

발 간 등 록 번 호

11-1543000-000976-01

친환경 작두콩 소재를 활용한 에너지증진 및
피부과민반응개선 소재개발과 제품화
(Development of Biomaterials from Environmental-friendly
Sword Bean and Their Manufacturing for Enhancing
Energy Efficiency and Improving Hypersensitive Skin
Reaction)

농업회사법인(주)산들춘

농 립 축 산 식 품 부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “친환경 작두콩 소재를 활용한 에너지증진 및 피부과민반응개선 소재 개발과 제품화” 과제의 보고서로 제출합니다.

2015년 08월 26일

주관연구기관명 : 농업회사법인(주)산들촌

주관연구책임자 : 차 민 석

주관기관연구원 : 김 진 영 외 6명

세부연구기관명 : 전남대학교 산학협력단

세부연구책임자 : 전 우 진

세부기관연구원 : 유 양 희 외 3명

세부연구기관명 : 경희대학교 산학협력단

세부연구책임자 : 이 정 민

세부기관연구원 : 이 민 희 외 1명

요 약 문

I. 제 목

친환경 작두콩 소재를 활용한 에너지증진 및 피부과민반응개선 소재개발과 제품화

II. 연구성과 목표 대비 실적

1. 기능성강화 식품개발 및 산업화

- 1) 기능성강화 식품 제조공정 표준화 완료
- 2) 작두콩추출물을 함유하는 에너지증진 건강지향식품 개발완료
- 3) 발효작두콩(추출물)을 함유하는 피부과민반응개선 건강지향식품 개발완료

2. 친환경작두콩 대상 에너지증진능 기능성 식품소재개발

- 1) 작두콩 추출물의 에너지 증진 효능평가 완료
- 2) 시제품의 에너지 증진 효능 평가 완료
- 3) 작두콩 추출물의 에너지 증진 작용 기작구명 완료
- 4) 작두콩 추출물의 산화적 스트레스 억제 기작구명 완료

3. 발효작두콩 대상 피부과민반응개선 기능성 식품 소재 개발

- 1) 작두콩 발효 및 표준화 완료
- 2) 동물 실험을 통한 발효작두콩 추출물의 피부과민반응 억제 효능 평가 완료
- 3) 발효작두콩 추출물의 피부과민반응 억제 효능의 기작 연구 완료

III. 연구개발의 목적 및 필요성

작두콩은 광주, 전남지역에서 최근 작물량이 증가하고 있으며 다양한 유효성분들이 함유되어 있는 것으로 보고된 바 그 기능성이 기대되는 식품원료이며 이들의 지속적인 소비량 촉진 및 건강기능성을 위한 고부가가치 식품의 개발이 필요하다. 작두콩의 경우는 피부과민반응 유발이 되지 않으며 오히려 면역 과민반응을 억제해 주는 것이 기대되어 이에 대한 고부가가치화를 위한 식품의 개발이 필요하다. 친환경으로 재배되고 있는 작두콩을 이용하여 생리활성을 평가하고 제품의 원료로 사용함으로써 제품의 유용성이 향상된 기능성 강화식품 개발이 필요하다. 본 과제에서는 기능성강화 식품 제조 공정 표준화와 친환경작두콩 및 발효작두콩을 활용한 기능성 강화식품 개발을 목적으로 하였다.

에너지 증진용 식품은 음료 및 에너지 바가 주류를 이루고 있으며, 그 성분은 주로 당류 및 단백질이나 고열량 식품으로서 어린이 및 청소년에게는 적합하지 않으므로 성

장기 소비층을 대상으로 열량 제공을 최소화하며 체내 에너지 활용도를 높일 수 있는 다양한 형태의 기능성 강화식품의 개발이 요구되고 있다. 국내외 에너지 증진 관련 제품의 경우 고카페인 제품이 시장을 점유하고 있으므로 작두콩 소재를 이용하여 무카페인 에너지증진 기능성 강화식품을 개발이 요구되고 있다. 본 과제에서는 *in vivo* 실험을 통하여 작두콩 소재의 에너지증진 활성과 에너지 관련 기전을 확인하는 것을 목적으로 하였다.

아토피 피부염(피부과민반응)은 복합적인 만성 염증성 질환으로 발병 원인은 아직 명확히 밝혀져 있지 않으며 복합적인 면역 인자가 관련되어 그에 따른 치료법도 어려움을 가지고 있다. 대체 의학적 보완요법에 대한 관심이 증가하고 있으며 부작용이 적은 천연물로부터 기능성을 찾는 연구가 활발하게 진행되고 있다. 아토피 발생에 관련되는 다양한 면역 세포와 사이토카인에 대한 융복합 기반 분석을 통하여 효과적인 피부과민 반응 면역 조절 소재 개발이 필요하다. 본 과제에서는 피부과민반응 면역 조절 소재 개발을 위하여 아토피 유발 동물모델에서 발효작두콩의 효능을 평가하고 세포실험을 통하여 기전을 확인하는 것을 목적으로 하였다.

IV. 연구개발 내용 및 범위

1. 기능성강화 식품개발 및 산업화

- 1) 선정 소재 가공기술 표준화 : 작두콩을 활용하여 에너지증진/피부과민반응개선 활성 소재로 선정된 추출물의 제조공정 표준화
- 2) 작두콩 함유 에너지증진 기능성강화 식품 개발 : 선호도 평가 결과를 바탕으로 선정한 제형으로 에너지증진 기능성강화 식품 생산
- 3) 발효작두콩 함유 피부과민반응개선 기능성강화 식품 개발 : 선호도 평가 결과를 바탕으로 선정한 제형으로 피부과민반응개선 기능성강화 식품 생산
- 4) Global 산업화 : 국내 온·오프라인을 통한 판매 및 해외바이어 수출을 통해 국내 천연물을 소재로 하는 건강지향식품의 Global 산업화

2. 친환경작두콩 대상 에너지증진능 기능성 식품 소재개발

- 1) 작두콩 소재의 에너지 증진 효능평가 : 작두콩 소재의 안전성 평가, *in vivo* 지구적 운동능력향상능 평가, 지구적 운동능력향상 바이오마커 평가
- 2) 시제품의 에너지 증진 효능 평가 : *in vivo* 지구적 운동능력향상능 평가
- 3) 작두콩 소재의 에너지 증진 작용 기작구명 : 에너지대사 관련 효소활성 분석, 에너지대사 관련 조절인자 발현평가
- 4) 작두콩 소재의 산화적 스트레스 억제 기작구명 : 추출물의 기능성분 함량 분석, 라디칼 소거활성 및 환원력 평가, *in vivo* 산화적 스트레스 억제능 바이오마커 평가

3. 발효작두콩 대상 피부과민반응개선 기능성 식품 소재개발

- 1) 작두콩 발효 및 시료표준화 : 발효 확립을 위한 시간별, 온도별 변화에 따른 최적 조건 설정, 유산균, 황국균을 이용한 작두콩 발효 및 발효 전·후 일반기능성분 비교를 통한 균주선발, 발효작두콩 추출 및 시료표준화
- 2) 독성시험 : 발효작두콩의 단회, 반복 독성평가(male, female mice로 생존률, 생화학분석)
- 3) 동물 실험을 통한 발효작두콩 추출물의 피부과민반응 억제 효능 평가 : NC/Nga 마우스를 이용한 피부과민반응 유발 동물 모델에서 발효작두콩 추출물의 효능 평가[임상증상 평가(관능평가시험, 경표피수분증발량 측정, Scratching behavior), 조직학적 평가 (피부조직 H&E염색을 통한 조직학적 관찰)], 혈액학적 평가(히스타민, 면역글로불린 농도 측정), 생물학적 평가(비장세포 배양을 통한 사이토카인과 T세포 및 B세포 증식능 측정)
- 4) 발효작두콩 추출물의 피부과민반응 억제 효능의 기작구명 : 비장세포와 Keratinocyte를 이용한 발효작두콩 추출물의 효능 평가 및 기작구명, 히스타민, 면역글로불린 생성 기작, 사이토카인 및 케모카인, T세포 및 B세포 기작

V. 연구개발결과

1. 기능성장화 식품개발 및 산업화

- 1) 작두콩 50%주정추출물의 표준화를 수행하였다.
- 2) 발효작두콩의 발효 표준화를 수행하였다.
- 3) 작두콩추출물을 함유하는 에너지증진 식품 ‘작두콩소이칩’ 을 개발하고 품목제조 보고하여 산업화하였다.
- 4) 발효작두콩(추출물)을 함유하는 피부과민반응개선 식품 ‘피넛씨리얼’ 을 개발하고 품목제조보고하여 산업화하였다.
- 5) 작두콩 효능, 지표물질 조사 및 분석, 작두콩잔유물 활용도 조사, 시장조사를 수행하고 마케팅 계획을 수립하였다.

2. 친환경작두콩 대상 에너지증진능 기능성 식품소재개발

- 1) 작두콩 80%주정추출물은 지구적 운동능력증진과 그에 따른 생리활성을 나타내었고 작두콩 소재의 에너지 증진 효능 기작 및 산화적 스트레스 억제 작용을 나타내었다.
- 2) 작두콩 50%주정추출물은 지구적 운동능력증진과 그에 따른 생리활성을 나타내었고 작두콩 소재의 에너지 증진 효능 기작 및 산화적 스트레스 억제 기작 작용을 나타내었다.
- 3) 작두콩 함유 개발 시제품은 지구적 운동능력증진을 나타내었고, 카페인(양성대조군)과 동등한 지구적 운동능력증진 활성을 나타내었다.

3. 발효작두콩 대상 피부과민반응개선 기능성 식품 소재 개발

- 1) 황국균 발효를 통하여 작두콩의 아미노산은 증가하고 canavanine 함량은 감소하였다.
- 2) 작두콩 추출물과 발효 작두콩 추출물 1 g/kg b.w./day 농도까지 동물 독성이 없었다.
- 3) 아토피가 유발된 NC/Nga mice를 사용하여 발효작두콩 30%주정 추출물과 80% 주정추출물 식이투여군에서 아토피에 의한 생물학적 변화가 가장 많이 억제되었음을 확인하였다.
- 4) 발효작두콩 30% 주정추출물 처리한 세포들에서 Th1/Th2 cytokine의 불균형, IgE와 histamine의 분비, chemokines, pro-inflammatory cytokines의 expression을 억제되었음을 확인하였다.

VI. 연구성과 및 성과활용 계획

본 기술개발을 통해 에너지증진 소재를 활용한 ‘작두콩소이칩’ 과 피부과민반응개선 소재를 활용한 ‘피넛시리얼’ 을 개발하였고 마케팅계획에 따라 경제적 성과를 창출할 예정이다. 추출 표준화 기법, 발효 표준화 기법 등 신 기술을 축적하였고, 에너지증진능 및 피부과민반응개선 소재를 밝혀 향후 파생된 고부가가치 식품개발에 활용할 수 있는 기초 기술을 획득하였고, 건강지향식품, 건강기능식품의 개발을 위한 소재로 본 과제의 소재들을 활용할 계획이다. 참여기관들의 연구 결과는 학술발표 및 논문개제를 수행 할 예정이다. 본 과제 기간동안 작두콩의 재배지와 시장성이 확대된 것과 함께 작두콩의 사회적, 기술적, 경제적 가치를 높여 농가 및 식품산업 저변으로 산업화가 확대될 수 있을 것으로 판단된다.

SUMMARY

I. Title

Development of Biomaterials from Environmental-friendly Sword Bean and Their Manufacturing for Enhancing Energy Efficiency and Improving Hypersensitive Skin Reaction

II. Propose and necessity of project

This project tried to present the possibility of development of domestic agricultural products as functional materials and industrial products from *Canavalia gladiata DC.* Recently, *Canavalia gladiata DC.*, Sword Bean, was widely cultivated as an alternative crop, but its high-value products were very low and its nutritional value on physiological properties were not sufficiently reported. Therefore, this study was performed not only to develop a standardized process for high-value products with functional materials, but also to product functional foods with enhanced energy efficiency and improved hypersensitive skin reaction.

III. Contents and Scope of the Research and Development

1. Development of industrial products with functional properties
2. Development of functional material with elevating energy metabolism
3. Development of functional material with atopic dermatitis by modulating immune

II. Results

1. Development of industrial products with functional properties
 - Development of standardized manufacturing process of functional snack with functional materials from *Canavalia gladiata DC.*
 - Development of functional snack including extract from *Canavalia gladiata DC.* with enhanced energy efficiency ; Sword Bean ‘Soy Chip’
 - Development of functional snack including extract from fermented *Canavalia gladiata DC.* with improved hypersensitive skin reaction ; ‘Peanut Cereal’
2. Development of functional material with elevating energy metabolism

- Antioxidant capacities of CGE were revealed by measuring total phenolic compounds, total flavonoids, ABTS radical scavenging activity, and DPPH radical scavenging activity.
 - Enhancing endurance exercise capacities and energy metabolites from CGE from *Canavalia gladiata* DC. were revealed by increasing endurance exercise time, delaying the accumulation of lactate, saving glycogen, and elevating the antioxidant defense activities. So, CGE suggests that CGE supplement is taken as ergogenic acid.
3. Development of functional material with atopic dermatitis by modulating immune
- The fermented *Canavalia gladiata* was compared with the non-fermented *Canavalia gladiata* on NEAA and EAA. The fermented *Canavalia gladiata* was indicated by Canavanine.
 - The fermented *Canavalia gladiata* extracts (FCG) attenuated macroscopic and histopathological changes in skin of mice compared with the atopic dermatitis control group. FCG improved immune responses including increases of IgE and histamine for through attenuation of Th1/Th2 cytokines imbalance, and expression of pro-inflammatory cytokines and chemokines in NC/Nga mice. In addition, we showed that the FCG, 30% ethanol extract treatment inhibited Th1/Th2 cytokines imbalance on splenocyte, and expression of chemokines and pro-inflammatory cytokines on HaCaT cell (keratinocyte). The FCG, 30% ethanol extract caused the decrease in histamine production on MC/9 cell (mast cell) compared with the control group. The findings of this study suggest that fermented *Canavalia gladiata* extracts can protect against the development of atopic dermatitis by modulating immune system function.

IV. Outcome and Future Applications

From the outcomes of this project, the manufacturing technology for high-value processed foods using extracts from domestic *Canavalia gladiata* DC. were developed and authorized by 'item manufacturing report' and obtained two related products. The products have been developed via the evaluation of the enhancing energy efficiency and improving hypersensitive skin reaction of extracts from *Canavalia gladiata* and fermented *Canavalia gladiata*. Two patents on this project have been applied to products, process and efficacy of functional materials. Seven presentations have been published in scientific conferences and two papers submitted for publication. All this technology developed in this project has been planned for active use in new productions, new technologies, and market distribution.

CONTENTS

Chapter I . Overview of Research and Objectives	10
Section 1. Overview and Necessity of Research	10
Section 2. Objectives of Research	13
Chapter II . Research and development status in domestic and abroad	16
Section 1. Present state of R&D in Domestic and Overseas	16
Chapter III . Research contents and results	20
Section 1. Development of Functional food and Industrialization	20
Section 2. Development of functional material with elevating energy metabolism	83
Section 3. Development of functional material with atopic dermatitis by modulating immune	118
Chapter IV . Achievement and contribution	156
Chapter V . Plans for the use of the results	159
Chapter VI . International trend and scientific information	165
Chapter VII . Equipment	168
Chapter VIII . Safety Management of Laboratory	169
Chapter IX . References	172

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표	10
제 1 절 연구개발과제의 개요 및 필요성	10
제 2 절 연구개발과제의 성과목표	13
제 2 장 국내외 기술개발 현황	16
제 1 절 국내외 기술개발 현황	16
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	20
제 1 절 기능성강화식품 개발 및 산업화	20
제 2 절 친환경작두콩 대상 에너지증진능 기능성 식품소재개발	83
제 3 절 발효작두콩 대상 피부과민반응개선 기능성 식품 소재개발	118
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	156
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용계획	159
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	165
제 7 장 연구시설·장비	168
제 8 장 연구실 안전관리 이행실적	169
제 9 장 참고문헌	172
 <첨부> 특허, 논문, 제품(시장) 분석보고서	

제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표

제 1 절 연구개발과제의 개요 및 필요성

1. 연구개발과제의 개요

- 가. 농림수산물식품부에 따르면 친환경 유기농 식품 시장규모는 2011년에는 3조 9678억원으로 발표되었으며 2014년에는 4조8622억원, 2015년에는 5조3111억원으로 성장할 것으로 전망한 바 있다.
- 나. 저급한 먹을거리와 신종 질환 등 관련 이슈가 끊이지 않고 있는 가운데, 먹을거리에 대한 불안감 증폭으로 인해 친환경 원료 및 이들 식품에 대한 소비자의 수요가 갈수록 증가하고 있다.
- 다. 국내 친환경 농산물 재배 면적의 약 59%를 차지하는 전남은 최근 소비자의 요구에 적합한 원료들을 공급하고 있으나, 이들을 이용한 소비자 needs에 부합되는 제품개발이 부족한 실정이다.
- 라. 두류식품은 영양 및 기능성 측면에서 중요한 위치를 차지하고 있으나 식생활의 서구화에 따라 어린이 및 청소년층의 낮은 소비 현상이 나타나고 있다.
- 마. 에너지 식품시장은 음료 및 에너지 바가 주류를 이루고 있으며, 그 성분은 주로 당류 및 단백질로 알려져 있다. 더하여 카페인을 함유하고 있는 식품들이 개발되어 시장에서 판매되고 있다. 특히 청소년들의 건강을 위협하는 우려를 낳고 있어 이에 상응하는 제품 및 소재개발이 사회적으로 요구되고 있다.



- 바. 피부과민반응은 환경적인 요인과 유전적인 요인이 모두 관여하는 복합적인 만성적인 염증성 질환이다. 가려움, 홍반, 피부균열, 염증진행 등의 증상이 장시간 동안 회복과 재발생이 반복되는 만성 소모성 질환이다. 대개 1세 이하의 소아에서 시작하여 장기간 지속되며 90% 정도 자연치유 되는 경향이 있으나 성인이 된 이후에도 지속될 수 있는 만성적인 염증성 피부 질환이다. 피부과민반응에서는 다양한 면역세포들의 복잡한 기전에 의해 알레르기 반응을 일으키게 된다. 피부과민반응은 IgE와 연관된 면역기전에 의해 발생되는데 특정 알레르겐에 대한 즉시형 면역반응보다 T세포 이상에 의한 지연형 면역반응이 관여한다고 알려져 있다. 피부과민반응은 Th1 과 Th2 세포의 불균형으로 사이토카인 분비가 비정상적인 면역반응을 일으키며, Th1의 IL-2, IFN- γ 등의 사이토카인 분비 감소, Th2의 IL-4, IL-5, IL-10 등의 사이토카인 분비의 증가, B 세포의 isotype switching을 유도하고 IgE의 발현은 증가, IgE에 의한 비만세포의 활성화에 의한 히스타민 등의 화학물질을 분비 증가, 혈관과 피부를 자극시켜 증상을 악화시키는 일련의 과정이 나타난다. 피부과민반응의 정확한 원인을 규명하지 못하고 있으며 복합적인 인자가 함께 관련되어 있어 치료법에 관한 연구에서도 어려움을 겪고 있다. 피부과민반응 치료는 국소 스테로이드제, 항히스타민제, 면역조절제 등의 약물을 이용한 일시적인 치료가 일반적으로 이용되고 있으며, 치료제의 장기적인 사용은 부작용의 위험성이 있으며 근본적인 치료를 기대하기 어려운 상황이다. 따라서 대체 보완요법에 대한 관심이 증가하고 있으며 부작용이 적은 천연물로부터 기능성 소재를 찾는 연구가 활발하게 진행되고 있다.
- 사. 친환경 식품 섭취는 알레르기 소인을 가진 피부과민반응 연구 대상자들의 증상 호전에 유의적인 영향을 미치는 것으로 파악되었으며, 또 다른 연구에서도 친환경 식품이 피부과민반응 완화에 긍정적인 영향을 미친다고 하였다[1].

증가하는 아토피 피부염 ! 대안은 친환경적 생활과 먹거리

증가하는 아토피 피부염



보건복지가족부 2008년

- 아. 발효식품에 함유된 각종 단백질이나 펩타이드 등은 항암, 혈압 강하, 콜레스테롤 저하, 면역 증강, 항균작용, 비피더스 생육 촉진 등의 광범위한 생리활성을 나타내며, 발효식품을 먹으면 미생물 자체적으로 지닌 영양소와 유효 성분이 함유되어 있으며, 발효과정에서 생기는 산물은 우리 신체의 면역 기능이 잘 자라도록 해주며 또한 미생물의 분해 능력에 의해 식품의 소화 흡수율이 높아진다고 보고하였다[2].
- 자. 최근 발효 등의 기법을 응용한 생물전환물질의 개발이 기존에 사용해 오던 추출물들의 효율성 및 기능성을 향상시킬 수 있는 새로운 방안으로 등장하고 있다. 발효 기법의 효과는 기존의 천연물 추출물에 존재하는 배당체 및 올리고 펩타이드 등의 생리활성물질들에 미생물을 이용하여 aglycone 또는 di-, tri- 펩타이드로 전환하여 저분자화 함으로써 생체내에서 보다 쉽게 흡수되고 또한 특이적 생리활성도 나타나게 한다고 하였다 [3].
- 차. 발효는 친환경적인 기법으로 건강중심의 제품을 요구하는 소비자 needs를 충족시킬 수 있는 기술이며, 친환경 작두콩을 유효 소재화 할 수 있는 적합한 기술이다.

2. 연구개발과제의 필요성

- 가. 친환경 농산물의 재배농가 육성을 위해서는 친환경 농산물의 산업적 이용을 높이고, 소비 촉진을 위한 새로운 기술 창출이 필요하다. 즉 직접적인 농가소득창출을 위한 원료의 발굴과 함께 발굴된 원료의 고부가가치화 식품의 기술개발을 통해 지역내외의 활발한 산업화 촉진 방법을 개발할 필요가 있다.
- 나. 두류를 이용한 개발식품은 제한되어 있어 다양한 신규 기술개발과 제품화, 이들의 산업화가 필요하다.
- 다. 작두콩의 생리활성 연구는 매우 미흡한 상황이다. 친환경 작두콩의 산업화와 이들 연관 제품을 고부가가치화 하기 위해서는 작두콩 및 그로부터 가공된 소재들의 생리활성에 대한 과학적 접근방법의 연구가 필요하다.
- 라. 현재까지 작두콩을 이용한 에너지 대사 조절 연구는 진행된 바 없어 에너지 식품의 개발에 작두콩 에너지 대사 생리활성 조절 작용을 밝히고, 이를 제품 개발에 응용하여 기술적 선점 효과와 고부가가치 제품화로 산업화 할 필요가 있다.
- 마. 현재까지 작두콩의 면역 관련 연구는 일부 진행되어 있으나, 발효작두콩의 피부과민반응 관련 연구는 미개척분야로서 이의 생리활성 연구를 수행하고, 이를 제품 개발에 응용하여 기술적 선점 효과와 고부가가치 제품화로 산업화 할 필요가 있다.

제 2 절 연구개발과제의 성과목표

1. 기능성강화 식품개발 및 산업화

가. 기능성강화 식품 제조공정 표준화

나. 작두콩추출물을 함유하는 에너지증진 건강지향식품 개발

다. 발효작두콩(추출물)을 함유하는 피부과민반응개선 건강지향식품 개발

2. 작두콩 추출물 대상 에너지 증진능(能) 기능성 소재 개발

가. 작두콩 추출물의 에너지 증진 효능평가

나. 시제품의 에너지 증진 효능 평가

다. 작두콩 추출물의 에너지 증진 작용 기작구명

라. 작두콩 추출물의 산화적 스트레스 억제 기작구명

3. 발효작두콩 추출물 대상 피부과민반응개선 기능성 식품 소재 개발

가. 작두콩 발효 및 표준화

나. 동물 실험을 통한 발효작두콩 추출물의 피부과민반응 억제 효능 평가

다. 발효작두콩 추출물의 피부과민반응 억제 효능의 기작 연구

제 3 절 연구내용 및 범위

1. 친환경 작두콩을 이용한 기능강화 식품 개발

가. 선정 소재 가공기술 표준화 : 작두콩을 활용하여 에너지증진/피부과민반응개선 활성 소재로 선정된 추출물의 제조공정 표준화

나. 작두콩 함유 에너지증진 기능성강화 식품 개발 : 선호도 평가 결과를 바탕으로 선정한 제형으로 에너지증진 기능성강화 식품 생산

다. 발효작두콩 함유 피부과민반응개선 기능성강화 식품 개발 : 선호도 평가 결과를 바탕으로 선정한 제형으로 피부과민반응개선 기능성강화 식품 생산

라. Global 산업화 : 국내 온·오프라인을 통한 판매 및 해외바이어 수출을 통해 국내 천연물을 소재로 하는 건강지향식품의 Global 산업화

2. 작두콩 추출물 대상 에너지 증진능(能) 기능성 소재 개발

- 가. 작두콩 소재의 에너지 증진 효능평가 : 작두콩 소재의 안전성 평가, *in vivo* 지구적 운동능력향상능 평가, 지구적 운동능력향상 바이오마커 평가
- 나. 시제품의 에너지 증진 효능 평가 : *in vivo* 지구적 운동능력향상능 평가, 작두콩 소재의 에너지 증진 작용 기작구명, 에너지대사 관련 효소활성 분석, 에너지대사 관련 조절인자 발현평가
- 다. 작두콩 소재의 산화적 스트레스 억제 기작구명 : 추출물의 기능성분 함량 분석, 라디칼 소거활성 및 환원력 평가, *in vivo* 산화적 스트레스 억제능 바이오마커 평가

3. 발효작두콩 추출물 대상 피부과민반응개선 기능성 식품 소재 개발

- 가. 작두콩 소재 함유 피부과민반응개선 기능성 식품 소재 개발 : 작두콩 발효 및 시료 표준화, 발효 확립을 위한 시간별, 온도별 변화에 따른 최적 조건 설정, 유산균, 황국균을 이용한 작두콩 발효 및 발효 전·후 일반기능성분 비교를 통한 균주선발
- 나. 발효작두콩 추출 및 시료표준화(지표성분 설정)
- 다. 독성시험 : 발효작두콩의 단회, 반복 독성평가(male, female mice로 생존률, 생화학적 분석)
- 라. 동물 실험을 통한 발효작두콩 추출물의 피부과민반응 억제 효능 평가
 - (1) NC/Nga 마우스를 이용한 피부과민반응 유발 동물 모델에서 발효작두콩 추출물의 효능 평가 : 임상증상 평가 (관능평가시험, 경표피수분증발량 측정, Scratching behavior), 조직학적 평가 (피부조직 H&E염색을 통한 조직학적 관찰), 혈액학적 평가 (히스타민, 면역글로블린 농도 측정), 생물학적 평가 (비장세포 배양을 통한 사이토카인과 T세포 및 B세포 증식능 측정)
 - (2) 발효작두콩 추출물의 피부과민반응 억제 효능의 기작구명 : 비장세포와 Keratinocyte를 이용한 발효작두콩 추출물의 효능 평가 및 기작구명(히스타민, 면역글로블린 생성 기작 : 사이토카인 및 케모카인, T세포 및 B세포 기작)

제 3 절 연구성과

1. 기능성강화 식품개발 및 산업화

- 가. 기능성 강화식품 제조공정 표준화 완료
- 나. 작두콩추출물을 함유하는 에너지증진 기능성강화 ‘작두콩소이칩’ 식품개발
- 다. 발효작두콩 추출물을 함유하는 피부과민반응개선 기능성강화 ‘피넛씨리얼’ 식품개발

2. 작두콩 추출물 대상 에너지 증진능(能) 기능성 소재 개발

- 가. 작두콩 80%주정추출물과 작두콩 50%주정추출물은 지구적운동능력 증진 생리활성을 나타냄
- 나. 작두콩 추출물 함유 시제품은 지구적운동능력 증진 생리활성을 나타냄
- 다. 지구적운동능력 생리활성을 갖는 작두콩 추출물들은 에너지대사 증진 및 산화적 스트레스 억제 기작을 나타냄

3. 발효작두콩 추출물 대상 피부과민반응개선 기능성 식품 소재 개발

- 가. 작두콩 발효 및 표준화와 표준화 지표를 설정함
- 나. 동물 실험을 통한 발효작두콩 추출물의 피부과민반응 억제 효능을 확인함
- 다. 발효작두콩 추출물의 피부과민반응 억제 효능을 확인하고 기작을 밝힘

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내외 기술개발 현황

1. 기능성강화식품 개발 및 산업화

- 가. 작두콩은 민간에서 식용 및 약용으로 사용되어왔던 두류의 하나이다. 이들의 국내 유입 기원을 파악할 수 없으나 현재 국내에서 재배되고 있는 꽃과 종실이 붉은색인 *Canavalia gladiata*(Jacq) DC.와 흰색인 *Canavalia gladiata*(Jacq.) DC. var *alba*의 두 종이 있는 것으로 알려져 있다[4]. 도두라고 불리는 작두콩은 한해살이 덩굴성 식물로 식용 두류 가운데 제일 큰 품종이며, 종실뿐만 아니라 뿌리, 꼬투리, 잎 등 식물체 모두 약용 또는 식용으로 사용되어 왔다 작두콩에는 전분, 단백질, 지방, 무기질, 비타민 A, B1, B2, C 및 niacin, urease, 혈구 응집소(PHA: phytohemagglutinin), canavanine 등이 함유되어 있는 것으로 보고되었다. 유두에는 canavalia gibberellin I 및 II가 있으며, 잎에 canavanine이 함유되어 종양 억제 작용, 소염, 혈액 순환 촉진 작용 및 민간요법으로 딸국질, 축농증, 비염, 백일해 및 신허요통 등의 개선 및 치료에 사용하는 것으로 알려져 있다[5]. 또한 작두콩의 혈구 응집소(PHA)는 항암 효과가 우수하며, 일본에서는 작두콩을 비염, 치통, 치조농루, 습진, 종기 및 화농성·염증성 질환 등의 개선을 위한 민간 치료 요법에 사용되고 있다[6].
- 나. 다양한 약리적 효능과 건강 기능성이 알려져 있음에도 불구하고 가공방법 및 용도 개발 그리고 건강 기능의 효과에 대한 연구의 부족으로 작두콩 또한 생산량 대비 수요량이 적어 재배 농가의 수익성이 낮은 것으로 알려진 바 있다[7].

<p>■ 작두콩 항산화·항균물질 다량 함유 - 광주보건환경연구원</p> <p>■ 작두콩! 면역성분 압제포 억제성분 다량 함유! 만성 축농증, 비염, 편도선염 환자들이 많이 찾아 - 내일신문</p> <p>■ 중초를 따뜻하게 하고, 기를 잘 통하게 하므로 위나 장이 허냉하여 생긴 염증에 효력이 좋다 - 동의학사전</p> <p>■ 보통의 항암제는 위암이나 간암 등 특정한 암에만 효능이 있지만 작두콩은 5종류의 암에 효능이 있는 것으로 밝혀져... - 연합뉴스</p>

- 다. 작두콩을 이용한 가공제품은 작두콩 엑기스, 환 및 분말, 샴푸, 바디클렌저 등이 생산 농가를 중심으로 제품화 된 바 있다. 최근에는 작두콩을 첨가한 장류의 기술개발과 제품화가 이루어져 작두콩의 고부가가치화가 걸음마 단계에 있는 실정이다.
- 라. 국내의 친환경 전문시장에서는 수입산 원료와 첨가물을 허용하고 있지 않아 에너지와 관련된 제품은 없는 실정이다. 친환경 시장내에 기능성 강화식품은 극히 제한적으로 국내산 친환경 작두콩을 활용한 제품은 친환경 시장내 판매되고 있는 제품이 없다.
- 마. 청소년층을 대상으로 친환경 식품의 개발은 과자류 소비시장을 살펴볼 때 지속적인

소비층을 이끌어 내기에 적합한 것으로 분석되고 있다.

- 바. 과자류의 대표 시장인 스낵시장은 2012년 기준으로 생산 규모는 약 41만 8천 톤이고 생산액은 약 1조 38억 원으로 집계되고 출하량은 2012년 약 13만 9천 톤이고 출하액 기준으로 약 1조 40억 원이다. 수입 실적의 경우 수출에 비해 급속하게 성장하고 있는데, 수입액은 2008년 약 2억 2천만 달러에서 2013년 약 4억 달러로 약 68% 급증하고 있다.
- 사. 국내에서 생산하는 과자류의 사용 원료로는 곡류인 소맥(밀), 옥수수, 쌀과 곡류의 분말 형태인 소맥분(밀가루), 옥수수가루, 쌀가루 등이 있다. 그리고 대두와 감자, 변성전분 등 다양한 원료가 있다. 스낵과자의 유통경로는 대부분 B2C 소매 유통 채널을 통해 이루어지는데, 국내 제조 및 판매 업체의 경우 도매 유통채널인 영업소와 대리점을 거친 후 일반 식품점, 편의점, 독립 슈퍼, 할인점 등의 소매 유통 채널을 통해 소비자에게 판매되는 경로가 대부분이다. 국내 스낵과자 시장은 편의점 PB 과자 시장의 성장, 프리미엄 과자의 확대, 건강을 생각한 웰빙 스낵 선호, 그리고 이색 스낵 제품 및 관련 마케팅 등의 소비시장 특성을 갖고 있다. 수입 과자의 경우, 중간 유통과정을 거치지 않고 수입 과자점에서 소비자에게 직접 판매되는 경로가 추가로 성행하고 있다.
- 아. 해외 스낵시장은 Nuts and Seeds(너트 및 씨앗류), Other Savory Snack(기타 짹짹한 스낵), Popcorn(팝콘), Processed Snacks (가공 과정을 거친 스낵), Potato Chips(감자칩)의 세부 품목으로 나누는 기준을 나타내고 있다. 너트류는 Peanut(땅콩)과 그 외 너트 및 씨앗류로 세분화되고 기타 짹짹한 스낵은 Pretzel(프레첼)과 Ethnic Snack(전통 스낵)으로 세분화되어 있다. 팝콘은 Microwaveable(전자레인지 전용), Ready-to-eat(바로 먹는), Unpopped (부풀리지 않은) 팝콘 등으로 세분화되어 있으며, 가공 과정을 거친 스낵은 Corn Chips(콘 칩), extruded snack(압축 스낵), 그리고 tortilla Chips(토르티아 칩)으로 세분화 되어 있다. 스낵과자에 대한 국외 트렌드는 개별적 욕구 충족을 위한 다양성 추구, 쉽고 편리한 구매 및 취식을 위한 제품, 건강에 대한 꾸준한 관심, 원재료 안전 확보 등이 소비시장의 특성으로 나타나고 있다[8].

2. 에너지증진능 기능성 소재개발

- 가. 에너지 증진 생리활성능 측정과 관련하여 유영 혹은 트레드밀을 이용한 운동수행능력을 평가하는 기법이 유용하게 사용되고 있으며, 에너지대사 증진과 관련된 기작 구명 연구의 평가방법으로도 이용되어 왔다.
- 나. 에너지 증진은 최근 에너지 균형과 건강을 추구하는 소비자의 건강성 및 기호성에 필요한 요소로 에너지 소재의 개발이 핵심 기술이며, 이들을 이용한 다양한 신규 에너지 식품의 개발이 가능하다.
- 다. 에너지 식품은 식품시장에서 음료 및 에너지 바가 주류를 이루고 있다. 특히 그 핵심 원료는 건강기능식품원료 들 중 에너지 연관 기능성 원료에서 찾아 볼 수 있다.

건강기능식품원료 중 에너지 생성 및 에너지 영양소 대사의 에너지 생성에 필요한 영양소 기능성 원료로는 비타민 B1, B2, 나이아신, 판토텐산, 비오틴, 마그네슘, 철, 요오드, 망간이 있고, 지구력 증진에 도움을 주는 고시형 건강기능식품 소재로는 옥타코사놀함유 유지가 있다. 지구력증진 기능성이 인정된 개별인정형 소재로는 마카 젤라틴화 분말, 크레아틴, 동충하초 발효추출물이며, 피로개선에 도움을 주는 것으로 인정된 고시형 원료는 인삼, 홍삼, 매실추출물이고, 개별인정형 원료는 발효생성 아미노산복합물과 홍경천추출물이 있다.

- 라. 최근 연구에서 솔잎분말 첨가식은 에너지의 저장량을 증가시켜 운동수행능력의 향상을 보였으며 이를 이용한 에너지 저장능력에 대한 연구의 병행은 운동보조식품으로서의 가치를 입증할 수 있을 것이라고 연구 보고된 바 있다[9].
- 마. 최근 국외 연구진들은 Citrulline 섭취를 통해 유영시간증가, 혈중 젖산농도 감소를 통하여 운동수행능력의 향상을 확인하였으며, Citrulline이 신규 운동보조식품의 소재로 활용할 수 있을 것이라고 보고하였다[10].
- 바. 황기 추출물을 이용하여 swimming test, treadmill test하여 운동수행능력이 향상됨이 보고되었고, 혈중 바이오마커들에서 유의적인 차이를 보여 황기 추출물이 신규 ergogenic aid로 사용될 수 있다고 최근 보고되었다[11].

3. 발효작두콩 추출물대상 피부과민반응개선 기능성 소재개발

- 가. 국내 아토피 환자의 급증에 따라 대기업-제약사-바이오벤처들은 관련시장 선점을 위해 다양한 제품을 개발하고 있다[12].
- 나. 정제된 작두콩 추출물은 무좀을 발병시키는 *Trichophyton mentagrophytes*, 여드름을 유발시키는 *Propionibacterium acnes*에 대하여 탁월한 항균활성을 가진다고 보고된 바 있다. 또한 한약초와 작두콩을 발효처리한 추출물에 약초액을 넣은 조성물이 알레르기성 질환 및 무좀균 치료, 피부재생에 긍정적인 영향을 미쳤다고 (주)한빛코리아가 발표하였다[12].
- 다. 국내의 (주)바이오에프디엔씨의 천연 한방 추출물을 통한 아토피 피부염 개선 효능 연구, (주)성균바이오텍의 식물추출물을 함유하는 아토피성 피부염을 치료를 위한 약학 조성물 연구 등 다양한 업체에서 천연물을 통한 아토피 피부염 치료 효능을 확인하기 위한 연구가 진행 중이다. 이러한 연구 현황은 산업적으로 발전할 가능성이 높은 효과적인 건강기능식품을 개발에 관심이 증가하여 그 과학적 효능 규명에 대한 필요성 증가에 따른 현상으로 보인다[12,13,14,15].
- 라. 최근 미국에서는 EPA를 비롯하여 DHA, GLA, LA 등 천연의 고도불포화 지방산의 항아토피 활성을 개와 양들에 대한 동물실험으로 입증하였다. 이들이 arachidonic acid cascade에 미치는 활성기작이 널리 규명되어 있어서 피부질환 치료제에의 개발가능성이 높게 평가받고 있다. 따라서 이들이 고농도로 함유된 어유(fish oil), 식물의 종자유 등이 피부질환증상완화제의 성분으로 널리 활용되고 있다. 이처럼 국외에서도 기존 합성의약품의 부작용 등으로 천연물을 이용한 신약 개발이 활발히

진행 중이다[16,17].

마. HMGB1 translocation과 RAGE/NF- κ B의 아토피 피부염 연관성에 대한 연구, IFN- γ 에 의한 Nfkbiz expression이 아토피 피부염에 미치는 영향 등 아토피 피부염의 기전을 밝히기 위한 연구도 활발하게 진행 중이다[18,19].

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 기능성강화식품 개발 및 산업화

1. 소재확보 및 추출물의 제작

가. 방법

(1) 작두콩 원료 검토

식품원재료데이터베이스를 활용하여 ‘작두콩’에 대한 정보와 식품원료 활용여부를 확인하였다. 또한 학술자료와 전문가 자문을 통해 개화기, 분포, 형태, 잎의 형태, 꽃, 열매, 줄기, 생육환경, 번식방법, 국내 분포도 등의 정보를 조사하였다.

(2) 친환경 작두콩의 안전성 평가

안전성 평가를 위해 원료의 원산지 및 친환경 서류를 검토하였으며, 친환경농산물 검사 기준으로 제시된 잔류농약항목 177종에 대한 검사를 그 시험방법에 준하여 분석하였다. 중금속(납, 카드뮴, 수은, 비소) 및 총 아플라톡신은 식품의약품안전청 고시 식품공전의 시험방법에 준하여 평가하였다.

(3) 추출물 제작

시료제작은 아래와 같이 원료 평량, 추출, 농축, 동결건조 과정으로 진행되었다.

(가) 원료평량

작두콩 2.5kg을 정확히 칭량하고 매 추출시 원료를 정확히 재 칭량하여 추출원료로 사용하였다.

(나) 추출

소형추출/농축기((주)대신기공 2ton)를 이용하여 물추출물은 25L의 물로 용매를 조제하여 추출용매로 사용하였고, 30%주정추출물은 17.5L의 물과 7.5L의 주정으로 용매를 조제하여 추출용매로 사용하였고, 50%주정추출물은 12.5L의 물과 12.5L의 주정으로 용매를 조제하여 추출용매로 사용하였고, 80%주정추출물은 5L의 물과 20L의 주정으로 용매를 조제하여 추출용매로 사용하였다. 추출은 각 용매별로 용매를 투입하고 온도, 시간, 압력을 맞추어 추출하였다.

	추출 원료량 (Kg)	추출용매 (L)		추출온도 (℃)	압력 (Kg/cm ²)
		물	주정		
작두콩 물추출물	2.5	물	25	100	0.7~0.75
		주정	0		
작두콩 30%주정추출물	2.5	물	17.5	85	0.7~0.75
		주정	7.5		
작두콩 50%주정추출물	2.5	물	12.5	80	0.7~0.75
		주정	12.5		
작두콩 80%주정추출물	2.5	물	5	80	0.7~0.75
		주정	20		

(다) 농축

작두콩 물추출물은 소형추출/농축기((주)대신기공 2ton)의 농축 기능을 가동하여 70℃에서 내부감압 750 mmHg로 추출액을 농축하였다.

작두콩 30%주정추출물은 소형추출/농축기((주)대신기공 2ton)의 농축 기능을 가동하여 65℃에서 내부감압 750 mmHg로 추출액을 1차 농축하고, 1차 농축액에 정제수를 15L 투입하여 2차 농축하였다.

작두콩 50%주정추출물은 소형추출/농축기((주)대신기공 2ton)의 농축 기능을 가동하여 60℃에서 내부감압 750 mmHg로 추출액을 1차 농축하고, 1차 농축액에 정제수를 15L 투입하여 2차 농축하였다.

작두콩 80%주정추출물은 소형추출/농축기((주)대신기공 2ton)의 농축 기능을 가동하여 60℃에서 내부감압 750 mmHg로 추출액을 1차 농축하고, 1차 농축액에 정제수를 25L 투입하여 2차 농축하였다.

(라) 동결건조

동결건조기((주)대명이엔지)에 시료를 넣고 내부압 0.5Torr에서 -35℃에서 60시간 동결건조 하였다.



<소형추출/농축기>



<동결건조기>

나. 결과

(1) 작두콩 원료

‘작두콩’ 과 ‘도두’ 를 포함하여 3종류가 검색어로 식품원재료데이터베이스에서 확인되었다. 학명, 과명, 식용가능여부, 식용부위, 특성분포, 주요성분, 안전성·독성, 식용이외의 용도에 대해 확인하여 원료의 정보를 확보하였다. 또한 학술자료와 전문가 자문을 통해 개화기, 분포, 형태, 잎의 형태, 꽃, 열매, 생육환경, 국내 분포도 등의 정보를 확보하여 원료의 정보를 확보하였다.

도두(작두콩)	
학명	<i>Canavalia gladiata</i> (Jacq.) DC.
과명	Leguminosae(콩과)
식용가능여부	식용가능
식용부위	열매
특성분포	콩과의 한해살이 덩굴풀. 잎은 어긋나고 세 개의 작은 잎으로 된 겹잎이다. 여름에 긴 꽃줄기가 나와 옅은 홍자색 또는 흰색의 꽃이 총상(總狀) 화서로 피고 작두날 같은 콩꼬투리 속에 열 개가량의 씨가 들어 있다. 열대 아시아가 원산지이다.
주요성분	canavaline
안전성·독성	-
식용이외의 용도	-
근거자료	국립국어원.표준국어대사전. http://stdweb2.korean.go.kr .2012 이영노,한국식물도감,교학사,401p(1998) 두산세계대백과엔사이버 안덕균,원색한국본초도감,교학사(1998)원색한국식물도감,교학사(1996) 이우철,원색한국기준식물도감,아카데미서적,(1996) 이창복,대한식물도감,향문사,(1979) 정태현,한국식물도감,신지사,(1958)

< 식품원재료데이터베이스 >

작두콩	
학명	<i>Canavalia gladiata</i> (Jacq.) DC.
과명	Leguminosae(콩과)
개화기	8월
분포	중부이남에 식재
형태	덩굴성 한해살이풀
잎의 형태	잎은 3출엽으로서 원줄기와 더불어 털이 없고 소엽은 난상 긴 타원형이며 길이 10cm 로서 끝이 뾰족하고 엽병이 짧다.
꽃	잎겨드랑이에서 긴 화경이 자라 끝이 활같이 굽으면서 10여개의 꽃이 수상으로 달리며 꽃차례는 길이 7cm이고 꽃은 8월에 피며 연한 홍색 또는 백색이고 접형화로서 극히 짧은 꽃자루가 있다. 꽃받침은 종형이며 2개로 갈라지고 기꽃입은 둥글며 접혀지고 10개의 수술과 1개의 암술이 있다.
열매	열매는 협과로 길이 30cm, 폭 5cm로서 뒷등이 편평하며 작두 같고 10~14개의 종자가 들어 있다. 종자는 편평하며 홍색 또는 백색이고 선상의 종부와 길이가 거의 같다.
생육환경	칼콩은 비교적 내한발성이고, 다른 두과작물에 비하여 내염성이 높은 것으로 알려져 있다. 열대원산이어서 고온을 좋아하고 25℃ 전후의 기온이 적합하다. 광범위한 토양에서 생육할 수 있어 양토에서 사질토까지도 적합하다. 중점도에서는 종자가 굵어 발아시 호흡량이 많아 발아가 나쁘게 된다. 약산성을 좋아하여 pH5.0 ~ 7.1에서 재배가 가능하다.

< 작두콩 식물정보 >

작두콩 계약재배 현황은 2010년을 기준으로 전남, 충북, 경북에 주요 재배가 되고 있었으며, 주로 전남지역의 재배 및 수매량이 높은 것으로 나타났다.

구분	전남 강진	전남 장흥	전남 화순	충북 옥천	경북 의성	합계
재배면적	2,480 m ²	3,306 m ²	4,132 m ²	6,198 m ²	4,132 m ²	20,248 m ²
수매량	600 kg	800 kg	1,000 kg	1,500 kg	1,000 kg	4,900 kg

<작두콩의 재배 및 수매량>

작두콩은 광주 및 전남의 지역특화작목으로 집중 육성되고 있으며, 종래에 생산되는 농산물과의 차별화 및 경쟁력에 우위를 갖는 것으로 파악되었다.

품목	재배면적(m ²)	수확량(Kg)	1Kg당 수매비용 (원)	생산소득(원)	비고
쌀	661.16	330	1,850	610,500	
작두콩	661.16	160	13,000	2,080,000	

<작두콩 생산소득 비교>

(2) 친환경 작두콩 안전성 평가

(가) 작두콩은 건조된 형태로 황금농원식품으로부터 구매하였으며, 원산지 증명서를 통해 충북 옥천산 원료임을 확인하였고, 잔류농약검사에서 177종 항목 모두 불검출로 확인되어 잔류농약에 대한 안전성 여부를 검토하였다.



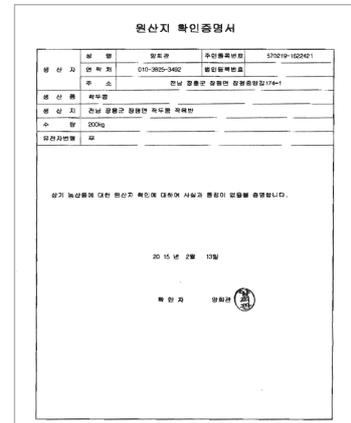
[작 두 콩]



[잔류농약검사성적서]



[친환경인증서]



[원산지증명서]

(나) 4종의 납, 카드뮴, 수은, 비소 검사항목에서 유사 식품의 기준 적용 범위 이내의 결과를 얻어 중금속에 안전성 여부를 검토하였다.

분류	종류	검사결과
중금속	납(mg/kg)	0.1569
	카드뮴(mg/kg)	0.0020
	수은(mg/kg)	0.1450
	비소(mg/kg)	0.0168

(다) 총아플라톡신에 대한 곰팡이독소 검사를 식품공전 상 시험방법에 준하여 실험하고 불검출 결과를 얻어 곰팡이독소에 안전성 여부를 검토하였다.

분류	종류	검사결과
곰팡이독소	총아플라톡신	불검출

(3) 추출물 제작

각 추출물의 수율은 추출 전 시료 대비 동결건조물의 중량으로 계산하였다.

	시료명	추출물(g)	수율(%)
작두콩 물추출물	CGW	393	14.3
작두콩 30%주정추출물	CGE30	965	35.1
작두콩 50%주정추출물	CGE50	303	12.1
작두콩 80%주정추출물	CGE80	406	14.8

[시생산 작두콩추출물의 수율]



작두콩 물추출물
CGW



작두콩 30%주정추출물
CGE30



작두콩 80%주정추출물
CGE80

2. 시제품의 제형개발

가. 방법

(1) 기능별 제품 선호도 평가

조사항목으로 연령, 성별, 기호식품의 섭취빈도, 기호식품의 관능적 선택기준, 기호식품 선택 식품유형, 기호식품의 선택시 가치요소, 기호식품의 선택 가격요소, 소비자가 고려하는 기호식품 개발시 중요요소, 기호식품 구매 시장선택요소, 식품의 맛과 원료의 안전성 선호도, ‘에너지증진’ 기능성 선택 식품유형, ‘과민성피부반응개선’ 기능성 선택 식품유형, 각 기능성과 식품제형 선호도를 평가하였다. 제품유형과 관련하여서는 기능성과 식품유형간의 1차 선호도 결과를 바탕으로 도출된 식품유형에 따른 제형을 선정하여 제작된 설문지를 이용하여 유아층과 청년층의 선호도 평가를 수행하였다.

(2) chip 제형

(가) 원료확인

시제품 제형 개발에 사용할 친환경(유기농) 원료들을 확인하고 배합비에 맞춰 정밀히 칭량하여 실험에 사용하였다.

(나) 배합 및 용액제조

① 원료 배합

대형 리본믹서기에 넣고 15~20분간 혼합하였다. 혼합된 원료는 리본 믹서기를 통해 호퍼에 모여진 후 원료 이송관을 따라 압축성형기로 유입되었다. 압출성형의 결과물을 확인하고 곡물의 성상을 파악하여 Chip의 최적화 제형에 따른 배합비를 완성하였다.



원료 배합 모습



리본믹서기

② 용액 및 분말제조

시럽코팅으로 개발되는 제형을 위해 원료를 액조제 탱크에 넣고 물과 유기농 설탕을 설정온도까지 올려 끓인 다음, 50℃ 온도에서 씨즈닝을 잘 용해시켜 코팅용액을

제조하였다. 분말코팅으로 개발되는 제형을 위해 액조제 탱크에 고올레산해바라기유를 넣어 설정온도까지 끓인 다음 식혀놓고, 맛 개발을 위해 인절미맛 원료를 배합하여 분말을 제조하였다.



액조제 탱크



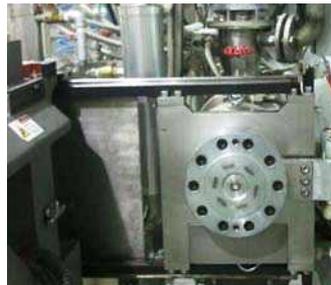
액조제 탱크 내부

③ 압출성형

성형 사출기의 규격을 사용하여 성형하였으며, feed 곡물투입량과 압력, 수분함량 등의 조건을 조절하면서 생산하였다. 압출 성형되어 나온 공정품은 압연, 절단 과정을 거쳐 에어 이송관을 따라 다음 과정으로 들어갔다.



Twin Screw Extruder



다이모양



컨트롤시스템



롤링/컷팅기



압출모습1



압출모습2

④ 1차 건조

1차 건조는 5단 건조기를 이용하여 표준화된 온도를 적용하여 건조하였다.



1차건조기



투입모습



배출과정

⑤ 파칭

고온 자동파칭기를 이용하여 표준화된 회전 속도를 적용하여 파칭하였다.



자동파칭기



파칭기 컨트롤



투입모습



배출모습

⑥ 코팅

드럼코팅기에서 식물성유지를 sprinkle하면서 제조한 분말도 함께 분사하여 코팅하였다.



드럼코팅기



분말투입기

⑦ 2차 건조

5단 건조기를 이용하여 건조하였다.



2차건조기



투입모습



배출과정

⑧ 포장

최종 포장 전 시생산의 제형들은 벌크 형태로 포장하여 실험에 사용하였고, 시생산 하였다.



선별모습



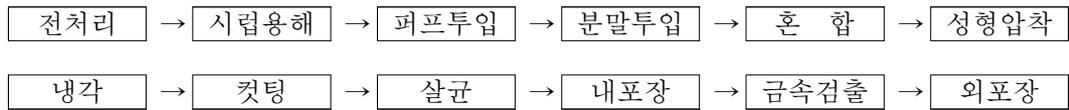
자동포장기

⑨ 최종 원료배합비

쌀가루, 옥수수가루, 보리, 옥수수전분, 백태, 소이식이섬유, 코코넛파우더, 오크분말, 콩비지분말, 천일염의 재료의 최종배합비를 선정하여 시생산에 이용하였다.

(3) Bar 제형

(가) 주요공정도



(나) 원료확인

시제품제형 제작에 사용할 원료들을 배합비에 맞춰 정밀히 칭량하였다. 주원료는 국내산 펫핑곡물과 볶음콩가루 및 19곡분말, 미니칩, 베리류, 쿠키가루, 이소말토올리고당을 이용하였다.

(다) 혼합 및 압착성형

① 원료 혼합

시럽을 용해하여 준비하고 퍼프와 믹서하면서 분말을 투입하였다. 대형 믹서기에 넣고 15~20분간 혼합하였다.



원료투입기



시럽용해 및 보관탱크

② 성형 - 압착

혼합된 원료에 시럽을 투입하여 혼합하고 혼합물을 믹싱한 후 압착기로 이송하였다. 컨베이어로 이송하면서 약 19~20 mm두께로 압착하였다.



성형 및 압착공정



이동되면서 압착되는 모습

③ 냉각 및 컷팅

압착된 제품은 냉각기를 통과하면서 냉각시켰다. 냉각된 반제품은 줄컷팅기를 통해 30*19~20cm(폭*두께)로 컷팅되어 분배컨베이어를 통해 분배시켰다. 분배된 시제품은 컷팅기로 컷팅되면서 UV살균기를 통과하게 하였다.



성형공정 파라메타



냉각터널



줄컷팅기



분배컨베이어



컷팅기



UV살균모습

④ 정렬 및 포장

93±10mm로 컷팅된 제품은 포장하기 용이한 형태로 정렬하여 소포장으로 포장하였다.



정렬공정



포장공정



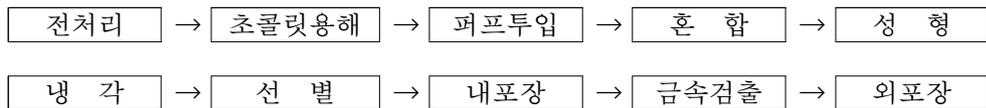
금속검출기

⑤ 원료 배합비

올리고당, 아리스크리스피, 19곡분말, 미니칩, 쌀엿, 콩가루 등의 재료 최종배합비를 선정하여 시생산에 이용하였다.

(4) 크런치 제형

(가) 주요 공정도



(나) 초콜릿 용해 및 성형

준 초콜릿제품을 용해탱크에 넣고 40℃에서 1.0시간동안 용해하였다. 용해된 초콜릿에 펫핑곡물과 분말을 혼합하여 드럼성형기에서 35~40℃ 온도로 20회/min의 속도로 회전하면서 사각 및 원형으로 성형하였다.



초콜릿용해탱크



초콜릿성형공정

(다) 냉각공정 및 포장

성형 압착된 시트를 냉각터널을 통해 $10\pm 5^{\circ}\text{C}$ 에서 약 10분간 냉각하였다. 필로우 포장기를 통해 제품 중량을 확인하고 포장하였다.



초콜릿 냉각공정



냉각터널

(라) 원료 배합비

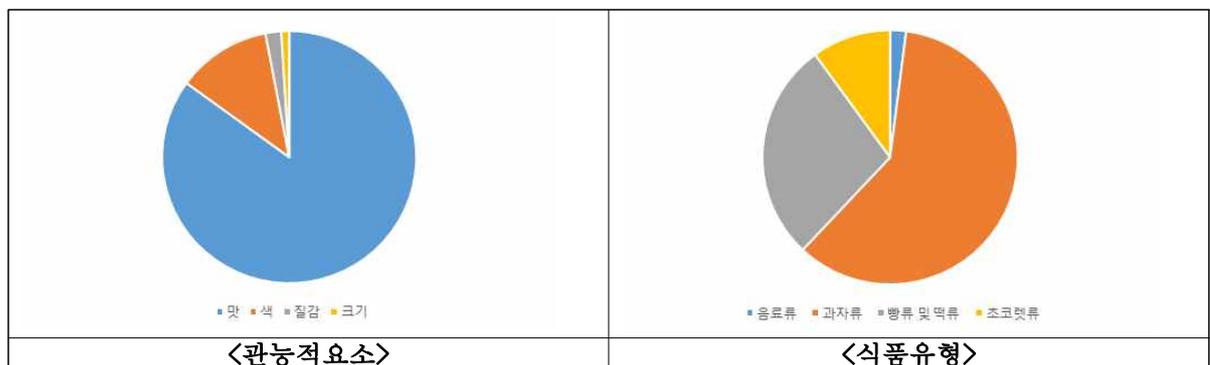
디다크, 초코쿠키크런치, 19곡분말, 콩분말 등의 재료 최종배합비를 선정하여 시생산에 이용하였다.

