발 간 등 록 번 호
11-1541000-001747-01

청국장의 스포츠 기능성 연구

(A Study on Sports Function of Korean Soybean ChungGukJang)

2012. 12. 29

주관연구기관: 한국과학기술연구원
위탁연구기관: 한국체육대학교

농 림 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “청국장의 스포츠 기능성 연구” 에 대한 최종보고서로 제출합니다.

2012 년 12 월 29 일

연구기관명 한국과학기술연구원

연 구 진

연구기관명 : 한국과학기술연구원
연구책임자 : 엄병헌

연 구 원 : 판철호, 김상민, 강석우, 차광현
연구보조원 : 목일균, 김우리, 상아방, 서구량, 김은옥

연구기관명 : 한국체육대학교
책임연구원 : 오재근
연 구 원 : 윤진호

요 약 문

Ⅰ. 제 목

청국장의 스포츠 기능성 연구

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 목적

- 한국 전통식품인 청국장의 스포츠기능성 평가
- 청국장 추출물을 이용한 스포츠 기능성 식품 개발

2. 필요성

- 세계적으로 경제 성장에 따라 동물성 식품 및 우유가공제품 등의 섭취가 증가하여 암, 당뇨병, 심혈관 질환, 골다공증 등과 같은 성인병이 지속적으로 증가하고 있는 경향이며, 그 결과 전통 웰빙 식품에 대한 관심이 크게 증가하고 있다.
- 여가시간이 증가하고 사회 전반의 웰빙 열풍과 맞물려 생활체육 인구가 증가하면서 스포츠에 대한 관심이 높아지고 있다.
- 청국장은 한국의 대표적인 전통 발효 식품으로써 높은 영양학적 가치와 다양한 생리 활성 물질을 포함하고 있다. 유산소 운동 능력을 향상시켜 주며 근육 형성의 단백질 공급원으로서 근비대 및 근력향상 효과를 기대할 수 있다.
- 청국장의 스포츠 기능성 평가를 통해 청국장의 효능에 대한 과학적 근거를 마련하고 한국 전통 발효식품의 우수성을 지켜가고 향상시킬 수 있다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 청국장으로부터 스포츠 기능성 원료 추출
- 청국장 제조 방법 설정 및 추출물 분석
- 지표 성분 설정 및 분석 방법 확립
- 인체 시험용 대용량 추출물 제조

- 추출 조건의 최적화

2. 청국장의 스포츠 기능성 평가
- 청국장 스포츠기능성 원료 및 유효성분의 유산소 능력 향상 효능 검증
- 청국장 스포츠기능성 원료 및 유효성분의 근육형성 효과 분석

3. 청국장 지표 성분의 생이용성 연구
- 청국장 추출물 분말 및 제형에 따른 지표 성분의 생이용성 확인
- 생이용성 분석 system을 확립하여 소화과정 중 지표성분의 안전성, 유리 효율 및 장세포 투과도 검증

4. 청국장 활용 스포츠 기능성 식품 가공
- 인체 실험용 청국장 추출물 제형 설정
- 스포츠 기능성 시제품 개발

Ⅳ. 연구개발결과

1. 청국장으로부터 스포츠 기능성 원료 추출
- 청국장을 5가지 방법으로 제조하여 각각에 대한 추출율 및 주성분 함량 분석
- 지표성분으로 콩의 Isoflavone을 설정하고 LC-MS를 활용한 분석법 개발
- 대용량 추출물 가공방법 확립 및 지표 성분 표준화
- PLE (Pressurized Liquid Extraction)를 활용한 추출 조건 최적화

2. 청국장의 스포츠 기능성 평가
- 4주간의 임상실험을 통해 유산소 운동능력 향상 경향성 확인
- 청국장 스포츠기능성 원료 및 유효성분의 근 비대 및 근력 향상 경향성 확인

3. 청국장 지표 성분의 생이용성 연구
- 지표성분 정성 정량 분석법 확립 및 청국장 형태에 따른 생이용성 비교 분석
- 생이용성 분석 system 확립
  a. simulated digestion
  b. Caco-2 분석 시스템

4. 청국장 활용 스포츠 기능성 식품 가공
- 청국장 추출분말의 하드 캡슐 제조
- 청국장 분말의 함량 조절 및 바형태 제품 적용
- 청국장 잔사를 활용한 시제품 개발 및 영양성분 분석

Ⅴ. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 연구 성과
- 스포츠 기능성 청국장 추출물 제조 및 지표성분 분석법 설정
- 대용량 추출물 제조 방법 개발 및 추출 조건 최적화
- 인체 실험을 통한 스포츠 기능의 유효성 검증
- 청국장을 활용한 다양한 스포츠 기능성 식품 (환, 캡술, 분말, 바 등)의 개발에 필요한 기초 기술 확립

2. 활용 계획
- 청국장 원료를 활용하여 다양한 종류의 스포츠 기능성 식품 개발
- 관능 테스트 결과 도출된 문제점을 보완할 수 있는 개선책 마련
- 청국장의 스포츠 기능성 메카니즘 규명을 위한 추가 연구를 통하여 청국장의 우수성을 규명할 수 있는 과학적 근거 보강
- 기술이전을 통한 기업의 제품 생산 지원

SUMMARY

Ⅰ. Title

Study on sports function of Korean soybean chunggukjang

Ⅱ. Purpose and necessity of the study

1. Purpose

- Evaluation of sports function of Korean traditional food chunggukjang
- Development of sports functional food made from chunggukjang extract

2. Necessity

- Global economic growth raised the intake of foods of animal origin and processed milk, therefore adult diseases such as cancer, diabetes, cardiovascular disease, osteoporosis continues to increase and interest for traditional wellness food has been greatly increased.
- For increased leisure time and craze for well-being of society as a whole, interest in the sports is growing.
- The chunggukjang, Korean representative traditional fermented food, contains high nutritional value and variety of biologically active substances. The chunggukjang can enhance the ability of aerobic exercise, and muscle formation and strength gains can be expected because chunggukjang act as a source of protein.
- By evaluating the sports functionality of chunggukjang, we can establish a scientific basis for the beneficial efficacy of chunggukjang and improve the excellence of Korean traditional fermented food.

Ⅲ. Scope and contents of the study

1. Extraction of sports-functional material from chunggukjang
- Determination of chunggukjang manufacturing methods and analysis of extract
- Determination of marker compounds and analysis method
- Preparation of large amount of extract for human test
- Optimization of extraction condition

2. Evaluation of sports function of chunggukjang
- Investigation of improvement in aerobic exercise capacity
- Investigation of improvement in muscle formation

3. Bioavailability of marker compounds from chunggukjang
- To evaluate bioavailability of marker compounds from chunggukjang extract powder and different formulations
- To establish bioavailability analysis system and to investigate stability, bioaccessibility and cell permeability

4. Processing of sports functional food from chunggukjang
- Formulation of chunggukjang extract for human test
- Development of sports functional trial products

Ⅳ. Results of the study

1. Extraction of sports-functional material from chunggukjang
- To investigate extraction yield and marker compound contents from 5 different kinds of chunggukjang.
- To determine marker compounds as isoflavone and to develop analysis methods by LC-MS
- To establish processing method of high-volume extract and standardization of marker compounds.
- Optimization of extraction condition by PLE (Pressurized Liquid Extraction)

2. Evaluation of sports function of chunggukjang

- To verify improvement in aerobic exercise capacity through 4 weeks' humane test
- To verify improvement in muscle formation and muscle strength

3. Bioavailability of marker compounds from chunggukjang
- To establish quantification and qualification methods of marker compounds and to compare bioavailability of different formulation of chunggukjang
- To establish bioavailability analysis system
  a. Simulated digestion
  b. Caco-2 transport system

4. Processing of sports functional food from chunggukjang
- To produce hard capsules from chunggukjang extract powder
- To regulate content of chunggukjang powder and to apply bar-type products
- To develop trial products from chunggukjang residue and to analyze nutritive components

Ⅴ. Outcomes of the studies and suggestions for further application

1. Outcomes
- To produce sports functional chunggukjang extract and to establish analysis methods of marker compounds
- To develop processing method of high-volume extract and to optimize extraction condition
- To verify sports function of chunggukjang through humane test
- To establish the basis necessary for developing a variety of sports functional food (pill, capsule, powser, bar and so on) from chunggukjang

2. suggestions for further application
- To develop various sports functional food from chunggukjang
- To improve the problems revealed by the sensory test
- To elucidate mechanism of sports funtion of chunggukjang and to reinforce scientific basis to prove the excellence of chunggukjang
- To support production of companies through technology transfer

CONTENTS

CHAPTER 1. OUTLINE OF THE RESEARCH PROJECT ····· 1

SECTION 1. PURPOSE OF THE RESEARCH ····· 1
1. FINAL GOALS AND MAIN CONTENTS OF THE RESEARCH ····· 1
2. DETAILED GOALS AND CONTENTS OF THE RESEARCH ····· 1
SECTION 2. THE FEATURE OF CHUNGGUKJANG ····· 1
1. OUTLINE OF CHUNGGUKJANG ····· 2
2. EFFICACY OF CHUNGGUKJANG ····· 2
SECTION 3. NECESSITY OF THE STUDY ····· 4
1. ASPECTS OF TECHNOLOGY AND RESEARCH ····· 4
2. ASPECTS OF ECONOMY AND INDUSTRY ····· 6
3. ASPECTS OF SOCIETY ····· 7
SECTION 4. TREND ANALYSIS ····· 8
1. CHUNGGUKJANG ····· 8
2. SPORTS NUTRITION SUPPLEMENTS ····· 10

CHAPTER 2. CONTENTS AND RESULTS OF THE RESEARCH ····· 12

SECTION 1. EXTRACTION OF SPORTS-FUNCTIONAL MATERIAL FROM CHUNGGUKJANG 12
1. RESEARCH STRATEGY ····· 12
2. METHODS FOR PRODUCING CHUNGGUKJANG AND HPLC ANALYSIS ····· 12
3. HIGH-VOLUME EXTRACTION AND QUANTIFICATION OF ISOFLAVONES ····· 23
4. MASS EXTRACTION FOR HUMANE TEST AND QUANTIFICATION ISOFLAVONES ··· 26
5. OPTIMAZATION OF EXTRACTION CONDITION BY PLE ····· 29
SECTION 2 EVALUATION OF SPORTS FUNCTION OF CHUNGGUKJANG ····· 34
1. CONTENTS ····· 34
2. SUBJECTS ····· 34
3. METHODS ····· 34
4. DATA PROCESSING ····· 37
5. RESULTS ····· 38
SECTION 3 BIOAVAILABILITY OF MARKER COMPOUNDS ····· 54
1. RESEARCH STRATEGY ····· 54
2. Simulated digestion ····· 56
3. Caco-2 transport ····· 66

SECTION 4 PROCESSING OF SPORTS FUNCTIONAL FOOD FROM CHUNGGUKJANG …… 74
1. FORMULATION OF SPORTS FUNCTIONAL MATERIAL …… 74

CHAPTER 3. ACHIEVEMENTS AND CONTRIBUTION OF THE RESEARCH …… 76

CHAPTER 4. OUTCOME AND PRACTICAL USE OF THE RESEARCH …… 77

SECTION 1 TECHNICAL ACHIEVEMENTS …… 77
SECTION 2 ECONOMICAL AND INDUSTRIAL ACHIEVEMENTS …… 77
SECTION 3 ACHIEVEMENTS OF PAPERS AND PATENTS …… 78
SECTION 4 SUGGESTIONS FOR FURTHER APPLICATION …… 78

목 차

제 1 장 연구과제의 개요 ····· 1

제 1 절 연구의 목적 ····· 1
1. 연구개발의 최종목표 및 주요내용 ····· 1
2. 연구개발의 세부 목표 및 내용 ····· 1
제 2 절 청국장의 특징 ····· 1
1. 청국장 개요 ····· 2
2. 청국장 효능 ····· 2
제 3 절 연구의 필요성 ····· 4
1. 기술 연구적 측면 ····· 4
2. 경제 산업적 측면 ····· 6
3. 사회적 측면 ····· 7
제 4 절 동향 분석 ····· 8
1. 청국장 ····· 8
2. 스포츠 영양 보충제 ····· 10

제 2 장 연구 수행의 내용 및 결과 ····· 12

제 1절 청국장을 활용한 스포츠기능성 원료 추출 ····· 12
1. 연구 전략 ····· 12
2. 청국장 제조 방법 및 HPLC 분석법 설정 ····· 12
3. 청국장 대용량 추출물 제조 및 isoflavone 정량 ····· 23
4. 인체 실험용 청국장 대용량 추출물 제조 및 isoflavone 정량 ····· 26
5. PLE를 활용한 지표성분의 최적화 추출 조건 확립 ····· 29
제 2 절 청국장의 스포츠기능성 평가 ····· 34
1. 연구내용 ····· 34
2. 연구대상 ····· 34
3. 실험방법 ····· 34
4. 자료처리 방법 ····· 37
5. 연구결과 ····· 38
제 3 절 청국장 유효성분의 생이용성 연구 ····· 54

1. 연구 전략 ····· 54
2. Simulated digestion ····· 56
3. Caco-2 transport ····· 66
제 4 절 청국장 활용 스포츠기능성 식품 가공 ····· 74
1. 스포츠 기능성 원료의 제형화 연구 ····· 74

제 3 장 목표 달성도 및 관련 분야에 대한 기여도 ····· 76

제 4 장 연구 개발 성과 및 활용 계획 ····· 77

제 1 절 기술적 성과 ····· 77
제 2 절 경제 산업적 성과 ····· 77
제 3 절 논문 및 특허 성과 ····· 78
제 4 절 활용 계획 ····· 78

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 청국장의 스포츠 기능성 연구			
	(영문) Study on Sports Function of Korean Soybean ChungGukJang			
연 구 기 관	한국과학기술연구원		연 구 책 임 자	(소속)한국과학기술연구원
참 여 기 관	한국체육대학교			(성명) 엄병헌
연 구 비	계	₩160,000,000	총 연 구 기 간	2011.12.30. ~ 2012.12.29. (1 년)
참 여 연 구 원	20명 (책임연구원: 2 명, 연구원: 5명, 연구보조원: 13명, 보조원 명)			

O 연구개발 목표 및 내용

1. 목표
   - 한국 전통식품인 청국장의 스포츠기능성 평가 및 청국장 추출물을 이용한 스포츠 기능성 식품 개발
2. 내용
   - 청국장으로부터 스포츠 기능성 원료 추출
   - 청국장의 스포츠 기능성 평가
   - 청국장 지표 성분의 생이용성 연구
   - 청국장 활용 스포츠 기능성 식품 개발

O 연구결과

1. 청국장으로부터 스포츠 기능성 원료 추출
   - 청국장의 제조 방법에 따른 추출물 분석 및 지표성분 분석법 개발
   - 대용량 추출물 가공방법 확립 및 PLE (Pressurized Liquid Extraction)를 활용한 추출 조건 최적화
2. 청국장의 스포츠 기능의 유효성 평가
   - 4주간의 임상실험을 통해 유산소 운동능력 향상 경향성 확인
   - 청국장 스포츠기능성 원료 및 유효성분의 근 비대 및 근력 향상 경향성 확인
3. 청국장 지표 성분 생이용성 연구
   - 지표성분 정성 정량 분석법 확립 및 청국장 형태에 따른 생이용성 비교 분석
   - 생이용성 분석 system 확립 (simulated digestion, Caco-2 분석 시스템)
4. 청국장 활용 스포츠 기능성 식품 가공법 연구 및 시제품 개발
   - 청국장 추출분말의 하드 캡슐 제조
   - 청국장 분말 및 잔사를 활용한 시제품 개발 및 영양성분 분석

O 연구성과 및 성과활용 계획

1. 청국장 원료를 활용하여 다양한 종류의 스포츠 기능성 식품 개발
2. 관능 테스트 결과 도출된 문제점을 보완할 수 있는 개선책 마련
3. 청국장의 스포츠 기능성 메카니즘 규명을 위한 추가 연구를 통하여 청국장의 우수성을 규명할 수 있는 과학적 근거 보강
4. 기술이전을 통한 기업의 제품 생산 지원

제 1 장 연구과제의 개요

제 1 절 연구의 목적

1. 연구개발의 최종목표 및 주요내용

한국의 전통식품인 청국장의 스포츠기능성 평가를 통해, 청국장의 스포츠 기능성 식품으로서의 우수성을 증명하고, 활용을 도모한다.

가. 청국장을 활용한 스포츠기능성 원료 추출
나. 청국장 스포츠기능성 원료의 스포츠기능성 평가
다. 청국장 활용 스포츠기능성 식품 제조 및 가공

2. 연구개발의 세부 목표 및 내용

가. 청국장을 활용한 스포츠기능성 원료 추출
- 다양한 추출/가공 방법을 적용하여 청국장으로부터 스포츠기능성 원료를 개발한다.
- 용매 (물/주정)에 따른 추출율 조사
- 물리적 가공 방법에 따른 추출율 조사
- 지표성분의 분석(LC/MS)

나. 청국장의 스포츠기능성 평가 (인체실험)
- 청국장 스포츠기능성 원료 및 유효성분의 유산소 능력 향상 효능 검증
- 청국장 스포츠기능성 원료 및 유효성분의 근육형성 효과 분석

다. 청국장 유효성분의 생이용성 연구
- 생이용성 (bioavailability) 측정을 통한 청국장 유효성분의 생체 흡수율 조사

라. 청국장 활용 스포츠기능성 식품 가공
- 스포츠기능성 원료의 제형화 연구
- 스포츠바, 영양바 등 스포츠기능성 식품 제조

제 2 절 청국장의 특징

1. 청국장 개요

청국장은 자연식품임과 동시에 발효식품으로 우리의 대표적인 전통식품 중 하나이다. 우리나라는 예로부터 콩을 발효한 식품을 많이 섭취하여 왔다. 특히 된장은 우리나라의 주요한 영양원 및 음식으로서 사랑을 받아왔다. 된장이외에 콩발효 식품으로 많이 섭취되는 청국장은 예부터 전통 음식으로 널리 알려져 있으며, 된장과 달리 제조 시간이 짧고 집에서도 간단하게 소량으로 제조할 수 있으며 많은 식이섬유를 함유한 다이어트식이라는 점으로 현대인의 취향에 맞는 건강 음식으로 각광을 받고 있다.

청국장의 역사는 고구려로 거슬러 올라간다. 고구려의 옛 영토인 지금의 만주 지방의 기마 민족들은 쉽게 단백질을 섭취할 수 있는 방법으로 콩을 삶아서 말안장 밑에 넣 고 다녔다. 이것이 한반도로 내려와 서민의 유용한 단백질 공급원이자 왕가의 폐백식품으로 애용되기도 하였다. 이 청국장은 한국 뿐 아니라 실크로드를 따라 중국의 서 역 지방까지 전해지게 되었고, 네팔, 태국, 인도네시아, 부탄, 아프리카까지 퍼져 나갔다. 또한 일본에서는 '낫토(natto)'라는 이름으로 불리었으며, 점차 동남아시아에 청국장 음식문화권이 형성되었다.

2. 청국장 효능

청국장도 다른 콩발효 식품과 마찬가지로 뛰어난 건강식품이다. 콩이 발효하면서 여러 가지 복합균과 곰팡이, 효소의 작용에 의해 생겨난 물질이 더해져서, 항암효과, 혈전용해능력 그리고 간 기능 강화의 효과가 있다고 알려져 있다. 청국장의 효능을 간단히 살펴보면, 다음과 같이 몇 가지의 효능으로 나눌 수 있다.

가. 변비 개선

섬유질은 자기 무게 보다 40배나 많은 수분을 흡수하기 때문에 변이 대장 속을 지나면서 굳어지고 딱딱해지는 것을 예방한다. 또한 대장 벽을 자극해 변이 대장을통과하는 시간을 단축시켜 주므로 대장의 수분 흡수량이 줄어들어 수분을 많이 포함한 변이 부드럽게 나오게 해준다. 또한 바실러스균에 의한 정장 효과도 뛰어나 설사가 있는 사람들에겐 설사를 멎게 해주고, 변비가 있는 사람들에게는 변비를 개선시켜준다.

나. 비만 방지

섬유질이 풍부한 음식을 섭취하면 섬유질의 수분 흡수 성질 때문에 만복감을 주어 과식을 하지 않게 되고, 대장암을 예방하며 콜레스테롤의 양도 낮출 수 있다. 특히 청국장은 발효가 일어나면서 원재료인 콩에는 많지 않거나 아예 없는 비타민 B1, B2, B6, B12 등이 만들어지는데, 이들 비타민은 신진대사를 촉진하므로 영양분이 지방으로 축적되는 것을 예방하고, 신진대사 회로를 거쳐 영양분이 완전 분해되도록 도와준다. 또한 칼슘, 칼륨 및 각종 비타민과 미네랄의 도움으로 인체의 신진대사를 촉진하고, 레시틴과 사포닌은 과도한 지방을 흡수하여 배출함으로써 비만을 막아주는 역할을 한다.

다. 뇌졸중 예방

단백질 분해효소의 작용에 의해 혈전을 예방할 수 있다. 일본 사람들이 '낫토키나아제'라고 부르는 혈전 용해 효소는 정확한 학술용어로 '섭틸리신 나트 (subtilisinNAT)'라고 하는데, 바실러스 분해효소의 일종으로 평소에 꾸준히 먹어주면 뇌졸중을 예방할 수 있다.

라. 항암작용

생청국장에는 '제니스테인'이라는 성분이 있는데, 이는 암에 탁월한 효과를 보인다. 암은 세포의 유전자가 손상되는 단계와 세포 분열이 빨라지는 단계로 나눠지는데 이 제니스테인은 세포 분열이 빨라지는 것을 억제하는 역할을 한다. 또한 '사포닌'이라는 성분 또한 암 예방에 큰 역할을 하는데, 암의 발생 과정에서 생기는 DNA 부가물이 자라는 것을 억제하여 암 발생 촉진 인자를 감소시켜 준다. 그밖에 청국장에는 파이틱산, 트립신 억제제와 같은 항암성분도 존재하는 것으로 밝혀져 미국에서도 마늘과 함께 최고의 항암식품으로 각광받고 있다.

마. 혈압강하

고혈압을 일으키는 효소로 ACE(Angiotensin Converting Enzyme)라는 효소가 있다. 콩이 바실러스라는 세균에 의해 분해되면 아미노산 조각들이 만들어 지고 이 조각들이 ACE 효소의 활성을 억제하는 작용을 해 준다. 또한 생청국장에는 100g당 790mg의 칼륨이 들어 있어 몸속에 쌓여있는 소금 성분인 소디움을 체외로 배출시켜주는 작용을 하여 혈압이 오르는 것을 막아준다.

바. 인슐린 분비 촉진

생청국장에는 비타민 B2가 풍부하게 들어 있어 비타민 B2를 필요로 하는 당뇨병 환자에게 좋은 음식이다. 청국장에 함유된 섬유질은 당의 흡수가 서서히 일어날 수 있도록 도와주어 혈당이 급격히 증가하거나 떨어지는 증상을 조절해 주기도 한다. 또 청국장에는 트립신

분비를 억제하는 성분이 있는데, 이 성분이 췌장에 영향을줘서 인슐린의 분비를 촉진시켜서 인슐린이 부족한 당뇨병환자들의 치료와 예방에 도움이 된다.

사. 피부미용개선

청국장에 함유된 레시틴은 우리 내장에 있는 독소들을 신장으로 보내 소변으로 배출시키거나 간으로 보내 분해하는 역할을 하고, 수분과 지방분의 균형을 적절하게 맞춰서 노화로 인해 수분이 빨리 줄어들어 피부가 윤기 없이 주름지는 것을 예방해 준다. 또한 청국장에는 피부에 좋은 비타민 E와 비타민 B군이 많이 들어 있다.

아. 치매에 효과

청국장에 들어 있는 레시틴이 분해되면 '콜린'이란 물질이 생성되는데, 이 '콜린'이란 물질이 치매 환자에게 부족한 '아세틸콜린'이라는 신경전달물질의 양을 늘리는데 중요한 역할을 하여 치매치료에 효과를 나타낸다.

차. 숙취에 효과

청국장에 들어 있는 비타민 B2가 알코올 분해를 촉진시켜 간의 기능을 좋게 하여 숙취해소에 도움이 된다.

제 3 절 연구의 필요성

1. 기술 연구적 측면

가. 콩의 대표 발효식품중의 하나인 청국장은 쇠고기에 버금가는 영양적 가치와 비타민 및 무기질의 함량은 그 원료가 되는 콩보다도 우수하다고 보고되어 있다. 슬로우 푸드의 선두주자이자 한국발효식품의 대표인 청국장이 영양학적인 우수성의 근거가 날로 가시화됨에 따라 항암 및 항비만, 변비해소 등 단순한 식품으로서의 가치가 아니라 영양성·기능성이 대두되고 있다.

표 1. 생청국장 100g에 포함된 영양성분

성분	함유량	성분	함유량	성분	함유량
수분	55 g	비타민B1	0.16 mg	아연	3 mg
열량	212 Kcal	비타민B2	0.56 mg	칼륨	790 mg
단백질	17.7 g	비타민E	1.2 mg	리놀산	53 mg
지질	11 g	비타민K	0.87 mg	이소플라본	92 mg
당질	14.3 g	칼슘	217 mg		
섬유질	5.4 g	마그네슘	115 mg		
회분	1.9 g	철	8.6 mg		

나. 최근에는 콩에 항산화성을 갖는 이소플라본류(isoflavone)나 토코페롤(tocopherol)과 같은 기능성 물질이 존재하는 것으로 알려져, 이들 기능성 물질에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 특히 이소플라본은 여성호르몬 (estrogen)과 유사한 구조를 가지고 있어 암, 폐경기 증후군, 심혈관계질환과 골다공증을 포함한 호르몬 의존성 질병에 대한 잠재적인 대체 요법을 제공함으로써 많은 관심을 일으키고 있다.

다. 대두식품은 암예방 식품으로 특히 유방암, 전립선암의 발생률을 감소시켜 준다. 청국장의 단백질분해효소에 의한 혈전용해 효과, daidzein에 의한 면역조절효과 등도 알려져 있다. 청국장의 daidzein은 estrogen receptor β (ERβ)를 자극하는 효과도 있다. ERβ를 매개로 한 세포신호전달은 항산화 유전자 발현조절, 면역반응조절, 유방, 전립선, 대장암 세포의 증식억제, 세포사멸 조절, 혈압조절과 관련이 있다. 그 밖에 청국장에 존재하는 β-glucanase에 의해 만들어진 oligosaccharide도 당뇨병 예방 등 다양한 생리활성을 지니고 있다.

라. 청국장 발효가 진행되면서 Bacillus protease에 의해 대두단백질이 분해되어 아미노산이나 peptide류가 생성된다. Angiotensin I-converting enzyme (ACE)는 angiotensin I을 II로 전환시키며, angiotensin II는 생체 내에서 혈압을 높이게 된다. 청국장에 존재하는 peptide류는 ACE 억제제로 작용하여 혈압을 떨어뜨릴 수 있다

마. 선행 연구 결과 콩은 유산소 운동 능력을 향상시켜 주며 근육 형성의 단백질 공급원으로서 근비대 및 근력향상 효과를 보이고 있다. 또한 청국장은 단백질 및 비타민, 무기질 함량이 콩에 비해 향상되었으며 다양한 생리활성물질이 함유되어 있으므로 스포츠 기능성 또한 향상되었을 것으로 기대된다. 이를 검증하기 위해 한국의 전통 음식인 청국장의 스포츠 기능성연구를 수행하려고 한다.

2. 경제 산업적 측면

가. 소득의 증가, 주5일 근무제 등으로 여가시간이 증가하고 사회 전반의 웰빙 열풍과 맞물려 생활체육 인구가 증가하고 있다.

나. 한국은 스포츠 메달 획득 세계 10대 강국이나 스포츠 소재 용품은 대부분 (70%이상, 특수용품은 90%이상 수입에 의존하고 있는 실정이고, 스포츠기능성 식품을 포함한 스포츠 용품에 대한 기반 기술 연구가 절실히 필요한 상황이다.

다. 미국과 같은 선진국을 바탕으로 스포츠 기능성 식품 시장이 지속적으로 성장하고 있으며, 웰빙에 대한 인식이 높아지면서 육식 보다는 채식에 대한 관심이 증가하고 있는 추세이다.

라. 현재 일본은 낫토를 활용한 과자 및 아이스크림, 라면 및 쥬스 등 수백 가지 관련 제품이 나와 있으며, 이에 한국의 청국장도 관련 제품의 다양화를 통해 소비자에게 다양하게 어필할 필요성이 있다.

<table>
<tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr>
<tr><td>낫토 스낵</td><td>낫토 사탕</td><td>낫토 음료</td><td>낫토 차</td></tr>
<tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr>
<tr><td>낫토 아이스크림</td><td>낫토 케익</td><td>낫토 빵</td><td>낫토 라면</td></tr>
<tr><td> </td><td> </td><td> </td><td> </td></tr>
<tr><td>낫토 안주</td><td>낫토 발효기</td><td>낫토 비누</td><td>낫토 로션</td></tr>
</table>

그림 1 일본에서 판매되는 낫토 제품

3. 사회적 측면

가. 전 세계적으로 육류대안 식품으로 콩 가공 식품산업이 증가추세에 있으며 콩은 우리의 전통적인 식품의 주원료로써 필수 3대 영양소와 각종 무기질 및 비타민을 함유하고 있다. 그러나 조직이 단단하여 그대로 삶거나 볶아 먹으면 소화 흡수가 잘 안되므로 두부나 두유 등의 가공 식품이나 청국장 등의 발효 식품을 만들어 이용해 왔다.

