

발 간 등 록 번 호

11-1541000-001322-01

**이소플라본 대사체 생산연구와 이를 이용한 폐경기 개선
Medical Food의 개발**

(이소플라본 대사체가 함유된 폐경기 개선식 개발)

(The research for production of isoflavone metabolite
derived from soy isoflavone and the development of
medical food for treatment of menopausal symptoms)

(주)정 · 식품 중앙연구소

농 립 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “이소플라본 대사체 생산연구와 이를 이용한 폐경기 개선 Medical Food의 개발에 관한 연구” 과제(세부과제 “이소플라본 대사체가 함유된 폐경기 개선식 개발에 관한 연구”)의 보고서로 제출합니다.

2012년 4월 9일

주관연구기관명 : (주)정식품

주관연구책임자 : 이윤복

세부연구책임자 : 이윤복

연 구 원 : 한재흠

연 구 원 : 최재권

연 구 원 : 오승현

연 구 원 : 정구훈

연 구 원 : 이장운

연 구 원 : 최정호

연 구 원 : 전경진

협동연구기관명 : (주)비피도

협동연구책임자 : 권빈

협동연구기관명 : (주)청맥

협동연구책임자 : 정상옥

협동연구기관명 : 건양대학교병원

협동연구책임자 : 유병연

요 약 문

I. 제 목

이소플라본 대사체 생산연구와 이를 이용한 폐경기 개선 Medical Food의 개발

II. 연구개발의 목표

- 대두로부터 이소플라본 및 이소플라본 대사체 발효생산 기술 개발
- 이소플라본 및 이소플라본 대사체를 함유한 폐경기 개선식 제조
- 이소플라본 대사 가능 균주 선발 및 이소플라본 생산조건 최적화
- 이소플라본 및 이소플라본 대사체를 함유한 폐경기 개선식의 기능성 평가
- 이소플라본 및 이소플라본 대사체를 함유한 폐경기 개선식의 임상적 평가

III. 연구개발 내용 및 범위

- 이소플라본 및 이소플라본 대사체 발효생산 기술개발
 - 대두를 이용한 발효기술을 적용 이소플라본 대사체 생산 최적 환경구축

- 이소플라본 및 이소플라본 대사체를 함유한 폐경기 개선식 제조
 - 이소플라본 대사체가 함유된 발효물을 이용 폐경기 개선식 적용
 - 폐경기 개선식 제품화를 위한 공정 개발

- 기능성 이소플라본 대사체 생산균주 개발 및 생산조건 확립
 - 이소플라본 대사체 균주 개발 및 균주 대량화 공정 정립
 - 이소플라본 대사체가 포함된 발효물을 이용한 제품개발

- 이소플라본 대사체의 전임상적 기능성 입증
 - 폐경기 증후군 동물실험 모델 개발
 - 이소플라본 대사체가 포함된 발효물의 전임상적 기능성 확인 연구
 - 이소플라본 대사체가 포함된 폐경기 개선식의 안전성 및 전임상적 기능성 확인 연구

- 이소플라본 대사체의 임상적 기능성 입증
 - Equol Producer/Non producer와 폐경기 유병률 관계연구
 - 이소플라본 대사체 발굴 시스템 개발
 - 폐경기 개선식 기능성 임상평가

IV. 연구개발결과

○ 대두 배아를 이용한 이소플라본 비배당체 생산 조건 최적화

대두가공과정 중 발생하는 부산물인 대두배아 및 대두 단백질을 이용하여 *Bifidobacterium lactis* BL740의 생균수 및 대두 이소플라본 비배당체 생산 최대화를 위한 배지최적화를 수행하였고 이를 위하여 통계적 방법인 fractional factorial design(FFD) 및 central composite design(CCD)를 이용, 대두 유래 성분들이 포함된 배지(S-medium)의 최적 조성물을 확인하였다. FFD의 경우 glucose, cellobiose, fructooligosaccharidde, soy peptone, soy protein, 대두배아를 이용 총 6가지 요소를 2수준에서 적용하였으며 이 중 soy protein, soy peptone 그리고 대두 배아가 *B. lactis* BL740의 균성장 혹은 대두 이소플라본 비배당체 전환에 중요 인자로 확인이 되었다. FFD에서 확인된 3가지 인자를 CCD에 적용하였으며 이를 통해 균성장의 경우 최적의 배지조성함량이 soy peptone 29.55 g/L, soy protein 12.73 g/L, 대두 배아 130.67 g/L로 확인되었으며 비배당체 전환의 경우 soy peptone 1.25 g/L, soy protein 2.06 g/L, 대두 배아 60.02 g/L로 최적화 되었다.

○ 이소플라본 대사체가 함유된 폐경기 개선식 개발

폐경기 개선식의 이소플라본 함량을 결정하기 위하여 국내와 임상연구 자료를 조사한 결과, 피험자들의 일일 평균 이소플라본 섭취량은 약 비배당체로 70 mg 정도 이었으며 안면홍조 등의 폐경기 증상 개선에 효과를 보인 최소 이소플라본 섭취량은 비배당체로 40 mg 정도이었다.

이 결과와 국내 폐경 여성들의 일일 평균 이소플라본 섭취량(30 mg)을 고려하여 폐경기 개선식 한 캔 당 비배당체로 30 mg 이상의 이소플라본이 함유되도록 제조하고자 하였다.

대두 배아 발효물의 첨가량을 결정하기 위하여 대두 유액과 대두 배아 발효물의 혼합 비율을 달리하여 제품의 안정성과 이소플라본 함량을 살펴 본 결과, 대두 유액 75.4%, 대두 배아 발효물 0.7%를 첨가한 시료가 가장 안정적이었으며, 이소플라본 함량 역시 캔 당 비배당체로 40 mg 이상의 수준을 나타내었다.

폐경기 개선식의 단백질:지방:탄수화물의 열량 구성비는 12:20:68(% calories)로 설정하였고 제품 열량 밀도는 1 kcal/mL로 설정하였다. 폐경기 개선식 제품 1,000 kcal 당 단백질 30g, 지방 22g을 공급할 수 있도록 설계하였으며, 비타민과 무기질의 경우 1,000 kcal 당 한국인 1일 섭취 권장량의 100%를 공급할 수 있도록 설계하였다.

제품의 우수한 관능 구현을 위해 당도 조절 실험, 조향 실험, 제품 안정성 개선 실험, 감미료 변경 실험 등을 진행하였다. 그 결과, 적절한 당도와 혈당 조절 가능성을 나타내는 결정과당 2%를 첨가하는 것이 적절한 것으로 나타났다. 향은 고구마향, 미숫가루향, 인절미향, 커피향, 호두향 중에서 인절미향이 가장 선호되는 향으로 나타났으며, 안정성 향상을 위해 젤란검 0.01%를 첨가하고자 하였다.

본 제품의 일정한 품질 유지를 위한 규격을 설정하였다. 설정된 규격은 비중 1.086 ± 0.005 g/cm³, pH 6.80 ± 0.2 , 미생물은 모두 음성으로 관리하도록 설정하였다.

본 제품을 이용하여 건양대학교 병원에서 진행한 임상연구의 피험자들을 대상으로 제품에 대한 선호도 조사를 진행하였다.

그 결과 제품을 구매하겠다는 의사를 보인 응답자가 전체 중 69.1%를 차지하였으며, 제품의 효과에 대한 기대치 역시 전체 응답자 중 57.1%가 효과가 있을 것이라는 긍정적인 반응을 나타내었다. 본 제품을 통해 개선되기를 희망하는 폐경기 증상으로는 안면홍조, 골다공증, 피부건

조, 불면증, 비만의 순으로 나타났다. 폐경기 증상 개선 제품 형태로 병과류, 제과류, 캡슐, 음료류 중에서 캡슐 형태가 61.8%로 가장 높은 응답률을 보였으며, 음료 형태가 32.7%로 두 번째 선호되는 제품 형태로 나타났다.

본 제품을 25℃와 35℃에 각각 보관하면서 이소플라본 함량, pH, 비중, 관능 만족도에 대한 변화 정도를 12개월 동안 측정하였다. 그 결과 이소플라본 함량, pH, 비중 그리고 관능 만족도 모두 저장기간 동안 유의적인 변화를 보이지 않았으며, 품질 규격에 적합하였다.

임상시험용 식이 공급을 위해 총 2회에 걸쳐 생산을 진행하였으며, 본약의 주요 원재료는 카제인 나트륨, 대두유액, 대두유, 대두레시틴, 대두배아발효물 등 이었고, 위약의 주요 원재료는 카제인 나트륨, 대두유, 정제수 등으로 대두 이소플라본이 함유되어 있는 대두유액, 대두레시틴, 배아발효물 등을 제외시켰다.

위 결과들을 종합하여 최종 제품을 시험 생산하였으며, 제품명은 “그린비아 우면파워”로 선정하였으며, 품질 측정 결과 비중 1.0746 g/cm³, pH 6.73, 미생물은 모두 음성으로 확인되어 품질 규격에 적합한 것으로 나타났다.

○ 생물전환 우수균주의 선발

식용미생물을 대상으로 이소플라본의 생물전환 우수 균주를 선발하고자 1차 선발로써 pNP 기질을 이용한 β-glucosidase 활성 우수균주인 Bifidobacterium sp. INT57과 IF65를 선발하였음. 또한 equol 생산 가능성이 있는 균주를 선발하고자 배당체를 기질로 약 60여 종의 식용 미생물에 대하여 2차로 생물전환 우수 균주를 선발한 결과 Lactococcus garvieae에서 미량의 equol 유사 peak가 검출되는 것을 확인하였으나 추가적인 연구가 필요하다고 사료됨.

○ 이소플라본 분석 표준화

이소플라본의 생물전환을 통한 식품소재의 개발과 이를 표준화하기 위하여 HPLC를 통하여 정량적으로 daidzin, daidzein, genistin, genistein, equol 에 대한 분석법을 확립하였으며 이를 통하여 시제품에 대한 성적서를 작성하였고 공인기관 성적서와 비교 검토하였음.

○ 고효율 생물전환 공정의 개발 및 최적화

고효율 생물전환을 위하여 기질의 농도를 초기에 비하여 400% 증가시킨 공정을 개발하였으며 추가 이소플라본 첨가로 고농도 고효율 생물전환공정 확립하여 산업화를 위한 기초를 마련하였음. 이렇게 제조된 시료는 동물실험에 제공되었음.

○ 생물전환 및 회수공정의 스케일업 및 제품 규격화

위의 결과들을 200L 규모에서 재현하여 생물전환 공정을 스케일업 하였으며 여기서 생산된 시제품을 원료물질을 동결건조 및 열풍건조를 이용하여 회수한 후 품질평가를 통하여 동결건조 공정을 선택하였고 공인기관에서 제품 성적서를 부여하여 제품 규격화의 기초자료를 확보함. 또한 이 원료를 음료형 제품에 적용하여 제품화를 하였음.

○ 이소플라본 대사체가 포함된 발효물의 전임상적 기능성 확인 연구

본 연구는 Sprague Dawley계 암컷 흰쥐를 대상으로 1차와 2차로 나누어서 실험을 시행하였다. 1차 실험에 대해서는 이소플라본 고함유 대두배아발효물에 대한 실험으로 난소를 절제하지

않고 정상적인 사료를 급여한 정상군(normal)과 개복수술만을 시행하고 칼슘이 없는 기본사료를 급여한 sham군으로 나누었으며, 난소를 절제한 군은 양측난소를 제거한 후 칼슘이 없는 기본사료를 급여한 난소절제군(OVX), 양측난소를 제거한 후 칼슘이 없는 기본사료에 대두배아추출물을 23 g/kg 첨가한 군(SEE), 양측난소를 제거한 후 칼슘이 없는 기본사료에 대두배아발효추출물 30 g/kg 첨가한 군(SEF), 양측난소를 제거한 후 칼슘이 없는 기본사료에 발효균 0.57 g/kg 첨가한 군(BL)으로 실험을 진행하였다. 2차 실험은 이소플라본 고함유 폐경기 개선식의 실험에 대해서는 시험군에 대하여 모두 난소를 적출한 다음 estrogen을 0.001/g으로 처치한(estrogen) 그리고 시험군으로는 폐경기 개선식의 정상용량 급여군 이소플라본 함량 8.5 g/kg 급여군 (FFR), 개선식의 과용량 급여군으로 171.7 g/kg 급여군 (FFO)으로 구성하였으며 각 군 당 공시동물은 10마리씩 공시하였으며, 실험기간은 12주 동안 실험 식이를 급여한 후 부검을 실시하여 골 대사에 미치는 효과 등을 알아보았다. 또한 대두배아발효물과 폐경기 개선식에 대한 안전성에 대한 실험을 시행하였다.

체중의 측정은 동물의 건강상태를 알려주는 가장 중요한 지표 중의 하나이다. 또한 각종 실험에서 시험물질의량을 결정할 때 중요한 인자이기도 하다. 따라서 본 실험에서 이소플라본 고함유 대두배아발효물과 폐경기 개선식의 체중에 미치는 효과에서 두 실험 모두에서의 난소절제로 인한 체중의 유의한 변화는 관찰되지 않아 두 시험물질의 급여가 정상적인 성장 등에 영향을 미치지 않는 것으로 생각된다고 하겠다. 폐경기 개선식에서도 이소플라본 고함유 대두배아발효물에서와 같이 사료섭취와 음수식이 섭취에 미치는 영향에서는 정상대조군을 포함하여 sham군을 포함하여 난소절제군 그리고 모든 시험물질의 투여군 모두에서 특이한 변화는 관찰되지 않았다. 일부 주차에서 약간의 변동을 보이거나 이는 정상적 생리적 범위에서의 변화로 유의한 변화로 보기는 어렵다고 생각된다.

일반 혈액학적 변화에서 대두배아 발효물에서는 유의한 변화가 관찰되지 않은 반면 폐경기 개선식에서는 적혈구계, 백혈구를 포함한 혈소판의 유의한 증가를 보이나 이는 폐경기 개선식이 혈액의 조혈기능을 촉진하는 것으로 생각된다. 주요 생화학적 지표에서 calcium과 phosphorus에서는 유의한 변화가 관찰되지 않은 반면 혈중 뇨소질소와 creatinine에서 sham군을 포함하여 난소절제군 모두에서 유의하게 감소되었다. 이에 반하여 2차년도 연구결과와는 상호 다른 결과를 보였다. 즉 대두배아와 발효물 등의 투여군에서는 칼슘과 무기인 등의 감소가 보인 반면 혈중의 뇨소질소와 크레아티닌의 결과와는 반대의 결과를 보였다. 혈당과 지질 관련 대사에서는 혈당의 경우 난소절제로 인한 혈당의 증가에 대한 대두배아발효물과 폐경기 개선식 모두 유의하게 항당뇨효과를 효과를 보였다. 이러한 결과는 이소플라본 고함유 대두배아발효물에 대한 스트렙토조토신으로 유도한 제1형 당뇨병모델로 실험한 결과 혈당, 호르몬 및 당화혈색소 농도, 지질대사에 미치는 영향, 간 기능대사, 당질 관련 효소대사에 미치는 영향과 항산화 관련 효소대사에서 유의하게 개선된 결과를 보였다. 나아가 심혈관 동맥경화지수를 완화시켜 주어 이는 골다공증으로 인한 당뇨와 나아가 이로 인한 합병증으로 동맥경화 등의 예방효과가 있음을 확인하였다. 따라서 이소플라본 고함유의 폐경기 개선식의 섭취는 골다공증 등 노화로 인해 유발되는 당뇨병에서 당대사 이상에 의한 고혈당증과 지질대사 이상에 의한 식이요법으로 유용할 수 있을 것으로 사료된다. 또한 난소절제에 의한 간기능의 저하에 대한 이소플라본 고함유 대두배아발효물과 폐경기 개선식 모두에서 유의하게 개선됨을 확인하였다. 이러한 결과는 항산화지표 등 여러 실험의 결과에서도 상기한 결과를 뒷받침한다고 하겠다. 따라서 본 실험에서는 이소플라본 고함유 대두배아발효물 이를 원료로한 폐경기 개선식이 난소

절제로 유발된 간기능 저하에 대하여 항산화 및 지질과산화 등에 개선효과와 이를 통한 간세포의 활성화 등으로 개선되는 것으로 사료되나 좀 더 명확한 기전을 위해서는 향후 간 손상 모델을 통하여 추후 연구가 필요할 것으로 생각된다.

골밀도를 포함한 골대사 관련 지표에서 난소절제 모델에서 유의하게 골밀도의 감소를 보인 결과를 보였다. 이는 난소절제를 통한 대퇴골의 골단간부에서 sham군에 비해 소주골 (trabecular bone)의 면적이 감소되었고 파골세포의 수가 증가된 양상을 보였다. 반면 대두배아추출물, 배아발효물을 포함한 폐경기 개선식이 등에서 유의한 억제효과를 보였다. 이러한 효과는 골밀도를 포함한 골 관련 주요 지표인 요중과 혈중에서의 골 무기질, 혈중 호르몬과 골대사와 사이토카인과 항산화 및 지질과산화 관련 지표 모두에서 유의한 억제효과를 보여 이는 난소절제를 통해 소실되었던 골밀도가 이소플라본 고함유 대두배아, 발효물 그리고 이를 원료로 한 개선식에서 효과를 보였다. 즉 골단간부에서 소주골의 소실이 뚜렷하게 관찰되었으며 이는 파골세포 및 골세포의 수가 증가함을 알 수 있었다. 난소적출 후에 골감소증 (osteopenia)이 일어난 것은 bone turnover가 증가하기 때문으로 해석되고 있다. 난소적출 후에 initial rapid phase에서 TBV 감소, osteoblast 및 osteoclast의 표면적 및 수가 증가로 bone turnover가 되었음을 선행 연구결과로 알 수 있었다. 즉 고함유의 아이소플라본의 급여로 estrogenic effect로 인해 calcium의 함량을 증가시켜 골흡수를 억제함으로 해석되고 있다. 본 실험에서 이러한 결과를 뒷받침하는 것은 estrogen 제제의 주사로 난소절제에 의하여 증가된 bone turnover가 억제되는 것을 관찰할 수 있어 이러한 결과를 뒷받침한다고 하겠다. 이러한 결과들은 대퇴골의 조직학적인 소견에서도 동일한 결과를 보여 상기의 결과들을 뒷받침하다고 생각된다. 한편 대두배아추출물, 대두배아발효물 그리고 폐경기개선식의 안전성 평가에서 본 연구결과로 보아 본 실험조건하에서 3개월 동안 반복급여 시험 결과, 시험물질 즉 이소플라본 고함유 대두배아발효물과 폐경기 개선식에 대한 용량은 모두 무해용량 (no observed adverse effect level, NOAEL)인 것으로 사료된다.

○ 이소플라본 대사체의 임상적 기능성 입증 및 이소플라본 대사체 함유 폐경기 개선식의 임상적 효능평가

이소플라본의 장기 복용에 대한 효과와 Equol 생산 여부와의 관계는 아직까지 명확히 알려지지 않았다. 본 연구에서는 이소플라본 섭취시 나타나는 폐경 증상 및 심혈관계,골다공증 관련 인자의 변화를 알아보고, 이것이 소변 Equol 농도와 어떤 관련이 있는지 알아보았다.

60명의 폐경 여성을 대상으로 한 무작위배당, 단일맹검으로 진행하였다.. 이소플라본 74mg이 함유된 음료를 12개월간 섭취 한 후 폐경증상 및 심혈관계 위험인자와 관련된 혈액 지표 및 골대사 지표와 골밀도의 변화에 대해 분석하였다.

이소플라본 투여 후 위약에 비해 MRS 총 점수 감소, 안면 홍조 및 발한, 심계항진, 불안감, 성적 욕구 및 행위 및 만족감 변화 등의 증상 개선이 통계적으로 유의하게 관찰되었다. 체지방 증가는 관찰되나 허리 둘레는 감소하였고, 혈청 지질, S-CRP는 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 대퇴 전체 골밀도는 시간 효과를 보정하였을 때 이소플라본 군의 골 소실이 유의하게 적었고 이는 통계적으로 유의하였다. 요추 및 대퇴 경부에서 골감소 효과가 유의하게 나타났는데 이 효과는 시간을 보정하였을 때 통계적으로 유의하지 않았다. Equol 생산 여부에 따른 임상 지표의 차이는 통계적으로 유의하지 않았다.

이소플라본 투여는 폐경기 증상 개선, 골소실 억제 등의 임상 효과를 나타내며, Equol 생산 여

부에 따른 효과의 차이는 유의하지 않았다. 위 결과를 종합하였을 경우, 이소플라본 대사체가 함유된 폐경기 개선식은 폐경 여성의 건강 지표 증진에 기여할 수 있을 것으로 생각된다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

○ 연구성과

- 새로운 형태의 식물성 에스트로겐을 적용한 고기능성 medical food 제공
- 대두배아 발효물 및 폐경기 개선식 제품에 대한 비임상연구 및 임상연구를 통한 생리 기능성 확인
- 이소플라본 대사 균주 및 배양기술 확보
- 이소플라본 대사물질 분석기술 확립
- 식용 미생물을 이용한 생물전환용 최소가공공정의 개발

○ 실용산업화 계획

- 갱년기 여성에게 도움을 주는 기능성 음료 제품 개발
- 기능성 원료소재화

○ 정량적 연구 실적

- 국내 특허 출원 - 2건
- 국내 학술지 발표 - 5건
- 국외 학술지 논문 투고/심사 중 - 4건
- 국내 학술대회 포스터 발표 - 7건
- 전시회 참여 - 1건
- 인력지원 성과 - 박사 1명, 학사 4명, 기타 3명

SUMMARY

(영문 요약문)

The objectives of this project were to develop medical food for treatment of menopausal symptoms and evaluate production of isoflavone metabolite derived from soy isoflavone.

First, In order to maximize the growth of *Bifidobacterium lactis* BL 740 and soy isoflavone aglycones production, we investigated the optimization of a culture medium containing soy hypocotyls, which are the by products of the soy manufacturing process, and soy proteins. The ingredients of the medium containing soy materials (S-medium) were selected by fractional factorial design (FFD) and central composite design (CCD) within a desirable range. The FFD was applied by six factors: glucose, cellobiose, fructooligosaccharide, soy peptone, soy protein, and soy hypocotyl. Soy protein, soy peptone, and soy hypocotyl were found to be significant factors from the result of FFD for both the growth of *B. lactis* BL 740 and aglycone production. The CCD was then applied with three variables found from FFD at five levels each and the optimum values were determined for the three variables: soy peptone, soy protein, and soy hypocotyl. In the case of the growth of *B. lactis* BL740, the proposed optimal media contained 12.73 g/L of soy protein, 29.55 g/L of soy peptone, and 130.67 g/L of soy hypocotyl. To produce isoflavone aglycones, optimized media was composed of 2.06 g/L, soy protein, 1.25 g/L of soy peptone, and 60.02 g/L of soy hypocotyl.

Second, In order to determine the content of isoflavone in medical food for menopausal women, we surveyed clinical study data which effect on menopausal symptom of isoflavone. Subjects's average daily intake of isoflavone was approximately about 70 mg as aglycone. Menopausal symptoms such as facial flushing seen to be effective in improving the minimum intake of isoflavone were about 40 mg by aglycone.

In addition, South Korea menopausal women's average daily isoflavone intake is about 30 mg. Therefore, our products over the 30 mg as aglycone was tried to add.

In order to determine the content of fermented soybean hypocotyl powder, according to the mixing ratio of soy milk and fermented soybean hypocotyl powder, isoflavone content and stability of product were measured. As a result, Product containing 75.4% soy milk and 0.7% fermented soybean hypocotyl powder was the most stable. In addition, isoflavone content in product was about 40 mg as aglycone per 1 can.

This product's protein: fat: carbohydrate composition ratio was set to 12:20:68 (% calories). And the product caloric density was set to 1 kcal/mL. It was designed to provide protein

30g and fat 22g per 1,000 kcal and to offer vitamins, mineral 100% depending on dietary reference intakes for Koreans.

Fructose content in product was determined 2%. This content was showed the most suitable taste and healthy. Injeolmi scent was the most preferred among potato, powder made of mixed grains, injeolmi, coffee, walnut scent. In addition, we added 0.01% gellan gum to improve stability of the product.

Specifications of quality were set to specific gravity $1.086 \pm 0.005 \text{ g/cm}^3$, pH 6.80 ± 0.2 , microorganism negative in order to control quality.

We aimed at menopausal women, the preference for product was investigated.

As a result, 69.1% of the respondents have tendency to intention of purchase. Expectations for the effectiveness of the product, 57.1% of respondents would be in effect showed a positive response. They wished to improve the menopause symptoms which hot flush, osteoporosis, skin dryness, insomnia, obesity in order through the product. 61.8% of respondent was preference for the capsule type among ice cream, cookies, capsule, drink type, as a result of investigation the most preference for product type. secondary, drink type was favored as product type(32.7%).

This product was kept at 25 °C and 35 °C, respectively, while 12 months isoflavone content, pH, specific gravity, sensory score were measured. As a result, isoflavone content, pH, specific gravity, and sensory score did not change significantly during the period. Quality also were suitable for quality standards during the period.

Dietary supply of clinical trial was conducted twice to produce. The main raw materials of drugs was sodium caseinate, soy milk, soybean oil, soy lecithin, fermented soy hypocotyl. the main raw materials of placebo was sodium caseinate, soybean oil, purified water. And soy milk, soy lecithin, fermented soy hypocotyl, etc. which contain isoflavone were excluded.

By integrating the above results, the final product was manufactured medical food. It was named the "**GreenBia Woman Power**". Its product quality were suitable for quality standard, as a result of investigation(specific gravity 1.0746 g/cm^3 , pH 6.73, microorganism negative).

For efficient production of isoflavone aglycones from soybean hypocotyl and development of functional food, food grade microorganisms including *Bifidobacterium* and lactic acid bacteria have been screened for β -glucosidase activity and bioconversion activity on isoflavone glycosides. Among 60 LAB tested, *Bifidobacterium* sp. INT57 and IF65 was isolated as best strain for this purpose. Furthermore, we tried to screen equol producing LAB and isolated *Lactococcus garvieae* as a candidate but need further study. The process for the bioconversion of isoflavone in soybean hypocotyl was optimized and the concentration of substrate was increased up to 4 fold and showed complete bioconversion of isoflavones. For the standardization and quality control of the product, SOP(standard operation protocol) of HPLC analysis of the major isoflavones such as daidzin, daidzein, genistin and genistein were established. The scale-up of bioconversion process was

performed using 200L fermentor and the conversion rate was reproducible. After bioconversion, the product was dried and tested using freeze dryer or hot air dryer. Freeze drying was chosen for drying process after the sensory evaluation. The specification of the sample product was analyzed by both in-house SOP and analysis service institute (Korea Health Supplement Institute). The sample product was used for the animal feeding study and supplemented in the ginseng drink for women.

This study was carried out with female Sprague Dawley (SD) rat on two trial tests. In first experiment, fermented soybean with high concentrated isoflavones in each groups has done as follows, 1) basic chow dieted non-ovariectomized normal group, 2) basic chow without calcium dieted sham group, 3) basic chow without calcium dieted OVX group, 4) basic chow without calcium and with SEE (23 g/kg) dieted OVX group, 5) basic chow without calcium and with SEF (30 g/kg) dieted OVX group, 6) basic chow without calcium and with BL (0.57 g/kg) dieted OVX group. In second experiment, the effect of fermented soybean with high concentrated isoflavones on menopause in OVX rat was examined. The OVX rats were divided into three different groups which were treated estrogen (0.001/g), FFR (8.5g/kg) and FFO (171.7 g/kg) during 12 weeks.

The measurement of body weight indicating the health status of animals is one of the most important indicators. We evaluated body weights of diet fermented soybean isoflavones group has no significant changes compared to control and sham group. Fermented soybean isoflavones showed the significant effects in general hematological changes while diet chow of postmenopausal improvement did show a significant increase in blood components including RBC, WBC and platelet. It is strongly suggest that diet chow of postmenopausal improvement has stimulated to hematopoietic systems. Calcium and phosphorus in the major biochemical markers did not show any significant changes, while the level of urea-nitrogen and creatinine in serum significantly decreased in the sham and OVX groups.

However, in the second year, fermented soybean isoflavones treated group showed the reduction of calcium and phosphorus in the blood, whereas the level of urea-nitrogen and creatinine in serum lead to an opposite result.

Moreover, diet fermented soybean isoflavones and chow of postmenopausal improvement showed anti-diabetes mellitus effect. These results showed that fermented soybean isoflavones significantly improved streptozotocin-induced type 1 diabetes showing the improvements in blood glucose, hormones, and glycolated hemoglobin, lipid metabolism, liver metabolism, carbohydrate metabolism and antioxidant enzyme in the metabolism.

Thus, intake of isoflavones in menopause is considered to be useful in diabetes caused by osteoporosis and arteriosclerosis.

Furthermore, diet isoflavones has significantly decreased bone density in OVX animals. In addition, diet isoflavones in OVX animals showed the same effects in bone-related major indicator including bone density, such as bone mineral, serum hormones, cytokines, and lipoperoxide and antioxidant-related indicators. After ovariectomy, area of trabecular bone

was decreased and the number of osteoclast was increased in comparison with sham group. However there was significant inhibition effect for a decrease of bone density and increase of osteoclast in all test group. Osteopenia was caused by increasing bone turnover after ovariectomy. Estrogenic effects of isoflavon increased calcium and inhibited bone reabsorption.

In continuous administration for 3 months result, Dose of soybean extract and in postmenopausal diet was NOAEL..

Therefore, fermented soybean isoflavones on the improvement food of postmenopausal showed the possibility as functional foods showing the prevention of osteoporosis and diabetes mellitus, but several indicators decreased effect in normal dose diet of fermented soybean isoflavones compare to high dose. This should be improved and additional research will be made.

The long term effects of long term isoflavone intake and its relationships of equol is unknown.

It is a single blind,randomized,controlled trial. 60 menopausal women takes daily 72mg soy isoflavone or casein-contained placebo for 12month, assessed Menopausal symptoms, cardiovascular risk factor, Serum Bone marker and BMD.

Total MRS score, Facial flushing and sweating,palpitation, anxiety and sexual behavioral change was improved. Body fat mass was increased, but waist was decreased. Serum Lipid profile and S-CRP change was not significant. Total femoral bone loss was significantly decreased, but spine and femur neck bone loss was not changed significantly. Bone marker was not changed significantly.

Isoflavone is improved menopausal symptom, bone health. But the effect of equol production was not significant.

CONTENTS

SUMMARY

Chapter 1. Introduction

Session 1. Necessity of study

Session 2. Purpose and contents of study

Chapter 2. The status of domestic and foreign technical development

Chapter 3. Contents and results of study

Session 1. Statistical optimization of production of soy isoflavone aglycones

Session 2. Development of beverage for improving menopausal symptoms comprising fermented soybean hypocotyl

Session 3. Process optimization for efficient production of isoflavone aglycones and product development using food grade microorganisms

Session 4. Process optimization for efficient production of bioconversion

Session 5. Development of raw materials for functional food

Session 6. Effect of fermented soybean hypocotyl and beverage for improving menopausal symptoms on ovariectomized osteoporotic rats

Session 7. Effect of fermented soybean hypocotyl and beverage for improving menopausal symptoms on streptozotocin-induced type 1 diabetes.

Session 8. Anti-inflammatory effect of equol, an isoflavone derived from soy bean

Session 9. Study on estimation of clinical efficacy of isoflavone-containing food for women in the menopause

Chapter 4. Purpose achievement and contribution degree on field of the study

Chapter 5. Application plan of the study results

Chapter 6. Corrected Foreign scientific technology information for studying

Chapter 7 References

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 / 16

제 1 절 연구개발의 필요성	16
1. 기술적 측면	16
2. 경제/산업적 측면	17
3. 사회/문화적 측면	18
제 2 절 연구개발과제의 목표 및 내용	20
1. 연구개발의 최종 목표 및 주요내용	20
2. 과제별(세부·협동) 연구개발의 목표 및 내용	20
3. 연차별 연구개발의 목표 및 내용	21

제 2 장 국내외 기술개발 현황 / 24

1. 국내외 관련기술 현황	24
2. 당해 연구 수행기관의 보유기술	25

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 / 28

제 1 절 대두 배아를 이용한 이소플라본 비배당체 생산 조건 최적화	28
1. 비배당체 전환율 우수 균주 선별	28
2. 배아를 이용한 배지 최적화	29
3. 통계적 방법을 이용한 대두부산물 배지화	36
4. 이소플라본 대사체 생산 발효 환경 구축	39
제 2 절 이소플라본 대사체가 함유된 폐경기 개선식 개발	40
1. 배합비 확립 및 제품 개발	40
2. 폐경기 개선식 중 배아 발효물 배합비 결정	43
3. 폐경기 개선식의 기본 배합비 개발	44
4. 배합비 개발 실험	45
5. 원료 및 제품의 품질관리 규격 설정	47
6. 소비자 선호도 조사	48
7. 저장안정성 평가	50
8. 임상시험용 식이 제조	52
9. 최종 제품 생산 및 상품화	54

제 3 절	고효율로 비배당체의 이소플라본(daidzein, genistein, equol)을 생산하는 공정 개발 및 제품화	56
1.	PNP assay를 통한 β -glucosidase 활성 우수 균주 1차 선발	56
2.	생물전환 모니터링 방법 확립: HPLC 및 TLC를 이용한 분석법	58
3.	배당체 분해능을 기준으로 한 균주 선발	60
4.	균체 및 조효소액을 이용한 equol 생산 탐색	61
5.	대두배아에서 Equol 생산 가능 균주 선발	62
제 4 절	고효율 생물전환 공정의 개발 및 최적화	64
1.	Equol 생산가능성 평가	64
2.	고농도 이소플라본 전환공정 개발	66
제 5 절	기능성 식품 소재의 개발	71
1.	발효 후 회수 공정 개발	71
2.	배양조건의 스케일업 및 최적화	73
3.	제품 규격화	74
제 6 절	이소플라본 발효물 및 폐경기 개선식이 난소절제 흰쥐의 골대사 및 생화학적 지표에 미치는 영향	78
1.	연구 재료 및 방법	78
2.	결과 및 고찰	82
제 7 절	폐경기 개선식이 Streptozotocin으로 유도한 당뇨 모델에서 항당뇨 및 항산화 작용에 미치는 효과 (추가연구)	117
1.	추가 연구배경	117
2.	재료 및 방법	119
3.	결과 및 고찰	121
제 8 절	Equol 의 항염증 활성 효과	128
1.	Equol의 Macrophage 염증반응에 대한 항염증 활성	128
제 9 절	이소플라본 함유 폐경기 개선식의 임상 효과 검증	137
1.	연구 재료 및 방법	137
2.	결과 및 고찰	139
3.	결론 및 전망	143

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 / 145

제 1 절 연도별 연구목표 및 달성도	145
1. 연도별 연구 평가의 착안점	145
2. 1세부과제 달성도	146
3. 2세부과제 달성도	147
4. 3세부과제 달성도	148
5. 4세부과제 달성도	149
제 2 절 관련분야의 기술발전예의 기여도	149

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 / 151

제 1 절 연구개발 성과	151
제 2 절 실용산업화 계획(기술실시 등)	151
1. 갱년기 여성에게 도움을 주는 기능성 음료 제품 개발	151
2. 기능성 원료소재화	152
제 3 절 연구결과의 대외적 활용방안	152

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 / 155

제 7 장 참고문헌 / 156

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

가. 호르몬 치료법 위험성의 대두

폐경기 질환 치료요법은 대부분 호르몬 치료법을 통해 이루어져 왔으나 미국 국립보건원의 대규모 역학조사인 WHI (Women's health initiative) 연구 결과 폐경 후 여성호르몬 대체 요법(HRT)이 global index의 발생빈도 뿐 아니라 유방암이 증가되는 것으로 확인되어 폐경기 질환 치료에 있어 안전성 문제가 제기되고 있으며 이 같은 부작용 때문에 여성호르몬 치료 기피 현상이 심해지고 있다.

국내외 학회 간에도 HRT 사용에 있어 안전성에 대한 견해 차이를 보이고 있으나 폐경기 여성에서 폐경기 증상완화를 위한 목적으로는 제한적으로 사용할 것을 권고 하고 있다.

이소플라본의 경우 다양한 약리 및 질환 관련연구가 진행되어 효과 및 작용기전이 규명되고 있음에도 불구하고 이소플라본을 이용한 건강기능식품은 치료 보조제 형태로만 권고되는 실정임. 따라서 기능적 측면에 보완과 입증에 보장되는 물질이 함유된 폐경기 개선식의 필요성이 대두되고 있는 실정이다.

나. 에스트로겐 유사물질에 대한 관심 증가

대표적인 에스트로겐 유사물질인 합성 raloxifene과 tamoxifen은 조직 특이작용에 의한 유방암에 대한 예방효과를 바탕으로 개발되어 현재는 다양한 조직특이작용에 의해 골다공증의 치료 등 용도의 다양화를 개발 중에 있다.

대두 천연 생리활성물질인 이소플라본은 조직특이작용을 가지고 있으며, 대표적인 천연 SERM으로서의 작용가능성에 대한 연구가 수행중이다.

블랙코호시와 히패리시로 구성된 비호르몬성 폐경기 장애 치료제가 독일, 미국, 스위스, 오스트리아 등에서 폐경 증상치료에 널리 사용되고 있다.

식물성 치료제는 우울감, 발한, 안면홍조, 심계항진 등과 같은 증상을 효과적으로 치료해 주며 승마, 히패리시 등의 식물성분은 예전부터 미국, 유럽 등에서 폐경기 증상 치료에 사용되어 왔으며 2002년 세계보건기구에서 폐경기 질환 치료제로 허가되어 신뢰성이 높다.

다. 이소플라본 대사체의 고기능성 대두

대두 이소플라본은 주로 배당체 형태로 존재하며 장에서 바로 흡수되지 않고 장내 미생물이나 β -glucosidases에 의해 비배당체의 형태로 전환 된 후 흡수가 이루어진다. 이것은 장내 미생물에 의해 dihydrodaidzein(DHD)를 통해 equol로 대사 되거나 O-desmethylangolensin (O-DMA)로 대사된다(1-2).

이소플라본 최종 대사체 형태로서 체내에서 dadizein으로부터 생성된 equol은 에스트로겐 수용체(ER receptor)와의 높은 (이소플라본의 10~80배) 결합력을 지니며 에스트로겐과 유사기능성을 나타내어 골다공증과 폐경기 질환 등에 적용 가능성이 높다. 또한 여성에게서 안

면홍조 감소 및 남성의 전립선 확대가 감소되는 것이 관찰되었다(3-8).

라. 고기능성 폐경기 개선 물질 개발을 위한 발효기술 연구 필요성

이소플라본 섭취 효율을 높이기 위한 기술로서 이소플라본 배당체(glycosides)의 생리활성적인 응용적 가치를 증대시키기 위해 biotransformation 연구가 국외적으로 비교적 활발히 진행되고 있으며 최근 이소플라본 대사체의 기능성에 대한 관심 대두와 함께 이를 생산하기 위한 발효기술 및 대사 균주 연구, 식품, 약품 적용 등이 해외에서 실시되고 있다.

특히 일본을 중심으로 기반 기술 확보 및 특허 등록이 이루어지고 있다.

현재, 기술적, 연구적 측면에서 생물전환 효소 및 반응성, 그 전환체 구조와 생리활성 기능성과의 상관성에 관한 국내 연구는 일부의 연구 그룹에만 진행되고 있어 부족한 현실이다.

마. 이소플라본 대사체 진단을 위한 스크리닝 기술 개발 필요

이소플라본의 기능성 연구가 급속히 진행함에 인체내 섭취 후 대사 및 흡수과정에 대한 이해가 깊어짐에 따라 이소플라본 대사체 형태가 임상적 효능에 영향이 미칠 수 있다는 제안이 계속적으로 제기되고 있다.

특히 이소플라본 대사체 equol의 생리적 중요성에 비하여 이를 생산할 수 있는 equol producer의 경우 일본인의 50%, 아시아인의 30% 정도만이 생산할 수 있다고 보고되고 있으며 이소플라본 대사체의 인체 내 유무에 의해 유방암이나 전립선암 등의 위험성과의 관계성에 대한 임상적 결과 및 기능성에 대한 결과가 발표되고 있는 실정이다(9).

따라서 이소플라본 대사체 equol의 producer/non-producer의 스크리닝 기술을 통한 국내 폐경기 여성 질환과 이소플라본 대사체의 유병률의 조사가 절실히 필요하다.

이를 추적하기 위한 현 이소플라본 대사체 분석 방법은 효소 처리 및 추출 등 전처리 시간이 길며 equol의 검출 농도가 낮은 한계성을 지니고 있으며 면역학적 검출 방법 역시 estrogen과의 간섭 현상 등으로 인해 정확한 진단이 어려운 실정이다.

2. 경제/산업적 측면

가. 식물성 에스트로겐에 대한 관심 및 시장 확대

HRT 요법에 대한 여성들의 거부감으로 인해 식물성 제제와 식품 보조제와 같은 자연성 호르몬제가 미국의 경우 40~60세 사이 70% 이상의 여성이 갱년기 증상이나 질병을 치료 목적으로 사용하고 있다.

국내 제약업계에서의 호르몬 치료법 대체치료제로서 식물성 에스트로겐을 이용한 제품들을 출시 중에 있으며 업계추산 폐경기 치료시장 2000억~3000억 원으로 추정하고 있다.

한국의 건강기능식품을 찾는 주 고객층은 갱년기 여성이며 갱년기 여성 건강기능식품 시장은 지난 3년간 매년 약 15%씩 성장해 2008년 현재 약 5000억 규모이며 식물성 에스트로겐을 이용한 식품군이다.

나. 치료식(병원식) 시장 확대

건강기능식품이 국내외적으로 많은 종류의 다양한 제품들이 출시되면서 효능이나 임상적

효과가 증명이 되지 않음에도 불구하고 기능성 광고 및 무분별한 판매 등이 이루어지고 있어 문제점으로 제기되었다.

일본의 경우 건강기능성 식품 시장에 대해서는 특정용도식품 중심으로 효과가 보다 명확하게 증명된 제품의 구성비가 높아지고 있으며 일본의 특수용도식품 시장현황은 약 352억 엔 수준이다.

국내의 경우도 건강기능식품 시장은 급속히 성장하고 있으나 식품의 효능적면에서 확실한 입증의 필요하다.

국내의 특수용도 식품 시장은 2004년 196억, 2005년 242억, 2006년 249억원 이었으며 계속 증가할 것으로 예상된다.

다. 부산물의 활용 및 부가가치성 기대

국내 대두가공산업에서 발생하는 다량의 생리활성물질을 포함한 부산물은 사료 혹은 폐기물로 버려지거나 기술력이 확보된 외국으로 수출이 진행, 가공 후 역수입이 되는 모순이 상존하고 있는 실정이다.

대두 부산물의 일종인 대두배아는 자체에 과량의 이소플라본이 존재함으로써 기능성 소재 생산에 원료 및 이소플라본 대사체 생산의 발효기질로 이용함으로써 발효 영양원을 대체효과, 자원재 활용 및 생산원가 절감효과를 기대할 수 있을 것이다.

라. 수입의존도가 높은 기능성 식품 소재

건강기능식품 수입 건수는 2005년 5816건, 2006년 7006건, 2007년 7223건으로 꾸준히 증가하여 3년간 24.2%나 증가되었다.

2008년 이전 3년간 수입된 건강기능식품은 모두 2만45건이고 주로 미국 일본 등 의료 선진국에서 수입되었다.

수입 품목의 종류는 비타민류 54.8%, EPA 또는 DHA 제품이 8.8%, 글루코사민(7.3%), 알로에(5.2%), 콜로렐라(4.0%), 감마리놀렌산(3.9%), 화분 제품(3.5%), 효모 제품(2.9%), 프로폴리스 추출물 제품(2.7%), 로열젤리 제품(2.4%), 스피루리나 제품(2.3%), 유산균 함유 제품(2.2%)의 순이다.

마. 이소플라본 대사체 발효물의 다양한 소재로서 활용

Nutraceutical 산업이 급속하게 성장하면서 미용을 위하여 섭취하는 식품, 음료, 식이보충제의 시장은 4억 9656만 달러로 추정하고 있다. 현재 미용식품의 소재로 사용하고 있는 포도씨 추출물, 콜라겐, 은행추출물, 세라마이드 등이 있으며 특히 콩의 이소플라본 및 이소플라본 대사체는 항산화효과 뿐 아니라 피부노화 및 자외선으로 인한 방광암 현상에 대한 보호효과가 있는 것으로 보고되어 있으며 미국의 약물성 화장품 시장의 경우 2007년 80억 달러, 2010년에는 100~120억 달러로 예상된다.

3. 사회/문화적 측면

가. 폐경기 대상 인구 증가

소비자 트렌드는 감성적 소비의 양극화와 ‘약’에서 ‘식품’으로의 인식전환이 증가되고 있으며 QOL 의약품이 시장이 성장하고 웰빙에 대한 강한 인식이 성장하였다. 점차 고령화 사회

로 증진되면서 폐경기 여성을 중심으로 골다공증에 대한 인식이 새로워지고 있고 적극적인 예방과 치료에 나서는 사례가 급증하고 있다. 폐경기에 야기되는 근본적인 건강상의 문제점은 타 질병보다 장기적이며, 삶의 질과 노년기 질병에 직접적으로 영향을 줄 수 있다.

2008년 현재 국내 45세에서 64세 사이의 폐경 여성은 600만 명으로 추산되며 2020년까지 800만 명으로 급증할 것으로 예상된다.

나. 여성건강 증진 및 보건복지 향상을 위한 식품 개발 필요

여성건강 정책 반영부분에서 젠더 차이 관점을 가져야 한다는 주장이 여성 및 폐경학회 중심으로 일어나고 있다. 서서히 노화가 진행되는 남성과는 달리 여성의 경우 폐경을 전후로 급격한 신체적, 생리적 변화를 겪게 되나 호르몬 대체요법이 현저히 위축되고 있는 추세로 운동 및 영양 특히 식생활 습관이 폐경기 여성의 건강관리법으로 더욱 중요하게 대두

폐경기 질환은 골다공증, 발한, 안면홍조, 위축성 질염 등 신체적 질환뿐 아니라 무력감, 현기증, 초조감, 근심, 두려움 등 정신적 이상상태를 동반하며 이러한 증상은 폐경기 여성의 85% 정도가 겪는 증상이며 이러한 증상은 에스트로겐 결핍에서 기인한다. 골다공증은 폐경 후 15~20년 이내에 나타나며 같은 연령의 남성보다 여성에서 6~8배 높게 나타나며, 국내 폐경이 여성의 인구수는 700만명, 골다공증 환자 수는 150만명에 이른다.

최근에는 임신과 출산에 따른 칼슘 손실 및 과도한 다이어트로 인한 영양대사의 불균형에 의해 폐경기 여성뿐만 아니라 30대의 젊은 여성에서 골다공증의 위험이 증가되고 있는 실정이다. 미국 Archives of Internal Medicine사의 조사 결과에 따르면 1994년에서 2003년 사이에 골다공증환자의 병원 방문이 5배 증가했다고 밝히는 등 여성의 골다공증에 의한 사회적 보건의료비용 지출이 매우 크게 증가하고 있다.

다. 연간 의료비 지출의 증대

국내 의료비는 2004년 의료비 지출은 GDP 대비 5.6%였으나 2010년 국민일인당 의료비는 GDP 대비 8.1%로 약 60조로 예상되며 지속적으로 증가할 것으로 예상되며 보건의료비 지출 중 개인부담이 높아 의약품 대체식이 필요한 실정이다.

제 2 절 연구개발과제의 목표 및 내용

1. 연구개발의 최종 목표 및 주요내용

연구개발 최종목표 :

폐경기 질환 예방 및 개선을 위한 이소플라본 및 이소플라본 대사체가 포함된 Medical Food 개발 및 상품화

- 대두로부터 이소플라본 및 이소플라본 대사체 발효생산 기술 개발
- 이소플라본 및 이소플라본 대사체를 함유한 폐경기 개선식 제조
- 이소플라본 대사 가능 균주 선발 및 이소플라본 생산조건 최적화
- 이소플라본 및 이소플라본 대사체를 함유한 폐경기 개선식의 기능성 평가
- 이소플라본 및 이소플라본 대사체를 함유한 폐경기 개선식의 임상적 평가

2. 과제별(세부·협동) 연구개발의 목표 및 내용

<p>(주)정식품 (세부)</p>	<p>이소플라본 대사체가 함유된 폐경기 개선식 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ 대두 및 대두 부산물을 이용한 이소플라본 대사체 생산발효기술 개발 ■ 이소플라본 대사체가 함유된 폐경기 개선식 제조 ■ 폐경기 개선식 상품화를 위한 공정개발
<p>(주) 비피도 (제1협동)</p>	<p>고효율로 비배당체의 이소플라본(daidzein, genistein, equol)을 생산하는 공정 개발 및 제품화</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ 고효율 생물전환 균주의 선발 ■ 고효율 생물전환 공정의 개발 및 최적화 ■ 기능성 식품 소재의 개발
<p>(주) 청맥 (제2협동)</p>	<p>이소플라본 대사체의 전임상적 기능성 입증</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ 폐경기 증후군 동물실험 모델 개발 ■ 이소플라본 발효물의 전임상적 기능성 확인 연구 ■ 이소플라본 대사체가 포함된 발효물의 전임상적 기능성 확인연구 ■ 이소플라본 대사체가 포함된 폐경기 개선식의 전임상적 기능성 확인 연구
<p>건약대학교 병원 (제3협동)</p>	<p>이소플라본 대사체의 임상적 기능성 입증</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ Urine중의 equol을 측정하는 정량분석법을 확립 ■ 이소플라본 대사체, equol과 폐경기 여성의 증상 발현과의 상관관계를 규명할 수 있는 생화학적 분석 시스템을 개발 ■ 폐경기 증상 여성을 대상으로 한 임상시험을 통해서 isoflavone 대사체 함유 식품의 증상개선효과를 검토 및 생화학적 분석치와의 상관관계를 규명

3. 연차별 연구개발의 목표 및 내용

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차 년도	2009년	◇ 대두 및 대두 부산물로부터 이소플라본 대사체 발효생산 기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> ■ 대두 부산물 배지화 연구 <ul style="list-style-type: none"> ▶ 균주 성장 최적 영양조건 개발 ▶ 대두 부산물 이용량 조건 확립 ■ 이소플라본 대사체 생산 발효 환경 구축 <ul style="list-style-type: none"> ▶ 생산 최적화 환경 조건 구축
		◇ 고효율 생물전환 균주의 선발	<ul style="list-style-type: none"> ■ PNP assay를 통한 β-glucosidase 활성 우수 균주 1차 선발 ■ 배당체 분해능을 분석하여 최종 우수균주 선정 ■ 선별 균주 중 이소플라본 대사체 equol 생산균주 screening ■ 생물전환 모니터링 방법 확립: HPLC 및 TLC를 이용한 분석법
		<ul style="list-style-type: none"> ◇ 폐경기 증후군 동물실험 모델 개발 ◇ 이소플라본 발효물의 전임상적 기능성 확인 연구 	<ul style="list-style-type: none"> ■ 폐경기 모델에서 biomarker study <ul style="list-style-type: none"> ▶ 이소플라본이 골대사 (골밀도와 골무기질함량)에 미치는 지표개발 ▶ 이소플라본이 항동맥경화에 미치는 효과
		◇ 생체 시료 중의 이소플라본 대사체 equol 생성량 정량을 위한 측정 시스템의 개발	<ul style="list-style-type: none"> ■ 뇨 및 혈장 중의 이소플라본 대사체 equol 측정을 위한 생화학적 정량법 개발 ■ 생체 시료 중의 이소플라본 대사체 equol 측정을 위한 면역학적 분석법 개발

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
2차 년도	2010년	◇ 이소플라본 대사체가 함유된 폐경기 개선식 제조	<ul style="list-style-type: none"> ■ 이소플라본 대사체 생산 발효 환경 최적화 ■ 레시피 확립 및 제품개발 ■ 관능적 평가
		◇ 고효율 생물전환 공정의 개발 및 최적화	<ul style="list-style-type: none"> ■ β-glucosidase 활성 유도 연구: 배지 내 유도물질 첨가 탐색으로 효소활성 최대화 연구 및 이를 통한 비배당체 이소플라본 (daidzein, genistein, equol) 생산량 최적화 ■ 배양 조건 탐색에 의한 생물전환 최적화 연구: pH, 온도, agitation 등 최적화
		◇ 이소플라본 대사체가 포함된 발효물의 전임상적 기능성 확인 연구	<ul style="list-style-type: none"> ■ 골대사에 미치는 효과 ■ 호르몬 대사에 미치는 효과 ■ 항동맥경화에 미치는 효과 ■ 항산화 작용에 미치는 효과 ■ 지질대사에 미치는 효과
		◇ 임상시험 준비 및 개시	<ul style="list-style-type: none"> ■ Non-producer의 선별 ■ 지표물질 측정
		◇ 이소플라본 대사체 equol 측정법 개발연구의 계속 진행 및 완성	<ul style="list-style-type: none"> ■ 이소플라본 대사체 equol 정량법 개발 완성 ■ 이소플라본 대사체 equol정량을 통한 equol producer와 non-producer 폐경기 여성을 식별하는 기준치를 설정

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
3차 년도	2011년	◇ 폐경기 개선식 제품화 공정개발	<ul style="list-style-type: none"> ■ Pilot scale을 통한 시제품 생산 ■ 시제품 안정성 확인 및 유통기한 설정
		◇ 기능성 식품 소재의 개발	<ul style="list-style-type: none"> ■ 생물전환 공정의 스케일업: 200L 규모에 이소플라본 비배당체 및 이소플라본 대사체가 함유된 발효물을 생산할 수 있는 공정을 재현 ■ 회수공정: 발효 후 회수공정 개발 ■ 공인기관 분석: 제품규격화 연구 ■ 생물전환 공정의 스케일업: 200L 규모에서 발효물을 생산할 수 있는 공정을 재현
		◇ 이소플라본 대사체가 포함된 폐경기 개선식의 전임상적 기능성 확인 연구	<ul style="list-style-type: none"> ■ 개선식의 안전성 평가 ■ 골대사에 미치는 효과 ■ 호르몬 대사에 미치는 효과 ■ 항동맥경화에 미치는 효과 ■ 항산화 작용에 미치는 효과 ■ 지질대사에 미치는 효과
		◇ 임상시험의 종료 및 시험결과 분석	<ul style="list-style-type: none"> ■ 시험결과의 처리법 기술 ■ 결과 분석법 및 통계처리

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 국내외 관련기술 현황

가. 배당체 형태의 이소플라본을 비배당체 형태로 전환 기술

대두 또는 대두배아에 존재하는 이소플라본 섭취로 폐경기 증후, 골다공증 개선 효과, 동맥경화 예방, 항암효과 등 다양한 기능적 효과를 기대할 수 있으나 현 대두 또는 대두배아에 주로 존재하는 배당체 형태의 이소플라본은 비배당체 형태보다 생체 내 이용률이 상대적으로 낮다고 보고되었다(10-12). 일반적으로 배당체 형태의 이소플라본 흡수는 장내 균총들을 통한 비배당체로의 전환이 선행되어야 한다. 따라서 대장까지의 이동 및 장내 균총에 의한 비배당체 전환 시 많은 시간이 필요하다(13). 또한 배당체 형태의 이소플라본은 용해도가 비배당체에 비하여 높으나 이소플라본은 nonionic passive diffusion 기작에 의하여 흡수되므로 비배당체 형태가 이러한 흡수 메커니즘에 유리하다고 보고되었다(14).

따라서 비배당체로 생물전환 시 이소플라본의 생리적 기능성을 높일 수 있고 특히 이소플라본이 가장 많이 포함되어 있는 대두 배아는 대두가공 공정에서 대부분 제거, 폐기되고 있어 이를 이용한 연구는 식품 폐기물 처리, 자원 재활용면에서 매우 중요하다고 할 수 있다. 이소플라본 배당체는 β -glycosidase에 의하여 비배당체로 대사 되어지며 이와 관련한 기술로는 효소처리를 통한 비배당체 생산 및 *Bifidobacterium* strain을 이용한 생물전환 기술들이 보고되었다(15-17).

나. 갱년기 증상 개선에 효과를 갖는 식품 제조 기술

대한민국특허등록번호 제100989174호, ‘여성 갱년기 증상 개선에 효과를 갖는 효모 가수분해물 및 이를 포함하는 식품’는 효모 가수 분해물을 포함하는 갱년기 또는 폐경기 장애의 예방 및 개선용 조성물, 및 상기 조성물의 제조방법에 대한 것으로, 혈중 호르몬을 정상화시키고 골조직을 개선시키는 등 골다공증, 우울증 등 폐경, 성호르몬 감소, 난소의 기능 저하로 인한 여러 증상 및 질환에 효과적이라고 기재되어 있다.

대한민국특허등록번호 제1020050052451호, ‘석류 유래 피토에스트로젠을 함유하는 건강기능식품의 제조방법’은 카테킨 1.0~2.0ppm, 다이드제인 20~30ppm, 제니스테인 0.1~0.5ppm, 쿠에르세틴 8.0~14.0ppm, 17 β -에스트라디올 0.05~0.3ppm 및 2,3-디-MeO-에스트라디올 0.01~0.10ppm을 포함하는 석류 추출물을 전 중량 기준으로 0.1~99중량% 포함하는 갱년기 또는 폐경기 여성의 골다공증 또는 안면 홍조 예방 개선용 피토에스트로젠 함유 건강기능식품의 제조방법이 제공되며, 그 제조방법에 의하여 제조되는 건강기능식품은 우수한 에스트로젠성을 나타내면서도 부작용이 없는 안전한 피토에스트로젠을 다량 함유하고 있으므로, 갱년기 또는 폐경기 여성에 있어서의 에스트로젠 결핍으로 인하여 유발될 수 있는 제반 증상을 효과적으로 예방 및 치료할 수가 있을 것으로 기대되고, 특히, 안면홍조, 골다공증, 아테롬성 심장질환에 탁월한 효과를 나타내면서도, 부작용으로서의 체지방 증가 현상이 매우 낮다고 기재되어 있다.

2. 당해 연구 수행기관의 보유기술

가.(주) 정식품

(1) 대두 가공 두유 전문 생산 회사

- ▶ 대두소재를 이용한 가공 식품화에 주력하여, 대두를 이용한 영유아용 특수영양 식품과 각종 대두의 음료화의 개발에 주력하여 20여종의 대두식품을 개발보급 하고 있음
- ▶ 각종 대두 및 유가공 식품 및 기능성 소재의 동물실험을 이용한 영양성 및 기능성평가 연구를 수행하여 실험동물을 이용한 in vivo 기능성 판정 기술을 보유하고 있음

(2) 대두 기능성 소재 관련 정부 지원과제의 수행 및 기술력 축적

- ▶ 기능성 올리고당 생산기술에 관한 국책과제(1994)를 수행하여 대두 올리고당의 분리정제 이용 기술을 확보하였고, 분리정제 기술의 응용력 보유
- ▶ 대두로부터 기능성 peptide 소재개발과 이를 이용한 경장영양식의 개발과제를 수행 (1998) 기능성 peptide의 분리기술과 in vivo, in vitro 상에서의 기능성 판정 및 보건 기능성 peptide를 이용한 제품화 연구 노하우를 축적하고 있음
- ▶ 대두박으로부터 식이섬유 생산 기술 및 제품적용 기술을 충북생물산업연구개발사업 (2005)을 수행하여 확보하고 있음
- ▶ 대두 이소플라본 분리 및 노화억제 소재화·제품화관련 지역개발사업(2005)을 수행하여 대두로부터 생리 기능성 물질 회수 및 기능성 평가 방안에 대한 연구 기술 확보

(3) 특정질환자용 보건식품 시장 개척

- ▶ 국내 최초로 특정질환자용 치료식을 개발하여, 소모성질환자용, 당뇨환자용, 신장질환자용, 경관급식용 제품, 간장질환자용 병원식을 제품화하여 Medical Food 시장 형성 및 수입대체 효과 얻음

(4) 대두가공 관련 특허 보유

- ▶ 대두 가공상의 제반기술인 두유원료의 이취제거방법, 두유의 수율증진방법, 대두가공부산물인 비지의 건조방법 등의 기술과 특허를 보유하고 있음

나. (주) 비피도

(1) 식용 미생물을 이용하여 식품 소재의 생리활성 phytochemical의 생물전환 연구에 선두적인 역할을 수행

- ▶ 유전자 정보에서 특히 일반적으로 천연물에 존재하는 배당체 형태를 분해할 수 있는 효소활성을 이용하여 생물 전환 기반 고 기능성 제품을 개발하는 기반을 보유하고 있음
- ▶ 생물 전환능을 기반으로 새로운 정장 기능성 및 항 아토피 소재를 선별하여 신소재에 적합한 발효균주를 선별하고 소재의 분자구조, 균주의 효소 및 균주의 생리가 체계적으로 조사수행 (연구기관 관련 논문: Biol. Pharm. Bull. 28, 2101-2105, 2005. 등 SCI 논문 7 편등 다수 논문, 특히 10-0671263, 2007 등 4 건)
- ▶ 프로바이오틱스로 사용하는 유용 미생물과 식용으로 안전하게 사용 가능한 미생물자원

을 이용하여 배당체의 전환 연구를 실시하여 전환체의 새로운 생리활성 작용에 대하여 연구하였음

- ▶ 최근에는 식용미생물을 활용하여 활성 진세노사이드가 고 함유된 발효홍삼 제품을 출시하여 시장에 진입
- ▶ 식용 미생물을 이용한 발효식품 개발 및 생물전환기술에 대한 KNOW-HOW를 확보 (관련 논문 100 여 편, 특허 30 건, 학술발표 200 여 건 등 약 400 건)
- ▶ 본 연구진은 프로바이오틱스 미생물과 GRAS식용 미생물을 이용한 생물 전환 기술로 대두 이소플라본, 인삼의 진세노사이드를 활성이 강한 비배당체로 전환하는 관련 특허 기술을 확보

(2) High-throughput 시료 자동 분주 시스템에 반응 조합의 고효율화 및 활성 고속 스크리닝 시스템을 확립하였음

- ▶ 수백 종류의 특용작물 추출물에 대한 수 십 가지의 효소 추출액을 이용한 신속한 스크리닝이 가능

(3) ‘고기능성 비피더스균 생산기반 고효율 분리회수 공정개발’을 기반으로 프로바이오틱스 균주들을 1,010 cfu/ml 이상 배양하고 1,012 cfu/g 의 원말 제품을 생산하는 기술을 확보하고 있음

다. (주) 청맥

(1) 신약 및 건강기능성 식품의 안전성 평가기관 운영

- ▶ 2004년부터 약 5년 동안 LG 생활과학, KT&G 중앙연구원 등 제약회사 그리고 향장회사를 포함하여 약 50여건의 과제를 수행한 경험을 가지고 있음

(2) 천연물 유래 또는 각종 건강기능성 식품에 있어서 다양한 유효성 평가 모델 확립

- ▶ 2004년부터 현재에 이르기까지 국내 우수 제약회사는 물론 연구소, 각 대학교 (의과대학, 약학대학 및 수의과대학)의 천연물유래의 각종 유효성 평가를 수행하여 왔으며, 현재 약 70여 가지의 유효성평가 모델을 확립하고 있음
- ▶ 주요 유효성 평가 수행 과제로는 성기능, 혈당, 간기능, 숙취해소, 콜레스테롤, 지질, 동맥경화, 혈압, 혈행개선, 스트레스, 집중력 및 기억력, 면역, 알레르기 등과 관련한 유효성평가를 수행하여 왔다
- ▶ 본사에는 충북대학교 수의과대학의 독성학교실, 약학대학의 독성약리학교실 그리고 대전대학교 임상병리학과 교수 각기 자문위원으로 모든 실험에 있어서 연구계획서의 평가, 실험과정의 점검 및 결과에 대한 토의 그리고 보고서의 작성에 대하여 검토하고 있다.

