches are actively promoting in worldwide because of the clarify of the disease. According to a recent released survey, the number of diabetic patient will be increased from 3.2 million people in 2010 to 5.91 million people in 2050 as well as the prevalence of metabolic syndrome increased rapidly over the past decade. Therefore, national policies should be established to prevent this problem. In particular, abdominal obesity, dyslipidemia, and hyperglycemia will be considered a priority among the factors of metabolic syndrome. Because the ingredient of health-functional food in Korea is mainly imported from the USA, China, and Japan, domestic agricultural resources are needed to develop functional ingredient and product development.

## III. Scope of the study

1st Sub-project: Development of functional materials for reducing body fat and improving blood glucose

- Analysis of components and establishment of standardization method of high-pterocarpan functional materials
- In vitro and cell-based bioactivity screening of functional materials and compounds isolated from them for target markers of obesity and diabetes

- Investigation of efficacy of functional materials for regulating body fat and blood glucose in animal model
- Study of molecular mechanism underlying the anti-obesity and anti-diabetic effects of functional materials
- Acquisition of basis information for application of individual approval

2nd Sub-project: Industrialization of functional materials of improving body fat and blood glucose

- Industrial mass production of soybean leaves for clinical trial and development of product
- Study standardization of industrial extraction method from soybean leaves
- Safety/toxicity test of functional ingredient
- Development of industrial mass and process production for clinical trial
- Establishment of mass and material process production for development of formula and product
- Formulation study with functional ingredient and sub-materials and establishment of quality control
- Development of product for improving body fat and blood glucose using functional ingredient

3rd Sub-project: Investigation of efficacy of functional ingredients for regulating body fat and blood glucose in human

- Request for approval of Institutional Review Board for clinical trial
- Clinical trial of high-pterocarpin functional materials for regulation of body fat and blood glucose

#### IV. Results

1st Sub-project: Soy leaf was selected to pterocarpin-enriched functional materials for body fat changes and improving blood glucose level. Efficient extraction methods of pterocarpin-enriched fractions were established and the standardization method was set up using the main components of pterocarpin-rich fractions. The efficacy of high-pterocarpin extracts from soy leaves were validated in 3T3-L1 adipocytes, HIT-T15  $\beta$ -cells, MIN6  $\beta$ -cells, and RAW264.7 macrophages. Supplementation of high-pterocarpin fraction was beneficial for reducing lipid absorption and improving glucose tolerance in C57BL/6J mice with high-fat diet (HFD)-induced type 2 diabetes. Furthermore, the molecular mechanisms of anti-diabetic and anti-obesity effects were investigated through adipocytes, pancreatic cells, and mice based studies. This study suggests that pterocarpin-enriched functional materials improves abdominal fat accumulation, plasma glucose, and insulin levels in mice with HFD-induced type 2



diabetes by regulating lipogenesis,  $\beta$ -cell proliferation, and insulin sensitivity.

2nd Sub-project: In this study, we developed functional ingredient by mass and process product system from soybean leaves extracts. And it is use in products sample for clinical test and goods for improvement of body fat and blood glucose in human. For the industrial mass production of soy leaves, we growed GH specie for 110 days. The specie and growth day was tested by economic feasibility and production active ingredients. In process production, soy leaves were hot-air dried and than extracted by 95% ethanol. It shows that 95% ethanol extracts of soy leaves (95ESL) are high 3.21 fold of total flavonoids content and 1.17 fold of total phenolic contents than EtOAc extracts. The concentrated 95ESL were mixed with dilute agent, starch and/or dextrin and then dried by vacuum dry.

The acute oral toxicity test in Sprague-Dawley rats and chromosomal aberration test in *Salmonella typhimurium* (TA100, TA1535, TA98, TA1537) and *E. coli* WP2 *uvrA* of 95ESL showed that no significant changes between control and test groups. Reverse mutation test of 95% ethanol extracts in Chinese hamster lung (CHL) cells showed that safety in less than 550  $\mu\text{g}/\text{mL}$  95ESL.

For clinical test, we were prepared 3 capsule type samples, i) control sample that contained only starch, ii) a positive control sample that contained mate extract, and iii) test group that contained 95ESL.

we produced the development of 'SLIM POWER', which is a health functional food for control and improvement of body fat.

3rd Sub-project: We performed a clinical trial to investigate effects of high-pterocarpan fraction from soy leaf in subjects with mild metabolic syndrome for 12 weeks. Supplementation of high-pterocarpan fraction was beneficial for improving features of metabolic syndrome, such as abnormal glucose and lipids levels, in obese subjects with mild metabolic syndrome. Therefore, high-pterocarpan fraction has been proven to improve the features for metabolic syndrome and is a beneficial plant resource for a new functional food ingredient.

## V. Research achievements and Application Plan of the Results

This research consortium is planning to commercialize a functional ingredient with pterocarpan-enriched fraction isolated from soy leaves for improving body fat and blood glucose. This research could be contribute to enhance the income levels of farmer though increasing utilization of soy leaves, byproduct of soybean cultivation. The research consortium has established a mass production of functional materials, standardized functional materials, and investigated efficacy and molecular mechanism based on the animal study and human clinical trial. These findings have been

published in prominent international journals and formed the basis for patent applications, which has promoted the export possibility of functional materials made in Korea to an international audience. The research consortium has also contributed to industrial development by nurturing human resources for future growth.

## CONTENTS

Chapter 1	Introduction	15
Chapter 2	Overview of Research Development in the World and Korea	19
Chapter 3	Research Contents and Results	27
	1st Sub-project: Development of functional materials for reducing body fat and improving blood glucose	27
	2nd Sub-project: Industrialization of functional materials of improving body fat and blood glucose	253
	3rd Sub-project: Investigation of efficacy of functional ingredients for regulating body fat and blood glucose in human	257
Chapter 4	Achievement and Contribution of the Research	253
Chapter 5	Achievement of the study and application plan of the results	257
Chapter 6	Foreign Information of Science and Technology	271
Chapter 7	Current status of research installation	272
Chapter 8	References	273

# 목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요.....	15
제 2 장	국내외 기술개발 현황.....	19
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과.....	27
	제1세부과제: 체지방 및 혈당 개선 기능성 소재의 도출.....	27
	제1협동과제: 체지방 및 혈당 개선 기능성 원료의 제품화 .....	253
	제2협동과제: 기능성 소재의 체지방 및 혈당 조절 효능 검정을 위한 인체 시험 .....	257
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도.....	253
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획.....	257
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보.....	271
제 7 장	연구시설·장비 현황.....	272
제 8 장	참고문헌.....	273

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제1절 연구개발의 목적

본 연구과제에서는 체지방 및 혈당 개선 테로카판 강화 기능성 소재의 도출, 대량생산 및 사업화를 위한 기능성 제품 개발을 최종 목표로 하며, 주요 연구 내용은 i) 테로카판 강화 기능성소재 개발을 위한 지표물질 선정 및 표준화, ii) 효능 및 기작 규명: 테로카판 강화 소재의 체지방 조절 및 혈당 강하 효능에 대한 in vitro, in vivo, 인체시험 효능 검정 및 작용기작 규명, iii) 대량생산, 안전성: 기능성소재의 대량생산 공정 개발 및 품질관리 방법 확립, iv) 제품, 제형: 기능성소재의 제형 개발을 통한 체지방 조절 및 혈당 강하 건강기능식품(식품) 개발, v) 기능강화 및 차별화된 기능성 제품의 생산 및 사업화이다. 따라서 본 연구과제를 통해 체지방 및 혈당 개선 효능이 검증된 기능성 소재를 확보하고, 나아가 본 연구결과를 바탕으로 개별인정형 건강기능식품 원료성분 인정을 획득하고자 한다. 또한, 식용 가능하고 대량 생산이 가능한 장점이 있는 콩잎이 개별인정 기능성 원료로 등재되면 비만 및 당뇨 예방으로 국민건강 증진 및 의료비 절감, 농가소득 향상 및 부가가치 창출을 통한 관련기술의 산업화 증진에 기여할 것으로 판단된다.

## 제2절 연구개발의 필요성

○ 현대사회의 도시화된 생활환경, 육체적 활동 감소 및 식생활 및 생활방식의 문제점으로 인해 많은 대사성질환 환자가 증가하고 있어, 이들의 건강관리 및 치료문제가 사회적으로 심화되고 있다. 우리나라의 경우, 총 섭취열량 중 지방급원 에너지 비는 과거 14%에서 최근 약 20% 이상으로 증가되었고, 이러한 지방의 소비증가 추세는 비만, 당뇨병, 동맥경화증 등을 포함한 대사증후군의 발병증가와 관련이 있다.

○ 세계보건기구에 따르면 지난 30년간 전 세계적으로 비만 유병률이 두 배 정도 증가하였으며 20세 성인의 1/3이 과체중이거나 비만한 상태이다. 2013년 대한당뇨병학회의 Diabetes Fact Sheet에 의하면 당뇨병이 없는 한국인 성인의 44.4%와 당뇨병이 있는 성인의 30.8%가 비만인 것으로 보고되었다. 비만 유병률이 늘면서 대사증후군 유병률은 평행적으로 늘어날 것으로 예상된다.

○ 이러한 대사증후군의 유병률은 앞으로도 증가할 것으로 추정되며, 특히 아시아인의 당뇨병 발생 증가율이 빨라지고 있으며, 젊은 환자도 매년 증가하고 있는 추세이다. 미국뿐만 아니라 국내에서도 대사증후군의 급증으로 개인의 의료비 지출 증가에 의한 국가 의료재정이 급격히 상승하고 있다 (의료비 지출 2004년 5조 1천억원 → 2010년 11조 2천억원 이상).

○ 한국인의 당뇨병 발생 체형은 체질적으로 ‘마른 비만’으로, 환자 대부분이 체중은 정상 범위이지만 복부 비만만 있는 경우였다. 하지만 최근 들어 당뇨병 환자 네 명 중 세 명이 과체

중이거나 비만 계층에서 집중적으로 발생하고 있다. 특히 여성 당뇨병 환자의 복부 비만율은 56% 수준이며, 남성은 41%이다. 혈당 조절은 췌장에서 분비되는 인슐린에 의해 주로 이뤄지는데, 과도하게 쌓인 지방 조직들이 인슐린을 잡아먹거나 활성도를 떨어뜨린다. 한국인은 서구인에 비해 상대적으로 인슐린 분비능이 떨어지고, 고혈압, 고지혈증, 당뇨병성 신증 등 각종 합병증을 동반하는 비율이 높고, 복약 순응도가 낮다. 따라서 국가적 당뇨병 관리 사업 필요 국가 전체 의료비 부담을 줄이려면 당뇨병 조기 발견 사업과 위험 그룹에 대해 합병증 발생을 줄이는 대대적인 검진 사업이 필요하다.

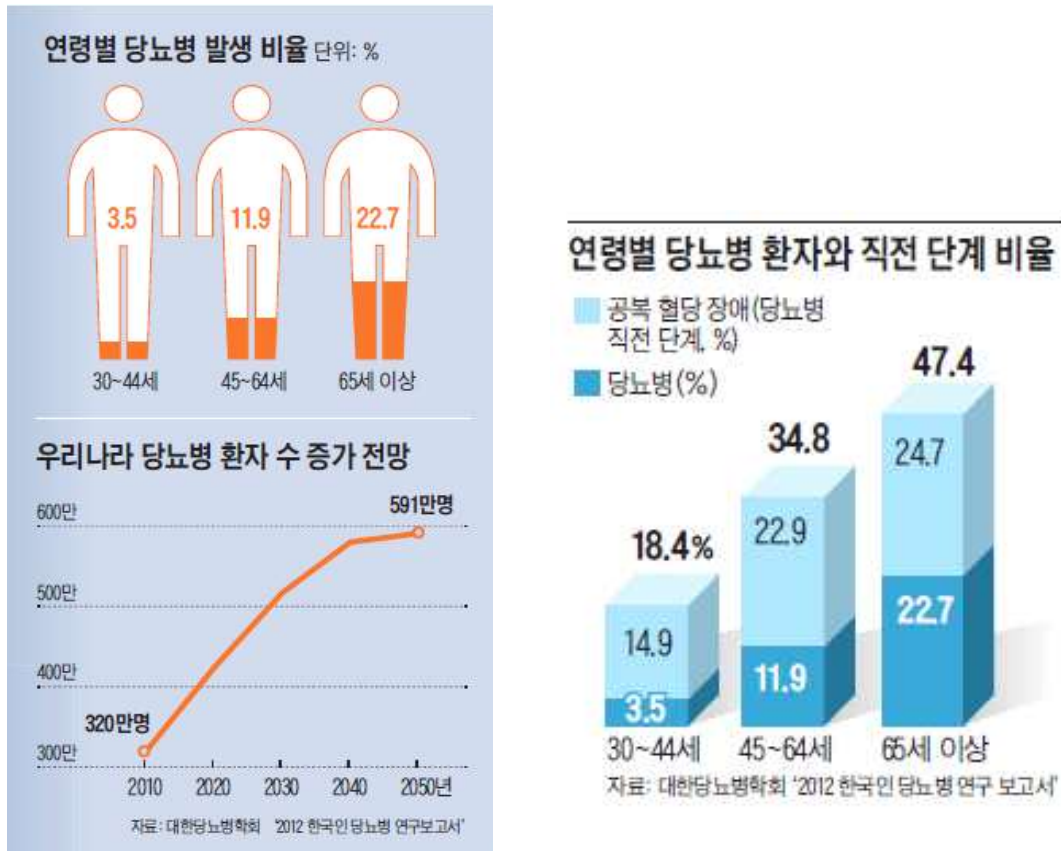


그림 1. 우리나라 당뇨병 환자 현황 및 증가 전망 (출처: 2012. 11. 9. 조선일보 기사에서 발췌).

○ Framingham Heart Study Offspring 연구에 따르면 기저 대사증후군이 있는 대상자에서 당뇨병 위험도가 7배 정도 증가하는 것으로 보고되었다. 또 다른 연구에서는 위험도가 남성에서는 3.7배, 여성에서는 6.1배 증가하는 것으로 보고되었다. 또한, 위험인자의 수가 많을수록 당뇨병의 위험도는 증가하는 것으로 분석되었다. 따라서 대사증후군의 진단은 심혈관질환의 위험도를 2배 정도 증가시키며 당뇨병의 위험도는 적어도 5배 이상 증가시키는 것으로 사료된다.

○ 당뇨병 치료제 시장은 제약 산업에서 가장 빠르게 성장하고 있는 시장 중 하나이다. 전 세계 당뇨병 치료제 시장은 2009년 263억 달러에서 2016년에는 443억 달러로 성장이 예상된다 (Datamonitor, Diabetes Market to 2016, 2010). 국내 당뇨병 치료제 시장 규모도 2010년 4,401억 원에서 2016년에는 9,300억 원의 시장으로 성장할 것으로 예상된다 (유한양행, Decision

Resources Group, 2012).

○ 기존 당뇨병 제제는 혈당조절에 탁월한 효과를 보이지만 당대사를 근본적으로 조절하거나 특정 단백질에만 작용하는 것이 아니어서 저혈당이나 신부전 등 부작용을 초래할 수 있다는 한계가 있다. 따라서 부작용이 없고 유효성이 우수한 식품유래 항비만 및 혈당강하 기능성 소재 개발이 절실히 필요하다.

○ 당뇨병치료제 시장 현황

계열	매출액 (억원)		점유율 (%)	
	2012년	2013년	2012년	2013년
DPP-4 (DPP-4억제제)	1487	2230	30.8	43.3
SU (설폰닐우레아)	713	531	14.8	10.6
Met (메트포민)	493	355	10.2	7.1
TZD (치아졸리딘)	86	104	1.8	2.1
AGI (알파글루코시다제)	137	81	2.8	1.6
기타	241	214	5.0	4.3

\*DPP-4의 경우 Met 복합제 매출을 합산

○ 당뇨병치료제 계열별 현황

계열	치료원리	특징	단점
SU	췌장 인슐린 분비 촉진	가장 오래된 약물	저혈당, 체중증가
Met	간의 포도당 생성 억제	저혈당 위험↓, 식욕감퇴	위장관 부작용
TZD	근육·지방 조직에 포도당 소비 촉진	저혈당 위험↓, 인슐린저항성 개선	체중증가, 말초부종
AGI	탄수화물 소화감소	식후혈당 조절	위장관 부작용
Meg	인슐린 분비 촉진	식후혈당 조절	위장관 부작용
DPP4	DPP-4효소 억제로 인슐린 조절	저혈당 위험↓, 식후혈당 조절	장기 임상실결과 부족

○ 현재 만성질환치료제 시장에서 당뇨병치료제가 우세를 띄고 있으며, 고혈압과 고지혈증 약물의 경우 신약 출시가 미흡한 상태이다.

○ 우리나라는 2018년이면 65세 이상 노인인구 비중이 14%에 달해 고령사회로 진입하고 2026년엔 노인비중이 21%에 달하는 초고령사회에 들어설 것으로 예상되고 있다. 중국도 2010년 1억 110만명이었던 노인인구가 2025년에는 2억명에 육박할 것으로 전망된다. 따라서 바이오, 헬스케어 산업이 커질 것으로 예상된다.

○ 한국인의 기대수명은 1970년 평균 61.9세에서 2012년 81.4세로 20년 가까이 연장됐지만 서

구화된 식습관으로 암, 심혈관질환, 대사증후군 등의 발병위험도 함께 높아졌기 때문에 예방 및 치료제 연구개발이 필요하다. 뿐만 아니라 고령자 당뇨인구 증가로 인한 의료비 증가에 따라 유발되는 건강보험 재정악화, 세대 간 갈등 및 사회적 혼란 유발, 생산성저하 측면에서 향후 사회의 새로운 위험요소로 작용할 가능성이 크다.

○ 우리나라 및 세계의 건강기능 식품 시장 현황

(단위: 억원/억달러)

구분		시장규모					성장률 CAGR (%)
		2012	2013	2014	2015	2016	
국내 시장	고시형 건강기능식품	13,434	14,794	16,129	17,347	18,314	6.4%
	개별인정형 건강기능식품	2,197	3,064	4,274	5,962	8,316	39.5%
	건강기능식품 합계	15,631	17,858	20,403	23,309	26,630	14.2%
세계 시장	Dietary supplement	951	1,013	1,082	1,156	1,235	6.0%
국내외 합계 (억원)		1,061,731	1,132,158	1,210,603	1,294,909	1,385,130	5.5%

○ 위의 표에 제시된 것처럼 국내 및 국외 건강기능식품 시장이 꾸준히 성장하고 있으며 국내의 경우, 특히 개별인정형 건강기능식품의 성장률이 가장 높다.

○ 건강에 대한 소비자의 관심과 질병예방 차원에서 건강식품 성분이나 기능성 식품섭취에 대한 관심이 고조되고 있기 때문에 농림수산물 원료를 활용하여 건강기능식품 소재를 개발하는 것은 농수산물을 고부가가치화 함으로써 식품산업뿐만 아니라 타 산업 (제약, 한방, 화장품)과의 접목 가능성이 높아 미래 성장 동력으로 발전할 가능성이 높다.



## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제1절 국내 연구 현황

○ 질병관리본부의 김원호 박사연구팀에서는 간과 췌장에서의 대사기능이상조절에 관여하는 주요 조절인자로서의 ATF3 단백질의 역할과 기능조절 연구를 진행하였다. 그 결과를 바탕으로 직접 이 유전자를 제어함으로써 실제 비만성 당뇨병 발생을 제어함과 함께 관련 분자적 조절 기전을 밝혔다. 연구결과 ATF3가 비만과 당뇨병 발생에 있어 원인 조절 유전자임을 확인하였고 이에 따른 새로운 치료기술에 대한 과학적 근거를 제시하기 위해 연구를 수행중이다.

○ 광주과학기술원 생명과학부 박철승 교수 연구팀은 세레브론이 비만 및 제2형 당뇨병의 예방과 치료에 중요한 표적인 AMPK를 직접적으로 조절하는 상위 메카니즘임을 확인하였다. 세레브론의 발현을 저해하거나 세레브론과 AMPK의 결합을 차단할 경우, AMPK를 인위적으로 활성화하는 것이 가능할 것으로 예상 된다. 따라서 이러한 물질을 개발하거나 발견한다면, 고지방식 등으로 초래되는 비만, 지방간 및 제2형 당뇨병을 예방 또는 치료할 수 있는 획기적인 전기를 제공할 것으로 기대된다.

○ 정부는 기능성소재 개발의 중요성을 인식하여 복지부의 보건의료 기술연구 개발사업, 교과부의 특정연구개발사업 및 지역협력연구센터, 지경부, 중기청의 기술개발사업, 농식품부의 농림기술개발사업 및 바이오그린연구사업을 통해 기능성 소재 개발 연구를 지원하고 있으나, 천연물소재의 상용화 연구에 대한 예산지원은 아직까지 미흡하고, 상용화를 달성하기 위한 연구관리 및 연구결과물 관리체계의 활성화가 부족하다.

### 제2절 국외 연구 현황

○ 미국은 정부차원에서 ‘NIH Obesity Research’ 계획을 수립하여 산하 연구소 (NIDDK, NHLBI, NCCOR 등)를 중심으로 광범위한 비만연구 및 전략 계획을 연구 수행중이며 2011년에는 Strategic Plan for NIH Obesity Research를 발표하였다.

○ 또한 ADA (American Diabetes Association) Research Founding Program을 통해 1999년에 180억원이었던 예산이 점차 증가하여 2005년에는 400억원의 연구비를 투입하여 당뇨의 유전학적, 면역학적 연구 등을 통해 발병원인 규명, 새로운 치료법 연구를 수행해 오고 있다.

○ 일본은 청부차원에서 당뇨병을 포함한 생활습관병에 대해 연구개발을 지원하고 있으며 2011년에는 34억 엔이었다. 당뇨병 가족의 genome 해석 및 exon 시퀀스를 통한 유전자 연구 및 신규 바이오 마커 도출 연구가 진행 중이다.

○ Chien-Yun Hsiang 연구팀은 인슐린 수용체와 자체적으로 찾은 M. charantia 인슐린 수용체

-결합 단백질 (M. charantia insulin receptor-binding protein (mciRBP))이라고 이름붙인 여주 단백질 사이의 특징한 상호작용을 발견하여 새로운 당뇨 치료기술을 연구 중이다.

○ 유럽당뇨학회에서는 인슐린 복합 당뇨신약인 LAPSInsulin Combo와 LAPSGLP/GCG의 연구 결과가 각각 발표됐으며 LAPSInsulin Combo는 인슐린 분비 및 식욕 억제를 돕는 ‘GIP-1과 대사를 증가시키는 ‘Glucagon의 결합체로 주1회 투여하는 인슐린 복합 당뇨치료제 후보물질로 기대된다.

○ 독일 뮌헨헬름홀츠센터 연구팀은 당뇨병 치료제로 널리 사용되는 메트포르민 (Metformin)과 SGLT2 억제제 (SGLT2 inhibitor)를 병용하는 동물 실험을 수행하였는데 그 결과 혈당이 효과적으로 억제되고 특히 식후 피크 혈당이 감소한 가운데 당화혈색소 (HbA1c) 수치가 개선되었음을 보고하였다.

○ 스웨덴 룬드(Lund) 대학 당뇨병센터의 안데르스 로센그렌(Anders Rosengren) 박사는 염증에 관여하는 SFRP-4 단백질의 혈중수치로 당뇨병 발병을 여러 해 전에 예측할 수 있는 연구결과를 발표했다. 연구팀은 당뇨병 환자와 정상인을 대상으로 췌장에서 인슐린을 생산하는 베타세포를 비교분석한 결과 당뇨병 환자의 베타세포가 SFRP-4 단백질을 훨씬 많이 가지고 있다는 사실을 발견했고, SFRP-4 단백질의 혈중수치가 평균 이상인 사람은 평균 이하인 사람에 비해 몇 년 후 2형 당뇨병이 나타날 가능성이 5배 가까이 높은 것으로 나타났음 (Mahdi T *et al.*, Cell Metab. 16: 625-33, 2012). 이 결과는 염증에 관여하는 SFRP-4 단백질의 혈중수치가 당뇨병 발병을 여러 해 전에 예고하는 강력한 ‘위험표지’임을 보여주며, 이 염증표지 단백질이 당뇨병과 연관이 있는 이유는 가벼운 만성염증이 베타세포의 기능을 약화시켜 충분한 인슐린이 만들어지지 못하기 때문이다. 당뇨병이 진단되었을 때는 이미 혈관, 망막 등 여러 신체조직 손상이 여러 해 동안 진행돼 왔을 가능성이 매우 크므로, 진단되기 여러 해 전에 혈액검사를 통해 이를 예측할 수 있다면 당뇨병의 예방이 가능하며, SFRP-4 단백질 증가 억제제 개발이 당뇨병의 예방과 치료의 새로운 타겟이 될 수 있을 것으로 전망했다.

○ 캐나다 성미카엘병원 연구팀은 총 450명을 대상으로 한 12건의 나무 견과류 관련 임상시험 자료를 종합 분석한 결과 나무 견과류를 하루 평균 56g 정도를 섭취하면 공복혈당 수치와 당화혈색소 (HbA1c) 혈중 수치가 현저히 감소됨을 보고하였다.

### 제3절 국내·외 연구 및 제품개발 현황 비교 및 필요 연구 분야

#### 1. 국외 연구 및 제품개발 현황

○ 경구용 혈당강하제에는 설폰요소제(설폰닐우레아), 벤조산 유도제, 비구아니드제, 알파글루코시다제 억제제, 치아졸리딘디온제 등이 있다. 이 약들은 각각의 특성이 다르고, 혈당강하 정도, 작용시간, 발현시간, 지속시간, 약물의 대사, 부작용 등이 달라 환자에게 맞는 약물을 처방해야 한다. 기존의 제2형 당뇨병 치료제 대부분은 인슐린 저항성에 작용하거나 인슐린 분비를

자극하는데 초점이 맞춰져 있다. 다시 말해 DPP-4 억제제가 나오기 전까지 제2형 당뇨병 환자의 고혈당의 원인으로 작용하는 췌장 섬세포에 맞춰진 당뇨병 치료제는 없었기 때문에 DPP-4 억제제는 획기적인 약으로 평가 받고 있다.

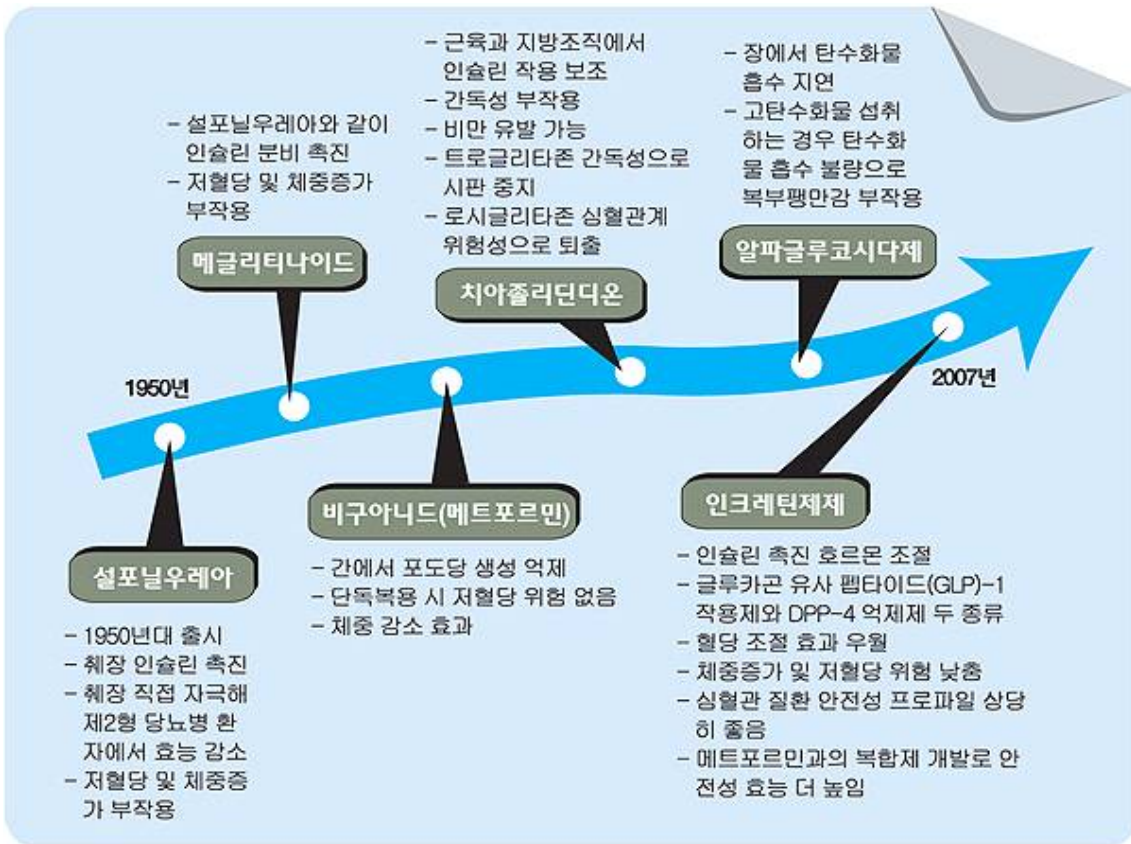


그림 2. 당뇨병 치료제의 종류 및 장·단점 (2013. 6. 24. 의협신문 기사에서 발췌함).

○ 인슐린 분비 호르몬 분해효소(DPP-4) 억제제 계열로 세대교체가 이뤄지고 있는 당뇨병 치료제 시장: 의약품조사 전문기관 유비케어의 시장분석 자료에 따르면 지난 2008년 자누비아(한국MSD)가 시장에 첫선을 보인 이후 DPP-4 억제제는 2010년 12.9%, 2011년엔 18.8%, 2012년 5월 현재 26.4%로 매년 점유율을 높여 왔다. DPP-4 억제제는 안정적인 혈당 강하 효과와 저혈당 및 체중증가 위험이 낮고, 심혈관 질환에 대한 안전성 연구도 진행하고 있는데, 이 결과가 좋게 나온다면 DPP-4 억제제는 더 많은 사랑을 받을 것으로 전문가들은 예측하고 있다. PP-4 억제제 제품에는 자누비아 (시티그립틴, 한국 MSD) 가브스(빌리글립틴, 한국노바티스), 트라젠타 (리나그립틴, 한국베링거인겔하임-일라이릴리), 온글라이자 (삭사글립틴, 한국BMS-한국아스트라제네카), 제미글로 ((제미글립틴, LG 생명과학, 국내 최초 개발 DPP-4 억제제)가 시장에 출시되었다.

○ 현재는 미국의 제약회사가 특허 출원을 주도하고 있으며, 일본의 경우 2002년부터 정부차원의 지원으로 대사증후군 관련 특허의 출원이 급격히 증가하는 추세를 보이고 있다.

○ 미국의 IGSB (Institute for Genomics & Systems Biology) 기관은 2006년부터 설립되었으며

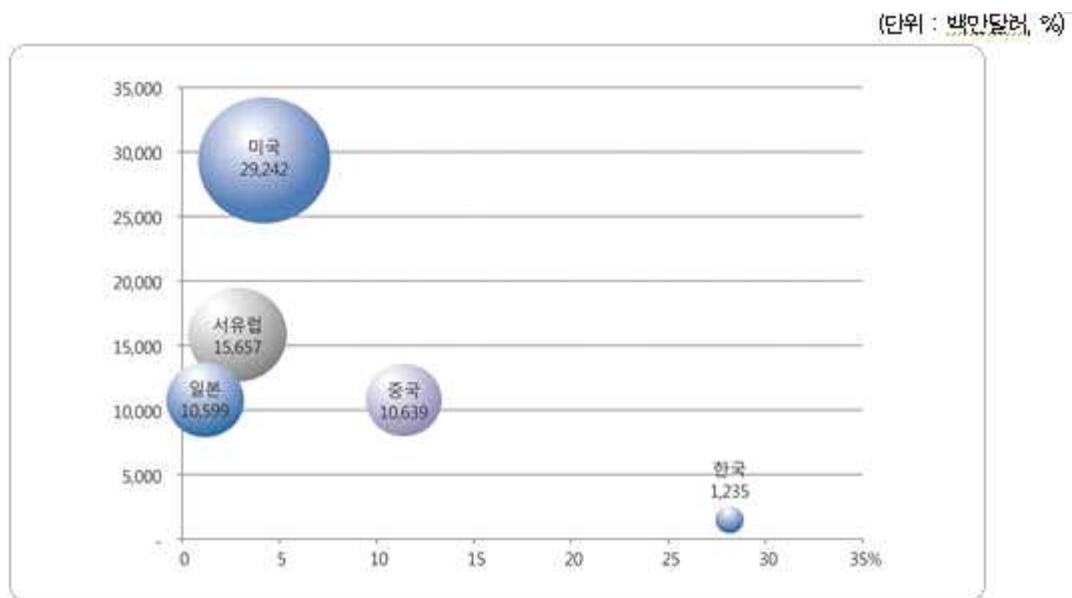
생물학 관련 주요 연구를 DNA 시퀀스, 유전자 발현도 분석 등 유전체 연구에 초점을 맞춰 대사성질환, 당뇨병, 및 염증성 장 질환 등의 연구가 진행 중이다.

○ 대사 증후군 원인 규명과 치료법 개발을 위한 천연물질 및 기존 치료제의 조합에 관한 신약 제품 개발이 주를 이루고 있다.

○ 일본기업 (Takeda Chemical Industries)과 미국 기업 (Eli Lilly and Company, XOMA Technology, Merck Sharp & Dohme) 아일랜드기업 (Amarin Pharmaceutical Ireland)은 대사증후군 병인규명 및 치료법 개발에 관련한 특허의 비중이 매우 높다.

○ 유럽의 경우, 기존에 있는 특정 성분을 더욱 보강하거나 새로운 성분을 첨가한 식품 개발이 최근 추세이며 예로, 스위스연구팀에 의해 개발된 비타민 A와 철분이 풍부한 황금쌀 (golden rice)이 있다.

○ 국가/지역별 건강기능식품 시장규모 및 성장률



주 : 한국은행 경제통계시스템(ECOS), 2011년도 원/달러 평균환율 적용  
출처 : 1) 식약청, 2011년 건강기능식품 생산실적 분석결과 발표, 보도자료, 2012. 5. 9  
2) NBI's Global Supplement & Nutrition Industry Report, Nutrition Business Journal, 2012

○ 위에 제시된 것처럼 국가/지역별 건강기능식품 시장규모 및 성장률을 보면 미국이 가장 우세를 보이고 있다. 그러나 선진국들은 약 3%의 낮은 성장률을 유지할 것으로 예상되고 개발도상국이 큰 성장률을 보일 것으로 예측된다.

○ 최근 건강에 대한 소비자들의 관심이 체중조절과 체력향상을 돕는 performance enhancers, muscle builders, weight gainers 등 건강증진용 제품의 판매확대로 연결되면서 sports nutrition 시장의 최근 5년간 연평균 성장률이 가장 높은 6.2%를 기록하였다.

## 2. 국내 연구 및 제품개발 현황

- 국내에서는 정부차원의 다양한 지원에 의해 기능성 식품 및 소재에 관한 연구개발이 진행되고 있다. 교육부와 미래창조과학부는 이공분야 기초연구사업, 유전자-동의보감 사업 등을 통해 기능성 식품 및 소재 개발을 위한 원천기술 개발을 지원하고 있으며 한국식품연구원에서도 식품 소재의 기능성 탐색 및 발굴, 질병 예방과 건강 증진용 식품 개발, 이들의 기능성을 평가하는 기술 개발을 지원하여 비만억제, 개인맞춤형 식품 등에 관한 연구가 수행 중이다.
- 국가적 문제로 대두되고 있는 인구고령화에 대응하기 위해 ‘과학기술 미래비전 2040’ 및 ‘건강한 세상 구현에 필요한 핵심기술’ 등과 같은 연구를 제도적으로 지원하고 있다.
- 또한, 연구 개발로 얻어진 기술이 사업화로 연계될 수 있도록 국가차원에서 기술사업화지원 사업이 추진되고 있다. 기능성 소재 및 건강기능식품 개발사업단, 생활습관병 개선 기능성 가공제품개발 및 산업화, 항비만 바이오 신소재 사업단 등 5개의 과제가 현재 진행 중이다.
- 현재 체지방 조절을 위한 식품으로 일반식품, 건강기능식품 그리고 체중조절용식품으로 나누어져 있는 상황이다. 일반 식품의 경우, 효능효과를 확인하기 어려우며 식단조절형태이기에 소비자의 요구에서는 많이 낮은 상황이다. 건강기능식품의 경우, 현재 고시되어 있는 기능성 원료를 사용하여 효과를 확인하기 위한 제품이 많이 유통되고 있다. 건강기능식품으로 가장 많이 이용되고 있는 원료로는 가르시니아카보지아껍질추출물과 공액리놀레산이며, 이는 시장에서 주 기능성 원료로 활용되고 있다. 실례로 2004년 이후 가장 많이 인정된 원료로 밀크씨슬추출물(26건)이 있으며, 다음으로 가르시니아카보지아껍질추출물 (25건)과 공액리놀레산 (22건) 순으로 되어 있다. 체중조절을 위해 식품공전에서 따로 분리한 것으로 체중조절용식품이 있다. 이는 건강기능식품과 식품의 장단점을 보완한 것으로 건강기능식품의 단점으로 될 수 있는 기능성에 영양성분을 포함한 형태이다.
- 체중조절과 혈당 조절을 위해 시장에서는 기존에 나와 있는 기능성 원료인 가르시아카보지아껍질추출분말, 공액리놀레산 (유리지방산), 공액리놀레산 (트리글리세라이드), 그린마테추출물 등과 같은 기능성 원료를 포함하는 체지방 개선용 기능성식품과 구아바잎 추출물, 난소화성 말토덱스트린, 동결건조누에분말등의 기능성 원료를 주 원료로하는 혈당개선용 건강기능식품이 출시되고 있다. 현재 출시되어 있는 제품은 한정된 기능성 원료를 중심으로 진행하고 있기에 시장에서는 신규 소재를 이용한 제품에 욕구가 높아져 있는 상태이다.
- 제품의 경우 기존의 기능성식품을 복용 시 초기에는 효과를 보이는 부분은 있으나 장기 복용으로 생길 수 있는 부작용과 지속적인 효과에 대해 신뢰도가 떨어져 있는 상태이다. 특히 많은 소비자들이 체지방 및 혈당 개선용 식품을 계속 복용 했을 경우 간손상의 우려를 나타내고 있으며, 일부 제품은 빠른 효과를 통한 영업의 극대화를 꾀하기 위해 복용량을 늘려 소비자들이 2차적인 피해를 보고 있는 실정이다.

○ 체중조절용식품은 특수영양식품 중 식사대용식품의 한 유형으로, 정상인 또는 체중의 감소, 증가가 필요한 사람의 한 끼니를 대응할 수 있도록 열량 및 필요한 영양소를 가감하여 분말, 액상, 페이스트상, 편상, 덩어리 등의 식용에 적합한 제형으로 섭취할 수 있도록 제조·가공된 식품이다. 이는 1회 섭취할 때에 비타민 A, B1, B2, B6, C, 나이아신, 엽산, 그리고 비타민 E를 영양소 기준치의 25%이상, 단백질, 칼슘, 철 및 아연을 영양소 기준치의 10%이상 이 되도록 원료식품을 조합하고 영양소를 첨가를 하는 것을 규정으로 하고 있다.

○ 일반식품, 체중조절용식품(특수영양식) 그리고 건강기능식품에 마케팅 및 영업 효과를 위해 일부 신규 소재를 첨가한 제품의 경우, 소재에 대한 효능에 대한 자료는 없으며 단순 컨셉 포함을 통해 오히려 제품에 대한 신뢰를 떨어뜨리는 경우가 많이 발생되고 있는 실정이다.

○ 건강기능식품 시장은 계속 성장하고 있다. 각 판매가 및 제품 판매가가 상이하고 유통라인이 다양하여 형성 시장을 정확하게 파악하는 것은 어려움이 있다. 그러나 식품의약품안전처에 보고되어 있는 건강기능식품 생산실적을 통해 상대적으로 시장형성을 확인할 수 있다. 2013년도 건강기능식품이 생산실적은 1조 4,820억원으로 2012년 (1조 4,091억원)에 비해 5% 증가하였다 (13.12.31 기준, 출처: 식품의약품안전처).

○ 체지방 감소의 경우, 가장 많은 비중을 차지하고 있는 가르시니아카모보지아추출물의 생산량은 2011년 207억원에서 2012년 440억원, 2013년도 541억원으로 높은 성장세를 보여주고 있다. 이밖에도 마테열수추출물은 2013년도 229억원을 생산하였으며, 2012년도 말 개별인정형으로 고시된 돌외주정추출분말은 63억원을 생산하였다. 그러나 가르시니아카모보지아추출물과 마테열수추출물 등은 그 원료를 대부분 외국에서 전량 수입하는 실정이다.

○ 체지방감소용 건강기능식품

표. 대표적인 체지방감소 기능성 원료

생리활성기능 인정등급	원료명	지표성분	일일섭취량
고시형 1등급	가르시니아카모보지아 껍질추출물	Hydroxycitric acid 600 mg/g	Hydroxycitric acid 750~2,800 mg
고시형 2등급	녹차추출물	카테킨 200 mg/g	카테킨 0.3~1.0 g
고시형 2등급	공액리놀레산	공액리놀레산 660~850 mg/g	공액리놀레산 1.4~4.2 g
개별인정형 2등급	히비스커스 등 복합추출물	키토산, L-카르니틴	히비스커스 등 복합추출물 2,079 mg
개별인정형 2등급	잔티젠(Xanthigen)	미역 등 복합추출물	잔티젠 600 mg

- 체지방감소와 관련한 잘 알려진 소재인 가르시니아카모보지아는 탄수화물이 지방으로 합성되는 것을 억제하여 체지방감소에 도움을 주는 고시형 기능성 원료이다. 다이어트에 대한 소비자의 니즈(Needs)가 크고, 그에 따른 분말, 음료, 바 등의 다양한 형태 및 섭취방법에 따른

제품들이 출시되었다. L-카르니틴 역시 체지방감소용 고시형 기능성 원료로 잘 알려져 있으며, 히비스커스꽃 추출물과 키토산 등을 혼합한 복합추출물을 이용한 개별인정형 제품도 출시되었다. 천연 추출물 중에 하나인 카테킨은 녹차추출물의 지표물질로 혈중 콜레스테롤 개선에 도움을 줄 수 있는 고시형 기능성 원료이다. 카테킨은 카페인이 함유되어 있어 초조감, 불면 등을 나타낼 수 있기 때문에 섭취 시 주의가 필요하다.



- 최근 주목받고 있는 미역 등 복합추출물을 활용한 잔티젠은 생리활성 기능성인증을 체지방 감소에 도움을 줄 수 있는 2등급으로 개별인정을 받았고, 관련 제품을 주로 정, 캡슐 형태로 개발하여 판매하고 있다. 해당 성분은 미역 추출물과 석류씨 오일에서 유래한 복합추출물로 미역 추출물의 후고잔틴 (fucoxanthin)과 석류씨 오일의 주성분인 푸닉산 (punicic acid)이 체지방 및 내장(간) 지방 감소, 몸무게 및 허리둘레 감소, 기초대사량 증가에 효과가 있는 것으로 알려져 있으나 일부 알레르기가 발생하는 사례가 보고되고 있어서 섭취에 주의가 필요하다.



○ 혈당 개선용 건강기능식품

표. 대표적인 혈당 저하 기능성 원료

생리활성기능 인정등급	원료명	지표성분	일일섭취량
고시형 2등급	난소화성말토덱스트린	난소화성말토덱스트린 850 mg/g	난소화성말토덱스트린 식이섬유 11.9~30 g/일
고시형 2등급	바나바잎 주정추출물	코로소린산 9~13 mg/g	고로소코린산 0.45~1.3 mg
고시형 2등급	구아바잎추출물	총 폴리페놀 250~450 mg/g	총 폴리페놀 120 mg
고시형 2등급	탈지달맞이꽃 종자추출물	Penta-O-galloyl β-D-glucose (PGG), 20~28 mg/g	PGG 4~8.4 mg
개별인정형 2등급	동결건조누에분말	데옥시노지리마이신 (1-Deoxynojirimycin)	동결건조누에분말 2.7 g

- 난소화성말토덱스트린은 식후 혈당상승 억제, 혈중 중성지방 개선, 배변활동 원활에 도움을 줄 수 있는 고시형 기능성 원료로 녹즙 제품과 같은 농축액 등에 기능을 부여하기 위한 성분으로 주로 사용되고 있다. 난소화성말토덱스트린은 식이섬유의 일일 섭취량이 많기 때문에 환, 정 등의 제품에 활용하기에는 어렵기 때문에, 최근에는 음료, 즉석밥 등에도 활용되고 있다.



- 식물추출물을 활용한 혈당개선용 기능성 원료는 바나바이추출물, 구아바이추출물, 탈지달맞이꽃종자 등을 활용한 추출물로서, 일일 섭취량이 상대적으로 적은 기능성 성분이다. 따라서, 주로 환, 정제, 캡슐 형태의 소비자가 간편하게 휴대하고 섭취할 수 있는 제품으로 개발되어 있다.



### 3. 필요 연구 분야

당뇨 치료를 위해서 여러 종류의 많은 화학약제 및 고대로부터 전해오는 민간요법을 대상으로 의학적인 검증을 거친 제조방법을 이용한 약품이 시중에 유통되고 있음에도 불구하고 전통적으로 민간에서 사용해 온 천연물을 이용한 체지방 및 혈당 개선을 위한 새로운 복합소재를 개발할 필요가 있으며, 이러한 소재는 식재료로 사용하는데 문제가 없어 동물실험 등을 통한 효능 검증이 선행되면 다양하게 이용될 수 있다.

이에 비해 서구에서 유래된 기능성 소재는 특정 효능을 가진 단리물질을 분리하여 생리활성 또는 기능성 소재로 이용하여 왔으나, 단리물질을 다량 투여할 경우 부작용도 크고 단리물질을 천연물로부터 확보하는데 환경적 제약과 많은 비용이 드는 문제점이 있다.

따라서 전통 천연물 소재를 이용하여 차별화된 기능성 신소재로 개발함으로써 새로운 기능성 소재를 국내 뿐 만 아니라 해외 시장에 소개 및 수출 할 수 있는 기회를 마련할 수 있다. 그러나 이러한 천연물 소재가 기능성식품으로 이용되는 것은 극히 일부분이며 대부분이 약리효과를 중심으로 한 연구가 주종을 이루고 있다. 따라서 실험실 규모의 연구 결과는 바로 산업화에 적용하기 어렵다. 따라서 천연물 성분 분석이나 추출 조건에 관한 실험실 규모의 연구 결과를 바탕으로 산업체에서 실용화가 가능까지의 연구에 대한 적극적이고, 지속적인 정부의 지원과 연구가 필요하다.



## 제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 체지방 및 혈당 개선 기능성 소재의 도출 (제1세부과제) .....	29
1. 연구개발 수행 내용 및 방법 .....	29
2. 연구개발 수행 결과 .....	39
제 2 절 체지방 및 혈당 개선 기능성 원료의 제품화 (제1협동과제) .....	179
1. 연구개발 수행 내용 및 방법 .....	179
2. 연구개발 수행 결과 .....	188
제 3 절 기능성 소재의 체지방 및 혈당 조절 효능 검정을 위한 인체 시험 (제2협동과제) .....	231
1. 연구개발 수행 내용 및 방법 .....	231
2. 연구개발 수행 결과 .....	238

# 제 1 절 체지방 및 혈당 개선 기능성 소재의 도출 (제1세부과제)

## 1. 연구개발 수행 내용 및 방법

가. 품종별, 재배기간별 콩잎 추출물의 조제 및 HPLC 분석

### (1) 품종별, 재배기간별 콩잎 추출물의 조제

대두콩 또는 검은콩을 과중하여 생육기간이 30일 이후에 15일 간격으로 수확한 콩잎을 열풍, 음지, 햇볕 등에서 건조하였다. 건조하여 분쇄한 콩잎 100 mg에 70% EtOH, 95% EtOH 또는 EtOAc 등을 가하고 24~48 시간 동안 vortex mixer를 사용하여 실온에서 진탕하면서 추출한 후, 여과하여 70% EtOH, 95% EtOH 또는 EtOAc 가용부를 회수하고, 각각 가용부의 부피를 측정하고 후 일정량을 감압하에 농축·건조하여 건조물의 무게를 측정하였다. 각 추출물은 2~3 개의 같은 시료를 준비하였다.

### (2) 콩잎 추출물의 표지물질 함량 분석용 HPLC (Analytical HPLC)

본 연구에서 사용한 HPLC system은 Shimadzu 10A vp series를 사용하였고, Brownlee SPP C18 column을 사용하여 분석하였다. HPLC 용출 조건은 아래 표 1에 표시하였다.

Table 1. 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 (4.6×50 m, 2.7 μm)	23.0	0	100	gradient
Flow rate: 1.8 ml/min	27.5	0	100	isocratic
Sample injection volume: 10 μl	30.0	95	5	gradient
Flow solvent A: 0.1% Acetic acid in Water				
Flow solvent B: Acetonitrile				

나. 테로카판 강화 소재 (PTH)로부터 테로카판 화합물의 분리, 정제 및 구조 결정 방법

### (1) 테로카판 강화 소재 (PTH)로부터 테로카판 화합물의 분리·정제

건조된 분쇄콩잎으로부터 95% EtOH과 ethyl acetate (EtOAc)를 이용하여 추출하였다. 얻어진 95% EtOH 추출물을 물에 현탁하고, hexane, chloroform, butanol을 사용하여 용매 극성도에 따라 분획하였다. EtOAc 추출물은 조추출물 상태로 각종 컬럼크로마토그래피를 수행하여 분획하였다. 다음 각각의 분획층에 대해서 TLC 또는 analytical HPLC를 이용하여 테로카판 화합물을 탐색하였다. 다음 단계로 테로카판 화합물의 분리·정제를 위해 silica gel column chromatography (Silica-P Flash silica gel, 40-63 μm, 60 A), RP-C<sub>18</sub> column chromatography (Reverse phase column, C<sub>18</sub>), preparative HPLC (Shimadzu LC-8A vp series, YMC-Pack Pro

SPP C18 column), MPLC (Biotage KP-Sil (US Patent 6.294.087, 40 x 150 mm), Sephadex LH-20 gel chromatography, preparative-TLC (Silica gel, RP-18 plate, 0.25  $\mu$ m, Merck KGaA) 등의 방법을 사용하였다.

### (2) 테로카판 화합물 구조분석 방법

순수분리·정제된 화합물들의 구조를 동정하기 위하여 NMR, Mass, UV 등의 분광학기기를 사용하였다. 수소 NMR ( $^1\text{H}$  NMR)과 탄소 NMR ( $^{13}\text{C}$  NMR)은 600 MHz, 150 MHz에서 측정하였고, 수소와 탄소의 개수와 화학적 이동 (Chemical shift) 값으로 기본 골격을 예상하고, 2D-NMR ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, HMQC, HMBC)을 측정하여 수소-수소와 수소-탄소 연관관계를 통해 치환기의 정확한 위치와 탄소 차수를 확인하여 생리활성물질의 구조를 예상하였다. 또한 Mass (ESI-MS) 분석을 통해 질량 대 전하 (m/z) 값으로 화합물의 분자량을 확인하고, 기 보고된 자료와 문헌에 보고된 결과를 종합하여 최종 구조를 동정하였다.

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

총 플라보노이드 함량은 Zhishen 등 (1999)이 개발한 분광분석법을 일부 수정하여 측정하였다. 시험관에 시료 0.2 ml과  $\text{H}_2\text{O}$  1.3 ml, 5%  $\text{NaNO}_2$  7.5  $\mu\text{l}$ 를 각각 첨가하여 5 분 동안 상온에서 반응시킨 후 10%  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.15 ml를 첨가하여 다시 6 분 동안 상온에서 반응시킨다. 다음 1 M  $\text{NaOH}$  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)이 개발한 Folin-Ciocalteu법을 일부 수정하여 측정하였다. 시험관에 시료 0.125 ml과  $\text{H}_2\text{O}$  0.5 ml, Folin & Ciocalteu's phenol Reagent 0.125 ml를 첨가하여 실온에서 6 분 동안 반응시킨다. 다음 7%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1.25 ml과  $\text{H}_2\text{O}$  1 ml을 첨가하고 실온에서 90 분 동안 반응시킨 후, UV/Visible spectrophotometer를 이용하여 760 nm에서 흡광도를 측정한다. Gallic acid를 표준물질로 사용하여 gallic acid equivalents (mg gallic acid/g sample)로 표시하였다.

### 다. Yeast $\alpha$ -glucosidase 저해활성 측정 방법

$\alpha$ -Glucosidase 활성의 측정은 Kim *et al.* (2008)의 방법을 일부 수정하여 사용하였다. 96 well plate를 사용하여  $\alpha$ -glucosidase 저해활성을 측정하였다. DMSO에 녹인 시료 10  $\mu\text{l}$ , 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.8) 90  $\mu\text{l}$ , 0.1 unit/ml의 yeast  $\alpha$ -glucosidase (maltase from *Saccharomyces cerevisiae*, G5003, Sigma) 50  $\mu\text{l}$ 를 넣고 5 분간 예비반응시켰다. 이 반응액에 기질인 2.5 mM *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside (pNPG, Sigma) 50  $\mu\text{l}$ 를 첨가하여 37  $^\circ\text{C}$ 에서 60 분간 반응시킨 후, 100 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  100  $\mu\text{l}$ 를 첨가하여 반응을 정지시켰다. Microplate Reader 680 (Bio-Rad, Co., Hercules, CA, USA)를 사용하여 415 nm에서 pNPG의 가수분해로 생성된 발색단인 *p*-nitrophenol의 흡광도를 측정하여  $\alpha$ -Glucosidase 활성을 계산하였다. 저해활성 측정을 위한 양성대조군으로는  $\alpha$ -Glucosidase 저해제인 coumestrol (Sigma) (Yuk *et al.*, 2011)를 사용하였다.

## 라. 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%  $\text{NaN}_3$ , 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

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

측정하고자 하는 시료 10  $\mu\text{l}$ , 사람의 혈액으로부터 초원심분리기를 이용해 분리한 LDL 10  $\mu\text{l}$  (100-120  $\mu\text{g}$  protein), 10 mM, pH 7.4 PBS 230  $\mu\text{l}$ 를 혼합한 후에 0.125 mM  $\text{CuSO}_4$  10  $\mu\text{l}$ 를 첨가함으로써 반응을 시작한다. 37°C에서 4 시간 동안 반응시간 후, 20% trichloroacetic acid (TCA) 용액 1 ml을 첨가하여 반응을 중단시킨다. 0.05 N NaOH 용액에 녹인 0.67% thiobarbituric acid (TBA) 1 ml을 첨가하고 교반한 후, 발색반응이 일어나도록 95°C에서 15 분간 가열하고 얼음물에 냉각한다. 3,000 rpm에서 15 분 동안 원심분리한 후, 상등액의 흡광도를 540 nm에서 측정하여 생성된 malondialdehyde (MDA)의 양을 계산한다. 한편, tetramethoxypropane malonaldehyde bis (dimethylacetal)의 저장용액을 이용하여 0~10 nmol MDA를 포함하는 PBS 표준용액 250  $\mu\text{l}$ 씩 만든다. 이 표준용액을 상기와 같은 방법으로 발색시켜 540 nm에서의 흡광도를 측정하고, MDA의 표준곡선을 구한다. 양성 대조군으로는 butylated hydroxytoluene (BHT)을 사용하였다.

## 마. Human Acyl-CoA: cholesterol acyltransferase (hACAT) 저해활성 측정 방법

hACAT은 두 개의 동위효소인 hACAT-1과 hACAT-2가 존재한다. hACAT-1과 hACAT-2 재조합바이러스를 Hi5 세포에서 배양한 후 microsome 분획을 분리하여 효소원으로 사용한다. hACAT 활성 측정은  $[1-^{14}\text{C}]$  oleoyl-CoA를 기질로 하여 Brecher & Chan의 방법을 일부 수정하여 사용하였다 (Ahn BT *et al.*, 2001). 시료 5  $\mu\text{l}$ , 2  $\mu\text{l}$  microsomal enzyme, 10  $\mu\text{l}$  assay buffer (0.5 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM DTT, pH 7.4), 7.5  $\mu\text{l}$  BSA (40 mg/ml), 1  $\mu\text{l}$  cholesterol (20 mg/ml), 24  $\mu\text{l}$ 의  $\text{H}_2\text{O}$ 를 가하여 37°C에서 15 분간 예비반응을 시켰다. 이 반응액에  $[1-^{14}\text{C}]$  oleoyl-CoA (최종농도 100  $\mu\text{M}$ ) 5.5  $\mu\text{l}$ 를 첨가하여 다시 37°C에서 20 분간 반응시킨 후 isopropanol-heptane (4:1 ; v/v) 500  $\mu\text{l}$ 를 가하여 반응을 정지시키고 heptane 300  $\mu\text{l}$ 와 5배 희석한 assay buffer 400  $\mu\text{l}$ 를 첨가하였다. 효소 활성의 측정은 원심분리하여 얻은 상층액 100  $\mu\text{l}$ 에 scintillation cocktail (Lipoluma, Lumac Co.) 4 ml를 첨가한 후 liquid scintillation counter를 이용하여 radioactivity를

측정하였다. 양성대조군으로는 oleic acid anilide (OAA)을 사용하였다.

#### 바. Dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) 저해활성 측정 방법

실험에는 black 96 well plate, 50 mM Tris buffer (pH 7.5), human recombinant DPP-4 (ENZ 375, 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. 시료 2  $\mu$ l를 50 mM Tris buffer 78  $\mu$ l에 넣는다. 이 반응액에 50 mM Tris buffer에 녹인 효소인 1  $\mu$ g/ml DPP-4 10  $\mu$ l과 50 mM Tris buffer에 녹인 기질인 0.4 mM H-Ala-Pro-AFC를 10  $\mu$ l를 첨가하여 실온에서 1 시간 반응시킨다. 1 시간 반응시킨 후 Fluorometer (Victor 2, Perkin Elmer, excitation 355 nm, emission 510 nm)를 사용하여 DPP-4에 의해 dipeptide로부터 분해된 AFC의 형광값을 측정하여 DPP-4 활성을 계산하였다. 양성대조군으로는 DPP-IV 저해제인 KR-62436을 사용하였다 (Kim KR *et al.*, 2005).

#### 사. *in vitro* 세포 실험 방법

##### (1) 췌장베타세포 (HIT-T15와 MIN6) 실험

###### (가) 세포독성의 측정 방법

- HIT-T15 세포: 96 well plate에 well 당 배지와 햄스터 췌장 베타 세포주인 HIT-T15 세포를  $1 \times 10^5$  세포/100  $\mu$ l 씩 넣고 37°C, 습윤한 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 24 시간 동안 배양한다. 미리 RPMI1640 배지에 다양한 농도의 시료를 넣어 준비 한다 (대조군은 DMSO). 각 well에서 배지를 제거한 후 시료를 처리한 RPMI1640 배지를 well 당 200  $\mu$ l 씩 넣고 24 시간 배양한 뒤, 각 well에서 배지를 100  $\mu$ l씩 취하고 Cyto X™ (LPS solution, Korea)를 10  $\mu$ l 씩 첨가하여 2 시간 동안 반응시킨 다음 Microplate Reader을 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

- MIN6 세포: 96 well plate에 well 당 배지와 마우스 췌장 베타 세포주인 MIN6 세포를  $1 \times 10^5$  세포/100  $\mu$ l 씩 넣고 37°C, 습윤한 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 24 시간 동안 배양한다. 미리 DMEM 배지에 다양한 농도의 시료를 넣어 준비 한다 (대조군은 DMSO). 각 well에서 배지를 제거한 후 시료를 처리한 RPMI1640 배지를 well 당 200  $\mu$ l 씩 넣고 24시간 배양한 뒤, 각 well에서 배지를 100  $\mu$ l씩 취하고 Cyto X™ (LPS solution, Korea)를 10  $\mu$ l 씩 첨가하여 1 시간 동안 반응시킨 다음 Microplate Reader을 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

###### (나) 인슐린 분비능의 측정 방법

- HIT-T15 세포: 24 well plate에 HIT-T15 세포를  $2 \times 10^5$  세포/well 씩 분주하고 37°C, 습윤한 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 24 시간 동안 배양하였다. Glucose를 포함하지 않은 RPMI1640 배지로 교체하여 30 분 동안 반응시킨 후, 여러 가지 농도의 시료를 첨가한 20 mM glucose를 함유한 배지 또는 시료를 첨가하지 않은 20 mM glucose를 포함한 배지 (대조군)로 교환하여 60 분간 반응시킨 후 배지로 분비된 인슐린을 ELISA insulin kit (Alpco diagnostics)를 사용하여 측정하였다.

- MIN6 세포: 24 well plate에 MIN6 세포를  $2 \times 10^5$  세포/well 씩 분주하고 37°C, 습윤한 5% CO<sub>2</sub> 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

### (가) 세포독성의 측정 방법

96 well plate에 well 당 배지와 세포를  $5 \times 10^4$  세포/100  $\mu$ l 씩 넣고 37°C, 습윤한 5% CO<sub>2</sub> 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  $\mu$ l 씩 넣는다. 24 시간 배양한 뒤, 각 well에서 배지를 100  $\mu$ l씩 취하고 Cyto X™ (LPS solution, Korea)를 10  $\mu$ l 씩 첨가하여 30 분 동안 반응시킨 다음 Microplate Reader를 사용하여 490 nm 에서 흡광도를 측정하였다.

### (나) Nitric oxide (NO)의 생성량 측정 방법

NO의 생성량은 세포 배양액을 이용하여, NO의 반응 산물인 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>를 측정하는 방법으로 정량하였다. 96 well plate에  $1 \times 10^4$  개의 cell을 넣어 키운 후 80% 이상 채워지게 되면 시험물질을 상승 농도 순으로 처리한다. 이 후, 1  $\mu$ g/ml의 lipopolysaccharide (LPS)로 16 시간 가량 세포를 자극한 후, 배양액 50  $\mu$ l를 새로운 96 well plate에 옮긴다. 동일한 부피의 Greiss 시약 [0.5% sulfanilyamide, 0.05% N-(1-naphthyl) ethylene diamine dihydrochloride/2.5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>]을 첨가하여 상온에서 10 분간 반응시킨 후 540 nm에서 Microplate Reader로 시료의 흡광도를 측정하였다. NO<sub>2</sub><sup>-</sup>의 농도는 NaNO<sub>3</sub>를 이용하여 표준곡선을 만들고, 이와 비교하여 NO의 생성량을 측정하였다.

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

ROS의 측정은 외부자극에 의해 대식세포에 축적되는 hydroxyl peroxidase의 양을 조사하기 위해 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH<sub>2</sub>-DA)를 사용하여 측정하였다. DCFH<sub>2</sub>-DA는 세포 침투성이 있고 형광성을 갖고 있지 않지만, 세포 안으로 들어오면 세포 esterases에 의해 DCFH<sub>2</sub>로 쪼개진다. 쪼개진 DCFH<sub>2</sub>는 peroxidases, cytochrome c, Fe<sup>2+</sup> 등 ROS에 의해 형광을 띠는 DCF로 산화된다. 이때 DCF를 측정하는 방법으로 ROS 축적량을 측정한다. 96 well plate에 well 당 배지와 세포를  $5 \times 10^4$  세포/100  $\mu$ l 씩 넣고 37°C, 습윤한 5% CO<sub>2</sub> 배양상자에 넣고 세포수가 80% 이상 될 때까지 배양한다. 다음 DMEM 배지를 이용하여 농도별 시료를 준비하여 100  $\mu$ l/well 씩 넣고 2 시간 동안 반응시킨다. 다음 LPS (1  $\mu$ g/ml)을 처리하고 18 시간 동안 세포를 자극시킨 후 DCFH<sub>2</sub>-DA를 최종농도 15  $\mu$ M로 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) 세포독성의 측정 방법

96 well plate에 well 당 배지와 세포를  $5 \times 10^3$  세포/100  $\mu\text{l}$  씩 넣고  $37^\circ\text{C}$ , 습윤한 5%  $\text{CO}_2$  배양기에서 24 시간 동안 배양한다. 미리 DMEM 배지에 다양한 농도의 시료를 넣어 준비한다 (대조군은 DMSO). 각 well에서 배지를 제거한 후 시료를 처리한 DMEM 배지를 well 당 200  $\mu\text{l}$  씩 넣는다. 24 시간 배양한 뒤, 각 well에서 배지를 100  $\mu\text{l}$  씩 취하고 Cyto X<sup>TM</sup> (LPS solution, Korea)를 10  $\mu\text{l}$  씩 첨가하여 60 분 동안 반응시킨 다음 Microplate Reader를 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### (나) 지방축적 저해능 측정 방법

지방세포인 3T3-L1 세포를 사용하여 adipogenesis assay를 실시한다. 먼저 3T3-L1 세포는 10% calf serum (CS, Gibco-BRL, Gaithersburg, MD), 2 mM L-glutamine, 100 units/ml penicillin, 그리고 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycin이 포함된 DMEM 배지에서 배양한다. 48 well plate에 세포를 100% confluent하게 깔고 2 일 동안 배양한 후 FBS (Gibco)로 serum이 교환된 DMEM 배지에 시료와 0.25  $\mu\text{M}$  dexamethasone (DEX), 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  insulin, 0.5 mM 1-methyl-3-isobutylxanthine (IBMX)을 첨가하여 3 일간 지방세포로의 분화를 촉진하였다. 이후에는 상기 세 가지 자극제는 제외한 같은 배지 조건으로 2 일 간격으로 배지를 갈아주면서 지방이 축적될 수 있도록 6 일 ~ 10 일 정도 더 배양한다. 이 후 oil red O로 염색하여 세포내에 생성된 중성지방을 육안으로 관찰하고 현미경 촬영을 한다. 다음 200  $\mu\text{l}$ 의 isopropanol로 세포에 염색된 oil red O 색소를 추출하여 Microplate Reader를 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정함으로써 지방축적의 정도를 정량화한다.

### (4) 유전자 발현의 측정 방법

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 합성한다. 베타세포의 증식 및 인슐린 신호전달에 관련된 유전자, 염증 (inflammation)과 관련된 유전자, 지방생합성 (adipogenesis)와 지방분해 (lipolysis)와 관련된 유전자 및 GAPDH의 발현양상을 보기 위하여 아래에 열거한 primer를 사용하였다 (Table 2). 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 2. Sequences of primer used for real-time qRT-PCR**

Gene	Forward primer	Reverse primer
Pancreatic cell development and insulin sensitivity (HIT-T15 and MIN6 cells)		
Pax4	CCCAGTGTGTCCTCTATCAATCG	GGGAAGAACTGGAGCCAACA
Ngn3	CACTCAGCAAACAGCGAAGAAG	GTCAGTGCCCAGATGTAGTTGTG
Ins1	TTTCTCACCTGGAAGACAGC	TGATGCTCTTCACCTTCCTG
Ins2	CCCCACCCAGGCTTTTGT	GCGGGACATGGGTGTGTAG
IRS1	GAGAAGAGACTGGCTCGGAAGA	GCCTATTCTGCCAACTCAACT
IRS2	GGCCCGAACCTCAATAACAA	CCGCGCAACACGAAAAAG
MafA	GAACCGGAGGAGAATAAGAGG	AGTCAAGTTGAGCATCACTGC
PKA	GGTTTTGCCAAGCGTGTGA	CAGCCTTGTGTAGCCTTTGC
Proinsulin	CCCAGGCTTTTGTCAACCA	CGGGATTTGGGTGTGTAGAAG
Inflammation (RAW264.7 cells)		
COX-2	AACCGTGGGGAATGTATGAGCA	AACTCTCTCCGTAGAAGAACCTTTTCCA
IL-1 $\beta$	ATGAGGACATGAGCACCTTC	CATTGAGGTGGAGAGCTTTC
IL-6	GCTACCTGGAGTACATGAAG	CTGTGACTCCAGCTTATCTG
iNOS	CTTTAGACCTCAACAGAGCC	GTAGGACAATCCACAACCTCG
Adopogenesis and lipilysis (3T3L1 cells)		
ACC1	AGTTTCCCAGCCAGCAGATT	ATCCATCACCACAGCCTTCA
AP2	TTTCTCACCTGGAAGACAGC	TGATGCTCTTCACCTTCCTG
C/EBP $\alpha$	CAAGAAGTCGGTGGACAAGA	TCAACTCCAGCACCTTCTGT
C/EBP $\delta$	GTTTCCTCGCGGTCTCTATT	GAGGCAACGAGGAATCAAGT
DGAT1	ACAACCTGACCTACCGAGAT	AGTAGGGACCATCCACTGTT
FAS	TGTGAGTGGTTCAGAGGCAT	TTCTGTAGTGCCAGCAAGCT
FATP4	GCCCTGCGCCACTGTCTTGA	TGGGCTCCAGGCTAGCATGG
HSL	TTCGAGGGTGATGAAGGACT	ACTCTGGGTCTATGGCGAAT
PGC1	GTGCAGCCAAGACTCTGTAT	GGTCGCTACCACTTCAAT
PPAR $\gamma$	TGGGAGATTCTCCTGTTGAC	AGGTGGAGATGCAGGTTCTA
SREBP1	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 $\beta$ , interleukin-1 beta; IL-6, interleukin-6; iNOS, induced nitric oxide synthase 2; ACC1, acetyl-CoA carboxylase 1; aP2, adipocyte protein 2; C/EBP $\alpha$ , CCAAT/enhancer binding protein alpha; C/EBP $\delta$ , 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 $\gamma$ , Peroxisome proliferator-activated receptor gamma; SREBP1, Sterol regulatory element-binding protein 1; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.



#### (5) 단백질 발현의 측정 방법

- HIT-T15 세포: HIT-T15 세포를 100 mm plate에 분주하여 24 시간 배양한 후 0.4 mM PA 및 각 농도의 시료를 첨가한 배지로 1 시간 배양한다. 그 다음 HIT-T15 세포를 수확하여 단백질을 정량한다.

- RAW264.7 세포: RAW264.7 세포를 24시간 배양한 후 시료를 2 시간 동안 처리 한 뒤, LPS를 처리하였다. 그 다음 RAW264.7 세포를 수확하여 단백질을 정량한다.

- 3T3-L1 세포: R3T3-L1 세포는 10% CS가 포함된 DMEM 배지에서 배양한다. 세포를 100% confluent하게 깔고 2 일간 배양한 후 FBS으로 serum이 교환된 DMEM 배지에 시료와 0.25  $\mu$  M DEX, 1  $\mu$ g/ml insulin, 0.5 mM IBMX을 첨가하여 지방세포로의 분화를 촉진한 다음 3T3-L1 세포를 수확하여 단백질을 정량한다.

50  $\mu$ g의 단백질을 SDS-PAGE로 분리한 다음 polyvinylidene fluoride membrane (PVDF) membrane으로 이동시키고, 비특이적 단백질을 차단하기 위하여 이 PVDF membrane을 5% non-fat dry milk를 함유한 PBST (?)로 2 시간 정도 반응시켰다. 이후 primary 항체와 overnight 동안 반응시킨 후, 각 항체에 대한 이차항체인 anti-rabbit IgG 또는 anti-goat IgG에 1 시간 반응시켰다. 각 반응 사이 PBST로 8 분씩 5 번 세척하였다. 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.

#### 아. 지질흡수 저해 시험 (Lipid absorption test)

C57BL/6J (SLC, Shiwuoka, Japan) 6~7 주령 웅성 마우스를 1 주일간 순화시킨 후 실험에 사용했다. 지질흡수 저해 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 Xenical (50 mg/kg body wt)을 사용하였다. 시료 투여 30 분 뒤에 corn oil (2 g/kg body wt, C8267, Sigma) 250  $\mu$ l을 경구 투여하여 지질 흡수를 유도한 후 0, 1, 2, 4 시간 후에 후안와 정맥총에서 혈액을 채취하여 혈장 TG를 측정하였다.

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

C57BL/6J (SLC, Shiwuoka, Japan) 6~7 주령 웅성 마우스를 1 주일간 순화시킨 후 실험에 사용하였다. OGTT를 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 투여했다. 10일 간 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.

#### 차. 인슐린 내성 시험 (Insulin tolerance test, ITT)

C57BL/6J (SLC, Shiwuoka, Japan) 6~7 주령 웅성 마우스를 1 주일간 순화시킨 후 실험에 사

용하였다. 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.

## 카. 질환모델동물을 이용한 체지방 조절 및 혈당 강하 효능 검증 실험 방법

### (1) 실험동물 및 식이조성

C57BL/6J (SLC, Shiwuka, Japan) 4 주령 웅성 마우스를 2 주간 정상식이 (2018S, powder type, Harlan Laboratories, Inc.) 분말사료와 물을 자유롭게 공급하면서 순화시킨 후, 건강상태가 양호한 6 주령의 마우스를 실험에 사용하였다. 실험군은 ND군, high-fat diet 대조군 (HFD), 콩잎 95% EtOH 추출물군 (95ESL), 콩잎 EtOAc 추출물군 (EASL), Pinitol군 (양성대조군)의 5군으로 나누어 12 주간의 실험을 진행하였다. 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 95ESL과 테로카판 함량이 2배 이상 (표지물질인 coumestrol 기준)인 EASL이 포함된 식이를 섭취시킨 후, 혈당 관련 인자들을 비교·분석함으로써 콩잎으로부터 도출된 테로카판 강화 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.

### (2) 체중 측정 및 혈액 분석 방법

체중은 매주 일정한 시간에 측정하여 기록하였으며, 2 주마다 후안와 정맥총에서 capillary tube를 사용하여 채혈한 후 EDTA를 사용하여 응고를 방지하였고, 혈액 생화학적 검사를 실시하기 위하여 채혈 후 30 분 이내에 3,000 rpm (4°C)에서 15 분간 원심분리하여 혈장 (plasma)을 분리하였고, 분석 시까지 -70°C에 보관하였다. 체중 변화 및 장기무게를 측정하였고, 분리한 혈장을 이용하여 당노 지표인 포도당 (glucose), 당화혈색소 (HbA1c)를 생화학 자동분석기 (Hitachi-720, Hitachi Mecidal, Japan)를 이용하여 측정하였다. 또한 총 콜레스테롤 (total cholesterol, TC), HDL-콜레스테롤 (HDL-C), 혈장 중성지방 (Triglyceride, TG), 간기능의 지표인 glutamate oxaloacetate transaminase (GOT)와 glutamate pyruvate transaminase (GPT) 농도는 측정 kit (아산제약)를 사용하여 정량하였다. 혈장 인슐린 농도는 Insulin kit (ELISA kit, Alpcodiagnosics)를 사용하여 측정하였다.

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

적출한 췌장 조직을 10% 중성 포르말린에 고정하여 탈수한 후 칩투 과정을 거쳐 파라핀에

포매하고 5  $\mu$ m의 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) 간조직의 Glycogen 함량 및 소장의  $\alpha$ -glucosidase 함량 측정 방법

글리코젠의 측정은 Seifter 등 (1950)의 방법을 수정, 보완하여 측정하였다. 개체별 간 조직 0.1 g 당 30% KOH 용액을 5배 첨가한 후 100°C에서 30 분간 반응시킨다. 반응 후 EtOH로 침전시키고 세척한 후 증류수에 녹여 이를 글리코젠 함량 측정에 사용하였다. 소장의  $\alpha$ -glucosidase 함량 측정을 위해서 적출한 소장을 차가운 50 mM phosphate buffer (pH 6.8) 4 ml 넣은 후 파쇄한다. 그 후 15 분 동안 4°C에서 균질화한 후, 10,000 x g, 4°C, 60 분 동안 원심분리기 하여 얻은 상층액을 효소원액으로 사용하였다. 효소의 활성은 기질로 2.5 mM *p*-Nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside를 사용하여 측정하였다.

(5) 조직에서의 유전자 발현의 측정 방법

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

Gene	Forward primer	Reverse primer
C/EBP $\alpha$	CAAGAAGTCGGTGGACAAGA	TCAACTCCAGCACCTTCTGT
FoxO1	TGGGCCCTAATTCGGTCAT	TTGGGTCAGGCGGTTTCATAC
GLUT4	GCCCCACAGAAGGTGATTGA	AGCGTAGTGAGGGTGCCTTGT
G6Pase	GCTGGAGTCTTGTCAGGCATT	AAACAAGAAGATGGTGATGAGACAAT
GAPDH	ACATCATCCCTGCATCCACT	AGATCCACGACGGACACATT
Ins2	CCCCACCCAGGCTTTTGT	GCGGGACATGGGTGTGTAG
Insr	CTGAACAAAGATGACAACGAGGAA	CTTACAGATGGTTGGGCAAACCT
IRS1	GAGAAGAGACTGGCTCGGAAGA	GCCTATTCTGCCAACTCAACT
IRS2	GGCCCGAACCTCAATAACAA	CCGCGCAACACGAAAAAG
IL-1 $\beta$	ATGAGGACATGAGCACCTTC	CATTGAGGTGGAGAGCTTTC
IL-6	GCTACCTGGAGTACATGAAG	CTGTGACTCCAGCTTATCTG
MafA	GAACCGGAGGAGAATAAGAGG	AGTCAAGTTGAGCATCACTGC
Ngn3	CACTCAGCAAACAGCGAAGAAG	GTCAGTGCCCAGATGTAGTTGTG
p53	ACATCATCCCTGCATCCACT	AGATCCACGACGGACACATT
Pax4	CCCAGTGTGCTCTATCAATCG	GGGAAGAAGTGGAGCCAACA
PEPCK	AGACCCTGCGAGTGCTTAGTG	AGGGTCAGTGTGGCAGTATTCTC
PKA	GGTTTTGCCAAGCGTGTGA	CAGCCTTGTGTAGCCTTTGC
TNF $\alpha$	CTCAGATCATCTTCTCAAATTCGAGTGACA	CTTCACAGAGCAATGACTCCAAAGT

C/EBP $\alpha$ , CCAAT/enhancer binding protein alpha; FoxO1, forkhead box O1; GLUT4, Glucose transporter type 4; G6Pase, Glucose 6-phosphatase; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; Ins2, insulin 2; Insr, insulin receptor; IRS1, insulin receptor substrate 1; IRS2, insulin receptor substrate 2; IL-1 $\beta$ , interleukin-1 beta; IL-6, interleukin-6; MafA, v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein A; Ngn3, neurogenin 3; p53, Tumor protein p53; Pax4, paired box 4; PEPCK, Phosphoenolpyruvate carboxykinase; PKA, protein kinase; TNF $\alpha$ , Tumor necrosis factor alpha.

각 조직의 유전자 발현 양상을 real-time qRT-PCR을 사용하여 알아보았다. 지방조직, 췌장과 간 조직은 TRI reagent 용액을 사용하여 각 조직으로부터 RNA를 추출한 뒤 High-capacity cDNA Reverse Transcriptase kit를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 베타세포의 증식 및 인슐린 신호전달에 관련된 유전자, 염증 (inflammation)과 관련된 유전자, 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 dsDNA에 끼어들어가는 SYBR Green의 특성을 이용한 QuantiTect SYBR Green PCR kit를 사용하여 7500-Real-Time PCR system에서 실시간으로 cDNA의 증폭과정을 확인하였다. 결과는 GAPDH의 발현으로 정량화하여 표시하였다.

## 2. 연구개발 수행 결과

가. HPLC를 이용한 대사체 분석을 통해 수확시기에 따른 테로카판 화합물의 성분과 함량 변화 조사 및 PTH의 표준화를 위한 지표성분 선정

(1) 콩잎추출물의 HPLC 분석 방법 확립 및 콩잎이 함유하는 물질의 UV spectra 분석을 통한 retention time ( $T_R$ ) 확인

NS (A)와 JP (B) 두 지역에서 재배하여 수확한 콩잎 (102~105일령) 추출물의 함유 성분을 비교·분석하고, 테로카판계 화합물의 검출을 위해 HPLC 분석 방법을 확립하였다. 분쇄한 건조콩잎 100 mg 에 70% EtOH, 95% EtOH 또는 EtOAc를 1 ml 씩 첨가하고 실온에서 24 시간 동안 진탕하면서 추출한 후, 여과하여 70% EtOH, 95% EtOH 또는 EtOAc 추출물을 회수하였다. 추출물의 표지물질로 사용할 콩잎에 함유된 화합물 (16종)은 구입 또는 선행연구를 통해 분리하여 확보한 것을 사용하였다. HPLC system은 분석용 Shimadzu 10A vp series와 Cosmosil C18 HPLC column을 사용하였으며, 254 nm에서의 흡광도를 기본으로 측정하였다. HPLC 분석 조건 및 용매 용출 방법은 표 4와 같다. 각 화합물들의 UV spectra 분석 및 co-injection을 통해 각 화합물들의 retention time ( $T_R$ )을 확인하였다 (Fig. 1). 테로카판계 화합물인 glyceofuran (7), isotrifoliol (8), coumestrol (9), phaseol (12) 등은 45~71 분대에서 검출되었다.

Table 4. 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	60	60	40	gradient
Detector: Shimadzu SPD-M10A vp (PDA detector, 254 nm)	80	0	100	gradient
Column: Cosmosil 5C18-MS-II (4.6×150 m, 5 μm)	90	95	5	gradient
Flow rate: 1.0 ml/min	100	95	5	isocratic
Sample injection volume: 10 μl				
Flow solvent A: 0.1% Acetic acid in Water				
Flow solvent B: Acetonitrile				

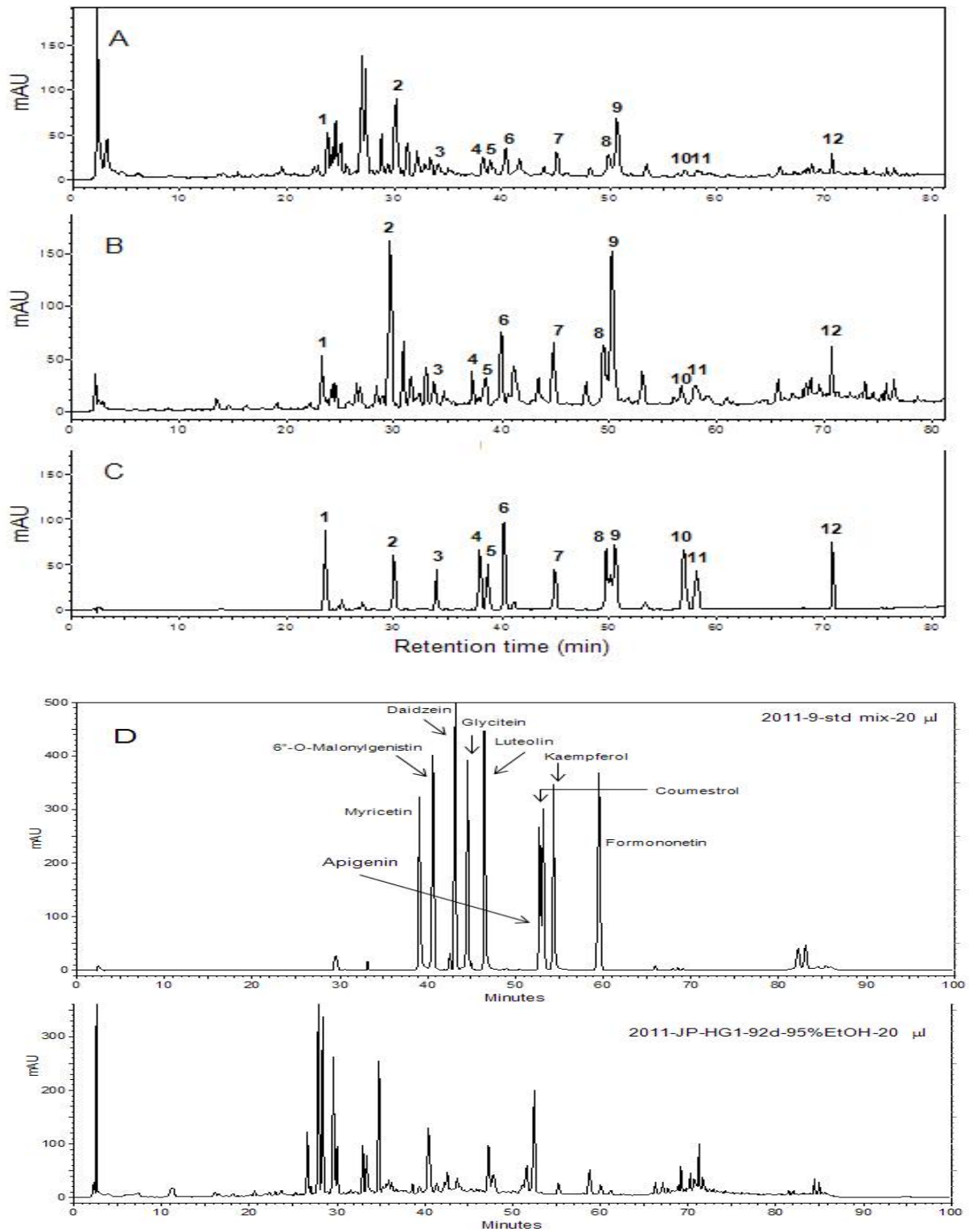


Fig. 1. HPLC profiles of 2011-JP-GH1-92d 95% EtOH ex. (A), EtOAc fraction of 2011-JP-GH1-92d 95% EtOH ex. (B), and internal standard mixture (C) & (D). Description of the peaks: 1, daidzin; 2, genistin; 3, apigenin-7-O- $\beta$ -glucoside; 4, ononin; 5, genistin-5,4'-methylether; 6, daidzein; 7, glyceofuran; 8, isotrifoliol; 9, coumestrol; 10, formononetin; 11, afromosin; 12, phaseol. 13, Apigenin; 14, Glycitein; 15, Kaempferol; 16, Luteolin, 6''-O-Malonylgenistin.

(2) 품종별 콩잎 추출물(70% EtOH, 95% EtOH, EtOAc)의 HPLC profile 비교 및 지표물질 선정

A 지역에서는 WD와 GH 콩품종을 재배하였고, B 지역에서는 GH-1, GH-2, YS 콩품종을 재배하였으며, 102~105일경에 수확하였다. 따라서 5 개 콩잎 시료의 70% EtOH, 95% EtOH, EtOAc 추출물을 조제하여 그림 3~그림 5에 나타내었다. 이 추출물들이 공통적으로 함유하는 물질을 파악하기 위해 그림 2에는 2011-JP-B-GH1-102일령 콩잎의 70% EtOH 추출물의 HPLC profile의 각 peak의 UV spectra를 표시하였다 (Fig. 2).

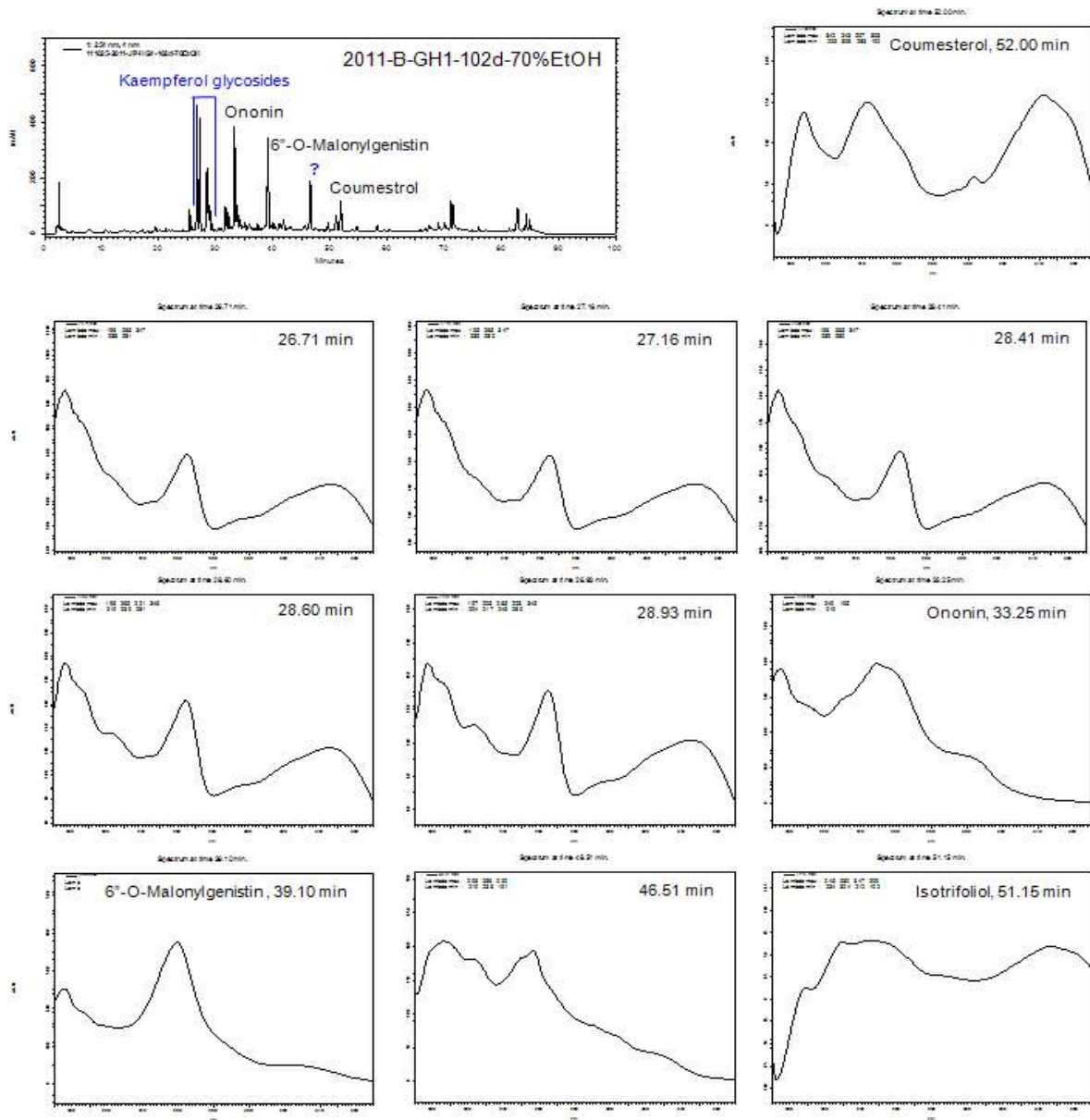


Fig. 2. HPLC profiles of 2011-B-GH1-102d-70% EtOH ex. and UV spectra of the detected isolated peaks.

그림 2의 각 peak의 UV spectra를 그림 1과 비교하여 분석한 결과,

- 25~29분 사이에 있는 5 개 (26.71, 27.16, 28.41, 28.60, 28.93 분)의 함량이 높은 peak는 kaempferol 배당체로 추정되었다.
- 33.25분대의 화합물은 ononin, 39.10분대의 화합물은 6'' -O-malonylgenistin, 51.15분대의 화합물은 isotrifoliol, 52.00분대의 화합물은 coumestrol로 확인하였다. 이 확인된 화합물 중 용매의

극성에 따라 추출물 내 함유량의 현저한 차이를 보이는 6"-*O*-malonylgenistin, coumestrol을 1차 표지물질 후보로 선택하였다.

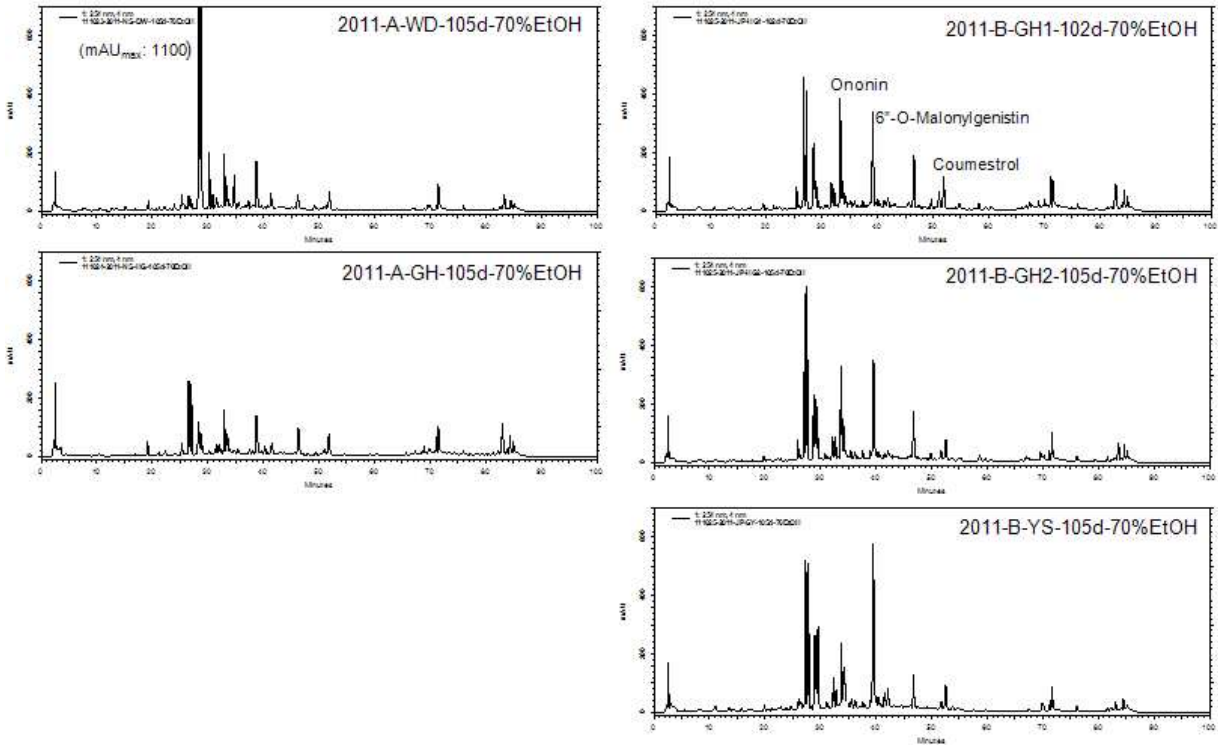


Fig. 3. HPLC profiles of 70% EtOH ex. from three variants, WD, GH and YS harvested on 102~105 day from the two different cultivating area examined.

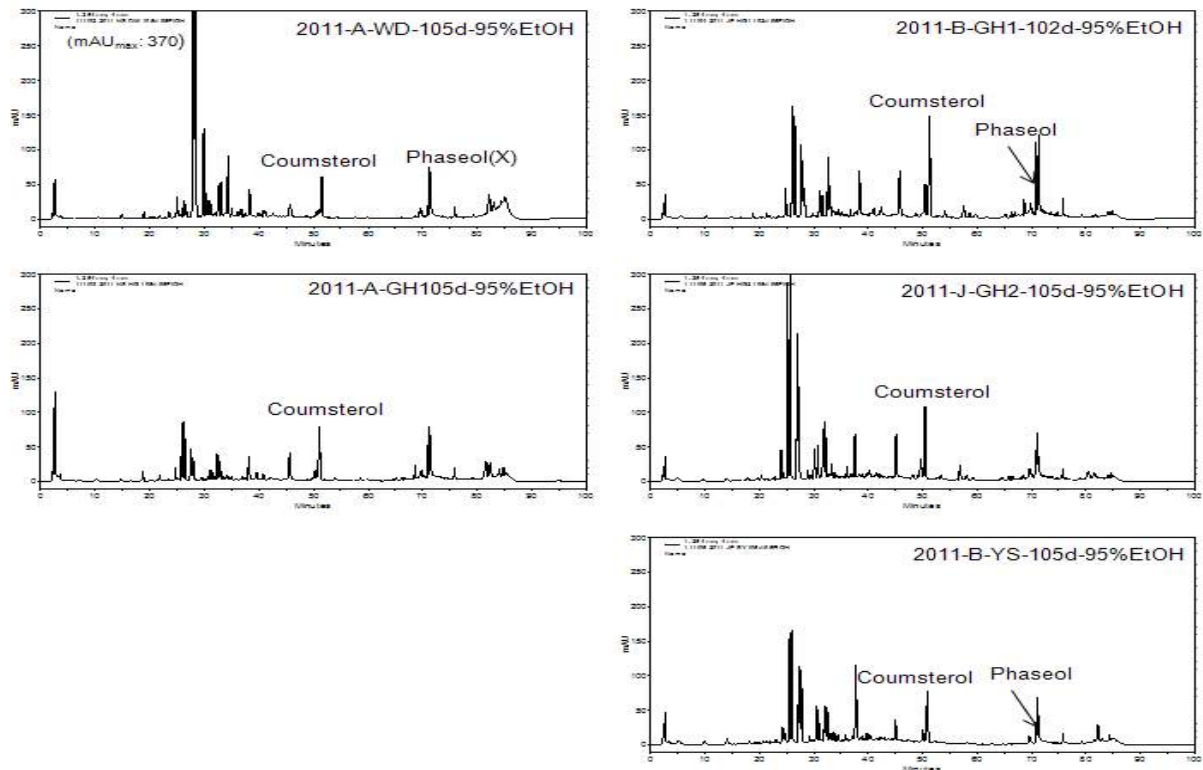


Fig. 4. HPLC profiles of 95% EtOH ex. from three variants, WD, GH and YS harvested on 102~105 day from the two different cultivating area examined.



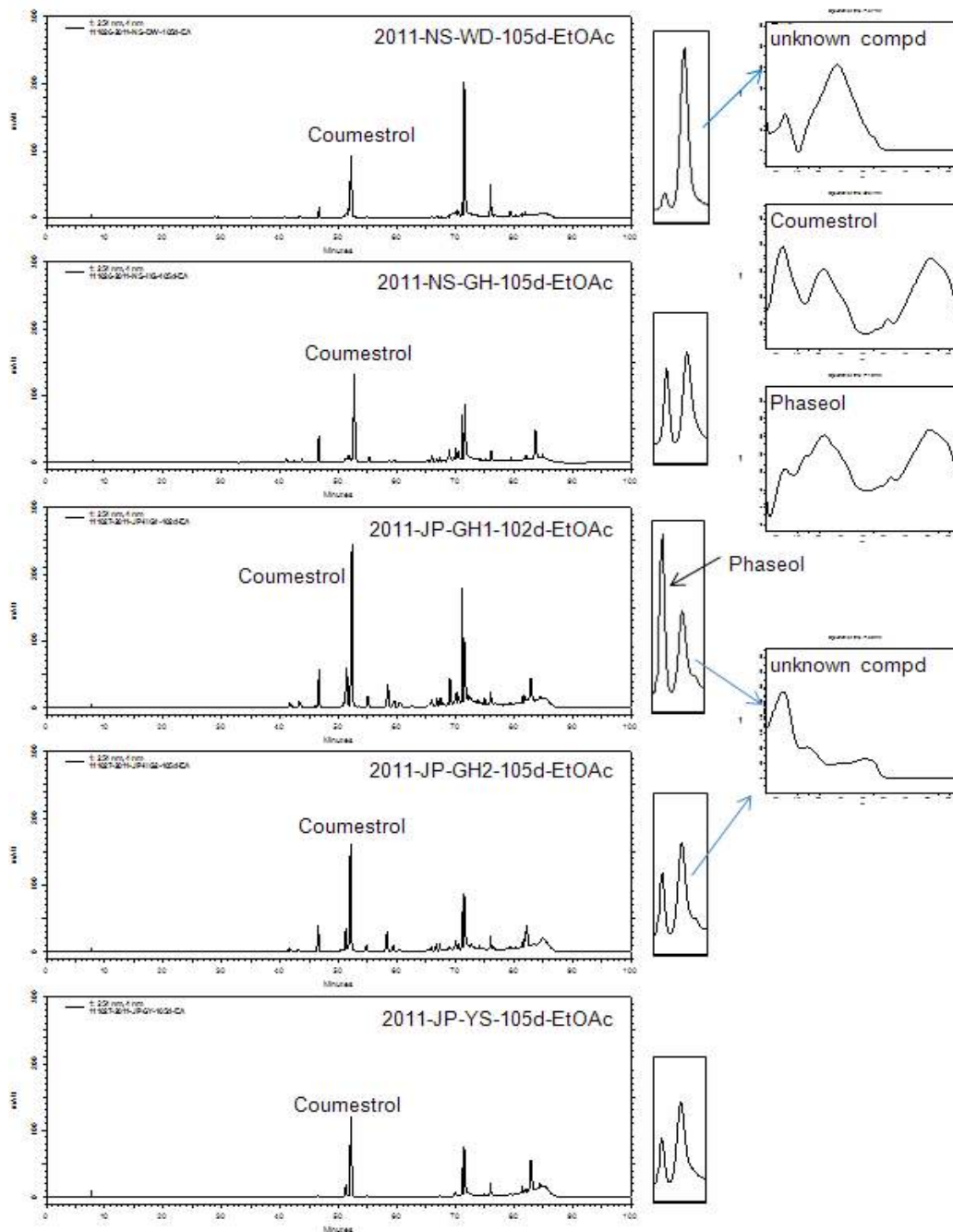


Fig. 5. HPLC profiles of EtOAc ex. from three variants, WD, GH and YS harvested on 102~105 day from the two different cultivating area examined and VU spectra of the detected isolated peaks.

- 콩잎 EtOAc 추출물 (Fig. 5)의 HPLC profile을 분석한 결과, 검색 가능한 제1 고함량 화합물로는 52분대의 테로카관계 화합물인 coumestrol이었고, 검색 가능한 제2 고함량 화합물로는 71분대의 테로카관계 화합물인 phaseol이었다. 따라서 콩잎의 EtOAc 추출물의 표지물질로 테로카관계 화합물인 coumestrol, phaseol을 표지물질 후보로 선택하였다.

- 5가지 콩잎 시료의 70% EtOH, 95% EtOH, EtOAc 추출물의 HPLC profile을 비교해 본 결과, 검출 가능한 테로카관계 화합물인 coumestrol과 phaseol의 함량은 B지역에서 재배한 GH1-105일령이 가장 높은 것으로 확인되었다.

- 또한 B지역에서 재배한 GH1과 GH2 콩잎 시료의 102일령과 2주 후에 수확한 120일령의 EtOAc 추출물의 HPLC profile을 분석한 결과, GH1 콩잎과 GH2 콩잎 모두 재배기간이 길어짐에 따라 coumestrol 함량이 현저하게 증가한 것을 확인하였다 (Fig. 6).

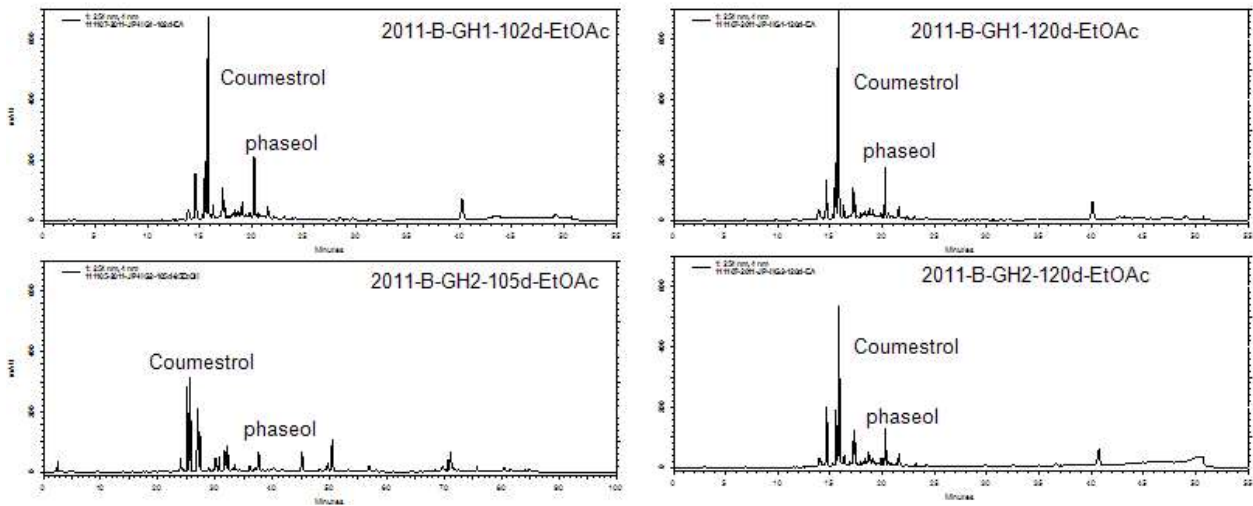


Fig. 6. Comparison of coumestrol and phaseol peaks from HPLC profiles of 2011-GH1-102d-EtOAc ex. & 2011-GH1-120d-EtOAc ex. and 2011-GH2-102d-EtOAc ex. & 2011-GH2-120d-EtOAc ex.

### (3) 총 플라보노이드 (total flavonoid)와 총 페놀 (total phenol) 함량 측정

위에서 HPLC를 이용하여 콩잎 품종별, 재배지역, 재배기간에 따른 성분 변화를 관찰·분석하였으며, 5종의 102~105일령 콩잎의 건조분말 시료들을 이용하여 총 플라보노이드 및 총 페놀 함량을 측정하여 비교하였다.

총 플라보노이드량: GH1-102일령 70% EtOH 추출물과 GH-105일령 70% EtOH 추출물의 총 플라보노이드 함량이 80.2 mg quercetin/g으로 가장 높았고, YS-105일령 70% EtOH 추출물의 총 플라보노이드 함량이 63.3 mg quercetin/g으로 21.1% 낮았다 (Table 5). 반면 EtOAc 추출물의 총 플라보노이드 함량을 측정한 결과, 70% EtOH 추출물에 비해 5종 시료들 간의 함량 차이가 현저하게 나타났다. GH1-102일령 EtOAc 추출물의 총 플라보노이드 함량이 64.1 mg quercetin equivalents/g이고 YS-105d령 EtOAc 추출물의 총 플라보노이드 함량은 10.4 mg quercetin equivalents/g으로 GH1-102일령 EtOAc 추출물에 비해 16.2%에 불과했다. (Table 6).

총 페놀 함량: 4 종류의 시료 모두 39.7~47.5 mg gallic acid equivalents/g로 비슷했다 (Table 6). 반면에 EtOAc 추출물의 총 페놀 함량은 총 플라보노이드와 같은 양상으로 시료 간에 함량 차이가 현저하게 나타났다. 즉 GH1-102일령 EtOAc 추출물의 총 페놀 함량이 37.8 mg gallic acid equivalents/g이었고, YS-105일령 EtOAc 추출물의 총 페놀 함량은 14.9 mg gallic acid equivalents/g으로 2011-B-GH1-102일령 EtOAc 추출물에 비해 60.6% 정도 현저하게 낮았다 (Table 6). 따라서 전반적으로 WD, YS 품종에 비해 GH 품종의 콩잎 추출물의 총 플라보노이드와 총 페놀 함량이 높으며, 콩품종 및 재배지역이 다른 콩잎에 함유되어 있는 총 플라보노이드와 총 페놀 함량도 항비만, 항당뇨, 항산화 효능 예측의 또 다른 하나의 지표로 가치가 있는 것으로 판단된다.

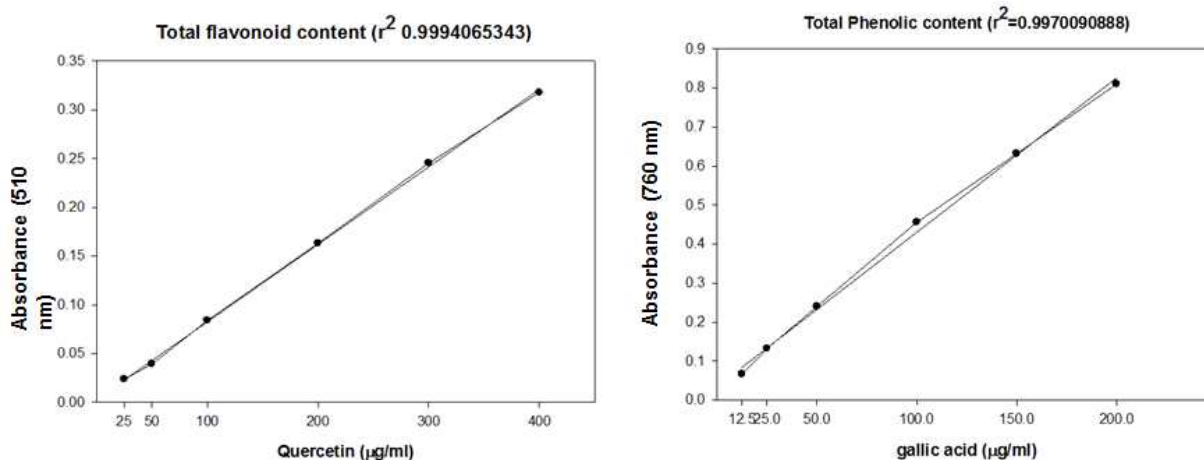


Fig. 7. Standard curves of total flavonoid and total phenol.

