

발 간 등 록 번 호

11-1541000-001062-01

**대두의 발아 및 발효를 통한 glyceollins  
강화 기능성식품의 개발**

(Development of Soybean Functional  
Products Enriched with Glyceollins)

Glyceollins 함유제품의 기능성 평가,

발효에 의한 기능성 강화,

Glyceollins 강화발효식품 개발 및 산업화

Functional evaluation of soybean product containing glyceollins

Production of glyceollins-enriched soybean by fungal infection

Development and industrialization of glyceollins-enriched food

경북대학교

농 립 수 산 식 품 부

## 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “대두의 발아 및 발효를 통한 glyceollins 강화 기능성식품의 개발에 관한 연구”  
과제의 보고서로 제출합니다.

2011 년 11 월 30 일

주관연구기관명 : 경북대학교

주관연구책임자 : 김 정 상

세부연구책임자 : 김 정 상

연 구 원 : 김 효 정

연 구 원 : 임 지 선

연 구 원 : 장 찬 호

협동연구기관명 : 경상대학교

협동연구책임자 : 김 정 환

협동연구기관명 : 호서대학교

협동연구책임자 : 박 선 민

협동연구기관명 : 바 이 셸

협동연구책임자 : 주 영 철

## 요 약 문

### I. 제 목

대두의 발아 및 발효를 통한 glyceollins 강화 기능성식품의 개발에 관한 연구

### II. 연구개발의 목적 및 필요성

#### 1. 연구개발의 목적

- 가. 대두에서 glyceollins 생산효율을 극대화 할 수 있는 방법 개발
- 나. Glyceollins 및 isoflavone 비배당체, 대사체 성분 강화 발효제품 개발
- 다. Glyceollins 함유 제품의 건강 기능성 평가 및 작용기전 규명

#### 2. 연구개발의 필요성

- 가. Glyceollins은 곰팡이 (예, *Asp sojae*)에 감염시 콩에 존재하는 daidzein으로부터 합성되며, 최대 축적 농도는 약 1 mg/g정도임.
- 나. Glyceollins은 광범위한 식중독균에 대한 항균활성이 보고되어 있어, 장류 등 조미원료에 항균원료로서 유용성을 나타낼 가능성이 큼.
- 다. 콩단백질과 isoflavones의 기능성에 대해서는 많은 연구가 진행되었으나, glyceollins에 대한 기능성 평가 및 이를 활용한 제품개발은 미미함. 따라서 이 분야의 연구 및 개발에서 국내외적으로 선도적인 역할을 할 수 있는 기회임.
- 라. Glyceollins은 isoflavones의 기능성은 지니면서 isoflavones에 대하여 제기된 안전성 측면에서의 문제점 (유방암, 자궁내막암 등의 촉진 가능성)은 없음.
- 마. 콩 제품의 소비촉진을 위하여 보다 다양한 기능성 발굴 및 제품의 개발이 필요함
- 바. 소비자들의 건강에 대한 관심고조에 따라 콩가공제품 (예: 장류 등 소스 제품)에 부가적인 기능성 부여가 관련 산업의 quantum jump를 위하여 필요함.

### III. 연구개발 내용 및 범위

#### 1) 콩을 포함한 두류로부터 glyceollins의 최적 생성 조건 확립

- 가. 곰팡이 균주 2종 이상, 콩품종 5종 이상, 기타 처리조건 3종 이상에 대하여 콩으로부터 glyceollins의 생성정도 비교
- 나. Glyceollin-rich fraction 제조
- 다. Glyceollins의 식중독 균 수종에 대한 항균능력 평가

- 라. Glyceollins 생산을 유도한 대두를 원료로 두유를 제조하고 여러 발효 미생물들을 단독/ 혼합접종하여 발효를 진행하면서 glyceollins 함량변화를 모니터링함.
- 마. Glyceollins 및 기타 생리활성 성분들의 조합이 가장 바람직한 최적 발효조건 설정
- 바. 급성독성 평가
- 사. 저장안정성 시험

## 2) Glyceollins의 기능성 규명 - 항당뇨, 항비만, 항균 중심으로

- 가. 세포 및 마우스를 이용한 항비만 및 항당뇨 효능 평가
- 나. 세포수준에서 기능성 평가 : 항산화활성, 항곰팡이 활성, 에스트로겐 유사활성 및 항염증 활성 평가
- 다. Glyceollins 강화 콩제품의 인체시험을 통한 항비만, 혈당 조절기능 평가

## 3) Glyceollins 강화 발효제품 개발

- 가. Glyceollins 생성 유도 콩을 이용한 발효소스 개발
- 나. Glyceollins 생성 유도 콩을 이용한 대두유 및 분말환 개발

# IV. 연구개발을 통한 glyceollins의 기능성 평가 결과

## 1. Glyceollins의 생리활성기능 입증: 항산화, 항당뇨, 여성호르몬 유사활성, 항염증 효과

- 가. DPPH, hydroxyl radical, ABTS radical, singlet oxygen 소거능, mouse 조직의 지질과산화 억제활성 및 곰팡이의 생육저해능 우수
- 나. 당뇨마우스에서 혈당 항상성유지, 혈청 인슐린 농도 증가, 인슐린 민감도 증가, 간 내 글리코겐의 함량 증가 및 중성지방의 함량 저하
- 다. 우수한 에스트로겐 유사활성
- 라. LPS에 의해 유도된 대식세포 (RAW264.7)내 증가된 염증관련인자들 (COX-2, nitric oxide, TNF $\alpha$ , NF- $\kappa$ B의 핵내로의 이동)의 감소 유도
- 마. 마우스를 이용해 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)로 유도된 염증반응에서 TPA 처리된 mouse ear 상피와 진피의 두께 증가와 진피층의 염증세포 증가율 감소

## 2. 식용 곰팡이를 이용한 국내산 콩품종을 이용한 glyceollins 최대 유도 조건 확립

# V. 연구성과 및 성과활용 계획

## 1. 연구성과

- 가. 특허 : 총 4건  
  - 갱년기 증상완화(국내 1건 및 PCT 1건), 항당뇨효능 1건 (국내), 항산화 활성 1건 (국내)
- 나. 논문: SCI급 총 6편, 국내외 학술대회발표 15건
- 다. 홍보실적

국내 radio 매체 (2009) : 제주의 소리 “제주 청정 콩을 장수식품으로 육성하려면?”를 통하여 콩 isoflavones의 기능성 홍보

## 2. 성과활용 계획

가. 과제 종료후 1년 이후부터 상품화 추진. 우선, 참여기업인 바이셀 그리고 주변 콩가공 관련 기업(순창 전통 장류마을, 경북대 소이벤처 (주) 등)에 기술이전 추진

나. 전통장류의 건강이미지 제고를 위하여 본 소재를 첨가하는 방안 모색

다. Glyceollins 다량생성 유도 기술 이용해 식품가공업체를 통한 식품제조 및 발효를 통한 신규 기능성 부여로 “기능성 식품화“ 가능화 추진

라. 생물적 또는 비생물적 elicitor들을 이용한 glyceollins 유도방안 연구 추진

마. 본인이 소속된 경북대학교 농생대 식품공학부 대학원생 및 학부생들의 지도를 통하여 기능성 식품 관련 전문연구인력을 양성하는데 기여할 것으로 기기대하며, 특히, 본 과제가 갖는 복합적인 학문의 성격으로 인해, 다양한 분야에 능동적으로 대처가 가능한 경쟁력 있는 인재양성에 기여

## SUMMARY

### I. Title

Development of Soybean Functional Products Enriched with Glyceollins

### II. Objectives and Necessity

This study was conducted with the following practical objectives;

1. Development of methods to maximize de novo biosynthesis of glyceollins in soybean
2. Development of fermented soy products enriched with glyceollins and aglycone forms of isoflavones
3. Evaluation of health benefits of glyceollins or their products

### III. Contents and scope

1. Development of optimal processing conditions for glyceollin production in soybean
  - A. Evaluated for glyceollin production depending upon fungal strains, soybean varieties, physical treatment
  - B. Preparation of glyceollin-rich fraction
  - C. Evaluation of anti-fungal activity of glyceollins against 4 fungal strains responsible for plant diseases
  - D. Monitoring of glyceollin concentration during fermenting soybean in which glyceollins synthesis was induced.
  - E. Establishment of optimal fermentation condition based on concentrations of bioactive components such as glyceollin.
  - F. Assessment of acute toxicity
  - G. Evaluation of storage stability
2. Bioactive function of glyceollins
  - A. Evaluation of anti-obesity and anti-diabetic activities using cultured cell and animal models
  - B. Assessment of antioxidant, anti-fungal, anti-inflammatory, and estrogenic activities
  - C. Human study for evaluating anti-diabetic activity of glyceollin-rich soybean product
3. Development of fermented products using glyceollins-containing soybean
  - A. Preparation of seasoning or sauce using glyceollins-containing soybean
  - B. Preparation of soymilk and glyceollin-rich soy tablet

## **IV. Major results**

1. The optimum condition for accumulation of glyceollins in soybean was established through the study in which several varieties of soybean, 5 different fungal strains, and different physical pretreatments were compared with regard to glyceollin production.

2. Diverse bioactive functions of glyceollins were examined using in vitro cell culture and in vivo animal models. Glyceollins showed strong antioxidant activity as revealed by DPPH and ABTS<sup>+</sup> radical scavenging activities, singlet oxygen scavenging activity, inhibitory activities against lipid peroxidation, and intracellular ROS scavenging activity.

Glyceollins also improved glucose tolerance, increased serum insulin level and insulin sensitivity, promoted glycogen accumulation and inhibited total TG level in liver from diabetic mice, suggesting their anti-diabetic potential. The compounds showed estrogenic and anti-inflammatory activities including reduction in proinflammatory mediators such as COX-2, iNOS, TNF-alpha. In particular, TPA-induced ear swelling in mouse was ameliorated by treatment with glyceollins, further confirming anti-inflammatory action of glyceollins.

## **V. Achievements and future plans**

### **1. Achievements**

#### **A. Patents**

The application of four patents including one PCT based on the results was completed.

#### **B. Publications**

Total six papers were published in SCI journals and 15 papers were presented in the scientific meetings.

#### **C. Others**

### **2. Future plan**

A. Transfer the technology and know-hows to any industry interested in the research results

B. Foster graduate students with expertise in the areas of screening of bioactive compounds and developing health functional foods.

CONTENTS

Chapter 1. Overview of research project .....1  
 1. Objective .....1  
 2. Necessity .....1

Chapter 2. Current trend in research on glyceollins-rich soybean products .....5

Chapter 3. Methods and Results .....6  
 1. Elicitation of soy with fungi and analysis of glyceollins contents in elicited soy .....6  
 2. Effect of fermentation on glyceollin content and biological activity of soybean elicited with fungus .....11  
 3. Biological activities of glyceollins: estrogenic activity, anti-fungal and antioxidant activities, anti-inflammatory activity, anti-diabetic activity .....44  
 4. Development of fermented food products using glyceollin-containing soybean .....82

Chapter 4. Accomplishment and expected contribution .....98  
 1. Yearly plan and achievements .....98  
 2. Patents .....98  
 3. Publications .....99  
 4. Presentations .....100  
 5. Development of human resources .....101

Chapter 5. Application of research results .....102  
 1. Plan for commercialization .....102  
 2. Education, advertizement, dissemination and others .....102  
 3. Plans for patent application, publication, and others .....102  
 4. Additional research plan .....102

Chapter 6. Overseas scientific information collected during the study .....103

Chapter 7. References .....103



# 목 차

- 제 1 장 연구개발과제의 개요 .....1
  - 제 1 절 연구개발의 목적 .....1
  - 제 2 절 연구개발의 필요성 .....1
    - 1. Glyceollins의 일반적 특성 .....2
    - 2. Glyceollins의 합성 경로 및 작용기전 .....2
  
- 제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....5
  
- 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 .....6
  - 제 1 절 발효에 의한 기능성 강화 .....6
    - 1. 콩 종류별 glyceollins 생성량 분석 .....6
      - 가. 곰팡이를 이용한 glyceollins 함유 콩 생성 .....6
      - 나. HPLC 및 LC/Mass 분석조건 .....6
      - 다. HPLC를 이용한 glyceollins의 분리정제 .....9
      - 라. MPLC silica gel을 이용한 glyceollins의 분리정제 .....9
  - 제 2 절 Glyceollins 최적 생합성 조건 확립 및 발효제품개발 .....11
    - 1. 연구수행 방법 .....11
      - 가. Glyceollins 최적 유도 조건 조사 .....11
      - 나. Glyceollins 유도 두유의 발효 특성 조사 .....12
      - 다. Glyceollins 유도 두유에서 유산 발효중 glyceollins 및 다른 isoflavone 화합물 함량 변화 .....13
      - 라. Glyceollins 유도 두유의 항균력 검사 .....14
      - 마. Glyceollins 수율에 영향을 미치는 요인들 조사 .....15
      - 바. Glyceollins 생성 유도 콩을 이용한 대두 요구르트 제조 .....16
    - 2. 연구수행 결과 .....18
      - 가. Glyceollins 생성 최적 조건 조사 .....18
      - 나. Glyceollins 유도 두유의 발효 특성 조사 ..... 23
      - 다. Glyceollins 유도 두유에서 유산 발효 중 glyceollins 및 다른 isoflavone 화합물들의 함량 변화 .....28
      - 라. Glyceollins 유도 두유의 항균력 검사 .....34
      - 마. 포자의 전처리가 glyceollins 유도에 미치는 영향 .....36
      - 바. Glyceollins 생성 유도 콩을 이용한 대두 요구르트 .....39

제 3 절. Glyceollins의 기능성 평가 .....	44
1. Glyceollins의 에스트로겐 유사활성 .....	44
가. E-Screen (MCF-7 cell proliferation assay)을 이용한 glyceollin의 에스트로겐 활성 평가 .....	44
나. Yeast를 이용한 glyceollins의 estrogen활성 측정 .....	45
다. pS2 mRNA expression에 미치는 영향 .....	46
2. Glyceollins의 항곰팡이활성 .....	48
가. 항곰팡이 활성 측정 .....	48
나. 곰팡이 최소억제 농도 (minimum inhibitory concentrations, MICs) .....	48
3. Glyceollins의 항산화활성 .....	50
가. DPPH scavenging activity, 총페놀 함량 및 FRAP assay .....	50
나. Mouse 조직내 지질과산화 억제활성 .....	52
다. Hydroxy 라디칼 및 ABTS 라디칼 소거능 .....	53
라. Singlet oxygen 생성 억제 .....	54
마. ROS 억제활성 .....	55
4. Glyceollins의 항염증활성 .....	56
가. 세포생존률과 염증관련 단백질 발현 조사 .....	56
나. 염증관련 사이토카인 함량 .....	58
다. Nitric Oxide (NO) 생성량 .....	59
라. NF- $\kappa$ B activity와 발현 .....	59
마. 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)로 유도된 동물염증모델 .....	61
5. Glyceollins의 항당뇨활성 .....	63
가. Glyceollins이 당대사에 미치는 영향 - 세포수준연구 .....	63
나. 당뇨병 동물모델에서 glyceollins의 당대사 조절 기능 .....	70
다. Glyceollins강화제품(발효제품)의 인체시험을 통한 혈당 조절기능 평가 .....	76
제 4 절 Glyceollins 강화 발효식품 개발 및 산업화 .....	82
1. 곰팡이를 이용한 콩의 발아 방법 .....	82
2. 곰팡이 발효 발아콩의 2차 유산균 발효 .....	83
3. 진공건조장치의 설계 .....	84
4. 발아 공정 평가 .....	86
5. 발효공정 평가 .....	88
6. 효율적 제조공정 연구 .....	91
7. 발효환 제조 .....	93
8. 발효 환제품의 법적 유형 및 규격기준 .....	94
9. 발효두유 제조 .....	95
제 4 장  목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	98
제 1 절 연차별 연구성과 목표 달성도 .....	98
제 2 절 특허 성과 .....	98
제 3 절 논문 실적 .....	99

제 4 절 학회발표실적 .....	100
제 5 절 인력활용/양성 성과 .....	101
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 .....	102
제 1 절 실용화·산업화 계획 .....	102
제 2 절 교육·지도·홍보 등 기술확산 계획 등 .....	102
제 3 절 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등 .....	102
제 4 절 추가연구, 타연구에 활용 계획 등 .....	102
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	103
제 7 장 참고문헌 .....	103

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 목적

- 가. 대두에서 glyceollins 생산효율을 극대화 할 수 있는 방법 개발
- 나. Glyceollins 및 isoflavone 비배당체, 대사체 성분 강화 발효제품 개발
- 다. Glyceollins 함유 제품의 건강 기능성 평가 및 작용기전 규명

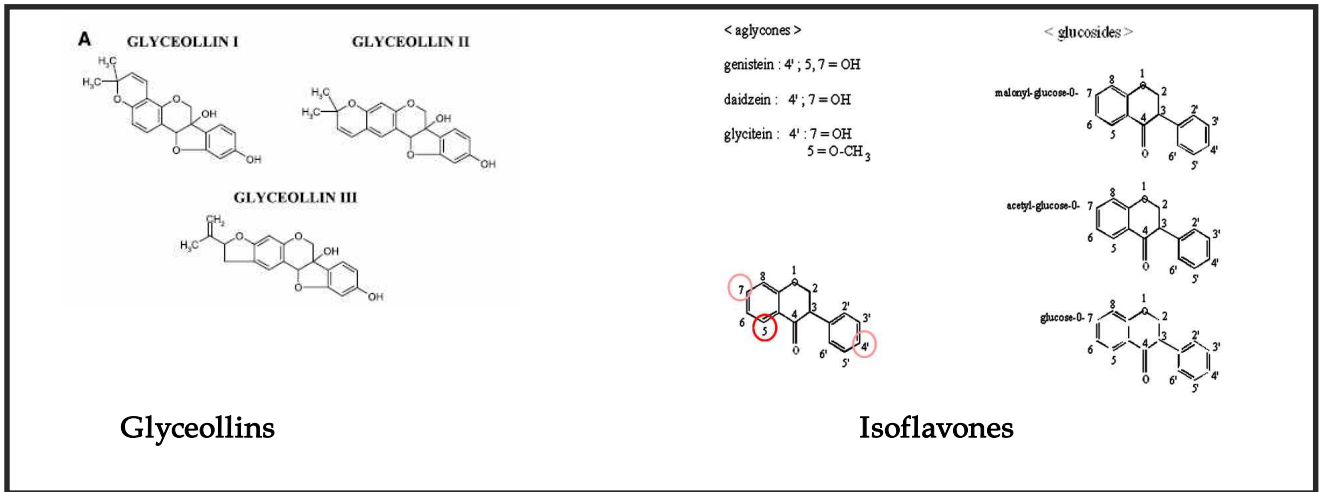
## 제 2 절 연구개발의 필요성

### 1. Glyceollins의 일반적 특성

지난 20여년 동안, 콩단백질과 isoflavones의 기능성에 대해서는 많은 연구가 진행되었으나, glyceollins에 대한 기능성 평가나 이를 활용한 제품개발은 거의 이뤄지지 않았다. 따라서 이 분야의 연구 및 개발에서 국내외적으로 선도적인 역할을 할 수 있는 좋은 기회로 여기고 본 연구를 수행하게 되었다.

글리세올린 (glyceollins)은 콩이 곰팡이 (예, *Asp sojae*)에 감염되거나 외부적 스트레스에 노출되면 이소플라본의 일종인 daidzein으로부터 합성된다. 아직 전체적인 생합성경로가 밝혀지지 않았으나, daidzein으로부터 pterocarpan과 glycinol 등을 거쳐 합성되는 것으로 보고되었으며, 관련된 효소는 대부분 cytochrome P450 계열인 것으로 추정된다. Glyceollins은 구조적으로 여성호르몬인 에스트로겐과 유사하며, 에스트로겐 저해활성 또는 에스트로겐 활성을 발휘할 것으로 추측할 수 있다. 따라서 본 연구에서도 glyceollins의 에스트로겐 유사활성을 평가하였다. 에스트로겐 활성이 나타날 경우, 갱년기 여성들에게 나타나는 증후군 (골다공증, 우울증, 전신열 등)을 완화하는 소재로 활용될 수 있을 것으로 예상된다.

Glyceollins은 구조적으로 반응성이 비교적 높은 -OH기를 가지고 있는 flavonoid 계열에 속하므로 항산화 및 항염증활성이 예상되며, 이 경우 항동맥경화 소재로 개발하는 것도 가능할 것으로 판단된다. 한편 glyceollins은 곰팡이에 노출된 콩에서 합성되는 phytoalexins의 일종이므로 다양한 병원성곰팡이에 대해서 생육을 억제할 가능성이 크다. 그밖에도 항에스트로겐 효능을 나타낼 경우, 항비만효능을 발휘할 가능성이 있으므로 관련된 효능 평가가 필요하다 (*Obesity Research* 11:477, 2003).



## 2. Glyceollins의 합성 경로 및 작용기전

Phytoalexins은 식물체가 곰팡이, 박테리아등과 같은 외부의 생명체에 공격을 받았을 때, 자체적으로 합성되는 화합물로서, 콩의 glyceollins은 phytoalexins의 일종으로서, daidzein에서 NADPH:isoflavones oxidoreductase (IFR), vestitone reductase, 6-alpha-hydroxylase, dimethylallyltransferase의 효소활성이 유도되어 이들이 순차적으로 작용하여 합성되는 것으로 보고되었다 (Boue 등, 2000). Phytoalexins은 항균 작용을 나타내지만 인체에는 무해한 것으로 알려져 있으며, 최근 항암, 항염증 효과 등이 알려지면서 신규 기능성 물질로 주목 받고 있다. 포도의 resveratrol은 대표적인 phytoalexin으로서 항산화, 항암활성외에도 인체의 sirtuin 경로를 활성화하여 칼로리 섭취를 낮추고 수명 연장 효과도 예상되어 많은 주목받고 있다 (Sinclair, 2006).

콩에 함유되어 있는 isoflavonoid인 genistein, daidzein, glycitein과 그 유도체의 기능성에 대해서는 이미 많은 연구가 되어 있으나, 콩에서 유래된 phytoalexins 들의 건강기능성에 대한 연구는 거의 이뤄지지 않아서 신규 기능성 소재로 개발 잠재성이 큰데, 특히 식용에 안전한 *Aspergillus*로 처리하여 콩에서 합성이 유도되는 glyceollins 및 KODE (oxooctadecadienoic acids)등은 (Feng 등, 2007) 기존 콩과 다른 새로운 기능성을 지닌 식품 소재로서 각종 장류가공제품, 발효두유, 소스와 같은 발효식품에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 판단된다. 예를 들어, 콩을 *Aspergillus*로 발효시켜 기능성이 높은 glyceollins을 강화한 발효식품을 개발함으로써 부가가치를 높이고, 기능성 제품의 다변화를 통하여 식품산업의 성장에 기여가 예상된다.

콩에 함유된 isoflavonoids는 glycosidic bond로 당이 결합된 형태인 genistin, daidzin, glycitin 으로 주로 존재하는데, 배당체형태는 섭취 후, 소장 점막에 존재하는 beta-glucosidase에 의해서 aglycone 형태로 바뀌기는 하나, 배당체형태로 섭취하는 것이 aglycone에 비해 기능적 효과가 낮은 것으로 알려져 있다. 또한 콩은 발효되면서 aglycone 형태의 isoflavonoid를 생성하는

것 이외에도 전혀 다른 종류의 isoflavonoid인 equol 같은 기능성이 탁월한 새로운 물질이 생성되는 것으로 알려져 있다. Glyceollins은 배당체 형태가 아니므로 생체이용률 측면에서도 콩에 이미 함유되어 있는 이소플라본들과 비교하여 우수할 것으로 예상된다.

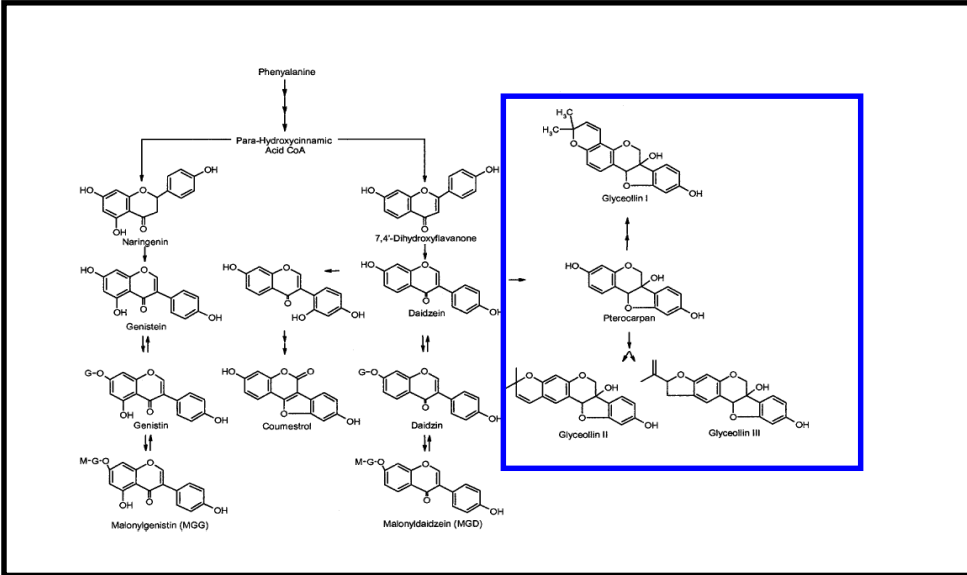


Fig. 1. Pterocarpan, glyceollins의 합성경로

콩은 발효시킨 것이 발효시키지 않은 것에 비해 다양한 물질이 생성되고, 이것이 콩의 기능성을 향상시킨다. 국내에서 시판되는 주요 콩 발효 식품으로는 청국장, 고추장, 된장 등 장류들이 대부분을 차지하고 있다. 전통 발효 식품인 고추장과 된장은 조절발효 방식이 아닌, 자연발효 방식이어서 잡균 오염에 의한 위생적인 문제가 제기되고, 또 소금이 많이 함유되어서 섭취 방법과 양이 제한적이며 발효기간도 장기간인 한계점이 있다.

전통 콩 발효식품에서 제기되는 안전성 문제를 해결한 새로운 콩 발효식품의 개발은 관련 산업의 성장에 기여할 수 있으므로 이와 같은 연구가 필요하다. 콩 발효시 주된 균은 *Bacillus subtilis*, *Bacillus natto*, *Aspergillus sojae*와 *Aspergillus oryzae* 등이므로 먼저 이들 균을 접종하여 단기 또는 장기간 발효시켜 특정 isoflavonoid를 강화시키는 기술을 확립하고, 관능적으로 우수한 가공식품으로 개발하는 것은 산업적인 기술 향상 뿐 아니라 농가소득 증대 차원에서 필요한 연구로 생각한다.

현재 glyceollins의 기능성에 대한 연구가 많지는 않지만, 다른 isoflavonoids와는 달리 낮은 농도에서도 에스트로겐 또는 항에스트로겐 활성을 나타내는 물질로 알려져 있으며, 특히, 최근 연구에서 유방암과 난소암의 발병 예방과 진행을 억제하는 효과가 있는 것으로 보고되어 있어, 항암소재로도 개발이 유망하다. 즉, 유방암, 자궁암이나 난소암에 효과적인 anti-estrogen 특성을 가진 tamoxifen과 유사한 효과를 나타내며, tamoxifen은 부작용이 심해 환자들이 순응도 (compliance)가 낮으므로 이에 대안으로 glyceollins 강화 콩의 기능성에 대한 연구도 필요하다고 판단된다.

의료보험 연합회의 통계를 보면 당뇨병의 발병률이 급증하여 1960년의 당뇨병 발병률은 0.2%에 지나지 않았던 것이 1990년에는 3%이상이 되었고, 최근 우리나라에서 당뇨병의 대부분은 40대 이후의 중년에서 발병이 급증하여 서울 지역의 40대 남자에서 당뇨병 발병률은 16%에 달한다. 우리나라에서 대다수를 차지하는 제2형 당뇨병의 병인은 인슐린 저항성과 인슐린 결핍을 들 수 있고 이 두 가지 병인은 상호 영향을 주므로, 제2형 당뇨병을 치료하기 위하여서는 인슐린 저항성을 경감시키고 인슐린 분비능을 증진시키는 방법이 가장 효과적이다.

임상적으로 사용되는 인슐린 저항성을 개선시키는 인슐린 약제는 thiazolidinediones 계열의 troglitazone, rosiglitazone, pioglitazone이 있으며 이들은 PPAR-gamma agonist로 지방조직에서 포도당의 흡수를 증가시키고, 간에서도 지방 합성을 감소시키며, 포도당 신생합성을 감소시키는 것으로 알려져 있다. 이 약제는 일본에서 식물에서 추출하여 구조를 변형시켜 만든 신약으로 최근 연구에 따르면 다양한 천연물에 그 효능은 다르지만 함유되어 있는 것으로 보고되고 있으며, 콩에 함유된 isoflavonoid의 하나인 daidzein도 moderate PPAR-gamma agonist인 것으로 알려져 있다. PPAR-gamma agonist는 매우 고가이기에 대체 약물 개발이 이루어질 경우 수입 대체 효과 및 국산 콩의 부가가치를 높일 수 있을 것으로 본다.

2007년에 미국 FDA의 허가를 받은 insulintropic agent인 exenatide의 경우 PPAR-gamma agonist와는 달리 포도당 자극에 의한 인슐린 분비능을 향상시키고, 베타세포 증식을 증가시켜 베타세포의 양을 유지시켜 당뇨병 악화를 방지한다. Exenatide는 glucagon like peptide-1 (GLP-1) receptor agonist로 도마뱀의 독에서 분리한 peptide로 GLP-1과는 달리 장시간 동안 작용하는 특징을 가지고 있다.

결과적으로 제2형 당뇨병의 개선 및 예방에 사용될 수 있는 신약들은 천연물에서 추출 분리한 것으로 천연물에 존재하는 것들이 많이 있으며 콩에도 PPAR-gamma나 GLP-1 receptor agonist로 작용하는 물질들이 있고 발효를 통해 그 효과를 더 향상시킬 수 있을 것으로 사료된다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

우리나라 주요 식량작물인 콩은 영양학적으로 단백질, 지방 함량이 높아 식품 및 사료원료로서 중요한 위치를 차지하고 있다. 우리나라 콩 재배 면적은 105,421 ha로, 전체식량작물재배면적(1,921,000 ha)의 5.5%이며, 2005년도 콩 생산량은 183,338 M/T으로 이 가운데 수입량이 1,300,00 M/T으로 자급율은 12% 정도에 불과한 실정이다 (농림부, 농림수산통계연보, 2006). 국내 콩가공제품 시장규모는 장류가 5,145억원, 두부 4,200억원, 두유 2,750억원, 콩나물이 1,175억원 등으로 총 1조3000억 시장을 형성하고 있다 (2003).

특히 콩발효제품은 크게 장류와 유산균 음료로 구분되는데, 이 가운데 장류의 총생산량은 2000년 252천톤에서 2004년 365천톤으로 증가하였고, 매출액은 동기간에 3,370억원에서 5,000억원으로 증가하여 장류산업이 증가하고 있음을 보여주고 있다. 특히, 2004년 기준으로 된장은 출하액 기준 944억, 청국장은 225억으로, 2001년에 비하여 각각 32%, 480% 성장하였다.

콩의 유산균발효제품은 콩에 대한 건강기능성이 널리 알려지면서 국내외 일부 식품회사들이 제품을 출시하였는데, 아직까지는 시장규모가 미미하지만 향후 지속적으로 수요가 증가하리라 추정된다. 특히 만성질환에 의한 사망률 증가와 건강에 대한 일반인의 관심이 높아지면서, 콩 및 콩가공제품의 소비가 증가하고 있는 추세이다. 콩은 다양한 연령층에 대하여 건강기능이 입증되고 있으나, 특히 콩의 만성질환예방효능이 가장 효과적으로 여겨지는 유·소년기에 콩 섭취를 촉진하기 위해서는 발효제품을 포함한 콩가공제품의 다양화가 필요하다.

콩에 함유된 isoflavones (genistein, daidzein)등의 경우, estrogen 활성이 높아, 자궁내막암등의 우려가 제기되고 있으나, glyceollin의 경우 isoflavones에서 유도된 화합물이지만, estrogen 활성은 거의 없으면서 estrogen receptor에 대한 친화성이 높아 endogenous estrogen의 작용을 효과적으로 차단함으로써 유방암의 발생을 억제하고, 다양한 기능성 (예를 들면, 당뇨, 비만예방효능)을 기대할 수 있어 식품 산업적으로 유용한 소재로 여겨진다.

또한 최근 장류에서 *Bacillus cereus* 에 대한 규제가 강화되어 (10,000마리이하/ml), 장류산업이 지속적으로 성장하기 위해서는 장류에서 출현율이 높은 *B. cereus* 균의 효과적인 증식억제를 위한 다각적인 방법의 모색이 필요한 실정이다. Glyceollins이 이러한 유해세균의 증식을 억제하는지 여부를 평가하는 것도 이런 측면에서 의미있는 연구로 여겨진다. 결론적으로 glyceollins 또는 이 성분이 함유된 콩을 이용한 제품개발은 거의 이뤄지고 있지 않으며, 단지 그 기능성 (항암활성, 여성호르몬 조절효능)에 대한 연구만 극히 제한적으로 이뤄져 있는 실정이다. 본 연구팀은 당 과제를 통하여 항산화, 항곰팡이, 항염증, 항암, 항동맥경화 등 다양한 기능을 발표하여 국제적으로 이 분야 연구에서 선도그룹에 진입하였다고 판단하고 있다.



# 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

## 제 1 절 발효에 의한 기능성 강화

### 1. 콩 종류별 glyceollins 생성량 분석

#### 가. 곰팡이를 이용한 glyceollins 함유 콩 생성

- (1) 곰팡이 배양: 곰팡이 *A. sojae*, *A. oryzae*는 25°C의 어두운 chamber에서 5일간 배양하였다.
- (2) 곰팡이 접종: 콩은 70% EtOH에서 3분 동안 표면 살균한 후, 탈이온수로 2분간 세척하고 5시간 (단, 아가3호 (A3)는 4시간 침지)동안 물에 침지시켰다. 1 mL의 물로 적셔진 살균된 filter paper가 깔린 petri dish (90x15 mm)에 절반으로 분할된 콩을 놓고, 곰팡이 포자 부유물(~10 µL)을 분할된 면에 접종하였다. 대조군 콩은 절반으로 분할하되 곰팡이 접종은 하지 않았다. Parafilm으로 감싼 petri dish는 3일 동안 25°C의 어두운 chamber에 보관되었다. 콩 알갱이 파쇄 정도에 따른 glyceollins 축적 정도를 평가하기 위하여 콩을 믹서기를 이용해 1/2~1/8 절편으로 분할하거나 분말화하였다.
- (3) Glyceollins 함유 콩 추출물 제조: 콩에 함유된 isoflavone들과 glyceollins은 3일간 배양된 콩 (0.5 g)을 80% ethanol (1.5 mL)에서 균질화한 후, 1시간동안 50°C에서 incubation하였다. 상온에서 식힌 후, 10분 동안 14,000x g에서 원심분리하고 상층액의 일부(100 µL)는 HPLC에 이용되었다.

#### 나. HPLC 및 LC/Mass 분석조건

사용한 HPLC 장치는 Jasco 1580 system (Japan)이었으며, 컬럼은 Gemini 5 µm C18 (Phenomenex, 150x2.0 mm, 미국)을 사용하였다. 이동상은 acetonitrile (HPLC급, Sigma, 미국)(A)과 증류수(B)이고, acetonitrile의 비율을 90%에서 65%와 90%로 순차적으로 증가토록 조절하였다. Injection volume은 10 µL를 취하였다. 전개온도는 실온이었고 유속은 분당 0.8 mL이었다. 크로마토그램은 UV/Visible 검출기(Jasco)를 이용하여 280 nm에서 분석하였다.

R.T.(min)	0	40	45	55
% A	90	65	90	90
% B	10	35	10	10

Mass spectrometer는 heated capillary electrospray interface가 내장된 ion trap을 사용하였고, Positive ion mode는 5000v sprayer needle voltage이고, drying gas temperature는 300°C로 하였다. Elution solvent system은 flow rate를 0.2 mL/min로 하여 0.1% formic acid (A)와 물(B)를 90% A~10% B 2분, 60% A~40% B 10분, 30% A~70% 20분, 10% A~90% B 25분, 10% A~90% B 25분, 10% A~90% B 30분, 90%~10% B 33분으로 설정하였다.

(1) 실험에 이용된 콩은 국내산 당해 생산품 아가3호 (A3), 아가4호 (A4), 대망2호 (D2), 일품검정 (IG)을 이용하였다 (Fig. 5). *Asp. sojae*와 *Asp. oryzae*가 glyceollins 생성유도를 위한 곰팡이로 이용되었다.

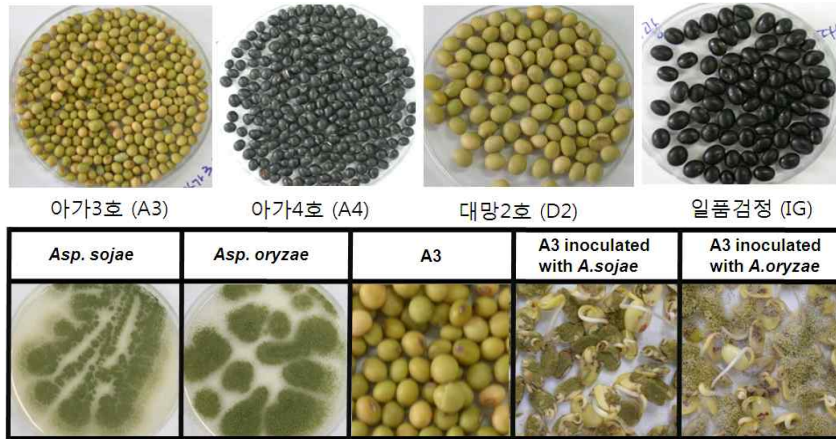


Fig. 5. Appearance of soybean samples and soybean (Aga #3 variety) inoculated with fungi.

(2) 매주에 번식하는 곰팡이인 *Asp. sojae*와 *Asp. oryzae*를 콩에 접종하여 isoflavones으로부터 glyceollins 생성유도여부를 조사한 결과, 두 곰팡이 접종이 되지 않은 군에서는 접종된 군보다 매우 낮은 함량의 glyceollins이 검출되었다. 이와 달리 곰팡이 접종된 4가지 콩품종들 모두에서 glyceollins이 다량 생성되는 것을 확인하였다.

접종에 이용된 곰팡이 가운데 *Asp. sojae*가 아가3호 (A3)에서 *Asp. oryzae*보다 1.7배 더 많은 glyceollins을 생성하는 것으로 나타났다 (Fig. 6A). Isoflavones (daidzein, genistein)함량 또한 접종한 A3 추출물에서 다량 생성되었고, 다른 콩 품종 및 접종되지 않은 콩들과는 차별되는 결과를 보여주었다 (Fig. 6B).

(3) Glyceollins의 정성, 정량 분석은 HPLC를 이용해 분석되었으며, LC/MS에 나타난 m/z 321 및 339는 각각 glyceollin I 의 (M-H<sub>2</sub>O+H<sup>+</sup>)와 (M+H)<sup>+</sup> 형태를 나타낸다 (Fig. 7).

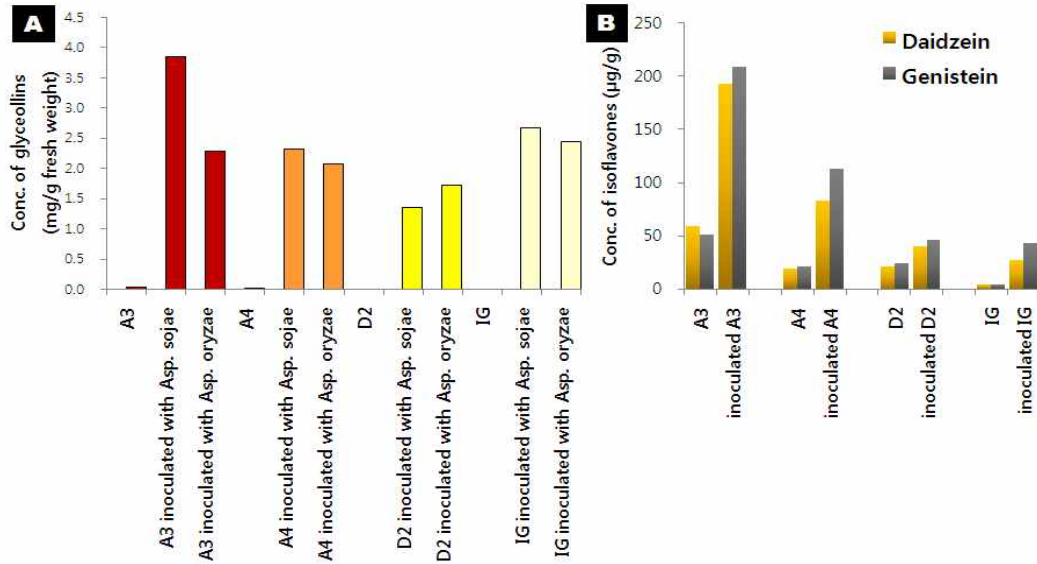


Fig. 6. Concentration of glyceollins (A) and isoflavones (B) in 4 varieties of soybeans incubated for 3 days with *Aspergillus* species.

