

발간등록번호

11-1541000-001338-01

과제번호 109144-3

**전통적인 식품 소재 콩을 이용한 항당뇨 물질 개발  
및 산업화**

**Industrialization and Development of anti-hyperglycemic food  
material from soybean hydrolysate using enzymatic system**

대구대학교 생명환경대학

농림수산식품부

# 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “전통적인 식품 소재 콩을 이용한 향당노 물질 개발 및 산업화” 과제의 보고서로 제출합니다.

2012 년 04 월 09 일

주관연구기관명 : 대구대학교

주관연구책임자 : 최 장 원

세부연구책임자 : 최 장 원

연 구 원 : 구 광 본

연 구 원 : 신 동 주

연 구 원 : 최 송 아

연 구 원 : 박 세 영

연 구 원 : 정 월 례

연 구 원 : 이 선 주

협동연구기관명 : 대구공업대학

협동연구책임자 : 나 경 수

연 구 원 : 황 정 욱

연 구 원 : 곽 성 민

연 구 원 : 김 현 지

연 구 원 : 표 미 선

참 여 기 관 명 : (주)새롬바이오

참여기관책임자 : 배 송 환

연 구 원 : 박 민 주

연 구 원 : 송 치 현

# 요 약 문

## I. 제 목

전통적인 식품 소재 콩을 이용한 항당뇨 물질 개발 및 산업화

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

: 궁극적으로 당뇨질환에 유효한 농산물 (콩 가수분해물)을 소재화하여 고부가가치의 기능성식품을 개발함으로써 농업은 고부가가치 산업으로, 농촌은 녹색산업기반의 발전모델을 제시하며, 국민보건 향상 및 관련 산업의 경쟁력을 제고함.

### 1. 연구개발의 목적

- 가. 국산 콩을 이용한 가수분해물 제조법 확립 및 효율적인 CHP 생산, 생리활성 규명
- 나. CHP 함유 항당뇨 기능성 소재 개발
- 다. CHP 식이 실험동물의 주요 조직에 대한 총괄적 DEG (Differentially expressed genes) 분석에 의한 항당뇨 기작 관련 특이유전자 발굴
- 라. CHP 식이 실험동물의 주요 조직에 대한 총괄적 프로테옴 분석에 의한 항당뇨 기작 관련 특이단백질을 발굴
- 마. 항당뇨 기작 관련 특이 유전자 및 단백질 특성 분석
- 바. 항당뇨 특이 단백질 이용 분자 의약 후보물질 개발 핵심자료 제공
- 사. CHP 소재 함유 다양한 제품 개발 : 원료 형태, 완제품 OEM 형태, 자사브랜드 등으로 상품화

### 2. 연구개발의 필요성

- 가. 당뇨대란 (2020년경)에 대비한 효과적인 혈당강하용 기능성식품 개발이 요구됨
- 나. 단백질 함량이 타 식품 재료에 비해 월등히 높은 콩으로부터 항당뇨 활성물질 개발 연구 필요
- 다. 식품 존재 CHP를 혈당강하 소재로 활용하기 위하여 가수분해물 제조 기술 개발의 필요성
- 라. Post-genome 시대에 적합한 첨단 농업생명과학 기술개발이 요구됨 (proteomics & genomics 이용)
- 마. 합성 제조한 CHP 원가는 고가이므로 (350-400만원/g) 본 연구 제조방법에 의해 생산 시 원가 절감에 의한 다양한 식품소재로 활용 필요

### Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

#### 1. 연구개발 내용 및 범위

##### 가. 전통적인 국산 콩 소재 선정 및 가수분해물 제조법 확립

- (1) 대두, 쥐눈이콩, 대두박 등 국내에서 생산 및 유통되고 있는 콩을 상업용 단백질 분해 효소를 활용하여 가수분해물 제조
- (2) 효소 및 반응 조건에 따른 가수분해 조건 확립
- (3) 가공 조건에 따른 CHP의 안정성 평가

##### 나. CHP 함량 증진에 따른 소재화 여부

- (1) Cyclization 및 여러 생화학적 방법을 통한 함량 증진법 개발
- (2) CHP 생리활성 측정 (면역, 항산화 등)
- (3) 소재 가공적성, 물성, 순도증진에 의한 기능성 소재화 (시약, bulk 원료형태, 액상, 분말, 과립화)

##### 다. *In vitro* cell에서 CHP 항당뇨 활성 분석

- (1) CHP 처리에 의한 당뇨 예방 및 치료 효과 측정
- (2) 항당뇨 활성측정 (nitrite 생성, 지질과산화, caspase-3, cytochrome C, ROS 측정)
- (3) CHP 처리 세포의 항당뇨 관련 유전자 (단백질) 발굴 및 특성 분석

##### 라. 제1형 (제2형) 당뇨 실험동물에 의한 항당뇨 활성 검증

- (1) 당뇨모델 유발 및 경구투여에 의한 혈당강하 효과 분석
- (2) Glucose tolerance, insulin level, weight 측정
- (3) Histochemical analysis를 통한 인슐린 생성률 및 조직 복구 측정
- (4) 혈액 및 조직별 DEGs (differentially expressed genes), proteome 발굴 및 특성 분석 (MALDI-TOF)
- (5) 항당뇨 관련 주요 유전자(단백질) 발현에 의한 특성 분석(northern, realtime-PCR, western blot)

##### 마. CHP에 의한 제1형 (제2형) 당뇨모델의 항당뇨 기작 규명

- (1) Diabetes RT-PCR Array Profiler를 이용한 당뇨 관련 유전자들의 발현 분포 분석
- (2) CHP에 의한 antidiabetic pathway 및 기작 규명

##### 바. 항당뇨 관련 특이 유전자 (단백질) DB 구축 및 실용성 조사

- (1) 항당뇨 특이 유전자 (단백질) database화 및 실용성 조사 (chip, biomarker,



inhibitor 관련)

(2) 인체 상동성 비교연구에 의한 의학 소재 후보물질 개발 가능성 조사 (optional)

(3) 간이 임상 test에 의한 CHP 혈당강하 효과 규명 (optional)

사. 대량생산 및 CHP 소재 함유 제품화

(1) CHP의 대량생산 공정 최적화 및 제형화 조건 확립

(2) 가공식품 소재로의 활용을 위한 소재의 가공적성, 일반적 특성, 안정성, 기능성 분석

(3) CHP 소재를 함유한 다양한 형태의 제품화 (과립포, 드링크, 혈당강하 건강보조식품) 및 시장성 조사

#### IV. 연구개발결과

##### 1. CHP 함유 가수분해물 제조법 확립 및 함량 증진에 따른 소재화

다양한 단백질 가수분해효소를 이용하여 국내산 대두, 미국산 대두, 쥐눈이콩, 대두박에 대한 가수분해 효과를 측정한 결과, flavourzyme이 가장 높은 가수분해도를 나타냈다. 대두박을 이용하여 flavourzyme으로 제조한 가수분해물의 가수분해도는 60.1%로 국내산 대두, 미국산 대두, 쥐눈이콩에서의 가수분해도 보다 높은 가수분해도를 보였다. 또한 국내산 대두, 미국산 대두, 쥐눈이콩, 대두박에 대한 가수분해물의 CHP 함량을 측정한 결과, flavourzyme 가수분해물의 CHP 함량이 18.9~28.2 µg/ml로 높은 함량을 나타내었다. 다양한 단백질가수분해에 의해 생산된 가수분해물에서 A-N의 양은 ficin으로 가수분해한 대두 가수분해물에서 가장 높은 값을 나타냈으며 가수분해물의 가수분해도 (DH)는 ficin, alcalase, flavourzyme에 의해 64.7%, 62.2%, 55.2%의 비교적 높은 DH를 보였다.

CHP의 함량은 flavourzyme, alcalase, pancreatin 가수분해물에서 27.6, 9.3, 13.4 µg 함량을 나타내었으며, flavourzyme과 alcalase를 3:1의 비율로 혼합하였을 때 가장 높은 A-N의 함량과 38.1 µg/ml의 높은 CHP 함량을 나타내었다.

청국장으로부터 분리한 균주를 이용하여 대두 발효물을 제조하고 CHP 함량의 증진 여부를 확인하였다. 분리한 균주 중 4균주는 10 unit 이상의 단백질가수분해 활성을 나타냈으며 *Bacillus subtilis*와 *Bacillus* sp.로 동정되었다. 분리균주를 대두용액에서 배양 시 protein의 함량은 발효가 진행될수록 점차 감소하였으며, CHP 함량은 균주의 종류에 따라 증가와 감소, 지속적인 증가 등의 변화를 보였으나 효소를 이용한 가수분해물에 비해 CHP 함량이 상대적으로 낮은 수준이었다.

가수분해물에서의 CHP의 수율을 높이기 위해 대두 가수분해물을 알콜 분획한 결과, 60-80% 분획에 32.9 µg의 CHP가 함유되어 있었으며, 대두 가수분해물의 산처리에 의한 침전 회수, 활성탄 처리 및 한외 여과 처리 시, 수율과 CHP 함량은 한외여과(5 kDa 이

하 회수)에서 71.3%와 1.12%로 가장 높은 수치를 나타내 대두가수분해물 제조 공정에 UF 공정을 추가하였다.

대두 가수분해물의 온도에 따른 CHP의 함량은 40~60°C에서 증진 효과를 보였으며 열안정성은 산성 조건에서 가장 안정하였다. Crude 대두 가수분해물은 pH 7.6에서 가열 시간이 증가할수록 급격히 감소한 반면, pH 3.6과 9.0에서는 비교적 안정한 열안정성을 보였다. 대두 가수분해물 5%는 약 70% 이상의 높은 용해도를 나타내었으며 분자량별로는 <10 kDa MW, crude, >10 kDa MW 순으로 분자량이 적을수록 용해도가 높은 것으로 나타났다. 대두 가수분해물의 거품 형성력 및 안정성 또한 저분자량 순으로 나타났으며, 유화력은 pH 증가와 저분자량의 순으로, 그리고 소화력은 68.3-77.9%로 매우 높은 결과를 나타냈다.

대두가수분해물 10 kDa 이하 분획의 안전성을 쥐에서 평가한 결과 체중 변화, 식이 섭취율 및 음용수 섭취량에서의 차이가 없었으며 혈액학적인 변화도 나타나지 않았다. 또한 간, 신장, 심장, 폐 등 장기의 무게 변화와 조직상의 변화도 나타나지 않았다.

## 2. *In vitro* cell에서 CHP 항당뇨 활성 분석

CHP는 thyrotropin-유리 호르몬 (TRH)과 구조적으로 관련이 있는 자연에 존재하는 원형의 dipeptide이다. CHP는 flavourzyme과 alcalase의 가수분해에 의해 대두로부터 효과적으로 얻었다. 본 연구에서 인슐린을 분비하는 쥐 insulinoma 세포 (RIN5mF)에서 STZ (streptozotocin)에 의해 유도된 베타세포의 기능 이상 및 세포자살에 대하여 조사하였다. RIN5mF 세포를 2 mM STZ으로 처리하였을 때, 인슐린 분비는 정상세포의 약 54% 수준으로 감소하였다. 그러나 CHP를 처리하였을 때 RINm5F 세포의 인슐린 분비능은 처리하지 않은 세포의 71%까지 복구되었다. 또한 CHP는 STZ에 의해 유도되는 산화질소는 2.3배, 지질과산화는 2.3배 줄임으로서 STZ에 의해 중재되는 세포독성으로부터 세포를 보호하였다. 더구나 CHP 처리는 RINm5F 세포에서 caspase-3 활성화, poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) 분해, DNA 절단과 같은 STZ에 의해 유도되는 세포자살현상을 약화시켰다. 따라서 이런 결과는 항세포자살 단백질인 Bcl-2의 발현을 증가시킴으로서 STZ에 의한 산화적 스트레스를 통한 세포자살 현상으로부터 세포를 보호하는 것이고 또한 CHP는 STZ-중재 세포독성 및 세포자살에 대한 보호 및 치유 기능을 갖는 후보물질이 될 수 있을 것으로 사료된다.

## 3. 제1형 (제2형) 당뇨 실험동물에 의한 항당뇨 활성 검증

STZ 처리에 의해 유도된 제 1형 당뇨 모델 쥐에서 포도당 대사, 혈당수준, 지질 변화, 췌장세포의 생존력에 대하여 CHP 효과를 조사하였다. STZ (50 mg/체중 kg)에 의한 당뇨 유발 후 혈당 수준이 300 mg/dL 이상 되는 Sprague-Dawley 쥐를 당뇨 상태임을 확인하고 매일 체중 kg 당 50 mg의 CHP를 투여하였다. 투여 21일째 CHP-투여

쥐에서 혈당 수준은 투여하지 않은 쥐에 비해 약 56% 감소하였다. 포도당 저항성 테스트에 의하면 혈당 수준은 30분 후에는 크게 증가하였지만 CHP 투여 120 분후 정상 수준으로 복구되었다. CHP 투여군에서 혈액 인슐린 수준은 투여하지 않은 그룹에 비해 2 배 정도 증가하였다. CHP 처리군에서 중성지방 및 콜레스테롤 수준은 정상 수준으로 복구 되었으며, 조직학적 분석에 의하면 CHP 처리시 췌장의 손상된 베타세포는 정상 수준의 2/3 정도까지 복구되었다. 염증 반응의 마커로 사용되는 C-reactive protein (CRP)의 전사 수준은 CHP 처리군에서 정상 수준으로 복구되었으며, 이는 STZ에 의해 손상된 베타세포들이 적어도 부분적으로 복구되었다는 것을 암시하는 것이다. 따라서 CHP는 평균 혈당 수준을 낮추고, 인슐린 분비는 증가시키며 당뇨 쥐에서 췌장 베타세포의 생존력을 복구시킴으로서 아주 우수한 혈당 강하 효과를 갖는다고 볼 수 있다. 그러므로 CHP는 제 1형 당뇨를 조절하는 잠재력을 갖는 물질이라 볼 수 있다.

제 2형 당뇨 모델, C57BL/6J *ob/ob*, mouse에서 혈당수준, 포도당 저항성, 체중, 지질변화, 조직학적, 면역학적 실험을 통하여 CHP 함유 대두 가수분해물의 항당뇨 활성이 조사되었으며 또한 CRP 및 렙틴의 변화도 측정되었다. CHP (2 mg/kg BW, 24일)를 *ob/ob* mouse에 24일 동안 투여하였을 때 혈당 수준은 control *ob/ob* mouse에 비해 57% 감소하였으며, 인슐린 수준은 CHP 처리군에서 2배 정도 증가하였다. 포도당 내성 조사에서, CHP 처리군에서 혈당 수준은 120분에서 180분 사이에 정상으로 복구되었으나, 반면에 control *ob/ob* mouse에서는 350 mg/dL의 고혈당 상태가 유지되었다. 더구나 전체 콜레스테롤 및 중성지방은 CHP 처리군에서 control *ob/ob* mouse에서 보다 약 2배 정도 감소하였다. 조직병리학적 분석에 의하면 CHP 처리에 의해 췌장의 손상된 베타세포들은 정상 수준으로 복구되었으며, control *ob/ob* mouse에서는 췌장이 별로 없었지만 CHP 처리군에서는 24일 후 더 커진 췌장들이 관찰되었다. 더욱 흥미로운 사실은 췌장 베타세포들은 CHP 투여 중단 72일과 130일 경과 후 관찰하였을 때 더 많은 췌장 베타세포들이 복구되었다. 또한 인슐린 분비도 CHP 투여를 중단하여도 크게 증가하였다. 이런 결과는 CHP가 CHP 투여군에서 췌장의 생존력 및 복구력을 크게 증가시킨다는 것을 보여 주는 것이다. 염증 반응의 마커로 사용되는 C-reactive 단백질의 전사 수준은 control *ob/ob* mouse 보다 2배 정도 감소하였고, 포도당 수송 조절에 관여하는 렙틴 단백질은 CHP 처리군에서 약 1.5배 정도 증가하였다. 이런 결과들에 의해 CHP는 *ob/ob* mouse에서 인슐린 수준을 증가시켜 혈당을 조절하는데 효과적인 물질이며, 제 2형 당뇨 환자들의 고혈당증을 조절하는데 식품첨가제로 사용하기에 좋은 물질이라 볼 수 있다.

#### 4. 항당뇨 관련 특이 유전자 (단백질) 특성 분석

##### 가. 제 1형 Rat과 2형 mouse 췌장에서 당뇨관련 유전자들의 기능 및 특성 분석

당뇨 관련 연구는 췌장에서 유전자 발현 및 혈당 수준을 조절하는 인슐린 분비 부위에 집중되어 왔다. 그러나 당뇨 유발 과정에 관여하는 분자적 연계망 또는 새로운 유전자의 발견에 있어서 한 유전자를 집중 연구하는 방식은 배제되어왔다. CHP가 당뇨병 개선에 영향을 주는 분자적 기작에 관한 연구를 이해하기 위하여, 2 당뇨 동물 모델인, STZ 유도 당뇨쥐 (T1DM)와 유전적 당뇨 (C57BL/6J ob/ob) 쥐 (T2DM)의 췌장 조직에서 유전자 발현 양상을 조사하였다. 이런 당뇨 설치류들의 치유과정을 이해하기 위하여 당뇨 모델의 췌장조직에서 CHP가 여러 가지 유전자 발현에 미치는 효과가 조사되었다. Microarray 분석에 의해 STZ 처리 시 1,175 유전자들의 발현이 감소하였고, 629 유전자들의 발현 수준은 증가하였다. 또한 여러 유전자들의 변화된 발현 수준은 CHP 처리에 의해 정상적인 수준으로 복구되었다. 그중에서 특히 476 유전자들은 CHP 처리 시 변화가 큰 유전자 발현 양상을 보였다. 기능적 분류에 의하면, 7,198 유전자들은 STZ이나 CHP 처리 쥐에서 control에 비해 다르게 발현되는 것으로 분류 되었고, 반면에 1,534 유전자들은 CHP 처리에 의해 정상 수준으로 복구되었다. 제 1형 당뇨 병발 요인과 크게 연관되는 IL-1 receptor, 지질대사효소 (*Mte1*, *Ptdss1*, *Sult2a1*), myo-inositol oxygenase, glucagon, somatostatin 등은 과발현 되었고, 후각수용체 984 및 미토콘드리아 ribosomal 단백질 등의 발현 수준은 감소한다는 결과를 처음으로 마이크로 어레이 결과에 의해 증명하였다.

유전적 제 2형 당뇨 쥐에서 CHP를 처리하였을 때 췌장 조직에서 control mouse에서 보다 4,384 유전자들의 발현 수준이 2배 이상 변화되었다. 반면에 CHP 처리에 의해 2,140 유전자들은 발현이 증가하였고, 2,244 유전자들의 발현은 감소하였다. 마이크로 어레이 결과에 의해 *IL-2*, *IL12a*, 랩틴 수용체들의 발현 증가와 *PIK3*의 발현 감소는 제 2형 당뇨 발병에 주요한 생리적 역할을 보여준다. 결론적으로 CHP는 당뇨병을 개선시키는 쪽으로 유전자 발현을 촉진하며 당뇨 유발 요인에 대하여 길항작용을 하는 것으로 판단할 수 있다.

#### 나. 제 1형 Rat과 2형 mouse 췌장에서 당뇨관련 단백질들의 기능 및 특성 분석

당뇨병 요인들의 분자적 기작을 알아 보기위하여 2 당뇨 동물 모델인, STZ 유도 당뇨쥐 (T1DM)와 유전적 당뇨 (C57BL/6J ob/ob) 쥐 (T2DM)의 췌장 조직에서 단백질 발현 양상을 조사하였다. CHP 경구 투여에 의해 두 당뇨 모델에서 약 50% 이상 혈당 수준을 낮추는 혈당 강하 효과를 보였으며, 췌장 조직 단백질들이 이차원적 전기영동에 의해 분리되고 MALDI-TOF에 의해 단백질들을 확인하였다. 당뇨와 연관이 있다고 확인된 34 단백질들이 CHP의 실질적인 표적이고, 제 1형 및 2형 당뇨병에 강력한 항당뇨 효과가 있다는 것이 본 연구에 의해 밝혀졌다. 이런 단백질들의 발현에 있어서 변화는 당뇨 모델 동물들이 당뇨 상태를 극복하는데 필요할 것이라 판단된다. 이런 단백질들은 대사, 세포구조, 산화적 스트레스, 신호 및 에너지 전달과 같은 세포기능에 관여한다. 어떤 단

백질은 이미 당뇨병과 연관이 되어 있고 새로 발견된 단백질은 당뇨 발병에 중요한 역할을 할 것으로 보여지므로 좀 더 심층적인 연구가 필요할 것이다. CHP는 당뇨병 관련 분자기작의 연구 및 당뇨병 치료 등에 강력한 물질로 부상되고 있으며, 본 연구에서 제시한 발견들은 새로운 시각에서 당뇨병 치료 및 연구에 중요한 자료를 제공할 수 있을 것이다.

#### 다. 제 1형 Rat과 2형 mouse 혈액에서 당뇨관련 단백질들의 기능 및 특성 분석

혈액 단백질의 경우 신체에서 중요한 기능을 수행하며 혈액의 단백질 분포는 여러 생리적 및 병리학적 조건하에서 변한다. 당뇨병 진단을 위하여 새로운 마커 단백질을 확인하기 위하여, CHP 의해 제 1형 (STZ 유도) 및 유전적 제 2형 당뇨 (ob/ob) 쥐에서 혈액 단백질들의 발현 수준에 미치는 영향을 조사하였다. 경구 투여된 CHP에 의해 혈당이 50% 정도 감소하는 혈당강하 효과를 보였고 이 때 혈액 단백질들에 대하여 2차원적인 전기영동을 수행하였다. 그 결과 나타난 500 spot 중에서 31 spot들이 다르게 발현되는 것으로 나타났고, 그 단백질들이 MALDI-TOF에 의해 확인되었다. STZ 처리 쥐에서 ApoE의 발현은 감소하였고, FGA, ApoA-I, ApoA-IV, A1M, CRP 등의 단백질들의 발현 수준은 증가하였다. 유전적 제 2형 당뇨 쥐에서는 FGB, FGC, F12, C1Q, TNF5, SPA3K 등의 단백질들은 CHP 처리에 의해 혈액 내 발현 수준이 감소하였지만, A1M, A2M, ApoE, TTR 등의 단백질들은 발현 수준이 증가하였다. 결론적으로 이런 단백질들의 조절 변화는 당뇨병 상태를 극복하는데 결정적인 영향을 줄 수가 있고, 당뇨병의 예방 및 치유에 좋은 자료를 제공할 수 있을 것이다.

#### 5. 간이 임상 test에 의한 CHP 혈당강하 효과 규명 (optional)

CHP 함유 대두가수분해물의 혈당강하 효과를 측정하기 위해 피험자 10명을 대상으로 CHP 함유 알약(소환)을 하루에 3회, 총 12.0 g/일 섭취케 하였다. 그 결과 대두가수분해물 복용 전 혈당이 278.25 mg/dL이었으나 15일 복용 후의 혈당은 121.25 mg/dL로 유의적으로 감소하였으며, 복용 전 당화혈색소는 평균 12.45%에서 복용 후 9.85%로 유의적으로 감소하는 경향을 보였다. 또한 실험 전 후의 혈액내의 지질 성분의 변화를 측정한 결과, 실험 전과 후의 유의적인 차이를 보이지 않았으며 GOT와 GPT 수치도 유의적인 변화를 나타내지 않았다.

#### 6. 대량생산 및 CHP 소재 함유 제품화

대두가수분해물을 대량 생산하기 위해 물과 탈지대두분 100 kg을 넣어 혼합하면서 pH를 7.0으로 조정 한 후 효소를 첨가하여 50℃에서 12시간 반응시켰다. 반응 후 30분간 80℃로 가열에 의한 효소의 불활성화, 여과, 농축, 분무건조를 통하여 대두가수분해물을 얻었으며 이용도를 높이기 위해 캡슐형태, 타블렛 및 소환 형태로 제조하였다. 이러한

혈당강화작용을 가진 CHP 함유 대두가수분해물에 대한 연구결과를 특허출원(2건)하였고, 이를 참여기업인 (주)새롬바이오에 기술이전함으로써 이를 이용한 “뉴엔솔라”제품을 생산, 상품화하여 시판하게 되었다.

대두가수분해물을 가공식품에 이용하기 위하여 대두가수분해물을 첨가한 대두강정바를 제조하여 특성을 측정하였다. 대두강정바의 L값은 곡물강정바에 비해 다소 높았으며, a와 b값은 차이가 없었다. 또한  $\Delta E$  값은 대두강정바가 곡물강정바에 비하여 낮은 수치를 보여 대두가수분해물 첨가가 색도에 큰 영향을 주지 않는 것으로 판단되었다. 기계적 물성 평가에서 hardness는 곡물강정바가 대두강정바에 비하여 높은 값을 보였으며 springiness 값은 유의적인 차이를 보이지 않았다. 반면 brittleness는 대두강정바가 곡물강정바에 비하여 낮은 힘에서 깨짐성을 보였다. 곡물강정바와 대두강정바의 관능검사 결과 색, 향 및 단맛의 정도에서 유의적인 차이는 없었으며, 전체 기호도 역시 차이가 없었다. 혈당강화 효과를 가진 대두가수분해물의 이용도를 높이기 위해 대두가수분해물이 첨가된 두부를 제조하여 물리적 특성 등을 조사하였다. 일반 두부와 대두가수분해물 첨가 두부의 b값은 각각 16.18과 15.15로 나타났으며, hardness, springiness, cohesiveness, brittleness와 chewiness에서의 유의적인 차이가 나타나지 않았고, 관능검사에서도 일반 두부와 유의적인 차이가 없었다.

대두가수분해물 강화 코팅 쌀을 제조하여 흡수 코팅 (dip coating) 기능을 살펴본 결과, 대두가수분해물은 hyperbolic한 수화양상을 보였고, 수화정도 (흡수 속도)는 1~10% 농도범위에서 무첨가구와 비교하여 큰 차이를 보이지 않았으나 농도 증가에 따른 흡수 저해가 나타나 methylcellulose polymer 분무코팅 (spray coating)을 실시하였다. 대두가수분해물 코팅쌀은 다소 불투명하며 유백색을 띄고 cracking 현상이 관찰되었고, 색도에서 L값이 원료쌀과 코팅쌀에서 각각 72.52과 77.96이었으며 a값과 b값 모두 원료쌀에 비해 약간 높아진 경향을 나타내었다. 총 색차 (total color difference,  $\Delta E$ )는 원료쌀에 비하여 코팅쌀에서 유의적으로 감소하는 경향으로 나타났다. Fractal dimension은 원료쌀 및 코팅쌀 시료의 값은 각각 1.03과 1.23으로 코팅쌀에서 약간 높은 수치를 나타내었다. 상온에서의 원료쌀과 코팅쌀의 수화양상은 코팅쌀은 침지 시간 5 min에서부터 saturation되는 양상을 보였다. CHP 함유 대두가수분해물로 코팅한 쌀의 표면과 종단면을 전자현미경으로 관찰한 결과 코팅쌀의 표면에서 cracking 현상이 발생하였으나 CHP 함유 대두가수분해물의 methylcellulose polymer 분무코팅이 비교적 고르게 된 것이 관찰되었다.

시판 두유와 대두가수분해물을 함유한 두유의 색도값도 두유와 대두가수분해물 함유 두유의 L, a, b값의 차이가 크게 나타나지 않아 대두가수분해물을 두유에 적용하여 기능이 강화된 두유 제조 가능성을 제시할 수 있었다.

## V. 연구성과 및 성과활용 계획

### 1. 연구논문

본 연구에서 얻어진 직, 간접의 결과들을 이용하여 국내 및 국제 저널에 투고하여 발간 되었으며 일부 논문들은 현재 final minor revision 중에 있다

#### 가. 국내 논문

- (1) Choi, J. W. 2011. Anti-diabetic effect of the exopolysaccharide (EPS) produced from *Cordyceps sinensis* on *ob/ob* mice. *Korean Society for Biotechnology & Bioengineering Journal*. 26: 33-40.
- (2) Ra, K. S. and J. W. Choi. 2011. Enhancement of cyclo (His-Pro) content from soybean fermented with *Bacillus amyloliquefaciens* CHP-12 and Its anti-diabetic effect. *Korean Society for Biotechnology & Bioengineering Journal*. 26: 41-48.

#### 나. 국제논문

- (1) Choi, J. W., K. S. Ra, S. Y. Kim, T. J. Yoon, K. W. Yu, K. S. Shin, S. P. Lee, and H. J. Suh. 2010. Enhancement of anti-complementary and radical scavenging activities in the submerged culture of *Cordyceps sinensis* by addition of citrus peel. *Bioresource Technology*. 101(15): 6028-6034. (SCI, Impact factor = 4.365)
- (2) Jung, E. Y., H. S. Lee, J. W. Choi, K. S. Ra, M. R. Kim, and H. J. Suh. 2011. Glucose tolerance and antioxidant activity of spent brewer's yeast hydrolysate with a high content of cyclo-His-Pro (CHP). *J. Food Science*. 76(2): C272-C278. (SCI, IF = 1.733)
- (3) Koo, K. B., H. J. Suh, K. S. Ra, and J. W. Choi. 2011. Protective effect of cyclo (His-Pro) on streptozotocin-induced cytotoxicity and apoptosis *in vitro*. *J. Microbiol. Biotechnol*. 21: 218-227. (SCIE, IF = 1.224)
- (4) Ra, K. S., H. J. Suh, and J. W. Choi. 2012. Hypoglycemic effects of cyclo (His-Pro) in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 17: 176-184. (SCIE, IF = 1.004)
- (5) Park, S. W., S. A. Choi, J. W. Yun, and J. W. Choi. 2012. Alterations in pancreatic protein expression in STZ-induced diabetic rats and genetically diabetic mice in response to treatment with hypoglycemic dipeptide cyclo (His-Pro). *Cellular Physiology and Biochemistry*. 29: 603-616. (SCI, IF = 3.585)
- (6) Choi, S. A., H. J. Suh, J. W. Yun, and J. W. Choi. 2012. Differential gene expression in pancreatic tissues of streptozocin-induced diabetic rats and genetically-diabetic mice in

response to hypoglycemic dipeptide cyclo (His-Pro) treatment. *Molecular Biology Reports* "under final revision". (SCI, IF = 1.875)

- (7) Choi, S. A., J. W. Yun, H. S. Park, and J. W. Choi. 2012. Plasma proteome alterations in two diabetic animal models in response to cyclo (His-Pro) treatments. *Proteomics*. "under final revision". (SCI, IF = 4.815)

## 2. 특허

- 가. 바실러스 속 KH-15의 콩 발효물을 유효성분으로 포함하는 당뇨병 예방 및 치료용 조성물 (출원일자 2011.01.07; 출원번호 10-2011-0001900 )
- 나. CHP(cyclo(His-Pro))를 고농도로 함유한 대두 가수분해물을 포함하는 혈당 조절용 조성물 (출원일자 2011.07.08; 출원번호10-2011-0068055)

## 3. 성과활용

### 가. 기술이전

- (1) 참여기업 : (주)새롬바이오
- (2) 기술 : CHP(cyclo(His-Pro))를 고농도로 함유한 대두 가수분해물을 포함하는 혈당 조절용 조성물
- (3) 기술이전 : 전용실시권 (5년)
- (4) 기술료 : 선급기술료 (1,000 만원) + 경상기술료 (제품판매액의 2%/년)

### 나. 상품화 및 시제품 제조

- (1) 상품화 : “뉴엔솔라” 제품을 생산 및 상품화하여 시판
- (2) 시제품 : 대두강정마, 대두가수분해물 첨가 두부, 대두가수분해물 강화 코팅 쌀, 대두가수분해물 함유 기능성 두유



## SUMMARY

### I . Title of Research Project

Industrialization and Development of anti-hyperglycemic food material from soybean hydrolysate using enzymatic system

### II . Objective and Necessity of the Research and Development

Through development of functional food using material (soybean hydrolysate) effective for diabetic disease, agriculture will be as high value-added industry, rural will present development model of green industrial base, and finally public health and competitiveness of the related industry will be increased.

#### 1. Objective of the Research and Development

- A. Establishment of manufacturing method for soybean hydrolysate from domestic soybean, efficient production of CHP and Elucidation of biological activity
- B. Development of anti-diabetic functional material containing CHP
- C. Screening of differentially expressed genes related to anti-diabetic mechanism by analysis for major tissues of CHP feeding animal model
- D. Screening of differentially expressed proteins related to anti-diabetic mechanism by proteomic analysis for major tissues of CHP feeding animal model
- E. Analysis for characteristics of specific genes and proteins related to anti-diabetic mechanism
- F. Provision of the essential data for developing molecular, pharmaceutical candidates using anti-diabetic proteins
- G. Development of various products containing CHP : raw material, end-product of OEM type, self-company brand

#### 2. Necessity of the Research and Development

- A. Need for development of effective, hypoglycemic functional food preparative for diabetes crisis (2020)
- B. Need for research and development of anti-diabetic component from soybean containing higher protein content than other food materials

- C. Need for development of hydrolysate manufacturing technique to apply CHP present in foods for hypoglycemic material
- D. Need for development of high technique of agricultural life science suitable to post-genome era
- E. Need for application as various food materials by cost reduction on CHP production using our manufacturing method (high price of synthetic CHP)

### III. Contents and Scope of the Research and Development

#### 1. Contents and Scope the Research and Development

##### A. Establishment of manufacturing method for soybean hydrolysate

- (1) Preparation of soybean hydrolysate from soybean, small black soybean and soy flour using commercial proteolytic enzymes
- (2) Establishment of hydrolysis condition according to enzymes and reaction conditions
- (3) Stability assessment of CHP according to processing conditions

##### B. Increasing method of CHP content and materialization

- (1) Development for increasing CHP content by cyclization and biochemical methods
- (2) Biological activities of CHP (immunological activity, antioxidant, etc.)
- (3) Materialization by processing suitability, rheological property, improving the purity (reagents, bulk material forms: liquid, powder, granulation)

##### C. Analysis of hypoglycemic effect of CHP in *In vitro* cell.

- (1) Measurement of preventive and therapeutic effects on diabetes by CHP treatment
- (2) Assessment of anti-diabetic activities (nitrite, lipid peroxidation, caspase-3, cytochrome C, reactive oxygen species)
- (3) Screening of anti-diabetic related genes (proteins) in CHP-treated cells and Its characteristics

##### D. Identification of anti-diabetic activity by Type I and Type II animal model

- (1) Induction of diabetic animal model and Analysis of hypoglycemic effect by oral injection
- (2) Assessment of glucose tolerance, insulin level, weight
- (3) Assessment of insulin production and tissue recovery
- (4) Screening of differentially expressed genes and proteome in blood plasma and each tissue and Its characterization

- (5) Characterization of anti-diabetic related genes and proteome (northern, realtime-PCR, western blot)
- E. Elucidation of anti-diabetic mechanism for Type I (Type II) animal model by CHP
- (1) Analysis of expression distribution of diabetes-related genes using RT-PCR Array Profiler
  - (2) Elucidation of the mechanism and antidiabetic pathway by CHP
- F. Establishment of data base of anti-diabetic genes (proteins) and application study
- (1) Database of anti-diabetic specific genes (proteins) and Its application (chip, biomarker, inhibitor etc)
  - (2) Comparative study of human homologous and Possible study of development of pharmaceutical substitute materials (optional)
  - (3) Elucidation of hypoglycemic effect of CHP by simple clinical test (optional)
- G. Mass production and manufacture of end product containing CHP
- (1) Optimization of mass producing process of CHP and establishment of formulating conditions
  - (2) Analysis of processing property, general characteristic, stability, and function for using as a materials of food processing
  - (3) Manufacture for various forms of material containing CHP (granules, drinks, and hypoglycemic dietary supplements) and market research

#### IV. Results of the Research and Development

1. Establishment of preparation process of soybean hydrolysate containing CHP and Its material by increase of content

Hydrolytic activity was measured on domestic soybeans, U.S. soybean, small black soybean, and defatted soybean flour using various proteolytic enzymes. Flavourzyme showed the highest degree of hydrolysis (DH). Especially, DH (60.1%) of deffated soybean by flavourzyme was higher than in domestic soybean, U.S. soybean and small black soybean. Also, CHP contents in hydrolysates of several soybeans by flavourzyme were higher than by other enzyme. Ficin treatment among various enzymes showed the high content of A-N, and degrees of hydrolysis rate. The contents of CHP were 27.6, 9.3 and 13.4 µg/ml in soybean hydrolysates by flavouzyme, alcalase and pancreatin, respectively, and mixture of flavourzyme and alcalase (3:1) showed a high level of A-N and CHP content (38.1 µg/ml).

Four strains separated from the Chonggukjang, showed above 10 unit of protein hydrolysis activity. The strains were classified to *Bacillus subtilis* and *Bacillus* sp. The content of

protein showed a decrease trend with increasing fermentation time by separated strains. CHP contents showed fluctuation changes, but sustained increasing trend in fermentation period. Hydrolysate of soybean by *Bacillus* sp. showed relatively a low content of CHP comparing with enzymatic hydrolysate.

Soybean hydrolysate was fractionated by alcohol to increase the yield of CHP. 32.9 µg of the CHP was contained in 60~80% of alcohol fraction. The yields of hydrolysates by ultrafiltration process, acid and active carbon treatment were 71.3%, 13.5% and 4.3%, respectively. CHP content appeared highly by ultrafiltration.

Soybean hydrolysate showed a promoting effect and cyclization reaction of CHP at 40~60°C. The thermal stability of soybean hydrolysate was high in acidic condition. Soybean hydrolysate (5%) showed a high solubility of 70% above, and the smaller molecular weight was higher solubility (<10 kDa MW, crude, >10 kDa MW). The foaming capacity and foam stability appeared <10 kDa MW, crude, and >10 kDa MW in order. The emulsifying activity increased with increasing pH, and appeared >10 kDa MW, crude, and <10 kDa MW in order.

Digestive activity in the 68.3 to 77.9% also was very high. Weight change, dietary uptake, and water intake were not significantly different, and hematological changes not observed in rat model administered soybean hydrolysate. In addition, weight of liver, kidney, heart and lung and tissue changes did not appear. Soybean hydrolysate (crude), soybean hydrolysate fractions less or more than 10 kDa had not ABTS and hydroxyl radical scavenging activity.

## 2. Analysis of anti-diabetic activity of CHP in *in vitro* cell, RINm5F

Cyclo (His-Pro) (CHP) is a naturally occurring, cyclic dipeptide structurally related to thyrotropin-releasing hormone (TRH). CHP was efficiently obtained from soybean meal by hydrolysis with flavourzyme and alcalase. In this study, the effects of CHP on streptozotocin (STZ)-induced  $\beta$ -cell dysfunction and apoptosis were investigated in rat insulinoma cells (RINm5F) secreting insulin. When the RINm5F cells were treated with 2 mM STZ, insulin secretion decreased to approximately 54% that of control cells. However, CHP treatment restored the insulin secreting activity of RINm5F cells to approximately 71% that of the untreated control cells. Also, CHP significantly protected the cells from STZ-mediated cytotoxicity via reduction of nitric oxide (NO) production (2.3-fold) and lipid peroxidation (1.9-fold), which were induced by STZ. Moreover, CHP treatment also attenuated STZ-induced apoptotic events, such as activation of caspase-3, poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage, and DNA fragmentation in RINm5F cells, indicating that CHP could protect the cells from apoptotic cell death induced by oxidative stress of STZ by increasing the expression of an anti-apoptotic protein, Bcl-2. These results suggest that CHP could be a

candidate material for a protective and therapeutic agent against STZ-mediated cytotoxicity and apoptosis.

### 3. Identification of anti-diabetic activity by Type I and Type II animal model

The effects of Cyclo (His-Pro) (CHP), a cyclic dipeptide structurally related to thyrotropin-releasing hormone (TRH), on glucose metabolism, blood insulin level, lipid profile, and the viability of pancreatic cells were investigated in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats. The rats (Sprague-Dawley) with a blood glucose level above 300 mg/dL after induction with STZ (50 mg/kg of body weight) were considered to be diabetic and used for the treatment with CHP (4 mg/day/kg of body weight). The blood glucose level in the CHP-fed rats was reduced remarkably by approximately 56% as compared to the untreated diabetic group at 21 days of feeding. In an oral glucose tolerance test, blood glucose levels were restored to baseline at 120 min after CHP treatment, although the levels increased significantly after 30 min. Plasma insulin levels in the CHP-treated group were also enhanced by 2-fold compared to the untreated group. Triglyceride and total cholesterol levels in CHP-treated rats almost returned to normal levels. Moreover, histological examination showed that CHP treatment restored impaired  $\beta$ -cells in the pancreas up to two-thirds of the normal level. The transcriptional level of C-reactive protein (CRP), used mainly as a marker of inflammation, was also restored mimicking normal level in the CHP-treated-group, suggesting that the  $\beta$ -cells destroyed by STZ were, at least in part, recovered. Accordingly, CHP was concluded to have an excellent hypoglycemic effect by lowering average plasma glucose levels, increasing insulin secretion, and restoring the viability of pancreatic  $\beta$ -cells in diabetic rats. We suggest that CHP might be a potential candidate to control Type I diabetes mellitus.

The present study was conducted to examine anti-diabetic activities of soybean hydrolysate containing cyclo (His-Pro) (CHP) on plasma glucose level, oral glucose tolerance, body weight, lipid profile, histological and immunohistochemical staining, and levels of C-reactive protein and leptin in a Type II diabetic animal model (C57BL/6J *ob/ob*). When the *ob/ob* mice were administrated with CHP (2 mg/kg BW, 24 days), blood glucose levels decreased to approximately 57% that of the control *ob/ob* mice at 24days of feeding and insulin levels in plasma were significantly increased (2-fold) in CHP-treated *ob/ob* mice. In the oral glucose tolerance test, blood glucose levels were nearly restored to its baseline between 120 and 180 min in CHP-treated *ob/ob* mice, where as the control *ob/ob* mice showed high blood glucose above 350 mg/dL. Moreover, total plasma cholesterol and triglyceride

concentrations in CHP treated *ob/ob* mice were significantly decreased by approximately 2-fold, compared to those of control *ob/ob* mice. And also, a histopathological examination revealed that CHP treatment could restore the impaired  $\beta$ -cells of pancreas to the normal level and pancreases are becoming larger at 24day after CHP treatment, whereas few pancreas of the control *ob/ob* mice group was detected. Interestingly, pancreatic  $\beta$ -cells were strikingly restored at 72nd and 130th day after stopping CHP feeding, respectively. And also, insulin secretion was largely enhanced though the CHP treatment was stopped, indicating that the CHP largely increased viability and restoration of the pancrease in CHP-treated *ob/ob* mice group. The transcriptional level of C-reactiveprotein (CRP), used mainly as a marker of inflammation, was decreased by approximately two-fold than those of the control *ob/ob* mice group. Leptin which is involved in the regulation of glucose transport was increased by approximately 1.5 fold in CHP-treated *ob/ob* mice. Based on these results, it is demonstrated that the CHP could be effective for regulating blood glucose to normal level by increasing plasma insulin level in *ob/ob* mice. Conclusively, we suggest that this compound might be a candidate material as a dietary supplement to control hyperglycemia in patients suffering from type II diabetes.

#### 4. Analytical study of characteristics of anti-diabetic related gene (protein)

##### A. Analyses of functions and characteristics of anti-diabetic related genes in pancreases of Type I rat and Type II mouse

Diabetic studies are mostly interested in gene expression in the pancreas, the site of insulin secretion that regulates blood glucose levels. However, a single gene approach has been ruled out for many years in discovering new genes or the molecular networks involved in the induction process of diabetes. To understand the molecular mechanisms by which cyclo (His-Pro) (CHP) affects amelioration of diabetes mellitus, we performed gene expression profiling in the pancreatic tissues of two diabetic animal models, streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats (T1DM) and genetically-diabetic (C57BL/6J *ob/ob*) mice (T2DM). To understand the healing process of these diabetic rodents, we examined the effects of CHP on various gene expression in pancreatic tissues of both animal models. Our microarray analysis revealed that a total of 1,175 genes were down-regulated and 629 genes were up-regulated in response to STZ treatment, and the altered expression levels of numerous genes were restored to normal state upon CHP treatment. In particular, 476 genes showed significantly altered gene expression upon CHP treatment. In a functional classification, 7,198 genes were counted as differentially expressed in pancreatic tissues of STZ- and CHP-treated rats compared with control, whereas 1,534 genes were restored to normal states by CHP

treatment. Microarray data demonstrated for the first time that overexpression of the genes encoding IL-1 receptor, lipid metabolic enzymes (e.g. *Mte1*, *Ptdss1*, and *Sult2a1*), myo-inositol oxygenase, glucagon, and somatostatin as well as down-regulation of olfactory receptor 984 and mitochondrial ribosomal protein, which are highly linked to T1DM etiology. In genetically-diabetic mice, 4,384 genes altered in expression by higher than 2-fold were counted as differentially expressed genes in pancreatic tissues of CHP-treated mice. On the other hand, 2,140 genes were up-regulated and 2,244 genes were down-regulated by CHP treatment. The results of the microarray analysis revealed that up-regulation of *IL-2*, *IL12a*, and leptin receptor and down-regulation of *PIK3* played important physiological roles in the onset of T2DM. In conclusion, we hypothesize that CHP accelerates alterations of gene expression in ameliorating diabetes and antagonizes those that induces the disease.

#### B. Analyses of functions and characteristics of anti-diabetic related proteins in pancreases of Type I rat and Type II mouse

To provide insights into the molecular mechanisms underlying diabetes mellitus, we performed a proteomic study on two diabetic animal models, streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats (T1DM) and genetically diabetic (C57BL/6J *ob/ob*) mice (T2DM). To better understand the recovery process of those diabetic rodents, we examined the effect of hypoglycemic dipeptide Cyclo (His-Pro) (CHP) treatment on the differential expression of pancreatic proteins in both animal models. Oral administration of CHP had an excellent hypoglycemic effect in both animal models, lowering the average plasma glucose level by over 50%. Pancreatic proteins were separated by two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) and identified by MALDI-TOF mass spectrometry. This study allowed, for the first time, the identification of 34 proteins that are related to diabetes and potential targets of CHP, a potent anti-diabetic agent for both T1DM and T2DM. The alterations in the expression of these proteins could indicate a tendency for diabetic animals to overcome their diabetic state.

These proteins are involved in cellular functions such as metabolism, cellular structure, oxidative stress, as well as signal and energy transduction. Some have already been linked to diabetes, suggesting that the newly identified proteins might also be significant in the etiology of this pathology and should be further investigated. Furthermore, CHP has emerged as a potent tool for both the treatment and study of the molecular mechanisms underlying diabetes. Thus, the findings presented here provide new insights into the study and potential treatment of this pathology.

C. Analyses of functions and characteristics of anti-diabetic related proteins in blood plasma of Type I rat and Type II mouse

The proteins in plasma perform many important functions in the body, and the protein profiles of the plasma vary under different physiological and pathological conditions. In an attempt to identify novel marker proteins for diabetes prognosis, we examined the effect of hypoglycemic dipeptide cyclo (His-Pro) (CHP) on the differential regulation of plasma proteins in streptozotocin-induced diabetic rats and genetically-diabetic (*ob/ob*) mice. The orally-administrated CHP produced an excellent hypoglycemic effect in both animal models, lowering the average plasma glucose level by over 50%. In the 2-DE analysis of the plasma, a total of 31 spots among 500 visualized spots were found to be differentially regulated, and they were identified by MALDI/TOF mass spectrometry. These proteins include the down-regulation of ApoE and the up-regulation of FGA, ApoA-I, ApoA-IV, A1M, and CRP in STZ-induced diabetic rats. Moreover, CHP significantly reduced the plasma protein levels of FGB, FGC, F12, C1Q, TNF5, and SPA3K, as well as increased the abundance of A1M, A2M, ApoE, and TTR in genetically-diabetic mice. In conclusion, alteration in the regulation of these proteins indicates that this treatment may be successful in overcoming the diabetic state. The present proteomic data can serve as the basis for the development of specific evidence-based interventions allowing for the prevention and treatment of diabetes.

5. Elucidation for the hypoglycemic effect of soybean hydrolysate containing CHP by simple clinical test

Total of 12.0 g/day (3 times/day) were taken in subject 10 patients to measure the blood glucose for hypoglycemic effect of soybean hydrolysate containing CHP. As a result, blood sugar content before taking soybean hydrolysates was 278.25 mg/dL, but after 15 days the level decreased significantly to 121.25 mg/dL. HbA1c level also decreased from 12.45% to 9.85%. In addition, the changes of lipid components, GOT and GPT in blood were not changed significantly.

6. Mass production and development of new products containing CHP

2,000 L of water and 100 kg of defatted soy flour were mixed with adjusting to pH 7.0, and reacted for 12 hours at 50°C, and with enzyme to produce soybean hydrolysates largely. After 30 min the reaction was inactivated by heating at 80°C, and through filtration, concentration and spray drying, soy hydrolysates were prepared. Also, soybean hydrolysates were prepared in the form of capsule, tablet and small pill form to increase the availability.



Two patents were applied on soybean hydrolysate containing CHP with hypoglycemic effect. These patents were transferred to the participating company, Saerom Bio, and was commercialized to product named as New Ensular.

Cereal bar containing soybean hydrolysate was prepared, and its characteristics were examined to apply to processed foods. L value of soybean hydrolysate bar was slightly higher than cereal bar, and a and b values were no differences between the soybean hydrolysate bar and cereal bar.  $\Delta E$  values of soybean hydrolysate bar was lower level than cereal bar. Hardness of soybean hydrolysate bar showed a high level, but springiness level did not showed significantly different. However, soybean hydrolysate bar showed a low level of brittleness. Total acceptability of soybean hydrolysate bar did not showed significantly differences.

Tofu was prepared with soybean hydrolysate, and physical characteristics of tofus (SH-tofu: tofu prepared with soybean hydrolysate, C-tofu: commercial tofu) were measured. The b levels of SH- and C-tofu showed 16.18 and 15.15, respectively. Texture analysis (hardness, springiness, cohesiveness, brittleness and chewiness) did not showed significantly difference between tofus. And sensory analysis also showed no significantly differences.

The dip and spray coating method of a rice with soybean hydrolysate was investigated for the utility of rice. Dip coating method was inadequate by a low absorption rate of soybean hydrolysate, while spray coating method was relatively adequate although formation of some crack. The coated rice exhibited the external appearance, hydration pattern and rate similar to that of raw rice. The coated rice showed slightly a high level of moisture absorption rate owing to methyl cellulose polymer as coating binder.

There were no significantly differences of physical characteristic including colors and sensory evaluation between commercial soy milk and soy milk added soybean hydrolysate. Therefore, functional soybean milk with soybean hydrolysate was suggested.

## V. Research outcome and Its applicable plans

### 1. Research papers

Using direct and indirect results obtained from this research, the manuscripts were submitted to domestic and international journals, published, and 2 manuscripts are under minor revision (going to be accepted).

#### A. Domestic paper

- (1) Choi, J. W. 2011. Anti-diabetic effect of the exopolysaccharide (EPS) produced from *Cordyceps sinensis* on *ob/ob* mice. *Korean Society for Biotechnology & Bioengineering Journal*. 26: 33-40.
- (2) Ra, K. S. and J. W. Choi. 2011. Enhancement of cyclo (His-Pro) content from soybean fermented with *Bacillus amyloliquefaciens* CHP-12 and Its anti-diabetic effect. *Korean Society for Biotechnology & Bioengineering Journal*. 26: 41-48.

#### B. International paper

- (1) Choi, J. W., K. S. Ra, S. Y. Kim, T. J. Yoon, K. W. Yu, K. S. Shin, S. P. Lee, and H. J. Suh. 2010. Enhancement of anti-complementary and radical scavenging activities in the submerged culture of *Cordyceps sinensis* by addition of citrus peel. *Bioresource Technology*. 101(15): 6028-6034. (SCI, Impact factor = 4.365)
- (2) Jung, E. Y., H. S. Lee, J. W. Choi, K. S. Ra, M. R. Kim, and H. J. Suh. 2011. Glucose tolerance and antioxidant activity of spent brewer's yeast hydrolysate with a high content of cyclo-His-Pro (CHP). *J. Food Science*. 76(2): C272-C278. (SCI, IF = 1.733)
- (3) Koo, K. B., H. J. Suh, K. S. Ra, and J. W. Choi. 2011. Protective effect of cyclo (His-Pro) on streptozotocin-induced cytotoxicity and apoptosis *in vitro*. *J. Microbiol. Biotechnol*. 21: 218-227. (SCIE, IF = 1.224)
- (4) Ra, K. S., H. J. Suh, and J. W. Choi. 2012. Hypoglycemic effects of cyclo (His-Pro) in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 17: 176-184. (SCIE, IF = 1.004)
- (5) Park, S. W., S. A. Choi, J. W. Yun, and J. W. Choi. 2012. Alterations in pancreatic protein expression in STZ-induced diabetic rats and genetically diabetic mice in response to treatment with hypoglycemic dipeptide cyclo (His-Pro). *Cellular Physiology and Biochemistry*. 29: 603-616. (SCI, IF = 3.585)
- (6) Choi, S. A., H. J. Suh, J. W. Yun, and J. W. Choi. 2012. Differential gene expression in pancreatic tissues of streptozotocin-induced diabetic rats and genetically-diabetic mice in response to hypoglycemic dipeptide cyclo (His-Pro) treatment. *Molecular Biology Reports* "under final revision". (SCI, IF = 1.875)
- (7) Choi, S. A., J. W. Yun, H. S. Park, and J. W. Choi. 2012. Plasma proteome alterations in two diabetic animal models in response to cyclo (His-Pro) treatments. *Proteomics*. "under final revision". (SCI, IF = 4.815)

## 2. Patents and Technical transfer

- A. COMPOSITION FOR PREVENTION AND TREATMENT OF DIABETES WHICH INCLUDES SOYBEAN FERMENTATION PRODUCT OF BACILLUS SP. KH-15  
(Application date 2011.01.07; Application number 10-2011-0001900 )
- B. COMPOSITION FOR BLOOD SUGAR REGULATION COMPRISING SOYBEAN HYDROLOLYSATE WITH HIGH CHP(CYCLO(HIS-PRO))  
(Application date 2011.07.08; Application number 10-2011-0068055)

## 3. Applications

### A. Technology transfer

- (1) Participant : SeromBio
- (2) Technology : COMPOSITION FOR BLOOD SUGAR REGULATION COMPRISING SOYBEAN HYDROLOLYSATE WITH HIGH CHP(CYCLO(HIS-PRO))  
(Application number 10-2011-0068055)
- (3) Technical transfer : Exclusive license (5 years)
- (4) Royalties : Prepaid royalties (10,000,000 won) + Ordinary royalties (2% per total sales/year)

### B. Commercialization and Manufacturing prototype

- (1) Commercialization : "New Ensular"
- (2) Prototype : Cereal bar containing soybean hydrolysate, Tofu prepared with soybean hydrolysate, Rice coated with soybean hydrolysate, Functional soybean milk with soybean hydrolysate

## CONTENTS

<b>Chap. 1. Introduction of the Research and Development</b> .....	40
<b>I. Purpose of the Research and Development</b> .....	40
<b>1. Final Purpose of the Research and Development</b> .....	40
<b>2. Characteristics of the Research and Development</b> .....	40
2.1. Research resources.....	40
2.2. Diabetic study using proteomics and gene-fishing technology.....	41
2.3. Commercialization of the hypoglycemic materials.....	41
<b>II. Necessity of the Research and Development</b> .....	41
<b>1. Economic and Industrial Importance of Research and Development Technology and Its Necessity</b> .....	41
1.1. Current diabetes.....	42
1.2. Developmental field of diabetic drugs.....	42
1.3. Material of Cyclo-His-Pro (CHP) and its function.....	43
1.4. Necessity of the research and development.....	44
A. Technical aspects.....	44
B. Economic and industrial aspects.....	46
C. Social and cultural aspects.....	47

<b>Chap. 2. Current Domestic and International Technology and Developments</b> .....	48
<b>I. World Level of Technology and Development</b> .....	48
<b>1. Overseas Production and Current Market</b> .....	48
1.1 Overseas industrial trends of bio-food.....	48
1.2. Current Market.....	48
<b>2. Overseas Currency of Diabetes-Improving Foods</b> .....	50
<b>3. Proteomics-Related Technology of Foreign Countries</b> .....	51
<b>4. CHP-Related Research Trends of Foreign Countries</b> .....	52
<b>II. Domestic Technical Level</b> .....	52
<b>1. Domestic Production and Current Market of Diabetic Products</b> .....	52
1.1. Domestic industrial trends of bio-food.....	52
1.2. Summary of domestic market.....	54
1.3. Proposal of diabetes-related health food by manufacturer.....	54
<b>2. Status of Domestic Diabetes-Improving Food</b> .....	55
<b>3. Status of Domestic Diabetes-related Proteomics Technology</b> .....	57
<b>4. Domestic CHP-Related Study</b> .....	57
<b>III. Domestic and Foreign Diabetes-related Technical Problems and Prospects</b> .....	58

<b>Chap. 3. Results of the Research and Development</b> .....	60
<b>I. First Year of Research</b> .....	60
<b>1. Contents of Research</b> .....	60
<b>2. Results of Research</b> .....	63
2.1. Establishment of preparation process of soybean hydrolysate containing CHP and its material by increase of content.....	63
A. Preparation of soybean hydrolysate using proteolytic enzymes and analyses of CHP..	66
(1) Comparison of CHP production in kinds of soybeans.....	68
(2) Preparation of soybean hydrolysate and analyses of CHP.....	72
B. Preparation of soybean hydrolysate using the fermentation and analyses of CHP.....	77
C. Increase of soybean hydrolysate by flavourzyme and alcalase.....	78
2.2. Anti-diabetic activity of Cyclo-His-Pro (CHP) in insulinoma cell (in vitro).....	78
A. Characteristics of RINm5F cell.....	78
B. STZ-induced diabetic model in RINm5F cells.....	91
2.3. Anti-diabetic activity by type	
A. Anti-diabetic activity of CHP in rat.....	91
(1) Glucose tolerance test by CHP treatment.....	91
(2) Weight change and dietary uptake.....	92
(3) Change of blood insulin level by CHP treatment.....	92
(4) Total cholesterol and triglyceride in blood.....	92
B. Anti-diabetic activity of CHP in mouse.....	96
2.4. Analyses of proteome in type I diabetes model by CHP.....	97
2.5. Gene expression pattern using cDNA microarray techniques.....	102

2.6. Histological study of pancreas in rat.....	105
<b>II. Second Year of Research.....</b>	<b>108</b>
<b>1. Contents of Research.....</b>	<b>108</b>
<b>2. Results of Research.....</b>	<b>113</b>
2.1. Anti-diabetic activity in type II diabetes.....	113
A. Anti-diabetic activity of CHP in genetically ob/ob mice.....	113
B. Glucose tolerance test by CHP treatment.....	113
C. Weight change and dietary uptake.....	114
D. Change of blood insulin level by CHP treatment.....	114
E. Total cholesterol and triglyceride in blood.....	114
F. Histological study of pancreas in mouse.....	115
2.2. Analyses of proteome in type II diabetic model by CHP treatment.....	121
A. Change of plasma proteins in type II diabetic model (ob/ob mice) by CHP treatment.....	121
(1) Analyses of plasma proteins by CHP treatment.....	121
(2) Analyses of proteins by western blotting.....	121
(3) Analyses of leptin gene expression level.....	122
B. Change of pancreatic tissue protein in type II diabetic model (ob/ob mice) by CHP treatment.....	129
(1) 2-DE separation and identification of proteins.....	129
(2) Detection of proteins by western blotting.....	129
2.3. Gene analyses of type II diabetic model by CHP treatment.....	134
A. Gene expression patterns using cDNA microarray techniques.....	134
B. Functional classification of gene expression pattern.....	134
C. Expression pattern of diabetes-related genes and markers proteins.....	135
D. Putative anti-diabetic mechanism of CHP.....	135
2.4. Establishment of manufacturing process and standardization in pilot plant.....	147

A. Increasing process of CHP content.....	147
(1) Increasing process of CHP content by alcohol, acid and ultrafiltration.....	147
(2) The effect of temperature on cyclization reaction.....	148
2.5. Functional evaluation of soybean hydrolysate.....	151
A. Thermal stability.....	151
B. Solubility.....	151
C. Foaming capacity and foam stability.....	151
D. Emulsifiability.....	152
E. Digestibility.....	152
F. Safety evaluation of 10 kDa molecule below in soybean hydrolysate.....	152
G. Antioxidant activity.....	153
<b>III. Third Year of Research.....</b>	<b>165</b>
<b>1. Contents of Research.....</b>	<b>165</b>
<b>2. Results of Research.....</b>	<b>169</b>
2.1. Effect of CHP in type 2 db/db mouse.....	169
A. Change of blood glucose by administrated time.....	169
2.2. Characteristics and its functions of diabetes-related genes in pancreas of type I rat and II mouse.....	171
A. Anti-diabetic activity of CHP in STZ-induced diabetic rat and diabetic rat ( <i>ob/ob</i> mouse).....	171
B. Analyses of gene expression pattern in pancreatic tissue of STZ-induced diabetic rat.....	171
C. Analyses of gene expression pattern in pancreatic tissue of genetically diabetic rat ( <i>ob/ob</i> mouse).....	179
D. Putative anti-diabetic mechanism in pancreas of type I and type II diabetic rat.....	187
① Putative anti-diabetic mechanism in pancreas of type I diabetic rat.....	187
② Putative anti-diabetic mechanism in pancreas of type II diabetic mouse.....	188



2.3. Characteristics and its functions of diabetes-related proteins in pancreas type of I rat and II mouse	189
A. Characteristics of diabetes-related proteins in type I rat pancreas	189
B. Characteristics of diabetes-related proteins in type II mouse pancreas	194
2.4. Characteristics and its functions of diabete-related proteins in plasma type I rat and II mouse blood	200
A. Characteristics of diabetes-related proteins in plasma type I rat	200
B. Characteristics of diabetes-related proteins in plasma type II mouse	206
C. Results of proteome by western blot anlalysis and characteristics of adiponectin and resistin protein	218
2.5. Hypoglycemic effect of soybean hydrolysate containing CHP	221
A. Selection of patients and administration	221
B. Analyses of blood sugar and lipid contents in fasting	221
2.6. Development of product using soybean hydrolysate containing CHP	223
A. Mass production of soybean hydrolysate containing CHP	223
B. Formulation of soybean hydrolysate	224
(1) Capsule	224
(2) Tablet	224
(3) Small pill	225
C. Commercialization of soybean hydrolysate containing CHP	225
D. Application of soybean hydrolysate to cereal bar	229
(1) Composition	229
(2) Manufacturing process	230
(3) Characteristics of product	230
(4) Evaluation of product	230
① Color	230
② Evaluation of rheological property	231
③ Sensory evaluation	232

E. Preparation of tofu adding soybean hydrolysate.....	233
(1) Preparation of tofu.....	233
(2) Color.....	233
(3) Texture of tofu.....	234
(4) Sensory evaluation.....	235
F. Preparation of coated rice with soybean hydrolysate.....	237
(1) Materials.....	237
(2) Hydration or absorption rate of soybean hydrolysate in rices.....	237
(3) Coating of rice grain.....	237
(4) Hydration or absorption rate of coated rices with soybean hydrolysate.....	237
(5) Conformational analyses of rice grain.....	238
(6) Surface analyses of rice grain.....	238
(7) Measurement of color.....	238
(8) Statiscal analyses.....	238
(9) Results.....	239
① Hydration or absorption-coating ratio of rices by soybean hydrolysate.....	239
② External characteristics of coated rices.....	240
③ Hydration pattern and rate of coated rice.....	244
④ Observation of surface and internal structure in coated rice.....	246
G. Preparation of soy milk using soybean hydrolysate.....	248
(1) Materials and recipe.....	248
(2) Process.....	248
(3) Color value of soy milk containing soybean hydrolysate.....	248
(4) Total sugar and protein contents.....	249