Table 5. Contents of total flavonoids and total phenolics of 70% EtOH extracts

Area	Samples	Total flavonoid (mg Quercetin equivalents/g)	Total phenolics (mg Gallic acid equivalents/g)
A	WD-105d	63.8 ± 1.1	47.5 ± 1.1
A	GH-105d	<b>77.9 ± 1.0</b>	39.7 ± 0.6
B	GH1-102d	<b>80.2 ± 2.3</b>	45.6 ± 1.0
B	GH2-105d	65.5 ± 2.8	43.1 ± 1.3
B	YS-105d	63.3 ± 3.3	45.3 ± 1.2

Table 6. Contents of total flavonoids and total phenolics of EtOAc extracts

Area	Samples	Total flavonoid (mg Quercetin equivalents/g)	Total phenolics (mg Gallic acid equivalents/g)
A	WD-105d	45.7 ± 2.9	18.9 ± 0.9
A	GH-105d	34.8 ± 1.1	25.8 ± 1.1
B	GH1-102d	<b>64.1 ± 1.5</b>	<b>37.8 ± 1.7</b>
B	GH2-105d	51.3 ± 3.7	24.6 ± 0.8
B	YS-105d	10.4 ± 0.6	14.9 ± 1.1

## 나. PTH로부터 테로카판 화합물의 분리, 정제 및 구조 확인을 통해 지표물질 확보 및 신규물질/용도 도출

### (1) 지표물질인 coumestrol의 분리

건조콩잎 109일령 880 g에 95% EtOH 10 L를 첨가한 후 실온에서 4 일 동안 교반하면서 추출한 후 농축·건조하여 95% EtOH 추출물 134 g을 얻었다. 농축된 상태의 95% EtOH 추출물을 물에 현탁 시킨 후 동량 부피의 Hexane을 첨가하고 용매 분획하여 Hexane층을 얻었고, 같은 방법으로 해당 물층에 동량의 CHCl<sub>3</sub>과 BuOH을 각각 첨가하여 순차적으로 CHCl<sub>3</sub>층과 BuOH층을 얻었다 (Fig. 8A).

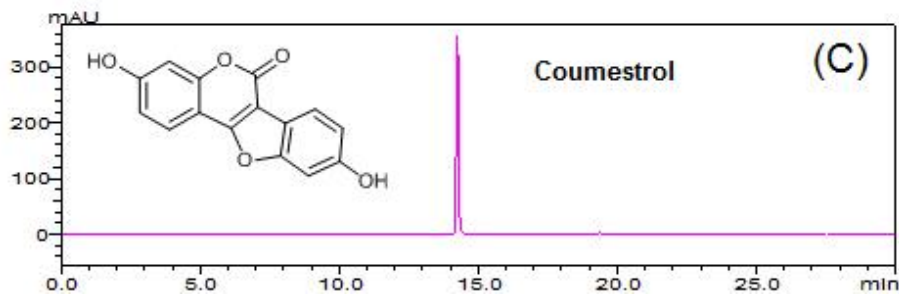
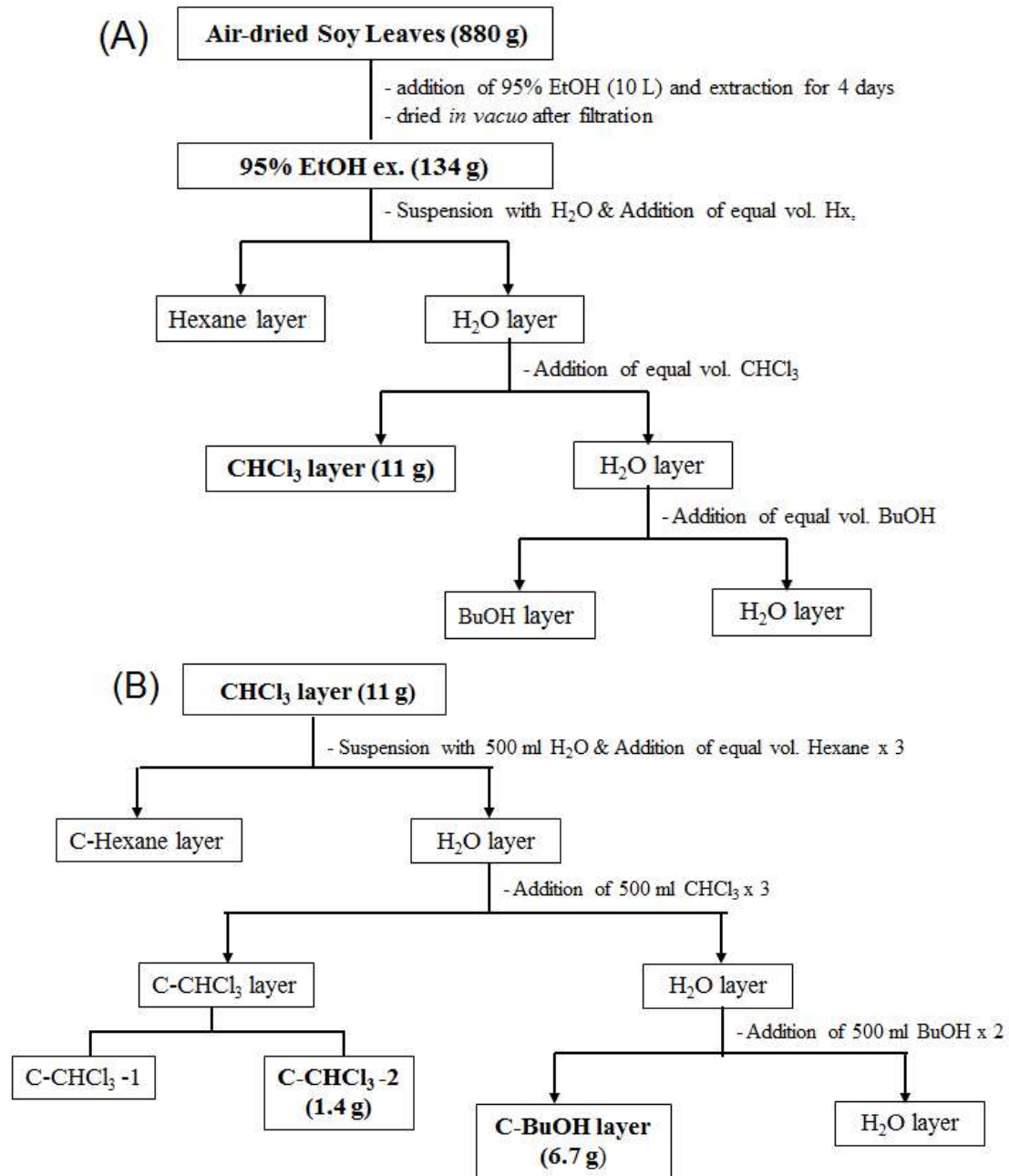


Fig. 8. Isolation schemes of coumestrol and phaseol from 95% EtOH extracts of soy leaves. (A) solvent partition of 95% EtOH extracts of soy leaves; (B) solvent partition of CHCl<sub>3</sub> layer; (C) HPLC profile of coumestrol isolated from prep-TLC.

TLC를 통해 용매 분획에서 얻은 CHCl<sub>3</sub> 층 (11 g)에 Hexane 층의 물질이 다량 포함되어 있는 것을 파악하여, Hexane, CHCl<sub>3</sub>과 BuOH을 이용하여 이 CHCl<sub>3</sub> 층에 대한 2차 용매 분획을 수행

하여 C-BuOH 층 6.7 g을 얻었다 (Fig. 8B). 이 C-BuOH 층을 analytical HPLC로 분석한 결과, 주성분으로 coumestrol이 포함되어 있는 것을 확인하였다.

C-BuOH 층을 이등분하고 Silica-gel column chromatography (190 x 250 mm)를 2번에 걸쳐 수행하였다. CHCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub>/MeOH, MeOH을 이동상으로 하여 MeOH의 비율을 순차적으로 높여가면서 [CHCl<sub>3</sub>/MeOH=97:3 (500 ml), CHCl<sub>3</sub>/MeOH=95:5 (600 ml), CHCl<sub>3</sub>/MeOH=94:6 (900 ml), CHCl<sub>3</sub>/MeOH=93:7 (300 ml), MeOH (500 ml)] 용출하여 coumestrol이 포함된 분획 (220 mg)을 얻었다.

다음으로는 Silica-gel column을 통해 얻은 분획물을 MPLC system (Biotage, Charlottesville, VA USA)을 이용하여 분리하였다. MPLC에 사용한 column은 Biotage KP-Sil (US Patent 6.294.087, 40 x 150 mm)이었고, 이동상으로 CHCl<sub>3</sub>과 MeOH gradient 조건에서 활성분획 61 mg을 얻었다. 최종적으로 coumestrol을 순수 분리하기 위하여 MeOH/water=4:1을 이동상으로 prep-TLC (TLC Silica-gel 60 RP-18, 20 x 20)를 수행하여 95% 이상 정제된 coumestrol 11 mg을 얻었다 (Fig. 8C).

## (2) Phaseol의 분리

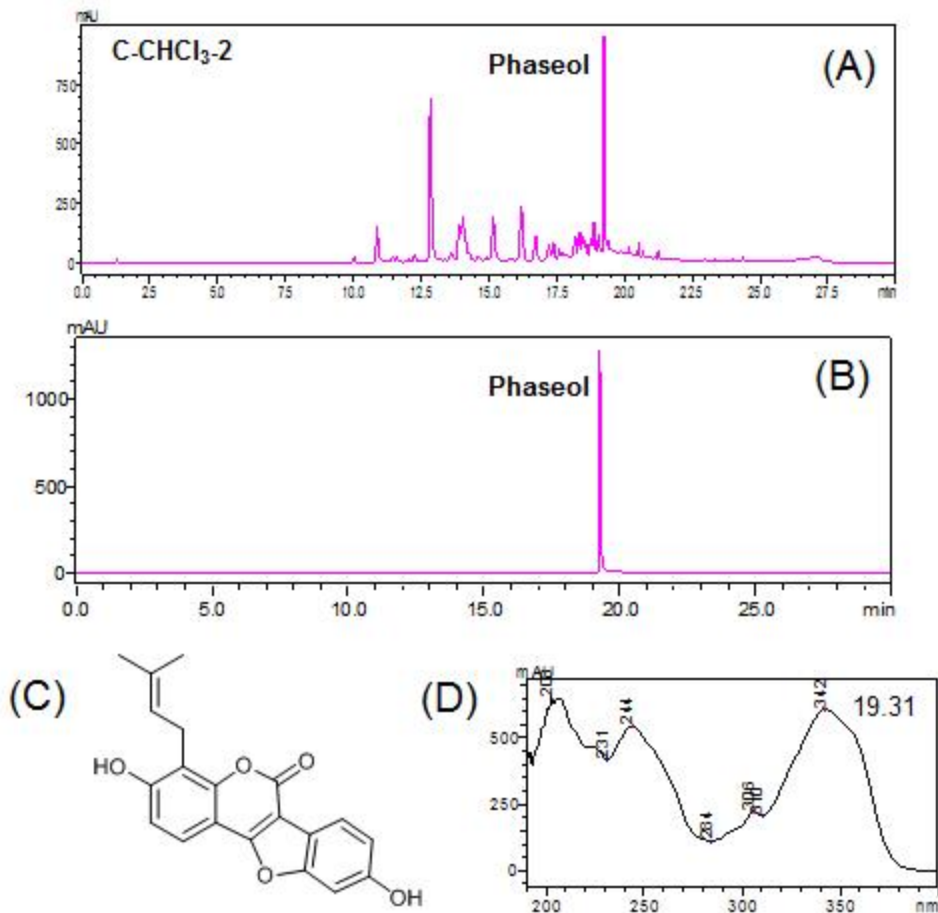


Fig. 9. HPLC profiles of phaseol-contained MPLC fraction and phaseol isolated using prep-TLC. (A) solvent partition of C-CHCl<sub>3</sub>-2 layer; (B) HPLC profile of phaseol isolated from prep-TLC; (C) Structure of phaseol; and (D) UV spectrum of phaseol.

Analytical HPLC로 분석한 결과, 상기 Fig. 8B의 C-CHCl<sub>3</sub>-2 분획 (1.4 g)에 phaseol이 다량 함

유되어 있는 것을 알았다 (Fig. 9A). 따라서 위의 coumestrol을 분리할 때와 같은 방법으로 MPLC를 이용하여 phaseol을 분리하였다. MPLC에 사용한 column은 Biotage KP-Sil (US Patent 6.294.087, 40 x 150 mm)이었고, 이동상으로  $\text{CHCl}_3$ 과 MeOH gradient 조건에서 활성분획 80 mg을 얻었으며, 최종적으로 phaseol을 순수 분리하기 위하여 MeOH/water=4:1을 이동상으로 prep-TLC (TLC Silica-gel 60, RP-18, Merck)를 수행하여 정제된 phaseol 16 mg을 얻었다 (Fig. 9B).

### (3) Isotrifoliol의 분리

분쇄한 건조콩잎 200 g에 EtOAc 2 L를 첨가하고 실온에서 3 일 동안 진탕하면서 1차 추출하였다. 1차 추출액을 여과지로 거른 후, 1차 여과 후 남은 찌꺼기에 동량의 EtOAc를 첨가하여 1차 추출물과 동일 조건하에서 2차 추출하였다. 1차 및 2차 추출물 혼합액을 감압 하에 농축하여 흑갈색의 EtOAc 추출물 약 10 g을 얻었다. 이 EtOAc 추출물 10 g은 첫 단계로 silica-gel column chromatography (60 x 180 mm)를 수행하여 분리하였다. 이동상으로 hexane/acetone의 혼합용매 (30:1~1:1)를 사용하였으며, acetone의 비율을 높여가며 순차적으로 용출하여 7 개의 분획을 얻었다 (A~G). 이들 분획물을 RP C18-TLC (전개용매 MeOH/H<sub>2</sub>O=4:1) 상에서 확인 한 결과, E 분획물 (hexane/acetone=1:1, 0.4 g)에 isotrifoliol이 함유되어 있는 것을 확인하였다. 다음 단계로 E 분획물은 2차 silica-gel column chromatography (20 x 260 mm)를 수행 수행하여 분리하였다. 이동상으로 hexane/acetone의 혼합용매를 사용하였으며, acetone의 비율을 높여가며 순차적으로 용출하여 7 개의 분획을 얻었다 (FE1~FE7). FE6 분획물 (hexane/acetone=2:1, 0.1 g)에 isotrifoliol이 함유되어 있는 것을 TLC 및 analytical HPLC로 확인 하였다. 연이어 prep-HPLC system (Shimadzu LC-8A series)에서 prep-HPLC column (YMC-Pack Pro C18; 20 x 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ; 254 nm; 10 ml/min)을 이용하여 표 2의 용매조건으로 용출하였으며, 40% acetonitrile 조건에서 용리되는 isotrifoliol (3.4 mg)을 분리하였다 (Fig. 10).

**Table 7. Preparative HPLC condition and solvent elution method**

Preparative HPLC condition	Solvent elution method			
HPLC apparatus: Shimadzu LC-8A vp	Time	A (%)	B (%)	
Pump system: Shimadzu LC-8A vp with binary pump	0	100	0	isocratic
manual injector: Shimadzu FRC-10A vp	30.0	70	30	gradient
Detector: Shimadzu SPD-M20A vp (PDA detector, 254 nm)	50.0	50	50	gradient
Column: YMC-Pack Pro SPP C18 (20 x 250 mm, 5 $\mu\text{m}$ )	60.0	0	100	gradient
Flow rate: 10 ml/min	70.0	0	100	isocratic
Flow solvent A: 0.1% Acetic acid in Water				
Flow solvent B: Acetonitrile				

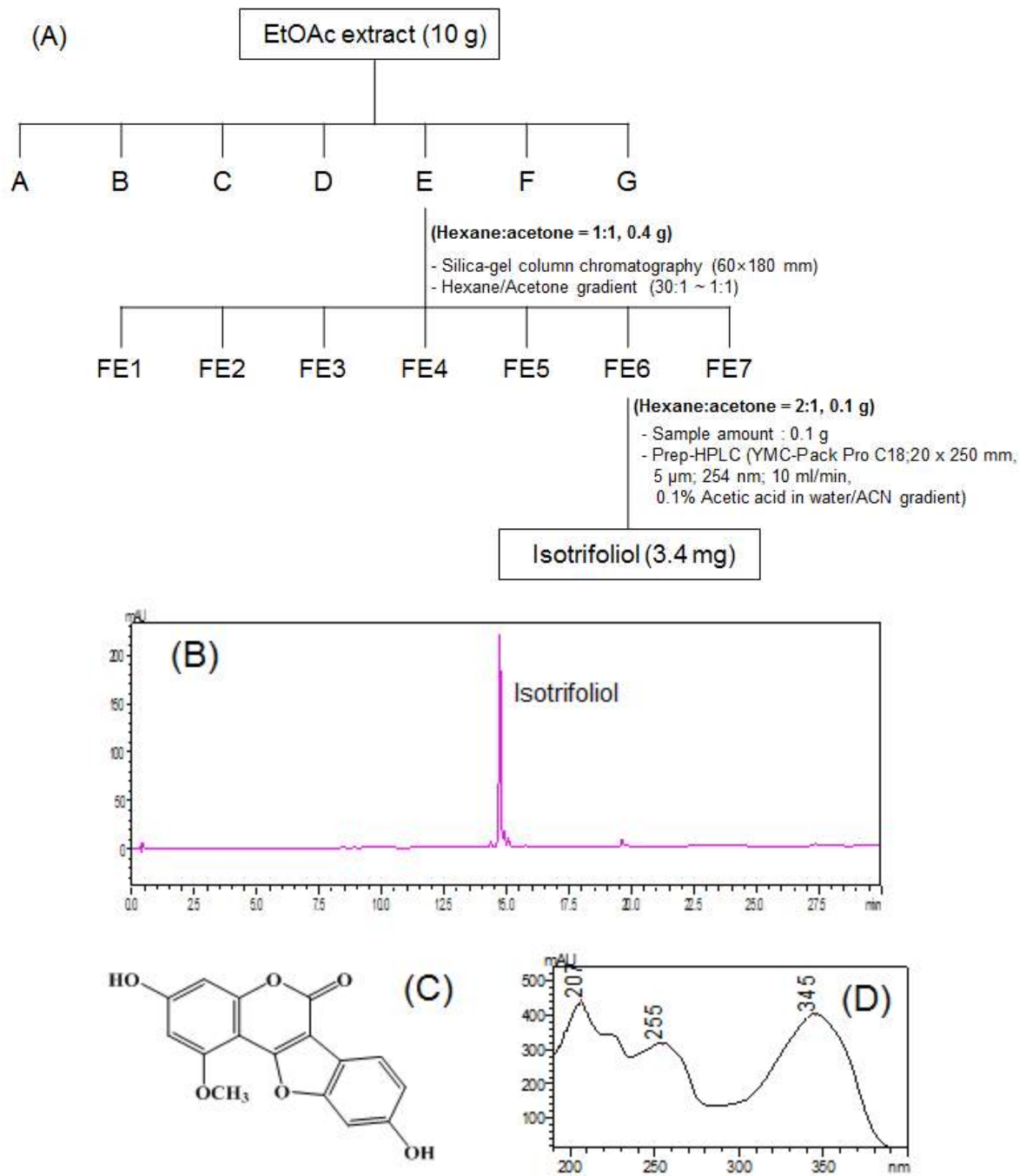


Fig. 10. Isolation schemes of isotrifoliol from EtOAc extracts of soy leaves. (A) Isolation schemes of isotrifoliol from EtOAc extracts of soy leaves; (B) HPLC profile of isotrifoliol isolated from preparative HPLC.; (C) Structure of isotrifoliol; and (D) UV spectrum of isotrifoliol.

#### (4) 테로카판계 화합물 PD-1 및 신규 물질 PD-2의 분리 및 구조 분석

충청남도 일대에서 대두콩을 파종하여 생육기간이 110일 이후에 수확한 콩잎을 열풍 건조 하였다. 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 CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 1 : 10을 유출용매로 사용하여 Sephadex LH-20 (18 x 430 mm, Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden) column chromatography를 수행하여 신규 화합물 PD-2 (5.5 mg)을 얻었다 (Fig. 18).

상기 2차 silica-gel column chromatography의 분획인 FD17~FD23을 합쳐서CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 1 : 10을 유출용매로 사용하여 Sephadex LH-20 column chromatography (18 x 430 mm)를 수행하여 화합물 PD-1 (3.5 mg)를 얻었다 (Fig. 11).

분리한 화합물 PD-1과 화합물 PD-2의 구조분석을 위하여 NMR 분석 (Figs. 13~22) 및 질량 분석을 수행하여 그 결과를 표 8에 정리하였다. 기기분석 결과 및 기 보고된 문헌 (J. Agric. Food Chem., 54: 2057-920, 2063)을 참고하여 화합물 PD-1은 (9-hydroxy-2-(prop-1-en-2-yl)-1H-benzofuro[3,2-c]furo [3,2-g]chromen-6(2H)-one)의 구조를 갖는 plicadin으로 확인되었고, 화합물 PD-2는 11-hydroxy-4,4-dimethylbenzofuro[3,2-c]pyrano[2,3-h]chromen-8(4H)-one의 구조를 갖는 신규 화합물이었으며 (Fig. 12), PD-1과 PD-2에 대한 용도 및 신규물질에 대한 특허출원 (대한민국특허출원 2014-0131540)을 완료하였다.

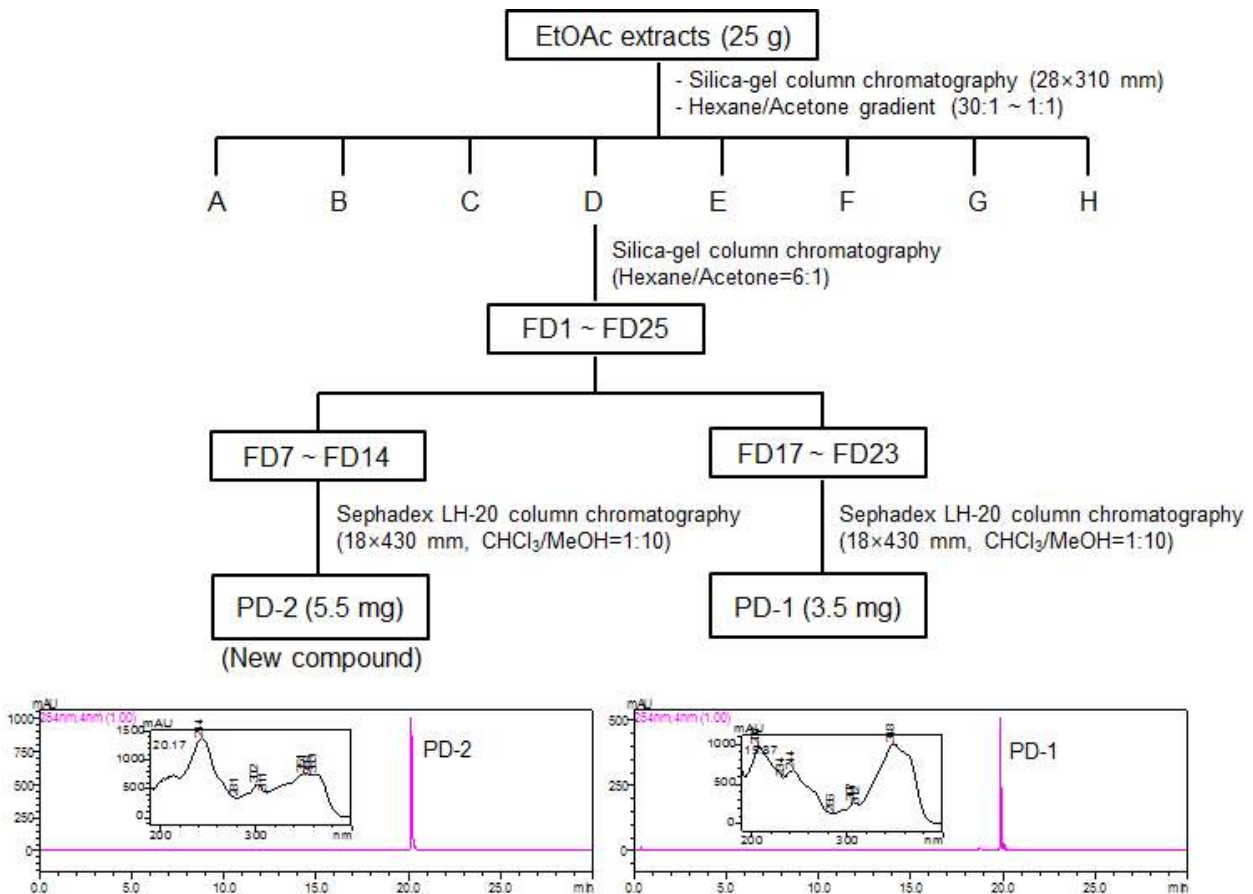


Fig 11. Isolation scheme of compounds, PD-1 and PD-2 from EtOAc extracts of soy leaves.



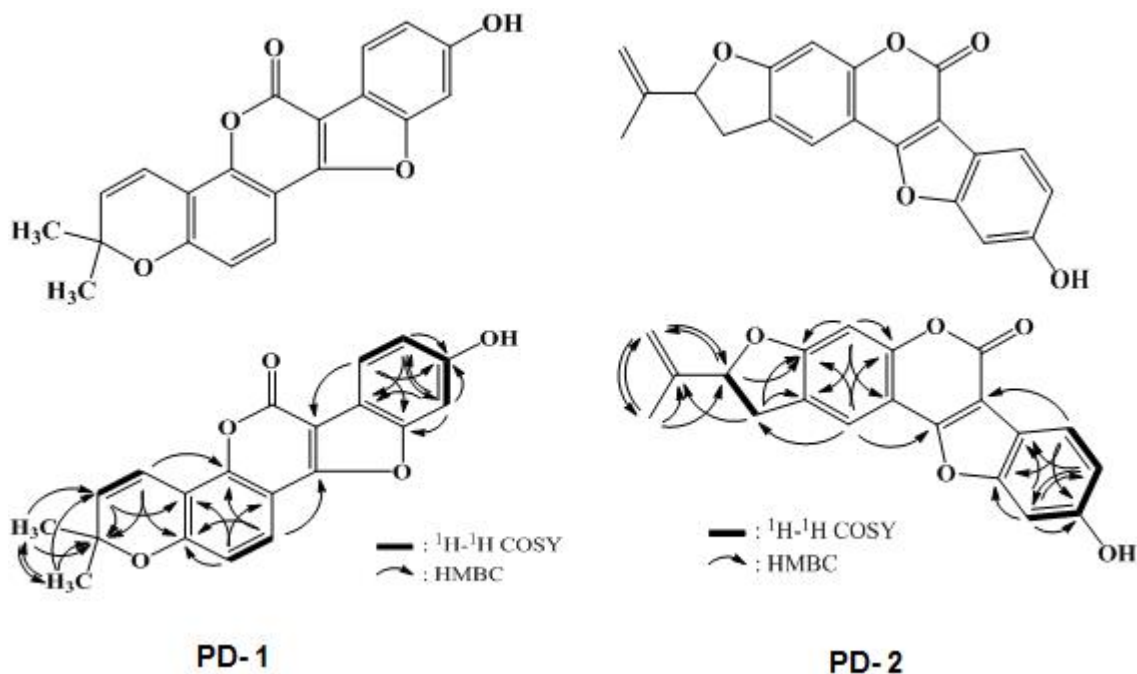


Fig. 12. Chemical structures and  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY and HMBC correlation of compounds PD-1 and PD-2.

Table 8.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compounds PD-1 and PD-2

화합물	분광학적 분석	Data
PD-1 (Plicadin)	분자식	$\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{O}_5$
	분자량	334.33 g/mol
	$^1\text{H}$ NMR	(600 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ ) $\delta$ 1.43(3H, s, H-15,16), 5.17(1H, d, $J=10.3\text{Hz}$ , H-13), 6.78(1H, d, $J=8.3\text{Hz}$ , H-2), 6.89(1H, dd, $J=8.2\text{Hz}$ , H-8), 7.03(1H, brs, H-10), 7.64(1H, $J=8.3\text{Hz}$ , H-1), 7.77(1H, $J=8.2\text{Hz}$ , H-7)
	$^{13}\text{C}$ NMR	(150 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ ) $\delta$ 28.2(C-15,16), 77.8(C-14), 98.9(C-10a), 103.4(C-6), 106.3(C-11b), 110.1(C-4), 114.0(C-8), 114.1(C-2), 115.5(C-12), 115.8(C-6b), 121.4(C-1), 121.7(C-7), 131.2(C-13), 149.3(C-4a), 156.1(C-3), 156.7(C-9), 158.9(C-6), 160.4(C-11a)
PD-2	분자식	$\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{O}_5$
	분자량	334.33 g/mol
	$^1\text{H}$ NMR	(600 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) $\delta$ 1.79(3H, s, H-16), 3.14(1H, d, m, H-12 $\beta$ ), 4.46 (1H, m, H-12 $\alpha$ ), 4.97 (1H, br s, H-15 $\alpha$ ), 5.14 (1H, br s, H-15 $\beta$ ), 6.91 (1H, s, H-1), 6.94 (1H, dd, $J=8.2\text{Hz}$ , H-8), 7.11 (1H, s, H-10), 7.73 (1H, s, H-1), 7.90 (1H, d, $J=8.3\text{Hz}$ , H-7)
	$^{13}\text{C}$ NMR	(150 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) $\delta$ 17.1(C-16), 33.6(C-12), 87.6(C-13), 98.6(C-4), 102.8(C-6a), 106.0(C-11b), 113.7(C-8), 117.0(C-6b), 117.1(C-1), 122.2(C-7), 125.0(C-2), 142.9(C-14), 154.9(C-4a), 155.1(C-9), 158.6(C-6), 160.6(C-11a), 163.2(C-3)

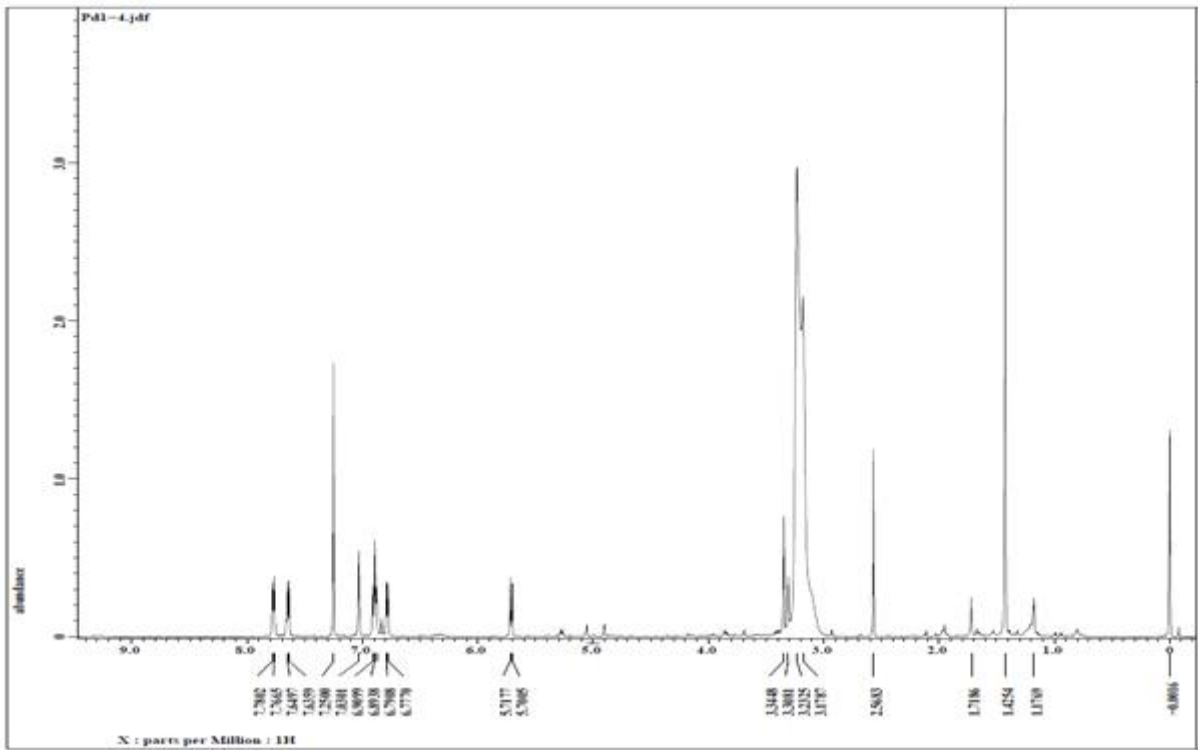


Fig. 13  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound PD-1 (600 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ ).

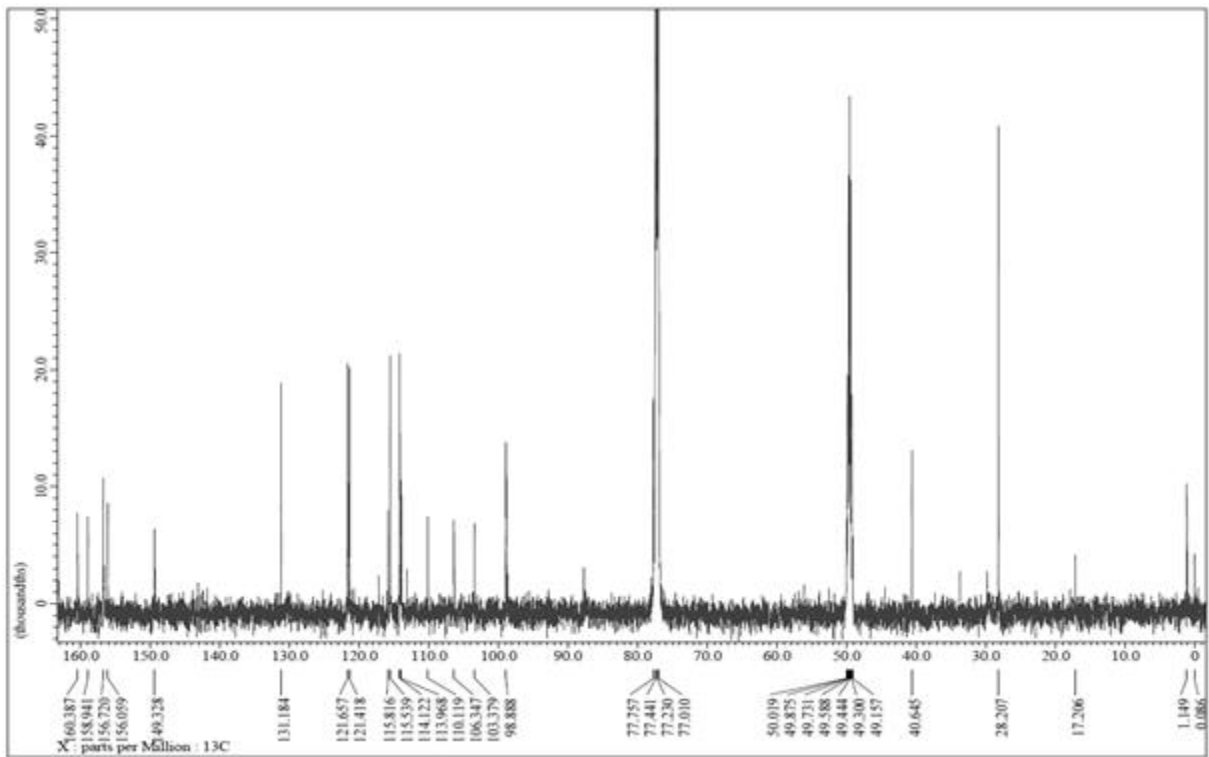


Fig. 14.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of compound PD-1 (150 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ ).

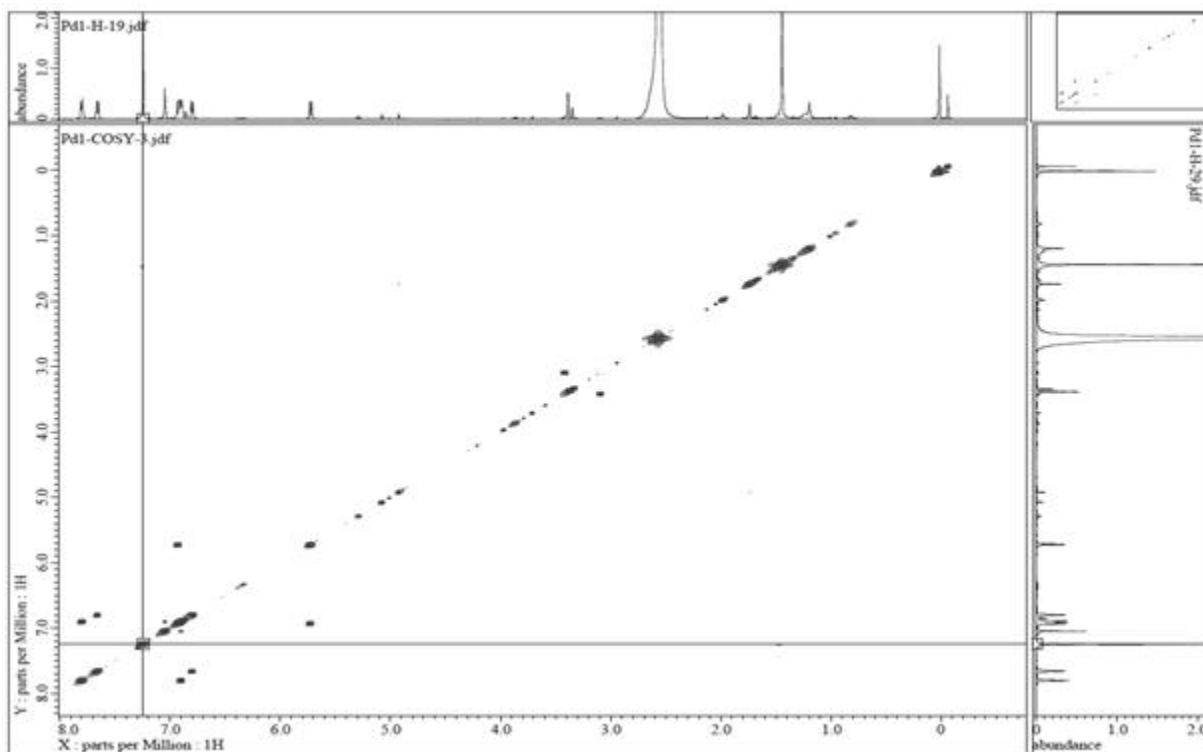


Fig. 15.  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY spectrum of compound PD-1 (600 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ ).

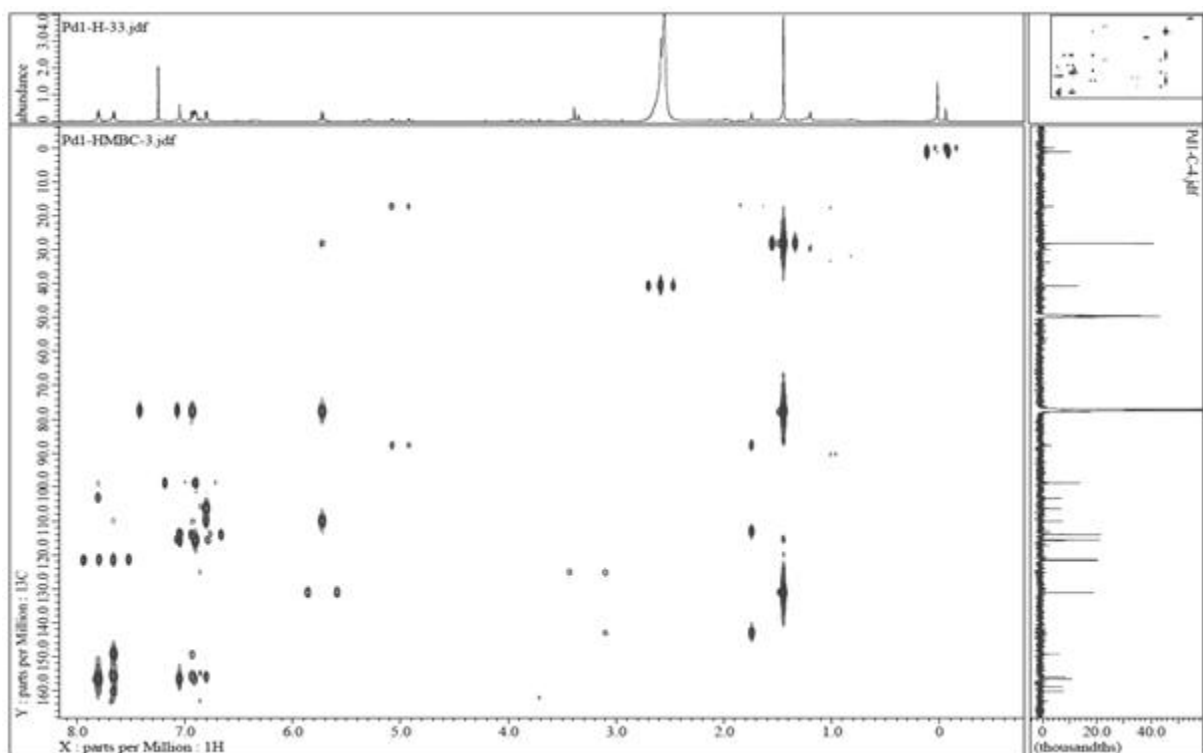


Fig. 16. HMBC spectrum of compound PD-1.

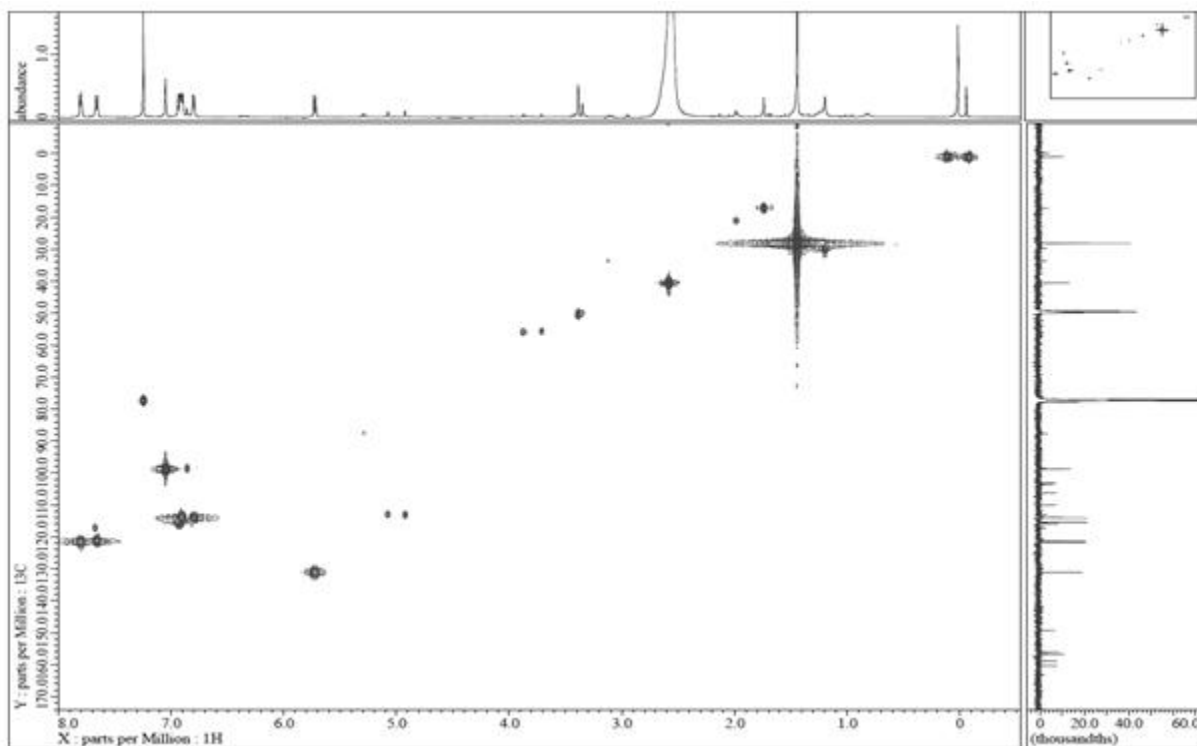


Fig. 17. HMQC spectrum of compound PD-1.

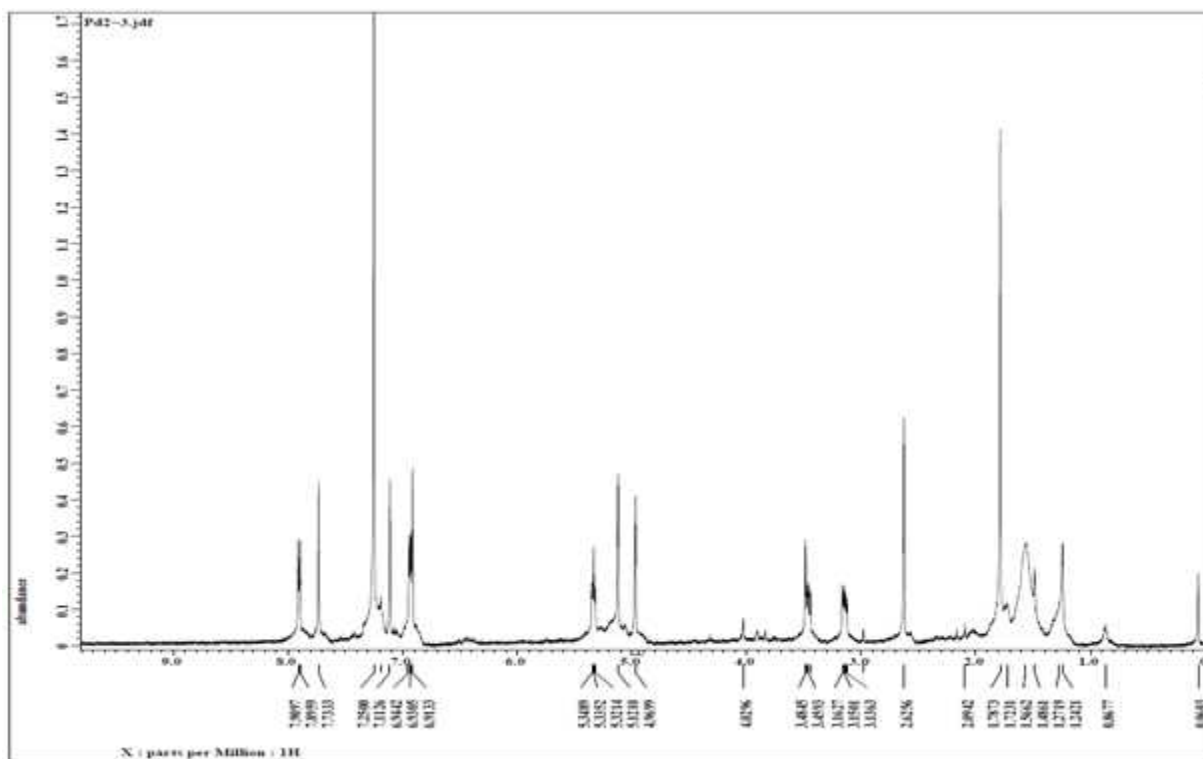


Fig. 18.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound PD-2 (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

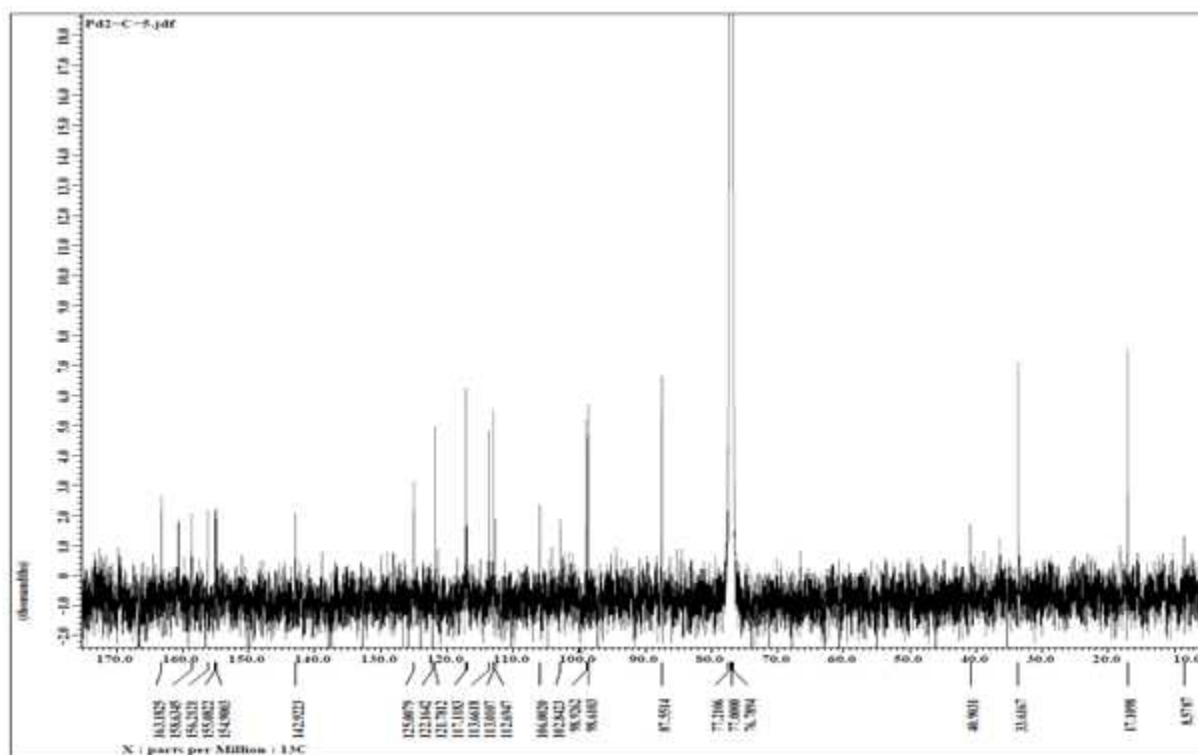


Fig. 19.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of compound PD-2 (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

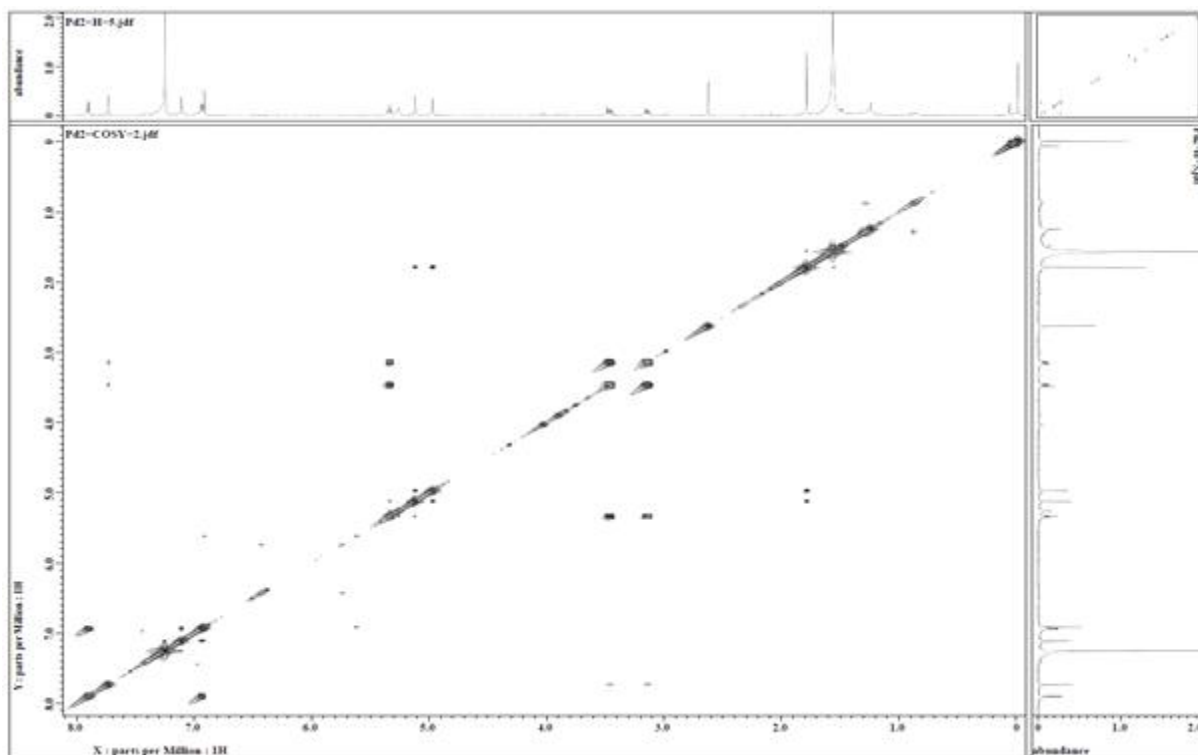


Fig. 20.  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY spectrum of compound PD-2 (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

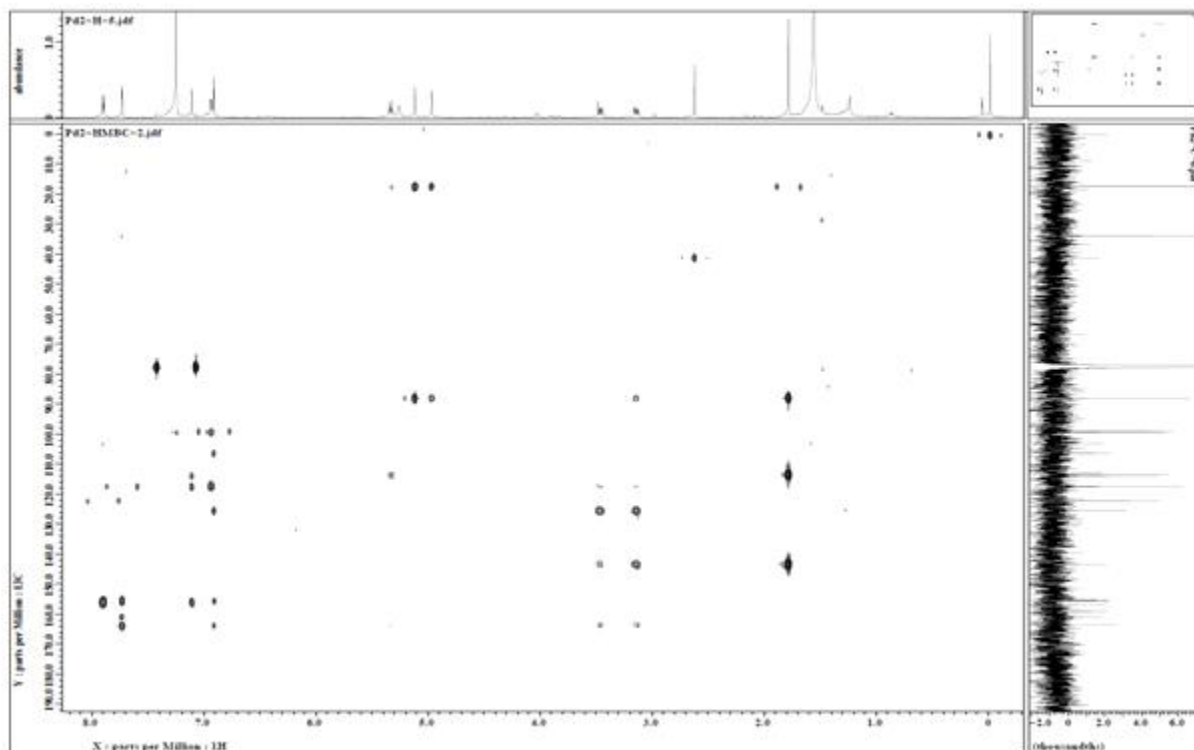


Fig. 21. HMBC spectrum of compound PD-2.

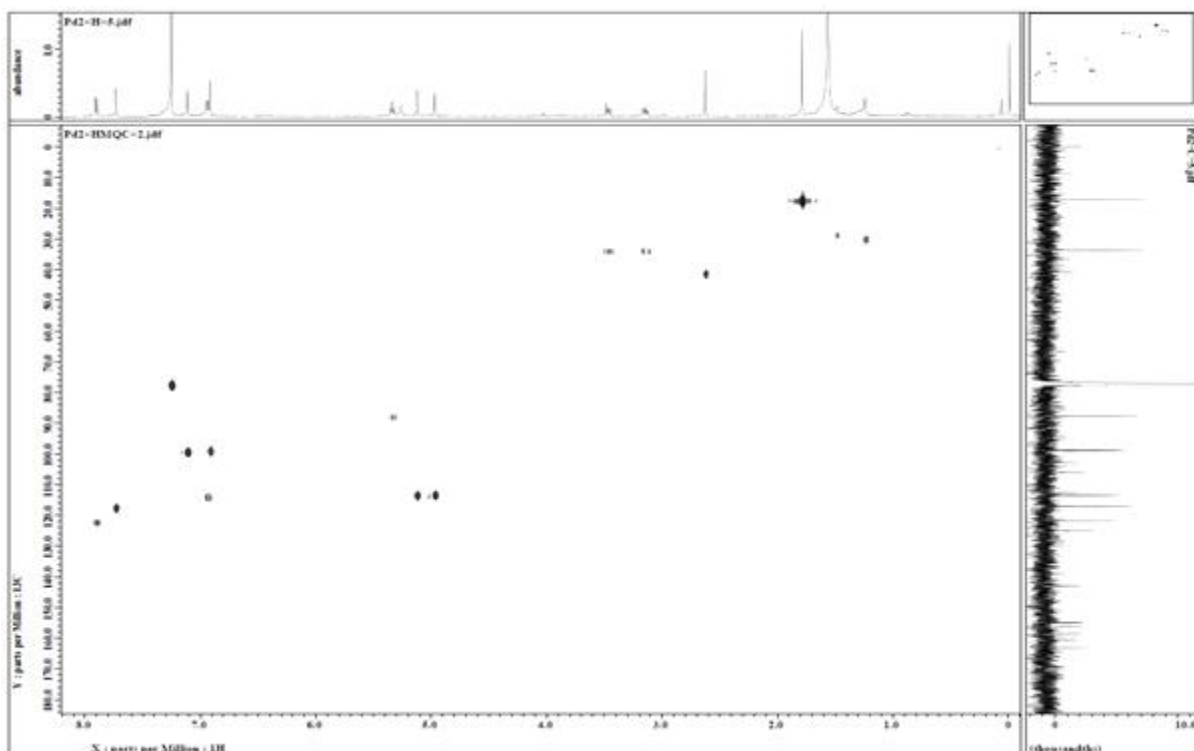


Fig. 22. HMQC spectrum of compound PD-2.

화합물 PD-1과 PD-2의 생리활성을 탐색하기 위하여 porcine  $\alpha$ -amylase, yeast  $\alpha$ -glucosidase, LDL-산화 및 hACAT1 저해활성을 측정한 결과, PD-1은 10  $\mu$ g/ml에서 LDL-산화를 80.0% 저해하였으며,  $\alpha$ -glucosidase 활성을 79.0% 저해하였고, 100  $\mu$ M에서 hACAT1 효소 활성을 60.4% 저해하였다. 신규물질인 PD-2는 10  $\mu$ g/ml에서 LDL-산화 및 yeast  $\alpha$ -glucosidase에 대한 저해활성이 각각 82.0% 및 79.0%로 나타났으며, porcine  $\alpha$ -amylase에 대해서도 100  $\mu$ g/ml에서 61.4%의 저해활성을 보였다. 따라서 PD-1과 PD-2는 항당뇨, 고지혈증 및 동맥경화의 예방과 치료에 활용할 수 있는 유용한 화합물로 판단된다.

Table 9. Bioactivities of compounds PD-1 and PD-2 isolated from the EtOAc extracts of soy leaves

Compounds	Inhibition (%)			
	Porcine $\alpha$ -amylase (100 $\mu$ g/ml)	Yeast $\alpha$ -glucosidase (10 $\mu$ g/ml)	LDL-oxidation (10 $\mu$ g/ml)	hACAT1 (100 $\mu$ M)
PD-1	14.9 $\pm$ 1.6	78.1 $\pm$ 0.9	80.0 $\pm$ 0.5	60.4 $\pm$ 0.3
PD-2	61.4 $\pm$ 1.0	82.0 $\pm$ 1.3	79.0 $\pm$ 1.4	24.5 $\pm$ 2.8
Positive control	52.2 $\pm$ 1.9 (Acarbose 2.7 $\mu$ M)	51.0 $\pm$ 1.7 (coumestrol 5 $\mu$ M)	48.7 $\pm$ 0.4 (BHT 2 $\mu$ M)	51.4 $\pm$ 0.4 (OAA 150 nM)

### (5) Pheophobide a와 xanthophyll 유도체 분리의 분리 및 구조 분석

분쇄한 건조 콩잎 100 g에 EtOAc 500 ml를 첨가하여 실온에서 2 일 동안 추출하였다. 추출액을 감압 하에 농축하여 흑갈색의 EtOAc 추출물 약 2.75 g을 얻었다. 이 추출물을 RP-C18 column chromatography (50 x 290 mm)를 이용하여 분리하였다. 80% MeOH, 100% MeOH, CHCl<sub>3</sub>/MeOH=1:9, CHCl<sub>3</sub>/MeOH=1:1 용매로 순차적으로 용출하여 15 개의 분획을 얻었다. 이 중 높은 LDL-산화 저해활성과 yeast  $\alpha$ -glucosidase 저해활성을 동시에 갖는 분획 5 (C18-5, 0.48 g)를 얻었다.

다음 단계로 C18-5 분획을 analytical HPLC column (Cosmosil 5C18-MS-II; 4.6 x 150 mm, 5  $\mu$ m; 0.1% acetic acid in H<sub>2</sub>O (eluent A) and acetonitrile (eluent B); a linear gradient elution program; 5-80% B for 0~20 min, 80-95% B for 20~35 min, 95-100% B for 35~40 min; 100% B for 40~45 min; 100-5% B for 45~55 min; 1 ml/min)으로 분석한 결과, P1-P5의 화합물이 존재함을 알았다. 또한 PDA detector를 이용하여 얻은 P1-P5 각각 UV/VIS 스펙트럼으로부터 P1, P2, P3와 P5는 같은 계열을 화합물이며, P4는 다른 계열의 화합물임을 확인하였다 (Fig. 23).

분석 결과를 바탕으로 C18-5 분획 (0.48 g)을 prep-HPLC column (Cosmosil 5C18-MS-II; 10 x 250 mm, 5  $\mu$ m; 254 nm; 0.1% acetic acid in H<sub>2</sub>O (eluent A) and acetonitrile (eluent B); a linear gradient elution program; 5-80% B for 0~15 min, 80-95% B for 15~30 min, 95-100% B for 30~40 min; 100% B for 40~50 min; 100-5% B for 50~60 min; 3 ml/min)을 이용하여 HPLC를 2번 반복 실행하여 P1 ( $T_R$  = 30.2분, 순도가 낮음), P2 ( $T_R$  = 37.3분, 5.4 mg), P3 ( $T_R$  = 39.1분, 2.0 mg), P4 ( $T_R$  = 44.5분, 1.9 mg)에 해당하는 4개의 물질을 분리하였다.

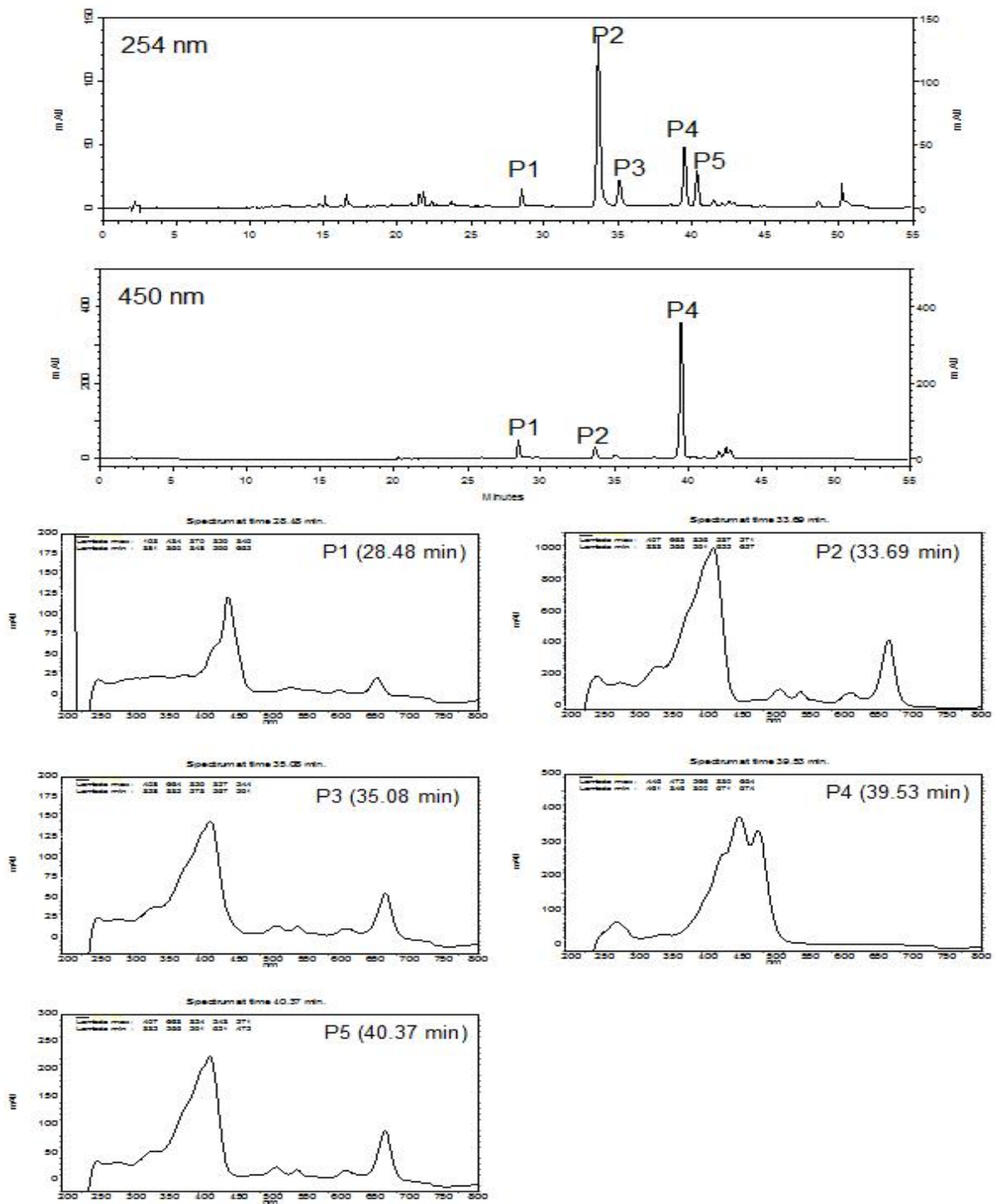


Fig. 23. HPLC profile of Fr. C18-5 at 254 nm and 450 nm and UV/VIS spectra of P1-P5.



P2는 NMR 분석 및 질량분석을 수행하여 발표된 문헌의 것과 비교 분석한 결과, chlorophyll 전환체인 phephorbide a 이며 (Fig. 24), P3는 phephorbide a의 호변이성체(tautomer)로 확인되었다 (Bousslama L *et al.*, 2011; Lai CS *et al.*, 2010; Cho M *et al.*, 2011)

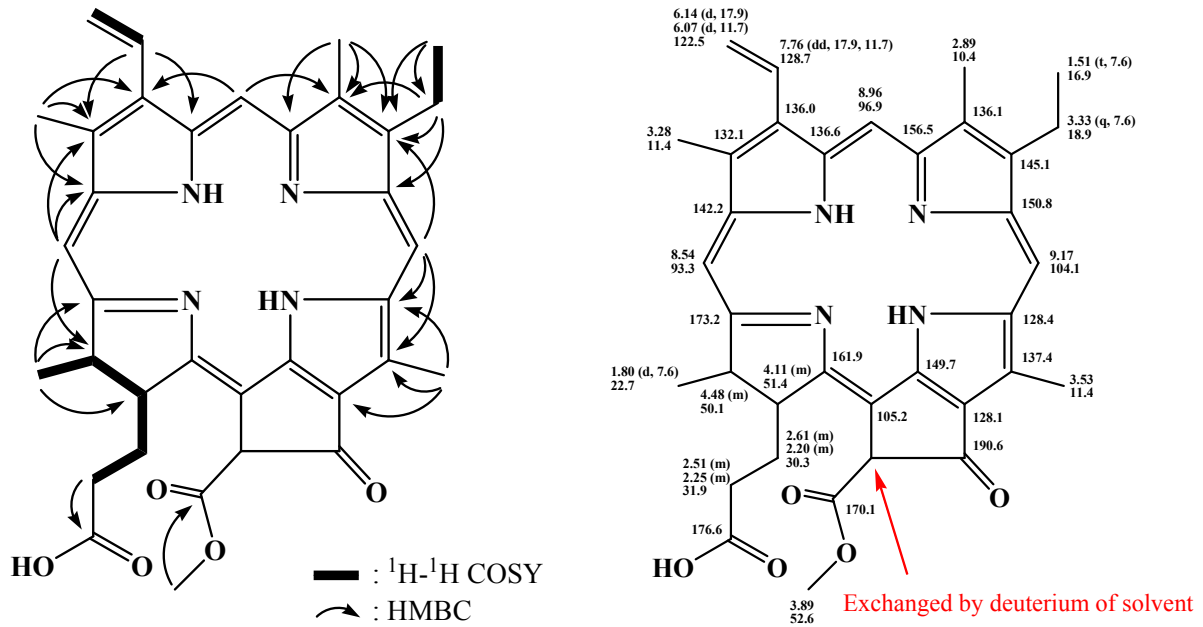


Fig. 24. Two-dimensional NMR correlations and structure of compound P2, phephorbide a.

P4도 질량분석 및 NMR 분석 (Figs. 26~31)을 수행하여 발표된 문헌의 것과 비교 분석한 결과, xanthophyll 계열의 화합물인 Lutein으로 구조 결정되었다 (Fig. 25).

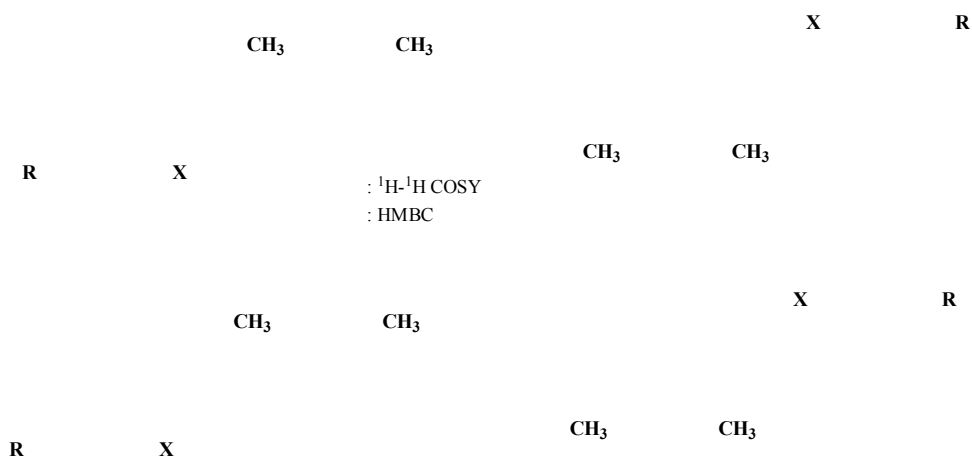


Fig. 25. Structure of compound P4.

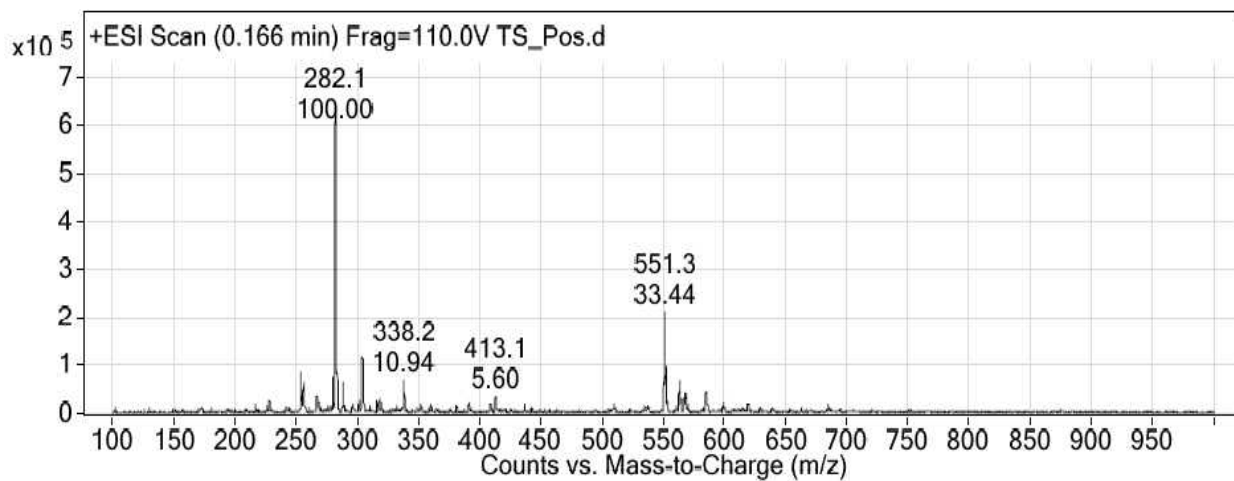


Fig. 26. ESI-mass spectrum of compound P4.

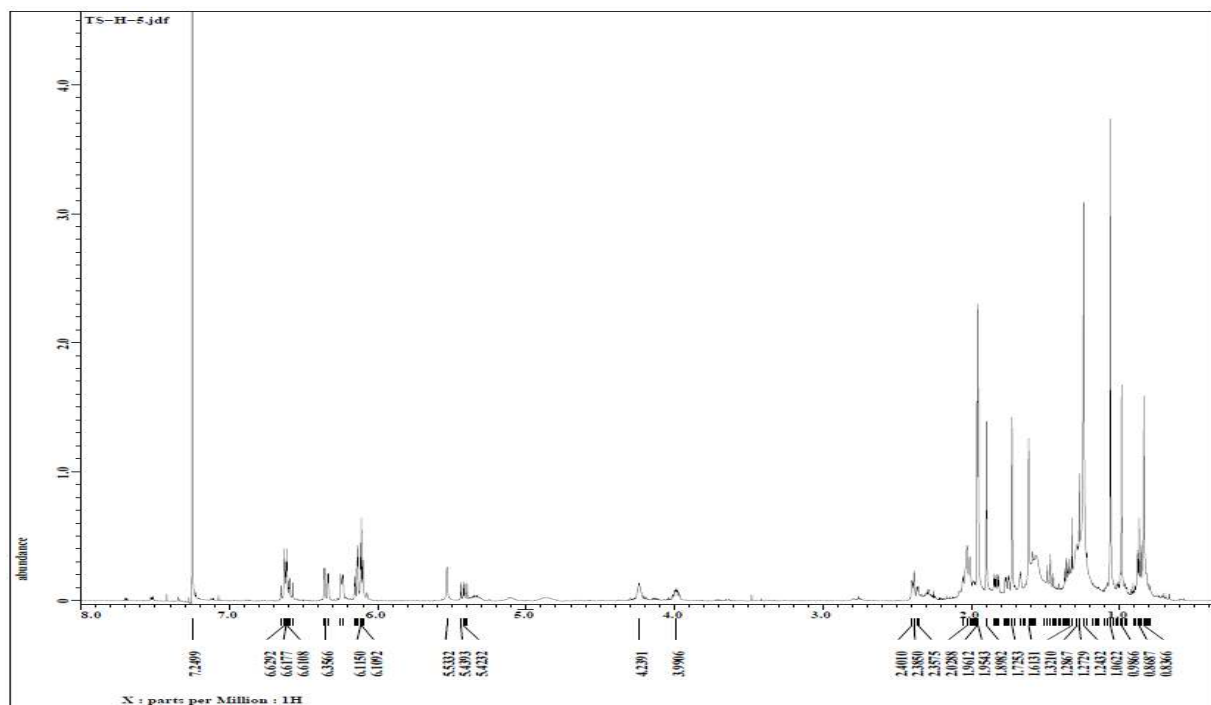


Fig. 27.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound P4 (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

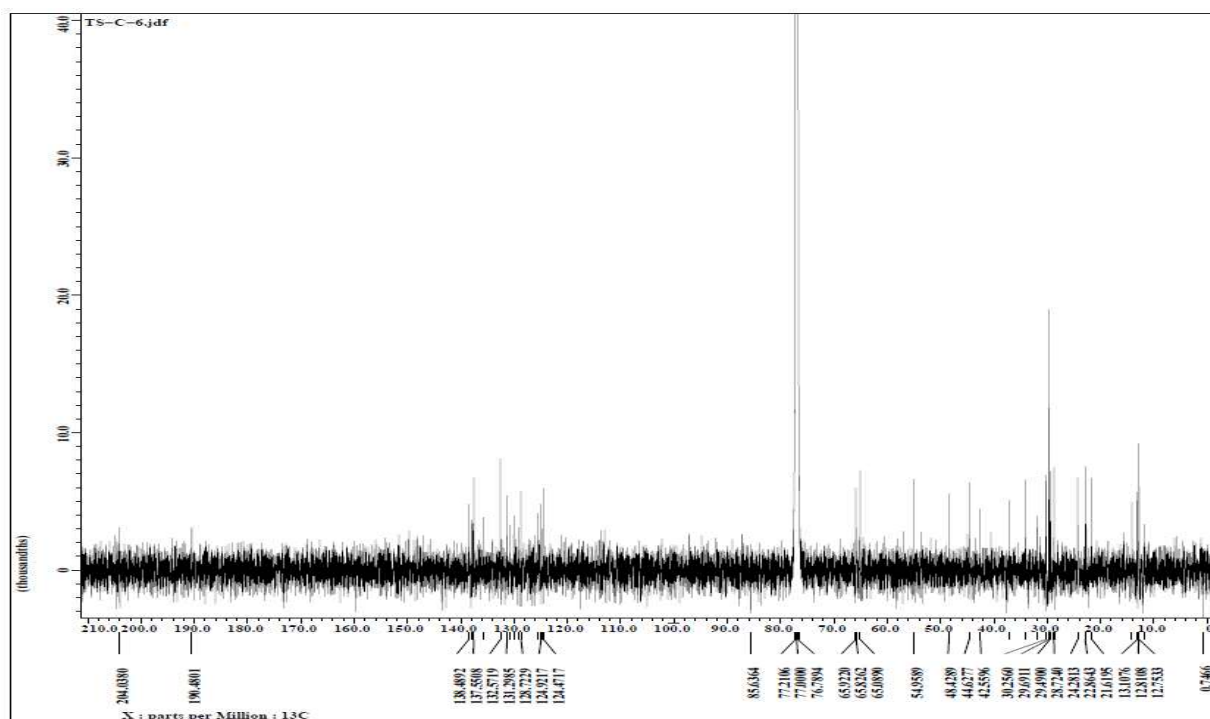


Fig. 28.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of compound P4. (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

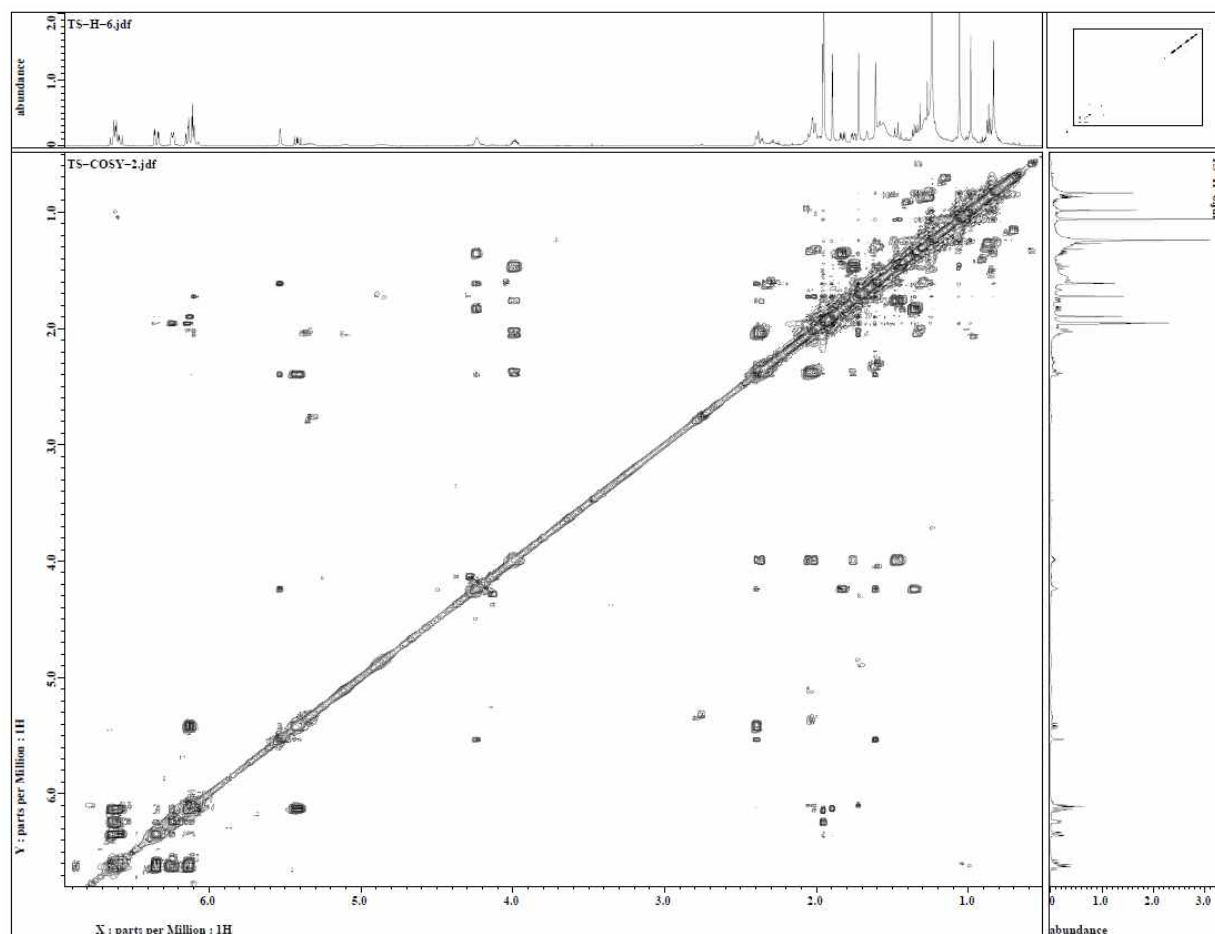


Fig. 29.  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY spectrum of compound P4.

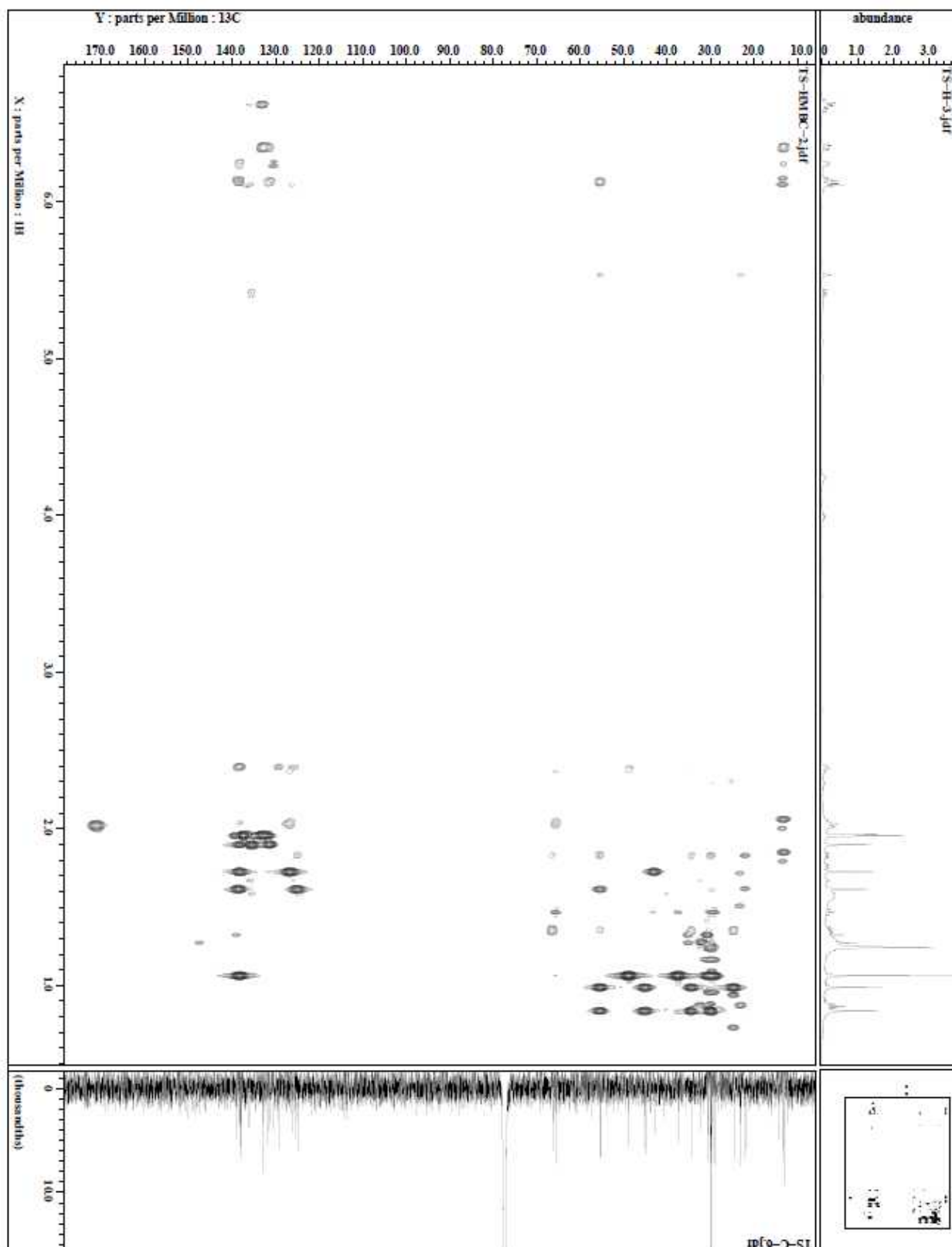


Fig. 30. HMBC spectrum of compound P4.

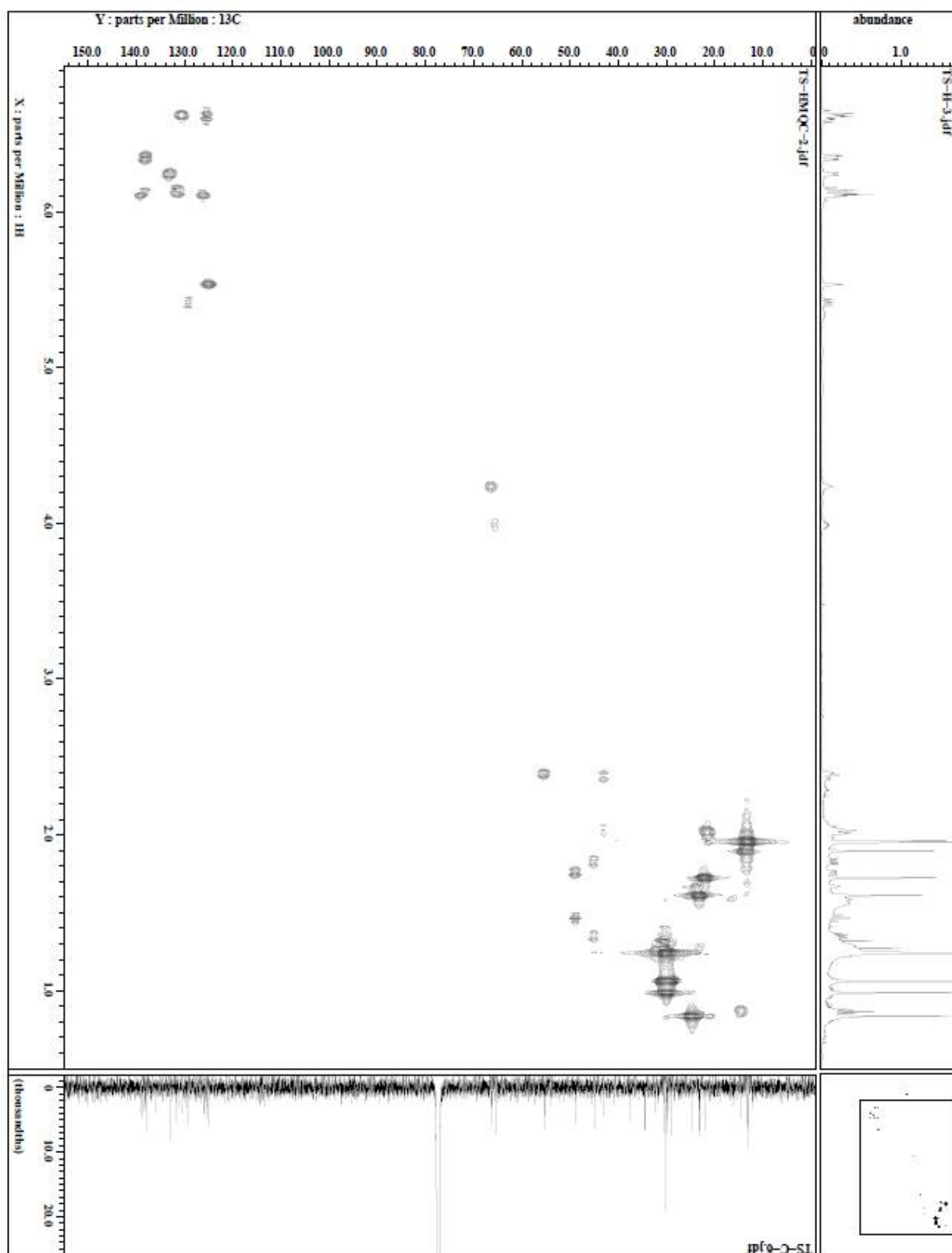


Fig. 31. HMQC spectrum of compound P4.

이 분리된 화합물들의 LDL-산화 저해활성 및 yeast  $\alpha$ -glucosidase 저해활성을 측정한 결과, 화합물 P2와 P3는 강한 LDL-산화 저해활성과 함께 yeast  $\alpha$ -glucosidase 저해활성을 갖으며, P4는 P2와 P3에 비해 LDL-산화 저해활성과 yeast  $\alpha$ -glucosidase 저해활성이 다소 낮은 화합물이었다 (Table 10). P2의 강한  $\alpha$ -glucosidase 저해활성 ( $IC_{50} = 45.2 \mu\text{g/ml}$ )을 갖는 한편, PA 독성유도 췌장세포 (HIT-T15 cells)에서 저농도 P-2 ( $0.5 \mu\text{g/ml}$ )의 전처리로 proinsulin와 PKA 유전자의 발현이 유의적으로 증가되었고, P-2  $0.1\sim 0.5 \mu\text{g/ml}$ 에서 인슐린 조절 유전자인 MafA, Pax4 유전자의 발현이 농도 의존적으로 증가되었으며, 베타세포의 분화를 조절하는 Ngn3 유전자의 발현도 유의적으로 증가되었다 (Fig. 21 참조). 따라서 이와 같은 항당뇨 효과를 바탕으로 특허출원 (대한민국특허출원 2012-0111623)을 완료하였다.

Table 10. LDL-oxidation and yeast $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities of P2~P4

Fr. of HPLC	Inhibition (%)	
	LDL-oxidation (20 $\mu\text{g/ml}$ )	yeast $\alpha$ -glucosidase (50 $\mu\text{g/ml}$ )
P2	65.5 $\pm$ 0.4	57.8 $\pm$ 1.5
P3	59.2 $\pm$ 1.3	49.7 $\pm$ 2.4
P4	16.6 $\pm$ 0.7 (80 $\mu\text{g/ml}$ )	40.8 $\pm$ 2.8
Positive control	54.1 $\pm$ 0.3 (BHT 2 $\mu\text{M}$ )	51.0 $\pm$ 1.7 (coumestrol 5 $\mu\text{M}$ )

#### 다. HPLC를 이용한 PTH의 지표성분 함량 분석 방법 확립

##### (1) 표준추출물 제조 방법 설정 및 콩잎 추출물의 지표물질 선정

###### (가) 표준추출물 제조 방법

2012년도에 제1협동과제에서 재배 및 시기별로 채취한 콩잎을 실험에 사용하였다. 대두콩을 파종하여 생육기간이 30 일 이후에 15 일 간격으로 수확한 콩잎을 건조하여 분쇄한 콩잎 100 mg에 70% EtOH, 95% EtOH 또는 EtOAc 등을 가하고 48 시간 동안 vortex mixer를 사용하여 진탕하면서 실온에서 추출한 후 여과하여 70% EtOH, 95% EtOH 또는 EtOAc 가용부를 회수하였다. 모든 시료는 HPLC column에 주입하기 전에  $0.45 \mu\text{M}$  syringe filter로 여과하였다.

###### (나) HPLC profile을 이용한 콩잎추출물의 정성 분석

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)을 사용하였고, HPLC column은 Brownlee SPP C18-MS-II column (4.6 x 50 mm,  $2.7 \mu\text{m}$ ), 유속 1.8 ml/min, 이동상은 0.1% acetic acid (용매 A)과  $\text{CH}_3\text{CN}$  (용매 B), 프로그램된 용출 조건 (a linear gradient elution program: 5-30% B for 0~15 min, 30-80% B for 15~20 min, 80-100% B for 20~23 min; 100% B for 23~27.5 min; 100-5% B for 27.5~30 min)으로 콩잎 추출물을 분석하였다. 표지물질인 coumestrol (순도 95%)은 Sigma사로부터 구입하여 사용하였다.

(다) 지표물질 선정

재배기간이 길어짐에 따라 70% EtOH, 95% EtOH 또는 EtOAc 추출물에 함유된 테로카판계 화합물인 coumestrol의 함유량이 늘어나는 것을 HPLC profile을 통해 확인하였으며 (Figs. 32~34), 이 coumestrol은 다양한 생리활성을 나타내므로 유효물질임과 동시에 지표물질로 선정하여 콩잎추출물 내의 함량을 분석하는 것이 타당한 것으로 판단되었다.

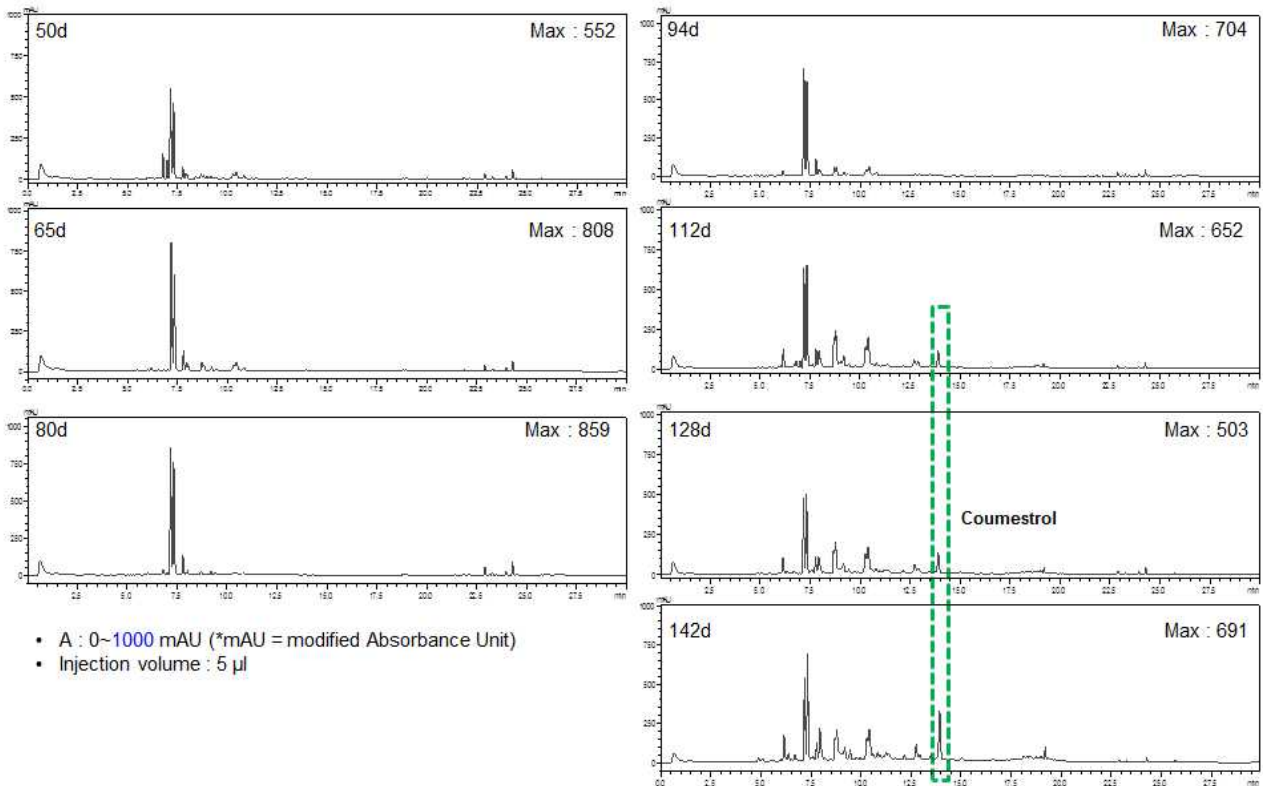


Fig. 32. HPLC profiles of 70% EtOH extracts of 2012-NS-GH soy leaves.

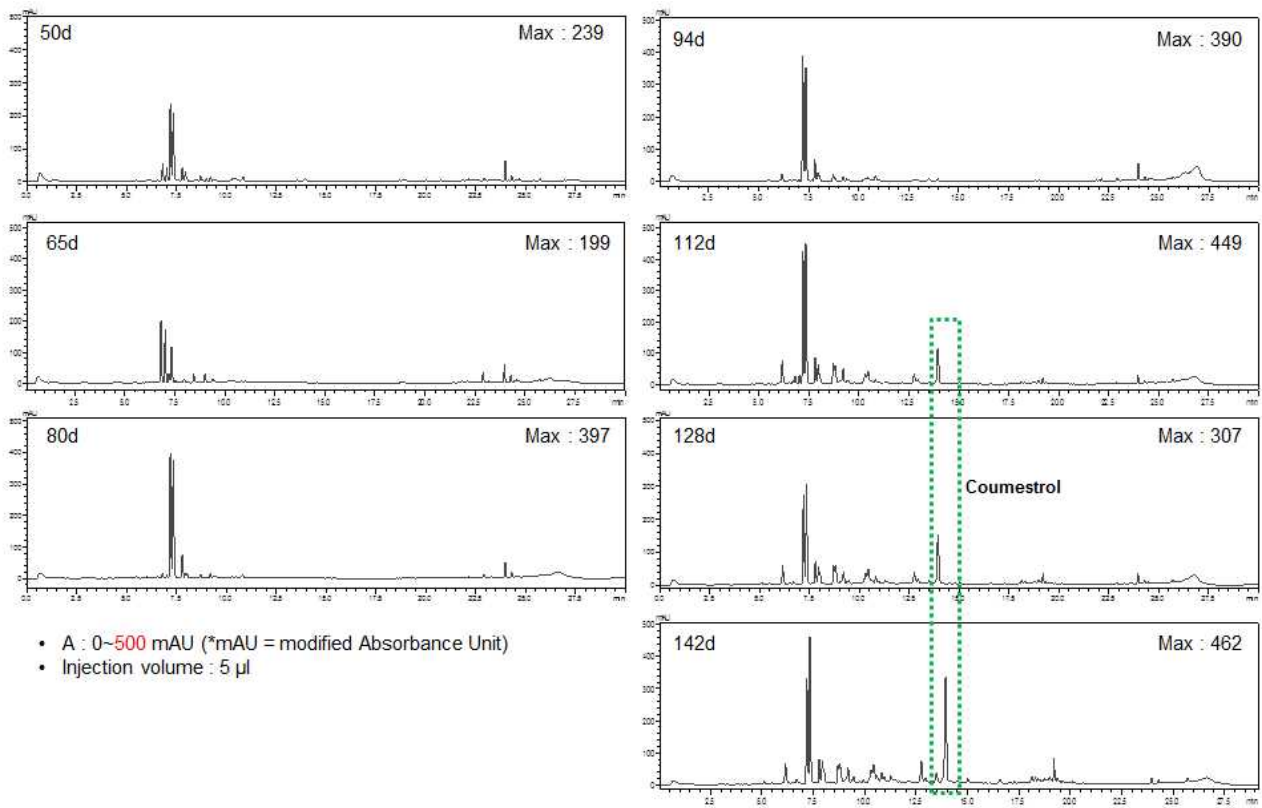


Fig. 32. HPLC profiles of 95% EtOH extracts of 2012-NS-GH soy leaves.

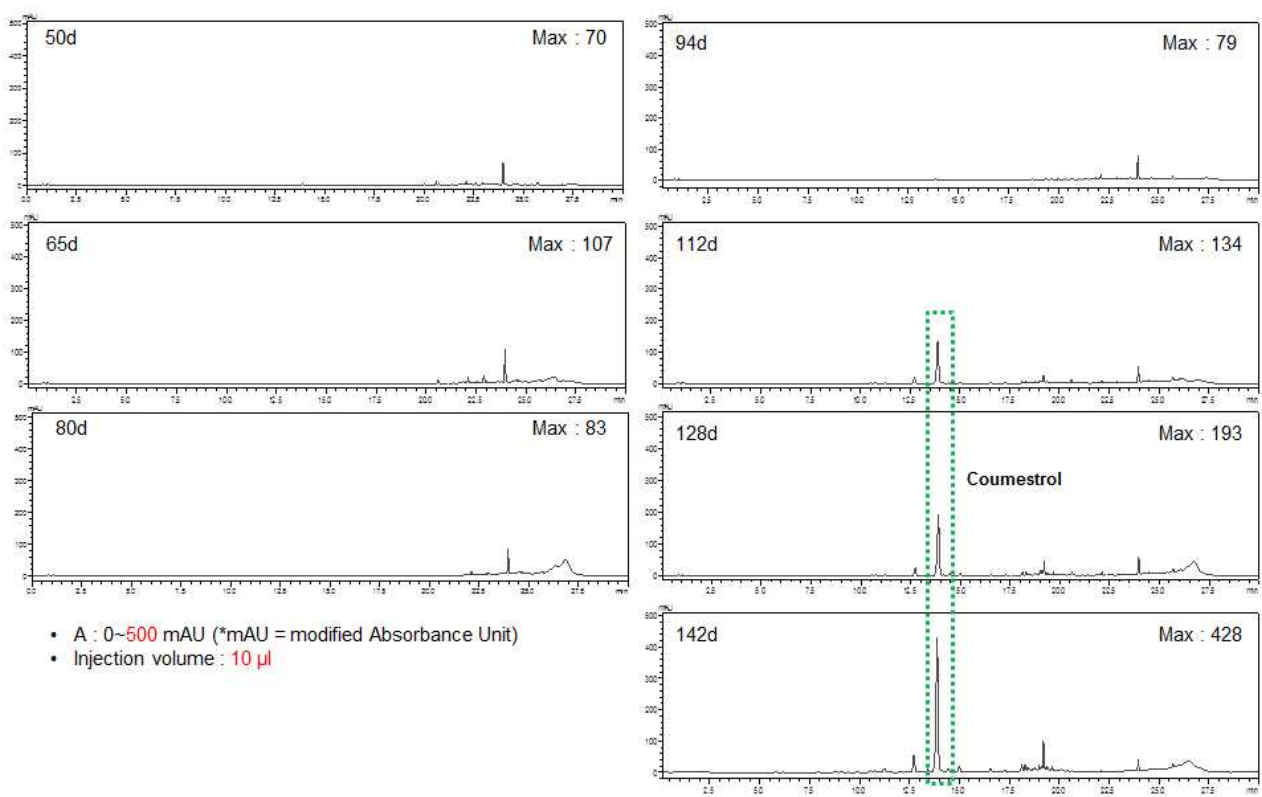


Fig. 34. HPLC profiles of EtOAc extracts of 2012-NS-GH soy leaves.

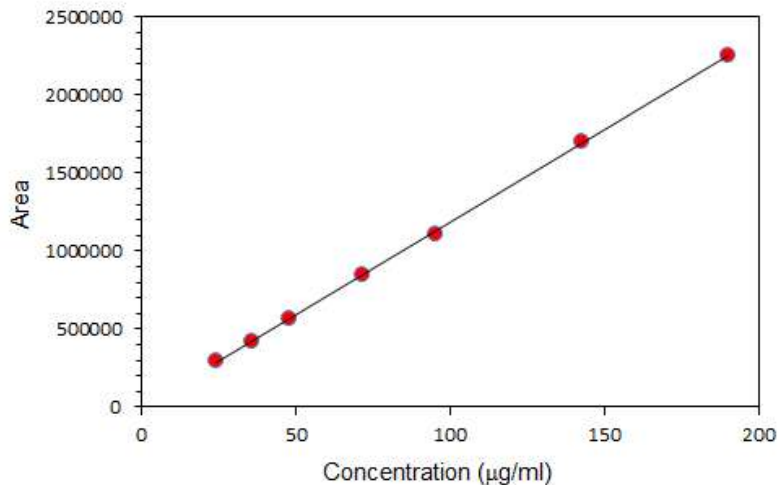


## (2) 정량법에 대한 직선성 (linearity) 및 검출한계

표준품 coumestrol (Sigma, purity 95%)을 23.75 ~ 190.00  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 조제하여 본 연구실에서 확립한 HPLC를 이용한 콩잎 정량법 분석조건에 따라 실험하여 coumestrol의 농도를 X축에 대응시키고, 그 농도에 대한 크로마토그램으로부터 얻은 면적을 Y축에 대응시켜 검량선을 작성하였다 (Fig. 35).

- 직선성(Linearity) (Calibration curve)

Sample No.	Coumestrol ( $\mu\text{g/ml}$ )	Peak area
1	23.75	294458
2	35.63	423937
3	47.50	570478
4	71.25	848678
5	95.00	1112051
6	142.50	1706494
7	190.00	2254202



Compound	Wavelength	Regression equation	$r^2$
Coumestrol	254 nm	$Y=0.00007633X - 0.06740888$	<b>0.9983228</b>

Fig. 35. Linearity of a standard compound, coumestrol.

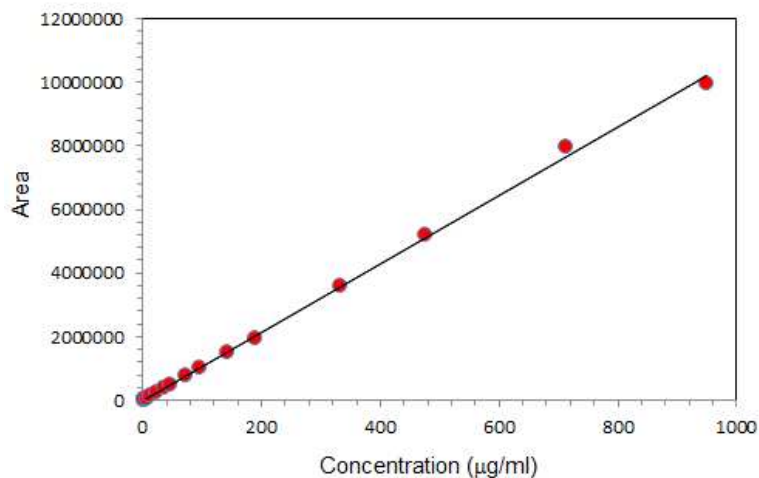
- 검출한계: 분석법에 따라 coumestrol 농도를 23.75  $\mu\text{g/ml}$  ~ 190.00  $\mu\text{g/ml}$ 인 범위에서 calibration curve가 양호한 직선 ( $r^2 \geq 0.99$ )을 나타내주었다. 이로부터 검량선 최저 농도인 23.75  $\mu\text{g/ml}$ 을 정량한계 (limit of quantification)로 설정하여 coumestrol를 사용하여 정량하였다.