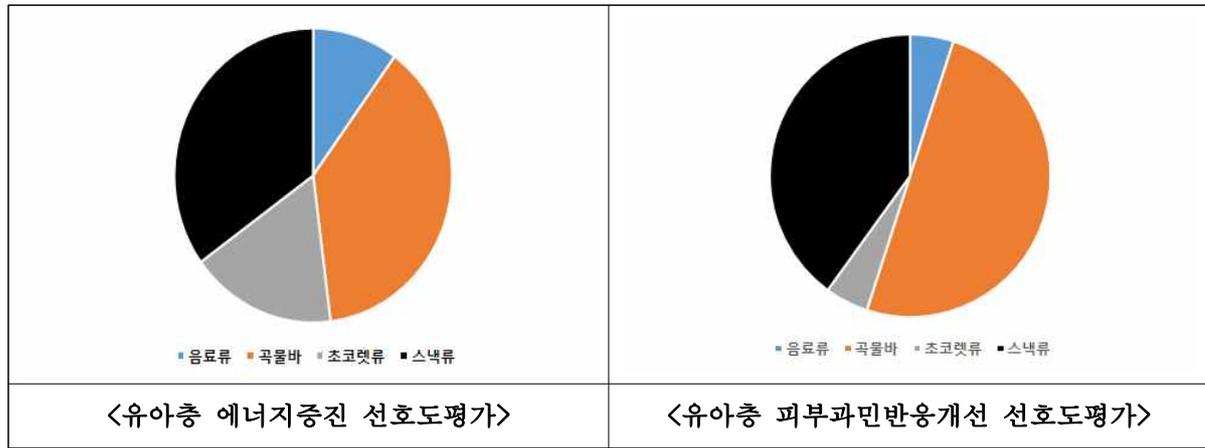
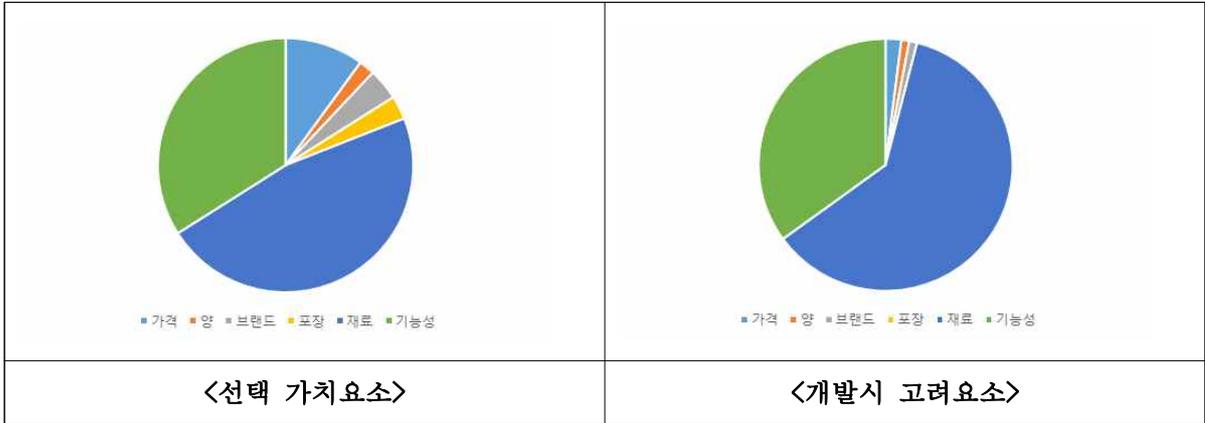
나. 결과

(1) 기능별 제품 선호도 평가

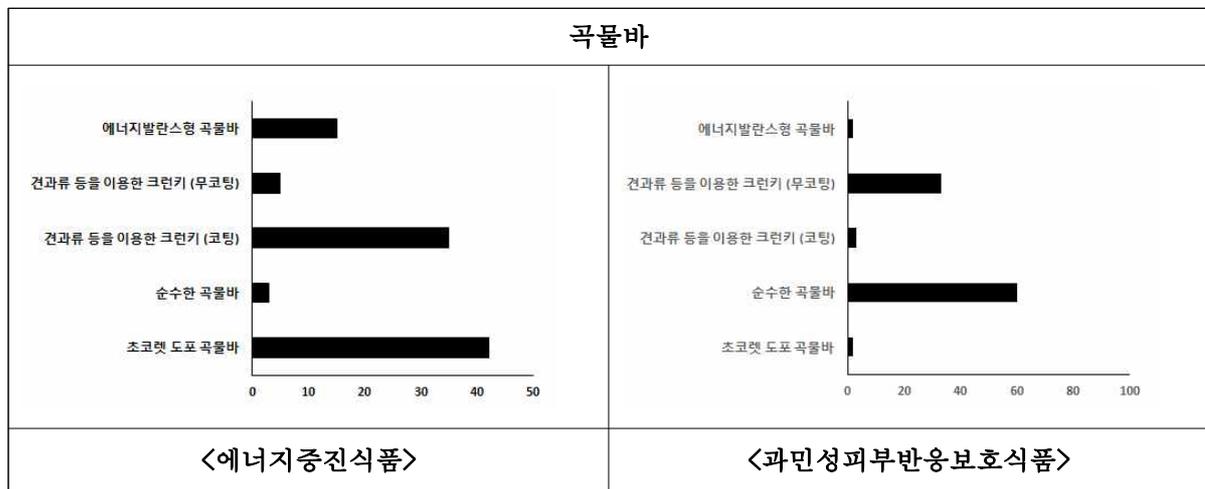
(가) 유아층 선호도 평가

유아층을 대상으로 수행한 선호도 평가에서 총 50명 평가자의 연령은 5세~7세였고, 이들의 남녀 성별비율은 50:50 이었다. 평가시 유아와 그 부모들이 같이 검사표 작성시 참여하였다. 평가자들이 기호식품을 선택하는 가장 중요한 관능적 요소는 ‘맛’ 이었으며, 선택시 선호된 식품유형은 ‘과자류’ 였다. 선택시 가치요소 및 개발시 중요요소는 ‘재료’ 와 ‘기능성’ 이었으며, 식품 선택요소 중 맛에 비하여 재료의 안전성 부분의 선택이 높게 나타났다. 유아층 대상 기능성별 식품유형 선호도 평가에서 ‘에너지증진’ 기능성에 대한 선택은 ‘곡물바’, ‘스낵’ 의 선호도가 높았고, ‘과민성피부반응개선’ 기능성에 대한 선택에서도 ‘곡물바’, ‘스낵’ 의 선호도가 높게 나타났다.





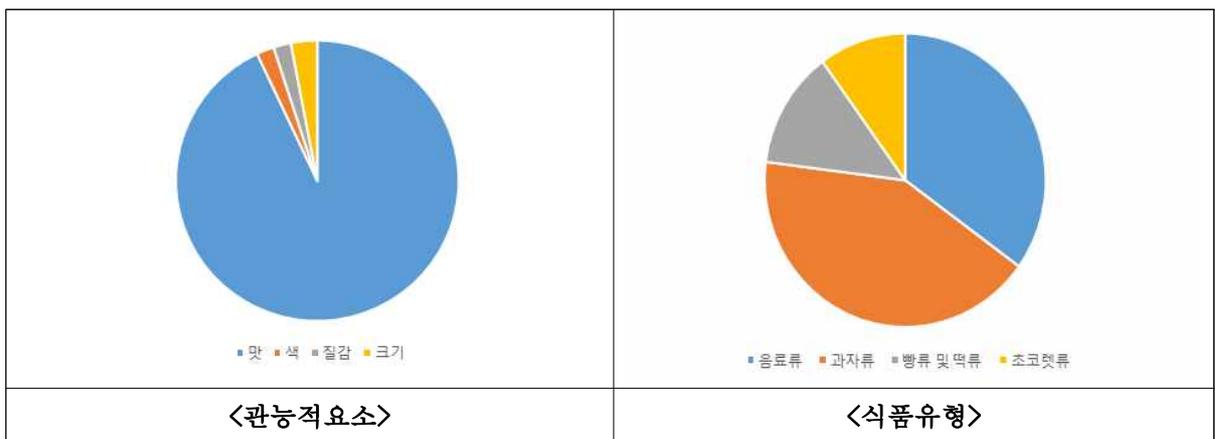
유아층을 대상으로 기능성과 제형간의 선호도를 평가한 평가결과에서 ‘에너지증진식품’으로 가장 적당하다고 생각하는 제형 선택 질문에서 초콜릿을 도포한 곡물바의 형태와 견과류 등을 활용한 크런키 형태의 곡물바의 선호도가 높게 나타났다. 또한 스낵류의 경우 칩 제형과 소형 구형의 선호도가 높게 나타났다. ‘과민성피부반응보호식품’으로 가장 적당하다고 생각하는 제형 선택 질문에서 곡물바는 순수한 곡물바의 제형과 견과류 등을 활용한 크런키 형태의 곡물바의 선호도가 높게 나타났고, 스낵류에서는 스틱 제형과 칩 제형의 선호도가 높게 나타났다.

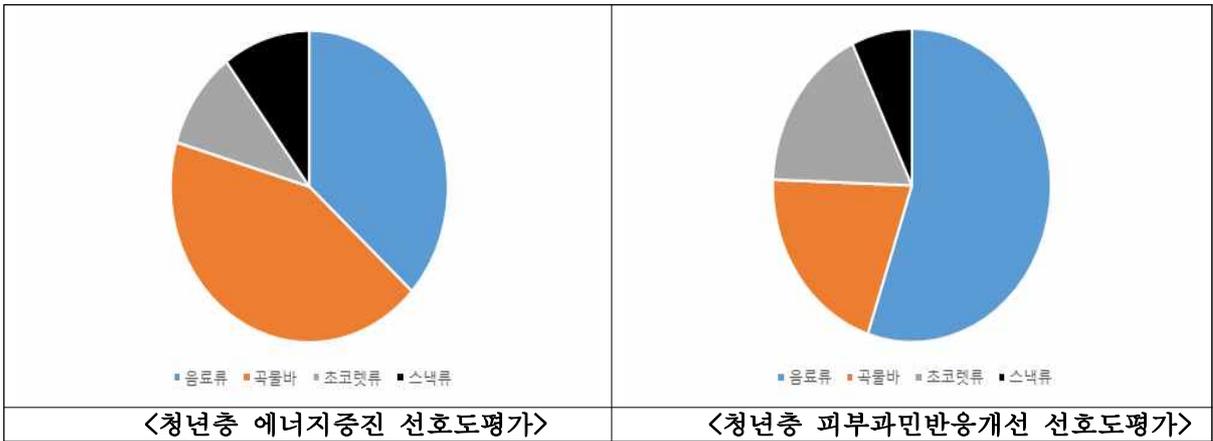
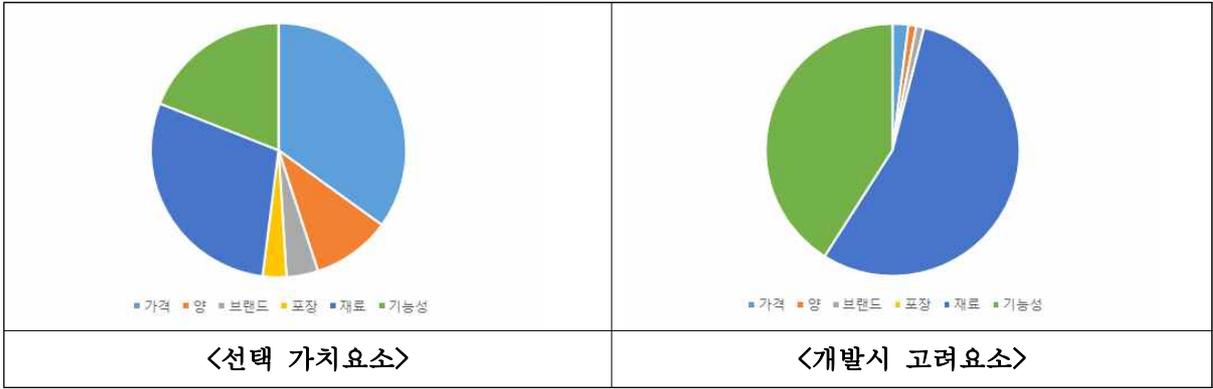




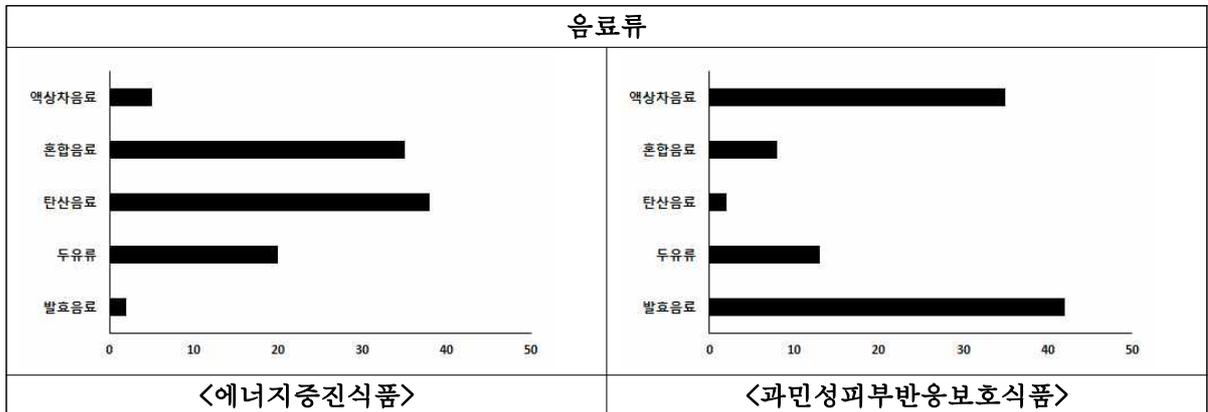
(나) 청년층 선호도 평가

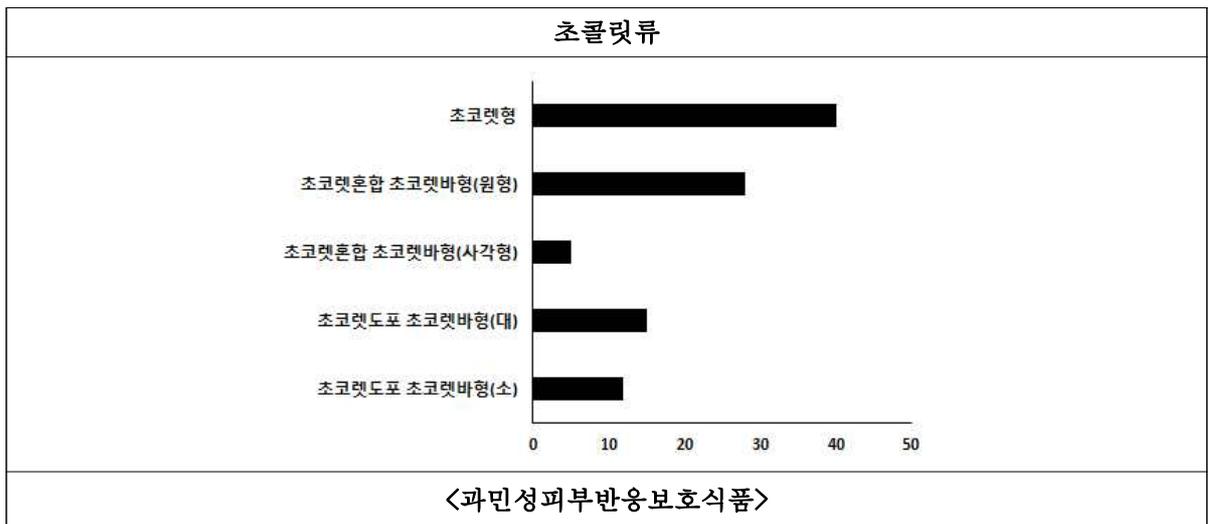
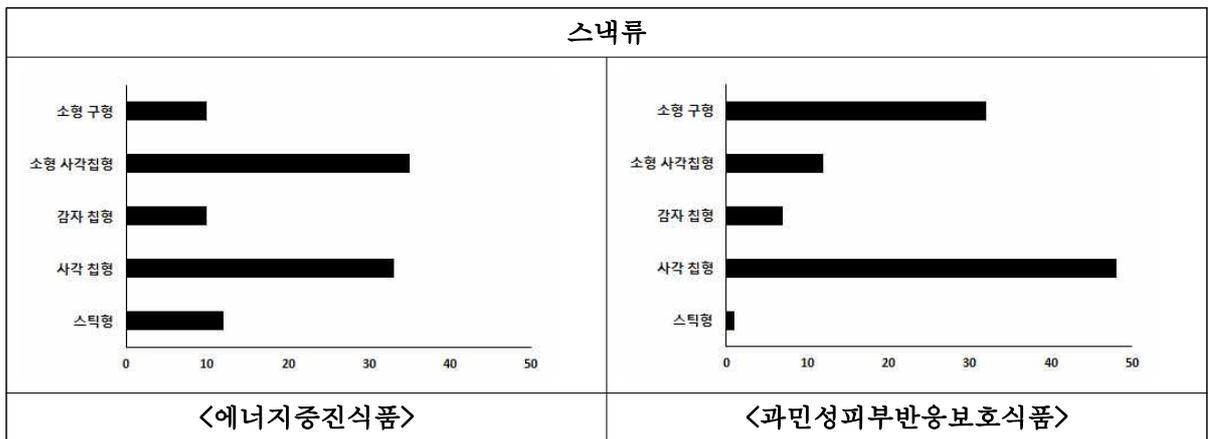
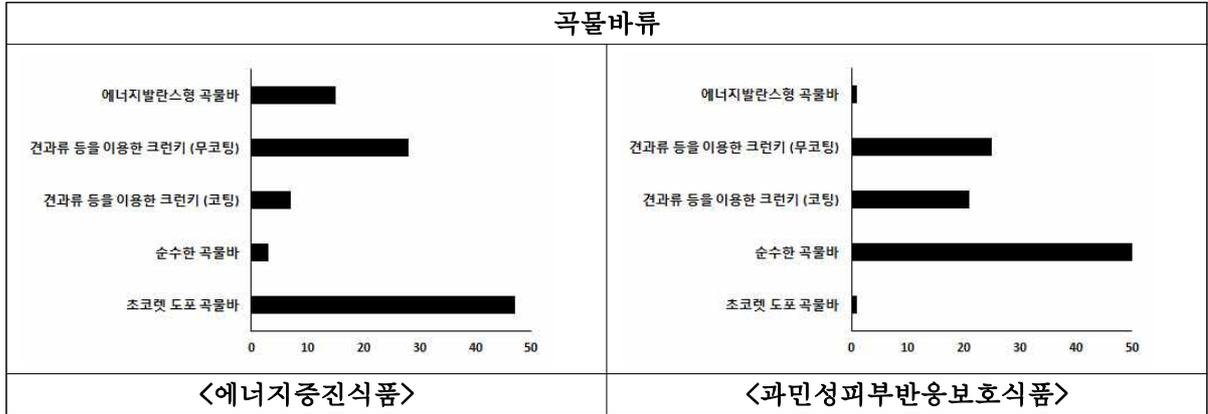
청년층을 대상으로 수행한 선호도 평가의 평가자 총50명 이었고, 19세~22세 연령의 청년들로 구성되어 있었고, 이들의 남녀 성별비율 40:60이었던. 평가자들이 기호식품을 선택하는 가장 중요한 관능적 요소는 ‘맛’ 이었으며, 선택시 선호 식품유형은 ‘음료류’와 ‘과자류’였다. 선택시 가치요소는 ‘가격’과 ‘재료’, ‘기능성’ 순으로 나타났으며, 식품 개발시 중요 요소는 ‘재료’, ‘기능성’ 순으로 나타났다. 식품 선택요소 중 맛과 재료의 안전성 부분의 선택이 높게 나타났다. 청년층 대상 기능성별 식품유형 선호도 평가에서 ‘에너지증진’ 기능성에 대한 선택은 ‘음료류’, ‘곡물바’, ‘초콜릿류’, ‘스낵’으로 선호도가 나타났고, ‘과민성피부반응개선’ 기능성에 대한 선택에서 ‘음료류’, ‘곡물바’, ‘초콜릿류’, ‘스낵류’의 순으로 선호도가 나타났다.





청년층을 대상으로 기능성과 제형간의 선호도를 평가한 평가결과에서 ‘에너지증진식품’으로 가장 적당하다고 생각하는 제형 선택 질문에 음료류의 경우 탄산음료와 혼합음료의 선호도가 높게 나타났고, 곡물바의 경우 초콜릿을 도포한 제형과 견과류 등을 활용한 크런키 제형의 선호도가 높게 나타났다. 스낵류에서는 사각 칩형과 소형 사각칩형의 선호도가 높게 나타났다. ‘과민성피부반응보호식품’으로 가장 적당하다고 생각하는 제형 선택 질문에 음료류의 경우 발효음료와 액상차 음료의 선호도가 높게 나타났다. 곡물바에서는 순수한 곡물바의 형태와 견과류 등을 활용한 크런키 제형의 선호도가 높게 나타났다. 초콜릿류에서는 곡물과 함께 사용된 초콜릿류들의 선호도가 높았다. 스낵류에서는 사각 칩 제형과 소형 구형 제형의 선호도가 높게 나타났다.





(2) 시제품 제형 개발

(가) Chip 제형

- ① 본 연구에서는 소비자 선호도평가를 통해 선정된 Chip 타입의 제형 개발을 위해 원료확인, 배합, 압출성형, 압연, 절단, 1차건조, 파칭의 공정으로 시생산하였다. 압출성형은 압출기 내부에서 가열·용융, 운송만이 일어나는 것이 아니라 혼합, 압축, 살균, 단백질변성, 전분호화 등 여러 가지 반응이 동시에 일어나는 공정이다. 이러한 이유 때문에 다른 식품제조기로서는 가공하기 곤란한 독특한 제품의 제조가 가능한 반면, 여러 가지 반응의 제어와 표준화가 어려운 점이 있다. 각 단계별로 반가공품의 색상, 크기, 두께, 에어셀의 유무, 형태의 균일성 등을 평가하고, 이들을 최적화하였다. 이 제형개발에서 최종 제형에 가장 많은 영향을 주는 원료배합, 압출성형, 파칭 표준화를 위해 원료의 배합, 압출 parameter들의 조정, 파칭 조건의 조절을 표준화 중점 포인트로 제형개발을 완료하였다. 특히 곡물의 피더량, 바렐의 온도, 수분, 스크류 속도 등의 변수를 조절하였으며, 성형물의 크기, 두께, 에어셀의 크기 등을 평가하였고, 주요 표준화 지표는 에어셀의 크기로 하여 제형을 시생산하였다.



Parameter 조절화면

- ② 초기 시생산에서 에어셀이 펠렛표면의 70% 가까이 생겼으나, 곡물의 피더량, 바렐의 온도, 수분, 스크류 속도 등의 parameter의 조절을 통해 재 수행한 시생산에서는 에어셀을 20% 이내로 줄일 수 있었다.



Parameter 조절에 따른 에어셀의 변화

- ③ 파칭은 1차건조 과정을 거친 펠렛을 숙성시켜 제품의 수분함량을 일정하게 만든 다음 소금 또는 모래의 열을 이용하여 굽는 과정으로 이 과정에서는 펠렛의 수분함량과 텀블러의 속도가 매우 중요하다. 따라서 수분함량을 적정하게 맞추기 위해서 반복실험을 통해 파칭 조건을 최적화 하였다. 파칭 된 반가공품을 분말코팅과정을 통해 최종 시제품의 제형을 완성하였다.



분말코팅 소이칩



분말코팅 소이칩

(나) Bar 제형

- ① 본 연구에서는 소비자 선호도평가를 통해 선정된 Bar 타입의 제형을 개발하고자 팻핑 된 곡물과 곡물분, 미니칩, 베리류, 쿠키가루를 활용하여 시럽과 분말의 양을 조절하여 시제품 제형을 개발하였다. 시럽의 양을 더 많이 함유한 제형에서는 부드러운 식감은 있으나, 입에 달라붙고 쉽게 떨어지지 않는 단점이 있었으며, 분말의 양을 많이 하고 시럽을 적게 한 제형에서는 바삭한 식감은 있었으나, 팻핑 곡물과 분말들이 쉽게 떨어지는 단점이 있어 이를 개선하여 제형 개발을 수행하였다.



곡물시리얼 바(분말)



베리류 함유(분말)



초코릿함유(분말)



곡물시리얼 바(시럽)



베리류 함유(시럽)



초코릿함유(시럽)

② 본 연구에서는 이러한 단점들을 개선하여 최종배합비를 결정하였고 세부공정조건을 확립하여 제형개발을 완료하였다.



개발된 제형



개발된 제형

(다) 크런치 제형

① 본 연구에서는 시리얼 Bar 제형의 단점을 개선하고자 초코릿을 함유한 크런치 제품의 제형을 개발하였다. 시럽으로 제작된 시리얼 Bar에 비해 펫핑 한 곡물과 분말류를 블랙 및 화이트 초콜릿을 첨가하여 식감이 부드러우며 유아 및 노약자층에도 섭취가 용이한 제형으로 개발하였다.



화이트 제형 1



화이트 제형 2



화이트 제형 3



블랙 제형 1



블랙 제형 2



블랙 제형 3

- ② 원료의 배합을 통해 뭉침 현상을 파악하고 통곡물 팻핑 곡물과 분쇄된 팻핑 곡물을 활용하여 블랙 및 화이트 초콜릿으로 크런치 제형을 개발하였고, 최종 배합비를 결정하고 사각 및 원형 형태의 제형으로 변화시켜 최종 크런치 타입의 제형을 개발 완료하였다.



화이트 제형 사각



화이트 제형 원형



블랙 제형 사각



블랙 제형 원형

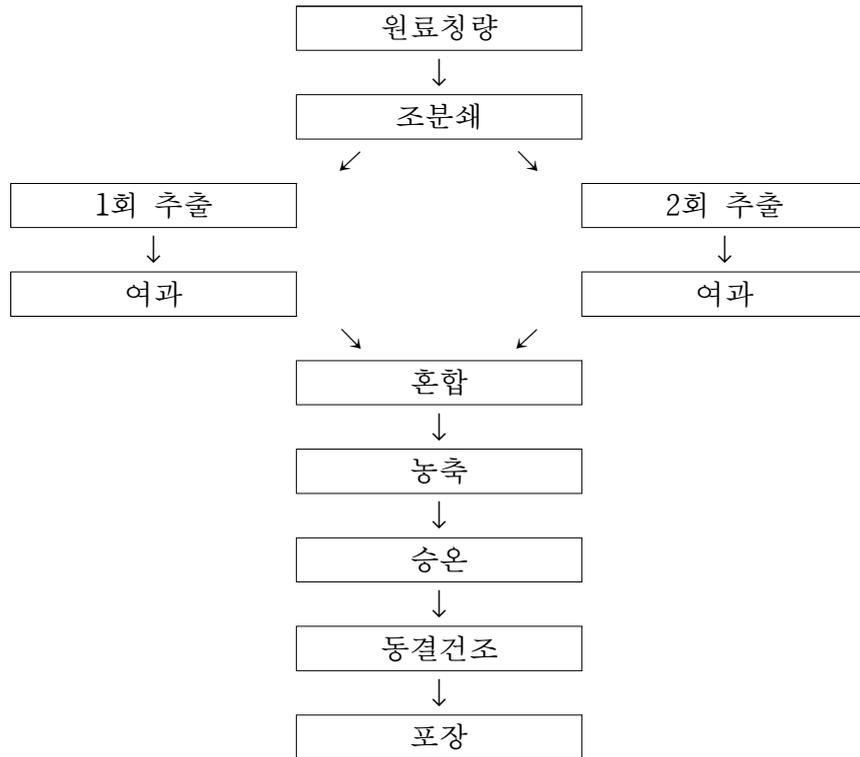
3. 선정 소재 표준화

가. 방법

(1) 작두콩 추출물의 대량 생산 표준화

(가) 작두콩 80%주정추출물

작두콩은 2013년 11월에 채취(친환경작두콩)하여 상온건조 후 당사에 보관중인 원료를 사용하였으며, 모든 단계의 표준화 공정은 외주가공 업체를 통해 다음과 같은 과정을 통해 표준화를 실시하였다.



〈작두콩 추출물 표준화 과정〉

① 원료칭량

추출에 사용할 작두콩 50 kg을 정밀히 칭량하였다.

② 조분쇄

작두콩을 1mm이하로 분쇄하여, 각 10kg씩 나누어 추출준비를 하였다.

③ 추출

대형추출기기((재)춘천바이오산업진흥원)를 이용하여 각 2회씩 대량추출을 수행하였다. 각 추출은 2회의 대량추출과 여과액을 합하여 다음 공정에 이용되었다.

④ 농축

추출여과액을 농축탱크로 이송시켜 50℃, 500 mmHg 조건에서 6시간 동안 농축하여 농축액을 제조하였다.

⑤ 승온

농축액을 95℃에서 90분 동안 승온 및 용해하여 Mesh cartridge로 여과하였다.

⑥ 동결건조

여과액을 tray에 분주하여, -40℃에서 10시간 동안 동결시킨 후, 15시간 동안 승화건조 하였다. 승화건조 된 시료를 다시 40℃에서 4일동안 진공건조를 실시하였다.

(나) 작두콩 50%주정추출물

① 원료칭량

추출에 사용할 작두콩 100 kg(친환경작두콩)을 정밀히 칭량하였다.

② 조분쇄

작두콩을 15mm이하로 분쇄하여, 각 10kg씩 나누어 추출준비를 하였다.

③ 추출

대형추출기기를 이용하여 각 2회씩 대량추출을 수행하였다. 각 추출은 2회의 대량추출과 여과액을 합하여 다음 공정에 이용되었다.

④ 농축

추출여과액을 농축탱크로 이송시켜 60℃, 500 mmHg 조건에서 12시간 동안 농축하여 농축액을 제조하였다.

⑤ 승온

농축액을 90 ~ 95℃에서 1시간 동안 승온 및 용해하여 Mesh cartridge로 여과하였다.

⑥ 동결건조

여과액을 tray에 분주하여, -40℃에서 10시간 이상 동결시킨 후, 15시간 동안 승화건조 하였다. 승화건조 된 시료를 다시 40℃에서 4일동안 진공건조를 실시하였다.



조분쇄



추출기



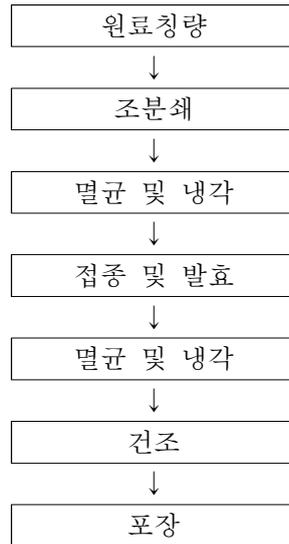
농축기



동결건조기

(2) 발효작두콩의 대량생산 표준화

작두콩은 2013년 11월에 채취(친환경작두콩)하여 상온건조 후 당사에 보관중인 원료를 사용하였으며, 모든 단계의 표준화 공정은 외주 가공업체 업체의 통해 생산시설을 사용하였으며, 다음과 같은 과정을 통해 표준화를 실시하였다.



<발효작두콩 표준화 공정>

(가) 원료칭량

발효에 사용할 원료를 확인하고 칭량하여 발효기에 투입하였다.

(나) 조분쇄

분쇄기를 이용하여 작두콩을 조분쇄하였다.

(다) 1차 멸균 및 냉각

작두콩을 발효조에 투입하고 121℃에서 15분간 가압멸균 후 냉각하였다.

(라) 접종 및 발효

작두콩 중량 대비 2% 황국조제종국을 접종하여 고체발효기를 20분 회전한 후, 정제수를 투입한다. 수분량 $40 \pm 5\%$, 온도 $30 \pm 2^\circ\text{C}$ 조건에서 28시간 발효하였다.

(마) 2차 멸균 및 냉각

121℃에서 15분간 가압멸균 후 냉각하였다.

(바) 건조

열풍건조기를 이용하여 24시간동안 건조하였다.

[발효 사용기기]



분쇄기



고체발효기



건조기

[발효 과정]



발효 중



건조 중

나. 결과

(1) 작두콩 80%주정추출물

작두콩 80%주정추출물의 대량추출 실시 결과는 다음과 같다.



작두콩 80%주정출물

시료명	추출원료량 (Kg)	용매량(L) 주정/정제수 (추출회수)	추출물량 (kg)	수율
CGE80	50	504/126(2회)	5	10%

(2) 작두콩 50%주정추출물

작두콩 50%주정추출물의 대량추출실험 결과는 다음과 같다.



작두콩 50%주정추출물

시료명	추출원료량 (Kg)	용매량(L) 주정/정제수 (추출회수)	추출물량 (kg)	수율
CGE50	100	300/300(2회)	14.1	14.1%

(3) 발효작두콩

상기 기술한 방법을 통하여 발효를 실시한 결과는 다음과 같다.

작두콩량 (kg)	황국조제종국량 (kg)	생산량 (kg)	수득률 (%)
120	2.4	101.9	83.2



발효 전



발효 후



4. 작두콩 함유 에너지 증진 기능성 강화식품 개발

가. 방법

(1) 1차 Chip 제품

(가) 작두콩 80%주정추출물 함유 1차 chip 시생산 제품은 아래와 같다.

분류		Sample No.	사진
대조군		389	
시즈닝1	소이시즈닝-L	279	
	소이시즈닝-H	423	
시즈닝2	카레시즈닝-L	918	
	카레시즈닝-H	132	
시즈닝3	요거트시즈닝-L	598	
	요거트시즈닝-H	638	

(나) 배합비

389는 작두콩 80%주정추출물을 함유하지 않은 제품이며, L은 작두콩 80%주정추출물을 유효함량의 1/2만큼 배합한 제품들이며, H는 작두콩 80%주정추출물을 유효함량 만큼 배합하여 시즈닝을 제조하여 시생산 한 것으로 179, 423은 소이맛, 918,132는 카레맛, 598, 638은 요거트맛으로 시즈닝을 적용하여 제조되었다.

(다) 검사표의 구성

검사표는 각 제품별 제시되었으며 「전체적외관」, 「전체적냄새」, 「전체적맛」, 「전체적식감」, 「전체적선호도」, 「단맛」, 「구수한맛」, 「쓴맛」, 「이미」 2항목, 「이취」 2항목으로 구성하였다. 「전체적외관」, 「전체적냄새」, 「전체적맛」, 「전체적식감」, 「전체적선호도」, 「단맛」, 「구수한맛」, 「쓴맛」의 항목은 ‘매우 좋음’, ‘좋음’, ‘약간 좋음’, ‘보통’, ‘약간 싫음’, ‘싫음’, ‘매우 싫음’의 7개의 척도로 구분하여 구성하였다. 「이미」와 「이취」는 ‘매우 많음’, ‘많음’, ‘약간 있음’, ‘보통’의 4개 척도와 ‘싫음’과 ‘좋음’의 2개 척도로 구분하여 구성하였다.

〈389〉				
전체적 외관(색포함)	전체적 냄새	전체적 맛	전체적 식감	전체적 선호도
<input type="checkbox"/> 매우 좋음				
<input type="checkbox"/> 좋음				
<input type="checkbox"/> 약간 좋음				
<input type="checkbox"/> 보통				
<input type="checkbox"/> 약간 싫음				
<input type="checkbox"/> 싫음				
<input type="checkbox"/> 매우 싫음				
단맛	구수한 맛	쓴맛	이미	이취
<input type="checkbox"/> 매우 좋음	<input type="checkbox"/> 매우 좋음	<input type="checkbox"/> 매우 좋음	<input type="checkbox"/> 매우 많음	<input type="checkbox"/> 매우 많음
<input type="checkbox"/> 좋음	<input type="checkbox"/> 좋음	<input type="checkbox"/> 좋음	<input type="checkbox"/> 많음	<input type="checkbox"/> 많음
<input type="checkbox"/> 약간 좋음	<input type="checkbox"/> 약간 좋음	<input type="checkbox"/> 약간 좋음	<input type="checkbox"/> 약간 있음	<input type="checkbox"/> 약간 있음
<input type="checkbox"/> 보통				
<input type="checkbox"/> 약간 싫음	<input type="checkbox"/> 약간 싫음	<input type="checkbox"/> 약간 싫음	이미	이취
<input type="checkbox"/> 싫음				
<input type="checkbox"/> 매우 싫음	<input type="checkbox"/> 매우 싫음	<input type="checkbox"/> 매우 싫음	<input type="checkbox"/> 좋음	<input type="checkbox"/> 좋음

(라) 검사방법

검사표, 물, 티슈, 종이컵, 펜 등 기타 재료를 별도로 구비하여 평가에 활용하였고, 훈련된 패널 10명이 평가자로 각자 제공된 제품을 대상으로 검사표에 평가하도록 하였다.

(마) 통계처리

통계처리는 SPSS(Ver 21.0)를 이용하였다. 모든 검사항목의 평균은 평균과 표준오차로 제시하였고, 시제품별 통계적 유의성은 일원배치분산분석을 통해 분석하였다. 각 유의수준은 $p < 0.05$ 로 판정하였다.

(2) 2차 Chip 제품

(가) 작두콩 50%주정추출물 함유 2차 chip 시생산 제품은 아래와 같다.

분류		Sample No.	사진
대조군		805	
시즈닝	소이시즈닝	341	
	소이시즈닝 + 작두콩 50%주정추출물	736	

(나) 배합비

805는 작두콩 50%주정추출물을 함유하지 않은 제품이며, 341은 소이시즈닝을 적용한 제품이며, 736은 소이시즈닝과 작두콩 50%주정추출물을 배합하여 제조한 제품이다.

(다) 검사표의 구성

검사표는 각 제품별 제시되었으며 「전체적외관」, 「전체적냄새」, 「전체적 맛」, 「전체적식감」, 「전체적선호도」, 「단맛」, 「구수한맛」, 「쓴맛」, 「이미」, 「이취」, 「섭취량」, 「구매의향」으로 구성하였다. 「전체적외관」, 「전체적냄새」, 「전체적 맛」, 「전체적식감」, 「전체적선호도」, 「단맛」, 「구수한맛」, 「쓴맛」의 항목은 ‘매우 좋음’, ‘좋음’, ‘약간 좋음’, ‘보통’, ‘약간 싫음’, ‘싫음’, ‘매우 싫음’의 7개의 척도로 구분하여 구성하였다. 「이미」와 「이취」 및 「구매의향」은 ‘있음’, ‘없음’의 2개 척도로 「섭취량」은 ‘적당함’, ‘부족함’의 2개 척도로 구분하여 구성하였다.

전체적 외관(색포함)	전체적 냄새	전체적 맛	전체적 식감	전체적 선호도
<input type="checkbox"/> 매우 좋음 <input type="checkbox"/> 좋음 <input type="checkbox"/> 약간 좋음 <input type="checkbox"/> 보통 <input type="checkbox"/> 약간 싫음 <input type="checkbox"/> 싫음 <input type="checkbox"/> 매우 싫음	<input type="checkbox"/> 매우 좋음 <input type="checkbox"/> 좋음 <input type="checkbox"/> 약간 좋음 <input type="checkbox"/> 보통 <input type="checkbox"/> 약간 싫음 <input type="checkbox"/> 싫음 <input type="checkbox"/> 매우 싫음	<input type="checkbox"/> 매우 좋음 <input type="checkbox"/> 좋음 <input type="checkbox"/> 약간 좋음 <input type="checkbox"/> 보통 <input type="checkbox"/> 약간 싫음 <input type="checkbox"/> 싫음 <input type="checkbox"/> 매우 싫음	<input type="checkbox"/> 매우 좋음 <input type="checkbox"/> 좋음 <input type="checkbox"/> 약간 좋음 <input type="checkbox"/> 보통 <input type="checkbox"/> 약간 싫음 <input type="checkbox"/> 싫음 <input type="checkbox"/> 매우 싫음	<input type="checkbox"/> 매우 좋음 <input type="checkbox"/> 좋음 <input type="checkbox"/> 약간 좋음 <input type="checkbox"/> 보통 <input type="checkbox"/> 약간 싫음 <input type="checkbox"/> 싫음 <input type="checkbox"/> 매우 싫음
단맛	구수한 맛	쓴맛	이미	이취
<input type="checkbox"/> 매우 좋음 <input type="checkbox"/> 좋음 <input type="checkbox"/> 약간 좋음 <input type="checkbox"/> 보통 <input type="checkbox"/> 약간 싫음 <input type="checkbox"/> 싫음 <input type="checkbox"/> 매우 싫음	<input type="checkbox"/> 매우 좋음 <input type="checkbox"/> 좋음 <input type="checkbox"/> 약간 좋음 <input type="checkbox"/> 보통 <input type="checkbox"/> 약간 싫음 <input type="checkbox"/> 싫음 <input type="checkbox"/> 매우 싫음	<input type="checkbox"/> 매우 좋음 <input type="checkbox"/> 좋음 <input type="checkbox"/> 약간 좋음 <input type="checkbox"/> 보통 <input type="checkbox"/> 약간 싫음 <input type="checkbox"/> 싫음 <input type="checkbox"/> 매우 싫음	<input type="checkbox"/> 있음 <input type="checkbox"/> 없음 섭취량(3봉지 섭취시) <input type="checkbox"/> 적당함 <input type="checkbox"/> 부족함	<input type="checkbox"/> 있음 <input type="checkbox"/> 없음 구매의향 <input type="checkbox"/> 있음 <input type="checkbox"/> 없음

(라) 검사방법

검사표, 물, 티슈, 종이컵, 펜 등 기타 재료를 별도로 구비하여 평가에 활용하였고, 훈련된 패널 10명이 평가자로 각자 제공된 제품을 대상으로 검사표에 평가하도록 하였다.

(라) 통계처리

통계처리는 SPSS(Ver 21.0)를 이용하였다. 모든 검사항목의 평균은 평균과 표준오차로 제시하였고, 시제품별 통계적 유의성은 일원배치분산분석을 통해 분석하였다. 각 유의수준은 $p < 0.05$ 로 판정하였다.

(3) 3차 Chip 제품

(가) 작두콩 50%주정추출물 함유 3차 chip 시생산 제품은 아래와 같다.

분류	Sample No.	사진
소이칩+ 작두콩50%주정추출물	A	
소이칩	B	

(나) 배합비

A는 소이시즈닝과 작두콩 50%주정추출을 배합하여 제조한 것이며, B는 상용화된 소이칩 제품이다.

(다) 검사표의 구성

검사표는 각 제품별 제시되었으며 「전체적외관」, 「전체적냄새」, 「전체적 맛」, 「전체적식감」, 「전체적선호도」, 「단맛」, 「구수한맛」, 「쓴맛」, 「콩맛」, 「이미」, 「이취」로 구성하였다. 「전체적외관」, 「전체적냄새」, 「전체적 맛」, 「전체적식감」, 「전체적선호도」의 항목은 ‘매우좋음’, ‘좋음’, ‘약간좋음’, ‘보통’, ‘약간싫음’, ‘싫음’, ‘매우싫음’의 7개의 척도로 구분하여 구성하였다. 「단맛」, 「구수한맛」, 「쓴맛」, 「콩맛」의 항목은 ‘매우강함’, ‘강함’, ‘약간강함’, ‘보통’, ‘약간약함’, ‘약함’, ‘매우약함’의 7개의 척도로 구분하여 구성하였으며, 「이취」 및 「이미」 항목은 ‘있음’, ‘없음’의 2개 척도로 2개 척도로 구분하여 구성하였다.

전체적 외관(색포함)	전체적 냄새	전체적 맛	전체적 식감	전체적 선호도
<input type="checkbox"/> 매우 좋음				
<input type="checkbox"/> 좋음				
<input type="checkbox"/> 약간 좋음				
<input type="checkbox"/> 보통				
<input type="checkbox"/> 약간 싫음				
<input type="checkbox"/> 싫음				
<input type="checkbox"/> 매우 싫음				
단맛	구수한 맛	쓴맛	콩맛	이취
<input type="checkbox"/> 매우 강함	<input type="checkbox"/> 있음			
<input type="checkbox"/> 강함	<input type="checkbox"/> 강함	<input type="checkbox"/> 강함	<input type="checkbox"/> 강함	<input type="checkbox"/> 없음
<input type="checkbox"/> 약간 강함	이미			
<input type="checkbox"/> 보통	<input type="checkbox"/> 보통	<input type="checkbox"/> 보통	<input type="checkbox"/> 보통	<input type="checkbox"/> 있음
<input type="checkbox"/> 약간 약함	<input type="checkbox"/> 없음			
<input type="checkbox"/> 약함	<input type="checkbox"/> 약함	<input type="checkbox"/> 약함	<input type="checkbox"/> 약함	
<input type="checkbox"/> 매우 약함				

(라) 검사방법

검사표, 물, 티슈, 종이컵, 펜 등 기타 재료를 별도로 구비하여 평가에 활용하였고, 훈련된 패널 10명이 평가자로 각자 제공된 제품을 대상으로 검사표에 평가하도록 하였다.

(마) 통계처리

통계처리는 SPSS(Ver 21.0)를 이용하였다. 모든 검사항목의 평균은 평균과 표준오차로 제시하였고, 시제품별 통계적 유의성은 일원배치분산분석을 통해 분석하였다. 각 유의수준은 $p < 0.05$ 로 판정하였다.

(4) 최종 제품의 개발

(가) 제조공정표준화

① 최종 배합비

관능평가 결과를 반영하여 시즈닝을 포함한 최종배합비를 결정하였다. 작두콩 추출물은 2.14% 배합하였다.

② 원료 계량

사용할 원료의 제품상태 및 유통기한 등을 확인한 후, 배합량에 맞춰 정밀히 칭량하였다.

③ 배합 및 시즈닝 준비

곡물원료는 리본믹서기에 넣어 혼합하고, 오일류는 오일탱크에 60℃로 예열하고, 시즈닝은 분말투입기에 투입하였다.

④ 압출 성형

Twin Screw Extruder의 Die는 6Hole을 사용하여 성형하였으며, 곡물투입량과 압력, 수분함량 등의 조건을 조절하면서 생산하였다. 압출성형되어 나온 공정품은 압연, 절단 과정을 다음과정으로 들어갔다.

⑤ 1차 건조

5단 건조기를 이용하여 표준화 조건으로 건조하였다.

⑥ 파칭

고온 자동파칭기를 이용하여 표준화 조건으로 파칭하였다.

⑦ 분말코팅

드럼코팅기에서 유지 및 미리 준비해 놓은 분말을 sprinkle 하면서 코팅하였다.

⑧ 포장

최종 제품은 선별대를 지나 자동포장기를 이용하여 폴리에틸렌 재질의 포장지를 이용하여 30g씩 삼면포장한 후, 박스포장을 하였다.

(나) 디자인개발

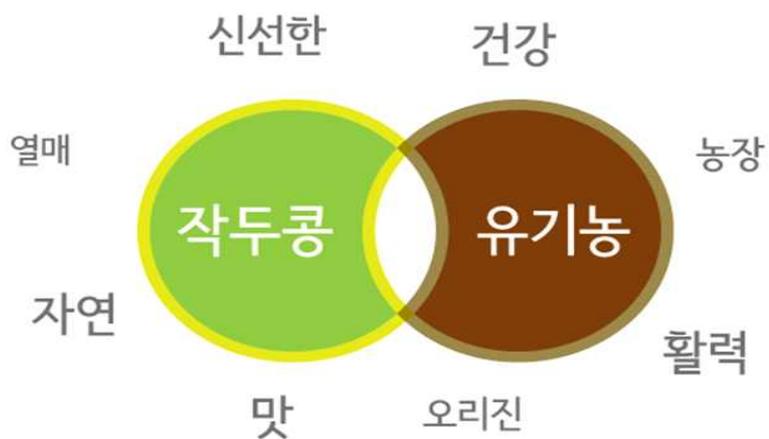
① 시장조사

국내·외 콩을 원료로 사용한 스낵류 패키지디자인을 조사한 결과, 씨줄을 직접적으로 활용하였으며, 세련되고 자연스러운 컬러 표현을 한 제품이 대다수였다.



② 디자인제작

‘건강까지 생각하는 작두콩과자’ 라는 컨셉을 가지고 디자인을 구상하였다. 원재료인 작두콩 시즐속성을 강조하고, 작두콩의 이미지를 일러스트 이미지로 표현하였으며, 세련되고 심플한 느낌의 디자인을 제작하였다.



(다) 제품화

영양성분 분석, 품목제조보고, 자가품질검사를 수행하고 제품을 개발을 완료하였다.

(라) 작두콩 소이칩 제품의 기호도 평가

작두콩 소이칩의 소비층 기호도 평가는 아래의 검사표 및 검사방법을 이용하여 평가하였다.

① 검사표의 구성

검사표는 「전체적외관」, 「전체적냄새」, 「전체적 맛」, 「전체적식감」, 「전체적선호도」, 「단맛」, 「구수한맛」, 「쓴맛」, 「콩맛」, 「구매의향」, 「연령대」의 항목으로 구성하였다. 「전체적외관」, 「전체적냄새」, 「전체적 맛」, 「전체적식감」, 「전체적선호도」, 「단맛」, 「구수한맛」, 「쓴맛」, 「콩맛」의 항목은 ‘매우 좋음’, ‘좋음’, ‘약간 좋음’, ‘보통’, ‘약간 싫음’, ‘싫음’, ‘매우 싫음’의 7개의 척도로 구분하여 구성하였다. 「구매의향」과 「연령대」는 ‘있음’, ‘없음’ / ‘20 ~ 25세’, ‘26 ~ 30세’, ‘30세 ~ 이상’ 척도 구분하여 구성하였다.

전체적 외관(색포함)	전체적 냄새	전체적 맛	전체적 식감	전체적 선호도
<input type="checkbox"/> 매우 좋음				
<input type="checkbox"/> 좋음				
<input type="checkbox"/> 약간 좋음				
<input type="checkbox"/> 보통				
<input type="checkbox"/> 약간 싫음				
<input type="checkbox"/> 싫음				
<input type="checkbox"/> 매우 싫음				
단맛	구수한 맛	쓴맛	콩맛	구매의향
<input type="checkbox"/> 매우 강함	<input type="checkbox"/> 있음			
<input type="checkbox"/> 강함	<input type="checkbox"/> 강함	<input type="checkbox"/> 강함	<input type="checkbox"/> 강함	<input type="checkbox"/> 없음
<input type="checkbox"/> 약간 강함				
<input type="checkbox"/> 보통	<input type="checkbox"/> 보통	<input type="checkbox"/> 보통	<input type="checkbox"/> 보통	연령대
<input type="checkbox"/> 약간 약함	<input type="checkbox"/> 20 ~ 25세			
<input type="checkbox"/> 약함	<input type="checkbox"/> 약함	<input type="checkbox"/> 약함	<input type="checkbox"/> 약함	<input type="checkbox"/> 26 ~ 30세
<input type="checkbox"/> 매우 약함	<input type="checkbox"/> 30세 ~ 이상			

② 검사방법

검사표, 물, 티슈, 종이컵, 펜 등 기타 재료를 별도로 구비하여 평가에 활용하였고, 30명이 평가자로 각자 제공된 제품을 대상으로 검사표에 평가하도록 하였다.

③ 통계처리

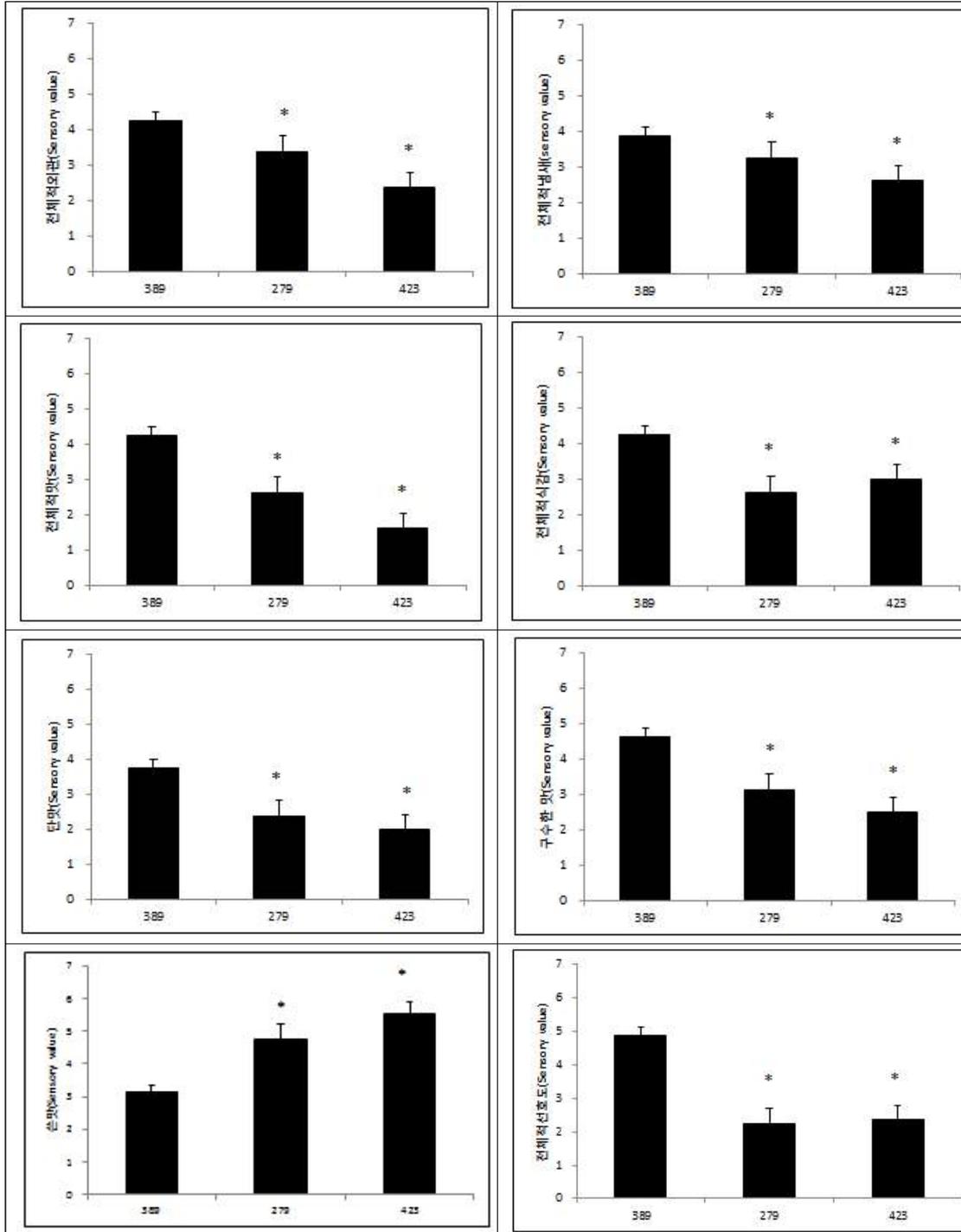
통계처리는 SPSS(Ver 21.0)를 이용하였다. 모든 검사항목의 평균은 평균과 표준오차로 제시하였고, 시제품별 통계적 유의성은 일원배치분산분석을 통해 분석하였다. 각 유의수준은 $p < 0.05$ 로 판정하였다.

나. 결과

(1) 1차 chip제품 기호도 평가 결과

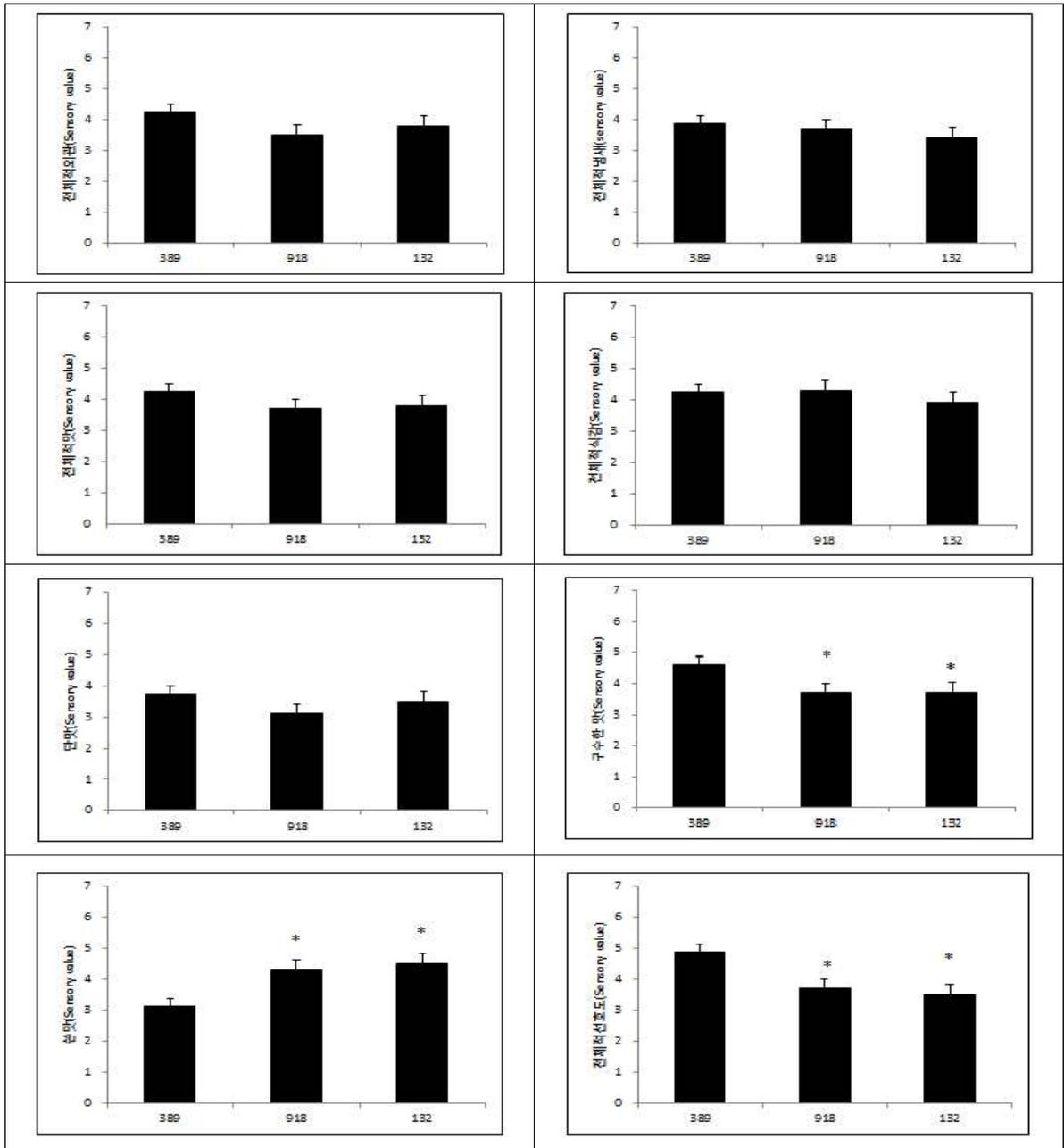
소이시즈닝을 사용한 관능평가검사 결과에서 「전체적외관」, 「전체적냄새」, 「전체적 맛」, 「전체적식감」, 「전체적선호도」, 「단맛」, 「구수한맛」의 평가항목은 추출물을 함유한 279 및 423 시제품에서 감소하였고, 「쓴맛」의 평가항목은 추출물을 함유한 279 및 423 시제품에서 증가하였다. 두 추출물 함유 시제품 사이에는 통계적으로 유의

한 차이를 나타내지 않았다. 「이미」의 경우 279는 평가자의 약 50%에서 423은 평가자의 약 70%에서 평가되었고, 「이취」의 경우 두 시제품 모두에서 평가되지 않았다. 그리고, ‘싫음’, ‘좋음’으로 평가한 「이미」, 「이취」 항목에서 두 시제품 ‘싫음’의 의견을 제시하였다.