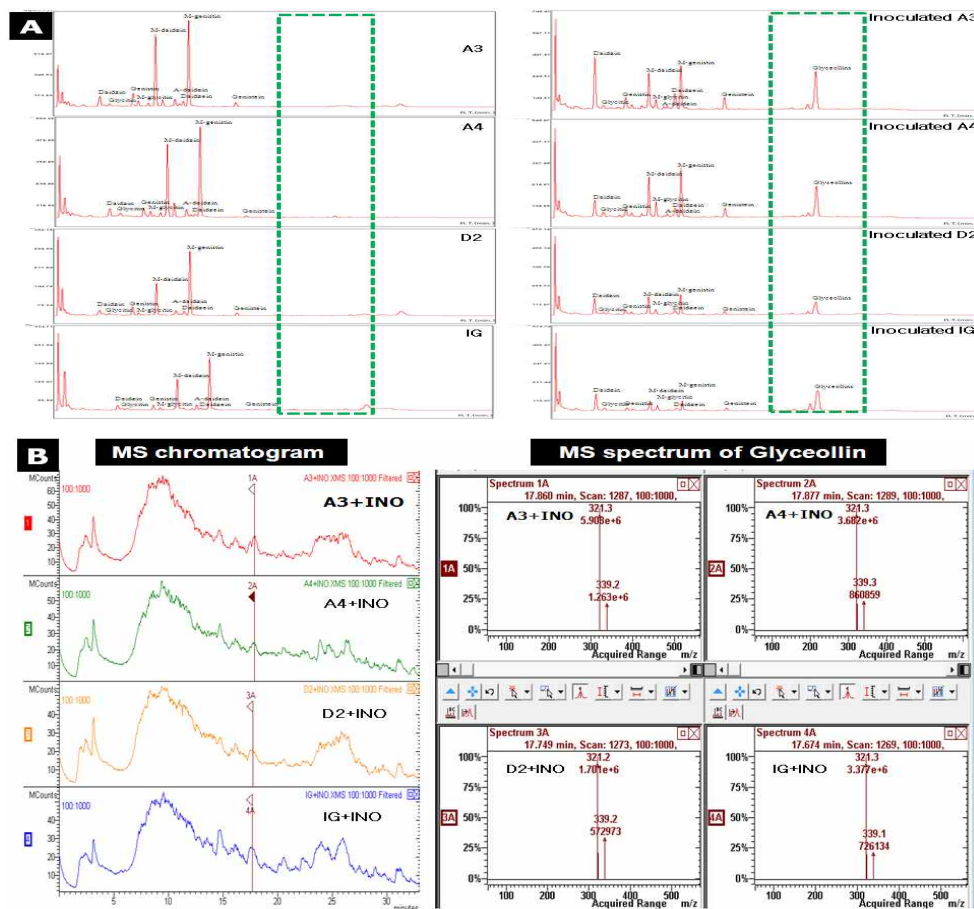


Fig. 7. Identification of glyceollins production by HPLC and electrospray ionization-mass spectrometric analysis. A: Comparison of HPLC chromatograms of non-inoculated- and inoculated A3 crude extracts. B: Positive ion ESI mass spectrum of glyceollin I isolated from A3 inoculated with *A. sojae*

다. HPLC를 이용한 glyceollins의 분리정제

(1) Semi-prep HPLC를 이용한 glyceollins의 정제

콩에 곰팡이를 접종한 후 생성되는 glyceollins을 정제하기 위하여 HPLC (Jasco 1580 system) 사용하였으며, 이때 사용한 컬럼은 Gemini 5  $\mu\text{m}$  C18 (Phenomenex, 250x10.0 mm, 미국)을 사용하였다. 이동상은 1 mM ammonium acetate와 methanol을 6:4의 비율로 흘려주고, Injection volume은 100  $\mu\text{L}$  (10 mg)로 하였다. 전개온도는 실온이었고 유속은 분당 4.5 mL/min로 하였다. 크로마토그램은 UV/Visible 검출기(Jasco)를 이용하여 280 nm에서 수집하였다. Glyceollins (I, II III)은 semi-prep HPLC를 이용해 정제하여 일부 세포실험에 사용하였다 (Fig. 8).

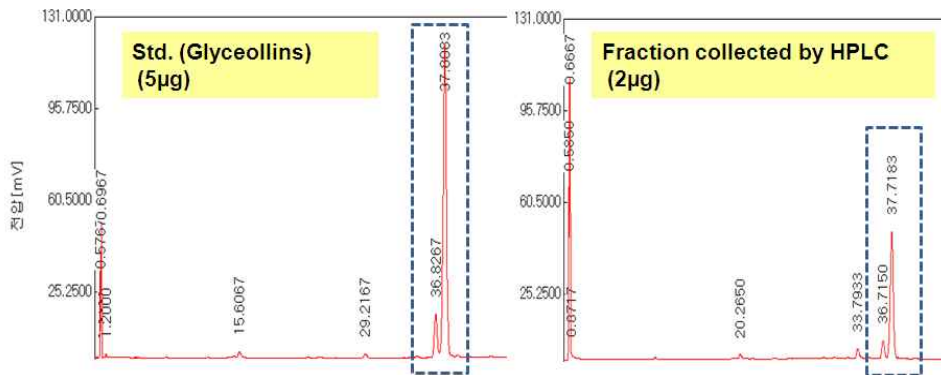
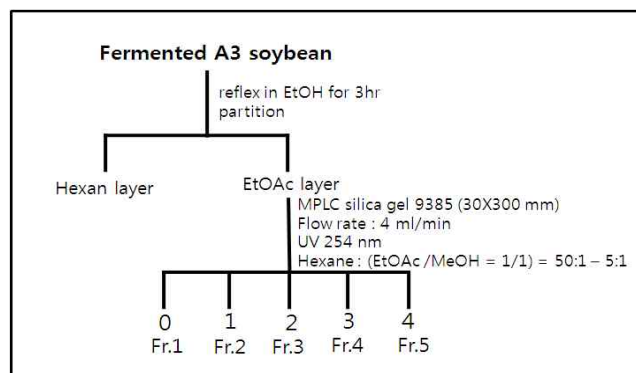


Fig. 8. HPLC chromatograms of glyceollins purified by semi-prep HPLC.

라. MPLC silica gel을 이용한 glyceollins의 분리정제

*Asp. sojae*로 접종된 A3는 scheme 1의 과정을 거쳐 glyceollins 함유 분획을 얻은 다음, 각각의 fraction들은 TLC 전개를 통해 확인하였다 (Fig. 9A). 각 분획은 다시 HPLC를 통해 glyceollins 표준품과 co-injection으로 확인되었다 (Fig. 9B).



Scheme 1. Isolation procedure of glyceollins-rich fraction.

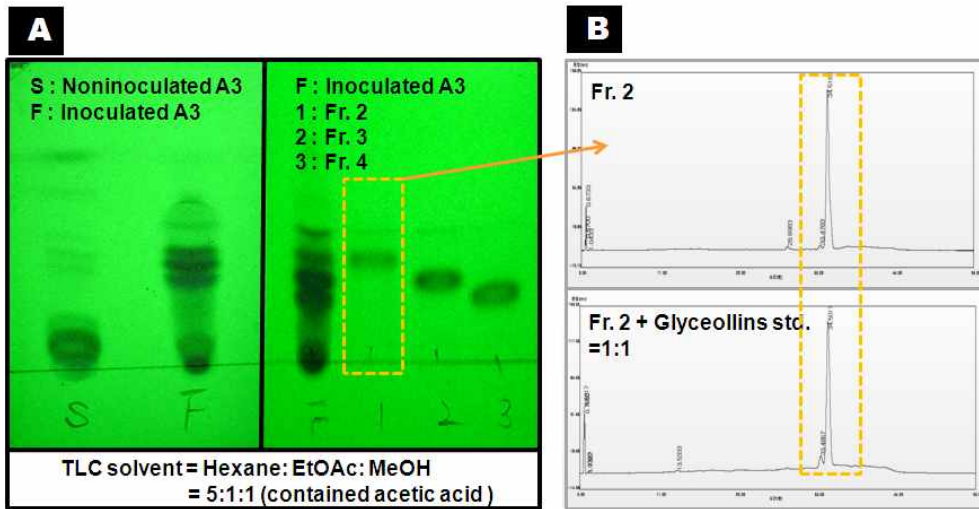


Fig. 9. TLC pattern of inoculated A3 crude extract (A) and HPLC chromatogram of fraction 2 (B).

## 제 2 절 Glyceollins 최적 생합성 조건 확립 및 발효 두유 제품개발

### 1. 연구수행 방법

#### 가. Glyceollins 최적 유도 조건 조사

##### (1) 콩 전처리

선별한 콩을 증류수에서 최소 5 시간 이상 10 시간 이내로 담가 불린다. 불린 후 콩 껍질은 손으로 제거한다. 이 과정에서 콩은 두 조각으로 쉽게 분리된다. 두 조각의 콩 표면에 곰팡이를 접종하기 전에 80% EtOH에 콩을 짧은 시간 3 회 담가 표면을 살균한다. EtOH 세척 후 증류수로 최소 3 회 이상 세척하여 EtOH를 제거한다. 멸균증류수를 넣고 5 시간 이상 (overnight) 냉장고에서 저장한 후 곰팡이를 대두 표면에 접종한다. 실험에 사용한 콩 품종은 아래 Table 2과 같다.

Table 2. Soybean varieties used for this work

품종	연도	비고
Taekwang	2007	
Aga	2007	
Chungja	2003	black bean
DaeYang	2007	
Nampoong	2007	
Sunchang	2007	

##### (2) 곰팡이 배양방법

동결 건조상태의 곰팡이를 소량의 멸균수에 녹인 후 PDA (potato dextrose agar, Difco) 평판배지 중앙에 20  $\mu$ l를 spot 한다. 25 $^{\circ}$ C 배양기 (Jeio Tech, BL-600, Low Temp incubator)에서 3 일간 배양한다. 곰팡이 포자를 대량으로 얻기 위해 계대 배양할 경우에는 멸균 나무 막대를 이용하여 포자를 모은 다음 소량의 멸균수에 녹인다. 멸균 가제를 이용하여 걸른 후 얻은 포자액을 PDA 평판배지 중앙에 20  $\mu$ l spot 한 후 25 $^{\circ}$ C에서 3 일 배양한다. 본 실험에 사용한 곰팡이 균주들을 Table 3에 표시하였고 종균센터에서 동결건조된 포자를 구입하여 사용하였다.

Table 3. Fungal species used for this work

	KACC No.	ATCC NO.
<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>oligosporus</i>	41363	22959
<i>Aspergillus awamori</i>	41844	14331
<i>Aspergillus niger</i>	40280	4695
<i>Aspergillus oryzae</i>	60166	11493
<i>Aspergillus sojae</i>	60354	9362

(3) Glyceollins- rich 콩 시료 제조

물에 불린 콩 200 g 당 fungal suspension 15 ml를 가해서 골고루 섞는다. 곰팡이 포자 농도는  $1 \times 10^8$ /mL suspension (conidia solution)이다. 콩을 petri dish에 깔고 곰팡이 포자를 콩에 접종한 다음 parafilm으로 petri dish를 느슨하게 막고 incubator (25°C)에서 3일간 어두운 조건하에서 배양하여서 glyceollins 생성을 유도한다. 발아 기간 중 콩의 수분이 충분히 유지되는 게 중요하기 때문에 콩 아래에 멸균한 filter paper를 여러 장 깔고 멸균수를 충분히 적셔준다. 배양 중 공기가 있는 것이 곰팡이 균사 증식에는 유리하나 반면 오염 우려도 있어서 parafilm을 느슨하게 씌운 후 배양하였다.

(4) Glyceollins HPLC 분석 조건

3일간 발아한 콩을 증류수로 세척하여 포자를 씻어내고 80% EtOH을 가한 후 homogenizer를 사용하여 콩을 균질화시킨다. 50°C 수조에서 1시간 연속적으로 진탕하여 추출한 다음 14,000 x g에서 10분간 원심분리한다. 0.45 µm PVDF filter로 여과한 여액을 HPLC로 분석한다. HPLC 분석 조건은 Table 4과 같다.

Table 4. Quantification of Glyceollins with HPLC

	Water (A)	Acetonitrile (B)
0 - 1 min	100 %	0 %
1 - 17 min	55 %	45 %
17 - 27 min	10 %	90 %
27 - 33 min	10 %	90 %
33 - 35 min	100 %	0 %
35 - 40 min	100 %	0 %

\* X bridge C18 3.5 µm, 3.6 mm x 150 mm (285nm)

나. Glyceollins 유도 두유의 발효 특성 조사

대두, 발아 대두, 그리고 곰팡이 접종 후 발아시킨 (glyceollin 생성을 유도한) 대두로부터 각각 두유를 아래와 같이 제조하였다. 이들 두유를 각각 M1, M2, M3로 표기하며 각각에 유산균을 접종하여 유산 발효를 진행하면서 시간대별로 생균수, 산도 및 pH를 측정하였다.

### (1) 3 종류 두유 제조

태광콩 (2009년도 수확, 경남 농업기술원, 진주)을 흐르는 물에 세척한 후 70% EtOH에 2분 담가 표면살균 처리하고 3차 증류수로 3번 씻어서 EtOH을 제거하였다. 콩 무게 2배인 멸균수에 10시간 담가 팽윤시킨 콩을 무균대에서 껍질을 제거하고 반으로 자른다. 하루 동안 냉장 보관하였다. 이후 바로 두유를 제조한 것이 M1 시료이다. 대두의 발아를 위해 지름 150 mm의 petridish (Cat. no. DH.SP20151)에 filter paper (현대, 150mm)를 깔고 멸균수 20 ml로 적신 후 그 위에 대두를 놓고 25°C에서 3일 배양하였다. 여기서 얻은 두유가 M2이다. Glyceollins 유도 대두의 경우 *Rhizopus oligosporus* ATCC 22959 포자를 ( $1 \times 10^8$  spores/ml) 대두 200 g당 15 ml를 가해서 골고루 섞어준 후 filter paper (현대, 150mm) 5장이 깔린 petri dish에 깔고 parafilm으로 느슨하게 막아 25°C에서 3일간 배양하였다. 이후 얻은 두유가 M3이다. 한편 *R. oligosporus*를 PDA (Difco) 평판배지 중앙에 20  $\mu$ l spot 하여 25°C 배양기 (Jeio Tech, BL-600)에서 3일 배양한 후 수거한 균사체로부터 회수한 포자를 접종하였다.

M1, M2, M3 3 종류의 두유 제조를 위해 대두 중량의 8배인 800 ml 끓는 증류수를 가하여 Waring blender로 5분 (저속 3분, 고속 2분) 마쇄하였다. Cheese cloth을 이용하여 분쇄한 대두를 거른 후 원심분리 (5,000 rpm, 5분) 하고 이후 121°C에서 15분 멸균 후 4°C 냉장 보관하였다.

### (2) 두유 유산발효

*Streptococcus infantarius* 12, *Weissella* sp. 4, *Lactobacillus paraplantarum* KM 6, *Streptococcus salivarius* 27을 두유에 접종하여 유산발효를 일으켰다. MRS 배지에 도말하여 24시간 배양 후 얻은 단일 균락을 MRS 액체배지에 접종하여 12시간 배양 (2회 반복) 한 유산균을 두유 100 ml에 2% (v/v) 접종하였다. 여러 번 섞어서 완전히 혼합한 다음 정확히 13 ml씩 conical tube에 옮겨 담은 후 37°C에서 48시간 두어 발효를 일으켰다.

### (3) 두유 발효액 특성 조사

발효 시간대 (0, 6, 12, 18, 24, 36, 48 h) 별로 회수한 두유들을 완전히 균질화 시킨 후 생균수, pH, TA를 측정하였다. 생균수는 pour plate method을 이용하여 측정하였다. 균질화된 시료 100  $\mu$ l를 취하여 0.1% peptone 수로 단계 희석한 후 희석액 100  $\mu$ l를 plate에 분주하고 1.5% agar가 포함된 MRS 배지를 부어 굳혔다 (3 반복). 37°C에서 24시간 배양 후 균락수를 계수하였다. pH는 두유 5 ml를 취하여 pH meter (DMS)를 이용하여 측정하였다. 산도 측정은 발효 두유 5 g을 비커에 취하여 3차 증류수 20 ml와 지시약 (1% phenolphthalein, Sigma) 250  $\mu$ l 넣은 후 0.1% NaOH (Mereck KGaA) 용액으로 열린 분홍색이 30초간 지속 될 때를 종말점으로 잡았다. 종말점까지 소비된 NaOH 용액의 양을 이용하여 산도를 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{산도} = \text{소비된 NaOH ml수} \times 0.9 / \text{두유의 중량 (g)}$$

다. Glyceollins 유도 두유에서 유산 발효 중 glyceollins 및 다른 isoflavone 화합물들의 함량 변화



유산발효중 시간대별로 glyceollins과 다른 isoflavone 화합물들의 함량 변화를 HPLC로 측정하였다. 생균수, 산도 및 pH 변화도 다시 측정하였다.

발효 6, 12, 18, 24 시간대 시료를 -70°C에서 동결 시킨 후 동결건조하여 HPLC 분석 시료로 사용하였다. 대조구로는 발효하지 않은 두유 (M1)와 발아 두유(M2)를 사용하였다. 동결건조된 두유 샘플 (1.5 g)에 80% ethanol (4.5 mL)을 첨가한 후 잘 섞고 1 시간동안 50°C 수조에 서 진탕하였다. 상온에서 식힌 후 14,000 x g에서 10분간 원심분리하고 필터로 여과한 후 일부 (100 µl)를 HPLC로 분석하였다.

HPLC 기기는 Jasco 1580 system (Japan)이며, 컬럼은 Gemini 5 µm C<sub>18</sub> (Phenomenex, 150x2.0 mm, 미국)을 사용하였다. 이동상은 acetonitrile (HPLC급, Sigma, 미국)과 증류수이고, acetonitrile의 비율을 90%에서 65%와 90%로 순차적으로 증가토록 조절하였다. Injection volume은 10 µl를 취하였다. 전개온도는 실온이었고 유속은 분당 0.8 ml이었다. 크로마토그램은 UV/Visible 검출기 (Jasco)를 이용하여 280 nm에서 분석하였다. Gradient 조건은 아래의 Table 5와 같다.

Table 5. Gradient conditions used for the HPLC analysis

R.T. (min)	0	40	45	55
% A	90	65	90	90
% B	10	35	10	10

#### 라. Glyceollins 유도 두유의 항균력 검사

##### (1) 두유의 항세균 활성 조사

Glyceollins 생성을 유도한 대두로부터 얻은 추출물의 항균력 검사를 위해 아래의 Table 6에 수록된 균주들을 사용하였다. 대조구로는 대두, 발아만 시킨 대두를 사용하였다. 동결 건조한 대두 (Tae-Kwang, 2009) 시료들을 Warning blender를 사용하여 분말화한 후 각 시료 10 g 씩을 멸균수 40 ml에 현탁 (vortex, 30분)한다. 수조 (37°C, 132 rpm)에서 1시간 진탕하여 추출한 다음 원심분리 (13,000 x g) 20 분 한 뒤, PVDF membrane filter (0.45µm)로 여과하여 얻은 상등액을 취하여 항균력 측정 시료로 사용하였다. Paper disc법을 이용하여 생육저해 효과를 측정하였고 indicator 균을 1x10<sup>5</sup> CFU가 되도록 희석하여 사용하였다. 평판배지 위에 paper disc을 올려놓은 후 추출물 20, 40, 60 µl씩을 spot한다. Indicator 균주 100 µl를 0.7% top agar 10 ml와 혼합하여 평판배지 위에 overlay한다. 37°C incubator에서 24 시간 배양한 뒤 저해 여부를 관찰하였다.

Table 6. Bacterial strains used in this work

<i>Salmonella typhimurium</i> TA98
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19111
<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Escherichia coli</i> 0157 : H7 ATCC 43894
<i>Bacillus coagulans</i> ATCC 7050
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 21415
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 23856
<i>Bacillus circulans</i> ATCC 4513
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10004
<i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC 33679
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212
<i>Lactobacillus pentosus</i> ATCC 8041
<i>Lactobacillus fermentum</i> ATCC 14931

(2) 두유의 항진균력 조사

앞서 얻은 대두 추출물들의 항진균력을 paper disc법을 이용하여 측정하였다. 균기전의 PDA배지 14 ml 에 indicator 인 각 곰팡이 포자액 ( $1 \times 10^5$  spore/ml) 100  $\mu$ l를 섞은 후 petri dish에 붓는다. 균으면 그 위에 paper disc을 올려놓은 후 대두 추출물 시료를 20, 40, 60  $\mu$ l 씩 spot 하였다. 대조구로는 대두와 발아대두 추출물들을 사용하고 25°C incubator에서 24시간 동안 배양한 뒤 관찰하였다.

마. Glyceollins 수율에 영향을 미치는 요인들 조사

대두에서 glyceollins 유도가 곰팡이 포자를 대두에 접종한 경우에만 가능한지 아니면 곰팡이 포자 추출물 접종으로도 유도 가능한지를 알아보려고 하였다. 이를 위해 곰팡이를 한천배지에서 배양하여 얻은 포자를 증류수에 현탁한 다음 물리적 방법들로 처리 (bead beater, sonication, autoclave) 하여 포자의 사멸을 유도하였다. 얻어진 추출물 (혹은 사멸액)을 대두에 접종하여 발아를 유도한 후 glyceollins 생성 여부 및 생성량을 조사하였다. 대조구로는 전 처리하지 않은 포자를 대두에 접종하여 발아한 시료를 사용하였다. 국내산 대두 가격 상승으로 인해 국내산 대두와 비교할 때 상대적으로 저렴한 수입산 (중국산) 대두를 동일한 조건으로 처리한 후 glyceollin 유도 여부를 조사하였다.

(1) 콩 전처리

선별한 국내산 콩(2009년 수확, 경남 농업기술원, 태광)과 중국산 콩(2010년 수입, 진주 자유시장, 2011년 3월 2일 구입)을 흐르는 물로 세척한 후 70% EtOH에 2분간 담가 표면살균 처리하고 증류수로 3번 씻어 EtOH을 제거하였다. 콩 무게 2 배의 증류수에 15 시간 팽윤시킨 콩의 껍질을 제거하고 반으로 자른 후 하룻밤 저온에서 보관하였다.

(2) 곰팡이 배양방법

실험실내 보관중인 *Rhizopus oligosporus* ATCC 22959 Stock 을 PDA 평판배지 중앙에 20  $\mu$ l spot하여 25°C 배양기 (Jelo Tech, BL-600, Low Temp, incubator)에서 3~4일간 배양하였다.

### (3) 콩 시료 제조 방법

곰팡이 포자를 각각 sonication (Bandelin Sonopuls, HD2070 model) 10분, bead beater (Mibi beadbeater, Biospec Products) 5분 처리한 후 autoclave (Daeil Eng. Autoclave DAC 822)를 실시한 포자와 autoclave만 실시한 포자, 전처리 하지 않은 포자 총 4종류 시료를 준비하였다. 물에 불린 콩 20 g 당 fungal suspension 16ml를 가하여 골고루 섞어준다. 이때 곰팡이 포자 농도는  $2.5 \times 10^8$ /mL suspension (conidia solution)이다. 25°C에서 3 일간 배양하여 Glyceollin 생성을 유도한 다음 glyceollin 분석을 하였다.

### 바. Glyceollins 생성 유도 콩을 이용한 대두 요구르트 제조

#### (1) 3 종류의 두유 제조

국내산 대두 (2009년 수확, 경남 농업기술원, 태광, 4°C 보관) 500 g 을 사용해 앞서 언급한 방법으로 바로 두유를 제조한 것이 M1 시료이다. 대두를 25°C에서 3 일간 발아시킨 후 얻은 두유가 M2이다. *Rhizopus oligosporus* ATCC 22959 포자를 ( $1 \times 10^8$  spores/ml) 대두 500g 당 100 ml를 가해서 골고루 섞어준 후 25°C에서 3일간 배양한 대두에서 얻은 두유가 M3이다. 한편 *R. oligosporus*를 potato dextrose agar(MBcell, Korea) 평판배지 중앙에 20  $\mu$ l spot 하여 25°C 배양기 (Jelo Tech, BL-600) 에서 3일간 배양한 후 수거한 균사체로부터 회수한 포자를 접종하였다.

#### (2) 3 종류 두유의 유산 발효 특성 조사

3가지 두유(M1, M2, M3) 각 200g에 유산균 *Streptococcus infantarius* 12(실험실 자체 분리,  $\alpha$ -Galactosidase 고 역가 균주)와 *Weissella* sp. 4(실험실 자체 분리,  $\beta$ -Glucosidase 고 역가 균주)를 각각 OD<sub>600nm</sub>가 1.5가 되는 수준까지 배양한 배양액을 1: 5(v/v)의 비율로 혼합한 혼합균주 배양액을 각 두유에 2% 접종하였다. 균질하게 잘 혼합한 다음 conical tube에 각각 13 ml 씩 정확히 옮겨 담은 후 뚜껑을 막고 37°C에서 12시간 발효시켰다. 발효 시간대(0, 3, 6, 9, 12 h) 별로 회수한 발효 두유를 완전히 균질화 시킨 후 생균수, pH, 산도를 앞과 동일한 방법으로 측정하였다.

#### (3) 3 종류 발효 두유 관능 검사

##### 가) 관능 검사 시료 준비

3 종류 두유(M1, M2, M3)를 5 L 용기에 각각 1.8L씩 담은 후 *Streptococcus infantarius* 12와 *Weissella* sp. 4를 각각 OD<sub>600nm</sub>가 1.5가 되는 수준까지 배양한 배양액을 1: 5(v/v)의 비율로 혼합한 혼합균주 배양액을 각 두유의 2% 수준(36 ml, v/v)이 되도록 접종하였다. 균질하게 되도록 잘 혼합한 후 뚜껑을 막고 37°C에서 12시간 발효시켰다. 발효가 종료된 시료를 Mixer에서 약 30초 동안 blending 시켜 형성된 curd가 균질하게 되도록 만든 후 냉장보관 하였다.

##### 나) 발효 두유의 첨가물 농도 결정

제조 후 냉장 보관된 발효 요구르트를 잘 혼합해 균질화시킨 후 종이컵에 60g 씩 담았다. 첨가시 최종 설탕(삼양, 큐원, 흰설탕)농도가 약 6%(w/v)와 소금(백설, 명품천일염)농도 약

0.8%(w/v), 설탕농도 약 8%(w/v), 설탕농도 약 8%(w/v)와 소금농도 약 0.8%(w/v) 되도록 만든 발효 요구르트와 첨가시 딸기잼(효성, 진양딸기잼)농도가 약 15%(w/w), 20%(w/w)가 되도록 만든 발효 요구르트를 제조 하였다. 균질하게 잘 혼합된 첨가 발효 요구르트를 시판 요구르트 맛에 익숙한 실험실 panel 요원 4명(남 2명, 여 2명)을 대상으로 단맛을 검사한 결과 설탕농도 약 8%와 소금농도 약 0.8%, 딸기잼 농도 약 20% 첨가량을 가장 선호하는 것으로 나타나 이를 관능검사를 위해 제조된 발효 요구르트들을 위한 첨가량으로 결정하였다. 설탕과 소금은 물에 녹인 상태로 첨가하였다. 첨가물을 잘 혼합한 발효 요구르트를 냉장 보관하고 관능검사 직전에 다시 혼합하여 관능검사 대상자에게 제공되었다.

#### 다) 관능검사(소비자 기호도 검사)

경상대학교 대학생 32명(남 11명, 여 21명)을 대상으로 색(Color), 향(Flavor), 맛(Taste), 종합적 기호도(Overall Preference) 항목에 대하여 9점법 (9 point scale)으로 작성된 검사지를 이용하여 소비자 검사법을 실시하였다. 점수에 있어서 1점은 평가되는 시료에 대한 기호도가 대단히 싫은 정도를 나타내며 9점은 기호도가 대단히 좋은 정도를 나타내는 것으로 하였다. 관능검사자 32명에 대한 기본 정보는 Table 7에 요약하였다.

Table 7. Information on consumer

Panel			Average consumption of yogurts (month)					Most critical quality			
mal	fem	mean	1-3	5-8	10-15	20-30	other	taste	color	fla	functi
e	ale	age								vor	onalit
											y
11	21	23세	7	11	9	3	2	20	2	3	7
total 32			21.8%	34.3%	28.1%	9.3%	6.2%	62.5%	6.3%	9.4%	21.8%

#### (4) 발효 대두유의 저장성

제조된 발효 대두유들을 일정 온도에서 장기간 저장하면서 저장중 유산균 발효제품들에 서의 주요 품질 요소인 산도, pH, 생균수 변화를 조사하였다.

3종류의 두유(M1, M2, M3)를 앞의 실험방법과 동일하게 제조한 후 혼합균주 (*S. infantarius* 12: *Weissella* sp. 4=1:5) 배양액을 시료의 2% 수준으로 접종하여 37°C에서 12시간 발효시켰다. 발효 후 Incubator에서 꺼낸 시료를 두 그룹으로 나누어 각각 4°C와 25°C 배양기에 저장하면서 3일 간격으로 21동안 산도, pH, 생균수 변화를 관찰하였다.

## 2. 연구수행 결과

### 가. Glyceollins 생성 최적 조건 조사

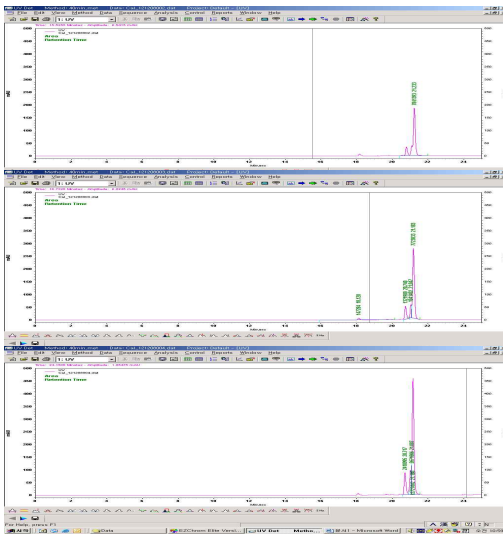
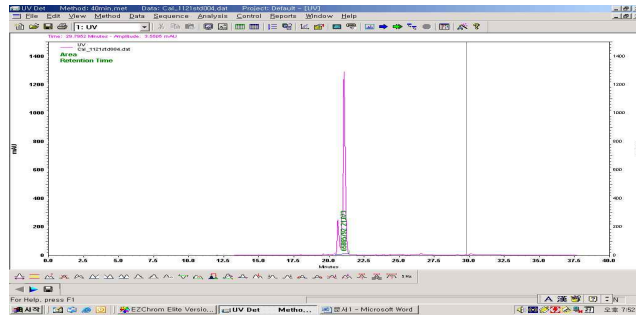
#### (1) Glyceollin HPLC 분석 조건 확립

Glyceollin 정량을 위한 HPLC 분석조건을 조사하였다. 아래 Fig. 10은 타 실험실에서 분양받은 정제된 glyceollin standard에 대한 HPLC chromatogram이다. Glyceollin I, II, 및 III는 한 개 peak로 나오고 실험조건하에서는 retention time이 21.5 min이다. 농도별로 injection을 달리하여 chromatogram을 얻고 peak area에서 glyceollin 농도를 추정하는데 사용할수 있는 standard curve를 얻었다 (Fig 11).

#### (2) 곰팡이 종류별 glyceollins 유도 효과 비교

본 실험에 사용한 곰팡이 균주별로 glyceollin 유도 정도는 차이가 상당하였다. Fig. 12를 보면 순창콩에 대해 각각 *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* (이하 *R. oligosporus*)와 *A. niger*를 감염시켜 glyceollin 생성을 유도한 시료 분석 결과이다. *A. niger*보다는 *R. oligosporus* 감염시 훨씬 더 많은 glyceollin이 유도됨을 알 수 있다. 이는 기존에 보고된 결과들과도 일치한다 (Feng *et al.* 2007). Fig. 13는 순창에서 얻은 콩 (Soon-Chang)과 아가 그리고 태광 품종에 대해 곰팡이들을 달리하여 감염시킨 후 생성된 glyceollin 함량 측정결과이다. 아가와 태광 품종의 경우 *R. oligosporus*가 가장 많이 glyceollin을 유도하며 다음으로 *A. sojae*가 효과적이었다. 이처럼 기존에 보고된 결과들과 동일한 결과를 본 연구에서도 확인하였다 (Boue 등, 2000). 순창콩의 경우에는 *A. sojae*가 가장 높았고 다음이 *R. oligosporus*였다. 순창 장류연구소를 통해 얻은 콩을 순창콩이라 했지만 이는 실제 품종명이 아니라 해당지역에서 생산된 콩을 나타내기에 실제 품종별 차이를 보는 실험에서는 태광이나 아가 품종을 우선 고려하였다. 이상 결과들을 보면 *R. oligosporus*가 glyceollin 유도 효과면에서 가장 우수하고 다음으로 *A. sojae*가 우수하였다. 나머지 *A. oryzae*나 *A. niger*, *A. awamori* 들은 그 효과가 비슷하였다.

### HPLC Diagram of Glyceollin Standard (100 ug/100 ul)



### HPLC Diagram of Glyceollin Standard

10 ug/ul

20 ug/ul

30 ug/ul

Fig. 10. HPLC chromatogram of purified glyceollins

### Standard Curve of Glyceollins from HPLC

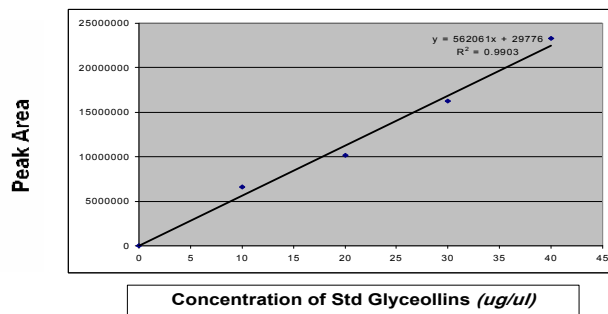


Fig. 11. A standard curve showing the relationship between peak area and glyceollin concentrations.

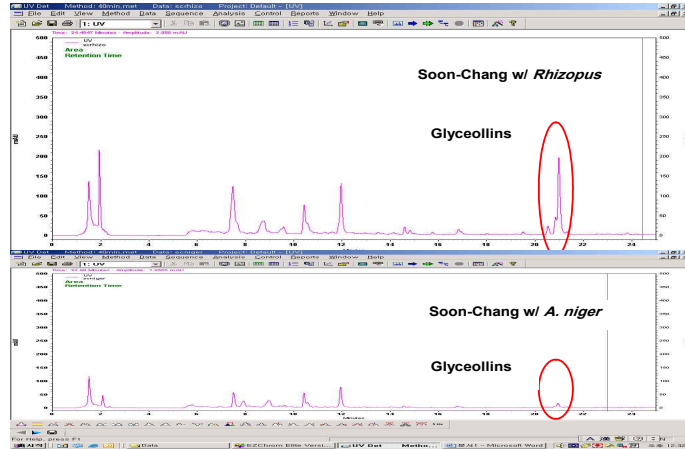
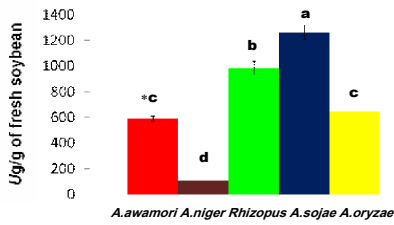


Fig. 12. The comparison of two fungal species for the induction of glyceollins. Soon-chang soybean was either inoculated with *R. oligosporus* or *A. niger*.

A.

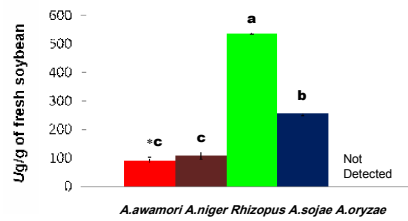
Production of Glyceollins from Various Fungi (Soon-Chang)



\* Values sharing the same letter are not significantly different (p<0.05)

B.

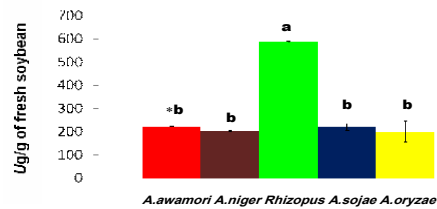
Production of Glyceollins from Various Fungi (Aga)



\* Values sharing the same letter are not significantly different (p<0.05)

C.

Production of Glyceollins from Various Fungi (Tae-Kwang)



\* Values sharing the same letter are not significantly different (p<0.05)

Fig. 13. Production of glyceollins in soybean challenged by various fungal species. A. Soon-Chang soybean B. Aga variety C. Tae-Kwang variety.

(3) 콩 품종별 glyceollins 유도효과

Glyceollin 유도효과가 가장 우수한 *R. oligosporus*를 여러 품종에 동일하게 접종한 후 생성된 glyceollins 함량을 측정한 결과를 Fig. 14에 나타내었다. 순창이 가장 높은 것으로 나타났고 다음이 남풍과 태광 그리고 아가 품종이었다. 청자콩과 대양콩은 다소 낮았으나 큰 차이는 없었다. 순창콩이 가장 우수했지만 앞서 언급한대로 동일 품종이 아닌 여러 품종의 콩들이 섞였을 개연성이 높아서 이 부분은 좀 더 확인이 필요하다. 단일 품종이 확인된 것 들 중에서는 태광이나 남풍이 적당한 것으로 생각된다. 대량으로 콩에 곰팡이를 접종하여 glyceollin을 생산할 경우에는 콩 품종별 glyceollins 유도 효율과 함께 품종별 생산 단가가 중요하게 고려되어야 한다. 이런 점에서 소량 생산되어 단가가 비싼 아가나 청자콩 보다는 널리 재배되는 태광이 사 용에 유리한 것으로 생각된다.

Production of Glyceollins from Different Varieties of Soybean (Inoculated w/ *Rhizopus*)

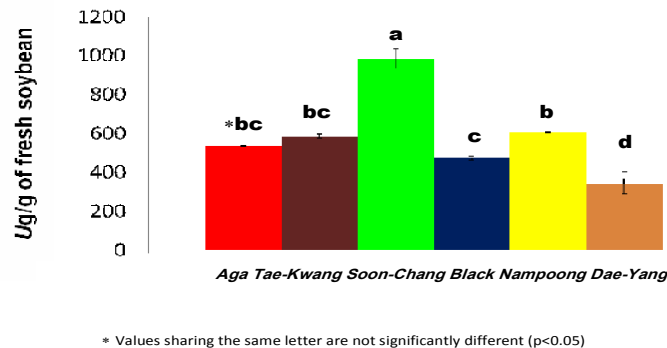


Fig. 14. Production of glyceollins in different varieties of soybean challenged by *R. oligosporus*.

(4) 접종방식에 따른 glyceollins 유도 효율 비교

콩을 달리 자른 후에 곰팡이를 접종하고 어느 시료에서 glyceollins 생성이 가장 효과적인 지를 조사하였다. 콩을 두 쪽으로 분리한 것, 칼을 이용하여 분리된 반쪽을 몇 토막낸 것 (chopped) 그리고 균질기를 이용하여 더 파쇄하여 균질화한 것 (homogenized) 3 종류의 콩 시료들을 조사하고 그 결과를 Fig. 15에 표시하였다. 두 종의 곰팡이 모두에서 반쪽으로 분리한 것이 가장 우수하였고 chopped 시료나 균질화된 시료는 거의 glyceollins이 검출되지 않았다. 이 결과는 glyceollins 생성을 위해서는 콩이 충분히 생합성을 위한 활성을 지니고 있어야 한다는 점을 보여준다. 여러 토막을 내거나 균질화할 경우 콩 조직들이 파괴되고 결과적으로 glyceollins 생성능력도 소실되는 것으로 생각된다. 이상 결과를 보면 콩을 불린 후 두쪽으로 분리한 후 포자를 접종하는 것이 가장 효과적인 glyceollins 유도방법으로 생각된다. (5)

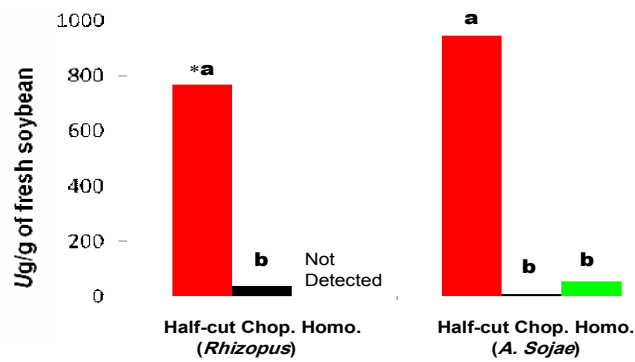
MGG와 MGD 생성

콩 isoflavone들중 한 종류인 malonyl type 화합물들이 곰팡이 접종후 배양중 생성된다. 곰팡이 접종 후 3일간 배양중 이들의 생성을 측정한 결과를 Fig. 16,17 및 18에 표시하였다. Fig. 16에는 MGG를 Fig. 17에는 MGD 그리고 Fig. 9에는 MGG+MGD를 함께 측정한 결과를



표기하였다. 순창콩이 가장 우수하였고 다음으로는 남풍 콩이 우수하였다. 둘 간의 차이가 크지 않아서 남풍콩을 사용할 경우 MGG나 MGD 생산에서 유리할 것으로 생각된다. 아가와 대양이 다음이고 태광 품종이 생성량이 가장 적었다. Glyceollin 생성은 태광도 우수했기에 MGG나 MGD 생성이 이처럼 태광 품종에서 작은 이유로는 아마도 isoflavone 상당수가 glyceollin 생성으로 진행되고 그로인해 malonyl 화합물은 적게 생성되기 때문인 것으로 추정된다. 혹은 콩 품종별로 malonyl 화합물로 전환되는 효율에서 차이를 보이기 때문일 수도 있다.