## (3) 정량법에 대한 범위 (Range) 시험

Coumestrol 표준품을 가지고 0.74  $\mu\text{g/ml}$  ~ 950  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 조제하여 정량법 분석조건에 따라 표준곡선을 계산한 결과를 그림 36에 나타내었다. coumestrol 농도에 대해 아주 넓은

범위로 실험에도 불구하고  $r^2 = 0.9985959$  ( $r^2 \geq 0.99$ )로 직선성을 만족시킴을 확인하였다.

sample No.	Conc. ( $\mu\text{g/ml}$ )	Peak area
1	0.74	28546
2	1.48	24846
3	2.97	32870
4	5.94	67038
5	11.88	127150
6	23.75	246439
7	35.63	389505
8	47.50	510358
9	71.25	803262
10	95.00	1040020
11	142.50	1486119
12	190.00	1962846
13	332.50	3616783
14	475.00	5220201
15	712.50	7977585
16	950.00	9942272



Compound	Wavelength	Regression equation	$r^2$
Coumestrol	254 nm	$y=10741X + 12091.22$	0.9985959

Fig. 36. Calibration curve of a standard compound, coumestrol (0.74 ~ 950.00  $\mu\text{g/ml}$ ).

#### (4) 정량법에 대한 정밀성 (Precision) 시험

142.5  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 조제한 95% EtOH 추출물을 시료로 사용하여 coumestrol 표준품 (순도 95%)을 가지고 정량법 분석조건에 따라 6회 반복 시험하여 그 재현 정밀성을 측정하였다. 95% EtOH 추출물이 함유하는 coumestrol의 재현 정밀성과 coumestrol 표준품의 재현 정밀성 모두 표준편차(SD) 값이 5% 이내이므로 재현 정밀성을 충족시킴을 확인하였다 (Tables 11& 1

2).

Table 11. 95% EtOH extract 중 coumestrol 측정의 재현 정밀성

No.	Conc. ( $\mu\text{g/ml}$ )	Peak area
1	149.77	2060590
2	149.77	2090653
3	149.77	2124136
4	149.77	2142108
5	149.77	2148667
6	149.77	2147830
SD	36019	
Average	2118997	
CV (%)	1.7	

SD (Standard Deviation) = 표준편차; CV (Coefficient of Variability) = 상대표준편차

\*상대표준편차 = 표준편차를 평균으로 나눈 후 100을 곱한 수치.

Table 12. Coumestrol standard 측정의 재현 정밀성

No.	Conc. ( $\mu\text{g/ml}$ )	Peak area
1	142.50	1548963
2	142.50	1555822
3	142.50	1554332
4	142.50	1606936
5	142.50	1588177
6	142.50	1574517
SD	22765	
Average	1571458	
CV (%)	1.4	

SD (Standard Deviation) = 표준편차; CV (Coefficient of Variability) = 상대표준편차

\*상대표준편차 = 표준편차를 평균으로 나눈 후 100을 곱한 수치.

### (5) 정량법에 대한 고찰

이상과 같이 상기의 HPLC 분석조건으로 콩잎에 포함된 성분인 Coumestrol을 지표성분으로 하여 정량한 결과, 정밀성, 직선성, 범위, 정량한계 및 검출한계 모두 양호한 결과를 보여주었다.

## 라. 2012, 2013년도 시기별 수확 콩잎추출물의 건조 중량 및 표지물질 함량 측정

### (1) 2012, 2013년도 시기별 수확 콩잎추출물의 건조 중량 비교

- 표준추출물 제조 방법: 2012, 2013년도에 제1협동과제에서 재배 및 시기별로 채취한 콩잎

을 실험에 사용하였다. 대두콩을 파종하여 생육기간이 30 일 이후에 15 일 간격으로 수확한 콩잎을 열풍 건조하여 분쇄한 콩잎 100 mg에 70% EtOH, 95% EtOH 또는 EtOAc 등을 가하고 48 시간 동안 vortex mixer를 사용하여 진탕하면서 실온에서 추출한 후 여과하여 70% EtOH, 95% EtOH 또는 EtOAc 가용부를 회수하고, 일정량 (70% EtOH ex. 50  $\mu$ l, 95% EtOH ex. 100  $\mu$ l, EtOAc ex. 200  $\mu$ l)을 감압 하에 농축·건조하여 건조물의 무게를 측정하였다 (n = 3).

- 2012년도 콩잎 추출물의 부피 당 무게는 A (NS) 지역에 비해 B (JP) 지역에서 수확한 콩잎이 다소 높은 것으로 나타났으며, 추출물의 평균 회수율은 70% EtOH 추출물 (32.4%) > 95% EtOH 추출물 (19.6%) > EtOAc 추출물 5.7% 순이었다 (Table 13).

**Table 13. Dry weights of 70% EtOH, 95% EtOH, and EtOAc extracts from the leaves of 4 soybean cultivar having different cultivating duration on 2012**

No.	Samples	Dry weight of soy leaves extracts (mg/ml)		
		70% EtOH	95% EtOH	EtOAc
1	2012-NS-GH-50d	29.7 ± 0.0	15.0 ± 0.0	3.3 ± 0.1
2	2012-NS-GH-65d	26.2 ± 0.1	11.0 ± 0.3	6.4 ± 0.0
3	2012-NS-GH-80d	38.9 ± 0.1	18.9 ± 0.1	5.0 ± 0.0
4	2012-NS-GH-94d	28.4 ± 0.0	14.3 ± 0.1	4.9 ± 0.1
5	2012-NS-GH-112d	27.8 ± 0.1	15.8 ± 0.1	5.7 ± 0.0
6	2012-NS-GH-128d	28.8 ± 0.0	15.5 ± 0.1	4.5 ± 0.0
7	2012-NS-GH-142d	31.8 ± 0.1	17.3 ± 0.0	5.7 ± 0.0
8	2012-JP-GH-50d	23.1 ± 0.0	12.6 ± 0.1	4.8 ± 0.1
9	2012-JP-GH-65d	32.5 ± 0.1	18.2 ± 0.0	3.8 ± 0.1
10	2012-JP-GH-79d	27.1 ± 0.1	15.6 ± 0.1	6.7 ± 0.0
11	2012-JP-GH-93d	35.5 ± 0.1	19.4 ± 0.1	6.2 ± 0.3
12	2012-JP-GH-109d	34.8 ± 0.0	21.0 ± 0.3	7.8 ± 0.1
13	2012-JP-GH-123d	32.5 ± 0.1	17.4 ± 0.1	7.3 ± 0.0
14	2012-NS-YS-50d	27.5 ± 0.1	16.6 ± 0.1	4.1 ± 0.0
15	2012-NS-YS-65d	28.1 ± 0.1	14.8 ± 0.1	3.6 ± 0.1
16	2012-NS-YS-80d	29.0 ± 0.0	16.0 ± 0.0	6.4 ± 0.1
17	2012-NS-YS-94d	32.4 ± 0.1	17.0 ± 0.0	5.8 ± 0.0
18	2012-NS-YS-112d	34.0 ± 0.1	17.8 ± 0.1	5.0 ± 0.1
19	2012-NS-YS-128d	30.6 ± 0.0	14.3 ± 0.2	6.3 ± 0.0
20	2012-JP-WD-50d	28.8 ± 0.1	15.5 ± 0.0	4.3 ± 0.0
21	2012-JP-WD-65d	33.9 ± 0.0	17.7 ± 0.0	5.4 ± 0.1
22	2012-JP-WD-79d	28.6 ± 0.1	16.9 ± 0.1	7.7 ± 0.1
23	2012-JP-WD-93d	36.0 ± 0.0	18.4 ± 0.1	6.5 ± 0.0
24	2012-JP-WD-109d	32.9 ± 0.1	19.5 ± 0.1	8.6 ± 0.0
25	2012-JP-WD-123d	33.8 ± 0.1	18.0 ± 0.1	7.7 ± 0.0
	mean	32.4	19.6	5.7

- 2013년도에 대두콩잎 (WD, GH) 추출물과 검은콩잎 (BB) 추출물의 품종별 건조 중량은 큰 차이가 없었다. 추출물의 평균 회수율은 70% EtOH 추출물 (29.7%) > 95% EtOH 추출물 (18.7%) > EtOAc 추출물 4.9% 순이었으며, 2012년도에 비해 다소 낮은 경향을 나타내었다 (Table 14). 이는 콩잎 수확시기에 2012년도와 달리 2013년도에는 늦은 장마 등으로 날씨가 좋지 않았기 때문으로 추측된다. 한편 2012년도와 달리 2013년도에는 재배기간이 길어짐에 따라 건조 중량이 증가하는 양상을 70% EtOH, 95% EtOH, EtOAc 추출물 모두에서 관찰할 수 있었다.
- 열풍 건조한 콩잎에 비해 동결 건조한 콩잎추출물의 건조 중량이 전반적으로 다소 높은 양상을 나타내고 있으나, 동결 건조 공정에 따르는 비용을 감안할 때 동결 건조 방법이 경제적인 면을 감안하면 효과적인 공정은 아닌 것으로 파악된다.

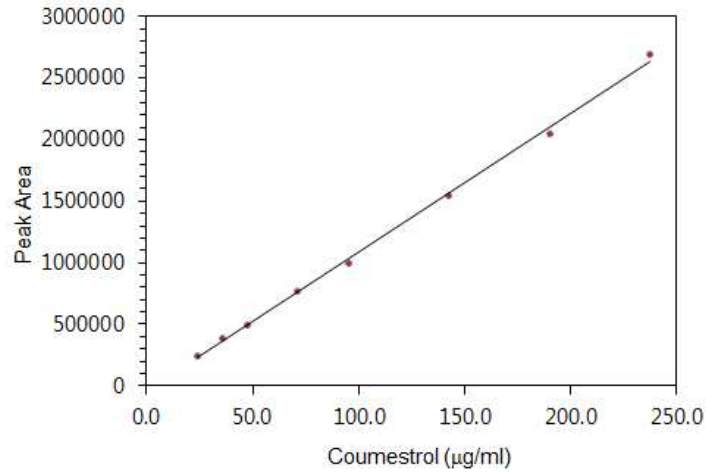
Table 14. Dry weights of 70% EtOH, 95% EtOH, and EtOAc extracts from the leaves of 3 soybean cultivar having different cultivating duration on 2013

No.	Samples	Dry weight of soy leaves extracts (mg/ml)		
		70% EtOH	95% EtOH	EtOAc
1	2013-JP-GH-50d	21.0 ± 1.0	10.0 ± 0.0	3.5 ± 0.0
2	2013-JP-GH-60d	19.0 ± 1.0	11.0 ± 0.0	4.8 ± 0.3
3	2013-JP-GH-75d	24.0 ± 2.0	14.0 ± 0.0	5.0 ± 0.0
4	2013-JP-GH-90d	27.0 ± 1.0	15.0 ± 0.0	6.0 ± 0.5
5	<b>2013-JP-GH-107d</b>	<b>29.0 ± 1.0</b>	<b>14.0 ± 0.0</b>	<b>6.5 ± 0.5</b>
6	<b>2013-JP-GH-110d (Freeze-dried)</b>	<b>30.0 ± 0.0</b>	<b>15.5 ± 0.5</b>	<b>7.0 ± 0.5</b>
7	2013-JP-WD-50d	25.0 ± 1.0	11.0 ± 0.0	4.0 ± 0.5
8	2013-JP-WD-60d	25.0 ± 1.0	11.5 ± 0.5	3.8 ± 0.3
9	2013-JP-WD-75d	34.0 ± 2.0	15.5 ± 0.5	4.7 ± 0.3
10	2013-JP-WD-90d	32.0 ± 0.0	18.0 ± 0.0	5.7 ± 0.3
11	<b>2013-JP-WD-107d</b>	<b>31.0 ± 1.0</b>	<b>18.5 ± 0.5</b>	<b>6.5 ± 0.0</b>
12	<b>2013-JP-WD-110d (Freeze-dried)</b>	<b>28.0 ± 2.0</b>	<b>16.0 ± 0.0</b>	<b>7.0 ± 0.0</b>
13	2013-JP-BB-50d	22.0 ± 0.0	12.0 ± 0.0	3.8 ± 0.3
14	2013-JP-BB-60d	26.0 ± 0.0	11.5 ± 0.5	3.5 ± 1.0
15	2013-JP-BB-75d	28.0 ± 0.0	13.5 ± 0.5	4.0 ± 1.0
16	2013-JP-BB-90d	34.0 ± 0.0	17.5 ± 0.5	6.0 ± 0.5
17	<b>2013-JP-BB-107d</b>	<b>28.0 ± 0.0</b>	<b>16.5 ± 0.5</b>	<b>6.5 ± 0.5</b>
18	<b>2013-JP-BB-110d (Freeze-dried)</b>	<b>32.0 ± 0.0</b>	<b>19.5 ± 0.5</b>	<b>1.0 ± 0.5</b>
	Mean	29.7	18.7	4.9

## (2) 콩잎 추출물의 표지물질 coumestrol의 함량 측정

위에서 준비한 표준추출물을 사용하였으며, 이미 확립된 방법으로 analytical HPLC를 이용

하여 지표물질인 coumestrol에 대한 함량을 측정하였다. 표준품은 Sigma사에서 구입한 순도 95% coumestrol을 사용하였으며, 그림 37에 표시한 표준곡선을 바탕으로 각 추출물의 함량을 산출하였다 (Tables 15 & 16).



Compound	Wavelength	Regression equations	$r^2$
Coumestrol	254 nm	$Y = 011294.28X - 42990.17$	0.9984012

Fig. 37. Calibration curve of a standard compound, coumestrol (purity 95%, Sigma).

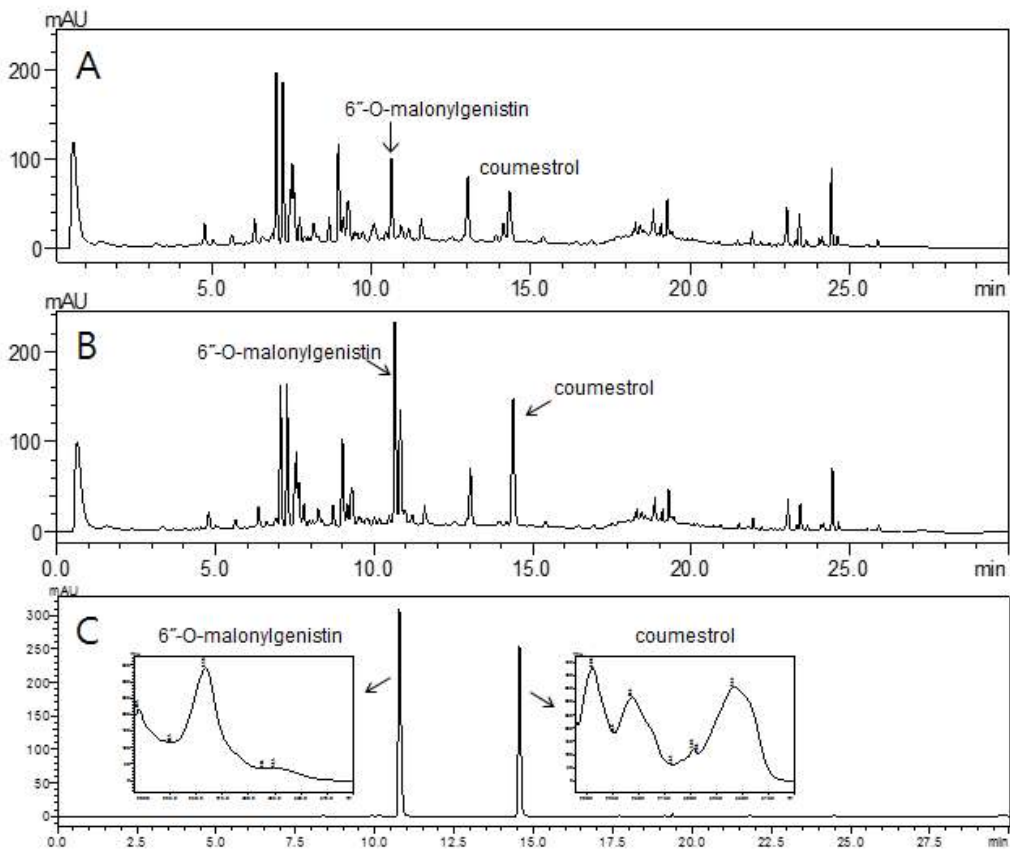


Fig. 38. HPLC profiles of 70% EtOH extracts of soy leaves (A), 70% EtOH extracts + internal standard mixture (B), and internal standard mixture, 6<sup>o</sup>-O-malonylgenistin and coumestrol (C).

(가) 2012년도에 충청도 두 지역에서 재배하여 수확한 GH, YS, WD 콩잎을 시기별로 채집한 50, 65, 80, 93, 94, 109, 112, 123, 128, 142일령 콩잎의 70% EtOH, 95% EtOH, EtOAc 추출물을 HPLC를 이용하여 분석하였다 (Table 15).

Table 15. Comparison of coumestrol content in 70% EtOH, 95% EtOH, and EA extracts from the leaves of 4 soybean cultivar having different cultivating duration on 2012

No.	Samples	Coumestrol contents of soy leaves extracts (mg/g)		
		70% EtOH	95% EtOH	EtOAc
1	2012-NS-GH-50d	0.19 ± 0.03	0.33 ± 0.03	0.29 ± 0.09
2	2012-NS-GH-65d	0.24 ± 0.02	0.33 ± 0.26	0.24 ± 0.18
3	2012-NS-GH-80d	0.07 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.12 ± 0.04
4	2012-NS-GH-94d	0.13 ± 0.02	0.22 ± 0.02	0.35 ± 0.06
5	2012-NS-GH-112d	1.95 ± 0.22	3.68 ± 0.48	6.28 ± 1.29
6	2012-NS-GH-128d	2.36 ± 0.29	5.08 ± 0.65	10.72 ± 3.15
7	2012-NS-GH-142d	5.24 ± 0.70	10.08 ± 1.01	22.25 ± 2.96
8	2012-JP-GH-50d	0.23 ± 0.02	0.28 ± 0.12	0.40 ± 0.08
9	2012-JP-GH-65d	0.06 ± 0.01	0.19 ± 0.13	0.28 ± 0.26
10	2012-JP-GH-79d	0.12 ± 0.03	0.17 ± 0.02	0.25 ± 0.04
11	2012-JP-GH-93d	2.05 ± 0.22	4.31 ± 0.51	9.81 ± 3.62
12	2012-JP-GH-109d	3.73 ± 0.32	8.17 ± 1.96	16.30 ± 3.00
13	2012-JP-GH-123d	2.56 ± 0.27	6.29 ± 0.82	11.44 ± 1.71
14	2012-NS-YS-50d	0.32 ± 0.04	0.36 ± 0.24	0.48 ± 0.05
15	2012-NS-YS-65d	0.23 ± 0.02	0.21 ± 0.13	0.64 ± 0.14
16	2012-NS-YS-80d	0.28 ± 0.03	0.42 ± 0.05	0.71 ± 0.07
17	2012-NS-YS-94d	0.50 ± 0.06	0.96 ± 0.10	2.10 ± 0.45
18	2012-NS-YS-112d	2.45 ± 0.26	4.51 ± 0.46	10.19 ± 2.46
19	2012-NS-YS-128d	4.72 ± 0.52	9.97 ± 1.89	15.39 ± 2.79
20	2012-JP-WD-50d	0.08 ± 0.01	0.22 ± 0.11	0.07 ± 0.02
21	2012-JP-WD-65d	0.07 ± 0.02	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.03
22	2012-JP-WD-79d	0.06 ± 0.02	0.10 ± 0.01	0.13 ± 0.02
23	2012-JP-WD-93d	1.88 ± 0.28	4.53 ± 0.62	8.35 ± 1.56
24	2012-JP-WD-109d	2.46 ± 0.37	4.68 ± 0.73	7.30 ± 0.93
25	2012-JP-WD-123d	2.54 ± 0.26	5.33 ± 1.18	8.43 ± 0.94

HPLC profile에 관찰한 것처럼 2012년도에 수확한 콩잎추출물에 함유된 지표물질인 coumestrol의 함량은 재배 기간이 길어짐에 따라 증가하는 경향을 나타내었으며 (Figs. 32~34 참조), 특히 93일령 (NS-GH-94일령 제외) 이후에 coumestrol의 함량이 급격히 증가하였다. 이와 같은 결과는 본 연구팀이 수년간의 반복 실험에서도 같은 결과를 얻었다. NS지역에서 재배한 콩잎은 142일까지 재배기간이 길어짐에 따라 coumestrol의 함량이 증가하는 반면에, JP지역에서 재배한 콩잎은 109일령 이후에 수확한 콩잎의 coumestrol 함량이 다소 감소하는 양상을 띠고 있다. 과중 후 109일에서 128일에 수확한 콩잎 추출물의 지표물질 함량을 비교해 보면,

2012-JP-GH-109일령 콩잎의 70% EtOH, 95% EtOH, EtOAc 추출물 모두 가장 높은 coumestrol 함량을 나타내었다. 또한 가장 재배 기간이 길었던 2012-NS-GH-142일령 콩잎의 70% EtOH, 95% EtOH 및 EtOAc 추출물에 포함된 coumestrol의 함량이 각각 5.24 mg/g extracts, 10.08 mg/g extracts, 22.25 mg/g extracts로 전체 시료 중에서 가장 높았으나, 142일령은 추석이 훨씬 지난 후에 수확한 것이기 때문에 콩잎이 자연적으로 많이 떨어져서 콩잎 수확량이 절대적으로 감소한다는 문제점이 있다. 따라서 충청도 지방에서 대량재배를 통해 테로카관 화합물을 많이 함유하는 콩잎을 확보하고자 한다면 콩잎 수확시기는 파종 후 110~120일 정도가 적당할 것으로 판단된다.

(나) 2013년도에 대두콩잎 (WD, GH) 추출물과 검은콩잎 (BB) 시기별로 채집한 50, 60, 75, 90, 107, 110일령 콩잎의 70% EtOH, 95% EtOH, EtOAc 추출물을 HPLC를 이용하여 분석하였다 (Table 16).

Table 16. Comparison of coumestrol content in 70% EtOH, 95% EtOH, and EA extracts from the leaves of 4 soybean cultivar having different cultivating duration on 2013

No.	Samples	Coumestrol contents of soy leaves extracts (mg/g)		
		70% EtOH	95% EtOH	EtOAc
1	2013-JP-GH-50d	0.43 ± 0.02	0.75 ± 0.00	1.41 ± 0.01
2	2013-JP-GH-60d	0.34 ± 0.01	0.59 ± 0.00	1.11 ± 0.07
3	2013-JP-GH-75d	1.33 ± 0.13	2.93 ± 0.07	7.45 ± 0.12
4	2013-JP-GH-90d	2.63 ± 0.16	6.81 ± 0.16	15.39 ± 0.42
5	<b>2013-JP-GH-107d</b>	<b>4.09 ± 0.17</b>	<b>10.75 ± 0.04</b>	<b>17.30 ± 0.28</b>
6	2013-JP-GH-110d (Freeze-dried)	2.26 ± 0.07	9.05 ± 0.55	14.73 ± 0.32
7	2013-JP-WD-50d	0.43 ± 0.01	1.19 ± 0.08	2.08 ± 0.27
8	2013-JP-WD-60d	0.27 ± 0.01	0.60 ± 0.02	1.39 ± 0.05
9	2013-JP-WD-75d	0.89 ± 0.04	2.87 ± 0.06	7.40 ± 0.47
10	2013-JP-WD-90d	2.52 ± 0.02	6.23 ± 0.01	15.01 ± 0.52
11	<b>2013-JP-WD-107d</b>	<b>2.48 ± 0.05</b>	<b>6.57 ± 0.12</b>	<b>14.12 ± 0.01</b>
12	2013-JP-WD-110d (Freeze-dried)	2.31 ± 0.18	7.17 ± 0.13	11.85 ± 0.16
13	2013-JP-BB-50d	0.29 ± 0.00	0.52 ± 0.01	1.27 ± 0.09
14	2013-JP-BB-60d	0.36 ± 0.01	0.73 ± 0.02	2.30 ± 0.06
15	2013-JP-BB-75d	0.56 ± 0.01	1.42 ± 0.07	3.98 ± 0.17
16	2013-JP-BB-90d	0.25 ± 0.01	0.40 ± 0.01	1.07 ± 0.10
17	<b>2013-JP-BB-107d</b>	<b>0.95 ± 0.01</b>	<b>1.79 ± 0.01</b>	<b>4.69 ± 0.00</b>
18	2013-JP-BB-110d (Freeze-dried)	1.04 ± 0.05	1.94 ± 0.08	1.1 ± 0.25

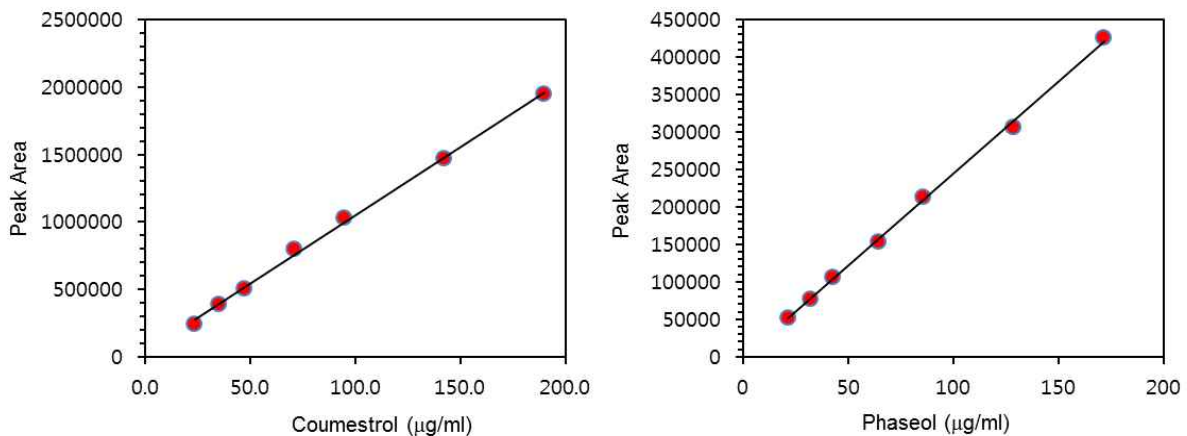
2012년도와 마찬가지로 2013년도에 수확한 콩잎추출물에 함유된 지표물질인 coumestrol의 함량은 재배 기간이 길어짐에 따라 증가하는 경향을 나타내었다. 특이한 점은 대두콩잎인 GH와 WD는 90일령 이후에 coumestrol의 함량이 급격히 증가하는 반면에 검은콩잎은 107일령부



터 coumestrol의 함량이 급격히 증가하였다. 또한 2012년도와 비슷하게 107일령에 수확한 콩잎의 70% EtOH, 95% EtOH, EtOAc 추출물 모두 가장 높은 coumestrol 함량을 나타내었다. 또한 2013-GH-107일령 콩잎의 70% EtOH, 95% EtOH 및 EtOAc 추출물에 포함된 coumestrol의 함량이 각각 4.09 mg/g extracts, 10.75 mg/g extracts, 17.30 mg/g extracts로 전체 시료 중에서 가장 높았다. 콩잎품종별로 비교할 때, 2013-GH-107일령과 2013-WD-107일령에 비해서 2013-BB-107일령의 콩잎이 함유하는 coumestrol의 함량이 현저하게 낮아 70% EtOH 추출물은 2013-GH-107일령의 23.2%, 95% EtOH 추출물은 2013-GH-107일령의 16.7%, EtOAc 추출물은 2013-GH-107일령의 27.1%에 불과했다. 즉, 생리활성물질인 테로카판은 검은콩잎에 비해 대두콩잎에 더 많이 함유되어 있는 것을 알 수 있다.

### (3) 콩잎 추출물의 표지물질 phaseol의 함량 측정

위에서 준비한 95ESL 표준추출물 (18.6 mg/ml)을 사용하였으며, 이미 확립된 방법으로 analytical HPLC를 이용하여 지표물질인 coumestrol과 phaseol의 함량을 측정 및 비교하였다. 표준품은 Sigma사에서 구입한 순도 95% coumestrol과 본 연구실에서 분리한 phaseol을 사용하였고, 그림 39에 표시한 표준곡선을 바탕으로 각 추출물의 함량을 산출하였다 (Table 17).



Compound	Wavelength	Regression equation	r <sup>2</sup>
Coumestrol	254 nm	Y=10161.03X+32257.58	0.9982675
Phaseol	254 nm	Y=2457.886X - 2035.565	0.9987142

Fig. 39. Calibration curve of standard compounds, coumestrol and phaseol.

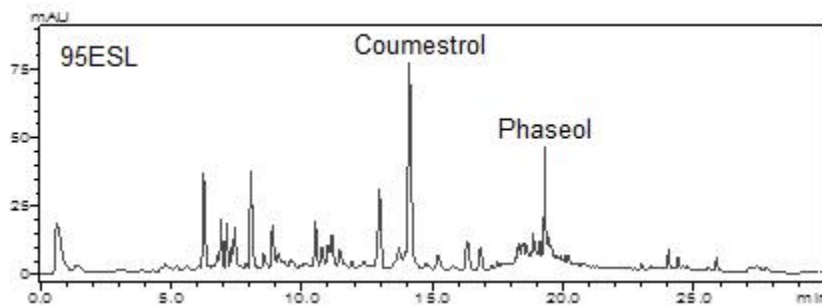


Fig. 40. HPLC profiles of 95% EtOH extract of soy leaves.

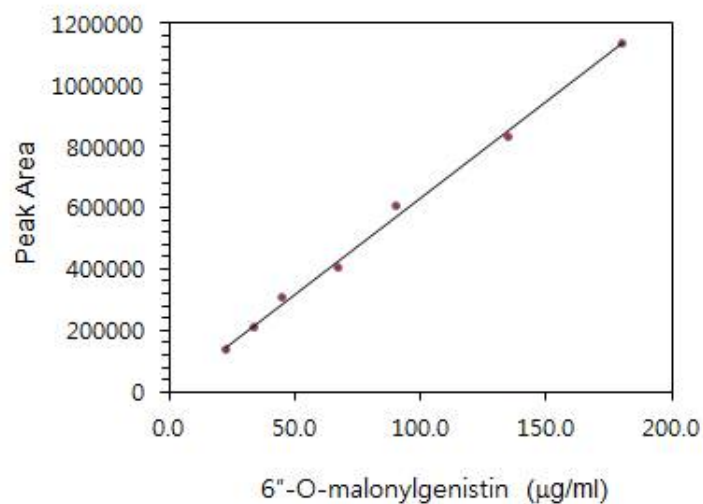
254 nm에서 관찰한 95ESL의 HPLC profile을 관찰해 보면, peak area를 비교할 때 coumestrol에 비해 phaseol이 훨씬 좁은 것으로 나타난다. 그러나 표준곡선을 비교해 보면 같은 농도에서 coumestrol의 peak area가 phaseol에 비해 넓은 것을 알 수 있다. 이에 위의 표준곡선을 이용하여 coumestrol과 phaseol의 함량을 측정된 결과, 95ESL g 당 함유되어 있는 coumestrol은 9.8 mg 이었고, phaseol은 5.9 mg 이었다. 실험실 수준에서 추출할 때와 대량생산을 통해 추출할 때, 또한 용매 조건에 따라서 두 성분이 함량이 달라질 수 있으므로 coumestrol과 함께 phaseol의 함량 측정도 필요할 것으로 판단된다.

Table. 17. Comparison of coumestrol and phaseol contents in 95% EtOH extract

	Rt (min)	Coumestrol in extract (µg/ml)	Coumestrol/95ESL (mg/g)
Coumestrol	14.3 ± 0.1	182.0 ± 6.9	9.8 ± 0.0
	Rt (min)	Phaseol in extract (µg/ml)	Phaseol/95ESL (mg/g)
Phaseol	19.3 ± 0.0	108.0 ± 6.0	5.9 ± 0.1

#### (4) 콩잎 추출물의 표지물질 6"-O-malonyl genistin의 함량 측정

위에서 준비한 표준추출물을 사용하였으며, 이미 확립된 방법으로 analytical HPLC를 이용하여 지표물질인 6"-O-malonylgenistin에 대한 함량을 측정하였다. 표준품은 Wako사에서 구입한 순도 90% 6"-O-malonylgenistin을 사용하였으며, EtOAc 추출물은 6"-O-malonylgenistin이 검출되지 않아서 측정하지 않았다. 그림 41에 표시한 표준곡선을 바탕으로 각 추출물의 함량을 산출하였다 (Table 18).



Compound	Wavelength	Regression equation	r <sup>2</sup>
6"-O-malonylgenistin	254 nm	Y = 6268.488X + 5570.882	0.9967602

Fig. 41. Calibration curve of a standard compound, 6"-O-malonyl genistin (Purity 90.0%, Wako).

Table 18. Comparison of 6"-O-malonylgenistin content in 70% EtOH, 95% EtOH, and EtOAc extracts from the leaves of 4 soybean cultivar having different cultivating duration on 2013

No.	Samples	6"-O-malonylgenistin contents of soy leaves extracts (mg/g)	
		70% EtOH	95% EtOH
1	2013-JP-GH-50d	2.28 ± 0.17	1.32 ± 0.04
2	2013-JP-GH-60d	2.57 ± 0.20	1.19 ± 0.00
3	<b>2013-JP-GH-75d</b>	<b>8.54 ± 0.75</b>	<b>4.37 ± 0.04</b>
4	<b>2013-JP-GH-90d</b>	<b>9.06 ± 0.28</b>	<b>4.91 ± 0.08</b>
5	2013-JP-GH-107d	4.89 ± 0.42	4.15 ± 0.16
6	2013-JP-GH-110 (Freeze-dried)	2.58 ± 0.03	2.15 ± 0.09
7	2013-JP-WD-50d	1.76 ± 0.11	1.06 ± 0.07
8	2013-JP-WD-60d	1.97 ± 0.13	0.97 ± 0.06
9	<b>2013-JP-WD-75d</b>	<b>5.55 ± 0.26</b>	<b>2.79 ± 0.08</b>
10	<b>2013-JP-WD-90d</b>	<b>6.96 ± 0.03</b>	<b>3.86 ± 0.10</b>
11	<b>2013-JP-WD-107d</b>	<b>5.98 ± 0.05</b>	<b>3.49 ± 0.14</b>
12	2013-JP-WD-110d (Freeze-dried)	2.39 ± 0.14	1.35 ± 0.04
13	2013-JP-BB-50d	3.00 ± 0.06	1.26 ± 0.00
14	2013-JP-BB-60d	2.07 ± 0.08	1.26 ± 0.08
15	2013-JP-BB-75d	2.91 ± 0.01	1.50 ± 0.02
16	2013-JP-BB-90d	2.98 ± 0.07	1.75 ± 0.15
17	<b>2013-JP-BB-107d</b>	<b>6.26 ± 0.06</b>	<b>2.69 ± 0.16</b>
18	2013-JP-BB-110d (Freeze-dried)	5.84 ± 0.38	2.47 ± 0.01

2013년도에 수확한 콩잎추출물에 함유된 지표물질인 6"-O-malonylgenistin의 함량을 조사한 결과, 대두콩잎인 GH와 WD는 75일령 이후에 6"-O-malonylgenistin의 함량이 급격히 증가하는 반면에 검은콩잎은 107일령부터 6"-O-malonylgenistin의 함량이 급격히 증가하였다. 또한 2013-GH-90일령 콩잎의 70% EtOH, 95% EtOH 추출물에 포함된 6"-O-malonylgenistin의 함량이 각각 9.06 mg/g extracts, 4.91 mg/g extracts로 전체 시료 중에서 가장 높았다. 콩잎품종별로 70% EtOH 추출물의 6"-O-malonylgenistin의 함량을 비교할 때, 2013-GH-90일령이 9.06 mg/g extracts > 2013-WD-90일령이 6.96 mg/g extracts > 2013-BB-107일령이 6.26 mg/g extracts 순이었다. 즉, GH 품종 콩잎의 6"-O-malonylgenistin 함유량이 WD, BB 품종 콩잎에 비해 높았으며, 이 결과는 coumesterol을 표지물질로 함유량을 산출했을 때와 수확시기별, 품종별 함유량의 양상이 다소 다른 경향을 보였다. 따라서 테로카판 고함유 분획을 기능성 성분으로 할 경우 coumesterol을 표지물질로 선정하는 것이 더 합당한 것으로 판단된다.

#### 마. 수확 콩잎 추출물의 생리활성 측정

##### (1) 수확시기별, 품종별 콩잎 추출물의 생리활성 측정

2012년도에 제1협동과제에서 재배 및 시기별로 채취한 콩잎을 실험에 사용하였다. 70% EtOH 추출물, 95% EtOH 추출물 및 EtOAc 추출물의 시료 무게를 비슷한 수준으로 맞추기 위하여 assay계별로 시료의 부피를 달리하였다.

(가) 수확시기별, 품종별 콩잎 추출물의 LDL-산화 저해활성 측정

2012년 A 지역과 B 지역에서 재배한 콩잎의 추출액 상태로 70% EtOH 추출물 (0.3  $\mu$ l), 95% EtOH 추출물 (0.9  $\mu$ l) 및 EtOAc 추출물 (2.2  $\mu$ l) 시료 각각의 동일한 부피를 반응액에 첨가하여 LDL-산화 저해활성을 측정하였다.

Table 19. Inhibitory effects of 70% EtOH, 95% EtOH, and EtOAc extracts on LDL-oxidation

Samples (volume of extracts)	Inhibition of LDL-oxidation (%)					
	70% EtOH ex. (0.3 $\mu$ l)	Note ( $\mu$ g/ml)	95% EtOH ex. (0.9 $\mu$ l)	Note ( $\mu$ g/ml)	EtOAc ex. (2.2 $\mu$ l)	Note ( $\mu$ g/ml)
NS-GH-50d	0.4 $\pm$ 0.4	29	6.4 $\pm$ 1.1	57	0	45
NS-GH-65d	4.3 $\pm$ 0.6	27	5.2 $\pm$ 1.6	45	5.5 $\pm$ 0.3	45
NS-GH-80d	0	36	0.1 $\pm$ 0.3	73	0.9 $\pm$ 2.0	62
NS-GH-94d	0	27	4.0 $\pm$ 2.0	51	8.5 $\pm$ 0.7	56
NS-GH-112d	7.6 $\pm$ 0.2	28	36.5 $\pm$ 0.2	60	45.5 $\pm$ 1.8	64
NS-GH-128d	18.0 $\pm$ 0.8	29	59.0 $\pm$ 0.4	60	64.3 $\pm$ 0.5	57
<b>NS-GH-142d</b>	<b>69.5 <math>\pm</math> 0.8</b>	34	<b>81.6 <math>\pm</math> 0.4</b>	72	<b>87.0 <math>\pm</math> 0.0</b>	61
NS-YS-50d	0	29	9.1 $\pm$ 0.4	48	8.3 $\pm$ 0.2	40
NS-YS-65d	0	27	5.5 $\pm$ 0.6	76	5.4 $\pm$ 1.5	72
NS-YS-80d	0	29	0.8 $\pm$ 0.5	61	6.9 $\pm$ 0.7	72
NS-YS-94d	0	30	19.2 $\pm$ 0.4	81	5.9 $\pm$ 1.8	60
NS-YS-112d	18.8 $\pm$ 0.0	32	57.1 $\pm$ 0.8	76	60.1 $\pm$ 1.9	63
<b>NS-YS-128d</b>	<b>58.8 <math>\pm</math> 0.2</b>	29	<b>71.1 <math>\pm</math> 0.7</b>	67	<b>79.8 <math>\pm</math> 1.7</b>	80
JP-GH-50d	0	25	7.6 $\pm$ 1.4	57	21.4 $\pm$ 0.7	42
JP-GH-65d	0	34	6.2 $\pm$ 0.1	51	19.3 $\pm$ 0.4	38
JP-GH-79d	0	28	8.3 $\pm$ 0.2	59	100.4 $\pm$ 0.3	56
JP-GH-93d	18.5 $\pm$ 1.3	34	58.2 $\pm$ 0.4	68	7.7 $\pm$ 0.4	55
<b>JP-GH-109d</b>	<b>78.6 <math>\pm</math> 0.6</b>	36	<b>84.7 <math>\pm</math> 1.4</b>	64	76.8 $\pm$ 0.2	52
JP-GH-125d	69.7 $\pm$ 1.8	40	77.7 $\pm$ 1.9	53	<b>83.6 <math>\pm</math> 1.0</b>	60
JP-WD-50d	0	29	0.7 $\pm$ 2.0	65	6.0 $\pm$ 2.1	44
JP-WD-65d	0	32	4.8 $\pm$ 0.4	68	8.6 $\pm$ 1.2	68
JP-WD-79d	0	28	6.1 $\pm$ 1.5	68	11.2 $\pm$ 1.9	61
JP-WD-93d	14.4 $\pm$ 0.5	32	62.3 $\pm$ 2.1	72	81.5 $\pm$ 0.0	58
JP-WD-109d	28.7 $\pm$ 1.1	33	57.5 $\pm$ 0.9	75	80.1 $\pm$ 2.3	74
<b>JP-WD-125d</b>	<b>63.6 <math>\pm</math> 0.8</b>	34	<b>65.8 <math>\pm</math> 1.2</b>	76	<b>83.7 <math>\pm</math> 2.3</b>	73
(BHT at 2 $\mu$ M)	49.7 $\pm$ 1.6		52.7 $\pm$ 0.5		57.8 $\pm$ 0.5	

70% EtOH 추출물은 A 지역의 GH-142일령, YS-128일령, B 지역의 GH-109일령, WD-125일령에서 50% 이상의 높은 LDL-산화 저해활성을 나타내었다. 95% EtOH 추출물과 EtOAc 추출물은 모두 재배기간이 길어질수록 LDL-산화 저해활성이 증가하였다. A 지역의 GH-128일령, YS-112일령에서부터 50% 이상의 높은 LDL-산화 저해활성을 나타내었고, B 지역의 GH와 WD는 93일에서부터 50% 이상의 높은 LDL-산화 저해활성을 나타내었다 (Table 19).

#### (나) 수확시기별, 품종별 콩잎 추출물의 hACAT1과 hACAT2 저해활성 측정

- 70% EtOH 추출물의 활성 비교: A 지역과 B 지역에서 재배한 콩잎의 70% EtOH 추출물 0.4  $\mu$ l씩을 사용하여 hACAT1, hACAT2의 저해활성을 측정하였다. A 지역에서 재배한 GH-80일령이 각각 hACAT1, hACAT2에 대해 46.4%, 37.1%의 저해활성을 나타내었고, YS-112일령이 각각 hACAT1, hACAT2에 대해 38.9%, 30.1%의 저해활성을 나타내었다. B 지역에서 재배한 콩잎의 경우에도 GH-79일령에서 각각 hACAT1, hACAT2에 대해 55.7%, 46.0%, WD-93일령에서 59.4%, 53.4%의 높은 저해활성을 나타냈다. 즉, 품종에 상관없이 B 지역에서 재배한 GH, WD가 보다 높은 저해활성을 나타냈다 (Table 20).

- 95% EtOH 추출물의 활성 비교: A 지역과 B 지역에서 재배한 콩잎의 95% EtOH 추출물 0.8  $\mu$ l씩을 사용하여 hACAT1, hACAT2의 저해활성을 측정하였다. A 지역에서 재배한 GH-80일령이 각각 hACAT1, hACAT2에 대해 79.7%, 71.5%의 높은 저해활성을 나타냈고, YS-80일령이 각각 hACAT1, hACAT2에 대해 81.8%, 74.3%의 높은 저해활성을 나타냈다. B 지역에서 재배한 콩잎의 경우에도 GH-79일령에서 각각 hACAT1, hACAT2에 대해 80.9%, 75.7%, WD-79일령에서 각각 hACAT1, hACAT2에 대해 86.9%, 82.4%의 저해활성을 나타냈다. 전반적으로 70% EtOH 추출물에 비해 높은 활성을 나타냈고, 각 품종별로 가장 높은 활성을 나타내는 시기가 서로 다른 것을 알 수 있었다 (Table 20).

- EtOAc 추출물의 활성 비교: A와 B 지역에서 재배한 콩잎의 EtOAc 추출물의 1.3  $\mu$ l씩을 사용하여 hACAT1, hACAT2의 저해활성도 확인하였다. A 지역에서 재배한 GH-112일령이 각각 hACAT1, hACAT2에 대해 43.7%, 24.7%의 저해활성을 나타냈고, YS-80일령이 각각 hACAT1, hACAT2에 대해 43.7%, 29.1%의 저해활성을 나타냈다. B 지역에서 재배한 콩잎의 경우에도 GH-125일령에서 각각 hACAT1, hACAT2에 대해 52.1%, 37.3%, WD-109일령에서 각각 hACAT1, hACAT2에 대해 45.3%, 29.0%의 저해활성을 나타냈다. 전반적으로 늦은 수확시기에서 비교적 높은 저해 활성을 나타냈고, 그중에서도 B 지역에서 재배한 GH가 가장 높은 저해활성을 나타냈다 (Table 21). 특이한 점은 70% EtOH 추출물 및 95% EtOH 추출물은 hACAT1, hACAT2의 저해활성이 큰 차이가 나지 않는 반면에, EtOAc 추출물은 전반적으로 hACAT2에 비해 hACAT1 저해활성이 월등히 높았다. 즉, EtOAc 추출물에는 hACAT1-specific inhibitor를 함유하는 것으로 추측할 수 있다.

Table 20. hACAT1 and hACAT2 inhibitory effects of 70% EtOH and 95% EtOH extracts

Samples	Inhibition (%)					
	hACAT1	hACAT2	Note ( $\mu\text{g/ml}$ )	hACAT1	hACAT2	Note ( $\mu\text{g/ml}$ )
	70% EtOH ex. (0.4 $\mu\text{l}$ )			95% EtOH ex. (0.8 $\mu\text{l}$ )		
NS-GH-50d	26.0 $\pm$ 2.2	20.4 $\pm$ 1.5	245	58.4 $\pm$ 2.1	50.8 $\pm$ 1.3	262
NS-GH-65d	25.5 $\pm$ 2.6	17.7 $\pm$ 2.6	233	61.9 $\pm$ 1.6	52.5 $\pm$ 0.8	207
<b>NS-GH-80d</b>	<b>46.4<math>\pm</math>2.6</b>	<b>37.1<math>\pm</math>1.3</b>	278	<b>79.7<math>\pm</math>0.0</b>	<b>71.5<math>\pm</math>3.7</b>	<b>335</b>
NS-GH-94d	23.4 $\pm$ 0.0	13.9 $\pm$ 2.2	210	74.6 $\pm$ 2.4	64.0 $\pm$ 1.1	232
NS-GH-112d	26.3 $\pm$ 1.0	16.8 $\pm$ 2.0	235	79.1 $\pm$ 2.0	66.0 $\pm$ 0.3	273
NS-GH-128d	35.0 $\pm$ 3.6	22.7 $\pm$ 3.0	255	74.8 $\pm$ 0.4	65.0 $\pm$ 0.4	273
NS-GH-142d	28.1 $\pm$ 2.3	19.3 $\pm$ 1.6	275	64.7 $\pm$ 2.0	46.8 $\pm$ 1.2	332
NS-YS-50d	28.3 $\pm$ 3.8	23.1 $\pm$ 3.3	243	67.0 $\pm$ 1.8	55.5 $\pm$ 2.2	260
NS-YS-65d	28.7 $\pm$ 0.0	18.5 $\pm$ 1.2	223	66.2 $\pm$ 2.0	59.9 $\pm$ 2.4	235
NS-YS-80d	37.7 $\pm$ 0.1	23.6 $\pm$ 2.7	227	81.8 $\pm$ 2.5	74.3 $\pm$ 2.6	272
NS-YS-94d	32.5 $\pm$ 2.5	16.9 $\pm$ 1.8	240	78.9 $\pm$ 1.3	64.4 $\pm$ 1.4	310
<b>NS-YS-112d</b>	<b>38.9<math>\pm</math>0.4</b>	<b>30.1<math>\pm</math>2.0</b>	260	<b>75.1<math>\pm</math>1.0</b>	<b>60.9<math>\pm</math>1.9</b>	<b>293</b>
NS-YS-128d	30.7 $\pm$ 1.7	14.4 $\pm$ 0.2	240	68.6 $\pm$ 0.7	47.4 $\pm$ 0.6	243
JP-GH-50d	37.8 $\pm$ 1.2	37.1 $\pm$ 3.6	188	66.2 $\pm$ 1.6	63.3 $\pm$ 0.6	218
JP-GH-65d	48.5 $\pm$ 2.0	42.1 $\pm$ 2.1	253	81.5 $\pm$ 0.9	73.8 $\pm$ 2.6	348
<b>JP-GH-79d</b>	<b>55.7<math>\pm</math>1.6</b>	<b>46.0<math>\pm</math>0.3</b>	238	<b>80.9<math>\pm</math>1.9</b>	<b>75.7<math>\pm</math>0.2</b>	<b>282</b>
JP-GH-93d	51.5 $\pm$ 2.3	40.9 $\pm$ 1.6	275	80.0 $\pm$ 2.8	71.1 $\pm$ 0.1	373
JP-GH-109d	33.0 $\pm$ 3.2	21.4 $\pm$ 1.1	292	67.3 $\pm$ 1.2	52.2 $\pm$ 1.4	347
JP-GH-125d	34.8 $\pm$ 1.8	26.5 $\pm$ 1.4	293	74.5 $\pm$ 1.1	57.4 $\pm$ 2.0	308
JP-WD-50d	34.1 $\pm$ 1.5	39.2 $\pm$ 2.8	247	63.9 $\pm$ 1.5	60.0 $\pm$ 2.1	298
JP-WD-65d	57.4 $\pm$ 1.1	53.4 $\pm$ 2.4	250	84.8 $\pm$ 0.1	78.9 $\pm$ 0.8	313
JP-WD-79d	51.0 $\pm$ 0.2	47.6 $\pm$ 1.4	230	86.9 $\pm$ 0.4	82.4 $\pm$ 0.6	313
<b>JP-WD-93d</b>	<b>59.4<math>\pm</math>1.5</b>	<b>53.4<math>\pm</math>0.5</b>	260	<b>85.9<math>\pm</math>0.1</b>	<b>78.1<math>\pm</math>0.1</b>	<b>328</b>
JP-WD-109d	54.2 $\pm$ 3.1	41.7 $\pm$ 0.9	278	79.3 $\pm$ 2.3	70.9 $\pm$ 1.5	343
JP-WD-125d	42.8 $\pm$ 1.1	26.9 $\pm$ 2.0	283	74.0 $\pm$ 1.0	59.4 $\pm$ 0.7	348
(OAA 0.1 $\mu\text{M}$ )	44.0 $\pm$ 2.7	49.6 $\pm$ 1.0		44.1 $\pm$ 3.6	53.5 $\pm$ 0.2	

Table 21. hACAT1 and hACAT2 inhibitory effects of EtOAc extracts

Samples	Inhibition (%)		
	hACAT1	hACAT2	Note
	EtOAc ex. (1.3 $\mu$ l)		( $\mu$ g/ml)
NS-GH-50d	24.4 $\pm$ 1.9	12.1 $\pm$ 1.7	126
NS-GH-65d	18.1 $\pm$ 0.8	12.6 $\pm$ 1.8	126
NS-GH-80d	33.2 $\pm$ 2.0	11.5 $\pm$ 1.3	175
NS-GH-94d	34.3 $\pm$ 1.5	17.2 $\pm$ 1.1	159
<b>NS-GH-112d</b>	<b>43.7<math>\pm</math>1.6</b>	<b>24.7<math>\pm</math>1.1</b>	179
NS-GH-128d	34.6 $\pm$ 0.1	21.8 $\pm$ 0.6	160
NS-GH-142d	35.6 $\pm$ 2.0	22.9 $\pm$ 1.3	173
NS-YS-50d	28.1 $\pm$ 0.9	15.4 $\pm$ 0.6	119
NS-YS-65d	28.6 $\pm$ 0.1	15.5 $\pm$ 0.2	106
NS-YS-80d	43.7 $\pm$ 1.2	29.1 $\pm$ 0.1	159
NS-YS-94d	37.3 $\pm$ 2.0	19.1 $\pm$ 2.3	154
NS-YS-112d	37.1 $\pm$ 2.4	21.9 $\pm$ 1.7	146
<b>NS-YS-128d</b>	<b>46.8<math>\pm</math>0.1</b>	<b>25.5<math>\pm</math>1.3</b>	169
JP-GH-50d	26.4 $\pm$ 2.4	19.0 $\pm$ 1.1	114
JP-GH-65d	36.7 $\pm$ 0.2	19.1 $\pm$ 0.7	204
JP-GH-79d	37.1 $\pm$ 1.1	26.8 $\pm$ 2.1	203
JP-GH-93d	40.3 $\pm$ 2.1	27.5 $\pm$ 2.1	168
JP-GH-109d	41.3 $\pm$ 0.6	28.5 $\pm$ 0.1	176
<b>JP-GH-125d</b>	<b>52.1<math>\pm</math>1.8</b>	<b>37.3<math>\pm</math>1.2</b>	225
JP-WD-50d	27.0 $\pm$ 0.7	17.8 $\pm$ 1.3	125
JP-WD-65d	35.7 $\pm$ 0.5	24.8 $\pm$ 1.5	191
JP-WD-79d	38.4 $\pm$ 0.7	30.4 $\pm$ 0.3	171
JP-WD-93d	40.6 $\pm$ 1.2	28.1 $\pm$ 3.0	164
<b>JP-WD-109d</b>	<b>45.3<math>\pm</math>0.4</b>	<b>29.0<math>\pm</math>2.1</b>	209
JP-WD-125d	40.6 $\pm$ 2.1	26.0 $\pm$ 1.1	206
(OAA 0.1 $\mu$ M)	48.1 $\pm$ 0.6	55.2 $\pm$ 1.2	

(다) 수확시기별, 품종별 콩잎 추출물의 DPP-4 저해활성 측정

A 지역과 B 지역에서 재배한 콩잎의 70% EtOH 추출물 (1.0  $\mu$ l), 95% EtOH 추출물(2.0  $\mu$ l) 및 EtOAc 추출물 (4.0  $\mu$ l)을 사용하여 당뇨병에 중요한 타겟인 dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) 저해활성을 측정하였다 (Table 22).

- 70% EtOH 추출물의 DPP-4 저해활성은 비교적 낮은 편이지만, A 지역과 B 지역의 모든 품종의 재배기간이 길어질수록 DPP-4 저해활성이 증가하였다.

- 95% EtOH 추출물의 경우 A 지역과 B 지역에서 재배한 모든 품종의 DPP-4 저해활성이 비슷하였으나, A 지역의 YS 콩잎은 재배기간이 짧은 50일령, 65일령에서 DPP-4 저해활성이 상대적으로 높게 나타났고, A 지역의 YS 콩잎을 제외한 3가지 품종의 콩잎 (A-GH, B-GH, B-WD)은 재배기간이 긴 142일령, 109일령, 125일령에서 상대적으로 높은 DPP-4 저해활성을 나타냈다.
- EtOAc 추출물은 70% EtOH 추출물, 95% EtOH 추출물과는 달리, A지역 GH 콩잎은 94일령에서, YS 콩잎은 50일령, 65일령에서 상대적으로 높은 DPP-4 저해활성을 나타내었고, B지역 GH 콩잎은 109일령에서, WD콩잎은 50일령 콩잎에서 상대적으로 높은 활성을 나타내었다.

Table 22. DPP-4 inhibitory effects of 70% EtOH, 95% EtOH, and EtOAc extracts

Samples	Inhibition of DPP-4 (%)					
	70% EtOH ex. (1 $\mu$ l)	Note ( $\mu$ g/ml)	95% EtOH ex. (2 $\mu$ l)	Note ( $\mu$ g/ml)	EtOAc ex. (2 $\mu$ l)	Note ( $\mu$ g/ml)
NS-GH-50d	13.7 $\pm$ 1.6	294	33.3 $\pm$ 1.5	314	25.3 $\pm$ 1.4	206
NS-GH-65d	15.6 $\pm$ 1.3	280	36.3 $\pm$ 2.2	248	29.7 $\pm$ 1.5	200
NS-GH-80d	16.3 $\pm$ 0.5	334	36.8 $\pm$ 0.9	402	29.8 $\pm$ 1.5	282
NS-GH-94d	14.0 $\pm$ 0.9	252	38.6 $\pm$ 0.8	278	<b>30.6 <math>\pm</math> 1.6</b>	228
NS-GH-112d	18.9 $\pm$ 0.5	282	37.5 $\pm$ 1.4	328	26.5 $\pm$ 1.9	298
NS-GH-128d	19.6 $\pm$ 1.5	306	37.9 $\pm$ 1.1	328	29.7 $\pm$ 2.8	242
<b>NS-GH-142d</b>	<b>29.0 <math>\pm</math> 1.7</b>	330	<b>41.2 <math>\pm</math> 1.7</b>	398	23.7 $\pm$ 1.6	296
NS-YS-50d	16.8 $\pm$ 1.8	226	<b>35.0 <math>\pm</math> 1.4</b>	312	<b>31.3 <math>\pm</math> 1.8</b>	192
NS-YS-65d	13.1 $\pm$ 1.2	304	<b>35.1 <math>\pm</math> 1.4</b>	282	<b>31.0 <math>\pm</math> 2.4</b>	298
NS-YS-80d	14.8 $\pm$ 1.8	286	29.4 $\pm$ 0.8	326	27.5 $\pm$ 2.3	276
NS-YS-94d	16.1 $\pm$ 2.4	330	32.6 $\pm$ 1.4	372	23.7 $\pm$ 2.2	302
NS-YS-112d	22.3 $\pm$ 2.0	350	34.3 $\pm$ 1.1	352	28.0 $\pm$ 1.7	318
<b>NS-YS-128d</b>	<b>24.9 <math>\pm</math> 2.2</b>	352	31.7 $\pm$ 1.1	292	24.9 $\pm$ 2.7	304
JP-GH-50d	16.1 $\pm$ 1.2	292	16.1 $\pm$ 1.2	292	33.9 $\pm$ 1.1	184
JP-GH-65d	18.5 $\pm$ 1.7	268	18.5 $\pm$ 1.7	268	33.0 $\pm$ 1.6	178
JP-GH-79d	18.7 $\pm$ 1.2	272	18.7 $\pm$ 1.2	272	33.4 $\pm$ 2.3	286
JP-GH-93d	26.8 $\pm$ 1.6	288	26.8 $\pm$ 1.6	288	29.7 $\pm$ 1.2	252
<b>JP-GH-109d</b>	<b>30.3 <math>\pm</math> 1.3</b>	312	<b>30.3 <math>\pm</math> 1.3</b>	312	<b>38.0 <math>\pm</math> 0.7</b>	244
JP-GH-125d	28.9 $\pm$ 1.9	288	28.9 $\pm$ 1.9	288	30.6 $\pm$ 2.0	310
JP-WD-50d	19.3 $\pm$ 1.5	296	19.3 $\pm$ 1.5	296	<b>33.8 <math>\pm</math> 2.2</b>	192
JP-WD-65d	22.6 $\pm$ 0.6	300	22.6 $\pm$ 0.6	300	30.3 $\pm$ 1.6	298
JP-WD-79d	20.4 $\pm$ 2.3	276	20.4 $\pm$ 2.3	276	32.7 $\pm$ 1.0	276
JP-WD-93d	25.3 $\pm$ 1.2	312	25.3 $\pm$ 1.2	312	28.0 $\pm$ 3.3	302
JP-WD-109d	26.2 $\pm$ 2.4	334	26.2 $\pm$ 2.4	334	27.5 $\pm$ 2.6	318
<b>JP-WD-125d</b>	<b>30.5 <math>\pm</math> 3.0</b>	340	<b>30.5 <math>\pm</math> 3.0</b>	340	26.6 $\pm$ 2.3	304
(KR-62436 at 0.5 $\mu$ M)	55.9 $\pm$ 1.1		54.5 $\pm$ 0.0		59.7 $\pm$ 0.8	



바. 콩잎 테로카판 강화 소재 (PTH) 및 단일물질에 대한 *in vitro* 항비만, 항당뇨 활성 검색

콩잎으로부터 테로카판계 화합물과 함께 이소플라보노이드 및 이들의 배당체를 주성분으로 함유하는 70% EtOH 추출물 (70ESL)과 테로카판계 화합물을 주성분으로 함유하는 EtOAc 추출물 (EASL)의 활성을 비교, 분석하여 콩잎으로부터 테로카판 강화 소재 (PTH)에 대한 기능성을 입증하고자 하였다.

(1) 췌장 베타세포 (HIT-T15 cells)에서 PTH 및 분리 단일물질의 항당뇨 활성

(가) 70ESL과 EASL의 항당뇨 활성

① 70ESL과 EASL의 세포 독성 및 인슐린 분비능 측정

서로 다른 품종 GH, YS 및 WD 콩잎의 70ESL 및 EASL에 대한 인슐린 분비능을 HIT-T15 세포를 이용하여 측정하였다. 상기의 모든 시료는 100  $\mu$ g/ml까지 HIT-T15 세포에 대한 독성을 나타내지 않았다 (data not shown). GH-70ESL이 인슐린 분비를 3.5배 현저하게 증가시켰고 ( $P < 0.01$ ), YS-70ESL도 유의적으로 인슐린의 분비를 2.2배 증가시켰으나, WD-70ESL은 인슐린의 분비에 영향을 주지 못했다 (Fig. 42A).

또한 EASL 중에서는 GH-EASL 100  $\mu$ g/ml에서 유의적으로 인슐린 분비를 증가시켰다. 그 외 YS, WD은 100  $\mu$ g/ml에서 인슐린 분비를 증가시켰지만 유의적인 차이는 없었다 (Fig. 42B).

앞서 설명한 것처럼 GH-70ESL의 coumsterol 함량이 YS-70ESL, WD-70ESL에 많고, GH-EASL의 coumsterol 함량도 YS-EASL, WD-EASL에 비해 많다는 점으로부터 인슐린 분비 촉진 효능이 테로카판계 화합물에 기인한다는 것을 예측할 수 있었다. 그러나 추출물 g 당 GH-70ESL의 coumsterol 함량이 GH-EASL의 coumsterol 함량에 약 25% 정도인 점으로부터 콩잎 70% EtOH 추출물에는 인슐린 분비 촉진시키는 다른 계열의 화합물이 있다는 것을 시사하고 있다.

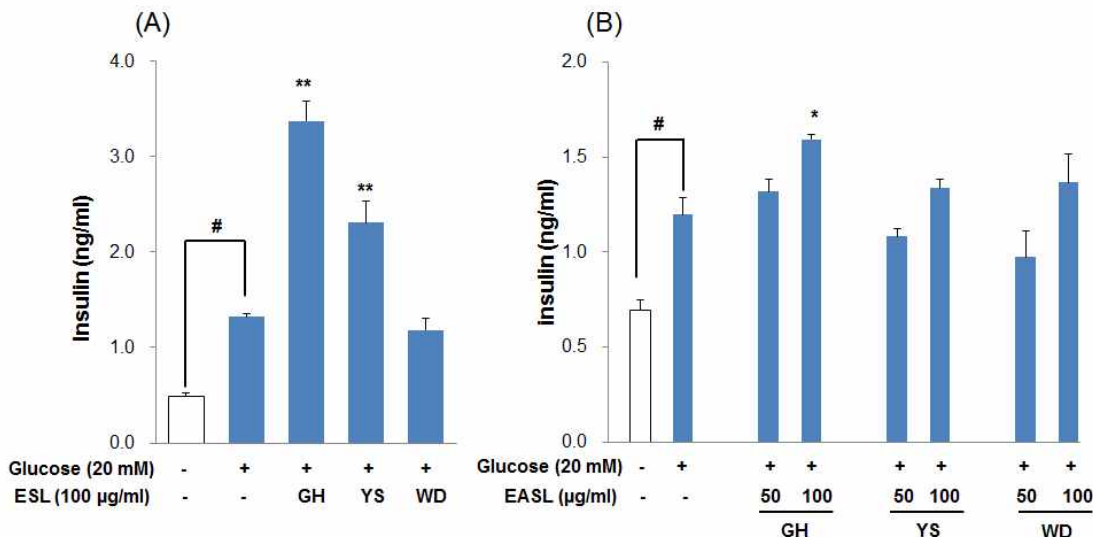


Fig. 42. Effects of 70ESL (A) and EASL (B) of GH, YS, and WD on the glucose-induced insulin secretion in HIT-T15 cells. HIT-T15 cells were seeded into a 24 well plate at a density of  $2 \times 10^5$  cells per well and grown for 24 h. The cells were washed twice and preincubated for 30 min in without glucose. Then cells were treated with media containing 20 mM glucose with samples, and incubated for 60 min at 37°C. After incubation, measured the insulin concentration of the media (Alpco diagnostics, insulin ELISA kit). Data were

expressed as mean  $\pm$  SD. # $P < 0.01$  versus non-glucose group. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  versus glucose alone-treated group.

## ② 70ESL과 EASL에 의한 proinsulin 유전자 발현의 변화

3가지 품종 콩잎 (GH, YS, WD)의 70ESL이 palmitic acid (PA)에 의해 저해된 인슐린 유전자 발현에 대한 영향을 확인하였다. GH-70ESL 50  $\mu$ g/ml 처리로 인슐린 유전자의 발현이 유의적으로 증가되었고, YS-70ESL에 의해서는 큰 변화를 나타내지 않았으며, WD-70ESL의 처리에 의해 인슐린 유전자의 발현은 오히려 감소되었다. 한편 GH-, YS-, WD-EASL의 처리에 의해 인슐린 유전자의 발현은 PA만 처리한 군에 비해 더 감소하였으며, 특히 WD-EASL은 PA만 처리한 군에 비해 50% 가량 감소하는 부정적인 결과를 보였다 (Fig. 43).

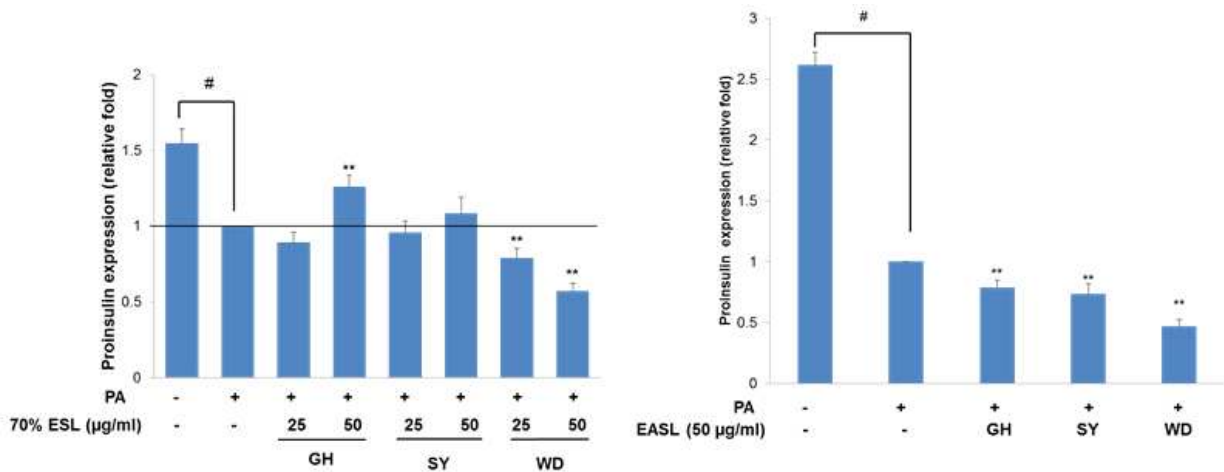


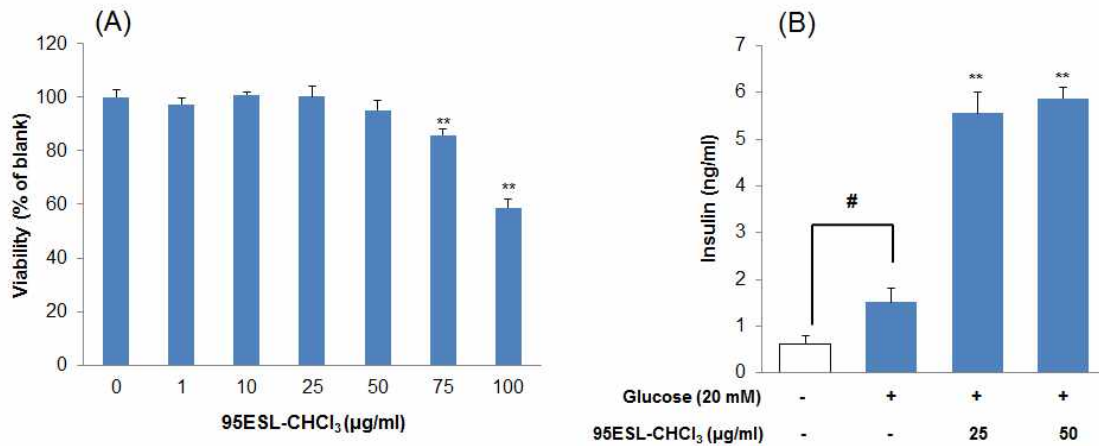
Fig. 43. Effects of 70ESL and EASL on proinsulin gene expression in PA induced HIT-T15 cells. Cells were administered 0.4 mM PA with or without of extracts for 8 h and harvested mRNA to be used in qRT-PCR. # $P < 0.01$  compared with non-PA group. \*\* $P < 0.01$  compared with PA alone-treated group.

GH-70ESL은 인슐린 유전자의 발현을 증가시키는 반면, GH-EASL은 인슐린 유전자의 발현을 감소시키는 결과 및 그림 40의 결과로부터 인슐린 유전의 발현을 증가시키는 물질은 70% EtOH에 의해 추출되는 비교적 극성물질일 가능성이 있다.

## (나) 95ESL-CHCl<sub>3</sub> 분획물의 항당뇨 활성

### ① 95% EtOH 추출물 (95ESL)-CHCl<sub>3</sub> 분획의 세포독성 및 인슐린 분비능 측정

GH 콩잎의 95% EtOH 추출물로부터 용매분획 방법으로 극성물질을 제거한 CHCl<sub>3</sub> 분획물을 이용하여 HIT-T15 세포에서의 세포독성을 관찰한 후 인슐린 분비능 및 PA 유도 독성에 대한 유전자 및 단백질 발현 변화를 관찰하였다. 95ESL-CHCl<sub>3</sub> 분획물은 75  $\mu$ g/ml의 농도에서부터 세포독성을 나타내었다 (Fig. 44A). 따라서 세포에서 독성을 나타내지 않는 25, 50  $\mu$ g/ml의 농도에서 95ESL-CHCl<sub>3</sub> 분획물을 처리한 결과, 인슐린 분비능이 3배 이상 현저하게 증가하였다 ( $P < 0.01$ ) (Fig. 44B).



**Fig. 44.** The cell viabilities (A) and insulin secretion (B) of 95ESL-CHCl<sub>3</sub> fraction in HIT-T15 cells. (A) Cells were treated with vehicle (DMSO) or indicated concentrations of samples. 24 h after treatment of samples, cell viability was measured by Cyto X™ cell viability assay kit (LPS solution, Korea). \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01 compared with media alone-treated group. (B) HIT-T15 cells were seeded into a 24 well plate at a density of 2×10<sup>5</sup> cells per well and grown for 24 h. The cells were washed twice and preincubated for 30 min in without glucose. Then cells were treated with media containing 20 mM glucose with samples, and incubated for 60 min at 37°C. After incubation, measured the insulin concentration of the media. Data were expressed as mean ± SD. #*P* < 0.01 versus non-glucose group. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01 versus glucose alone-treated group.

② 95ESL-CHCl<sub>3</sub> 분획물에 의한 유전자 및 단백질 발현의 변화

95ESL-CHCl<sub>3</sub> 분획물이 PA에 의해 저해된 인슐린 유전자 발현에 미치는 영향을 조사하였다. Glucagon-Like Peptide 1 (GLP-1)은 소장의 L 세포에서 분비되어 포도당 농도의 증가에 따른 인슐린 분비를 자극하여 식후 혈당을 조절하는 효과가 있다. GLP-1의 인슐린분비를 유도하는 작용은 췌장 베타세포의 GLP-1 수용체 (GLP-1R)와의 결합을 통해 활성화된다. 본 실험에서 95ESL-CHCl<sub>3</sub> 분획물 50 µg/ml의 처리에 의해 GLP-1R의 발현이 유의적으로 증가되었다. 또한 insulin receptor substrate (IRS)는 인슐린 신호전달 과정의 기질로 대사성 스트레스 환경에서 베타세포의 증식과 기능, 생존을 증진시켜 당뇨병을 예방하는 역할을 한다. 50 µg/ml의 95ESL-CHCl<sub>3</sub> 분획물의 처리로 IRS1과 IRS2의 유전자 발현을 유의적으로 증가되었으며, 따라서 95ESL-CHCl<sub>3</sub> 분획물은 베타세포의 기능 향상에 기여할 것으로 판단된다 (Fig. 45). 그 외에 인슐린의 분비를 직접적으로 조절하는 PKA의 유전자 발현은 95ESL-CHCl<sub>3</sub> 분획물에 의해 큰 변화가 없었지만, PKA 단백질의 인산화가 활성화되는 것을 확인하였다 (Fig. 46).

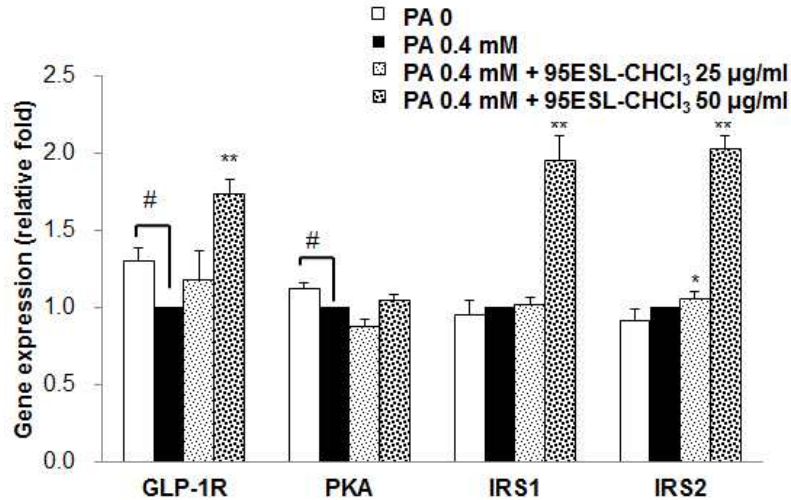


Fig. 45. Effects of 95ESL-CHCl<sub>3</sub> on gene expressions in PA induced HIT-T15 cells Cells were administered 0.4 mM PA with or without of 95ESL-CHCl<sub>3</sub> for 8 h and then harvested mRNA to be used in qRT-PCR. #*P* < 0.01 compared with non-PA group. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01 compared with PA alone-treated group.

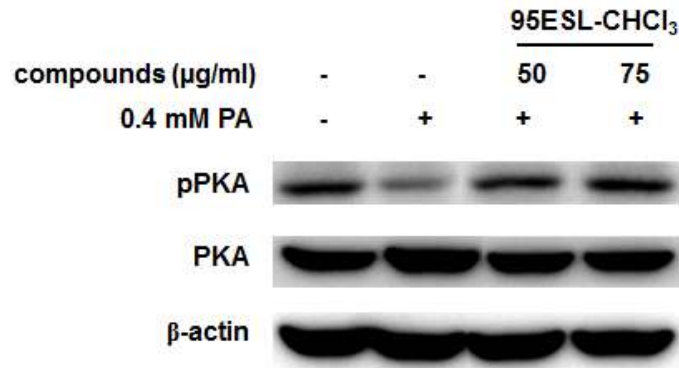


Fig. 45. PA induced phosphorylation of PKA protein in HIT-T15 cells Western blot analysis. Cells were administered 0.4 mM PA with or without of 95ESL-CHCl<sub>3</sub> fraction for 30 min and then Cell lysates were prepared and subjected to Western blotting using antibodies specific for phospho-PKA and PKA.

(다) 70% EtOH 추출물 (70ESL)로부터 분리한 MPLC 분획물의 *in vitro* 생리활성

① 분획물 조제 및 분획물의 함유물질 확인: 앞서 설명한 결과로부터 70ESL에는 테로카관계 화합물 외에 인슐린 분비능을 갖는 또 다른 계열의 활성물질이 있을 것으로 추측되었다. 따라서 70ESL로부터 인슐린 분비능을 나타내는 분획을 찾기 위하여 Flash purification system (MPLC, Biotage; Biotage Flash KP-Sil 40+M cartridge, 40 x 150 mm)를 이용하여 70ESL을 7 개의 분획으로 분리하였다 (Fig. 47).

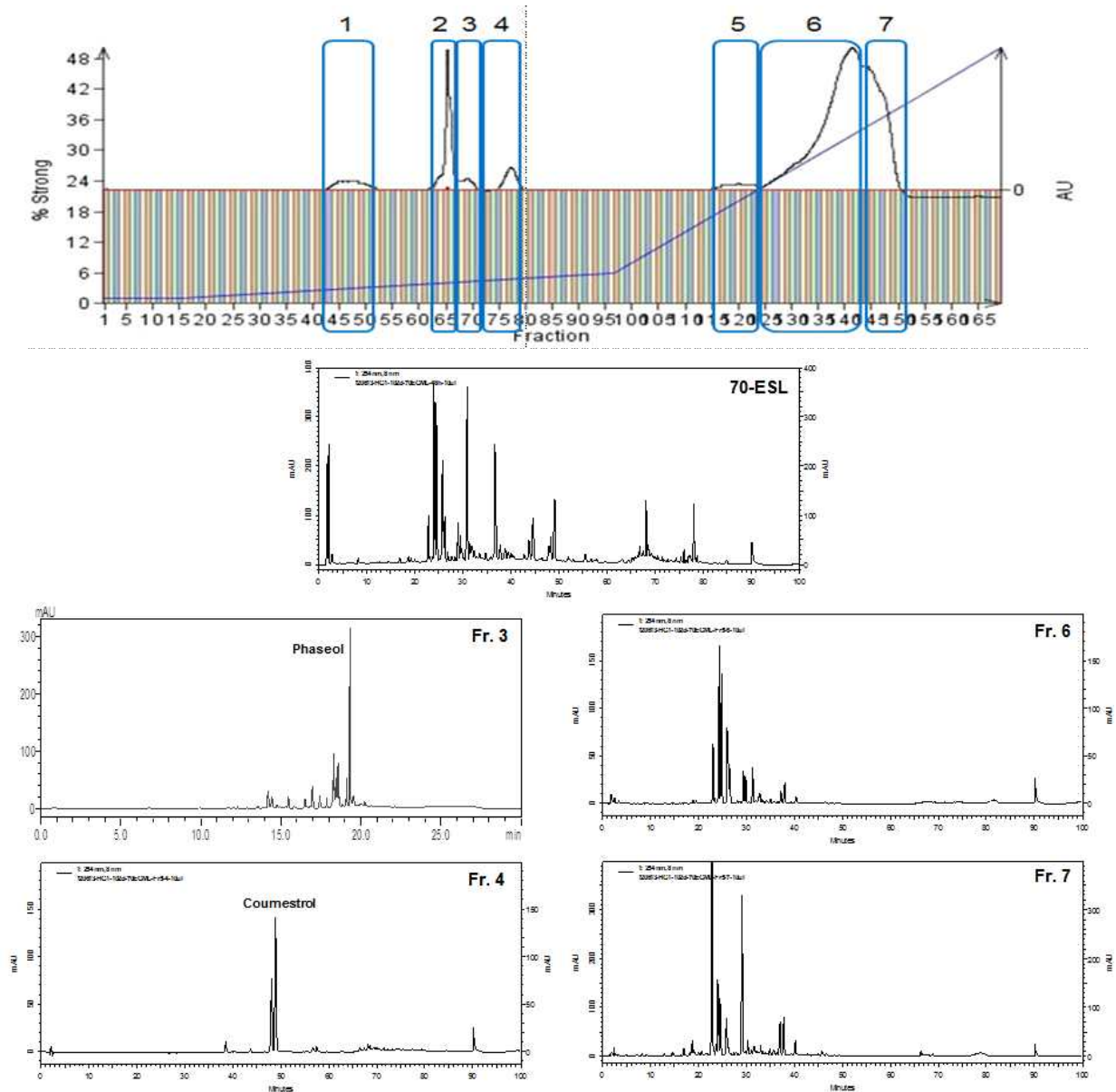


Fig. 47. MPLC chromatogram of GH-70ESL and HPLC profiles of isolated fractions 3, 4, 6, and 7.

분리에 사용한 silica-gel column은 Biotage Flash KP-Sil 40+M cartridge (40x150 mm), 유속은 40 ml/min, detection은 UV 254 nm, 분리를 위한 이동상은  $\text{CHCl}_3$ -MeOH gradient를 사용하였으며, MeOH 농도를 0%-50%까지 단계적으로 증가시켜 물질을 용출하여 170 개의 분획으로 분리하였고, TLC를 이용하여 유사한 분획을 모아서 7 개의 분획으로 분리하였다 (Fig. 47). 이분획들을 HPLC를 이용하여 분석한 결과, Fr. 3에는 phaseol, Fr. 4에는 coumestrol이 함유되어 있었고, Fr. 6과 Fr. 7에는 다양한 플라보노이드, 이소플라보노이드 및 이들의 배당체가 함유되어 있음을 보유한 표지물질 및 UV spectra를 통해서 알 수 있었다.

② 70ESL 분획의 LDL-산화 저해활성 및 DPP-4 저해활성 측정: 70ESL의 7 개의 분획에 대한 LDL-산화 저해활성 및 DPP-4 저해활성을 측정하였다 (Table 23). 80  $\mu\text{g/ml}$ 에서 Fr. 2, Fr. 3, Fr. 4에서 각각 73.7%, 86.7%, 89.4%의 강한 LDL-산화 저해활성을 나타내었고, Fr. 1 ~ Fr. 4 (100  $\mu\text{g/ml}$ )에서 높은  $\alpha$ -glucosidase 저해활성을 나타내었으며, Fr. 4에서 상대적으로 높

은 DPP-4 저해활성 (31.6%)을 나타내었다.

Table 23. Inhibitory activities of MPLC fractions from 70ESL on LDL-oxidation and DPP-4

MPLC Fractions	Inhibition (%)		
	LDL-oxidation (80 $\mu\text{g/ml}$ )	Yeast $\alpha$ -glucosidase (100 $\mu\text{g/ml}$ )	DPP-4 (100 $\mu\text{g/ml}$ )
Fr. 1	39.7 $\pm$ 0.1	<b>68.3 <math>\pm</math> 3.1</b>	18.4 $\pm$ 0.3
Fr. 2	<b>73.7 <math>\pm</math> 0.4</b>	<b>81.5 <math>\pm</math> 2.8</b>	17.8 $\pm$ 2.2
Fr. 3	<b>86.7 <math>\pm</math> 1.9</b>	<b>57.7 <math>\pm</math> 2.9</b>	13.8 $\pm$ 3.9
Fr. 4	<b>89.4 <math>\pm</math> 1.5</b>	<b>88.9 <math>\pm</math> 1.1</b>	<b>31.6 <math>\pm</math> 1.3</b>
Fr. 5	22.3 $\pm$ 3.0	22.2 $\pm$ 0.9	11.5 $\pm$ 2.0
Fr. 6	10.1 $\pm$ 2.2	25.6 $\pm$ 0.2	11.9 $\pm$ 0.8
Fr. 7	<b>73.7 <math>\pm</math> 1.5</b>	39.8 $\pm$ 1.5	14.2 $\pm$ 0.5
Positive control	BHT 2 $\mu\text{M}$ : 56.5 $\pm$ 0.6	Coumestrol 25 $\mu\text{M}$ : 56.1 $\pm$ 2.6	KR-62436 0.2 $\mu\text{M}$ : 43.8 $\pm$ 2.9

(라) HIT-T15 세포에서 PTH 및 분리된 단일물질의 항당뇨 활성

① HIT-T15 세포에서 70ESL의 MPLC 분획 및 분리된 단일물질들의 세포독성 측정: 70ESL의 MPLC 분획 1~7 (Fig. 45 참조)의 HIT-T15 세포에서의 세포독성을 측정하였다 (Fig. 48). Fr. 6과 Fr. 7은 100  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 독성을 나타내지 않았다. 반면에 phaseol이 포함된 Fr. 3은 50  $\mu\text{g/ml}$ 에서부터 독성을 나타내었다. 그 외 Fr. 1, 2, 4, 5는 75  $\mu\text{g/ml}$  농도에서부터 독성을 나타내었다.

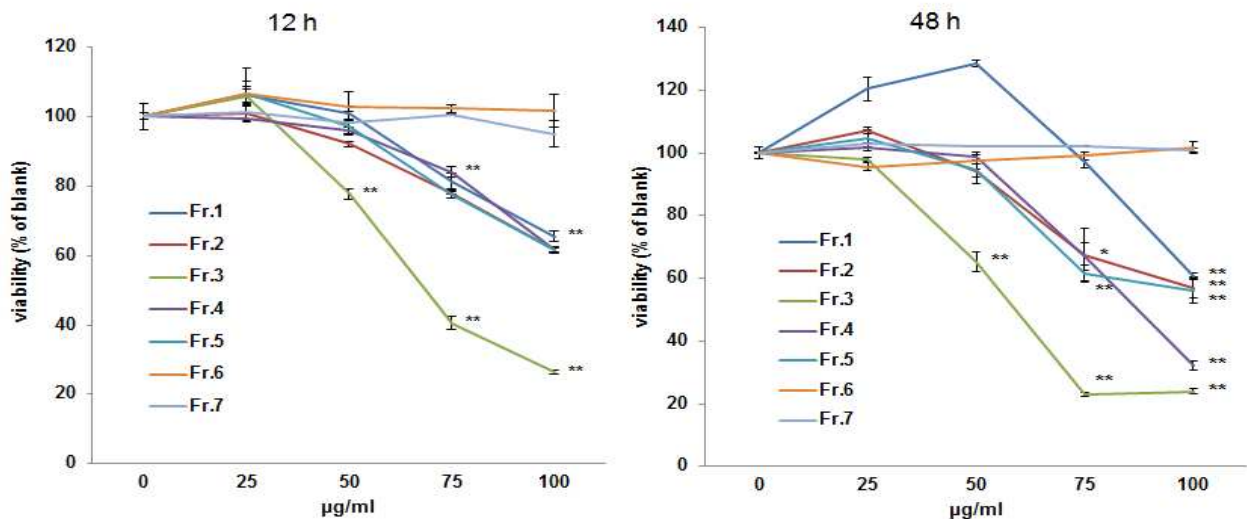
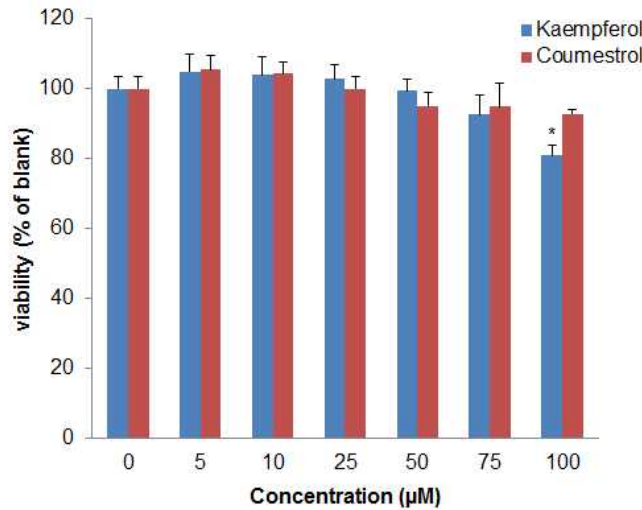


Fig. 48. Cell viabilities of MPLC Fr. 1~7 in HIT-T15 cells. Cells were treated with DMSO or indicated concentrations of samples. Twelve or 24 h after treatment of extracts, cell viability was measured by Cyto X™ cell viability assay kit. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared with media alone-treated group.

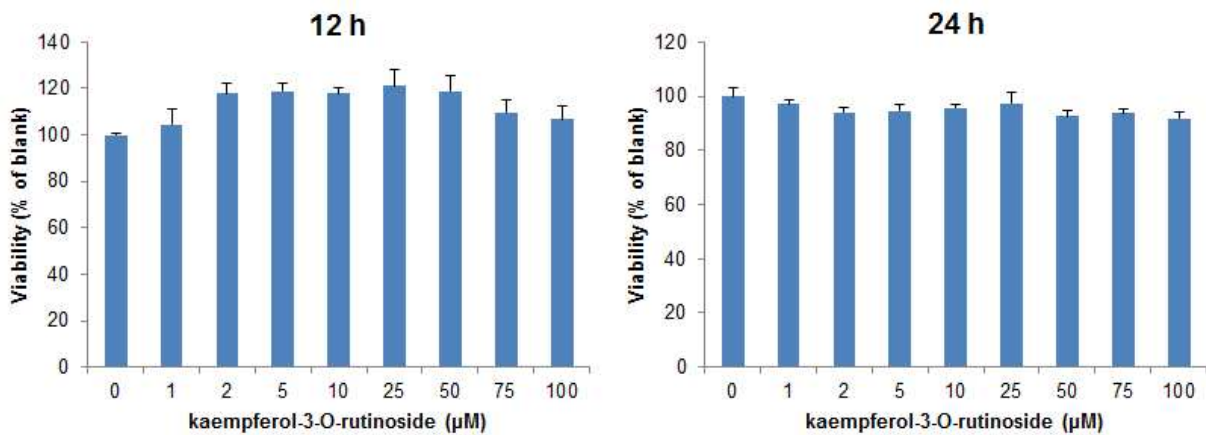
콩잎 추출물에는 여러가지 종류의 kaempferol 배당체가 함유되어 있는 것으로 알려져 있다 (Ho *et al.*, Biomed Pharmacother, 56: 289-295, 2002). 따라서 kaempferol 배당체의 aglycone인 kaempferol과 콩잎이 함유하는 대표적인 테로카관계 화합물인 coumestrol의 HIT-T15 세포에서

의 세포독성을 측정하였다 (Fig. 46). Kaempferol은 100  $\mu\text{g/ml}$ 에서 10% 이하의 독성을 나타내었고, coumestrol은 100  $\mu\text{g/ml}$  농도까지 독성을 나타내지 않았다 (Fig. 49).



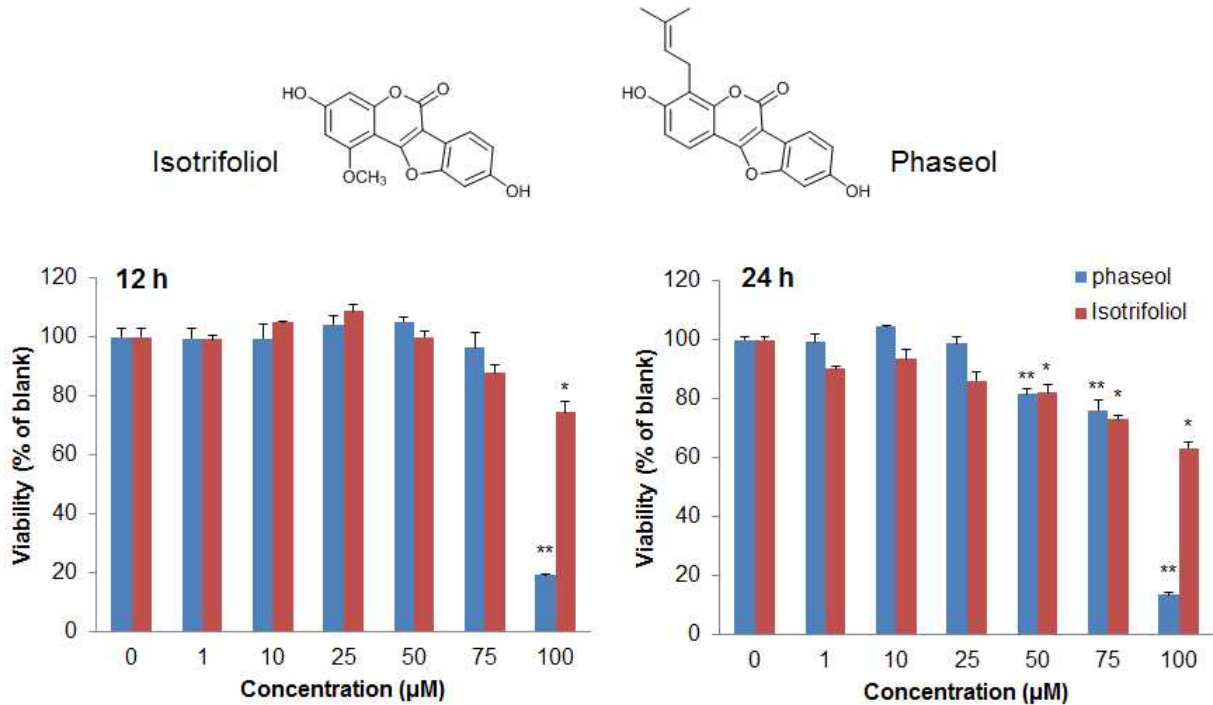
**Fig. 49. Cell viabilities of kaempferol and coumestrol in HIT-T15 cells** Cells were treated with DMSO or indicated concentrations of samples. Twenty four h after treatment of extracts, cell viability was measured by Cyto X™ cell viability assay kit. \* $P < 0.05$  compared with media alone-treated group.

다음으로는 콩잎이 함유하는 대표적인 kaempferol 배당체인 kaempferol-3-O-rutinoside (90242, Sigma)의 HIT-T15 세포에서 세포독성을 측정한 결과, 100  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 12 시간 및 48 시간 동안 처리 후 모두 독성을 나타내지 않았다 (Fig. 50).



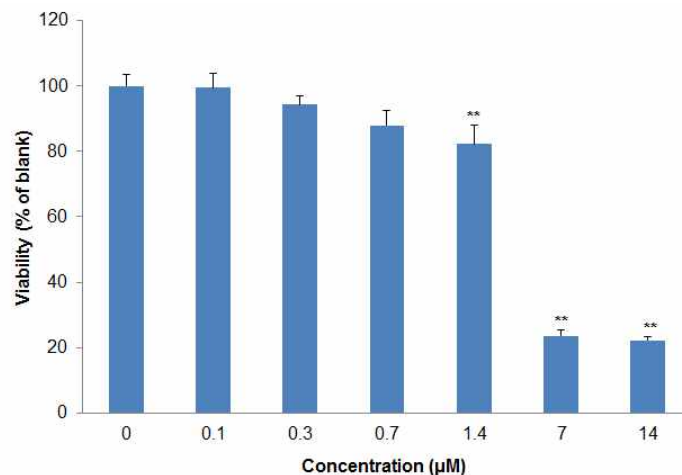
**Fig. 50. Cell viabilities of kaempferol-3-O-rutinoside in HIT-T15 cells.** Cells were treated with vehicle (DMSO) or indicated concentrations of sample. Twelve and 24 h after treatment of extracts, cell viability was measured by Cyto X™ cell viability assay kit (LPS solution, Korea).

다음으로 본 연구팀에서 분리한 테로카판계의 화합물인 isotrifoliol과 phaseol의 HIT-T15 세포에서 독성을 확인하였다. Isotrifoliol 또는 phaseol 100  $\mu\text{M}$ 을 12 시간 동안 처리 후 세포독성을 나타내었고, 24 시간 동안 처리 시에는 50  $\mu\text{M}$  농도에서부터 세포독성을 나타내었다 (Fig. 51). 특히 phaseol은 100  $\mu\text{M}$ 에서 20% 이하의 세포 생존률을 나타내었다. 따라서 70ESL, 95ESL 및 EASL은 HIT-T15 세포에서 비교적 독성을 나타내지 않지만, 고농도의 테로카판 고함유 분획 (PTH)을 사용 시에는 적절한 사용 농도를 고려해야 할 것으로 판단된다.



**Fig. 51. Cell viabilities of isotrifoliol and phaseol in HIT-T15 cells** Cells were treated with vehicle (DMSO) or indicated concentrations of samples. Twelve or 24 h after treatment of extracts, cell viability was measured by Cyto X™ cell viability assay kit (LPS solution, Korea). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared with media alone-treated group.

잎의 엽록소(chlorophyll)의 변형물인 pheophorbide a (본 연구팀에서 콩잎으로부터 분리함)의 HIT-T15 세포에서 세포독성을 확인하였다. Pheophorbide a는 매우 강한 세포독성을 나타내었으며, 12 시간 동안 처리 후 7 μM 농도에서부터 세포독성이 나타났다 (Fig. 52). 따라서 70ESL, 95ESL 및 EASL은 HIT-T15 세포에서 비교적 독성을 나타내지 않지만, 고농도의 테로카판 고함유 분획 (PTH)에는 pheophorbides계 화합물이 함유될 수 있으므로 사용 시에는 적절한 사용 농도를 고려해야 할 것으로 판단된다.



**Fig. 52. Cell viabilities of pheophorbide a in HIT-T15 cells** Cells were treated with vehicle (DMSO) or indicated concentrations of samples. Twelve hours after treatment of compounds, cell viability was measured by Cyto X™ cell viability assay kit (LPS solution, Korea). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared with media alone-treated group.



② HIT-T15 세포에서 70ESL-MPLC 분획의 인슐린 분비능 및 유전자 발현에 미치는 영향

- 70ESL을 MPLC로 분리하여 얻은 7개의 분획에 대한 HIT-T15 세포에서의 인슐린 분비능을 측정·비교하였다 (Fig. 53). 다양한 플라보노이드, 이소플라보노이드 및 이들의 배당체 함유하는 Fr. 6과 Fr. 7의 인슐린 분비능이 가장 효과적으로 증가되었다. Fr. 6과 Fr. 7보다는 인슐린 분비능이 약하지만 Fr. 1, Fr. 4 (coumestrol 함유), Fr. 5에서도 유의적인 인슐린 분비능 증가 효과를 나타내었다. 이에 비해 Fr. 2와 Fr. 3 (phaseol 함유)은 세포독성이 나타났다.

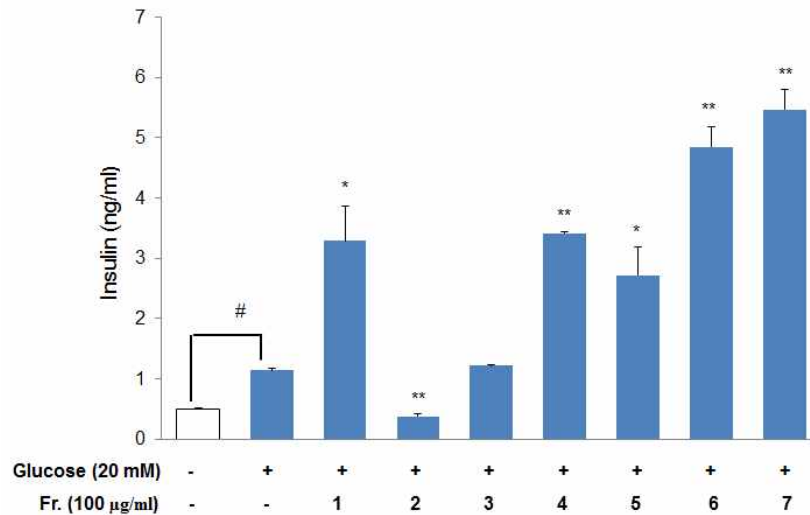
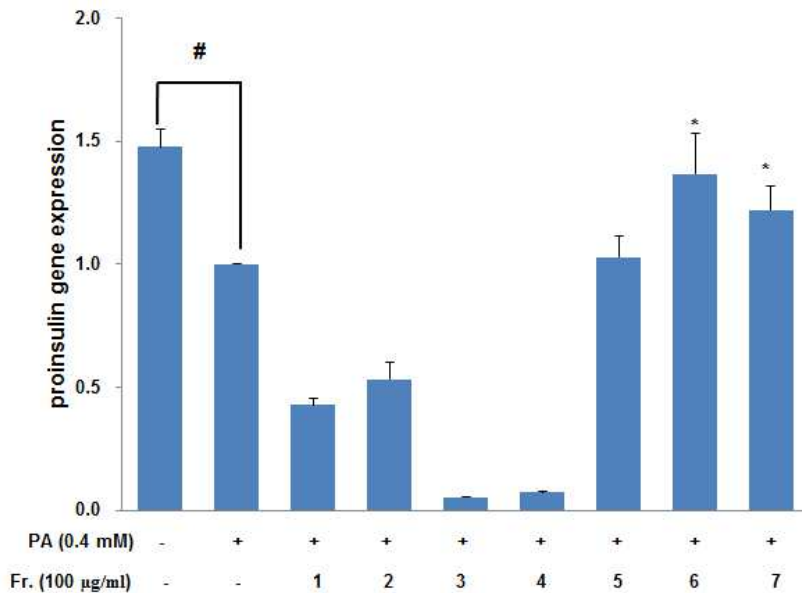


Fig. 53. Effects of MPLC fractions of 70ESL on the glucose-induced insulin secretion in HIT-T15 cells. HIT-T15 cells were seeded into a 24 well plate at a density of  $2 \times 10^5$  cells per well and grown for 24 h. The cells were washed twice and preincubated the samples for 30 min in without glucose. Then cells were treated with media containing 20 mM glucose, and incubated for 60 min at 37°C. After incubation, measured the insulin concentration of the media. Data were expressed as mean  $\pm$  SD. # $P < 0.01$  versus non-glucose group. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  versus glucose alone-treated group.

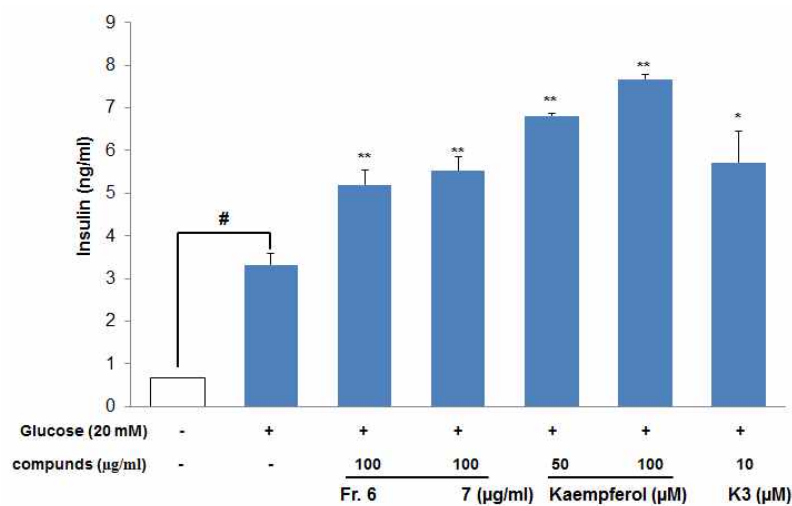
- 70ESL을 MPLC로 분리하여 얻은 7 개의 분획이 HIT-T15 세포에서 proinsulin 유전자의 발현에 미치는 영향을 측정한 결과, 그림 51에서와 같은 양상으로 Fr. 6과 Fr. 7 (100 µg/ml)이 PA 독성으로 감소된 proinsulin 유전자의 발현을 유의적으로 증가시켰다 (Fig. 54).



**Fig. 54. Effects of MPLC fraction of GH-70ESL on proinsulin gene expression in PA induced HIT-T15 cells.** Cells were administered 0.4 mM PA with or without of MPLC fraction for 8 h and harvested mRNA to be used in qRT-PCR. #*P* < 0.01 compared with non-PA group. \**P* < 0.05 compared with PA alone-treated group.

③ HIT-T15 세포에서 kaempferol 및 kaempferol-3-O-rutinoside (K3)이 인슐린 분비능 및 유전자 발현에 미치는 영향

- Kaempferol 50, 100 μM에서 농도 의존적으로 인슐린 분비능이 증가되었고, kaempferol-3-O-rutinoside는 10 μM에서도 효과적으로 인슐린 분비가 촉진되었다 (Fig. 55). 따라서 콩잎이 함유하는 kaempferol 배당체들이 Fr. 6과 Fr. 7의 인슐린 분비능이 촉진에 기여할 것으로 추측할 수 있다.



**Fig. 55. Effects of GH-70-ESL MPLC fr.6~7, kaempferol, and kaempferol-3-O-rutinoside (K3) on the glucose-induced insulin secretion in HIT-T15 cells.** HIT-T15 cells were seeded into a 24 well plate at a density of  $2 \times 10^5$  cells per well and grown for 24 h. The cells were washed twice and preincubated the samples for 30 min in without glucose. Then cells were treated with media containing 20 mM glucose and samples incubated for 60 min at 37°C. After incubation, measured the insulin concentration of the media (Alpco diagnostics, insulin ELISA kit). Data were expressed as mean  $\pm$  SD. #*P* < 0.01 versus non-glucose group. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01 versus glucose alone-treated group.

- Kaempferol 및 kaempferol-3-O-rutinoside가 HIT-T15 세포에서 proinsulin 유전자의 발현에 미치는 영향을 측정한 결과, 50 μM kaempferol 및 kaempferol-3-O-rutinoside을 전처리로 PA만을 처리한 대조군에 비해 유의적으로 proinsulin 유전자의 발현이 증가되었다 (Fig. 56).

- 다음으로 인슐린을 분비하는 성숙한 HIT-T15 세포에서 많이 발현이 되는 유전자인 MafA의 발현을 확인해보았다 (Fig. 56). MPLC-Fr. 7의 처리로 MafA의 발현이 100 μg/ml에서 유의적으로 증가되었고, 50 μM kaempferol 처리로 MafA 유전자의 발현이 PA만 처리한 대조군에 비해 4배 증가되었다. 또한 kaempferol-3-O-rutinoside 50 μM 농도에서도 유의적으로 MafA의 발현이 다소 증가되었다. 따라서 kaempferol 배당체가 많이 함유되어 있는 Fr. 7은 체내 작용 시 그 aglycone 형태인 kaempferol로 전환됨에 따라 더 효과적으로 작용할 것으로 판단된다.

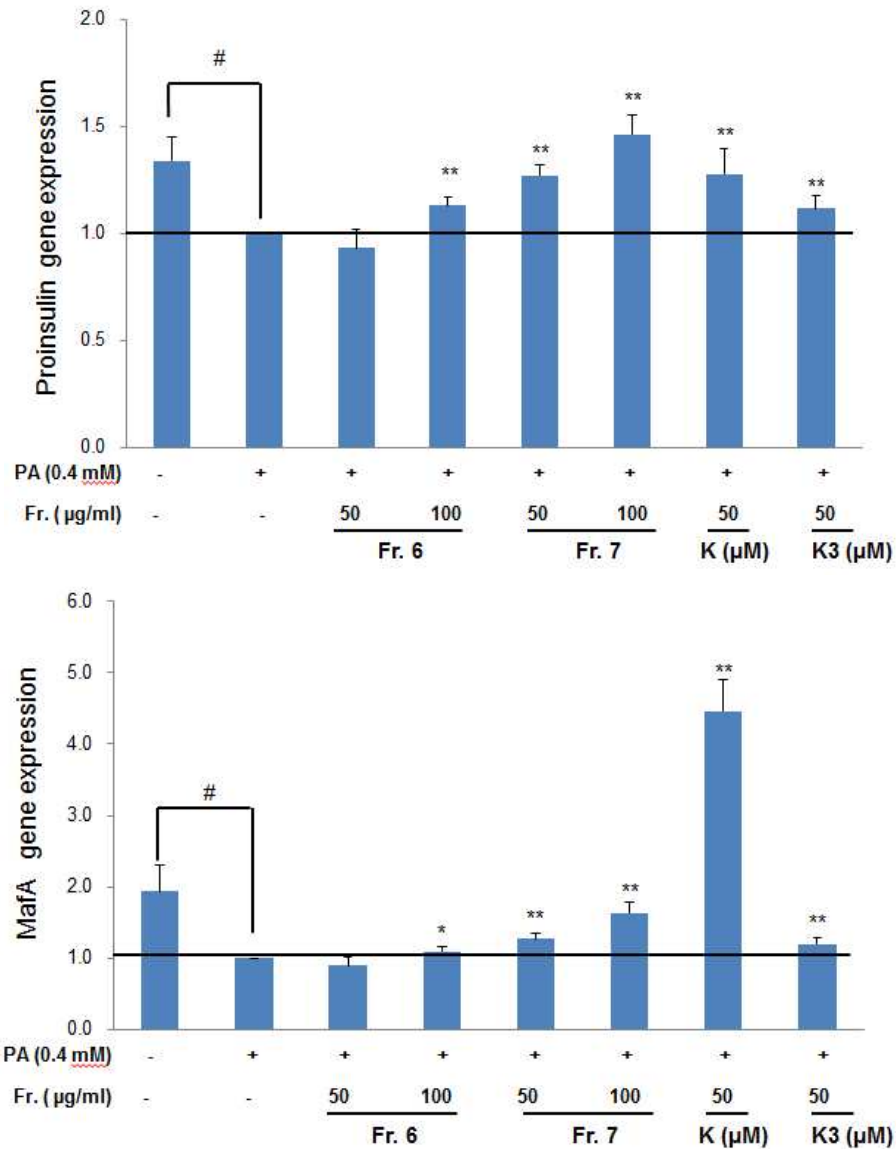


Fig. 56. Effects of 70ESL-MPLC Fr. 6, 70ESL-MPLC Fr. 7, kaempferol (K), and kaempferol-3-*O*-rutinoside (K3) on proinsulin and MafA gene expression in PA-induced HIT-T15 cells. Cells were administered 0.4 mM PA with or without of MPLC Fr. for 8 h and harvested mRNA to be used in qRT-PCR. #*P* < 0.01 compared with non-PA group. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01 compared with PA alone-treated group.