카레시즈닝을 사용한 관능평가검사 결과에서 「전체적외관」, 「전체적냄새」, 「전체적맛」, 「전체적식감」, 「단맛」의 평가항목에서 추출물을 함유한 918, 132 시제품 모두에서 대조군인 389와 큰 차이를 나타내지 않았다. 그러나 「구수한맛」, 「쓴맛」의 평가항목에서 918, 132시제품의 관능점수가 낮게 나타났고, 전체 「전체적선호도」 또한 이

들 맛에 따른 결과로 관능점수가 낮게 나타났다. 「이미」, 「이취」는 평가자의 약 50%에서 평가 되었다. ‘싫음’, ‘ 좋음’ 으로 평가한 「이미」 항목에서 918 시제품은 ‘ 좋음’ 의 비율이 70%, 「이취」 항목에서 918 시제품은 ‘ 좋음’ 의 비율이 90%로 높은 비율을 나타내었다. 그러나 「이미」 항목에서 132 시제품은 ‘ 좋음’ 의 비율이 50%, 「이취」 항목에서 918 시제품은 ‘ 좋음’ 의 비율이 60%로 나타나, 상대적으로 918제품의 「이미」, 「이취」가 낮게 평가됨을 확인할 수 있었다.

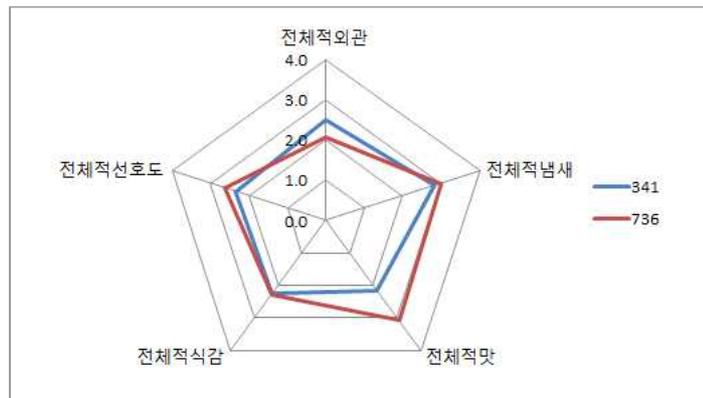


요거트시즈닝을 사용한 관능평가검사 결과에서 「전체적외관」, 「구수한맛」, 「단맛」의 평가항목은 추출물을 함유한 638 및 598 시제품과 389 대조군 사이에 차이를 나타내지 않았다. 그러나 「전체적냄새」, 「전체적맛」, 「전체적식감」, 「전체적선호도」의 평가항목은 638 및 598 시제품에서 감소하였고, 「쓴맛」의 평가항목은 추출물을 함유한, 두 추출물 함유 시제품에서 증가 되었다. 「이미」, 「이취」의 경우 두 시제품에서 모든 평가자에게서 ‘약간싫음’의 평가를 받았고, ‘싫음’, ‘ 좋음’ 으로 평가한 「이

미」, 「이취」 항목에서 두 시제품 모두 ‘싫음’의 의견이 제시되었다.

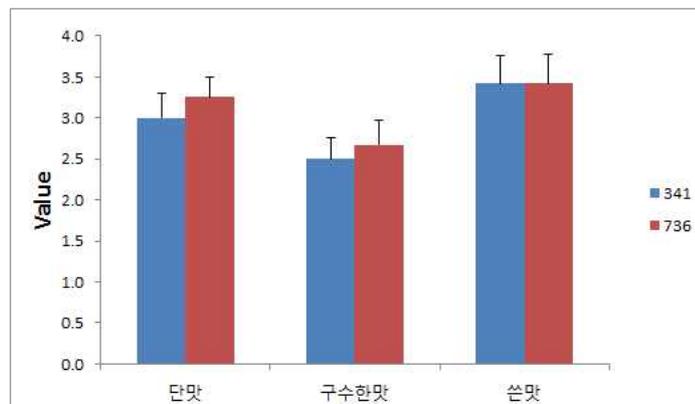
(2) 2차 chip제품 기호도 평가 결과

전반적인 선호도 평가 중 「전체적외관」을 제외한 「전체적냄새」, 「전체적 맛」, 「전체적식감」, 「전체적선호도」의 결과에서 소이시즈닝만을 처리한 341시제품에 비해 작두콩 50%주정추출물을 함유한 736시제품이 같거나 높게 평가되었다. 이 결과로부터 작두콩추출물의 함유가 소이칩의 선호도에 영향을 주지 않음을 확인하였다.



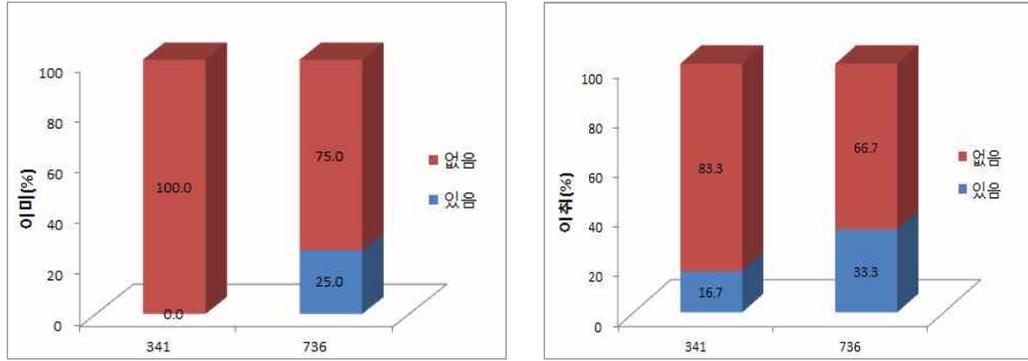
[그림. 전반적 선호도]

다음으로 맛에 대한 평가는 「단맛」, 「구수한맛」, 「쓴맛」으로 세분화하여 검사를 실시하였는데 관능점수의 경우, 작두콩 50주정추출물을 함유한 736시제품에서 「단맛」과 「구수한맛」의 값이 소이칩인 341시제품에 비해 높게 나타났으며, 「쓴맛」은 같은 값을 나타냈다. 그러나 두 시제품에 대한 유의적인 차이는 나타나지 않았다.



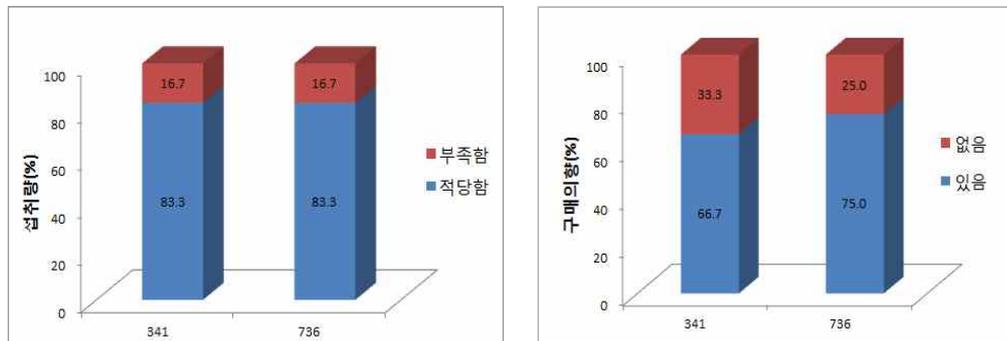
<맛에 대한 평가>

제품 구입에 영향을 미치는 「이미」와 「이취」에 대한 결과는 다음과 같다. 「이미」의 경우 341시제품에서는 100% 없음을 나타낸 반면, 736시제품은 약 25%가 이미가 있다고 답하였다. 「이취」의 경우는 341시제품은 약 16.7%, 736시제품에서는 약 33.3%가 이취가 있다고 답하였다. 이는 소이시즈닝과 추출물의 혼합이 균일하지 않음에서 비롯된 것으로 사료된다. 앞선 결과인 전체적 선호도 및 전체적인 맛에는 영향을 주지 않음을 확인하였기 때문에 일부 섞이지 않은 시즈닝을 검사자가 감지한 것으로 판단된다.



<이미, 이취에 대한 평가>

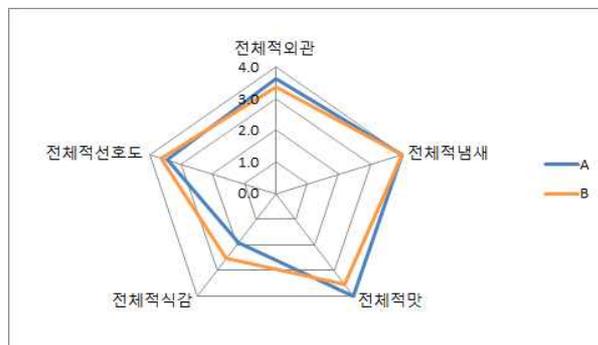
마지막으로 「섭취량」과 「구매의향」에 대한 결과는 다음과 같다. 「섭취량」의 경우 341시제품과 736시제품 모두 검사자의 83.3%가 적당하다고 답하였다. 「구매의향」은 341시제품은 검사자의 66.7%, 736시제품은 75%가 구매의향이 있다고 답하였다.



<섭취량 및 구매의향에 대한 평가>

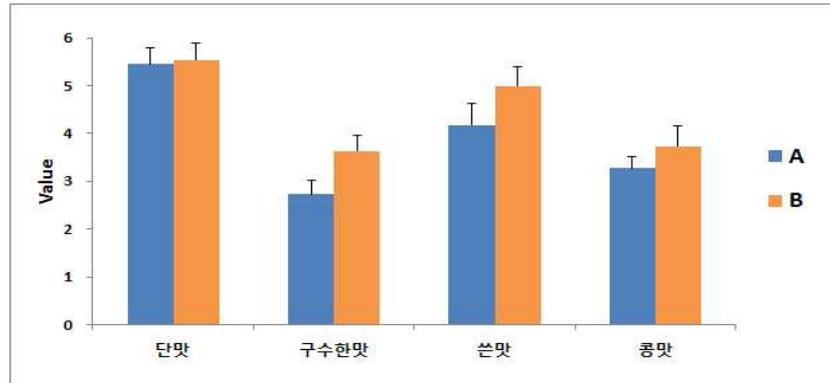
(3) 3차 chip제품 기호도 평가 결과

전반적인 선호도 평가 결과 「전체적외관」, 「전체적냄새」, 「전체적 맛」, 「전체적 식감」, 「전체적선호도」에서 두 시료간의 유적인 차이는 나타나지 않아, 작두콩추출물의 추가로 인한 기호도 저하는 나타나지 않음을 확인하였다. 그러나 5가지 항목중에서 「전체적식감」의 경우 다른 항목에 비해 평가값이 A, B 모두에서 낮게 나타났는데, 이는 생산 후 밀봉이 약한 포장지의 사용으로 인해 바삭거리는 식감이 줄어들어 평가에 영향을 준 것으로 보인다.



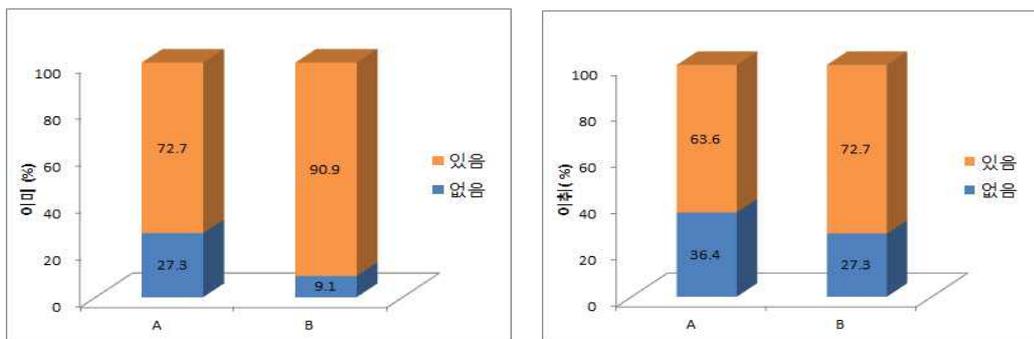
<전반적 선호도>

다음으로 맛에 대한 평가는 「단맛」, 「구수한맛」, 「쓴맛」, 「콩맛」 세분화하여 검사를 실시하였는데, 모든 항목에서 B시제품이 A시제품에 비해 높게 나타났다. 그러나 두 시제품에 대한 유의적인 차이는 나타나지 않아 제품의 맛의 차이가 크지 않음을 확인하였다.



< 맛에 대한 평가 >

제품 구입에 영향을 미치는 「이미」와 「이취」에 대한 결과는 다음과 같다. 「이미」의 경우 A시제품에서는 72.7%, B시제품에서는 그보다 높은 90.9%가 있다고 평가했다. 「이취」의 경우도 A시제품은 63.6%, B시제품은 A시제품보다 높은 72.7%가 이취가 있다고 답하였다. 2차 시제품에 비해 이미, 이취가 있다고 대답한 비율이 높아졌는데, 이는 이미나 이취를 매스킹할 수 있는 시즈닝과 후 건조과정이 생략되어 생긴 결과라고 볼 수 있다.



< 이미, 이취에 대한 평가 >

(4) 최종 제품의 개발 결과

(가) 디자인 개발

① 1차로 아래와 같은 디자인이 개발되었다.



② 2차로 아래와 같은 디자인이 개발되었다.



③ 최종 디자인

과자시장의 기존이미지를 탈피하여 건강을 생각하는 세련되고 트렌디한 블랙과 콩을 연상할 수 있는 옐로우컬러를 포인트컬러로 사용하였으며, 과자몰드와 작두콩의 시즐배경은 밝은색의 우드패턴을 사용하여 디저트과자의 트렌디함을 표현하였다. 타이포에서도 내추럴한 이미지를 연상할 수 있도록 질감을 표현하였으며, 수출용 언어를 감안하여 영문위주로 표현하였고, 타입컬러는 블랙과 대비를 높여 브랜드 가시성을 높여 최종디자인을 완성하였다.



(나) 제품화

① 영양성분 분석

검사항목은 열량, 탄수화물, 당류, 단백질, 지방, 포화지방, 트랜스지방, 콜레스테롤, 나트륨으로 총 9가지 항목과 식이섬유 항목을 평가하였고, 그 결과를 바탕으로 제품의 1회 제공량 당 영양성분 표시기준을 완료하였다.

영양성분	1회제공량 1봉지(30g)	
1회 제공량 당 함량	* %영양소기준치	
열량	139 kcal	
탄수화물	23 g	8%
식이섬유	3 g	12%
당류	2 g	
단백질	2 g	4%
지방	4.4 g	9%
포화지방	0.6 g	4%
트랜스지방	0g	
콜레스테롤	0 mg	0%
나트륨	130 mg	7%

* %영양소 기준치 : 1일 영양소 기준치에 대한 비율

② 품목제조보고 및 자가품질검사

본 사업을 통해 개발된 제품은 ‘작두콩 소이칩’의 제품명으로 품목제조보고하였으며, 국가 공인시험기관에 자가품질검사를 의뢰하여 세균수 및 산가 시험항목에서 기준이하의 ‘적합’ 판정을 확인하였다.

식품(식품첨가물) 품목제조보고서 신고인: 1970년 05월 09일 주소: 081-381-9047 신고인명: 김대현		검사 성적서 검사번호: 1188-4805-8W08-01P 검사일자: 2015년 07월 29일	
품목명: [1] [2] [3] [4] [5] [6] [7] [8] [9] [10] [11] [12] [13] [14] [15] [16] [17] [18] [19] [20] [21] [22] [23] [24] [25] [26] [27] [28] [29] [30] [31] [32] [33] [34] [35] [36] [37] [38] [39] [40] [41] [42] [43] [44] [45] [46] [47] [48] [49] [50] [51] [52] [53] [54] [55] [56] [57] [58] [59] [60] [61] [62] [63] [64] [65] [66] [67] [68] [69] [70] [71] [72] [73] [74] [75] [76] [77] [78] [79] [80] [81] [82] [83] [84] [85] [86] [87] [88] [89] [90] [91] [92] [93] [94] [95] [96] [97] [98] [99] [100]		품목번호: 00000000000000000000 품목명: [1] [2] [3] [4] [5] [6] [7] [8] [9] [10] [11] [12] [13] [14] [15] [16] [17] [18] [19] [20] [21] [22] [23] [24] [25] [26] [27] [28] [29] [30] [31] [32] [33] [34] [35] [36] [37] [38] [39] [40] [41] [42] [43] [44] [45] [46] [47] [48] [49] [50] [51] [52] [53] [54] [55] [56] [57] [58] [59] [60] [61] [62] [63] [64] [65] [66] [67] [68] [69] [70] [71] [72] [73] [74] [75] [76] [77] [78] [79] [80] [81] [82] [83] [84] [85] [86] [87] [88] [89] [90] [91] [92] [93] [94] [95] [96] [97] [98] [99] [100]	
제조업자: [1] [2] [3] [4] [5] [6] [7] [8] [9] [10] [11] [12] [13] [14] [15] [16] [17] [18] [19] [20] [21] [22] [23] [24] [25] [26] [27] [28] [29] [30] [31] [32] [33] [34] [35] [36] [37] [38] [39] [40] [41] [42] [43] [44] [45] [46] [47] [48] [49] [50] [51] [52] [53] [54] [55] [56] [57] [58] [59] [60] [61] [62] [63] [64] [65] [66] [67] [68] [69] [70] [71] [72] [73] [74] [75] [76] [77] [78] [79] [80] [81] [82] [83] [84] [85] [86] [87] [88] [89] [90] [91] [92] [93] [94] [95] [96] [97] [98] [99] [100]		검사대상: [1] [2] [3] [4] [5] [6] [7] [8] [9] [10] [11] [12] [13] [14] [15] [16] [17] [18] [19] [20] [21] [22] [23] [24] [25] [26] [27] [28] [29] [30] [31] [32] [33] [34] [35] [36] [37] [38] [39] [40] [41] [42] [43] [44] [45] [46] [47] [48] [49] [50] [51] [52] [53] [54] [55] [56] [57] [58] [59] [60] [61] [62] [63] [64] [65] [66] [67] [68] [69] [70] [71] [72] [73] [74] [75] [76] [77] [78] [79] [80] [81] [82] [83] [84] [85] [86] [87] [88] [89] [90] [91] [92] [93] [94] [95] [96] [97] [98] [99] [100]	
검사결과: [1] [2] [3] [4] [5] [6] [7] [8] [9] [10] [11] [12] [13] [14] [15] [16] [17] [18] [19] [20] [21] [22] [23] [24] [25] [26] [27] [28] [29] [30] [31] [32] [33] [34] [35] [36] [37] [38] [39] [40] [41] [42] [43] [44] [45] [46] [47] [48] [49] [50] [51] [52] [53] [54] [55] [56] [57] [58] [59] [60] [61] [62] [63] [64] [65] [66] [67] [68] [69] [70] [71] [72] [73] [74] [75] [76] [77] [78] [79] [80] [81] [82] [83] [84] [85] [86] [87] [88] [89] [90] [91] [92] [93] [94] [95] [96] [97] [98] [99] [100]		검사결과: [1] [2] [3] [4] [5] [6] [7] [8] [9] [10] [11] [12] [13] [14] [15] [16] [17] [18] [19] [20] [21] [22] [23] [24] [25] [26] [27] [28] [29] [30] [31] [32] [33] [34] [35] [36] [37] [38] [39] [40] [41] [42] [43] [44] [45] [46] [47] [48] [49] [50] [51] [52] [53] [54] [55] [56] [57] [58] [59] [60] [61] [62] [63] [64] [65] [66] [67] [68] [69] [70] [71] [72] [73] [74] [75] [76] [77] [78] [79] [80] [81] [82] [83] [84] [85] [86] [87] [88] [89] [90] [91] [92] [93] [94] [95] [96] [97] [98] [99] [100]	
품목번호: 00000000000000000000 품목명: [1] [2] [3] [4] [5] [6] [7] [8] [9] [10] [11] [12] [13] [14] [15] [16] [17] [18] [19] [20] [21] [22] [23] [24] [25] [26] [27] [28] [29] [30] [31] [32] [33] [34] [35] [36] [37] [38] [39] [40] [41] [42] [43] [44] [45] [46] [47] [48] [49] [50] [51] [52] [53] [54] [55] [56] [57] [58] [59] [60] [61] [62] [63] [64] [65] [66] [67] [68] [69] [70] [71] [72] [73] [74] [75] [76] [77] [78] [79] [80] [81] [82] [83] [84] [85] [86] [87] [88] [89] [90] [91] [92] [93] [94] [95] [96] [97] [98] [99] [100]		검사결과: [1] [2] [3] [4] [5] [6] [7] [8] [9] [10] [11] [12] [13] [14] [15] [16] [17] [18] [19] [20] [21] [22] [23] [24] [25] [26] [27] [28] [29] [30] [31] [32] [33] [34] [35] [36] [37] [38] [39] [40] [41] [42] [43] [44] [45] [46] [47] [48] [49] [50] [51] [52] [53] [54] [55] [56] [57] [58] [59] [60] [61] [62] [63] [64] [65] [66] [67] [68] [69] [70] [71] [72] [73] [74] [75] [76] [77] [78] [79] [80] [81] [82] [83] [84] [85] [86] [87] [88] [89] [90] [91] [92] [93] [94] [95] [96] [97] [98] [99] [100]	

품목제보고서

자가품질검사

(다) 제품의 기호도평가

검사에서 전체적 외관은 4.8±0.1점, 전체적 냄새는 4.6±0.2점, 전체적맛은 5.1±0.2점, 전체적식감은 5.1±0.3점, 전체적선호도는 5.0±0.1점으로 보통이상의 점수를 획득하였고, 구매의향은 63.6%로 나타나 20 ~ 30대의 소비층에 소비 의향을 파악할 수 있었다.

(라) 타제품과 열량비교

N사의 유처리 쌀과자(콩고물맛)의 경우 45 g, 1회 제공량당 235 kcal의 열량을 제공하였으나 개발한 작두콩 소이칩은 30 g, 1회 제공량당 135 kcal의 열량을 제공하는 것을 비교할 수 있었다.

5. 발효작두콩 함유 피부과민반응 개선 기능성 강화식품 개발

가. 방법

(1) 제조공정표준화

(가) 최종 배합비

간이평가 및 제품적성에 맞는 원료와 생리활성 평가를 반영하여 최종 배합비를 결정하였다.

(나) 원료 계량

사용할 원료의 제품상태 및 유통기한 등을 확인한 후, 배합량에 맞춰 정밀히 칭량하였다. 발효작두콩 추출물은 1.5% 배합하였다.

(다) 배합 및 충전액 준비

곡물원료는 리본믹서기에 넣어 혼합하고, 충전물은 충전탱크에 넣어 혼합하였다.

(라) 압출 성형 및 충전

압출성형기에 Ring Die을 사용하여 성형하였으며, 곡물투입량과 압력, 수분함량 등의

조건을 조절하면서 생산하였다. 압출성형되어 나온 튜브모양의 반제품에 증진물을 증진하였다.

(마) 압착 및 절단

증진된 제품을 롤링기로 이동시켜 0.5~1cm로 압착 후 1cm*1cm의 크기로 절단하였다.

(바) 건조

5단 건조기를 이용하여 50±5℃에서 40±5Hz의 속도로 건조하였다.

(사) 코팅

드럼코팅기를 이용하여 45Hz의 속도에서 곡물대비 5%정도로 유지를 분사하고, 분말은 1% 이내로 분사하였다.

(아) 포장

최종 제품은 선별대를 지나 자동포장기를 이용하여 폴리에틸렌 재질의 포장지를 이용하여 45g씩 삼면포장한 후, 박스포장을 하였다.

(2) 디자인개발

(가) 시장조사

국내·외 쿵을 원료로 사용한 스낵류 패키지디자인을 조사한 결과, 씨즐을 직접적으로 활용하였으며, 세련되고 자연스러운 컬러 표현을 한 제품이 대다수였다.



(나) 디자인제작

‘새로운 맛, 즐거움이 있는 과자’ 라는 컨셉을 가지고 디자인을 구상하였다. 원재료의 곡물과 내추럴한 이미지를 베이스로 땅콩버터와 씨리얼을 다이나믹하게 표현하여, 땅콩캐릭터를 이용한 경쾌하고 편안한 느낌의 디자인을 제작하였다.



(3) 제품화

영양성분분석, 품목제조보고, 자가품질검사를 수행하고 제품을 개발을 완료하였다.

나. 결과

(1) 디자인 개발

(가) 1차로 아래와 같은 디자인이 개발되었다.



(나) 2차로 아래와 같은 디자인이 개발되었다.



(다) 최종 디자인

땅콩버터가 들어있는 씨리얼과자의 이미지를 캐릭터를 이용해 재미를 더하였으며, 땅콩을 연상할 수 있는 밝은 Yellow와 Brown 컬러를 사용하였다. 콩깍지를 연상할 수 있는 타입의 형태는 땅콩버터를 연상 하게끔 디자인 되었으며, 배경에는 땅콩과 연관된 자유로운 그래픽을 사용하여 젊은층에 어필할 수 있도록 디자인 되었다. 수출용 언어를 감안하여 영문명으로 디자인 하였으며, 캐릭터를 이용하여 경쾌한 이미지와 원물을 연상하는 밝은 Yellow의 바탕컬러는 주목성을 높여 최종디자인을 완성하였다.



(2) 제품화

(가) 영양성분 분석

검사항목은 열량, 탄수화물, 당류, 단백질, 지방, 포화지방, 트랜스지방, 콜레스테롤, 나트륨으로 총 9가지 항목을 평가하였고, 그 결과를 바탕으로 제품의 1회 제공량 당 영양성분 표시기준을 완료하였다.

영양성분	1회제공량 1봉지(45g)	
1회 제공량 당 함량	* %영양소기준치	
열량	240 kcal	
탄수화물	27 g	8%
당류	6 g	
단백질	4 g	7%
지방	13 g	25%
포화지방	1.8 g	12%
트랜스지방	0g	
콜레스테롤	0 mg	0%
나트륨	160 mg	8%

* %영양소 기준치 : 1일 영양소 기준치에 대한 비율

(나) 품목제조보고 및 자가품질검사

본 사업을 통해 개발된 제품은 ‘피넛씨리얼’의 제품명으로 품목제조보고하였으며, 국가 공인시험기관에 자가품질검사를 의뢰하여 세균수 및 산가, 총아플라톡신 시험항목에서 기준이하의 ‘적합’ 판정을 확인하였다.



(다) 타제품과 열량비교

O사의 Pillow 크래커의 경우 150 g에 665 kcal의 열량을 제공하였으나 개발한 피넛씨리얼은 45 g에 240 kcal의 열량을 제공하는 것을 비교할 수 있었다.

6. 작두콩 효능·지표물질 조사 및 분석

가. 방법

영양성분과 비영양성분으로 분류하여 조사하고 이들 중 본 과제 생리활성과 연관된 주요 지표성분 2종에 대한 분석방법을 정리하고, 발효작두콩의 지표물질 1종을 분석하였다.

나. 결과

(1) 영양성분

(가) 국외 연구자에 의해 보고된 작두콩의 영양성분으로는 아래와 같다[20].

Component	<i>Canavalia gladiata</i> ^b
Moisture (%)	7.58–12.2
Crude protein (g 100 g ⁻¹)	26.8–35
True protein (g 100 g ⁻¹)	20.8–21.3
Albumins (g 100 g ⁻¹)	5.10–5.60
Globulins (g 100 g ⁻¹)	12.5–13.0
Prolamins (g 100 g ⁻¹)	0.91–0.98
Glutelins (g 100 g ⁻¹)	1.81–2.06
Crude lipid (g 100 g ⁻¹)	1.40–9.90
Crude fiber (g 100 g ⁻¹)	2.05–12.8
Ash (g 100 g ⁻¹)	3.19–4.18
Total starch (g 100 g ⁻¹)	31.8–39.6
Digestible starch (g 100 g ⁻¹)	18.7–20.0
Resistant starch (g 100 g ⁻¹)	11.8–14.0
Crude carbohydrates (g 100 g ⁻¹)	45.1–68.5
Energy value (kJ 100 g ⁻¹)	1690–1830

(나) 국내 연구자에 의해 보고된 작두콩의 영양성분은 아래와 같았다[21,22].

Component	Kim et al. ⁽²⁾	Kim et al. ⁽³⁾
Moisture (%)	9.3±0.3	8.3±0.01
Crude protein (g/ 100 g)	28.3±1.1	25.6±0.4
Crude lipid (g/ 100 g)	5.9±0.2	1.2±0.13
Ash (g/ 100 g)	3.4±0.1	3.8±0.02
Crude carbohydrates (g/ /100 g)	53.1±1.5	

(다) 작두콩의 식이섬유는 g/kg으로 아래와 같이 보고되었다[20].

Fiber	<i>Canavalia gladiata</i>
<i>Soluble fibers</i>	
Rhamnose	0.31-0.39
Fucose	Trace-0.05
Ribose	0.38-0.52
Arabinose	0.98-0.74
Xylose	0.30-0.49
Mannose	0.26-0.46
Galactose	0.59-0.82
Glucose	0.39-0.52
Uronic acids	5.36-6.25
<i>Insoluble fibers</i>	
Rhamnose	2.98-3.2
Fucose	0.28-0.48
Ribose	0
Arabinose	10.42-15.96
Xylose	9.30-10.27
Mannose	1.63-1.75
Galactose	4.32-4.4
Glucose	24.73-29.29
Uronic acids	25.26-31.04
Klason lignin	114.3-123.72
Total soluble fiber	0.16-8.65
Total insoluble fiber	210.61-202.72
Total dietary fiber	211.37-220.77

(라) 작두콩의 미네랄 함량은 mg/100 mg으로 아래와 같이 보고되었다[20].

Mineral	<i>Canavalia gladiata</i>
Sodium	0.26-83.9
Potassium	790-2280
Calcium	150-310
Phosphorus	262-625
Magnesium	65.2-172
Iron	Trace-45.2
Copper	0.36-1.67
Zinc	1.37-8.42
Manganese	0.23-1.08

Arinathan et al. (2003), Bressani et al. (1987), Ekanayake et al. (1999), Mohan and Janardhanan (1994), Rajaram and Janardhanan (1992), and Siddhuraju and Becker (2001).

(마) 국내 연구자에 의해 보고된 작두콩의 미네랄 함량은 아래의 표와 같았다[22].

Sword bean	
Cu	8.2±0.5 ^a
Fe	31.0±5.4 ^a
Mn	15.0±1.0 ^a
Se	ND ¹⁾
Zn	28.9±0.5 ^a
Na	ND
K	9,879.8±464.8 ^a
Ca	1,265.6±73.0 ^a
Mg	1,288.7±52.0 ^a
Ge	ND

(바) 국내 연구자에 의해 보고된 작두콩의 비타민 함량은 아래의 표와 같았다[22].

Sword bean	
Vitamin A	0.37±0.04 ^a
Vitamin C	25.5±1.1 ^a

(사) 국외 연구자에 의해 보고된 작두콩의 아미노산 함량은 아래와 같이 제시되었다[20].

Amino acid	<i>Canavalia gladiata</i>
Glutamic acid	6.3-17
Aspartic acid	6.0-16
Serine	2.2-5.4
Threonine	2.4-4.2
Proline	2.5-4.4
Alanine	2.5-4.6
Glycine	2.2-4.6
Valine	3.1-5
Cystine	Trace-0.9
Methionine	Trace-3.8
Isoleucine	
Leucine	8.6-13.8 ^b
Tyrosine	2.2-4
Phenylalanine	2.2-5.0
Tryptophan	0.4-1.3
Lysine	4.3-6.1
Histidine	2.6-4.2
Arginine	3.4-5.1

Bressani et al. (1987), Ekanayake et al. (1999), Mohan and Janardhanan (1994), Rajaram and Janardhanan (1992), and Siddhuraju and Becker (2001).

(아) 국내 연구자에 의해 보고된 작두콩의 아미노산 함량은 아래의 표와 같았다[22].

Amino acid	Sword bean (mg)	%
Aspartic acid	2,409.4	12.8
Threonine	1,020.2	5.4
Serine	1,308.8	7.0
Glutamic acid	2,568.0	13.6
Glycine	889.7	4.7
Alanine	965.3	5.1
Cystine	N.D ¹⁾	N.D
Valine	954.6	5.1
Methionine	207.2	1.1
Isoleucine	819.8	4.4
Leucine	1,688.3	9.0
Tyrosine	780.1	4.1
Phenylalanine	978.9	5.2
Histidine	1,724.0	9.2
Lysine	1,265.6	6.7
Arginine	1,242.0	6.6
Total	18,821.8	100

(자) 작두콩의 지방산은 g/100g으로 아래와 같이 보고되었다[20].

Fatty acid	<i>Canavalia gladiata</i>
Saturated fatty acids	
Lauric acid (C _{12:0})	0.17-0.21
Myristic acid (C _{14:0})	0.55-0.72
Palmitic acid (C _{16:0})	16.7-47.3
Stearic acid (C _{18:0})	2.74-11
Arachidic acid (C _{20:0})	0.76-0.78
Henicosanoic acid (C _{21:0})	0.10-0.12
Behenic acid (C _{22:0})	0.45-0.48
Tricosanoic acid (C _{23:0})	0.14-0.15
Lignoceric acid (C _{24:0})	1.19-1.53
Cerotic acid (C _{26:0})	0.63-1.05
Polyunsaturated fatty acids	
Myristoleic acid (C _{14:1})	0-0.16
Palmitoleic acid (C _{16:1})	0-2.79
Heptadecenic acid (C _{17:1})	0.25-0.31
Elaidic acid (C _{18:1})	0
Oleic acid (C _{18:1})	22.5-47.4
Linoleic acid (C _{18:2})	10.7-16.4
Linolelaidic acid (C _{18:2})	0-0.04
Linolenic acid (C _{18:3})	6.56-8.49
Eicosenoic acid (C _{20:1})	1.01-1.35
Eicosadienoic acid (C _{20:2})	0.16-0.22
Eicosatrienoic acid (C _{20:3})	0
Arachidonic acid (C _{20:4})	0
Erucic acid (C _{22:1})	0.17-0.18
Docosadienoic acid (C _{22:2})	0
Docosatetraenoic acid (C _{22:4})	0.04-0.09
Docosapentaenoic acid (C _{22:5})	0.63
Nervonic acid (C _{23:1})	0.07-0.11
P/S ratio ^e	0.72-3.12

Mohan and Janardhanan (1994), Siddhuraju and Becker (2001), and Spoladore and Teixeira (1987).

(2) 비영양성분

(가) 비영양성분으로는 phenolics, tannins, saponins, cyanogenic glycosides, hydrogen cyanide이 알려져 있다. 항균 활성이 알려진 methyl ester, methyl gallate와 같은 3,4,5-trihydroxybenzoic acid, 항산화 활성이 알려진 3-deoxyglucosone, 혈구응집 및 항암 활성을 갖는 canavanine 등이 포함되어 있다.

Component	<i>Canavalia gladiata</i>
Total phenolics (mg 100 g ⁻¹)	640-710
Tannins (mg 100 g ⁻¹)	0-230
Condensed tannins (mg 100 g ⁻¹)	Trace
Saponins (mg 100 g ⁻¹)	813-1005
Canavanin A (mg 100 g ⁻¹)	-
Canavanine (mg 100 g ⁻¹)	2637-3060
L-DOPA (mg 100 g ⁻¹)	2130-3010
Hydrogen cyanide (mg 100 g ⁻¹)	5-109.3
Phytic acid (mg 100 g ⁻¹)	0-868
Phytin (mg 100 g ⁻¹)	-
Phytin phosphorus (mg 100 g ⁻¹)	-
Trypsin inhibition activity (mg g ⁻¹)	8.85-10.22
Unit g ⁻¹	
Chymotrypsin inhibition activity	2.2-3.48
Unit mg ⁻¹	
Alpha-amylase inhibition activity	0
Unit g ⁻¹	
Phytohemagglutinin activity	
Cattle RBC (HU mg ⁻¹)	161-164
Human RBC (A)	0, + (Alb) +, ++ (Glo)
Human RBC (B)	+ (Alb) +, ++ (Glo)
Human RBC (O)	+ (Alb) +, ++ (Glo)
HU mg ⁻¹	80.5-81.9
Rabbit RBC	-
HU mg ⁻¹	

Laurena et al. (1994), Mohan and Janardhanan (1994), Okolie and Ugochukwu (1989), Rajaram and Janardhanan (1992), Rodrigues and Torne (1992), Siddhuraju and Becker (2001), and Thangadurai et al. (2001).

(나) 국내 연구자에 의해 보고된 작두콩의 비영양성분 중 isoflavone과 total flavonoids, total polyphenol은 아래와 같이 보고된 바 있다[21,22].

Component		mg/100 g ⁽²⁾	mg/kg ⁽³⁾
Isoflavonoids	Daidzein	2.55	ND
	Glycitein	4.28	ND
	Genistein	3.93	ND
Total flavonoids (%)		3.10±0.55	493.2±21.2
Total polyphenol (%)		-	1.152.0±26.8

ND : not detected

(다) Isoflavone과 total flavonoids, total polyphenol 이외에도 항균 활성이 알려진 methyl ester, methyl gallate와 같은 3,4,5-trihydroxybenzoic acid, 항산화 활성이 알려진 3-deoxyglucosone, 혈구응집 및 항암, 소염 활성이 알려진 plant lectin의 하나인 canavanine, 미네랄 흡착력과 항암 활성이 알려진 phytate 등이 포함되어 있다고 보고된 바 있다[20].

(라) 지표성분의 분석법

① 본 과제에서 지표성분으로써 적절할 것으로 판단되는 Isoflavonoids과 Canavanine의 분석법을 조사하였다.

② Isoflavonoids

㉞ Isoflavonoids의 추출은 뚜껑이 있는 갈색 시험관에 식품 분말 0.2 g과 10 mL의 80% methanol 용액(v/v)을 가하여 70℃, 150 rpm으로 15시간 진탕 추출한 후 원심분리(800×g, 10 min)한 추출액을 30℃에서 농축한 뒤 10 mL의 80% methanol 용액(v/v)에 녹인 다음 0.45 μm membrane filter로 여과하여 HPLC(1100 series, Agilent Technology, Santa Clara, CA, USA)로 분리하였다. 이때 column은 Symetry shield RP C18(4.6×250 mm i.d., Waters, Milford, MA, USA)을 25℃로 유지되도록 하고, 용매는 ACN : A 용액(80:20, v/v)[A 용액=glacial acetic acid : DW (52.6:900, v/v)]의 비율로 섞인 것을 분당 1 mL로 용리되게 하였다. Detector는 DAD로서 254 nm에서 분리된 각 peak를 표준 isoflavone(Sigma Chemical)의 retention time과 비교하여 동정 및 정량하였다[21].

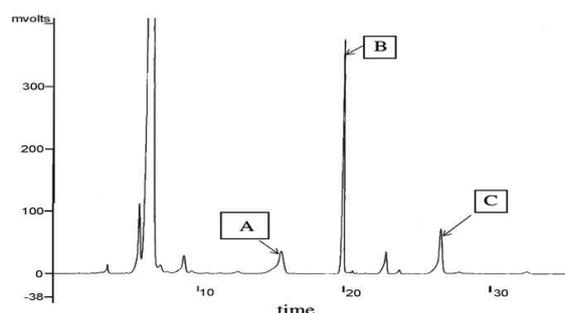
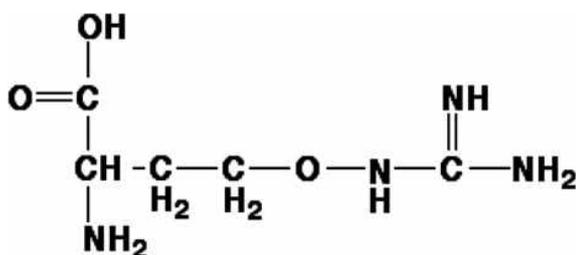
㉟ 시료를 80% 메탄올로 65℃에서 2시간 추출 후 2M NaOH 3 mL를 가해 상온에서 10분간 교반 후 빙초산 1 mL를 가하고 80% 메탄올로 50 mL로 정용하여 적당히 희석하여 시험용액으로 하였다. 분석에 사용된 액체크로마토그래피(Alliance 2695, Waters, Milford, MA, USA)의 분석조건은 다음과 같다. Column은 Capcell Pak C18, UG 120(4.6 mm ID×250 mm, 5 μm, Shiseido, Tokyo, Japan)을 사용하였고, 분석파장은 260 nm, 이동상은 증류수(2% acetic acid 함유)와 메탄올(2% acetic acid 함유)을 사용하여 gradient 조건[DW:MeOH=(90:10)–(40:60)]으로 분석하였다 [건강기능식품공전] [22].

③ Canavanine

㉞ 시료 1 g을 완전히 균질화시켜, 9 mL의 95℃ 물에 분산시키고, 14시간동안 20℃에서 침지시킨다. 1 mL 1M HCl을 internal standard를 (590 mmol/L) 첨가하고, 시료를 ultrasonic treatment로 30 min간 처리하고 1000g for 20 min간 원심분리한다. 상층액 1 mL과 1 mL trichloroacetic acid (40% v/v)를 혼합하여 10분간 ice에 방치한 후 2000g for 30 min간 원심분리한다. 질소가스 하에서 상층액을 완전히 건조한다. 건조된 시료와 Canavanine 표준물질은 0.15 mol/L NaHCO₃, pH 8.6인 reaction buffer에 완전히 풀고 dabsyl chloride reagent (40 mg/10 mL acetone)와 혼합한다. 시료는 70℃에서 20분 동안 침지하고, 1분, 5분, 12분에 혼합하고, 5 ~ 8분동안 ice에 방치한다. 각 시료와 standards는 Millipore HV filters (0.45 μm)로 여과하고 HPLC를 수행한다. HPLC의 분석 조건은 아래와 같다[23].

An HPLC (Varian 9100) was coupled to an auto-sampler (Varian 9000) and a UV/VIS detector (Company X 206PHD). Varian Star software was used for system control, data collection and peak integration. The volume of the injection loop was 100 μ L. The column (LiChrospher 100, RP-C18, 5 μ m, length 25 cm, i.d. 4.6 mm, Merck KGaA) equipped with a guard cartridge was maintained at 50 $^{\circ}$ C (Eurotherm Thermostat).

Mobile phase A consisted of NaH_2PO_4 (9 mmol), 4% dimethyl formamide and 0.2% triethylamine, pH adjusted to 6.55 with phosphoric acid. Mobile phase B consisted of aqueous acetonitrile (80% v/v). For best resolution with a short elution time, a gradient system was used starting at 40% B for 15 min and then increased to 58% B from 15 to 17 min, followed by an increase to 100% B from 17 to 42 min. The flow rate was 1.0 mL/min, the injection volume was 20 μ L and the effluent was monitored at 436 nm. Identification and quantification were achieved by comparing retention times and peak areas with those from a standard sample run under the same conditions.



Molecular structure of canavanine.

HPLC chromatogram (436 nm) of a soaked and boiled sword bean sample. The peaks corresponding to the internal standard (B) and canavanine (A and C) are indicated by arrows.

- ㉔ 시료 0.5 g을 250 mL volumetric flask에 무게를 측정한다. Ultrasonic bath에 20분 간 처리한다. 상층액은 0.5- μ m Millex membrane filter로 여과하여 HPLC 분석에 사용한다. Canavanine 표준물질은 phosphate/propionate buffer (pH 6.5)에서 처리 하여 시료와 같이 사용한다[24].

Columns (5 mm id by 160 mm and 5 mm id by 100 mm long) were packed using a Magnus P6050 column packer (Magnus Scientific Ltd, Sandbach, Cheshire) modified to pack Shandon columns. Columns were packed upwards using an acetone slurry. Efficiencies obtained, using anthracene in methanol at a flow rate of 1 ml min⁻¹ with acetonitrile/H₂O (80:20v/v) as the eluent, were 50000–60000 and 100000–120000 plates per metre for the Spherisorb (5 mm id by 160 mm long) and Hypersil (5 mm id by 100 mm long) packed columns respectively. A Gilson gradient HPLC system (Scotlab Ltd, Bellshill) with 5-ml pump heads was used for chromatography. Detection was with a Gilson model 121 fluorimeter fitted with a 9- μ L flow cell. Excitation and emission filter bandwidths were 305–395 nm and 420–650 nm respectively. Injection was achieved using a Rheodyne 7125 injection valve with a 20 μ L loop.

TABLE 1 Eluent composition			TABLE 2 Gradient profiles (eluent D and H were used to produce the gradient at ambient temperature)			
Eluent	D	H	Gradient 1		Gradient 2	
			Time (min)	% H	Time (min)	% H
H ₂ O (ml)	600	590	0	0	0	0
Tetrahydrofuran (ml)	—	380	8	0	5.5	0
Acetonitrile (ml)	125.6	—	8.1	12	6.0	10
Methanol (ml)	58.1	—	36.2	12	7.0	100
Dimethyl sulphoxide (ml)	7.0	30	36.3	70	11.0	100
Propionate buffer (pH 6.5) (m ³)	209.3	—	40	70	12.0	0
			40.2	100	15.0	0
			44	100		
			44.2	0		
			50	0		

Flow rate for Spherisorb columns = 1.4 ml min⁻¹; flow rate for Hypersil columns = 1.0 ml min⁻¹. Gradient 1 used for analysis of canavanine and canaline. Gradient 2 for the analysis of canavanine only.

TABLE 3
Concentration of canavanine in jack beans (g kg⁻¹ ground sample as received) determined by HPLC, ion exchange chromatography (IEC) and colorimetry

Method of analysis	HPLC	Colorimetric ^a	HPLC	IEC
Method of preparation	H ₂ O extract	H ₂ O extract	HCL hydrolysate	
Concentration of canavanine (g kg ⁻¹)	38.3	38.1	36.0	35.9
% RSD	4.27	1.79	2.59	7.29
n	4	6	4	6

^a By colorimetric examination of the pentacyanoammine ferrate (III) complex.

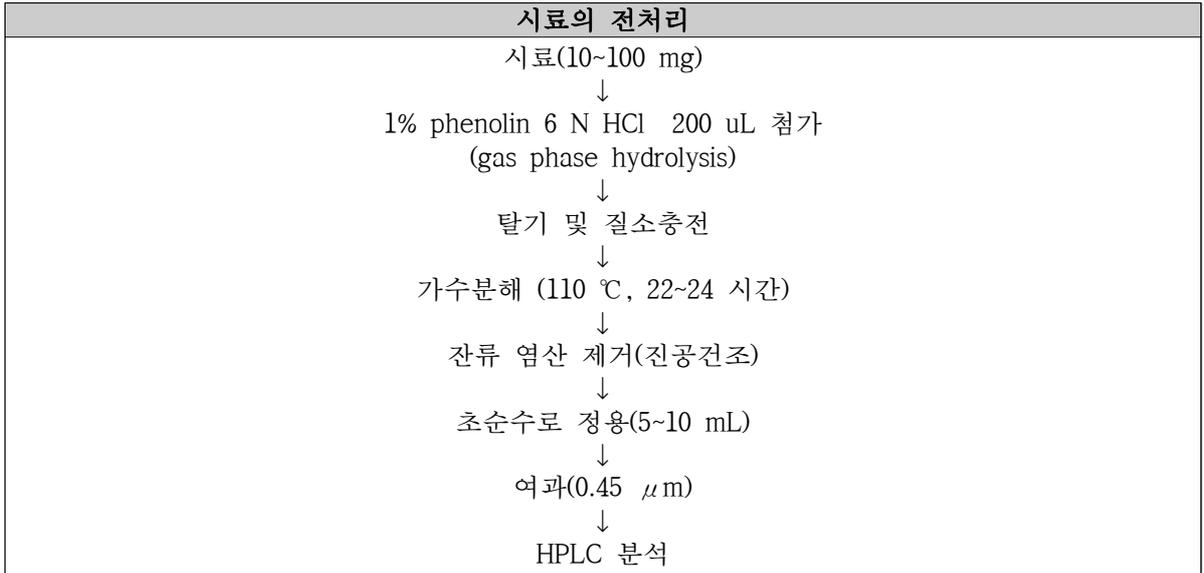
㉔ 시료 2 g을 80°C에서 4시간동안 건조한 후 분쇄한다. 50% ethanol, 0.4 N H₂SO₄를 10 mL 처리하고 3회 추출한다. 20 mL diethyl ether를 3회 처리하여 지질을 제거한다. 2N NaOH를 추출물에 처리하고 중화시킨다. ion-exchange chromatography에 의해 HPLC를 수행한다[25].

NaOH. If protein was precipitated, the extracts were centrifuged at 2000g for 10 min, and the supernatant as well as the aqueous milieu of the paper disks or sandy beds was fractionated by cation exchange chromatography on Dowex 50 WX8 (NH₄⁺), 100–200 mesh, according to Rosenthal (1977c). The resin-bound canavanine was eluted by 50% aqueous ethanol, 0.35 N with respect to NH₄OH. All eluates were evaporated to dryness in vacuo below 40°C, and the residues obtained were dissolved in 1–2 ml of double-distilled water.

For measuring amino acids by an automatic analyzer, the same extraction procedure was used except: (1) the cation exchange resin used was changed to Dowex 50 WX8 (H⁺), 100–200 mesh, (2) the resin-bound amino acids were eluted by 2 N NH₄OH in 50% aqueous ethanol, and (3) the residues were dissolved in 4 ml 0.01 N HCl.

㉔ 시료 0.1 g에 6N HCl을 처리하고 110°C에서 24시간 분해한다. 산분해한 시료는 pre-column o-phthalaldehyde (OPA)와 같이 HPLC를 수행한다. Canavanine은 4.6 × 150 mm supelcosil 3 micron LC-18 reverse phase column (Supelco, Oakville, Ontario)으로 분리하였다[26].

㉕ 본 과제의 참여기관에서 수행한 Canavanine 분석방법은 다음과 같다.



HPLC 분석조건

- Column CapcellpakUG120C18 (250mm × 4.6mm, 5 μm)
- Column temperature 40° C
- Injection volume Progame
- Mobile phase A : 40mMNaH₂PO₄(pH7.8)
B : ACN : MeOH : DW (45:45:10)

Time	A(%)	B(%)	Flow rate(mL/min)
0.00	95	5	1.5
31.00	44	56	1.5
33.00	44	56	1.5
34.00	0	100	1.5
38.00	0	100	1.5

Stop time : 38분 Post time : 3분

- Detector

Signal(nm)	Bw(nm)	Reference(nm)	Bw(nm)
338	4	450	20
262	4	450	20

㉞ 지표성분의 분석

참여기관에서 분석기기 및 분석조건으로 산업화 표준화 된 발효작두콩을 HPLC 분석 실험을 수행하였을 때 그 결과 38.05±1.72 mg/g의 canavanine이 검출되었다.

7. 작두콩 잔유물 활용성 검토

가. 방법

- (1) 콩부산물, 콩잔유물, 대두박 등의 키워드를 중심으로 자료를 수집하였다.
- (2) 작두콩잔유물의 특성을 검토한다.

나. 결과

(1) 콩부산물의 특성 및 활용방법

(가) 콩부산물 중 대표적인 것은 ‘대두박’으로 전처리 가공방법에 따라 부산물 대두박의 명명은 일반대두박, 탈피대두박 등으로 분류된다. 이들의 주요 영양성분은 다음과 같은 차이를 나타내는 것으로 나타났다.

	일반대두박	탈피대두박
대사에너지(Mcal/g)	3.18	3.38
조단백질 %	43.8	47.5
조지방	1.5	3.0
NDF%	13.3	8.9
ADF%	9.4	5.4

<<http://www.soyworld.org>>

(나) 콩부산물의 대부분은 사료로 이용되어 왔으며 이와 관련된 가치 창출을 위한 연구가 꾸준히 진행되어 왔다. 이에 몇몇 연구 보고는 다음과 같다.

(다) 압출기의 양조식품에의 이용성 부분에서 두부 제조시 생기는 비지의 수분 함량을 10%로 건조한 후 쌀가루, 쌀겨, 콩비지의 배합을 적용하여 부산물의 특수한 관능을 제거하고 이용할 수 있음이 보고된 바 있다.

<ReSEAT 분석리포트, 이성갑, 2005>

(라) 수입산 콩비지의 경우 변질 우려가 높아 건비지 형태의 사료원료로 판매되고 있다. 식용원료에 대한 수요가 많지 않아 식품원료로 고려되지 않는 측면이 있고, 콩비지는 특정폐기물로 분류되며, 상품화 시도를 하였으나 활용빈도가 낮다. 이에 빵 제조 원료로 사용법에 대한 연구가 수행된 바 있다. 이 연구에서 콩비지의 특성은 조직감이 좋지 않고, 불용성식이섬유가 많고, 기름성분이 함유되어 있어 제품화가 어려운 측면이 있는 점을 제시한 바 있다.

Table 8. The characteristics of soybean curd residue and soybean oil cake

Section	Soybean curd residue	Soybean oil cake	Remark
Process	residues after production of soybean curd and soybean milk	residues after production of soybean oil by pressure method	
Water	high	low	
Conservative property	low	high	
Utility	for feed	for ISP ⁷⁾	

* Soybean curd residue is not appropriate for manufacture of ISP by higher oil content

Table 9. Self quality control of dried soybean curd residue in factory

Section	Standard and Specification		Remark
	Self management	Final product(Ave.)	
Crude protein	25% ↑	33%	
Water	13% ↓	4%	
Crude fiber	43% ↓	37%	
Crude ash	10% ↓	4%	

7) ISP(Isolated Soy Protein, 분리대두단백)

〈원료성 가공식품 등의 기준·규격 마련 연구, 2009, 식품위해평가부〉

(마) 학계의 대두박 이용성 연구는 대두박, 발효대두박, 발효대두액 등이 이용되고 있으며 육계의 사료, 어류의 사료, 기능성 사포닌 소재화, 기능성 펩타이드 소재화 등의 연구가 2000년대 이후로 진행되어 왔다. 이들의 연구는 아래의 표와 같다.

No	제목	년도	학회지	저자
1	대두박 단백질 이용 및 사료에의 최적 인산염 첨가량의 결정을 위한 실험 연구	1990	韓國養魚學會誌 = Journal of aquaculture	김이배, 김영미, 소명현
2	은연어(Oncorhynchus kisutch) 사료 단백질원으로서 대두박의 이용에 관한 연구(대두박 함량에 따른 성장)	1992	韓國養魚學會誌 = Journal of aquaculture	김병기, 전중근, 김형선, 양정규, 허정택
3	조피볼락 사료의 어분 대체 단백질원으로서 대두박 평가	1996	한국수산학회지 = Journal of the Korean fisheries society	이상민, 전임기
4	납치 배합사료의 어분 대체 단백질원으로서 대두박 이용성	2000	한국어업기술학회 2000년도 춘계수산관련학회 공동학술대회발표요지집	김윤숙, 허재이, 문태석, 이상민
5	납치 치어 배합사료의 어분 대체 단백질원으로서 탈지 대두박 이용성	2000	한국수산학회지 = Journal of the Korean fisheries society	김윤숙, 김봉석, 문태석, 이상민
6	지질함량별 대두박 첨가가 조피볼락 치어의 성장 및 체성분에 미치는 영향	2006	한국양식학회 2006년도 춘계학술발표대회 논문요약집	강용진, 김강원, 이해영
7	지질함량별 대두박 첨가가 납치 치어의 성장 및 체성분에 미치는 영향	2006	한국양식학회 2006년도 춘계학술발표대회 논문요약집	강용진, 김강원, 이해영
8	사료 내 면실박 및 대두박 첨가가 납치의 번식 조직화에 미치는 영향	2006	韓國養魚學會誌 = Journal of aquaculture	임세진, 이경준, 이영돈, 송영보
9	대두박 추출물의 논 잡초에 대한 타감작용 효과 및 Phenole 함량 분석	2008	한국잡초학회지 = Korean journal of weed science	안철화, 이상복, 임일빈, 김서, 안승현, 김재덕
10	해양미세조류(Schizochytrium mangrovei MM103)를 이용한 발효 대두박 급이에 따른 D-세, 다량 함유 육계의 계란의	2008	한국가금학회지 = Korean journal of poultry science	정오정, 이정열, 김상호, 이상진, 최병대, 강석중
11	대두박 식용사포닌의 항산화 및 대장암세포 성장 억제효과	2009	한국식품저장유통학회지 = Korean journal of food preservation	박경옥, 김재용, 서권일
12	대두박 사포닌 보충이 식이성 유도 비만대우스의 체중과 내당능에 미치는 영향	2009	한국식품영양과학회지 = Journal of the Korean society of food science and nutrition	김성미, 서권일, 박경옥, 정영기, 조영주, 김영주, 김민정, 이미경
13	살겨 이용 잡초관리시 대두박 혼합 및 중경계조기 병용 효과	2010	한국잡초학회지 = Korean journal of weed science	안승현, 김서, 임일빈, 문은호, 차영록, 박선태, 구분철, 서세정
14	농산부산물을 이용한 In Vitro 반추위발효 특성 및 적정 배합수준을 통한 옥수수 및 대두박 대체 효과	2011	한국동물자원과학회지 = Journal of animal science and technology	박중국, 임동원, 김상범, 기광석, 이원준, 권용기, 조원모, 김창현
15	계분, 대두박, 알거름 이용한 유기 역대의 제조 특성	2011	韓國有機農業學會誌 = Korean journal of organic agriculture	이광재, 전중옥, 박재호, 남상영, 김태중
16	반응표면분석법에 의한 대두박 수수구조체 발효 최적화와 생산된 대두 항산화 펩타이드의 연구	2012	中國生物工學雜誌 = Journal of Chinese biotechnology	차재미, 심충중, 장레이, 류용평, 마오빙쉬안
17	대두박 대체 부산물 위주의 NIR 시료 기반 위 내 미생물의 In Vitro 발효특성에 미치는 영향	2014	한국초지조사료학회지 = Journal of the Korean society of grassland and forage science	배귀석, 김은중, 송태호, 송태화, 박태일, 최학진, 권찬호, 장문백
18	대두박 사료에 대한 무지개송어(Oncorhynchus mykiss)의 소화 특성	2014	한국수산과학회지 = Korean journal of fisheries and aquatic sciences	김병기, 전중근

〈NDSL, 2015〉

(바) 사료화 이외에도 ‘다공질 탄소재료’에 대한 내용이 제시된 바 있다. 콩깍데기 부산물을 새로운 탄소자원으로 이용할 가치가 있으며 그만큼 충분하다는 것이다. 이들 다공질 탄소재료들은 고내열성, 경량성, 흡착성, 전기전도성, 고유전성 등의 특성을 갖도록 개발해야 하며, 콩깍데기는 불활성 가스 중 고온 소성 시켜 무정형 탄소를 만들고 이를 페놀 수지에 함침시켜 소성을 강화시켜 경질유리모양의 탄소질 소재가 될 수 있고, 이들을 합성고무나 플라스틱 등 고분자 재료에 혼합하여 적절한 전기전도성을 갖는 플라스틱 제제를 개발할 수 있다고 하였다. 또한 이러한 복합재료는 전자과 흡수성을 갖고 있어, 전자과 흡수특성에 대한 연구도 진행하고 있다고 하였다.

(2) 작두콩잔유물의 특성

작두콩의 영양성분은 조단백질 28.3%, 조지방 5.9%, 탄수화물 53.1%, 섬유소 9.3%, 회분 5.9%로 보고된 바 있다[27]. 본 연구에서 연구에 사용한 작두콩은 광주광역시 2014년 생산된 작두콩의 영양성분은 조단백질 26.3%, 조지방 1.0%, 탄수화물 57.4%, 수분 12.0%, 회분 3.3%, 섬유소 8.9%로 나타났다. 작두콩 50%주정추출물의 잔유물은 73.4%로 나타났고, 발효작두콩 30%주정추출물의 잔유물은 71.7%로 나타났다. 각 작두콩 추출 잔유물들의 아래의 표와 같았다.