**Chap. 4. Accomplishment and Contribution to the Related Field..... 250**

**I. Total Research and Development Purpose and Accomplishment..... 250**

**1. Total Research and Development Purpose and Accomplishment..... 250**

1.1. Purpose of the research..... 250

1.2. Application of research accomplishments..... 251

<b>II. Annual Research and Development Purpose and Contribution to Related Fields</b> .....	251
1. Achievement of Research and Development (First year) and the Related Fields .....	252
2. Achievement of Research and Development (Second year) and the Related Fields.....	253
3. Achievement of Research and Development (Third year) and the Related Fields.....	255
<b>Chap. 5. Outcome of Research and Development and Its Application</b> .....	255
<b>I. Outcome of Research and Development</b> .....	255
1. Research Paper and Poster Presentation in Conference.....	255
1.1. International research paper.....	255
1.2. Poster presentation.....	257
1.3. Patent submission.....	266
2. Domestic Research Paper.....	274
<b>II. Application of RND Outcome</b> .....	276
1. Technology Transfer.....	276
2. Product Development by Technology Transfer.....	280
3. Application of the Developed Technology and Sales Strategy (by Serom Bio).....	284
3.1. Application of the developed technology.....	285
3.2. Sales plan.....	285
4. Application to Other Research.....	285

**Chap. 6. Foreign Technological Informations** ..... 287

**Chap. 7. References** ..... 288

# 목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	40
제 1 절	연구개발의 목표	40
1.	연구개발의 최종목표	40
2.	연구개발 목표의 성격	40
가.	연구소재	40
나.	Proteomics 및 Gene-fishing 기술을 이용한 당뇨 연구	41
다.	혈당강하물질의 상품화	41
제 2 절	연구개발의 필요성	41
1.	연구개발대상 기술의 경제적·산업적 중요성 및 연구개발의 필요성	41
가.	당뇨병 현황	42
나.	당뇨치료제 개발 분야	42
다.	Cyclo-His-Pro (CHP)의 소재 및 기능	43
라.	연구개발의 필요성	44
(1)	기술적 측면	44
(2)	경제·산업적 측면	46
(3)	사회·문화적 측면	47

<b>제 2 장</b>	<b>국내외 기술개발 현황</b>	48
<b>제 1 절</b>	<b>세계적 수준</b>	48
1.	국외 제품생산 및 시장 현황	48
가.	해외 바이오식품 산업동향	48
나.	시장 현황	48
2.	국외 당뇨병 개선 식품 현황	50
3.	국외 당뇨병 관련 Proteomics 기술현황	51
4.	국외 CHP 관련 연구현황	52
<b>제 2 절</b>	<b>국내적 수준</b>	52
1.	국내 제품생산 및 시장 현황	52
가.	국내 바이오식품 산업동향	52
나.	국내시장 요약	54
다.	업체 당뇨관련 건강식품 제안	54
2.	국내 당뇨병 개선 식품 현황	55
3.	국내 당뇨병 관련 Proteomics 기술현황	55
4.	국내 CHP 관련 연구현황	57
<b>제 3 절</b>	<b>국내·외 관련기술의 문제점 및 전망</b>	58

<b>제 3 장</b>	<b>연구개발수행 내용 및 결과</b>	<b>60</b>
<b>제 1 절</b>	<b>1차년도</b>	<b>60</b>
1.	연구내용	60
2.	연구결과	63
가.	콩 가수분해물의 제조 (분해 조건 확립) 및 함량증진	63
	(1) 단백질가수분해 효소를 이용한 가수분해물 제조 및 CHP 분석	63
	(가) 콩의 종류에 따른 CHP 생산량 비교	66
	(나) 대두 가수분해물 제조 및 CHP 분석	68
	(2) 미생물 발효를 이용한 대두 가수분해물 제조 및 CHP 분석	72
	(3) Flavourzyme/alcalase 가수분해물의 CHP 증진	77
나.	Insulinoma cell (in vitro)에서 Cyclo-His-Pro (CHP)의 항당뇨활성	78
	(1) RINm5F Cell의 특성	78
	(2) RINm5F 세포에서 STZ으로 유도한 당뇨 모델	78
다.	제 1형 당뇨 항당뇨 활성	91
	(1) Rat에서 CHP의 항당뇨 활성 효과	91
	(가) CHP 처리에 따른 포도당부하시험	91
	(나) CHP 처리에 따른 체중 변화 및 식이량	91
	(다) CHP 처리에 혈중 인슐린 변화	92
	(라) 혈중 총콜레스테롤 및 중성지방	92
	(2) Mouse에서 CHP의 항당뇨 활성 효과	96
라.	CHP에 의한 제1형 당뇨모델의 프로테옴 분석	97
마.	cDNA microarray 기법을 이용한 유전자 발현양상	102
바.	Rat 췌장의 조직학적 연구	105

제 2 절	2차년도	108
1.	연구내용	108
2.	연구결과	113
가.	제 2형 당뇨 항당뇨 활성	113
	(1) Genetically <i>ob/ob</i> mice에서 CHP의 항당뇨 활성 효과	113
	(2) CHP 처리에 따른 포도당부하시험	113
	(3) CHP 처리에 따른 체중 변화 및 식이량	114
	(4) CHP 처리에 혈중 인슐린 변화	114
	(5) 혈중 총콜레스테롤 및 중성지방	114
	(6) Mice 체장의 조직학적 연구	115
나.	CHP 처리에 의한 2형 당뇨 모델에서 프로테옴 분석	121
	(1) 2형 당뇨 모델 ( <i>ob/ob</i> mice)에 대한 CHP 처리에 따른 plasma 단백질 변화	121
	(가) CHP 처리에 따른 plasma 단백질 분석	121
	(나) Western blotting에 의한 단백질 분석	121
	(다) Leptin 유전자 mRNA 발현량 분석	122
	(2) 2형 당뇨 모델 ( <i>ob/ob</i> mice)에 대한 CHP 처리에 따른 체장 조직 단백질 변화	129
	(가) 2-DE separation and identification of proteins	129
	(나) Detection of proteins by Western blotting	129
다.	CHP 처리에 의한 2형 당뇨 모델에서 유전자 분석	134
	(1) cDNA microarray 기법을 이용한 유전자 발현양상	134
	(2) 유전자 발현양상 기능적 분류	134
	(3) 당뇨관련 유전자 및 마커 단백질 발현양상	135
	(4) CHP에 의한 추정의 항당뇨 기작	135
라.	Pilot plant에서 생산 공정 및 표준화 조건 확립	147
	(1) CHP 함량 증진 공정 도입 방법	147
	(가) 알콜, 산에 의한 침전 및 UF에 의한 CHP 함량 증진 공정	147



(나) 온도에 의한 cyclization 검토 .....	148
마. 대두 가수분해물의 기능성 평가 .....	151
(1) 열안정성 .....	151
(2) 용해도 .....	151
(3) 거품 형성력 및 안정성 .....	151
(4) 유화력 .....	152
(5) 소화력 .....	152
(6) 콩가수분해물 10 kDa 이하 분획의 안전성 평가 .....	152
(7) 항산화 효과 .....	153
<b>제 3 절   3차년도</b> .....	165
1. 연구내용 .....	165
2. 연구결과 .....	169
가. Type 2 <i>db/db</i> mouse에서 CHP의 효과 .....	169
(1) 투여 시간에 따른 혈당 변화 .....	169
나. 제 1형 Rat과 2형 mouse 췌장에서 당뇨관련 유전자들의 기능 및 특성 분석 .....	171
(1) STZ-처리 diabetic rat과 당뇨 쥐 ( <i>ob/ob</i> mouse)에서 CHP 항당뇨 효과 .....	171
(2) STZ-처리 diabetic rat의 췌장 조직에서 유전자 발현 패턴 분석 .....	171
(3) 유전적 당뇨쥐 ( <i>ob/ob</i> mouse)의 췌장 조직에서 유전자 발현 패턴 분석 .....	179
(4) 제 1형 및 제 2형 당뇨쥐의 췌장에서 추정의 항당뇨 기작 .....	187
(가) 제 1형 당뇨 쥐 췌장에서 추정의 항당뇨 기작 .....	187
(나) 제 2형 당뇨 쥐 췌장에서 추정의 항당뇨 기작 .....	188
다. 제 1형 Rat과 2형 mouse 췌장에서 당뇨관련 단백질들의 기능 및 특성 분석 .....	189
(1) 제 1형 Rat 췌장에서 당뇨관련 단백질 특성 분석 .....	189
(2) 제 2형 mouse 췌장에서 당뇨관련 단백질 특성 분석 .....	194

라. 제 1형 Rat과 2형 mouse 혈액에서 당뇨관련 단백질들의 기능 및 특성 분석.....	200
(1) 제 1형 Rat 혈액에서 당뇨관련 단백질 특성 분석.....	200
(2) 제 2형 mouse 혈액에서 당뇨관련 단백질 특성 분석.....	206
(3) Western blot 분석에 의한 프로테옴 결과 확인 및 adiponectin 및 resistin 단백질 분석.....	218
마. CHP 함유 대두가수분해물의 혈당강하 효과.....	221
(1) 피험자 선정 및 투약.....	221
(2) 공복 시의 혈당 및 지질 측정.....	221
바. CHP 함유 대두가수분해물을 이용한 제품 개발.....	223
(1) CHP 함유 대두가수분해물의 대량생산.....	223
(2) 대두가수분해물의 제형화.....	224
(가) 캡슐.....	224
(나) 타정.....	224
(다) 환제조.....	225
(3) CHP 함유 대두가수분해물의 상품화.....	225
(4) 대두가수분해물의 곡물 강정바 적용.....	229
(가) 배합비.....	229
(나) 제조공정.....	230
(다) 제품성상.....	230
(라) 제품 평가 결과.....	230
① 색도.....	230
② 기계적 물성 평가.....	231
③ 관능평가.....	232
(5) 대두가수분해물 첨가 두부 제조.....	233
(가) 두부의 제조.....	233
(나) 색도.....	233
(다) 두부의 조직감 측정.....	234
(라) 관능검사.....	235
(6) 대두가수분해물 강화 코팅 쌀의 제조.....	237
(가) 재료.....	237

(나) 대두가수분해물의 수화 및 흡수 측정	237
(다) 쌀입자의 코팅	237
(라) 대두가수분해물 코팅쌀의 수화 및 흡수 측정	237
(마) 쌀입자의 형태분석	238
(바) 쌀입자의 표면분석	238
(사) 색도 측정	238
(아) 통계 처리	238
(자) 결과	239
① 쌀의 대두가수분해물의 수화 및 흡수 코팅	239
② 코팅쌀의 외형적 특성	240
③ 코팅쌀의 수화 양상 및 수화 속도	244
④ 코팅쌀의 표면 및 내부구조 관찰	246
(7) 대두가수분해물을 이용한 두유 제조	248
(가) 원료 및 레시피	248
(나) 공정	248
(다) 대두가수분해물 함유 두유의 색차값	248
(라) 총당 및 단백질 함량	249

## 제 4 장    목표달성도 및 관련분야에의 기여도 ..... 250

### 제 1 절    총괄 연구개발 목표 달성도 ..... 250

#### 1. 총괄연구목표 및 달성도 ..... 250

##### 가. 연구성과 목표 ..... 250

##### 나. 연구성과 활용 목표 ..... 250

### 제 2 절    연도별 연구개발 목표 달성도 및 관련분야 기여도 ..... 251

#### 1. 1차년도 연구개발 목표 달성 및 관련 분야 기여도 ..... 251

#### 2. 2차년도 연구개발 목표 달성 및 관련 분야 기여도 ..... 252

#### 3. 3차년도 연구개발 목표 달성 및 관련 분야 기여도 ..... 253

<b>제 5 장</b>	<b>연구개발 성과 및 성과활용 계획</b>	255
<b>제 1 절</b>	<b>연구개발 성과</b>	255
1.	연구논문 및 학술대회 발표	255
가.	국내 연구논문	255
나.	국제 연구논문	257
다.	학술대회 발표	266
2.	특허 출원	274
<b>제 2 절</b>	<b>연구성과 활용 계획</b>	276
1.	기술이전	276
2.	기술이전에 의한 상품개발	280
3.	개발기술 활용계획 및 판매 전략 (세롬바이오)	284
가.	개발기술 활용계획	285
나.	판매계획	285
4.	타 연구 활용계획	285
<b>제 6 장</b>	<b>연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보</b>	287
<b>제 7 장</b>	<b>참고문헌</b>	288

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 목표

### 1. 연구개발의 최종목표

본 연구에서는 전통적인 식품 소재 콩을 이용하여 항당뇨 물질 개발하고 산업화하기 위하여 국산 콩을 이용한 가수분해물 제조법 확립 및 효율적인 CHP 생산과 생리활성 규명, CHP 함유 항당뇨 기능성 소재 개발, CHP 식이 실험동물의 주요 조직에 대한 총괄적 프로테옴 분석에 의한 항당뇨 기작 관련 특이단백질 발굴, CHP 식이 실험동물의 주요 조직에 대한 총괄적 DEG (Differentially expressed genes) 분석에 의한 항당뇨 기작 관련 특이유전자 발굴, 항당뇨 기작 관련 특이 유전자 및 단백질 특성 분석에 의한 항당뇨 기작 규명, 항당뇨 특이 단백질 이용 분자 의약 후보물질 개발 핵심자료 제공, CHP 소재 함유 다양한 제품 개발(원료 형태, 완제품 OEM 형태, 자사브랜드 등으로 상품화)에 목표를 두고 있다.

궁극적으로 당뇨질환에 유효한 농산물 (콩 가수분해물)을 소재화 하여 고부가가치의 기능성식품을 개발함으로써 농업은 고부가가치 산업으로, 농촌은 녹색산업기반의 발전모델을 제시하며, 국민보건 향상 및 관련 산업의 경쟁력을 제고하고자 한다.

### 2. 연구개발 목표의 성격

#### 가. 연구소재

CHP 소재로 현재 활용되고 있는 소(牛)의 전립선 (약 1% 정도 CHP함유)은 광우병에 대한 불안 심리가 작용하므로 콩 가수분해물을 이용하여 CHP를 생산함에 따라 광우병으로부터 안전성 확보를 해야만 한다. 또한 제조 공정 시 효소를 사용하므로 산분해 시 발생될 발암성분 (DCP & MDCP) 발생이 없으며, 인슐린 분비 결함 및 인슐린 저항성이 상대적으로 높은 한국형 당뇨와 내당능 장애에 효과적일 것이라 사료된다.

CHP 함유 소재는 혈액 중 당의 조직 내 유입 및 이용률 향상과 인슐린의 분비 촉진 등 당의 이용률을 증가시키는 소재로서 향후 당뇨를 개선 또는 예방 시키는 소재로 당질흡수저해소재보다 2-3배의 시장성이 예측되며, CHP 함유 소재는 기존의 당뇨치료제의 단일 기전에 의한 효과보다는 복합기전에 의해 혈당 개선 효과와, 인슐린 분

비능 향상, 근육에서 포도당 흡수 촉진, 당뇨 진행 억제 등, 당뇨를 예방할 수 있는 효과가 다른 소재에 비해 강조되고 있는 소재이다.

#### 나. Proteomics 및 Gene-fishing 기술을 이용한 당뇨 연구

기존의 화학합성으로 생산된 당뇨치료제가 작용기전이 서로 다르고 부작용이 공통으로 나타나므로, 프로테옴 분석에 의해 정확한 marker 단백질을 발굴할 확률이 낮은데 비해, 본 연구에서는 부작용이 없으며 항당뇨 활성에서 복합기전을 나타낼 것으로 기대되는 천연물 유래 항당뇨 소재에 의한 항당뇨 관련 단백질을 발굴할 가능성이 높다.

혈당강하 물질에 의한 Insulinoma 세포, 제1,2형 당뇨 모델동물에 대하여 동시에 genome 및 proteome 분석 연구. 혈액샘플뿐만 아니라 당뇨와 관련된 주요 기관(pancreas)의 조직세포에 대해 총괄적 프로테옴 분석을 수행하여 프로테옴 수준에서 당뇨기작을 제안할 수 있으며, 당뇨유발 및 당뇨억제 특이 단백질의 발굴 가능성이 높다.

#### 다. 혈당강하물질의 상품화

각종 식용 응용제품 (CHP, 유도체 포함) 등의 세계시장화 가능성은 미국, 유럽의 생명공학 선진국에 비해 우리나라, 일본, 중국 3개국이 치열한 기술개발 경쟁이 가속화되고 있으므로, 성공적으로 연구개발이 완료될 경우, 우리나라가 기술적 우위를 선점할 수 있다.

본 연구에서처럼 CHP의 가능성을 규명하는 과정에서 첨단생명공학 기술의 하나인 proteomics 기술을 응용한 고부가제품의 개발기술이 성공적으로 수행될 경우, 여러 가지 천연물을 이용한 첨단 생명공학제품 개발기술에도 확대될 수 있다.

본 과제를 통해서 개발 예정인 혈당강하용 기능성소재 및 식품은 당뇨병 유발 기작의 전체에 관여하는 소재 개발을 목표로 하고 있기 때문에 국내외적으로 경쟁력이 있는 분야로 판단되며 또한 실질적인 유효 소재 개발은 당뇨병 치료를 위한 국내외적으로 새로운 시장을 개척할 것으로 예상된다.

## 제 2 절 연구개발의 필요성

### 1. 연구개발대상 기술의 경제적·산업적 중요성 및 연구개발의 필요성

### 가. 당뇨병 현황

우리나라 당뇨병 환자는 현재 약 500만명에 이르고 있고 (전 세계 : 약 1억 4천만 명), 2015년 전후로 1,000만 명으로 늘어나 "당뇨대란"이 예고 될 정도로 심각한 실정이다. 또한 당뇨병으로 인한 직, 간접적인 경제적 손실은 약 169조원으로 추산된다.

<2007 한국인 당뇨병 연구보고서 [1]>에 따르면, 국내에서 당뇨병 유병률은 2003년 기준 전국 20~79세 성인 가운데 7.7%에 달하며, 매년 10%의 신규 당뇨환자가 발생하고 있으며, 서구와 비교했을 때 제1형 (인슐린 의존형, IDDM) 당뇨병 발생율은 낮으나, 제2형 (인슐린 비의존형, NIDDM) 당뇨병 발병률은 급격하게 증가하고 있다 (표 1). 제2형 당뇨병 환자들 중 60% 이상이 비비만형 제2형 당뇨병 환자이다. 또한 당뇨병 이전 단계의 상태인 Pre-diabetes (내당능장애)는 1970년대 인구의 1% 정도였던 것이 최근 10%에 육박할 정도로 급증하고 있으며, 내당능장애로 진단 받으면 5년 안에 25%, 10년 안에 60%가 당뇨병으로 악화될 가능성이 높다.

Table 1. 당뇨병의 분류

	1형 당뇨병	2형 당뇨병
발병 연령	20세 이하	40세 이상
발병 원인	자기항체, 바이러스 감염, 염증 등에 의한 췌장 베타세포 파괴	유전적 소인, 비만, 운동부족 등의 요인에 의한 인슐린작용 저하
발병의 경과	급격(구갈, 다음, 다뇨, 체중감소)	완만(많은 경우 증상없음)
체형	마른 사람	비만 경향
가족력	적음	종종 있음
인슐린 분비	현저히 저하	많은 경우 반응성 저하

### 나. 당뇨치료제 개발 분야

당뇨병 치료제의 세계시장 규모는 2003년 약 135억 달러 (혈당강화 보조제 및 건강식품 제외) (국내 : 350억원)로 향후 급신장 할 것으로 예상되며, 2012년에는 약 474억 달러의 시장 (국내 : 1,000억불)이 형성될 것으로 예측하고 있다 [2]. 그러나 지금까지 시판되어 온 당뇨병 치료제는 단일기전에 의한 효과이며 부작용을 나타내는 경우가 많이 있으며 (표 2), 30-50%의 당뇨병 환자에게는 뚜렷한 치료 효과를 나타내지 못하는 실정이기 때문에 기존약물의 부작용을 보완하거나, 새로운 효능을 갖는 새로운 천연물 유래의 당뇨병 치료제 개발이 필요하다 [3].

Table 2. 당뇨병 치료제

치료 방법 (작용기전)	치료제	단 점 (부작용)
인슐린제제	유전자 재조합	경구투여불가
Sulfonylurea 계	Glibenclamide, Glipizide, Gliquidone	저혈당증, 인슐린 분비능 상실
Biguanide 계	Metformin, Phenfomin	위장장애, 신장독성
$\alpha$ -Glucosidase 저해제	Miglitol, Voglibose	설사 및 배탈
Glitazone 계	Rosiglitazone, Pioglitazone	심부전, 빈혈, 간 부전 등의 부작용
Meglitinide 계	Repaglinide, Nateglinide	저혈당, 두통, 설사, 관절통, 요통 등의 부작용

국내 당뇨병 환자가 계속해서 증가하는 가운데 일반인의 당뇨예방에 대한 인식이 높아져 혈당강하식품 시장이 급성장할 것으로 예상되며, 일반인에게 비교적 친숙하고 안전성이 확보된 식품재료로부터 생산된 항당뇨 제품 개발이 요구된다. 운동, 식이요법 등을 통해 당뇨병이나 기타 질환으로 진행되는 것을 막는 것이 최선이지만, 내당능장애(Pre-diabetes) 판정 시 적극적인 약물 치료가 당뇨환자로의 이행을 감소시킬 수 있음이 보고되어 있고, Pre-diabetes를 대상으로 한 다양한 항당뇨 물질 및 식품 개발이 절대적으로 요구되고 있다.

#### 다. Cyclo-His-Pro (CHP)의 소재 및 기능

CHP는 체내에 존재하며 효소 저항성과 생물학적 활성을 지닌 dipeptide로서 TRH (Thyrotrophin-releasing hormone)의 대사와 *de novo*로 체내에서 합성되어 뇌전반과 척수 및 위 장관등에 분포한다. 또한 CHP에 대한 입체이성질적 수용체는 간 및 부신에 존재하며, 뇌하수체로부터 prolactin의 분비 저해, 알콜에 의한 부작용 완화, 식사욕구 완화로 비만 예방 효과가 있다고 알려져 있다.

CHP는 비특이적으로 pyroglutamyl aminopeptidase에 의해 TRH로부터 생성되며 (표 3), 단백질 유래 식품 속에 주로 많이 함유되어 있다. 예로 새우, 젓갈, 참치, non-dairy creamer, white bread, 국수 등에 존재하나 그 양은 미미하여 ppm 정도의 함량으로 존재한다 [4]. 현재 미국에서는 CHP가 함유된 casein 또는 soybean을 활용한 제품인 Ensure, Ensure Plus와 Osmolite와 같은 제품들이 개발되어 있다 [4-6].



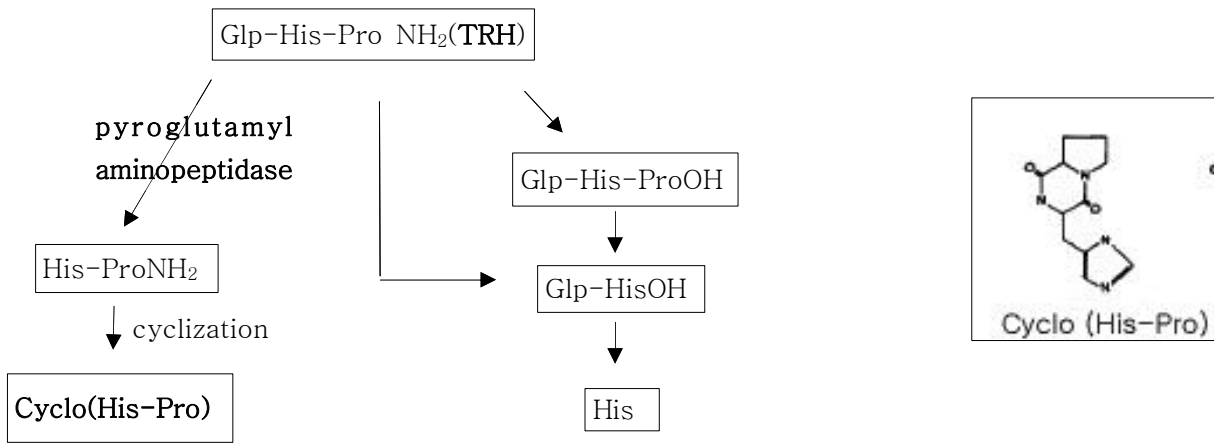


Fig. 1.. TRH에 의한 CHP 합성

동물이나 사람 당뇨 개체에서 CHP 수준은 비당뇨 개체에서 보다 현저히 낮은 수준이며, 췌장의 TRH 수준이 streptozotocin (STZ, 제1형 당뇨 유발) 처리 후 감소 한다는 연구결과는 당뇨 개체에서 CHP 수준이 낮다는 것을 입증할 수 있다. TRH 수준은 고혈당에 의해 영향을 받지 않으며 사람에게 있어 근육이나 지방세포들의 포도당 이용을 직접적으로 촉진 시키지 않는다는 것이 보고되었다.

경구 및 주사에 의한 포도당 투여 시 증가된 혈당 수준은 TRH 수준과는 대조적으로 말초 CHP 농도를 증가시키며, 순환계 및 뇌조직에서 CHP 수준은 STZ에 의한 고혈당 유도 후 증가되며 혈당을 낮추기 위하여 인슐린 투여 시에는 CHP 수준도 감소한다고 보고되었다 [7].

당뇨에서 CHP의 생물학적 활성은 아연(Zinc)과 연관되어 있으며 CHP에 의한 chelating에 의해 아연의 장내 흡수가 증가하며 따라서 근육의 포도당 흡수를 증가 시키며, 또한 아연은 인슐린이 필요한 세포에서 포도당 흡수 및 이용에 관여하며 CHP와 함께 혈당을 조절하는 당대사에 관련된다고 알려져 있다 [8-10].

기존의 개발된 소재들은 당질 흡수 억제효과를 지닌 반면, CHP는 Zn의 전달, 포도당 운송 조절, 근육에서 포도당 흡수 증가, 인슐린 합성 및 분비촉진, 인슐린 분해를 감소시켜 혈당을 완화시키므로 복합기전의 특성을 나타내며, 식품을 통해 CHP 섭취 시 비만억제, 알콜에 의한 부작용 완화 또는 혈당 감소 효과가 기대된다.

## 라. 연구개발의 필요성

### (1) 기술적 측면

식품에 존재하는 CHP는 nmol 또는 pmol 수준으로 CHP를 소재로 활용하기 위해서

는 기존에 보고된 CHP 양보다 더 많은 양을 함유하는 가수분해물을 제조하는 기술 개발에 의한 혈당강하 식품 소재로 활용할 필요가 있다.

최근의 당뇨병 연구동향은 췌장세포에서 인슐린분비 조절 및 근육세포에서 인슐린작용 조절에 관련된 단백질과 유전자를 발견하고, 그 기능을 분자적 측면에서 이해하여 당뇨병의 원인 규명과 이를 이용한 치료제의 개발 연구에 집중하고 있으며 (표 4), Gene-fishing 및 Proteomics 기술을 이용한 연구 보고도 증가하는 추세에 있다.

당뇨병 발병 혹은 합병증이 발생할 때 Proteomics 기술을 이용하여 과다 혹은 과소 발현하는 단백질을 고속으로 발굴하고 그 기능을 규명하는 연구가 활발히 진행되고 있으며 이를 통해 당뇨병의 진단과 치료용 표적 분자를 발굴하는 연구가 진행 중이다. 또한 유전체 기능연구를 통해 당뇨병 특이 유전자 혹은 단백질이 발견되면 이들이 유전적 표지자로 사용 가능한지를 검색하고, 발굴되는 당뇨병 관련 유전적 표지자 혹은 유전자들을 DNA 또는 protein chip으로 개발하는데 주력 하고 있다.

지금까지 콩 및 발효제품에 대해서는 항산화효과, 혈압강하효과, 암세포증식 억제효과 등 생리활성능 검정 연구결과는 많이 있으나, 콩 또는 콩 발효제품으로부터 항당뇨 활성을 가진 CHP에 관한 연구나 proteomics, DNA chip 등의 최신 생명공학 기술을 접목한 응용 연구는 국내외적으로 크게 부족한 실정이다.

Table 3. 작용기전별 당뇨병치료제의 개발 현황

작 용 기 전	L	III	II	I	P	선 두 기 업
α-Glucosidase inhibitor	3				1	Bayer, Takeda, Chong Kun Dang
Insulin agonist	13	5	11	4	27	Chiron, Eli Lilly, Aventis, IDEA ZymoGenetics, Novo Nordisk, Akzo Nobel, Biobras, Alkermes, Merck KGaA,
Glucagon like peptide-1 agonist		1	4	1	4	Amylin, Eli Lilly, Novo Nordisk, Restoragen, Zealand Pharmaceuticals
β3-Adrenoreceptor agonist			1	2	1	Dainippon, Asahi Kasei, GlaxoSmithKline
Dipeptidyl peptidase IV inhibitor			2		1	Bristol-Myers Squibb, Novartis
Peroxisome proliferator-activated receptor α agonist		2	2		6	Novartis, Kyorin, BMS, GlaxoSmithKline
Protein tyrosine phosphatase-1B inhibitor			1		7	Wyeth, ISIS Pharmaceuticals, Ontogen, Abbott, Kaken Pharmaceutical
Leptin stimulator			1		1	Amgen, Tularik
Melanocortin-4 agonist					1	Neurocrine Biosciences
AMPK stimulant	2	2	1		1	Andrx, Merck KGaA, Flamel Technologies

Peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma$ agonist	3	0	4		9	GlaxoSmithKline, Samchundang, BMS, Japan Tobacco, Dr Reddy's, Kyorin
---	---	---	---	--	---	--

콩에는 단백질 함량이 타 식품재료에 비해 높으며, 콩에 존재하는 단백질을 이용한 항당뇨 활성 물질 개발에 대한 연구는 실행되지 않고 있다. 그러나 콩으로부터 분리된 CHP에 의해 항당뇨 관련 특이단백질 및 유전자를 발굴할 경우, 항당뇨 기전 규명과 함께 새로운 당뇨 치료제, 기능성 소재 및 응용제품의 개발 가능성이 잠재한다.

Genomics 및 proteomics 등의 첨단 생명공학 기술을 응용한 새로운 생명공학제품의 생산에서 우리나라가 강점을 가질 수 있는 연구소재로서 각종 식용 재료로부터 유래된 생물고분자 응용제품 (CHP, 항당뇨 관련 단백질 응용제품)의 개발이 절실하며, 성공적으로 연구개발이 완료될 경우 선진국과의 특허마찰이 없으므로 유리하고 우리나라가 기술적 우위를 선점할 수 있다.

(2) 경제 · 산업적 측면

당뇨 예방 인식이 높아져 혈당강하식품시장이 급증할 것으로 예상되며, 미국 등 서구의 경우 규제상의 문제로 혈당강하 보조식품 관련 시장이 제약 위주로 성장하고 있으나 최근 기능성 제품들이 틈새시장을 형성하여, 2002년 한해 전체 40억 달러 (미국)를 넘어선 것으로 파악 된다. 반면 700만 명에 달하는 당뇨환자와 1,370만 명의 잠재환자수를 가지고 있는 일본의 경우에는 전체 299개 품목의 특정 보건용식품의 11%(33건)가 혈당조절관련 제품으로 이들 제품의 매출액도 184억 엔에 달하고 있다 (전체매출 4,120억 엔). 국내의 경우 한국인에게 주로 발병하는 제 2형 당뇨병 관련 치료제 시장이 1997년 약 40억 원에서 최근 급격히 성장 2003년 350억 원대를 육박할 정도로 대형시장을 형성하고 있다.

**Table 4.. 전세계 당뇨예방 개선식품 시장 : 당질흡수저해소재, 혈당치억제소재, 인슐린기능개선 소재, 비만관련제품시장 <자료 : 기능성 식품 보고서, 2002 [11]>**

구 분	시장 규모 (2002년)	시장 규모 (2005년)	예상시장 규모 (2009년)
세 계 시 장 규 모	412억불	610억불	970억불
한 국 시 장 규 모	480억원	720억원	1,100억원

당뇨 관련 제품 시장이 점차 증가하는 추세(15%/년 증가 예상)이기 때문에 연구 개발 성공 시, CHP 및 항당뇨 관련 단백질 및 유전자 발굴에 의한 응용 제품들의 경제적, 산업적 효과가 클 것으로 예상된다. 합성 제조한 CHP의 원가는 g당 350-400만원에 해당하는 고가이므로 이를 활용한 제품은 원가에 부담이 될 수 있다. 그러나 합성 CHP 보다 순도는 다소 떨어진다고 해도 본 연구의 제조방법에 의한 생산 시, 생산단가

가 낮아지므로 CHP 활용제품의 원가를 낮출 수가 있어 다양한 식품소재로 활용 할 수 있다.

### (3) 사회·문화적 측면

2010년 전후 세계 당뇨병 환자의 수가 약 2억 2천명으로 늘어날 것으로 예상 되고 있어 심각한 사회 문제가 될 것으로 우려되므로 효과적인 혈당강하 건강식품의 보급으로 당뇨병으로 야기되는 문제에 대비가 필요하다. 국내에서도 생활수준이 향상되면서 건강식품에 대한 관심이 높아졌고 식생활의 서구화 및 운동량 부족의 생활 습관으로 인하여 당뇨병 환자가 급증하고 있으므로 당뇨병 예방 및 치료를 위한 새로운 기능성식품 소재 발굴 및 신약 개발이 절실하다. 여러 가지 형태의 농산제품을 이용한 기능성식품이 쏟아져 나오고 있는 시점에서 보다 체계적인 연구를 통해 콩으로부터 항당뇨물질의 소재 개발을 통해 국민 건강에 기여할 수 있다.

현재 CHP 소재로 활용되고 있는 소의 전립선 (약 1% 정도 CHP 함유)은 광우병에 대한 불안 심리가 있고, 본 연구에서는 제조공정 시 효소를 사용하므로 산분해시 발암 성분 발생 가능성이 없는 안정성이 확보된 식품류인 콩 유래 혈당강하제품의 개발이 요구된다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 세계적 수준

#### 1. 국외 제품생산 및 시장 현황

##### 가. 해외 바이오식품 산업동향

바이오식품(연평균증가율 28.2%) 산업이 세계 BT산업 시장에서 차지하는 규모는 매우 클 것으로 예상되고 있으며 이것은 바이오에너지·자원(36.4%) 다음의 성장률을 보이고 있을 만큼 그 전망이 좋을 것으로 예측되고 있다.

Table 5. 세계 BT산업 시장규모(2000~2013년)

(단위: 억달러, %)

분야별	2000	2003	2008	2013	연평균증가율 (2000~2013년)
생물의약	325	444	688	1,155	19.7
생물화학	38	52	100	168	26.3
생물환경	32	44	87	147	27.6
바이오식품	27	37	75	126	28.2
바이오에너지 자원	11	15	37	63	36.4
생물농업 해양	27	37	75	126	28.2
생물공정 측정시스템	81	111	188	315	22.2
계	540	740	1,250	2,100	26.9

\* 자료 : OECD 및 Consulting Resources Corporation 예측자료

##### 나. 시장 현황

기능성식품의 세계시장은 통계기관별로 다소 차이가 있으나, 1997년 650억불 규모였던 세계시장은 2001년 1,501억불로의 높은 성장률을 나타내었으며, 2007년도에는 3,771억불에 달할 것으로 전망되고 있다. 또한, 국가의료비 증가에 따른 국가부담 가중, 노

평화 사회 진입, 소비자의 건강관심고조, 식품산업계의 신제품 개발 방향 등을 고려할 때, 건강 기능식품의 수요는 지속적으로 증가될 것으로 전망되고 있다.

Table 6. 연도별 기능성식품 시장현황

년도	1977	1998	1999	2000	2001	2002	2007
시장규모 (억불)	650	1,090	1,280	1,380	1,501	2,023	3,771

\* 자료 : Nutrition Business Journal, 2003 Food Technology, USA(2003)

Table 7. 일본시장 : 특정보건용식품 시장상황

(출처 : 日健榮協, 2002. 09)

년도	매출추이(억엔)			구성비 추이(%)		
	1997	1999	2001	1997	1999	2001
*장기능	1201.6	2069.6	3355.4	91.4	91.2	81.4
콜레스테롤	0.3	4.3	27.9	0.0	0.2	0.7
혈압	13.8	71.6	99.9	1.1	3.2	2.4
이네란	92.0	44.9	113.9	7.0	2.0	2.8
총치	0	3.7	186.7	0	0.2	4.5
<b>혈당</b>	6.7	5.2	<b>184.3</b>	0.5	0.2	<b>4.5</b>
체지방	0	70.0	152.4	0	3.1	3.7
합계	1314.5	2269.3	4120.6	100.0	100.0	100.0

\*장기능 : 올리고당, 유산균 및 식이섬유 포함

NBJ(2003)에 보고에 따르면 세계 최대의 기능성식품 시장을 형성하고 있는 나라는 미국으로 708억불의 매출로 해외시장의 35%를 차지하였으며, 유럽은 647억불로 32%, 일본은 364억불로 18%를 차지하였다. 미국, 유럽, 일본이 세계 시장의 85%를 차지함으로써 해외 기능성식품시장은 기능성 소재 산업이 활성화된 선진국 중심으로 발달되었음을 알 수 있다.

**Table 8. 건강기능식품 세계시장에서 한국의 위치 (NBJ, 2003)**

\* 자료: Nutrition Business Journal, USA(2003)

	미국	EU	일본	캐나다	한국	아시아 <sup>1)</sup>	기타 <sup>2)</sup>	계
매출액 (억불)	708	647	364	60	10	139	95	2,023
%	35.0	32.0	18.0	3.0	0.5	6.9	4.6	100

<sup>1)</sup> 일본, 한국 제외

<sup>2)</sup> 라틴아메리카 등

- 미국의 2006년도 건강기능식품시장 (Nutrion Business Journal 2003)

(단위: 억불)

분류	미국	세계시장
식이보충용 제품군	225	683
자연/유기식품	236	538
자연/유기 퍼스널케어, 가정식	75	197
기능식품	314	844
합계	850	2,263

**2. 국외 당뇨병 개선 식품 현황**

**Table 9. 국외 당뇨병 개선식품**

식이섬유소 (Dietary fiber)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 글루세나 및 초이스 DM과 같은 당뇨병관련 기능성 식품에는 다양한 공급원으로부터 얻은 섬유소가 사용됨</li> <li>- 글루세나의 웨이크 제품은 콩에서 얻은 식이섬유 및 프락토올리고당을 사용</li> </ul>
저항전분 (resistant starch)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 초이스 DM 바(bar)는 혈당상승을 감소시키기 위해 저항전분을 사용</li> </ul>
Fenugreek (호로파,콩과식물의 일종)씨	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fenugreek은 식후 혈당 및 지방대사에 좋은 결과를 보임.</li> <li>- Fenugreek은 섬유소가 많은 허브의 일종으로 식사로 섭취시 소화속도를 늦추고 혈당 상승을 낮추면서 포만감을 주는 것으로 나타남</li> </ul>
크롬	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 당내성인자라고하는 유기복합체의 필수성분으로 인슐린의 작용을 강화 (탄수화물, 지방, 단백질의 대사에 관여하는 영양소 알려짐).</li> </ul>

	- Chromium-tricarnosinate는 물에 100% 녹으며 흡수가 가능한 안전한 형태의 크롬으로 보고됨
<b>비오틴 (biotin)</b>	- 비오틴은 체내 탄수화물 및 지방 대사에서 조효소로 작용하므로 혈당 조절 향상에 기여하는 것으로 알려짐
<b>CHP (cyclo-His-Pro)</b>	- 소의 전립선에 가장 많은 양이 들어있는 것으로 알려진 CHP - 아연(Zn; 인슐린 생성에 필수요소, 인슐린의 활성을 안정화)의 전달 및 인슐린의 분비 및 작용에 관여함. - Intramedicine사에서는 전립선 분말을 이용한 혈당조절식품을 시판

### 3. 국외 당뇨병 관련 Proteomics 기술현황

- 미국 Wadsworth Center Chatterjee 그룹 : 1985년 세계 최초로 제1형 당뇨병과 췌장 세포와의 연관성을 알아보기 위해 이차원 전기영동을 통한 프로테옴 분석을 실시하여 virus-induced hyperglycemia mice에서 단백질 변화를 연구한바 있다.

- 미국 워싱턴 의과대학 Nepom 그룹: 1987년 제1형 당뇨 환자로부터 HLA 분자를 분석하기 위하여 이차원 전기영동과 면역 반응을 이용하였으며, 그 결과 hybrid HLA 분자들이 이형접합으로 연관이 되어있음을 규명한 바 있다.

- 미국 펜실베이니아 의과대학 Collins 그룹: 1990-1992년 췌장 세포에서 glucose의 영향을 알아보기 위해 이차원 전기영동을 이용한 glucose response protein 동정 실험을 수행한 바 있다.

- 스페인 Sanchez 그룹: 2001년부터 현재까지 Glitazone계 당뇨치료제 Rosiglitazone을 제 2형 당뇨 실험쥐에 투여하여 췌장세포와 간세포 및 여러 조직에서 당뇨관련 단백질을 탐색하는 연구를 진행 중에 있다.

- 덴마크 Steno Diabetes Center의 Nerup과 Sparre 그룹: 1995년부터 현재까지 제1형 당뇨병 발병 원인을 프로테옴 분석을 통한 분자적 작용기작을 밝히기 위한 연구가 진행 중이며, 이차원 전기영동을 통해 제1형 당뇨에서 cytokine에 의해 유도되는 췌장세포의 손상과 관련된 단백질을 규명하기 위한 연구를 수행 중이다.



#### 4. 국외 CHP 관련 연구현황

- UCLA Vay Liang Go 그룹 (2003) : 당뇨 및 늙은 쥐에서 CHP 및 아연 경구투여 시 혈당수준, 혈중 인슐린 양, 포도당 내성, food 및 물 흡수량 등의 측정에 의해 CHP가 근육의 포도당 이용을 증가 시켜 혈당대사에 관여 한다고 보고하였다 [9].
- UCLA Song 그룹 (2003) : 유전적으로 형질 전환 된 *ob/ob* mouse에서 CHP 및 아연이 혈당농도를 낮춤으로서 CHP 및 아연이 중요한 anti-hyperglycemic agent임을 규명하였다[12].
- 이태리 Michele Vacca 그룹 (2006) : PC12 세포에서 CHP가 식욕조절 및 음식량 조절에 관여함을 증명하고 세포증식 및 apoptosis에 관련된다고 보고하였다 [13].
- 미국 루이지애나 대학 Mouton 그룹 (2008) : 식품에 존재하는 CHP의 함량 분석 및 분리 정제에 관한 연구가 보고 되었다 [4].
- 관련 특허
  - Prostate extract supplemented with zinc (Song, Moon K : US patent 5997908, Dec. 7. 1999)
  - Compositions and methods for treating diabetes (Song, Moon K : US patent 5834032 , Nov. 10. 1998)

## 제 2 절 국내적 수준

### 1. 국내 제품생산 및 시장 현황

#### 가. 국내 바이오식품 산업동향

- 국내 식품 산업은 원재료의 70%를 수입 원료에 의존하고 있으나 기능성 식품 산업은 선진 기술을 바탕으로 국내 자생 원료만으로 개발이 가능하므로 국내 식품 산업의 구조 개선 전략분야로 인식돼 관련 제도 및 국가적 지원 규모가 크게 확대될 전망이다.
- 국내 건강식품 시장은 선진국보다 뒤지긴 하였지만 96년까지 꾸준한 성장을 하다

IMF 때 급격한 감소세를 나타냈으나 99년부터 빠른 회복세를 보여 2001년 약 1조 2000억원으로 10%이상의 지속적인 상승세를 보이고 있음.

- 기능성 식품 시장은 다른 식품이나 음료 제품들에 비해 상대적으로 경기를 많이 타는 업종으로 2002년도는 월드컵 이후 하반기에 국내 경기가 급속히 악화돼 매출 부진 현상을 보여 2001년과 비슷한 시장 규모를 보였으나, 젊은 층을 위한 저가의 비타민이나 다이어트 식품에 대한 인기가 상승하고 있고, 웰빙산업과 실버산업의 시장도 점차 커질 것으로 기대되고 있어, 2006년경에는 4조원대로 시장 규모가 급성장할 것으로 전망.

- 2004년도 생물산업 분야별 국내 판매액, 수출액 및 수입액분야별 생산 비중을 살펴보면, 바이오식품(44%)과 생물의약품(40%)이 대부분을 차지하고 있듯이 바이오식품 시장의 비중이 매우 크다는 사실도 알 수 있음.

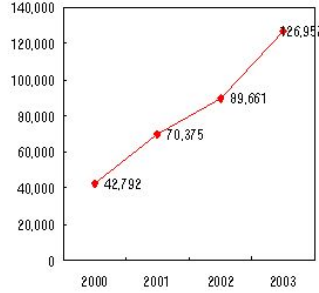
Table 10. 생물산업 분야별 국내 판매액 수출액 및 수입액

(단위 : 백만원, %)

대분류	생산				계	수입	계
	국내 판매액		수출액				
	금액	비중	금액	비중			
생물의약품산업	696,244	71.6	276,832	28.4	973,076	473,760	1,446,836
생물화학산업	117,964	82.5	25,065	17.5	143,029	47,797	190,826
바이오식품산업	250,789	23.7	805,284	76.3	1,056,073	5,092	1,061,165
생물환경산업	111,573	89.9	1,298	1.1	112,871	2,000	114,871
생물전자산업	9,065	56.1	7,087	43.9	16,152	171	16,323
생물공정 및 기기산업	33,448	73.3	12,186	26.7	45,634	141,542	187,176
바이오에너지 및 자원산업	8,217	92.4	674	7.6	8,891	2,600	11,491
생물검정, 정보서비스 및 연구개발업	58,122	90.5	6,079	9.5	64,201	15	64,216
전체	1,285,422	53.1	1,134,505	46.7	2,419,927	672,977	3,092,904

나. 국내시장 요약

- 당뇨인구 증가로 제약시장 2003년 1,300억원 규모, 매년 38%성장
- 질병에 대한 Health Claim 불가로 건식은 고가격/군소업체/방문판매 형태를 보임

제약현황	건식 제품 현황	Communication
<p>매년 평균 37% 성장</p>  <p>경구용 혈당 강하제 시장 &lt;IMS 자료&gt;</p> <p>* 약은 의사 처방전 필요 1회 처방 당 최고 3개월분 가능</p>	<p>타블렛 제형의 방판 건식 소재 당뇨 신약 개발 중인 소재 Soytol, pinitol, silk peptide... 당뇨에 좋다고 알려진 한방 소재 → 수개월치로 단량화/고가격 → 방판위주 판매</p> <p>특수영양식품(환자용식품) 액상타입 당뇨환자용 균형영양 식 ex) 글루서나(Abbott), 뉴케어 (대상), 그린비아(정식품)</p>	<p>기존 건강보조식품으로 질병에 대한 효능 표현 불가 제품에는 표기될 수 없으므로 구전을 통한 판매(방판) 위주 주요 건식업체 중 당뇨인 타겟 제품 ;남양알로에의 ‘알로당’이 유 일함 (silk peptide/Cr 강화효모 함유, 540환, 3개월분/330,000원) 03년 10억원 매출</p> <p>특수영양식품 (환자용식품) “당뇨환자용식품” 표기되어 출시, 판매중</p>

다. 업체 당뇨관련 건강식품 제안

남양 알로당 (실크펩타이드 Cr 강화효모 함유)을 제외하고 혈당을 조절할 수 있는 제품은 부재. 합병증 예방을 위해 비타민제, 혈행개선제, 항산화제 등을 권하는 수준임

Table 11. 업체별 당뇨관련 건강식품

업체명	상담내용	추천상품	특징	제품가	1일 가격
풀무원	식이/운동요법강조 합병증 예방을 위해 혈행개선제 추천	트롬보 큐	혈행개선	360 ea/200,000	2,200
		알로당 (10억/년)	당뇨제품	108 ea/120,000	4,000
남양	기본적으로 알로당 추천(혈당조절 가능)	알로맥	혈행개선	180 ea/90,000	3,000
		알로신	신장제품	180 ea/100,000	3,330
허벌라이프	식이요법이 중요함 식이요법에 도움이 되는 제품 추천	알브레인	눈/두뇌	542 ea/220,000	2,440
		프로틴 드링크 믹스	단백질	550 g/35,600	1,618

암웨이	당뇨치료의 제품은 없음. 비타민제나 나이에 맞는 제품 추천	액티브 화이버	섬유소		
		더블엑스	종합 비타민		
김정문	알칼리이온수가 좋음. (비싸니까) 알로에 드링크 추천	머쉬룸			
		슈퍼골드	면역증강	3병/170,000	5,670

- 국내 건강식품 시장

\* 건강기능식품 판매액 (식품의약품안전청, 2010)

(단위: 억원)

	2005		2006		2007	
	건강기능식품	농산물 건강기능식품	건강기능식품	농산물 건강기능식품	건강기능식품	농산물 건강기능식품
판매액	6,856	3,618	7,009	4,131	7,235	4,876

\* 건강식품 상위 10개 품목 (식품의약품안전청, 2010)

순위	품목명	2005	2006	2007
1	홍삼 제품	1,919	2,469	3,270
2	알로에 제품	970	1,031	797
3	영양보충용 제품	948	859	785
4	인삼 제품	364	356	350
5	글루코사민 함유제품	643	367	270
6	개별인정형 제품	82	89	264
7	클로렐라 제품	575	325	187
8	유산균 함유제품	143	168	175
9	EPA/DHA 함유제품	153	152	167
10	감마리놀렌산 함유제품	153	289	165
상위 10개 품목 판매액 소계		5,953 (87%)	6,105 (87%)	6,430 (89%)
건강 기능식품 판매액 전체		6,856	7,009	7,235

\* 개별인정형 건강식품 상위 10개 제품 (건강기능식품공전에 수재되지 않은 제품)

순위	품목명	2005	2006	2007
1	공액리놀렌산 (CLA)		13	127
2	코엔자임 Q10			73
3	황금 등 복합물		46	16
4	대나무잎 추출물			13
5	쏘팔메토 열매 추출물			9
6	허비스커스 등 복합 추출물	5	9	6
7	초록홍합 오일 추출물	54		
8	정어리펩타이드	10		1
9	참당귀주정추출물	11	3	
10	난소화성말토덱스트린	3	16	3
소계		83	87	248 (94%)
전체 (개별인정형 판매액)		83	89	264

\* 개별인정형 건강기능식품 상위 10개 가능성 내용 (식품의약품안전청, 2010)

순위	품목명	인정건수	2006	비고
1	체지방 감소	26	가르시니 캄보지아(3), 대두 배아(1)	
2	항산화 효과	19	대나무잎(1), 복분자(1), 포도종자(1), 토마토(2)	
3	관절 건강	14	로즈힙(2)	
4	혈압 조절	14		
5	식후 혈당 조절	10	구아바잎(2), 달맞이꽃 종자(2), 콩 발효물(4)	
6	눈 피로 개선	8	빌베리(3)	
7	눈 건강 (노화 기인)	8		
8	배변활동 원활	7	목이버섯(1), 분말한천(1), 대두올리고당(1)	
9	혈중 콜레스테롤 개선	7	대나무잎(1), 아미인(1), 알로에(2)	
10	전립선 건강 유지	5	쏘팔메토 열매(5)	
소계		118	34 (29%)	

## 2. 국내 당뇨병 개선 식품 현황

Table 12. 국내 당뇨병 개선식품

가시오가피	- 세코트리테페노이드(Secotriterpenoid) 성분이 당뇨병 치료효과를 나타냄
선인장줄기분말	- 대부분 식이섬유와 수분으로 구성되어 저열량 식이요법 소재로 이용됨. - 선인장 분말 섭취 시 장의 흡수를 지연시켜 혈당을 감소시킴
두충	- 낙엽고목의 일종으로 옛날부터 한방에서 널리 사용된 당뇨치료약재
실크펩타이드	- 누에고치에서 뽑아낸 실크를 가수분해 한 것으로 분자량이 낮은 펩타이드 단위로 분해되어 체내흡수율이 높음
누에분말	- 작은창자내에서 혈액으로 흡수되는 혈당량을 조절함으로써 최적의 효과를 나타냄
뽕잎(桑葉)	- 모란 A(Moran A)의 혈당강하효과 [1938년 인체실험을 통한 뽕잎의 혈당 강하 효과 인정(Moran - A성분)]

## 3. 국내 당뇨병 관련 Proteomics 기술현황

- 보건복지부 지정(2000년) 당뇨 및 내분비질환 유전체 연구센터(서울대): Proteomics 기술을 이용하여 당뇨병 발병 혹은 합병증이 발생할 때, 과다, 과소 발현하는 단백질의 고속 발굴과 그 기능의 규명 연구와 이를 통해 당뇨병 진단과 치료 표적분자 발굴 연구진행 중이다. 이와 같은 유전체 기능연구를 통해 당뇨병 특이 유전자 혹은 단백질 발견 시 이들의 유전적 표지자 사용 가능여부 검색과 발굴되는 당뇨병 관련 유전적 표지자 혹은 유전자들을 DNA 또는 protein chip으로 개발하는데 주력하고 있다.

- 고려대 생명공학원 세포신호전달 연구실: Lipid Raft 프로테오미를 통한 제2형 당뇨병 단백질 탐색 및 조절 기작 이해를 위한 연구 수행 중이다. 그 결과 암세포, 노화세포, 면역세포, 신경세포 등 lipid raft에서 일어나는 다양한 신호전달과정 연구 중에 있다.

## 4. 국내 CHP 관련 연구현황

- 고려대학교 서형주 교수팀 (2004) : 플라보자임에 의한 신경전달물질인 Cyclo-His-Pro 함유하는 효모 가수분해물 제조방법에 관한 연구

### 제 3 절 국내·외 관련기술의 문제점 및 전망

□ 불법·유사 건강식품과의 혼돈으로 건강기능식품 전반에 대한 소비자의 불신이 팽배해 있고 기능성식품에 대한 언론·여론 주도층의 부정적 시각이 만연해 기능성식품에 대한 체계적인 소비자 교육·홍보가 부족하다.

□ 질병예방 및 삶의 질적 향상과 기능성식품과의 연관성이 있는 천연물 소재 기능성 원료의 연구개발에 대한 예산지원이 미흡하고 특히 한국인의 주요 질병 원인인 암·고혈압·당뇨·심혈관질환·비만 등을 감소시키는 타겟팅 신소재 원료에 대한 연구개발이 부족하다.

□ 국내·외 기능성식품 관련 시장 동향, 식품기술, 제품 정보, 통계 등에 대한 데이터가 부족하며, 또한 기능성식품의 신제품 개발에 필수적으로 거쳐야 하는 동물실험, 인체 실험에 소요되는 비용이 고가로 중소기업에게는 부담이 크다고 할 수 있다.

□ 식품소재에서 나타내는 탁월한 생리활성능에 대한 체계적인 연구가 여전히 부족한 실정이며, 특히 본 연구에서와 같이 최신 생명공학 기술인 프로테옴 분석기술과 분자생물학 기술을 융합하여 전통 식품소재를 이용하여 2차적인 고부가 제품을 생산하려는 연구는 시도된 바가 없다.

□ 우리나라 건강기능식품 시장은 장기적인 불황으로 인해 소비심리가 위축돼 있으나 인지도가 높은 품목 위주로 시장을 형성할 것으로 보인다.

□ 개별 인정형 제품의 매출 증대가 하나의 축을 형성할 것으로 보이며 제품의 품질 및 가격의 다양화가 계속 진행될 전망이다.

□ 향후 농산물 건강기능식품을 제조하고자 하는 경우에는 소비자의 요구에 부응하는 기능성인 항당뇨, 비만 감소, 면역력 증진, 아토피 완화 등을 주요 목표로 삼는 것이 바람직하다.

□ 현재 시판되고 있는 당뇨병 치료제의 대부분은 인슐린 분비 촉진 혹은 세포의 인슐린 반응성을 높이는 작용을 하는 반면, 본 과제를 통해서 개발 예정인 혈당강하용 기능성소재 및 식품은 당뇨병 유발 기작의 전체에 관여하는 소재 개발을 목표로 하고 있기 때문에 국내외적으로 경쟁력이 있는 분야로 판단되며 또한 실질적인 유효 소재 개발은 당뇨병 치료를 위한 국내외적으로 새로운 시장을 개척할 것으로 예상된다.

□ 본 연구사업에서 핵심기술이 되는 유용성분의 추출 및 정제기술, 프로테옴 분석기술, 배양기술, 생리활성능 평가기술 등은 국내기술력이 선진국에 근접하여 있고, 특히 식품자원의 이용기술이 일본과 함께 세계적으로 우위에 있는 바, 기술도입의 필요성이 없다고 판단된다.



### 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

#### 제 1 절 1차년도

##### 1. 연구내용

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
<p>o <i>In vitro</i>에서 CHP 항당뇨 활성 분석</p>	<p>o 세포 배양</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- RINm5F cell</li> <li>- RPMI1640</li> <li>- 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 인슐린을 분비하는 흰쥐 인슐린종세포 (RINm5F; rat insulinoma cell)의 배양은 10% fetal bovine serum, penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 U/mL) 등을 함유한 RPMI1640 배지에서 CO<sub>2</sub> 배양기로 37°C, 5% CO<sub>2</sub> /95% air로 조절된 항온기 내에서 배양하고, 3일마다 배양액을 교환해주며 trypsin-EDTA을 이용하여 계대 배양함.</li> </ul>
	<p>o MTT assay</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Cell proliferation</li> <li>- Cell viability assay</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 96 well microplate에 cell (2X10<sup>4</sup>/well)을 plating.</li> <li>- 세포를 24시간 동안 배양 후, 인슐린 생성 베타 세포를 파괴 하는 세포 독성 물질 2 mM STZ (streptozotocin)을 세포에 30분 동안 처리한 다음, 농도별 CHP를 처리하여 24시간 배양.</li> <li>- MTT assay : MTT solution (0.5 mg/ml )을 첨가하여 37°C incubator에서 4시간 동안 incubation하고 MTT 용액을 제거한 후, DMSO 용액을 가하여 (100 ul) insoluble crystal을 완전히 용해시킴.</li> <li>- ELISA reader를 사용하여 wave length 570 nm에서 흡광도를 측정함.</li> </ul>
	<p>o NO test</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Griess Nitrite assay</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 면역 활성물질의 최초 적정농도 설정이나 초기 활성물질분획의 검색에 이용.</li> <li>- <i>In vitro</i> 상에서 cell supernatant에 녹아 있는 NO의 양을 정량.</li> </ul>
	<p>o Apoptosis test</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- DAN Fragmentation</li> <li>- Morphology analysis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Genomic DNA 추출.</li> <li>- 1.2% agarose gel에서 전기영동(50 voltage)을 실시한 후, ethidium bromide로 염색하여 자외선등 아래에서 관찰.</li> <li>- 현미경을 이용한 세포변화 관찰.</li> </ul>

<p>○ 제1형 당뇨병 모델 : 항당뇨 활성 분석</p>	<p>○ 항당뇨 효과 실험</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- SD-rat</li> <li>- ICR mouse</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 제1형 당뇨병 모델 동물 : Sprague-Dawley 수컷 rat 및 ICR mice를 사용함.</li> <li>- 췌장의 <math>\beta</math>-cell 만을 특이적으로 파괴하여 인슐린 분비량을 낮춤으로써 고혈당을 일으킨다고 알려진 [14] streptozotocin (STZ) 으로 IDDM 형태의 당뇨 유발.</li> <li>- 혈액 내 당량이 300 mg/dl 이상인 것만을 선별하여 실험에 이용.</li> </ul>
	<p>○ 경구포도당 내성 시험법 (OGTT, Oral Glucose Tolerance Test)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 15시간 절식한 후, 포도당을 1g/체중 1 kg의 농도로 경구투여.</li> <li>- 혈액 내 glucose 측정 : glucose 처리 전 -30 분, glucose 처리 후 0, 30, 60, 120, 180 분에 꼬리 부분 정맥에서 얻은 혈액 샘플 이용.</li> </ul>
	<p>○ 채혈, 혈청 및 장기분리</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ether로 마취, 복부대동맥으로부터 주사기로 채혈한 혈액은 4°C 에서 원심분리 하여 혈청으로 사용함.</li> <li>- 실험동물로부터 각 장기 (간, 췌장, 신장, 지방, 근육조직)를 적출.</li> <li>- 적출된 장기는 Proteome analysis를 위해 신속히 보관(-70°C).</li> </ul>
<p>○ Proteome 분석 : CHP에 의한 제1형 당뇨병 모델의 항당뇨 기작 규명</p>	<p>○ Proteome 분석을 위한 시료준비</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Proteome analysis를 위해 lysis buffer 용액 (8M urea, 2% CHAPS, 65 mM DTE, 2%(v/v) isocratic pH gradient (IPG) buffer (pH 3-10 NL, non-linear), trace bromophenol blue)으로 처리한다.</li> <li>- 500 <math>\mu</math>g-1 mg 단백질을 2-D gel에 loading 하는데, 이때 초기에는 pH 3-10 NL용 immobilized pH gradient strip을 사용하되, 필요할 경우, 특정 pH 영역에 적합한 zoom-in-gel을 사용하여 정밀분석을 행함.</li> </ul>
	<p>○ Proteome analysis</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 2-D gel 전기영동 (또는 CAT) 및 Image Processing</li> <li>- MALDI-TOF MASS 분석</li> <li>- 단백질 동정</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 대조구 및 실험구 실험동물의 주요기관을 적출해서 proteome을 분석.</li> <li>- 대두가수분해물을 섭취한 rat의 2-DE proteome map상에 나타난 표적단백질들을 MALDI-TOF MASS로 동정하고, 특이단백질 자료를 획득한 다음, 항당뇨 활성에 관여하는 유용단백질을 encoding하는 유전자를 탐색.</li> <li>- Isoelectric focusing은 IPGphor를 이용하여 수행하고, 2-D 전기영동은 Protean IIXL 2D multi cell (Bio-Rad)을 사용함. 단백질의 spot은 fluorescence dye SyproRuby (Molecular Probe)를 사용함.</li> </ul>

		<ul style="list-style-type: none"> <li>- 염색된 gel은 fluorescence laser scanner (Bio-Rad)를 사용하여 10Mb size로 scanning 한 후 ImageMaster software (Amersham Pharmacia Biotech)를 이용하여 정량함.</li> </ul>
	o cDNA microarray	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Microarray 기법을 이용한 연구 : total RNA 추출 및 cDNA 합성 및 labeling 과정, hybridization 과정, wash &amp; stain, scan 단계를 거쳐 spot의 intensity를 분석함.</li> </ul>
	o 조직병리검사 (H&E 염색 및 Insulin-면역조직화학적 분석)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 췌장 조직을 paraffin으로 고정 후, 췌장조직 절편은 hematoxylin and eosin (H&amp;E) 염색 및 인슐린 항체를 이용하여 면역반응 후 현미경을 통해 관찰함.</li> </ul>
o 콩 가수분해물의 제조 및 분해 조건 확립	o 단백질가수분해 효소 및 미생물 발효를 이용하여 대두 가수분해물 제조 및 CHP 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cyclo (His-Pro)는 Sigma Chemical Co.에서 구입하여 CHP 분석에 표준물질로 사용하였다. 서목대 쥐눈이콩 (Rhynchosia Nulubilis), 황금콩 (대두, Glycine max), 대두박은 새롬바이오 (군포, 한국)으로부터 제공받아 실험에 사용하였다.</li> <li>- flavourzyme, alcalase, nutrase 등 단백질 가수분해효소를 사용하여 가수분해물을 조제하고, 가수분해물의 A-N, protein, DH, APL(average peptide length), dry weight와 CHP 함량을 측정하여 조건 확립하였으며 미생물 발효에 의한 대두 가수분해물을 제조하여 CHP 함량 측정</li> <li>- HPLC를 이용하여 Hamilton PRP-1 RP 10 <math>\mu</math>m (250 mm <math>\times</math> 4.1 mm ID, Hamilton Co.) column과 pre-column Hamilton PRP 10 10 <math>\mu</math>m (25 mm <math>\times</math> 1.3 mm ID)에 시료 20 <math>\mu</math>l 주입하여 유속 0.5 ml/min으로 eluent (acetonitrile : 0.75 g/l 1-heptanesulfonic acid in 0.004 M TFA = 10:90 v/v)로 용출 206 nm에서 시료 내 함량 측정.</li> </ul>
o Cyclization에 의한 CHP 함량 증진	o Flavourzyme와 alcalase 혼합사용에 의한 가수분해물의 CHP 증진	<ul style="list-style-type: none"> <li>- flavourzyme과 alcalase를 여러 비율로 혼합 사용 시 가수분해물의 A-N과 protein 양 및 CHP 함량을 측정하여 증진 효과 파악</li> </ul>

<p>o 생화학적 정제 방법을 통한 CHP 함량 증진</p>	<p>o 산처리, 한외여과, 알콜분획에 의한 정제를 통한 CHP 함량 증진</p>	<p>- 대두가수분해물의 알콜 분획에 의한 CHP 함량 증진 및 산처리, 활성탄 처리 또는 한외 여과 처리 시 CHP 함량을 측정하여 함량 증진 방법 파악</p>
-----------------------------------	---	--

## 2. 연구결과

### 가. 콩 가수분해물의 제조 (분해 조건 확립) 및 함량증진

#### (1) 단백질가수분해 효소를 이용한 가수분해물 제조 및 CHP 분석

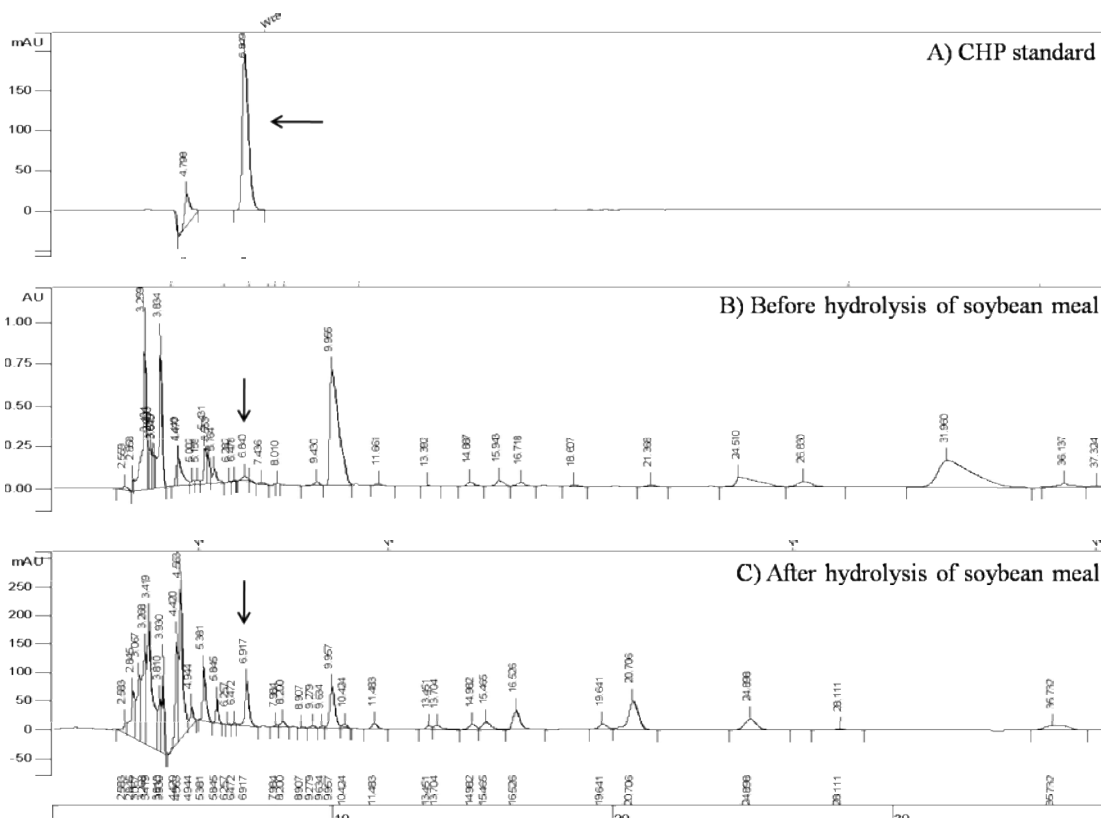
Cyclo (His-Pro)는 Sigma Chemical Co.에서 구입하여 CHP 분석에 표준물질로 사용하였으며, 서목태 쥐눈이콩 (Rhynchosia nulubilis), 황금콩 (대두, Glycine max), 대두박은 새롭바이오(군포, 한국)로부터 제공 받아 가수분해물 제조에 사용하였다. 가수분해물 제조에 사용한 단백분해효소인 neutrase, alcalase, flavourzyme, protamax는 Novo Korea에서, ficin과 pancreatin은 Sigma Chemical Co.에서, collupulin은 DSM으로부터 각각 구입하여 사용하였으며, 효소의 반응조건은 [Table 13]과 같다.

