



# 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “청국장의 대사성 질환 (당뇨병 및 치매) 예방에 미치는 영향 및 작용기전 연구” 에 대한 최종보고서로 제출합니다.

2012 년 11 월 30 일

호서대학교

## 연 구 진

연구기관명 : 호서대학교

연구책임자 : 박 선 민

책임연구원 : 박 선 민

연 구 원 : 김 다 술

연 구 원 : 강 선 아

연 구 원 : 문 나 랑

연 구 원 : 이 정 주

연 구 원 : 이 나 라

연 구 원 : 신 배 근

연 구 원 : 최 석 호

연구기관명 : 한국식품연구원

책임연구원 : 김 현 진

연 구 원 : 박 재 호

연 구 원 : 양 혜 정

연 구 원 : 정 도 연

연 구 원 : 손 나 리

연 구 원 : 최 지 혜

## 요 약 문

I. 제 목: 청국장의 대사성 질환 (당뇨병 및 치매) 예방에 미치는 영향 및 작용기전 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

○ 연구 목적: 전통 청국장과 3가지 종류의 *Bacillus*로 만든 표준 청국장의 항당뇨 및 항치매 효과와 기전을 당뇨병 동물 모델과 치매 동물 모델에서 조사하였음

III. 연구개발 내용 및 범위

○ 체장부분제거 당뇨백서이나 당뇨백서에 CA1 부위로  $\beta$ -amyloid (25-35)를 주입한 치매 백서에서 고지방식이, 10% 삶은콩 (CSB), 10% 전통청국장 (TFC), 10% *B. lichemiformis*로 만든 표준 청국장 (SFC)를 8주 동안 투여하였을 때 항당뇨 효과와 항치매효과를 각각 조사하였음. 치매 연구에서는 정상대조군으로  $\beta$ -amyloid (35-25)를 CA1으로 주입한 백서를 사용하였음.

- 인식변화와 포도당 대사를 측정하였음

IV. 연구개발결과

○ 당뇨백서에서 TFC와 *B. lichemiformis*로 만든 SFC는 같은 정도의 항당뇨 효과가 있었음

- In vitro 연구에서 TCF와 *B. lichemiformis*로 만든 SFC는 표준- $\gamma$  활성과 발현을 증가시킴으로 인슐린 자극에 의한 포도당 흡수를 증가시켰으며 인슐린 분비를 향상시키고 베타세포의 증식을 증가시키는 효과가 있었음

○ SFC는 치매 동물 모델에서 가장 큰 치매 유발 방지 효과가 있었음

- SFC는 water maze와 passive avoidance로 인식변화정도를 측정하였을 때 인지가 대조군에 비해 가장 향상되었고 TFC와 CSB는 SFC 만큼은 아니지만 대조군보다는 향상되었음

- euglycemic hyperinsulinemic clamp에서 대조군의 치매 백서는 말초조직의 인슐린 저항성을 증가시키고 특히 고인슐린혈증에서 간에서 포도당신생합성을 증가시켰고, SFC는 인슐린 저항성의 악화를 방지하였음.

- hyperglycemic clamp에서 두 번째 phase의 인슐린 분비능은 정상대조군에 비해 치매대조군에서 증가하였고, 이것은 궁극적으로 체내 포도당 대사를 악화시키며 SFC는 이것을 회복시켰고, TFC와 CSB도 인슐린 분비능을 억제하였음.

- 과도한 인슐린 분비로 인해 치매대조군의 베타세포의 양이 감소시켰고, 이것은 apoptosis의 증가와 관련이 있으며, 이것은 SFC의 투여에 의해서 회복되었음.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

○ 노인들에서 치매와 당뇨병의 유발이 증가하고 있으므로 건강기능성식품을 개발하여 노인의 삶의 질을 향상시키는데 기여할 것이고 연구결과를 SCI 저널에 발표하여 한국의 전통식품의 우수성을 알리고자 함

## SUMMARY

**I. Title :** Study to examine the effects and mechanism of chungkookjang on metabolic disease (diabetes and Alzheimer diseases)

### II. The purpose of this research

- We investigated whether both chungkookjang have the protective action in diabetes in diabetic rats and cognitive dysfunction in  $\beta$ -amyloid-infused diabetic rats

### III. The contents of the study

- Partial pancreatectomized diabetic rats or rats with type 2 diabetes and Alzheimer's disease induced by partial pancreatectomy and  $\beta$ -amyloid (25-35) infusion into CA1 were fed either control diet, 10% cooked soybeans (CSB), 10% traditionally made chungkookjang fermented for 48 h (TFC), or standardized chungkookjang (SFC) fermented by inoculating *Bacillus lichemiformis* for 48 h in a high fat diet for 8 weeks. Px rats infused  $\beta$ -amyloid (35-25) as a normal-control group.
- To measure cognitive function and glucose metabolism

### IV. The results

- TFC and SFC made with *B. lichemiformis* had equivalent anti-diabetic activity in partial pancreatectomized diabetic male rats
- In vitro studies showed that TCF and SFC made with *B. licheniformis* had insulin-stimulated glucose uptake with increased  $\alpha$ -glucosidase activity and expression and also they had insulinotropic activity.
- In vivo study revealed that TCF and SFC improved insulin sensitivity in whole body and the liver and they also potentiated glucose-stimulated insulin secretion and increased  $\beta$ -cell mass.
- SFC made with *B. lichemiformis* had the biggest protective effect on Alzheimer's disease in diabetic rats infused  $\beta$ -amyloid (25-35) into CA1 region.
- SFC greatly improved cognitive function measured by water maze and passive avoidance tests by decreasing  $\beta$ -amyloid deposition in the hippocampus and TFC and CSB also improved but not as much as SFC.
- Rats in the control group increased whole body glucose infusion rates and decreased hepatic glucose output at hyperinsulinemic state during euglycemic hyperinsulinemic clamp and SFC restored it.
- Insulin secretion, especially at the second phase during hyperglycemic clamp was potentiated in control rats in comparison to the normal control group and CSB, TFC and SFC lowered it.
- $\beta$ -cell mass was recovered by SFC in  $\beta$ -amyloid-infused rats that reduced  $\beta$ -cell mass by increased  $\beta$ -cell apoptosis.

### V. Future plan

- To contribute the improvement of life quality of elderly generation through making functional foods and to publish in SCI journal.

## 국 문 목 차

I. 제 목	
II. 연구개발의 목적 및 필요성 -----	8
III. 연구개발 내용 및 범위 -----	15
IV. 연구개발결과 -----	19
V. 연구성과 및 성과활용 계획 -----	50
VI. 참고문헌 -----	52

CONTENTS  
(영 문 목 차)

I. Title	
II. The purpose of this research	8
III. The contents of the study	15
IV. The results	19
V. Future plan	50
VI. References	52

## 연구개발보고서 초록

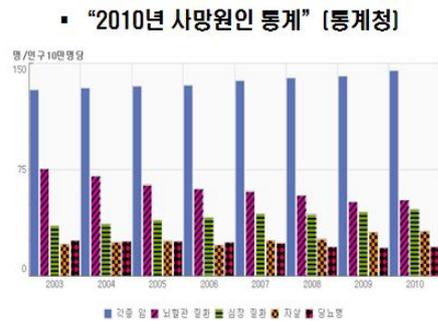
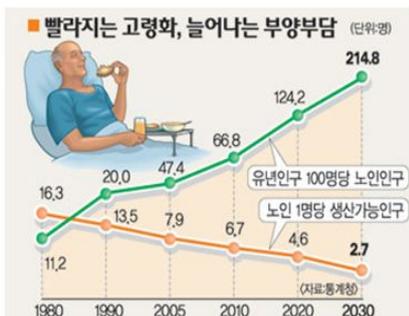
과 제 명	(국문) 청국장의 대사성 질환 (당뇨병 및 치매) 예방에 미치는 영향 및 작용기전 연구 (영문) Study to examine the effects and mechanism of chungkookjang on metabolic disease (diabetes and Alzheimer diseases)		
연 구 기 관	호서대학교	연 구	(소속) 식품영양학과
참 여 기 관	한국식품연구원	책 임 자	(성명) 박선민
연 구 비	계	총 연 구 기 간	2011. 12. 1 - 2012. 11. 30 (1년)
참 여 연 구 원	명 (연구책임자: 명, 책임연구원: 명, 연구원: 명, 연구보조원 명)		
<p>○ 연구개발 목표 및 내용</p> <p>전통청국장과 표준화된 청국장의 대사성 질환인 당뇨병과 치매의 예방 효과를 확인하고, 그 유효성분을 탐색하고, 그 작용 기전을 구명함으로써 우리나라 전통 장류의 하나인 청국장의 세계화 기반 마련</p> <p>제1세부과제: 전통 및 표준 청국장의 대사성 질환 예방에 효과적인 기능성 성분 탐색 및 기전 규명</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 실험동물모델을 이용하여 전통 및 표준 청국장의 항당뇨 및 항치매 효과를 조사하고 그 작용기전을 조사함</li> </ul> <p>제2세부과제: 청국장 발효 중 대사 물질 변화 및 섭취 후 체내 metabolomics의 변화 조사</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 청국장의 발효 기간 동안 변화하는 발효대사물질의 변화 조사함</li> <li>- 청국장 식이 동물모델의 혈액, 뇨, 장기 등에서 체내 대사물질의 변화를 연구함</li> </ul> <p>○ 연구결과</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 당뇨백서에서 TFC와 <i>B. lichemiformis</i>로 만든 SFC는 같은 정도의 항당뇨 효과가 있었음</li> <li>: In vitro 연구에서 TCF와 <i>B. lichemiformis</i>로 만든 SFC는 표준-<math>\gamma</math> 활성과 발현을 증가시킴으로 인슐린 자극에 의한 포도당 흡수를 증가시켰으며 인슐린 분비를 향상시키고 베타세포의 증식을 증가시키는 효과가 있었음</li> <li>- SFC는 치매 동물 모델에서 가장 큰 치매 유발 방지 효과가 있었음</li> <li>: SFC는 water maze와 passive avoidance로 인식변화정도를 측정하였을 때 인지가 대조군에 비해 가장 향상되었고 TFC와 CSB는 SFC 만큼은 아니지만 대조군보다는 향상되었음</li> <li>: euglycemic hyperinsulinemic clamp에서 대조군의 치매 백서는 말초조직의 인슐린 저항성을 증가시키고 특히 고인슐린혈증에서 간에서 포도당신생합성을 증가시켰고, SFC는 인슐린 저항성의 악화를 방지하였음.</li> <li>: hyperglycemic clamp에서 두 번째 phase의 인슐린 분비능은 정상대조군에 비해 치매대조군에서 증가하였고, 이것은 궁극적으로 체내 포도당 대사를 악화시키며 SFC는 이것을 회복시켰고, TF와 CSB도 인슐린 분비능을 억제하였음.</li> <li>: 과다한 인슐린 분비로 인해 치매대조군의 베타세포의 양이 감소시켰고, 이것은 apoptosis의 증가와 관련이 있으며, 이것은 SFC의 투여에 의해서 회복되었음.</li> </ul> <p>○ 연구성과 및 성과활용 계획</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 노인들에서 치매와 당뇨병의 유발이 증가하고 있으므로 건강기능성식품을 개발하여 노인의 삶의 질을 향상시키는데 기여할 것이고 연구결과를 SCI 저널에 발표하여 한국의 전통식품의 우수성을 알리고자 함.</li> </ul>			

# 1 장. 연구개발의 목적 및 필요성

## 1절. 연구개발의 필요성

### (1) 우리나라에서의 당뇨병 및 뇌졸중 치매와 뇌졸중 발병률 증가

- 우리나라에서는 식생활과 생활 습관의 변화로 인해 당뇨병 유병률은 1970년대의 약 2%를 시작으로 점차적인 증가를 보이기 시작하여 200년대에는 당뇨병 유병률은 7-10% 정도로 증가하고 그 후에는 더욱 증가할 것으로 예측하고 있음<sup>1)</sup>
- 우리나라에서는 관상동맥질환의 발병률은 서구에 비해 낮지만 심혈관계질환 중에서는 뇌졸중의 발병률이 급격하게 증가하고 있음
- 우리나라 사람들은 BMI가 23 이상만 되어도 이러한 대사성 질환 발병에 대한 위험이 증가하므로 특히 나이가 들면서 체지방의 증가나 활동량의 감소는 당뇨병이나 치매의 발병을 급격하게 증가시킴
- 치매는 뇌의 당뇨병이라고 할 정도로 당뇨병과 밀접한 관련이 있으므로 향후 사람들의 수명이 더 길어지면 치매의 발병률은 또한 급격히 증가할 것이므로 치매를 예방할 수 있는 식품을 탐색하는 연구가 필요함 (Fig. 1)
- 우리나라가 고령화 사회로 진입하면서 치매 유병률 증가하고 있으며 노인에서 치매의 유병률은 6.3%에서 13.0%에 이르며, 노인인구의 급격한 증가에 따라 치매 환자의 숫자 도 빠르게 증가하고 있음<sup>2,3)</sup> (Fig. 1)
- 그러므로 매일 섭취할 수 있는 식품 중에서 당뇨병 및 치매를 예방할 수 있는 기능성 식품의 개발이 시급함



당뇨



치매

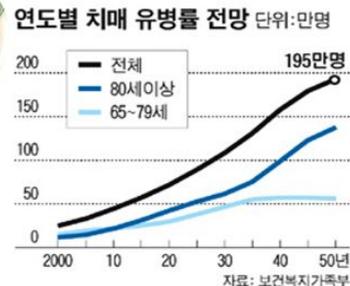


Fig. 1. 고령화로 인한 당뇨병 및 치매 유병률의 증가

## (2) 당뇨병과 Alzheimer disease의 관련성

- 중추신경계는 비만, 제2형 당뇨병 및 치매의 발병과 직·간접적으로 영향이 있을 것으로 알려져 있고 시상하부는 식욕 조절 중추로 지방 조직에서 분비되는 렙틴(leptin)은 시상하부에 신호전달을 통해 체지방의 양을 알려주고 이러한 신호전달로 식이 섭취량 조절하고 또한 시상하부의 AMPK의 인산화도 식이 섭취량 조절에 관여한다는 것이 알려짐<sup>4,5)</sup> (Fig. 2)
- 또한, 시상하부에서의 렙틴과 인슐린 신호전달은 간에서의 포도당 신생합성에 영향을 미쳐 말초조직에서의 당대사에 직접적으로 관여한다는 것이 알려짐<sup>4,5)</sup> (Fig. 2)

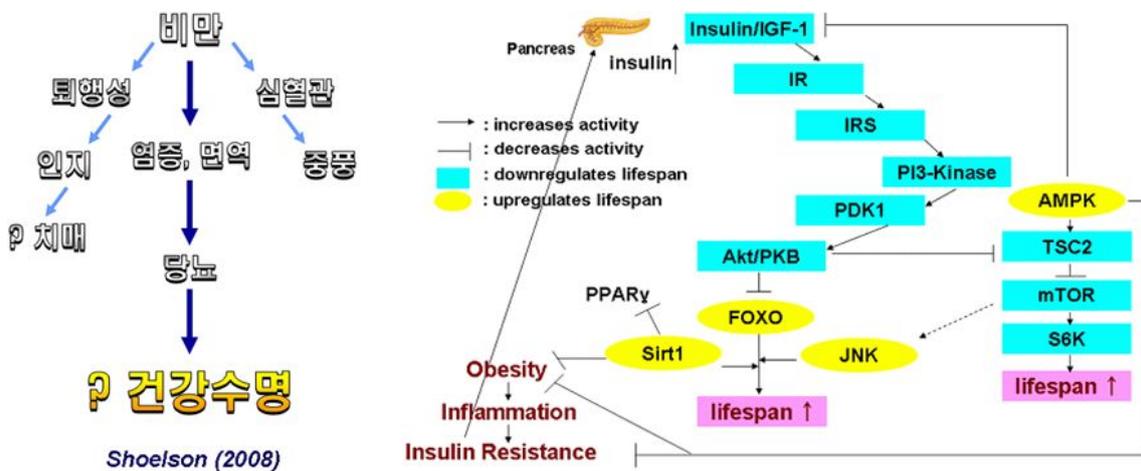


Fig. 2. 비만과 대사성 질환의 연계성

- 해마는 기억을 담당하는 기관으로 인슐린을 합성하여 분비하며 인슐린이 기억력을 조절하는데 중요한 역할을 하는 것이 알려졌으며, 최근에는 해마에서 인슐린을 분비하는 것에 장애가 생기거나 뇌의 특정부위에서 췌장의 베타세포로부터 인슐린을 분비하는 것에 장애가 나타나는 당뇨병을 제3형 당뇨병이라고 명명하였음<sup>6,7)</sup>
- 해마의 손상은 Alzheimer 질환을 유발한다는 것은 잘 알려져 있으며 이 질환이 유발되는 기전은 아직 확실하게 알려지지 않았지만  $\beta$ -amyloid 축적이나 ischemia가 Alzheimer 질환을 유발시킨다는 것은 알려졌음<sup>8)</sup>
- 한편, Alzheimer 질환이 뇌의 당뇨병이라고 불릴 정도로 당뇨병과 Alzheimer 질환이 밀접한 관련이 있고 이 두 질환은 당대사 장애, 과산화의 증가, 인슐린 저항성과 amyloidogenesis 등의 공통장애를 가지고 있으면서도<sup>9,10)</sup> (Fig. 3) 어떤 기전에 의해서 이러한 공통적인 장애를 나타내는 지에 대한 연구가 이루어지지 않고 있음
- 일반적으로 비만이나 당뇨병등과 같이 인슐린 저항성이 증가한 상태에서 이차적으로 해마에서의 amyloidogenesis가 증가하여 Alzheimer 질환이 증가하는 것

- 에 대해서는 여러 연구가 있지만 해마에서의 amyloidogenesis나 ischemia가 해마나 다른 뇌 부위에서 인슐린 저항성을 증가시키거나 더 나아가 간이나 말초조직에서의 인슐린 저항성이 나타나는 지에 대한 연구는 거의 없었음
- Harvard 의과대학의 White group에서는 뇌에서 인슐린 신호전달에 중요한 역할을 하는 insulin receptor substrate-2 (IRS2)를 제거한 마우스는 베타세포의 증식 장애로 인한 인슐린 분비능의 감소로 심한 당뇨병을 나타낼 뿐 아니라 해마에서 tau phosphorylation이 증가하였다는 보고가 있었으나<sup>11)</sup>, 최근연구에서는 유전적으로  $\beta$ -amyloid 축적시키는 mice (APP transgenic mice)에서 IGF-1-->IRS2을 제거하였을 때 오히려  $\beta$ -amyloid의 축적을 감소시켰다는 보고가 있음<sup>12)</sup> (Fig. 4)
  - 그러므로 IRS2로 시작하는 인슐린 신호전달의 장애는 다양한 대사성 장애를 유발시킬 수 있음 (Fig. 4)
  - $\beta$ -amyloid의 축적에 의해서 neurodegenerative 과정이 진행되어 발생하는 Alzheimer 질환뿐만 아니라 치매를 일으키는 또 하나의 기전인 artery occlusion에 의해서 나타나는 hippocampus의 세포 사멸이 체내 당대사에 미치는 영향을 연구한 것도 거의 없음
  - Alzheimer 치매는 뇌에서의 인슐린 저항성의 증가와 밀접한 관련이 있다고 보고 있으며, 제2형 당뇨병이 치매의 근본원인 중 하나라는 보고로 이를 확인하기 위한 대대적인 임상시험이 미국에서 인슐린 민감성을 개선하는 약을 복용하는 당뇨병 재향군인 14만 명을 대상으로 실시하고 있음
  - 결과적으로 여러 연구 결과에서 시상하부는 식이섭취량, 열량소모량, 체내 당대사에 관여하는 것으로 보고되고 있고 Alzheimer 질환이 당대사에 장애를 일으킨다는 것이 보고되고 있지만 뇌의 해마가 식이 섭취나 당대사 등에 영향을 미친다는 것에 대한 연구한 것은 거의 없음