	작두콩 50%주정추출물 잔유물	발효작두콩 30%주정추출물 잔유물
조단백질 %	25.9	32.2
조지방 %	1.3	1
탄수화물 %	64.45	59.86
수분%	6.29	4.94
회분%	2.1	2
조섬유%	8.02	11.4

8. 시장조사 및 마케팅 계획

가. 방법

- (1) 콩 이용 제품 시장 조사를 수행한다.
- (2) 작두콩 제품 시장 조사를 수행한다.
- (3) 국내의 마케팅 계획을 수립한다.

나. 결과

(1) 콩 이용 제품 시장조사

(가) 작두콩 등 콩을 이용하여 과자류를 제조하기 위하여 콩이용 제품(과자류) 국내 시장 조사 결과는 다음과 같다. 콩가루를 이용한 제품은 경화당제과의 ‘진해명물콩과자’, 롯데제과의 ‘구워만든 쌀로별 인절미맛’, 농업회사법인 다살림(주)의 ‘유기농 인절미스낵’, 우래식품의 ‘우래 순수 인절미바’ 등이 있었고, 시즈닝과 혼합곡물을 이용한 제품은 개미식품의 ‘곡물치즈롤’, 해태가루비의 ‘구운인절미’, 미미제과의 ‘우리쌀로 빛은 고소한 인절미’ 등이 있었으며, 기타로 대두분을 이용한 오츠카제약주식회사의 ‘소이조이’, 대두를 이용한 우래식품의 ‘오곡코코넛힐링바’, 렌틸콩과 대두효소액을 이용한 리뉴얼라이프(주)의 ‘아이배넷 베베핑거 쌀과자와 렌틸콩, 검은콩을 이용한 해오름식품의 ‘맛콩’ 등이 조사되었다.

(나) 작두콩 등 콩을 이용하여 과자류를 제조하기 위하여 콩이용 제품(과자류) 국외 시장조사 결과는 다음과 같다. 대두를 이용한 제품으로 ECHIGOESIKA CO.,LTD의 ‘훈와리메이진 콩가루모찌’, MATSUO SEIKA CO.,LTD의 ‘나메리카키나코모찌 초코릿’, BEIJINGHUAFEI FOOD CO.,LTD의 ‘별집모양 쌀+콩과자 매운맛’이 있었고, 완두콩을 이용한 VIEN HONG CO.,LTD의 ‘그린피스 와사비스낵’, 병아리콩을 이용한 BESLER KURUYEMIS ve GIDA MADDELER의 ‘투르카넛’ 제품이 조사되었다.

〈국외 제품〉

제품명	제품사진	제조사	용량(g)	가격	원재료	비고
훈와리메이진 콩가루모찌		ECHIGOESIKA CO.,LTD-일본 (명진유통)	85	4,200	쌀, 식물성유지(유채유), 설탕, 대두 , 포도당, 초산염, 경제소금	대두
그린피스 와사비스낵		VIEN HONG CO.,LTD-일본 (효성인터내셔널)	380	4,180	완두콩 , 밀가루, 식물성유지(참유, 디부틸히드록시톨루엔(산화방지제)), 와사비분말, 설탕, 경제소금, 합성착색료(식용색소황색제4호, 황색제1호)	완두콩
나메리카키나코 모찌초콜릿		MATSUO SEIKA CO.,LTD-일본 (제이투코리아)	56	2,240	설탕, 밀유, 유당, 대두분말9.28% , 분말, 환원분말, 전지분유, 크로아버터7.6%, 말저분유, 젤라틴(황지표기), 옥수수전분, 프치알로스, 히드록시프로필셀룰로스, 락틴, 율락, 대두레시틴, 합성착색료(대두황)	대두분말9.26%
별집모양 쌀+콩과자 매운맛		BEIJINGHUAFEI FOOD CO.,LTD-중국 (혜성식품)	100	2,000	쌀, 대두 (유전자변형대두포함가능성있음), 대두유, 옥수수전분(유전자변형옥수수포함가능성있음), 그루가루, 산소가루, 후추분말, 생강분말, 경제소금, L-글루탐산나트륨, 대설탕, 합성료(말린향, 말향, 제피)	대두
투르카넛		BESLER KURUYEMIS ve GIDA MADDELERI-터기 (벨리시모)	50	1,500	투르카넛 100%	병아리콩

(2) 작두콩 제품 시장조사

작두콩을 이용하여 식품을 제조하기 위하여 작두콩 이용 제품에 대한 시장조사 결과는 다음과 같다. 식용부위인 열매와 깍지는 각각 건조상태 및 생물상태로 판매되고 있는 것으로 조사되었다. 환, 분말, 엑기스, 장류, 발효액, 식혜 등의 제품을 시장에서 조사할 수 있었다.

작두콩	 작두콩	 작두콩깍지	
환	 작두콩 환	 작두콩환	 작두콩환
분말	 작두콩분말	 작두콩분말	 습수기편한 작두콩분말
엑기스	 작두콩 엑기스 골드	 작두콩 엑기스즙	 신비의 작두콩진액
장류	 작두콩 청국장	 콩순이 작두콩참혼합장	 국산작두콩으로만든된장
기타	 볶은 작두콩	 작두콩발효액	 작두콩 도라지청
			 작두콩알식혜

(3) 마케팅 계획

(가) 국내 마케팅 계획

① 온라인

- ㉞ 파워블러거 리뷰 콘텐츠 : 파워블러거의 제품 사용 리뷰를 통한 콘텐츠 신뢰성 확보, 직접적인 제품리뷰를 통한 파워블러거 팬에게 어필 및 노출증가, 블러거 방문자의 이웃들을 통해 소문 확산 유도, 리뷰 포스팅 노출을 통해 소비자 인지도 상승효과 획득

- ㉔ 개발된 제품 무료 체험단 진행 운영 및 블로그에 게재 : 국내 유명 커뮤니티 카페와 제휴를 통한 후기 체험단 진행, 체험단을 통한 제품 소문 효과, 제품 후기 콘텐츠 대량 발생
- ㉕ 소셜커머스 판매를 통한 홍보 효과 : 단기적인 할인 판매를 통한 홍보 기회 노출, 판매된 제품의 후기를 통해 단점 개선 효과, SNS를 통한 신제품 홍보 파급효과
- ㉖ 카카오톡 공동구매 참여

② 오프라인

- ㉗ 현재 주관기관은 국내 친환경시장 내 과자류의 약 40%를 Marker share 하고 있어 본 사업을 통해 개발된 제품의 시장 진입은 어렵지 않음
- ㉘ 지역 내 시식행사를 시작으로 대표적인 친환경 전문업체인 ‘생협’, ‘초록마을’ 입점 할인 행사 기획
- ㉙ 유통업체 소식지를 활용하여 신제품 홍보
- ㉚ 기 거래중인 대형유통업체 및 대기업 OEM 제품 개발

③ 해외 마케팅 계획

- ㉛ 기 구축된 바이어 활용 방안
 - 주관기관에서 기 수출중인 바이어들에게는 본 사업을 통해 개발된 제품의 샘플 및 홍보자료가 전달되어 있으며, 현재 수입 검토중에 있음
 - 기 구축된 잠재바이어 Pool를 통한 신제품 홍보, 샘플전달, 국내 상담 행사 초청 등
 - 수출중인 국가 내 프로모션 행사를 통한 매출확대
- ㉜ 신규 바이어 확보 방안
 - NPEW를 포함한 해외 전문식품박람회 3회 이상 참가
 - B2B사이트를 활용한 바이어 검색 및 온라인 홍보
 - aT, kotra 등 수출유관기관의 사업참여 및 바이어 미팅 행사 참여

9. 결론

가. 작두콩 원료를 추출하여 물추출물, 30%주정추출물, 50%주정추출물, 80%주정추출물을 추출하여 동결건조 추출물을 제작하였다. 이들 추출물들은 참여기관인 전남대학교에 제공하여 에너지증진능 생리활성 평가에 활용하였다. 활성 결과에 따라 소재 표준화를 위해 산업용 추출기를 이용하여 추출물의 시생산을 수행하였고, 각 추출물의 성상과 수율을 확인하였다. 생리활성, 기술성, 경제성을 고려하여 에너지증진 기능성 소재로는 작두콩 50%주정추출물을 선정하였고 이의 대량추출표준화를 수행하였다.

나. 발효작두콩의 표준화는 참여기관인 경희대학교에서 수행하여 이의 결과를 기초로 하여, 발효표준화 및 발효작두콩 30%주정추출물 시생산을 수행하였다.

다. 작두콩과 발효작두콩을 활용한 기능성 강화식품을 개발하기 위해 chip, bar, 크런치 제형을 검토하고 개발을 수행하였으며, 주요 소비층인 유아와 청년층을 대상으로 각 기능성과 개발 제형간의 관련성 분석을 통해, 소비층의 제형 선호도를 분석하였다. 에너지증진능 소재인 작두콩 50%주정추출물을 함유한 기능성 강화 식품개발을 위해 검토된 제형 중 chip 제형의 시생산을 통해 개발된 시제품들의 기호도를 평가하였고 ‘작두콩소이칩’을 개발하였다. 또한 피부과민반응개선 소재인 발효작두콩 30%주정추출물을 함유한 기능성 강화 식품을 ‘피넛씨리얼’을 개발하였다.

제 2 절 친환경작두콩 대상 에너지증진능 기능성 식품소재개발

1. 작두콩추출물의 에너지증진 기능성평가

가. 방법

(1) 작두콩추출물 시료

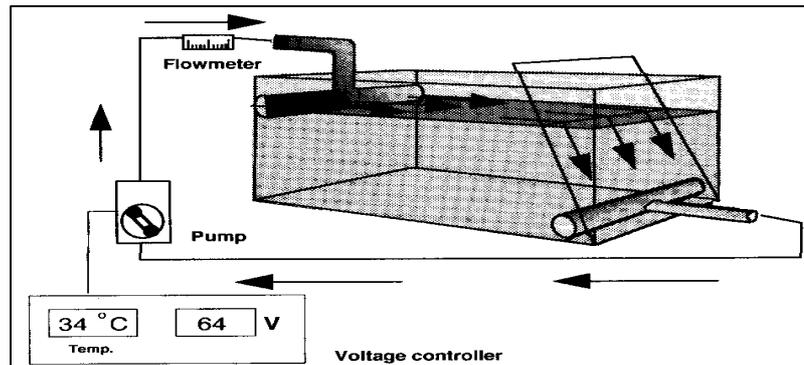
주관기관으로부터 작두콩 물추출물, 작두콩 30%주정추출물, 작두콩 80%주정추출물을 제공받아 본 실험에 시료로 사용하였다.

(2) 마우스를 이용한 추출물의 독성평가

- (가) 실험동물의 관리 및 이상증상 등 측정 : SPF (Specific pathogen free)의 4주령 ICR 옹성마우스를 구입하여 실험동물로 사용하였다. 실험동물은 항온항습시스템을 갖춘 후드 내에서 5~6마리를 polycarbonate cage (278×420×200 mm)에 넣고, 실내온도 22±2℃, 기류속도 13~18cm/sec, 환기횟수 10~20회/h, 기압차2~10 mm H₂O, 명암주기 12시간; 7:00~19:00, 조도 150~300 Lux에서 사육하였다. 일주일간의 적응기간 후 체중감소가 없는 건강한 동물을 선별하여 무작위법으로 체중의 평균값이 같도록 그룹화 하였다. 500 mg/kg/day, 1000 mg/kg/day, 1500 mg/kg/day, 2000 mg/kg/day 농도의 작두콩 추출물들을 28일간 경구투여 하였다. 경구투여는 1일 1회 동일시간대에 수행하였다. 경구투여 후 1시간부터 6시간까지 이상 증상을 2시간 간격으로 관찰하였다. 투여 다음날부터 매일 1회 모든 동물에 대해 일정한 시간에 외형의 일반 증상, 경련 등의 중독증상, 사망의 유무를 관찰하여 기록하였다. 관찰 기간 중 나타난 이상증상 및 특징들을 군별로 기록하였다.
- (나) 실험동물의 생존률 및 체중변화 측정 : 그룹화 된 실험동물군 각 개체의 체중은 매 3일 간격으로 측정하였고, 투여 최종일에 모든 생존 동물의 수와 그들의 외관검사를 실시하였다.
- (다) 실험동물의 혈청학적 바이오마커 측정 : 마지막 추출물 투여 후 12시간 동안 절식하고 에테르를 이용하여 마취한 후 회복하여 복대동맥에서 채혈하였다. 혈액은 3,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 -70℃ 냉동고에 보관하여 사용하며, GPT(glutamicpyruvic transaminase)와 GOT(glutamic-oxaloacetic transaminase)는 상용화된 kit를 사용하여 분석하였다.
- (라) 실험동물의 조직무게 측정 : 각 실험군의 조직무게(g)를 측정하여 relative organ weight (조직무게/체중×100)으로 각 실험군간 통계적 비교를 수행하였다.
- (마) 실험군간 데이터의 통계적 분석 : 데이터는 평균±표준오차로 제시하였고, 각 실험군간의 통계적 비교는 ANOVA 분석을 이용하였고, Duncan multiple range test를 이용하여 사후 검정을 실시하였다. $p<0.05$ 일 때 통계적 유의차가 있는 것으로 판정하였다.

(3) 유영수조를 이용한 *in vivo* 지구적 운동능력향상능 평가

(가) 유영수조 : 유영운동능력측정에 이용된 유영수조는 90×45×45cm 크기의 아크릴로 제작된 기구이며, 이 수조는 운동능력측정시 높이 35cm까지 물을 채운 후 수온을 34°C로 유지시키고, 운동부하는 물 표면의 유속으로 조절하며, 표면유속은 전압조절기가 연결되어 pump와 water flowmeter(type F45500, Blue white Co, Westminster, CA, USA)를 이용하여 최적유속을 유지하면서 마우스의 지구적 운동능력을 측정에 이용하였다.



<유영운동능력 측정용 유영수조>

(나) 실험동물의 분류 및 체중 등 측정 : SPF (Specific pathogen free)의 4주령 ICR 웅성 마우스를 구입하여 실험동물로 사용하였다. 실험동물은 항온항습시스템을 갖춘 후드 내에서 5마리를 polycarbonate cage (278×420×200 mm)에 넣고, 실내온도 22±2°C, 기류속도 13~18cm/sec, 환기횟수 10~20회/h, 기압차2~10 mm H₂O, 명암주기 12시간; 7:00~19:00, 조도 150~300 Lux에서 사육하였다. 일주일간의 적응기간 후 체중감소가 없는 건강한 동물을 선별하여 무작위법으로 체중의 평균값이 같도록 1차 그룹화 하였다. 실험기간동안 매 3회 체중을 측정하여 실험군별 체중의 변화를 기록하였다.

(다) 지구적 운동능력 향상능 측정 : 추출물들의 지구적 운동능력 향상능 측정 실험에서 추출물 등 처리 전 1주일간 8L/min 유속의 운동 강도 하에서 2번의 한계유영운동시간을 측정하여 군별 평균 유영시간 및 체중이 같도록 대조군(CON)과 투여군(작두콩 추출물; CGW/ 작두콩 30%주정추출물; CGE30/작두콩 80%주정추출물; CGE80)들로 나누었다. 2주간 시료를 처리하였고, 한계까지의 유영운동능력은 매 7일 간격으로 측정하였다. 카페인 투여에 따른 지구적 운동능력 향상능 측정 실험에서 카페인 처리 전 1주일간 8L/min 유속의 운동 강도 하에서 2번의 한계유영운동시간을 측정하여 군별 평균 유영시간 및 체중이 같도록 대조군(CON)과 카페인투여군(Caffeine)으로 나누었다. 유영운동시간의 한계치는 마우스가 물속에 빠져 7초가 경과될 때까지 물 표면으로 올라오지 못하는 시점을 시간으로 평가하였다.

(라) 혈중 lactic acid의 농도 측정 : 대조군과 추출물 투여군들의 운동전과 15분 운동 후, 혈중 피로 지표인 lactic acid의 농도를 kit를 이용하여 측정하였다.

(마) 혈중 유리지방산의 농도 측정 : 대조군과 추출물 투여군들의 한계 운동 후 혈중 유리지방산 함량을 kit를 이용하여 평가하였다. 또한, 혈중 중성지방(TG)과 총콜레스테롤(TCHO)을 측정하였다.

(바) 근육 및 간조직의 글리코젠 함량 측정 : 각 조직을 적출하여 분석 전까지 -70°C에 보관하였다. 각 조직을 해동하여 무게의 10배에 해당하는 30% KOH를 넣고 100°C에서 30분간 lysis 하여 분석할 조직액을 준비하였다. Glass tube에 각 군의 조직액에 2% anthrone solution을 혼합하여 15 분간 상온에서 반응시키고 620 nm에서 흡광도를 측정하였다. Glycogen standard curve 작성을 위하여 bovine liver glycogen을 0, 100, 250, 500, 1000 ug/mL의 농도로 제조하였다. 조직액과 동일한 방법으로 각 농도의 시료를 반응하여 흡광도에 따른 표준곡선을 작성하였다. 각 조직으로부터 분석된 흡광도를 적용하여 mg glycogen/g tissue로 환산하여 각 실험군의 조직 glycogen 함량을 제시하였다

(사) 실험군간 데이터의 통계적 분석 : 데이터는 평균±표준오차로 제시하였고, 각 추출물간의 통계적 비교는 ANOVA 분석을 이용하였고, Duncan multiple range test를 이용하여 사후 검정을 실시하였다. $p < 0.05$ 일 때 통계적 유의차가 있는 것으로 판정하였다

2. 결과

(1) 작두콩추출물의 독성평가

500 mg/kg/day, 1000 mg/kg/day, 1500 mg/kg/day, 2000 mg/kg/day 농도의 작두콩 추출물들을 28일간 반복 경구투여 하여 독성평가를 수행하였다. 경구투여기간 동안 외형적으로 관찰된 중독증상 및 사망 개체는 없었다. 초기체중, 최종체중, 간·신장·비장의 무게를 평가한 결과를 다음 표에 제시하였다. 초기 및 최종체중, 각 조직의 무게에서는 실험군별 통계적 유의차가 나타나지 않았다(Table 1, Table 2, Table 4, Table 5). 독성의 혈청학적 바이오마커인 GOT 및 GPT를 측정한 결과 CGE80 2000을 제외하고 실험군별 통계적 유의차이를 나타내지 않았다(Table 3, Table 6)

Table 1. Survival Rate and Body Weight of Experimental Mice for Toxicity

Group	No.	Initial body weight (g)	No.	Final body weight (g)	Survival Rate
CONTROL	5	30.48±0.49 ^a	5	36.37±1.21 ^a	100
CGE80 500	5	30.48±0.49 ^a	5	36.30±1.74 ^a	100
CGE80 1000	5	30.48±0.75 ^a	5	38.78±1.67 ^a	100
CGE80 1500	5	29.88±0.61 ^a	5	35.30±0.98 ^a	100
CGE80 2000	5	30.46±1.04 ^a	5	38.58±1.51 ^a	100

Data represents the mean ± S.E.

* $P < 0.05$ v.s. CONTROL

Data represents the mean ± S.E. CONTROL: control, CGE80 500: 500 mg/kg/day of 80% ethanol extract from *Canavalia gladiata* DC., CGE80 1000: 1000 mg/kg/day of 80% ethanol extract from *Canavalia gladiata* DC., CGE80 1500: 1500 mg/kg/day of 80% ethanol extract from *Canavalia gladiata* DC., CGE80 2000: 2000 mg/kg/day of 80% ethanol extract from *Canavalia gladiata* DC., Values with different letters in a column are significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

Table 2. Relative Organ Weights of Experimental Mice for Toxicity

Group	Relative Organ weight (%)		
	Liver	Kidney	Spleen
CONTROL	4.15±0.23 ^a	1.51±0.07 ^a	0.27±0.03 ^a
CGE80 500	4.05±0.24 ^a	1.59±0.19 ^a	0.27±0.02 ^a
CGE80 1000	3.99±0.34 ^a	1.54±0.09 ^a	0.25±0.02 ^a
CGE80 1500	3.77±0.32 ^a	1.63±0.07 ^a	0.25±0.01 ^a
CGE80 2000	4.24±0.22 ^a	1.61±0.10 ^a	0.26±0.02 ^a

Data represents the mean ± S.E.

* $P < 0.05$ v.s. CONTROL

Data represents the mean ± S.E. Group expressed in Table 1. Values with different letters in a column are significantly different by Duncan' s multiple range test ($p < 0.05$).

Table 3. Biochemical Biomarkers for Toxicity

Group	GOT	GPT
	(Karmen/mL)	(Karmen/mL)
CONTROL	111.95±8.62 ^b	24.04±2.72 ^a
CGE80 500	116.61±17.07 ^b	26.97±4.30 ^a
CGE80 1000	88.56±3.58 ^b	17.79±2.10 ^a
CGE80 1500	94.75±12.62 ^b	17.98±3.39 ^a
CGE80 2000	152.04±12.56 ^a	26.93±3.06 ^a

Data represents the mean ± S.E.

* $P < 0.05$ v.s. CONTROL

Table 4. Survival Rate and Body Weight of Experimental Mice for Toxicity

Group	No.	Initial body weight (g)	No.	Final body weight(g)	Survival Rate
CONTROL	5	30.48±0.49 ^a	5	36.37±1.21 ^a	100
CGW 500	5	29.54±1.61 ^a	5	37.32±2.45 ^a	100
CGW 1000	5	30.04±1.22 ^a	5	36.00±0.93 ^a	100
CGW 1500	5	31.14±0.98 ^a	5	39.56±1.01 ^a	100
CGW 2000	5	30.30±1.23 ^a	5	38.02±1.48 ^a	100

Data represents the mean ± S.E.

* $P < 0.05$ v.s. CONTROL

Data represents the mean ± S.E. CONTROL: control, CGW500: 500 mg/kg/day of water extract from *Canavalia gladiata* DC., CGW 1000: 1000 mg/kg/day of water extract from *Canavalia gladiata* DC., CGW 1500: 1500 mg/kg/day of water extract from *Canavalia gladiata* DC., CGW 2000: 2000 mg/kg/day of water extract from *Canavalia gladiata* DC., Values with different letters in a column are significantly different by Duncan' s multiple range test ($p < 0.05$).

Table 5. Organ Weights of Experimental Mice for Toxicity

Group	Relative Organ weight (%)		
	Liver	Kidney	Spleen
CONTROL	4.15±0.23 ^a	1.51±0.07 ^a	0.27±0.03 ^a
CGW 500	4.07±0.28 ^a	1.46±0.08 ^a	0.23±0.04 ^a
CGW 1000	4.04±0.30 ^a	1.56±0.09 ^a	0.26±0.02 ^a
CGW 1500	4.19±0.22 ^a	1.49±0.07 ^a	0.28±0.03 ^a
CGW 2000	4.18±0.14 ^a	1.50±0.12 ^a	0.26±0.05 ^a

Data represents the mean ± S.E.

* $P < 0.05$ v.s. CONTROL

Data represents the mean ± S.E. Group expressed in Table 4. Values with different letters in a column are significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

Table 6. Biochemical Biomarkers for Toxicity

Group	GOT	GPT
	(Karmen/mL)	(Karmen/mL)
CONTROL	111.95±8.62 ^a	24.04±2.72 ^a
CGW 500	94.21±4.68 ^a	18.84±2.45 ^a
CGW 1000	128.54±7.80 ^a	26.19±2.70 ^a
CGW 1500	132.78±5.07 ^a	20.33±1.75 ^a
CGW 2000	82.15±7.18 ^a	22.80±6.55 ^a

Data represents the mean ± S.E.

* $P < 0.05$ v.s. CONTROL

(2) 작두콩추출물의 지구적 운동능력향상능

(가) 작두콩추출물의 지구적 운동능력향상능

마우스의 한계유영운동시간 측정은 총 14일간의 시료 투여와 함께 매 7일에 한번씩 총 2회 수행되었다. 각 추출물이 지구적 운동능력향상능을 갖는지 평가하기 위해 한계유영시간을 측정하였다. CON, CGW, CGE30, CGE80의 각 실험군의 초기 유영시간은 20.6±1.4 min, 20.5±1.8 min, 20.5±0.8 min, 20.3±1.5 min으로 군별 차이가 나타나지 않도록 무작위로 나누었다. 각 군의 초기체중은 33.9±1.2 g, 32.4±1.0 g, 32.6±0.7 g, 33.1±0.7 g으로 나누었다. 7일에 수행한 한계유영시간은 CON, CGW, CGE30, CGE80군에서 21.8±2.9 min, 21.8±2.3 min, 23.1±1.6 min, 26.9±3.2 min으로 나타났다. 작두콩추출물 투여군에서 대조군과 비교하여 통계적인 유의 차이를 나타내지는 않았다. 14일에 수행한 한계유영시간은 CON, CGW, CGE30, CGE80군에서 21.1±2.4 min, 23.1±2.3 min, 21.4±1.5 min, 29.9±2.1 min으로 나타났다. 작두콩 물추출물과 작두콩 30%주정추출물은 한계유영시간에 통계적 유의차를 나타내지 않았으나, 작두콩 80%주

정추출물은 약 1.4배의 지구적 운동능력향상이 나타났다. 따라서 작두콩 80%주정추출물의 투여가 실험동물의 지구적 운동능력향상에 기여하였을 것으로 판단되며, 지구적 운동능력향상 가능성을 갖는 소재로써 작두콩 80%주정추출물의 선택이 바람직 한 것으로 판단된다(Figure 1).

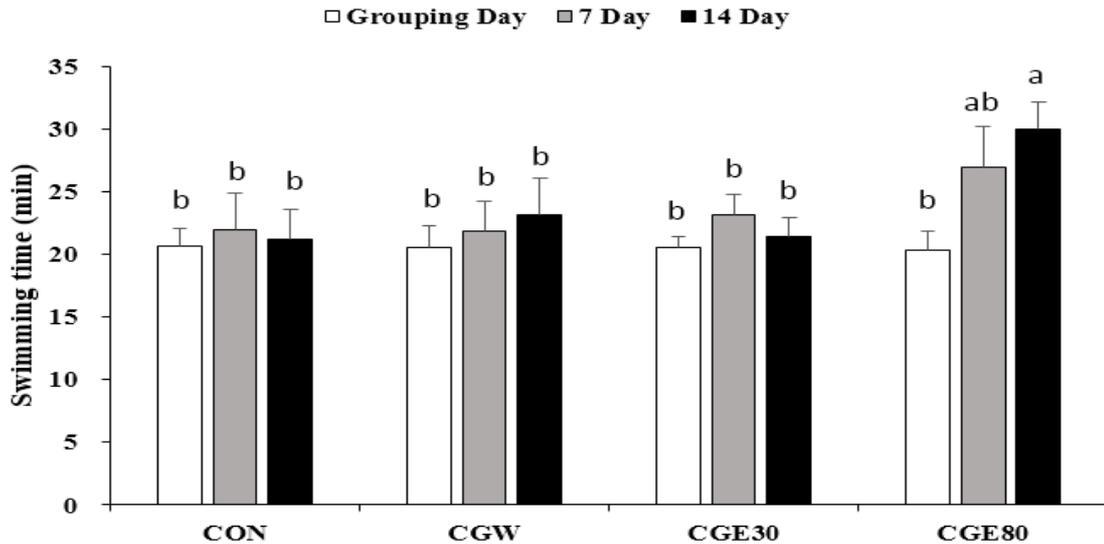


Figure 1. Effects of Extracts from *Canavalia gladiata* DC. on Endurance Swimming Capacity in Mice.

Each value represents the mean \pm S.E. The swimming time was measured at 8 L/min. CON: exercised control, CGW: 1 g/kg/day of hot water extract from *Canavalia gladiata* DC., CGE30: 1 g/kg/day of 30% ethanol extract from *Canavalia gladiata* DC., CGE80: 1 g/kg/day of 80% ethanol extract from *Canavalia gladiata* DC. Different letters above the bar are statistically different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

Table 7. Body Weights and Relative Organ Weights of Experimental Mice

Group	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	Relative Organ Weight (%)				
			Liver	Kidney	Spleen	Vastus intermedius muscle	Gastrocnemius muscle
CON	33.98 \pm 1.15 ^a	35.87 \pm 1.10 ^a	4.58 \pm 0.15 ^a	1.57 \pm 0.04 ^a	0.32 \pm 0.05 ^a	0.49 \pm 0.02 ^a	0.94 \pm 0.13 ^a
CGW	32.44 \pm 1.01 ^a	33.75 \pm 1.57 ^a	4.68 \pm 0.14 ^a	1.66 \pm 0.06 ^a	0.31 \pm 0.03 ^a	0.49 \pm 0.05 ^a	0.98 \pm 0.05 ^a
CGE30	32.58 \pm 0.77 ^a	34.78 \pm 0.73 ^a	4.66 \pm 0.22 ^a	1.64 \pm 0.05 ^a	0.26 \pm 0.02 ^a	0.53 \pm 0.03 ^a	0.92 \pm 0.02 ^a
CGE50	33.11 \pm 0.71 ^a	34.67 \pm 0.66 ^a	4.75 \pm 0.09 ^a	1.56 \pm 0.06 ^a	0.26 \pm 0.02 ^a	0.54 \pm 0.02 ^a	0.95 \pm 0.04 ^a

Data represents the mean \pm S.E. CON: exercised control, CGW: 1 g/kg/day of hot water extract from *Canavalia gladiata* DC., CGE30: 1 g/kg/day of 30% ethanol extract from *Canavalia gladiata* DC., CGE80: 1 g/kg/day of 80% ethanol extract from *Canavalia gladiata* DC. Values with different letters in a column are significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

(나) 혈중 lactate 수준

유영운동 전·후 혈중 lactate 함량을 측정한 결과, 운동 전 CON, CGW, CGE30, CGE80 군의 혈중 lactate 양은 2.3 ± 0.3 mmole/L, 3.0 ± 0.3 mmole/L, 2.4 ± 0.2 mmole/L, 2.4 ± 0.2 mmole/L로 군별 차이를 나타내지 않았다. 운동 15분 후 CON, CGW, CGE30, CGE80군의 혈중 lactate 양은 5.4 ± 0.4 mmole/L, 5.5 ± 0.3 mmole/L, 5.8 ± 0.5 mmole/L, 4.3 ± 0.2 mmole/L로 운동 15분 후 모든 실험군에서 혈중 lactate 수준이 증가하였고, CGE80군의 경우 운동 후 혈중 lactate 수준이 가장 낮게 나타났다. 본 결과로부터 작두콩 80%주정추출물은 혈중 lactate 제거 혹은 생성 억제에 의한 효과를 갖는 것으로 판단된다(Figure 2).

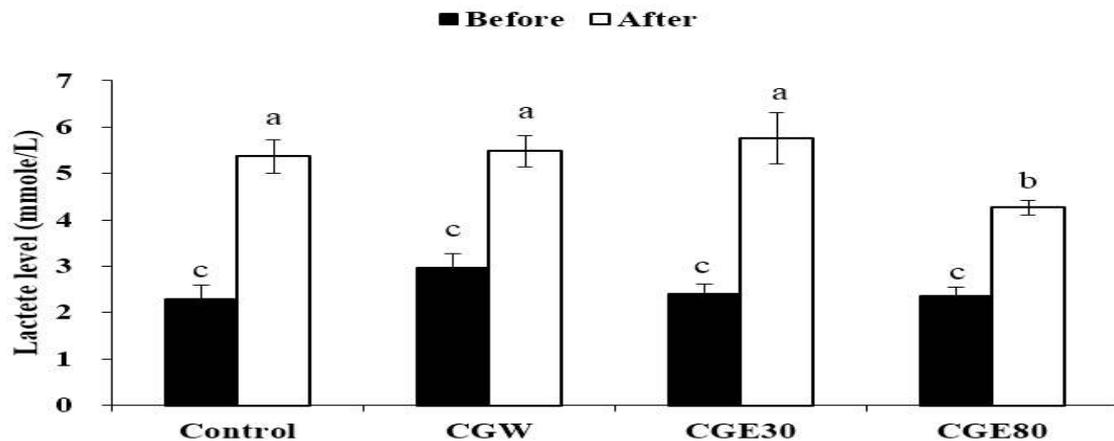


Figure 2. Effects of Extracts from *Canavalia gladiata* DC. on Lactate Level.

Each value represents the mean \pm S.E. The blood lactate level was measured twice: before the swimming and 15 min after swimming time. CON: exercised control, CGW: 1 g/kg/day of hot water extract from *Canavalia gladiata* DC., CGE30: 1 g/kg/day of 30% ethanol extract from *Canavalia gladiata* DC., CGE80: 1 g/kg/day of 80% ethanol extract from *Canavalia gladiata* DC. Different letters above the bar are statistically different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

(다) 혈중 유리지방산 수준

지구적운동능력 실험을 수행한 후 혈중 유리지방산의 수준을 평가한 결과, CON, CGW, CGE30, CGE80군의 혈중 유리지방산 수준은 0.58 ± 0.04 mEq/L, 0.66 ± 0.05 mEq/L, 0.70 ± 0.08 mEq/L, 0.77 ± 0.05 mEq/L로 나타났다. CGE80 투여군이 가장 높은 혈중 유리지방산 함량을 나타냈고 CGE30과 CGW는 CON군과 유사한 혈중 유리지방산 함량을 나타내었다. 본 결과로부터 작두콩 80%주정추출물은 조직의 지방산분해를 촉진하여 혈중 유리지방산의 함량을 증가시키는데 기여하였을 것으로 판단된다(Figure 3).

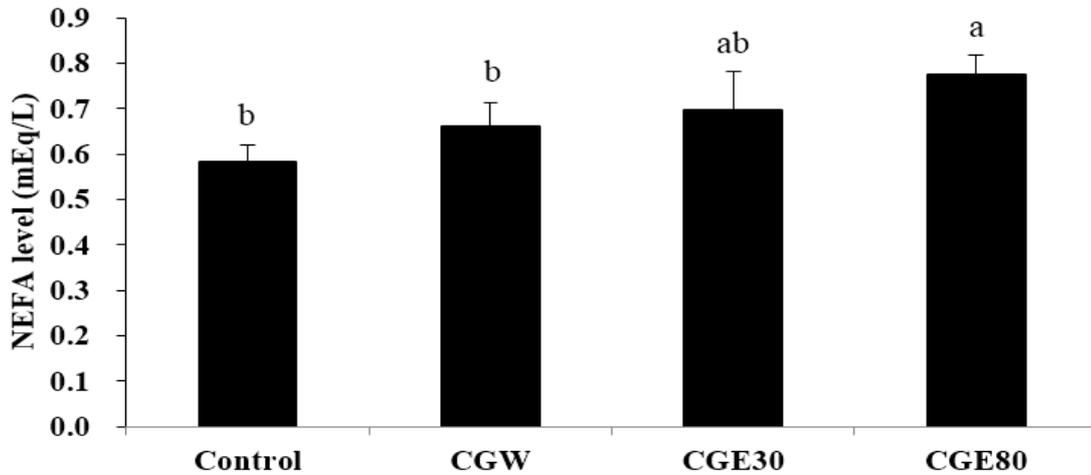


Figure 3. Effects of Extracts from *Canavalia gladiata* DC. on NEFA Level.

Each value represents the mean \pm S.E. The blood NEFA level was measured after swimming. CON: exercised control, CON: exercised control, CGW: 1 g/kg/day of hot water extract from *Canavalia gladiata* DC., CGE30: 1 g/kg/day of 30% ethanol extract from *Canavalia gladiata* DC., CGE80: 1 g/kg/day of 80% ethanol extract from *Canavalia gladiata* DC. Different letters above the bar are statistically different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

(라) 혈중 중성지방 및 총콜레스테롤 수준

지구적운동능력 실험을 수행한 후 혈중 중성지방 수준을 평가한 결과, CON, CGW, CGE30, CGE80군의 혈중 중성지방 수준은 169.21 ± 4.06 mg/dL, 170.88 ± 3.48 mg/dL, 162.14 ± 6.82 mg/dL, 166.67 ± 2.78 mg/dL로 나타났다(Figure 4). 지구적운동능력 실험을 수행한 후 혈중 총 콜레스테롤 수준을 평가한 결과 CON, CGW, CGE30, CGE80군의 혈중 총 콜레스테롤 수준은 190.60 ± 6.28 mg/dL, 174.92 ± 7.22 mg/dL, 181.03 ± 6.94 mg/dL, 180.72 ± 6.04 mg/dL로 나타났다(Figure 5). 각 추출물은 각 실험군의 혈중 중성지방과 총콜레스테롤 수준에는 영향을 미치지 않았다.

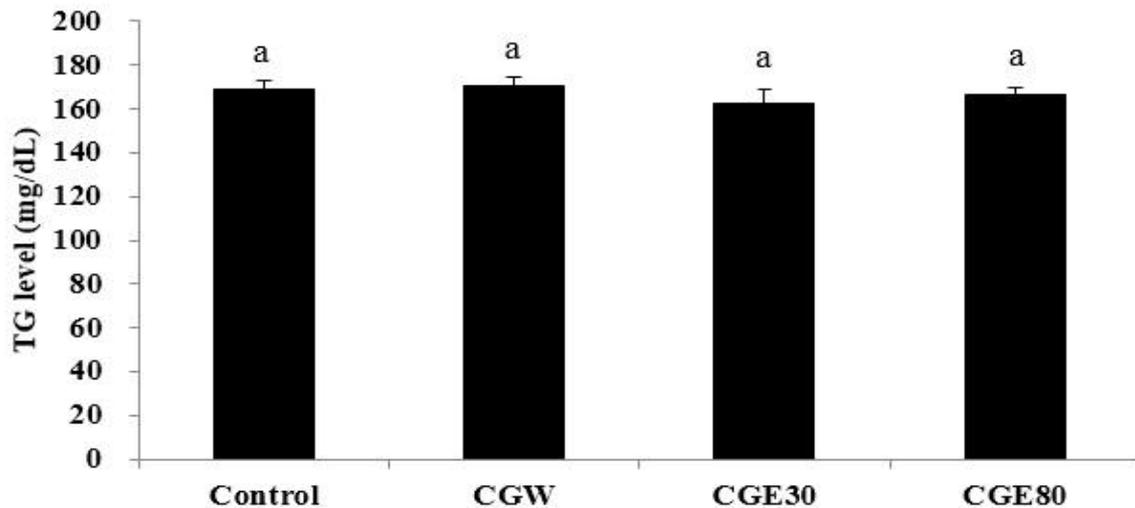


Figure 4. Effects of Extracts from *Canavalia gladiata* DC. on TG Level.

Each value represents the mean \pm S.E. The blood TG level was measured after swimming. CON: exercised control, CON: exercised control, CGW: 1 g/kg/day of hot water extract from *Canavalia gladiata* DC., CGE30: 1 g/kg/day of 30% ethanol extract from *Canavalia gladiata* DC., CGE80: 1 g/kg/day of 80% ethanol extract from *Canavalia gladiata* DC. Different letters above the bar are statistically different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

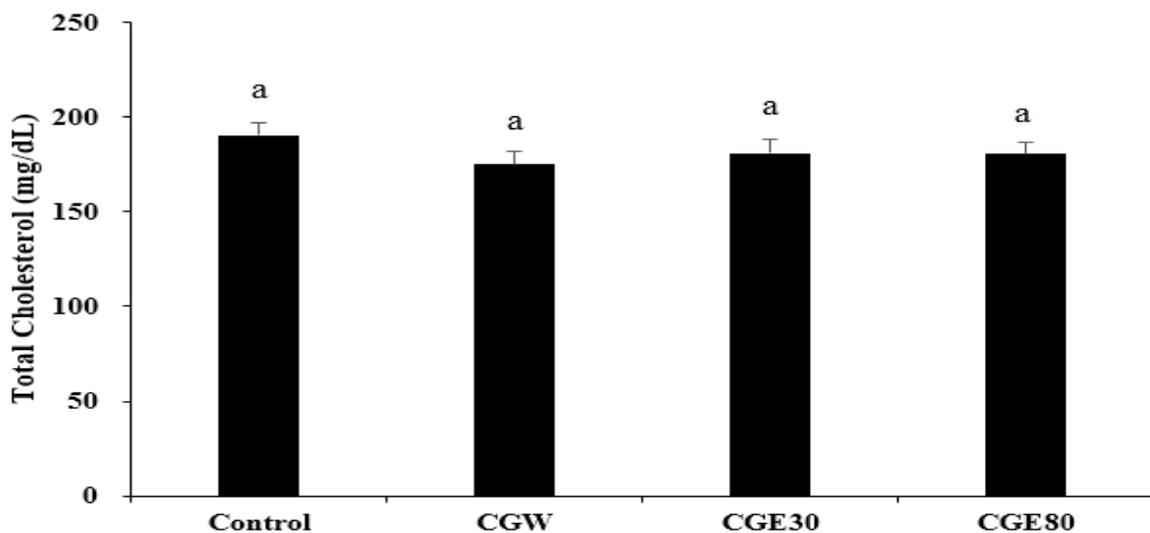


Figure 5. Effects of Extracts from *Canavalia gladiata* DC. on TCHO Level.

Each value represents the mean \pm S.E. The blood TCHO level was measured after swimming. CON: exercised control, CON: exercised control, CGW: 1 g/kg/day of hot water extract from *Canavalia gladiata* DC., CGE30: 1 g/kg/day of 30% ethanol extract from *Canavalia gladiata* DC., CGE80: 1 g/kg/day of 80% ethanol extract from *Canavalia gladiata* DC. Different letters above the bar are statistically different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

(마) 작두콩추출물의 조직 글리코겐 수준

지구적운동능력 실험을 수행한 후 간조직의 글리코겐 수준을 평가한 결과, CON, CGW, CGE30, CGE80군의 간조직의 글리코겐 수준은 7.68 ± 0.31 mg glycogen/g tissue, 7.78 ± 0.25 mg glycogen/g tissue, 8.05 ± 0.30 mg glycogen/g tissue, 8.76 ± 0.48 mg glycogen/g tissue로 나타났다(Figure 6). 지구적운동능력 실험을 수행 한 후 근육조직의 글리코겐 수준을 평가한 결과 CON, CGW, CGE30, CGE80군의 근육조직의 글리코겐 수준은 2.23 ± 0.08 mg glycogen/g tissue, 2.16 ± 0.09 mg glycogen/g tissue, 2.21 ± 0.18 mg glycogen/g tissue, 2.67 ± 0.15 mg glycogen/g tissue로 나타났다(Figure 7). 본 결과는 운동 수행을 위한 에너지 제공에서 간조직 및 근육조직의 글리코겐 사용량의 감소가 작두콩 80%추정추출물 투여에 의해 나타난 것으로 판단된다.

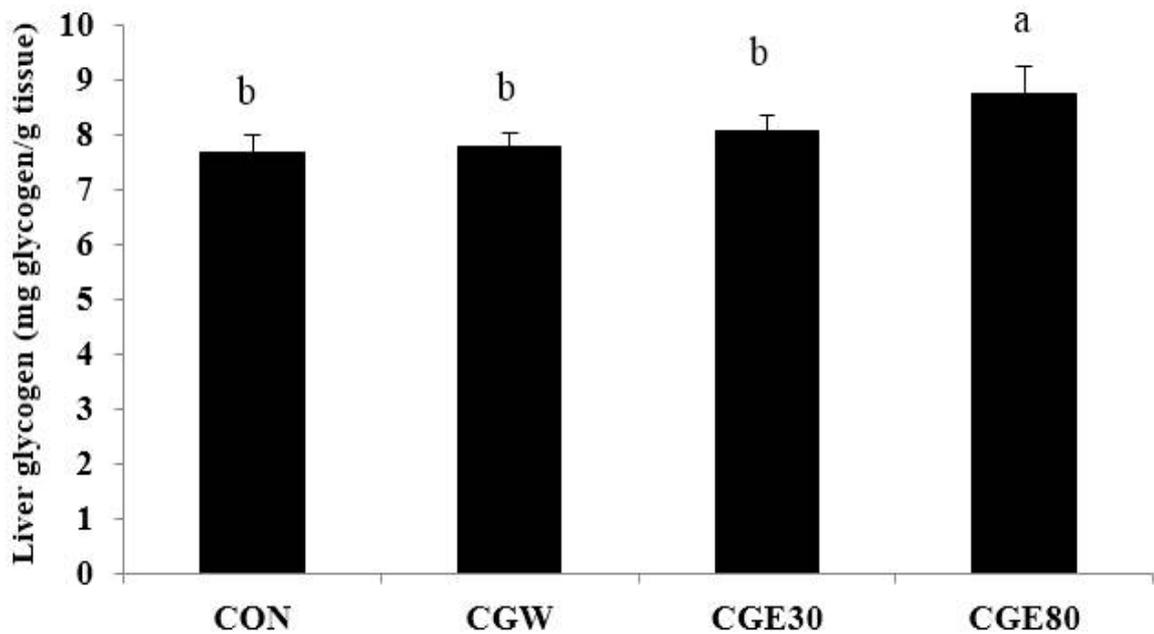


Figure 6. Effects of Extracts from *Canavalia gladiata* DC. on Liver Glycogen Level.

Each value represents the mean \pm S.E. The liver glycogen level was measured after swimming. CON: exercised control, CGW: 1 g/kg/day of hot water extract from *Canavalia gladiata* DC., CGE30: 1 g/kg/day of 30% ethanol extract from *Canavalia gladiata* DC., CGE80: 1 g/kg/day of 80% ethanol extract from *Canavalia gladiata* DC. Different letters above the bar are statistically different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

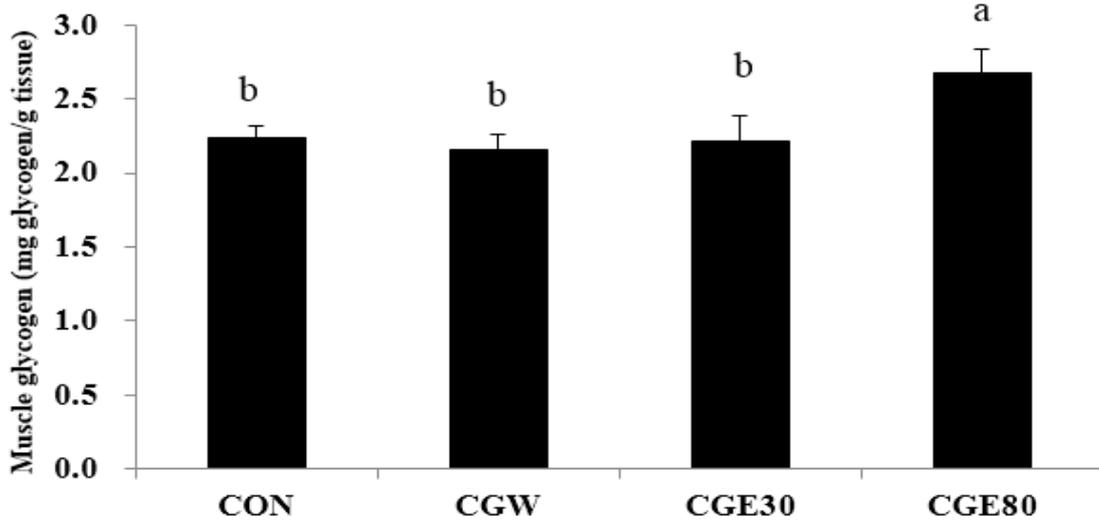


Figure 7. Effects of Extracts from *Canavalia gladiata* DC. on Muscle Glycogen Level.

Each value represents the mean \pm S.E. The muscle glycogen level was measured after swimming. CON: exercised control, CGW: 1 g/kg/day of hot water extract from *Canavalia gladiata* DC., CGE30: 1 g/kg/day of 30% ethanol extract from *Canavalia gladiata* DC., CGE80: 1 g/kg/day of 80% ethanol extract from *Canavalia gladiata* DC. Different letters above the bar are statistically different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

(3) 카페인의 운동능력향상능 평가

(가) 카페인의 운동능력향상능

본 과제에서 활용하는 운동능력 향상능 평가에서 카페인의 운동능력향상능을 평가하였다. 마우스의 한계유영운동시간 측정은 총 14일간의 시료 투여와 함께 매 7일에 한번씩 총 2회 수행되었다. 카페인 섭취가 지구적 운동능력향상능을 갖는지 평가하기 위해 한계유영시간을 측정하였다. Control 및 Caffeine 군의 초기 유영시간은 18.67 ± 3.57 min, 19.95 ± 3.80 min으로 군별 차이가 나타나지 않도록 무작위로 나누었다. 각 군의 초기체중은 31.95 ± 0.40 g, 30.18 ± 0.35 g으로 나누었다. 7일에 수행한 한계유영시간은 Control 및 Caffeine 군에서 17.07 ± 2.77 min, 38.61 ± 6.60 min으로 나타났다. 카페인 투여군은 증류수를 투여한 실험군과 비교하여 약 2.3배의 유영시간 증가가 나타났고, Control군과 Caffeine군간의 통계적 유의차가 나타났다. 14일에 수행한 한계유영시간은 Control군과 Caffeine군에서 각각 20.47 ± 4.55 min, 50.69 ± 5.27 min으로 나타났다. 카페인 투여군이 통계적으로 유의하게 증가된 유영시간을 나타냈다(2.4 배). 따라서 양성대조군인 카페인의 투여가 본 연구에서 활용하는 평가 시스템에서 유의하게 증가된 수영시간을 나타냈다(Figure 8).

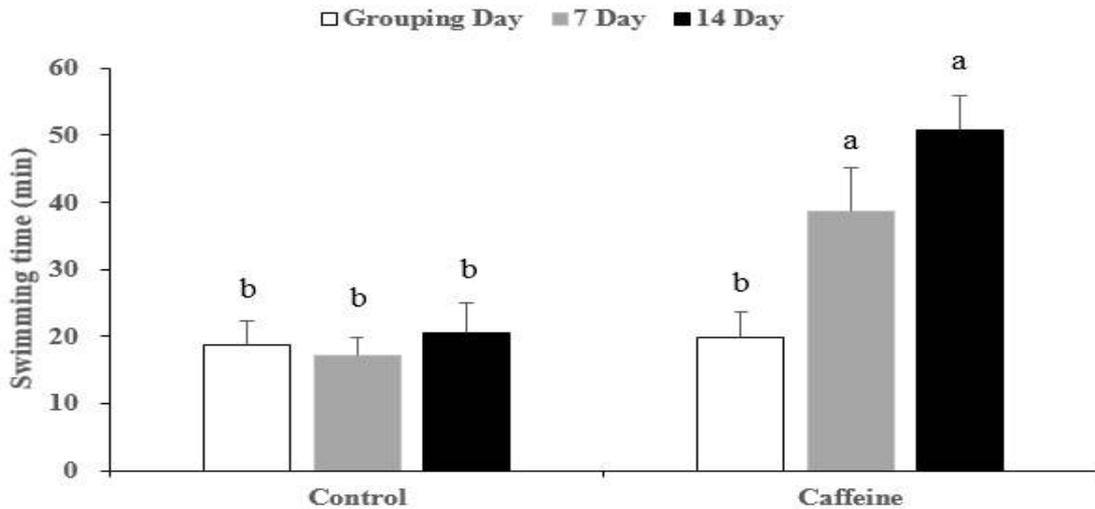


Figure 8. Effects of Caffeine on Endurance Swimming Capacity in Mice.

Each value represents the mean \pm S.E. The swimming time was measured at 8 L/min. Control: exercised control, Caffeine: Caffeine with distilled water. Different letters above the bar are statistically different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

(나) 혈중 lactate 수준

유영운동 전·후 혈중 lactate 함량을 측정된 결과 운동 전 Control군과 Caffeine군은 각각 2.5 ± 0.3 mmole/L, 2.5 ± 0.3 mmole/L로 군별 차이를 나타내지 않았다. 운동 15분 후 Control군과 Caffeine군의 혈중 lactate 수준은 5.7 ± 0.4 mmole/L, 5.26 ± 0.4 mmole/L로 나타났다. 그러나 두 군 사이에는 통계적 유의차가 나타나지 않았다(Figure 9).

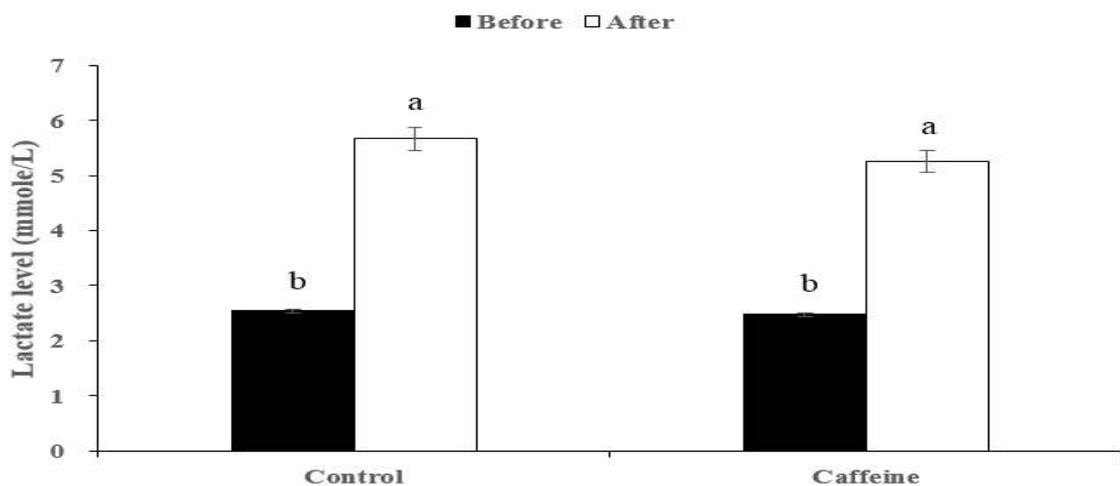


Figure 9. Effects of Caffeine on Lactate Level.

Each value represents the mean \pm S.E. The blood lactate level was measured twice: before the swimming and 15 min after swimming time. Control: exercised control, Caffeine: Caffeine with distilled water. Different letters above the bar are statistically different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

(다) 혈중 유리지방산 수준

지구적운동능력 실험을 수행 한 후 혈중 유리지방산의 수준을 평가한 결과 Control군과 Caffeine군의 혈중 유리지방산 수준은 1.01 ± 0.01 mEq/L, 0.91 ± 0.01 mEq/L로 나타났다. Caffeine 투여군이 낮은 혈중 유리지방산 함량을 나타내었다(Figure 10).

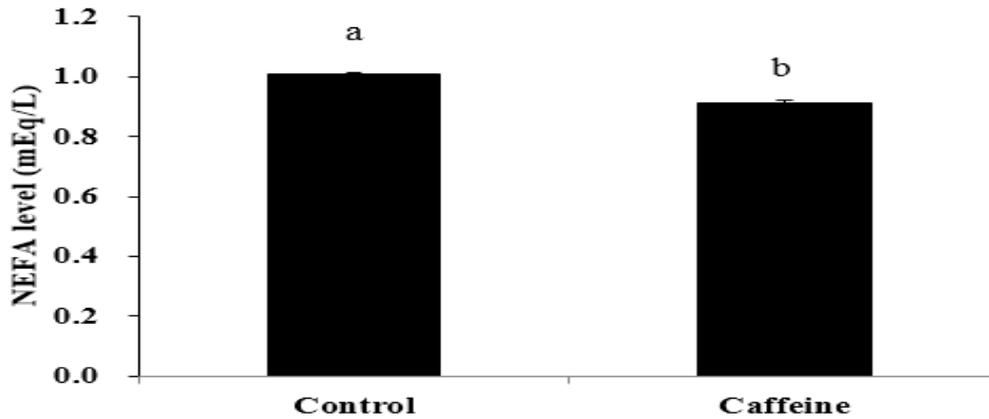


Figure 10. Effects of Caffeine on NEFA Level.

Each value represents the mean \pm S.E. The blood NEFA level was measured after swimming. Control: exercised control, Caffeine: Caffeine with distilled water. Different letters above the bar are statistically different by Student t-test ($p < 0.05$).

(라) 혈중 중성지방 및 총콜레스테롤 수준

지구적운동능력 실험을 수행한 후 혈중 중성지방 수준을 평가한 결과, Control군과 Caffeine군의 혈중 중성지방 수준은 118.36 ± 1.27 mg/dL, 106.25 ± 0.85 mg/dL로 나타났다(Figure 11). 지구적운동능력 실험을 수행한 후 혈중 총 콜레스테롤 수준을 평가한 결과, Control군과 Caffeine 군의 혈중 총 콜레스테롤 수준은 144.04 ± 0.62 mg/dL, 121.78 ± 5.19 mg/dL로 나타났다(Figure 12). 카페인 실험군의 혈중 중성지방의 수준에는 영향을 미치지 않았으나 총콜레스테롤 수준을 낮추는데 기여하였다.

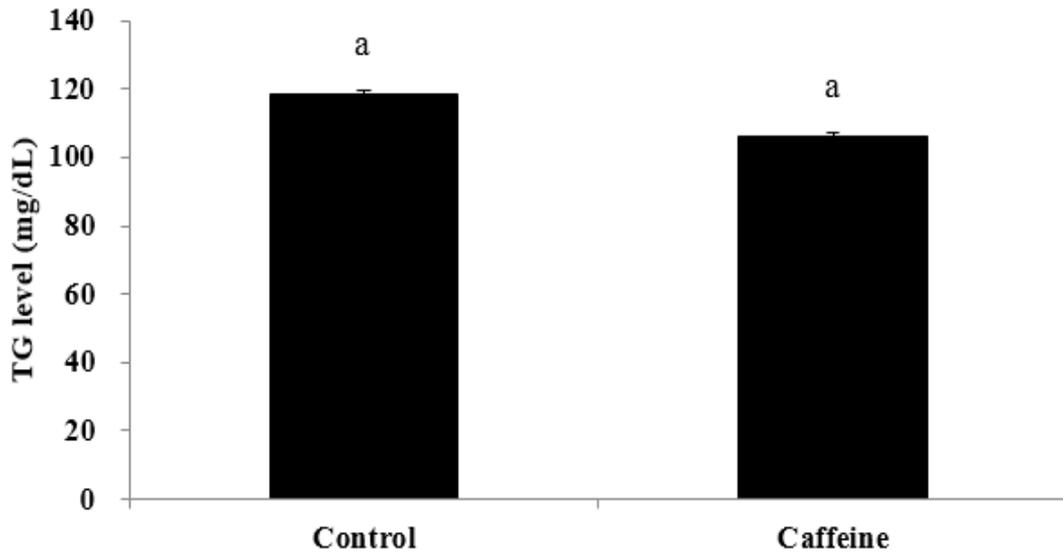


Figure 11. Effects of Caffeine on TG Level.

Each value represents the mean \pm S.E. The blood TG level was measured after swimming. Control: exercised control, Caffeine: Caffeine with distilled water. Different letters above the bar are statistically different by Student t-test ($p < 0.05$).