제조된 콩 가수분해물의 CHP (Cyclo-his-pro) 함량 분석은 HPLC를 이용하여 다음과 같은 조건에서 분석하였다. Hamilton PRP-1 RP 10  $\mu\text{m}$  (250 mm  $\times$  4.1 mm ID, Hamilton Co.) column과 pre-column Hamilton PRP 10 10  $\mu\text{m}$  (25 mm  $\times$  1.3 mm ID)에 시료 20  $\mu\text{l}$  주입하여 유속 0.5 ml/min으로 eluent (acetonitrile : 0.75 g/L 1-heptanesulfonic acid in 0.004 M aqueous TFA = 10:90 v/v)로 용출하여 206 nm 파장을 가지는 UV 검출기를 이용하여 시료 내에 CHP 함량을 측정하였다 (Fig 2).

가수분해 과정 중의 성분 변화량을 측정하고자 A-N(amino nitrogen), DH(degree of hydrolysis)와 dry weight를 각각 측정하였다. A-N은 TNBS(trinitrobenzenesulfonate)를 사용하여 다음과 같이 측정하였다 [15]. 적당량 희석한 시료 0.125 ml을 취하고 1 ml phosphate buffer(pH 8.2, 0.212 M)과 1 ml 0.1% TNBS를 가하여 50°C에서 1시간 반응 후 2 ml 100 mM HCl를 가하여 20분간 반응하였다. 반응액에 4 ml 증류수를 가한 후 10분간 방치 후에 340 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 이때 표준물질로 leucine을 사용하였다. DH는 Adler-Nissen(1986) 식 [15]에 준하여 계산하였다.

**Table 13. Enzymes for the production of hydrolyzates and CHP from soyprotein**

Enzyme	Source	Temp(°C)	pH
Flavourzyme	<i>Aspergillus</i> sp.	45-50	5.0-7.0
Protamax	<i>Bacillus</i> sp.	35-60	5.5-7.5
Neutrase	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	45-55	5.5-7.5
Alcalase	<i>Bacillus</i> sp.	50	8.3
Ficin	<i>Ficus carica</i>	45-55	5.0-8.0
Collupulin	<i>Carica papaya</i>	50-70	5.0-7.5
Pancreatin	Porcine pancreas	35-40	6.0-8.0



**Fig 2. HPLC analysis of cyclo (His-Pro).** The CHP content for each hydrolysate was analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC, Varian 230, Varian Inc., Palo Alto, CA, USA) using a Hamilton PRP-1 RP 10  $\mu$ m (250 mm  $\times$  4.1 mm ID, Hamilton Co.) column and a Hamilton PRP 10  $\mu$ m (25 mm  $\times$  1.3 mm ID) pre-column. The mobile phase was a mixture of acetonitrile and 0.75 g/L 1-heptanesulfonic acid in 0.004 M aqueous TFA (10:90, v/v), adjusted to a pH 2.4 with NaOH before use. The flow rate was 0.5 ml/min. The sample (20  $\mu$ L) was injected and monitored spectrophotometrically at 220 nm. The pure (synthetic) cyclo (His-Pro) was purchased from the Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO., USA) and used for the CHP analysis as a standard material.

(가) 콩의 종류에 따른 CHP 생산량 비교

콩의 종류에 따른 가수분해물을 제조하기 위해 대두 가수분해물 제조 시 활성이 높았던 flavourzyme, alcalase, pancreatin을 이용하여 국내산 대두(S-D), 미국산 대두(S-F), 쥐눈이콩(S-E), 대두박(S-C)에 대한 가수분해물을 제조하였다. 각 가수분해물의 가수분해도를 측정한 결과 (Fig. 3), Flavourzyme 가수분해물의 가수분해도가 가장 높은 48.9-60.1%였으며, alcalase와 pancreatin 가수분해물의 가수분해도는 낮은 수치를 보였다. 가장 높은 가수분해도를 보였던 flavourzyme 가수분해물은 국내산(S-D) 및 외국산(S-F) 대두가 각각 55.2%와 58.9%의 가수분해도를, 쥐눈이콩(S-E)은 48.9%로 다소 낮은 가수분해도를 보였으나 대두박(S-C)을 이용하여 제조한 가수분해물의 가수분해도는 60.1% 가장 높은 가수분해도를 보였다. 그러나 대두, 즉 국내산, 미국산 및 국내산 대두박 가수분해물의 가수분해도는 유의적인 차이가 없었다. Flavourzyme, alcalase, pancreatin을 이용하여 국내산 대두(S-D), 미국산 대두(S-F), 쥐눈이콩(S-E), 대두박(S-C)에 대한 가수분해물의 CHP 함량을 측정한 결과 (Fig. 4), 가수분해도가 높았던 flavourzyme 가수분해물의 CHP 함량이 18.9-28.2  $\mu\text{g/ml}$ 로 높은 함량을 보였다. 반면 alcalase나 pancreatin 가수분해물의 CHP 함량은 다소 낮은 7.5-13.4  $\mu\text{g/ml}$ 의 함량을 보였다. CHP 함량이 높았던 flavourzyme 가수분해물의 콩의 종류에 따른 함량은 국내산(S-D)과 미국산 대두(S-F)를 비교 시 각각 27.6  $\mu\text{g/ml}$ 과 28.2  $\mu\text{g/ml}$ 의 함량을 보였으나 유의적인 차이는 없었다. 또한 국내산 대두를 이용하여 제조한 가수분해물 S-C의 CHP 함량은 28.9  $\mu\text{g/ml}$ 이었으나 국내산(S-D)과 미국산(S-F)과 유의적인 차이는 없었다.

이상의 실험 결과에 의하면 쥐눈이콩 사용 시 대두 사용 시에 비하여 가수분해도와 CHP 함량이 낮았으나, 대두의 종류간, 즉, 국내산, 외국산 및 대두박을 이용하여 가수분해물 제조 시 가수분해도나 CHP 함량에는 유의적인 차이가 없었다.

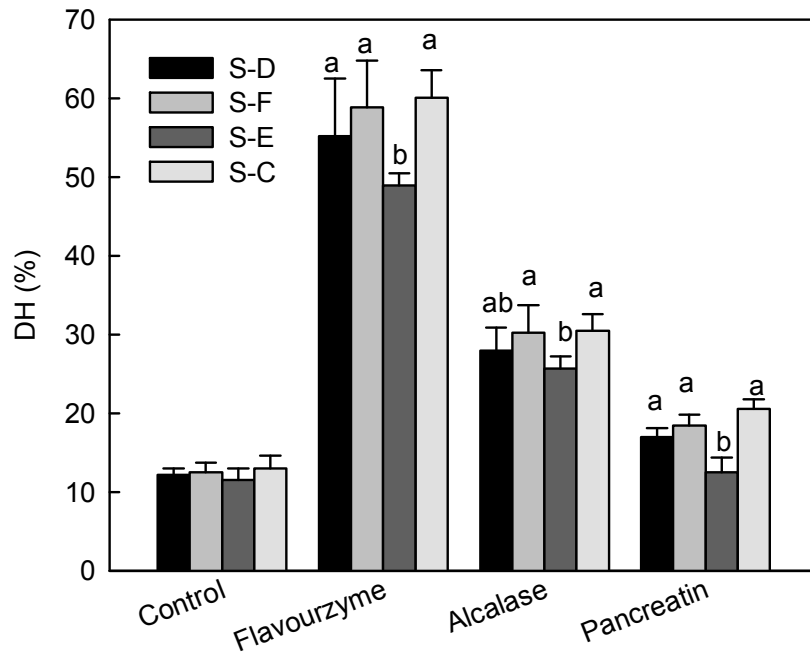


Fig 3. DH of various soybean by hydrolysate by enzymes.

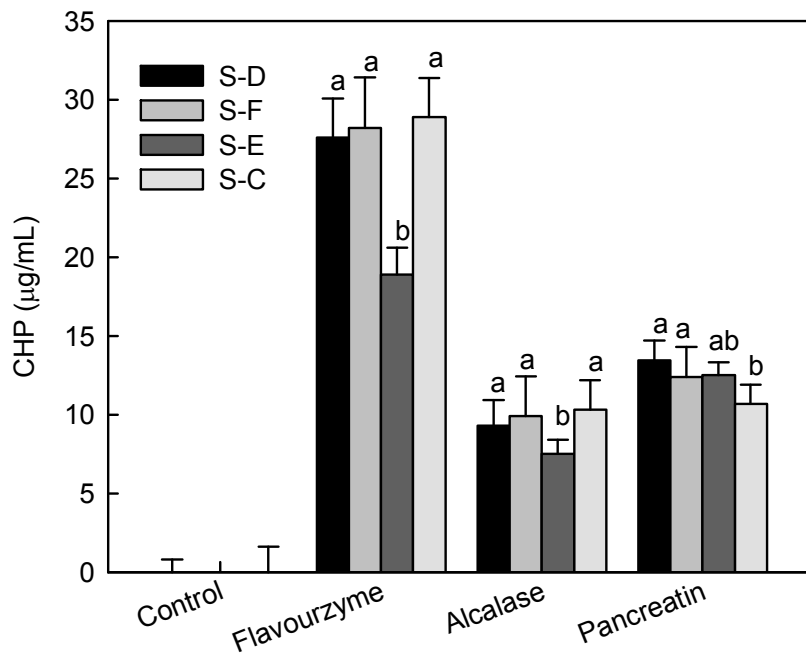


Fig 4. CHP content of various soybean by hydrolysate by enzymes.



#### (나) 대두 가수분해물 제조 및 CHP 분석

대두 가수분해물의 제조는 식품 산업에서 가장 널리 사용되는 식물성 원료인 대두를 사용하여 CHP가 함유된 가수분해물을 제조하고자 flavourzyme, alcalase, nutrase 등 상업용 효소를 사용하여 가수분해물을 제조하였다. 대두분말 8 g을 증류수 100 ml에 현탁하여 pH를 6-8로 조정한 후 단백분해효소를 0.05-1.0%를 첨가하여 50°C에서 48-72시간 동안 가수분해하여 원심분리 후 상정액을 건조하여 가수분해물로 사용하였다.

대두 가수분해물에 함유된 CHP의 함량을 높이기 위해 산처리, 활성탄처리 및 한외여과를 실시하였다. 산처리는 5% 효모 가수분해물 용액에 구연산을 가하여 pH를 3.5로 조정한 후 30분간 방치하여 생긴 침전을 여과하여 제거한 다음 NaOH로 pH를 7.0으로 중화 처리하여 건조하였다. 활성탄 처리는 5% 효모 가수분해물 용액 100 ml에 활성탄 1 g을 가하여 30분간 진탕한 후 여과하여 여액을 제거하여 얻은 활성탄에 0.3% 암모니아수를 70 ml를 가하여 30분간 진탕 후에 여과하여 얻은 여액의 pH를 7.0으로 조정하여 건조하였다. 한외여과 처리는 5% 효모 가수분해물 용액을 한외여과막 (PM-10)을 이용하여 분자량 10,000 이하되는 여과액을 모아 이를 건조하였다.

A-N의 양은 ficin으로 가수분해한 대두 가수분해물이 가장 높은 값을 보인 반면, 같은 식물 기원 효소인 collupulin 가수분해물은 17.0 µg/ml의 함량을 보였으며, alcalase, flavourzyme이 각각 6144.9와 6739.2 µg/ml의 함량을 보였다 (Fig. 5).

Protein양은 A-N의 함량이 낮았던 pancreatin과 collupulin이 각각 14233.6과 13560.0 µg/ml로 높은 함량을 보였으며, A-N의 함량이 가장 높았던 ficin 가수분해물에서는 11590.7 µg/ml의 함량을 보여 가수분해 되어진 peptide의 길이를 추정할 수 있으며, A-N과 protein 양을 가지고 정확한 APL의 값을 구할 수는 없지만 상대적인 비교는 가능하다. 즉, protein양을 A-N의 함량 대비 시 ficin 가수분해물은 상대적으로 가장 짧은 peptide를 가지는 것으로 추정되며, A-N의 함량이 낮고 protein의 함량이 높았던 collupulin과 pancreatin 가수분해물은 각각 8.45와 7.75개의 아미노산을 가지고 있는 비교적 긴 peptide로 구성되어 있는 것으로 추정된다. Flavourzyme, protamax, neutrase와 alcalase는 각각 1.69, 3.79, 4.20, 1.21 아미노산을 가지고 있을 것으로 추정된다.

가수분해물의 가수분해도(DH)를 측정한 결과, APL의 경향과 유사한 경향을 보였다. 짧은 peptide로 구성된 것으로 추정되는 ficin가수분해물이 64.7%의 가수분해도를 보였으며, alcalase와 flavourzyme가수분해물의 DH가 각각 62.2%와 55.2%로 비교적 높은 DH를 보였다 (Fig. 6).

본 실험에서 목적하는 CHP의 함량을 각각 측정한 결과, protamax, neutrase, ficin,

collupulin은 CHP가 측정되지 않았거나 굉장히 낮은 수준으로 존재함을 확인하였으며, flavouzyme, alcalase, pancreatin 가수분해물에서는 27.6, 9.3, 13.4  $\mu\text{g/ml}$  함량을 가지고 있었다 (Fig. 7). 특히 flavourzyme에서는 다른 가수분해물에 비해 높은 함량을 보였으며, CHP 이외의 다른 성분에서 비교적 낮은 수준을 보였던 pancreatin 가수분해물에서 CHP가 다소 높은 함량을 보였으나, pancreatin의 효소는 다른 효소에 비해 제조원가가 고가일 뿐만 아니라 동물성 기원 효소이므로 동물 관련 질병이 발생 시 문제 소지를 가지고 있으므로 가수분해물 제조에는 부적합한 것으로 생각된다.

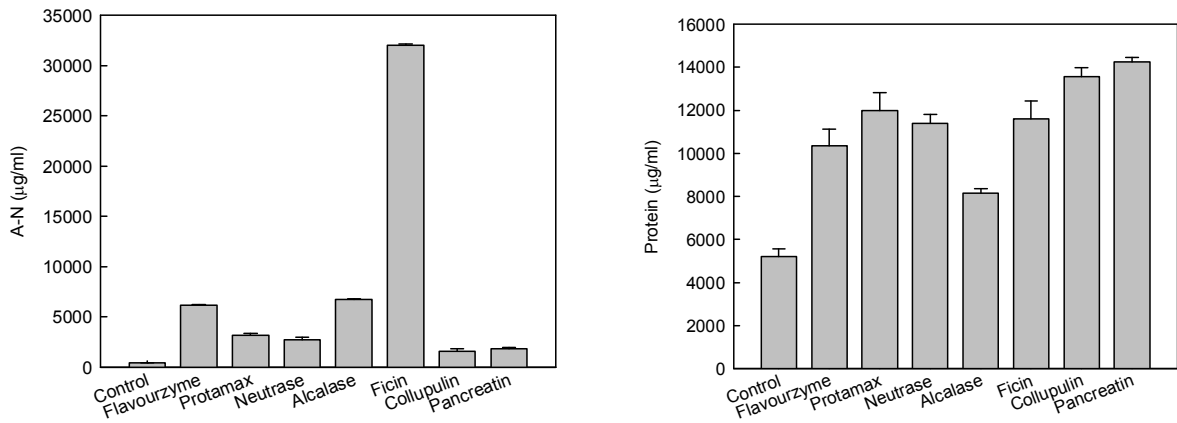
상업용 효소 중 CHP 함량이 높았던 flavourzyme과 alcalase를 각각 4:0, 3:1, 2:2, 1:3, 0:4로 각각 혼합 사용 시 가수분해물의 성분 변화를 측정하였다. A-N의 양은 flavourzyme과 alcalase를 3:1의 비율로 혼합하였을 때 가장 높은 A-N의 함량을 보였으며, alcalase의 혼합 비율이 높아질수록 A-N의 함량은 점차 감소하는 경향을 보였으며 protein양은 A-N의 함량과는 다소 다른 경향을 보였다. Flavourzyme 혼합 사용 시 protein의 함량은 커다란 차이를 보이지 않았으나, alcalase 단독 사용 시 protein의 생산량은 급격히 줄어 10047.5  $\mu\text{g/ml}$ 의 함량을 보였다. 따라서 flavourzyme과 alcalase 혼합 사용 시 flavourzyme의 혼합 사용 비율이 높을수록 바람직한 경향을 보이는 것으로 추정되며, flavourzyme 단독 사용 보다는 혼합사용이 A-N의 함량 증가를 꾀하는 것으로 확인하였다 (Fig. 8).

Protein양의 A-N 함량 대비 시 protein함량이 낮았던 alcalase 단독 사용 시 추정되는 peptide 길이가 가장 길었으며, 혼합 사용 시 3:1과 2:2의 비율로 혼합 사용하는 것이 가장 낮은 APL의 길이를 보였다. 또한 가수분해물의 가수분해도(DH)를 측정한 결과, APL의 경향과 유사한 경향을 보였다. 짧은 peptide로 구성된 것으로 추정되는 3:1 또는 2:2로 혼합 사용 시 DH는 73.1%와 68.9%로 비교적 높은 가수분해도를 보였다 (Fig. 9).

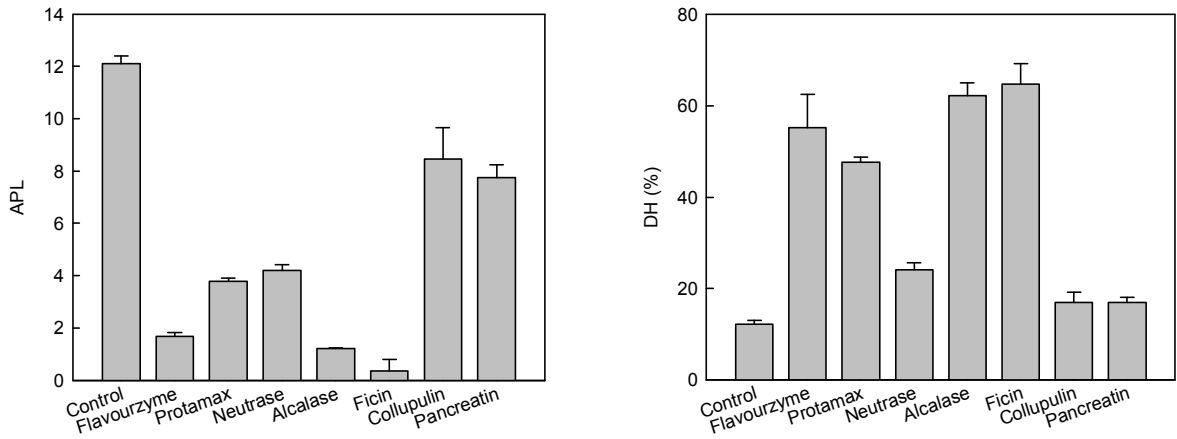
Flavourzyme과 alcalase 혼합 사용시 CHP의 함량을 각각 측정한 결과, flavourzyme과alcalase를 3:1로 혼합 시 가장 높은 38.1  $\mu\text{g/ml}$ 의 함량을 보였으며, 비교적 다른 성분의 함량이 유사하였던 2:2 혼합 비율에서는 CHP 함량은 25.9  $\mu\text{g/ml}$ 으로 다소 낮은 수준이었다 (Fig. 10).

이상의 결과에 의하면 상업용 효소인 flavourzyme과 alcalase를 3:1로 혼합 사용 시 DH와 CHP 함량이 높았으므로 대두 가수분해물 제조에 2가지 효소를 3:1의 비율로 혼합 사용하기로 하였다.

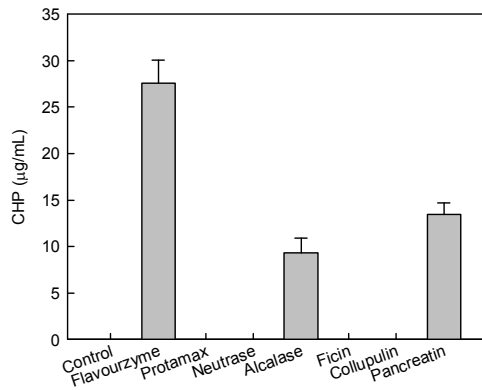
아래 Fig. 5~10 을 통해 주요 연구결과를 나타내었다.



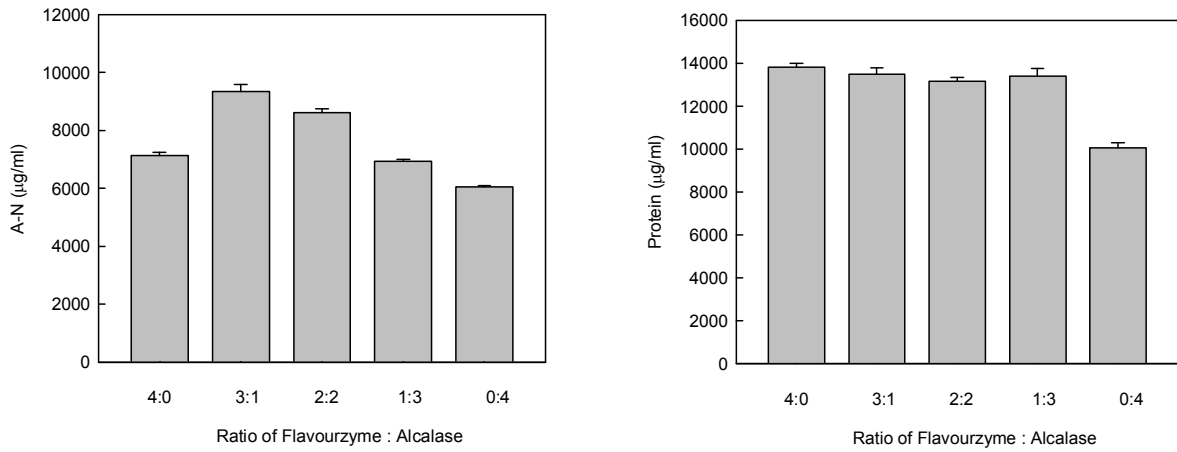
**Fig 5. A-N and protein content of soybean hydrolysate by various enzymes.**



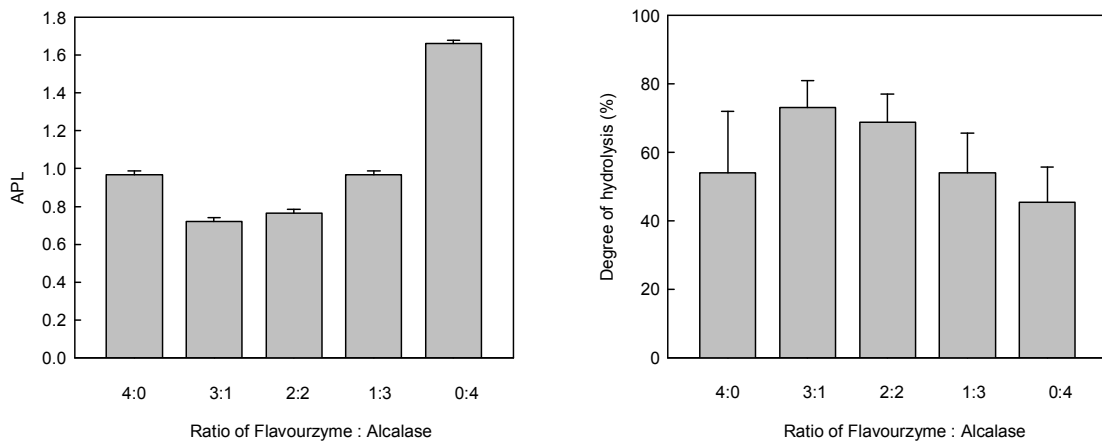
**Fig 6. APL and DH of soybean hydrolysate by various enzymes.**



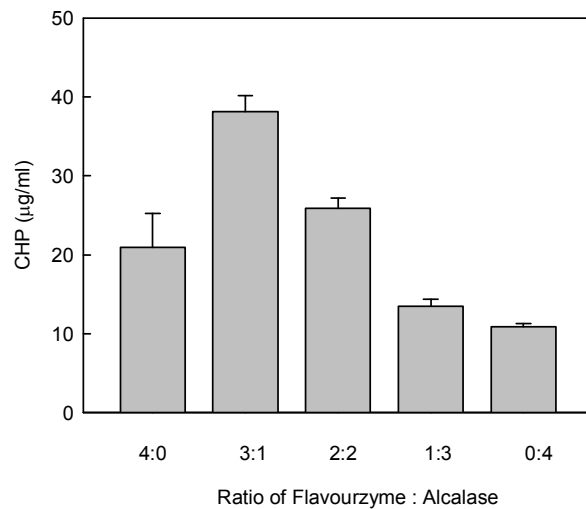
**Fig 7. CHP content of soybean hydrolysate by various enzymes.**



**Fig 8. A-N and protein content of soybean hydrolysate by ratio of flavorzyme and alcalase.**



**Fig 9. APL and DH of soybean hydrolysate by ratio of flavorzyme and alcalase.**



**Fig 10. CHP content of soybean hydrolysate by ratio of flavorzyme and alcalase.**

## (2) 미생물 발효를 이용한 대두 가수분해물 제조 및 CHP 분석

청국장은 *Bacillus* spp.에 의해서 발효되는 식품으로 이 균주들은 내생포자를 생성한다. 수집된 시료 5 g씩 시험관에 넣고, 멸균수 10 ml를 가한 후 80°C에서 15분간 물증탕 하였다. 이 후 상등액을 LB agar 배지에 희석하여 도말하고 호기적 조건 하 37°C에서 2~3일간 배양한 후 colony 색상과 형태 등을 기준으로 균주들을 분리하였다.

분리한 균주들은 Bergey's Manual [16]에 따라 형태학적, 생리학적 특성을 분석하고자, 세포형태, 운동성, 그람 염색, 포자 염색과 catalase 활성을 분석하였다. 분리 균주들의 생장곡선 측정은 LB 액체배지 50 ml에 균을 접종하고 37°C에서 58시간 동안 600 nm에서 UV-VIS spectrophotometer (Beckman Du® 650, USA)를 사용하여 흡광도를 측정하였다.

분리된 균주들의 16S rDNA 염기서열을 결정하기 위하여 Weisburg 등 [17]이 제안한 primer를 기초로 제작된 forward primer인 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'와 reverse primer인 5'-GYTACCTTGTTACGACTT-3'을 이용하여 PCR 반응 (GeneAmp® PCR system 2700, Applied Biosystems)을 실시하였다. PCR 증폭산물 중 1.5~1.6 kb에 해당하는 DNA 밴드를 gene clean kit (AtmanBio, Korea)을 이용하여 정제한 후, 유전자 해석센터 (Takara Korea, Co.)에 염기서열 분석을 의뢰하였다. 염기서열 분석을 통하여 얻은 각 균주의 염기서열은 Blast Network Service를 이용하여 NCBI GeneBank database의 염기서열과 비교함으로써 계통분류학적 유연관계를 분석하였다.

시중에서 유통되는 대두 관련 제품인 청국장과 된장을 구입하여 CHP 함량을 측정한 결과, 청국장이 된장에 비해 다소 높은 함량인 3.2-5.7 µg/ml 함량을 보인 반면, 된장은 비교적 낮은 수준의 함량을 보였다 (Table 14). 따라서 청국장에 함유된 균주를 분리하여 대두 발효물을 제조하여 CHP 함량의 증진 여부를 확인하기로 하였다.

청국장으로부터 분리한 미생물을 배양하여 대두 가수분해 활성을 보일 수 있는 단백질 분해활성을 측정한 결과, 단백질 분해능을 가지는 12개의 균주를 분리하였으며, 12개의 균주 중 10 unit 이상의 활성을 보이는 균주는 1, 4, 5, 7번 균주로 각각 14.3, 10.8, 12.4, 10.9 unit의 활성을 보였다 (Table 15).

비교적 유단백 분해능이 높았던 분리균주 1, 4, 5번과 7번 균주의 동정을 실시한 결과, 16S rDNA 염기서열 분석 결과, strain 1과 7은 *Bacillus subtilis* 균주로 동정되었으며, strain 4와 5는 *Bacillus* sp. 균주로 동정되었다 (Fig. 11). 탄수화물의 이용성을 비교한 결과, *Bacillus* sp.에 해당하는 균주 4번 균주와 5번 균주 비교 시 xylose, trehalose, maltose, palatinose, salicin, sorbitol, glucoamine의 이용성에 차이를 보였으며, 1번과 7번 균주도 inositol, arabinose, salicin, sorbitol, glucosamine의 이용성에 차이를 보임에 따라 각각 다른 균주로 추정된다 (Table 16)..

대두 10% 용액에 preculture한 분리균주를 각각 2%씩 접종 후에 30°C에서 6일간

배양을 하면서 protein, A-N과 CHP의 성분 변화를 측정하였다. Protein의 함량 변화는 발효가 진행될수록 점차 감소하는 경향을 보였으며, protein 함량간의 다소 차이는 있었으나 뚜렷한 경향 차이는 없었다. 대두에 함유된 protein은 발효가 진행될수록 가수분해되어 A-N으로 전환되는 것을 확인 할 수 있었다. A-N의 함량은 배양 시간이 증가할수록 점차 증가하는 경향을 보였다. Protein이나 A-N의 함량 변화는 배양 3일 후에 점차 변화 폭이 줄어드는 경향이 나타나 청국장에서 분리한 균주는 3-4일 정도 발효가 적당한 것으로 추정된다 (Fig. 12).

발효과정 중의 CHP 함량 변화를 측정한 결과, 발효초기에 CHP는 검출되지 않았으나, 발효가 진행될수록 함량에 변화를 보였다. Strain 7의 경우 발효 2일째에 CHP 함량이 가장 높았으나 발효가 진행될수록 약간 감소하는 경향을 보였고, strain 5는 발효 시간이 경과할수록 증가하는 경향을 보였다. 반면 strain 1과 4는 발효시간이 증가할수록 약간 증가하다가 다시 감소하는 경향을 보였다. 발효과정에 의해 CHP 함량의 변화는 있지만 분리균주에 의한 CHP 생산을 확인할 수 있었다. 그러나 최소 3-4일 동안 발효과정이 소요되며, 효소 가수분해물에 비해 CHP 함량이 상대적으로 낮은 수준이므로 대두의 CHP 함유 가수분해물 제조에는 발효 방법 보다는 효소를 이용한 방법이 적합하다고 사료되었다.

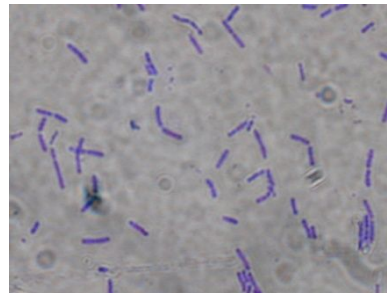
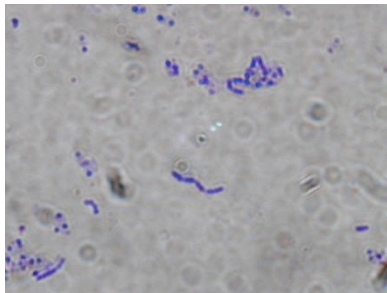
아래 Table 14-16과 Fig 11-12를 통해 주요 연구결과를 나타내었다.

**Table 14. CHP content of commercial chungkukjang and doenjang**

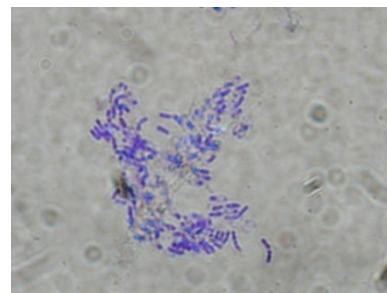
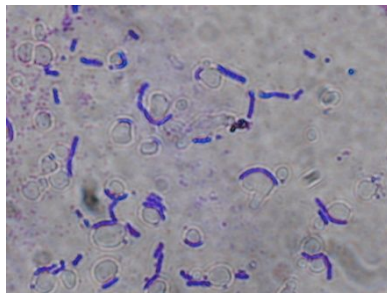
시료	시료량	추출물량 (g)	CHP ( $\mu\text{g/ml}$ )
청국장 A	40 g/200 ml	4.24	4.2
청국장 B	40 g/200 ml	4.31	5.7
청국장 C	40 g/200 ml	3.94	3.2
된장 A	40 g/200 ml	3.98	-
된장 B	40 g/200 ml	3.21	3.2
된장 C	40 g/200 ml	3.88	-

**Table 15. Caseinolytic activity of strains from Chungkookjang**

Strain	Unit	Strain	Unit	Strain	Unit
1	14.3	5	12.4	9	4.3
2	4.8	6	7.1	10	6.2
3	4.9	7	10.9	11	7.8
4	10.8	8	2.6	12	9.4



Strain 1 and 7 (*Bacillus subtilis*)



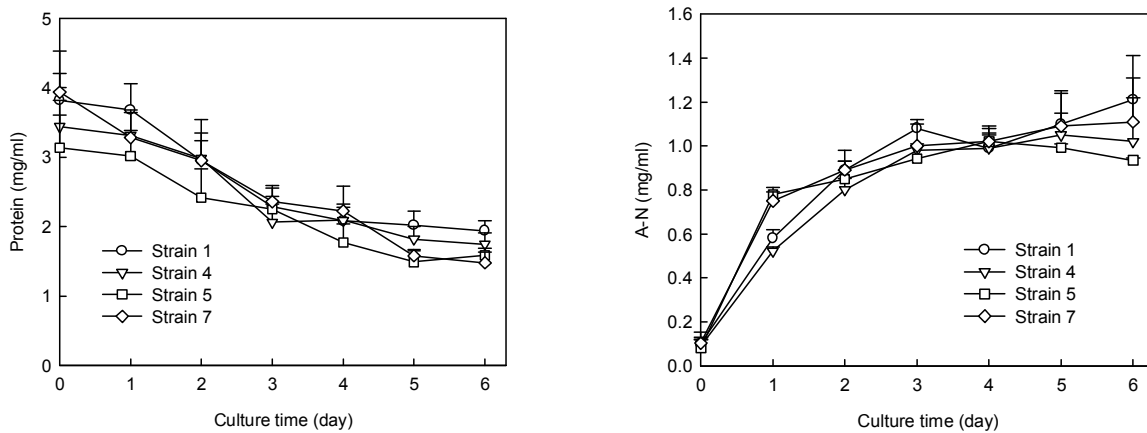
Strain 4 and 5 (*Bacillus* sp.)

**Fig 11. Morphology of isolated strain from Chungkukjang.**



**Table 16. Carbohydrate utilization of the isolated strains from Chongkukjang**

Carbohydrate	Strain			
	4	5	1	7
Sucrose	+	+	+	+
Tagatose	-	-	-	-
Glucose	+	+	+	+
Inositol	-	-	-	+
Galactose	-	-	-	-
Arabinose	-	-	+	-
Xylose	+	-	+	+
Mannitol	+	+	+	+
Raffinose	-	-	-	-
Salicin	+	-	-	+
Amygdalin	-	-	-	-
Inulin	+	-	+	+
Ribose	-	-	-	-
Maltose	+	-	+	+
Trehalose	+	-	+	+
Palatinose	+	-	+	+
Sorbitol	-	+	+	-
N-Acetyl-D-Glucosamine	+	+	+	+
Amylopectin	-	-	-	-
Arabitol	-	-	-	-



**Fig. 12. Changes of protein and A-N content during fermentation of soybean.**

(3) Flavourzyme/alcalase 가수분해물의 CHP 증진

Flavourzyme과 alcalase 혼합(3:1) 사용에 의한 대두 가수분해물에 들어있는 CHP는 펩타이드로 알콜에 의해 정제가 가능하므로 이를 확인하고자 알콜 분획을 실시한 결과, 60-80% 분획에서 32.9 µg의 CHP가 함유되어 있는 것을 확인하였으며 알콜로 분획 시 알콜 80% 첨가 시까지 침전으로 회수가 되지 않는 것으로 보아 상당히 작은 펩타이드로 구성되어 있고 알콜에 의해 분획되지 않는 것으로 확인되었다 (Table 17).

대두 가수분해물의 CHP 함량 증진을 위해 산처리에 의한 침전으로 회수, 활성탄 처리 및 한외 여과 처리를 실시하여 얻은 건조물의 CHP 함량을 측정된 결과, 수율은 한외여과 (5 kDa 이하 회수)가 71.3%, 산처리가 13.5% 수율을 보였으며, CHP 함량은 한외여과가 1.12%로 가장 높은 수율을 보여 CHP의 함량과 수율이 가장 높은 한외여과가 가장 바람직한 정제과정이라고 사료되었다 (Table 18).

**Table 17. CHP content of alcohol fraction**

Fraction	CHP (µg)
0-30%	-
30-60%	-
60-80%	32.9
Supernatant	1345.7

**Table 18. CHP content after purification treatment**

Treatment	Yield (%)	CHP (%)
Non-treatment	100	0.31
Acid precipitate	13.5	0.84
Active carbon	4.3	0.63
Ultrafiltration	71.3	1.12

※ in vitro 및 in vivo 실험에 사용된 CHP는 모두 위와 같은 방법을 통해 얻은 전통적인 식품소재인 콩 가수분해물을 이용하여 실험하였으며, 필요에 따라 화학적으로 합성된 CHP를 사용하였을 경우 따로 pure-CHP로 표기하였다.

나. Insulinoma cell (in vitro)에서 Cyclo-His-Pro (CHP)의 항당뇨활성

(1) RINm5F Cell의 특성

Insulinoma cell, Insulin 생산

Growth properties (성장특징): adherent, fibroblast type 성장

Cell Passage No.: 20

사용배지: RPMI 1640, 10% FBS, penicillin (100 U/ml), streptomycin (100  $\mu$ g/ml)

37°C CO<sub>2</sub> Incubator에서 배양.

사용목적에 따라 Hemocytometer로 세포수를 측정하여 사용.

(2) RINm5F 세포에서 STZ으로 유도한 당뇨 모델

베타세포에서 제 1형 전 당뇨(prediabetes)모델을 만들기 위해 선택적 베타세포 독성을 나타내는 스트렙토조토신(streptozotocin)을 사용하였다 [18]. 스트렙토조토신은 포도당과 구조적으로 유사한 D-glucosamine의 N-nitroso 유도체로서, deoxyglucose 부분에 의해 베타세포의 세포막 투과를 항진시키며, 뒤이어 nitrosoourea 부분에 의해 세포독성을 발생시켜 세포막 장애와 세포내 상해를 일으키는 것으로 알려져 있다 [19-22].

RINm5F 세포는 여러 가지 약제들(agonist, antagonist)에 의해 인슐린 분비량의 적절한 변화를 나타내는 베타세포주이다 [23]. 특히 glucose 반응성을 보면 낮은 농도에서는 매우 감수성이 높아 전형적인 정상 베타 세포를 나타내나, glucose 농도가 높은 조건에서는 부적절한 감수성을 나타내며 passage number에도 제한을 받는다 [24, 25].

RINm5F 세포에 당뇨유발 약물 streptozotocin을 1.6 mM~3.2 mM STZ 농도 범위 내에서 처리시 대조군에 비해 40~60% 정도의 세포활성을 나타내었다. 그 결과, CHP 항당뇨 활성 측정을 위한 STZ 농도는 1.6 mM과 3.2 mM 사이 적정선인 2 mM로 처리하여 실험을 진행하였다.

생산된 CHP의 생리활성능을 평가해 보기 위하여 in vitro 실험을 통해 인슐린 분비 세포주인 RINm5F에 CHP를 일정농도 처리하여 세포성장효과와 streptozotocin에 의해 유발된 전 당뇨 (prediabetes) 모델 RINm5F 세포에 CHP 처리 후 세포성장 효과를 관찰 하였다 [26]. 그 결과, RINm5F의 항당뇨활성은 CHP의 처리 농도를 0.1 mg/ml의 농도로 처리하였을 때, 약 18% 개선되었다 (Fig. 13-14).

Nitric oxide (NO)는 혈압조절, 신경전달, 혈소판 응집억제, 면역기능 등의 역할을 하는 것으로 알려져 있으며 여러 조직과 세포에서 L-arginine으로부터 nitric oxide synthase에 의해 합성된다. 그러나 NO가 필요이상으로 생성되면 shock에 의한 혈관

확장, 염증반응으로 유발되는 조직손상, 신경조직의 손상 등을 일으켜 생체에 유해한 작용을 나타낸다 [27-29]. 생산된 CHP에 대한 NO 생성능을 측정함으로써 염증반응 억제 효과를 판단할 수 있다. NO 유도체로서 STZ 및 SNAP를 처리하여 분비된 NO를 분석 [30]한 결과, STZ를 처리하여 NO 유도된 그룹이 대조군에 비해 3.3배 증가하였으며, STZ으로 NO 유도 후 0.1 mg/ml CHP 처리군에서는 STZ만 처리한 그룹과 비교시 NO의 생성량이 약 2.3배 감소하였다 (Fig. 15-16). 또한 CHP가 지질과산화에 미치는 영향에 대하여 알아보았다. 지질이 산화되면 세포가 손상되면서 free radical이 지질로부터 전자를 빼앗게 되어 free radical chain reaction mechanism으로 진행된다 [31]. 본 실험에서는 MDA를 표준시료로 하는 TBARS 방법을 실시하였다. STZ 처리군에서는 대조군에 비해 MDA양이 급격히 늘어났지만 CHP를 처리하자 감소하였다. 0.15 mg/ml CHP 처리군에서는 STZ 처리군에 비해 50% 정도 감소하였다 (Fig. 17).

STZ으로 유도한 당뇨 모델인 RINm5F 세포에서 CHP에 의한 apoptosis 현상의 변화를 관찰함으로써 apoptosis의 관계를 알아보고자 DNA Fragmentation, Bcl-2/Bax Expression, Caspase-3 Activity, PARP Cleavage를 확인하였다. Apoptosis 유발 정도를 genomic DNA 분리 및 agarose 젤 전기영동에 의한 관찰 결과, STZ에 의한 apoptosis의 특징적인 현상인 ladder DNA[32-34]가 관찰되었다. STZ가 처리된 세포에 CHP를 처리하여 apoptosis 저해 현상을 관찰한 결과, DNA ladder 감소 현상이 관찰되었다 (Fig. 18). Bcl-2/Bax 발현양을 Western blot을 통해 확인해 보니 Bcl-2 단백질은 STZ를 처리한 그룹이 대조군에 비해 2배 감소된 반면 Bax 단백질은 1.5배 증가하였다. Bcl-2/Bax 비율은 CHP 0.05 mg/ml 처리군 1.01, 0.1 mg/ml 처리군 1.61, 0.15 mg/ml 1.52로 STZ 0.33에 비해 증가하였다 (Fig. 19). Caspase-3 활성은 cleavage 된 19 kDa 단백질에 의해 결정된다. STZ를 처리한 그룹이 대조군에 비해 21배 증가하였고 0.15 mg/ml CHP 처리군에서는 STZ만 처리한 그룹에 비해 2.8배 감소하였다. 이는 CHP가 Caspase-3 활성 억제를 통해 RINm5F 세포를 apoptosis로부터 보호할 수 있다는 것을 나타낸다 (Fig. 20A). PARP의 경우 116 kDa 밴드가 STZ군에서 감소하지만 cleavage 된 85 kDa 밴드는 대조군에 비해 STZ 처리군이 83배 증가하였고 0.1 mg/ml CHP 처리군에서는 STZ만 처리한 그룹에 비해 3배 감소하였다 (Fig. 20B).

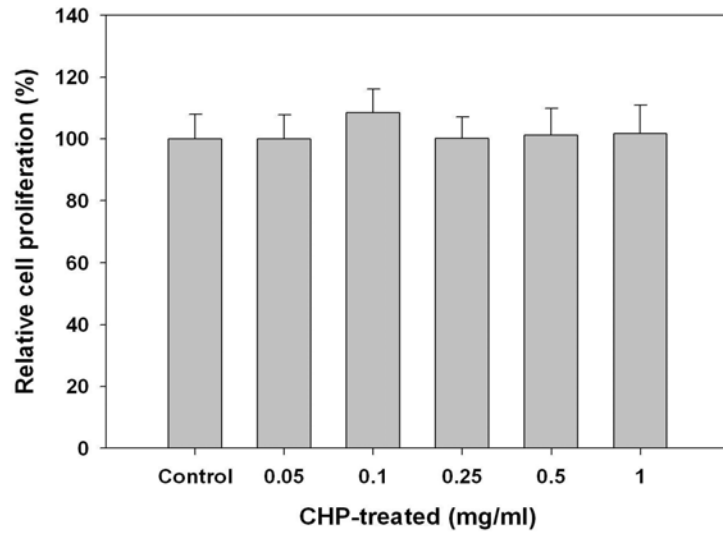
Morphology 변화와 세포활성 정도를 관찰한 결과, 2 mM STZ로 유도된 모델의 경우 세포수가 현저하게 감소하는 현상을 보여 주고 있으나, STZ으로 유도된 모델에 CHP를 처리하였을 때 훨씬 경미한 변화가 관찰되었다 (Fig. 21).

RINm5F 세포는 인슐린을 생산하고 분비하는 RIN-m 쥐(Rat)의 소도세포에서 파생된 세포다 [35]. STZ와 CHP가 인슐린 분비에 영향을 미치는지 알아보기 위해 인슐린

을 측정하였다. STZ를 처리군은 대조군에 비해 인슐린 수준이 약 54.6% 정도 감소했고, CHP를 처리하자 인슐린 분비기능이 개선되어 0.15 mg/ml CHP 처리군에서는 인슐린 수준이 STZ 처리군에 비해 71% 높아졌다 (Table 19).

그 결과, *in vitro*에서 항당뇨 효과를 나타낸 CHP를 이용하여 *in vivo* 모델인 STZ 처리에 의해 유발된 제1형 당뇨 쥐에서 항당뇨 효과를 분석하였다.

**A**



**B**

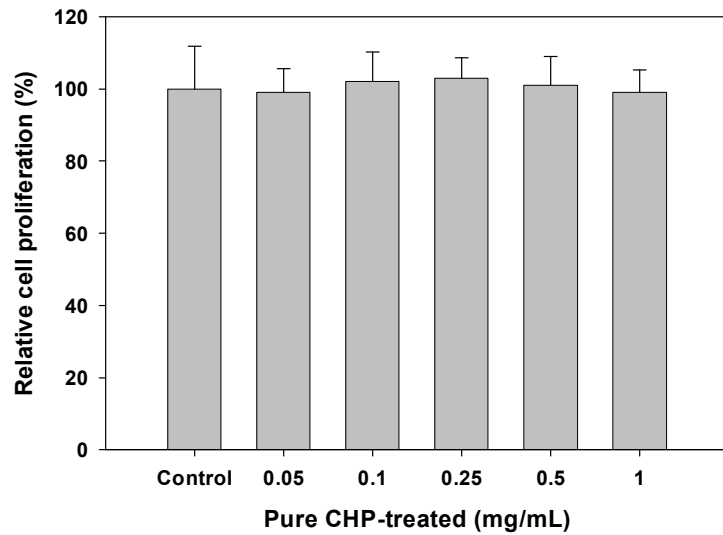
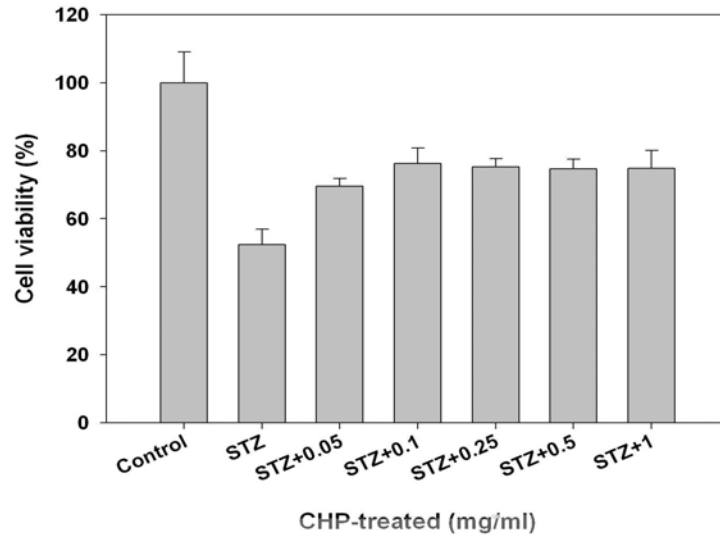


Fig. 13. Effect of Cyclo-His-Pro (CHP) on proliferation of rat insulinoma RINm5F cells. (A) Korea CHP (B) Pure CHP

A



B

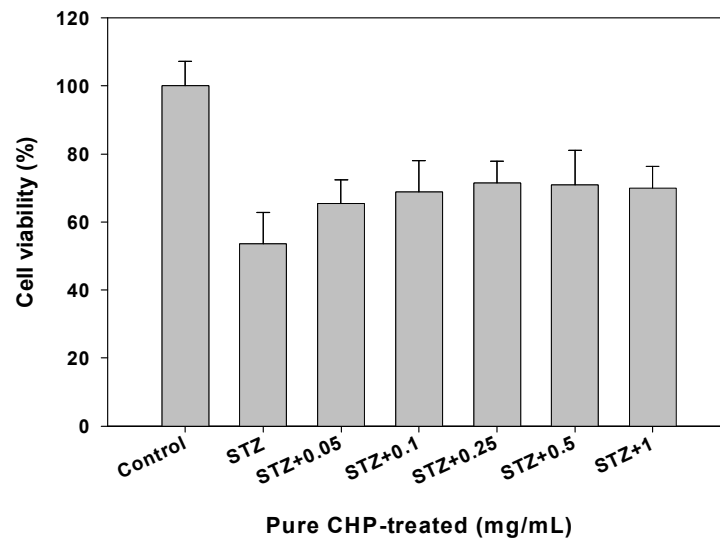
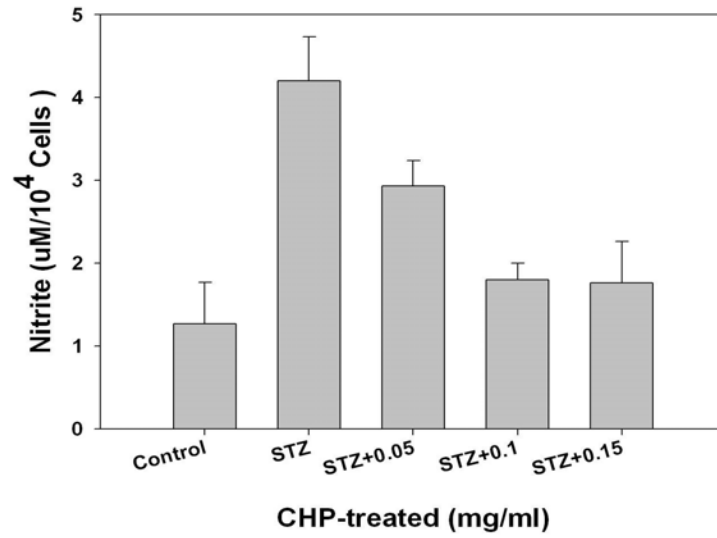
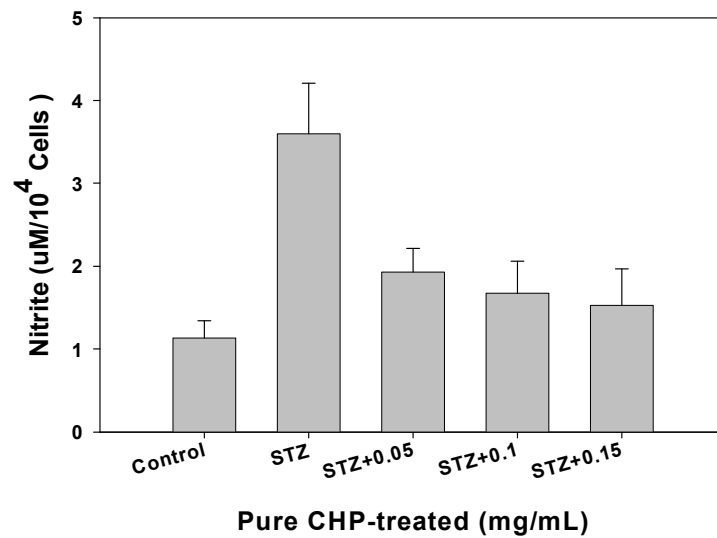


Fig. 14. Effect of Cyclo-His-Pro (CHP) on proliferation of rat insulinoma RINm5F cells after streptozotocin (STZ) treatments. (A) Korea CHP (B) Pure CHP

A

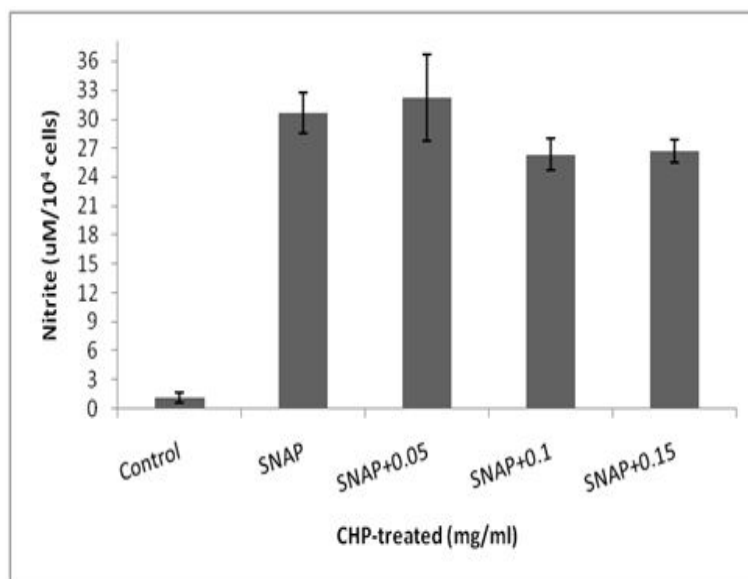


B



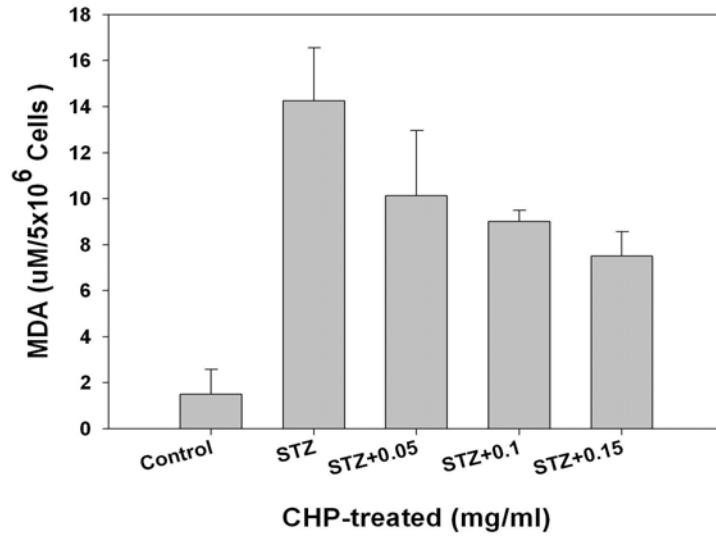
**Fig. 15. Effect of 24 h streptozotocin treatment on the levels of nitrite generation in the RINm5F cells.** The columns represent the M of nitric oxide (NO), in terms of nitrite (NO<sub>2</sub>), formed 104 RINm5F cells. Data are means ±S.D. (A) Korea CHP (B) Pure CHP





**Fig. 16. Effect of 24 h SNAP treatment on the levels of nitrite generation in the RINm5F cells.** The columns represent the M of nitric oxide (NO), in terms of nitrite (NO<sub>2</sub>), formed 10<sup>4</sup> RINm5F cells. Data are means ±S.D.