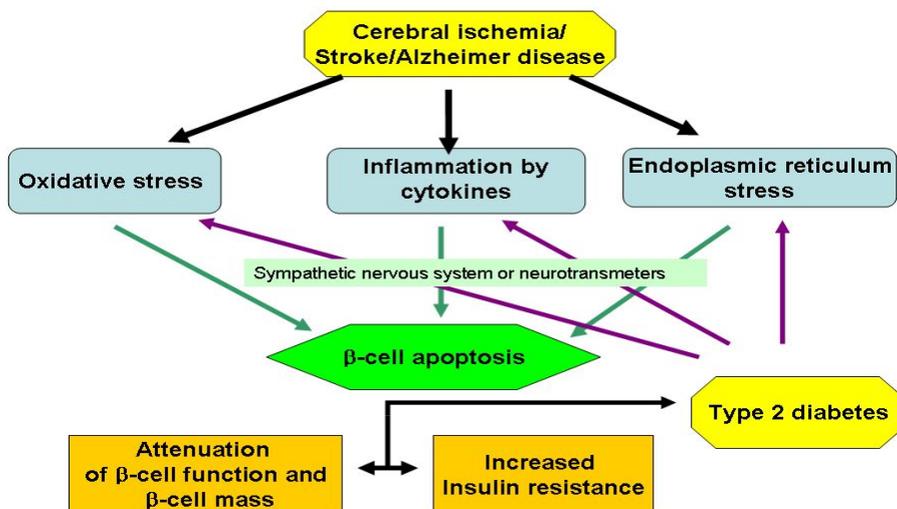


Fig. 3. 뇌졸중, 치매와 당뇨병의 병인의 상호 관계

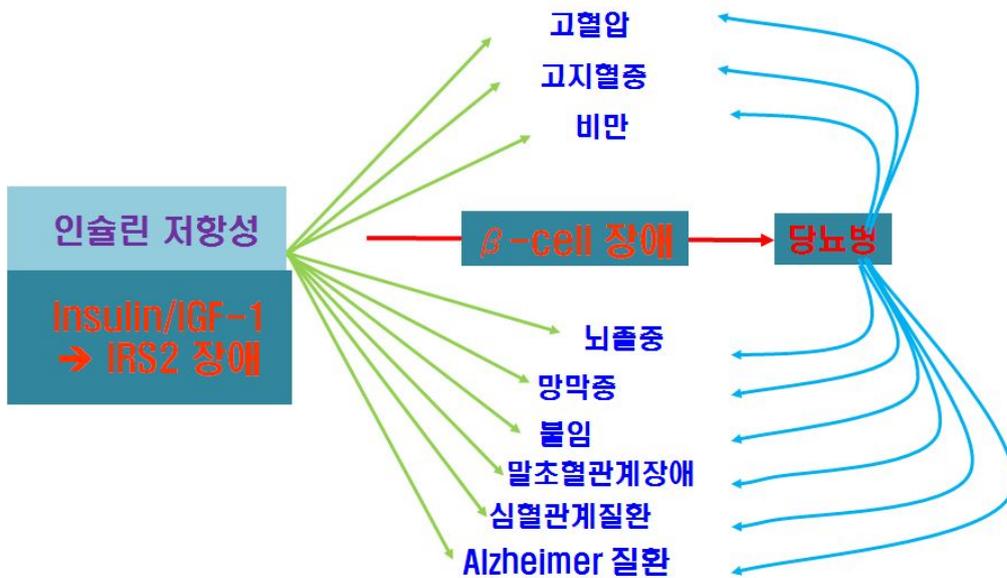


Fig. 4. 대사성 질환의 공통적 병리 기전

### (3) 기능성을 나타내는 성분 규명

- 된장에서 형성된 크기가 작은 올리고펩타이드는 angiotensin converting enzymes (ACE) 억제, 항트로빈 형성과 항산화 효과가 있다는 것이 보고되었으나 청국장에서는 분리된 올리고펩타이드가 거의 없었음
- 항고혈압에 효과가 있는 것에는 된장에서 분리된 Ala-Pro나 Val-Pro-Pro와 Ile-Pro-Pro가 있으며 항ACE 효과가 있는 것으로는 His-His-Leu이 알려져 있음
- 혈청 콜레스테롤 농도를 낮추는 펩타이드로는 콩단백질인 glycinin을 trypsin과 pepsin으로 분해해서 제조한 Leu-Pro-Tyr-Pro, Ile-Ala-Val-Pro-Gly-Glu-Val-Ala와 Ile-Ala-Val-Pro-Thr-Gly-Val-Ala가 있으며 이들은 체내 콜레스테롤 생합성에 중요한 조절효소인 HMG-CoA reductase의 활성을 억제하였음
- 과거의 연구에서 콩에 함유된 isoflavonoid glycones는 청국장에서 glycoside가 제거된 isoflavonoid aglycone형태인 daidzein과 genistein으로 전환되고 이들은 탁월한 항당뇨 효과를 나타내었음<sup>13)</sup>
- 그러나 아직까지 청국장에서 분리한 특정한 펩타이드 sequence가 항당뇨 효과를 나타내는 지에 대한 연구는 이루어지지 않았지만 분해된 펩타이드를 주로 함유하고 있는 청국장의 물추출물이 인슐린 민감성과 인슐린 분비능을 증가시킨다는 것을 보여 주었으므로 항당뇨 효과가 있는 특정 펩타이드 배열이 존재할 것으로 사료되었음
- 청국장이 제조되는 동안 콩단백질은 크기가 작은 (0.2-2 KD) 펩타이드로 전환되고 이들도 콩단백질 자체에 비해 항당뇨 효과를 향상시켰음<sup>14)</sup> (Fig. 4)

- 본 연구팀은 콩의 식이 섬유소에 대한 연구는 하지 않았으나 콩의 식이 섬유소도 청국장으로 제조되는 동안 변화하여 다양한 물질을 생성할 수 있으므로 이에 대한 연구가 향후 필요함
- 청국장에서 기능성을 나타낼 수 있는 성분을 탐색하기 위해서 top-down 방식을 사용하여 청국장을 여러 가지 용매로 추출하고 펩타이드를 크기와 전하 등에 의해서 분리하여 하는 것은 시간과 노력에 비해서 결과가 좋지 않은 경우가 많았음
- 본 연구팀은 청국장에 대한 연구를 오랫동안 진행하여 전통 청국장과 표준 청국장의 isoflavonoid, 펩타이드, 식이섬유소 성분 변화에 대해서 자세히 파악하고 있으므로 각 성분들을 먼저 분리하고 분리한 성분의 치매나 뇌졸중의 발생을 지연시키는 효과에 대해서 조사하는 bottom-up 방식을 사용하였음

	[%]		
	삶은 콩	전통청국장 - 48hr	
Daidzin	45.7	28.9	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 아미노산 조성의 변화</li> <li>: 메티오닌 함량이 3배 이상 증가;</li> <li>lysine 10배 이상 증가;</li> <li>다른 필수아미노산 함량도 3배 이상 증가</li> <li>• 3-5% polyglutamic acids (PGA) 함유</li> <li>• 식이섬유소 함유</li> </ul>
Glycitin	8.2	1.8	
Genistin	43.5	17.6	
Daidzein	1.0	26.1	
Glycitein	0.8	15.3	
Genistein	0.9	10.9	

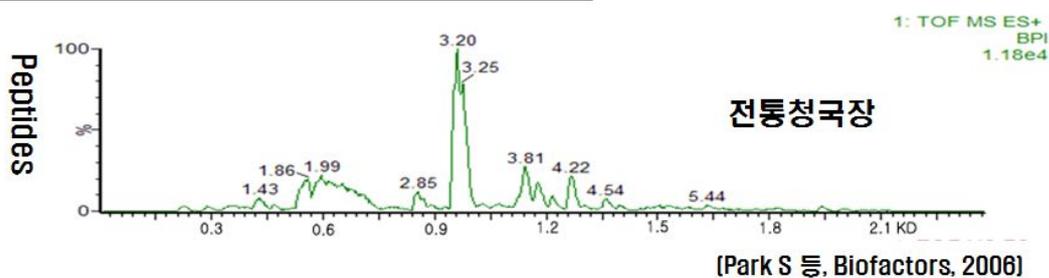


Fig. 4. 전통 청국장의 성분

#### (4) metabolomic의 중요성

- 대사체학 (Metabolomics or metabonomics)는 “-omics”의 한 분야로 high throughput technology (NMR, LC/MS, GC/MS 등)을 이용하여 다양한 유전적, 생리적, 또는 환경적 조건하에서 변화되어 나타나는 생체내 (조직, 혈액, 뇨 등) 저분자 대사물질들을 분석하고 이들 대사물질들이 관여하는 대사경로를 총체적으로 분석함으로써 생명현상의 변화 원인을 규명해 나가는 연구 분야임
- 대사체 (대사물질, metabolite)는 실제로 생명체의 표현형을 가장 잘 나타내는 분자량 1,000 이하의 저분자 물질이며 이를 연구하는 대사체학은 유전자나 단백질

질의 기능을 밝혀낼 수 있는 중요한 연구 분야로 인식되고 있음

- 대사체학 연구를 통해 얻어진 결과들 자체 또는 유전자나 단백질 연구에서 얻어진 결과들과의 연관성을 조사함으로써 생체에서 일어나는 여러 생리학적, 병리학적 발현에 관한 상당한 정보를 제공하였음
- 이런 중요성으로 인하여 2005년에 MIT의 Technology review지에서 선정한 10 emerging technology 중 하나로 선정되었으며 2010년도 1월 Nature지의 2020 visions 중 하나로 선정되었음
- 대사체학의 활용분야로는 질병진단, 신약개발, 약물효능 및 독성, 환경, 식물 또는 미생물의 생리변화뿐만 아니라 최근에서 발효, 기능성식품의 효능검증, 식품의 섭취 모니터링, 소재의 진위판별 등 식품/영양 분야에서도 활용되고 있음
- 발효 대사산물을 분석하는 발효 대사체학 연구를 통해 얻어진 결과들은 발효산물의 sensory, nutritional quality control에 대한 정보를 제공하였음

#### (5) 연구 결과의 유용성

- 일본에는 청국장과 유사한 나또 (natto)가 있는데 이것도 청국장과 같이 전통적으로 콩을 발효시켜 섭취하던 것을 *Bacillus natto*를 접종하여 제품화하여 일본의 대표 콩 발효식품으로 세계화하였음
- 우리나라의 청국장은 일본의 나또에 비해 기능성이 탁월함에도 불구하고 연구가 많이 이루어지지 않았고 청국장을 된장처럼 찌개로 조리하여 섭취하여서 청국장을 세계화하는데 어려움이 있었음
- 본 연구에서 중점을 둔 것은 과거의 본 연구자 뿐 아니라 다른 연구자들의 연구들에서 전통 청국장이 당뇨병에 효과적인 것은 알고 있었고, 이러한 효과는 전통 청국장이 만들어질 때 생성되는 성분 중에서 특히 genistein, glycitein과 daidzein과 같은 isoflavonoid aglycone들과 작은 펩타이드들의 효과일 가능성을 보고하였음
- 그러나 전통청국장의 단점은 공기에 있는 미생물이나 벧짚에 있는 미생물이 발효 미생물이어서 제조하는 지역이나 시기에 따라 기능성에 차이를 나타낼 수 있다는 것을 알 수 있었음
- 본 연구에서 특히 관심을 가진 것은 청국장에서 기능성 특히 항당뇨와 항치매에 효과적인 균주를 발견하여 항상 일정한 기능과 품질을 가진 청국장을 제조하는 것이었음
- 청국장의 발효과정을 특정 균주로 표준화하여 생성되는 성분들을 표준화하고 제품의 기능성을 항상 일정하게 나타나도록 함으로써 한식의 세계화에 기여할 수 있음
- 향후 청국장에 대한 기능성 연구를 통해 건강에 유익하다는 것을 세계에 알리고 청국장을 그자체로 식사 대용 제품이나 간식으로 섭취할 수 있는 형태로 세

계시장을 넓히는 것이 필요함

- 청국장은 소금을 함유하고 있지 않아서 저염식으로 조리할 수 있으며 특히 생으로 섭취할 수 있어서 다양한 형태의 식품으로의 개발이 가능하므로 연구 결과를 활용하기 쉬운 장점이 있어 간식으로도 섭취가 가능하므로 사람들이 일상생활에서 섭취하기 쉬우므로 장기간 동안 섭취해야 예방과 약물 치료 효과를 극대화할 수 있는 기능성 식품으로 적절함
- 청국장은 전통방식이나 표준화된 방식 모두 제조 시간이 짧아서 연구가 용이함
- 표준 청국장을 개발할 때는 집중하는 Bacillus 균의 속에 따라 질병에 더 효과적인 것이 있을 수 있으므로 여러 종류의 미생물을 각각 집중한 표준 청국장을 개발하여 대사성 질환에 효과적인 기능성 식품을 개발하여 한식의 우수성을 알려 한식의 세계화에 기여하고자 함
- 청국장이 뇌졸중이나 치매가 효과가 있다면 다양한 제품으로 개발하여 많은 사람들이 질병 예방의 혜택을 볼 수 있으므로 우리나라 의료비 지출을 감소시킬 수 있는 효과를 볼 수 있음
- 당뇨병, 뇌졸중과 치매는 상호 연관성이 있으므로 이 세 가지 질병에 효과적인 청국장을 개발할 수 있을 것으로 사료됨

## 2절. 연구개발의 목적

- 전통청국장과 표준화된 표준 청국장의 대사성 질환인 당뇨병, 치매 및 뇌졸중의 예방 효과를 확인하고, 그 유효성분을 탐색하고, 그 작용 기전을 구명함으로써 우리나라 전통 장류의 하나인 청국장의 세계화 기반 마련
- 제1세부과제: 전통 및 표준 청국장의 대사성 질환인 제2형 당뇨병과 치매 예방에 효과적인 기능성 성분 탐색 및 작용기전 규명
  - 전통 청국장과 표준청국장들의 항당뇨 효과를 in vitro에서 연구
  - 전통 청국장과 표준청국장들의 항당뇨 효과를 in vivo에서 연구
  - 전통 청국장과 표준청국장들의 항치매 효과를 in vivo에서 연구
- 제2세부과제: 청국장 발효 중 대사 물질 변화 및 섭취 후 체내 metabolomics의 변화 조사
  - 순창장류연구소에서 전통청국장과 표준화된 개량 청국장을 제조하여 동물실험과 발효대사체 분석용으로 시료를 제공함.
  - LC/MS를 이용하여 전통청국장과 표준화된 개량 청국장의 발효기간별 발효대사체 분석을 진행하였음.
  - 제1세부과제에서 진행한 치매관련 동물실험의 시료 (혈액, 뇨, 간, 뇌)의 대사체 분석을 진행하였음.

## 2 장. 연구개발 내용 및 범위

### 1절. 연구개발 내용

#### 1. 제1세부과제

: 전통 및 표준 청국장의 대사성 질환 예방에 효과적인 기능성 성분 탐색 및 작용 기전 규명

가. 전통 및 표준 청국장의 항당뇨와 항치매 효과를 조사하고 그 작용기전을 조사하였음

나. 전통 청국장의 발효 과정 중 생성되는 물질들의 항당뇨와 항치매 효과를 조사하고 그 작용기전을 조사하였음

: 당뇨병과 치매 실험 동물 모델에 전통 및 표준 청국장 또는 청국장 생리활성 물질을 경구 투여한 후 인지능력 변화와 에너지 및 포도당 대사 조사하였음

(1) 뇌 세포 사멸의 정도와 부위 또는  $\beta$ -amyloid 축적 정도를 측정하였음

(2) 뇌에서 CNTF나 BDNF 등 신경 세포의 성장에 관여하는 단백질의 발현을 조사하였음

(3) 뇌에서 PI3 kinase-->Akt-->GSK-1 신호전달과 AMPK 인산화 조사하였음

(4) 인지능력에 변화를 water maze와 신경 결핍증세 점수로 조사하였음

(5) 체내 에너지 소모량과 포도당과 지방의 산화를 조사하였음

(6) 체내 인슐린 저항성의 변화를 조사하였음

(7) 췌장의 베타세포에서 인슐린 분비능의 변화를 조사하였음

(8) 췌장 베타세포의 양 및 islet morphometry (apoptosis와 proliferation)를 조사하였음

#### 2. 제2세부과제

: 청국장 발효 중 대사 물질 변화 및 섭취 후 체내 metabolomics의 변화 조사

가. 전통청국장 및 표준 제조 청국장의 제조 및 시료제공하였음

- 과거 연구에서 탐색한 결과인 전통청국장의 주요 Bacillus인 *B. subtilis*, *B. lichemiformis*, *B. amyloquences*로 제조한 표준 청국장을 사용하였음

나. 청국장의 발효 기간 동안 변화하는 발효대사물질의 변화 조사하였음

다. 청국장의 주요 기능성물질의 분리 동정하였음

라. 청국장 식이 동물모델의 혈액, 뇨, 장기 등에서 체내 대사물질의 변화를 연구하였음

## 2절. 연구 내용 범위

### 1. 제1세부과제

(1) 전통 및 표준 청국장의 항당뇨 및 항치매 효과를 조사하고 그 작용기전을 조사

- 과거의 연구에서 항당뇨 효과가 있는 전통 청국장과 그들의 함유되어 있는 미생물로 표준화시켜 제조한 표준 청국장을 치매와 당뇨병 동물 모델에게 공급할 때 항치매와 항당뇨병 효과와 작용 기전을 조사하였음
- 본 연구에서는 치매 동물 모델과 당뇨병 동물 모델에서 전통 및 표준 청국장들이 치매와 당뇨병의 예방 효과 뿐 아니라 체내 에너지와 포도당 대사의 변화도 측정하여 전체적으로 대사성질환의 예방에 효과가 있는지 를 조사하였음
- 전통과 표준 청국장의 항치매 및 항당뇨병 효과와 작용기전을 조사하였음
- 전통 청국장의 발효 과정 중 생성되는 물질들의 항치매 및 항당뇨병 효과를 조사하고 그 작용기전을 조사하였음
- 치매 동물 모델과 당뇨병 동물 모델에서 포도당과 에너지 대사 변화를 조사하였고, 이를 통해 항당뇨와 항치매 효과 뿐만 아니라 항비만 효과도 알 수 있었음

(2) 항당뇨병 효과

- 제조한 전통 및 표준 청국장을 당뇨백서에게 8주동안 투여한 후 당뇨병의 진전 지연과 그 지연 기전을 조사하였음
- 90% 채식 제거백서에게 전통과 표준청국장을 10%를 첨가한 고지방식이를 8주 동안 투여한 후
- 경구내당능 검사로 체내 포도당 대사 조사하였음
- 체내 인슐린 저항성의 변화 조사하였음
- 췌장의 베타세포에서 인슐린 분비능의 변화를 조사하였음
- 췌장 베타세포의 양 및 islet morphometry (apoptosis와 proliferation) 조사하였음

(3) 항치매 효과

- 제조한 전통 및 표준 청국장을 10%를 첨가한 고지방식이를 치매 동물모델에게 6주 동안 투여한 후 치매의 진전 지연과 그 지연 작용기전을 조사하였음
- 치매 동물 모델은 치매의 원인으로 알려진  $\beta$ -amyloid (25-35)를 intracerebroventricular (ICV) 방법으로 뇌로 주입한 백서를 사용하였음
- 치매의 예방 효과를 보기 위해서  $\beta$ -amyloid (25-35)를 주입하기 6주 전부터 청국장이나 그들에 함유된 생리활성 물질을 경구 투여하면서  $\beta$ -amyloid를 2주

- 동안 투여하고 그 후 시간 별로 치매의 예방 효과를 조사하였음
- water maze로 인지능력 변화 조사하였음
  - 해마에  $\beta$ -amyloid 축적에 영향을 미치는 지를 조사하였음
  - 뇌의 대뇌, 해마, 시상하부에 인슐린/insulin growth factor-1(IGF-1) 신호전달 (insulin receptor substrate-2 (IRS2)--> Akt--> glycogen synthase kinase-1 (GSK-1))과 tau 인산화 조사하였음
  - ciliary neurotrophic factor (CNTF) 나 brain-derived neurotrophic factor (BDNF)등 신경 세포의 성장에 관여하는 단백질의 발현이 변화하는 지를 조사하였음
  - 체내 에너지 소모량과 포도당과 지방의 산화를 조사하였음
  - 경구내당능 검사로 체내 포도당 대사 조사하였음
  - 체내 인슐린 저항성의 변화를 조사하였음
  - 췌장의 베타세포에서 인슐린 분비능의 변화를 조사하였음
  - 췌장 베타세포의 양 및 islet morphometry (apoptosis와 proliferation)를 조사하였음

## 2. 제2세부과제

### (1) 청국장의 제조

- 실험에 사용된 청국장은 전통청국장과 표준제조 청국장으로 나누어서 진행하였음
  - 전통청국장은 벗짚을 이용한 전통방법으로 60시간동안 발효하여 제조하였음
  - 표준제조 청국장은 확보된 우수 *Bacillus* 균주인 *B. subtilis*, *B. lichemiformis*, *B. amylofenices*를 각각 단독으로 사용하여 순창장류연구소 발효실에서 60시간 동안 발효하여 세가지 표준 청국장을 제조하였음

### (2) 청국장 발효 대사체 분석

- 발효과정 중 청국장의 변화를 확인하기위하여 전통청국장과 표준제조 청국장은 발효 0, 12, 36, 48, 60시간에 채취하여 발효대사체 분석에 사용되었음
  - 청국장의 발효기간별 발효대사체는 50% ethanol로 추출한 청국장 추출물을 LC/MS를 이용하여 분석하며 분석된 LC/MS data는 PCA와 PLS-DA의 다변량 통계분석을 통해 분석하였음
  - 분석된 대사체의 주요성분들을 동정한 후 발효 대사경로를 추적 연구하였음

### (3) 활성물질의 분리 동정

- 대사성 질환에 효과가 있는 분획에서 활성물질을 분리 동정하였음
  - 물 추출물과 주정 추출물 중 효과가 있는 분획에서 활성물질을 LC/MS, GC/MS

를 이용하여 분리 동정하였음

(4) 생체 대사체 분석

- 청국장 식이 동물실험 후 혈액과 간조직에서 대사체를 분석하였음.

○ 정상상태의 metabolite, 질환상태의 metabolite, 활성물질을 처리했을때의 metabolites의 변화를 LC-MS 또는 GC-MS를 이용하여 비교분석 한 후 다변량 통계분석 방법을 이용하여 그룹간의 차이를 시각화시켜주며 어떤 metabolites이 주로 그 차이에 관여하는지를 확인하였음

○ 다변량분석(Multivariate data analysis)을 통한 데이터 분석 : LC-MS 또는 GC-MS를 이용하여 얻은 생체시료 metabolome data을 Principal Component Analysis (PCA), Partial Least Squares-Discriminant Analysis (PLS-DA) 등의 다변량 통계 기법을 이용하여 분석함으로써 후보 생체지표물질을 선정하였음

### 3 장. 연구개발 결과

#### 1절. 제1세부과제

##### 1. in vitro 실험에서 표준 청국장들의 항당뇨 효과

###### (1) 표준 청국장 제조

- 전통청국장은 볶짚을 이용한 전통방법으로 48 또는 72시간 동안 발효하여 제조하였음.
- 표준제조 청국장은 확보된 우수 Bacillus균주인 *B. subtilus* (BS), *B. lichemiformis* (BL), *B. amylofenices* (BA)를 각각 단독으로 사용하여 순창장류 연구소 발효실에서 48 또는 72시간동안 발효하여 세 가지 표준 청국장을 제조하였음 (Fig. 5).