(3) 동물시료분석 (일반혈액, 임상화학, 특수화학, 생화학, 조직학 및 면역조직학 등)센터 운영

- ▶ 동물시료의 분석은 인체유래의 시험물질과는 달리 동물의 각종에 따른 특수성에 따라서 분석 시 각기 다른 주의사항이 요구되고 있다. 지난 5년여 가까이 혈액학적, 임상

화학적 그리고 조직학적 등 여러 가지 다양한 분석을 수행하여 왔으며, 현재에도 KT&G 중앙연구원 등 여러 연구소와 대학의 동물시료를 분석하고 있음은 물론 그 결과에 대한 해석을 통하여 연구결과에 크게 기여하고 있다.

(4) 천연물 유래 기능성 인증에 대한 특허출원 중 (2008년도 4건)

- ▶ 야콘과 신선초에 대하여 각각 혈행개선, 항동맥경화와 생성균주 배양제 MBL생성균주를 검출하기 위한 DPA에 기초한 배지 등에 대하여 각기 4건의 특허를 출원하였으며, 현재 이를 상품화하기 위한 여러 가지 방안을 연구하고 있다. 그리고 현재는 중소기업청 지원 천연물로부터 분리한 β -sitosterol에 대한 양모효능에 대한 연구를 진행하고 있다. 또한 배지제조시설의 환경에 대하여 생산환경혁신기술과제를 신청 중에 있으며 연구용배지에 대한 시제품개발에 박차를 가하고 있다.

(5) 이노비즈 및 ISO 기술인증 획득

- ▶ 2007년 8월 16일에는 연구개발 전담부서를 인정받았으며, 2008년 4월 22일에 미생물 배양배지개발로 ISO9001, 14001을 인증 받았고 2008년 12월 31일에는 INOBIZ 기술혁신형 중소기업 등급: A를 받았다. 본사는 급변하는 기술과 여러 환경 변화에 대하여 적극적으로 대응하기 위하여 다각도로 많은 노력을 기울이고 있다.

라. 건양대학교병원

- (1) 건양대 병원은 28개 진료과와 813개의 병상을 갖춘 대학병원으로 최신 첨단 영상의학 장비와 임상병리 자동화 시스템, 처방전산화 등 최상의 진료설비와 우수한 의료진을 갖추고 있음
- (2) 본 과제 수행을 위하여 위탁연구기관은 기초의학교실의 연구진과 연구 장비를 이용하여 이소플라본 대사체 및 equol에 대한 생화학적 및 생물학적 분석을 수행할 수 있는 연구능력을 보유하고 있음
- (3) 위탁연구기관은 임상시험 실시병원으로 100병상 규모의 임상시험센터를 개설, 운영하고 있으며, 임상시험심사위원회(IRB)가 활발한 활동을 하고 있다. 특히 2009년 1월 식품의약품안전청으로부터 생물학적 동등성 시험기관으로 지정된 바 있음
- (4) 위탁연구기관의 진단검사의학과는 기존의 진단검사의학과에서 부분적으로 이루어졌던 자동분석시스템을 검체 채혈에서 결과보고까지 전 과정을 자동화한 Total laboratory automation 시스템을 갖추고 있으며, 대한임상검사정도관리협회에 등록되어 정기적인 정도관리진단을 받고 있음은 물론 검사실신임인증위원회의 심사를 거쳐 각 검사 분야에 대하여 우수검사실로 인증받고 있음

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 대두 배아를 이용한 이소플라본 비배당체 생산 조건 최적화

1. 비배당체 전환율 우수 균주 선별

대두 부산물을 이용하여 배지최적화에 적용하기 위하여 우선 비배당체 전환활성이 높은 균주를 선별하였다. 대두 부산물인 배아를 이용 Table 1-1과 같이 소이펩톤 및 소이단백질과 배합하여 배지를 제조 후 Test 균주를 접종, 배양하였다. 배양된 배양물 내 이소플라본 비배당체 형태의 Daidzein, Glycitein, Genistein의 함량을 측정하였다. 결과는 Fig. 1-1과 같았으며 Test한 균주 중 *Bifidobacterium latic*s BL 740의 비배당체 전환 활성이 가장 높았다. 따라서 *Bifidobacterium latic*s BL 740을 실험대상균주로 선정 대두부산물을 이용한 배지 최적화를 수행하였다.

Table 1-1. 비배당체 전환 Test 배지 배합

성분	함량(g)
배아(Soy hypocotyl)	100
소이펩톤(Soy peptone)	1
소이단백질(Soy protein)	10
H ₂ O	889
Total	1000

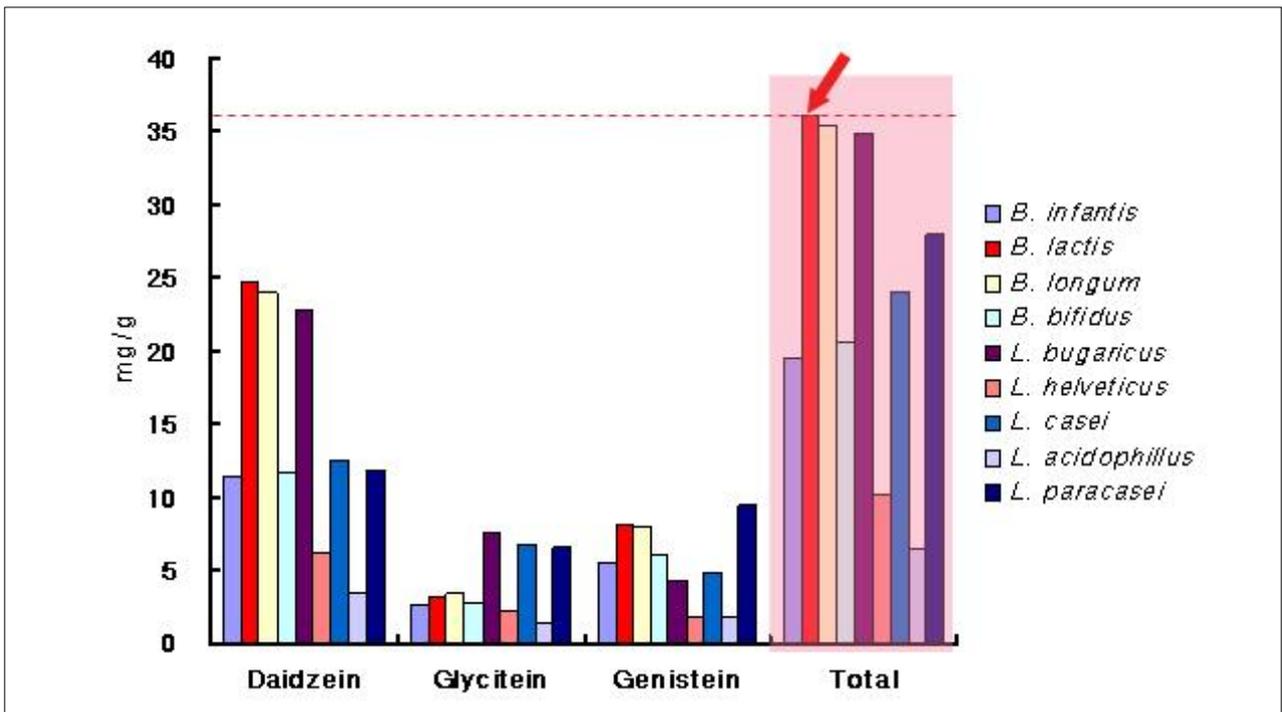


Fig. 1-1. 균주별 이소플라본 비배당체 함량.

2. 배아를 이용한 배지 최적화

가. 배아 함량에 따른 이소플라본 비배당체 전환

대두 배아 투입 함량을 결정하기 위하여 Table 1-2와 같이 각 배지를 제조하여 이소플라본의 비배당체 전환 정도를 확인 하였다. 이소플라본 비배당체인 Daidzein, Glycitein, Genistein 각각의 시간에 따른 변화량은 Fig. 1-2와 같았다. 결과 그래프에서 확인할 수 있듯이 이소플라본의 전환율이 가장 높았던 경우는 배아 50 g을 사용하였을 때였으며 이는 Daidzien, Glycitein, Genistein 3종 모두 동일하였다. 배아를 100 g 이상 이용하면 오히려 건조중량당 비배당체 함량이 감소하는 것을 확인 할 수 있었다.

Table 1-2. 배아 함량별 배지 조성

내 용	case1 (g)	case2 (g)	case3 (g)	case4 (g)	case5 (g)
배아(Soy hypocotyl)	0	25	50	100	150
소이펩톤(Soy peptone)	1	1	1	1	1
소이단백질(Soy protein)	10	10	10	10	10
H ₂ O	989	964	939	889	789
Total	1000	1000	1000	1000	1000

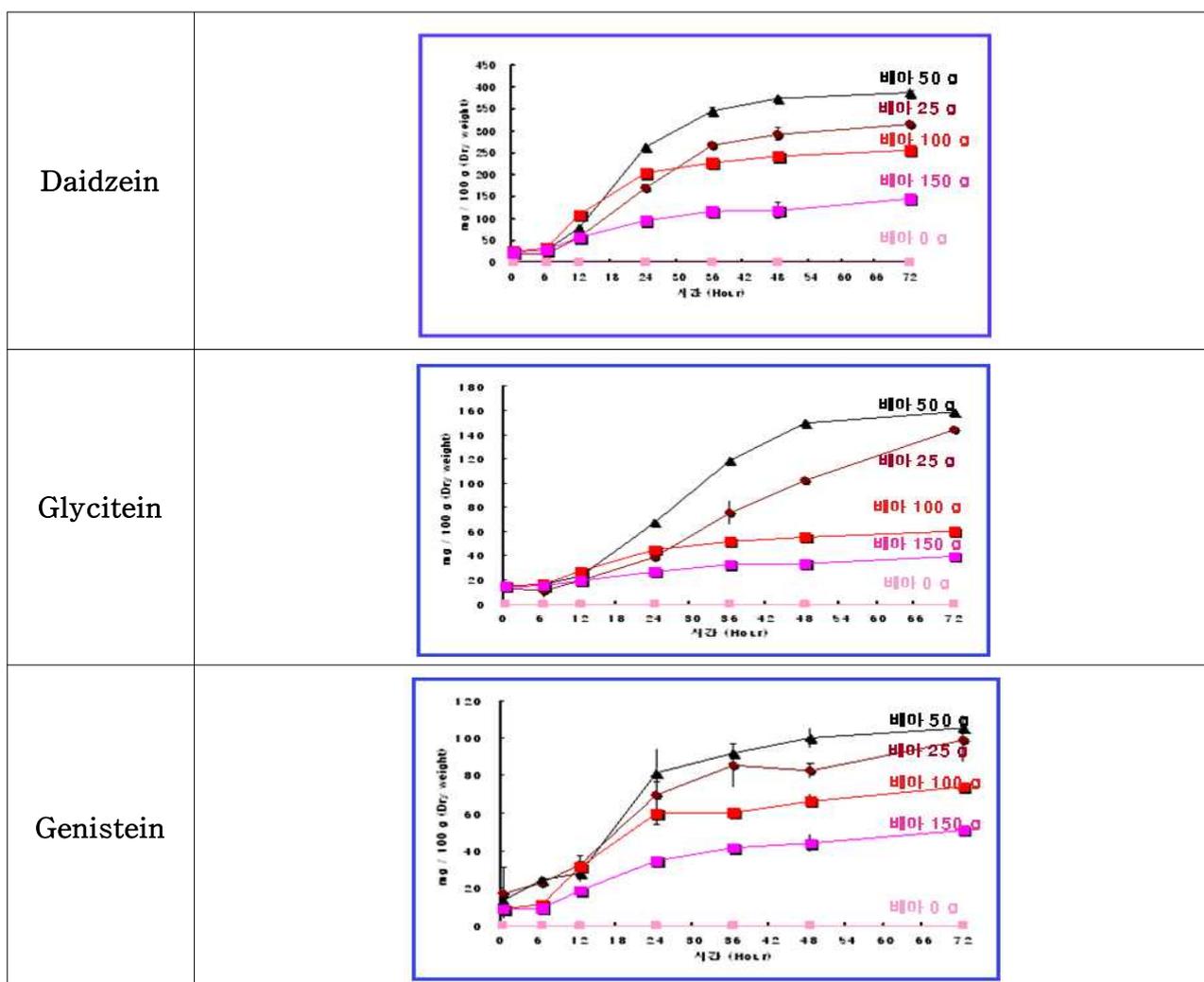


Fig. 1-2. 배아 함량별 시간에 따른 이소플라본 비배당체 생산변화.

나. 소이단백질 함량(Soy protein)에 따른 이소플라본 비배당체 전환

Table 1-3와 같이 각 배지를 제조하여 소이단백질 함량에 따른 이소플라본의 비배당체 전환 정도를 확인 하였다. 이소플라본 비배당체인 Daidzein, Glycitein, Genistein 각각의 시간에 따른 변화량은 Fig. 1-3과 같았다. 결과는 소이단백질의 포함은 건조중량당 이소플라본 비배당체 생산량을 감소시키는 것으로 확인되었으며 이는 3가지 비배당체 모두에게서 동일하게 나타났다(Fig. 1-3).

Table 1-3. 소이단백질 함량별 배지조성

내 용	case1 (g)	case2 (g)	case3 (g)	case4 (g)	case5 (g)
배아(Soy hypocotyl)	100	100	100	100	100
소이펩톤(Soy peptone)	1	1	1	1	1
소이단백질(Soy protein)	0	5	10	15	20
H ₂ O	899	894	889	884	879
Total	1000	1000	1000	1000	1000

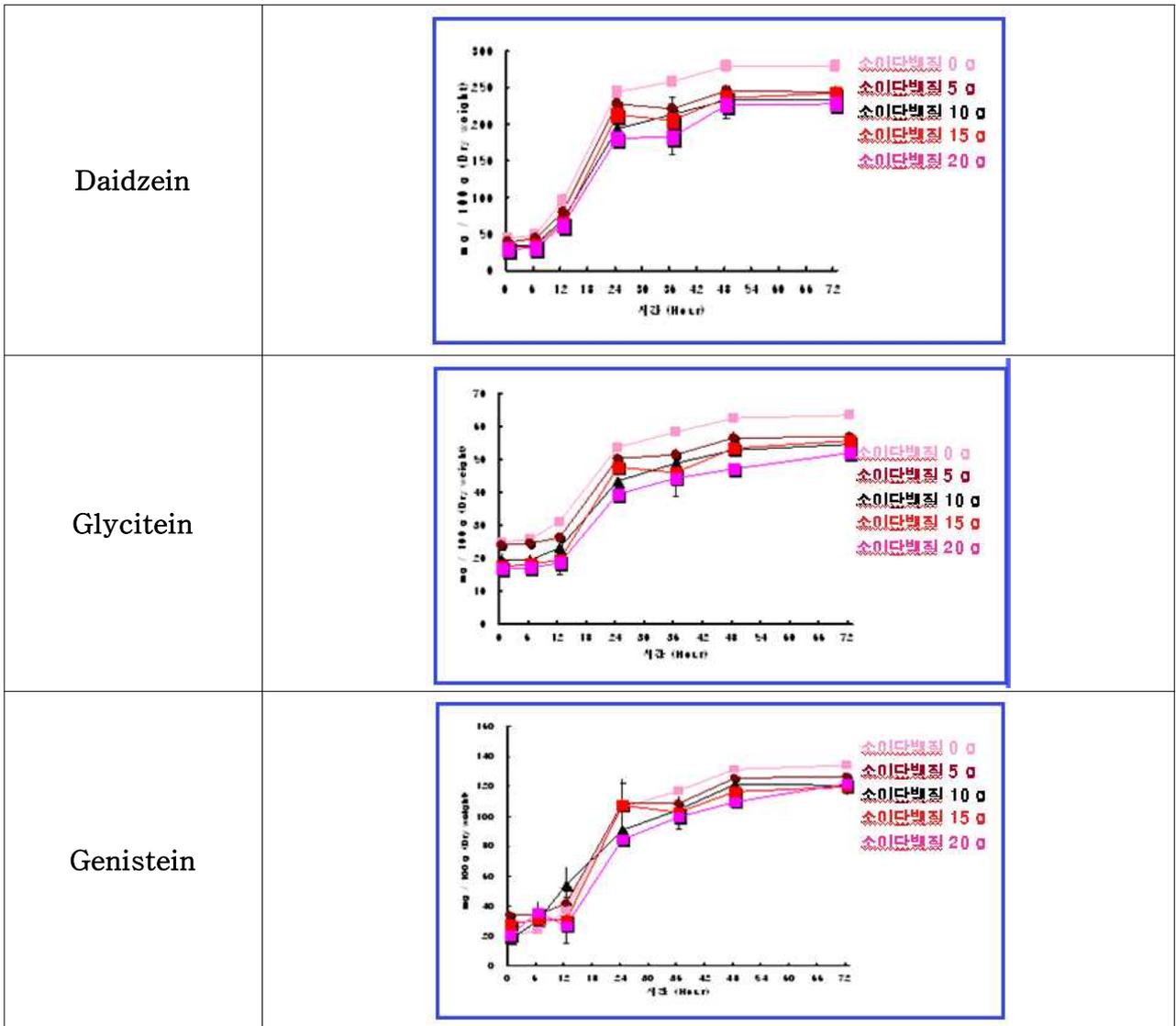


Fig. 1-3. 소이단백질 함량별 시간에 따른 이소플라본 비배당체 생산변화.

다. 소이펩톤 함량(Soy peptone)에 따른 이소플라본 비배당체 전환

Table 1-4와 같이 각 배지를 제조하였으며 소이단백질 함량에 따른 이소플라본의 비배당체 전환 정도를 확인 하였다. 결과는 소이단백질의 경우와 유사하게 소이펩톤의 함량을 증가 시킬수록 건조 중량당 이소플라본 생산량이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. Glyciteiin과 Genistein의 경우 소이펩톤 4 g시 보다 2 g 사용하였을 시 비배당체 함량이 적은 것을 확인 할 수 있었으나 그 차이는 크지 않았다.(Fig. 1-4)

Table 1-4. 소이펩톤 함량별 배지조성

내 용	case1 (g)	case2 (g)	case3 (g)	case4 (g)	case5 (g)
배아(Soy hypocotyl)	100	100	100	100	100
소이펩톤(Soy peptone)	0	0.5	1.0	2.0	4.0
소이단백질(Soy protein)	10	10	10	10	10
H ₂ O	890	885.5	889	888	876
Total	1000	1000	1000	1000	1000

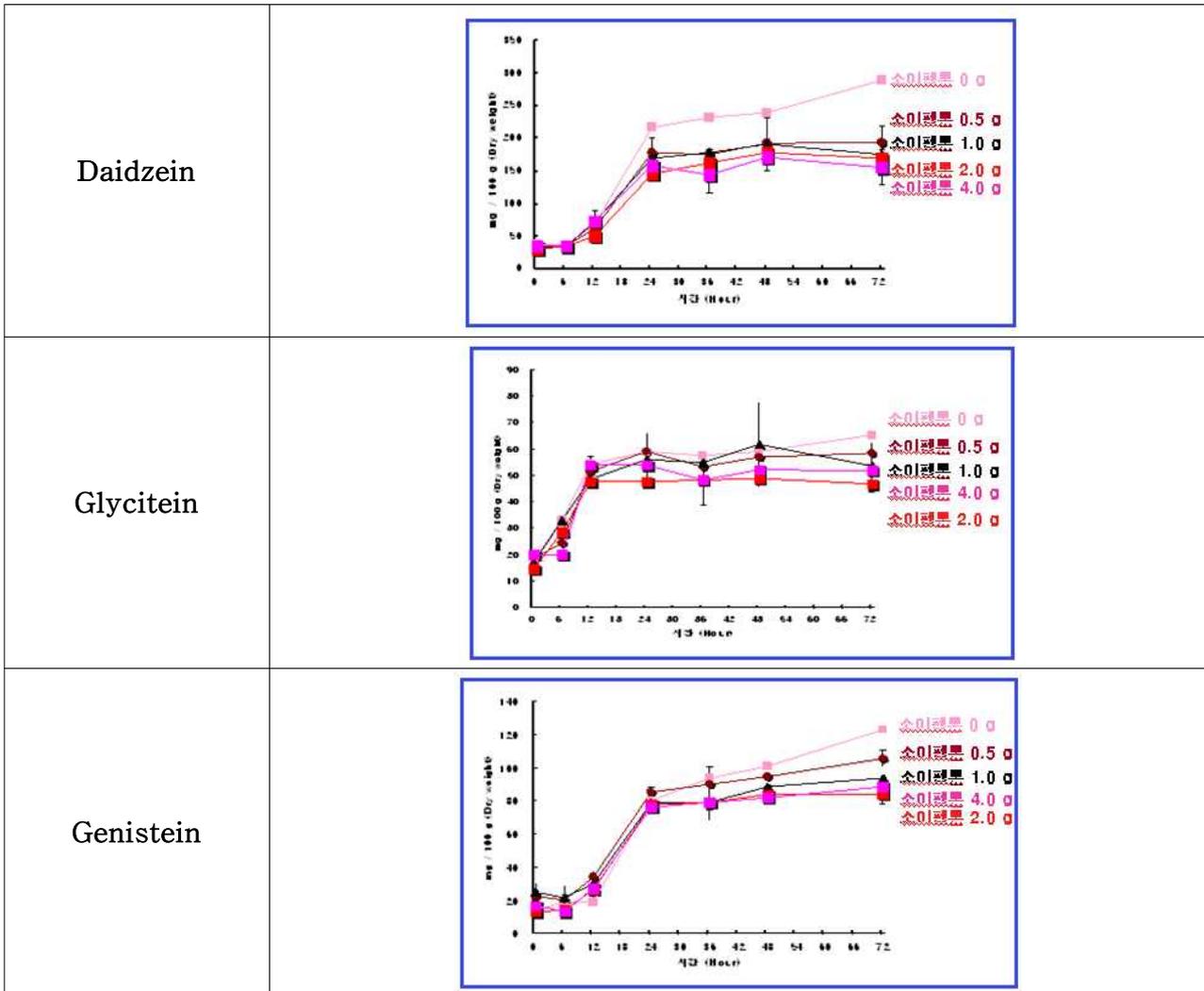


Fig. 1-4. 소이펩톤 함량별 시간에 따른 이소플라본 비배당체 생산변화.

라. Glucose 함량에 따른 이소플라본 비배당체 전환

탄소원에 따른 이소플라본 비배당체 영향력 정도를 확인하기 위하여 Table 1-5와 같이 각 배지를 제조한 후 이소플라본 비배당체 함량을 확인하였다. Fig. 1-5에서 확인된 것처럼 Glucose의 첨가는 *Bifidobacterium lactics* BL 740의 비배당체 전환률의 감소를 가져왔으며 전반적으로 Glucose 함량이 높을 수록 비배당체 함량이 줄어드는 것을 확인하였다.

Table 1-5. Glucose 함량별 배지조성

내 용	case1 (g)	case2 (g)	case3 (g)	case4 (g)	case5 (g)
배아(Soy hypocotyl)	100	100	100	100	100
소이펩톤(Soy peptone)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
소이단백질(Soy protein)	10	10	10	10	10
Glucose	0	2.5	5	7.5	10
H2O	890	885.5	889	888	886
Total	1000	1000	1000	1000	1000

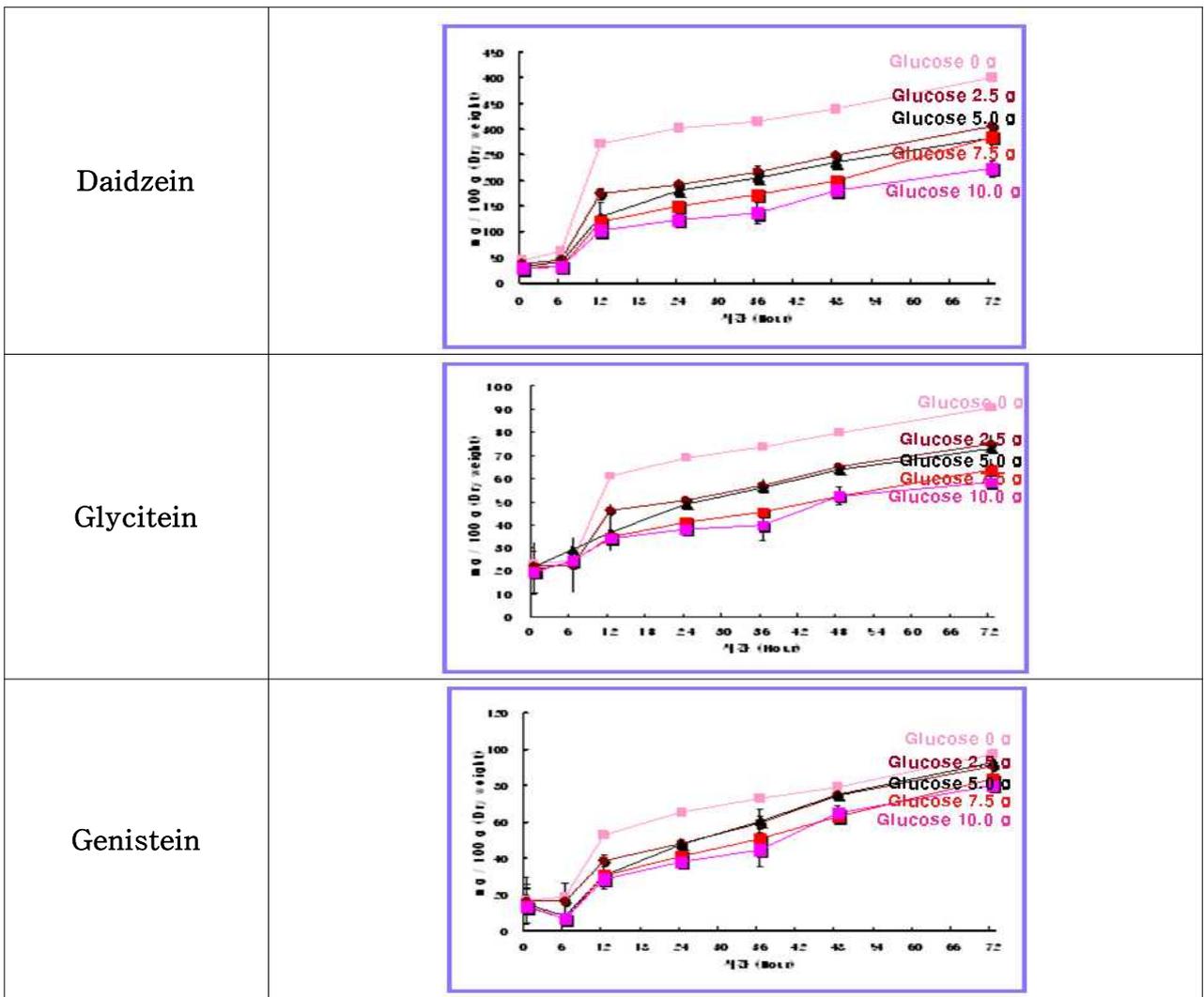


Fig. 1-5. Glucose 함량별 시간에 따른 이소플라본 비배당체 생산변화.

마. Cellobiose 함량에 따른 이소플라본 비배당체 전환

Cellobiose가 포함된 배지를 Table 1-6.과 같이 제조하여 이소플라본 비배당체 함량을 확인하였다. Glucose와 마찬가지로 Cellobiose 역시 배지 내 함량이 높을수록 비배당체 전환을 저해하였으며 이는 Daidzein, Glycitein, Genistein 모두에서 같은 패턴으로 나타났다.(Fig. 1-6)

Table 1-6. Cellobiose 함량별 배지조성

내 용	case1 (g)	case2 (g)	case3 (g)	case4 (g)	case5 (g)
배아(Soy hypocotyl)	100	100	100	100	100
소이펩톤(Soy peptone)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
소이단백질(Soy protein)	10	10	10	10	10
Cellobiose	0	2.5	5	7.5	10
H ₂ O	890	885.5	889	888	886
Total	1000	1000	1000	1000	1000

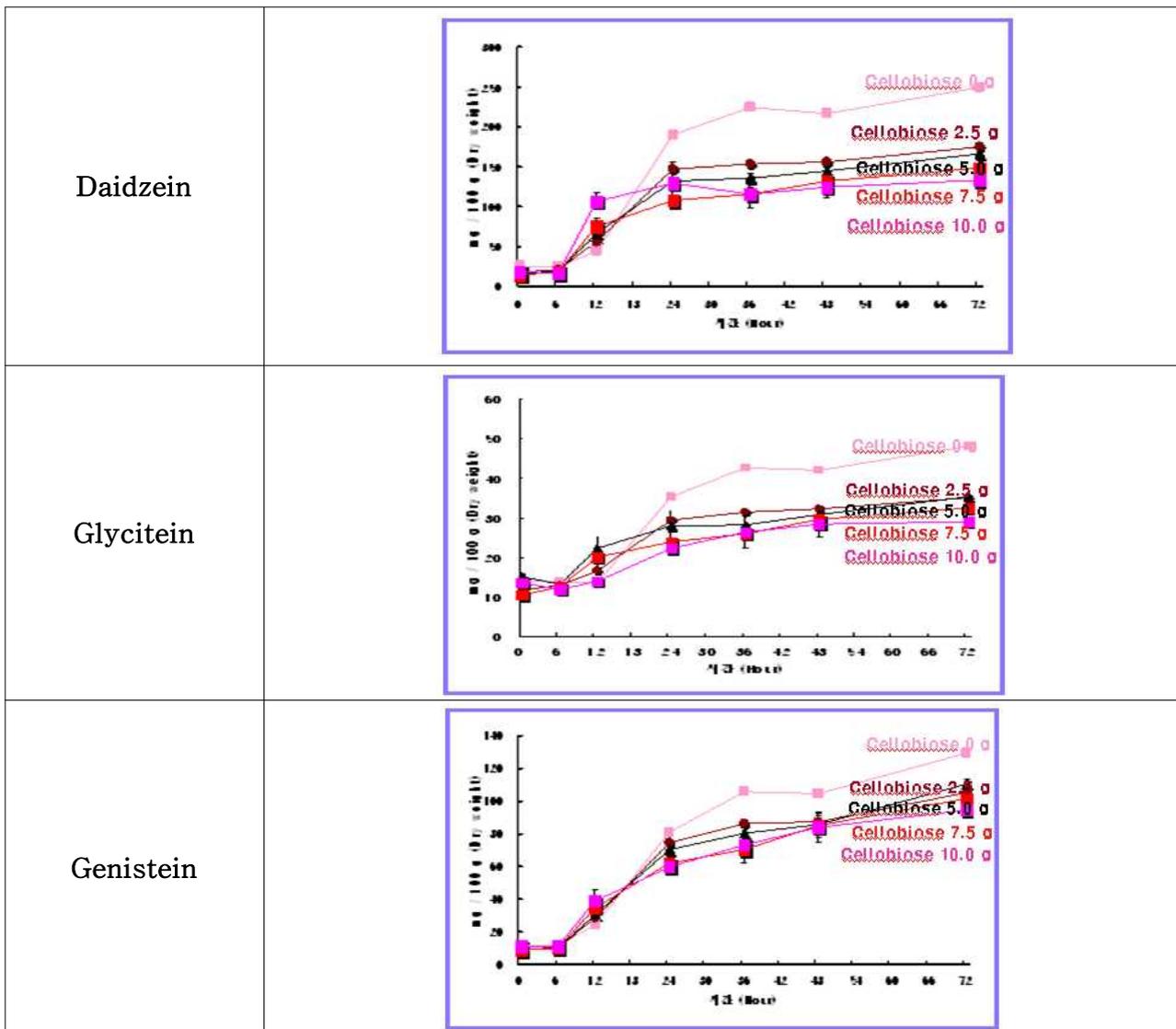


Fig. 1-6. Cellobiose 함량별 시간에 따른 이소플라본 비배당체 생산변화.

바. Fructooligosaccharide 함량에 따른 이소플라본 비배당체 전환

Fructooligosaccharide 경우 Table 1-7.과 같이 제조하여 이소플라본 비배당체 함량을 확인하였으며 2.5 g이용 시 Daidzein과 Glycitein의 경우 이소플라본 비배당체 함량이 가장 높았으나 0 g의 경우와 큰 차이는 발생하지 않았다.(Fig. 1-7)

Table 1-7. Fructooligosaccharide 함량별 배지조성

내 용	case1 (g)	case2 (g)	case3 (g)	case4 (g)	case5 (g)
배아(Soy hypocotyl)	100	100	100	100	100
소이펩톤(Soy peptone)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
소이단백질(Soy protein)	10	10	10	10	10
Fructooligosaccharide	0	2.5	5	7.5	10
H ₂ O	890	885.5	889	888	886
Total	1000	1000	1000	1000	1000

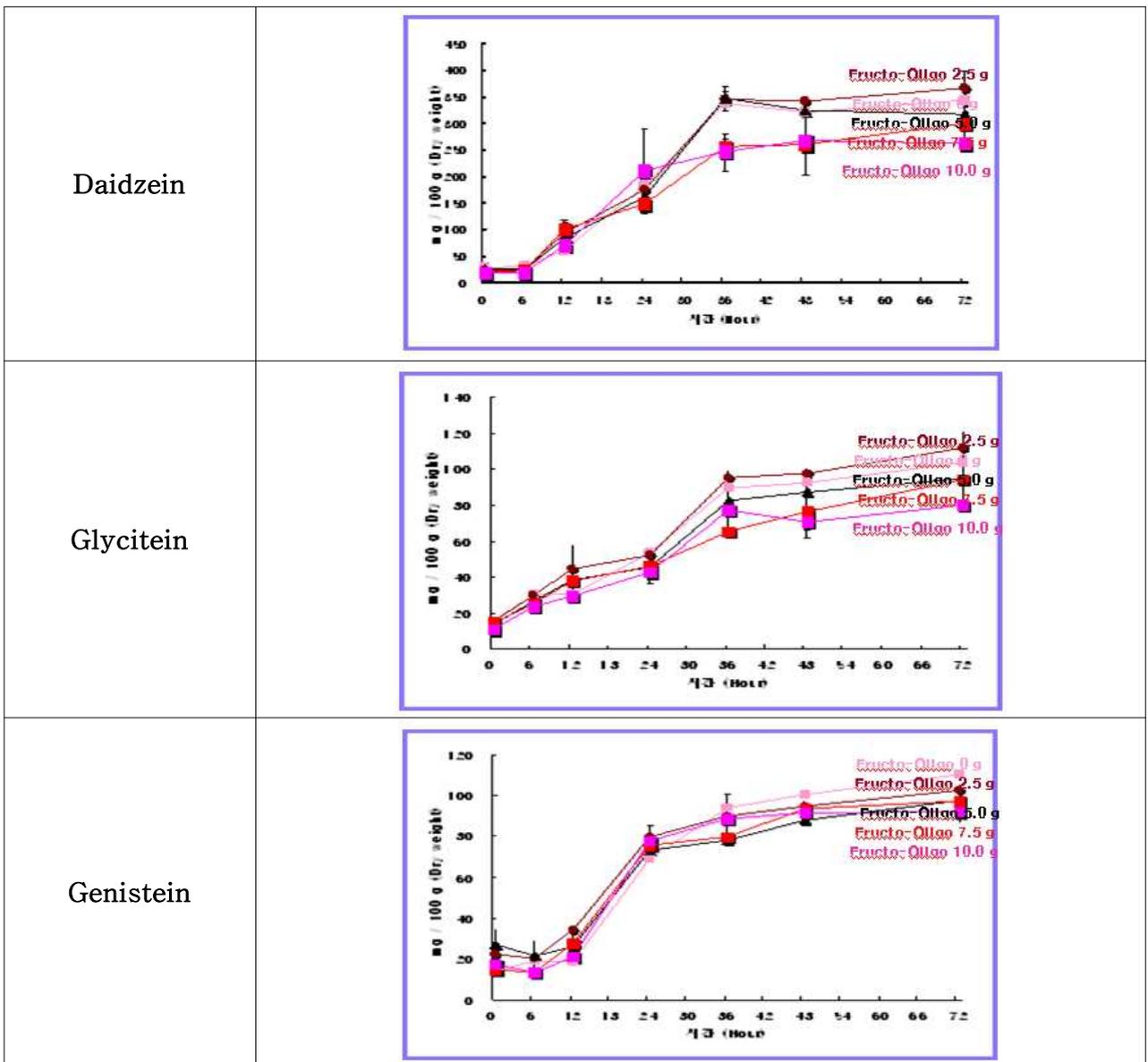


Fig. 1-7. Fructooligosaccharide 함량별 시간에 따른 이소플라본 비배당체 생산변화.

사. pH에 따른 이소플라본 비배당체 전환

Table 1-8과 같이 pH를 4-8까지 조절하여 pH에 따른 비배당체 전환률을 확인하였다. Daidzein의 경우 pH가 감소함에 따라 비배당체 생성량이 증가하는 것을 확인 할 수 있었으나 Glycitein과 Genistein의 경우는 특별한 관계성을 확인 할 수 없었다.(Fig. 1-8)

Table 1-8. pH별 배지조성

내 용	case1 (g)	case1 (g)	case3 (g)	case4 (g)	case5 (g)
배아(Soy hypocotyl)	100	100	100	100	100
소이펩톤(Soy peptone)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
소이단백질(Soy protein)	10	10	10	10	10
Fructooligosaccharide	5	5	5	5	5
H2O	889	889	889	889	889
Total	1000	1000	1000	1000	1000
pH	4	5	6	7	8

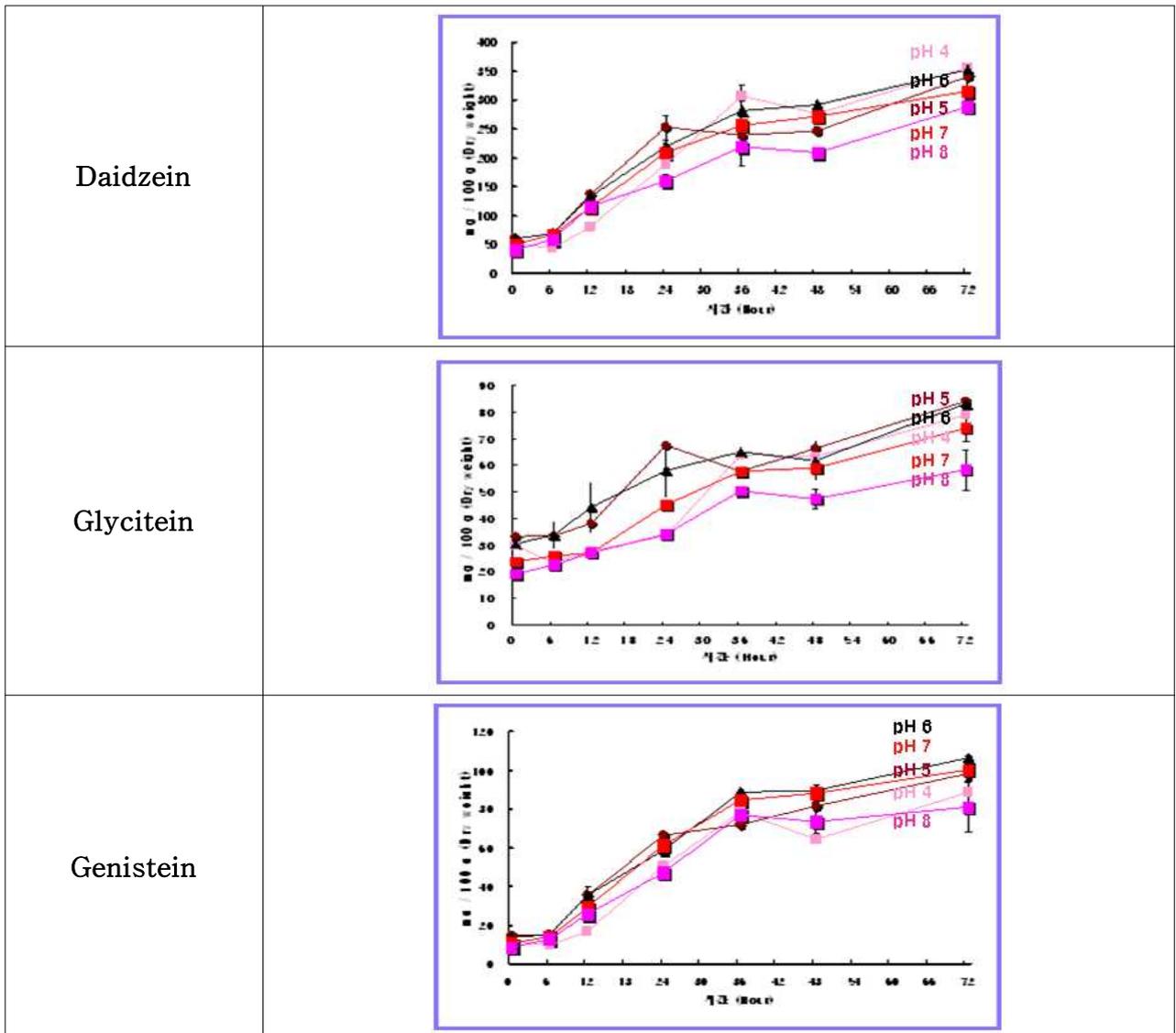


Fig. 1-8. pH별 시간에 따른 이소플라본 비배당체 생산변화.

3. 통계적 방법을 이용한 대두부산물 배지화

대두 부산물을 이용한 배아의 배지화를 보다 구체적이고 합리적 접근을 위하여 통계적 방법을 이용하여 최적화를 실시하였다. 사용한 통계방법은 Fractional Factorial Design(FFD)와 Central Composite Design(CCD)를 이용하였다. 각 성분들이 비배당체화에

통계적으로 유의성 있게 영향력을 미치는지를 FFD를 통해 관찰하였으며 FFD를 통해 관찰된 영향력있는 인자들을 대상으로 최적 투입량을 결정하기 위한 CCD를 실시하였다.

가. FFD를 이용한 통계분석

배아를 이용한 최적의 발효환경 조건 구축을 위하여 실시한 FFD 통계 디자인은 Table 1-9.과 같았으며 실제 투입량은 Table 1- 10.와 같았다. p-level이 0.1 이하 값을 영향력 인자로 간주하였으며 배아 및 glucose만이 유의적 영향력을 보였다.(Table 1- 11.)

Table 1-9. FFD 실험디자인

Ru n	Glucose	Cellobiose	Fructo oligosacchari de	Soy protein	Soy peptone	Soy hypocotyl
1	1	-1	1	-1	1	-1
2	-1	-1	1	1	-1	-1
3	1	-1	-1	-1	1	1
4	-1	1	-1	-1	1	-1
5	1	1	-1	1	1	-1
6	0	0	0	0	0	0
7	1	1	1	1	-1	1
8	-1	-1	-1	1	-1	1
9	-1	1	1	-1	-1	1

Table 1-10. 각 조성성분의 실제 투입량

Case	Compound	Real Value(g/L)		
		-1	0	1
Soy isoflavone aglycone	Glucose	1	3	5
	Cellobiose	1	3	5
	Fructooligosaccharide	1	3	5
	Soy protein	5	10	15
	Soy peptone	5	10	15
	Soy hypocotyl	30	50	7

Table 1-11. FFD 결과

Case	Variables	Effect	Coef.	t-value	p-level ¹⁾
------	-----------	--------	-------	---------	-----------------------

Soy isoflavone aglycone	Constant	-	321.61	31.96	-
	Glucose	-154.46	-77.23	-7.44	*** ₁₎
	Cellobiose	-17.75	-8.88	-0.86	-
	Fructo oligosaccharide	-49.14	-21.57	-2.08	-
	Soy protein	-9.71	-4.86	-0.47	-
	Soy peptone	41.80	20.90	2.01	-
	Soy hypocotyl	104.81	52.40	5.05	* ₁₎

¹⁾ p-levels of coefficients are given as ***95%, **95%, *90% by t-test

나. CCD를 이용한 통계분석

최적의 이소플라본 비배당체화 조건 구축을 위하여 대두배아, 소이단백질, 소이펩톤을 대상으로 CCD를 실시하였다. CCD 디자인 및 각각의 이소플라본 비배당체 함량은 Table 1-12와 같았으며 이소플라본 배당체 생산결과를 분석한 결과 반응을 가장 잘 설명하는 반응모형식은 아래와 같았다.

Table 1-12. CCD 실험디자인 및 이소플라본 비배당체 결과

Run	Coded levels			Aglycone (mg/100 g)
	x1	x2	x3	
1	-1	1	-1	4030
2	1	-1	-1	3984
3	-1	-1	1	6836
4	0	0	0	4573
5	0	0	0	4820
6	0	0	0	4603
7	-1	-1	-1	5542
8	0	0	0	4421
9	1	1	-1	3660
10	0	0	1.68179	4313
11	1	1	1	3616
12	0	1.68179	0	3740
13	1.68179	0	0	4536
14	0	0	0	5654
15	-1.68179	0	0	6044
16	1	-1	1	4509
17	-1	1	1	4730
18	0	0	0	5286
19	0	0	-1.68179	3413
20	0	-1.68179	0	6046

이소플라본 비배당체(Yaglycone) 반응모형식 : R²=0.86***

$$\text{Yaglycone} = 4894.64 - 973.49X_1^{***} - 1073.00X_2^{***} + 491.18X_3^{***} + 363.84X_{12}^* - 33.16X_{22}^{***} - 1063.16X_{32}^{***} + 848.88X_{1X_2} - 534.83X_{1X_3} + 200.25X_{2X_3}$$

모형식의 confident level은 다음과 같았다.

***p-level < 0.01, **p-level < 0.05, *p-level < 0.1, p-level > 0.1

X₁: soy protein, X₂ : soy peptone, X₃: soy hypocotyl

배아(X₃)의 경우 반응 모형식 일차항에서 491.18(비배당체 p<0.01)로 가장 영향력있는 배지 조성물로 확인되었다. 이는 대두 배아의 적절한 사용이 매우 중요하다는 것을 말해준다. soy protein(x₁)과 soy peptone(x₂)경우도 이소플라본 비배당체 모형식의 일차식(p<0.01), 이차식(p<0.1) 모두에서 유의적 값을 확인하였다.

반응표면분석을 통한 반응계수를 이용 두 개의 독립변수간의 상관관계 확인을 하기위하여 반응표면곡선 그래프 plot을 실시하였으며(Fig. 1-9) 이소플라본 비배당체 생산의 경우 최적의 배지조성은 soy protein 2.06 g/L, soy peptone 1.25 g/L, 대두 배아 60.02 g/L로 확인되었다.

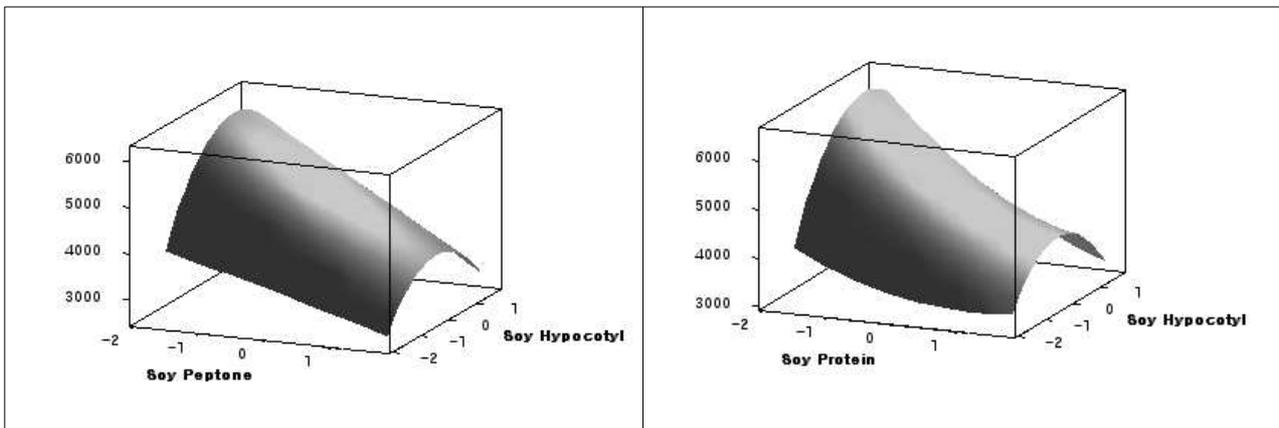


Fig. 1-9. 반응표면분석 Plot.

4. 이소플라본 대사체 생산 발효 환경 구축

임상시험용 식이를 제조하기 위하여 배아 발효물을 대량으로 생산하고자 하였다. 1차년도에 이소플라본 대사체 생산 발효 환경 구축을 위한 lab scale의 연구 결과, 이소플라본 대사체 생산 발효 조건 중 soy peptone과 soy protein의 첨가는 큰 영향을 미치지 않았기 때문에 원가 절감을 위해 pilot scale에서는 제외하였다. 또한 배아 발효물의 대량 생산을 위하여 배아를 60 g 이상 첨가하고자 하였고 80 g을 초과하여 첨가하였을 경우 배아의 팽윤 현상에 의해 발효가 불가능하였기 때문에 물 1 L 당 배아 80 g을 첨가하여 이소플라본 대사체 생산을 진행하였다.

최종적으로 물 200 L에 배아 16 kg을 첨가하고 *Bifidobacterium lactis* BL740 배양액 2 L를 첨가하여 37°C에서 48시간 동안 교반하면서 발효를 진행하였고 완료된 발효액은 48시간 동안 동결건조를 하여 배아 발효물을 얻을 수 있었다. 발효에 따른 배당체에서 비배당체로의 전환율은 Table 1-13과 같았다.

Table 1-13. 대두 배아의 발효에 따른 배당체에서 비배당체로의 전환율

기질	전환물질	전환율(%)	평균(%)
대두 배아	daidzin → daidzein	22	32
	glycitin → glycitein	20	
	genistin → genistein	53	

제 2 절 이소플라본 대사체가 함유된 폐경기 개선식 개발

1. 배합비 확립 및 제품 개발

가. 기능성 인정 함량 검토

폐경기 개선식의 이소플라본에 적절한 함량을 결정하기 위하여 폐경 후 여성들을 대상으로 한 폐경 증상 관련 임상연구들을 Table 2-1와 같이 조사하여 요약하였다. 조사된 논문의 건수는 모두 39건 이었으며 그 중 6건 만이 폐경 후 증상 개선에 대한 효과가 없는 것으로 나타났으며 안전성에는 모두 문제가 없는 것으로 나타났다.

현재 일본 식품안전위원회에서는 대두 이소플라본의 일일섭취 권장량을 비배당체로 70-75 mg정도로 설정하고 있으며 이에 따른 특정보건용식품으로서의 섭취량을 비배당체로 30 mg/day로 제한하고 있다(18).

조사된 논문들의 임상연구 대상자들의 일일 평균 이소플라본 섭취량은 비배당체로써 약 70 mg 정도이었으며 안면홍조 등의 폐경기 증상 개선에 효과를 보인 최소 이소플라본 섭취량은 비배당체로써 40 mg 정도이었다. 따라서 본 과제 of 임상시험 대상자들에게 역시 일일 평균 비배당체로써 약 40 mg 이상의 이소플라본을 제공하는 것이 폐경기 증상 개선에 도움이 될 것으로 판단하였다.

2002년도에 국내 폐경 후 여성들을 대상으로 일일 평균 이소플라본 섭취량을 조사한 결과 약 30 mg으로 나타났다(19). 이 연구결과와 피험자들의 안전성과 일일섭취 권장량 등을 고려하여 본 과제에서 개발 될 폐경기 개선식 한 캔 당 비배당체로 30 mg 이상의 이소플라본 이 함유되도록 제조하여 일일 평균 60 mg 이상의 이소플라본을 섭취하게 함으로써 폐경기 증상 개선에 도움을 주고자 하였다.

Table 2-1. 폐경기 증상 관련 임상연구 결과 요약

순번	대상	기간	피험자 수	섭취량	결과	요약	참고 문헌
1	40~65세 7일동안 최소 5회 이상의 안면홍조, 6개월 동안 월경 없는 여성	12주	180명	80 mg/day (genistein으로 60 mg에 해당)	대조군(29.3%) 보다 실험군(41.2%)의 안면홍조 증상이 감소함	+	20
2	62~89세 정상 남녀 노인	6개월	34명	100 mg/day (glycoside weight)	실험군의 공간지각, 언어구사, 반응속도 능력 등이 대조군보다 월등하며 안전함	+	21
3	평균 55.1세 매일 안면홍조 증세 5회 이상 발생하는 폐경 여성	10개월	80명	100 mg/day (aglycone으로 섭취)	폐경 후 여성의 혈관운동성 장애 치료제로서 안전하고 효과적임	+	22

순번	대상	기간	피험자 수	섭취량	결과	요약	참고 문헌
4	폐경여성	6개월	79명	120 mg/day (glycoside, aglycone 섭취)	폐경 증상 감소, Estrogen과 유사한 효과	+	23
5	폐경여성	6개월	79명	120 mg/day (glycoside, aglycone 섭취)	질과 자궁내막 상피의 증식 없음. E2와 FSH 효과 없음	+	23
6	폐경여성	12주	51명	60 mg/day	E2와 FSH의효과 없음 가슴과 자궁내막의 증식 marker와 hormone 수용체 발현 없음 자궁내막 두께의 증가 없음 유방 X-선촬영에서 증식 없음 갑상선 기능의 영향 없음	+	24
7	폐경여성	1년	247명	54 mg/day (genistein)	자궁내막 두께와 질 세포분열의 Genistein효과 없음	+	25
8	폐경여성	10개월	80명	100 mg/day (glycoside, aglycone 섭취)	Lipid profiles, vaginal cytology Mammography, endometrial thickness, FSH, LH, E2의 변하지 않거나 Placebo와 다른 점 없음	+	26
9	폐경여성	8주	60명	101 mg/day (aglycone 섭취)	Hormonal safety parameter 이상 없으며 안면홍조는 감소함	+	27
10	폐경여성	12주	192명	60 mg/day (aglycone으로 섭취)	Vaginal cytology, E2, FSH, LH, Thyroid parameters 등 안전 변수의 아무런 변화 없음	+	28
11	폐경여성	12주	186명	60 mg/day (aglycone으로 섭취)	Vaginal cytology, E2, FSH, LH, Thyroid parameters 등 안전 변수의 아무런 변화 없음	+	28
12	폐경여성	12주	143명	40 or 60 mg/day	Placebo와 비교하여 안면홍조는 감소하였고 endogenous sex hormones 나 thyroid hormones 은 차이 없음	+	29
13	폐경여성	3년	138명	54mg/day (genistein tablet)	플라시보 군과 차이는 없음 3년간의 섭취가 유방의 안전성과 관련된 parameter에는 어떠한 영향도 없었음(안전함)	+	30
14	폐경여성	1년	202명	99 mg/day (glycoside으로 섭취)	유방암 측정에서 유방밀도를 완화하였음	+	31
15	폐경여성	12주	84명	160 mg/day (glycoside weight)	호르몬 parameter(LH, FSH, SHBG)에 어떠한 영향도 없었음	+	32
16	폐경여성	2년	406명	80 mg/day 120 mg/day (glycoside으로 섭취)	유방암 측정에서 유방밀도를 완화하지는 못했다.(호르몬 치료법과 같은 효과는 없었음)	△	33
17	초기 폐경 여성	생리 주기	34명	37.2 mg/day vs 128.8 mg/day (glycoside으로 섭취)	유방암 세포에 어떤 변화도 발생시키지 않음 C3(Estrogen에 의해 조절되는 protein)의 항 estrogenic 효과를 보임 40mg의 복용군에서는 암 증진 유전자 발현의 억제	+	34
18	폐경여성	10개월	80명	100mg/day (aglycone으로 섭취)	안면홍조가 감소하며 Endometrial thickness, mammography, vaginal cytology, lipids와 hormonal Profile 변화가 없어 안전함	+	35

순번	대상	기간	피험자 수	섭취량	결과	요약	참고 문헌
19	Denmark, Germany, UK 폐경여성	8주	89명	50mg/day (aglycone으로 섭취)	tHcy(plasma total homocysteine) or ADMA (asymmetric dimethylarginine) 변화 없이 안전함	+	36
20	폐경여성	3개월	80명	60mg/day (aglycone으로 섭취)	KI significantly ($p < 0.05$)	+	37
21	폐경여성	3개월	18명	160mg/day (aglycone으로 섭취)	폐경여성의 피하 지방과 복부지방이 증가를 억제함	+	38
22	폐경여성	24주	136명	75mg/day (aglycone으로 섭취)	이소플라본과 운동의 조합은 혈중 지질농도와 체중을 효과적으로 감소함	+	39
23	폐경여성	12주	216명	160mg/day (glycoside, aglycone섭취)	Total cholesterol (P = 0.01) LDL-cholesterol (P = 0.02) LDL-particle number (P = 0.002) 개선	+	40
24	폐경여성	24개월	389명	54mg/day (genistein)	fasting glucose, insulin 감소 Endometrial Thickness 변화없음	+	41
25	폐경여성	6개월	24명	70mg/day (aglycone으로 섭취)	appendicular (P=0.034) leg (P=0.016) FFM (Fat-Free Mass) MMI (muscle mass index) (P=0.037) 유의적 차이발생	+	42
26	폐경여성	12개월	300명	110mg/day (aglycone으로 섭취)	Not prevent postmenopausal bone loss Not affect bone turnover	-	43
27	폐경여성	6개월	142명	72mg/day	Kupperman Menopause Index (KI) significantly higher (p=0.0265) Triglyceride(TG) significant(p=0.0151)decrease	+	44
28	폐경여성	6개월	142명	60mg/day	폐경기 여성의 심리적 평가에서 Isoflavones은 positive effects	+	45
29	폐경여성	12주	29명	100mg/day (aglycone으로 섭취)	platelet thromboxane A2 receptor density 감소 폐경여성에 있어서 beneficial effects	+	46
30	폐경여성	12주	32명	132mg/day (aglycone으로 섭취)	이소플라본 만으로는 심혈관 보호나 혈당조절에 관여하지 않음	△	47
31	Generally Healthy Chinese Postmenopausal women	6개월	200명	80mg/day (aglycone으로 섭취)	standard neuropsychological tests와 overall quality of life 에서 개선사항 없음	-	48
32	Chinese Postmenopausal women	12개월	203명	40 or 80mg/day (aglycone으로 섭취)	FG(fasting glucose) 효과 serum lipids는 no significant effect	△	49
33	폐경여성	12주	26명	40mg/day (aglycone으로 섭취)	실험동안 부정적인 증상은 없었으며 중년여성의 피부나이를 개선함	+	50
34	폐경여성	6주	25명	55-65mg/day (aglycone으로 섭취)	Raloxifene보다 안전한 endothelial function로 사용가능	+	51
35	폐경여성	12주	191명	40 or 60mg/day (aglycone으로 섭취)	폐경여성의 안면홍조에 있어서 호르몬 대체제로 사용이 가능한 효과가 있음	+	52

순번	대상	기간	피험자 수	섭취량	결과	요약	참고 문헌
36	폐경여성	16주	99명	42mg/day (aglycone으로 섭취)	아마씨나이소플라본 모두 폐경후 삶의 질 이나 안면홍조 영향 준다	+	53
37	폐경여성	12개월	203명	50mg/day (aglycone으로 섭취)	몸 조절인자에 영향을 주지 않지만 lipid profile 에는 많은 영향을 준다	△	54
38	폐경여성	6개월	90명	84 or 126mg/day (aglycone으로 섭취)	이소플라본 함량이 높아질수록 bone loss 가 약화됨	+	55
39	중국 폐경여성	24개월	100명	78mg/day (aglycone으로 섭취)	자궁내막에 대한 이상증상을 발견할수 없고 bone loss에 대한 효과가 있음	+	56

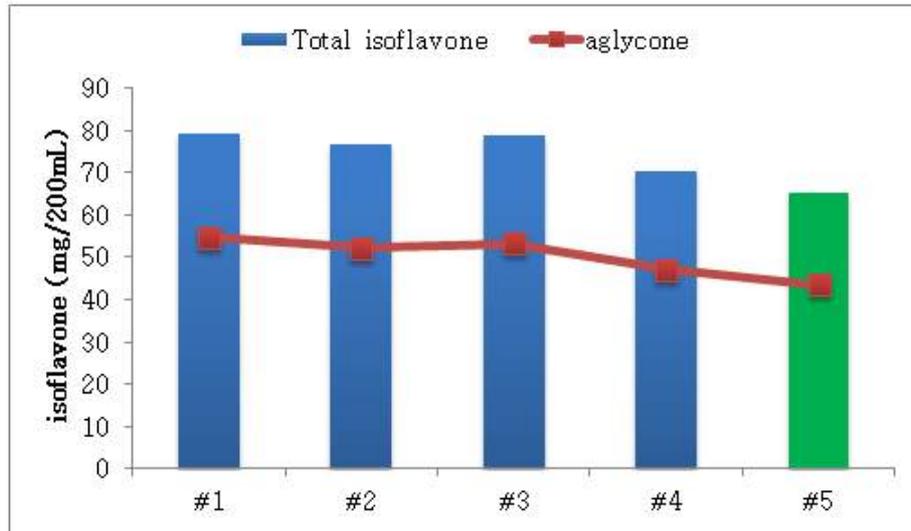
2. 폐경기 개선식 중 배아 발효물 배합비 결정

배아 발효물의 첨가량을 결정하기 위하여 Table 2-2와 같이 대두 유액과 배아 발효물의 혼합 비율을 달리하여 제품의 안정성과 이소플라본 함량을 살펴보았다. 혼합 비율에 따른 이소플라본 함량은 비배당체와 배당체 형태의 이소플라본을 모두 합한 총 이소플라본 함량과 식품공전에 고시된 비배당체 환산계수를 적용하여(57) 배당체 형태를 비배당체 형태로 환산한 비배당체 형태로서의 이소플라본 함량으로 나타내었으며 그 결과는 Fig. 2-1과 같았다.