나. 청국장은 예전부터 먹어온 한국 고유의 대두 발효 식품이다. 국외로는 일본의 낫또, 인도네시아의 템페나 네팔의 키네마 등이 청국장과 비슷한 식품으로 알려져 있다. 청국장은 대두 발효 식품으로 미생물, 효소, 다양한 생리 활성물질 등이 풍부하며, 인체의 균형

을 잡아 주어 건강을 유지, 증진시켜 주는 것으로 알려져 있다. 또한 청국장은 정장, 혈행 개선 등의 기능성 식품으로서 도 각광받고 있으며, 생, 분말 청국장의 형태로 개발되고 있다.

다. 청국장은 예전부터 한국인의 대표 건강 음식으로 널리 받아들여지고 있다. 다른 한국 전통 발효 식품인 장류나 김치에는 높은 농도의 소금이 들어간다. 이는 한국인이 소금 섭취를 증가시킴으로써 한국인에게 많이 발생하는 것으로 보고되는 위암, 고혈압과 관련이 있을 수 있다. 반면에 청국장은 소금을 전혀 사용하지 않고 제조할 수 있어 이들 질환의 예방에 도움이 된다. 또한 된장의 경우 제조기간이 수개월 걸리나 청국장의 경우 2-3일의 짧은 기간에 제조할 수 있다는 장점이 있다.

제 4 절 동향 분석

1. 청국장

청국장 관련 특허출원의 건수를 보면, 2000년부터 2006년까지 7년간 총 288건이 출원되었는데, 2004년 79건, 2005년 67건 그리고 2006년 84건이 출원되어 최근 3년간 출원 건수가 근래 7년간 출원 건수의 대략 80%를 차지하고 있어 청국장 관련 출원이 최근 들어 급격히 증가하고 있음을 알 수 있다.

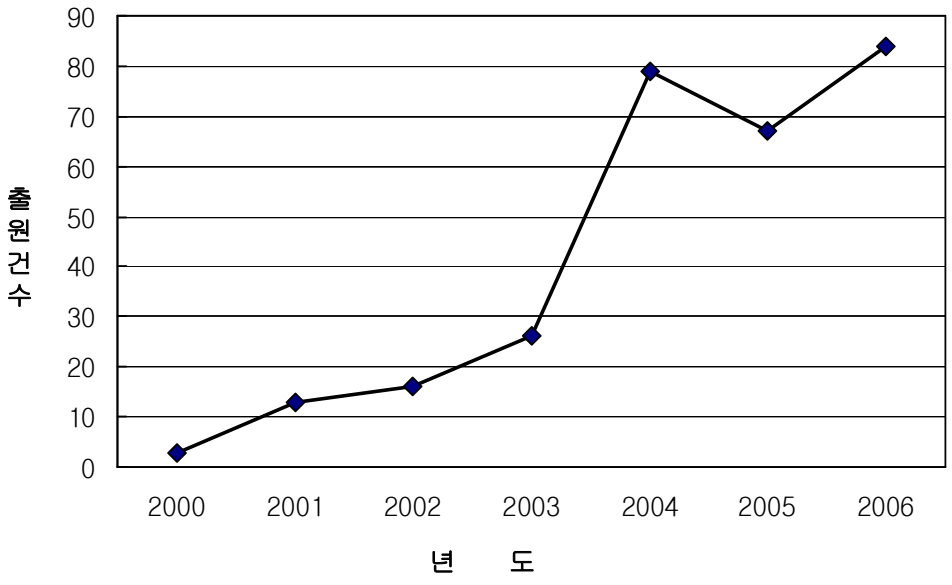


그림 2 청국장 관련 특허의 년도별 출원 동향

청국장 관련 특허출원의 기술유형을 보면, 증자된 대두 원료에 신규 미생물 및 기능성이 알려진 물질들을 첨가하거나 발효공정을 개선함으로써 청국장 고유의 냄새를 제거하는 한편 기능성 및 기호성을 향상시킨 청국장에 대한 특허출원이 58%를 차지하여, 일단 청국장 자체의 품질 개선에 대한 특허출원이 대종을 이루고 있음을 알 수 있다. 한편, 청국장에 동충하초, 인삼 등의 한약재 또는 건강증진 효과가 있는 각종 천연물질들을 혼합하여 청국장 분말, 환 또는 캡슐로 제조함으로써 보존성, 취식성 및 기능성이 향상된 건강보조식품에 대한 특허출원이 14%를 차지하고 있다. 또한 초콜릿, 과자, 빵, 아이스크림, 요구르트, 두유 등의 간식류에 청국장을 가공하여 이용하고자 한 출원이 17%를 차지하여 최근 들어 젊은 층을 겨냥한 다양한 형태의 청국장 이용기술이 개발되고 있는 것을 볼 수 있다. 그 밖에 청국장을 스파게티, 피자, 자장면, 김치 등에 첨가하여 기존 식품의 소스 또는 양념으로 이용하는 형태의 특허출원이 7%를 차지하고 있고, 기타 미용용품 등에 관한 기술내용이 4%이다.

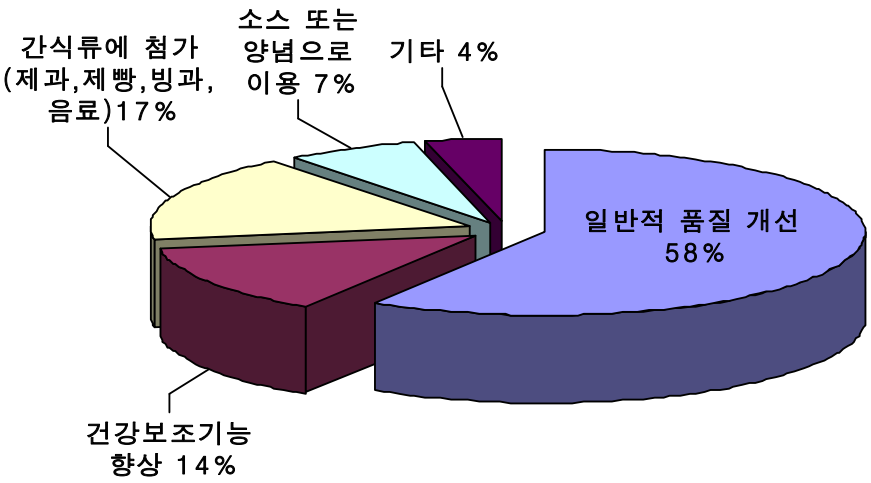


그림 3 청국장 관련 특허의 기술 유형별 출원 비율

이와 같은 청국장 관련 특허출원의 기술유형을 보면, 단순히 찌개로 이용되어 온 청국장이 식품 가공 기술과 접목되어 다양한 변신을 시도하고 있음을 알 수 있다. 청국장 관련 특허출원의 출원인을 구분해 보면, 근래 7년간 청국장 관련 특허출원 288건 중 개인 출원이 233건, 중소기업 출원이 43건 그리고 연구기관에 의한 출원이 12건이다. 이는 청국장 관련 기술의 개발이 주로 개인적 수준에서 많이 이루어지고 있을 뿐 기업 또는 연구기관 수준에서는 아직 청국장 관련 기술에 대한 관심이 낮음을 나타내고 있는 것으로써, 우수한 전통식품인 청국장에 대한 조직적이고 심화된 기술개발이 아쉬운 실정이다.

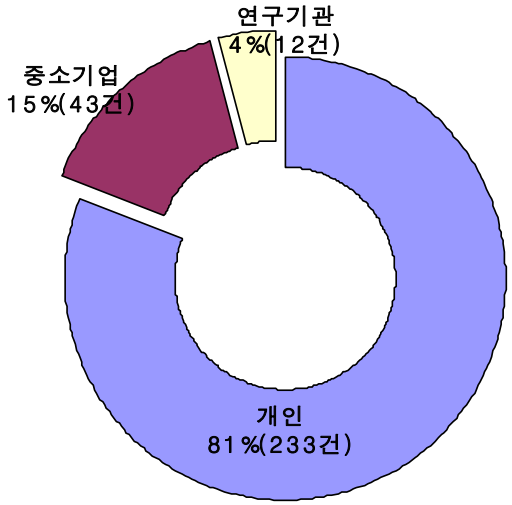


그림 4 청국장 관련 특허의 출원인별 출원 현황

2. 스포츠 영양 보충제

Euromonitor에 따르면 스포츠 영양보충제 (sports supplement) 세계 시장은 2009년 기준으로 약 46억 달러에 달한다고 보고되고 있다. (스포츠 음료 제외).

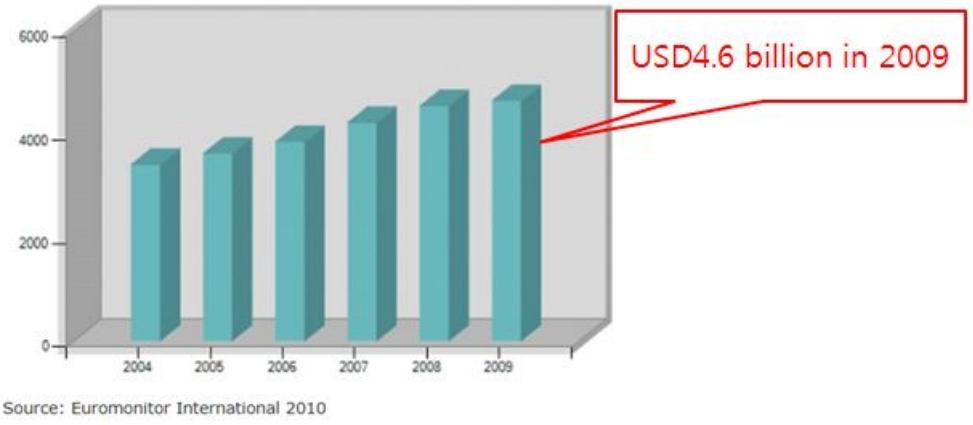
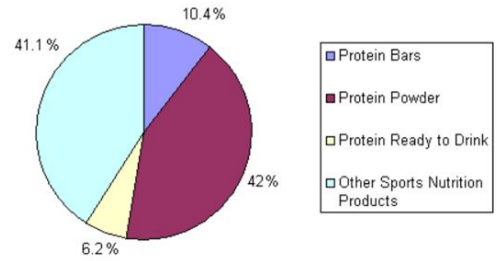


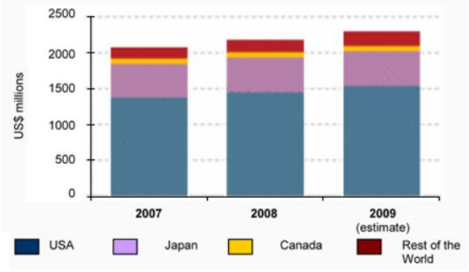
그림 5 스포츠 영양보충체의 세계 시장 규모

스포츠 영양보충제 시장의 성장은 세계 경제 성장과 밀접한 관련이 있으며, 특히 미국의 경제 상황과 밀접하게 연관되어 있는데, 미국 시장은 전 세계 시장의 약 2/3를 차지하고 있다. 스포츠 음료 시장은 이미 포화 상태에 달해 있는 반면, 에너지 바 등의 새로운 형태의 스포츠 제품이 점차 소비자의 구매를 이끌고 있음.



Source: Euromonitor

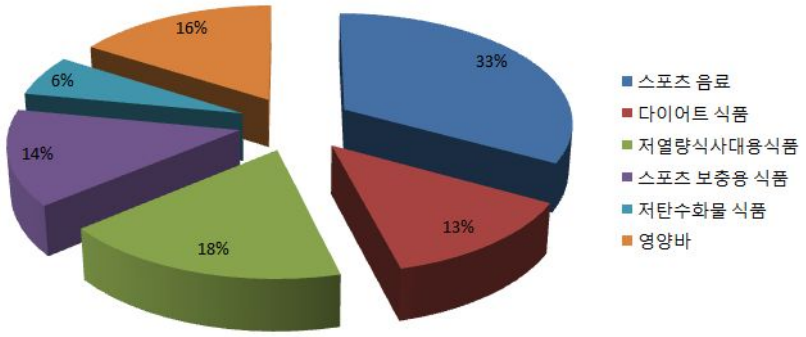
그림 6 2009년 각 스포츠 보충제 점유율



Source: Euromonitor, 2009

그림 7 에너지 바의 전 세계 판매량

미국 업계지 NBJ (Nutrition Business Journal:NBJ)의 스포츠 영양보충용식품과 다이어트 식품 시장에 관한 조사에 따르면 2003년 시장규모가 141억 달러에 이르며, 스포츠/에너지 식음료가 33%, 저열량 식사대용식품이 18%, 영양보충용식품이 16%, 스포츠영양식품이 14%, 건강기능식품이 13% 등으로 나타났으며, 스포츠 음료의 시장은 호조를 띄어 작년보다 두자리 성장률을 보인 것으로 보고되었다. 스포츠 영양보충용식품 중 식사대용으로 한 영양바 제품이 약 40% 이상으로 가장 많았으며, 다음으로 단백질과 에너지대용 제품이 각 20%, 저탄수화물 제품과 여성용 제품이 각 10%로 나타나, 영양/에너지대용 제품의 소구가 높은 추세이다. 스포츠에 대한 관심 급증, 생활체육인의 증가, 다양한 스포츠 활동을 통한 사회 참여의 증가 등을 배경으로 스포츠 식품 시장은 젊은 층을 겨냥한 식품 시장에 성장 잠재력이 큰 분야인 것으로 평가받고 있음. 특히 최근 미국의 10대들은 근육을 튼튼하게 하고 운동능력을 향상시키는 데 관심이 높아 10대 소년들의 70%와 소녀들의 53%가 이러한 목적을 달성하는 데 도움이 되기 위해 제조한 식품이나 음료를 이용하고 있는 것으로 보고된 바 있음



※ 출처 : NBJ Vol.Ⅷ.No.10

그림 8 미국 스포츠 영양 보충용 식품과 다이어트 식품 시장 현황

제 2 장 연구 수행의 내용 및 결과

제 1절 청국장을 활용한 스포츠기능성 원료 추출

1. 연구 전략

가. 청국장 제조 방법에 따른 추출물의 HPLC 및 LC-MS를 활용한 분석법 설정.

나. LC-MS를 이용한 청국장 EtOH 추출물의 isoflavonoids (daidzin, daidzein, genistin, genistein) 지표 성분 설정 및 정량분석법 확립. 콩의 isoflavonoid의 항산화 능력 및 다양한 기능성을 고려함.

한국체육과학회지, 2010, 제19권 제3호, pp. 1465~1475
The Korea Journal of Sports Science
2010, Vol. 19, No. 3, pp. 1465~1475

8주간의 이소플라본과 아르기닌 혼합섭취가 심폐운동능력과 혈중지질에 미치는 영향

박 선 희[1)] 양 윤 권[2)*]

The Effect of Isoflavone and Arginine Simultaneous Administration on Cardioactive Capacity and Blood Lipids.

Park, Sun-Hee[1] Yang, Yoon-Kwon[2*]

그림 9 아이소플라본이 운동 능력에 미치는 영향을 연구한 논문

다. 인체 실험을 위하여 청국장의 대용량 추출물 제조 및 지표성분의 정량

라. 물리적 추출 조건에 따른 지표성분의 최적화 추출 조건 확립

2. 청국장 제조 방법 및 HPLC 분석법 설정

가. 청국장 제조 방법

- 원료: 대두(40kg), 물 75kg(오차 ± 1kg)

- 청국장 제조 순서

a. 콩 씻기 및 담금

중간정도의 콩을 준비한다. 콩을 잘 씻고 3배 양의 물에 넣는다. 담그는 시간은 15~18시간 정도면 되는데 정확하게 시간을 맞출 필요는 없다. 콩의 침지시간에 따른 흡수량은 콩의 품종, 저장기간, 물의 온도 등에 따라 다르다. 일반적으로 행하여지고 있는 침지시간은 다음 표와 같다.

표 2. 온도와 담금 시간과의 관계

온도 (계절)	0~5 ℃ (겨울)	18~25 ℃ (여름)	10~16 ℃ (가을)
시간	24~38	10~16	16~24

b. 콩 익히기

콩을 익히는 방법에는 두 가지가 있는데 첫 번째가 물에 넣고 삶는 방법과 두 번째가 시루에 넣고 찌는 방법이다. 어느 쪽이든지 처리시간은 김이 난후 불을 약하게 해서 3시간 이상 지속한다. 콩을 증자하면 이에 함유된 탄수화물이 어느 정도 가수분해되어 환원당의 양은 증가하나 이외의 양이 감소하여, 총 함량이 줄어든다. 단백질은 열변성을 받아 수용성 질소의 양은 전질소량의 20%이하로 감소하나 청국장을 발효할 때 다시 회복된다. 또한 유리아미노산의 양도 대두에 함유된 양보다 10%정도 증가한다.

c. 종균(볏짚) 접종

볏짚을 구하기 어려우면 기존의 청국장을 종균으로 사용한다. 먼저 볏짚을 사용할 때는 바닥에 볏짚을 깔거나 콩에 볏짚을 꽂아두면 된다. 종균을 사용할 때는 우선 소독한 컵에 물 한 숟가락을 넣고 소독된 젓가락으로 기존의 청국장을 조금 찍어 잘 저어준 후 접종하면 된다.

d. 발효

청국장 종균과 섞은 콩 위에 천을 씌운다. (청국장균도 사람처럼 산소 호흡을 한다.) 40℃ 정도의 온도가 유지되도록 보온하여 18 시간 정도 발효시킨다. 그러나 진이 나는 상태와 냄새를 살펴서 발효의 종결점을 결정한다.

그림 10 청국장 제조 방법

나. 청국장 및 콩 추출 및 분석

- 시료: 삶은 콩, 햇콩, 청국장 (생청국장, 파쇄한 콩, 삶은콩 생청국장 1% 파쇄, 삶은콩 생청국장 5% 파쇄, 삶은콩 파쇄 생청국장 1%-> 각각 3일, 5일간 숙성)
- EtOH 및 water 추출: 시료 100g, solvent 500 mL 2회 (각 24시간) 상온 추출

표 3. 청국장 시료의 추출율

시료		Yield / 100g . 24hr	
		EtOH extraction	water extraction
삶은 콩		4.58	13.15
햇 콩		3.57	26.11
생청국장	2일 숙성	4.09	13.08
	3일 숙성	3.62	14.79
	5일 숙성	4.13	17.57
파쇄	3일 숙성	3.96	13.51
	5일 숙성	3.77	15.92
1% 파쇄	3일 숙성	3.34	12.54
	5일 숙성	3.36	11.75
5% 파쇄	3일 숙성	3.85	11.7
	5일 숙성	4.02	11.66
1% 파쇄안함	3일 숙성	3.50	10.54
	5일 숙성	4.24	12.94

- HPLC chromatogram 분석

a. C18 4.6×150mm column, flow rate: 1ml/min, UV 320 nm

b. HPLC condition

min	ACN	water
0	5	95
5	5	95
45	95	5
50	95	5

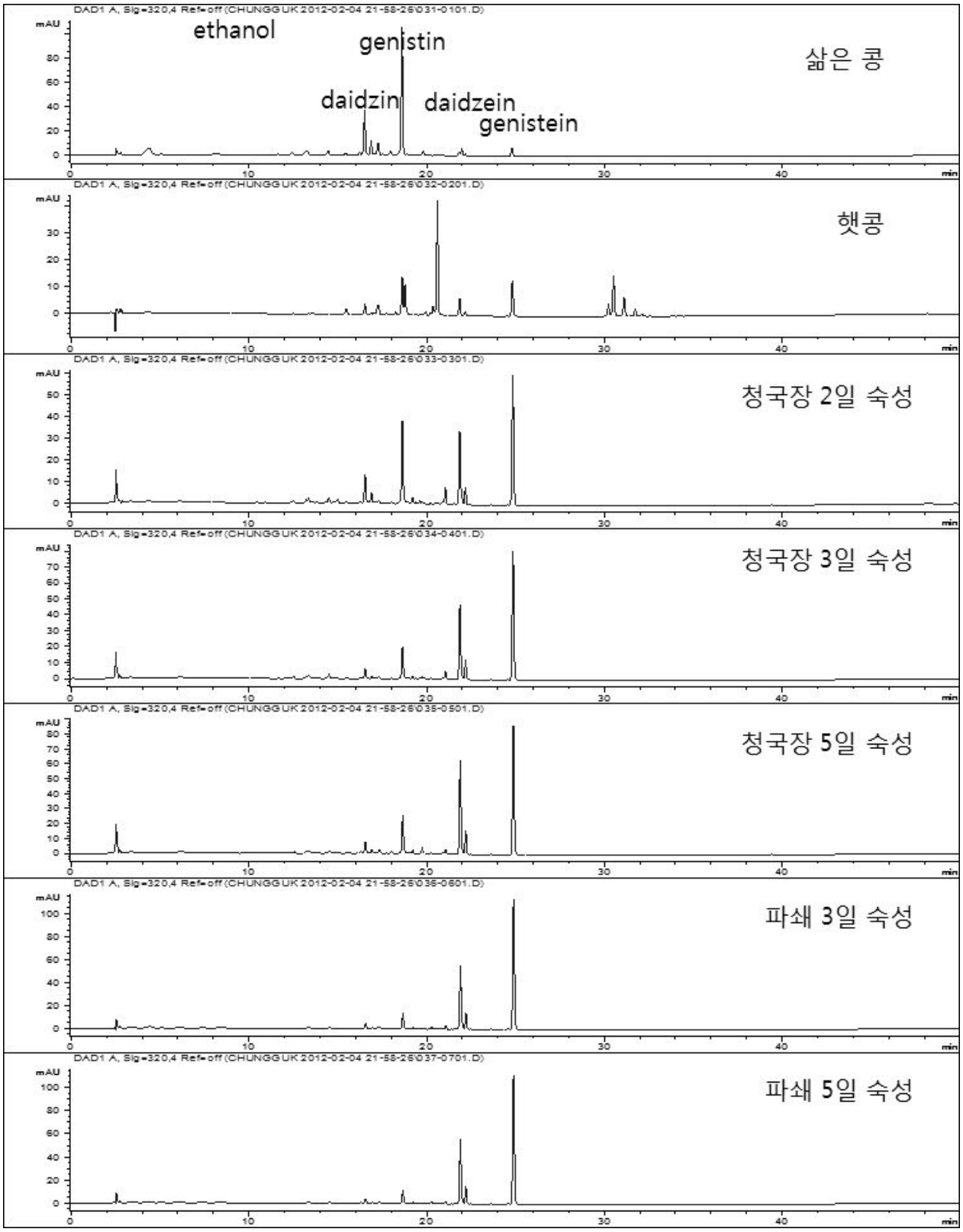


그림 11 콩 및 청국장 시료의 HPLC chromatogram

-continued-

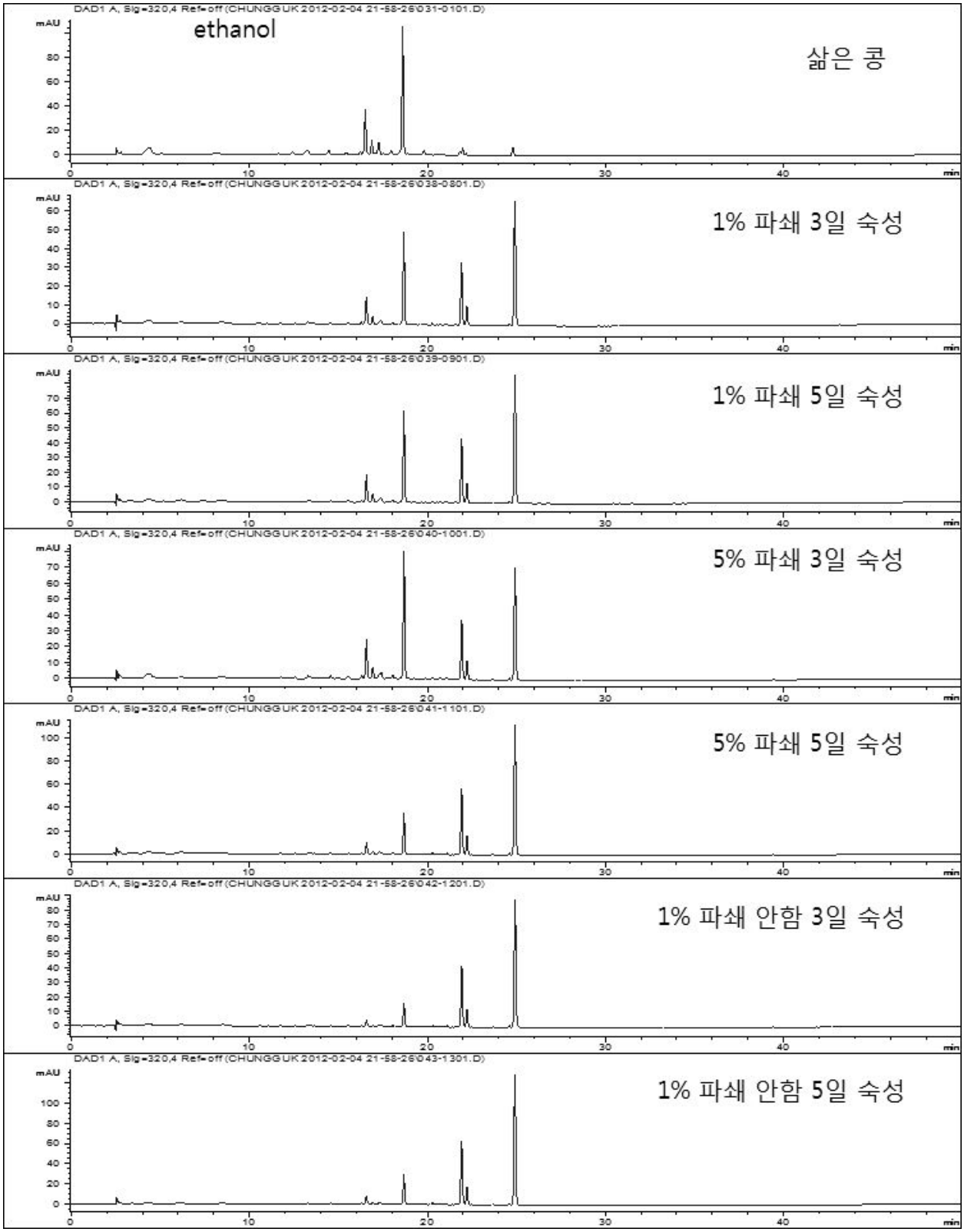

ethanol
삶은 콩
1% 파쇄 3일 숙성
1% 파쇄 5일 숙성
5% 파쇄 3일 숙성
5% 파쇄 5일 숙성
1% 파쇄 안함 3일 숙성
1% 파쇄 안함 5일 숙성

표 4. 시료별 주요 isoflavone 함량 비율

	Daidzin (16.50)	Daidzein (21.80)	Daidzin /Daidzein	Genistin (18.60)	Genistein (24.8)	Genistin /genistein
삶은콩	235.5	20.1	11.72	641.2	48.3	13.28
햇콩	23.2	41.5	0.56	86.7	91.3	0.95
청국장 2일	83.5	219.8	0.38	243.3	369.2	0.66
청국장 3일	41.3	300.4	0.14	133.8	540.9	0.25
청국장 5일	47.7	396.7	0.12	165.6	575	0.29
파쇄 3일	30.8	355.9	0.09	91.3	751.5	0.12
파쇄 5일	27.4	358.4	0.08	71.6	747.9	0.10
1% 파쇄 3일	91.1	207.9	0.44	285.2	440.1	0.65
1% 파쇄 5일	111.4	268.2	0.42	354.5	571.1	0.62
5% 파쇄 3일	149.9	237.2	0.63	465.8	469.1	0.99
5% 파쇄 5일	61.8	357.1	0.17	208.3	742.5	0.28
1% 파쇄 안함 3일	30.1	271.3	0.11	94.6	586.6	0.16
1% 파쇄 안함 5일	53.3	410.1	0.13	175.2	868.7	0.20

청국장의 isoflavone 중에는 콩에 비해 당이 유리된 aglycone (daidzein, genistein) 형태의 비중이 높았다. 당이 떨어짐으로써 세포막 투과성이 높아지기 때문에 청국장의 isoflavone 흡수율이 높아질 것으로 예상된다. 청국장의 발효 기간을 비교했을 때, 2일 보다는 3일에서 glycoside의 당가수분해가 많이 일어난 것으로 보이며 3일과 5일의 유의적 차이는 나타나지 않았다. 파쇄에 의한 isoflavone 함량의 차이는 현저하게 나타나지 않았다.