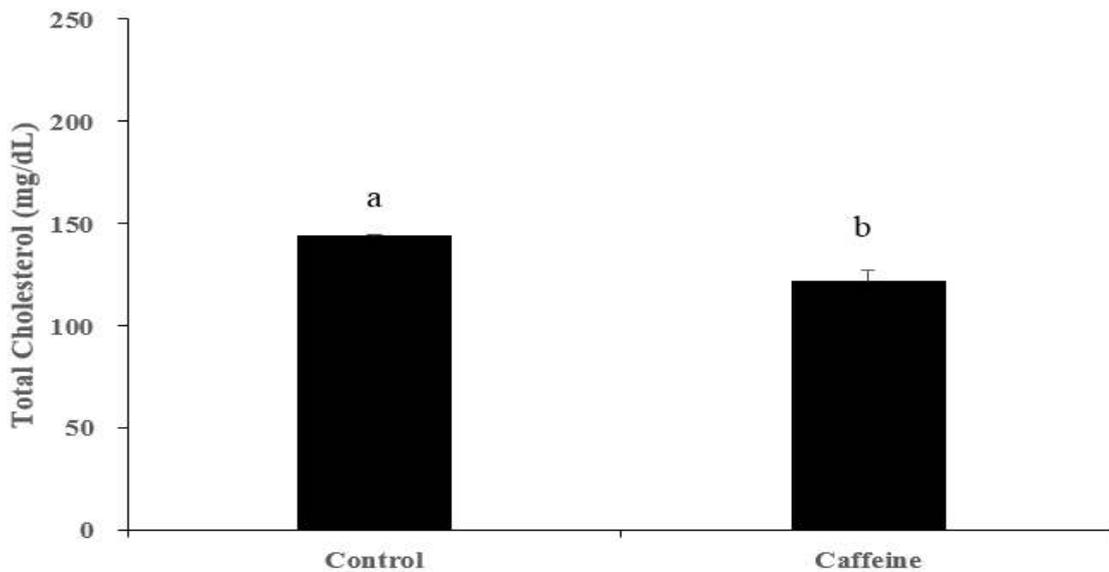


Figure 12. Effects of Caffeine on TCHO Level.

Each value represents the mean \pm S.E. The blood TCHO level was measured after swimming. Control: exercised control, Caffeine: Caffeine with distilled water. Different letters above the bar are statistically different by Student t-test ($p < 0.05$).

(마) 조직 글리코젠 수준

지구적운동능력 실험을 수행 한 후 간조직의 글리코젠 수준을 평가한 결과 Control군과 Caffeine군 간조직의 글리코젠 수준은 9.85 ± 0.59 mg glycogen/g tissue, 10.42 ± 0.27 mg glycogen/g tissue로 나타났다(Figure 13). 지구적운동능력 실험을 수행 한 후 근육조직의 글리코젠 수준을 평가한 결과 Control군과 Caffeine군의 근육조직의 글리코젠 수준은 2.73 ± 0.03 mg glycogen/g tissue, 2.80 ± 0.09 mg glycogen/g tissue로 나타났다(Figure 14). 카페인의 투여는 간과 근육조직의 글리코젠 수준에 영향을 미치지 않았다.

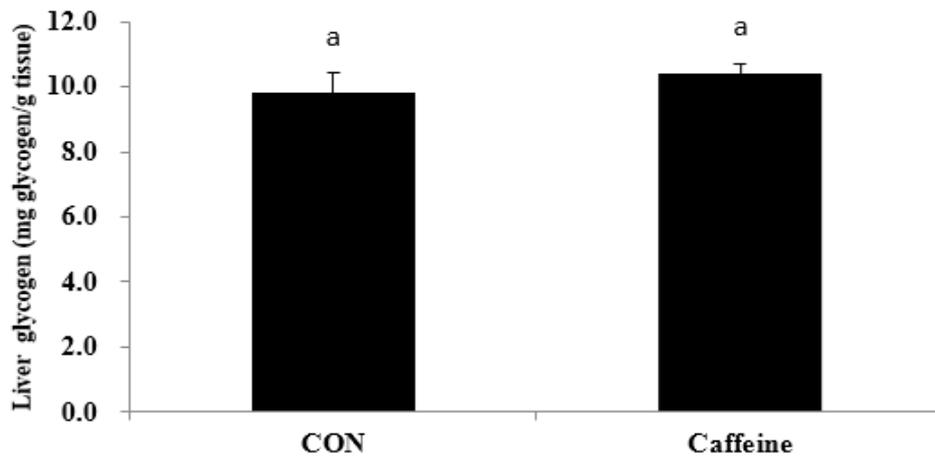


Figure 13. Effects of Caffeine on Liver Glycogen Level.

Each value represents the mean \pm S.E. The liver glycogen level was measured after swimming. Control: exercised control, Caffeine: Caffeine with distilled water. Different letters above the bar are statistically different by Student t-test ($p < 0.05$).

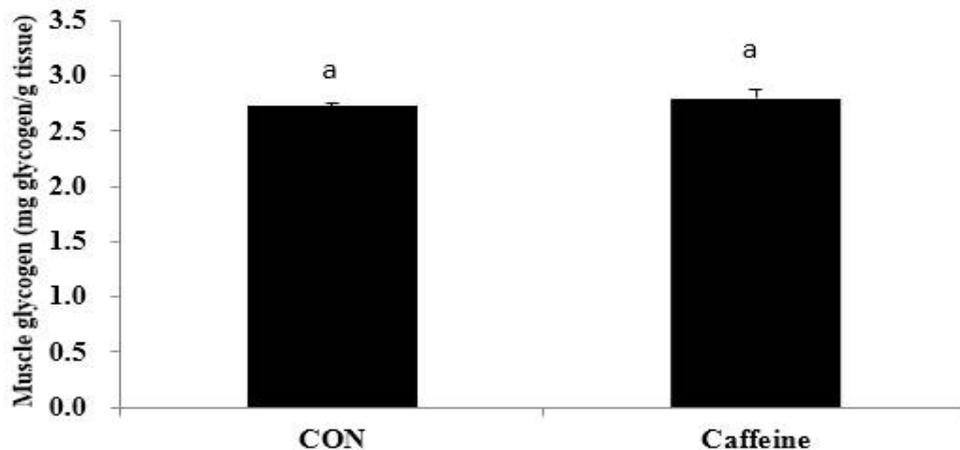


Figure 14. Effects of Caffeine on Muscle Glycogen Level.

Each value represents the mean \pm S.E. The muscle glycogen level was measured after swimming. Control: exercised control, Caffeine: Caffeine with distilled water. Different letters above the bar are statistically different by Student t-test ($p < 0.05$).

2. 작두콩 50%주정추출물의 에너지증진 기능성평가

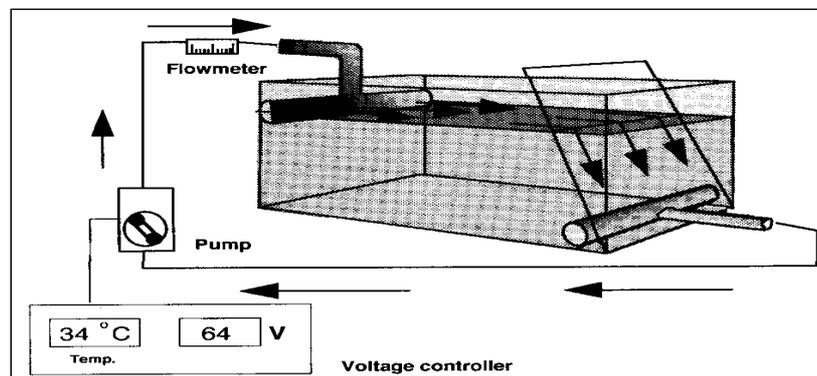
가. 방법

(1) 작두콩추출물 시료

주관기관으로부터 작두콩 50%주정추출물을 제공받아 본 실험에 시료로 사용하였다. 작두콩 50%주정추출물은 CGE50으로 명명하였다.

(2) 유영수조를 이용한 *in vivo* 지구적 운동능력향상능 평가

(가) 유영수조 : 유영운동능력측정에 이용된 유영수조는 90×45×45cm 크기의 아크릴로 제작된 기구이며, 이 수조는 운동능력측정시 높이 35cm까지 물을 채운 후 수온을 34°C로 유지시키고, 운동부하는 물 표면의 유속으로 조절하며, 표면유속은 전압조절기가 연결되어 pump와 water flowmeter(type F45500, Blue white Co, Westminster, CA, USA)를 이용하여 최적유속을 유지하면서 마우스의 지구적 운동능력을 측정에 이용하였다.



<유영운동능력 측정용 유영수조>

(나) 실험동물의 분류 및 체중 등 측정 : SPF (Specific pathogen free)의 4주령 ICR 웅성 마우스를 구입하여 실험동물로 사용하였다. 실험동물은 항온항습시스템을 갖춘 후드 내에서 5마리를 polycarbonate cage (278×420×200 mm)에 넣고, 실내온도 22±2°C, 기류속도 13~18cm/sec, 환기횟수 10~20회/h, 기압차2~10 mm H₂O, 명암주기 12시간; 7:00~19:00, 조도 150~300 Lux에서 사육하였다. 일주일간의 적응기간 후 체중감소가 없는 건강한 동물을 선별하여 무작위법으로 체중의 평균값이 같도록 1차 그룹화 하였다. 실험기간동안 매 3회 체중을 측정하여 실험군별 체중의 변화를 기록하였다.

(다) 지구적 운동능력 향상능 측정 : 추출물의 지구적 운동능력 향상능 측정 실험에서 추출물 등 처리 전 1주일간 7.5L/min 유속의 운동 강도 하에서 2번의 한계유영운동 시간을 측정하여 군별 평균 유영시간 및 체중이 같도록 대조군(CON)과 500 mg/kg/day 작두콩 50%주정추출물 투여군(CGЕ50-500), 800 mg/kg/day 작두콩 50%주정추출물 투여군(CGЕ50-800)들로 나누었다. 2주간 시료를 처리하였고, 한계까지의 유영운동능력은 매 7일 간격으로 측정하였다. 유영운동시간의 한계치는 마우스가 물속에 빠져 7초가 경과될 때까지 물 표면으로 올라오지 못하는 시점을 시간으로 평가하였다.

- (라) 혈중 lactic acid의 농도 측정 : 대조군과 추출물 투여군들의 운동전과 15분 운동 후, 혈중 피로 지표인 lactic acid의 농도를 kit를 이용하여 측정하였다.
- (마) 혈중 유리지방산의 농도 측정 : 대조군과 추출물 투여군들의 한계 운동 후 혈중 유리지방산 함량을 kit를 이용하여 평가하였다.
- (바) 실험군간 데이터의 통계적 분석 : 데이터는 평균±표준오차로 제시하였고, 각 실험군간의 통계적 비교는 ANOVA 분석을 이용하였고, Duncan multiple range test를 이용하여 사후 검정을 실시하였다. $p < 0.05$ 일 때 통계적 유의차가 있는 것으로 판정하였다.

나. 결과

(1) 작두콩추출물의 용량별 지구적 운동능력향상능

마우스의 한계유영운동시간 측정은 총 14일간의 시료 투여와 함께 매 7일에 한번씩 총 2회 수행되었다. 작두콩추출물이 지구적 운동능력향상능을 갖는지 평가하기 위해 한계유영시간을 측정하였다. CON, CGE50-500, CGE50-800군의 각 실험군의 초기 유영시간은 22.3 ± 2.3 min, 22.6 ± 2.0 min, 22.6 ± 2.0 min으로 군별 차이가 나타나지 않도록 무작위로 나누었다. 7일에 수행한 한계유영시간은 CON, CGE50-500, CGE50-800군에서 20.5 ± 2.8 min, 30.0 ± 2.6 min, 29.1 ± 2.8 min으로 나타났다. 14일에 수행한 한계유영시간은 19.4 ± 3.1 min, 32.1 ± 3.3 min, 33.4 ± 2.6 min으로 작두콩추출물 투여군들에서 대조군과 비교하여 통계적인 유의 차이를 나타났다. 따라서 작두콩추출물의 투여가 실험동물의 지구적 운동능력향상에 기여하였을 것으로 판단되었다(Figure 1).

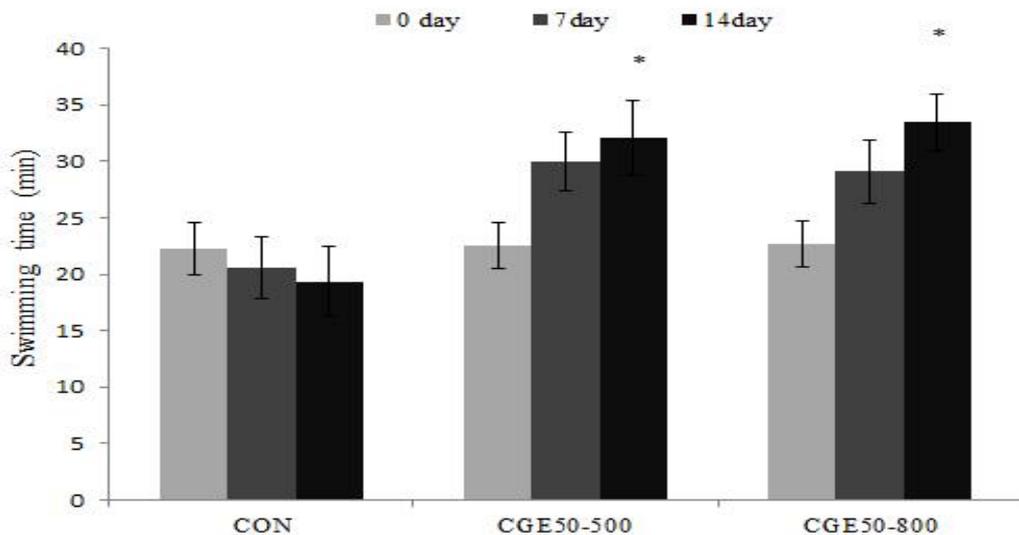


Figure 1. Effect of CGE50 on Endurance Swimming Capacity in Mice.

Each value represents the mean \pm S.E. The swimming time was measured at 7.5 L/min. CON: exercised control, CGE50-500: 500 mg/kg/day of CGE50, CGE50-800; 800 mg/kg/day of CGE50. Asterisk above the bar represent significant difference from Control group ($p < 0.05$).

(2) 혈중 lactate 수준

유영운동 전·후 혈중 lactate 함량을 측정한 결과 운동 전 CON, CGE50-500, CGE50-800 군은 각각 2.27 ± 0.6 mM/L, 2.34 ± 0.3 mM/L, 1.72 ± 0.6 mM/L로 군별 차이를 나타내지 않았다. 운동 10분 후 CON, CGE50-500, CGE50-800군은 각각 4.68 ± 0.8 mM/L, 3.16 ± 0.3 mM/L, 2.65 ± 1.5 mM/L로 나타났다. 작두콩추출물군들은 CON군과 비교하여 통계적인 유의 차이를 나타냈다. 따라서 작두콩추출물의 투여가 실험동물의 혈중 lactate수준에 기여하였을 것으로 판단되었다(Figure 2).

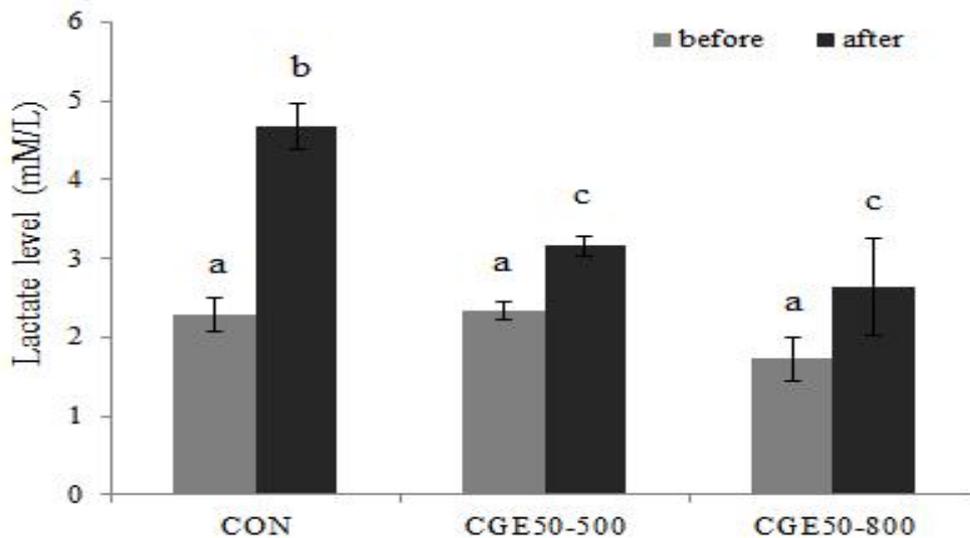


Figure 2. Effects of CGE50 on Lactate Level.

Each value represents the mean \pm S.E. The blood lactate level was measured twice: before the swimming and 10 min after swimming time. CON: exercised control, CGE50-500: 500 mg/kg/day of CGE50, CGE50-800: 800 mg/kg/day of CGE50. Different letters above the bar are statistically different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

(3) 혈중 유리지방산 수준

지구적운동능력 실험을 수행 한 후 혈중 유리지방산의 수준을 평가한 결과 CON, CGE50-500, CGE50-800군의 혈중 유리지방산 수준은 1.10 ± 0.04 mEq/L, 1.22 ± 0.02 mEq/L, 1.34 ± 0.01 mEq/L로 나타났다. 작두콩 추출물군들은 CON군과 비교하여 통계적인 유의 차이를 나타냈다. 따라서 작두콩추출물의 투여가 실험동물의 혈중 유리지방산 수준에 기여하였을 것으로 판단되었다(Figure 3).

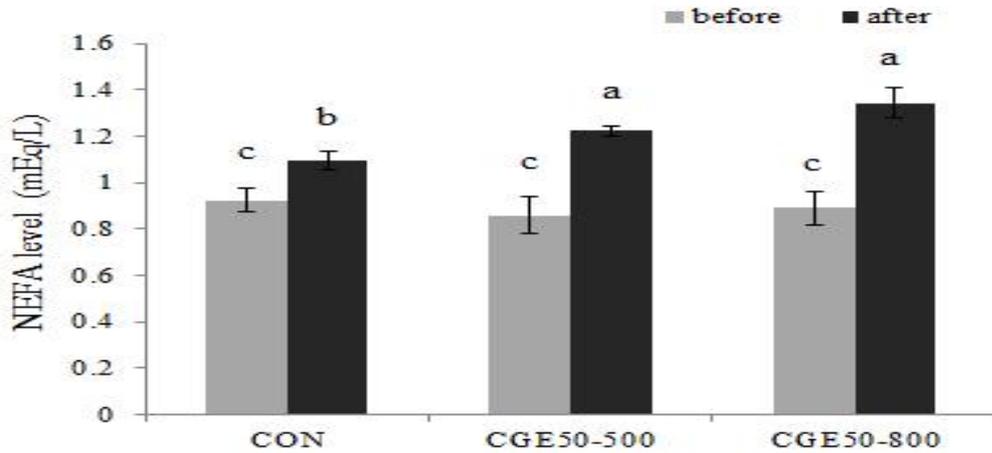


Figure 3. Effects of CGE50 on NEFA Level.

Each value represents the mean \pm S.E. The blood NEFA level was measured after swimming. CON: exercised control, CGE50-500: 500 mg/kg/day of CGE50, CGE50-800; 800 mg/kg/day of CGE50. Different letters above the bar are statistically different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

3. 작두콩 소재의 에너지 증진 효능 기작 구명

가. 방법

(1) 1차년도에 지구적 운동능력향상능이 확인된 작두콩 80%주정추출물 (1 g/kg/day, CGE80)과 2차년도에 지구적 운동능력향상능이 확인된 작두콩 50%주정추출물(500 mg/kg/day, CGE50)의 조직을 이용하여 에너지증진 기작구명 연구를 수행하였다.

(2) 조직의 효소액 추출

간과 근육은 무게 10배의 lysis buffer를 처리 한 후, 13,000 rpm, 30분 원심분리 하여 얻어진 상등액을 회수하여 항산화활성 분석에 활용하였다. 각 조직의 효소액은 bradford reagent (Sigma, USA)를 이용하여 단백질 정량을 비색정량 하였으며, bovine serum albumin 표준곡선을 활용하여 각 개체의 mg/protein의 함량을 산출하였다.

(3) 조직 내 citrate synthase 효소 활성 측정

Citrate synthase 활성은 30 mM acetyl CoA solution 200 μ L, 10 mM DTNB 용액 200 μ L, assay buffer 16 mL을 혼합한 기질액을 준비하여 조직액 20 μ L에 기질액 170 μ L를 첨가하여 kinetic method를 이용하여 6분간 412 nm에서 흡광도의 변화를 측정한 뒤, 10 mM oxaloacetate solution 10 μ L를 첨가하여 다시 6분간 412 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다. citrate synthase 효소활성은 U/mg protein으로 제시하였다.

(4) 조직 내 β -HAD 효소 활성 측정

β -HAD 활성은 조직액 20 μ L와 대조구 20 μ L에 0.54 mM s-acetoacetyl CoA 20 μ L, 0.64 mM NADH 용액 20 μ L, 100 mM potassium phosphate buffer 140 μ L을 첨가하여

kinetic method를 이용하여 5분간 340 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다. β -HAD 효소활성은 U/mg protein으로 제시하였다.

(5) 조직 내 에너지 대사 전사인자 발현 측정

(가) 근육 조직의 total RNA 추출

균질화된 근육 조직에 Trizol 시약(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)과 클로로포름을 넣고 13,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 상층액과 이소프로판올을 섞은 후 상온에서 10분간 반응시켜 RNA를 침전시킨 후 에탄올로 1회 세척하여 total RNA를 분리하였다.

(나) Real-time polymerase chain reaction(RT-PCR)

추출된 RNA는 1 mg을 QuantiFast™ SYBR®Green RT-PCR kit(Qiagen, Venlo, Netherlands)를 이용하여 각 분석 primer와 함께 reverse transcription반응을 55°C에서 10분 수행한 후, PCR initial activation 반응을 95°C에서 5분 수행하고, denaturation 반응을 95°C에서 5초, annealing과 extension 반응을 60°C에서 10초간 40 cycle을 반응시키고 Rotor-gene 6000 software version 1.7(Corbett, Sydney, Australia)을 이용하여 데이터를 분석하였다. Peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPAR- δ), carnitine palmitoyl transferase 1(CPT1), uncoupling protein 3 (UCP3), sirtuin 1 (Sirt1), peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 (PGC-1), AMP-activated protein kinase (AMPK)의 primer 염기서열은 아래와 같다.

Oligo NAME	Purification	SEQUENCE (5' --> 3')
F-beta-actin	Bio-RP	ACGGCCAGGTCATCACTATTG
R-beta-actin	Bio-RP	CAAGAAGGAAGGCTGGAAAAG A
F-PPAR- δ	Bio-RP	CGCAAGCCCTCAGTGACAT
R-PPAR- δ	Bio-RP	CGCATTGAACTTGACAGCAAA
F-CPT1	Bio-RP	GTGACTGGTGGGAGGAATAC
R-CPT1	Bio-RP	GAGCATCTCCATGGCGTAG
F-UCP3	Bio-RP	CCAGAGCATGGTGCCCTTCGCT
R-UCP3	Bio-RP	CTCGTGTCAGCAGCAGTG
F-Sirt1	Bio-RP	CGGCTACCGAGGTCCATATACT
R-Sirt1	Bio-RP	TCGAGGATCGGTGCCAAT
F-PGC1- α	Bio-RP	CACGTTCAAGGTCACCCTACAG
R-PGC1- α	Bio-RP	CTCTTCGCCCTCAGACTTTCC
F-AMPK	Bio-RP	TCGTGCCGCCCTTT
R-AMPK	Bio-RP	GGTCAGCATGCCACAAAA

(6) 실험군간 데이터의 통계적 분석

데이터는 평균±표준오차로 제시하였고, 각 실험군간의 통계적 비교는 ANOVA 분석을 이용하였고, Duncan multiple range test를 이용하여 사후 검정을 실시하였다. $p < 0.05$ 일

때 통계적 유의차가 있는 것으로 판정하였다.

나. 결과

(1) 조직 내 citrate synthase 효소 활성

지구적운동능력 실험을 수행 하고 얻은 조직 내 citrate synthase 효소 활성을 평가하였다. 간조직에서 cs 효소 활성은 CON, CGE50군에서 0.27 ± 0.01 U/mg protein, 0.33 ± 0.01 U/mg protein로 나타났다. 근육조직에서 cs 효소 활성은 CON, CGE50군에서 0.06 ± 0.01 U/mg protein, 0.08 ± 0.00 U/mg protein로 나타났다. 작두콩 추출물군은 CON군과 비교하여 통계적인 유의 차이를 나타냈다. 따라서 작두콩추출물의 투여가 실험동물의 조직 내 citrate synthase 효소 활성 증가에 기여하였을 것으로 판단되었다(Figure 4).

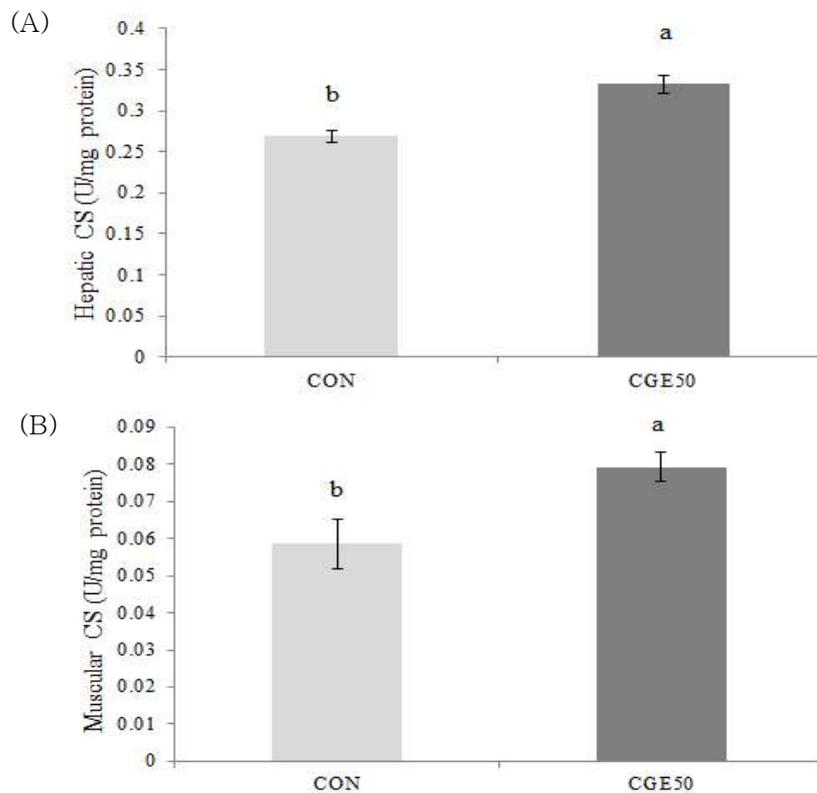


Figure 4. Effects of CGE50 on citrate synthase Activity.

(A) Hepatic citrate synthase activity, (B) Muscular citrate synthase activity. Data are expressed as mean \pm S.E. in each group. CON: exercised control, CGE50: 500 mg/kg/day of CGE50. Different letters above the bar are statistically different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

(2) 조직 내 β -HAD 효소 활성

지구적운동능력 실험을 수행 하고 얻은 조직 내 β -HAD 효소 활성을 평가하였다. 간조직에서 β -HAD 효소 활성은 CON, CGE50군에서 0.004 ± 0.001 U/mg protein, 0.012 ± 0.002 U/mg protein로 나타났다. 근육조직에서 β -HAD 효소 활성은 CON, CGE50군에서 0.018 ± 0.002 U/mg protein, 0.035 ± 0.002 U/mg protein로 나타났다. 작두콩추출물군은 CON군과 비교하여 통계적인 유의 차이를 나타냈다. 따라서 작두콩추출물의 투여가 실험동물의 조직 내 β -HAD 효소 활성 증가에 기여하였을 것으로 판단되었다 (Figure 5).

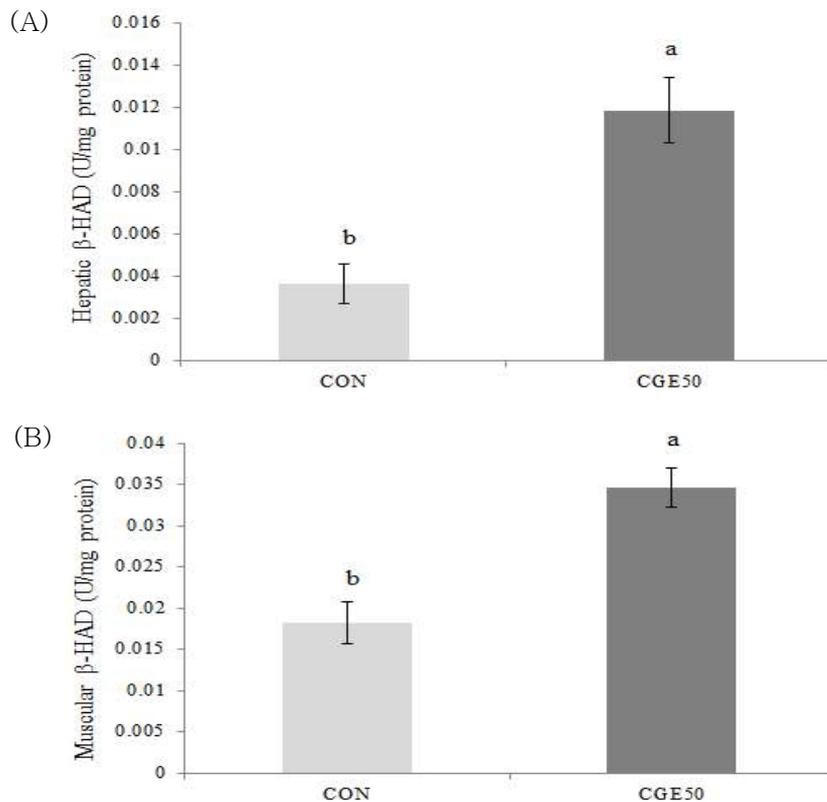


Figure 5. Effects of CGE50 on β -HAD Activity.

(A) Hepatic β -HAD activity, (B) Muscular β -HAD activity. Data are expressed as mean \pm S.E. in each group. CON: exercised control, CGE50: 500 mg/kg/day of CGE50. Different letters above the bar are statistically different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

(3) 작두콩 50%주정추출물의 에너지 대사 전사인자 발현

지구적운동능력 실험을 수행 하고 얻은 근육 조직 내 PPAR- δ , CPT1, UCP3, Sirt1, PGC-1, AMPK의 mRNA 발현을 평가하였다. PPAR- δ 의 경우 CGE50군에서 CON군에 비하여 2.0-fold 증가하는 것으로 나타났다. CPT1의 경우 CGE50군에서 CON군에 비하여 1.5-fold 증가하는 것으로 나타났다. UCP3의 경우 CGE50군에서 CON군에 비하여

1.4-fold 증가하는 것으로 나타났다. Sirt1의 경우 CGE50군에서 CON군에 비하여 1.7-fold 증가하는 것으로 나타났다. PGC-1의 경우 CGE50군에서 CON군에 비하여 2.2-fold 증가하는 것으로 나타났다. AMPK의 경우 CGE50군에서 CON군에 비하여 2.4-fold 증가하는 것으로 나타났다. CGE50을 경구투여 한 실험군에서 통계적으로 유의하게 증가된 mRNA 발현량을 확인하였다(Figure 6).

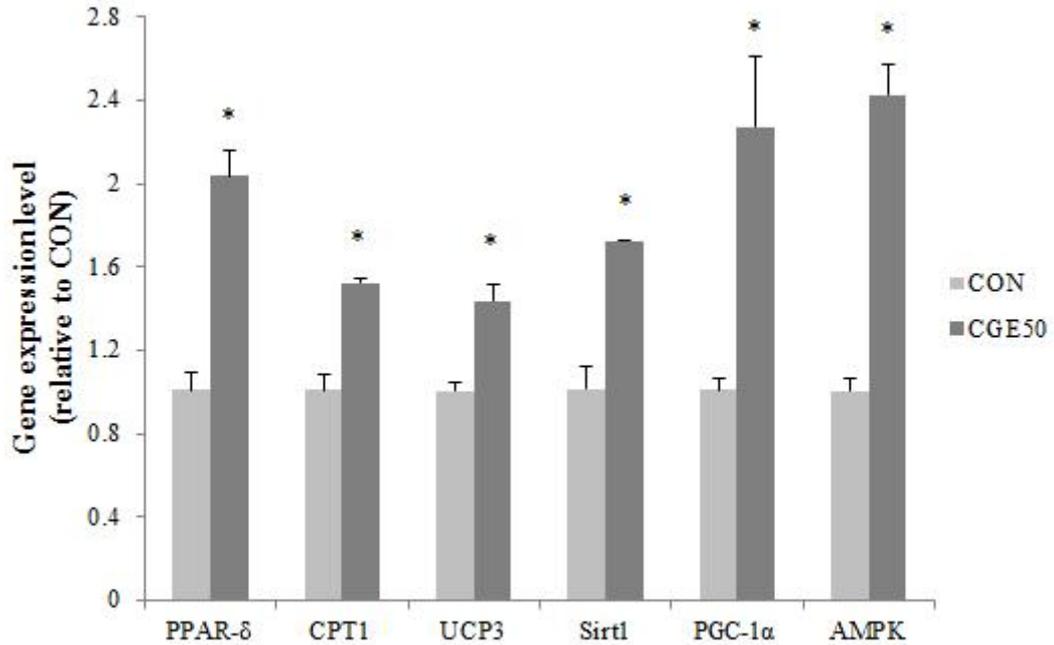


Figure 6. Effects of CGE50 on mRNA Expression.

CON: exercised control, CGE50: 500 mg/kg/day of CGE50. PPAR- δ : peroxisome proliferator-activated receptor delta, CPT1: carnitine palmitoyl transferase 1, UCP3: uncoupling protein 3, Sirt1: sirtuin 1, PGC-1: peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1, AMPK: AMP-activated protein kinase. Data are expressed as mean \pm S.E. in each group. * $p < 0.05$ v.s. CON.

(4) 작두콩 80%주정추출물의 에너지 대사 전사인자 발현

지구적운동능력 실험을 수행 하고 얻은 근육 조직 내 PPAR- δ , CPT1, UCP3, Sirt1, PGC-1, AMPK의 mRNA 발현을 평가하였다. PPAR- δ 의 경우 CGE80군에서 CON군에 비하여 1.7-fold 증가하는 것으로 나타났다. CPT1의 경우 CGE80군에서 CON군에 비하여 1.7-fold 증가하는 것으로 나타났다. UCP3의 경우 CGE80군에서 CON군에 비하여 1.9-fold 증가하는 것으로 나타났다. Sirt1의 경우 CGE80군에서 CON군에 비하여 1.4-fold 증가하는 것으로 나타났다. PGC-1의 경우 CGE80군에서 CON군에 비하여 1.6-fold 증가하는 것으로 나타났다. AMPK의 경우 CGE80군에서 CON군에 비하여 1.8-fold 증가하는 것으로 나타났다. CGE80을 경구투여 한 실험군에서 통계적으로 유의하게 증가된 mRNA 발현량을 확인하였다(Figure 7).

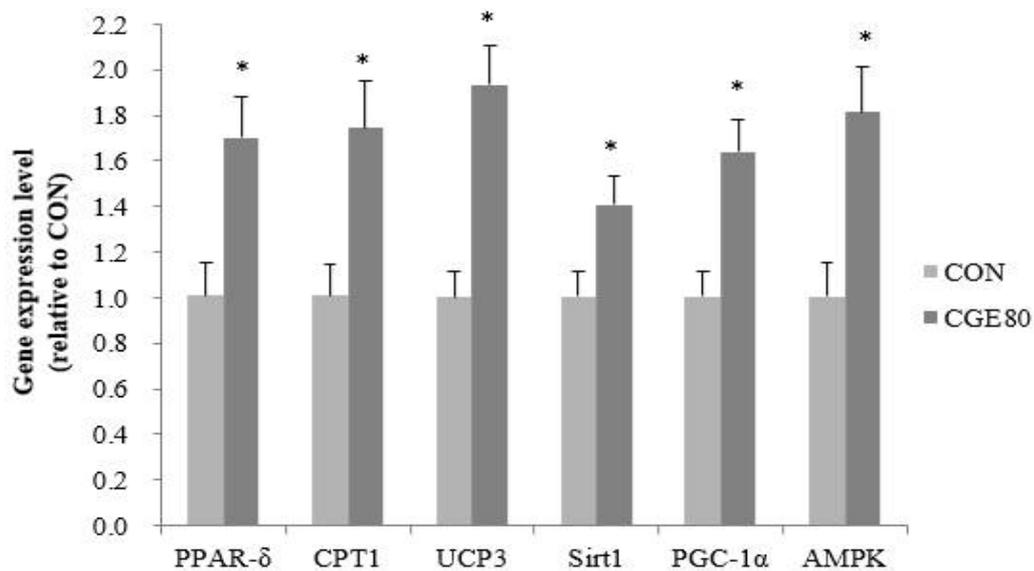


Figure 7. Effects of CGE80 on mRNA Expression.

CON: exercised control, CGE80: 1 g/kg/day of CGE80. PPAR- δ : peroxisome proliferator-activated receptor delta, CPT1: carnitine palmitoyl transferase 1, UCP3: uncoupling protein 3, Sirt1: sirtuin 1, PGC-1: peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1, AMPK: AMP-activated protein kinase. Data are expressed as mean \pm S.E. in each group. * p<0.05 v.s. CON.

4. 작두콩 소재의 산화적 스트레스 억제 기작구명

가. 방법

(1) 1차년도에 지구적 운동능력향상능이 확인된 작두콩 80%주정추출물 (1 g/kg/day, CGE80)과 2차년도에 지구적 운동능력향상능이 확인된 작두콩 50%주정추출물(500 mg/kg/day, CGE50)의 조직을 이용하여 산화적 스트레스 억제 기작구명을 연구를 수행하였다.

(2) 조직의 효소액 추출

간과 근육은 무게 10배의 lysis buffer를 처리 한 후, 13,000 rpm, 30분 원심분리 하여 얻어진 상등액을 회수하여 항산화활성 분석에 활용하였다. 각 조직의 효소액은 bradford reagent (Sigma, USA)를 이용하여 단백질 정량을 비색정량 하였으며, bovine serum albumin 표준곡선을 활용하여 각 개체의 mg/protein의 함량을 산출하였다.

(3) 조직의 항산화 효소활성 및 비효소 항산화 인자 측정

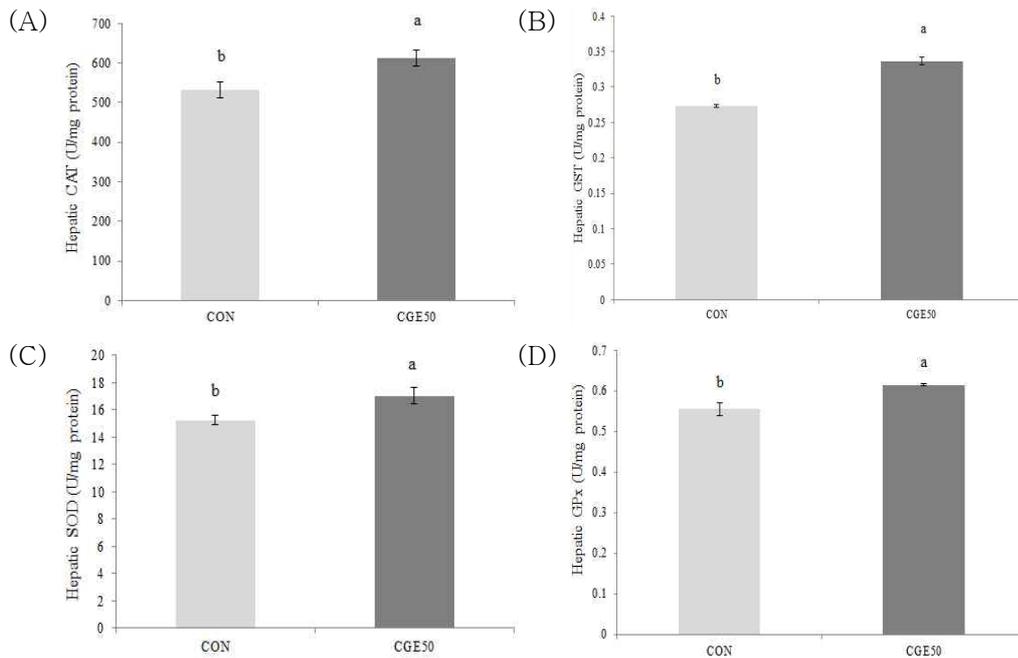
(가) CAT (Catalase) : 조직액 10 μ L에 20 mM H₂O₂용액 290 uL를 첨가하여 kinetic method를 이용하여 3분간 240 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 U/mg protein으로 제시하였다.

- (나) GST (Glutathione-S-transferase) : phosphate buffered saline 196 μL 와 200 mM reduced glutathione 2 μL , 100 mM CDNB 용액 2 μL 을 혼합한 기질액을 준비하여, 조직액 20 μL 에 기질액 180 μL 를 첨가하여 5분간 340 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 U/mg protein으로 제시하였다.
- (다) SOD (Superoxide dismutase) : 조직액과 대조구에 동일한 시료 20 μL 를 준비한 후 WST-1용액 (1-(4-indophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt)를 200 μL 씩 분주한 뒤, xanthine oxidase 용액을 20 μL 씩 첨가하여 37°C에서 20분 반응시키고 450 nm 에서 흡광도를 측정하였다. SOD 활성은 상용화된 SOD를 0, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 U/mL 농도로 표준곡선을 작성하고 이를 이용하여 U/mg protein 제시하였다.
- (라) GPx (Glutathione peroxidase) : 조직액 10 μL 에 3.5 mM reduced glutathione 120 μL , 2.5 mM NADPH 20 μL , 0.5 U glutathione reductase 20 μL 를 넣어 잘 혼합한 후, 30 mM tert-butyl hydroperoxide 20 μL 를 첨가하여 반응을 유도하고 5분간 340 nm에서 흡광도를 측정하여 U/mg protein으로 제시하였다.
- (마) GR (Glutathione reductase) : 조직액 20 μL 에 100 mM potassium phosphate buffer (pH7.0) 30 μL , 2 mM oxidized glutathione 100 μL , 3 mM DTNB 50 μL 를 넣어 잘 혼합한 후, 2 mM NADPH 10 μL 를 첨가하여 반응을 유도하고 5분간 412 nm에서 측정하여 U/mg protein으로 제시하였다.
- (바) GSH (Reduced glutathione), GSSG (oxidized glutathione) : 100 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0) 7.54 mL, 6 unit glutathione reductase 228 μL , 3 mM DTNB 228 μL 를 혼합하여 기질액을 준비한 후, 조직액 10 μL 과 준비한 기질액 150 μL 를 잘 혼합한 후 50 mM NADPH를 50 μL 첨가하여 반응을 유도하고 5분간 412 nm 에서 흡광도의 변화를 측정하였다. 각 GSH 및 GSSG 함량은 각 표준곡선을 이용하여 계산하여 moles/min/mg protein으로 제시하였다.
- (사) MDA (Malondialdehyde) : 조직액 500 μL 에 15% TCA 250 μL 를 첨가하여 10분간 단백질을 침전시킨다. 그 후 4°C, 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액 500 μL 를 새로운 1.5 mL 튜브로 옮기고 0.375% TBA를 500 μL 첨가하여 혼합하였다. 혼합액을 100°C에서 30분간 끓이고, ice에서 10분간 cooling 하였다. 4°C, 3,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액 만을 535 nm에서 측정하였으며 MDA 함량은 mole/g protein로 제시하였다.
- (4) 실험군간 데이터의 통계적 분석 : 데이터는 평균±표준오차로 제시하였고, 각 실험군간의 통계적 비교는 ANOVA 분석을 이용하였고, Duncan multiple range test를 이용하여 사후 검정을 실시하였다. $p < 0.05$ 일 때 통계적 유의차가 있는 것으로 판정하였다.

나. 결과

(1) 간조직의 항산화 효소활성 및 비효소 항산화 인자

산화적 스트레스 억제 기작구명을 위해 CGE50 실험군의 조직 내 CAT, GST, SOD, GPx, GR, GSH, GSSG, MDA를 측정하였다. 간조직에서 CAT 활성은 CON, CGE50군에서 531.8 ± 19.3 U/mg protein, 612.4 ± 19.4 U/mg protein로 나타났다. 작두콩 추출물군은 CON군과 비교하여 통계적인 유의 차이를 나타냈다. GST 활성은 CON, CGE50군에서 0.27 ± 0.01 U/mg protein, 0.34 ± 0.00 U/mg protein으로 유의적으로 활성이 증가하였다. SOD 활성은 CON, CGE50군에서 15.2 ± 0.3 U/mg protein, 17.0 ± 0.6 U/mg protein으로 유의적으로 활성이 증가하였다. GPx 활성은 CON, CGE50군에서 0.56 ± 0.00 U/mg protein, 0.62 ± 0.00 U/mg protein으로 유의적으로 활성이 증가하였다. GR 활성은 CON, CGE50군에서 0.16 ± 0.01 U/mg protein, 0.23 ± 0.02 U/mg protein으로 유의적으로 활성이 증가하였다. GSH 함량은 CON, CGE50군에서 2.74 ± 0.13 moles/min/mg protein, 3.39 ± 0.12 moles/min/mg protein으로 유의적으로 증가하였다. GSSG 함량은 CON, CGE50군에서 5.02 ± 0.17 moles/min/mg protein, 4.26 ± 0.22 moles/min/mg protein으로 유의적으로 감소하였다. MDA 함량은 CON, CGE50군에서 4.83 ± 0.19 moles/g protein, 4.18 ± 0.16 moles/g protein으로 유의적으로 감소하였다. 따라서 작두콩추출물의 투여가 산화적 스트레스 억제에 기여하였을 것으로 판단되어진다(Figure 8).



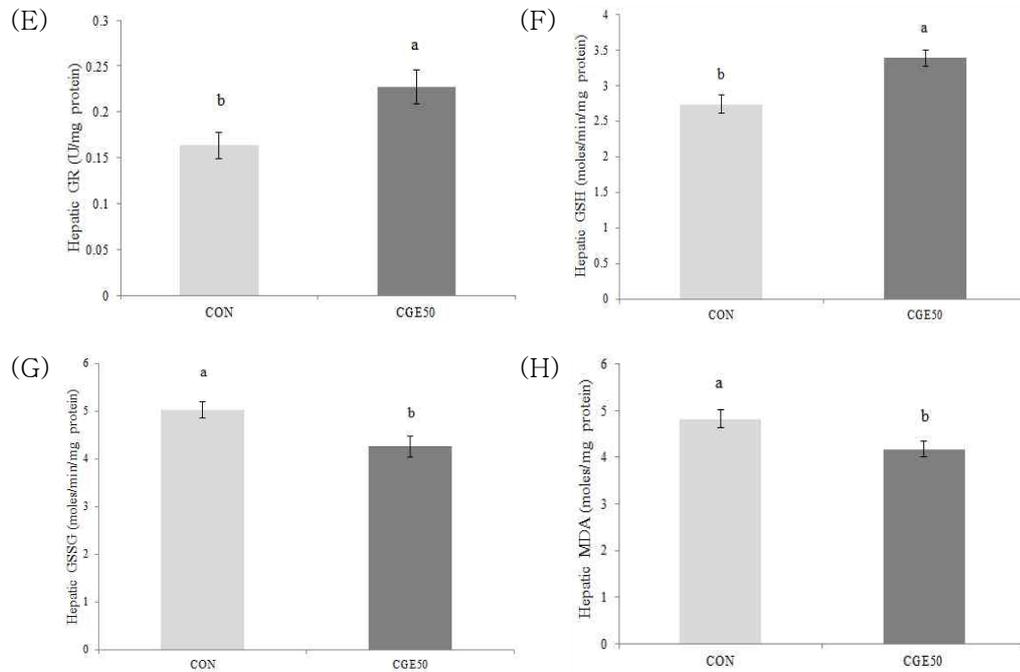


Figure 8. Effects of CGE50 on Antioxidant Activity in Liver.

(A) CAT; catalase, (B) GST; glutathion-S-transferase, (C) SOD; superoxide dismutase, (D) GPx; glutathion peroxidase, (E) GR; glutathione reductase, (F) GSH; reduced glutathione, (G) GSSG; oxidized glutathione, (H) MDA; malondialdehyde. Data are expressed as mean \pm S.E. in each group. CON: exercised control, CGE50: 500 mg/kg/day of CGE50. Different letters above the bar are statistically different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

(2) 근육조직의 항산화 효소활성 및 비효소 항산화 인자

산화적 스트레스 억제 기작구명을 위해 CGE50 실험군의조직 내 CAT, GST, SOD, GPx, GR, GSH, GSSG, MDA를 측정하였다. 근육조직에서 CAT 활성은 CON, CGE50군에서 23.72 ± 2.30 U/mg protein, 40.78 ± 4.77 U/mg protein로 나타났다. 작두콩 추출물군은 CON군과 비교하여 통계적인 유의 차이를 나타났다. GST 활성은 CON, CGE50군에서 0.049 ± 0.001 U/mg protein, 0.058 ± 0.003 U/mg protein으로 유의적으로 활성이 증가하였다. SOD 활성은 CON, CGE50군에서 3.00 ± 0.80 U/mg protein, 5.77 ± 0.61 U/mg protein으로 유의적으로 활성이 증가하였다. GPx 활성은 CON, CGE50군에서 0.069 ± 0.001 U/mg protein, 0.076 ± 0.001 U/mg protein으로 유의적으로 활성이 증가하였다. GR 활성은 CON, CGE50군에서 1.97 ± 0.03 U/mg protein, 2.13 ± 0.02 U/mg protein으로 유의적으로 활성이 증가하였다. GSH 함량은 CON, CGE50군에서 2.07 ± 0.23 moles/min/mg protein, 2.79 ± 0.10 moles/min/mg protein으로 유의적으로 증가하였다. GSSG 함량은 CON, CGE50군에서 2.52 ± 0.16 moles/min/mg protein, 2.00 ± 0.11 moles/min/mg protein으로 유의적으로 감소하였다. MDA 함량은 CON, CGE50군에서 1.52 ± 0.11 moles/g protein, 1.24 ± 0.13 moles/g protein으로 유의적으로 감소하였다. 따라서 작두콩추출물의 투여가 산화적 스트레스 억제에 기여하였을 것으로 판단되어진다(Figure 9).

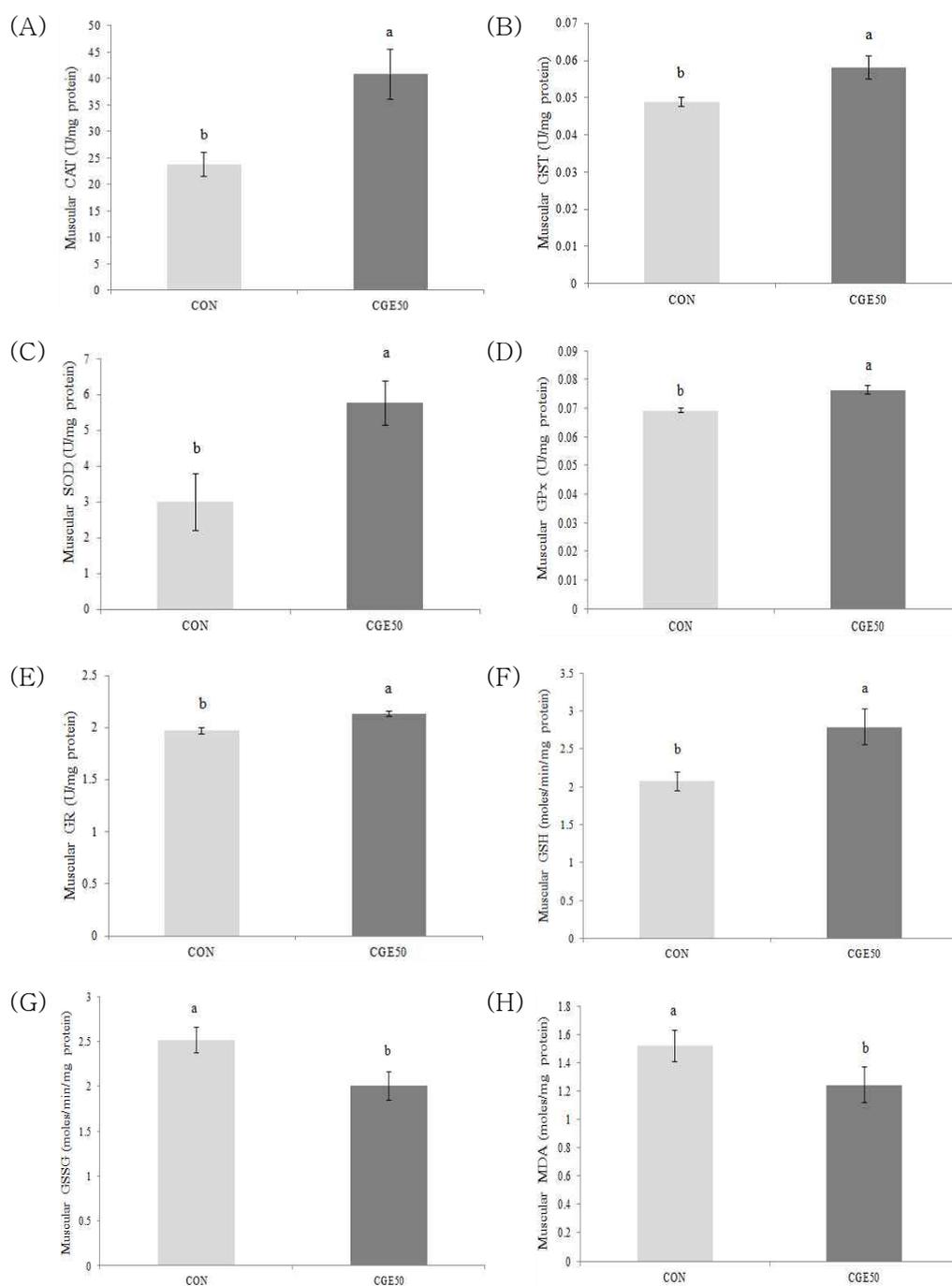
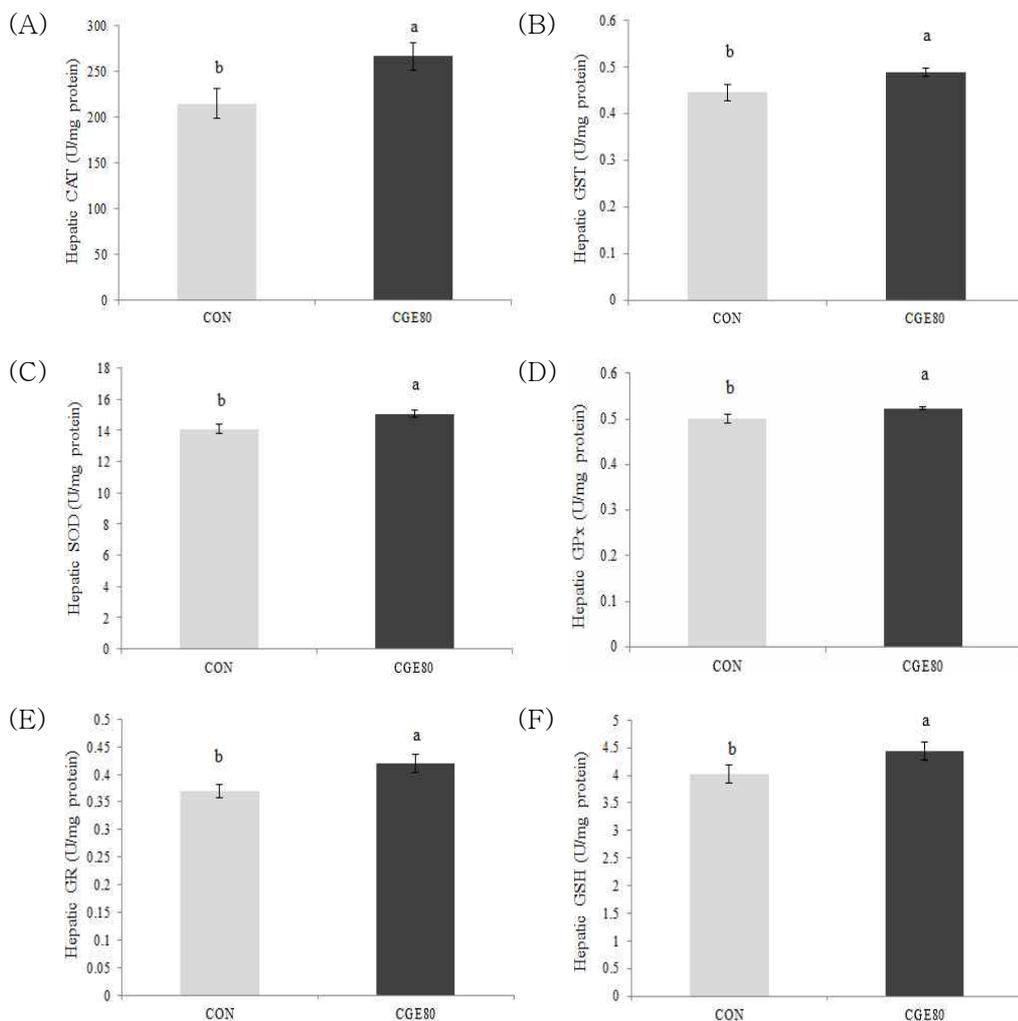


Figure 9. Effects of CGE50 on Antioxidant Activity in Muscle.

(A) CAT; catalase, (B) GST; glutathion-S-transferase, (C) SOD; superoxide dismutase, (D) GPx; glutathion peroxidase, (E) GR; glutathione reductase, (F) GSH; reduced glutathione, (G) GSSG; oxidized glutathione, (H) MDA; malondialdehyde. Data are expressed as mean \pm S.E. in each group. CON: exercised control, CGE50: 500 mg/kg/day of CGE50. Different letters above the bar are statistically different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

(3) 간조직의 항산화 효소활성 및 비효소 항산화 인자

산화적 스트레스 억제 기작구멍을 의해 CGE80 실험군의 조직 내 CAT, GST, SOD, GPx, GR, GSH, MDA를 측정하였다. 간조직에서 CAT 활성은 CON, CGE80군에서 215.1 ± 12.7 U/mg protein, 266.4 ± 15.4 U/mg protein로 나타났다. 작두콩 추출물군은 CON군과 비교하여 통계적인 유의 차이를 나타냈다. GST 활성은 CON, CGE80군에서 0.45 ± 0.02 U/mg protein, 0.49 ± 0.01 U/mg protein으로 유의적으로 활성이 증가하였다. SOD 활성은 CON, CGE80군에서 14.1 ± 0.3 U/mg protein, 15.1 ± 0.2 U/mg protein으로 유의적으로 활성이 증가하였다. GPx 활성은 CON, CGE80군에서 0.50 ± 0.01 U/mg protein, 0.52 ± 0.00 U/mg protein으로 유의적으로 활성이 증가하였다. GR 활성은 CON, CGE80군에서 0.37 ± 0.01 U/mg protein, 0.42 ± 0.02 U/mg protein으로 유의적으로 활성이 증가하였다. GSH 함량은 CON, CGE80군에서 4.02 ± 0.17 moles/min/mg protein, 4.44 ± 0.16 moles/min/mg protein으로 유의적으로 증가하였다. MDA 함량은 CON, CGE80군에서 0.29 ± 0.03 moles/g protein, 0.24 ± 0.02 moles/g protein으로 유의적으로 감소하였다. 따라서 작두콩추출물의 투여가 산화적 스트레스 억제에 기여하였을 것으로 판단되어진다(Figure 10).