- 이상의 결과로부터 kaempferol이 효과적으로 인슐린 분비를 촉진시킨다는 것을 알 수 있었으며, 이 외에 당뇨병과 관련된 유전자의 발현에 어떠한 영향을 미치는지 알아보았다.

PA 유도 HIT-T15 세포에서 kaempferol은 인슐린 분비를 직접 조절하는 단백질인 PKA 유전자 발현을 유의적으로 증가시켰고, 인슐린 분비능을 지닌 HIT-T15 세포에서 발현이 증가되는 MafA 유전자의 발현도 효과적으로 증가되었다. 또한 HIT-T15 세포의 분화과정에 중요한 작용을 일으키는 Ngn3 및 Pax4 유전자의 발현도 kaempferol에 의해 농도 의존적으로 증가되었다 (Fig. 57).

- 이상의 결과로부터 70ESL은 kaempferol 배당체에서 기인하는 인슐린 분비 촉진 및 췌장세포의 증식에 관여하는 인자들의 작용으로 항당뇨 효능을 나타낼 것으로 예상된다.

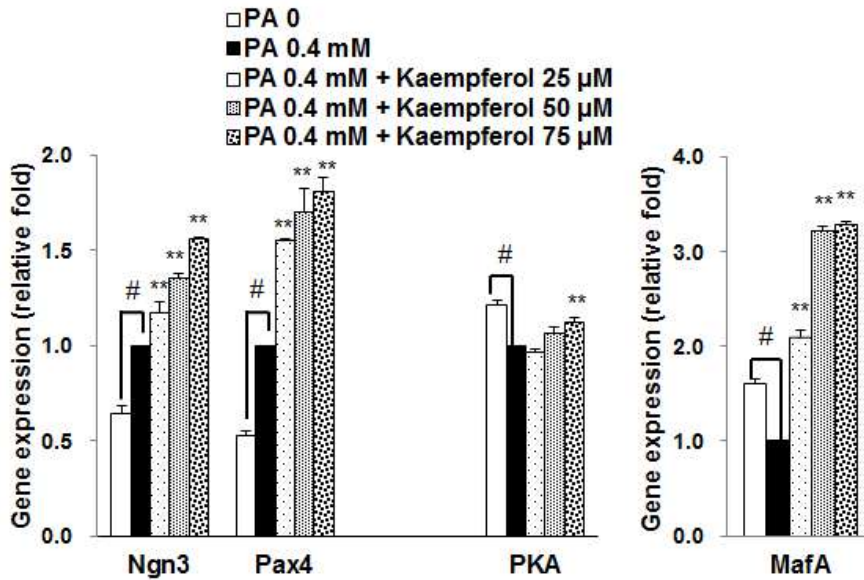


Fig. 57. Effects of kaempferol on gene expressions in PA-induced HIT-T15 cells. Cells were administered 0.4 mM PA with or without of kaempferol for 8 h and harvested mRNA to be used in qRT-PCR. #*P* < 0.01 compared with non-PA group. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01 compared with PA alone-treated group.

④ HIT-T15 세포에서 pheophorbide a가 인슐린 분비능 및 유전자 발현에 미치는 영향

- Chlorophyll 전환체인 pheophorbide a는 항당뇨 기작 중 하나인  $\alpha$ -glucosidase 저해활성 ( $IC_{50} = 45.2 \mu\text{g/ml}$ )이 매우 높다 (대한민국특허출원 2012-0111623). 한편 HIT-T15 세포에서의 pheophorbide a의 인슐린 분비능을 측정한 결과, 0.1, 0.3  $\mu\text{M}$ 의 저농도에서도 pheophorbide a 전처리로 인해 HIT-T15 세포에서의 인슐린 분비능이 유의적으로 증가되었다 (Fig. 58).

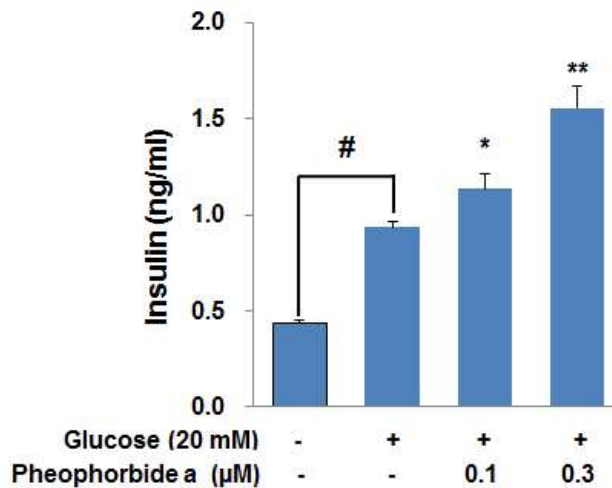


Fig. 58. Effects of pheophorbide a on the glucose-induced insulin secretion in HIT-T15 cells. HIT-T15 cells were seeded into a 24 well plate at a density of  $2 \times 10^5$  cells per well and grown for 24 h. The cells were washed twice and pre-incubated the samples for 30 min in without glucose. Then cells were treated with media containing 20 mM glucose and pheophorbide a incubated for 60 min at 37°C. After incubation, measured the insulin concentration of the media (Alpco diagnostics, insulin ELISA kit). Data were expressed as mean  $\pm$  SD. #*P* < 0.01 versus non-glucose group. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01 versus glucose alone-treated group.

- PA 유도 독성에 대한 HIT-T15 세포에서 pheophorbide a의 인슐린의 신호전달과 베타세포의 증식과 관련한 유전자의 변화를 관찰하였다. 그 결과, 저농도 (0.1, 0.3  $\mu$ M) pheophorbide a의 전처리로 proinsulin과 PKA 유전자의 발현이 유의적으로 증가되었다. HIT-T15 세포의 증식과 관련된 유전자인 MafA, Pax4 유전자 발현도 농도 의존적으로 증가되었으며, HIT-T15 세포의 분화를 조절하는 Ngn3 유전자의 발현도 유의적으로 증가되었다 (Fig. 59).

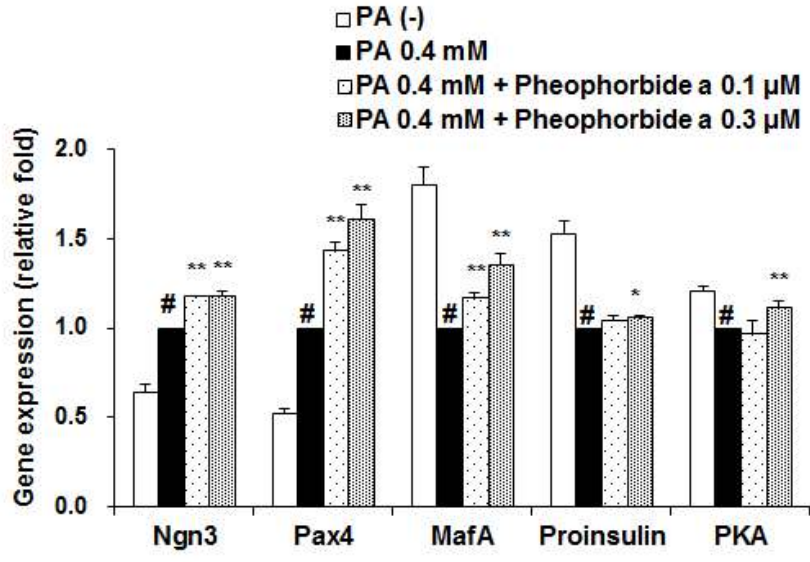


Fig. 59. Effects of pheophorbide a on proinsulin, MafA, Ngn3, and Pax4 gene expression in PA induced HIT-T15 cells. Cells were administered 0.4 mM PA with or without of pheophorbide a for 8 h and harvested for mRNA to be used in qRT-PCR. # $P < 0.01$  compared with non-PA group. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared with PA alone-treated group.

⑤ Kaempferol 및 pheophorbide a에 의한 단백질 발현의 변화

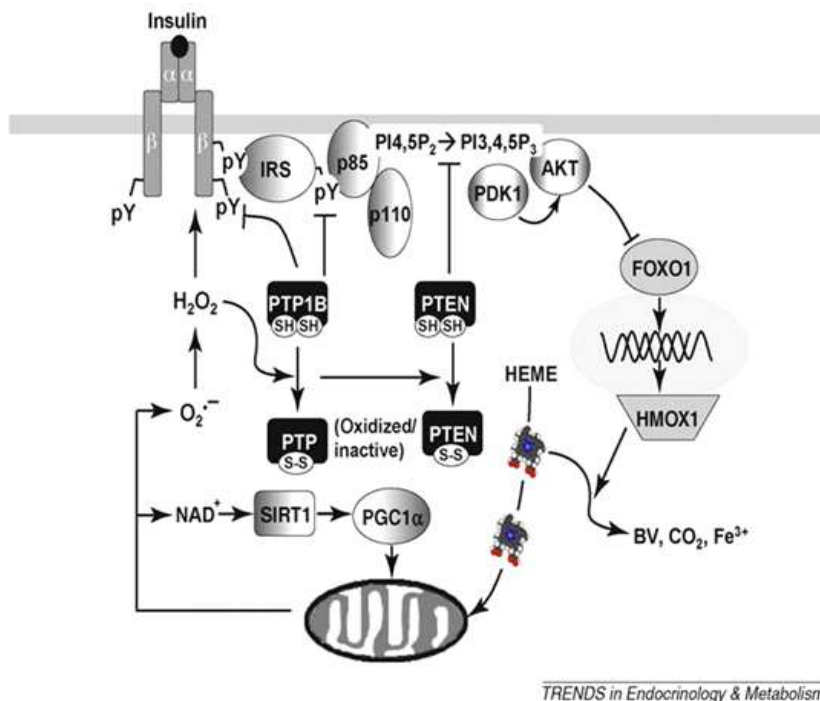


Fig. 60. Mechanistic association of insulin signaling with FoxO1 (Cheng Z *et al.*, 2010).

인슐린에 의해 IR → IRS → PI3K → AKT 신호전달이 일어나면 FoxO1이 인산화가 이루어지며 핵 내 존재하던 FoxO1 단백질이 세포질로의 translocation을 일으킨다. 그 후, 세포질 내에서 FoxO1 단백질의 degradation이 일어남으로써 FoxO1의 활성이 저해된다. 반대로 insulin 저항성을 나타내는 상황에서는 FoxO1이 활성화되고 HMOX1이 발현되면서 HEME의 산화로부터 최종적으로 PTP1B, PTEN을 통하여 인슐린 신호전달을 억제한다 (Fig. 60). 또한 베타세포에서 PA에 의해 FoxO1이 활성화되면 인슐린의 신호전달을 저해하는 것으로 알려져 있다. 따라서 위의 유전자 발현 변화를 바탕으로 캄페롤과 pheophorbide a에 의한 FoxO1과 PKA 단백질의 발현 변화를 관찰하였다.

- Kaempferol의 처리로 HIT-T15 세포에서 PA 유도독성에 대한 단백질 발현의 변화를 측정하였다. kaempferol (25~75 μM)의 전처리로 농도 의존적이면서 FoxO1 단백질의 인산화를 억제하였다. 또한 50 μM, 75 μM kaempferol 처리로 인슐린 분비를 직접적으로 조절하는 PKA 단백질의 인산화가 활성화되는 것을 확인하였다 (Fig. 61).

- Pheophorbide a의 처리로 HIT-T15 세포에서 PA 유도독성에 대한 단백질 발현의 변화를 측정하였다. 0.3 μM pheophorbide a의 전처리로 FoxO1 단백질의 인산화가 효과적으로 감소되었으며, 0.1, 0.3 μM의 pheophorbide a 처리에 의해 인슐린 분비를 직접적으로 조절하는 p-PKA 단백질이 농도 의존적으로 증가한 것을 확인하였다 (Fig. 61).

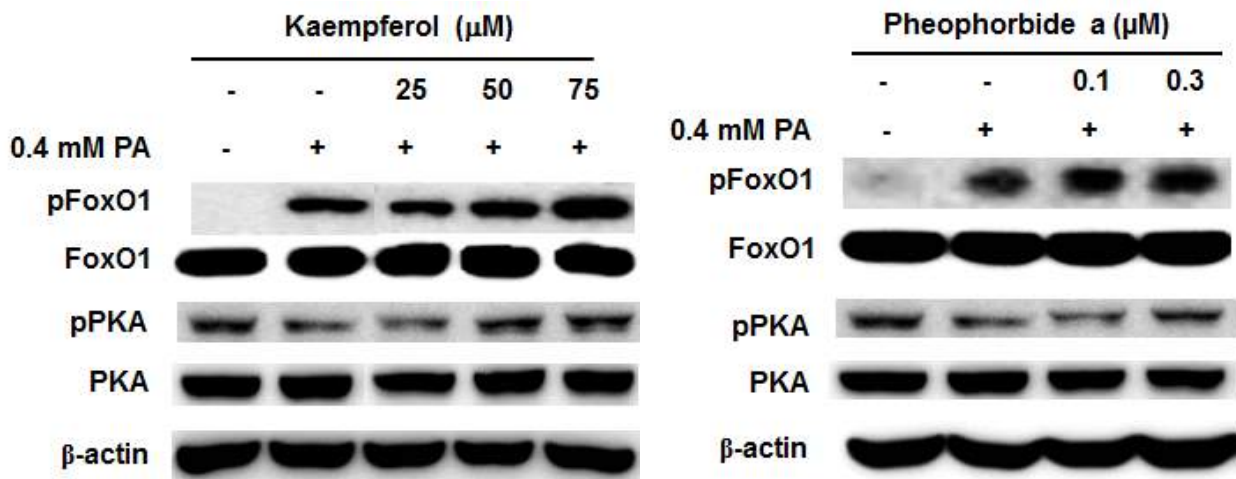


Fig. 61. Effects of kaempferol and pheophorbide a on PA-induced phosphorylation of Foxo1 and PKA protein in HIT-T15 cells. Cells were administered 0.4 mM PA with or without of kaempferol or pheophorbide a for 30 min and then Cell lysates were prepared and subjected to Western blotting using antibodies specific for (phospho-FoxO1 and FoxO1) and (phospho-PKA and PKA).

## (2) 3T3-L1 세포에서 PTH의 항비만 활성

### (가) 콩잎 EtOAc 추출물 (EASL)의 항비만 활성

#### ① 2011년도 수확 콩잎 EtOAc 추출물의 세포독성 측정

지방전구세포인 3T3-L1 섬유아세포를 이용하여 서로 다른 세 개의 콩품종인 GH, YS, WD

의 용액 EtOAc 추출물 (EASL)의 세포독성 및 성장에 대한 영향을 관찰하였다. GH-EASL, YS-EASL, WD-EASL 모두 3T3-L1 세포에서 100  $\mu\text{g/ml}$ 까지 독성을 나타내지 않았다 (Fig. 62).

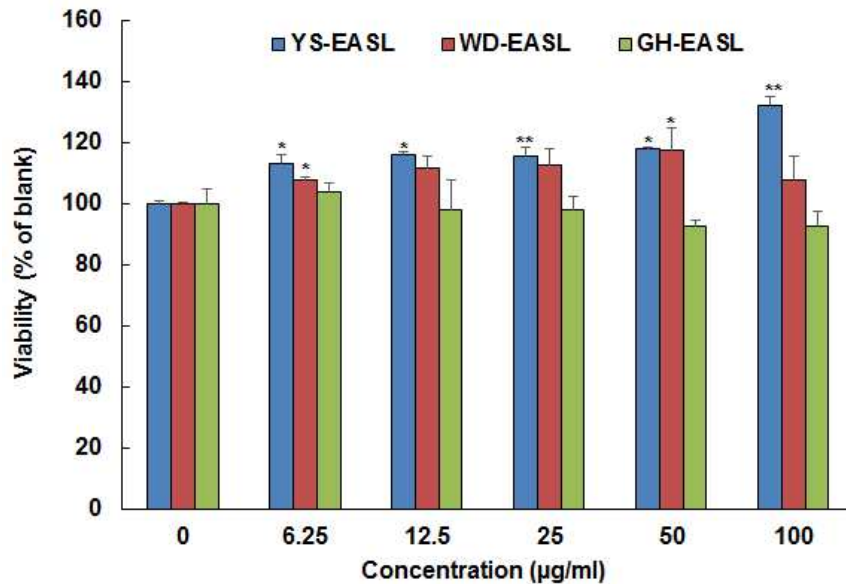
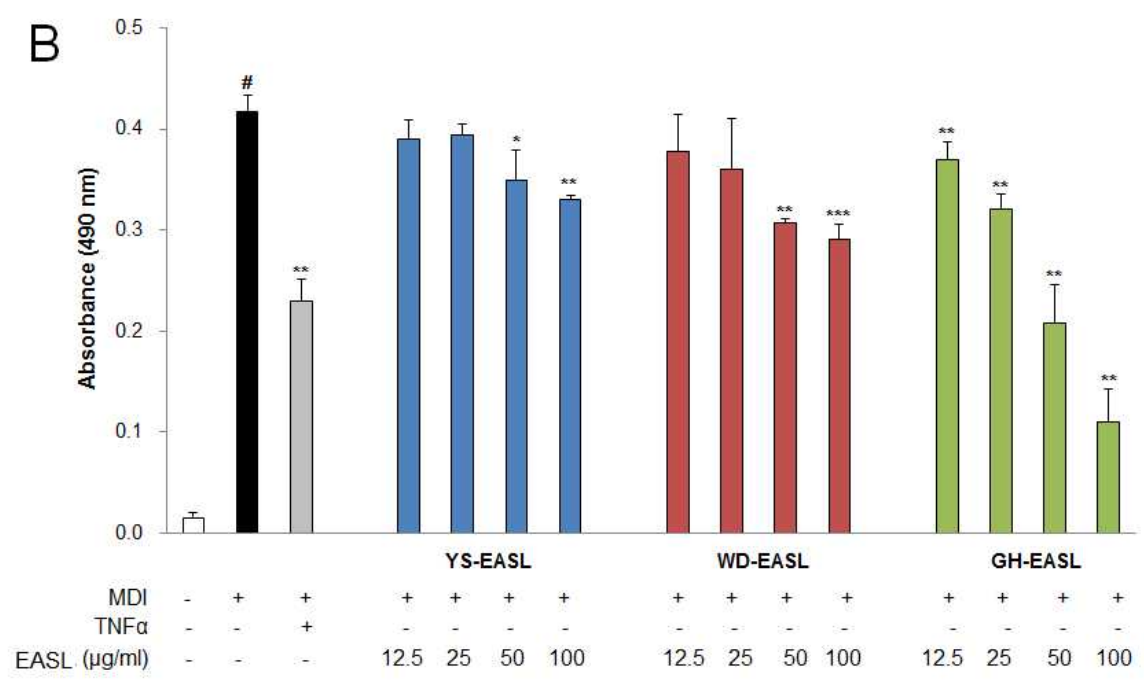
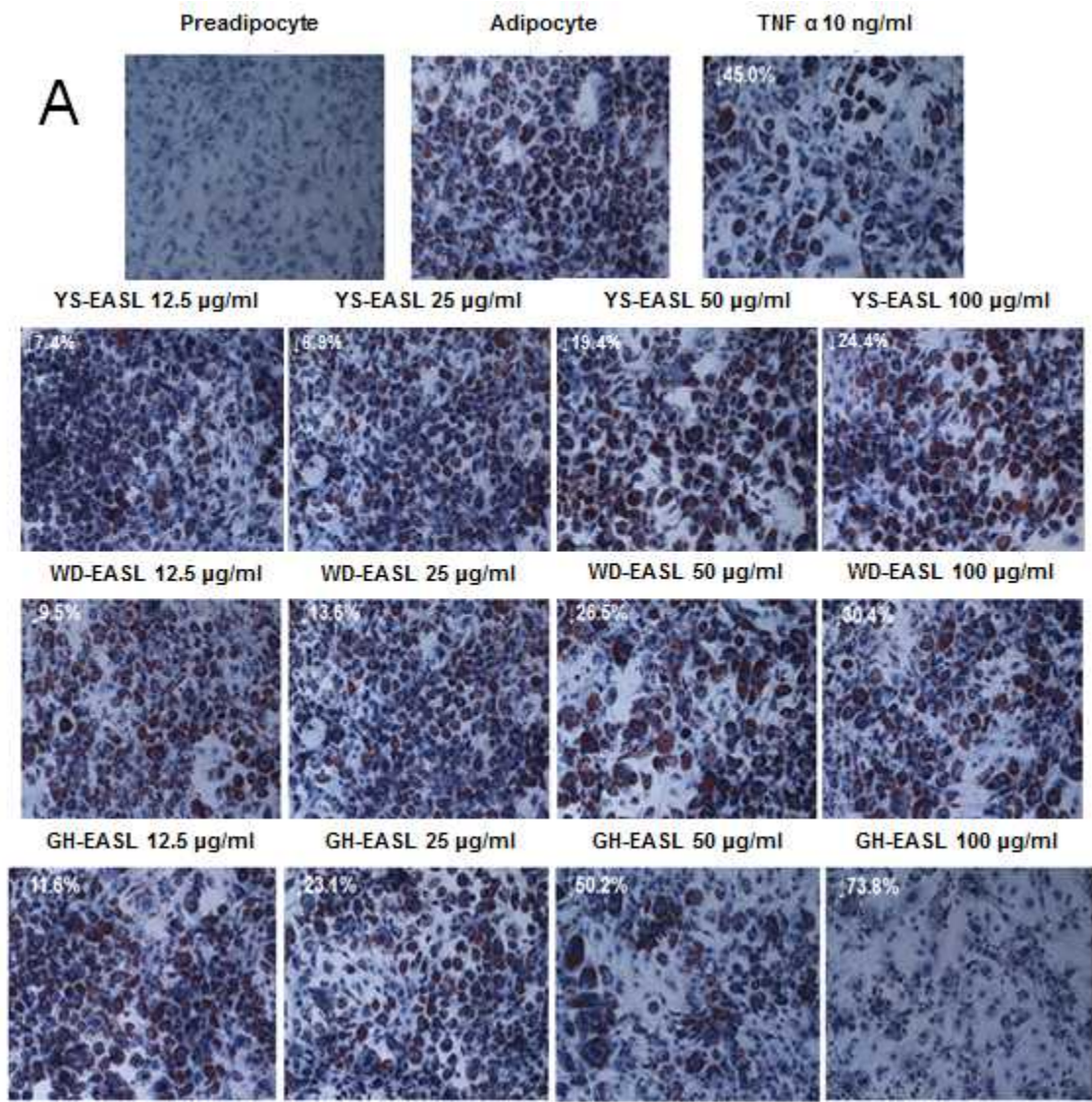


Fig. 62. The cell viabilities of EASL in 3T3-L1 cells. 3T3-L1 cells ( $5 \times 10^3/200 \mu\text{l}$ ) were grown on 96-well plate. Cells were treated with vehicle (DMSO) or indicated concentrations of samples. Forty-eight h after treatment of samples, cell viability was measured by Cyto X™ cell viability assay kit (LPS solution, Korea). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared with media alone-treated group.

## ② 2011-EASL의 지방생성 (adipogenesis) 억제 효능

YS-EASL, WD-EASL, GH-EASL의 전처리로 adipocytes의 지방축적이 감소되는 효과를 현미경상으로 관찰하였다 (Fig. 63A). 이에 축적된 지방을 isopropanol로 추출하여 490 nm에서 흡광도(OD) 값을 측정하여 그 값을 그래프로 표시하였다 (Fig. 63B). 지방축적을 사진으로 비교한 결과, YS-EASL 50  $\mu\text{g/ml}$ 에서 19.4% ( $P < 0.05$ ), WD-EASL 50  $\mu\text{g/ml}$ 에서 26.5% ( $P < 0.05$ ) TG 축적이 adipocytes에 비하여 감소되었다. GH-EASL 12.5  $\mu\text{g/ml}$  (11.6%) ~ 50  $\mu\text{g/ml}$  (50.2%)에서 농도의존적으로 adipocytes에 비해 TG 축적이 현저하게 감소되었고 ( $P < 0.01$ ), 100  $\mu\text{g/ml}$ 에서는 독성이 나타났다. 즉, 3T3-L1 세포 자체에 대한 독성은 없으나, adipocytes로 분화시킨 후에는 고농도에서 독성을 나타내었으며, GH-EASL의 지방 생성 억제 효능이 YS-EASL과 WD-EASL에 비해 월등히 좋았다.



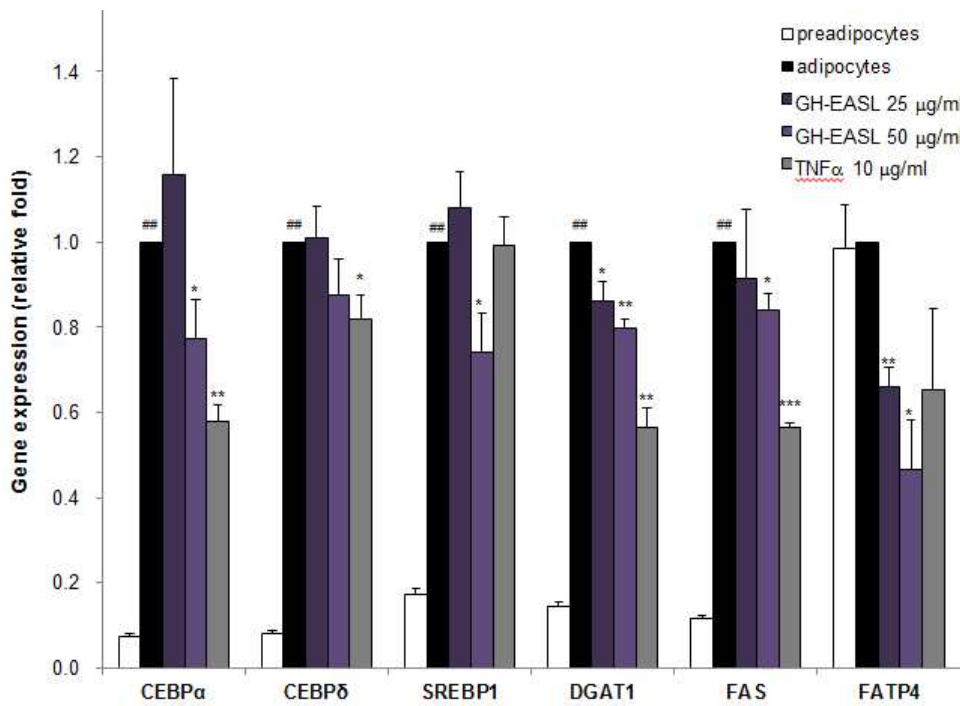


**Fig. 63. Anti-adipogenic effects of GH-EASL, YS-EASL, and WD-EASL on 3T3-L1 adipocytes.** (A) Lipid accumulation in differentiated adipocytes was assessed by Oil Red O staining. 3T3-L1 cells were photographed at magnification  $\times 200$ . (B) The stained lipid droplets in the cells were dissolved in isopropanol and quantified by measuring the absorbance at 490 nm. Data are expressed as the mean  $\pm$  SD. # $P < 0.001$  versus preadipocytes. \* $P < 0.05$  versus adipocytes. \*\* $P < 0.01$  versus adipocytes.

③ GH-EASL의 지방생성 (adipogenesis) 관련 유전자와 단백질 발현의 변화

GH-EASL 50  $\mu\text{g/ml}$ 을 처리하였을 때 지방세포의 성장을 이끄는 중요한 전사인자인 C/EBP  $\alpha$  유전자의 발현이 22.5% 감소하였고, C/EBP  $\alpha$ 와 같이 지방세포 분화에 관여하는 전사인자인 SREBP-1과 지방합성에 관여하는 FAS, DGAT1, 지방산 운반에 관여하는 FATP4의 유전자 발현이 각각 25.9%, 16.0%, 20.2%, 53.4% 감소하였다 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ) (Fig. 64).

또한, 2011 GH-EASL 50  $\mu\text{g/ml}$ 을 처리하였을 때 C/EBP  $\alpha$ , SREBP-1, FAS의 단백질 발현도 농도 의존적이면서 유의적으로 감소시켰다 (Fig. 65). 결론적으로 2011 GH-EASL의 작용기작은 지방생합성에 관여하는 유전자 및 단백질을 조절함으로써 3T3-L1 세포내의 TG 축적을 억제하는 것으로 예상된다.



**Fig. 64. Effects of 2011 GH-EASL on the regulation of ipogenesis-related genes in 3T3-L1 cells.** 3T3-L1 adipocytes differentiation was induced, two days after confluence, by 0.5 mM IBMX, 0.25  $\mu\text{M}$  DEX, and 1  $\mu\text{g/ml}$  insulin in the basal medium containing 10% FBS. And then the cells were incubated with samples. After 50 h 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. ## $P < 0.001$  versus preadipocytes \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  versus adipocytes.

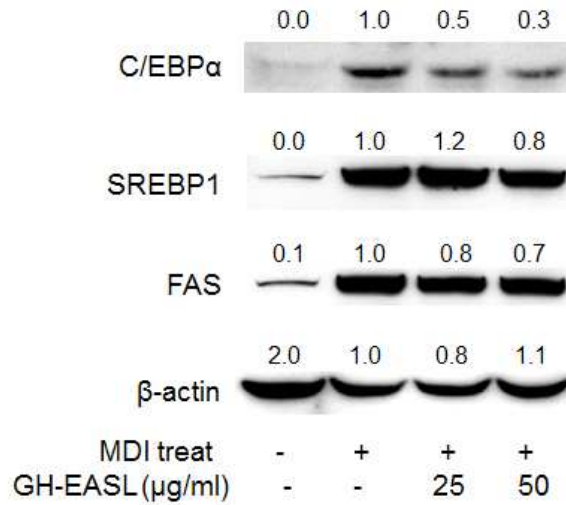


Fig. 65. Effects of GH-EASL on the expression of lipogenesis-related proteins in 3T3-L1 cells. cells ( $2 \times 10^5$  cells/60 $\phi$ ) treated with 25  $\mu$ g/ml or 50  $\mu$ g/ml GH-EASL for 96 h and lysed. proteins were detected by Western blot using their specific antibodies.

#### (나) GH-70ESL-MPLC 분획의 항비만 활성

##### ① GH-70ESL-MPLC 분획의 세포독성 측정

GH-70ESL-MPLC 분획 (Fig. 47 참조)을 3T3-L1 세포에 농도별로 처리하여 독성실험을 수행한 결과, 100  $\mu$ g/ml에서 Fr. 2와 Fr. 4는 세포의 생존 능력을 각각 25.3%, 15.5% 씩 억제하였다 (Fig. 66).

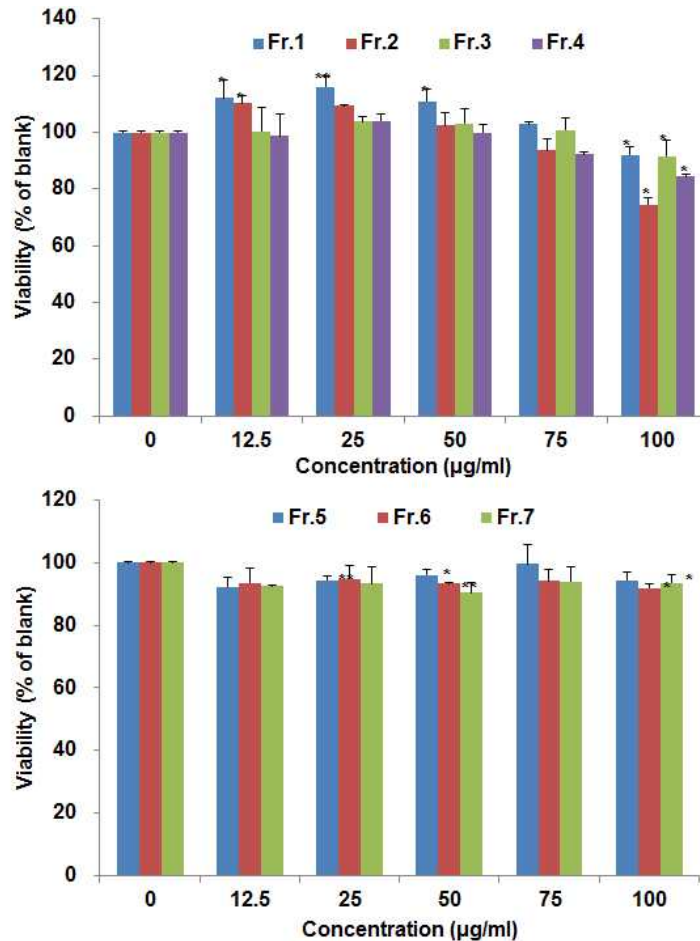
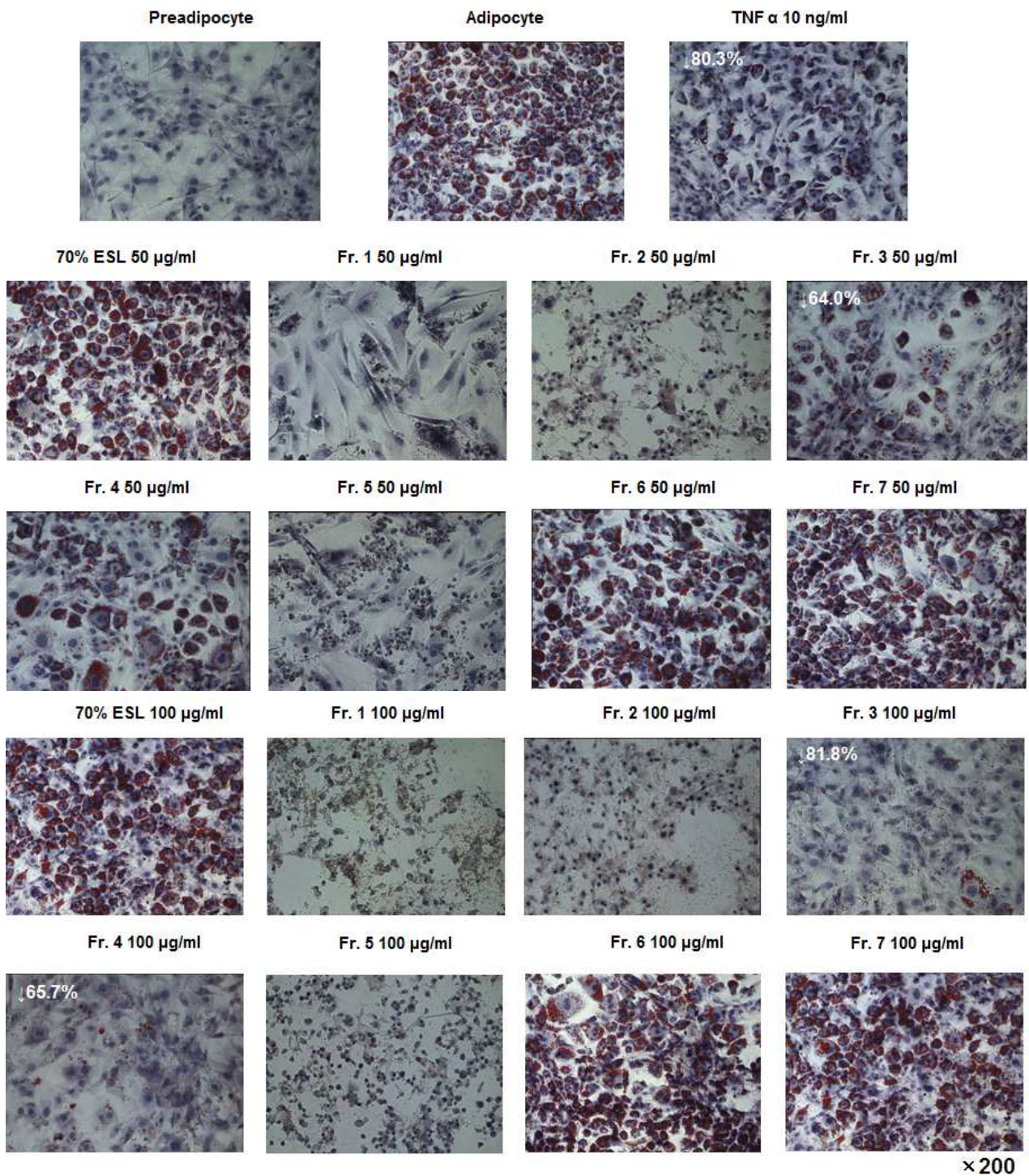


Fig. 66. Cell viabilities of MPLC fractions from GH-70ESL in 3T3-L1 cells. 3T3-L1 cells ( $5 \times 10^3/200 \mu\text{l}$ ) were grown on 96-well plate. Cells were treated with vehicle (DMSO) or indicated concentrations of samples. Forty-eight h after treatment of samples, cell viability was measured by Cyto X™ cell viability assay kit (LPS solution, Korea). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared with media alone-treated group.

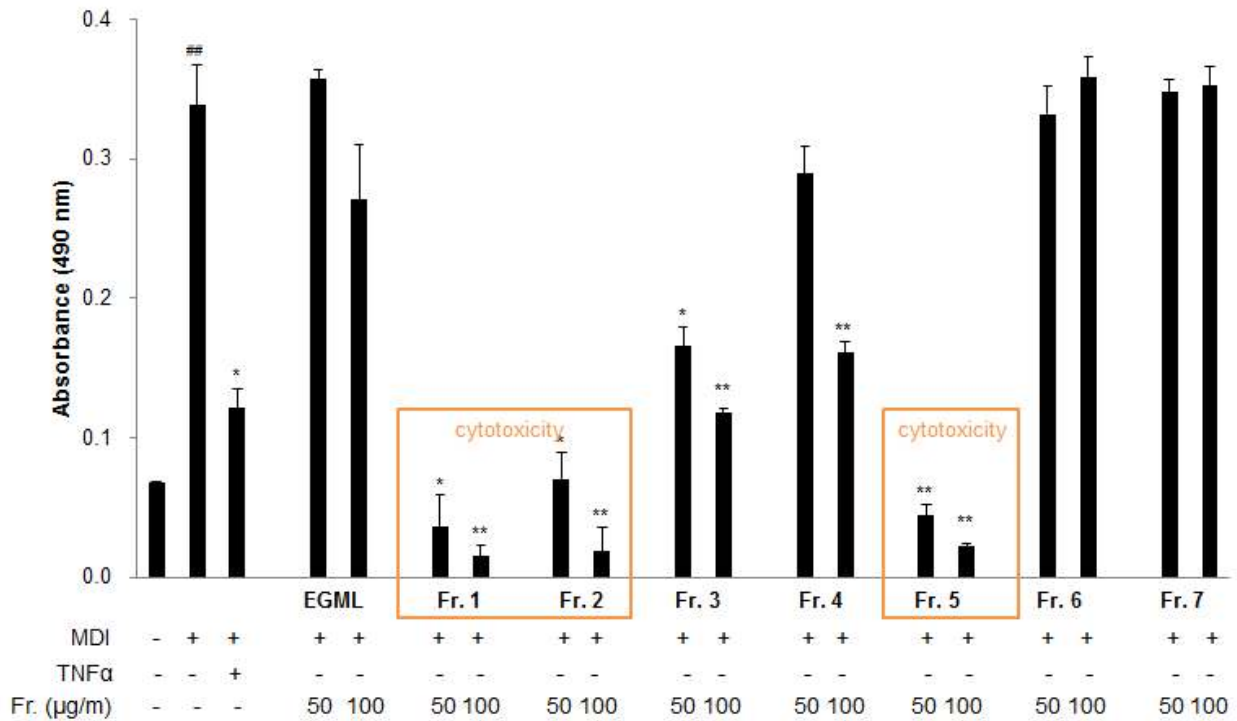
## ② GH-70ESL-MPLC 분획의 지방생성 억제 효능

지방축적을 사진으로 비교한 결과, 분획 후에 Fr. 1, Fr. 2, Fr. 5는 50  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$ 에서 독성이 나타났다. Fr. 3과 Fr. 4의 전처리로 adipocytes에 비해 지방 축적이 현저하게 감소되는 효과를 확인하였다. 또한 Fr. 6과 Fr. 7은 TG 축적을 억제하는 효능이 나타나지 않았다 (Fig. 67).

이 결과를 정량화하기 위해 isopropanol로 추출하여 490 nm에서 흡광도를 측정한 결과를 그림 68에 표시하였다. Fr. 3을 50  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 처리하였을 때, adipocytes에 비해 지방축적이 각각 64.0%, 81.8% 씩 감소되었다 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). 또한 Fr. 4를 100  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 처리하였을 때, adipocytes에 비해 지방축적이 65.7% 감소되는 효과를 확인하였다 ( $P < 0.01$ ).



**Fig. 67. Anti-adipogenic effects of MPLC fractions from GH-70ESL on 3T3-L1 adipocytes.** Two-day post-confluent 3T3-L1 preadipocytes (day 0) were treated MDI (IBMX, DEX, insulin) with the indicated concentrations of MPLC fractions every day for 4 days. Cells treated with 0.1% DMSO were used as controls (adipocytes). The assays were performed on fully differentiated adipocytes (day 7). Lipid accumulation in differentiated adipocytes was assessed by Oil Red O staining. 3T3-L1 cells were photographed at magnification ×200.



**Fig. 68. Anti-adipogenic effects of MPLC fractions from GH-70ESL on 3T3-L1 adipocytes.** Two-day post-confluent 3T3-L1 preadipocytes (day 0) were treated MDI (IBMX, DEX, insulin) with the indicated concentrations of MPLC fractions every day for 4 days. Cells treated with 0.1% DMSO were used as controls (adipocytes). The assays were performed on fully differentiated adipocytes (day 7). 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. # $P < 0.05$  versus preadipocytes. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , versus adipocytes.

### ③ MPLC-Fr. 3의 지방생성 관련 유전자 발현의 변화

Phaseol 함유 분획인 Fr. 3 (Fig. 45 참조)을 12.5~100  $\mu$ g/ml 농도로 지방세포에 처리하였을 때 지방세포의 성장을 이끄는 중요한 전사인자인 C/EBP $\alpha$ 와 PPAR $\gamma$ 의 유전자 발현 및 C/EBP $\alpha$ 와 같이 지방세포 분화에 관여하는 전사인자인 SREBP-1 유전자 발현이 농도 의존적으로 감소하였다. 또한 이들 전사인자에 의해 조절되고 지방합성에 관여하는 유전자인 FAS, DGAT1, 지방산 운반에 관여하는 FATP4의 유전자 발현이 Fr. 3 (50  $\mu$ g/ml)을 처리하였을 때 각각 58.7%, 68.9%, 53.8% 감소하였다 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). 결론적으로 phaseol이 주성분으로 함유되어 있는 Fr. 3은 지방생합성에 관여하는 유전자를 조절함으로써 지방세포내의 TG 축적을 억제하는 것으로 예상된다 (Fig. 69).

### ④ MPLC-Fr. 3의 지방분해 (lipolysis) 관련 유전자 발현의 변화

Phaseol 함유 분획인 Fr. 3를 50~100  $\mu$ g/ml 농도로 지방세포에 처리하였을 때 지방분해 효소인 HSL이 농도 의존적으로 증가하였고, 지방산 산화를 조절하는 CPT1과 에너지 항상성을 유지시키고 갈색지방세포로의 분화에 관여하는 PGC1의 유전자 발현이 농도 의존적으로 증가하였다 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). 결론적으로 phaseol이 함유되어 있는 Fr. 3은 지방분해, 지방산 산화 및 발열반응에 관여하는 유전자를 조절함으로써 지방세포내의 TG 축적을 억제하는 것으로 예상된다 (Fig. 70).

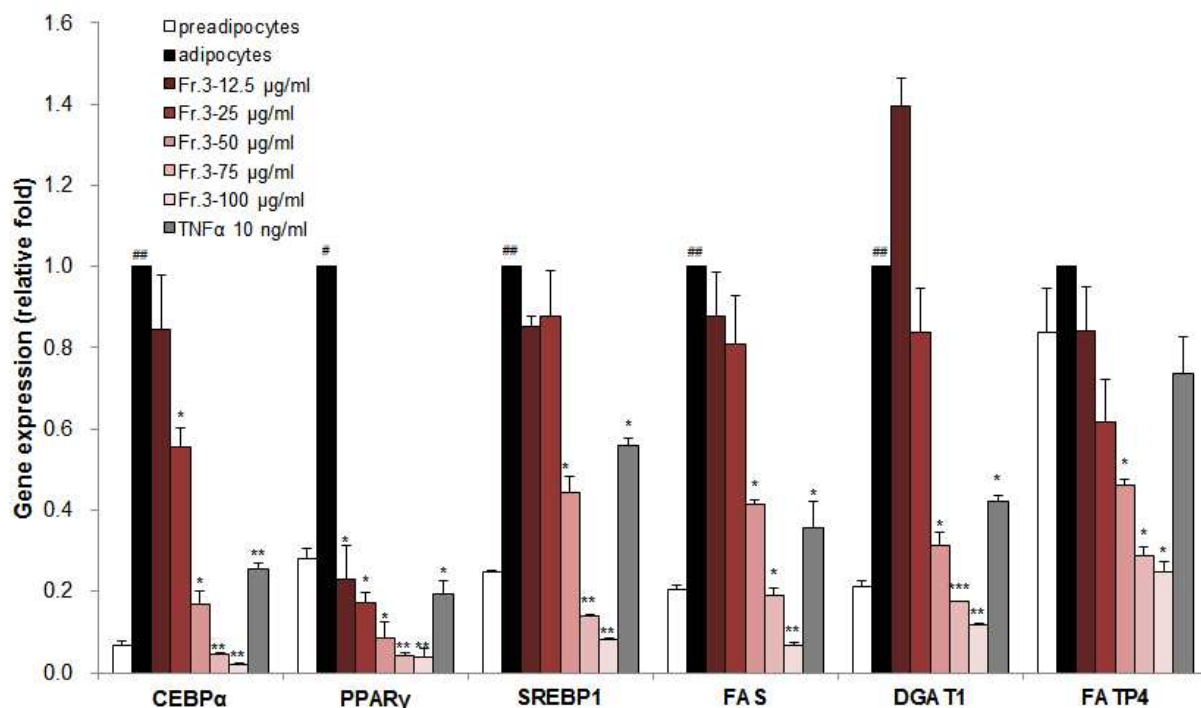


Fig. 69. Effects of MPLC-Fr. 3 isolated from GH-70ESL on the regulation of adipogenesis related genes in 3T3-L1 cells. 3T3-L1 adipocytes differentiation was induced, two days after confluence, by 0.5 mM IBMX, 0.25  $\mu$ M DEX, and 1  $\mu$ g/ml insulin in the basal medium containing 10% FBS. And then the cells were incubated with 50~100  $\mu$ g/ml Fr. 3 for the differentiation period. After 50 h 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. # $P$  < 0.05, ## $P$  < 0.01 versus preadipocytes \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01, \*\*\* $P$  < 0.001 versus adipocytes.

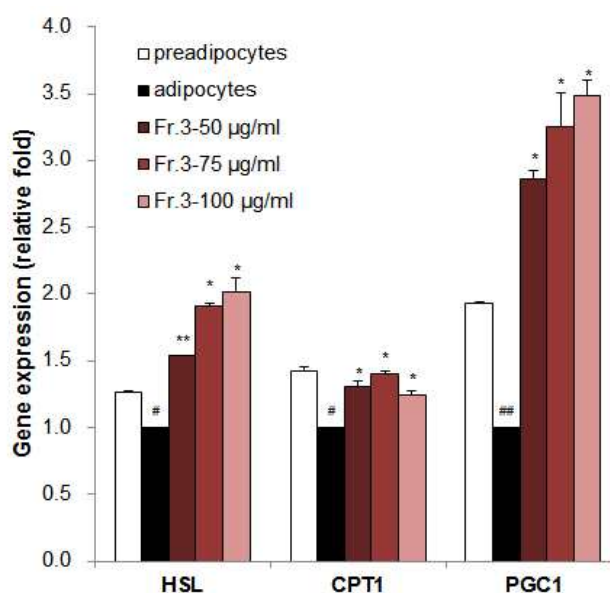


Fig. 70. Effects of MPLC-Fr. 3 isolated from GH-70ESL on the regulation of lipolysis related genes in 3T3-L1 cells. 3T3-L1 adipocytes differentiation was induced, two days after confluence, by 0.5 mM IBMX, 0.25  $\mu$ M DEX, and 1  $\mu$ g/ml insulin in the basal medium containing 10% FBS. And then the cells were incubated with 50~100  $\mu$ g/ml Fr. 3 for the differentiation period. After 50 h 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. # $P$  < 0.05, ## $P$  < 0.01 versus preadipocytes \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01, \*\*\* $P$  < 0.001 versus adipocytes.

⑤ MPLC-Fr. 4의 지방생성 관련 유전자 발현의 변화

Coumestrol 함유 분획인 Fr. 4 (50~100  $\mu\text{g/ml}$ )를 지방세포에 처리하였을 때 지방세포의 성장을 이끄는 중요한 전사인자인 C/EBP $\alpha$ 와 PPAR $\gamma$  유전자의 발현이 농도 의존적으로 감소하였고, C/EBP $\alpha$ 와 같이 지방세포 분화에 관여하는 전사인자인 SREBP-1 유전자의 발현이 농도 의존적으로 감소하였다. 또한 Fr. 4 (100  $\mu\text{g/ml}$ )를 처리하였을 때 이들 전사인자에 의해 조절되는 지방합성에 관여하는 유전자인 FAS와 DGAT1, 지방산 운반에 관여하는 aP2와 FATP4 유전자의 발현이 각각 68.2%, 47.8%, 57.9%, 58.7% 씩 감소하였다. 그리고 acetyl-CoA로부터 지방산을 합성하는 과정에 관여하는 유전자인 ACC1 유전자의 발현도 감소하였다 ( $P < 0.01$ ) (Fig. 71). 결론적으로 coumestrol이 함유되어 있는 Fr. 4는 phaseol이 함유되어 있는 Fr. 3보다는 효과가 낮지만 같은 기작에 의해 지방생합성에 관여하는 유전자를 조절함으로써 지방세포내의 TG 축적을 억제하는 것으로 예상된다.

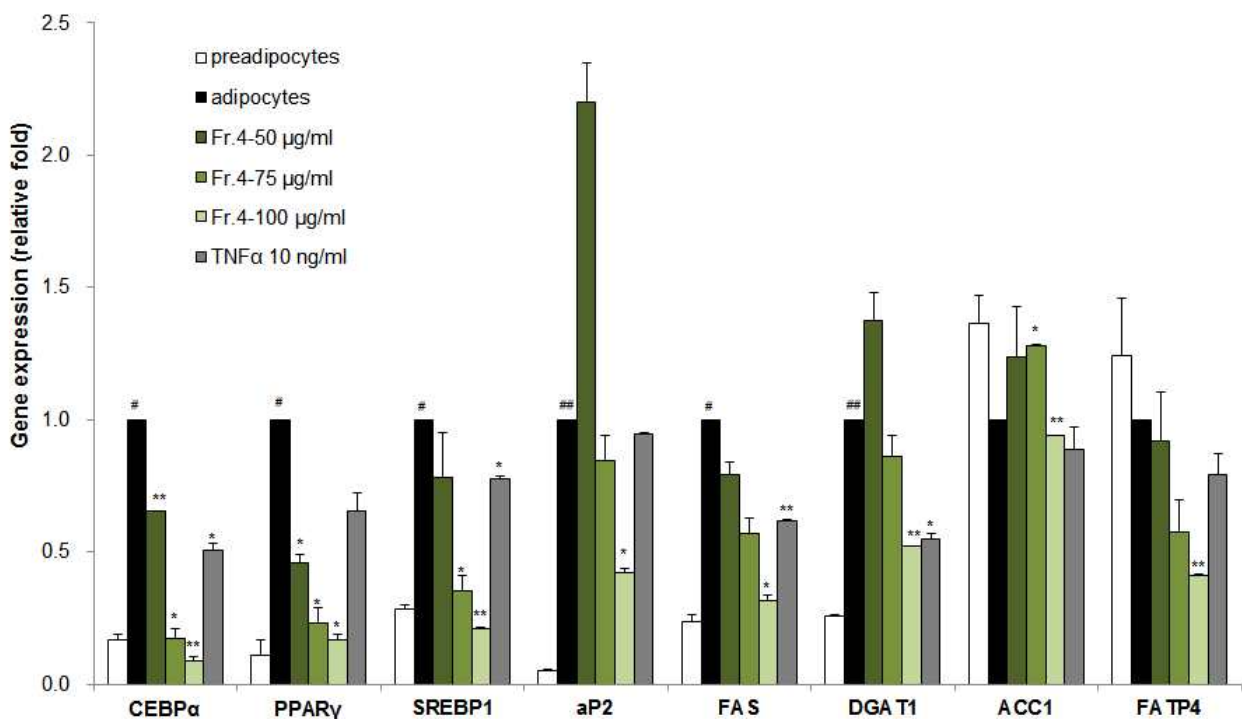
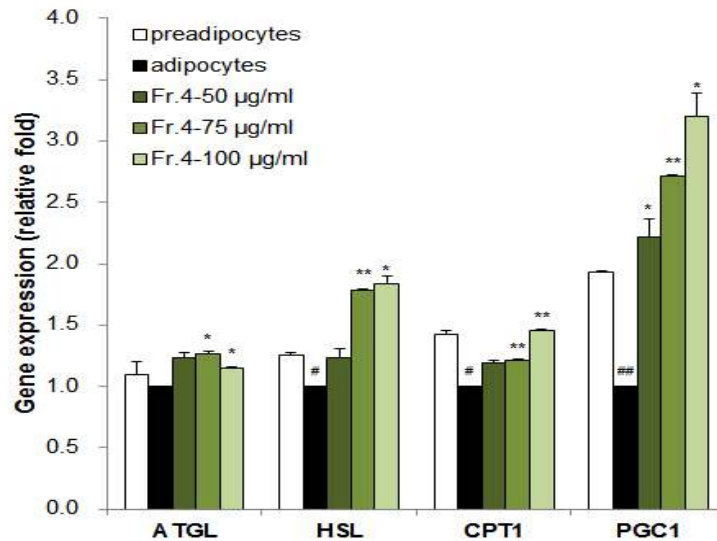


Fig. 71. Effects of MPLC-Fr. 4 isolated from GH-70ESL on the regulation of genes in 3T3-L1 cells. 3T3-L1 adipocytes differentiation was induced, two days after confluence, by 0.5 mM IBMX, 0.25  $\mu\text{M}$  DEX, and 1  $\mu\text{g/ml}$  insulin in the basal medium containing 10% FBS. And then the cells were incubated with 50~100  $\mu\text{g/ml}$  Fr. 4 for the differentiation period. After 50 h 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. # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  versus preadipocytes \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  versus adipocytes.

⑥ MPLC-Fr. 4의 지방분해 관련 유전자 발현의 변화

Coumestrol 함유 분획인 Fr. 4 (50~100  $\mu\text{g/ml}$ )을 지방세포에 처리하였을 때 지방분해 효소인 ATGL과 HSL의 유전자 발현이 농도 의존적으로 증가하였다. 또한 지방산 산화를 조절하는 CPT1과 에너지 항상성을 유지시키고 갈색지방세포로의 분화에 관여하는 PGC1의 유전자 발현도 농도 의존적으로 증가하였다 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ) (Fig. 72). 결론적으로 coumestrol이 함유되어 있는 Fr. 4는 지방분해, 지방산 산화 및 발열반응에 관여하는 유전자를 조절함으로써 지방세포내의 TG 축적을 억제하는 것으로 예상된다.



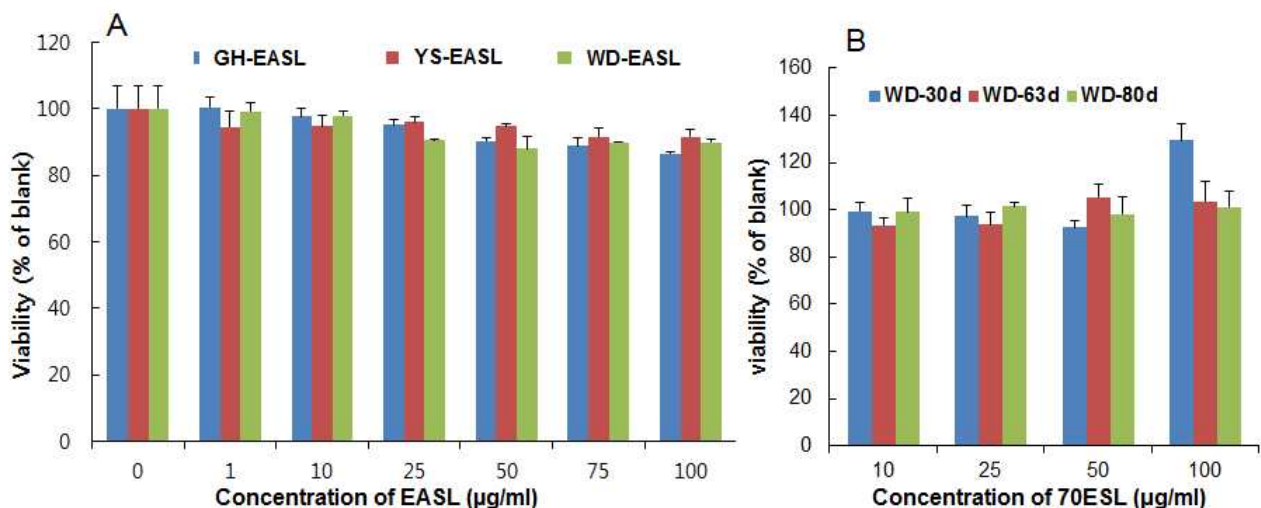
**Fig. 72. Effects of MPLC-Fr. 4 isolated from GH-70ESL on the regulation of genes in 3T3-L1 cells.** 3T3-L1 adipocytes differentiation was induced, two days after confluence, by 0.5 mM IBMX, 0.25  $\mu$ M DEX, and 1  $\mu$ g/ml insulin in the basal medium containing 10% FBS. And then the cells were incubated with 50~100  $\mu$ g/ml Fr. 4 for the differentiation period. After 50 h 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. # $P$  < 0.05, ## $P$  < 0.01 versus preadipocytes \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01, \*\*\* $P$  < 0.001 versus adipocytes.

### (3) RAW264.7 세포에서 PTH의 항염증 활성

#### (가) 70ESL과 EASL의 항염증 활성 비교

##### ① EASL과 70ESL의 세포독성 측정

대식세포인 RAW264.7 세포를 이용하여 대표적인 3품종 수확콩잎 (GH, YS, WD)의 PTH에 해당하는 EASL과 70ESL, 시기별 WD-70ESL의 세포독성 및 성장에 대한 영향을 관찰하였다. 세포독성을 측정한 모든 시료는 100  $\mu$ g/ml까지 독성을 나타내지 않았다 (Fig. 73),



**Fig. 73. The cell viabilities of 70ESLs and EASLs in RAW264.7 cells.** Cells were treated with vehicle (DMSO) or indicated concentrations of EASLs and 70ESLs. Forty-eight h after treatment of extracts, cell viability was measured by Cyto X™ cell viability assay kit.



② 70ESL과 EASL의 NO의 생성 억제 효능 비교

GH-70ESL과 YS-70ESL은 NO 생성 저해활성이 낮은 반면에 WD-70ESL은 50  $\mu\text{g/ml}$ 에서 36.3%, 100  $\mu\text{g/ml}$ 에서 67.3% 씩 NO 생성을 억제하였다. 또한 YS-EASL과 WD-EASL은 NO 생성 저해활성이 낮은 반면에, GH-EASL은 50  $\mu\text{g/ml}$ 에서 31.4%, 100  $\mu\text{g/ml}$ 에서 50.0% 씩 NO 생성을 억제하였다 (Table 24). 결과적으로 YS는 NO 생성 억제 활성이 없으며, WD는 70ESL이, GH는 EASL에서 NO 생성 억제 활성을 나타내었다. 따라서 WD-70ESL은 상대적으로 극성물질이, GH-EASL는 상대적으로 비극성물질이 NO 생성 저해활성을 나타낼 것으로 추측된다.

③ 70ESL과 EASL의 ROS의 축적 억제 효능 비교

세 개의 다른 품종인 콩잎의 70ESL, EASL은 모두 50, 100  $\mu\text{g/ml}$ 에서 ROS 축적을 억제하였으며, GH-70ESL과 GH-EASL이 다른 품종의 콩잎보다 효과적으로 ROS 축적을 억제하였다 (Table 24). 전반적으로 70ESL이 EASL보다 ROS 축적 억제능이 높은 것으로부터 테로카판 화합물도 ROS 축적 억제능이 있지만, 70ESL에 다량 함유된 것으로 알려진 kaempferol 배당체 또는 이소플라본이 ROS의 축적억제능이 작용한 것으로 판단된다.

Table 24. Effects of various 70ESLs and EASLs on the NO production and ROS accumulation in LPS-induced RAW264.7 cells

Samples	Inhibition of NO production (%)		Inhibition of ROS accumulation (%)	
	50 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$
GH-70ESL	9.7 $\pm$ 1.9	24.8 $\pm$ 2.8	<b>71.6 <math>\pm</math> 3.2</b>	<b>81.2 <math>\pm</math> 1.7</b>
YS-70ESL	0	0	49.9 $\pm$ 1.3	70.4 $\pm$ 4.6
WD-70ESL	<b>36.3 <math>\pm</math> 3.8</b>	<b>67.3 <math>\pm</math> 6.6</b>	50.9 $\pm$ 3.3	71.9 $\pm$ 2.0
GH-EASL	<b>31.4 <math>\pm</math> 1.7</b>	<b>50.0 <math>\pm</math> 4.5</b>	<b>52.3 <math>\pm</math> 8.7</b>	<b>61.0 <math>\pm</math> 1.4</b>
YS-EASL	2.9 $\pm$ 1.4	19.6 $\pm$ 2.6	48.4 $\pm$ 2.7	57.0 $\pm$ 3.9
WD-EASL	8.5 $\pm$ 0.6	20.6 $\pm$ 2.6	43.0 $\pm$ 8.2	56.0 $\pm$ 5.2

다음으로는 NO 생성 억제 및 ROS 축적 억제능을 모두 나타내는 WD-70ESL의 수확시기별 시료의 NO 생성 억제 및 ROS 축적 억제능을 측정하였다 (Table 25). NO 생성 억제능은 30일 령과 63일령은 큰 차이가 없으나, 재배기간이 길어진 성숙한 잎 (80일령)에서 다소 감소하였다. ROS 축적 억제능도 63일령에서 가장 높고, 이후 다시 감소하였다.

Table 25. Effects of WD-70ESLs having different cultivating duration on the NO production and ROS accumulation in LPS-induced RAW264.7 cells

Samples	Inhibition of NO production (%)		Inhibition of ROS accumulation (%)	
	50 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$
WD-30d-70ESL	37.4 $\pm$ 2.3	<b>72.4 <math>\pm</math> 4.2</b>	15.2 $\pm$ 2.4	29.1 $\pm$ 1.7
WD-63d-70ESL	40.9 $\pm$ 3.7	<b>71.4 <math>\pm</math> 2.3</b>	<b>31.0 <math>\pm</math> 2.1</b>	<b>49.2 <math>\pm</math> 2.8</b>
WD-80d-70ESL	33.5 $\pm$ 4.3	56.7 $\pm$ 2.3	25.5 $\pm$ 2.9	32.8 $\pm$ 0.1

(4) 테로카판계 화합물 coumestrol, isotrifoliol, phaseol 및 콩잎 함유 화합물들의 *in vitro* 생리활성

EASL에 함유된 테로카판계 화합물 중 가장 많은 함유량을 나타내는 것은 coumestrol이며, isotrifoliol과 phaseol도 함유하고 있으며, 본 연구팀이 EASL로부터 이들 단일화합물들을 분리하였다. 또한 선행 연구를 통해 확보하였거나, Sigma사로부터 구입한 콩잎이 함유하는 화합물들의 여러 가지 대사성질환 타겟에 대한 *in vitro* 생리활성을 측정하였다.

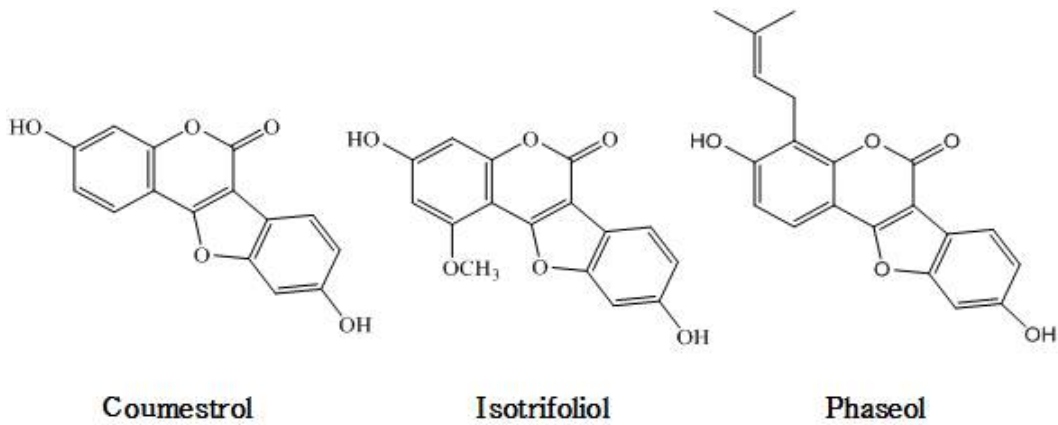


Fig. 74. Chemical structures of coumestrol, isotrifoliol, and phaseol.

(가) Yeast  $\alpha$ -glucosidase 저해활성

테로카판 화합물의 yeast  $\alpha$ -glucosidase 저해 활성을 살펴본 결과, coumestrol, isotrifoliol, phaseol의  $IC_{50}$  값은 각각  $5.6 \mu M$ ,  $23.0 \mu M$ ,  $2.61 \mu M$ 로 매우 강한  $\alpha$ -glucosidase 저해 활성을 나타냈다.

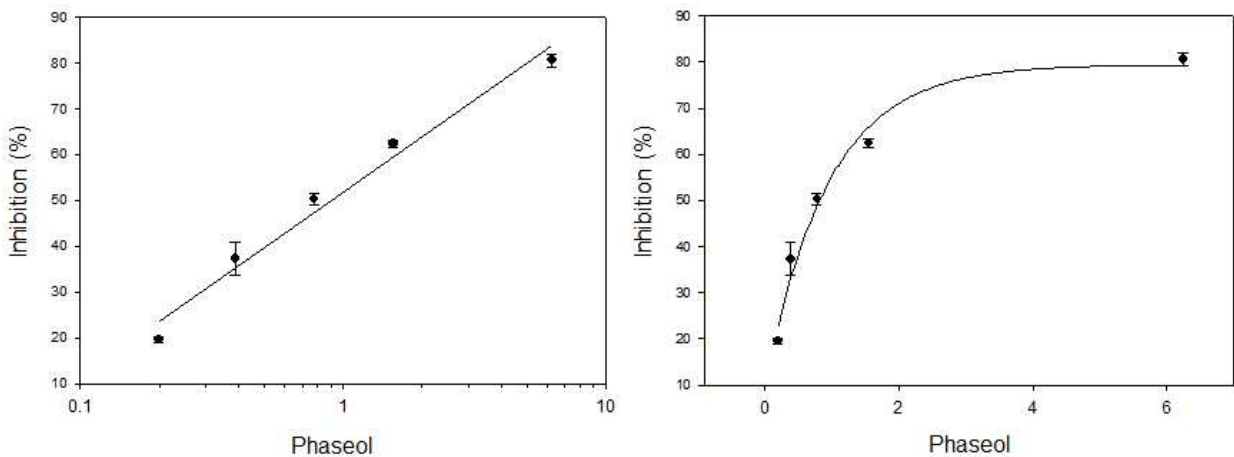


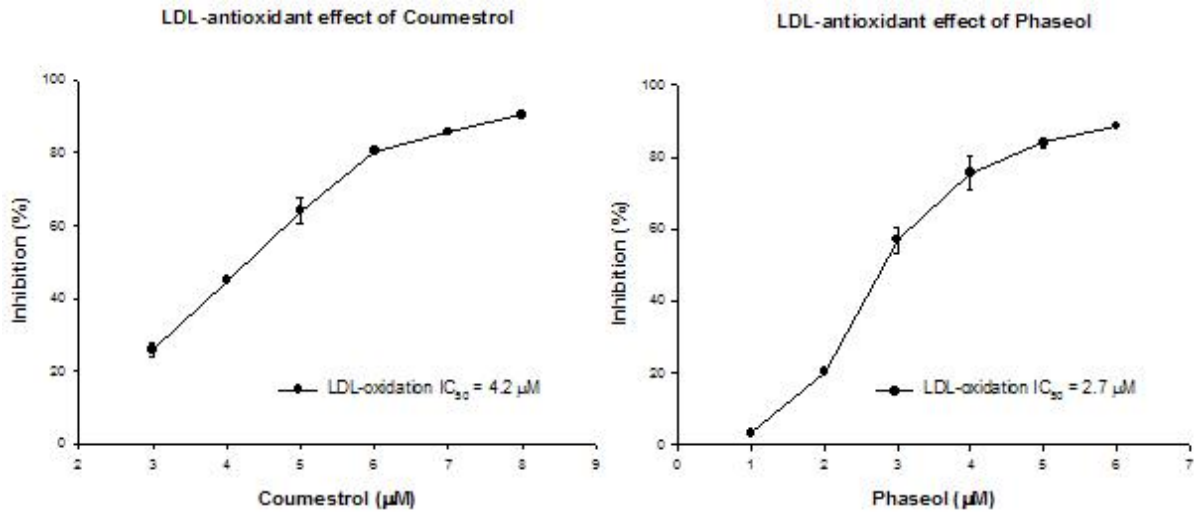
Fig. 75. Yeast  $\alpha$ -glucosidase inhibitory effect of phaseol isolated from soy leaves.

(나) LDL-산화 저해활성

Coumestrol, isotrifoliol, phaseol과 함께 보유한 콩잎 함유 화합물의 LDL-산화 저해 활성을 측정하여 표 25에 정리하였다. Coumestrol, isotrifoliol과 phaseol은  $10 \mu M$  농도에서 각각  $84.3 \pm 0.1\%$ ,  $82.6 \pm 1.9\%$ , 그리고  $85.9 \pm 1.4\%$ 의 강한 LDL-산화 저해활성을 나타내었고,

IC<sub>50</sub> 값은 coumestrol이 4.2  $\mu$ M이고, isotrifoliol 은 4.5  $\mu$ M, phaseol 이 2.7  $\mu$ M로 phaseol이 coumestrol과 isotrifoliol 보다 강한 LDL-산화 저해활성을 나타내었다 (Table 26). 또한 kaempferol도 매우 강한 LDL-산화 저해활성을 나타내었다.

Table 26. LDL-oxidation inhibitory activities of compounds isolated from soy leaves



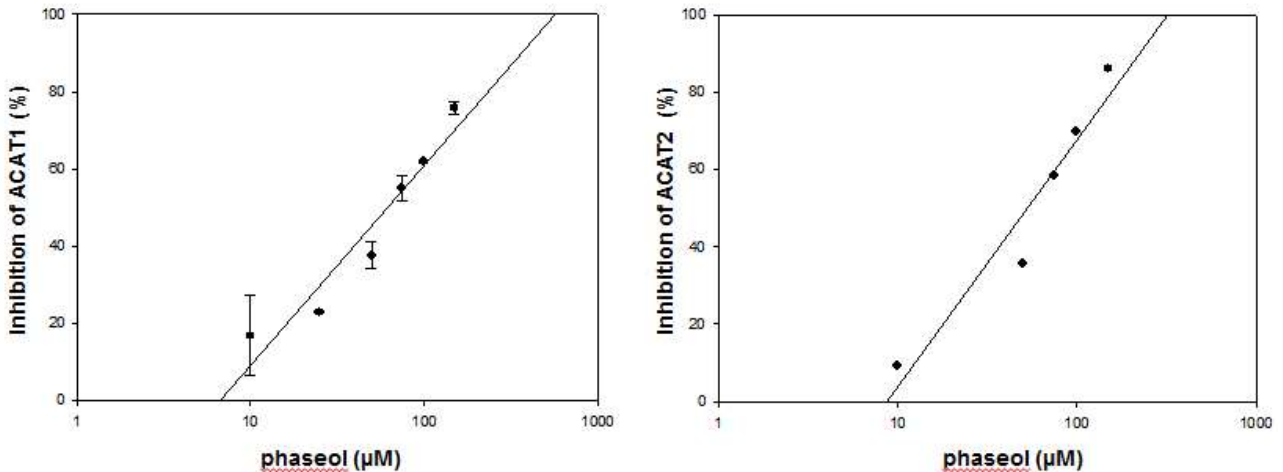
Compounds	Purity of compounds	Inhibition of LDL-oxidation (%)		
		10 $\mu$ M	100 $\mu$ M	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
Apigenin		16.0 $\pm$ 2.0	-	
Apigenin-7-O- $\beta$ -glucoside		-	33.6 $\pm$ 0.5	
Afrososin	83.3%	-	0.3 $\pm$ 1.4	
Coumestrol	95%>	<b>84.3 <math>\pm</math> 0.1</b>	<b>96.2 <math>\pm</math> 0.8</b>	<b>4.2</b>
Daidzein	98%	-	11.7 $\pm$ 0.9	
Daidzin		-	89.4 $\pm$ 0.4	<b>62.1</b>
Formononetin	99.1%	-	0.1 $\pm$ 0.2	
Genistein	98%	-	75.9 $\pm$ 0.1	
Genistin	97.3%	-	44.2 $\pm$ 0.5	
Genistin-5,4-methyl ether	87.3%	-	9.4 $\pm$ 5.2	
Glyceollin IV	95%>	4.8 $\pm$ 0.4	-	<b>43.0</b>
Glycitein	97%	-	19.1 $\pm$ 1.1	
Isotrifoliol	95%>	<b>82.6 <math>\pm</math> 1.9</b>	-	<b>4.5</b>
Kaempferol		<b>90.6 <math>\pm</math> 0.1</b>	<b>98.4 <math>\pm</math> 0.4</b>	<b>4.4</b>
Ononin	73.1%	-	0	
Phaseol	95%>	<b>85.9 <math>\pm</math> 1.4</b>	-	<b>2.7</b>

(다) hACAT 저해활성

Coumestrol과 phaseol의 hACAT1과 hACAT2 저해활성은 [1-<sup>14</sup>C] oleoyl-CoA과 cholesterol을 기질로 하여 Brecher & Chan의 방법을 일부 수정하여 측정하였다. Coumestrol, isotrifoliol을 포

함하여 콩잎에 함유된 화합물들은 hACAT1, hACAT2에 대한 저해활성이 매우 낮았다. 반면 phaseol은 75  $\mu$ M 농도에서 hACAT1, hACAT2의 활성을 각각 54.9%, 58.2%씩 저해하였고, hACAT1, hACAT2에 대한 IC<sub>50</sub> 값은 각각 61.2  $\mu$ M, 52.8  $\mu$ M로 측정되었다.

Table 27. hACAT1 and hACAT2 inhibitory activities of compounds isolated from soy leaves



Compounds	Purity of compounds	Inhibition at 100 $\mu$ M (%)	
		hACAT1	hACAT2
Apigenin		18.9 $\pm$ 0.1	9.8 $\pm$ 2.1
Apigenin-7-O- $\beta$ -glucoside		0	2.0 $\pm$ 0.6
Afromosin	83.3%	3.0 $\pm$ 0.4	0
Coumestrol	95%>	9.5 $\pm$ 0.9	4.4 $\pm$ 2.2
Daidzein	97.1%	5.4 $\pm$ 1.1	3.5 $\pm$ 1.5
Daidzin		0	0
Formononetin	99.1%	6.1 $\pm$ 3.2	1.7 $\pm$ 0.6
Genistein	98%	4.9 $\pm$ 2.5	2.7 $\pm$ 1.6
Genistin	97.3%	0	0
Genistin-5,4-methyl ether	87.3%	0	0
Glyceollin IV	95%>	29.7 $\pm$ 1.3	22.9 $\pm$ 2.5
Glycitein	97%	2.5 $\pm$ 3.3	NI
Isotrifoliol	95%>	14.9 $\pm$ 0.2	7.9 $\pm$ 1.6
Kaempferol		20.9 $\pm$ 0.4	12.1 $\pm$ 1.0
Kaempferol-3-O-rutinoside		12.8 $\pm$ 0.8	5.4 $\pm$ 2.3
Ononin	73.1%	0	0.4 $\pm$ 1.8
Phaseol	95%>	<b>85.9 <math>\pm</math> 1.1</b>	<b>67.4 <math>\pm</math> 0.5</b>
Plicadin	95%>	0	0

(라) DPP-4 저해활성 측정

Coumestrol, isotrifoliol, phaseol과 함께 보유한 콩잎 함유 화합물의 LDL-산화 저해 활성을 측정하여 표 28에 정리하였다. Coumestrol과 isotrifoliol이 100  $\mu$ M 농도에서 각각 38.2  $\pm$

0.8%,  $39.7 \pm 0.8\%$ 의 DPP-4 저해활성을 나타내었다. DPP-4는 당뇨병 치료제 개발의 좋은 타겟이나 개발된 신약은 대부분은 합성화합물이며, 천연물 중에서 DPP-4 저해활성을 나타내는 물질은 많이 알려져 있지 않다. 따라서 위의 Table 22에서 언급한 EASL의 DPP-4 저해활성은 테로카판 화합물의 함량과 상관관계가 있는 것으로 판단된다. 또한 apigenin-7-O- $\beta$ -glucoside 와 kaempferol이 비교적 강한 DPP-4 저해활성을 나타내었다.

Table 28. DPP-4 inhibitory activities of compounds isolated from soy leaves

Compounds	Purity of compounds	DPP-4 Inhibition at 100 $\mu$ M (%)
Apigenin		$6.6 \pm 0.31$
Apigenin-7-O- $\beta$ -glucoside		<b><math>35.8 \pm 1.4</math></b>
Afromosin	83.3%	$18.2 \pm 1.0$
Coumestrol	95%>	<b><math>38.2 \pm 0.8</math></b>
Daidzein	97.1%	0
Daidzin		0
Formononetin	99.1%	$1.8 \pm 1.0$
Genistein	98%	$3.3 \pm 1.3$
Genistin	97.3%	0
Genistin-5,4-methyl ether	87.3%	$5.1 \pm 1.5$
Glyceollin IV	95%>	$6.2 \pm 1.1$
Glycitein	97%	$0.2 \pm 2.3$
Isotrifoliol	95%>	<b><math>39.7 \pm 0.8</math></b>
Kaempferol		<b><math>39.6 \pm 6.1</math></b>
Luteolin		$23.2 \pm 2.5$
Ononin	73.1%	0
Phaseol	95%>	$14.4 \pm 0.1$

#### 사. 마우스모델에서 PTH의 지방 흡수 (lipid absorption) 저해효과 측정

선행연구를 통해 대사증후군 관련 여러 가지 타겟에 대해 높은 활성을 나타내는 GH1-102 일령과 WD-105일령 두 품종의 70ESL과 EASL의 지방 흡수 저해 효과를 검증하고자 하였다.

C57BL/6J 응성 마우스를 대조군과 2 개의 시험군으로 GH1-102d-70ESL군, WD-105d-70ESL군으로 세 그룹으로 나누었고, 지방 흡수 저해 효능실험 전 18 시간 동안 절식시켰다. 2 개의 시험군은 각각 시료를 500 mg/kg body wt으로 경구 투여하고 30 분 뒤 corn oil (C8267, Sigma) 250  $\mu$ l을 경구 투여하여 지질 흡수를 유도하였다. 이로부터 각각 0, 1, 2, 4 시간 후에 후안와 정맥총에서 혈액을 채취하여 혈장 TG를 측정하였다. GH1-102d 70ESL의 투여로 corn oil을 투여하고 1 시간 후에 대조군에 비해 혈액속의 중성지방 농도가 유의적으로 16.3% 감소 되었으며, 2 시간까지 지속되었다 (Fig. 73A). 반면에 WD-105d-70ESL의 투여로 중성지방 농도가 다소 감소되었으나, 유의성은 나타나지 않았다 (Fig. 76A).

다음 단계로 위와 같은 방법으로 GH1-102일령과 WD-105일령 콩잎의 EtOAc 추출물인 EASL에 대한 지방 흡수 저해 효과를 검증하고자 하였다. 이때 양성대조군으로 지방흡수 저해제인 Xenical을 사용하였다. GH1-102일령과 WD-105일령의 EASL을 200 mg/kg body wt으로 투여 시 GH1-102일령 EASL이 WD-105일령 EASL보다 더 효과적으로 지방 축적을 억제하였으며, corn oil을 투여하고 1, 2 시간 후 대조군에 비해 혈중 중성지방 농도를 각각 19.6%, 15.9%씩 감소시켰다 (Fig. 76B). 양성대조군인 Xenical은 50 mg/kg body wt으로 경구 투여하였고, 콩잎 추출물과 달리 corn oil을 투여하고 1 시간 후보다는 2 시간 후에 보다 효과적으로 중성지방 흡수를 억제하였다.

위의 두 실험 결과로부터 70ESL보다는 테라카판 화합물의 함유량이 높은 EASL이 더 효과적으로 지방 흡수를 저해하는 것을 확인하였으며, 70ESL과 EASL이 함유하는 지표물질 coumsterol의 함량을 HPLC를 이용하여 측정하여, 테로카판계 화합물의 함량과 지방흡수 저해 효능의 상관관계를 입증하였다 (Table 29 참조).

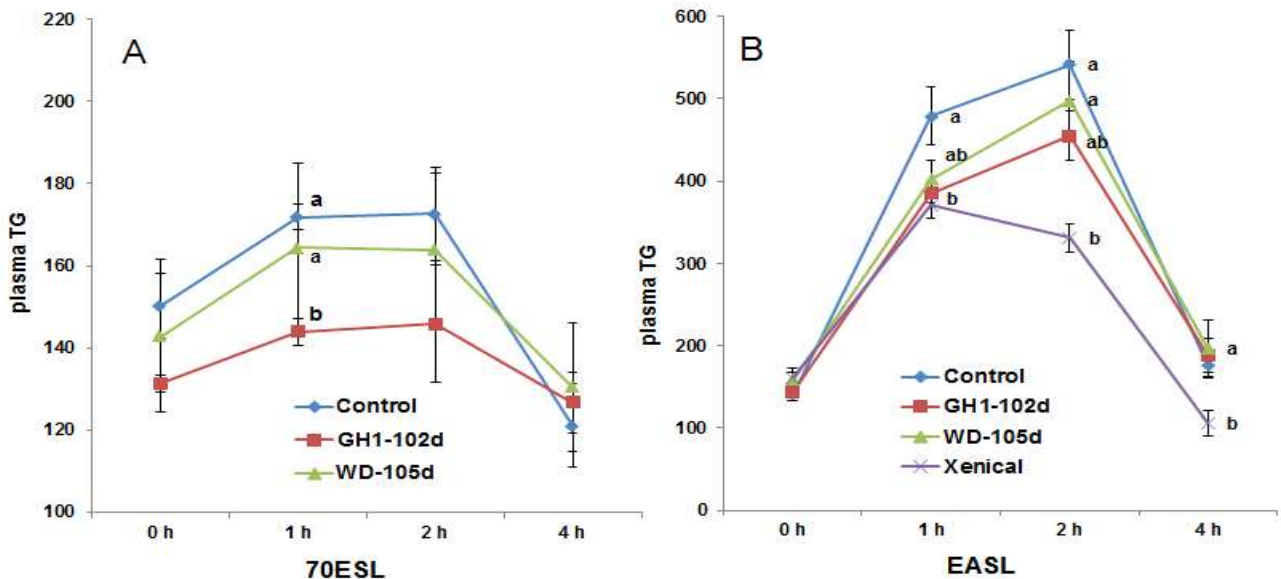


Fig. 76. Effects of 70ESLs (A) and EASLs (B) on lipid absorption in C57BL/6J mice.

#### 아. 마우스모델에서 PTH의 내당능 (glucose tolerance) 측정

콩잎 GH1-102일령의 70ESL과 EASL의 당부하 내당능 효과를 비교 검증하고자 하였다. C57BL/6J 웅성 마우스를 대조군, GH1-102d-ESL군 (500 mg/kg body wt), GH1-102d-EASL군 (200 mg/kg body wt)의 세 군으로 나누고 10 일 동안 시료를 투여하였다. 10 일 후, glucose (G7021, Sigma) 2 g/kg body wt을 구강 투여하고, 0, 15, 30, 60, 90, 120 분 후 각 군의 마우스의 꼬리에서 혈액을 채혈하고 glucometer를 이용하여 혈당을 측정하였다. 그 결과, GH1-102d의 70ESL과 EASL 모두 내당능을 향상시키며, 70ESL은 glucose를 투여하고 15, 30 분 후 혈당의 농도를 각각 26.2%, 9.4%씩 감소시켰고, EASL은 각각 19.3%, 20.6%씩 감소시켜 EASL이 ESL보다 당부하 내당능에 효과적임을 확인하였다 (Fig. 77). 또한 70ESL은 15 분 후에 혈당량 (220 mg/dl)에 비해 30 분 후의 혈당량 (259 mg/ml)이 증가하였다가 다시 감소한 반면, EASL은 전

구간에서 대조군과 같은 패턴을 유지하면서 낮은 혈당량을 유지하였고, 120 분 후에는 같은 수준으로 회복되었다.

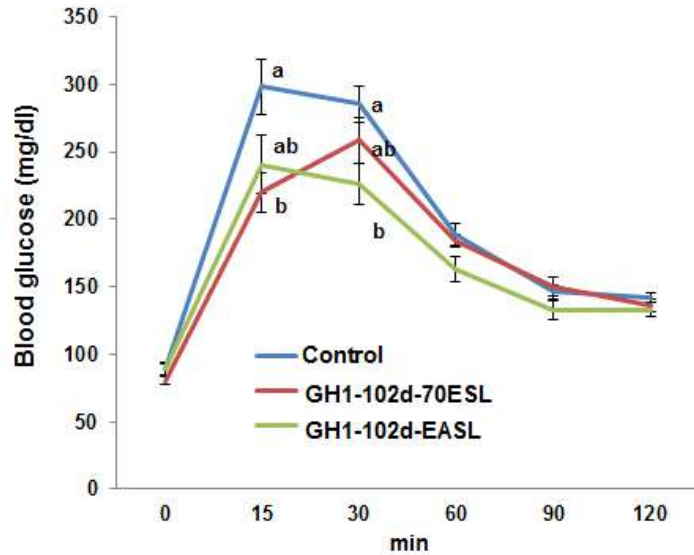


Fig. 77. Effects of 70ESL and EASL on glucose tolerance in C57BL/6J mice.

#### 자. 질환모델동물을 이용한 테로카판 고함유 분획 (PTH)의 체지방 조절 및 혈당 강하 효능 검증

##### (1) PTH 시료, 95ESL과 EASL의 정량 분석

테로카판 고함유 분획 (PTH)의 체지방 및 혈당 개선 효능을 검증하기 위하여 C57BL/6J mice 에 고지방식이로 당뇨를 유발하고, 콩잎 95% EtOH 추출물 (이하 95ESL로 표기함)과 콩잎 EtOAc 추출물 (이하 EASL로 표기함)이 첨가된 식이를 섭취시키면서 in vivo 체지방 감소 및 항당뇨 효능 비교실험을 수행하였다.

우선 두 가지 추출물 시료인 95ESL과 EASL에 대해 analytical HPLC를 이용하여 지표물질인 coumestrol의 함량을 분석하였다 (Figs. 78 & 79). HPLC 분석을 위해 Shimadzu LC-10A series HPLC system을 사용하였고, HPLC 컬럼으로 Brownlee SPP C18-MS-II column (4.6 x 50 mm, 2.7 μm)을 사용하였다. HPLC 용출 조건은 아래 표 1에 표시하였다. 95ESL과 EASL이 함유하는 지표성분인 동시에 유효성분인 coumestrol의 함량 비율은 1 : 1.94 이었다 (Table 29).

HPLC analysis 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 x 50 mm, 2.7 μm
Flow rate :	1.8 ml/min
Sample injection volume :	5 μl
Flow solvent B :	0.1% Acetic acid in Water
Flow solvent C :	Acetonitrile
Elution method :	2013-soy leaf Ex-30 min-1.8 ml

Solvent elution method			
Time	Solvent B (%)	Solvent C (%)	
0	95	5	isocratic
15	70	30	gradient
20	20	80	gradient
23	0	100	gradient
27.5	0	100	isocratic
30	95	5	gradient

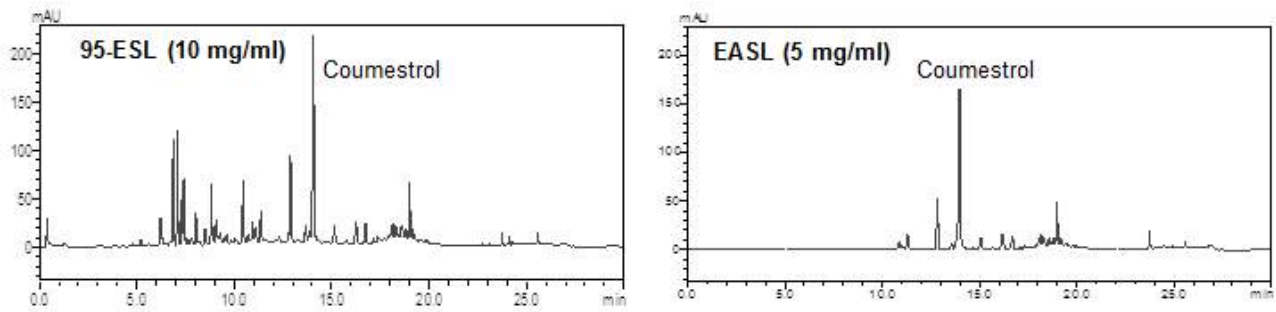


Fig. 78. HPLC profiles of 95ESL and EASL.

Table 29. Coumestrol contents of anti-diabetic experiment samples, 95ESL and EASL

Samples	Rt of coumestrol (min)	Peak area*	Coumestrol (mg/ml)*	Coumestrol in sample (%)*
95ESL (10 mg/ml)	14.04	1199124	120.49	1.21
EASL (5 mg/ml)	14.00	1167281	117.31	2.35

\*The values are means of duplication.

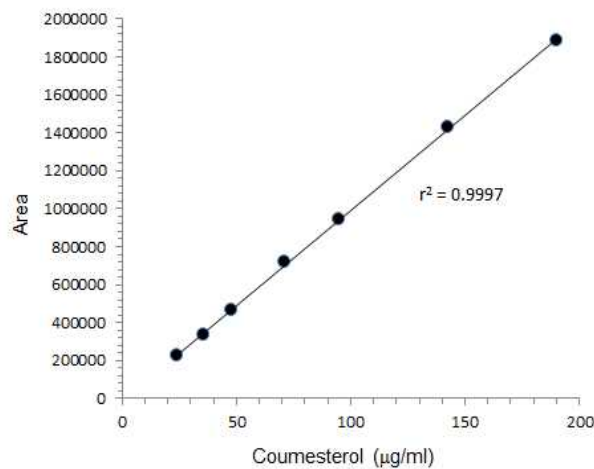


Fig. 79. A standard curve of coumestrol.

95ESL과 EASL의 총 플라보노이드 및 페놀 함량을 측정한 결과, EASL의 총 플라보노이드 함량이 95ESL의 3.45배 이었으며, EASL의 총 페놀 함량은 95ESL의 1.23배 이었다 (Table 30).

Table 30. Contents of total flavonoids and total phenolics of 95ESL and EASL

Samples	Total flavonoid (mg Quercetin equivalents/g)	Total phenolics (mg Gallic acid equivalents/g)
95ESL	136.7	77.3
EASL	471.8	94.8

\*The values are means of duplication.



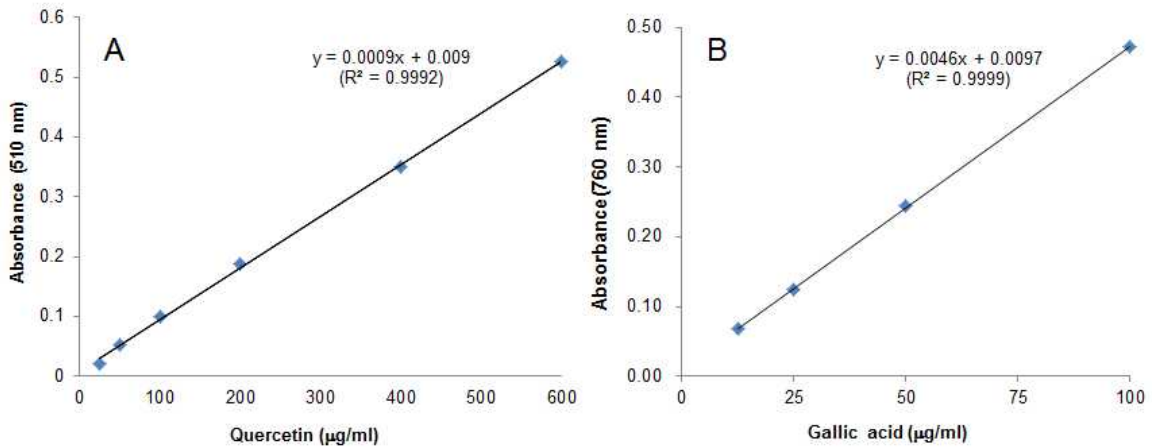


Fig. 80. Standard curves of quercetin for total flavonoids and gallic acid for total phenols.

### (2) 95ESL과 EASL의 *in vitro* 항산화 및 항당뇨 활성 측정

95ESL과 EASL으로부터 테로카판 화합물의 고함유 분획을 만들기 위해 95ESL 농축액에 동량의  $\text{CHCl}_3$ 을 첨가한 후 분액깔대기를 이용하여 용매 분획 방법으로  $\text{CHCl}_3$  분획물을 얻었다. 95ESL, EASL 및 95ESL의  $\text{CHCl}_3$  분획물에 대한 LDL-산화 저해활성 및 DPP-4 저해활성을 측정하였다 (Table 31).

LDL-산화 저해활성 (80  $\mu\text{g/ml}$ )은  $\text{CHCl}_3$  분획물 (86.5%) > EASL (77.5%) > 95ESL (63.7%) 순으로 높게 나타났다. 또한 400  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 DPP-4 저해활성도  $\text{CHCl}_3$  분획물 (55.1%) > 95ESL (33.2%) > EASL (31.9%) 순으로 높게 나타났다. 이상의 결과로부터 추출물이 함유하는 LDL-산화 저해활성과 DPP-4 저해활성은 비교적 비극성물질일 것으로 예측된다.

Table 31. Inhibitory activities of 95ESL, EASL, and  $\text{CHCl}_3$  Fr. of 95ESL on LDL-oxidation and DPP-4

Samples	Inhibition (%)	
	LDL-oxidation (80 $\mu\text{g/ml}$ )	DPP-4 (400 $\mu\text{g/ml}$ )
95ESL	63.7 ± 0.7	33.2 ± 1.6
EASL	77.5 ± 0.5	31.9 ± 3.0
$\text{CHCl}_3$ Fr. of 95ESL	86.5 ± 0.5	55.1 ± 0.6
Positive control	41.3 ± 0.1 (BHT 2 $\mu\text{M}$ )	54.0 ± 2.1 (KR-62436 0.5 $\mu\text{M}$ )

### (3) 당뇨유발 동물모델에서 PTH의 체지방 감소 및 혈당 조절 효능 검증 실험

실험동물인 C57BL/6J (SLC, Shiwuoka, Japan) 4 주령, 웅성 마우스를 1 주일간 실험동물실 환경에 적응시킨 후 정상식이군 (ND), 고지방식이군 (HFD), 콩잎 95% EtOH 추출물 투여군 (95ESL), 콩잎 EtOAc 추출물 투여군 (EASL), Pinitol군 (양성대조군)의 5군으로 나누었다 (Table 32). C57BL/6J mice에 95ESL과 EASL이 포함된 식이에 coumestrol 함량 기준으로 동량이 투여 되도록 각각 95ESL 1% (wt/wt diet)와 EASL 0.56% (wt/wt diet)를 식이에 첨가하여 섭식시켰으

며, 양성대조군으로는 혈당 개선에 도움을 주는 것으로 알려진 건강기능 인증원료인 pinitol의 유효농도인 0.15% (wt/wt diet)를 섭취시켰다. 동물실험은 12 주 동안 진행하였으며, 효능을 비교, 분석함으로써 콩잎으로부터 테로카판 강화 소재 (PTH)에 대한 기능성을 입증하고자 하였다.

**Table 32. Experimental design of the anti-diabetic effects of 95ESL and EASL**

Groups	n	Dose of samples in diet (wt %/wt diet)
ND <sup>1</sup>	10	Normal diet <sup>1</sup> only
HFD <sup>2</sup>	10	High-fat diet <sup>2</sup> (HFD) only
95ESL	10	HFD + 1% ESL (95% EtOH extracts of soy leaf)
EASL	10	HFD + 0.56% EASL (EtOAc extracts of soy leaf)
Pinitol	10	HFD + 0.15% Pinitol (CnF Co.)

<sup>1</sup>Teklad Global 18% Protein Rodent Diet (2018S, powder type, Harlan Laboratories, Inc);

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

#### (4) 체중 변화

C57BL/6J mice를 이용하여 건조분말 콩잎의 95ESL과 EASL을 섭취시킨 혈당조절 및 비만 예방 실험에서 11 주간의 체중 변화를 비교하였다. 실험 전의 C57BL/6J mice의 체중은 19 ~ 21 g 이었다. 11 주 동안 식이만을 섭취한 정상마우스인 ND군의 체중은 6.5 g 증가하였고, 고지방 식이를 섭취한 HFD군 20.7 g으로 현저한 체중 증가를 보였다. 이에 비해 95ESL군은 16.5 g, EASL군은 16.3 g으로 HFD군과 비교하여 체중 증가율이 약 20% 씩 낮았다 (Fig. 81, Table 33). 양성대조군인 Pinitol군에 첨가한 Pinitol은 콩류나 솔잎 등에 포함되어 있는 천연 혈당강화 성분으로 myo-inositol의 구조이성질체인 chiro-inositol의 3번 탄소에 methyl기가 붙은 ether 화합물이다. chiro-inositol을 당뇨병 환자들에게 투여 시 혈당을 조절할 수 있으며, chiro-inositol이 자연계에서 존재하는 형태인 pinitol도 Insulin-like effect (인슐린 유사 영향)을 통해 혈당강화 효과를 가지는 것으로 보고되어있다.

**Table 33. The effect of the supplementation of 95ESL and EASL on body weight gain in C57BL/6J mice**

	ND	HFD	95ESL	EASL	HFD-Pinitol
Initial (g)	20.3 ± 0.6 <sup>a</sup>	19.5 ± 0.2 <sup>a</sup>	20.5 ± 0.1 <sup>a</sup>	20.1 ± 0.3 <sup>a</sup>	19.6 ± 0.3 <sup>a</sup>
Final (g)	26.8 ± 0.6 <sup>c</sup>	40.2 ± 0.8 <sup>a</sup>	37.0 ± 0.6 <sup>b</sup>	36.3 ± 0.7 <sup>b</sup>	36.7 ± 0.4 <sup>b</sup>
Weight gain (g/11 wk)	6.5 ± 0.2 <sup>c</sup>	20.7 ± 0.8 <sup>a</sup>	16.5 ± 0.6 <sup>b</sup>	16.3 ± 0.6 <sup>b</sup>	17.0 ± 0.2 <sup>b</sup>

Values are represented mean ± SE, n=10. <sup>a,b,c</sup>Means in the same row not sharing a common letter superscript are significantly different ( $P < 0.05$ ) between groups.

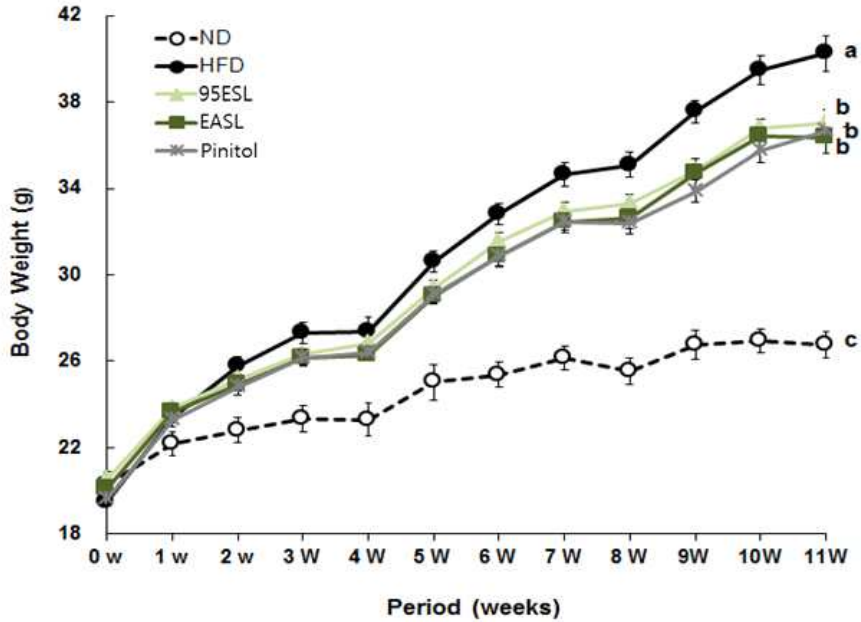


Fig. 81. The effect of the supplementation of 95ESL and EASL on Body weight in C57BL/6J mice. Values are represented mean  $\pm$  SE. <sup>a,b,c</sup>Means not sharing a common letter are significantly different between groups ( $P < 0.05$ ).

#### (5) 장기 중량 변화 및 육안 관찰

C57BL/6J mice을 이용하여 95ESL과 EASL을 12 주간 섭취시킨 후 부검 시 간 (liver), 췌장 (pancreas), 복부지방 (abdominal fat), 근육 (muscle) 등 여러 장기의 중량 변화를 사진 촬영하여 육안으로 관찰함과 동시에 각 장기무게를 측정하였다 (Fig. 82, Table 34).

Fig. 82. Representative photographs of liver, pancreas, muscle, and abdominal adipose tissue from each group are shown

	ND	HFD	95ESL	EASL	Pinitol
Liver					
Pancreas					
Muscle					
Abdominal adipose tissue					

HFD군의 간조직 중량은 ND군에 비해 현저히 증가되었다. 한편 95ESL군의 간조직 중량은 HFD군에 비해 차이가 없었다. HFD군에 비해 EASL군과 Pinitol군의 간조직의 중량이 감소하는 경향을 보였으나, 유의성은 없었다.

HFD군의 췌장 중량은 ND군에 비해 유의적으로 증가되었고, HFD군, 95ESL군, EASL군, Pinitol군 간의 췌장 무게의 유의적인 차이는 없었다.

근육조직의 중량은 모든 군에서 거의 비슷한 크기 및 무게를 나타내어 큰 차이가 없었다.

HFD군의 지방조직 무게는 ND군에 비해 현저히 증가되었다 ( $P < 0.05$ ). 한편 95ESL군과 EASL군, Pinitol군의 지방조직의 무게는 HFD군에 비해 감소하였으며, 특히 EASL군은 HFD군에 비해 유의적으로 지방조직의 무게가 감소되었다 ( $P < 0.05$ ).

**Table 34. Effects of the supplementation of 95ESL and EASL on organ weights in C57BL/6J mice**

	ND	HFD	95ESL	EASL	Pinitol
Liver (g)	0.81 ± 0.01 <sup>b</sup>	1.03 ± 0.04 <sup>a</sup>	1.02 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.95 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.97 ± 0.01 <sup>a</sup>
Pancreas (g)	0.11 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.18 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.17 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.17 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.17 ± 0.01 <sup>a</sup>
Muscle (g)	0.31 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.31 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.31 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.31 ± 0.04 <sup>a</sup>	0.32 ± 0.01 <sup>a</sup>
Abdominal adipose tissue (g)	0.26 ± 0.02 <sup>c</sup>	2.01 ± 0.07 <sup>a</sup>	1.66 ± 0.07 <sup>ab</sup>	1.50 ± 0.13 <sup>b</sup>	1.80 ± 0.10 <sup>ab</sup>

Values are represented mean ± SE. <sup>a,b,c</sup>Means not sharing a common letter are significantly different between groups ( $P < 0.05$ ).

## (6) 혈액의 생화학적 분석

HFD대조군은 ND군에 비해 유의적으로 높은 수준의 plasma profile (glucose, HbA1c, Insulin, TG)을 나타냈으며, 95ESL군과 EASL군에서는 12 주 동안 시료 투여에 의해 당뇨질환모델 마우스에서 혈당조절이 일어나는 것을 확인하였다 (Table 35).

95ESL군, EASL군의 glucose 농도는 유의성은 없으나 HFD대조군보다 각각 13%, 5%씩 감소되었고, 당화혈색소 (HbA1c) 농도는 95ESL군과 EASL군 모두 유의적으로 각각 13%, 17% 감소되었다.

Insulin 농도는 HFD대조군에 비해 95ESL군, EASL군에서 각각 53%, 40%씩 유의적으로 감소되었다.

간 기능의 지표인 GOT와 GPT 농도는 HFD대조군에 비해 95ESL군, EASL군이 유의적으로 감소되었다 (Table 35).

Table 35. Effects of the supplementation of 95ESL and EASL on plasma parameters in C57BL/6J mice

	ND	HFD	95ESL	EASL	Pinitol
Glucose (mg/dl)	93.9 ± 3.1 <sup>c</sup>	203.7 ± 3.9 <sup>a</sup>	178.0 ± 8.5 <sup>ab</sup>	193.0 ± 6.0 <sup>ab</sup>	171.2 ± 9.1 <sup>b</sup>
HbA1c (%)	4.6 ± 0.1 <sup>b</sup>	5.4 ± 0.2 <sup>a</sup>	4.7 ± 0.0 <sup>b</sup>	4.5 ± 0.1 <sup>b</sup>	4.5 ± 0.1 <sup>b</sup>
Insulin (ng/ml)	0.5 ± 0.0 <sup>b</sup>	1.5 ± 0.2 <sup>a</sup>	0.7 ± 0.1 <sup>b</sup>	0.9 ± 0.1 <sup>b</sup>	0.9 ± 0.1 <sup>b</sup>
TC (mg/dl)	149.7 ± 5.2 <sup>ab</sup>	168.4 ± 5.6 <sup>a</sup>	161.4 ± 5.2 <sup>ab</sup>	136.3 ± 11.0 <sup>b</sup>	98.2 ± 9.6 <sup>c</sup>
TG (mg/dl)	20.8 ± 3.9 <sup>c</sup>	67.6 ± 11.4 <sup>ab</sup>	94.2 ± 7.4 <sup>a</sup>	57.2 ± 5.5 <sup>b</sup>	50.0 ± 5.4 <sup>b</sup>
GOT (IU/L)	113.8 ± 10.0 <sup>a</sup>	120.0 ± 8.1 <sup>a</sup>	87.1 ± 3.4 <sup>b</sup>	72.1 ± 1.2 <sup>b</sup>	67.0 ± 1.9 <sup>b</sup>
GPT (IU/L)	68.9 ± 4.7 <sup>ab</sup>	71.4 ± 6.3 <sup>a</sup>	47.2 ± 1.8 <sup>c</sup>	54.8 ± 1.9 <sup>bc</sup>	50.5 ± 2.3 <sup>c</sup>
HDL-C/TC (%)	0.44 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.36 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.41 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.56 ± 0.10 <sup>a</sup>	0.58 ± 0.04 <sup>a</sup>

Values are represented mean ± SE, n=10. <sup>a,b,c</sup>Means in the same row not sharing a common letter superscript are significantly different ( $P < 0.05$ ) between groups.