- LC-MS 실험을 통한 구조 분석법 설정

a. C18 2.0×50mm column, flow rate: 0.3ml/min, UV 320 nm, ion source: ESI

b. HPLC condition

min	ACN	water
0	5	95
1	5	95
25	95	5
30	95	5

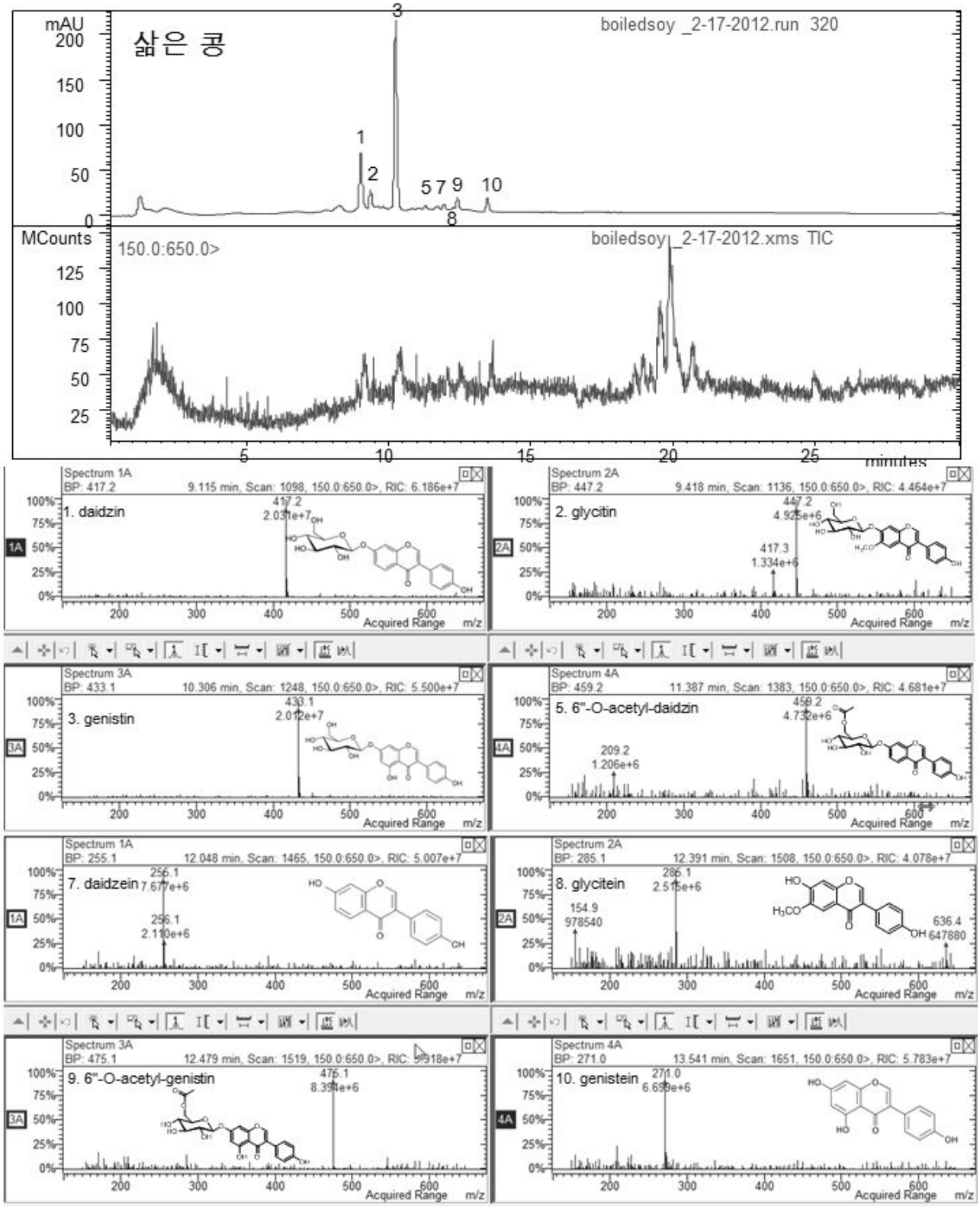


그림 12 삶은 콩의 LC-MS 분석 및 주요 성분 구조 동정

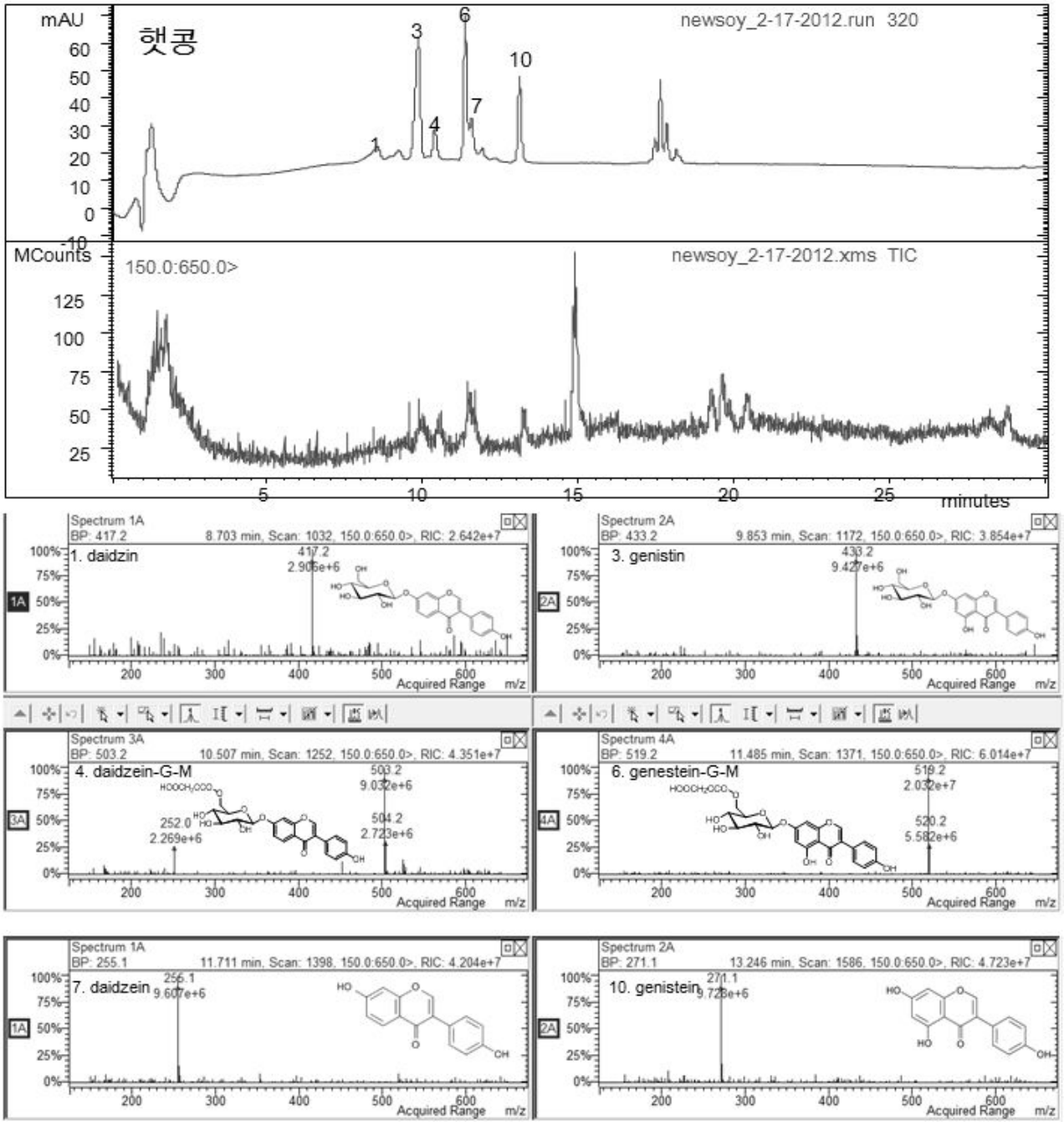


그림 13 햇콩의 LC-MS 분석 및 주요 성분 구조 동정

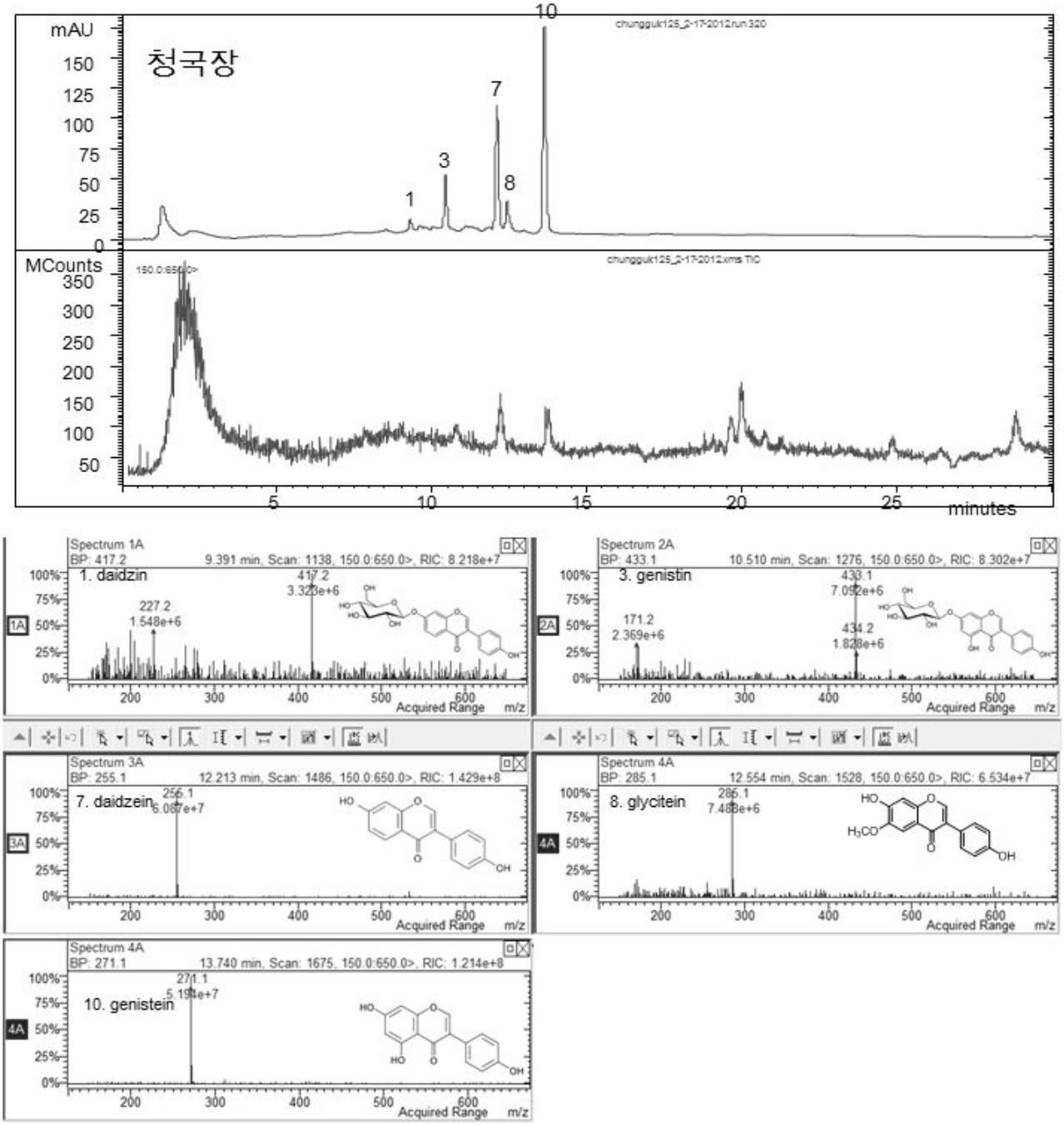
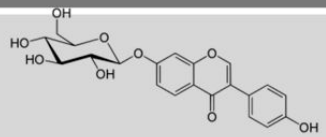
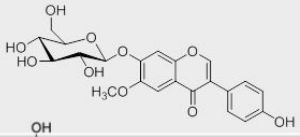
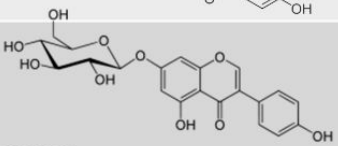
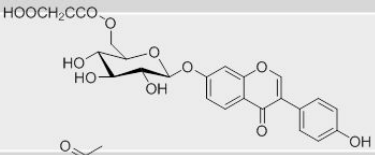
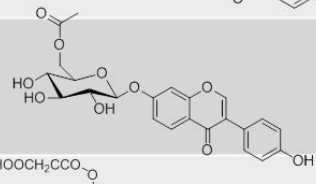
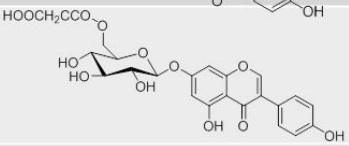
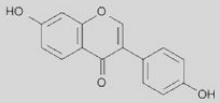
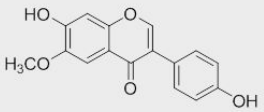
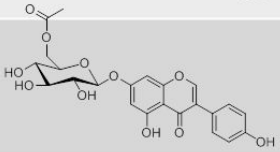
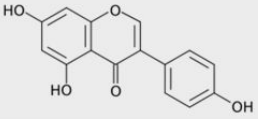


그림 14 청국장의 LC-MS 분석 및 주요 성분 구조 동정

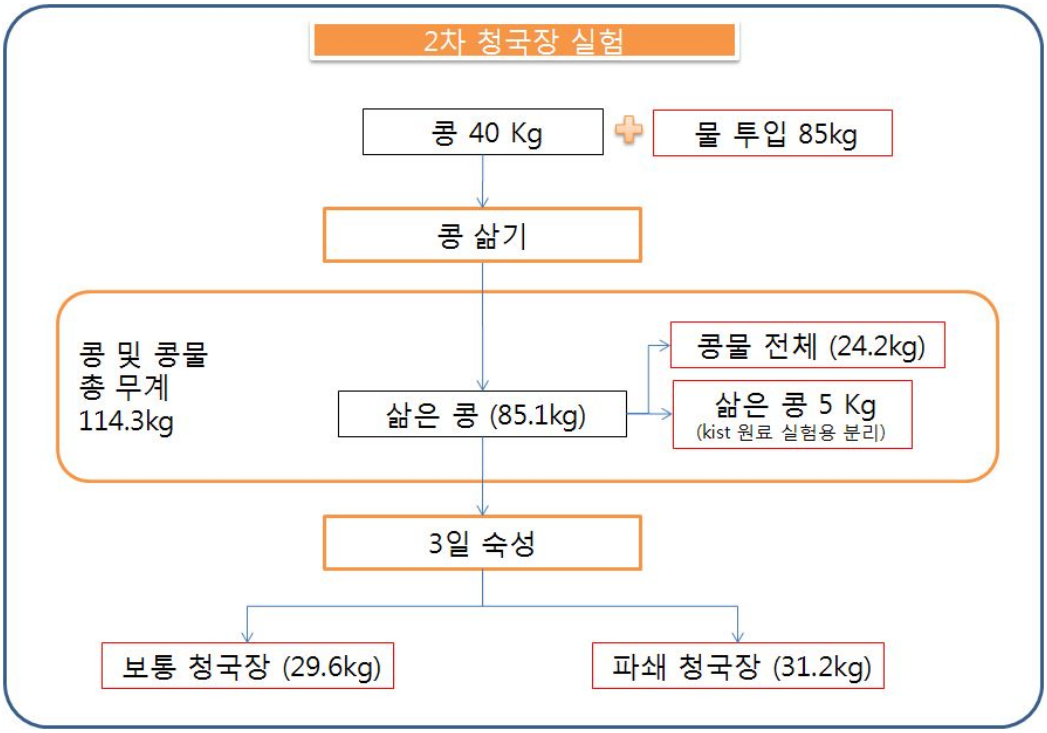
표 5. 콩 및 청국장 EtOH 추출물의 주요 peak 구조

peak	tR	$[M+1]^+$	identities	structures
1	9.12	417	daidzin	
2	9.42	447	glycitin	
3	10.31	433	genistin	
4	10.50	503	daidzein-G-M	
5	11.39	459	6"-O-acetyl-daidzin	
6	11.49	519	genestein-G-M	
7	12.05	255	daidzein	
8	12.39	285	glycitein	
9	12.48	475	6"-O-acetyl-genistin	
10	13.54	271	genistein	

3. 청국장 대용량 추출물 제조 및 isoflavone 정량

가. 청국장 대용량 추출물 제조

- 재료: 콩 (삶기 전), 콩물, 삶은 콩, 보통 청국장, 파쇄 청국장
- 청국장 제조 방법



- 추출물 제조

EtOH (94 % 주정) 24h * 3회 추출 (상온) (콩물은 예외, 콩물은 바로 동결건조함)

시료	추출시 양 (kg)	추출된 양 (g)	수율 (%)
콩 (삶기전)	1	23.4	2.34
콩물	24.2 (물포함 무게)	3080 (동결 건조후)	12.7
삶은 콩	1	49.04	4.904
보통 청국장	20	506	25.3
파쇄 청국장	20	640	3.2

나. isoflavonoids (IF)정량

- 콩 IFs (daidzin, genistin, daidzein, genistein) calibration curve
  a. C18 4.6×150mm column, flow rate: 1ml/min, UV 320 nm
  b. HPLC condition

min	ACN	water
0	5	95
5	5	95
45	95	5
50	95	5

c. 콩 IF 표준물질 HPLC

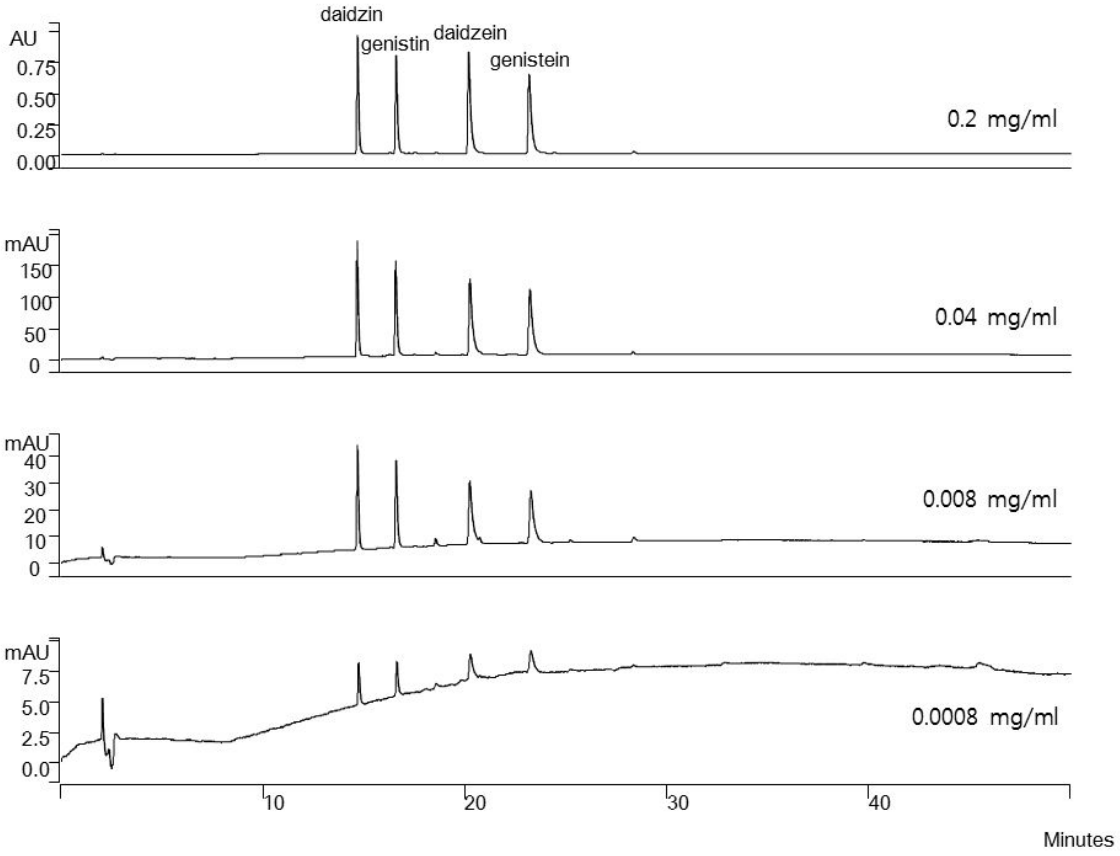


그림 15 콩 IF 표준물질의 농도별 chromatogram

d. 콩 IF 표준물질 검량선 그리기

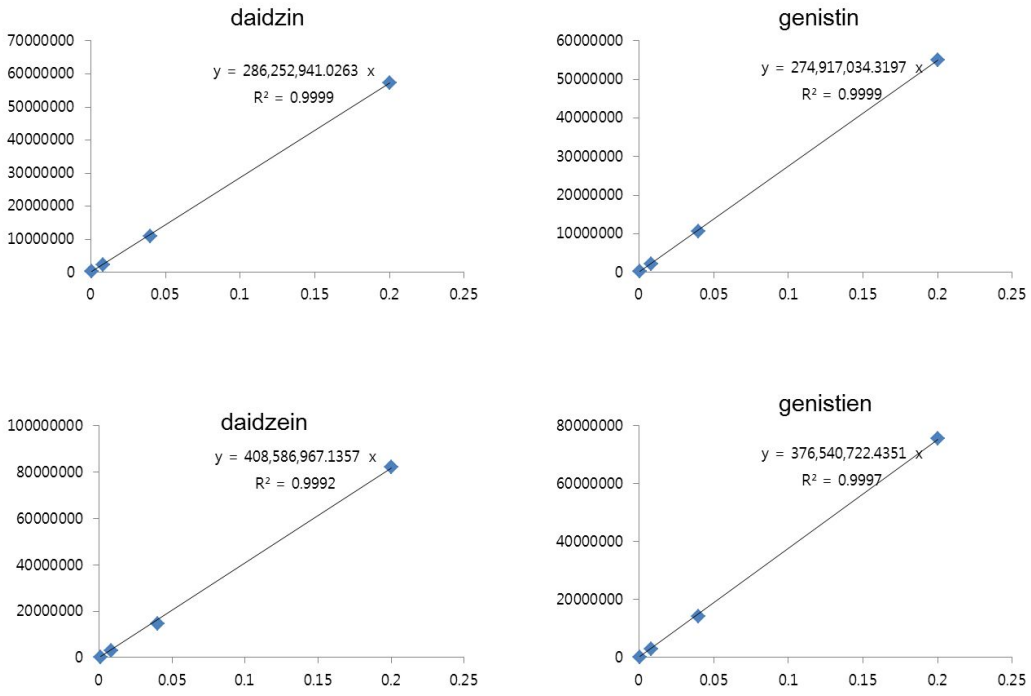


그림 16 콩 IF 표준물질의 calibration curves

e. 콩 및 청국장 추출물의 HPLC chromatogram

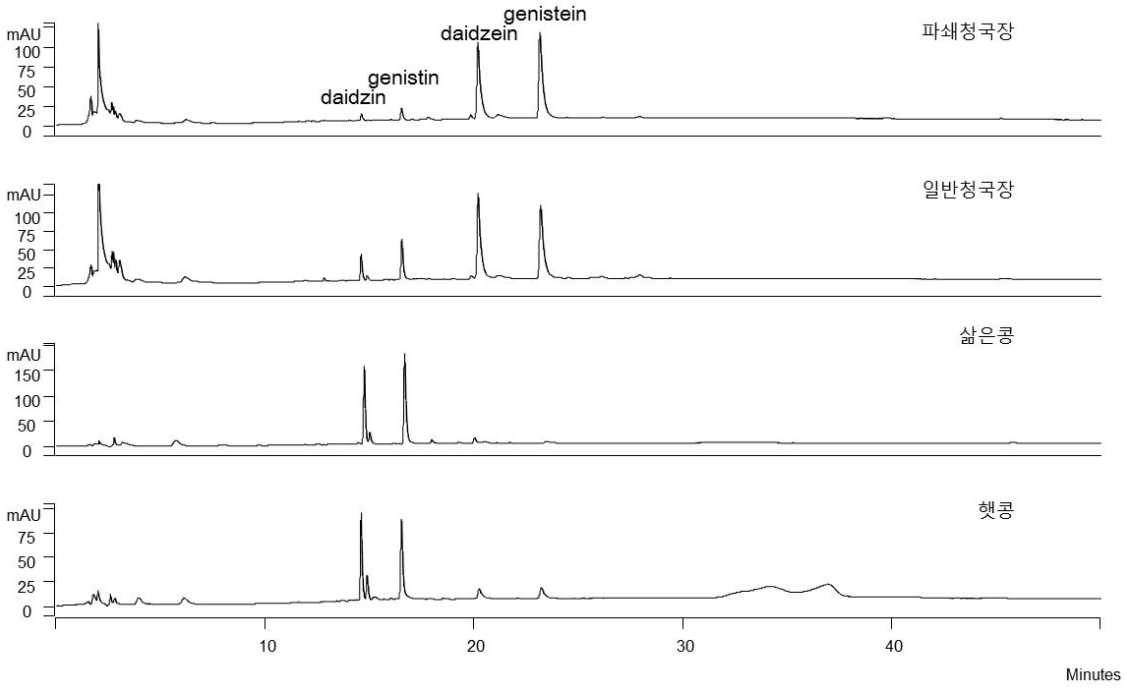


그림 17 콩과 청국장 시료의 chromatogram

f. 추출물의 IF 함량 정량

표 6. 콩 및 청국장 EtOH 추출물의 IF 함량

EtOH ext.	Isoflavone함량 (mg/g)				
	daidzin	genistin	daidzein	genistein	total
햇콩	1.85	2.30	0.36	0.41	4.92
삶은콩	3.32	4.84	0.25	0.15	8.56
일반청국장	0.76	1.44	3.88	3.72	**9.8**
파쇄청국장	0.18	0.39	2.86	3.92	7.35

° 콩의 IF 함량은 일반청국장 > 삶은 콩 > 파쇄 청국장 > 햇 콩 순으로 나타났다.
° 청국장에서는 daizein 과 genistein 의 비율이 daidzin genistin 보다 월등히 높았다.

4. 인체 실험용 청국장 대용량 추출물 제조 및 isoflavone 정량

가. 청국장 대용량 추출물 제조

- 재료: 청국장 100 Kg
- 청국장 추출물 제조
  a. 에탄올 100 L(시간: 24시간, 온도 50도) 2회 추출
  b. 추출물을 감압 건조 시킨 후 남은 추출용액을 동결 건조 시킴
    ° 수율: 2.3 % (추출물 2.3 Kg 획득)

그림 18 대용량 추출 장치

나. isoflavonoids (IF)정량

- 콩 IFs (daidzin, genistin, daidzein, genistein) calibration curve
  a. C18 4.6×150mm column, flow rate: 1ml/min, UV 320 nm
  b. HPLC condition

min	ACN	water
0	5	95
5	5	95
45	95	5
50	95	5

c. 콩 IF 표준물질 HPLC

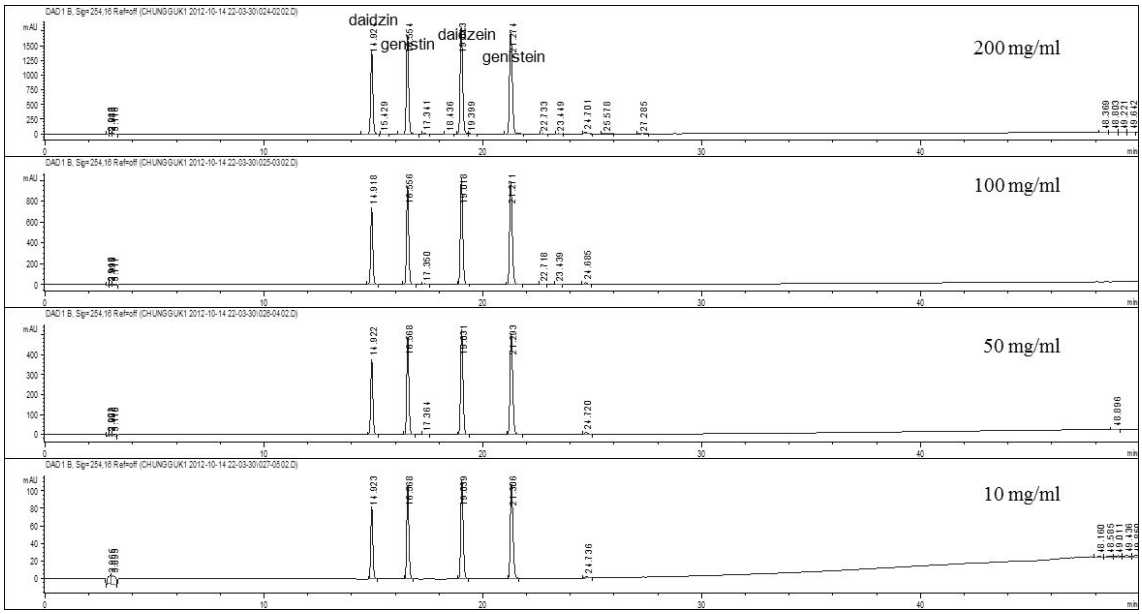


그림 19 콩 IF 표준물질의 농도별 chromatogram

d. 콩 IF 표준물질 검량선 그리기

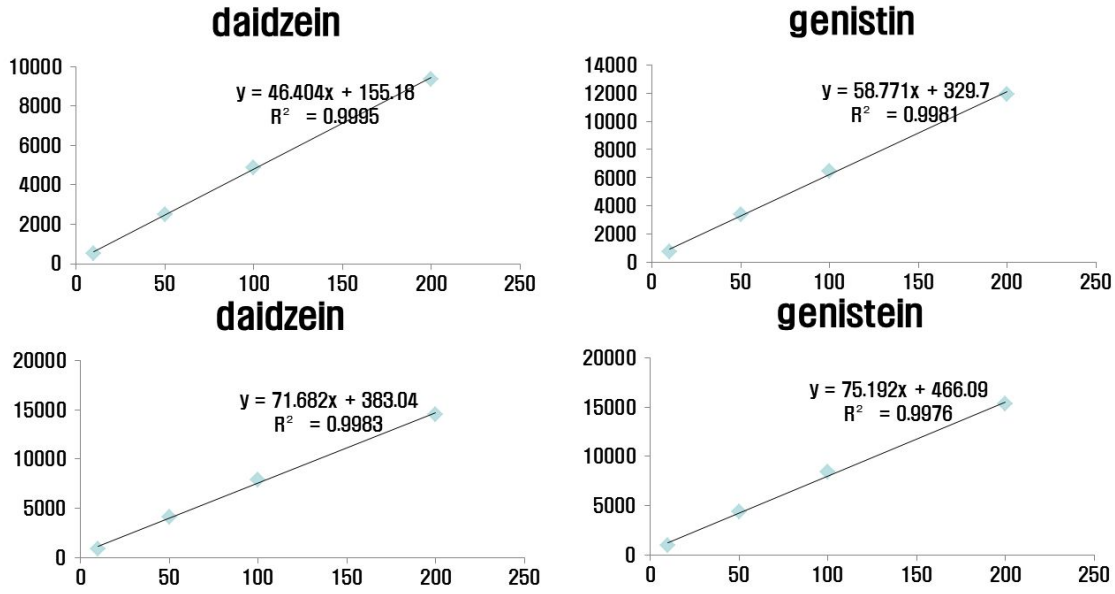


그림 20 콩 IF 표준물질의 calibration curves

c. 추출물의 IF 함량 정량

표 7. 청국장 EtOH 추출물 및 추출후 잔사의 IF 함량

EtOH ext.	Isoflavone함량 (mg/g)				
	daidzin	genistin	daidzein	genistein	total
청국장	3.14	3.85	4.35	4.37	**15.71**
잔사(mg/50g)	2.96	4.38	0.56	0.72	8.62

° 청국장 추출물 및 추출 후 남은 잔사의 IF 함량을 측정함

° 청국장 추출물에서 total IF 함량이 15.71 mg/g으로 나타났으며, 청국장 잔사에도 비교적 높은 8.62 mg/50g 의 함량이 나타남

° IF의 추출 조건을 최적화함으로써 추출효율을 높일 수 있을 것으로 기대됨.