A



B

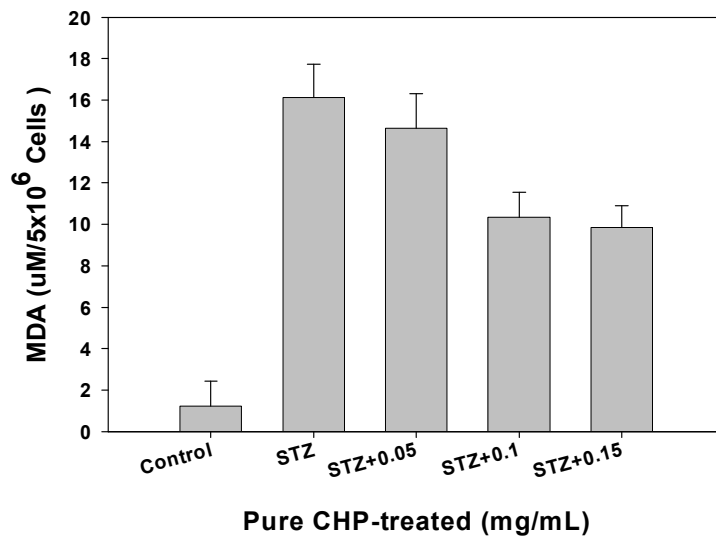
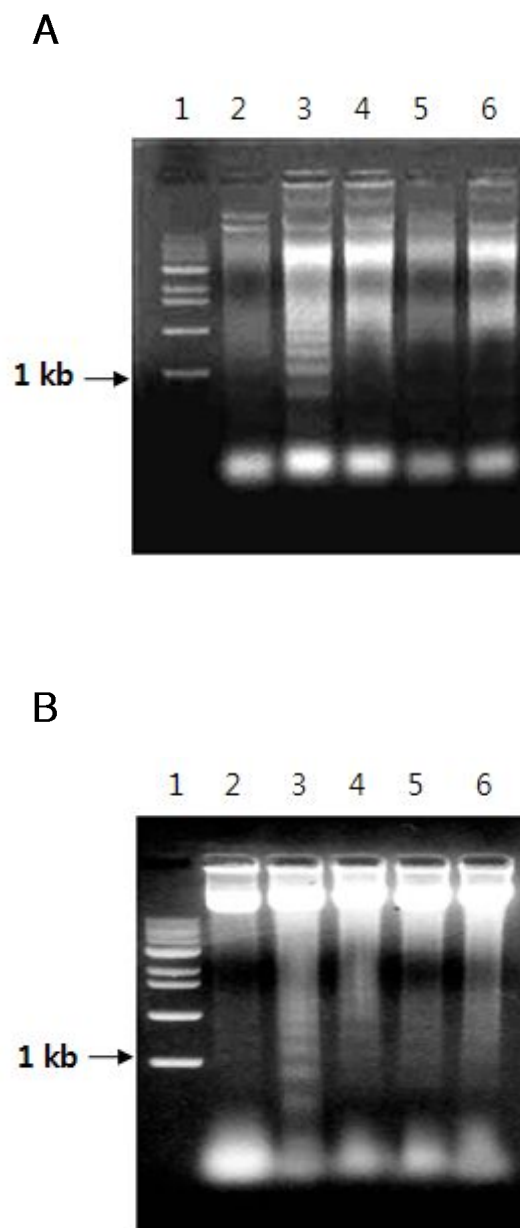
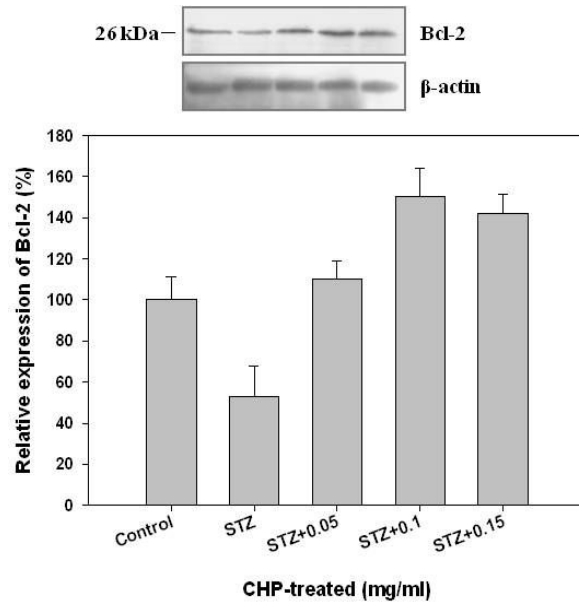


Fig. 17. Effect of CHP on lipid peroxidation in STZ-treated RINm5F cells. Values are mean  $\pm$  SD of triple determinations. (A) Korea CHP (B) Pure CHP

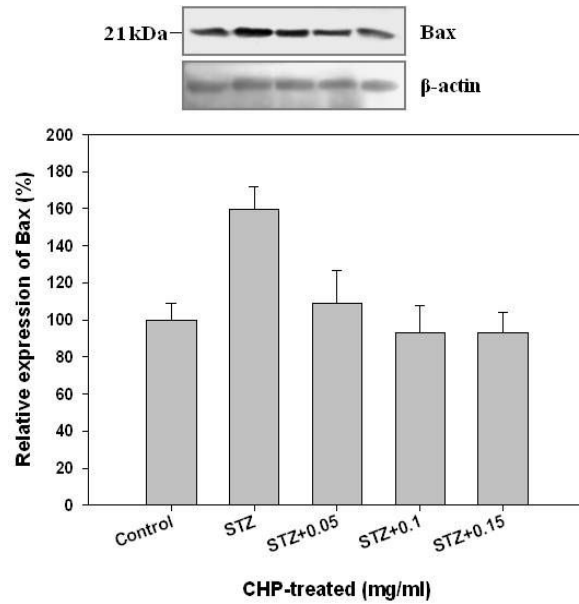


**Fig. 18. Determination of apoptosis by DNA fractionation.** RINm5F cells were pretreated with 2 mM STZ for 30 min and followed by incubation with CHP for 24 h. DNA was extracted and analyzed by 1.2% agarose gel electrophoresis. Lane 1, Marker, Lane 2, control; Lane 3, 2 mM STZ; Lane 4, 2 mM STZ with 0.05 mg/ml CHP, Lane 5, 2 mM STZ with 0.1 mg/ml CHP; Lane 6, 2 mM STZ with 0.15 mg/ml CHP. (A) Korea CHP (B) Pure CHP

**A**

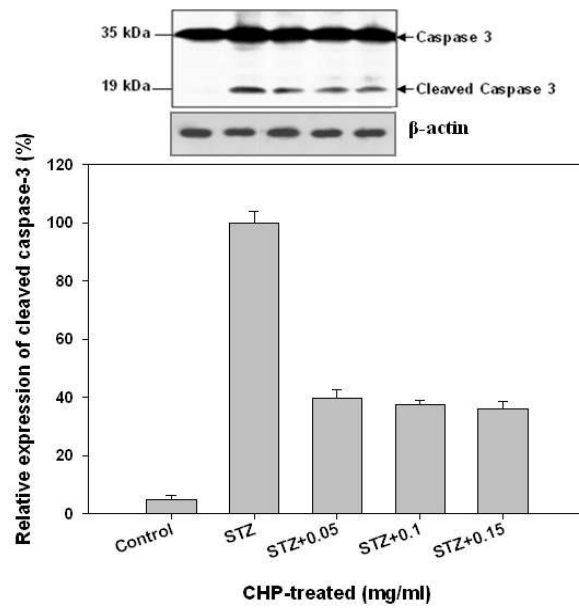


**B**

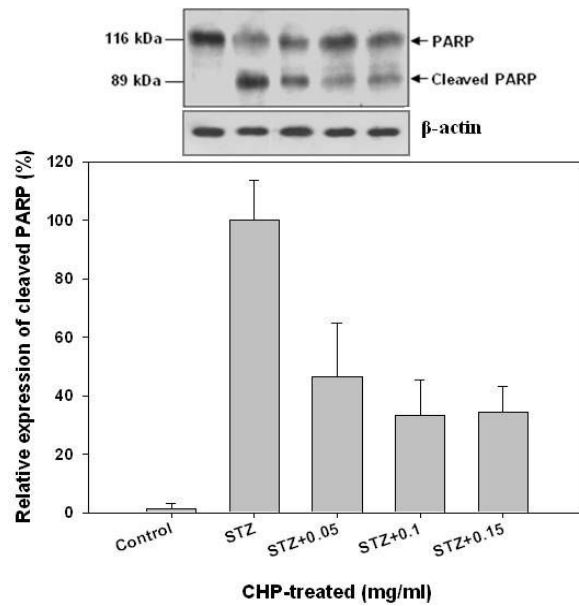


**Fig. 19.** Western blot analyses of Bcl-2 (A) and Bax (B) in RINm5F cells after exposure to STZ and CHP. Values are the mean  $\pm$  SD of triple determinations.

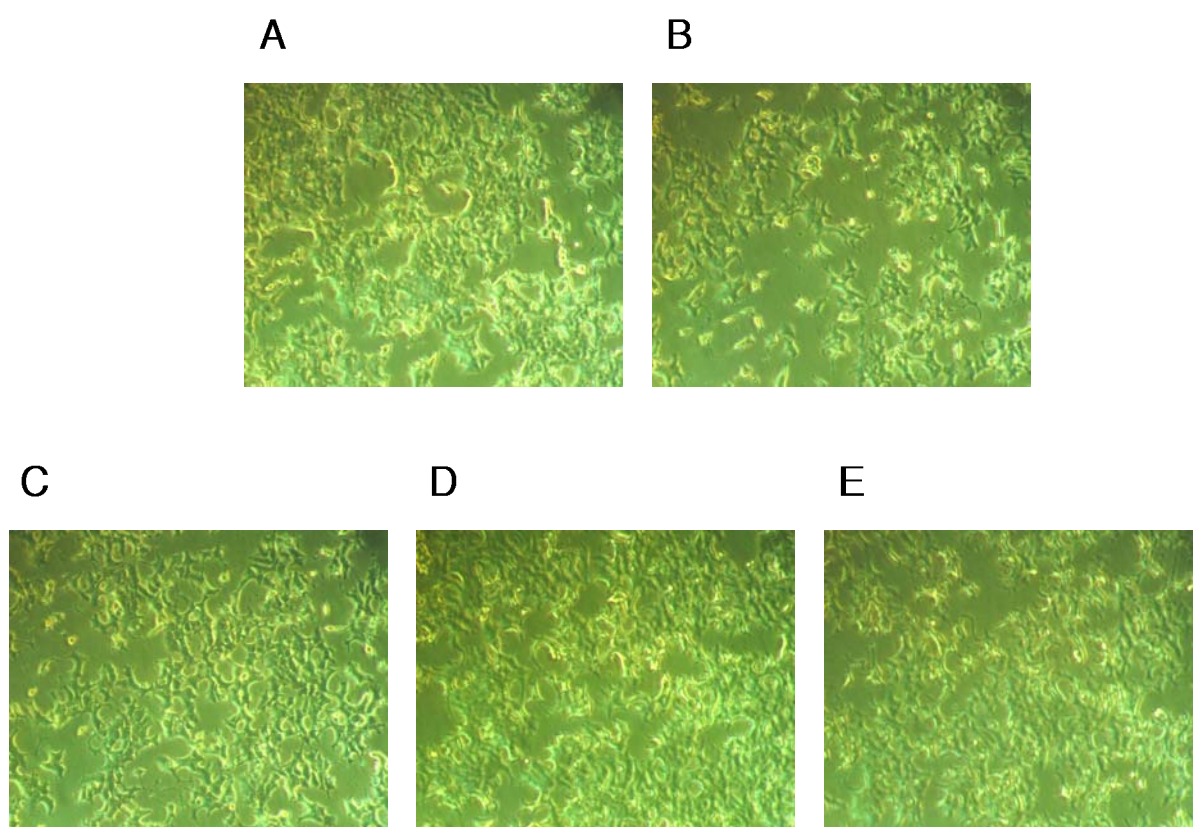
**A**



**B**



**Fig. 20. Inhibitory effects of cyclo(His-Pro) on the activation of caspase-3 (A) and PARP (B) cleavage in STZ-treated RINm5F cells. Values are the mean  $\pm$  SD of triple determinations.**



**Fig. 21. Morphological appearance of the STZ-treated RINm5F cells by inverted microscope.** A: Control; B: 2 mM STZ; C: 2 mM STZ with 0.05 mg/ml CHP; D: 2 mM STZ with 0.1 mg/ml CHP; E: 2 mM STZ with 0.15 mg/ml CHP.

**Table 19. Effect of CHP on insulin secretion in STZ-treated RINm5F cells**

Insulin level (ng/mL)				
Control	STZ	STZ+0.05 mg/mL CHP	STZ+0.1 mg/mL CHP	STZ+0.15 mg/mL CHP
57.99±1.02	31.67±0.92	34.83±0.58	41.32±4.08*	41.61±2.53*
Control	STZ	STZ+0.05 mg/mL pure CHP	STZ+0.1 mg/mL pure CHP	STZ+0.15 mg/mL pure CHP
51.32±3.15	26.38±2.56	29.08±1.62	37.64±3.64*	39.24±1.28*

<sup>a</sup> Values are means ± S.D.

\*  $P < 0.05$ , compared with that in STZ group.

#### 다. 제 1형 당뇨병 항당뇨 활성

##### (1) Rat에서 CHP의 항당뇨 활성 효과

1형 당뇨병 모델 쥐를 위하여 체중이 100-120g인 5주령 Sprague-Dawley 수컷을 구입 (대한바이오링크)하여  $22\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ , 습도  $55\pm 5\%$ , 12시간의 명암 사이클을 유지하는 사육실에서 stainless steel cage에 1마리씩 분리하여 일주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 본 실험에 들어갔다. 실험기간동안 물과 식이는 자유롭게 섭취케하며 사육하였다.

In vitro에서 항당뇨 효과를 나타낸 CHP를 이용하여 항당뇨 활성 검증을 위한 in vivo assay를 위하여 streptozotocin (Sigma chemical Co., 50 mg/체중 1 kg /0.01 M citrate buffer, pH 4.5)을 1회 근육 주사하여 실험적으로 IDDM 형태의 당뇨병 유발된 실험 동물 rat을 이용하였다. 항당뇨 활성 검증에 사용된 rat을 4 group으로 나누어 [Normal, STZ, STZ+CHP (1 mg/kg body weight), STZ+CHP+Zinc (CHP+Zinc : 1 mg/kg+10 mg/kg body weight)] 혈당을 23일 동안 분석 한 결과, 대조군에 비해 CHP 및 CZ 처리 그룹에서 각각 56% 와 20% 혈당 강화 효과를 나타내었다 (Fig. 22).

##### (가) CHP처리에 따른 포도당부하시험

CHP를 경구 투여하여 지속적인 혈당 강화 효과를 나타내는 시점인 23일째 포도당 부하 시험 (OGTT)을 하였다. 포도당 부하 시험 15시간 전부터 절식한 후, 포도당을 1 g /체중 1 kg의 농도로 구강투여 하였다. 포도당 처리 후, 0, 30, 60, 120, 180분에 꼬리 부분 정맥에서 얻은 혈액 샘플을 이용하여 혈당을 측정 한 결과, 포도당 수치는 초기 포도당 과부하가 일어난 후에 당뇨병 쥐의 혈당이 높은 수준으로 유지되는 경향을 보였으며 CHP 투여 쥐의 혈당은 120분부터 초기 정상 수준으로 나타났다. 그 결과, 포도당 내성이 현저하게 개선된 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 23).

##### (나) CHP 처리에 따른 체중 변화 및 식이량

당뇨병은 체중 감량을 특징으로 하며 STZ 유도 1형 당뇨병 모델에서 세포외 다당류와 생약재와 같은 저혈당 처리를 하면 회복된다 [36, 37]. 1형 당뇨병 모델에서 체중 증가 및 식이량 효율에 대한 CHP의 효과를 관찰 한 결과, 대조군에 비해 STZ 처리군이 체중 있으나 대조군과 CHP 처리군 비교 시 큰 변화는 없었다. 식이량 효율에 있어서는 대조군에 비해 STZ 처리군, CHP 처리군 모두 감소하였다 (Table 20). Sprague-Dawley Rat에 STZ를 주사한 당뇨병 모델에 CHP를 식이 후, STZ 처리군에서는 몸이 위소해지고 소변양 증가 및 털의 윤기 등과 같은 외형적인 변화를 관찰하였고 CHP 처리군에서는 많이 회복되어 대조군과 비슷한 양상을 보였다 (Fig, 24).



(다) CHP처리에 혈중 인슐린 변화

콩 가수분해물인 CHP의 메커니즘을 관찰하기 위해 1형 당뇨병 모델에 경구 투여 후, 혈장내 인슐린 수치에 미치는 효과를 시험 하였다. 21일 동안 CHP 처리 후 대조군 ( $15.23 \pm 0.51$ ) 과 비교 시 STZ( $5.38 \pm 0.23$ ) 처리군의 인슐린 농도는 혈중 인슐린 레벨이 약 3배 정도 감소하였으며, CHP 처리군( $9.72 \pm 0.70$ )에서는 STZ 처리군에 비해 혈중 인슐린 레벨이 약 2배 정도 증가 하였다 (Table 21).

(라) 혈중 총콜레스테롤 및 중성지방

혈액 내의 총콜레스테롤과 중성지방을 측정하기 위하여 혈액을 분석하였다. 콜레스테롤이나 중성지방의 지속적인 증가는 고지혈증이 초래되며 결국에는 심장의 관상동맥경화나 뇌동맥경화를 유도한다. 대사증후군을 구성하는 위험인자들로는 비만, 혈당 상승을 동반하는 인슐린 저항성, 혈중 인슐린 농도의 상승, 고혈압, 중성지방의 상승과 낮은 농도의 고밀도 지단백 (콜레스테롤)이 있다. 혈장 지질 바이오마커 (중성지방과 총콜레스테롤)는 CHP 처리 21일째 얻어진 혈액으로부터 혈장을 분리하여 분석하였다. 분석한 결과 총콜레스테롤과 중성지방의 수치는 대조군의 총콜레스테롤은  $127.92 \pm 1.21$  mg/dl 이며 중성지방은  $132.58 \pm 4.11$  mg/dl 이었으며, STZ 처리군에서는 각각  $136.39 \pm 6.77$  mg/dl 와  $287.42 \pm 15.05$  mg/dl 수준으로 증가하였으나 CHP 처리에 의하여 각각  $111.67 \pm 8.18$  mg/dl 와  $148.06 \pm 12.32$  mg/dl 수준으로 정상수준으로 회복되었다 (Table 22). 그러므로, 1형 당뇨병모델 쥐에서 관찰된 증가된 총콜레스테롤과 중성지방은 STZ 유도로 인해 악화된 간 기능의 결과라고 할 수 있다 [38].

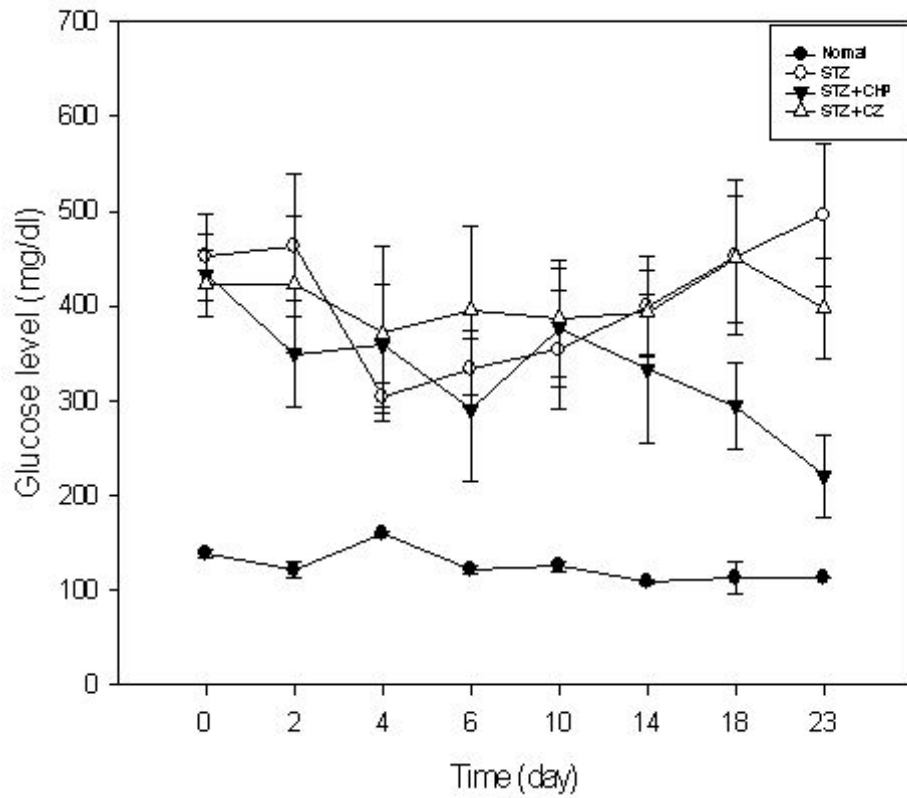


Fig. 22. Effect of CHP on the plasma glucose levels in Rat.

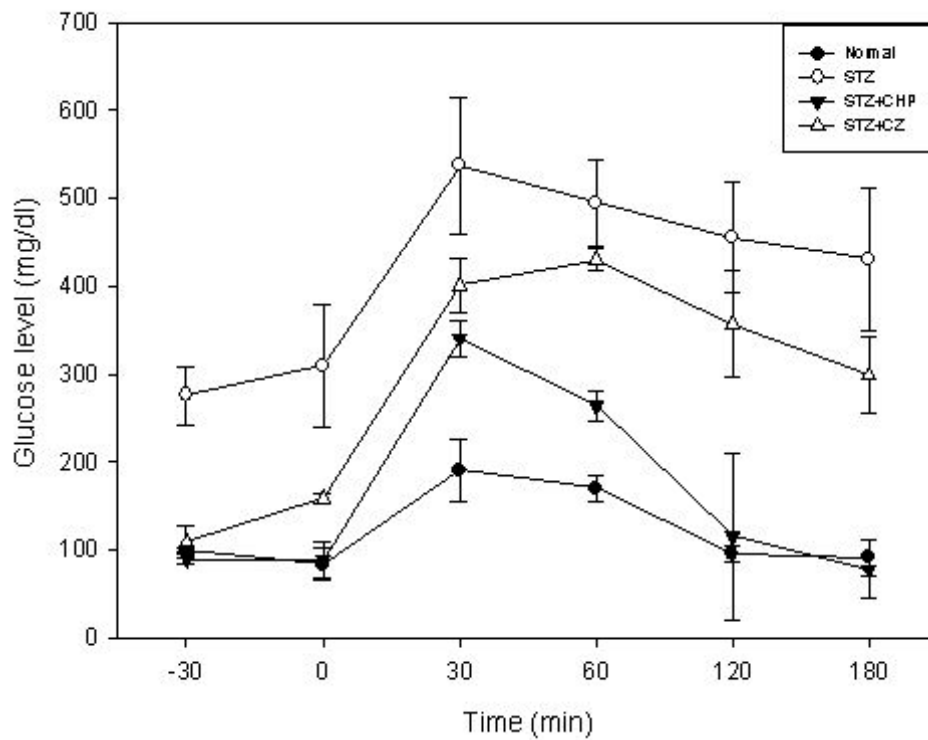


Fig. 23. Effect of CHP on glucose tolerance in Rat.

**Table 20. Effect of CHP on the body weight gain and food intake in STZ-induced diabetic rats for 21 days.**

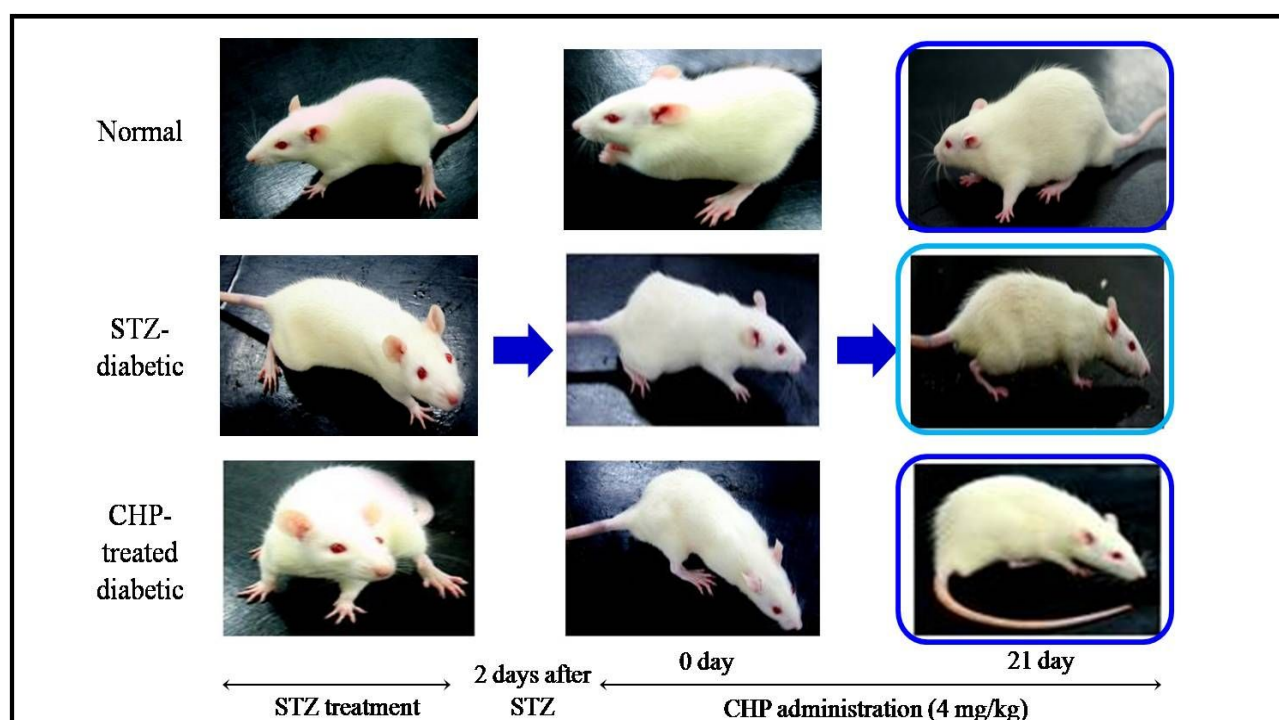
Group	Body weight gain (g/day)	Food intake (g/day)	Food efficiency ratio <sup>b</sup>
Control	5.57±0.43	36.71±0.91	0.15±0.02
STZ	3.56±0.67	31.71±0.27*	0.11±0.03*
CHP	5.04±0.89	31.41±0.69**	0.16±0.02**

<sup>a</sup> Values are means ± S.D. (n=7)

<sup>b</sup> Body weight gain/Food intake

\*  $P < 0.05$ , compared with that in control group

\*\*  $P < 0.05$ , compared with that in STZ group



**Fig. 24. Anti-diabetic activity** : morphological change during the experimental period.

**Table 21. Effect of CHP on plasma insulin levels in the STZ-induced diabetic rat**

Group	Plasma insulin level (ng/mL)	
	Day 0	Day 21
Control	11.60±0.20	15.23±0.51
STZ	6.91±0.09	5.38±0.23*
CHP	6.97±0.12	9.72±0.70**

<sup>a</sup> Values are means ± S.D. (n=7)

\* *P*<0.05, compared with that in control group

\*\* *P*<0.05, compared with that in STZ group

**Table 22. Effect of CHP on plasma levels of total cholesterol and triglyceride in the STZ-induced diabetic rat**

Group	Total cholesterol (mg/dl)	Triglyceride (mg/dl)
Control	127.92±1.21	132.58±4.11
STZ	136.39±6.77	287.42±15.05*
CHP	111.67±8.18	148.06±12.32**

<sup>a</sup> Values are means ± S.D. (n=7)

\* *P*<0.05, compared with that in control group

\*\* *P*<0.05, compared with that in STZ group

(2) Mouse에서 CHP의 항당뇨 활성 효과

1형 당뇨병 모델 쥐를 위하여 체중이 23-28 g인 5주령 ICR mouse 수컷을 구입 (대한 바이오링크)하여 22±0.5℃, 습도 55±5%, 12시간의 명암 사이클을 유지하는 사육실에서 cage에 1마리씩 분리하여 일주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 본 실험을 행하였다. Streptozotocin (Sigma chemical Co., 50 mg/체중 1 kg /0.01 M citrate buffer, pH 4.5)을 1회 복강 주사하여 실험적으로 IDDM 형태의 당뇨 (300 mg/dl 이상)가 유발된 mice를 이용하였다. 실험기간동안 물과 식이는 자유롭게 섭취케하며 사육하였다.

CHP의 항당뇨활성을 조사하기 위하여 STZ으로 유도된 당뇨모델 ICR mice를 대상으로 1 mg/체중 1 kg의 CHP를 매일 경구투여 하였다. 23일 동안 CHP 투여하여 분석 한 결과, 흥미롭게도 대조군에 비해 실험군에서 30% 정도만 정상 혈당으로 복구하였으며, 포도당 내성은 당뇨그룹과 비교 시 현저하게 개선된 것으로 나타내었다 (Fig. 25).

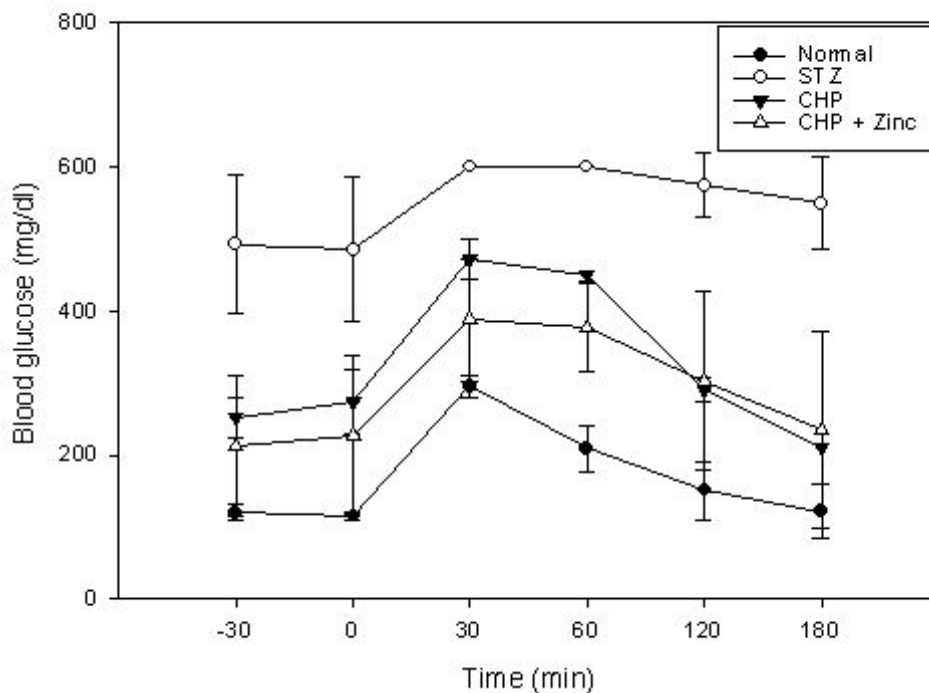
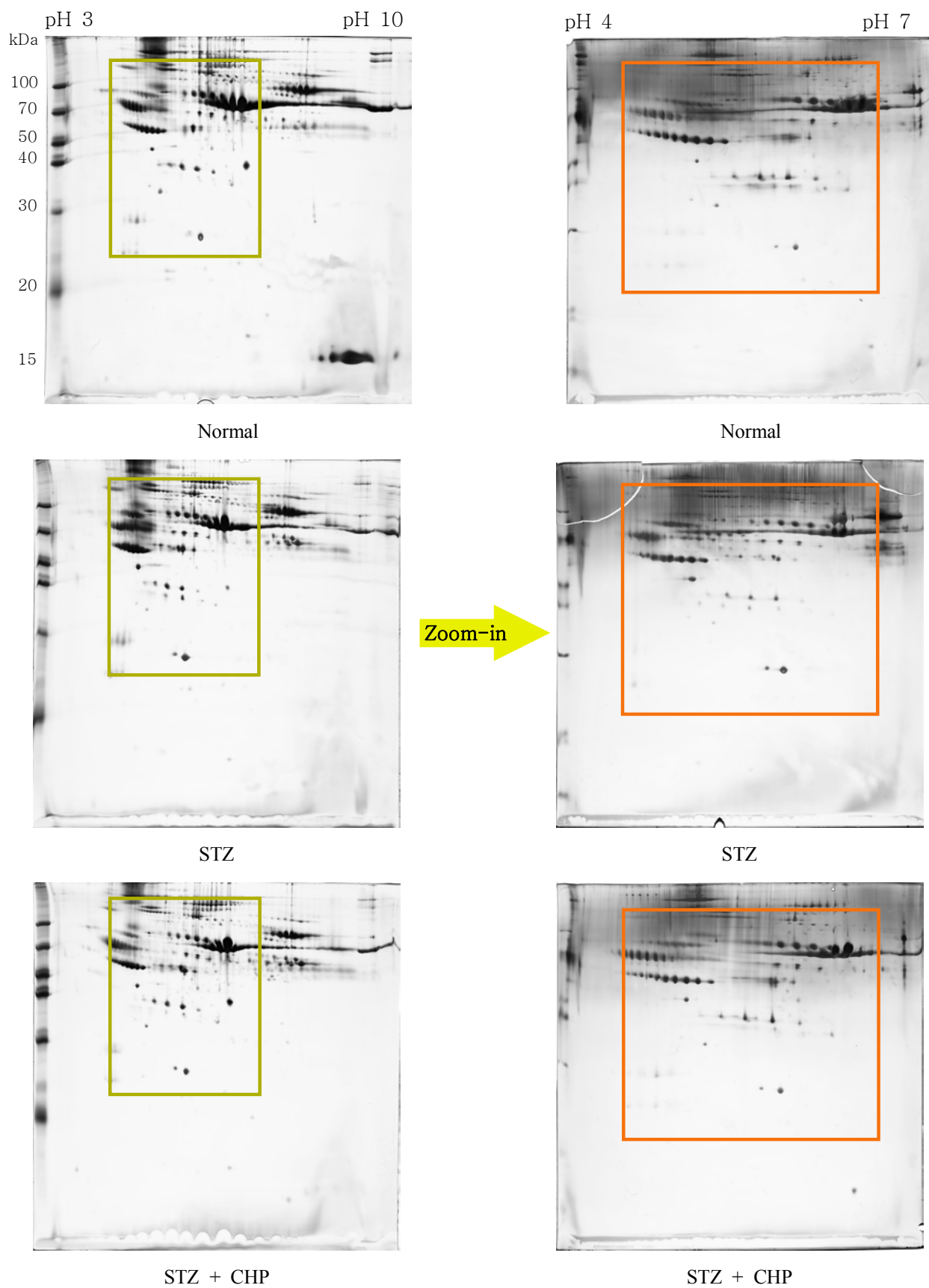


Fig. 25. Effect of CHP on glucose tolerance in ICR mice.

## 라. CHP에 의한 제1형 당뇨병모델의 프로테옴 분석

본 연구에서 CHP를 함유하는 대두 가수분해물을 이용하여 1형 당뇨병 모델에서 얻어진 혈장 (plasma) 및 췌장 조직을 이용하여 이차원 전기영동을 실시하였다. Isoelectric focusing은 IPGPhor (Amersham Pharmacia Biotech)를 이용하여 수행하고, 2-D 전기영동은 Protean IIxL 2D multi cell (Bio-Rad)을 사용한다. 이차원 전기영동은 동물실험이 완료된 후 혈액을 채취하고 원심분리를 통하여 혈장을 얻어서 분석하였으며, 당뇨병에 관련된 단백질을 ImageMaster 2D Platinum Software v4.9 (Amersham Biosciences)로 분석한 결과 약 500여개의 spot들 중 약 50개의 발현 차이를 나타내는 spot들을 선정하였다. Sypro Ruby 시약에 의해 염색된 단백질 spot을 PROTEAN 2-D Spot Cutter로 잘라내어 50 mM의 ammonium bicarbonate (pH 8.5, buffer in 50% CH<sub>3</sub>CN)를 이용하여 세척한 후, digestion buffer 용액 (100 mM ammonium bicarbonate (pH 8.5), 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 10% CH<sub>3</sub>CN, 50 mg sequencing grade trypsin)과 혼합한다 (overnight). 50%CH<sub>3</sub>CN/5% TFA용액을 사용하여 peptide를 추출한 다음, MALDI-TOF 분석과 NCBI database을 이용하여 분석하였다. 그 결과, 제1형 당뇨병에 관련된 혈액내 단백질 ( $\alpha$ 1-AT,  $\alpha$ 1-I III, Apo A-I, Apo, A-IV, Apo E, Cp, Hp  $\beta$ )로서 당뇨병 유발쥐와 비교시 단백질 농도는 정상쥐 수준으로 감소 하는 경향을 나타냈으며, Gc, TTR 단백질은 정상쥐 수준으로 증가 하는 경향을 나타내었다. 이들 단백질중 흥미롭게도 지질대사와 관련된 혈액 단백질들 (Apo A-I, Apo A-IV, Apo E)의 변화가 뚜렷하게 나타났다 (Fig. 26, Table 23). 또한 이차원 전기영동을 이용한 췌장 단백질체 분석결과, 약 2000종 이상의 단백질들이 분리되었으며, 동정된 약 500여종의 단백질 중에서 34종의 단백질의 발현 변화가 크게 나타났다. 그 중 13개의 단백질을 최종적으로 정밀 분석하였으며, 당뇨병 유발 쥐에서의 이들 단백질의 발현은 정상쥐와 비교할 때 9종 단백질 ( $\alpha$ -glucosidas, Ela3b, EIF-5A, NDKs, SOD-1, MYL6, HOXA7, MAWDBP 등)은 증가하였고 4종 단백질 (LAMR1, PRDX4 등)은 감소하는 것을 발견하였다 (Fig. 27, Table 24). 췌장 단백질체 분석 결과에서도 CHP가 단백질 발현에 영향을 미친 것을 확인하였다.

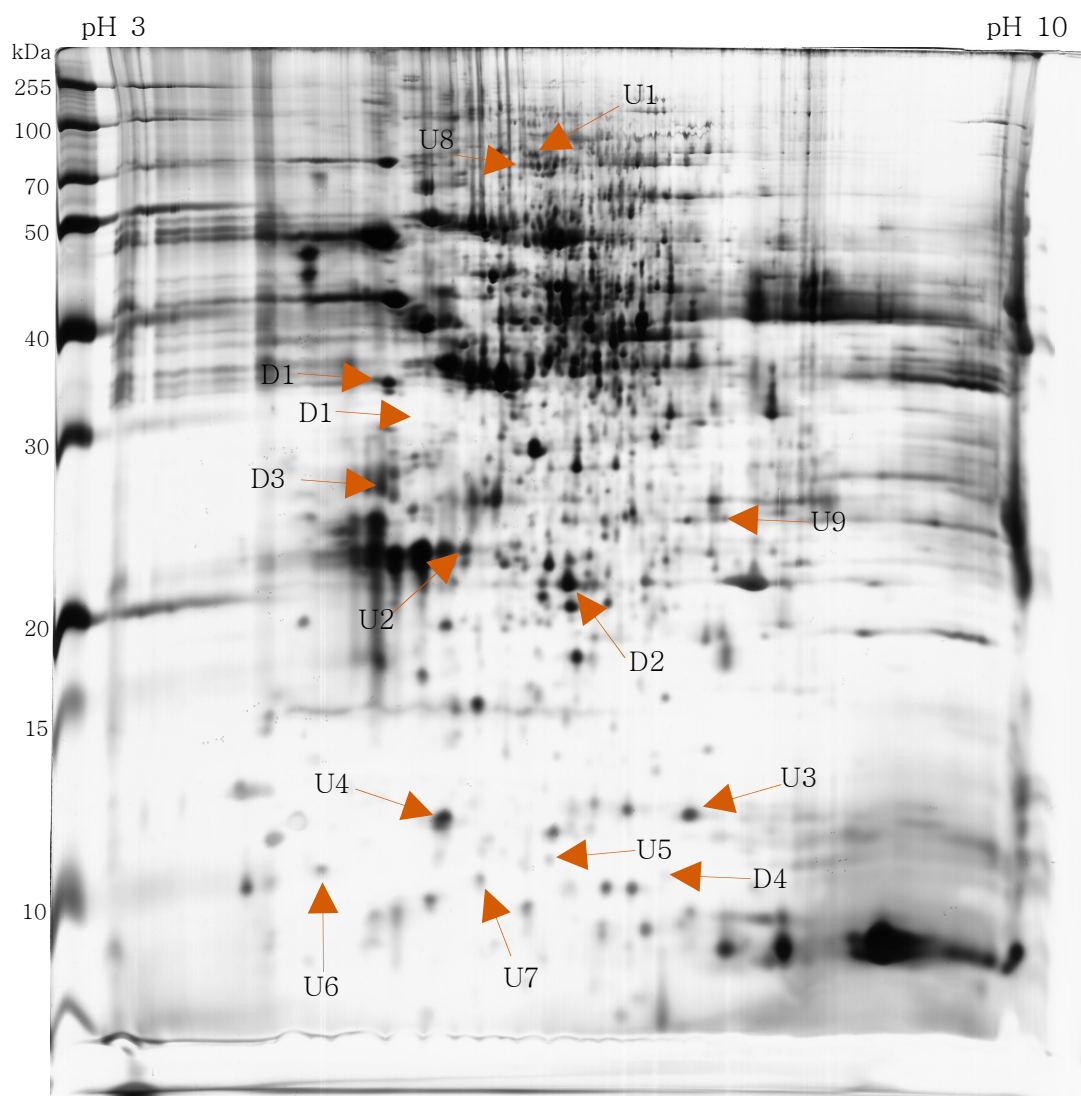


**Fig. 26. Gel image of silver-stained plasma proteins in rat.**

**Table 23. Identification of plasma proteins in rat (CHP).**

Protein name	Description	Acc. No.	kDa	pI	Expression direction	Reference
$\alpha$ 1-AT	Plasma glycoprotein member of the serpin superfamily which inhibits trypsin, neutrophil elastase, and other proteolytic enzymes	gi:112889 P17475	46.14	5.70	↓	Song et al. (2004) McMillan (1989)
$\alpha$ 1-I III	A protease inhibitor with a wide spectrum of protein targets Attaches through its thiolester function	gi:12831225	166.68	5.70	↓	Saso et al. (2000) Komori et al. (1992)
Apo A-I	The major protein of plasma HDL Found in chylomicrons Synthesized in intestine and liver	gi:113997 P04639	30.39	5.52	↓	Yamada et al. (1984)
Apo A-IV	(VLDL) secretion and catabolism Synthesis in intestine	gi:114008 P02651	44.46	5.12	↓	O'Looney et al. (1985)
Apo E	Binding, internalization, and catabolism of lipoprotein particles	gi:1703338 P02650	35.75	5.23	↓	Yamada et al. (1984)
Cp	A blue copper-containing dehydrogenase protein Copper-binding glycoprotein Ferroxidase activity, amine oxidase activity, Copper transport and homeostasis, superoxide dismutase activity	gi:6978695 P13635	120.84	5.34	↓	Prakasam et al. (2003) Kamalakkannan et al. (2003)
Gc	A multifunctional protein in plasma, it carries the vitamin D sterols and prevents polymerization of actin by binding its monomers	gi:139643 P04276	53.54	5.65	↑	Verhaeghe et al. (1990) Nyomba et al. (1985)
Hp $\beta$	Combine with free plasma hemoglobin, preventing loss of iron through the kidneys Protecting the kidneys from damage by hemoglobin	gi:123513 P06866	38.55	6.10	↓	Saso et al. (2000) Engstrom et al. (2003)
Hpx	Bind heme and transports Present at around 1mg/ml in plasma Responsible for transporting haem groups to the liver for breakdown Structurally related to vitronectin and some collagenases	gi:123036 P20059	51.29	7.58	↔	Saso et al. (2000)
TTR tetramer	A prealbumin plasma protein that transports thyroxine A thyroid hormone-binding protein Most abundant in the choroids plexus but also present in the liver	gi:3212535	50.28	5.80	↑	Tuitoek et al. (1996)





**Fig. 27. Silver-stained 2-DE image of rat pancreas tissue.**

**Table 24. Identification of the rat pancreatic proteins downregulated (D) and upregulated (U).**

Spot No.	Gene name	protein	Function	Acc. No.
D1	LAMR1	Laminin receptor 1	Physiologic and pathologic processes Regulatory role in the	gil:8393693
D2	PRDX4	Peroxiredoxin 4	activation of the transcription factor	gil:37590233
D3		Weak spectrum, no identification		Unidentified
D4		Good spectrum, no identification		Unidentified
U1	$\alpha$ -glucosidas	Similar to alpha glucosidase II, alpha subunit	Folding and maturation of glycoproteins	gil:34861580
U2	Ela3b	Similar to elastase 3B, pancreatic	Intestinal transport and metabolism of cholesterol	gil:34872187
U3	EIF-5A	Similar to Eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF-5A) (eIF-4D) (Rev-binding factor)	Nucleocytoplasmic shuttle protein	gil:27672956
U4	NDKs	Nucleoside diphosphate kinase	Nucleotide metabolism and transport	gil:13929192
U5	SOD-1	Dismutase (Cu/Zn superoxide dismutase)	Destroys radicals which are normally produced within the cells and which are toxic to biological systems	gil:818029
U6	MYL6	Myosin light polypeptide 6 (Myosin light chain alkali 3) (Myosin light chain 3) (MLC-3) (LC17)	Regulatory light chain of myosin. Does not bind calcium	gil:2842665
U7	HOXA7	Homeobox protein Hox-A7 (Hox-1.1) (R5)	DNA-binding transcription factor	gil:123220
U8		Weak spectrum, no identification		Unidentified
U9	MAWDBP	MAWD-binding protein	Phenazine biosynthesis-like protein family	gil:19743770

## 마. cDNA microarray 기법을 이용한 유전자 발현양상

Agilent Rat genome 4x44K array (Agilent technologies, CA)를 이용하여 정상대조군, 당뇨유발군과 CHP 투여군 간의 유전자 mRNA 발현을 측정하였다. Array를 수행하여 얻어진 raw data를 통해 전체 유전자발현을 normalization한 후, 유전자발현 증감의 패턴에 따라 hierarchical clustering plot을 통해 확인하였다 (Fig. 28). CHP 처리군에서 유의적인 발현의 변화를 보였던 7198개의 probe를 선별하여 CHP 투여에 따른 유전자 발현양상을 K-means clustering algorithm을 적용하여 조사한 결과 유전자 발현 패턴은 크게 9가지로 나타났다 (Fig. 29). Normalized data를 기준으로 gene functional classification을 통해 4배 이상 증가 또는 감소가 되는 유전자를 확인한 결과, 정상대조군과 비교 시 7198개의 유전자의 변화 패턴을 확인 하였으며, 당뇨유발군에 CHP를 처리하였을 때 1534개의 유전자가 정상대조군 수준으로 mRNA 수준이 증가 또는 감소되는 경향을 나타내었다(Fig. 30). CHP에 의해 주로 cell proliferation, signal transduction, immune response, apoptosis, transport, lipid metabolism, transcription, cell differentiation 관련 유전자들의 증가 및 감소가 조사되었다 (Fig. 31).

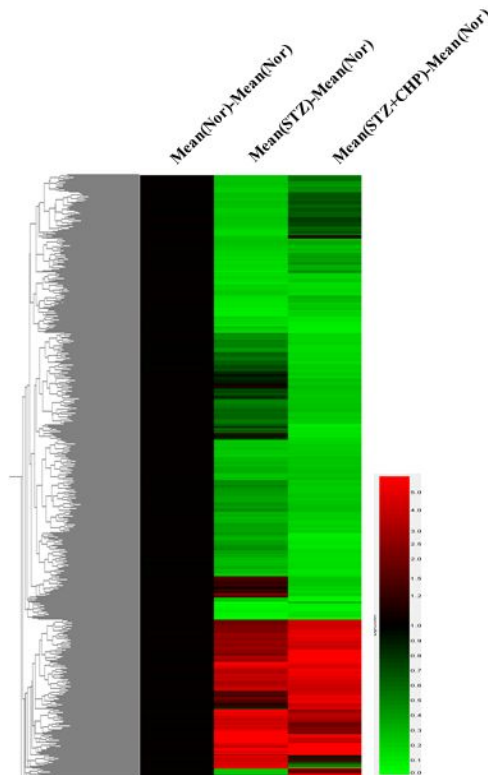


Fig. 28. Changed genes hierarchical clustering

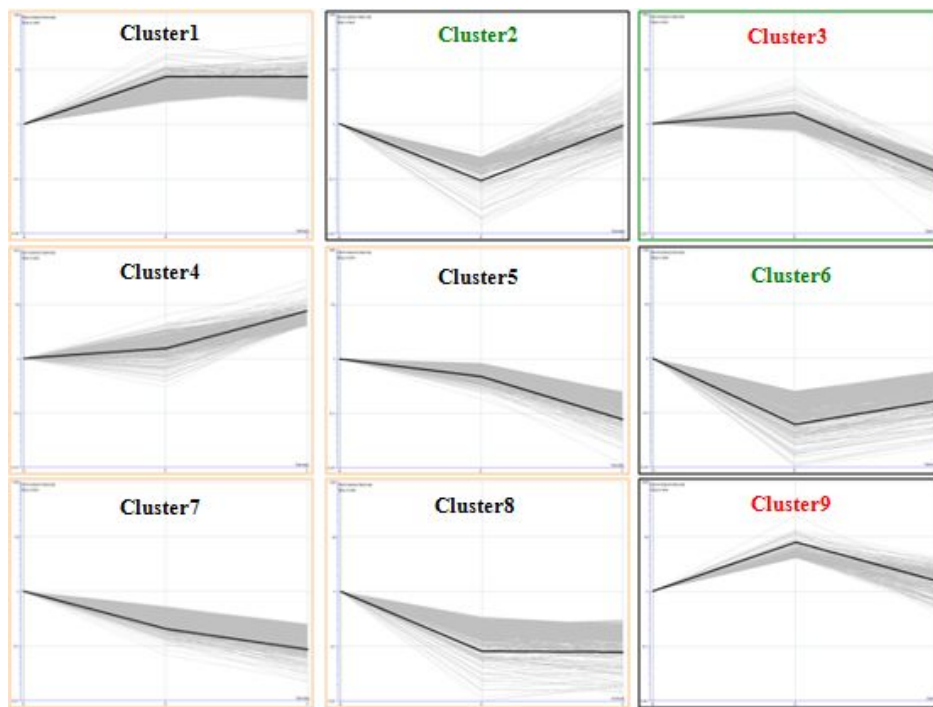


Fig. 29. Dendrogram and clustering of significantly changed genes.

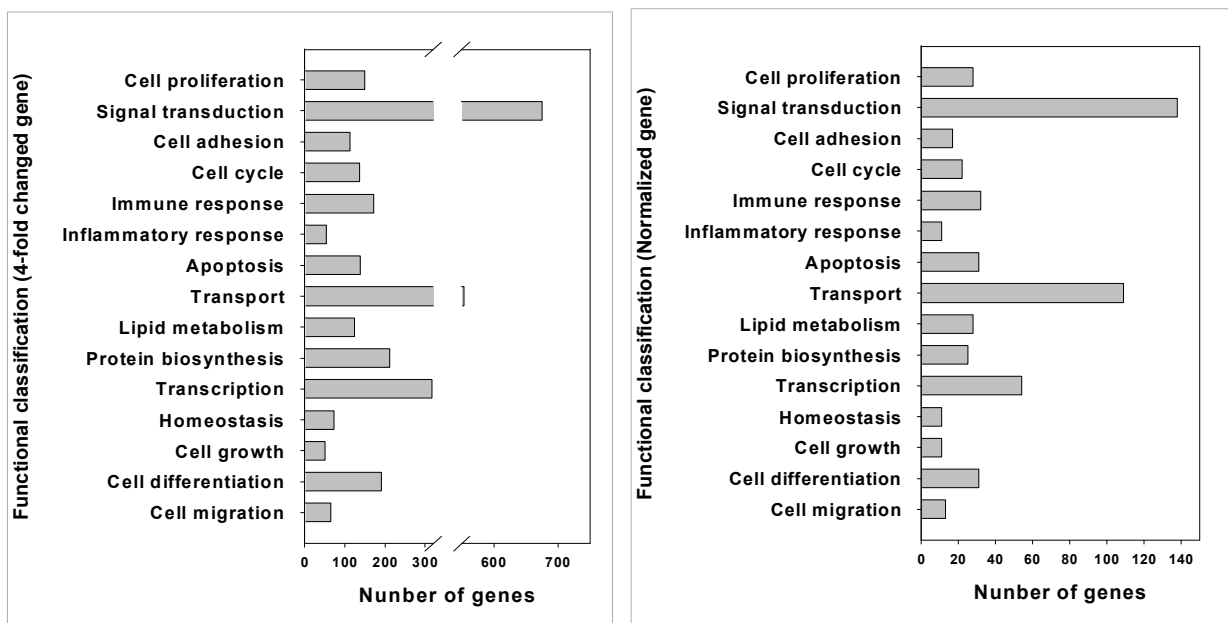


Fig. 30. Functional classification of normalization genes in 4-fold changed pancreatic gene.

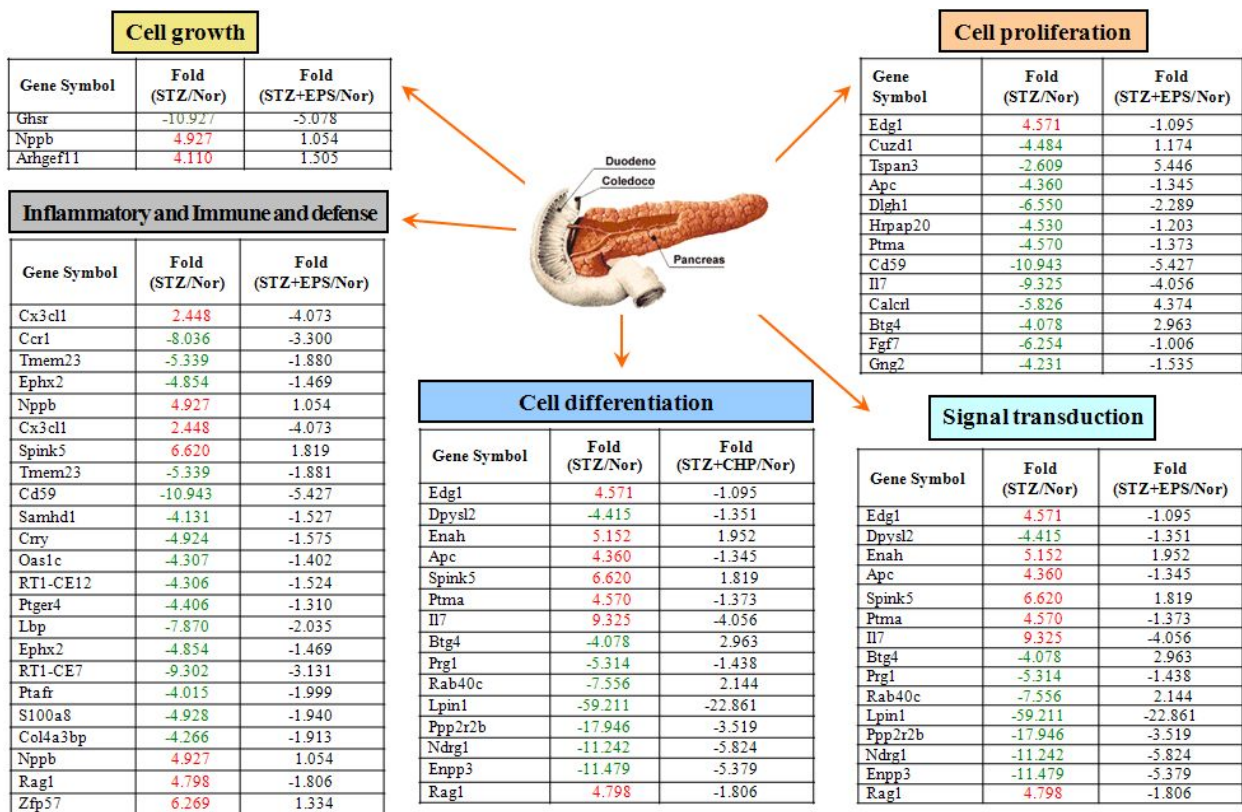


Fig. 31. Illustration of genes clustered by their biological process in response to CHP.

## 바. Rat 췌장의 조직학적 연구

$\beta$ -세포의 파괴와 인슐린 분비상태를 구명하기 위하여 CHP를 23일간 처리 후, 쥐의 췌장조직을 적출하여 조직병리검사 (H&E 염색) 및 Insulin-면역조직화학적 방법으로 분석하였다. STZ로 처리한 당뇨유발 모델에서는 Prasad *et al.* [37]에서 보고된 것처럼 전반적으로 췌장섬이 거의 관찰되지 않았을 뿐만 아니라 극소수 관찰되는 췌장섬에서는 insulin-positive  $\beta$  세포들이 소수 존재하였으며, 면역 반응성 또한 매우 미약하였다. 이와 같은 결과는 STZ로 고혈당이 유발된 당뇨 쥐는  $\beta$ -세포가 파괴되어 인슐린의 분비가 극히 저조하여 그 결과 혈당량이 증가한 것으로 보인다. STZ로 처리한 당뇨유발 모델에 CHP를 처리한 STZ를 투여하고 보통식을 한 대조군에서는 거의 관찰되지 않았던 췌장섬들이 다수 관찰되었을 뿐만 아니라 모든 췌장섬들이 인슐린에 대하여 강한 면역반응성을 보여주어  $\beta$ -세포의 인슐린 합성과 분비가 대조군에 비하여 현저함을 알 수 있었다 (Fig. 32-33). 이와 같은 결과로 보아 CHP를 섭취한 실험군 쥐는 STZ에 의해서 손상된 췌장섬이 회복 또는 재생되어  $\beta$ -세포의 인슐린 분비가 복원되어 가고 있다고 사료되었다.

또한 췌장조직에서 RT-PCR을 통해 mRNA 수준에서 C-reactive protein (CRP)의 발현양을 알아보았다. CRP는 *Streptococcus pneumoniae*의 표면 항원인 C-polysaccharide와 반응하는 단백질로서 염증이나 조직 손상에 비특이적으로 반응하는 대표적인 단백질이다 [39, 40]. 대조군에 비해 STZ 처리군에서 CRP의 양이 약 5배 정도 증가했으나 CHP 처리군에서는 정상수준으로 감소하였다 (Fig. 34). 이는 STZ 처리로 인해 CRP가 증가되면서, 췌장  $\beta$ -세포를 파괴하였다는 것을 알 수 있다. 반면 CHP 처리군에서 CRP의 전사 레벨은 정상수준으로 감소된 것으로 보아 STZ로 파괴된  $\beta$ -세포가 거의 CHP 처리에 의해 회복된 것을 나타낸다.



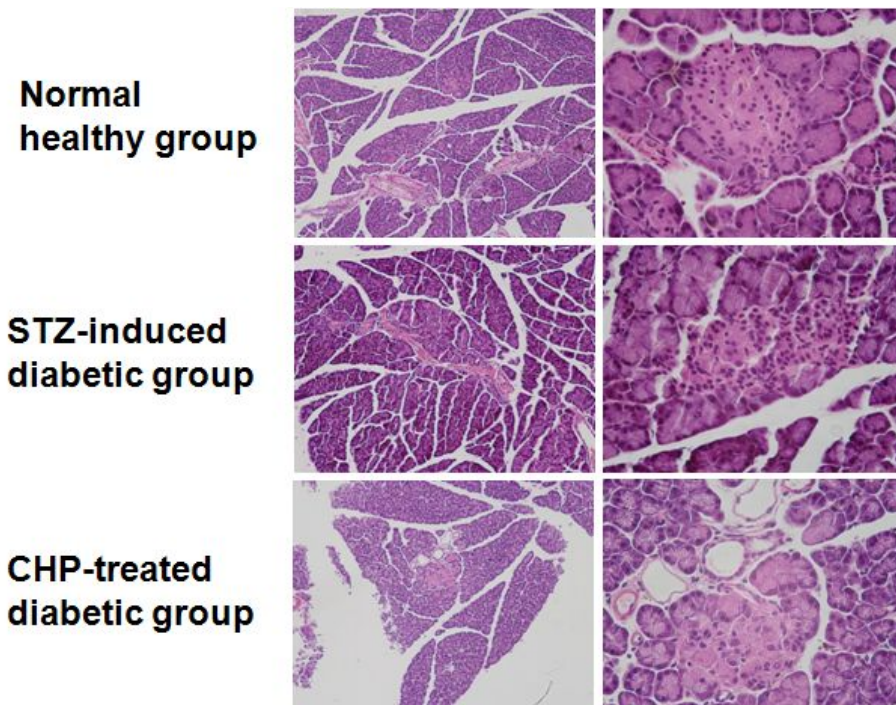


Fig. 32. Hematoxylin and Eosin staining of rat pancreas tissue.

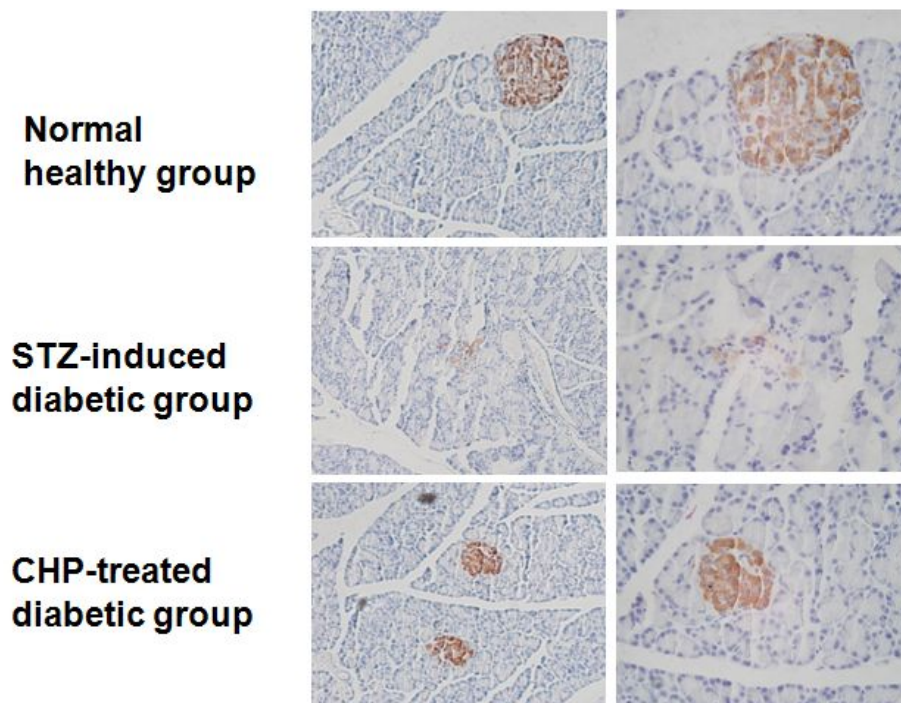
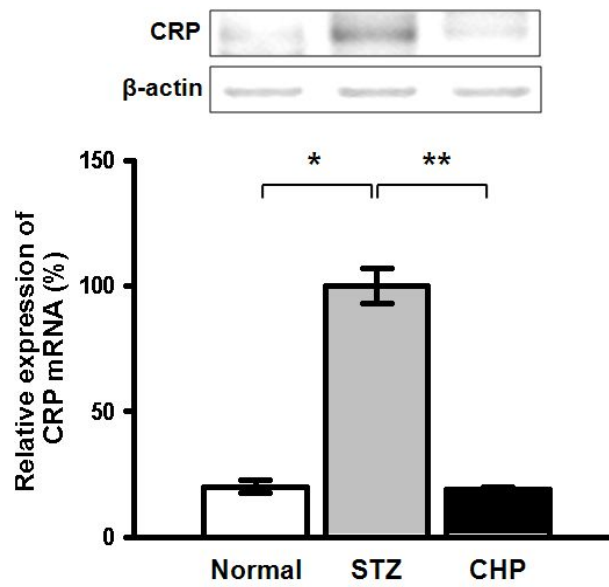


Fig. 33. Insulin immunohistochemical staining of rat pancreas tissue.



**Fig. 34.** Analysis of mRNA expression for CRP (C-reactive protein) in rat pancreas by RT-PCR. Normal, control group; STZ, STZ-induced diabetic group; CHP, CHP-treated diabetic group. \* $P < 0.01$ , compared with that in control group, \*\* $P < 0.05$ , compared with that in STZ group.