### (7) 췌장 조직의 형태학적 관찰

췌장조직을 H&E 염색하여 췌장의 islet 크기를 관찰하였다. 췌장에서 islet mass는 95ESL군과 EASL군에서 HFD대조군에 비해 효과적으로 증가된 것을 관찰하였다. 또한 양성대조군인 Pinitol 군에서도 islet mass가 증가된 것을 관찰하였다 (Fig. 83).

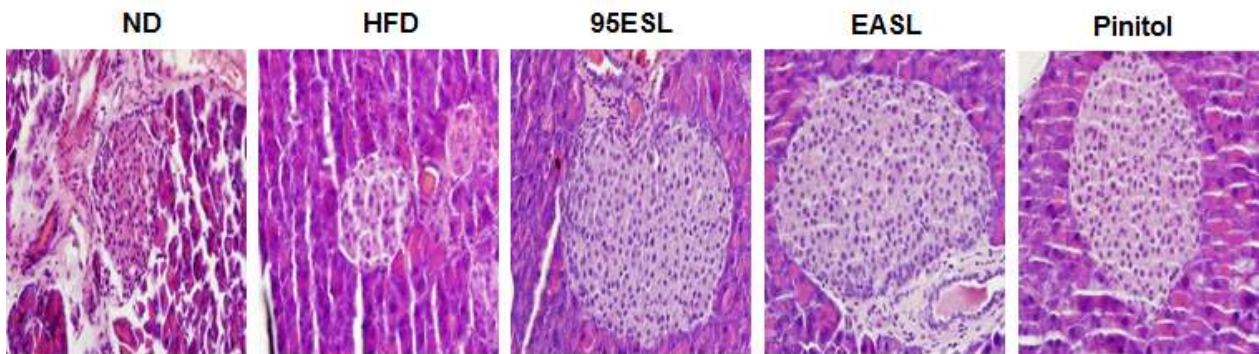


Fig. 83. Histology of pancreas with H&E staining in C57BL/6J mice (Original magnification 400x).

### (8) 췌장조직에서 면역조직염색에 의한 인슐린의 발현

췌장조직에서 인슐린 단백질의 발현을 관찰하기 위해 면역염색을 실시하였다. 그 결과 HFD 대조군에서 인슐린 단백질의 발현은 ND군에 비해 현저하게 감소된 반면, HFD-ESL군과 HFD-EASL군에서는 인슐린 단백질의 발현이 HFD군에 비해 현저하게 증가되었다 (Fig. 84).

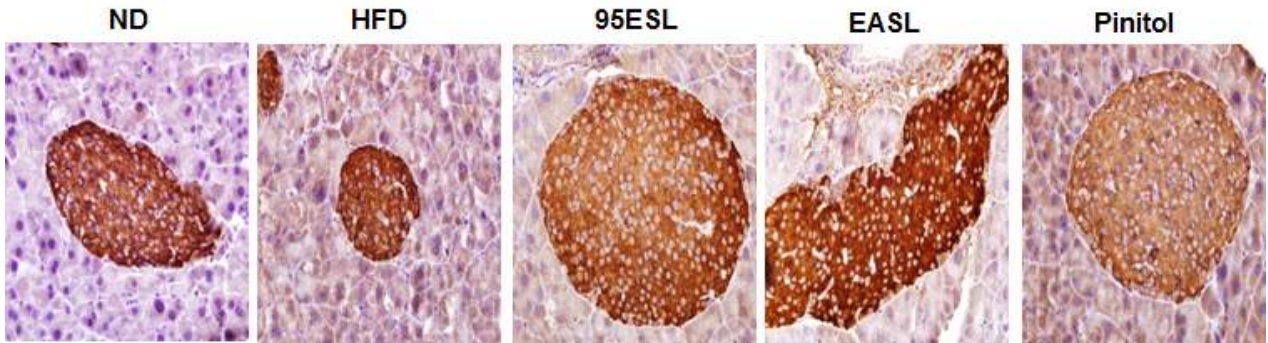


Fig. 84. Histology of pancreas with insulin IHC staining in C57BL/6J mice (Original magnification 400x).

### (9) 간과 지방조직의 형태학적 관찰

지방조직과 간조직의 H&E 염색 결과, ND군에 비해 HFD대조군에서 간조직의 지방 축적이 많이 발생하였으며, HFD대조군의 지방 조직에서는 지방 방울이 비대해진 것을 관찰하였다. 반면 EASL군은 HFD군에 비해 간조직의 지방 축적이 감소되는 것을 확인하였으며, 지방조직의 방울 크기 또한 작아지는 것을 확인하였다. 95ESL군에서도 지방 방울의 크기가 감소하는 것을 확인하였으나, EASL에 비해서 간조직의 지방 축적 감소 효과는 다소 떨어지는 것으로 보인다 (Fig. 85). 이는 혈중 중성지방의 농도가 EASL군에서 감소되는 것과 상응하는 결과이다.

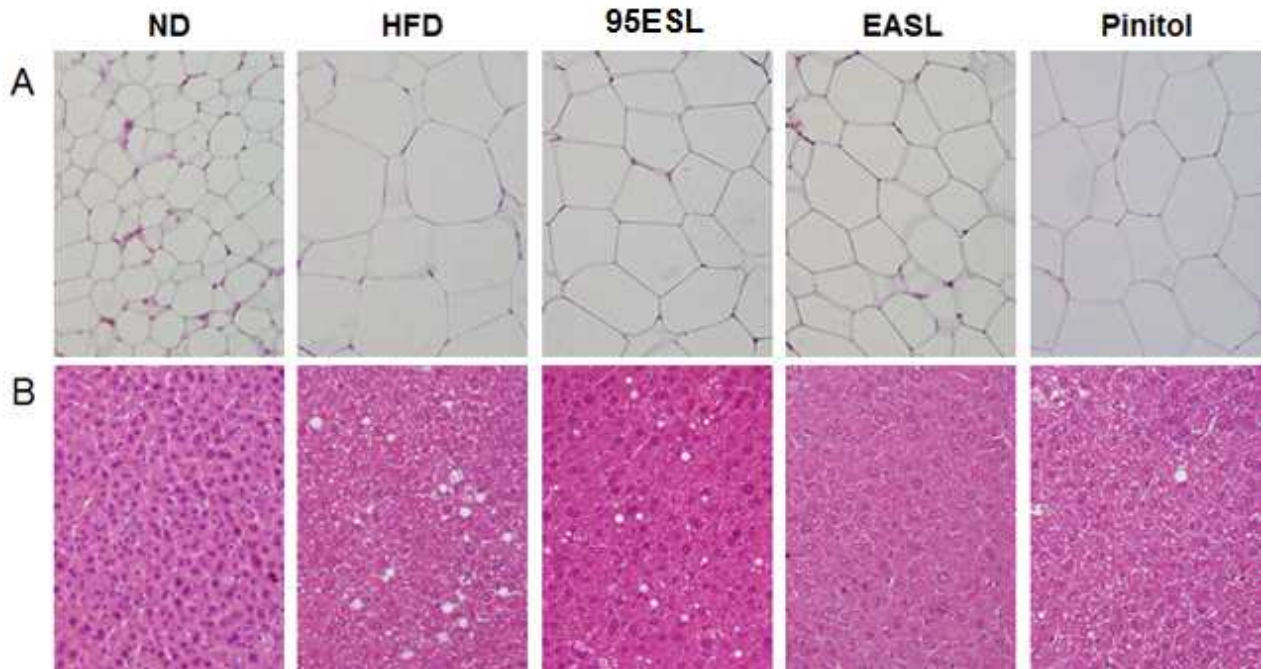


Fig. 85. Histology of white adipose tissue and liver with H&E staining in a HFD-fed C57BL/6J mice. Sections from liver was stained with H&E staining (Original magnification 200x).

### (10) 간의 글리코겐 함량 측정

간 조직에서 글리코겐 함량은 HFD대조군의 경우 ND군에 비해 글리코겐 합성이 유의적으로 저하되었다. 이는 고지방식이로 제 2형 당뇨의 인슐린 저항성 비만이 유도된 C57BL/6J mice에서 인슐린이 글리코겐 합성활성에 제대로 작용하지 못함을 보고한 선행 연구와 일치하는 결과

이다. HFD대조군에 비해 95ESL군, EASL군, Pinitol군의 글리코겐 함량이 14~17% 증가되었으나, 유의성은 없었다.

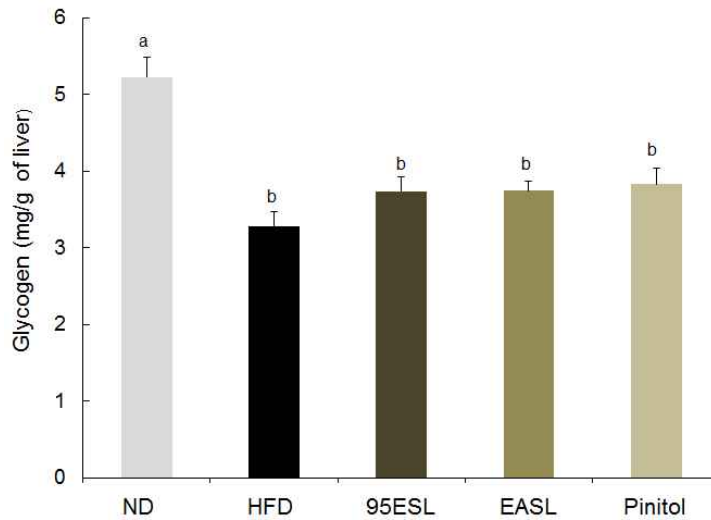


Fig. 86. Effects of the supplementation of 95ESL and EASL on glycogen content in C57BL/6J mice. Values are represented mean  $\pm$  SE. <sup>a,b</sup>Means not sharing a common letter are significantly different between groups ( $P < 0.05$ ).

### (11) 소장 $\alpha$ -glucosidase 활성 측정

당뇨병 치료제로  $\alpha$ -glucosidase의 활성 저해물질이 많이 사용되고 있다. 따라서 각 실험군의 장내  $\alpha$ -glucosidase의 활성을 측정하여 비교해 보았다 (Fig. 87). HFD군의  $\alpha$ -glucosidase 활성이 다른 군에 비해 유의적으로 높았으며, 95ESL군과 EASL군은 HFD군에 비해  $\alpha$ -glucosidase의 활성이 ND군과 비슷한 수준으로 25~27% 낮아졌다. 또한 Pinitol군은  $\alpha$ -glucosidase의 활성이 ND군보다 더 낮아 HFD군 대비 44% 감소하였다. 즉, 95ESL과 EASL은 탄수화물 소화 흡수에 있어 필수적인 효소인  $\alpha$ -glucosidase의 작용을 저해하여 체내 포도당의 흡수를 억제함으로써 식후 혈당을 조절하고, 비만을 억제하는 기작을 나타내고 있으며, 이는 95ESL과 EASL의 *in vitro*  $\alpha$ -glucosidase 저해활성효과도 일치하는 결과이다.

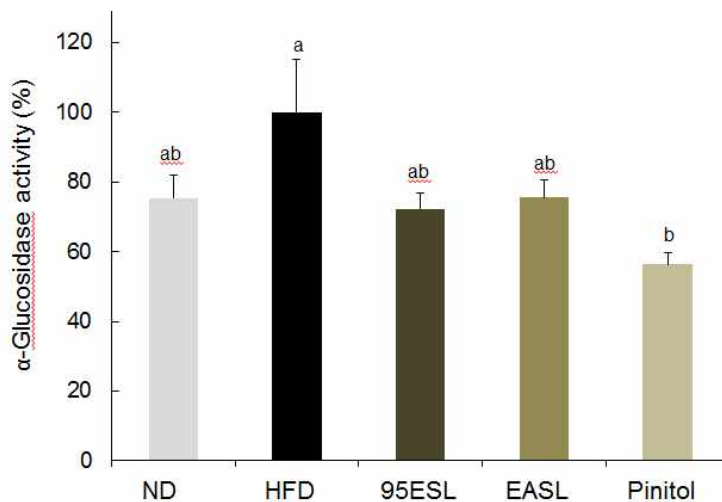


Fig. 87. Effects of the supplementation of 95ESL and EASL on intestinal  $\alpha$ -glucosidase activity. Values are represented mean  $\pm$  SE. <sup>a,b,c</sup>Means not sharing a common letter are significantly different between groups ( $P < 0.05$ ).

## (12) 95ESL과 EASL의 당부하 내당능 및 인슐린 내성 실험

### (가) 당부하 내당능 실험

12 주간의 C57BL/6J mice를 이용한 항당뇨 효능 동물실험이 진행되고 있는 상태에서 10주차에 당부하 내당능 시험을 시행하였다. 6 시간 절식한 뒤 glucose (1 g/kg body wt, G7021, Sigma) 를 구강 투여 한 후 0 분, 15 분, 30 분, 60 분, 90 분 및 120 분에 마우스의 꼬리정맥에서 채혈하여 glucometer를 이용하여 혈당 변화를 측정하였다. Glucose 투여 후 HFD대조군의 혈당 농도는 급격히 증가하였으며, 15분 뒤 혈당의 농도는 0분 혈당농도보다 208 mg/dl 증가하여 최고치에 달하였다. 이후 혈당 농도는 120분까지 지속적으로 감소하였다. 0분 시점의 각 군간의 혈당치가 조금씩 차이가 있었으며, HFD대조군에 비해 95ESL군과 EASL군이 조금 높았다. 시험군인 95ESL군, EASL군과 pinitol군은 HFD대조군에 비해 15 분, 30 분에 혈당이 낮게 측정되었으며, 특히 95ESL군은 HFD군에 비해 뚜렷한 당부하 내당능을 나타내었으나, 유의성은 없었다 (Fig. 88).

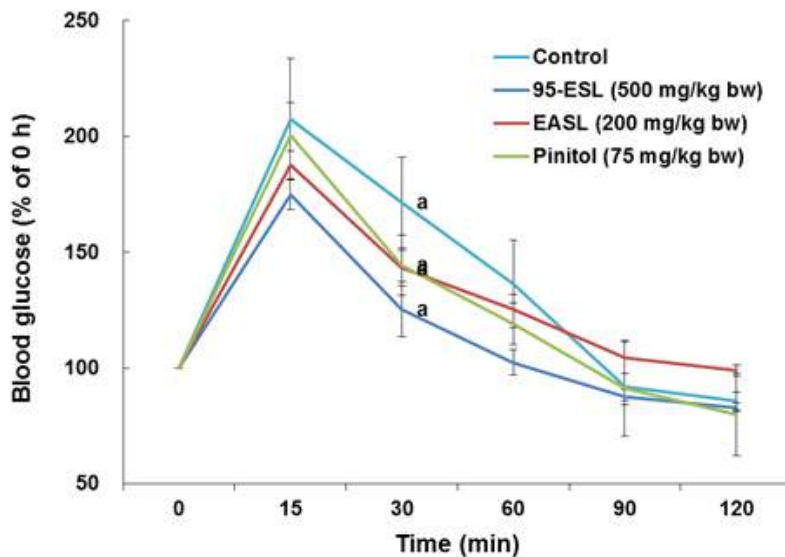


Fig. 88. Effects of the supplementation of 95ESL and EASL on oral glucose tolerance test in C57BL/6J mice. Data are expressed as the means  $\pm$  SE. <sup>a,b</sup> Means not sharing a common letter are significantly different between groups ( $P < 0.05$ ).

### (나) 인슐린 내성 실험

C57BL/6J (SLC, Shiwuoka, Japan) 10 주령 웅성 마우스를 1 주일간 실험동물실 환경에 적응시킨 후 대조군, 95ESL군, EASL군 3군으로 나누었다. 대조군은 vehicle을, 95-ESL군에는 500 mg/kg body wt으로, EASL군에는 200 mg/kg body wt으로 10 일 동안 (하루 1회) 경구 투여하였다. 10일 투여 후에 5 시간 동안 절식시키고 insulin (I2643, Sigma) 0.5 U/kg bd wt을 복강 투여 후 0, 30, 60, 90 분 및 120 분에 마우스 꼬리에서 채혈하여 glucometer를 이용하여 혈당을 측정하였다 (Fig. 89). 0 분의 혈당 농도는 모든 군에서 크게 차이가 없었다. Insulin 투여 후 대조군의 혈당 농도는 점차 감소되어 60 분 뒤의 혈당 농도가 0분 혈당 농도에 비해 31.4%가 감소되었고, 이후 혈당 농도는 120 분까지 서서히 증가되었다. 60 분에 대조군에 비해 95ESL군은



34.9% 낮은 혈당을 보였다. 95ESL군의 경우, 인슐린 투여 후 30분과 60분 후에 대조군에 비해서 현저히 낮은 혈당을 보였으며, 이러한 혈당 강하 경향은 90분과 120분 후 측정에서도 지속되었다. 대조군에 비하여 유의성은 보이지 않았으나, 95ESL 시료를 통한 인슐린 내성 개선 효과를 기대할 수 있을 것으로 보인다. 반면에 EASL은 대조군과 별 차이가 없었다.

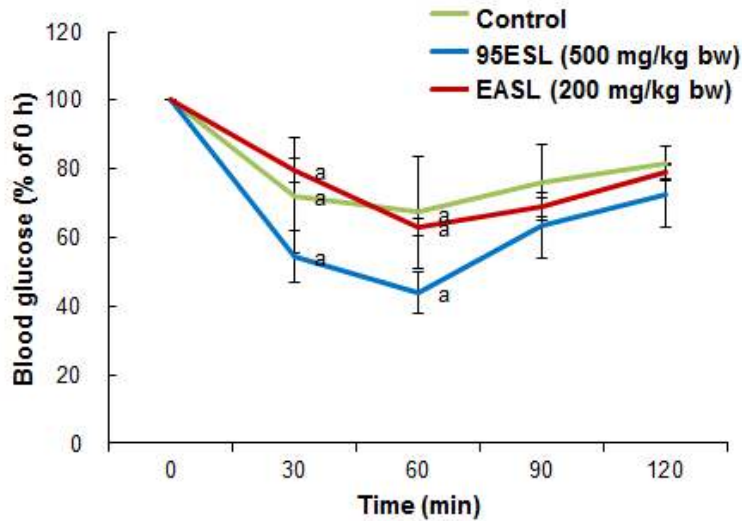


Fig. 89. Insulin tolerance test of 95ESL and EASL in C57BL/6J mice. Data are expressed as the means  $\pm$  SE. <sup>a,b</sup> Means not sharing a common letter are significantly different between groups ( $P < 0.05$ )

위의 당부하 내당능 및 인슐린 내성 실험 결과로부터 95ESL과 EASL의 투여 후 당부하 내당능 및 인슐린 내성 개선 효능에 대해서는 95ESL이 EASL보다 효과적이었다.

### (13) 작용점에 기초하여 간, 지방, 췌장 조직의 추가적인 유전자 및 단백질 발현 분석

#### (가) 췌장 조직의 인슐린 작용과 베타 세포의 증식과 분화 유전자의 발현 분석

췌장조직의 유전자 발현 변화를 관찰하여 작용기작을 규명하고자 하였다.

- IRS1 유전자의 발현은 95ESL군과 EASL군에서 HFD군에 비해 유의적으로 증가하였고, 특히 95ESL군에서 그 발현양이 두 배 이상 증가하였다.

- FOXO-1 유전자의 발현은 95ESL군과 EASL군에서 그 발현양이 시료를 투여하지 않은 HFD군에 비해 현저히 억제되었으며, proinsulin인 Ins2 유전자의 발현은 EASL군에서 유의적으로 증가하였다.

- 베타세포의 분화에 영향을 미치는 Ngn3, Pax4 그리고 MafA 등의 유전자의 발현을 살펴본 결과, Pax4 유전자의 발현은 95ESL군 및 EASL군과 HFD간의 유의적 차이는 보이지 않았으나 시료를 투여하였을 때 조금 증가하는 현상을 보였으며, 그 외 target gene인 Ngn3와 MafA 유전자의 발현은 95ESL군과 HFD군 간에는 차이가 나지 않았으나, EASL군의 경우에는 Ngn3와 MafA의 발현양이 유의적으로 증가하였다 ( $P < 0.05$ ).

- Insulin receptor (Insr)의 발현양은 95ESL군과 EASL군에서 HFD대조군에 비해 유의적으로 증가하였고, EASL에 비해 95ESL의 투여할 때 Insr의 발현양이 더 많이 증가하였다.

- 외부 자극, 스트레스에 의해 발현이 증가되는 염증 target gene으로 알려진 p53의 발현은 95ESL과 EASL을 투여 하였을 때 HFD대조군에 비해 현저히 감소하였고, 이는 95ESL과 EASL

에 의한 췌장의 세포내 pro-inflammatory cytokine의 생성 억제를 통해 인슐린 저항성이 억제 될 것으로 예상된다. 즉, 인슐린 작용 관련 유전자의 발현을 알아본 결과 95ESL과 EASL의 투여로 두 군 모두 IRS의 발현이 증가되었고, 이를 통해 FOXO-1의 발현을 억제시켜 인슐린 신호전달이 정상적으로 일어나 항당뇨 작용을 나타내는 것으로 판단된다. 특히 EASL군에서 베타 세포의 분화과정에 필요한 유전자의 발현이 95ESL군에 비해 현저히 증가되었다.

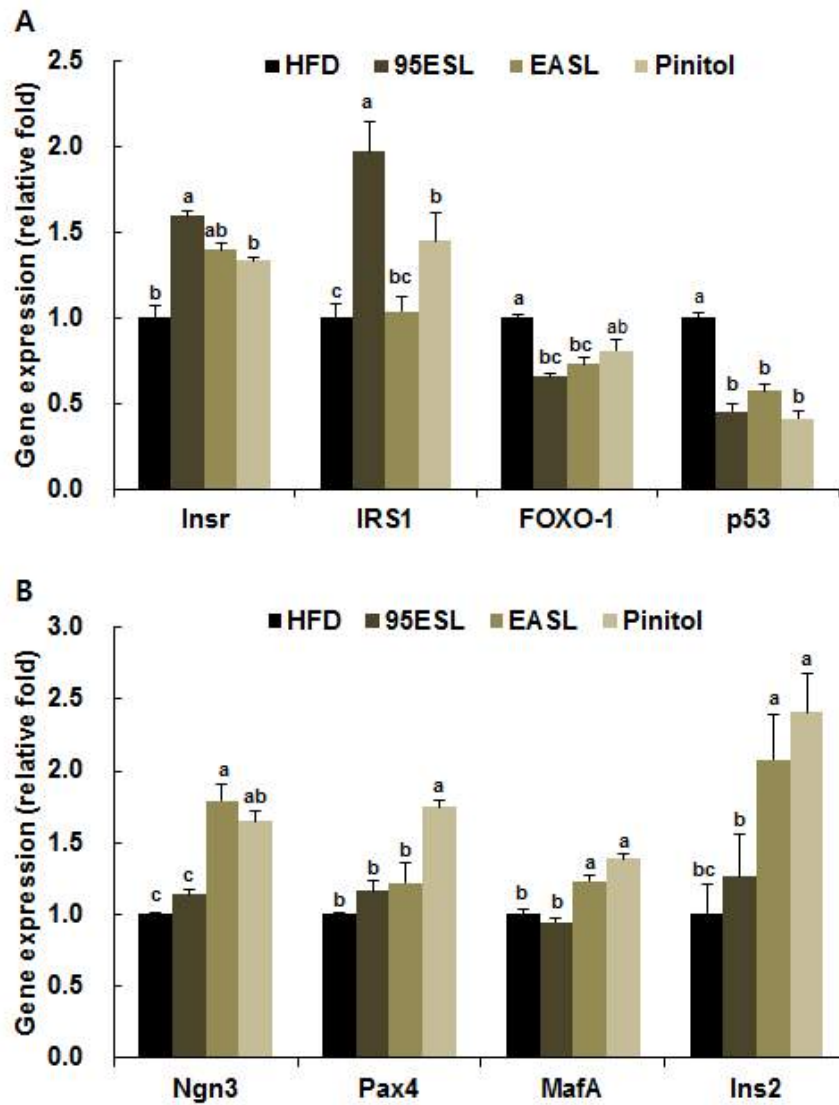


Fig. 90. Effects of the supplementation of 95ESL and EASL on gene expression related to insulin sensitivity (A) and  $\beta$ -cell development (B) in pancreas. The levels of mRNA in pancreas were measured by qRT-PCR and normalized by GAPDH. Values were represented the means  $\pm$  S.E. <sup>a,b,c</sup>Means not sharing a common letter are significantly different between groups ( $P < 0.05$ ).

### (나) 간 조직의 당신생 유전자의 발현 분석

Glucose-6-phosphatase (G6Phase)는 간 조직에서 당신생 과정과 글리코겐 분해과정의 마지막 단계에서 결정적 역할을 하는 효소이며, phosphoenoyl pyruvate carboxykinase (PEPCK)는 당신생 과정의 첫 단계에 관여하는 효소로 pyruvate carboxylase에 의해 형성된 oxaloacetate가 phosphoenolpyruvate로 전환되는 과정에 필요하다. CCAAT-enhancer-binding proteins  $\alpha$  (C/EBP  $\alpha$ )는 당신생 과정의 초기 단계의 주 프로모터이며, Forkhead box-containing protein of

the O superfamily-1 (FOXO1)는 인산화에 의해 G6Phase와 PEPCK의 유전자 발현을 억제한다. 그리고 공복 시 증가된 글루카곤은 cAMP를 증가시켜 protein kinase A (PKA)를 활성화함으로써 G6Phase 및 PEPCK를 발현시킨다. 이러한 기전을 통하여, 간에서의 당신생합성과 관련된 유전자인 G6Phase, PEPCK, FOXO1, PKA, C/EBP  $\alpha$  유전자들의 발현을 qRT-PCR을 통해 분석하였다. 당신생 과정의 대표적인 효소 유전자인 G6Phase와 PEPCK는 95ESL과 EASL에서 유의적으로 발현이 감소하였으며, 이는 PKA의 발현이 유의적으로 낮아진 것과 관계가 있는 것으로 보인다. FOXO1과 C/EBP  $\alpha$ 의 발현은 95ESL군과 EASL군에서 활성이 저하되었으나, 유의성은 없었다 (Fig. 91).

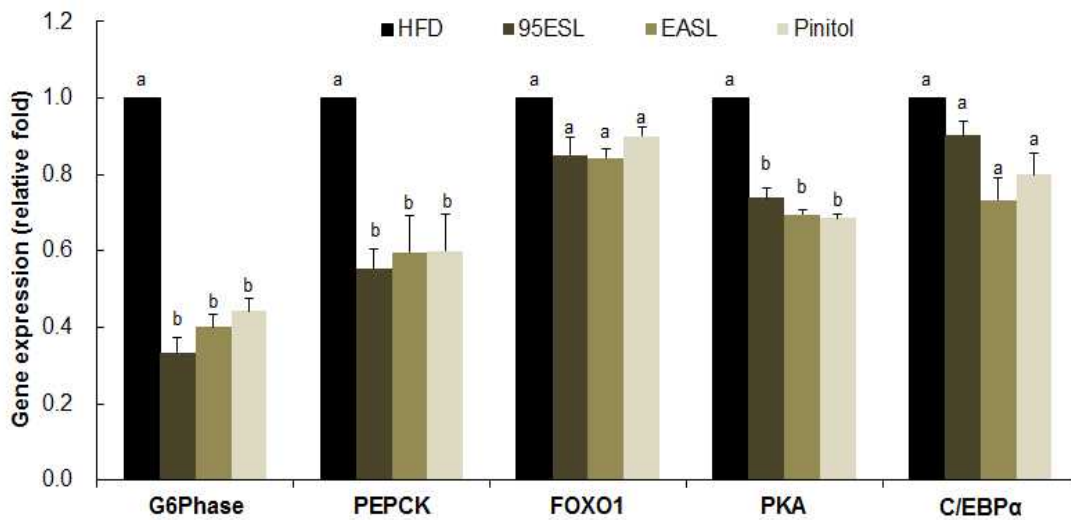


Fig. 91. Effects of the 95ESL and EASL on the regulation of gluconeogenesis related gene expressions in liver. The levels of mRNA in liver were measured by qRT-PCR and normalized by GAPDH. Values were represented the means  $\pm$  S.E. <sup>a,b,c</sup>Means not sharing a common letter are significantly different between groups ( $P < 0.05$ ).

#### (다) 지방 조직에서의 염증 유발 유전자와 인슐린 감수성 유전자의 발현 분석

비만을 동반한 당뇨병에서 비만한 지방조직에서 분비되는 TNF  $\alpha$ 와 같은 아디포카인 (adipokine)의 분비는 인슐린 의존적인 조직에서 인슐린 민감성이 감소되는 원인으로 작용을 한다. 또한 아디포카인은 인슐린 신호전달계를 억제하는 저해분자들을 활성화시킨다. 95ESL과 EASL의 투여로 복부지방조직에서 비만 시 분비가 증가되는 TNF  $\alpha$ , IL-6  $\beta$ , IL-1 유전자의 발현이 유의적으로 감소되었으며, 이에 따라 인슐린 수용체 유전자 IRS1과 IRS2의 발현이 유의적으로 증가되었다. 또한 IRS1과 IRS2 유전자의 발현과 포도당 수송체 유전자인 GLUT4의 발현도 유의적으로 증가되었다 ( $P < 0.05$ ) (Fig. 92).

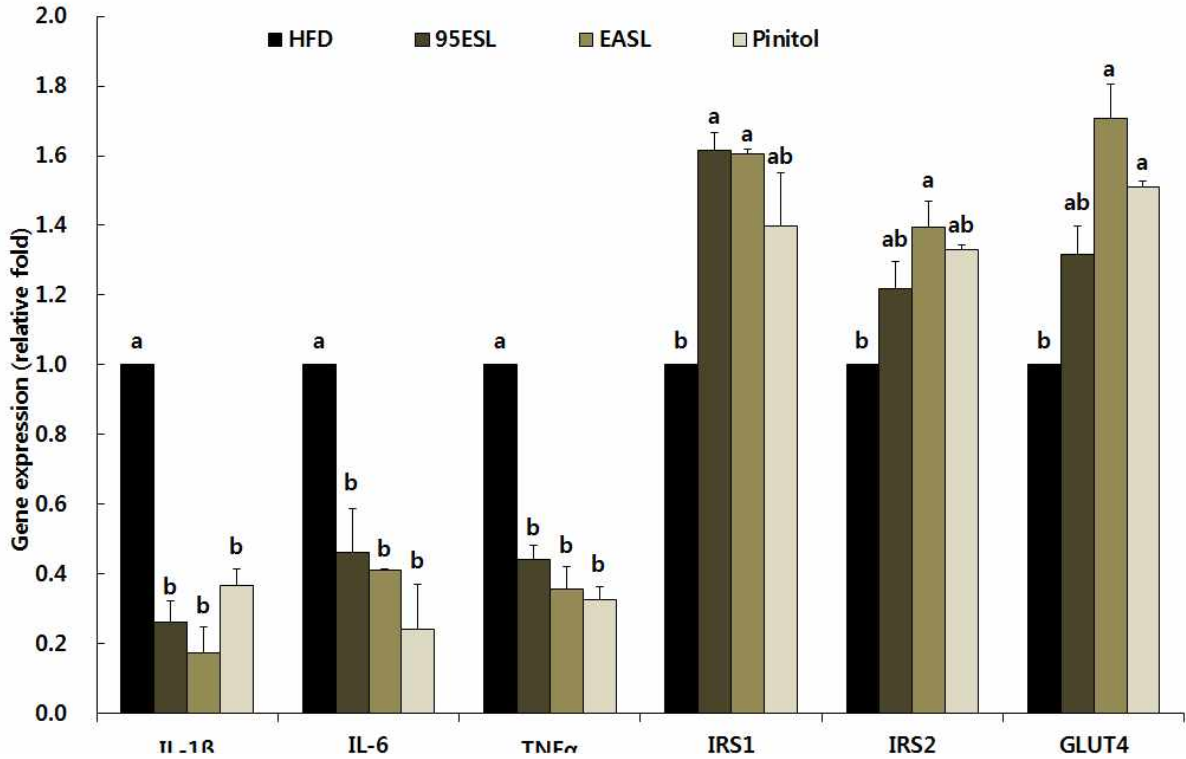


Fig. 92. Effects of the supplementation of 95ESL and EASL on gene expression in abdominal adipose tissue. The levels of mRNA in abdominal adipose tissue were measured by qRT-PCR and normalized by GAPDH. Values were represented the means  $\pm$  S.E. <sup>a,b,c</sup> Means not sharing a common letter are significantly different between groups ( $P < 0.05$ ).

#### 차. 테로카판 강화 소재 (PTH)의 체지방 조절 및 혈당 강하 효능에 대한 생화학적, 분자생물학적, 면역학적 작용기작 규명

##### (1) MIN6 세포와 HIT-T15 세포에서 항당뇨 활성 및 작용점 관련 인자의 발현 변화 분석

###### (가) MIN6 세포에서 95ESL과 EASL의 항당뇨 활성

###### ① MIN6 세포에서 95ESL과 EASL의 세포독성 측정

췌장의 베타 세포주인 MIN6 세포에서 95ESL과 EASL의 세포독성을 평가해 보았다. 25, 50, and 100  $\mu\text{g/ml}$  농도의 95ESL과 EASL을 각각 24 시간 동안 처리 하였을 때 세포독성을 나타내지 않았다 (Fig. 93).

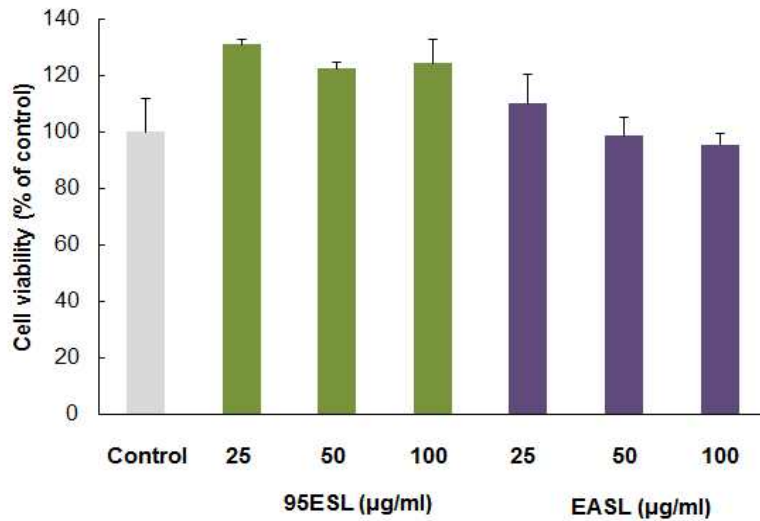


Fig. 93. Cell viability of 95ESL and EASL in MIN6 cells. Cells were treated with vehicle (DMSO) or indicated concentration of samples. Twenty-four h after treatment of extracts, cell viability was measured by Cyto X™ cell viability assay kit (LPS solution, Korea).

② MIN6 세포에서 95ESL과 EASL의 insulin secretion 측정

Glucose의 처리에 의해 대조군의 인슐린 분비량이 2배 증가하였고, glucose를 처리하지 않은 경우보다 glucose를 처리한 경우에 95ESL과 EASL 100 µg/ml의 농도에서 인슐린 분비능이 효과적으로 증가되었고, EASL에 의한 인슐린 분비능이 95ESL보다 효과적이었다 (Fig. 94).

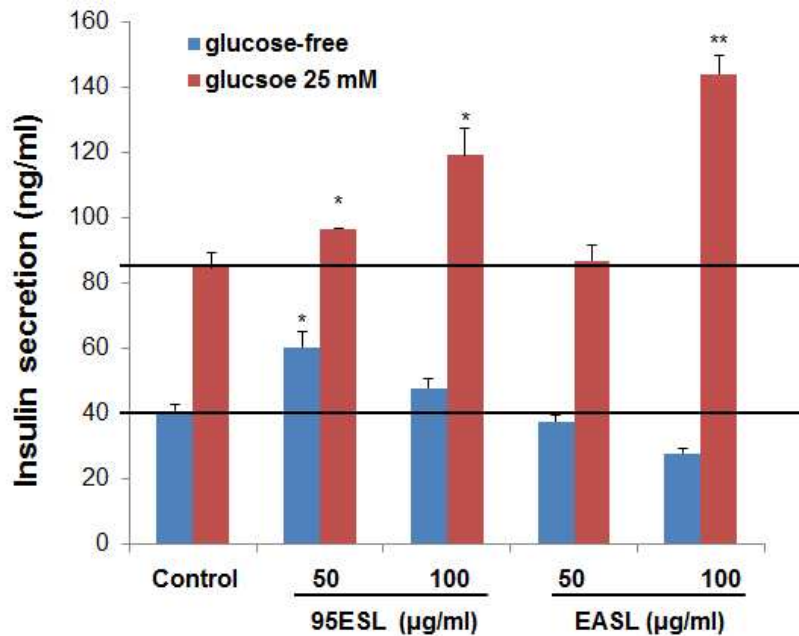


Fig. 94. Effects of of 95ESL and EASL on glucose-induced insulin secretion in pancreatic MIN6 β-cells. MIN6 cells were seeded into a 24-well plate at a density of  $1 \times 10^5$  cells per well and grown for 48 h. The cells were washed twice and preincubated for 60 min in glucose-free Krebs buffer. Then cells were treated with or without 25 mM glucose, and 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 control.

③ MIN6 세포에서 95ESL과 EASL에 의한 유전자 발현 변화

다음으로 효과적인 인슐린 분비능을 나타내는 100 µg/ml의 농도에서 95ESL과 EASL의 PA 유도독성에 대한 유전자 발현을 MIN6 세포에서 관찰하였다. 95ESL과 EASL의 처리에 의해 *Insr*와 *IRS1*의 발현이 유의적으로 증가하였고, EASL의 처리로 인해 *IRS1* 외에도 *IRS2*와 *Ins2* 유전자의 발현이 효과적으로 증가되었다 (Fig. 95).

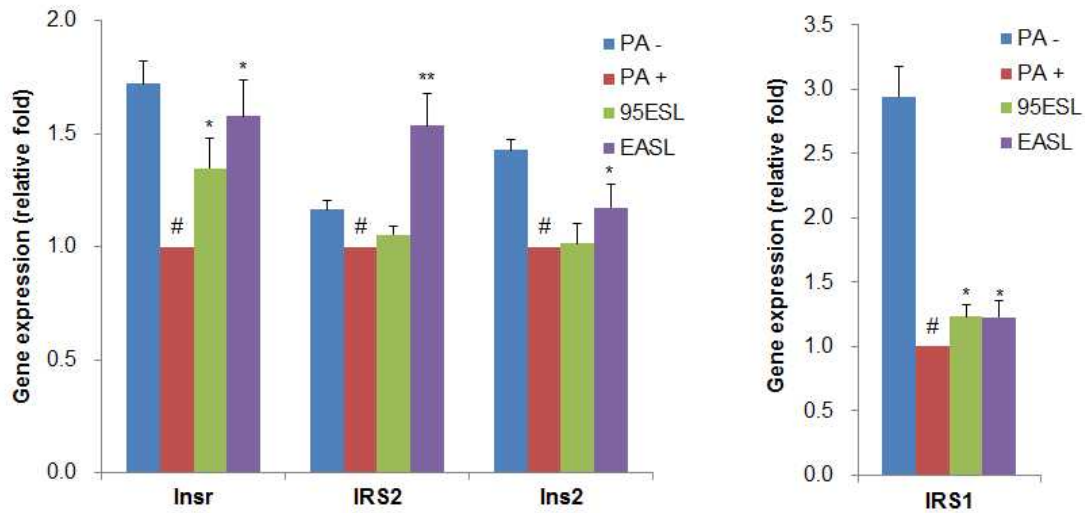
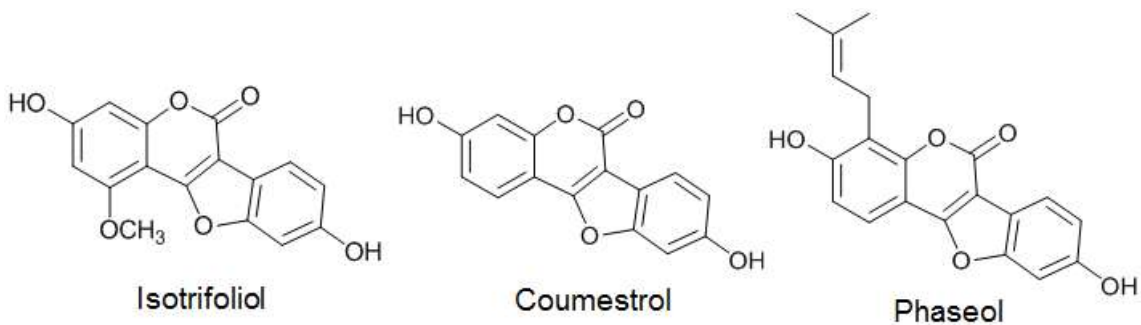


Fig. 95. Effects of 95ESL and EASL on gene expression in PA-induced pancreatic MIN6  $\beta$ -cells. Cells were administrated 0.3 mM PA with or without of WD compounds for 8 h and then harvested mRNA to be used in qRT-PCR. # $P < 0.01$  compared with non-PA group. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared with PA alone-treated group.

(나) MIN6 세포에서 테로카판 화합물 (phaseol, isotrifoliol, coumestrol)의 항당뇨 활성



① MIN6 세포에서 테로카판 화합물 (phaseol, isotrifoliol, coumestrol)의 세포독성 측정

테로카판 화합물 (isotrifoliol, coumestrol, phaseol)의 MIN6 세포에서의 세포독성 및 성장에 미치는 영향을 관찰하였다. coumestrol과 phaseol은 100 µM까지 MIN6 세포에서 독성을 나타내지 않았고, isotrifoliol은 20 µM의 농도에서부터 세포독성을 나타내었다 (Fig. 96). 테로카판 화합물의 HIT-T15 세포에서의 세포독성과는 조금 다른 결과로 이는 서로 다른 베타 세포주에 의한 상이한 결과를 보인 것으로 여겨진다.

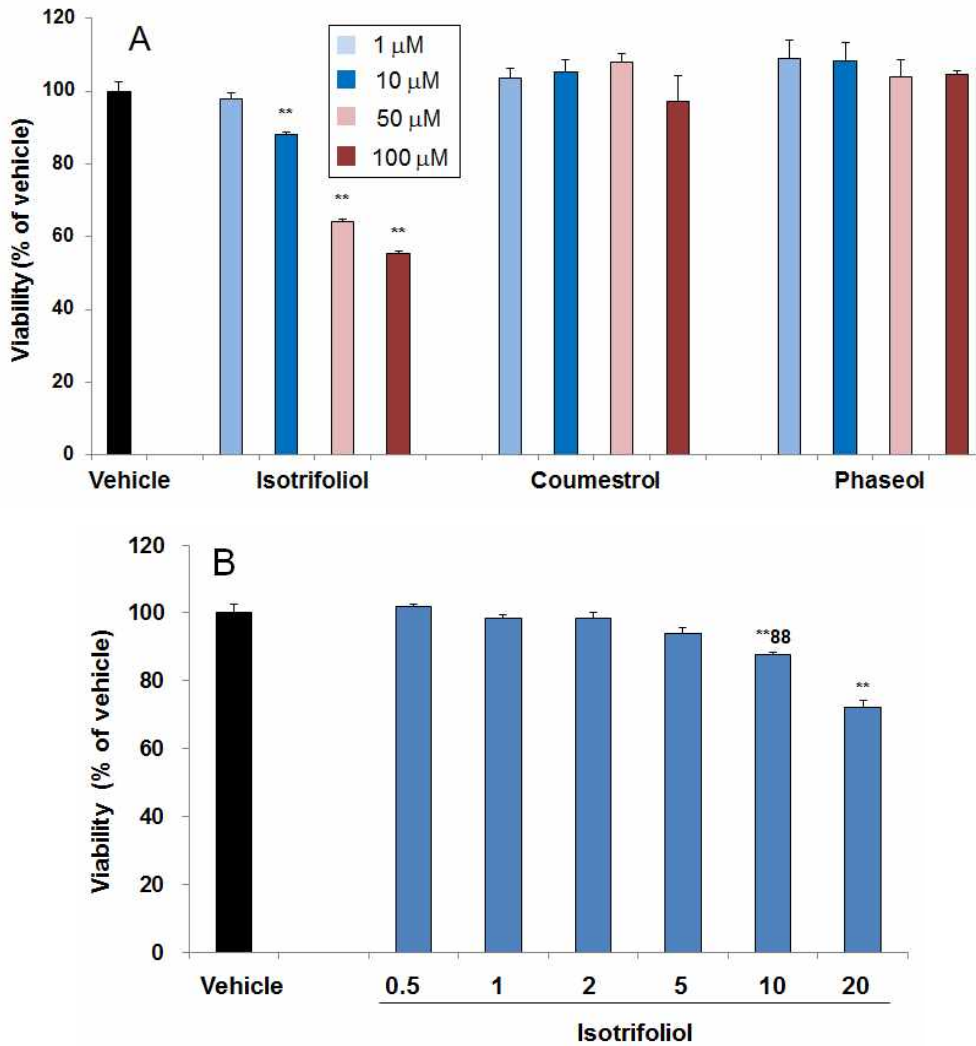


Fig. 96. Cell viability of coumestans (A) and isotrifoliol (B) in MIN6 cells. Cells were treated with vehicle (DMSO) or indicated concentrations of compounds. Twenty four hours after treatment of compounds, cell viability was measured by Cyto X™ cell viability assay kit (LPS solution, Korea). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared with media alone-treated group.

② MIN6 세포에서 phaseol, isotrifoliol, coumestrol의 insulin secretion 측정

그림 91의 결과에서 EASL은 효과적인 인슐린 분비능을 나타내었다. 이 EASL의 주된 구성 성분인 테로카판 화합물인 phaseol, isotrifoliol, coumestrol 각각에 대한 인슐린 분비능을 측정하였다. isotrifoliol, coumestrol, 또는 phaseol을 MIN6 세포에서 세포독성을 나타내지 않는 농도로 처리하여 인슐린 분비능을 측정한 결과, isotrifoliol 5, 10 μM의 농도에서 효과적으로 인슐린 분비능이 증가되었고, phaseol 50, 100 μM의 농도에서 유의적으로 인슐린 분비능이 증가되었다. 이에 비해 coumestrol은 인슐린 분비능에 큰 변화를 주지는 않았다 (Fig. 97). 즉 테로카판 화합물의 MIN6 세포에서의 인슐린 분비능에 대한 효과는 isotrifoliol > phaseol > coumestrol의 순이다. 이러한 결과는 HIT-T15 세포에서 테로카판 화합물의 인슐린 분비능을 측정한 결과와 유사하다 (Data not shown).

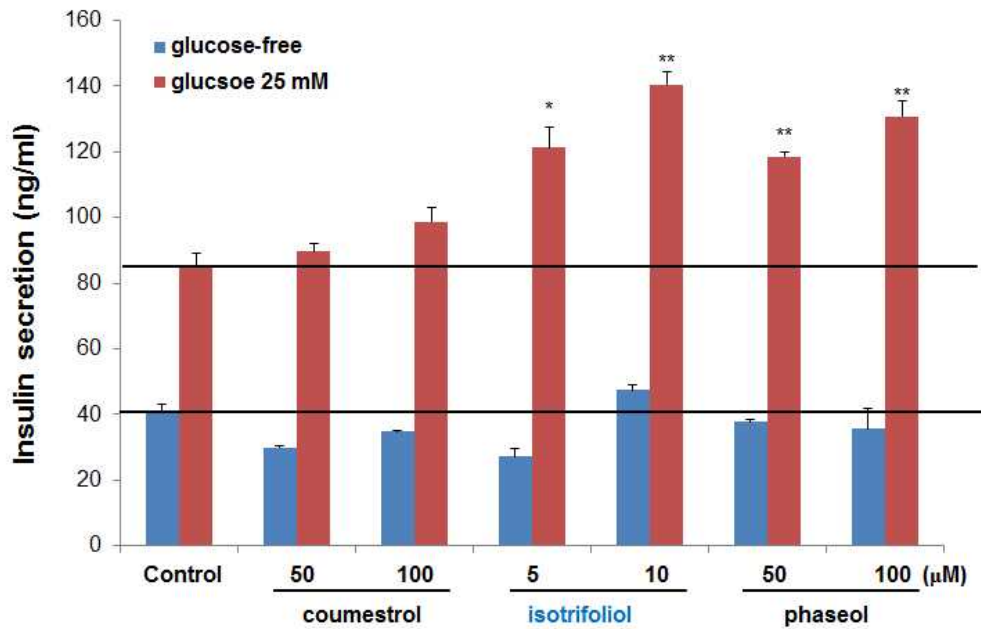


Fig. 97. The glucose-induced insulin secretion test performed in MIN6 cells. MIN6 cells were seeded into a 24-well plate at a density of  $1 \times 10^5$  cells per well and grown for 48 h. The cells were washed twice and preincubated for 60 min in glucose-free Krebs buffer. Then cells were treated with or without 25 mM glucose, and coumestans incubated for 30 min at 37°C. After incubation, measured the insulin concentration of the media (Alpco diagnostics, insulin). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  compared with control.

#### (다) HIT-T15 세포에서 isotrifoliol과 phaseol에 의한 유전자와 단백질 발현의 변화

##### ① HIT-T15 세포에서 isotrifoliol에 의한 유전자와 단백질 발현 변화

콩잎 추출물의 지표물질인 coumestrol의 메틸화된 형태인 isotrifoliol은 HPLC profile 상으로는 많은 양을 함유하지 않는다. 그러나, 본 연구팀에서 지역별로 생산된 콩잎을 채집하여 그 함량을 조사하던 중 전라북도 지역에서 생산된 콩잎에 특이하게 isotrifoliol의 함량이 높음을 analytical HPLC 분석을 통해 확인하였다. 또한 본 연구진이 현재까지 측정된 여러 가지 지표의 생리활성이 coumestrol과 차이가 많은 것을 알았고, isotrifoliol의 생리활성에 대한 보고는 많지 않다.

Isotrifoliol 100  $\mu$ M을 12 시간 동안 처리 후 세포독성을 나타내었고, 24 시간 동안 처리 시에는 50  $\mu$ M 농도에서부터 세포독성을 나타내었다 (Fig. 51 참조).

베타세포에서 isotrifoliol의 PA 유도 독성에 대한 유전자 발현 발현을 관찰하였다. Isotrifoliol의 처리로 베타세포의 세포막에 존재하는 GLP-1R (GLP-1의 receptor)의 유전자의 발현이 유의적으로 증가되었고, 이에 따른 인슐린 분비를 조절하는 PKA 유전자의 발현도 75  $\mu$ M에서 유의적으로 증가되었다. 그 외 인슐린 신호전달에서 중요한 작용을 일으키는 IRS1, IRS2의 발현도 75  $\mu$ M에서 유의적으로 증가되었다 (Fig. 98).

또한 Western blot를 이용하여 단백질의 발현 변화를 측정 하였다. PKA 단백질의 인산화는 인슐린 분비를 활성화시킨다고 알려져 있으며, 본 실험에서 PKA의 유전자의 발현 역시 유의적으로 증가하였으므로 PKA 단백질의 변화를 측정해 보았다. 그 결과, isotrifoliol의 처리에 의해 PKA 단백질의 인산화가 증가되는 것을 확인하였다 (Fig. 99).



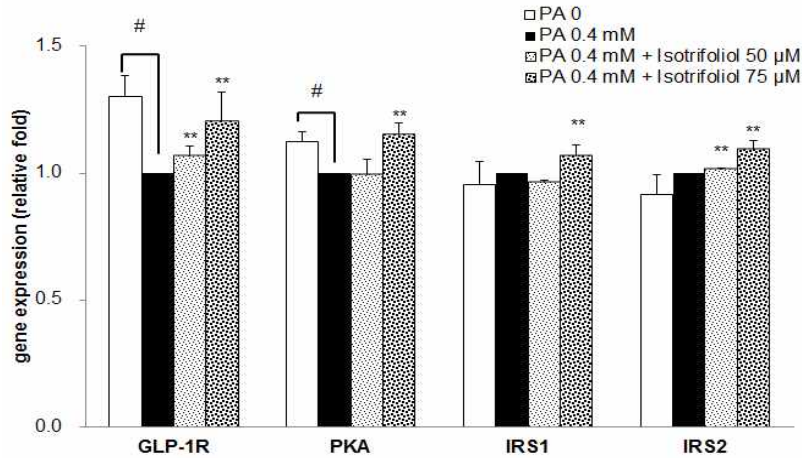


Fig. 98. Effects of isotrifoliol on gene expressions in PA induced HIT-T15 cells. Cells were administered with 0.4 mM PA for 8 h and harvested for mRNA to be used in qRT-PCR. # $P < 0.01$  compared with non-PA group. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared with PA alone-treated group.

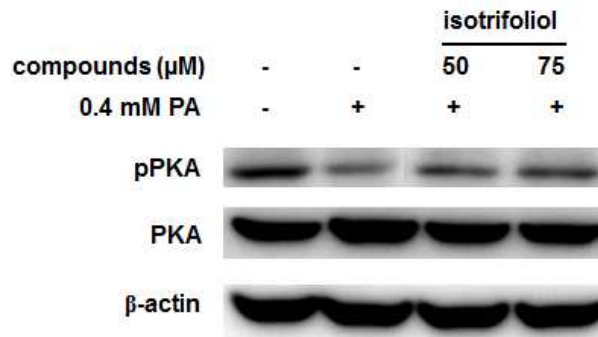


Fig. 99. PA induced phosphorylation of PKA protein in HIT-T15 cells. Western blot analysis. Cell lysates were then prepared and subjected to Western blotting using antibodies specific for phospho-PKA and PKA.

② HIT-T15 세포에서 Phaseol에 의한 유전자와 단백질 발현 변화

테로카판계 화합물 중 coumestrol 다음으로 많은 양을 함유하고 있는 phaseol의 PA 유도 독성에 대한 유전자 및 단백질의 변화를 관찰하였다. Phaseol 100  $\mu\text{M}$ 을 12 시간 동안 처리 후 세포독성을 나타내었고, 24 시간 동안 처리 시에는 50  $\mu\text{M}$  농도에서부터 세포독성을 나타내었다 (Fig. 51 참조).

Phaseol 50, 70  $\mu\text{M}$ 의 농도에서 GLP-1R 유전자의 발현이 현저하게 증가되었고, 이에 따른 IRS1, IRS2 및 PKA의 유전자 발현이 모두 유의적으로 증가되었다 (Fig. 100). 또한 PKA 단백질의 인산화도 효과적으로 증가되었다 (Fig. 101).

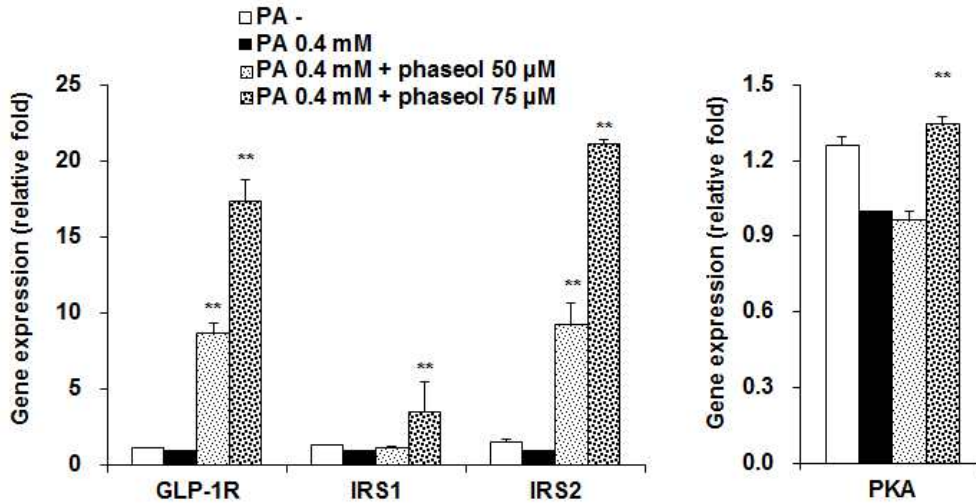


Fig. 100. Effects of phaseol on gene expressions in PA induced HIT-T15 cells Cells were administered with 0.4 mM PA for 8 h and harvested for mRNA to be used in qRT-PCR. # $P < 0.01$  compared with non-PA group. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared with PA alone-treated group.

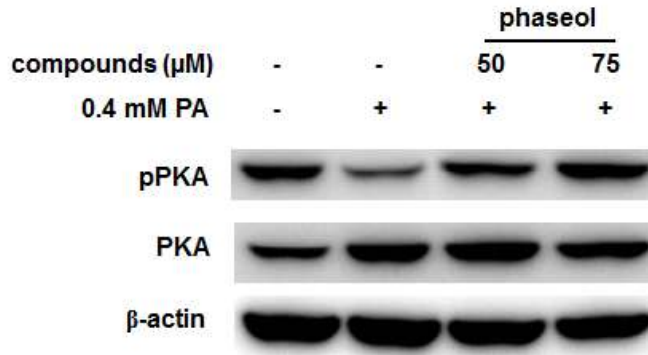


Fig. 101. PA induced phosphorylation of PKA protein in HIT-T15 cells Western blot analysis. Cell lysates were then prepared and subjected to Western blotting using antibodies specific for phospho-PKA and PKA.

이상의 결과로부터 테로카판계 화합물 isotrifoliol, coumestrol, phaseol 중 베타세포에서 인슐린 분비능을 향상 시키는 효과를 보이는 화합물은 isotrifoliol과 phaseol이고, 이들의 인슐린 분비능 증가는 GLP-1R 및 IRS1, IRS2, PKA의 유전자 발현의 조절과 PKA 단백질의 인산화를 통해 이루어진다. 이에 비해 coumestrol에 의한 인슐린 분비능 조절작용은 일어나지 않았다.

## (2) RAW264.7 세포에서의 항염증 활성 및 작용점 관련 인자의 발현 변화 분석

### (가) RAW264.7 세포에서 95ESL과 EASL의 항염증 활성

#### ① RAW264.7 세포에서 95ESL과 EASL의 세포독성 측정

대식세포에서 95ESL와 EASL의 세포독성을 측정해 보았다. 각각의 추출물을 25, 50, 100  $\mu$ g/ml로 농도별로 24 시간 동안 처리하였을 경우 95ESL와 EASL은 세포독성을 보이지 않았다 (Fig. 102).

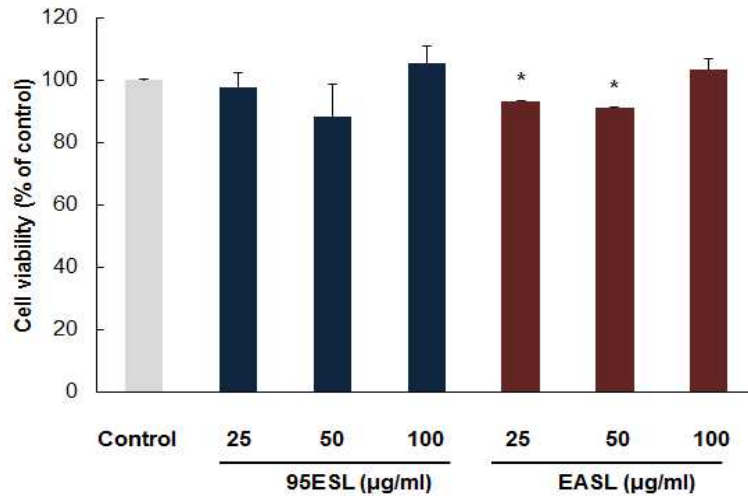


Fig. 102. Cell viability of 95ESL and EASL in RAW264.7 cells. Cells were treated with vehicle (DMSO) or indicated concentration of compounds. 24 hr after treatment of extracts, cell viability was measured by Cyto X™ cell viability assay kit (LPS solution, Korea). \* $P < 0.05$  compared with media alone-treated group.

② LPS 유도 RAW264.7 세포에서 95ESL과 EASL의 ROS 축적 및 NO 생성 억제 효능

95ESL와 EASL의 LPS 유도독성에 대한 대식세포 주에서 ROS 축적 억제능을 알아보았다. 95ESL과 EASL을 50, 100 µg/ml 농도로 처리 하였을 때 LPS만을 처리한 대조군에 비해 ROS 축적량이 농도 의존적으로 현저히 낮아졌다 (Fig. 103A).

95ESL와 EASL의 LPS 유도독성에 대한 대식세포 주에서 NO 생성 억제능을 알아보았다. NO 생성량의 경우 아무것도 처리하지 않은 음성대조군 (4.5 µM)에 비해 LPS만을 처리한 대조군에서 NO의 생성량이 약 5배 (27.2 µM) 증가하였다. LPS를 처리하기 전 3 시간 동안 95ESL와 EASL을 전처리한 결과, 95ESL과 EASL을 각각 100 µg/ml로 처리했을 때 NO의 생성량이 각각 14.2 µM과 12.8 µM로 현저하게 감소하였고, 같은 농도에서 95ESL보다 EASL이 NO의 생성 억제에 더 효과적이었다 (Fig. 103B).

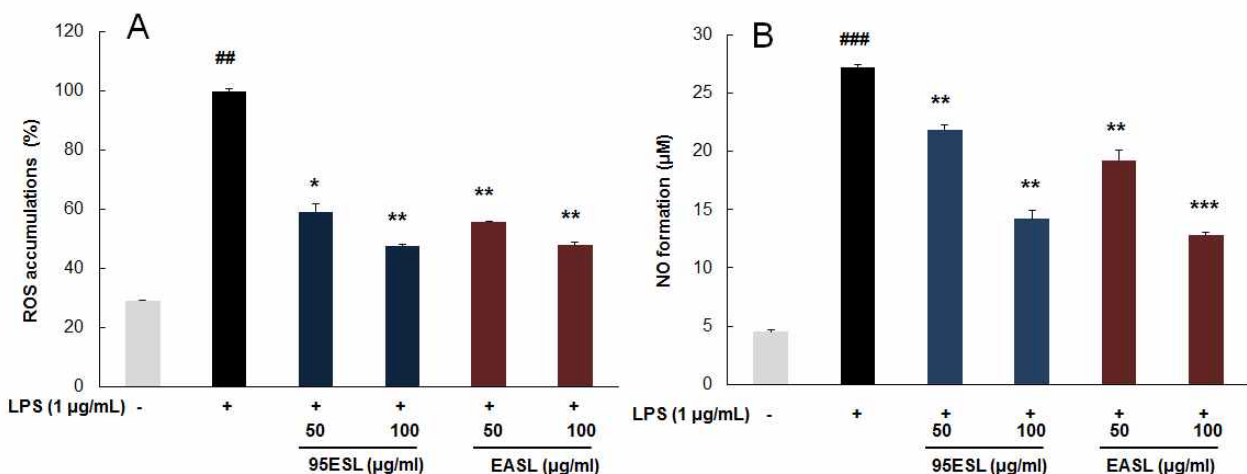


Fig. 103. 95ESL and EASL inhibit LPS-induced ROS accumulation (A) and NO production (B) in RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were treated with various concentrations of compounds for 3 h prior to the addition of LPS (1 µg/mL), and the cells were further incubated for 18 h. ## $P < 0.01$  compared with media alone-treated group; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , and \*\*\* $P < 0.001$  compared with LPS alone-treated group.

(나) RAW264.7 세포에서 95ESL과 EASL에 의한 유전자와 단백질 발현의 변화

① LPS 유도 RAW264.7 세포에서 95ESL과 EASL에 의한 유전자 발현의 변화

LPS 유도 독성에 의해 발생하는 염증성 사이토카인의 발현에 95ESL과 EASL이 미치는 영향을 알아보았다 (Fig. 103). 95ESL과 EASL의 처리로 염증성 인자를 조절하는 효소인 iNOS와 COX-2, 그리고 염증성 사이토카인인 IL-6, IL-1 $\beta$ , CCL3의 발현 양이 전반적으로 감소되었으며, 95ESL에 비해 EASL을 처리 하였을 때 염증성인자의 발현억제 효과가 월등하게 좋았다.

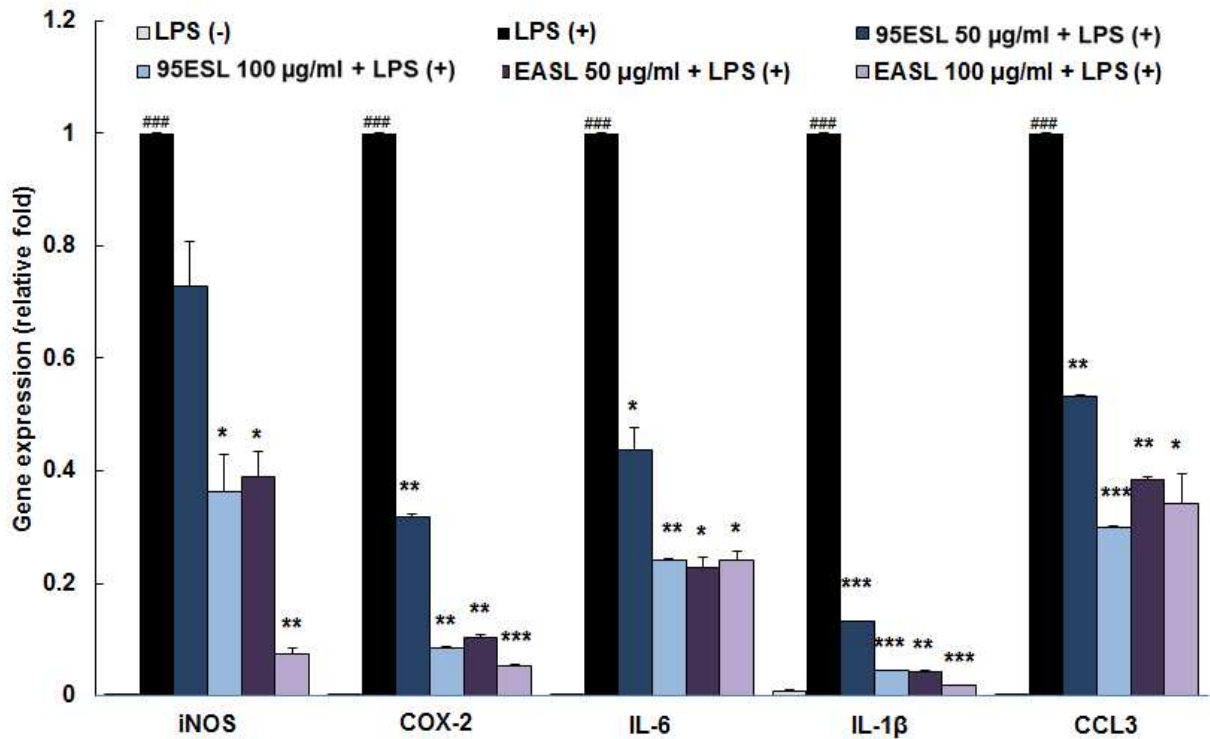


Fig. 103. Relative expression of proinflammatory mediators. Cells were treated with DMSO or compounds. After 3 hours treated LPS (1  $\mu$ g/ml) and 8 hours after treatment of LPS harvested. ###  $P < 0.001$  compared with media alone-treated group (LPS-). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , and \*\*\* $P < 0.001$  compared with LPS alone-treated group (LPS+).

② LPS 유도 RAW264.7 세포에서 95ESL과 EASL에 의한 단백질 발현 변화

- 95ESL과 EASL에 의한 iNOS와 COX-2의 단백질 발현 변화: 콩잎추출물의 염증성 인자를 조절하는 효소인 iNOS와 COX-2의 발현이 95ESL과 EASL에 의해 감소되었으며, 특히 95ESL에 비해 EASL을 처리 하였을 때 iNOS의 발현억제 효과가 월등하게 좋았다 (Fig. 105).

- 95ESL과 EASL에 의한 NF- $\kappa$ B와 I $\kappa$ B의 단백질 발현의 변화: NF- $\kappa$ B는 염증반응, 면역반응 등 다양한 유전자의 발현에 관여하는 전사 인자로 종양형성, 자가 면역질환, 염증반응에 중요한 역할을 담당하고 있다. NF- $\kappa$ B는 세포질 속에 p50과 p65의 heterodimer와 저해 단백질인 I $\kappa$ B와 함께 불활성형으로 존재하다 염증성 자극에 의해 I $\kappa$ B kinase가 활성화되어 I $\kappa$ B가 분해되면, NF- $\kappa$ B는 활성화된 후 핵 안으로 이동하게 되어 염증반응을 유도하는 유전자 발현을 촉진시킨다. 따라서 본 실험에서는 LPS에 의해서 활성화된 NF- $\kappa$ B가 95ESL과 EASL에 의해 억제되는 기전을 알아보려고 Western blot analysis를 이용하여 NF- $\kappa$ B활성을 조사하였다. 그

결과 95ESL과 EASL을 100  $\mu\text{g/ml}$ 로 처리 하였을 때 인산화된 NF- $\kappa$ B와 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 발현 양이 줄어들었다는 것을 확인하였다 (Fig. 106).

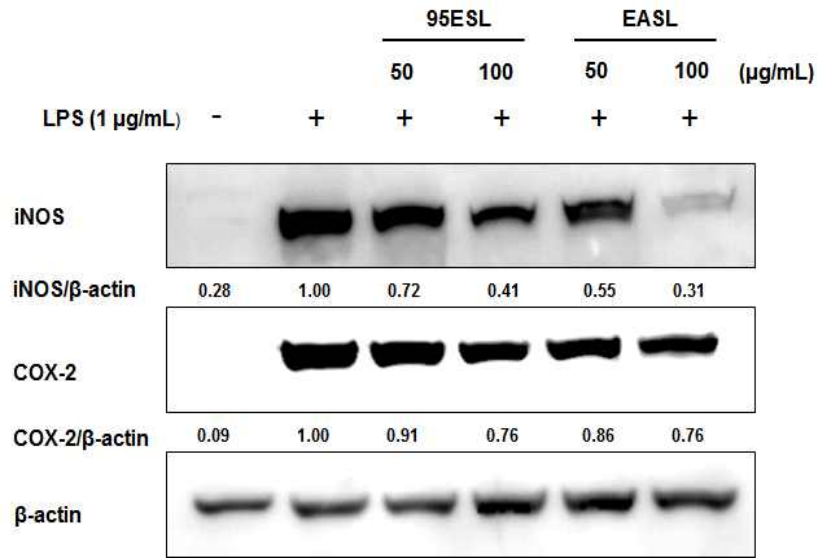


Fig. 105. Effects of 95ESL and EASL on LPS induced iNOS and COX-2 expression in RAW264.7 cells. The total lysates of the proteins were subjected to Western blot analysis, as described under Materials and Methods. Cells were pretreated with samples at the indicated concentrations for 3 h and then exposed to LPS (1 $\mu\text{g/ml}$ ) for 24 h. The ratio of immunointensity between COX-2/iNOS and  $\beta$ -actin was calculated.

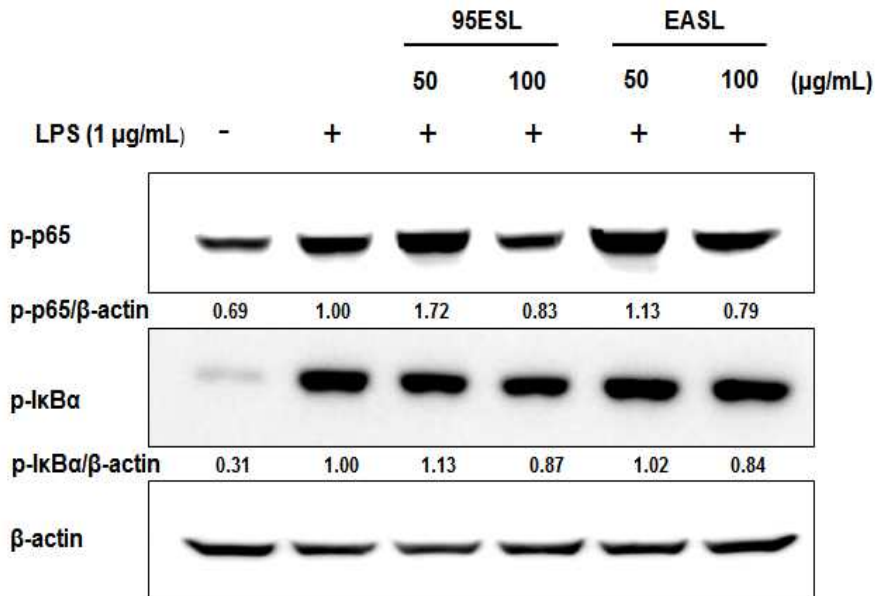


Fig. 106. Effects of 95ESL and EASL on LPS induced phosphorylation of NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B $\alpha$  in RAW264.7 cells. The total lysates of the proteins were subjected to Western blot analysis, as described under Materials and Methods. Cells were pretreated with samples at the indicated concentrations for 3 h and then exposed to LPS (1 $\mu\text{g/ml}$ ) for 2 h. The ratio of immunointensity between NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B $\alpha$  and  $\beta$ -actin was calculated.

(다) 테로카판 화합물 (phaseol, isotrifoliol, coumestrol)의 항염증 활성

① RAW264.7 세포에서 phaseol, isotrifoliol, coumestrol의 세포독성 측정

RAW264.7 세포에서 phaseol, isotrifoliol, coumestrol의 세포독성을 측정해 본 결과, phaseol은 25, 50, 100  $\mu\text{M}$ 을 처리하였을 때 100  $\mu\text{M}$ 에서 약 71%의 세포 생존율을 보였고, isotrifoliol

은 12.5, 25, 50  $\mu\text{M}$ 을 처리하였을 때 50  $\mu\text{M}$ 에서 72%의 생존율을 보였다. 반면 coumestrol을 농도별로 처리한 결과, 100  $\mu\text{M}$ 에서도 독성을 나타내지 않았다 (Fig. 107).

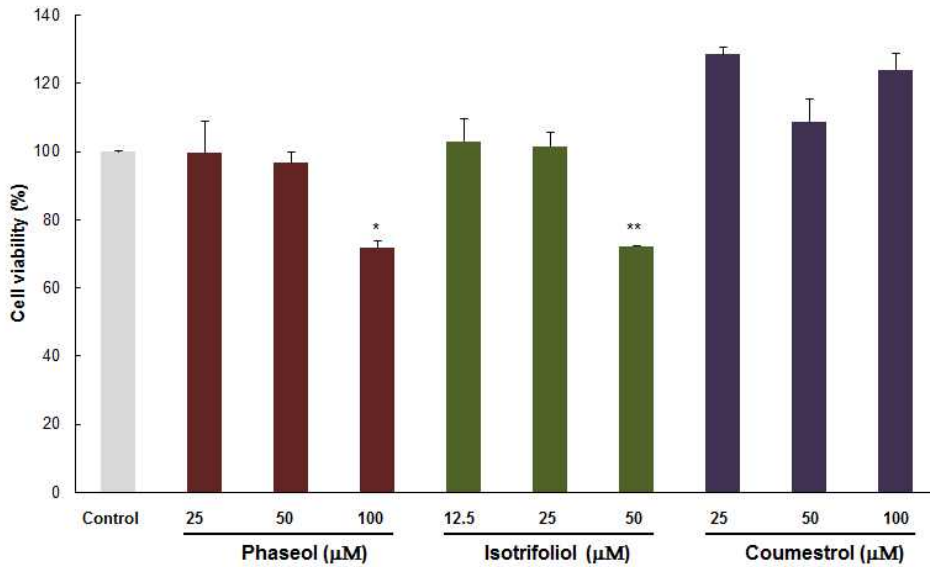


Fig. 107. Cell viability of phaseol, isotrifoliol, and coumestrol in RAW264.7 cells. Cells were treated with vehicle (DMSO) or indicated concentration of compounds. 24 h after treatment of extracts, cell viability was measured by Cyto X™ cell viability assay kit.

② LPS 유도 RAW264.7 세포에서 phaseol, isotrifoliol, coumestrol의 ROS 축적 및 NO 생성 억제 효능

LPS 유도 RAW264.7 세포에서의 Phaseol, isotrifoliol, coumestrol의 ROS 축적 억제능을 알아보았다. 세포독성이 나타나지 않는 농도에서 phaseol (25, 50  $\mu\text{M}$ ), isotrifoliol (12.5, 25  $\mu\text{M}$ ), coumestrol (25, 50, 100  $\mu\text{M}$ )을 LPS 유도 RAW264.7 세포에 처리하였을 때, phaseol은 50  $\mu\text{M}$ 에서 유의적으로 ROS 축적량이 감소함을 보였으며 ( $P < 0.05$ ), isotrifoliol은 12.5  $\mu\text{M}$ 와 25  $\mu\text{M}$ 에서 유의적으로 ROS 축적이 감소되었다. 그리고 coumestrol은 100  $\mu\text{M}$ 에서 유의적으로 ROS 축적이 감소되었다. 세 가지 화합물을 같은 농도 (25  $\mu\text{M}$ )에서 비교 하였을 때 isotrifoliol이 가장 ROS의 축적 억제에 효과적임을 알 수 있었다 (Fig. 108).

LPS 유도 RAW264.7 세포에서의 Phaseol, isotrifoliol, coumestrol의 NO 생성 억제능을 알아보았다. 위와 같이 세포독성이 나타나지 않는 농도에서 phaseol, isotrifoliol, coumestrol을 LPS 유도 RAW264.7 세포에 처리하였을 때, phaseol은 25  $\mu\text{M}$  ( $P < 0.01$ )과 50  $\mu\text{M}$  ( $P < 0.001$ )에서 각각 유의적으로 NO 생성량이 감소되었다. Isotrifoliol은 12.5  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ 에서 유의적으로 NO의 생성이 억제되었고, 반면 coumestrol은 ROS와 마찬가지로 100  $\mu\text{M}$ 에서만 유의적으로 NO 생성량이 감소되었다 ( $P < 0.05$ ). 세 가지 화합물을 같은 농도 (25  $\mu\text{M}$ )에서 비교 하였을 때 이 보다 NO 생성 억제에 효능은 isotrifoliol > phaseol > coumestrol의 순으로 낮아지고 있었다 (Fig. 109).

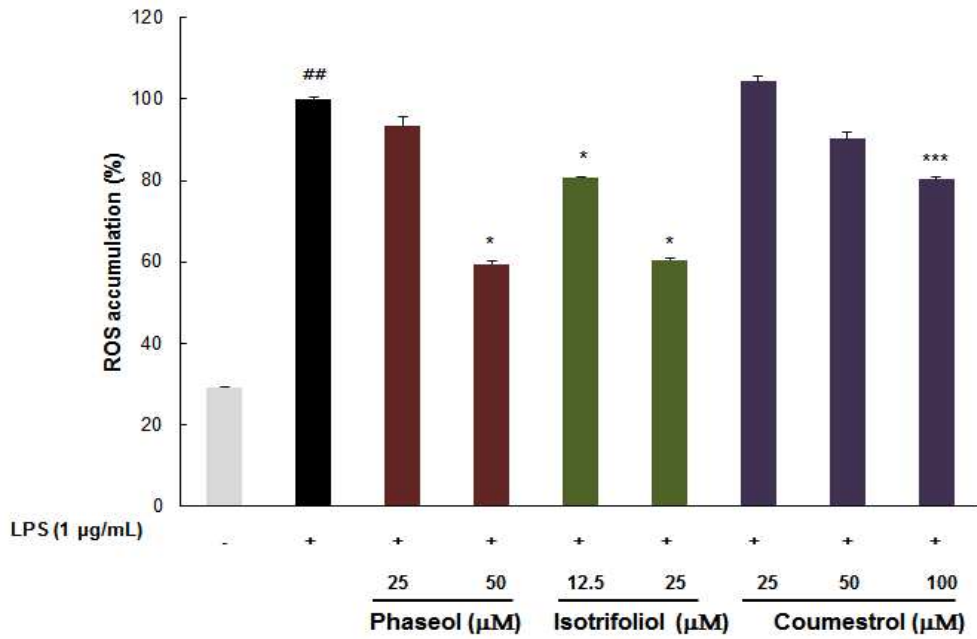


Fig. 108. Phaseol, Isotrifoliol, and coumestrol inhibits LPS-induced ROS accumulation in RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were treated with various concentrations of compounds dissolved in dimethylsulfoxide for 3 h prior to the addition of LPS (1 µg/mL), and the cells were further incubated for 18 h. ## $P < 0.01$  compared with media alone-treated group; \* $P < 0.05$  and \*\*\* $P < 0.001$  compared with LPS alone-treated group.

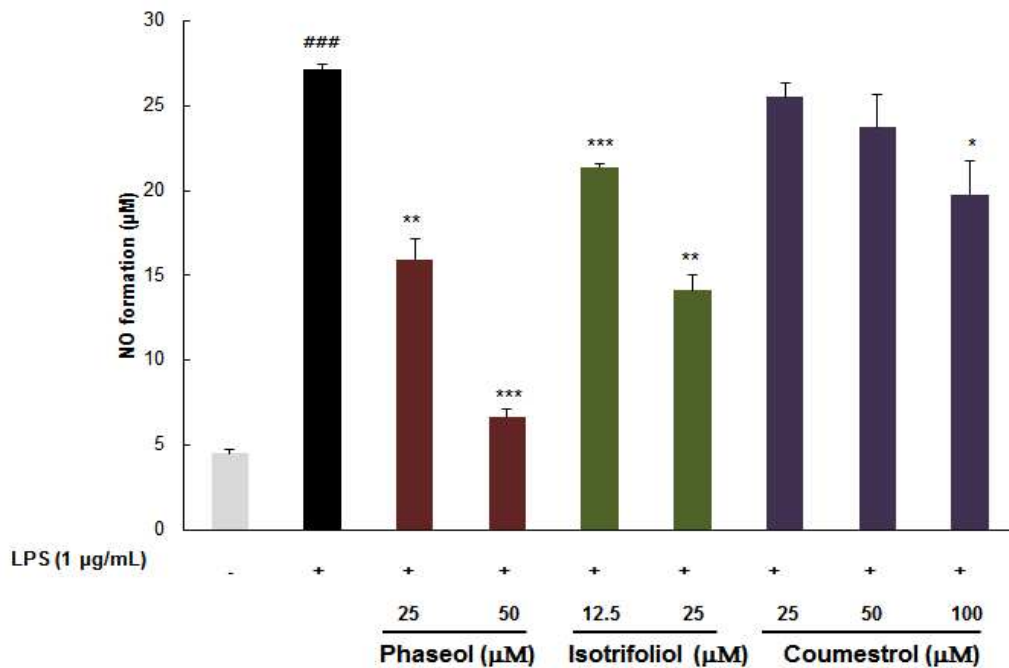


Fig. 109. haseol, Isotrifoliol, and coumestrol inhibit LPS-induced NO production in RAW264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with various concentrations of compounds dissolved in dimethylsulfoxide for 2 h prior to the addition of LPS (1 µg/mL), and the cells were further incubated for 18 h. The culture medium was subsequently collected, and the nitrite concentration was measured by Griess reaction. ### $P < 0.001$  compared with media alone-treated group; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$  compared with LPS alone-treated group.

③ LPS 유도 RAW264.7 세포에서 phaseol, isotrifoliol, coumestrol에 의한 유전자 발현의 변화

qRT-PCR를 통하여 RAW264.7 세포에서 phaseol, coumestrol, isotrifoliol이 LPS 유도 독성에 의한 염증성 사이토카인과 효소의 조절에 미치는 영향을 조사하였다. Isotrifoliol를 12.5, 25  $\mu\text{g/ml}$  농도로 처리하였을 때 염증에 의해 발현이 증가되는 유전자인 iNOS, COX-2, CCL3, IL-6, IL-1 $\beta$ 의 발현이 감소되었다. Phaseol을 25, 50  $\mu\text{g/ml}$  농도로 처리하였을 때 iNOS와 IL-1 $\beta$ 의 발현이 LPS만을 처리한 대조군에 비해 유의적으로 감소되고, coumestrol을 50, 100  $\mu\text{g/ml}$  농도로 처리하였을 때 COX-2, CCL3 IL-6, IL-1 $\beta$  유전자의 발현이 LPS만을 처리한 대조군에 비해 감소하였다 (Fig. 110),

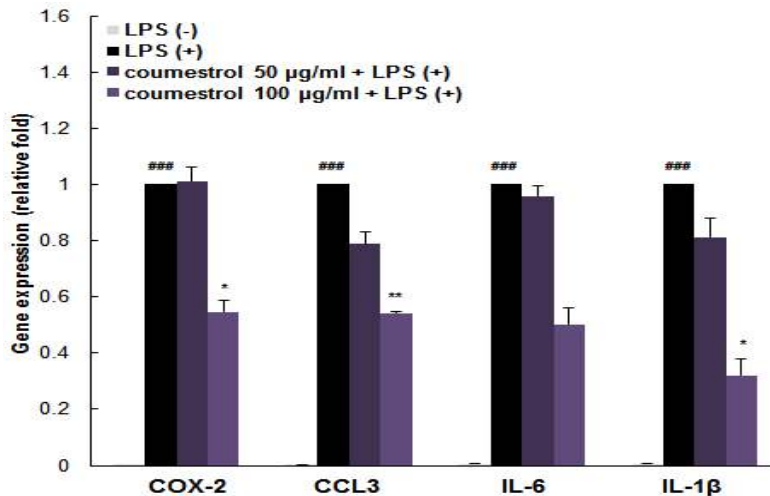
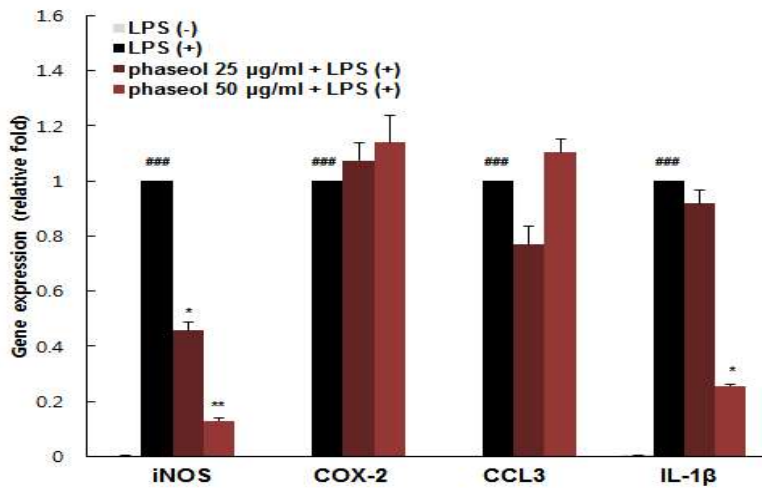
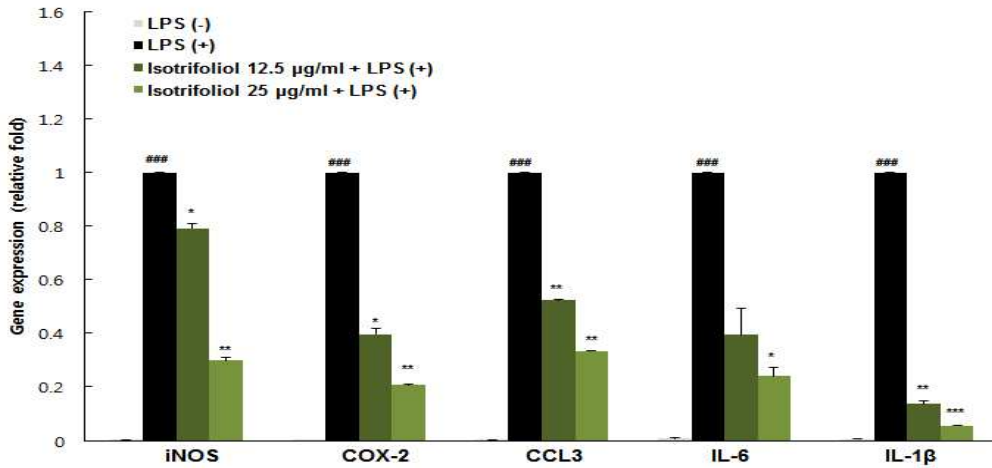




Fig. 110. Effects of isotrifoliol, phaseol, and coumestrol on LPS-induced gene expression of pro-inflammatory mediators in RAW264.7 cells. Cells were treated with vehicle (DMSO) or compounds. After 3 h treated LPS (1  $\mu$ g/ml) and 8 hours after treatment of LPS harvested. ###  $P < 0.001$  compared with media alone-treated group (LPS -). \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$  compared with LPS alone-treated group (LPS+).

④ LPS 유도 RAW264.7 세포에서 phaseol, isotrifoliol, coumestrol에 의한 단백질 발현 변화  
 - RAW264.7 세포에서 LPS 유도독성에 의해 증가된 iNOS와 COX-2의 발현이 isotrifoliol의 처리로 감소되었다 (Fig. 111).

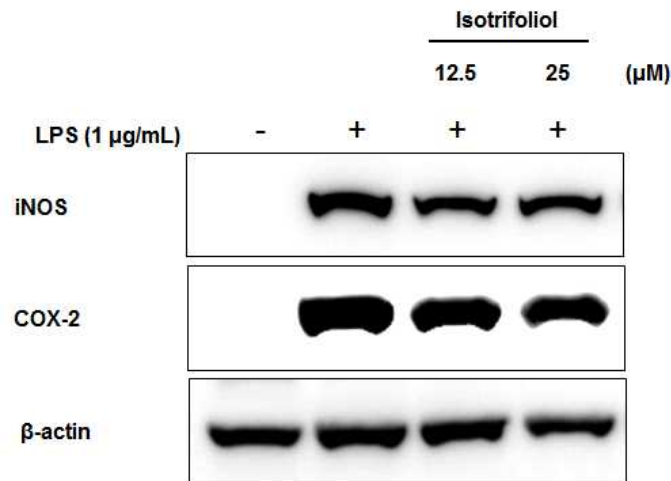


Fig. 111. Effects of Isotrifoliol on LPS-induced iNOS and COX-2 expression in RAW264.7 cells. Cells were pretreated with samples at the indicated concentrations for 3 h and then exposed to LPS (1 $\mu$ g/ml) for 24 h. The ratio of immunointensity between COX-2/iNOS and  $\beta$ -actin was calculated.

- Isotrifoliol을 12.5, 25  $\mu$ M 농도로 처리하였을 때 RAW264.7 세포에서 LPS 유도독성에 의해 증가된 인산화가 억제 되어지는 양상을 볼 수 있었으며, I $\kappa$ B $\alpha$ 의 인산화는 12.5, 25  $\mu$ M 농도로 Isotrifoliol을 처리 하였을 때 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 활성화를 강력히 억제 시키는 것을 알 수 있었다.

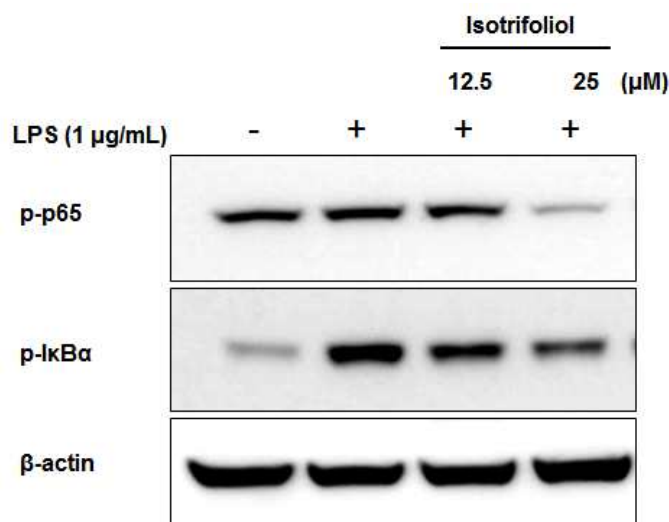


Fig. 112. Effects of isotrifoliol on LPS-induced phosphorylation of NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B $\alpha$  in RAW264.7 cells. Cells were pretreated with samples at the indicated concentrations for 3 h and then exposed to LPS (1 $\mu$ g/ml) for 2 h. The ratio of immunointensity between NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B $\alpha$  and  $\beta$ -actin was calculated.

- NF- $\kappa$ B의 상위 신호 전달 기전인 MAPKs의 단백질 발현에 대해 isotrifoliol이 미치는 효과를 살펴 보았다. MAPKs의 경우 ERK, JNK, p38이 존재하며, 이 세 가지 단백질의 경우 염증을 일으키는 유도 물질에 의해 인산화가 증가되면서 염증반응을 일으킨다. LPS 유도 RAW264.7 세포에 isotrifoliol를 처리하였을 때 ERK와 p38의 단백질 발현이 감소하였으며, 반면에 JNK 발현 수준은 변화가 없었다 (Fig. 113). 이를 통해 isotrifoliol은 ERK와 p38의 인산화를 억제하여 NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B $\alpha$ 의 활성화를 억제시키고, 다음 단계로 염증 매개 효소인 iNOS와 COX-2의 발현을 감소시킴으로써 염증반응을 조절함을 알 수 있었다.

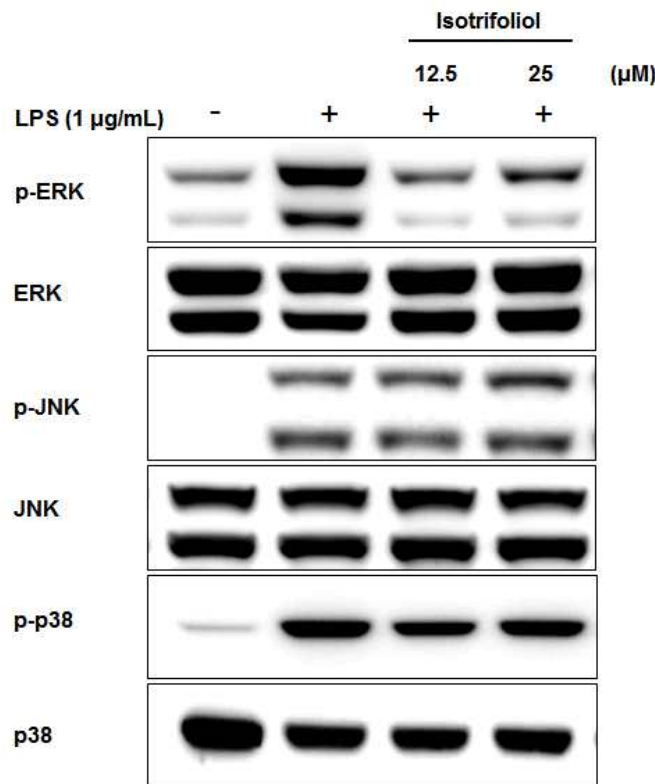


Fig. 113. Effects of isotrifoliol on LPS-induced phosphorylation of MAPKs in RAW264.7 cells. Cells were pretreated with samples at the indicated concentrations for 3 h and then exposed to LPS (1 $\mu$ g/ml) for 10 min. The ratio of immunointensities between p-ERK/ERK, p-JNK/JNK, p-p38/p38, and  $\beta$ -actin were calculated.

### (3) 3T3-L1 세포에서의 항비만 활성화

#### (가) 3T3-L1 세포에서 95ESL과 EASL의 항비만 활성화

##### ① 3T3-L1 세포에서 95ESL과 EASL의 세포독성 측정

95ESL과 EASL를 3T3-L1 세포에 농도별로 처리하여 독성실험을 수행한 결과, 95ESL과 EASL은 100  $\mu$ g/ml에서도 독성이 나타나지 않았다 (Fig. 114).

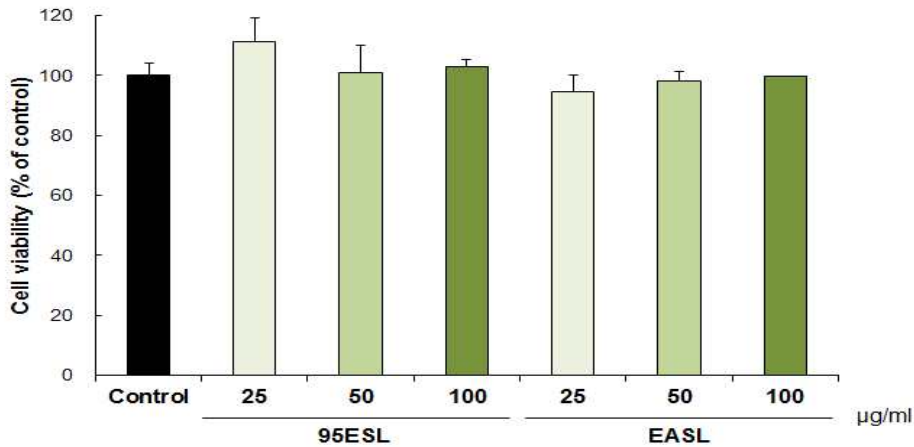
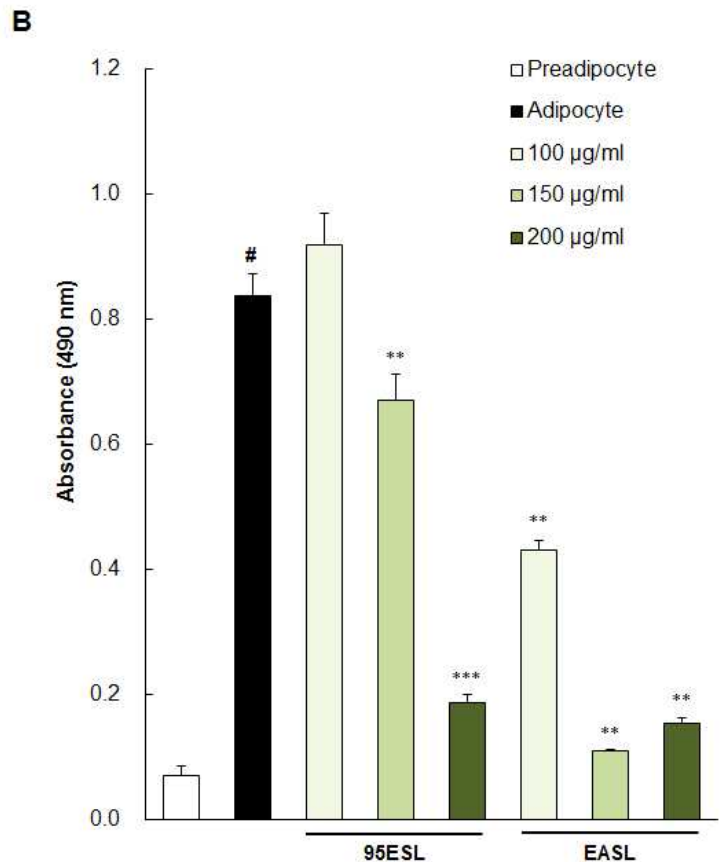
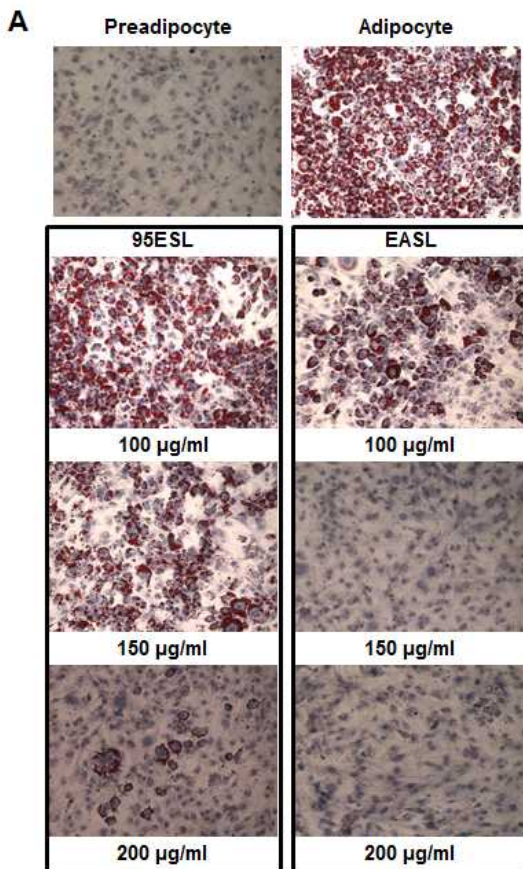


Fig. 114. Cell viability of 95ESL and EASL in 3T3-L1 cells. 3T3-L1 preadipocytes were incubated with 95ESL and EASL for 48 hr. Cells treated with 0.1% DMSO were used as controls. cell viability was measured by Cyto X™ cell viability assay kit (LPS solution, Korea).

② 3T3-L1 세포에서 95ESL과 EASL의 지방축적 억제능 측정

3T3-L1 세포에서 95ESL과 EASL의 전처리 후에 지방축적을 사진으로 비교한 결과, 100 µg/ml의 동일 농도에서 EASL이 95ESL 보다 지방축적을 강하게 억제하는 것을 확인하였다. 이를 isopropanol로 추출하여 490 nm에서 흡광도 값을 측정한 결과, 150 µg/ml에서 95ESL은 20.0%, EASL 86.9% 씩 지방 축적으로 억제하였다 (Fig. 115). 이러한 결과는 95ESL에 비하여 EASL에 다량 함유되어 있는 테로카판 계열 물질인 coumestrol과 phaseol의 강한 지방 축적 억제능 결과와 일치한다.

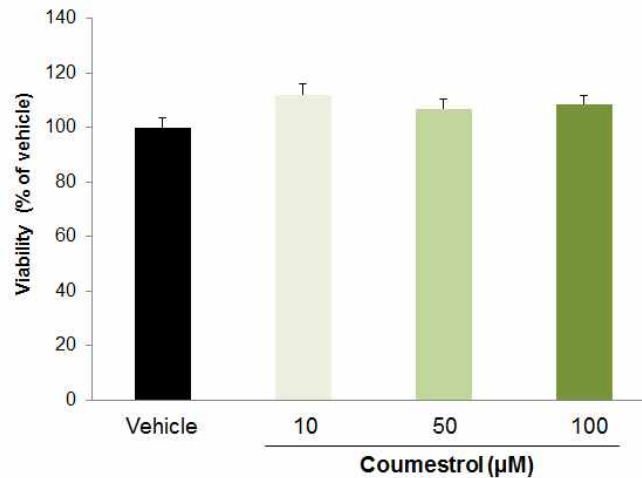


**Fig. 115. Effects of 2012-JP-GH-109d 95ESL and EASL on lipid accumulation in 3T3-L1 cells.** Two day post-confluent 3T3-L1 preadipocytes (day 0) were treated with the 100, 150, and 200 mg/ml 95ESL and EASL every other day for 4 days. Cells treated with 0.1% DMSO were used as controls (adipocytes). The assays were performed on fully differentiated adipocytes (day 8). (A) Lipid accumulation in differentiated adipocyte was assessed by Oil Red O staining. (B) 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. # $p < 0.001$  versus preadipocytes. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs adipocytes.

**(나) Coumestrol의 항비만 활성**

① 3T3-L1 세포에서 coumestrol의 세포독성 측정

Coumestrol을 3T3-L1 세포에 농도별로 처리하여 독성실험을 수행한 결과, coumestrol은 100  $\mu$ M까지 독성이 나타나지 않았다.



**Fig. 116. Cell viability of Coumestrol in 3T3-L1 cells.** 3T3-L1 preadipocytes were incubated with Coumestrol 50  $\mu$ M and 100  $\mu$ M for 48 hr. Cells treated with 0.1% DMSO were used as controls. Cell viability was measured by Cyto X™ cell viability assay kit (LPS solution, Korea). Values are represented the mean $\pm$ SD of triplicated experiments. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , versus control.

② 3T3-L1 세포에서 coumestrol의 지방축적 억제능 측정

3T3-L1 세포에서 adipogenesis assay를 통하여 coumestrol의 지방 축적 억제 효과를 측정하였다. 4일 동안 분화 유도물질을 처리하여 adipocytes로 분화시키고 동시에 coumestrol 25, 50, 100  $\mu$ M 농도를 처리한 후 중성지방 축적을 현미경으로 관찰한 결과 (Fig. 117A), coumestrol 농도 의존적으로 중성지방의 축적이 감소되었다. 축적된 중성지방을 isopropanol로 추출하여 490 nm에서 흡광도를 측정한 결과 coumestrol 25, 50  $\mu$ M 처리군에서 adipocytes군에 비해 각각 21.4%, 70.1% 유의적으로 지방 축적이 감소되었다 (Fig. 117B).

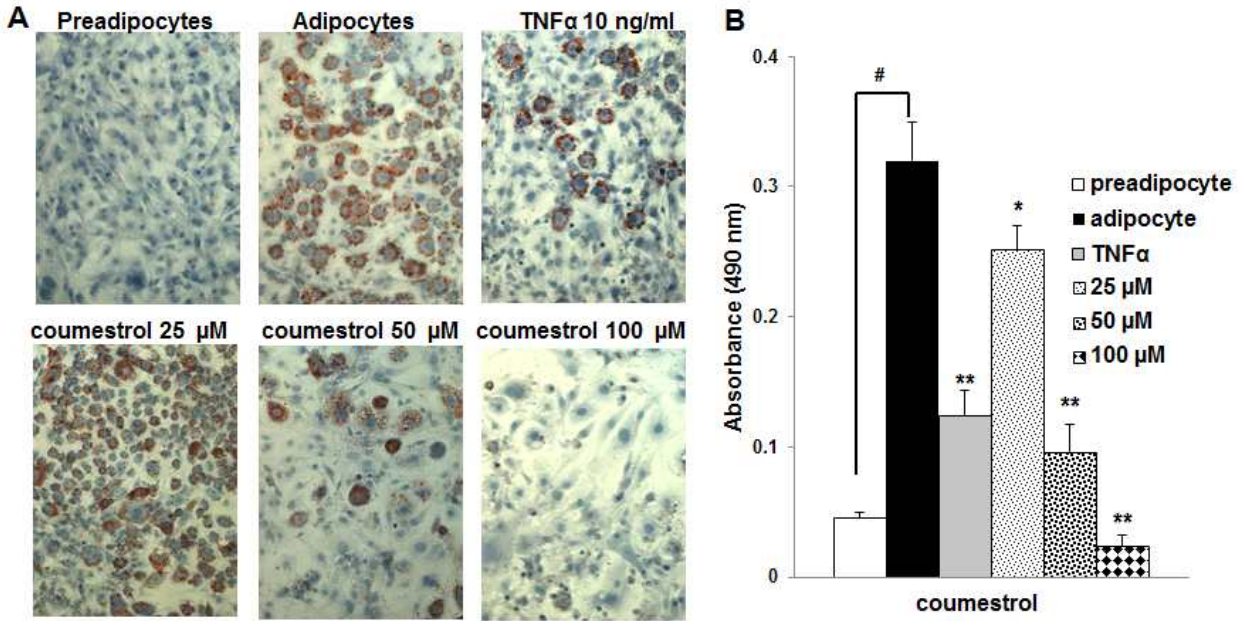


Fig. 117. Anti-adipogenic effects of coumestrol on 3T3-L1 adipocytes. Two-day post-confluent 3T3-L1 preadipocytes (day 0) were treated with the indicated concentrations of coumestrol every other day for 4 days. Cells treated with 0.1% DMSO were used as controls (adipocytes). The assays were performed on fully differentiated adipocytes (day 7). 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 means  $\pm$  SD. #  $p < 0.01$  versus preadipocytes, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  versus adipocytes.

③ 3T3-L1 세포에서 coumestrol에 의한 지방생합성 관련 유전자와 단백질 발현의 변화

- Coumestrol의 전처리로 PPAR $\gamma$ , c/EBP $\alpha$ , 및 SREBP-1과 같은 지방세포의 지방축적을 조절하는 transcription factor의 발현이 유의적으로 감소되었다. 또한 지질 합성과정에서 rate limit enzyme으로 작용을 하는 FAS의 유전자 및 단백질의 발현도 유의적으로 감소되었다 (Figs. 118 & 119).