5. PLE (pressurized liquid extraction)를 활용한 지표성분의 최적화 추출 조건 확립

가. 재료 및 방법

- 실험재료

청국장의 건조분말

- 실험기기 및 시약

청국장 시료의 추출장비로 PLE 장비(Dionex, ASE 300)를 사용하였으며, 추출물의 isoflavone 성분 분석을 위해 Agilent 1200series HPLC를 사용하였다. 추출용매는 1등급의 Ethanol과 1차 증류수를 사용하였다.

- 청국장분말의 isoflavone 추출 및 분석방법

a. 온도(40~200℃) 및 유기용매(Ethanol 0~100%)를 변수로 하여 minitab을 이용한 2인자 요인배치법의 중심합성법으로 실험설계하여 13개의 추출조건을 실험하였다. 압력(1500psi)과 추출용매부피 70% flush volume을 고정값으로 하여 PLE를 사용하여 추출하였다.

b. HPLC 분석조건

표 8. Isoflavone 분석에 사용된 HPLC 분석조건

Inj vol	10μL
Flow-rate	1.0mL
Column temp	35℃
Column	YMC-Pack Pro C18 RS, s-5μm, 8nm, 4.6×150mm
Detection	λ = 320nm
Elution	

Time (min)	AcCN (%)	Water+0.1%FA (%)
0	5	95
5	5	95
45	95	5
50	95	5

표 9. minitab의 실험설계법을 이용한 13가지 추출 실험조건

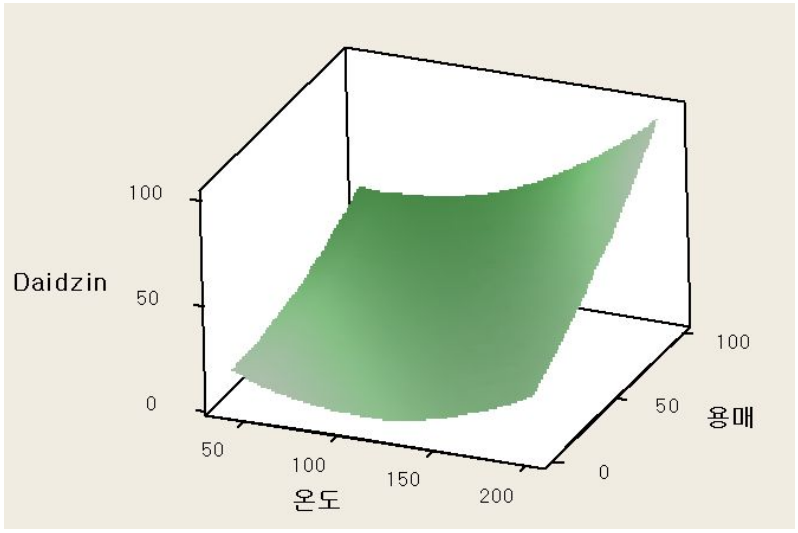
PLE No	X1	X2	온도(℃)	용매(EtoH %)
1	0	1.4	120	100
2	1.4	0	200	50
3	0	0	120	50
4	0	0	120	50
5	0	0	120	50
6	1	1	177	85
7	0	0	120	50
8	0	-1.4	120	0
9	-1.4	0	40	50
10	1	-1	177	15
11	-1	-1	63	15
12	0	0	120	50
13	-1	1	63	85

나. 결과

표 10. PLE 추출공정의 청국장 건조시료 1g 당 각 isoflavone함량 및 총 isoflavone 함량

No.	청국장 건량 1g 당 isoflavone 함량 [μg/g]				
	Daidzin	Genistin	Daidzein	Genistein	Total isoflavone
PLE_01	48.3	65.3	96.8	80.0	**290.4**
PLE_02	45.7	91.2	79.4	59.8	**276.1**
PLE_03	17.8	28.6	34.3	26.1	**106.9**
PLE_04	34.7	60.8	67.0	50.2	**212.7**
PLE_05	23.2	37.9	45.0	34.6	**140.7**
PLE_06	79.8	148.8	132.2	109.6	**470.3**
PLE_07	23.3	39.1	44.5	34.2	**141.2**
PLE_08	8.1	14.1	10.1	4.8	**32.3**
PLE_09	31.5	49.6	58.3	42.2	**181.6**
PLE_10	28.7	36.8	37.4	11.9	**114.9**
PLE_11	4.0	4.8	5.7	3.6	**14.4**
PLE_12	14.5	23.3	28.3	20.8	**86.9**
PLE_13	33.0	50.3	68.6	55.4	**207.2**

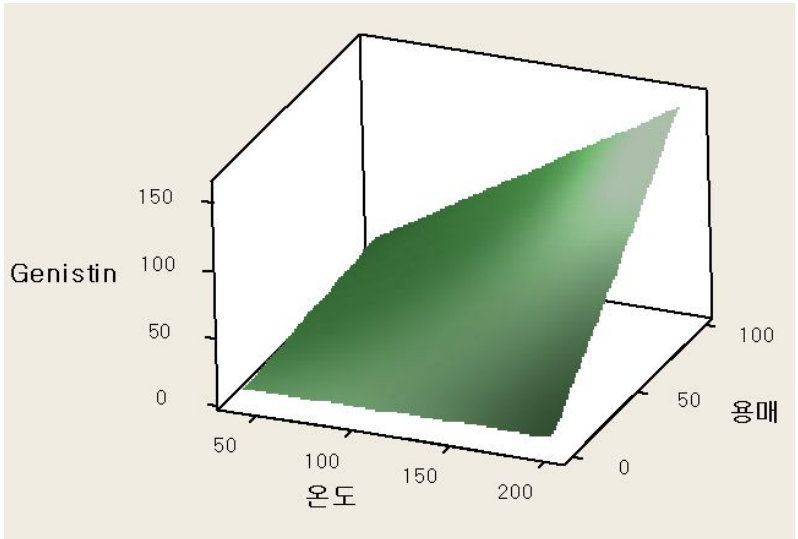
- Daidzin의 반응표면분석을 통한 표면도 및 최적화 예상치



Daidzin의 반응최적화 예상치

최적화 조건 (온도 = 200℃ / 용매(에탄올%) = 100%)에서의 Daidzin추출 기대 수율은 81.637μg/g로, 최적화 전조건 (온도 = 40℃ / 용매(에탄올%) = 0%)에서의 수율 0.852μg/g에 비해, 기대 수율이 80배가량 증가되었다. 또한 실험최저치 63도 15% 에탄올에서 4.0 μg/g에 비해서는 20배 이상 증가되었다

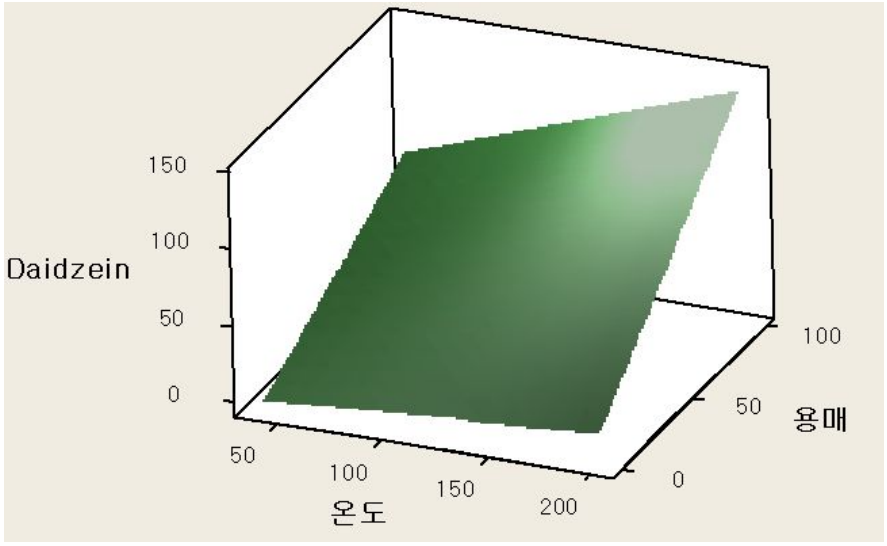
- Genistin의 반응표면분석을 통한 표면도 및 최적화 예상치



Genistin의 반응최적화 예상치

최적화 조건 (온도 = 200℃ / 용매(에탄올%) = 100%)에서의 Genistin 추출 기대 수율은 157.385μg/g 로, 최적화 전조건 (온도 = 40℃ / 용매(에탄올%) = 0%)에서의 수율 9.149μg/g 에 비해, 수율이 16배가량 증가되었다. 또한 실험최저치 63도 15% 에탄올에서 4.8 μg/g에 비해서는 32배 가량 증가되었다

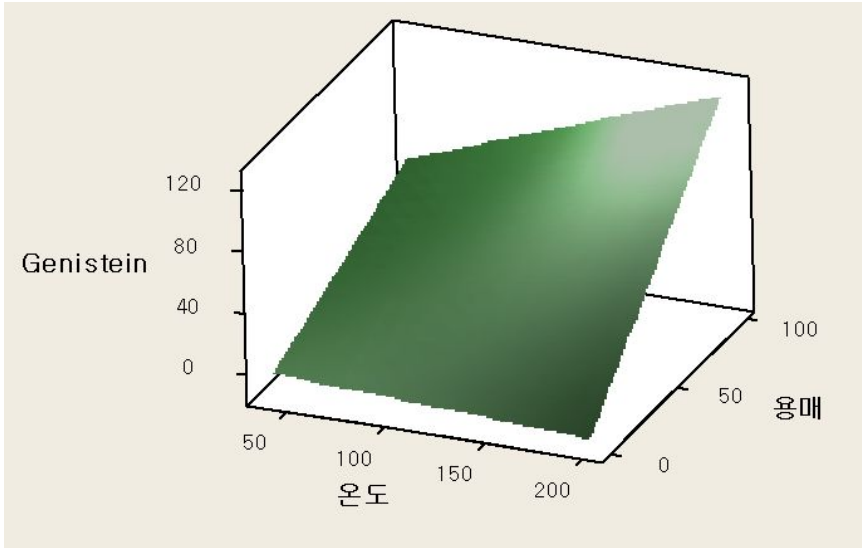
- Daidzein의 반응표면분석을 통한 표면도 및 최적화 예상치



Daidzein의 반응최적화 예상치

최적화 조건 (온도 = 200℃ / 용매(에탄올%) = 100%)에서의 Daidzein 추출 기대 수율은 141.991μg/g 로, 실험최저치 63도 15% 에탄올에서 5.7 μg/g에 비해 28배이상 증가되었다.

- Genistein의 반응표면분석을 통한 표면도 및 최적화 예상치



Genistein의 반응최적화 예상치

최적화 조건 (온도 = 200℃ / 용매(에탄올%) = 100%)에서의 Genistein 추출 기대 수율은 124.651μg/g 로, 최적화 전조건인, 실험최저치 63도 15% 에탄올에서 3.6 μg/g에 비해 34배가량 증가되었다.

제 2 절 청국장의 스포츠기능성 평가 (인체실험)

1. 연구내용

청국장으로부터 추출된 유효성분이 대학생의 유산소 능력 향상 및 근육형성에 미치는 영향을 규명하기 위해 본 연구를 진행하였다.

2. 연구대상

신체 건강한 20대 남자 대학생 총 33명을 연구대상으로 선정한 후, 세 집단(유효성분 처치군 : n=11, 위약군: n=11, 통제군: n=11)으로 이중 맹검에 의한 무작위 할당법을 적용하였다. 피험자들은 사전에 실험의 목적과 사용되는 추출물 등 전반적인 실험의 철차와 계획에 관한 설명을 충분히 듣고 실험동의서를 작성하였으며, 유효성분 처치군과 위약군은 매일(주 7회) 정해진 장소(실험실)에서 유효성분 캡슐과 크기, 모양, 향이 동일한 위약캡슐을 복용하였다.

표 11. Classification of Experimental Groups

Group	pre	post
Control	10	10
Placebo	10	10
Isoflavon	10	10

3. 실험방법

청국장 유효성분의 복용은 KIST(원료)와 파시코(캡슐화)에서 공급받았으며, 선행연구(김병로 등, 2006; 이경혜 등, 2006; 서효빈 등, 2008)에서 시도된 투여량인 하루 2회, 아침 저녁 4g의 청국장 유효성분 캡슐을, 대조군은 Dextrin으로 만든 위약캡슐을, 통제군은 아무 것도 섭취하지 않았다. 모든 집단은 4주간 매일 복용에 따른 변화를 관찰하는 반복측정 실험설계를 채택하였다.

가. 신체조성

신장은 자동 신장계(SH-9600A, Sewoo system, Korea)를 사용하였으며, 신체조성은 In-body 4.0(Biospace Co., Korea)을 이용하여 체중, 체지방량, BMI를 측정하였다.

나. 유산소 능력 측정방법 및 분석항목

모든 피험자는 사전에 유산소성 운동 능력을 측정하기위해 트레드밀(Quinton, USA) 위에서 KISS-M Protocol을 이용한 점증부하의 방법으로 주행속도를 더 이상 유지할 수 없을 때까지 지속하며(RPE, Value: 20 이상, 최고 심박수 항정상태 유지, RER Value: 1.05 이상, 산소섭취량 항정상태 유지), 대사적 자료는 가스분석기(COSMED, Italy)에 의해 측정하였다. KISS-M Protocol은 남자 운동선수를 대상으로 점증부하검사 방법을 실시하도록 한국체육과학연구원에서 개발한 것으로써, 경사도는 6%를 유지, 최초 80m/min의 속도로 시작하여 2분마다 20m/min씩 증가되는 운동 프로토콜이다. 운동부하 검사 장비를 이용하여 유산소능력 지표인 최대산소섭취량(VO2max:ml/kg/min), 젖산역치(LT), 운동지속시간(sec)을 측정하여 기록하였다. 4주간 유용성분 및 위약 처치 후 사전검사와 동일하게 유산소능력 측정하였다.

그림 21 운동부하검사

다. 혈액 측정

실험 전 혈액채취는 섭취 전 안정 시, 운동부하검사 종료 후, 회복 30분, 회복 60분에 실시하였으며, 4주간 유효성분 및 위약 처치 후 사전검사와 동일하게 혈액을 채취하였다. 채혈방법은 전완정맥(Antecubital vein)에서 각 시기마다 8cc의 혈액을 채혈하였고, 채혈된 혈액은 항 응고 처리가 된 Heparin-tube와 항 응고 처리가 안 된 Vacutainer tube에 넣어 원심분리기를 이용하여 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청은 분석 전까지 -70°C에 냉동 보관하였다.

라. 혈액 분석

채취된 혈액은 운동에너지원(glucose), 혈중 피로물질(Lactate, LDH, CK, Pi, Ammonia), 혈중 지질(lipid profiles : LDL-C, HDL-C, TC, TG), 염증 및 간손상 지표

(CRP, GOT, GPT) 분석을 위해 사용하였으며, G 의료재단에 의뢰하여 분석을 하였다. 또한 Glucose, Lactate, 항산화항목 중 SOD항목(Superoxide Dismutase Assay Kit, IBL, Hamburg, Germany)과 MDA항목(TBARS Assay Kit)은 ELISA Kit를 사용하여 K대학 스포츠의과학 연구소 실험실에서 분석을 진행하였다.

마. 근 비대 측정방법

모든 피험자는 사전에 근 횡단면적(muscle cross sectional arear) 측정을 위해 전산화 단층 촬영기(computer tomography; SCT-4800TE, Japan)를 이용해 촬영하였으며, 단면적의 측정부위는 피검자가 하의를 탈의하지 않은 자세에서 슬관절을 중심으로 90°로 굴곡 시 슬개골(patella)의 끝 부위에서 28㎝에 해당되는 대퇴위 중앙부부분의 측정부위를 개별적으로 정하고, 지정부위에 특징표시를 한 후 매 측정마다 같은 지점이 촬영될 수 있도록 유의하였다. CT상의 근 횡단면적의 직경측정은 대퇴사두근의 윗부분과 햄스트링근의 아랫부분을 수직으로 그어 산출하였다.

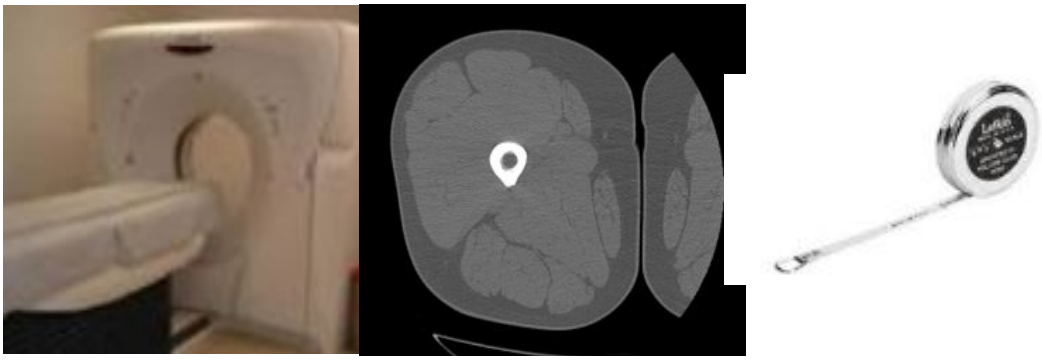


그림 22 CT를 이용한 근 비대 및 둘레 측정

바. 등속성 근력 측정방법

등속성 근력은 HUMAC사의 CSMi를 이용하여 측정하였으며, 피험자는 <그림 27>과 같이 앉은 자세에서 대퇴를 고정시키고 무릎관절을 다이나모메터(dynamometer) 회전축에 일치시켰다. 그리고 신전 및 굴곡 운동 시 외력의 힘이 작용하지 않도록 고정 띠를 이용하여 가슴, 대퇴, 복부 부위를 고정시킨 뒤 힘점인 레버 암(lever arm)은 발목관절의 외과 부위에서 2-3㎝정도 위인 지점에 묶어 신전 및 굴곡운동을 하도록 하고, 가동범위(ROM)는 신전 0°에서 굴곡 90°까지 움직이도록 하였다. 측정은 각속도 60°/sec에서 5회, 180°/sec에서 5회, 240°/sec에서 25회를 시작 신호와 함께 최대한 힘차게 굴곡과 신전운동을 하였다. 비교를 위해 분석 변인은 peak torque %body weight, total work done

%body weight, 그리고 extensor/flexor ratio를 수치화 하였다.

그림 23 CSMi를 이용한 하지 등속성 근력 검사

4. 자료처리 방법

이 연구를 위한 자료처리는 WINDOW용 SPSS/PC 18.0 통계 프로그램을 이용하여 기술 통계치(Mean, SD)를 산출하였다. 모든 집단 간 운동능력 및 혈중피로물질의 변화는 반복측정에 의한 변량분석(Repeated measured One-way ANOVA)을 실시하였으며, 유의한 차이가 나타날 경우 사후검증은 t-test를 실시하였다. 모든 통계적 유의 수준은 $p<.05$로 설정 하였다.

5. 연구결과

가. 청국장 유효성분 섭취에 따른 신체조성의 변화

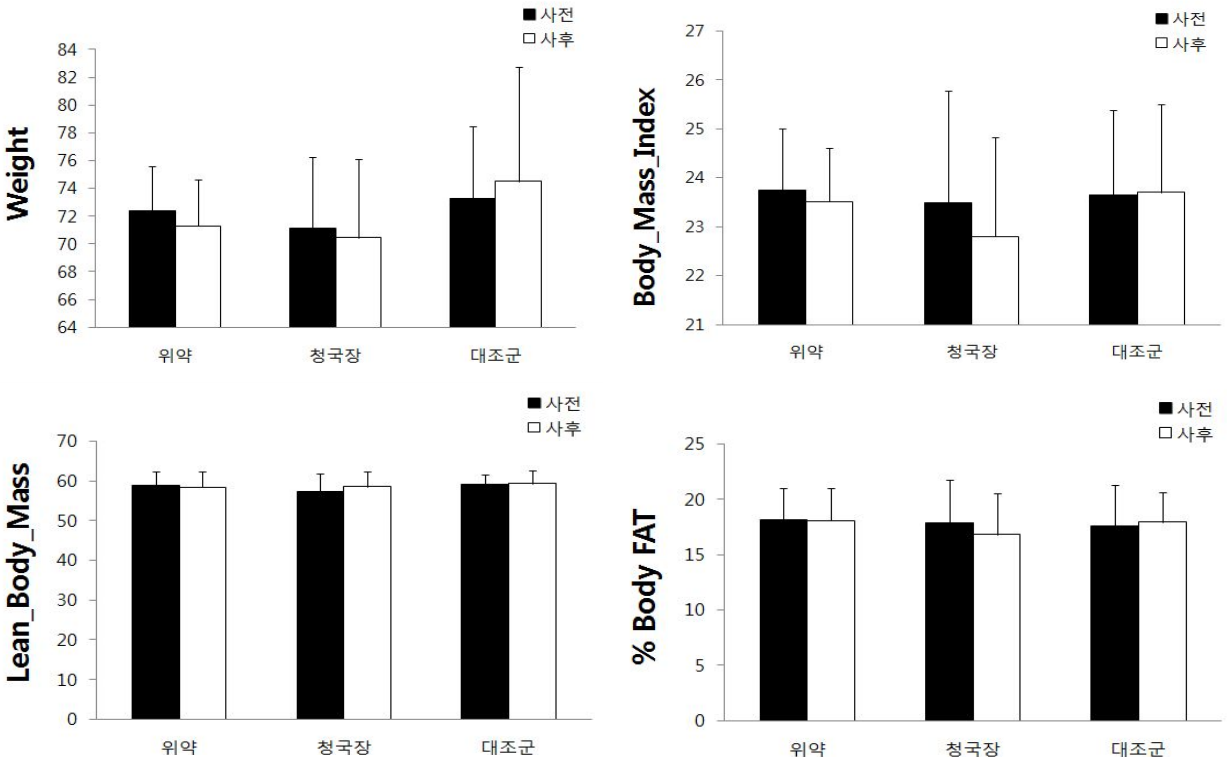
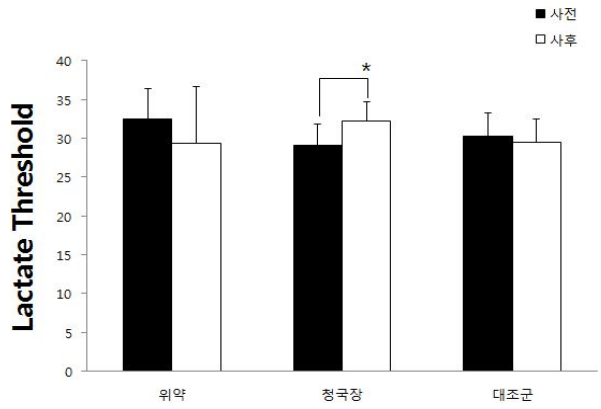


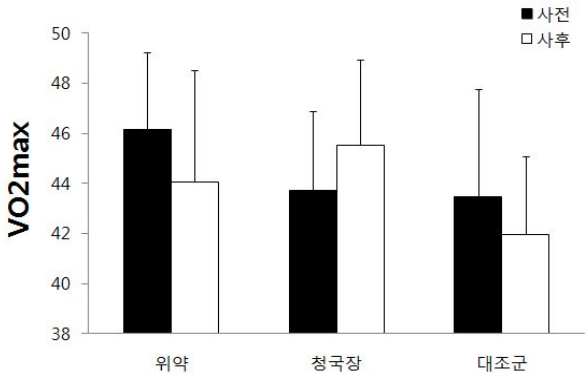
표 12. 신체조성의 변화

	위약(n=10)		청국장(n=10)		대조군(n=10)		Sig
	사전	사후	사전	사후	사전	사후	
체중	75.35±3.26	71.28±3.31	71.13±5.08	70.45±5.66	73.26±5.22	74.50±8.27	Time: .805 Time × Group : .350 Group : .486
체질량지수	23.75±1.25	23.51±1.08	23.48±2.27	22.80±2.02	23.63±1.73	23.70±1.80	Time: .543 Time × Group : .805 Group : .680
제지방량	58.98±3.46	58.37±3.94	57.32±4.54	58.60±3.69	59.20±2.47	59.40±3.20	Time: .373 Time × Group : .072 Group : .752
체지방율	18.15±2.88	18.10±2.92	17.90±3.84	16.83±3.68	17.88±3.36	17.95±2.74	Time: .487 Time × Group : .291 Group : .895

1. 체중의 변화를 분석한 결과 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다.
2. 체질량지수의 변화를 분석한 결과 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다.
3. 제지방량의 변화를 분석한 결과 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다.
4. 체지방률의 변화를 분석한 결과 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다.

나. 유산소 운동능력의 차이





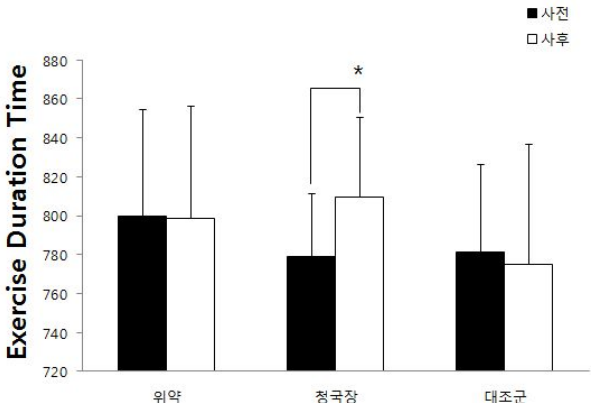


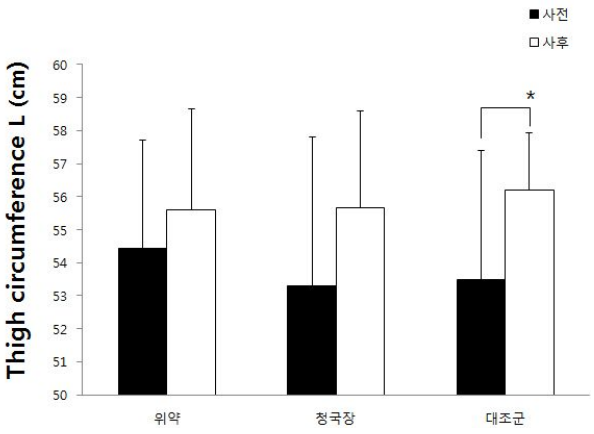
표 13. 유산소성 능력의 변화

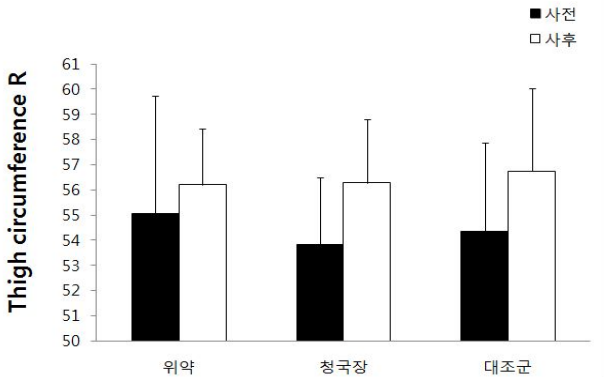
	위약(n=10)		청국장(n=10)		대조군(n=10)		Sig
	사전	사후	사전	사후	사전	사후	
젖산 역치 (ml/mg)	32.48 ± 3.87	29.40 ± 7.28	29.02 ± 2.86	32.22 ± 2.41	30.25 ± 2.97	29.48 ± 2.98	Time: .793 Time × Group : .019 Group : .824
최대산소섭취량 (mg/kg/min)	46.15 ± 3.06	44.06 ± 4.44	43.73 ± 3.13	45.52 ± 3.39	43.47 ± 4.30	41.98 ± 3.11	Time: .566 Time × Group : .277 Group : .177
운동 지속 시간 (sec)	800.00 ± 54.24	798.75 ± 57.18	778.75 ± 32.70	809.37 ± 41.26	781.25 ± 44.86	775.00 ± 61.64	Time: .231 Time × Group : .050 Group : .651

(*p<.05)

1. 젖산역치의 변화를 분석한 결과 실험전후 × 집단에서 유의한 차이가 나타났다(P<.019). 사후검증 결과 청국장 그룹이 실험 전·후 유의하게 높은 것으로 나타났다(P<.046).
2. 최대산소섭취량의 변화를 분석한 결과 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다
3. 운동지속시간의 변화를 분석한 결과 실험전후 × 집단에서 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다(P<.050). 사후검증 결과 청국장 그룹이 실험 전·후 유의하게 높은 것으로 나타났다(P<.038).