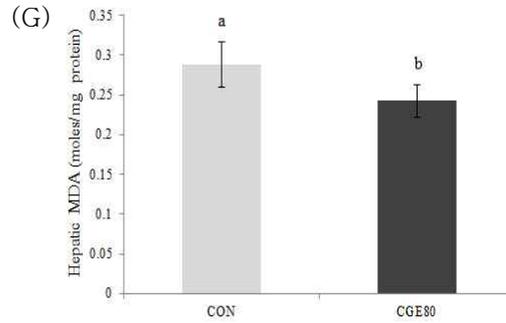
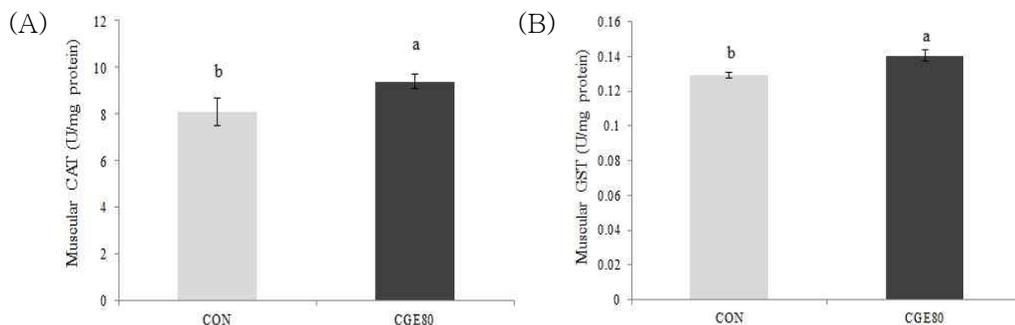


Figure 10. Effects of CGE80 on Antioxidant Activity in Liver.

(A) CAT; catalase, (B) GST; glutathion-S-transferase, (C) SOD; superoxide dismutase, (D) GPx; glutathion peroxidase, (E) GR; glutathione reductase, (F) GSH; reduced glutathione, (G) MDA; malondialdehyde. Data are expressed as mean \pm S.E. in each group. CON: exercised control, CGE80: 1 g/kg/day of CGE80. Different letters above the bar are statistically different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

(4) 근육조직의 항산화 효소활성 및 비효소 항산화 인자

산화적 스트레스 억제 기작구멍을 의해 CGE80 실험군의 조직 내 CAT, GST, SOD, GPx, GR, GSH, MDA를 측정하였다. 근육조직에서 CAT 활성은 CON, CGE80군에서 8.09 ± 0.57 U/mg protein, 9.40 ± 0.30 U/mg protein로 나타났다. 작두콩 추출물군은 CON군과 비교하여 통계적인 유의 차이를 나타냈다. GST 활성은 CON, CGE80군에서 0.13 ± 0.00 U/mg protein, 0.14 ± 0.00 U/mg protein으로 유의적으로 활성이 증가하였다. SOD 활성은 CON, CGE80군에서 7.31 ± 0.22 U/mg protein, 7.76 ± 0.11 U/mg protein으로 유의적으로 활성이 증가하였다. GPx 활성은 CON, CGE80군에서 0.15 ± 0.00 U/mg protein, 0.16 ± 0.00 U/mg protein으로 유의적으로 활성이 증가하였다. GR 활성은 CON, CGE80군에서 0.39 ± 0.01 U/mg protein, 0.44 ± 0.02 U/mg protein으로 유의적으로 활성이 증가하였다. GSH 함량은 CON, CGE80군에서 0.63 ± 0.02 moles/min/mg protein, 0.69 ± 0.02 moles/min/mg protein으로 유의적으로 증가하였다. MDA 함량은 CON, CGE80군에서 0.78 ± 0.02 moles/g protein, 0.69 ± 0.05 moles/g protein으로 유의적으로 감소하였다. 따라서 작두콩추출물의 투여가 산화적 스트레스 억제에 기여하였을 것으로 판단되어진다(Figure 11).



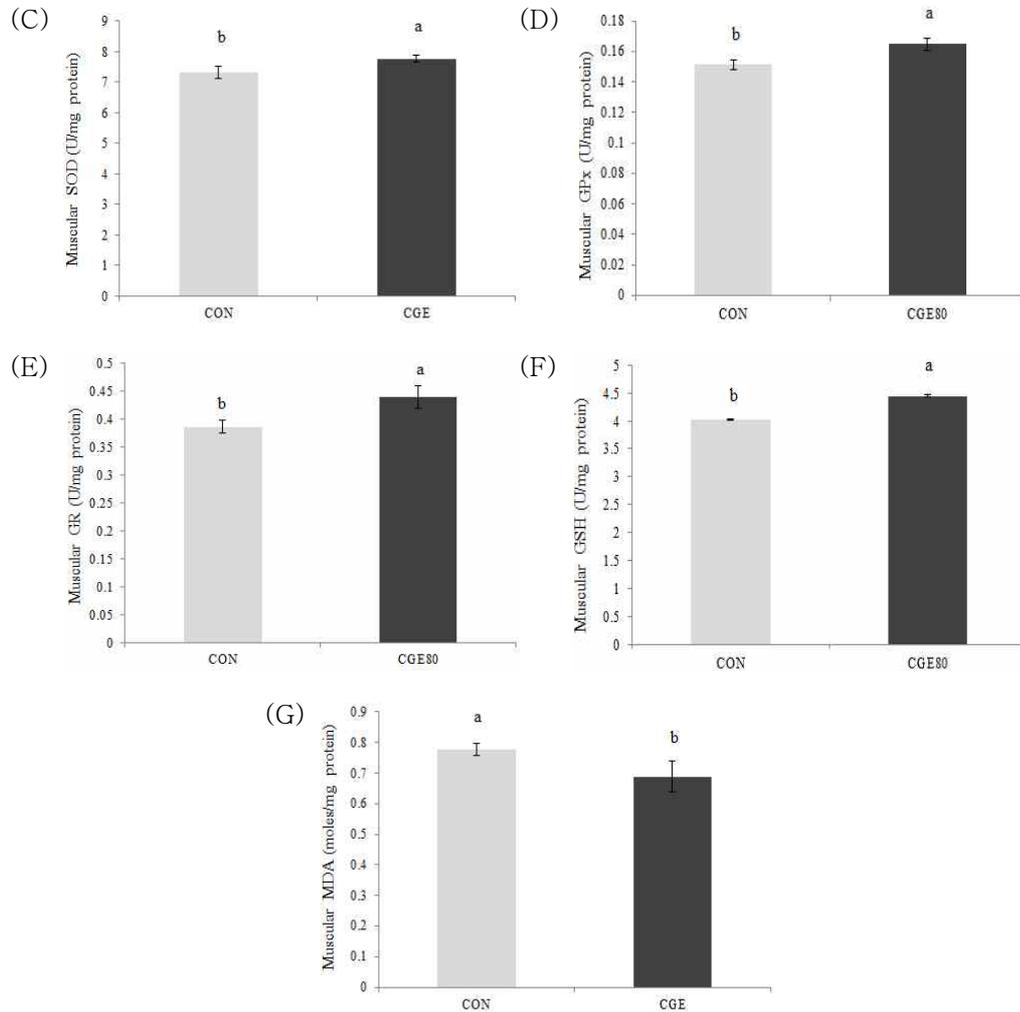


Figure 11. Effects of CGE50 on Antioxidant Activity in Muscle.

(A) CAT; catalase, (B) GST; glutathion-S-transferase, (C) SOD; superoxide dismutase, (D) GPx; glutathion peroxidase, (E) GR; glutathione reductase, (F) GSH; reduced glutathione, (G) MDA; malondialdehyde. Data are expressed as mean \pm S.E. in each group. CON: exercised control, CGE50: 500 mg/kg/day of CGE50. Different letters above the bar are statistically different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

5. 시제품의 에너지 증진 효능 평가

가. 방법

(1) 작두콩시제품 식이제작

주관기관으로부터 시제품을 제공받아 (주)유니페이스에 의뢰하여 AIN-93 식이에 10%의 시제품을 첨가하여 식이를 제작하였다. 이 식이에는 실험동물의 식이섭취량과 유효용량을 고려하여 GCE50과 caffeine을 첨가 제작하였다.

(2) 유영수조를 이용한 *in vivo* 지구적 운동능력향상능 평가

- (가) 유영수조 : 유영운동능력측정에 이용된 유영수조는 90×45×45cm 크기의 아크릴로 제작된 기구이며, 이 수조는 운동능력측정시 높이 35cm까지 물을 채운 후 수온을 34°C로 유지시키고, 운동부하는 물 표면의 유속으로 조절하며, 표면유속은 전압조절기가 연결되어 pump와 water flowmeter(type F45500, Blue white Co, Westminster, CA, USA)를 이용하여 최적유속을 유지하면서 마우스의 지구적 운동능력을 측정에 이용하였다.
- (나) 실험동물의 분류 및 체중 등 측정 : SPF (Specific pathogen free)의 4주령 ICR 옹성 마우스를 구입하여 실험동물로 사용하였다. 실험동물은 항온항습시스템을 갖춘 후드 내에서 5마리를 polycarbonate cage (278×420×200 mm)에 넣고, 실내온도 22±2°C, 기류속도 13~18cm/sec, 환기횟수 10~20회/h, 기압차2~10 mm H₂O, 명암주기 12시간; 7:00~19:00, 조도 150~300 Lux에서 사육하였다. 일주일간의 적응기간 후 체중감소가 없는 건강한 동물을 선별하여 무작위법으로 체중의 평균값이 같도록 1차 그룹화 하였다. 실험기간동안 매 3회 체중을 측정하여 실험군별 체중의 변화를 기록하였다.
- (다) 지구적 운동능력 향상능 측정 : 시제품의 지구적 운동능력 향상능 측정 실험에서 추출물 등 처리 전 1주일간 7.5L/min 유속의 운동 강도 하에서 2번의 한계유영운동 시간을 측정하여 군별 평균 유영시간 및 체중이 같도록 대조군(CON)과 투여군(CGЕ50-C, CGЕ50-P)으로 분류하였다. 2주간 시료를 섭취하게 하고, 한계까지의 유영운동능력은 매 7일 간격으로 측정하였다. 유영운동시간의 한계치는 마우스가 물속에 빠져 7초가 경과될 때까지 물 표면으로 올라오지 못하는 시점을 시간으로 평가하였다.
- (라) 혈중 lactic acid의 농도 측정 : 대조군과 추출물 투여군들의 운동전과 15분 운동 후, 혈중 피로 지표인 lactic acid의 농도를 kit를 이용하여 측정하였다.

(3) 실험군간 데이터의 통계적 분석

데이터는 평균±표준오차로 제시하였고, 각 실험군간의 통계적 비교는 ANOVA 분석을 이용하였고, Duncan multiple range test를 이용하여 사후 검정을 실시하였다. $p<0.05$ 일 때 통계적 유의차가 있는 것으로 판정하였다.

나. 결과

(1) 작두콩시제품의 지구적 운동능력향상능

마우스의 한계유영운동시간 측정은 총 14일간의 시료 투여와 함께 매 7일에 한번씩 총 2회 수행되었다. 작두콩시제품이 지구적 운동능력향상능을 갖는지 평가하기 위해 한계 유영시간을 측정하였다. CON, Caffeine, CGE 800의 각 실험군의 초기 유영시간은 18.8±3.6 min, 18.9±2.1 min, 18.8±2.3 min으로 군별 차이가 나타나지 않도록 무작위

로 나누었다. 7일에 수행한 한계유영시간은 CON, Caffeine, CGE 800군에서 18.9 ± 5.3 min, 36.6 ± 3.2 min, 23.1 ± 3.1 min으로 나타남. 카페인 투여군에서 대조군과 비교하여 통계적인 유의 차이를 나타냈다. 14일에 수행한 한계유영시간은 CON, Caffeine, CGE 800군에서 18.2 ± 3.6 min, 27.4 ± 4.8 min, 28.3 ± 4.3 min으로 작두콩추출물 투여군에서 대조군과 비교하여 통계적인 유의 차이를 나타냈다. 따라서 작두콩시제품의 투여가 실험동물의 지구적 운동능력향상에 기여하였을 것으로 판단되었다(Figure 12).

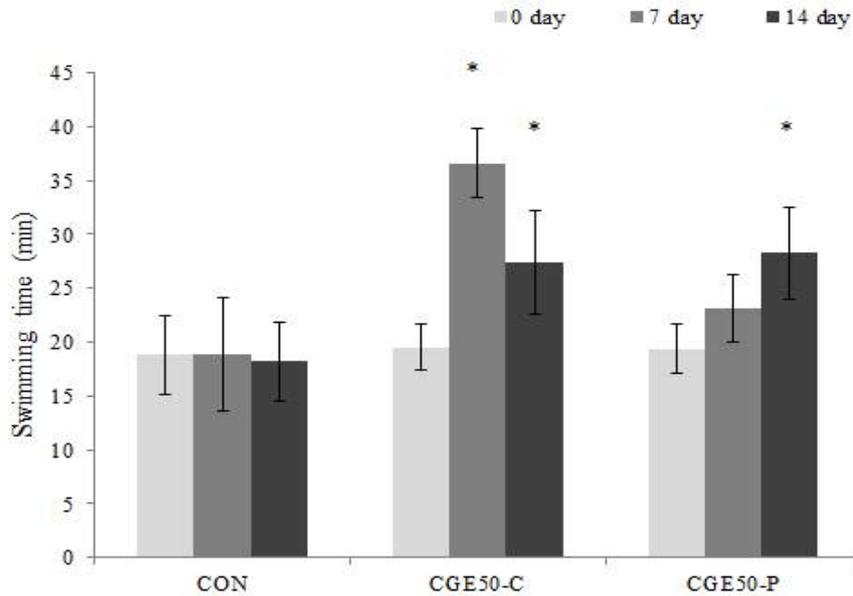


Figure 12. Effects of CGE50 and Caffeine on Endurance Swimming Capacity in Mice.

Each value represents the mean \pm S.E. The swimming time was measured at 7.5 L/min. CON: exercised control, CGE50-C: 50 mg/kg/day of Caffeine, CGE50-P: 800 mg/kg/day of CGE50. Asterisk above the bar represent significant difference from Control group ($p < 0.05$).

(2) 혈중 lactate 수준

유영운동 전·후 혈중 lactate 함량을 측정한 결과 운동 전 CON, Caffeine, CGE 800군은 각각 2.03 ± 0.3 mM/L, 2.03 ± 0.3 mM/L, 2.04 ± 0.2 mM/L로 군별 차이를 나타내지 않았다. 운동 10분 후 CON, Caffeine, CGE 800군은 각각 5.82 ± 0.6 mM/L, 4.10 ± 0.3 mM/L, 4.00 ± 0.4 mM/L로 나타났다. Caffeine군과 CGE 800군은 CON군과 비교하여 통계적인 유의 차이를 나타냈다. 따라서 작두콩시제품의 투여가 실험동물의 혈중 lactate수준에 기여하였을 것으로 판단되었다(Figure 13).

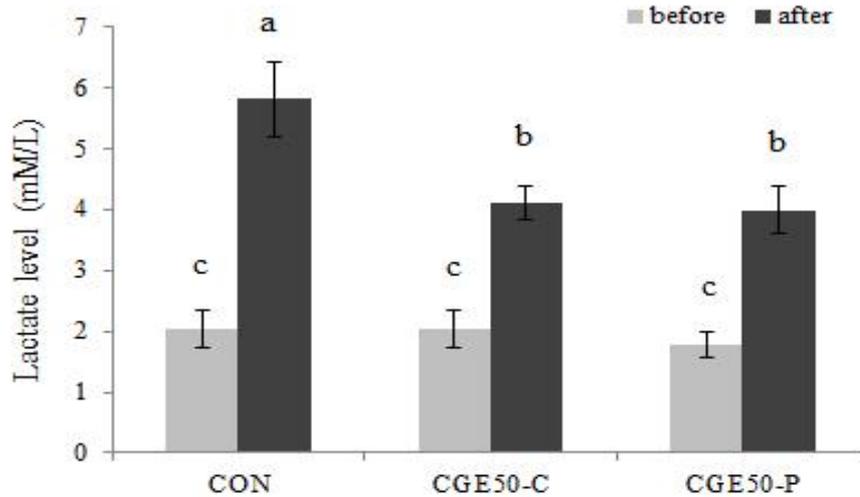


Figure 13. Effects of CGE50 and Caffeine on Lactate Level.

Each value represents the mean \pm S.E. The blood lactate level was measured twice: before the swimming and 10 min after swimming time. CON: exercised control, CGE50-C: 50 mg/kg/day of Caffeine, CGE50-P: 800 mg/kg/day of CGE50. Different letters above the bar are statistically different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

6. 결론

가. 작두콩 추출물의 용량별 지구적 운동능력향상능 평가를 수행한 결과 투여 14일째, 작두콩 50%주정추출물 800 mg/kg/day를 섭취한 CGE50-800이 대조군과 통계적으로 유의한 운동수행능력증가 활성을 나타내었다. 운동 전·후 혈중 젖산 수준의 증가가 작두콩 50%주정추출물의 투여에 의해 억제되었다. 혈중 유리지방산 수준은 운동 후 작두콩 50%주정추출물 투여군에서 유의하게 증가된 결과를 얻었다. 본 결과에 따라 작두콩 50%주정추출물은 에너지 증진 효능을 갖는 소재로 판단된다.

나. 작두콩 추출물의 에너지 증진 효능 기작구명을 위해 citrate synthase 효소, β -HAD 효소 활성을 측정한 결과 작두콩 50% 주정추출물이 대조군과 통계적으로 유의한 효소 활성증가를 나타내었다. 조직 내 에너지 대사 전사인자 발현을 측정한 결과 UCP-3, PPARA- δ , PGC-1, AMPK 모두 작두콩 50% 주정추출물이 대조군과 통계적으로 유의적으로 증가함을 보였다. 본 결과에 따라 작두콩 50%주정추출물은 에너지 증진 효능을 갖는 소재로 판단된다.

다. 작두콩 추출물의 산화적 스트레스 억제 기작구명을 위해 조직의 항산화 효소활성 및 비효소 항산화 인자를 측정한 결과 간과 근육 조직에서 CAT, GST, SOD, GPx, GR 효소 활성이 증가하였고, GSH 함량이 증가하였으며, GSSG 함량과 MDA 함량이 대조군과 통

계적으로 유의적 감소함을 보였다. 본 결과에 따라 작두콩 80%주정추출물과 작두콩 50%주정추출물은 산화적 스트레스 억제 효능을 갖는 소재로 판단된다.

라. 작두콩 추출물을 통한 시제품의 에너지 증진 효능을 알아보기 위해 지구적 운동능력향상능 평가를 수행한 결과 투여 14일째, 작두콩 50%주정추출물이 포함된 시제품이 대조군과 통계적으로 유의한 운동수행능력증가 활성을 나타내었다. 또한 카페인 투여군과 유사하게 운동수행능력증가 활성을 나타내었다. 운동 전·후 혈중 젖산 수준의 증가가 작두콩 50%주정추출물이 포함된 시제품이 대조군에 비해 유의적으로 낮게 증가되었다. 본 결과에 따라 작두콩 50%주정추출물을 유효용량으로 포함된 시제품은 에너지 증진 효능을 갖는다고 판단된다.

제 3 절 발효작두콩 대상 피부과민반응개선 기능성 식품 소재 개발

1. 발효작두콩 추출물 대상 피부과민반응개선 기능성 식품 소재 개발

가. 방법

(1) 작두콩 발효 및 시료표준화

(가) 유산균, 황국균을 이용한 작두콩 발효

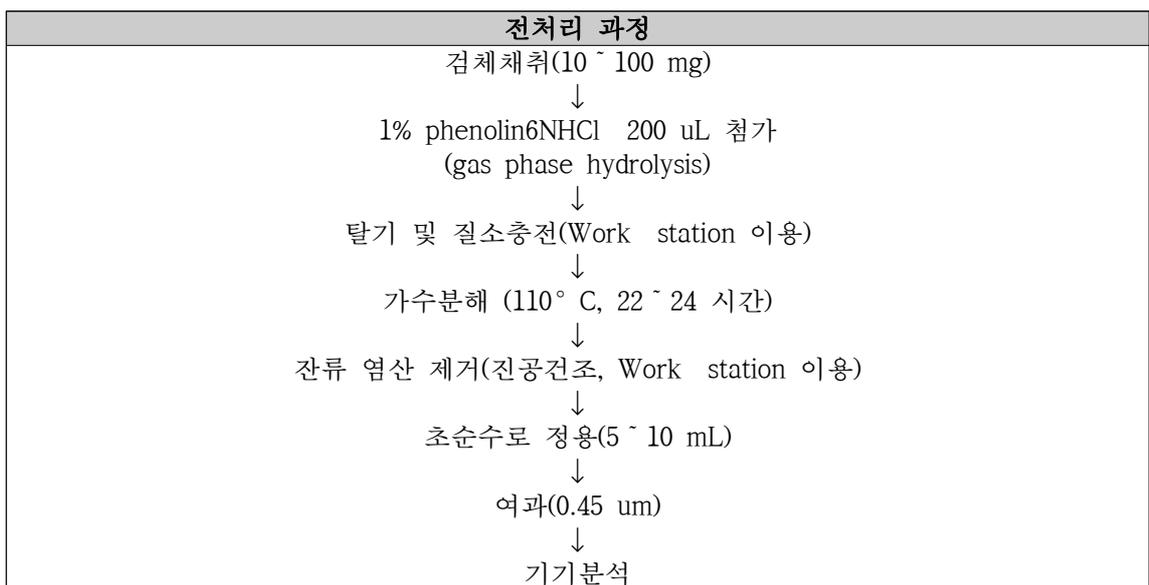
산들촌에서 공급받은 작두콩을 마쇄하여 분말화한 후 다음과 같은 조건에서 발효를 실시하였다. 발효를 마친 후 동결 건조시켜 얻은 시료를 이용하여 성분분석과 추출을 실시하였다.

균주	발효조건		
	균주 주입량	온도	시간
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	5*10 ¹⁰ CFU	20°C	48h
<i>Lactobacillus brevis</i>	5*10 ¹⁰ CFU	20°C	48h
<i>Lactobacillus fermentum</i>	5*10 ¹⁰ CFU	20°C	48h
<i>Lactobacillus helveticus</i>	5*10 ¹⁰ CFU	20°C	48h
<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	5*10 ¹⁰ CFU	20°C	48h
<i>Bacillus licheniformis</i>	5*10 ¹⁰ CFU	20°C	48h
<i>Aspergillus oryzae</i>	3%	25°C	32h
	3%	25°C	36h

(나) 성분분석 및 표준화

발효를 하지 않은 작두콩 분말과 각 균주로 발효를 마친 작두콩 분말을 HPLC를 사용하여 아미노산과 canavanine의 함량을 분석하여 비교하였다. HPLC 분석 조건은 다음과 같이 실시하였다.

① 구성 아미노산 분석 (16종)



표준용액의 조제

mg/100mL	Stock	STD 1	STD 2	STD 3
Asp	13.311	2.662	6.656	13.311
Glu	14.713	2.943	7.357	14.713
Ser	10.509	2.102	5.255	10.509
His	20.963	4.193	10.482	20.963
Gly	7.507	1.501	3.754	7.507
Thr	11.912	2.382	5.956	11.912
Arg	17.420	3.484	8.710	17.420
Ala	8.910	1.782	4.455	8.910
Tyr	18.119	3.624	9.060	18.119
Cys	24.030	4.806	12.015	24.030
Val	11.715	2.343	5.858	11.715
Met	14.921	2.984	7.461	14.921
Phe	16.519	3.304	8.260	16.519
Ile	13.118	2.624	6.559	13.118
Leu	13.118	2.624	6.559	13.118
Lys	18.265	3.653	9.133	18.265
Pro	11.513	2.303	5.757	11.513
표준용액 조제	Stock	Agilent 1 nm/uL 혼합용액		
	STD 1	STD 3을 5배 희석		
	STD 2	STD 3을 2배 희석		
	STD 3	Stock 그대로 사용		

HPLC 분석조건

- Column CapcellpakUG120C18 (250mm × 4.6mm, 5µm)
- Column temperature 40°C
- Injection volume Programe
- Mobile phase A : 40mM NaH₂PO₄(pH7.8)
B : ACN : MeOH : DW (45:45:10)

Time	A(%)	B(%)	Flow rate(mL/min)
0.00	95	5	1.5
31.00	44	56	1.5
33.00	44	56	1.5
34.00	0	100	1.5
38.00	0	100	1.5

Stop time : 38분 Post time : 3분

- Detector

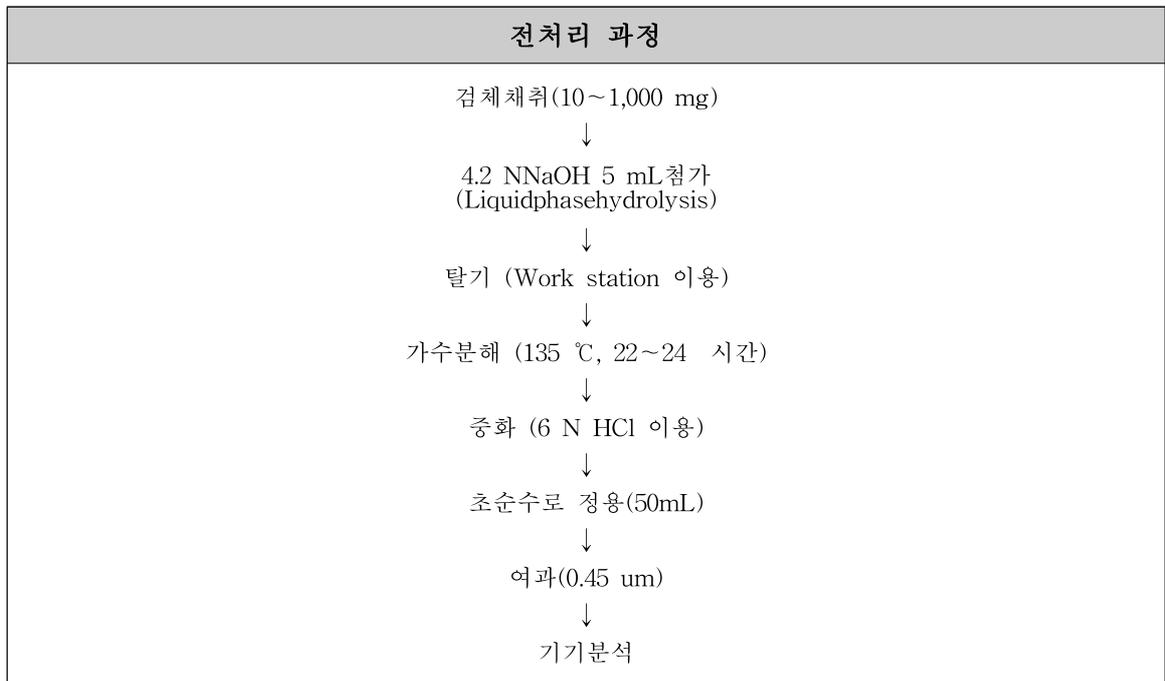
Signal(nm)	Bw(nm)	Reference(nm)	Bw(nm)
338	4	450	20
262	4	450	20

② Cystine 분석

전처리 과정	
검체 채취(10~100 mg) ↓ 2% DTDPA 10 mL 첨가 ↓ 밀봉 후 100°C 에서 60분간 반응 ↓ 2% mercaptoethanol/6 N HCl 10 mL ↓ 가수분해 (105 °C, 22~24 시간) ↓ 잔류 염산 제거(진공건조, Work station 이용) ↓ 초순수로 정용 ↓ 여과(0.45 um) ↓ 기기분석	
표준용액의 조제	
Cys-MPA	Stock 108.8505 mg/100g
표준용액 조제	STD 1 2.177 mg/100g
	STD 2 5.4425 mg/100g
	STD 3 10.8851mg/100g
제조법	Cystine (Wako, 99%)을 취함 0.4N Borate buffer(Ph10.4) 10ml 녹임 ↓ Cys STD용액에 10% DTDPA (in Borate buffer) 용액을 1:1의 비율로 혼합 ↓ 수욕중에서 60분간 반응 ↓ 원심분리하여 상등액만을 사용

HPLC 분석조건			
• Column	Capcellpak UG120 C18 (250mm × 4.6mm, 5µm)		
• Column temperature	40°C		
• Injection volume	Programe		
• Mobile phase	A : 40mM NaH ₂ PO ₄ (pH 7.8) B : ACN : MeOH : DW (45:45:10)		
Time	A(%)	B(%)	Flow rate(mL/min)
0.00	95	5	1.5
31.00	44	56	1.5
33.00	44	56	1.5
34.00	0	100	1.5
38.00	0	100	1.5
Stop time : 38분		Post time : 3분	
• Detector			
Signal(nm)	Bw(nm)	Reference(nm)	Bw(nm)
338	4	450	20
262	4	450	20

③ Tryptophan 분석



표준용액의 조제

mg/100mL	Stock	STD 1	STD 2	STD 3
TRP	96.53	1.9306	4.8265	9.653
표준용액 조제	Stock	19.70 mg/20mL로 제조(98%)		
	STD 1	STD 3을 5배 희석		
	STD 2	STD 3을 2배 희석		
	STD 3	Stock 10배 희석		

HPLC 분석조건

- Column CapcellpakUG120C18 (250mm × 4.6mm, 5µm)
- Column temperature 40°C
- Injection volume Programe
- Mobile phase A : 40mMNaH₂PO₄(pH7.8)
B : ACN : MeOH : DW (45:45:10)

Time	A(%)	B(%)	Flow rate(mL/min)
0.00	95	5	1.5
31.00	44	56	1.5
33.00	44	56	1.5
34.00	0	100	1.5
38.00	0	100	1.5

Stop time : 38분 Post time : 3분

- Detector

Signal(nm)	Bw(nm)	Reference(nm)	Bw(nm)
338	4	450	20
262	4	450	20

④ Canavanine 분석

전처리 과정				
검체채취(10~100 mg) ↓ 1% phenolin 6 NHCl 200 uL 첨가 (gas phase hydrolysis) ↓ 탈기 및 질소충전(Work station 이용) ↓ 가수분해 (110 ℃, 22~24 시간) ↓ 잔류 염산 제거(진공건조, Work station 이용) ↓ 초순수로 정용(5~10 mL) ↓ 여과(0.45 um) ↓ 기기분석				
표준용액의 조제				
mg/100mL	Stock	STD 1	STD 2	STD 3
canavanine	114.6	2.2920	5.73	11.46
표준용액 조제	Stock	11.46mg/100mL로 제조(100%)		
	STD 1	STD 3을 5배 희석		
	STD 2	STD 3을 2배 희석		
	STD 3	Stock 10배 희석		
std-L-canavanine(C1625, Lot# SLBF8202V)				
HPLC 분석조건				
• Column	CapcellpakUG120C18 (250mm × 4.6mm, 5μm)			
• Column temperature	40°C			
• Injection volume	Programe			
• Mobile phase	A : 40mMNaH ₂ PO ₄ (pH7.8) B : ACN : MeOH : DW (45:45:10)			
Time	A(%)	B(%)	Flow rate(mL/min)	
0.00	95	5	1.5	
31.00	44	56	1.5	
33.00	44	56	1.5	
34.00	0	100	1.5	
38.00	0	100	1.5	
Stop time : 38분 Post time : 3분				
• Detector				
Signal(nm)	Bw(nm)	Reference(nm)	Bw(nm)	
338	4	450	20	
262	4	450	20	

(다) 작두콩 발효물 추출

발효 작두콩은 *Aspergillus oryzae*을 배양액 3%농도로 접종하고 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 $50\pm 5\%$ 에서 36시간 동안 발효시켰다. 추출물 제조는 분말 상태인 시료에 용매(정제수, 30% 에탄올, 80% 에탄올)를 첨가하고, 열수 추출물 제조는 100°C 에서 4시간 추출, 30% 주정 추출물 및 80% 주정 추출물 제조는 상온에서 12 시간 추출 후, 감압여과 장치에서 여과한 후 감압농축기를 사용하여 추출용매를 제거한 후 동결 건조하여 실험에 사용하였다.

(2) 발효작두콩의 독성시험

(가) 실험동물

실험에 사용한 동물은 약 8주령 암컷, 수컷 ICR 마우스이며 일주일 동안 설치류 사육실에서 적응시킨 후 적응기간 중 일반 상태를 관찰하여 건강한 개체만 실험에 사용하였다. 사육환경은 온도 $23\pm 3^{\circ}\text{C}$ 습도 $50\pm 5\%$ 에서 Light cycle은 12 시간으로 유지하였다. 순화기간 중 건강하다고 판정된 동물에 대하여 체중을 측정하고 평균체중에 가까운 개체를 선택하여 무작위법을 이용하여 군 분리를 실시하였다. 발효 작두콩 추출물을 0 g/kg b.w./day , 0.5 g/kg b.w./day , 1 g/kg b.w./day 로 단회(1회) 및 반복(14일) 경구 투여를 통하여 독성검사를 실시하였다. 투여를 하는 기간 동안 이상증상과 생존율을 관찰하였고 14일 동안의 관찰이 끝난 후 동물을 희생시켜 부검하여 장기의 이상증상 유무를 관찰하고 혈액분석을 실시하였다.

(나) 혈액분석

동물을 희생시켜 얻은 혈액을 16000 rpm에서 20분 동안 원심 분리하여 혈청을 얻어서 다음 시험에 사용하였다.

- ① AST : ELISA용 96-well plate에 각 well당 1×10^6 cells을 $200\ \mu\text{L}$ assay buffer로 homogenize 시킨 후 원심 분리 후 assay buffer로 희석시켰다. 96-well plate에 각 well당 $50\ \mu\text{L}$ sample을 넣어주고, $100\ \mu\text{L}$ Reaction mix를 넣어준 후 1시간 동안 37°C 에서 incubation 시킨 뒤 450 nm 에서 흡광도를 측정하였다.
- ② ALT : ELISA용 96-well plate에 각 well당 1×10^6 cells을 $200\ \mu\text{L}$ assay buffer로 homogenize 시킨 후 원심 분리 후 assay buffer로 희석시켰다. 96-well plate에 각 well당 $20\ \mu\text{L}$ sample을 넣어주고, $100\ \mu\text{L}$ Reaction mix를 넣어준 후 1시간 동안 37°C 에서 incubation 시킨 뒤 570 nm 에서 흡광도를 측정하였다.
- ③ Creatine : ELISA용 96-well plate에 각 well당 $50\ \mu\text{L}$ sample에 $50\ \mu\text{L}$ assay buffer를 섞은 후 $50\ \mu\text{L}$ Reaction mix를 넣어주었다. 1시간 동안 37°C 에서 incubation 시킨 뒤 570 nm 에서 흡광도를 측정하였다.
- ④ Glucose : ELISA용 96-well plate에 각 well당 $2\ \mu\text{L}$ sample에 $50\ \mu\text{L}$ assay buffer를 섞은 후 $50\ \mu\text{L}$ Reaction mix를 넣어준 후 30분 동안 37°C 에서 incubation 시

킨 뒤 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

- ⑤ Urea : ELISA용 96-well plate에 각 well당 2×10^6 cells을 100 μ L assay buffer로 homogenize 시킨 후 원심 분리 후 10 μ L sample에 50 μ L씩 assay buffer를 넣어 주고, 50 μ L씩 Reaction mix를 넣어준 후 1시간 동안 37°C에서 incubation 시킨 뒤 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(3) 동물 실험을 통한 발효작두콩 추출물의 피부과민반응 억제 효능 평가

(가) 실험동물

실험동물인 수컷 6주령의 NC/Nga mice와 정상대조군에 사용할 Balb/c mice를 중앙실험동물(주)(seoul, korea)에서 공급 받아 동물 사육실에서 일정한 조건(온도: $23 \pm 2^\circ$ C, 상대습도: $50 \pm 5\%$, 명암: 12시간 light/dark cycle)으로 1주일 동안 주위 환경에 적응 시킨 후 사용하였다. 적응기간 중 건강하다고 판정된 동물에 대하여 평균체중에 가까운 개체를 선택하여 무작위법을 이용하여 각 군당 8마리의 마우스를 이용하여 군 분리를 하였다. 정상대조군(Normal control), 아토피대조군(AD control), 작두콩 열수 추출물 300 mg/kg b.w식이 투여군 (CGH), 작두콩 주정 30% 300 mg/kg b.w 식이 투여군(CG30), 작두콩 주정 80% 300 mg/kg b.w 식이 투여군(CG 80), 발효 작두콩 열수 300 mg/kg b.w 식이 투여군(FCGH), 발효 작두콩 주정 30% 300 mg/kg b.w 식이 투여군(FCG30), 발효 작두콩 80% 300 mg/kg b.w 식이 투여군(FCG80)으로 분리하여 정상대조군을 제외한 모든 군의 마우스는 아토피 피부염을 유발하였다. 모든 식이는 AIN93G를 기본으로 제작하였으며, 식이와 음수는 자유공급 하였다. 아토피 동물모델인 NC/Nga mice는 specific pathogen free(SPF) 환경에서는 정상이지만, 일반 환경에서는 3-4주 후 가려움증을 수반하며 아토피 피부염이 유발된다. 따라서 아토피 피부염을 유발하기 위하여 NC/Nga mice는 여과시설이 없는 일반 환경에 노출시켰고 10주 후 모든 동물을 희생시켰다.

(나) 가려움에 대한 행동학적 분석

20분간 automatic video camera(Sony TRV, Tokyo, Japan)를 이용하여 촬영하고 얼굴, 귀, 목을 비롯한 전신을 긁는 횟수를 측정하여 기록하였다. NC/Nga mice의 소양증에 대한 유형은 개체 간에 다양하므로 긁는 횟수를 20분 동안 측정하여 군 간의 유의성을 통계학적으로 분석하였다.

(다) 경표피 수분 증발량 측정

피부 측정 기기인 CM825(Courage & Khazaka GmbH, Cologne, Germany)을 이용하여 아토피 피부염 상태에서 변화하는 피부수분지수를 측정 및 분석하였다. 희생 전 동물의 귀 부위 피부를 5회 연속 측정하여 평균값을 얻었으며 측정 장소는 실내온도 21~23°C, 습도 50~60%가 유지되는 조건에서 측정하였다.

(라) H&E와 Toluidine blue 염색

아토피 NC/Nga 마우스를 제모하여 피부조직을 10% formalin에 고정시켜 파라핀 포매한 후 파라핀 블록의 제작을 위해 냉각은 자동 포매장치(Tissue-TEX 4701, Sakura Co., Japan)를 사용하였다. 제작된 블록은 회전식 미세 박절기(Rotary Microtome 2040, Sakura Co., Japan)를 사용하여 조직을 수직방향으로 7 μm 두께로 연속 절편 하여, 부유 온수조와 신전기 과정을 거쳐 슬라이드에 부착시켰다. 제작된 조직 슬라이드는 동물표피의 조직학적 관찰을 위해 Hematoxylin & Eosin(H&E) 염색을, 비만세포(mast cells)를 염색하는 toluidine 염색을 실시하여 면역세포들의 침윤을 관찰하였다.

(마) 비장세포 배양 및 T세포 및 B세포 증식능 측정

동물에서 분리한 비장은 PBS로 세척한 후 0.45 μm cell strainer를 사용하여 단일 세포 부유액을 만들었다. 단일 세포 부유액을 10% fetal bovine serum(Hyclone Laboratories, Logan, Utah, USA), 2 mmol/L-glutamine(Hyclone Laboratories, Logan, Utah, USA), 100 mg/L penicillin-streptomycin(Hyclone Laboratories, Logan, Utah, USA)를 첨가한 RPMI-1640(Hyclone Laboratories, Logan, Utah, USA)으로 세척 후 red blood cell lysing buffer(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)로 적혈구를 용혈시켜 비장세포 부유액을 만들어 96 well plate에 각 well 당 1×10^6 cells/well을 200 μL 씩 분주 하였다. T 세포 증식능 측정을 위하여 concanavalin A(ConA) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 5 $\mu\text{g/mL}$ 를 처리하였고, B세포 증식능 측정을 위하여 lipopolysaccharide(LPS)(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 5 $\mu\text{g/mL}$ 를 처리한 후 48시간 동안 37° C에서 배양하였다. 48시간 후, EZ-Cytox(Deilab INC, Korea)를 20 μL 씩 분주하고 4시간 동안 37° C에서 배양시킨 뒤 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

(바) Cytokines 측정

비장세포를 96 well plate에 각 well당 1×10^6 cells/well을 200 μL 씩 분주 후, ConA 5 $\mu\text{g/mL}$ 를 처리하여 IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ 의 생성을 자극시켰고, LPS 5 $\mu\text{g/mL}$ 를 처리하여 TNF- α , IL-6의 생성을 자극 시켰다. IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ 은 24시간 배양 후에, IFN- γ 은 72시간 배양 후에 상층액을 수집하였다. 상층액의 cytokine의 양은 DuoSet sandwich ELISA mouse kit(R&D System, McKinley Place NE, MN, USA)를 이용하여 측정하였다.

ELISA용 96-well plate에 각 cytokine 측정에 특성화 된 1차 항체를 PBS에 희석 후 100 μL 씩 분주해 하루 동안 처리한 후, 그 다음날, washing buffer (PBST, 0.05% Tween 20 in PBS)로 1차 항체를 씻어낸 뒤, 항체가 붙지 않은 plate의 다른 공간을 메워주기 위해 assay buffer (1% BSA in PBS (IL-4, -6, -10, TNF- α) 또는 0.1% BSA in TBST (IL-2, IFN- γ))를 넣어 2시간 동안 처리한 뒤 washing buffer로 씻어냈다. Standard curve를 위한 용액과 위에서 seeding한 비장세포의 배양액을 100 μL 씩 각 well에 넣어 2시간 동안 반응시킨 후, 반응이 끝난 뒤 washing buffer로 씻어내고 assay buffer

에 2차 항체를 희석시켜 준비한 뒤 각 well에 100 μ L씩 분주하고 2시간 동안 처리하였다. 이 과정이 끝나면 washing buffer를 이용해 plate를 씻어내고 발색을 도와주는 substrate시약을 100 μ L씩 넣어 반응 시킨 뒤 570 nm에서 흡광도를 측정하고 Standard curve를 이용해 세포에서 생성된 cytokine의 양을 계산하였다.

(사) 혈중 면역 글로블린 측정

동물을 희생시켜 얻은 혈액을 16,000rpm에서 20분간 원심분리하여 혈청을 얻은 후 mouse immunoglobulin E(IgE), mouse immunoglobulin G1(IgG1), mouse immunoglobulin G2a(IgG2a) ELISA kit(abcam, USA)를 이용하여 IgE, IgG1, IgG2a를 측정하였다.

(아) 혈중 히스타민 측정

동물을 희생시켜 얻은 혈액을 16,000rpm에서 20분간 원심분리하여 혈청을 얻은 후 mouse histamine ELISA kit(LDN, Nordhorn, Germany)를 이용하여 측정하였다.

(자) 통계처리

본 실험 결과는 SPSS(Statistical Package for Social Science, version 20.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 통계프로그램을 이용하여 각 실험군의 mean \pm SD로 표시하였고, 군 간의 통계적 유의성을 Duncan's multiple range test로 실시하여 유의성 $p < 0.05$ 수준에서 검정하였다.

나. 결과

(1) 작두콩 발효 및 시료표준화

(가) 작두콩 분말과 발효 작두콩 분말의 필수아미노산 함량

발효란 미생물이 자신의 효소로 유기물을 분해 또는 변화시켜 특유한 최종산물을 만들어내는 현상을 말한다. 무산소호흡을 하는 생물들은 유기물을 완전히 분해시키지 못하고 다른 종류의 유기물을 만들어내기도 하는데 미생물의 종류와 발효의 방법에 따라 유기물이 분해되어 생성되는 최종산물이 달라진다. 본 과제에서는 유산균과 황국균을 사용하여 작두콩 분말을 발효하여 변화되는 아미노산 성분들을 비교하였다.

필수아미노산 성분을 비교한 표는 Table 1과 같다. 메티오닌(Met)과 트립토판(Trp)을 제외한 필수아미노산의 함량은 발효를 함으로서 함량이 증가되었음을 확인하였다. 히스티딘(His)의 함량은 황국균(*Aspergillus oryzae*) 32시간 발효한 작두콩에서 가장 높은 함량이 나왔다. 아르기닌 함량에서는 발효를 하지 않은 작두콩에서 9.95 mg/g인 반면 발효한 작두콩 중 황국균(*Aspergillus oryzae*) 32시간, 36시간 발효한 작두콩에서 11.01 mg/g으로 가장 높았다. 발린(Val)의 함량은 *Lactobacillus brevis* 발효 작두콩이 11.02 mg/g으로 가장 높았고, 황국균(*Aspergillus oryzae*) 32시간 발효(10.89 mg/g),

Lactobacillus plantarum subsp. *plantarum* 발효(10.86 mg/g), 황국균(*Aspergillus oryzae*) 36시간 발효(10.71 mg/g) 순으로 높았다. 메티오닌(Met)의 함량은 발효하지 않은 작두콩(9.85 mg/g)에 비교하여 모든 발효 작두콩에서 함량이 낮아졌다. *Bacillus licheniformis* 발효(9.03 mg/g)가 발효균중에 가장 높은 함량이었으며 다음으로 황국균(*Aspergillus oryzae*) 36시간 발효(8.80 mg/g)가 높았다. 페닐알라닌(Phe)의 함량은 황국균(*Aspergillus oryzae*) 36시간 발효(11.18 mg/g), 황국균(*Aspergillus oryzae*) 36시간 발효(11.16 mg/g) 순으로 높은 함량을 보였다. 아이소루신(Ile)과 루신(Leu)의 함량은 *Lactobacillus brevis* 발효에서 가장 높아졌고, 다음으로 황국균(*Aspergillus oryzae*) 32시간 발효에서 높았다. 트립토판(Trp) 함량은 대부분 낮아졌지만 *Lactobacillus acidophilus* 발효, *Lactobacillus brevis* 발효, *Lactobacillus fermentum* 발효에서는 높아졌음을 확인하였다.

유산균종 중에서는 *Lactobacillus brevis* 발효에서 필수아미노산의 함량이 가장 높아졌고 다음으로 황국균(*Aspergillus oryzae*) 32시간 발효, *Lactobacillus fermentum* 발효, 황국균(*Aspergillus oryzae*) 36시간 발효 순으로 필수아미노산의 함량이 높아졌음을 확인하였다.

Table 1. Essential amino acid composition of *Canavalia gladiata* and Fermented *Canavalia gladiata*

EAA (mg/g)	<i>Canavalia gladiata</i>	Fermented <i>Canavalia gladiata</i>							
		<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Aspergillus oryzae</i> (32h)	<i>Aspergillus oryzae</i> (36h)
His	7.86	8.06	8.31	8.25	8.16	8.05	8.04	8.40	8.20
Arg	9.95	10.08	10.39	10.56	10.13	10.14	10.36	11.01	11.01
Val	10.34	10.57	11.02	10.75	10.68	10.86	10.66	10.89	10.71
Met	9.85	5.64	7.06	6.66	7.24	8.40	9.03	8.21	8.80
Phe	10.45	10.77	11.07	11.15	11.03	10.56	10.78	11.16	11.18
Ile	8.70	9.05	9.38	9.28	9.24	8.92	9.07	9.36	9.12
Leu	17.35	17.98	18.68	18.61	18.30	17.78	17.87	18.42	18.04
Lys	13.13	15.68	16.14	15.90	15.43	15.07	14.45	14.70	14.88
Trp	2.22	2.25	2.41	2.39	2.14	2.05	1.85	2.02	1.49
Total	89.86	90.08	94.46	93.56	92.35	91.83	92.10	94.17	93.42

(나) 작두콩 분말과 발효 작두콩 분말의 비필수아미노산 함량

비필수아미노산 함량 변화에 대한 결과는 Table 2와 같다. 아스파르트산(Asp)은 *Lactobacillus acidophilus* 발효와 *Lactobacillus helveticus* 발효를 제외한 모든 발효 작두콩에서 함량이 낮아졌다. 세린(Ser)의 함량은 *Bacillus licheniformis* 발효를 제외한 모든 발효 작두콩에서 발효하지 않은 작두콩에 비교하여 함량이 높아졌다. *Lactobacillus brevis* 발효 (14.68 mg/g), 황국균(*Aspergillus oryzae*) 36시간 발효 (14.66 mg/g), *Lactobacillus fermentum* 발효, 황국균(*Aspergillus oryzae*) 32시간 발효 (14.65 mg/g)순으로 함량이 높았다. 글라이신(Gly)의 함량은 발효한 작두콩에서 모두 높아졌음을 확인하였고, 특히 *Lactobacillus fermentum* 발효(11.00 mg/g)에서 가장 높았다. 티로신(Tyr)의 함량은 *Lactobacillus acidophilus* 발효, *Lactobacillus fermentum* 발효, *Lactobacillus helveticus* 발효에서는 함량이 감소되었으며 나머지 발효 작두콩은 증가되었다. 프롤린(Pro)의 함량은 황국균(*Aspergillus oryzae*) 발효보다 유산균 중 발효에서 더 증가되었다. 총 비필수아미노산의 함량의 변화를 비교하였을 때 유산균 중 발효에서 더 함량이 증가되었음을 확인하였다.

(다) 작두콩 분말과 발효 작두콩 분말의 canavanine 함량

Canavanine은 작두콩에 함유되어 있는 글로불린성 단백질로서 아미노산의 일종이지만, 단백질 합성에 참여할 수 없는 아미노산이기 때문에 초식동물에게 해로운 작용을 하는 것으로 콩과식물에서 관찰할 수 있다. canavanine은 구조적으로 알기닌과 거의 흡사하여, 단백질 합성 시 알기닌이 결합되어야 할 부분에 canavanine이 들어가 단백질 합성을 방해하게 되므로 애벌레등의 벌레들이 canavanine 섭취로 사망하게 되어 콩과식물은 피해를 막을 수 있도록 하는 단백질이다. 항염작용을 한다는 면에서 천연물 약성의 효능을 가지고 있어 과거에 사용되기도 하였지만 루푸스 등의 자가면역 질환을 유발한다는 연구결과가 있어 독성에 대해 고려해야 한다[28]. 따라서 canavanine은 식물이 자신을 보호하기 위한 물질이지만 인체에서는 면역반응을 자극시켜 해가 될 수 있는 아미노산이므로 그 함량을 측정하여 발효가 미치는 영향을 살펴보았다. 그 결과 발효하지 않은 작두콩의 canavanine의 함량 42.02 mg/g과 비교하여 유산균 중의 발효에서는 모두 함량이 증가하였음을 확인하였다. 반면 황국균(*Aspergillus oryzae*) 36시간 발효에서는 38.32 mg/g으로 가장 함량이 낮아졌음을 확인하였다(Table 3). 따라서 본 연구에서는 canavanine의 함량을 가장 감소시킨 황국균(*Aspergillus oryzae*) 36시간 발효 작두콩을 이용하여 과민성 피부질환에 대한 억제 효과를 측정하였다.

(라) 발효작두콩 추출물의 수득률 및 표준화

황국균 발효작두콩 추출물의 수득률은 각각 물추출물은 10.2%, 30%주정추출물은 6.1%, 80% 주정 추출물은 3.0%이었다. 효능평가에서 활성이 나타난 30%주정추출물을 3번 반복을 통하여 얻은 canavanine의 함량을 측정하여 추출의 표준화를 확인하였다. 발효작두콩 30%주정추출물의 canavanine 함량은 154.08 ± 8.95 mg/g로 나타났다.

Table 2. Non-essential amino acid composition of *Canavalia gladiata* and Fermented *Canavalia gladiata*

NEAA (mg/g)	<i>Canavalia gladiata</i>	Fermented <i>Canavalia gladiata</i>							
		<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Aspergillus oryzae</i> (32h)	<i>Aspergillus oryzae</i> (36h)
Asp	25.94	27.25	25.68	26.36	26.07	25.42	25.57	25.91	25.43
Glu	30.38	30.64	31.60	31.58	31.12	29.79	30.15	32.32	31.40
Ser	13.89	14.08	14.68	14.32	14.36	14.03	13.87	14.65	14.66
Gly	9.34	9.73	9.80	10.04	9.81	9.64	9.58	9.79	9.63
Thr	11.97	11.43	11.76	11.37	11.70	11.69	11.47	12.14	12.34
Ala	10.14	10.95	10.60	11.00	10.87	10.63	10.56	10.53	10.31
Tyr	4.66	4.26	4.71	4.55	4.55	4.73	5.13	4.89	4.85
Pro	11.49	11.99	17.03	16.21	16.07	14.40	10.40	8.57	10.87
Cys	6.11	7.89	7.74	7.37	7.10	7.04	7.44	7.47	6.88
Total	123.90	128.22	133.59	132.79	131.64	127.37	124.17	126.27	126.36

Table 3. Effect of *Canavalia gladiata* and Fermented *Canavalia gladiata* on canavanine content

Canavanine (mg/g)	<i>Canavalia gladiata</i>	Fermented <i>Canavalia gladiata</i>							
		<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Aspergillus oryzae</i> (32h)	<i>Aspergillus oryzae</i> (36h)
Canavanine (mg/g)	42.02	43.17	44.75	44.96	43.68	42.49	43.73	41.16	38.32

(2) 발효작두콩의 독성시험

(가) 단회 독성 평가

발효작두콩 추출물을 농도별로 단회 경구 투여하여 1주 동안 일반증상, 체중변화와 사망률, 부검소견을 관찰한 결과 사망동물은 관찰되지 않았으며, 일반증상 관찰결과 이상증상 또한 관찰되지 않았다. 따라서 단회 독성 평가에서 안전성을 확인하여 반복 독성 시험을 실시하였다.

(나) 반복 독성 평가

발효작두콩 추출물 농도별로 일주일동안 1회/1일 경구투여하여 2주 동안 일반증상, 체중변화와 사망률, 부검소견을 관찰한 결과 사망동물은 관찰되지 않았으며, 식이효율(Food efficiency rate, FER)의 군간 유의적인 차이를 보이지 않았다. 일반증상과 부검 관찰결과 또한 이상 증상이 관찰되지 않았다. 독성검사를 위하여 혈액분석을 통하여 AST, ALT, Creatine, Glucose, Urea 수치를 비교하였다. Female, Male 모두에서 군간 유의적인 차이를 보이지 않아 1 g/kg b.w./day 농도까지 독성이 없었음을 확인할 수 있었다 ($P<0.05$)(Table 4,5). 안전성이 검증된 농도 안에서 산업화의 단가문제, 상품화 하였을 때 인체에 적용할 수 있는 농도의 범위를 고려하여 300 mg/kg b.w./day의 농도에서의 피부과민 반응 억제 효능을 살펴보기로 하고 동물실험을 실시하였다.

Table 4. Repeated oral administration of Fermented *Canavalia gladiata* for 2 weeks on male ICR mice

	Control	Fermented <i>Canavalia gladiata</i>	
		0.5 g/kg b.w.	1 g/kg b.w.
Survivability coefficient(%)	100 (4/4)	100 (4/4)	100 (4/4)
FER ^D	1.48 ± 0.51 ^{NS}	0.97 ± 0.8	1.01 ± 0.69
AST (mU/mL)	24.38 ± 2.45 ^{NS}	23.17 ± 2.93	25.07 ± 5.01
ALT (mU/mL)	42.25 ± 4.27 ^{NS}	43.15 ± 5.12	44.40 ± 7.32
Creatine (uM)	49.09 ± 6.43 ^{NS}	46.15 ± 5.04	51.77 ± 6.19
Glucose (mM)	4.29 ± 0.71 ^{NS}	4.18 ± 0.81	3.98 ± 1.02
Urea (mM)	1.11 ± 0.09 ^{NS}	1.02 ± 0.04	0.91 ± 0.04

1) FER (Food efficiency rate) = { weight (g) / food intake (g) } * 100

The results were presented means ± SD. Different letters show a significantly difference at $p<0.05$ as determined by Duncan's multiple range test.

Table 5. Repeated oral administration of Fermented *Canavalia gladiata* for 2 weeks on female ICR mice

	Control	Fermented <i>Canavalia gladiata</i>	
		0.5 g/kg b.w.	1 g/kg b.w.
			
Survivability coefficient(%)	100 (4/4)	100 (4/4)	100 (4/4)
FER ¹⁾	0.70 ± 0.53 ^{NS}	0.66 ± 0.38	0.68 ± 0.34
AST (mU/mL)	23.71 ± 3.54 ^{NS}	26.11 ± 4.41	25.83 ± 4.98
ALT (mU/mL)	29.58 ± 5.53 ^{NS}	31.53 ± 5.90	30.41 ± 6.34
Creatine (uM)	53.73 ± 7.53 ^{NS}	50.45 ± 4.04	52.64 ± 5.70
Glucose (mM)	2.88 ± 0.39 ^{NS}	3.63 ± 0.69	3.46 ± 0.47
Urea (mM)	0.80 ± 0.07 ^{NS}	1.06 ± 0.10	0.81 ± 0.09

1) FER (Food efficiency rate) = { weight (g) / food intake (g) } * 100

The results were presented means ± SD. Different letters show a significantly difference at $p < 0.05$ as determined by Duncan's multiple range test.

(3) 동물 실험을 통한 발효작두콩 추출물의 피부과민반응 억제 효능 평가

(가) 식이효율 및 장기무게 변화

식이효율은 모든 군간의 유의적인 차이가 없었음을 확인하였다. 면역세포가 밀집되어 있어 면역체계에서 가장 중요한 림프기관인 비장의 무게 변화를 관찰한 결과에서는 아토피 대조군에서 정상대조군과 유의적으로 무게가 증가되었음을 확인하였다($P < 0.05$). 비장은 항원이 제시되거나 면역반응이 급속하게 진행되면 이에 반응하여 크기가 증가하여 비장비대증이 유발되므로 아토피 유발에 의하여 무게가 유의적으로 증가되었음을 확인하여 면역반

응이 증가되었음을 확인하였다.($P<0.05$). 반면 CG 80, FCG30, FCG80에서는 아토피대조군과 비교하여 유의적으로 감소되었음을 확인하였다.($P<0.05$). 또한 간의 무게의 변화에서도 아토피대조군에서 정상대조군과 비교하여 유의적으로 무게가 증가되었음을 확인하였다.($P<0.05$). 아토피 유발에 의하여 활성산소가 증가되어 산화적 스트레스가 급격히 증가하는 것으로 알려져 있으며 이로 인하여 간세포의 염증이 유발될 수 있다[29]. 아토피 유발에 의하여 증가된 간의 무게가 FCG30에서 아토피대조군과 비교하여 유의적으로 감소되었음을 확인하였다.($P<0.05$)(Table 6)

(나) 피부 형태학적 변화 관찰

아토피 유발이 자연적으로 진행되는 NC/Nga mice의 피부를 정상군과 비교하여 살펴보았을 때, 홍반, 부종, 건조, 혈종, 짓무름, 발진 등의 증상이 나타났음을 확인할 수 있었다. 이러한 아토피 피부염의 형태학적인 변화는 육안으로 살펴보았을 때 발효하지 않은 작두콩의 추출물보다는 발효 작두콩의 식이투여가 아토피 피부염 증상을 완화하였음을 알 수 있었다. 특히 FCG30, FCG80에서 아토피 피부염의 증상이 약화되었으며, 이러한 결과로 발효하지 않은 작두콩에 비교하여 발효한 작두콩의 추출물의 아토피 피부염 억제효능이 더 뛰어났음을 확인하였다(Figure 1).

Table 6. Effect of *Canavalia gladiata* extracts and fermented *Canavalia gladiata* extracts on FER and organ weights of NC/Nga mice.