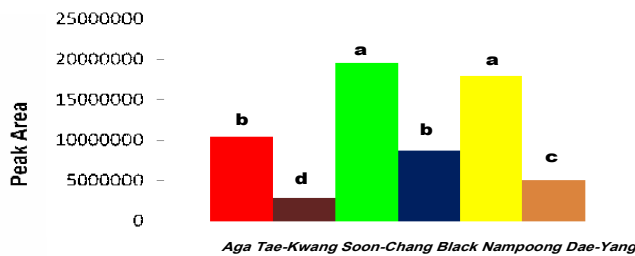
### The Amount of Glyceollin Produced from differently-Cut Soon-Chang Soybean



\* Values in the same Fungi, sharing the same letter are not significantly different (p<0.05)

Fig. 15. Production of glyceollins in soybeans differently prepared.

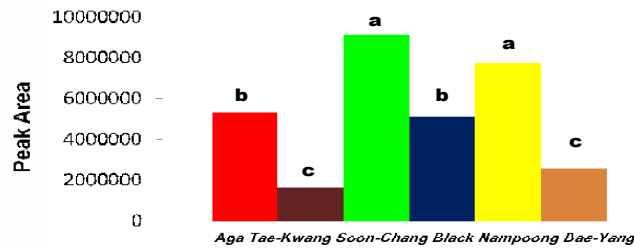
### The Amount of MGG (Malonylgenistin) from Different Varieties of Soybean



\* Values sharing the same letter are not significantly different (p<0.05)

Fig. 16. Production of MGG (malonylgenistin) from different varieties of soybean.

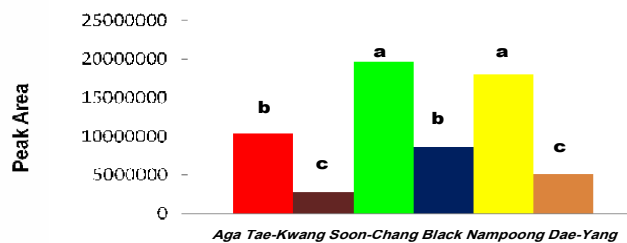
### The Amount of MGD (Malonyldaidzin) from Different Varieties of Soybean



\* Values sharing the same letter are not significantly different (p<0.05)

Fig. 17. Production of MGD (malonyldaidzin) from different varieties of soybean.

### The Amount of MGD+MGG from Different Varieties of Soybean



\* Values sharing the same letter are not significantly different (p<0.05)

Fig. 18. Production of MGD (malonyldaidzin) + MGG (malonylgenistin) from different varieties of soybean.

#### 나. Glyceollins 유도 두유의 발효 특성 조사

발효 시간대(0, 6, 12, 18, 24, 36, 48 h) 별로 회수한 3가지 두유(M1, M2, M3)에 유산균 (*Streptococcus infantarius* 12, *Weissella* sp. 4, *Lactobacillus paraplantarum* KM 6, *Streptococcus salivarius* 27)을 접종하여 유산발효를 일으킨 후 생균수, pH, 산도를 측정하였다 (Fig. 19, 20, 21). 모든 두유들이 6시간 이후에는 특유의 신 냄새와 함께 curd가 생성되어 유동성이 작고 점성이 높은 발효 대두유로 되었으며 M2 (발아 두유)와 M3 (glyceollin 유도 두유)에 비해 M1 (전처리하지 않은 두유)이 가장 단단한 curd를 생성하였다.

##### (1) 생균수 측정

생균수는 발효 6시간까지 급격히 증가한 후 그 이후 서서히 감소하는 경향을 보였다. 3 종류 시료에서 공통적으로 *Weissella* sp. 4의 생균수가 가장 낮았고 *L. paraplantarum* KM6이 가장 높았다. 이로써 유산균 종류에 따라 두유에서 생육 정도에 차이가 있음을 알 수 있

다. 3 종 두유 공통으로 접종 6시간에 최고 ( $3-4 \times 10^9$  CFU/mL)에 달하며 이후 완만히 감소함을 알 수 있다. M1에서 *L. paraplantarum* KM6의 감소가 가장 완만함도 알 수 있다.

## (2) pH 변화

3 종류 두유의 유산발효 초기 pH는 6.2-6.5 이지만 발효 6 시간 동안 pH는 급격히 떨어지고 이후 48 시간까지 일정 수준으로 유지 되었다. 발효 6 시간부터 48 시간 동안 M1은 약 pH 4.5, M2는 pH 4.8 그리고 M3는 pH 5.3을 유지하였다.

## (3) 산도 변화

초기 산도는 약 0.23에서 시작하여 M2 와 M3 두유는 발효 6 시간 이후 0.35-0.38로 유지되었으며, M1 두유는 발효 12 시간 이후 0.5-0.6을 유지하였다. *L. paraplantarum* KM 6 를 접종한 두유들이 pH 강하와 마찬가지로 산도가 다른 균주들 보다 더 높았다. M1 두유의 산도가 0.6-1.0 사이로 가장 컸고 M3 가 가장 낮았다. 이는 M3 두유의 경우 glyceollin 생성으로 인해 유산균 생육이 억제되었을 가능성을 보여준다. M2 두유 역시 glyceollin은 아니지만 발아 과정중 유산균 생육을 억제하는 물질들이 생성되었을 가능성이 있다.

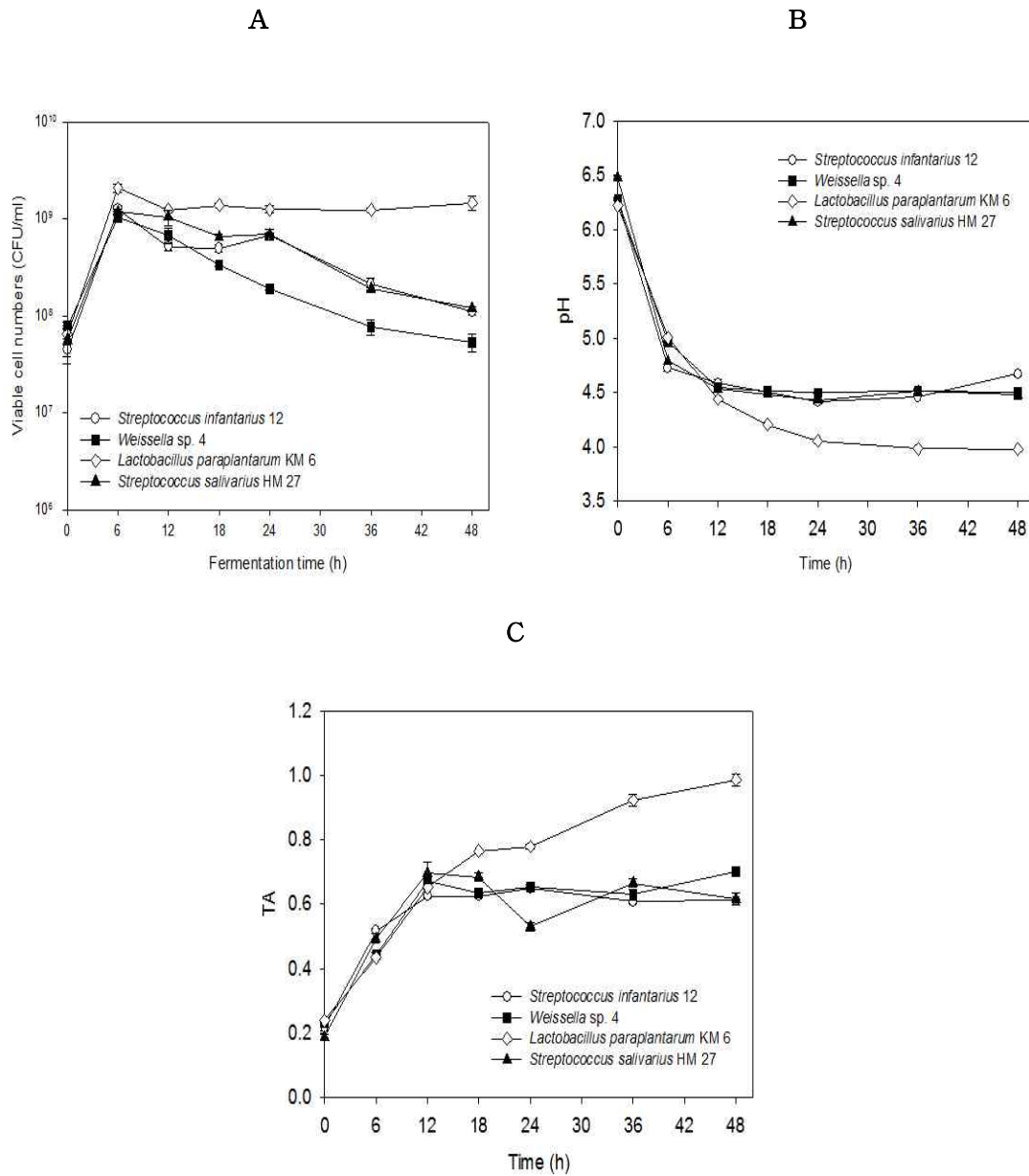


Fig. 19. Growth, pH and TA changes during lactic fermentation of soy milk (M1). Viable cell counts (A), pH (B), and TA (C). -○-, *Streptococcus infantarius* 12 ; -■-, *Weissella* sp. 4 ; -◇- *Lactobacillus paraplantarum* KM6 ; -▲- *Streptococcus salivarius* HM27.

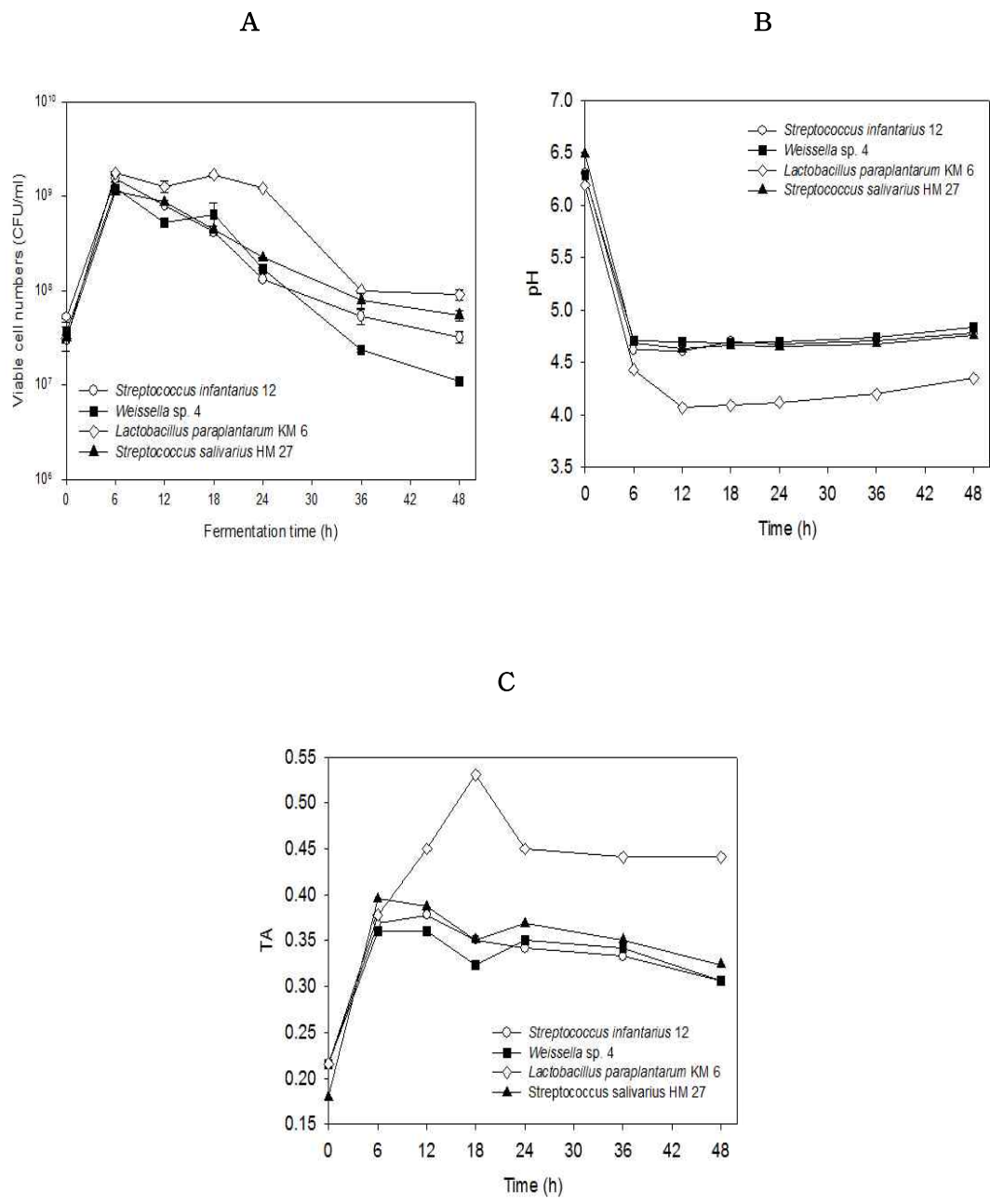


Fig. 20. Growth, pH and TA changes during lactic fermentation of soy milk (M2). Viable cell counts (A), pH (B), and TA (C). -○-, *Streptococcus infantarius* 12 ; -■-, *Weissella* sp. 4 ; -◇- *Lactobacillus paraplantarum* KM6 ; -▲- *Streptococcus salivarius* HM27.

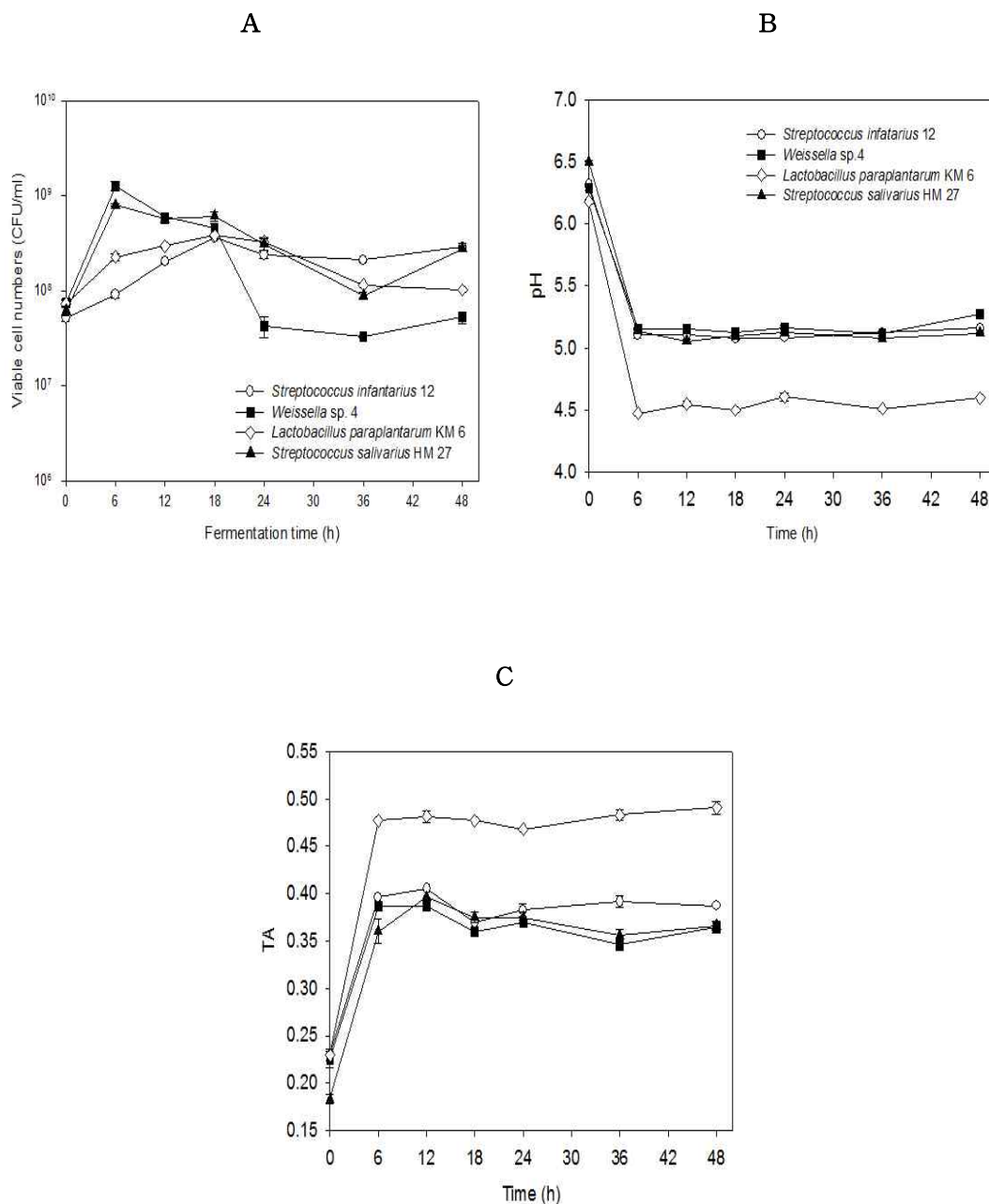


Fig. 21. Growth, pH and TA changes during lactic fermentation of germinated and fungal infected soy milk (M3). Viable cell counts (A), pH (B), and TA (C). -○-, *Streptococcus infantarius* 12; -■-, *Weissella* sp. 4; -◇-, *Lactobacillus paraplantarum* KM6; -▲-, *Streptococcus salivarius* HM27.

다. Glyceollins 유도 두유에서 유산 발효 중 glyceollins 및 다른 isoflavone 화합물들의 함량 변화

(1) 유산 발효 중 생육특성 조사

3가지 두유(M1, M2, M3)의 초기 pH와 산도를 측정된 결과 pH 6.5-6.6 그리고 산도는 약 0.18-0.12 수준을 나타내었다 (Table 8).

Table 8. pH and TA values of three different soy samples (unfermented)

대두유(M1)		발아대두유 (M2)		glyceollins 유도 대두유 (M3)	
pH	TA	pH	TA	pH	TA
6.64 ± 0	0.12 ± 0	6.57 ± 0.01	0.12 ± 0	6.54 ± 0.01	0.18 ± 0

Glyceollins 유도 두유에서 유산 발효 중 생육특성을 살펴보면 *S. salivarius*와 *L. paraplantarum*의 생균수가 가장 높았고 발효 초기  $2 \times 10^7$ 에서 12 시간까지 급격히 약  $10^9$  까지 증가한 후 일정하게 유지되다가 24 시간 이후로 완만히 감소하였다. 반면 *Weissella* sp. 4를 접종한 경우 가장 낮았다. 초기 생균수  $2 \times 10^7$ 에서 12 시간까지  $7 \times 10^8$ 까지 증가한 후 그 이후부터 생균수가 감소하여 48시간에는  $2 \times 10^6$  로 감소하였다. pH는 발효 초기 6시간 동안 급격히 감소하다가 이후 일정 수준으로 유지됨을 볼 수 있다. *L. paraplantarum* KM6는 약 pH 4.5, *S. salivarius* HM27은 pH 4.8 다른 두균은 pH 5.0 부근을 48 시간 동안 유지하였다. 산도 역시 *L. paraplantarum* KM6를 접종한 두유가 다른 균주들을 접종한 두유에 비해 높게 나왔다. 발효 48 시간에 *L. paraplantarum* 두유는 약 0.63 그리고 다른 균주들을 접종한 두유들은 0.4-0.45 정도였다 (Fig. 22). 발효 12시간대에서도 *L. paraplantarum* KM6 접종한 두유는 0.54를 나타내나 나머지 유산균 접종 두유들은 0.4 이하이고 특히 *S. salivarius* HM27 접종 두유는 0.3 부근으로 가장 낮았다.

앞서 소규모로 제조한 두유에서 얻은 결과들과 기본적으로 같은 결과들을 확인하였다. 즉 *L. paraplantarum* KM6 균주가 glyceollins 생성을 유도한 두유에서 가장 잘 자랐고 그 결과 pH 강하 정도나 산 생성 정도가 가장 우수하였다. 발효두유의 산도 0.6과 pH 4.5는 일반 우유 발효유 제품들의 수치들과 비슷한 수준이며 원료로 glyceollins 생성 두유를 사용할 경우에도 비슷한 정도의 산 생성을 예상할 수 있음을 보여준다. 결론적으로 glyceollin 생성유도 두유를 유산발효할 경우 종균의 선택에 신중해야하고 종균에 따라 발효제품의 품질에 큰 차이를 예상할 수 있겠다.

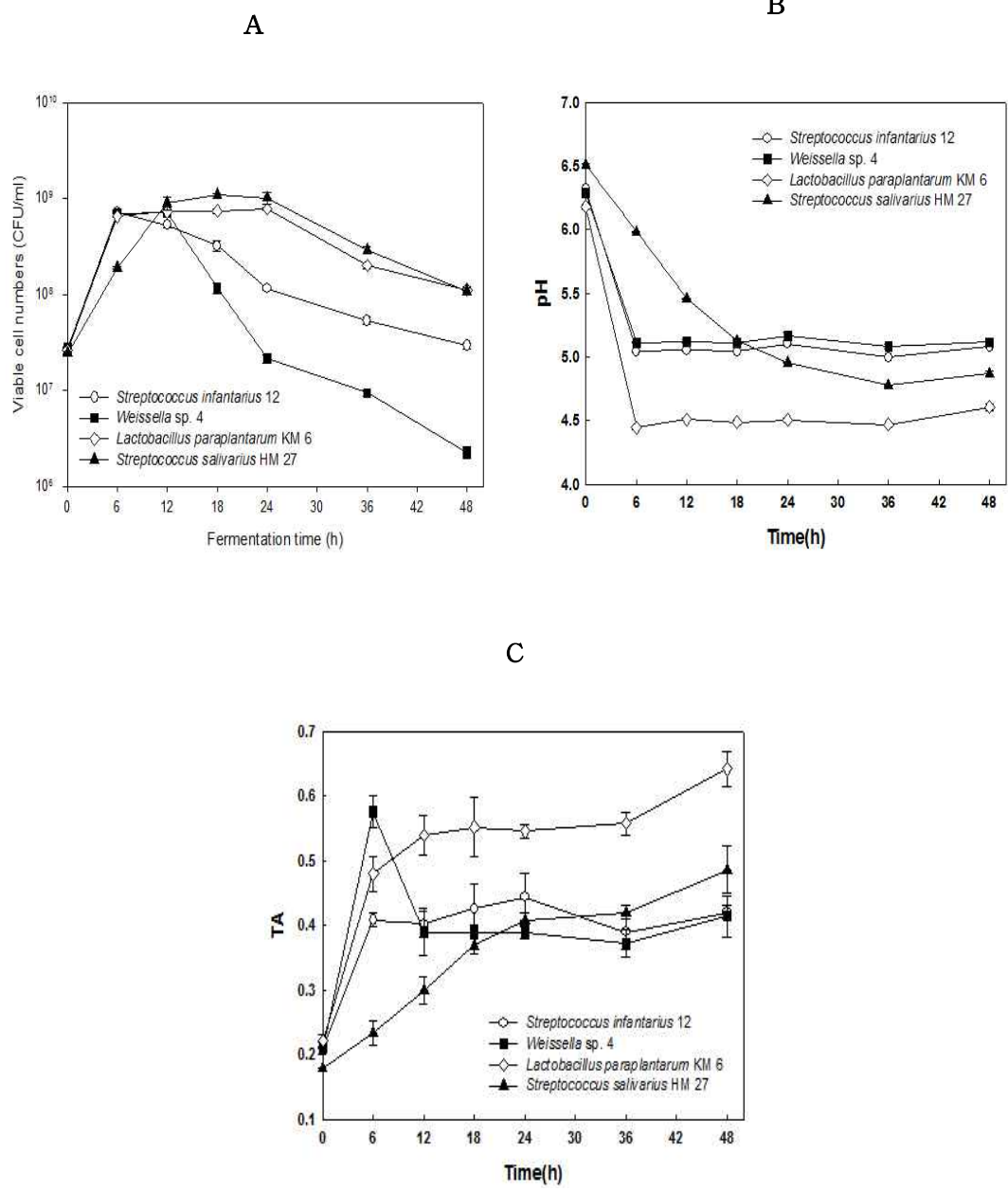


Fig 22. Growth, pH and TA changes of soy milk (M3, glyceollin induced) during lactic fermentation. Viable cell counts (A), pH (B), and TA (C). -○-, *Streptococcus infantarius* 12; -■-, *Weissella* sp. 4; -◇- *Lactobacillus paraplantarum* KM6; -▲- *Streptococcus salivarius* HM27.



## (2) Glyceollins 및 다른 isoflavones 화합물 함량 변화

3 종류 두유의 HPLC 분석 결과 공통적으로 배당체인 daidzin, glycitin, genistin 함량이 높았고 특히 genistin 함량이 높게 나왔다. M1 (843±40)과 M2 (834±89)에서 높게 나왔고 M3는 이보다는 다소 적었다. 반면에 daidzein, genistein 및 glycitein 등 비배당체들은 적은 양만 존재하였다. 곰팡이를 접종한 두유 (M3)의 glyceollins 함량은 218±8 µg/g 이었으나 M1과 M2 두유에서는 glyceollins 이 검출되지 않았다 (Table 19).

*L. paraplantarum* KM6를 접종한 M3 두유는 발효 6 시간내에 상당량의 배당체가 비배당체로 전환되었고 (Table 10), 특히 genistin은 6 시간 이후 급격히 감소하여 검출이 힘들었다. Genistein은 genistin 감소와 상관없이 역시 6 시간 이후 감소했다가 다시 증가하였고, daidzein은 daidzin 감소와 비례하여 6 시간 이후 크게 증가한 것을 알 수 있다. 보다 구체적으로 이들 화합물들의 변화를 관찰 조사할 필요가 있다. 한편 glyceollins 함량은 발효를 통해 크게 변화는 없으나 6 시간대에 증가하고 이후 서서히 감소하나 24 시간대에도 처음보다는 약간 증가하였다.

*Weissella* sp. 4를 접종한 두유도 전반적으로 비슷한 경향을 보였다. Glyceollins 함량은 발효 초기부터 지속적으로 증가하여 24 시간에 가장 높은 수준을 보였다 (293±25 µg/g). *L. paraplantarum* 발효와는 달리 malonyl-daidzin 함량이 계속 증가하는 점도 차이점이다. 균주의 특성에 따라 isoflavonoid 화합물들의 조성은 차이가 있음을 알수있다 (Table 11).

*Streptococcus salivarius* HM27을 접종한 두유에서는 시간이 경과해도 배당체들이 감소하지 않고 오히려 증가하였다. 이는 비배당체로의 전환이 이루어지지 않음을 나타내고 실제 비배당체 함량 증가도 관찰되지 않아서 *S. salivarius* HM27은 두유 발효에 적합지 않다. Glyceollins 함량은 6 시간 이후에도 줄지 않고 약간 증가한 수준으로 유지되었다 (Table 12).

*Streptococcus infantantarius* 12를 접종한 경우는 앞의 두 균주와 비슷한 결과를 보였다. 즉 배당체들의 비배당체로의 전환은 잘 이루어지며 특히 M-genistin과 A-genistin 증가가 현저하다. Glyceollin 함량은 일정하게 유지되나 다른 균주와 달리 12 시간대가 가장 높았다 (Table 13).

Glyceollins 함량만 고려할 경우에는 *L. paraplantarum* 이나 *Weissella* sp. 4를 접종하는 것이 유리해 보이거나 다른 isoflavonoid 화합물들과 함께 고려할 경우에는 신중하게 균주를 선정할 필요성이 있다. 특히 glyceollins 생성량과 최대 생성시간대 그리고 관련하여 daidzein 함량 변화가 미치는 영향에 대해서는 좀더 자세한 연구가 필요하다. 대표적인 glyceollins HPLC chromatogram들을 Fig. 23와 24에 나타내었다.

Table 9. HPLC profiles of isoflavones with non-fermented soymilk.

Isoflavones	$\mu\text{g/g}$ of soybean (0 hr)		
	S1	S2	S3
Daidzin	561 $\pm$ 111	605 $\pm$ 159	532 $\pm$ 21
Glycitin	138 $\pm$ 36	100 $\pm$ 12	76 $\pm$ 2
Genistin	843 $\pm$ 40	834 $\pm$ 89	648 $\pm$ 23
M-Daidzin	18 $\pm$ 7	15 $\pm$ 1	31 $\pm$ 7
M-Glycitin	72 $\pm$ 11	28 $\pm$ 2	10 $\pm$ 4
M-Genistin	1 $\pm$ 0	63 $\pm$ 9	6 $\pm$ 0
A-daidzin	28 $\pm$ 3	44 $\pm$ 3	26 $\pm$ 1
A-Glycitin	4 $\pm$ 2	5 $\pm$ 1	58 $\pm$ 3
A-Genistin	8 $\pm$ 1	7 $\pm$ 1	8 $\pm$ 1
Daidzein	14 $\pm$ 0	4 $\pm$ 0	18 $\pm$ 1
Glycitein	8 $\pm$ 6	18 $\pm$ 2	14 $\pm$ 1
Genistein	17 $\pm$ 2	17 $\pm$ 3	34 $\pm$ 3
Glyceollins	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	218 $\pm$ 8

Table 10. Isoflavonoid contents during fermentation of glyceollins induced soymilk (M3) with *L. paraplantarum* KM 6

Isoflavones	$\mu\text{g/g}$ of soybean				
	0 hr	6 hr	12 hr	18 hr	24 hr
Daidzin	532 $\pm$ 21	69 $\pm$ 1	19 $\pm$ 1	19 $\pm$ 0	18 $\pm$
Glycitin	76 $\pm$ 2	69 $\pm$ 5	107 $\pm$ 4	116 $\pm$ 2	125 $\pm$
Genistin	648 $\pm$ 23	12 $\pm$ 4	11 $\pm$	5 $\pm$ 2	5 $\pm$ 2
M-Daidzin	31 $\pm$ 7	141 $\pm$ 1	104 $\pm$ 46	3 $\pm$ 0	5 $\pm$ 1
M-Glycitin	10 $\pm$ 4	24 $\pm$ 2	18 $\pm$ 4	32 $\pm$ 0	5 $\pm$ 1
M-Genistin	6 $\pm$ 0	95 $\pm$ 4	10 $\pm$ 0	199 $\pm$ 3	190 $\pm$ 8
A-daidzin	26 $\pm$ 1	31 $\pm$ 0	36 $\pm$ 0	15 $\pm$ 0	39 $\pm$ 2
A-Glycitin	58 $\pm$ 3	44 $\pm$ 1	15 $\pm$ 0	4 $\pm$ 0	14 $\pm$ 0
A-Genistin	8 $\pm$ 1	13 $\pm$ 9	2 $\pm$ 0	4 $\pm$ 1	4 $\pm$ 0
Daidzein	18 $\pm$ 1	275 $\pm$ 7	281 $\pm$ 10	289 $\pm$ 4	275 $\pm$ 4
Glycitein	14 $\pm$ 1	41 $\pm$ 6	94 $\pm$ 4	7 $\pm$ 0	85 $\pm$ 4
Genistein	34 $\pm$ 3	7 $\pm$ 5	3 $\pm$ 1	20 $\pm$ 2	18 $\pm$ 1
Glyceollins	218 $\pm$ 8	301 $\pm$ 10	287 $\pm$ 14	277 $\pm$ 6	259 $\pm$ 3

Table 11. Isoflavonoid contents during fermentation of glyceollins induced soy milk (M3) with *Weissella* sp. 4

Isoflavones	ug/g of soybean				
	0 hr	6 hr	12 hr	18 hr	24 hr
Daidzin	532±21	64±3	66±2	66±1	65±4
Glycitin	76±2	8±2	6±0	7±3	8±2
Genistin	648±23	8±3	11±2	13±2	13±1
M-Daidzin	31±7	170±13	176±9	175±4	189±8
M-Glycitin	10±4	28±1	28±1	26±1	29±2
M-Genistin	6±0	5±0	5±0	7±6	38±19
A-daidzin	26±1	42±4	12±10	17±0	19±4
A-Glycitin	58±3	6±1	13±12	12±7	15±3
A-Genistin	8±1	24±2	17±4	23±2	25±1
Daidzein	18±1	283±20	312±13	298±6	79±9
Glycitein	14±1	65±11	84±3	78±1	2±2
Genistein	34±3	25±2	25±2	10±2	12±1
Glyceollins	218±8	285±18	262±5	286±8	293±25

Table 12. Isoflavonoid contents during fermentation of glyceollin induced soy milk (M3) with *Streptococcus salivarius* 27.

Isoflavones	ug/g of soybean				
	0 hr	6 hr	12 hr	18 hr	24 hr
Daidzin	532±21	578±33	554±13	569±5	582±15
Glycitin	76±2	144±9	73±2	74±1	74±3
Genistin	648±23	696±36	693±8	716±5	760±19
M-Daidzin	31±7	16±1	19±7	23±4	23±7
M-Glycitin	10±4	25±2	21±2	21±1	21±2
M-Genistin	6±0	7±2	4±1	16±0	12±2
A-daidzin	26±1	48±3	45±1	45±0	42±1
A-Glycitin	58±3	3±2	3±1	2±2	4±2
A-Genistin	8±1	11±0	10±	10±0	12±1
Daidzein	18±1	18±3	18±1	20±1	22±4
Glycitein	14±1	1±1	11±0	7±0	9±4
Genistein	34±3	25±16	39±1	40±0	29±7
Glyceollins	218±8	257±9	243±2	249±5	251±14

Table 13. Isoflavonoid contents during fermentation of glyceollin induced soymilk (M3) with *Streptococcus infantantarius* 12.

Isoflavones	ug/g of soybean				
	0 hr	6 hr	12 hr	18 hr	24 hr
Daidzin	532±21	35±4	7±0	6±3	3±1
Glycitin	76±2	32±1	4±	36±1	35±0
Genistin	648±23	3±0	3±1	3±0	3±0
M-Daidzin	31±7	51±3	36±7	28±1	33±5
M-Glycitin	10±4	9±1	11±0	10±0	12±1
M-Genistin	6±0	120±15	154±5	150±5	143±8
A-daidzin	26±1	24±2	26±0	23±1	22±1
A-Glycitin	58±3	2±0	2±0	2±0	2±0
A-Genistin	8±1	549±29	621±8	591±11	608±9
Daidzein	18±1	228±9	253±5	244±7	240±1
Glycitein	14±1	17±1	19±1	17±0	15±1
Genistein	34±3	12±1	14±1	12±1	8±4
Glyceollins	218±8	221±11	255±4	241±0	235±4

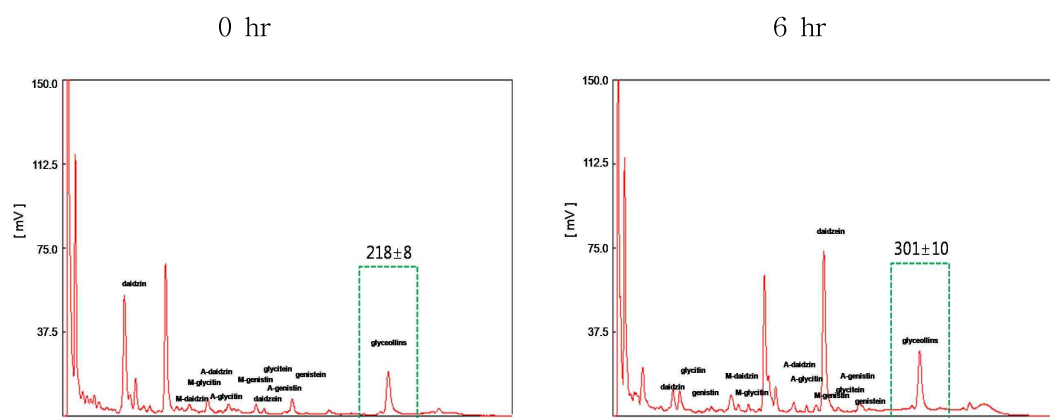


Fig. 23. HPLC chromatogram of glycerollins induced soy milk fermented with *L. paraplantarum* KM 6 (ug/g of soybean)

0 hr 6 hr

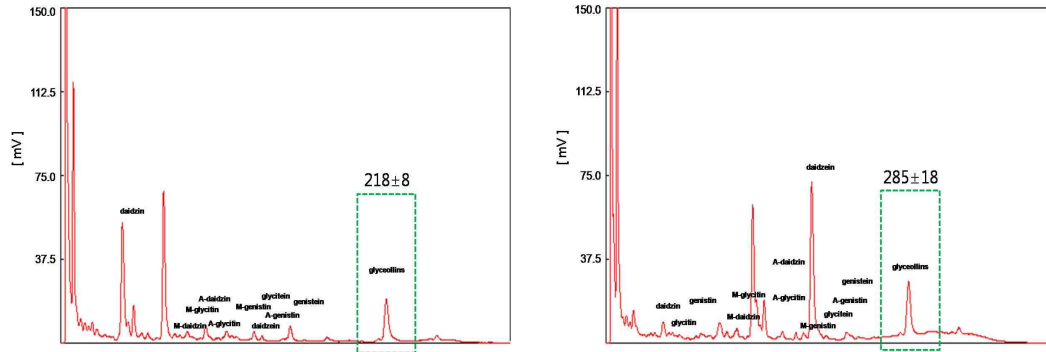


Fig. 24. HPLC chromatograms of soymilk fermented with *Weissella* sp. 4

라. Glyceollins 유도 두유의 항균력 검사

(1) 두유의 항세균 활성

Glyceollins 유도 대두로부터 얻은 추출물의 항균력을 측정 하였다. 대조구로 대두, 발아만 시킨 대두를 사용하였다. 조사결과 세균들 중에서는 *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* 0157:H7, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*에 대하여 항균력을 보였다 (Table 14).

Table 14. Antibacterial activities of glyceollins induced soybean extracts. *Rhizopus oligosporus* was used as an elicitor.

	Soybean soaked in the water (Sample 1)			Soybean germinated (Sample 2)			Fungal-infected (Sample 3)		
	1-1	1-2	1-3	2-1	2-2	2-3	3-1	3-2	3-3
<i>Salmonella typhimurium</i> TA98	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19111	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	++
<i>Escherichia coli</i> 0157 : H7 ATCC 43894	-	-	-	-	-	-	+	+	++
<i>Bacillus coagulans</i> ATCC 7050	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 21415	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 23856	-	-	-	-	-	-	+	+	++
<i>Bacillus circulans</i> ATCC 4513	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10004	-	-	-	-	-	-	++	++	++
<i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC 33679	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lb. pentosus</i> ATCC 8041	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lb. fermentum</i> ATCC 14931	-	-	-	-	-	-	-	-	-

\*-1 : sample 0.2g/ml spot      \*-2 : sample 0.4g/ml      \*-3 : sample 0.6g/ml

inhibition zone size : +, 0.5 to 2mm; ++2 to 4mm ; more than 4mm

The value equals to (diameter of an inhibition zone in mm-diameter of a colony)/2

## (2) 두유의 항진균력 조사

위에서 얻은 대두 추출물들의 항진균력을 측정한 결과는 Fig. 25과 같다. 결과를 보면 glyceollin 생성이 유도된 대두 추출물은 *Aspergillus awamori*, *Aspergillus* sp.에 저해 효과를 보였고 *Penicillium* sp. 도 미약하나마 저해하였다.

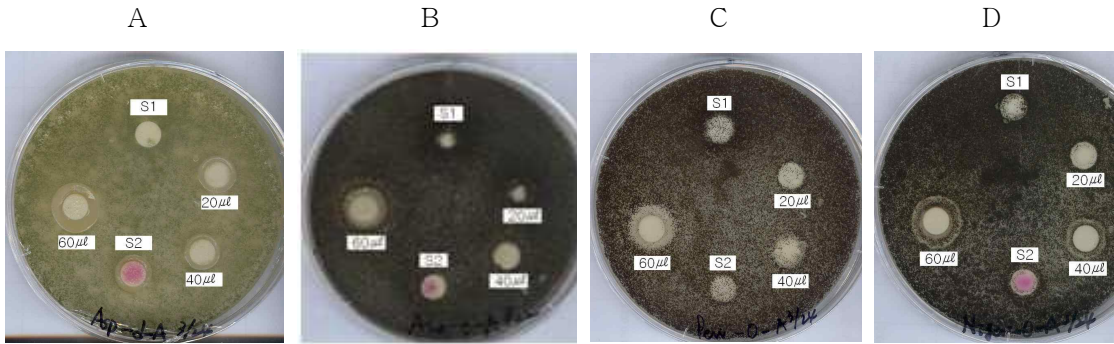


Fig. 25. Antifungal activities of soybean extracts glyceollins induced by *Rhizopus oligosporus*.