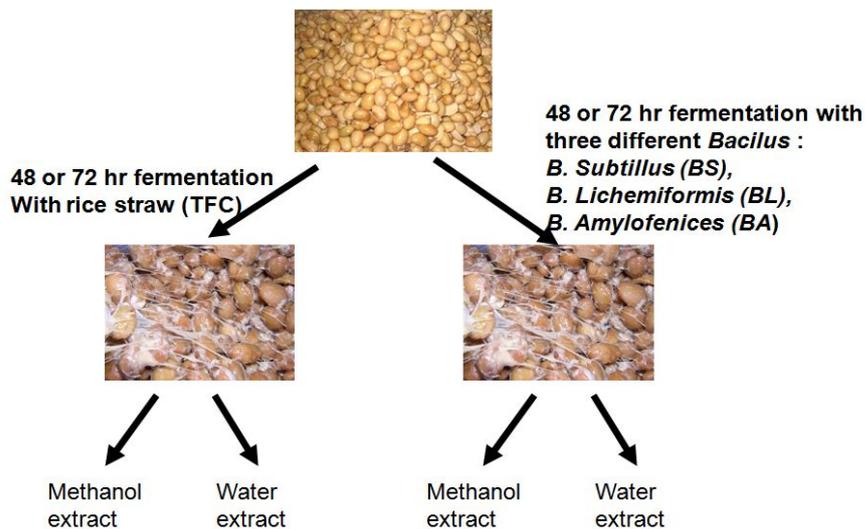


Fig. 5. 청국장 제조 및 추출

###### (2) 청국장 메탄올 추출액 중의 isoflavonoid contents

- 본 연구에서 메탄올 추출물을 사용한 것은 isoflavonoid를 최대한 용출시키기 위한 것이었음. 과거의 연구에서 전통 청국장의 항당뇨병에 대한 연구를 주정 추출물로 한 경우에도 항당뇨 효과가 있어서 메탄올이나 주정 추출물 사이에 큰 차이는 없을 것으로 사료되나 향후 연구를 더 진행하여 건강기능성 식품으로 개발하고자 함.
- 발효시키지 않은 삶은 콩 (CSB), 48시간 동안 전통청국장 (TFC), BS, BL, BA의 메탄올 추출물을 HPLC로 분석하였을 때 각각에 함유된 isoflavonoid 양은 Table 1에 주었음
- 총 isoflavonoid 함량은 발효 균주에 관계없이 발효시킨 청국장이 발효하지 않

은 콩인 CSB에 비해 약 30% 감소하였으나, CSB에는 주로 isoflavonoid에 glycation이 된 형태로 존재하였고, isoflavonoid aglycone은 소량 존재하였는데, 발효를 시키면 isoflavonoid glycone은 감소하고 isoflavonoid aglycone이 증가하였음 (Table 1)

- 전통청국장인 TFC와 isoflavonoid profile 중 특히 isoflavonoid aglycones의 함량이 가장 유사한 것은 BL이었음
- 지표 성분으로 genistein과 daidzein을 사용할 것이고 이성분에 대한 연구는 항당뇨 효과에 대한 연구는 과거에 본 연구자에 의해서 진행되었음
- 또한, 청국장의 점액성분인 poly-r-glutamate는 *B. lichemiformis*로 발효시킨 청국장에 많이 함유되어 있어서 이 성분에 대한 연구를 향후 진행하고자 함
- 또한, 청국장의 발효과정 중 생성되는 soyasaponin의 함량이 *B. lichemiformis*로 발효시킨 청국장에 많이 함유되어 있는데 이에 대한 연구가 적어서 이 성분에 대한 연구를 향후 진행하고자 함

Table 1. 청국장의 종류에 따른 isoflavonoid 함량

	(µg/g dry matter)				
	CSB	TFC	BS	BL	BA
Daidzin	489±17.4 <sup>d</sup>	151±20.0 <sup>c</sup>	85.9±5.3 <sup>b</sup>	61.8±5.1 <sup>a</sup>	104±5.1 <sup>b</sup>
Glycitin	157±18.6 <sup>d</sup>	75.2±11.4 <sup>c</sup>	48.2±2.3 <sup>b</sup>	32.6±0.5 <sup>a</sup>	55.3±3.5 <sup>b</sup>
Genistin	844±22.2 <sup>d</sup>	254±37.1 <sup>c</sup>	118±7.7 <sup>ab</sup>	105±11.3 <sup>a</sup>	146±8.8 <sup>b</sup>
Total glycosides	1,952±28.9 <sup>c</sup>	738±98.7 <sup>ab</sup>	777±59.0 <sup>b</sup>	624±55.9 <sup>a</sup>	817±41.9 <sup>b</sup>
Daidzein	25±6.5 <sup>a</sup>	170±49.9 <sup>c</sup>	78.7±5.0 <sup>b</sup>	138±9.2 <sup>c</sup>	72.9±2.6 <sup>b</sup>
Glycitein	13±3.9 <sup>a</sup>	66.3±9.0 <sup>c</sup>	41.3±3.3 <sup>b</sup>	74.3±5.4 <sup>c</sup>	37.4±1.2 <sup>b</sup>
Genistein	26±4.8 <sup>a</sup>	122.5±17.8 <sup>d</sup>	48.9±2.0 <sup>b</sup>	85.0±5.0 <sup>c</sup>	39.3±0.9 <sup>b</sup>
Total aglycones	64±8.0 <sup>a</sup>	359.1±76.1 <sup>c</sup>	169±10.0 <sup>b</sup>	298±19.5 <sup>c</sup>	150±4.4 <sup>b</sup>
Total isoflavones	1413±97.8 <sup>b</sup>	1097±174 <sup>a</sup>	945±67.5 <sup>a</sup>	922±74.4 <sup>a</sup>	967±45.2 <sup>a</sup>

(3) 청국장 물 추출액 중의 peptide profiles

- 발효시키지 않은 삶은 콩 (CSB), 48시간 동안 전통청국장 (TFC), BS, BL, BA의 물 추출물을 HPLC로 분석하였을 때 각각에 함유된 peptide profile은 Fig. 6에 주었고 각각 펩타이드 peak는 여러 가지 peptide 표준물질로 정하였음
- 펩타이드 profile은 TFC, BS, BL, BA가 유사하기는 하나 TFC가 가장 다른 profile을 나타내었고, BS, BL, BA도 펩타이드 크기에 차이가 있고 그 양도 차이가 있었음 (Fig. 6)

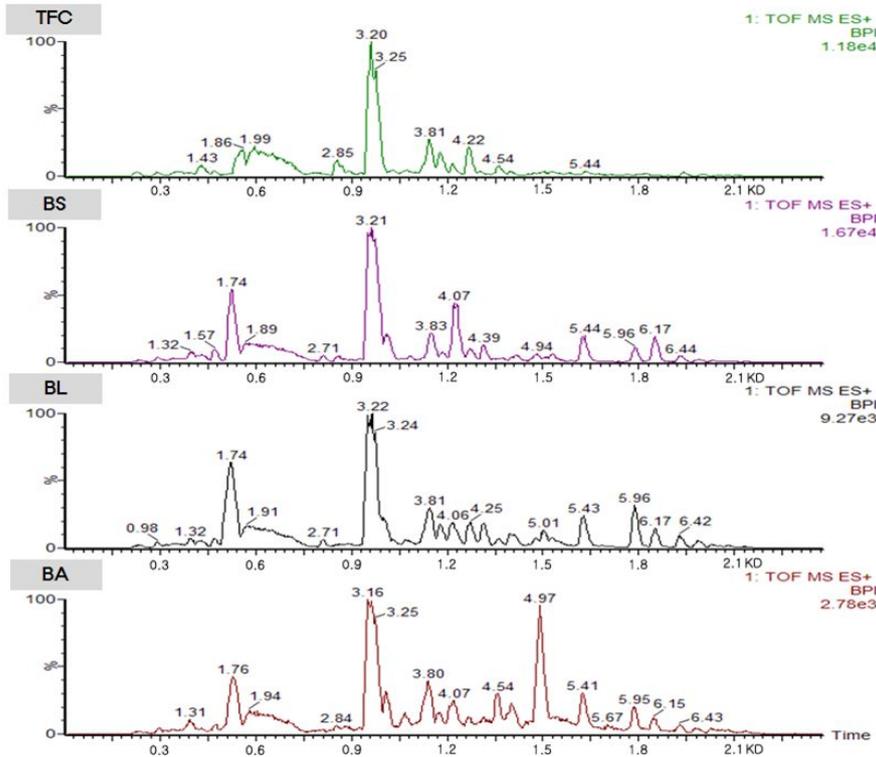


Fig. 6. Peptide profiles in different chungkookjangs

(4) 청국장 추출물의 *in vitro*에서 항당뇨 효과

1) 청국장 추출물의 인슐린 민감성 효과

- 청국장 추출물을 3T3-L1 fibroblast에 처리한 후 지방세포로 변형시킬 때 peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ )의 agnoist로 작용하는 지를 조사하였는데, PPAR- $\gamma$  agonist로 작용하는 것은 지방세포로의 변형을 촉진시키고 소량의 인슐린 (0.2nM)이 존재할 때 인슐린의 작용을 향상시켜 3T3-L1 지방세포에서 인슐린을 10 nM 처리한 것 만큼 포도당 흡수를 증가시키는 지를 조사하였음 (Fig. 7)
- 청국장 추출물과 함께 소량의 (0.2 nM) 인슐린을 처리하였을 때 인슐린 자극에 의한 포도당 흡수를 촉진하는지를 조사하였을 때 대체적으로 물추출물이 메탄을 추출물보다 더 효과적으로 촉진시켰으며 48시간 발효시킨 것이나 72시간 발효시킨 것의 차이는 적었음
- 청국장 중에서는 전통 청국장과 함께 BL로 발효시킨 표준 청국장이 가장 효과적으로 인슐린 자극에 의한 포도당 흡수를 촉진시켰으며 이것은 인슐린을 10 nM 처리한 것 보다는 적었지만 PPAR- $\gamma$ agonist로 판매되고 있는 rosiglitazone를 처리한 것과 유사한 효과를 나타내었음 (Fig. 8)

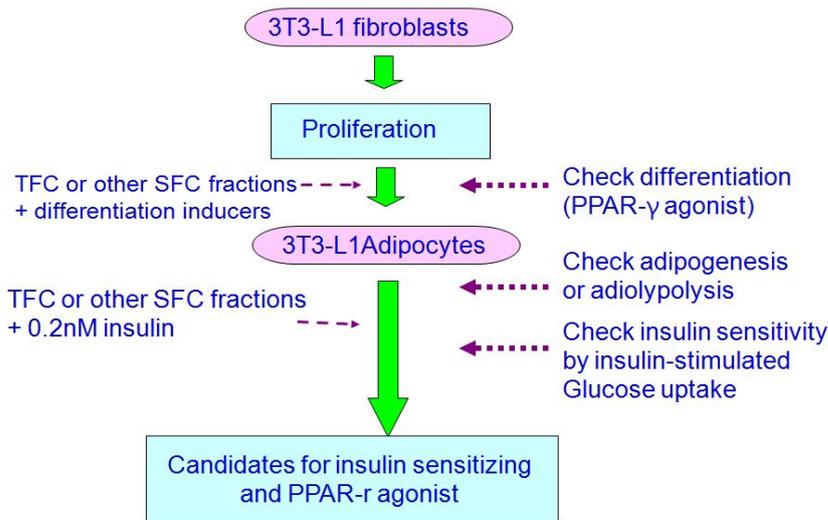


Fig. 7. Insulin sensitizing and PPAR-γ agonistic effects

2) 청국장 추출물의 peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-γ activity

- PPAR-γ가 활성화될 때 fibroblast가 지방세포로 전환되는 것을 촉진시키고 포도당의 세포 흡수를 촉진시키는 수용체로 이들을 활성화시키는 물질은 혈당을 낮추는 역할을 한다는 것이 알려졌다으므로, 전통 청국장과 표준 청국장의 메탄올과 물 추출물이 PPAR-γ 활성화를 시키는 지를 조사하였음
- 지방세포에서의 인슐린 자극에 의한 포도당 흡수 결과와 유사하여 48시간동안 발효시킨 TFC과 BL 메탄올 추출물이 PPAR-γ 활성을 증가시켰는데, BL 메탄올 추출물이 더 높게 증가시켰음 (Fig. 9)

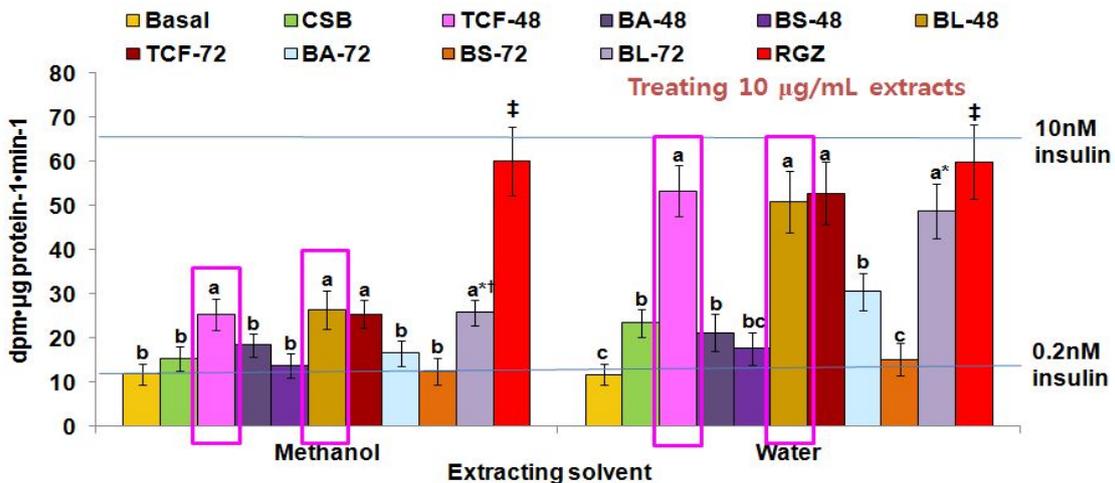


Fig 8. Insulin-stimulated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes

- 그러나 72시간 동안 발효시킨 것도 42시간 동안 발효시킨 것과 유사한 경향을 나타내었으나 48시간 발효시킨 전통청국장과 BL 표준 청국장이 더 효과적이었

음 (Fig. 9)

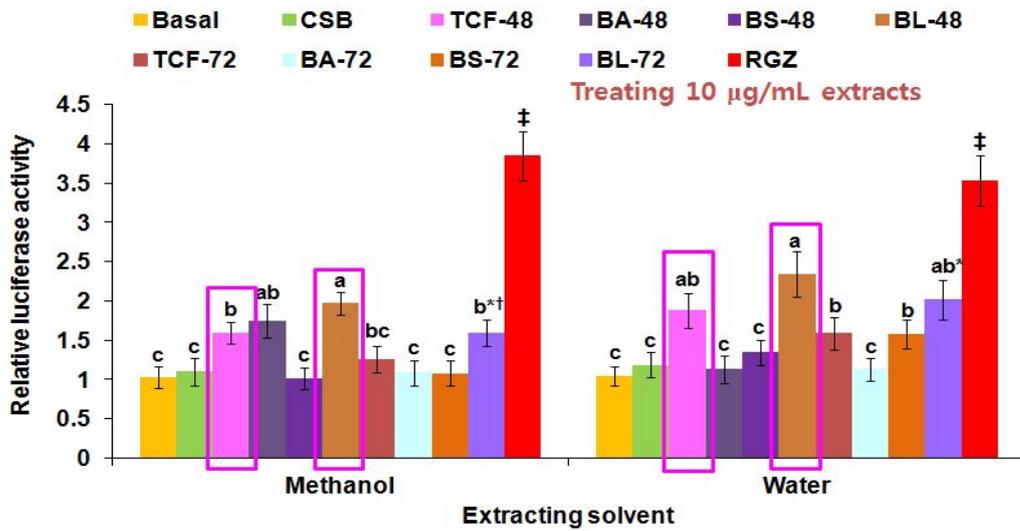


Fig. 9. PPAR- $\gamma$  activity

○ PPAR- $\gamma$ 의 발현에 변화를 조사하기 위해서 3T3-L1 지방세포에 청국장을 처리한 후에 mRNA양을 측정하였는데 48시간을 발효시킨 것이 72시간 발효시킨 것에 비해 PPAR- $\gamma$ 의 mRNA의 양이 많았으며 특히 전통청국장과 BL로 발효시킨 것의 메탄올과 물추출물이 효과적으로 PPAR- $\gamma$ 의 mRNA양을 증가시켰으나 특히 물 추출물이 메탄올 추출물에 비해 증가량이 높았음 (Fig. 10)

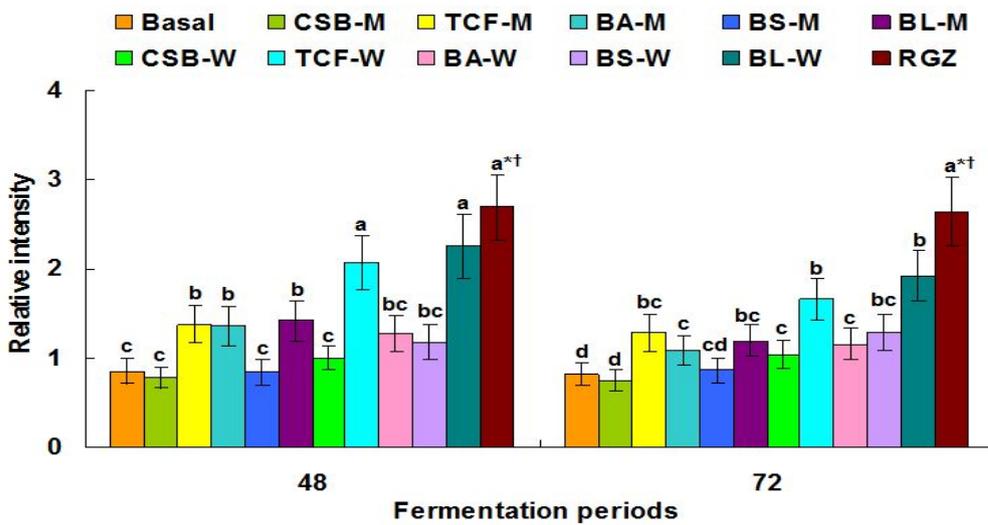


Fig. 10. mRNA levels of PPAR- $\gamma$

3) 청국장 추출물이 insulin secretion에 미치는 영향

○ 인슐린을 분비하는 세포인 mouse insulinoma cell인 MIN6 cells에 청국장 추출

물을 처리하였을 때 포도당 자극에 의한 인슐린 분비를 측정하였을 때 TFC, BL, BA의 메탄올 추출물은 포도당 자극에 의한 인슐린 분비를 증가시켰으나 물추출물은 어느 것도 인슐린 분비에 영향을 미치지 않았음 (Fig. 11)

- 특히, 48시간 발효시킨 BL은 가장 효과적으로 포도당 자극에 의한 인슐린 분비를 증가시켰으며, 이것은 glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor agonist로 알려진 exendin-4과 거의 유사하게 포도당 자극에 의한 인슐린 분비를 촉진시켰으며, 포도당이 없을 때는 인슐린 분비를 증가시키지 않아 베타세포의 보존 효과도 있었음

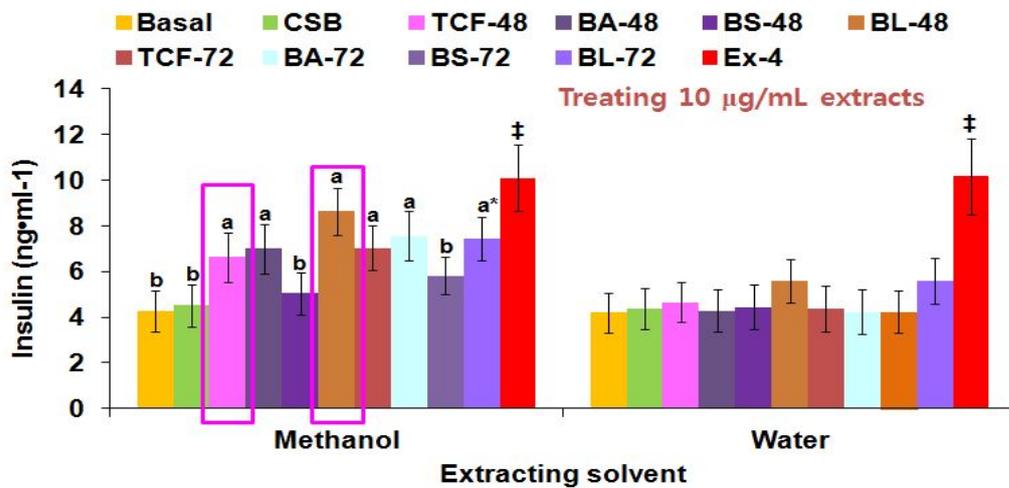


Fig. 11. Glucose-stimulated insulin secretion in MIN6 cells

#### 4) 청국장 추출물이 GLP-1 secretion에 미치는 영향

- GLP-1은 베타세포에 존재하는 그들의 receptor에 작용하여 포도당이 높을 때만  $Ca^{+2}$ 의 세포내 유입의 증가를 촉진시켜 인슐린 분비를 촉진시키는 것이어서 GLP-1 receptor agonist도 베타세포의 피로없이 인슐린 분비를 촉진시킬 수 있는 target 단백질임
- GLP-1을 직접 약으로 사용하기에는 극복해야하는 문제들이 있는데 이것은 GLP-1은 단백질이어서 경구 투여가 불가능하며 주사로 주입해야만 하여 주입하더라도 반감기가 짧아 작용시간이 수분에서 길어야 1-2시간동안만 약효가 지속되는데 그 이유는 dipeptidyl peptidase-4 (DPP-IV)와 같은 단백질 분해효소에 의해서 분해되기 때문임
- GLP-1은 장세포인 L-cell에서 분비되는 것이어서 enteroendocrine cell에 청국장 추출물을 처리하였을 때 GLP-1 분비를 측정하였을 때 인슐린 분비와 마찬가지로 48시간동안 발효시킨 BL의 메탄올 추출물이 GLP-1의 분비를 가장 많이 촉진시켰고 전통청국장의 48 h 동안 발효한 메탄올 추출물도 이들의 분비를 촉진시켰으나 BL 만큼 높지 않았음 (Fig. 12)