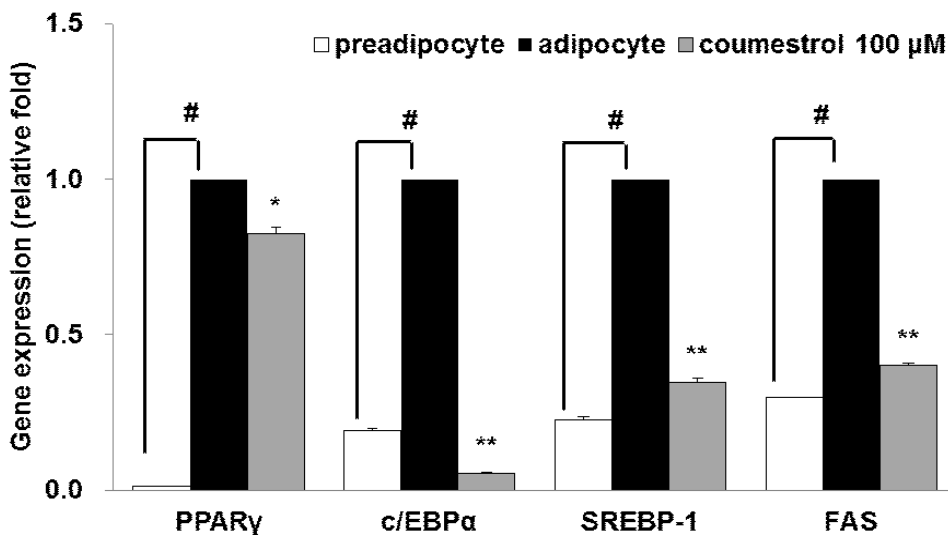


Fig. 118. Effects of coumestrol on gene expression in 3T3-L1 cells. The levels of mRNA in cells were measured by qRT-PCR and normalized by GAPDH. Data are expressed as the means  $\pm$  SD. #  $p < 0.01$  versus preadipocytes, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  versus adipocytes.

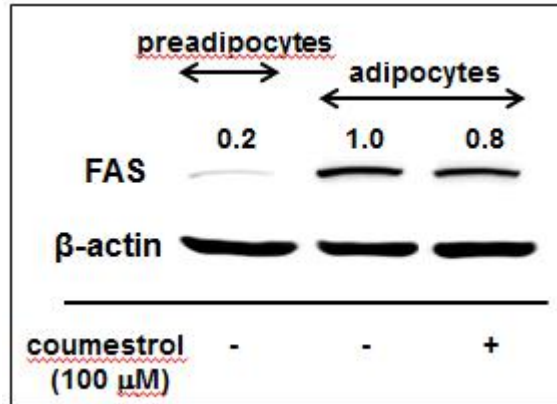


Fig. 119. Effects of coumestrol on the protein levels of 3T3-L1 cells were analyzed by Western blot analysis.

이상의 결과로부터 테로카판 화합물 coumestrol은 3T3-L1 지방세포에서 농도 의존적인 지방축적 억제 효과를 나타내었고, 이는 지방 축적을 조절하는 transcription factor PPAR  $\gamma$ , c/EBP  $\alpha$  및 SREBP-1의 유전자 발현을 억제하여 최종적으로 FAS 유전자 및 단백질의 발현을 저해하면서 일어난다.

#### (다) Phaseol의 항비만 활성

##### ① 3T3-L1 세포에서 phaseol의 세포독성 측정

Phaseol을 3T3-L1 세포에 농도별로 처리하여 독성실험을 수행한 결과, 25  $\mu\text{g/ml}$ 에서는 대조군에 비해 독성이 나타나지 않았으나, 50  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$ 에서 독성이 나타났다.

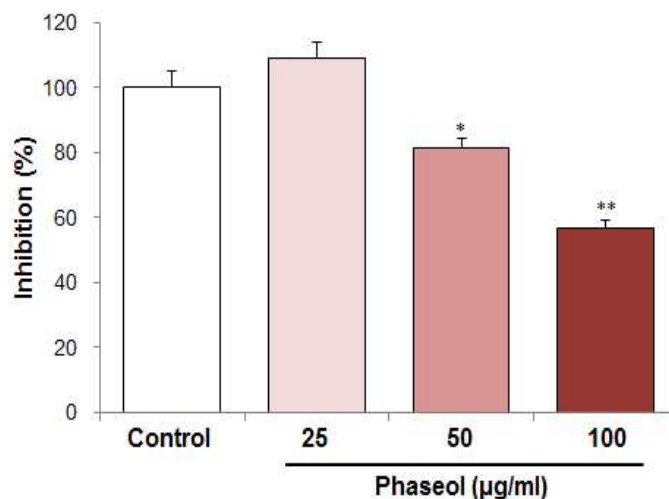
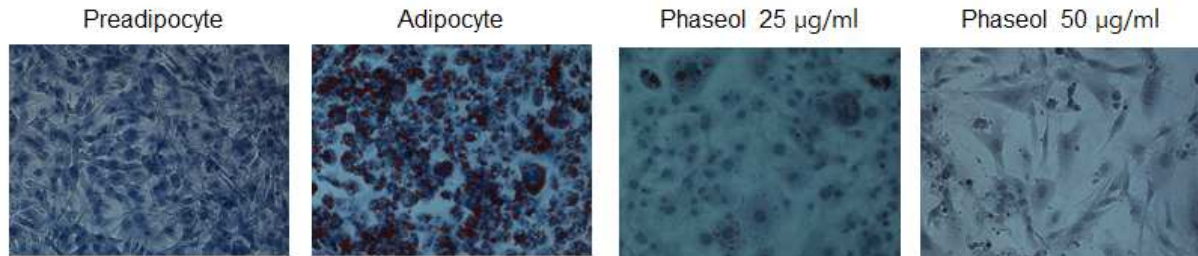


Fig. 120. Cell viability of Phaseol in 3T3-L1 cells. 3T3-L1 preadipocytes were incubated with Phaseol 25  $\mu\text{g/ml}$  and 50  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$  for 48 hr. Cells treated with 0.1% DMSO were used as controls. Cell viability was measured by Cyto X™ cell viability assay kit (LPS solution, Korea). Values are represented the mean  $\pm$  SD of triplicated experiments. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , versus control.

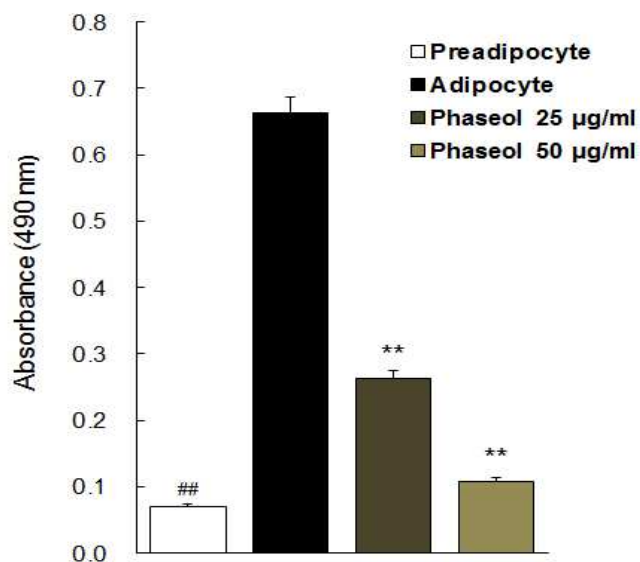
##### ② 3T3-L1 세포에서 phaseol의 지방축적 억제능 측정

3T3-L1 세포에서 adipogenesis assay를 시행하여 3일 동안 분화 유도 물질을 처리하여 adipocytes로 분화시키면서 phaseol을 처리하였다. TG 축적을 현미경으로 관찰한 결과 (Fig.

121), phaseol 25  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$ 에서 TG 축적이 adipocytes에 비하여 감소되는 효과를 확인 하였으나, phaseol 50  $\mu\text{g/ml}$  농도에서는 독성이 나타났다. 이 세포를 isopropanol로 추출하여 490 nm에서 흡광도 값을 측정한 결과, phaseol 전처리 시 25  $\mu\text{g/ml}$ 에서 39.7% TG 축적을 억제하였다 (Fig. 122).



**Fig. 121. Anti-adipogenic effects of phaseol on 3T3-L1 adipocytes** Two-day post-confluent 3T3-L1 preadipocytes (day 0) were treated MDI (IBMX, DEX, insulin) with the indicated concentrations of phaseol every day for 4 days. Cells treated with 0.1% DMSO were used as controls (adipocytes). The assays were performed on fully differentiated adipocytes (day 7). Lipid accumulation in differentiated adipocytes was assessed by Oil Red O staining. 3T3-L1 cells were photographed at magnification  $\times 200$ .



**Fig. 122. Anti-adipogenic effects of phaseol on 3T3-L1 adipocytes** 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. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  versus adipocytes

### ③ 3T3-L1 세포에서 phaseol에 의한 지방생합성 관련 유전자 발현의 변화

3T3-L1 세포에 phaseol을 전처리한 후 지방합성에 관여하는 유전자들의 발현 변화를 조사 하였다. Phaseol을 25  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$  농도로 처리하였을 때, 지방세포의 성장을 이끄는 중요한 전사인자인 C/EBP  $\alpha$  유전자의 발현이 유의적으로 감소하였다. 또한 지방세포 분화에 관여하는 전사인자인 SREBP1과 지방합성에 관여하는 FAS, DGAT1, 지방산 운반에 관여하는 aP2 유전자 발현이 유의적으로 감소하였다 (Fig. 123).

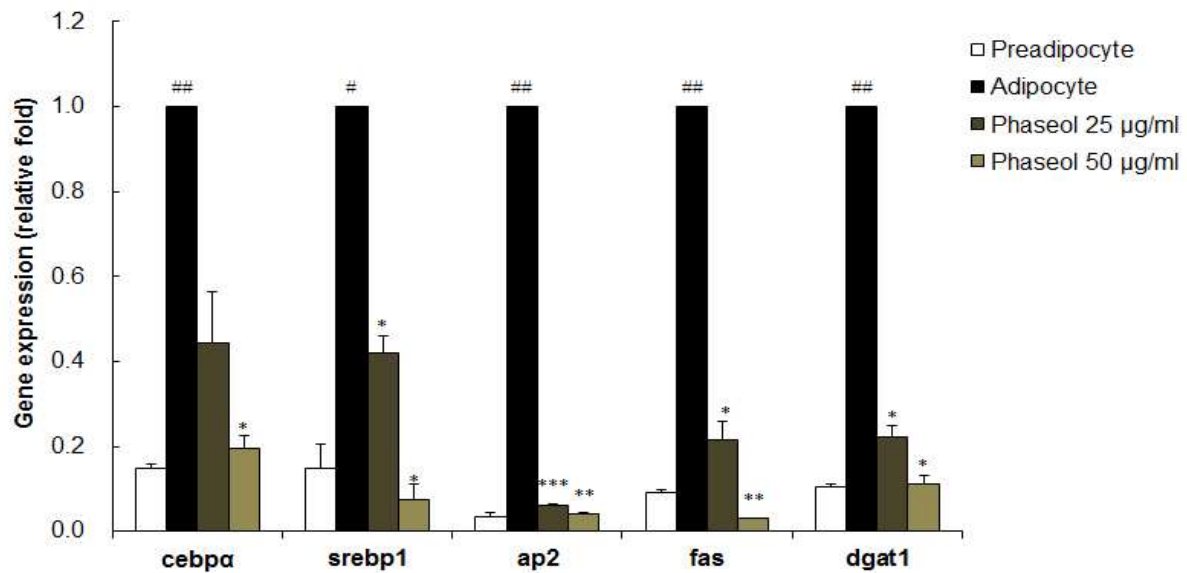


Fig. 123. Effects of phaseol on the expression of adipogenesis-related genes in 3T3-L1 cells. Cells were incubated with 25–50  $\mu\text{g/ml}$  Phaseol for the differentiation period. After 48 h incubation, the cells were harvested. The levels of mRNA were measured by real-time qRT-PCR and normalized to GAPDH. Values are represented the mean $\pm$ D of triplicated experiments. # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  versus preadipocytes \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  versus adipocytes.

④ 3T3-L1 세포에서 phaseol에 의한 지방분해 관련 유전자 발현의 변화

3T3-L1 세포에 phaseol을 전처리한 후 지방분해에 관여하는 유전자들의 발현 변화를 qRT-PCR 방법으로 조사하였다. 그 결과 phaseol을 50  $\mu\text{g/ml}$  농도로 처리하였을 때, 지방분해 효소인 HSL의 발현이 유의적으로 증가하였다 ( $P < 0.05$ ).

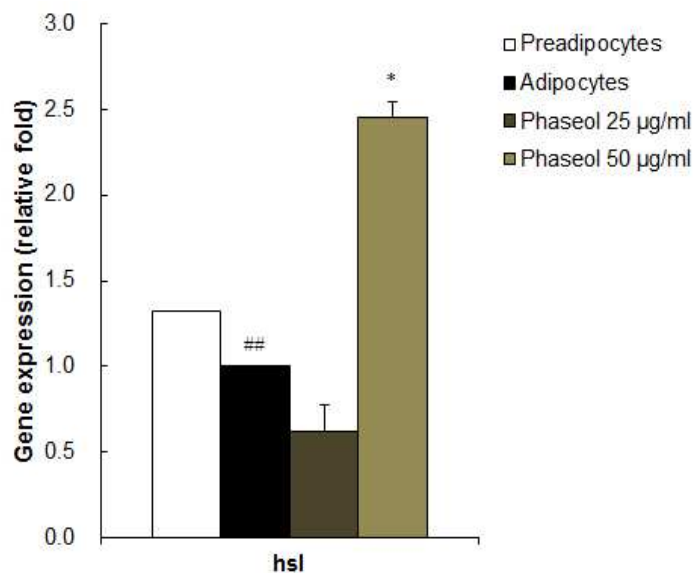


Fig. 124. Effects of Phaseol on the expression of lipolysis-related genes in 3T3-L1 cells. Cells were incubated with 25–50  $\mu\text{g/ml}$  Phaseol for the differentiation period. After 2 h incubation, the cells were harvested. The levels of mRNA were measured by real-time qRT-PCR and normalized to GAPDH. Values are represented the mean $\pm$ D of triplicated experiments. # $P < 0.05$  versus preadipocytes \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  versus adipocytes.



## (2) 1차년도 *in vitro*, 세포계 실험 및 2차년도 동물실험 결과의 종합적인 분석을 통한 체지방 조절 및 혈당 강하 기작의 체계적 작용점 제시

### (가) 95ESL 및 EASL의 항당뇨 작용 기작

- 당뇨유발 마우스를 이용하여 95ESL, EASL을 식이와 함께 12 주 동안 투여한 후 대조군에 비해 95ESL, EASL군에서 모두 혈중 HbA1c, glucose 및 insulin 농도가 효과적으로 감소하였다. 또한 간 기능 지표물질인 GOT, GPT의 농도가 대조군에 비해 유의적으로 감소하였다.
- 95ESL 및 EASL은 마우스에서 인슐린 내성 개선 효과를 보여주었고, 소장에서 탄수화물 소화 흡수를 도모하는 필수효소인  $\alpha$ -glucosidase의 활성을 저해시켜 체내 포도당의 흡수를 억제시켰을 것으로 추측된다. 또한 EASL의 투여로 지방흡수 저해효과를 나타냈다.
- 95ESL 및 EASL의 투여는 당뇨 유발 마우스에서 손상된 췌장조직이 회복되어 islet 크기가 대조군에 비해 증가하였고, 이에 따른 인슐린 단백질의 발현도 효과적으로 증가되었다. 또한 지방과 간 조직에서 지방축적을 억제하였고, EASL 투여군이 95ESL 투여군보다 더 효과적인 억제효과를 보였다.
- 95ESL 및 EASL은 췌장 조직에서 인슐린 신호전달에 관련된 Insr, IRS1의 발현을 향상시켰으며 이는 glucose에 대한 반응성을 증가시켰을 것이다. EASL의 투여는 췌장 조직에서 베타세포의 증식에 관련된 Ngn3, MafA 유전자 발현을 증가, 베타세포의 사멸에 관련된 p53 유전자의 발현은 감소시킴으로서 인슐린 유전자 Ins2의 발현이 증가시켜 최종적으로 인슐린 합성을 증가시켰다.
- 95ESL 및 EASL은 MIN6 세포에서 인슐린 분비능을 증가시키는데 이러한 효과는 EASL에서 더 효과적이었다. 추출물 g 당 테로카판 화합물의 함량 (지표물질인 coumsterol 기준)이 95ESL에 비해 EASL에 2배 정도 많이 함유 되어 있으며, 테로카판계 화합물인 isotrifoliol, coumestrol, phaseol을 분리하여 생리활성을 측정하였다. MIN6 세포에서 분리된 테로카판 화합물의 인슐린 분비능의 효과는 isotrifoliol > phaseol > coumestrol 순으로 활성이 높았다.
- 베타세포에서 Isotrifoliol와 phaseol의 인슐린 분비를 촉진시키는 기전은 GLP-1R 유전자 발현을 증가시켜 그 다음 신호전달기전인 IRS1, IRS2의 유전자 발현을 증가, 최종적으로 PKA 단백질의 인산화를 일으켜 베타세포에서의 인슐린 분비를 향상시킴을 예측 할 수 있었다 (Fig. 125).
- 95ESL 및 EASL은 간 조직에서 당신생을 조절하는 유전자 G6Phase, PEPCK의 발현을 효과적으로 감소시켰고, 이는 혈당 조절에 기여하였을 것이다.
- 95ESL 및 EASL은 지방 조직에서 인슐린 신호전달에 관련된 IRS1, IRS2 및 이에 따른 glucose uptake에 중요한 조절인자인 GLUT4의 발현을 효과적으로 증가시켰다.

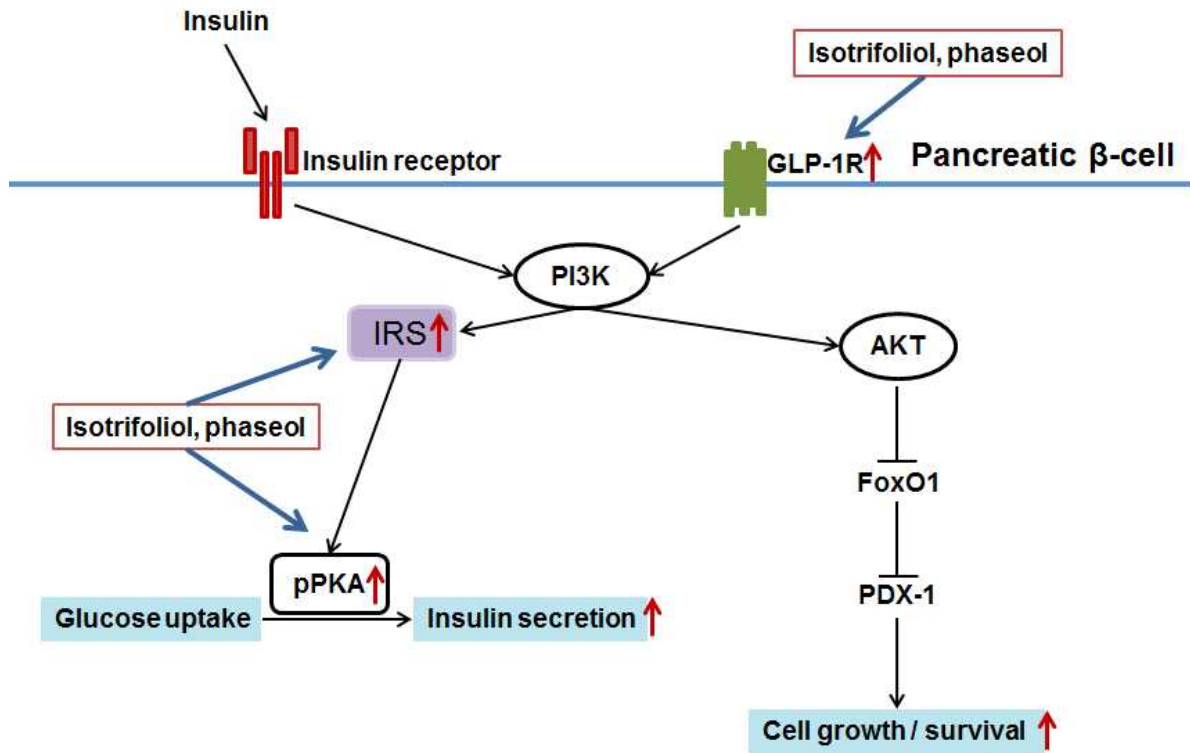


Fig. 125. Mechanism of PTH in anti-diabetic effect.

- 95ESL 및 EASL은 지방 조직에서 염증에 관련된 cytokine물질인 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  유전자의 발현이 유의적으로 감소시켰고, 이는 당뇨병에 동반된 염증반응을 감소하는데 기여할 것이다 (항염증 효과).
- 또한 95ESL 및 EASL의 항염증 효능은 RAW264.7 염증세포에서 NO의 생성 및 ROS의 축적을 감소하는 효과를 통해 검증하였다. 항염증 기전을 살펴본 결과, LPS에 의한 pre-inflammatory cytokines 유전자 (iNOS, COX-2, IL-6, IL-1 $\beta$ , CCL3) 및 염증매개효소 iNOS, COX-2 단백질의 발현을 억제하는 것을 알 수 있었으며, 이는 염증 기전인 NF- $\kappa$ B 활성 저해를 통해 이루어짐을 밝혔다. 또한, EASL이 95ESL에 비해 더 강한 항염증 효능을 나타내었다.
- 95ESL 및 EASL에 많이 함유되어 있는 테로카관계 화합물 isotrifoliol, coumestrol, phaseol이 NO생성 및 ROS 축적을 억제하는 항염증활성은 Isotrifoliol > phaseol > coumestrol 순으로 높았다.
- RAW264.7 세포에서 isotrifoliol은 가장 효과적으로 iNOS, COX-2, IL-6, IL-1 $\beta$ , CCL3 유전자의 발현을 농도의존적인 억제하였다. 반면 phaseol은 iNOS, IL-1 $\beta$  유전자의 발현만 효과적으로 억제하였고, coumestrol은 COX-2, IL-6, IL-1 $\beta$ , CCL3의 발현을 억제하였다.
- 가장 효과적인 항염증 효능을 나타낸 isotrifoliol은 iNOS, COX-2 단백질 발현도 효과적으로

감소시켰으며, 이러한 항염증 기전은 LPS에 의한 NF- $\kappa$ B p65 및 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 인산화를 억제하여 NF- $\kappa$ B의 세포핵으로 전사 억제에 의해 일어남을 알 수 있었다. 또한 isotrifoliol은 그 상위 기전인 MAPKs 중 ERK, p38 단백질의 인산화를 억제함으로써 최종적으로 항염증 효능을 나타냄을 알 수 있다 (Fig. 124).

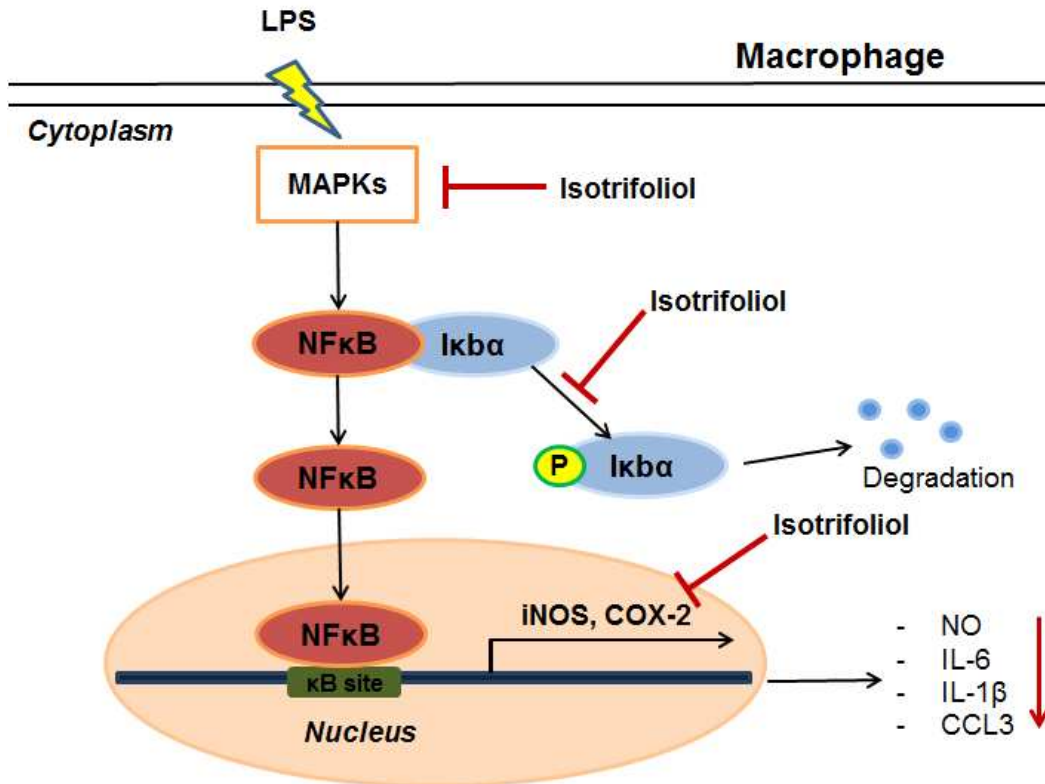


Fig. 126. Mechanism of PTH in anti-inflammatory effect.

95ESL 및 EASL의 항당뇨 작용은 췌장조직의 기능개선과 간 조직에서의 당신생을 조절하고 또한 지방조직에서 인슐린의 반응성을 높임으로서 나타내는데, 이는 주로 콩잎추출물 중에 함유되어 있는 테로카판계 화합물 (isotrifoliol, phaseol)이 베타세포에서 GLP-1R, IRS1, IRS2 유전자 및 PKA단백질에 대한 조절을 통해 인슐린 분비를 증가시키고, 베타세포의 기능을 향상시킨 것으로 분석된다. 그 외 95ESL 및 EASL의 항염증 작용이 염증을 동반한 당뇨병 치료에 중요한 역할을 할 것이다. 또한 95ESL 및 EASL의 함유성분인 테로카판계 화합물 (isotrifoliol, phaseol, coumestrol)의 대식세포에서의 항염증 작용을 검증하였고, isotrifoliol의 항염증 기작은 NF- $\kappa$ B 및 MAPKs에 대한 조절을 통해 이루어짐을 알 수 있었다.

#### (나) 95ESL 및 EASL의 항비만 작용 기작

- 마우스에 95ESL 및 EASL의 투여로 지방조직에서 대조군에 비해 지방의 축적을 억제하였으며, 특히 EASL의 투여는 마우스에서 지방 흡수 억제 효능을 나타내었다.

- 95ESL과 EASL 3T3-L1 지방세포에서 농도 의존적으로 지방생합성 억제 효능을 나타내었고,

EASL이 더 효과적으로 지방생합성을 억제하였다.

- 테로카판계 화합물 중 coumestrol과 phaseol은 3T3-L1 지방세포에서 농도의존적인 지방생합성 억제 효능을 나타내었다.

- Coumestrol과 phaseol의 지방생합성 억제 효능은 지방생합성을 조절하는 전사인자인 c/EBP $\alpha$ , PPAR $\gamma$  유전자의 발현을 억제함으로써 다음 단계의 발현인자인 FAS, aP2 등의 유전자의 발현 억제하여 지방 생합성을 저해시킴을 알 수 있었다 (Fig. 127).

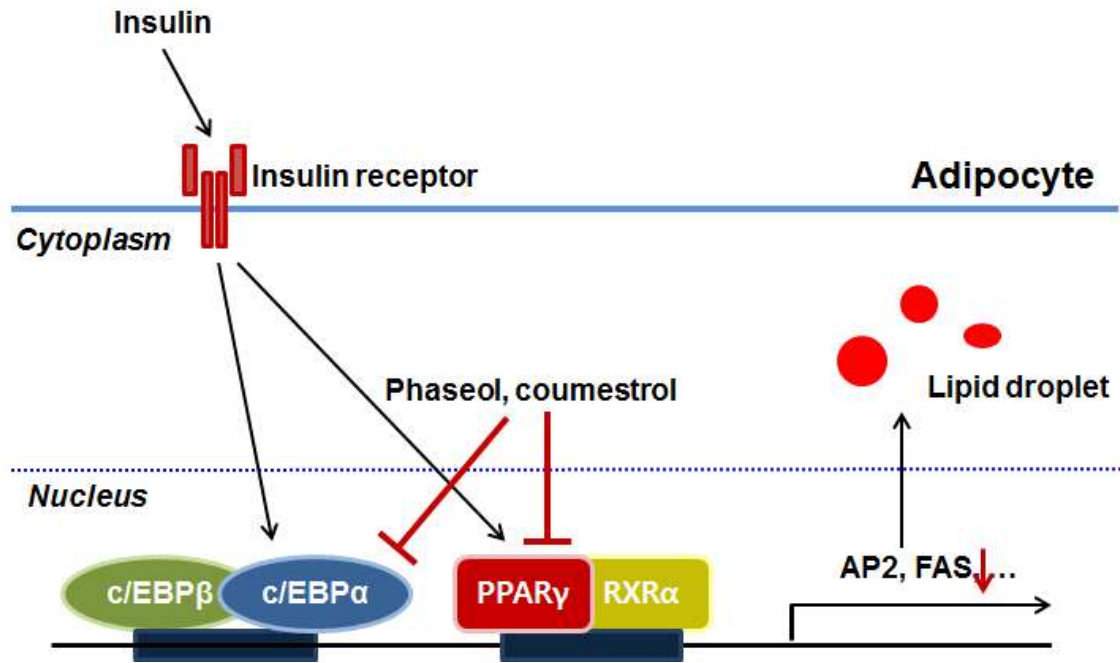


Fig. 127. Mechanism of PTH in anti-obesity effect.

(다) 95ESL 및 EASL의 항당뇨, 항비만 효능에 영향을 주는 생리활성

- 콩잎 추출물에 함유된 테로카판계 화합물 {plicadin, PD-2 (신물질), coumestrol, phaseol} 및 pheophorbide계 화합물 (P2, P3, P4)이 강력한 yeast  $\alpha$ -glucosidase 저해활성을 나타냈다.

- 수확시기별, 품종별, 용매별 콩잎 추출물의 yeast  $\alpha$ -glucosidase 저해활성을 *in vitro* assay를 통하여 측정·비교한 결과, 파종 후 약 105~120일령의 GH 품종 콩잎을 EtOAc로 추출하였을 때 가장 효과적인 yeast  $\alpha$ -glucosidase 저해활성을 나타냈다. 이는 테로카판계 화합물 및 클로로필 대사체들에 의해 나타나는  $\alpha$ -glucosidase 저해활성이라 예상한다.

- 콩잎 테로카판계 화합물 (plicadin, PD-2, coumestrol, phaseol, isotrifoliol) 및 pheophorbide계 화합물 (P2, P3)은 강한 LDL-항산화 활성을 나타냈다.

- 콩잎 테로카판계 화합물 (coumestrol, phaseol, isotrifoliol)은 미약하기는 하나 DPP-4 저해 활

성을 나타냈다.

- 본 연구팀에서 사용한 대두 품종 콩잎 WD, GH, YS는 재배기간이 길수록, 그리고 (95ESL과 EASL에 비해) 70ESL에서 가장 높은 LDL-항산화 활성을 나타냈다. 이는 콩잎이 함유하는 다양한 flavone 배당체와 isoflavonoids에 의한 항산화 활성으로 예상된다.

- hACAT 저해활성은 80~112일령 콩잎의 95ESL, EASL에서 높은 저해활성을 나타내고 있다.

- 따라서 95ESL 및 EASL에 함유된 화합물들의  $\alpha$ -glucosidase, DPP-4 및 hACAT 효소 저해활성과 LDL-항산화 활성은 당뇨 및 비만의 예방 및 치료에 있어 도움을 주는 요인으로 작용할 것이다.

## 카. PTH의 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 서양으로 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 찜용으로서 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).

### (다) 국내·외 인정·허가 현황

#### 1.3.1. 국내

○ 원재료 ‘대두’의 씨와 잎은 식품의 원료로 사용 가능

○ 신청원료

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

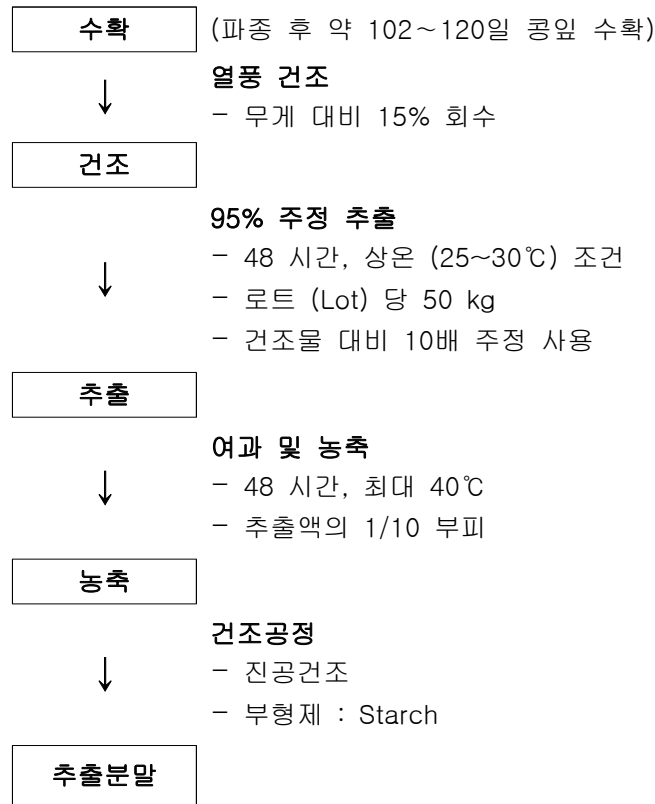
<유통 판매 현황 표>

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%, 우수결정포도당, 유당(우유), 폴리덱스트로스, 난소화성말토덱스트린, 대두분리단백(대두), 비타민미네랄믹스, 합성착향료(레몬향분말), 지자청색소, 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) PTH 제조공정도

#### <Flow diagram>



### (나) 제조공정 세부 설명

#### ① 원료, 선별, 건조

- 재배기간 120일령 이후의 콩잎 색깔이 누렇게 변하면서 낙엽이 많이 생겨 콩잎 수확량이 급격히 감소하므로 102~105일이 콩잎 수확의 적정시기이다.
- 응달건조, 열풍건조 (50~60℃), 태양광건조에 다른 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 열풍 건조 방법이 적절하다.

#### ② 추출, 여과 및 농축

- 추출 조건으로 1차 95% 추정을 용매로 사용하며, 추출 시 25~30℃ 조건으로 48 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, Dextrose, Glucose, Starch가 대표적이거나, 본 연구의 대상 기능성소재인 PTH의 주요 효능이 체지방 및 혈당개선인 점을 감안하여 starch를 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 pterocarpan계 화합물인 coumestrol의 함유량이 늘어나는 것을 HPLC를 통해 분석하였으며, 이 coumestrol은 다양한 생리활성을 나타내므로 유효물질임과 동시에 지표물질로 선정하여 콩잎추출물 내의 함량을 분석하는 것이 타당한 것으로 판단된다.

(가) 기준규격 및 함량

- ① 원료·성분명 : *Glycin max* 의 잎
- ② 원산지 : 국내산
- ③ 정의 : *Glycin max* L. 테로카관 고함유 추출물 (PTH) 의 건조 분말
- ④ 지표성분 및 함량 : Coumestrol 1.14% (m/m)
- ⑤ 성상 : 분말
- ⑥ 부원료 : Starch (PTH : Starch = 90:10 비율로 혼합)
- ⑦ 잔류 용매(주정) : < 0.5%(m/m)
- ⑧ 촉진제(carrier) : 무첨가
- ⑨ 보존제 : 무첨가
- ⑩ 중금속 : 수은 0.030 mg/kg, 비소 흔적, 납 흔적
- ⑪ 잔류농약 : Glyphosate, Deltamethrin 불검출
- ⑫ 영양성분

분석항목	시료명	콩잎 주정추출 분말
	수분	
일반성분 (g/100 g)	단백질	9.24
	회분	7.56
	지방	0.62
총 식이섬유 (%)		0.28

(나) 기능성분

① Coumestrol

기능성분	Coumestrol
구조	
일반명	Coumestrol
분자식	C <sub>15</sub> H <sub>8</sub> O <sub>5</sub>
분자량	268.22
기능	<ul style="list-style-type: none"><li>• Yeast <math>\alpha</math>-glucosidase 저해활성</li><li>• LDL 산화 저해활성</li><li>• DDP-4 저해활성</li></ul>

② Phaseol

기능성분	Phaseol
구조	
일반명	Phaseol
분자식	C <sub>20</sub> H <sub>16</sub> O <sub>5</sub>
분자량	336.34
기능	<ul style="list-style-type: none"><li>• Yeast <math>\alpha</math>-glucosidase 저해활성</li><li>• LDL 산화 저해활성</li><li>• hACAT1,2 효소 저해활성</li></ul>

③ Isotrifoliol

기능성분	Isotrifoliol
구조	
일반명	Isotrifoliol
분자식	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>
분자량	298.25
기능	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Yeast α-glucosidase 저해활성</li> <li>• LDL 산화 저해활성</li> <li>• hACAT1,2 효소 저해활성</li> </ul>

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

(가) HPLC를 이용한 Coumestrol 함량 분석 조건

- 준비물

0.1% Acetic acid in water HPLC

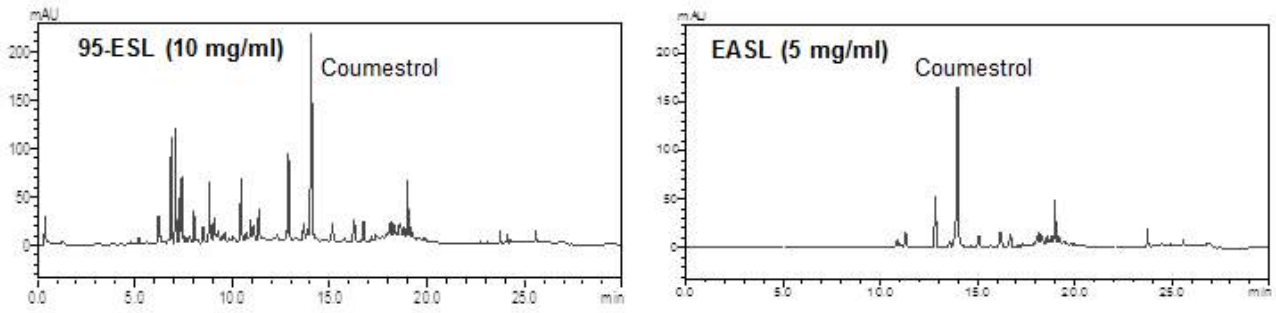
Acetonitrill HPLC

Coumestrol (기능성분, 지표성분, Sigma, purity 95%)

<p>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</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time</th> <th>A (%)</th> <th>B (%)</th> <th></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>95</td> <td>5</td> <td>isocratic</td> </tr> <tr> <td>15.0</td> <td>70</td> <td>30</td> <td>gradient</td> </tr> <tr> <td>20.0</td> <td>20</td> <td>80</td> <td>gradient</td> </tr> <tr> <td>23.0</td> <td>0</td> <td>100</td> <td>gradient</td> </tr> <tr> <td>27.5</td> <td>0</td> <td>100</td> <td>isocratic</td> </tr> <tr> <td>30.0</td> <td>95</td> <td>5</td> <td>gradient</td> </tr> </tbody> </table>	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	isocratic	30.0	95	5	gradient
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	isocratic																										
30.0	95	5	gradient																										

(나) PTH 시료 95% 주정추출물과 EtOAc 추출물의 Coumestrol 함량 분석

- 콩잎 95% EtOH 추출물 (95-ESL)과 콩잎 95% EtOAc 추출물 (EASL)이 함유하는 지표성분인 동시에 유효성분인 coumestrol의 추출물 g 당 함량 비율은 1 : 1.94 이다.



< HPLC profiles of 95ESL and EASL >

표 1. Coumestrol content analysis of 95-ESL and EASL >

Samples	Rt of Coumestrol (min)	Peak area*	Coumestrol conc. (mg/ml)*	Coumestrol in sample (%)*
ESL (10 mg/ml)	14.04	1199124	120.49	1.21
EASL (5 mg/ml)	14.00	1167281	117.31	2.35

\*The values are means of duplication.

(다) 총 플라보노이드, 총 페놀 함량 측정

- 95-ESL과 EASL의 총 플라보노이드 함량은 Zhishen 등 (1999)이 개발한 분광분석법을 일부 수정하여 측정하고, quercetin을 표준물질로 사용하여 quercetin equivalents (mg quercetin/g sample) 로 표시한다. 총 페놀 함량은 Singleton & Rossi (1965)이 개발한 Folin-Ciocalteu법을 일부 수정하여 측정하고, gallic acid 을 표준물질로 사용하여 gallic acid equivalents (mg gallic acid/g sample)로 표시한다. 그 결과, EASL의 총 플라보노이드 함량이 95-ESL의 3.45배 이고, EASL의 총 페놀 함량은 95-ESL의 1.23배 이다.

표 2. Contents of total flavonoids and total phenolics of 95-ESL and EASL

Samples	Total flavonoid (mg Quercetin equivalents/g)	Total phenolics (mg Gallic acid equivalents/g)
95-ESL	136.7	77.3
EASL	471.8	94.8

\*The values are means of duplication.

(5) 안전성에 관한 자료

(가) 섭취근거 정보

①원료의 안전성

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

## 식품의약품 안전처 (식품원재료 검색)

### a) 대두

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



이미지 출처 : 식품의약품안전청

1 2

클릭하시면 원래 크기로 보실 수 있습니다.

<b>특성/분포</b>	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]
<b>주요성분(부위별)</b>	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, taitoin, daidzin등의 isoflavon계 색소 흑색콩 종피 - chrysanthemins 등의 anthocyan계 색소
<b>안전성/독성</b>	독성은 약하고 장기간 복용하지 않으면 된다.
<b>기타</b>	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 당화시키고 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 드레디드 나토(threaded natto) 또는 드레디드 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 <sub>2</sub> , CaCl <sub>2</sub> , 또는 CaSO <sub>4</sub> 등이 사용된다. 5.콩나물: 콩을 따뜻하고 어두운 곳에 두면서 발아시킨 것으로 발아한 다음 5-10일 후의 것을 식용으로 한다. 단백질의 일부가 손실되나 비타민 C가 풍부하게 들어 있다.
<b>근거자료</b>	국립국어원, 표준국어대사전. <a href="http://stdweb2.korean.go.kr">http://stdweb2.korean.go.kr</a> . 2012 두산세계대백과 엔사이버 유명균 외, 식품위생학, 대학서림, p131(1993) <a href="http://www.tradimed.co.kr">www.tradimed.co.kr</a>

b) 검정콩

원재료명	검정콩(Black Beans)	
이명	흑두(黑豆), 서러터, 콩, 대두, 웅흑두(雄黑豆)	
학명	<i>Glycine max</i> (L.) Merr.	
생약명		
원재료 분류	식물	
식용가능 여부	가능	씨 / 잎
	제한적	
	불가능	
	※ 해당부위를 클릭하시면 부위별 상세정보를 확인 할 수 있습니다.	



※ 식품의약품안전처

이미지 출처 : 식품의약품안전청

1 2

클릭하시면 원래 크기로 보실 수 있습니다.

특성/분포	원산지는 만주를 중심으로한 중국일원이며 분포지역은 열대 - 온대북부(중국은 북위 52, 캐나다 46까지) 이다.
주요성분(부위별)	1. 검정콩 100g당 영양가 : 에너지 378kcal, 수분 11.7g, 단백질 34.3g, 지질 18.1g, 당질 26.5g, 섬유 4.0g, 회분 5.4g, 칼슘 224mg, 인 629mg, 철 7.8mg, 나트륨 5mg, 칼륨 1,539mg Vit B1 0.34mg, Vit B2 0.22mg, 나이아신 1.9mg 2. 콩피 - delphinidin-3-o-β-D-glucoside, cyanidin-3-o-β-D-glucoside, petuinidin-3-o-β-D-glucoside 3. 불포화지방산(리놀레산), 비타민E, 칼륨 등 풍부 4. Amino acid(Aspartic acid, glutamic acid), Carotene, Vitamin(B1, B2, B12, nicotine), Isoflavone, Daidzin, Genistin, Choline, Organic acid(Folic acid, pantothenic acid), Lecithin, Saponins(Soyasapogenol A, B, C, D, E의 aglycon)등의 생리활성물질
안전성/독성	조리하지 않은 날콩은 독성이 있을수 있으므로 반드시 조리하여 섭취한다. 그 외에 알려진 독성 및 부작용이 없다.
식용외 용도 (이용부위)	공업용, 약용
기타	[고전 문헌의 검은콩] 1. 검은콩은 정철음식에만 사용된다고 생각하는 사람도 있지만 그렇지 않다. 검정콩은 아름다운 목소리, 아름다운 피부에 매우 효과적인 식품으로 일년 내내 계속 먹으면 좋다. 2. 검정콩에는 기관지를 강하게 하고 내장의 점막을 튼튼하게 하는 작용이 있어 예로부터 기침의 묘약으로 이용되어 왔다. 왜 목소리가 아름다워지는지 학문적으로는 알 수 없지만, 검은 색소 부분에 효소나 그 외의 유효한 성분이 있는 것으로 알려져 있다. 검정콩을 검은 설탕이나 벌꿀로 단맛을 내서 먹으면(흰 설탕은 사용하지 않는다. 혈액을 오염시키고 약효가 반으로 줄어든다) 기침뿐만 아니라 기관지나 천식에도 효과적이다. 3. 검정콩 끓인 물은 각기병·위궤양·신장병에도 좋다. 4. 검정콩은 해독효과가 있어 한방에서는 검정콩과 팥을 볶아 가루로 만들어 독을 제거하는데 사용할 정도이다. [검정콩 먹으면 노화 억제]- 중앙일보 기사 일반인에게 약콩으로 알려져 있는 검정콩에 노화와 암을 억제하는 성분(이소플라본)이 갈색콩보다 4배이상 들어있는 것으로 확인됐다. 한국식품개발연구원 김성란(金成蘭)박사팀은 3일 지난해 검정콩,황색콩,갈색콩등 국내외 50여종의 콩속에 포함된 이소플라본 성분을 분석한 결과 이 같이 드러났다고 밝혔다. 콩,알팔파,병아리콩,클로버잎 등에 함유된 이소플라본은 콩을 먹을 때 씹을하고 비릿한 뒷맛을 주는 성분으로 비타민C나 비타민E처럼 몸안에 쌓인 노화 원인물질(산소원자 또는 발생기 산소)을 제거하는 효과를 갖고 있는 것으로 알려져 있다.이소플라본 성분이 갈색콩에는 0.1% 이하 들어있는데 비해 검정콩에는 0.2~0.4% 함유돼 있으며 송편속으로 많이 사용되는 겉절이 검고 안이 녹색인 검정콩의 이소플라본 함량이 최대였다는 것이다. <박태균 식품의약품안전청기자>
근거자료	김길환, 권태안, 콩 品質과 加工利用, 農振廳 심포지엄 우리나라 콩의 生産性 및 이용도 向上技術, p 5-30.(1988) 김길환, 콩나물콩 品種別 生育特性 및 一般成分 組成, 콩연구회 18차 研究發表會 要 旨, p 4-(1992) 金爽東, 洪殷喜, 金龍昊, 우리나라 콩의 生産과 品種開發 方向, 한국콩연구회 10주년 기념 發表論文集, p 5-3(1994) 金龍昊, 金爽東, 成烈圭, 洪殷喜, 콩 高蛋白系統 種實 成分含量의 地域變異, 한옥지 25(3):157-16(1993) 권신한, 임건혁, 김재리, 송희섭, 김병우, 우리나라 在來種 蒐集 대두의 蛋白質 및 脂肪含量에 관한 研究, 한옥지 7:40-4(1975)

② 독성/안전성 시험결과를 통한 안정성 확보

실험명	Chinese Hamster lung (CHL) 세포를 이용한 염색체이상 시험
<p><b>실험 방법</b></p>	<p>(주)캠온에 의뢰하여 염색체이상을 실시함. 콩잎 추출물 10~2500 µg/ml 및 음성대조군 (DMSO)를 이용하여 대사활성계 적용/비적용 시험을 실시하였다 (대사활성계: Acroclor-1254-induced rat river 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><b>실험 결과</b></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><b>출처</b></p>	<p>농산자원을 이용한 대사증후군 예방 치료용 기능성소재 개발, 바이오그린21사업, 2010</p>
실험명	단회 경구 투여 독성 시험
<p><b>실험 방법</b></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><b>실험 결과</b></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><b>출처</b></p>	<p>체지방 및 혈당 개선용 테로카판 강화 기능성소재 개발, IPET, 2014</p>
실험명	복귀돌연변이시험
<p><b>실험 방법</b></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><b>실험 결과</b></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><b>출처</b></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)켄온에 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 10 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	테로카판강화 기능소재의 체지방 및 혈당조절 효능 검증을 위한 인체 시험
시험방법	대사증후군의 성인 남녀를 대상으로 12주간 시행되는 이중맹검, 무작위 배정, 위약대조 연구임. 대상자는 각 군에 25여명씩 무작위로 배정하였고 테로카판 강화소재 2 g/day로 섭취시킨 후 영양설문조사, 신체 계측, 혈액 biomarker 분석 하였음.
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	체지방 및 혈당 개선용 테로카판 강화 기능성소재 개발, IPET, 2014

(6) 기능성내용 및 그에 관한 자료

(가) 효능 표시 (효능 효과)

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

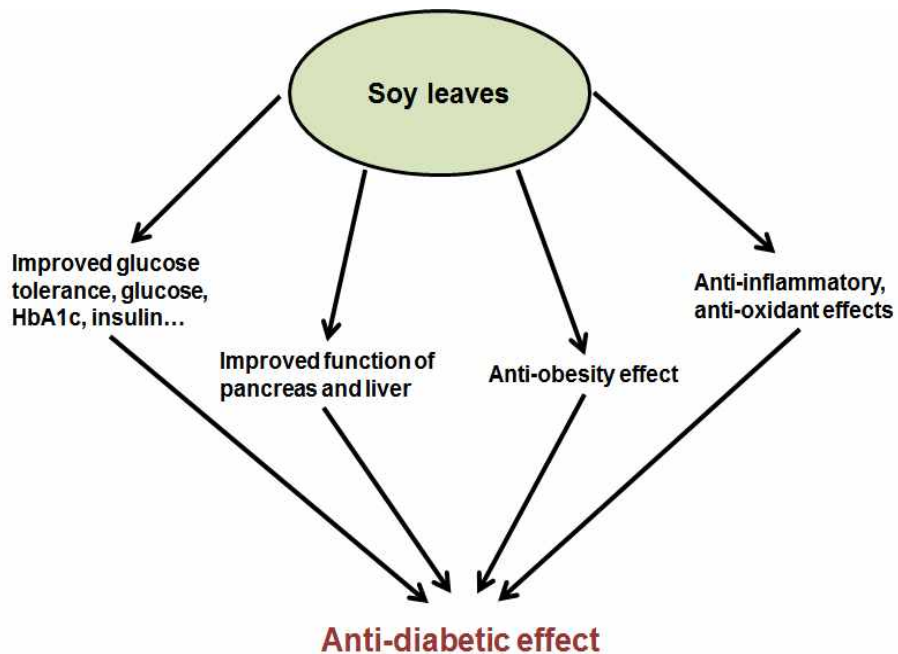
(나) 기능성 내용에 대한 요약

본 원료인 콩잎 주정추출물은 콩잎을 주정으로 추출하여 제조하였으며 콩잎과 콩잎에 많이



함유되어 있는 생리 활성 물질인 이소플라본 (Isoflavone)류, 테로카판 (Pterocarpan) 등에 관한 체지방 감소 및 항당뇨 효능은 이미 국내외 많은 연구를 통하여 입증되어있다.

국내의 경우 콩잎 추출물의 체지방 감소, 혈중 콜레스테롤 저하, 혈당강하 등에 관한 효과에 대해 현재 한국생명공학연구원 정태숙 박사 연구팀과 경북대학교 최명숙 교수팀의 효능 검증 결과로 세포 실험뿐만 아니라 동물실험을 통해서 이를 입증되어있으며 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 (Nutrition Journal, Food & Function)에 발표하였다. 또한 국내뿐만 아니라 국외 다수의 학회지에서 콩잎 주정 추출물의 체지방감소 및 항당뇨 효능에 대해 보고된 바 있다.



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  $\alpha$ -glucosidase와  $\alpha$ -amylase의 활성을 효과적으로 억제한다는 연구결과도 국내외 저널을 통해서도 알 수 있다.

또한 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  $\alpha$ -glucosidase의 활성억제에 탁월한 효능을 가지고 있다는 것을 밝혔다. 테로카판류는 콩과 식물에만 존재하는 것으로 알려져 있어, 새로운 고부가가치 기능성 식품소재로서 콩잎의 가치가 입증된 바 있다. 하지만 현재 이러한 활성 보고에 비해 국내외에서 기능성 소재로서 많이 이용 되어있지 않으므로 향후 콩잎이 건강 기능식품소재로서 가치가 증대 될 것으로 기대한다.

**(다) 콩잎 추출물의 체내 작용기전**

서구화된 식습관, 생활양식의 변화로 인하여 현재 비만과 당뇨병환자가 급증하고 있으며 대사성질환인 비만과 당뇨의 경우 서로 상호관련성에 대한 많은 연구가 이루어져 왔다. 비만의 경우 에너지 섭취가 소비에 비해 과다 할 때 비롯되며 비만의 경우 인슐린 비의존성 당뇨병뿐만 아니라 고지혈증, 고혈압 등의 만성질환을 일으킨다. 그리고 통계적으로 당뇨병 환자의 약 75% 이상의 환자의 경우 과체중이거나 비만인 것으로 조사된바 비만과 당뇨병의 상호 관련성은 매우 크다고 볼 수 있다. 그리하여 많은 국내외 우수 저널지에서 이들의 공통적인 병인기전을 연구하였고 그 병인기전으로 인슐린 저항성이 매개 된다고 보고하였다.

인슐린 저항성이란 인슐린 감수성이 유전적, 환경적인 요인에 의해 생리적 인슐린농도보다 대사 상태가 저하 된 경우를 말한다. 즉, 당뇨병 환자와 비만인 환자의 경우 식이로 섭취한 당이 정상적인 인슐린 대사가 작용되어 지지 않아 혈당이 계속 높아져 있는 형태를 유지하게 되며 당이 체내에서 독성을 나타나게 됨으로써 많은 합병증을 일으키게 된다. 그러므로 당뇨병 환자의 경우 식이로 섭취된 당이 체내 천천히 흡수되도록 하는 것이 하나의 중요한 대안으로 설명 된다. 그러므로 이를 *in vitro* 실험을 통하여 검정하기 위해 장내 효소인  $\alpha$ -amylase와  $\alpha$ -glucosidase 효소의 활성을 억제시키는 많은 연구가 이루어지고 있다.  $\alpha$ -amylase와  $\alpha$ -glucosidase는 장내의 가수분해 효소로 식이로 섭취된 탄수화물을 분해하여 장내에서 당의 흡수가 가능해지도록 한다. 즉, 탄수화물의 대사에 가장 중요한 역할을 하며, 당뇨병환자와 비만 환자의 경우 식후의 고혈당증과 당의 흡수를 억제시키는 것이 병을 개선시키거나 예방하는데 중요한 기전이므로 이 효소의 억제 물질을 찾는데 많은 연구가 이루어지고 있다. 본 연구에서 콩잎 추출물 및 콩잎 테로카판계 화합물이  $\alpha$ -glucosidase 저해활성을 나타내었고  $\alpha$ -glucosidase 저해활성의 측정을 통하여 콩잎 추출물의 수확시기, 품종, 및 추출용매를 선정하였다 (표 1). Tadera 등 (표3, 참고 9) 에 따르면 콩잎추출물에 주요 성분인 flavonoid 물질이 amylase와  $\alpha$ -glucosidase 효소의 활성 억제에 탁월하다는 연구 결과를 이미 보고 했으며, Babu 등 (표 4, 참고 10)은 flavonoid 화합물의 항당뇨 기작에 대해 Review 논문을 발표하였다.

**<표 3> Flavonoids의 porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase와 rat small intestinal  $\alpha$ -glucosidase 억제효과**

Table 3. Inhibitory activity of flavonoid against rat small intestinal  $\alpha$ -glucosidase and porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase.

Flavonoid	$\alpha$ -Glucosidase		$\alpha$ -Amylase	Flavonoid	$\alpha$ -Glucosidase		$\alpha$ -Amylase
	Inhibition <sup>a,b</sup> (%)	Inhibition <sup>a,b</sup> (%)	IC <sub>50</sub> <sup>a,c</sup> (mM)		Inhibition <sup>a,b</sup> (%)	Inhibition <sup>a,b</sup> (%)	IC <sub>50</sub> <sup>a,c</sup> (mM)
Flavonol				Isoflavone			
Myricetin	29	64	0.38	Daidzein	0	19	>0.50
Quercetin	28	50	0.50	Genistein	2	33	>0.50
Kaempferol	8	18	>0.50	Flavan-3-ol			
Fisetin	26	33	>0.50	Catechin	1	4	>0.50
Flavone				Epicatechin	5	14	>0.50
Luteolin	19	61	0.36	Epigallocatechin	7	5	>0.50
Apigenin	3	21	>0.50	Epigallocatechin gallate	32	21	>0.50
Baicalein	16	31	>0.50	Anthocyanidin			
Flavanone				Cyanidin	6	37	>0.50
Naringenin	1	5	>0.50				
Hesperetin	2	16	>0.50				

The activity of rat small intestinal  $\alpha$ -glucosidase was estimated by measuring glucose liberated from maltose, and that of porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase by measuring *p*-nitrophenol from BPNPG7. Experimental details are described in "Materials and Methods."

<sup>a</sup>The result was an average of three determinations.

<sup>b</sup>Inhibition by 0.50 mM flavonoid.

<sup>c</sup>Concentration of flavonoid required for 50% inhibition of the enzyme activity under the assay conditions.

<표 4> 식이 Flavonoids의 항당뇨 기전

Table 1  
The anti-diabetic properties and the underlying mechanisms of dietary flavonoids

Flavonoid	Function	In vitro or in vivo model	Mode of action
4. Flavonols			
Fisetin	↓ Hyperglycemia ↓ Glycosylated Hb	STZ-induced diabetic rat	↓ PEPCK and G6Pase
Kaempferol	↑ Secretion of insulin ↓ β cell apoptosis	INS-1E cells and pancreatic human islets	↑ Akt ↑ IκB-2 ↑ cAMP signaling ↑ PKA activation ↑ CREB phosphorylation ↑ PDX-1 ↓ Caspase-3

Table 1 (continued)

Flavonoid	Function	In vitro or in vivo model	Mode of action
Quercetin rich extract Quercetin-3-O-glucoside, Q-3-O-galactoside	↑ Glucose uptake	C2C12 muscle cells	↑ AMPK
Quercetin	↓ Hyperglycemia ↑ Insulin Cell proliferation in liver and pancreas	STZ-induced diabetic mice	↓ Cdkn1a
Quercetin	↓ Hyperglycemia Improve insulin resistance	db/db mice	
Quercetin	↑ GSIS	INS-1 cells	ERK1/2 pathway
Quercetin and its glucoside quercitrin	↑ GSIS ↑ Cell viability	Rat insulinoma cells	↓ iNOS ↓ Nuclear translocation of NF-κB ↓ Cytochrome C release from mitochondria
Quercetin, isoquercetin, rutin	Inhibit α-glucosidase	Cell free system	
5. Flavones			
Apigenin	↓ Hyperglycemia ↑ Hepatic antioxidant enzymes	Alloxan-diabetic mice	
Apigenin	↓ Hyperglycemia	STZ-induced diabetic mice	
Apigenin	↓ Apoptosis	HIT-T15 clonal β-cells	
Apigenin, luteolin	↓ Apoptosis	Rat insulinoma cells	↓ iNOS ↓ NF-κB activation
Apigenin	↑ GLUT4	HepG2 hepatocytes	↑ AMPK phosphorylation
6. Isoflavones			
Genistein and daidzein	Improve glucose homeostasis	NOD mice	↓ PEPCK and G6Pase
Genistein	↓ Hyperglycemia ↑ β-cell mass	T2D mice	
Genistein	Insulinotropic effect	INS-1 MIN-6 Human islet β-cells	Activation of cAMP/PKA-dependent ERK1/2 signaling pathway ↑ Cyclin D1
Genistein	↓ Hyperglycemia ↑ Glucose tolerance ↑ Insulin ↑ β-cell proliferation, survival and mass	STZ-induced diabetic mice	Activation of cAMP/PKA-dependent ERK1/2 signaling pathway
Genistein	↑ Insulin secretion	INS-1 cells	CaMK II and Ca <sup>2+</sup> signaling
Genistein	↑ β-cell function	RINm5F (RIN) cells	↓ NF-κB, ERK1/2 and JAK/STAT pathway

특히 콩잎 추출물에 함유되어 있는 테로카판 화합물의 경우 Yeast α-glucosidase 효소 활성에 효과가 높으며 IC<sub>50</sub> 값의 경우 coumestrol은 약 6 μM이며 phaseol의 경우 약 42.6 μM에서 효소의 활성을 반 이하로 억제시킴을 Yuk 등이 보고 하였다 (표 5, 참고 5).

<표 5> 콩잎의 테로카판 화합물 (compound 3 : coumestrol, compound 4 : isoflaviol, 및 compound 5 : phaseol)의  $\alpha$ -Glucosidase 억제효과

**Table 2**  
Inhibitory effects of compounds 1-7 on  $\alpha$ -glucosidase activities.

Compound	$\alpha$ -glucosidase	
	IC <sub>50</sub> <sup>a</sup> ( $\mu$ M)	Kinetic mode ( $K_i$ , $\mu$ M) <sup>b</sup>
1	31.3 $\pm$ 1.8	Noncompetitive (36.04)
2	122.9 $\pm$ 1.3	Noncompetitive (120.24)
3	6.0 $\pm$ 0.6	Noncompetitive (7.78)
4	23.0 $\pm$ 1.6	Noncompetitive (24.21)
5	42.6 $\pm$ 1.9	Noncompetitive (41.19)
6	>200	NT <sup>c</sup>
7	90.4 $\pm$ 1.9	Noncompetitive (79.14)

<sup>a</sup> All compounds were examined in a set of experiments repeated three times; IC<sub>50</sub> values of compounds represent the concentration that caused 50% enzyme activity loss.

<sup>b</sup> Values of inhibition constant.

<sup>c</sup> NT is not tested.

당뇨병과 비만을 치료하는데 있어 체내지방의 감소와 혈당조절을 핵심으로 들 수 있다. 체내 지방의 경우 이를 감소시키는데 크게 두 가지 기전이 있다. 하나는 식품 섭취나 식이 흡수를 감소시키는 방법과 에너지 소비를 증진 시키는 방법이다. Jeong 등에 따르면 C57BL/6J mice와 LDLR<sup>-/-</sup> mice에 고지방 고콜레스테롤 식이를 섭취시켰을 경우 콩잎 추출물을 식이와 같이 섭취시킨 군이 추출물을 투여하지 않은 군에 비해 혈액 내 중성지방수치와 체지방 감소의 효과를 가진다고 보고하였다 (참고 11). 인체 실험에서는 Kim 등에 따르면 콩잎 추출물을 10 주간 섭취 시켰을 경우 체중의 감소와 식이 섭취에는 크나큰 변화가 없었다. 그러나 체지방의 감소를 placebo 그룹에 비해 유의적으로 낮추어 주는 효과를 보였으며 또한 혈장의 HDL 콜레스테롤의 비율을 증가 시켜준다는 결과를 보고 하였다 (참고 7). 또한 이는 Ho 등의 연구 결과를 살펴보면 콩잎을 섭취시킨 햄스터의 경우 Non-HDL 콜레스테롤의 비율이 HDL 콜레스테롤에 비해 감소되었다고 이미 밝힌 바 있다 (참고 2). 즉, 콩잎 추출물의 경우 체지방을 감소시켜주는 동시에 좋은 콜레스테롤인 HDL 콜레스테롤을 증가시킴으로써 이상지질혈증을 개선시키며 항비만 효과가 있음을 알 수 있다.

혈당조절과 관련해서 콩잎의 경우 Chio 등에 따르면 콩잎추출물을 섭취시킨 전당뇨병 환자 (공복시 혈당 100-125 mg/dl) 의 경우 혈당, 당화혈색소(HbA1c)의 수준이 placebo에 비해 감소하였고 체지방, 허리둘레 또한 Placebo group 에 비해 감소함을 보임으로써 콩잎 추출물이 혈당조절에 기여 한다고 보고되어 있다 (참고 8).

콩잎에 주요 함유 물질인 phytoestrogen으로 불리는 주요 물질인 genistein, coumestrol 등이 있다. 이들의 풍부한 섭취가 당뇨병의 대사개선에도 유익할 수 있음을 보여주는 연구결과들이 보고 되어 있으며 Ali 등은 유전적으로 비만과 당뇨를 가진 SHR/N-cp 쥐에서 콩 isoflavone의 투여 결과 혈당과 중성지질 농도가 감소되고, 혈장 insulin, leptin, glucagon 농도에 의적인 개선효과가 있음을 보고하였다 (표 6, 참고 12). 또한 genistein이 제1형과 제2형 당뇨쥐에 genistein을 공급한 결과 공복 혈당, 내당능, HbA1c 수준이 유의적으로 개선되었다고 보고하였

다 (표 7, 참고 13).

<표 6> 비만 · 당뇨모델 쥐 (SHR/N-cp)에서 isoflavone의 혈당강하효과 및 중성지질 개선효과

Table 1  
Effects of soy isoflavones and probiotics on plasma glucose and triglyceride in a genetic model of obesity and diabetes

Phenotype	Diet	Glucose (mmol/L)	Triglyceride (mmol/L)
Lean	Casein	19.89±2.90	0.81±0.05
	Isoflavones	14.36±2.71	0.61±0.04
	Probiotics	19.92±3.84	0.76±0.16
	I+P	18.87±2.41	0.63±0.10
Obese	Casein	27.24±3.13	5.55±0.47
	Isoflavones	19.95±2.95	7.10±0.26
	Probiotics	26.06±3.09	5.99±0.14
	I+P	27.51±2.36	8.34±0.27
ANOVA	Phenotype	<i>P</i> <.001	<i>P</i> <.0001
	Diet	NS	NS
	<i>P</i> × <i>D</i>	NS	<i>P</i> <.018

Values are means±S.E.M. of eight rats.  
I+P, isoflavones+probiotics; *P*×*D*, phenotype × diet.

<표 7> streptozotocin으로 유도된 당뇨모델 Rat에서 genistein의 혈당 및 중성지질 개선 효과

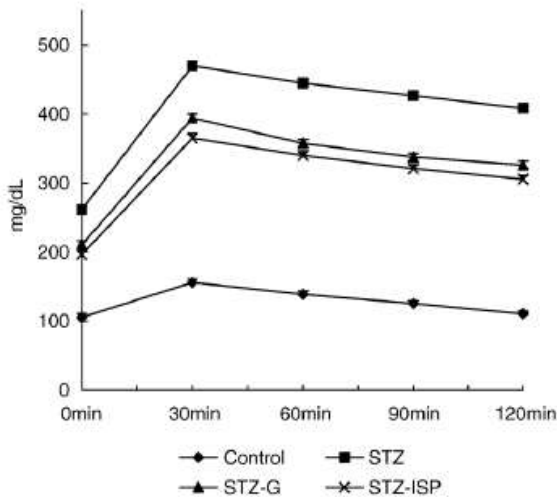


Fig. 1. Oral glucose tolerance test in experimental groups (*n*=8). The blood glucose levels (mean±SD) are expressed as mg/dL. The means sharing a common letter are not significantly different (*p*<0.05).

Table 3  
Effect of genistein and isolated soy protein on serum and hepatic lipids in diabetic rats

	Control	STZ	STZ-G	STZ-ISP
<b>Serum</b>				
Total cholesterol (mmol/L)	2.40±0.16 <sup>b</sup>	3.62±0.20 <sup>a</sup>	2.61±0.09 <sup>b</sup>	2.55±0.08 <sup>b</sup>
HDL-cholesterol (mmol/L)	1.22±0.05 <sup>a</sup>	0.42±0.05 <sup>c</sup>	0.65±0.06 <sup>b</sup>	0.63±0.06 <sup>b</sup>
Triglyceride (mmol/L)	1.11±0.09 <sup>b</sup>	2.03±0.16 <sup>a</sup>	1.16±0.09 <sup>b</sup>	1.15±0.13 <sup>b</sup>
<b>Liver</b>				
Cholesterol (mmol/g)	0.13±0.02 <sup>b</sup>	0.23±0.04 <sup>a</sup>	0.16±0.03 <sup>b</sup>	0.15±0.03 <sup>b</sup>
Triglyceride (mmol/g)	0.24±0.02 <sup>b</sup>	0.45±0.05 <sup>a</sup>	0.28±0.03 <sup>b</sup>	0.26±0.03 <sup>b</sup>

Values are mean±SD of 8 rats from each group.

<sup>a,b,c</sup> Means in the same row not sharing a common superscript are significantly different (*p*<0.05) between groups.

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 (표 8, 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.

<표 8> Genistein과 coumestrol의 내당능 효과

Table 4. The effect of phytoestrogen supplementation on glucose tolerance in C57BL/KsOlaHsd-db/db mice

Group	Fasting	30 min	60 min	120 min	AUC
	(mg glucose/dL plasma)				
DC	493.75 ± 13.47 <sup>ac</sup>	602.75 ± 13.16 <sup>a</sup>	550.13 ± 14.32 <sup>a</sup>	506.63 ± 14.21 <sup>a</sup>	65444 ± 1335 <sup>a</sup>
GS	436.63 ± 23.00 <sup>b</sup>	534.50 ± 9.61 <sup>b</sup>	491.63 ± 11.89 <sup>b</sup>	462.13 ± 14.21 <sup>ab</sup>	58572 ± 1032 <sup>b</sup>
CS	472.38 ± 20.48 <sup>ab</sup>	549.63 ± 14.84 <sup>b</sup>	499.75 ± 14.33 <sup>b</sup>	463.75 ± 24.88 <sup>ab</sup>	59976 ± 2343 <sup>b</sup>
EL	463.43 ± 10.46 <sup>ab</sup>	540.71 ± 8.06 <sup>b</sup>	465.43 ± 13.81 <sup>b</sup>	435.86 ± 8.90 <sup>b</sup>	57193 ± 620 <sup>b</sup>

DC: Diabetic control, GS: Genistein (3.75 mg/100 g diet), CS: Coumesterol (3.75 mg/100 g diet), EL: Enterolactone (3.75 mg/100 g diet), AUC: Area under the curves in oral glucose tolerance test

Different superscripts in the same column indicate significant difference ( $p < 0.05$ ) among 4 groups by Duncan's multiple comparison test

\*Mean ± S.E.

(마) 동물실험

학술지정보	Journal of Medicinal Food (투고)				
	Vol		게재연도		시작페이지
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 대사증후군 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 (50 g)을 실온에서 500 ml의 95% 주정으로 추출하였다 (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 고지방식이을 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 표준편차, 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	Molecular Nutrition & Food Research (투고 준비 중)				
	Vol		게재연도		시작페이지
논문제목	Kaempferol glycosides- and pheophorbides-rich soybean leaf extract improves glucose tolerance and suppresses lipid accumulation in <i>db/db</i> diabetic mice				
연구목적	콩잎추출물의 대사증후군 예방용 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 (140 g)을 실온에서 1.4 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 <sup>db</sup> ( <i>db/+</i> ) mice와 8마리의 male C57BLKS/J lar-Lepr <sup>db</sup> /Lepr <sup>db</sup> ( <i>db/db</i> ) mice 는 정상식이 섭취 (AIN-76A diet, Research Diets) 하였다.		
		positive	8마리의 <i>db/db</i> mice 는 0.05% wt/wt Acarbose 정상식을 섭취하였다. (AB)		
		negative			
	시험군	8마리의 <i>db/db</i> mice는 1% wt/wt ESL 정상식이 섭취하였다. (ESL)			
	디자인	총 32 마리의 mice를 4군 ( <i>db/+</i> 군, <i>db/db</i> 군, ESL군, AB군)으로 나누어 식이와 물을 8주 동안 자유롭게 섭취	섭취량	자유 섭취	
		섭취기간	8주		
식이조절					
바이오마커	체중, 혈당, 당화혈색소, 혈장 중성지방 및 인슐린 함량, 체장에서의 조직학적 분석				
통계처리	군별 8마리 mice에 대한 평균과 표준편차, One-way ANOVA 와 Student's <i>t</i> -test 수행, 유의수준은 위험율 5% 미만으로 설정				
시험결과	<ol style="list-style-type: none"> <li>ESL군과 양성대조군인 AB군에서 혈액 내 당, 당화혈색소 그리고 중성지방 수치가 대조군인 <i>db/db</i>군에 비하여 유의적으로 낮아졌다.</li> <li>체장에서의 조직학적 및 면역학적 분석을 통해, ESL군에서 랑게르한스섬의 크기와 인슐린 발현이 <i>db/db</i>군에 비하여 크게 증가되었다.</li> <li>ESL군이 체장의 랑게르한스섬의 베타세포의 증식과 분화에 관련된 유전자들의 발현을 긍정적으로 조절하였다.</li> </ol>				
비고					



학술지정보	Molecules (Revised)				
	Vol		게재연도		시작페이지
논문제목	Pterocarpan-enriched soy leaf extract ameliorates insulin sensitivity and pancreatic $\beta$ -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"> <li>EASL군과 양성대조군인 AB군에서 혈액 내 당, 당화혈색소 그리고 인슐린 수치가 대조군에 비하여 유의적으로 낮아졌다.</li> <li>EASL군이 체장의 랑게르한스섬의 베타세포의 증식과 분화에 관련된 유전자들의 발현을 긍정적으로 조절하였다.</li> <li>EASL군에서 지방조직의 인슐린 감수성에 관련된 유전자들의 발현이 대조군에 비하여 유의적으로 증가하였다.</li> </ol>				
비고					

학술지정보	2014 International Conference on Diabetes and Metabolism (포스터 발표)				
	Vol		게재연도		시작페이지 PE125
논문제목	Anti-diabetic Effects of Soy Leaf Extracts and Pinitol in High-fat Diet-fed C57BL/6J 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 95% EtOH로 추출하였다 (95ESL).				
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 고지방식이를 섭취하였다.		
		negative			
	시험군	95ESL군의 C57BL/6J mice 10마리는 1.0% EASL 고지방식이 섭취를 섭취하였다. (95ESL)			
	디자인	총 40 마리의 C57BL/6J mice를 4군 (정상군, 대조군, 95ESL군, Pinitol군)으로 나누어 식이와 물을 12주 동안 자유롭게 섭취	섭취량	자유 섭취	
		섭취기간	12주		
	식이조절				
바이오마커	체중, 혈당, 당화혈색소, 혈장 중성지방 및 인슐린 함량, 췌장에서의 조직학적 분석				
통계처리	군별 10마리 mice에 대한 평균과 표준편차, One-way ANOVA 와 Student's t-test 수행, 유의수준은 위험을 5% 미만으로 설정				
시험결과	<ol style="list-style-type: none"> <li>95ESL군과 양성대조군인 AB군에서 혈액 내 당화혈색소 그리고 인슐린 수치가 대조군에 비하여 유의적으로 낮아졌다.</li> <li>췌장에서의 조직학적 및 면역학적 분석을 통해, 95ESL군에서 랑게르한스섬의 크기와 인슐린 발현이 대조군에 비하여 크게 증가되었다</li> <li>95ESL군에서 간조직에서의 당생합성에 관련된 유전자들을 대조군에 비하여 유의적으로 감소되었다.</li> </ol>				
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						

(바) 인체실험 관련 자료

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
대상자특징	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		- 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)				
시험디자인	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 <sup>2</sup> 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 (L.) Merr.</i> ) 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"> <li>- 시험물질 (SLE): 콩잎 추출물 함유 캡슐 (2000 mg/day)</li> <li>- 대조물질1 (BE): 바나나 추출물 함유 캡슐 (300 mg/day; 0.3% corosolic acid)</li> <li>- 대조물질2 (Placebo): starch 함유 캡슐 (2000 mg/day)</li> </ul>				
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 식이습관과 신체활동 유지, 24시간 회상법으로 식이섭취량 측정				
바이오마커		<ul style="list-style-type: none"> <li>- BMI (body mass index) = weight/height<sup>2</sup></li> <li>- WHR (waist and hip circumference) = dividing the measurement of waist by the hip measurement</li> <li>- LDL-cholesterol (Friedewald formula) : total cholesterol - HDL-cholesterol - (triglycerides ÷ 5)</li> <li>- HTR (ratio of HDL cholesterol to total cholesterol) : HDL-C/Total-Cholesterol × 100</li> <li>- HOMA-IR (the index of insulin resistance) : [fasting glucose (mmol/L) × fasting insulin (μU/mL)]/22.5</li> </ul>				
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"> <li>1. SLE 집단, BE 집단에서 final blood glucose, HbA1c, HOMA-IR 그리고 transaminase level 이 placebo 집단에 비교하여 현저히 감소하였다.</li> <li>2. body weight, BMI, WHR 은 세 집단 간에 차이가 없었다.</li> <li>3. SLE 집단과 BE 집단에서 final body fat content, waist circumference 는 SLE과 BE 집단이 placebo 보다 낮았다.</li> <li>4. 혈장 내 총 콜레스테롤 농도와 LDL 콜레스테롤 농도의 경우 세 집단간의 차이가 없었다.</li> <li>5. placebo 집단과 비교했을 때, SLE 집단에서 혈장 내 HDL 콜레스테롤 농도와 총 콜레스테롤에 대한 HDL 콜레스테롤의 비율이 증가하였고 atherogenic index 는 감소하였다.</li> </ol>				
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 2회 식후 경구 복용 (1회 2정)을 권장한다.

### (나) 섭취 시 주의 사항 및 근거

- 정해진 섭취량을 지킬 것.
- 위장장애, 신기능 장애 등이 있는 사람은 섭취 시 주의 요망
- 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) 참고문헌 (카. PTH의 개별인정 기능성 원료 신청을 위한 자료 확보)

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<sup>y</sup> 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) Pterocarpans 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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -Glucosidase and  $\alpha$ -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, Bhatena 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.

## 제2절 체지방 및 혈당 개선 기능성 원료의 제품화 (제1협동과제)

### 1. 연구개발 수행 내용 및 방법

#### 가. 수확 시기별 콩잎 확보 및 유기용매를 이용한 PTH 제조

##### (1) 품종별/채취시기별 콩잎 재배

본 연구과제는 2011년 9월 23일 시점에 시작되었기 때문에 본 연구 과제를 진행하기 위해 제1협동연구기관에서 선행연구를 위해 미리 준비한 품종별/채취 시기별 콩잎 시료를 사용하였다. 2011년도 5월 17일에 파종하여 9월 19일까지 키운 후 수확하여 확보한 품종별/채취시기별 콩잎을 사용하여 제1세부과제의 기능성 분석 등을 통해 연구를 수행하였다. 기능성 분석 항목으로는 콩잎에 대한 제1세부과제의 생리활성물질 함유량 (HPLC profile을 통한 예측, 총 플라보노이드 및 총 페놀 함량 측정)에 대한 분석을 시행하였다. 1차 실험을 위해 2012년 7월 10일에 50일령 콩잎 시료를 채취하여 각각 건조콩잎 약 60 g x 2개씩 확보하였다. 선행연구 및 2011년도에 확보한 결과 분석을 통해 원료 품종을 고려하였다. 품종의 경우에는 경제성등을 감안하여 쉽게 재배를 할 수 있으며 수급이 용이한 품종으로 선별하였다. 선별 결과를 바탕으로 2 차년도와 3 차년도 재배 품종 및 시기를 결정하였다. 콩잎 재배를 위해 2012년도에는 충청남도 인근에 A, B 두 지역을 선택하여 전체 2,000평 규모에 3가지 품종의 콩 (YS, GH, WD)을 재배하여 수확 시기별 콩잎을 확보하고자 하였다.

##### (2) 수확 시기별 콩잎의 추출물 또는 분획물 분석

2011년도에 A지역 (WD, GH) 및 B지역 (GH1, GH2, YS)에서 재배하여 일정 기간별로 수확한 콩잎의 건조분말 100 mg을 70% 에탄올 (EtOH) 1 mL 또는 에틸아세테이트 (EtOAc) 1 mL을 이용하여 24시간 동안 1회 추출하였고, 1.5 mL e-tube에 70% EGmL (50  $\mu$ l), EAGmL (200  $\mu$ l)을 소량으로 각각 6개씩 분주하여 감압하에 완전건조 후 추출물의 평균 무게를 측정하여 추출물 1 mL에 대한 무게로 환산하였다.

##### (3) 테로카판 고함유 콩잎의 최종 수확 시기 결정

2012년도 A, B지역의 YS, WD 그리고 GH 품종을 바탕으로 재배하여 수확시기를 결정하였다. 파종 시기는 일년중 일모작 재배를 중심으로 하여 파종시기를 결정하였으며 지정 담당자가 초기에는 60일령까지 한달 간격으로, 이후에는 2주 간격으로 콩잎을 채취하여 분석을 통해 유효 성분이 가장 많이 생산하는 시기를 바탕으로 최종 수확시기로 결정하였다.

표 1. 2012년도 지역별/품종별 콩잎 파종 및 재배

재배지역	재배품종	재배 범위	파종시기	수확시기	수확일령
A 지역	YS	500 평	5월 22일	9월 2일	103일령
	GH	500 평	5월 22일	9월 26일	128일령
B 지역	WD	500 평	6월 6일	9월 23일	106일령
	GH1	500 평	6월 6일	9월 23일	106일령



#### 나. 동물실험/인체시험/제품화를 위한 콩잎 대량 수확 (계약재배)

본 연구과제의 1 차년도 연구결과를 바탕으로 충청남도 A, B 두 지역의 YS, GH, WD, GH1에 대한 콩잎의 재배 및 수확을 실행하였다. 품종별 콩잎의 수확은 선행 연구를 통해 확보된 결과를 중심으로 101~120일령의 콩잎을 수확하였다. 또한 같은 품종의 파종이라도 시기적, 환경적인 특성에 의한 수확이 달라짐을 고려하여 다소 시간적 차이를 두어 수확을 진행하였다.

#### 다. 콩잎으로부터 PTH 추출 방법의 표준화 연구

##### (1) 콩잎의 추출량 및 추출 횟수 확립을 위한 예비 실험

콩잎을 이용하여 실험실 수준에서 95% EtOH 이용한 대량 및 소량 추출물의 LDL-항산화활성을 비교, 분석하여 pilot plant 수준의 추출을 위한 공정을 확립하는 기초 data를 확보하였다.

콩잎은 95% EtOH와 EtOAc를 이용하여 콩잎 건조 무게의 10 배에 해당하는 용매를 첨가하였으며, 건조 콩잎 20g (대량)과 건조콩잎 100 mg (소량)을 2일간씩, 3회 반복 추출하였다. 이들 추출물의 일부를 건조한 후 40 µg/mL로 농도를 맞추어 동일한 조건에서 각각 LDL-항산화활성과 DPP-4 저해활성을 측정하였다.

##### (2) 수확한 콩잎의 건조 방법에 따른 활성 변화 측정

응달건조, 열풍건조(50~60°C) 그리고 태양광건조에 따른 콩잎 건조 후의 추출물 (70% EGmL, 95% EGmL 그리고 EAGmL)의 무게 및 이들에 대한 LDL-산화와  $\alpha$ -glucosidase 저해활성에 미치는 영향을 조사하였다.

##### (3) 추출 및 농축 공정에 따른 수율 검토

열풍건조 콩잎을 이용하여 추출 및 농축 공정을 진행하였다. 추출 조건으로 1차 70% EtOH을 용매로 사용하였으며, 추출 시 25~30°C 조건으로 48시간 동안 추출하였다. 추출 후 용매 제거를 위한 농축기 온도 40°C를 내외로 진행하였으며 농축 후 냉동진공건조기를 이용하여 추출물의 건조분말을 회수하여 각각의 고형분 함량과 HPLC system을 활용하여 화합물의 함량의 비교 분석하였다.

#### 라. 혈당 개선용 건강기능 원료/신제품 모니터링 및 효능 기작 파악

체지방 개선, 당료 및 지질대사 개선 관련 기능성 식물 추출물에 대한 국내특허 등록 및 출원된 기능성 물질 또는 기능성 소재의 리스트 및 중점 사항을 조사하였다. 기능성 원료의 조사는 특허청 홈페이지를 통해 자료를 분석하였으며 2000년 이후의 자료를 중심으로 조사하였다. 조사의 대상은 천연물을 바탕으로 조사하였다. 산업화 제품은 2010년 이후 판매되고 있는 제품 중 식약처에 신고 품목과 인터넷 판매 제품에 대한 주요 성분과 마케팅 소개를 중심으로 조사하였다.

#### 마. 인체시험 및 제품화를 위한 콩잎 대량 수확

선행 및 1 차년도 실험을 통해 확보한 결과를 통해 B 지역에서 WD와 GH 품종에 대한 대단위 (1,000 평 규모) 계약재배를 수행하였다. 보다 정확한 생산량 및 경제성 분석을 위해 2013년도 재배를 실행하였으며 임상실험 및 시제품 개발을 위해 선별 품종의 콩잎 원료를 대량 확보하고자 하였다. 콩잎 품종의 대량 생산 시 무농약 재배를 시행하였고, 1차년도에는 2012년 5월 22일에 파종을 하였지만, 2차년도의 경우 기온 및 파종시기를 고려하여 WD, GH 품종 모두

2013년 6월 9일에 파종하였다.

표 2. 2013년도 품종별 콩잎 파종 및 재배

재배 년도	재배품종	파종시기	수확시기	수확일령
2013년	GH	6월 9일	9월 26일	110일령
	WD	6월 9일	9월 26일	110일령

**바. 콩잎으로부터 테로카판 고함유 분획(PTH) 생산 공정 표준화**

**(1) 발효콩잎 추출물의 LDL-항산화 활성 및 yeast  $\alpha$ -glucosidase 저해활성 측정**

콩잎의 생리활성 또는 유효성분의 함량 증가 방법의 일환으로 물, 소금(천일염), 설탕, 유산균(*Lactobacillus* sp.)을 이용한 콩잎 발효를 시도하였다. 대조군 1은 콩잎 건조분말 3.5g에 70% EtOH 52.5 mL을 첨가 (15배)하여 25°C에서 48 시간 동안 추출하였고, 대조군2는 콩잎 건조분말 3.5 g에 증류수 52.5 mL을 첨가 (15배)하여 100°C에서 30분간 추출하였다. 또한 실험군은 물로 세척한 콩잎을 체로 걸러서 사용하였고, 콩잎 350 g에 각각 증류수 350 mL과 소금 (70 g), 설탕 (70 g), 유산균 (70 mL) 씩을 첨가하여 40°C에서 3 일간 숙성시킨 후 25°C에서 1 년간 발효를 실행하였다. 1년 후, 발효된 콩잎에 증류수 175 mL을 첨가하여 100°C에서 30 분간 열탕 추출하였고, 활성 측정을 위해 발효한 콩잎의 열탕 추출물로부터 콩잎을 걸러내고, 그 발효 추출물을 3,000 rpm에서 15 분간 원심분리하여 상등액을 분리하였다. 원심분리 후 침전물에는 95% EtOH 7.5 mL을 첨가 (15배)하여 25°C에서 48 시간 동안 추출하여 95% EtOH 추출물을 확보하였다. 콩잎 발효 후 열수추출 상등액과 침전물의 95% EtOH 추출물에 대한 여러 가지 생리활성을 측정하였다.

**(2) 콩잎의 단기 발효 후 열수 추출물 및 95% EtOH 추출물의 LDL-항산화 활성 측정**

단기 발효실험은 2012년에 수확한 콩잎을 사용하였다. 대조군은 콩잎 건조분말 1 g에 증류수 또는 95% EtOH 20 mL을 첨가 (20배)하여 95°C에서 1 시간 동안 추출함. 실험군은 물로 세척한 콩잎을 체로 걸러서 사용하였고, 4군의 시험군은 각각 콩잎 150 g에 물 (300 mL), 소금 (300 g), 설탕 (300 g), 유산균 (물 200 mL + 유산균 100 mL)을 각각 첨가하여 37°C에서 2 일간 숙성시키고, 25°C에서 45 일간 발효시켰다. 열수추출물은 발효 콩잎 10 g에 증류수 40 mL을 첨가하여 95°C에서 1시간 추출한 후 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상등액을 분리하여 활성측정에 사용함. 또한 95% EtOH 추출물은 발효 콩잎 3 g에 증류수 60 mL을 첨가하여 25°C에서 48 시간 추출한 후 종이필터로 추출물을 걸러서 활성측정에 사용하였다.

**사. HPLC를 이용한 PTH의 지표성분 (또는 유효성분) 함량 분석 및 validation**

대량생산 (larger scale) 공정을 통해 얻은 NS-GH-142d 시료의 95-ESL과 EASL를 analytical HPLC를 이용하여 분석하였다. HPLC 분석을 위해 Shimadzu HPLC system (Pump: Shimadzu LC-10A vp with binary pump; Detector: Shimadzu SPD-M10A vp PDA detector, 254 nm; Auto injector: Shimadzu SIL-10A vp)을 사용하였고, HPLC 컬럼으로 Brownlee SPP C18-MS-II column (4.6 x 50 mm, 2.7  $\mu$ m), 이동상으로는 0.1% 초산을 포함하는 물 (용매 B)과 아세트나이트릴 (용매 C)을 사용한 gradient condition, 유속 1.8 mL/min에서 분리 및 용출하여 PDA detector를

이용하여 분석하였다.

### 아. PTH의 안전성 시험

#### (1) 랫드를 이용한 단회 경구 독성시험

시험동물은 독성시험에 널리 사용되고 있고, 풍부한 시험기초자료가 축적되어 있는 특정병원체 부재 (SPF) Sprague Dawley 랫드 7주령 암, 수 각각 24 마리를 입식하여, 7일 동안 순화시켰고, 건강한 동물 암, 수 각각 20 마리를 선별하여 활용하였다.

사육조건은 온도  $23\pm 3^{\circ}\text{C}$ , 상대습도  $55\pm 15\%$ , 환기횟수 10-20 회/hr, 조명시간 12 시간 (오전 8 시 점등-오후 8 시 소등) 및 조도 150-300 Lux로 유지하였고, 사료는 방사선조사로 멸균된 실험동물용 고형사료 (TEKLAD CERTIFIED IRRADIATED GLOBAL 18 % PROTEIN RODENT DIET, 2918C, Harlan Laboratories Inc.,USA)를 (주)두얼바이오텍 (서울특별시 서초구 양재동 153, 정보프라자 107 호)으로부터 공급받아 자유섭취 하도록 하였다. 사육동물은 스테인레스제 망사육상자 (W 215 x L 355 x H 200 mm)에서 검역, 순화, 투여 및 관찰기간 모두 3 마리 이하/사육상자로 사육하였다. 시험군의 구성은 다음과 같이 하였고, 투여경로는 경구투여, 1회/일, 단회투여하였고, 투여액량은 투여일의 절식시의 체중을 기준으로 산출하였다.

표 3. 단회 경구 독성시험을 위한 시험군 구성

시험군	성 별	동물수	투여액량 (mL/kg)	투여량 (mf/kg)
G1	M/F	5/5	20	0
G2	M/F	5/5	20	1250
G3	M/F	5/5	20	2500
G4	M/F	5/5	20	5000

\* G1: 부형제대조군 (1% Tween 80이 포함된 멸균주사용수)

일반증상에 대하여 모든 동물에 대하여 매일 1 회 이상 실시하였다. 단, 투여 당일에는 투여 직후부터 1 시간까지는 지속적으로, 6 시간까지는 매시간마다 관찰하였다. 투여일을 Day 1으로 설정하였고, 일반증상관찰은 Day 15까지 실시하였다. 체중변화는 모든 동물에 대하여 Day 1 (투여전), 2, 4, 8 및 15에 측정하였다. 장기부검은 Day 15에 모든 생존동물을 CO<sub>2</sub>를 이용하여 마취시킨 후 개복하여 후대정맥 및 복대동맥을 절단하는 방법으로 방혈치사시켜 육안적으로 모든 장기를 검사하였다. 통계학적 분석은 상용으로 널리 사용되는 통계 패키지인 SPSS 10.1K를 이용하여 유의수준은  $P < 0.05$ 로 설정하였다.

#### (2) 세균을 이용한 복귀돌연변이시험

시험물질은 함량에 대한 보정 없이 중량 그대로를 조제에 사용한다. 최고농도군은 적량의 시험물질을 칭량하여 부형제에 용해하여 조제하고, 이것을 동일한 부형제로 희석하여 각 농도군을 조제한다. 처리용 시험물질은 처리 직전에 조제한다.

양성대조물질인 sodium azide (SA, Sigma)는 멸균주사용수 (대한약품공업(주), 제조번호 04L0F21)로 조제하여 냉동한 것을 해동하여 사용하였다. 2-Aminoanthracene (2-AA, Sigma),

Benzo[a]pyrene (B[a]P, Sigma), 2-Nitrofluorene (2-NF, Sigma), 4-Nitroquinone-1-oxide (4NQO, Sigma) 및 Acridine Mutation ICR (ICR-191, Sigma)은 DMSO (Sigma)로 조제하여 냉동 보관한 것을 해동하여 사용하였다.

표 4. 돌연변이 시험용 균주

균주명	<i>his/trp</i> 돌연변이	부가적인 돌연변이	플라스미 드	검출 돌연변이
<i>Salmonella typhimurium</i> TA100	<i>hisG46</i>	<i>rfa uvrB</i>	pKM101	Base pair substitution
<i>Salmonella typhimurium</i> TA1535	<i>hisG46</i>	<i>rfa uvrB</i>	-	Base pair substitution
<i>Salmonella typhimurium</i> TA98	<i>hisD3052</i>	<i>rfa uvrB</i>	pKM101	Frameshift
<i>Salmonella typhimurium</i> TA1537	<i>hisC3076</i>	<i>rfa uvrB</i>	-	Frameshift
<i>Escherichia coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	<i>trpE</i>	<i>uvrA</i>	-	Base pair substitution

균주 공급원은 Molecular toxicology Inc. (P.O. BOX 1189 BOONE, NC 28607, USA)에서 구입 후 (주)캠온 비임상연구소에서 형질확인 후 계대배양한 것을 시험에 사용하였고, 복귀돌연변이 시험을 위한 균주의 전배양에는 2.5 % Oxoid Nutrient broth No. 2를 사용하였다.

최소배지 (Minimal glucose agar plate)는 1.5 % Bacto agar (Difco)와 Vogel-Bonner medium E 및 2 % glucose를 함유한 것을 페트리디쉬 (90 x 15 mm, 감마선 멸균)에 25 mL씩 분주한 것을 사용하였다. 대장균 (*E. coli*)의 경우 위와 동일한 최소배지에 0.1 % tryptophan액을 0.25 mL/L로 첨가한 것을 사용하였다. Top agar는 0.6 % Bacto agar와 0.5 % NaCl로 조제하였으며, 살모넬라 균주용 top agar에만 100 mL당 10 mL의 0.5 mM histidine-biotin 액을 첨가하였다.

농도균은 5 종의 균주에 대하여 농도균당 1 개의 플레이트 (평판)를 사용하여 대사활성계 적용 및 비적용하에 시험물질을 처리하여 얻은 결과를 근거로 결정하였다.

예비시험에서는 5 - 5000  $\mu$ g/plate의 8 단계 농도를 처리하였으며, 시험물질 처리시 top agar와 혼합할 때 및 집락 계수시 플레이트에 침전 생성 여부를 관찰하였다.

그 결과 모든 농도균에서 처리시 침전은 관찰되지 않았으며, 플레이트에서도 침전 및 세포독성은 관찰되지 않았다. 따라서, 본시험에서는 다음과 같이 시험균을 구성하고, 음성 및 양성대조균을 포함하며, 농도균당 3 개의 플레이트를 사용하여 시험하였다.

표 5. 돌연변이 시험을 위한 농도

균주명	S9 mix	농도균 ( $\mu$ g/plate)				
		50	150	500	1500	5000
TA strains	+/-	50	150	500	1500	5000
WP2 <i>uvrA</i>	+/-	50	150	500	1500	5000

시험물질의 처리는 direct plate incorporation 방법으로 실시하였다. 시험균주는 master plate로부터 20 mL의 액체배지 (2.5 % Oxoid Nutrient Broth No. 2)에 접종해 shaking incubator (37  $\pm$  2°C, 120 rpm)에서 10 시간 전배양 하였으며, 전배양을 마친 균주는 파장 600 nm에서 흡광도 측정으로 생균수를 산출한 후 시험에 사용할 때까지 냉장 보관하였다. 온도 45  $\pm$  2°C를 유

지하는 dry bath에 꽂은 멸균 tube (12 x 75 mm)에 고압증기 멸균한 top agar를 2 mL씩 분주한 다음, S9 mix 0.5 mL (대사활성계 비적용시에는 S9 mix 대신 0.5 mL의 sodium-phosphate buffer, pH 7.4), 균배양액 0.1 mL, 시험물질 용액 0.1 mL을 혼합하고 즉시 vortex mixer로 2-3 초간 진탕하여 minimal glucose agar plate에 부어 여러 방향으로 기울여 고루 퍼뜨려 굳게 하였다.

음성대조군은 시험물질 용액 대신 부형제 0.1 mL을, 양성대조군은 양성대조물질 용액을 동일한 방법으로 가하여 실시하였다. 시험물질 및 S9 mix의 무균성 확인을 위해 시험물질 최고 농도액 0.1 mL 및 S9 mix 0.5 mL을 각각 2 mL의 top agar에 혼합하여 평판을 제작하였다. 처리가 끝난 후 top agar가 굳으면 평판을 뒤집어  $37 \pm 2^\circ\text{C}$ 에서  $50 \pm 2$  시간 배양한 후 복귀돌연변이집락(이하 집락)을 육안으로 계수하였다.

집락 계수시 각 평판의 기본성장균층 (background lawn)의 형성여부를 음성대조군과 비교하여 검사하였으며, 오염 혹은 기타 이상의 발생여부를 점검하였다.

다음 중 최소 한 항목이 관찰되는 경우 해당 농도에서 세포독성이 있는 것으로 판단하였다.

- ① 기본성장균층이 옅어지거나 없어지면서 집락수의 감소가 나타날 때.
- ② 미세집락 (microcolony)이 나타날 때.

집락수의 '감소'에 대해서는 공통된 기준이 없으므로, 본 시험에서는 집락수가 음성대조군 평균치의 50 % 미만인 경우 혹은 증가 경향이 역전되는 경우로 판단하였다.

### (3) 세포주를 이용한 염색체이상시험

본 시험에는 암컷 Chinese hamster의 폐섬유아세포에서 유래한 CHL/IU 세포주를 사용하였다. 이 세포주는 다양한 화학물질을 대상으로 한 유전독성시험에 널리 사용되고 있으며, 염색체이상의 검출에 적합함이 입증되었다. 세포주는 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)에서 입수하였다 (Cat. No. CRL-1935). ATCC에서 제공한 정보에 의하면 이 세포주의 염색체 modal number는 25 이며, 분열주기는 약 15 시간이다. 본 시험에서 사용한 세포주의 세포 증식률 및 핵형 검사 결과, 염색체 modal number는 25 이며, 분열주기는 약 14.6 시간이었다.

배양액은 1 리터용 Minimum Essential Medium (Gibco-BRL #41500-034) 분말배지에 sodium bicarbonate (2200 mg), L-glutamine (292 mg), penicillin-streptomycin 액 (Gibco-BRL #15140-122)을 첨가하여 멸균증류수로 총 액량을 1000 mL로 조정된 것을 공경  $0.2 \mu\text{m}$ 의 membrane filter로 여과한 것에 Fetal Bovine Serum (Gibco-BRL #16000-044) 100 mL를 첨가한 것을 사용하였다. 세포는 5 %의 이산화탄소와 포화 수증기를 함유한  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 항온배양기 (Forma 311 및 3111)에서 세포 배양용 플라스크 (배양면적 75 cm<sup>2</sup>, Falcon)를 사용하여 배양하며 매 2-3 일 마다 0.1 % 트립신액으로 세포를 분리, 계대 배양하였다.

본 시험의 처리 농도는 예비시험 (시험번호 13-VG-255P)에서 본시험과 같은 방법으로 대사활성계 적용 및 비적용 하에 시험물질을 처리하여 얻은 결과를 근거로 결정하였다. 처리 방법에 따라 다음과 같이 구분하였다.

예비시험에서는 부형제에 대한 용해한계인 1670  $\mu\text{g/mL}$ 을 최고농도로 하여, 5-1670  $\mu\text{g/mL}$  범위의 8 단계 시험물질을 처리하고, 처리 개시 및 종료 시각에 침전 생성 여부, 배양액의 색

변화 등을 관찰하였다. 침전의 생성은 육안으로 관찰하였으며, 처리 종료시까지 처리액 중에 시험물질 입자가 관찰될 때를 침전으로 판단하였다. 시험물질 처리개시로부터 약 24 시간 후 플라스크로부터 세포를 분리, 계수하여 얻은 세포 수로 다음 수식에 의해 상대세포수 (Relative Cell Count, RCC)를 산출하여 세포독성의 지표로 하였다.

$$RCC = (\text{처리군의 세포수} / \text{음성대조군의 세포수}) \times 100 (\%)$$

예비시험 결과 1000  $\mu\text{g/mL}$  이상의 농도군에서 처리종료시까지 혼탁이 관찰되었고, 모든 처리계열에서 세포독성이 관찰되었다. 따라서 본시험에서는 Linear regression을 적용한 결과를 근거로 각 처리계열에서 RCC 값이 50 % 미만일 것으로 추정되는 높은 농도를 고농도로 설정하여 아래 표와 같이 본시험의 시험군을 구성하였다.

표 6. 염색체 이상 시험을 위한 농도

처리계열	대사활성 유/무 (+/-)	처리/회복 시간 (hrs)	검체 처리농도 ( $\mu\text{g/ml}$ )	양성대조구 처리농도( $\mu\text{g/ml}$ )
1	+	6/18	0, 275, 550, 980, 1100	B[a]P 20
2	-	6/18	0, 200, 400, 580, 800	EMS 800
3	-	24/0	0, 150, 300, 400, 600	EMS 600

세포배양 배양 면적 25  $\text{cm}^2$ 인 플라스크 (Falcon)당 6 × 104 세포를 5 mL의 배양액으로 파종하여 약 3 일간 배양하였다. 농도군당 2 개의 플라스크를 사용하였다. 세포를 처리계열 (Series) 1, 2, 3으로 나누어 준비하고, 시험물질 처리 전에 미리 각 플라스크의 배양액을 모두 제거한 후 대사활성계 적용군 (계열-1)은 2.47 mL, 비적용군 (계열-2 및 3)은 4.95 mL 의 배양액을 분주, 1 시간 이상 경과한 후 시험물질을 처리하였다. 음성대조군에는 부형제만을 같은 양 처리하였다.

시험물질 처리액 조성은 아래와 같다.

표 7. 시험물질 처리액 조성

처리계열	배양액 + 검체	S9 mix	최종 부피
1	2.47 mL + 0.03 mL	0.5 mL	3.0 mL
2	4.95 mL + 0.05 mL		5.0 mL
3	4.95 mL + 0.05 mL		5.0 mL

양성대조군에는 30  $\mu\text{L}$  B[a]P (series-1), 400  $\mu\text{L}$  EMS (series-2) 및 300  $\mu\text{L}$  EMS (series-3)를 처리

계열-1 및 계열-2는 처리개시로부터 약 6 시간 경과 후 플라스크로부터 시험물질을 함유한 처리액을 제거하고 5mL의  $\text{Ca}^{2+}$  &  $\text{Mg}^{2+}$  free Dulbecco's phosphate buffered saline (CMFD-PBS)로 세포층을 1 회 세척한 후 신선한 배양액 5mL를 가하여 중기세포 수거시까지 계속 배양하였다. 계열-3은 처리개시로부터 약 22 시간 경과 후 플라스크로부터 시험물질을 함유한 처리액을 제거하고 5mL의  $\text{Ca}^{2+}$  &  $\text{Mg}^{2+}$  free Dulbecco's phosphate buffered saline

(CMFD-PBS)로 세포층을 1 회 세척하고 신선한 배양액 5 mL를 가한 후 콜히친을 처리하고 다시 2시간을 배양 한 후 중기세포를 수거하였다. 모든 계열의 처리개시 및 종료시에 침전의 생성 혹은 pH에 따른 배양액의 색변화 등을 관찰하였다.

시험물질 처리 개시로부터 약 22 시간 후 모든 플라스크에 50  $\mu$ L의 콜히친 액을 처리하여 (최종농도 1  $\mu$ M) 2 시간 경과 후 진탕법으로 중기세포를 수거하였다. 중기세포를 포함한 배양액을 원심분리, 75 mM KCl 액에 의한 저장액처리 및 고정 (메틸알콜:빙초산=3:1 v/v)을 거쳐 공기건조법으로 염색체검체를 제작하고 5 % Giemsa액으로 염색하였다. 검체는 각 플라스크 당 2 매씩 제작하였다.

염색체이상의 형태 판별 및 계수는 일본환경변이원학회(JEMS) 포유동물시험분과회(MMS)판 ‘염색체이상 아틀라스(1988)’ 에 의하였다. 각 플라스크로부터 제작한 2 매의 검체 중 1 매씩을 선택하여 코드화 한 후, 100 개의 분열중기상 (이하 ‘중기상’이라 함)을 대상으로 1000 배의 배율로 염색체이상을 계수하였다.

구조적 이상은 동원체 수가 23-27인 중기상에 대하여 동원체 수 및 염색체이상의 유무를 관찰하고, 염색체이상이 관찰되면 이상의 종류와 수 및 슬라이드 상의 위치를 기록하였다. 이상은 크게 염색체형 절단 및 교환과 염색분체형 절단 및 교환으로 대별해 계수하였으며, gap을 포함한 경우와 제외한 경우를 병기하였다.

#### (4) 대량생산 수확한 콩잎 주정추출 분말의 잔류농약, 중금속 함량 분석

콩잎 주정추출 분말의 안전성 검토를 위하여 잔류농약 및 중금속 함량 분석을 공인인증기관을 통하여 식품공전에서 제시하는 방법으로 분석하였다.

잔류농약 분석은 시료 20 g을 칭량하여 아세톤 100 mL를 넣은 후 균질기로 2~3분간 균질화한 용액을 여과지 (whatman)를 포함하는 뷰흐너 깔때기 (Buchner funnel)를 이용하여 1차 감압 여과하고, 아세톤 30 mL로 2차 여과한 여과액을 분액깔때기 상에서 100 mL 헥산, 50 mL 포화염화나트륨용액 50 mL 및 물 450 mL과 진탕 혼합하였다. 정치후 수용액 층을 제거한 헥산 층을 무수환산나트륨 칼럼에 통과시켜 탈수한 액을 40°C 에서 감압농축하여 다시 10 mL의 헥산에 용해하고, 용해액 4 mL을 취하여 6 mL을 가하여 합친다. 5 ml 헥산을 이용하여 활성화한 florisil cartridge (RS tech, Korea)에 1 drop/초 속도로 용출시킨 후, 디클로로메탄/헥산 혼합액 (5/95, v/v) 10mL로 씻어서 버리고 디클로로메탄/헥산 혼합액 (40/60, v/v) 10 mL로 용출액을 회수한다. 용출액은 40 이하의 항온수조 중에서 질소를 낮은 유속으로 통과시키면서 농축하고 4 mL의 이소옥탄으로 녹여 시험용액으로 한다.

시험용액은 DB-5MS 컬럼 (30m/0.53mm ID 0.5)을 이용하여 캐리어 가스는 헬륨, 유량 2 mL/분 속도, 주입부 260°C, 측정부 300°C 의 조건에서 기체크로마토그래피 기법으로 측정하고 피크 높이법과 피크면적법을 이용하여 측정하였다.

중금속 함량 분석은 습식분해법의 황산-질산법을 활용하였다. 시료 20 g을 분해플라스크에 취해 물 50~70 mL, 질산 10~40 mL를 넣고 혼합하여 방치한다. 다음에 조용히 가열하여 격렬한 반응이 그치면 식힌 다음 황산 5~20 mL를 넣고 다시 조용히 가열한다. 내용물이 암색이 되기 시작하면 질산 2~3 mL씩을 추가하면서 가열을 계속하여 내용물이 미황색 ~ 무색이 되었을 때 분해가 끝난 것으로 한다. 분해액을 식힌 후 물 30~50 mL, 포화수산암모늄용액 10~25 mL를 가

해서 황산의 흰 연기가 발생할 때까지 가열하고 식힌 다음 물로 일정량으로 하여 시험용액으로 한다. 시험용액 및 공시험용액을 그대로, 혹은 희석 또는 농축한 다음 원자흡광광도계에 주입하여 흡광도를 구하고 따로 표준용액 및 이의 공시험용액에 대해서도 각각 시험용액의 경우와 같은 조작을 해서 검량선을 작성하여 시험용액의 농도를 구하였다.