A, *Aspergillus* sp; B, *Aspergillus awamori*; C, *Penicillium* sp.; D, *Aspergillus niger*

마. 포자의 전처리가 Glyceollins 유도에 미치는 영향

(1) 국내산과 수입산 대두 이용한 포자 전 처리 후 glyceollins 유도

국내산 대두만 아니라 수입산 대두를 사용하고, *R. oligosporus*의 포자를 전 처리하여 glyceollins를 유도하였다 (Table 15). 대두에서 glyceollins를 유도할 때 *R. oligosporus*의 포자가 형성되면 시각적으로나 위생적으로 좋지 않을 뿐 아니라 균체가 들어간 발효 음료는 쓴맛이 난다. 특히, glyceollins 유도 발아 두유 요구르트를 공장에서 제품화할 때에 공기 중에 퍼진 곰팡이 포자에 의한 주변 환경오염이 심각해 질 수 있으므로 가급적 공장내에서는 포자를 처리하지 않는 것이 바람직하고 식품 생산시설과 분리된 별도의 공간에서 얻은 포자를 전처리하여 얻은 포자추출물을 대두에 접종하여 glyceollin 생성을 유도하는 것이 바람직하다.

포자 현탁액을 bead beater나 sonicator로 처리한 후 autoclave하고 또는 autoclave 처리만 한 다음 이를 대두에 접종한 후 발아를 유도한 다음 생성된 glyceollins를 HPLC 방법으로 측정하였다. HPLC 결과를 보면 전반적으로 국내산에 비해 수입산 대두는 glyceollins 유도가 거의 되지 않았음을 알 수 있다 (Fig. 27). 중국산 대두는 수입되는 과정이나 기간 경과 등에 의해서 발아가 잘되지 않는 것으로 생각되고 (Fig. 26), 이에 따라서 glyceollis 유도 또한 잘 되지 않는 것으로 판단된다. 따라서 상대적으로 가격이 저렴한 수입산 대두로 대체하여 glyceollins를 유도하기 위해 수입산 대두를 선택할 때 수입되는 과정이나 수확년도를 충분히 고려해서 선별할 필요가 있다.

포자에 전처리 과정을 시행하여 균체형성을 억제한 glyceollins 유도 결과는 Fig. 27이다. 국내산 대두를 이용해 glyceollins를 유도한 시료 중 전 처리 하지 않은 포자를 접종한 D1-1이 가장 높은 수치 ( $10,463.7 \mu\text{g}/\text{ml}$ )를 나타내었고, 포자 현탁액을 Autoclave 만 실시한 C1-1이 그 다음으로 높은 수치 ( $3,402.3 \mu\text{g}/\text{ml}$ )를 나타내었다. Bead beater 또는 sonication 처리 후 autoclave 실시한 A1-1 ( $1,537.4 \mu\text{g}/\text{ml}$ ), B1-1( $1,791.3 \mu\text{g}/\text{ml}$ )은 비슷한 수치를 나타내고 있다. 이상 결과를 보면 전 처리를 통해서 대부분의 포자를 사멸시킨 경우에도 glyceollins 유도를 확인할

수가 있었다. 포자 현탁액을 autoclave만 실시하여도 콩에서 곰팡이 균사 형성이 거의 되지 않았기 때문에 (Fig. 26) 대두의 발아 상태만 유의하여 glyceollins 생성을 유도한다면 식품 공장에서의 곰팡이 오염을 줄인 위생적인 제품생산이 가능할 것으로 판단되며, 쓴맛 또한 줄일 수 있을 것이다. 다만 전 처리 하지 않은 포자에 의한 glyceollin 유도 정도가 훨씬 더 높아서 glyceollin 수율이 기능성에 영향을 미칠 가능성이 있다. 때문에 전처리 포자추출물 (사멸액)에 의한 glyceollin 유도 효율을 더 높일수 있는 방안들에 관한 연구가 필요하다.

Table 15. Soy samples used for determination of efficiencies of glyceollin production

	bead beter treated and autoclaved	sonicated and autoclaved	autoclaved	control
domestic soybean (Taekwang, 2009 crop year)	A 1-1	B 1-1	C 1-1	D 1-1
Imported soybean (China, 2010 crop year)	A 1-2	B 1-2	C 1-2	D 1-2





Fig. 26. Photographs of soybeans after germination. Soybeans (domestic, imported) were inoculated with spores of *R. oligosporus* which were treated differently.

1-1, Taekwang variety; 1-2, imported soybean from China. A, bead biter treated and then autoclaved ; B, sonicated and then autoclaved; C, autoclaved; D, control (no treatments).

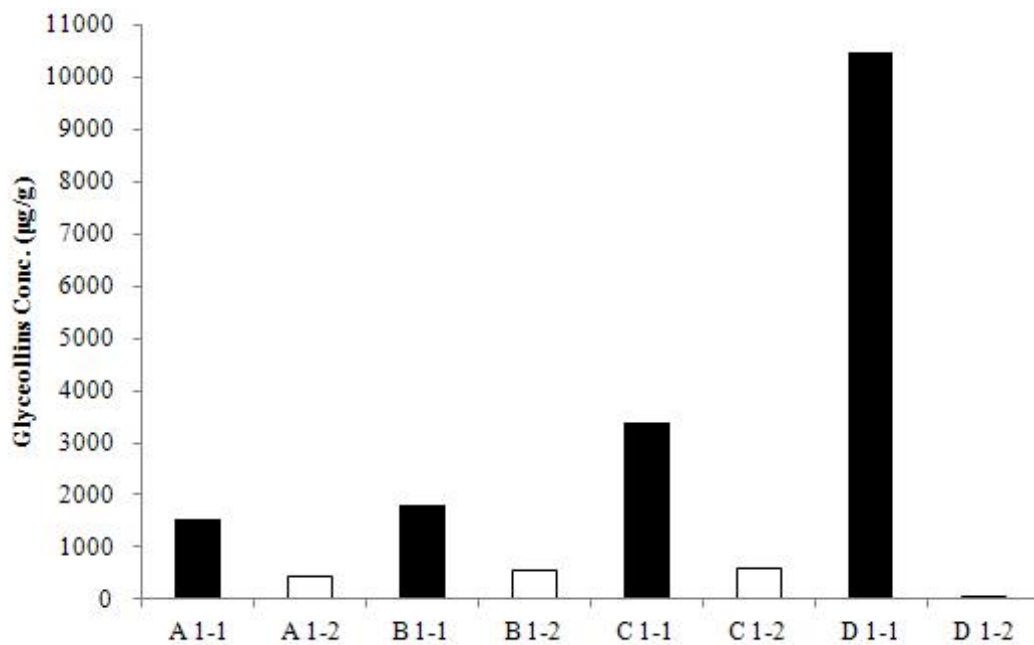


Fig. 27. Glyceollin contents of domestic soybean and imported soybean.

1-1, Taekwang variety; 1-2, imported soybean from China. A, bead biter treated and then autoclaved ; B, sonicated and then autoclaved; C, autoclaved; D, control (no treatments).

## 바. Glyceollins 생성 유도 콩을 이용한 대두 요구르트

### (1) 3 종류 두유의 유산 발효 특성 조사

유산 발효 중의 특성을 알기위해서 일반 두유(M1), 발아 두유(M2), *R. oligosporus* 접종 발아 두유 (glyceollins 유도, M3)를 다시 제조하고 유산균 (*S. infantarius* 12: W. sp 4 = 1:5, v/v)을 접종 한 후 37°C에서 12 시간 배양하면서 pH, 산도, 생균수를 측정하였다. 앞서 두유 유산발효와 전반적으로 동일한 결과를 확인할수 있었고 이렇게 얻은 두유발효액을 대상으로 아래 관능검사를 실시하였다.

12시간 발효도중 시간이 지남에 따라 천천히 curd를 생성하는 것을 관찰 할 수 있었다. M1와 M2는 약 6시간 정도 발효되었을 때 산 생성으로 인한 특유한 신 냄새와 함께 전반적으로 유동성이 낮고 점성이 높은 요구르트가 생성되는 반면, M3는 M1, M2에 비해서 적은 신 냄새와 유동성이 높고 점성이 낮은 요구르트가 생성되었다.

유산 발효 초기의 pH는 6.3~6.5 이지만 발효 6 시간 동안 급격히 떨어지고 이후 12시간 까지 일정수준 유지 되었다 (Fig. 28). M1과 M2가 발효 6시간에 pH 4.4~4.9 수준이 된 후 서서히 떨어지는 반면 M3는 pH 5 수준에서 발효 말기까지 일정 수준 유지 되었다. 두유에 들어있는 난소화성 소당류인 stachyose, raffinose 등의 감소를 위해  $\alpha$ -galactosidase 역가를 지닌 균주를 이용해 발효를 하였는데, 발효유 섭취에 적합한 pH 4.0~4.3에 미치지 못하므로 추후 발효 대두유 제조 시 산생성능이 보다 우수한 균주를 사용하거나 혹은 추가로 종균으로 사용하는 것이 바람직 할 것으로 판단된다. 초기 산도는 약 0.14~0.18 에서 시작하여 M1, M2은 발효 9시간 이후 0.52~0.56 를 유지하였고, M3는 발효 6시간 이후 큰 변화 없이 0.27~0.29 을 유지하였다. 발효 중 생균수의 변화는 3 종류 두유에서 뚜렷한 차이는 관찰되지 않았다. 모든 두유에서 초기 균수  $10^7$ 이 발효 3 시간 동안  $10^8$ 까지 빠르게 성장 한 후 완만한 곡선의 그래프를 그리고 있다 (Fig. 28). 3 종류의 두유의 생균수에서는 뚜렷한 차이가 없었지만 glyceollins를 유도한 M3의 pH와 산도변화를 보면 M1, M2에 비해서 차이가 있다. 이것은 2차년도 시행한 실험과 유산균주의 차이는 있으나 비슷한 결과로 glyceollins에 의해 유산균 생육이 저해됨을 역시 추측해 볼 수 있다. 하지만 생균수에서는 별다른 차이가 없음에도 glyceollin 유도 두유의적정 산도와 pH 값이 다른 두유 시료들과 차이가 큰 이유에 대해서는 앞으로 추가적인 연구가 필요하다.

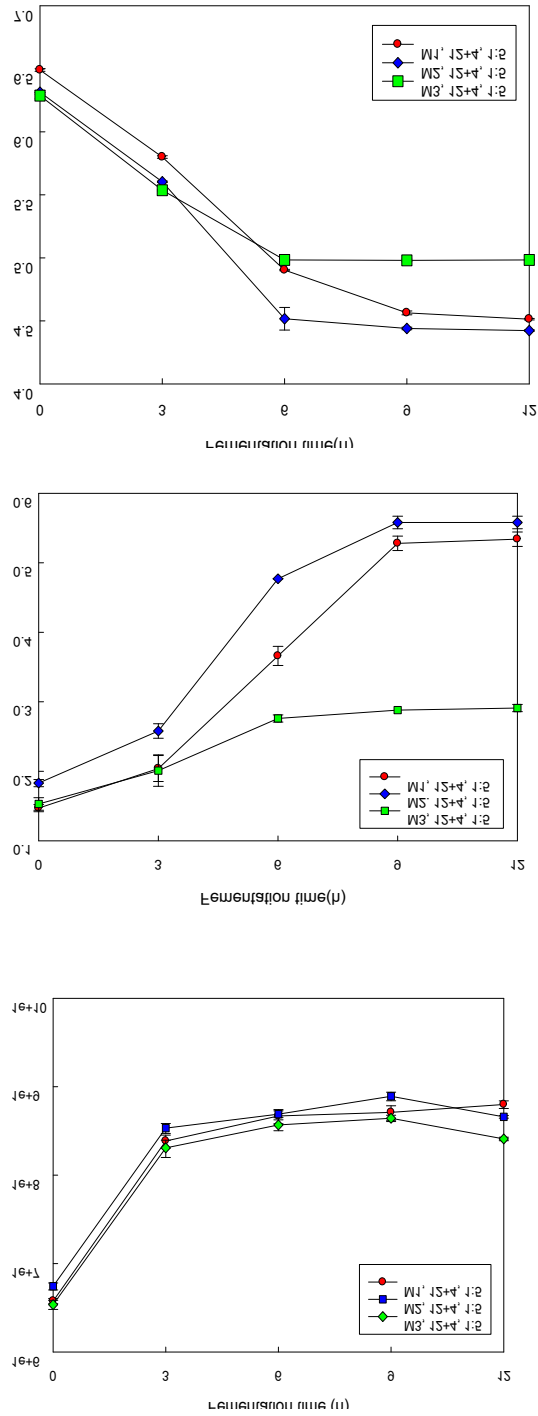


Fig. 28. Changes in pH, TA, and viable cells during lactic fermentation of M1, M2, and M3 soy milk.

(2) 발효 두유 관능 검사

제조된 발효유에 대한 관능검사 결과는 Table 15에 요약하였다. 이 데이터는 독립변수(두유 6종)와 4개의 종속변수(color, flavor, taste, overall acceptance)에 대하여 ANOVA 분산분석, Duncan's multiple comparison 분석한 결과이며, Duncan's multiple comparison 결과를 윗 첨자로 표시하였다.

색에 있어서는 딸기잼을 첨가한 발효유가 탁한색을 띄어 상대적으로 관능검사치가 4점대로 낮은 기호도를 나타내었고, M3 발효유가 연노란색을 띄어 M1과 M2의 수치보다 다소 낮은 점수를 얻었다. 향에 있어서는 모든 발효유에서 큰 차이를 보이지 않았다. 한편, 맛에 있어서는 딸기잼을 넣은 발효유가 상대적으로 높은 점수를 얻었다. 설탕과 소금을 첨가한 발효유 중에서는 M1이  $4.13 \pm 1.98^{bc}$  으로 높은 값을 나타내었고 M3가  $2.10 \pm 1.27^e$  로 낮은 관능검사 수치를 보였다. 이들을 종합한 전반적인 기호도(Overall acceptability)를 살펴보면 M1S ( $5.55 \pm 1.86^a$ ) > M2S ( $4.68 \pm 1.58^{ab}$ ) > M1B ( $5.55 \pm 1.86^a$ ) > M2S ( $3.7 \pm 1.68^c$ ) > M3B ( $3.58 \pm 1.84^c$ ) > M3S ( $3.06 \pm 1.41^c$ ) 의 순으로 나타났다.

본 실험에서 진행된 관능검사는 검사이전에 소비자들에게 시료에 대한 정보를 제공하지 않은 blind test로 진행되었기 때문에 소비자들이 요구르트의 선택 할 때 맛 다음으로 기능성을 고려한다는 설문조사 결과를 바탕으로 볼 때 (Table 16), Glycollins 등의 기능성을 소비자들에게 인지시킬 때 맛 이외의 다른 기호도 상승효과를 기대해 볼 수 있을 것으로 판단된다.

Table 16. Sensory evaluation of soymilk samples fermented at 37°C for 12 h

Samples	Attributes				
	Color	Flavor	Taste	Overall acceptability	
M1	S	$6.00 \pm 1.37^a$	$4.65 \pm 1.68^a$	$4.13 \pm 1.98^{bc}$	$4.61 \pm 1.99^b$
	B	$4.61 \pm 2.04^b$	$4.55 \pm 2.11^a$	$5.97 \pm 1.94^a$	$5.55 \pm 1.86^a$
M2	S	$6.10 \pm 1.66^a$	$4.06 \pm 1.75^a$	$2.74 \pm 1.57^{de}$	$3.7 \pm 1.68^c$
	B	$4.23 \pm 1.73^b$	$4.06 \pm 1.26^a$	$4.61 \pm 2.03^b$	$4.68 \pm 1.58^{ab}$
M3	S	$5.74 \pm 1.75^a$	$4.26 \pm 1.73^a$	$2.10 \pm 1.27^e$	$3.06 \pm 1.41^c$
	B	$4.16 \pm 1.86^b$	$3.74 \pm 1.91^a$	$3.52 \pm 2.03^{cd}$	$3.58 \pm 1.84^c$

S: sugar 8%+ salt 0.8%

B: strawberry jam 20%

(3) 발효 대두유의 저장성

제조된 3 종류 두유 (M1, M2, M3)를 37°C에서 12 시간 발효시킨 발효 대두유의 생균수는 약  $10^8 \sim 10^9$  cfu/ml, M1과 M2의 pH는 4.63~4.69이고 산도는 0.49~0.52, 그리고 M3의 pH는 5.21~5.24이고 산도는 0.25~0.26 정도의 값을 보였다. 이후 4°C와 25°C 두 그룹으로 나누어서 발효 두유들을 3 주간 저장하며 3 일 간격으로 시료들을 취해서 생균수, pH, 산도를 측정하였다.

결과를 보면 각 온도에서 저장 기간이 증가됨에 따라 생균수가 점차 감소하는 것을 알 수 있는데, 특히 4℃ 보다 25℃에서 저장시 3~6일 경과 후 생균수가 급격히 감소하고 이후에는 천천히 감소하는 것을 관찰할 수 있다. 즉, 발효 두유를 25℃ 저장하는 경우 생균수 감소가 현저하므로 4℃ 저장이 유리할 것으로 생각된다. 3 종류의 발효 두유의 4℃ 저장에서 M1에 비해 M2, M3는 9 일 경과 후 더 감소되는 정도가 큼을 볼 수 있고, 이는 발효유의 조성 (glyceollins, 발아중 생성되는 화합물등)이 유산균 생존에 영향을 주는 것으로 추정된다.

M3는 9 일 이후 서서히 감소되기 시작하는 것을 관찰할 수 있는데 식품공정상 발효음료류의 생균수 규격이  $10^6$  cfu/ml (식품공전, 2010)이나 농후발효유의 생균수가  $10^8$  cfu/ml (축산물의 가공기준 및 성분규격, 2001)이므로 기능적인 면을 고려했을 때 glyceollins 유도 발효 두유 (M3)의 저장 시 9일 이상 장기간 저장은 바람직하지 않다. pH와 산도의 경우에는 3 종류 발효 두유에서 저장온도나 저장기간에 따라 약간의 증감은 있으나 큰 변화는 관찰되지 않았다.

한편, 발효 중 낮아진 pH로 인하여 형성된 curd는 붕괴되지 않았는데 25℃에 저장된 발효유는 유청 분리 현상을 관찰 할 수 있었으며 저장 3주 동안 이취나 이색 등의 이상변화는 관찰되지 않았다. 이상 결과들을 종합해 볼 때 실험에서 제조된 발효 두유들은 4℃에서 저장 시 최소 2 주간 혹은 3주간은 별다른 품질변화를 일으키지 않는 것을 알 수 있다 (Fig. 29).

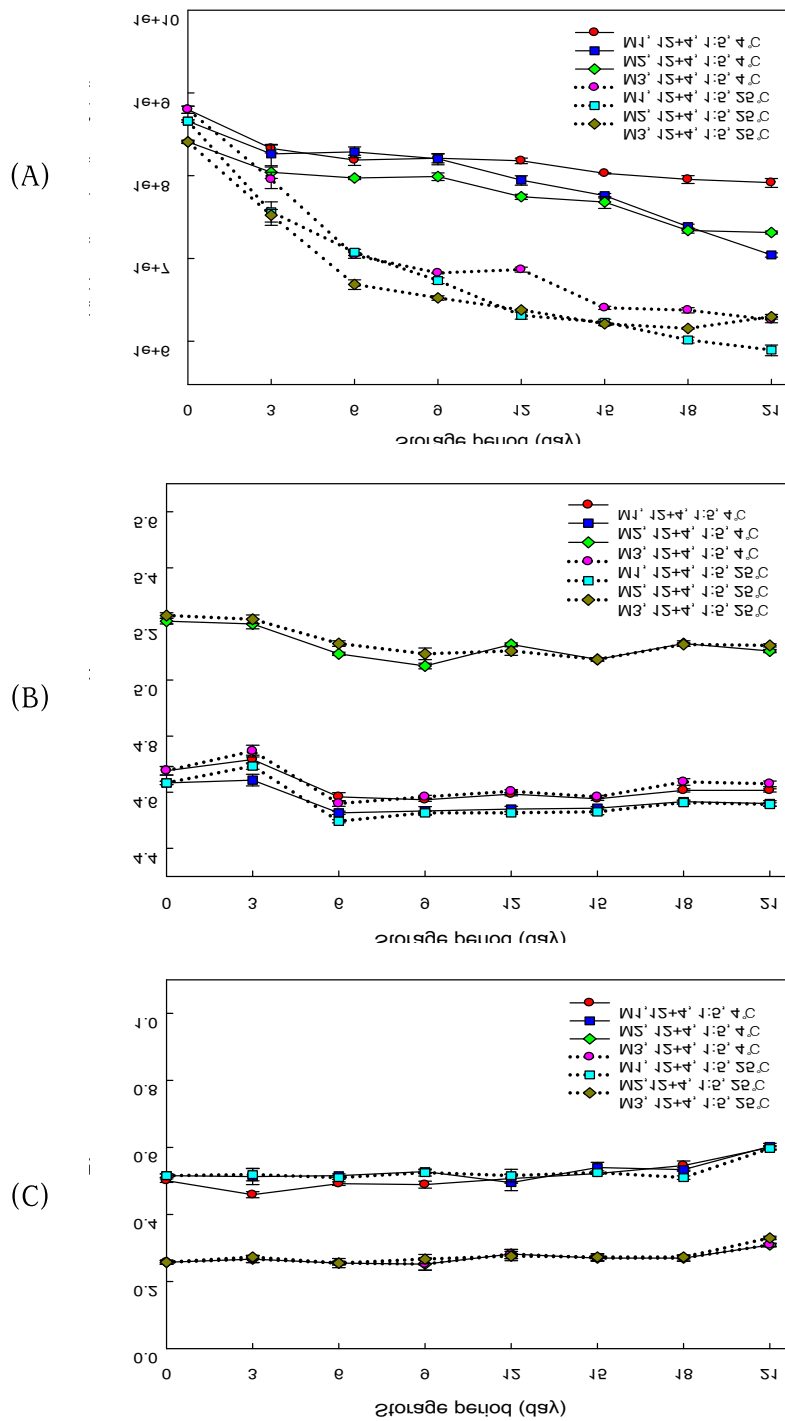


Fig. 29. Changes in viable cell numbers (A), pH (B) and TA (C) of fermented soymilk during storage at 4°C and 25, respectively. Soymilk samples (M1, M2, M3) were fermented with *S. infantarius* 12 and *Weissella* spp. 4 at 37°C for 12 h.

### 제 3 절 Glyceollins의 기능성 평가

#### 1. Glyceollins의 에스트로젠 유사활성

가. E-Screen (MCF-7 cell proliferation assay)을 이용한 glyceollin의 에스트로젠 활성 평가

Estrogen receptor를 가지고 있는 MCF-7 breast carcinoma cell은 24-well plate에  $2 \times 10^4$  cells/well로 medium (10% charcoal stripped-FBS in EMEM)과 함께 분주하여 37°C에서 배양하였다. 분주 24시간 후, medium을 제거하고 0.01-500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도 범위에 있는 test compounds가 포함된 medium으로 교체하였다. 2일간의 배양기간을 거친후 세포증식 유도 측정을 MTT assay로 평가하였다. 대조군 세포로는 estrogen receptor가 결여된 MDA-MB-231 세포를 사용하였다.

- E-screen 방법에 의한 에스트로젠 활성을 측정한 결과 (Fig. 30), 에스트로젠은 0.01~1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 대조군보다 2배 증가된 세포증식률을 나타냈다.
- 접종된 A3 추출물은 0.01~1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도범위에서 MCF-7 세포의 성장을 증가시켰다. 접종되지 않은 A3 추출물도 농도의존적으로 증가된 세포성장률을 보였고, 두 추출물들간 차이는 미미하였다.
- A3 추출물들은 모두 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  이상의 농도에서 세포 독성을 갖는 것으로 나타났다.
- 에스트로젠은 A3 추출물들보다 저농도 (0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )에서 뚜렷한 증가된 세포 증식을 보여주었다.
- 에스트로젠 수용체가 결여된 MDA-MB-231 세포에서는, 테스트된 모든 추출물 및 에스트로젠이 MCF-7 세포에서와 같은 증가된 세포 증식을 유도하지 못했다.
- 따라서, A3 추출물들은 저농도에서는 에스트로젠 활성을 가지나, 고농도에서는 세포독성을 갖는 것으로 나타났다.

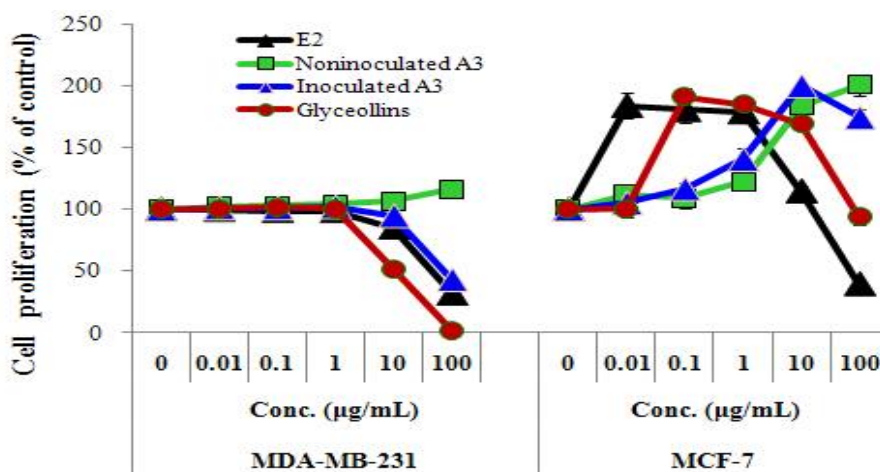


Fig. 30. Concentration-dependent proliferation of ER-positive MCF-7 breast cancer cells by inoculated A3 crude extract.

## 나. Yeast를 이용한 glyceollins의 estrogen활성 측정

- (1) Yeast strain (Saccharomyces cerevisiae ER +LYS 8127: human estrogen receptor를 가지고 있는 recombinant yeast)가 estrogen활성 분석에 사용되었다.
- (2) Yeast 배양: Yeast는 shaking incubator (30°C, 300 rpm)에서 성장 배지 (yeast nitrogen base (6.74 g/L), dextrose (20 g/L), L-lysine (36 mg/L), L-histidine (24 mg/L))에서 증식시켰다. 이틀간의 배양한 후, yeast는 OD<sub>600nm</sub>에서 흡광도가 1.0~2.0에 도달되도록 하였다.
- (3) 추출물 처리: yeast는 receptor 생산을 위하여 50 µM CuSO<sub>4</sub>가 첨가된 증식배지에서 OD<sub>600nm</sub>에서의 0.03 수치로 희석하였다. 50 mL conical tube에 희석된 yeast 5 mL, 각 추출물 (또는 시료) 5 µL를 첨가한 후, shaking incubator (30°C, 300 rpm)에서 24시간 동안 배양하였다.
- (4) β-Galactosidase assay: 각종물질 처리가 이루어진 yeast는 OD<sub>600nm</sub>에서 0.25 수치로 희석하여 96-well plate에 100 µL를 첨가하였다. 배지 색깔 측정을 위해 OD<sub>590nm</sub>에서 흡광도를 측정하였다. β-Galactosidase 활성은 2 mg/ml *O*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside (ONPG), 0.1% sodium dodecyl sulfate, 50 mM β-mercaptoethanol과 25 U/ml zymolase가 첨가된 100 µL Z buffer (60mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 40 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, pH 7.0)을 넣어 유도하였다. 20분간 상온에서 incubation 한 후, OD<sub>420nm</sub>에서 흡광도를 측정하고, OD<sub>420nm</sub>-OD<sub>590nm</sub> 값을 산출하여 음성대조군 (negative control)으로 나머지 값을 나누었다.

• Positive control인 에스트로젠은 1 µg/mL vehicle인 DMSO를 처리한 군의 8.3배 높은 에스트로젠 활성을 나타냈다.

• 접종한 A3 추출물(0.1, 1.0, 10 µg/mL)은 접종하지 않은 추출물보다 높은 에스트로젠 활성을 보였고, 이는 농도의존적이었다. 10 µg/mL의 접종한 A3 추출물은 동일농도의 접종하지 않은 A3 추출물에 비해 4.1배 높은 활성을 나타냈다.

• 접종한 A3 추출물(10 µg/mL)은 에스트로젠(1.0 µg/mL) 보다 높은 에스트로젠 효과를 나타냈다.

• 콩에 함유된 isoflavone류인 daizein과 genistein 모두 에스트로젠 효과를 보였고, 이중 genistein이 daizein보다 높은 에스트로젠 효과를 나타냈다. 동일농도(1.0 µg/mL)에서, genistein의 효과는 에스트로젠에 준하는 것으로 나타났다 (100%, 94%).

• HPLC에 의해 정제된 glyceollins은 농도의존적(0.1 µg/mL-15%, 1.0 µg/mL-20%, 10 µg/mL-117%)으로 뚜렷한 에스트로젠 효과(10 µg/mL-117%)를 나타냈다 (Fig. 31).



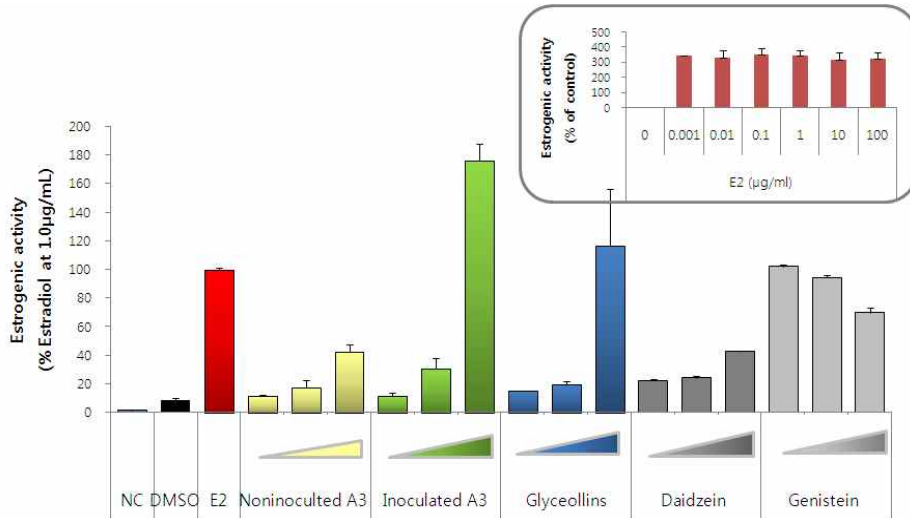


Fig. 31. Estrogenic activity of inoculated A3 crude extract in yeast based estrogen receptor activity assay.

다. pS2 mRNA expression에 미치는 영향

MCF-7 cell proliferation assay와 동일한 방법으로 petri dish (56 cm<sup>2</sup>)에 세포를 분주하여 test compounds 를 medium에서 6시간동안 배양하였다. 그 후에 medium을 제거하고 total RNA는 RNeasy Mini Kit (Qiagen)로 정제하여 이용시까지 -80°C에 보관하였다. pS2 발현정도는 semi-quantitative RT-PCR 방법으로 측정하였다. 이때 사용한 human pS2와 human β-tubulin primers는 다음과 같다.

- >β-tubulin-forward: 5'-CATACCTTGAGGCGAGCAAA-3'
- >β-tubulin-reverse: 5'-TGAGAAGCCTGAGGTGATGG-3'
- >pS2-forward: 5'-TTTGGAGCAGAGAGGAGGCAATGG-3'
- >pS2-reverse: 5'-TGGTATTAGGATAGAAGCACCAGGG-3'

pS2 PCR product는 336 bp이고, 증폭은 PCR thermocycler (MJ Research)에서 수행되었다. cDNA 첫 번째 가닥 합성의 thermal cycle profile은 initial denaturation step으로 95°C에서 2분, amplification cycle을 위해 denaturation은 94°C에서 1분, annealing은 60°C에서 1분, extension은 72°C에서 1분으로 하여 30회 반복하였고, final extension step은 72°C에서 10분으로 하였다. 1% agarose gel을 이용하여 PCR 반응 생성물 5 µL 전기영동 (100V, 30분)한 다음, EtBr로 염색하여 UV하에서 동정하였다.

에스트로겐 반응에 관련된 유전자에 미치는 A3 추출물의 영향을 알아보기 위해 estrogen-responsive pS2 gene의 발현을 실험하였다 (Fig. 32).

- 에스트로겐을 처리한 MCF-7 세포(1.03)는 대조군(0.96)보다 증가된 pS2 mRNA 발현을 나타냈다.
- 접종된 A3 추출물(1.06)과 정제된 glyceollins(1.10)은 접종되지 않은 A3 추출물(0.93)보다 증가된

pS2 mRNA 발현을 나타냈다.

• 정제된 glyceollins의 pS2 mRNA 발현량(1.10)은 접종된 A3 추출물(1.06)에서의 발현량보다 더 높게 나타났다.

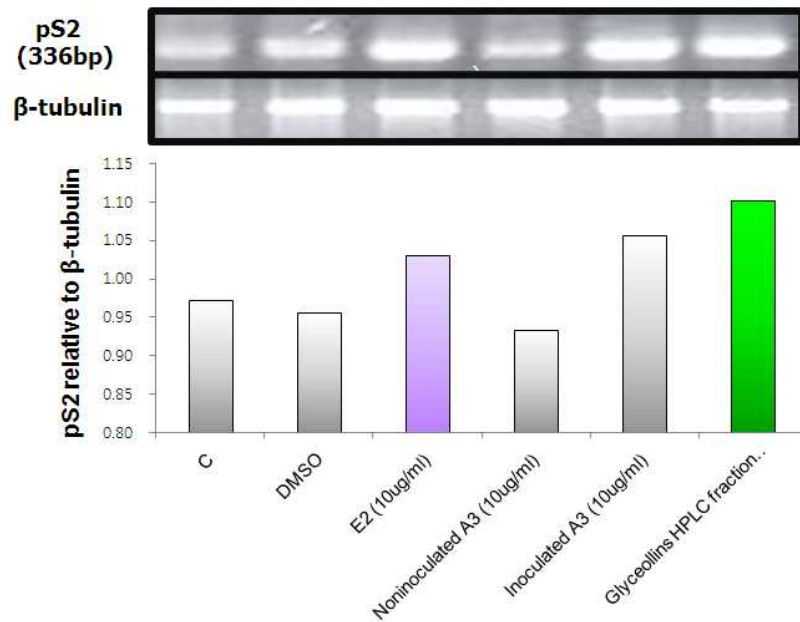


Fig. 32. The effect of glyceollins on mRNA expression of pS2 in MCF-7 cells as evaluated by semi-quantitative PCR.

## 2. Glyceollins의 항곰팡이활성

### 가. 항곰팡이 활성 측정

PDA배지로 채워진 petri dish (9cm diameter)에 멸균된 5  $\mu$ l (200  $\mu$ g/disc)와 15  $\mu$ l glyceollins (600  $\mu$ g/disc) 용액을 함유한 Whatman paper disc (6 mm diameter)를 놓고, 곰팡이를 평판배지에 올려 접착시켰다. 곰팡이는 25°C에서 4-6일간 배양한 후, clear zone 직경 (mm)으로 항곰팡이 활성을 측정하였다. 계산식: Inhibition (%) = [1 - (radial growth of treatment (mm)/radial growth of control (mm))]  $\times$  100

Glyceollins의 항곰팡이 활성을 조사한 결과, glyceollins (200  $\mu$ g와 600  $\mu$ g/disc)은 *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici*, *Sclerotinia sclerotiorum*의 생육을 뚜렷이 억제하는 것으로 나타났다 (그림 33).



Fig. 33. Antifungal activities of soybean extracts glyceollins.

### 나. 곰팡이 최소억제 농도 (minimum inhibitory concentrations, MICs)

시료는 PDB (potato dextrose broth)에 농도별로 희석시켰다 (10, 25, 50, 100, 250, 500, 750  $\mu$ g/ml). 곰팡이포자 현탁액 (10  $\mu$ L)을 시료가 함유된 PDB medium에 접종시켜, 2-4일간 28°C에서 배양시켰다. 대조군은 곰팡이포자 현탁액 (10  $\mu$ L)만 함유된 PDB medium을 이용하였다. 곰팡이포자의 발아 및 성장 속도 측정은 *B. cinerea*, *F. oxysporum*, *S. sclerotiorum*, *P. capsici*종을 이용하여 실험하였다. 농도별로 나뉜 시료액은 mL당  $1 \times 10^8$  개의 포자를 함유한 현탁액으로 접종하였다. 접종액 100  $\mu$ L를 glass slide에 놓고, moisture chamber (25°C)에서 24시간 동안 배양하였다. 각 slide는 lactophenol-cotton blue로 고정하여 발아정도를 현미경상에서 관찰하였다. 포자 발아저해능의 계산식은 (% = [treatment (germinated spore/total spore)/control (germinated spore/total spore)]  $\times$  100)와 같다.

시료의 항곰팡이 활성이 높게 나타났던 *P. capsici*가 kinetic assay에 이용되었다. 곰팡이포자현탁액 10  $\mu$ L를 시료가 든 tube내로 접종시키고 (약  $2 \times 10^5$  spore/mL), 30, 60, 90, 120, 150분

간의 서로 다른 배양시간 간격을 둔 후, 필터링을 거쳐, 멸균수로 2~3회 세척하였다. 세척을 거친 곰팡이포자 현탁액은 glass slide 에 놓고 25°C에서 24시간동안 배양하였다.

•Glyceollins의 곰팡이생육저해 범위는 10.9 ~ 61.0%로, MIC value로는 25 ~ 750 µg/mL에 해당한다. Glyceollins은 테스트된 곰팡이중 *P. capsici*에서 생육저해능이 가장 뛰어난 것으로 나타났다 (MIC value 25 µg/mL) (Table 17).

•Glyceollins은 실험에 이용된 곰팡이들의 포자 발아를 농도의존적으로 저해하였고 (그림 34. A), *P. capsici*의 시간별로도 저해하였다 (그림 34A와 B).

•따라서, glyceollins의 항곰팡이 활성은 곰팡이관련 질환을 조절하는데 유용하게 이용되어 질 수 있을 것으로 사료된다.

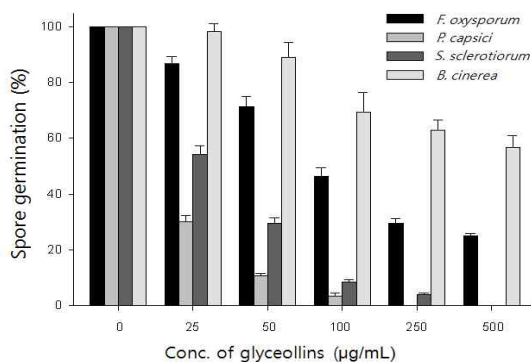
Table 17. Antifungal activity of glyceollins derived from soybean seed elicited with *Aspergillus sojae*

Fungal strain	Mycelial growth inhibition <sup>a</sup>			MIC <sup>b</sup> (µg/ml)
	mg/disc	mm	%	
<i>Fusarium oxysporum</i> KACC 41092	0.2	24.3 ± 1.0 (33.5 ± 0.7)	27.4 ± 1.2	250
	0.6	20.0 ± 0.8 (33.4 ± 0.9)	40.1 ± 1.6	
<i>Phytophthora capsici</i> KACC 41092	0.2	24.2 ± 1.4 (38.7 ± 0.8)	37.5 ± 1.1	25
	0.6	22.1 ± 1.0 (37.1 ± 1.0)	40.5 ± 1.3	
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> KACC 41065	0.2	21.2 ± 0.7 (40.9 ± 0.4)	48.2 ± 0.8	50
	0.6	15.7 ± 1.1 (40.3 ± 0.6)	61.0 ± 1.1	
<i>Botrytis cineria</i> KACC 40573	0.2	38.3 ± 1.5 (42.9 ± 0.7)	10.9 ± 0.7	750
	0.6	34.1 ± 1.3 (43.8 ± 0.3)	22.1 ± 0.9	

\*Values are given as mean±S.D. of three experiments.

<sup>a</sup> mm, Radial growth with sample (radial growth without sample); %, percentage of radial inhibition. <sup>b</sup> Minimum inhibitory concentration

A.



B.

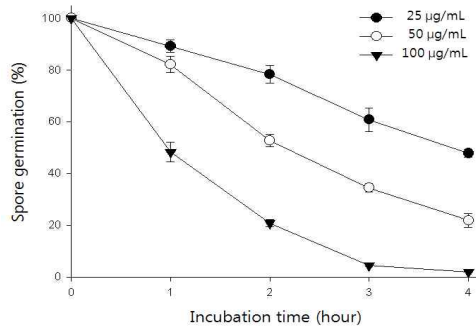


Fig. 34. Effect of glyceollins on spore germination of tested fungi and kinetics of inhibition of *P. capsici* spore by the glyceollins.