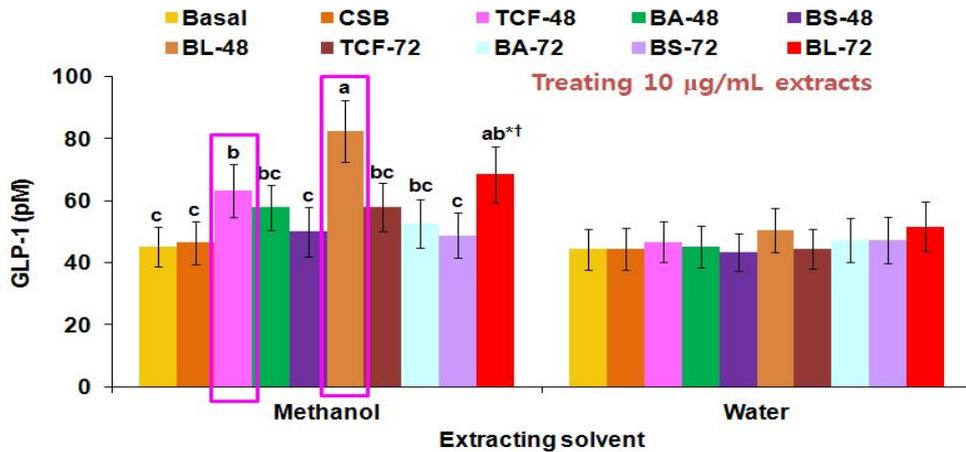


Fig. 12. GLP-1 secretion in enteroendocrine cells

#### 5) 청국장 *in vitro* 연구 성과

- 48 시간동안 발효해서 제조한 전통청국장의 메탄올과 물 추출물은 모두 인슐린 자극에 의한 포도당 흡수를 증가시켰으며 이것은 표준- $\gamma$  activity를 활성화시키는 것과 밀접한 관련이 있었고 표준 청국장 중에서는 BL이 전통청국장보다도 우수하게 인슐린 민감성을 향상시키는 작용을 하였음
- 48시간 발효시킨 전통청국장과 BL 청국장의 메탄올 추출물은 포도당 자극에 의한 인슐린 분비와 GLP-1의 분비를 향상시켜서 이 두 가지 청국장은 항당뇨 효과가 있을 것으로 결론을 지음
- 이 연구 결과는 현재 Nutrition Research에 투고 중임

#### (2) 청국장 추출물의 *in vivo*에서 항당뇨 효과

##### 1) 실험 디자인

- *in vitro* 실험에서 전통청국장보다 항당뇨 효과가 더 좋은 *B. lichemiformis*로 제조한 청국장이 동물실험에서도 효과가 있는지를 알아보기 위해서 삶은콩, 전통청국장, *B. lichemiformis*를 만든 표준 청국장을 동결건조하여 10%를 첨가한 후 고지방식으로 만들어 당뇨병 모델 백서에게 공급하였음 (Fig. 13)
- 90% 채식만을 제거한 백서에게 10%의 전통 청국장 (TFC)이나 *Bacillus lichemiformis*로 접종하여 제조한 표준 청국장 (SFC)을 8주 동안 공급하였을 때 당뇨병의 진전을 억제하는 효과가 있었음.

##### 2) 혈당과 혈청 인슐린 농도

- 8주 동안 정해진 식이를 섭취한 후 공복 혈당은 대조군에 비해 CSB, TFC와 SFC군에서 모두 감소하였으나, 혈청 인슐린농도는 TFC와 SFC는 대조군에 비해 높았으나 CSB는 대조군과 차이가 없었음 (Fig. 14)

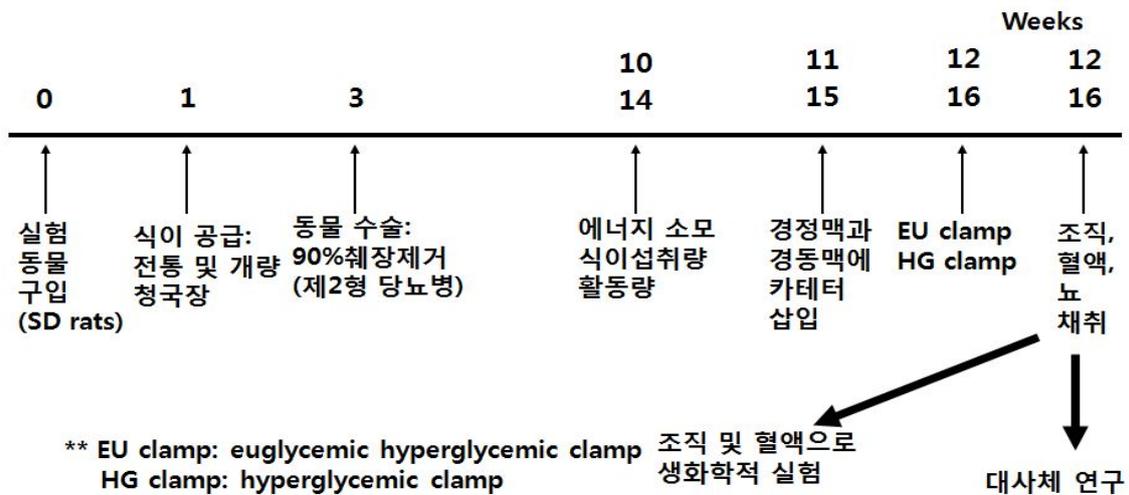


Fig. 13. Experimental design

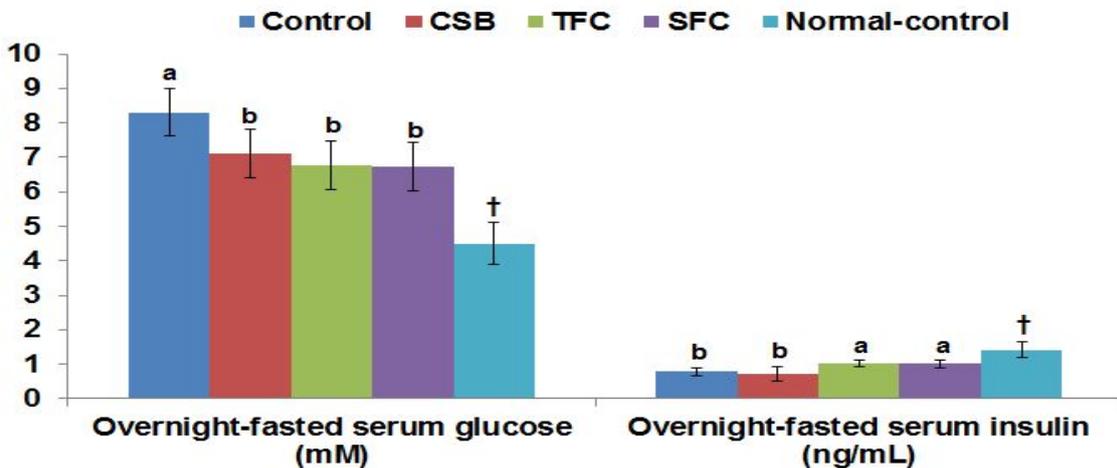


Fig. 14. Overnight fasted serum glucose and insulin levels.

### 3) 경구 내당능 검사

- 발효하지 않은 콩 (CSB)에 비해 TFC와 SFC가 포도당을 경구로 투여후 혈당의 상승이 낮았고 가장 높은 peak에 도달한 후에 감소하는 정도도 더 높아서 CSB에 비해 TFC와 SFC가 경구내당능을 향상시키는 것을 알 수 있었음 (Fig. 15A)
- 이러한 혈당 변화는 혈청 인슐린 농도와 관련이 있을 수 있으므로 혈청 인슐린 농도를 측정하였는데 포도당을 경구 투여한 후 CSB에 비해 TFC와 SFC는 0-40분 동안의 혈청 인슐린 농도가 높은 것을 알 수 있었지만 40-120분 동안의 혈청 인슐린 농도는 차이가 없었으므로 결과적으로 혈당 변화는 인슐린 분비능의 향상과 관련이 있을 것을 생각할 수 있었음 (Fig. 15)

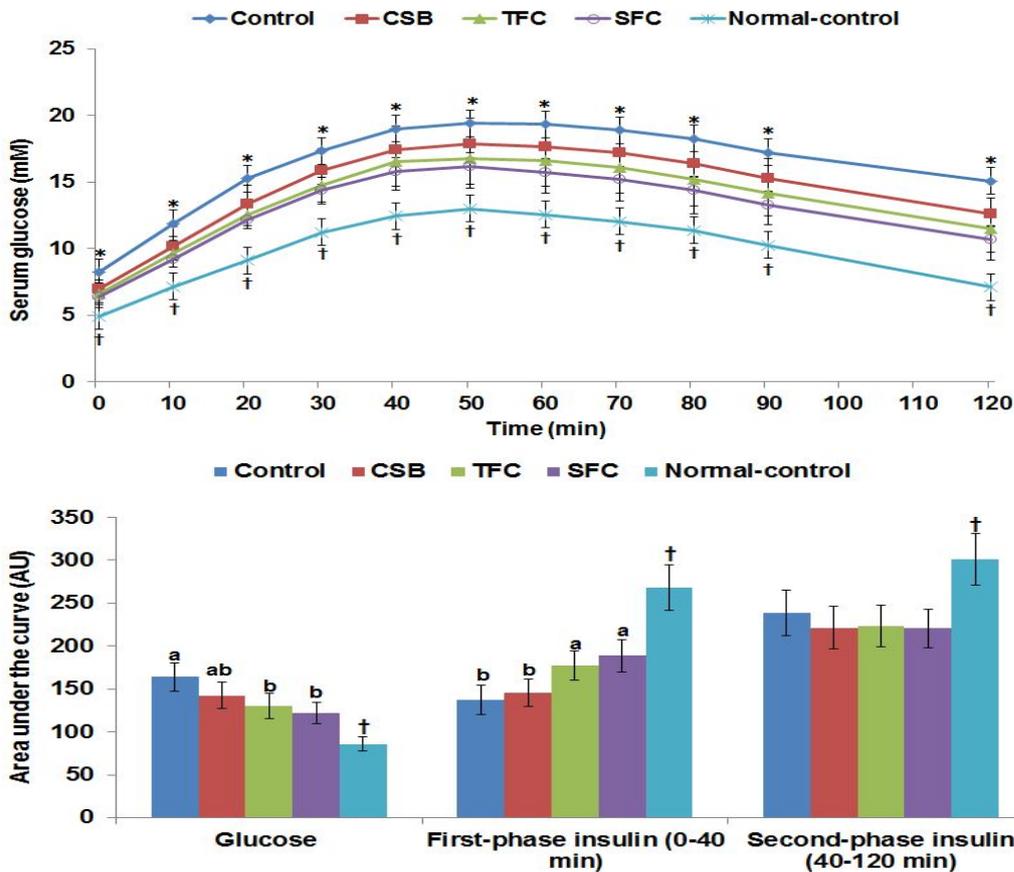


Fig. 15. Changes of serum glucose levels (A) and area under the curve of serum glucose and insulin levels (B) during oral glucose tolerance test

#### 4) 인슐린 분비능

- 당뇨병에서 인슐린 분비능을 hyperglycemic clamp 방법으로 측정하였을 때 TFC와 SFC를 섭취한 백서의 first phase 인슐린 분비능이 현저하게 향상되었으면 발효하지 않은 CSB군에 비해서도 first phase 인슐린 분비능이 향상되었고, second phase 인슐린 분비에서는 대조군에서 120분에 인슐린 분비가 감소하는 것을 방지할 수 있었음 (Fig. 16)

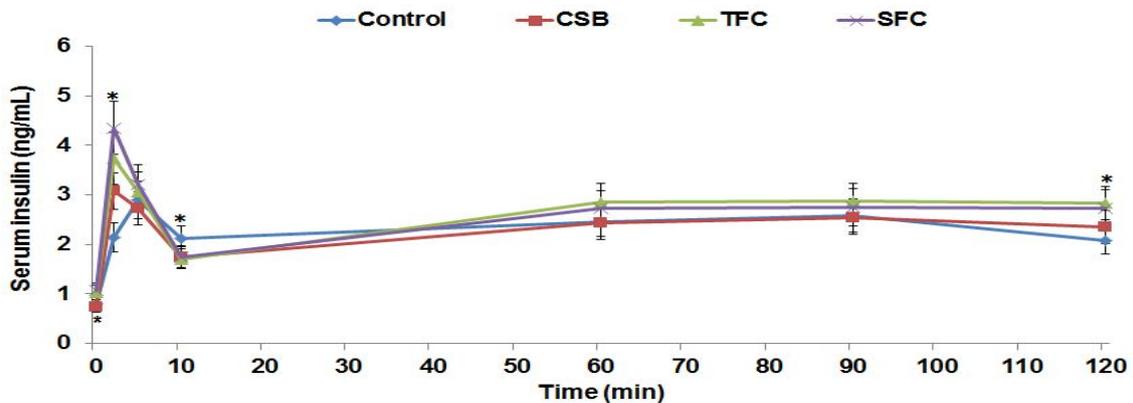


Fig. 16. Changes of serum insulin levels during hyperglycemic clamp

### 5) islet morphometry

- 췌장 베타세포의 양은 TFC와 SFC를 섭취한 군에서 대조군과 CSB에 비해 증가하였으며 이것으로 인슐린 분비능이 췌장 베타세포의 양과 비례적인 관계가 있다는 것을 알 수 있었음 (Table 2)
- 췌장 베타세포의 변화는 proliferation과 apoptosis와의 균형에 의해서 조절되는데 대조군에 비해 TFC와 SFC는 proliferation을 증가시키고 apoptosis는 감소시켰음 (Table 2)
- 일반적으로 당뇨병에서 알파세포의 양이 증가하므로  $\beta$ -cell와  $\alpha$ -cell의 비가 대조군에서 감소하였고 이것은 대조군에 비해 CSB, TFC와 SFC는 이 비가 증가하였음 (Table 2)
- TFC와 SFC가 대조군에 비해 당뇨병 증세를 완화시키는 것은 인슐린 분비능이 증가하고 베타세포의 양을 증가시키는 것과 관련이 있음

Table 2. Islet morphometry

	Control	CSB	TFC	SFC	Sham
<b><math>\beta</math>-cell area (%)</b>	6.6 $\pm$ 0.7 <sup>b</sup>	7.0 $\pm$ 0.8 <sup>b</sup>	7.9 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>	8.2 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup>	5.5 $\pm$ 0.7 <sup>†</sup>
<b>Individual <math>\beta</math>-cell size (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	239.4 $\pm$ 28.4 <sup>a</sup>	198.3 $\pm$ 24.2 <sup>b</sup>	188.5 $\pm$ 26.8 <sup>b</sup>	185.4 $\pm$ 27.5 <sup>b</sup>	185.6 $\pm$ 23.2 <sup>†</sup>
<b>Absolute <math>\beta</math>-cell mass (mg)</b>	21.8 $\pm$ 2.7 <sup>b</sup>	23.1 $\pm$ 3.0 <sup>b</sup>	26.0 $\pm$ 3.0 <sup>a</sup>	27.1 $\pm$ 3.3 <sup>a</sup>	34.8 $\pm$ 4.4 <sup>††</sup>
<b>BrdU<sup>+</sup> cells (% BrdU<sup>+</sup> cells of islets)</b>	0.84 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>	0.89 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	1.07 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	1.11 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	0.72 $\pm$ 0.10 <sup>†</sup>
<b>Ratio of <math>\beta</math>:<math>\alpha</math> cells</b>	4.7 $\pm$ 0.6 <sup>b</sup>	5.4 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	5.7 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>	5.9 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	5.8 $\pm$ 0.7 <sup>†</sup>

### 6) 인슐린 저항성

- euglycemic hyperinsulinemic clamp 방법으로 인슐린 저항성을 측정하였을 때 SFC와 TFC 뿐만 아니라 CSB도 인슐린 저항성을 정도를 나타내는 혈청 인슐린 농도를 1100 ppm으로 높혔을 때 포도당 주입속도를 증가시켜 체내 인슐린 저항성을 감소시킨다는 것을 알 수 있었음 (Fig. 17A). 또한, 간에서의 인슐린 저항성을 나타내는 고인슐혈증에서의 포도당 생성이 CSB, TFC,와 SFC에서 모두 감소

하였으므로(Fig. 17B) 당뇨병에서 증가한 간에서의 인슐린 저항성을 저하시켰다는 것을 알 수 있었고 이것은 인슐린 신호전달의 변화로도 알 수 있었음

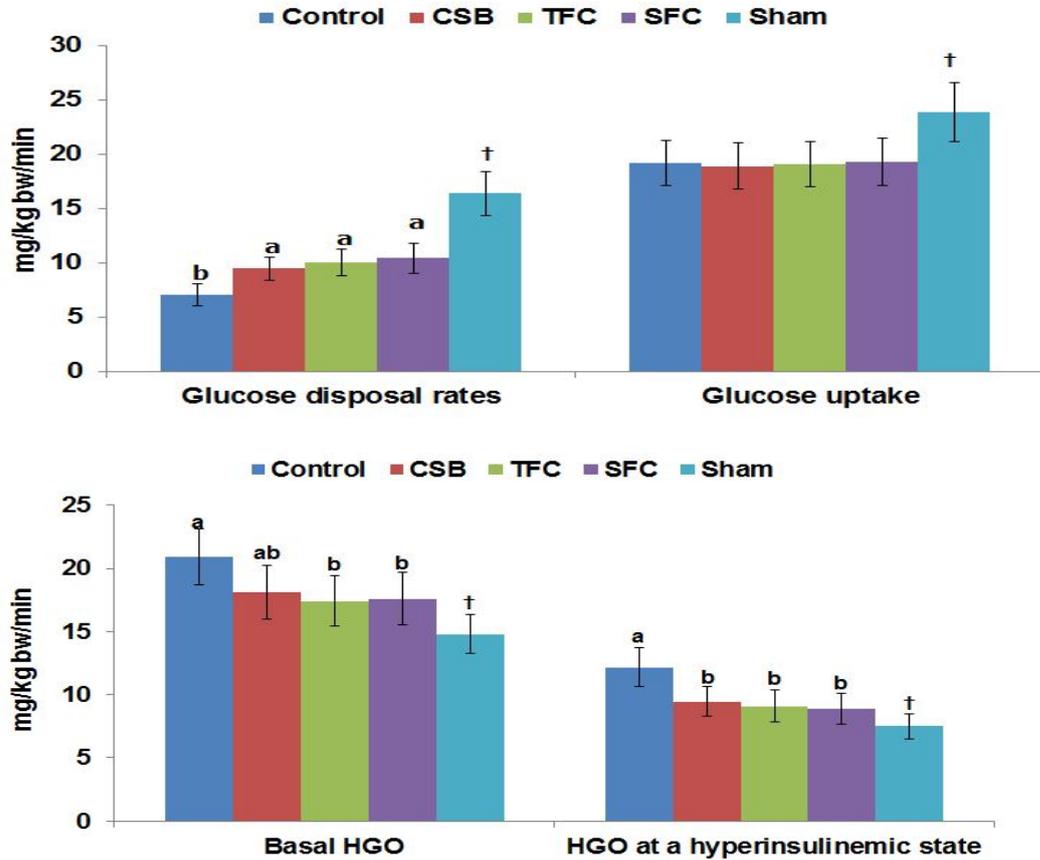


Fig. 17. Glucose infusion rates and hepatic glucose output at basal and hyperinsulinemic states

#### 6) 간에서의 인슐린 신호전달

- 고지방식을 섭취한 부분 췌장 제거한 백서는 간에서 인슐린 저항성이 있었고 이것을 확인하기 위해서 간에서의 인슐린 신호전달을 조사하였는데 인슐린 신호전달에서 인슐린 수용체가 인슐린과 결합해서 그 신호를 IRS 단백질의 tyrosin 인산화로 전달하고 이 신호가 전달되는 것이 Akt인데 Akt의 인산화가 높은 것은 인슐린 신호전달이 높다는 것을 나타내는 것임.
- 간에서는 TFC와 SFC군에서는 CSB에 비해 Akt인산화가 증가하였고 당신생합성에 중요한 효소인 PEPCK의 발현이 감소하였음 (Fig. 18)
- 지방분해와 관련이 있는 AMPK 인산화도 TFC와 SFC는 대조군에 비해 증가하여 지방 분해가 증가한 것을 알 수 있었음 (Fig. 18)