다. 근육형성의 차이





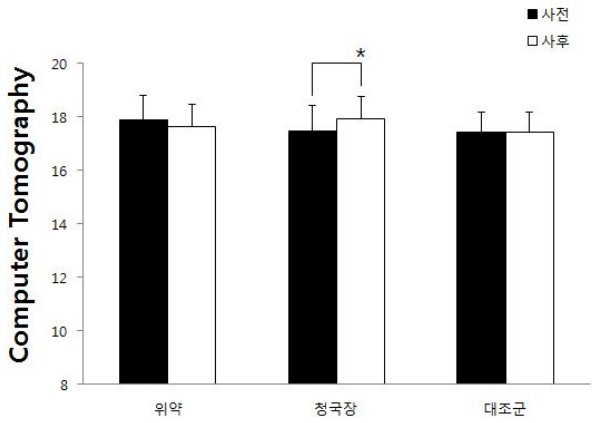


표 14. 집단별 근비대 차이

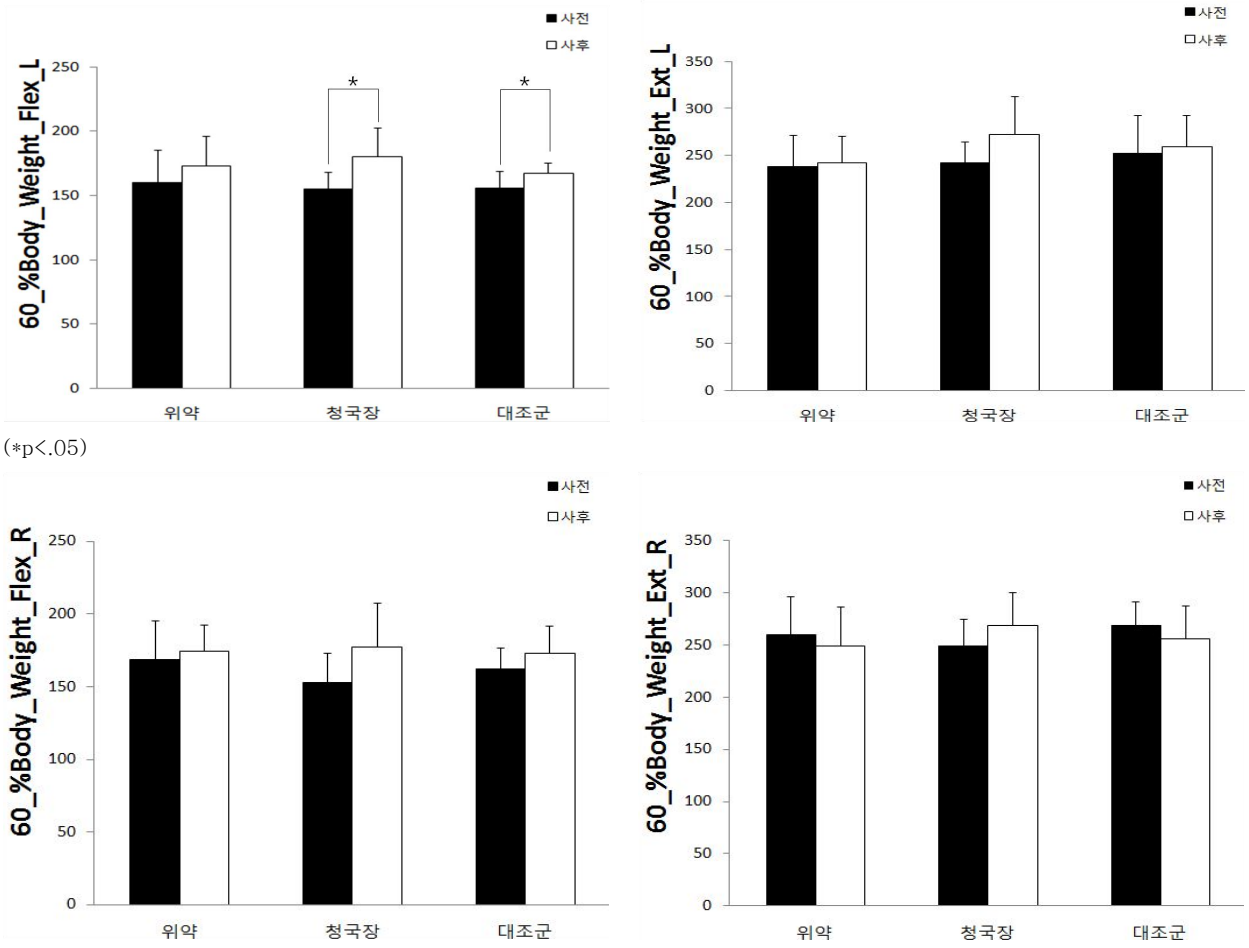
	위약(n=10)		청국장(n=10)		대조군(n=10)		Sig
	사전	사후	사전	사후	사전	사후	
좌측 대퇴둘레(cm)	54.42 ± 3.29	55.60 ± 3.05*	53.31 ± 4.49	55.67 ± 2.91	53.48 ± 3.90	56.18 ± 1.73	Time: .003 Time × Group : .586 Group : .939
우측 대퇴둘레(cm)	55.06 ± 4.68	56.21 ± 2.20	53.82 ± 2.66	56.28 ± 2.52	54.35 ± 3.50	56.75 ± 3.28	Time: .022 Time × Group : .760 Group : .888
CT 대퇴 직경(cm)	17.87 ± .89	17.60 ± .82	17.44 ± .97	17.91 ± .81*	17.41 ± .73	17.38 ± .77	Time: .773 Time × Group : .291 Group : .596

* ; p< .05. 사전 vs 사후

1. 좌측 대퇴 둘레의 변화를 분석한 결과 실험전후에 유의한 차이가 나타났다(P=.003). 사후검증결과 대조군 그룹에서 실험 전에 비해 실험 후에 2.70cm 증가한 것으로 나타났다(P=.020).
2. 우측 대퇴 둘레의 변화를 분석한 결과 실험전후에 유의한 차이가 나타났으나(P=.022), 사후검증결과 유의한 차이가 나타나지 않았다.
3. CT 대퇴 직경의 변화를 분석한 결과 실험 전·후에 유의한 차이가 나타나지 않았으나, 사후검증결과 청국장 그룹에서 실험 전에 비해 실험 후에 .47cm 증가한 것으로 나타났다(P=.011).

라. 등속성 근력의 차이

a. 각속도 60° 근파워의 차이



(*p<.05)

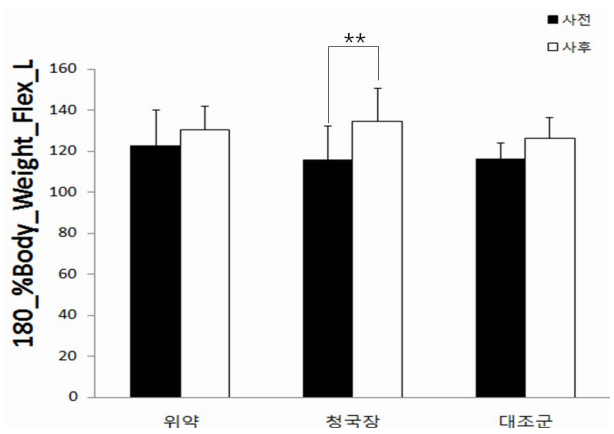
표 15. 집단별 등속성 운동 관련 변인 변화량

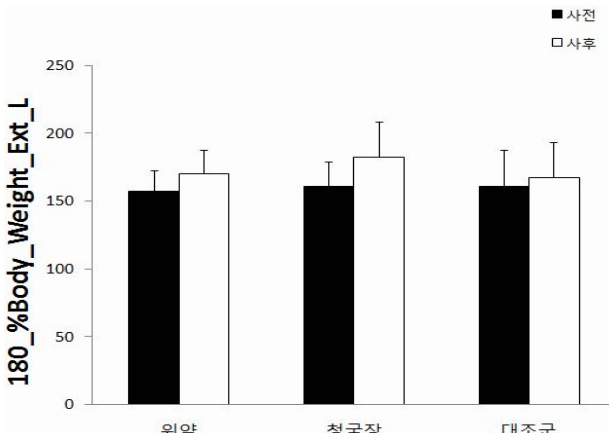
	위약(n=10)		청국장(n=10)		대조군(n=10)		Sig
	사전	사후	사전	사후	사전	사후	
60_% Body _Weight_Flex_L	159.87 ±25.45	173.00 ±22.79	155.00 ±13.12	180.12 ±22.50	155.75 ±12.80	167.37 ±7.42	Time: .004 Time × Group : .514 Group : .650
60_%Body _Weight_Ext_L	237.75 ±33.22	242.12 ±28.59	242.25 ±21.52	272.37 ±39.79	252.12 ±40.18	259.00 ±32.94	Time: .144 Time × Group : .457 Group : .324
60_%Body _Weight_Flex_R	168.87 ±26.49	174.12 ±17.85	153.12 ±20.02	177.37 ±30.00	162.12 ±14.69	173.00 ±18.83	Time: .034 Time × Group : .419 Group : .749
60_%Body _Weight_Ext_R	259.50 ±36.58	248.87 ±37.35	249.12 ±24.95	268.25 ±31.90	268.75 ±22.08	256.12 ±31.42	Time: .876 Time × Group : .270 Group : .772

(*p<.05)

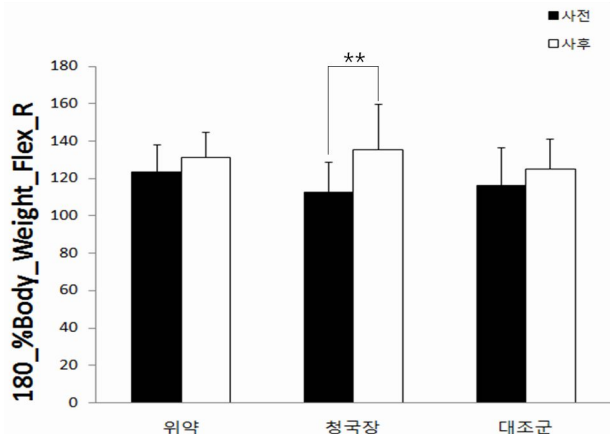
1. 60_%Body_Weight_Flex_L 측정결과 실험 전·후에 유의한 차이가 나타났으며(p=.004), 사후검증결과 청국장군(p=.012)과 대조군(p=.030)에서 유의한 차이가 나타났다.
2. 60_%Body_Weight_Ext_L 측정결과 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다.
3. 60_%Body_Weight_Flex_R 측정결과 실험 전·후에 유의한 차이가 나타났으나(p=.034), 사후검증결과 유의한 차이가 나타나지 않았다.
4. 60_%Body_Weight_Ext_R 측정결과 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다.

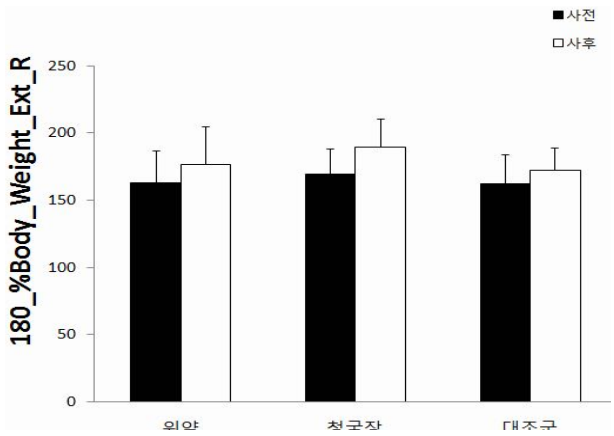
b. 각속도 180° 근력의 차이





(**p<.01)





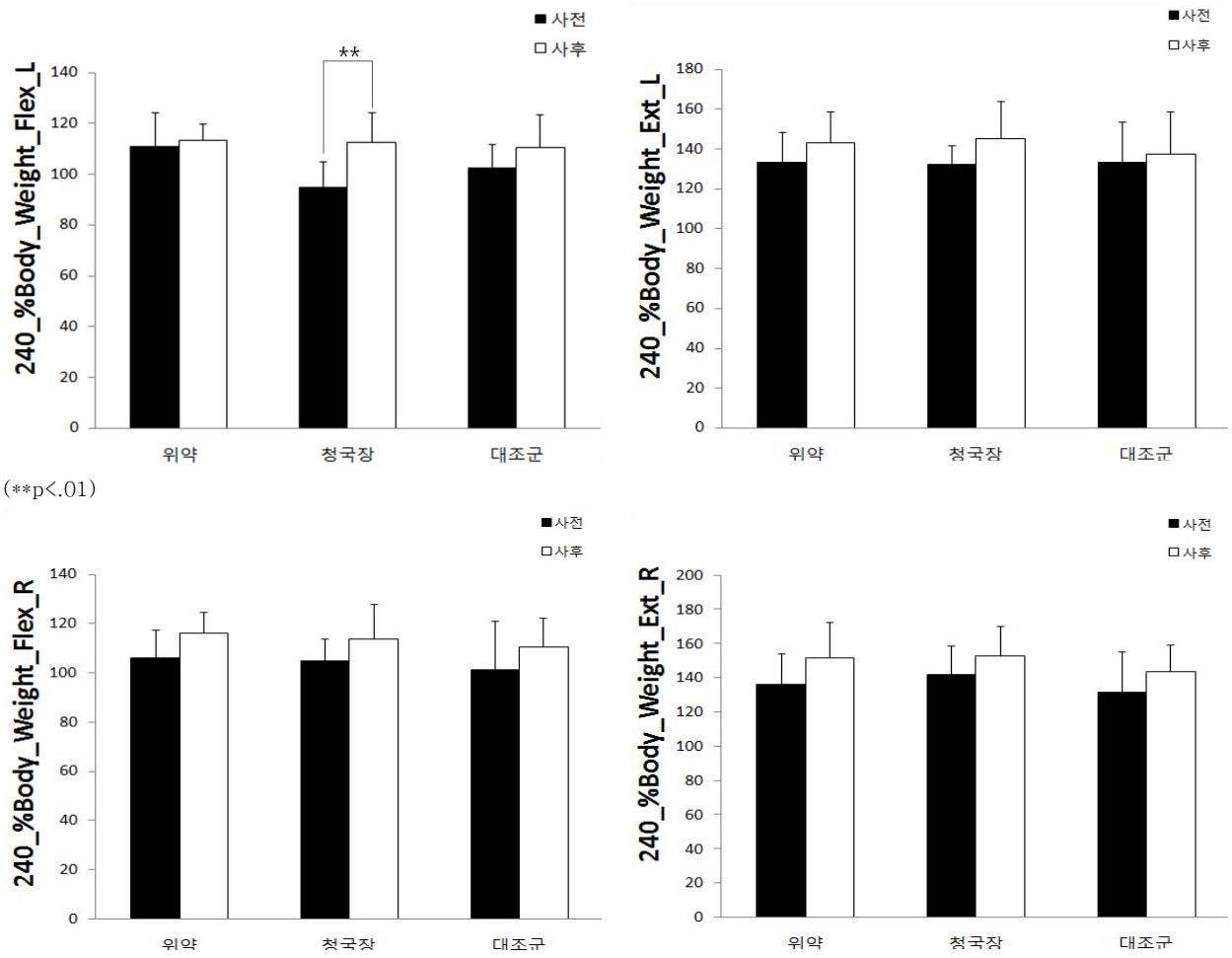
(**p<.01)

표 16. 집단별 등속성 운동 관련 변인 변화량 (단위 : NM)

	위약(n=10)		청국장(n=10)		대조군(n=10)		Sig
	사전	사후	사전	사후	사전	사후	
180_%Body	122.75	130.62	115.62	134.75	116.00	126.12	Time: .002
_Weight_Flex_L	±17.54	±11.50	±16.77	±15.69	±8.17	±10.50	Time × Group : .419
							Group : .557
180_%Body	157.25	170.37	161.00	182.37	160.62	167.37	Time: .035
_Weight_Ext_L	±14.93	±16.85	±17.71	±25.52	±26.66	±25.67	Time × Group : .624
							Group : .535
180_%Body	123.50	131.37	112.62	135.12	116.00	125.00	Time: .006
_Weight_Flex_R	±14.52	±13.36	±16.15	±24.52	±20.53	±16.03	Time × Group : .328
							Group : .637
180_%Body	162.87	176.37	169.62	189.12	162.50	171.87	Time: .030
_Weight_Ext_R	±23.39	±27.79	±18.38	±21.45	±20.96	±16.96	Time × Group : .794
							Group : .289

1. 180_%Body_Weight_Flex_L 측정결과 실험 전·후에 유의한 차이가 나타났으며(p=.002), 사후검증결과 청국장 군에서 유의한 차이가 나타났다(p=.001)
2. 180_%Body_Weight_Ext_L 측정결과 실험 전·후에 유의한 차이가 나타났으나(p=.035). 사후검증결과 유의한 차이가 나타나지 않았다.
3. 180_%Body_Weight_Flex_R 측정결과 실험 전·후에 유의한 차이가 나타났으며(p=.006), 사후검증결과 청국장 군에서 유의한 차이가 나타났다(p=.005).
4. 180_%Body_Weight_Ext_R 측정결과 실험 전·후에 유의한 차이가 나타났으나(p=.030). 사후검증결과 유의한 차이가 나타나지 않았다.

c. 각속도 240° 근지구력의 차이



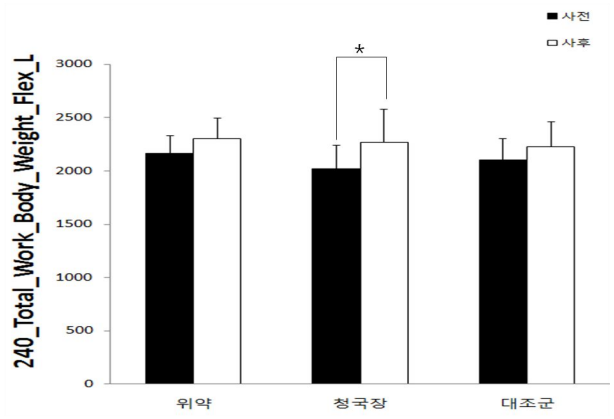
(**p<.01)

표 17. 집단별 등속성 운동 관련 변인 변화량

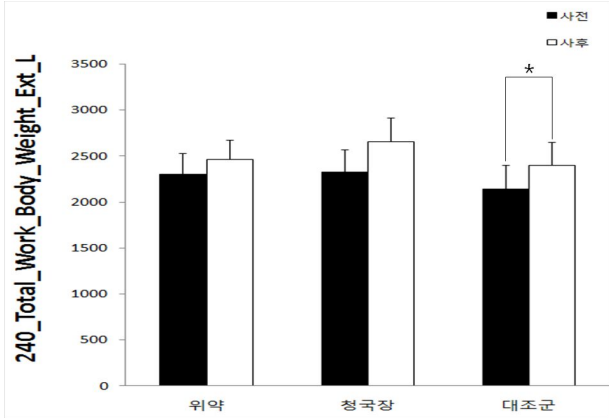
	위약(n=10)		청국장(n=10)		대조군(n=10)		Sig
	사전	사후	사전	사후	사전	사후	
240_%Body	110.75	113.37	95.00	112.62	102.50	110.37	Time: .001
_Weight_Flex_L	±13.39	±6.30	±9.88	±11.72	±9.21	±12.97	Time × Group : .072
							Group : .191
240_%Body	133.25	143.00	132.50	145.25	133.25	137.37	Time: .082
_Weight_Ext_L	±15.19	±15.54	±9.21	±18.61	±20.33	±21.30	Time × Group : .765
							Group : .834
240_%Body	106.25	116.00	104.75	113.75	101.37	110.37	Time: .017
_Weight_Flex_R	±11.19	±8.48	±8.89	±14.23	±19.60	±11.72	Time × Group : .995
							Group : .542
240_%Body	135.87	151.62	141.87	152.75	131.75	143.75	Time: .047
_Weight_Ext_R	±17.85	±20.56	±16.73	±17.17	±23.38	±15.44	Time × Group : .944
							Group : .251

1. 240_%Body_Weight_Flex_L 측정 결과 실험 전·후에 유의한 차이가 나타났으며(p=.001), 사후검증결과 청국장군에서 유의한 차이가 나타났다(p=.001).
2. 240_%Body_Weight_Ext_L 측정 결과 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다.
3. 240_%Body_Weight_Flex_R 측정 결과 실험 전·후에 유의한 차이가 나타났다(p=.017). 사후검증결과 유의한 차이가 나타나지 않았다.
4. 240_%Body_Weight_Ext_R 측정 결과 실험 전·후에 유의한 차이가 나타났다(p=.047). 사후검증결과 유의한 차이가 나타나지 않았다.

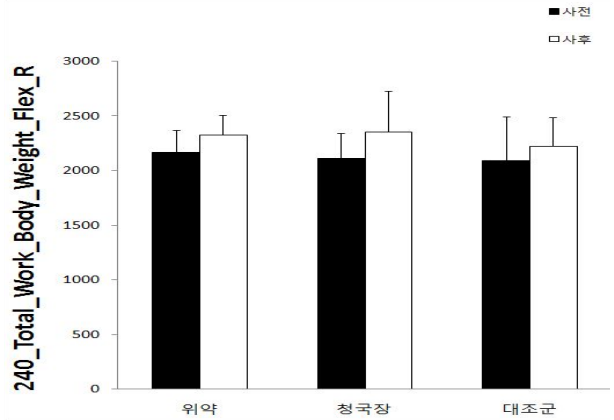
d. 각속도 240° Total Work의 차이

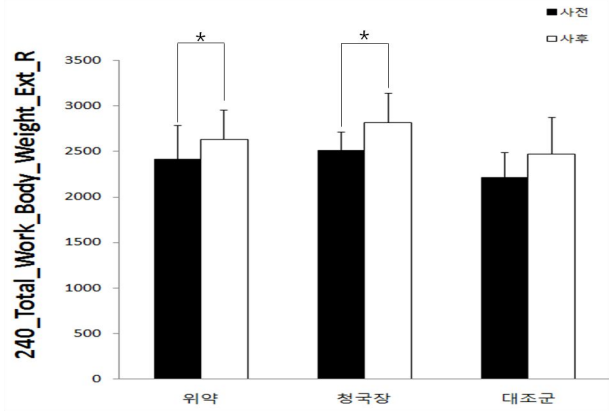


(*p<.05)



(*p<.05)





(*p<.05)

표 18. 집단별 등속성 운동 관련 변인 변화량 (단위 : NM)

	위약(n=10)		청국장(n=10)		대조군(n=10)		Sig
	사전	사후	사전	사후	사전	사후	
240_Total_Work_BW_Flex_L	2165.00 ±16.59	2303.50 ±192.84	2019.50 ±219.88	2269.87 ±312.45	2100.37 ±203.97	2231.12 ±228.66	Time: .007 Time × Group : .648 Group : .574
240_Total_Work_BW_Ext_L	2302.62 ±225.24	2462.50 ±207.06	2325.12 ±240.82	2658.00 ±257.68	2143.75 ±252.69	2397.87 ±252.67	Time: .002 Time × Group : .601 Group : .054
240_Total_Work_BW_Flex_R	2163.50 ±203.94	2324.12 ±176.96	2113.37 ±224.85	2354.75 ±371.42	2088.62 ±400.69	2217.75 ±264.02	Time: .039 Time × Group : .842 Group : .639
240_Total_Work_BW_Ext_R	2412.50 ±374.65	2631.87 ±318.85	2507.12 ±204.90	2815.25 ±318.74	2211.00 ±275.63	2473.75 ±395.65	Time: .001 Time × Group : .888 Group : .090

(*p<.05)

1. 240_Total_Work_Body_Weight_Flex_L 측정결과 실험 전·후에 유의한 차이가 나타났으며(p=.007), 사후검증결과 청국장 군에서 유의한 차이가 나타났다(p=.034).
2. 240_Total_Work_Body_Weight_Ext_L 측정결과 실험 전·후에 유의한 차이가 나타났으며(p=.002), 사후검증결과 대조군에서 유의한 차이가 나타났다(p=.034).
3. 240_Total_Work_Body_Weight_Flex_R 측정결과 실험 전·후에 유의한 차이가 나타났다(p=.039). 사후검증결과 유의한 차이가 나타나지 않았다.
4. 240_Total_Work_Body_Weight_Ext_R 측정결과 실험 전·후에 유의한 차이가 나타났으며(p=.001), 사후검증결과 위약군(p=.027)과 청국장군(p=.048)에서 유의한 차이가 나타났다.

마. 운동 에너지원의 차이(Glucose)

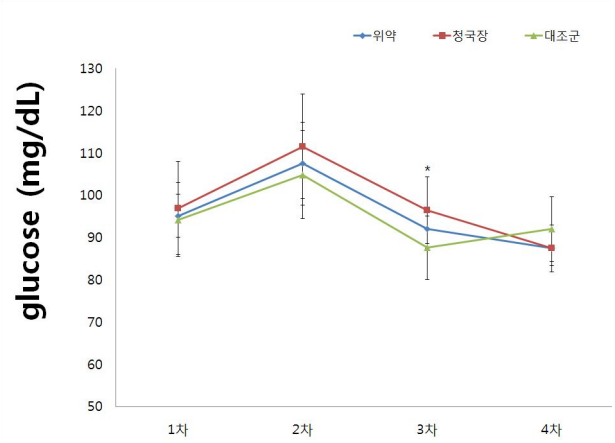


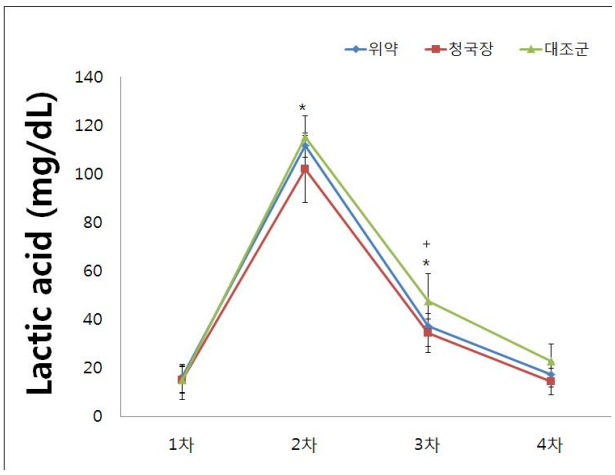
표 19. 집단별 운동에너지원의 차이

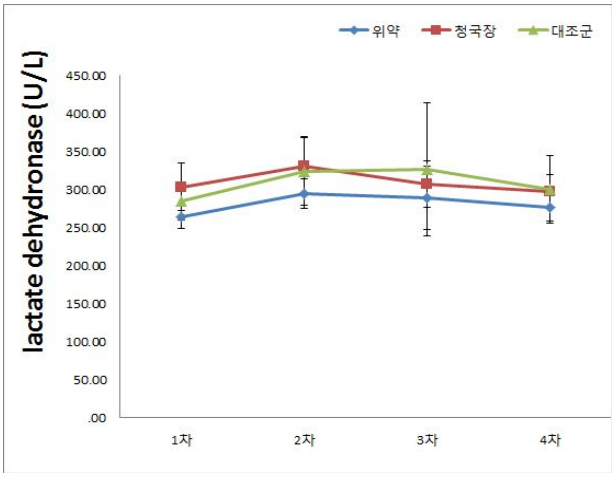
(단위 : mg/dl)

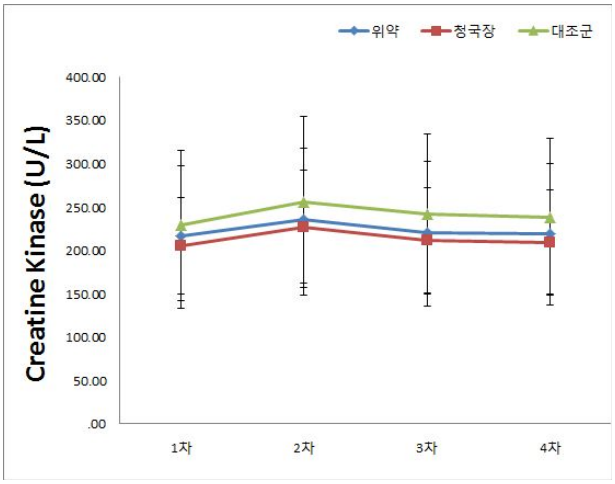
	안정시	운동종료	종료-30	종료-60	Sig
위약 (n=10)	95.13±5.08	107.50±9.87	92.13±4.64*	87.50±5.55	Time: .000
청국장 (n=10)	96.96±11.05	111.58±12.44	96.50±7.88	87.54±4.16	Time × Group : .403
대조군 (n=10)	94.25±8.75	104.88±10.44	87.63±7.50	92.00±7.65	Group : .265

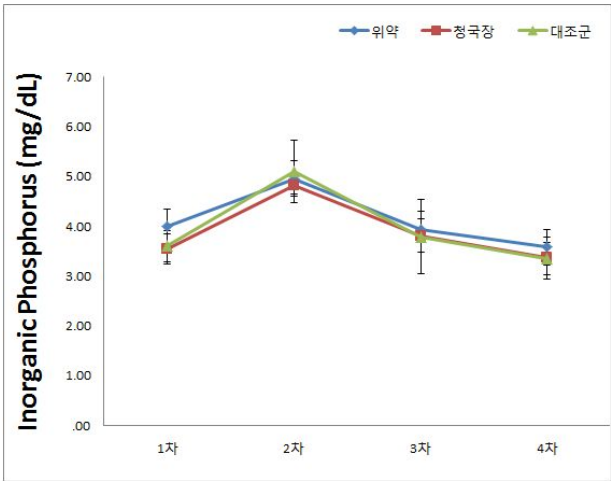
1. 4주간 청국장 유효성분 투여에 따른 Glucose 농도의 차이를 분석한 결과 측정시기에서 유의한 차이가 나타났으며(p=.001), 청국장 집단이 대조군에 종료-30분에서 8.87mg.dl 유의하게 높은 것으로 나타났다(p=.017)

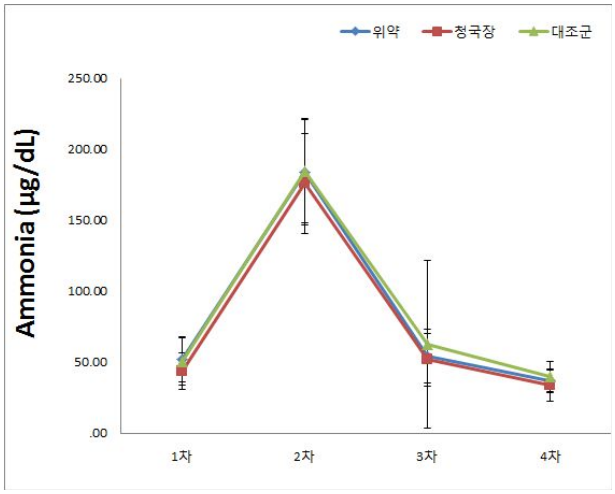
바. 혈중 피로물질의 차이(Lactate, LDH, CK, Pi, Ammonia)











1. 혈중 Lactate 농도 측정 결과 측정시기에 유의한 차이가 나타났으며(p<.001), 집단 간 유의한 차이가 나타났다(p=.001). 사후검증결과 운동종료에서 청국장 집단이 대조군에비해 13.32mg/dl 유의하게 낮은 것으로 나타났으며(p=.025), 종료-30분 에서 청국장 집단이 대조군에비해 13.08mg/dl, 위약이 대조군에 비해 10.13mg/dl 유의하게 낮은 것으로 나타났다(p=.014, p=.049).