Groups	Normal control	NC/Nga mice						
		AD control	CGH	CG30	CG80	FCGH	FCG30	FCG80
FER ¹⁾	0.037±0.009 ^{NS}	0.035±0.006	0.042±0.006	0.033±0.008	0.040±0.002	0.036±0.003	0.034±0.002	0.033±0.005
Spleen (g)	0.13±0.03 ^b	0.18±0.01 ^a	0.15±0.01 ^{ab}	0.16±0.03 ^{ab}	0.13±0.04 ^b	0.16±0.05 ^{ab}	0.12±0.03 ^b	0.13±0.03 ^b
Kidney (g)	0.49±0.04 ^{NS}	0.48±0.09	0.54±0.04	0.53±0.04	0.53±0.02	0.52±0.05	0.53±0.08	0.49±0.04
Liver (g)	1.33±0.09 ^c	1.62±0.11 ^a	1.54±0.07 ^{ab}	1.58±0.05 ^{ab}	1.54±0.06 ^{ab}	1.49±0.06 ^{ab}	1.47±0.11 ^b	1.49±0.09 ^{ab}

¹⁾FER = weight gain (g)/food intake calories (g)

The results were presented means ± SD. Different letters show a significantly difference at $p < 0.05$ as determined by Duncan's multiple range test.

Figure 1. Effect of *Canavalia gladiata* extracts and fermented *Canavalia gladiata* extracts on macroscopic morphological change of the back in mice.

NC/Nga mice

Normal
control

AD control

CGH

CG30

CG80

FCGH

FCG30

FCG80



(다) 가려움에 대한 행동학적 분석

아토피 피부염의 대표적인 증상은 가려움에 대한 반응을 확인함으로써 아토피 피부염 유발 정도를 평가하였다. 정상대조군 1.5 ± 0.6 과 비교하여 아토피대조군에서는 57 ± 12.5 으로 유의적으로 크게 긁는 횟수가 증가되었다($P < 0.05$). 추출물 식이투여 군에서는 각각 CGH 54.5 ± 9.3 , CG30 44 ± 11.0 , CG80 53 ± 12.1 , FCGH 58.5 ± 4.5 , FCG30 33 ± 10.4 , FCG80 30 ± 10.7 이었다. 아토피대조군과 비교하여 유의적으로 감소된 군은 FCG30와 FCG80이었음을 확인하였다($P < 0.05$). 이러한 결과를 통하여 발효를 하지 않은 추출물과 비교하여 발효를 한 후 추출한 작두콩에서 효능이 증가되었음을 확인할 수 있었다(Figure 2).

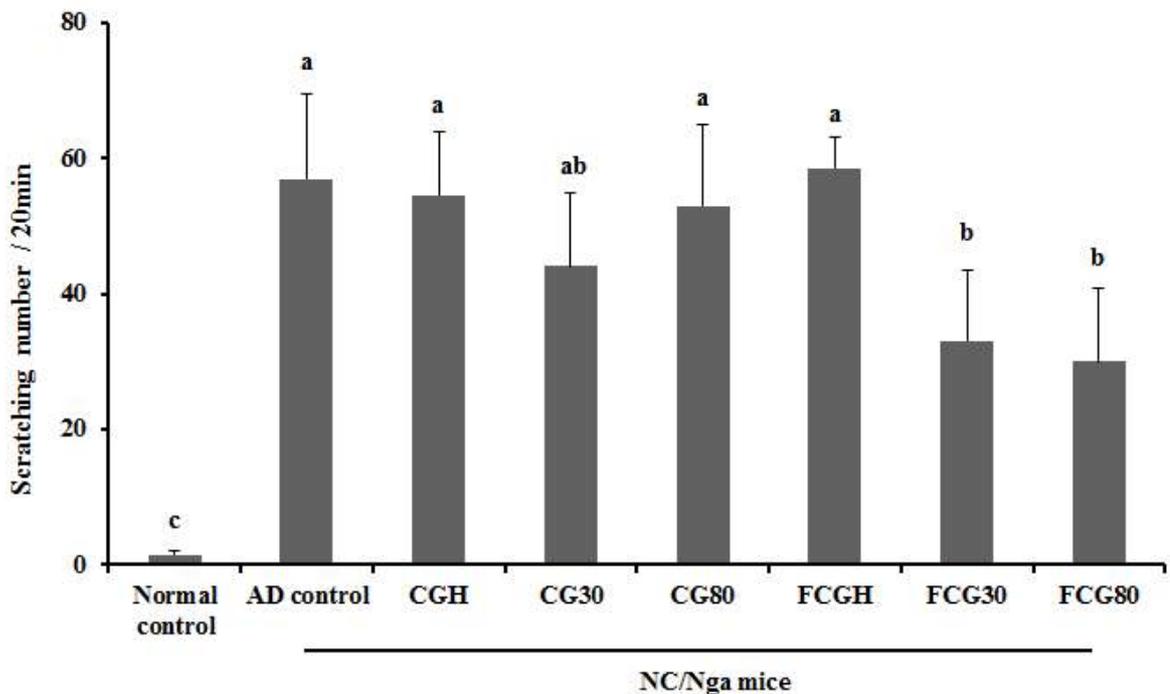


Figure 2. Effect of *Canavalia gladiata* extracts and fermented *Canavalia gladiata* extracts on scratching number in Nc/Nga mice.

The results were presented means \pm SD. Different letters show a significantly difference at $p < 0.05$ as determined by Duncan's multiple range test.

(라) 경표피 수분 증발량 측정

피부는 표피, 진피 및 피하지방의 세 개의 층으로 구성되어있으며, 표피는 각질세포(keratinocyte), 멜라닌세포(melanocyte), Langerhans세포 등으로 구성되어 각질층을 형성하며 진피를 보호하는 역할을 한다. 진피는 섬유아세포로부터 만들어지는 결체조직인 collagen fiber, elastin fiber와 기질(derma matrix)로 구성되어 피부의 탄력을 유지하는 기능을 한다. 표피의 가장 외층인 stratum corneum층은 외부의 침범에 대한 방어벽으로 작용할 뿐만 아니라, 피부내 수분량을 적절하게 유지시키는 역할을 한다. stratum corneum은 지질성분들로 이루어져 있으며 이러한 지질성분들의 감소는 피부건조를 유발하여 각질생성을 일으킨다. 아토피 피부염 환자의 피부의 표피에서 stratum corneum의 지질성분이 감

소되며 이러한 결과로 피부건조과 각질생성이 증가되고 가려움에 의하여 긁음으로서 표피층 손상이 일어나 더욱 그 현상이 악화된다. 따라서 피부의 수분 함량은 아토피 피부염 유발 정도를 평가하는 지표로 사용된다[30].

정상대조군은 39.2 ± 2.8 A.U 인 반면, 아토피대조군은 25.3 ± 0.4 A.U으로 표피 수분함량이 유의적으로 감소되었음을 확인하였다($P < 0.05$). 반면 모든 추출물의 식이투여군에서 유의적으로 수분함량이 증가되었으며, 특히 CG30, FCG30, FCG80 에서 각각 34.9 ± 1.9 A.U, 34.0 ± 2.0 A.U, 36.3 ± 0.8 A.U으로 나타나 추출물 식이투여군 중에서 유의적으로 높게 나타났다($P < 0.05$). 따라서 추출을 통하여 효능이 유의적으로 주정 80%에서 증가되었음을 확인하였다(Figure 3).

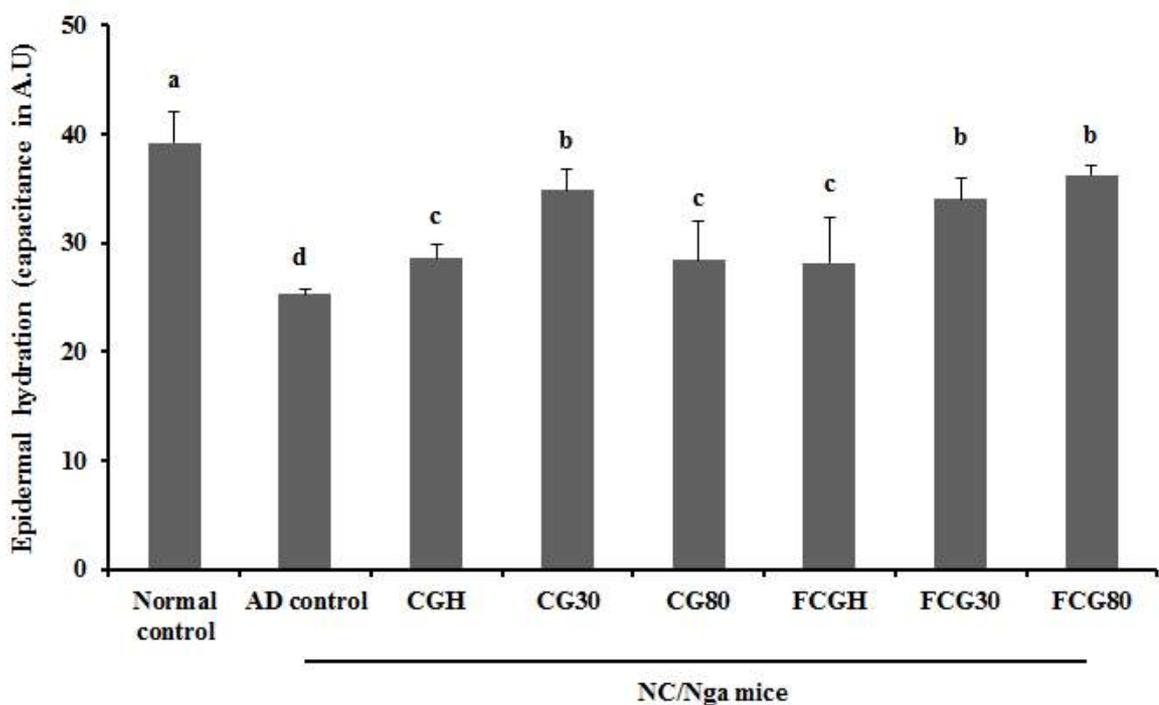


Figure 3. Effect of *Canavalia gladiata* extracts and fermented *Canavalia gladiata* extracts on epidermal hydration of skin in mice.

The results were presented means \pm SD. Different letters show a significantly difference at $p < 0.05$ as determined by Duncan's multiple range test.

(마) T세포 및 B세포 증식능

아토피대조군은 정상군과 비교하여 T세포의 증식능($83.0 \pm 1.4\%$)은 유의적으로 감소하였고 B세포의 증식능($121.0 \pm 10.5\%$)은 유의적으로 증가하였다($P < 0.05$). T세포 증식능은 FCG30($91.9 \pm 6.7\%$)에서 아토피대조군과 비교하여 유의적으로 증가하고 다른 실험군에서는 유의적인 차이를 보이지 않았다($P < 0.05$). 또한 B세포의 증식능에서도 FCG30($107.9 \pm 8.5\%$)군에서만 아토피대조군과 유의적인 차이를 보였고 다른 실험군에서는 유의적인 차이를 보이

지 않았다($P<0.05$)(Figure 4).

본 연구에서 아토피에 의하여 T세포의 증식능을 감소한 것으로 확인함으로써 T세포의 정상적인 기능이 상실되었음을 예측할 수 있었으며, B세포의 증가로 면역글로불린의 과생성에 의하여 IgE의 증가로 mast cell이 활성화되어 histamine생성을 촉진시켜 가려움을 유발하고 염증을 유발시킨 것으로 보인다. FCG30은 이러한 T세포와 B세포의 비정상적인 증식능을 억제시켜 아토피 피부염을 약화시킨 것으로 나타났다.

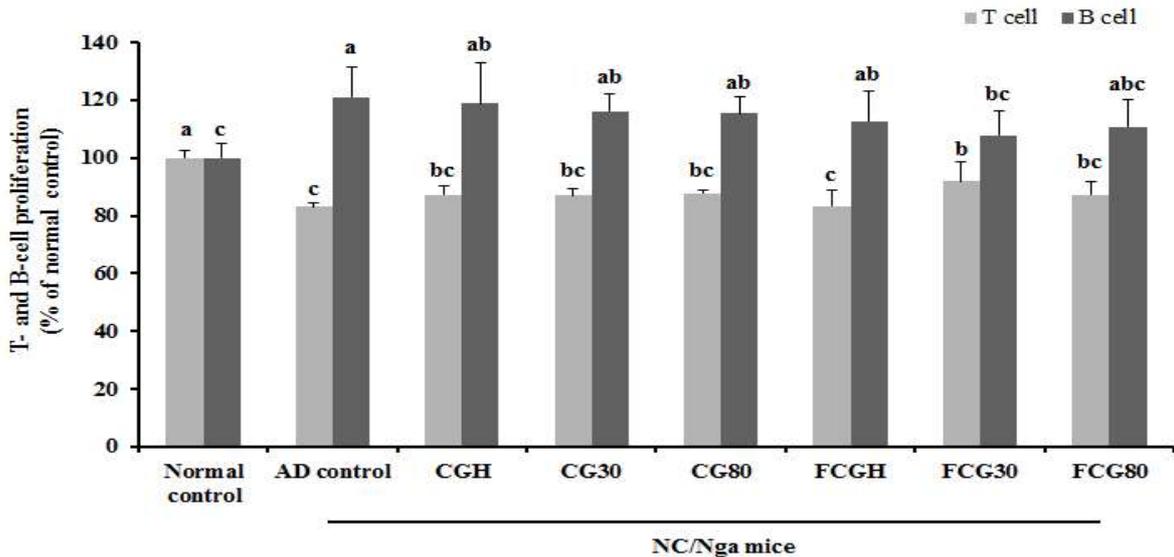


Figure 4. Effect of *Canavalia gladiata* extracts and fermented *Canavalia gladiata* extracts on T and B cell proliferation from primary splenocytes.

The results were presented means \pm SD. Different letters show a significantly difference at $p<0.05$ as determined by Duncan's multiple range test.

(바) Th1 cytokines 생성 변화

CD4⁺ Th 세포에는 Th1 type cytokines을 생성하는 Th1 세포와 Th2 type cytokines을 생성하는 Th2 세포가 있다. Th1 type cytokines은 주로 대식세포의 활성을 증가시켜 탐식작용을 자극하며, Th2 type cytokines은 B 세포의 활성을 자극시켜 항체생산을 증가시키는 역할을 한다. 이러한 Th1/Th2 type cytokines의 상호보완적인 조절에 의하여 면역 균형을 유지시키는데 아토피 상태에서는 Th1 type cytokines을 감소되어있고 Th2 type cytokines을 증가되어있다고 보고되고 있다. 이러한 cytokines 불균형은 면역 조절 능력을 떨어뜨리게 되어 아토피 현상을 만성으로 발전시키게 된다[31].

Th1 type cytokines인 IL-2와 IFN- γ 의 생성을 비교하였을 때 정상대조군에 비하여 아토피 대조군에서 유의적으로 감소되었음을 확인하였다. IL-2 생성은 FCG30군과 FCG80군에서 유의적으로 증가되었으며, IFN- γ 의 생성은 CG30군, FCG30군, FCG80군에서 유의적으로 증가되었음. 따라서 발효를 한 80% 주정 추출물이 발효를 하지 않은 추출물보다 효능이 유의적으로 증가되었음을 확인하였다($P<0.05$)(Figure 5).

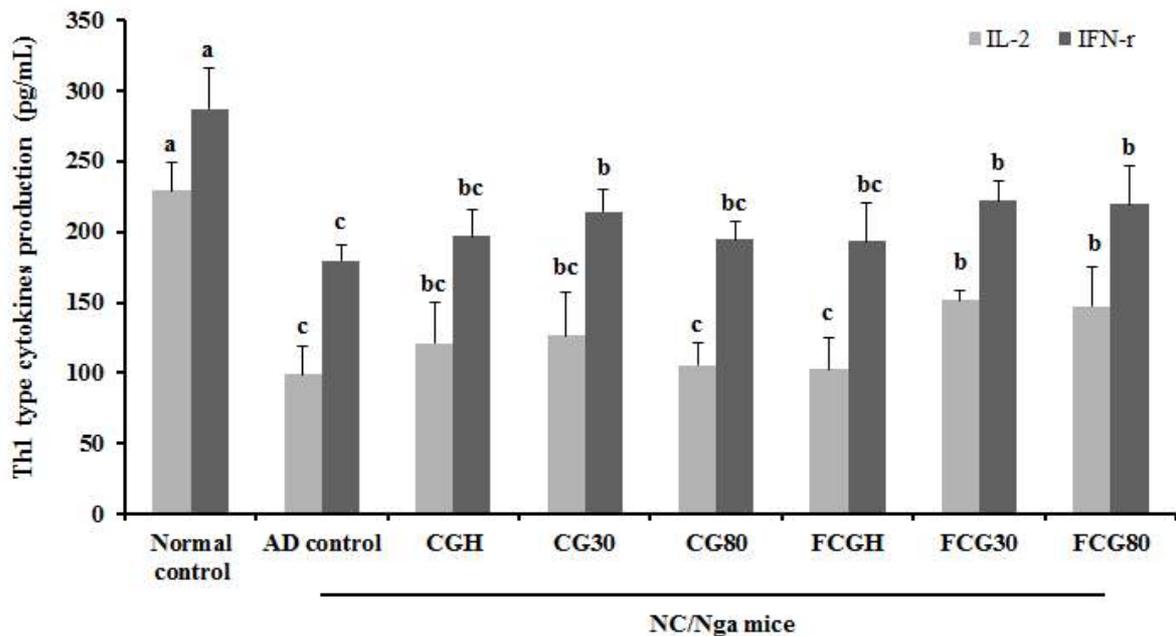


Figure 5. Effect of *Canavalia gladiata* extracts and fermented *Canavalia gladiata* extracts on Th1 type cytokines (IL-2, IFN- γ) production from ConA-stimulated primary splenocytes.

The results were presented means \pm SD. Different letters show a significantly difference at $p < 0.05$ as determined by Duncan's multiple range test.

(사) Th2 cytokines 생성 변화

Th2 type cytokines은 B세포에서 면역글로불린의 생산을 자극시켜 혈중 면역글로불린을 증가시켜 면역을 활성화시키게 한다. Th1 type cytokines의 증가는 Th2 type cytokines를 감소시켜 조절하게 된다. 정상대조군과 비교하여 아토피대조군에서 Th2 type cytokines인 IL-4와 IL-10 모두 생성량이 유의적으로 증가되었음을 확인하였다($P < 0.05$). 이러한 결과는 아토피대조군에서 Th1 type cytokines의 감소와 연관시켜 보았을 때 아토피가 Th1/Th2 type cytokines불균형을 일으킨 것을 확인할 수 있는 것이다.

IL-4 생성은 FCG30과 FCG80에서 유의적으로 아토피대조군에 비교하여 감소되었으며, IL-10 생성은 CG80을 제외한 실험군에서 아토피대조군에 비교하여 모두 유의적으로 감소되었다($P < 0.05$). 특히 FCG30과 FCG80에서 유의적으로 가장 많이 감소되었다($P < 0.05$). 따라서 발효 작두콩 추출물이 발효를 하지 않은 추출물보다 Th2 type cytokines 감소 효능이 뛰어났음을 확인할 수 있었다. Th2 type cytokines 감소 결과는 Th1 type cytokines 감소를 억제시킴으로서, Th1/Th2의 불균형을 감소시켜 면역 항상성 유지에 도움을 주는 것으로 해석된다(Figure6).

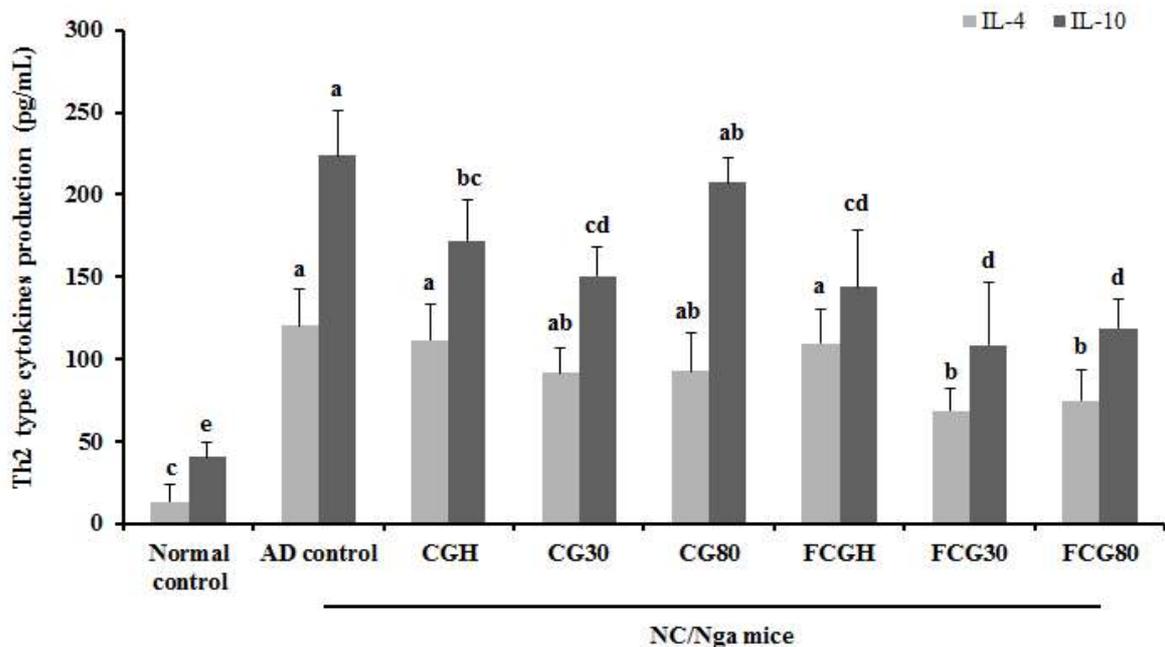


Figure 6. Effect of *Canavalia gladiata* extracts and fermented *Canavalia gladiata* extracts on Th2 type cytokines (IL-4, IL-10) production from ConA-stimulated primary splenocytes.

The results were presented means \pm SD. Different letters show a significantly difference at $p < 0.05$ as determined by Duncan's multiple range test.

(아) Pro-inflammatory cytokines 생성 변화

TNF- α 는 주로 활성화된 대식세포에 의해 분비되며, 다른 pro-inflammatory cytokine의 생성을 증가시켜 염증반응을 유도하고 apoptosis를 일으키므로 면역세포 활성 조절에 중요한 cytokine이다. 아토피 피부염 환자들에게서 TNF- α 의 발현이 증가되어있음이 보고된 바 있다[32]. TNF- α 의 생성은 정상대조군(84.8 ± 26.9 pg/mL)에 비교하여 아토피대조군(578.1 ± 32.4 pg/mL)에서 7배 정도 유의적으로 증가되었다. 증가된 TNF- α 의 생성은 CG30에서 450.3 ± 43.7 pg/mL, FCGH에서 429.2 ± 44.0 pg/mL, FCG30에서 398.1 ± 29.1 pg/mL, FCG에서 372.6 ± 65.0 pg/mL으로 유의적으로 감소되었다($P < 0.05$). IL-6는 아토피대조군에서 정상대조군과 비교하여 약 2배 증가되었으나 CG30, FCG30, FCG80에서 아토피대조군과 비교하여 유의적으로 감소되었다($P < 0.05$)(Figure7).

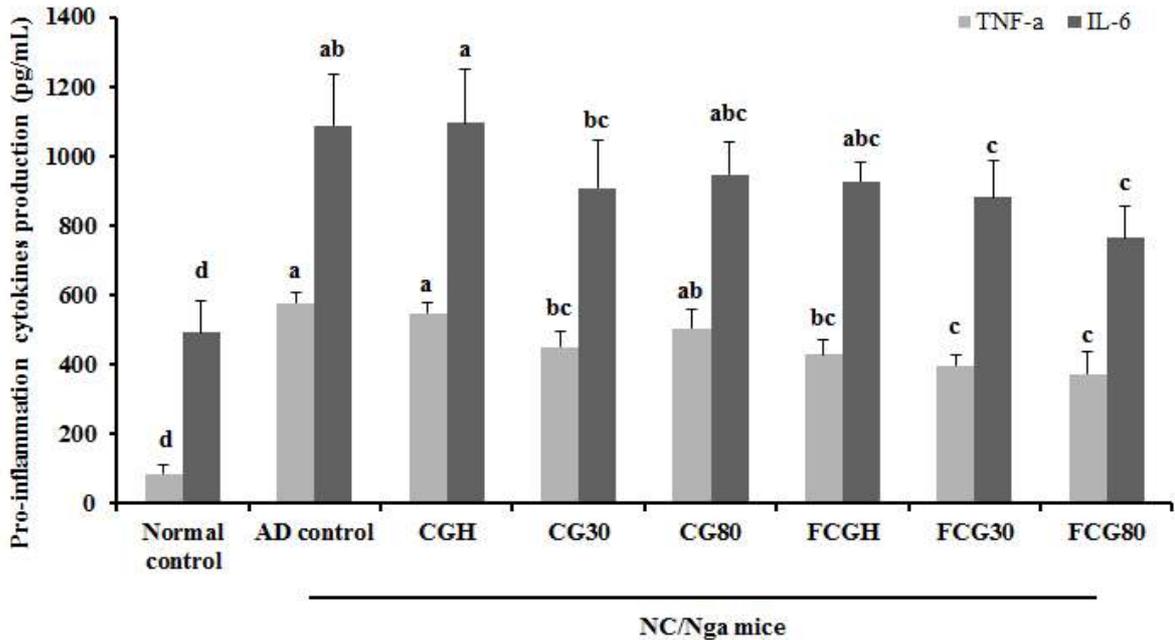


Figure 7. Effect of *Canavalia gladiata* extracts and fermented *Canavalia gladiata* extracts on pro-inflammatory type cytokines (IL-6, TNF-a) production from ConA-stimulated primary splenocytes.

The results were presented means \pm SD. Different letters show a significantly difference at $p < 0.05$ as determined by Duncan's multiple range test.

(자) 혈중 면역글로불린 농도 변화

알레르겐에 노출되게 되면 B 세포가 IL-4에 의하여 IgM이 IgG1과 IgE으로 isotype switching이 일어나게 되어 mast cell과 결합하여 자극시킴으로서 활성화시킨다. 반면 IFN- γ 의 분비감소로 IgG2a로의 isotype switching은 감소하게 된다[33]. 본 연구에서는 IgG1과 IgE, IgG2a의 혈중 농도를 비교하여 알레르겐 반응을 확인하였다.

IgG2a의 농도는 정상대조군과 비교하여 아토피대조군에서 6배정도 유의적으로 감소되었으며, IgG1과 IgE는 유의적으로 증가되었고 특히 IgE의 농도가 6배정도 크게 증가되었다 ($P < 0.05$). FCG80군에서만 IgG2a의 농도가 아토피대조군과 비교하여 유의적으로 감소되었으며 다른 실험군에서는 유의적인 차이를 보이지 않았다($P < 0.05$). IgG1의 농도 변화는 모든 실험군과 아토피대조군과 유의적인 차이를 보이지 않았지만, IgE의 농도는 FCG30과 FCG80에서 유의적으로 감소되었음을 확인하였다($P < 0.05$). 따라서 발효 작두콩의 추출물의 식이투여가 발효하지 않은 작두콩의 추출물보다 면역글로불린의 농도 변화를 감소시키는 데 효과적이었음을 확인하였다(Figure8).

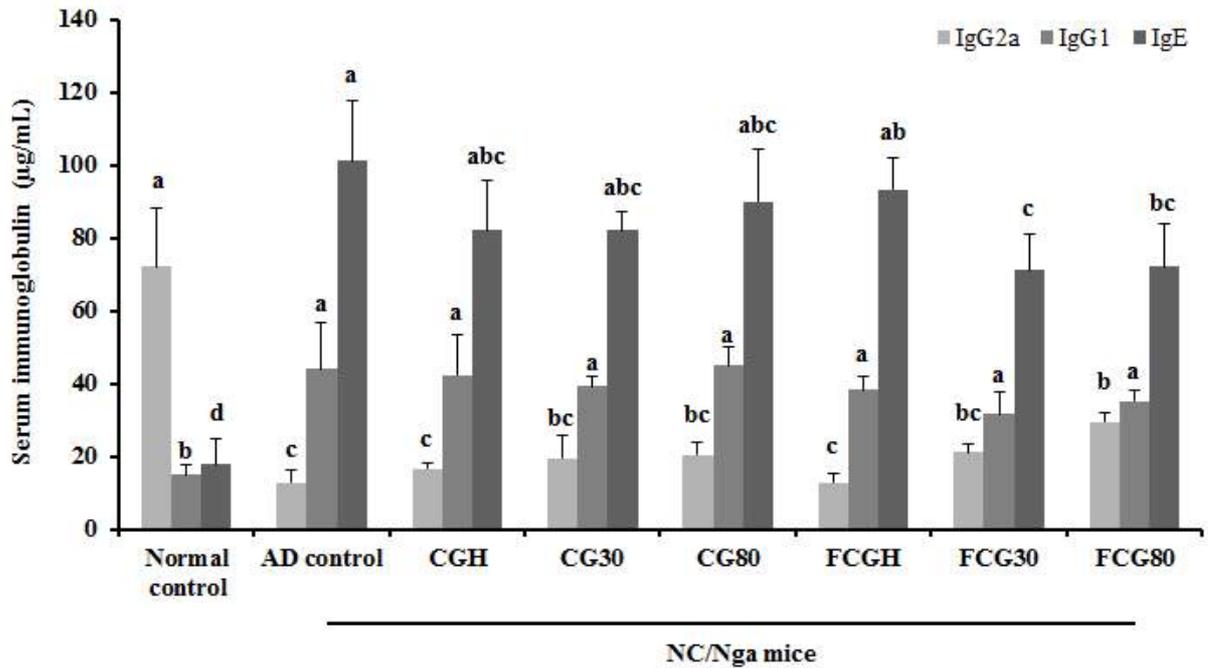


Figure 8. Effect of *Canavalia gladiata* extracts and fermented *Canavalia gladiata* extracts on serum IgE, IgG1 and IgG2a production in Nc/Nga mice.

The results were presented means \pm SD. Different letters show a significantly difference at $p < 0.05$ as determined by Duncan's multiple range test.

(차) 혈중 히스타민 농도 변화

히스타민은 mast cell안에 저장되어 있다가 mast cell이 자극되어 손상되면 방출되어 혈관의 이완과 투과성의 증가시켜 혈구와 여러 혈장단백질들이 세균이 침입한 부위로 빨리 이동할 수 있도록 하여 염증반응을 일으키게 된다. 과도한 면역반응으로 인한 히스타민의 과다 분비는 알러지 반응과 아나필락시스를 일으키기도 한다. B세포에서 생성된 과다한 IgE가 mast cell을 자극시켜 히스타민의 방출을 증가시키게 되므로, IgE와 함께 알레르기 증상을 평가하는 중요한 지표이다[33].

정상대조군에서 혈중 히스타민의 농도는 65.2 ± 4.1 nmol/L인 반면, 아토피대조군은 100.6 ± 15.4 nmol/L으로 유의적으로 증가되었다($P < 0.05$). 실험군 중에서 아토피대조군과 유의적으로 차이가 있는 군은 FCG30(77.2 ± 10.8 nmol/L)과 FCG80(82.4 ± 12.3 nmol/L)이었다($P < 0.05$). 따라서 혈중 히스타민 농도의 변화에서는 발효하지 않은 작두콩 추출물은 유의적인 효능을 보이지 않았으나, 발효 작두콩 주정 추출물에서는 유의적인 효능을 보였음을 확인할 수 있었다($P < 0.05$)(Figure 9).

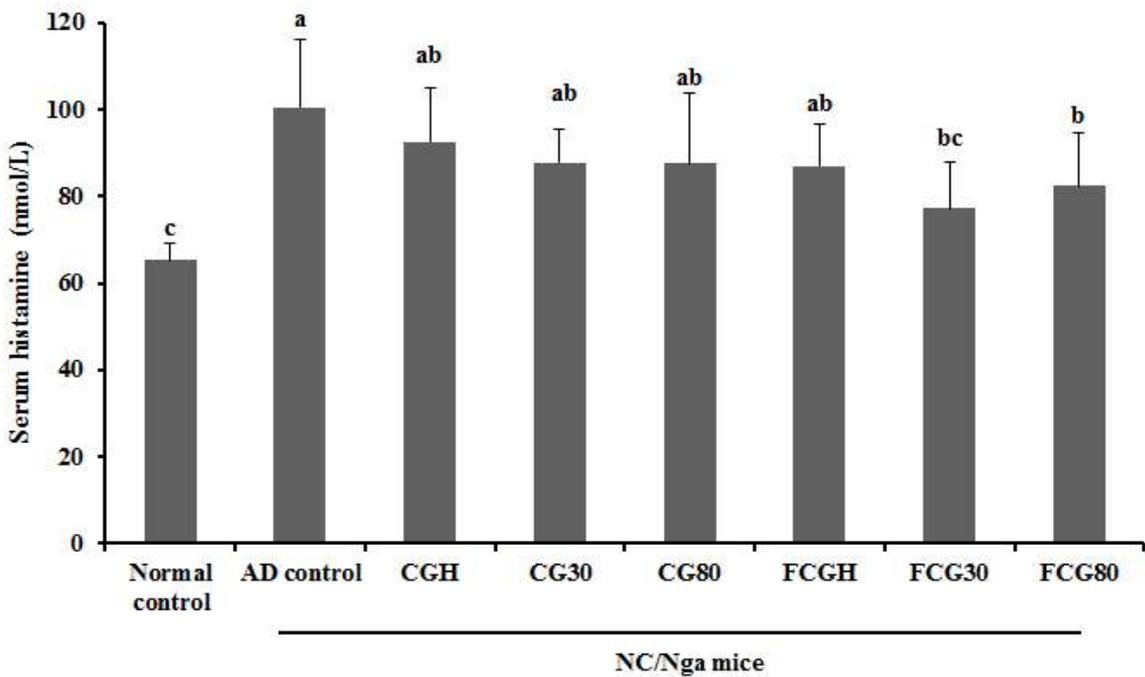


Figure 9. Effect of *Canavalia gladiata* extracts and fermented *Canavalia gladiata* extracts on serum histamine production in Nc/Nga mice.

The results were presented means \pm SD. Different letters show a significantly difference at $p < 0.05$ as determined by Duncan's multiple range test.

2. 세포 실험을 통한 발효작두콩 주정 30%추출물의 피부과민반응 억제 효능 평가

가. 방법

(1) 재료

HaCaT cell (keratinocyte)과 MC/9 cell은 각각 경기바이오 센터와 American Type Cultured Collection (ATCC; Rockville, MD, USA)에서 분주 받아 실험하였다. High-glucose Dulbeco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), PBS, penicillin-streptomycin, L-glutamin, sodium pyruvate, hepes, NEAA mixture은 Thermo scientific (hyclone, thermo fisher scientific, MA, USA)에서 구입하였고, gentamicin reagent solution은 Gibco-BRL (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다. Thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT), dimethyl sulfoxide (DMSO), human tumor necrosis factor alpha (TNF- α), Interferon gamma (IFN- γ), interleukin 4 (IL-4), A23187, phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), lipopolysaccharide (LPS), concanavalin A (ConA)은 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 그 외의 모든 시약 및 용매는 일급 또는 특급 이상의 등급을 사용하였다.

(2) 세포독성 실험(MTT assay)

본 실험에 사용한 발효작두콩 주정 30%추출물(*Fermented Canavalia gladiata* ethanol 30% extracts; FCE)이 HaCaT cell (keratinocyte)에 독성을 나타내는지를 측정하기 위하여 MTT as

say를 수행하였다. MTT solution (5 mg/mL)은 PBS에 녹인 뒤 여과하여 사용하였다. 분화하기 직전의 상태인 HaCaT cell을 96 well plate에 1×10^4 cells/well로 총 용적을 100 μ L이 되도록 분주하였으며, 배양액은 10% FBS를 함유한 DMEM을 사용하였다. 12시간 동안 배양한 후 FCE을 100-1000 μ g/mL 농도로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 그 후, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 시약을 20 μ L 처리하여 MTT 환원을 최소화하기 위해서 호일로 빛을 차단하고, 최대 3시간 37°C incubator에서 배양한 후 배지와 MTT 시약을 제거하고, 각 well 당 DMSO 200 μ L를 첨가하여 배양기에서 용해 시켰으며, 20분 후 iMARK™ Microplate Reader (Bio-Rad Laboratories Headquarters, Hercules, CA, USA)를 이용하여 560 nm 파장에서 optical density를 3회 측정으로 그에 대한 평균값과 표준 오차를 구하였다.

(3) Splenocyte에서 T 세포 및 B 세포 증식능 측정

동물에서 분리한 splenocyte은 PBS로 세척한 후 0.45 μ m cell strainer를 사용하여 단일 세포 부유액을 만들었다. 단일 세포 부유액을 10% fetal bovine serum (Hyclone Laboratories, Logan, Utah, USA), 2 mmol/L-glutamine (Hyclone Laboratories, Logan, Utah, USA), 100 mg/L penicillin-streptomycin (Hyclone Laboratories, Logan, Utah, USA)를 첨가한 RPMI-1640 (Hyclone Laboratories, Logan, Utah, USA)으로 세척 후 red blood cell lysing buffer (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)로 적혈구를 용혈 시켜 비장세포 부유액을 만들어 96 well plate에 각 well 당 1×10^6 cells/well을 200 μ L 씩 분주 하였다. T 세포 증식능 측정을 위하여 concanavalin A (Con A) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 5 μ g/mL를 처리하였고, B세포 증식능 측정을 위하여 lipopolysaccharide (LPS) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 5 μ g/mL를 처리한 후 48시간 동안 37°C에서 배양하였다. 48시간 후, EZ-Cytox (Deilab INC, Korea)를 20 μ L 씩 분주하고 4시간 동안 37°C에서 배양시킨 뒤 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(4) Splenocyte에서 cytokines 측정

Splenocyte를 96 well plate에 각 well당 1×10^6 cells/well을 100 μ L 씩 분주 후, Con A 5 μ g/mL를 처리하여 IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ 의 생성을 자극시켰다. IL-2, IL-4, IL-10은 24시간 배양 후에, IFN- γ 은 72시간 배양 후에 상층액을 수집하였다. 상층액의 cytokine의 양은 DuoSet sandwich ELISA mouse kit (R&D System, McKinley Place NE, MN, USA)를 이용하여 측정하였다.

ELISA용 96-well plate에 각 cytokine 측정에 특성화 된 1차 항체를 PBS에 희석 후 100 μ L 씩 분주해 하루 동안 처리한 후, 그 다음날, washing buffer (PBST, 0.05% Tween 20 in PBS)로 1차 항체를 씻어낸 뒤, 항체가 붙지 않은 plate의 다른 공간을 메워주기 위해 assay buffer (1% BSA in PBS (IL-4, -10) 또는 0.1% BSA in TBST (IL-2, IFN- γ))를 넣어 2시간 동안 처리한 뒤 washing buffer로 씻어냈다. Standard curve를 위한 용액과 위에서 seeding한 비장세포의 배양액을 100 μ L 씩 각 well에 넣어 2시간 동안 반응시킨 후, 반응이 끝난 뒤 washing buffer로 씻어내고 assay buffer에 2차 항체를 희석시켜 준비한 뒤 각 well에 100 μ L 씩 분주하고 2시간 동안 처리하였다. 이 과정이 끝나면 washing buffer를 이용해 plate

를 씻어내고 발색을 도와주는 substrate시약을 100 μ L씩 넣어 반응 시킨 뒤 570 nm에서 흡광도를 측정하고 standard curve를 이용해 세포에서 생성된 cytokine의 양을 계산하였다.

(5) Splenocyte에서 면역 글로블린 측정

Splenocyte를 96 well plate에 각 well당 1×10^6 cells/well을 100 μ L 씩 분주 후, IL-4 (50 ng/mL)와 LPS (10 μ g/mL)로 immunoglobulin E (IgE)의 생성을 자극시키고, FCE를 각각 200, 500, 700 μ g/mL로 처리하여 일주일 배양 후 상층액을 수집하였다. ELISA용 96-well plate에 각 cytokine 측정에 특성화 된 1차 항체를 PBS에 희석 후 100 μ L씩 분주해 overnight 동안 처리한 후, 그 다음날, washing buffer (PBST, 0.05% Tween 20 in PBS)로 1차 항체를 씻어낸 뒤, 항체가 붙지 않은 plate의 다른 공간을 메워주기 위해 assay buffer (1% BSA in PBS)를 넣어 1시간 동안 처리한 뒤 washing buffer로 3번 씻어냈다. Standard curve를 위한 용액과 위에서 seeding한 비장세포의 배양액을 100 μ L씩 각 well에 넣어 2시간 동안 반응시킨 후, 반응이 끝난 뒤 washing buffer로 5번 씻어내고 assay buffer에 2차 항체와 SAV-HRP를 희석시켜 준비한 뒤 각 well에 100 μ L씩 분주하고 30분 동안 처리하였다. 이 과정이 끝나면 washing buffer를 이용해 plate를 7번 씻어내고 발색을 도와주는 substrate시약을 100 μ L씩 넣어 반응 시킨 뒤 650 nm에서 흡광도를 측정하고, standard curve를 이용해 세포에서 생성된 cytokine의 양을 계산하였다.

(6) MC/9 cell에서 히스타민 측정

MC/9 cell은 96 well plate에 각 well당 1×10^6 cells/well을 100 μ L 씩 분주 후, A23187 (1 μ M)와 phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (50 nM)로 Histamine의 생성을 자극 시킨 후, FCE를 각각 200, 500, 700 μ g/mL로 처리하여 24시간동안 배양 하여 상층액을 수집하여 mouse histamine ELISA kit (LDN, Nordhorn, Germany)를 이용하여 측정 하였다.

Reaction plate에 standard, controls, sample을 25 μ L씩 분주하고, acylation buffer와 acylation reagent를 각각 25 μ L씩 1시간 동안 처리한다. distilled water 200 μ L을 30분 동안 처리 하여, 20 μ L을 수집한 뒤, Histamine Microtiter Strips에 옮긴다. 100 μ L의 Histamine Antiserum을 각 well에 처리하고 호일을 부착하여 15-20시간 2-8°C 에 배양한다. Washing buffer (PBST, 0.05% Tween 20 in PBS)로 씻어낸 후, enzyme conjugate를 각 well 당 100 μ L씩 분주하여 호일을 부착하여 1시간 처리한 뒤 washing buffer로 씻어낸다. Substrate를 각 well당 100 μ L씩 20-30분 동안 처리한 뒤 650 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 5회의 측정으로 그에 대한 평균값과 표준 오차를 구하였다.

(7) Real-time polymerase chain reaction에 의한 Chemokine & Proinflammatory 측정

FCE을 처리하였을 때 피부 과민 반응에 관여하는 chemokine과 pro-inflammatory의 발현을 확인하기 위해 real time PCR을 실시하였다. Keratinocyte (HaCaT cell)은 6 well plate에 각 well당 1×10^6 cells/well을 2 mL 씩 분주 후 TNF- α (20 ng/mL)와 IFN- γ (20 ng/mL)로 피부 과민성으로 자극시킨 후, FCE를 각각 200, 500, 700 μ g/mL로 24시간 동안 처리한 뒤, 세포를 수집하여 RNeasy extraction kit (Qiagen, Gaithersburg, Maryland, USA)로 제조사의 protocol에 따라 RNA 추출을 실시하였다. iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad

Laboratories Headquarters, Hercules, CA, USA)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 유전자들의 발현을 측정하기 위하여 SYBR Green (iQ SYBR Green Supermix, Bio-Rad Bio-Rad Laboratories Inc.)을 이용한 실시간 정량 PCR을 실시하였고, 기기는 Real-Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 사용하였다. 각각의 유전자에 대한 PCR primer의 염기서열은 Table 1에 나타났다. Real time PCR 반응은 총 20 μ L 내에 cDNA 2 μ L와 2X SYBR mix 10 μ L, forward, reverse primer는 각각 100 pmol/ μ L를 1 μ L씩 첨가하였고, 나머지는 H₂O로 채워주었다. PCR 증폭 단계는 다음과 같고 증폭 cycle은 40 cycle을 실시하였다. Hot start를 위해 95°C에서 8분, 증폭 단계의 denaturation을 95°C에서 15초, annealing을 TARC와 Eotaxin은 55°C에서, TNF- α 와 IL-6은 56°C에서 1분30초, extension을 72°C에서 1분간 반복하며, 각 cycle의 extension 후에 값이 기록되었다. 모든 cycle이 완료된 후 primer의 특이성을 확인하기 위해 melting curve 분석을 실시하였다. 결과의 분석은 Applied Biosystems에서 제공하는 One step system software v2.1로 분석하였다.

Table 1. Primer sequences used in real time PCR quantification of mRNA

Gene	Primer sequences
GAPDH(H)	F 5'-ATGGAAATCCCATCACCATCTT-3'
	R 5'-CGCCCCACTTGATTTTGG-3'
TARC(H)	F 5'-GAAGACGTGGTACCAGACATCTGA-3'
	R 5'-CCCTGCACAGTTACAAAAACGA-3'
Eotaxin(H)	F 5'-GCGACTAGAGAGCTACAGGAGAATC-3'
	R 5'-GGTCTTGAAGATCACAGCTTTCTG-3'
IL-6(H)	F 5'-AGGGCTCTTCGGCAAATGTA-3'
	R 5'-GAAGGAATGCCCATTAACAACAA-3'
TNF- α (H)	F 5'-CCACTTCGAAACCTGGGATTC-3'
	R 5'-TTAGTGGTTGCCAGCACTTCA-3'

(8) 통계처리

본 실험 결과는 SPSS (Statistical Package for Social Science, version 20.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 통계프로그램을 이용하여 각 실험군의 mean \pm SD로 표시하였고, 군 간의 통계적 유의성을 Duncan's multiple range test로 실시하여 유의성 $p < 0.05$ 수준에서 검정하였다.

나. 결과

(1) 세포독성

FCE을 keratinocyte (HaCaT cell)에 24시간 처리하여 세포 생존율을 측정한 결과는 Fig. 1과 같다. FCE을 100-1000 μ g/mL농도로 처리한 결과, 900 μ g/mL (76.3 \pm 1.8%)에서부터 세포독성이 나타났다. 따라서, 본 실험에서는 세포독성이 나타나지 않는 농도인 200, 500, 700 μ g/mL를 사용하여 keratinocyte에서 피부과민반응 억제 효능을 검정하였다.

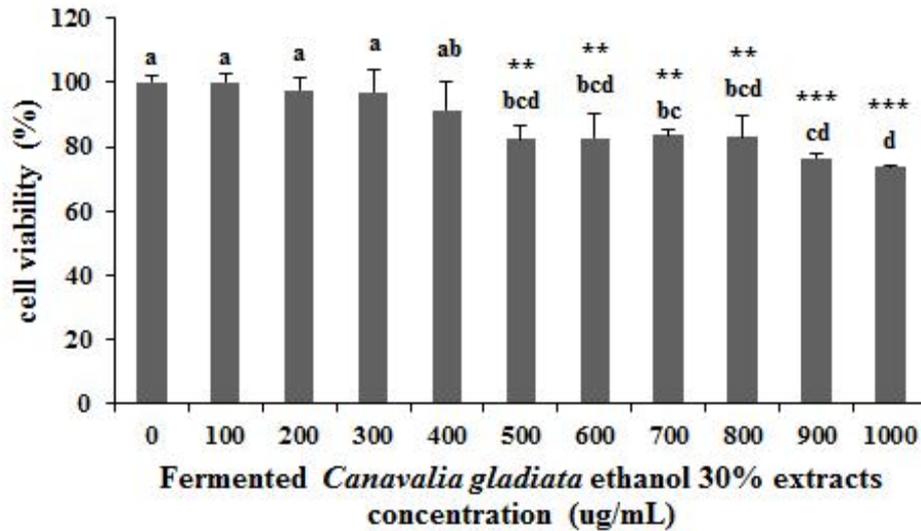


Figure 1. Effect of *Fermented Canavalia gladiata* ethanol 30% extracts on cell viability in keratinocyte.

Keratinocyte were incubated with *Fermented Canavalia gladiata* ethanol 30% extracts at the indicated concentration for 24 hr. Cell viability was measured by MTT assay. Data were expressed as percent growth rate of cells cultured in presence of *Fermented Canavalia gladiata* ethanol 30% extracts, compared with untreated control (NC) cells, taken as 100%. The results were presented means±SD. Different letters show a significantly difference at $p<0.05$ as determined by Duncan's multiple range test and All data are presented as mean±standard deviation. Significantly different at $p<0.05$ compared with control by Student's t-test, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

(2) Splenocyte에서 T 세포 및 B 세포 증식능

아토피대조군은 정상군과 비교하여 T 세포의 증식능($140.3\pm 0.4\%$)은 유의적으로 감소하였고 B 세포의 증식능($128.5\pm 1.0\%$)은 유의적으로 증가하였다($p<0.05$). T 세포 증식능은 FCE 200, 500, 700 $\mu\text{g/mL}$ 모든 군에서 아토피대조군과 비교하여 유의적으로 증가하였다($p<0.05$). 또한 B 세포의 증식능에서도 FCE 200, 500, 700 $\mu\text{g/mL}$ 에서 아토피대조군과 유의적인 차이를 보였다($p<0.05$)(Figure 2).

본 연구에서 아토피에 의하여 T 세포의 증식능을 감소한 것으로 확인함으로서 T 세포의 정상적인 기능이 상실되었음을 예측할 수 있었으며, B 세포의 증가로 면역글로불린의 과생성에 의하여 IgE의 증가로 mast cell이 활성화되어 histamine생성을 촉진시켜 가려움을 유발하고 염증을 유발시킨 것으로 보인다. FCE은 이러한 T 세포와 B 세포의 비정상적인 증식능을 억제시켜 아토피 피부염을 약화시킨 것으로 보인다.

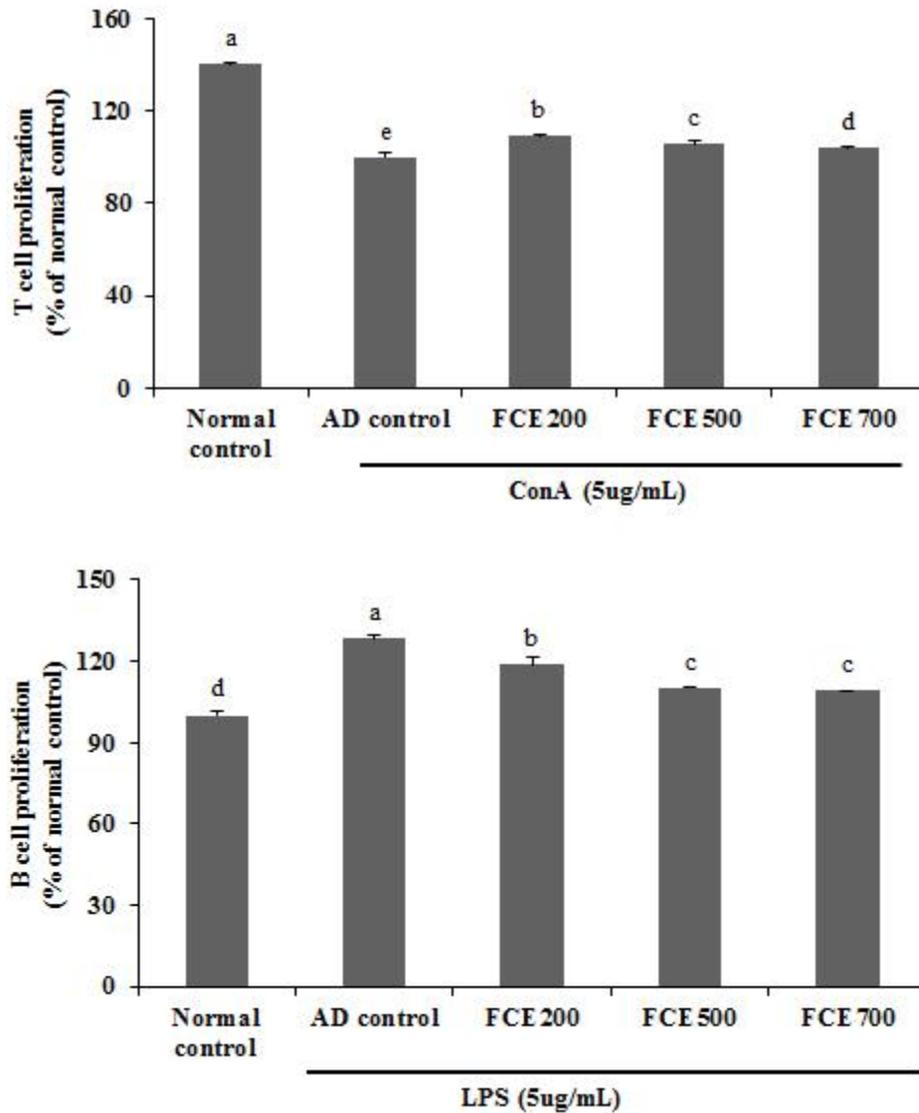


Figure 2, 3 Effect of fermented *Canavalia gladiata* extracts on T and B cell proliferation from primary splenocytes.

(A) Normal control, No treatment group; AD control, LPS (5 $\mu\text{g/mL}$) treatment group; FCE200, LPS (5 $\mu\text{g/mL}$) treatment group + fermented *Canavalia gladiata* ethanol 30% extracts 200 $\mu\text{g/mL}$; FCE500, LPS (5 $\mu\text{g/mL}$) treatment group + fermented *Canavalia gladiata* ethanol 30% extracts 500 $\mu\text{g/mL}$; FCE700, LPS (5 $\mu\text{g/mL}$) treatment group + fermented *Canavalia gladiata* ethanol 30% extracts 700 $\mu\text{g/mL}$;

(B) Normal control, No treatment group; AD control, ConA (5 $\mu\text{g/mL}$) treatment group; FCE200, ConA (5 $\mu\text{g/mL}$) treatment group + fermented *Canavalia gladiata* ethanol 30% extracts 200 $\mu\text{g/mL}$; FCE500, ConA (5 $\mu\text{g/mL}$) treatment group + fermented *Canavalia gladiata* ethanol 30% extracts 500 $\mu\text{g/mL}$; FCE700, ConA (5 $\mu\text{g/mL}$) treatment group + fermented *Canavalia gladiata* ethanol 30% extracts 700 $\mu\text{g/mL}$; The results were presented means \pm SD. Different letters show a significantly difference at $p < 0.05$ as determined by Duncan's multiple range test.

(3) Splenocyte에서 Th1 cytokines 생성 변화

CD4⁺ Th 세포에는 Th1 type cytokines을 생성하는 Th1 세포와 Th2 type cytokines을 생성하는 Th2 세포가 있다. Th1 type cytokines은 주로 대식세포의 활성을 증가시켜 탐식작용을 자극하며, Th2 type cytokines은 B 세포의 활성을 자극시켜 항체생산을 증가시키는 역할을 한다. 이러한 Th1/Th2 type cytokines의 상호보완적인 조절에 의하여 면역 균형을 유지시키는데 아토피 상태에서는 Th1 type cytokines을 감소되어있고, Th2 type cytokines을 증가되어있다고 보고되고 있다. 이러한 cytokines 불균형은 면역 조절 능력을 떨어뜨리게 되어 아토피 현상을 만성으로 발전시키게 된다[31].

Th1 type cytokines인 IL-2와 IFN- γ 의 생성을 비교하였을 때 정상대조군에 비하여 아토피 대조군에서 유의적으로 감소되었음을 확인하였다. IL-2 생성은 모든 군에서 유의적인 차이는 없었으나, IFN- γ 의 생성에서는 모든 군에서 유의적으로 증가되었음을 확인하였다 ($p < 0.05$)(Figure 3).

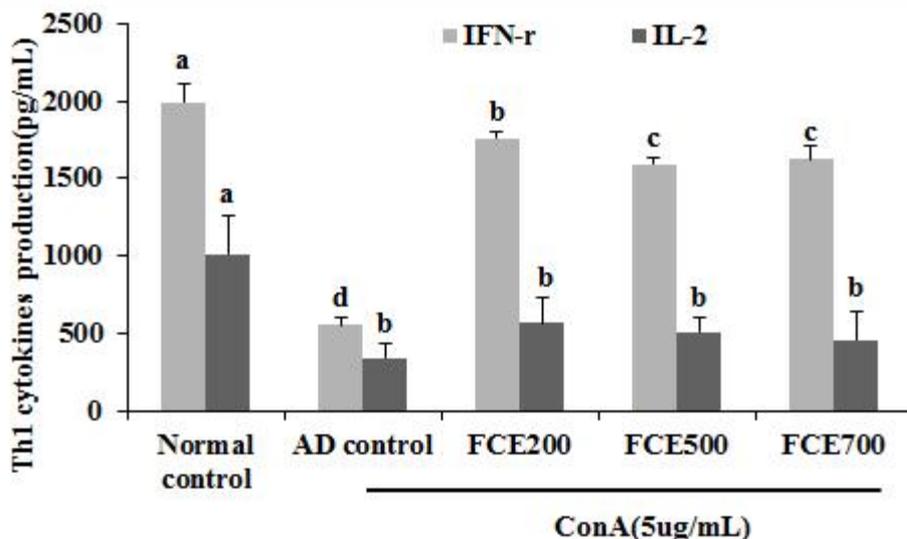


Figure 4. Effect of fermented *Canavalia gladiata* extracts on Th1 type cytokines (IL-2, IFN- γ) production from ConA-stimulated primary splenocytes.

Normal control, No treatment group; AD control, ConA (5 μ g/mL) treatment group; FCE200, ConA (5 μ g/mL) treatment group + fermented *Canavalia gladiata* ethanol 30% extracts 200 μ g/mL; FCE500, ConA(5 μ g/mL) treatment group + fermented *Canavalia gladiata* ethanol 30% extracts 500 μ g/mL; FCE700, ConA(5 μ g/mL) treatment group + fermented *Canavalia gladiata* ethanol 30% extracts 700 μ g/mL; The results were presented means \pm SD. Different letters show a significantly difference at $p < 0.05$ as determined by Duncan's multiple range test.

(4) Splenocyte에서 Th2 cytokines 생성 변화

Th2 type cytokines은 B 세포에서 면역글로불린의 생산을 자극시켜 혈중 면역글로불린을 증가시켜 면역을 활성화시키게 한다. Th1 type cytokines의 증가는 Th2 type cytokines를 감소시켜 조절하게 된다. 정상대조군과 비교하여 아토피대조군에서 Th2 type cytokines인

IL-4와 IL-10 모두 생성량이 유의적으로 증가되었음을 확인하였다($p<0.05$). 이러한 결과는 아토피대조군에서 Th1 type cytokines의 감소와 연관시켜 보았을 때 아토피가 Th1/Th2 type cytokines 불균형을 일으킨 것을 확인할 수 있는 것이다[31].

IL-4 생성은 모든 군에서 유의적으로 아토피대조군에 비교하여 감소되었으며, 특히 FCE500 과 FCE700에서 정상군 만큼 감소하였다. IL-10 생성 또한 모든 군에서 유의적으로 아토피 대조군에 비교하여 감소하였다($p<0.05$). 따라서 Th2 type cytokines 감소 결과는 Th1 type cytokines 감소를 억제시킴으로서, Th1/Th2의 불균형을 감소시켜 면역 항상성 유지에 도움을 주는 것으로 해석되었다(Figure 4).