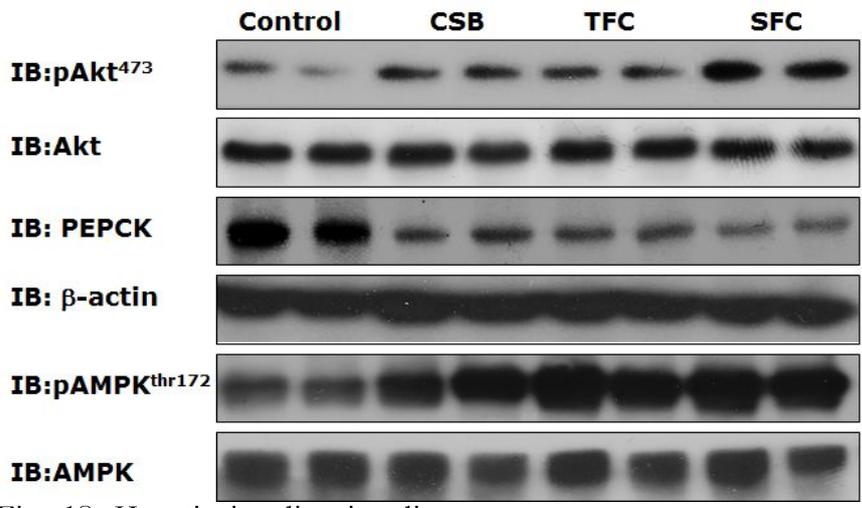


Fig. 18. Hepatic insulin signaling

7) 결론과 연구 성과

- 전통청국장과 *B. lichemiformis*로 제조한 표준청국장은 모두 대조군에 비해서는 월등하게 항당뇨효과가 있었으며 발효하지 않은 콩에 비해서 항당뇨 효과가 향상되었음을 알 수 있었음
- 그 기전은 Fig. 19에 있듯이 청국장이 G protein receptor를 활성화시켜 CREP 인산화를 증가시키고 이것이 IRS protein의 발현을 증가시켜 insulin signaling을 향상시키므로 항당뇨 효과를 나타낼 것이라는 것을 보여주었음

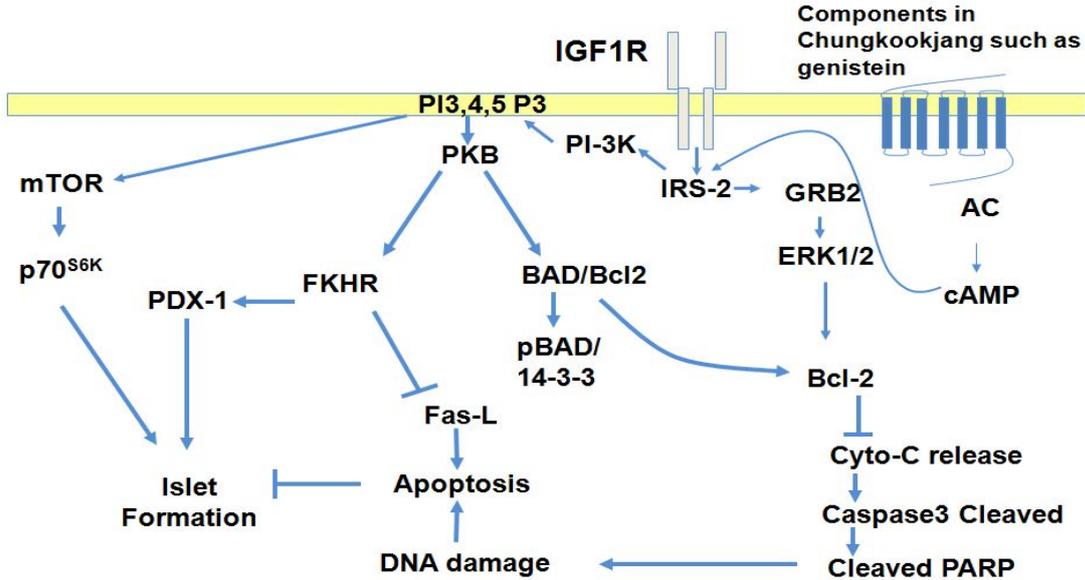


Fig. 19. Modulation of insulin signaling through chungkookjang

- 이 연구 결과는 Journal of Clinical Nutritional Biochemistry (SCI급 저널)에 게재 확정되었음

- 박선민. The prevention of type 2 diabetes mellitus and foods. 2012 International Symposium & Annual Meeting 한국미생물·생명공학회(The Korean Society for Microbiology and Biotechnology; KMB) 부산 벵스코 6.27-29. 29일 구연 발표

## 2. 표준 청국장 (*Bacillus lichemiformis*로 접종하여 제조한 청국장)의 항치매 효과

### (1) 실험 디자인

- 당뇨병에서 치매 증세가 악화된다는 것이 알려졌다으므로 부분적으로 췌장을 제거한 당뇨병 동물 모델에  $\beta$ -amyloid를 해마에 주입하여 치매를 동시에 유발시킨 것을 동물 모델로 사용하였음
- 전통 청국장 (TFC)와 표준 청국장 (SFC)의 항치매효과를 조사하기 위해서 stereotactic a표준atus로 CA1 지역에  $\beta$ -amyloid (25-32)를 주입하여 치매 모델을 만들어 조사하였고, 정상대조군은 당뇨 백서이면서  $\beta$ -amyloid (35-25)를 사용하여 치매를 유발시키지 않았음 (Fig. 20)
- 치매 동물 모델에게 전통과 표준청국장을 10%를 첨가한 고지방식을 6주 동안 투여한 후 인지 능력을 water maze와 passive avoidance 방법으로 측정하였음 (Fig. 20)

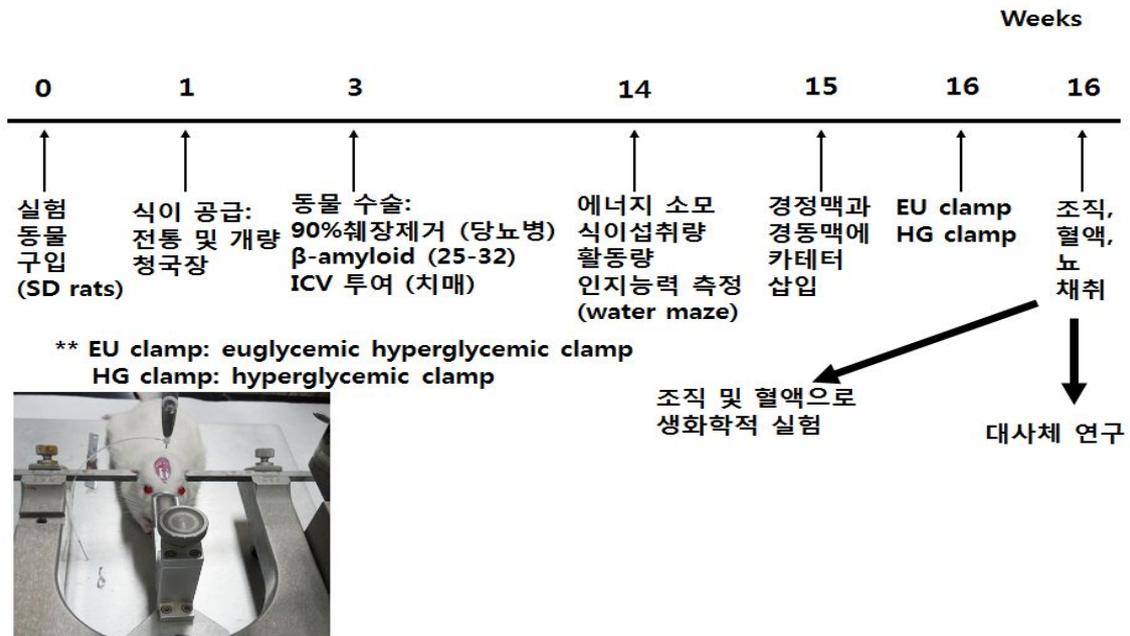


Fig. 20. Experimental design

### (2) 해마 (hippocampus)에 $\beta$ -amyloid의 추적

- CA1으로  $\beta$ -amyloid를 주입한 후에 해마에  $\beta$ -아밀로이드 추적을

- immunohistochemistry 방법으로 염색하였을 때  $\beta$ -amyloid가 green 염색을 하였음
- Fig. 21에서 보이듯이 대조군은 green으로 염색된  $\beta$ -amyloid 축적이 많았지만 표준 청국장 (SFC)을 투여한 군에서는  $\beta$ -amyloid의 축적은 많이 감소하였음

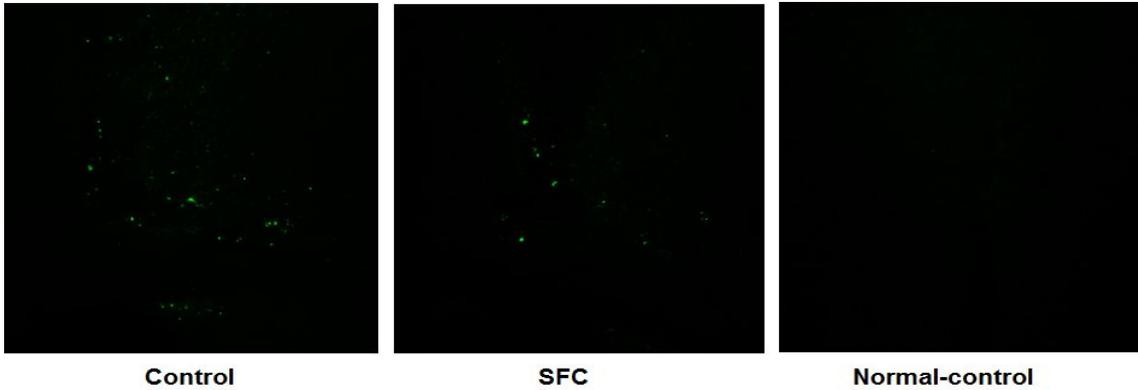


Fig. 21.  $\beta$ -amyloid deposition in the hippocampus (green:  $\beta$ -amyloid staining)

### (3) 인지 능력 측정

- passive avoidance test로 단기 기억능력을 측정하였을 때 표준청국장 (SFC)는 가장 인지능력을 향상시켰으나 삶은콩 (CSB)과 전통청국장은 (TFC)은 대조군에 비해서는 향상하였으나 SFC보다는 낮았음 (Fig. 22)

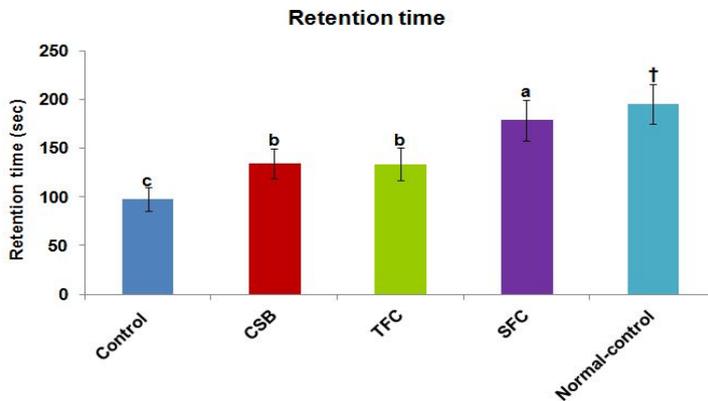


Fig. 22. Retention time during passive avoidance test

- water maze로 인지 능력을 측정하였을 때 3일 동안 훈련을 시킨 후 5일째에 zone 5에 있는 platform을 제거한 채 zone 5에 이르는 시간을 조사한 결과 zone 5에 가는데 걸리는 시간이 control이 가장 길고 CSB와 TFC는 줄었으나 SFC가 가장 짧은 시간 내에 zone 5에 도달하였고 또한 zone 5에 도달한 후에 zone 5에 머물면서 platform을 찾는데 걸리는 시간이 오히려 길어서 zone 5의 부분을 기억하고 그 부분에서 있었던 platform을 찾으려고 머무르는 시간이 길었음 (Fig. 23)

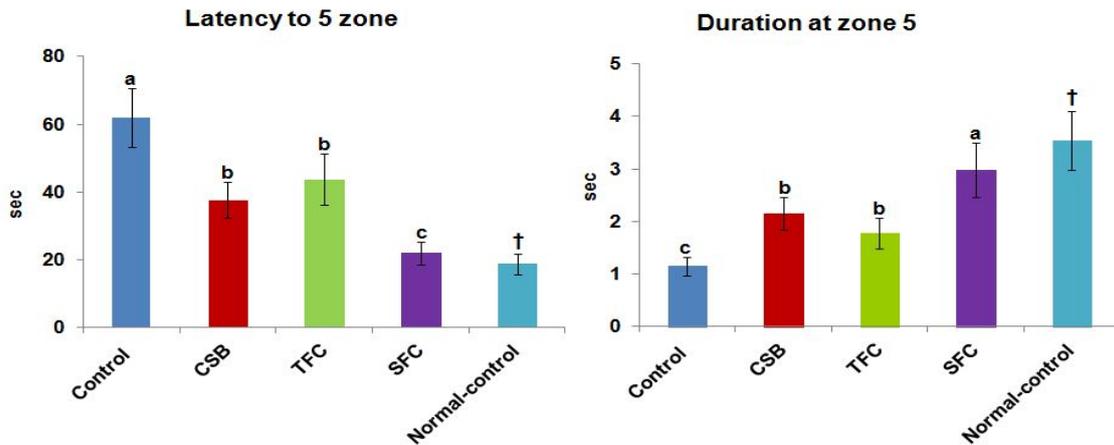


Fig. 23. Latency to zone 5 and duration to stay at zone 5 at day 5 during water maze test

(4) 체중 및 지방량 변화

- 치매가 나타났을 때 체중 감량이 나타났으며 체중감량은 CSB, TFC와 SFC군에서 모두 완화되는 것을 보였으나 통계적으로 유의하지는 않았음 (Fig. 24A)
- 그러나 정상대조군에 비해 치매대조군에서 복부 지방량은 통계적으로 유의하진 않았지만 오히려 높은 경향을 나타내었고 SFC군에서만 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 감소하였음 (Fig. 24B)

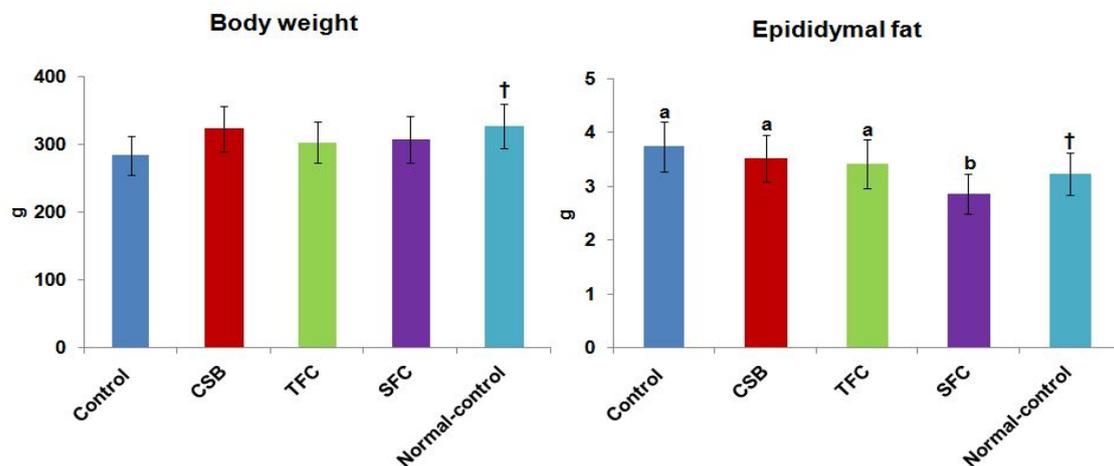


Fig. 24. Body weight and epididymal fat pads

(5) 경구내당능 검사

- 경구로 1g/kg 체중을 투여한 후 시간별로 혈당을 측정하였을 때 치매 대조군은 정상대조군에 비해 혈당이 약간 증가하는 경향을 보였으나 통계적으로 유의하지는 않았지만, SFC는 최고혈당 이후 혈당이 가장 빨리 감소하여 치매 대조군에 비해 낮은 혈당을 나타내었음 (Fig. 25A)

- 이러한 혈당 변화가 인슐린 농도와 관련이 있는 지를 조사하기 위해서 인슐린 농도를 측정하였을 때 0-40분 동안의 first 부분에 분비된 혈청 인슐린 농도의 면적은 군별 차이가 없었지만 40-120분 동안의 혈청 인슐린 농도의 면적은 대조군이 정상 대조군에 비해 높았으며 CSB, TFC와 SFC군들보다도 높았음 (Fig. 25B)

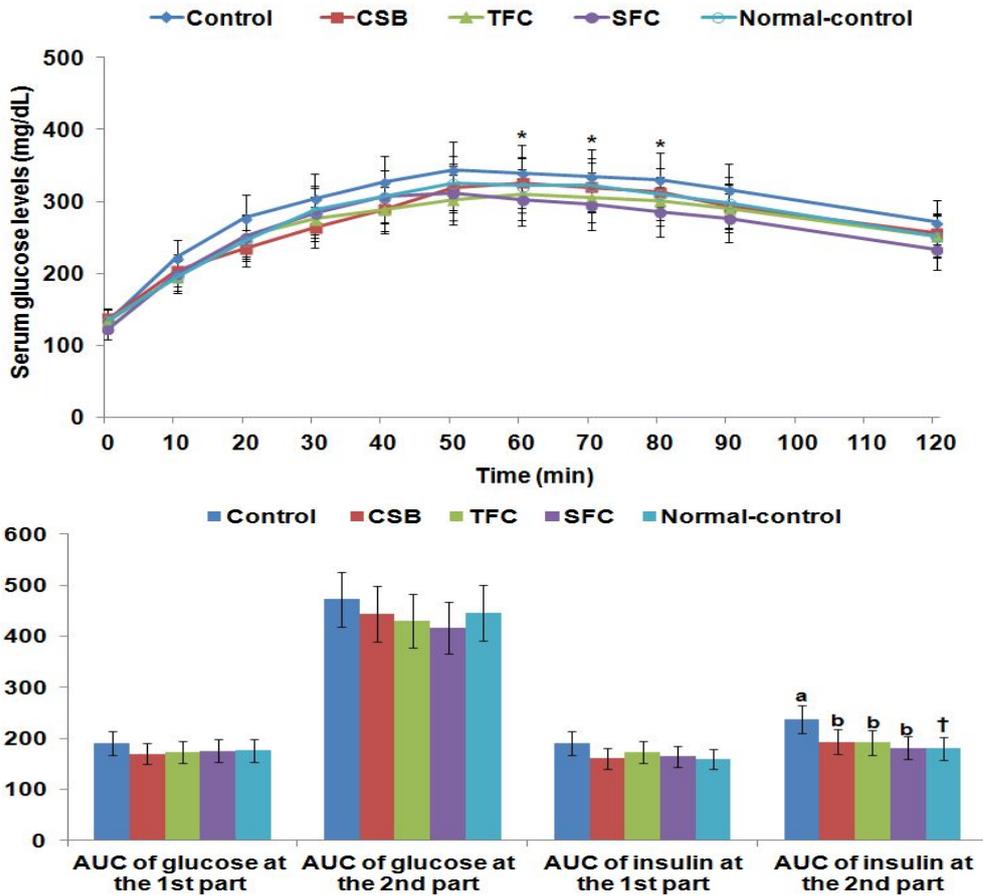


Fig. 25. Changes of serum glucose levels and area under the curve of serum glucose and insulin levels during OGTT

#### (6) 인슐린 저항성

- 경구 내당검사 결과를 분석하여 보면 치매가 발생하면 인슐린 저항성과 인슐린 분비능에 문제가 발생하는 것으로 보여서 이에 대한 실험을 하였음: 인슐린 저항성을 euglycemic hyperglycemic clamp로 측정하였을 때 몸전체의 인슐린 저항성을 나타내는 지표로서 인슐린을 일정하여 주입하였을 때 정상 혈당을 유지하는데 필요한 포도당 양인 glucose infusion rate이 정상대조군에 비해 치매대조군에서 낮아졌으므로 치매가 나타나면 인슐린 저항성이 증가한다는 것을 알 수 있었음 (Fig. 26A)
- 반면에 glucose infusion rate은 SFC를 투여하였을 때 증가하는 것을 보여 주며

SFC는 치매로 인한 인슐린 저항성의 증가를 방지할 수 있다는 것을 알 수 있었음 (Fig. 26A)

- 체내로 포도당의 흡수를 나타내는 glucose uptake는 군별 차이가 없었음 (Fig. 26A)
- glucose uptake가 차이가 없는데 glucose infusion rates에 차이가 있는 것은 간에서의 포도당 신생합성과 관련이 있는데 고인슐린혈 상태에서 간에서 포도당 생성이 치매에서 증가하였고 이것은 특히 SFC에 의해서 감소하는 것을 볼 수 있었음: 이것은 치매는 간에서의 인슐린 저항성을 증가시키고 SFC는 이것을 완화시킨다는 것을 보여주었음 (Fig. 26B)