시료 1-3까지의 비배당체 형태로서 이소플라본 함량은 50mg/200mL 이상으로 나타났으며 시료 4와 5는 60mg/200mL(비배당체로 40mg) 수준의 이소플라본 함량을 나타내었다. 위에서 설정하였던 한 캔당 비배당체로 30 mg 이상의 이소플라본 함량 목표값에 적합하고 제품의 안정성을 고려하여 가장 안정하였던 시료 5의 혼합 비율(대두유액 75.4%, 배아발효물 0.7%)을 폐경기 개선식의 배합비로 선정하였다.

Table 2-2. 대두 유액 및 배아 발효물의 조성비에 따른 제품 안정성

시료	대두유액 (%)	배아발효물(%)	제품안정성
#1	55.25	1.5	불안정
#2	60.43	1.3	불안정
#3	65.61	1.1	불안정
#4	70.22	0.9	불안정
#5	75.40	0.7	안정



샘플	대두유액 (%)	배아발효물(%)	제품안정성
#1	55.25	1.5	불안정
#2	60.43	1.3	불안정
#3	65.61	1.1	불안정
#4	70.22	0.9	불안정
#5	75.40	0.7	안정

Fig. 2-1. 대두 유액 및 배아 발효물 조성비에 따른 이소플라본 함량

3. 폐경기 개선식의 기본 배합비 개발

폐경기 개선식 제품이 가져야 할 기본적인 영양성분 기준을 설정하기 위하여 2010 한국인 영양섭취 기준(58)을 근거로 하여 영양성분 함량의 기준치를 Table 2-3과 같이 설정하였다. 단백질:지방:탄수화물의 열량 구성비는 12:20:68(% calories)로 설정하였고 제품 열량 밀도는 국내 및 해외 영양 균형식 제품들을 기준으로 하여 제품 1 mL 당 1 kcal의 열량을 갖도록 하였다.

폐경기 개선식 제품 5 캔(1,000 kcal) 당 30 g의 단백질을 공급함으로써 30~49세 여성의 권장량의 65%를 충족하도록 설정하였다. 지방은 제품 5 캔(1,000 kcal) 당 22 g을 공급하도록 설정하였으며 다가불포화지방산과 단일불포화지방산 그리고 포화지방산의 비율이 3:1:1의 비율을 갖도록 설정하였다.

비타민과 무기질의 경우에는 제품 5 캔(1,000 kcal) 당 한국인 1일 섭취 권장량의 100%를 공급할 수 있도록 설정하였다.

Table 2-3. 폐경기 개선식 기본 배합비 개발 근거

영양성분	기준 함량
단백질:지방:탄수화물 의 열량구성비	12:20:68 (% calories) : KDRIs 에너지 적정 비율(AMDR)에 의거한 비율 설정
제품 열량밀도	1 kcal/ml 기준 (국내 및 해외 영양 균형식 제품 기준에 의거)
단백질 함량	1,000 kcal 당 30g 단백질 공급 (30~49세 여성 권장량의 65% 충족)
지방 함량	1,000 kcal 당 22g 지방 공급 (P : M : S Ratio = 3 : 1 : 1)
단백질 급원	카제인 나트륨, 대두 유액 : 소화 흡수에 용이한 정제된 원료
지방 급원	대두유액, 대두유 (P : M : S Ratio = 3 : 1 : 1) 불포화 지방산 풍부

탄수화물	덱스트린, 대두 유액 : 소화 흡수에 용이한 정제된 원료, 대두유액으로 부드러운 관능
비타민, 무기질	제품 1,000 kcal 섭취 시 한국인 1일 권장량의 100% 함유를 공급 기준으로 삼음

4. 배합비 개발 실험

위에서 결정된 배합비 개발 근거를 바탕으로 우수한 품질과 관능을 가진 제품을 개발하기 위하여 당도 조정 실험, 조향 실험, 제품 안정성 실험 등의 기본적인 배합비 개발 실험을 진행하였다. 이 때 제품 제조는 lab scale로 진행 되었으며 그 공정은 Fig. 2-2와 같았다.



Fig. 2-2. 폐경기 개선식의 lab scale 제조 공정

가. 당도 조정 실험

단맛을 첨가시켜 맛의 만족도를 향상시키기 위해 당도 조정 실험을 진행하였다. 정백당의 함량을 2.0%에서 4.0%까지 달리하여 첨가하였을 경우의 맛의 만족도는 Fig. 2-3과 같았다. 정백당 함량이 높을수록 만족도가 다소 높아지는 경향을 나타내었다. 하지만 3.5% 이상 첨가 할 경우 고당 함유 제품으로 비만 등을 야기할 수 있으므로 만족도 면에서 큰 차이가 없으며 적절한 당 함량을 유지할 수 있는 3.0%가 가장 적절할 것으로 판단하였다.

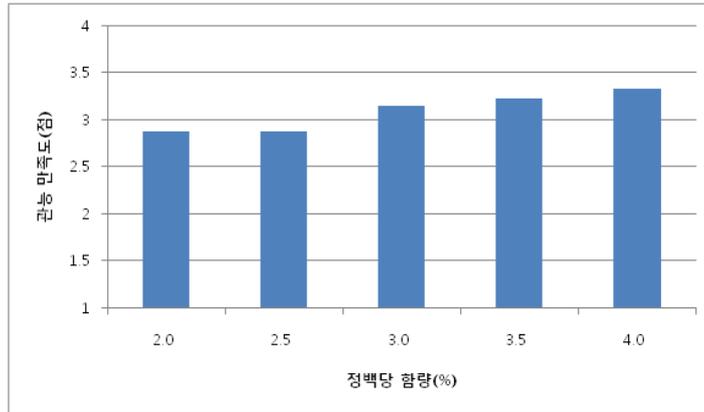


Fig. 2-3. 폐경기 개선식의 당도 조정 실험

나. 조향 실험

배아 발효물의 발효취를 제거하기 위하여 조향 실험을 진행하였다. 실험에 사용된 향 종류는 고구마향, 미숫가루향, 인절미향, 커피향, 호두향으로 총 5가지 이었다. 이에 대한 관능 만족도를 순위법을 통하여 조사한 결과는 Fig. 2-4와 같이 인절미향의 점수가 가장 높게 나타났다. 따라서 본 과제의 폐경기 개선식 제품에는 인절미향을 적용하고자 하였다.

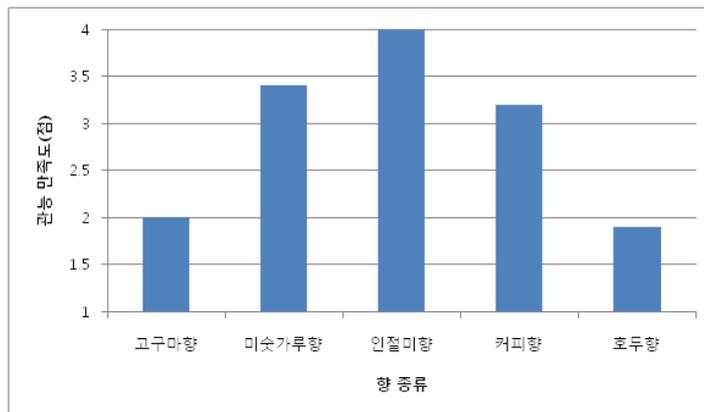


Fig. 2-4. 폐경기 개선식의 조향 실험

다. 안정성 실험

배아 발효물이 첨가된 제품을 한 달 동안 정치하였을 경우 약간의 침전 현상이 발생하는 문제점을 보완하기 위하여 젤란검을 첨가하여 안정성 향상 실험을 진행하였다. 젤란검을 0%에서 0.03%까지 달리하여 첨가하였을 경우 안정성 및 제품의 점도는 Table 2-4와 같았다. 0.01% 이상의 젤란검을 첨가한 모든 시료에서 한 달 동안 제품의 안정한 것을 확인 할 수 있었고 0.03%를 첨가한 시료를 제외한 나머지 시료의 점도는 10~20 cps 로 음용하기에 적당한 것으로 나타났다. 따라서 원가 절감 등을 고려하여 제품이 안정한 상태를 유지할 수 있는 최소량인 0.01%를 선정하였다.

Table 2-4. 폐경기 개선식의 안정성 실험

젤란검 함량	0 %	0.01%	0.02%	0.03%
--------	-----	-------	-------	-------

정치 결과	침전 현상 발생	안정	안정	안정
제품 점도	10~15cps	10~15cps	15~20cps	30~35cps

라. 감미료 변경 실험

본 제품은 폐경기 전·후 여성들을 위한 영양 보충식으로 개발되었다. 따라서 주 소비층은 50대 이상의 여성들이다. 보건복지부에서 실시한 국민건강영양조사(2010) 결과에 의하면 50대 이상 여성의 평균 16.1% 정도가 당뇨를 앓고 있는 것으로 나타났다(59). 따라서 기존에 사용되었던 정백당 대신 결정과당을 사용함으로써 폐경기 여성들의 당 관리에도 도움을 줄 수 있는 제품을 개발하고자 하였다. 결정과당은 정백당 보다 감미도가 높고 인슐린 저항성과 감수성을 낮추어 혈당 관리에 유익한 것으로 알려져 있다(60).

정백당 3.0%를 첨가한 시료를 대조군으로 하여 결정과당 1.25%와 2.0%를 첨가한 시료를 제조하여 5점 척도법으로 달콤한 맛, 고소한 맛, 담백한 맛, 깔끔한 맛, 향에 대한 평가를 실시하였으며, 관능검사 결과는 SPSS를 이용하여 통계 분석하였으며 처리구 평균간의 유의성 검정은 Tukey의 방법을 사용하였다.

관능검사 결과는 Table 2-5와 같이 달콤한 맛을 제외한 모든 평가 항목에서 시료간에 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 달콤한 맛 같은 경우 결정과당 1.25%를 함유한 시료가 정백당 3.0%와 결정과당 2.0% 첨가한 시료에 비하여 유의적으로 낮은 점수를 나타내었다. 또한 정백당 3.0%와 결정과당 2.0%를 첨가한 시료 간에는 유의적인 차이를 보이지 않았다 ($p < 0.05$).

Table 2-5. 감미료 종류 및 농도에 따른 관능 평가 결과

항목	정백당 3.0%	결정과당 1.25%	결정과당 2.0%
달콤한 맛	3.2±0.7 ^b	2.5±0.6 ^a	3.2±0.5 ^b
고소한 맛	3.0±0.6 ^a	2.9±0.7 ^a	2.9±0.7 ^a
담백한 맛	2.7±0.4 ^a	2.9±0.8 ^a	2.7±0.6 ^a
깔끔한 맛	2.6±0.7 ^a	2.3±0.6 ^a	2.6±0.7 ^a
향	2.6±0.7 ^a	2.6±0.7 ^a	2.6±0.6 ^a

1) Data were expressed as mean±SD

2) ^{ab}Means within a row not followed by the same letter are significantly different ($p < 0.05$)

5. 원료 및 제품의 품질관리 규격 설정

폐경기 개선식 제품화 되었을 경우 원료 및 제품에 대한 품질관리 규격을 확립해야 한다. 원료의 경우 입고시 첨부되는 일반성분 및 미생물에 대한 시험 성적서를 확인하고 정상일 경우 보관하도록 하였다. 자체적으로 제조 한 배아 발효물의 경우에는 일반성분 분석을 공인 시험기관에 의뢰하여 시험 성적서를 발급받아 보관하도록 하였다. 배아 발효물의 일반성분 분석 결과는 Table 2-6와 같았으며 이를 기준으로 차년도 제품 시생산시에 배아 발효물의 기준으로 삼고자 하였다.

제품의 경우에는 pH, 비중, 제품 정치 실험 등을 자체적으로 진행하여 그에 대한 규격을 설정하고 제품의 일정한 품질을 유지할 수 있도록 하였다. 일반성분 및 미생물은 공인 시험기관에 분석을 의뢰하여 시험 성적서를 발급받아 보관하도록 하였다. 설정된 제품의 품질 규격은 Table 2-7과 같이 비중과 pH가 각각 1.086 ± 0.005 , 6.80 ± 0.2 이었으며 미생물은 대장균군, 일반세균, 고온균에 대하여 음성으로 관리하도록 하였다.

Table 2-6. 배아발효물의 일반 성분

성분명	탄수화물	지방	단백질	수분	회분
함량(g/100g)	48.8	1.9	41.2	3.8	4.3

Table 2-7. 폐경기 개선식 제품에 대한 자체 설정 규격

규격	비중	pH	미생물
설정값	1.086 ± 0.005	6.80 ± 0.2	모두 음성

6. 소비자 선호도 조사

건양대학교 병원에서 임상시험을 통해 본 제품을 꾸준히 음용하고 있는 피험자들을 대상으로 제품에 대한 관능, 구매의사, 선호도 등에 대한 조사를 진행하였다. 본 조사는 본약군과 위약군 각각 28명, 27명으로 총 55명을 대상으로 진행되었다.

나. 제품 구매 의사

본 제품의 컨셉인 폐경기 여성을 위한 영양 보충용 음료 제품이 출시 될 경우 구매 의사가 있는지 여부에 대하여 설문하였다. 그 결과 Fig. 2-5 와 같이 구매하겠다는 의사가 있는 것으로 응답한 인원은 69.1%로 절반 이상을 차지하였으며 이 중에서 반드시 구매하겠다는 강한 의지를 보인 응답자는 21.8% 정도이었다. 본 제품의 컨셉이 폐경기 여성들에게 긍정적인 수용도를 나타내는 것으로 판단되었으며 본 제품의 시장 진출 가능성이 있을 것으로 사료되었다.

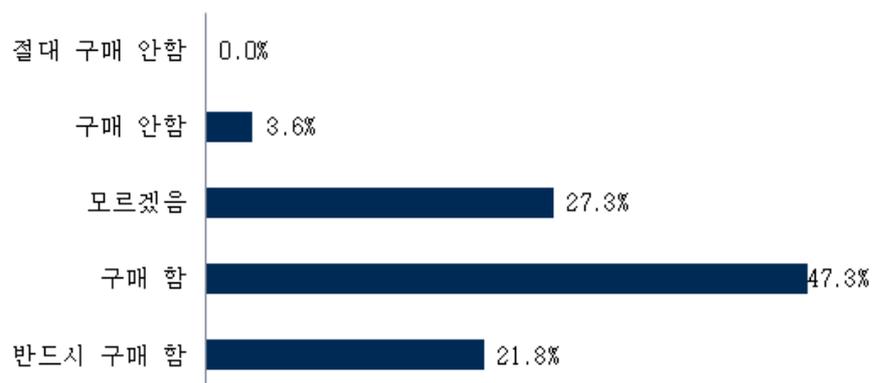


Fig. 2-5. 폐경기 개선식 음료 제품에 대한 구입 의사 조사 결과.

다. 제품의 효과에 대한 기대

본 제품을 매일 음용하고 있는 임상시험 피험자들을 대상으로 폐경기 여성의 건강에 도움을 준다는 효과에 대한 기대치와 신뢰도에 대하여 설문하였다. 그 결과 Fig. 2-6 와 같이 57.1% 정도가 효과가 있을 것이라는 긍정적인 응답을 하였고 보통 수준이 25% 정도로 대두 이소플라본이 첨가된 음료에 대한 폐경기 여성들의 기대치가 높은 것으로 확인되었다.

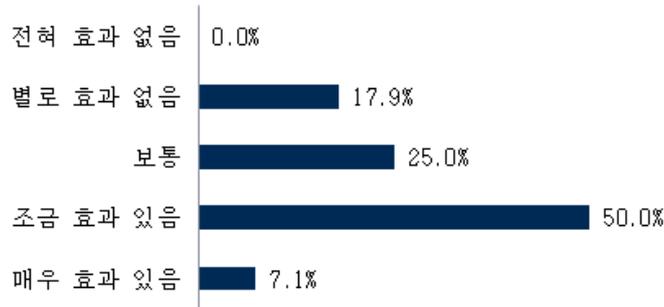


Fig. 2-6. 제품 효과에 대한 기대 정도 설문 결과.

나. 본 제품을 통해 개선을 희망하는 폐경기 증상

본 제품을 통해 폐경기 증상을 앓고 있거나 걱정하는 여성들을 대상으로 개선되기를 희망하는 증상에 대하여 설문한 결과 Fig. 2-7와 같이 안면홍조가 26%, 골다공증이 17% 정도의 응답율로 가장 높은 개선 희망 증상으로 나타났으며, 피부건조, 불면증, 비만 등이 뒤를 이었다. 대두 이소플라본은 현재 건강기능식품의 기능성 원료로써 뼈 건강에 도움을 줄 수 있다는 기능성을 인정받은 상태이고 안면홍조 등에 대두 이소플라본이 효과가 있다는 연구 결과도 많이 발표되고 있는 실정이다.

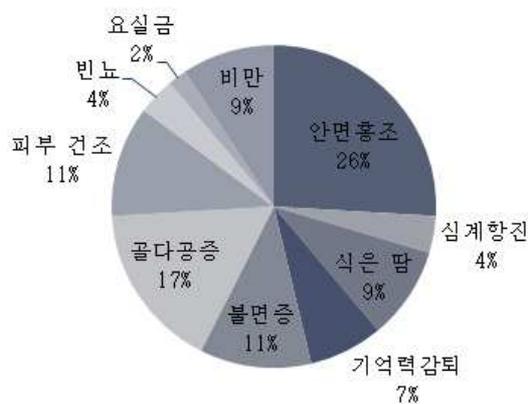


Fig. 2-7. 폐경기 개선식 제품을 통해 개선을 희망하는 증상 설문 결과.

다. 선호하는 제품 형태

폐경기 여성들의 건강을 위한 제품의 형태로 가장 선호하는 것이 무엇인지 설문한 결과

Fig. 2-8와 같이 캡슐 형태가 61.8%로 가장 높은 선호도를 보였으며 그 다음으로 음료 형태가 32.7%로 뒤를 이었다. 캡슐 형태는 물과 함께 간단히 섭취할 수 있고 휴대가 편리하다는 장점이 있기 때문에 가장 높은 선호도를 얻은 것으로 판단된다. 음료 형태는 캡슐에 비해 휴대는 불편하지만 균형잡힌 영양보충식으로 한 끼 식사 대용식으로도 이용이 가능하다는 장점이 있기 때문에 두 번째로 높은 선호도를 보인 것으로 사료된다. 이밖에 빙과류나 제과류는 비만의 원인이 되는 제품으로 인식되어 있기 때문에 선호도가 높게 나타나지 않은 것으로 판단된다.

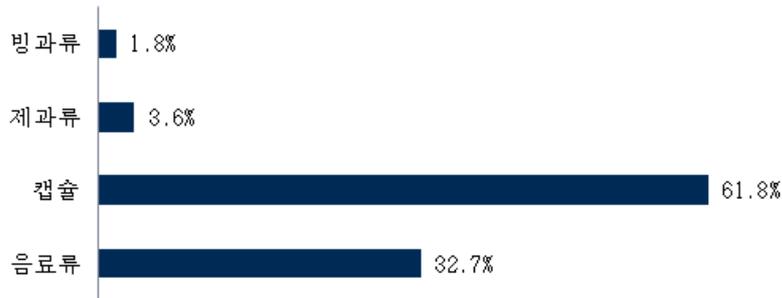


Fig. 2-9. 폐경기 증상 개선 제품으로 선호하는 제품 유형 조사 결과

7. 저장안정성 평가

임상시험용 식이로 제조된 제품을 25℃와 35℃에 각각 보관하면서 이소플라본 함량, pH, 비중, 관능 만족도에 대한 변화 정도를 0,3,6,9,10,11,12개월째에 측정하였으며 이 결과를 토대로 제품의 저장안정성을 평가하였다.

이소플라본 함량의 경우 기준 함량치인 비배당체로서 30mg/200mL 보다 높은 값을 유지하는 것으로 확인 되었으며, 저장 기간 동안에도 큰 변화를 보이지 않았다(Fig. 2-10).

pH와 비중의 경우도 저장기간 동안 품질 규격 수준을 벗어나지 않아 품질의 안정성을 확인할 수 있었다(Fig. 2-11, 12).

관능 만족도 역시 Table 2-8과 같이 저장기간 동안 유의적인 변화를 보이지 않아 12개월 동안 본 제품의 저장안정성은 적합한 것으로 판단되었다. 현재 국내에서 유통되고 있는 환자용 균형영양식 캔 제품의 유통기한은 제조일로부터 12개월로 설정되어 있다. 따라서 폐경기 여성들을 위한 균형 영양식인 본 제품 역시 유통기한을 제조일로부터 12개월로 설정하여도 적합할 것으로 사료된다.

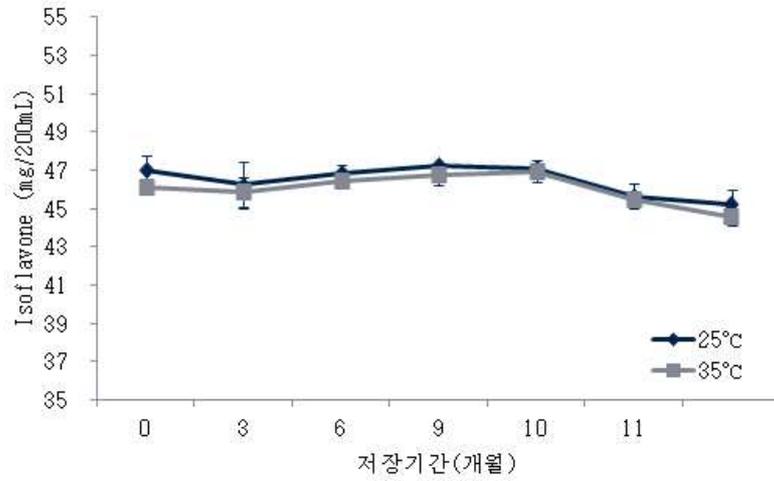


Fig. 2-10. 폐경기 개선식 제품의 저장기간에 따른 온도별 이소플라본 함량 변화.

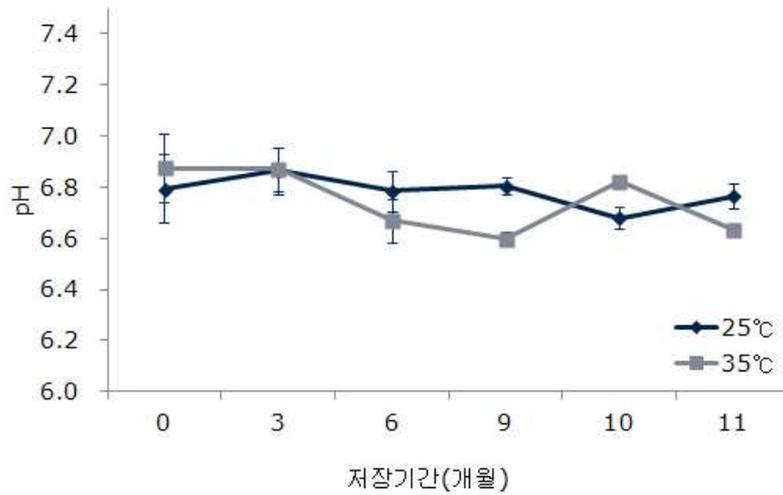


Fig. 2-11. 폐경기 개선식 제품의 저장기간에 따른 온도별 pH 변화.

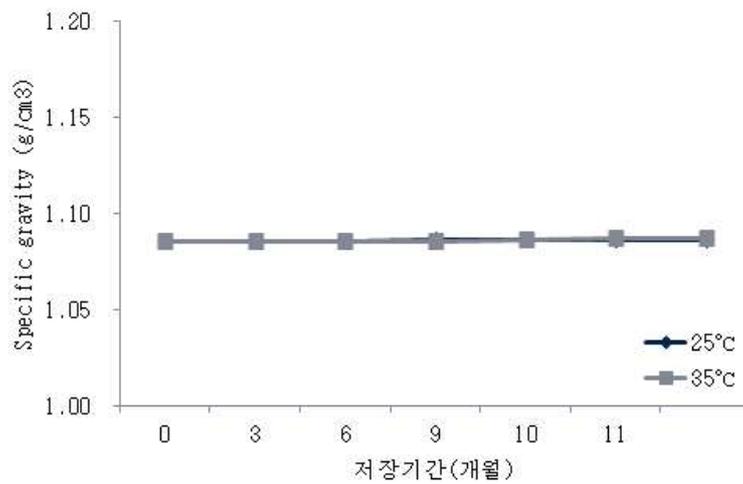


Fig. 2-12. 폐경기 개선식 제품의 저장기간에 따른 온도별 비중 변화.

Table 2-8. 폐경기 개선식 제품의 저장기간에 따른 온도별 관능 만족도 변화

저장기간(개월)	관능 만족도	
	25℃	35℃
0	3.3±0.3	3.3±0.5
3	3.1±0.4	3±0.4
6	3.1±0.3	3.1±0.4
9	3.2±0.3	3.3±0.2
10	3.1±0.5	3.1±0.4
11	3.0±0.4	3.2±0.4
12	3.1±0.5	3.0±0.3

8. 임상시험용 식이 제조

가. 임상시험용 식이의 주요 배합비 및 제조 공정

현재 건양대학교 병원(제 3 협동기관)에서 진행 중인 임상시험 피험자들을 위한 식이를 제공하기 위하여 위에서 개발된 폐경기 개선식을 대량으로 생산하고자 하였다. 또한 폐경기 개선식의 대조군으로서 이소플라본이 포함되어 있을 가능성이 있는 대두 유액, 대두 레시틴, 배아 발효물 등을 제외시키고 정제수, 카제인 나트륨 등을 이용하여 위약을 제조하였다. 본약(폐경기 개선식)과 위약의 제조를 위해 결정된 주요 배합비는 Table 2-9과 같았고 이 것의 제조 공정은 Fig. 2-13와 같았다.

Table 2-9. 본약과 위약의 주요 배합비

원재료명	본약	위약
카제인나트륨	0.45	2.98
대두유액	75.05	0
대두유	0.52	2.59
대두레시틴	0.20	0
배아발효물	0.70	0
정제수	6.54	77.89
기타	16.54	16.54
합계	100	100



Fig. 2-13. 임상시험용 식이 제조 공정

나. 임상시험용 식이의 품질 규격

본약과 위약의 생산량은 각각 5,760 캔, 5,220 캔이었다. 위에서 설정한 비중, pH, 미생물 (대장균군, 일반세균, 고온균)에 대한 규격 검사결과는 Table 2-10에서 보는 바와 같이 모두 적합한 것으로 확인되었다. 또한 Table 2-11는 본약과 위약의 영양성분 분석표로써 두 군간에 영양학적으로 차이는 거의 없는 것으로 확인되었다.

Table 2-10. 임상시험용 식이의 품질 규격 검사 결과

구분	비중		pH		미생물	
	기준치	검사치	기준치	검사치	기준치	검사치
본약	1.086±0.05	1.083	6.80±0.2	7.05	음성	음성
위약	1.074±0.05	1.078	6.80±0.2	6.61	음성	음성

Table 2-11. 임상시험용 식이의 영양성분

성분	단위	Test1(본약)	Test2(위약)	성분	단위	Test1(본약)	Test2(위약)
Calories	kcal	200	200	Niacin	mg	2.8	2.8
Protein	g	6	6	Biotin	mcg	6	6
Fat	g	4.44	5.56	Pantothenic Acid	mg	1	1
Carbohydrate	g	32.5	31.5	Calcium	mg	280	280
Dietary Fibre	g	3	0	Phosphorus	mg	140	140
Taurine	mg	0	0	Magnesium	mg	36.4	36.4
L-Carnitine	mg	0	0	Sodium	mg	93.23	76.81
Choline	mg	61	61	Potassium	mg	158.56	130.63
Vitamin A	µg	130	130	Chloride	mg	121.63	120.56
Vitamin B1	mg	0.22	0.22	Zinc	mg	1.6	1.6
Vitamin B2	mg	0.24	0.24	Iron	mg	2.8	2.8
Vitamin B6	mg	0.28	0.28	Manganese	mg	0.6	0.6
Vitamin B12	µg	0.48	0.48	Iodine	µg	0	0
Vitamin C	mg	20	20	Copper	mg	0.16	0.16
Vitamin D	µg	1	1	Selenium	µg	5	0
Vitamin E	mg	2	2	Chromium	µg	5	0
Vitamin K	µg	13	13	Molibdenum	µg	2.5	0
Folic Acid	µg	80	80				

다. 임상시험용 식이의 관능평가

임상시험용 식이로 제조된 본약 및 위약의 관능을 비교 평가하기 위하여 (주)정·식품중앙연구소 직원 20명을 대상으로 관능평가를 실시하였다. 평가 항목으로는 관능 만족도, 관능 선호도, 관능적 차이 정도 이었으며 그 결과는 Table 2-12과 같았다. 대두 유액을 사용한 본약과 그 대신 정제수와 카제인 나트륨을 사용한 위약 사이에 관능적인 차이 정도는 3.95점으로 약간의 차이는 피할 수 없었다. 하지만 관능 만족도와 선호도 면에서는 두 군간에 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다. 따라서 배아 발효물 등이 관능적 저하에 영향을 미치지 않을 것으로 판단하였다. 하지만 본약의 관능 만족도가 3.05점으로 보통 수준에 머물렀기 때문에 보다 높은 관능 만족도를 위하여 맛의 개선이 필요할 것으로 사료된다.

Table 2-12. 임상시험용 식이의 관능평가 결과

구분	관능 만족도	관능 선호도	관능 차이 정도
Test 1	3.05 / 5 점	10 / 20 명	3.95 / 5점 (약간 차이 있음)
Test 2	3.15 / 5 점	10 / 20 명	

9. 최종 제품 생산 및 상품화

위에서 언급한 제품 개발 결과를 최종적으로 종합하여 최종 제품을 시험 생산하였다. 생산은 전라남도 담양군에 소재한 음료 제조 업체인 “자연과 사람들”에 의뢰하였으며, 생산량은 총 2,000 kg을 배합하였다. 포장 방식은 200 mL 용량의 백색공관에 충전 후 라벨러를 이용하여 캔 디자인을 부착시키는 방법을 사용하였다.

제품의 상품명은 그린비아 우먼과워라고 하였으며, 캔 제품의 디자인과 최종 캔 제품의 외관은 Fig. 2-14, 15와 같았다. 위에서 설정한 품질 지표에 대하여 측정된 결과 Table

2-13와 같이 모두 적합한 것으로 확인되었으며, 비배당체 형태의 이소플라본 함량은 한 캔 당 43.18mg 정도이었으며 기준치인 30mg 이상으로 품질적으로 적합한 것으로 확인되었다.



Fig. 2-14. 그린비아 우먼파워 캔 디자인.



Fig. 2-15. 그린비아 우먼파워 제품의 외관 모습.

Table 2-13. 그린비아 우먼파워 품질 측정 결과

구분	비중		pH		미생물	
	기준치	검사치	기준치	검사치	기준치	검사치
그린비아 우먼파워	1.086±0.05	1.0746	6.80±0.2	6.73	음성	음성

제 3 절 고효율로 비배당체의 이소플라본(daidzein, genistein, equol)을 생산하는 공정 개발 및 제품화

1. PNP assay를 통한 β -glucosidase 활성 우수 균주 1차 선발

대두에 존재하는 이소플라본은 천연적으로 존재할 경우에 배당체로 존재하는 경우가 많으며 이를 비 배당체로 전환하기 위해서는 β -glucosidase의 활성이 우수한 균주의 선발이 필요하다. 본 연구에서는 당사에서 기존에 보유하고 있던 균주 들 중에서 PNP assay를 통하여 예비 선발한 4가지의 비피더스균주와 *Lactococcus garvieae*, *Leuconostoc* 균주를 대상으로 생육곡선과 그에 따른 효소활성을 다음과 같이 측정하였다. 각 균주를 MRS 배지에 1차 활성화 한 후 MRS 배지에 1% 되도록 접종하여 37°C (*L. garvieae*의 경우는 30°C)에서 정지 배양하면서 OD600에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과 Fig. 3-1 과 같은 생육곡선을 얻을 수 있었다. 비피더스균 IF65와 INT57이 가장 우수한 생육을 나타내었다. β -glucosidase의 활성은 각 시간별로 시료를 취하여 bead beater를 이용하여 세포를 파쇄한 후 이를 원심 분리 하여 얻은 조효소액 70 μ L와 p-NPG(5mM) 30 μ L를 넣고, 37°C에서 30분간 반응한 후 sodium carbonate 100 μ L 넣고 반응 종결시킨 후 450nm에서 흡광도를 측정하여 평가하였다 (Fig. 3-2). 그 결과 *Bifidobacterium* INT57과 IF65가 가장 우수한 효소활성을 나타내었다. 효소의 활성은 생육과 비례하여 나타났으며 효소활성을 생육정도(OD600)값으로 나누어 세포 당 효소의 활성으로 나타내었을 때에는 IF65>*Leuconostoc*>INT57의 순으로 나타났다 (Fig. 3-3).

*Leuconostoc*의 경우 초기 배양조건에서는 생육이 저조하였기 때문에 이를 개선하기 위하여 배지에서 환원제인 L-cystein HCl을 제거하고 배양한 결과 생육이 12시간 이후에는 높게 나타났다(Fig. 3-4). 하지만 효소활성에서는 IF65, INT57이 우수한 것으로 나타났다.

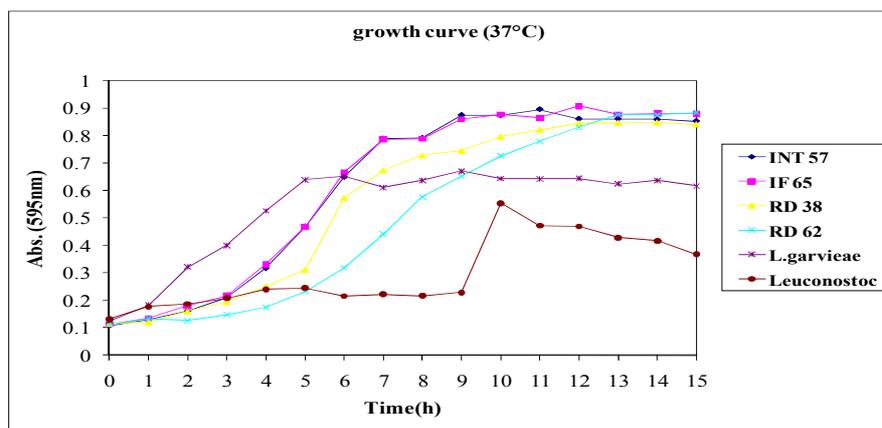


Fig. 3-1. Growth curve of Bifidobacterium and lactic acid bacteria.

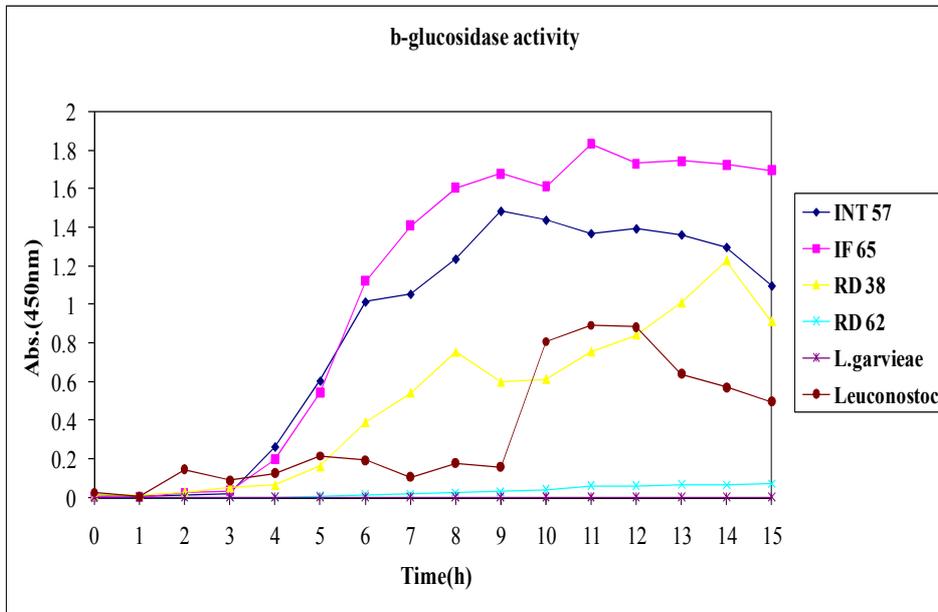


Fig. 3-2. β -glucosidase activities of various Bifidobacterium and lactic acid bacteria.

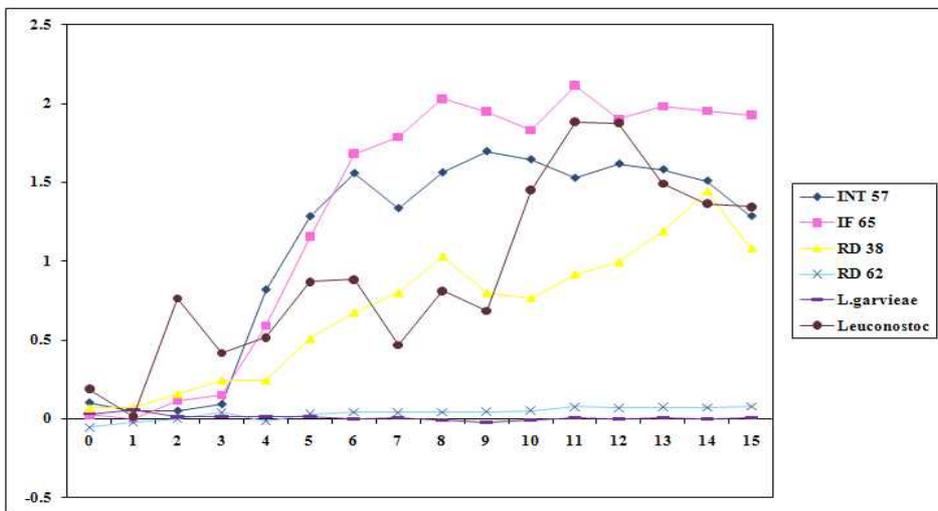


Fig. 3-3. β -glucosidase activities of each bacteria divided by OD600 at each time point.

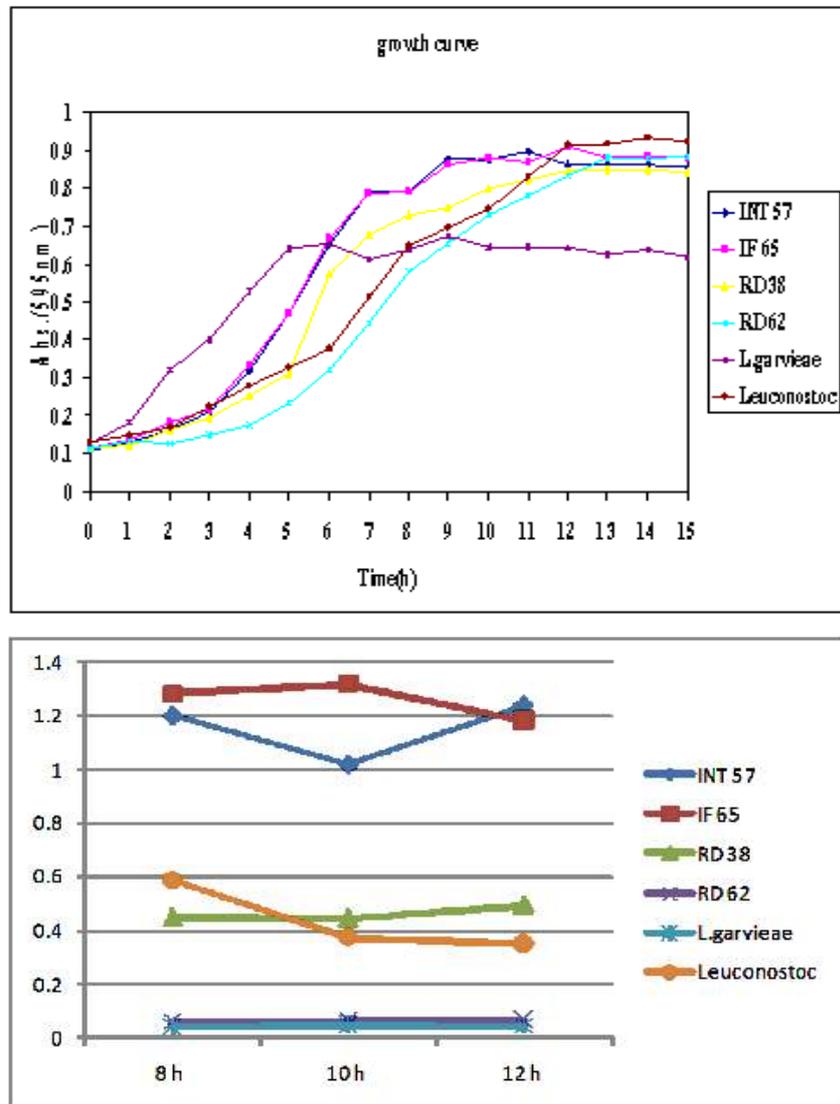


Fig. 3-4. Growth curve of various lactic acid bacteria(upper) and β -glucosidase activities(lower) of them at 8, 10, 12 hrs. Leuconostoc was cultivated in the MRS medium without L-cystein HCl.

2. 생물전환 모니터링 방법 확립: HPLC 및 TLC를 이용한 분석법

본 연구의 원활한 진행을 위해서는 각종 이소플라본을 정확하게 분석할 수 있는 방법의 설정이 먼저 필요하였다. 간이 분석을 위해서는 TLC를 우선 실시하였다. 분석 조건은 전개액 조성(Acetonitrile : Water : Acetic acid (60 : 40 : 1))에서 다음과 같은 결과를 얻을 수 있었다(Fig. 3-5). 실험 결과 daizin, daidzein, equol을 각각 10, 35, 50mM까지 검출하는 데 용이하였다.

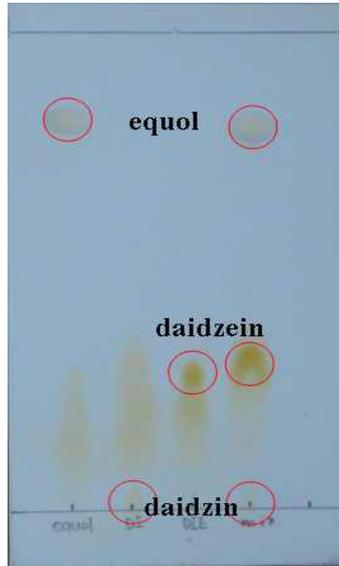
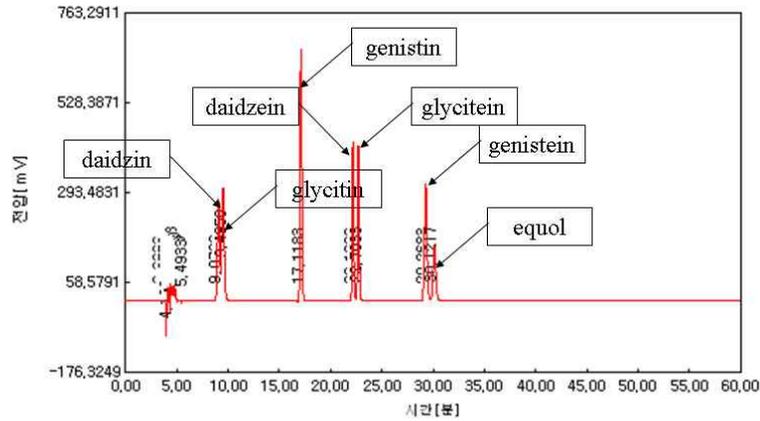


Fig. 3-5. TLC analysis of daizin, daidzein and equol.

각 isoflavone의 정량적인 분석을 위해서는 HPLC 조건이 필요하다. 이를 설정하기 위하여 다양한 문헌을 기반으로 다음과 같은 분석조건을 설정하였다. 초기에는 검출 파장을 254nm로 하였으나 270nm에서 equol의 검출감도가 더 우수하여 이후의 실험은 270nm에서 실시하였다(Table 3-1).

Table 3-1. Operation condition of HPLC for the analysis of various isoflavones

Wavelength : 270nm		
Flow rate : 0.6mL/min		
Injection volume : 20 μ L		
Column : Waters Symmetry C18 (4.6 X 250 mm)		
Time (min)	A (1% acetic acid in water)	B (acetonitrile)
0	85	15
5	85	15
44	65	35
45	65	35
50	85	15
60	85	15



Isoflavone	Retention Time (RT)
Daidzin	8.5617
Daidzein	24.7900
Genistin	18.8950
Genistein	34.0483

Fig. 3-6. HPLC chromatogram and retention time of various isoflavones.

3. 배당체 분해능을 기준으로 한 균주 선발

β -glucosidase의 기질로서 pNP- β -D-glucoside 기질의 경우와 실제기질에서의 활성이 일치하는 않는 경우가 종종 발생한다. 따라서 이소플라본의 생물전환을 위한 실제 균주의 선발에서는 대두유래의 이소플라본을 기질로 하여 배양하였을 때 대사산물을 직접 분석하는 것이 더욱 정확한 균주 선발 방법이라 하겠다. 특히 equol의 생산을 위해서는 그 전구물질인 daidzin과 daidzein을 대사할 수 있는 효소활성이 필요하다. 본 실험에서는 다양한 비피더스균주의 배양과정에서 daidzin과 daidzein의 대사활성을 평가하였다. 우선 58종(2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 33, 34, 36, 37, 38, UN4, 49, 91, 191, 세경12, 현희도3, adol2, adolscent, BB12, BF-1, HJ30, HS-1, IF65, INT57, JS-9, KJ, MS-1, PBK 36-6, RD22, RD38, ST, L.garvieae, Leuconostoc, RD62)의 비피더스균 및 유산균을 1차 활성화하여 MRS 배지에 1% 되도록 접종한 후 DMSO에 녹인 5mM daidzin, daidzein을 각각 1% 되도록 첨가하여 37 °C에서 배양하며 시간별로 샘플을 채취하여 HPLC로 대사산물을 분석하였다. 샘플은 0, 24, 48시간에 배양액 200ul를 취하여 MeOH 800 μ L로 추출한 후 0.2um filter하여 HPLC로 분석하였다.

그 결과 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 14균주는 초기에 첨가해 준 daidzein이 사라지면서 R/T 13분경에 새로운 peak가 형성되었고 (Fig. 3-7) 9, 20 균주는 2개의 새로운 peak가 형성되었다(Fig. 3-8). 그러나 대부분의 균주 (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 33, 34, 36, 37, 38, UN4, 49, 91, 191, S12, H3, adol2, adolescent, BB12, BF-1, HJ30, HS-1, IF65, INT57, JS-9, KJ, MS-1, PBK 36-6, RD22, RD38, ST)는 daidzein을 대사하지 못하였다.

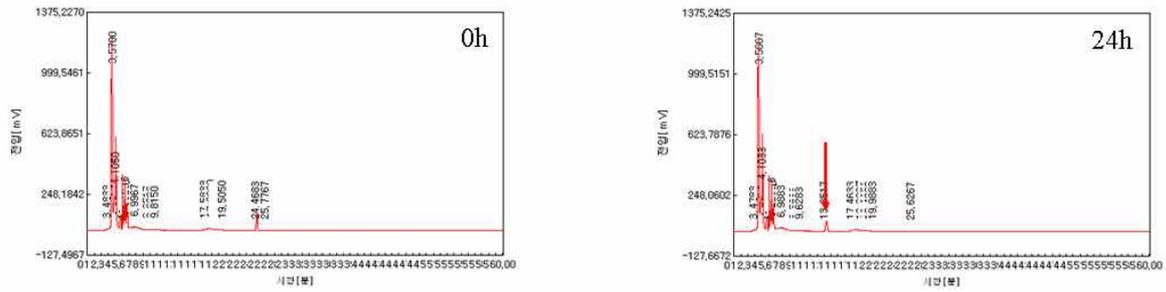


Fig. 3-7. HPLC chromatogram of various *Bifidobacterium* cultivated with daizein. One new peak was detected.

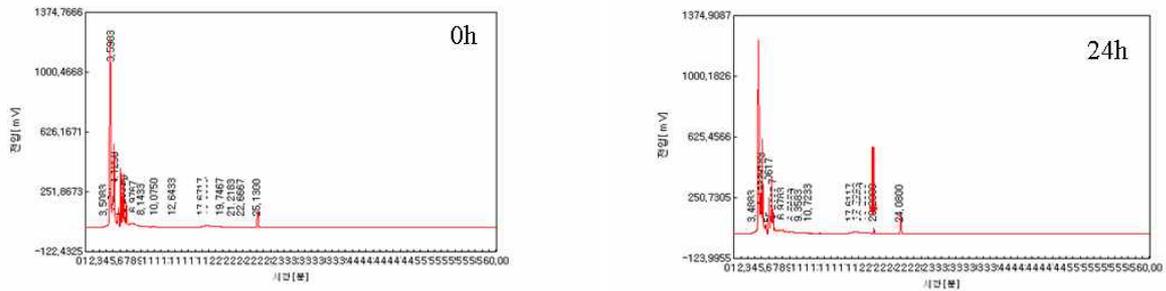


Fig. 3-8. HPLC chromatogram of various *Bifidobacterium* cultivated with daizein. Two new peaks were detected.

Daidzin을 기질로 첨가한 경우에는 10, 26, 37번 균주를 제외한 대부분의 균주가 대사를 거쳐 새로운 peak와 daidzein을 생성함을 알 수 있었다. 즉 대부분의 균주가 배당체인 daidzin을 비배당체인 daidzein까지 전환함을 확인하였다(Fig. 3-9).

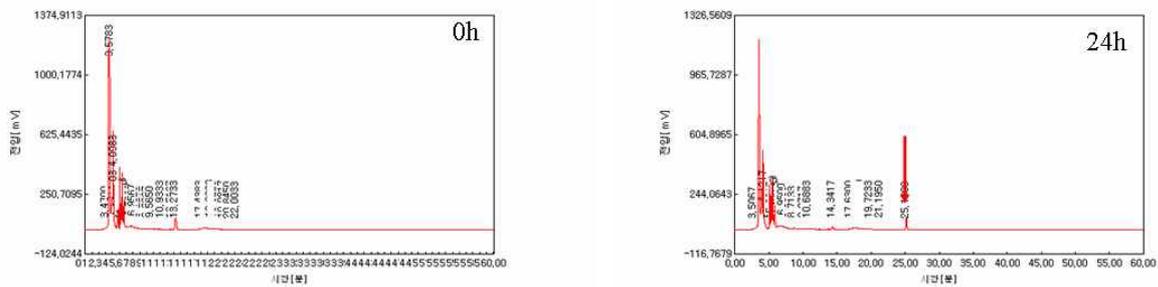


Fig. 3-9. HPLC chromatogram of various *Bifidobacterium* cultivated with daizin. daizein were detected.

4. 균체 및 조효소액을 이용한 equol 생산 탐색

*Lactococcus garvieae*를 이용하여 daidzein에서 equol을 생산하는 지를 균체와 조효소액을 이용하여 평가하였다. 균체를 이용한 경우에는 MRS 배지를 기본으로 200 μ M의 daidzein을 첨가하고 37°C에서 정치배양하며 정상기에서 Ethyl acetate를 배양액의 1.5배 부피로 3회 추출하여 감압농축기 농축 한 후 MeOH(3mL)로 용출한 후 필터 하여 HPLC 분석을 실시하였다. 그 결과 첨가된 daidzein이 전환되지 않으며 equol도 검출되지 않았다(Fig. 3-10).

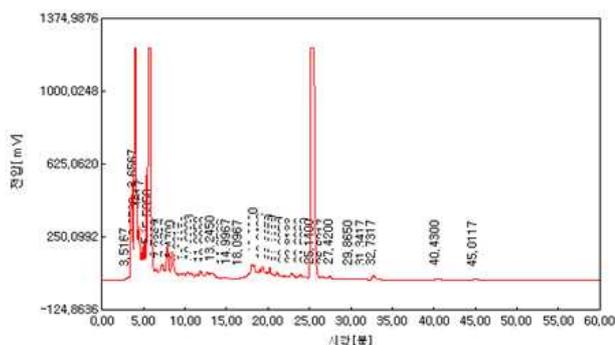


Fig. 3-10. Bioconversion of daidzein using whole cell of *L. garvieae*

균체 조효소액을 이용한 경우에는 MRS 배지에 1% arginine, 100 μ M daidzein을 첨가하고 균을 1% 접종한 후 배양하여 정상기 때 상등액을 획수하고 남은 균체는 D.W로 3회 Wash 하여 bead beater로 파쇄하였다. 이를 원심분리하여 상등액을 조효소액으로 이용하였다. 이 조효소액에 50mM MOPS-NaOH pH 7.0, 0.2 mM NADPH, 100 μ M(0.1mM) daidzein을 첨가하고 혐기조건에서 37°C, 16시간 반응한 후 HPLC 분석을 실시하였다. 하지만 이 경우에도 equol이 검출되지 않았다(Fig. 3-11).

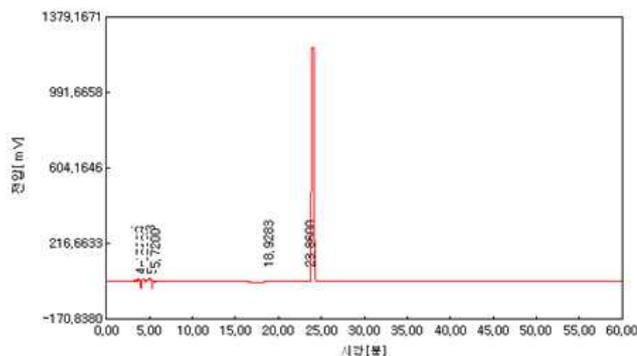


Fig. 3-11. Bioconversion of daidzein using whole cell extract of *L. garvieae*

5. 대두배아에서 Equol 생산 가능 균주 선발

위의 연구를 통하여 이소플라본 배당체인 daidzin이 비피더스균주를 통하여 daidzein까지 전환이 우수하게 일어남을 확인하였으나 최종 대사산물인 equol까지 대사되는 균주는 검출되지 않았다. 본 연구에서는 이를 극복하기 위하여 문헌검토를 통하여 *Lactococcus*

garvieae 균주를 대상으로 equol 검출을 시도하였다. Equol의 전구체인 daidzein 및 daizin은 물에 대한 용해도가 낮아서 배지에 적정량을 첨가하기가 용이하지 않아서 대두배아를 기질로 생물전환 및 equol 생산 균주를 탐색하였다. 대두배아는 믹서로 곱게 갈아 증류수 혹은 MRS 배지에 2.5 or 5%를 첨가하여 멸균한 후 미리 활성화한 *L. garvieae*를 5% 접종하고 30°C에서 혐기적으로 96시간까지 배양하면서 시간별로 샘플을 채취하였다. 이소플라본의 변화를 측정하기 위하여 각 샘플을 동결건조하여 대두배아 발효물 분말을 제조하고 isoflavone 추출법을 이용하여 isoflavone 추출한 후 HPLC를 이용하여 분석하였다. MRS배지에 2.5%의 대두배아를 첨가하여 배양한 경우 internal standard로 formononetin을 첨가한 경우와 추가적으로 equol을 첨가한 실험에서 equol과 동일한 retention time에 약하지만 genistein peak 옆에 equol peak가 검출됨을 확인하였다. 또한 대부분은 배당체들이 배양과정동안 비배당체로 전환되는 것도 함께 확인되었다(Fig. 3-12).

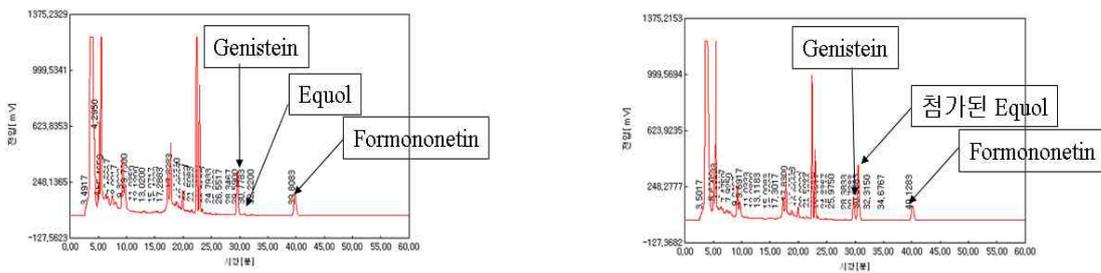


Fig. 3-12. Bioconversion of isoflavone aglycones and equol from hypocotyl of soybean.

제 4 절 고효율 생물전환 공정의 개발 및 최적화

1. Equol 생산가능성 평가

Equol은 이소플라본의 최종 대사산물로써 체내에서 daidzein의 대사에 의해 생성된다. 1차년도 연구결과 대두배아의 발효물에서 equol 유사 peak가 약하게 검출되었으며 이를 검증하기 위하여 2차년도에 추가적인 연구를 진행하였다. *L. garvieae*에 의하여 5%의 대두배아를 4일간 발효시킬 경우 배양 시간에 따라 daidzein과 genistein의 함량이 증가하다가 3일째 부터는 daidzein의 함량은 줄어드는 것을 확인하였다.

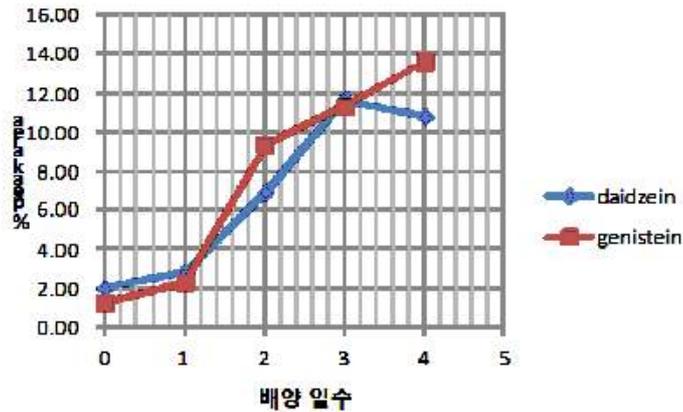


Fig. 4-1. Changes of daidzein and genistein contents of fermented soy hypocotyl by *L. garvieae*.

또한 MRS 배지에 daidzein을 첨가한 후 *L. garvieae*로 배양한 경우 24시간에 비하여 48시간에 daidzein peak가 줄어들고 새로운 peak가 생성되는 것을 확인하였다.

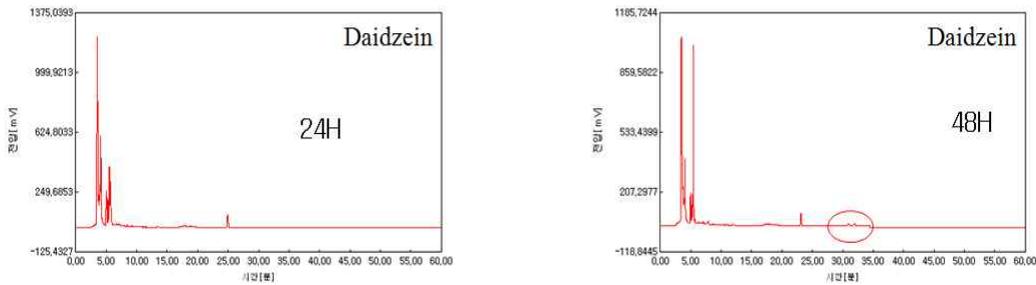


Fig. 4-2. Changes of daidzein peak by fermentation using *L. garvieae*.