### 3. Glyceollins의 항산화활성

#### 가. DPPH scavenging activity, 총페놀 함량 및 FRAP assay

##### (1) DPPH scavenging

분석법의 원리는 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazylradical (DPPH\*)에 대한 항산화제의 환원능력을 측정하는 데 근거하고 있다. 515 nm에서 DPPH의 색깔이 소실되는 정도를 측정하여 남아있는 DPPH의 함량은 다음과 같이 계산하였으며, 이것은 항산화제 농도와 비례한다.

$$\text{환산식: } \% \text{ DPPH}^*_{\text{REM}} = 100 \times [\text{DPPH}^*]_{\text{REM}} / [\text{DPPH}^*]_{T=0}$$

##### (2) 총페놀 함량

총 페놀 함량의 측정을 위해 Folin-Ciocalteu assay 방법을 사용하였다. 이 방법은 alkali solution (5~10%의 soluble sodium carbonate)에서 tungstate와 molybdate의 혼합물을 이용하는 것으로 phenolic compound는 산화되어  $\cdot\text{O}_2^-$ 를 형성하여 molybdate와 반응하여 molybdenum oxide ( $\text{MoO}_4^{4-}$ )를 형성하는데 이렇게 형성된 물질을 750 nm에서 측정하였으며, gallic acid equivalents (GAE)로 나타내었다.

##### (3) FRAP assay

Ferric 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ) 시약이 산화반응에 의하여 2가의 철이 3가로 산화되면서 colored product로 전환되는 원리를 이용한 것이다. 그러나 radical quenching (수소 전이)에 의하여 작용하는 화합물 (예, thiols, 단백질)의 항산화활성을 측정하지 못하는 결점을 가지고 있다. Ferrous sulphate를 사용하여 1 mM 용액 (0.278 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}/\text{L}$ )을 제조후 표준용액으로 사용하였으며, FRAP 용액은 300 mM acetate buffer (pH3.6) 200 mL, 10 mM TPTZ 용액 20 mL, 20 mM  $\text{FeCl}_3$ 용액 20 mL, 24 mL 멸균수를 섞어 제조한 37°C를 유지시켜 사용하였다. 96-well plate를 사용하여 well 당 멸균수 170  $\mu\text{L}$ , standard와 시료용액 7  $\mu\text{L}$ 와 30  $\mu\text{L}$  FRAP 용액을 섞어준 다음, 4분 후 593 nm에서 흡광도를 측정하였다. FRAP level은 흡광도 값의 표준용액에 대한 선형회귀분석을 통해 산출하였다.

•FRAP assay 결과, *Asp. sojae*에 의해 접종된 A3이 접종되지 않은 대조군에 비해 농도의존적으로 증가된 항산화 활성을 나타냈다. 각 농도별 대조군과 실험군간의 항산화활성은 1.4~4.0배로 뚜렷한 차이를 보였다.

•페놀성 화합물의 총량은 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 접종된 A3가 대조군보다 높은 함량차이를 나타냈다 (Fig. 35).

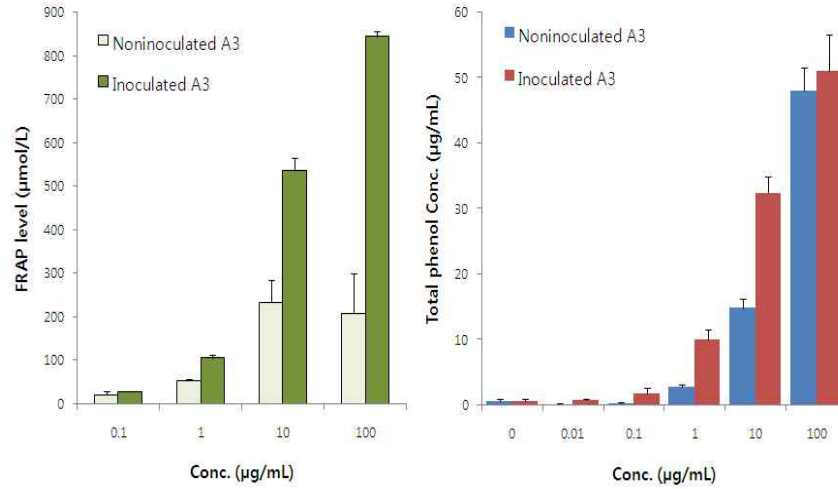


Fig. 35. Total phenolic contents and FRAP values of inoculated A3 crude extract.

- Glyceollins 시료내 (glyceollins의 3가지 isomer들의 복합체) 총 phenol 당량을 측정된 결과, glyceollins은 농도의존적으로 증가된 phenol 당량을 나타내었다. FRAP assay에 의해 항산화 활성도를 측정된 결과, glyceollins은 농도증가와 함께 비례적인 항산화활성을 갖는 것으로 나타났다 (Fig. 36)
- 총페놀함량 및 FRAP assay 결과와 동일하게 glyceollins은 저농도 (25 µM에서 고농도 (500 µM)로 증가될수록 DPPH 라디칼 소거능이 증가되었다 (Fig. 36).

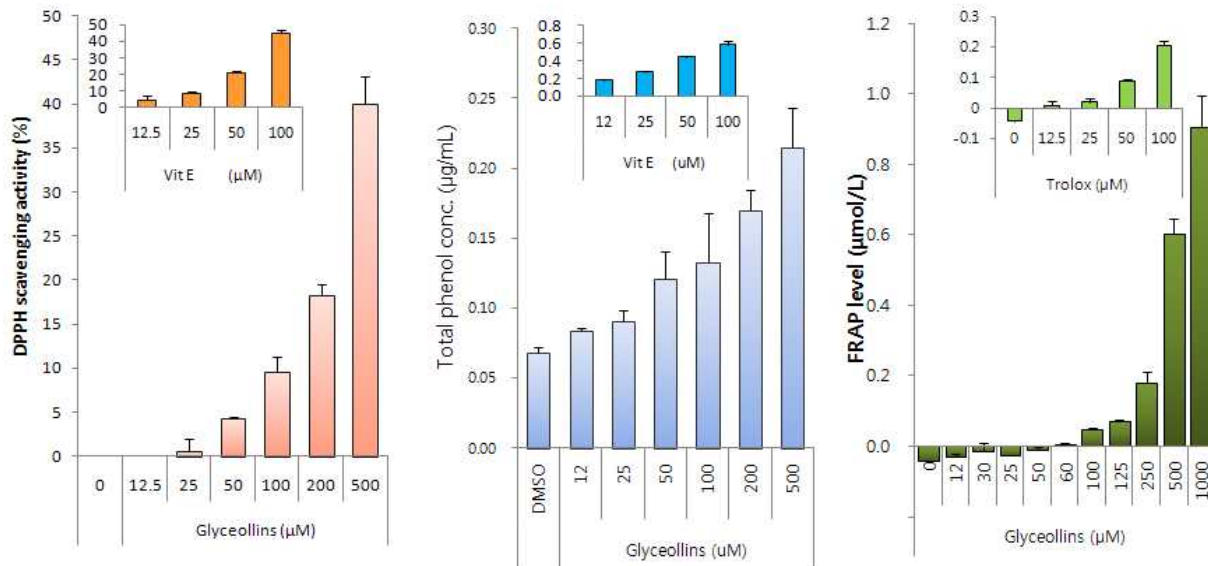


Fig. 36. DPPH scavenging activity, total phenol content and FRAP level.

나. Mouse 조직내 지질과산화 억제활성

(1) Mouse 조직내 lipid peroxidation 측정

간조직의 perfusion 후 간의 무게를 측정 한 다음, 조직무게의 10%에 해당하는 ice cold phosphate buffered saline (PBS)를 넣고, sonicator를 이용해 조직을 현탁시켰다. 현탁액은 10,000x g에서 5분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 상등액 50  $\mu$ L와 0.15M KCl 500  $\mu$ L를 잘 혼합한 후, 0.4 mM FeCl<sub>2</sub> 100  $\mu$ L를 첨가하였다. 혼합액은 37°C에서 30분간 incubation하고, 반응종료액 (0.25N ice-cold HCl+15%TCA+0.385 TBA+0.05% BHT) 1 mL 첨가로 반응을 종료시켰다. 90°C에서 30분간 incubation을 한 후, 10,000x g에서 5분간 원심분리를 실시하였다. 분홍색 시료물을 분광광도계 (535 nm)에서 측정하였다. 뇌와 신장조직도 동일한 과정을 통해 분석되었다. TBARS의 값은 tetraethoxupropene의 농도에 따른 표준곡선과 단백질의 nmoles/mg 로써 계산하였다.

• Fig. 37에 나타난 바와 같이, glyceollins (0.5 mM)는 mouse의 간조직 (35%), 신장조직(15%) 및 뇌조직(10%) 각각에서 지질과산화 억제 효과를 가지는 것으로 나타났다. Glyceollins는 간조직에서는 농도증가와 무관하게 일관된 저해율을 나타내었으나, 신장조직과 뇌조직에서는 농도의존적 (0.5-10 mM)으로 증가된 지질과산화 억제활성을 나타내었다. 조직별 지질과산화 억제정도를 비교해보면, 신장조직과 뇌조직내 glyceollins의 지질과산화 억제정도가 매우 유사한 것으로 나타났다.

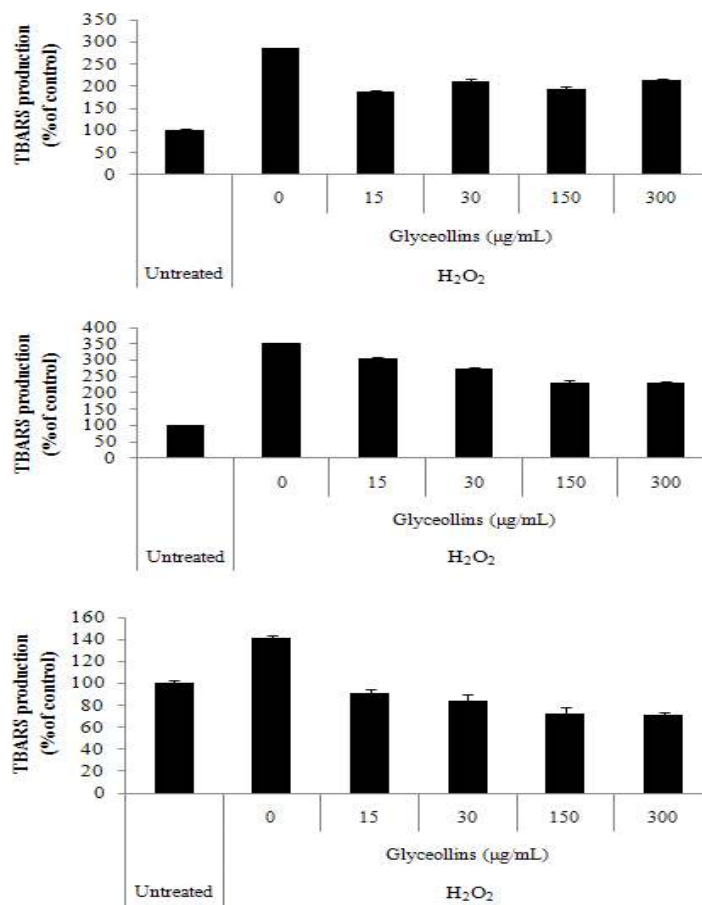


Fig. 37. Lipid peroxidation inhibition by glyceollins in liver (A), kidney (B), and brain (C) tissue extracts. The results are expressed as means (SD of four separate experiments. \*,  $p < 0.05$ , compared to the untreated as control; #,  $p < 0.05$ , compared to the  $H_2O_2$  treatment.

## 다. Hydroxy 라디칼 및 ABTS 라디칼 소거능

### (1) OH radical 소거능

OH radical 소거능은 ascorbic acid와 iron-EDTA method를 이용해 분석하였다. 표준반응 혼합물은 총 부피 3 mL에 167  $\mu$ M iron-EDTA mixture (1:2, w/w), 0.1 mM EDTA, 2 mM ascorbic acid, 33 mM DMSO를 혼합(pH 7.4)하여 만들고, 37°C에서 30분간 반응시켰다. 이 반응을 통해 ascorbic acid가 iron을 산화시키고, 산화된 iron이 DMSO로부터 formaldehyde를 생성토록 유도하였다. TCA 150  $\mu$ L와 Nash reagent 350  $\mu$ L (75 g ammonium acetate, 3 mL glacial acetic acid, 2 mL acetyl acetone)을 잘 혼합한 후 H<sub>2</sub>O로 총 volume을 1 liter로 맞춘 용액)로 반응을 종료시킨 후, 상온에 30분간 방치시키고 분광광도계 (412 nm)를 이용해 흡광도를 측정하였다. 대조군시료는 아스코르브산염이 없는 반응 혼합물을 만들어 사용하였다.

Hydroxy radical은 지질과산화과정중 가장 빠른 개시자로 알려져 있다. Glyceollins의 hydroxy radical 소거능은 Fe<sup>3+</sup>/ascorbic acid system을 사용해 hydroxy radical 생성 과정을 통해 측정하였다.

• Glyceollins의 hydroxy radical 소거능은 glyceollins의 농도 (5 ~ 10 mM)에 따라 증가하는 것으로 나타났다. 특히, 5, 10 mM 농도에서 각각 5%와 20%의 hydroxy radical 소거능을 보인 반면, 저농도 (0.5, 1 mM)에서는 소거능이 없는 것으로 나타났다 (Fig. 38C).

### (2) ABTS 라디칼 소거능

7 mM ABTS 용액과 2.45 mM potassium persulfate (final conc.)를 혼합하여 상온, 빛 차단하여 shaking incubator에서 12시간 반응시켜 라디칼을 생성시키고 EtOH로 415 nm 흡광도가 0.7±0.02가 되도록 EtOH (100%)로 희석하였다. 250  $\mu$ L ABTS 용액과 28  $\mu$ L sample을 혼합하여 상온에서 5분 동안 반응시킨후, 분광광도계 (415 nm)를 이용해 흡광도를 측정하였다. Trolox를 positive control로 사용하였다.

$$\text{계산식: } I_{ABTS^{o+}}\% = \left[ \frac{A_{control} - (A_{sample} - A_{blank})}{A_{control}} \right] \times 100$$

• Glyceollins는 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 mM 농도범위에서 농도의존적으로 증가된 ABTS 라디칼 소거능 (각 21%, 34%, 41%, 48%, 65%)을 보였으며, 동일농도 (1 mM)의 다른 isoflavone들과 비교해 볼 때 equol과는 유사하나, genistein이나 daizein보다 2배 높은 ABTS 라디칼 소거능을 나타냈다 (Fig. 38).



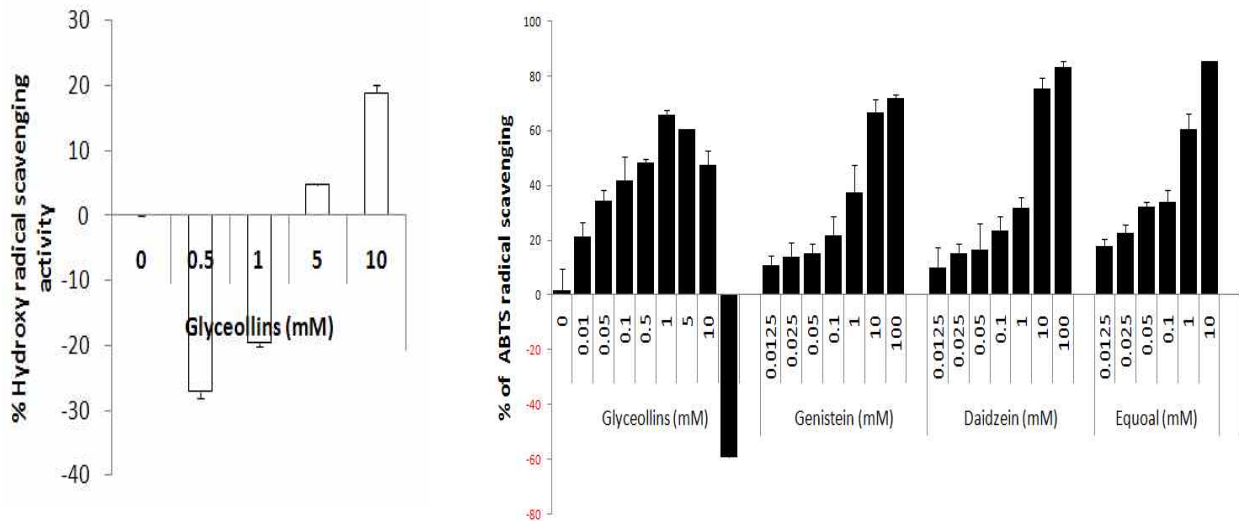


Fig. 38. ABTS and hydroxyl radical scavenging activity of glyceollins. The results are expressed as means (SD of four separate experiments. \*,  $p < 0.05$ , compared to the control.

라. Singlet oxygen 생성 억제

반응액 (RB (5 M), imidazole (8 mM), RNO (5 M), 20 mM Tris-succinate buffer (pH 6.5))를 시료와 함께 반응시키고, 25°C에서 5분간 150 W Halogen-lamp (Osram, Augsburg, Germany)로부터 6 mm Plexiglass와 UV-35 filter를 통과한 white light ( $\lambda > 350$  nm)를 측정하였다. Positive control로는 ascorbic acid를 사용하였다.

• 350nm에서 자외선 조사시간에 따른 RNO의 흡광도를 대표적 siglet oxygen 억제제로 알려진 ascorbic acid (20  $\mu\text{g}/\text{mL} \approx 120 \mu\text{M}$ )와 시료 glyceollins (10  $\mu\text{g}/\text{mL} \approx 30 \mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{g}/\text{mL} \approx 60 \mu\text{M}$ )과 비교하여 나타내면 Fig. 39E와 같다. 결과를 통해, glyceollins이 ascorbic acid 보다 높은 singlet oxygen 생성 억제효과를 나타냄을 확인할 수 있었다. 이러한 glyceollins의 singlet oxygen 저해 효과는, glyceollins 농도증가에 따라 더 큰 폭으로 증가하였다 (Fig. 39).

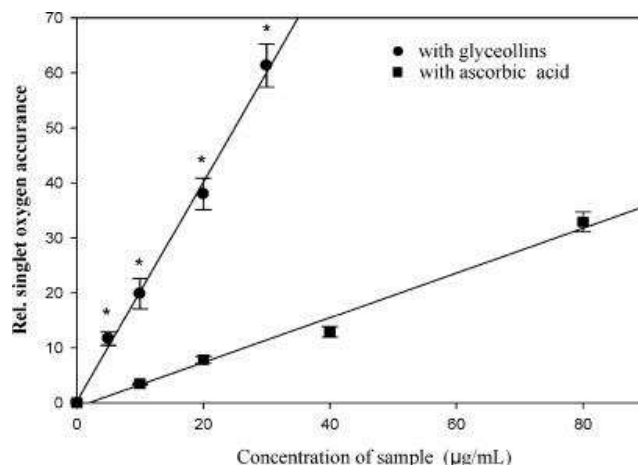


Fig. 39. Kinetics of singlet oxygen quenching capacity of glyceollins (b) and ascorbic acid (9). Data are representative of four independent experiments as mean $\pm$ SD. \*,  $p < 0.05$ , compared to the control.

마. ROS 억제활성

DCF/DHE assay

Hepa1c1c7 cell을 glass coverslip (12 mm, dia.)상에 plating ( $2 \times 10^4$  cells)하고, 24시간 후,  $H_2O_2$  (200  $\mu M$ )을 2시간 동안 처리한 이후에 시료를 24시간 동안 처리하여 배양하였다. PBS로 2번 세척한 후, DCF-DA 또는 DHE solution (50  $\mu M$ )을 세포에 주입하여 37°C에서 30분간 배양하였다. PBS로 다시 2번 세척하고, mounting하여 형광현미경을 통해 형광도를 측정하였다.

• Glyceollins이  $H_2O_2$ 에 의한 산화적 손상으로부터 간세포를 보호하는 효과를 측정하기 위하여 DCF-DA/DHE assay를 실시하였다. 그 결과 사용된 2종의 간암세포 (Hepa1c1c7) 모두에서,  $H_2O_2$ 를 단독으로 처리한 군에 비하여 glyceollins를 처리한 군에서 3  $\mu g/mL$  농도에서 뚜렷한 산화 손상 억제 효과를 나타냈다. 저농도의 glyceollins 단독 처리군에서는  $H_2O_2$ 만 처리한 군과 유사한 것으로 나타났다. 24시간 glyceollins (6  $\mu g/mL$ ) 처리시에는, hepa1c1c7 세포에서 산화적 손상이 억제되었었다 (Fig. 40).

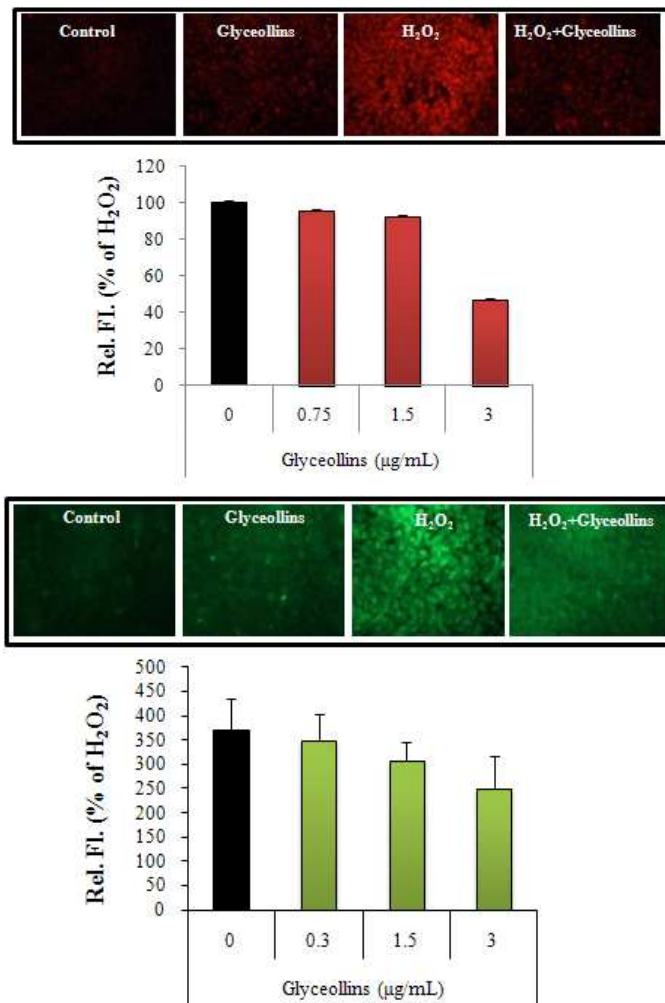


Fig. 40. Inhibition of  $H_2O_2$ -induced ROS production in hepa1c1c7 cells by glyceollins. Fluorescence micrographs of murine hepatoma cell line (hepa1c1c7 cells) stained with DCFDA (green) (A) and DHE (red) (B): a, control; b,  $H_2O_2$  (500  $\mu M$ ) c, glyceollins (3  $\mu g/mL$ ) d,  $H_2O_2$  (500  $\mu M$ ) plus glyceollins (3  $\mu g/mL$ ). Magnification 40x

#### 4. Glyceollins의 항염증활성

##### 가. 세포생존률과 염증관련 단백질 발현 조사

###### (1) 세포생존율

ATCC로부터 분양받은 RAW264.7을 DMEM (10% heat-inactivated FBS), 37°C, 5% CO<sub>2</sub>에서 배양하였고, 주 2회 0.25% trypsin으로 보통 1:4의 비율로 분주하였다.

세포를 단시간에 트립신 처리하여 수집하고, 2 x 10<sup>4</sup>개 세포를 배양액과 함께 24-well에 plating하고 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 24시간 배양하였다. 시료처리후 하루 뒤, 배양액을 제거하고, MTT solution (0.5 mg/mL in phenol red free culture medium)을 넣는다. 2시간 뒤에, solution을 제거하고 200 uL acidic isopropanol을 첨가했다. 10분 후, 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

• Glyceollins은 10 µM에서 세포생존률에는 영향을 주지 않았고, 대식세포 (RAW264.7)에서 독성을 나타내지도 않았다 (Fig. 41).

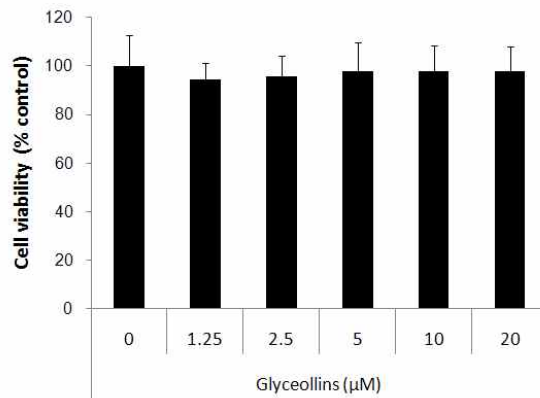


Fig. 41. Effects of glyceollins on cell viability of RAW264.7 macrophages as determined by MTT assay

###### (2) Western blotting

세포내 MAPkinases 및 iNOS 단백질 발현양상 변화를 관찰하기 위해 cold lysis buffer (Tris-HCl 20 mM, NaCl 145 mM, Glycerol 10%, EDTA 5 mM, Triton-X 1%, Nonidet 0.5%, proteinase inhibitor cocktail (40 µL/mL))에서 균질화시켰다. 얼음에서 30분 동안 incubation한 후에, pellet은 원심분리 (14,000x g, 4°C, 10분)로 제거하고 상층액의 단백질 정량을 실시하고, sample buffer를 이용해 95°C에서 5분 동안 변성시켰다. 세포질 및 핵단백질 수집은 1 mL KCl buffer를 이용하였다. 원심분리후 (8,000x g, 15분), 상층액은 세포질 추출물로 분리하였고, 분리된 핵은 300 mM KCL buffer 80 µL를 이용해 현탁액을 만들고, 얼음위에 30분간 방치하였다. 원심분리 (8,000x g, 15분)후, 상층액은 cold tube에 옮기고, 단백질 정량을 실시하고, 변성시켜 사용하였다.

단백질은 10% SDS-polyacrylamide gel로 100V에서 1.5시간 동안 전기영동하였으며, 100V로 1.5시간 동안 Nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences, Freiburg, Germany)로 이동시켰다. Membrane은 1% BSA 용액으로 blocking하고, 각 항체가 함유된 TBS/T용액에서 overnight incubation (4°C)하여 chemiluminescence kit (Pierce, Cheshire, United Kingdom)를 이용해 단백질을 감지하고, Lab Image software로 정량분석하였다.

•Glyceollins은 10  $\mu$ M에서 세포생존률에는 영향을 주지 않았고, 대식세포 (RAW264.7)에서 독성을 나타내지도 않았다 (Fig. 22). LPS는 대식세포에서 COX-2의 발현을 유도하였고, glyceollins은 LPS에 의해 증가된 염증관련단백질 COX-2의 발현을 두드러지게 억제하였다. HO-1의 발현에서는, glyceollins이 농도의존적으로 HO-1 단백질의 발현을 증가시켰다 (Fig. 42).

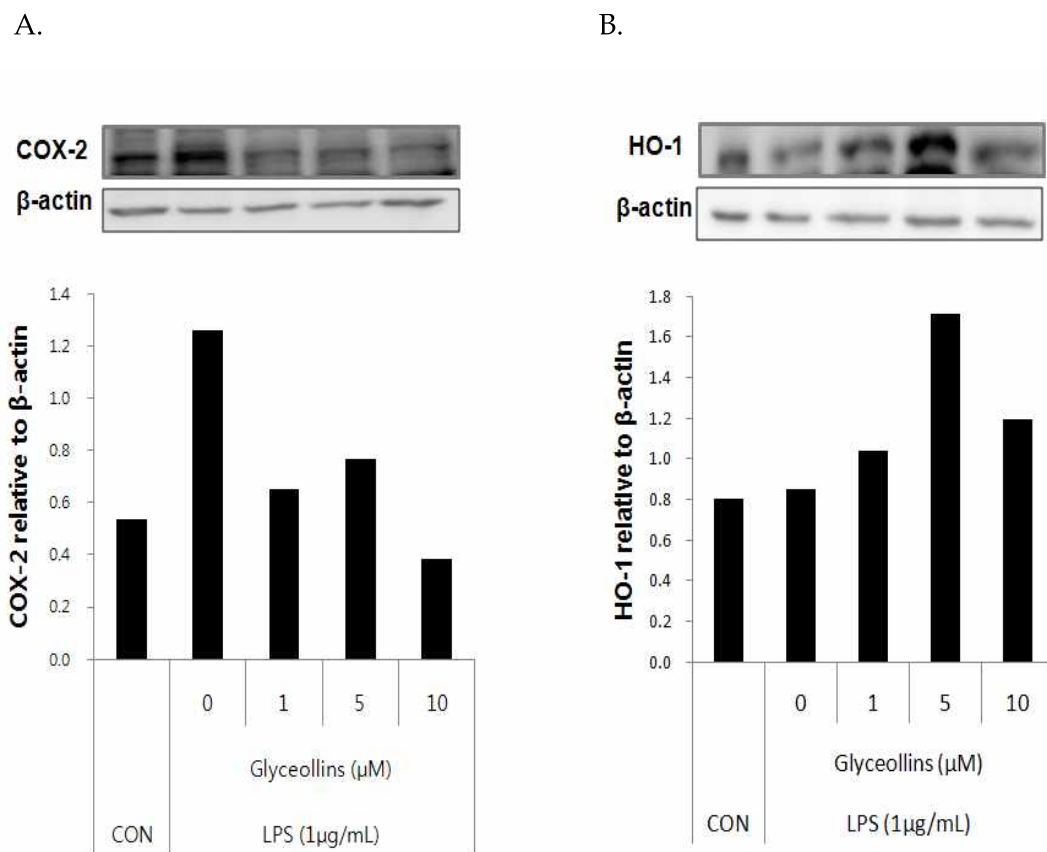


Fig. 42. Effect of glyceollins on COX-2 and HO-1 expression in RAW264.7 cells. Expression of COX-2 (a) and HO-1 (b) was determined in cell lysates from RAW264.7 cells pretreated with glyceollins (0, 3, 1.5 and 3  $\mu$ g/mL) for 2 h followed by LPS (1  $\mu$ g/mL) treatment for an additional 24 h by Western blot analysis as described in 'Materials and Methods'. Whole cell extracts (30  $\mu$ g) were subjected to Western blot analysis. Upper part shows a representative Western blot data for COX-2, and HO-1, respectively. Bar graph (lower part) shows densitometric evaluation of COX-2 or HO-1 relative to b-actin. The results are expressed as mean  $\pm$  SD of three separate experiments. \* $p$ <0.05 compared to control; # $p$ <0.05 compared to LPS stimulation

나. 염증관련 사이토카인 함량

RAW cell에 LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )와 시료를 0 ~ 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  넣고 24시간 배양하였다. Commercial diagnostic kit (BD, San Diego, CA, USA)를 사용해 ELISA (효소면역측정법)으로 배양액내 IL-6의 level을 측정하였다.

• Glyceollins이 항염증 활성을 가지고 있는지 측정해보기 위해서 LPS를 처리한 대식세포에서 염증 유도 cytokines의 생성량에 영향을 주는지를 테스트했다. Glyceollins을 2시간 전처리하고, LPS를 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 처리하고 24시간 더 배양하였다. Glyceollins는 0.3~3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 IL-6생성을 현저히 억제하지만, TNF- $\alpha$ 에서는 유의적인 차이를 나타내지 않았다 (Fig. 43).

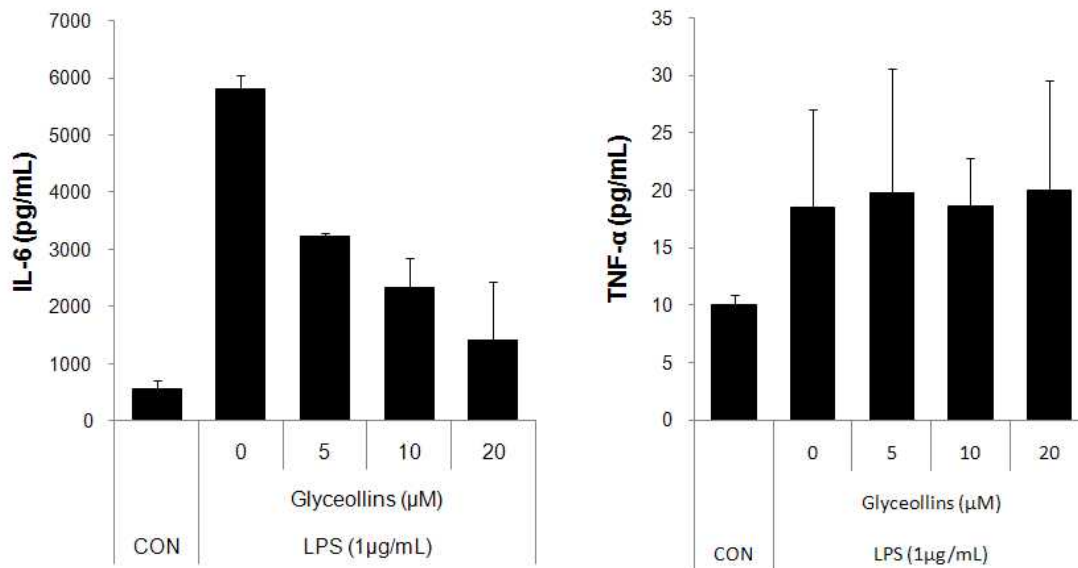


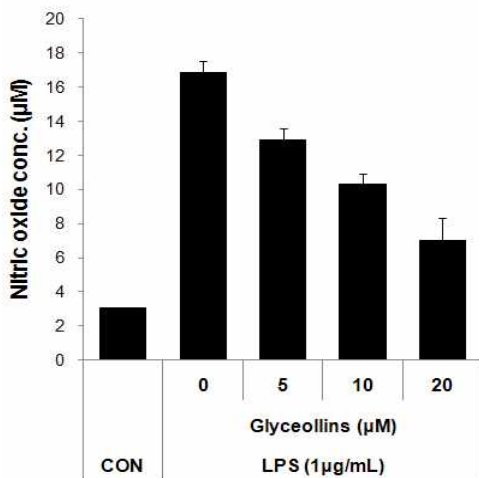
Fig. 43 Effects of glyceollins on IL-6 and TNF- $\alpha$  production in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. Cytokines production was determined in cell culture media from RAW264.7 cells pretreated with glyceollins (0 - 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 2 h, followed by LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) treatment for an additional 24 h as described in 'Materials and Methods'. The results are expressed as means  $\pm$  SD of three separate experiments. \* $p < 0.05$  compared to control; # $p < 0.05$  compared to LPS stimulation.

#### 다. Nitric Oxide (NO) 생성량

RAW cell에 LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )와 시료를 0-6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 넣고 24시간 배양하였다. 분석은 NO assay kit (Promega, Madison, WI, USA)에서 제시한 실험법을 따랐다. 배양액을 수집하고 동량의 Griess reagent를 혼합하여 nitrite함량으로 NO 생성량을 측정하였다.

•Glyceollins이 염증매개물질인 NO의 생성량 또한 억제할 수 있는지를 알아본 결과, glyceollins은 농도 의존적으로 LPS에 의해 증가된 NO를 유의적으로 감소시켰으며, NO생성효소로 알려진 iNOS의 발현을 감소시켰다 (Fig. 44).

A.



B.

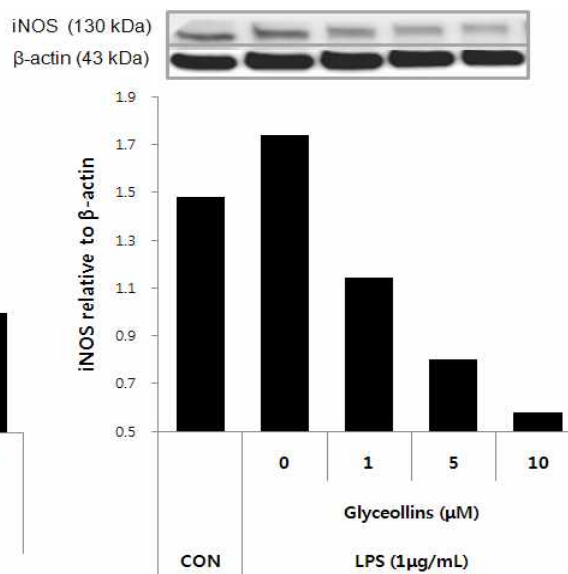


Fig. 44 Effect of glyceollins on LPS-induced NO production in RAW264.7 cells. a. NO secretions were determined in cell culture media from RAW264.7 cells treated with glyceollins and LPS as described in Fig. 3. b. Whole cell extracts (30  $\mu\text{g}$ ) were subjected to Western blot analysis. Upper part shows a representative Western blot data for iNOS. Bar graph (lower part) shows densitometric evaluation of iNOS relative to b-actin. Beta-Actin was used as loading control. The results are expressed as mean  $\pm$  SD of three separate experiments. \* $p < 0.05$  compared to control; # $p < 0.05$  compared to LPS stimulation

#### 라. NF- $\kappa$ B activity와 발현

염증 매개물의 생성은 NF- $\kappa$ B의 전사 발현으로 인해 조절된다. 본 실험과정에서 glyceollins이 COX-2 발현을 억제하였으므로, LPS와 관련된 NF- $\kappa$ B 활성 조절에 영향을 끼치는지를 조사하였다. Western blot은 앞에서 언급한 내용과 동일한 방법으로 시행하였고, immunocytochemistry는 coverslip상에서 배양, 시료처리, 고정화 (95% EtOH), 세정 (0.3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ )과정을 거친 세포를 blocking reagent (Ultra Teck HRP, IMMUNOTECH, USA)를 사용하여 상온에서 10분 동안 처리한 후, 1차 antibody (1:200의 TBS buffer로 희석)로 상온에서 1시간 동안 incubation하고, 이어서 2차 antibody-peroxidase complex (DAKO, Denmark)를 이용

해 발색시켰다. Slide는 가볍게 탈수시킨 다음, 형광현미경으로 관찰하였다.

• Glyceollins은 LPS에 의해 유도된 p65의 발현을 감소시킴과 동시에 p65의 인산화를 동시에 억제하였고, LPS에 의한 p65의 핵내로의 증가된 이동이 glyceollins (5, 10  $\mu$ M) 으로 인해 뚜렷이 감소하는 것을 확인하였다. NF- $\kappa$ B와 dimer를 형성하고 있는 I $\kappa$ -Ba의 발현량 조사결과, LPS에 의해 감소되었던 I $\kappa$ -Ba가 glyceollins에 의해 대조군세포 수준으로 유지되는 것을 확인하였다 (Fig. 45, 46).

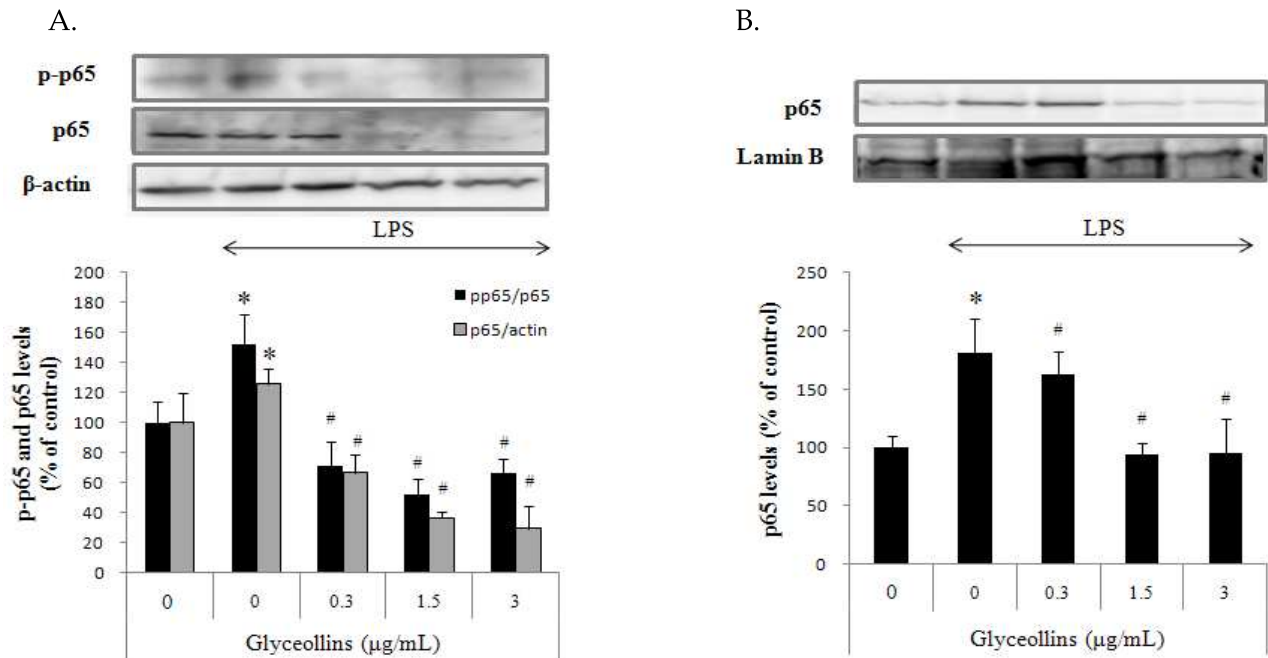


Fig. 45. Effects of glyceollins on NF- $\kappa$ B. a Western blot of p-p65 and p65. RAW264.7 cells were treated with medium containing 0.3, 1.5 and 3  $\mu$ g/mL glyceollins for 16 h followed by LPS (1  $\mu$ g/mL) treatment for an additional 2 h, collected, and whole cell extracts (30  $\mu$ g) were subjected to Western blot analysis. The representative data of three separate experiments are shown. \* $p$ <0.05 compared to control; # $p$ <0.05 compared to LPS stimulation.