#### **자. 1차년도 결과 및 2차년도 제 1 세부과제의 결과를 바탕으로 시제품 제작 및 시제품 물리생화학적 특성 분석**

체지방 및 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 혈당개선을 의한 제품에 대한 분석을 시행하였으며, 분석된 제형 및 원료성분을 바탕으로 제작하였다.

#### **차. 기능성소재의 대량 생산공정 확립 및 임상시험을 위한 시제품 제작**

B 지역 GH 콩잎의 주정추출분말을 이용하여 인체시험을 위한 시제품을 제작하였다. 인체시험을 위해 캡슐제조기를 이용하여 500 mg capsule에 95% EtOH PTH를 충전 한 캡슐을 제작하였다. 95% EtOH PTH의 자체 제습작용으로 인해 캡슐제작이 용이하지 않았으며, 이를 극복하기 위해 PTH : Starch를 90:10 비율로 혼합하여 캡슐을 제작하여 시제품으로 활용하였다.

#### **카. 기능성소재 및 부재료와의 최적 배합 및 제형 설정 연구 및 품질관리 방법 확립.**

체지방 개선, 당료 및 지질대사 개선 관련 기능성 식물 추출물에 대한 국내특허 등록 및 출원된 기능성물질 또는 기능성소재의 리스트 및 중점 사항을 조사하였다.

#### **타. 식품(식품첨가물) 품목 등록**

본 연구의 연구결과를 중심으로 95% EtOH 콩잎주정추출분말을 활용하여 체지방 조절 및 혈당 강하를 위한 기능성 제품을 개발을 위한 등록을 시행하였다. 제품은 일반 식품이 아닌 기능성을 함유하는 체중조제용 조절식품으로 ‘슬림파워’라는 브랜드로 개발하였다. ‘슬림파워’의 효율을 극대화하기 위해 기능성 소재 및 부재료와의 최적 배합 및 제형 설정 연구를 통해 확보된 관련 부형제 및 기능성 원료를 활용를 활용하고 이에 대한 분석을 시행하였다.

#### **파. 기능성소재를 활용한 체지방 및 혈당 조절 기능성 (시)제품 개발**

기능성 원료로는 폴리덱스트로스과 가르시니아감보지아추출분말을 혼합하여 체지방 조절에 활용하였으며 혈당 강하를 위해서는 난소화성 말토덱스트린을 기능성으로 활용하였다.

소비자의 기호성 마케팅을 위하여 분리대두단백, 볶은 현미분말 등을 혼합하였으며, 영양성분을 감안하여 제품을 개발하였다.



## 2. 연구개발 수행 결과

### 가. 수확 시기별 콩잎 확보 및 유기용매를 이용한 PTH 제조

#### (1) 품종별/채취시기별 콩잎 재배

본 연구과제는 2011년 9월 23일 시점에 시작되었기 때문에 본 연구 과제를 진행하기 위해 협동연구기관에서 선행연구를 위해 미리 준비한 품종별/채취 시기별 콩잎 시료를 사용하였다. 2011년도 5월 17일에 파종하여 9월 19일까지 키운 후 수확하여 확보한 품종별/채취시기별 콩잎을 사용하여 제1세부과제의 기능성 분석등을 통해 연구를 수행하였다. 기능성 분석항목으로는 콩잎에 대한 제1세부과제의 생리활성물질 함유량 (HPLC profile을 통한 예측 및 총 플라보노이드 및 총 페놀 함량 측정)에 대한 분석을 하였다. 1차 실험을 위해 2012년 7월 10일에 50일령 콩잎 시료를 채취하여 각각 건조콩잎 약 60 g x 2개씩 확보하였다. 선행연구 및 2011년도에 확보한 결과 분석을 통해 원료 품종을 고려하였다. 또한 품종의 경우, 경제성등을 감안하여 쉽게 재배를 할 수 있으며 수급이 용이한 품종으로 선별하였다. 선별결과를 바탕으로 2 차년도 및 3 차년도 재배 품종 및 시기를 결정하였다. 콩잎 재배를 위해 2012년도에는 충청남도 인근에 A, B 두 지역을 선택하여 전체 2,000평 규모에 3품종의 콩(YS, GH, WD)을 재배하여 수확 시기별 콩잎을 확보하고자 하였다.

콩잎은 충청 A, B 두 지역에서 세가지 품종(A 지역 GH, WD; B지역 GH, YS)별로 2011년도 5월 17일에 파종하여, 약 30일에 9월 19일과 24일에 시료를 채취(그림 1, 2)하였고, 품종별 시료를 확보하였다. 시료는 파종 후 약 30일 간격으로 시료를 채취하여 생리활성 물질의 분석용으로 활용하였다. 확보한 시료는 건조기를 이용하여 건조 후 분말화 한 시료를 약 100~300 g 씩 확보하였다.



2011-A지역 GH



2011-A지역 WD



2011-B지역 GH



2011-B지역 YS

그림 1. 2011년도 지역별/품종별 콩잎 대량 재배 현장

표 8. 2011년도 지역별/품종별 콩잎 파종 및 수확 시기

재배 지역	재배 품종	파종시기	수확 시기	수확일령
A	GH	5월 15일	9월 1일	107
	WD	5월 16일	9월 2일	108
B	GH1	5월 20일	8월 31일	101
	GH2	6월 06일	10월 04일	120
	YS	6월 06일	10월 04일	120



그림 2. 2011년도 수확시기별로 확보한 GH1 콩잎 건조분말 (품종별 대표 그림)

## (2) 수확 시기별 콩잎의 추출물 또는 분획물 분석

2011년도에 A지역 (WD, GH) 및 B지역 (GH1, GH2, YS)에서 재배하여 일정 기간별로 수확한 콩잎의 건조분말 100 mg을 70% EtOH 1 mL 또는 EtOAc 1 mL을 이용하여 24시간 동안 1회 추출하였고, 1.5 mL e-tube에 70% EGmL (50  $\mu$ l), EAGmL (200  $\mu$ l)을 소량으로 각각 6 개씩 분주하여 감압하에 완전건조 후 추출물의 평균 무게를 측정하여 추출물 1 mL에 대한 무게로 환산하였다 (표 9). 70% EtOH 추출물의 건조 무게는 재배기간이 길어짐에 따라 점차적으로 증가하였으나, EtOAc추출물의 무게는 재배기간에 따른 상관관계가 없는 것으로 나타났다.

표 9. Dry weights of 70% EGmL and EAGmL of various soy leaves having different cultivating duration

Samples	Dry weights of extracts (mg/mL)		Samples	Dry weights of extracts (mg/mL)	
	70% EGmL	EAGmL		70% EGmL	EAGmL
A-WD-59d	24.0 $\pm$ 1.3	6.6 $\pm$ 0.6	B-GH1-102d	27.3 $\pm$ 1.6	7.1 $\pm$ 1.4
A-WD-91d	22.3 $\pm$ 1.5	6.6 $\pm$ 1.0	B-GH1-120d	31.3 $\pm$ 3.0	8.2 $\pm$ 1.3
A-WD-105d	26.7 $\pm$ 1.0	6.4 $\pm$ 1.1	B-GH2-60d	23.3 $\pm$ 1.6	7.6 $\pm$ 1.1
A-WD-125d	29.3 $\pm$ 1.6	7.1 $\pm$ 0.9	B-GH2-87d	30.7 $\pm$ 1.0	5.1 $\pm$ 0.8
A-GH-59d	21.0 $\pm$ 1.0	5.0 $\pm$ 0.6	B-GH2-105d	30.0 $\pm$ 2.5	6.5 $\pm$ 0.7
A-GH-91d	25.0 $\pm$ 1.7	5.3 $\pm$ 0.6	B-GH2-120d	32.7 $\pm$ 1.6	6.8 $\pm$ 0.5
A-GH-105d	24.0 $\pm$ 1.3	5.0 $\pm$ 0.4	B-S-60d	26.3 $\pm$ 1.5	5.3 $\pm$ 0.5
A-GH-120d	27.0 $\pm$ 2.1	5.6 $\pm$ 0.5	B-YS-87d	30.3 $\pm$ 0.8	6.3 $\pm$ 1.0
B-GH1-60d	24.3 $\pm$ 0.8	6.5 $\pm$ 0.8	B-YS-105d	32.7 $\pm$ 1.6	7.1 $\pm$ 0.6
B-GH1-92d	29.0 $\pm$ 2.1	6.3 $\pm$ 1.1	B-YS-120d	34.0 $\pm$ 0.0	5.5 $\pm$ 0.4

### (3) 테로카판 고함유 콩잎의 최종 수확 시기 결정

콩잎 재배시 재배기간 120 일령 이후의 콩잎 색깔이 누렇게 변하면서 낙엽이 많이 생겨 콩잎 수확량이 급격히 감소하므로 100~110일이 콩잎수확의 적정시기로 판단되었다. 파종 후 110일 정도 시간이 지나면 기온이 떨어지며 이로 인한 낙엽이 발생 빈도가 높아지는 현상이 발생하였다 (그림 3). 또한 환경적으로 서리와 같은 지면이 젖어 있는 상태에서 낙엽으로 인해 떨어진 콩잎은 추후 건조 등에서도 시간 소요가 길어지는 원인이 될 수 있어 경제성을 고려해 볼 경우, 110일 이전 또는 낙엽 발생이 높아지기 전에 수확하는 것이 좋은 것으로 판단되었다. 2012년도 재배 시 환경으로는 긴 가뭄 후에 갑작스런 우기로 인한 악천후가 겹쳤으며, 2013년도에는 중반 이후에 태풍과 함께 큰비로 인해 수확량이 감소하는 결과를 보였다.

대사중후군 예방 생리활성을 극대화 할 수 있는 WD, GH, YS 콩잎을 바탕으로 지형적 특성을 고려하여 A, B 지역에서 재배 수확한 결과 콩잎의 평당 회수량은 WD가 가장 좋았으며, 그 다음으로 GH와 YS 순이었다. 또한 지역적인 특성 (온도, 환경조건)에 의해 같은 품종이라도 회수량은 67~77%의 감소량을 보였다. 이는 지역적인 특성과 환경적인 특성인 것으로 생각이 된다. 지역적인 특성으로는 지형부분이 큰 관건으로는 장마 등으로 인한 물빠짐이 용이한 곳과 상대적으로 햇볕이 오랜 기간 동안 많이 드는 곳이 더 많은 회수량을 확보할 수 있을 것으로 판단된다.

1세부과제의 연구 결과를 바탕으로 A지역과 B지역에서 재배한 콩잎 모두 약 102~105일령 이후 80% 이상의 높은 LDL-항산화 활성을 나타내었다. 특히 B지역의 GH1은 92일령에서도 88.8%의 높은 저해활성을 나타내었다. 재배기간이 길어짐에 따라 70% EGmL과 95% EGmL의  $\alpha$ -glucosidase 저해활성은 다소 증가되었고, 전반적으로 120일령에서 가장 높은 저해활성을 나타내었다. 반면에 EAGmL의 A지역과 B지역 모두 102~105일령에서  $\alpha$ -glucosidase 저해활성은 높았으며, 특히 A지역에서 재배한 GH-105일령의 저해활성(92.8%)이 월등히 높았음을 확인하였다. 따라서 생리활성 및 수확량을 감안하여 파종 후 약 102~120일 콩잎 수확의 적정시기로 판단되나, 앞서 설명한 것처럼 환경적인 측면 (2012년도 심한 기후 변화)을 감안해 볼 경우 15일 간격으로 콩잎을 채취하여 여러 가지 생리활성을 검색을 병행하면서 적절한 수확 시기를 결정하는 것이 중요하다. 선행 연구와 본 연구를 통해 지역별, 품종별 그리고 시기에 따른 경제성을 감안한 콩잎의 수확에 대한 자료를 확보하였으며 이는 시제품 생산의 중요 data로 활용하였다.



그림 3. 일령별 공잎 변화 양상 (A 지역 GH 품종)

## 나. 동물실험/인체시험/제품화를 위한 콩잎 대량 수확

본 연구과제의 1 차년도 연구결과를 바탕으로 충청남도 A, B 두 지역의 YS, GH, WD, GH1에 대한 콩잎의 재배 및 수확을 실행하였다. 품종별 콩잎의 수확은 선행 연구를 통해 확보된 결과를 중심으로 101~120일령의 콩잎을 수확하였다. 또한 같은 파종이라도 시기적, 환경적인 특성에 의한 수확이 달라짐을 고려하여 다소 시간적 차이를 두어 수확을 진행하였다.

지역별 품종별 건조 콩잎의 생산은 A 지역과 B 지역의 재배를 통해 637.3 kg의 건조콩잎을 확보하였다 (표10). 같은 지역이라도 품종별로 확보된 건조 콩잎은 다소 차이가 있었다. 재배 당시 7월~8월 중순 (60일령~90일령)에 집중호우 형태의 비가 많이 왔으며, A 지역보다는 B 지역에 상대적으로 많은 비가 내려 지형적 특성으로 인해 물빠짐 (배수)가 상대적으로 용이하지 못해 수확량에 영향을 주었을 것으로 유추된다. GH의 수확량은 B 지역에 비해 A 지역에서 면적당 3배 정도 높았으며, 상대적으로 B 지역의 WD는 집중호우에도 불구하고 A 지역의 GH와 비슷한 수확량을 나타내었다. 이는 품종의 차이로 인한 것이라 판단한다. YS 품종은 1 차년도와 마찬가지로 GH, WD에 비해 적은 콩잎을 수확하였다. YS 품종의 경우, 충청남도 지역에서 재배하기에 적절하지 않은 것으로 판단되었다.

표 10. 지역별/품종별 건조 콩잎 확보량

재배지역	재배 품종	건조 콩잎 생산량	면적당 생산량
A 지역	YS	128.4 kg	0.078 kg/m <sup>2</sup>
	GH	221.2 kg	0.134 kg/m <sup>2</sup>
B 지역	WD	214.1 kg	0.129 kg/m <sup>2</sup>
	GH	73.6 kg	0.044 kg/m <sup>2</sup>
	총 량	637.3 kg	

생산된 건조 콩잎 추출물의 생리활성을 분석한 결과, 추출물의 DDP-4, LDL-oxidation,  $\alpha$ -glucosidase 저해활성은 다른 품종에 비해 열악한 환경에서 생산된 B 지역의 GH에서 가장 높았으며, 다음으로는 B 지역의 WD의 순서로 확인되었다. B 지역이 A 지역에 비해 추출물의 건조무게가 다소 높게 나옴을 확인하였다.

이상의 결과로부터 수확량과 생리활성을 모두 고려할 때, 기능성 소재로 재배하기 위해서는 GH > WD > YS 순으로 좋은 결과를 확인하였다.

표 11. A, B 두 지역에서 수확한 콩잎 추출물의 생리활성 비교

재배 지역	재배 품종	Inhibition (%)			Dry weight of extracts (mg/mL)
		DPP-4 (2 $\mu$ l of extract)	LDL-oxidation (0.9 $\mu$ l of extract)	$\alpha$ -glucosidase (1.7 $\mu$ l of extract)	
A지역	YS	34.3 $\pm$ 1.1	57.1 $\pm$ 0.8	8.5 $\pm$ 0.2	17.4
	GH	37.5 $\pm$ 1.4	36.5 $\pm$ 0.8	22.6 $\pm$ 0.5	16.8
B지역	WD	36.7 $\pm$ 0.9	57.5 $\pm$ 0.9	21.5 $\pm$ 4.5	21.1
	GH	<b>41.0 <math>\pm</math> 0.8</b>	<b>84.7 <math>\pm</math> 1.4</b>	<b>69.1 <math>\pm</math> 0.4</b>	20.7
Positive control		54.5 $\pm$ 0.0 (KR-62436 at 0.5 $\mu$ M)	52.7 $\pm$ 0.5 (BHT at 2 $\mu$ M)	46.6 $\pm$ 4.5 (coumestrol at 5 $\mu$ M)	

#### 다. 콩잎으로부터 PTH 추출 방법의 표준화 연구

##### (1) 콩잎의 추출량 및 추출 횟수 확립을 위한 예비 실험

콩잎을 이용하여 실험실 수준에서 95% EtOH 이용한 대량 및 소량 추출물의 LDL-항산화 활성을 비교, 분석하여 pilot plant 수준의 추출을 위한 공정을 확립하는 기초 data를 확보하였다.

콩잎은 95% EtOH와 EtOAc를 이용하여 콩잎 건조 무게의 10 배에 해당하는 용매를 첨가하였으며, 건조 콩잎 20g (대량)과 건조콩잎 100 mg (소량)을 2일간씩, 3회 반복 추출하였다. 이들 추출물의 일부를 건조한 후 40  $\mu$ g/mL로 농도를 맞추어 동일한 조건에서 각각 LDL-항산화 활성과 DPP-4 저해활성을 측정하였다.

측정결과 LDL-항산화 활성은 40  $\mu$ g/mL 농도에서 95% EtOH 추출물보다 EtOAc 추출물이 월등히 높은 저해 활성을 확인하였다. 95% EtOH 추출물의 경우에는 대량 생산의 경우 소량 생산보다 높은 LDL-항산화 활성을 보였으며, 3차 추출로 갈수록 활성이 현저하게 낮아지는 것을 확인할 수 있었다. EtOAc 추출물의 경우에는 대량추출이 소량추출에 비해서 다소 높은 LDL-항산화 활성을 보였다. EtOAc 추출물의 경우 대량생산과 소량생산 모두 1차 추출과 2차 추출의 활성이 크게 차이가 없었으나, 3차 추출에서는 활성이 다소 감소하였다.

표 12. 콩잎 추출량 (소량, 대량) 및 추출 횟수에 따른 LDL-항산화활성 비교

Soy leaf extracts (40 µg/mL)			Inhibition of LDL-oxidation (%)
95% EtOH Ex.	20 g	1st	61.1 ± 0.8 (100)
		2nd	46.2 ± 0.3 (75.6)
		3rd	26.8 ± 2.5 (43.9)
	100 mg	1st	58.1 ± 0.2 (100)
		2nd	40.3 ± 1.4 (69.3)
		3rd	32.2 ± 3.2 (55.4)
EtOAc Ex.	20 g	1st	77.8 ± 0.8 (100)
		2nd	80.8 ± 0.0 (103.8)
		3rd	73.3 ± 0.1 (94.2)
	100 mg	1st	77.5 ± 1.3 (100)
		2nd	76.8 ± 0.4 (99.1)
		3rd	62.0 ± 0.5 (80.0)
Positive control (BHT 2 µM)			45.5 ± 0.2

(2) 수확한 콩잎의 건조 방법에 따른 활성 변화 측정

응달건조, 열풍건조 (50~60°C) 그리고 태양광건조에 따른 콩잎 건조 후의 추출물 (70% EGmL, 95% EGmL 그리고 EAGmL)의 무게 및 이들에 대한 LDL-산화와 α-glucosidase 저해활성에 미치는 영향을 조사하였다. 측정결과, 콩잎 건조 후 추출물의 무게는 큰 차이가 없었으나, 태양광건조 시료의 EAGmL의 무게가 응달건조와 열풍건조에 비해 다소 감소하였다.

각각의 건조 조건에 따른 콩잎 추출물의 LDL-산화 저해활성은 70% EGmL과 95% EGmL 모두에서 큰 차이가 없었다. 따라서 건조 방법에 따라 항산화활성은 비교적 안정적인 것으로 확인되었다.

콩잎 건조 후 추출물 (70% EGmL, 95% EGmL, EAGmL)의 α-glucosidase 저해활성은 전체적으로 큰 차이가 없었으나, EAGmL의 경우 태양광 > 열풍 > 응달 순으로 저해활성이 증가되는 것으로부터 건조 과정에서 열에 의해 EAGmL이 함유하는 비극성물질에 다소 변화가 오는 것을 확인하였다.

표 13. 콩잎의 건조조건에 따른 추출물의 수율 분석

Samples	Dried weight of extracts (mg/ml)			
	EAGML	70% EGML	95% EGML	
JP-HG2-105 d	6.7	32.0	18.0	
JP-HG2-120d	응달건조	6.7	30.0	16.0
	열풍건조	6.7	34.0	16.0
	태양광건조	5.3	30.0	16.0

표 14. 콩잎의 건조조건에 따른 추출물 LDL-oxidation 저해 활성

Samples		Inhibition of LDL-oxidation (%)		
		EAGML	70% EGML (80 µg/ml)	95% EGML (80 µg/ml)
JP-HG2-105 d		-(not detected)	92.4 ± 0.7	68.1 ± 1.3
JP-HG2-120d	응달건조	-	95.0 ± 0.3	85.5 ± 0.6
	열풍건조	-	95.7 ± 0.8	87.1 ± 1.5
	태양광건조	-	96.8 ± 0.8	86.4 ± 0.2

표 15. 콩잎의 건조조건에 따른 추출물 α-glucosidase 저해 활성

Samples		Inhibition of α-glucosidase (%)		
		EAGML (50 µg/ml)	70% EGML (200 µg/ml)	95% EGML (200 µg/ml)
JP-HG2-105 d		38.6±1.7	35.9±3.1	42.5±1.5
JP-HG2-120d	응달건조	47.8±2.1	44.0±2.9	45.6±0.1
	열풍건조	53.4±1.5	47.9±2.6	46.5±2.5
	태양광건조	57.4±1.0	41.5±1.4	43.2±1.1

### (3) 추출 및 농축 공정에 따른 수율 검토

열풍건조콩잎을 이용하여 추출 및 농축 공정을 진행하였다 (그림 4). 추출 조건으로 1차 70% EtOH을 용매로 사용하였으며, 추출 시 25~30℃ 조건으로 48 시간 동안 추출하였다. 추출 후 용매 제거를 위한 농축기 온도 40 ℃를 내외로 진행하였으며 농축 후 냉동진공건조기를 이용하여 추출물의 건조분말을 회수하였다.

표준 공정을 거친 최종 콩잎 주정추출분말은 고형분 25.7 %의 24 Brix로 수율은 17.3 %였다. 기존의 실험실에서의 선행 실험 시 17.5 ~ 21 %의 수율에 비교해 볼 경우, 대량 공정으로 인해 기본적인 수율이 나온 것으로 판단이 되며, 보다 경제성을 확보할 수 있는 수율을 위한 공정은 반복 수행을 통한 최적화가 가능할 것으로 판단된다. 또한 1세부과제의 추출물에 대한 HPLC 분석을 통해 70% EGmL에도 테라카판계 화합물이 함유된 것을 확인하였다.

95% EtOH을 용매로 사용하여 70% EtOH을 함유하는 방법과 동일 방법으로 GH의 추출을 실행하였다. 추출결과 표준 공정을 거친 최종 콩잎 주정추출분말에 대한 수율은 70% EtOH 추출 시와 비슷한 수율을 나왔으나 고형분 함량 Brix는 30 Brix로 70% EtOH 대비 높게 나오는 것을 확인하였다.



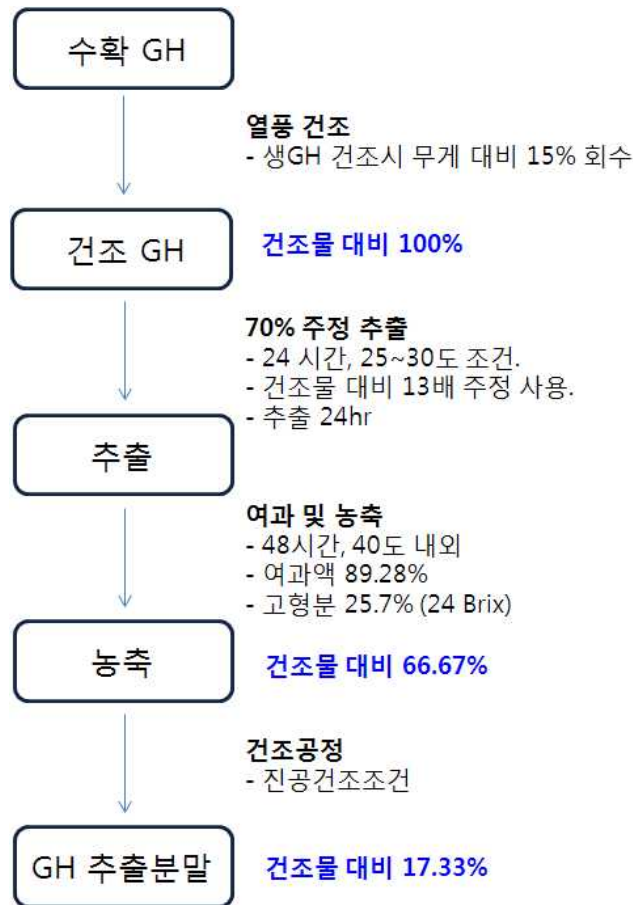


그림 4. 콩잎으로부터 PTH 표준 추출 방법 모식도.

본 연구를 통해 추출된 식물체의 주정추출물 등을 장기보관하면서 동물실험, 인체시험, 시제품 제작과 관련된 연구를 수행과 함께 제품 생산 시 추출물의 보관 용이성, 안정성 등을 고려하여 완전히 건조하여 분말 보관이 필요하다. 이 때 건조 방법인 동결건조기 또는 진공건조기 사용에 따른 추출물의 생리활성에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 LDL-산화와  $\alpha$ -glucosidase 저해활성에 미치는 영향을 조사하였다 (표 16). 진공건조 및 동결건조 방법으로 건조하여 분말화한 시료의 LDL-산화 및  $\alpha$ -glucosidase 저해활성에 차이가 없는 점을 확인하였다. 대량공정 시스템과 제작시설 등을 고려하여 동결건조 방법과 진공건조 방법 모두 사용이 가능한 것으로 확인되었다.

표 16. Effects LDL-oxidation and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activities of 70% EtOH extracts from *G. max* leaf on vacuum- or freeze-dry method

Dry method of Concentrated 70% EGML	Inhibition of LDL-oxidation (%) at 80 $\mu$ g/ml	Inhibition of $\alpha$ -glucosidase (%) at 200 $\mu$ g/ml
Vacuum dry	96.3 $\pm$ 0.7	39.6 $\pm$ 2.5
Freeze dry	95.5 $\pm$ 0.6	39.6 $\pm$ 1.1
Positive control	71.4 $\pm$ 0.7 (BHT 2 $\mu$ M)	52.0 $\pm$ 1.7 (coumestrol 25 $\mu$ M)

#### (4) 부형제 첨가 시 추출물의 활성에 미치는 영향 조사

재배된 콩잎의 대량 공정 시 식물체의 주정추출물은 배당체 등이 다량 함유되어 있으므로 동결건조 또는 진공건조 등이 용이하지 않은 경우가 있었다. 따라서 일반적으로 생리활성물질의 활성에 영향을 미치지 않으면서 동결건조 또는 진공건조를 용이하게 하기 위하여 부형제로 많이 사용되는 덱스트린을 활용하여 생리활성 물질의 함량을 비교 분석하였다. 이 덱스트린 함량에 따른 생리활성 변화 유무를 관찰하기 위하여 덱스트린 첨가하지 않은 상태와 덱스트린의 함량을 늘리면서 LDL-산화와  $\alpha$ -glucosidase 저해활성에 미치는 영향을 조사하였다(표 17). 덱스트린 함량이 추출물 대비 50% 이상이 되는 경우  $\alpha$ -glucosidase 저해활성이 7% 감소하였으며, LDL-산화 저해활성에는 덱스트린 함량 증가가 거의 영향을 미치지 않는 것을 알 수 있었다(표 17). 따라서 대량 공정 시 추출물의 건조 및 formulation을 위해 부형제인 덱스트린을 첨가량을 조절하여 추출물의 유효성분 함량을 조절할 수 있었다. 건조 부형제는 덱스트린, 전분, 말토덱스트린 등의 다당체를 이용하여 소재의 최종 제형과 용도에 따라 변경이 가능하다.

표 17. Effects of Dextrin on  $\alpha$ -glucosidase and LDL-oxidation inhibitory activities of 70% EtOH extracts from *Glycine max* leaf

		Dextrin ( $\mu$ g/ml)	A : Dextrin	Inhibition of yeast $\alpha$ -glucosidase (%)	Inhibition of LDL-oxidation (%)
		200 $\mu$ g/ml of 70% EtOH extracts from <i>Glycine max</i> leaf (A)	+	0	
25	8 : 1			72.2 $\pm$ 2.2	92.5 $\pm$ 0.9
50	4 : 1			72.2 $\pm$ 2.5	93.5 $\pm$ 1.3
100	2 : 1			67.7 $\pm$ 3.2	93.5 $\pm$ 1.1
200	1 : 1			67.8 $\pm$ 2.4	92.5 $\pm$ 0.9
400	1 : 2			66.6 $\pm$ 2.9	91.6 $\pm$ 1.0
Positive control				53.1 $\pm$ 2.8 (coumestrol, 25 $\mu$ M)	59.4 $\pm$ 0.3 (PHT, 2 $\mu$ M)

The reaction mixture contained 90  $\mu$ l of 0.1 M phosphate buffer (pH 6.8), 50  $\mu$ l of 0.1 U/mL  $\alpha$ -glucosidase, 50  $\mu$ l of 2.5 mM p-nitrophenyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside (pNPG), 5  $\mu$ l of 8 mg/mL 70% EtOH extract from *G. max* leaf (A), and 5  $\mu$ l of various concentration of dextrin. This reaction mixture was then incubated at 37 $^{\circ}$ C for 60 min. All values were expressed as means  $\pm$  SD.

## 라. 혈당 개선용 건강기능식품 원료/신제품 모니터링 및 효능 기작 파악

체지방 개선, 당료 및 지질대사 개선 관련 기능성 식물 추출물에 대한 국내특허 등록 및 출원된 기능성물질 또는 기능성소재의 리스트 및 중점 사항을 조사하였다.

가시오가피를 중심으로 50개의 천연물 (식물) 및 추출물에 관한 연구 및 특허 출원(등록) 자료가 있다. 대부분의 특허 자료는 단순하게 알도스환원효소 및 최종당화산물 생성억제, 당뇨병 합병증 억제 활성,  $\alpha$ -glucosidase 저해활성 및 스트렙토조토신(streptozotocin) 유발 당뇨 흰쥐에서의 혈중 포도당 및 콜레스테롤 분석에 관한 실험을 중심으로 진행하고 있다.

본 연구 과제인 콩잎 및 콩잎 주정 추출분말을 이용한 당뇨 및 관련 기능성 연구는 전혀 없는 상태이며 유사 관련 특허 및 천연물 (식물)로는 감잎 (특허 10-1063174), 민둥아까시 추출물 (Robinia pseudo-acacia var. umbralifera; 콩과에 속하는 식물, 특허 10-0902338), 바나바잎 추출물 (Lagerstoemia speciosa; 특허 10-1072905), 잣나무잎 추출물 (특허 출원 10-2010-0115598)이 보고되어 있다.

현재 산업화되고 있는 천연물 (식물)은 가시오가피, 결명자 등을 중심으로 다수 있으나, 항당뇨 부분이 아닌 단순 면역 증강 부분으로 광범위하게 사용되고 있다. 항당뇨로 사용되고 있는 천연물은 바나바 잎 추출분말로 주요 성분인 코로솔산을 주성분으로 사용하고 있다. 식품으로 시중에 유통되고 있는 바나바 잎 추출분말은 코로솔산 0.1~1.3% 함유한 성분이 유통되고 있음. 이를 이용한 제품으로는 바나바 주정 추출분말 (국내 개별인증형)을 함유하여 코로솔산을 1일 1 mg 섭취할 수 있도록 타 부형제와 함께 조합하여 시중에 판매하고 있다.

표 18. 주요 식물 추출물 관련 혈당개선용 원료 리스트

물질명	중점 사항	참조 문헌
강화약썩 추출물	당뇨로 인해 비정상적으로 증가된 항산화 효소의 활성화 정상화	10-0900875
감잎	감잎으로부터 얻은 트리테페노이드계 화합물. AMPK 활성화	10-1063174
곰피 추출물	<i>Ecklonia stolonifera</i> 알도스환원효소 및 최종당화산물 생성을 억제, 당뇨병 합병증 억제 활성화	10-0908038
닭의 장풀	<i>Commelina communis L</i> 스트렙토조토신 유발 당뇨 흰쥐에서 혈당강하 효과	Korean. J Nutr. 25, 511-517
대황	<i>Eisenia bicyclis</i> 고지방-콜레스테롤 식이 래트의 지질대사 개선효과, 당뇨쥐의 혈당 강하 효과	10-0966128
더덕 추출물	<i>Codonopsis lanceolate</i> 최종당화산물 형성 억제. 알도스환원효소 활성화 억제, 알파-글루코시데이즈 활성화 억제	10-1126677
두릅나무 추출물	혈당강하 효과	J. Korean Soc. Food Nutr. 17, 57-61
등근잎유홍초 추출물	<i>Quamoclit angulata</i> 혈당강하, 인슐린 분비촉진, 뇨단백 저해작용 및 수정체 혼탁도 감소 효과	10-2011-0095835
메밀	스트렙토조토신 유발 당뇨 흰쥐에서 혈중 포도당과 콜레스테롤 함량을 감소시킴	한국영양학회지 27, 819-827
모임 추출물	<i>Melastoma sanguieum</i> 당화생성물의 축적 억제, 알도스환원효소의 활성화 억제, 고혈당으로 인한 혈관확장을 강력하게 억제	10-2012-0019392
바나바잎 추출물	<i>Lagerstroemia speciosa</i> 주된 물질 코로솔산, 간접적으로 수용체에 붙어서 인슐린의 활성을 높임	10-1072905
소석적려	<i>Ostermeles schwerine</i> 최종당화산물 생성억제, 알도스환원효소 활성화 억제	10-0973941
수양류	<i>Homonola riparia Lour</i> 알도스환원효소의 활성화 억제. 항백내장, 항망막증 및 항신증 효과를 통한 당뇨합병증 억제	10-1115505
순무 추출물	당대사 및 지질대사 이상을 정상화, 당뇨로 인해 비정상적으로 증가된 항산화 효소의 활성을 정상화함	10-0710818
오미자	알록산(alloxan)으로 당뇨병이 유발된 토끼에서 에테르-메탄올 추출물의 강력한 혈당강하 작용 확인	J. Korean Soc. Food Nutr. 16, 262-267
잣나무잎 추출물	췌장세포에서 인슐린 분비 결핍으로 인한 체중감소 억제, 혈당 강하, 지질대사 개선, 신장 기능저하 억제	10-2010-0115598
지각 추출물	스트렙토조토신으로 유발 당뇨 쥐에서 혈당과 동맥혈관벽에 효과	10-0940133
참마	<i>Dioscorea japonica Thunb</i> 스트렙토조토신 유발 당뇨 흰쥐에서 혈당강하 효과	Korean. J Nutr. 25, 511-517

#### 마. 인체시험 및 제품화를 위한 콩잎 대량 수확

선행 및 1차년도 실험을 통해 확보한 결과를 통해 B 지역에서 WD와 GH 품종에 대한 대단위 (1,000 평 규모) 계약재배를 수행하였다. 보다 정확한 생산량 및 경제성 분석을 위해 2013년도에 재배를 실행하였으며 임상시험 및 시제품 개발을 위해 선별 품종의 콩잎 원료를 대량 확보하고자 하였다. 콩잎 품종의 대량 생산 시 무농약 재배를 시행하였고, 1 차년도에는 2012년 5월 22일에 파종을 하였지만, 2차년도의 경우 기온 및 파종시기를 고려하여 WD, GH 품종 모두 2013년 6월 9일에 파종하였다.

재배에 따른 변화를 확인하기 위해 파종 후 지정된 담당자 2주 단위로 콩잎 시료를 확보하고 재배 상황을 확인하였다. 확보된 시기별 콩잎은 자연건조를 시행한 후 제1세부과제의 HPLC를 이용한 성분 분석 및 생리활성 분석을 통해 시기별/품종별 데이터를 확보하였다, 테로카판 함유량 등의 기능성 성분의 분석결과는 같은 지역의 같은 품종 재배를 통해 1 차년도의 시기별 변화를 바탕으로 기후에 따른 활성 물질의 변화에 대한 트렌드 (trend)의 자료로 활용하였다.

	
<p>5월 23일 (파종)</p>	<p>6월 26일 (35일령)</p>
	
<p>7월 10일 (50일령)</p>	<p>8월 9일 (80일령)</p>
	
<p>8월 23일 (94일령)</p>	<p>9월 2일 (수확)</p>

그림 5. 2012년도 시기별 콩잎 대량 재배 현장(A 지역 YS 품종).


	
<p>5월 23일 (파종)</p>	<p>6월 26일 (35일령)</p>
	
<p>7월 10일 (50일령)</p>	<p>7월 25일 (65일령)</p>
	
<p>8월 9일 (80일령)</p>	<p>9월 2일 (수확)</p>

그림 6. 2012년도 시기별 콩잎 대량 재배 현장 (A 지역 GH 품종).

	
<p>6월 16일 (10일령)</p>	<p>7월 10일 (35일령)</p>
	
<p>7월 25일 (50일령)</p>	<p>7월 23일 (79일령)</p>
	
<p>9월 10일 (93일령)</p>	<p>9월 23일 (수확)</p>

그림 7. 2012년도 시기별 콩잎 대량 재배 현장(B 지역 WD 품종).





그림 8. 2012년도 시기별 콩잎 대량 재배 현장 (B 지역 GH1 품종).

	
<p>6월 9일 (파종)</p>	<p>6월 25일 (16일령)</p>
	
<p>7월 10일 (31일령)</p>	<p>7월 29일 (50일령)</p>
	
<p>8월 26일 (75일령)</p>	<p>9월 26일 (수확)</p>

그림 9. 2013년도 시기별 콩잎 대량 재배 현장 (GH 품종).

	
<p>6월 9일 (파종)</p>	<p>6월 25일 (16일령)</p>
	
<p>7월 10일 (31일령)</p>	<p>7월 29일 (50일령)</p>
	
<p>8월 26일 (75일령)</p>	<p>9월 26일 (수확)</p>

그림 10. 2013년도 시기별 콩잎 대량 재배 현장(WD 품종).

2012년도와 2013년도 계약재배 콩잎의 열풍 건조를 통해 확보된 콩잎의 수확량을 면적당 생산량은 다음과 같다. 표 19에서와 같이 2013년도에서 상대적으로 면적당 생산량이 낮은 이유로는 환경적인 측면으로 2012년도에 비해 2013년도에 집중 호우가 많이 내렸으며, 질병으로 인한 콩잎의 손실이 커서 이로 인해 낮은 일조량과 콩잎 재배에 중요한 배수의 어려움으로 인해 생산량이 감소된 것으로 생각된다.

표 19. 년도 별 면적당 콩잎 수확량

년도	품종별 면적당 생산량 (kg/m <sup>2</sup> )		
	GH	WD	YS
2011	0.077	0.109	0.022
2012	0.089	0.129	0.078
2013	0.056	0.057	

연구 결과를 바탕으로 산업적 대량생산을 위해 본 연구 과제를 통해 확보된 충청남도 일원의 A, B 지역을 중심으로 매년 계약재배를 통해 원활한 수급을 실행할 계획이다. 선행연구 및 본 연구를 통해 확보된 시기별 수확 및 기능성 물질 생산을 바탕으로 5월 중순에 파종하여 10월중에 수확하는 방식으로 콩잎을 산업적으로 대량 확보하는 방식을 취할 계획이다. 대량 확보된 콩잎은 본 연구를 통해 확립된 건조방식(열풍건조)으로 부피를 최소화하여 보관하며 제품 생산 시 확보된 건조콩잎을 활용할 계획이다. 본 연구에서의 제품 생산도 동일한 방법으로 실행하여 수행하였다.

#### 바. 콩잎으로부터 테로카판 고함유 분획(PTH) 생산공정 표준화

##### (1) 발효콩잎 추출물의 LDL-항산화 활성 및 yeast $\alpha$ -glucosidase 저해활성 측정

위와 같은 방법으로 조제한 발효콩잎 추출물에 대한 LDL-항산화 활성과 yeast  $\alpha$ -glucosidase 저해활성을 측정하였다 (표 20). 열수추출 상등액 각 시료를 80  $\mu$ g/mL 농도에서 항산화 활성을 측정한 결과, 건조콩잎의 70% EtOH 추출물과 열수추출물은 각각 77.3 %, 65.6 %의 LDL-항산화 활성을 나타내었다. 발효콩잎의 열수추출물의 상등액에서는 LDL-항산화 활성이 나타나지 않은 반면에, 침전물의 95% EtOH 추출물 중 물-콩잎, 물-유산균 시료에서 각각 82.4 %, 67.5 %의 높은 LDL-항산화 활성을 나타내었다.

각 시료를 100  $\mu$ g/mL 농도에서 yeast  $\alpha$ -glucosidase 저해활성을 측정한 결과, 열수추출물에서는 저해활성이 전혀 나타나지 않은 반면, 발효 콩잎의 상등액 및 침전물의 95 % EtOH 추출물에서 전반적으로 그 활성이 증가하는 것을 확인하였다. 특히 물-콩잎 발효 침전물의 95% EtOH 추출물의 경우 72.0 %의 매우 높은  $\alpha$ -glucosidase 저해활성을 나타냈고, 물-설탕 발효 침전물의 95 % EtOH 추출물의 경우에서도 43.4%의 높은  $\alpha$ -glucosidase 저해활성을 나타내었다. 따라서 발효콩잎의 열수추출 후 침전물을 95% EtOH을 이용하여 추출하면, 농축된 활성성분을 얻을 수 있을 것으로 생각된다.

표 20. Inhibitory effects of extracts of various 1 year-fermented soy leaves on LDL-oxidation and yeast  $\alpha$ -glucosidase

발효콩잎 추출물 (용매: DMSO)		Dried weight of extracts (mg/mL)	Inhibition of LDL-oxidation (%)	Inhibition of yeast $\alpha$ -glucosidase (%)
			80 $\mu$ g/mL	100 $\mu$ g/mL
70% EtOH Ex. (대조군1)		20.0 $\pm$ 0.0	<b>77.3 <math>\pm</math> 0.1</b>	7.6 $\pm$ 1.3
열수추출물* (대조군2)		25.0 $\pm$ 4.2	<b>65.6 <math>\pm</math> 0.5</b>	-1.1 $\pm$ 1.0
열수추출 상등액 (a)	물-콩잎*	19.0 $\pm$ 1.4	-2.0 $\pm$ 0.8	17.4 $\pm$ 0.8
	물-소금*	208.0 $\pm$ 2.8	4.5 $\pm$ 0.8	32.5 $\pm$ 1.5
	물-설탕	263.0 $\pm$ 1.4	7.7 $\pm$ 2.0	20.9 $\pm$ 0.5
	물-유산균*	19.0 $\pm$ 4.2	-0.2 $\pm$ 0.9	17.9 $\pm$ 1.3
침전물의 95% EtOH 추출물 (b)	물-콩잎	0.6 $\pm$ 0.0	<b>82.4 <math>\pm</math> 0.1</b>	<b>72.0 <math>\pm</math> 1.6</b>
	물-소금*	8.3 $\pm$ 1.1	1.1 $\pm$ 2.1	30.1 $\pm$ 1.1
	물-설탕	15.0 $\pm$ 0.0	34.6 $\pm$ 0.7	43.4 $\pm$ 1.5
	물-유산균	1.1 $\pm$ 0.2	<b>67.5 <math>\pm</math> 0.2</b>	32.8 $\pm$ 0.9
Positive control			63.6 $\pm$ 1.0 (BHT 2 $\mu$ M)	51.6 $\pm$ 0.5 (Coumesterol 5 $\mu$ M)

\*: DMSO에 잘 녹지 않음

표 21의 결과에서 DMSO에 잘 녹지 않았던 열수추출물 상등액 시료를 증류수에 녹여 LDL-항산화 활성과  $\alpha$ -glucosidase 저해활성을 재측정 하였다. 그 결과 표 21과 같이 80  $\mu$ g/mL 농도에서 열수추출물 (대조군 2), 물-콩잎 및 물-유산균 열수추출 상등액이 각각 86.1 %, 93.4 %, 94.3%의 높은 LDL-항산화활성을 나타내었다. 또한 열수추출물 (대조군 2), 물-설탕 및 물-유산균 열수추출 상등액의  $\alpha$ -glucosidase 저해활성이 증가하는 것으로부터 생리활성물질이 수용성임을 알 수 있었다.

표 21. Inhibitory effects of water soluble extracts of various 1 year-fermented soy leaves on LDL-oxidation and yeast  $\alpha$ -glucosidase

발효콩잎 추출물 (용매: 물)		Dried weight of extracts (mg/mL)	Inhibition of LDL-oxidation (%)	Inhibition of yeast $\alpha$ -glucosidase (%)
			80 $\mu$ g/mL	100 $\mu$ g/mL
열수추출물 (대조군2)		25.0 $\pm$ 4.2	<b>86.1 <math>\pm</math> 1.1</b>	<b>70.0 <math>\pm</math> 0.9</b>
열수추출 상등액 (a)	물-콩잎	19.0 $\pm$ 1.4	<b>93.4 <math>\pm</math> 1.7</b>	15.9 $\pm$ 1.0
	물-소금	208.0 $\pm$ 2.8	-7.0 $\pm$ 0.6	6.2 $\pm$ 2.1
	물-설탕	263.0 $\pm$ 1.4	-11.5 $\pm$ 0.1	<b>52.2 <math>\pm</math> 0.5</b>
	물-유산균	19.0 $\pm$ 4.2	<b>94.3 <math>\pm</math> 0.5</b>	<b>52.1 <math>\pm</math> 0.3</b>
Positive control			65.0 $\pm$ 0.4 (BHT 2 $\mu$ M)	52.1 $\pm$ 0.3 (Coumesterol 5 $\mu$ M)

**(2) 콩잎의 단기 발효 후 열수 추출물 및 95% EtOH 추출물의 LDL-항산화 활성 측정**

콩잎 발효액 및 발효콩잎 열수추출물에 대한 LDL-항산화 활성을 측정한 결과를 확인하였다. 물-설탕, 물-유산균, 물-콩잎 시료에서 각각 85.6 %, 78.9 %, 54.9 %의 높은 LDL-항산화 활성을 나타내었으나 물-소금 시료에서는 항산화 활성이 거의 나타나지 않았다. 또한 콩잎을 발효시켜 얻은 발효액의 LDL-항산화활성을 측정한 결과, 발효원액에서는 모두 90 %에 가깝거나, 그 이상의 측정 한계의 높은 LDL-항산화 활성을 확인하였다. 따라서 발효액을 2배 희석하여 LDL-항산화 활성을 측정한 결과 물-유산균 (91.1 %), 물-설탕 (88.9 %), 물-콩잎 (76.7 %), 물-소금 (73.1 %) 순으로 높은 LDL-항산화 활성을 하였다. 또한 콩잎을 발효시킬 때 사용한 5% 소금물과 5 % 설탕물 자체는 LDL-항산화 활성을 나타내지 않았다. 따라서 유산균 또는 설탕을 첨가하여 발효함으로써 콩잎 추출물의 LDL-항산화 활성을 증가시킬 수 있으며, 소금을 첨가한 콩잎 발효는 효과적이지 않음을 본 연구를 통해 확인할 수 있었다.

발효콩잎 95 % EtOH에 대한 LDL-항산화 활성을 측정한 결과, 80  $\mu\text{g/mL}$  농도에서는 비교적 모든 시료에서 높은 LDL-항산화 활성을 나타내었고, 40  $\mu\text{g/mL}$  농도에서는 물-설탕, 물-콩잎 시료는 각각 53.2 %, 48.7 %의 높은 LDL-항산화 활성을 나타낸 반면에 물-소금 (12.7 %), 물-유산균 (4.5 %) 시료는 상대적으로 LDL-항산화 활성이 낮았다. 결론적으로 45일간의 단기 콩잎 발효시 설탕을 첨가함으로써 다소 95% EtOH 침전물의 LDL-항산화 활성이 증가하는 것을 확인하였다.

표 22. LDL-oxidation inhibitory effects of hot-water extracts from 45 days-fermented soy leaves

콩잎발효 액/추출물 (용매: 물)		Dried weight of extracts (mg/mL)	Inhibition of LDL-oxidation (%)	
대조군 (80 $\mu\text{g/mL}$ )		20.5 $\pm$ 0.7		93.7 $\pm$ 0.4
발효콩잎 열수추출물 (80 $\mu\text{g/mL}$ )	물-콩잎	1.1 $\pm$ 0.1		54.9 $\pm$ 1.3
	물-소금	3.6 $\pm$ 0.0		3.6 $\pm$ 0.4
	물-설탕	1.2 $\pm$ 0.0		<b>85.6 <math>\pm</math> 0.4</b>
	물-유산균	1.5 $\pm$ 0.0		<b>78.9 <math>\pm</math> 1.2</b>
발효액	Dilution		1/2	1
	물-콩잎		76.7 $\pm$ 0.9	88.7 $\pm$ 0.8
	물-소금		73.1 $\pm$ 1.1	91.3 $\pm$ 0.7
	물-설탕		<b>88.9 <math>\pm</math> 0.5</b>	92.6 $\pm$ 0.2
	물-유산균		<b>91.1 <math>\pm</math> 1.5</b>	92.7 $\pm$ 0.4
5% 소금물			0	
5% 설탕물			0	
Positive control			54.0 $\pm$ 0.0 (BHT 2 $\mu\text{M}$ )	

표 23. LDL-oxidation inhibitory effects of 95% EtOH extracts from 45 days-fermented soy leaves

콩잎발효 추출물 (용매: DMSO)		Dried weight of extracts (mg/mL)	Inhibition of LDL-oxidation (%)	
			40 µg/mL	80 µg/mL
대조군		12.8 ± 0.4	48.3 ± 1.6	81.9 ± 1.3
발효콩잎 95% EtOH 추출물	물-콩잎	0.6 ± 0.0	<b>48.7 ± 0.4</b>	<b>81.7 ± 1.7</b>
	물-소금	1.1 ± 0.1	14.7 ± 0.8	73.0 ± 0.0
	물-설탕	0.7 ± 0.0	<b>53.2 ± 0.4</b>	<b>82.5 ± 1.7</b>
	물-유산균	1.6 ± 0.0	4.5 ± 2.0	61.3 ± 0.1
Positive control			54.0 ± 0.0 (BHT 2 µM)	

### 사. HPLC를 이용한 PTH의 지표성분 (또는 유효성분) 함량 분석 및 validation

대량생산 (larger scale) 공정을 통해 얻은 NS-GH-142d 시료의 95-ESL과 EASL를 analytical HPLC를 이용하여 분석하였다. HPLC 분석을 위해 Shimadzu HPLC system (Pump: Shimadzu LC-10A vp with binary pump; Detector: Shimadzu SPD-M10A vp PDA detector, 254 nm; Auto injector: Shimadzu SIL-10A vp)을 사용하였고, HPLC 컬럼으로 Brownlee SPP C18-MS-II column (4.6 x 50 mm, 2.7 µm), 이동상으로는 0.1% 초산을 포함하는 물 (용매 B)과 아세토나이트릴 (용매 C)을 사용한 gradient condition, 유속 1.8 mL/min에서 분리 및 용출하여 PDA detector를 이용하여 분석하였다 (그림 11). 95-ESL과 EASL이 함유하는 지표성분인 동시에 유효성분인 coumestrol의 함량 비율은 1 : 2.92 이었다 (표 24). 따라서 실험실 수준에서의 추출에 비해 대량 공정 시에는 95% EtOH 추출물에 비해 EtOAc 추출물의 테로카판 함유량이 높았다.

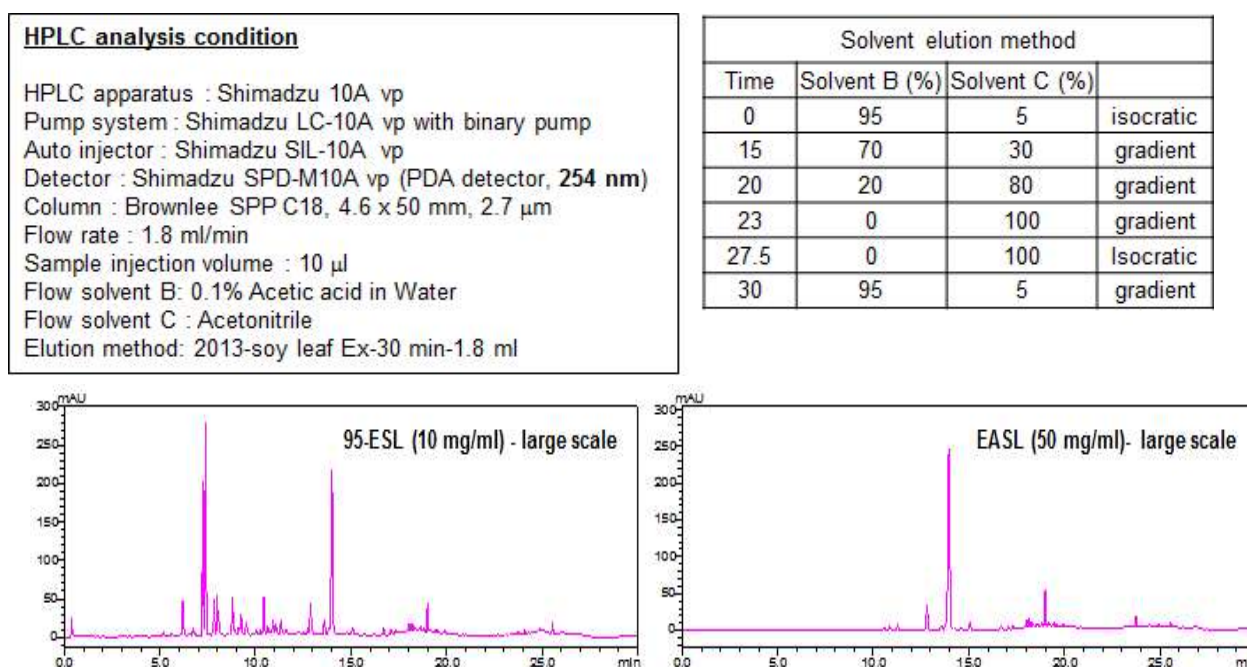
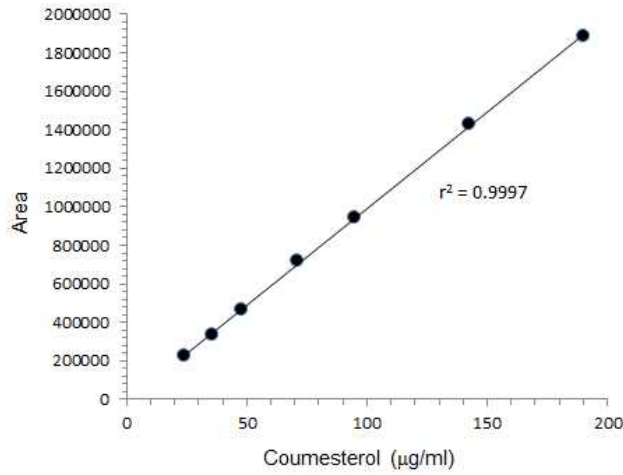


그림 11. 대량생산 공정 95-ESL과 EASL HPLC profiles.

표 24. Coumestrol content analysis of large scale samples, 95-ESL and EASL

Samples	Rt of coumestrol (min)	Peak area*	Coumsterol conc. (mg/mL)*	Coumestrol in sample (%)*
ESL (10 mg/mL)	13.99	1132947	113.88	1.14
EASL (5 mg/mL)	13.94	1659581	166.46	3.33

\*The values are means of duplication.



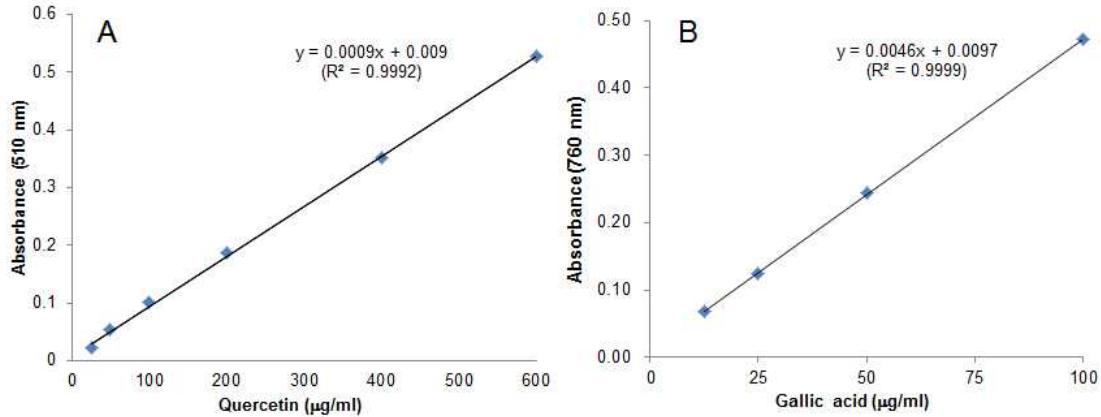
또한 대량공정 95-ESL과 EASL의 총 플라보노이드 함량은 Zhishen 등 (1999)이 개발한 분광 분석법을 일부 수정하여 측정하였고, quercetin을 기준물질로 사용하여 quercetin equivalents (mg quercetin/g sample)로 표시하였다. 또한 총 페놀 함량은 Singleton & Rossi (1965)이 개발한 Folin-Ciocalteu법을 일부 수정하여 측정하였고, gallic acid을 기준물질로 사용하여 gallic acid equivalents (mg gallic acid/g sample)로 표시하였다. 그 결과, 대량공정 95-ESL의 총 플라보노이드 함량이 EASL의 3.21배 이었으며, 95-ESL의 총 페놀 함량은 EASL의 1.17배 높은 것을 확인할 수 있었다 (표 25).

표 25. Contents of total flavonoids and total phenolics of 95-ESL and EASL

Samples	Total flavonoid (mg Quercetin equivalents/g)	Total phenolics (mg Gallic acid equivalents/g)
95-ESL	428.9	70.6
EASL	133.3	60.1

\*The values are means of duplication.





## 아. PTH의 안전성 시험

### (1) 단회 경구 투여 독성시험

95% PTH (코드명 201305-ESL)의 Sprague-Dawley 래드에 단회 경구 투여를 하였을 때 나타나는 개략적인 독성을 비교 평가하여 안정성 실험을 수행하였다. 수컷, 암컷 각각 24 마리씩 7주령에 입수하여 8주령부터 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 평가하였다.

비교평가 결과 사망동물은 관찰되지 않았다. 일반 증상의 경우 95% PTH 암수에서 2일째에 시험물질색변(compound-colored stool)이 관찰되었고, 2,500 mg/kg 투여군 암수 모든 동물과 5,000 mg/kg 투여군 수컷 1 레, 암컷 2 레에서 2일째에 연변 (soft stool)이 관찰되었으며, 5,000 mg/kg 투여군 수컷 4 레, 암컷 3 레에서 2일에 설사 (diarrhea)와 하복부오염 (solide perineal region)이 관찰되었다. 체중변화는 표 26과 같이 95% PTH 처리구와 관련된 부형제조대조군 대비 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

부검소견에서는 1,250 mg/kg 투여군 수컷(#6) 1레에서 비장이 종대되었으며, 우측 종대 및 표면의 일부가 흰색으로 변색되었다. 이는 1 레에서만 나타났고 저용량군에서 나타난 변화인 점을 고려해 볼 때 95% PTH에 의한 변화가 아닌 개체에 의한 변화로 판단된다.

이상의 95% PTH를 Sprague-Dawley 래드에 경구투여한 후 2 주간의 사망률 및 일반증상 관찰, 체중변화, 육안적 부검 소견 관찰 실험을 실시해본 결과, 사망동물은 관찰되지 않았기에 본 시험조건 하에서 개략의 치사량(Approximate Lethal Dose, ALD)은 암수 모두 5,000 mg/kg을 상회하는 것으로 판단하였다

표 26. PTH 첨가의 단회 경구 투여에 의한 체중 변화

Day	Groups (mg/kg)			
	G1 (0)	G2 (1,250)	G3 (2,500)	G4 (5,000)
<b>male</b>				
1	213.28 ± 3.84	211.29 ± 4.53	212.10 ± 5.17	212.17 ± 4.83
2	240.51 ± 6.47	236.39 ± 3.63	237.92 ± 6.08	239.60 ± 5.68
4	257.05 ± 6.72	255.96 ± 7.20	254.09 ± 7.50	256.18 ± 2.88
8	291.73 ± 6.62	384.31 ± 5.60	287.37 ± 8.59	287.43 ± 4.97
15	324.34 ± 8.15	309.28 ± 15.79	321.80 ± 13.81	322.26 ± 6.21
Gains	111.06 ± 5.20	97.99 ± 14.24	109.70 ± 9.66	110.09 ± 6.85
N	5	5	5	5
<b>female</b>				
1	163.11 ± 4.80	159.19 ± 5.24	161.02 ± 5.34	162.53 ± 5.95
2	182.84 ± 7.57	180.16 ± 5.31	180.48 ± 6.68	183.75 ± 8.70
4	191.47 ± 7.79	187.57 ± 6.11	191.00 ± 8.33	189.31 ± 6.76
8	205.33 ± 7.32	203.79 ± 8.57	203.55 ± 11.58	203.04 ± 9.63
15	224.24 ± 7.74	219.49 ± 11.09	214.09 ± 7.98	222.47 ± 13.63
Gains	61.13 ± 8.35	60.30 ± 6.23	53.07 ± 8.32	59.94 ± 8.63
N	5	5	5	5

The day of administration was designated as day 1. Data were expressed as Mean ± S.D. Gain is (body weight on day 15) - (body weight on day 1).

## (2) 복귀돌연변이시험

95% PTH의 대사활성계 적용 및 비적용하에 *Salmonella typhimurium* 히스티딘 요구성 4 균주 (TA100, TA1535, TA98, TA1537)와 트립토판 요구성 균주인 *Escherichia coli* WP2 uvrA에 복귀돌연변이를 유발하는가를 알아보기 위해 실험을 실행하였다. 대사활성계로는 Aroclor-1254로 유도한 랫드의 간균질액에 보효소(cofactor)를 첨가한 것을 사용하였다. 시험은 direct plate incorporation 방법으로 실시하였다.

*Salmonella typhimurium* 균주의 rfa 돌연변이는 세포벽의 lipopolysaccharide 장벽의 합성에 관여된 유전자에 일어난 돌연변이로써, 이 돌연변이로 인한 장벽의 손상은 일부 큰 분자량의 화학물질에 대한 세포벽의 투과성을 높여준다. DNA 손상의 관련된 유전자에 일어난 uvrA 혹은 uvrB 돌연변이는 일부 돌연변이원에 대한 감수성을 현저히 높여주었다. 플라스미드 pKM101은 이를 가진 균주에서 일부 돌연변이원에 대한 감수성을 더욱 높여준다.

실험 결과, 집락계수시에 모든 플레이트에서 침전이나 기타 이상은 관찰되지 않았다. *Salmonella typhimurium*의 히스티딘 요구성 균주 TA100, TA1535, TA98 및 TA1537의 4 개의 균주에서 대사활성계 적용 및 비적용시 시험물질 농도의 증가에 따른 집락수의 증가는 나타나지 않았으며, 세포독성 또한 나타나지 않았다.

*E. coli* WP2 uvrA에서도 대사활성계 적용 및 비적용시 모두 시험물질 농도의 증가에 따른 집락수의 증가는 나타나지 않았으며, 세포독성 또한 나타나지 않았다. 이상의 결과로 95% PTH는 본 시험 조건하에 사용한 시험 균주에 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것을 확인하였다.

표 27. PTH 첨가의 복귀돌연변이 결과

Test Strain	Dose (ug/plate)	Colonies/plate [Factor] <sup>a</sup>	
		With S9 mix	Without S9 mix
TA100	0	116 ± 6	111 ± 5
	50	113 ± 4 [1.0]	104 ± 11 [0.9]
	150	133 ± 4 [1.1]	104 ± 4 [0.9]
	500	106 ± 4 [0.9]	108 ± 6 [1.0]
	1500	118 ± 6 [1.0]	114 ± 8 [1.0]
	5000	128 ± 2 [1.1]	125 ± 3 [1.1]
TA1535	0	14 ± 2	12 ± 2
	50	11 ± 1 [0.8]	10 ± 2 [0.8]
	150	10 ± 2 [0.7]	11 ± 2 [0.9]
	500	12 ± 1 [0.9]	15 ± 1 [1.2]
	1500	11 ± 2 [0.8]	12 ± 1 [0.9]
	5000	11 ± 0 [0.8]	15 ± 2 [1.2]
TA98	0	36 ± 2	36 ± 3
	50	44 ± 8 [1.2]	32 ± 4 [0.9]
	150	43 ± 6 [1.2]	31 ± 2 [0.9]
	500	36 ± 2 [1.0]	41 ± 4 [1.1]
	1500	31 ± 3 [0.9]	38 ± 2 [1.0]
	5000	42 ± 2 [1.2]	36 ± 3 [1.0]
TA1537	0	18 ± 1	11 ± 1
	50	18 ± 2 [1.0]	12 ± 1 [1.1]
	150	19 ± 2 [1.1]	12 ± 1 [1.2]
	500	22 ± 2 [1.2]	10 ± 1 [0.9]
	1500	14 ± 3 [0.8]	11 ± 1 [1.0]
	5000	17 ± 2 [1.0]	12 ± 1 [1.2]
<i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>	0	24 ± 2	19 ± 4
	50	22 ± 2 [0.9]	18 ± 4 [0.9]
	150	24 ± 3 [1.0]	18 ± 1 [0.9]
	500	23 ± 3 [1.0]	17 ± 2 [0.9]
	1500	22 ± 3 [0.9]	18 ± 2 [1.0]
	5000	21 ± 3 [0.9]	20 ± 2 [1.1]

Positive control			
TA-100	2-AA	1.0	546 ± 3 [4.7]
TA1535	2-AA	2.0	111 ± 9 [8.1]
TA98	B[a]P	1.0	172 ± 9 [4.7]
TA1537	2-AA	1.0	78 ± 10 [4.4]
WP2 <i>uvrA</i>	2-AA	6.0	130 ± 16 [5.5]
TA100	SA	0.5	387 ± 5 [3.5]
TA1535	SA	0.5	444 ± 62 [36.0]
TA98	2-NF	2.0	279 ± 21 [7.7]
TA1537	ICR-191	0.5	154 ± 40 [14.5]
WP2 <i>uvrA</i>	4NQO	0.5	167 ± 25 [8.8]

a) Three plates/dose were used. No. of colonies of treated plate/No. of colonies of negative control plate. Abbreviations: 2-AA, 2-aminoanthracene; B[a]P, benzo[a]pyrene; SA, sodium azide; 2-NF, 2-Nitrofluorene; ICR-191, acridine mutagen ICR 191; 4NQO, 4-nitroquinoline N-oxide

### (3) 염색체이상시험

95% PTH의 유전독성 평가를 위하여 배양 chinese hamster lung (CHL) 세포를 이용하여 대사활성계 적용 및 비적용 하에 염색체이상 시험을 수행하였다.

대사활성계 적용 6시간 처리결과 95% PTH 처리시 550  $\mu\text{g/mL}$  이상의 농도군에서 처리 종료

시까지 혼탁이 관찰되었다. 농도의 증가에 따라 RCC 값의 감소 경향이 관찰되었다. 수적이상을 가진 중기상의 빈도는 음성대조군 및 시험물질 처리군에서 모두 1.5 이하로, 시험물질을 처리한 모든 농도군에서 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 보이지 않았다. 양성대조군에서는 구조적 이상을 가진 중기상의 빈도 (25.5)에서 통계학적으로 유의한 증가가 관찰되었다 ( $P<0.01$ ).

대사활성계 비적용 6시간 처리 결과 95% PTH 처리시 550  $\mu\text{g/mL}$  이상의 농도군에서 처리 종료 시까지 혼탁이 관찰되었다. 농도의 증가에 따라 RCC 값의 감소 경향이 관찰되었다. 이상 중기상의 빈도는 800  $\mu\text{g/mL}$  농도군에서 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 나타내었다 ( $P<0.05$ ). 수적이상을 가진 중기상의 빈도는 음성대조군 및 시험물질 처리한 모든 농도군에서 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 보이지 않았다. 양성대조군에서는 구조적 이상을 가진 중기상의 빈도 (26.0)에서 통계학적으로 유의한 증가가 관찰되었다 ( $P<0.01$ ).

24시간 처리 결과 95% PTH 처리시 600  $\mu\text{g/mL}$  이상의 농도군에서 처리 종료 시까지 혼탁이 관찰되었다. 농도의 증가에 따라 RCC 값의 감소 경향이 관찰되었다. 이상중기상의 빈도는 시험물질 처리한 모든 농도군에서 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 나타내지 않았다. 단, 600  $\mu\text{g/mL}$  농도군에서는 중기세포가 관찰되지 않았기 때문에 결과 해석에서 제외하였다. 수적이상을 가진 중기상의 빈도는 음성대조군 및 시험물질 처리한 모든 농도군에서 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 보이지 않았다. 양성대조군에서는 구조적 이상을 가진 중기상의 빈도 (30.0)에서 통계학적으로 유의한 증가가 관찰되었다 ( $P<0.01$ ).

이상의 결과에서, 염색체 이상을 계수한 결과, 95% PTH 550  $\mu\text{g/mL}$  이상 처리구에서 대사활성계 적용 및 비적용 6시간 처리군에서 염색체 구조적 이상을 가진 중기상 출현빈도가 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의하게 증가하였다. 따라서 시제품 제작에 염색체 이상에 문제가 없는 양으로 550  $\mu\text{g/mL}$  이하로 하여 시제품화를 시행하였다.

#### (4) 대량생산 수확한 콩잎 주정추출 분말의 잔류농약, 중금속 함량 분석

인체실험/시제품 제작을 위한 A, B 지역에서 생산 및 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.

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 확보함. 검사 항목으로 제조제는 Glyphosate (단제)와 Deltamethrin을 사용하였다. 검사 항목으로 사용한 Glyphosate는 유럽을 중심으로 가장 많이 사용되고 있는 대표적인 제조제이며 Deltmethrin은 피레드린의 농용살충제로서의 단점을 보완한 합성 피레드린계로 대표적으로 사용되는 살충제이다.

비선택성 제조제이면서 식물체내에서 비교적 안정하여 잘 분해가 되지 않은 Glyphosate와 냄새가 없는 백색 결정 분말로 해충에 대한 살충효과가 인정되어 있는 Deltamethrin에 대한 잔류농약은 불검출 되었다 (표 28).

표 28. 잔류 농약 분석

잔류농약	검출결과	비고(검출한계)
Glyphosate	불검출	0.2 mg/kg
Deltamethrin	불검출	0.05 mg/kg

콩잎의 재배 및 콩잎의 대량 생산 과정과 콩잎 주정 추출분말의 제작 중에 포함될 수 있는 중금속에 대한 분석을 의뢰하였다. 중금속이 포함되어 있을 경우, 시제품 제작과 제품에 문제가 발생할 수 있기에 이에 대한 조사 분석을 시행하였다. 비소와 납에 대한 중금속 분석 결과 모두 불검출의 결과를 확인하였다.

발급번호 제14-C-1443호

□ 시험 성적서  
■ 분석

① 의 뢰 인	성 명	(주)인섹트바이오텍	사업자등록번호 (법인등록번호)	314-81-32507
	주 소	305-811 대전광역시 유성구 유성대로1628번길 3(전민동) (주)인 섹트바이오텍		
② 의 뢰 내 용	대상 물품명	콩잎주정추출물		
	시 험 개 요	2항목: Glyphosate(단제),Deltamethrin		
	용 도	자체검정		

③ 분석(시험) 성적 : - Glyphosate: 불검출(검출한계 0.02 mg/kg)  
- Deltamethrin: 불검출(검출한계 0.05 mg/kg)

「농업기술실용화재단 분석검정 의뢰 및 처리규정」 제4조의 규정에 의하여  
2014년 07월 22일 자로 의뢰한 시료에 대한 분석(시험) 성적입니다.

2014년 07월 28일

이 성적은 신청인이 제출한 시료를 분석한 것으로  
관련사항 이외의 선전 소송 등 증거자료로 사용하지  
수 없습니다.

농업기술실용화재단 이사장



그림 12. 잔류농약 분석 결과.

발급번호  
14-PLANT-1-00045

## 분석결과통지서

① 의뢰인	성명	(주)인섹트바이오텍	사업자등록번호	314-81-32507
	주소	305-811 대전광역시 유성구 유성대로1628번길 3(전민동) (주)인섹트바이오텍		
② 의뢰내용	대상물품명	콩잎주정추출물		
	접수번호	분석의뢰-U-14-01113	접수년월일	2014.07.22
	용도	자체검정		

### ③ 분석결과

항목	성적(단위)	항목	성적(단위)
As(비소) Pb(납)	불검출 불검출 이하 여백		

#### ④ 비고

「농업기술실용화재단 분석검정 의뢰 및 처리규정」 제4조의 규정에 의하여 2014년 07월 22일자로 의뢰한 시료에 대한 분석(시험)성적입니다.

이 성적은 신청인이 제출한 시료를 분석한 것으로  
관련사항 이외의 선전 소송 등 증거자료로 사용하지  
수 없습니다.

2014년 07월 28일




농업기술실용화재단이사장



그림 13. 중금속 함량 분석 결과.

자. 1 차년도 결과 및 2 차년도 제 1 세부과제의 결과를 바탕으로 시제품 제작 및 시제품의 물리 생화학적 특성 분석

체지방 및 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 혈당개선을 위한 제품에 대한 분석을 시행하였다. 현재 체지방 개선과 혈당 개선을 위한 다양한 제품이 출시되어 있으나 사용되고 있는 지표성분 및 기능성 성분은 한정되어 있다. 이상의 상황을 고려하여, 시장에서 소비자가 원하는 제형개발을 실행하였으며, 체지방 개선을 위주로 하며 일부 혈당개선에 도움을 줄 수 있는 원료를 넣은 체지방 개선용 시제품을 개발하고자 하였다. 개발을 위해 먼저 현재 시장에서 가장 많이 활용되고 있는 제품을 선별하였으며 선별된 제품으로 식사대용의 제품이 가장 범용적으로 확인됨. 식사대용으로 체지방 개선용 시제품의 경우 우유 등에 타서 먹는 타입의 제형(30 g, 40 g)과 쉽게 차 형태로 먹을 수 있는 형태의 제형으로 개발하고자 하였다 (그림 14). 본 연구 기술에서는 각 품목당 95% EtOH PTH 함유량을 4%로 하여 제형화를 완성하였다.

	제형 1	제형 2	제형 3
사진			
용량	30 g	40 g	15 g
성상*	분말	분말	분말
주요 성분	단소화성말토덱스트린, 유청단백분말, 대두분리단백, 가르시아람보디아추출물, 유청분말, 혼합곡물가루, 팔라티노신, 분말비타민 혼합제제, <b>콩잎주정추출분말 (4%)</b> , 프로테아제	치커리추출분말, 난소화성말토덱스트린, 폴리덱스트로스, 볶은현미분말, 분리대두단백, 가르시아람보디아추출분말, 비타민, 곡물발효효소혼합분말, <b>콩잎주정추출분말 (4%)</b> , 프로테아제	

\*성상 : 최종 제품 개발에는 제형의 안정성을 고려하여 분말, 그레놀 등의 다양한 형태의 제형화가 가능함

그림 14. PTH를 이용한 시험 제형





그림 15. 제형 3와 제형 2의 포장 예시

각각의 형태 및 제형 성분을 중심으로 한 제형을 바탕으로 한국생명공학연구원의 연구원을 대상으로 기호성을 검토하였다. 제형 3은 적은 양으로 우유 및 음료에 혼합하였을 경우 효과를 얻기에는 어려움이 있었다. 특히 대부분 유통되고 있는 체지방 개선 식품의 경우 30 g 이상이라는 점을 감안할 경우 소비자의 기호도와는 상반된다고 판단되었다. 음료에 혼합시 30 g 이상이 효과가 있었으며 제형 1에 비해 제형 2에 대해서 일반인을 대상으로 한 평가에서 기호성이 높음을 확인하였다. 이상의 결과를 바탕으로 제형 2를 바탕으로 체지방 조절 및 혈당 강하를 위한 기능성 제품을 개발하였다.

#### 차. 기능성소재의 대량생산공정 확립 및 임상시험을 위한 시작품 제작

##### (1) 대량생산공정 개발

대량생산 및 수확한 콩잎에 대한 공정 실험을 통해 추출 조건은 95% EtOH을 용매로 실행하는 것으로 하였다. 95% EtOH 추출은 산업적으로 70% EtOH추출시보다 공정이 까다롭지만 회수되는 유효성분이 높아 95% EtOH 추출을 이용한 유효성분을 확보하는 것으로 결정하였다.

추출공정으로는 상온 (25~30℃)에서 1차 추출을 시행하며, 한 로트 (Lot) 당 추출이 용이한 양인 50 kg의 건조 콩잎에 건조물 대비 10배의 EtOH인 500 L의 EtOH을 첨가하여 48 시간 동안 추출하였다. 추출 후 부지포가 장착된 여과지에 부유물 (추출 후 콩잎 찌꺼기)을 제거하여 95 % EtOH 추출물을 확보하였다. 콩잎의 양과 주정의 양의 선별은 콩잎이 EtOH에 대한 비율 실험을 통해 결정하였다. 콩잎은 침지가 용이하지 않은 특성을 보이고 있다. 침지의 경우 콩잎이 가벼워 뜨는 성질이 있고, 콩잎과 콩잎사이의 공간으로 충분히 적셔지지 않는 특성으로 인해 충분한 EtOH의 추출에 문제가 발생할 수 있다. 또한, 대량생산공정 추출시에 EtOH의 양은 경제성과 바로 연관되기에 추출시 EtOH의 양 또한 경제성의 중요한 변수 중의 하나로 작용하였다. 적은 EtOH의 경우 침지가 용이하지 않아 충분한 유효성분을 확보하지 못했으며 EtOH의 양이 많을 경우 공정에 사용되는 EtOH의 가격과 처리비용이 상승하여 산업적 생산 공정에 문제가 발생할 수 있다. 따라서, 효과적인 추출을 위하여 건조 콩잎에 대한 EtOH의 양은 건조 콩잎 50 kg당 500 L으로, 침지 시간으로는 48 시간 이상의 조건에서 우수한 추출수율을 확보할 수 있었다.

효과적인 추출을 위한 또 한가지 방법으로 건조된 콩잎의 전처리를 위하여 분쇄공정을 검토하였다. 분쇄기를 통한 가루를 만들 경우, 분쇄과정을 통해 손실되는 콩잎이 발생과 분쇄과정 중 발생하는 비용 그리고 분쇄된 콩잎으로 인해 2 차 공정에서의 문제점 등으로 인해 분쇄기 사용은 하는 것은 효과적이지 않았다. 분쇄기 사용 후 2 차 공정에서의 문제점은 콩잎 가루로 인해 여과 과정에서 여과기(여과포)를 막아 압력 상승 등으로 인해 여과시 5배 이상의 시간 소요가 발생하는 발생하였다.

따라서, 이러한 문제점을 개선하기 위하여, 부분 파쇄된 큰 입자를 활용하여 추출조건을 최적화하였다. 인위적 절단한 큰 가루는 95 % EtOH에 침지시킨 후 6 시간 간격으로 교반을 하여 준다. 식품 가공등 산업적으로 사용되고 있는 대부분의 산업용 용출기는 교반시설이 없으므로 인위적인 교반을 통해 침지가 잘 되어 있는 아래층과 침지가 되지 않는 윗층을 혼합하여 골고루 혼합하게 한다. 95 % EtOH 추출물의 농축은 최대 40℃의 온도 조건에서 48 시간 동안 실행을 하여 초기 첨가한 용매부피의 1/10 부피가 되 때까지 실행하였다.

다음 단계로 농축물은 진공 건조기를 이용하여 추출 분말로 회수하였다. 열풍 건조의 경우 자체 점성도로 인해 높은 점성도와 수분을 흡수하여 작업 후 회수 공정 시 회수가 용이하지 않았고, 자체 수분 흡습으로 인한 미생물의 오염 등이 있어 진공건조를 시행하였다. 또한 진공 건조 시 보다 높은 회수율을 위해 부형제로 가용성 전분(soluble starch)을 혼합하였다. 가장 많이 사용하고 있는 부형제로서 Lactose, Dextrose, Glucose, Starch가 대표적이거나, 본 연구의 대상 기능성소재인 PTH의 주요 효능이 체지방 및 혈당개선인 점을 감안하여 가용성 전분을 부형성분으로 선택하였다.

표 29. 테로카판 고탄유 분획(PTH) 생산 공정 요약표

PTH 생산	공정	비고
콩잎 수확	B 지역, GH 품종	110~120 일령
건조	열풍 건조	Lot. 당 50 kg
추출	95% EtOH (건조물 무게의 10배 부피)	상온(25~30 ℃), 48 시간
농축	추출액의 1/10 부피	상온(최대 40℃), 48 시간
건조	진공 건조	부형제 : Starch

## (2) 인체시험을 위한 샘플 제작

B 지역 GH 콩잎의 주정추출분말을 이용하여 인체시험을 위한 시제품을 제작하였다. 인체시험을 위해 캡슐제조기를 이용하여 500 mg capsule에 95% EtOH PTH를 충전 한 캡슐을 제작하였다.

캡슐제작을 위해 95% EtOH PTH의 자체 제습작용으로 인해 캡슐제작이 용이하지 않았으며, 이를 극복하기 위해 PTH : Starch를 90:10 비율로 혼합하여 캡슐을 제작하여 시제품으로 활용하였다. 다양한 부형제 중 starch를 사용한 것은 표준화 연구중 생산공정 확립에 언급한 바와 같이 연구의 기능성 소재인 95% EtOH PTH의 주요 효능이 체지방 및 혈당개선인 점을 감안하여 starch를 부형성분으로 선택하였다. 500 mg 캡슐 작업 후 자체 제습을 방지하기 위해 실리

카겔을 넣어 주어 샘플을 완성하였다.

제 2협동기관에서 인체실험을 위해 제 1군, 제 2군 그리고 제 3군으로 나누어 용기에만 표시를 하여 공급하였다. 제 1군은 위약 대조물질 (placebo) 군으로 500 mg starch를 캡슐 충전 하였다. 제 2군으로는 양성대조물질로 그린마테추출물 (chlorogenic acid 34%, 0.426 g/day)로 하였다. 하루 복용량을 맞추기 위해 500 mg 캡슐 당 71 g의 그린마테추출물에 429 mg의 starch를 혼합하여 캡슐 충진을 하였다. 그린마테추출물에 대한 정보는 표 30과 같다. 제 3군은 95% EtOH PTH로 제작하였다. 동결건조한 95% EtOH 주정추출물 400 mg에 100 mg의 starch를 충분히 혼합한 후 500 mg 캡슐 충진을 완료하였다.

필요수량으로 1일 3회 식후 경구복용 (복용기간 12 주)를 각 27명이 복용하는 것을 감안할 경우 13,608 capsule일 필요하나, 자체 보관 수량 및 제작시 손실을 감안하여 각 15,000 capsule을 제작하였다. 제작된 모든 군들은 캡슐을 무작위적으로 선별한 후 정밀 저울을 이용하여 캡슐 포함 무게를 측정하였다. 모든 군에서  $\pm 5 \sim 7\%$ 의 오차가 있음을 확인하였다.



그림 16. 캡슐제작을 위한 캡슐기 및 인체시험용 샘플

표 30. 마테추출물의 영양 정보

항목	결과 (100 g 당)
Energy	62.12 kcal
Caffeine	2.5 %
Protein	2.94 g
Carbohydrates	12.34 g
Iron	3.6 mg
Potassium	1.095 mg
Sodium	121.8 mg
Thiamin (Vit. B1)	0.41 mg
Riboflavin (Vit. B2)	0.78 mg
Pantotenic acid	6.5 mg
Magnesium	370.5 mg
Chlorogenic acid	34 g

### 카. 기능성소재 및 부재료와의 최적 배합 및 제형 설정 연구 및 품질관리 방법 확립

체지방 개선을 위해 인정된 기능성 원료로는 가르시아캄보지아껍질추출분말, 공액리놀레산 (유리지방산), 공액리놀레산 (트리글리세라이드), 그린마테추출물, 녹차추출물, 대두배아추출물 등혼합물, 레몬 밤 추출물 혼합분말, 중쇄지방산함유유지, 콜레우스포스폴리추출물, 히비스커스 등복합추출물, 깻잎추출물, L-카르니틴 타르트레이트, 식물성유지 디글리세라이드가 있다.

혈당개선을 위해 인정된 기능성 원료와 고시형 기능성 원료를 사용하고 있다. 인정된 기능성 원료로는 구아바잎 추출물, 난소화성 말토덱스트린, 동결건조누에분말, 마주정추출물, 바나바잎 주정추출물, 솔잎 증류농축액, 알부민, 인삼가수분해농축액, 지각상엽추출혼합물, 쥐눈이콩 펩타이드복합물, 콩발효 추출물, 타가토스, 탈지달맞이꽃종자추출물, 피니톨, 홍경천등 복합추출물, nopal 추출물이 있으며, 고시형 원료로는 구아검/구아검가수분해물, 귀리, 밀식이섬유, 옥수수겨, 호로파종자, 이눌린/치커리 추출물이 기능성 원료로 사용할 수 있다.

바나바잎 주정추출물의 형태는 소용량으로 복용되고 있으나, 밀전분 유래 난소화성 말토덱스트린은 섭취량이 8~20 g/일, 동결건조누에분말은 2.7 g/일, nopal 추출물은 4.3 g/일로 대부분의 품목은 하루의 섭취량이 높아 식사대용으로 활용하는 부분이 많으며, 시장에서 체지방 개선 용과 함께 병용하여 사용하고 있는 실정이다.

### 다. 식품(식품 첨가물) 품목 등록 (제품명 결정)

본 연구의 연구결과를 중심으로 95% EtOH 콩잎주정추출분말을 활용하여 체지방 조절 및 혈당 강하를 위한 기능성 제품을 개발하였다. 본 연구의 콩잎추출분말을 이용한 시제품 생산을 위한 인허가(식품첨가물 인허가)는 선행 실행 완료된 인허가를 활용하였다. 식품(식품첨가물) 품목제조 인허가(신고)는 2011년 12월 26일에 완료하였다 (그림 17~18). 시제품(제품) 제작을 위해 콩잎추출분말의 사용을 위해 식품식품첨가물 사용을 위한 식약처에서 요구하는 항목에 대한 공인 조사를 과학기술분석센터를 통해 분석하였으며, 이에 대한 분석 결과는 표 31와 같다.

표 31. 식품 첨가물 사용 ‘콩잎주정추출분말’의 검사 결과

시험항목	결과
대장균	음성
황색포도상구균	음성
살모넬라	음성
타르색소	불검출
납	0.14mg/kg
비소	불검출
수분	4.59 g/100 g

## 식품(식품첨가물) 품목제조보고서

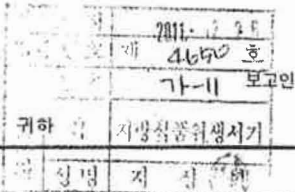
보고인	성명     김 미 경	생년월일 1970년 8월 5일
	주소	전화번호 043-883-0805
		휴대전화

영업소	명칭(상호)     서진 바이오텍
	소재지     충청북도 음성군 삼성면 덕정리 247-4

제품정보	식품의 유형     기타 가공품	영업신고 번호     제 398 호
	제품명     콩인추출물분말	
	유통기한     제조일부터     24     일(월, 년)	
	품질유지기한     제조일부터     일(월, 년)	
	원재료명 또는 성분명 및 배합비율	(별 첨)
	용도 용법	(별 첨)
	보관방법 및 포장재질	(별 첨)
	포장방법 및 포장단위	(별 첨)
	성상	(별 첨)
	고열량·저영양 식품 해당 여부	[ ]에    [ ]아니오    [O]해당 없음

기타	
----	--

「식품위생법」 제37조제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다.



2011 년 12 월 26 일

김 미 경



첨부서류	1. 제조방법설명서 1부 2. 식품위생검사기관이 발급한 식품등의 한시적 기준 및 규격 검토서 1부 3. 식품의약품안전청장이 정하여 고시한 방법에 따라 실정한 유통기한의 설정사유서 1부
------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------

### 규외사항

1. 품목제조보고서는 제품생산의 개시 전이나 개시 후 7일 이내에 제출하여야 합니다.
2. 배합비율 표시는 식품공전 및 식품첨가물공전에 사용기준이 첨하여져 있는 원재료 또는 성분의 경우만 해당합니다.

## 식품품목제조보고 설명서

- 제 품 명 : 콩 잎 추출물 분말
- 식품의유형 : 기타 가공품
- 성분배합비율

### 원료명

1. 콩잎추출물(고형분기준) : 30%  
(콩잎추출물 : 콩잎 100%)
2. 덱스트린 : 70%

합계 : 100 %

- 제조방법
  - 원료검사 : 식품공전규격에 적합한 원료를 구입하여 검사 후 합격된 것을 사용한다.
  - 추 출 : 추출기에 콩잎을 계량하여 투입하고 콩잎투입량의 10배의 70% 주정을 투입하여 2일간 침지추출 후 100mesh 체로 여과 후 농축한다.
  - 건 조 : 진공 건조기에 투입하여 진공건조한다.
  - 분쇄 : 진공건조한 콩잎추출물을 분쇄한다.
  - 계 량 : 성분배합비율대로 계량한다.
  - 혼 합 : 혼합기에 투입하여 균일하게 혼합한다.
  - 검사및포장 : 규격검사를 실시하여 합격한 것을 포장단위별 충전 포장한다.

성 상 : 미황색의 분말로서 콩잎추출물분말 향미를 지니며 이미, 이취가 없음.

포장방법 : 폴리에틸렌으로 100g이상에서 25kg까지 포장

용도·용법 : 가공식품에 적량 사용한다.

유통기한 : 제조일로부터 24개월까지 (직사광선을 피하고 실온보관)

그림 18. 콩잎추출분말 식품첨가물 품목제조보고 설명서.

[별지 제43호서식]

## 식품(식품첨가물) 품목제조보고서

보고인	성 명	조인식, 조형권	생년월일	
	주 소	전라북도 완주군 봉동읍 완주신단6로 301	전화번호	063-715-0045
			휴대전화	
영업소	명칭(상호)	㈜ 한풍네이처팜		
	소재지	전라북도 완주군 봉동읍 완주신단6로 301		
제품 정보	식품의 유형	특수용도식품 / 체중조절용조제식품	영업신고번호	제12-7호
	제품명	슬립파워		
	유통기한 품질유지기한	제조일로부터 24개월 제조일로부터		
	원재료명 또는 성분명 및 배합비율	별첨		
	용도 용법	용도 : 체중조절용조제식품    용법 : 1일 1회, 1회 1포를 우유 또는 물과 함께 섭취		
	보관방법 및 포장재질	보관방법 : 실온보관    포장재질 : 폴리에틸렌(PE)		
	포장방법 및 포장단위	포장방법 : 포 포장    포장단위 : 30 g*15포, 30 g* 30포, 30 g*45포, 30 g*60포, 30 g*75포, 30 g*90포		
	성상	이미, 이취가 없는 미황색 분말		
	고열량·저영양 식품 해당 여부	[ ] 예    [ ] 아니오    [ <input checked="" type="radio"/> ] 해당없음		
기타				
<p>「식품 위생법」 제37조 제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조 제1항에 따라 식품(식품첨가물)품목제조 사항을 보고합니다.</p> <p style="text-align: right;">2014 년    07 월    일</p> <p style="text-align: right;">보고인    조인식, 조형권    (인)</p> <p style="text-align: left;"><b>완주군수    귀하</b></p>				
첨부서류	1. 제조방법설명서 1부 2. 식품위생검사가관이 발급한 식품등의 표시적 기준 및 규격 검토서 1부 3. 식품의약품안전청장이 정하여 고시한 방법에 따라 설정한 유통기한의 설정서류서 1부			
	식품위생법 제37조제5항 및 동법시행규칙 제45조제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조(사)보고서    유의사항			
1. 품목제조보고서는 제품생산의 개시 전이다 개시 후 7일 이내에 제출하여야 합니다. 2. 배합비율 표시는 식품안전 및 식품첨가물공전에 사용기준이 정하여져 있는 원재료 또는 성분의 경우만 해당합니다.				
확인자: 완주군청    김경민    김상준    김 직    급:    2016    이    상:    최수자				

그림 19. 체중조절용조제식품 제조보고서.

제품은 일반 식품이 아닌 기능성을 함유하는 체중조절용 조제식품인 ‘슬림파워’ 라는 브랜드로 개발하였다. ‘슬림파워’의 효율을 극대화하기 위해 기능성 소재 및 부재료와의 최적 배합 및 제형 설정 연구를 통해 확보된 관련 부형제 및 기능성 원료를 활용하였다. ‘슬림파워’에 대한 기능성 유효 함량 및 열량 등에 대한공인인증기관인 한국식품연구소에 의뢰를 통한 분석 결과를 확보 (표 32)하고, 이를 통해 체중조절용식품으로 인정을 받아 제조를 실행하였다 (그림 19).

표 32. ‘슬림파워’의 영양성분

품목	단위	결과	비고
열량	kcal	331.4	100g 당
탄수화물	%	64.3	
조단백	%	26.9	질소계수 6.25
조지방	%	2.2	
나트륨	mg/100g	288.92	
당류	g/100g	7.1	과당 3.1, 포도당 1.9, 자당 1.1, 맥아당 0.6, 유당 불검출
포화지방산	g/100g	1.2	
트랜스지방	g/100g	0.01	
콜레스테롤	mg/100g	불검출	
식이섬유	%	26.6	

**파. 기능성소재를 이용한 체지방 및 혈당 조절 기능성 (시)제품 개발**

기능성 원료로는 폴리덱스트로스과 가르시니아카보지아추출분말을 혼합하여 체지방 조절에 활용하였으며 혈당 강하를 위해서는 난소화성 말토덱스트린을 기능성으로 활용하였다. 소비자의 기호성 마케팅을 위하여 분리대두단백, 볶은 현미분말 등을 혼합하였으며, 영양성분을 감안하여 제품을 개발하였다.

‘슬림파워’는 체지방조제식품으로 유효 성분 함량은 표 33과 같다. 또한 한국식품산업협회를 통해 광고심의 (광고심의 번호 21418012)을 거쳐 제품에 대한 설명 자료 및 표시 사항을 표 33와 같은 내용을 확인하였다. 심의 결과를 바탕으로 한 ‘슬림파워’의 내용과 제품은 표 34와 그림 20과 같다.



표 33. '슬림파워'의 기능성 유효 함량

성분	단위	결과
수분	%	4.3
조단백	%	26.9
비타민A	ug/100g, RE	591.95
비타민B1	mg/100g	3.01
비타민B2	mg/100g	2.98
비타민B6	mg/100g	2.27
비타민C	mg/100g	92.27
나이아신	mg/100g, NE	16.15
엽산	mg/100g	816.03
비타민E	mg/100g, a-TE	20.98
칼슘	mg/100g	351.53
철	mg/100g	9.23
아연	mg/100g	6.83
바실러스 세레우스	g	0
대장균	양성/음성	음성

표 34. '슬림파워'의 기본 함량

제품명	슬림파워 'SLIM POWER'
식품의 유형	체중조절용 조제식품
내용량	450g (1,500 kcal) / [30g(100 kcal) X 15포]
원재료명	분리대두단백, 볶은현미분말, 치커리추출분말, 오렌지맛분말, <b>난소화성말토덱스트린, 폴리덱스트로스</b> , 차전자피분말, 프락토올리고당분말, <b>공익추출분말</b> , 식물성크림분말, 맥주건조효모, 오렌지향코튼, 해조분말, 비타민혼합제제, 생선콜라겐, 프로테아제, 비타민C, 인산철, 니코틴산아미드, 비타민A혼합제제, 산화아연, 비타민B6염산염, 비타민B2, <b>가르시아캄보지아추출분말</b> , 복합효소분말, 녹차추출분말, 베리혼합분말, 엽산, 아미노산혼합분말,
권장섭취량 및 섭취방법	1일 1회, 1회 1포 (30 g)을 우유 200mL (약 120 kcal)에서 타서 잘 흔들어 섞은 후 씹는 기분으로 천천히 섭취하십시오.
섭취시 주의사항	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 유통기한을 확인하시기 바라며, 섭취량 및 섭취방법을 준수하시기 바랍니다.</li> <li>- 특이체질, 알레르기 체질인 경우 성분을 확인하신 후 섭취하여 주시기 바랍니다.</li> <li>- 제품 개봉 또는 섭취 시 포장재에 의해 상처를 입을 수 있으니 주의하시기 바랍니다.</li> </ul>
내포장재질	폴리에틸렌 (PE)
보관시 주의사항	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 직사광선 및 고온다습한 곳을 피해 습기가 적고 서늘한 곳에 보관, 유통하십시오.</li> <li>- 개봉 후에는 즉시 섭취하시기 바랍니다.</li> </ul>



그림 20. '슬림파워' 제품 사진

### 최종 요약 및 결론 (제1협동)

- 본 연구과제에서 테로카관 강화 소재를 산업적으로 생산하기 위한 대량 수확, 원료 생산 공정 시스템을 개발하였으며 이를 이용하여 생산된 소재를 이용하여 인체시험과 제품화에 사용하였다. 기능성소재 및 부재료와의 최적 배합 및 제형설정을 통해 체지방 조절 및 혈당 강하를 목적으로 하는 제품 개발을 완성하였다.
- 2011년도, 2012년, 2013년도 콩잎재배를 통해 시기별 콩잎을 확보하였으며 시기별 콩잎의 유효성분 자료를 바탕으로 최적 배양 품종을 바탕으로 2012년도와 2013년도 콩잎을 대량 수확하였다. 수확한 콩잎은 생산공정을 거쳐 인체시험과 제품화에 활용하였다.
- 유효성분 확보를 위한 콩잎의 대량 수확에서 콩잎의 수확 시기는 생리활성 및 수확량을 감안하여 파종 후 약 101 ~ 120일 콩잎 수확이 적정기로 판단되었다. 생산된 콩잎 품종에 대한 수확량과 생리활성을 고려해본 결과 GH>WD>YS 순으로 나왔으며 인체시험과 제품화를 위해서는 GH로 결정하였다.
- 콩잎으로부터 테로카관 고함유 분획(PTH) 생산 공정 확립하기 위해 단기, 장기 콩잎 발효를 통한 함량의 변화를 확인하였다. 단기 콩잎 발효 후 LDL-항산화 활성을 측정된 결과 물-유산균 (91.1%), 물-설탕 (88.9%), 물-콩잎 (76.7%), 물-소금 (73.1%) 순으로 높은 LDL-항산화 활성이 나타내었다. 또한 장기 발효를 통해 발효콩잎의 열수추출 후 침전물을 95% EtOH을 이용하여 추출하면, 농축된 활성성분을 얻을 수 있음을 확인하였다.
- 생산된 대량 콩잎의 건조를 통한 생리활성 비교 실험에서 응달건조, 열풍건조 및 태양광건조에서 생리활성에는 두드러지는 차이가 없었으며 건조시간의 단축을 통한 단가 절감을 감안할 경우 열풍건조가 적정함을 확인하였다. 추출시 대량생산 공정을 통해 95% EtOH 추출과

EtOAc 추출이 함유하는 지표성분인 동시에 유효성분인 coumestrol 함량 비율이 1:2.92 임을 확인하였으며, 총 플라보노이드 함량은 3.21배, 총 페놀 함량은 1.17배가 높음을 확인하였다. 따라서 실험실 수준에서의 추출에 비해 대량 공정 시에는 95% EtOH 추출물에 비해 EtOAc 추출물의 테로카판 함유량이 높았다. 그러나 추출 수율면에서는 95% EtOH 추출물이 EtOAc 추출물에 비해 3.44배 높았다. 따라서 이상의 결과로 대량생산 시 95% EtOH이 EtOAc보다 효과적인 추출용매인 것을 확인하였다. 주정추출분말의 산업적 대량 생산공정으로 건조 콩잎 건조물 무게의 10배 부피의 95% EtOH로 추출한 후 부형제로 starch를 첨가한 후 진공건조를 통한 공정을 완성하였다.

○ PTH의 안전성 시험결과 단회 경구투여 독성시험에서 비교 평가 결과 사망동물이 발견되지 않았으며, 일반증상, 체중변화 및 부검소견에서 이상소견이 발견되지 않았다. 복귀돌연변이시험에서 모든 군주에 시험물질 처리농도에서 음성 대조군에 비해 집락수의 증가는 관찰되지 않았으며 세포 독성도 관찰되지 않았다. 또한 모든 양성대조군에서는 해당 음성대조군에 비해 집락수의 확실한 증가가 관찰되지 않아 PTH를 사용한 시험군주에 복귀돌연변이를 유발하지 않은 것으로 확인되었다. 염색체 이상의 시험결과 550  $\mu\text{g/mL}$  이하 처리구에서 대사활성계 적용 및 비적용 6시간 처리군에서 염색체 구조적 이상을 발견하지 못하였으며 이상의 결과를 바탕으로 550  $\mu\text{g/mL}$ 을 적정 농도로 활용하였다. 또한, 무기농 재배를 통한 잔류농약과 중금속이 함유되지 않음을 확인하였다.

○ 제 2협동기관에서 인체실험을 위해 위약 대조물질 (placebo) 군으로 500 mg starch, 양성대조물질로 그린마테추출물 (chlorogenic acid 34%, 0.426 g/day), 그리고 실험군으로 본 연구의 대량생산공정을 거쳐 확보한 95% EtOH PTH를 500 mg 캡슐 충전 하여 공급하였다. 캡슐 작업 후 모든 군들은 캡슐을 무작위적으로 선별한 후 정밀 저울을 이용하여 캡슐 포함 무게를 측정하였다. 모든 군에서  $\pm 5 \sim 7\%$ 의 오차가 있음을 확인하였다.

○ 본 연구의 연구결과를 중심으로 95% EtOH 콩잎주정추출분말을 활용하여 체지방 조절 및 혈당 강하를 위한 기능성 제품을 개발하였다. 제품은 일반 식품이 아닌 기능성을 함유하는 체중조절용 조제식품인 ‘슬림파워’ 라는 브랜드로 개발하였다. ‘슬림파워’의 효율을 극대화하기 위해 가능성 소재 및 부재료와의 최적 배합 및 제형 설정 연구를 통해 확보된 관련 부형제 및 기능성 원료를 활용하였다.

기능성 원료로는 폴리덱스트로스과 가르시니아캄보지아추출분말을 혼합하여 체지방 조절에 활용하였으며 혈당 강하를 위해서는 난소화성 말토덱스트린을 기능성으로 활용하였으며 소비자의 기호성 마케팅을 위하여 분리대두단백, 볶은 현미분말 등을 혼합하였으며, 영양성분을 감안하여 제품을 완성하였다.

# 제3절 기능성 소재의 체지방 및 혈당 조절 효능 검정을 위한 인체 시험 (제2협동과제)

## 1. 연구개발 수행 내용 및 방법

### 가. 인체시험 수행방법

#### (1) 인체시험 연구 대상 선정

##### ㉠ 인체시험 대상자 모집

본 연구는 2013년 12월부터 2014년 2월까지 3개월 동안 공고문을 통하여 일반 시민들의 자발적인 지원을 받았다. 시험의 임상 피험자 선정기준은 다음과 같다.

##### ㉡ 선택기준

- 심각한 질병이 없는 35세 이상 65세 미만의 남녀
- 체질량지수(BMI)가 23이상인 과체중 또는 BMI가 25이상인 비만에 해당하며 기타 의학적 부적격 사유가 없는 대상자

##### ㉢ 제외기준

- 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
- 혈당조절용 타 건강기능식품을 복용하고 있는 경우
- 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

○ 본 연구는 테로카판 강화 기능성 소재를 주성분으로 35-65세 사이의 과체중 또는 비만이면서 대사증후군 진단요인 (허리둘레 남성 허리 90, 여자 80 cm 이상, 중성지방 150 mg/dL, HDL-콜레스테롤 농도 남성 40, 여성 50 mg/dL 미만, 공복혈당 100 mg/dL, 혈압 [수축기혈압 130 mmHg 이상 또는 이완기 혈압 85 mmHg 이상] 중 3가지 이상에 부합한 대사증후군의 성인 남녀를 대상으로 12주간 시행되는 이중맹검, 무작위 배정, 위약대조 연구이다. 대상자는 각 군에 25여 명씩 무작위로 배정하였고 시험기간 중 양성대조군에서 2명, 시험 물질군에서 1명 탈락하여 총 3명이 탈락하였다 (fig. 1). 각 군당 1일 섭취용량은 Table 1과 같다.

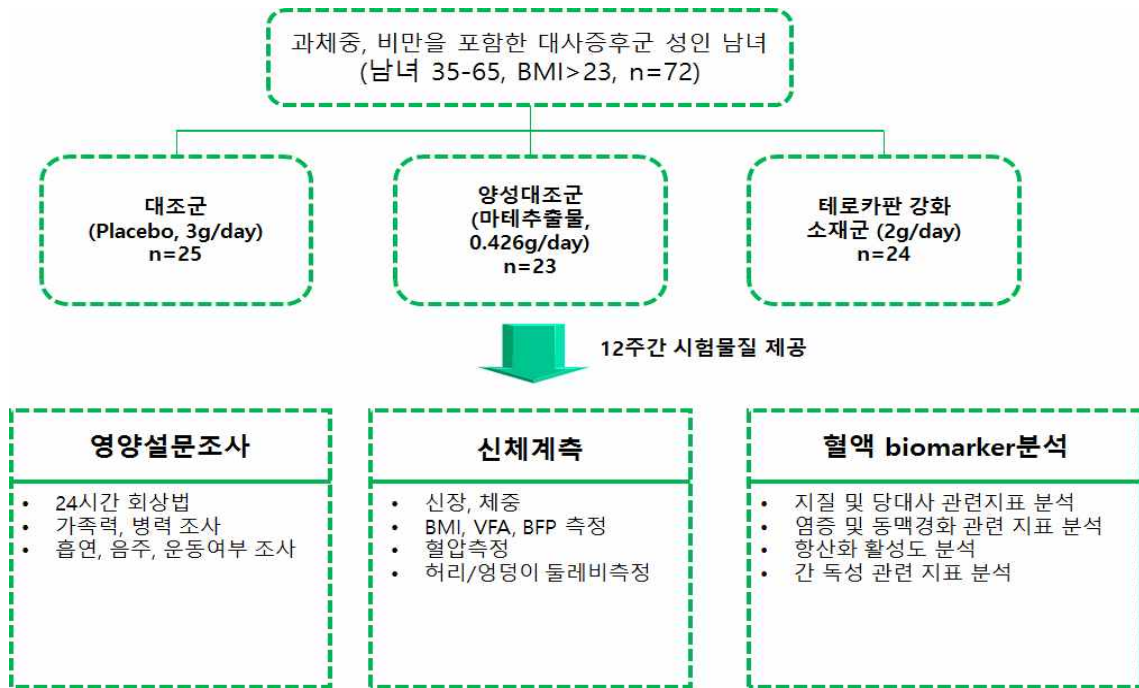


Fig. 1. Experimental design for human experiment. BMI: Body mass index, VFA: Visceral fat area, BFP: Body fat percentage, Placebo: Starch, ME: mate extract (0.426g/day), PT: high-pterocarpin fraction (2g/day).

Table 1. 인체시험 전체 실험군 1일 복용량

Group	용량 (g/tablet)	1일 복용량		비고	
		tablets	g		
제1군	위약 대조물질 (placebo)군	0.5	6	3 (starch)	복용기간:12주 1일 3회 식후 경구복용
제2군	양성대조물질 (마테추출물)군	0.5	6	3 (chlorogenic acid 34%, 0.426g/day)	
제3군	테로카판 강화 소재군	0.5	6	3 (95% 콩잎추출물)	

○ 양성대조군으로 사용한 마테열수추출물은 개별인정원료 제2013-2호(2013. 01. 10, 블루그린 링크)이며, 체지방 감소에 도움을 줄 수 있으나, 관련 인체적용시험이 미흡하여 생리활성 기능 3등급에 해당하며, 일일섭취량은 마테열수추출물로서 3 g/day, 유분인 chlorogenic acid 144 mg/day 이다. 본 연구의 기능성 소재는 체지방 조절과 함께 혈당 조절을 목표로 하고 이끄다. 따라서 마테추출물의 항비만 및 항당뇨 효능에 대한 보고된 마테추출물을 양성대조군으로 사용하였다 (Kang YR, *et al.*, 2012; Boaventura BCR *et al.*, 2012).

○ 본 연구는 2013년 11월 5일 인체시험 계획서, 피험자 동의서와 피험자 설명문 및 공고문이 경북대 산학협력단의 인체시험 심의위원회 (IRB : Institutional Review Board)에서 심의 및 승인

된 후 실시되었다.