Equol의 전구체인 daidzein이 충분히 생성된 기질에 *L. garvieae*를 접종하여 추가적인 equol 생산성을 보고자 하였다. 1차년도 선발 균주인 Int 57를 이용하여 1차 발효하여 배당체를 비배당체로 전환한 기질에 *L. garvieae*를 접종하여 equol의 생산성을 분석하였다. 실험군은 glucose를 제거한 MRS 배지에 1차발효 대두배아 분말을 기질로 한 경우와 1차발효 대두배아 분말에 각각 0.5%와 1%의 수용성 이소플라본 (솔루본, 바이오랜드)을 첨가하여 발효한 경우로 나누어 96시간 배양하면서 이소플라본

의 변화 추이를 HPLC로 분석하였다.

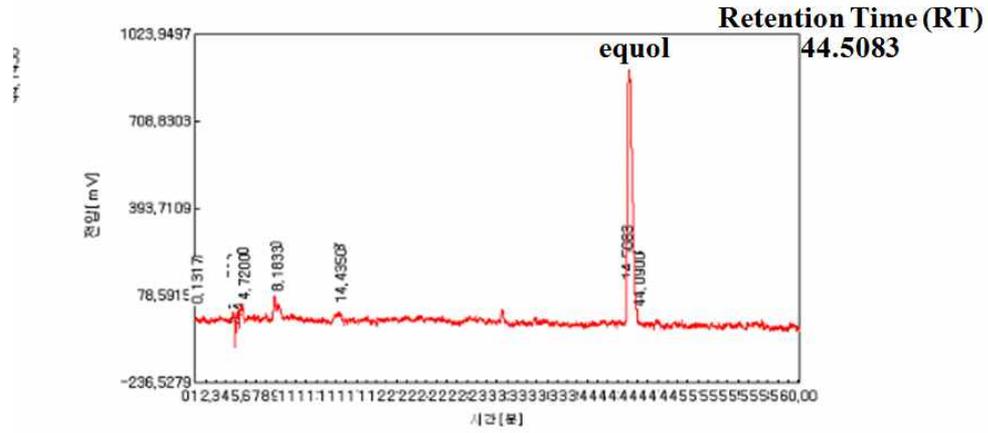


Fig. 4-3. HPLC chromatogram of standard equol.

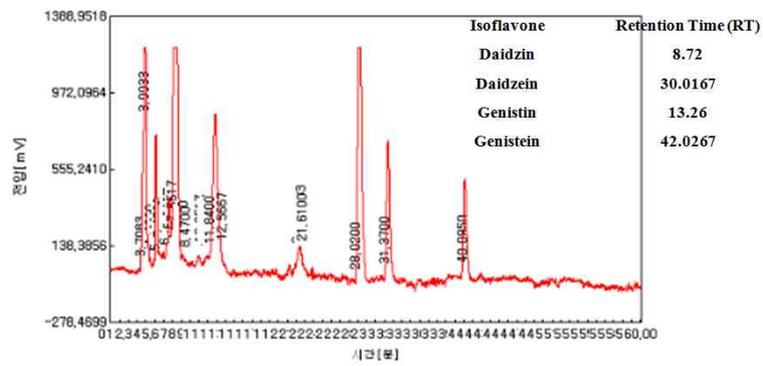


Fig. 4-4. HPLC chromatogram of fermented soybean hypocotyl by *L. garvieae*.

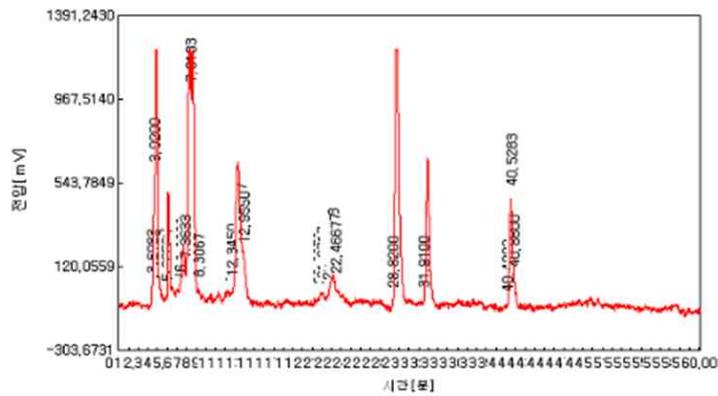


Fig. 4-5. HPLC chromatogram of fermented soybean hypocotyl with 0.5% solubone by *L. garvieae*.

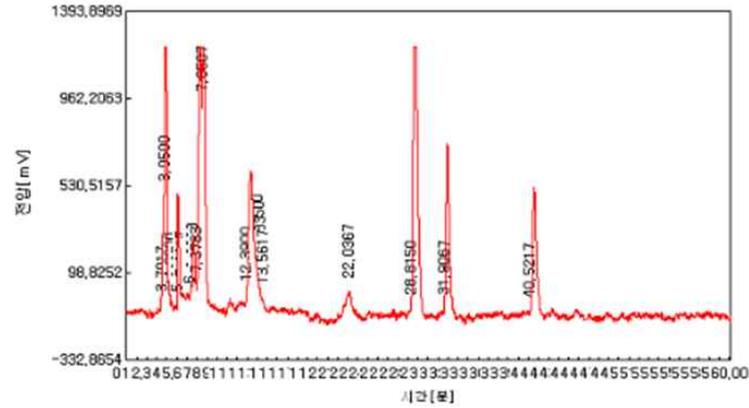


Fig. 4-6. HPLC chromatogram of fermented soybean hypocotyl with 1.0% solubone by *L. garvieae*.

실험결과 1차발효 대두배아만을 기질로 한 경우에 genistein peak 옆에 equol 추정 peak 가 보였기 때문에 이를 확인하기 위하여 standard equol을 발효물에 첨가한 후 HPLC로 분석하였다. 이때 equol 추정 peak와 겹치게 나타나는 것을 확인하였다.

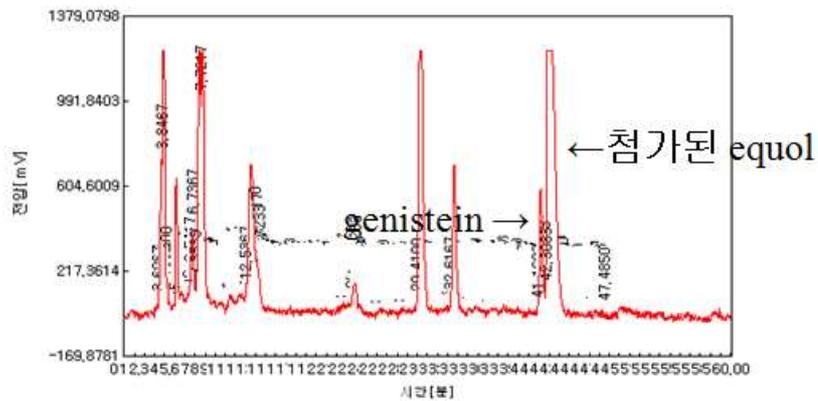


Fig. 4-7. HPLC chromatogram of equol-spiked soybean hypocotyl fermented by *L. garvieae*.

2. 고농도 이소플라본 전환공정 개발

1차 년도에는 5% 대두배아 첨가 시 대부분의 배당체 이소플라본이 비배당체로 전환됨을 확인하였다. 대두배아의 경우 쓴 맛과 콩 비린내 등으로 관능적인 특성이 좋지 않기 때문에 궁극적으로 이를 이용한 제품을 개발하기 위해서는 적게 첨가하면서도 필요한 이소플라본 양을 충족시켜야 한다. 이를 위해서는 되도록 고농도의 이소플라본을 함유한 원료의 개발이 필요하다.

가. 접종량의 영향

본 연구에서는 우선 접종량에 따른 전환율을 비교 평가하였다. 20%의 대두배아 분말을 멸균하여 제조한 배지에 미리 배양한 Int 57 균주를 각각 5%, 10% 접종한 후 전환 패턴을

분석하였다. 그 결과 10% 접종하였을 때 약간 peak area %가 증가 (4.1% -> 4.5%) 함을 알 수 있었다 (Table 4-1).

Table 4-1. Peak area % of genistein in fermented soybean hypocotyl according to the amount of inoculum

sample	RT	Peak area	Area %
5 % 접종	34.1883	7092.5149	4.0913
10 % 접종	34.9317	1756.9132	4.4534

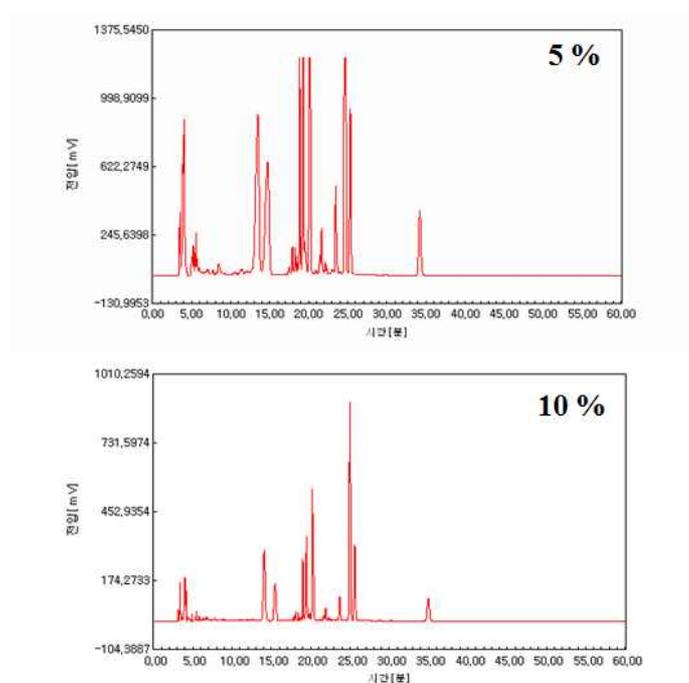


Fig. 4-8. HPLC chromatogram of soybean hypocotyl fermented by Bif. Int57 according to the amount of inoculum.

나. 배양시의 pH에 따른 영향

접종량을 5%로 하고 배양시의 초기 pH를 각각 4.0 - 8.0까지 살펴보았다. 그 결과 pH 5.0에서 가장 우수한 전환능을 보였다.

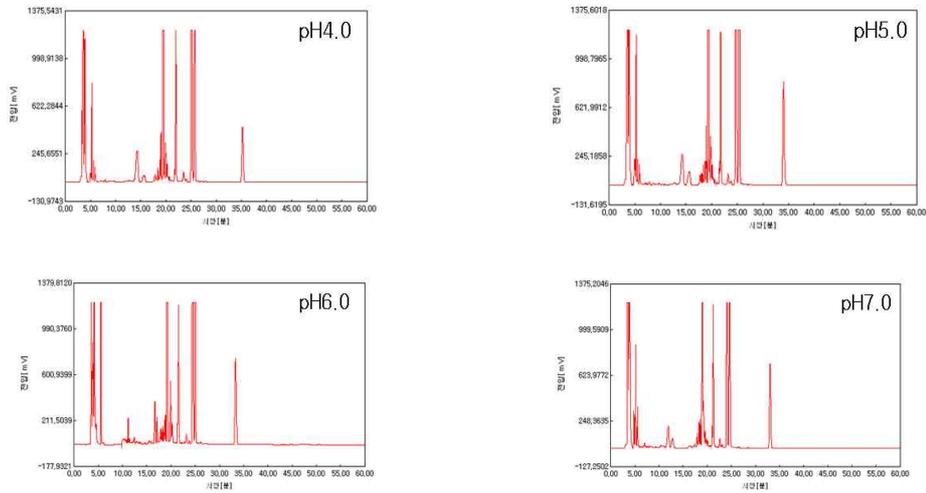


Fig. 4-9. HPLC chromatogram of soybean hypocotyl fermented by Bif. Int57 according to the initial pH.

Table 4-2. Peak area % of genistein in fermented soybean hypocotyl according to the initial pH

pH	R.T	peak area	area %
3	35.28	533.608	0.4436
4	35.2417	9034.6273	6.1852
5	34.0367	15527.4015	9.035
6	33.3383	13247.2751	7.5946
7	33.0267	12800.4559	7.962
8	33.145	12078.0136	7.9201

다. 추가 이소플라본 첨가에 의한 생물전환능 평가

위의 결과에서 얻은 접종량 5%와 초기 pH5.0 으로 조절한 후 대두배아분말을 20% 첨가하고 여기에 추가로 수용성 이소플라본 (솔루본, 바이오랜드, 이소플라본 함량 20%)을 각각 0.5%와 1%를 첨가한 후 생물전환능을 평가하였다. 그 결과 솔루본을 첨가한 경우가 오히려 첨가하지 않은 경우보다 더 높은 전환능을 보였다. 최적의 전환율은 0.5%의 솔루본을 첨가한 경우였으며 1%의 솔루본을 첨가한 경우에도 약 75%의 전환율을 보였다. 솔루본의 첨가에 의하여 전환율이 높아진 원인에 대해서는 추가적인 연구가 필요하다.

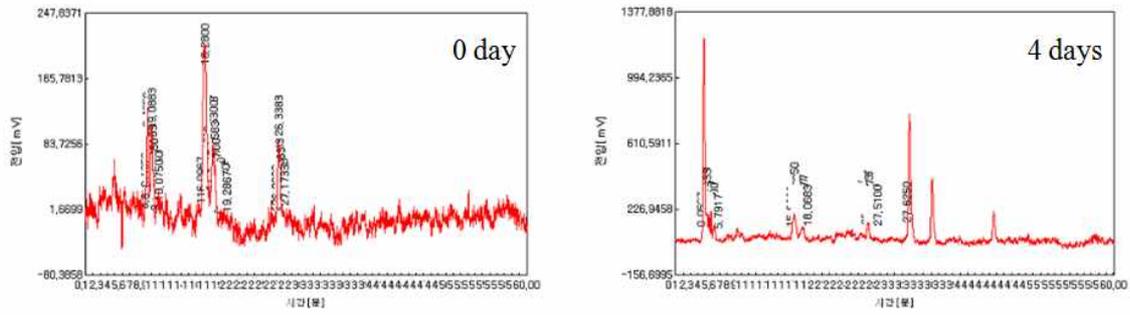


Fig. 4-10. HPLC chromatogram of fermented soybean hypocotyl(20%) by *B. int57*.

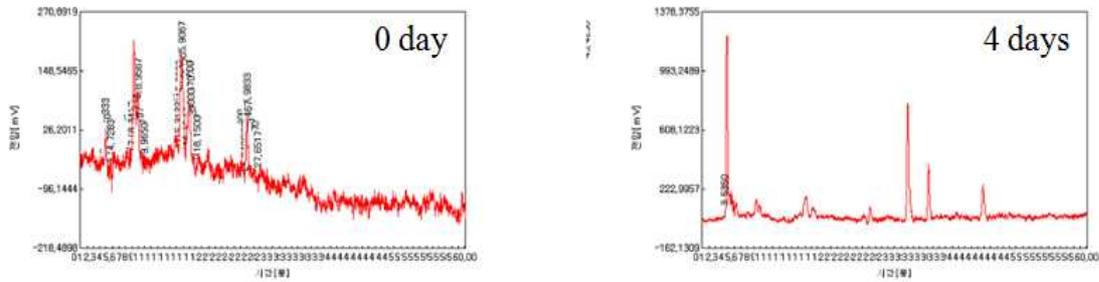


Fig. 4-11. HPLC chromatogram of fermented soybean hypocotyl(20%) and solubone 0.5% by *B. int57*.

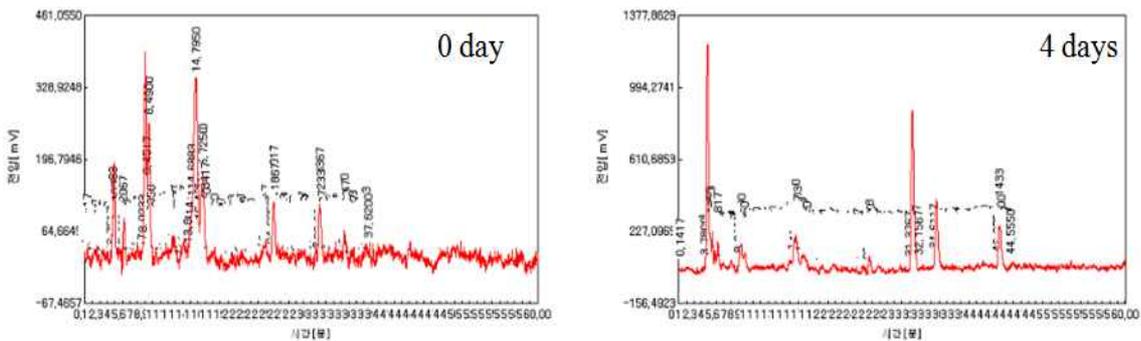


Fig. 4-12. HPLC chromatogram of fermented soybean hypocotyl(20%) and solubone 1.0% by *B. int57*.

Table 4-3. Bioconversion rates of daidzin, glycitin and genistein

기질	전환물질	전환율(%)	평균(%)
대두배아 20%	daidzin → daidzein	62	55.67
	glycitin → glycitein	50	
	genistin → genistein	55	
대두배아 20%+0.5% 솔루본	daidzin → daidzein	97	88.67
	glycitin → glycitein	85	
	genistin → genistein	84	
대두배아 20%+1.0% 솔루본	daidzin → daidzein	89	74.67
	glycitin → glycitein	67	
	genistin → genistein	68	

제 5 절 기능성 식품 소재의 개발

1. 발효 후 회수 공정 개발

대두배아 발효물을 제품화하기 위해서는 전환된 비배당체의 isoflavone을 최대한 회수하고 발효물이 제품을 생산하는데 질감, 향기 및 맛에 있어서 거부감이 없어야 한다. 그러기 위해서는 발효물의 회수 시기와 회수 방법 및 회수 후 공정의 개발이 필요하다.

가. 회수시기별 생물전환을 평가하여 최적의 회수시기 결정

대두 배아 발효 중 최적의 회수시기를 결정하기 위해서 발효 시작과 발효 시작 후 24, 48, 72시간이 경과 된 시점에서 이소플라본의 변화를 측정하기 위하여 각 sample을 동결건조하여 대두배아 발효물 분말을 제조하고 isoflavone 추출법을 이용하여 isoflavone을 추출한 후 HPLC를 이용하여 분석하였다.

분석결과 48시간 내에 대부분의 이소플라본이 배당체에서 비배당체로 전환되었다(Fig. 5-1).

나. 최적의 회수공정 선정

대두배아 발효물을 1차 발효상태 그대로 건조 공정을 거치게 되면 대두배아가루의 입자가 그대로 남아 있어 제품화 하더라도 제품을 사용하는 소비자가 제품에 거부감을 보일 수 있다. 그래서 고려되어진 isoflavone 회수 공정이 원심분리, 막분리, 추출법이었다. 원심분리는 대두배아 발효물을 원심분리하여 상층액을 취하는 방법이고, 막분리는 원심분리와 같은 원리로 투과성 막을 이용하여 대두배아 발효물의 고형성분을 걸러내는 것이다. 추출법은 대두배아 발효물을 용매를 이용하여 유효한 성분만 추출해 내는 방법이다.

최종 대두배아 발효물을 원심분리하여 상층액을 취하여 분석한 결과 대두배아 발효물 전체를 분석한 결과보다 isoflavone의 함량이 현저하게 적었다(Fig. 5-2). 막분리의 경우도 원심분리하여 분석한 결과와 크게 다르지 않았다. 추출법에 의한 isoflavone의 회수공정은 실험실 내에서 소량의 대두배아 발효물에 적용하기는 가능 하지만 추출 시간과 추출 공정을 고려했을 때 대량의 대두배아 발효물에 적용하기에는 부적합하다고 판단된다.

다. 회수 후의 건조공정

대두배아 발효물은 회수 후 제품화하기 위해서 건조과정을 거치게 된다. 대두 배아는 발효 과정에서 대두배아의 독특한 향기를 감소시키는 것도 중요하지만 최종 건조 단계에서도 발효물의 조성을 변화 시키지 않으면서 독특한 향기를 감소시키는 방법이 필요하다.

본 실험에서 다루어진 건조 방법은 동결건조와 열풍건조이다. 동결건조는 대두배아 발효물을 초저온냉동고에서 하루 동안 동결 시킨 후에 진공동결건조기에서 건조 시켰고, 열풍건조는 대두배아 발효물을 60°C dry oven에서 완전히 건조 시켰다.

그 결과 같은 양의 대두배아 발효물을 건조 시켰을 때 동결건조는 4일, 열풍건조는 6일이 소요되었다(Fig. 5-3). 발효 완료 후 동결건조와 열풍건조에서 얻어진 발효물의 성분은 차이가 없었다. 그러나 열풍건조가 동결건조보다 건조 시간이 길고, 건조된 발효물의 색이 진하며 대두배아 특유의 향기가 더 진하게 났다.

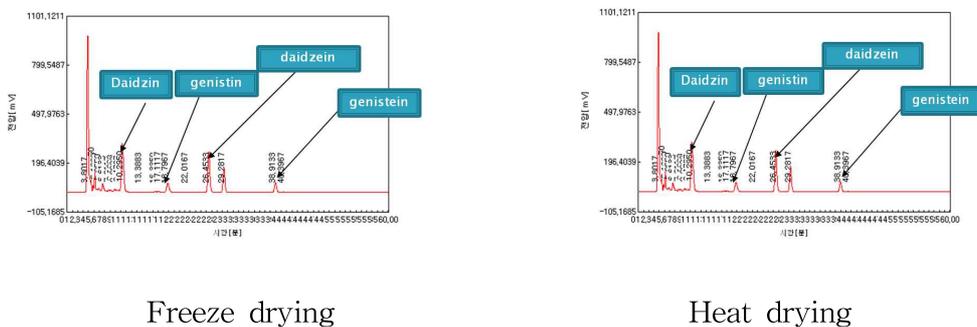


Fig. 5-3. HPLC chromatogram of soybean hypocotyl fermented by *B. Int57* according to drying method.

2. 배양조건의 스케일업 및 최적화

생물전환 공정의 스케일업 전 예비실험을 통해 공정의 재현성을 확인하였다. 공정의 재현성을 확인하기 위해 2가지 실험을 진행하였다. 첫 번째는 대두배아만 발효하였고, 두 번째는 대두배아에 0.5% 솔루분을 첨가한 후 발효하여 isoflavone 비배당체로의 전환을 확인하였다.

예비 발효 결과 이전 실험과 같은 isoflavone 배당체에서 비배당체로 전환되는 것을 확인하였다.(Fig. 5-4, 5)

예비 실험 결과를 바탕으로 200L 규모에서 이소플라본 비배당체 및 이소플라본 대사체가 함유된 발효물을 생산할 수 있는 공정을 재현하고자 시행하였다. 발효 온도는 37°C, 초기 pH 5.0, 대두배아 함유량 20%, 균 접종량을 0.5%로 대형 발효 탱크에서 30시간 발효를 하였다. 본 발효 전 배지를 만들어 멸균을 하여야 했는데 대두배아가 20% 함유된 배지는 죽과 같은 걸쭉한 상태가 되어 멸균 시 발효 탱크 벽면에 늘어붙는 현상이 나타났다. 그래서 온도를 낮추고 시간을 늘리는 멸균 방법을 사용 하였다. 발효 완료 후 발효물을 동결 건조하고 isoflavone 비배당체 및 대사물을 분석한 결과 시험실에서 시행되었던 소량 발효 실험과 같은 결과를 보였다.

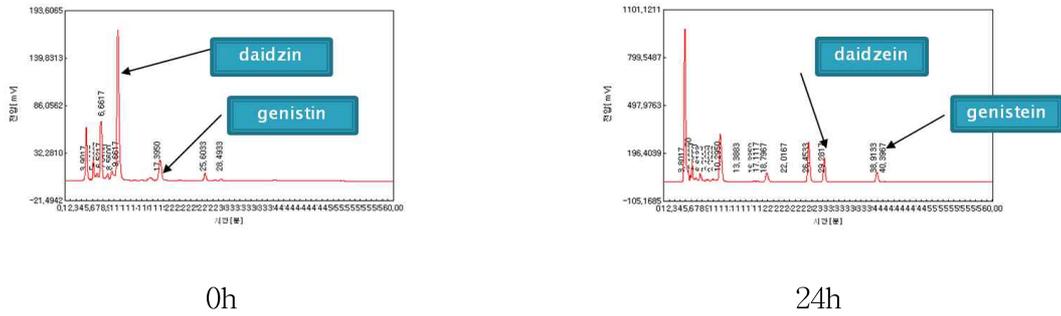


Fig. 5-4 HPLC chromatogram of fermented soybean hypocotyl(20%) by *B. int57*.

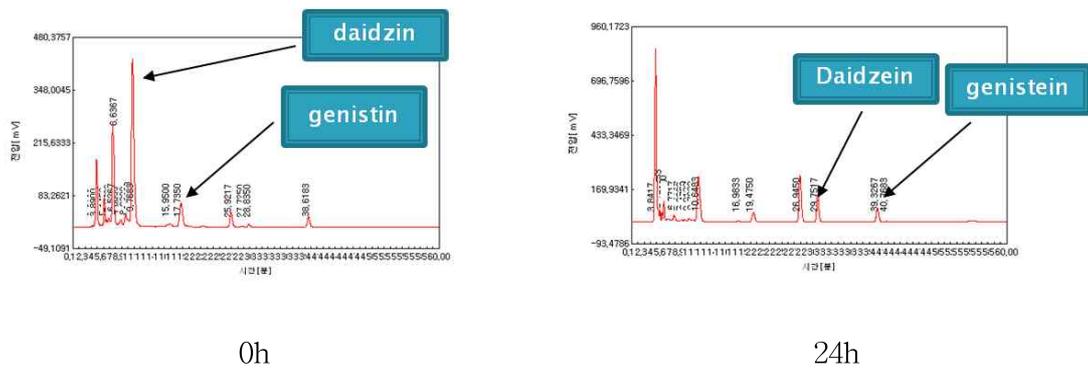


Fig. 5-5. HPLC chromatogram of fermented soybean hypocotyl(20%) and solubone 0.5% by *B. int57*.

대량 발효를 통해 얻어진 대두배아 발효물은 Fig. 5-6와 같았다.



Fig. 5-6. Soybean hypocotyl fermented product.

3. 제품 규격화

지금까지 연구한 결과를 제품에 적용하기 위해서는 제품이 항상 같은 양의 생리활성 물질을 포함 할 수 있도록 관리되어 져야 한다. 그러기 위해서는 1차 발효물에 대한 정량분석이 필요하므로 실험실 내 분석(Fig. 5-7)과 공인분석기관인 한국기능식품연구원에 1차 발효물

에 대한 성분 분석을 의뢰하여 정량분석을 하였다. (Fig. 5-8) 1차 발효물 Sample은 10배 희석하여 시험기관에 제공하였다.

실험실 내 분석 결과 1차 대두배아 발효물에 비배당체로서 isoflavone의 함량은 daidzin 9.08mg/100g, genistin 2.25mg/100g, daidzein 34.11mg/100g, genistein 13.44mg/100g으로 검출되었다.

한국기능식품연구원에서 분석 결과 1차 대두배아 발효물에 비배당체로서 isoflavone의 함량은 daidzein, genistin, glycitin은 검출 되지 않았고, daidzein 4.169mg/100g, genistein 2.540mg/100g, glycitein 2.945mg/100g이 함유되어 있었다. 이는 실험실 내에서 분석되어진 정량과 크게 차이를 보이지 않았다. isoflavone의 권장 섭취량은 4~27mg/day이다. 위의 검사 성적서에서 1차 발효물의 비배당체로서 isoflavone의 함량이 196.5mg/100g으로 4g~27g 정도를 섭취해야한다. 순수하게 1차 발효물 분말을 하루에 4g~27g을 섭취하기는 쉽지가 않다. 그래서 1차 발효물 단위 g당 고농도의 isoflavone이 함유할 수 있는 방법의 모색이 필요하고 다른 목적의 제품에 대두배아 발효분말을 첨가하여 그 효과를 기대하는 것이 좋다. 그렇게 만들어진 제품에 (주)비피도에서 생산한 홍삼 발효워터가 있다. (Fig. 5-9)

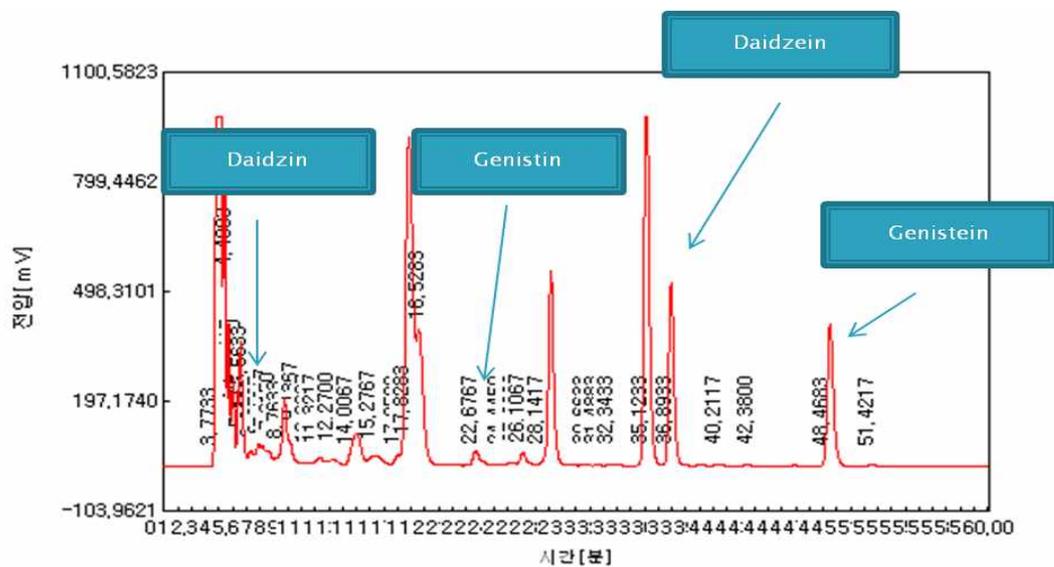


Fig. 5-7. Laboratory analysis of fermented soybean hypocotyl product.



제 D2011120496 호

검 사 성 적 서

검체명	대두배아발효물	제조일자 (유통기한)	
의뢰인	업체명	(주)비피도	성명
	주소	경기 성남시 중원구 상대원동 190-1 SK테크노파크 309호	
제조번호		접수년월일	2011-12-15
검사의뢰목적	참고용	검체접수번호	D2011120496

귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다. 검사관련 총 책임자: 김 천 회

시험항목	결과	검사담당자
대두이소플라본(비배당체로서)(mg/100g)	9.65mg/100g(daidzin, genistin, glyeitin 불검출, daidzein 4.169mg/100g, glycitein 2.945mg/100g, genistein 2.540mg/100g)	정은숙

2011 년 12 월 28 일

한국기능식품연구원장

(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 <http://www.khsi.re.kr> 전화번호(02)592-2100 FAX(02)592-9304-5

Fig. 5-8. A report card about soybean hypocotyl fermented.



Fig. 5-9. Final product containing fermented soybean hypocotyl.

제 6 절 이소플라본 발효물 및 폐경기 개선식이 난소절제 흰쥐의 골 대사 및 생화학적 지표에 미치는 영향

1. 연구 재료 및 방법

가. 실험동물

Sprague-Dawley (SD)계 5주령의 암컷 랫드를 (주)샘타코바이오코리아(경기도 오산)로부터 구입하여 4주 동안 사육장과 조제사료에 순화기간을 거쳐 260 g 정도 되었을 때 건강한 동물만을 골라 실험에 사용하였다. 이소플라본 발효물의 실험은 정상대조군 (normal control 군), pentobarbital sodium (entobal, 한림제약)으로 마취 (50 mg/kg. bw, ip)한 다음 등쪽의 피부만 절개하여 개복한 군 (sham-operation, 이하 sham군), 양쪽 난소 적출군 (ovariectomized group, OVX군)으로 양쪽의 난소를 모두 절제하였다. 수술 후 모든 공시동물은 감염을 방지하기 위해 gentamycin sulfate 주사액 (겐타마이신 주, 동신제약)을 1회 투여 (0.2 mg/kg.bw, IM)하였다. 시험군은 상기와 같이 난소를 절제한 다음 대두배아 급여군 (이하 SEE군이라 약함, 23 g/kg), 대두배아 발효물 급여군 (이하 SEF군이라 약함, 30g/kg), 발효균주 급여군 (이하 BL군이라 약함, 0.57g/kg)으로 시험군을 구성하였으며, 폐경기 개선식의 실험에 대해서는 시험군에 대하여 모두 난소를 적출한 다음 estrogen 처치군 (이하 estrogen군이라 약함, 0.001/g) 그리고 시험군으로는 폐경기 개선식의 정상용량 급여군 (이하 FFR군이라 약함, 8.5 g/kg), 개선식의 과용량 급여군 (이하 FFO라 약함, 171.7 g/kg)과 대두배아 발효군 (이하 SEF군이라 약함, 26.73 g/kg) 으로 구성하였으며, 두 실험 모두 각 군당 공히 10마리씩 공시하였으며 실험은 모두 3개월 동안 실시하였다. 동물실의 환경은 온도(23 ± 2 °C), 상대습도(50 ± 5 %), 및 명암주기(07:00 점등 19:00 소등)가 조절되는 환경에서 사육하였고, 음수, 사료섭취량 및 분변 등의 채취를 위하여 전 시험기간 동안 clean rack을 사용하여 각각 1마리씩 사육하였다. 음수는 여과된 정제수를 자유섭취 시켰다. 본 연구에서의 모든 동물실험은 대전대학교 동물실험윤리위원회 (Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)의 승인 하에 동 위원회의 표준작업순서 (Standard Operation Procedures, SOP)에 따라 수행되었다.

나. 사료의 제조

식이의 조성은 (주)정·식품에서 제공받은 이소플라본 고함유 대두배아 발효물과 폐경기 개선식의 원료를 미국의 Dyets (Dyets, Inc. USA)에서 AIN-93M purified diet를 기본으로 하여 조제하였다 (Table 6-1,2).

Table 6-1. 이소플라본 고함유 대두배아 발효물 사료의 조성

Group Ingredient	Diet					
	Normal	Sham	OVX	SEE	SEF	BL
Casein	140	140	140	140	140	140
L-cystine	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8
Sucrose	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Corn starch	465.692	465.692	465.692	465.692	465.692	465.692
Dyetrose	155.0	155.0	155.0	155.0	155.0	155.0
Soybean oil	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0
t-Butylhydroquinone	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008
Cellulose	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0
Mineral mixture (#210050)	35.0	35.0	35.0	35.0	35.0	35.0
Vitamin mixture (#310025)	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Choline bitarte	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
SEE, SEF and BL	0	0	0	23.0	26.73	0.57
Total	1,000.0	1,000.0	1,000.0	1,000.0	1,000.0	1,000.0

다. 체중, 사료 및 음수섭취량의 측정

이소플라본 고함유 대두배아 발효물과 폐경기 개선식이 실험 모두 모든 동물에 대하여 시험물질 급여 개시 직전에 1회, 급여 이후에는 2주에 1회씩 3개월 동안 일정한 시간에 체중을 측정하였으며, 그리고, 부검 당일 체중을 측정하였다. 한편, 사육케이지 별로 2주에 1회씩 3개월간 사료와 음수소비량을 측정하여, 일일 평균사료섭취량 (g/animal/day)과 평균음수섭취량 (ml/animal/day)을 산출하였다.

라. 혈액학적 검사

부검전일 20~24시간 절식시킨 동물을 에테르 마취하에 복대정맥으로부터 전채혈하여 얻은 혈액의 일부를 EDTA tube (BD vacutainer, USA)에 응고되지 않게 잘 보관한 다음 3시간 이내에 적혈구수(red blood cells, RBC) 및 백혈구수(white blood cells, WBC)를 포함한 혈액학적인 검사를 자동혈액측정기 (Sysmax SE-9000, Sysmax Medical, Co., LTD., Japan)를 이용하여 측정하였다.

Table 6-2. 폐경기 개선식의 사료 조성

Group Ingredient	Diet						
	Normal	Sham	OVX	Estrogen	FFR	FFO	SEF
Casein	140	140	140	140	140	140	140
L-cystine	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8
Sucrose	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Corn starch	465.692	465.692	465.692	465.692	465.692	465.692	465.692
Dyetrose	155.0	155.0	155.0	155.0	155.0	155.0	155.0
Soybean oil	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0
t-Butylhydroquinone	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008
Cellulose	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0
Mineral mixture (#210050)	35.0	35.0	35.0	35.0	35.0	35.0	35.0
Vitamin mixture (#310025)	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Choline bitarte	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
SEE, F & Medical food	0	0	0	0.001	8.5	171.7	26.73
Total	1,000.0	1,000.0	1,000.0	1,000.0	1,000.0	1,000.0	1,000.0

마. 혈액생화학적 검사

혈액생화학적 검사는 부검전일 20~24시간 절식 시킨 동물을 에테르 마취하에, 복대정맥에서 전체혈해서 얻은 혈액을 혈청분리용 원심분리관 (SST-tube, BD vacutainer, USA)에 넣어 실온에 30분간 방치하여 응고시킨 다음, 원심분리 (3,000 rpm × 15 min)해서 얻은 혈청에 대해서 골 지표에 관련한 혈청생화학적 지표를 포함하여 alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST), total cholesterol, triglycerides를 포함한 생화학적 검사를 생화학 자동분석기 (Hitachi-7180, Hitachi Medical, Co., LTD. Japan)를 이용하여 측정하였으며, 모든 실험과정과 검사법은 진단검사의학적 가이드라인에 준하여 실험하였다.

바. 골밀도의 측정

이소플라본 고함유 대두배아 발효물과 폐경기 개선식이 두 실험에서 대퇴골의 골밀도 측정은 부검 시 골발을 실시한 다음 LUNAR사의 PIXIMUS™ Serise densitometer (GE LUNAR Corporate, USA)를 이용하여 골밀도 및 골함량과 골칼슘량을 각각 측정하였다.

사. 골조직의 칼슘과 인 분석

대퇴골에서의 칼슘의 함량은 대퇴골은 550~600℃ 회화로에서 24시간 정도 회화하여 얻은 회분을 6N HCl 용액으로 용해한 후 LaCl₂로 희석하여 원저흡광도계 (AAS, GBC HG3000, GBC Scientific Equipment Pty Ltd., Australia)로 칼슘의 함량을 측정하였다. 인의 함량은 골조직을 회화시켜 용해한 용액을 탈이온수로 희석하여 Fisk와 Subbarow 방법을 이용하여 비색법으로 측정하였다. 한편 요중에서의 무기물의 분석은 실험 종료 전주에 대사케이지를 이용하여 24시간 뇨를 채취한 다음 여과지와 원심분리를 이용하여 불순물을 제한 다음 일반 생화학적 분석법과 동인한 방법으로 실험하였다.

아. 혈중 호르몬과 골대사지표에 미치는 효과

골대사의 주요 지표인 혈청 중의 osteocalcin의 농도는 rat 전용 osteocalcin ELISA kit (Biomedical Technologies Inc., USA)를 이용하여 ELISA reader로 분석하였다. 골용해의 주요 지표인 혈청 중 콜라겐 가교 C-terminal telopeptide (CTX)의 농도는 RatL멘 ELISA kit (Nordicbioscience diagnostic)를 이용하여 측정하였다.

자. 조직생화학적 분석

Bansal 등 (1983)의 방법에 따라 적출한 랫드의 간을 잘게 썰고 150 mM KCl을 함유한 30 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)으로 5배 희석하여 균질화한 다음 700 g로 20분간 원심 분리하여 상등액을 얻었다. 그 상등액을 11,000 g로 30분간 고속원심 분리하여 pellet을 제거하였다. 그 상등액을 다시 105,000 g로 60분간 초원심분리하여 세포질 분획을 얻었으며, pellet은 130 mM KCl 함유 Hepes 완충액으로 씻어낸 다음 같은 완충액으로 재균질하여 마이크로솜 분획을 얻었다. 마이크로솜과 세포질 분획을 분리하는 전 과정은 0~4°C의 저온실에서 수행하였으며, 조제한 분획을 -70°C에 보관하면서 superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST), glutathione (GSH) 및 MDA의 실험에 각각 사용하였다. 단백질 정량은 Bovine serum albumin (BSA)을 표준물질로 사용하여 Lowry 등 (1951)의 방법에 따라 측정하였다. 한편 간 조직의 superoxide dismutase의 활성도는 Cropo 등의 방법, Catalase의 활성도는 Aebi의 방법, glutathione-S-transferase의 활성도는 Habig 등의 방법, glutathione의 함량은 Uchiyama 등의 방법과 Ellman 등의 방법에 따라 측정하였으며, MDA의 함량은 Suematsu 등 (1977)의 방법에 따라 시험관에 20% acetic acid 1.5ml, 8.1% SDS 0.225ml, 증류수 0.075ml, 1.2% TBA 용액 1ml, 그리고 간의 균질액, cytosol, 혹은 microsome을 각각 넣었다. 반응액은 100°C/30분 가열 후 원심분리 (3,000rpm, 10min)하여 상등액에 대하여 532nm에서 흡광도를 측정하였으며 검량선은 malondialdehyde (MDA)를 사용하여 환산하였다. 또한 microsomal membrane의 지질과산화도를 비교하기 위하여 NADPH 0.1mM과 ADP-Fe²⁺(ADP 0.5mM, Fe²⁺ 0.02mM)을 첨가하고 시험관에 microsome을 넣은 후 각각 37°C에서 0, 5, 10, 30 60분 반응 시켜 위와 동일한 방법으로 MDA함량 변화를 측정하였다. 모든 시험항목에 대해서는 3번을 공히 반복 측정하여 각각의 농도를 구하였다.

차. 조직학적 검사

적출한 간, 폐, 신장, 비장, 자궁에 대하여는 우선 육안으로 관찰하고 실험 목적에 따라 구분한 후, 일반조직의 경우 automatic tissue processor (Citable 2000)를 이용하여 탈수, 투명, paraffin 침투 과정을 거친 다음, 포매, 삭정, 박절, 염색 및 봉입하였다. 반면 골조직의 경우 오른쪽 대퇴부의 골편을 절취하여 5% 질산 (HNO₃) 용액에서 2~3일간 탈회시킨 후 ethanol 계열로 탈수하고 통산적인 방법에 따라 파라핀에 포매하여 염색한 후 검경하였다. 즉 염색은 Hematoxylin-Eosine (H&E)염색을 탈 paraffin과 함수 과정을 거친 후 수세하고 5분간 hematoxylin 으로 염색한 다음 과염색된 부분은 흐르는 수돗물로 세척 후 1% HCl/70% A/C 용액에 3-5회 dipping 한 후 다시 흐르는 수돗물에 수세하였다. 검체는 1% 암모니아수에 5-10 dipping 함으로써 핵을 청화 하였다. 그 다음 5-10분 정도 충분히 수세

하여 핵이 청명한 청색이 되도록 하고 세포질 대조 염색으로 염색한 다음 15초간 과도한 eosine 여액을 흐르는 물로 세척하고 탈수 및 투명 과정을 거쳤다. 다음으로 봉입을 실시한 다음 검경하였다.

카. 통계처리

실험 결과는 PASW(version 19.0)을 이용하여 각 실험군마다 평균과 표준편차를 구하였고, One-way analysis of variance (ANOVA) t-test를 한 후 Duncan's multiple-range test에 의하여 각 실험군간의 유의차 검증을 확인하였다.

2. 결과 및 고찰

가. 체중변화에 미치는 영향

(1) 이소플라본 고함유 대두배아 발효물이 체중변화에 미치는 영향

체중에 미치는 효과에서는 정상대조군과 sham군에 비하여 난소절제군에서 유의하게 증가하였으며 ($p < 0.01$), 이러한 변화는 대두배아 발효물의 투여군과 발효미생물군에서 유의하게 증가하였으며, 대두배아투여군에서는 증가하는 경향은 보였으나 통계적인 유의성은 관찰되지 않았다 (그림. 1)

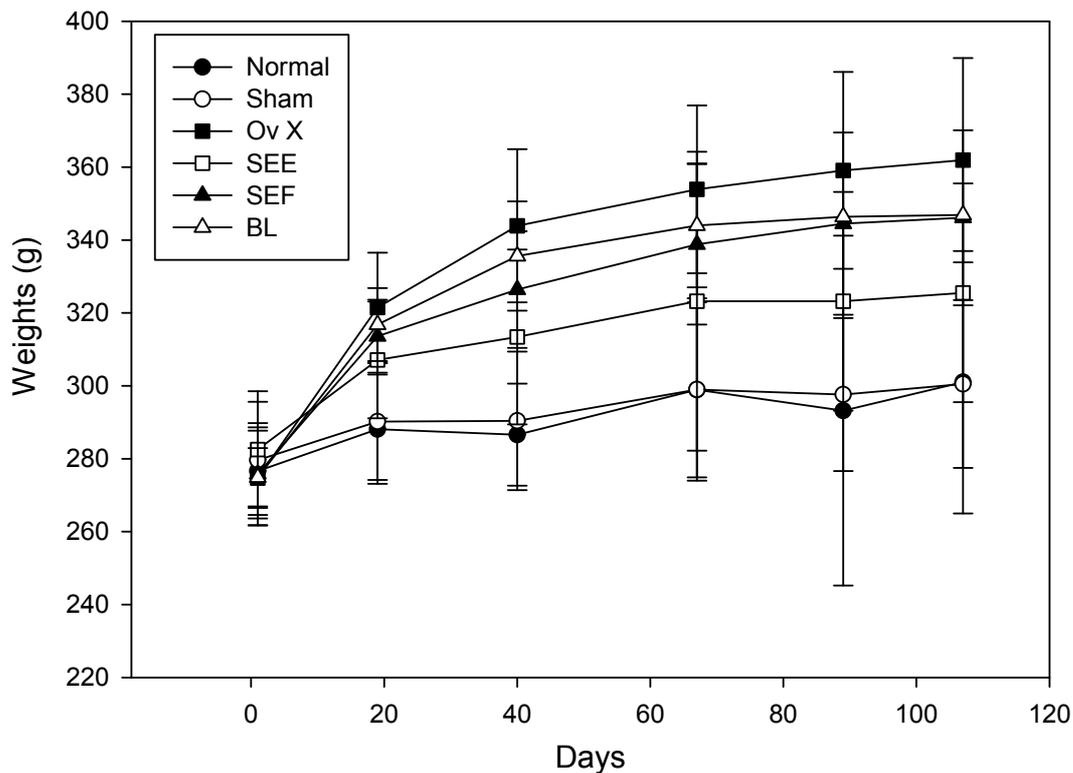


그림. 1 이소플라본 고함유 대두배아 발효물이 체중변화에 미치는 영향

(2) 이소플라본 고함유 폐경기 개선식이 체중변화에 미치는 영향

체중에 미치는 효과에서는 정상대조군과 sham군에 비하여 난소절제군을 포함한 시험군

에서 4개월째부터 정상대조군 대비 난소절제군을 포함하여 모든 시험군에서 유의하게 증가하였으며, 이러한 변화는 개선식이의 정상용량과 과용량 투여군 그리고 대두배아발효물의 투여군의 순으로 유의한 증가를 보였다 ($p < 0.01$). 체중의 증가현상은 개선식을 포함한 대두배아발효물의 투여군에서 뚜렷한 증가를 보였다 (그림. 2). 체중의 측정은 동물의 건강상태를 알려주는 가장 중요한 지표 중의 하나이다. 또한 각종 실험에서 시험물질의량을 결정할 때 중요한 인자이기도 하다. 따라서 본 실험에서 이소플라본 고함유 대두배아발효물과 폐경기 개선식이의 체중에 미치는 효과에서 두 실험 모두에서의 난소절제로 인한 체중의 유의한 변화는 관찰되지 않아 두 시험물질의 급여가 정상적인 성장 등에 영향을 미치지 않는 것으로 생각된다고 하겠다.

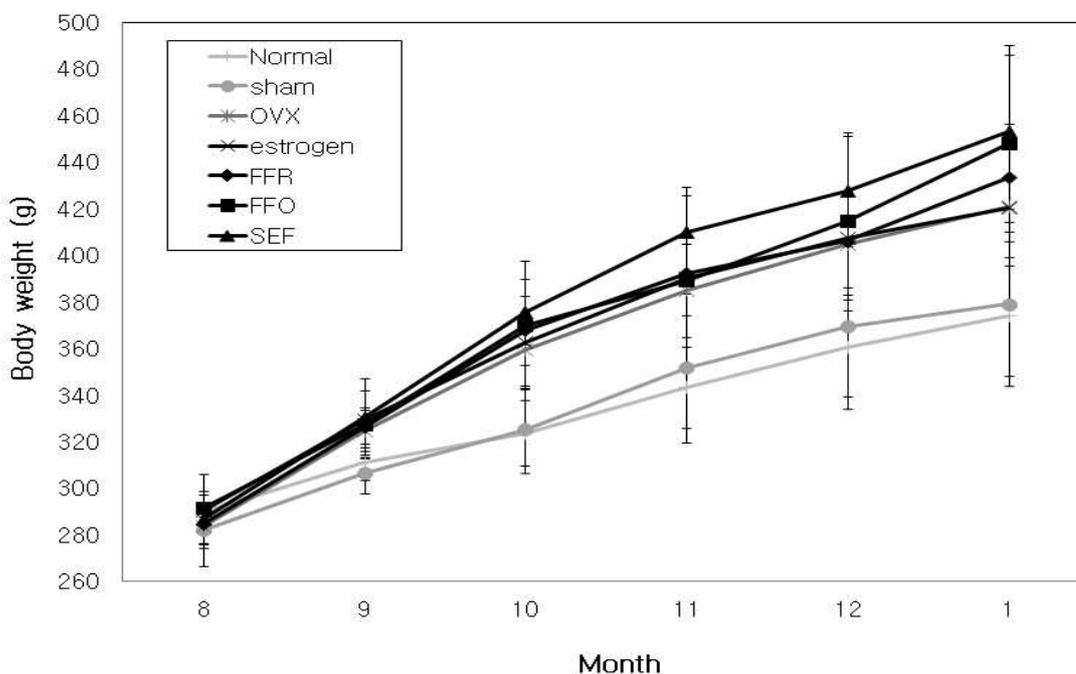


그림. 2 이소플라본 고함유 폐경기 개선식이 체중변화에 미치는 효과

나. 음수 및 사료변화에 미치는 영향

(1) 이소플라본 고함유 대두배아 발효물이 음수 및 사료섭취에 미치는 영향

사료섭취와 음수식이 섭취에 미치는 영향에서는 정상대조군을 포함하여 sham군을 포함하여 난소절제군 그리고 모든 시험물질인 대두배아 발효물을 포함한 시험물질 급여군 모두에서 특이한 변화는 관찰되지 않았다. 일부 주차에서 약간의 변동을 보이나 이는 정상적 생리적 범위에서의 변화로 유의한 변화로 보기는 어렵다고 생각된다 (data not shown).

(2) 이소플라본 고함유 폐경기 개선식이 체중변화에 미치는 영향

폐경기 개선식이에서도 이소플라본 고함유 대두배아발효물에서와 같이 사료섭취와 음수식이 섭취에 미치는 영향에서는 정상대조군을 포함하여 sham군을 포함하여 난소절제군 그리고 모든 시험물질의 투여군 모두에서 특이한 변화는 관찰되지 않았다. 일부 주차에서 약간의 변동을 보이나 이는 정상적 생리적 범위에서의 변화로 유의한 변화로 보기는 어렵다고

생각된다 (그림. 3, 4). 사료 및 음수량의 측정은 동물의 상태를 아는 가장 중요한 지표로 이는 체중과 같이 매우 유의한 지표이다. 외견으로는 정상으로 보이더라도 실험동물의 체내에 이상이 있을 때 일반적으로 식욕이 감퇴되며, 사료 및 음수섭취량의 감소가 관찰되기도 하다. 통상적으로 사료 및 음수섭취량은 거의 평행한 증감을 나타내는 경향이 일반적이다. 따라서 본 두 실험 모두 음수와 사료섭취량에 미치는 영향에서 시험물질에 대한 영향을 받지 않아 이는 아무런 영향을 받지 않아 이는 체중의 결과를 뒷받침한다고 하겠다.

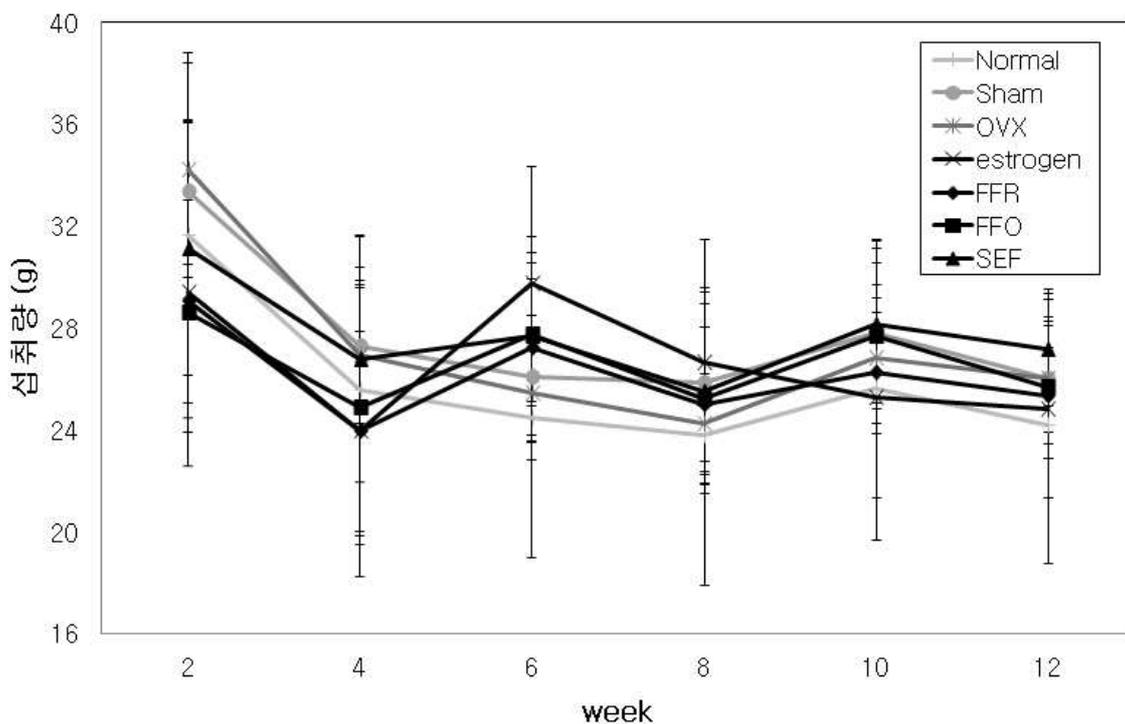


그림. 3 대두배아발효물이 사료변화에 미치는 효과

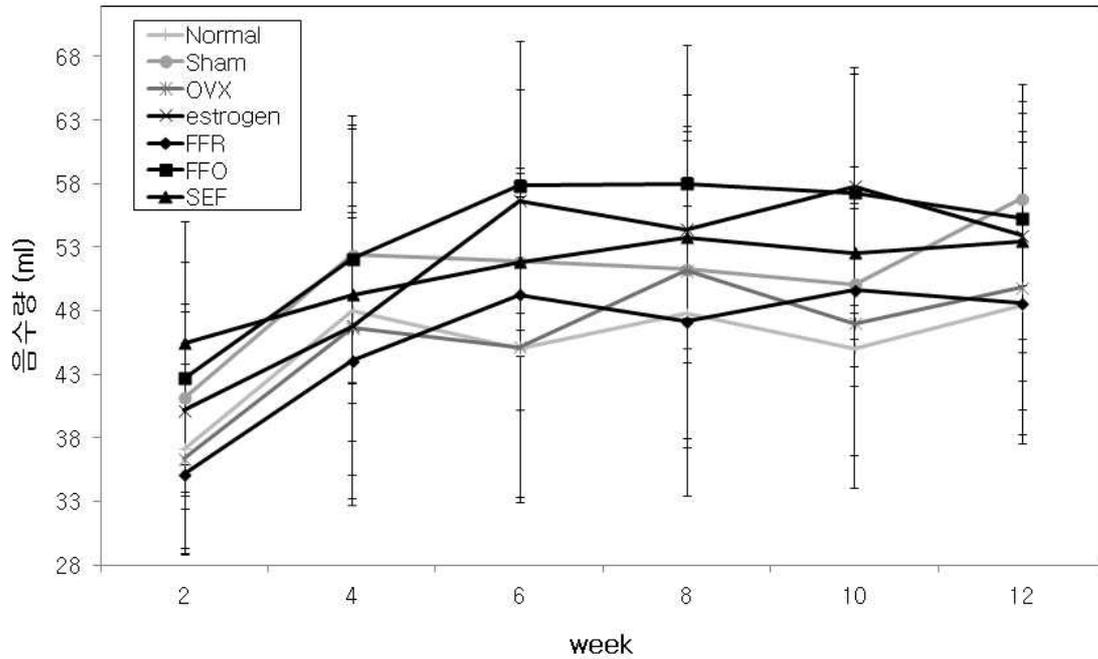


그림. 4 대두배아발효물이 음수변화에 미치는 효과

다. 장기변화에 미치는 영향

(1) 이소플라본 고함유 대두배아 발효물이 장기변화에 미치는 영향

절대 장기의 무게에 미치는 영향에서는 간, 비장, 신장에서는 유의한 변화가 관찰되지 않은 반면 부신에서는 난소절제군 대비 sham군에서 유의하게 증가하였다. 한편 자궁에서는 정상군과 sham군 대비 난소절제를 시행한 모든 군에서 유의하게 감소하였으며, 난소절제군 대비 정상군과 sham군에서 유의하게 증가된 결과를 보였다. 시험물질 투여군에서는 대두배아투여군에서는 증가한 경향은 확실하게 보였으나 통계학적으로 유의성은 관찰되지 않았다. 그 외 시험군에서도 난소절제군 대비 증가하는 경향이 관찰되었다 (표. 2). 반면 상대 장기의 무게에 미치는 영향에서는 난소절제군에서 정상군 대비 신장을 포함한 모든 측정 장기에서 유의하게 감소하였고 이러한 결과들은 신장, 갑상선을 포함하여 뇌하수체에서도 일부 발견되었다. 반면 난소절제군 대비 유의하게 증가한 장기는 간, 비장, 신장 그리고 대퇴골의 대두배아의 투여군에서 유의하게 증가한 결과 ($p < 0.05$)를 보였다 (Table 6-3, 4).

Table 6-3. Absolute organ weights (g)

Item	Normal	Sham	OVX	SEE (23 g/kg)	SEF (30 g/kg)	BL (0.57 g/kg)
Liver	5.69±0.5	6.23±0.5	5.98±0.5	6.22±0.3	6.01±0.3	6.01±0.3
Spleen	0.53±0.1	0.57±0.1	0.59±0.1	0.61±0.1	0.58±0.1	0.58±0.1
Kidney	1.70±0.1	1.70±0.1	1.59±0.1	1.71±0.1	1.62±0.1	1.62±0.1
Adrenal	0.0584±0.007	0.0629±0.008#	0.0488±0.007	0.0547±0.013	0.0532±0.011	0.0529±0.007
Thyroid	0.1190±0.017	0.1135±0.019	0.1124±0.013	0.1199±0.022	0.1082±0.021	0.1125±0.023
Pituitary	0.0283±0.027	0.0149±0.003	0.0142±0.001	0.0154±0.004	0.0200±0.014	0.0134±0.002
Uterus	0.69±0.2#	1.01±0.5#	0.18±0.1*	0.48±0.3	0.28±0.2*	0.24±0.3*
Femur	1.89±0.1	1.97±0.1	1.92±0.1	1.90±0.1	1.86±0.1	1.91±0.1

*: Significantly different from normal, P<0.05

#: Significantly different from Ov X, P<0.05

Table 6-4. Relative organ weights (%)

Item	Normal	Sham	OVX	SEE (23 g/kg)	SEF (30 g/kg)	BL (0.57 g/kg)
Liver	2.05±0.2#	2.18±0.2#	1.72±0.1*	2.02±0.2#	1.82±0.2	1.82±0.2
Spleen	0.19±0.0	0.20±0.0#	0.17±0.0	0.20±0.0#	0.17±0.0	0.18±0.0
Kidney	0.60±0.1#	0.59±0.0#	0.46±0.0*	0.56±0.1#	0.49±0.0*	0.49±0.1*
Adrenal	0.0206±0.003#	0.0221±0.003#	0.0141±0.002*	0.0181±0.006	0.0163±0.005	0.0161±0.003
Thyroid	0.0419±0.007#	0.0396±0.006	0.0324±0.005*	0.0385±0.006	0.0330±0.008*	0.0339±0.007
Pituitary	0.0101±0.009	0.0051±0.001	0.0042±0.000	0.0047±0.001	0.0059±0.005	0.0040±0.001*
Uterus	0.24±0.1#	0.36±0.2#	0.05±0.0*	0.16±0.1	0.09±0.1*	0.08±0.1*
Femur	0.66±0.1#	0.68±0.0#	0.54±0.0*	0.62±0.1#	0.56±0.1*	0.58±0.0*

*: Significantly different from normal, P<0.05

#: Significantly different from Ov X, P<0.05

(2) 이소플라본 고탍유 폐경기 개선식이 장기무게에 미치는 영향

절대 장기의 무게에 미치는 영향에서 간장과 자궁의 무게의 경우는 정상대조군 대비 난소를 절제한 모든 시험동물인 즉, 난소절제군을 포함하여 모든 시험군에서 유의하게 감소하였다 (p<0.05~0.01). 이러한 현상은 신장의 경우는 난소절제군에서만 정상대조군에 비하여 감소하였다. 그 외 장기인 즉 비장, 부신, 흉선, 뇌하수체 등에서는 정상대조군 대비 시험물질 급여군에서 유의한 체중의 변화는 보이지 않았다. 이러한 현상은 대퇴골에 미치는 변화에서도 유의한 변화는 관찰되지 않았다 (Table 6-5). 반면 상대장기의 무게에 미치는 영향에서는 난소절제군에서 정상군 대비 신장을 포함한 모든 측정 장기에서 유의하게 감소하였고 이러한 결과들은 신장, 갑상선을 포함하여 뇌하수체에서도 일부 발견되었다. 반면 난소절제

군 대비 유의하게 증가한 장기는 간, 비장, 신장 그리고 대퇴골의 대부배아발효 투여군에서 유의하게 증가한 결과 ($p < 0.05$)를 보였다 (data not shown). 이러한 결과는 자궁을 포함하여 2차년도와 유사한 결과를 보였다.