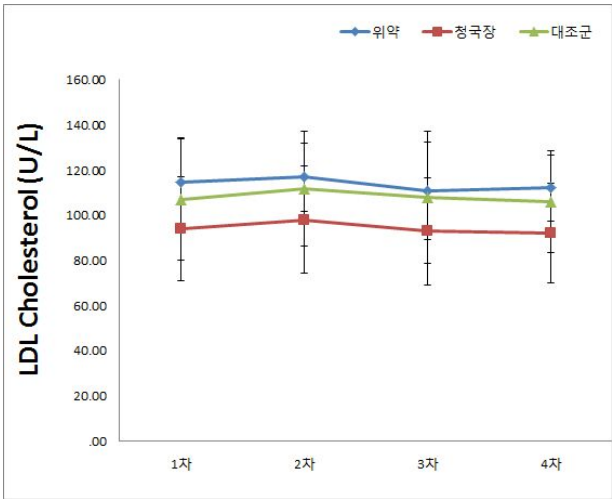
2. 혈중 LDH 농도 측정 결과 측정시기 간 유의한 차이가 나타났으나(p=.004), 집단 간 유의한 차이는 나타나지 않았다.

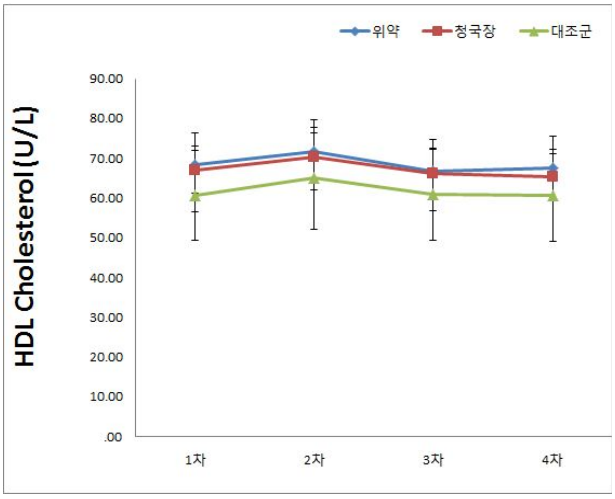
3. 혈중 CK 농도 측정 결과 측정시기 간 유의한 차이가 나타났으나(p<.001), 집단 간 유의한 차이는 나타나지 않았다.
4. 혈중 IP 농도 측정 결과 측정시기 간 유의한 차이가 나타났으나(p<.001), 집단 간 유의한 차이는 나타나지 않았다.
5. 혈중 Ammonia 농도 측정 결과 측정시기 간 유의한 차이가 나타났으나(p<.001), 집단 간 유의한 차이는 나타나지 않았다.

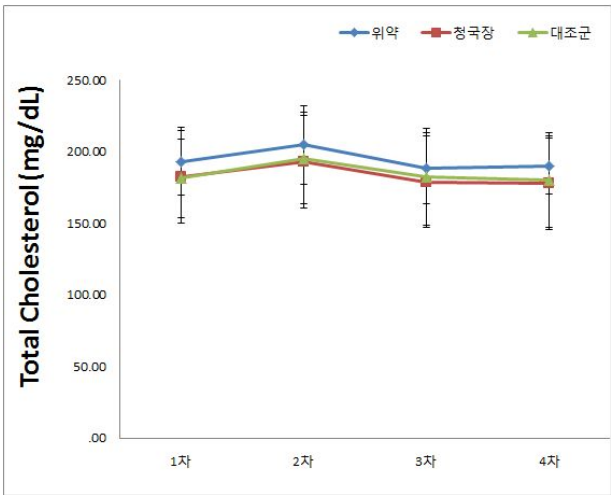
표 20. 혈중 피로물질의 차이(Lactate, LDH, CK, Pi, Ammonia)

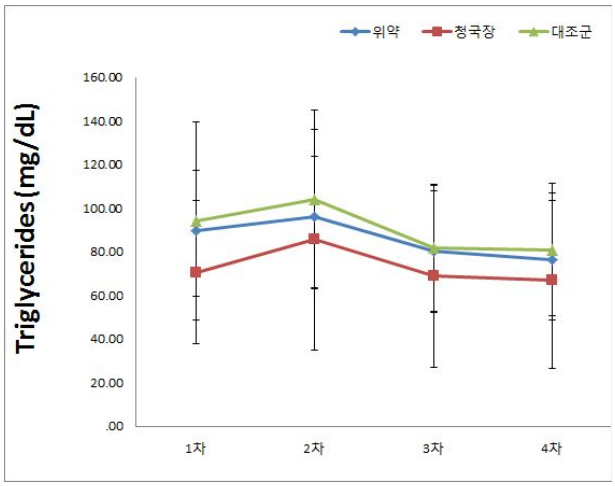
Lactate (단위: mg/dl)	안정시	운동종료	종료-30	종료-60	Sig
위약 (n=10)	16.25±9.39	11.80±10.05*	47.58±11.14*	17.28±5.11	Time : .000
청국장 (n=10)	15.13±5.70	102.11±13.80	34.49±5.54+	14.44±5.59	Time × Group : .,291
대조군 (n=10)	15.20±5.27	115.43±8.53	47.58±11.32	22.76±7.04	Group : ..001
LDH (단위: U/L)	안정시	운동종료	종료-30	종료-60	Sig
위약 (n=10)	263.50±14.13	295.00±19.38	288.88±41.80	276.13±17.25	Time : .004
청국장 (n=10)	303.44±31.43	331.47±38.42	307.35±30.44	297.70±21.50	Time × Group : .788
대조군 (n=10)	285.00±24.41	324.00±44.00	326.63±87.38	300.63±44.79	Group : .078
CK (단위: U/L)	안정시	운동종료	종료-30	종료-60	Sig
위약 (n=10)	216.13±83.51	235.25±87.20	220.00±84.46	218.50±81.71	Time : .000
청국장 (n=10)	204.77±55.75	227.11±65.55	211.34±60.39	209.10±59.81	Time × Group : .672
대조군 (n=10)	228.75±86.45	255.63±98.08	241.38±92.36	238.38±89.96	Group : .778
IP (단위:)	안정시	운동종료	종료-30	종료-60	Sig
위약 (n=10)	3.99±.46	4.95±.31	3.94±.26	3.58±.36	Time : .000
청국장 (n=10)	3.54±.30	4.81±.21	3.81±.33	3.36±.42	Time × Group : .367
대조군 (n=10)	3.60±.31	5.10±.63	3.79±.75	3.35±.33	Group : .313
Ammonia (단위: μg/dL)	안정시	운동종료	종료-30	종료-60	Sig
위약 (n=10)	51.88 ±15.47	183.63 ±37.06	54.13 ±18.87	36.88 ±7.90	Time : .000
청국장 (n=10)	43.96 ±12.88	175.91 ±35.32	51.86 ±18.62	33.97 ±11.28	Time × Group : .999
대조군 (n=10)	50.75 ±16.91	184.88 ±37.08	62.75 ±59.22	39.50 ±10.92	Group : .458

사. 혈중 지질의 차이(LDL-C, HDL-C, TC, TG)







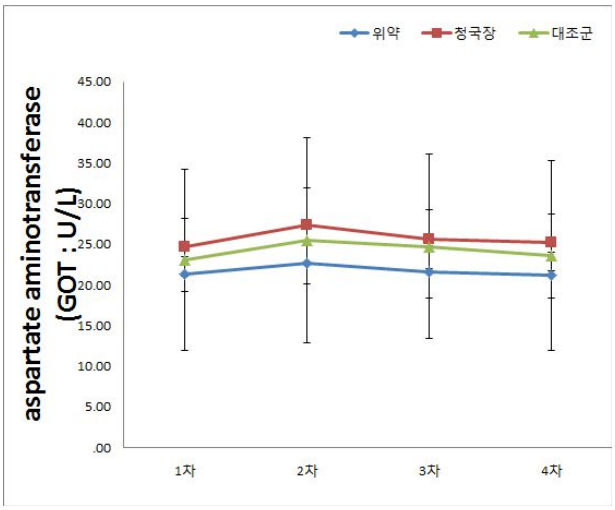


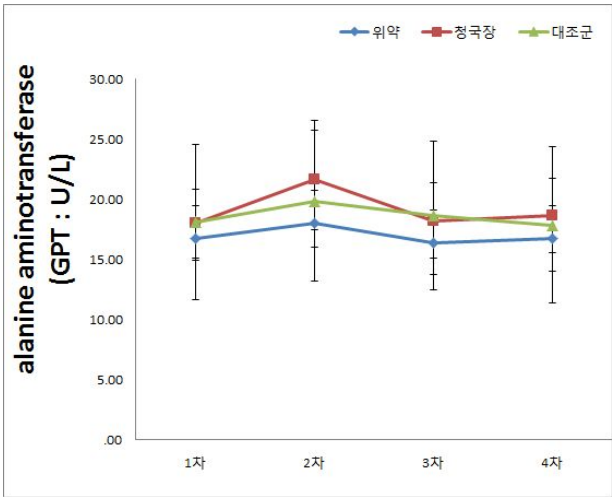
1. 혈중 LDL-C 농도 측정 결과 측정시기 및 집단 간 유의한 차이가 나타나지 않았다
2. 혈중 HDL-C 농도 측정 결과 측정시기 및 집단 간 유의한 차이가 나타나지 않았다
3. 혈중 TC 농도 측정 결과 측정시기 간 유의한 차이가 나타났지만(p=.017), 집단 간 유의한 차이는 나타나지 않았다.
4. 혈중 TG 농도 측정 결과 측정시기 간 유의한 차이가 나타났지만(p=.001), 집단 간 유의한 차이는 나타나지 않았다.

표 21. 혈중 지질의 차이(LDL-C, HDL-C, TC, TG)

LDL-C (단위:U/L)	안정시	운동종료	종료-30	종료-60	Sig
위약 (n=10)	114.50±19.78	116.75±14.97	110.63±21.47	112.00±14.62	Time: .732
청국장 (n=10)	93.86±23.17	97.85±23.71	92.76±23.71	91.87±22.11	Time × Group : .998
대조군 (n=10)	106.88±26.80	111.50±25.46	107.75±29.32	105.75±22.56	Group : .066
HDL-C (단위:U/L)	안정시	운동종료	종료-30	종료-60	Sig
위약 (n=10)	68.50±11.83	71.75±9.57	66.88±10.18	67.63±7.98	Time: .082
청국장 (n=10)	67.13±5.98	70.27±6.25	66.08±6.52	65.26±5.92	Time × Group : .995
대조군 (n=10)	60.75±11.37	65.00±12.73	60.88±11.44	60.75±11.57	Group : .192
TC (단위: mg/dl)	안정시	운동종료	종료-30	종료-60	Sig
위약 (n=10)	193.25±23.95	204.63±27.71	188.38±24.51	189.63±19.49	Time: .017
청국장 (n=10)	182.63±32.30	193.00±32.54	178.99±31.65	178.11±32.53	Time × Group : .997
대조군 (n=10)	181.63±27.44	195.50±32.01	182.50±33.90	180.13±33.26	Group : .660
TG (단위: mg/dl)	안정시	운동종료	종료-30	종료-60	Sig
위약 (n=10)	90.00±30.14	96.25±32.50	80.50±28.22	76.25±27.62	Time: .001
청국장 (n=10)	70.79±33.04	85.67±50.80	68.88±41.78	66.93±40.41	Time × Group : .976
대조군 (n=10)	94.25±45.39	104.25±40.92	81.75±29.21	81.13±30.51	Group : .564

아. 염증 및 간 손상지표의 차이(GOT, GPT)



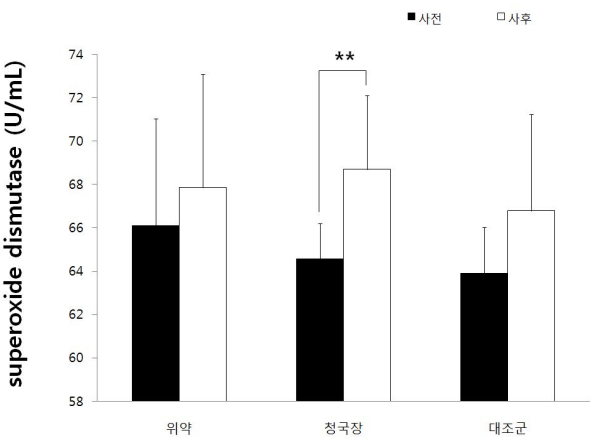


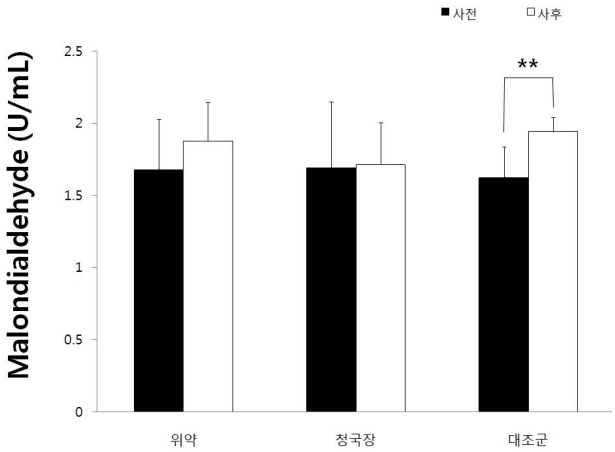
1. 혈중 GOT 농도 측정 결과 측정시기 및 집단 간 유의한 차이가 나타나지 않았다
2. 혈중 GPT 농도 측정 결과 측정시기에 유의한 차이가 나타났지만(p=.031), 집단 간 유의한 차이는 나타나지 않았다.

표 22 염증 및 간 손상지표의 차이(GOT, GPT)

GOT (단위:U/L)	안정시	운동종료	종료-30	종료-60	Sig
위약 (n=10)	21.38±2.13	22.63±2.50	21.63±3.20	21.25±2.82	Time: .475 Time × Group : .957 Group : .399
청국장 (n=10)	24.64±3.55	27.38±4.54	25.68±3.61	25.25±3.53	
대조군 (n=10)	23.13±11.14	25.50±12.62	24.75±11.32	23.63±11.70	
GPT (단위:U/L)	안정시	운동종료	종료-30	종료-60	Sig
위약 (n=10)	18.13±1.83	18.00±2.00	16.38±2.67	16.75±2.71	Time: .031 Time × Group : .909 Group : .471
청국장 (n=10)	17.98±2.86	21.61±4.13	18.23±3.18	18.65±3.09	
대조군 (n=10)	18.13±6.47	19.88±6.66	18.63±6.19	17.88±6.49	

자. 항산화 항목의 차이(SOD, MDA)





1. 혈중 SOD 농도 측정 결과 측정시기 간 유의한 차이가 나타났으며(p=.012), 사후검증결과 청국장 집단에서 측정시기 간 4.13 U/mL 유의하게 증가하였다(p=.006).

2. 혈중 MDA 농도 측정 결과 측정시기 간 유의한 차이가 나타났으며(p=.049), 사후검증결과 대조군에서 측정시기 간 ,31 U/mL 유의하게 증가하였다(p=.006).

표 23. 집단별 항산화 항목의 변화 (단위 : U/mL)

	위약(n=10)		청국장(n=10)		대조군(n=10)		Sig
	사전	사후	사전	사후	사전	사후	
SOD	66.11 ±4.93	67.87 ±5.24	64.56 ±1.66	68.70 ±3.41	63.90 ±2.13	66.78 ±4.46	Time: .012 Time × Group : .664 Group : .499
MDA	1.68 ±.35	1.88 ±.27	1.69 ±.46	1.72 ±.29	1.62 ±.22	1.94 ±.10	Time: .049 Time × Group : .402 Group : .705

■ 콩의 스포츠 기능성 관련 선행 연구 자료

Bruce, Kusumi & Hosmer(1973) Maximal oxygen intake and nomographic assessment of functional aerobic impairment in cardiovascular disease. Am Heart J. 1973 Apr;85(4):546-62.

Boivin S, Cusack S, Ruigrok RW, Hart DJ(2010) Influenza A virus polymerase: structural insights into replication and host adaptation mechanisms. J Biol Chem.285(37):28411-7.

Brown EC, DiSilvestro RA, Babaknia A, Devor ST(2004). Soy versus whey protein bars: effects on exercise training impact on lean body mass and antioxidant status. Nutr J. 2004 Dec 8;3:22.

Denysschen CA, Burton HW, Horvath PJ, Leddy JJ, Browne RW(2009) Resistance training with soy vs whey protein supplements in hyperlipidemic males. J Int Soc Sports Nutr. 11; 6~8.

Haub MD, Wells AM, Tarnopolsky MA, Campbell WW(2002) Effect of protein source on resistive-training-induced changes in body composition and muscle size in older men. Am J Clin Nutr. 2002 Sep;76(3):511-7.

Hawrylewicz, C. J., J. J. Zapata, and W. H. Blair.(1995) Soy and exterimental cancer: Animal studies. J. Nutr., 125, 698-708.

Klein, B. P., Perry, A. K. & Adair. N.(1995) Incorporating soy proteins into barked products for use in clinical studies. J. Nutr., 125, 666-674.

Kinson SB, Tarnopolsky MA, Macdonald MJ, Macdonald JR, Armstrong D, Phillips SM(2007) Consumption of fluid skim milk promotes greater muscle protein accretion after resistance exercise than does consumption of an isonitrogenous and isoenergetic soy-protein beverage. Am J Clin Nutr. 85(4):1031-40.

Lee Jeong-Sook.(2006). Effect of soy protein and genistein on blood glucose, antioxidant enzyme activites, and lipid profile in streptozotocin-induces diabetic rats. Life Sciences.

Phillips SM, Hartman JW, Wilkinson SB(2005) Dietary protein to support anabolism with resistance exercise in young men. J Am Coll Nutr. 24(2):134S-139S.

권선화, 이규복, 임근숙, 김수옥, 박건영(2006). 전통장류의 체중감소 및 지질저하 효과. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr, 35(9). 1194-1199.

김병로, 구광수, 임인수(2005). 유산소 운동과 청국장 보충투여가 고혈압 환자의 신체구성 혈압 혈중 지질 및 프리래디칼 생성에 미치는 영향 운동과학 15(3). 23-34

김정인, 강민정, 권태완(2003). 콩과 청국장의 혈당조절 및 지질대사 개선 효과. Korea Soybean Digest, 제20권 제2호, 44-52.

서효빈, 김현국(2008) 청국장 분말 섭취와 운동이 혈중 지질농도 및 SOD활성과 MDA함량에 미치는 영향. 한국체육과학회지, 17(4),1571~1580

신경수, 이상직, 류승필, 최승조, 허만동, 김유진, 장응찬, 민경선(2001). 트레이닝후의 단백질보충제 섭취 타이밍이 청소년의 체격 및근력에 미치는 효과, 한국체육학회지 10(0),

695-701.
이경혜, 허은실, 박은주(2006). 찐콩과 청국장 가루 섭취가 여대생의 혈액성상과 항산화 영양소에 미치는 영향. 한국영양사협회 학술지, 제12권 제3호, 289-298.
장용우, 최경수, 권양기(1998) 전방십자인대 술후 등속성 운동이 대퇴위 근력 및 근비대에 미치는 영향 대한스포츠의학회지, 16(1) 6~17
홍희도, 김성란, 김성수(2000). 대두 및 대두가공제품 중의 Bowman-Birk protease inhibitor 함량. 한국콩연구회지, 17(1), 61-68.

제 3 절 청국장 유효성분의 생이용성 연구

1. 연구 전략

가. 청국장 형태에 따른 isoflavonoids의 생이용성을 비교하기 위해 청국장 추출물 및 분말을 확보함.

나. LC-MS를 이용한 청국장 내 isoflavonoids (daidzin, daidzein, genistin, genistein) 정량분석법 확립

다. 소화과정 중 청국장 내 isoflavonoids의 파괴 여부 (stability, recovery %)와 소화 중 활성물질 유리효율 (bioaccessibility %)을 분석함.

라. 유리된 각 isoflavonoids의 장내세포투과효율 (cell permeability %)을 분석함.

마. recovery, bioaccessibility는 simulated digestion method를 통해 측정하며 permeability는 Human intestinal Caco-2 cell transport assay를 통해 측정함.

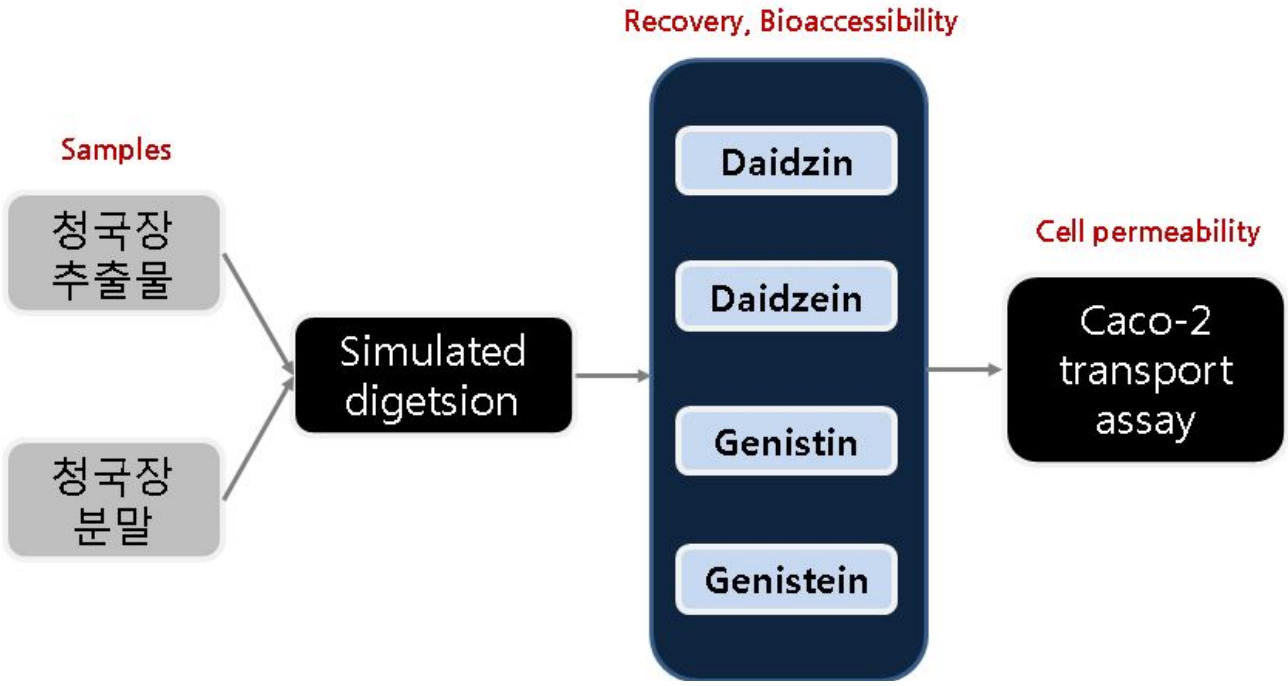


그림 24. 청국장 분말/추출물의 생이용성 연구 스킴

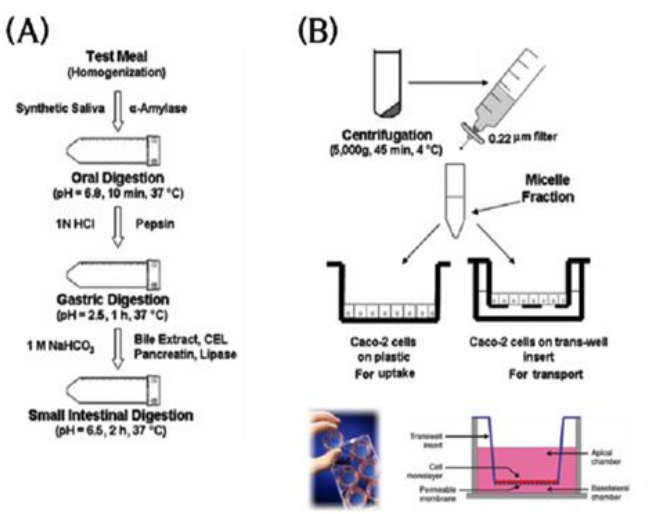


그림 25. 청국장 생이용성 분석을 위한 simulated digestion (A), Caco-2 분석 시스템 (B)

- 2 가지 실험 도구를 이용하여 청국장 생이용성 분석을 수행
  a. simulated digestion: 소화안정성, 활성물질 유리효율
  b. Caco-2 분석 시스템: 장세포투과도

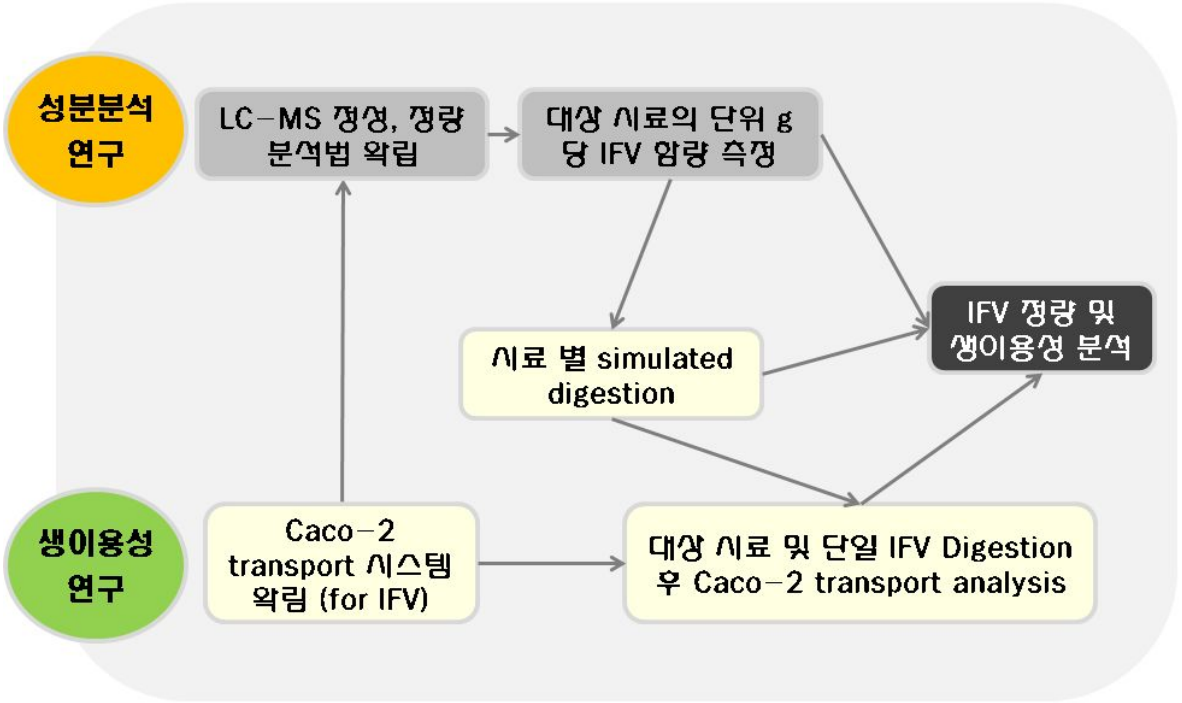


그림 26. 성분분석 / 생이용성 연구 간의 역할 분담 관계도

- 성분분석 연구를 통해 isoflavonoids 정성, 정량 분석법을 확립하고 이를 바탕으로 simulated digestion, Caco-2 수송 연구를 통한 생이용성 연구를 수행함.