○ 대상자들은 시험기간 12주 동안 일상적인 식생활 및 생활습관을 유지하도록 하였다. 인체시험 피험자 모니터링은 2주 1회 전화로 시험 식품의 섭취 여부, 시험기간 중 나타날 수 있는 부작용 또는 불편사항 (설사, 장내가스 발생, 어지러움, 복통, 구토 등)을 조사하였다.

### (3) 인체시험 대상자 방문 및 시료수집

#### ① 방문일정

총 4회 방문을 통해 영양설문지와 24시간 식사일지 작성, 신체계측, 체성분 측정, 허리 둘레와 엉덩이 둘레 측정, 혈압, 공복혈당, 당화혈색소 (HbA1c) 농도 측정, 처방식품 배분 및 채혈 및 소변 수집을 수행하였으며 방문 시 수행내용은 다음과 같다.

1차 방문 (0주)	2차, 3차 방문 (4,8주)	4차 방문 (12주)
<ul style="list-style-type: none"><li>• 동의서, 설문지, 24시간 회상법 작성</li><li>• 신체계측 및 체성분 분석</li><li>• 허리/엉덩이 둘레비 측정</li><li>• 혈압, 공복혈당 측정</li><li>• HbA1c 측정</li><li>• 채혈 및 소변 수집</li><li>• 처방식품 배분</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• 신체계측 및 체성분 분석</li><li>• 허리/엉덩이 둘레비 측정</li><li>• 혈압 및 공복혈당 측정</li><li>• 처방식품 배분</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• 동의서, 설문지, 24시간 회상법 작성</li><li>• 신체계측 및 체성분 분석</li><li>• 허리/엉덩이 둘레비 측정</li><li>• 혈압, 공복혈당 측정</li><li>• HbA1c 측정</li><li>• 채혈 및 소변 수집</li></ul>

#### ② 시료수집

시험 전 (0주) 및 시험 후 (12주)에 12시간 공복 후 공복혈액과 소변을 채취하였다. 채취된 혈액은 헤파린으로 처리된 시험관에 바로 수집하였고, 1000×g, 4° C에서 15분간 원심 분리하여 혈장을 분리한 후, 시료 분석 시까지 -70° C에 보관하였다.

### (4) 실험 분석 및 측정 방법

인체시험 분석방법은 동물실험 방법에서 사용된 내용 외의 추가적인 부분만 기술하였다.

#### ① 설문조사 결과정리

○ 인체시험대상자의 영양섭취상태 설문조사 결과정리 및 통계처리는 Can Pro (한국영양학회)와 엑셀 프로그램을 이용하여 결과 정리 및 ANOVA 통계 처리하였다.

#### ② 신체 계측 및 체성분 분석

○ 주원메디컬사 (한국)와 X-Scan 체성분 분석기를 이용하여 측정하였다.

#### ③ 혈압 변화 분석

○ OMRON DALIAN사 (중국)의 혈압계를 이용하여 측정하였다.

## (5) 생화학적 바이오마커 측정

### ① Total-cholesterol 정량

혈장 총 콜레스테롤 정량은 Allain 등 (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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와  $\Delta^4$ -cholestenon으로 전환시키고, 이 중 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 peroxidase 및 phenol, 4-amino-antipyrine과 혼합하여 적색으로 발색시킨 후, 500 nm에서 흡광도를 측정하여 콜레스테롤 표준용액 (300 mg/dL)과 비교하여 정량하였다.

### ② Triglyceride 정량

혈장 중성지질은 McGowan 등 (1983)의 효소법을 이용한 발색법 원리에 따라 중성지방 측정용 시액 (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- $\alpha$ -glycerophosphate를 형성하며, 이것은 O<sub>2</sub> 및 glycerophosphoxidase (GPO)와 반응하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 발생시켰다. 여기에 peroxidase와 4-amino-antipyrin을 처리하여 적색으로 발색시킨 후 550 nm에서 흡광도를 측정하여 글리세롤 표준곡선과 비교하여 정량하였다.

### ③ HDL-cholesterol 정량

혈장 HDL-cholesterol (HDL-C)은 HDL-C 측정용 시액 (아산제약 kit)을 사용하여 측정하였다. 혈장 100  $\mu$ L를 취하여 인텡스텐 나트륨 500  $\mu$ g과 염화마그네슘 1 mg을 처리하면 인텡스텐 산과 마그네슘 양이온의 작용으로 지단백질 중 apo B를 포함하는 LDL과 VLDL이 침전된다 (Warnick, 1982). 이것을 원심분리한 후 상층액에 남은 HDL 중의 콜레스테롤을 총콜레스테롤과 같은 방법으로 발색반응 시켜 500 nm에서 흡광도를 측정하고, 콜레스테롤 표준용액 (50 mg/dL)과 비교하여 정량하였다.

### ④ 혈중 non-HDL-cholesterol 농도 계산

혈중 non-HDL-cholesterol 농도는 총 콜레스테롤 농도에 HDL-cholesterol 농도를 뺀 후 아래의 수식에 의해 산출하였다.

$$[\text{non HDL-cholesterol}] = [\text{Total-cholesterol}] - [\text{HDL-cholesterol}]$$

### ⑤ 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 555 nm에서 흡광도를 측정하여

유리지방산 표준곡선과 비교하여 정량하였다.

⑥ LDL-cholesterol 및 AI (동맥경화지수) 계산

LDL-cholesterol 및 AI는 다음 공식에 의해 산출되었다.

$$\text{LDL} = ([\text{Total-cholesterol}] - [\text{HDL-cholesterol}]) - (\text{triglyceride}/5)$$

$$\text{Atherogenic index, AI} = [(\text{Total-cholesterol}) - (\text{HDL-cholesterol})] / \text{HDL-cholesterol}$$

⑦ Phospholipid (PL)

혈장 인지질은 가수분해되어 유리된 choline이 oxidase에 의해 생성된 과산화수소수와 산화축합하여 생성한 키논색소의 흡광도를 측정하였다.

⑧ 아포지단백질 정량

혈장 apolipoprotein A-1 (apo A-1) 농도는 apo A-1 측정용 kit (日東紡績株式會社, Japan)를 사용하여 측정하였다. 혈장 3  $\mu\text{l}$ 에 R-1 시약 300  $\mu\text{l}$ 를 가하고 37° C에서 5분간 반응시키고 R-2 시약 100  $\mu\text{l}$ 를 가하여 37° C에서 5분간 반응시킨 후 항원항체 반응에 의해 생성된 응집물의 탁도를 800nm에서 흡광도를 측정하였다.

⑨ 공복혈당측정

시험 전 (0주) 및 시험 후 (12주) 공복혈당 농도는 12시간 절식한 피험자들의 공복 정맥혈을 채취하여 혈액자동분석기 (Cholestech LDX System, USA)를 이용하여 측정하였다. 또한 시험기간 10주 동안 격주로 자가 혈당 측정계 (글루코닥터슬림, (주)그린메디칼)를 이용하여 12시간 절식한 피험자들의 손끝에서 공복혈당을 측정하였다.

⑩ 당화혈색소 (HbA<sub>1c</sub>) 측정

HbA<sub>1c</sub> 농도는 commercial kit (Nycocard HbA<sub>1c</sub>)를 이용하여 0주 및 12주에 채혈한 공복 전혈로 측정하였다. HbA<sub>1c</sub>는 hemoglobin  $\beta$ -chain과 N-terminal valine 및 포도당의 carbonyl group 간의 가역적 축합에 의해 생긴 schiffbase가 Amadori 산물로 변형된 것인데, 이것의 농도는 혈중 포도당 농도와 양의 상관관계를 가지며, 2~3개월간의 혈당 조절 상태를 파악할 수 있다.

⑪ 혈장 포도당 농도 (plasma glucose) 측정

혈장 포도당 함량 측정을 위해 상업용 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 200  $\mu\text{l}$ 에 효소시액 3 ml을 가하여 37° C, 5분간 반응시킨 후 500 nm에서 생성된 키논형 적색 색소의 흡광도를 측정하여 glucose 표준용액과 비교하여 정량하였다.

⑫ 혈장 cytokine 측정

혈장 cytokine인 monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 함량 측정은 Multiplex detection kit (Bio-Rad, USA) 및 Luminex 200



Labmap system (Bio-Rad, USA)을 사용하였다. 데이터 분석은 Bio-Plex manager software version 5.0 (Bio-rad)을 이용하여 수행하였다.

⑬ 인슐린 감수성 지표 (HOMA-IR) 계산

인슐린 감수성 지표인 HOMA-IR (homeostasis model assessment of insulin resistance)는 [공복 인슐린(uU/mL)×공복포도당(mmol/L)]/22.5로 계산하였다.

⑭ 혈중 insulin 및 glucagon 측정

혈장 insulin 및 glucagon의 함량 측정은 Multiplex detection kit (Bio-Rad, USA) 및 Luminex 200 Labmap system (Bio-Rad, USA)을 사용하였다. 데이터 분석은 Bio-Plex manager software version 5.0 (Bio-rad)를 이용하여 수행하였다.

⑮ 혈중 ghrelin, GIP 및 PAI-1 측정

혈장 ghrelin, gastric inhibitory polypeptide (GIP) 및 plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)의 함량 측정은 Multiplex detection kit (Bio-Rad, USA) 및 Luminex 200 Labmap system (Bio-Rad, USA)을 사용하였다. 데이터 분석은 Bio-Plex manager software version 5.0 (Bio-rad, USA)를 이용하여 수행하였다.

⑯ 혈중 leptin 및 resistin 측정

혈장 leptin 및 resistin의 함량 측정은 Multiplex detection kit (Bio-Rad, USA) 및 Luminex 200 Labmap system (Bio-Rad, USA)을 사용하였다. 데이터 분석은 Bio-Plex manager software version 5.0 (Bio-rad, USA)를 이용하여 수행하였다.

⑰ 혈중 GOT 및 GPT 활성도 측정

간독성 지표이자 간세포 손상과 밀접한 관련이 있는 glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) 및 glutamic pyruvic transaminase (GPT) 활성도는 Reitman 등 (1957) 등의 효소법을 이용한 GOT 및 GPT 측정용 시액 (Asan kit, Korea)을 사용하여 측정하였다. GOT의 경우 L-aspartate와  $\alpha$ -ketoglutarate, GPT의 경우 D,L-alanine과  $\alpha$ -ketoglutarate 기질을 37° C, 5분간 preincubation시키고, 혈장 10 $\mu$ l를 첨가하여 37° C에서 GOT는 60분, GPT는 30분 반응시키면 혈장의 효소에 의해 기질이 pyruvate로 전환되며, 이 pyruvate를 2,4-dinitrophenylhydrazine과 20분간 실온에 반응시켜 0.4N NaOH를 가하면 비색으로 발색되며, 이를 피루브산 리튬의 표준 곡선과 비교하여 505nm에서 활성도를 측정하였다.

⑱ 혈중 albumin 및 BUN 활성도 측정

신장 기능과 밀접한 관련이 있는 albumin 및 blood urine nitrogen (BUN) 활성도는 albumin 및 BUN 측정용 시액 (Asan kit, Korea)을 사용하여 측정하였다.

⑲ Superoxide dismutase (SOD) 활성도 측정

SOD는 superoxide anion radical(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)을 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 및 O<sub>2</sub>로 분해시키는 반응을 촉매하는 효소로서 활성도는 Marklund 등 (1974)의 방법을 수정하여 알칼리 상태에서 SOD가 pyrogallol의 자동산화

를 억제하는 정도를 측정하였다. 10 mM EDTA를 포함한 50 mM Tris-hydroxymethyl-aminomethane buffer (Tris-HCl buffer, pH 8.5) 1.5 ml에 적혈구 효소원 0.1 ml와 7.2 mM pyrogallol 용액 0.1 ml를 순서대로 잘 넣어 25°C에서 10분간 반응시킨 후 1 N HCl 50  $\mu$ L를 첨가하여 반응을 종결시키고, 420 nm에서 흡광도를 측정하여 효소활성을 산출하였다.

#### ㉑ Catalase (CAT) 활성도 측정

CAT는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 및 O<sub>2</sub>로 분해시키는 역할을 하며 활성도는 Aebi 등 (1974)의 방법을 수정, 보완하여 측정하였다. 50 mM potassium phosphate buffer (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> = 1:1, pH 7.0) 용액 2.89 ml와 적혈구 효소원 10  $\mu$ l를 25°C에서 5분간 preincubation한 후 30 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 용액 0.1 ml를 첨가하여 25°C에서 5분간 흡광도 변화를 240 nm에서 측정하였다.

#### ㉒ Glutathion reductase (GR) 측정

GR 활성도는 GSSG가 NADPH가 GR의 작용으로 GSH로 환원될 때 NADPH가 감소되는 정도를 Pinto 등 (1969)의 방법을 수정·보완하여 측정하였다. 1 M potassium phosphate buffer (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, PH 7.4) 0.1 ml에 증류수 780  $\mu$ l를 첨가한 후 0.1M EDTA 10  $\mu$ l, 10mM GSSG 100  $\mu$ l, 효소원인 cytosol 및 적혈구 10  $\mu$ l, 그리고 NADPH 10  $\mu$ L를 순서대로 첨가한 후 340nm (25°C)에서 2분 동안의 흡광도 감소량을 측정하였다.

#### ㉓ 적혈구 지질과산화물 함량 측정

적혈구의 지질 과산화물 (TBARS) 함량 측정은 Tarladgis 등 (1964)의 방법을 적용하였다. 적혈구 0.5 ml에 5 % TCA (thiochloroacetic acid) 3 ml과 0.06 M TBA(thiobarbituric acid) 1 ml을 첨가하여 80°C에서 90분간 가열하여 이를 실온에서 냉각시킨 후 2,000 rpm, 25°C에서 15분간 원심분리하여 상층액 흡광도를 535 nm에서 측정하였다.

### (6) 연구원의 역할

제2협동 참여 연구원은 역할을 분담하여 인체시험을 진행하였으며, 대상자 모집과 4 주마다 대상자 방문 시에는 모든 연구원이 참여하였다. 방문 시, 대상자가 72명으로 많기 때문에 설문조사, 혈당 및 당화혈색소 측정, 신체 계측, 혈압 등의 역할을 나누어 인체시험을 원활히 진행하였으며 석사연구원이 2 주마다 모니터링을 실시하였다.

### (7) 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 포도-오미자 혼합소재군과의 수치비교를 위해 Student's 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.

## 2. 연구개발 수행 결과

### (1) 신체 계측치 비교

테로카판 강화 소재 및 대조물질들 섭취 전의 각 군 baseline 신체 계측치와 특성은 Table 2와 같다. 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	ME	PT
N	25	23	24
Age	48.40±1.51	48.30±1.26	50.58±1.35
Body weight (kg)	67.62±1.45	66.19±2.19	66.25±1.94
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	25.97±0.39	25.43±0.45	25.49±0.38
Systolic BP (mmHg)	138.87±3.43	128.22±2.92	132.17±3.73
Diasolic BP (mmHg)	80.70±1.83	76.70±2.60	76.54±2.73
Waist (cm)	85.64±1.09	84.72±1.12	84.19±0.85
Hip (cm)	98.48±1.12	99.04±1.60	98.73±1.29
WHR	0.87±0.01	0.86±0.01	0.85±0.01
FBG (mg/dL)	104.61±3.77	103.90±2.45	107.76±4.62

Values are the mean±S.E. **Placebo:** Starch, **ME:** Mate extract (0.426g/day), **PT:** High-pterocarpan fraction (2g/day), **BMI:** Body mass index, **WHR:** Waist-hip ratio, **FBG:** Fasting blood glucose.

### (2) 시험 물질 복용 전·후 영양섭취량 조사

인체시험 시작 전과 12주 인체시험 후 24시간 회상법에 의해 조사된 평균 영양소 섭취량은 각각 Table 3 (시험 전)과 Table 4 (시험 후)에 제시하였다. 인체시험 시작 전 모든 군의 에너지, 단백질, 주요 비타민과 무기질, 콜레스테롤 및 식이섬유소 섭취량은 유의적인 차이가 없었다. 또한 인체시험 진행 동안 이들 영양소 섭취량이 군간 유사하여 대조물질인 전분, 마테추출물 및 테로카판 강화소재 섭취에 의한 영양소 섭취량의 유의적 변화는 없었다.

**Table 3. Nutrients intake in overweight subjects by 24h dietary recall before the trial**

Nutrients	Placebo	ME	PT
<b>Energy</b> (kcal/day)	1416.69±76.09	1411.68±69.63	1356.91±98.94
<b>Protein</b> (g/day)	53.84±3.23	57.93±3.23	48.92±4.25
<b>fat</b> (g/day)	31.69±2.99	34.56±3.03	33.16±3.59
<b>carbohydrate</b> (g/day)	236.88±14.49	228.63±13.07	218.93±16.14
<b>Fiber</b> (g/day)	18.77±1.53	21.25±1.37	17.72±1.52
<b>Ca</b> (mg/day)	422.11±50.45	503.71±41.20	433.31±54.34
<b>P</b> (mg/day)	891.90±60.49	954.33±54.43	838.17±78.92
<b>Fe</b> (mg/day)	13.17±1.03	13.95±0.79	11.73±0.86
<b>Vit. B<sub>1</sub></b> (mg/day)	1.04±0.08	1.05±0.07	0.91±0.08
<b>Vit. B<sub>2</sub></b> (mg/day)	1.02±0.09	1.08±0.08	0.86±0.10
<b>Vit. B<sub>6</sub></b> (mg/day)	1.29±0.11	1.51±0.13	1.23±0.12
<b>Vit. C</b> (mg/day)	104.62±17.67	114.82±9.16	80.18±10.20
<b>folate</b> (µg/day)	490.99±33.26	549.31±32.81	452.62±30.11
<b>Vit. E</b> (mg/day)	12.19±1.32	14.33±1.58	12.19±1.21
<b>Cholesterol</b> (mg/day)	280.99±47.28	245.22±39.88	240.95±45.18

Values are the mean±S.E. **Placebo:** Starch, **ME:** Mate extract (0.426g/day), **PT:** High-pterocarpan fraction (2g/day).

**Table 4. Nutrients intake in overweight subjects by 24h dietary recall after the trial**

Nutrients	Placebo	ME	PT
<b>Energy</b> (kcal/day)	1297.79±76.25	1316.48±93.63	1349.91±75.42
<b>Protein</b> (g/day)	50.96±2.99	54.10±4.54	50.22±3.61
<b>fat</b> (g/day)	29.50±2.40	31.16±4.06	33.52±2.60
<b>carbohydrate</b> (g/day)	208.93±13.77	206.97±13.20	210.98±12.85
<b>Fiber</b> (g/day)	15.40±1.18	16.62±2.01	17.32±1.46
<b>Ca</b> (mg/day)	364.25±31.45	436.30±66.67	334.39±40.85
<b>P</b> (mg/day)	775.23±44.97	884.76±80.92	780.92±66.54
<b>Fe</b> (mg/day)	12.39±1.22	12.10±1.07	11.57±0.96
<b>Vit. B<sub>1</sub></b> (mg/day)	0.93±0.06	0.86±0.09	0.08±0.06
<b>Vit. B<sub>2</sub></b> (mg/day)	0.92±0.08	1.10±0.65	0.80±0.06
<b>Vit. B<sub>6</sub></b> (mg/day)	1.14±0.07	1.34±0.14	1.21±0.10
<b>Vit. C</b> (mg/day)	89.26±11.38	86.72±12.95	86.23±9.96
<b>folate</b> (µg/day)	421.08±51.49	389.01±36.55	425.81±40.71
<b>Vit. E</b> (mg/day)	10.51±0.95	10.72±1.19	11.17±1.15
<b>Cholesterol</b> (mg/day)	246.34±33.06	288.44±39.69	237.70±33.33

Values are the mean±S.E. **Placebo:** Starch, **ME:** Mate extract (0.426g/day), **PT:** High-pterocarpan fraction (2g/day)

### (3) 시험 물질 복용 전·후 신체계측 및 체지방 변화

12 주간의 시험 전·후 대상자들의 체중, 체질량지수 (body mass index, BMI), 체지방률 (Body fat percentage, BFP), 내장지방면적 (Visceral fat area, VFA), 허리 둘레, 엉덩이 둘레, 허리/엉덩이 둘레비 (waist-hip ratio, WHR) 및 혈압 측정결과는 Table 5와 같다. 시험 물질 복용 전 후 신체계측 및 체지방 변화는 군간 및 군내 비교 시 유의적 차이가 없었다. 그러나 마테추출물 보충군에서 최고혈압이 군간 및 시험 전·후 모두 유의적으로 변화하였다 (P = 0.017). 또한 테로카판 강화소재군에서 내장지방 면적이 감소하는 경향이 관찰되었다. 특히, 체지방률의 전 후 변화율 비교 결과 테로카판 강화소재군에서 대조군에 비해 유의적으로 감소하였다 (Fig. 2).

Table 5. Effect of mate extract and high-pterocarpan fraction supplementation on changes of BMI, BFP, VFA, WHR-related body measurements and blood pressure in subjects with metabolic syndrome

		Placebo	ME	PT	p-value* (ANOVA)
Body weight (kg)	Before	67.79±1.50	66.19±2.19	66.09±2.08	0.780
	After	67.25±1.56	65.45±2.21	64.80±2.23	0.668
	p-value**	0.806	0.813	0.676	
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	Before	25.97±0.39	25.43±0.45	25.51±0.40	0.599
	After	25.65±0.38	25.11±0.48	25.15±0.44	0.605
	p-value**	0.563	0.632	0.544	
BFP (%)	Before	32.08±0.95	30.80±0.80	32.41±0.72	0.359
	After	31.14±0.87	29.16±0.97	31.04±0.77	0.205
	p-value**	0.472	0.201	0.200	
VFA (cm <sup>2</sup> )	Before	98.25±6.51	93.32±6.08	94.75±5.19	0.834
	After	91.96±5.47	83.50±5.79	84.83±5.30	0.505
	p-value**	0.463	0.249	<b>0.186</b>	
Waist (cm)	Before	85.64±1.12	84.72±1.60	84.19±1.29	0.735
	After	88.46±1.22	85.54±1.74	86.06±1.11	0.276
	p-value**	0.095	0.728	0.276	
Hip (cm)	Before	98.48±1.09	99.04±1.12	98.73±0.85	0.928
	After	100.90±0.91	100.59±0.98	100.44±1.02	0.942
	p-value**	0.096	0.307	0.206	
WHR	Before	0.87±0.01	0.86±0.01	0.85±0.01	0.440
	After	0.88±0.01	0.85±0.01	0.85±0.01	0.147
	p-value**	0.668	0.807	0.932	
Systolic BP (mmHg)	Before	136.45±2.77	129.14±2.90	131.68±3.12	0.210
	After	<b>128.77±2.38<sup>b</sup></b>	<b>119.27±2.58<sup>a</sup></b>	<b>126.00±3.37<sup>ab</sup></b>	<b>0.056</b>
	p-value**	0.147	<b>0.017</b>	0.336	
Diastolic BP (mmHg)	Before	81.24±1.83	76.70±2.60	76.54±2.73	0.289
	After	77.12±2.05	70.57±2.31	72.13±2.62	0.121
	p-value**	0.203	0.085	0.250	

Values are the mean±S.E. **Placebo**: Starch, **ME**: Mate extract (0.426g/day), **PT**: High-pterocarpan fraction (2g/day), **BFP**: Body fat percentage, **VFA**: Visceral fat area, **WHR**: Waist-hip ratio

\*ANOVA among 3 groups, \*\*t-test between before and after trial in each group.

<sup>ab</sup>Means not sharing common letters that are significantly different between groups at p<0.05.

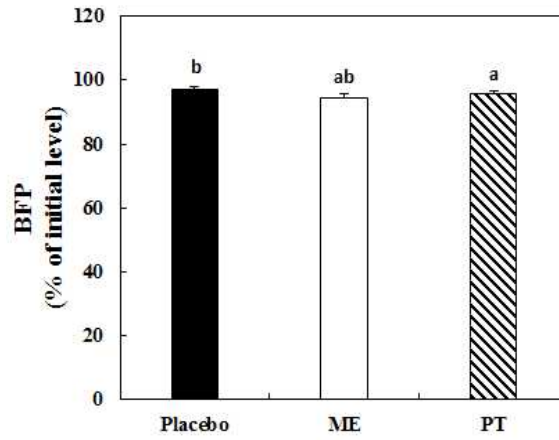


Fig. 2. Effect of mate extract and high-pterocarpan fraction supplementation on body fat percentage with adjusted base line in subjects with metabolic syndrome. Values are the mean $\pm$ S.E. <sup>ab</sup>Means not sharing common letters that are significantly different between groups at  $p < 0.05$ .

**Placebo:** Starch, **ME:** Mate extract (0.426g/day), **PT:** High-pterocarpan fraction (2g/day), **BFP:** Body fat percentage

#### (4) 시험 물질 복용 전·후 혈중 지질 농도 변화

시험물질 복용 12주 후 혈장 중성지방, 유리지방산, 총콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, non HDL-콜레스테롤, LDL, 인지질 (phospholipid, PL) 측정 결과는 다음 Table 6과 같다. 시험 물질 복용 12주 후 혈장 유리지방산 농도는 대조군에 비해 마테추출물군과 테로카판 강화소재군 모두에서 유의적으로 감소하였다. 혈장 총콜레스테롤 농도는 마테추출물군에서 시험 전에 비해 유의적으로 감소하였으며 (P = 0.017), 테로카판 강화소재군에서는 감소 경향이 관찰되었다. 혈장 중성지방, HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤 및 인지질 농도는 군간 및 군내 전후 비교 모두에서 유의적 차이가 관찰되지 않았다. 그러나, 혈장 중성지방, 총콜레스테롤, 유리지방산, HDL-콜레스테롤, nonHDL-콜레스테롤 및 LDL-콜레스테롤 농도를 시험물질 복용전에 대한 시험물질 복용 후의 변화율로 비교한 결과 (Fig. 3), 테로카판 강화소재군의 혈장 총콜레스테롤, 유리지방산, nonHDL-콜레스테롤 농도 변화율이 대조군에 비해 유의적으로 낮은 반면 HDL-콜레스테롤 변화율은 유의적으로 높았다.

Table 6. Effect of supplementation of mate extract and high-pterocarpan fraction for 12 weeks on changes in plasma lipids concentrations in subjects with metabolic syndrome

		Placebo	ME	PT	p-value* (ANOVA)
Triglyceride (mg/dL)	Before	187.19±	211.82±25.85	176.41±11.54	0.423
	After	178.91±14.99	165.82±9.70	161.79±13.13	0.615
	p-value**	0.722	0.108	0.408	
Free fatty acid (mmol/L)	Before	2.25±0.08	2.39±0.09	2.42±0.15	0.523
	After	<b>1.98±0.07<sup>b</sup></b>	<b>1.45±0.07<sup>a</sup></b>	<b>1.60±0.13<sup>a</sup></b>	<b>0.001</b>
	p-value**	<b>0.015</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	
Total cholesterol (mg/dL)	Before	165.54±6.75	179.79±6.89	173.00±5.04	0.281
	After	165.14±6.43	157.05±6.05	155.19±7.80	0.540
	p-value**	0.966	<b>0.017</b>	0.063	
HDL-cholesterol (mg/dL)	Before	38.54±2.87	34.83±2.40	32.90±2.27	0.283
	After	26.34±2.19	33.99±2.06	36.38±2.42	0.687
	p-value**	0.546	0.791	0.342	
non HDL-cholesterol (mg/dL)	Before	128.11±7.70	143.63±7.21	130.28±10.74	0.389
	After	132.68±7.44	124.68±6.74	108.76±11.36	0.155
	p-value**	0.672	0.062	0.177	
LDL-cholesterol (mg/dL)	Before	91.77±6.92	104.38±6.64	107.24±5.10	0.185
	After	92.89±6.68	87.90±5.62	92.64±7.80	0.847
	p-value**	0.908	0.067	0.217	
Phospholipid (mmol/L)	Before	2.02±0.06 <sup>b</sup>	1.99±0.06 <sup>a</sup>	1.82±0.04 <sup>a</sup>	0.026
	After	1.92±0.08	1.92±0.06	1.86±0.05	0.763
	p-value**	0.309	0.395	0.562	

Values are the mean±S.E. <sup>ab</sup>Means not sharing common letters that are significantly different between groups at p<0.05. **Placebo:** Starch, **ME:** Mate extract (0.426 g/day), **PT:** High-pterocarpan fraction (2 g/day), **HDL:** High density lipoprotein, **LDL:** Low density lipoprotein, \*ANOVA among 3 groups, \*\*t-test between before and after trial in each group.

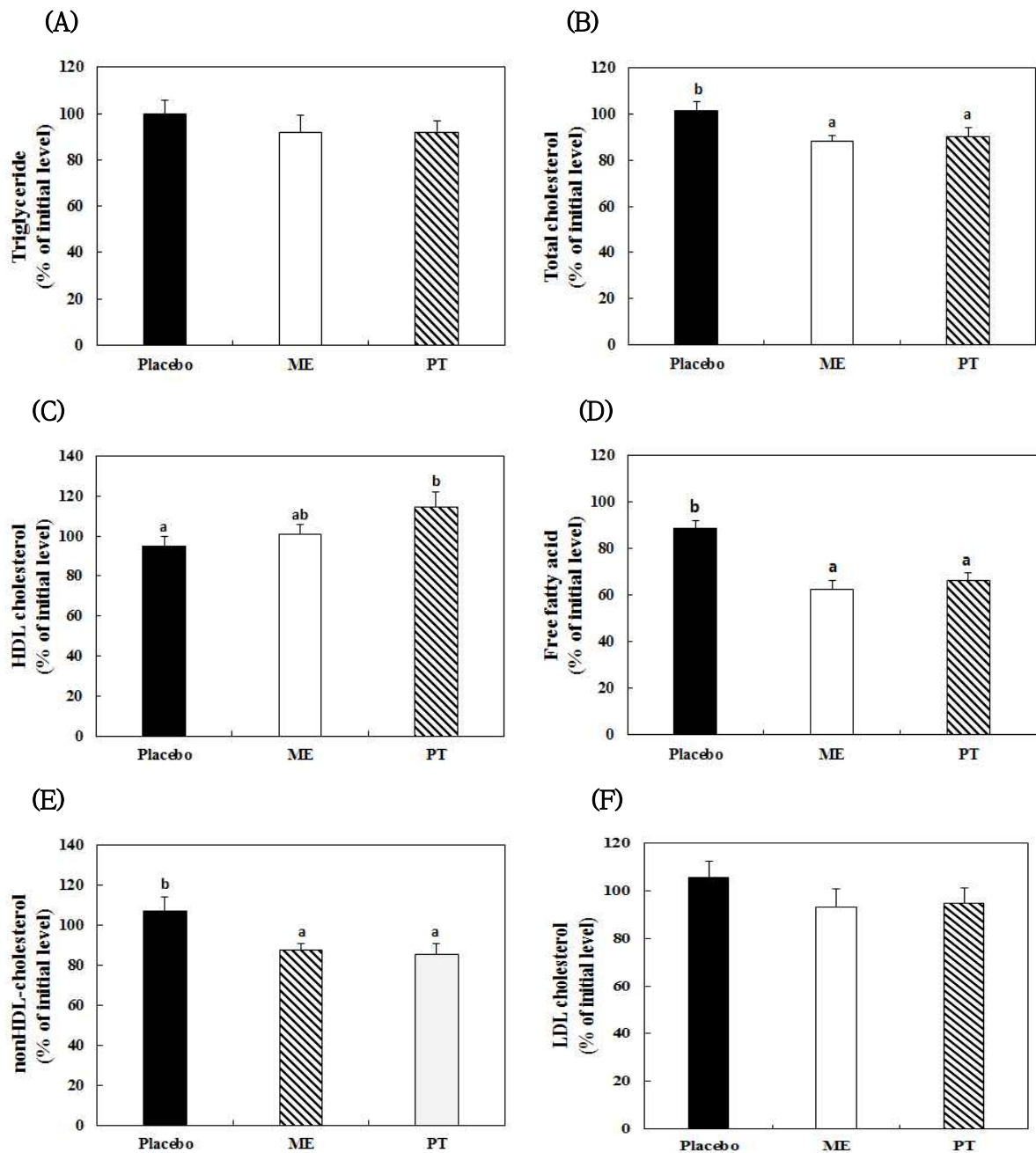


Fig. 3. Effect of mate extract and high-pterocarpin fraction supplementation on plasma lipid levels with adjusted baseline in subjects with metabolic syndrome. Values are the mean  $\pm$  S.E. <sup>ab</sup>Means not sharing common letters that are significantly different between groups at  $p < 0.05$ . Placebo: Starch, ME: Mate extract (0.426 g/day), PT: High-pterocarpin fraction (2 g/day), HDL: High-density lipoprotein, LDL: Low-density lipoprotein.



(5) 시험 물질 복용 전·후 Apo A1 농도 및 동맥경화지수(AI) 변화

12 주간 시험물질 복용 후 Apo A1 농도와 동맥경화지수 (atherogenic index, AI) 수치는 다음과 같다 (Table 7). Apo A1 농도는 대조군 대비 군간 비교 시 유의적인 감소가 나타나지 않았다. AI는 시험 물질 복용 전 대비 복용 후에 테로카판 강화소재 군에서 약 20% 감소하였으며 전·후 변화율 비교시 대조군에 비해 유의적으로 감소하였다 (Fig. 4).

Table 7. Effect of supplementation of mate extract and high-pterocarpan fraction for 12 weeks on changes of apolipoprotein A1 and atherogenic index in subjects with metabolic syndrome

		Placebo	ME	PT	p-value* (ANOVA)
Apo A1 (mg/dL)	Before	161.48±3.82	157.43±4.52	160.60±4.36	0.775
	After	161.63±3.38	160.60±4.55	160.81±4.95	0.984
	p-value**	0.977	0.623	0.975	
AI	Before	3.77±0.38	4.51±0.45	4.59±0.36	0.271
	After	3.81±0.30	4.04±0.38	3.81±0.39	0.872
	p-value**	0.931	0.250	0.146	

Values are the mean±S.E. **Placebo:** Starch, **ME:** Mate extract (0.42 6g/day), **PT:** High-pterocarpan fraction (2 g/day), **Apo A1:** Apolipoprotein A1, **AI:** Atherogenic index,

\*ANOVA among 3 groups, \*\*t-test between before and after trial in each group.

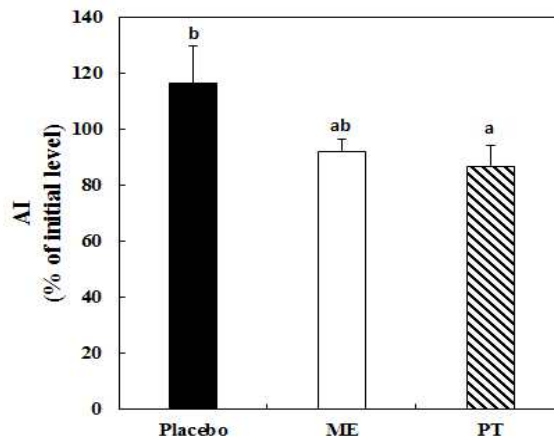


Fig. 4. Effect of mate extract and high-pterocarpan fraction supplementation on atherogenic index with adjusted baseline in subjects with metabolic syndrome. Values are the mean±S.E. <sup>ab</sup>Means not sharing common letters that are significantly different between groups at p < 0.05.

**Placebo:** Starch, **ME:** Mate extract (0.426 g/day), **PT:** High-pterocarpan fraction (2 g/day), **AI:** Atherogenic index.

(6) 시험 물질 복용 전·후 염증관련 혈중 cytokine 농도 변화

시험 전·후 지방세포 분비 염증성 cytokine인 MCP-1, IL-6 및 TNF- $\alpha$ 의 농도 변화는 Table 8과 같다. 혈장 TNF- $\alpha$  농도가 시험 물질 복용 전 대비 복용 후에 테로카판 강화소재에서 유의적으로 감소하는 것으로 나타났다 ( $p = 0.000$ ). 한편 혈장 MCP-1 및 IL-6 농도는 군간 및 군내 비교에서 유의적인 차이가 관찰되지 않았다. 시험 전·후 변화율 비교결과에서도 혈장 MCP-1과 IL-6의 농도는 군간 유의적인 차이가 없었으나 혈장 TNF- $\alpha$  농도는 테로카판 강화소재군에서 대조군에 비해 유의적으로 감소하였다 (Fig. 5).

Table 8. Effect of supplementation of mate extract and high-pterocarpan fraction for 12 weeks on changes of MCP-1, IL-6 and TNF- $\alpha$  in subjects with metabolic syndrome

		Placebo	ME	PT	p-value* (ANOVA)
MCP-1 (pg/mL)	Before	124.47±13.66	131.58±9.52	141.13±10.00	0.577
	After	131.52±11.20	121.23±14.59	126.72±9.41	0.828
	p-value**	0.692	0.557	0.300	
IL-6 (pg/mL)	Before	6.14±0.13	6.43±0.22	6.51±0.38	0.566
	After	5.80±0.11	5.94±0.15	5.96±0.21	0.737
	p-value**	0.061	0.072	0.209	
TNF- $\alpha$ (pg/mL)	Before	18.66±0.37	19.04±0.73	19.88±0.38	0.224
	After	16.62±0.31 <sup>ab</sup>	17.53±0.93 <sup>b</sup>	15.74±0.33 <sup>a</sup>	0.100
	p-value**	0.000	0.206	0.000	

Values are the mean±S.E. <sup>ab</sup>Means not sharing common letters that are significantly different between groups at  $p < 0.05$ . **Placebo:** Starch, **ME:** Mate extract (0.426 g/day), **PT:** High-pterocarpan fraction (2 g/day), **MCP1:** Monocyte chemotactic protein 1, **IL-6:** Interleukin-6, **TNF- $\alpha$ :** Tumor necrosis factor- $\alpha$ , \*ANOVA among 3 groups, \*\*t-test between before and after trial in each group.

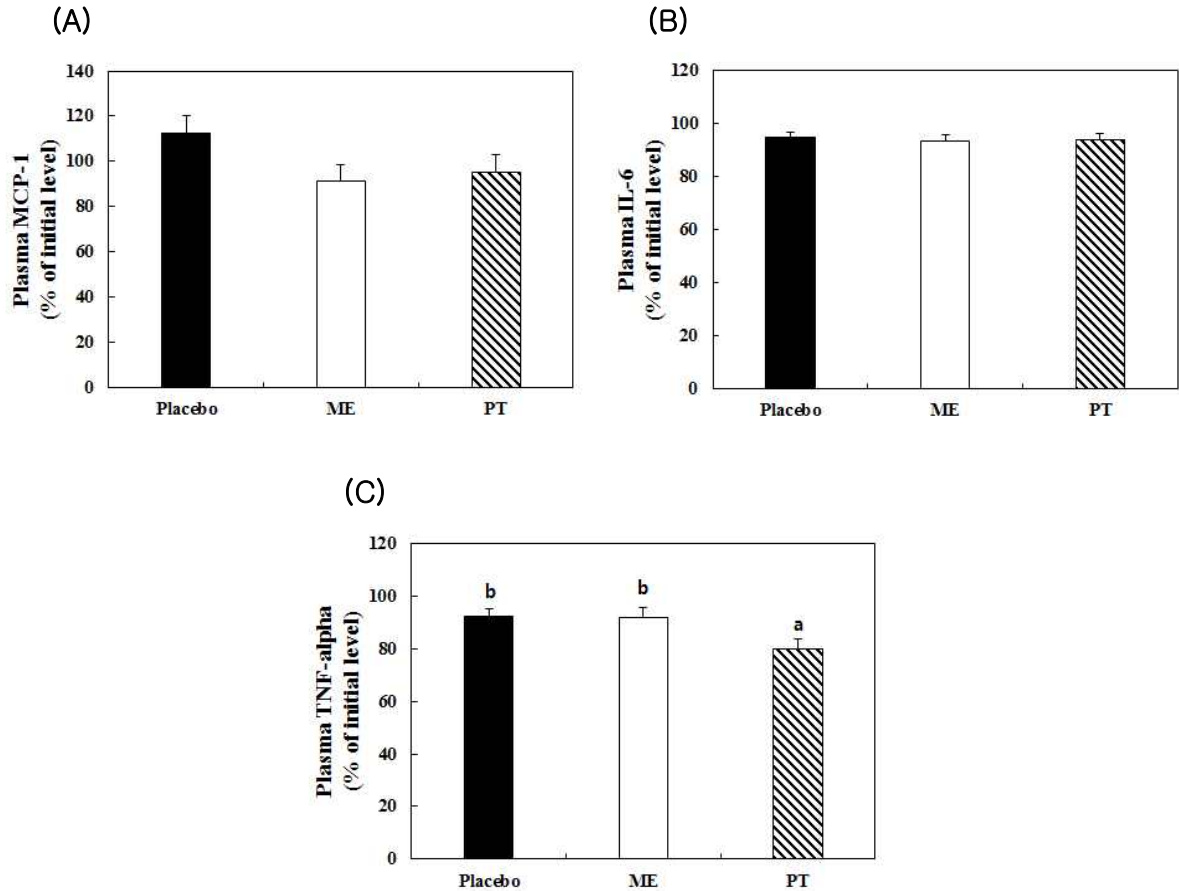


Fig. 5. Effect of mate extract and high-pterocarpan fraction supplementation on plasma cytokine levels with adjusted baseline in subjects with metabolic syndrome. Values are the mean±S.E. <sup>ab</sup>Means not sharing common letters that are significantly different between groups at  $p < 0.05$ .

Placebo: Starch, ME: Mate extract (0.426 g/day), PT: High-pterocarpan fraction (2 g/day), MCP-1: Monocyte chemotactic protein 1, IL-6: Interleukin-6, TNF- $\alpha$ : Tumor necrosis factor- $\alpha$ .

### (7) 시험 물질 복용 전·후 혈중 당뇨 관련 지표 변화

12 주간의 시험 전·후 공복혈당, 당화혈색소 (HbA1c), 혈장 포도당, 인슐린, 글루카곤, ghrelin, GIP, PAI-1 농도 및 HOMA-IR 수치를 비교한 결과는 Table 9에 제시된 바와 같다. 시험물질 복용 전에 비해 복용 후, 테로카판 강화 소재군은 혈장 포도당 및 ghrelin 농도를 유의적으로 감소시켰으며 ( $P = 0.005$ ,  $P = 0.000$ ), 마테추출물군은 공복혈당, HOMA-IR 및 혈장 GIP 농도를 유의적으로 감소시켰다 ( $P = 0.034$ ,  $P = 0.000$ ,  $P = 0.037$ ). 대조군은 혈중 glucagon 농도를 시험물질 복용 전에 비해 후에 유의적으로 증가시키는 반면 혈중 ghrelin 농도를 감소시켰는데, 이는 대조군이 추가로 섭취한 전분섭취 증가에 기인하는 것으로 추정된다. 한편 ANOVA를 이용한 시험물질 복용 후 군간 비교에서, 혈장 포도당 농도가 대조군에 비해 테로카판 강화소재군과 마테추출물군 모두에서 유의적으로 감소하였다 ( $P = 0.038$ ). 또한 시험 전·후 변화율 비교시 테로카판 강화소재군에서 당화혈색소, 혈장 포도당 농도, PAI-1 농도, HOMA-IR 이 대조군에 비해 유의적으로 감소하였다 (Fig. 6).

Table 9. Effect of supplementation of mate extract and high-pterocarpan fraction for 12 weeks on changes of fasting blood glucose, HbA<sub>1c</sub>, plasma glucose concentrations and HOMA-IR in subjects with metabolic syndrome

		Placebo	ME	PT	p-value* (ANOVA)
FBG (mg/dL)	Before	104.61±3.77	103.90±2.45	107.76±4.62	0.745
	After	103.83±3.54	96.07±2.59	99.14±3.19	0.219
	p-value**	0.880	<b>0.034</b>	0.133	
HbA <sub>1c</sub> (%)	Before	5.56±0.10	5.60±0.12	5.60±0.09	0.945
	After	5.69±0.11	5.43±0.09	5.44±0.10	0.130
	p-value**	0.400	0.302	0.201	
Plasma glucose (mmol/L)	Before	98.55±3.12	94.57±1.87	101.65±2.95	0.204
	After	<b>100.19±4.10<sup>b</sup></b>	<b>90.52±2.27<sup>a</sup></b>	<b>89.79±2.65<sup>a</sup></b>	<b>0.038</b>
	p-value**	<b>0.721</b>	<b>0.176</b>	<b>0.005</b>	
Insulin (unit)	Before	8.28±1.33	8.94±0.82	8.14±1.03	0.862
	After	8.12±1.60	6.77±0.83	6.58±0.72	0.583
	p-value**	0.938	0.074	0.225	
Glucagon (pg/mL)	Before	504.94±21.48	532.90±19.35	559.25±23.12	0.206
	After	604.89±35.27	535.26±21.98	605.08±24.22	0.140
	p-value**	<b>0.021</b>	0.936	0.180	
HOMA-IR	Before	1.99±0.34	2.05±0.20	2.10±0.28	0.955
	After	1.88±0.35	1.41±0.21	1.46±0.18	0.370
	p-value**	0.836	<b>0.000</b>	0.062	
Ghrelin (pg/mL)	Before	658.47±24.82	615.04±47.97	666.79±22.62	0.501
	After	585.70±24.61	608.75±31.86	555.89±15.34	0.332
	p-value**	<b>0.043</b>	0.914	<b>0.000</b>	
GIP (pg/mL)	Before	330.47±42.13	357.71±39.30	366.77±30.37	0.777
	After	324.61±48.11	259.19±23.07	288.11±25.41	0.396
	p-value**	0.928	<b>0.037</b>	0.054	
PAI-1 (ng/mL)	Before	9.22±0.47	10.78±1.63	11.95±1.01	0.155
	After	10.28±1.18	8.76±1.26	10.18±1.11	0.632
	p-value**	0.410	0.336	0.246	

Values are the mean±S.E. <sup>ab</sup>Means not sharing common letters that are significantly different between groups at p<0.05.

**Placebo:** Starch, **ME:** Mate extract (0.426 g/day), **PT:** High-pterocarpan fraction (2 g/day), **FBG:** Fasting blood glucose, **HbA<sub>1c</sub>:** Hemoglobin A<sub>1c</sub> **HOMA-IR:** Homeostasis model assessment of insulin resistance **GIP:** Gastric inhibitory polypeptide, **PAI-1:** Plasminogen activator inhibitor-1,

\*ANOVA among 3 groups, \*\*t-test between before and after trial in each group.

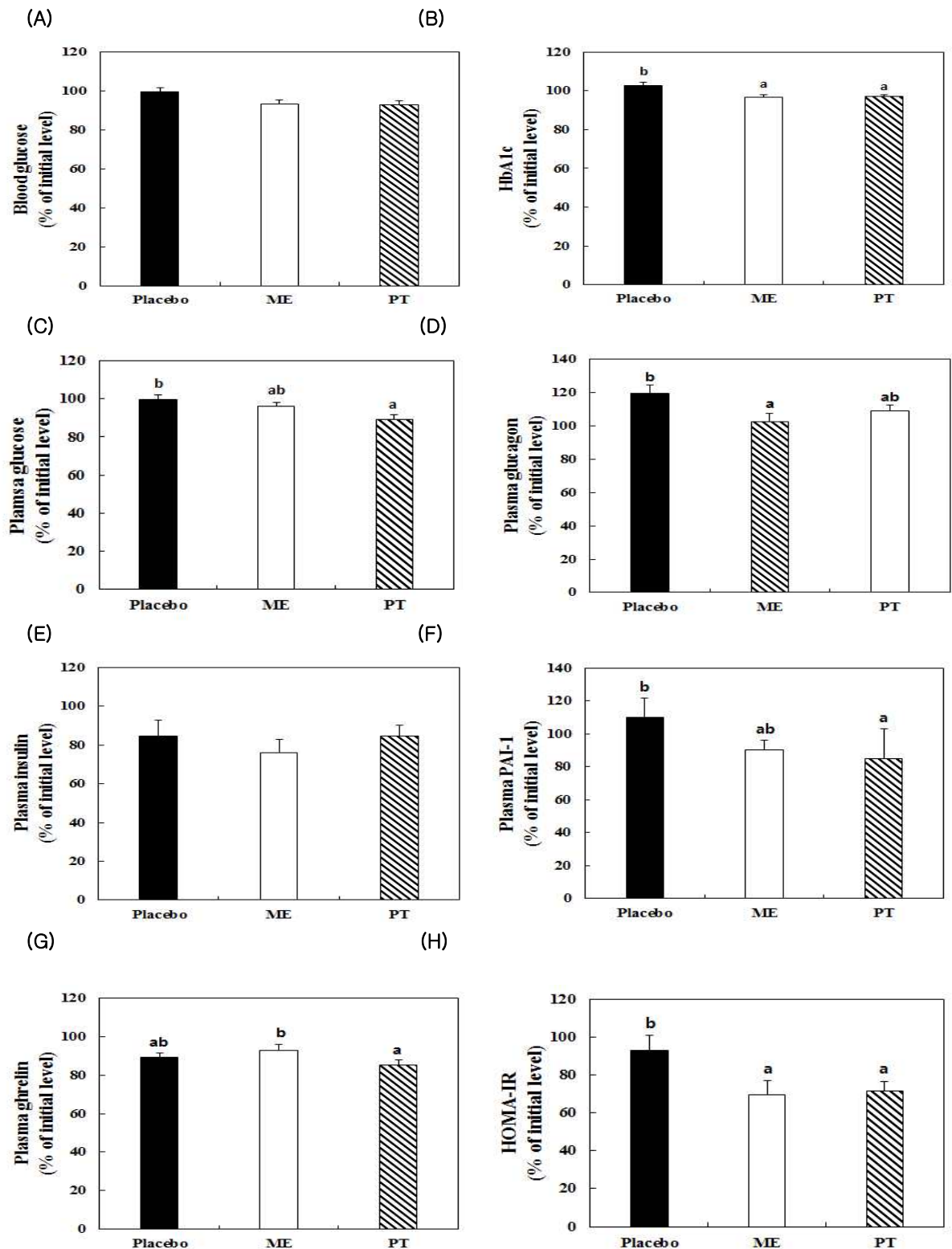


Fig. 6. Effect of mate extract and high-pterocarpan fraction supplementation on fasting blood glucose, HbA<sub>1c</sub>, plasma glucose concentrations and HOMA-IR with adjusted baseline in subjects with metabolic syndrome. Values are the mean±S.E. <sup>ab</sup>Means not sharing common letters that are significantly different between groups at p<0.05. **Placebo**: Starch, **ME**: Mate extract (0.426 g/day), **PT**: High-pterocarpan fraction (2 /day).

(8) 시험물질 복용 전·후 지방세포분비 호르몬 수준 변화

지방세포에서 분비되는 호르몬인 leptin, resistin 및 adiponectin의 혈중 수준은 모든 실험군에서 실험 전과 실험 후의 차이가 없었으며 실험군간 차이도 나타나지 않았다 (Table 10). 또한 군 간 전·후 변화 비교에서도 유의적인 차이는 관찰되지 않았다 (Fig. 7).

Table 10. Effect of supplementation of mate extract and high-pterocarpan fraction for 12 weeks on changes of plasma adipokine levels in subjects with metabolic syndrome

		Placebo	ME	PT	p-value* (ANOVA)
Leptin (pg/mL)	Before	13.39±1.66	12.82±1.85	13.79±1.55	0.926
	After	14.16±1.69	12.59±1.98	13.40±1.39	0.806
	p-value**	0.747	0.932	0.852	
Resistin (pg/mL)	Before	4.71±0.55	4.39±0.54	4.04±0.29	0.622
	After	5.89±0.86	4.95±0.68	4.53±0.38	0.371
	p-value**	0.251	0.522	0.314	
Adiponectin (ng/mL)	Before	73.10±10.55	67.74±11.39	75.63±8.29	0.853
	After	65.92±7.58	74.67±13.15	71.06±8.47	0.830
	p-value**	0.584	0.693	0.702	

Values are the mean±S.E. **Placebo:** Starch, **ME:** Mate extract (0.426g/day), **PT:** High-pterocarpan fraction (2g/day), \*ANOVA among 3 groups, \*\*t-test between before and after trial in each group.

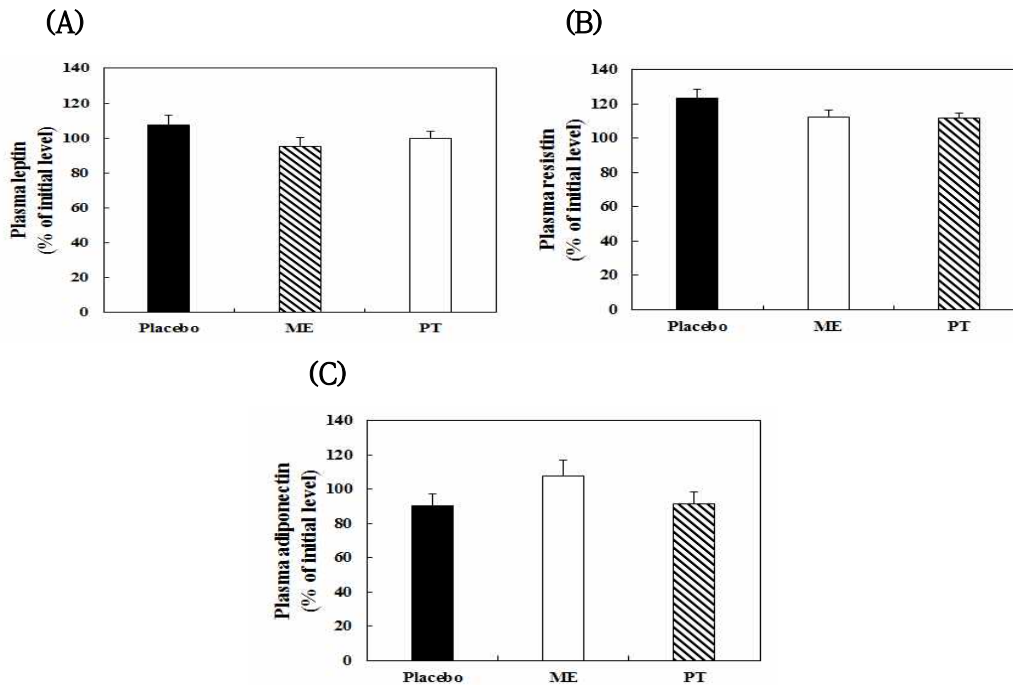


Fig. 7. Effect of mate extract and high-pterocarpan fraction supplementation on plasma adipokine levels with adjusted baseline in subjects with metabolic syndrome. Values are the mean±S.E. **Placebo:** Starch, **ME:** Mate extract (0.426 g/day), **PT:** High-pterocarpan fraction (2 g/day).

(9) 시험 물질 복용 전·후 간 및 신장 기능 관련 지표 변화

시험 물질 복용 전·후와 실험물질간의 간독성 지표인 혈장 GOT와 GPT 수준 비교 시, 테로카판 강화물질과 마테추출물은 혈중 GOT와 GPT 농도에 유의적인 영향을 미치지 않았다. 신장 기능 관련 지표인 albumin 및 BUN 수준 분석 시, 군간의 유의적인 차이는 관찰되지 않았다 (Table 11).

Table 11. Effect of supplementation of mate extract and high-pterocarpan fraction for 12 weeks on changes of plasma GOT, GPT, albumin and BUN levels in subjects with metabolic syndrome

		Placebo	ME	PT	p-value* (ANOVA)
GOT (Karman/mL)	Before	10.03±1.33	12.64±1.57	9.79±1.05	0.251
	After	10.86±1.63	9.63±0.88	8.79±0.74	0.438
	p-value**	0.693	0.101	0.444	
GPT (Karman/mL)	Before	11.24±0.56	11.83±0.87	10.49±0.52	0.378
	After	11.34±0.69	10.37±0.44	10.13±0.46	0.251
	p-value**	0.905	0.146	0.605	
Albumin (g/dL)	Before	4.88±0.06	4.82±0.07	4.68±0.07	0.120
	After	4.11±0.06	4.18±0.07	4.13±0.06	0.718
	p-value**	0.000	0.000	0.000	
BUN (mg/dL)	Before	13.13±0.59	12.75±0.57	13.21±0.67	0.859
	After	12.97±0.83	13.16±0.63	13.37±0.73	0.927
	p-value**	0.874	0.625	0.866	

Values are the mean±S.E. **Placebo:** Starch, **ME:** Mate extract (0.426g/day), **PT:** High-pterocarpan fraction (2g/day), **GOT:** Glutamic oxaloactic transaminase, **GPT:** Glutamic pyruvic transaminase, **BUN:** Blood urine nitrogen. \*ANOVA among 3 groups, \*\*t-test between before and after trial in each group.

(10) 시험 물질 복용 전·후 항산화 효소 활성화도 및 TBARS 변화

시험 물질 복용 전·후 적혈구 항산화 효소 활성화도 및 지질과산화물 (TBARS) 함량 비교는 Table 12에 제시하였다. 시험 물질 복용 전 대비 복용 후, 적혈구 CAT, GR 및 SOD 활성화도는 대조군에서 유의적으로 감소하였다. 마테추출물 및 테로카판 강화소재 복용 후 적혈구 CAT, GR, SOD 활성화도 및 TBARS는 대조군에 비해 유의적인 변화는 관찰되지 않았다.

Table 12. Effect of supplementation of mate extract and high-pterocarpan fraction for 12 on changes of erythrocyte antioxidant activities and TBARS in subjects with metabolic syndrome

		Placebo	ME	PT	p-value* (ANOVA)
CAT (umol/min/mg Hb)	Before	5.22±0.21	5.99±0.73	5.27±0.14	0.389
	After	4.39±0.21	4.81±0.21	4.84±0.20	0.223
	p-value**	<b>0.007</b>	0.129	0.082	
GR (nmol/min/mg Hb)	Before	22.22±2.99	18.31±2.64	18.16±1.95	0.440
	After	13.97±1.28	15.75±2.49	15.64±2.12	0.820
	p-value**	<b>0.031</b>	0.484	0.387	
SOD (Unit/mgHb)	Before	10.52±0.46	9.60±0.29	8.68±0.26	0.066
	After	<b>8.00±0.37<sup>a</sup></b>	<b>9.04±0.26<sup>b</sup></b>	<b>8.41±0.36<sup>ab</sup></b>	<b>0.048</b>
	p-value**	<b>0.001</b>	0.159	0.327	
TBARS (nmol/mgHb)	Before	15.95±0.39	15.53±0.95	16.86±0.42	0.377
	After	15.58±0.35	16.21±0.40	16.65±0.34	0.136
	p-value**	0.490	0.511	0.710	

Values are the mean±S.E. <sup>ab</sup>Means not sharing common letters that are significantly different between groups at p<0.05. **Placebo:** Starch, **ME:** Mate extract (0.426g/day), **PT:** High-pterocarpan fraction (2g/day), **CAT:** Catalase, **GR:** Glutathion reductase, **SOD:** Superoxide dismutase,

\*ANOVA among 3 groups, \*\*t-test between before and after trial in each group.



## 최종 요약 및 결론 (제2협동)

- 본 연구과제에서 테로카판 강화 소재 (콩잎추출물)를 선정할 근거는, 제1세부의 동물실험 결과에서 이 소재가 항당뇨 및 항비만에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 검증되어 이에 대한 인체유효성을 평가하고자 인체 시험을 실시하였다.
- 인체시험은 경미한 고혈당 및 이상지질혈증을 동반하는 과체중 또는 비만인 72명을 대상으로 진행되었고, 12 주간의 시험물질 복용 후 혈당과 혈중 지질 개선 및 항비만 등의 대사증후군 효능 평가를 위한 바이오마커를 측정할 후 결과분석을 실시하였다.
- 신체계측 및 체지방 측정 결과, 시험 전 대비 시험 후의 체지방 변화율이 테로카판 강화소재 보충군에서 유의적으로 감소하였으며 마테추출물 보충군에서는 감소 경향이 나타났다.
- 혈장 지질농도 분석 결과에서 테로카판 강화소재 및 마테추출물 보충군의 혈장 유리지방산 농도가 시험 전·후 비교 및 군간 비교에서 유의적으로 감소하였다. 또한 시험물질 복용전의 혈장 총콜레스테롤, 유리지방산, nonHDL-콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 농도를 100으로 정하여 시험물질 복용 후의 혈장 총콜레스테롤, 유리지방산, nonHDL-콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 농도를 각각 계산하였을 때, 테로카판 강화소재는 시험물질 보충 전에 대한 보충 후의 혈장 총콜레스테롤, 유리지방산, nonHDL-콜레스테롤 농도 변화율을 유의적으로 감소시켰으며 HDL-콜레스테롤 농도 변화율을 유의적으로 증가시켰다.
- 동맥경화지수인 AI의 변화율이 테로카판 강화소재 보충에 의해 현저히 감소하였다. 그리고 마테추출물군에서 시험물질 보충 전에 대한 보충 후의 혈장 총콜레스테롤, 유리지방산, nonHDL-콜레스테롤 농도 변화율을 유의적으로 감소시켰다. 따라서 양성대조물질인 마테추출물과 테로카판 강화소재의 지질 대사 개선에 미치는 영향이 유사하였다.
- 12 주간의 테로카판 강화소재 보충은 시험물질 보충 전에 비해 염증 관련 cytokine인 TNF- $\alpha$ 의 혈중 농도를 유의적으로 감소시켰다.
- 복용 전 대비 복용 후, 혈중 당노 관련 지표 분석 결과에서는 혈장 포도당 농도 및 ghrelin 농도가 테로카판 보충에 의해 유의적으로 낮아졌다. 또한 시험 전·후 변화율 비교시에 테로카판 강화소재 보충군은 대조군에 비해 당화혈색소, 혈장 포도당, PAI-1 및 HOMA-IR 수치가 감소되어 개선효과를 보였다.
- 따라서, 본 인체시험 결과를 종합해 볼 때 테로카판 강화소재는 대사증후군 개선에 유효한 소재임이 입증되었으며 신기능성 식품소재로 개발가능성이 크다고 판단된다.

# 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

## 제 1 절 연구목표의 달성도

### 1. 1차년도

세부연구목표	가중치	평가의 착안점 및 기준	달성도	내용
기능성 소재의 체지방 및 혈당 개선 기능성 도출	20%	수확 시기별 콩잎 테로카판 강화 소재(PTH)에 대한 in vitro 및 세포계에서의 항비만, 항당뇨 활성검색 여부	100	- 콩잎추출물(70ESL, 95ESL, EASL)의 <i>in vitro</i> 항비만, 항당뇨, 항산화 활성 및 세포계에서 인슐린 분비능, 지방축적 억제, 항염증 활성 측정 및 비교 - 테로카판계 화합물의 <i>in vitro</i> , 세포계 생리활성 측정
	15%	마우스모델에서 PTH의 지방 흡수저해, 내당능 및 insulin tolerance 측정 여부	100	- 콩잎추출물의 <i>in vivo</i> 지방 흡수 억제 효능 검증 - 콩잎추출물의 <i>in vivo</i> 인슐린 민감도 개선 효능 검증
	10%	수확시기에 따른 테로카판 화합물의 성분 및 함량 변화 조사 및 PTH의 표준화를 위한 지표성분 선정 여부	100	- 콩잎추출물의 HPLC 분석 방법 확립 및 콩잎이 함유하는 물질의 UV spectra 분석을 통한 retention time (Rt) 확인 - 지역별/3품종(5시료) 수확 콩잎추출물(70ESL, 95ESL, EASL)의 HPLC profile 비교 및 지표물질 후보 4개 선정 - 콩잎추출물의 총 플라보노이드, 총 페놀 함량 측정 - B지역, GH품종이 PTH 우수소재로 선정
	5%	세포계에서 PTH의 세포독성 측정 여부	100	- 췌장 베타세포, 섬유아세포, 대식세포에서 콩잎추출물은 세포독성 나타나지 않았음 - 세포계 활성 측정을 위해 분획물 또는 단일화합물이 독성을 나타내지 않는 농도 설정
기능성 소재의 원료 확보 및 공정 표준화	12.5%	수확 시기별 콩잎 확보 및 유기용매를 이용한 테로카판 고함유 추출물 또는 분획물 제조 여부	100	- 충청남도 A, B 두 지역의 YS, GH, WD, GH1에 대한 콩잎의 재배 및 시기별 수확을 실행하여 품종별, 시기별 그리고 환경적인 특성을 고려한 수확 품종 및 시기에 대한 자료 확보
	25%	동물실험/인체시험/제품화를 위한 콩잎 대량 수확 여부	100	- 지역별 품종별 건조 콩잎의 생산은 A 지역과 B 지역의 재배를 통해 637.3 kg의 건조콩잎을 확보함. 확보된 콩잎에 대한 유효성분함량 등을 측정
	12.5%	콩잎으로부터 PTH 추출 방법의 표준화 연구 여부	100	- 주정 추출(95% EtOH), 건조(열풍건조), 농축 및 부형제 첨가(덱스트란, starch) 조건 확립 및 표준화를 이용한 추출방법 확립
	5%	혈당 개선용 건강기능 원료/신제품 모니터링 및 효능 기작 파악	100	- 체지방 개선, 당료 및 지질대사 개선 관련 기능성 식물 추출물에 대한 국내특허 등록 및 출원된 기능성물질 또는 기능성소재의 리스트 및 중점 사항을 조사하였으며 이를 이용한 제품화 실행

## 2. 2차년도

세부연구목표	가중치	평가의 착안점 및 기준	달성도	내용
동물실험을 통한 기능성 소재의 체지방 및 혈당 개선 기능성 검증	25%	질환모델동물을 이용한 테로카판 고함유 분획 (PTH)의 체지방 조절 및 혈당 강하 효능 검증 여부	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 두 PTH 시료 (95-ESL과 EASL)의 분석, 생리활성 측정 및 비교</li> <li>- 당뇨유발 동물모델에서 PTH의 체지방 감소 및 혈당 조절 효능검정 실험 및 분석</li> <li>- 콩잎 품종별 70-ESL 및 EASL의 HIT-T15 세포계 및 in vitro 활성 비교</li> <li>- PA로 유도된 HIT-T15 세포 및 3T3-L1 세포계에서 콩잎 추출물 및 단일물질에 의한 유전자/단백질 발현 변화</li> <li>- 95ESL과 EASL의 지방흡수 저해 및 내당능/인슐린내성 비교 측정</li> </ul>
	15%	PTH로부터 테로카판 화합물의 분리, 정제 및 구조 확인을 통해 지표물질 확보 여부	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 지표물질 선정 (coumesterol) 및 phaseol을 분리하여 생리활성 측정</li> <li>- Pheophobide a와 xanthophyll 유도체 분리 및 구조 결정</li> <li>- 특허출원/산업재산권 확보</li> </ul>
	10%	HPLC를 이용한 PTH의 지표성분 함량 분석 방법 확립 여부	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 표준추출물 제조 방법 설정 및 콩잎 추출물의 지표물질 함량 분석</li> <li>- 정량법에 대한 직선성, 검출한계, 정밀성 등 validation 방법 확립</li> <li>- 2012 시기별 수확 콩잎 추출물의 in vitro 생리 활성 측정 및 비교</li> </ul>
기능성 소재의 대량 생산공정 표준화 확립 및 안전성 검증	15%	인체시험 및 제품화를 위한 콩잎 대량 수확 여부	100	- 선행연구 및 2011년도 콩잎 수확 data를 바탕으로 선별된 품종(GH), 시기(110일령)를 바탕으로 대량 재배를 통한 수확을 실행함
	10%	콩잎으로부터 PTH 생산공정 표준화 확립 여부	100	- 단기, 장기 콩잎 발효를 통한 함량의 변화를 통해 물-유산균 발효에서 가장 높은 LDL-항산화 활성이 있음을 확인하였으며, 발효콩잎의 열수추출 후 침전물을 95% EtOH을 이용하여 추출하면, 농축된 활성성분을 얻을 수 있음을 확인함
	10%	HPLC를 이용한 PTH의 지표성분 (또는 유효성분) 함량 분석 및 validation 여부	100	- 대량생산 공정을 통해 함유하는 지표성분인 동시에 유효성분인 coumestrol의 함량을 분석하였으며 95% EtOH 추출이 EtOAc 추출에 비해 효율적임을 확인
	5%	시작품 제작 및 이를 이용한 물리·화학적 물성 분석	100	- 체지방 혈당 개선을 위해 시장에 출시되어 있는 원료성분을 바탕으로 파우더와 그레놀 타입의 제형 개발함
	10%	PTH의 안전성 시험 (GLP 기관에 의뢰) 여부	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 캡온(GLP 기관)을 통한 단회 경구투여 독성시험, 복귀돌연변이시험, 염색체이상시험을 통해 안전성 자료를 확보함</li> <li>- 무기농 재배 관련 잔류농약과 중금속 함량분석을 통해 함유되어 있지 않음을 확인함</li> </ul>

### 3. 3차년도

세부연구목표	가중치	평가의 착안점 및 기준	달성도	내용
기능성 소재의 체지방 및 혈당 개선 작용기작 규명 및 개별인정 신청을 위한 자료준비	20%	PTH의 체지방 조절 및 혈당 강하 효능에 대한 생화학적, 분자생물학적, 면역화학적 작용기작 규명 여부	100	- 작용점에 기초하여 간, 지방, 췌장 조직의 추가적인 유전자 및 단백질 발현 분석 - 췌장세포 (MIN6 세포와 HIT-T15 세포), 비만세포 (3T3-L1 cells), 염증성 대식세포 (RAW264.7 cells)에서의 작용점 관련 인자의 유전자 및 단백질 발현 분석을 통한 작용기작 입증
	20%	PTH의 개별인정 기능성 원료 신청을 위한 자료준비 여부	100	- 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
기능성 소재 이용의 체지방 및 혈당 개선 건강기능식품 시제품 개발	5%	기능성소재의 대량 생산공정 확립 및 임상시험을 위한 시제품 제작	100	- 콩잎의 재배품종(GH), 시기(110일령)와 건조(열풍), 추출, 농축, 건조 관련 공정 완성 - 인체실험을 위한 대조구(starch), 양성대조군(마테추출물), 실험군 (95% EtOH PTH) 시제품 제작하여 제2협동기관에 공급함
	10%	기능성소재 및 부재료와의 최적 배합 및 제형 설정 연구 및 품질관리 방법 확립 여부	100	- 체지방 조절과 혈당 강화를 위한 부재료(기능성 인증 원료) 혼합 실험을 통한 제형 확정 - 확정된 제형에 대한 영양성분 검사를 통한 기능성 확보
	15%	기능성소재를 이용한 체지방 및 혈당 조절 기능성 시제품 개발 여부	100	- PTH와 체지방 조절, 혈당 강하 원료를 혼합한 체지방조제식품 ‘슬림파워’의 제품화 개발을 완료하였.
기능성 소재의 체지방 및 혈당 조절 효능 검정을 위한 인체시험	6%	인체시험을 위한 IRB 구성 및 승인 여부	100	- 생명윤리위원회 심의 신청용 인체시험 실시 계획서를 작성하여 승인 획득함
	12%	인체시험 대상자 모집 및 설문지를 통한 기초자료 수집 및 복용기간 중 인체시험 대상자 모니터링 여부	100	- 체지방 및 혈당 개선 효능 평가를 위해 경미한 대사증후군을 동반하는 반건강인 72명을 임상피험자로 모집하였음. - 2013.12 ~ 2014.02 (3개월)동안 인체시험을 실시 완료하였음 - 2주마다 모니터링 실시하였음
	12%	당뇨 및 대사증후군 개선용 바이오마커 분석 여부	100	- 대사증후군 예방 및 개선 효능 평가를 위해 체중, 체지방, 체성분 및 혈압 변화 분석 - 관련 바이오마커를 측정하였으며 궁극적으로 소재의 유효성을 검증하였음

## 제 2 절 관련분야에의 기여도

- 본 연구를 통해 활용도가 낮았던 콩잎을 이용한 기능성 소재 개발을 통해 활용도를 높임으로써 농가 소득 증대를 꾀할 수 있는 계기를 마련하게 되었다. 또한 대부분 외국으로부터 수입해오고 있는 건강관련 식품소재의 국내자원과 기술을 이용한 기능성 원료개발을 통해 국내 기술력의 강화를 할 수 있는 계기를 마련하였다. 특히 나고야의정서 협약 이후 생물 자원에 대한 국제적인 대응이 필요한 시기에 국내 자원을 산업화하기 위한 방안으로 활용할 수 있을 것으로 판단된다.
- 콩 재배의 경우 다른 작물에 비교해 재배가 원활하며 배수가 잘되는 조건에서 척박한 지역에서도 재배가 용이하기에 농가에서 사용이 제한된 농토 재배를 통한 농가 수익을 확보할 수 있을 것으로 판단된다. 콩잎 재배 후 수확되는 콩은 무농약 재배 콩으로 농가 자체에서 이차 수익을 실현할 수 있을 것으로 판단된다.
- 본 연구 과제를 통해 확보된 산업적 대량생산 공정을 이용하여 효율적으로 원료물질을 선별하고 이를 사업화하는 일련의 과정을 통해 확보하였으며, 이를 통해 국내 생물자원의 산업화를 위한 방향을 제시해 줄 수 있다. 본 연구 과제를 통해 국내 자원 및 기술을 이용한 기능성 원료개발을 통해 국내 기술력의 세계화 및 외화 누출 방지에 기여할 수 있다.
- 본 연구 과제를 통해 안전한 원료물질의 대량생산, 품질관리 시스템의 확립과 원료물질에 대한 과학적 효능 분석을 통해 소비자에게 믿을 수 있는 원료물질 및 제품을 공급함으로써 원료 및 효능에 대한 불신이 많은 시장에서의 새로운 방향을 제시해 줄 수 있다.
- 콩잎에서 유래한 테로카판 강화소재의 체지방, 혈당 조절 및 대사증후군 개선 기능성을 동물모델 및 인체에서 확인함으로써 콩잎의 기능성을 제시하였으며, 향후 테로카판 화합물을 이용한 천연물신약 개발 가능성이 제시되었다.
- 식용 가능한 천연물로부터 도출된 테로카판 강화 소재의 대사증후군의 개선 기능성을 입증함으로써 대한민국 30대 이상 성인 10명 중 3명이 겪고 있는 대사증후군에 대한 해결책으로 활용될 경우 관련 질환의 발병률 감소에 기여할 수 있다.
- 국내 자원 및 기술을 이용한 기능성 원료개발을 통해 국내 기술력의 세계화에 기여하며, 대사증후군 개선 효능을 국제 저널에 게재함으로써 국내산 기능성 소재가 국제적으로 인정받을 가능성을 제시하였다.

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 제1절 연구개발 성과

#### 1. 연구개발 성과

(단위 : 건수)

구분		특허		논문		기타		
		출원	등록	SCI	비SCI	학회발표	연구성과활용 (전시회/제품설명 회를 통한 기술/제품 홍보)	수상실적
1차 년도	목표			1				
	달성	1	1	0		3		
2차 년도	목표	2		1	1			
	달성	2		3		1	5	2
3차 년도	목표	2		2		2		
	달성	1	1	3		7	2	
계	목표	4		4	1	2		
	달성	4	2	6		11	7	2

(단위 : 건수)

구분		기술실시 (이전)	상품화	상품화를 위한 기능성원료의 품목 신고 및 등록	인재양성	언론홍보
활용건수	목표	1	2	2		1
	달성	1	1	2	2	

가. 특허

등록된 특허				
등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2012 (6/15)	콩잎 추출물 또는 이의 분획물을 유효 성분으로 함유하는 비만, 고지혈증, 동맥경화, 지방간, 당뇨 또는 대사증후군의 예방 또는 치료용 조성물	한국생명공학 연구원 (정태숙, 이우송, 박기훈, 최명숙, 박호용, 한종민)	대한민국	10-1158856
2014 (6/27)	테로카판계 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 대사성 질환 또는 이들의 합병증의 예방 또는 치료용, 또는 항산화용 조성물	한국생명공학 연구원 (정태숙, 박기훈, 박호용)	대한민국	10-1415167

출원된 특허				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호
2012 (10/9)	페어포바이드계 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 대사성질환 또는 이들의 합병증의 예방 또는 치료용 조성물	한국생명공학 연구원 (정태숙, 박호용, 신동하)	대한민국	10-2012- 0111623
2013 (5/16)	테로카판계 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 대사성 질환 또는 이들의 합병증의 예방 또는 치료용, 또는 항산화용 조성물	한국생명공학 연구원 (정태숙, 박기훈, 박호용)	미국	13/895760
2013 (7/12)	크라이토싸이빈 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 당뇨, 인슐린 저항성 증후군 또는 이들의 합병증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물	한국생명공학 연구원 (정태숙, 유익동, 이상구, 김언희, 류인자, 윤정현)	대한민국	10-2013- 0082190
2014 (9/30)	코우메스탄계 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 대사성 질환 또는 이들의 합병증의 예방 또는 치료용, 또는 항산화용 조성물	한국생명공학 연구원 (정태숙, 박호용, 신동하)	대한민국	10-2014- 0131540

나. 논문

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2013	1			✓	Carbohydr. Res.	372: 9-14	국외	SCI
2013	2			✓	Arch. Pharm. Res.	36: 423-429	국내	SCIE
2013	3		✓		J. Med. Food.	16: 133-138	국내	SCI
2014	4	✓	✓		Food & Function	5: 1621-1630	국외	SCIE
2014	5			✓	Nat. Prod. Res.	28: 831-834	국외	SCIE
2014	6	✓	✓		Molecules	19: 18493-18510	국외	SCI

(1) Wu Q, Cho JG, Lee DS, Lee DY, Song NY, Kim YC, Lee KT, Chung HG, Choi MS, Jeong TS, Ahn EM, Kim GS, Baek NI. Carbohydrate derivatives from the roots of *Brassica rapa* ssp. *campestris* and their effects on ROS production and glutamate-induced cell death in HT-22 cells. *Carbohydrate Research*. 372: 9-14, 2013.

(2) Wu Q, Cho JG, Yoo KH, Jeong TS, Park JH, Kim SY, Kang JH, Chung IS, Choi MS, Lee KT, Chung HG, Bang MH, Baek NI. A new phenanthrene derivative and two diarylheptanoids from the roots of *Brassica rapa* ssp. *campestris* inhibit the growth of cancer cell lines and LDL-oxidation. *Archives Pharmaceutical Research*. 36: 423-429, 2013.

(3) Jeon SM, Kim JE, Shin SK, Kwon EY, Jung UJ, Baek NI, Lee KT, Jeong TS, Chung HG, Choi MS. Randomized double-blind placebo-controlled trial of powdered *Brassica rapa* ethanol extract on alteration of body composition and plasma lipid and adipocytokine profiles in overweight subjects. *Journal of Medicinal Food*. 16: 133-138, 2013.

(4) Choi MS, Ryu R, Seo YR, Jeong TS, Shin DH, Park YB, Kim SR, and Jung UJ. The beneficial effect of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) leaf extracts in adults with prediabetes: a randomized placebo controlled trial. *Food & Function*. 5: 1621-1630, 2014.

(5) Huh GW, Park JH, Kang JH, Jeong TS, Kang HC, Baek NI. Flavonoids from *Lindera glauca* Blume as low-density lipoprotein oxidation inhibitors. *Natural Product Research*. 28: 831-834, 2014.

(6) Kim UH, Yoon JH, Li H, Kang, JH, Ji HS, Park KH, Shin DS, Park HY, Jeong TS. Pterocarpan-enriched soy leaf extract ameliorates insulin sensitivity and pancreatic  $\beta$ -cell proliferation in type 2 diabetic mice. *Molecules*. 19: 18493-18510, 2014.



다. 학술대회/심포지엄 발표

발표일시	발표제목	발표자	학술대회 또는 심포지움명	발표 장소	초록집
2012. 4. 22	Anti-obese Effects of Ethanol Extracts of Glycine Max (L.) Merr. Leaves in C57BL/6J Mice and 3T3-L1 Cells	이화	2012년 제36차 춘계학술대회 및 제24회 연수강좌	서울성모병원 성의회관 및 의과학연구원 대강당	대한비만학회지 (The Korean Journal of Obesity) Vol. 21, p230
2012. 5. 10	Soy leaf regulates glucose-insulin system in diabetic mice and pancreatic beta cells	이화	2012년 대한당뇨병학회 춘계학술대회	대구 인터블고 엑스코호텔	당뇨병 (The Journal of Korean Diabetes) Vol. 13, p236
2012. 6. 27	Anti-diabetic Effects of the Ethanolic Extracts of Glycine max Leaves in Diabetic Mice and Pancreatic Beta Cells	이화	2012한국 미생물·생명공학회	부산 벅스코	A New Era of Biotechnology and Bioeconomy p378
2012. 11. 16	천연물 기반 대사성질환 예방 건강기능식품 소재 개발 (구두 발표)	정태숙	지식재산 성과확산 포럼 2012	서울 리츠칼튼호텔	대학·공공(연)의 글로벌 리더를 위한 IP 성과확산 포럼 2012: 143-156
2013. 11. 14	Anti-Diabetic Effects of Pterocarpan Enriched Extracts from Soy Leaf in High-Fat Fed C57BL/6J Mice	김언희	2013년도 한국식품영양과학회 국제심포지엄, 정기학술대회	광주 김대중컨벤션 센터	2013 KFN International Symposium and Annual Meeting Food Safety for the Food Industry P09-186
2014. 05. 08	콩잎의 유용물질 및 비만, 당뇨 예방 효능 (구두 발표)	정태숙	한국잠사학회 심포지엄 및 춘계학술대회	대전 유성호텔	2014년 제57회 (사)한국잠사학회 심포지엄 및 춘계학술대회 Vol. 57, No. 1: 29-30
2014. 09. 25	제주산림자원 산업화 방향 제언 (구두 발표)	정태숙	제주테크노파크 포럼	제주도 농업기술원 농어업인회관	제2차 제주 버섯자원 산업화 포럼 2014: 33-51
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	KINTEX, 제2전시관	2014 International Conference on Diabetes and Metabolism (PE125)

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, 정기학술대회	대전 컨벤션센터	2014 KFN International Symposium and Annual Meeting Lifelong Health and Wellness from Nutrition and Food (OP-05)
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, 정기학술대회	대전 컨벤션센터	2014 KFN International Symposium and Annual Meeting Lifelong Health and Wellness from Nutrition and Food (P09-49)
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, 정기학술대회	대전 컨벤션센터	2014 KFN International Symposium and Annual Meeting Lifelong Health and Wellness from Nutrition and Food (P07-06)

라. 연구성과 활용 (전시회, 제품설명회 참가)

유형	행사명칭	전시품목 및 목적	장소	참가 일시
전시회	2013 BIO International Convention	콩잎 활용 체지방 및 혈당 개선용 건강기능식품 효능 홍보	미국(시카고)	2013. 4. 21~25
제품설명회	2013년 대전 동남아 시장개척단	‘체지방 및 혈당 개선용 테로카판 강화 기능성 소재 개발’에 관한 기술 및 제품화에 대한 소개 (베트남 및 인도 시장 진출 관련)	베트남 (호치민), 인도 (뭄바이)	2013. 4. 22~27
전시회	COPHEX2013 (제8회 제약·화장품 기술전)	‘체지방 및 혈당 개선용 테로카판 강화 기능성 소재 개발’에 관한 기술 및 제품화에 대한 국내 및 해외 소개	일산 KINTEX	2013. 5. 28~31
제품설명회	2013년 대전 러시아 시장개척단	‘체지방 및 혈당 개선용 테로카판 강화 기능성 소재 개발’에 관한 기술 및 제품화에 대한 소개 (러시아 및 시베리아 주변국 진출 관련 협의)	러시아 (모스크바, 노보시비르스크)	2013. 6. 26~7. 2
전시회	2013년 한중기술 수출 로드쇼	‘체지방 및 혈당 개선용 테로카판 강화 기능성 소재 개발’에 관한 기술 및 제품에 대한 중국(심양) 소개 (제품 및 기술 이전 관련 협의)	중국 (심양시)	2013. 7. 28~7. 31

제품설명회	2014년 바이오재 토탈마케팅 사업	‘체지방 및 혈당 개선용 테로카판 강화 기능성 소재 개발’에 관한 기술 및 제품화에 대한 베트남 소개	베트남 (호치민)	2014 1. 12~15
전시회	2014년 중국 광저우 미용박람회	‘체지방 및 혈당 개선용 테로카판 강화 기능성 소재 개발’에 관한 기술 및 제품화에 대한 국내 및 해외 소개	중국 (광저우)	2014 3. 8~12

전시회명 : 2013 BIO International Convention USA

전시기간 : 2013년 4월 21일(일) ~ 4월 25일 (목)

전시장소 : 미국 시카고, McCormic Place Convention Center

전시목적 : 테로카판 강화 콩잎 추출물의 비만, 당뇨 예방 효능 홍보 및 콩잎 추출물을 원료로 한 체지방 및 혈당 개선용 건강기능식품의 기술 및 제품화에 대한 소개



제품설명회명 : 2013년 대전 동남아 시장개척단

상담기간 : 2013년 4월 22일(수) ~ 4월 27일 (월)

상담장소 : 베트남 (호치민), 인도 (뭄바이)

전시목적 : ‘체지방 및 혈당 개선용 테로카판 강화 기능성 소재 개발’에 관한 기술 및 제품화(상품화)에 대한 소개. 기술 및 제품의 베트남 및 인도 시장 진출 관련



전시회명 : COPHEX 2013 (제8회 제약 ■ 화장품 기술전)

전시기간 : 2013년 5월 28일(화) ~ 5월 31일 (금)

전시장소 : 일산 KINTEX

전시목적 : ‘체지방 및 혈당 개선용 테로카판 강화 기능성 소재 개발’에 관한 기술 및 제품화(상품화)에 대한 국내 및 해외 소개



제품설명회명 : 2013년 대전 러시아 시장개척단

상담기간 : 2013년 6월 26일(수) ~ 7월 2일 (화)

상담장소 : 러시아 모스크바, 러시아 노보시비르스크

전시목적 : ‘체지방 및 혈당 개선용 테로카판 강화 기능성 소재 개발’에 관한 기술 및 제품화(에 대한 소개. 기술 및 제품의 러시아 및 시베리아 주변국 진출 관련 협의



제품설명회명 : 2013년 한중 기술 수출 로드쇼

상담기간 : 2013년 7월 28일(일) ~ 7월 31일 (수)

상담장소 : 중국 심양시

전시목적 : ‘체지방 및 혈당 개선용 테로카판 강화 기능성 소재 개발’에 관한 기술 및 제품화에 대한 소개. 기술 및 제품의 중국 (특히 심양) 판매 관련 협의 및 기술 이전



제품설명회명 : 2014년 바이오소재 토탈 마케팅 사업

상담기간 : 2014년 1월 12일(일) ~ 1월 15일 (수)

상담장소 : 베트남 호치민

전시목적 : ‘체지방 및 혈당 개선용 테로카판 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

전시기간 : 2014년 3월 8일(토) ~ 3월 12일 (수)

전시장소 : 중국 광저우 컨벤션 센터

전시목적 : ‘체지방 및 혈당 개선용 테로카판 강화 기능성 소재 개발’에 관한 기술 및 제품화(상품화)에 대한 해외 소개



마. 수상 실적

수상일자	수상명칭	수상자	공적 내용
2013. 4. 19	과학기술유공자 포상 대통령상 표창	정 태 속	농산자원(굴피)으로부터 심혈관질환 예방, 치료 활성 신소재 개발, 강화약썩/순무/비자의 항동맥경화, 항비만 예방 효능 규명, <u>바이오그린21사업(농진청) 및 생명산업기술개발사업(IPET)을 통해 콩잎추출물을 이용한 비만, 당뇨 예방용 건강기능식품 소재 개발 등의 공로를 인정받아 2013. 4. 19 과학기술, 정보통신 진흥유공자 정부 포상 중 대통령표창을 수여받음</u>

바. 기술 이전

- (1) 기술이전명: 코우메스단계 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 대사성 질환 또는 이들의 합병증의 예방 또는 치료용, 또는 항산화 조성물 (대한민국 특허출원 10-2014-0131540)

기술이전 대상 및 일자: (주)인세트바이오텍, 2014년 11월 11일

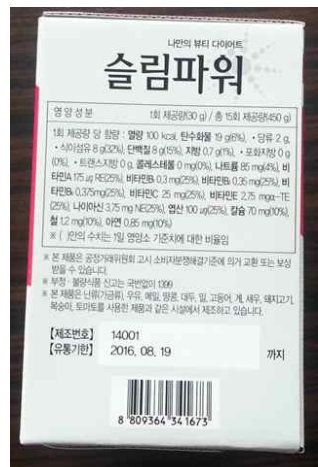
기술이전 조건: 통상실시권, 선급실시료 10,000 천원

사. 사업화(제품화) 현황

- (1) ‘슬림파워’ 체중조절용 조제식품 (2014년 8월 말에 출시하였음)

사업화명	사업화내용	사업화 업체 개요				기매출액	당해년도 매출액*	매출액 합계
		업체명	대표자	종업원수	사업화형태			
슬림파워 (제품명)	콩잎추출물 분말을 이용한 체중조절용 조제용 식품	(주)인세트바이오텍	조영진	15	제조	-	1,500 만원	1,500 만원

\*당해 연도 매출액: 현재 마케팅 및 일부 업체 납품 조율을 통한 2014년도 예상 매출



아. 상품화를 위한 기능성원료의 품목 신고 및 등록 (2 건)

(1) 식품(식품첨가물) 품목제조 인허가(신고)를 통해 콩잎추출분만을 이용한 시제품 생산,  
2011년 12월 26일에 완료

(2) 식품(식품첨가물) 품목제조보고서: ‘슬립파워’ 체중조절용 조제식품으로 인정받음.  
2014년 7월 23일

■ 식품위생법 시행규칙 [별지 제43호서식] <개정 2011.8.19>

### 식품(식품첨가물) 품목제조보고서

보고인	성명	김 미 경	생년월일	1970년 8월 5일	
	주소	전화번호 043-883-0805 휴대전화			
영업소	명칭(상호)	서진 바이오텍			
	소재지	충청북도 음성군 삼성면 덕정리 247-4			
제품정보	식품의 유형	기 타 가 공 품		영업신고 번호	제 398 호
	제품명	콩잎추출물분말			
	유통기한	제조일부터	24	일(월, 년)	
	품질유지기한	제조일부터		일(월, 년)	
	원재료명 또는 성분명 및 배합비율	(별 첨)			
	용도 용법	(별 첨)			
	보관방법 및 포장재질	(별 첨)			
	포장방법 및 포장단위	(별 첨)			
성상	(별 첨)				
고열량·저영양 식품 해당 여부	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오 <input type="checkbox"/> 해당 없음				
기타					
「식품위생법」 제37조제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다.					
음성군수	귀하의	지방식품위생서기	2011년 12월 26일	김 미 경	
첨부서류	1. 제조방법설명서 1부 2. 식품위생검사가관이 발급한 식품등의 한시적 기준 및 규격 검토서 1부 3. 식품의약품안전청장이 정하여 고시한 방법에 따라 설정된 유통기한의 설정사유서 1부				
유의사항					
1. 품목제조보고서는 제품생산의 개시 전이나 개시 후 7일 이내에 제출하여야 합니다. 2. 배합비율 표시는 식품공전 및 식품첨가물공전에 사용기준이 첨하여져 있는 원재료 또는 성분의 경우만 해당합니다.					

210mm×297mm[일반용지 60g/㎡ (제할용종)]

## 식품품목제조보고 설명서

- 제 품 명 : 콩 잎 추출물 분말
- 식품의유형 : 기 타 가 공 품
- 성분배합비율

### 원료명

1. 콩잎추출물(고형분기준) : 30%  
(콩잎추출물 : 콩잎 100%)
2. 덱스트린 : 70%

합계 : 100 %

- 제조방법
  - 원료검사 : 식품공전규격에 적합한 원료를 구입하여 검사 후 합격된 것을 사용한다.
  - 추 출 : 추출기에 콩잎을 계량하여 투입하고 콩잎투입량의 10배의 70% 주정을 투입하여 2일간 침지추출 후 100mesh 체로 여과 후 농축한다.
  - 건 조 : 진공 건조기에 투입하여 진공건조한다.
  - 분 쇄 : 진공건조한 콩잎추출물을 분쇄한다.
  - 계 량 : 성분배합비율대로 계량한다.
  - 혼 합 : 혼합기에 투입하여 균일하게 혼합한다.
  - 검사및포장 : 규격검사를 실시하여 합격한 것을 포장단위별 충전 포장한다.
- 성 상 : 미황색의 분말로서 콩잎추출물분말 향미를 지니며 이미, 이취가 없음.
- 포장방법 : 폴리에틸렌으로 100g이상에서 25kg까지 포장
- 용도·용법 : 가공식품에 적량 사용한다.
- 유통기한 : 제조일로부터 24개월까지 (직사광선을 피하고 실온보관)



[별지 제43호서식]

## 식품(식품첨가물) 품목제조보고서

보고인	성명	조인식, 조형권	생년월일	
	주소	전라북도 완주군 봉동읍 완주신단6로 301	전화번호	063-715-0045
영업소	명칭(상호)	㈜ 한풍네이처팜		
	소재지	전라북도 완주군 봉동읍 완주신단6로 301		
제품정보	식품의 유형	특수용도식품 / 체중조절용조제식품	영업신고번호	제12-7호
	제품명	슬립파워		
	유통기한 품질유지기한	제조일로부터 24개월 제조일로부터		
	원재료명 또는 성분명 및 배합비율	별첨		
	용도 용법	용도 : 체중조절용조제식품 용법 : 1일 1회, 1회 1포를 우유 또는 물과 함께 섭취		
	보관방법 및 포장재질	보관방법 : 실온보관 포장재질 : 폴리에틸렌(PE)		
	포장방법 및 포장단위	포장방법 : 포 포장 포장단위 : 30g*15포, 30g*30포, 30g*45포, 30g*60포, 30g*75포, 30g*90포		
	상상	이미, 이취가 없는 미향색 분말		
고열량·저영양 식품 해당 여부	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오 <input checked="" type="checkbox"/> 해당없음			
기타	<p>「식품 위생법」 제37조 제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조 제1항에 따라 식품(식품첨가물)품목제조 사항을 보고합니다.</p> <p style="text-align: right;">2014년 07월 일</p> <p style="text-align: right;">보고인 조인식, 조형권 (인)</p> <p style="text-align: center;"><b>완주군수 귀하</b></p>			
첨부서류	1. 제조방법설명서 1부 2. 식품위생검사기관이 발급한 식품등의 한시적 기준 및 규격 검보서 1부 3. 식품의약품안전청장이 정하여 고시한 방법에 따라 설정한 유통기한의 설정서류 1부			
	식품위생법 제37조제5항 및 동법시행규칙 제45조제1항에의거 식품품목제조(제)보고서 1. 품목제조보고서는 제품생산의 개시 전이다 개시 후 7일 이내에 제출하여야 합니다. 2. 배합비율 표시는 식품공전 및 식품첨가물공전에 사용기준이 정하여져 있는 원재료 또는 성분의 경우만 해당합니다.			

확인자: 완주군청 건강안전과 위생관리계  
 직급: 216 이삼: 조수정

### 자. 인력 양성

인력양성명	인력양성년도	성과발생년도	인력양성 내용	학위	성별
박사 인력양성	2014.2	2014	조수정	박사 (이학)	여

## 제2절 연구성과 활용 계획

○ 연구의 연구결과를 중심으로 95% EtOH 용인주정추출분말을 활용하여 체지방 조절 및 혈당 강하를 위한 기능성 제품을 개발하였다. 개발된 제품은 제 1 세부연구기관과 제 2 협동연구기관이 도출한 본 기능성소재에 대한 연구 논문 및 관련 임상 실험 자료를 활용하여 마케팅에 활용할 계획이다. 제품에 대한 기존 제품과의 차별화를 위해 본 연구를 통해 확보한 과학적 근거 자료 (효능 효과 입증 자료, 논문 및 학회 발표 자료 등)를 바탕으로 진행할 계획이다.

○ 본 연구 및 선행연구를 통해 확보한 자료를 바탕으로 기능성소재의 개별인정을 신청하고자 하며, 이를 위해서는 농림축산식품부 또는 농진청에서 발주하는 건강기능 인증을 위한 추가 연구를 기획하여 진행하고자 하며, 반드시 식약처 건강기능식품 기준의 검토 및 CRO가 참여하는 형태의 연구를 통해 지금까지 얻은 연구결과 및 자료의 부족한 부분을 충족할 수 있을 것으로 판단된다.

○ 나고야의정서협정 이후 2014년 10월 12일 생물협약조약으로 인한 국내 생물소재에 대한 관심이 높아지고 있다는 점을 감안할 때 본 연구 소재 및 이를 이용한 제품에 대한 언론 발표, 제품설명회 등을 통해 본 기술의 우수성과 국내 천연소재의 신규 활용성에 대해 홍보를 진행할 계획이다

○ 마케팅 및 영업효과를 위해 국내 전시회 뿐 만 아니라 특화된 해외 전시회 (미국 BIO, COSMOPRO, 건강기능식품전시회 등)을 통해 본 연구결과와 홍보와 함께 제품의 홍보 및 마케팅을 시행할 계획이다. 또한 정부차원의 마케팅 지원인 해외마케팅지원사업, 지사화 사업과 해외무역사절단 등을 통해 본 연구를 통해 창출한 제품에 대한 신규 바이어 발굴을 진행할 계획이다.

○ 협동연구기관인 (주)인섹트바이오텍은 관련 유통 및 판매 라인을 가지고 있으며, 현재 가동 중인 라인을 이용한 제품의 판매 등을 실시할 예정이다. 또한 미국, 중국, 일본, 브라질 등 국외 10여 개국에 보유하고 있는 글로벌 네트워크 라인을 활용하여 본 연구의 기능성 소재에 대한 소개와 함께 소재를 활용한 제품의 판매에 극대화할 예정이다. 보다 세밀하게는 국내 라인은 혈당과 함께 체지방에 문제가 되고 있는 소비자를 대상으로 진행하고 있으며 일부 특화 병원을 중심으로 진행 중에 있다. 해외 라인은 국내 특화 라인과 연계되어 있는 해외 유통 라인과 함께 협동기관이 보유하고 있는 해외 대리점의 영업망을 중심으로 식품 및 의약품 회사를 통한 마케팅 및 영업활동을 진행하고 있다.

○ 일부 유통 라인 및 해외 네트워크의 경우, 요구하는 부분이 다를 수 있으며, 이에 대해서는 제 1 세부연구기관과 제 2 협동연구기관의 도움을 받아 요구부분에 대한 조율을 진행할 계획이다. 일부 국가마다 사용에 제한되는 제형이 있으며 ‘슬림파워’의 일부 제형이 이에 해당하거나, 일부 유통 라인 및 해외 네트워크에서 제형에 첨가를 원하는 신규 제형(또는 원료)가 발생할 경우 이에 대한 검토를 시행할 계획이다.

○ 본 연구 및 본 연구를 통해 확보한 ‘슬림과워’를 통해 시장에서의 소비자의 반응과 소비자의 요구 사항을 보다 많이 확보하여 본 연구를 이용한 새로운 제형 개발을 통한 업그레이드된 신규 제품 생산을 시행할 계획이다. 새로운 업그레이드 제품의 경우, ‘슬림과워’를 자체 브랜드 및 타겟 선호층 (타겟 마케팅)의 방향을 대상으로 제품구성을 진행 중에 있다. 신규 제품 생산 시 제 1 세부연구기관과 제 2협동연구기관의 연구 결과를 바탕으로 협동연구기관인 (주)인섹트바이오텍이 확보한 다양한 부형제와 원료를 이용하여 개발을 진행할 계획이다. 신규 제형의 경우, ‘슬림과워’ 제형이 아닌 다른 제형으로 시장에서의 충돌이 없이 판매의 극대화를 꾀할 계획이다. 또한 혈당 저하 기능성 원료 중 동결건조누에분말을 제외하고는 그 원재료를 국내에서 생산하는 것은 없는 실정이다. 따라서 국내에서 대량 생산이 가능한 원재료인 콩잎을 이용한 혈당 조절용 건강기능식품으로 실용화가 가능하다. 또한 요즈음 갱년기 여성 건강을 위한 건강기능식품인 백수호등복합추출물 제품에 (가르시아카보지아추출물 추가하여) 체지방 억제 효능을 추가함으로써, 새로운 제품을 출시하였다. 반면에 테로카판 강화 콩잎추출물은 체지방 조절 및 혈당 개선 기능을 함께 나타내고 있으므로 이를 실용화를 위한 핵심기술로 활용하고자 한다.

○ 해외 유통라인의 경우, 일부 식품 및 의약품 회사에서는 포장은 자체적으로 진행하기를 희망하고 있으며, 이에 대한 방안으로 기능성 원료인 콩잎주정추출분말 자체를 원료로 판매하는 방식이 아닌 본 연구를 통해 확보한 일정 부형성분과 혼합을 통한 혼합(mixture) 제형 형태로 판매를 시도하여 본 기술의 주요성분의 수출과 동시에 기술의 노하우 및 원료 물질의 직접적인 유출을 방제할 계획이다.

○ 기능성소재의 개별인정 등 기능성 인정은 완제품이 아닌 기능성소재를 위주로 하므로, 본 연구를 통해 수행한 인체시험 및 동물실험 결과로 그 효능이 충분히 검증되었으며, 이 결과를 바탕으로 논문 출판 등을 통해 효능이 공인된 자료를 확보하고자 한다. 현재 1편의 논문이 Revised 상태에 있으며, 추가 2편을 투고할 예정이다.

○ 언론 홍보 계획: 인체시험 및 동물실험을 통해 테라카판 고함유 기능성 소재의 체지방 및 혈당 조절 효능을 검증하였다. 따라서 기술이전 및 투고 중인 논문의 게재가 확정되면 중앙 TV 및 언론매체를 이용하여 콩잎으로부터 도출한 새로운 기능성 소재에 대한 홍보를 계획하고 있다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

○ 콩잎에는 다양한 생리 활성 물질인 이소플라본 (Isoflavone)류, 플라본(Flavone), 플라보놀 (Flavonol), 테로카판 (Pterocarpan), 페놀성 화합물, 소야사포닌 (Soyasaponine), 당알콜 등이 함유되어 있다. 이 중 이소플라본은 주로 콩과 식물에만 함유되어 있으며 유방암, 전립선암, 골다공증, 심장병 등 성인병 예방에 효과적이며, 플라본 (Flavone)과 플라보놀 (Flavonol)은 강력한 항산화 효능을 기반으로 고지혈증, 동맥경화, 폐암 등에 뛰어난 효과를 가진 것으로 알려졌다.

○ 콩잎은 콩이 함유하고 있는 phytoestrogen인 genistein, coumestrol 등을 함유하고 있다. 이들의 풍부한 섭취가 당뇨병의 대사 개선에도 유익할 수 있음을 보여주는 연구결과들이 보고되어 있다. 미국 농무부 산하 연구기관인 Beltsville Human Nutrition Research Center 의 연구팀은 유전적으로 비만과 당뇨를 가진 SHR/N-cp 쥐에 isoflavone을 섭취시켜 혈당과 중성지방 농도, 혈장 insulin, leptin, glucagon의 개선 효과를 보고하였다. 또한 제1형과 제2형 당뇨 쥐에 genistein을 섭취시켜 공복 혈당, 내당능, HbA1c 수준의 개선효과를 밝혔다.

○ 미국 버지니아 공대 연구팀은 콩의 isoflavone인 genistein이 췌장의 베타 세포를 증식시키고 인슐린 분비를 향상시키며, apoptosis를 억제하여 당뇨를 개선하는데 효과가 있다고 밝혔다. 또한 덴마크 공대 연구팀은 3T3-L1 세포주 실험을 통해 콩의 isoflavone 종류 중 genistein, daidzein, coumestrol이 지방축적을 억제한다는 것을 보고하였다.

○ 이태리 밀라노 대학의 연구팀은 streptozotocin (STZ)로 당뇨를 유발시킨 C57BL/6J 쥐 실험을 통해 genistein이 좌골신경 (sciatic nerve)의 산화스트레스와 염증성 cytokine을 줄이고 nerve growth factor (NGF)를 증가시켜 당뇨로 인한 합병증을 개선시킨다고 보고하였다.

○ 일본 이와테 대학의 연구팀은 당뇨모델 마우스 (KK-A<sup>y</sup>/TaJcl)에게 콩잎 추출물 중 kaempferol glycoside가 다량 함유된 분획을 식이와 함께 섭취시켜 효능을 평가하러 한 결과, 혈액 내 glucose 지표가 개선되는 효과를 나타내었으며, 간 내 중성지방과 지방산 합성효소의 활성도 감소하였다.

○ 중국 향권 중문 대학의 연구팀은 콩잎 추출물이 래트 (rat)의 경동맥을 이완시키는 실험 결과를 제시하였다. 또한 이 연구팀에서는 햄스터에게 콩잎 파우더, 콩잎 에탄올 추출물이 함유된 식이를 섭취시켜 효능을 평가하였던 결과, 모든 시험군에서 HDL-cholesterol의 상대적인 비율이 증가하였다.

○ Gláucia M. Machado-Santelli 연구팀은 테로카판이 유사분열 동안 전중기 때 cell cycle을 막는 spindle pole 분리를 억제함으로써 항암작용을 가질 것으로 보고하였다.

## 제 7 장 연구시설·장비 현황

○ 해당 사항 없음

## 제 8 장 참고문헌

보건복지부 보건의료기술연구개발사업 (1차) 대사성 증후군 대응 R&D 기획 연구 특허동향 조사 보고서. (2013) 특허청.

이은정. (2014) 대사증후군에 대한 내분비-대사적 견해. 대한내과학회 춘계학술대회.

2013 생명공학백서. (2013) 생명공학정책연구센터.

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.

Allain CC, Poon LS, Chan CS, Richmond W, and Fu PC. (1974) Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin. Chem.* 20: 470-475.

Boaventura BCB, Pietro PF, Stefanuto A, Klein GA, Morais ED, Andrade F, Wazlawik E, Silva EL. (2012) Association of mate tea (*Ilex paraguariensis*) intake and dietary intervention and effects on oxidative stress biomarkers of dyslipidemic subjects. *Nutrition* 28: 657-664.

Bousslama L, Hayashi K, Lee JB, Ghorbel A, and Hayashi T. (2011) Potent virucidal effect of pirophorbide a and pyropheophorbide a on enveloped viruses. *J. Nat. Med.* 65: 229-233.

Brecher P and Chan CT. (1980) Properties of acyl-CoA:cholesterol O-acyltransferase in aortic microsomes from atherosclerotic rabbits. *Biochim. Biophys. Acta.* 617: 458-471.

Cheng Z, Tseng Y, White MF. (2010) Insulin signaling meets mitochondria in metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* 21: 589-598.

Cho M, Lee HS, Kang IJ, Won MH, and You S. (2011) Antioxidant properties of extract and fractions from *Enteromorpha prolifera*, a type of green seaweed. *Food Chem.* 127:999-1006.

Kang YR, Lee HY, Kim JH, Moon DI, Seo MY, Park SH, Choi KH, Kim2, Sang-Hyun Kim CR, Oh JH, Cho SW, Kim SY, Kim MG, Schae SW, Kim5 O, Oh HG. (2012) Anti-obesity and anti-diabetic effects of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. 28: 23-29.

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.

Lai CS, Mas RH, Nair NK, Mansor SM, and Navaratnam V. (2010) Chemical constituents and in vitro anticancer activity of *Typhonium flagelliforme* (Araceae). *J. Ethnopharmacol.* 127: 486–494.

McGowan MW, Artiss JD, Strandbergh DR, and Zak B. (1983) A peroxidase-coupled method for the colorimetric determination of serum triglycerides. *Clin. Chem.* 29:538–542.

Militão GC, Prado MP, Pessoa C, de Moraes MO, Silveira ER, Lima MA, Veloso PA, Costa-Lotufo LV, and Machado-Santelli GM. (2014) Pterocarpan induce tumor cell death through persistent mitotic arrest during prometaphase. *Biochimie*. 104: 155–174.

Reitman S and Frankel S. (1957) A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am. J. Clin. Pathol.* 28: 56–63,

Steel RGD and Torrie JH. (1960) Principles and procedures of statistics. McGraw Hill, New York.

Strategic plan for NIH Obesity Research. (2011)

Warnick GR, Mayfield C, Benderson J, Chen JS, and Albers JJ. (1982) HDL cholesterol quantitation by phosphotungstate-Mg<sup>2+</sup> and by dextran sulfate-Mn<sup>2+</sup>-polyethylene glycol precipitation, both with enzymic cholesterol assay compared with the lipid research method. *Am. J. Clin. Pathol.* 78: 718–723.

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.

## 주 의

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