Table 6-5. Absolute organ weights (g)

Item	Normal	Sham	OVX	Estrogen	SEE	SEF	FFR	FFO
Liver	10.08±2.09	9.41±2.95	7.23±0.93**	8.07±1.75*	6.22±0.3	8.19±1.05*	8.02±1.14*	7.45±0.61**
Spleen	0.56±0.07	0.61±0.11	0.56±0.08	0.57±0.11	0.61±0.1	0.56±0.10	0.59±0.05	0.61±0.08
Kidney	1.95±0.15	1.80±0.19	1.59±0.11*	1.61±0.13	1.71±0.1	1.60±0.09	1.62±0.11	1.66±0.13
Adrenal	0.0457±0.008	0.0599±0.007	0.0477±0.009	0.0555±0.011	0.0547±0.013	0.0542±0.009	0.0483±0.013	0.0464±0.008
Thyroid	0.1087±0.014	0.1237±0.011	0.1027±0.015	0.1238±0.014	0.1199±0.022	0.1134±0.011	0.1021±0.013	0.1029±0.017
Pituitary	0.0254±0.022	0.0154±0.009	0.0157±0.010	0.0236±0.015	0.0154±0.004	0.0213±0.016	0.0164±0.012	0.0184±0.008
Uterus	0.72±0.14	0.80±0.14	0.11±0.01**	0.14±0.01**	0.48±0.3	0.12±0.01**	0.13±0.03**	0.23±0.25**
Femur LT	1.06±0.08	1.01±0.11	1.04±0.05	1.10±0.07	1.07±0.1	1.03±0.09	0.96±0.05	1.02±0.07
Femur RT	1.03±0.13	1.03±0.06	1.04±0.12	1.04±0.09	1.10±0.1	1.02±0.10	0.95±0.07	1.01±0.07

*: Significantly different from normal, $P < 0.05$

#: Significantly different from Ov X, $P < 0.05$

라. 혈액학적 변화에 미치는 영향

(1) 이소플라본 고함유 대두배아 발효물이 혈액학적 변화에 미치는 영향

일반 혈액학적인 변화에 미치는 영향에서는 백혈구수, 적혈구수, 적혈구에 대한 백분율, 혈색소 함량 그리고 혈소판 수 등에 미치는 영향을 조사한 바 각 군에서 유의한 변화가 관찰되지 않았다(Table 6-6).

Table 6-6. 이소플라본 고함유 대두배아 발효물이 혈액학적 변화에 미치는 영향

Item	Normal	Sham	OVX	SEE (23 g/kg)	SEF (30 g/kg)	BL (0.57 g/kg)
WBC ($10^3/\mu\ell$)	5.51±1.62	6.66±1.94	5.74±2.03	6.86±2.69	6.64±2.18	7.76±2.17
RBC ($10^6/\mu\ell$)	7.36±0.49	7.40±0.29	7.52±0.23	7.53±0.27	7.65±0.30	7.85±0.22
HCT (%)	43.39±2.24	43.39±1.90	43.60±1.85	44.00±1.81	45.29±1.82	44.87±1.90
HGB (g/dl)	14.88±0.87	14.97±0.63	15.14±0.63	15.15±0.56	15.55±0.63	15.55±0.64
MCV (fl)	59.05±1.83	58.69±1.90	57.99±2.68	58.49±1.29	59.21±1.88	57.17±1.69
MCH (pg)	20.24±0.58	20.26±0.71	20.21±0.91	20.15±0.52	20.31±0.70	19.82±0.61
MCHC (g/dl)	34.29±0.47	34.47±0.15	34.85±0.48	34.51±0.63	34.33±0.28	34.66±0.44
Platelets ($10^3/\mu\ell$)	711.7±232.9	734.2±150.9	567.1±93.8	697.4±113.9	591.0±84.1	583.8±86.3

(2) 이소플라본 고함유 폐경기 개선식이 혈액학적 변화에 미치는 영향

일반 혈액학적인 변화에 미치는 영향에서는 백혈구의 경우 정상대조군과 난소절제군 대비 대두배아발효균에서 유의하게 증가하는 것으로 관찰되었고 적혈구계통에서는 적혈구 백분율과 혈색소에서 정상대조군 대비 난소절제군에서 유의하게 증가하였으나 이러한 현상은 적혈구 백분율은 대두배아발효균에서만 혈색소의 경우는 모든 난소절제군에서 유의하게 증가하는 것으로 관찰되었다. 이러한 현상은 혈소판수에서 더욱 뚜렷하게 관찰되었다 ($p < 0.05 \sim 0.01$). 실험동물의 혈액학적 검사는 사람에서와 마찬가지로 매우 중요한 생체 정보와 질환 그리고 장기의 기능정보를 얻을 수 있는 지표로 활용되고 있다. 가장 일반적이면서도 중요한 정보를 제공하고 있다. 이에 반하여 2차년도 결과에서는 일반 혈액학적 변화 즉 백혈구계를 포함하여 적혈구 및 혈소판계에도 유의한 변화를 보이지 않은 것에 반하여 본 개선식에 미치는 혈액학적 변화에서는 백혈구, 적혈구를 포함하여 혈소판 모두 증가하는 경향을 보여 본 실험결과로 볼 때 난소절제 이후에 골수에서의 조혈기능의 촉진으로 백혈구를 포함한 적혈구의 증가도 매우 의미 있는 결과로 해석된다. 특히 혈소판수의 증가는 설치류에 있어 가끔은 거대혈소판을 동반할 수 있으나 혈소판 증식 촉진 인자인 thrombopoietin (TPO)와 다른 여러 가지 성장인자에 의해 증가될 수 있다고 생각된다. 본 연구결과에서는 이소플라본 고함유 폐경기 개선식이 혈소판의 증식 촉진인자를 자극한 결과로 생각된다. 향후 이에 대한 추가적인 연구가 필요하다고 사료된다(Table 6-7).

Table 6-7. 이소플라본 고함유 폐경기 개선식이 혈액학적 변화에 미치는 영향

Item	Normal	Sham	OVX	Estrogen (/kg)	FFR (8.5 g/kg)	FFO (171.7g/kg)	SEF (26.73g/kg)
WBC (10 ³ /μℓ)	4.3±1.2	3.5±1.5	5.9±2.1	4.9±1.6	5.4±2.5	4.9±1.1	6.9±1.9**,#
RBC (10 ⁶ /μℓ)	6.9±0.5	6.8±0.5	7.7±0.5	7.4±0.4	7.5±0.6	6.9±1.3	7.9±0.3
HCT (%)	36.1±2.5	37.9±1.7	41.5±2.1*	39.5±1.9	39.4±2.2	38.6±3.4	42.1±1.3*
HGB (g/dℓ)	11.7±3.3	13.1±0.5	14.1±0.8**	13.6±0.6*	13.7±0.8*	13.2±1.2*	14.2±0.4**
MCV (fl)	52.8±2.3	55.7±2.8	54.3±1.9	53.3±2.2	52.8±2.1	57.1±7.9	53.4±1.6
MCH (pg)	18.4±0.7	19.3±1.0	18.4±0.6	18.4±0.9	18.3±0.7	19.5±2.5	18.0±0.5
MCHC (g/dℓ)	34.9±0.5	34.6±0.3	34.0±0.1	34.6±0.7	34.7±0.5	34.2±0.4	33.7±0.5
Platelets (10 ³ /μℓ)	669.4±389.9	858.6±366.2**	857.1±58.5**	941.4±143.7**	848.1±398.3**	976.4±476.6**	995.0±138.9**

*, **: Significantly different from normal, P<0.05~0.01

#: Significantly different from Ov X, P<0.05

마. 임상화학적 변화에 미치는 영향

(1) 이소플라본 고함유 대두배아 발효물이 신장 및 무기물의 변화에 미치는 영향

신장은 매우 복잡한 기관이지만 그 구조적 특성과 수행되는 다양한 기능은 생체의 기본적인 상태 유지를 위하여 매우 정확히 기능을 수행해야 한다. 신장은 단백질 분해산물의 최종 대사산물인 요소의 제거와 크레아티닌 그리고 요산 등을 제거하는 중요한 기능과 체내의 항상성을 유지하는 중요한 역할을 담당하고 있다. 체내의 산, 염기의 평형 및 염도와 수분의 평형은 신자의 여과, 재흡수 배설의 과정을 통해서 관리된다. 신장에서의 가장 중요한 질환은 지표는 근위세뇨관의 손상을 볼 수 있는데 그 이유는 신장으로부터 혈액의 공급량이 많기 때문에 이로 인해 독성물질이 운반될 가능성이 크다. 또한 신장은 외부 물질의 제거 뿐만 아니라 재흡수하는 기능도 가지고 있다. 마지막으로 무해한 물질을 반응성 있는 대사물질로 변화시킬 수 있는 혼합기능 있다는 것이다. 이러한 여러 가지 이유로 신장기능의 주요 지표로 혈액에서는 혈중 요소질소와 크레아티닌은 필수적인 검사로 애용되고 있다.

뼈는 골격의 80%를 구성하는 겉질뼈 (cortical bone)와 20%를 차지하는 해면뼈 (trabecular bone)로 이루어져 있고 해면뼈가 대사적으로 활동적이다. 뼈의 2/3는 무기질로 수산화인석 결정체와 무형의 칼슘염으로 구성되며 나머지 1/3은 기질로 이중 90%가 제1형의 콜라겐이다. 성인의 골격에서는 새로운 뼈가 오래된 뼈를 대체하는 골재형성 (bone remodeling) 과정이 끊임없이 반복된다. 골의 재형성과정은 파골세포 활성화, 반전기, 조골세포에 의한 골형성기, 휴식기로 구분되며 평균 4~6개월을 주기로 하고 개인차마다 차이가 있다. 골의 성장과 교체에 영향을 미치는 것은 칼슘, 인, 마그네슘 그리고 부갑상선호르몬 등이며 이 호르몬들이 영향을 미치는 주된 기관은 뼈, 신장, 소장이다. 이 외에도 다양한 지표들이 이용되고 있다. 본 결과에서는 뼈의 주성분을 이루는 무기물과 생화학적 지표 등을 통하여 난소절제 모델에서 폐경기 개선식이 가 어떠한 영향을 미치는지 보고자 하였다.

주요 생화학적 지표에서 calcium과 phosphorus에서는 정상군과 sham군과의 비교에서 난소절제군에서는 유의하게 감소한 반면 정상군을 포함한 시험물질 특히 대두배아투여군에서는 유의하게 칼슘과 인의 흡수를 유의하게 억제하였다. 이러한 결과들은 난소절제로 인하여 혈중에서 무기물질의 소실이 일어난 것으로 이는 대퇴골에서의 결과와 요중에서의 결과들을 뒷받침한다고 하겠다. 총단백과 알부민의 결과에서는 난소절제군에서 정상군과의 비교에서 유의하게 감소한 반면 총단백의 경우 정상군을 포함한 배아발효물 투여군과 발효미생물군에서 증가한 결과를 알부민에서는 정상군과 모든 시험물질 투여군에서 유의하게 증가한 결과를 보였다. 이러한 결과들은 시험물질인 대두 단백질에 의한 결과들로 다른 선행연구결과들과도 일치한다고 하겠다. 한편 신장의 주요 지표로 활용되는 creatinine과 BUN의 지표에서는 모든 시험군에서 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

Table 6-8. 이소플라본 고함유 대두배아 발효물이 신장 및 무기물의 변화에 미치는 영향

Item	Normal	Sham	OVX	SEE (23 g/kg)	SEF (30 g/kg)	BL (0.57 g/kg)
CA (mg/dl)	11.22±0.34#	11.07±0.28#	10.61±0.19*	10.20±0.29*#	10.10±0.15*#	10.41±0.12*
IP (mg/dl)	4.5±0.5#	4.6±0.5#	3.6±0.3*	4.5±0.2#	4.2±0.2	3.9±0.3
Mg (mg/dl)	4.1±0.4	4.1±0.4	4.4±0.5	4.3±0.3	4.2±0.2	4.3±0.5
BUN (mg/dl)	19.90±2.63	20.10±3.12	17.20±2.66	18.68±1.54	18.52±1.37	17.49±1.39
Creatinine (mg/dl)	0.79±0.06	0.80±0.04	0.79±0.05	0.83±0.06	0.86±0.05	0.82±0.09

*, **: Significantly different from normal, P<0.05~0.01

(2) 이소플라본 고함유 폐경기 개선식이 신장 및 무기물의 변화에 미치는 영향

주요 생화학적 지표에서 calcium과 phosphorus에서는 정상군과 sham군과의 비교에서 난소절제군을 포함하여 시험물질 투여군 모두에서도 그 어떤 변화도 관찰되지 않았다. 혈중 뇨소질소의 경우 sham군을 포함하여 난소절제군 모두에서 유의하게 감소되었다. 이러한 현상은 creatinine에서도 같은 결과를 보 보였다(Table 6-9). 이에 반하여 2차년도 연구결과와는 상호 다른 결과를 보였다. 즉 대두배아와 발효물 등의 투여군에서는 칼슘과 무기인 등의 감소가 보인 반면 혈중의 뇨소질소와 크레아티닌의 결과와는 반대의 결과를 보였다.

Table 6-9. 대두배아발효물이 신장기능 및 무기물대사 변화에 미치는 효과

Item	Normal	Sham	OVX	Estrogen (/kg)	FFR (8.5 g/kg)	FFO (171.7g/kg)	SEF (26.73g/kg)
CA (mg/dl)	8.6±1.3	9.0±0.3	8.5±0.3	8.6±0.5	8.6±0.2	8.5±0.2	8.6±0.4
IP (mg/dl)	3.5±0.3	4.0±0.6	4.7±0.5	4.6±0.4	4.2±0.6	4.0±0.2	4.4±0.4
Mg (mg/dl)	4.5±0.6	4.3±0.5	4.1±0.8	4.7±0.2	4.2±0.5	3.9±0.4	4.6±0.5
BUN (mg/dl)	18.6±3.2	16.6±3.3	15.8±1.5**	12.8±4.4**	12.5±2.7**	13.1±2.7**	15.7±2.6**
Creatinine (mg/dl)	0.7±0.1	0.6±0.1	0.7±0.1	0.5±0.1*	0.6±0.1	0.5±0.2*	0.7±0.1

*, **: Significantly different from normal, P<0.05~0.01

(3) 이소플라본 고함유 대두배아 발효물이 당 및 지질대사 변화에 미치는 영향

혈중 콜레스테롤 조절은 여러 가지 방법으로 이루어지지만 그 중에서도 간세포에서 이루어지는 콜레스테롤 생합성의 억제가 가장 중요한 요소 중 하나이다. 콜레스테롤은 acetic acid로부터 20여 단계를 거쳐 합성되며 그 반응의 속도제한 단계는 HMG-CoA가 HMG-CoA reductase에 의해서 mevalonic acid로 되는 과정이다. 콜레스테롤은 이 단계에

서 negative feedback으로 조절되고 있다. 고지질혈증은 동맥경화증의 지표로서 생체 내 혈 중 콜레스테롤 농도의 조절기전에 장애가 있을 때 즉, 소장에서 중성지질의 합성 및 chylomicron의 분비 증가, 간에서 중성지방의 합성 증가, VLDL 및 LDL의 합성 및 분비 증가, HDL의 합성 감소, 그리고 lipase의 활성 감소로 인한 말초조직에서의 중성지방의 제거 기능 저하 등에 의해 발생한다. 한편 본 연구에서 지질 관련 지표에서는 총 콜레스테롤, 저밀도 콜레스테롤 그리고 중성지질에 있어서 난소절제군에 비하여 유의하게 증가한 결과가 관찰되었다. 반면 시험물질 투여군에서는 총 콜레스테롤과 고밀도 콜레스테롤에서 대두배아발효물 투여군과 미생물처리군에서 유의하게 감소한 결과를 보였고 그 외의 지표에서도 난소절제군 대비 시험물질 처리군에서 억제되는 경향은 보이나 통계적 유의성은 나타나지 않았다(Table 6-10).

Table 6-10. 이소플라본 고함유 폐경기 개선식이 당 및 지질대사 변화에 미치는 영향

Item	Normal	Sham	OVX	SEE (23 g/kg)	SEF (30 g/kg)	BL (0.57 g/kg)
Glucose (mg/dl)	107.00±10.18#	117.80±23.59	134.30±25.21*	112.40±8.34#	109.70±10.85#	112.10±11.13#
T.Cho (mg/dl)	127.10±24.02#	118.60±16.04#	152.40±20.60*	143.50±10.23	122.30±4.45#	119.60±11.68#
TG (mg/dl)	123.61±41.52	116.37±29.20	164.92±55.76	116.70±32.56	123.77±32.11	121.94±31.60
HDL (mg/dl)	83.86±14.86	82.07±10.35	89.13±9.53	77.06±10.45	65.42±8.39**	66.25±12.10**
LDL (mg/dl)	28.20±7.15#	25.00±5.72#	40.30±8.63*	38.70±12.11	37.50±7.04	35.30±6.02

*, **: Significantly different from normal, P<0.05~0.01

#: Significantly different from Ov X, P<0.05

(4) 이소플라본 고함유 폐경기 개선식이 당 및 지질대사 변화에 미치는 영향

한편 혈당과 지질 관련 지표에서는 혈당의 경우 난소절제군에서 정상대조군 대비 유의하게 증가하였다. 이는 시험군에서는 개선식이의 급여군에서도 모두 증가 하였으나 정상 용량군에서만 난소절제군에서와 같이 유의하게 증가 (p<0.05)하였고, 과용량 급여군에서는 증가하는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 관찰되지 않았다. 반면 대두배아 발효군에서는 난소절제로 인하여 증가된 혈당을 반대로 유의하게 억제하는 경향을 보여 2차 시험에서의 결과와 재현성 있는 결과를 보여 대두배아 발효가 혈당을 유의하게 억제하는 것으로 관찰되었다 (p<0.05). 총 콜레스테롤은 정상대조군을 포함하여 난소절제군 모두에서 유의한 변화는 관찰되지 않은 반면 중성지방과 저지방 콜레스테롤 모두에서 오히려 난소절제군 모두에서 유의하게 억제되는 현상이 관찰되었다 (p<0.05~0.01). 본 실험에서 총 콜레스테롤을 포함하여 중성지방과 저지방 콜레스테롤 모두에서는 2차 실험에서 모두 2차 실험에서의 결과와는 매우 낮게 측정되었다. 이러한 결과는 현재로서 납득하기 어려우나 일반적으로는 제한식이 등에서 관찰될 수 있는 결과로 어떤 결론을 내리기가 어렵다고 판단된다(Table 6-11).

Table 6-11. 이소플라본 고탍유 폐경기 개선식이 당 및 지질대사 변화에 미치는 영향

Item	Normal	Sham	OVX	Estrogen (/kg)	FFR (8.5 g/kg)	FFO (171.7g/kg)	SEF (26.73g/kg)
Glucose (mg/dℓ)	112.7±10.0	125.0±11.4	132.2±9.7*	116.7±7.0*	135.1±8.8*	121.8±7.6	110.1±11.7#
T.Cho (mg/dℓ)	96.8±5.4	95.9±8.7	89.1±2.8	108.6±6.3	96.8±8.6	86.8±7.4	92.3±7.3
TG (mg/dℓ)	97.1±3.8	118.1±6.4	54.6±9.9**	56.1±8.1**	62.1±9.9**	70.0±9.3*	62.8±1.7**
HDL (mg/dℓ)	27.6±1.0	25.7±2.9	24.0±1.1	26.3±1.4	28.6±1.0	25.6±3.0	25.5±3.2
LDL (mg/dℓ)	21.9±2.0	16.9±1.1*	17.8±1.2*	20.2±0.3#	15.9±1.3**	14.8±1.8**	17.7±1.7*

*, **: Significantly different from normal, P<0.05~0.01

#: Significantly different from Ov X, P<0.05

(5) 이소플라본 고탍유 대두배아 발효물이 간 기능지표에 미치는 영향

AST와 ALT는 간세포의 손상을 반영하는 중요한 효소로서 가장 기본적인 간기능 검사의 중요한 항목이다. 두 효소는 모두 보조인자로서 인산피리독살 (비타민 B6)을 필요로 한다. ALT를 엘르 들면 알라닌은 인산피리독살과 반응하여 피르부산염과 피리독신을 생성한다. 그뒤 피리독신은 알파케토글루타레이트와 반응하여 글루탄산염과 인산피리독살을 재생한다. AST와 ALT의 반감기는 각각 17시간과 47시간이며, ALT는 모두 사립체 밖에 존재하는데 반해 AST는 사립체의 밖과 안에 모두 존재한다. 사립체성 AST의 반감기는 87시간이다. AST는 심장, 근육, 혈구 등을 포함하여 체내 대부분에 존재하는데 반해 ALT는 주로 간에만 존재하며, 신장에도 상당량이 존재한다. 일반적으로 실험에서의 이 두 지표의 해석은 AST는 혈장에서 7,000배, ALT는 약 3,000배 정도로 많이 존재한다. 본 실험에서와 같이 비알콜성 실험일 경우 AST와 ALT를 해석함에 있어 ALT가 더 특이적이기는 하나 AST 또한 중요한 지표로 해석되고 있다. 그 이유는 AST가 간장을 포함한 신체의 여러 장기에 널리 분포되어 있음으로 일반적인 동물실험에서는 모두 효과적이라고 할 수 있겠다.

간기능의 주요 지표인 AST와 ALT의 지표에서는 난소절제군에서 유의하게 증가한 반면 AST에서는 정상군을 포함한 다른 시험물질 투여군에서는 정상적으로 회복되었다. 그러나 ALT에서는 정상군과의 비교에서 억제되는 경향은 보이나 통계적으로 유의성은 관찰되지 않았다(Table 6-12). 이러한 결과들은 대두배아 또는 발효물들이 난소절제로 인한 저하된 간의 기능을 정상적으로 회복시켜 주는 데에 있어 중요하게 작용하고 있음을 시사한다고 하겠다.

Table 6-12. 대두배아발효물이 간 기능 변화에 미치는 효과

Item	Normal	Sham	OVX	SEE (23 g/kg)	SEF (30 g/kg)	BL (0.57 g/kg)
TP (mg/dℓ)	8.36±0.48#	8.40±0.31#	7.58±0.33*	7.80±0.26*	8.05±0.12#	7.99±0.15#
ALB (mg/dℓ)	4.11±0.25#	4.17±0.22#	3.59±0.13*	4.60±0.48*#	5.07±0.08*#	5.033±0.15*#
ALP (IU/L)	49.30±13.12#	43.10±6.14#	68.50±16.97*	57.40±10.69	64.80±17.60	55.80±10.43
AST (IU/L)	89.40±19.27#	86.50±10.81#	125.60±35.26*	88.90±15.79#	75.00±10.52#	79.80±15.14#
ALT (IU/L)	37.70±8.23#	31.00±5.03#	51.40±10.35*	48.50±3.60*	46.50±5.46	48.20±6.11*
GGT (IU/L)	6.9±0.5	7.4±0.6	7.1±0.4	6.5±0.8	7.5±0.6	7.3±0.8

*, **: Significantly different from normal, P<0.05~0.01

##: Significantly different from Ov X, P<0.01

(6) 이소플라본 고탍유 폐경기 개선식이 간 기능지표에 미치는 영향

간 기능지표에서는 총 단백질과 알부민의 경우 정상대조군 대비 난소절제군 모두에서 감소하는 경향을 보였다. 특히 총 단백질의 경우는 통계적 유의성이 관찰되지 않은 반면 알부민의 경우 유의하게 감소하는 것으로 관찰되었다 (p<0.05). ALP의 활성 농도는 정상대조군 대비 난소절제군 모두에서 유의하게 증가하였다. 그러나 시험군 모두에서 억제되는 현상은 관찰되지 않았다. ALP는 골형성 활동의 중요한 지표가 되는 것으로 골아세포에 존재하며, 골신생이 활발하게 진행될 때 혈 중 농도가 증가하게 되는데, 폐경 후, 골다공증, 골절 환자와 성장기 초기 그리고 Ca 결핍 시 증가한다는 보고가 있다. 다른 선행연구결과에서는 Sprague-Dawley계 암컷 흰쥐를 대상으로 난소절제군이 개복수술만을 시행한 군에 비해 ALP 농도가 높게 나타난 것으로 보고하였다. 그 이유는 난소절제로 인하여 bone turnover가 증가되었기 때문으로 해석되고 있다. 본 연구에서도 정상군에 비하여 난소절제군의 혈청 ALP의 농도가 증가하였고, 본 시험의 개선 식이에서도 ALP의 증가가 일부 억제되는 경향을 나타내었지만 유의성이 관찰되지 않은 반면 estrogen의 투여에 의해 ALP의 농도가 유의하게 감소하여 상기의 연구결과를 뒷받침한다고 하겠다. 한편 간 기능의 주요 지표인 AST/ALT의 변화에서는 정상대조군 대비 난소절제로 인하여 간 기능의 저하가 유의하게 관찰되었다. 에스트로겐 주사군에서는 오히려 유의하게 증가하는 결과를 보였다. 이는 다른 선행연구결과에서도 일부 간 기능이 저하되는 것으로 관찰되어 본 연구의 결과를 뒷받침한다고 하겠다. AST의 시험물질인 개선식이의 경우 모두 유의하게 억제되었다. 이러한 결과는 대두배아 발효물의 급여에서도 같은 결과를 보였다. 한편 ALT의 변화에서는 개선식이의 과용량 급여군에서만 유의하게 억제되는 것으로 관찰되었다. 상기와 같은 결과는 2차 연구의 결과인 난소절제 모델에서 대두배아, 대두배아 발효물의 결과에서와 같은 결과를 보였다 (Table 6-13). 따라서 현재의 결과로 볼 때 이러한 결과들은 대두배아 또는 발효물들이 난소절제로 인한 저하된 간의 기능을 정상적으로 회복시켜 주는 데에 있어 중요하게 작용하고 있음과 같이 본 연구인 폐경기 개선식이에서도 간기능을 현저하게 개선시켜 주는 것을

시사한다고 하겠다. 좀더 정확한 기전 연구를 위해서는 향후 간 손상 모델을 통하여 추후 연구가 필요할 것으로 생각된다.

Table 6-13. 이소플라본 고함유 폐경기 개선식이 간 기능지표에 미치는 영향

Item	Normal	Sham	OVX	Estrogen (/kg)	FFR (8.5 g/kg)	FFO (171.7g/kg)	SEF (26.73g/kg)
TP (mg/dℓ)	5.0±0.4	5.0±0.1	4.3±0.2	4.4±0.3	4.3±0.2	4.3±0.3	4.5±0.2
ALB (mg/dℓ)	3.2±0.2	3.3±0.2	2.6±0.1*	2.7±0.2*	2.6±0.1*	2.7±0.3*	2.7±0.1*
ALP (IU/L)	50±3.3	42.4±5.1	96.3±8.4**	75.4±12.1*,#	120.7±15.7**	84.1±11.5**	111.7±9.6**
AST (IU/L)	104.5±10.3	111.7±7.0	179.8±9.1**	241.0±19.3**.,##	117.2±6.0##	127.1±5.3##	121.0±3.5##
ALT (IU/L)	35.9±2.6	31.4±9.7	56.0±3.2**	94.2±8.3**	45.4±1.7	28.8±6.3	48.4±3.2
GGT (IU/L)	7.7±1.0	8.6±0.7	6.9±0.1	8.5±1.0	6.89±1.1	6.9±0.5	5.4±1.1

*, **: Significantly different from normal, P<0.05~0.01

##: Significantly different from Ov X, P<0.01

마. 개선식이 골밀도 및 관련 지표에 미치는 영향

(1) 골밀도의 변화에 미치는 효과

(가) 이소플라본 고함유 대두배아 발효물이 골밀도에 미치는 영향

난소를 절제한 흰쥐에 배아추출물, 배아발효추출물, 발효균을 12주간 매일 투여하면서 각 군의 대퇴골에서 골밀도를 측정하여 그림. 2에 나타내었다. 그 결과 정상군에 비해 OVX군, SEE군, SEF군, BL군의 골밀도 값이 유의하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 반면에 Sham군과 SEE군의 골밀도 값이 OVX군에 비하여 유의하게 증가하는 것을 알 수 있었다 (그림. 5). Tsuchida 등(1999)은 일본에서 중년과 폐경 후 여성의 대두 섭취량이 골밀도와 유의적인 양의 상관관계를 보였다고 보고하였고, 한국에서도 대두 섭취가 폐경 후 골다공증 여성의 골밀도를 증가시키며, 골용해를 낮추는 등 골밀도와 골대사에 긍정적인 영향을 주고 있는 것으로 보고되고 있다. 본 연구의 SEE, SEF, BL군에서 골밀도가 향상되는 경향을 나타내었고, 특히 대두배아 추출물을 투여한 SEE군에서 유의한 증가를 보였는데, 이는 대두배아 추출물이 난소절제에 따른 골소실을 막아줌으로써 폐경기 여성들에게서 빈번하게 발생하는 골다공증 예방에 효과적인 물질인 것으로 사료된다.

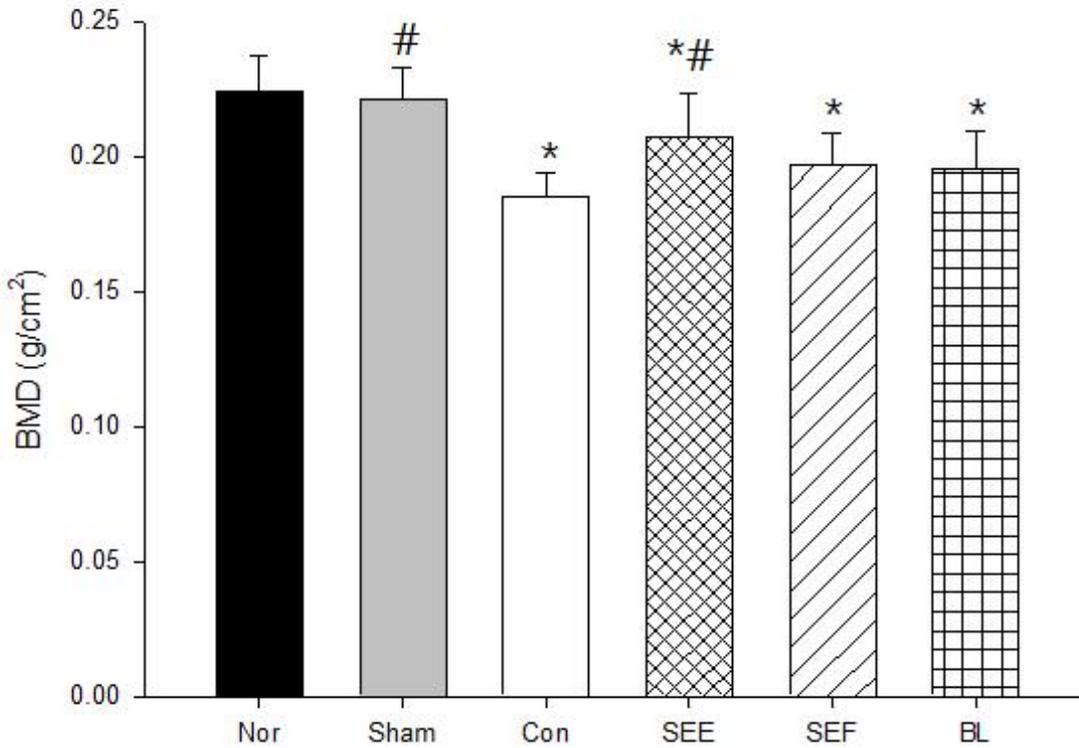


그림. 5. 대두배아발효물이 골다공증 변화에 미치는 효과

*: Significantly different from normal, $P < 0.05$

#: Significantly different from Ov X, $P < 0.05$

(나) 이소플라본 고함유 폐경기 개선식이 골밀도에 미치는 영향

난소를 절제한 흰쥐에 개선식이와 배아발효추출물을 12주간 매일 급여하면서 시험한 각 군의 대퇴골에서 골밀도를 측정하여 그림. 4에 나타내었다. 그 결과 정상군에 비해 OVX군, 개선식이 급여군과 대두배아 발효물의 급여군의 골밀도 값이 유의하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 반면에 Sham군과 개선식이의 고용량 급여군과 대두배아 발효물의 급여군의 골밀도 값이 OVX군에 비하여 유의하게 증가하는 것을 알 수 있었다. 본 연구의 개선식이와 발효물의 급여군에서 골밀도가 향상되는 경향을 나타내었고, 특히 본 연구에서는 2차 연구결과에서 유의한 증가를 보였던 발효물의 급여군에 비하여 개선식이의 고용량 급여군에서 유의한 증가를 보였는데, 이는 개선식이가 난소절제에 따른 골소실을 막아줌으로써 폐경기 여성들에게서 빈번하게 발생하는 골다공증 예방에 효과적인 물질인 것으로 사료된다. 향후 이에 대한 추가적인 연구가 필요하다고 사료되나 개선식이의 고용량의 투여가 유의하게 효과가 있는 것으로 관찰되어 본 연구과제에서의 큰 성과로 사료된다(그림. 5).

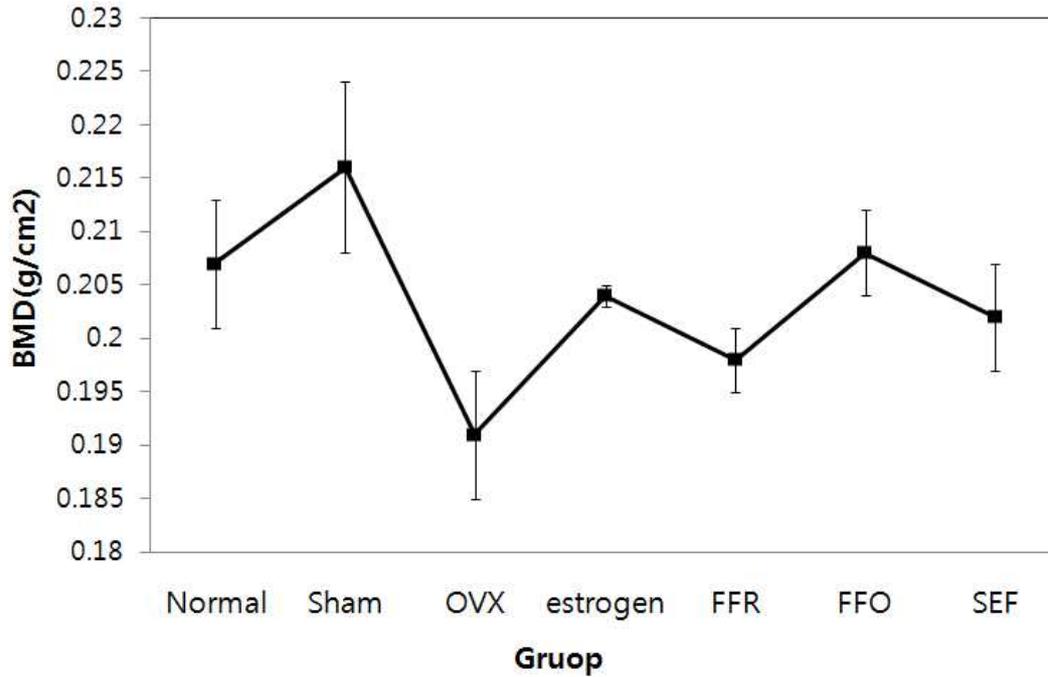


그림. 5 이소플라본 고함유 폐경기 개선식이 간 기능지표에 미치는 영향

*: Significantly different from normal, $P < 0.05$

#: Significantly different from Ov X, $P < 0.05$

(2) 대퇴골에서 골 무기물에 미치는 영향

(가) 이소플라본 고함유 대두배아 발효물이 골 무기질에 미치는 영향

대퇴골 중의 회분 함량의 변화를 보면, OVX군에서는 411 ± 32.6 mg로 정상군에 비하여 유의성 있게 감소하였다($p < 0.05$). 반면에 대두배아추출물(SEE)군에서는 OVX군에 비하여 유의성 있게 증가하였다($p < 0.05$). 대퇴골의 회분, 칼슘 그리고 인의 함량은 Table 6-14와 같다. 대퇴골 중의 calcium 함량의 변화를 보면, OVX군에서는 127 ± 10.5 mg으로 정상군에 비하여 유의성 있게 감소하였다($p < 0.05$). 반면에 칼슘이 없는 기본사료에 대두배아추출물과 대두배아발효물을 각각 첨가하여 섭취한 SEE군과 SEF군에서는 135 ± 5.5 mg, 133 ± 9.5 mg으로 OVX군에 비하여 유의하게 증가하였다($p < 0.05$). 반면 대퇴골 중의 인의 함량은 난소절제군을 포함하여 SEF 투여군과 BE 투여군에서 각각 유의하게 억제된 ($p < 0.05$) 반면 난소절제군 대비 대두배아 투여군에서 유의하게 억제되는 경향 ($p < 0.05$)을 보였다.

Table 6-14. 이소플라본 고함유 대두배아 발효물이 골 무기질에 미치는 영향

Group	Ash (mg/dL)	Ca (mg/dL)	P (mg/dL)
Normal	451±10.2	141±5.8	135±4.6
Sharm	446±16.7	139±7.7	134±5.3
OVX	411±32.6*	127±10.5*	121±7.1*
SEE(23 g/kg)	439±11.3*#	135±5.5*#	133±4.1#
SEF(30 g/kg)	429±23.4*	133±9.5*#	125±5.5*
BE(0.57 g/kg)	430±26.1*	129±6.6*	126±3.2*

*: Significantly different from normal, P<0.05

#: Significantly different from Ov X, P<0.05

(나) 이소플라본 고함유 폐경기 개선식이 골 무기질에 미치는 영향

대퇴골 중의 회분 함량의 변화를 보면, OVX군에서는 398.5±19.2 mg로 정상군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(p<0.05). 반면에 개선이식의 과용량 L 급여군과 대두배아 발효물의 급여군에서 OVX군에 비하여 유의성 있게 증가하였다 (p<0.05). 대퇴골의 칼슘과 회분의 함량은 Table 6-15와 같다. 대퇴골 중의 calcium 함량의 변화를 보면, OVX군에서는 114.5±8.7 mg으로 정상군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(p<0.05). 반면에 개선이식의 과용량 급여군과 대두배아발효물을 각각 첨가하여 섭취한 군에서는 132±15.7 mg, 139.7±6.4 mg으로 OVX군에 비하여 유의하게 증가하였다(p<0.05). 반면 대퇴골 중의 인의 함량은 난소절제군에서 정상대조군 대비 유의하게 감소하여 칼슘에서의 결과와 동일한 현상을 보였다. 시험물질의 급여군에서는 개선이식의 과용량 급여군에서 유의하게 증가된 결과 (p<0.05)를 보였다(Table 6-15).

Table 6-15. 이소플라본 고함유 폐경기 개선식이 골 무기질에 미치는 영향

Group	Ash (mg/dL)	Ca (mg/dL)	P (mg/dL)
Normal	443.5±16.7	138.4±6.5	128.7±5.6
Sharm	456.3±11.4	141.2±5.8	131.4±4.5
OVX	398.5.4±19.2*	114.5±8.7*	118.4±5.9*
Estrogen (0.001g)	431.3±15.4	123.5±10.2	129.5±2.9
FFR (8.5 g/kg)	413.6±11.9	125.4±13.4	121.7±4.2
FFO (171.7 g/kg)	436.1±12.8#	132.2±15.7#	132.3±7.4#
SEF (26.73 g/kg)	445.6±18.7#	139.7±6.4#	125.1±6.5

*: Significantly different from normal, P<0.05

#: Significantly different from Ov X, P<0.05

(3) 요중에서 골 무기물과 Dpd에 미치는 영향

(가) 이소플라본 고함유 대두배아 발효물이 요중에서 골 무기질과 Dpd 미치는 영향

요중에서의 calcium의 함량은 정상대조군과 sharm군에 비해 유의하게 증가하였으며, 반면 난소절제군 대비 시험물질 투여군에서는 유의하게 억제되는 결과를 보였다. 한편 뇨중에서의 phosphorus의 함량 역시 calcium의 결과 ($p < 0.05 \sim 0.01$)와 같은 결과를 보였다. 한편 요중에서의 deoxypyridinoline (Dpd)에 미치는 효과에서는 정상대조군을 포함한 sharm군과의 비교에서 난소절제군과 미생물의 투여군에서 유의하게 증가한 반면 난소절제군 대비 대두배아투여군에서 억제되는 경향을 보였으며 그 외 투여군에서는 감소하는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 인정되지 않았다(Table 6-16).

Table 6-16. 대두배아발효물이 요중에서 골 무기물과 Dpd에 미치는 영향

Group	Ca (mg/dL)	P (mg/dL)	Dpd (nM/24-h urine)
Normal	1.52±0.54	5.92±1.16	10.5±0.36
Sharm	1.49±0.46	5.84±0.95	10.1±0.47
OVX	2.13±0.86**	7.56±1.05**	11.6±0.26*
SEE(23 g/kg)	1.62±0.72#	6.16±1.10#	10.8±0.21#
SEF(30 g/kg)	1.55±0.67#	5.59±0.87#	10.7±0.33
BE(0.57 g/kg)	1.46±0.36#	6.04±0.93#	11.1±0.51*

*: Significantly different from normal, $P < 0.05$

#: Significantly different from Ov X, $P < 0.05$

(나) 이소플라본 고함유 폐경기 개선식이 요중에서 골 무기질과 Dpd 미치는 영향

요중에서의 calcium의 함량은 정상대조군과 sharm군에 비해 유의하게 증가하였으며, 반면 난소절제군 대비 시험물질 급여군에서는 유의하게 억제되는 결과를 보였다. 이는 개선식의 과용량 급여군과 대두배아 발효물의 급여군에서 억제되는 결과를 보였다. 한편 뇨중에서의 phosphorus의 함량 역시 calcium의 결과 ($p < 0.05$)와 유사한 결과를 보인바 대두배아 발효물의 급여군에서만 난소절제군 대비 억제되는 결과를 보였다. 한편 요중에서의 deoxypyridinoline (Dpd)에 미치는 효과에서는 정상대조군을 포함한 sharm군과의 비교에서 난소절제군에서 유의하게 증가한 반면 난소절제군 대비 대두배아 발효물의 급여군에서 억제되는 경향을 보였으며 그 외 급여군에서는 변화가 관찰되지 않았다(Table 6-17).

Table 6-17. 이소플라본 고함유 폐경기 개선식이 요중에서 골 무기질과 Dpd 미치는 영향

Group	Ca (mg/dL)	P (mg/dL)	Dpd (nM/24-h urine)
Normal	1.48±0.34	4.82±0.85	11.4±0.51
Sharm	1.54±0.27	4.95±0.42	10.8±0.34
OVX	1.76±0.45**	6.94±1.84*	13.4±0.59*
Estrogen (0.001g)	1.58±0.55#	6.26±0.64*	12.1±0.62
FFR (8.5 g/kg)	1.70±0.14*	5.41±1.25	15.4±0.71
FFO (171.7 g/kg)	1.65±0.49*,#	5.98±1.19	14.2±0.28
SEF (26.73 g/kg)	1.64±0.39*,#	5.52±0.66#	10.1±0.12#

*: Significantly different from normal, P<0.05

#: Significantly different from Ov X, P<0.05

(4) 혈중 호르몬과 골대사 지표에 미치는 영향

(가) 이소플라본 고함유 대두배아 발효물이 혈중 호르몬과 골대사 지표에 미치는 영향

Estradiol은 주요한 estrogenic hormone으로 estrogen의 가장 주요한 활성형이다. Estradiol의 측정은 사춘기의 지연, 무월경 및 폐경기의 경우를 진단하는데 가장 중요한 지표중의 하나이다. 또한 estradiol 및 estrogen이 감소되면 골흡수가 증가되고, 소화관에서 칼슘 흡수가 저하되어 폐경 후 골다공증과 관련되어 있다고 알려져 있다. 본 연구에서 정상대조군 대비 난소절제군을 포함하여 배아추출물, 배아발효물 그리고 발효균 모두에서 유의하게 감소한 ($p<0.05\sim 0.01$) 반면 난소절제군 대비 시험물질 투여군 모두에서 유의하게 증가하였다 ($p<0.05\sim 0.01$). 한편 난소를 절제한 흰쥐에 대두배아추출물, 대두배아발효추출물, 발효균을 매일 투여하면서 12주 후 각 군의 혈청 중 osteocalcin의 함량은 Table 6-18과 같다. 혈청 중 osteocalcin의 함량은 OVX군에서 39.6 ± 3.46 ng/mL로 정상군에 비해 유의하게 증가하였고($p<0.05$), 반면에 SEE군은 28.4 ± 1.25 ng/mL, SEF군은 32.6 ± 2.93 ng/mL 그리고 BL군은 31.4 ± 1.35 ng/mL로 나타나 OVX군에 비하여 SEE 투여군에서는 유의한 감소를 ($p<0.05$) 보인 반면 그 외 투여군에서는 감소하는 경향은 관찰되었으나 통계적인 유의성은 관찰되지 않았다. 한편 황체형성 호르몬의 변화에 있어서는 정상대조군을 포함하여 sharm을 포함하여 난소절제군 그리고 대두 배아를 포함한 발효물 그리고 세균의 투여군 모두에서 어떠한 변화도 관찰되지 않아 다른 선행연구결과들과 일치하는 결과를 보였다. 다만 난소절제군에서 증가하는 경향을 보였으나 통계적인 유의한 차이는 관찰되지 않았다

Osteocalcin은 calcium과 결합하는 Vitamin K 의존성 α -carboxy glutamic acid 단백질로서 조골세포에 의해 생성되어 70%는 골기질에 축적, 30% 정도는 혈액 속으로 분비됨으로서 골 형성의 정도를 예측할 수 있는 생화학 지표로 사용되고 있다. 선행연구들에 의하면 젊은 연령층에서의 osteocalcin의 농도 증가는 골형성의 증가를 의미하지만, 폐경 후에는 골소실을 잘 예측할 수 있는 지표로 이용되고 있다고 한다. Byun 등은 어린 쥐에서 난소절제로 유도된 에스트로겐 결핍은 혈중 osteocalcin의 농도를 증가시키고, 이소플라본 보충으로 혈중 osteocalcin 농도가 감소되었음을 보고하였고, 이는 실험대조군에서 osteocalcin이 유의하게 감소를 보인 Kim 등의 연구와 일치하는 결과를 보였다. 본 연구에서도 난소절제된 OVX군의 혈중 osteocalcin의 농도는 증가하였고, OVX군에 비해 대두배아추출물과 발효물

을 첨가한 군에서 유의적인 감소를 나타내어 대두배아에 함유된 이소플라본이 골교체율을 감소시켜 골흡수를 억제함으로써 골 보호 효과를 나타낸 것으로 사료된다. 또한 최근 골대사지표에서 널리 쓰이고 있는 지표인 NTx에서는 다른 선행연구의 결과와 같이 정상대조군과 sharm군에 비하여 난소절제군에서 유의하게 증가한 반면 난소절제군 대비 시험물질 투여군에서는 모두 유의하게 억제되는 결과를 보였다 (Table 6-18).

Table 6-18. 이소플라본 고함유 대두배아 발효물이 혈중 호르몬과 골대사 지표에 미치는 영향

Group	Estradiol (pg/mL)	LH (mIU/ml)	Osteocalcin (ng/mL)	NTx (nM)
Normal	4.58±0.95	0.32±0.05	27.6±1.62	15.43±0.84
Sharm	4.46±1.16	0.33±0.07	26.4±2.34	14.62±0.92
OVX	2.16±0.73**	0.36±0.04	39.6±2.46*	20.61±1.25**
SEE(23 g/kg)	3.85±1.81###	0.33±0.06	28.4±1.15#	16.40±0.84##
SEF(30 g/kg)	3.21±1.76***	0.31±0.05	32.6±2.93	17.29±1.16##
BE(0.57 g/kg)	2.72±1.36***#	0.33±0.07	31.4±1.35	18.53±1.05##

*, **: Significantly different from normal, $P<0.05$ ~ $P<0.01$

#, ##: Significantly different from Ov X, $P<0.05$ ~ $P<0.01$

(나) 이소플라본 고함유 폐경기 개선식이 혈중 호르몬과 골대사 지표에 미치는 영향

본 연구에서 정상대조군 대비 난소절제군을 포함하여 개선식을 포함하여 배아발효물 급여군 모두에서 유의하게 감소한 ($p<0.01$) 반면 난소절제군 대비 에스트로겐 주사군을 포함하여 개선식의 급여군인 과용량군과 대두배아 발효물의 급여군 모두에서 유의하게 증가하였다 ($p<0.01$). 한편 난소를 절제한 흰쥐에 대두배아추출물, 대두배아발효추출물, 발효균을 매일 투여하면서 12주 후 각 군의 혈청 중 osteocalcin의 함량은 Table 6-19과 같다. 혈청 중 osteocalcin의 함량은 OVX군에서 59.2 ± 5.41 ng/mL로 정상군에 비해 유의하게 증가하였고($p<0.01$), 반면에 시험물질의 급여군에서는 개선식의 정상용량 급여군에서만 증가되는 경향을 보인 반면 그 외 시험물질 급여군에서는 정상대조군과의 비교에서 유의한 변화가 없었다. 다만 난소절제군 대비 에스트로겐 주사군과 개선식의 과용량과 대두배아 발효물의 급여군에서는 유의하게 억제되는 결과를 보였다. 한편 황체형성 호르몬의 변화에 있어서는 정상대조군을 포함하여 sharm을 포함하여 난소절제군 그리고 개선식을 포함한 발효물의 급여군 모두에서 어떠한 변화도 관찰되지 않아 다른 선행연구결과들과 일치하는 결과를 보였다. 다만 난소절제군에서 증가하는 경향을 보였으나 통계적인 유의한 차이는 관찰되지 않았다. 또한 NTx의 측정에서는 난소절제군에서 유의하게[증가되는 것으로 관찰된 반면 시험물질의 급여군에서는 에스트로겐의 주사군과 대두배아 발효물의 급여군에서 유의하게 억제되는 결과 ($p<0.05$)를 보였다.

본 연구에서도 난소절제된 OVX군의 혈중 osteocalcin의 농도는 증가하였고, OVX군에 비해 개선식의 과용량의 급여군과 대두배아 발효물을 급여한 군에서 유의적인 감소를 나타내어 대두배아에 함유된 이소플라본이 골교체율을 감소시켜 골흡수를 억제함으로써 골 보

호 효과를 나타낸 것으로 사료된다. 또한 최근 골대사지표에서 널리 쓰이고 있는 지표인 NTx에서는 다른 선행연구의 결과와 같이 정상대조군과 sharm군에 비하여 난소절제군에서 유의하게 증가한 반면 난소절제군 대비 시험물질 투여군에서는 모두 유의하게 억제되는 결과를 보였다(Table 6-19).

Table 6-19. 이소플라본 고함유 폐경기 개선식이 혈중 호르몬과 골대사 지표에 미치는 영향

Group	Estradiol (pg/mL)	LH (mIU/ml)	Osteocalcin (ng/mL)	NTx (nM)
Normal	5.43±1.23	0.41±0.03	33.4±1.24	16.54±1.24
Sharm	4.84±0.87	0.39±0.04	31.4±3.47	15.47±0.82
OVX	2.84±0.47**	0.33±0.06	59.2±5.41**	25.29±1.58**
Estrogen (0.001g)	4.49±0.91	0.37±0.05	29.4±2.43##	16.35±2.64#
FFR (8.5 g/kg)	2.96±0.23**	0.32±0.06	48.4±5.40*	21.44±2.55
FFO (171.7 g/kg)	3.43±0.19**,#	0.38±0.04	36.7±4.32#	19.52±3.65
SEF (26.73 g/kg)	3.87±0.83**,#	0.39±0.03	34.1±4.74#	16.29±1.81#

*, **: Significantly different from normal, P<0.05~P<0.01

#, ##: Significantly different from Ov X, P<0.05~P<0.01

(5) 사이토카인의 농도에 미치는 영향

(가) 이소플라본 고함유 대두배아 발효물이 사이토카인의 농도에 미치는 영향

사이토카인에 미치는 영향은 IL-6와 TNF-α 모두 난소절제 모두에서 유의하게 증가하였고 반면 시험물질 처리군에서는 IL-6의 경우 대두배아투여군에서 TNF-α에서는 시험물질 투여군 모두에서 유의하게 억제하였다. 이러한 결과들은 난소절제에 의하여 사이토카인이 증가하는 것을 대두배아 또는 발효물이 유의하게 억제하는 것을 관찰할 수 있었다(Table 6-20).

Table 6-20. 이소플라본 고함유 대두배아 발효물이 사이토카인의 농도에 미치는 영향

Group	IL-6 (pg/mL)	TNF-α (pg/mL)
Normal	20.6±1.54	143.5±10.6
Sharm	19.42±1.16	155.6±12.9
OVX	22.75±1.92*	259.5±16.7**
SEE(23 g/kg)	20.43±0.98#	176.1±13.4***##
SEF(30 g/kg)	21.54±1.83	189.5±11.6***##
BE(0.57 g/kg)	21.52±1.13	2013.8±10.8***#

*, **: Significantly different from normal, P<0.05~P<0.01

#, ##: Significantly different from Ov X, P<0.05~P<0.01

(나) 이소플라본 고탍유 폐경기 개선식이 사이토카인의 농도에 미치는 영향

사이토카인에 미치는 영향은 IL-6와 TNF- α 모두 난소절제 모두에서 유의하게 증가하였고 ($p < 0.01$), 반면 시험물질 처리군에서는 에스트로겐 주사군에서만 유의하게 억제된 반면 그 외 IL-6에서 유의한 변화가 관찰되지 않은 반면 TNF- α 에서는 정상대조군 대비 난소절제군을 포함하여 개선식이 급여군에서 증가한 결과를 보였다. 그러나 난소절제군 대비 시험물질의 급여군과의 비교에서는 에스트로겐 주사군과 폐경기 개선식이 고용량 급여군과 대두배아발효물 급여군에서 유의하게 억제되는 결과 ($p < 0.05 \sim 0.01$)를 보였다(Table 6-21).

Table 6-21. 이소플라본 고탍유 폐경기 개선식이 사이토카인의 농도에 미치는 영향

Group	IL-6 (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)
Normal	19.84 \pm 0.89	155.4 \pm 13.64
Sharm	18.53 \pm 2.43	158.3 \pm 15.31
OVX	26.71 \pm 3.56**	285.6 \pm 26.71**
Estrogen (0.001g)	17.63 \pm 1.84##	165.7 \pm 32.43##
FFR (8.5 g/kg)	22.16 \pm 5.64	254.3 \pm 28.7**
FFO (171.7 g/kg)	20.80 \pm 2.97	215.4 \pm 20.5**,#
SEF (26.73 g/kg)	21.65 \pm 1.59	187.6 \pm 16.32##

*, **: Significantly different from normal, $P < 0.05 \sim P < 0.01$

#, ##: Significantly different from Ov X, $P < 0.05 \sim P < 0.01$

(6) 개선식의 급여가 항산화 및 지질과산화의 농도에 미치는 영향

개선식이 항산화 효과에 미치는 영향에서 정상대조군 대비 SOD, CAT, GST, GSH, GSH-Px 그리고 MDA 모두에서 난소절제군에서 유의한 증가와 감소를 보였다 ($p < 0.05 \sim 0.01$). 그러나 시험물질의 급여에 대한 효과에서는 항산화 관련 지표에서는 대두배아발효물 급여군에서 효과를 보인 반면 GST에서는 개선식의 과용량 급여군에서도 난소절제군 대비 억제되는 결과를 보였다. 이러한 결과는 지질과산화에서도 같은 결과 ($p < 0.05$)가 관찰되었다(Table 6-22, 23).

Table 6-22. 이소플라본 고탍유 폐경기 개선식이 항산화 농도에 미치는 영향

Group	SOD (pg/mL)	CAT (mIU/ml)	GST	GSH	GSH-Px
Normal	3.842±0.231	8.413±0.263	111.2±7.5	14.35±2.25	3.156±0.352
Sharm	4.021±0.174	7.561±0.157	105.3±6.3	15.47±1.33	2.957±0.542
OVX	5.546±0.167*	5.871±0.764*	135.4±10.5*	12.56±0.83*	4.529±0.664*
Estrogen (0.001g)	5.541±0.634*	7.214±0.527#	125.7±13.6	13.34±0.97	3.554±0.371
FFR (8.5 g/kg)	4.871±0.243	5.074±0.834*	131.2±14.3*	13.41±1.26	4.337±0.854
FFO (171.7 g/kg)	4.475±0.541	6.547±0.765*	114.2±11.6#	14.55±2.43	3.762±0.554
SEF (26.73 g/kg)	4.168±0.954#	7.431±0.541*,#	110.5±9.7#	13.57±1.24	3.051±0.763#

*: Significantly different from normal, P<0.05

#: Significantly different from Ov X, P<0.05

Table 6-23. 이소플라본 고함유 폐경기 개선식이 지질과산화 농도에 미치는 영향

Group	MDA
Normal	1.803±0.257
Sharm	2.023±0.155
OVX	3.023±0.155**
Estrogen (0.001g)	2.264±0.187**,#
FFR (8.5 g/kg)	2.924±0.643*
FFO (171.7 g/kg)	2.471±0.543#
SEF (26.73 g/kg)	2.143±0.271#

*: Significantly different from normal, P<0.05

#: Significantly different from Ov X, P<0.05

바. 대두배아발효물과 폐경기 개선식이 대퇴골의 조직학적 변화에 미치는 효과

골은 조직학적으로 바깥쪽을 피질골 (cortical bone) 또는 치밀골 (compact bone)이라 하고 안쪽의 골조직은 소주골 (trabecular bone) 또는 해면골 (sponge bone) 또는 망상골 (cancellous bone)이라 한다. 이들 소주골은 조골세포와 파골세포의 coupling에 의하여 그 용적이 유지되며 조골세포는 골형성시 골기질인 유골에 무기질을 유도하여 유골에 침착시키고 골이 두꺼워지면 골침단부 아래로 이동하여 자신이 만들어 내는 고원질 등의 기질에 둘러 쌓이게 되는데 결국은 calcium의 침착과 함께 골세포로 변하게 된다. Osteoclast는 다핵세포로서 뼈의 아래쪽을 소화, 파괴하며 monocyte-macrophage 계통에서 유래한다. 이들의 활성은 골세포의 활성에 영향을 받을 뿐만 아니라 탐식세포와 골세포에 의해 조절된다.

Osteoclast는 특징적으로 ruffled border라는 세포막을 가지고 있으므로 뼈의 표면에 붙고, 이곳에서 골흡수가 일어난다.

난소절제군은 대퇴골의 골단간부에서 sham군에 비해 소주골 (trabecular bone)의 면적이 감소되었고 파골세포의 수가 증가된 양상을 보였다. 이는 대두배아발효물과 폐경기 개선식의 급여로 난소절제군에서 관찰되었던 소주골의 증가를 볼 수 있었다. 이러한 현상은 이소플라본이 많이 함유된 대두배아발효 및 폐경기 개선식의 급여로 파골세포의 수의 감소와 앞서 논의한 소주골의 면적의 증가를 관찰할 수 있었다. 본 연구의 대퇴골의 소견에서 골단간부에서 소주골의 소실이 뚜렷하게 관찰되었으며 이는 파골세포 및 골세포의 수가 증가함을 알 수 있었다. 난소적출 후에 골감소증 (osteopenia)이 일어난 것은 bone turnover가 증가하기 때문으로 해석되고 있다. 즉 난소적출 후에 initial rapid phase에서 TBV 감소, osteoblast 및 osteoclast의 표면적 및 수가 증가로 bone turnover가 되었음을 선행연구결과로 알 수 있었다. 즉 고함유의 아이소플라본의 급여로 estrogenic effect로 인해 calcium의 함량을 증가시켜 골흡수를 억제함으로 해석되고 있다. 본 실험에서 이러한 결과를 뒷받침하는 것은 estrogen 제제의 주사로 난소절제에 의하여 증가된 bone turnover가 억제되는 것을 관찰할 수 있어 이러한 결과를 뒷받침한다고 하겠다.

사. 대두배아발효물이 주요장기에 대한 조직학적 변화에 미치는 영향 및 요약

간은 해부학적 위치나 신체내 대사에서 차지하는 역할 때문에 다양한 내인성 또는 외래물질에 노출된다. 이러한 물질에는 환경독소, 치료약제, 식품과 음료에 첨가물 또는 오염물로 들어 있는 화학물질 등 다양한 종류의 호르몬과 내인성 산물이 포함된다. 이들 대부분은 간에 손상을 일으키거나 적응반응을 유발한다. 간독성물질은 간에서 다양한 방법으로 효과를 나타낸다. 어떤 물질은 간세포의 소기관 또는 미세 구성성분과의 특별한 친화력을 나타내어 간세포에 직접 영향을 준다. 내인성 간독소는 독성반응을 나타내는 방법에 따라 직접 또는 간접 두 가지로 분류한다. 직접 간독소는 간손상을 일차적으로 유발하고 이로 인해 대사 장애가 나타난다. 대표적인 예가 인과 탄닌산에 의한 예가 여기에 해당한다고 하겠다. 간접 간독소는 세포의 고유기능을 유지하는데 필수적인 대사과정의 일부를 방해함으로써 세포의 손상을 나타낸다.