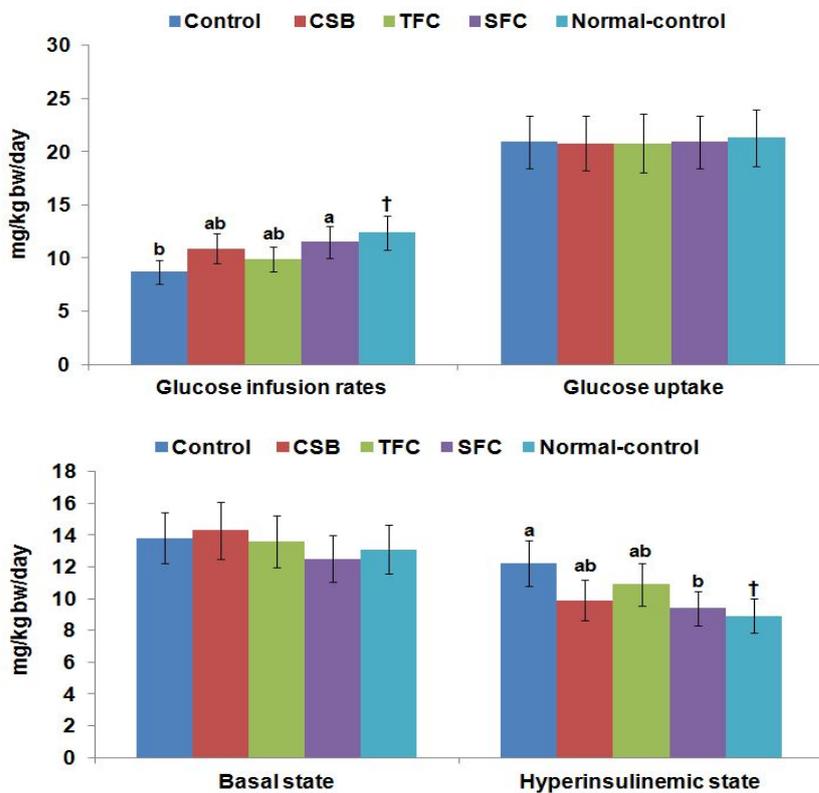


Fig. 26. Glucose infusion rates and hepatic glucose output at basal and hyperinsulinemic states

#### (7) 인슐린 분비능

- 치매 대조군이 정상 대조군에 비해 인슐린 저항성이 높음에도 불구하고 경구내 당능 검사에서 혈당이 현저하게 높지 않은 것은 인슐린 분비능이 증가했을 가능성이 있으므로 인슐린 분비능을 조사하였는데 예상했던 것처럼 포도당을 주입하여 혈당을 공복혈당보다 100 mg/dL 높였을 때 치매대조군에서 혈청 인슐린 농도가 정상대조군에 비해 현저하게 높았음 (Fig. 27A)
- TFC와 SFC는 first phase 인슐린 분비능은 높았지만 second phase 인슐린 분

비능은 치매 대조군에 비해 현저하게 낮아져서 혈당 조절이 치매 대조군에 비해 호전된것을 알 수 있었으나 반면에 SCB는 first phase도 낮추었음 (Fig. 27A)

- 이러한 시간에 따른 혈청 인슐린 농도의 변화를 area under the curve로 계산하였을 때도 치매대조군에서는 first phase와 second phase에서 모두 면적이 넓었으나 SFC와 TFC는 second phase의 면적은 감소하여서 인슐린 저항성의 감소로 인슐린 분비능이 호전된 것을 알 수 있었음 (Fig. 27B)

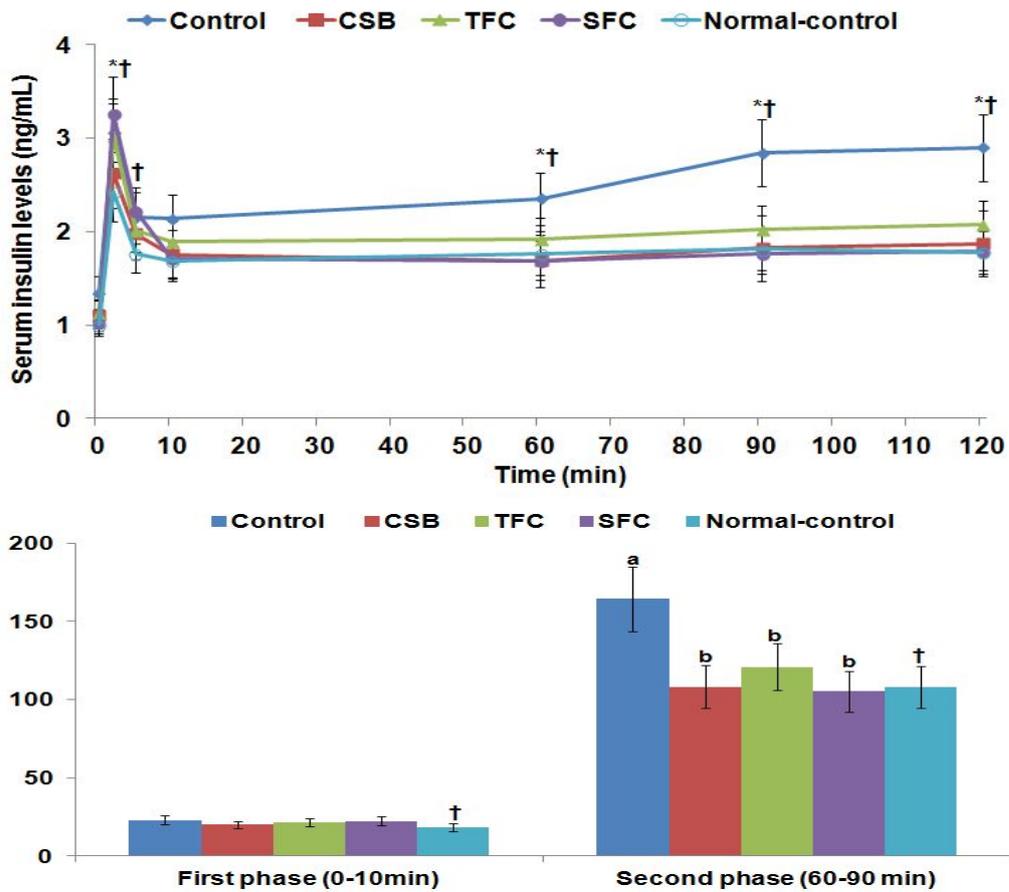


Fig. 27. Changes of serum insulin levels and area under the curve of serum insulin levels during hyperglycemic clamp

#### (8) Islet morphometry

- 개개의  $\beta$ -cell size는 치매대조군에서 약간 높은 경향을 보였으나 통계적으로 유의한 차이는 없었으나  $\beta$ -cell의 수의 증가로 인한 면적이 치매 대조군에서 감소하여 전체적으로 베타세포의 양은 감소하였고 이것은 TFC와 SFC에 의해서 통계적으로 유의하게 증가하였음 (Fig. 28)

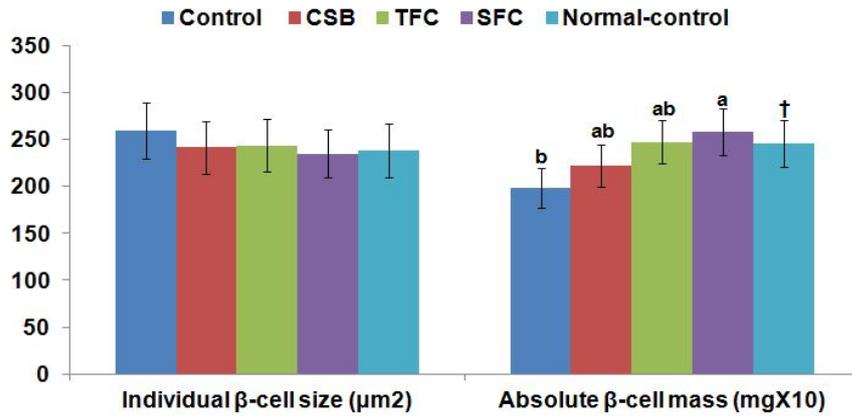


Fig. 28. Individual  $\beta$ -cell size and  $\beta$ -cell mass

- $\beta$ -cell의 양은  $\beta$ -cell의 proliferation과 apoptosis의 균형에 의해서 조절이 되므로 각각을 측정하였을 때  $\beta$ -cell proliferation은 치매 대조군과 정상대조군 사이에 차이가 없었고, CSB, SFC와 TFC가  $\beta$ -cell의 proliferation을 대조군에 비해 증가시키는 하였으나 통계적으로 유의한 차이는 아니었음 (Fig. 29A)
- 반면에  $\beta$ -cell apoptosis는 치매 대조군에서 정상대조군에 비해 증가하였으며 SFC는 치매대조군에 비해 통계적으로 유의하게 apoptosis를 감소시켰음 (Fig. 29B)
- 결과적으로 치매대조군에서  $\beta$ -cell 양의 감소는  $\beta$ -cell의 apoptosis의 증가로 인한 것이고 이것은 SFC의 투여에 의해서 감소하였음

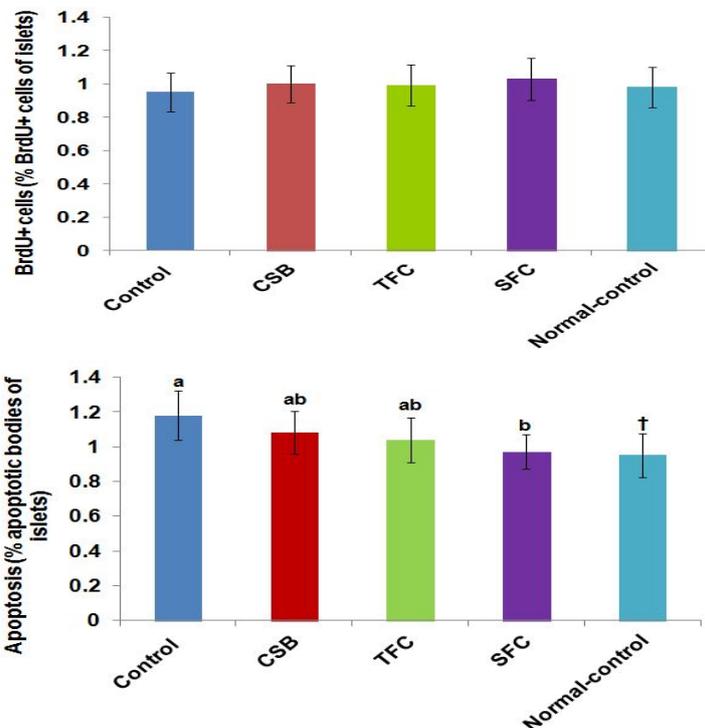


Fig. 28.  $\beta$ -cell proliferation and apoptosis

## (9) 결론 및 성과

- 결론적으로 전통청국장보다도 *Bacillus lichemiformis*로 만든 표준청국장이 치매의 유발을 억제하는 효과가 탁월하여서 전통청국장보다 *B. lichemiformis*로 만든 청국장에 더 많이 함유된 성분을 탐색하여 항치매제를 개발하는 것도 의미가 있을 것으로 사료됨

## 2절. 제2세부과제

### 1. 청국장 시료의 제조 및 제공

- 본 연구에 사용될 청국장 시료는 순창장류연구소에서 제조되었다. 메주콩을 수세 후 실온에서 12시간 침지 후 120℃, 상압의 NK증자기에서 2시간 증자 냉각 후 *Bacillus licheniformis* (순창균 자체 분리균주)을 대두 중량의 0.5 % (turbidity 0.15 - 0.16 Abs.) 기준으로 접종하여 40℃도, 습도 90%되는 청국장발효실에서 발효시켰으며 전통청국장은 메주콩을 수세 후 실온에서 12시간 침지 후 삶았음.
- 증자한 콩을 플라스틱 상자나 나무상자에 담고 사이사이에 벧짚을 깔고 35-40℃에서 발효시켰고, 이렇게 제조한 시료들을 동물실험용으로 호서대학교에 제공하였음.

### 2. 청국장의 발효 대사체 분석

- 순창장류연구소에서 확보하고 있는 우수균주인 *B. licheniformis* 67 균주를 이용하여 제조한 표준제조 청국장 (CK)과 벧짚으로 제조한 전통청국장 (TCK)을 삶은 콩(증자콩, control)과 비교하였음
- PGA 생성능력이 기존 전통 청국장의 2.5배나 되는 것으로 알려져 있으면서 전통 청국장과 유사한 맛을 갖고 있는 표준제조 청국장을 50% 메탄올로 추출한 후 UPLC-Q-TOF MS를 이용하여 발효대사체를 분석한 결과 전통청국장과는 다소 다른 profiles을 보여주었으며 적은 양의 대사체가 추출되는 것을 확인하였음
- 또한 36시간 이후의 청국장에서는 발효에 의한 차이는 거의 없는 것으로 확인되었음
- 60여종의 대사체를 동정하였으며 이중 절반정도는 발효시간에 따라 감소한 반면 나머지는 시간에 따라 증가하는 것으로 관찰되었음
- 이들 차이로 인해 표준청국장과 전통청국장은 PLS-DA scores plot 상에서 서로 분리되는 것을 확인할 수 있었음

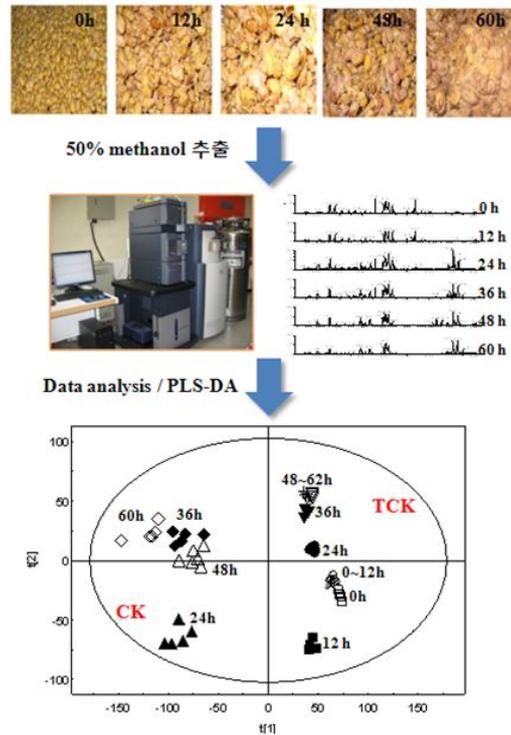


Fig. 29. 표준제조 청국장과 전통청국장의 시간별 발효 대사체 분석

- 표준청국장의 발효시간별 발효대사체의 profiles을 LC-MS로 분석한 결과 발효 시간이 증가할수록 아미노산, 저분자 펩타이드, 당이 결합되어있지 않은 아이소플라본, lysophosphatidylcholins 등이 증가하는 것으로 확인되었음 (Fig. 29)
- 또한, R project를 이용하여 표준청국장의 발효시간별 대사체의 변화를 heat map으로 작성한 결과 발효시간 12시간 이전과 24시간 이후로 대사체 프로파일이 극명하게 나누어지는 것을 확인하였으며 이는 PLS-DA scores plot 상에서도 확인되었음 (Fig. 30)
- 물론 동정되지 않은 많은 대사물질들이 발효시간에 따라 증가 또는 감소되는 것으로 확인되었지만 동정된 이들 대사체들의 VIP (variable importance in the projection)값이 1.0이상으로 주로 발효시간별 시료의 차이에 관여하는 것으로 확인되었음
- 따라서 이들 물질의 변화가 표준제조 청국장의 품질 및 기능성 변화에 주로 영향을 미칠 수 있을 것으로 사료됨

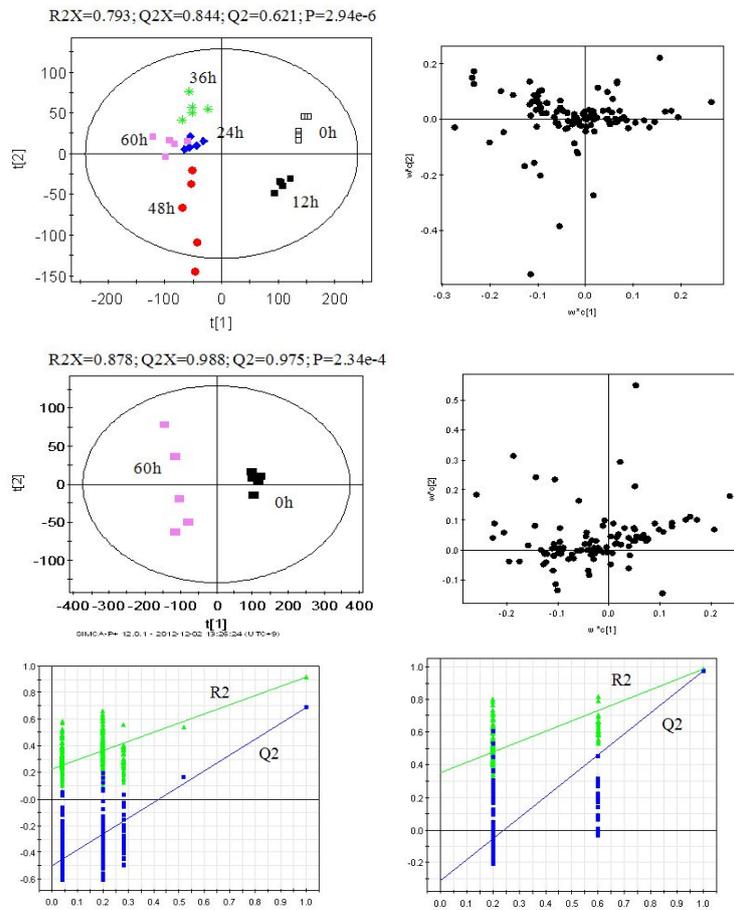


Fig. 30. 표준제조 청국장의 발효시간별 분석된 대사체들의 PLS-DA scores plots, loading plots, cross validation