## 제 2 절 2차년도

### 1. 연구내용

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
<p>○ 제2형 당뇨 모델 : 항당뇨 활성 분석</p>	<p>○ 항당뇨 효과 실험 - <i>ob/ob</i> mice</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 제2형 당뇨모델 동물 : <i>ob/ob</i> mice를 사용함.</li> <li>- 5주령의 유전적 비만 쥐 (<i>ob/ob</i> mice) : 인슐린 비의존형 당뇨 (NIDDM) 형태의 당뇨 유발.</li> <li>- 혈액 내 당량이 300 mg/dl 이상인 것 만을 선별하여 실험에 이용.</li> <li>- 4일 단위로 혈당 체크 : 꼬리 부분 정맥에서 얻은 혈액 샘플을 이용하여 혈당 측정</li> </ul>
	<p>○ 경구포도당 내성 시험법 (OGTT, Oral Glucose Tolerance Test)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 15시간 절식한 후, 포도당을 1g/체중 1 kg의 농도로 경구투여.</li> <li>- 혈액 내 glucose 측정 : glucose 처리 전 -30 분, glucose 처리 후 0, 30, 60, 120, 180 분에 꼬리 부분 정맥에서 얻은 혈액 샘플 이용.</li> </ul>
	<p>○ 채혈, 혈청 및 장기분리</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ether로 마취, 복부대동맥으로부터 주사기로 채혈한 혈액은 4℃에서 원심분리하여 혈청으로 사용함.</li> <li>- 실험동물로부터 각 장기 (간, 췌장, 신장, 지방, 근육조직)를 적출.</li> <li>- 적출된 장기는 Proteome analysis를 위해 신속히 보관(-70℃).</li> </ul>
	<p>○ 총 콜레스테롤 및 중성지방 측정</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 총 콜레스테롤과 중성지방을 측정하기 위하여 혈액을 분석</li> <li>- Enzymatic colorimetric assay로 측정</li> </ul>
	<p>○ 조직병리검사 (H&amp;E 염색) 및 Insulin-면역조직화학 적 분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 췌장 조직을 paraffin으로 고정 후, 췌장 조직 절편을 hematoxylin and eosin (H&amp;E) 염색 및 인슐린 항체를 이용하여 면역반응 후 현미경을 통해 관찰함.</li> </ul>
<p>○ CHP에 의한 제2형 당뇨모델의 항당뇨 기작 규명</p>	<p>○ Proteome 분석을 위한 시료준비</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Proteome analysis를 위해 lysis buffer-용액 (8 M urea, 2% CHAPS, 65 mM DTE, 2%(v/v) isocratic pH gradient (IPG) buffer (pH 4-7 NL, non-linear), trace bromophenol blue)으로 처리한다.</li> <li>- 500 ~ 1 mg 단백질을 2-D gel에</li> </ul>

		loading 하는데, 이때 초기에는 pH 4-7 NL용 immobilized pH gradient strip을 사용하되, 필요할 경우, 특정 pH 영역에 적합한 zoom-in-gel을 사용하여 정밀분석을 행함.
o Proteome analysis	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 2-D gel 전기영동 (또는 ICAT) 및 Image Processing</li> <li>- MALDI-TOF MASS 분석</li> <li>- 단백질 동정</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 대조구 및 실험구 실험동물의 주요기관을 적출해서 proteome을 분석.</li> <li>- 대두가수분해물을 섭취한 mice의 2-DE proteome map상에 나타난 표적단백질들을 MALDI-TOF MASS로 동정하고, 특이단백질 자료를 획득한 다음, 해당노화에 관여하는 유용단백질을 encoding하는 유전자를 탐색.</li> <li>- Isoelectric focusing은 IPGphor를 이용하여 수행하고, 2-D 전기영동은 Protean IIXL 2D multi cell (Bio-Rad)을 사용함. 단백질의 spot은 fluorescence dye SyproRuby (Molecular Probe)를 사용함.</li> <li>- 염색된 gel은 fluorescence laser scanner (Bio-Rad)를 사용하여 10 Mb size로 scanning한 후 ImageMaster software (Amersham Pharmacia Biotech)를 이용하여 정량함.</li> </ul>
o cDNA microarray		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Microarray 기법을 이용한 연구 : total RNA 추출 및 cDNA 합성과 labeling 과정, hybridization 과정, wash &amp; stain, scan 단계를 거쳐 spot의 intensity를 분석함.</li> <li>- 대조군에 비해 2배 이상 발현 차이를 나타내는 유전자를 기준으로 분류 하였으며, 유전자의 특성을 분석함.</li> </ul>
o Western blot analysis		<ul style="list-style-type: none"> <li>- 혈액 및 췌장 조직의 단백질을 추출하여 관심 단백질에 특이적인 항체를 이용하여 분석하였음.</li> <li>- Western blotting을 실시하여 2-DE를 통해 확인된 단백질의 발현량을 검증.</li> <li>- 비만관련 단백질 (Adiponectin, Resistin, Leptin 등)의 발현량을 검증.</li> </ul>
o Real-Time PCR		<ul style="list-style-type: none"> <li>- 당뇨 관련 단백질들의 발현변화를 규명하기 위하여 췌장 조직에서 RNA를 추출하였으며, 유전자 발현 변화를 RT-PCR로 검증</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>- 알콜에 의한 분획: 콩단백 가수분해물 1 L에</li> </ul>

<p>o Pilot plant에서 생산 공정 및 표준화 공정 조건 확립</p>	<p>o 알콜, 산에 의한 침전 및 UF에 의한 CHP 함량 증진 공정</p>	<p>알콜 4 L 첨가(alcohol 4배량 첨가) → 방치(overnight) → 여과 또는 원심분리에 의해 침전(Alcohol-1)과 상징액(Alcohol-2) 분리.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 산에 의한 분획: 콩단백 가수분해물 1 L의 pH를 3.0으로 조정(5% citric acid를 사용) → 2시간 동안 실온에서 방치 → 여과 또는 원심분리에 의해 침전(pH-1)과 상징액 분리 → 상징액의 pH 7.0으로 조정(1 N NaOH 사용, pH-2).</li> <li>- 활성탄 처리: 콩 가수분해물 용액 1 L에 활성탄 10 g을 가하여 30분간 진탕한 후 여과하여 여액 회수(Charcoal-1) → 활성탄에 20% 알콜 500 ml를 가하여 80℃에서 reflux → 환류액을 회수하여 알콜 증발 후 용액 사용 (Charcoal-2).</li> <li>- 한외여과에 의한 분획: 콩 단백질 가수분해물 1 L를 한외여과막 (10 &amp; 30 kDa cut-off)을 이용하여 분자량 10 kDa이하, 10-30 kDa, 30 kDa 이상으로 분획.</li> </ul>
<p>o 콩 가수분해물의 안정성 평가</p>	<p>o 대두 가수분해물의 기능성 평가</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 열안정성, 용해도, 유화력 소화력</li> <li>- 급성독성 및 아급성 평가</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 열안정성: 대두 가수분해물(&lt;10 kDa MW, &gt;10 kDa MW, Crude)을 3가지 buffer(pH 3.6 50 mM Citrate-NaOH buffer, pH 7.6 Phosphate buffer, pH 9.0 Tris-HCl buffer)에 1% 혼합: 1% 대두 가수분해물 용액. 1% 대두 가수분해물 용액을 100℃, 20-60분 열처리. 열처리 전후의 흡광도 측정(600 nm).</li> <li>- 용해도: 대두 가수분해물(&lt;10 kDa MW, &gt;10 kDa MW, Crude)을 3가지 buffer(pH 3.6 50 mM Citrate-NaOH buffer, pH 7.6 Phosphate buffer, pH 9.0 Tris-HCl buffer)에 5% 혼합: 5% 대두 가수분해물 용액. 5% 대두 가수분해물 용액을 12,000 rpm, 10분 원심분리. 상징액 제거 후 침전물의 dry weight. 용해도(%) = 혼합된 시료양(g) - 침전된 시료양(g) / 혼합된 시료양(g) × 100</li> <li>- 거품 형성력 및 안정성: 대두 가수분해물(&lt;10 kDa MW, &gt;10 kDa MW, Crude)을 3가지 buffer(pH 3.6 50 mM Citrate-NaOH buffer, pH 7.6 Phosphate buffer, pH 9.0 Tris-HCl buffer)에 1% 혼합: 1% 대두 가수분해</li> </ul>

		<p>물 용액. 1% 대두 가수분해물 용액 20 ml를 10,000 rpm에서 2분간 균질기로 균질화. 균질화한 후 거품을 포함한 부피(균질화 후 부피)를 측정하고 상온에서 3분간 안정시킨 후 다시 거품을 포함한 부피(안정화 후 부피)를 측정함.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 유효력: 대두 가수분해물(&lt;10 kDa MW, &gt;10 kDa MW, Crude)을 3가지 buffer(pH 3.6 50 mM Citrate-NaOH buffer, pH 7.6 Phosphate buffer, pH 9.0 Tris-HCl buffer)에 1% 혼합: 1% 대두 가수분해물 용액. 1% 대두 가수분해물 용액 12 ml에 콩기름 4 ml을 넣고 12,000 rpm에서 1분간 균질기로 균질화함. 균질화된 용액 50 µl에 0.1% sodium dodecyl sulfate 5 ml를 넣어 희석한 후 흡광도 측정(500 nm).</li> <li>- 소화력: 대두 가수분해물(&lt;10 kDa MW, &gt;10 kDa MW, Crude) 400 mg을 pepsin 1.5 mg(in 0.1 N HCl 15 ml)과 혼합 후 37°C에서 3시간 반응. 2M NaOH로 중화시킨 후 pancreatin 4 mg(in phosphate buffer 7.5 ml, pH 8.0)와 1 ml toluene을 첨가하고 37°C에서 24시간 반응. 0.55M trichloroacetic acid 10 ml 첨가. 12,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 상정액을 BCA법으로 총 단백질량 산출.</li> <li>- 실험동물: SD rat 5주령 암수를 중앙실험동물로부터 분양 받아 23±3°C, 습도 55±5%에서 light/dark 12시간 조정하면서 사육.</li> <li>- 투여량 및 시험군 조성: 투여용량은 OECD guide line에 준하여 급성독성은 5,000 mg/kg을 1회 투여, 아급성은 1,000 mg/kg을 14일 반복 투여하였으며, satellite group은 1,000 mg/kg을 14일 반복 투여 후 또 다른 14일간 방치하였다.</li> <li>- 혈액학적 평가 및 조직검사: 혈액학적 검사는 hematological analyzer KN-21N을 이용하여 red blood cell (RBC) count, white blood cell (WBC) count,</li> </ul>
--	--	---

		<p>hematocrit (Hct), hemoglobin (Hgb), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC)을 평가하였으며, FUJI DRI-CHEM 3500 analyzer (Fuji Photo Film Co., Osaka, Japan): glucose, blood urea nitrogen (BUN), creatinine, total protein, albumin, total bilirubin, glutamate oxaloacetate transaminase (GOT), and glutamate pyruvate transaminase (GPT)을 측정.</p> <p>- 간 및 신장 조직 검사: 간 및 신장 조직은 hematoxylin and eosin (H &amp; E) 염색법과 periodic acid schiff (PAS) 염색법으로 각각 염색하여 현미경으로 관찰.</p>
<p>○ 소재의 일반적 특성 평가 및 CHP 생리활성 측정</p>	<p>○ 소재의 일반적 특성 ○ 항산화 효과</p>	<p>- ABTS radical scavenging activity: ABTS 7.4 mM과 potassium persulphate 2.6 mM을 하루 동안 암소 방치하여 ABTS·+을 형성시킨 후 이 용액을 414 nm에서 흡광도 값이 1.5가 되도록 흡광계수(<math>\epsilon=1.6 \times 10^4 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}</math>)를 이용하여 ethanol로 희석 사용하였음.</p> <p>- Hydroxyl radical 소거활성은 2-deoxyribose oxidation 방법을 변형하여 측정하였음. Hydroxyl radical은 <math>\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}</math>의 존재 하에서 Fenton 반응에 의해 생성한다. 반응용액은 10 mM <math>\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}</math> 용액, 10 mM EDTA 용액과 10 mM 2-deoxyribose 용액을 각각 200 <math>\mu\text{L}</math>를 첨가한 후 각 분획물 200 <math>\mu\text{L}</math>와 0.1 M phosphate buffer 용액(pH 7.4) 1 mL를 넣어 혼합시킨 후 총 부피가 1.8 mL가 되도록 조제하였다. 반응용액에 10 mM <math>\text{H}_2\text{O}_2</math> 200 <math>\mu\text{L}</math>를 넣어 37°C에서 4시간 동안 반응시킨 후 2.8% TCA와 50 mM NaOH에 용해시킨 1% TBA를 각각 1 mL씩 첨가시키고, 100°C에서 10분간 발색시킨 후 532 nm에서 흡광도를 측정.</p>

## 2. 연구결과

### 가. 제 2형 당뇨 항당뇨 활성

#### (1) Genetically *ob/ob* mice에서 CHP의 항당뇨 활성 효과

본 연구에서 콩 가수분해에 의하여 생산되어진 CHP를 이용하여 2형 당뇨 모델인 유전자 변형 마우스 (*ob/ob* mice)에 항당뇨 효과 실험을 실시하였다. 2형 당뇨 모델 쥐인 C57BL/6J *ob/ob* mice (Hamamatsu, Japan)를 구입하여 23±2°C, 습도 55±5%, 12시간의 명암 사이클을 유지하는 사육실에서 stainless steel cage에 1마리씩 분리하여 이주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 본 실험을 실시하였다. 실험기간동안 물과 식이는 자유롭게 섭취케 사육하였다. 모든 동물들을 대조군과 시료 투여군으로 나누었으며 1군당 7마리로 하여 무작위로 나누었다. 혈당수치는 4시간 동안 절식 후 꼬리 부분 정맥에서 얻은 혈액 샘플을 혈당측정기 (Lifescan, Milpitas, CA, USA)를 사용하여 분석하였다. 실험동물의 체중은 오전의 일정한 시간에 매일 측정하며, 식이 섭취량은 각 실험 군별로 체중 측정 직전에 잔량을 수거하여 측정하였다.

CHP를 이용하여 2형 당뇨 모델인 유전자 변형 마우스 (*ob/ob* mice)에 항당뇨 효과 실험을 실시하였다. 초기 혈중혈당이 300 mg/dl (16.7 mmol/L) 이상 2형 당뇨 모델 마우스를 대조군과 실험군으로 분리하여 최적조건에서 생산되어진 CHP를 2 mg/kg body weight를 경구 투여 후, 24일 동안 4일 간격으로 혈중 혈당 변화를 살펴본 결과, 지속적으로 혈당 강하 효과를 나타내었으며 대조군에 비해 57% 이상 혈당 강하 효과를 나타내었다 (Fig. 35). 또한, CHP를 24일간 투여 후 CHP 투여를 중단하였으며, 130일 동안 혈당의 변화를 관찰한 결과 CHP 식이를 중단 후에도 CHP 투여한 그룹의 혈중 혈당은 유지되었다. 이러한 결과, CHP는 혈당 반응에 놀라운 향상을 보여 주었으며, 기능성 식품 및 의약품 첨가제에 대한 중요한 후보 물질중 하나로서 가능성을 제시 하고 있다.

#### (2) CHP처리에 따른 포도당부하시험

CHP를 경구 투여하여 지속적인 혈당 강화 효과를 나타내는 시점인 24일째 포도당 부하 시험 (OGTT)을 하였다. 포도당 부하 시험 15시간 전부터 절식한 후, 포도당을 1 g /체중 1 kg의 농도로 구강투여 하였다. 포도당 처리 후, 0, 30, 60, 120, 180분에 꼬리 부분 정맥에서 얻은 혈액 샘플을 이용하여 혈당을 측정된 결과, 포도당 수치는 초기 포도당 과부하가 일어난 후에 당뇨쥐의 혈당이 높은 수준으로 유지되는 경향을 보였으며 CHP 투여쥐의 혈당은 60분부터 초기 혈당 수준으로 나타났다. 그 결과, CHP 처리에 의하여 포도당 내성이 현저하게 개선된 것을 관찰할 수 있었다 (Fig.. 36).

또한, 24일 동안 CHP를 처리 후, 약 130일 동안 2형 당뇨모델인 비만 마우스의 혈당

변화를 관찰하였다. 흥미롭게도, CHP 식이를 중단 후에도 약 130일 동안 혈당수치는 큰 변화 없이 CHP 중단 시점의 혈당수준에서 감소현상을 나타내며 유지 되었으며, 혈당상승을 나타내지 않았다 (Fig. 37). 이 결과로부터 CHP는 전반적인 혈당 반응에 두드러진 향상을 나타내며, 당뇨치료제로서의 가능성 및 산업적으로 적용 (식품 및 의약품 첨가제) 할 수 있는 중요한 물질로서 가능성을 나타내고 있다.

### (3) CHP 처리에 따른 체중 변화 및 식이량

2형 당뇨 모델에서 체중 증가 및 식이량 효율에 대한 CHP의 효과를 관찰한 결과, 체중 변화는 대조군과 CHP 처리군 비교 시 큰 변화는 없었으며, 식이량 효율에 있어서도 대조군에 비해 변화가 없었다 (Table 25). 대표적인 비만쥐인 (*ob/ob* mice) 2형 당뇨모델에 CHP를 식이 후, 소변양 증가 및 털의 윤기 등과 같은 외형적인 변화를 관찰하였으나 큰 변화를 보이지 않았다 (Fig. 38).

### (4) CHP처리에 혈중 인슐린 변화

콩 가수분해물인 CHP의 메커니즘을 관찰하기 위해 2형 당뇨 모델에 경구 투여 후, 혈장내 인슐린 수치에 미치는 효과를 시험하였다. 24일 동안 CHP 처리 후 대조군 ( $52.12 \pm 17.95$ ) 과 비교 시 CHP ( $98.27 \pm 11.69$ ) 처리군의 인슐린 농도는 혈중 인슐린 레벨이 약 2배 정도 증가 하였다 (Table 26). 흥미롭게도, 24일 동안 CHP 투여한 다음 CHP를 투여를 중단하였지만, 중단 후에도 48, 72 그리고 130일 후에도 인슐린 농도는 유지되었다. 그 결과, CHP는 인슐린 합성과 분비능력을 증가시키며, 인슐린의 분해를 감소시켜 활성을 향상시키는 것으로 예상되며, 대부분의 가수분해물인 CHP는 혈당내 인슐린 분비 강화 및 혈당강하제로서 가능성을 제시하고 있다.

### (5) 혈중 총콜레스테롤 및 중성지방

혈액 내의 총콜레스테롤과 중성지방을 측정하기 위하여 혈액을 분석하였다. 콜레스테롤이나 중성지방의 지속적인 증가는 고지혈증이 초래되며 결국에는 심장의 관상동맥경화나 뇌동맥경화를 유도한다. 대사증후군을 구성하는 위험인자들로는 비만, 혈당상승을 동반하는 인슐린 저항성, 혈중 인슐린 농도의 상승, 고혈압, 중성지방의 상승과 낮은 농도의 고밀도 지단백 (콜레스테롤)이 있다. 혈장 지질 바이오마커 (중성지방과 총콜레스테롤)는 CHP 처리 24일째 얻어진 혈액으로부터 혈장을 분리하여 분석하였다. 분석한 결과 총콜레스테롤과 중성지방의 수치는 대조군의 총콜레스테롤은  $95.81 \pm 3.41$  mg/dl이며 중성지방은  $92.99 \pm 3.13$  mg/dl이었으며, CHP 처리에 의하여 각각  $43.97 \pm 2.23$  mg/dl 와  $53.13 \pm 4.70$  mg/dl 수준으로 대조군과 비교 시 절반 수준으로 감소하였다 (Table 27). CHP는 2형 당뇨병에서 증가된 총 콜레스테롤과 중성지방을 효과적으로 억제하는 것으로 나타났다.

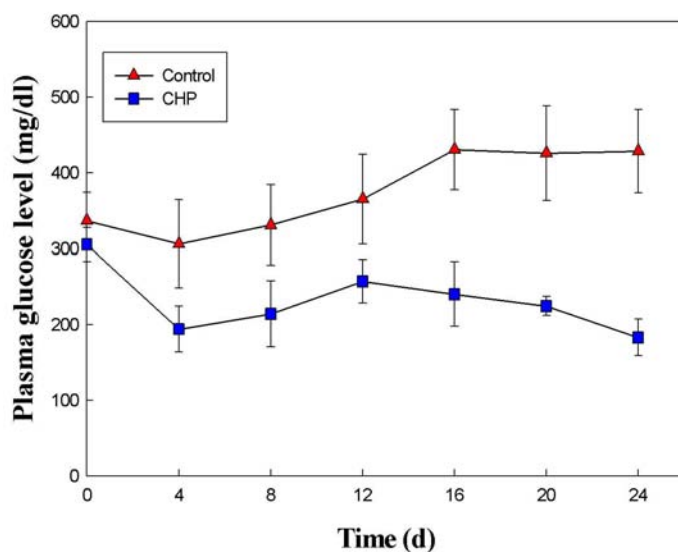
#### (6) Mice 췌장의 조직학적 연구

CHP를 처리 후 혈당 강하 효과를 나타내는 mice의 췌장 조직에서 인슐린 분비능 복구결과를 조직병리학적 방법으로 확인하였다.  $\beta$ -세포의 파괴와 인슐린 분비상태를 규명하기 위하여 CHP를 24일간 처리 후, 쥐의 췌장조직을 적출하여 조직병리검사 (H&E 염색) 및 Insulin-면역조직화학적 방법으로 분석하였다. 그 결과, 당뇨모델의 췌장조직은 전반적으로 췌장섬이 거의 관찰되지 않았을 뿐만 아니라 극소수 관찰되는 췌장섬에서는 insulin-positive  $\beta$  세포들이 소수 존재하였으며, 면역 반응성 또한 매우 미약하였다. 이와 같은 결과는 비만 및 Leptin 결핍으로 고혈당이 유발된 당뇨 쥐는  $\beta$ -세포가 파괴되어 인슐린의 분비가 극히 저조하여 그 결과 혈당량이 증가한 것으로 보인다. 당뇨유발 모델에 CHP를 처리한 결과 대조군에서는 거의 관찰되지 않았던 췌장섬들이 복구 되었다 (Fig. 39). 더욱이, 면역조직화학 염색법으로 확인한 결과, 대조군으로 사용된 당뇨 쥐의 베타세포에서 인슐린 항원이 약하게 나타났다. 반면 CHP를 처리한 당뇨 쥐에서는 강하게 면역반응이 나타났으며 베타세포가 복구되었음을 확인하였다. CHP를 처리한 당뇨모델에서 인슐린 항원성이 당뇨군 보다 증가하였다 (Fig. 40). CHP를 섭취한 실험군 쥐는 비만 및 leptin 결핍의 원인으로 손상된 췌장섬이 복구 또는 재생되어  $\beta$ -세포의 인슐린 분비가 복원되었음을 확인하였다. 이 결과로부터 당뇨병에서 CHP 처리는 베타 세포의 복구와 생성의 가능성을 제시하였다.

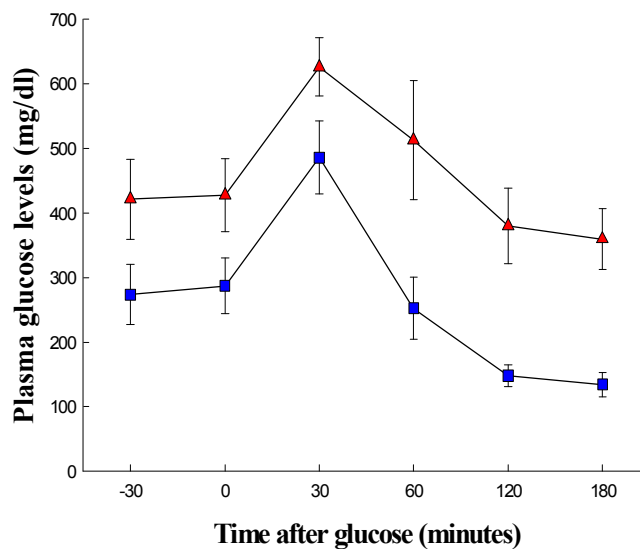
흥미롭게도, CHP 처리 중단 후에도 조직병리학적 또는 면역학적 검사 결과 72, 130 일 경과 후에도 CHP를 처리한 당뇨 쥐에서는 강하게 면역반응이 나타났으며 베타세포가 복구되었음을 확인하였다. 이 결과로부터 CHP는 당뇨 치료제로서의 가능성을 제시하였다.

또한 췌장조직에서 RT-PCR을 통해 mRNA 수준에서 C-reactive protein (CRP)의 발현양을 알아보았다. CRP는 *Streptococcus pneumoniae*의 표면 항원인 C-polysaccharide와 반응하는 단백질로서 염증이나 조직 손상에 비특이적으로 반응하여 대표적인 단백질이다. 대조군에 비해 CHP를 처리하자 CRP 수준이 50% 정도 감소하였다 (Fig. 41). 이로써 CHP 처리로 인해 췌장조직이 복구되었다는 것을 알 수 있다.

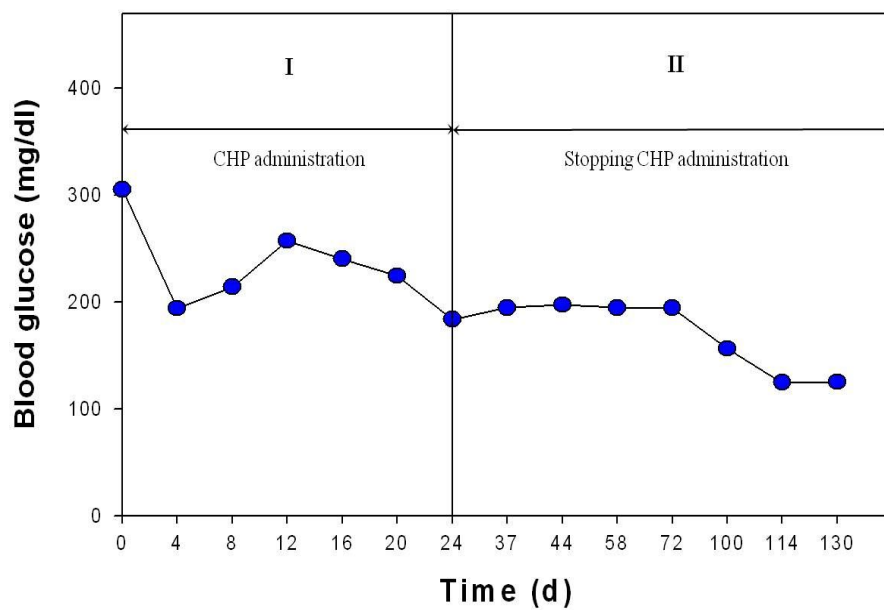




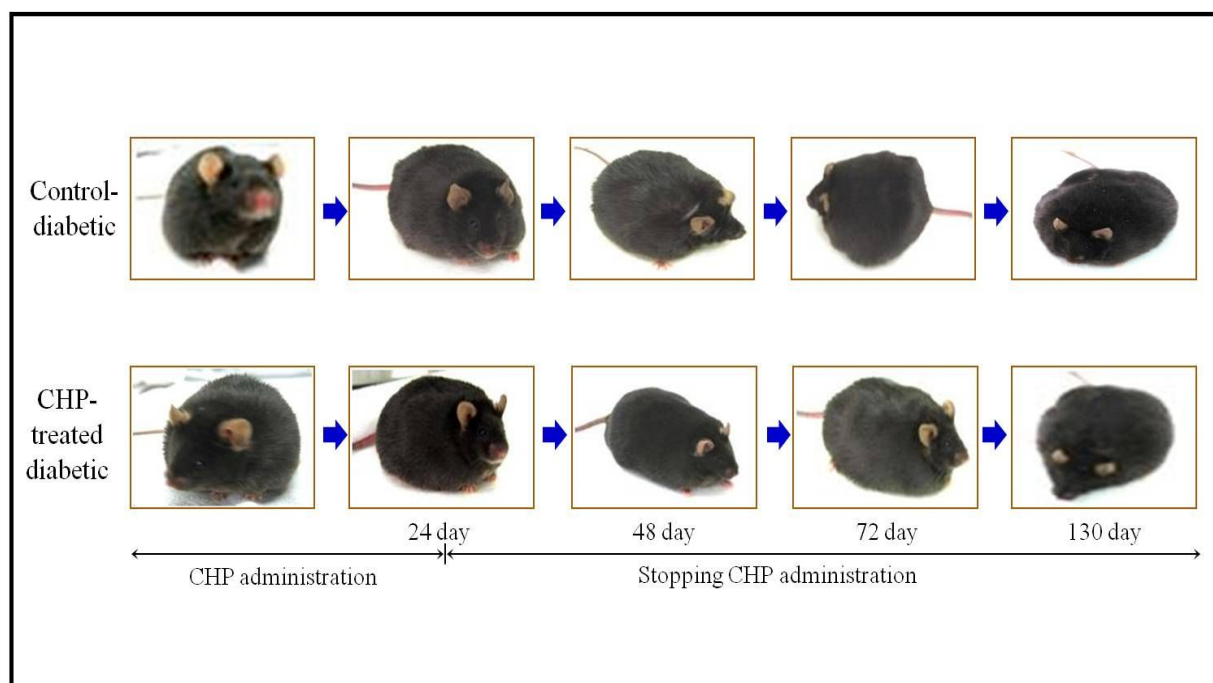
**Fig. 35. Effect of CHP on the plasma glucose levels in genetically diabetic mice during 24 days.** All data were expressed as mean  $\pm$  S.D. ( $P < 0.05$ ). ( $\blacktriangle$ ) Control group, ( $\blacksquare$ ) CHP-treated group.



**Fig. 36. Effect of CHP on glucose tolerance in genetically diabetic mice.** All data were expressed as mean  $\pm$  S.D. ( $P < 0.05$ ). ( $\blacktriangle$ ) Control group, ( $\blacksquare$ ) CHP-treated group.



**Fig. 37. Long-term anti-diabetic effect of CHP.**



**Fig. 38. Anti-diabetic activity : morphological change during the experimental period.**

**Table 25. Effect of CHP on the body weight gain and food intake in genetically diabetic mice for 24 days.**

Group	Body weight gain (g/day)	Food intake (g/day)	Food efficiency ratio <sup>b</sup>
Control	0.27±0.02	4.84±0.07	0.06±0.01
CHP	0.32±0.03*	5.11±0.37*	0.06±0.02

<sup>a</sup> Values are means ± S.D. (n=7)

<sup>b</sup> Body weight gain/Food intake

\**P*<0.05, compared with that in control group

**Table 26. Effect of CHP on plasma insulin levels in ob/ob mice**

Group	Plasma insulin level (ng/mL)				
	Day 0	Day 24	Day 48	Day 72	Day 130
Control	31.92±5.30	52.12± 17.95	28.75±6.12	14.42±1.90	46.23±7.18
CHP	31.84±6.46	98.27±11.69*	125.87±6.66*	87.40±12.10*	107.38±9.86*

<sup>a</sup> Values are means ± S.D. (n=7)

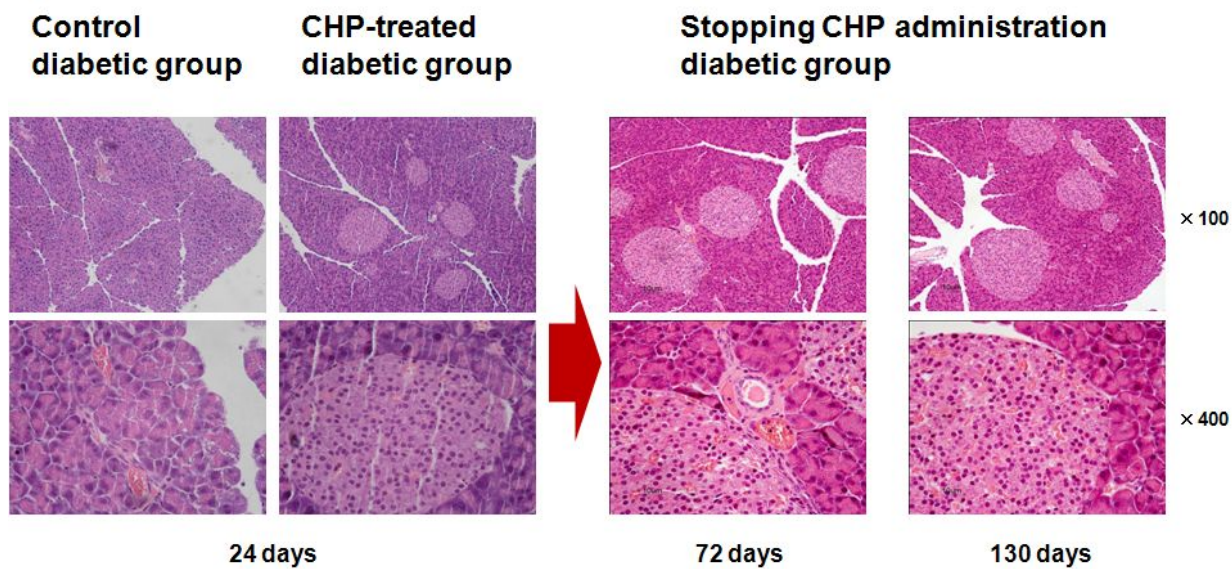
\**P*<0.05, compared with that in control mice

**Table 27. Effect of CHP on plasma levels of total cholesterol and triglyceride in ob/ob mice**

Group	Total cholesterol (mg/dl)	Triglyceride (mg/dl)
Control	95.81±3.41	92.99±3.13
CHP	43.97±2.23*	53.13±4.70*

<sup>a</sup> Values are means ± S.D. (n=7)

\**P*<0.05, compared with that in control mice



**Fig. 39. Hematoxylin and Eosin staining.** Mice pancreas before and after CHP treatment.

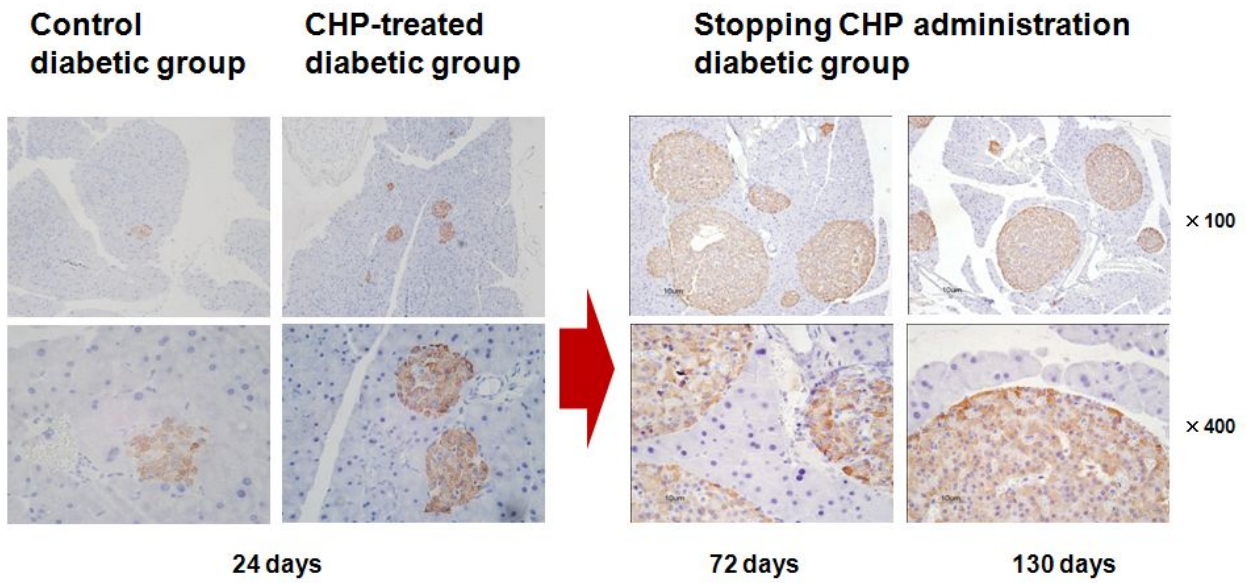


Fig. 40. Immunohistochemical staining before and after CHP treatment.

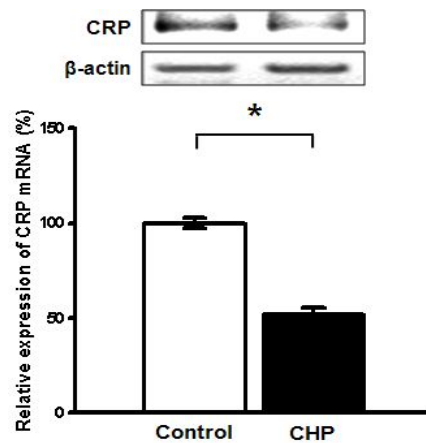


Fig. 41. Analysis of mRNA expression for CRP (C-reactive protein) in mice pancreas by RT-PCR. C, Diabetic control group; CHP, CHP-treated diabetic group. \* $P < 0.01$ , compared with that in control group

## 나. CHP 처리에 의한 2형 당뇨 모델에서 프로테오믹스 분석

본 연구에서 CHP를 함유하는 대두 가수분해물을 이용하여 2형 당뇨 모델에서 얻어진 혈장 (plasma) 및 췌장 조직을 이용하여 이차원 전기영동을 실시하였다. Isoelectric focusing은 IPGPhor (Amersham Pharmacia Biotech)를 이용하여 수행하고, 2-D 전기영동은 Protean IIXL 2D multi cell (Bio-Rad)을 사용한다. 이차원 전기영동은 동물실험이 완료된 후 혈액을 채취하고 원심분리를 통하여 혈장을 얻어서 분석하였으며, 당뇨에 관련된 단백질을 ImageMaster 2D Platinum Software v4.9 (Amersham Biosciences)로 분석한 결과 약 500여개의 spot들 중 약 50개의 발현 차이를 나타내는 spot들을 선정하였다. Sypro Ruby 시약에 의해 염색된 단백질 spot을 PROTEAN 2-D Spot Cutter로 잘라내어 50 mM의 ammonium bicarbonate (pH 8.5, buffer in 50% CH<sub>3</sub>CN)를 이용하여 세척한 후, digestion buffer 용액 (100 mM ammonium bicarbonate (pH 8.5), 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 10% CH<sub>3</sub>CN, 50 mg sequencing grade trypsin)과 혼합한다 (overnight). 50% CH<sub>3</sub>CN/5% TFA 용액을 사용하여 peptide를 추출한 다음, MALDI-TOF 분석과 NCBI database을 이용하여 분석하였다. 이러한 결과를 토대로 2형 당뇨모델에 대한 혈액 단백질의 프로테오믹스 데이터베이스화 하였다.

### (1) 2형 당뇨 모델 (ob/ob mice)에 대한 CHP 처리에 따른 plasma 단백질 변화

#### (가) CHP 처리에 따른 plasma 단백질 분석

본 연구에서 CHP의 혈당 저하 효과를 나타내는 근본적인 기작을 조사하기 위하여, 2형 당뇨 모델 (ob/ob mice)에서 얻어진 혈장 (plasma)을 이용하여 이차원 전기영동을 실시하였다. 혈장 단백질을 이용하여 증가하거나 감소한 단백질은 Image master software를 이용하여 비교하였고 눈에 띄게 많은 변화된 단백질만을 선택하여 분석하였다. 이차원 전기영동 결과 (Fig. 42), 이 단백질들은 특이적으로 발현 차이를 보이는 단백질을 선정하여 Ettan MALDI-TOF MS 와 NCBI database 을 이용하여 밝혔다 (Table 28). 단백질을 동정한 결과, 특히 지질 대사관련 단백질 Apo A-I, Apo IV, Apo E를 비롯하여 혈액응고 (F12, FGB, FGC), 프로테아제 억제제 (SPA3K, α1-P1, A2M, PZP), 단백질 수송 및 결합 (HBB, TTR) 그리고 다른 기능을 가진 단백질 (C1q, Ig)의 발현 차이를 확인하였다. 이 결과로부터, CHP의 처리에 의해 단백질 F12, SPA3K, FGB, Apo A-IV, FGC, α1-PI, C1q, HBB은 감소하였으며, 단백질 Apo A-I, TTR, α2M, PZP, Apo E, Ig는 증가하였음을 확인하였다.

#### (나) Western blotting에 의한 단백질 분석

특히 Apo A-I, Apo IV, Apo E를 비롯하여 2형 당뇨와 비만에 관련된 단백질 (F12, FGB, A2M)은 Western blotting을 실시하여 발현량을 검증하였다. 또한, 2형 당뇨와

관련된 관심 단백질 (Adiponectin, Resistin, Leptin)의 CHP 처리에 의한 변화를 Western blotting 방법으로 확인하였다. Western blotting을 실시하여 이들 단백질들을 비롯한 2-DE를 통해 확인되지는 않았지만 비만관련 단백질 (Adiponectin, Resistin, Leptin)의 발현량을 검증하였다. Adiponectin (Acrp30, apM1) 단백질은 지방조직에서 혈액으로 분비되는 호르몬이며, 혈장에 풍부하며 포도당 조절 및 지방산 이화 작용에 관여한다. Resistin은 지방조직에서 분비되는 호르몬이며, adipocytokine과 Insulin resistance에 관여한다. 비만일 경우 resistin 단백질이 증가하며, resistin 증가 시 TZD의 인슐린 저항성 감소한다. Leptin은 식욕 및 대사를 포함한 에너지 흡수와 에너지 이용에서 핵심적인 역할을 담당하는 단백질이다. 그 결과, CHP 처리에 의하여 Apo A-I, Apo E and A2M 단백질의 발현량은 증가하였으며, Apo A-IV, F12 and FGB 단백질은 CHP 처리에 의하여 감소하였다 (Fig. 43). 또한, CHP 처리에 의하여 고혈당 억제 관련 단백질 (Adiponectin, Leptin)은 증가한 반면, 고혈당 유도 단백질인 resistin은 감소하였다 (Fig. 44). 면역학적인 분석을 통하여 단백질의 2차원 전기영동 결과와 유의적으로 발현 차이가 나타내는 것을 확인하였다. 또한 단백질체 분석의 결과는 당뇨병 치료를 위한 바이오마커 확인하기 위한 추가 연구의 자료로 활용할 수 있을 것이다.

#### (다) Leptin 유전자 mRNA 발현량 분석

ob/ob mice는 leptin 유전자 결핍의 의하여 비만이 유도되어 당뇨가 발생하는 대표적인 2형 당뇨 모델이다. Leptin 결핍 mice (ob/ob) 지방조직에서 CHP 처리에 따른 leptin mRNA의 발현 양상을 조사하였다. 지방 조직의 leptin mRNA는 CHP 처리에 의하여 대조군과 비교하였을 때 약 40% 증가하였다 (Fig. 45). 그 결과, CHP는 2형 당뇨병에서 비만과 대사질환에서 중요한 역할을 하고 있음을 나타내고 있다.





**Table 28. Identification of plasma proteins in ob/ob mice and responses to CHP-treatment.**

Spot No. <sup>a</sup>	Protein	Function	Acc. No. <sup>b</sup>	Exp. <sup>c</sup>	Mw <sup>d</sup>	pI <sup>e</sup>	Coverage (%)
1049	unnamed protein product		Gi:74198755	↓	80.71	5.47	18
1092	Coagulation factor XII (FI2)	Coagulation cascade and activates factor XI and prekallikrein.	Gi:171906584	↓	67.94	6.39	10
1381	Serine protease inhibitor A3K precursor (SPA3K)	Protease inhibitor Serine protease inhibitor	Gi:148747546	↓	46.87	5.04	23
1389	Fibrinogen, B beta polypeptide (FGB)	Immunity and defense clotting factor	Gi:33859809	↓	55.42	6.7	43
1404	Fibrinogen, B beta polypeptide (FGB)	Blood clotting	Gi:33859809	↓	55.42	6.7	43
1427	Fibrinogen, B beta polypeptide (FGB)		Gi:33859809	↓	55.42	6.7	43
1495	Fibrinogen gamma chain precursor (FGC)	Protein binding, bridging receptor binding	Gi:19527078	↓	50.04	5.54	48
1613	Alpha-1 protease inhibitor 2 (alpha-1-PI)	Anti-angiogenesis	Gi:191844	↓	44.91	5.33	23
1631	Apolipoprotein A-IV (Apo A-IV)	lipoprotein metabolism	Gi:14789706	↑	45.01	5.3	26
1722	Chain A, Crystal Structure Of Mouse Transthyretin (TTR)		Gi:161172183	↑	13.77	5.76	69
1741	Alpha2 macroglobulin (A2M)	Protease inhibitor	Gi:134035924	↑	167.1 4	6.24	10
1743	Alpha2 macroglobulin (A2M)	Regulation of inflammation	Gi:134035924	↑	167.1 4	6.24	8
1746	Pregnancy zone protein, isoform CRA_a (PZP)		Gi:148667474	↑	167.0 3	6.24	8
1755	Alpha-2-macroglobulin (A2M)		Gi:134035924	↑	167.1 4	6.24	10
1776	Apolipoprotein E (Apo E)	Catabolism of lipoprotein	Gi:1703338	↑	35.75	5.23	49
1797	Chain A, The Crystal Structure Of A Complment-1q Family Protein Suggests An Evolutionary Link To Tumor Necrosis Factor (C1QTNF5)		Gi:6137745	↓	15.66	5.88	37
1831	Apolipoprotein A-I (Apo A-I)	Lipid metabolism Transport	Gi:6753096	↓	30.57	5.6	41
1840	Apolipoprotein A-I		Gi:160333304	↓	30.53	5.51	46

preproprotein						
1859	Ig kappa-chain V-J-region	Gi:194755	↑	11.62	7.96	40
1933	Hemoglobin beta (HBB)	Gi:229255	↓	15.63	7.26	69

<sup>a</sup> Numbers are arbitrary assigned for depicting Fig. 42.

<sup>b</sup> NCBI database accession number.

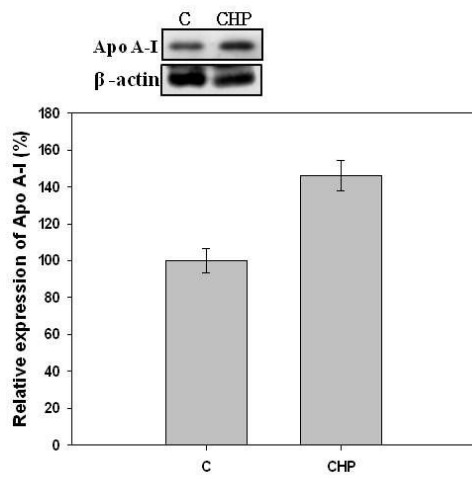
<sup>c</sup> CHP-treated diabetic group compared with control group.

<sup>d</sup> Mw: theoretical molecular weight of the matching protein in kDa.

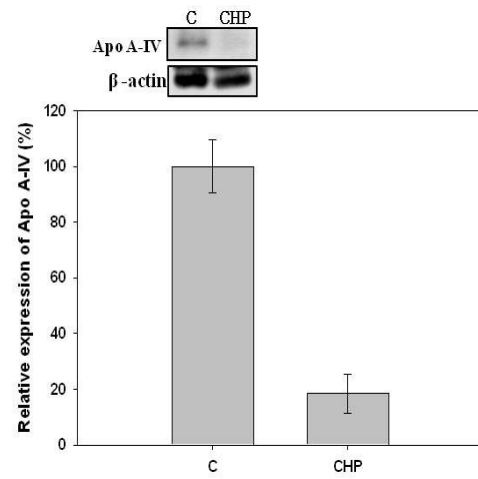
<sup>e</sup> pI: theoretical isoelectric point of the matching protein.

<sup>f</sup> Coverage: percent of identified sequence to the complete sequence of the known protein.

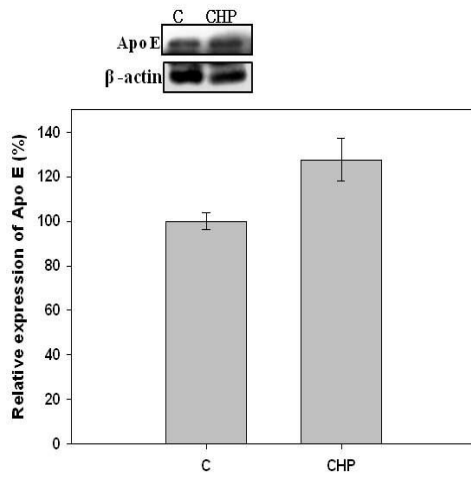
A



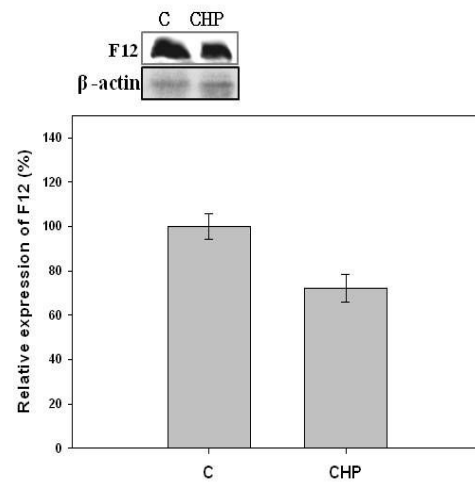
B



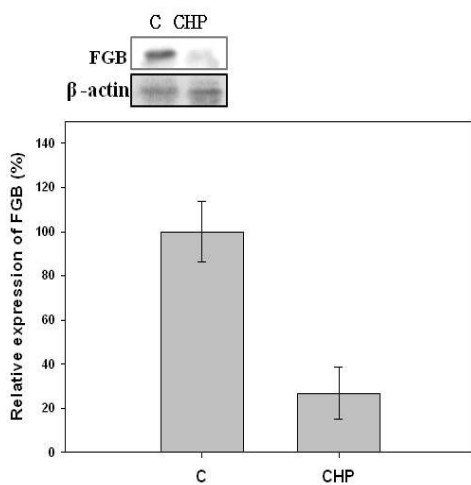
C



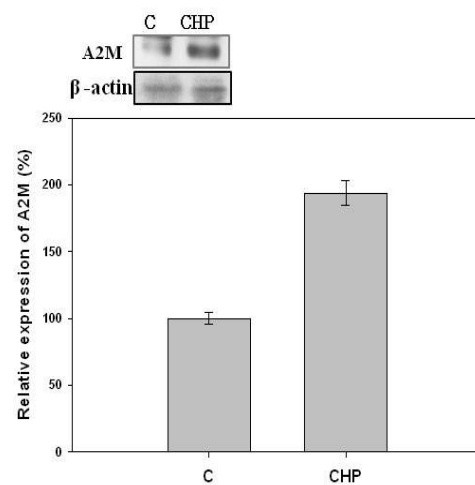
D



E

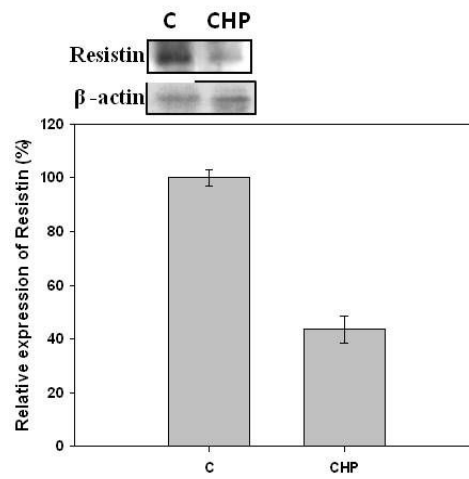


F

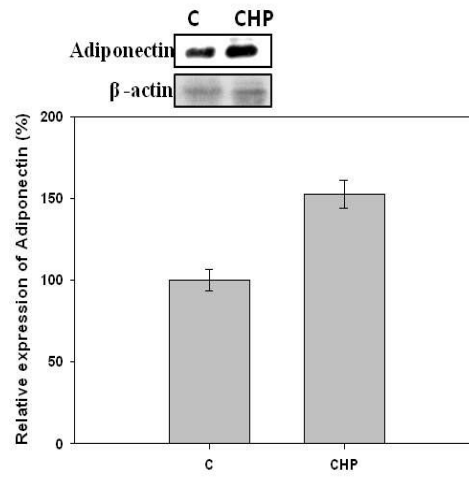


**Fig. 43. Detection of six proteins (Apo A-I, Apo A-IV, Apo E, F12, FGB, and A2M) by Western blot. Band density was digitized with software and mean  $\pm$ SD of three independent experiments are shown.**

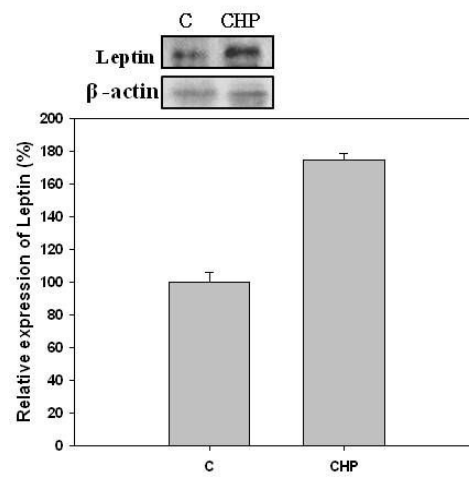
**A**



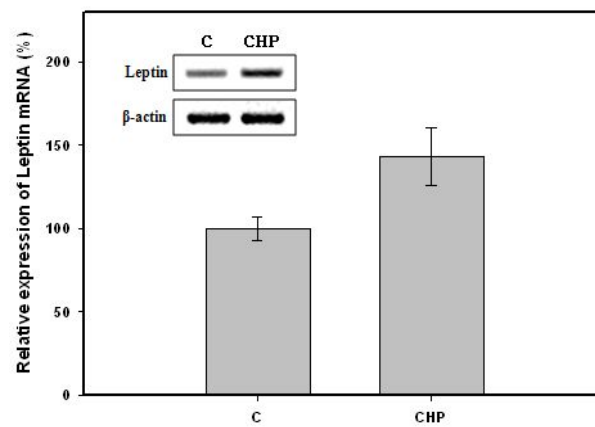
**B**



**C**



**Fig. 44. Detection of resistin, adiponectin and leptin proteins by Western blot.** Band density was digitized with software and mean  $\pm$ SD of three independent experiment are shown.



**Fig. 45.** Analysis of mRNA expression for leptin in mice pancreas by RT-PCR. C, Diabetic control group; CHP, CHP-treated diabetic group.

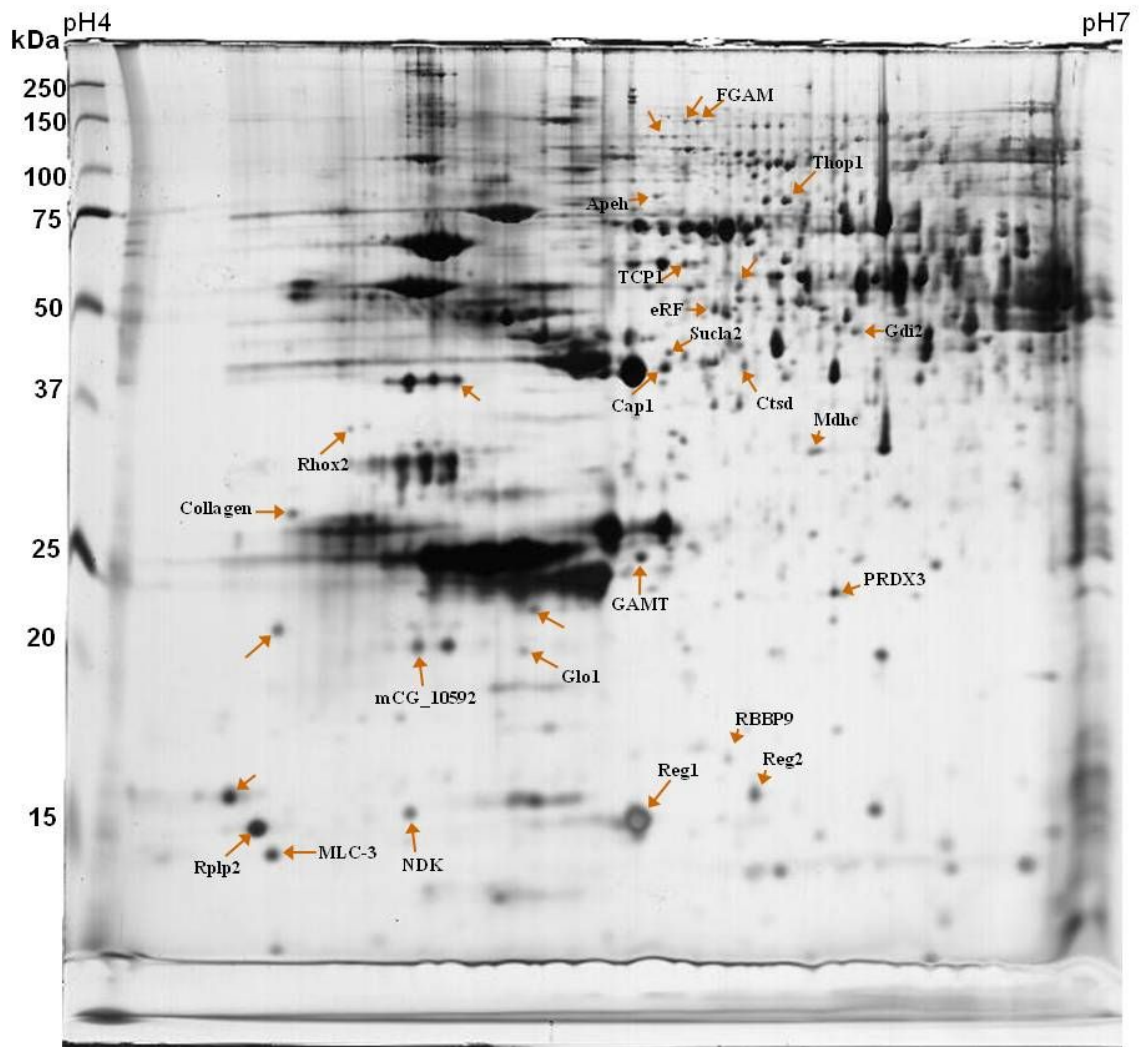
(2) 2형 당뇨병 모델 (*ob/ob* mice)에 대한 CHP 처리에 따른 췌장 조직 단백질 변화

(가) 2-DE separation and identification of proteins

2형 당뇨병 모델 (*ob/ob* mice)에서 얻어진 췌장조직을 이용하여 이차원 전기영동을 실시하였다. 이차원 전기영동을 통하여 분석하였으며, 분석한 결과 약 500여개의 spot 들 중 약 50개의 발현 차이를 나타내는 spot들을 선정하고 MALDI-TOF 분석을 실시하였다 (see the marked proteins in Fig. 46). 그 결과 CHP 처리에 의하여 FGAM, APEH, THOP1, TCP1, eRF, SUCLA2, CPA1, RHOX2, Collagen, GAMT, PRDX3, Rho GDI 1, mCG10592, GLO1, RBBP9, REG1, and REG2 단백질은 단백질 발현량은 감소하였으며, Gdi2, RPS2, Mdhc, Ppp1cb, and Ctsd 단백질은 CHP 처리에 의하여 증가하였다 (Table 29). Leptin 결핍 mice 췌장 조직에서 CHP 처리에 의하여 효소관련 단백질 (APEH, THOP1, GAMT, RBBP9, CTSD), 조직발달 (Collagen), 당분해 (MDHC), 수송 (FGAM synthase, GDI2), 항산화 (PRDX3), 사페론 및 결합 단백질 (CCT8, SUCLA2, CPA1, RPS2, GLO1, REG1, REG2), 기타 기능 (eRF, RHOX2, Rho GDI 1), 알려지지 않은 (mCG10592) 단백질의 발현 차이를 확인하였다. 특히, 2형 당뇨병 모델에서 산화방지 (MDHC), 그리고 Alzheimer-관련된 (APEH) 단백질의 수치는 CHP 처리에 의해 개선되었으며, CHP가 2형 당뇨병의 증상을 향상시킬지 있다는 가능성을 제시하였다.

(나) Detection of proteins by Western blotting

단백질체 분석의 결과를 면역학적으로 확인하기 위하여, Western blot 분석을 이용하였다. 그 결과, 이차원 전기영동 방법에 의한 단백질체 분석 결과와 Western blot 분석으로 확인한 단백질은 유의한 발현 경향을 확인하였다 (Fig. 47). 그 결과, CHP 처리에 의하여 APEH 단백질의 발현량은 증가하였으며, MDHC 단백질은 CHP 처리에 의하여 감소하였다 (Fig. 47). 면역학적인 분석을 통하여 단백질의 2차원 전기영동 결과와 유의적으로 발현 차이가 나타내는 것을 확인 하였다. CHP 처리에 의한 결과, 유전학적으로 당뇨병 (*ob/ob*) 마우스 (2형 당뇨병)에 관련된 단백질의 특성을 분석하였으며, 그것에 의하여 당뇨병과 CHP가 처리된 상태의 바이오마커 발견의 가능성으로 이어 질것이다 (2형 당뇨병: MDHC, APEH). 또한 단백질체 분석의 결과는 당뇨병 치료를 위한 바이오마커 확인하기 위한 추가 연구의 자료로 활용할 수 있을 것이다.



**Fig. 46. Silver-stained 2-DE of image of mice pancreatic proteome.** Differentially regulated proteins were marked with arrows together with identified major mouse plasma protein.

**Table 29. Identification of pancreatic proteins in *ob/ob* mice and responses to CHP-treatment.**

Spot No. <sup>a</sup>	Protein	Function	Acc. No. <sup>b</sup>	Exp. <sup>c</sup>	Mw <sup>d</sup>	pI <sup>e</sup>	Coverage (%) <sup>f</sup>
5480	Phosphoribosylformylglycinamide synthase (FGAM synthase)	Purine biosynthesis Nucleotide transport and metabolism	Gi:226958458	↓	146.25	5.43	13
6281	Acylpeptide hydrolase, isoform CRA_d (APEH)	Hydrolase	Gi:148689322	↓	80.93	5.32	12
6299	Thimet oligopeptidase (THOP1)	H y d r o l a s e , Metalloprotease Protease	Gi:239916005	↓	78.78	5.67	29
6787	unnamed protein product		Gi:12846632	↓	50.43	5.55	25
6952	unnamed protein product		Gi:74177659	↑	56.73	5.57	23
7064	Eukaryotic peptide chain release factor subunit 1 (eRF)	Translation release factor activity, codon specific	Gi:4759034	↓	49.23	5.51	39
7213	unnamed protein product		Gi:74150721	↑	58.27	8.18	58
7303	ATP-specific succinyl-CoA synthetase beta subunit (SUCLA2)	Ligase, ATP binding	Gi:3766201	↓	46.56	5.65	21
7374	Carboxypeptidase A1 precursor (CPA1)		Gi:54312076	↓	47.47	5.41	37
7429	unnamed protein product		Gi:26350123	↑	33.01	4.80	40
7567	Reproductive homeobox 2A (RHOX2 )	Regulation of transcription	Gi:13386376	↓	21.21	4.89	28
7619	Malate dehydrogenase, cytoplasmic (MDH1)	Glycolysis Oxidation reduction	Gi:254540027	↑	36.66	6.16	34
7619	Protein phosphatase 1, catalytic subunit, beta isoform		Gi:148705446	↑	36.09	6.59	30
7767	Collagen	Cell adhesion Protease inhibitor Serineproteaseinhibitor	Gi:467517	↓	115.37	6.11	14
7854	G u a n i d i n o a c e t a t e N-methyltransferase (GAMT)	Methyltransferase Transferase	Gi:6753944	↓	26.60	5.43	57
7942	Thioredoxin-dependent peroxidoreductase, mitochondrial precursor (PRDX3)	Antioxidant Oxidoreductase Peroxidase	Gi:6680690	↓	28.34	7.15	28
7968	unnamed protein product		Gi:26344461	↓	22.99	5.20	45
8006	mCG10592, isoform CRA_c		Gi:148703873	↓	16.58	5.23	33
8013	Lactoylglutathione lyase (GLO1)	Lyase Anti-apoptosis Metal ion binding	Gi:165932331	↓	20.97	5.24	35
8098	Putative hydrolase RBBP9 (RBBP9)	Hydrolase activity	Gi:86439977	↓	21.07	5.64	45
8125	Lithostathine-2 precursor (REG2)	Sugar binding	Gi:6677705	↓	19.79	5.89	45
8127	Good peak but no identification			↓			



8143	Lithostathine-1 (REG1)	precursor	Sugar binding	Gi:6677703	↓	18.91	6.08	56
8840	unnamed	protein product		Gi:74220823	↑	44.74	7.53	24

<sup>a</sup> Numbers are arbitrary assigned for depicting Fig. 46.

<sup>b</sup> NCBI database accession number.

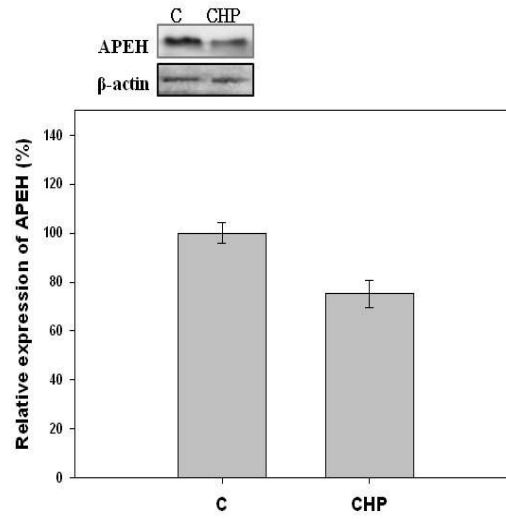
<sup>c</sup> CHP-treated diabetic group compared with control group.

<sup>d</sup> Mw: theoretical molecular weight of the matching protein in kDa.

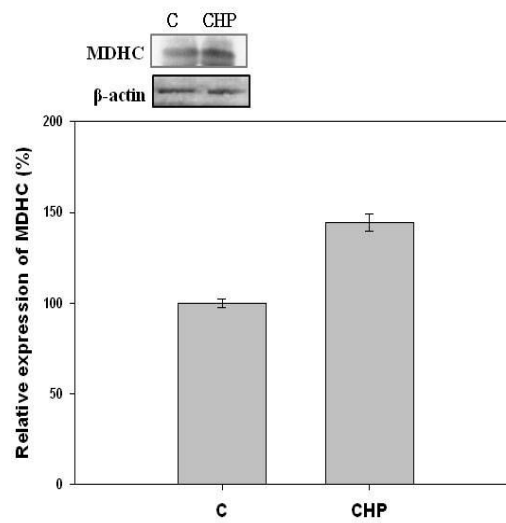
<sup>e</sup> pI: theoretical isoelectric point of the matching protein.

<sup>f</sup> Coverage: percent of identified sequence to the complete sequence of the known protein.