2. Simulated digestion 연구를 통한 청국장 시료의 소화안정성, 유리 효율 탐색

가. 소화안정성 (Recovery)과 유리 효율 (Bioaccessibility)

- 청국장 시료의 소화안정성과 활성물질 유리효율은 다음을 통해 측정함.

a. **소화안정성** (recovery %) = 소화반응 후 소화반응물 (digestate) 내 목적 물질의 양 / 소화반응 전 시료 (sample) 속 목적 물질의 양

b. **유리 효율** (bioaccessibility %) = 소화반응 후 수용층 (soluble fraction) 내 목적 물질의 양 / 소화반응 전 시료 (sample) 속 목적 물질의 양

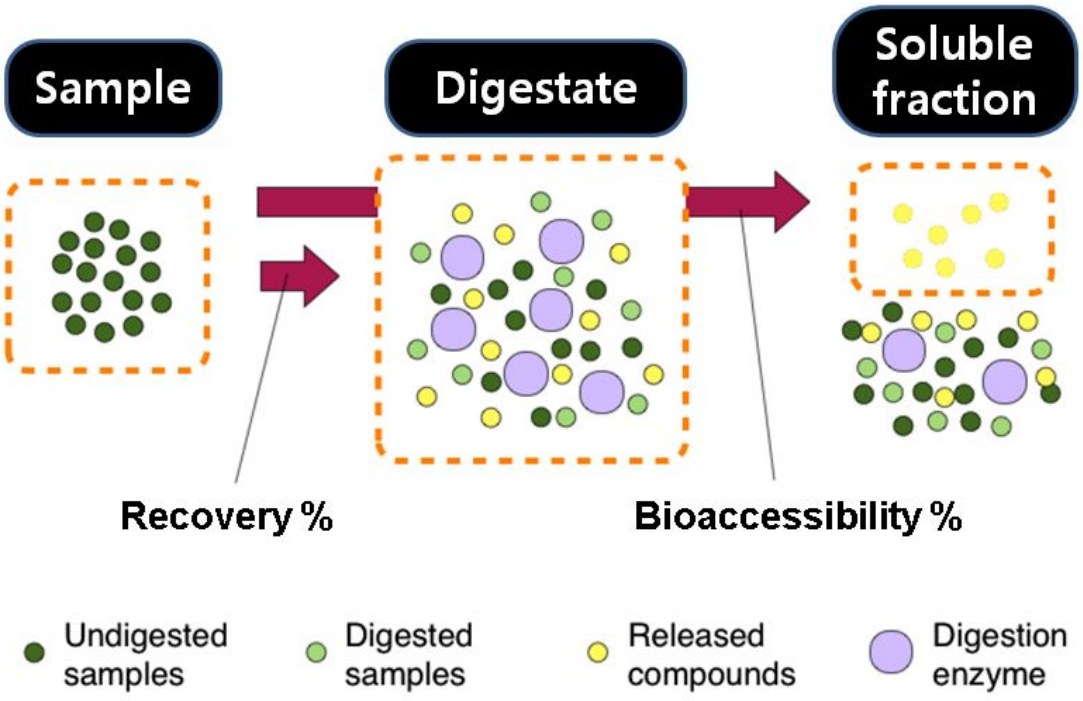


그림 27. 천연물 활성성분의 소화과정 내 소화안정성 및 유리효율 측정 개념도

나. 시료 준비

- 청국장 분말/추출물 총 4그룹으로 나누어 실험.
  a. 분말: 열풍건조 분말, 동결건조 분말
  b. 추출물: 청국장 추출물, 청국장 추출물 캡슐

그림 28. 생이용성 탐색 실험에 사용한 청국장 분말 및 추출물

다. 핵심연구방법

(다-1) HPLC 분석법 최적화 및 청국장 isoflavonoids 정량분석법 확립

- 추출용액 1 mL에 대해 filtration 후 HPLC insert vial에 옮김.
- HPLC 분석은 Agilent 1200 시스템을 사용.
  a. 컬럼: YMC Pack Pro C18 (150 × 4.6 mm, 5 μm)
  b. 온도: 35°C
  c. 검출파장: 254, 330 nm
  d. 유속: 0.8 mL/분
  e. 주입량: 10 μL
- daidzin, daidzein, genistin, genistein의 HPLC 분석조건 최적화 및 정량분석법 확립
- 다량의 시료 분석을 위해 샘플 당 분석시간을 최소화하고 peak 분리능을 높임.

표 24. 청국장 isoflavonoids의 HPLC 분석 조건

Min	Line C acetonitrile	Line D water with 0.1% formic acid
	%	
0	5	95
3	5	95
15	50	50
25	95	5
Post run 15 min		

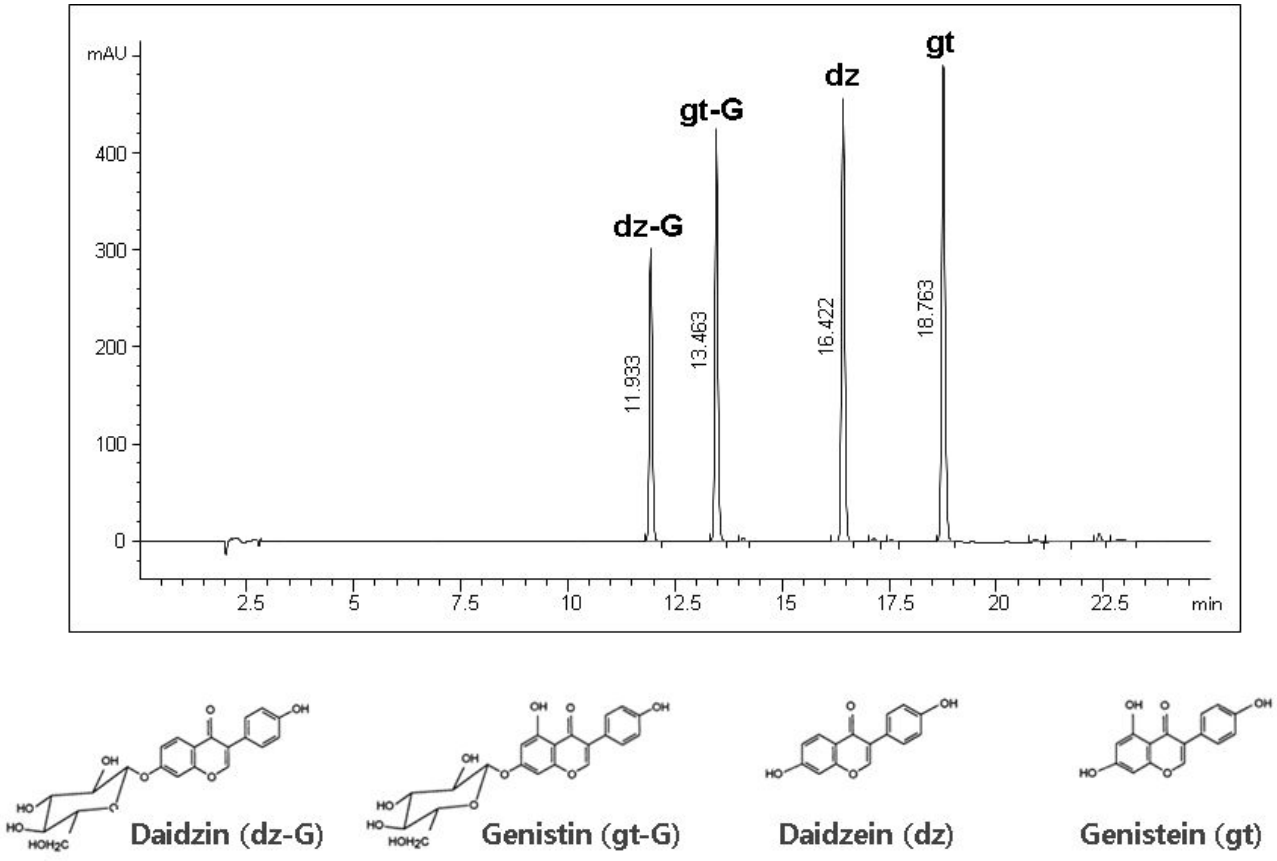


그림 29. 청국장 주요 isoflavonoids 표준품의 HPLC 크로마토그램

(다-2) simulated digestion

- 각 청국장 분말, 추출물 시료에 대해 총 isoflavonoids 함량을 동일하게 맞춰주어 위장관 모사 실험을 수행. 분말시료 (3 g), 추출물 (300 mg), 추출물 캡슐 (1 캡슐).
- 각 그룹 당 시료 추출용, 소화안정성 분석용, 유리 효율 분석용으로 다시 그룹을 나누어 실험을 수행.
- 위장관 모사 실험은 입 (oral), 위 (stomach), 소장 (small intestine)의 3부분으로 나누어 처리.
- 실험에 사용한 α-amylase (A3176) , pepsin (P6887), pancreatin (P3292), lipase (L3126), bile extract (B8631) 등의 소화효소는 SIGMA 시약을 사용하였으며 사람의 생리적 상태를 재현할 수 있는 조건에 맞도록 농도 및 처리시간을 정함.

표 25. simulated digestion 실험 조건 및 방법

	시료	농도	Stock	첨가량	온도, 시간, pH
입	Alpha-amylase	40 mg/mL Adjust voume to 15 mL	520 mg in 13 mL	500 uL	37°C, 10 min
위	1N HCl Pepsin	Adjust voulume to 20 mL 80 mg/mL in 0.1 N HCl	1040 mg in 13 mL	500 uL	37°C, 60 min pH 2.0-2.5 (1N HCl ? mL)
장	1M NaHCO3 Pancreatin Lipase Bile extract	Upto pH 5.5 80 mg/mL 10 mg/mL 100 mg/ mL	1040 mg in 13 mL 130 mg in 13 mL 6400 mg in 64 mL	500 uL 500 uL 2.5 mL	37°C, 120 min pH 6.5 (1M NaHCO3 ? mL)
					Final volume 25 mL

(다-3) soluble fraction 준비

- 청국장 isoflavonoids의 유리 효율을 구하기 위해 simulated digestion 후 소화반응물로부터 soluble fraction을 준비함.
- 전처리 방법
  a. 소화반응물을 10 분 동안 2,500 g에서 원심분리함.
  b. 상징액 8 mL에 대해 filtration
  c. 2 그룹으로 나눔. 6 mL: Caco-2 실험용, 1 mL: 추출분석용

(다-4) isoflavonoids 추출

- 시료, 소화반응물 25 mL에 메탄올 25 mL을 첨가. 준비된 soluble fraction 0.6 mL에는 메탄올 0.6 mL을 첨가.
- 50°C에서 8시간 동안 추출

라. simulated digestion 전후 isoflavonoids 함량변화

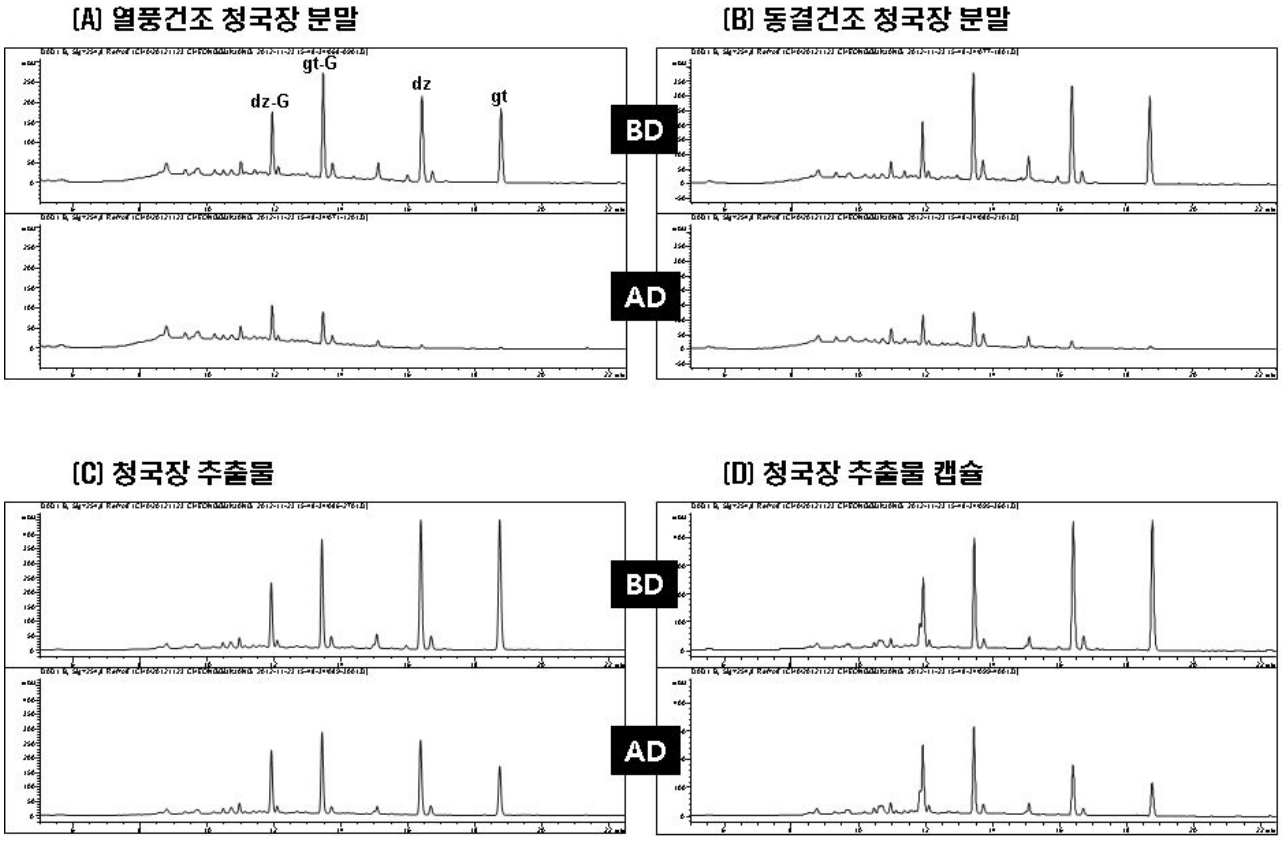


그림 30. 각 청국장 분말/추출물 (A-D)의 simulated digestion 전후 크로마토그램 비교

- 그림 7 (A), (B)에 의하면 청국장 분말에서는 digestion 전후 (BD: before digestion, AD: after digestion) daidzein, genistein의 피크가 사라지는 경향을 나타내 효과적인 수용화가 이루어지지 않음을 확인. 당이 붙어있는 glucoside 형태만 수용화 됨.

- 그림 7 (C), (D)에 의하면 simulated digestion 실험 후 추출물에서는 daidzein, genistein 등 당이 떨어져있는 aglycone 형태의 isoflavonoids가 효과적으로 수용화 됨.

- 문헌에서 glucoside 형태의 isoflavonoids는 세포흡수 효율이 적음이 보고되고 있어 isoflavonoids의 소장 생이용성을 높이기 위해서는 분말보다 추출물을 이용하는 것이 더 나음.

(라-1) in vitro 소화실험 단계별 isoflavonoids 비율 변화

- 그림 8, 9에 의하면 소화과정 중 'sample → digestate → soluble fraction' 단계별 각 isoflavonoids (daidzin, genistin, daidzein, genistein)의 함량을 알 수 있음.

- digestate의 함량에서는 큰 차이가 없지만 soluble fraction 에서의 함량은 제품형태 (분말, 추출물, 캡슐 등) 별로 차이가 큼.

- 초기에는 비슷한 함량으로 함유되어 있던 isoflavonoids의 비율이 소화과정에서 크게 달라짐. 이는 digestion 과정에서 당이 붙어있지 않은 isoflavonoids가 체내 흡수 가능한 soluble fraction으로 거의 옮겨지지 않았기 때문으로 보임.

- 그림 9에서 추출물의 경우 genistein, daidzein가 soluble fraction에서 검출 가능했으며 추출물 캡슐에서는 해당 isoflavonoids의 수용화가 일부 저해되었음을 확인할 수 있음.

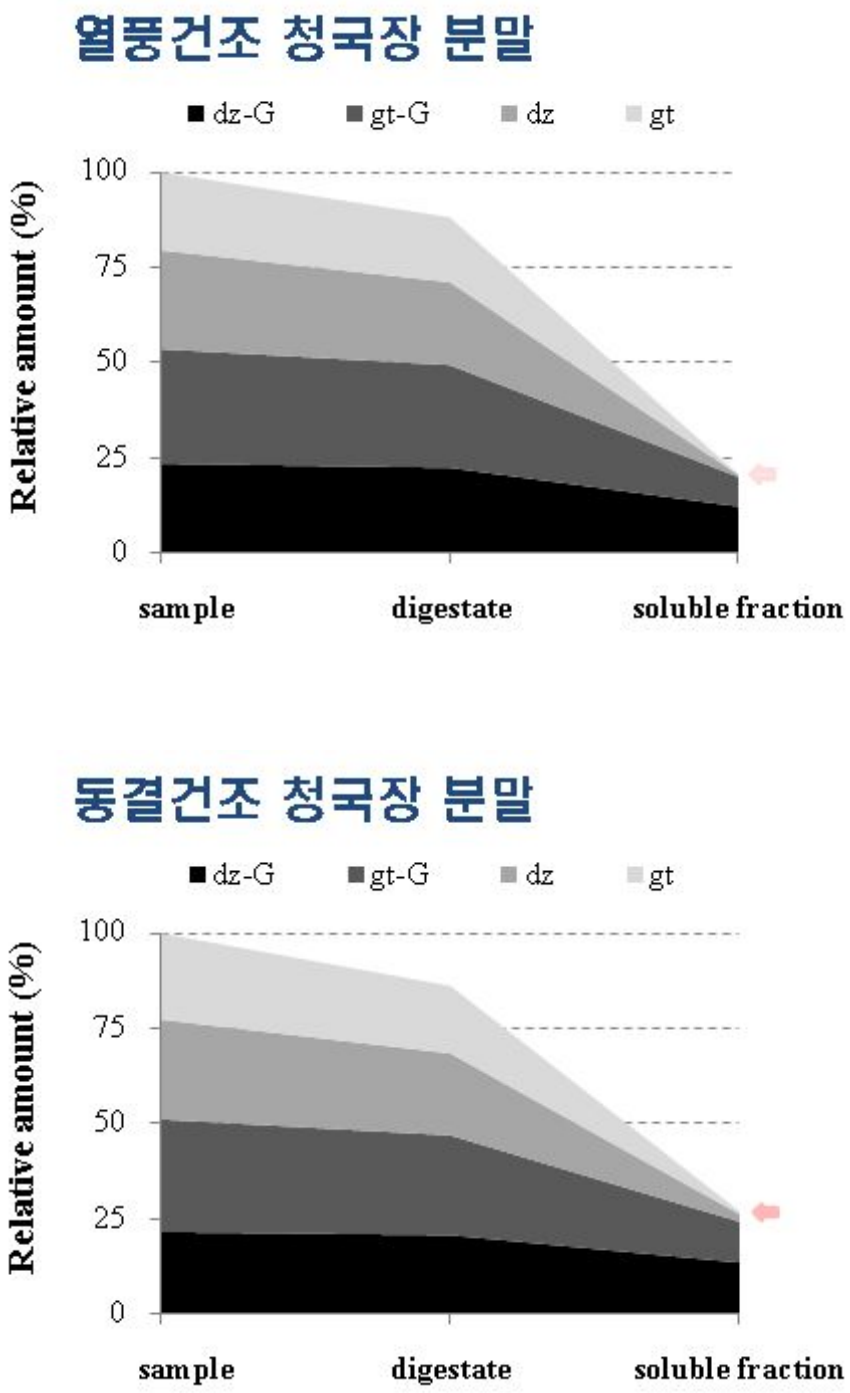
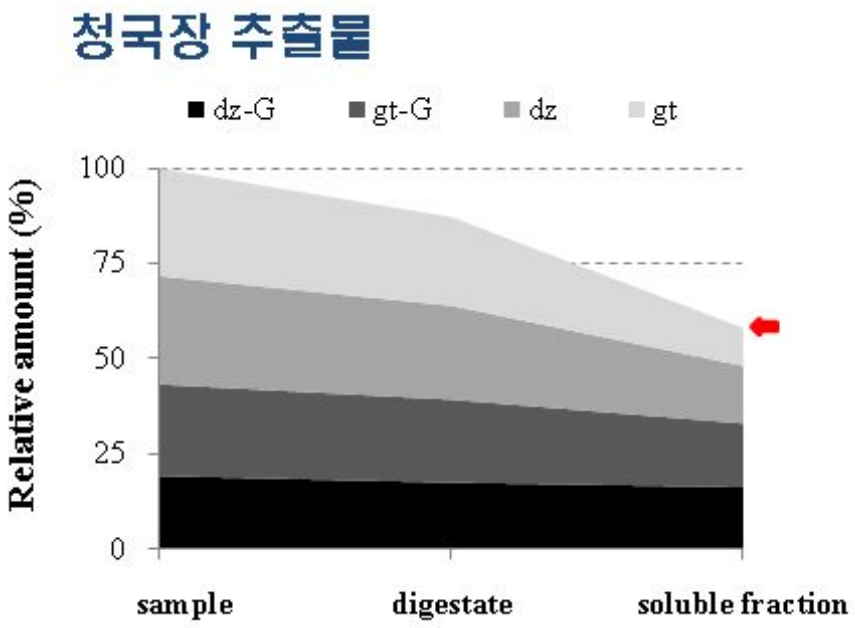


그림 31. 청국장 분말 (열풍건조, 동결건조)의 소화과정 내 함량비율 변화



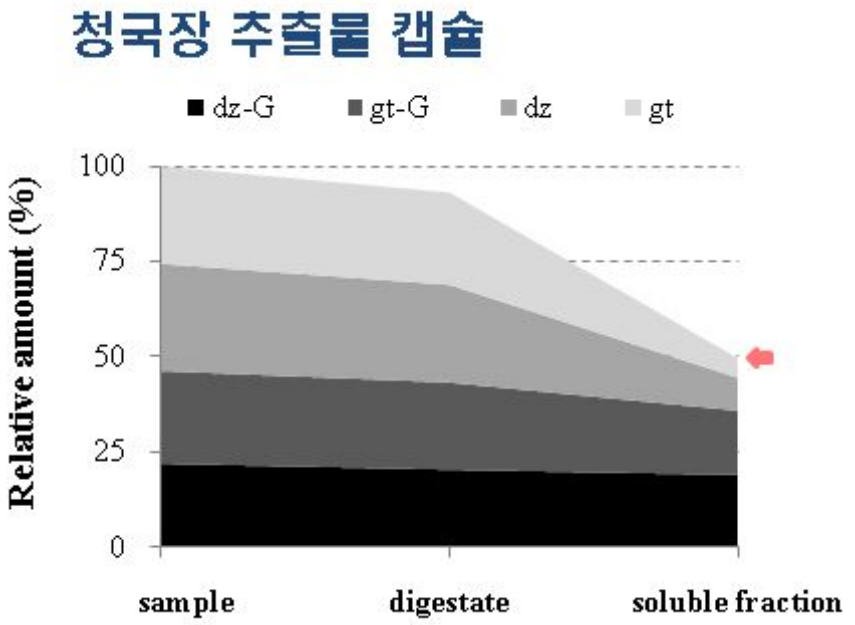


그림 32. 청국장 추출물 (캡슐 유·무)의 소화과정 내 함량비율 변화

(라-2) 소화안정성 (recovery)과 유리 효율 (bioaccessibility)

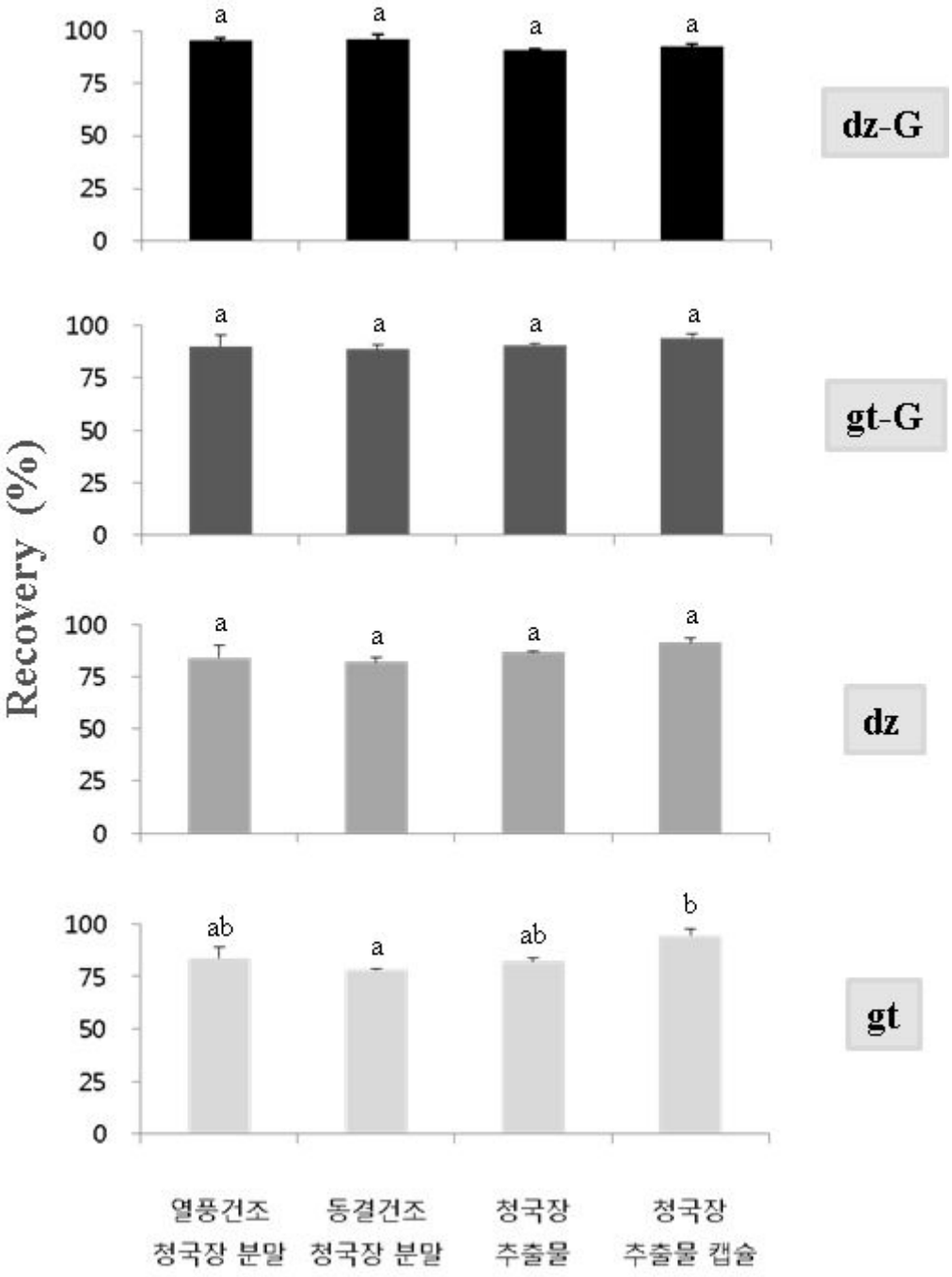


그림 33. 각 청국장 분말/추출물의 simulated digestion 후 recovery (소화안정성). 서로 다른 알파벳 문자는 그룹 간 유의적 차별성을 나타냄 ($P < 0.05$).

- 소화안정성은 제품 형태에 따른 차이가 크지 않음. 청국장 isoflavonoids 중에서는 genistein의 소화안정성이 가장 떨어졌으며 추출물 캡슐에서 통계적으로 유의한 증가를 보임.

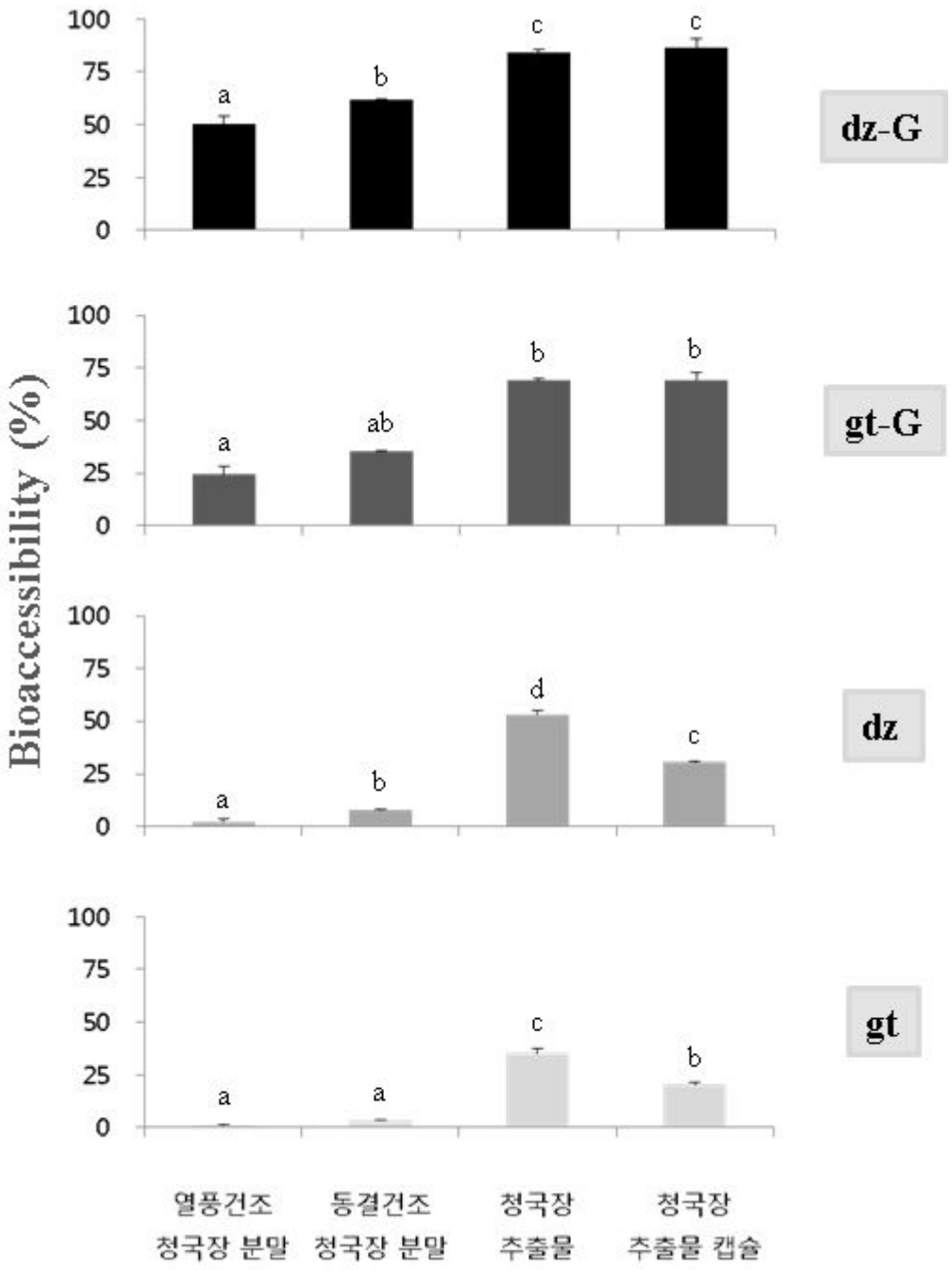


그림 34. 각 청국장 분말/추출물의 simulated digestion 후 bioaccessibility (유리 효율). 서로 다른 알파벳 문자는 그룹 간 유의적 차별성을 나타냄 ($P < 0.05$).