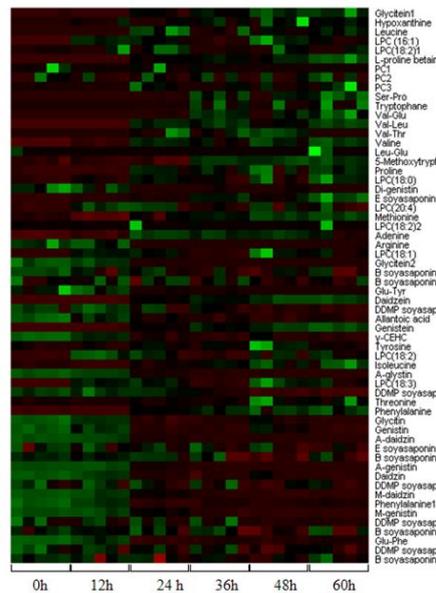


Fig. 31. 표준제조 청국장의 발효시간별 분석된 대사체들의 heat map

Table 3. 표준제조 청국장의 발효시간에 따른 주요 대사물질의 동정 및 함량비교

Identification	67 CK (Normalized intensity)					
	0h	12h	24h	36h	48h	60h
Arginine	49.76 <sup>b</sup>	43.73 <sup>b</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.15 <sup>a</sup>
Valine	2.30 <sup>a</sup>	18.65 <sup>b</sup>	47.59 <sup>c</sup>	68.72 <sup>d</sup>	70.35 <sup>de</sup>	83.73 <sup>e</sup>
Proline	0.24 <sup>a</sup>	1.21 <sup>a</sup>	14.07 <sup>b</sup>	15.87 <sup>bc</sup>	21.96 <sup>c</sup>	25.85 <sup>c</sup>
Methionine	1.71 <sup>a</sup>	2.83 <sup>a</sup>	20.58 <sup>b</sup>	38.33 <sup>c</sup>	44.08 <sup>c</sup>	48.80 <sup>c</sup>
Tyrosine	56.41 <sup>ab</sup>	58.40 <sup>ab</sup>	73.22 <sup>ab</sup>	79.26 <sup>b</sup>	102.49 <sup>c</sup>	52.95 <sup>a</sup>
Leucine	28.72 <sup>a</sup>	98.08 <sup>a</sup>	142.68 <sup>bc</sup>	273.81 <sup>bc</sup>	298.46 <sup>c</sup>	385.15 <sup>c</sup>
Phenylalanine	231.00 <sup>a</sup>	174.75 <sup>a</sup>	1032.15 <sup>b</sup>	1611.17 <sup>c</sup>	1796.01 <sup>c</sup>	1877.30 <sup>c</sup>
Threonine	190.70 <sup>a</sup>	168.84 <sup>ab</sup>	333.49 <sup>b</sup>	356.37 <sup>b</sup>	438.65 <sup>b</sup>	699.18 <sup>c</sup>
Tryptophane	0.01 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	139.74 <sup>b</sup>	273.09 <sup>c</sup>
Leu-Glu	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Glu-Tyr	114.08 <sup>a</sup>	120.57 <sup>b</sup>	5.81 <sup>b</sup>	3.56 <sup>b</sup>	0.08 <sup>a</sup>	0.36 <sup>a</sup>
Ser-Pro	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	2.97 <sup>a</sup>	79.11 <sup>b</sup>	58.68 <sup>b</sup>	127.26 <sup>c</sup>
Val-Glu	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	1.67 <sup>a</sup>	49.88 <sup>b</sup>	62.92 <sup>b</sup>	54.21 <sup>b</sup>
Val-Leu	0.00 <sup>a</sup>	0.67 <sup>a</sup>	78.73 <sup>b</sup>	125.40 <sup>c</sup>	134.49 <sup>c</sup>	152.96 <sup>d</sup>
Val-Thr	0.00 <sup>a</sup>	0.19 <sup>a</sup>	14.22 <sup>ab</sup>	16.48 <sup>b</sup>	27.12 <sup>b</sup>	0.00 <sup>a</sup>
Glu-Phe	1793.51 <sup>d</sup>	1218.64 <sup>c</sup>	324.53 <sup>b</sup>	310.67 <sup>b</sup>	244.05 <sup>ab</sup>	123.37 <sup>a</sup>
Adenine	36.28 <sup>a</sup>	57.17 <sup>a</sup>	83.02 <sup>b</sup>	145.24 <sup>c</sup>	150.09 <sup>c</sup>	157.84 <sup>c</sup>
L-proline betaine	0.00 <sup>a</sup>	0.47 <sup>a</sup>	141.20 <sup>b</sup>	190.55 <sup>b</sup>	272.11 <sup>c</sup>	411.01 <sup>d</sup>
Daidzin	463.65 <sup>d</sup>	376.92 <sup>c</sup>	111.29 <sup>b</sup>	110.19 <sup>b</sup>	109.18 <sup>b</sup>	79.87 <sup>a</sup>
Glycitin	275.62 <sup>d</sup>	194.46 <sup>c</sup>	24.97 <sup>a</sup>	46.86 <sup>b</sup>	59.38 <sup>b</sup>	33.45 <sup>ab</sup>
Genistin	310.73 <sup>d</sup>	244.14 <sup>c</sup>	143.41 <sup>b</sup>	116.12 <sup>ab</sup>	113.04 <sup>ab</sup>	96.92 <sup>a</sup>
Dihydrogenistin	15.59 <sup>c</sup>	6.02 <sup>b</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>
Malonyldaidzin	648.67 <sup>d</sup>	548.45 <sup>c</sup>	204.59 <sup>b</sup>	105.67 <sup>a</sup>	58.30 <sup>a</sup>	80.90 <sup>a</sup>
Malonylgenistin	904.61 <sup>c</sup>	863.22 <sup>c</sup>	374.00 <sup>b</sup>	206.08 <sup>a</sup>	149.62 <sup>a</sup>	164.28 <sup>b</sup>
Acetyldaidzin	287.21 <sup>d</sup>	255.65 <sup>c</sup>	31.22 <sup>b</sup>	3.73 <sup>a</sup>	1.69 <sup>a</sup>	3.75 <sup>a</sup>
Acetylglystin	107.30 <sup>d</sup>	87.69 <sup>c</sup>	11.21 <sup>b</sup>	1.76 <sup>a</sup>	1.01 <sup>a</sup>	0.67 <sup>a</sup>
Acetylgenistin	21.48 <sup>b</sup>	20.16 <sup>b</sup>	0.35 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>
Glycitein	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	29.35 <sup>b</sup>	35.77 <sup>c</sup>
Daidzein	78.71 <sup>a</sup>	81.43 <sup>a</sup>	501.42 <sup>b</sup>	642.06 <sup>c</sup>	1081.41 <sup>c</sup>	987.36 <sup>d</sup>
Genistein	0.08 <sup>a</sup>	5.06 <sup>b</sup>	12.43 <sup>c</sup>	14.92 <sup>c</sup>	24.45 <sup>d</sup>	27.66 <sup>c</sup>
B soyasaponin Bb	4135.98 <sup>b</sup>	3810.75 <sup>ab</sup>	3801.16 <sup>ab</sup>	3613.29 <sup>a</sup>	3629.60 <sup>ab</sup>	3650.27 <sup>ab</sup>
B soyasaponin Bc	692.93 <sup>a</sup>	689.01 <sup>a</sup>	684.32 <sup>a</sup>	726.64 <sup>b</sup>	713.96 <sup>b</sup>	737.88 <sup>b</sup>
B soyasaponin Bb'	21.34	39.73	40.51	33.64	47.27	40.02
B soyasaponin Bc'	351.00 <sup>c</sup>	314.72 <sup>bc</sup>	332.36 <sup>bc</sup>	186.85 <sup>bc</sup>	60.98 <sup>a</sup>	102.75 <sup>a</sup>
B soyasaponin Ba	1531.40	1489.02	1474.64	1444.50	1335.56	1492.45
E soyasaponin Bd	226.32 <sup>ab</sup>	228.06 <sup>b</sup>	216.05 <sup>ab</sup>	181.92 <sup>ab</sup>	156.12 <sup>ab</sup>	150.23 <sup>a</sup>
E soyasaponin Be	17.40 <sup>a</sup>	50.92 <sup>a</sup>	97.01 <sup>a</sup>	361.75 <sup>b</sup>	321.71 <sup>b</sup>	633.39 <sup>c</sup>
DDMP soyasaponin ag	942.18 <sup>c</sup>	818.83 <sup>c</sup>	546.88 <sup>b</sup>	79.53 <sup>a</sup>	18.39 <sup>a</sup>	30.73 <sup>a</sup>
DDMP soyasaponin Ba	562.56 <sup>ad</sup>	679.25 <sup>d</sup>	427.82 <sup>c</sup>	158.91 <sup>b</sup>	38.98 <sup>ab</sup>	26.41 <sup>a</sup>
DDMP soyasaponin Bg	3176.21 <sup>d</sup>	2838.58 <sup>cd</sup>	2549.21 <sup>c</sup>	1221.03 <sup>b</sup>	292.81 <sup>a</sup>	208.65 <sup>a</sup>
DDMP soyasaponin ?a	51.84 <sup>cd</sup>	78.57 <sup>d</sup>	40.34 <sup>bc</sup>	20.29 <sup>ab</sup>	7.73 <sup>a</sup>	3.54 <sup>a</sup>
DDMP soyasaponin ?g	154.64 <sup>d</sup>	154.70 <sup>d</sup>	100.09 <sup>c</sup>	45.80 <sup>b</sup>	11.64 <sup>ab</sup>	6.09 <sup>a</sup>
LPC(16:1)	0.39 <sup>a</sup>	75.89 <sup>c</sup>	53.33 <sup>d</sup>	17.82 <sup>b</sup>	81.88 <sup>c</sup>	35.07 <sup>c</sup>
LPC(18:0)	1.64 <sup>a</sup>	5.39 <sup>a</sup>	12.73 <sup>b</sup>	5.61 <sup>a</sup>	4.27 <sup>a</sup>	17.97 <sup>c</sup>
LPC(18:2)	713.43 <sup>a</sup>	5172.65 <sup>bc</sup>	4986.78 <sup>b</sup>	1167.98 <sup>a</sup>	5234.83 <sup>c</sup>	3641.05 <sup>b</sup>
LPC(18:3)	123.89 <sup>a</sup>	1988.42 <sup>c</sup>	1792.69 <sup>b</sup>	479.13 <sup>a</sup>	2508.48 <sup>b</sup>	1223.25 <sup>c</sup>
LPC(20:4)	10.38 <sup>a</sup>	47.34 <sup>c</sup>	32.42 <sup>bc</sup>	16.27 <sup>ab</sup>	16.70 <sup>ab</sup>	9.51 <sup>a</sup>
PCs	465.76 <sup>b</sup>	63.26 <sup>a</sup>	78.45 <sup>a</sup>	42.34 <sup>a</sup>	52.29 <sup>a</sup>	96.04 <sup>a</sup>

(참고: 농림기술개발사업의 장류식품의 고급화 기술 개발 및 기능성 규명 과제  
일부 결과 포함)

- 치매관련 동물실험에 사용된 증자콩(삶은 콩, control), 표준제조청국장(생산동, CK), 전통청국장(업체, TCK)의 발효대사체를 LC-MS로 분석한 대사체 프로파일을 PLS-DA에 의해서 분석하였음 (Table 3)
- PLS-DA 모델들이 잘 성립되었는지를 확인하기 위한 parameters을 분석한 결과 goodness of fitness의 파라미터인 R2X와 R2Y 값과 예측가능치를 보여주는 Q2Y 값이 0.95이상으로 매우 높은 것으로 보아 대사체분석을 위한 PLS-DA 모델들은 잘 성립된 것으로 확인되었음
- 또한 200 permutation test를 이용한 cross validation을 한 결과 초기 R와 Q 값과 최종 값이 차이가 많이 나는 것으로 보아 over-fit 되지 않았고 p-value 값도 6.87e-15로 매우 낮아서 분석하는데 통계적 문제가 없는 것으로 확인되었음
- 세 개의 그룹은 PLS-DA scores plot 상에서 뚜렷하게 구분되는 것이 확인되었으며 R project를 이용하여 이들 그룹의 대사체차이를 heat map으로 작성한 결과

증자콩과 두 청국장이 뚜렷하게 구분되는 것이 확인되었음 (Fig. 31)

- 이들 그룹의 차이에 관여하는 대사물질들을 동정하기 위하여 loading plot을 실시하였고 모든 대사물질들을 ANOVA와 Duncan을 이용하여 분석하였다. 물론 동정되지 않은 많은 물질들이 존재하지만 본 연구에서는 20개의 대사물질 (proline, adenine, tyrosine, leucine, phenylalanine, dipeptides, isoflavones, soyasaponins, lysoposphatidylcholines)이 주로 세 그룹의 차이에 관여하는 것으로 확인되었음 (Fig. 32, Table 4)
- 특히 이들 물질들 중 알츠하이머 질병에 긍정적인 효과를 갖고 있는 것으로 알려진 soyasaponins의 함량이 전통청국장과 증자콩보다 표준제조 청국장에 더 많이 들어있는 것으로 확인되었음

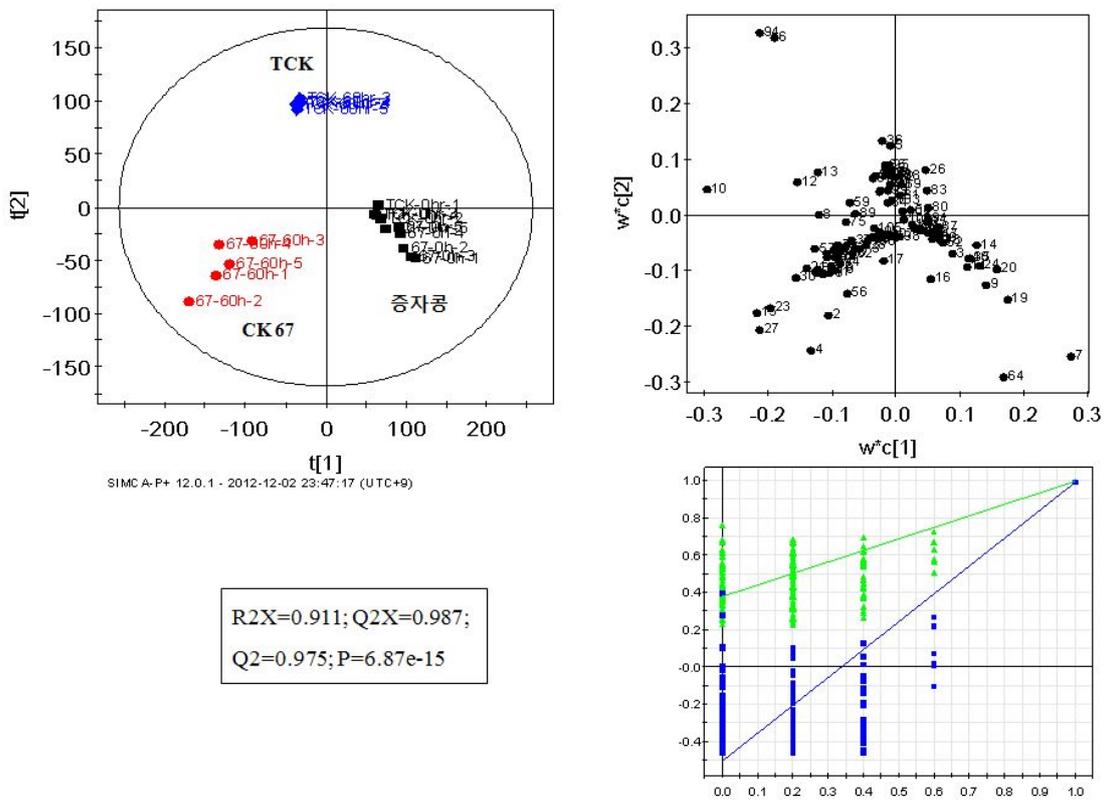


Fig. 32. PLS-DA를 이용한 증자콩, 표준제조 청국장, 전통청국장의 대사체 분석

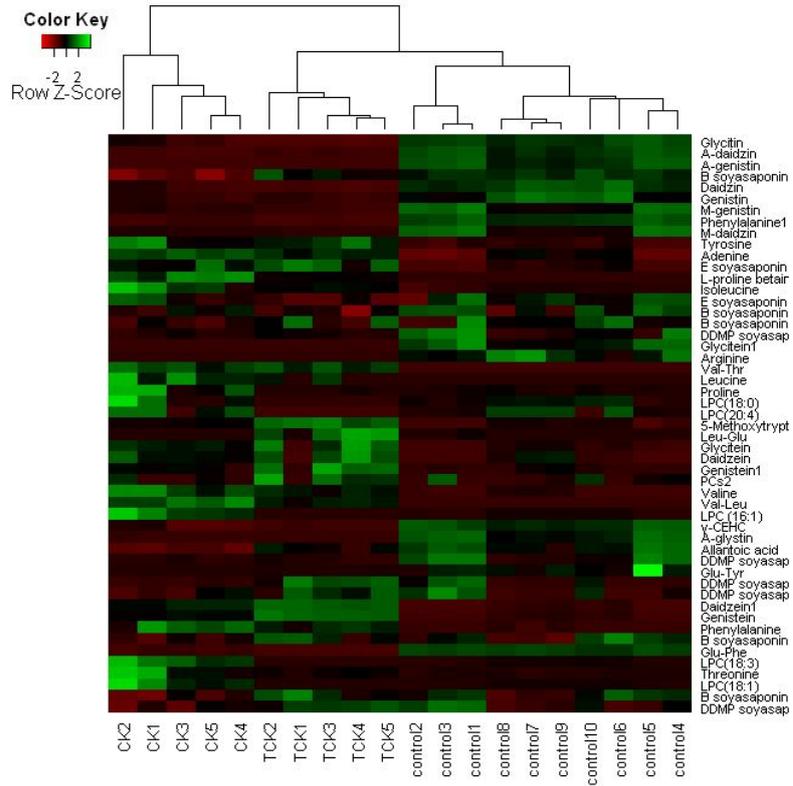


Fig. 33. Heat map을 이용한 증자콩, 표준제조 청국장, 전통청국장의 대사체 분석

Table 4. 증자콩, 표준제조 청국장, 전통청국장의 차이에 관여하는 주요 대사물질의 동정 및 함량비교

Identification	Formula(MH)	VIP	Normalized intensity		
			Control	CK	TCK
Proline	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1.27	1.4a	25.0b	0a
Adenine	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N <sub>5</sub>	2.45	67.9a	96.6a	147.0b
Tyrosine	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	2.59	71.3a	66.4a	222.3b
Leucine/isoleucine	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3.73	121.9a	502.5b	188.3a
Phenylalanine	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	4.27	271.1a	2127.2c	1429.5b
Ser-Pro	C <sub>8</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1.45	0a	153.7b	0a
Val-Glu	C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	1.02	0a	75.0b	0a
Val-Leu	C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	1.3	0a	167.5c	22.1b
Glu-Phe	C <sub>14</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	6.64	1739.3c	365.3b	58.5a
Daidzin	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>9</sub>	4.08	545.6b	79.1a	100.2a
Genistin	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>10</sub>	4.94	460.1c	106.1a	179.1b
Acetylgenistin	C <sub>23</sub> H <sub>23</sub> O <sub>11</sub>	3.31	328.8b	13.8a	3.4a
Daidzein	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>4</sub>	1.28	191.6a	1074.6b	1837.0c
Genistein	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>5</sub>	6.64	181.2a	891.5b	1633.5c
Bsoyasaponin Bb'	C <sub>42</sub> H <sub>68</sub> O <sub>14</sub>	1.46	37.5ab	26.3a	53.0b
Esosoyasaponin Bc	C <sub>48</sub> H <sub>76</sub> O <sub>18</sub>	3.76	51.4a	602.7b	133.3a
DDMsoyasaponin fg	C <sub>54</sub> H <sub>84</sub> O <sub>21</sub>	1.83	2021.3c	1184.7b	210.4a
LPQ(18:3)	C <sub>26</sub> H <sub>49</sub> NO <sub>2</sub> P	7.18	2949b	1252.7c	3.7a
LPQ(18:2)	C <sub>26</sub> H <sub>47</sub> NO <sub>2</sub> P	7.29	161.2b	747.7c	2.1a
LPQ(18:0)	C <sub>26</sub> H <sub>45</sub> NO <sub>2</sub> P	1.05	5.6a	22.2b	0a

### 3. 치매 유도 동물모델의 생체 대사체 분석

#### (1) 치매 유도 쥐에 청국장을 투여한 후 생체 대사체 분석

- 치매를 유도한 쥐에 증자콩, 표준제조 청국장, 업체청국장(전통청국장)을 투여한 후 뇨, 혈액, 뇌를 분리한 후 LC/MS를 이용하여 대사체 분석을 진행하였음
- 뇨는 동결건조한 후 다시 DW로 녹여서 사용하였고 혈액과 단백질을 제거한 후 사용하였음
- 또한, 뇌는 methanol, chloroform, DW를 일정 비율로 혼합한 후 수용성 층과 비수용성 층으로 분리한 후 수용성 층을 LC/MS로 분석하였고, LC/MS-MassLynx를 이용하여 분석한 MS profiles은 MarkerLynx를 이용하여 alignment와 normalization 한 후 다변량 통계분석을 위하여 Simca-P+의 PLS-DA를 이용하여 분석하였음 (Fig. 34)
- 또한 분석되어 나온 data들은 다시 ANOVA와 Duncan 방법으로 통계분석하였고, 혈액 대사체인 경우 모든 처리구에서 어떠한 유의적인 차이도 확인되지 않아서 더 이상의 분석이 진행되지 않았음

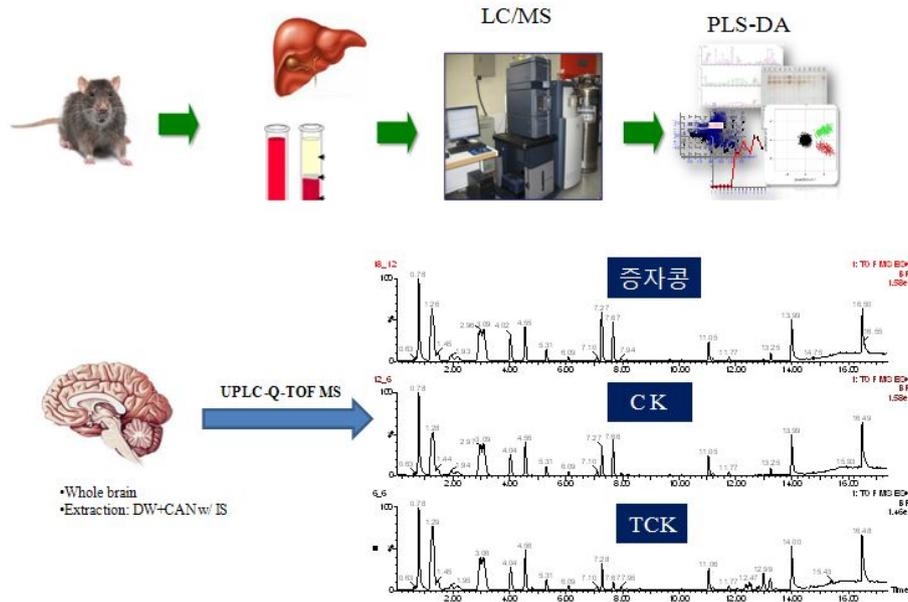


Fig. 34. LC-MS와 PLS-DA를 이용한 생체 대사체 분석 방법

### 1). 뇨 대사체 분석

- 뇨 대사체를 분석한 결과 치매유발 군과 정상군이 뚜렷하게 PLS-DA scores plot에서 서로 유의적 (P-value=0.0062) 으로 구별되는 것을 확인하였음 (Fig. 35)
- 또한, 모든 투여군에 의해 서로 분리되는 것을 확인할 수 있었다. PLS-DA scores plots 상에서 서로 구분되는데 관여하는 물질들을 추적한 결과 m/z 212, 230, 137, 242를 갖는 물질들이므로 확인되었지만 아직 동정하지는 못했음
- m/z 212, 230, 137인 경우 치매에 의해 증가되었다가 청국장 투여에 의해 감소하는 경향을 보였으며 반대로 m/z 242인 경우 치매에 의해 감소하였다가 청국장 투여에 의해 증가하는 것을 확인하였음 (Fig. 36)
- 시료들 사이에 큰 차이는 확인할 수 없었다. 비록 아직까지 이들 물질이 동정되지 않았지만 동정할 수 있다면 중요한 치매관련 후보 지표물질로 사용될 수 있을 것으로 사료되었음