A



B



**Fig. 47. Detection of APEH and MDHC proteins by Western blot.** Band density was digitized with software and mean  $\pm$ SD of three independent experiment are shown.

## 다. CHP 처리에 의한 2형 당뇨병 모델에서 유전자 분석

### (1) cDNA microarray 기법을 이용한 유전자 발현양상

본 실험에서 사용된 NimbleGen Mouse Whole Oligo 12-plex chip은 Mouse Genome Build 8을 database로 하여 mouse gene 42,576개를 3 반복하여 합성, 제작하였다. NimbleGen mouse Whole Oligo 12-plex chip에 합성되어 있는 spot은 control 유전자를 제외하고 총 137,090개의 spot이 16  $\mu\text{m}$  x 16  $\mu\text{m}$ 의 size로 17.4 mm x 13 mm에 합성되어 있다. 42,576개의 oligo에는 37,145개의 기능이 알려진 Known gene이 포함되어 있으며, 기능이 알려진 known gene들 중에 Ontology 분석 결과 Biological process에 관여하는 유전자는 29,965개가 포함되어 있으며, Cellular component에 관여하는 유전자는 28,750개가 포함되어 있으며, Molecular function에 관여하는 유전자는 32,464개가 포함되어 있다. 또한 KEGG pathway에 포함되어 있는 pathway related gene은 7,758개가 포함되어 있다. Roche NimbleGen Mouse whole genome 12-plex array를 사용하여 mice 췌장 조직 시료에서 추출한 total RNA 에서의 대조군에 따른 CHP 처리군의 유전자 발현 변이 차이를 확인하기 위하여 실시하였다. 실험에 사용된 Total RNA sample은 RNA quality check를 실시한 후 진행되었다. Total RNA sample은 20 ug을 사용하여 reverse transcription을 진행하였으며, 과정을 통하여 cDNA를 합성하고, fluorescent incorporation labeling method 과정을 통하여 합성된 labeled cDNA를 Roche NimbleGen Mouse whole genome 12-plex array에 MAUI system을 이용하여 hybridization을 실시하였다. DNA chip 결과의 분석 과정은 scanning을 통하여 얻어진 spot의 signal intensity 수치 데이터를 사용하여 median normalization과 quantile normalization, RMA (Robust Multi-array Average) normalization을 선별적으로 사용하였으며, 이를 사용하여 scatter plot으로 표시하였다. 실험 결과로 얻어진 모든 유전자들의 분포를 histogram으로 표시하였으며 이것은 normalization이 끝난 data의 분포도와 비교 검토하여 실험 결과의 정확성을 확인하였다. data의 모든 분석은 Agilent GeneSpring GX를 사용하여 분석하였다. 당뇨병 관련 유전자를 발견하기 위하여 유전학적 비만 (*ob/ob*) 마우스의 췌장에서 유전자의 발현량 변화를 분석하였다. 대조군 (당뇨)과 CHP 처리군 발현량을 비교 분석한 결과, 유전자 발현 증감의 패턴에 따라 hierarchical clustering plot을 통해 확인하였다 (Fig. 48A). 대조군을 기준으로 2배 이상 증가 또는 감소가 되는 유전자를 확인한 결과, 대조군과 비교시 4384개의 유전자의 발현 레벨이 증가 또는 감소되는 경향을 나타내었다 (Fig. 48B).

### (2) 유전자 발현양상 기능적 분류

2형 당뇨병에서 유전체의 변화를 분석한 결과, 2형 당뇨병에서, CHP 처리한 그룹과

당뇨그룹의 췌장 조직 비교 시 2배 이상 변화를 나타내는 4,384개 유전자를 확인하였으며, 2,140개 유전자는 CHP 처리에 의해 발현량이 증가하였으며, 2,244개 유전자는 감소하였다. CHP 처리에 의하여 대조군과 비교 시 2배 이상 발현 차이를 나타내는 유전자들을 기능적으로 분류 하였다. CHP에 의해 주로 homeostasis, signal transduction, cell cycle, apoptosis 관련 유전자들의 증가 및 감소되는 경향을 확인하였다 (Fig. 49).

### (3) 당뇨관련 유전자 및 마커 단백질 발현양상

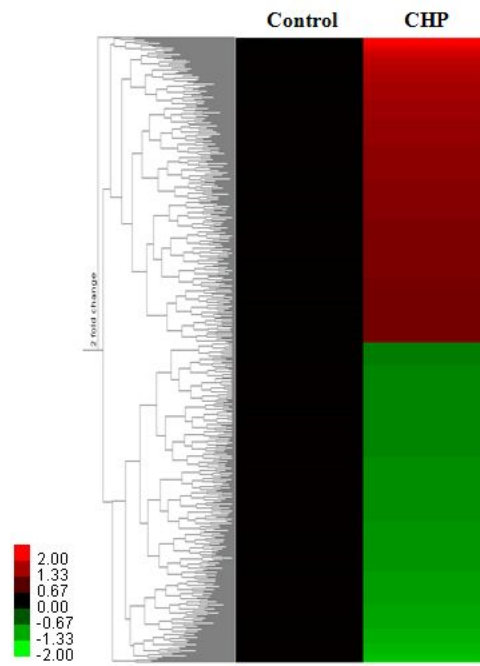
당뇨병 관련 유전자를 발견하기 위하여 유전학적 비만 (*ob/ob*) 마우스의 췌장에서 유전자의 발현량 변화를 분석하였다. 2형 당뇨에서 유전체의 변화를 분석한 결과, 2형 당뇨병에서, CHP 처리한 그룹과 당뇨그룹의 췌장 조직 비교 시 특이적으로 발현 차이를 보이는 30개의 당뇨관련 유전자 (IL2, Socs2, Slc2a4 and Pdx1 etc)를 확인하였다 (Table 30). 또한 CHP 처리에 의하여 특이적으로 8배 이상 발현 차이를 보이는 증가된 유전자 *Acbd5* (Transport), *Fubp1* (Transcription), *IL33* (Cytokine) 등 (23개 유전자, 8배)와 감소된 유전자 *Polr2i* (Signal transduction), *Dedd* (Cell growth, Apoptosis) 등 (40개 유전자, 4배)를 확인하였다. 유전체 분석의 결과는 당뇨병 치료를 위한 바이오마커 확인하기 위한 추가 연구의 자료로 활용할 수 있을 것이다. cDNA microarray 기법을 통해 CHP 처리에 의해 유의적으로 유전자 발현에 차이를 보이는 특정 유전자에 대하여 real-time PCR을 수행하여 mRNA 발현을 정량적으로 분석하여 microarray 결과와 서로 비교 분석하였다. 그 결과, 두 방법에 의한 data간 상관관계가 매우 높은 것을 알 수 있었다. 각 gene의 정보를 살펴보면 주로 수송, 전사 그리고 사이토카인 관련 단백질인 *Acbd5*, *Fubp1*와 *IL-33* 등은 CHP 처리 시 증가되는 것으로 나타났으며, 염증 및 면역반응, 전사와 신호전달에 관련 유전자인 *Polr2i*, *IL2*와 *Dedd* 는 CHP에 의해 감소되었다.

### (4) CHP에 의한 추정의 항당뇨 기작

2형 당뇨병 기작에서 CHP에 의해 당수송 및 지질 대사에 관련된 *SLC2A4* 유전자는 증가하였으며, 인슐린 신호전달에 관련된 유전자 (*SOCS2*) 또한 CHP 처리에 의하여 증가하였다. 그리고 췌장 발달과 인슐린 유전자 전사 조절에 핵심적인 역할을 하는 *PDX1* 유전자의 발현량은 증가하였으며, 핵산분해효소 관련 (Caspase-3과 *PARP*) 유전자의 발현량은 감소하였다. 또한, real-time PCR을 수행하여 mRNA 발현을 정량적으로 분석하여 microarray 결과와 서로 비교 분석하였다. 그 결과, 두 방법에 의한 data간 상관관계가 매우 높은 것을 알 수 있었다. 추가적으로 당뇨병과 관련이 높은 *SLC2A4* 와 *PDX1* 유전자의 단백질을 면역학적으로 분석한 결과 유의한 결과를 확인하였다. 그 결과, 2형 당뇨병과 관련된 당 수송 (*SLC2A4*), 인슐린 신호 전달

(SOCS2), 췌장 세포 분화 및 인슐린 분비 (PDX1), 그리고 핵산분해효소 활성화 (Caspase-3, PARP) 유전자는 CHP에 의해 당뇨 마우스와 비교 하였을 때 변화되었으며, CHP가 2형 당뇨병의 증상을 개선시킬 수 있다는 가능성을 나타내고 있다.

A



B

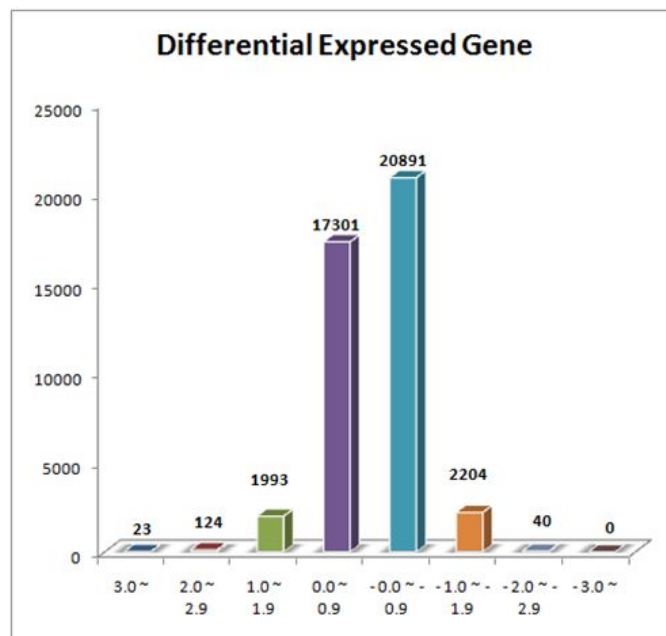


Fig. 48. Gene expression profiles of genetically diabetic (*ob/ob*) mice. (A) Clustering of significantly changed genes and (B) differential expressed gene (>2-fold).

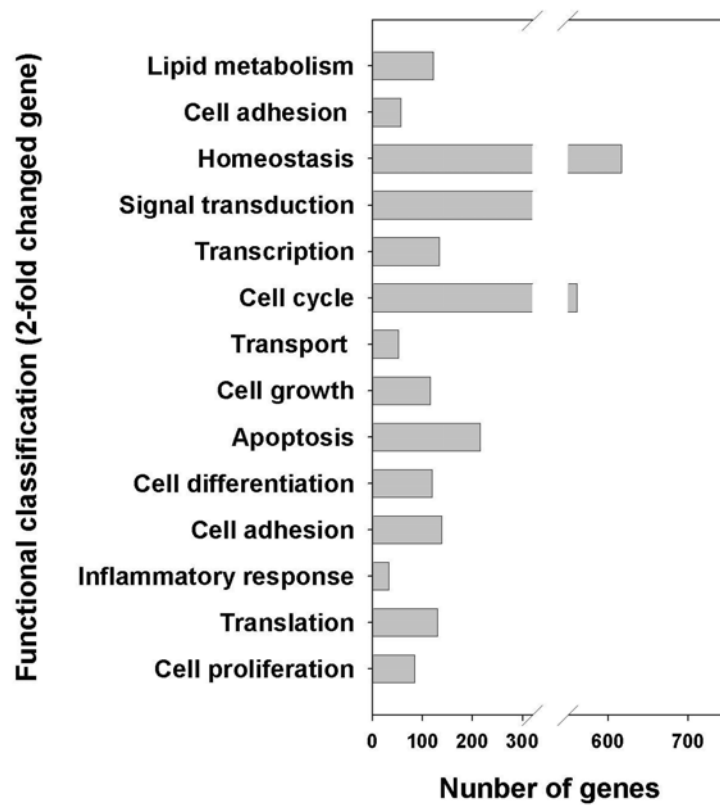


Fig. 49. Functional classification of normalized genes in 2-fold changed pancreatic gene (4384 genes).

**Table 30. Diabetes-associated genes differentially expressed in pancreatic tissue of *ob/ob* mice before and after treatments of CHP**

Gene Symbol	Gene name	Fold (CHP treated/ Diabetic group)	Biological process <sup>a</sup>
IL2	interleukin 2	-2.0412	C, D, K, L, M
IL12a	interleukin 12a	-2.3277	A, D, L
SOCS2	suppressor of cytokine signaling 2	2.2234	F, H, L
Cacna1a	calcium channel, voltage-dependent, P/Q type, alpha 1A subunit	2.1915	F, H, I, L, M
Cacna1c	calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1C subunit	-2.0333	I
HNF4g	hepatocyte nuclear factor 4, gamma	2.5435	K
IKBKB	inhibitor of kappaB kinase beta	-2.5893	K, L, M
H2-Ab1	histocompatibility 2, class II antigen A, beta 1	2.5792	D
H2-Q10	histocompatibility 2, Q region locus 10	-2.9078	D
TAP1	transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)	-2.3747	D, I
SNAP23	synaptosomal-associated protein 23	4.7913	I
SLC2A4	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4	2.1053	I, M
H2-T10	histocompatibility 2, T region locus 10	-2.4420	D
H2-Aa	histocompatibility 2, class II antigen A, alpha	-2.0960	D, F
H2-Dma	histocompatibility 2, class II, locus DMA	-2.3073	D, F, I
PIK3R1	phosphatidylinositol 3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 1 (p85 alpha)	-2.2487	D, E, F, G, L
H2-B1	histocompatibility 2, blastocyst	2.1343	D,G
MAPK14	mitogen activated protein kinase 14	2.1418	L
FRAP1	FK506 binding protein 12-rapamycin associated protein 1	2.0127	F
Cacna1b	calcium channel, voltage-dependent, N type, alpha 1B subunit	3.0047	I
H2-M9	histocompatibility 2, M region locus 9	2.5974	D
HNF4a	hepatic nuclear factor 4, alpha	2.1543	K, N
PDX1	pancreatic and duodenal homeobox 1	2.2671	F, K
SLC2A4	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4	2.1833	I, M
H2-Aa	histocompatibility 2, class II antigen A, alpha	-2.3132	D, F
H2-DMb1	histocompatibility 2, class II, locus Mb1	2.6386	D
READ	Ras-related associated with diabetes	2.2036	I, L
FRAP1	FK506 binding protein 12-rapamycin associated protein 1	2.3085	F
PIK3cb	phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, beta polypeptide	2.2991	E, L, M



Lepr	leptin receptor	-2.3153	L
H2-M1	histocompatibility 2, M region locus 1	-2.5820	D
PIK3cb	phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, beta polypeptide	3.5083	E, L, M

---

<sup>a</sup> A, cell proliferation; B, translation; C, inflammatory response; D, Immune response; E, cell adhesion; F, cell differentiation; G, apoptosis; H, cell growth; I, transport; J, cell cycle; K, transcription; L, signal transduction; M, homeostasis; N, lipid metabolism; O, cytokine; P, cell migration; Q, protein biosynthesis.

**Table 31. Novel diagnostic marker (Up-regulated) for Type II diabetes mellitus**

Gene Symbol	Gene name	Intensity	Biological process <sup>a</sup>
ACBD5	acyl-Coenzyme A binding domain containing 5	60.6458	I
1810030J14Rik	RIKEN cDNA 1810030J14 gene	16.4088	-
5730410E15Rik	RIKEN cDNA 5730410E15 gene	14.7298	-
Gm444	gene model 444, (NCBI)	14.1354	-
SPC24	NDC80 kinetochore complex component, homolog (S. cerevisiae)	13.9254	J
Igh	immunoglobulin heavy chain complex	13.3646	-
IGHV5-9-1	immunoglobulin heavy variable V5-9-1	13.1332	-
AK007235	unnamed protein product	10.9649	-
EG546397	predicted gene, EG546397	10.8724	-
Scnn1b	sodium channel, nonvoltage-gated 1 beta	10.6362	I
Hist1h4k	histone cluster 1, H4k	10.0859	-
D10Bwg1364e	DNA segment, Chr 10, Brigham & Women's Genetics 1364 expressed	9.6570	-
FUBP1	far upstream element (FUSE) binding protein 1	9.6556	K
1700013D24Rik	RIKEN cDNA 1700013D24 gene	9.3480	-
EG667905	predicted gene, EG667905	9.3230	-
MGC65593	cDNA sequence BC005512	9.2948	-
EMP1	epithelial membrane protein 1	8.9760	H
EG625690	predicted gene, EG625690	8.8674	B
LHX1	LIM homeobox protein 1	8.7838	K
FUS	fusion, derived from t(12;16) malignant liposarcoma (human)	8.7725	K
IL33	interleukin 33	8.7404	O
CLCC1	chloride channel CLIC-like 1	8.6452	I
EG666731	predicted gene, EG666731	8.0184	-

<sup>a</sup> A, cell proliferation; B, translation; C, inflammatory response; D, Immune response; E, cell adhesion; F, cell differentiation; G, apoptosis; H, cell growth; I, transport; J, cell cycle; K, transcription; L, signal transduction; M, homeostasis; N, lipid metabolism; O, cytokine; P, cell migration; Q, protein biosynthesis.

**Table 32. Novel diagnostic marker (Down-regulated) for Type II diabetes mellitus**

Gene Symbol	Gene name	Intensity	Biological process <sup>a</sup>
NEGR1	neuronal growth regulator 1	-5.9561	F
SLBP	stem-loop binding protein	-5.7339	-
POLR2D	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide D	-5.5862	L
STYXL1	serine/threonine/tyrosine interacting -like 1	-5.5200	-
POLR2I	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide I	-5.3754	L
BSPRY	B-box and SPRY domain containing	-5.1818	J
RORC	RAR-related orphan receptor gamma	-5.1787	G, L
Hist1H4j	histone cluster 1, H4j	-5.1583	-
TMEM63a	transmembrane protein 63a	-5.1513	-
DEDD	death effector domain-containing	-4.9463	H, L
OAS1A	2'-5' oligoadenylate synthetase 1A	-4.9023	E
Rad51c	Rad51 homolog c ( <i>S. cerevisiae</i> )	-4.9002	-
TMEM63b	transmembrane protein 63b	-4.8178	-
LOC637957	similar to ankyrin repeat domain 26	-4.7810	-
VASP	vasodilator-stimulated phosphoprotein	-4.7182	G,O
CENPO	centromere protein O	-4.6675	-
YrdC	yrdC domain containing ( <i>E.coli</i> )	-4.6531	J
ENSMUSG00000045836	predicted gene	-4.6478	-
IFI35	interferon-induced protein 35	-4.6342	E
HBQ1	hemoglobin, theta 1	-4.5988	J
SLC12A5	solute carrier family 12, member 5	-4.5610	J, N
EXOC5	exocyst complex component 5	-4.5540	J
AI481105	expressed sequence AI481105	-4.5188	L
NCAPH	non-SMC condensin I complex, subunit H	-4.5032	K
RBP1	nuclear receptor binding protein 1	-4.4762	J
PLA2G4B	phospholipase A2, group IVB (cytosolic)	-4.4748	-
CTSW	cathepsin W	-4.2933	-
EG574083	predicted gene, EG574083	-4.2930	-
SLC17A3	solute carrier family 17 (sodium phosphate), member 3	-4.2805	J
EG546862	predicted gene, EG546862	-4.2082	-
XPR1	xenotropic and polytropic retrovirus receptor 1	-4.1713	-
TMEM54	transmembrane protein 54	-4.1542	-
LOC627273	similar to T-cell receptor alpha chain V region CTL-L17 precursor	-4.1518	-
PPP1CB	protein phosphatase 1, catalytic subunit, beta isoform	-4.1120	K
ARHGAP9	Rho GTPase activating protein 9	-4.1075	M
PSMD7	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 7	-4.0956	-
GM1684	gene model 1684, (NCBI)	-4.0799	-
TBCE	tubulin folding cofactor E-like	-4.0611	G
Hist1H2ad	histone cluster 1, H2ad	-4.0413	-

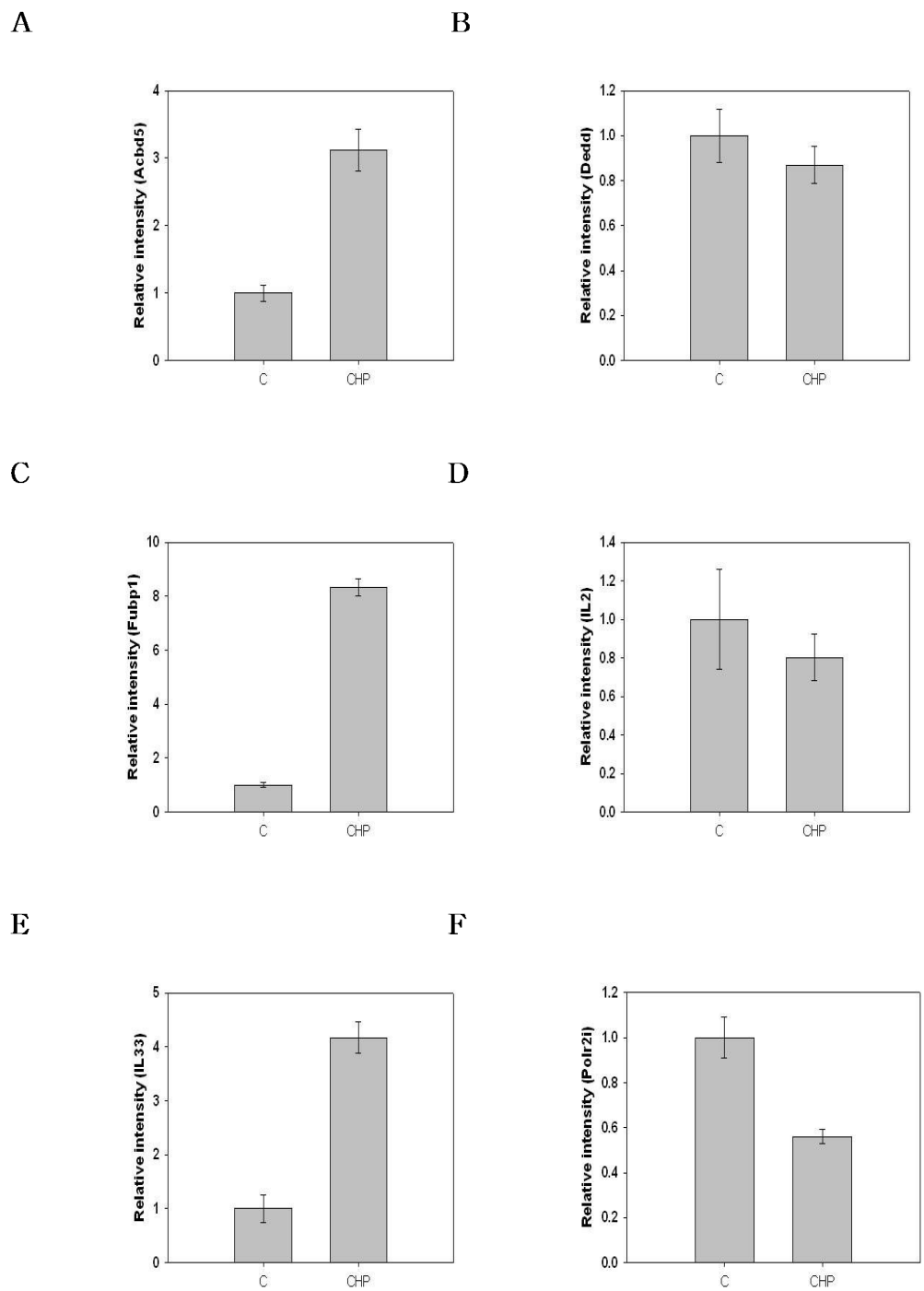
XLR4B

X-linked lymphocyte-regulated 4B

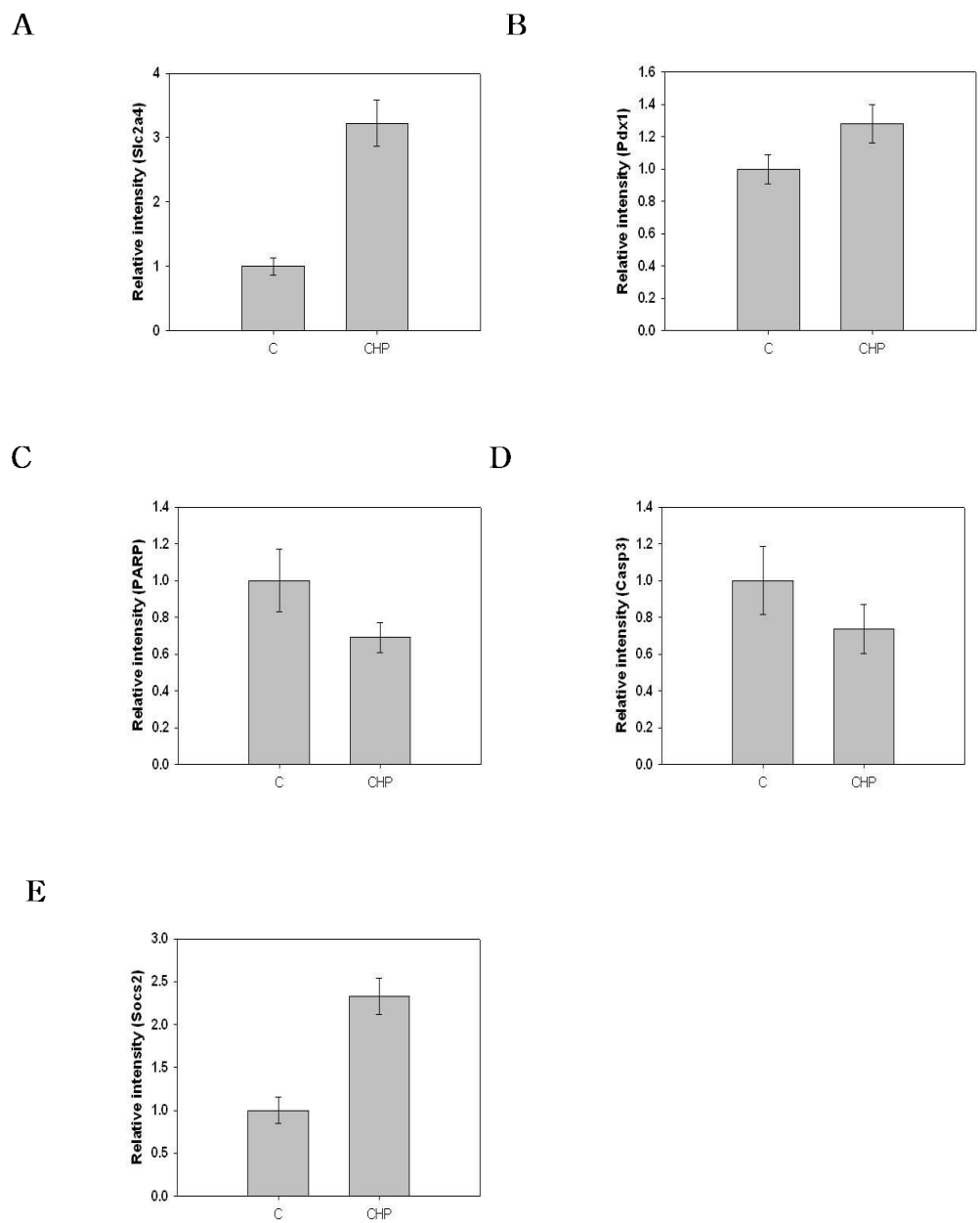
-4.0223

-

<sup>a</sup> A, cell proliferation; B, translation; C, inflammatory response; D, Immune response; E, cell adhesion; F, cell differentiation; G, apoptosis; H, cell growth; I, transport; J, cell cycle; K, transcription; L, signal transduction; M, homeostasis; N, lipid metabolism; O, cytokine; P, cell migration; Q, protein biosynthesis.

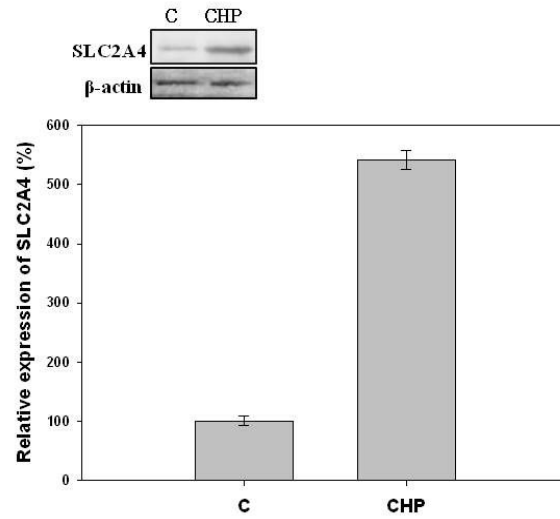


**Fig. 50. Quantification of gene expression level by Real-Time PCR. (A) ACBD5, (B) DEDD, (C) FUBP1, (D) IL2, (E) IL33, and (F) POLR2I.**

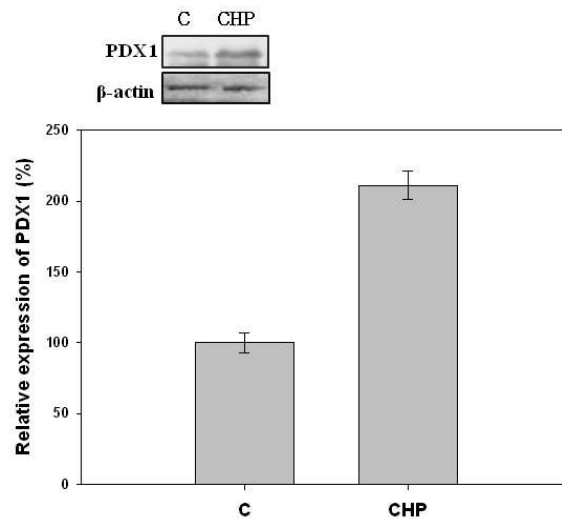


**Fig. 51. Quantification of gene expression level by Real-Time PCR. (A) SLC2A4, (B) PDX1, (C) PARP, (D) CASP3, and (E) SOCS2.**

**A**



**B**



**Fig. 52. Detection of SLC2A4 and PDX1 protein by Western blot.** Band density was digitized with software and mean  $\pm$ SD of three independent experiments are shown.

라. Pilot plant에서 생산 공정 및 표준화 조건 확립

(1) CHP 함량 증진 공정 도입 방법

(가) 알콜, 산에 의한 침전 및 UF에 의한 CHP 함량 증진 공정

▶ 콩 단백질 가수분해물 제조 : 탈지 대두 100 g을 넣고 total 2 L이 되도록 DW를 넣음 → 최적 pH를 맞춤 (pH 7로 조정) → 효소 첨가 (기질의 8%) → Flavourzyme(mg) : Alcalase(μg) = 6 g + 2 ml (3 : 1의 비율로 효소 첨가) → 최적 온도 50°C에서 12시간 가수분해 (150 rpm 교반) → 80°C에서 30분 불활성화 → 여과 또는 원심분리를 통해 상정액을 콩 단백질 가수분해물로 사용.

▶ 알콜에 의한 분획 : 콩단백 가수분해물 1 L에 알콜 4 L 첨가(alcohol 4배량 첨가) → 방치 (overnight) → 여과 또는 원심분리에 의해 침전 (Alcohol-1)과 상정액 (Alcohol-2) 분리

▶ 산에 의한 분획 : 콩단백 가수분해물 1 L의 pH를 3.0으로 조정 (5% citric acid를 사용) → 2시간 동안 실온에서 방치 → 여과 또는 원심분리에 의해 침전 (pH-1)과 상정액 분리 → 상정액의 pH 7.0으로 조정 (1 N NaOH 사용, pH-2)

▶ 활성탄 처리 : 콩 가수분해물 용액 1 L에 활성탄 10 g을 가하여 30분간 진탕한 후 여과하여 여액 회수(Charcoal-1) → 활성탄에 20% 알콜 500 ml를 가하여 80°C에서 reflux → 환류액을 회수하여 알콜 증발 후 용액 사용(Charcoal-2).

▶ 한외여과에 의한 분획 : 콩 단백질 가수분해물 1 L를 한외여과막 (10 & 30 kDa cut-off)을 이용하여 분자량 10 kDa이하, 10-30 kDa, 30 kDa 이상으로 분획.

CHP 함량 증진을 위해 알콜 처리 (침전: Alcohol-1, 상정액: 침전: Alcohol-2), pH 처리 (침전: pH-1, 상정액: pH-2), 활성탄 처리(비흡착액: Charcoal-1, 흡착액: Charcoal-2)를 하였을 때 회수되는 양을 비교한 결과, 알콜 처리 > pH 처리 > 활성탄 처리 순으로 건물량 및 아미노태 질소량의 함량 차이를 보였다 (Fig. 53). CHP 함량은 alcohol 처리 시 침전과 상정액에서 67.34, 130.35 μg/g인 반면, 산 처리하여 얻은 침전과 상정액에서의 CHP 함량은 115.99, 1967.84 μg/g로 높은 함량을 보였다. (Fig. 54).

한외여과에 의한 CHP 함량 증진 효과는 UF membrane의 분자량 cut-off에 따라 건물량 및 아미노태 질소량의 함량 차이를 보였다. 10 kDa 이하는 63.1%, 10-30 kDa 사이는 33.6%이었으며, 30 kDa이상은 12.4%의 비율로 분획물을 얻었다 (Fig. 55). CHP 함량 변화는 건물량 대비 10 kDa 이하는 10703.05 μg/g의 증진 효과를 보였으며, 10-30 kDa 사이의 분자량 분획은 1666.66 μg/g이었으며, 30 kDa 이상은 3922.96 μg/g이었다 (Fig. 56). UF 처리에 의해 10 kDa 이하에서의 CHP 함량이 가장 높았으므로 콩가수분해물 공정에 UF 공정을 추가하였다.



(나) 온도에 의한 cyclization 검토

Cyclization은 물리적 조건의 변화, 즉 온도, pH에 따라 cyclization 정도가 변화되거나 cyclization에 관여하는 cyclase에 의해 cyclization이 이루어진다. 콩 가수분해물의 온도에 따른 cyclization의 변화를 측정하기 위해 30-70°C에서 1시간 처리하였을 때의 CHP 함량 변화를 측정하였다.

그 결과, 온도에 따른 CHP의 함량 증진은 콩 단백질 가수분해물을 100%로 기준하였을 때 40-60°C에서의 CHP 함량 증진 효과를 보였으나 통계적으로 유의적인 차이는 없었다 (Fig 57). 즉, 콩가수분해물 제조 시 50°C에서 12시간 반응시키므로 cyclization이 충분히 이루어졌음을 알 수 있었다.

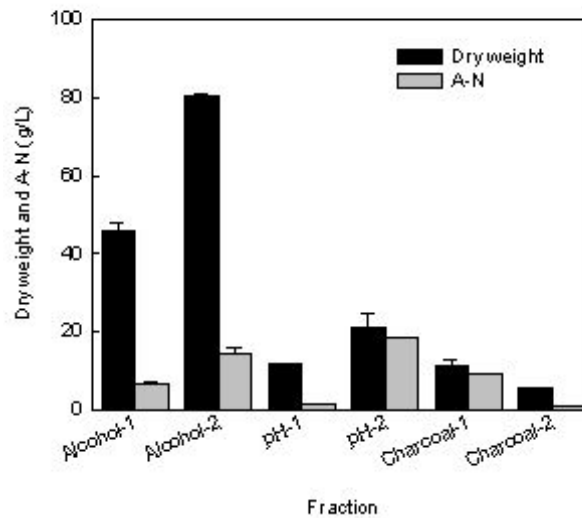


Fig. 53. Dry weight and A-N (amino-nitrogen) contents after fractionation with alcohol, acid and charcoal treatment.

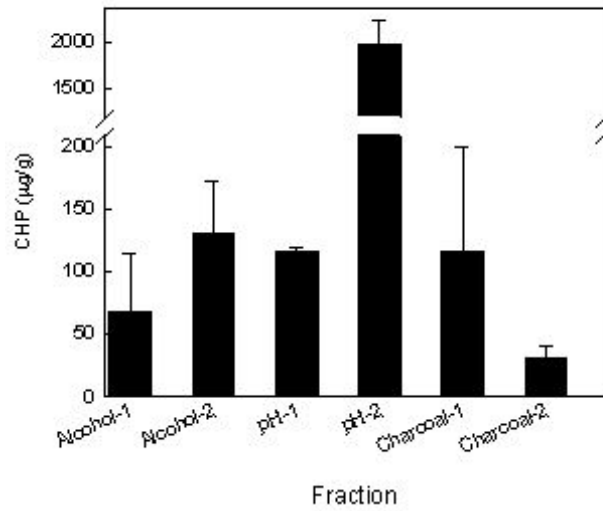


Fig. 54. CHP contents after fractionation with alcohol, acid and charcoal treatment.

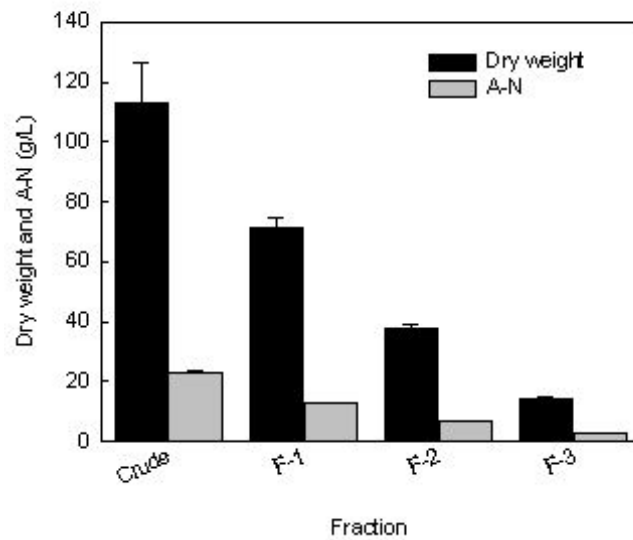


Fig. 55. Dry weight and A-N (amino-nitrogen) contents after fractionation with UF treatment. F-1: <10 kD MW, F-2: 10-30 kDa MW, F-3: >30 kDa MW

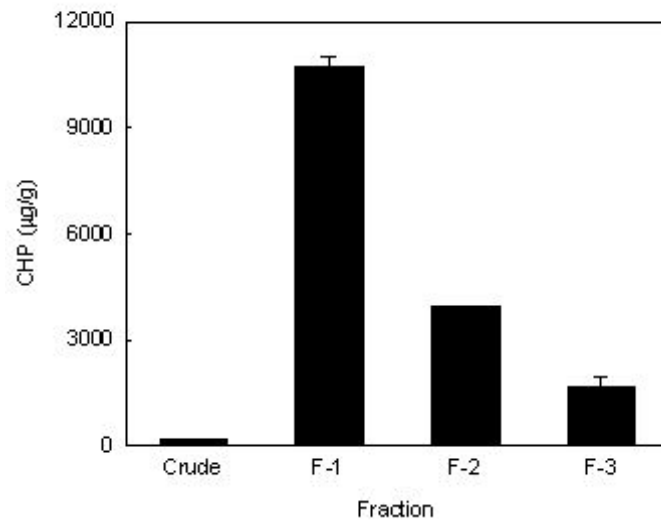


Fig. 56. CHP contents after fractionation with UF treatment. F-1: <10 kD MW, F-2: 10-30 kDa MW, F-3: >30 kDa MW

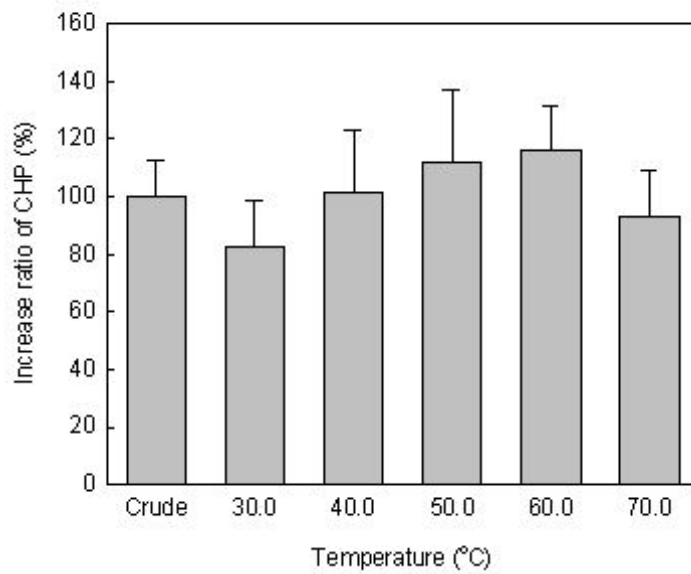


Fig. 57. Recovery ratio of CHP after cyclization at various temperature.

## 마. 대두 가수분해물의 기능성 평가

### (1) 열안정성

pH 3.6, 7.6과 9.0에서 각각 100°C, 20-60분 열처리하였을 때 콩 가수분해물의 안정성을 측정한 결과 (Fig. 58), CHP의 함량이 높은 10 kDa 이하인 분획은 산성 조건인 pH 3.6에서는 흡광도의 변화가 없었으나, 중성과 알칼리 조건인 pH 7.6과 9.0에서 흡광도의 증가가 있었으므로 이 조건에서의 열안정성은 산성 조건에 비해 다소 떨어지는 것으로 확인되었다. 반면 crude인 콩 가수분해물은 중성인 pH 7.6에서의 열안정은 가열시간이 증가할수록 급격히 감소한 반면, 산성과 알칼리성 조건인 pH 3.6과 9.0에서는 비교적 안정한 열안정성을 보였다.

### (2) 용해도

- ▶ <10 kDa MW: 대두 가수분해물 중 용해도가 가장 높았으며 pH 3.6과 7.6에서는 100% 용해되었고 pH 9.0에서도 81.0%의 용해도를 나타내었다.
- ▶ >10 kDa MW: 대두 가수분해물 중 용해도가 가장 낮았으며 pH에 따라 69.7-77.9% 범위의 용해도를 나타내었다.
- ▶ Crude: pH에 따라 74.3-80.4% 범위의 용해도를 나타내었다.

대두 가수분해물 5%는 약 70% 이상의 높은 용해도를 나타내었으며 분자량별로는 <10 kDa MW, Crude, >10 kDa MW 순으로 분자량이 적을수록 용해도가 높은 것으로 나타났으며, 특히 <10 kDa MW, 5% 용액은 pH 3.6과 7.6에서는 100% 용해도를 나타내었다 (Fig. 59).

### (3) 거품 형성력 및 안정성

- ▶ <10 kDa MW: 대두 가수분해물 중 거품 형성력 및 안정성이 가장 높았으며 pH에 관계없이 거품 형성력 18.3%, 거품 안정성 16.7%를 나타내었다.
- ▶ >10 kDa MW: 대두 가수분해물 중 거품 형성력이 가장 낮았으며, 특히 pH 3.6에서는 거품 형성력이 6.7%, 거품 안정성이 5.0%로 가장 낮았다.
- ▶ Crude: pH 9.0에서 거품 형성력 6.7%, 거품 안정성 5.0%로 가장 낮았으며 그 외의 pH에서는 거품 형성력 13.3%, 거품 안정성 11.7%를 나타내었다.

대두 가수분해물의 거품 형성력 및 안정성은 분자량별로는 <10 kDa MW, Crude, >10 kDa MW 순이었으며 Crude, >10 kDa MW의 경우 pH에 따른 거품 형성력 및 안정성의 차이를 나타내었다 (Fig. 60).

#### (4) 유화력

- ▶ <10 kDa MW: 대두 가수분해물 중 가장 낮은 유화력을 나타내었으며 pH가 증가함에 따라 유화력이 증가되는 경향을 나타내었고 12.5-23.4 m<sup>2</sup>/g 범위의 유화력을 나타내었다.
- ▶ >10 kDa MW: 대두 가수분해물 중 가장 높은 유화력을 나타내었으며 pH가 증가함에 따라 유화력이 증가되는 경향을 나타내었고 15.3-27.3 m<sup>2</sup>/g 범위의 유화력을 나타내었다.
- ▶ Crude: pH가 증가함에 따라 유화력이 증가되는 경향을 나타내었으며 13.4-22.8 m<sup>2</sup>/g 범위의 유화력을 나타내었다.

대두 가수분해물은 pH가 증가함에 따라 유화력이 증가되는 경향을 나타내었으며 분자량별로는 >10 kDa MW, Crude, <10 kDa MW 순으로 분자량이 클 경우 유화력이 컸으며 특히 >10 kDa MW는 pH 9.0에서 27.3 m<sup>2</sup>/g의 높은 유화력을 나타내었다 (Fig. 61).

#### (5) 소화력

- ▶ <10 kDa MW: 소화력은 77.9%로 대두 가수분해물 중 가장 높은 소화력을 나타내었다.
- ▶ >10 kDa MW: 소화력은 68.3%로 대두 가수분해물 중 가장 낮은 소화력을 나타내었다.
- ▶ Crude: 소화력은 76.2%로 대두 가수분해물 중 중간 정도의 소화력을 나타내었다.

대두 가수분해물의 소화력은 68.3-77.9%로 매우 높았으며 분자량별로는 <10 kDa MW, Crude, >10 kDa MW 순으로 분자량이 작을수록 소화력이 높은 것으로 나타났다 (Fig. 62).

#### (6) 콩가수분해물 10 kDa 이하 분획의 안전성 평가

- ▶ 급성독성 및 아급성 평가는 Table 33에서와 같이 콩 가수분해물 10 kDa 이하 분획을 5,000 mg/kg 단회 경구 투여한 결과, LD<sub>50</sub> 값을 측정할 수 없었다. 체중의 변화, 식이섭취율 및 음용수 섭취량에서의 차이가 없었다. 아급성 독성 평가는 Table 33에서와 같이 콩 가수분해물 10 kDa 이하 분획을 1,000 mg/kg 14일 반복 투여한 결과, 체중의 변화, 식이섭취율 및 음용수 섭취량에서의 차이도 없었다.
- ▶ 급성 및 아급성 독성 평가 시 Table 34, 35에서와 같이 혈액학적인 변화는 없었다. BUN의 변화에서 가수분해물과 control 그룹에 약간의 차이를 보였으나 이는 단백질 섭취량 증가에 따른 결과로 추정되므로 안전성에는 문제가 없는 것으로 추정된다.
- ▶ 급성독성 및 아급성 평가 시 장기 무게의 변화에 있어 간, 신장, 심장, 폐 등 장기의 무게 변화를 살펴 본 결과, Table 36에서와 같이 장기간의 변화는 나타나지 않았

다.

▶ 급성 및 아급성 독성 평가 시간 및 신장 조직의 변화를 측정한 결과 (Fig. 63, 64), 콩 가수분해물 10 kDa 이하 분획물에 대한 급성 및 아급성 독성에 대한 조직상의 변화는 없었다.

이상의 결과에 따라 콩 가수분해물 10 kDa 이하 분획은 급성 및 아급성 독성 평가 시 독성이 없는 것으로 추정된다.

#### (7) 항산화 효과

ABTS 및 hydroxyl radical scavenging activity를 측정한 결과 (Fig. 65, 66), 콩 가수분해물 (crude), 콩가수분해물 10 kDa 이하 분획 (<10 kDa)과 콩가수분해물 10 kDa 이상 분획 (>10 kDa)의 라디칼 소거능은 미미하였다. 일반적으로 라디칼활성을 보이는 소재의 경우 IC<sub>50</sub> 값이 수 mg 또는 수백 µg을 보이는 반면, 콩 가수분해물은 10 mg에서도 50% 이상의 라디칼 소거 활성을 갖지 못하는 결과를 나타내었다.

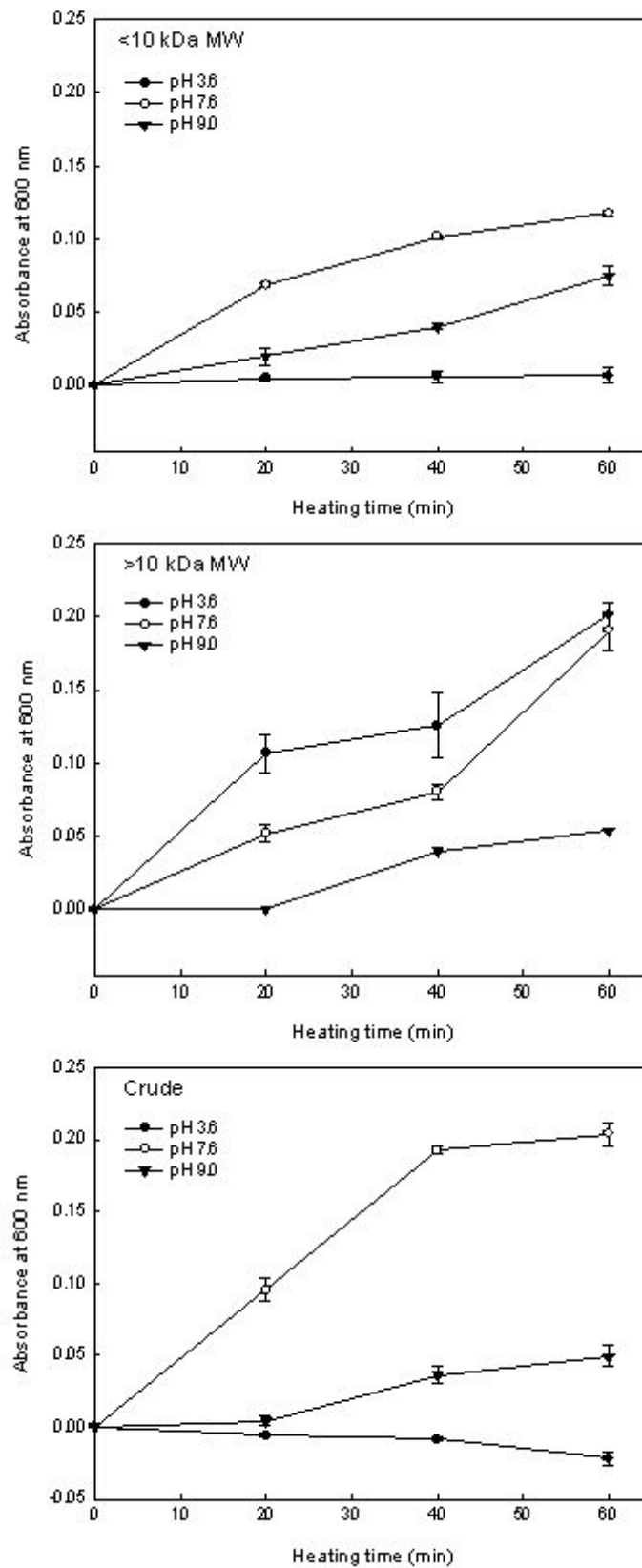
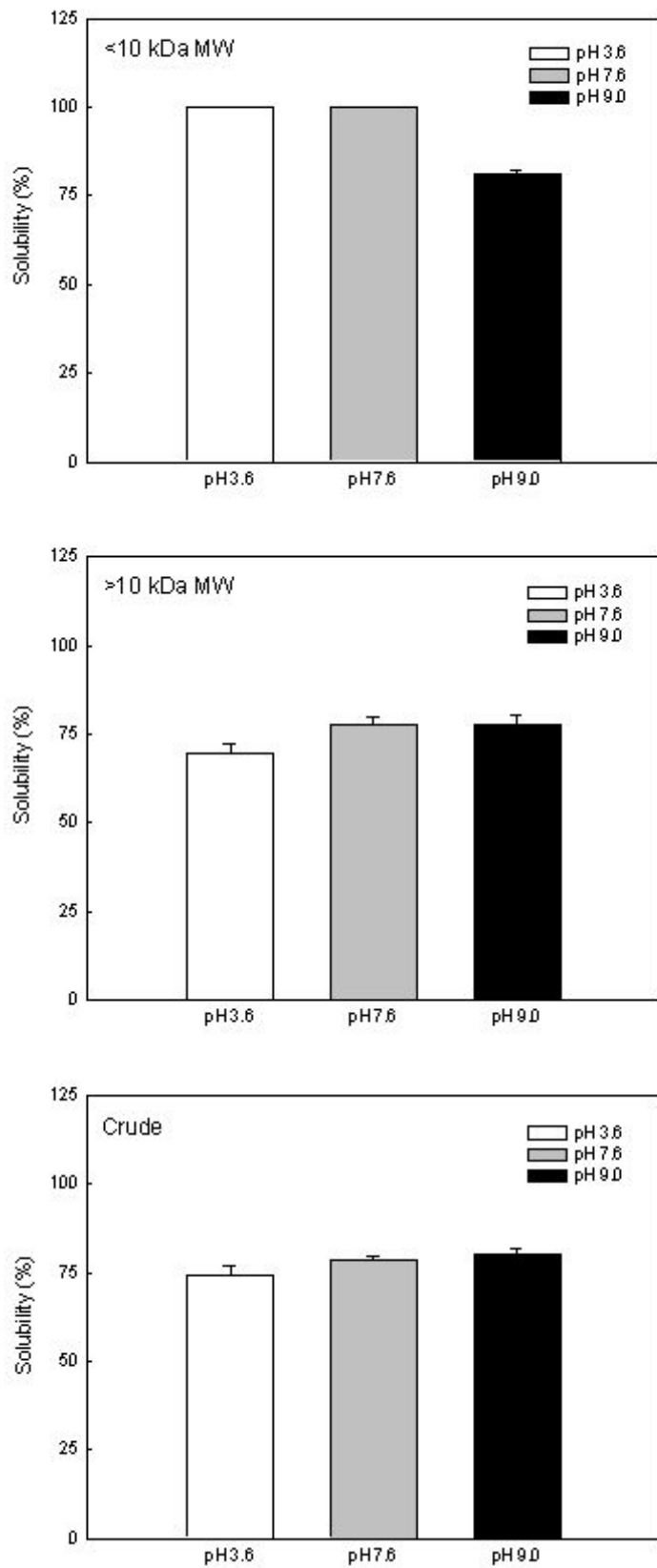


Fig. 58. Heat stability of soybean hydrolysates at pH 3.6, 7.6 and 9.0



**Fig. 59. Solubility of soybean hydrolysates at pH 3.6, 7.6 and 9.0**



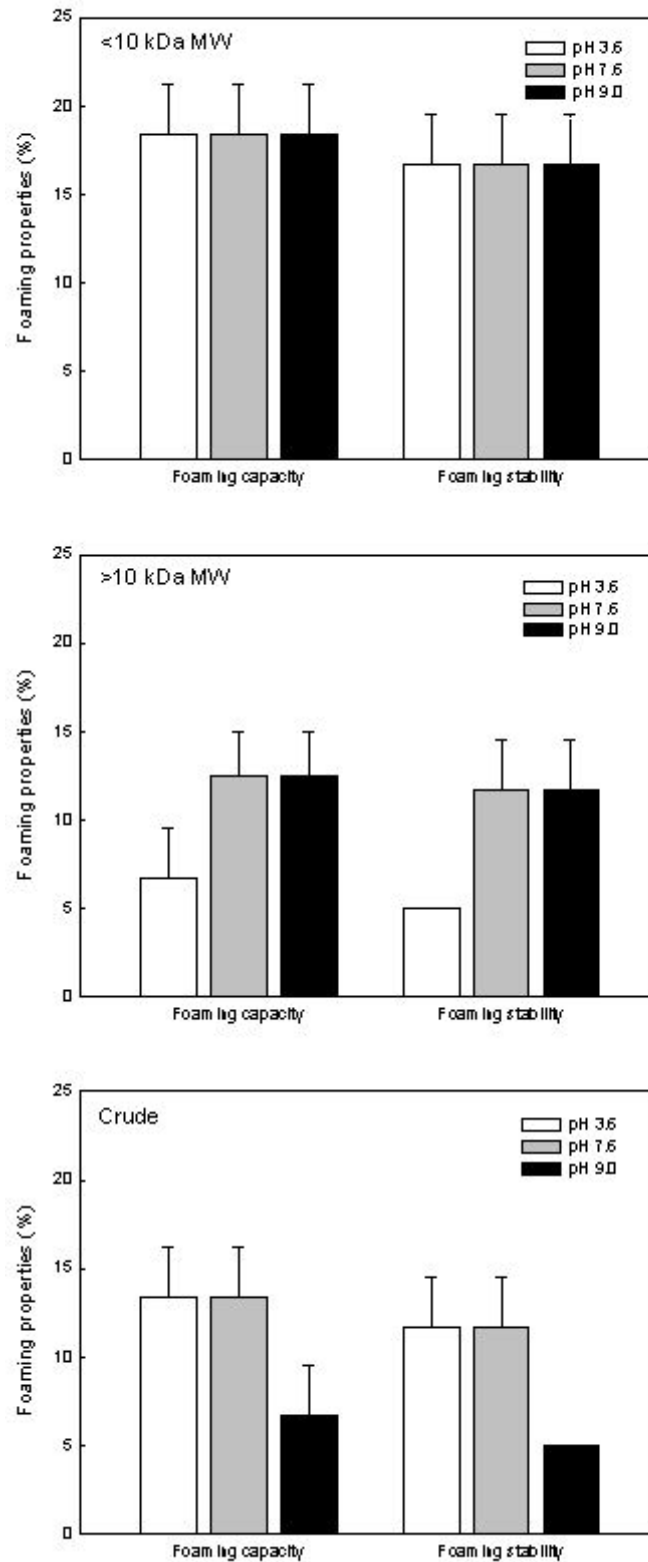


Fig. 60. Foaming capacity and foaming stability of soybean hydrolysates at pH 3.6, 7.6 and 9.0

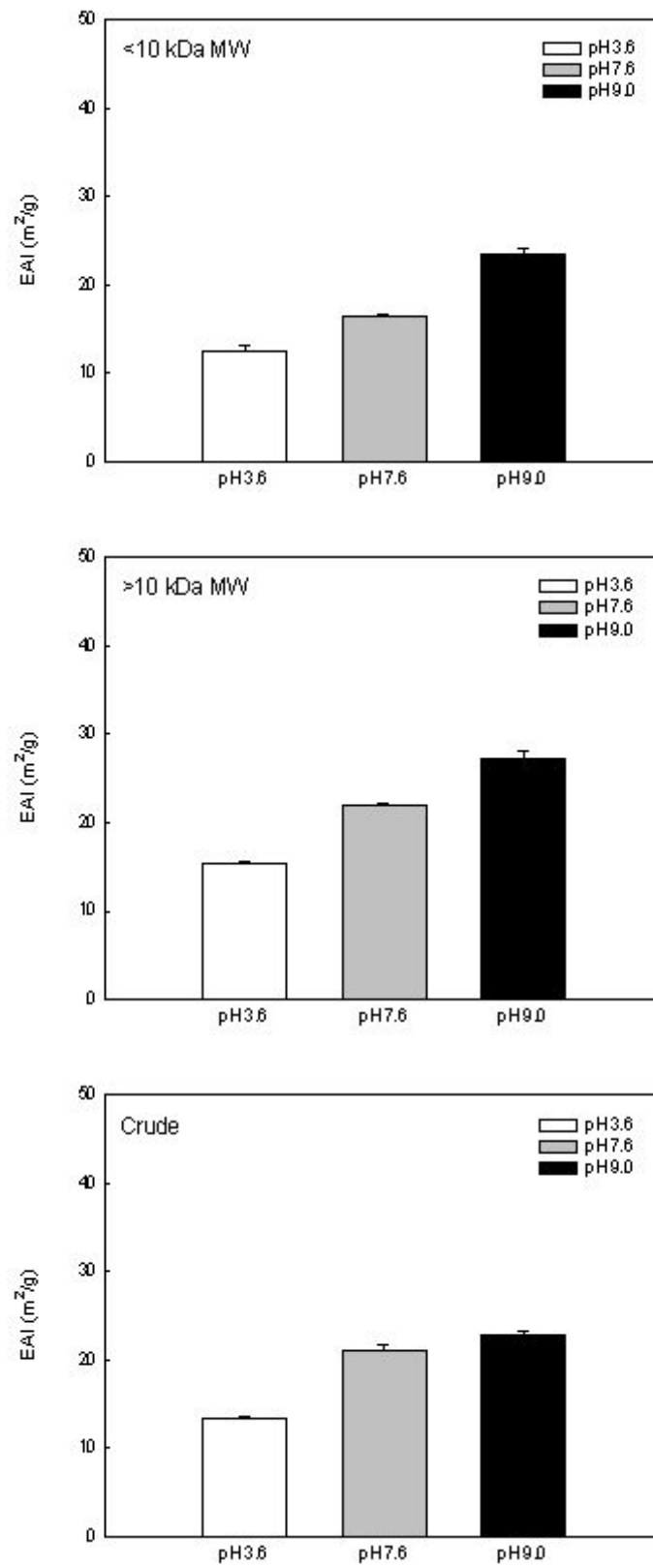
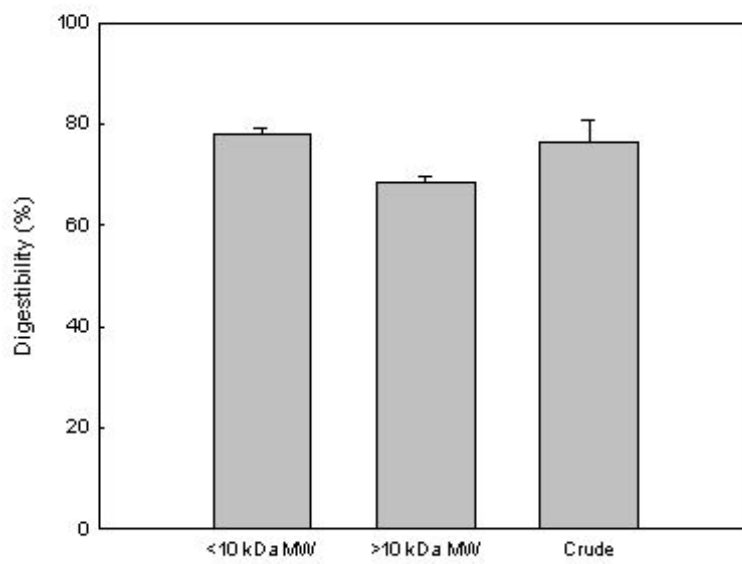


Fig. 61. Emulsifying capacity of soybean hydrolysates at pH 3.6, 7.6 and 9.0



**Fig. 62. Digestibility of soybean hydrolysates**

**Table 33. Body weight gain and daily intake of SD rats treated orally with soybean hydrolysate for acute/subacute toxicity**

	Group for acute toxicity <sup>a</sup>		Group for subacute toxicity <sup>b</sup>		Satellite group for subacute toxicity <sup>c</sup>	
	Control	Hydrolysate	Control	Hydrolysate	Control	Hydrolysate
<b>Female</b>						
Body weight gain (g)	71.03 ± 2.34	69.23 ± 9.27	43.36 ± 3.63	34.36 ± 7.72	72.03 ± 8.88	65.27 ± 9.43
Food intake (g/day)	18.01 ± 3.23	18.05 ± 3.57	17.99 ± 4.12	17.65 ± 3.94	18.11 ± 3.65	18.25 ± 4.43
Water intake (ml/day)	43.32 ± 5.33	43.02 ± 5.69	42.63 ± 5.12	42.18 ± 4.89	43.23 ± 3.89	44.02 ± 3.99
<b>Male</b>						
Body weight gain (g)	85.23 ± 3.48	83.12 ± 4.34	75.77 ± 8.11	64.21 ± 8.23*	142.23 ± 9.21	139.34 ± 5.34
Food intake (g/day)	19.16 ± 3.48	20.30 ± 3.77	20.85 ± 4.14	18.90 ± 3.99	23.98 ± 4.45	23.73 ± 3.19
Water intake (ml/day)	45.22 ± 3.52	43.27 ± 4.52	43.22 ± 3.24	44.21 ± 3.01	48.26 ± 4.29	46.28 ± 3.56

Values are means ± SD for 5 rats/group. a: The group for acute toxicity was given water vehicle or hydrolysate at 5,000 mg/kg once followed by no treatment for 14 days. b: The group for subacute toxicity was given water vehicle or hydrolysate at 1,000 mg/kg daily for 14 days. c: The satellite group for subacute toxicity was given water vehicle or hydrolysate at 1,000 mg/kg daily for 14 days followed by no treatment for 14 days. \*Significantly different from the control, P<0.05. The differences between the control and treated groups were evaluated by Student's t-test.