본 연구에서 정상대조군의 경우 간소엽구조의 중앙에 중심정맥이 위치하고, 간세포들이 간소엽의 가장 자리를 향해 방사형으로 코드 모양의 배열을 보였으며, 문맥과 간소엽구조의 경계가 잘 이루어진 정상적인 구조를 보였으나 일부 개체에서 지방변성이 관찰되었다. 이러한 지방변성과 수포변성은 정상동물에서도 약 10~15% 정도 관찰된다고 보고되고 있다. 이는 정상적인 범위 내에서의 변화여서 유의한 변화로 보기는 어렵다고 하겠다. 난소절제군에서 간세포에서는 일부 세포핵의 과염색상, 세포질에 호산성 변화 및 공포변성을 포함한 지방변성 (fatty change)과 수포변성 (hydropic change)이 일부 개체에서 특징적으로 관찰되었으며, 변성된 세포주위로의 단핵염증세포의 침윤, 중심엽 지역의 sinusoid가 일부 증가와 간소엽구조의 소실 등이 관찰되었다. 반면 시험물질인 개선식을 포함한 대두배아발효물의 급여군에서는 앞서 관찰된 난소절제군에서의 조직학적인 유의한 소견들의 특이한 현상은 관찰되지 않았다. 특히 폐경기 개선식을 3개월간 장기간 투여했음에도 불구하고 어떠한 조직학적 변화도 관찰되지 않아 이러한 결과들은 간기능 대사에서의 혈청학적인 결과와 항산화의 결과를 뒷받침한다고 하겠다.

신장은 간과 함께 외인성 화학물질의 주요 배설경로이기 때문에 일반 독성시험에서 표적 장기로 평가되는 경우가 흔하다. 또한 간과 마찬가지로 외인성 화학물질에 의해서 대사되고 축적되기도 한다. 신장은 사구체의 여과와 신세뇨관의 재흡수로 대표되는 여러 가지 기능을 수행하기 위하여 비교적 많은 혈액 (심박출량의 25%)이 공급된다. 그러므로 측정할 수 있는 정도로 혈액 내에 존재하면서도 어느 정도 이상은 신장을 통하여 배설되지 않은 화합물에 노출될 수 있다. 분자의 크기, 지방용해도 및 단백질 결합과 같은 다양한 요인들이 상호작용하여 화합물의 배설경로와 속도가 결정된다. 유해 화학물질의 경우, 화합물의 양과 노출 시간에 따라 신장독성의 정도가 결정된다. 도성발현의 과정에서 요로의 다른 부위, 즉 요관, 방광 그리고 요도는 거의 침범되지 않는다. 요관, 방광, 대부분의 요도 및 신장의 신우는 이행상피로 덮여 있다. 노를 통해 운반되는 화학물질은 이런 요로상피에 손상을 가하여 그 결과 괴사, 괴양, 수복 그리고 반응성 과형성 등을 유발하기도 한다. 일반적으로 전신적인 독소는 하부요로에는 영향을 미치지 않는 것으로 보고되고 있다.

본 실험에서는 정상대조군을 포함한 Sharm, 개선식이 급여군 그리고 대두배아발효물 급여군 모두에서 세뇨관에서 변성 및 괴사, 공포화, 붕괴체의 형성, 비대, 과형성, 결정체의 침착을 포함한 무기물질 등의 침착과 같은 유의한 소견은 어느 군에서나 모두 관찰되지 않았다. 경험에 의하면 인위적으로 신장독성을 유발하는 경우 근위세뇨관이 흔한 손상을 받는다. 가장 대표적인 손상은 세뇨관에서의 변성, 공포화와 비대와 과형성 등을 일반적으로 관찰할 수 있다. 그러나 본 연구에서 시험물질을 3개월간 투여했음에도 불구하고 신장 조직에서 어떠한 변화도 관찰되지 않았다.

한편 폐포벽에 대한 손상이 심할 경우에는 기저막이 파괴되면서 모세혈관으로부터 삼출물이 발생하여 염증반응을 일으킨다. 섬유소가 폐포벽에 국소적으로 침착할 수 있으며, 대식세포와 섬유아세포 등에 의해서 간질성 섬유화로 인해 두꺼워 질 수 있다. 현재 본 실험에서 암컷 모두에 있어서 폐 조직은 부분적으로 차이는 있으나 정상대조군인 및 Sharm군을 포함하여 모든 시험물질 급여군에서 혈관주위의 염증세포의 침윤이 (perivascular inflammatory cell infiltration)이 일부 관찰되었다. 이러한 변화는 정상 대조군을 포함하여 모든 시험군에서의 변화로 시험물질에 의한 영향이기 보다는 실험실의 환경에 의한 영향으로 판단된다고 하겠다. 즉 폐에서 관찰된 혈관주위의 염증세포의 침윤은 SPF 사육구역에서 원인 불명의 간질성 폐렴의 빈도가 높다는 기존의 보고와 유사하며, 이는 본 시험물질에 의한 독성학적 변화는 아닌 것으로 판단된다.

심장의 경우 일반적으로 다발국소성 심근괴사, 근세포질내 수축 띠의 출현, 근세포질내 과도한 과립형성, 국소성 근변증, 공포형성, 칼슘침착, 다양한 정도의 염증, 섬유모세포 반응, 출혈 등이 심근독성으로 병변이 보고되고 있다. 본 시험의 경우 암컷 모두에서 정상대조군을 포함하여 시험물질 투여군 모두에서 위에서 언급한 병변은 관찰되지 않았다.

면역장기인 비장은 림프구의 저장, 항원의 농축, 항체생산, 쇠퇴한 적혈구의 처리 그리고 일부의 조혈작용 기능을 포함하고 있다. 본 시험에서 수컷과 암컷 모두에 있어서 splenic zone에서 T세포와 B세포의 충실도와 감소상태 기능항진과 괴사, 경색 그리고 macrophages의 정도 등을 관찰한 결과 정상대조군 및 대조군을 포함한 시험물질 투여군 모두에서 유의한 변화는 관찰되지 않았다. 내분비 장기인 부신에서 암컷 모두에서 정상군을 포함하여 시험물질투여군 일부에서 수질부분의 증식성병변이 관찰되었으나 정상대조군에서도 부분적으로 관찰된 부분과 시험물질투여군에서도 일부 개체에서 관찰되었다. 이러한 증식성병변은

부신수질에서 가장 흔히 보고되는 변화로 본 다양한 화합물에 의해서 초래되는데 특히 유당과 mannitol, sorbitol, xylitol, lactiol과 같은 당알코올에 의한 보고로 보아 본 시험에서는 시험물질에 포함되어 있는 당에 의한 변화로 판단되며, 랫드에서는 이러한 변화들이 광범위하게 보고되어 있으나 다른 종에서는 거의 보고된 예가 없다. 결론적으로 본 연구에서는 정상대조군을 포함하여 시험물질 투여군의 일부 개체에서 관찰된 점과 시험물질 투여군에서 용량 의존성이 관찰되지 않은 점 등을 볼 때 시험물질로 인한 독성학적인 변화는 아닌 것으로 생각된다.

그 외 뇌와 뇌하수체를 포함한 여러 장기 또한 어떠한 변화도 관찰되지 않아 시험물질에 의한 영향은 없는 것으로 확인되었다.

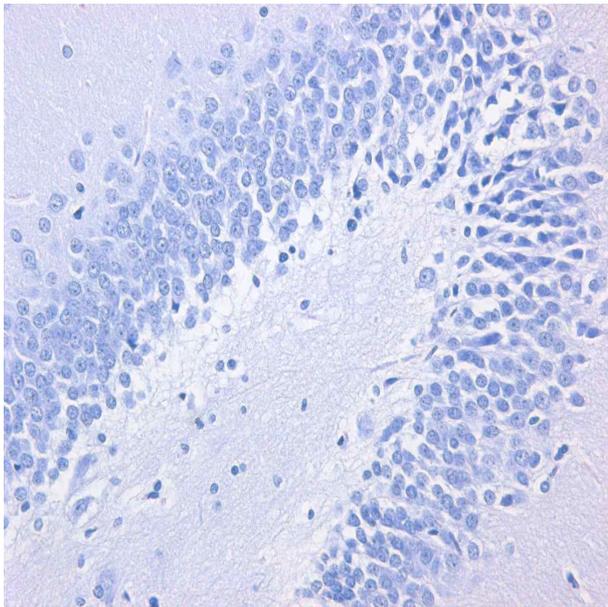
이상의 연구결과로 보아 본 실험조건하에서 3개월 동안 반복급여 시험 결과, 시험물질 즉 d 이소플라본 고함유 대두배아발효물과 폐경기 개선식에 대한 무해용량 (no observed adverse effect level, NOAEL)은 암컷 랫드에 있어서는 모두 5,000 mg/kg/day 이상인 것으로 사료된다.

Table 6-24. 난소절제 골다공증 모델에서의 폐경기 개선식이의 급여가 조직학적 변화에 대한 결과 요약 (Group summary)

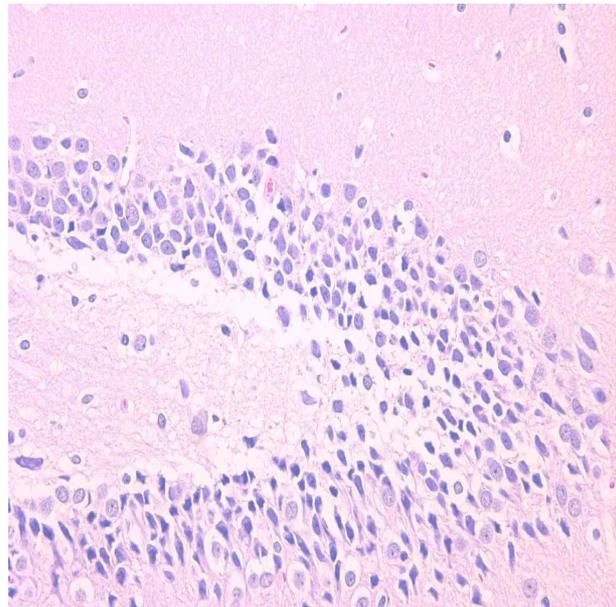
Sex : Female

Organ/ Findings	Sex	Female						
	Group	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7
	Dose (mg/kg)	N	S	OVX	EST	FFR	FFO	SEF
	Number of animals	10	10	10	10	10	10	10
Brain	- Degeneration of hippocampus	0	0	0	0	0	0	0
	No of examined	10	10	10	10	10	10	10
Pituitary	- Cyst and vacuolation	0	0	0	0	0	0	0
	- Infarction and apoptosis	0	0	0	0	0	0	0
	No of examined	10	10	10	10	10	10	10
Heart	- Inflammation	0	0	0	0	0	0	0
	- Myocardial necrosis and vacuolation	0	0	0	0	0	0	0
	No of examined	10	10	10	10	10	10	10
Lung	- Inflammation cell filtration	10	10	10	10	10	10	10
	- Dark red spots	0	0	0	0	0	0	0
	No of examined	10	10	10	10	10	10	10
Liver	-Fatty change	1	1	2	1	0	0	0
	-Vacuolization	0	0	2	0	0	0	0
	-Necrosis	0	0	0	0	0	0	0
	No of examined	10	10	10	10	10	10	10
Spleen	- Macrophages	0	0	0	0	0	0	0
	No of examined	10	10	10	10	10	10	10
Kidney	- Chronic progressive nephropathy	1	1	1	0	1	0	0
	- Vacuolation	0	0	1	1	0	0	0
	- Inclusions and hypertrophy	0	0	0	0	0	0	0
	No of examined	10	10	10	10	10	10	10
Adrenal	- Focal hyperplasia	1	1	2	1	1	2	2
	- Degeneration and atrophy	0	0	0	0	0	0	0
	No of examined	10	10	10	10	10	10	10
Bone	- Osteoporosis	0	0	0	0	0	0	0
	- Osteosclerosis	0	0	0	0	0	0	0
	No of examined	10	10	10	10	10	10	10
Thyroid	- Follicular hypertrophy	0	0	0	0	0	0	0
	- Follicular atrophy	0	0	0	0	0	0	0
	- Follicular pigmentation	0	0	0	0	0	0	0
	No of examined	10	10	10	10	10	10	10
Uterus	- Myometrial hypertrophy	0	0	0	0	0	0	0
	- Endometrial hyperplasia	0	0	0	0	0	0	0
	- Endometrial atrophy	0	0	0	0	0	0	0
	No of examined	10	10	10	10	10	10	10

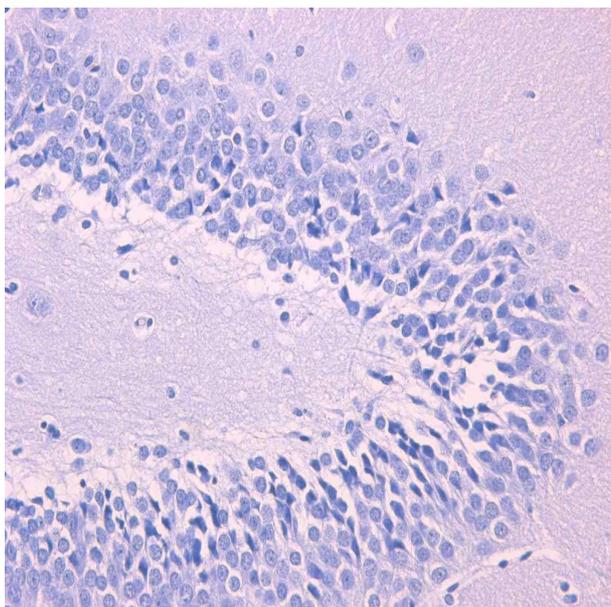
Sex : Female



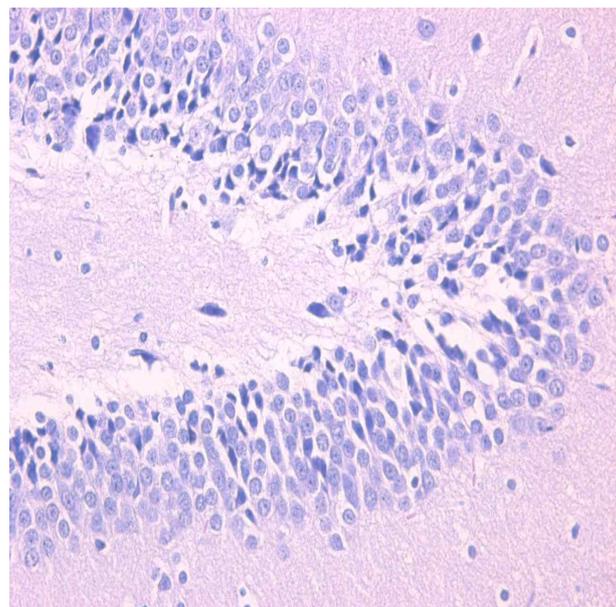
G1 - Brain x40



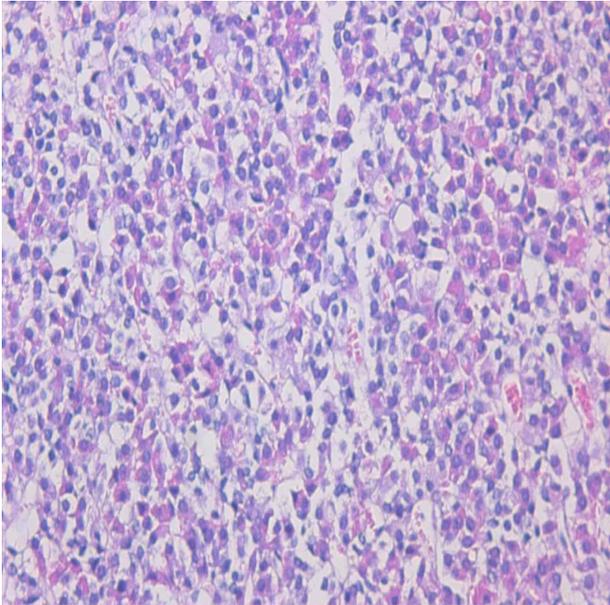
G2 - Brain x40



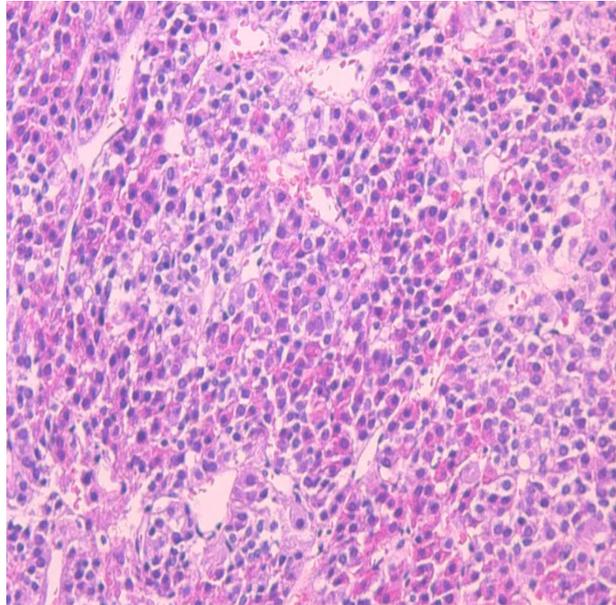
G3 - Brain x40



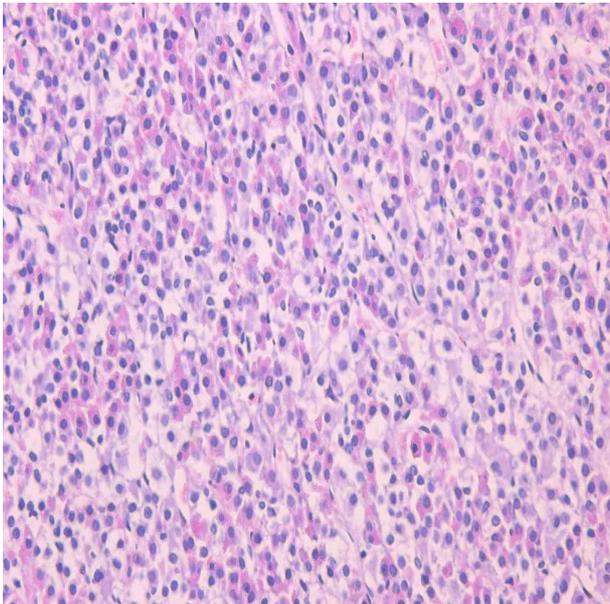
G6 - Brain x40



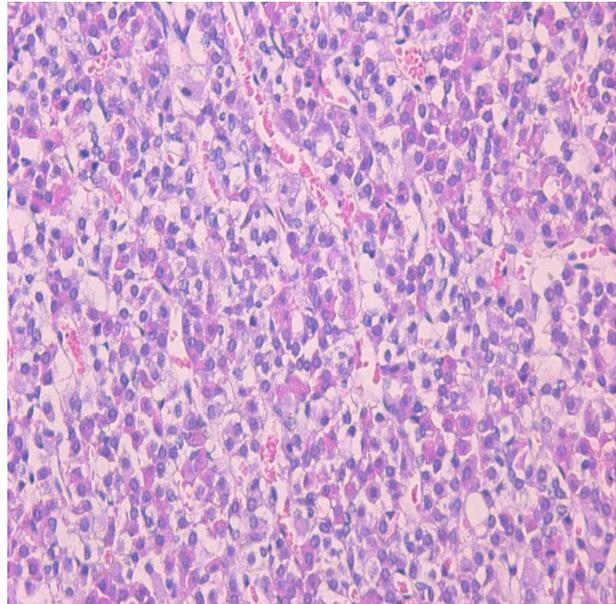
G1 - Pituitary x40



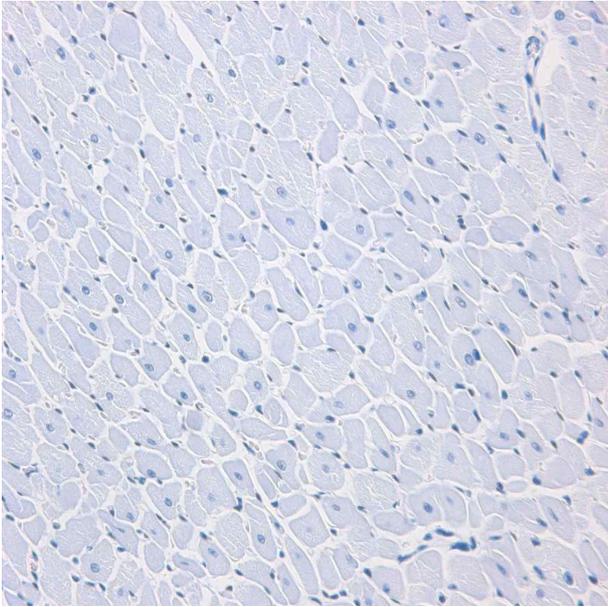
G2 - Pituitary x40



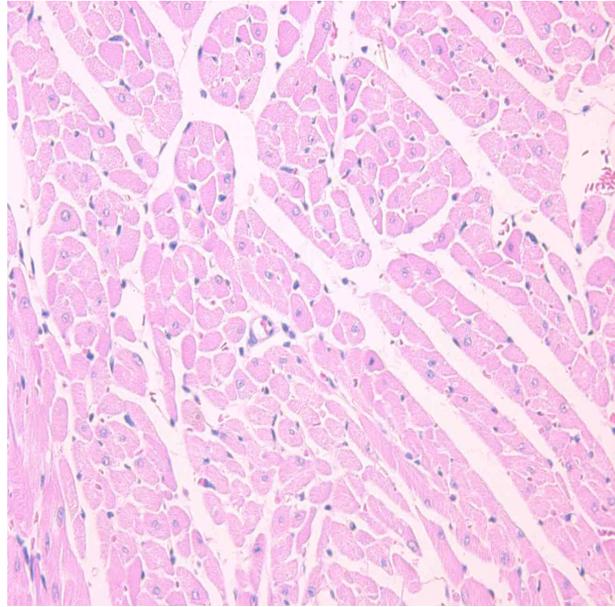
G3 - Pituitary x40



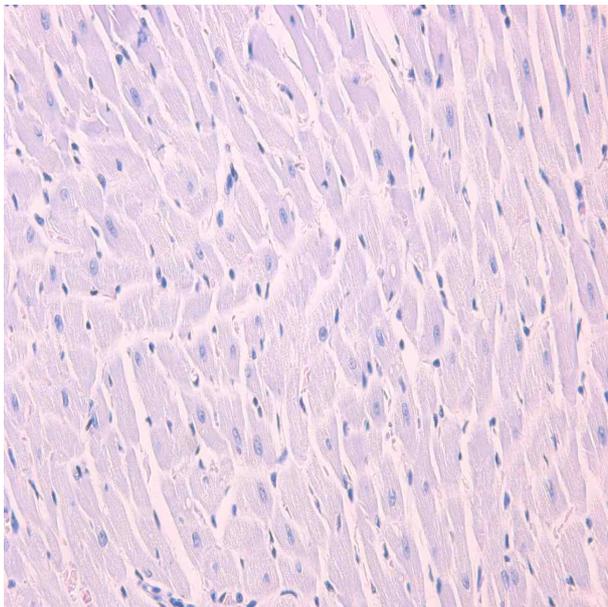
G6 - Pituitary x40



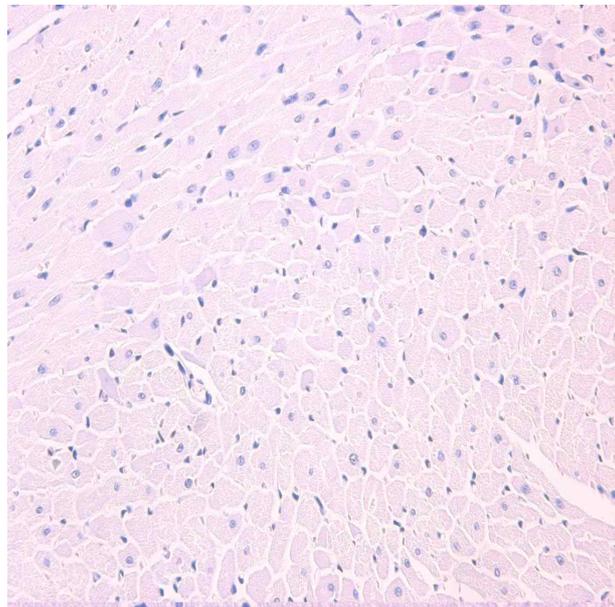
G1 - Heart x40



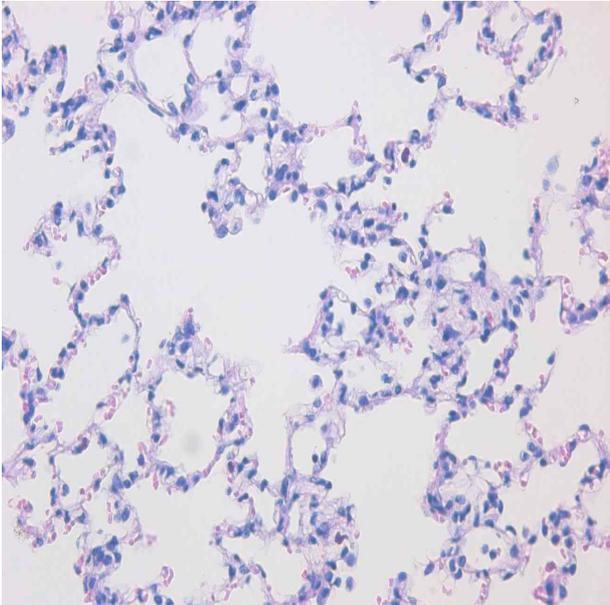
G2 - Heart x40



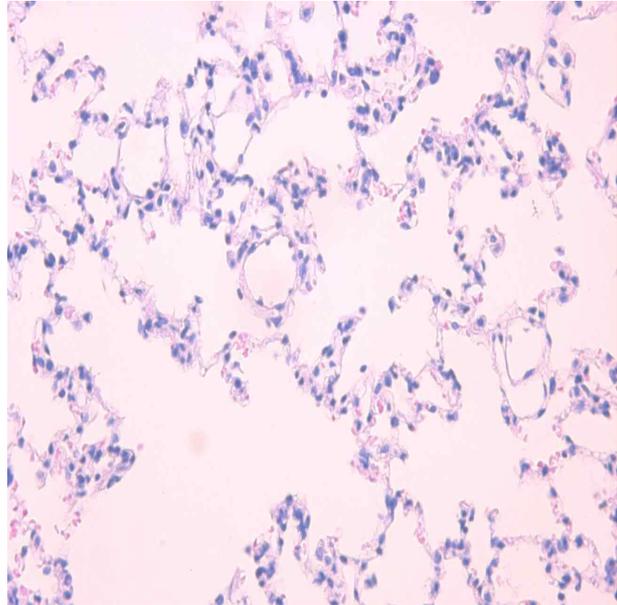
G3 - Heart x40



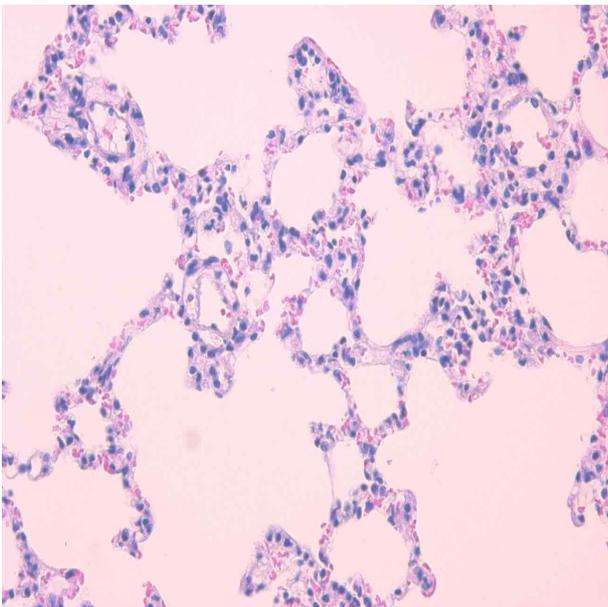
G6 - Heart x40



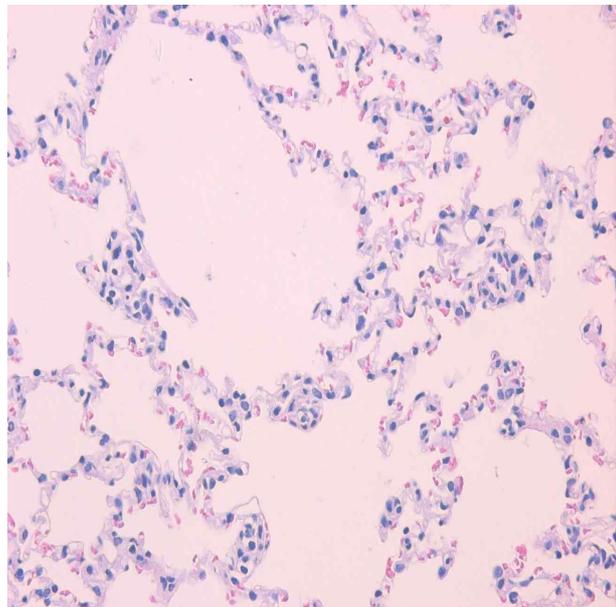
G1 - Lung x40



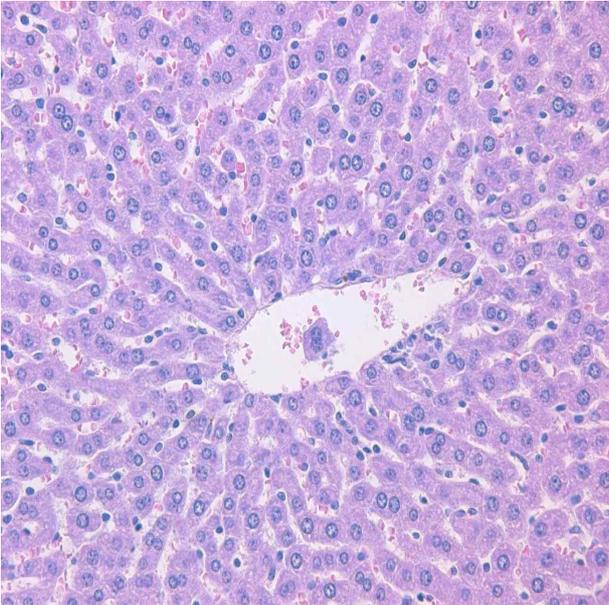
G2 - Lung x40



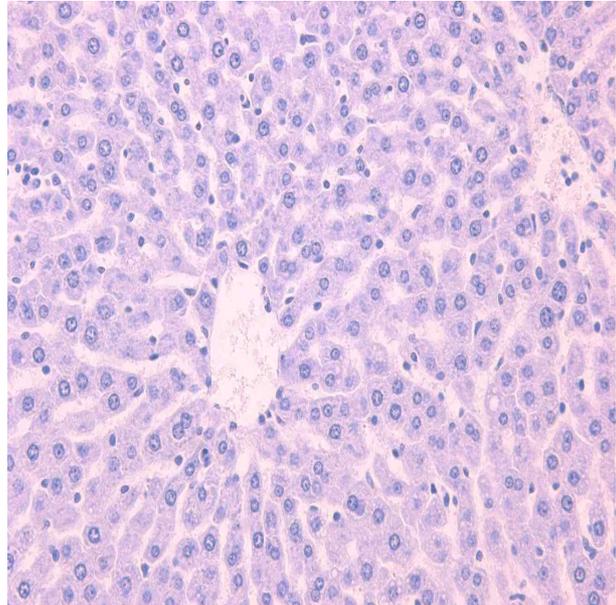
G3 - Lung x40



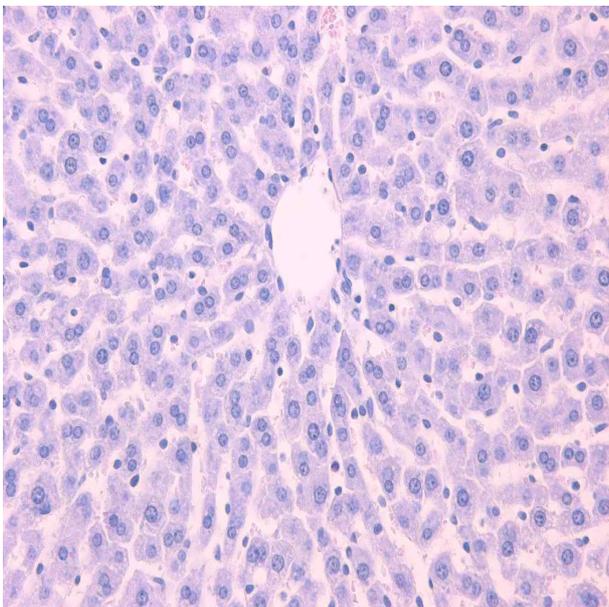
G6 - Lung x40



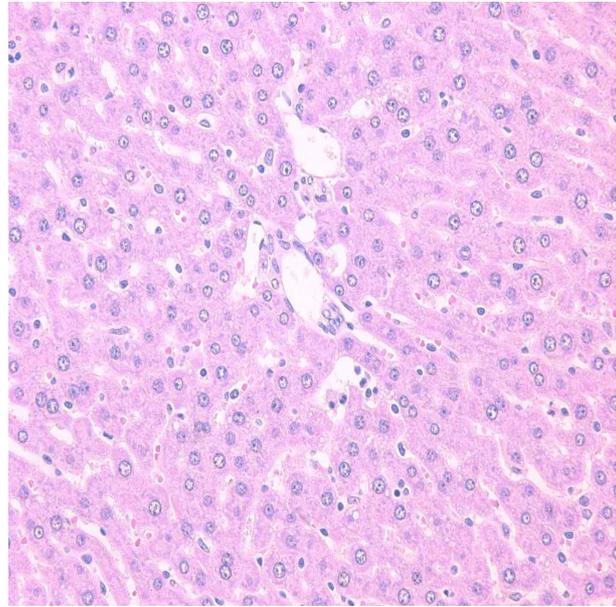
G1 - Liver x40



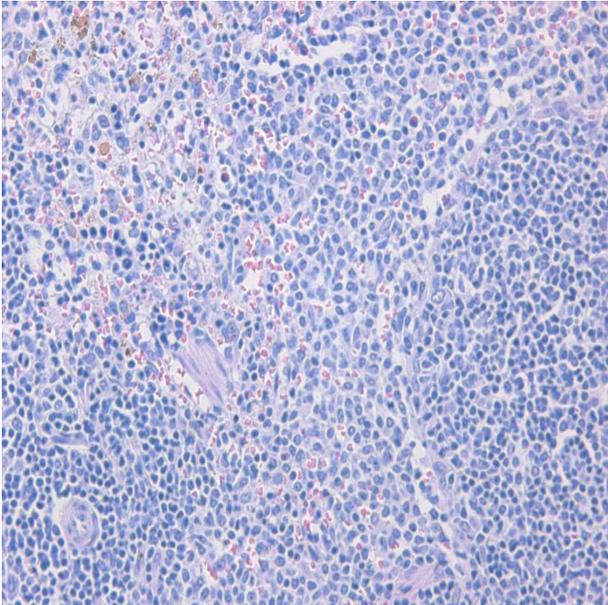
G2 - Liver x40



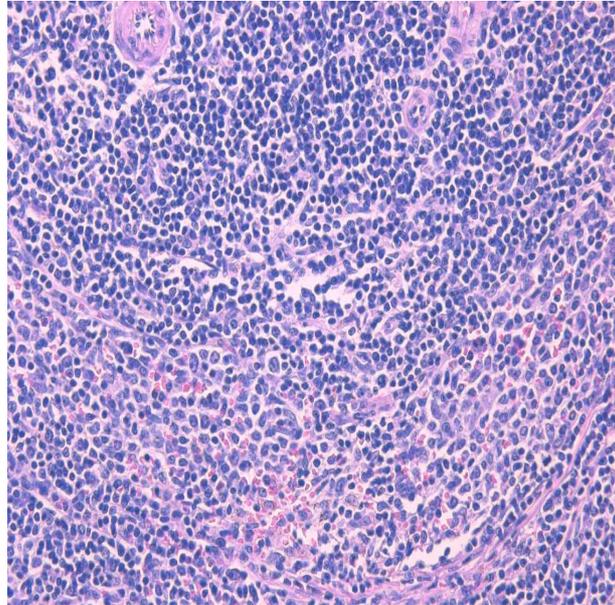
G3 - Liver x40



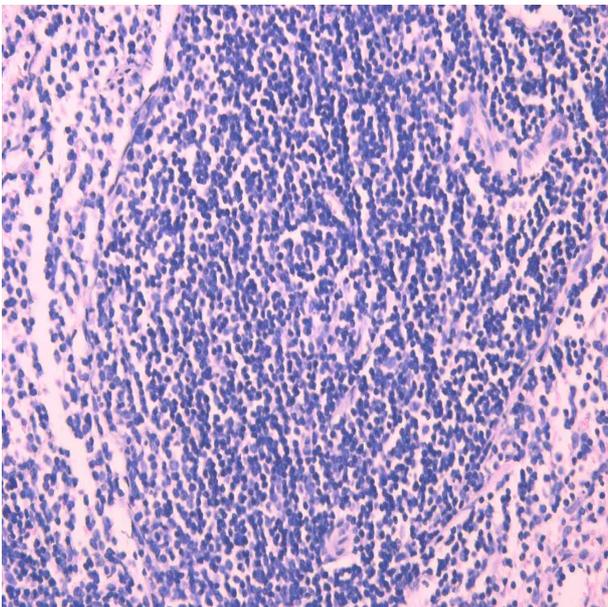
G6 - Liver x40



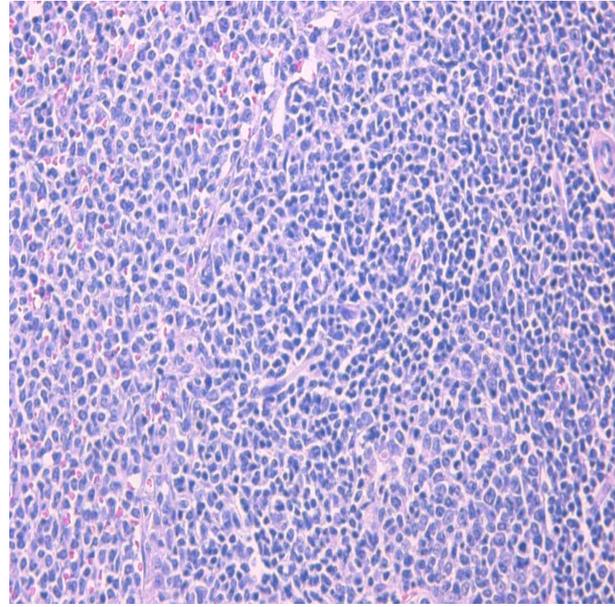
G1 - Spleen x40



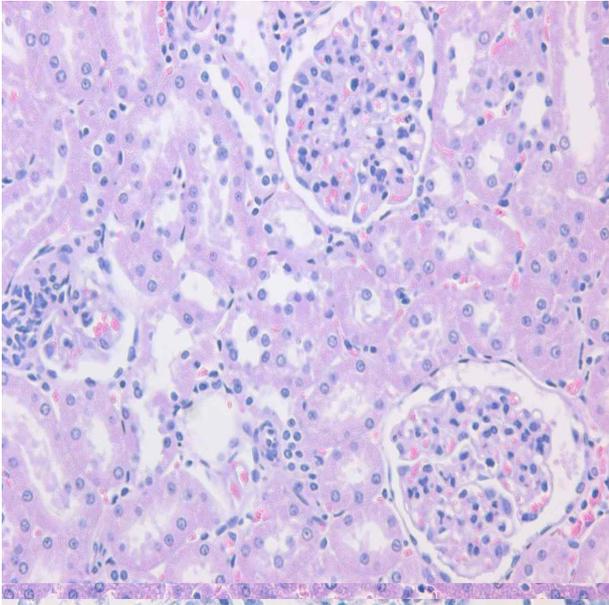
G2 - Spleen x40



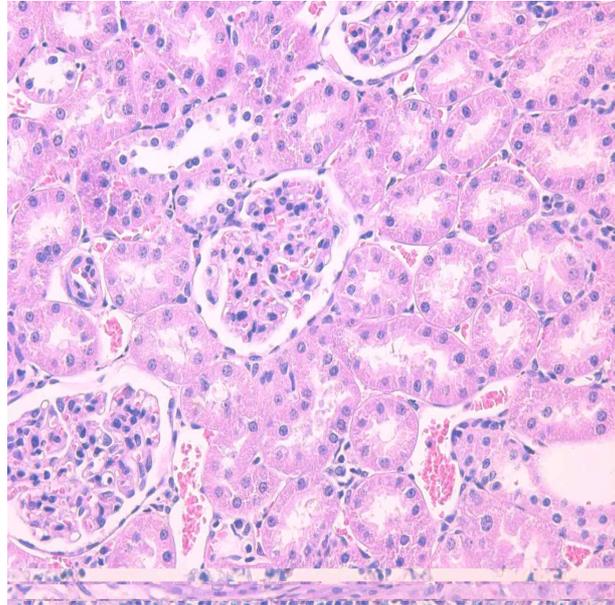
G3 - Spleen x40



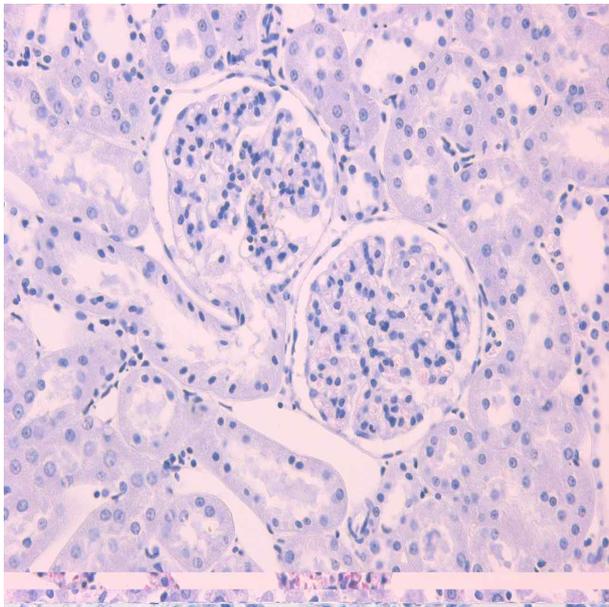
G6 - Spleen x40



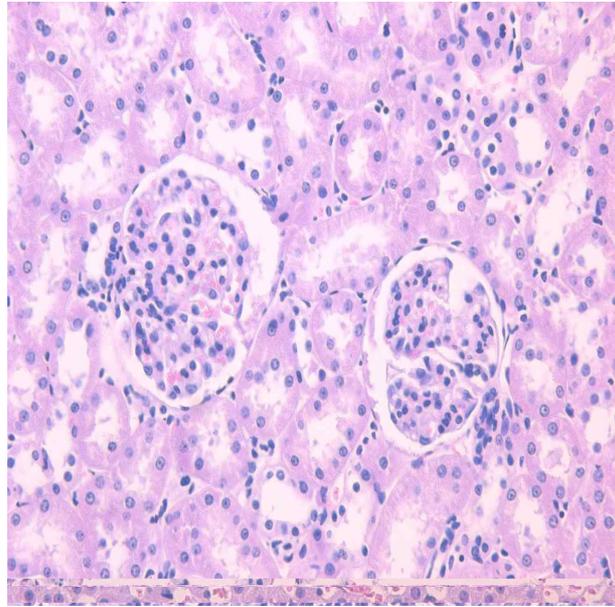
G1 -Kidney x40



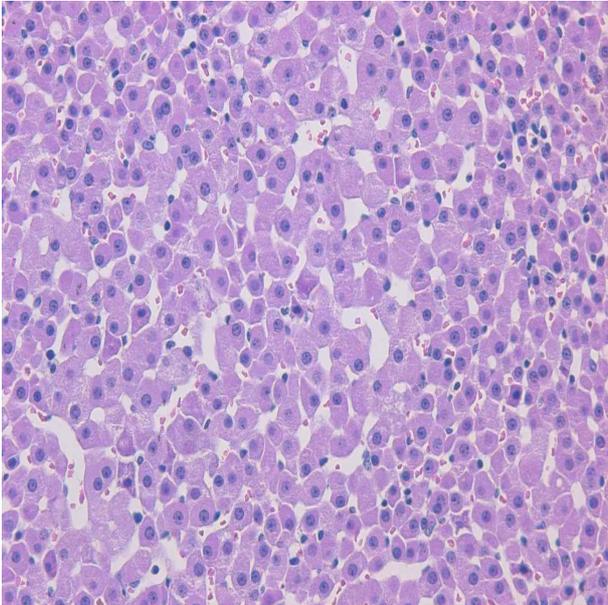
G2 - Kidney x40



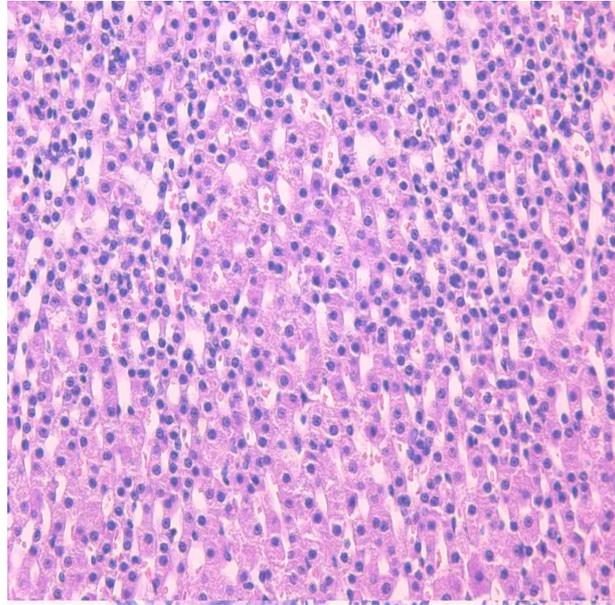
G3 -Kidney x40



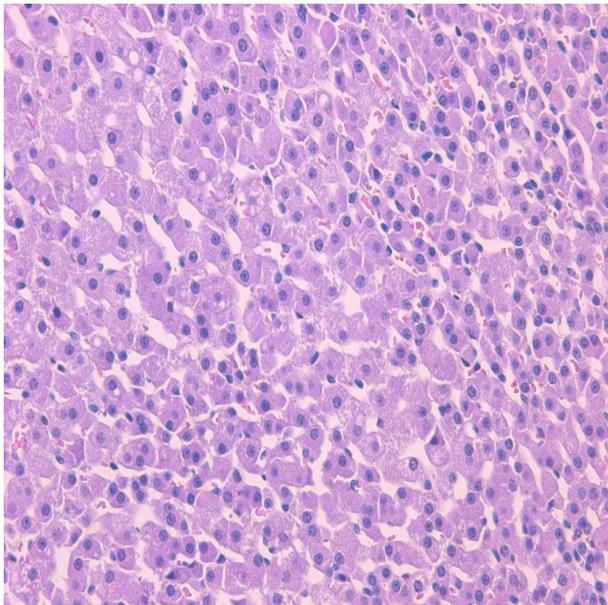
G6 - Kidney x40



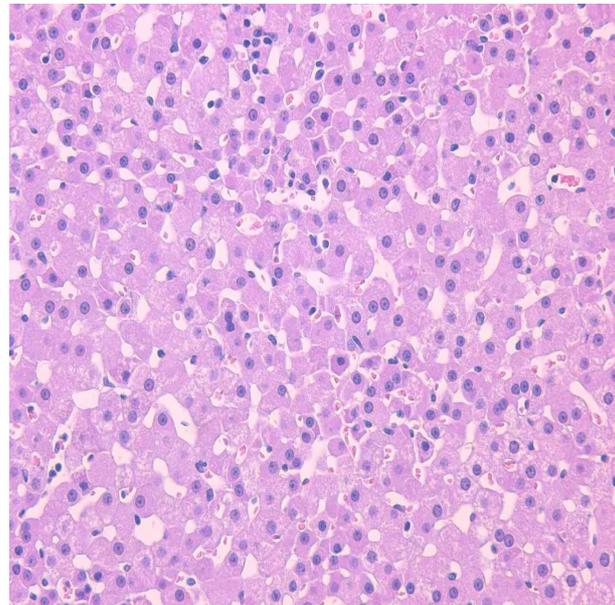
G1 - Adrenal gland x40



G2 - Adrenal gland x40



G3 - Adrenal gland x40



G6 - Adrenal gland x40

제 7 절 폐경기 개선식이 Streptozotocin으로 유도한 당뇨 모델에서 항당뇨 및 항산화작용에 미치는 효과 (추가연구)

1. 추가 연구배경

최근 서구화된 식생활과 생활습관 등으로 인하여 암, 뇌혈관질환, 심장질환 등 각종 성인병이 증가하고 있다(61). 그 중 대사성 질환인 당뇨병은 현재 전 세계적으로 급증하고 있는 추세이다. 통계청이 2010년 9월에 발표한 2009년도 사망원인통계를 보면 인구 10만명당 당뇨병이 19.6명으로 5위를 기록했다(62).

당뇨병은 인슐린의 분비와 그 작용 부족으로 혈액 내에 glucose가 다량 존재하여 고혈당 상태에 이르게 되는 내분비계 질환으로서, 이런 고혈당상태가 지속되면, 심혈관계 질환이나 신장질환, 말초부위 괴사, 백내장, 당뇨병성 망막증 등 많은 합병증을 야기 시킬 수 있는 질환으로 알려져 있다(63). 당뇨병은 크게 제1형 당뇨병(인슐린 의존성 당뇨병)과 제2형 당뇨병(인슐린 비의존성 당뇨병)으로 분류되며, 그 중 제2형 당뇨병이 전 당뇨병 환자의 95% 이상을 차지하고 있다.

고등동물의 혈당량은 소장에서 흡수된 glucose량, 간에 저장되어 있는 glycogen, 근육과 같은 조직에서 산화되는 glucose량, 지방질이나 단백질로 전환되는 glucose량 등과 관계가 있으며, 이러한 혈당량은 insulin, glucagon, adrenocorticotrophic hormone, glucocorticoid, adrenaline 등의 hormone 들에 의하여 조절 된다(64). 특히 중추신경계는 glucose만을 에너지원으로 이용하고 있기 때문에 항상 어느 정도 이상으로 혈중 glucose치를 유지하는 것은 매우 중요하다(64). 혈당치는 중추성이나 말초성에서 항상 감지되고 있으며, 혈당이 높아지면 부교감신경이 흥분하여 직접 glycogen 합성효소를 활성화하는 동시에 insulin 분비를 촉진시켜 혈당을 낮추고, 동시에 glucose는 직접 pancreas의 β 세포에 작용하여 insulin 분비를 촉진하고 glucagon 분비를 억제 한다(65). 이와 같이 신경이나 hormone의 변화가 간에서의 glycogen의 분해와 당 신생을 억제하고 glycolysis와 hexose monophosphate shunt의 활성을 높이고, 근육이 지방조직의 glucose 도입을 촉진하여 혈당을 낮추는 것이다(65). 반대로 혈당이 저하되면 교감신경이 흥분하여 직접 간의 glycogen phosphorylase를 활성화하는 동시에 insulin 분비를 억제하여 glycogen 분해와 당 신생을 높이며 glycolysis와 hexose monophosphate shunt의 활성과 근육이나 지방조직으로의 glucose 도입이 억제되어 혈당을 상승시키는 것이다(66). 당뇨병의 원인은 매우 다양하지만, 특히 이러한 insulin 부족이나 작용에 이상이 생기면 당뇨병이 유발되는 것이다(66). 그 결과로 고혈당이 초래되고, 나아가서 뇨당의 출현, 공복감으로 인한 다식, 고 삼투압에 따른 탈수 현상 및 그에 따른 수분 섭취 증가 그리고 당 대신에 지질과 단백질을 에너지원으로 사용하므로 체중 감소 등이 결과로 나타나게 된다. 또한 당뇨병이 장기간 지속되면 소혈관(망막, 신장), 신경 및 대혈관(벽)에 장애를 동반하게 된다(67).

당뇨병의 주요 대사적 특징은 혈당 농도의 상승과 지질 대사의 비정상성으로써 혈중 지단백과 유리지방산의 농도 상승으로 고지혈증을 초래하여 주요 합병증인 관상동맥질환을 일으키며 망막증, 고혈압 증 만성 당뇨 합병증을 일으키기도 하는데 최근에는 이러한 당뇨의

합병증에 산화적 스트레스가 관여한다는 보고가 있다(68). 인체는 정상적인 생리 상태에서는 자유 라디칼 (free radical)의 생산과 항산화 방어체계 (antioxidant defense system)의 활성이 균형을 이루고 있으며 체내에서 자유라디칼이 과다 생성되거나 혹은 항산화 방어체계의 기능이 감소되어 균형이 깨지면서 산화적 스트레스가 일어난다(69). 당뇨병 환자에서 산화적 스트레스가 증가하는 주요 원인은 비효소적 당화반응과 자동 산화적 당화 반응의 증가와 항산화 방어 체계의 손상 등으로 추측하고 있다(70).

당뇨병은 유전적인 요인과 환경적인 요인이 합쳐져서 나타나는데, 환경적인 요인에는 식생활, 운동부족 및 스트레스 등이 포함된다(71). 당뇨병은 고혈당의 지속화와 만성화로 혈관내 free radical의 발생을 촉진하여 체내 방어기전 저하와 free radical에 의한 조직 손상을 야기 한다(72). 그리하여 망막 질환으로 인한 실명, 뇌졸중, 심근경색증 및 만성신부전증 등의 여러 가지 합병증 발생을 유발하며 합병증으로 인한 심각한 결과를 초래할 수 있다(73-75). 특히 동맥경화증이나 고지혈증과 같은 혈관성 장애는 고혈당과 지질대사의 이상으로 인한 혈중 지질 증가와 지질과산화에 따른 조직의 손상으로 인하여 발병되며 지질대사에 대한 인슐린의 역할은 중성지방의 저장을 촉진시켜 지방세포에서 지방분해를 저해하는 작용을 하지만 인슐린의 분비가 저하되면 중성지방이 가수분해 되어 glycerol과 유리지방산으로 분해된다(76, 77). 또한 당뇨병의 경우 산화적 스트레스에 대한 감수성이 높아 생체의 reactive oxygen species (H_2O_2 , O_2^- , HO^-) 생성계가 정상인에 비해 더욱 촉진되고 지질과산화물이 다량 생성되어 단백질 파괴, 염색체 이상 및 적혈구 파괴 등의 세포 기능저하와 괴사를 일으킨다(78, 79). 그러나 이러한 reactive oxygen species (ROS) 에 대해 생체조직은 superoxide dismutase (SOD), glutathione S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GSH-Px), Catalase 및 glutathione (GSH) 등과 같은 내인성 제거제와 식품에 많은 vitamin A, C, E, flavonoid계 색소, poly phenol류 등의 생리활성 물질들이 유리기에 의한 조직 손상을 방어하지만 당뇨병의 경우 고혈당으로 인한 reactive oxygen species의 과도한 생성으로 상대적 내인성 제거제의 부족으로 합병증의 주된 기전으로 제시되고 있으며, 이러한 산화적 스트레스에 의한 조직손상과 체내의 항산화 방어체계의 변화에 대한 관심이 증가되고 있다(80-85).

당뇨병의 치료는 주로 혈당 조절의 불량에 의해 발생하는 당뇨병성 합병증이 발생이나 진전의 방지를 목표로 하고 있으며, 특히 제2형 당뇨병의 치료는 먼저 식사요법이나 운동요법으로 관리를 하고, 효과가 없으면 약물요법으로 경구혈당 강하제를 사용하고 있다(63). 현재 국내에서 치료용으로 sulfonyl urea계 약물이 사용되고 있지만 치료의 한계와 부작용으로 인하여 이와 유사한 효능을 가지면서도 안전하고 효과적으로 혈당을 조절할 수 있는 천연소재에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(86). 달개비풀, 인삼 및 달맞이꽃 종자유, 둥글레, 결명자, 구기자, 하늘타리 및 우영, 그리고 메밀, 누에 등은 과학적 연구가 어느 정도 진행된 바 있고(87), 엉겅퀴 (*Cirsium japonicum*)의 잎과 뿌리가 당뇨 유발로 인한 체중감소 및 식이 이용 효율 감소 억제 효과, 혈당 증가 완화 효과가 있음을 보고하였으며, 돼지감자 (*Helianthus tuberosus* L.)가 hamster β -cell인 HIT-T15 celldmltodwhs율을 높이고, 세포 보호효과를 가짐으로써 인슐린 분비능 정상화 및 NAD⁺ 함량을 증가시켜 혈당 조절과 당뇨에 효과적임을 보고하였다(88, 89).

이소플라본은 heterocyclic phenol로서 식물계에 널리 존재하는 천연화합물이며 특히 곡류와 대두에 많이 함유되어 있다. 대두의 활성물질 중 골 대사와 관련하여 활발하게 연구되고

있는 플라보노이드계 물질인 이소플라본은 대두에 약 0.2~0.4%, 대두 배아에는 1.0~1.5% 정도로 함유되어 있으며, 3개의 비배당체(aglycones)인 제니스테인(Genistein), 다이드제인(Daidzein), 글리시테인(Glycitein)과 이들에 당이 결합된 배당체 그리고 acetyl 및 malonyl 배당체 각각 3가지 총 12종류의 이소플라본 화합물로 이루어져 있다(90). 따라서 현재까지 대두 이소플라본에 대해서는 대두 이소플라본이 골다공증 치료약물인 ipriflavone과 구조적으로 유사하고 약한 에스트로겐의 활성을 갖는 성질 그리고 대두의 소비가 많은 아시아에서 관절골절 발생율이 낮은 점 때문에 폐경기 이후 골 손실 및 골다공증의 위험을 줄여 줄 수 있는 천연물질로서 관심의 대상이 되고 있다(91). 반면 이소플라본 함유 대두배아발효물 등에 대한 항당뇨 등에 대한 보고는 전무하여 본 과제에서 streptozotocin (STZ)을 이용하여 제1형 당뇨병 모델에서 항당뇨 효과를 규명하고자 본 연구를 시행하게 되었다.

2. 재료 및 방법

가. 실험동물 사육 방법

Sprague-Dawley (SD)계 8주령의 암컷 랫드를 (주)샘타코바이오코리아 (경기도 오산)로부터 구입하여 4주 동안 사육장과 조제사료에 순화기간을 거쳐 건강한 동물만을 시험에 사용하였다. 투여개시 시 체중은 280 ± 3 g이었다. 동물은 온도 (23 ± 2 °C), 상대습도 (50 ± 5 %), 및 명암주기 (07:00 점등 19:00 소등)가 조절되는 환경에서 사육하였고, 음수, 사료섭취량 및 분변 등의 채취를 위하여 전 시험기간 동안 steel cage를 사용하여 각각 1마리씩 사육하였다. 음수는 여과된 정제수를 자유섭취 시켰다.

실험군으로는 정상식이군 (normal diet), streptozotocin 투여군 (STZ alone) 그리고 대두 배아발효군으로 각 군당 10수씩 공시하였으며, 4주 동안 시험하였다.

나. 체중, 사료 및 음수섭취량의 측정

모든 동물에 대하여 투여 개시 직전에 1회, 투여 개시 후에는 매주 2회씩 3주간, 그리고, 부검 당일 체중을 측정하였다. 한편, 사육케이지 별로 매주 2회씩 3주간 사료와 음수소비량을 측정하여, 일일 평균사료섭취량(g/animal/day)과 평균음수섭취량(ml/animal/day)을 산출하였다.

다. 당뇨유발

실험동물을 당뇨유발 전 12시간 절식시킨 후 streptozotocin(S0136 STZ Sigma Chemical Co, USA)을 pH 4.5 0.01 M citrate buffer에 녹인 후 50 mg/kg b.w.(0.2 ml/200 g)로 복강 투여 하고 정상군은 동량의 citrate buffer 용액만 주사하였다. 주사 후 60시간 후 꼬리 정맥에서 혈액을 채취하여 혈당을 측정하였다.

라. 혈액생화학적 검사

혈액생화학적 검사는 부검전일 20~24시간 절식 시킨 동물을 에테르 마취하에, 복대정맥에서 전채혈해서 얻은 혈액을 혈청분리용 원심분리관 (SST-tube, BD vacutainer, USA)에 넣어 실온에 30분간 방치하여 응고시킨 다음, 원심분리 (3,000 rpm × 15 min)해서 얻은 혈청에 대해서 alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST), total cholesterol,

triglycerides를 포함한 생화학적인 검사를 생화학 자동분석기 (Hitachi-7180, Hitachi Medical, Co., LTD. Japan)를 이용하여 측정하였으며, 모든 실험과정과 검사법은 진단검사의학적 가이드라인에 준하여 실험하였다. 혈당치는 시험물질 투여전과 투여 후부터 1회/주 12시간 절식 후 꼬리정맥에서 혈당측정기 (주)올메디쿠스 GlucoDr AGm-2100, Korea)를 이용하여 측정하였다.

마. Insulin과 당화혈색소의 측정

혈청의 insulin의 농도는 ^{125}I -insulin 동물용 kit (RADIUM, USA)를 이용하여 radioimmunoassay (RIA)를 이용하여 측정하였다. 혈청 시료와 anti-insulin 0.2 ml을 각각 시험관에 넣고 0.2 ml의 ^{125}I 를 처리하여 37°C에 1시간 동안 반응시키고 2차 항체 0.1 ml을 넣고 충분히 섞은 후 상온에서 1시간 반응 직후 2, 500 rpm 15분간 원심 분리하여 얻은 침전물의 방사능의 양을 Y-scintillation counter에서 1분간 counting하여 측정하였다. 모든 시험항목에 대해서는 3번을 공히 반복 측정하여 insulin의 농도를 구하였다. 한편 당화혈색소의 양은 일반 혈액검사를 시행하고 남은 EDTA의 시료를 HPLC (Bio Rad, USA) 방법을 이용하여 측정하였다.