B.

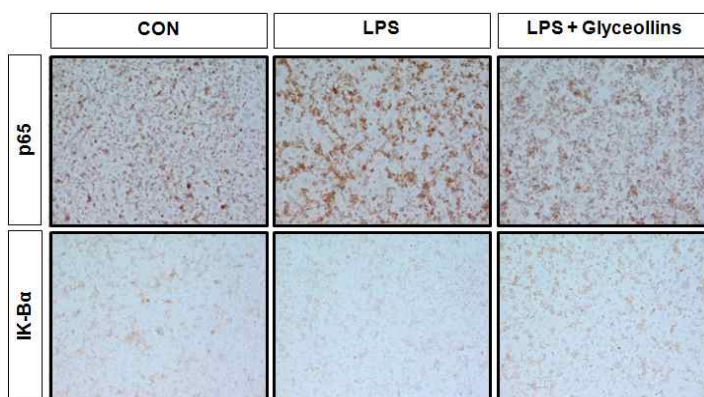


Fig. 46 Effects of glyceollins on I $\kappa$ B and p65 protein production. The cells were colorized with diaminobenzidine, and dehydrated with ethanol (95% and 100%; magnification  $\times$ 100). CON, negative control containing DMSO only as vehicle; LPS, LPS (1  $\mu$ g/mL)-treated cells; LPS + glyceollins, LPS (1  $\mu$ g/mL) and glyceollin (1.5  $\mu$ g/mL)-treated cells.

## 마. 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)로 유도된 동물 염증모델

### (1) 동물사양

수컷의 ICR 마우스를 샘타코 (경기 오산)에서 구입하여, 마우스가 1주일간 Chow 사료 (Standard feed, 중앙실험동물, Korea)와 물을 자유급식토록 하였고, 20±2°C, 상대 습도 44~55%의 사육장에서 적응기를 거치도록 하였다. 모든 실험은 경북대학교의 “실험동물 이용의 주의사항 가이드”에 따라 실시되었다.

### (2) Mouse ear 조직내 TPA에 의한 염증유도

12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)를 염증 유도제로 사용하였다. TPA는 DMSO에 녹여 최종농도가 5 mM이 되도록 하였다. 10 µl의 TPA solution을 mouse ear의 안쪽과 바깥쪽에 도포하고 30분간 방치후, 시료를 농도별로 ear 안, 밖 표면에 다시 도포하여 4시간 동안 방치하였다. Hydrocortisone (HC, 1%)은 positive control로 사용하였다. Mice는 경추탈골로 희생시키고, ear 조직을 분리하여 고정시켰다.

### (3) Mouse ear 조직의 형태변화

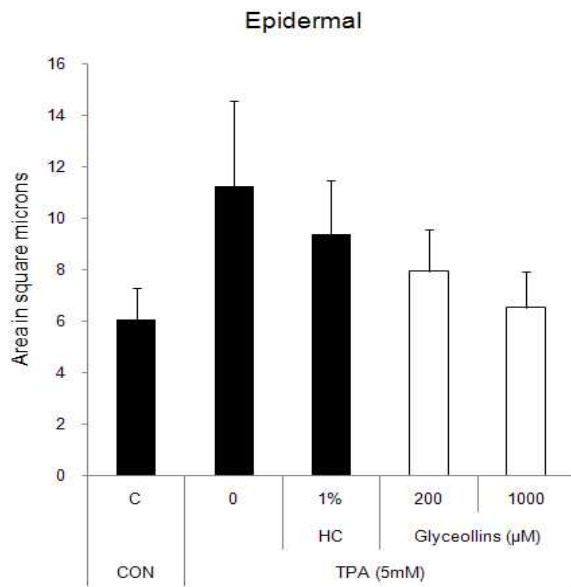
고정된 mouse ear 조직은 Microtome (LEICA RM2125RT, Nussloch, Germany)으로 각각 2.0 µm 두께로 절편을 만들고 Harry's hematoxylin-eosin으로 염색한 후, light microscope와 image analysis program (i-Solution, Nikon)을 이용하여 상피와 진피 조직내 부피변화를 관찰하였다.

• Mouse를 이용해 TPA로 유도된 염증반응에서 glyceollins 처리효과를 살펴본 조직실험결과, TPA 처리된 mouse ear section은 상피와 진피의 뚜렷한 두께 증가와 진피층의 염증세포 증가 또한 확인되었다. TPA의 이러한 효과는 1,000 µM glyceollins 처리군에서 현저히 감소 (TPA 처리군과 비교하여, 상피부피 58%, 진피부피 23% 감소)하였고, 그 감소수준은 대조군 및 positive control로 사용된 hydrocortisone (HC)과 유사하였다 (Fig. 47 A,B,C).

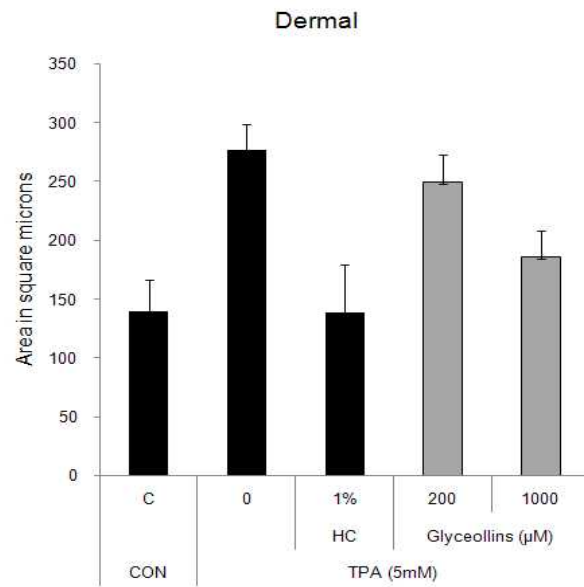
• Glyceollins의 항염증효과는, LPS에 의해 유도되는 염증반응 경로를 단계별로 차단한 결과로 사료된다.



A.



B.



C.

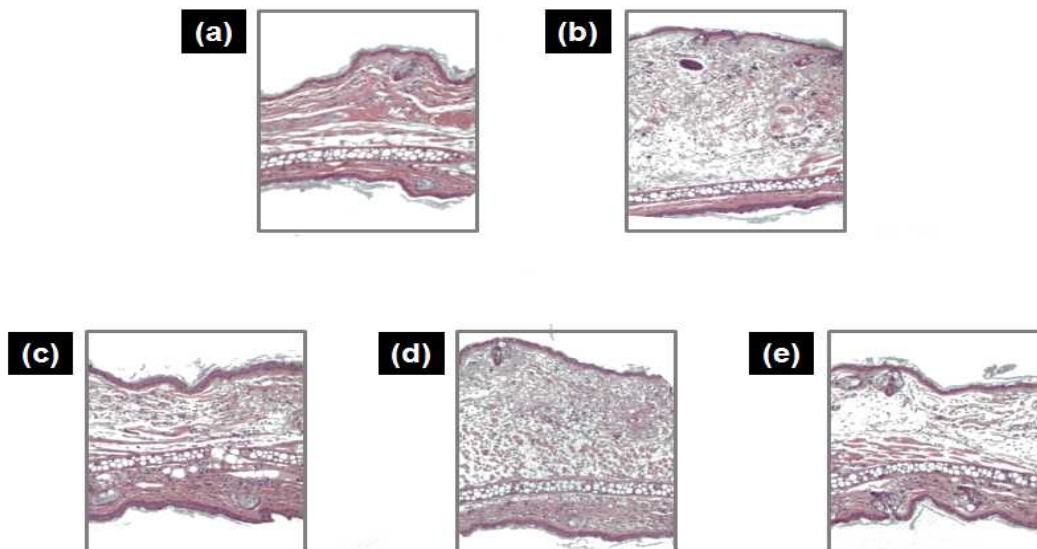


Fig. 47. Inhibitory effects of glyceollins on TPA-induced mouse ear swelling. A, Epidermal thickness of ear. B, Dermal thickness of ear. Each value is expressed as the mean  $\pm$  SD of triplicate determinations. \* $p < 0.05$  compared to control; # $p < 0.05$  compared to TPA stimulation

## 5. Glyceollins의 항당뇨활성

### 가. Glyceollins이 당대사에 미치는 영향 - 세포수준 연구

#### (1) 3T3-L1 지방세포에서 인슐린 자극에 의한 포도당 흡수

##### A. Insulin response assay

3T3-L1 adipocyte를 이용하여 인슐린 농도에 따라 3T3-L1 adipocytes의 glucose uptake에 미치는 영향을 조사하기 위해서 인슐린 0, 1, 3, 5, 10, 25, 50ng/mL에서의 glucose uptake 정도를 측정하였다.

3T3-L1 fibroblast는 10% fetal calf serum을 함유한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)으로 10% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 3T3-L1 fibroblast은 175 mm<sup>2</sup> flask에 배양하여 confluent된 지 2일이 지난 후에 medium에 1 µg/mL 인슐린, 0.25 µM dexametasone, 0.5 mM isomethylbutylxanthine를 넣어 2일 동안 배양하여 adipocytes로 분화시키고, 이 후 1주일 동안 2일에 한번씩 medium을 교환한 후, 이 adipocytes는 12 well plate로 옮기고, 2일 동안 배양하였다. adipocytes를 phosphate buffer saline (PBS)로 세척한 후 1% bovine serum albumin을 함유하고 있는 포도당이 없는 DMEM에 glyceollin을 0.5uM과 5 uM 농도로 medium에 섞어 8시간동안 배양한 후 37°C에서 30분 동안 배양하고 1 µCi/mL of [<sup>14</sup>C]2-deoxyglucose 와 1 mM 포도당을 첨가하고 22°C에서 30분 동안 배양하였다. 이 단계에서 발효대사체를 처리하였을 때와 처리하지 않았을 때 인슐린을 0 ng (basal), 1 ng/mL 그리고 50 µg/mL를 처리하였다. glyceollin을 처리하고 1 ng/mL 인슐린을 처리한 것이 추출물 없이 인슐린 50 ng/mL를 처리한 것만큼 또는 그 보다 더 포도당 uptake가 증가하는 지 여부를 조사하였다. nonspecific하게 포도당의 uptake를 증가시키는 추출물을 선별하기 위해서 인슐린 없이 추출물을 처리한 경우가 glyceollin과 인슐린 모두 없을 때 보다 포도당의 uptake를 증가시키는지 확인하였다. 배양한 세포는 10 mM 포도당이 함유한 PBS으로 세척하고 0.5 N NaOH로 세포를 분해 (lysis)하였다. 분해된 세포를 초산으로 중화시키고 이것에 함유된 <sup>14</sup>C의 함량을 베타 counter로 읽었다 (Fig. 48).

• 3T3-L1 adipocytes에 인슐린을 농도별로 처리하였을 때 포도당 uptake가 비례적으로 증가하였다.

• 3T3-L1 adipocytes에 인슐린 1 ng/mL와 glyceollin을 처리하였을 때 dose-dependent하게 포도당 uptake를 증가시켰고, 5 µM에서 가장 증가시켰다.

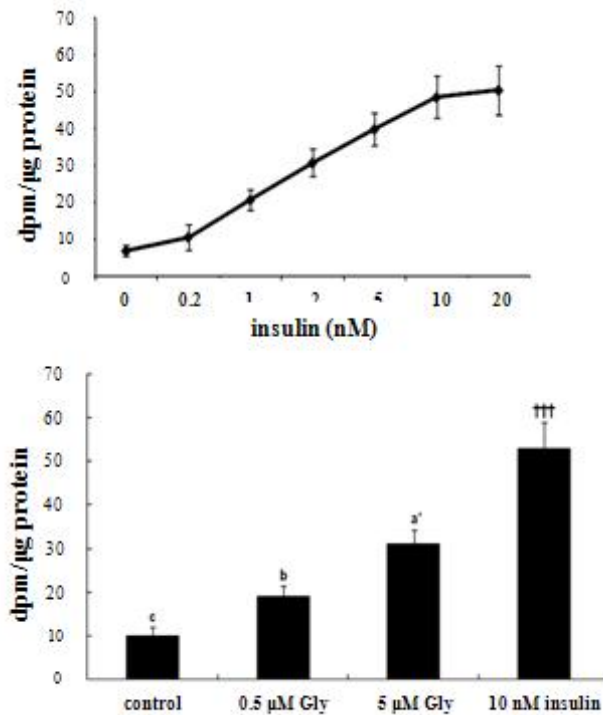


Fig. 48. Insulin-stimulated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. (A) Insulin-stimulated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes with the treatment of 0, 0.2, 1, 2, 5, 10, and 20 nM insulin. (B) Insulin-stimulated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes with the treatment of DMSO (control) or 0.5 or 5 μM glyceollins (Gly) plus 0.2 nM insulin. Rosiglitazone (2 μM) was used as a positive control. Each result is shown as the mean (SD (n = 5)). \*Significant effect of glyceollins at  $p < 0.05$ . a,b,c Bars with different superscripts were significantly different at  $p < 0.05$ . † † † Significant difference between the control and rosiglitazone at  $p < 0.001$ .

## (2) 3T3-L1 adipocytes에 중성지방 축적 및 PPAR-γ agonist로 역할

### (가) 중성지방 축적도

3T3-L1 fibroblast에 differentiation media와 함께 glyceollin을 0.5 μM과 5 μM 농도로 medium에 섞어 배양하여 지방세포로 분화시켰다. 6일 동안 분화한 후 중성 지방의 축적을 측정하였다. 분화된 세포는 PBS로 wash한 후 lysis buffer로 용해 시켜 중성지방 측정 kit로 측정하였다.

• 3T3-L1 지방세포로 분화되는 정도는 중성지방의 양으로 결정하였고, glyceollin은 농도가 증가함에 따라 지방세포로의 분화를 억제하는 경향을 나타내었다 (Fig. 49).

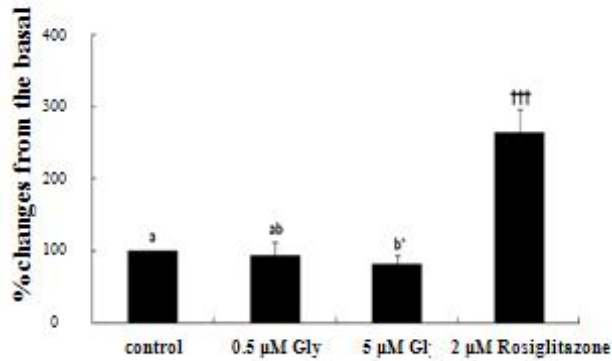


Fig. 49. Triglyceride accumulation with glyceollins.

(나) PPAR- $\gamma$  agonist로의 역할

Human embryo kidney (HEK) 293 cells을 transfection 24시간 전에 96 cell plate에 well 당  $1 \times 10^4$  cells을 seed하였다. 이 세포에 Lipofectamine PLUS reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) 을 사용하여 PPRE-luciferase construct (firefly pGL3-DR-1-luciferase;  $0.12 \mu\text{g}$  DNA/well), pSV-SPORT-PPAR- $\gamma$  expression vector ( $0.12 \mu\text{g}$  DNA/well)와 pSV-SPORT-retinoid X receptor (RXR)- $\alpha$  vector ( $0.08 \mu\text{g}$  DNA/well)을 transfection 시켰다. transfection의 효율을 조사하기 위해서 renilla phRL-TK vector ( $10 \text{ ng}$  DNA/well)를 사용하였다. transfection 시키고 42시간 후에 세포는 serum-free DMEM containing 0.1% BSA에 20시간동안 넣은 후에 glyceollin이나 DMSO를 8시간 동안 처리하였다. 배양후에 PBS로 세척하고 1X passive lysis buffer (Promega, Madison, WI)로 cell을 lysis 시킨 후에 firefly (PPRE-luciferase)와 renilla luciferase activities를 the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) 사용하여 측정하였다. 활성은 firefly luciferase activity와 renilla luciferase activity의 비로 계산하였다.

- Glyceollin은 농도에 관계없이 PPAR-r agonist로는 작용하지 않았다 (Fig. 50)

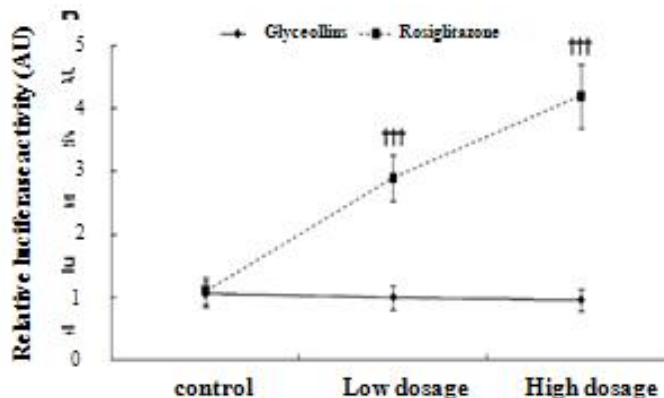


Fig. 50 PPAR-r agonistic activity with glyceollin.

(3) Min6 세포에서 포도당 자극 insulin secretion과 proliferation조사

(가) 베타세포 cell line인 Min6 세포에서 고농도의 포도당을 처리할 때 인슐린 분비정도를 측정하였다. Min6 cell line을 15% FBS, 2 mM L-glutamine, 100 IU/ml penicillin 와 100 µg/ml streptomycin 항생제를 포함하는 high glucose DMEM media에서 배양하였다. insulin 분비 실험을 하기 2일 전에  $1 \times 10^6$  cells 을 12-well plate로 옮기고 high-glucose DMEM, 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 100 IU/mL penicillin와 100 µg/mL streptomycin.으로 키우고 다음 날 0.2% BSA를 포함하는 low glucose DMEM으로 바꾸어 주었다. 분비실험을 하는 당일에 0.2% (w/v) BSA와 시험하고자하는 glyceollin을 넣은 KRB 용액 (pH. 7.2) 으로 바꾸어 주고 2시간 후에 각각의 well로 부터 KRB 용액을 모아 인슐린 농도를 측정할 때까지 -80 °C에 보관하였다. 12 well에 있는 cells은 끊어서 homogenization buffer (1 M HCl containing 5% (v/v) HCOOH, 1% (v/v) trifluoroacetic acid and 1% (w/v) NaCl)로 용해시키고, peptides를 세포로부터 alcohol extraction method으로 추출하였다. media로 분비된 것과 세포에 있는 insulin의 양을 insulin RIA Kit (Linco Research, Inc., St Charles, MO, USA)으로 측정하고 세포의 양을 보정하기 위해서 세포의 homogenate의 단백질 양을 Bradford protein assay (Bio-Rad, Inc.)로 측정하였다. Min6 cell을 96 well로 옮겨 glyceollins을 두 가지 농도로 처리하고 4시간과 8시간에 proliferation을 WST-1 kit를 이용하여 측정하였다.

• Min6 cell에 고농도 포도당 (20 mM)을 포함하는 KRB 용액에 glyceollin을 두 가지 농도로 처리하였을 때 농도에 비례하여 인슐린 분비가 DMSO에 비해 현저하게 증가하였다 (Fig. 51) 그러나 이미 미국 FDA에서 허가를 받은 GLP-1 agonist인 exendin-4보다는 인슐린 분비가 낮았다. 또한, glyceollin은 4시간과 8시간에 모두 DMSO 처리군에 비해 농도에 따라 proliferation을 증가시켰다 (Fig. 52).

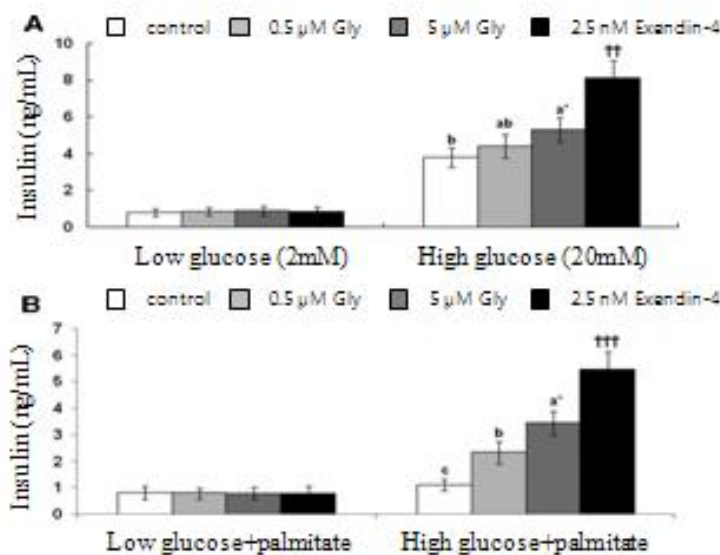


Fig. 51. Glucose-stimulated insulin secretion with glyceollin

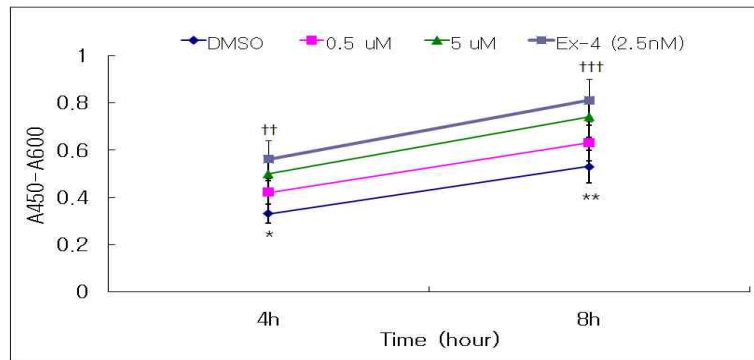


Fig. 52. Effect of glyceollins on beta-cell proliferation.

#### (4) 인슐린 신호전달 기전 조사

##### (가) 아팍토시스 (Apoptosis)

Min6 세포내 아팍토시스는, palmitate (500  $\mu$ M)과 0.5-5  $\mu$ M glyceollins 및 extendin-4 (2.5 nM) 을 처리한 후, cell death detection ELISA<sup>plus</sup> Roche Diagnostic Co. (Indianapolis, IN)를 이용해 측정하였다. 이 방법은 cytoplasm에 존재하는 mono-, oligonucleosome을 측정하여, 아팍토시스와 관련된 DNA degradation을 측정해내는 것이다. 아팍토시스를 겪는 세포는 405 nm에서 Aureon plate reader (Aureon Biosystems)를 정량화시켰다.

• Glyceollins는 palmitate에 의해 유도된 아팍토시스를 농도의존적으로 감소시켰고, extendin-4 또한 큰폭으로 아팍토시스를 감소시켰다. 이러한 glyceollins 및 extendin-4에 의한 Min6 세포내 아팍토시스 감소는 palmitate 가 포함되지 않은 배지상에서도 동일한 경향을 나타내었다 (Fig. 53).

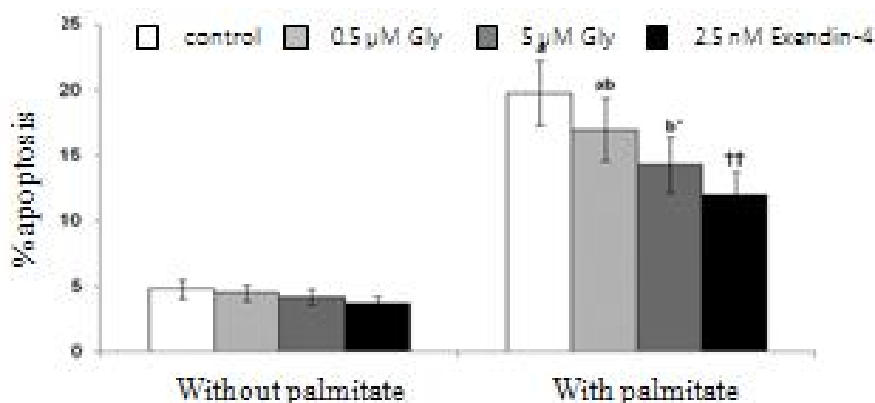


Fig. 53. Cell apoptosis with and without treatment with palmitate in Min6 cells. (C) Cell apoptosis in Min6 cells with the treatment of DMSO (control) and 0.5 or 5  $\mu$ M glyceollins (Gly) with and without 500  $\mu$ M palmitate treatment in high glucose media (20 mM). Each result is shown as the mean (SD (n = 5)). \*Significant effect of glyceollins at p<0.05. †† Significant

difference between the control and exendin-4 at  $p < 0.001$ . † † † at  $p < 0.001$ .

(나) Min6 세포내 ER stress에 반응하는 gene들의 발현

Min6 세포는 palmitate와 glyceollins 및 exendin-4와 24시간 동안 처리하여 Trizol reagent를 이용해 분리하여 isopropyl alcohol로 추출 및 침전시켰다. cDNA는 superscript III reverse transcriptase를 이용해 total RNA로부터 합성되었고, RT-PCR은 Tag DNA polymerase로 수행하였다. 동일 volume의 cDNA는 SyberGreen mix과 specific primer (totalX-box-binding protein-1 (XBP-1), activating transcription factor (ATF)-4, ATF-6, and C/EBP-homologous protein (CHOP)들과 함께 혼합시켜 real-time PCR machine으로 분석하였다. Expression 량은 GAPDH로 정량화하였다.

• Glyceollins은 ER stress와 관련된 gene (XBP-1, ATF-4, ATF-6, and CHOP)의 발현을 농도의존적으로 감소시켰다. Exendin-4 또한 같은 경향을 나타내었으나 감소폭은 glyceollins에 비해 더 크게 나타났다. 이러한 결과를 통해, palmitate가 Min6 세포내에서 ER stress를 통해  $\beta$ -세포내 아파토시스를 증가시키며, glyceollins은 이 과정에서 ER stress 제거제로 작용함을 알 수 있다 (Fig. 54).

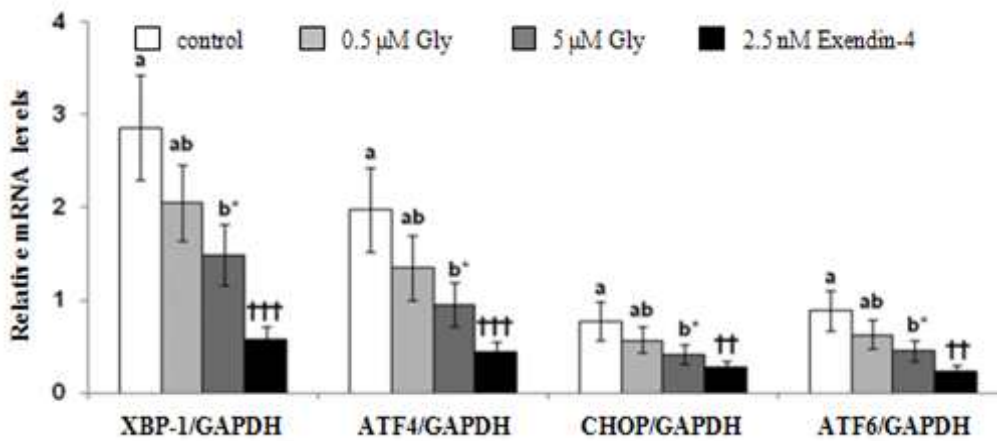


Fig. 54. Expression of response genes to ER stress in Min6 cells. The mRNA levels of the ER stress response genes, XBP-1, ATF-4, ATF-6, and CHOP in Min6 cells with the treatment of DMSO (control) and 0.5 or 5  $\mu$ M glyceollins (Gly). Exendin-4 (2.5 nM) was used as a positive control. Each result is shown as the mean (SD) (n = 5). \*Significant effect of glyceollins at  $p < 0.05$ . <sup>a,b</sup> Bars with different superscripts were significantly different at  $p < 0.05$ . † † Significant difference between the control and exendin-4 at  $p < 0.01$ . † † † At  $p < 0.001$ .

(5) GLP-1 분비 측정

대장암세포인 NCI-H716 cell line을 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 100 IU/mL penicillin 와 100  $\mu$ g/ml streptomycin 항생제를 포함하는 RPMI media에 suspension culture를 한 후 cell을 Matrigel (Becton Dickinson, Bedford, MA, USA)을 입힌 dish로 옮겨 키우면 내분비 세포로 분화되었다. GLP-1 분비 실험을 하기 2일 전에  $1 \times 10^6$  cells Matrigel을 입힌 12-well culture plates로 옮긴 후 high-glucose DMEM, 10% FBS, 2 mM L-glutamine와 항생제를 넣어 배양하였다. GLP-1 분비실험을 하는 당일에 0.2% (w/v) BSA와 시험하고자하는 glyceollin을 두 농도로 처리한 KRB 용액 (pH. 7.2) 으로 바꾸어 주고, 2시간 후에 각각의 well로 부터 KRB 용액을 모으고, 모은 KRB 용액에 50  $\mu$ g/ml phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) and diprotin-A (34  $\mu$ g/ml) 을 첨가하여 GLP-1 농도를 측정할 때까지  $-80^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다. well에 있는 cells 은 긁어서 homogenization buffer (1 M HCl containing 5% (v/v) HCOOH, 1% (v/v) trifluoroacetic acid and 1% (w/v) NaCl)로 용해시키고, peptides를 세포로부터 alcohol extraction method으로 추출하였다. 배지로 분비된 것과 세포에 있는 GLP-1의 양을 GLP-1 (7 - 36) Active RIA Kit (Linco Research, Inc., St Charles, MO, USA)으로 측정하고 세포의 양을 보정하기 위해서 세포의 homogenate의 단백질 양을 Bradford protein assay (Bio-Rad, Inc.)로 측정하였다.

• 대장암세포인 NCI-H716 cell line에 고농도 포도당 (20 mM)을 포함하는 KRB 용액에 glyceollin을 두 가지 농도로 처리하였을 때 농도에 비례하여 인슐린 분비가 DMSO에 비해 현저하게 증가하였다 (Fig. 55).

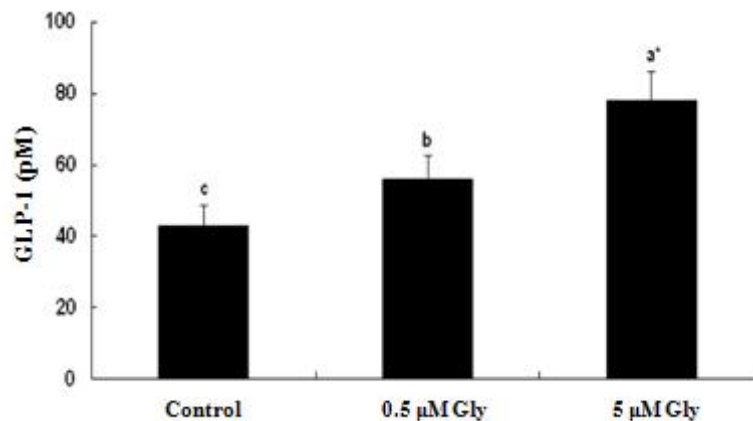


Fig. 55. GLP-1 secretion in enteroendocrine NCI-H716 cells. The total GLP-1 content of the supernatants in enteroendocrine NCI-H716 cells incubated with DMSO (control) or 0.5 or 5  $\mu$ M glyceollins (Gly) in high glucose media (20 mM). Each result is shown as the mean (SD) ( $n = 5$ ). \*Significant effect of glyceollins at  $p < 0.05$ . <sup>a,b,c</sup> Bars with different superscripts were significantly different at  $p < 0.05$ .



나. 당뇨병 동물모델에서 glyceollins의 당대사 조절 기능

정상대에서 제공받은 glyceollin rich 콩을 80% EtOH을 가한 후 homogenizer를 사용하여 콩을 균질화시킨 것을 50°C 수조에서 1시간동안 연속적으로 진탕하여 추출한 다음, 14,000 x g에서 10 분간 원심분리하였다. 여액을 0.45 µm PVDF filter로 여과한 후 사용하였다. 한편 HPLC 분석을 통하여 발효콩에만 glyceollin이 함유되어 있다는 것을 확인하였다.

(1) 제2형 당뇨병 동물 모델에서 glyceollins 함유 발효콩의 항당뇨 효과 조사

(가) 연구의 목적: Glyceollins이 강화된 발효콩을 유효성분으로 포함하는 발효콩의 항당뇨 효과를 조사하였다.

(나) 실험 디자인 : 제2형 당뇨병 모델로 streptozotocin을 20 mg/kg bw/day으로 두 번 복강 주사하여 공복혈당을 약 10 ~ 12 mM인 제2형 당뇨병 마우스 (C57BL6J 마우스)를 대상으로 식이의 20%를 발효콩, 비발효콩 또는 카제인 (대조군)을 포함하여 제조한 식이를 8주 동안 투여한 후 이들의 당뇨병의 진전을 조사하였다. 양성 대조군으로 정상 마우스를 정하였다.

Table 18. Composition of experimental diets

	Casein diet	Unfermented soybean (UFS) diet	Fermented soybean (FSG) diet
Carbohydrates (Energy %)	39.6	39.8	40.1
Protein (Energy %)	19.9	18.3	18.1
Fat (Energy %)	40.5	41.9	41.8
Fiber (%)	8.9	9.0	8.7
Total isoflavonoids (%)		0.010	0.012
Isoflavonoid aglycones (%)	-	0.0005	0.0009
Glyceollins (%)	-	-	0.0014

경구내당능 검사 : 당뇨병 마우스가 정상 마우스에 비해 혈당 상승이 높아 최고혈당이 높았으며 최고혈당에 이른 후에는 혈당 감소가 현저히 지연되었고, 이는 당뇨병 마우스군이 정상 마우스군에 비해 인슐린 저항성이 높다는 것을 의미한다. 당뇨병 마우스군에 발효콩을 섭취시킨 경우 당뇨병 마우스군 또는 비발효콩을 섭취시킨 경우에 비해 혈당 상승도 낮고 최고혈당 또

한 낮은 경향을 나타내었으며, 혈당 강하도 빨랐다 (Fig. 56).

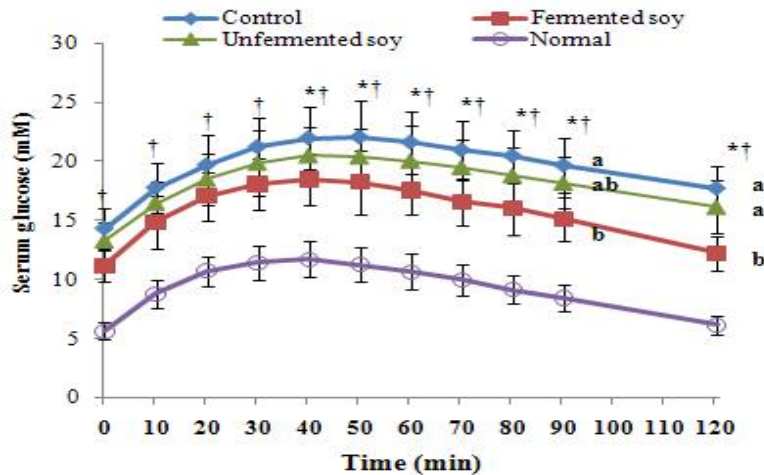


Fig. 56. The changes in blood glucose levels during insulin tolerance testing. After an 8-week treatment period of administering casein (control), fermented soybeans containing glyceollins (FSG), unfermented soaked soybeans (UFS), or rosiglitazone (RGZ), an insulin tolerance test was performed in overnight fasted mice with an intraperitoneal injection of insulin (1 U/kg bw). \*Means were significantly different among different treatment groups of diabetic mice at  $p < 0.05$ . † Means of the non-diabetic group were significantly different from the control group of the diabetic mice at  $p < 0.001$ .

(다) 경구 내당능 검사 결과를 곡선 아래 면적(area under the curve)으로 계산하였을 때도 당뇨병 마우스군이 정상 마우스군에 비해 면적이 넓었으며 이것은 포도당을 경구 투여하였을 때 혈당이 더 오랫동안 높게 유지한다는 것을 나타낸다. 또한 당뇨병 마우스군에 발효콩을 섭취하였을 때, 곡선 아래 면적이 당뇨병 마우스에 비해 적었고, 비발효콩을 섭취한 경우 당뇨병 마우스에 비해서는 낮았지만 혈당 강하 효과가 있었으나, 발효콩을 섭취한 경우에 비해서는 적었다.

(라) 경구 내당능 검사를 하는 동안 혈청 인슐린 농도를 측정하였을 때 초기와 후기 모두 당뇨병 마우스군이 정상 마우스군에 비해 낮았으며 당뇨병 마우스군 중에서 발효콩 섭취군이 다른 군에 비해 초기 변화를 나타내는 0 ~ 40분까지 혈청 인슐린 농도가 다른 군들에 비해 높았고, 반면 후기 변화는 군들 사이에 차이를 나타내지 않았다 (Fig. 57).

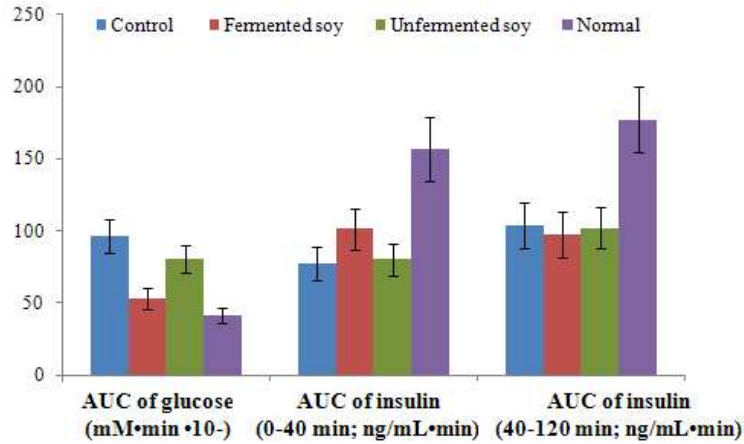


Fig. 57. Area under the curve of glucose and insulin.

(마) 따라서, 당뇨병 마우스에 glyceollins이 강화된 발효콩을 섭취시킨 경우, 혈당 항상성 유지 효과가 있음을 확인하였다.

(바) 또한, 당뇨병 마우스, 정상 마우스, 본 발명의 발효콩과 비발효콩을 각각 투여한 당뇨병 마우스의 공복 혈당과 혈청 인슐린을 식이 섭취 후 인슐린 내성도 검사를 하기 위한 항상성 모델 분석 (homeostasis model assessment of insulin resistance; HOMA<sub>IR</sub>)을 통하여 인슐린 저항성 변화를 측정하였는데 발효콩이 비발효콩에 비해 HOMA<sub>IR</sub>의 값을 감소시켜 인슐린 저항성을 낮추는 것을 알 수 있었다.

(사) 인슐린 저항성을 나타내는 또 하나의 지표인 인슐린 tolerance test 결과에서도 HOMA<sub>IR</sub>의 결과와 같은 결과를 나타내었다. 인슐린을 복강으로 투여한 후 혈당의 변화를 관찰하였을 때 정상 마우스는 혈당이 급격하게 감소하여 30분 후에 공복 혈당의 40%까지 감소하였고, 60분 후에는 50%까지 감소하여 정상 마우스가 인슐린에 대한 민감성이 높다는 것을 확인하였다. 그러나 당뇨병 마우스는 인슐린을 투여한 후 혈당의 감소가 정상 마우스에 비해 현저하게 낮아 30분 후에 10%가 감소하였고 90분 후에도 20%보다 적게 감소하였고, 비발효콩을 투여하였을 때도 유사한 결과를 나타내었다. 하지만, 당뇨병 마우스에 발효콩을 투여하였을 때는 인슐린 민감도가 향상되어 30분 후에는 25%정도 감소하였고, 90분 후에는 30%이상 감소하였다 (Fig. 58).

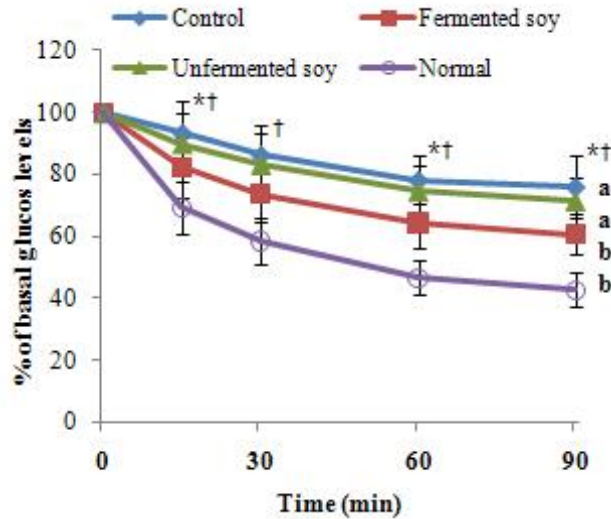


Fig. 58. Results of insulin tolerance test.