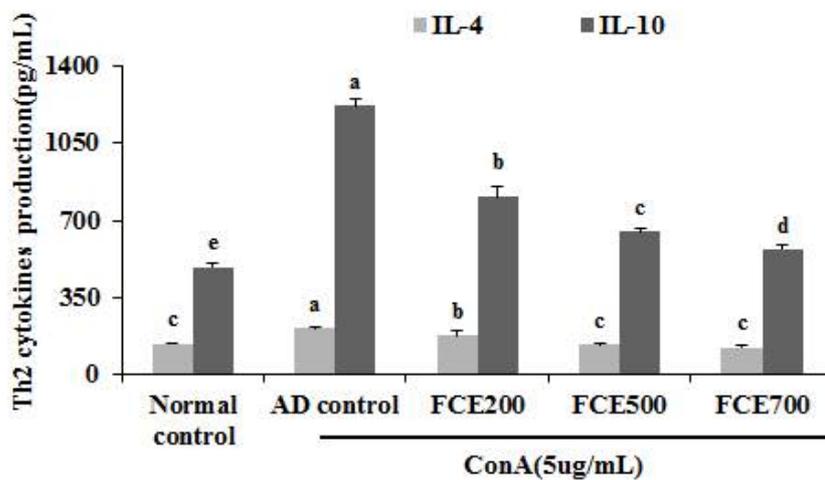


Figure 5. Effect of fermented *Canavalia gladiata* extracts on Th2 type cytokines (IL-4, IL-10) production from ConA-stimulated primary splenocytes.

Normal control, No treatment group; AD control, ConA (5 μ g/mL) treatment group; FCE200, ConA (5 μ g/mL) treatment group + fermented *Canavalia gladiata* ethanol 30% extracts 200 μ g/mL; FCE500, ConA(5 μ g/mL) treatment group + fermented *Canavalia gladiata* ethanol 30% extracts 500 μ g/mL; FCE700, ConA(5 μ g/mL) treatment group + fermented *Canavalia gladiata* ethanol 30% extracts 700 μ g/mL; The results were presented means \pm SD. Different letters show a significantly difference at $p<0.05$ as determined by Duncan's multiple range test.

(5) Splenocyte에서 면역 글로블린 측정

Splenocyte에서 LPS와 IL-4로 B 세포를 활성화시켰다. IL-4가 과생성 되면서 IgE으로 isotype switching이 일어나게 되어 mast cell과 결합하여 자극시킴으로서 활성화시켰다. IgE의 생성은 아토피대조군에서 정상대조군에 비교하여 유의적으로 증가하였고, 모든 군에서는 유의적으로 감소하였다($p<0.05$)(Figure 5).

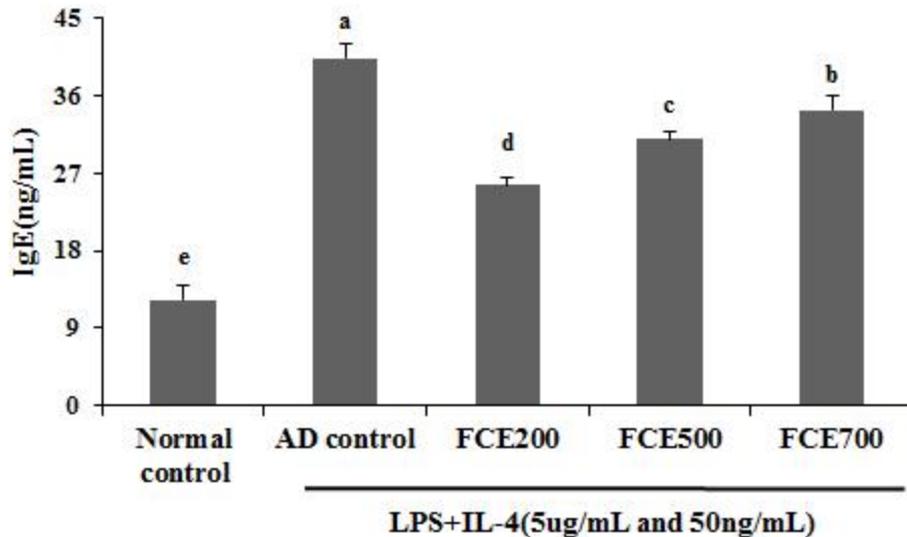


Figure 6. Effect of fermented *Canavalia gladiata* extracts on IgE production in splenocyte. Normal control, No treatment group; AD control, LPS+IL-4(5 μ g/mL and 50 ng/mL) treatment group; FCE200, LPS+IL-4 (5 μ g/mL and 50 ng/mL) treatment group + fermented *Canavalia gladiata* ethanol 30% extracts 200 μ g/mL; FCE500, LPS+IL-4(5 μ g/mL and 50 ng/mL) treatment group + fermented *Canavalia gladiata* ethanol 30% extracts 500 μ g/mL; FCE700, LPS+IL-4(5 μ g/mL and 50 ng/mL) treatment group + fermented *Canavalia gladiata* ethanol 30% extracts 700 μ g/mL; The results were presented means \pm SD. Different letters show a significantly difference at $p < 0.05$ as determined by Duncan's multiple range test.

(6) MC/9 cell에서 히스타민 측정

히스타민은 mast cell안에 저장되어 있다가 mast cell이 자극되어 손상되면 방출되어 혈관의 이완과 투과성의 증가시켜 혈구와 여러 혈장단백질들이 세균이 침입한 부위로 빨리 이동할 수 있도록 하여 염증반응을 일으키게 된다. 과도한 면역반응으로 인한 히스타민의 과다 분비는 알러지 반응과 아나필락시스를 일으키기도 한다. B세포에서 생성된 과다한 IgE가 mast cell을 자극시켜 히스타민의 방출을 증가시키게 되므로, IgE와 함께 알레르기 증상을 평가하는 중요한 지표이다[33].

MC/9 cell에 PMA와 A23187로 자극시킴으로서 히스타민이 방출되어 정상대조군에서 아토피 대조군은 유의적으로 증가되었다($p < 0.05$). 실험군 중에서 아토피대조군과 유의적으로 차이가 있는 군은 FCE 500,700임을 확인하였다($p < 0.05$)(Figure 6).

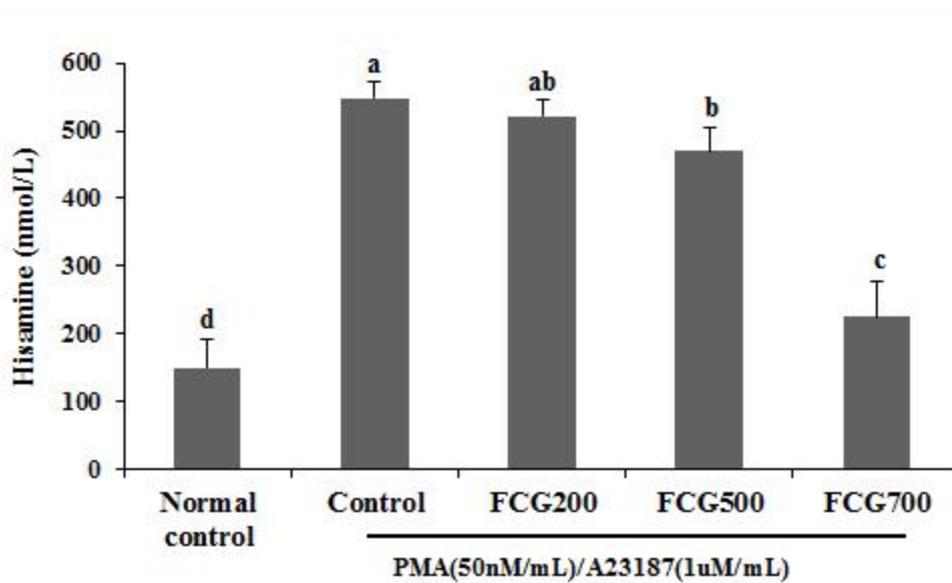


Figure 7. Effect of fermented *Canavalia gladiata* extracts on plasma histamine production in MC/9 cell.

Normal control, No treatment group; AD control, PMA+A23187(50 nM and 1 μ M) treatment group; FCE200, PMA+A23187(50 nM and 1 μ M) treatment group + fermented *Canavalia gladiata* ethanol 30% extracts 200 μ g/mL; FCE500, PMA+A23187(50 nM and 1 μ M) treatment group + fermented *Canavalia gladiata* ethanol 30% extracts 500 μ g/mL; FCE700, PMA+A23187(50 nM and 1 μ M) treatment group + fermented *Canavalia gladiata* ethanol 30% extracts 700 μ g/mL; The results were presented means \pm SD. Different letters show a significantly difference at $p < 0.05$ as determined by Duncan's multiple range test.

(7) Real-time polymerase chain reaction에 의한 Chemokine 측정

TARC와 Eotaxin은 아토피 발병 초기에 eosinophil과 Th2 cell을 불러들이는 염증과 알러지 반응과 관련이 있는 chemokines이다. 그러므로 TARC와 Eotaxin은 아토피 피부염에서 증가한다[34]. 아토피 대조군에서 정상 대조군과 비교하여 TARC와 Eotaxin의 mRNA발현이 상당히 증가 하였다. TARC와 Eotaxin의 mRNA생성은 FCE 실험군에서 모두 유의적으로 감소하였다($p < 0.05$)(Fig 8).

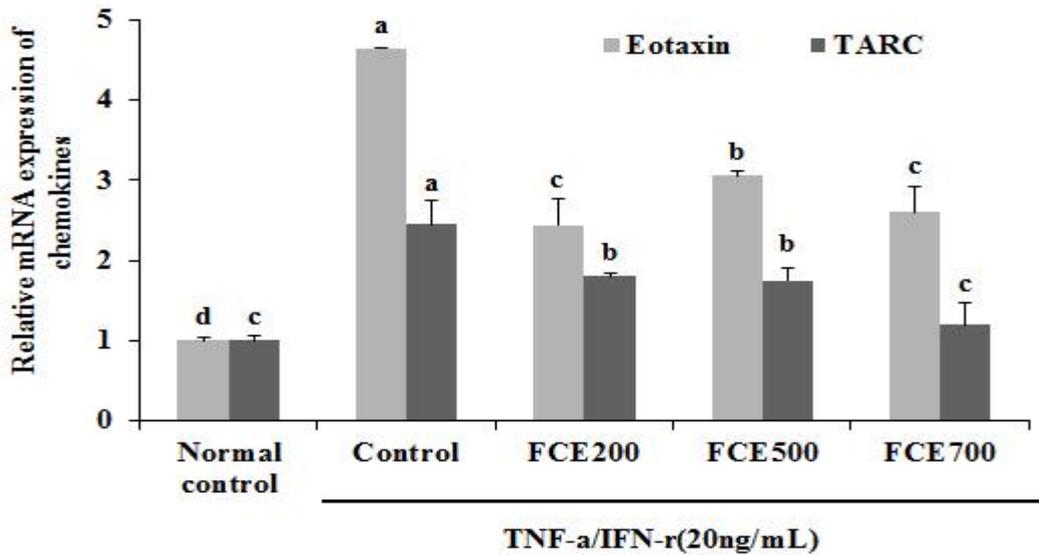


Figure 8. Effect of fermented *Canavalia gladiata* extracts on chemokines(TARC and Eotaxin) from TNF- α and IFN- γ stimulated Keratinocyte.

Normal control, No treatment group; AD control, TNF- α and IFN- γ (20 ng/mL) treatment group; FCE200, TNF- α and IFN- γ (20 ng/mL) treatment group + fermented *Canavalia gladiata* ethanol 30% extracts 200 μ g/mL; FCE500, TNF- α and IFN- γ (20 ng/mL) treatment group + fermented *Canavalia gladiata* ethanol 30% extracts 500 μ g/mL; FCE700, TNF- α and IFN- γ (20 ng/mL) treatment group + fermented *Canavalia gladiata* ethanol 30% extracts 700 μ g/mL; The results were presented means \pm SD. Different letters show a significantly difference at $p < 0.05$ as determined by Duncan's multiple range test.

(8) Real-time polymerase chain reaction에 의한 Pro-inflammatory 측정

TNF- α 는 주로 활성화된 대식세포에 의해 분비되며, 다른 pro-inflammatory cytokine의 생성을 증가시켜 염증반응을 유도하고 apoptosis를 일으키므로 면역세포 활성 조절에 중요한 cytokine이다. 아토피 피부염 환자들에게서 TNF- α 의 발현이 증가되어있음이 보고된 바 있다[32].

TNF- α 의 mRNA발현은 정상대조군에 비교하여 아토피대조군에서 5배 정도 유의적으로 증가되었다. 증가된 TNF- α 의 mRNA발현은 모든 실험군에서 유의적으로 감소되었다($p < 0.05$). IL-6의 mRNA발현은 아토피대조군에서 정상대조군과 비교하여 약 52배 증가되었고, 모든 발효작두콩 실험군에서 유의적으로 감소되었다($p < 0.05$)(Figure9)

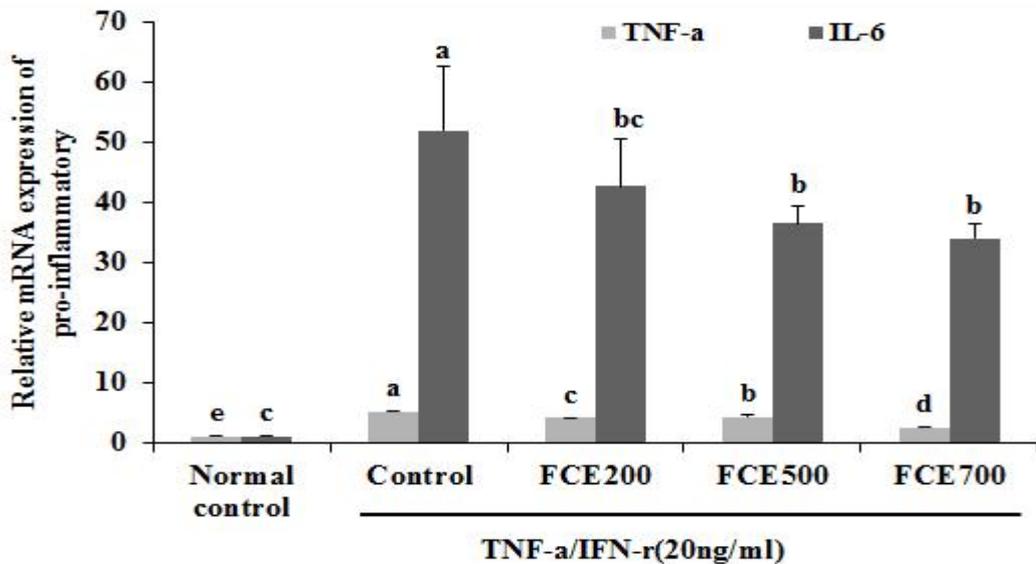


Figure 9. Effect of fermented *Canavalia gladiata* extracts on pro-inflammatory type cytokines (IL-6, TNF- α) production from TNF- α and IFN- γ stimulated Keratinocyte.

Normal control, No treatment group; AD control, TNF- α and IFN- γ (20 ng/mL) treatment group; FCE200, TNF- α and IFN- γ (20 ng/mL) treatment group + fermented *Canavalia gladiata* ethanol 30% extracts 200 μ g/mL; FCE500, TNF- α and IFN- γ (20 ng/mL) treatment group + fermented *Canavalia gladiata* ethanol 30% extracts 500 μ g/mL; FCE700, TNF- α and IFN- γ (20 ng/mL) treatment group + fermented *Canavalia gladiata* ethanol 30% extracts 700 μ g/mL; The results were presented means \pm SD. Different letters show a significantly difference at $p < 0.05$ as determined by Duncan's multiple range test.

3. 결론

가. 본 연구에서는 피부과민반응 개선 소재개발을 위하여 작두콩을 대상으로 발효 유무에 따른 성분 변화와 기능성을 비교하였다. 작두콩이 대표 물질인 canavanine은 자가 면역 질환을 유발하는 것으로 알려져 있어 알레르기 유발 가능성이 있으며 그 독성에 대해 밝혀져 사용에 주의를 주고있다. 따라서 유산균 종과 황국균 발효를 통하여 작두콩의 아미노산 성분 변화와 canavanine의 함량을 비교하였으며, 비교적 아미노산의 성분이 증가되었고 canavanine의 함량이 가장 감소된 황국균 36시간 발효 작두콩을 선택하여 추출물에 대한 피부과민반응 억제 효능을 관찰하였다.

나. 본 연구에서는 피부과민반응 개선 소재개발을 위하여 작두콩을 대상으로 발효 유무에 따른 성분 변화와 기능성을 비교하였다. 작두콩이 대표 물질인 canavanine은 자가 면역 질환을 유발하는 것으로 알려져 있어 알레르기 유발 가능성이 있으며 그 독성에 대해 밝혀져 사용에 주의를 주고있다. 따라서 유산균 종과 황국균 발효를 통하여 작두콩의 아미노산 성분 변화와 canavanine의 함량을 비교하였으며, 비교적 아미노산의 성분이 증가되었고 canavanine의 함량이 가장 감소된 황국균 36시간 발효 작두콩을 선택하여 추출물에 대한 피부과민반응 억제 효능을 관찰하였다.

다. 동물 효능 평가에 앞서 단회 및 반복 경우투여를 통하여 안전성을 평가하였다.. 해부학적인 관찰과 생화학적인 분석을 통하여 1 g/kg b.w./day 농도까지 독성이 없었음을 확인할 수 있었음. 안전성이 검증된 농도 안에서 산업화의 단가문제, 상품화 하였을 때 인체에 적용할 수 있는 농도의 범위를 고려하여 300 mg/kg b.w./day의 농도에서의 피부과민반응 억제 효능을 살펴보기로 하고 동물실험을 실시하였다.

라. 자연상태에서 아토피 유발이 진행이 되는 동물 모델인 NC/Nga mice를 사용하여 피부과민 반응인 아토피 피부염의 억제효능을 평가하였다.. 아토피 피부염에서 일반적으로 나타나는 홍반, 부종, 건조, 혈중, 짓무름, 발진 등의 증상과 가려움에 대한 반응인 긁는 횟수를 비교한 결과 발효작두콩 30% 주정 추출물 식이투여군과, 발효작두콩 80% 주정 추출물에서 약화되었음을 확인하였다.

마. 아토피 유발에 의하여 T세포의 증식능은 감소되고 B세포의 증식능은 증가되어 Th1/Th2 type cytokines의 불균형 유발되고, 이로 인하여 혈중 IgE와 히스타민의 농도가 증가되었다. 이러한 증상은 작두콩 30% 주정 추출물 식이투여군, 발효작두콩 30% 주정 추출물 식이투여군과 발효작두콩 80% 주정 추출물에서 유의적으로 약화되었음을 확인하였다. 특히 발효작두콩 주정 추출물에서 유의적으로 가장 많이 아토피에 의한 생물학적인 변화가 감소되었다.

바. 따라서 본 연구의 결과에서는 아토피 피부염 억제효능이 발효하지 않은 작두콩의 추출물보다 황국균 발효 작두콩 추출물에서 더 높은 효능을 보였으며 특히 30%주정 추출물과 80%주정 추출물에서 효능이 좋았음을 확인하였다. 이러한 결과는 발효에 의하여 알레르기 유발 감소에 유익한 아미노산의 증가에 의한 결과라고 예상된다.

사. 발효작두콩 주정 30% 추출물을 keratinocyte에 처리하여 생존율을 측정한 결과, 세포 독성이 나타나지 않은 200, 500, 700 μ g/mL을 사용하여 아토피 피부염 억제 효능을 검정하였다. 아토피 유발 동물의 splenocyte에 추출물을 처리한 후 T 세포와 B 세포의 증식능을 측정한 결과, T 세포 증식능은 아토피 대조군과 비교하여 모든 군에서 유의적으로 증가하였고, B 세포 증식능은 아토피 대조군과 비교하여 모든 군에서 유의적으로 감소하였다. Th1/Th2 cytokine의 생성을 측정한 결과, 발효 작두콩 주정 30% 추출물 처리군은 아토피 대조군에 비해 Th1 cytokine인 IL-2와 INF- ν 의 생성이 증가하였고, Th2 cytokine인 IL-4와 IL-10의 생성은 감소하였다. Th1/Th2의 불균형에 의해 IgE와 histamine의 농도가 증가하게 되는데 발효 작두콩 주정 30% 추출물 처리군은 아토피 대조군에 비해 IgE와 histamine의 농도가 감소하였다. 아토피 발병 초기에 호산구와 Th2 세포를 불러들이는 염증과 알러지 반응과 관련이 있는 chemokine인 TARC와 Eotaxin의 mRNA 발현을 측정한 결과, 발효 작두콩 주정 30% 추출물 처리군이 대조군에 비해 유의적으로 감소하였다.

아. 본 연구의 결과에서는 발효작두콩 30% 주정추출물이 아토피 피부염이 나타나는 여러 가지 면역조절 작용을 통해 아토피 피부염의 개선효과가 있음을 확인하였다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 기능성강화 식품개발 및 산업화

본 연구에서 에너지증진 효능평가에서 선정된 작두콩50%주정추출물과 발효표준화 결과를 반영하여 발효작두콩의 대량생산 및 가공기술에 대한 표준화를 확립하였다. 다음으로 기능성강화 식품개발을 위해 선호도 평가를 통해 제형을 결정하고, 효능평가를 반영한 배합비를 조성하였으며, 세부공정에 대한 기준을 수립하여 제조공정표준화를 실시하여 작두콩추출물을 함유한 ‘작두콩 소이칩’ 과 발효작두콩추출물을 함유한 ‘피넛씨리얼’ 을 과자류 유형으로 품목제조보고를 통해 산업화하였다. 산업화된 2종 제품은 마케팅 계획에 따라 진행중으로 이로인해 기업의 매출증대 및 고용효과가 발생될 것이며, 원료수급 및 판매량 증가에 따른 지역경제 활성화에 기여할 것으로 보인다.

구분 (연도)	세부과제명	세부연구내용	달성도
1차 년도 (2013)	○ 선정 소재 가공기술 표준화	<ul style="list-style-type: none"> • 소재의 확보 및 추출물의 제작 - 친환경 작두콩소재 확보 - 열수 및 주정추출물 시료제작 	100%
	○ 작두콩함유 에너지증진 기능성강화 식품개발	<ul style="list-style-type: none"> • 시제품 제형개발 - 기능별 제품 선호도평가 - 원료의 적성 확인 - 배합비 확보 	100%
	○ 발효작두콩 함유 피부과민반응개선 기능성강화 식품 개발	<ul style="list-style-type: none"> • 시제품 제형개발 - 기능별 제품 선호도평가 - 배합비 확보 	100%
	○ 선정 소재 가공기술 표준화	<ul style="list-style-type: none"> • 소재의 표준화 시작 - 원료의 추출조건 확립 	100%
2차 년도 (2014)	○ 선정소재의 대량 생산 기술개발	<ul style="list-style-type: none"> • 소재의 대량 생산 기술개발 - 작두콩주정추출물 표준화 기술 확보 - 발효작두콩 표준화 기술 확보 - 유효농도를 함유하는 제품 생산 기술개발 	100%
	○ 작두콩함유 에너지증진기능성강화 식품개발	<ul style="list-style-type: none"> • 제품 개발 - 제형 적합 배합비 결정 - 제품의 시생산 - 제품의 품질특성 - 제품의 생산 	100%
	○ 발효작두콩 함유 피부과민반응개선 기능성강화 식품 개발	<ul style="list-style-type: none"> • 제품 개발 - 제형 적합 배합비 결정 - 제품의 시생산 - 제품의 품질특성 - 제품의 생산 	100%

	○ 글로벌 산업화	<ul style="list-style-type: none"> • 국내·외 마케팅 계획수립 • 국내 친환경전문시장 입점 준비 • 해외바이어를 대상으로 기능성 강화식품 마케팅 개시 • 해외전문 식품박람회 참가 	100%
--	-----------	---	------

제 2 절 작두콩 추출물대상 에너지증진능 기능성 소재개발

본 연구의 결과에서는 작두콩추출물 소재를 통하여 산화스트레스 억제 활성을 확인하였으며 마우스를 이용하여 시료의 독성평가를 한 결과 독성은 나타나지 않았다. 이를 통해 유영수조를 이용한 지구적 유영시간과 혈중 바이오마커를 측정하였더니 실험대조군에 비해 향상된 결과를 보였다. 2차년도 연구에서 작두콩 추출물을 용량별로 효능 평가를 하여 800 mg/kg/day에서 효능을 보였으며 간과 근육 조직을 통하여 에너지 대사 효소 활성화와 지구적 운동능력향상 관련 효소 활성화 및 전사인자 발현율을 측정하였더니 실험대조군에 비해 향상된 결과를 보여 작두콩 소재의 에너지 증진 효능을 확인하였다. 또한 운동성 산화스트레스 억제능을 확인하기 위해 간과 근육의 조직을 이용하여 항산화 효소활성 및 비효소 항산화 인자를 분석한 결과 실험대조군에 비해 향상된 결과를 보여 작두콩 소재의 산화적 스트레스 억제 기작을 확인하였다. 이에 본 연구를 통한 작두콩 추출물의 에너지 증진능 기능성을 확인하였으며 이는 최근 에너지 증진 기능성 식품 개발에 긍정적인 영향을 제공할 것으로 기대된다.

구분 (연도)	세부과제명	세부연구내용	달성도
1차 년도 (2013)	○ 작두콩 소재의 에너지증진 효능 평가	<ul style="list-style-type: none"> • 마우스를 이용한 시료의 독성평가 • <i>In vivo</i> 지구적 운동능력향상능 평가 • 지구적 운동능력향상 바이오마커 평가 	100%
	○ 작두콩 소재의 산화스트레스 억제 활성 평가	<ul style="list-style-type: none"> • 작두콩 추출물의 수득 	100%
2차 년도 (2014)	○ 작두콩 소재의 용량별 에너지 증진 효능 평가	<ul style="list-style-type: none"> • 유영수조를 이용한 지구적 유영시간 측정, 혈청의 바이오마커 평가 	100%
	○ 작두콩 소재의 에너지 증진 효능 기작 구명	<ul style="list-style-type: none"> • 에너지 대사 효소 활성화 및 지구적 운동능력향상 관련 효소 활성화, 전사인자 발현 측정 	100%
	○ 시제품의 에너지 증진 효능 평가	<ul style="list-style-type: none"> • 마우스모델에서 유영수조를 이요한 지구적 유영시간 측정 	100%
	○ 작두콩 소재의 산화적 스트레스 억제 기작 구명	<ul style="list-style-type: none"> • <i>In vivo</i> 운동성 산화스트레스 억제능 바이오마커 평가 	100%

제 3 절 발효작두콩 추출물대상 피부과민반응개선 기능성 소재개발

본 연구의 결과에서는 아토피 피부염 억제효능이 발효하지 않은 작두콩의 추출물보다 황국균 발효 작두콩 추출물에서 더 높은 효능을 보였으며 특히 30%주정 추출물과 80% 주정 추출물에서 효능이 좋음을 동물실험을 통해 확인하였다. 이러한 결과는 발효에 의하여 알레르기 유발 감소에 유익한 아미노산의 증가에 의한 결과라고 예상된다. 2차년도 연구에서 세포를 사용하여 발효 작두콩 30%주정 추출물의 아토피 피부염 억제효능에 대하여 기전연구를 함으로서 발효 작두콩 추출물의 기능성을 과학적으로 검증하였다. 최근 다양한 천연물과 천연유래 물질들의 항아토피 피부염 기능성 평가 연구뿐만 아니라 그에 따른 기전에 대한 연구도 활발히 진행되고 있다. 이에 본 연구를 통한 발효 작두콩 추출물의 아토피 피부염 억제 효능 및 기전 규명은 최근 연구 분야 변화 발달에 긍정적인 영향을 미칠 것으로 사료된다.

구분 (연도)	세부과제명	세부연구내용	달성도
1차 년도 (2013)	○ 작두콩 발효 및 표준화	<ul style="list-style-type: none"> 유산균, 황국균을 이용한 작두콩 발효 및 비교를 통한 균주 선발 일반성분, 지표성분 분석 발효작두콩 추출의 표준화 	100%
	○ 독성평가	<ul style="list-style-type: none"> 단회, 반복 독성평가 (생존율, 생화학적 분석) 	100%
	○ 동물 실험을 통한 작두콩 추출물의 피부과민반응 억제 효능 평가	<ul style="list-style-type: none"> NC/Nga 마우스를 이용한 피부과민반응 유발 동물 모델에서 발효작두콩 추출물의 효능 평가 	100%
2차 년도 (2014)	○ 발효작두콩 추출물의 피부과민반응 억제 효능의 기작구명	<ul style="list-style-type: none"> 비장세포와 Keratinocyte, mast cell을 이용한 발효작두콩 추출물의 효능 평가 및 기작구명 	100%

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용계획

제 1 절 제품 개발 2건



작두콩소이칩
(작두콩 함유)



피넛시리얼
(발효작두콩 함유)

제 2 절 학술발표 7건

- 학술발표 1
 - 학술대회명 : 2013 KFN International Symposium and Annual Meeting
 - 발표 제목 : Effects of *Canavalia gladiata* DC. on Enduranc Exercise Capacity in Mice
 - 저 자 명 : Boemjeong Kim, Yanghee You, Jeongmin Lee, Jinyoung Kim, Jinseok Kim, Kyungmi Kim, Woojin Jun
 - 발 표 일 : 2013. 11.13.
- 학술발표 2
 - 학술대회명 : 2014 Annual Meeting
 - 발표 제목 : Effects of Extracts of *Canavalia gladiata* DC. on Antioxidant Defense System and Energy Metabolism on Swimming Mice
 - 저 자 명 : Yanghee You, Jeongjin Park, Beomjeong Kim, Suhwa Jeon, Haneul Jo, Minseok Cha, Jinyoung Kim Kyungmi Kim, Woojin Jun
 - 발 표 일 : 2014.08.26.

- 학술발표 3
 - 학술대회명 : 2014 International Symposium and Annual Meeting
 - 발표 제목 : Antioxidant Potential of 50% Ethanol Extract from *Canavalia gladiata* DC. and Its Endurance Exercise Capacity
 - 저 자 명 : Heesun Jeong*, Jinyoung Kim¹, Minseok Cha¹, Jeongjin Park², Yanghee You², Jeongmin Lee³, Kyungmi Kim⁴, Woojin Jun.
 - 발 표 일 : 2014.10.29.

- 학술발표 4
 - 학술대회명 : 2014 icSports
 - 발표 제목 : Improving Effect of *Canavalia Gladiata* on Exercise Capability
 - 저 자 명 : Beomjeong Kim, Yanghee You, Jeongjin Park, Kyungmi Kim, Jeongmin Lee, Woojin Jun
 - 발 표 일 : 2014.10.25

- 학술발표 5
 - 학술대회명 : 2015 International Symposium and Annual Meeting
 - 발표 제목 : Effect of 50% Ethanolic Extract from *Canavalia gladiata* DC. on Endurance Exercise Capacity in Mice
 - 저 자 명 : Heesun Jeong, Yanghee You, Kyungmi Kim, Eunju Cho, Jinyoung Kim, Minseok Cha, and Woojin Jun.
 - 발 표 일 : 2015.6.3.

- 학술발표 6
 - 학술대회명 : 2014 Korean Society of Food Science and Nutrition International Symposium and Annual meeting
 - 발표 제목 : A Study on the Immunomodulatory Effect of Fermented *Canavalia gladiata* in Animal Model of Atopic Dermatitis
 - 저 자 명 : Jee-yun Chang, Ok-kyung Kim, Da-eun Nam, Minhee Lee, Yejin Ha, Jeongmin Lee
 - 발 표 일 : 2014. 10. 28.

- 학술발표 7
 - 학술대회명 : 2015 KoSFoST International Symposium and Annual meeting
 - 발표 제목 : A Study on the Immunomodulatory Effect of *Canavalia gladiata* in NC/Nga mice, an Animal Model of Atopic Dermatitis
 - 저 자 명 : Jee-yun Chang, Jeongmin Lee
 - 발 표 일 : 2015. 6. 5.

- 출원일 : 2014. 06. 19.
- 출원번호 : 제10-2014-0074841호

증빙이미지	
특허 1	특허 2
<p>출원번호통지서</p> <p>관인생략</p> <p>출원번호통지서</p> <p>출원일자 2014.02.11 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 출원번호 10-2014-0015326 (접수번호 1-1-2014-0131686-15) 출원인명칭 전남대학교산학협력단(2-2004-036577-5) 대리인성명 임부현(9-1999-000421-2) 발명자성명 천우진 김경미 유양희 김범정 발명의명칭 작두꿈 추출물을 포함하는 운동 능력 개선용 조성물</p> <p>특 허 청 장</p> <p><<안내>></p> <p>1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다. 2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다. * 납부자번호 : 0131(가관코드) + 접수번호 3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다. * 특허료(patent.go.kr) 접속 > 민원서비스다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식 4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다. 5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허-실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받지 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다. * 제도 안내 : http://www.kipo.go.kr/특허마감-PCT마드리드 * 우선권 인정기간 : 특허-실용신안은 12개월, 상표-디자인은 6개월 이내 * 미국특허상표청의 제출일을 기준으로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미국공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자자료환하기서(PTOSB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다. 6. 본 출원 사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다. * 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000 7. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.</p>	<p>출원번호통지서</p> <p>관인생략</p> <p>출원번호통지서</p> <p>출원일자 2014.06.19 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 출원번호 10-2014-0074841 (접수번호 1-1-2014-0573087-10) 출원인명칭 (주)산들촌(1-2005-044331-7) 외 1명 대리인성명 선동인(9-2000-000156-1) 발명자성명 이광민 김옥경 남다운 차인석 김진영 천우진 유양희 발명의명칭 발효 작두꿈 추출물을 유효성분으로 함유하는 염증 또는 알러지 질환의 예방 및 치료용 조성물</p> <p>특 허 청 장</p> <p><<안내>></p> <p>1. 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다. 2. 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다. * 납부자번호 : 0131(가관코드) + 접수번호 3. 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다. * 특허료(patent.go.kr) 접속 > 민원서비스다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식 4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다. 5. 외국으로 출원하고자 하는 경우 PCT 제도(특허-실용신안)나 마드리드 제도(상표)를 이용할 수 있습니다. 국내출원일을 외국에서 인정받고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정받을 수 있습니다. * 제도 안내 : http://www.kipo.go.kr/특허마감-PCT마드리드 * 우선권 인정기간 : 특허-실용신안은 12개월, 상표-디자인은 6개월 이내 * 미국특허상표청의 제출일을 기준으로 우리나라에 우선권주장출원 시, 선출원이 미국공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자자료환하기서(PTO/58/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다. 6. 본 출원 사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다. * 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000</p>

제 4 절 언론홍보 5건

- 언론홍보 1
 - Title : ‘산들촌’의 끝없는 담양사랑
 - 게재기관 : 광주일보
 - 게재일 : 2013. 07. 15.
 -
- 언론홍보 2
 - Title : 중소기업을 찾아서 - (주)산들촌
 - 게재기관 : 전남매일
 - 게재일 : 2014. 07. 22.
- 언론홍보 3
 - Title : (주)산들촌 “유기농이 맛있다” ...아이들 위한 ‘착한과자’
 - 게재기관 : 뉴스천지
 - 게재일 : 2014. 09. 14.

제 5 절 성과활용 계획

1. 본 연구를 통해 작두콩 추출물과 발효작두콩 및 발효작두콩 추출물의 표준화, 각 소재의 제조 기술을 획득하였고, 이들을 적용하여 향후 건강지향식품 및 건강기능식품의 원료로 활용할 계획이다.
2. 동물실험의 효능평가를 통해 작두콩 50%주정추출물은 운동수행력 향상에 기능을 갖는 것으로 확인되었고, 발효작두콩 30%주정추출물은 과민성피부염에 기능을 갖는 것으로 확인되었다. 이들은 향후 건강기능식품 원료 개발에 활용할 계획이다.
3. 본 과제를 통해 개발된 작두콩 소이칩과 피넛시리얼 제품은 100 g 섭취에 실험동물 유효용량을 적용하였고, 각 기능성을 갖는 작두콩 추출물 및 발효작두콩 주정추출물을 유효용량 함유한 제품으로 제품화 하였다.
4. 작두콩 소이칩은 주관기관이 선행 개발하여 상품화 된 ‘식이섬유풍부 소이칩’의 후속 제품으로 판매할 예정이며, 주 대상은 청년층으로 설정하여 보유하고 있는 일반마켓(온라인마켓, 대형마켓, 편의마켓 등)에 마케팅을 수행하고 있다. 또한 중국 수출을 위한 바이어 미팅과 박람회 홍보를 계획 중에 있다.
5. 본 연구에서 지적재산권 성과물은 소재 및 조성물에 관한 출원 2건으로 1건은 공개되어 심사 중에 있으며, 다른 1건은 1년 6개월의 미공개 심사 중에 있다.
6. 본 과제에서 결과로 획득된 학술논문 (에너지증진 1건, 피부과민반응개선 2건)은 현재 투고 후 심사중에 있으며 이들 논문은 향후, 개별인정형 건강기능식품을 위한 기초자료와 추가 기술개발을 위한 핵심 자료로 활용할 예정이다.

발표 제목 : 아토피 피부염이 유발된 NC/Nga mice에서 작두콩 추출물 섭취에 의한 면역 조절 효과 / 저널 : 한국식품영양과학회
발표 제목 : Effect of <i>Canavalia gladiata</i> extract fermented with <i>Aspergillus oryzae</i> on the development of atopic dermatitis in NC/Nga mice / 저널 : Journal of Pharmacy and Pharmacology (SCI)
발표 제목 : Effect of Extract from <i>Canavalia gladiata</i> on Endurance Exercise Capacity in Mice / 저널 : Journal of Medicinal Food (SCI)

7. 본 과제의 시제품 개발에서 부족한 표기사항(작두콩 추출물, 친환경인증표시, 원산지표시)은 제품의 매출 증대를 위해 향후 표기, 품목제조보고 등을 변경, 추가할 계획이다.
8. 본 과제에서 결과로 획득된 학술논문 (에너지증진 1건, 피부과민반응개선 2건)은 현재 온라인 심사중에 있으며, 향후 이들 논문개제가 확정된 후 건강기능식품을 위한 추가 기술개발을 수행할 예정이다.
9. 본 과제에서 개발된 소재들의 원가 및 함유량을 재조정하고, 대량생산에 따른 원가를 산출하여 다양한 제품을 개발 추진할 계획이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 1 절 작두콩 추출물대상 에너지증진능 기능성 소재개발

- I Nallamuthu, A Tamatam, F Khanum (2014) Effect of hydroalcoholic extract of Aegle marmelos fruit on radical scavenging activity and exercise-endurance capacity in mice(Aegle marmelos 열매의 라디칼소거 활성과 지구적 운동수행능력 효과). *Pharmaceutical biology*. 52, 551-559 이 연구는 Aegle marmelos 열매 추출물의 라디칼소거 활성을 확인하였다. 지구적 운동수행능력은 마우스 유영실험을 측정하였다. 결과적으로 이 추출물은 유영시간증가와 혈중젖산농도 감소, 근육조직에서의 지방 이용 촉진을 통하여 지구적 운동수행능력에 효과가 있음을 보여주고 있다[35].
- N Watanabe, Y Hara, S Sakuda, Y Mori, Y Furuya, T watanabe (2014) Effects of Dietary Green Rooibos on Physical Endurance in Swimming Mice(마우스 유영실험을 통한 Dietary Green Rooibos의 지구력 운동수행효과). *Food and Nutrition Sciences*. 5, 127-131 Green rooibos는 발효되지 않은 rooibos leaves이며, aspalathin 함량이 매우 높다. Dietary green rooibos는 physical endurance증가와 physical fatigue 감소시킬 것으로 기대되는데 aspalathin이 항산화 활성이 있으며 근육에서 glucose uptake를 자극시키기 때문이다. 이 논문의 목표는 swimming mouse model을 이용하여 green rooibos와 aspalathin의 효과를 확인하는 것이다. Dietary green rooibos와 aspalathin은 수영시간을 증가시키는 경향을 보여주었다. 이러한 경향은 간과 골격근에서 글리코겐축적을 증가를 유도할 것이라고 여겨진다[36].
- C Xiang, L Zhang, Z Xiaowei, L Xiaojuan (2014) Polysaccharides from *Portulaca oleracea* L Improve Exercise Endurance and Decrease Oxidative Stress in Forced Swimming Mice(*Portulaca oleracea* L. 다당체의 지구력운동능력 향상과 산화스트레스 감소 효과). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 13, 229-234 이 연구논문은 POP의 투여가 실험대조군에 비해 한계수영시간이 증가함을 보여주었고, 한계수영 후, 혈중 젖산농도와 MDA 수준도 낮아짐을 보였다. 또한 SOD, GPx, CAT level은 대조군에 비해 높아짐을 확인하여 지구력운동능력 향상과 산화스트레스 감소효과를 확인하였다[37].
- SY Wang, WC Huang, CC Lin, MF Wang, CS Ho, WP Huang, CC Hou, HL Chuang, CC Huang (2012) Pumpkin (*Cucurbita moschata*) Fruit Extract Improves Physical Fatigue and Exercise Performance in Mice(호박추출물을 통한 신체적 피로와 운동수행능력향상 효과). *Molecules*. 17, 11864-11876 이 연구의 전반적인 목적은 호박추출물이 신체적 활동을 통한 항피로와 운동능력을 증진시키는 효과를 알아보는 것으로 CME 처리시 grip strength가 증가하였고 농도의존적으로 수영시간, 혈중 glucose, 근육과 간의 글리코겐이 증가되었다. 15분 수영 test 후에 농도의존적으로 혈중 lactate, ammonia, creatine kinase 활성이 감소하였다. 에너지 저장은 글리코겐, 에너지 방출은 glucose이며 혈중 lactate, ammonia, creatine kinase의 감소와 관련이 있으므로 CME는 항피로의 약리효과를 잠재적으로 가지고 있다[38].

- TS Yeh, HL Chuang, WC Huang, YM Chen, CC Huang, MC Hsu (2014) *Astragalus membranaceus* improves exercise performance and ameliorates exercise-induced fatigue in trained mice(황기추출물을 통한 운동수행능 향상과 피로 완화 효과). *Molecules*. 19, 2793-2807 운동능력과 항피로 기능은 forelimb grip strength, exhaustive swimming time, swimming exercise 15분 후 lactate, ammonia, glucose, creatine kinase을 통해 측정하였다. AM을 공급하고 운동을 한 후 endurance exercise capacity 증가와 간과 근육의 glycogen 함량이 증가하였다. AM은 운동으로 인한 혈중 lactate, ammonia 축적이 감소하였다. 그러므로 AM투여는 exercise performance와 anti-fatigue효과를 향상시켰다. exercise training에 효과적인 ergogenic aid일 것이다.

제 2 절 발효작두콩 추출물대상 피부과민반응개선 기능성 소재개발

- 최근 아토피 피부염 억제 기능성을 평가한 연구들은 단순히 다양한 천연물과 천연유래 물질들의 기능성 평가뿐만 아니라 기전에 대한 연구도 진행되고 있음을 확인할 수 있다. 아토피 피부염은 복잡하고 다양한 면역체계가 연관되어 있어 발병 기전에 대한 연구도 꾸준히 지속되고 있으며 이에 따라 기능성 평가 연구에서도 기전을 확인하는 추세이다.
- Wakame K, Komatsu K, Inagawa H, Nishizawa T. (2015). Immunopotentiator from *Pantoea agglomerans* Prevents Atopic Dermatitis Induced by *Dermatophagoides farinae* Extract in NC/Nga Mouse. *Anticancer Res.*35, 4501-4508. 본 연구는 일본의 연구팀에서 *Pantoea*에서 Immunopotentiator를 분리하여 아토피 억제효능에 사용하였다. TARC의 레벨과 IgE의 농도가 억제되었음을 확인하였고 CD4(+)/CD8(+) ratio의 증가를 확인함으로써 아토피 피부염 억제 효능을 확인하였다[39].
- Kim MS, Kim WG, Chung HS, Park BW, Ahn KS, Kim JJ, Bae H. (2012). Improvement of atopic dermatitis-like skin lesions by *Platycodon grandiflorum* fermented by *Lactobacillus plantarum* in NC/Nga mice. *Biol Pharm Bull.* 35, 1222-1229. 이 논문은 경희대학교 교수가 발표하였다. 이 연구는 *Lactobacillus plantarum*으로 도라지를 발효시켜 항 아토피 효능을 평가하였다. 아토피가 유발된 NC/Nga mice에 발효 도라지를 먹인 후 IgE의 분비가 감소되었고, Th2 cytokine이 감소하고, Th1 cytokine은 증가하여 아토피 개선효과가 있는 것으로 나타났다[14].
- Park SJ, Lee HA, Kim JW, Lee BS, Kim EJ. (2012) *Platycodon grandiflorus* alleviates DNCB-induced atopy-like dermatitis in NC/Nga mice. *Indian J Pharmacol.* 2012 44, 469-474. 이 논문은 경북대학교 교수가 발표하였다. 이 논문은 도라지로부터 원유를 추출하여 항 아토피 효능을 평가하였다. DNCB를 도포하여 아토피가 유발된 mice에 도라지 원유 추출물을 먹인 결과 IgE는 감소하였고, IL-1 β , IL-4, IL-6, T NF- α 등의 cytokine이 감소시켜 염증성 알러지 반응을 억제시켜주는 것으로 나타났다[40].
- Jiang J, Yamaguchi T, Funakushi N, Kuhara T, Fan PS, Ueki R, Suto H, Kase Y, Ikeda S, Ogawa H. (2009) Oral administration of Yokukansan inhibits the development of atopic dermatitis-like lesions in isolated NC/Nga mice. *J Dermatol Sci.* 56, 37-42.

이 논문은 일본 사립대 교수가 발표하였다. 이 논문은 Yokukasan(YKS)의 아토피 개선 효과를 평가하였다. 아토피가 유발된 NC/Nga mice에 YKS를 먹인 결과, AD-like skin lesion이 감소하였고 serum corticosterone level이 억제시켜주는 것으로 나타났다 [41].

- Kim MS, Hur YG, Kim WG, Park BW, Ahn KS, Kim JJ, Bae H. (2011) Inhibitory effect of Platycodon grandiflorum on T(H)1 and T(H)2 immune responses in a murine model of 2,4-dinitrofluorobenzene-induced atopic dermatitis-like skin lesions. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 106, 54-61. 이 논문은 Combimed company에서 발표하였다. 이 논문은 DNCB로 유도한 아토피 동물 모델에서 Platycodon grandiflorum(PG)의 Th1, TH2 면역 반응 억제효과를 측정하였다. PG를 먹은 아토피 동물 모델에서 IL-4, IgG1은 감소하였고, IL-12, IgG2는 증가하는 것으로 나타났다. 따라서 PG는 Th1 세포 반응은 증가시키고, Th2 세포 반응을 억제함으로써 아토피 증상을 억제시키는 것으로 나타났다 [42].

제 7 장 연구시설·장비 현황

없음

제 8 장 연구실 안전관리 이행실적

■ 농업회사법인(주)산들촌



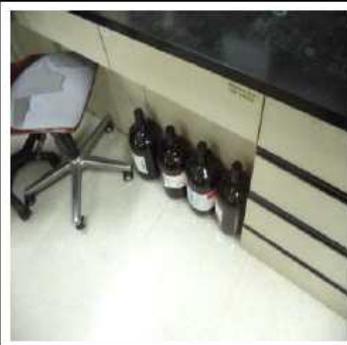
연구실 및 제조공정의 안전을 위해 사내교육을 매월 1회 실시



외부 전문강사를 초빙해 공장 내 안전사고에 대비한 안전관리 교육 실시

■ 경희대학교 산학협력단

경희대학교 동서의학대학원에서 실시한 다음과 같은 의학영양학과 연구실 안전관리 평가에 대한 결과에 따라 문제점을 모두 개선하였다.

동서의학대학원	전자정보/응용과학대학관	446	영양면역학실험실	화공4	2등급
	문제점	미사용 시약 장기간 보관			
	개선방안	장기간 사용하지 않은 시약이 밀폐된 시약장 내 공기중에 반응하여 흡이 발생하고, 변질될 우려가 있으므로 사용하지 않는 시약은 조속히 폐기 처리 요망			
	관련근거	미래부 고시 제2013-109호. 연구실 안전점검 및 정밀안전진단에 관한 지침 [별표 2]			
	문제점	독성시약 장기간 실험대 방치			
	개선방안	독성시약은 전용 시약장(밀폐환기식)에 보관하며 장기간 사용하지 않는 시약은 조속히 폐기처리 요망			
	관련근거	유해화학물질관리법 시행규칙 별표 제4호의 3의나 유독물 저장 및 저장관리			
	문제점	인화성 물질 다량 보관			
	개선방안	필요량 이상의 인화성물질은 별도 보관 장소를 마련하거나 부득이 실험실 내 보관시 인화성물질 전용 시약장에 보관하여 사고 발생 시 피해의 확산을 줄일 수 있도록 조치 요망			
	관련근거	실험실 안전보건에 관한 기술지침(KOSHACODE G-7-2006)			
	문제점	시약병 관리 미흡			
	개선방안	연구활동 종사자들의 보행 시 시약병이 발에 걸려 파손될 우려가 있으므로 전용시약장 및 시약병 받침대를 이용하여 보관 사용 요망			
	관련근거	실험실 안전지침 제2장 (화공약품의 위험성과 안전)			

제 9 장 참고문헌

- [1] 김혜경, 어린이 아토피 피부염에 대한 친환경 식품의 효과, 한양대학교 석사학위 논문, (2009)
- [2] Borresen EC, Henderson AJ, Kumar A, Weir TL, Ryan EP. Fermented foods: patented approaches and formulations for nutritional supplementation and health promotion. *Recent Pat Food Nutr Agric.* 4: 134-140 (2012)
- [3] Kim MS, Kim WG, Chung HS, Park BW, Ahn KS, Kim JJ, Bae H. Improvement of atopic dermatitis-like skin lesions by *Platycodon grandiflorum* fermented by *Lactobacillus plantarum* in NC/Nga mice. *Biol Pharm Bull.* 35: 1222-1229 (2012)
- [4] Smartt J. *Grain legumes*. Cambridge University Press, London, UK. p 301-309 (1990)
- [5] Lee SZ. Bonchogangmok. Eusungdang press, Seoul, Korea. p.585 (1994)
- [6] Cho YS, Seo KI, Shim KH. Antimicrobial activities of Korean sword bean (*Canavalia gladiata*) extracts. *Korean J Food Preserv* 7: 113-116 (2000)
- [7] Cho YS, Bae YI, Shim KH. Chemical components indifferent parts of Korean sword bean (*Canavalia gladiata*). *Korean J Food Preserv* 6: 475-480 (1999)
- [8] 가공식품 세분시장 현황조사, 농림축산식품부 (2014)
- [9] Se HB, Koo BM, Choi SK, Kim WC, Ryu SP. The Effects of Pine Needles Powder Intake and Swimming Exercise on the Energy Metabolic Substrate in Rats. *J. Korean Soc. Living Environ. Sys.* 22: 296-304 (2015)
- [10] K Takeda, M Machida, A Kohara, N Om, T Takemasa. Effects of Citrulline Supplementation on Fatigue and Exercise Performance in Mice. *J Nutr Sci Vitaminol.* 57:246-250 (2011)
- [11] TS Yeh, HL Chuang, WC Huang, YM Chen, CC Huang, MC Hsu. *Astragalus membranaceus* improves exercise performance and ameliorates exercise-induced fatigue in trained mice. *Molecules.* 19:2793-2807 (2014)
- [12] www.kipo.go.kr [특허청]
- [13] Tan HY, Zhang AL, Chen D, Xue CC, Lenon GB. Chinese herbal medicine for atopic dermatitis: a systematic review. *J Am Acad Dermatol.* 69: 295-304 (2013)
- [14] Kim MS, Kim WG, Chung HS, Park BW, Ahn KS, Kim JJ, Bae H. Improvement of atopic dermatitis-like skin lesions by *Platycodon grandiflorum* fermented by *Lactobacillus plantarum* in NC/Nga mice. *Biol Pharm Bull.* 35:1222-1229 (2012)
- [15] Shin YK, Son HU, Kim JM, Heo JC, Lee SH, Kim JG. Cinnamomum cassia bark produced by solid-state fermentation with *Phellinus baumii* has the potential to alleviate atopic

- dermatitis-related symptoms. *Int J Mol Med.* 35: 187-194 (2015)
- [16] Miles EA, Calder PC. Omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids and allergic diseases in infancy and childhood. *Curr Pharm Des.* 20: 946-953 (2014)
- [17] Weise C, Heunemann C, Loddenkemper C, Herz U, van Tol EA, Worm M. Dietary docosahexaenoic acid in combination with arachidonic acid ameliorates allergen-induced dermatitis in mice. *Pediatr Allergy Immunol.* 22: 497-504 (2011)
- [18] Karuppagounder V, Arumugam S, Thandavarayan RA, Pitchaimani V, Sreedhar R, Afrin R, Harima M, Suzuki H, Nomoto M, Miyashita S, Suzuki K, Nakamura M, Watanabe K. Modulation of HMGB1 translocation and RAGE/NF κ B cascade by quercetin treatment mitigates atopic dermatitis in NC/Nga transgenic mice. *Exp Dermatol.* 24: 418-423 (2015)
- [19] Ishiguro-Oonuma T, Ochiai K, Hashizume K, Morimatsu M. The role of IFN- γ in regulating Nfkbiz expression in epidermal keratinocytes. *Biomed Res.* 36: 103-107 (2015)
- [20] Sridhar KR, Seena S. Nutritional and antinutritional significance of four unconventional legumes of the genus *Canavalia* - A comparative study. *Food Chemistry* 99 267-288 (2006)
- [21] Kim US, Kim JY, Kim SJ, Moon KH, Baek SH. Isoflavonoid Contents, Antibacterial Activities, and Physiological Activities of Chenggukjang Mad from Sword Bean. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41(2) 174-181 (2012)
- [22] Kim JP, Yang YS, Kim JH, Lee HH, Kim ES, Moon YW, Kim JY, Chung JK. Chemical Properties and DPPH Radical Scavenging Ability of Sword Bean(*Canavalia gladiata*) Extract. *KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL* 44(4) 441-446 (2012)
- [23] S Ekanayake, K Skog, NG Asp. Canavanine content in sword beans (*Canavalia gladiata*): Analysis and effect of processing. *Food Chem Toxicol.* 45(5): 797-803 (2007)
- [24] T Acamovic, JP D'Mello. HPLC Analysis of Canavanine and Canaline in *Canavalia ensiformis*, and in Excreta and Serum of Chicks *J Sci Food Agric* 50 63~77 (1990)
- [25] J MIERSCH, C JOHLKE, IG STERNKOPF GJ KRAUSS. METABOLISM AND EXUDATION OF CANAVANINE DURING DEVELOPMENT OF ALFALFA. *Journal of Chemical Ecology*, 18(11) (1992)
- [26] Gh Sadeghi, A Samie, J Pourreza, HR Rahmani. Canavanine Content and Toxicity of Raw and Treated Bitter Vetch (*Vicia ervilia*) Seeds for Broiler Chicken. *International Journal of Poultry Science* 3(8) 522-529 (2004)
- [27] Kim US, Kim JY, Kim SJ, Moon KH, Baek SH. Isoflavonoid Contents, Antibacterial Activities, and Physiological Activities of Cheonggukjang Made from Sword Bean. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41:2 174 ~ 181(2012)
- [28] Akaogi J, Barker T, Kuroda Y, Nacionales DC, Yamasaki Y, Stevens BR, Reeves WH, Satoh M. Role of non-protein amino acid L-canavanine in autoimmunity. *Autoimmun Rev.*

5: 429-435 (2006)

- [29] Sivaranjani N, Rao SV, Rajeev G. Role of reactive oxygen species and antioxidants in atopic dermatitis. *J Clin Diagn Res.* 7: 2683-2685 (2013)
- [30] Boguniewicz M, Leung DY. Atopic dermatitis: a disease of altered skin barrier and immune dysregulation. *Immunol Rev.* 242: 233-246 (2011)
- [31] Werfel T, Wittmann M. Regulatory role of T lymphocytes in atopic dermatitis. *Chem Immunol Allergy.* 94: 101-11 (2008)
- [32] Bhol KC, Schechter PJ. Topical nanocrystalline silver cream suppresses inflammatory cytokines and induces apoptosis of inflammatory cells in a murine model of allergic contact dermatitis. *Br J Dermatol.* 152: 1235-1242 (2005)
- [33] Matsuda H, Watanabe N, Geba GP, Sperl J, Tsudzuki M, Hiroi J, Matsumoto M, Ushio H, Saito S, Askenase PW, Ra C. Development of atopic dermatitis-like skin lesion with IgE hyperproduction in NC/Nga mice. *Int Immunol.* 9: 461-466 (1997)
- [34] Carmi-Levy I, Homey B, Soumelis V. A modular view of cytokine networks in atopic dermatitis. *Clin Rev Allergy Immunol.* 41: 245-253 (2011)
- [35] I Nallamuthu, A Tamatam, F Khanum. Effect of hydroalcoholic extract of *Aegle marmelos* fruit on radical scavenging activity and exercise-endurance capacity in mice. *Pharmaceutical biology.* 52:551-559 (2014)
- [36] N Watanabe, Y Hara, S Sakuda, Y Mori, Y Furuya, T watanabe. Effects of Dietary Green Rooibos on Physical Endurance in Swimming Mice. *Food and Nutrition Sciences.* 5:127-131 (2014)
- [37] C Xiang, L Zhang, Z Xiaowei, L Xiaojuan. Polysaccharides from *Portulaca oleracea* L Improve Exercise Endurance and Decrease Oxidative Stress in Forced Swimming Mice. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research.* 13:229-234 (2014)
- [38] SY Wang, WC Huang, CC Lin, MF Wang, CS Ho, WP Huang, CC Hou, HL Chuang, CC Huang. Pumpkin (*Cucurbita moschata*) Fruit Extract Improves Physical Fatigue and Exercise Performance in Mice. *Molecules.* 17:11864-11876 (2012)
- [39] Wakame K, Komatsu K, Inagawa H, Nishizawa T. Immunopotentiator from *Pantoea agglomerans* Prevents Atopic Dermatitis Induced by *Dermatophagoides farinae* Extract in NC/Nga Mouse. *Anticancer Res.* 35: 4501-4508 (2015)
- [40] Park SJ, Lee HA, Kim JW, Lee BS, Kim EJ. *Platycodon grandiflorus* alleviates DNCB-induced atopy-like dermatitis in NC/Nga mice. *Indian J Pharmacol.* 44: 469-474 (2012)
- [41] Jiang J, Yamaguchi T, Funakushi N, Kuhara T, Fan PS, Ueki R, Suto H, Kase Y, Ikeda S, Ogawa H. Oral administration of Yokukansan inhibits the development of atopic dermatitis-like lesions in isolated NC/Nga mice. *J Dermatol Sci.* 56: 37-42 (2009)

- [42] Kim MS, Hur YG, Kim WG, Park BW, Ahn KS, Kim JJ, Bae H. Inhibitory effect of *Platycodon grandiflorum* on T(H)1 and T(H)2 immune responses in a murine model of 2,4-dinitrofluorobenzene-induced atopic dermatitis-like skin lesions. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 106: 54-61 (2011)

주 의

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