바. 간의 효소 활성 측정

Bansal 등(92)의 방법에 따라 적출한 랫드의 간을 잘게 썰고 150 mM KCl을 함유한 30 mM Hepes 완충액 (pH 7.4)으로 5배 희석하여 균질화한 다음 700 g로 20분간 원심 분리하여 상등액을 얻었다. 그 상등액을 11,000 g로 30분간 고속원심 분리하여 pellet을 제거하였다. 그 상등액을 다시 105,000 g로 60분간 초원심분리하여 세포질 분획을 얻었으며, pellet은 130 mM KCl 함유 Hepes 완충액으로 씻어낸 다음 같은 완충액으로 재균질하여 마이크로솜 분획을 얻었다. 마이크로솜과 세포질 분획을 분리하는 전 과정은 0~4°C의 저온실에서 수행하였으며, 조제한 분획을 -70°C에 보관하면서 superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST), glutathione (GSH) 및 MDA의 실험에 각각 사용하였다. 단백질 정량은 Bovine serum albumin (BSA)을 표준물질로 사용하여 Lowry 등(93)의 방법에 따라 측정하였다. 한편 간 조직의 superoxide dismutase의 활성도는 Cropo 등(94)의 방법, Catalase의 활성도는 Aebi의 방법, glutathione-S-transferase의 활성도는 Habig 등(95)의 방법, glutathione의 함량은 Uchiyama 등의 방법과 Ellman 등(96)의 방법에 따라 측정하였으며, MDA의 함량은 Suematsu 등(97)의 방법에 따라 시험관에 20% acetic acid 1.5ml, 8.1% SDS 0.225ml, 증류수 0.075ml, 1.2% TBA 용액 1ml, 그리고 간의 균질액, cytosol, 혹은 microsome을 각각 넣었다. 반응액은 100°C/30분 가열 후 원심분리 (3,000rpm, 10min)하여 상등액에 대하여 532nm에서 흡광도를 측정하였으며 검량선은 malondialdehyde (MDA)를 사용하여 환산하였다. 또한 microsomal membrane의 지질과산화도를 비교하기 위하여 NADPH 0.1mM과 ADP-Fe $_2^+$ (ADP 0.5mM, Fe $_2^+$ 0.02mM)을 첨가하고 시험관에 microsome을 넣은 후 각각 37°C에서 0, 5, 10, 30 60분 반응 시켜 위와 동일한 방법으로 MDA함량 변화를 측정하였다. 모든 시험항목에 대해서는 3번을 공히 반복 측정하여 각각의 농도를 구하였다.

한편 Glycogen의 함량과 당대사를 위한 효소의 전처리는 간 2 g을 0.1 M ice cold

citrate buffer (pH 4.2) 6 ml을 균질화한 후 3,000 rpm에서 10분간 원심 v분리하여 상층액에서 glycogen의 함량, glucose-6-phosphate (G-6-Pase)와 glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PDH)의 활성을 각기 측정하였다. Glucokinase의 측정은 간 2 g을 1 mM EDTA가 혼입된 buffer 6 ml에 넣어 균질화한 다음 12,000 g에서 1시간 동안 원심 분리하여 상층액을 취하여 Glycogen의 함량은 Murat의 방법, G-6-Pase의 활성도는 Baginaki 등의 방법, G-6-PDH의 활성도는 Demoss의 방법(98), Glucokinase의 활성도는 Hara 등(99)의 방법에 따라 각각 측정하였다. 단백질의 함량은 앞선 간조직의 항산화 효소와 동일한 Lowry 등의 방법에 따라 측정하였다.

병리조직학적 검사를 위하여 장기 적출 시 육안 관찰 후 무게를 측정하고 10% nature buffer formalin에 고정시킨 후 통상적인 방법으로 파라핀에 포매한 다음 4 μ m 두께로 박절하고 hematoxylin-eosin (H&E) 염색을 실시하였으며, 한편 대동맥(대동맥궁으로부터 복대동맥말단)은 적출하여 질소고정을 시킨 후 -70°C에서 보관하면서 사용하였다.

사. 통계처리

실험 결과는 PASW(version 19.0)을 이용하여 각 실험군마다 평균과 표준편차를 구하였고, One-way analysis of variance (ANOVA) t-test를 한 후 Duncan's multiple-range test에 의하여 각 실험군간의 유의차 검증을 확인하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 대두배아발효물이 체중의 변화 및 음수사료에 미치는 영향

실험기간 동안 체중변화를 보면 당뇨유발 후 정상군의 체중은 지속적으로 증가하였으나 당뇨대조군과 시험물질 급여군인 대두배아 발효물의 급여군에 있어 체중은 감소하였다. 실험 3주차부터 정상군에 비해 당뇨유발군의 체중이 유의적으로 낮은 수준을 보였으며 ($p<0.05$), 이는 Preston 등(100)의 연구에서 보고된 STZ로 당뇨병을 유발시킨 쥐의 체중과 성장률이 감소한다는 결과와 일치하였다. 실험 5주차 때에는 대두배아 발효물의 급여군에서 당뇨대조군에 비해 유의적으로 높게 나타났다. 그러나 다른 두 실험군은 유의적인 차이는 관찰되지 않았다. 실험 4주 동안의 체중증가율이 정상군에 비해 당뇨대조군이 유의적으로 낮음을 알 수 있다($p<0.05$). 당뇨 유발 쥐는 당뇨 유발 후 β -세포가 파괴되어 insulin의 생성이 부족하게 되고 insulin의 기능 또한 저하되어 세포 내 포도당의 이용률이 감소하게 되며, insulin의 작용 저하로 인하여 골격근으로부터의 아미노산 유입이 감소하여 단백질의 합성 작용이 저하된다. 이러한 현상으로 인해 세포 내의 에너지원이 부족하게 되어 간, 근육, 지방조직의 지방과 단백질이 부족한 에너지 생산에 이용되어 용질분자 교환이 가능한 모세혈관의 최대 면적이 상대적으로 감소하여 골격근 위축현상으로 체중감소가 일어나는 것이다. 이번 실험결과 역시 정상군에 비하여 당뇨유발군의 체중 증가율이 감소함을 알 수 있었다.

한편 음수와 사료의 섭취량에 미치는 효과에서는 당뇨대조군과 대두배아발효물의 급여군과 비교했을 경우 3주차부터 식이섭취량이 유의적으로 증가하였고, 당뇨대조군은 당뇨유발 후 식이섭취량이 유의적으로 감소하였다($p<0.05$).

식이이용효율은 정상군이 당뇨대조군 및 실험군과의 비교에서 유의적으로 높았으며

($p < 0.05$) 당뇨대조군이 시험물질 급여군인 대두배아 발효물군에서 식이이용효율이 떨어지는 것으로 나타났다. 이와 같은 식이이용효율의 감소는 당뇨로 인한 체내 대사의 퇴행적인 변화 때문인 것으로 보고되고 있다 (data not shown).

나. 대두배아발효물이 혈당, 호르몬 및 당화혈색소 농도에 미치는 영향

실험동물의 적응 기간이 포함되어 있던 1주를 제외한 4주 동안 주 1회 혈당을 측정하였다. 당뇨 유발 전 실험동물의 혈당을 측정하였고 당뇨유발 후 1주일 간격으로 일정한 시간에 비공복시의 실험동물을 대상으로 하여 채혈을 실시하였다. 실험 3주째부터 혈장 포도당의 수준은 STZ 주입으로 인하여 모든 당뇨유발군이 정상군에 비해 유의적으로 증가하였다 ($p < 0.05 \sim 0.01$). Kahn CR(101)의 연구에서는 당뇨유발 쥐의 고혈당 증상은 STZ가 췌장 β -세포의 포도당에 대한 신속한 인슐린 분비반응을 손상시켜 당질 및 기타 대사이상으로 인해 발생하는 것으로, 인슐린 부족으로 인하여 혈액에서 조직으로의 당 유입이 감소되고, 간에서 혈액으로 당 배출이 증가하여 고혈당을 초래하였다. 반면 시험물질의 급여군인 대두배아 발효물의 급여군에서는 유의하게 억제되는 것으로 관찰되었다. 이러한 결과는 본 연구결과인 2차 선행연구결과와 3차년도와도 일치하는 것으로 대두배아 발효물이 항당뇨 효과가 있는 것으로 관찰되나 현재로서는 어떠한 결론에 도달하기는 어려우나 향후 기전 연구를 포함한 다양한 실험이 동반되어야 할 것으로 생각된다.

한편 인슐린과 당화혈색소 또한 혈당의 결과와 유사한 결과를 보였다. 당대사의 조절에 있어서 가장 중요한 호르몬인 insulin은 췌장의 β -세포에서 분비되어 target cell의 insulin acceptor와 결합하여 그 작용을 나타나게 된다. 표적기관으로는 골격근과 간장 및 지방세포가 당대사에 중요한 역할을 하며 특히 체중의 20%나 되는 골격근이 가장 중요하다고 할 수 있다. insulin의 분비의 감소는 골격근의 포도당 섭취의 감소와 더불어 골격근의 주 에너지원이 지방으로 전환되는 등 당대사에 많은 변화를 초래 한다. Allen 등(102)은 당화혈색소 (HbA1c)가 정상인에서는 혈색소의 3~6%를 차지하며, 당뇨병 환자에서는 정상인 보다 2~3배 증가되며, 대부분 HbA1c라고 하였다. 또한 주위의 혈당농도에 비례하여 서서히 증가하므로 HbA1c의 수치는 혈당의 변화를 반영할 수 있다(Table 7-1).

Table 7-1. 대두배아발효물이 혈당, 호르몬 및 당화혈색소 농도에 미치는 영향

Group	Glucose (mg/dl)	Insulin (ng/ml)	C-peptide (pg/ml)	HbA1C (%)
Normal	113.5±10.2	4.15±0.54	755.6±51.2	3.38±0.21
STZ	314.2±27.3**	1.67±0.55**	468.3±38.7**	7.59±0.51**
STZ-SEF	236.4±31.5**,#	3.09±0.35*,#	521.5±45.4	6.63±0.38**,#

*, ** : Significantly different from normal, $P < 0.05 \sim 0.01$

#, ## : Significantly different from STZ, $P < 0.05 \sim 0.01$

다. 대두배아발효물이 신장기능 지표에 미치는 효과

혈중 뇨소질소(blood urea nitrogen)는 혈액 속에 존재하는 요소로 단백질이나 아미노산의 최종산물이며 간에서 생성되어 신장에서 배출되는데, 신장 기능이 나쁘면 배설되지 못하고

몸속에 축적되기 때문에 혈청 BUN (blood urea nitrogen)의 농도는 신장 기능을 평가하는 좋은 지표이다. 본 실험에서 나타난 BUN(blood urea nitrogen)의 수치는 정상군과 당뇨유발군을 비교하여 모든 당뇨유발군이 정상군보다 유의적으로 높은 수치를 나타내었으며 ($p<0.05$), 당뇨대조군과 시험물질인 발효물의 급여군 간의 비교에서는 유의적인 차이는 없었으나 감소하는 경향을 보였다.

크레아티닌(creatinine)은 요소질소나 요산과 마찬가지로 체내에서 에너지로 사용된 단백질의 노폐물이다. 즉 크레아티닌(creatinine)은 근육에서 에너지로 사용된 후 creatine이나 creatine phosphate로 형성되어 혈중으로 유출되어 신장으로 배출되게 되는데 신장 기능이 나빠지면 정상치(0.1~1.2 mg/dl)에서 벗어나게 되므로, 혈중 크레아티닌(creatinine)의 농도는 신장 기능의 지표가 된다. 본 실험에서 크레아티닌(creatinine) 수치를 볼 때 당뇨대조군이 정상군보다 높은 경향을 보였으나 통계적인 유의성은 관찰되지 않았다(Table 7-2).

Table 7-2. 대두배아발효물이 신장기능에 미치는 영향

Group	Creatinine	BUN
Normal	0.43±0.1	19.5±2.6
STZ	0.52±0.3	33.6±5.6*
STZ-SEF	0.48±0.2	29.5±7.2*

*, ** : Significantly different from normal, $P<0.05\sim0.01$

라. 대두배아발효물이 지질대사의 지표에 미치는 효과

총 콜레스테롤(total cholesterol)의 수치는 정상군에 비하여 모든 당뇨유발군이 유의적으로 높게 나타났으며($p<0.05$), 당뇨대조군과 시험물질 급여군 간에 유의적인 차이는 없었으나 낮은 경향을 보였다. HDL-C의 경우 정상군에 비해 모든 당뇨유발군이 유의적으로 높은 수치를 나타내었으며($p<0.05$), 이는 기존 연구들에서도 이와 유사한 결과들이 보고되고 있지만 명확한 기작에 대해서는 추가적인 연구가 필요하다. 당뇨대조군과 시험물질군 간의 비교에서는 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

Glycerine과 3분자의 지방산이 에스테르 결합을 한 화합물인 TG(triglyceride)는 탄수화물로부터 합성되는 중성지방으로 가수분해 되어 유리지방산(free fatty acid)을 혈액 중에 방출함으로써 유리지방산의 축적과 인슐린저항성을 유발하게 된다(103). 즉 당뇨병합병증의 경우 고지혈증과 고혈압을 동반하게 되는데 고지혈증은 중성지방과 직접 연관 된다(103). 중성지방 (triglyceride)의 수치에서는 정상군에 비해 당뇨대조군에서 유의적으로 높게 나타났으며($p<0.05$), 당뇨대조군과 시험물질의 급여군을 비교하였을 때에는 억제하는 경향은 보였으나 통계적 유의성은 인정되지 않았다(Table 7-3).

Table 7-3. 대두배아발효물이 지질대사에 미치는 영향

Group	T. Cholesterol	Triglyceride	HDL-C	LDL-C
Normal	102.3±3.84	112.3±3.2	55.6±1.8	43.5±1.32
STZ	135.6±5.34*	138.9±2.6*	38.2±3.8*	35.2±3.8*
STZ-SEF	121.6±4.6	81.6±1.8**	41.3±2.4	41.3±2.4#

*, ** : Significantly different from normal, P<0.05~0.01

#, ## : Significantly different from STZ, P<0.05~0.01

마. 대두배아발효물이 간 기능 지표에 미치는 효과

대두배아발효물이 간독성에 미치는 효과를 보기 위해 혈중의 aspartate aminotransferase (AST)와 alanine aminotransferase (ALT)를 각각 측정하였다. 두 지표 모두 정상대조군 대비 당뇨대조군에서 유의하게 증가하였다. 이는 STZ에 의하여 간손상이 관찰되었다. 이러한 AST의 증가는 De Ritis와 Coltorti에 의해 인정된 후 간세포 손상의 표준 생화학적 지표로 사용되어 왔다(104). 또한 Kim 등은 혈청 ALT와 AST의 증가는 간세포의 파괴를 의미하며 간질환의 진단 및 치료효과를 판정함에 있어서 매우 유용한 지표라고 하였다(105). 한편 Kim 등(106)은 간기능이 회복됨에 따라 점차 정상범위로 돌아온다고 하였는데, 본 실험에서는 대두배아발효물의 급여로 당뇨유발로 증가된 AST의 활성을 유의하게 억제하였다 (p<0.05). 따라서 대두배아발효물이 STZ로 유발된 간손상에 대하여 간기능 개선효과가 있음을 관찰하였다.

Table 7-4. 대두배아발효물이 간기능대사에 미치는 영향

Group	AST	ALT
Normal	94.3±14.2	41.2±5.1
STZ	135.4±15.3*	63.7±6.4*
STZ-SEF	112.7±10.2#	51.2±2.2

* : Significantly different from normal, P<0.05

바. 대두배아발효물이 당질 관련 효소대사에 미치는 효과

대두배아발효물이 간조직 중의 당질 관련 효소대사에 미치는 효과에 대해서 glycogen의 함량은 정상대조군 대비 당뇨유발군에서 유의하게 감소한 반면 시험물질인 대두배아발효 급여군에서는 통계적인 유의성은 관찰되지 않았으나 증가하는 경향을 보였다. 이는 STZ 투여에 의해 β-cell의 파괴로 인슐린의 분비가 저하되어 간내의 glycogen synthase 활성이 감소되고 glycogen을 분해하는 효소인 glycogen phosphorylase의 활성이 증가되어 간내의 glycogen의 함량을 감소시킨다는 보고(107)에 따라 당뇨대조군에서 감소를 나타내었으나 시험물질인 대두배아발효물에서는 증가하는 경향을 보여 혈청 중의 혈당치를 감소시킨 결과를 뒷받침한다고 하겠다. Glucokinase의 활성은 정상군에 비하여 당뇨대조군에서 유의하게 감소하는 경향을 보여 다른 여러 선행연구결과들의 결과를 뒷받침한다고 하겠다(108). GK

는 당대사 항상성 유지에 관여하며 insulin에 의해 조절되며, 특히 당뇨병에 있어서 GK 활성 감소가 특징적으로 나타나며, 활성 감소시 당대사 이용을 저하시킨다(109). 본 실험 결과 시허물질인 대두배아발효 급여군에서 유의하게 증가하였다 ($p < 0.05$). 이러한 결과는 G-6-Pase와 G-6-PDH에서의 결과와 동일한 결과를 보였다. G-6-Pase는 주로 간과 신장에 분포하며 microsome에 존재하는 막부착 효소로서 탄수화물 대사에 중요하게 관여하며, 또한 glycogen의 분해 및 포도당 신생 작용의 촉매 효소이며 cyclic AMP, glucocorticoids, glucose, fatty acid 및 간 췌장 부분의 절개에 의해 발현이 증가되는 반면에 insulin, tumor necrosis factor 및 interleukin-6에 의해 억제 된다(110). 특히 STZ 투여는 G-6-Pase mRNA의 발현을 증가시키고 그 결과 당뇨병에서 G-6-Pase의 활성을 증가시키며 고혈당과 함께 혈장의 protein Kinase의 활성도와 insulin의 농도를 감소시킨다고 하였다(111). 이는 본 실험에서도 대두배아발효 급여군에서 이와 같은 결과를 뒷받침한다고 생각되어 대두배아발효물의 급여가 항당뇨 효과가 있다는 것을 뒷받침한다고 하겠다.

Table 7-5. 대두배아발효물이 당질 관련 효소대사에 미치는 영향

Group	Glycogen (mg/tissue)	Glucokinase (unit/mg protein)	G-6-P (nmoles/mg/protein/min)	Glucose-6-PDH (nmoles/mg/protein/min)
Normal	169.7±5.52	47.22±0.52	1.55±0.13	0.76±0.06
STZ	154.3±16.4*	30.12±0.67*	1.91±0.31*	0.55±0.03*
STZ-SEF	160.2±8.6	40.9±0.43#	2.13±0.26*,#	0.59±0.07*,#

*, ** : Significantly different from normal, $P < 0.05 \sim 0.01$

#, ## : Significantly different from STZ, $P < 0.05 \sim 0.01$

사. 대두배아발효물이 항산화 관련 효소대사에 미치는 효과

당뇨병으로 인한 활성산소의 생성 및 활성에 대한 항산화 효소의 작용은 매우 중요하다. 활성산소를 제거하여 당뇨병의 합병증을 예방할 수 있다.

SOD(superoxide dismutase)는 독성이 강한 유해활성산소를 무해한 산소와 과산화수소로 분해하는 일을 한다. SOD(superoxide dismutase)는 활성산소를 제거하는 데 있어 최전방에서 가장 크고 빠른 속도로 항산화 효소 중에서도 과잉 생성된 활성산소의 해독을 방지하는 데 가장 중요한 역할을 한다. CAT(catalase)는 SOD(superoxide dismutase)에 의해서 분해되어 생긴 과산화수소를 산소와 물로 분해하는 효소이다. SOD(superoxide dismutase)는 2개의 superoxide radical을 과산화수소로 변화시킴으로써 항산화 기능을 나타내지만 이 반응에서 과산화수소를 만들어내고 이것은 인체에 여러 가지 영향을 미치며 그 자체로 SOD(superoxide dismutase)에 손상을 주어 SOD(superoxide dismutase)의 기능을 무력화시킬 수 있다. CAT(catalase)는 이런 과산화수소를 제거하는 항산화 효소인 것이다. GSH(glutathione peroxidase)는 CAT(catalase)와 같이 과산화수소를 산소와 물로 분해하는 효소이며, 과산화지질을 분해하여 해독시키는 글루타치온의 활동을 촉진하는 효소이다. GSH(glutathione peroxidase)는 CAT(catalase)가 먼저 과산화수소를 제거한 후에 제거하지 못한 나머지 과산화수소를 2차적으로 제거한다. GST(glutathione S-transferase)는 활성산소 중에 가장 독성이 강한 hydroxy radical 같은 전자친화성 기질을 glutathione에 결합시키

는 반응을 촉매하여 GSH(glutathione peroxidase)로 하여금 활성산소를 제거하게 도와주는 효소이다. 과산화 지질 반응은 유리기들에 의해 세포막 지질의 불포화지방산들이 산화적 분해를 일으키는 것으로 MDA(malondialdehyde)는 과산화지질의 지표가 된다.

실험동물의 간 조직을 이용하여 이러한 여러 항산화 효소들의 활성 능력을 알아보려고 하였다(Table 7-6). SOD(superoxide dismutase)의 수치는 정상군과 당뇨유발군을 비교하였을 때, 당뇨대조군과 시험물질인 대두배아발효 급여군에서 유의적으로 낮은 것을 볼 수 있었다 ($p<0.05$). 당뇨대조군과 대두배아발효 급여군을 비교하여 당뇨대조군에 비해 유의적으로 높게 나타났으며 이는 활성산소를 H_2O_2 와 O_2 로 전환시켜 활성산소에 의해 생기는 산화적 손상의 일차적 방어에 관여하며 비정상적으로 증가된 활성산소를 제거하기 위해 그 활성도가 높아진다는 보고에 따라 여주가 STZ 투여에 의해 생성된 활성산소를 억제할 수 있는 생리 활성 물질이 함유되어 있는 것으로 사료된다(112).

CAT(catalase)의 수치는 모든 당뇨유발군이 정상군보다 유의적으로 높게 나타내어 Lee 등과 Kakkar 등의 보고와 유사한 결과를 나타내었다. 간 조직에서 CAT(catalase) 함유량이 큰 것은 지방의 자동산화, 유기물의 산화 또는 SOD(superoxide dismutase)에 의해 생성된 H_2O_2 를 분해하기 위한 것이라는 보고에 따라 본 실험 결과 당뇨유발군에서 CAT(catalase) 활성도가 증가한 것으로 사료 된다(112). 당뇨대조군과 당뇨실험군을 비교하였을 때에는 대두배아발효 급여군이 당뇨대조군보다 유의적으로 낮게 나타났다($p<0.05$). SOD는 세포내 호흡작용의 부산물로 생성되는 superoxide radical이 효소반응에 의해 제거됨으로써 과산화수소가 세포내에 축적되는 것을 막아 세포내 항산화 능을 증가시킨다는 기전에 따라 본 연구에서도 고지방식이에 의한 독성 물질에 의한 세포의 산화 스트레스 저하에 따른 간조직의 손상이 억제되어 SOD의 활성이 증가된 결과로 생각된다. 반면 시험물질 투여군에서는 이러한 기전에 의하여 억제된 것으로 생각된다(112).

GST(glutathione S-transferase)는 정상군과 당뇨유발군을 비교하여 정상군보다 당뇨대조군과 대두배아발효물의 급여군에서 유의적으로 낮게 나타났고 당뇨대조군 대비 시험물질인 대두배아발효물 급여군에서는 증가하는 경향은 관찰되었으나 통계적인 유의성은 나타나지 않았다. 이는 GST(glutathione S-transferase)가 체내에서 생성된 친전자성 독성 물질에 glutathione의 thiol기를 포집시켜서 독성 물질을 전이 분해시키는 작용을 한다는 보고에 따라 여주가 독성 물질을 glutathione에 포집시켜 배설을 촉진시킴으로써 STZ 투여에 의한 간손상을 보호하여 그 함량이 증가된 결과로 생각 된다(112). GSH(glutathione peroxidase)의 수치에서는 당뇨유발군이 정상군보다 유의적으로 낮은 수치를 보였고, 당뇨대조군과 시험물질인 대두배아발효 급여군과 비교하였을 때에는 증가하는 경향이 관찰되었으나 통계적인 유의성은 나타나지 않았다.

MDA(malondialdehyde)의 수치의 경우에는 모든 당뇨유발군이 정상군보다 유의적으로 높은 수치를 보였다($p<0.05$). 이는 STZ 투여로 인한 당뇨유발 시 oxygen free radical의 생성과 산화적 스트레스가 증가하여 조직 내의 과산화지질이 증가된 결과 간 조직에서 함량이 증가한다는 보고와 비슷한 결과를 나타내었다(113). 당뇨대조군 대비 시험물질인 대두배아발효 급여군에서 유의하게 억제되는 것으로 관찰되었다 ($p<0.05$).

Table 7-6. 대두배아발효물이 항산화 관련 효소대사에 미치는 영향

	SOD (unit/mg)	CAT (nmol/min)	GST (nmol/g)	GSH (mol/g)	MDA (nmol/g)
NC	14.2±3.7	185.8±13.4	106.9±5.4	8.3±0.7	1.4±0.2
STZ	12.6±1.1*	278.6±15.0*	82.9±7.4*	6.9±0.4*	2.3±0.5*
SEF	13.8±1.4*,#	207.7±14.5*,#	93.2±28.4*	7.9±0.3	1.9±0.3*,#

*, ** : Significantly different from normal, P<0.05~0.01

#, ## : Significantly different from STZ, P<0.05~0.01

아. 병리조직학적 관찰

간조직에 있어 정상군의 경우 간소엽구조의 중앙에 중심정맥이 위치하고, 간세포들이 간소엽의 가장 자리를 향해 방사형으로 코드 모양의 배열을 보였으며, 문맥과 간소엽구조의 경계가 잘 이루어진 정상적인 구조를 보였다. 한편 당뇨유발물질 투여군에서는 일부 간세포에서 동양모양혈관의 확장과 공포가 간혈적으로 관찰되었다. 반면 시험물질 투여군에서는 농도에 관계없이 유의한 소견은 관찰되지 않았다. 따라서 여주분말의 투여가 간실질 손상에 있어 어떠한 변화도 야기하지 않는 것으로 생각된다.

신장조직에서는 일부에서 만성진행성신증 (chronic progressive nephropathy)이 관찰되었고, 세포질내의 공포성 변화가 부분적으로 관찰되었으나 이러한 변화는 정상적인 동물에서도 세포질내의 공포와 만성신증이 부분적으로 관찰되기도 하며, 본 연구에서는 시험물질에 의한 영향으로 보기에 어렵다고 하겠다.

한편 폐장의 경우 정상군과 시험물질투여군 모두에서 혈관주위의 염증세포의 침윤을 보였다. 폐포벽에 대한 손상이 심할 경우에는 기저막이 파괴되면서 모세혈관으로부터 삼출물이 발생하여 염증반응을 일으킨다. 섬유소가 폐포벽에 국소적으로 침착할 수 있으며, 대식세포와 섬유아세포 등에 의해서 간질성 섬유화로 인해 두꺼워 질 수 있다. 현재 본 실험에서 모두에 있어서 폐 조직은 부분적으로 차이는 있으나 정상대조군과 시험물질투여군 모두에 있어 혈관주위의 염증세포의 침윤이 (perivascular inflammatory cell infiltration)이 관찰되었다. 이러한 변화는 정상 대조군을 포함하여 모든 시험군에서의 변화로 시험물질에 의한 영향이기 보다는 실험실의 환경에 의한 영향으로 판단된다고 하겠다. 즉 폐에서 관찰된 혈관주위의 염증세포의 침윤은 SPF 사육구역에서 원인 불명의 간질성 폐렴의 빈도가 높다는 기존의 보고와 유사하며, 이는 본 시험물질에 의한 변화는 아닌 것으로 판단된다.

면역장기인 비장은 림프구의 저장, 항원의 농축, 항체생산, 쇠퇴한 적혈구의 처리 그리고 일부의 조혈작용 기능을 포함하고 있다. 본 시험에서 모든 시험동물에서 splenic zone에서 T세포와 B세포의 충실도와 감소상태 기능항진과 괴사, 경색 그리고 macrophages의 정도 등을 관찰한 결과 정상대조군 및 대조군을 포함한 시험물질 투여군 모두에서 유의한 변화는 관찰되지 않았다(Data not shown).

제 8 절 Equol 의 항염증 활성 효과

1. Equol의 Macrophage 염증반응에 대한 항염증 활성

가. 연구 재료 및 방법

콩에서 유래하는 배당체 형태의 이소플라본이 체내에서 대사되어 최종적으로 생산되는 equol의 항염증 활성을 측정하기 위하여 lipopoly- saccharide(LPS) 처리에 의해 유도되는 대식세포(macrophage, RAW 264.7세포)의 염증반응에 대한 억제효과를 조사하였다. LPS-유도 대식세포 염증반응의 억제활성은 염증세포에서 분비되는 nitric oxide(NO)와 prostagradin-E2(PGE2)와 같은 염증성 매개인자와, interleukin-1(IL-1), IL-6 및 tumor necrosis factor-a(TNF-a)와 같은 염증성 사이토카인(pro-inflammatory cytokines)의 분비 억제와 그에 관련된 세포 내 기전해석을 통해 검토하였다. 또한 LPS에 의해 in vivo에서 유도되는 치명적인 염증반응(lethal septic shock)인 septicemia(패혈증)에 대한 equol의 억제활성에 대해서도 조사하였다.

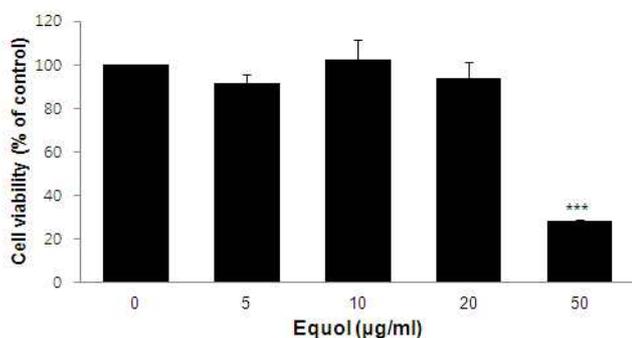
나. 결과 및 고찰

(1) Equol에 의한 염증성 매개인자 및 사이토카인의 억제활성

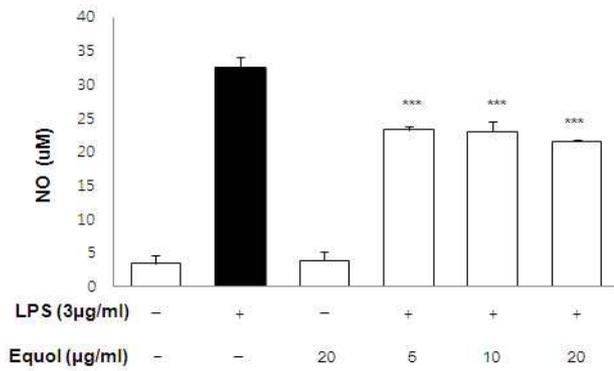
LPS에 의해 유도된 대식세포 염증작용에 대한 equol의 억제효과는 LPS를 대식세포에 처리하기 12시간 전에 equol을 전처리하여 조사하였다. 그 후 LPS자극 24시간 후에 세포 배양상청 중에 분비된 염증성 매개인자 및 사이토카인을 ELISA detection kit을 통해 분석하여 비교하였다. 먼저 equol에 의한 세포독성을 조사한 결과, equol은 20 ug/ml의 농도까지 RAW 264.7세포에 대해 안전한 것으로 나타났다 (Fig. 8-1A). 이 결과를 토대로 이 후 모든 in vitro실험은 20 ug/ml이하의 농도에서 진행하였다.

LPS에 의해 염증이 유도된 대식세포로부터 분비되는 NO은, equol의 전처리에 의해 유의하게 억제되었다 (Fig. 8-1B). 또한 NO의 생합성에 관한 inducible NO synthase(iNOS)의 세포 내 발현을 Western blot에 의해 분석한 결과, equol을 처리한 그룹에서 현저하게 감소하는 것으로 밝혀졌다 (Fig. 8-1C).

A) Cell viability



B) NO production



C)

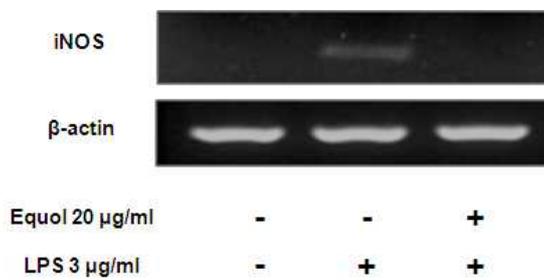
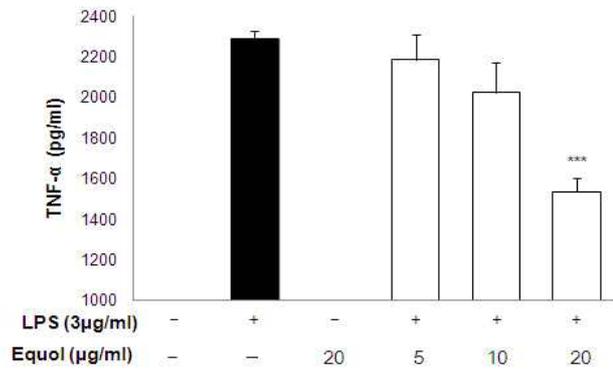


Fig. 8-1. LPS-유도 염증 대식세포에 대한 equol의 세포독성과 NO분비억제 활성.

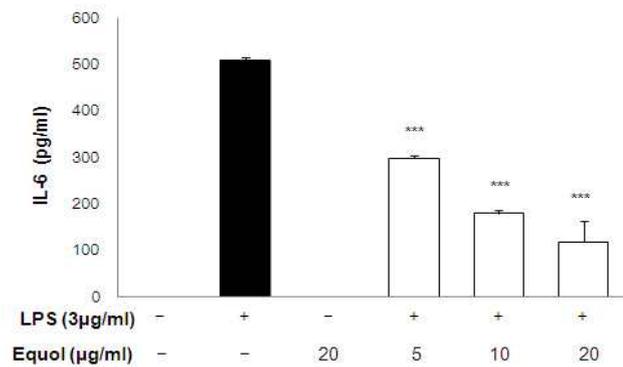
RAW 264.7 cells were pretreated with the indicated concentrations of equol for 12 hours, and subsequently incubated in presence or absence of LPS (3 µg/ml). Cell viability was determined by MTT assay (A). As an indicator of NO production, the amount of NO in the supernatants of cell cultures was measured using the NO detection kit (B). Suppressive effect of equol on LPS-induced mRNA expression of iNOS in RAW 264.7cells was RT-PCR. RAW 264.7 cells were pretreated with equol for 12 hours, and then treated with LPS for 6 hours. Total mRNA was isolated, and the mRNA level of iNOS was performed by RT-PCR (C). Data are expressed as means ± SEM (n=3).

한편, 염증성 사이토카인의 분비에 대한 equol의 억제활성에 있어서도, equol의 전처리에 의해 TNF-α와 IL-6의 분비가 현저히 감소하는 것으로 확인되었다 (Fig. 8-2A, B). 그리고 이들 사이토카인의 mRNA발현에 대해 RT-PCR을 통해 조사한 결과, 단백질 수준에서의 사이토카인의 발현과 동일하게 equol의 처리에 의해 mRNA의 발현도 감소하는 것을 알 수 있었다 (Fig. 8-3C).

A) TNF-α



B) IL-6



C) RT-PCR

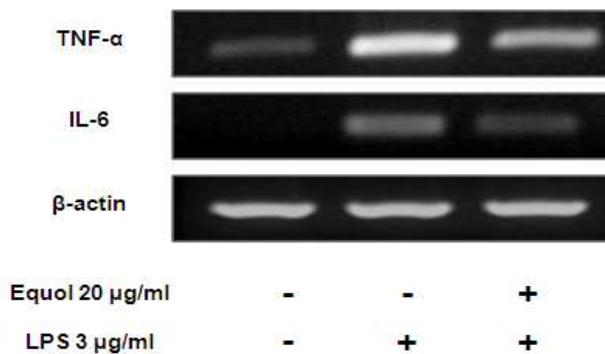


Fig. 8-2. LPS 자극 대식세포의 사이토카인 분비에 대한 equol의 억제 활성

Cells were pretreated with the incubated concentrations of equol for 12 hours and then stimulated with LPS (3 μg/ml) for 24 hours. The cytokine levels in the culture media were measured using an ELISA kit (A, B). For detection of LPS-induced mRNA expression of TNF-α and IL-6 were performed by RT-PCR (C). Data are expressed as means ± SEM (n=2).

LPS의 자극을 받은 대식세포는 염증성 매개인자로서 PGE2를 분비한다. Equol의 전처리에 의한 항염증 활성이 PGE2분비억제와도 연관되는 지를 조사하기 위해 세포 배양상청 중의 PGE2의 발현량과 이 PGE2의 발현을 매개하는 세포 내 cyclooxygenase-2(COX-2) 효소 활성을 측정하였다. Equol을 전처리한 그룹에서 PGE2의 분비가 농도 의존적으로 억제되었

으며, 또한 PGE₂ 생성효소인 COX-2의 세포 내 발현도 현저하게 감소하는 것으로 확인되었다 (Fig. 8-3).

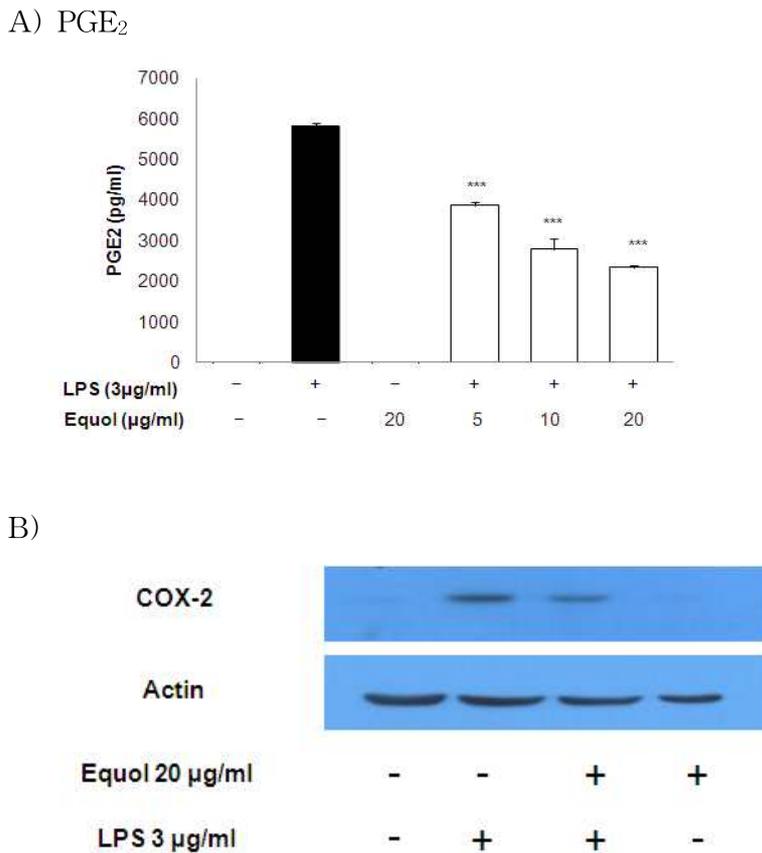


Fig. 8-3. Equol에 의한 LPS자극 대식세포로부터 PGE₂발현의 억제활성

Cells were pretreated with different concentrations of equol for 12 hours and then stimulated with LPS (3 µg/ml) for 24 hours. After incubation, the PGE₂ level in the cultured media were measured by ELISA kit (A). Cells were harvested and equal amounts of cell extracts were subjected to Western blot analysis using antibody against COX-2 (B). Data are expressed as mean ± SEM (n=2).

이들 결과를 종합해 보면, equol은 LPS에 의한 대식세포의 염증반응을 억제하여 염증세포로부터 분비되는 NO와 PGE₂ 등의 염증매개인자를 비롯하여 TNF-α와 IL-6와 같은 사이토카인의 분비를 억제하는 하며, 이들 염증성 매개인자의 분비억제는 세포 내 mRNA와 생합성 효소의 수준에서 이루어지는 것으로 판명되었다.

(2) Equol의 항염증 활성화에 관여하는 작용기전의 해석

LPS가 대식세포에서 염증을 유발할 때는 세포 표면에 발현되는 Toll-like receptor(TLR)와의 결합을 통해 세포 내 신호전달을 유도하며, 여기에는 특히 TLR-4가 가장 밀접하게 관여하는 것으로 알려져 있다. TLR-4와의 상호작용을 일으킨 후에는 세포 내에서 mitogen-activated protein kinase(MAPK)와 Nuclear factor-κB(NF-κB)에 의해 매개되는 일련의 신호전달 과정을 통해 염증반응이 진행된다 (Fig. 8-4).

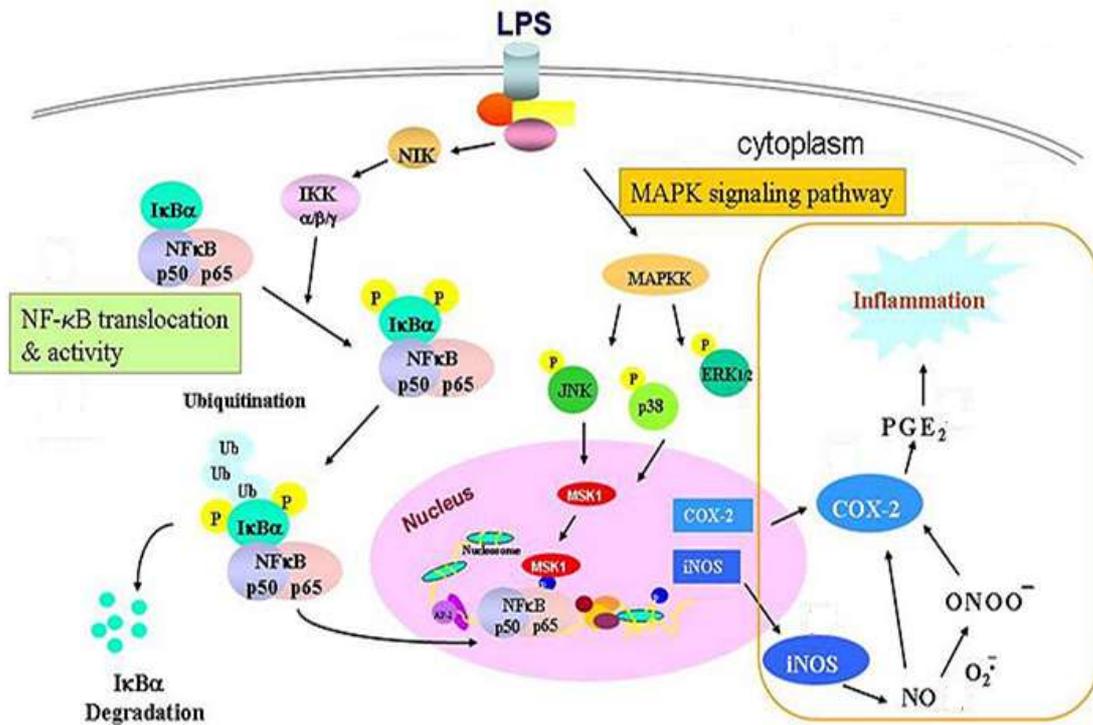


Fig. 8-4. LPS 자극에 의한 대식세포 염증반응의 세포내 기전.

Equol에 의한 대식세포 염증반응의 억제활성에 관한 작용기전을 확인하기 위하여, LPS처리에 의한 세포 내 신호전달 체계의 변화를 조사하였다. 먼저 equol의 전처리가 대식세포에 대한 LPS의 결합을 억제하는 작용이 있는가를 검토하기 위하여 FACS를 이용하여 대식세포에 대한 LPS의 결합력을 비교하였다. 그 결과 equol 전처리는 LPS와 대식세포의 결합에 대해 아무런 영향을 주지 않는 것으로 나타났다 (Fig. 8-5).

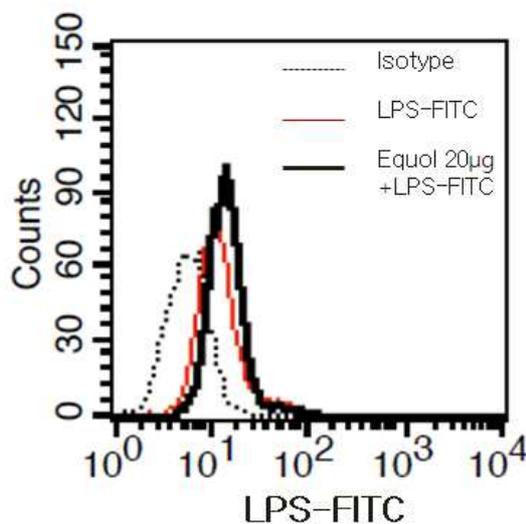
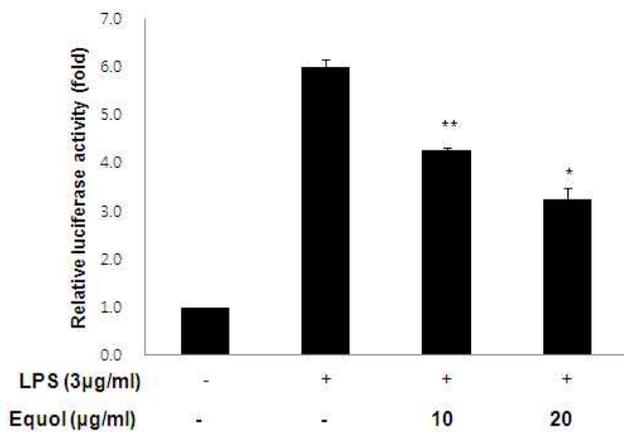


Fig. 8-5. 대식세포와 LPS 결합에 대한 equol의 영향.

Cells were pretreated with equol (20 µg/ml) for 12 hours and then harvested with cold PBS. Thereafter the cells were incubated with FITC-conjugated LPS for 20 min on 4°C. The binding of LPS to RAW 264.7 cells was measured by FACS.

다음으로 equol에 의한 항염증 작용을 세포 내 신호전달 관점에서 분석하기 위하여, MAPK와 NF-κB의 활성화에 미치는 영향을 분석하였다. 먼저 NF-κB 활성화에 미치는 영향을 관찰하기 위하여, Luciferase assay를 통한 NF-κB의 활성화 억제, Western blot을 통한 I-κB의 인산화 억제, NF-κB p65분자의 세포질 내 발현 등을 분석하였다. 결과적으로 equol은 I-κB의 인산화를 억제하여 LPS에 의한 대식세포의 활성화 기전에서 중요한 NF-κB 활성화를 저해하는 작용을 하는 것으로 밝혀졌다(Fig. 8-6).

A)



B)

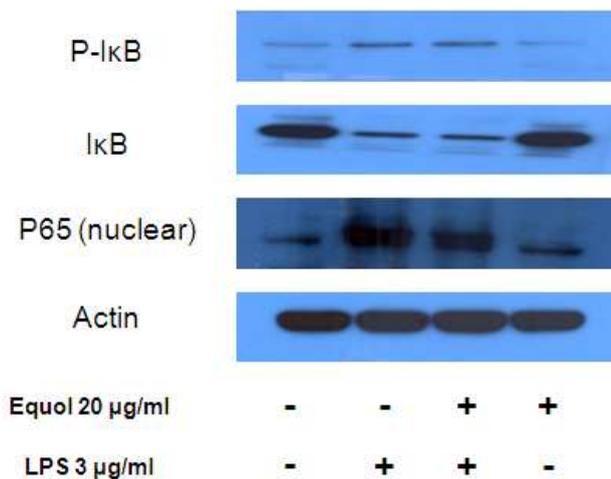


Fig. 8-6. LPS자극 대식세포에서 equol의 NF-κB활성화 억제작용.

(A) Cells were transfected with an NF-κB containing plasmid linked to the luciferase reporter gene and then incubated for 6 hours. Cells were next treated with equol for over night prior to stimulation of LPS for 6 hours. The supernatants of cell lysates were analyzed for the measurement of luciferase activity as described in Materials and methods.

(B) Cells were pretreated with equol (20 μg/ml) for 12 hours and then stimulated with LPS (3 μg/ml) for 15 min. Total cellular proteins and nuclear extracts were prepared for Western blot analysis of NF-κB ,p-IκB and IκB protein.

다음으로 LPS처리 대식세포의 염증발현 기전에서 MAPK의 활성화에 미치는 equol의 영향을 조사하였다. MAPK는 ERK, p38 및 JNK분자의 인산화에 대한 equol의 영향에 대해 검토하였다. 그 결과, equol을 처리함으로써 LPS로 자극된 대식세포에서 JNK와 ERK분자의 인산화 억제가 현저하게 억제되었으며, p38분자도 약간 억제되는 것으로 확인되었다 (Fig. 8-7). 즉 equol에 의한 LPS자극 대식세포 활성화 억제작용은 NF-κB와 MAPK의 활성화 억제에 의한 것으로 확인되었다.

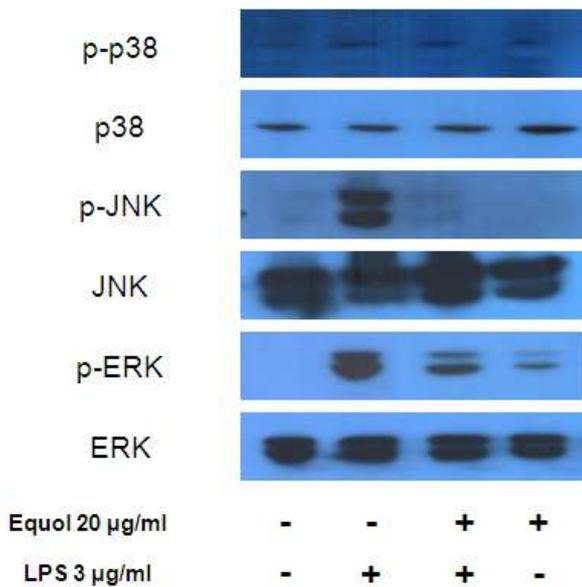


Fig. 8-7. LPS자극 대식세포에서 equol의 MAPK활성화 억제작용.

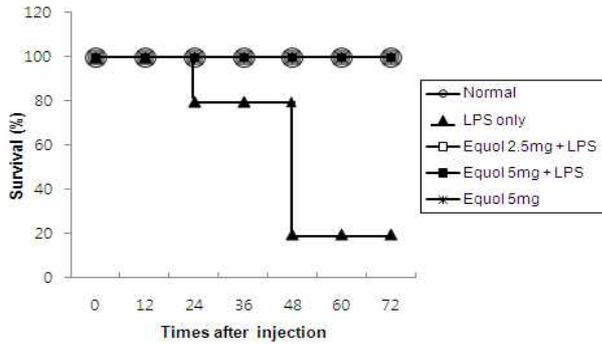
RAW 264.7 cells were treated with equol (20 μg/ml) for 12 hours, and then stimulated with LPS (3 μg/ml) for 10 min. The lysates of the cells were used for analysis of phosphorylation of ERK1/2, JNK/SAPK and p38 by Western blot.

(3) In vivo 패혈증 모델에서 equol의 패혈증 억제효과

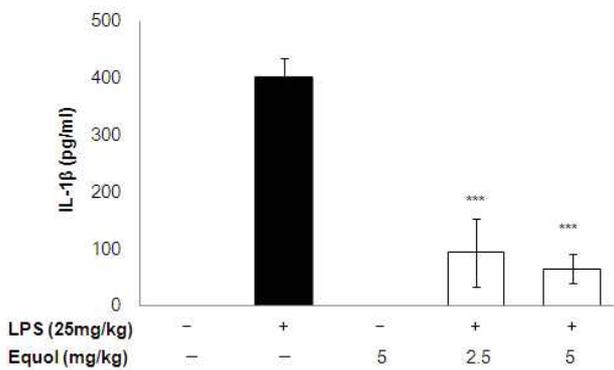
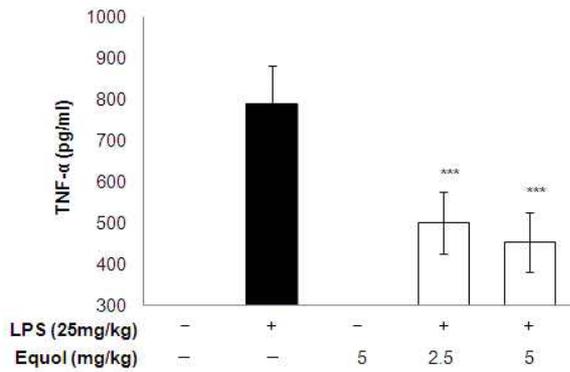
LPS 자극에 의한 염증반응과 관련하여 인체에서 가장 중요한 임상증상은 LPS노출에 의한 패혈증이다. 패혈증은 그람음성균으로부터 유래하는 LPS에 노출된 대식세포가 다량의 염증매개인자를 분비하여, 발열, 구토, 장기부전 등을 유발하게 되는 질병으로 세포내독소증

(endotoxemia) 혹은 lethal septic shock이라고도 부른다. Equol에 의한 항염증활성을 *in vivo*수준에서 조사하기 위하여, LPS 투여에 의해 치명적 패혈증을 유발하는 마우스 모델에서 equol을 전처리한 후, 생존율, 혈청 중의 사이토카인 분비억제 등을 조사하였다. 그 결과 LPS를 투여하기 전에 equol을 2.5 mg/mouse 이상 투여한 조건에서 LPS 투여 마우스에서 보여지는 패혈증에 의한 사망이 완전히 억제되는 것으로 확인되었다 (Fig. 8-8A). 또한 이들 마우스 혈청 중의 사이토카인을 분석한 결과, equol의 전처리에 의해 TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 등의 염증성 사이토카인의 분비가 현저히 억제된 것으로 나타났다 (Fig. 8-8B).

A)



B)



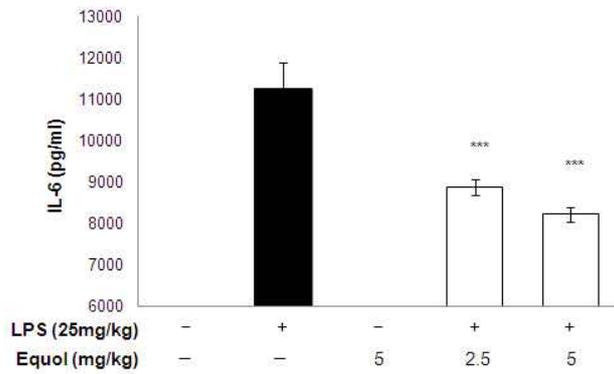


Fig. 8-8. Equol에 의한 패혈증 억제활성.

Groups of five mice were administered i.p. with equol (2.5, 5 mg/kg) three times 15, 2 hours prior to intravenous injection of LPS (20 mg/kg). Survival was monitored for 3 days after intravenous injection of LPS (A). Two hours after LPS injection, serum sepcimens were obtained from mice, and the level of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in serum was determined by ELISA (B). Each value indicated as mean \pm SEM (n=2).

다. 결론 및 전망

이상의 결과로부터, equol은 in vitro 모델에서 LPS자극에 의한 대식세포의 염증반응을 억제하는 활성을 지니며, 또한 in vivo 패혈증 모델에서는 LPS에 의해 유도되는 치명적인 패혈증을 유의하게 억제하는 것으로 확인되었다. 그러므로 equol은 면역세포의 염증을 억제하는 강력한 항염증 작용을 갖는 물질인 것으로 사료된다.

제 9 절 이소플라본 함유 폐경기 개선식이의 임상 효과 검증

1. 연구 재료 및 방법

가. 피험자의 선정

(1) 선정기준

지원자 모집 공고를 통해 호르몬제를 포함한 골대사에 영향을 줄 수 있는 약물을 복용하고 있지 않고 한국판 MRS 설문지 (이하 MRS)의 목록에 합당한 폐경기 증상이 있는 여성 중 제외 기준에 해당되지 않으면서 본 시험에 적합하다고 담당 의사가 확인한 자를 선정한다. 폐경은 자연 상태에서 무월경 12개월 경과자 혹은 FSH 40mIU/ml 이상인 경우로 정의한다.

(2) 제외 기준

- 갑상선 및 부갑상선 질환, 당뇨병 등 내분비질환 및 기왕력자
- 갈슘 및 골대사 질환 및 기왕력자
- 자가면역질환, 신장 질환, 심장 및 뇌혈관 질환, 악성 종양, 정신질환, 영양 실조 질환 및 기왕력자
- 골 및 미네랄 대사에 영향을 줄 수 있다고 알려진 약물 또는 건강식품을 복용하고 있는 경우나 과거 6개월 사이에 투약 받은 경력이 있는 경우
- 천식 및 기타 알레르기 질환이 있는 경우
- 최근 6개월 이내에 수술 병력이 있는 경우
- 지원자 사전 조사상 상기 소견이 의심되는 것으로 담당 의사가 판단하는 경우
- 현재 약물 치료 중인 고혈압 환자이거나 지원자 사전 검사상 2회 측정된 평균 혈압이 160/100mmHg 이상인 경우
- 지원자 사전 검사상 이상 소견이 있어 시험을 진행하기 어려운 상태로 임상 의사가 판단하는 경우
- 그 외 담당 의사가 본 시험에 적합하지 않다고 판단하는 경우

나. 임상 검사 수행 방법 및 내용

(1) 임상 검사 수행 일정

Table 9-1. 임상 검사 시행 일정

	-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
서면 동의, 고유 번호 부여	■													
지원자 선별 검사	■													
피험 적합 판정 및 무작위 배정	■													
시험 약물 및 대조약 투여		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
소변내 Equol 정량		■						■						■
문진, 이학적 검사	■	■												
갱년기 자각증상 조사		■						■						■
신체 계측 및 임상 검사	■	■						■						
이상 반응 및 순응도 확인			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

(2) 관찰 지표 및 검사 방법

(가) 소변 Equol 농도의 정량

검사 전과 표준 시료(시판 두유, 이소플라본 1일 260mg/ml)를 3일 복용한 후의 지원자의 중간뇨의 Equol 농도를 HPLC를 통하여 정량한다. 표준 시료 복용후 공복시 소변에서 정량한 Equol 농도가 20ng/ml 이상일 때 Equol 생산군으로 정의한다¹⁾. 시험 및 대조 음료 복용 6,12개월 두 차례 공복 상태에서 중간뇨를 채집하여 같은 방법으로 Equol 농도를 정량한다.

(나) 지원자 사전 검사

① 연구전 사전 조사

임상 의사의 문진을 통해 연구 대상자의 사회인구학적 특성 및 질병 과거력 및 약물 복용력을 청취하여, 선발 및 제외 기준을 만족하는지 확인한 후 산과력 (초경 및 폐경 연령, 임신 및 출산력, 폐경 후 경과 기간)과 사회력(운동, 흡연, 음주력)을 수집한다.

② 신체 계측

오전 공복 상태에서 내원하여 신장, 체중, 허리 둘레를 측정하고, 혈압은 자동 혈압계를 이용하여 수축 및 이완기 혈압을 각각 2회 측정하여 그 평균치를 사용한다.

③ 혈액 및 기타 검사

오전 공복 상태에서 혈청 CBC,Ca/P,AST/ALT,ALP,Glucose,Cr,TSH,FSH,Estradiol 및 소변 검사와 Mammography, Pap smear, Chest PA 검사를 시행한다. 아침 공복 상태에서 혈액을 채취하여 혈청 분리 후 CBC, Ca/P, AST/ALT, ALP, Glucose, Cr, TSH, FSH, E2는 자동화화학분석기(AU-5400;Olympus Optical Co,Tokyo,Japan)로 측정한다. Estradiol, FSH는 방사선 면역법으로 측정한다.

(다) 무작위배정

최종 선발된 Equol 생산군 및 비생산군 각 30명을 각 군마다 대조군 15인과 투여군 15인으로 무작위 배정한다.

(라) 시험제제 및 대조 제제의 투여

시험 제제는 캔 타입의 대두 이소플라본 액상 음료로 1캔은 200ml 로 구성되어있다. 이 시험 제제를 1일 1회, 1회 1캔, 아침 식후 30분에 복용한다. 투여 기간은 시험 시작 시점에서 12개월로 한다. 대조 제제는 시험 제제와 맛과 그 성상이 비슷한 음료로 제조하여 시험 제제와 동일한 용량과 회수로 투여한다. 이상 반응 여부와 복약 순응도 확인을 위한 전화 설문은 연구의 목적과 방법을 숙지한 숙련된 보조원이 시행하도록 하여, 이상 반응이 있을 시에는 시험에 참여하는 임상 의사에게 알려 참여 지속 여부를 결정하도록 하였다.

(마) 임상 효과 판정

급이 시작 및 투여 후 6,12개월째에 피험자는 공복 상태에서 내원하여 다음 지표를 측정하도록 한다.

① 약물 복용력 및 이상 반응 여부의 확인

② 폐경기 증상 : MRS 설문, 혈청 Estradiol, FSH 농도

③ 심혈관계 효과

㉠ 체성분 분석

Biospace사(Seoul, Korea) 의 Inbody720으로 오전 공복 상태에서 방광을 비운 후 체지방량, 체지방률, 체지방률, 근육량을 측정한다

㉔ 신체 계측

허리 둘레 및 신장, 체중을 측정하여 BMI를 산출한다.

㉕ 혈압

전자 혈압계를 이용하여, 수축 및 이완기 혈압을 각각 2회 측정하여, 그 평균치를 이용하도록 한다.