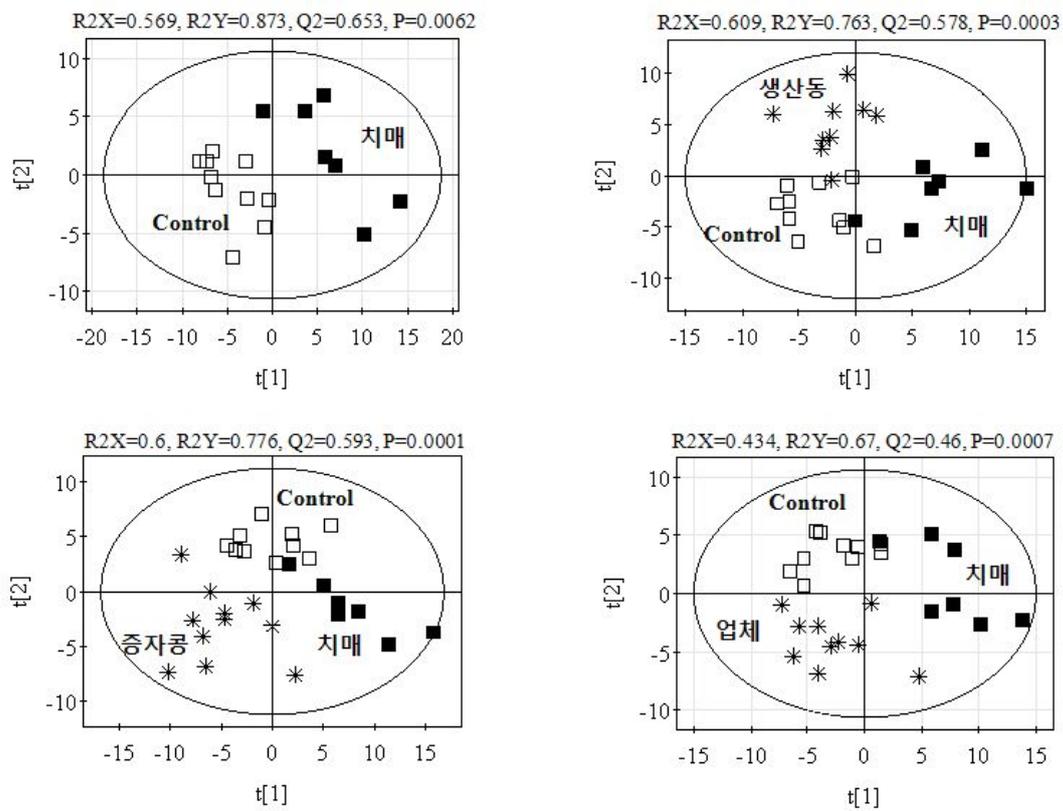


Fig. 35. PLS-DA scores plots를 이용한 뇨 대사체 분석

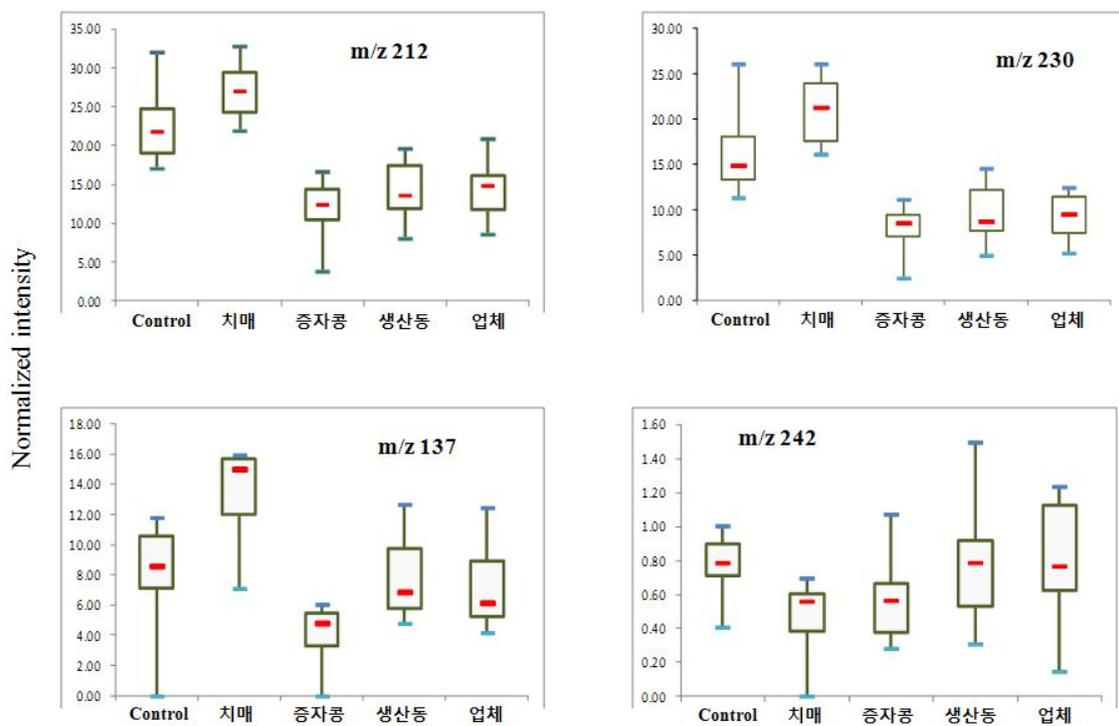
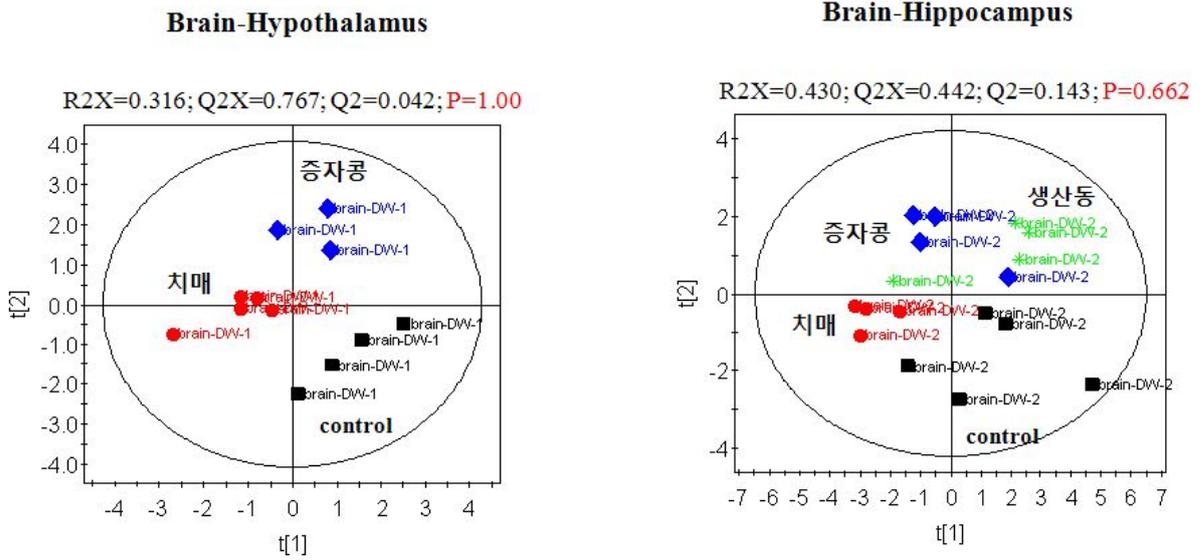


Fig. 36. 시료들의 차이에 관여하는 것으로 밝혀진 뇨 대사물질들의 intensity 비교

## 2) 뇌 대사체 분석

- 뇌 대사체를 분석하기 위하여 hypothalamus와 hippocampus를 분리하여 진행하였다. 두 뇌 조직에서 수용성 대사체만을 분리한 후 LC/MS를 이용하여 분석한 결과 PLS-DA scores plots에서 그룹간에 차이를 보이는 것처럼 보이지만 두 조직 다 PLS-DA model parameters 중 P-value 값이 1.00과 0.662로 매우 높아서 어떤 유의적인 차이를 확인 할 수가 없었음



## (2) 치매 유도 쥐에 theanine, quercetin, luteoline, 오미자를 투여한 후 생체 대사체 분석

- 치매를 유도한 쥐에 theanine, quercetin, luteoline, 오미자를 투여한 후 간에 들어있는 대사체를 LC/MS를 이용하여 분석하였음
- 분석진행 방법은 위에서 언급한 방법과 동일하게 진행하였다. 오미자와 luteoline 투여군의 경우 PLS-DA model parameters 중 P-value가 1.00과 0.85로 매우 높고 예측 가능한 값이 Q2 값이 매우 낮아 더 이상의 분석이 진행되지 못하였음
- 그에 반해 quercetin 투여군인 경우 R2X, R2Y, Q2값은 적절하였지만 p-value가 0.144로 다소 높게 나타났음
- 비록 오미자와 luteoline 보다 좋게는 나왔지만 통계적으로 유의적인 차이는 없었음
- 그러나 theanine 처리구에서는 R2X, R2Y, Q2값이 각각 0.509, 0.734, 0.516로 높으며 p-value 또한 0.038로 유의적인 차이를 보여 치매 유도군과 유의적으로 구별되는 것으로 확인되었음 (Fig. 37)
- 치매 유도군과 theanine 처리군과의 차이에 관여하는 대사물질을 확인하기 위하여 PLS-DA loading plot과 t-test를 진행한 결과 5개의 대사물질들 (proline, nicotinamide, hypoxanthine, phenylpyruvic acid, normetanephrine)을 동정하였음 (Fig. 38)
- 이들 물질들 중 hypoxanthine은 theanine 처리에 의해 증가한 반면 proline, nicotinamide, phenylpyruvic acid, normetanephrine은 theanine 처리에 의해 감소하는 결과를 얻었음

(Fig. 39)

- 이들 대사체들이 치매와의 상관성을 대한 구체적인 연구결과가 나와야 알 수 있겠지만 알츠하이머 병과 직간접적으로 연관성을 갖고 있는 phenylpyruvic acid와 normetanephrine의 감소는 매우 긍정적인 발굴이라고 할 수 있음

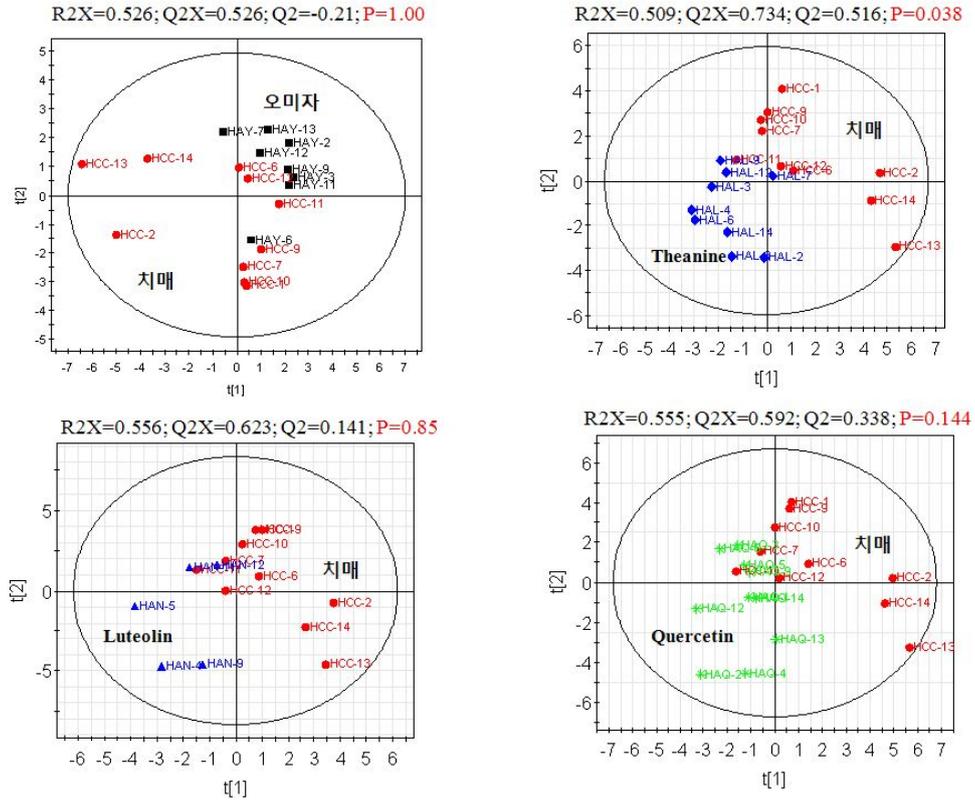


Fig. 37. 치매 유도 쥐에 theanine, quercetin, luteoline, 오미자를 투여한 후 생체 대사체 분석

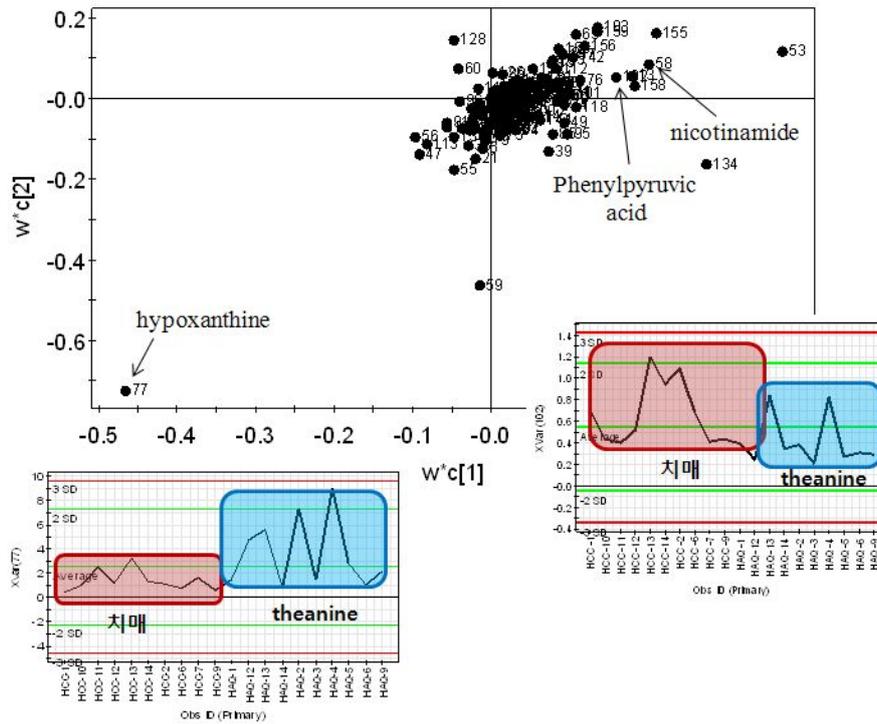


Fig. 38. PLS-DA loading plot과 line plot를 이용한 차메 유도 쥐에 theanine를 투여한 후 생체 대사체 분석

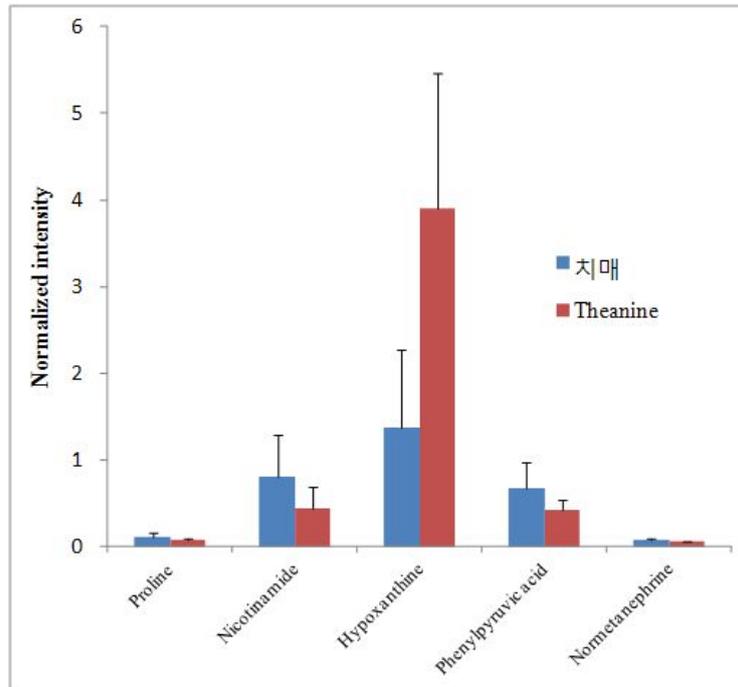


Fig. 39. 차메 유도 쥐에 theanine를 투여한 후 생체 대사체 분석을 통해 도출된 주요 후보 지표물질들

## 4장. 연구성과 및 성과활용 계획

### 1절. 연구 성과

#### (1) 연구 기간 내에 나온 연구 성과

- 아래 Table 3에 있듯이 계획에 맞게 연구가 진행되었으며 향후 논문과 학술 발표 계획이 2건씩 있으므로 연구 계획 대비 성과는 충분하다고 사료됨

Table 3. 연구 계획 대비 성과

구분	연구논문	학술발표	지식재산권	기술이전/ 제품화	기타	계
1년도 계획	2	2				4
1년도 성과	1	1				2
향후 성과발표 계획	2	2	1			5

- 이미 게재 확정된 연구 논문은 제목이 “Standardized chungkookjang, short-term fermented soybeans with *Bacillus lichemiformis*, improves glucose homeostasis as much as traditionally made chungkookjang in diabetic rats“ Journal of Clinical Nutritional Biochemistry (SCI급 저널)에 게재 확정되었음
- 이미 발표한 학술 발표로는 1) ; 2) 박선민. The prevention of type 2 diabetes mellitus and foods. 2012 International Symposium & Annual Meeting 한국미생물·생명공학회 (The Korean Society for Microbiology and Biotechnology; KMB) 부산 벅스코 6.27-29. 29일 구연 발표

#### (2) 연구 기간 후에 나올 연구 성과

- 청국장들의 여러 종류의 균주로 제조한 표준 청국장들의 항당뇨 효과를 in vitro에서 조사한 논문 (제목이 “Enhanced anti-diabetic activity by chungkookjang fermented with *Bacillus licheniformis* strains“)은 Nutrition Research에 투고하여 review 중임
- *B. lichemiformis*로 만든 청국장의 항치매 효과에 대한 내용을 SCI급 저널에 논문으로 게재하고자 준비 중에 있고 impact factor가 높은 저널에 투고하고자 함
- 2013년도 Experimental Biology에 청국장의 항치매 효과에 대해서 학술발표에 초록 (Standardized chungkookjang, short-term fermented soybeans with

*Bacillus lichemiformis*, improves cognitive function and insulin resistance in  $\beta$ -amyloid-infused diabetic rats)을 제출하고 발표 결정을 기다리고 있음

- *B. lichemiformis*로 만든 청국장의 항치매 효과에 대해서 특허 출원을 진행하고 있고 곧 출원할 것임

## 2절. 성과 활용계획

- 청국장의 대사성질환 (특히, 당뇨병과 치매) 효과의 과학적인 동물 실험 결과 제시로 국내 소비 촉진 및 해외 수출 증대
- 청국장 주원료의 표준화 및 기능성 물질 탐색을 통하여 생리활성 기능 증진을 과학적으로 입증함으로써 한국 전통 식품의 우수성을 알리는 근거 자료 확보
- 청국장은 전통장류 중에서도 가장 기능성이 뛰어난 제품이므로 청국장의 기능성을 과학적으로 입증함으로써 한국 전통 식품의 우수성을 세계에 알릴 수 있음
- 청국장은 전통 장류 중 유일하게 소금이 함유되어 있지 않으므로 다양한 조리에 사용할 수 있어서 한식 조리의 세계화에 다양하게 활용될 수 있음
- 청국장은 조리뿐만 아니라 다양한 가공식품으로 개발하여 세계 시장에 판매하여 수출 효과를 가져 올 수 있음
- 청국장의 기능성을 과학적으로 규명한 연구 결과를 국제 우수 논문으로 발표함으로써 한식의 우수성과 인지도 제고를 위한 언론홍보 가능

## 5 장. 참고문헌

1. Chan JC, Malik V, Jia W, *et al.* Diabetes in Asia: epidemiology, risk factors, and pathophysiology. *J Am Med Assoc* 2009; **301**:2129-2140.
2. Rocca WA, Petersen RC, Knopman DS, Hebert LE, Evans DA, Hall KS, Gao S, Unverzagt FW, Langa KM, Larson EB, White LR. Trends in the incidence and prevalence of Alzheimer's disease, dementia, and cognitive impairment in the United States. *Alzheimers Dement* 2011; **7**:80-93.
3. Wimo A, Jonsson L, Winblad B. An estimate of the worldwide prevalence and direct costs of dementia in 2003. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2006; **21**:175 - 181.
4. Park S, Jang JS, Jun DW, Hong SM. Exercise enhances insulin and leptin signaling in the cerebral cortex and hypothalamus during dexamethasone-induced stress in diabetic rats. *Neuroendocrinology* 2005; **82**:282-293.
5. Bjorbaek C, Kahn BB. Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Recent Prog Horm Res* 2004; **59**:305-331.
6. Liu Y, Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Gong CX. Deficient brain insulin signalling pathway in Alzheimer's disease and diabetes. *J Pathol* 2011; **225**:54-62.
7. Maesako M, Uemura K, Kubota M, Kuzuya A, Sasaki K, Hayashida N, Asada-Utsugi M, Watanabe K, Uemura M, Kihara T, Takahashi R, Shimohama S, Kinoshita A. Exercise is more effective than diet control in preventing high fat diet-induced  $\beta$ -amyloid deposition and memory deficit in amyloid precursor protein transgenic mice. *J Biol Chem* 2012; **287**:23024-23033.
8. Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 2002; **297**:353-356.
9. Ghanim H, Monte SV, Sia CL, Abuaysheh S, Green K, Caruana JA, Dandona P. Reduction in inflammation and the expression of amyloid precursor protein and other proteins related to Alzheimer's disease following gastric bypass surgery. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; **97**:E1197-E1201.
10. Akter K, Lanza EA, Martin SA, Myronyuk N, Rua M, Raffa RB. Diabetes mellitus and Alzheimer's disease: shared pathology and treatment? *Br J Clin Pharmacol* 2011; **71**:365-376.
11. Schubert M, Brazil DP, Burks DJ, Kushner JA, Ye J, Flint CL, Farhang-Fallah J, Dikkes P, Warot XM, Rio C, Corfas G, White MF. Insulin

- receptor substrate-2 deficiency impairs brain growth and promotes tau phosphorylation. *J Neurosci* 2003; **23**:7084-7092.
12. Poirier R, Fernandez AM, Torres-Aleman I, Metzger F. Early brain amyloidosis in APP/PS1 mice with serum insulin-like growth factor-I deficiency. *Neurosci Lett* 2012; **509**:101-4.
  13. Kwon DY, Hong SM, Ahn IS, Kim MJ, Yang HJ, Park S. Isoflavonoids and peptides from Meju, a long-term fermented soy food, increase insulin sensitivity and exert insulinotropic effects *in vitro*. *Nutrition* 2011; **27**:244-252.
  14. Kwon DY, Jang JS, Lee JE, Kim YS, Shin DW, Park S. The isoflavonoid aglycone-rich fractions of Chungkookjang, fermented unsalted soybeans, enhance insulin signaling and peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  activity *in vitro*. *Biofactors* 2006; **26**:245-258.

## 주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 한식세계화사업(해당사업 표기)의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 한식 세계화사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.