**Table 34. Hematological parameters of SD rats treated orally with hydrolysate for subacute toxicity**

Hematological parameters	Group for subacute toxicity <sup>a</sup>		Satellite group for subacute toxicity <sup>b</sup>	
	Control	Hydrolysate	Control	Hydrolysate
<b>Female</b>				
RBC ( $\times 10^6/\mu\text{l}$ )	7.18 $\pm$ 0.52	7.21 $\pm$ 0.19	7.47 $\pm$ 0.30	7.12 $\pm$ 0.17
WBC ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	8.57 $\pm$ 1.55	8.08 $\pm$ 1.24	8.00 $\pm$ 1.34	7.20 $\pm$ 0.22
Hct (%)	43.77 $\pm$ 3.75	43.98 $\pm$ 2.27	44.73 $\pm$ 2.74	45.10 $\pm$ 1.37
Hgb (g/dl)	13.51 $\pm$ 1.52	13.49 $\pm$ 0.94	14.50 $\pm$ 0.87	14.47 $\pm$ 0.35
MCV (fl)	56.77 $\pm$ 1.45	58.42 $\pm$ 1.26	59.83 $\pm$ 1.37	58.90 $\pm$ 1.20
MCH (pg)	18.34 $\pm$ 0.58	18.21 $\pm$ 0.88	19.33 $\pm$ 0.50	19.47 $\pm$ 0.65
MCHC (g/dl)	31.12 $\pm$ 1.23	31.55 $\pm$ 1.59	32.37 $\pm$ 0.21	32.50 $\pm$ 1.00
Platelets ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	845.26 $\pm$ 54.42	898.87 $\pm$ 49.99	728.00 $\pm$ 41.52	823.67 $\pm$ 38.94
<b>Male</b>				
RBC ( $\times 10^6/\mu\text{l}$ )	7.06 $\pm$ 0.78	7.24 $\pm$ 0.86	7.96 $\pm$ 0.38	7.98 $\pm$ 0.41
WBC ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	11.21 $\pm$ 1.02	11.00 $\pm$ 0.89	10.47 $\pm$ 0.31	10.82 $\pm$ 0.95
Hct (%)	45.15 $\pm$ 3.35	46.66 $\pm$ 4.32	47.25 $\pm$ 2.35	47.00 $\pm$ 4.48
Hgb (g/dl)	13.99 $\pm$ 0.98	14.28 $\pm$ 1.01	14.97 $\pm$ 0.21	15.00 $\pm$ 0.78
MCV (fl)	57.78 $\pm$ 1.24	57.62 $\pm$ 1.08	58.93 $\pm$ 1.11	58.83 $\pm$ 2.68
MCH (pg)	17.49 $\pm$ 0.52	18.00 $\pm$ 0.15	18.50 $\pm$ 0.52	18.73 $\pm$ 0.06
MCHC (g/dl)	31.07 $\pm$ 1.01	31.22 $\pm$ 1.75	31.27 $\pm$ 0.21	31.90 $\pm$ 1.44
Platelets ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	721.42 $\pm$ 58.87	705.66 $\pm$ 61.41	692.67 $\pm$ 60.34	695.00 $\pm$ 60.22

Values are means  $\pm$  SD for 5 rats/group. a: The group for subacute toxicity was given water vehicle or hydrolysate at 1,000 mg/kg daily for 14 days. b: The satellite group for subacute toxicity was given water vehicle or hydrolysate at 1,000 mg/kg daily for 14 days followed by no treatment for 14 days. RBC; red blood cell, WBC; white blood cell, Hct; hematocrit, Hgb; hemoglobin, MCV; mean corpuscular volume, MCH; mean corpuscular hemoglobin, MCHC; mean corpuscular hemoglobin concentration. The differences between the control and treated groups were evaluated by Student's t-test.

**Table 35. Blood biochemical parameters of SD rats treated orally with hydrolysate for subacute toxicity**

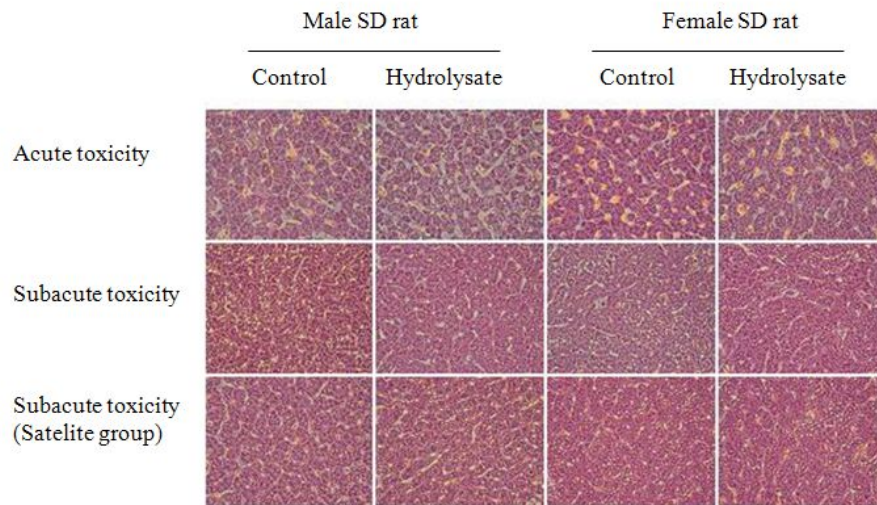
Blood biochemical parameters	Group for subacute toxicity <sup>a</sup>		Satellite group for subacute toxicity <sup>b</sup>	
	Control	Hydrolysate	Control	Hydrolysate
<b>Female</b>				
Glucose (mg/dl)	89.67 ± 8.02	94.67 ± 13.65	114.00 ± 9.70	116.33 ± 10.23
BUN (mg/dl)	8.57 ± 0.50	10.37 ± 0.32**	13.40 ± 1.40	13.45 ± 1.22
Creatinine (mg/dl)	0.30 ± 0.01	0.30 ± 0.01	0.27 ± 0.05	0.28 ± 0.05
Total protein (g/dl)	5.27 ± 0.06	6.00 ± 0.10	5.81 ± 0.13	5.84 ± 0.14
Albumin (g/dl)	3.53 ± 0.12	3.80 ± 0.01	3.79 ± 0.15	3.80 ± 0.13
Total bilirubin (mg/dl)	0.47 ± 0.06	0.53 ± 0.15	0.58 ± 0.08	0.58 ± 0.09
GOT (U/l)	85.33 ± 5.08	89.33 ± 6.21	90.00 ± 6.97	92.92 ± 7.80
GPT (U/l)	27.67 ± 4.16	29.33 ± 2.53	29.33 ± 4.18	30.92 ± 4.23
<b>Male</b>				
Glucose (mg/dl)	102.00 ± 8.89	102.33 ± 4.93	118.67 ± 4.04	125.00 ± 6.24
BUN (mg/dl)	7.03 ± 0.32	11.80 ± 0.26	13.00 ± 0.56	13.43 ± 0.31
Creatinine (mg/dl)	0.30 ± 0.01	0.37 ± 0.06	0.30 ± 0.01	0.30 ± 0.01
Total protein (g/dl)	5.40 ± 0.20	5.63 ± 0.15	5.60 ± 0.20	5.83 ± 0.06
Albumin (g/dl)	3.50 ± 0.01	3.60 ± 0.17	3.53 ± 0.06	3.62 ± 0.10
Total bilirubin (mg/dl)	0.47 ± 0.06	0.47 ± 0.05	0.47 ± 0.06	0.53 ± 0.06
GOT (U/l)	95.00 ± 5.01	98.33 ± 13.02	96.33 ± 8.13	99.33 ± 6.79
GPT (U/l)	37.33 ± 2.16	35.00 ± 2.61	41.67 ± 2.58	39.01 ± 2.00

Values are means ± SD for 5 rats/group. a: The group for subacute toxicity was given water vehicle or hydrolysate at 1,000 mg/kg daily for 14 days. b: The satellite group for subacute toxicity was given water vehicle or hydrolysate at 1,000 mg/kg daily for 14 days followed by no treatment for 14 days. BUN; blood urea nitrogen, GOT; glutamate oxaloacetate transaminase, GPT; glutamate pyruvate transaminase. \*\*Significantly different from the control, P<0.01. The differences between the control and treated groups were evaluated by Student's t-test.

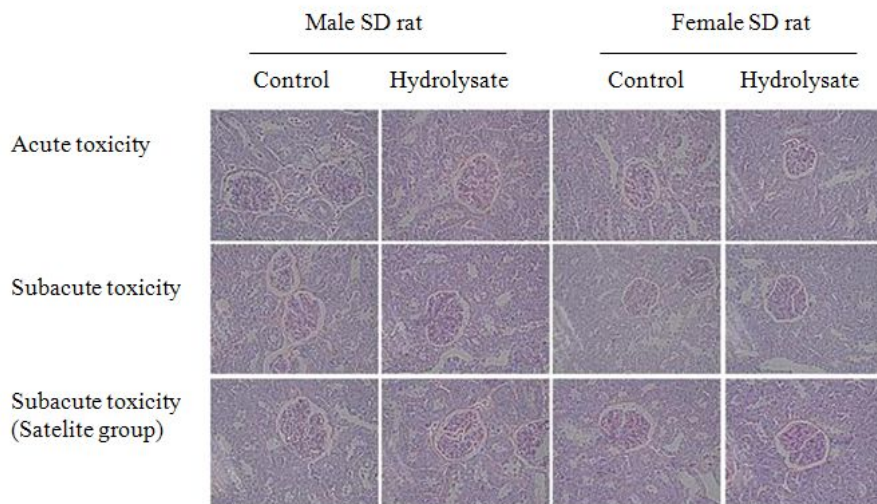
**Table 36. Relative organ weights of SD rats treated orally with hydrolysate for acute/subacute toxicity**

Relative organ weight (g/100 g of body weight)	Group for acute toxicity <sup>a</sup>		Group for subacute toxicity <sup>b</sup>		Satellite group for subacute toxicity <sup>c</sup>	
	Control	Hydrolysate	Control	Hydrolysate	Control	Hydrolysate
<b>Female</b>						
Liver	3.93 ± 0.35	4.02 ± 0.24	3.77 ± 0.16	3.79 ± 0.14	3.72 ± 0.20	3.73 ± 0.10
Kidney	0.98 ± 0.05	0.99 ± 0.09	0.89 ± 0.05	0.87 ± 0.04	0.84 ± 0.11	0.86 ± 0.06
Spleen	0.32 ± 0.01	0.30 ± 0.01	0.26 ± 0.03	0.26 ± 0.03	0.23 ± 0.02	0.25 ± 0.05
Lung	0.51 ± 0.02	0.49 ± 0.03	0.48 ± 0.03	0.47 ± 0.02	0.42 ± 0.04	0.43 ± 0.04
Heart	0.38 ± 0.01	0.36 ± 0.03	0.34 ± 0.01	0.34 ± 0.01	0.30 ± 0.01	0.32 ± 0.02
Ovary	0.08 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.01
<b>Male</b>						
Liver	4.77 ± 0.38	4.88 ± 0.44	3.80 ± 0.13	3.72 ± 0.26	3.37 ± 0.10	3.31 ± 0.29
Kidney	1.06 ± 0.13	1.05 ± 0.08	0.87 ± 0.07	0.89 ± 0.01	0.82 ± 0.01	0.86 ± 0.06
Spleen	0.40 ± 0.08	0.36 ± 0.09	0.24 ± 0.01	0.20 ± 0.05	0.20 ± 0.01	0.19 ± 0.04
Lung	0.44 ± 0.01	0.45 ± 0.03	0.41 ± 0.02	0.40 ± 0.01	0.36 ± 0.04	0.38 ± 0.01
Heart	0.38 ± 0.01	0.36 ± 0.03	0.34 ± 0.01	0.34 ± 0.01	0.30 ± 0.01	0.32 ± 0.02
Testis	0.76 ± 0.09	0.74 ± 0.08	0.71 ± 0.07	0.72 ± 0.04	0.68 ± 0.05	0.69 ± 0.04

Values are means ± SD for 5 rats/group. a: The group for acute toxicity was given water vehicle or hydrolysate at 5,000 mg/kg once followed by no treatment for 14 days. b: The group for subacute toxicity was given water vehicle or hydrolysate at 1,000 mg/kg daily for 14 days. c: The satellite group for subacute toxicity was given the water vehicle or hydrolysate at 1,000 mg/kg daily for 14 days followed by no treatment for 14 days. The differences between the control and treated groups were evaluated by Student's t-test.

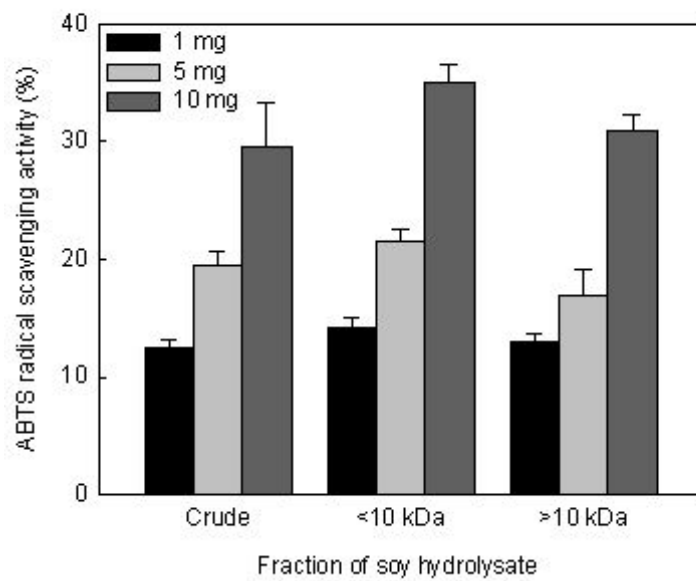


**Fig. 63. Representative microscopic findings in the liver of SD rats treated orally with hydrolysate for acute/subacute toxicity (hematoxylin-eosin stain, ×400).**

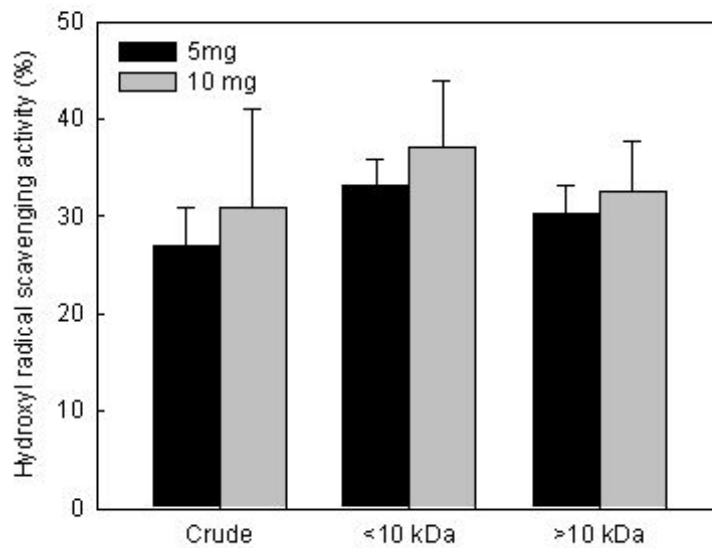


**Fig. 64. Representative microscopic findings in kidneys of SD rats treated orally with hydrolysate for acute/subacute toxicity (periodic acid Schiff stain, ×400).**





**Fig. 65.** ABTS radical scavenging activity of soybean hydrolysates



**Fig. 66.** Hydroxyl radical scavenging activity of soybean hydrolysates

# 제 3 절 3차년도

## 1. 연구내용

구분 (연도)	연구개발의 목표	연구개발의 내용	
3차년도 (2011)	제1세부	o 실험동물의 주요 조직세포 프로테옴 및 유전자 분석자료 해석	o 기존의 당뇨관련 특이 단백질 (유전자 과 비교분석(software 자료))
		o 제1형 및 2형 당뇨 관련 단백질들의 기능 및 특성 분석연구 (SAP, PRDX4, APEH, MDHC,... 등)	o 프로테오믹스에 의해 확보한 단백질들의 당뇨 연관성 및 작용 기전분석 (혈액 및 채장) o 당뇨병 진행 및 억제 기작과 관련된 새로운 단백질 마커 검색 o 당뇨병 관련 주요 미량 단백질 정밀분석 및 주요 표적단백질의 기능분석 o 당뇨 특이 단백질 발굴에 의한 실용성 연구 (biomarker, inhibitor 관련) o 진단 및 치료를 위한 표지 및 표적단백질 분석 및 발굴
		o 제1형 및 2형 당뇨 관련 유전자들의 기능 및 특성 분석 (Cysltr2, Mtus1, Wdr68, Sass6...등)	o 유전체 변화를 정량적 real time PCR 방법에 의해 유전자 검증 o 당뇨병 진행 및 억제 기작과 관련된 새로운 유전자 마커 검색 o CHP에 의해 특이 발현되는 유전자들 확인 및 분석(잠정적 바이오마커 후보군 선정) o 당뇨모델의 유전자 발현 프로파일 분석에 의한 CHP의 추가적 기능성 평가 (염증, 당수송, 인슐린 분비 조절 등의 기능)
		o CHP 처리에 의한 항당뇨 메카니즘 규명	o 각각의 항당뇨 관련 특이 유전자 및 단백질 기능 분석에 의한 작용 메카니즘 규명 o 인체 상동성 유전자 및 단백질 비교 연구 (optional)
		o 간이 임상 test에 의한 CHP 혈당 강하효과 규명	o 간이 임상 test용 시제품 제조 o 당뇨 및 내당성 환자 선별에 의한 CHP 투여 실험 (복용량, 복용기간, 혈당 및 인슐린 변화 등) o 인체 관련 의약 후보물질 개발 가능성 타진
		o Real-Time PCR	- 당뇨 관련 단백질들의 발현변화를 규명하기 위하여 채장 조직에서 RNA를 추출하였으며, 유전자 발현 변화를 RT-PCR로 검증 (실험에 사용된 Primer는 Table 37 참고)
		o 모든 실험 데이터의 통계적 해석	o t-test o ANOVA test
	제1협동	o 대량생산 공정의 최적화 및 표준화	o 실험실 수준을 벗어난 단백질 가수분해물 대량생산 공정 확립 (100 L ~ 500 L 반응조 조건 등 생산공정 확립 및 공정 중의 CHP 함량 변화 측정) o 대량생산 시 온도, 효소첨가량, pH, 염 등의 공정조건 확립에 따른 대량생산 표준화 확립
		o 최적의 공정 선정 및 평가	o 대량생산 최적화와 표준화된 공정 적용에 따른 원가, 폐수발생 등을 파악하여 최적의 공정을 선정(정제공정의 단순성, 수율, CHP 함량 및 단가 평가)
		o 기능성 소재화 및 다양한 형태의	o CHP 제형화 조건 확립 (건조, 과립화, 분말화): 기능성 소재화 (시약 및 bulk 원료형태)

	제품 개발	액상, 분말, 과립화) ○ 식품소재 가공 적성, 일반적 특성, 안정성, 기능성 분석에 의한 가공 식품 소재로 활용 ○ 다양한 형태의 제품 개발 (과립포, 드링크 음료, 혈당강하 건강보조식품 등) ○ 관능 검사 및 시장성 조사 ○ 상품화를 위한 포장 및 용기 개발
	○ 상품화	○ 간이 임상 test 결과를 토대로 최종적으로 안전하고 효과적인 제품개발 ○ 기술이전과 산학협동을 통한 최종 상품화
	○ 홍보	○ 인터넷 및 홈쇼핑 market 홍보(업체와 협동)
	○ 보고서 및 논문, 특허 작성	○ 결과보고서 작성 ○ 논문 작성 및 발간 ○ 특허 출원 및 등록

**Table 37. Primer sequences used for RT-PCR<sup>a</sup>**

Gene symbol	Gene name		Primer sequence <sup>b</sup>
<i>β-Actin</i>	β-Actin (rat)	F	5'-CACCCGCGAGTACAACCTTC-3'
		R	5'-CCCATACCCACCATCACACC-3'
<i>Mte1</i>	Mitochondrial acyl-CoA thioesterase 1	F	5'-CGAAACTGAGGGCTGAAGTC-3'
		R	5'-AGGCTCAGCGTAGCATTTG-3'
<i>Mt1a</i>	Metallothionein 1a	F	5'-ACCTCCTGCAAGAAGAGCTG-3'
		R	5'-AAACTGGGTGGAGGTGTACG-3'
<i>Miox</i>	Myo-inositol oxygenase	F	5'-ATCAGGGGCTGATTGACAAG-3'
		R	5'-TAGCCAGGCAAAAGTGACC-3'
<i>Cysltr2</i>	Cysteinyl leukotriene receptor 2	F	5'-TATTTGTCTGGGGAGCCTTG-3'
		R	5'-CATAATTCTGCAGGCCCAG-3'
<i>Mtus1</i>	Mitochondrial tumor suppressor 1	F	5'-TTCTGCAGGACTGACCCTC-3'
		R	5'-TTCCCTCGTTCCATAAGTGC-3'
<i>Wdr68</i>	WD repeat domain 68	F	5'-TCGCCATCTGCTACAACAAC-3'
		R	5'-CTGGCCTGGACTTCTACAGC-3'
<i>β-actin</i>	β-Actin (mouse)	F	5'-GTCCCTCACCTCCCAAAAG-3'
		R	5'-GCTGCCTCAACACCTCAACCC-3'
<i>Dedd</i>	Death effector domain-containing	F	5'-TTTCCTGTTGCCACTTACCC-3'
		R	5'-TCACAGCCCTTTGGTTTTTC-3'
<i>IL2</i>	Interleukin 2	F	5'-GCAGGCCACAGAATTGAAAG-3'
		R	5'-TCCACCACAGTTGCTGACTC-3'
<i>Socs2</i>	Suppressor of cytokine signaling 2	F	5'-TTGGGGTGTGCCTTTACTTC-3'
		R	5'-AGTCATGGGACACCTTCCTG-3'
<i>Slc2a4</i>	Solute carrier family 2, member 4	F	5'-ACATACCTGACAGGGCAAGG-3'
		R	5'-CGCCCTTAGTTGGTCAGAAG-3'
<i>Pdx1</i>	Pancreatic and duodenal homeobox gene 1	F	5'-GAAATCCACCAAAGCTCACG-3'
		R	5'-TTCAACATCACTGCCAGCTC-3'
<i>Acbd5</i>	Acyl-Coenzyme A binding domain containing 5	F	5'-GGAAGTGGAGGTGATGGAG-3'
		R	5'-CACCAAGCTGGTCTCTGTG-3'
<i>Fubp1</i>	Far upstream element binding protein 1	F	5'-AAAGTTCAGCAAGCCAAGG-3'
		R	5'-CGAACACCAGCATCATTTTG-3'
<i>IL33</i>	Interleukin 33	F	5'-CCTTCTCGCTGATTTCCAAG-3'
		R	5'-CCGTTACGGATATGGTGGTC-3'

<i>PolR2I</i>	Polymerase (RNA) II	F	5'-ACATGCTGTACCCCAAGGAG-3'
	polypeptide I	R	5'-GACACGTCTGCGATGATCTG-3'

---

<sup>a</sup> This was performed using the one-step RT-PCR kit (Takara Bio Inc., Madison, WI, USA).

<sup>b</sup> F (Forward) and R (Reverse) primer.

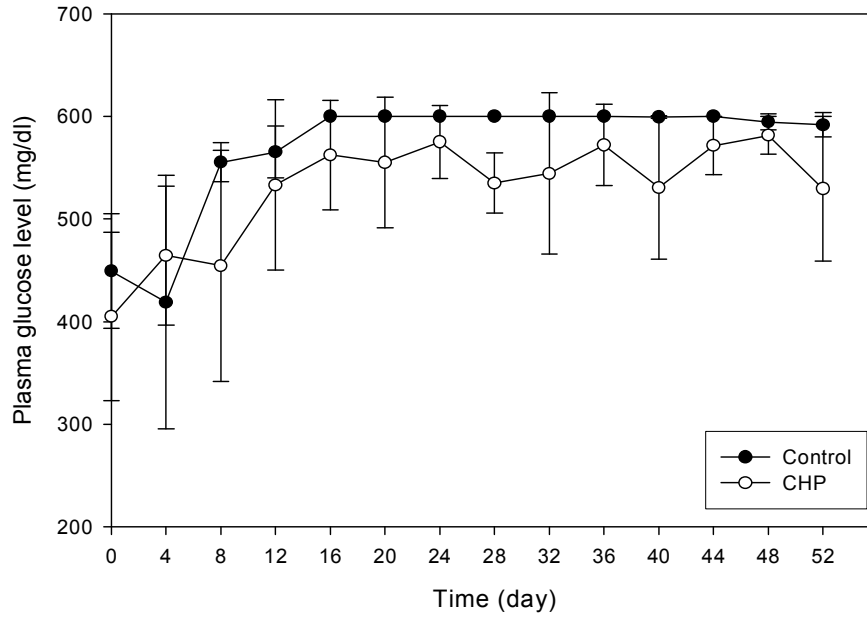
## 2. 연구결과

### 가. Type 2 *db/db* mouse에서 CHP의 효과

#### (1) 투여 시간에 따른 혈당 변화

*db/db* mouse를 구입하여 그룹별로 3마리씩 (3 그룹; control, CHP, K-CHP)케이지에 넣고 온도 및 습도를 유지하면서 일주일 정도 순화 기간을 거쳐 CHP 투여 실험을 진행하였을 때, Fig. 67에서 보는 바와 같이 2주 동안 pure CHP (2 mg/Kg)와 추출 정제한 CHP (2 mg/0.247 g CHP in Soybean hydrolysate) 처리군에서 혈당 수준의 변화가 대조군과 비교할 때 전혀 없음을 보여준다. 그 후 투여 농도를 1.5 (14 일후, 3 mg/Kg)에서 2배 (30 일후, 4 mg/Kg )까지 증가하여 투여하였을 때도 전혀 변화가 없는 것으로 확인되었다. 같은 실험을 (*db/db* mouse 이용) 3 반복하였을 때 서로 같은 결과, 즉 혈당 강화 효과를 보이지 않았다. 이는 CHP가 leptin이 결여된 *ob/ob* mouse에서는 leptin과 비슷한 작용에 의해 혈당강하, 포도당 내성 감소, 유전자 및 단백질 등의 변화와 같은 항당뇨 효과를 보이지만, leptin-receptor가 결여된 *db/db* mouse에서는 CHP가 작용을 전혀 하지 못하는 것으로 보이며, 따라서 항당뇨 효과를 나타내지 않는 것으로 사료된다.

### Control vs CHP



### Control vs K-CHP

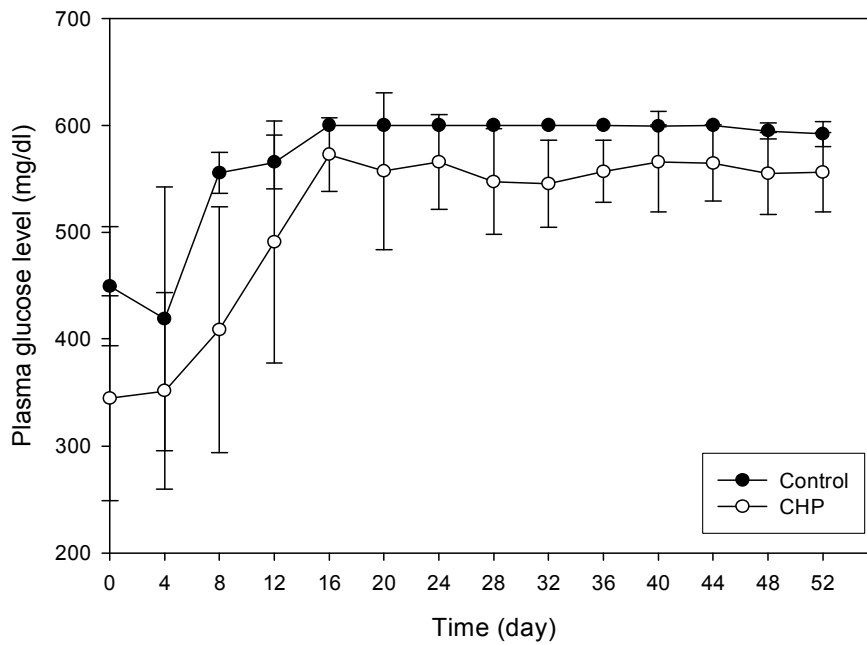


Fig. 67. Profile of blood sugar level by CHP treatment in Type 2 *db/db* mouse

#### 나. 제 1형 Rat과 2형 mouse 췌장에서 당뇨관련 유전자들의 기능 및 특성 분석

##### (1) STZ-처리 diabetic rat과 당뇨 쥐 (ob/ob mouse)에서 CHP 항당뇨 효과

Proteome 분석에 앞서, STZ-유도 당뇨쥐에서 21일 동안 CHP (4 mg/kg of body weight)를 처리하였을 때, STZ-처리 control rat 보다 56% 정도 평균 혈액 혈당을 낮추므로써 매우 좋은 혈당 감소효과를 보였고, 또한 CHP-처리 ob/ob mouse (C57BL/6J)에서 24일 동안 CHP (2 mg/kg of body weight)를 투여하였을 때 약 57% 정도 혈당 감소효과를 나타냈다. 이와 같은 결과는 CHP가 STZ-처리 제 1형 당뇨쥐와 유전적인 제 2형 당뇨쥐에서 모두 혈당강화 효과를 보이는 것으로 사료된다.

##### (2) STZ-처리 diabetic rat의 췌장 조직에서 유전자 발현 패턴 분석

유전자 발현 패턴 분석은 3 그룹 (normal healthy, STZ-treated, and CHP-treated rat) 췌장에 대하여 “Rat genome 4x44K array (Agilent) Chip을 이용하여 수행하였다. 많은 data 해석에 대하여 전체적으로 기능과 연관된 유전자 발현 패턴을 보고, 부분적으로는 췌장 조직에서 일어나는 생물학적 과정들을 반영하는 연관된 발현 패턴을 확인하기 위하여 “hierarchical clustering (계층적 집단화)”을 사용하였다. Fig. 68에서 보는 바와 같이, dendrogram (계통도, 수지상도)과 clustering display (군집도)는 그룹들 사이에 여러 유전자들의 다른 발현 패턴을 보여준다 (4배 이상 증가 또는 감소). 전체 44,000 유전자들 중에서 정확히 3,244 유전자들이 rat 췌장에서 다르게 발현되는 유전자들로 나타났다. Fig. 68에서 Cluster 2와 6에 포함된 유전자들은 (4,940 유전자 중에서 1,175 유전자) STZ 처리에 의해 유전자 발현이 감소하였지만, CHP 처리에 의해 완전하게 또는 부분적으로 정상 수준으로 복구되었다. 대조적으로 Cluster 3과 9에 포함된 유전자들은 (4,940 유전자 중에서 629 유전자) STZ 처리에 의해 유전자 발현이 증가하였지만, CHP 처리에 의해 정상 수준으로 다시 복구되었다. 이런 결과들에 의하면 발현에 변화가 있는 유전자들은 CHP 처리에 높은 반응성을 보이며 CHP의 항당뇨 활성화와 직,간접적으로 연관되어 있음을 보여준다.

기능적 분류에 있어서, control rat에 비해 STZ-처리 및 CHP-처리 rat의 췌장에서 7,198 유전자들이 다르게 발현되는 유전자들로 나타났고 (Fig. 69A), 정확히 1,534 유전자들은 CHP 처리에 의해 정상 수준으로 복구되었다 (Fig. 69B). 이런 정상화된 유전자들의 대부분은 신호전달, 운송, 전사, 면역반응, 세포분화, 세포자살, 지질대사, 염증반응, 세포성장, 세포이동, 항상성, 단백질 생합성, 세포주기, 세포 부착 및 세포증식에 관여하는 유전자들이다.

Rat 췌장에서 중요하게 조절되는 유전자들 중에서 당뇨 연관 유전자들은 Table 38에 보는바와 같다. 정상적으로 건강한 쥐와 비교해 볼 때 STZ 처리에 의해 22개 유전자들이 2배 이상 다르게 발현되는 것을 보이며, 특히 이들 유전자들 중에서 14개 유



전자 (*Mtel*, *Per2*, *Illrl1*, *Sult2a1*, *Nppb*, *Mtla*, *Miox*, *Angpt1*, *Tp53*, *Cbp*, *Plek*, *Sst*, *Gcg*, and *Cdkn1a*)들은 발현 수준이 증가하였고, 8개 유전자 (*Calcrl*, *Fgf7*, *Parp1*, *Thbs1*, *Nts\_predicted*, *Pvalb*, *Acsl6*, and *P2ry1*)들은 발현이 감소하였다. 더구나 Table 39에서 보는바와 같이, 11 유전자들은 STZ 처리에 의해 발현수준이 8배 정도 크게 증가하거나 감소하였고 또한 그 발현 수준은 CHP 처리에 의해 정상 수준으로 복구되었다.

STZ 처리 쥐의 췌장에서 여러 유전자들의 발현 수준 변화 중에서 먼저 인터루킨에 대한 유전자의 발현 변화에 대하여 조사하였다. Interleukin-1 $\beta$ 는 염증  $\beta$ -세포의 기능을 저해하여 파괴하므로써 제1형 당뇨를 유발하는 촉진제로 작용하는 cytokine이며,  $\beta$ -세포의 apoptosis(세포자살)를 촉진하는 것으로 알려져 있다 [41]. 또한 제 2형 당뇨 환자 췌장 절단 부위에서도  $\beta$ -세포가 interleukin-1 $\beta$ 를 생산한다고 알려져 있다. 이와 같은 발견들은 췌장의 랑겔한스섬에서 염증의 중재자인 interleukin-1 $\beta$ 의 생산이 제 1형 및 제 2형 당뇨의 병 발발에 중요한 역할을 할 것이라고 사료된다. 더욱 중요한 것은 interleukin-1 $\beta$ 는 이런 당뇨 환자들에 있어서  $\beta$ -세포의 양과 기능을 보존하는데 필요한 잠재적인 치료 표적이 된다. 제 1형 당뇨 환자들은 IL-2 생산이 획득에 의한 결핍을 갖지만, 제 2형 당뇨 환자들에서는 그렇지 않으며 이런 결핍은 진행하고 있는 자가면역질환, 고혈당, 인슐린 투여, 먹는 혈당치료제 등과는 연관성이 없다고 보고되었다 [42]. IL-1 receptor의 높은 수준의 발현은 (STZ 처리 쥐에서 3.9배 증가), 본 microarray 연구 결과가 상기 내용과 일치하는 것을 보여준다.

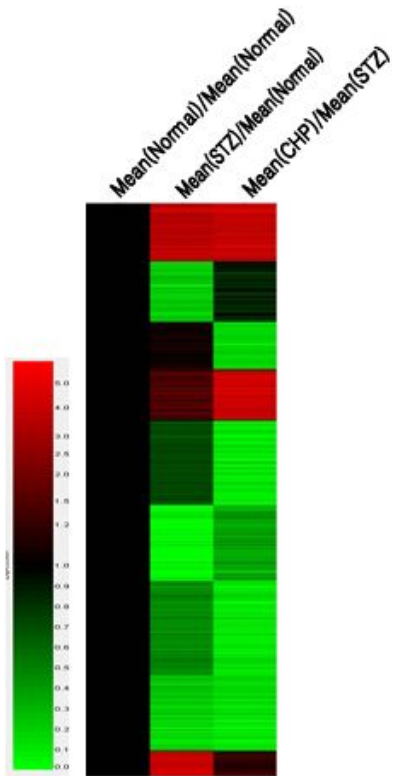
지질 대사효소에 대한 정보를 갖는 3가지 유전자들이 [*Mtel* (9.6-fold), *Ptdssl* (9.2-fold), and *Sult2a1* (3.1-fold)], STZ 처리 쥐에서 높은 수준으로 발현되었다. 그러나 그 발현 수준은 CHP 처리에 의해 정상적으로 복구되었으며, 이는 CHP를 처리한 쥐는 지질보다는 포도당을 더 빨리 대사하여 낮은 혈당 수준을 이끈다고 판단된다. 또한 STZ 처리 쥐에서 myo-inositol oxygenase (*Miox*)가 높은 수준으로 발현되었다. 쥐나 mouse에서 생체 내 myo-inositol 생합성능은 제한적이므로, 생리적 및 영양학적 스트레스 하에서 myo-inositol 결핍을 방지하기 위하여 음식에 있는 myo-inositol이 섭취해야만 한다 [43]. 제 1형 및 제2형 환자들 모두 정상인에 비해 뇨속에 D-chiro-inositol 과 myo-inositol 배출량이 증가한다고 보고되어 있다 [44]. STZ 처리 쥐의 췌장에서 *Miox*의 높은 수준의 발현에 의한 (인슐린 작용의 중재자 역할을 하는 myo-inositol), myo-inositol의 이화작용은 그 물질의 산화적 분해에 의해 일어나므로 인슐린 활성의 감소를 초래할 수도 있다고 보고되었다 [45]. 따라서, glucagon (*Gcg*) 과 somatostatin (*Sst*) 대한 정보를 갖는 유전자들이 STZ 처리 쥐의 췌장에서 높은 수준으로 발현되었으며, CHP 처리에 의해 발현 수준이 정상적으로 복구되었다는 것은 재미있는 일이다. STZ 처리 쥐의 췌장에 대한 microarray 분석 결과, olfactory receptor 984 (*Olr984*)의 중요한 down-regulation은 또 다른 현저한 발견이라 볼 수

있다. 냄새 수용체에 대한 다중유전자 계열의 발견은 후각기관의 화학적 특이성에 대한 분자적 수준의 연구를 가능케 하였다 [46]. 현재까지 비후각조직에서 냄새 수용체들의 기능은 알려지지 않았고, 더욱 당뇨병과 연관되어 있다는 증거는 없다. 본 연구에서 처음으로 STZ 처리 쥐에서 정상 쥐에 비해 약 14.7배 정도 발현이 감소한 것을 확인하였고, 후각기능의 저하는 당뇨병 환자에게서 일어날 가능성이 있고, 그러므로 후각기관이 가까운 미래에 당뇨병 치료의 표적이 될수 있을 것이다.

또 다른 microarray 결과로서 단백질 해독, 칼슘의존 단백질 분해효소 활성화, 결사슬을 갖는 아미노산 합성을 포함한 여러 가지 세포 활동에 관여하는 [47, 48] 다기능 단백질인 미토콘드리아 ribosomal protein (*Mrp*)의 down-regulation 결과이다. 효모에서 높은 수준으로 미토콘드리아 ribosome의 large subunit protein 40의 발현은 미토콘드리아 DNA 손실을 방지한다고 보고되고 있다 [49]. 그러나 포유동물에서는 *Mrp* 발현과 대사질환과의 확실한 관계가 정립되어 있지는 않지만, 이 유전자의 발현 감소는 apoptosis나 체장의 다른 기능의 손실과 관련이 있을 것이라 추측은 할 수가 있다.

제 1형 당뇨쥐를 이용하여 얻은 microarray data를 입증하기 위하여 여러 가지 관심 유전자들 (e.g. *Mte1*, *Mt1a*, *Miox*, *Mtus1*, *Cysltr2*, and *Wdr68*)에 대하여 real time RT-PCR을 수행하였고, Fig. 70에서 보는바와 같이 이런 유전자들의 발현 패턴은 microarray data와 흡사한 방향으로 변화하는 것을 보여준다.

A

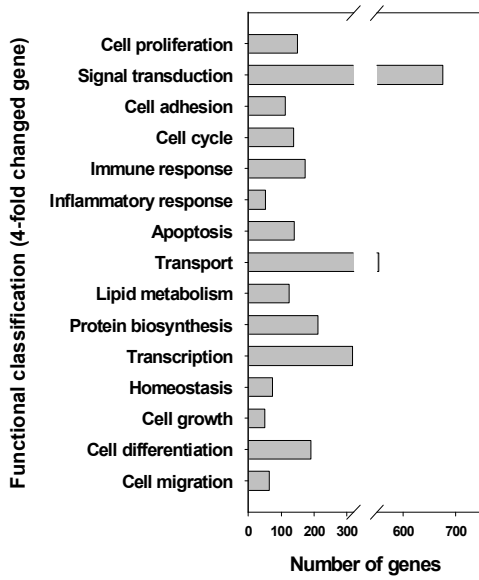


B

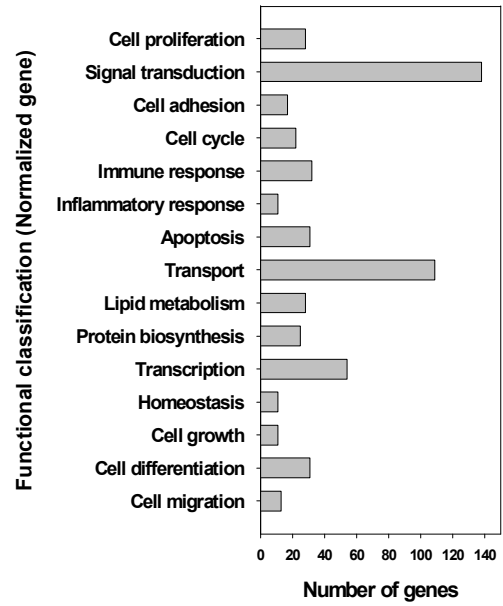


**Fig. 68. Dendrogram of gene expression profiles of diabetic rat pancreas.** Gene expression levels of normal healthy rats are shown in black for base-lines; up-regulated genes are shown in red color, whereas down-regulated genes are shown in green color (A). Clustering of significantly altered genes in STZ- and CHP-treated rats based on normal (Nor) healthy rats (B).

A



B



**Fig. 69. Functional classification of differentially expressed genes ( $\geq 4$ -fold change, a total of 7,198 genes) (A) normalized by CHP treatment (B) (1,538 genes).**

**Table 38. List of genes differentially expressed in pancreatic tissue of SD rats before and after treatments of STZ and CHP**

Gene Symbol	Gene name	Fold change (STZ/Nor)	Fold change [(STZ+CHP)/Nor] <sup>a</sup>	Biological process <sup>b</sup>
<i>Mte1</i>	Mitochondrial acyl-CoA thioesterase 1	9.5691	-1.4080	N
<i>Per2</i>	Period homolog 2	4.2200	-2.9968	K, L
<i>Calcrl</i>	Calcitonin receptor-like	-5.8255	4.3740	A, L
<i>Il1rl1</i>	Interleukin 1 receptor-like 1	3.9482	-1.7223	D, F, L, O
<i>Sult2a1</i>	Sulfotransferase family 2A, Dehydroepiandrosterone (DHEA)-preferring, member 1	3.1210	-1.5658	N
<i>Nppb</i>	Natriuretic peptide precursor type B	4.9268	1.0538	C, D, H, L
<i>Mt1a</i>	Metallothionein 1a	8.6046	-1.6918	M, L
<i>Miox</i>	Myo-inositol oxygenase	21.8610	-1.3350	M, L
<i>Fgf7</i>	Fibroblast growth factor 7	-6.2545	-1.0064	N, J, L, A
<i>Parp1</i>	Poly (ADP-ribose) polymerase family, member 1	-4.9675	-2.2253	H, K
<i>Indo</i>	Indoleamine-pyrrole 2,3 dioxygenase	5.8474	3.0781	-
<i>Thbs1</i>	Thrombospondin 1	-4.0268	-1.8188	E
<i>RGD1306802</i>	Similar to hypothetical protein BC008207	-3.2514	2.6854	-
<i>Nts_predicted</i>	Neurotensin (predicted)	-7.5657	-1.7323	L
<i>Angpt1</i>	Angiopietin 1	2.8348	-1.6309	F, L
<i>Tp53</i>	Tumor protein p53	3.2433	-1.4084	F, H, M, K, I, G, J, A
<i>Pvalb</i>	Parvalbumin	-4.3552	-1.5475	-
<i>Cbp</i>	Csk binding protein	5.3317	2.9955	D, L
<i>Plek</i>	Pleckstrin	2.1890	-4.3451	L
<i>Acsl6</i>	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 6	-4.3766	-2.0637	A, N
<i>Sst</i>	Somatostatin	2.8527	-10.6356	P
<i>Gcg</i>	Glucagon	2.4596	-2.4895	N, L, A
<i>P2ry1</i>	Purinergic receptor P2Y, G-protein coupled 1	-4.0052	-1.8970	L
<i>Cdkn1a</i>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A	9.3777	5.5511	G, D, J, A
<i>LOC309957</i>	Similar to myocyte enhancer factor 2C	4.8122	1.8311	K

<sup>a</sup> Nor: Normal healthy rats, STZ: STZ-induced diabetic rats, CHP: CHP-treated diabetic rats.

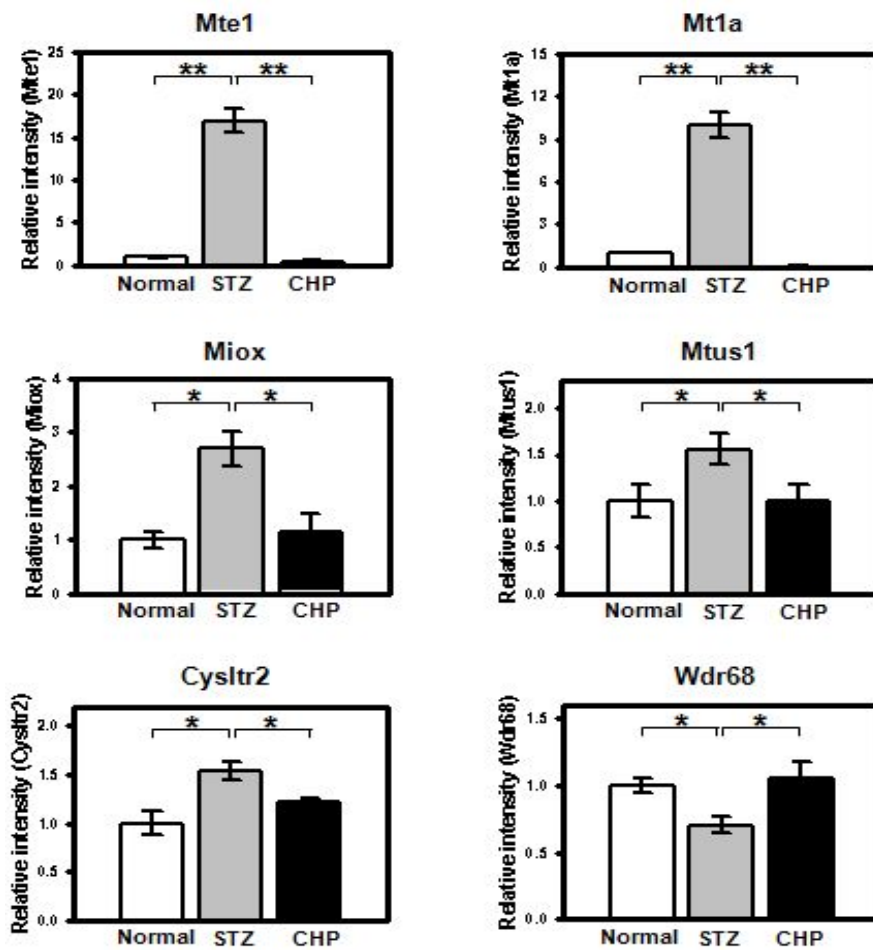
<sup>b</sup> A, cell proliferation; B, translation; C, inflammatory response; D, Immune response; E, cell adhesion; F, cell differentiation; G, apoptosis; H, cell growth; I, transport; J, cell cycle; K, transcription; L, signal transduction; M, homeostasis; N, lipid metabolism; O, cytokine; P, cell migration; Q, protein biosynthesis.

**Table 39. Genes differentially expressed (8-fold changed) in pancreatic tissue of SD rats before and after treatments of STZ and CHP**

Gene Symbol	Gene name	Fold change (STZ/Nor)	Fold change (STZ+CHP/Nor) <sup>a</sup>	Biological Process <sup>b</sup>
<i>Fut2</i>	Fucosyltransferase 2	10.459	1.620	Q
<i>Cysltr2</i>	Cysteinyl leukotriene receptor 2	11.840	-1.595	L
<i>Grid2ip_predicted</i>	Glutamate receptor, ionotropic, delta 2(Grid2) interacting protein 1 (predicted)	-14.248	-1.632	L
<i>Ibtk_predicted</i>	Inhibitor of Bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase (Ibtk_predicted)	9.897	-1.067	-
<i>Gpr85</i>	G protein-coupled receptor 85	8.613	-1.730	L
<b><i>Olr984</i></b>	Olfactory receptor 984	-14.760	1.546	L
<i>Mtus1</i>	Mitochondrial tumor suppressor 1	13.905	-1.336	-
<i>Wdr68</i>	WD repeat domain 68	-50.218	-1.239	L
<i>Ptdss1</i>	Phosphatidylserine synthase 1	9.195	-1.473	N
<b><i>Mrpl17</i></b>	Mitochondrial ribosomal protein L17	-15.355	-1.805	Q
<i>Sass6_predicted</i>	Spindle assembly 6 homolog ( <i>C.elegans</i> ) (predicted)	37.838	-1.579	J

<sup>a</sup> Nor: Normal healthy rats, STZ: STZ-induced diabetic rats, CHP: CHP-treated diabetic rats.

<sup>b</sup> Abbreviations for biological processes are the same in Table 38.



**Fig. 70. Validation of microarray data by RT-PCR in STZ-induced diabetic rats in response to CHP treatment.** Statistical significance between each group was determined by an ANOVA test, where  $p$  value is  $*p < 0.05$  and  $**p < 0.01$ . For abbreviation of each protein name, see abbreviations.

### (3) 유전적 당뇨병 (ob/ob mouse)의 췌장 조직에서 유전자 발현 패턴 분석

유전적 당뇨병 (ob/ob mouse)와 CHP 처리 쥐의 췌장 조직에서 유전자 발현 패턴 분석은 각 그룹의 3 마리로부터 모은 mRNA를 사용하여 mouse whole genome 12-plex array chip (Roche NimbleGen)으로 분석되었다. Fig. 71에서와 같이 유전자의 계층적 집단화 (hierarchical clustering)에 의하면 제 2형 당뇨병에서 보다 CHP 처리 mouse에서 유전자 발현의 중요한 변화를 보였다. 기능적 분류에 의하면 CHP 처리 mouse의 췌장에서 4,384 유전자들이 다르게 발현되었고, 그 중 2,140 유전자들의 발현이 증가하였고, 2,244 유전자들의 발현이 CHP 처리에 의해 발현이 감소되었다. 서로 다르게 발현되는 유전자들의 대부분은 신호전달, 운송, 전사, 해독, 세포 분화, apoptosis, 지질대사, 염증반응, 세포성장, 항상성, 세포주기, 세포부착, 세포증식 등과 관련된 유전자들로 구성되어있다 (Table 40). Fig. 72에 보는바와 같이 특히 신호전달, apoptosis, 항상성, 세포주기 등과 관련된 유전자들은 CHP 처리에 의해 2배 이상의 변화를 보인 유전자들이다.

그 결과 30 전사체들이 CHP 처리에 의해 2배 이상 다르게 발현되는 것으로 분석되었고, 그 중 18 전사체들 (*SOCS2*, *Cacna1a*, *Hnf4g*, *H2-Ab1*, *Snap23*, *Slc2a4*, *H2-B1*, *Mapk14*, *Frap1*, *Cacna1b*, *H2-M9*, *Hnf4a*, *Pdx1*, *Slc2a4*, *H2-DMb1*, *Rrad*, *Pik3cb*, and *Pik3cb*)은 발현이 증가하였고, 12 전사체들 (*Il2*, *Il12a*, *Cacna1c*, *Ikbkb*, *H2-Q10*, *Tap1*, *H2-T10*, *H2-Aa*, *H2-Dma*, *Pik3r1*, *Lepr*, and *H2-M1*)의 발현은 감소하였다. Table 41과 42에서 8배 이상 발현이 증가하는 유전자들과 4배 이상 발현이 감소하는 유전자들을 볼 수가 있고, 이런 유전자들은 mouse 췌장에서 당뇨와 연관성이 있던지 또는 CHP의 표적 유전자에 대한 후보군으로 생각할 수가 있다. 8배 발현이 증가하는 유전자들은 대부분 해독과정, 세포성장, 운송, 세포주기, 전사, 세포 cytokine 생산 등과 연관성이 있으며, 4배 감소하는 유전자들은 apoptosis, 세포주기, 신호전달 등과 관련이 있는 유전자들이다. STZ-처리 제 1형 당뇨병 쥐에서와 마찬가지로, interleukin 2 (IL2)와 interleukin 12a (IL12) 유전자가 유전적 당뇨병 (ob/ob mouse)의 췌장 조직에서도 과발현 되었다. IL2와 IL12는 non-obese diabetic (NOD) mice에서 제 1형 당뇨병으로 발병을 하는데 관여한다고 보고 되어있다 [50, 51]. 그러나 반대로 본 실험의 microarray 결과는 CHP-처리 mouse에서 interleukin 33 (IL33) 유전자의 발현은 제 2형 당뇨병 쥐보다 8배 정도 높게 발현되었다. 이런 결과는 당뇨 개체에서 다른 IL 계열 유전자들이 과발현 된다는 실험보고에 의해 더 확실해질 수가 있다. 제 2형 당뇨병은 당뇨 환자의 치주염증 조직에서 IL-1 $\beta$ 와 IL-6의 증가된 발현과 연관이 있으며 그런 과발현 기작에 의해 제 2형 당뇨병 환자에서 치주염증 조직의 파괴를 일으키는 것과 관련이 있다고 보고되어있다 [52]. 그러나 당뇨병에서 각각의 IL 단백질들의 생리적인 기능에 대하여 추가적인 연구가 필요하다.

여러 연구들에 의하면 비 당뇨 개체 control에 비해 제 2형 당뇨병 환자들에서 인슐린



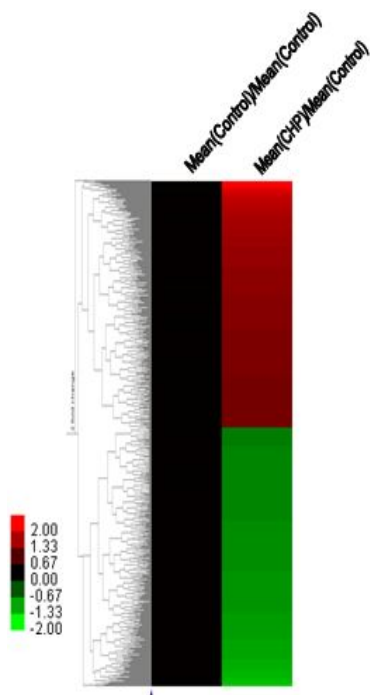
에 의해 phosphatidylinositol-3-kinase (PIK3) 유전자의 조절에 결합이 있는 것으로 보고되었다[53, 54]. 본 연구에서는 CHP 처리에 의해 PIK3 및 MAPK14 유전자 발현이 증가하였으며 이는 CHP가 확실히 인슐린 sensitivity를 증가 시키는 것으로 판단된다.

또한 microarray 결과에 의하면 유전적 제 2형 당뇨병에서 높은 수준으로 발현되는 췌장 렙틴 수용체 (*Lepr*)는 CHP 처리에 의해 발현 수준이 현저히 감소하였으며 이런 결과는 *Lepr*-결함 설치류에서 초기 단계의 증가된 인슐린 분비에 기인한 포도당 저항성이 개선되었다는 연구 보고와 거의 일치한다 [55]. 따라서 췌장 베타세포에서 당뇨병 상태에서 렙틴 저항성은 고혈당을 유발하고, 베타세포의 작용 부재 및 포도당 저항성을 감소시키는 것으로 보인다.

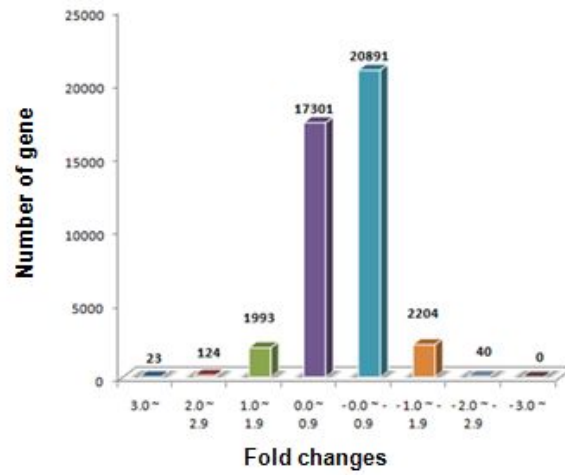
또한 유전적 당뇨병 (*ob/ob mouse*)의 췌장 조직에 대한 microarray data를 입증하기 위하여 여러 유전자들을 선택하여 (*ACBD5*, *DEDD*, *FUBP1*, *IL2*, *IL33*, *POLR2D*, *SLC2A4*, *PDX1*, and *SOCS2*) real time RT-PCR을 수행한 결과, Fig. 73에서 보는바와 같이 이런 유전자들은 microarray data와 동일한 발현 패턴을 보였다.

본 연구에서 CHP는 쥐 췌장세포에 직접적인 신호를 제공하여 많은 유전자들의 발현을 조절하며 복합적인 유전자 조절 기작을 통하여 그 효과를 증대하는 것으로 사료된다. CHP 처리에 의해 여러 유전자들의 발현 수준 변화는 당뇨병 설치류에서 고질적인 합병증을 예방하는데 관련된 후보 유전자들이 될수 있다는 가능성을 제시한다. 결론적으로 CHP는 당뇨병을 극복할 수 있는 유전자들의 발현 변화를 촉진하며, 질병을 쉽게 통제할 수 있는 것들과 상호 작용을 할 가능성이 있다.

A



B



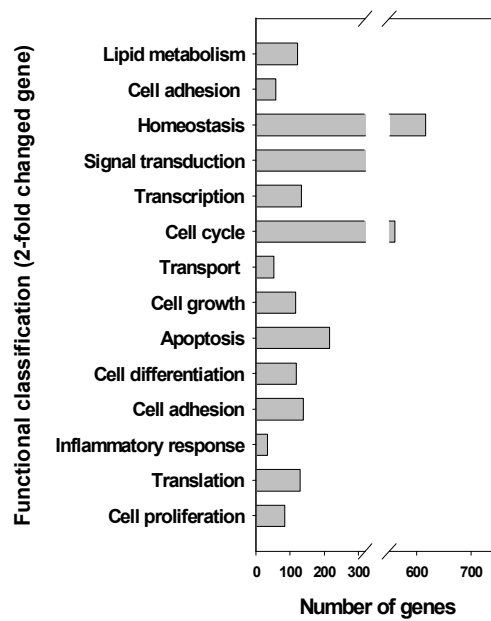
**Fig. 71. Dendrogram of gene expression profiles of diabetic rat pancreas.** Gene expression levels of genetically-diabetic mice are presented in black for base-lines; up-regulated genes are shown in red color, whereas down-regulated genes are shown in green color (A). The numbers of genes showing significantly different expression are marked according to their fold changes (B).

**Table 40. Diabetes-associated genes differentially expressed in pancreatic tissue of *ob/ob* mice before and after treatments of CHP**

Gene Symbol	Gene name	Fold change (CHP/control)	Biological process <sup>a</sup>
<i>IL2</i>	Interleukin 2	-2.0412	C, D, K, L, M
<i>IL12a</i>	Interleukin 12a	-2.3277	A, D, L
<i>Socs2</i>	Suppressor of cytokine signaling 2	2.2234	F, H, L
<i>Cacna1a</i>	Calcium channel, voltage-dependent, P/Q type, alpha 1A subunit	2.1915	F, H, I, L, M
<i>Cacna1c</i>	Calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1C subunit	-2.0333	I
<i>HNF4g</i>	Hepatocyte nuclear factor 4, gamma	2.5435	K
<i>IKBKB</i>	Inhibitor of kappaB kinase beta	-2.5893	K, L, M
<i>H2-Ab1</i>	Histocompatibility 2, class II antigen A, beta 1	2.5792	D
<i>H2-Q10</i>	Histocompatibility 2, Q region locus 10	-2.9078	D
<i>TAP1</i>	Transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)	-2.3747	D, I
<i>SNAP23</i>	Synaptosomal-associated protein 23	4.7913	I
<i>Slc2a4</i>	Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4	2.1053	I, M
<i>H2-T10</i>	Histocompatibility 2, T region locus 10	-2.4420	D
<i>H2-Aa</i>	Histocompatibility 2, class II antigen A, alpha	-2.0960	D, F
<i>H2-Dma</i>	Histocompatibility 2, class II, locus DMa	-2.3073	D, F, I
<i>H2-B1</i>	Histocompatibility 2, blastocyst	2.1343	D,G
<b>MAPK14</b>	Mitogen activated protein kinase 14	2.1418	L
<i>FRAP1</i>	FK506 binding protein 12-rapamycin associated protein 1	2.0127	F
<i>Cacna1b</i>	Calcium channel, voltage-dependent, N type, alpha 1B subunit	3.0047	I
<i>H2-M9</i>	Histocompatibility 2, M region locus 9	2.5974	D
<i>HNF4a</i>	Hepatic nuclear factor 4, alpha	2.1543	K, N
<i>Pdx1</i>	Pancreatic and duodenal homeobox 1	2.2671	F, K
<i>Slc2a4</i>	Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4	2.1833	I, M
<i>H2-Aa</i>	Histocompatibility 2, class II antigen A, alpha	-2.3132	D, F
<i>H2-DMb1</i>	Histocompatibility 2, class II, locus Mb1	2.6386	D
<i>READ</i>	Ras-related associated with diabetes	2.2036	I, L
<i>FRAP1</i>	FK506 binding protein 12-rapamycin associated protein 1	2.3085	F
<b>Lepr</b>	Leptin receptor	-2.3153	L
<i>H2-M1</i>	Histocompatibility 2, M region locus 1	-2.5820	D
<b>PIK3cb</b>	Phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, beta polypeptide	3.5083	E, L, M

<sup>a</sup> Nor: Normal healthy rats, STZ: STZ-induced diabetic rats, CHP: CHP-treated diabetic rats.

<sup>b</sup> Abbreviations for biological processes are the same in Table 38.