(아) 따라서, 당뇨병 마우스에 glyceollins이 강화된 발효콩을 투여하였을 때, 당뇨병 마우스에 비해 인슐린 민감도가 현저히 증가하였다.

(자) 또한, 당뇨병 마우스에 glyceollins이 강화된 발효콩의 투여시, 당뇨병으로 인해 나타나는 간 내 저장된 글리코겐의 저하 및 중성지방의 축적에 변화가 있는지 확인하기 위하여 간을 적출하여 저장된 글리코겐 및 중성지방의 양을 비교 분석하였고, 그 결과, 간에 저장된 글리코겐은 정상 마우스보다 당뇨병 마우스에서 더 낮게 나타났고 당뇨병 마우스에게 glyceollins이 함유된 발효콩을 공급하였을 때, 비발효콩을 공급한 경우에 비해 간에 저장된 글리코겐의 양이 증가하였다. 반면 중성지방의 함량은 정상 마우스보다 당뇨병 마우스에서 높게 나타났고 당뇨병 마우스에게 glyceollins이 함유된 발효콩을 공급하였을 때, 비발효콩을 공급한 경우에 비해 중성지방의 양이 감소하여, 글리코겐과는 반대 경향을 나타내었다 (Fig. 59).

(차) 당뇨병으로 인해 낮아진 간 내 글리코겐 함량 및 높아진 중성지방의 함량을 glyceollins이 함유된 발효콩 섭취를 통해 정상적인 함량으로 변화시킬 수 있음을 확인하였다.

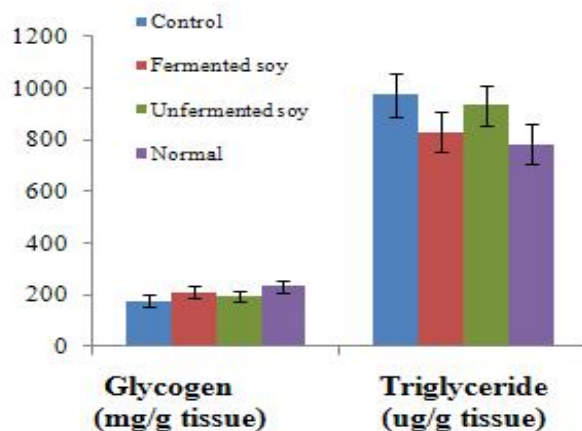


Fig. 59. Glycogen and triglyceride accumulation in the liver.

(카) 간에서의 인슐린 신호전달

Glyceollin이 함유되어 있는 콩에서 간에서 글리코겐의 축적이 증가하고 중성지방의 축적이 감소하는 것은 인슐린 신호전달이 향상되었다는 것을 의미하므로 이것을 간에서 인슐린 신호전달을 측정하였다 (Fig. 60). Glyceollin이 함유된 발효콩은 (FSG) 대조군에 비해서 Akt의 인산화를 향상시켰으며, 이것은 rosiglitazone을 (RGZ) 투여한 백서의 간에서와 유사하였으나 발아콩 (UFS)은 대조군에 비해서는 향상되었지만 FSG보다는 낮았다. 이것은 인슐린 신호전달이 향상되었다는 것을 나타내는 것으로 볼 수 있다.

또한, 중성지방의 합성과 관계가 있는 AMPK 인산화도 FSG군에서 대조군에 비해 높았으며 RGZ군과는 유사하였고 AMPK 인산화의 증가는 지방산 생합성의 조절효소인 Acetyl CoA carboxylase (ACC) 인산화를 증가시켜 지방산의 합성을 감소시킴으로 중성지방의 합성을 감소시켰다. 이러한 인슐린 신호전달의 향상과 AMPK인산화의 향상은 당신생합성을 억제시킬 수 있을 것으로 사료된다. 한편 당신생합성의 조절효소인 PEPCK의 발현을 조사하였는데 FSG군에서 PEPCK의 발현이 RGZ군만큼 감소하였다.

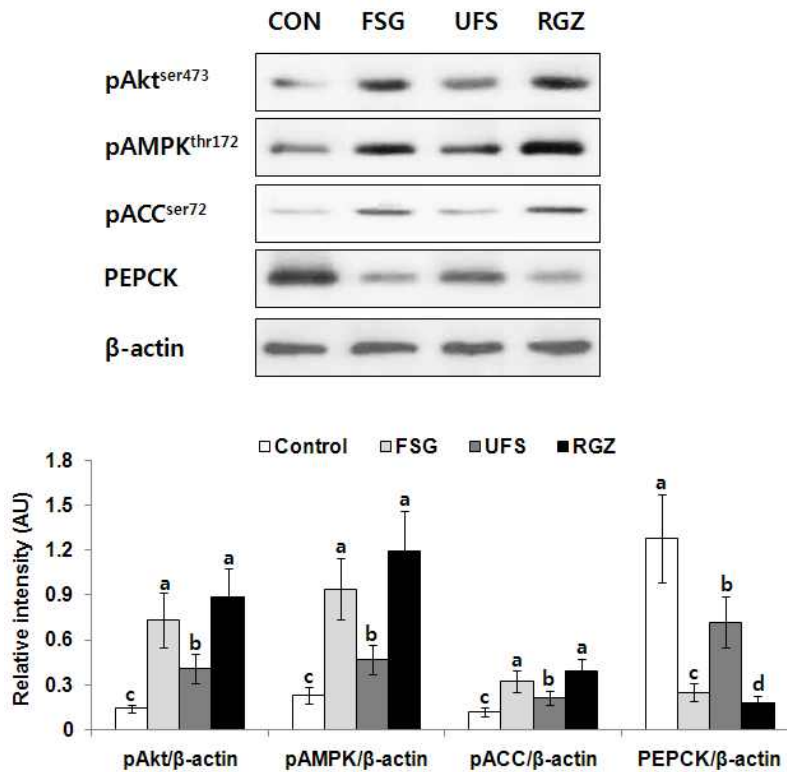


Fig. 60. Insulin signaling. The phosphorylation and expression levels of the Akt, AMPK, and ACC and expression of PEPCK, involved in insulin signaling were determined by immunoblotting with specific antibodies. The intensity of protein expression was determined using an Imagequant TL (B). These experiments were repeated four times for the liver, and the values are mean±SD. a,b,c Means on the same bars with different superscripts were significantly different at  $p < 0.05$ . † Means of the non-diabetic group were significantly different from the control group of the diabetic mice at  $p < 0.05$ .

(타) 췌장의 islet morphometry

제2형 당뇨병도 췌장의 베타세포의 양이 감소하면 악화되므로 islet morphometry를 측정하는 것은 제2형 당뇨병의 진전을 측정하는데 도움이 된다. FSG 투여군이 당뇨병 대조군에 비해서  $\beta$ -cell area가 높았으나 이것은 정상대조군에 비해서는 그 양이 적었고  $\beta$ -cell area는 USF군과 RGZ군에서는 당뇨병 대조군과 차이가 없었다. 이러한  $\beta$ -cell의 양의 변화는  $\beta$ -cell의 apoptosis와 관련이 있어서  $\beta$ -cell apoptosis는 당뇨병 백서들에서는 FSG군에서 가장 적었으나 정상 백서보다는 높았으며, USF군과 RGZ군은 대조군보다는 적었지만 FSG군에 비해서는 높았음. 그러므로  $\beta$ -cell area의 차이는  $\beta$ -cell의 apoptosis와 관련이 깊었다. 또한 당뇨병은  $\beta$ -cell의 양의 감소와 함께  $\alpha$ -cell이  $\beta$ -cell로 infiltration이 관련이 있어서 당뇨병 백서에서는  $\beta$ -cell과  $\alpha$ -cell의 비가 증가하는데, 이와 관련해서 FSG 투여가  $\beta$ -cell과  $\alpha$ -cell의 비를 변화시키는 지를 조사하였는데 FSG는  $\beta$ -cell과  $\alpha$ -cell의 비를 감소시켰으나 UFS군과 RGZ군은 당뇨병 대조군과 차이를 나타내지 않았다 (Table 19).

Table 19. The modulation of islet morphometry

	Diabetic Control (n=5)	UFS (n=5)	FSG (n=5)	RGZ (n=5)	Non-diabetic control (n=5)
$\beta$ -cell area (%)	3.1±0.7 <sup>b</sup>	3.5±0.7 <sup>b</sup>	4.3±0.8 <sup>a</sup>	3.6±0.8 <sup>b</sup>	5.9±0.8 <sup>†</sup>
Apoptosis (%) apoptotic bodies of islets)	2.36±0.32 <sup>a</sup>	2.03±0.33 <sup>b</sup>	1.45±0.31 <sup>c</sup>	2.06±0.34 <sup>b</sup>	0.91±0.32 <sup>†</sup>
Ratio of $\beta$ : $\alpha$ cells	5.9±0.8 <sup>a</sup>	5.4±0.8 <sup>a</sup>	4.3±0.7 <sup>b</sup>	4.9±0.8 <sup>ab</sup>	3.9±0.7 <sup>†</sup>

Values are mean±SD. The control group was fed a casein diet, UFS group a cooked soybean diet, FSG group a fermented soybean diet containing glyceollins, and the RGZ group a casein diet plus rosiglitazone (20 mg/kg bw/day).

<sup>a,b</sup>Values on the same row with different superscripts (a, b) were significantly different at P<0.05 by Tukey test.

<sup>†</sup> Significantly different from Px control at P<0.05.

다. Glyceollins강화제품(발효제품)의 인체시험을 통한 혈당 조절기능 평가

(1) 연구 방법

(가) 대상자 모집

대상자는 18세 이상 65세 미만인 비만 (체질량지수가 23 kg/m<sup>2</sup> 이상인 사람)이면서 공복 혈당이 100이상인 불내당 (glucose intolerance)을 가진 30명이었다.

[제외기준]

- ① 과거 심각한 질환을 앓았거나 현재 심각한 질환으로 치료 중인 환자
- ② 임신부 및 수유부
- ③ 조절되지 않은 중등도 이상의 고혈압 환자
- ④ 당뇨병으로 진단 받고 약물 치료 중인 사람
- ⑤ 갑상선 질환을 현재 앓고 있는 환자
- ⑥ 임신부, 수유부
- ⑦ 합병증이 있는 환자

(나) 콩 준비

발아콩과 glyceollins 함유 발효콩은 경상대학교 김정환 교수팀이 제조하여 공급하였고, 대조군은 콩의 영양성분을 고려하여 카제인, 콩기름과 설탕을 섞어서 같은 열량과 당을 공급하였다. 발효콩과 발아콩은 섭취하기 전에 물로 세척한 후 찜통에서 30분 동안 찌 후 사용하였다.

(다) 실험 군

임상 실험 대상자는 30명을 대상으로 1군에 10명씩 3군으로 무작위로 (double blind)나누어 1군은 대조군, 2군은 발아콩, 3군은 glyceollins 함유 발효콩을 35g 섭취시켰다.

(라) 체위 조사

조사대상자들의 체지방, 체중을 조사하였으며, 인체계측으로 신장과 체중을 측정하고 체질량지수 (body mass index, kg/m<sup>2</sup>)을 계산하고 % 체지방 (% body fat)과 근육량 (lean body mass: LBM)은 Body fat analyzer TBF-105 (Tanita Co., Japan)를 이용하여 직접 측정하였다.

(마) 경구내당능 검사

공복인 조사대상자의 체지방과 체중 등을 inbody로 측정하였다. 혈액을 채취한 후 식빵 (2쪽), 잼 (2 ts), 주스 (200 mL), 실험할 콩이나 대조군 35 g을 섭취시키고 (당으로 환산해서 100g의 포도당을 공급하였음), 1시간 2시간 후에 혈당을 측정하였다.

b. 경구내당능 검사

경구 내당능 검사하기 전날 12시간이상 금식하도록 하였고, 오는 순서에 따라 대조군, 발아콩

그리고 발효콩 순서로 군을 정하여 대상자들의 군의 배정을 무작위로 하였다. 아침에 와서 체중 및 체지방양을 측정하였으며, 측정후 혈액을 채취하고 배정된 군에 따라 1) 대조군, 2) 발아콩 또는 3) 발효콩을 섭취하였다.

모든 군에서 식빵 2쪽, 딸기잼 2 ts, 음료수는 공통으로 섭취하고 차이는 첨가한 대조군의 카제인, 콩기름과 당의 혼합물, 발아콩이나 발효콩 35g 이었다. Table 11은 섭취한 음식의 열량, 탄수화물, 지방과 단백질의 양을 적은 것으로, 이를 살펴보면 3군의 열량 및 영양소 배분은 똑같게 이뤄졌음을 알수 있다. 대부분의 열량을 탄수화물로 섭취하였고, 탄수화물로 환산했을 때 약 100g의 탄수화물을 섭취하였다. 본 연구에서 포도당을 사용하지 않고 복합당을 사용한 것은 glyceollins이 소화흡수에도 영향을 미칠 수 있기 때문이다.

Table 20. 경구내당능 검사전에 섭취한 식품의 열량 및 영양소 비

	열량	탄수화물	지방	단백질
식빵+잼+음료수	530 kcal	399.3 kcal (74.8%)	78.5 kcal (14.7%)	56.1 kcal (10.5%)
콩 또는 대조군	70 kcal	14.7 kcal (21%)	27.3 kcal (39%)	27.3 kcal (39%)
합계	600 kcal	41.1 kcal	105.8 kcal	83.4 kcal

(바) 식이 조사

식이를 모두 제한하기 어려우므로 경구 내당능 검사를 하기 2일 동안은 임상대상자들에게 콩 제품 (된장, 찜장, 청국장 등)의 섭취는 제한하도록 하였고 섭취할 경우 섭취량을 기록하도록 하였다.

(사) 생화학적 검사

혈청 총 콜레스테롤과 중성지방은 1차 방문 (0주)와 3차 방문 (12주)에 영동제약 시약을 이용하여 효소법으로 측정하고, HDL 콜레스테롤은 침전제를 이용하여 유미지립 (chylomicron), 저밀도 지단백 (low density lipoprotein: LDL), 초 저밀도 지단백 (very low density lipoprotein: VLDL)을 침전시킨 후, 상층액에 있는 HDL 중에서 콜레스테롤을 다시 효소법으로 측정하였다. LDL 콜레스테롤은 Friedwald 공식을 이용하여 구하였다. 혈당과 인슐린 농도는 경구 내당능검사 동안 채취한 혈액에서 측정하였으며, 혈청 human C-reactive protein (hs-CRP)으로 체내 염증 정도를 반영하는 지표를 측정하였다. 혈청 hs-CRP 농도는 CRP-Latex(II) X2 (Bayer Inc, USA)을 사용하여 측정하였다.

(아) 독성

본 임상시험의 주원료인 검정콩 펩타이드 분말은 콩의 발효 및 효소 분해를 통해 추출한 물



질로써 면 또는 조미식품 등에 적량 사용되고 있으며 특이한 부작용이 보고되어 있지 않았다. 또한 발아콩을 발효시킬 때 사용한 미생물이 중국에서 템파를 만들 때 사용하는 것과 같은 것이므로 특별히 독성이 없을 것으로 사료된다.

#### (자) 이상반응 점검

이상반응 (발열, 심각한 피로, 발진 등) 에 대한 정보는 수시로 피험자에게 자발적인 보고를 하도록 하며, 그 외에 시험용 건강기능식품 사용 기간 동안 시험담당자의 면담 및 문진 등 진료를 통하여 확인하였다. 이상반응 조사에는 발현일 및 소실일, 이상반응의 정도 및 결과, 시험용 건강기능식품과 관련하여 취해진 조치 및 시험용 건강기능식품과의 인과관계, 시험용 건강기능식품 이외 의심되는 약제명, 이상반응에 대한 치료 여부 및 내용 등이 포함되었다.

### (2) 임상실험 결과

#### (가) 경구내당능 검사 전날 섭취한 식품

경구내당능검사를 하기 전에 2일 동안은 콩제품을 섭취하지 않도록 대상자들에게 당부하였고, 만약에 섭취할 경우에는 기록하도록 하였으나 섭취하지 않았다.

#### (나) 경구내당능 검사

경구 내당능 검사하기 전날 12시간이상 금식하도록 하였고, 오는 순서에 따라 대조군, 발아콩 그리고 발효콩 순서로 군을 정하여 대상자들의 군의 배정을 무작위로 하였다. 아침에 와서 체중 및 체지방양을 측정하였으며 측정후 혈액을 채취하고 배정된 군에 따라 1) 대조군, 2) 발아콩 또는 3) 발효콩을 섭취하였다.

모든 군에서 식빵 2쪽, 딸기잼 2ts, 음료수는 공통으로 섭취하고 차이는 첨가한 대조군의 카제인, 콩기름과 당의 혼합물, 발아콩이나 발효콩 35g 이었다. Table 21은 섭취한 음식의 열량, 탄수화물, 지방과 단백질의 양을 적은 것임. 이것을 보면 세군의 열량 및 영양소 배분은 똑같았다. 대부분의 열량을 탄수화물로 섭취하였고, 탄수화물로 환산했을 때 약 100g의 탄수화물을 섭취하였다. 본 연구에서 포도당을 사용하지 않고 복합당을 사용한 것은 glyceollins이 소화흡수에도 영향을 미칠 수 있기 때문이다.

Table 21. 경구내당능 검사전에 섭취한 식품의 열량 및 영양소 비

	열량	탄수화물	지방	단백질
식빵+잼+음료수	530 kcal	399.3 kcal (74.8%)	78.5 kcal (14.7%)	56.1 kcal (10.5%)
콩 또는 대조군	70 kcal	14.7 kcal (21%)	27.3 kcal (39%)	27.3 kcal (39%)
합계	600 kcal	41.1 kcal	105.8 kcal	83.4 kcal

(다) 대상자들의 체질량 지수 (BMI)와 체지방

조사 대상자들의 비만도를 나타내는 BMI는 약 23.5로 개인차는 있었지만 정상 체중을 가진 학생들도 있었지만 일부는 상당히 비만한 학생들도 있었고, 체지방율도 남자로서는 체지방 함량이 상당히 높은 대상자들도 있었다. 그러나 군별로는 BMI와 체지방의 차이가 없었다 (Table 22)

Table 22. 대상자들의 군별 체질량지수와 체지방

	대조군	발아콩	발효콩
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	23.5±4.2	23.36±5.1	23.8±5.3
체지방 (%)	20.4±4.8	20.2±3.7	20.6±4.9

(라) 경구 내당능 검사 전 공복 혈청내 지방의 profiles

대상자들의 공복 혈청내 총콜레스테롤, LDL 콜레스테롤, HDL 콜레스테롤, 중성지방의 농도는 차이가 없었지만 혈청내 총콜레스테롤과 LDL 콜레스테롤의 농도는 정상범위내에 있지만 정상 범위 중에서는 약간 높은 쪽에 속하였고, 중성지방의 농도도 높은 상태를 유지하고 있었다. 체내 염증 정도를 나타내는 지표 중에 하나인 혈청 hsCRP 농도도 세군 사이에 차이가 없었다 (Table 23).

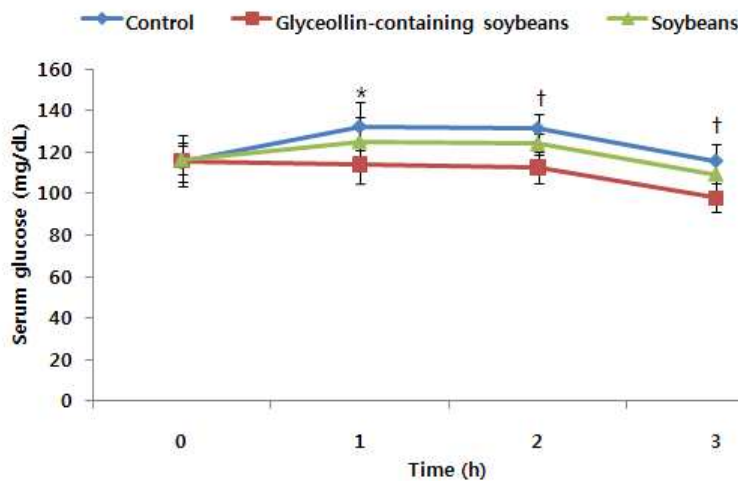
Table 23. 대상자들의 군 별 혈청 지방 profiles과 hsCRP 농도 (mg/dL)

	대조군	발아콩	발효콩
총콜레스테롤	205.1±33.3	209.6±35.3	207.3±37.4
LDL 콜레스테롤	114.0±20.3	117.4±22.6	117.1±19.5
HDL 콜레스테롤	59.3±8.9	60.3±7.3	58.2±8.4
중성지방	153.2±26.3	159.3±23.4	159.6±24.1
hsCRP	1.02±0.33	0.99±0.28	1.04±0.31

(마) 경구내당능 검사시 혈당 변화

경구내당능 검사 전 공복 혈당은 3군 사이에 차이가 없었다. Glyceollins 함유 발효콩은 경구내당능시험 동안 1시간, 2시간 3시간에 모두 대조군에 비해 혈당이 낮았고, 2시간과 3시간에는 발아콩에 비해서도 낮아서 glyceollins 함유 발효콩을 다른 식품과 함께 섭취했을 때 혈당 감소 효과가 있을 것으로 추정된다 (Fig. 61).

발아콩은 식품 섭취후 대조군에 비해서 낮은 경향을 보였지만 통계적으로 유의하게 낮지는 않았다.



\*Significantly different between the control and glyceollin-containing soybeans at P<0.05

†Significantly different among all three groups at P<0.05

Fig. 61. 경구 내당능 검사 동안 혈당의 변화

(바) 경구내당능 검사시 혈청 인슐린 변화

혈청 인슐린 농도는 경구내당능 검사 전 공복 혈청 인슐린 농도는 세군사이에 차이가 없었다 (Fig. 62). 경구내당능 검사 동안에 1, 2, 3시간의 혈청 인슐린 농도는 2시간째에 glyceollin 함

유 발효콩에서 혈청 인슐린 농도가 대조군에 비해 높은 경향이 있으나 통계적으로 유의한 차이를 나타내지는 않았다.

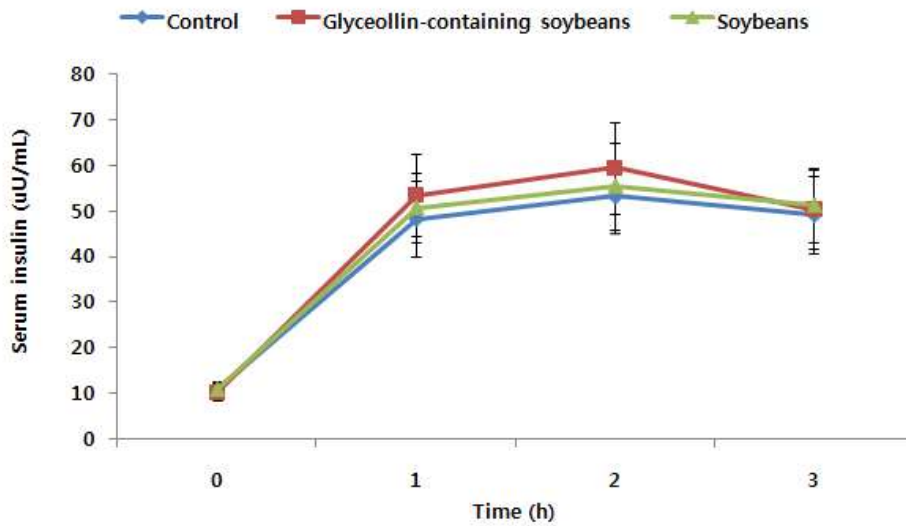


Fig. 62. 경구 내당능 검사 동안 혈청 인슐린 농도의 변화.

#### (사) 독성

본 임상시험의 주원료인 검정콩 펩타이드 분말은 콩의 발효 및 효소 분해를 통해 추출한 물질로써 면 또는 조미식품 등에 적량 사용되고 있으며 특이한 부작용이 보고되어 있지 않았다.

또한 발아콩을 발효시킬 때 사용한 미생물이 중국에서 템파를 만들 때 사용하는 것과 같은 것이므로 특별히 독성이 없을 것으로 사료된다.

#### (아) 이상반응 점검

과거에 건강기능성 식품 섭취시 이상반응 (발열, 심각한 피로, 발진 등) 에 대해 서 조사했을 때 이상이 없다고 하였다. 이번에 발효콩의 섭취후에도 이상 반응 (발열, 심각한 피로, 발진 등)이 나타나는 경우는 없었다.

결론적으로 glyceollin-containing 발효콩은 대조군에 비해 단기적으로도 혈당 강하 효과가 있다는 것을 알 수 있었고 인슐린 분비능을 촉진시키기 보다는 인슐린 작용을 향상시켜 혈당을 강하시키는 것으로 사료된다. 발효콩이 발아콩에 비해서도 혈당 강하 효과가 있을 것으로 사료된다.

## 제 4 절 Glyceollins 강화 발효식품 개발 및 산업화

### 1. 곰팡이를 이용한 콩의 발아 방법

발아콩의 곰팡이를 이용한 발효물을 제조하기 위하여 경상대에서 선발한 glyceollin 유도효과가 우수한 것으로 평가된 *R. oligosporus* 외 곰팡이 2종을 분양받아 콩에 접종하여 발효제품으로써의 개발을 위한 실험을 실시하였다. 콩은 아가콩과 메주콩을 사용하였고, 곰팡이 종류는 아래 Table 24과 같다.

Table 24. Sources of molds used in the soybean fermentation

	KACC No.	ATCC NO.
<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>oligosporus</i>	41363	22959
<i>Aspergillus oryzae</i>	60166	11493
<i>Aspergillus sojae</i>	60354	9362

#### 가. 콩의 전처리 및 곰팡이 접종

콩을 상온에서 5~6시간 수침하고, 두피제거 및 수세 후 반할하였다. plate에 20 g 정도의 콩을 담은 후, 콩의 수분 유지를 위해 plate 바닥에 멸균수를 충분히 적신 멸균 filter paper를 깔고, 각각의 곰팡이 포자를 접종하고, 23~25℃에서 2일 동안 배양하면서 발아상태와 곰팡이의 발효성상과 이취 등을 관찰하였다.

#### 나. 결과 및 고찰

콩의 종류와 곰팡이의 종류를 달리하여 발아중인 콩에 각각의 곰팡이 포자를 접종하여 3차례 반복 관찰한 결과는 아래와 Table 25 및 Table 26과 같다.

Table 25. Characteristics of germinated soybean and fungus-inoculated soybean

	아가콩			메주콩		
	<i>R. oligosporus</i>	<i>A. oryzae</i>	<i>A. sojae</i>	<i>R. oligosporus</i>	<i>A. oryzae</i>	<i>A. sojae</i>
1day	발아	발아	발아	발아	발아	발아
2day	균사, 포자 형성	균사, 포자 형성	균사, 포자 형성	균사, 포자형성	균사, 포자 형성	균사, 포자 형성
3day	균사로 뒤덮인 균괴	균사,포자	균사로 뒤 덮인 균괴	균사로 뒤덮인 균 괴	균사, 포자 형성	균사로 뒤 덮인 균괴

Table 26. Off-flavor and characteristics of fungus-inoculated and fermented soybeans

	아가콩			메주콩		
	<i>R. oligosporus</i>	<i>A. oryzae</i>	<i>A. sojae</i>	<i>R. oligosporus</i>	<i>A. oryzae</i>	<i>A. sojae</i>
1day	약간의 대두취, 균사생성	대두취, 균사생성	이취, 균사생성	대두취, 균사생성	이취, 균사생성	이취 및 대두취, 균사생성
2day	강한 대두취	이취	이취	대두취 및 균사로 뒤덮인 균괴	이취	이취 및 대두취, 균사생성
3day	강한 대두취 및 균사로 뒤덮인 균괴	이취 및 균사와 오염	이취 균사로 뒤덮인 균괴	대두취 및 균사로 뒤덮인 균괴	이취 및 균사와 오염	대두취 및 균사로 뒤덮인 균괴

모든 시료에서 1일차에서는 발아와 곰팡이의 발효가 완전히 이루어지지 않았으나, 2일차에서는 발아와 곰팡이의 균사의 성장이 모두 이루어졌다. 3일차에서는 균사로 뒤덮인 균괴가 형성되었다. *R. oligosporus*의 경우는 비교적 심한 이취가 나지는 않았으나 대두취가 강하였고, 나머지 *A. oryzae*, *A. sojae* 접종구는 콩의 종류에 상관없이 이취가 나타났고, 곰팡이 균사 외에 오염이 있었다. 반복 실험 중 콩의 오염이 심하여 발아와 이취에 영향을 준 것으로 보인다.

콩의 발아와 발효시간을 단축하기 위해서는 일정한 온도 (30℃)와 습도를 유지시킬 필요가 있고 이취제거를 위해 곰팡이 발효 후, 살균을 과정 등의 2차 발효를 위한 처리가 필요할 것으로 예상된다.

## 2. 곰팡이 발효 발아콩의 2차 유산균 발효

발아콩을 곰팡이를 이용해 발효 한 후, 유산균으로 2차 발효시키는 실험을 실시하였다. 곰팡이는 *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* KACC41363과 *Aspergillus oryzae* KACC41363를 사용하였고, 유산균은 *Lactobacillus plantarum* KFRA402과 상업용 균주 3종을 사용하였다.

Table 27. Source of Species and Medium used in this investigation

Lactic acid bacteria	Source
<i>Lactobacillus plantarum</i> KFRI 402	KFRI 402, Korea
<i>Lactobacillus casei</i> LC-01	CHR Hansen, Denmark
<i>Bifidobacterium infantis</i> BI710	Culture systems, USA
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5	CHR Hanen, Denmark

### 가. 유산균 발효 공정

대두를 상온에서 5~6시간 수침하고, 두피제거 및 수세, 반할하였다. Plate에 20 g정도의 콩을 담은 후, 콩의 수분 유지를 위해 plate 바닥에 멸균수를 충분히 적신 멸균 filter paper를 깔고,

곰팡이 포자를 접종하고, 23~25℃에서 3일간 배양 후, 유산균을 접종하여 36℃에서 15시간 배양하였다.

효모로 3일간 발아 및 발효시킨 대두를 유산균으로 2차 발효를 실시하여 경북대 연구실에 분석을 의뢰하여 Glyceollin의 함량을 확인하였다.

처리구	Control	효모	유산균	효모+유산균
접종 여부	발아콩(비접종)	접종	접종	접종

### 나. 결과 및 고찰

효모에 의한 발아콩의 1차 발효 후, 유산균에 의한 2차 발효를 실시하였으며 그 결과는 아래 Table 28과 같다.

Table 28. Chemical and sensory properties of yeast-fermented soy product

실시	효모 1차 발효	유산균 2차 발효
결과		
pH	5.54	3.96
향취, 맛	알콜취, 비린맛	시큼한 맛

콩의 발아 시 효모를 접종하였을 때 곰팡이 발아와 발효 시 생성되었던 특유의 심한 대두취는 관찰되지 않았다. 효모 발효 후, 선행 실험에서 선발된 *Lactobacillus plantarum* KFRI 402를 이용한 2차 발효에서도 오염없이 발효가 잘 된 것을 확인 할 수 있었다. 곰팡이 발효 시에 거부감을 줄 수 있는 특유의 발효취와 균사, 포자 등이 생기지 않는 장점이 있고, 2차 접종 전 열처리 공정이 없어 미생물이 생산하는 효소와 생균이 그대로 살아있는 장점도 있다. 곰팡이로 발효한 것에 비해 효모로 발효한 시료가 glyceollin이 어느 정도 유도되었는지 경북대 연구실에 의뢰하여 분석을 실시하였다. 분석 결과 모든 처리구에서 glyceollin이 미량만 검출되었을 뿐, 실제 효모에 의한 glyceollin유도 효과는 없는 것으로 확인되었다. 따라서, 효모로 발효한 것은 곰팡이 발효의 단점을 극복할 수는 있지만 연구 목표인 glyceollin의 유도가 안 되어서 효모나 유산균을 발아공정에서 곰팡이를 대체하는 것은 불가능한 것으로 확인되었다.

## 3. 진공건조장치의 설계

### 가. 장치 설계

진공건조를 통한 발효물의 건조 시에 일어나는 미생물과 효소 등의 손실을 최소화하기 위한 장치를 설계, 제작하였다. 진공건조 장치는 Fig. 63에서 보는 바와 같이 제작되었으며, 피건조물을 투입하여 건조하기 위한 진공용기, 진공용기내부의 진공압력유지를 위한 진공장치, 증발

건조를 위한 가열부와 온도, 압력 등을 실시간으로 측정할 수 있는 측정기 등으로 구성되어 있다. 액상 발효물을 건조할 수 있는 스프레이와 고상 발효물을 건조할 수 있는 선반을 각각 제작하여 두 가지 시료를 모두 처리할 수 있게끔 설계하였다.

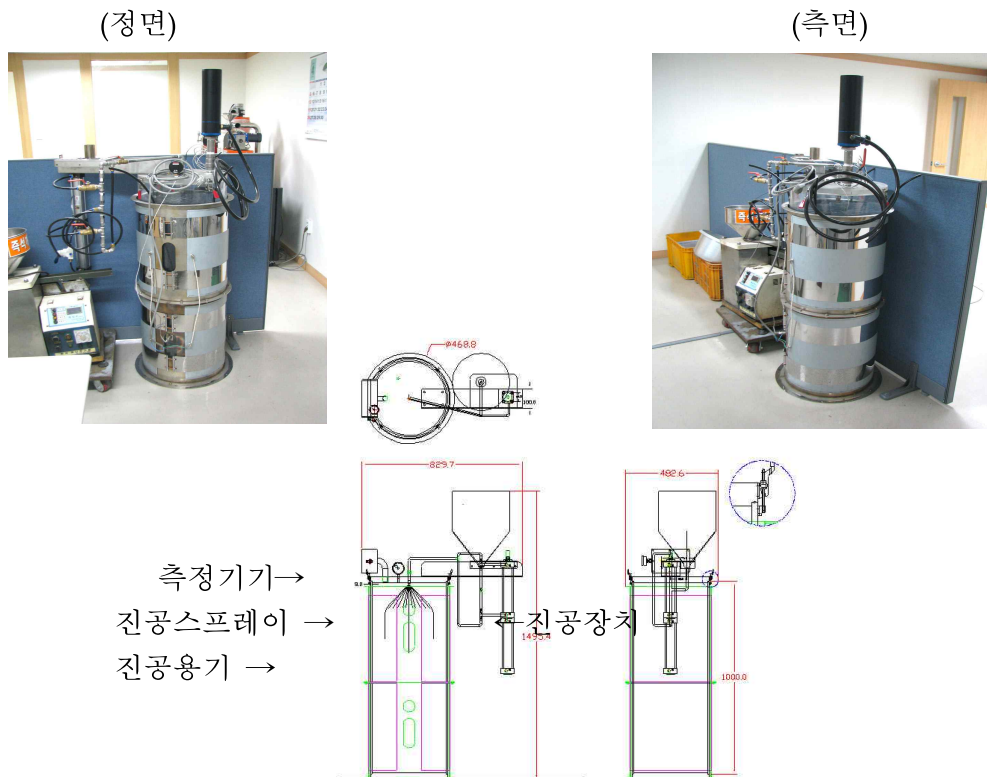


Fig. 63. View and schematic diagram of Vacuum dryer System.

Table 29. Specification of Vacuum drying System

크기 (W×D×H, cm)	온도조절 (°C)	압력조절 ( mmHg, abs)	비고
830×490×1500	20~40	750~759	진공압력이 다소 약해 보완 필요

#### 나. 결과 및 고찰

대두발효물의 진공건조를 위한 저온 진공건조장치를 기계 제작업체를 통해 제작하였다. 온도 조절은 원적외선램프를 이용한 가열장치를 사용하였고, 진공펌프를 이용하여 진공용기내부의 진공도를 조절할 수 있게 하였다. 기존의 진공건조기들은 고온에서 피조물을 건조하지만, 본 연구팀에서 제작한 저온 진공 건조장치는 40°C이하에서 진공건조가 가능하도록 하여 발효물의



미생물과 효소 등의 손실을 최소화도록 설계, 제작하였고, 고상발효물을 건조 할 수 있게 하였다. 가동 시험 결과 진공압력이 약하여 건조가 매우 더디게 진행되었고, 원적외선이 시료 내부에까지 잘 전달되지 못하는 등 온도조절과 압력조절 문제로 인하여 건조가 원활히 이루어지지 않았다. 따라서 신속하게 건조가 일어날 수 있도록 진공펌프와 온도 조정 방안을 보완함으로써 미생물과 효소의 파괴를 최소화할 필요가 있다고 평가되었다.

#### 4. 발아 공정 평가

콩의 발아를 위한 제조방법으로서 수침발아와 살수발아를 비교하여 *Rhizopus oligosporus*으로 glyceollin을 유도하는 과정에서 곰팡이의 확산을 방지하는 적합한 모델을 연구하였다. 그리고 콩의 부패를 최대한 억제하고 발아율을 높이는 조건들을 탐색하였다.

##### 가. 수침발아와 살수발아

일반적으로 콩나물 재배 시 활용되고 있는 살수발아를 수침발아와 비교 평가하여 보았으며, 그 결과는 다음 Table 30과 같았다.

Table 30. 수침발아와 살수발아의 비교

비교 항목	수침발아	살수발아
장치의 구조	간단	복잡
동일 크기 설비의 콩 처리량	많다	적다
곰팡이 접종 시의 비산 방지	용이함	비산 방지 위해 밀폐처리 필요
작업 편의성	중,대규모 적합	소규모 적합
작업 시 필요한 사항	청정공기제조장치 및 Aeration 장치 필요	시간에 맞추어 자동 살수 장치 필요
발아 온도조절	수조내의 액을 쉽게 조절 가능	수조내의 액과 콩 전체에 대한 보온 필요

위 표에서 비교한 바와 같이 소규모에서는 콩나물의 제조 시 널리 사용되고 있는 방법인 살수발아가 적합한 것으로 보이며, 이 때 곰팡이의 비산을 방지하고 보온하는 장치가 필요하다.

##### 나. 발아 온도

콩의 발아에 적합한 온도를 찾기 위해서 콩나물 재배 조건을 조사하였다. 아래 Table 22은 재배온도에 따른 콩나물의 부패발생 정도를 나타낸 것이다.

Table 31. 재배온도에 따른 콩나물의 부패발생 정도

재배온도 (°C)	재배일수(일)			비고
	5	6	7	
17	○	○	○	○ : 발생하지 않음 + : 10% 이하 ++ : 10~20%
20	○	○	○	
25	○	+	+	
30	+	++	++	

(작물시험장 1998 자료 인용)

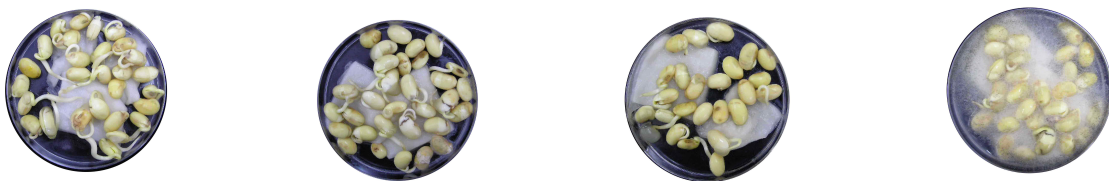
콩의 발아에 적합한 온도로서 부패를 방지하기 위하여 20°C가 일반적으로 권장되고 있는데, 이 경우 발아공정에 드는 시간이 매우 많이 소요될 수 있다. 그리고 곰팡이의 최적 생육온도가 25°C이므로 콩의 발아온도를 25°C로 하는 것이 적합한 것으로 보인다.

#### 다. 발아 시간

콩의 발아는 콩나물처럼 뿌리가 길게 나올 필요는 없고, glyceollin을 유도하기 위한 최소한의 발아조건을 만족시키면 되므로, 경상대에서 연구한 결과를 바탕으로 3일을 설정하였다. 3일간 25°C에서 발아시키면 뿌리가 내리며, *Rhizopus* 곰팡이도 충분히 자라므로 glyceollin을 유도하는 조건을 만족시킬 것으로 예상된다.

#### 라. 발아용 균주

1차년도 연구결과 *Aspergillus oryzae*와 *Aspergillus sojae*, 그리고 *Rhizopus oligosporus* 중 이취발생과 오염 등의 측면에서 *Rhizopus oligosporus*가 가장 우수하였으므로, 이 균주를 발아용 균주로 선발하였다. 그리고 동시에 살수액의 일반세균의 오염방지를 위해서 *Lactobacillus plantarum*을 첨가하였다. 살수액에 *Lactobacillus plantarum*을 첨가 시 pH를 3.96으로 낮추었으므로 일반세균과 대장균군의 생육을 크게 억제할 수 있고, 동시에 *Rhizopus oligosporus*은 억제되지 않고 잘 자랐으나 발아된 싹의 크기는 곰팡이 생균으로 인하여 매우 작았다(Fig. 64).