㉖ 혈액 검사

오전 공복에 채혈하여 Serum Glucose, HOMA-IR,HOMA-beta, T-Cholesterol, TG, HDL-Cholesterol, LDL-Cholesterol, hs-CRP 를 측정한다.

④ 골대사 효과

㉗ 골밀도

Dual energy X-ray absorptiometry(Lunar prodigy,GE,USA) 방법을 이용하여 요추 및 좌측 대퇴골밀도를 측정하여 요추, 대퇴 전체 및 대퇴 경부의 T-Score를 각각 산출한다. 좌측 대퇴골밀도 측정이 어려울 경우 우측으로 대체한다.

㉘ 골표지자 검사 및 기타 혈액 검사

오전 공복 상태에서 혈액을 채취하여 혈청 분리 후 intact PTH, Osteocalcin, CTx를 자동화화학분석기(AU-5400;Olympus Optical Co,Tokyo,Japan)로 측정한다. intact PTH 의 농도의 측정은 화학발광면역법, Osteocalcin 은 방사선 면역법, CTX 는 효소 면역법으로 측정한다.

⑤ 피험자 안전성 검사

혈청 AST/ALT,Creatinine,Thyroid stimulating Hormone (TSH), 소변 검사 및 유방 안전성 평가를위해 Mammography를 검사 시작,6개월,검사 종료시 시행한다.

2. 결과 및 고찰

가. 대상군의 특성

피험자로 선정된 60명의 시험전 임상 지표들의 통계적으로 유의한 차이는 관찰되지 않았으며 (Table 9-2), 1개월 시험 도중 자의에 의한 탈락 2례 및 이상 반응으로 인한 탈락 1례가 있었다. 이상 반응의 경우는 갑상선 악성 종양이 발견되었으나, 본 검사와의 인과 관계는 확실하지 않았다.

Table 9-2. 대상군의 기본 특성

	Isoflavone (n=30)	Placebo (n=30)	p
Age	54.08±3.67	54.59±3.78	0.628
폐경기간	44.05±35.63	45.05±39.77	0.935
체중	56.96±4.83	56.86±5.72	0.945
Normal (%)	41.7	50.0	
Overweight (%)	45.8	26.9	0.341
Obesity (%)	12.5	23.1	
허리둘레	80.59±4.46	79.74±5.97	0.574
<85Cm (%)	87.5	77.8	
≥85Cm (%)	12.5	22.2	0.297
수축기혈압 (mmHg)	113.82±11.31	117.24±10.81	0.274
이완기혈압 (mmHg)	69.02±9.56	72.41±10.56	0.238
MRS-Total	14.63±8.22	15.37±8.69	0.755
Urine Equol (ng/ml)	245.84±431.60	220.84±344.93	0.819
Production(%)	45.5	54.5	
Non-Production (%)	50	50	0.756
FSH (mIU/ml)	81.38±26.12	91.40±29.62	0.212
E2 (pg/ml)	2.37±4.89	2.47±5.30	0.944
Glucose (mg/dl)	94.88±9.73	98.19±9.88	0.235
HOMA-IR	1.26±0.470	1.44±0.65	0.308
Total Cholesterol (mg/dl)	215.29±33.17	198.44±47.75	0.155
Triglyceride (mg/dl)	123.27±77.38	117.33±54.32	0.750
HDL-Cholesterol (mg/dl)	59.38±10.09	57.38±15.25	0.589
LDL-Cholesterol (mg/dl)	139.54±27.13	136.37±21.21	0.642
S-CRP (mg/dl)	0.07±0.06	0.08±0.08	0.620
Calcium (mg/dl)	9.24±0.45	9.16±0.61	0.579
Phosphate (mg/dl)	4.08±0.41	3.94±0.31	0.194
intact-PTH (pg/ml)	55.04±15.95	60.51±20.60	0.298
Osteocalcin (ng/ml)	25.10±5.54	26.45±9.06	0.528
CTx (ng/ml)	0.43±0.18	0.37±0.17	0.860
T-Score			
Spine	0.45±1.28	0.39±1.29	0.860
Hip Total	0.58±1.08	0.39±1.14	0.555
Femur Neck	0.76±1.30	0.58±1.26	0.628

나. 폐경기 증상

폐경기 개선식이 투여시 혈중 Estradiol 농도의 증가가 통계적으로 유의하게 증가하였으나, 이는 위약군에서도 같은 효과를 나타내었다.

MRS 총 점수는 폐경기 개선 식이 12개월 투여시 통계적으로 의미 있게 감소하는 양상을 보였다. 위약군에서도 MRS 총 점수는 감소하는 양상을 보였으나 통계적으로는 유의하지 않았다. 증상별로 구분하여 관찰하였을 때 이소플라본 군에서는 안면 홍조 및 발한, 심계항진, 불안감, 성적 욕구 및 행위 및 만족감 변화 등의 증상 개선이 통계적으로 유의하게 관찰되었다. 그러나 위약군에서는 증상의 개선은 보였으나 모든 항목에서 통계적으로 유의한 감소는 나타나지 않았다.

Equol 생산군에서 총 MRS 점수 감소는 통계적으로 유의하지 않았고 위약군과 차이를 보이지 않았다. 그러나 안면 홍조 및 발한 등의 혈관 운동 증상의 경우 통계적으로 유의하게 개선 효과를 나타냈다 (p=0.011)

Table 9-3. 폐경기 개선식이 투여 후 혈청 Estradiol 농도와 폐경기 증상 변화

	Isoflavone (n=24)			Placebo (n=22)		
	0month	12month	p	0month	12month	p
Total Score	15.08±7.77	11.63±5.61	0.017	15.18±8.74	11.59±7.78	0.068
Vasomotor Sx.	1.83±1.24	0.96±0.75	0.003	1.45±1.34	0.95±0.95	0.094
Heart discomfort	1.83±1.24	0.96±0.75	0.015	1.00±1.16	0.77±1.07	0.381
Sleep problems	1.22±1.00	1.09±0.95	0.544	1.36±1.36	1.09±1.27	0.208
Depressive mood	1.04±0.91	0.96±1.04	0.692	1.50±1.06	1.18±0.96	0.284
Irritability	1.13±1.04	1.21±1.14	0.765	1.41±1.18	1.05±1.36	0.247
Anxiety	0.92±1.10	0.50±0.72	0.038	1.23±1.07	1.00±1.11	0.348
Exhaustion	1.58±1.06	1.54±0.93	0.814	1.91±0.75	1.55±1.06	0.162
Sexual problems	1.70±1.19	1.09±1.04	0.031	1.64±1.36	0.95±0.90	0.040
Bladder problems	1.08±1.06	0.71±0.81	0.095	0.95±1.21	0.73±1.03	0.448
Dryness of vagina	1.87±1.33	1.48±1.34	0.119	1.41±1.30	1.14±0.99	0.315
Joint,muscular discomfort	1.54±1.06	1.67±1.05	0.588	1.32±1.29	1.18±1.18	0.504
E2 (pg/ml)	3.39±6.63	12.49±9.76	0.000	1.31±2.98	13.33±5.61	0.000

다. 심혈관계 효과

이소플라본 투여시 BMI 증가가 관찰되었으나 통계적으로 유의하지 않았고, 이는 위약 투여군에서도 동일하게 관찰되었다.

근육량은 변화가 없었으나 통계적으로 유의한 체지방 증가가 관찰되나, 허리 둘레의 감소가 관찰된다. 폐경이 되면서 여성 체지방은 둔부 허벅지에 지방 분포가 우세한 여성형에서 복부에 분포가 우세한 남성형으로 재편되는데 이것이 심혈관 질환의 위험성을 높이는 요인 중 하나로 추측되고 있다²⁾. 이소플라본 투여시 위약과 달리 인슐린 저항성의 개선 효과가 관찰되었고, 공복 혈당의 증가도 위약에 비해 적게 나타났으나, 통계적으로 유의하지는 않았다.

지질대사에 있어서는 총 콜레스테롤, 중성지방, 저밀도 콜레스테롤 증가가 나타났고 이 경향은 위약군에서도 마찬가지로 관찰되었으나 통계적으로는 유의하지 않았고, 고밀도 콜레스테롤의 경미한 저하가 나타나나 통계적으로 유의하지는 않았다.

S-CRP 는 두 군 모두에서 증가하였으나, 통계적으로 유의하지는 않았다. 전임상 시험에서 Equol 투여에 의한 항염 효과가 보고된 바 S-CRP 증가를 기대하였으나, 실제 임상에서는 같은 경향을 보이지 않았다. Equol 생산 여부에 따른 임상적 효과는 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다.

Table 9-4. 폐경기 개선식이 투여와 심혈관 질환 관련 임상 지표의 변화

	Isoflavone (n=24)			Placebo (n=22)		
	0month	12month	p	0month	12month	p
체중 (Kg)	57.34±5.00	58.45±4.62	0.008	56.96±6.14	57.56±5.69	0.115
BMI (Kg/m ²)	23.22±2.29	24.15±3.07	0.108	23.23±2.16	23.43±2.05	0.254
Muscle Mass (Kg)	20.50±2.04	20.57±1.90	0.534	20.40±2.20	20.55±2.08	0.193
Fat Mass (Kg)	19.02±3.26	20.15±3.43	0.006	18.83±3.88	19.36±3.53	0.162
Body Fat (%)	33.06±3.95	34.35±4.11	0.013	32.85±4.27	33.52±4.07	0.138
허리둘레 (Cm)	80.33±4.88	77.19±5.88	0.008	79.65±6.34	77.52±6.29	0.052
수축기 혈압 (mmHg)	116.13±9.94	118.73±11.06	0.194	116.66±10.07	121.82±16.20	0.132
이완기 혈압 (mmHg)	69.67±8.66	74.21±14.83	0.156	73.52±10.56	79.46±11.17	0.009
Glucose (mg/dl)	95.00±8.11	96.17±6.05	0.407	98.91±10.34	101.09±22.04	0.507
HOMA-IR	1.39±0.64	1.34±0.52	0.655	1.62±0.76	1.72±1.20	0.614
HOMA-β	66.72±20.82	61.13±20.23	0.265	68.28±33.86	67.53±35.11	0.915
Total Cholesterol(mg/dl)	207.46±37.87	213.33±40.55	0.216	203.14±30.14	207.73±25.93	0.483
Triglyceride (mg/dl)	130.21±84.81	134.15±79.92	0.783	119.87±59.24	126.80±69.99	0.542
HDL-Cholesterol (mg/dl)	58.62±11.40	58.07±13.21	0.748	54.65±13.34	57.96±13.06	0.169
LDL-Cholesterol (mg/dl)	132.96±28.29	135.25±30.29	0.474	133.68±21.45	128.28±26.67	0.321
S-CRP (mg/dl)	0.08±0.06	0.19±0.40	0.203	0.08±0.08	0.21±0.08	0.096

라. 골대사 효과

골밀도의 경우 대퇴 전체 골밀도는 위약과 이소플라본 투여시 모두 감소하였고, 이 차이는 통계적으로 의미가 없었으나 시간 효과를 보정하였을 때 이소플라본 군의 골 소실이 더 적게 일어났고 이는 통계적으로 유의하였다 (p=0.011). 반면 폐경기 개선 식이 투여군에서 요추 및 대퇴 경부에서 골감소 효과가 유의하게 나타났는데 이 효과는 시간을 보정하였을 때 통계적으로 유의하지 않았다 (요추 p=0.355, 대퇴 경부 p=0.113).

Equol 생산군에서 골밀도의 감소 억제 효과가 나타났고, 특히 대퇴 경부 골밀도는 통계적으로 유의한 골밀도 감소 억제 효과를 나타내었다 (p=0.009). 골표지자 변화는 통계적으로 유의하지 않았다.

PTH 억제 효과는 두 군에서 모두 통계적으로 유의하게 나타났고 골표지자 검사는 골형성 표지자인 Osteocalcin 감소가 유의하게 관찰되나 약물 투여 여부와는 차이가 관찰되지 않았고, 골흡수 표지자인 CTx. 의 경우 의미있는 차이가 관찰되지 않았다.

Table 9-5. 폐경기 개선식이 투여 후 골밀도 및 골대사 지표의 변화

	Isoflavone (n=24)			Placebo (n=22)		
	0month	12month	p	0month	12month	p
intact PTH (pg/ml)	59.33±17.32	48.09±14.70	0.000	62.58±21.63	50.30±13.53	0.006
Osteocalcin (ng/ml)	25.11±6.13	20.53±6.29	0.000	26.00±9.33	22.58±8.20	0.028
CTx (ng/ml)	0.39±0.14	1.88±6.64	0.280	0.34±0.14	1.70±5.55	0.260
T-Score						
Spine	0.48±1.28	0.32±1.31	0.036	0.46±1.25	0.24±1.26	0.110
Total-Hip	0.66±0.99	0.56±0.98	0.063	0.34±1.05	0.16±1.07	0.253
Femur Neck	0.78±1.15	0.45±1.01	0.009	0.53±1.09	0.20±0.81	0.083

3. 결론 및 전망

본 과제에서 개발된 폐경기 개선식 음료를 이용하여 임상연구를 진행한 결과 폐경기 증상 개선에 긍정적인 결과를 확인 할 수 있었다.

이소플라본의 다양한 임상 효과가 보고되고 있으나, 그 효과에 대한 부분에 대해서는 논란의 여지가 많다. 본 연구는 단일 맹검으로 시행한 변인이 잘 통제된 연구로, 이소플라본의 투여가 1년이었고 비교적 순응도 관리가 잘 된 연구라는 장점이 있다.

폐경기 개선식이 투여시 혈중 Estradiol 농도의 증가가 통계적으로 유의하게 증가하였으나, 이는 위약군에서도 같은 효과를 나타내었다. 그럼에도 불구하고 MRS 총 점수와 특히 안면 홍조 및 발한 등의 혈관 운동 증상의 경우 폐경기 개선식이 투여군에서만 의미있는 차이를 나타내었고, Equol 생산군에서 차이를 보였다.

폐경기 개선식이 투여시 BMI 증가 및 허리 둘레의 감소가 관찰된다. 폐경이 되면서 여성 체지방은 둔부 허벅지에 지방 분포가 우세한 여성형에서 복부에 분포가 우세한 남성형으로

재편되는데 이것이 심혈관 질환의 위험성을 높이는 요인중 하나로 추측되고 있다(2). 또한 유의하지는 않았으나 인슐린 저항성의 개선 효과가 관찰되었고, 공복 혈당의 증가도 적게 나타났다.

골밀도의 경우 시간 효과를 보정하였을 때 이소플라본 군의 골 소실이 더 적게 일어났고 특히 대퇴골에서 이 효과는 더 뚜렷했고 특히 Equol 생산군에서 골소실 억제 효과가 더 뚜렷하였다.

결국 이소플라본의 투여는 폐경 이후의 여성에서 혈관 운동성 증상 개선을 통한 삶의 질 개선과 골소실 억제를 통한 골다공증 예방 효과가 있을 것으로 기대된다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연도별 연구목표 및 달성도

1. 연도별 연구 평가의 착안점

구 분	평가의 착안점 및 척도	
	착 안 사 항	척 도 (점수)
1차년도 (2009년)	<ul style="list-style-type: none"> ■ 대두를 이용한 이소플라본 대사 균주 배양화 ■ 이소플라본 대사체 생산 환경 구축 ■ 이소플라본 전환 균주가 2종 이상 선정 ■ 이소플라본 대사체 equol 전환균주 선정 ■ 생물전환 모니터링 방법은 확립 (HPLC, TLC) ■ 발효된 이소플라본의 80% 이상이 비배당체 전환 ■ 폐경기증후군 동물모델 개발 구축 ■ 폐경기증후군 동물모델에서 Biomarker 개발 ■ 이소플라본 발효물의 전임상적 기능성 확인 연구 ■ 생체시료 중의 equol 정량을 위한 분석법 개발 	<p>5</p> <p>15</p> <p>10</p> <p>5</p> <p>15</p> <p>10</p> <p>5</p> <p>10</p> <p>15</p> <p>10</p>
2차년도 (2010년)	<ul style="list-style-type: none"> ■ 이소플라본 대사체 생산 발효환경 최적화 ■ 이소플라본 대사체가 함유된 폐경기 개선식 개발 ■ 이소플라본 대사체가 함유된 폐경기 개선식 관능개선 ■ β-glucosidase 활성 유도 연구: 전환율이 30% 이상 향상 ■ 발효된 이소플라본 발효물 내 이소플라본 대사체 equol의 존재 ■ 배양 조건 탐색에 의한 생물전환 최적화 연구: pH, 온도, agitation, 등 최적화 ■ 이소플라본 대사체가 포함된 발효물의 안정성 평가 ■ 이소플라본 대사체가 포함된 발효물의 전임상적 기능성 확인 연구 ■ 이소플라본 대사체 equol 정량법 완성 및 equol producer와 non-producer 식별에 적용 여부 	<p>10</p> <p>15</p> <p>10</p> <p>15</p> <p>10</p> <p>10</p> <p>10</p> <p>10</p> <p>10</p>
3차년도 (2011년)	<ul style="list-style-type: none"> ■ 폐경기 개선식 생산 공정 적용(scale up) 후 시제품생산 ■ 시제품 안정성 평가 및 유통기한 설정 ■ 이소플라본 대사체가 포함된 발효물 공정의 Scale-up(200L까지) ■ 이소플라본 대사체가 포함된 발효물의시제품이 완성 유무 ■ 이소플라본 대사체가 포함된 폐경기 개선식의 안전성 평가 ■ 이소플라본 대사체가 포함된 폐경기 개선식의 전임상적 기능성 확인 연구 	<p>20</p> <p>10</p> <p>15</p> <p>15</p> <p>20</p> <p>20</p>
최종평가	<ul style="list-style-type: none"> ■ 이소플라본 대사체가 함유된 폐경기 개선식 개발 ■ 폐경기 개선식 공정개발 ■ 발효에 의한 생리활성 물질 생산 기술 개발 ■ 활성이 높은 비배당체 이소플라본(daidzein, genistein, equol)을 함유한 제품개발 ■ 이소플라본 대사체 생산 발효물 제품화 공정 개발 ■ 폐경기 개선식의 전/임상적 기능성 확보 ■ 폐경기 증상개선식의 임상적 효능과 equol생성 간의 상관관계 제시 	<p>15</p> <p>20</p> <p>10</p> <p>5</p> <p>20</p> <p>15</p> <p>15</p>

2. 세부과제 달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 연도 (2009)	◇ 대두 및 대두 부산물로부터 이소플라본 대사체 발효생산 기술 개발	■ 대두 부산물 배지화 연구	100	▷대두 배아를 이용하여 생산균주의 비배당체 전환에 필요한 배지환경을 구축하였음
		■ 이소플라본 대사체 생산 발효 환경 구축	100	▷배아, 질소원, 탄소원을 이용 생산균주의 최적 발효환경을 구축하였음
2차 연도 (2010)	이소플라본 대사체가 함유된 폐경기 개선식 제조	■ 이소플라본 대사체 생산 발효 환경 최적화	100	▷Pilot scale의 배아 발효물 제조 조건을 확립 후 대량 제조 하였음
		■ 레시피 확립 및 제품개발	100	▷폐경 관련 임상연구 결과들을 인용하여 제품에 함유될 이소플라본 함량을 결정하였음 ▷배합비 개발 실험을 통해 폐경기 개선식의 배합비를 설정하였음 ▷원료 및 제품에 대한 QC&QA 규격을 확립하였음 ▷임상시험 대상자들을 위한 식이를 제조하였음
		■ 관능적 평가	100	▷임상시험용 식이에 대한 관능 평가를 실시하였음
3차 연도 (2011)	대두 배아 발효를 통한 이소플라본 대사체 생산	■ 대두 배아 발효를 통한 이소플라본 대사체로의 전환율 측정	100	대두 배아중 배당체 형태의 이소플라본이 비배당체 형태로의 전환율을 측정함으로써 발효 정도를 확인
	폐경기 개선식 배합비 확정	■ 폐경기 개선식 관능 개선	100	▷향 및 감미료 종류 및 첨가량 개선을 통한 관능적 향상 ▷폐경 여성들의 건강에 도움을 줄 수 있는 천연 추출물을 스크리닝하여 폐경기 개선식에 첨가함으로써 관능 및 영양의 개선
	폐경기 개선식 제품화	■ 폐경기 개선식 제품화를 위한 규격 설정	100	▷Pilot scale 시생산을 통한 규격 확립 ▷제조 공정별 이소플라본 함량 변화를 측정하여 이소플라본의 품질적 안정성 조사 ▷pH, 점도, 비중 및 이소플라본 함량 등의 품질 안정성 확보를 위한 평가 기준 설정
		■ 폐경기 개선식 제품화 공정개발	100	▷이소플라본의 품질적 안정성 확보를 위한 공정 개선 ▷Pilot scale을 통한 시제품 생산 ▷시제품 안정성 확인 및 유통기한 설정
		■ 폐경기 개선식의 시장 조사	100	▷건양대 병원에서 진행 중인 임상시험 대상자들을 상대로 한 소비자 선호도 및 시장 조사 진행 ▷조사 결과를 바탕으로 한 제품화 가능성 검토

3. 세부과제 달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 연도 (2009)	고효율로 비배당체의 이소플라본(daidzein, genistein, equol)을 생산하는 공정 개발 및 제품화	■ PNP assay를 통한 β -glucosidase 활성 우수 균주 1차 선발	100	▷pNP assay를 통하여 효소활성 우수균주를 선발하였음
		■ 배당체 분해능을 분석하여 최종 우수균주 선정	100	▷약 60종의 균주에 대하여 daidzin, daizein을 기질로 전환능이 우수한 균주를 선발하였음
		■ 선별 균주 중 이소플라본 대사체 equol 생산균주 screening	100	▷daidzein, daidzin, 대두베아를 기질로 equol 생산 균주를 탐색하여 1종의 equol 생산 균주를 확보함
		■ 생물전환 모니터링 방법 확립: HPLC 및 TLC를 이용한 분석법	100	▷각종 이소플라본을 정성, 정량 분석할 수 있는 HPLC, TLC 조건을 확립하였음
2차 연도 (2010)	◇ 고효율 생물전환 공정의 개발 및 최적화	■ 1차발효물을 이용하여 2차 발효를 통한 equol 생산 평가	95	▷1차 생물전환된 발효물을 기질로 L. garvieae에 의한 equol 생산성 평가
		■ 이소플라본 추가 첨가로 생산성 증가 연구 동물실험용 시료 제조 완료	100	▷고효율 생물전환을 위하여 기질(대두베아)의 농도를 1차년도에 비하여 400% 증가 및 추가 이소플라본 첨가하여 생물전환공정 확립 ▷동물 실험용 시료를 제조하여 전달
3차 년도 (2011)	기능성 식품 소재의 개발	■ 200L 규모에서 이소플라본 비배당체 및 이소플라본 대사체가 함유된 발효물을 생산할 수 있는 공정을 재현하고 시제품으로 개발	100	▷200L 규모에서 생산공정을 확립하고 재현성을 평가하였으며 원료물질을 확보하였음.
		■ 발효 후 회수공정 개발	100	▷발효 후 회수공정에서 동결건조가 우수함을 확인함.
		■ 제품규격화 연구	100	▷공인기관에서 제품 성적서를 부여하여 제품 규격화 데이터 확보

4. 세부과제 달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 연도 (2009)	이소플라본 대사체의 전임상적 기능성 입증	<ul style="list-style-type: none"> ■ 폐경기 증후군 동물실험 모델 및 biomarker의 개발 	100	<ul style="list-style-type: none"> ▷폐경기 증후군 동물실험 모델 개발 ▷골대사 (골밀도와 골무기질함량)에 미치는 지표개발 ▷혈중 호르몬에 미치는 지표 개발
		<ul style="list-style-type: none"> ■ 이소플라본 발효물의 전임상적 기능성 확인 연구 	100	<ul style="list-style-type: none"> ▷대두배아발효 및 배아첨가물이 골대사에 미치는 효과 ▷대두배아발효 및 배아첨가물이 혈중 호르몬에 미치는 효과 ▷대두배아발효 및 배아첨가물이 혈중 및 지질대사에 미치는 효과 ▷대두배아발효 및 배아첨가물이 항동맥경화에 미치는 효과
2차 연도 (2010)	이소플라본 대사체가 포함된 발효물의 전임 상적 기능성 확인 연구	<ul style="list-style-type: none"> ■ 골대사에 미치는 효과 	100	<ul style="list-style-type: none"> ▷ 골대사에 미치는 효과를 골밀도, 혈청과 요중에서의 무기물질 등 생화학적 지표를 통하여 전임상적 효능확인
		<ul style="list-style-type: none"> ■ 호르몬 대사에 미치는 효과 	100	<ul style="list-style-type: none"> ▷호르몬대사, 지질대사와 조직학적, 사이토카인 등 여러 가지 실험결과를 통하여 난소 절제 모델에서 나타나는 대사이상에 대하여 Equol의 항염증 효과 증명 ▷in vitro 및 in vivo model에서 cytokine 농도 및 mRNA 발현 여부를 확인하여 Equol의 항염증 효과 증명
		<ul style="list-style-type: none"> ■ 항동맥경화에 미치는 효과 		
		<ul style="list-style-type: none"> ■ 항산화 작용에 미치는 효과 		
<ul style="list-style-type: none"> ■ 지질대사에 미치는 효과 				
3차 연도 (2011)	이소플라본 대사체가 포함된 폐경기 개선식의 전임상적 기능성 확인 연구	<ul style="list-style-type: none"> ■ 개선식의 안전성 평가 	100	<ul style="list-style-type: none"> ▷개선식의 안전성평가
		<ul style="list-style-type: none"> ■ 골대사에 미치는 효과 		<ul style="list-style-type: none"> ▷개선식에서의 골대사에 미치는 영향
		<ul style="list-style-type: none"> ■ 호르몬 대사에 미치는 효과 	100	<ul style="list-style-type: none"> ▷개선식에서의 골대사에 미치는 호르몬의 대사에 미치는 효과 연구
		<ul style="list-style-type: none"> ■ 항동맥경화에 미치는 효과 		<ul style="list-style-type: none"> ▷개선식에서의 항산화작용에 미치는 영향
		<ul style="list-style-type: none"> ■ 항산화 작용에 미치는 효과 	100	<ul style="list-style-type: none"> ▷개선식에서의 지질대사에 미치는 효과 연구
		<ul style="list-style-type: none"> ■ 지질대사에 미치는 효과 	100	<ul style="list-style-type: none"> ▷개선식에서의 사이토카인에 미치는 효과 연구
		<ul style="list-style-type: none"> ■ 항당뇨에 미치는 효과 	100 (추가연구)	<ul style="list-style-type: none"> ▷이소플라본 고함유 대두배아발효물에서 STZ로 유발된 제1형 당뇨모델에서 항당뇨 효과를 확인하였음

5. 4세부과제 달성도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 연도 (2009)	이소플라본 대사체의 임상적 기능성 입증	<ul style="list-style-type: none"> ■ 여성 체액(urine) 중의 equol의 생화학적 정량법 확립 	100%	▷HPLC기법을 이용하여, buffer 중의 equol 정량조건을 검토한 후, 인체 시료인 소변 중에 함유된equol을 정량하기 위한 생화학적 방법을 확립함.
		<ul style="list-style-type: none"> ■ 인체 체액에 함유된 equol의 면역학적 정량법 검토 	100%	▷동물에서 equol에 대한 polyclonal antibody를 제조하여 competitive assay를 통해 생체시료 중의 equol을 정량하는 방법을 검토하였으나, isoflavone분자간의 교차반응 때문에 측정이 어려운 것으로 확인됨
2차 연도 (2010)	이소플라본 대사체의 임상적 기능성 입증	<ul style="list-style-type: none"> ■ 폐경기 여성환자의 모집 및 시험법 완성 	100%	▷폐경 여성 지원자 중 문진 및 지원자 사전 검사를 통해 적합하다고 판정된 60명을 선정하여 Equo-Production 과 Non-Production 군을 각각 연령과 폐경 기간이 동일하도록 할당하여 시험군과 대조군 급이를 시행 ▷각 군의 피험자에게 급이 전, 급이 6개월, 12개월에 혈액 검사 및 소변 Equol 생산능 검사, 골밀도검사, 유방 촬영 시행함
		<ul style="list-style-type: none"> ■ 환자에게 제품투여 후 소변 중의 equol 함유 여부 측정 	100%	▷표준 시료 3일 복용 후 공복 상태 채집한 중간뇨의 HPLC를 통해 정량 시행하여 20ng/ml 이상을 Equol Production 군으로 정의함
3차 연도 (2011)	이소플라본 함유 폐경기 개선식의 임상적 효능평가	<ul style="list-style-type: none"> ■ 이소플라본 함유 시료 급이시 발생할 것으로 기대되는 다음의 임상적인 효과를 검증 	100%	▷폐경기 증상의 완화 ▷폐경기에 증가하는 건강 문제와 관련된다고 보이는 생화학적 실험 지표 및 방사선학적 검사 지표(골밀도, 심혈관 위험도, 유방 밀도, 면역 기능 등)의 개선 여부
		<ul style="list-style-type: none"> ■ 소변 Equol 의 정량 분석을 통해 폐경기 개선식의 임상 효과에 대한 생화학적 실험 지표와 Equol 생산능의 일치성을 조사함 	100%	▷Equol 생산능의 판별 ▷설문 조사,신체 측정 ▷생화학적 검사 ▷면역 기능 평가 ▷골밀도 검사 ▷유방 촬영

제 2 절 관련분야의 기술발전예의 기여도

1. 경제성이 높은 생산방법 개발로 인한 가격 경쟁력 향상 모색

가. 원료 : 대두 가공시 발생하는 부산물의 이용

나. 공정 : 식용미생물을 이용하여 기능성 물질인 대두배아의 이소플라본을 고농도로 생물 전환 할 수 있는 공정 개발

다. 조건 : 비배당체 이소플라본의 고농도 생산 공정 조건 개발로 원가 절감 모색

2. 대두 가공 부산물인 대두 배아 중 이소플라본에 대한 비임상연구 및 임상연구를 통한 생리 기능성 확인
3. In vitro, in vivo 등의 실험을 진행하여 기전적 효과를 입증함으로써 폐경기로 인한 골다공증, 동맥경화증 등에 대한 효과적 예방 및 개선방법을 발굴
4. 생리 기능성 물질인 이소플라본에 대한 정량법 확립으로 대두 이소플라본 이용 제품에 대한 데이터베이스 구축 및 활용
5. 대두 배아 유래 배당체 이소플라본에 대한 생물전환 기술 확립으로 생명공학적 핵심기반기술 창출
6. 기능성소재를 활용한 폐경기 증상 개선 및 국민의 건강 증진에 기여
7. 식품에 고부가가치 부여 - 대두 부산물을 가공하여 고부가가치의 원료 생산
8. 고순도 제품 개발 기술 확보 및 원료화에 따른 건강기능식품 소재화 모색
9. 식품의 인체 대사 및 질환과의 상관관계의 연구를 통한 임상영양학의 발전 도모
10. 고기능성 식물성 에스트로젠이 포함된 대두 발효물을 제공

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 연구개발 성과

1. 새로운 형태의 식물성 에스트로겐을 적용한 고기능성 medical food 제공

- ▶ 폐경기 여성들을 위한 특수의료용도식품 군으로 대두배아 발효물이 첨가된 균형 영양 식 제조 완료
- ▶ 이소플라본 대사체를 포함하는 원료를 기능성 음료에 적용 성공함으로써 원료 소재화 가능성 기대

2. 대두배아 발효물 및 폐경기 개선식 제품에 대한 비임상연구 및 임상연구를 통한 생리 기능성 확인

- ▶ 이소플라본 고함유 대두배아추출물, 발효물 및 폐경기 개선식에 대한 전임상에서의 난소절제 동물모델에서 골대사, 당, 지질대사, 간 조직에서의 항산화효과, 혈중 호르몬 및 조직학적 변화에서 유의한 개선효과를 보여 폐경기 개선식이 개발에 기여할 것으로 기대
- ▶ 이소플라본 고함유 대두배아추출물, 발효물 및 폐경기 개선식에서 3개월 반복급여에 대한 안전성 확보
- ▶ 이소플라본 고함유 대두배아발효물에 대하여 항당뇨효과를 확인함으로써 폐경기 개선식에 대한 새로운 기능성으로 가능성을 기대

3. 이소플라본 대사 균주 및 배양기술 확보

- ▶ Int 57 또는 *B. lactics* BL 740을 이용하여 비배당체 이소플라본을 고농도로 함유하는 배아 발효물 개발 기술 확보
- ▶ *L. garvieae*를 이용하여 Equol 전환 기술 확보

4. 이소플라본 대사물질 분석기술 확립

5. 식용 미생물을 이용한 생물전환용 최소가공공정의 개발

- ▶ 배당체를 활성성분으로 함유하는 다른 소재의 발효에 응용할 수 있는 기반확보
- ▶ 식용 미생물 활용으로 안전한 공정 가능

제 2 절 실용산업화 계획(기술실시 등)

1. 갱년기 여성에게 도움을 주는 기능성 음료 제품 개발

비임상연구와 임상연구 결과를 바탕으로 갱년기 여성들에게 도움을 주는 건강기능식품 또는 특수의료용도식품으로 상품화하고자 한다.

본 제품에 대한 소비자 선호도 조사 결과를 보았을 경우, 여성들이 보다 간편하고 부담없이 즐길 수 있는 제품이 개발되어 상품화가 된다면 여성 소비자들에게 큰 호응을 얻을 수 있을 것이라고 기대하고 있다.

2. 기능성 원료소재화

(주)비피도에서 생산되는 제품(홍삼발효워터)에 적용하여 원료소재로 제품화 하고자 한다.

제 3 절 연구결과의 대외적 활용방안

1. 정량적 연구 실적

가. 국내 특허 출원 2건

- (1) 대두배아를 포함하는 이소플라본 비배당체 생산 및 비피도박테리움 성장용 배지 및 그 생산 방법 (출원번호 : 제 10-2010-0120845)
- (2) 대두배아 발효물을 포함하는 갱년기 증상 개선용 음료 조성물 및 그 제조 방법 (출원번호 : 10-2012-0004461)

나. 국내 학술지 발표 5건

- (1) Choong-Young Lee. et. al. Statistical optimization of culture media contained soy proteins and hypocotyl for the growth of Bifidobacterium lactis BL740 and production of soy isoflavone aglycones. J. Appl Biol Chem. 53(3): 126-131. 2010.
- (2) Chang-Seob Son. et. al. The Effects of Soybean Peptide on Lipid Peroxidation, Antioxidant Enzyme and Inflammatory Cytokines in Elite Taekwondo Player, J Exp Biomed Sci. 16(4): 287-292. 2010.
- (3) Chang-Seob Son. et. al. The Effects of Soybean Peptide Intake on Index of Muscle Damage and Hormone Concentration in Taekwondo Player. J Exp Biomed Sci. 17(3): 245-251. 2011.
- (4) Min Jeong Kim. et. al. Inhibitory Effects of Genistein and Water Extracts of Various Herbs on Histamine Release. J Korean Soc Appl Biol Chem. 54(1): 95-98. 2011
- (5) Sujung Bae. et. al. Effects of Soybean Peptide Intake on Antioxidant Enzyme, Cortisol and Inflammatory Cytokines in High School Judo Athletes. J Exp Biomed Sci. 18(1): 1-7. 2012.

다. 국외 학술지 SCI급 논문 심사 중 2건, 투고 준비 중 2건

- (1) Wu QQ, You HJ, Ahn HJ, Ji GE. Effects of Propionibacterium freudenreichii subsp. shermaniicoculture on the growth pattern and survival of Bifidobacterium adolescentis Int 57 in soymilk, cow's milk and modified MRS medium. Int J Food Microbiol. (심사중)
- (2) You HJ, Ahn HJ, Kim JY, Wu QQ, Ji GE. High expression of β -glucosidase in

Bifidobacterium bifidum BGN4 and application to the bioconversion of isoflavone glucoside to aglycones during the fermentation of soy milk. Appl Microbiol Biotechnol. (심사중)

- (3) Areum Yeo, Yung-Choon Yoo. Anti-inflammatory effect of equol, an isoflavone derived from soy bean, on LPS-induced inflammation in RAW 254.7 macrophages. International Immunopharmacology (투고 준비중)
- (4) Areum Yeo, Yung-Choon Yoo. Inhibitory effect of equol, a soy bean-derived isoflavone, on CD3-mediated T activation. Scandinavian Journal of Immunology (투고 준비중)

라. 국내 학술대회 포스터 발표 7건

- (1) 2009년 충북대 산학초청세미나. 2009년 5월 6일. 충북대학교.
 - 발표제목: 대두로부터 유용성분 분리와 이를 이용한 건강기능식품 개발 및 제품화
 - 발표자: 이운복
- (2) 2010년 한국식품과학회 학술대회. 2010년 6월 16일. 인천송도.
 - 발표제목: Optimization of culture medium contained soy hypocotyls for the isoflavone aglycone production and the growth of bifidobacterium lactics BL 740
 - 발표자: 이충영
- (3) 2010년 2010 International symposium & Annual meeting. 2010년 6월 24일. 서울.
 - 발표제목: Screening of lactic acid bacteria for the production of isoflavone aglycones and equol from soy-hypocotyl.
 - 발표자: 박명수
- (4) 2011년 대한면역학회 춘계학술대회. 2011년 6월 3일-4일. 서울.
 - 발표제목: Effect of equol, an isoflavone derived from soy bean, on LPS-induced inflammation in RAW 254.7 macrophages
 - 발표자: 여아름, 이정립, 박석래, 유영춘
- (5) 2011년 한국실험동물학회 국제학술대회. 2011년 8월 25-27일. 부영.
 - 발표제목: Equol, a soy bean-derived isoflavone, inhibits inflammation in LPS-stimulated RAW 264.7 cells and LPS-induced septicemia in mice
 - 발표자: 여아름, 이정립, 박석래, 유영춘
- (6) 2011년 대한면역학회 추계학술대회. 2011년 11월 17-18일. 서울.
 - 발표제목: Effect of equol, an isoflavone derived from soy bean, on anti-CD3ε-stimulated T lymphocytes
 - 발표자: 여아름, 이정립, 박석래, 유영춘
- (7) 2011년 대한갱년기학회 추계학술대회. 2011년 11월 27일. 서울.
 - 발표제목: Effects of Soy Isoflavone on Menopausal Symptom, Cardiovascular and Bone Health and its relationships of Urine Equol Production: a single blind, randomized, controlled trial.

- 발표자: 서근영

마. 전시회 참여 1건

(1) 2009 대한노인요양병원협회 춘계학술세미나. 2009년 5월 15일. 백범기년관 컨벤션홀

- 참여품목: 환자식

- 참가자: 이충영

바. 인력활용/양성 성과

(1) 인력지원 성과

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
8	1		4	3	3	5			8

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 대두는 양질의 단백질과 높은 불포화지방산 비율 등 우수한 영양성분 외에도 다양한 생리활성을 가진 기능성 물질들을 다량 함유하고 있는 식물이다.
2. 특히, 생리활성 배당체의 기능성으로 인하여 대두의 기능성 성분은 항암 및 항산화 효과가 크다는 사실이 밝혀지고 있으므로 이에 초점을 맞춘 기능성, 영양성 및 경제성이 높은 소재의 생산 및 가공식품 개발 등의 다양한 각도에서의 연구 필요성이 대두되고 있는 실정이다.
3. 최근에는 대두 이소플라본의 생리 기능성 및 생산에 대한 연구가 활발히 진행되고 있고 어느 정도 가시적인 성과를 보이고 있음.
4. 특히, 해외에서 대두 이소플라본이 에스트로젠 대체가 가능한 식물성에스트로젠 물질으로써 안면홍조, 골다공증, 우울증, 기억력 감퇴 등 폐경기 증상의 개선 효과에 대한 연구뿐만 아니라 항암효과, 면역력 증진 효과, 콜레스테롤 감소 효과, 체지방 감소 효과 등 다양한 기능성에 대한 *in vitro*, *in vivo* 연구 결과 다수 축적되고 있으며, 국내의 대두 이소플라본 연구는 품종별 함량분포, 콩 및 일부 콩가공식품의 함량분석, 국민들의 일일 평균 섭취량 등에 대한 기초적인 연구만이 진행되었고, 기능성에 대한 임상적 연구 상태는 미비한 실정이다.
5. 해외의 경우 대두 이소플라본이 갱년기 여성용 식품으로써 이용 될 뿐만아니라 비누, 클렌징크림, 화장품 등 다양한 용도로 사용되고 있는 실정이다.

제 7 장 참고문헌

1. Chang YC, Nair MG. Metabolism of daidzein and genistein by intestinal bacteria. *J Nat Prod.* 58: 1892-1896. 1995.
2. Kelly GE, Joannou GE, Reeder AY, Nelson C, Waring MA. The variable metabolic response to dietary isoflavones in humans. *Proc Soc Exp Biol Med.* 208: 4043. 1995.
3. Watanabe S, Terashima K, Sato Y, Arai S, Eboshida A. effects of isoflavone supplement on healthy women. *Biofactors.* 12: 233-241. (2000)
4. Mizunuma H, Kanazawa K, Ogura S, Otsuka S, Nagai H. Anticarcinogenic effects of isoflavones may be mediated by genistein in mouse mammary tumor virus-induced breast cancer. *Oncology.* 62:7884. 2002.
5. Appt SE. Usefulness of the monkey model to investigate the role soy in postmenopausal women's health. *Ilar J* 45: 200-211. 2004.
6. Lukaczer D et al. Clinical effects of a proprietary combination isoflavone nutritional supplement in menopausal women: a pilot trial. *Altern Ther Health Med.* 11: 6065. 2005.
7. Jackman KA, Woodman OL, Sobey CG. Isoflavones, equol and cardiovascular disease: pharmacological and therapeutic insights. *Curr Med Chem.* 14: 2824-2830. 2007.
8. Ishiwata N, Melby MK, Mizuno S, Watanabe S. New equol supplement for relieving menopausal symptoms: randomized, placebo-controlled trial of Japanese women. *Menopause.* 16: 141-148. 2009.
9. Akaza H et al. Is daidzein non-metabolizer a high risk for prostate Cancer? A case-controlled study of serum soybean isoflavone concentration. *Jpn J Clin Oncol.* 32: 296-300. 2002.
10. Toru Izumi et. al. Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. *J Nutr.* 130: 1695-1699. 2000.
11. Kenneth D. R. Setchell et. al. Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. *J Nutr.* 131: 1362S-1375S. 2001.
12. Ligia Zubik and Mohsen Meydani. Bioavailability of soybean isoflavones from aglycone and glucoside forms in American women. *Am J Clin Nutr.* 77: 1459-65. 2003.
13. Kuhnau J. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet* 24: 117-191. 1976.
14. Kenneth D. R. Setchell et. al. Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 76: 447-53. 2002.
15. M. MATSUURA, A. OBATA, and D. FUKUSHIMA. Objectionable flavor of soy milk developed during the soaking of soybeans and its control. *J Food Sci.* 54(3): 602-605. 1989.
16. MASARU MATSUURA and AKIO OBATA. β -Glucosidases from soybeans hydrolyze daidzin and genistin. *J Food Sci.* 58(1): 144-147. 1993.

17. Stefano R, Lucia R, Marzia DL, Alberto A, Alan L, Ugo MP, and Maddalena R. Bioconversion of soy isoflavones daidzin and daidzein by bifidobacterium strains. *Appl Microbial Cell Physiol.* 81: 943–950. 2009.
18. Food Safety Commission. Fundamental concepts in the safety assessment of foods containing soy isoflavones for the purpose of specified health use. Japan. 2006.
19. Sung CJ. The effect of soy isoflavone supplementation on urinary isoflavone excretion in Korean postmenopausal women. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 31(6): 1043–1047. 2002.
20. Augusto Ferrari, Soy extract phytoestrogens with high dose of isoflavones for menopausal symptoms. *J. Obstet. Gynaecol.* 35(6): 1083–1090. 2009.
21. C. E. Gleason et al., A preliminary study of the safety, feasibility and cognitive efficacy of soy isoflavone supplements in older men and women. *Age and Ageing.* 38: 86–93. 2009.
22. E.A.P. Nahas et al., Efficacy and safety of a soy isoflavone extract in postmenopausal women: A randomized, double-blind, and placebo-controlled study. *Maturitas.* 58: 249–258. 2007.
23. Kaari C. et al., Randomized clinical trial comparing conjugated equine estrogens and isoflavones in postmenopausal women: a pilot study. *Maturitas.* 53: 49–58. 2006
24. Cheng G et al., Isoflavone treatment for acute menopausal symptoms. *Menopause* 14 (3 Pt 1): 468–473. 2007.
25. D'Anna R et al., Effects of the phytoestrogen genistein on hot flashes, endometrium, and vaginal epithelium in postmenopausal women: a 1-year randomized, double-blind, placebocontrolled study. *Menopause* 14 (4): 648–655. 2007.
26. Nahas E et al., Efficacy and safety of a soy isoflavone extract in postmenopausal women: A randomized, double-blind, and placebo-controlled study. *Maturitas* 58 (3): 249–258. 2007.
27. Welty F. K et al., The association between soy nut consumption and decreased menopausal symptoms. *J Womens Health (Larchmt.)* 16 (3): 361–369. 2007.
28. Imhof M et al., Improvement of menopausal symptoms by soy isoflavones: A randomized, double-blind study. *Planta Med* 74 (9): 928. 2008.
29. Khaodhilar L et al., Daidzein-rich isoflavone aglycones are potentially effective in reducing hot flashes in menopausal women. *Menopause* 15 (1): 125–132. 2008.
30. Marini H et al., Breast Safety and efficacy of genistein aglycone for postmenopausal bone loss: A follow-up study. *J Clin Endocrinol Metab* 93 (12): 7487–7496. 2008.
31. Verheus M et al., Soy protein containing isoflavones and mammographic density in a randomized controlled trial in postmenopausal women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 17 (10): 2632–2638. 2008.
32. Basaria S et al., Effect of high dose isoflavones on cognition, quality of life, androgens, and lipoprotein in postmenopausal women. *J Endocrinol Invest* 32 (2): 150–155. 2009.
33. Maskarinec G et al., Various Doses of Soy Isoflavones Do Not Modify

- Mammographic Density in Postmenopausal Women. *J Nutr.* 139: 981–986. 2009.
34. Qin W et al., Soy isoflavones have an antiestrogenic effect and alter mammary promoter hypermethylation in healthy premenopausal women. *Nutr Cancer* 61 (2): 238–244. 2009.
 35. Nahas EA et al., Efficacy and safety of a soy isoflavone extract in postmenopausal women: a randomized, doubleblind, and placebo-controlled study. *Maturitas.* 58:249–258. 2007.
 36. Reimann M et al., Consumption of soy isoflavones does not affect plasma total homocysteine or asymmetric dimethylarginine concentrations in healthy postmenopausal women. *J Nutr.* 136:100–105 2006.
 37. Sammartino et al., Short-term effects of a combination of isoflavones, lignans and *Cimicifuga racemosa* on climacteric-related symptoms in postmenopausal women: a doubleblind randomized placebo-controlled trial. *Gynecol Endocrinol.* 22:646–650. 2006.
 38. Sites CK et al., Effect of a daily supplement of soy protein on body composition and insulin secretion in postmenopausal women. *Fertil Steril.* 88:1609–1617. 2007.
 39. Wu J et al., Cooperative effects of isoflavones and exercise on bone and lipid metabolism in postmenopausal Japanese women: a randomized placebo-controlled trial. *Metabolism.* 55:423–433. 2006.
 40. Allen JK et al., Effect of soy protein-containing isoflavones on lipoproteins in postmenopausal women. *Menopause.* 14(1):106–114. 2007.
 41. Atteritano M et al., Effects of the phytoestrogen genistein on some predictors of cardiovascular risk in osteopenic, postmenopausal women: a two-year randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Clin Endocrinol Metab.* 92:3068–3075. 2007.
 42. Aubertin-Leheudre M et al., Six months of isoflavone supplement increases fat-free mass in obese-sarcopenic postmenopausal women: a randomized double-blind controlled trial. *Eur J Clin Nutr.* 61:1442–1444. 2007.
 43. Brink E et al., PHYTOS Investigators. Long-term consumption of isoflavone-enriched foods does not affect bone mineral density, bone metabolism, or hormonal status in early postmenopausal women: a randomized, double-blind, placebo controlled study. *Am J Clin Nutr.* 87:761–770. 2008.
 44. Cancellieri F et al., Efficacy on menopausal neurovegetative symptoms and some plasma lipids blood levels of an herbal product containing isoflavones and other plant extracts. *Maturitas.* 56:249–256. 2007.
 45. Casini ML et al., Psychological assessment of the effects of treatment with phytoestrogens on postmenopausal women: a randomized, double-blind, crossover, placebo-controlled study. *Fertil Steril.* 85:972–978. 2006.
 46. Garrido A et al., Soy isoflavones affect platelet thromboxane A2 receptor density but not plasma lipids in menopausal women. *Maturitas.* 54:270–276. 2006.
 47. Gonzalez S et al., Effects of isoflavone dietary supplementation on cardiovascular risk factors in type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 30:1871–1873. 2007.

48. Ho SC et al., Effects of soy isoflavone supplementation on cognitive function in Chinese postmenopausal women: a double-blind, randomized, controlled trial. *Menopause*. 14(3 Pt1):489-499. 2007.
49. Ho SC et al., Soy isoflavone supplementation and fasting serum glucose and lipid profile among postmenopausal Chinese women: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Menopause*. 14:905-912. 2007.
50. Izumi T et al., Oral intake of soy isoflavone aglycone improves the aged skin of adult women. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 53:57-62. 2007.
51. Katz DL et al., Raloxifene, soy phytoestrogens and endothelial function in postmenopausal women. *Climacteric*. 10:500-507. 2007.
52. Khaodhiar L et al., Daidzein-rich isoflavone aglycones are potentially effective in reducing hot flashes in menopausal women. *Menopause*. 15:125-132. 2008.
53. Lewis JE et al., A randomized controlled trial of the effect of dietary soy and flaxseed muffins on quality of life and hot flashes during menopause. *Menopause*. 13:631-642. 2006.
54. Maesta N et al., Effects of soy protein and resistance exercise on body composition and blood lipids in postmenopausal women. *Maturitas*. 56:350-358. 2007.
55. Ye YB et al., Soy isoflavones attenuate bone loss in early postmenopausal Chinese women: a single-blind randomized, placebo-controlled trial. *Eur J Nutr*. 45:327-334. 2006.
56. Zhang et al., Epimedium-derived phytoestrogen flavonoids exert beneficial effect on preventing bone loss in late postmenopausal women: a 24-month randomized, double-blind and placebo-controlled trial. *J Bone Miner Res*. 22:1072-1089. 2007.
57. 건강기능식품 기준 및 규격; II. 2.2.5 대두 이소플라본. 식품의약품안전청. 2010.
58. 한국인 영양섭취기준. 한국영양학회. 2010
59. Ministry of health & welfare. Korea health statistics: Korea National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES V-1): 57. 2010.
60. Elliott et. al. Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. *Am J Clin Nutr*. 76:911-22. 2002.
61. Sang Hyun Lim, Yu Hwa Park, Chang Ju Kwon, Hun Ju Ham, Haet Nim Jeong, Kyung Hee Kim, and Young Sup Ahn. Anti-diabetic and Hypoglycemic Effect of *Eleutherococcus* spp. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 39(12): 1761-1768. 2010
62. 통계청(www.kostat.go.kr). 사망원인통계연보. 2009. 연도별 사망원인순위
63. Jae-Hwang Jeong, Sang-Hwa Lee, Jin-Joo Hue, Ki-Nam Lee, Sang Yoon Nam, Young Won Yun, Seong-woon Jeong, Young Ho Lee, Beom Jun Lee. Effect of bitter melon(*Momordica Charantia*) on anti-diabetic activity in C57BL/6J db/db mice. *Korean J Vet Res*. 48(3): 327-336. 2008.
64. Hyeon-A Lee, Hee-Sun Sim, Kang-Ju Choi, Hee-Bong Lee. Hypoglycemic Action of red Ginseng Components (II) : Investigation of the Effect of fat Soluble Fraction From Red Ginseng on Enzymes Related to Glucose Metabolism in Cultured Rat Hapatocytes.

- Korean J. Ginseng Sci. 22(1): 51-59. 1998.
65. Satio, I. : Keio Medicine. 2: 149. 1922.
 66. Tsuo, C. and Yen, C. : The 1st Conference of Soc. of Chinese Physiol. Sci. 35. 1959.
 67. Jo, J. S. and Park, S. H. : Ann. Rept. Korean Ginseng and Tobacco Research Inst., 1979.
 68. Petkov, W. : Arzneimittelforschung. 11: 288. 1961.
 69. Kaplan, R. S., and Pederson, P. L. : Pharmacol. Rev. 21: 1. 1969.
 70. Chen, P. S., Toribara, T. T., and Warner, H. : Anal. Chem. 28: 1756. 1956.
 71. Mi-Yae Shon, Sun-Young Choi, Hyun-So Cho and Nak-Ju Sung. Effects of Cereal and Red ginseng Flour on Blood Glucose and Lipid Level in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. J Korean Soc Food Nutr. 33(9): 1463-1468. 2004.
 72. Wolff SP, Dean RT. Glucose autooxidation and protein modification: the potential role of autooxidative glycosylation in diabetes. Biochemical Journal. 245: 243-246. 1987.
 73. Defronzo RA. The effect of insulin on renal sodium metabolism. Diabetologia. 21: 165-171. 1981.
 74. Steiner G, Haynes F, Yoshino G. Hyperinsulinemia and in vivo very low density lipoprotein triglyceride kinetics. Am J Physio. 246: 187-192. 1984.
 75. Young IR, Stout RW. Effects of insulin and glucose on the cells of the arterial wall: Interaction of insulin with dibutyryl cyclic AMP and low density lipoprotein in arterial cells. Diabetes Metab. 13: 301-306. 1987.
 76. Urano, S., Midori, H. H., Tochihi, N., Matsuo, M. and Ito, H. Vitamin E and the susceptibility of erythrocytes and reconstituted liposomes to oxidative stress in aged diabetics. Lipids. 26: 58-61. 1991.
 77. Sohal, S. and Allen, R. G. Oxidative stress as a causal factor in differentiation and aging: A unifying hypothesis. Exp. Gerontol. 25: 499-522. 1990.
 78. Moody, C. S. and Hassan, H. M. Mutagenicity of oxygen free radicals. Proc. Natl. Acad. Sci. 79: 2855-2902. 1982.
 79. Junqueira, V. B. C, simiz, K., Videla, L. A. and Barros, S. B. Dose dependent study of the effects of acute lindamce administration on rat liver superoxide anion production antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation. Toxicology. 41: 193-203. 1996.
 80. Hassan, H. M. Free Radical. Biol. Med. 5: 377-384. 1988.
 81. Byers, T. and Perry, G. Diabetary Carotenes, Vitamin C and Vitamin E as Protective Antioxidants in Human Cancers. Ann. Rev. Nutr. 12: 135-139. 1992.
 82. West, K. M., Ahuja, M. M. S. and Bennett, P. H. et al. The role of circulating glucose and triglyceride concentration and their interaction with other "risk factor" as determinants of arteial disease in nine diabetic population samples from WHO multivational study. Diabetes Care. 6: 364-376. 1983.
 83. Ha, A. W. and Kim, H. M. The Study of lipid-per-oxidation, antixoidant enzymes, and the antioxidant vitamin in NIDDM patients with microvascular-diabetic complication. Korean

- J. Nutr. 21: 17-25. 1999.
84. Kim, J. Y. and Lee, B. H. Effect of the antioxidants on the diabetic complications J Vet Clin. 18: 374-387. 2001.
 85. Lee, K. H. and Dhung, S. H. Antidiabetic effect and mechanism of Mori folium on streptozotocin induced diabetic mouse. Bull KH Pharma Sci. 28: 87-92. 2000.
 86. Won HJ, Lee HS, Kim JT, Hong CO, Koo YC, Lee KW. The anti-diabetic effects of Kocat-D1 on streptozotocin induced diabetic rats. Korean J Food Sci. Technol. 42: 204-209. 2010.
 87. Eun-Kyung Kwon, Eun-Mi Choi and Sung-Ja Koo. Effects of Mucilage from Yam (*Dioscorea batatas* DECENE) on Blood Glucose and Lipid Composition in Alloxan-induced Diabetic Mice. KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. 33(6): 795-801. 2001.
 88. Han HK, Je HS, Kim GH. Effects of *Cirsium japonicum* powder on plasma glucose and lipid level in streptozotocin induced diabetic rats. Korean J Food Sci. Technol. 42: 343-349. 2010.
 89. Kim JL, Bae CR, Cha YS. *Helianthus tuberosus* extract has anti-diabetic effects in HIT-T15 cells. 2010. J Korean Food Sci. 42: 204-209. 2010.
 90. Wang H, Murphy PA. Isoflavone content in commercial soybean food. J Agric Food Chem. 42: 1666-1673. 1994.
 91. Messina M. Soyfoods, soybean Isoflavone bone health. Korea Soybean Digest. 15: 122-136. 1998.
 92. Bansal, S.k., Love J, and Gurtoo HL. High pressure liquid chromatographic separation of multiple of cytochrome P-450. Biochem. Biophys. Res. Commun. 117, 268-27. 1983.
 93. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275. 1951.
 94. Cropo, C. H., McCord, J. M. and Fridovich, E. Preparation and assay of superoxide dismutase. In *Methods in Enzymology*, Fleischer, S. and Packer, L(eds), Academic Press, New York. 52: 382-393. 1978.
 95. Habig, W. H., Pabst, M. J. and Jakoby, W. B. Glutathione-S-transferase, The first enzymatic step in mercapturic acid reaction. Anal. Biochem. 249: 7130-7139. 1974.
 96. Ellman, G. L. Tissue sulfhydryl groups. Arch Biochem. Biophys. 82: 70-77. 1959.
 97. Suematsu, T., Kamada, H Abe, S. Kikuchi and K. Yagi. Serum lipoperoxide levels in patients suffering from liver disease. Clin. Chim. Acta. 79: 267-770. 1977.
 98. Demoss, R. D. *Methods of Enzymology I*. Academic press, New York, 2: 876-880. 1962.
 99. Hara, H., Miwa, I. and Okuda, J. Inhibition of rat glucokinase by alloxane and ninhydrin. Chem Pharm Bull. 34: 4371-4737. 1986.

100. Preston, A. M., Tome, J., Morales, J. J., Milan, L., Cuevas, A. A., Medina, J. and Santiago, J. A. Diabetic parameters 58 weeks after injection with streptozotocin in rats fed basal diet supplemented with fiber, mineral and vitamins. *Nutr. Res.* 11: 895-906. 1991.
101. Kahn CR. The molecular mechanism of insulin action. *Ann Rev Med.* 36: 429-433. 1985.
102. Allen, D. W., Schroeder, W. A. and Balog, J. Observation on the chromatographic heterogeneity of normal adult & fetal human hemoglobin. *J. Am. Chem. Soc.* 80: 1628. 1958.
103. Hyo Sang Bae, Seong-Sik Park, Jin Ki Jung, Cheol-Ho Yoon, Sang Hyuk Byun, Yong-Ki Park. Anti-diabetic Effect of Indongdeungjokolpi-tang in Streptozotocin-induced Diabetic Rats. *Kor J. Herbology* 23(4): 103-112. 2008.
104. De Ritis F. Coltorti M. Activity transaminase del sieroumano nellepatita virale. *Minerva Med.* 46(3): 1207. 2005.
105. Kim YG, Cho GB, Kim MS, Ko YH, Park MI, Woo IK, Ahn SY, Park BC. The diagnostic significance of AST/ALT ratio in patients with hepatocellular carcinoma. *Korea J Gastroenterology.* 25(5): 958-963. 1993.
106. Kim HC, Koh YH, Moon JM, Wi JS, Jeung KW, Chun BJ, Heo T, Min YI. Clinical analysis of elevated serum AST Level in enzymology patients. *J Korea Soc Emergency Med* 14(1): 38-43. 2003.
107. Ghosh, R., Mukherjee, B and Chatterjee, M. A. Novel after of selenium on streptozotocin induced diabetic mice. *Diabetes Res.* 25: 165-171. 1986.
108. Vats V., Yadav, S. P. and Grover, J. K. Ethanolic extract of *Ocimum sanctum* leaves partially attenuates streptozotocin induced alteration in glycogen content and carbohydrate metabolism in rats. *J of Ethnopharmacol.* 90: 155-160. 2004.
109. Kim, S. Y., Kim, H. I., Kim, T. H., Ims, S. S., Park, S. K., Lee, I. K., Kim, K. S. and Ahn, Y. H. SREBP-1c mediates the insulin dependent hepatic glucokinase expression. *J of Bio Chem.* 279: 30823-30829. 2004.
110. Mithieux, G, Vidal, H., Zitoun, C., Bruni, N., Daniele, N. and Minassian, C. Glucose-6-phosphate mRNA and activity are increased to the same extent in kidney and liver of diabetic rats. 45: 891-896. 1996.
111. Liu, Z., Barrett, E. J., Dalkin, A. C., Zwart, A. D. and Chou, J. Y. Effect of acute diabetes on the rat hepatic glucose-6-phosphate tase activity and its messenger RNA level. *Bio Chem Biophys. Res. Commum.* 38: 680-686. 1994.
112. Ok-Kyung Kim. Antidiabetic and Antioxidative Effects of *Corni Fructus* in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *J of Korean Oil Chemists' Soc.* 22(2): 157-167. 2005.
113. Cho, S. Y., Park, J. Y., Park, E. M., Choi, M. S., Lee, M. K., Jeon, S. M. Jang, M. K., Kim, M. J. and Park, Y. B. Alternation of hepatic antioxidant enzyme activities and lipid profile in treptozotocin induced diabetic rats by supplementation of dandelion water extract. *Clin. Chim. Acta.* 317: 109-117. 2002.

주 의

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