- daidzein, genistein은 분말에서의 유리 효율이 매우 떨어짐. 추출물에서는 10배 이상 증가
- 청국장 iso flavonoids의 유리 효율은 청국장 추출물 > 청국장 추출물 캡슐 > 동

결건조 청국장 분말 > 열풍건조 청국장 분말 순으로 나타남.

3. Caco-2 transport 실험을 통한 청국장 주요 isoflavonoids의 장세포 투과 효율 탐색

가. 연구전략

- 청국장 주요 isoflavonoids 인 daidzin, genistin, daidzein, genistein의 장세포 흡수율을 Caco-2 transport assay를 통해 측정

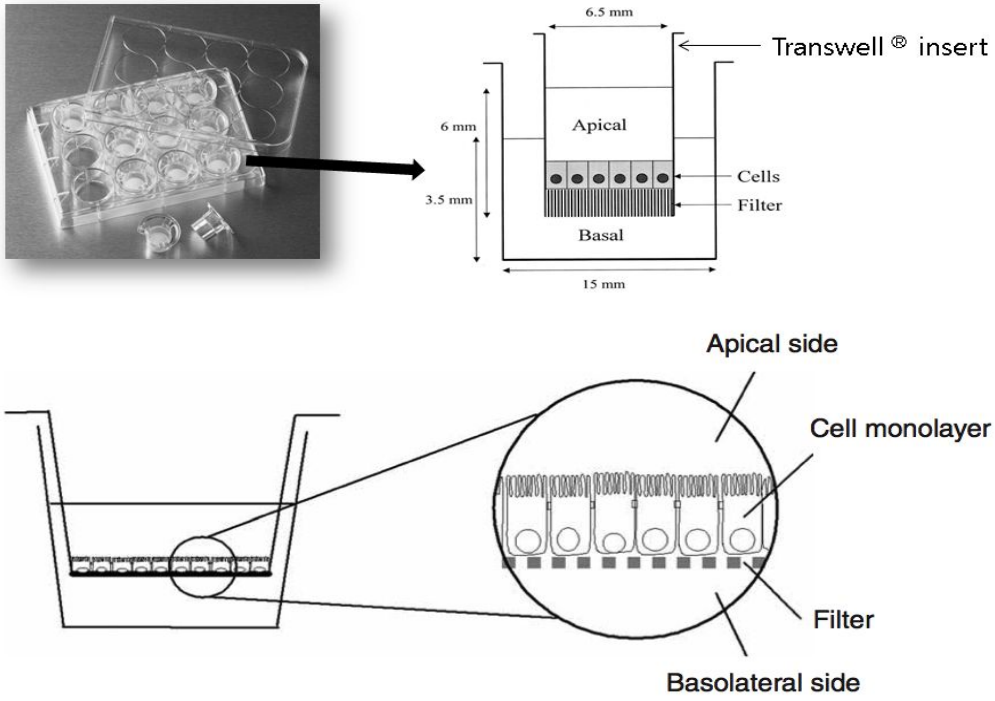


그림 35. Caco-2 transport 실험에 사용된 transwell plate 시스템

- 아래와 같이 isoflavonoids에 따른 apparent permeability coefficients (Papp)을 구함.

- P_{app} [cm/s] $= \frac{\Delta Q/\Delta t}{AC_0}$

$$= \frac{\text{LC-MS/MS peak area of substrate in acceptor compartment at end of incubation} \times \text{volume of medium in acceptor compartment [cm}^3\text{]}}{\text{LC-MS/MS peak area of substrate in donor compartment at start of incubation} \times \text{membrane surface area [cm}^2\text{]} \times \text{incubation time [s]}}$$

$$= \frac{\text{반응 후 투과된 기질의 LC-MS/MS 피크 면적} \times \text{투과된 쪽의 배지 볼륨 [cm}^3\text{]}}{\text{반응 전 처리한 기질의 LC-MS/MS 피크 면적} \times \text{투과막의 표면적 [cm}^2\text{]} \times \text{반응시간 [s]}}$$

- Efflux ratio = P_{app} B-A / P_{app} A-B

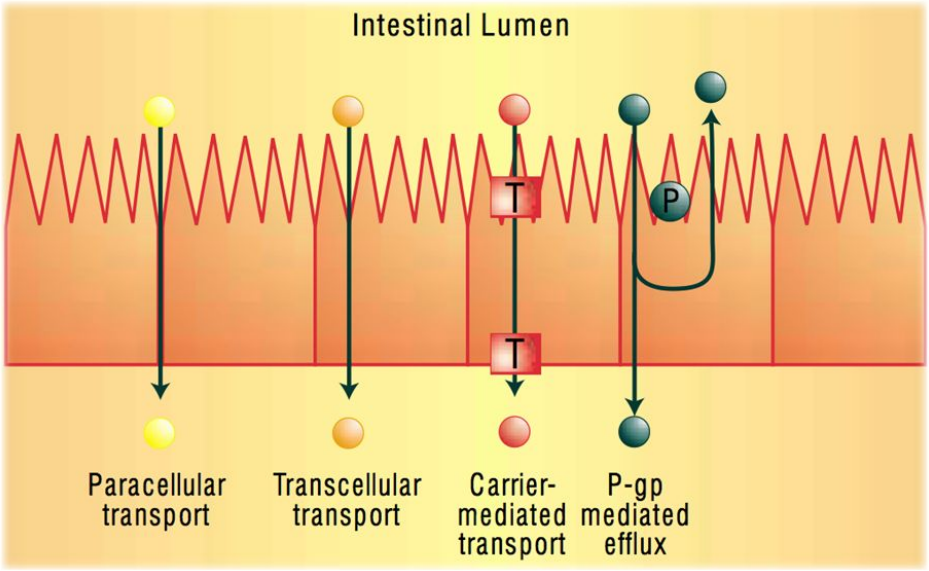
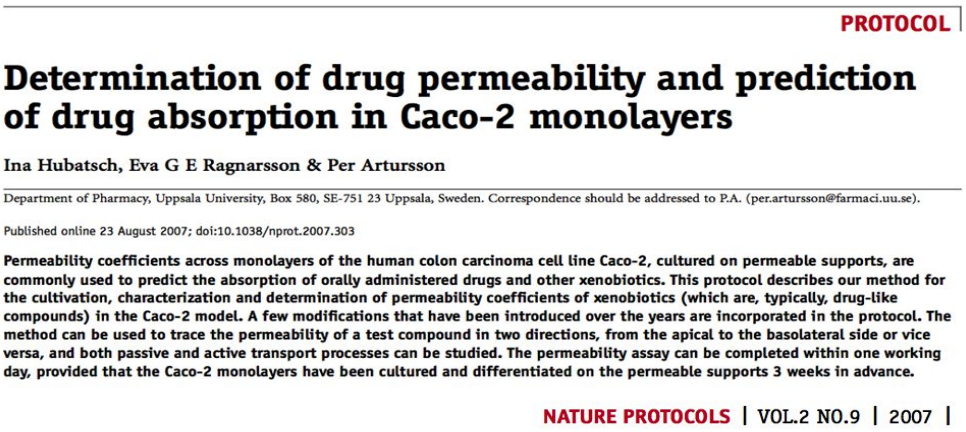


그림 36. 생리활성물질의 장세포투과 작용기전. 크게 경세포 (paracellular) 수송, 관세포 (transcellular) 수송, 능동 수송 및 efflux 시스템이 존재.

- 천연물 화합물에 따라 Caco-2 장세포를 통한 수송 작용기전이 다름. 포도당, 단백질 등은 효율적인 흡수를 위해 에너지를 사용하는 능동 수송 (active transport; carrier-mediated transport)을 통해 흡수됨. 일반적으로 식물에 다량으로 존재하는 폴리페놀과 같은 천연물 화합물은 수동 수송 (passive transport; paracellular transport, transcellular transport)을 통해 흡수됨.

- isoflavonoids는 aglycone의 경우 transcellular transport를 통해 흡수되고 당이

붙어있는 glycoside의 경우 P-glycoprotein 에 의해 efflux가 일어남이 기존 문헌에 보고됨.



PROTOCOL

Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers

Ina Hubatsch, Eva G E Ragnarsson & Per Artursson

Department of Pharmacy, Uppsala University, Box 580, SE-751 23 Uppsala, Sweden. Correspondence should be addressed to P.A. (per.artursson@farmaci.uu.se).

Published online 23 August 2007; doi:10.1038/nprot.2007.303

Permeability coefficients across monolayers of the human colon carcinoma cell line Caco-2, cultured on permeable supports, are commonly used to predict the absorption of orally administered drugs and other xenobiotics. This protocol describes our method for the cultivation, characterization and determination of permeability coefficients of xenobiotics (which are, typically, drug-like compounds) in the Caco-2 model. A few modifications that have been introduced over the years are incorporated in the protocol. The method can be used to trace the permeability of a test compound in two directions, from the apical to the basolateral side or vice versa, and both passive and active transport processes can be studied. The permeability assay can be completed within one working day, provided that the Caco-2 monolayers have been cultured and differentiated on the permeable supports 3 weeks in advance.

그림 37. Caco-2 transport 실험 방법의 기준이 된 참고문헌

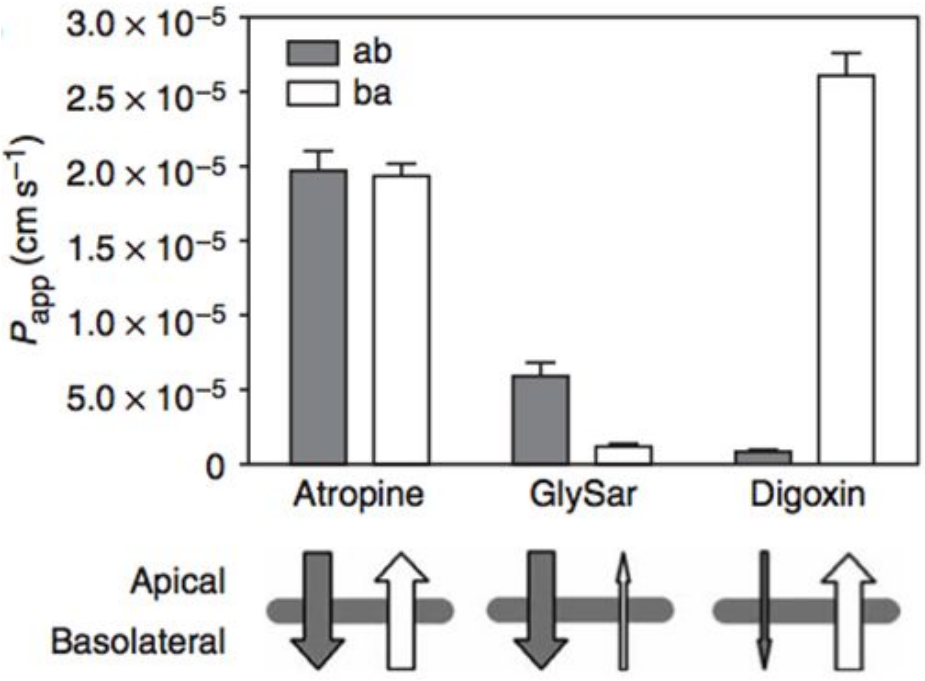


그림 38. 장세포투과 흡수 효율에 따른 생리활성물질 타입

나. 핵심연구방법

(나-1) cell seeding

- transwell plate (polyester, 12 well, 0.4 μm) 사용
  : polycarbonate 재질은 저렴하지만 배양 중 세포 관찰이 어렵기 때문에 polyester 재질을 사용함.

- 1×10^5 cells/cm^3 의 양으로 seeding. 21일 후 세포 수송 실험.

- membrane integrity 확인: TEER (transepitherial electrical resistance) 측정. (TEM, immunocytochemical stainining으로도 가능)
  : 21일 후 TEER 값이 800 Ωcm^2 인 transwell에서만 실험함.

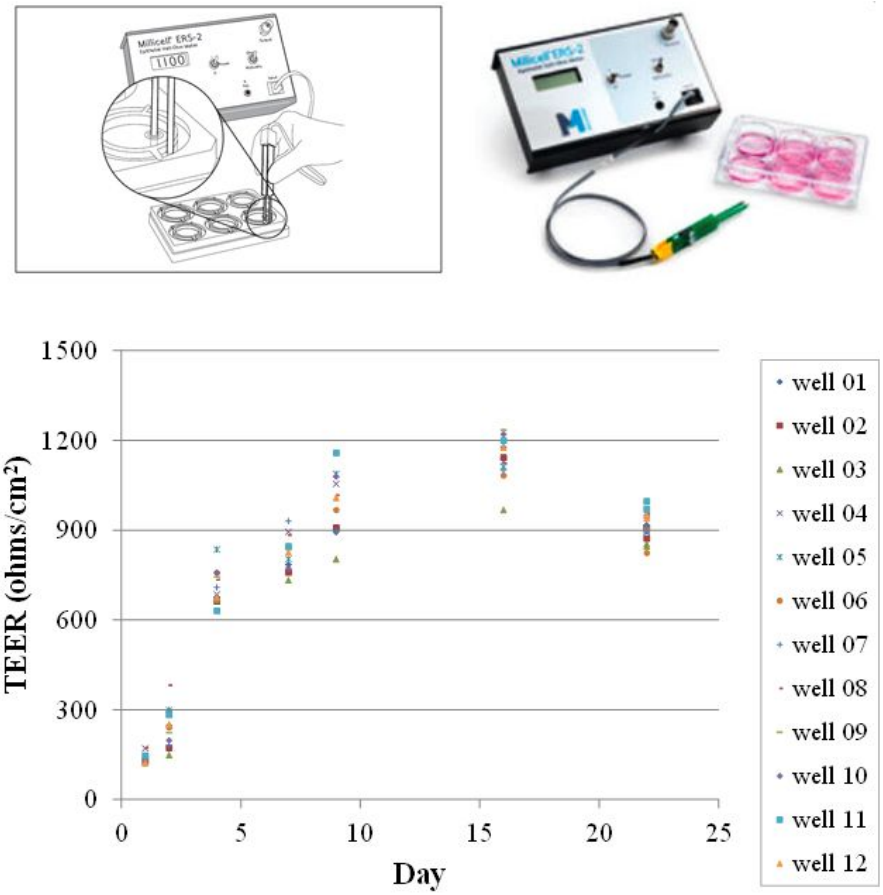


그림 39. Caco-2 세포 분화 일 수에 따른 TEER (trans epithelial electrical resistance) 변화. 배양일 수 증가에 따라 세포막의 integrity가 향상됨을 TEER 수치 증가로 확인할 수 있음. 실험에는 TEER > 800 Ωcm2 인 것만 데이터 처리에 사용됨.

(나-2) 시료준비

- 4개 청국장 주요 isoflavonoids: genistein, genistin, daidzein, daidzin 10 mM stock (500X) 준비

- 6 mL (pH 6.5 버퍼) + 1.2 µL stock 용액 → 20 µM, 0.2% DMSO

(나-3) Caco-2 assay

- 실험 전 HBSS 버퍼 (apical side: pH 6.5, basolateral side: pH 7.4)로 각 well을 30분 동안 세척

- 각 well의 TEER 값을 측정

- 반응 전 샘플처리 및 채취
  a. A to B
    · apical: 0.5 mL (화합물 준비용액) → 100 µL를 즉시 회수
    · basolateral: 1.2 mL (pH 7.4 HBSS 버퍼)
  b. B to A
    · apical: 0.4 mL (pH 6.5 HBSS 버퍼)
    · basolateral: 1.2 mL (화합물 준비용액) → 100 µL를 즉시 회수

- 2 시간 동안 55 rpm에서 흔들면서 반응시킴.

- 반응 후 샘플 채취
  a. A to B
    · apical
    · basolateral: 100 µL 회수 후 HBSS 버퍼 100 µL를 다시 채워줌.
  b. B to A
    · apical: 100 µL 회수 후 HBSS 버퍼 100 µL를 다시 채워줌.
    · basolateral

- 30분 후 TEER 측정

(나-4) 추출 및 분석

- 회수된 100 µL 용액에 아세토나이트릴 용매 200 µL를 넣고 15,000 g에서 원심분리

- 0.2 µm 필터로 거른 후 상징액 부분을 LC 혹은 LC-MS를 사용 (simulated digestion 시 사용한 LC 조건과 동일)하여 isoflavonoids 함량을 분석함.

(다) Caco-2 분화 및 TEER 측정

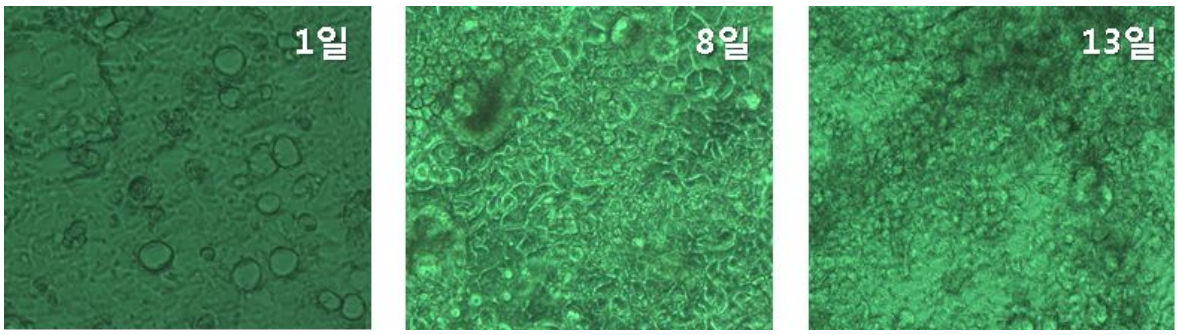


그림 40. Caco-2 세포 분화 일 수에 따른 세포 형태 현미경 관찰 사진

- Caco-2 세포의 배양 일 수가 경과됨에 따라 세포분화가 일어남을 현미경 관찰을 통해 확인할 수 있었으며 세포막의 integrity는 TEER 분석을 통해 확인함.

- 그림 16의 TEER 분석 결과에 의하면 실험 전 마지막 시기인 17일 째 까지는 TEER이 계속 증가되어 세포 분화가 진행 중임을 알 수 있음.

- 실험 수행 시 TEER 값이 10% 가량 저하됨. 이는 배지 대신 버퍼를 넣어주었기 때문임.

(라) 장세포투과도 분석

표 26. 청국장 주요 isoflavonoids의 장세포투과도 (Papp)

Compound	Papp A to B	Papp B to A	Papp A to B / Papp B to A
daidzin	0.10 ± 0.04	2.64 ± 1.01	0.04 (0.35)[a]
daidzein	9.68 ± 1.58	9.81 ± 1.93	0.99 (0.92)
genistin	NC	8.41 ± 2.12	NC
genistein	11.26 ± 1.16	11.19 ± 3.55	1.01 (1.04)

[a] ( ), 다른 문헌에서 보고된 수치. Int J Pharmaceut 367 (2009) 58-64

- Caco-2 수송 분석 결과 각 청국장 isoflavonoids의 장세포투과도를 구할 수 있었음.

- genistin은 apical → basolateral에서 검출되지 않음. daidzin, genistin과 같은 glycosides는 Caco-2 수송 실험에서 강한 efflux 시스템을 가짐을 확인.

- daidzein, genistein의 P_{app}A-B / P_{app} B-A 값이 거의 1에 가까움. → 수동수송으로 흡수됨을 예상할 수 있음.

- 실험에서 구한 P_{app}A-B / P_{app} B-A 값은 기존 문헌에 나와있던 값과 거의 일치하여 실험에서 사용한 실험 방법 및 결과가 유효함을 알 수 있음.

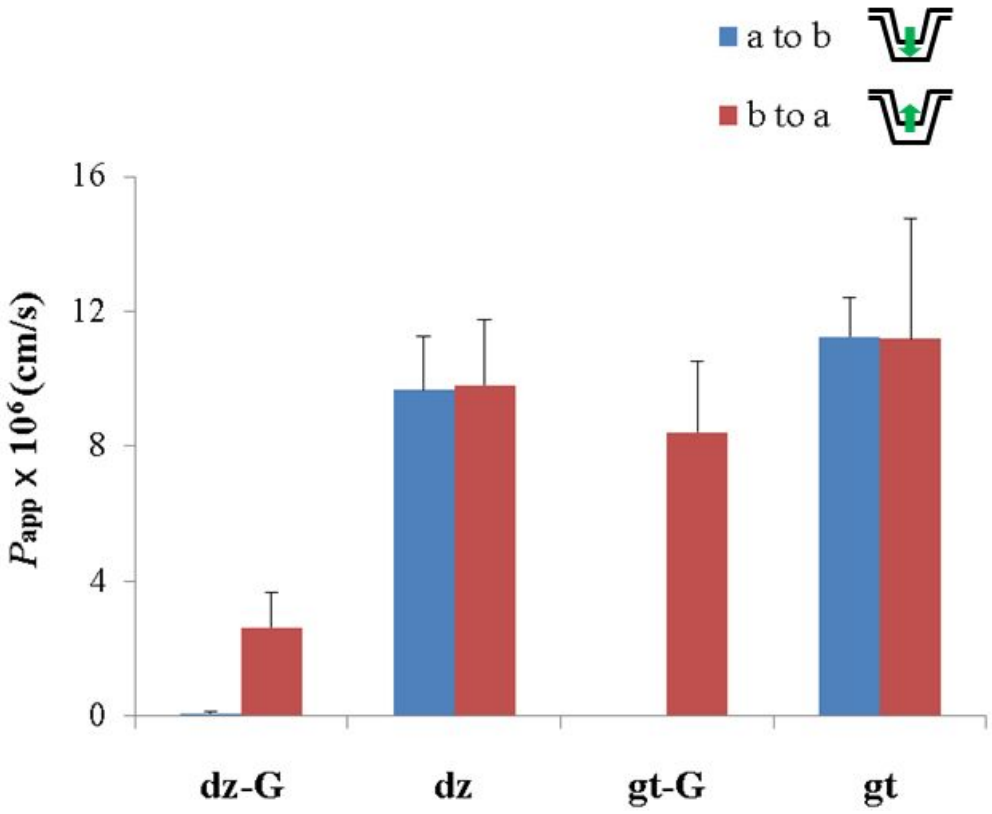


그림 41. 청국장 주요 isoflavonoids의 장세포투과도

- 청국장의 주요 isoflavonoids는 수동수송을 흡수 경로로 이용. glycoside 형태의 isoflavonoids인 daidzin, genistin의 흡수효율은 매우 낮음을 알 수 있으며 이는 강력한 efflux 시스템 때문으로 보임.

- 세포흡수가 용이한 daidzein, genistein 과 같은 aglycone은 청국장 추출물에서 소화과정 내 유리 효율이 높았으므로 isoflavonoids의 효과적인 소장 흡수를 위해서는 청국장 분말보다 추출물 형태로 흡수하는 것이 바람직함을 알 수 있음.

제 4 절 청국장 활용 스포츠기능성 식품 가공

1. 스포츠 기능성 원료의 제형화 연구

가. 청국장 추출분말

- 시료의 특성 : 상온 노출 시 조해 또는 흡습이 강하며, 청국장 특유의 향이 강해 원료 상태로 분말 형태의 제품에 적용하기는 어려움
- 하드캡슐을 사용한 캡슐형태의 제형이 가능

그림 42 청국장 추출물 분말 및 캡슐

나. 청국장 분말

- 시료의 특성 : 청국장 특유의 향으로 인해 청국장 분말의 함량을 조절하여, 분말제품, 바 형 태의 제품에 적용 가능

그림 43 청국장 분말 및 바형태 제형

다. 청국장 잔사/잔사분말

- 시료특성 : 탄수화물 31.68%(식이섬유 31.08%), 단백질 40.06%, 지방 22.35%의 영양적 특성을 지닌 분말
- 청국장 추출물분말이나 청국장 분말보다 향이 적으므로, 분쇄하여 분말형태, 정제형태, 바형태의 제품 구상 가능

검 사 성 적 서

시험항목	결과	검사담당자
탄수화물(%)	31.68(식이섬유 31.08 함유)	정은숙
조단백질(%)	40.06	김명옥
조지방(%)	22.35	이진경
식이섬유(%)	31.08	이주영

식이섬유분석법-식품공전/제10.1.1.4.3 가법.

2012 년 11 월 15 일

한국기능식품연구원장

그림 44 청국장 잔사, 분말 바형태 제형 및 영양성분 검사

제 3 장 목표 달성도 및 관련 분야에 대한 기여도

연구 개발 목표	달성도	관련 분야 기여도
청국장 활용 스포츠 기능성 원료 추출 - 청국장 제조방법 설정 및 용매에 따른 추출율 조사 - 지표성분 설정 및 분석법 확립 - 인체 실험용 대용량 추출물 제조 - 물리적 가공방법에 따른 추출율 조사	 100% 100% 100% 100%	**청국장 활용 스포츠 기능성 원료 추출** - 청국장을 5가지 방법으로 제조하여 각각에 대한 추출율 및 주성분 함량 분석 - 지표성분으로 콩의 Isoflavone을 설정하고 LC-MS를 활용한 분석법 개발 - 대용량 추출물 가공방법 확립 및 지표성분 표준화 - PLE를 활용한 추출 조건 최적화
청국장의 스포츠기능성 평가 - 청국장 스포츠기능성 원료 및 유효성분의 유산소 능력 향상 효능 검증 - 청국장 스포츠기능성 원료 및 유효성분의 근육형성 효과 분석	 100% 100%	**청국장의 스포츠기능성 평가** - 4주간의 임상실험을 통해 유산소 운동능력 향상 확인 - 청국장 스포츠기능성 원료 및 유효성분의 근 비대 및 근력 향상 효과 확인
청국장 유효성분의 생이용성 연구 - 청국장 형태에 따른 지표성분의 생이용성 비교 - 소화 과정 중 지표성분의 안전성, 유리 효율 및 장세포 투과도 검증	 100% 100%	**청국장 유효성분의 생이용성 연구** - 지표성분 정성 정량 분석법 확립 - 생이용성 분석 system 확립 a. simulated digestion b. Caco-2 분석 시스템
청국장 활용 스포츠기능성 식품 가공 - 인체 실험용 청국장 추출물 제형 설정 - 스포츠 기능성 시제품 개발	 100% 100%	**청국장 활용 스포츠기능성 식품 가공** - 청국장 추출분말의 하드 캡슐 제조 - 청국장 분말의 함량 조절 및 바형태 제품 적용 - 청국장 잔사를 활용한 시제품 개발 및 영양성분 분석

제 4 장 연구 개발 성과 및 활용 계획

제 1 절 기술적 성과

1. 청국장 원료인 콩과 청국장 제조 방법 별 추출 율 및 isoflavone 함량 비교 분석하여 제조 공정 확립

2. 지표성분인 isoflavone의 정량, 정성 분석 방법을 설정하여 추출물의 표준화 방법 확립

3. 대용량 추출물 제조 가공방법 개발

4. PLE를 활용한 추출 조건 최적화

5. 인체 실험을 통한 청국장의 스포츠 기능의 유산소, 무산소성 운동능력 유효성 검증

6. 청국장을 활용한 다양한 스포츠 기능성 식품 (환, 캡술, 분말, 바 등)의 개발에 필요한 기초 기술 확립

7. 청국장 추출불의 효능 분석을 통하여 산업화 소재 개발

제 2 절 경제 산업적 성과

1. 전통 청국장 산업의 소득 자원을 다각화 시키고 한식의 고부가가치 산업화 전기 마련

2. 소비자들에게 스포츠 기능성이 뛰어나고 안전한 식품 제공

3. 청국장 소비증대를 통한 콩 생산력 증대 및 콩 가공식품 산업 발달에 기여

4. 문화적으로 한국 전통 발효식품의 우수성을 지켜가고 향상 시킬 수 있는 토대 마련

제 3 절 논문 및 특허 성과

1. 논문 투고 및 계획

게재 연도	논문명	저자			학술지명	vol. (no.)	국내외 구분	SCI 구분
		주저자	교신 저자	공동 저자				
2013	Preparative isolation of black soybean seed flavonoids by centrifugal partition chromatography followed by solid-phase extraction	강석우 전제승	김철영	김상민 엄병헌	phytochemical analysis	투고 예정	국외	SCI
2013	청국장 isoflavonoids의 유리, 장내흡수, 대사 연구	차광현	판철호	강석우 엄병헌	Journal of Agricultural and Food Chemistry	투고 예정	국외	SCI

2 특허

	발명의 명칭	출원번호	발명자	출원년도	비고
1					

제 4 절 활용 계획

1. 청국장의 스포츠 기능성 메카니즘 규명을 위한 추가 연구를 통하여 청국장의 우수성을 규명할 수 있는 과학적 근거 보강

2. 청국장의 새로운 생리활성 물질 탐색을 통하여 우수한 청국장 개발의 지표 마련

3. 기술이전을 통한 기업의 제품 생산 지원

4. 청국장 원료를 활용하여 다양한 종류의 스포츠 기능성 식품 개발

5. 관능 테스트 결과 도출된 문제점을 보완할 수 있는 개선책 마련

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 한식세계화사업의 연구보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 한식세계화사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.