균주 무첨가

*L. plantarum* 첨가

*Rhizopus*(사균) + *L.p*

*Rhizopus*(생균) + *L.p*

Fig. 64. Soybean sprouts germinated for 3 d at 25°C in the absence and presence of various microorganisms.

## 5. 발효공정 평가

### 가. 발효 방식

발아한 콩의 발효를 하기위해 액상발효와 고상발효로 나누어서 평가를 하였다. 최종 제품의 형태가 액체일 경우에는 액상발효가 매우 편리하나, 분말일 경우에는 건조하는데 상당한 노력이 필요하게 되어서 제품에 따라 발효 방식을 나누는 것이 합리적인 것으로 보인다. 또한 발아콩을 원료로 하여 *Rhizopus*와 *Bacillus*는 호기성발효가 필요하므로 고상발효를 하고, 다음에 유산균은 혐기성발효를 하므로 페이스트를 만들어서 2차 발효를 하는 것이 가장 좋은 것으로 검토하였다. 이때 효모는 유산균과 함께 접종하여 공생하도록 하였다. 효모를 *Bacillus*와 함께 접종하였을 때는 *Bacillus*의 생육이 억제되는 것을 발견하여 이후부터는 *Bacillus*를 먼저 발효한 후에 유산균과 효모를 함께 발효하는 것으로 변경하였다.

### 나. 발효 공정

발아공정이 확립되는 연구와 동시에 발효공정을 연구한 관계로 발아를 하지 않은 백태(함양농협)에 미생물을 접종하여 발효하는 공정을 연구하였다. 콩의 전처리 및 발효공정은 다음과 같은 공정으로 실시하였다(Fig. 65). 원료로서 콩만 사용하는 것보다는 쌀을 함께 발효시키는 것이 발효를 촉진하여 생균수와 효소활성도를 높일 수 있는 것으로 예상되어 콩과 쌀의 비율을 80 : 20으로 하여 실험하였다. 완제품의 유형이 효소식품으로 할 경우 제품규격 중 Protease 뿐만 아니라  $\alpha$ -Amylase도 양성이 되어야 하는데, 이를 위해서는 콩만으로는 부족하여 쌀을 첨가하는 것이 필요하기 때문이다.

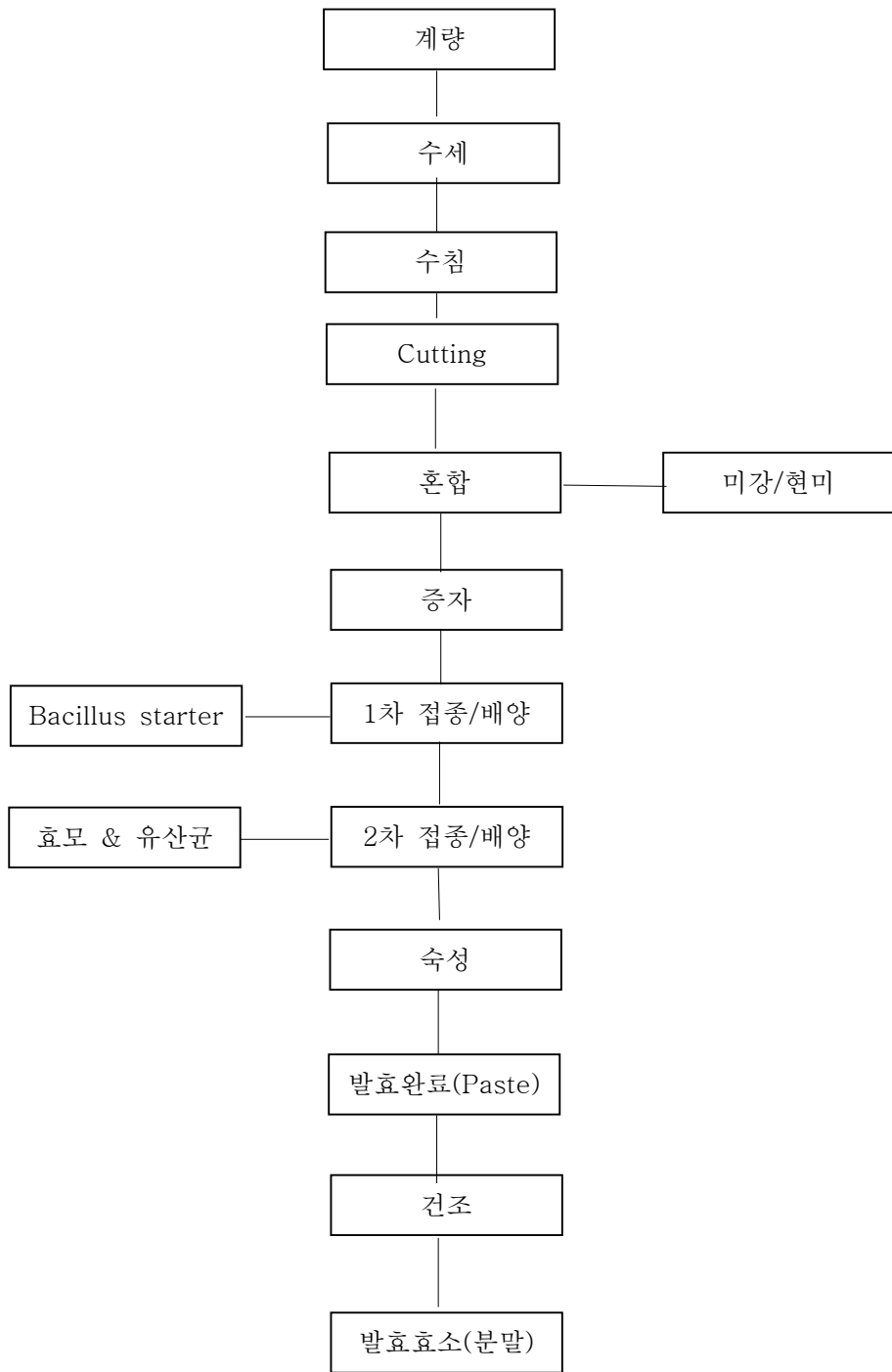


Fig. 65. Schematic Outline for Soy Fermentation.

발아 후 발효하기 위하여 적합한 미생물의 선발과 살균 및 발효공정을 검토하여 현장에서 제조하기에 적합한 생산공정을 연구하였다. 발효용 미생물로서는 *Bacillus subtilis*를 한국식품연구원에서 분양받았고, 유산균주 및 효모는 1차년도와 동일한 *Lactobacillus plantarum*과 *Sacharomyces cerevisiae*를 사용하였다. 발효한 시료의 검사는 유산균과 효모의 생균수를 MRS Agar 배지와 Potato Dextrose Agar 배지로 각각 측정하였고, 효소의 역가는 protease 효소활성과 amylase 효소활성은 다음과 같은 방법으로 측정하였다.

다. Protease activity

- ① Casein을 100mM Tris-HCl buffer(pH 7.3)에 1%가 되도록 용해하여 기질용액으로 사용한다.
- ② 기질용액 0.5ml에 시료용액 0.5ml를 가하여 30℃에서 1시간 반응시킨다.  
이 때 시료용액은 분말시료를 10%, 증류수 90%를 혼합하여 paper filter로 걸러서 준비한다.
- ③ Trichloroacetic acid(TCA) 40%(w/v) 용액을 100~200ul 가하여 반응을 정지시키고 15분간 정치한다.
- ④ 12,000g로 15분간 원심분리 후 상등액을 취하여 가용성 peptides의 양을 415nm에서 흡광도로 측정한다.
- ⑤ 표준곡선은 L-tyrosine 용액을 사용하여 작성하고, 효소활성 단위는 1분간 1ug에 상당하는 tyrosine을 생성하는 효소의 양을 1 unit로 정의한다.

라. α-Amylase activity

- ① Soluble starch 1%(w/v) 0.5ml에 시료 용액 0.5ml를 가하여 30℃에서 1시간 반응시킨다.
- ② 차가운 1N HCl을 가하여 반응을 정지시킨 후 Lugol's Iodine 용액 0.1ml를 가하여 발색시킨다.
- ③ 증류수를 가하여 25ml로 맞추고, 415nm에서 흡광도를 측정한다.
- ④ 표준곡선은 maltose를 사용하여 작성하고, 효소활성 단위는 1분간 soluble starch 0.01%를 줄이는데 소요되는 효소의 양을 1 unit로 정의한다.

마. 결과 및 고찰

수침 전 콩 500g을 15시간 수침한 후의 콩중량은 1,088g으로 늘어나서 118%나 증가하였다. 그리고 콩 80%와 혼합하는 쌀의 종류가 미강일 경우와 현미일 경우의 최종 발효 후의 생균수와 효소활력은 다음과 같이 분석되었다.

Table 32. 쌀 종류별 발효액의 생균수 및 효소활력

항 목	미강 첨가군	현미 첨가군
유산균	9.8 × 10 <sup>9</sup> /g	8.5 × 10 <sup>9</sup> /g
효모	6.3 × 10 <sup>9</sup> /g	4.4 × 10 <sup>9</sup> /g
protease	450 unit/g	299 unit/g
amylase	85 unit/g	50 unit/g

미강과 현미를 20% 씩 첨가한 발효액의 미생물 생균수와 효소활력은 미강첨가 시료가 비교적 더 좋은 결과가 나왔다. 이는 미강이 미생물에 의한 자화성이 더 좋기 때문으로 보인다. 따라서 차후 실험에서는 쌀 원료로서 미강을 사용하였다. 차후 연도에서는 발아가 완료된 콩을 원료로 사용하여 미생물을 접종하여 배양하는 것을 시도할 예정이고, 이를 진공건조함으로써 미생물과 효소의 역가가 급격히 떨어지지 않도록 하는 방안을 확립함으로써 사업화에 문제가 없도록 완성할 계획이다.

#### 6. 효율적 제조공정 연구

발아 및 발효에 필요한 설비와 제조하는 데 소요되는 시간을 검토하여 주기적으로 반복 생산하는 데 적합한 모델을 개발하였다.

콩을 원료로 한 발아와 발효공정을 통하여 제품을 완성하는데 있어서 설비와 생산공정을 합리적으로 디자인해야 효율적인 사업화가 가능하다. 이를 위하여 발아와 발효의 전 공정을 종합적으로 검토하여 설비와 인력의 가동을 최적화하는 생산관리 방안을 검토하였다.

먼저 원료의 콩을 선별하고 전처리하고 발아시키는 1단계 과정과, 미생물을 접종하여 발효시키는 2단계 과정, 그리고 발효된 것을 건조하여 분말화하는 3단계로 구분하여 연구하였다(Table 33-36). 이는 콩을 발아시키고, 배양한 후, 환제나 과립의 제형으로 만든 효소제품을 전제로 하여 검토한 것이다.

Table 33. 발아공정

No	공정명	소요시간	세부내용	비고
1	대두 원료 선별		1년 이내의 햇콩을 선별한다.	2년 이상된 콩 주의
2	이물질 제거	0.1Hr	콩보다 가벼운 이물질과 무거운 이물질을 제거한다.	
3	불량 콩 제거	0.1Hr	물에 침지 후 뜨는 콩을 제거한다.	발아율 향상 목적
4	수세	0.1Hr	흐르는 물로 수세	
5	수침	11.7Hr	20℃ 내외의 정수에 12~15시간 정도 담근다.	여름에는 짧고 겨울에는 길게 침지
6	발아	2.5Days	곰팡이를 접종하여 함께 발아시킨다.	발아온도 25℃
합 계		3Days		

Table 34. 배양공정

No	공정명	소요시간	세부내용	비고
7	증자	1.5Hr		
8	1차 접종	0.2Hr	Bacillus 접종	
9	1차 배양	2Days	고상배양(호기 배양)	36℃ 배양
10	2차 접종	0.2Hr	효모와 유산균 접종	
11	혼합	0.5Hr	페이스트화	
12	2차 배양	1 Day	통성혐기 배양	33℃ 배양
13	숙성	21.6Hr	10~15℃에서 숙성	
14	검사	0.5Hr	관능검사, 외관검사, pH 등	
합 계		4Days		

Table 35 분말화공정

No	공정명	소요시간	세부내용	비고
15	제환 또는 과립	2Hr	페이스트를 제형화함	
16	건조	6Hr	진공건조	
17	병 포장	6Hr	중량 맞춤	
18	품질검사	1Hr	포장단위별 중량검사, 수분함량 등	
19	보관	1Hr	제품 출고 전 보관창고에 보관	
20				
합 계		16Hr		

Table 36. 공정별 작업 일정

공정	1일	2일	3일	4일	5일	6일	7일	8일
발아공정	—————							
배양공정				—————				
분말화공정								—————

7. 발효환 제조

가. 환제조 공정

경상대로부터 *Rhizopus*와 함께 발아한 콩을 받아서 다음 Fig. 66와 같은 공정으로 발효환을 제조하였다. 미생물과 효소가 살아있게 하는 제품은 분말이 되어야 하는데 분말이나 정제보다는 환제가 사업화하기에 적합할 것으로 판단되어 환 제형으로 개발하였다.

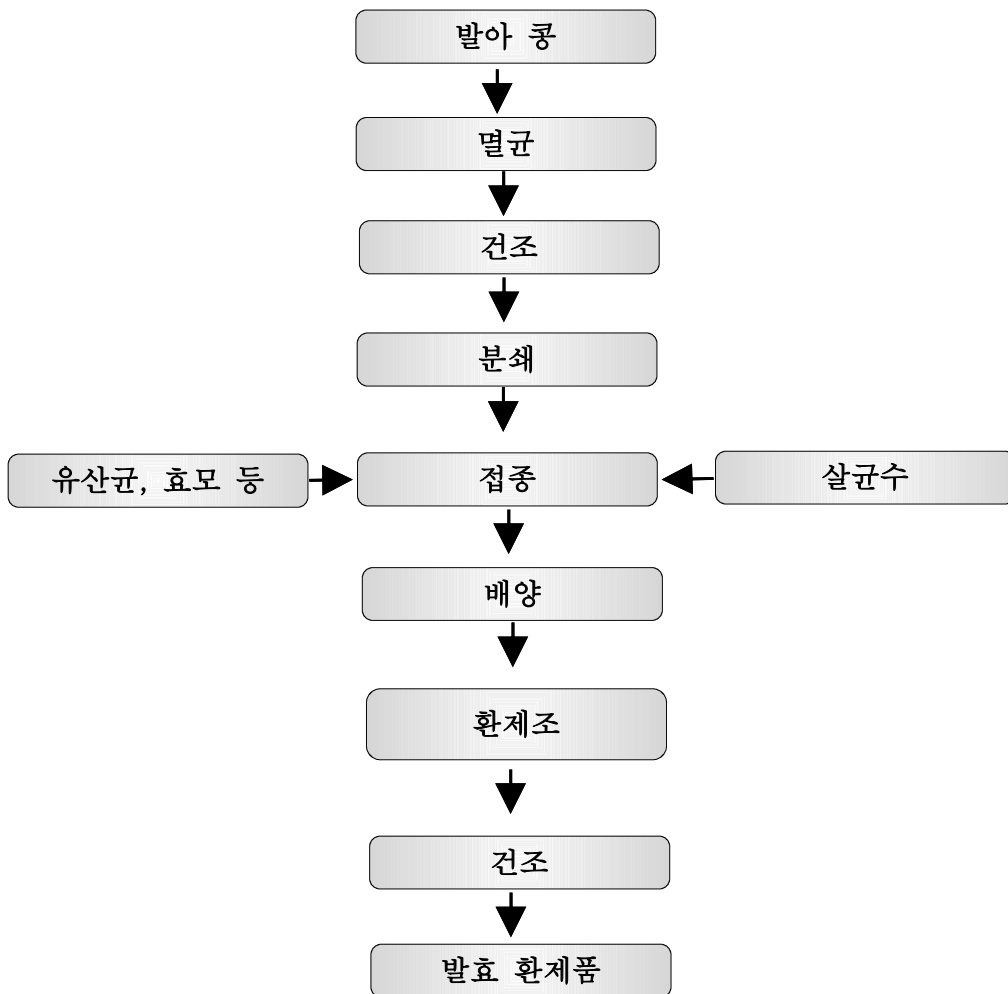


Fig. 66. 발효콩 환 제조공정.



## 나. 배합률

발효시킨 콩 100% 만으로는 환제형이 잘 되지 않는 관계로 발효콩분말 85%와 프락토올리고당 15%를 혼합하여 환을 제조하였다. 잘 뭉쳐지게 하기 위하여 분말을 더 미세하게 분쇄할 필요가 있을 것으로 예상된다. 2차년도에 유산균과 효모 등으로 발효시킬 때 미강 또는 현미분말을 8:2의 비율로 첨가하였는데, 미강의 경우에는 뭉쳐짐 개선에 도움이 되지 않았으나, 현미분말을 첨가하면 환제형으로 뭉쳐지는데 도움이 되므로 발효 콩 100%보다 현미분말을 혼합하여 제조하는 것을 추진할 계획이다.

## 8. 발효 환제품의 법적 유형 및 규격기준

### 가. 식품 유형

식품공전에 의하면 콩을 주원료로 하여 가공한 것은 기타 일반가공식품 중 두류가공품에 해당하는 것으로 나타났다. 콩이나 청국장을 주원료로하여 만든 환제품은 대부분이 두류가공품으로 판매하고 있었다.

- 1) 곡류가공품 : 곡류를 주원료로 하여 가공한 것을 말한다.
- 2) 두류가공품 : 두류를 주원료로 하여 가공한 것을 말한다.
- 3) 서류가공품 : 서류를 주원료로 하여 가공한 것을 말한다.
- 4) 전분가공품 : 전분을 주원료로 하여 가공한 것을 말한다.
- 5) 식용유지가공품 : 식용유지를 주원료(다만, 압착한 참기름, 압착한 들기름은 제외한다)로 하여 가공한 것을 말한다.
- 6) 당류가공품 : 당류를 주원료로 하여 가공한 것을 말한다.
- 7) 수산물가공품 : 수산물을 주원료로 하여 가공한 것을 말한다.
- 8) 기타가공품 : 상기 1)~7)에 해당하지 않는 가공식품을 말한다.

### 나. 규격기준

규격기준 중 두류가공품에 해당하는 것은 아래 4가지 항목이었으며, 멸균제품은 아니므로 1)항부터 3)항까지의 규격을 만족시켜면 되는 것으로 나타났다.

- 1) 성 상 : 적합하여야 한다.
- 2) 이 물 : 적합하여야 한다.
- 3) 대장균군 : 음성이어야 한다(살균제품에 한한다).
- 4) 세 균 수 : 음성이어야 한다(멸균제품에 한한다).



## 9. 발효두유 제조

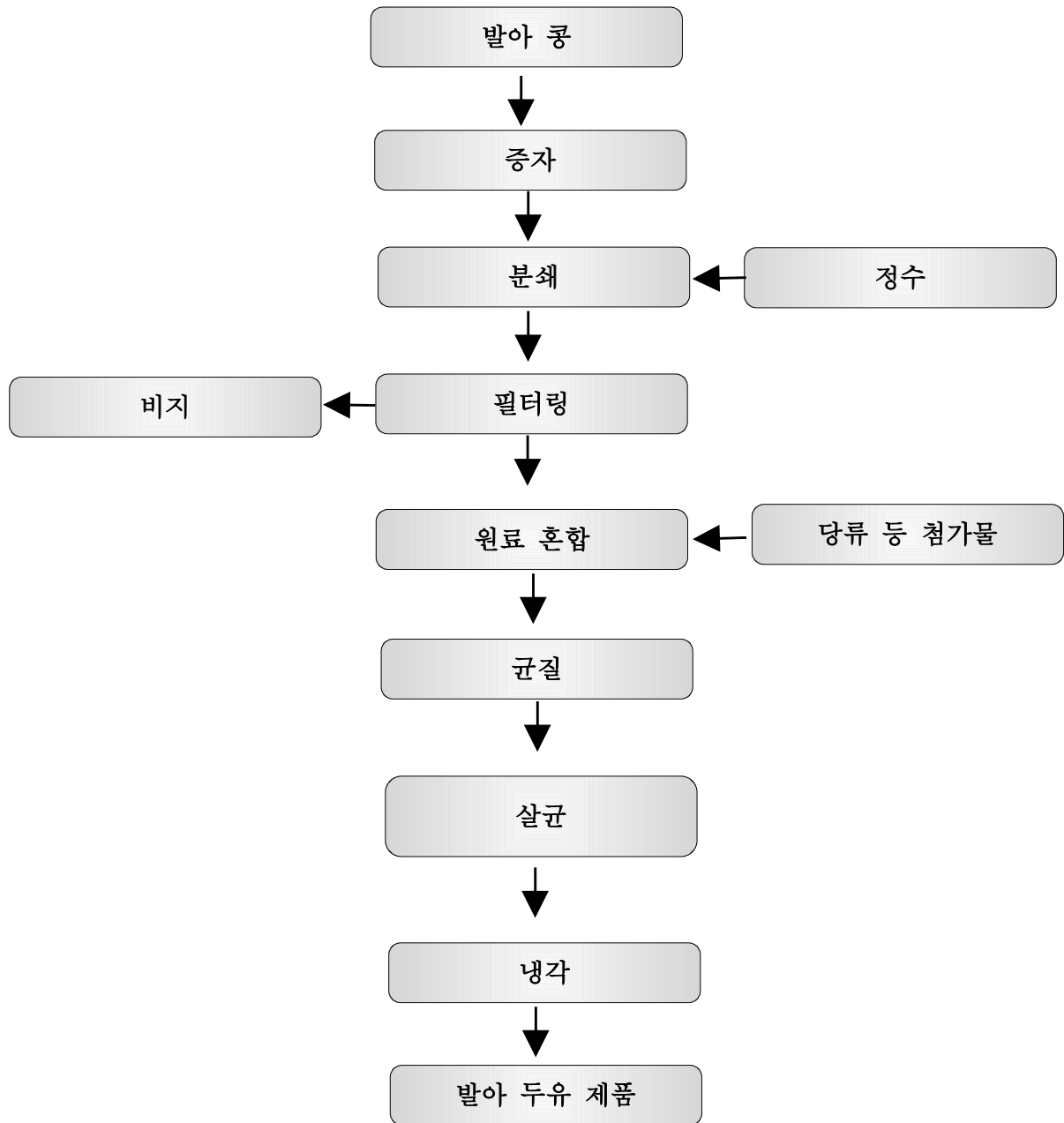


Fig. 67. 발아 두유 제조과정

• 콩의 발아공정에서 glyceollin을 유도하기 위하여 곰팡이 균주를 3가지 선발하여 비교하였다. *Rhizopus oligosporus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus sojae*를 각각 접종하여 발아한 결과 *Rhizopus oligosporus*가 풍미가 가장 무난하였으며 오염도 잘 되지 않았다. 여기에 유산균을 추가로 접종하여 비교하였는데 *L.plantarum* KFRI 402가 시큼한 향미를 내며 오염을 방지하는 효과도 있는 등 실제 현장에 적용가능한 것으로 평가되었다. 작업장에서 곰팡이로 인한 비산 등의 오염을 방지하기 위하여 발아공정에서 곰팡이 대신 효모나 유산균도 glyceollin 유도가 가능한지 확인하기 위하여 *Saccharomyces cerevisiae*와 *L. plantarum*을 사용한 결과 유도 효과가 거의 없었다. 발아공정의 조건을 탐색한 바 습도를 살수방식으로 조절하고, 온도는 25°C가 적합한 것으로 파악되었다. 곰팡이와 함께 발아된 콩을 증자하여 살균한 다음 바실러스균과 유산균, 효모균으로 2차 발효를 하였다. 이때 이 종균들을 동시에 접종하면 편리하기는 하였으나, 바실러스균주가 산에 약하여 잘 자라지못하였으므로 1단계로 바실러스균주를 먼저 접종하여 1~2일간 배양한 후, 2단계로 효모와 유산균을 접종하여 배양하였다. 이때 배양물은 콩 100%로 하는 것보다는 미강 또는 현미분말을 20% 혼합하여 배양하는 것이 배양도 잘 되고 amylase효소의 분비도 더 좋았다. 발효환을 제조하는데 콩 100%로는 잘 제한이 되지 않아서 프락토올리고당을 15% 혼합하여 제조하였으며, 식품공전상의 제품의 유형은 두류가공품으로 분류되었고, 이에 대한 규격기준도 성상과 이물에 적합하고 대장균균 음성을 만족시키는 것으로 비교적 간단하였다.



발아 및 발효 대두 (아가콩) 분말과 두유



## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 연차별 연구성과 목표 달성도

구분	특허출원		논문				학회발표		기술이전		상품화		홍보
			국외(SCI)		국내								
	목표	달성	목표	달성	목표	달성	목표	달성	목표	달성	목표	달성	
1차년도		1	1		2			4					1
2차년도	1	3	2	2	2			9					
3차년도	1		2	4	2			2	1	0	2	0	
계	2	4	5	6	6			15	1	0	2	0	

( )안은 논문투고 예정

### 제 2 절. 특허 성과

명칭	구분	출원국가	출원번호	특허권자	역할 (주/부발명자)	출원일자
글리세올린을 함유하는 갱년기 증상의 예방 및 개선용 조성물	출원	PCT (미국)	PCT/KR 2010/002331	경북대학교 산학협력단	김정상, 김효정	2010.04.15
글리세올린을 항산화 조성물	출원	한국	10-2010-0012125	경북대학교 산학협력단	김정상, 김효정	2010.02.09
글리세올린 또는 글리세올린이 강화된 발효콩을 유효성분으로 함유하는 당뇨병 예방 및 치료용 조성물	출원	한국	10-2010-0030537	호서대학교 산학협력단	박선민, 김정상, 김정환	2010.04.02
글리세올린을 유효성분으로 조성물	출원	한국	10-2009-0034438	경북대학교 산학협력단	김정상, 김효정	2009.04.21

제 3 절. 논문 실적

게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI(E) 구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2011	Glyceollin-containing fermented soybeans improve glucose homeostasis in diabetic mice	박선민	박선민	김다솔, 김정환, 김정상, 김효정	Nutrition	in press	국외	SCIE
2010	Antioxidat Activity of Glyceollins Derived from Soybean Elicited with <i>Aspergillussojae</i>	김효정	김정상	서화진, 김정환, 박선민, 주영철	Journal of Agricultural and Food chemistry	24	국외	SCI
2010	Induction of Glyceollins in Korean Soybean Varieties by Fungal Infection	이미령	김정환	김주연, 천지연, 박선민, 김효정, 김정상, 정종일	Journal of Microbiology & Biotechnology	20(8)	국내	SCIE
2010	Antifungal activity of glyceollins isolated from soybean elicited with <i>Aspergillussojae</i>	김효정	김정상	김정환, 박선민, 서화진,	Journal of Agricultural and Food chemistry	58(17)	국외	SCI
2010	Estrogenic Activity of Glyceollins Isolated from Soybean Elicited with <i>Aspergillus sojae</i>	김효정	김정상	서화진, 김정환, 강선철, 박선민, 이충환, 김정상	Journal of Medicinal Food	13(2)	국외	SCI
2010	Glyceollins, one of the phytoalexins derived from soybeans under fungal stress, enhance insulin sensitivity and exert insulinotropic actions.	박선민	박선민	안일성, 김정환, 이미령, 김정상, 김효정	Journal of Agricultural and Food chemistry	58	국외	SCI

## 제 4 절. 학회발표실적

1. Anticancer activities of phytoalexin derived from soybean isoflavone by biotic elicitor. Hyo Jung Kim, Chae Lim Jung, In Sil Park, Jong-Sang Kim. 한국식품과학회. 2011. 06. 포스터 발표.
2. Potential protective role of phytoalexins derived from soybean by biotic elicitor on inflammatory mechanism. Hyo Jung Kim, Chae Lim Jung, Dae Hwan Nam, Ji Sun Lim, Min Young Han, Ye-Seul Hong, Jong-Sang Kim. American Association Cancer Research. 2011. 04. (Orlando, USA) 포스터 발표
3. Modulation of inflammatory state by soy phytoalexins in vivo animal models. Hyo Jung Kim, Chae Lim Jung, Dae Hwan Nam, Ji Sun Lim, Min Young Han, Ye-Seul Hong, Jong-Sang Kim. 한국영양학회. 서울 그랜드 힐튼호텔. 2010. 11. 포스터 발표
4. Regulation of lipopolysaccharide-mediated inflammatory response by glyceollins. Hyo Jung Kim, Chae Lim Jung, Dae Hwan Nam, Jia Park, Ji Sun Lim, Min Young Han, Ye-Seul Hong, Jong-Sang Kim. 대한 암예방학회. 차병원. 2010. 11. 포스터 발표
5. Glyceollins as a potential cancer preventive agent. Hyo Jung Kim, Chae Lim Jung, Dae Hwan Nam, Eric di Luccio, Jia Park, Ji Sun Lim, Min Young Han, Ye-Seul Hong, Jong-Sang Kim. 대한 암예방학회. 차병원. 2010. 11. 포스터 발표
6. Effects of Glyceollins on Progression of Atherosclerosis. Hyo Jung Kim, Byung-Yoon Cha, Chae LimJung, Dae Hwan Nam, Jia Park, Ji Sun Lim, Min Young Han, Ye-Seul Hong, Je-Tae Woo, Jong-Sang Kim. 대한 암예방학회. 차병원. 2010. 11. 포스터 발표
7. Nrf2-mediated Induction of Detoxifying Enzymes by Glyceollins Derived from Soybean Exposed to *Aspergillussojajae*. Hyo Jung Kim, Chae Lim Jung, Dae Hwan Nam, Eric di Luccio, JiaPark, JiSunLim, MinYoungHan, Ye-SeulHong, Jong-SangKim 한국식품영양과학회. 대구 인터불고호텔 2010. 10. 포스터 발표
8. Glyceollins inhibit PDGF-mediated human arterial smooth muscle cell proliferation and migration. Hyo Jung Kim, Byung-Yoon Cha, Chae Lim Jung, Dae Hwan Nam, Jia Park, Ji Sun Lim, Min Young Han, Ye-Seul Hong, Je-Tae Woo, Jong-Sang Kim 한국식품영양과학회. 대구 인터불고호텔 2010. 10. 포스터 발표

9. Sunmin Park, Il Sung Ahn, JEONG HWAN Kim, JONG SANG Kim. Glyceollins, one of the phytoalexins derived from soybeans under fungal stress, enhance insulin sensitivity and exert insulinotropic actions in vitro and in vivo. EB10. (Amaheim, CA. USA) 2010. 포스터 발표
10. Hyo Jung Kim\*, Ji-Sun Lim, Jia Park, Min Young Han, Dae Hwan Nam, Ye-Seul Hong, Jong-Sang Kim. Antioxidant activities of glyceollins produced in soybean exposed to Aspergillus ssojae. 한국식품과학회 (인천, 송도컨벤시아) 2010. 6. 포스터발표.
11. Hyo Jung Kim, Jiyeon Seo, Ji-Sun Lim, Jia Park, Dae Hwan Nam, Annalene Garcia, Jong-Sang Kim. Antitumor activity of glyceollins through induction of apoptosis. American Association Cancer Research (Washington DC. USA) 2010. 4. 포스터 발표.
12. Sunmin Park, Il Sung Ahn, Jeong Hwan Kim, Mee Ryung Lee, Jong-Sang Kim. Glyceollins, one of the phytoalexins derived from soybeans under fungal stress, enhance insulin sensitivity and exert insulinotropic actions. 한국영양학회 (대전 컨벤션 센터) 2009. 11. (우수논문상 수상) 구두발표
13. 김정상. 대두 Isoflavones 과 대사체의 효능 및 작용기전. International Symposium and annual meeting (창원) 2009
14. Hyo Jung Kim, In Ae Lee, Jong-Sang Kim. Estrogenic activities of glyceollins synthesized from soybean. 한국식품과학회 (대전 컨벤션 센터) 2009. 5.
15. Hyo Jung Kim, Chan Ho Jang, In Ae Lee, Ji-Sun Lim, Ji-Yeon Seo, Jong-Sang Kim. Inhibition of adipocyte differentiation by glyceollin. Experimental Biology. (New Orleans, USA) 2009, 4. 18-22. 포스터 발표

## 제 5 절 인력활용/양성 성과

### 1. 인력지원 성과

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
2		2				2	1		1



## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 제 1 절. 실용화 · 산업화 계획

1. 과제 종료후 1년 이후부터 상품화 추진. 우선, 참여기업인 바이셀 그리고 주변 콩가공 관련 기업(순창 전통 장류마을, 경북대 소이벤처 (주) 등)에 기술이전 추진  
> 현재 A사에서 화장품용 향산화 소재 (특허출원중)로서 관심을 보이고 있으며, 추가적인 공동 연구도 계획하고 있음.
2. 건강보조제의 첨가제로 활용
3. Glyceollins 다량생성 유도 기술 이용해 식품가공업체를 통한 식품제조 및 발효를 통한 신규 기능성 부여로 “기능성 식품화“ 가능화 추진  
> 본 연구에 사용된 이소플라본이 풍부한 콩 품종 Aga3을 이용하여 elicitation하였을 경우, 발아콩 원료에 함유된 glyceollins 함량은 최대 0.1%이며, 효능 발현을 위한 1인 1회 복용량을 글리세올린 함량으로 50 mg (발아콩으로는 50 g)을 권장함.  
> 개별인정 위해 권장 유효농도를 기준으로 한 안전성평가 추가시행을 계획하고 있음.
4. Elicitor로써 곰팡이가 갖고 있는 단점인 공정 및 관능적 특성상의 문제점을 해결하기 위하여 jasmonate 등과 같은 식품성 호르몬 계열의 화합물, 그리고 미네랄 및 곰팡이 유래 성분의 elicitor로서의 가능성을 계속하여 검토 연구하고 있음.

### 제 2 절 교육 · 지도 · 홍보 등 기술확산 계획 등

1. 본 과제 연구자 책임자가 소속된 대학교의 대학원생 및 학부생들의 지도를 통하여 기능성 식품 관련 전문연구인력을 양성하는데 기여
2. 본 과제가 갖는 복합적인 학문의 성격으로 인해, 다양한 분야에 능동적으로 대처가 가능한 경쟁력 있는 인재양성에 기여

### 제 3 절 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등

### 제 4 절 추가연구, 타연구에 활용 계획 등

1. 타기관 과제 수행

과제명	연구비지원기관	연구기간
식품유래 Nrf2 의존성 항산화효소계 유도 성분의 뇌신경조직 보호효과 (Neuroprotective effect of food-derived phytochemicals from oxidative stress-induced damage through Nrf2-mediated antioxidant enzyme induction)	The National Research Foundation of Korea 한국연구재단 일반연구자지원사업 (총연구비 141,720 천원)	3 years (2011.05.01-2014.04.30)
식용곰팡이 접종 발아콩유래 phytoalexins 대사체의 항염증 및 Nrf2 의존성 암예방 효능 규명 및 작용기전연구 (Anti-inflammatory and Nrf2-dependent anti-cancer activities of phytoalexins and their metabolome derived from germinating soybean infected with edible fungi)	The National Research Foundation of Korea 한국연구재단 일반연구자지원사업 (총연구비 150,000 천원)	3 years (2010.09.01-2013.08.31)
콩유래 glyceollins의 암예방 효능 연구 (Study on anti-carcinogenic actions of glyceollins derived from soybean)	The National Research Foundation of Korea 한국연구재단 일반연구자지원사업 (총연구비 179,548 천원)	3 years (2010.05.10-2013.04.30)

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

### 제 7 장 참고문헌

Boue SM, Carter CH, Ehrlich KC, Cleveland T.E. Induction of the soybean phytoalexins coumestrol and glyceollin by *Aspergillus*. *J Agric Food Chem*, 2000, 48: 2167-2172.

Chae BN, Lee SG, Hong EK, Kim YJ, Nho HL, Jung YS, Lee KW, Kim HM. 한국인 제2형 당뇨병의 병인에서 인슐린 분비능과 저항성의 역할. *당뇨병*. 1998. 22:491-503.

Chun J, Choi I, Kim JH. Fermentation of soymilk prepared with green tea water extract. 한국식품영양과학회 2006년 정기학술대회 2006. 10. 18-20, 경주교육문화회관. P10-159 (p.323-324)

Chun J, Jeong W J, Choi I, JH. Lactic acid fermentation of black bean added soymilks. 한국식품과학회 제 74차 학술대회 및 정기총회. 부산 BEXCO 2007. 6.20-22. P12-078.

Chun J, Jeong WJ, Kim JS, Lim J, Park CS, Kwon DY, Choi I, Kim JH. Hydrolysis of Isoflavone Glucosides in Soymilk Fermented with Single or Mixed Cultures of *Lactobacillus paraplantarum* KM, *Weissella* sp. 33 and *Enterococcus faecium* 35 Isolated from Human. *J Microbiol Biotechnol* 2008, 18: (In Press)

Chun J, Kim GM, Ha H-M, Kwon G-H, Park J-Y, Jeong S-J, Kim J-S, Kim JH. Conversion of isoflavone glucosides to aglycones in soymilk by fermentation with lactic acid bacteria. *J FoodSci* 2007, 72(2): M39-M44.

Feng S, Saw CL, Lee YK, Huang D. Fungal-stressed germination of black soybeans leads to generation of oxooctadecadienoic acids in addition to glyceollins. *J Agric Food Chem* 2007, 55: 8589-8595.

Hennige AM, Burks DJ, Ozcan U, Kulkarni RN, Ye J, Park S, Schubert M, Fisher TL, Dow MA, Leshan R, Zakaria M, Mossa-Basha M, White MF. Upregulation of insulin receptor substrate-2 in pancreatic b-cells prevents diabetes. *J Clin Invest* 2003, 112:1521-1532.

Jang SA, Son HY, Cha BY, Moon SD, Song KH, Yu SJ, Yoon GH, Kang MI, Lee KW, Kang SG. 한국 정상성인에서 연령, 신체질량지수 및 포도당 농도에 따른 공복 인슐린 농도. 당뇨병. 1997, 21:433-43.

Jhala US, Canettieri G, Sreaton RA, Kulkarni RN, Krajewski S, Reed J, Walker J, Lin X, White M, Montminy M. cAMP promotes pancreatic beta-cell survival via CREB-mediated induction of IRS2. *Genes Dev* 2003, 17(13): 1575-1580.

Juhl K, Hutton J. Stimulus-secretion coupling in the pancreatic beta-cell. *Adv Exp Med Biol* 2004, 552:66-90.

Kulkarni RN, Jhala US, Winnay JN, Krajewski S, Montminy M, Kahn CR. PDX-1 haploinsufficiency limits the compensatory islet hyperplasia that occurs in response to insulin resistance. *J Clin Invest* 2004, 114(6): 828-836.

Kwon CS, Sohn HY, Kim SH, Kim JH, Son KH, Lee JS, Lim JK, Kim JS. Anti-obesity effect of *Dioscorea nipponica* Makino with lipase-inhibitory activity in rodents. *Biosci Biotechnol Biochem* 2003, 67(7):1451-6.

Lin X, Taguchi A, Park S, Kushner JA, Li F, Li Y, White MF. Dysregulation of insulin receptor substrate 2 in  $\beta$  cells and brain causes obesity and diabetes. *J Clin Invest* 2004, 114: 908-916.

Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol; the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discovery* 2006, 5: 493-506.

Shafir E, Ziv E, Mosthaf L. Nutritionally induced insulin resistance and receptor defect leading to beta-cell failure in animal models. *Ann N Y Acad Sci* 1999, 892:223-246.

Shin DH. 우리나라 장류산업의 현황과 제품개발 방향. 식품저장과 가공산업 2005, 5(1):31-46

Soo Bong Choi, Sunmin Park. Does fluoxetine administration influence insulin resistance in 90% pancreatectomized rats? *Metabolism* 51(1):38-43, 2002

Soo Bong Choi, Dong Wha Jun and Sunmin Park. The insulin sensitizing effect of homoisoflavone-enriched fraction in *Liriope platyphylla* Wang et Tang via PI3-kinase pathway *Life Sci* 2004, 75(22):2653-64.

White MF. IRS proteins and the common path to diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002, 283(3):E413-422.

Yi X, Schubert M, Peachey NS, Suzuma K, Burks DJ, Kushner JA, Suzuma I, Cahill C, Flint CL, Dow MA, Leshan RL, King GL, White MF. Insulin receptor substrate 2 is essential for maturation and survival of photoreceptor cells. *J Neurosci* 2005, 25(5):1240-8

Young AA, Gedulin BR, Bhavsar S, Bodkin N, Jodka C, Hansen B, Denaro M. Glucose-lowering and insulin-sensitizing actions of exendin-4: studies in obese diabetic (ob/ob, db/db) mice, diabetic fatty Zucker rats, and diabetic rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Diabetes* 1999, 48(5): 1026-1034.

Ikeda Y, Olsen GS, Ziv E, Hansen LL, Busch AK, Hansen BF, Shafrir E, Mosthaf-Seedorf L. Cellular mechanism of nutritionally induced insulin resistance: the desert rodent *Psammomys obesus* and other animals in which insulin resistance leads to detrimental outcome. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 1998, 9(2-4):347-385.

의료보험 연합회: 1992년 의료보험 통계 연보. 1993.

## 주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.