**Fig. 72. Functional classification of differentially expressed genes ( $\geq 2$ -fold change, a total of 4,384 genes) in the genetically-diabetic mice pancreas in response to CHP treatment.**

**Table 41. List of genes that were strikingly up-regulated by CHP treatment**

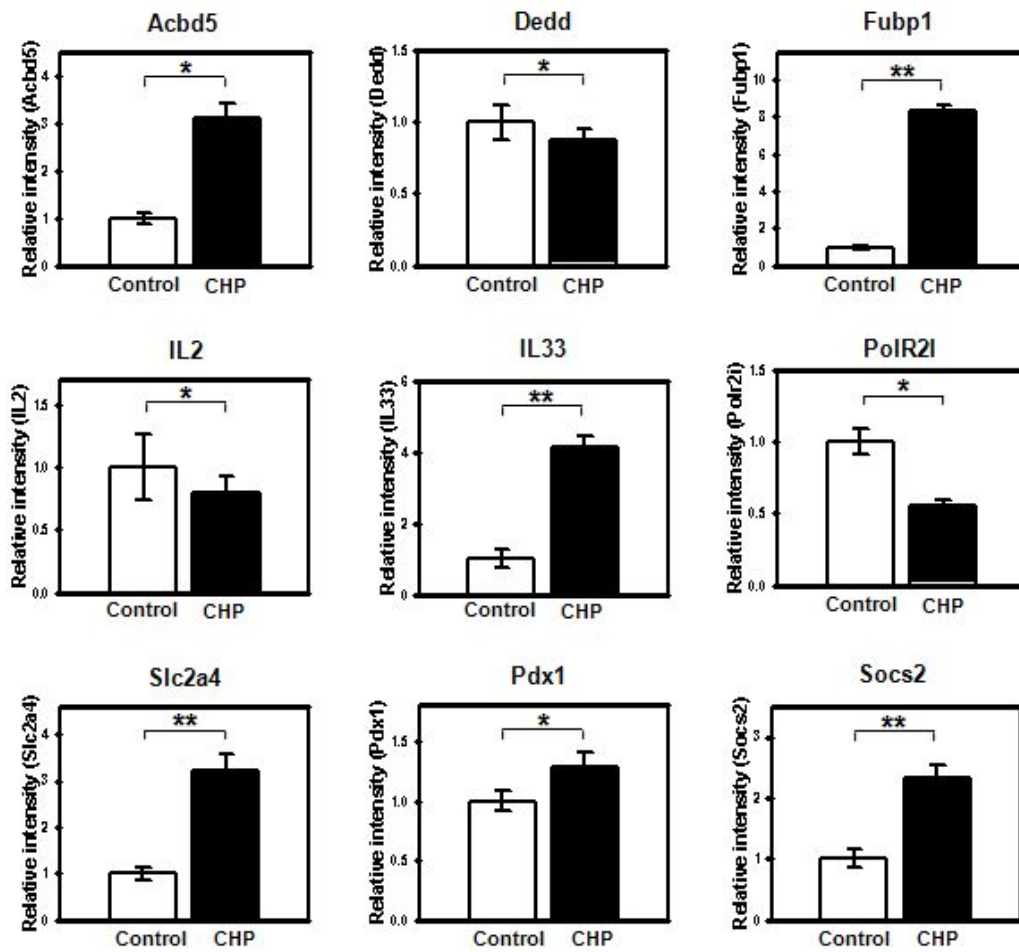
Gene Symbol	Gene name	Fold change (CHP/control)	Biological process <sup>a</sup>
<i>Acbd5</i>	Acyl-Coenzyme A binding domain containing 5	60.6458	I
<i>1810030J14Rik</i>	RIKEN cDNA 1810030J14 gene	16.4088	
<i>5730410E15Rik</i>	RIKEN cDNA 5730410E15 gene	14.7298	
<i>Gm444</i>	Gene model 444, (NCBI)	14.1354	
<i>SPC24</i>	NDC80 kinetochore complex Component, homolog (S. cerevisiae)	13.9254	J
<i>Igh</i>	Immunoglobulin heavy chain complex	13.3646	
<i>IGHV5-9-1</i>	Immunoglobulin heavy variable V5-9-1	13.1332	
<i>AK007235</i>	Unnamed protein product	10.9649	
<i>EG546397</i>	Predicted gene, EG546397	10.8724	
<i>Scnn1b</i>	Sodium channel, nonvoltage-gated 1 beta	10.6362	I
<i>Hist1h4k</i>	Histone cluster 1, H4k	10.0859	
<i>D10Bwg1364e</i>	DNA segment, Chr 10, Brigham & Women's Genetics 1364 expressed	9.6570	
<i>Fubp1</i>	Far upstream element (FUSE) binding protein 1	9.6556	K
<i>1700013D24Rik</i>	RIKEN cDNA 1700013D24 gene	9.3480	
<i>EG667905</i>	Predicted gene, EG667905	9.3230	
<i>MGC65593</i>	cDNA sequence BC005512	9.2948	
<i>EMP1</i>	Epithelial membrane protein 1	8.9760	H
<i>EG625690</i>	Predicted gene, EG625690	8.8674	B
<i>LHX1</i>	LIM homeobox protein 1	8.7838	K
<i>FUS</i>	Fusion, derived from t(12;16) malignant liposarcoma (human)	8.7725	K
<b>IL33</b>	Interleukin 33	8.7404	O
<i>CLCC1</i>	Chloride channel CLIC-like 1	8.6452	I
<i>EG666731</i>	Predicted gene, EG666731	8.0184	

<sup>b</sup> Abbreviations for biological processes are the same in Table 38.

**Table 42. List of genes that were strikingly down-regulated by CHP treatment**

Gene Symbol	Gene name	Fold change (CHP/control)	Biological process <sup>a</sup>
<i>NEGR1</i>	Neuronal growth regulator 1	-5.9561	F
<i>SLBP</i>	Stem-loop binding protein	-5.7339	
<i>POLR2D</i>	Polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide D	-5.5862	L
<i>STYXL1</i>	Serine/threonine/tyrosine interacting -like 1	-5.5200	
<i>PolR2I</i>	Polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide I	-5.3754	L
<i>BSPRY</i>	B-box and SPRY domain containing	-5.1818	J
<i>RORC</i>	RAR-related orphan receptor gamma	-5.1787	G, L
<i>Hist1H4j</i>	Histone cluster 1, H4j	-5.1583	
<i>TMEM63a</i>	Transmembrane protein 63a	-5.1513	
<i>Dedd</i>	Death effector domain-containing	-4.9463	H, L
<i>OAS1A</i>	2'-5' oligoadenylate synthetase 1A	-4.9023	E
<i>Rad51c</i>	Rad51 homolog c ( <i>S. cerevisiae</i> )	-4.9002	
<i>TMEM63b</i>	Transmembrane protein 63b	-4.8178	
<i>LOC637957</i>	Similar to ankyrin repeat domain 26	-4.7810	
<i>VASP</i>	Vasodilator-stimulated phosphoprotein	-4.7182	G, O
<i>CENPO</i>	Centromere protein O	-4.6675	
<i>YrdC</i>	YrdC domain containing ( <i>E.coli</i> )	-4.6531	J
<i>IFI35</i>	Interferon-induced protein 35	-4.6342	E
<i>HBQ1</i>	Hemoglobin, theta 1	-4.5988	J
<i>SLC12A5</i>	Solute carrier family 12, member 5	-4.5610	J, N
<i>EXOC5</i>	Exocyst complex component 5	-4.5540	J
<i>AI481105</i>	Expressed sequence AI481105	-4.5188	L
<i>NCAPH</i>	Non-SMC condensin I complex, subunit H	-4.5032	K
<i>RBP1</i>	Nuclear receptor binding protein 1	-4.4762	J
<i>PLA2G4B</i>	Phospholipase A2, group IVB (cytosolic)	-4.4748	
<i>CTSW</i>	Cathepsin W	-4.2933	
<i>EG574083</i>	Predicted gene, EG574083	-4.2930	
<i>SLC17A3</i>	Solute carrier family 17 (sodium Phosphate), member 3	-4.2805	J
<i>EG546862</i>	Predicted gene, EG546862	-4.2082	
<i>XPR1</i>	Xenotropic and polytropic retrovirus receptor1	-4.1713	
<i>TMEM54</i>	Transmembrane protein 54	-4.1542	
<i>LOC627273</i>	Similar to T-cell receptor alpha chain V region CTL-L17 precursor	-4.1518	
<i>PPP1CB</i>	Protein phosphatase 1, catalytic subunit, beta isoform	-4.1120	K
<i>ARHGAP9</i>	Rho GTPase activating protein 9	-4.1075	M
<i>PSMD7</i>	Proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 7	-4.0956	
<i>GMI684</i>	Gene model 1684, (NCBI)	-4.0799	
<i>TBCE</i>	Tubulin folding cofactor E-like	-4.0611	G
<i>Hist1H2ad</i>	Histone cluster 1, H2ad	-4.0413	
<i>XLR4B</i>	X-linked lymphocyte-regulated 4B	-4.0223	

<sup>a</sup>Abbreviations for biological processes are the same in Table 38.

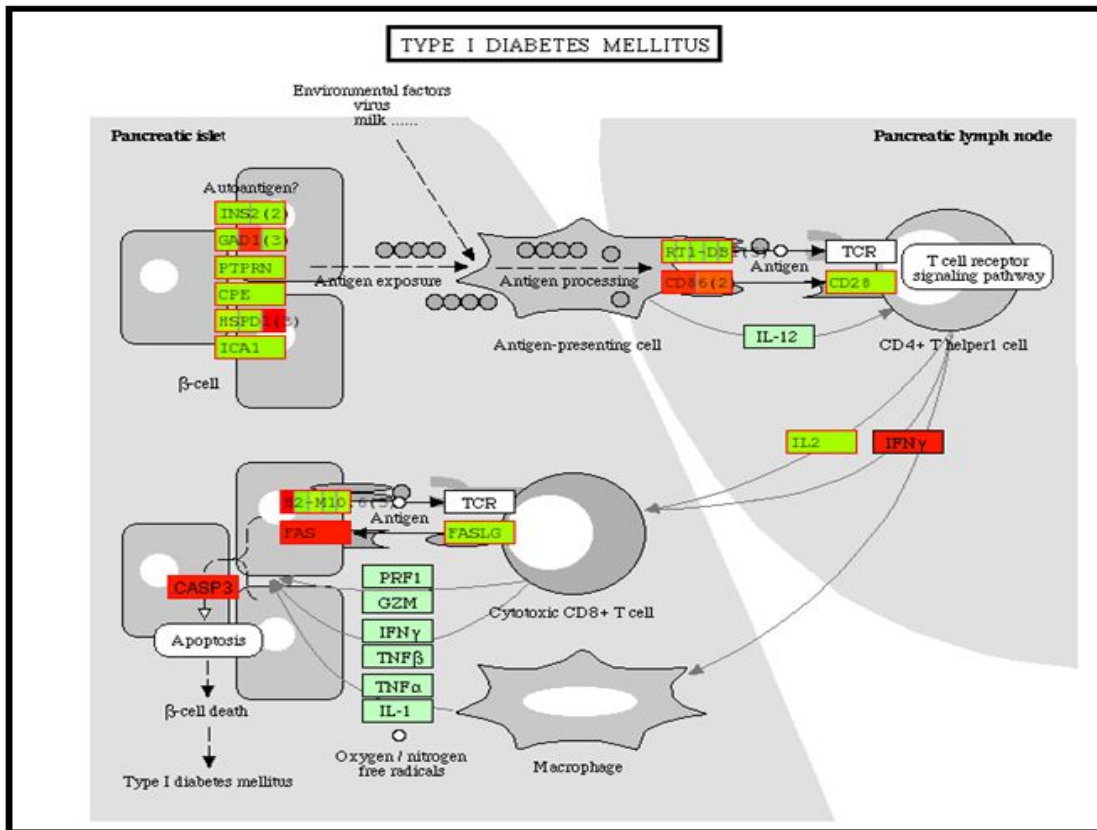


**Fig. 73. Validation of microarray data by RT-PCR in genetically-diabetic mice in response to CHP treatment.** Statistical significance between each group was determined by an ANOVA test, where  $p$  value is  $^*p < 0.05$  and  $^{**}p < 0.01$ . For abbreviation of each protein name, see abbreviations.

(4) 제 1형 및 제 2형 당뇨병의 췌장에서 추정된 항당뇨 기작

(가) 제 1형 당뇨병 췌장에서 추정된 항당뇨 기작

1형 당뇨병 기작에서 STZ 처리에 의해 T-cell 활성화에 의해 자가면역질환 발생에 관여하는 CD86의 유전자의 발현이 증가하였고, 항원특이적인 T 세포들이 Th1 세포로 분화됨으로 병을 악화시키는 IFN $\gamma$ 의 발현 수준도 증가하였다. IFN $\gamma$ 의 증가에 의해 cytotoxic CD8 T-cell에서 Fas가 증가하고 순차적으로 핵산 분해에 의해 apoptosis에 관여하는 caspase-3 활성이 증가하여 췌장세포의 apoptosis를 이끄는 것으로 추정된다. CHP 처리에 의해 세포증식 및 성장, 염증과 면역반응, 세포분화, 신호전달 등에 관련된 유전자들의 상호 연관관계는 확실히 알려져 있지 않지만 발현량의 증가와 더불어 췌장세포의 apoptosis 반응을 저해하므로써 제 1형 당뇨병의 증상을 개선시킬 수 있다는 가능성을 나타내고 있다.



**Fig. 74. Putative antidiabetic mechanism in Type I Rat Pancreas.** STZ vs Normal rat. Normalization by CHP  
 CD86 : T-cell activity (Autoimmune disease occurrence)(immune response); IFN $\gamma$  : Autoinflammatory and autoimmune diseases (apoptosis, T cell  $\rightarrow$ Th1); IL2 : T-cell & NK-cell control, Anticancer activity (cell differentiation); Caspase3 : Apoptosis



(나) 제 2형 당뇨병 쥐 체장에서 추정된 항당뇨 기작

2형 당뇨병 기작에서 CHP에 의해 당수송 및 지질 대사에 관련된 SLC2A4 유전자는 증가 하였으며, 인슐린 신호전달에 관련된 유전자 (SOCS2) 또한 CHP 처리에 의하여 증가 하였다. 그리고 체장 발달과 인슐린 유전자 전사 조절에 핵심적인 역할을 하는 PDX1 유전자의 발현량은 증가하였으며, 핵산분해효소 관련 (Caspase-3과 PARP) 유전자의 발현량은 감소하였다. 또한, real-time PCR을 수행하여 mRNA 발현을 정량적으로 분석하여 microarray 결과와 서로 비교 분석하였다. 그 결과, 두 방법에 의한 data간 상관관계가 매우 높은 것을 알 수 있었다. 추가적으로 당뇨병과 관련이 높은 SLC2A4 와 PDX1 유전자의 단백질을 면역학적으로 분석한 결과 유의한 결과를 확인 하였다. 그 결과, 2형 당뇨병과 관련된 당 수송 (SLC2A4), 인슐린 신호 전달 (SOCS2), 체장 세포 분화 및 인슐린 분비 (PDX1), 그리고 핵산분해효소 활성화 (Caspase-3, PARP) 유전자는 CHP에 의해 당뇨 마우스와 비교 하였을 때 변화되었으며, CHP가 2형 당뇨병의 증상을 개선시킬 수 있다는 가능성을 나타내고 있다.

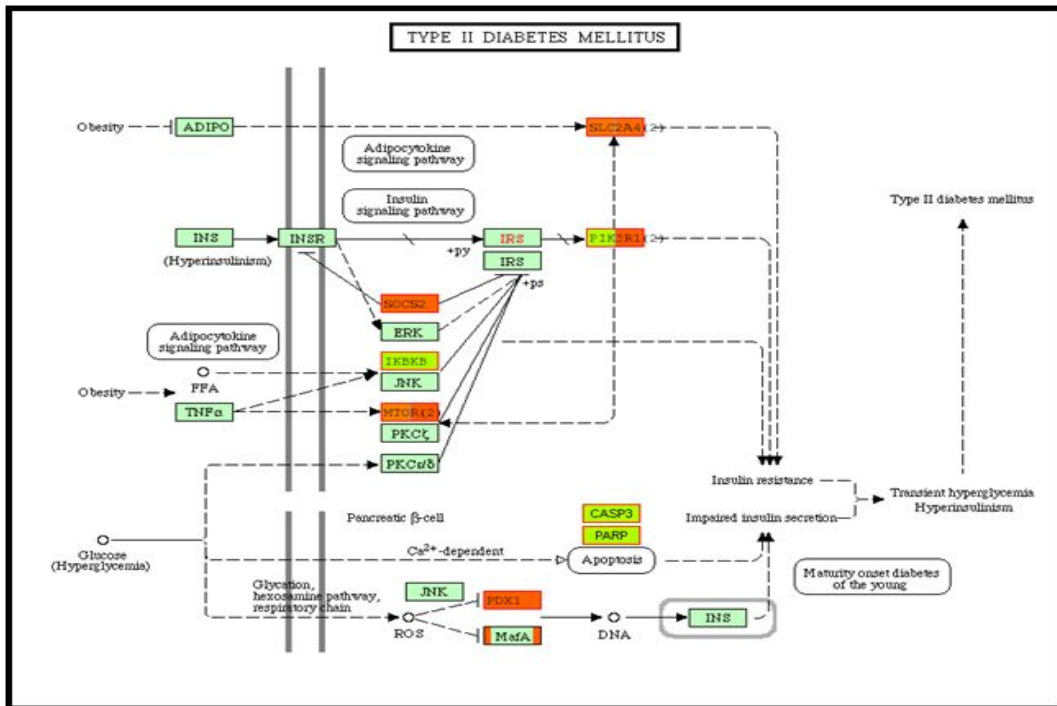


Fig. 75. Putative antidiabetic mechanism in Type II Mice Pancreas. CHP vs *ob/ob* mice.

SLC2A4 : Sugar transport and lipid metabolism; SOCS2 : Blocking-Signaling break of the insulin; PDX1 : Development of the pancreas Insulin gene transcriptional control; Caspase3 & PARP : Apoptosis

## 다. 제 1형 Rat과 2형 mouse 췌장에서 당뇨관련 단백질들의 기능 및 특성 분석

### (1) 제 1형 Rat 췌장에서 당뇨관련 단백질 특성 분석

CHP의 혈당강하 효과에 관련된 기작을 조사하기 위하여 췌장으로부터 thiourea를 함유하는 lysis buffer를 사용하여 단백질을 추출하였고, 그 췌장 단백질들을 pH 4-7 IEF strip을 사용하여 2차원적 전기영동을 수행한 다음 image analysis program을 이용하여 단백질 발현을 비교 분석하였다. Fig. 76A에서 보는 것과 같이 silver staining에 의해 500개 이상의 단백질 spot이 관찰되었다. 정상적인 rat와 STZ-처리 제 1형 당뇨쥐 사이에 다르게 발현되는 12개 spot에 대하여 MALDI-TOF 분석을 수행하여 단백질들을 확인하였다. 2-D gel에서 동정된 단백질들은 예상되는 등전점과 분자량 범위 내에서 검출되었고, 확인된 단백질들의 변화된 발현 패턴 또한 분석되었다 (Table 43). 이런 단백질들의 발현 수준은 당뇨 유도 시 현저하게 변하다가, CHP 처리에 의해 정상적인 수준으로 다시 복구되었다.

더구나 단백질마다 발현 변화 수준 정도는 크게 변하고, STZ 처리에 의해 대부분의 확인된 단백질들, 즉 keratin (KRT)1, KRT2, disulfide isomerase 3 (PDIA3), guanidinoacetate methyltransferase (GAMT), peroxiredoxin 4 (PRDX4), protein DJ-1, alc 60S acidic ribosomal protein P2 (RPLP2) 등은 발현이 감소하였다 (Fig. 77). 그러나 CHP를 처리하였을 때 정상수준으로 거의 복구되었다.

STZ 처리에 의해 유도된 제 1형 당뇨쥐에서 대부분의 단백질 발현 수준은 감소하다가 CHP 처리에 의해 정상 쥐와 비슷한 수준으로 복구되는 경향을 보이고 있다. 프로테옴 분석에 의해 재미있는 결과 중의 하나는 2개의 keratin isoform (KRT1, KRT9) 단백질들이며, 이 단백질은 STZ 처리에 의해 발현수준이 감소하다가 CHP 처리에 의해 건강한 정상쥐의 발현수준으로 복구되는 것이다 (Fig. 77). 췌장의 keratin은 간에서 필수적인 보호 기능을 갖는 keratin과는 달리 그렇게 중요하지 않은 단백질로 알려져 있다 [56]. 그러나 여러 가지 연구 결과들에 의해 췌장 조직에서 keratin의 역할이 알려지고 있고, keratin이 부족한 내배엽 세포들은 급성췌장염에서 TNF- $\alpha$  생성에 반응하여 nuclear factor인 (NF)- $\kappa$ B와 c-Jun N-말단의 kinase 활성화를 증가시키는 것으로 보고되었다 [57, 58]. 그러므로 췌장 keratin의 감소는 쥐에서 STZ 처리에 의해 중재되는 췌장의 손상에 대한 표시일 수가 있으며, 따라서 CHP 처리 시 keratin 발현 수준의 증가는 췌장에서 CHP의 보호 효과일 것이라는 것을 입증하는 것이다. 또 다른 재미있는 결과는 당뇨쥐와 CHP 처리 쥐에 있어서 protein disulfide isomerase associated 3 (PDIA3)의 다른 발현 형태이다. PDIA3 단백질은 단백질 disulfide isomerase 활성을 가지는 것으로 보고되었고 [59], 또한 소포체에서 세포 표면까지 운송 및 최종적인 항원 구조 형성에 필수적인 major histocompatibility complex (MHC) class I peptide-loading 복합체의 한 부분을 이루는 단백질이라는 것이 알려졌다

[60]. 초기 연구에서 BTBR-*ob/ob* mouse에서 증가된 *pdi* 유전자 발현과 당뇨 발병은 서로 인과관계가 있다는 것을 증명하였고, Pdi 단백질은 당뇨-저항성 C56BL/6 (B6) 종에 비해 당뇨-감수성 BTBR 종에서 20배 이상 발현되었다 [61]. 프로테옴 data에 의하면 STZ 처리에 의해 PDIA3의 발현은 감소하였고, CHP 처리에 의해 그 수준이 증가하였다. 이와 같은 결과는 PDIA3와 생리적 역할에 관여하는 그 isoform간에 차이가 존재한다고 추측할 수가 있으며, 그 추측을 규명하기 위하여 더 심도 있는 연구가 필요하다.

STZ 처리 쥐에서 guanidinoacetate methyltransferase (GAMT) 발현 수준은 감소하였고, CHP를 처리하였을 때는 그와 반대로 발현 수준이 증가하였다. 이런 결과는 STZ 처리 쥐의 뇌장에서 파괴된 creatine 대사의 결과로서 에너지 생산에 혼란이 일어났음을 반영하는 것이라고 보고되었다 [62]. 더구나 GAMT 유전자는 단백질 전구체 아미노산인 glycine, arginine, methionine으로부터 creatine의 2-step 합성에 관여하는 효소를 만드는 정보를 제공한다. 또한 GAMT 유전자 변이는 GAMT 효소가 creatine 합성에 관여하는 활성을 손상시킨다. 그러므로 creatine은 신체의 여러 조직에서 에너지를 보관하고 적절하게 사용하는데 있어서 필요하며, 따라서 GAMT의 결함은 뇌와 근육처럼 많은 양의 에너지를 필요로 하는 기관이나 조직에서 심각한 결함을 초래하게 된다 [62]. 전체적으로 볼 때 GAMT의 결함이 creatine 생합성을 파괴하고 나아가 creatine과 phosphocreatine의 고갈을 이끄는 결과를 초래한다는 것을 볼 때, CHP는 쥐 뇌장에서 에너지 생산을 조절하는데 중요한 역할을 할 것이라 판단된다.

STZ 처리 쥐의 산화적 스트레스에 대한 감수성은 산화적 손상 및 thioredoxin 의존 peroxidase 활성에 대하여 단백질의 free thiol기를 보호하는 역할을 하는 peroxiredoxin 4 (PRDX4)의 발현 수준의 감소에 의해 확인되었다 [63]. 유사한 결과가 Jiang과 공동연구자 [64]에 의한 프로테옴 연구에 의해 보고되었고, Bast 등 [65]은 PRDX I 과 II의 발현이 당뇨 유발 물질인 alloxan과 streptozotocine을 포함한 여러 가지 스트레스 유발 물질에 insulinoma 세포들이 노출될 때 발현 수준이 증가한다고 보고하였다. PRDX4는 STZ에 의해 유도된 인슐린염(뇌장세포 염증)에 기인한 뇌장 베타 세포의 손상을 보호할 수 있다고 보고하였다 [63]. 현재 본 연구의 프로테옴 data에 의하면 CHP는 PRDX4의 발현 수준을 정상 쥐의 수준과 흡사하게 복구 시켰으며 이는 STZ 처리에 의한 산화적 스트레스에 대하여 방지 효과가 있다는 것을 입증하는 것이다.

Protein DJ-1의 발현 수준은 STZ 처리 쥐에서 상당히 감소하였다. Protein DJ-1의 생리적인 역할은 뇌에서 유리 라디칼이 위험 수준으로 축적이 될 때 발생하는 산화적 스트레스로부터 세포를 보호하는 단백질로 알려져 있다 [66]. 또한 그 단백질은 산화적 손상으로부터 적혈구 세포를 보호하는 기능을 한다고 보고되었다 [67]. 최근 연구에 의하면 고지방식을 식이한 비만 쥐의 지방조직에서 DJ-1 단백질의 발현 수준은 크

게 감소하였다고 보고되었다 [68]. 그러나 췌장조직에서 DJ-1 단백질의 대사기능은 아직 정확하게 밝혀지지 않았다. 현재 연구에 있어서, CHP 처리에 의해 이런 2 단백질의 발현 수준이 크게 증가하였고, 따라서 CHP가 STZ에 의해 유도된 쥐의 췌장에서 산화적 스트레스를 완화시키는데 중요한 역할을 할 것이라고 판단된다.

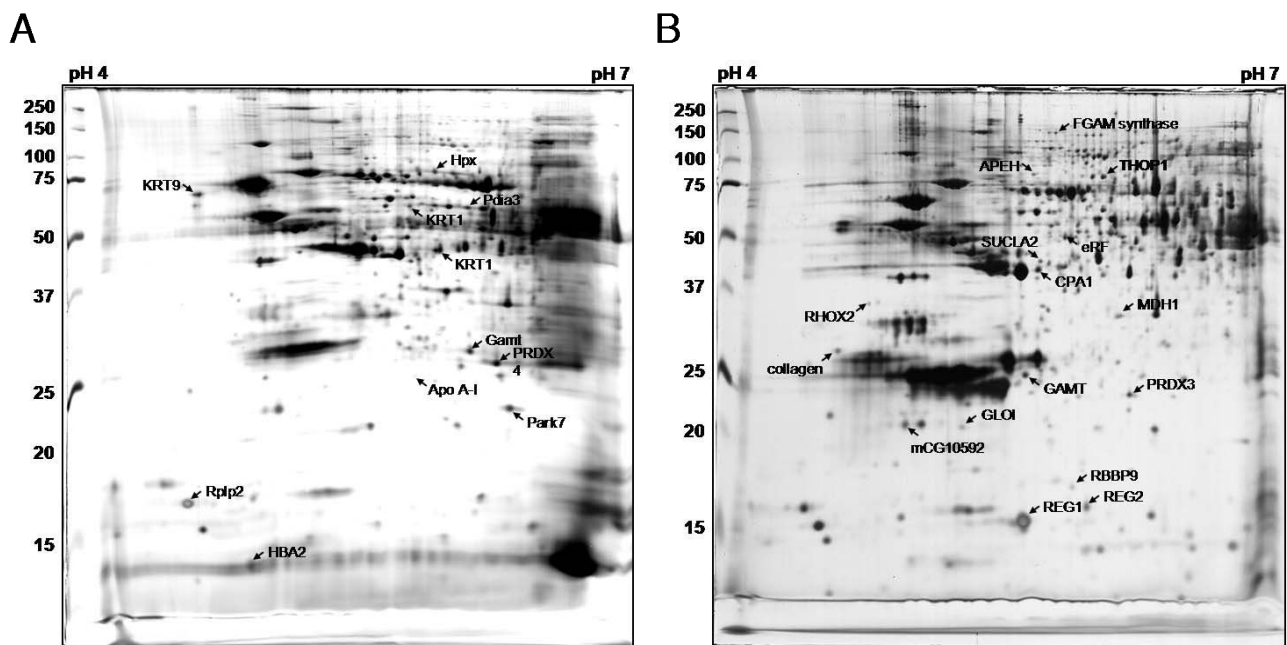


Fig. 76. A representative silver-stained 2-DE image of pancreatic tissues in STZ-induced diabetic rat (A) and genetically obese (*ob/ob*) mouse (B), where differentially regulated proteins were marked with arrows together with identified major rat plasma proteins. For abbreviation of each protein name, see abbreviations.

**Table 43. Identification of pancreatic proteins by PMF in STZ-induced rats in response to CHP treatment**

Protein	Function	Acc. No. <sup>a</sup>	Expression <sup>b</sup>	Mw <sup>c</sup>	pI <sup>d</sup>	Coverage (%) <sup>e</sup>
Hemopexin (Hpx)	Transport	GI:122065203	↓	52.06	7.58	24
keratin, type I cytoskeletal 9 (KRT9)	Protein binding	GI:55956899	↓	62.26	5.14	22
protein disulfide isomerase associated 3, isoform CRA_a (Pdia3)	Rspnse to oxidative stress	GI:160961491	↓	65.62	7.62	47
keratin 1 (KRT1)	Structural molecule activity	GI:149023097	↓	54.12	7.10	34
N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1 (Ddah1)	Arginine metabolic process Positive regulation of angiogenesis Positive regulation of Nitric oxide biosynthetic process Dimethylargininase activity Metal ion binding	GI:11935049	↓	66.20	8.16	17
Chain A, Guanidinoacetate Methyltransferase Containing S-Adenosylhomocysteine and Guanidinoacetate (Gamt)	S-adenosylhomocysteine metabolic process, S-adenosylmethionine Metabolic process, creatine biosynthetic process	GI:11560131	↓	31.81	5.75	39
peroxiredoxin-4 (PRDX4)	Cell redox homeostasis Oxidation reduction Peroxidase activity Peroxiredoxin activity		↓	26.51	5.83	61
Apolipoprotein A-I preproprotein (Apo A-I)	Metabolism & Transport	Gi:16758274	↓	31.22	6.18	52
Protein DJ-1 (Park7)	Rspnse to drug Rspnse to oxidative stress	Gi:6978515	↑	30.10	5.52	52
60S acidic ribosomal protein P2 (Rplp2)	Tanslational elongation Structural constituent of ribosome	Gi:16924002	↓	20.19	6.32	61
Hemoglobin alpha 2 chain (HBA2)	Oxygen transport & binding Heme binding	Gi:71795613	↓	11.69	4.44	78
Hemoglobin alpha 2 chain (HBA2)	Oxygen transport & binding Heme binding	Gi:60678292	↓	15.45	8.45	58

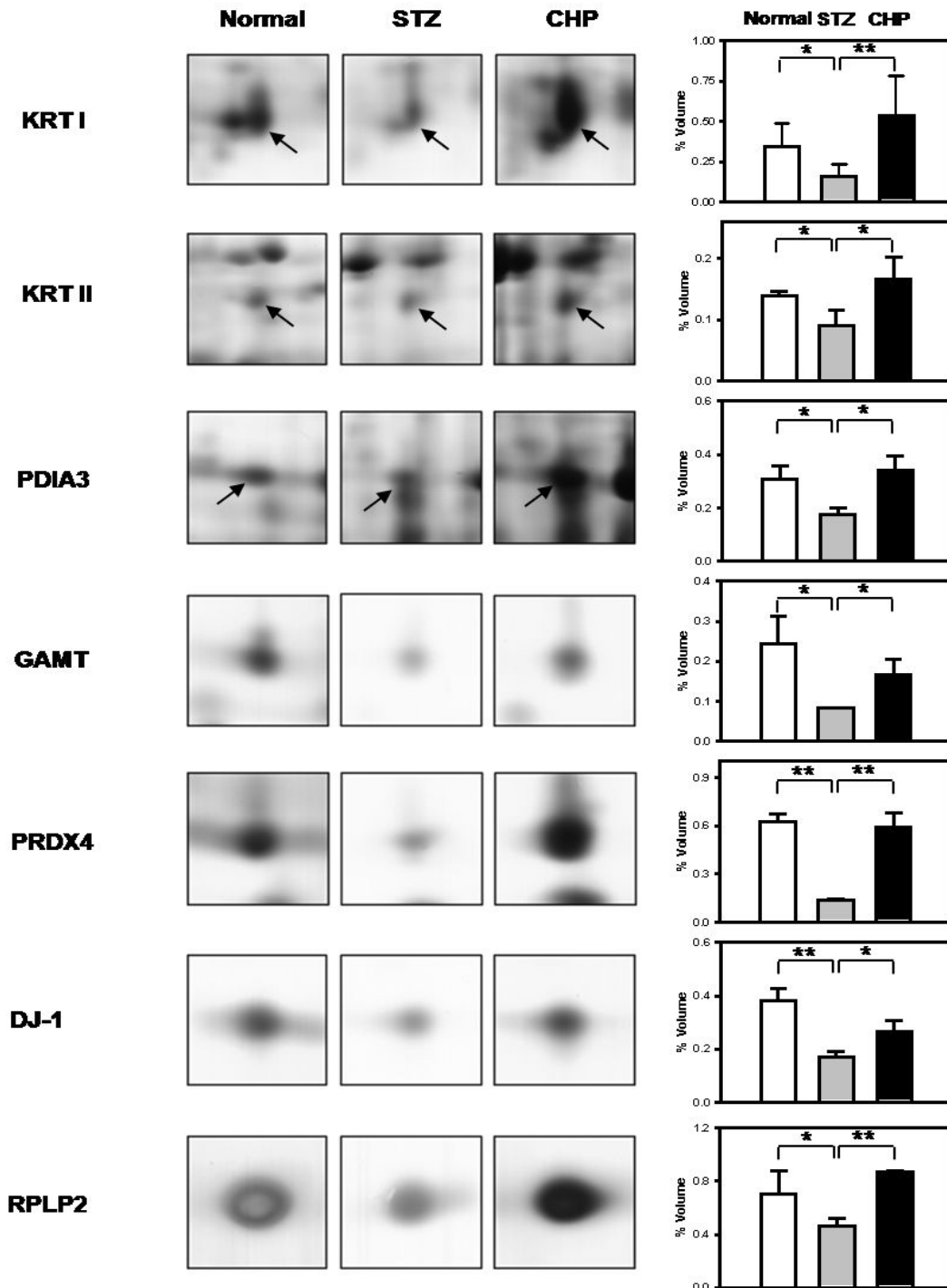
<sup>a</sup> NCBI database accession number.

<sup>b</sup> STZ-induced diabetic group compared with diabetic control group.

<sup>c</sup> Theoretical molecular weight of the matching protein in kDa.

<sup>d</sup> Theoretical isoelectric point of the matching protein.

<sup>e</sup> Percent of identified sequence to the complete sequence of the known protein.



**Fig. 77.** Differentially regulated pancreatic tissue proteins among normal (white bars), in STZ induced diabetic control rats (gray bars), and CHP treated diabetic rats (black bars). Data are exhibited as mean values  $\pm$  SD of volume density (%) of the changed spot in 3 individual gels from 6 rats. Statistical significance between each group was determined by an ANOVA test, where p value is  $*p < 0.05$  and  $**p < 0.01$ . For abbreviation of each protein name, see abbreviations.

## (2) 제 2형 mouse 체장에서 당뇨관련 단백질 특성 분석

Fig. 76B에서 보는 것처럼, 유전적 제 2형 당뇨쥐의 경우 silver staining에 의해 500 개 이상의 단백질 spot들이 2-DE gel에서 관찰되었고, 그 중 22 spot들에 대하여 MALDI-TOF 분석에 의해 확인하였다 (Table 44). 대부분 동정된 단백질들은 CHP-처리 mouse에서 보다 제 2형 당뇨쥐에서 더 높게 발현되었다. CHP를 처리하였을 때 acylpeptide hydrolase (APEH), thimet oligopeptidase 1 (THOP1), peroxireductase mitochondrial precursor (PRDX3), lactoylglutathione lyase (GLO1), hydrolase RBBP9 (RBBP9), lithostathine-1 precursor (REG1), 및 lithostathine-2 precursor (REG2) 등의 유전자들은 발현이 감소하였고, malate dehydrogenase cytoplasmic (MDH1)는 반대로 발현이 증가하였다 (Fig. 78).

유전적 제 2형 (ob/ob) control mouse와 CHP-처리 mouse간에 2 종류의 peptidase (APEH와 THOP1)들의 발현 수준 차이가 주시되었다. Acylpeptide hydrolase (APEH)는 펩타이드로부터 N-acylated amino acid 제거를 촉매하는 acylaminoacyl peptidase이다. 최근 연구에 의하면, APEH 활성은 알츠하이머 병발에 중요한 단백질인 amyloid-beta peptide (A $\beta$ )를 분해하는 것과 연관되어 있다고 보고하였다 [69, 70]. Thimet oligopeptidase (THOP)는 많은 neuropeptide를 분해하여 활성을 조절하는 thiol-dependent metallopeptidase이다. THOP1은  $\beta$ -amyloid 전구체 단백질을 분해하여 amyloidogenic fragments를 생성할 수가 있다 [71]. 현재 프로테오믹 연구에 의해 2 단백질들은 CHP 처리군에서 보다 당뇨 control 쥐에서 더 높게 발현 되었으며, 이런 현상은 증가된 A $\beta$  부하에 대하여 체장이 사용하는 보상기작의 한 부분일 것이라 판단된다. 이런 결과는 제 2형 당뇨 (T2DM)는 알츠하이머병의 위험인자가 될 수 있다는 것을 암시하는 것이다. CHP-처리 후 발현이 감소하는 hydrolase RBBP9 (RBBP9)는 세포증식과 분화 조절에 중요한 역할을 하는 retinoblastoma-결합 단백질이다 [72]. 최근 체장 암세포의 생화학적 연구에 의해 이 단백질은 TGF- $\beta$ 1 신호전달 pathway에서 아직 알려지지 않은 표적에 작용하는 serine protease라는 것이 밝혀졌다 [73]. 또한 RBBP9은 방사선에 의해 유도된 세포증식에 있어서 성 (gender) 차이와 연관된 다른 반응을 보이는 것에 중요한 역할을 할 것이라고 보고하였다 [74]. 본 연구에서 처음으로 RBBP9은 당뇨상태에서 높게 발현이 되며, 그 발현 수준은 혈당강하제인 CHP에 의해 감소한다는 것을 제시하였다. 그 결과 선택적으로 RBBP9 활성을 저해하는 화합물을 찾는다면 당뇨뿐만 아니라 apoptosis, 세포주기, 암세포화 등의 연구를 위하여 가치 있는 탐색을 할 수 있을 것이다.

본 프로테오믹 연구에 의해, CHP 처리 유전적 제 2형 당뇨 쥐에서 malate dehydrogenase (MDH) 발현은 현저하게 (3.9배) 증가하였다. MDH는 TCA회로에서 L-malate 및 NAD<sup>+</sup>로부터 NADH 및 oxaloacetate 형성을 촉매하는 당대사 관련 중요한 NAD<sup>+</sup>-dependent 효소이다 [75]. 또한 MDH는 뇌, 심장, 골격 근육에서 높게 발현

되며, 여러 세포활동을 위한 호기적 에너지 생산에 중요한 역할을 한다 [76]. 그러므로 MDH 활성의 감소는 주변 조직에서 포도당 흡수 및 해당과정 등에서 포도당 이용 저하에 의해 고혈당을 유지하게 된다고 보고되었다 [77]. 종합해서 볼 때, 유전적 제 2형 당뇨병에서 포도당 이용능은 CHP 처리에 의해 크게 증가 하였으며, Fig. 78과 Fig. 79에서 보듯이 면역학적 분석 방법에 의해 확인되었다.

제 2형 당뇨병 쥐에서 lactoylglutathione lyase (GLO)의 발현이 증가하는 것이 본 연구에 의해 처음으로 확인되었다. GLO1은 해당과정 산물에 의해 독성을 갖는 methylglyoxal의 해독에 관여하는 ubiquitous 세포 방어 효소로 알려져 있고 [78], 그 효소의 발현은 전이 흑색종과 같은 여러 가지 사람의 악성 종양에서 증가한다고 보고되었다 [79, 80]. 여러 보고에 의하면 GLO1은 methylglyoxal-의존 단백질 작용 및 당뇨, 암, 노화 등과 관련된 세포손상에 대하여 방어하는데 중요한 역할을 한다고 알려져 있다 [81].

또 다른 프로테옴 분석에 의한 결과로서 REG1과 REGII 단백질들의 발현수준의 차이에 관한 것이다. 이 단백질들은 분자량이 작고 분비되는 단백질로서 소화계의 상피세포, 신경세포, 인슐린 생산 베타세포에 생존/성장 인자로서 작용하는 생리적 기능을 갖는다고 보고되었다 [82]. REG 단백질 계열은 4 소그룹 (type I, II, III, IV)으로 분류되며, 과 발현시 랑겔한스섬의 제 1형 당뇨병 발병에 관여한다고 보고되었다 [82]. Lithostathine 2로 알려진 REGII는 세포증식, 암세포화, 암진행 등의 조절과 관련이 있다고 알려져 있다 [83]. 본 연구에서 REGI 및 REGII는 CHP 처리 시 각각 2.9배 및 5.2배정도 발현 수준이 감소하였고, 이런 변화는 제 2형 당뇨병 그룹과 통계학적으로 비교되었다. 그 결과 REG 단백질들은 제 2형 당뇨병 쥐에서 CHP를 처리한 그룹과는 달리 췌장세포의 손상을 개선시키는 스트레스 유도 단백질이라는 것을 보여준다.

프로테옴 분석에 있어서 기술적인 에러 및 인공적인 영향을 배제하기 위하여 4개의 단백질 (PRDX4 and HBA2 from rats; APEH, MDH1 from mice)에 대하여 면역학적 방법에 의해 분석하였다. 그 결과 Fig. 79에서 보는 것처럼 STZ에 의해 유도된 당뇨병 쥐로부터 2 단백질 및 유전적 제 2형 당뇨병 쥐로부터 유도된 2 단백질 모두 프로테옴 분석 방법과 동일한 결과를 보였으므로 2 분석 방법에는 차이가 없는 것으로 사료된다.

프로테옴 분석에 의해 당뇨 및 CHP의 작용 표적과 관련된 34 단백질들이 확인되었다. 그러나 제 1형 및 제 2형 당뇨병 쥐 모델에서 공통적으로 다른 발현 양상을 보이는 단백질들은 2 type간의 병 발생학적 차이에 의해 발견할 수가 없었다. 더구나, 사용한 동물 모델의 차이 및 제한적인 단백질들의 비교에 의해 본 연구와 다른 연구 결과들 간의 직접적인 비교를 하지 못한 점은 아쉬운 점이다. 그러나 상기 분석된 단백질들의 발현수준 변화는 당뇨병 모델 동물이 그들의 당뇨 상태를 벗어날 수 있는 가능성을 보여주고 있다. 이런 단백질들은 신호 및 에너지 전달, 대사, 세포구조, 산화적 스트레스



등 세포 기능들에 관여하며, 어떤 단백질은 이미 당뇨병과 연관이 되어 있고, 새롭게 확인된 단백질들은 당뇨 발병에 중요하게 관련이 있을 것으로 사료되며, 좀 더 심층적인 연구가 필요할 것으로 보여진다. 따라서 CHP는 당뇨관련 분자적 기작연구 및 당뇨병 치료에 잠재적인 가능성을 갖는 항당뇨 물질이라 판단된다.

**Table 44. Identification of pancreatic proteins by PMF in *ob/ob* mice in response to CHP treatment**

Protein	Function	Acc. No. <sup>a</sup>	Expression <sup>b</sup>	Mw <sup>c</sup>	pI <sup>d</sup>	Coverage (%) <sup>e</sup>
Phosphoribosylformylglycinamide synthase (FGAM synthase)	Purine biosynthesis Nucleotide transport & metabolism	Gi:226958458	↓	146.25	5.43	13
Acylpeptide hydrolase, isoform CRA_d (APEH)	Hydrolase	Gi:148689322	↓	80.93	5.32	12
Thimet oligopeptidase (THOP1)	Hydrolase, Metalloprotease Protease	Gi:239916005	↓	78.78	5.67	29
unnamed protein product		Gi:12846632	↓	50.43	5.55	25
unnamed protein product		Gi:74177659	↑	56.73	5.57	23
Eukaryotic peptide chain release factor subunit 1 (eRF)	Translation release factor activity, codon specific	Gi:4759034	↓	49.23	5.51	39
unnamed protein product		Gi:74150721	↑	58.27	8.18	58
ATP-specific succinyl-CoA synthetase beta subunit (SUCLA2)	Ligase, ATP binding	Gi:3766201	↓	46.56	5.65	21
Carboxypeptidase A1 precursor (CPA1)		Gi:54312076	↓	47.47	5.41	37
unnamed protein product		Gi:26350123	↑	33.01	4.80	40
Reproductive homeobox 2A (RHOX2)	Regulation of transcription	Gi:13386376	↓	21.21	4.89	28
Malate dehydrogenase, cytoplasmic (MDHI)	Glycolysis Oxidation reduction	Gi:254540027	↑	36.66	6.16	34
Protein phosphatase 1, catalytic subunit, beta isoform		Gi:148705446	↑	36.09	6.59	30
Collagen	Cell adhesion Protease inhibitor Serineproteaseinhibitor	Gi:467517	↓	115.37	6.11	14
Guanidinoacetate N-methyltransferase (GAMT)	Methyltransferase Transferase	Gi:6753944	↓	26.60	5.43	57
Thioredoxin-dependent peroxid reductase, mitochondrial precursor (PRDX3)	Antioxidant Oxidoreductase Peroxidase	Gi:6680690	↓	28.34	7.15	28
unnamed protein product		Gi:26344461	↓	22.99	5.20	45
mCG10592, isoform CRA_c		Gi:148703873	↓	16.58	5.23	33
Lactoylglutathione lyase (GLO1)	Lyase Anti-apoptosis Metal ion binding	Gi:165932331	↓	20.97	5.24	35
Putative hydrolase RBBP9 (RBBP9)	Hydrolase activity	Gi:86439977	↓	21.07	5.64	45
Lithostathine-2 precursor (REG2)	Sugar binding	Gi:6677705	↓	19.79	5.89	45
Good peak but no identification			↓			
Lithostathine-1 precursor (REG1)	Sugar binding	Gi:6677703	↓	18.91	6.08	56
unnamed protein product		Gi:74220823	↑	44.74	7.53	24

<sup>a</sup> NCBI database accession number.<sup>b</sup> STZ-induced diabetic group compared with diabetic control group.<sup>c</sup> Theoretical molecular weight of the matching protein in kDa.<sup>d</sup> Theoretical isoelectric point of the matching protein.<sup>e</sup> Percent of identified sequence to the complete sequence of the known protein.

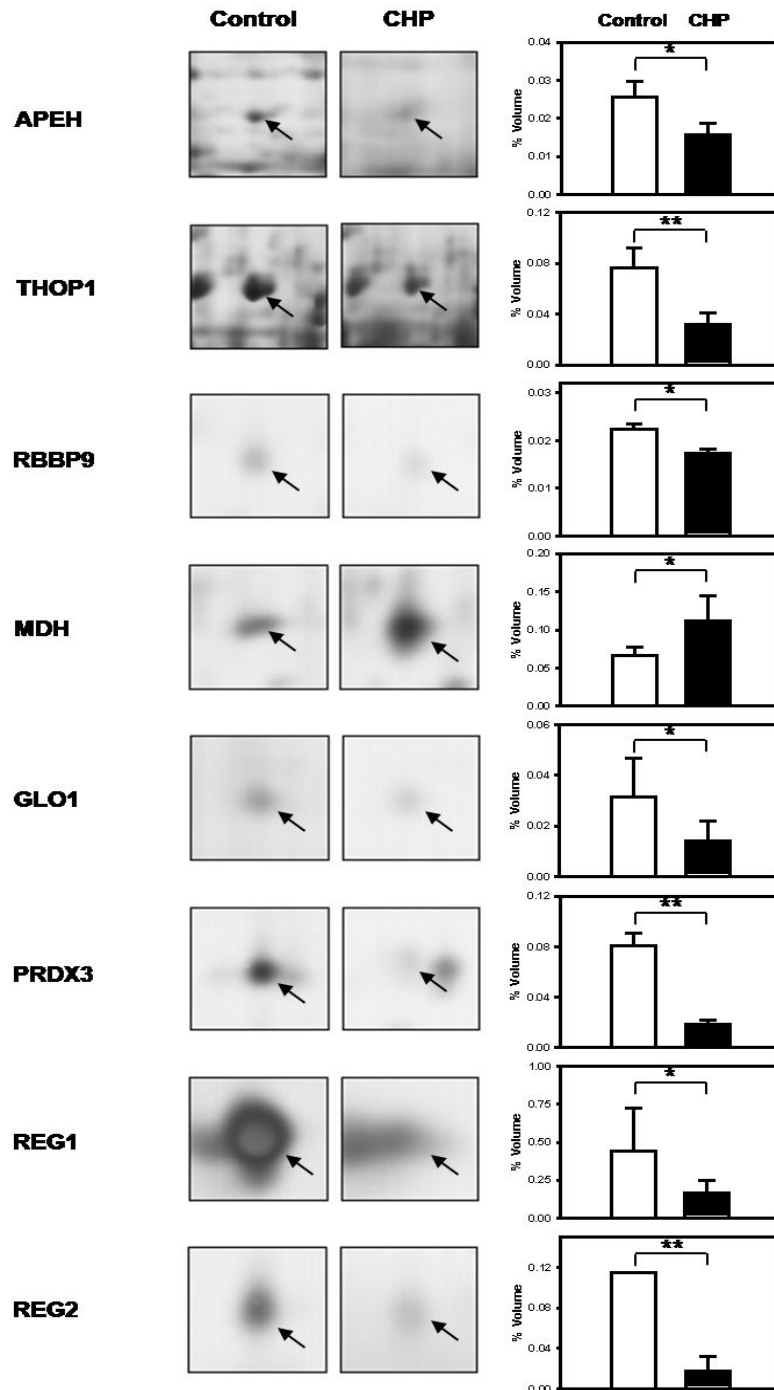
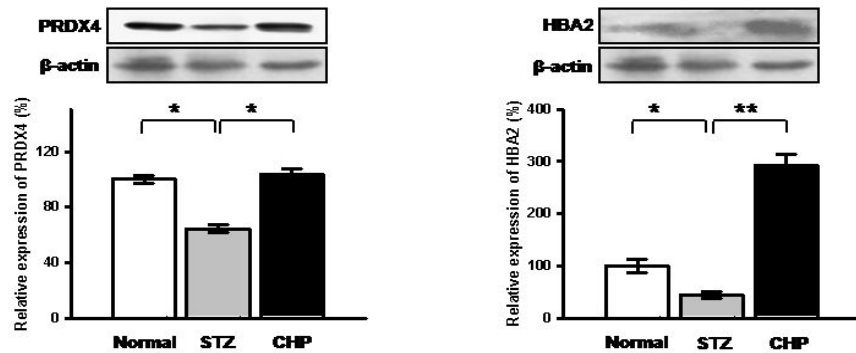
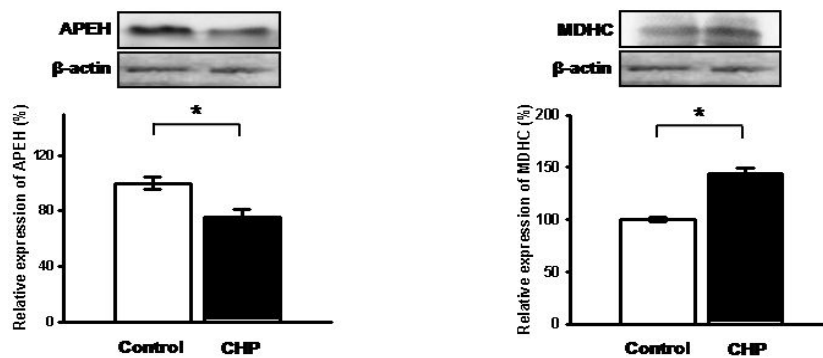


Fig. 78. Differentially regulated pancreatic tissue proteins between genetically diabetic control mice (white bars) and CHP-treated diabetic mice (black bars). Data are exhibited as mean values  $\pm$  SD of volume density (%) of the changed spot in 3 individual gels from 6 rats. Statistical significance between each group was determined by an ANOVA test, where  $p$  value is  $*p < 0.05$  and  $**p < 0.01$ . For abbreviation of each protein name, see abbreviations.

**A****B**

**Fig. 79. Validation of differentially regulated pancreatic tissue proteins in STZ-induced diabetic rats (A) and genetically diabetic mice (B).** Levels of 4 identified proteins from 2-DE analysis were investigated using 3 individual gels from 6 rats and mice, respectively. Statistical significance between each group was determined by an ANOVA test, where  $p$  value is \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ . For abbreviation of each protein name, see abbreviations.

## 라. 제 1형 Rat과 2형 mouse 혈액에서 당뇨관련 단백질들의 기능 및 특성 분석

: 본 실험은 CHP의 항당뇨활성이 혈액 단백질들의 조절에 다르게 작용할 것이라는 가정 하에서 프로테옴 실험이 설계되었고, 또한 혈액은 모든 신체의 조직과 직접 접촉을 하므로 병적인 변화는 혈액 시료의 단백질 변화와 직접적으로 연관관계가 있다고 판단되며 실질적으로 건강한 쥐와 당뇨 쥐 (제 1 형 및 제 2형)간에 31개 단백질들에서 발현이 다르게 조절되는 것을 확인하였다.

### (1) 제 1형 Rat 혈액에서 당뇨관련 단백질 특성 분석

각각의 실험 그룹 (normal, STZ-유도 당뇨쥐, CHP 처리 그룹)에 속하는 6마리 쥐들에 대한 2-D gel image들이 분석되었고. 눈에 보이는 약 500 개 spot 중에 11개의 단백질이 다르게 발현되었고, PMF에 의해 분석되었다 (Table 45, Fig. 80A). 여러 단백질들, fibrinogen alpha subunit (FGA), apolipoprotein (Apo) A-I, Apo A-IV, 및 serum amyloid P-component precursor (SAP),이 STZ 처리에 의해 발현이 증가하였다가 CHP 처리에 의해 다시 감소하였다. 반대로 Apo E의 경우 STZ 처리 시 발현 수준이 감소하였다가 CHP 처리에 의해 다시 증가하였으며 그 발현 수준은 정상적인 쥐에서 보이는 발현 수준과 흡사하였다 (Fig. 81)

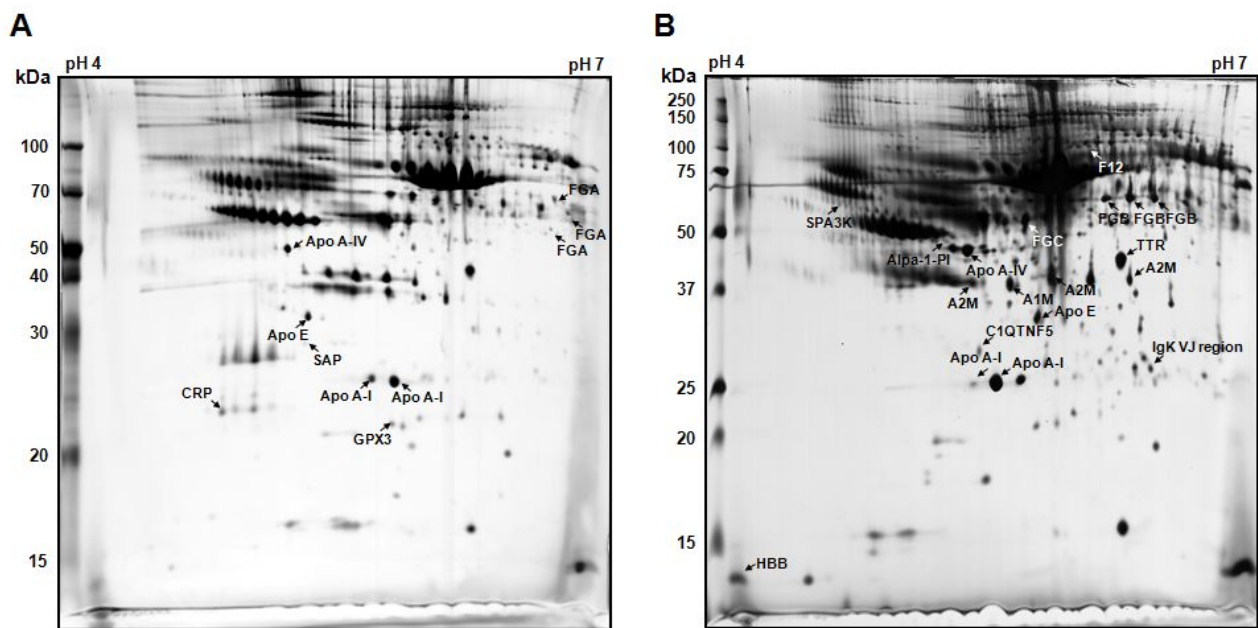
제 1형 당뇨 및 다른 질병에서 Apo 단백질의 발현 수준의 변화가 보고되었다 [84, 85]. 본 연구에서도 정상적인 그룹과 STZ-유도 당뇨 쥐간에 3종류의 Apo 단백질 (Apo A-I, Apo A-IV, and Apo E)의 다른 조절 현상이 관찰되었다. STZ에 의해 당뇨가 유발되었을 때, 혈액에서 Apo A-I과 Apo A-IV의 단백질 양은 증가하였지만, Apo E의 수준은 감소하였다. 재미있게도 그 단백질들의 수준은 CHP 처리군에서 정상적인 쥐의 수준과 같은 수준으로 복구되었다. 이런 결과는 당뇨병 개체의 전체 혈액에서 A-I, Apo A-IV, 및 Apo B 단백질의 수준은 증가하고, 반면 Apo E 단백질은 크게 감소한다는 O'Looney 등이 결과와 잘 일치한다 [85]. 그러나 예전 연구에서는 [86], 건강한 쥐와 혈당강화 다당류로 처리한 쥐 사이에 Apo E 단백질의 혈액 수준은 거의 변화가 없었다. 본 연구에서 CHP 처리 후 Apo E 단백질 수준의 증가는 STZ-유도 제 1형 당뇨 및 유전적 제 2형 당뇨 쥐 모두에서 증가된 지질 대사 때문에 기인한다고 판단된다. STZ-유도 당뇨 쥐에서 Apo A-I과 Apo A-IV의 증가는 간에서 지질 운송능의 조절과 마찬가지로 설치류 모델에서 식욕 및 포만감을 조절하는 것과 역 관계에 있다고 사료된다. 이런 점에서 CHP 처리에 의해 Apo A-I과 Apo A-IV의 발현 수준의 감소는 STZ-유도 당뇨 쥐에서 당뇨 상태는 완화된다는 것을 의미한다.

본 프로테옴 연구에서 흥미로운 결과는 유전적 제 2형 당뇨 쥐 혈액에서 CHP 처리에 의해 혈액 응고 인자들 [fibrinogen, B beta polypeptide (FGB), coagulation factor XII (F12)]에 관련된 단백질들의 발현 수준이 감소하는 것이다 (Fig. 82). 비슷한 결과

가 STZ-처리 당뇨 쥐의 혈액에서 나타나는데, 즉 STZ으로 당뇨를 유발했을 때 정상 쥐에 비해 FGA의 발현 수준은 2.94배 증가했지만, CHP 처리 시에는 정상적인 건강한 쥐에서 나타나는 수준으로 발현 수준이 감소하였다 (Fig. 81). FGB 또는 F12 결함은 출혈 환자에 있어서 심각한 이상을 일으키지만, 이런 단백질들이 혈액에 과량 존재 시에는 심장병 및 발열과 연관성이 있다고 보고되었다 [87-89]. FGB 및 F12 단백질들이 당뇨에 있어 위험한 인자로서 생리적인 중요성은 더 평가가 필요하지만, 이런 2 단백질은 강력한 항당뇨 후보물질을 검색하기 위한 표적 단백질로서 사용할 수도 있을 것이다.

또 다른 흥미로운 결과는 STZ-유도 제 1형 당뇨 쥐에서 amyloid P 성분 (SAP)의 발현 수준은 정상 쥐보다 약 9.3배 증가하였지만, CHP 처리에 의해 현저하게 감소하였다. SAP는 “amyloid”라 불리는 생체 내 비정상적인 축적물의 5각형 형태의 구성분으로 확인된 25 kDa의 pentameric 단백질인 amyloid P 성분과 동일한 형태의 serum form으로 알려졌다 [89]. 혈액 내 SAP 농도는 철저하게 조절되며 amyloid 축적물의 일반적인 구성성분으로 알려져 있고, 알츠하이머 및 제 2형 당뇨에서 뇌의 amyloid 축적물을 포함한 전반적인 아밀로이드 축적현상의 특징으로 보고되고 있다 [90]. 그 단백질은 면역 반응을 조절하는 급성 상태의 단백질이며, 간질환이나 동맥경화의 예측을 위한 단백질로 보고되었다 [91]. 높은 수준의 혈액 내 SAP 단백질의 존재는 제 1형 당뇨의 예측물질로서 처음으로 본 연구에서 보고하는 바이다.

STZ 처리에 의해 C-reactive protein (CRP) 단백질의 혈액 내 수준은 정상 쥐에서 보다 2.45배 증가하였고, CHP 처리에 의해 정상적인 수준으로 복구되었다 (Fig. 81). CRP는 펩티락신 계열에 속하는 단백질로 혈액에서 발견되며 발열에 반응하여 혈액 내 농도가 증가한다고 보고되었다 [92, 93]. 이런 증가는 지방세포 및 대식세포에서 우세하게 생산되는 IL-6의 혈액 내 농도 증가에 기인한다 [94]. 그러므로 CRP 수치는 치료제 효율성 및 병의 진행 여부를 판별하는데 도움을 줄 수도 있을 것이다. 현재 프로테옴 결과에 의해 CRP는 정상적인 쥐에서 보다 당뇨 쥐에서 혈액 내 단백질 수준이 높으므로 제 1형 당뇨의 예측물질로서 사용 가능할 것이다.



**Fig. 80.** A representative silver-stained 2-DE image of diabetic rat (A) and *ob/ob* mouse (B), where differentially-regulated proteins were marked with arrows together with the identified major rat plasma proteins. For the abbreviation of each protein name, see abbreviations.

**Table 45. Identification of plasma proteins by PMF in STZ-induced rats in response to CHP treatment.**

Protein	Acc. No. <sup>a</sup>	Mw <sup>b</sup>	pI <sup>c</sup>	Seq cov. (%) <sup>d</sup>	Peptides <sup>e</sup>	Score <sup>f</sup>	Normal (% vol) <sup>g</sup>	STZ (% vol) <sup>g</sup>	CHP (% Vol) <sup>g</sup>	Fold Change	
										STZ/Normal	CHP/STZ
Fibrinogen alpha subunit (FGA)	Gi:790486	60.96	7.56	28	18/23	191	0.20±0.16	0.57±0.11 <sup>*h</sup>	0.25±0.09 <sup>*</sup>	2.85	-2.28
Fibrinogen alpha subunit (FGA)	Gi:790486	60.96	7.56	33	22/27	222	0.11±0.05	0.41±0.15 <sup>*</sup>	0.22±0.02 <sup>*</sup>	3.73	-1.86
Fibrinogen alpha subunit (FGA)	Gi:790486	60.96	7.56	25	18/24	175	0.04±0.03	0.16±0.05 <sup>*</sup>	0.15±0.007 <sup>*</sup>	4.00	-1.07
Albumin, isoform CRA_a	Gi:149033753	53.06	6.72	31	14/15	196	0.017±0.007	0.08±0.03 <sup>*</sup>	0.06±0.02	4.71	-1.33
Apolipoprotein A-IV (Apo A-IV)	Gi:114008	44.46	5.12	62	26/36	323	0.64±0.13	0.90±0.29 <sup>*</sup>	0.73±0.21 <sup>*</sup>	1.41	-1.23
Apolipoprotein E (Apo E)	Gi:1703338	35.75	5.23	34	13/20	134	0.44±0.17	0.18±0.09 <sup>*</sup>	0.46±0.15 <sup>*</sup>	-2.44	2.56
Serum amyloid P-component precursor (SAP)	Gi:148747488	26.27	5.50	33	6/10	92	0.02±0.004	0.12±0.06 <sup>**</sup>	0.06±0.008 <sup>*</sup>	6.00	-2.00
Apolipoprotein A-I preproprotein (Apo A-I)	Gi:6978515	30.10	5.52	56	14/17	220	0.89±0.43	1.44±0.77 <sup>*</sup>	0.96±0.55 <sup>*</sup>	1.62	-1.50
Apolipoprotein A-I	Gi:113997	30.39	5.52	47	8/21	98	1.28±0.27	2.12±0.45 <sup>*</sup>	1.34±0.52 <sup>*</sup>	1.66	-1.59



(Apo A-I)

C-reactive protein precursor (CRP)	Gi:8393197	25.74	4.89	13	3/3	56	0.45±0.18	0.56±0.11*	0.47±0.05*	1.24	-1.19
Plasma glutathione peroxidase precursor (GPX3)	Gi:6723180	25.65	8.26	28	9/11	122	0.12±0.08	0.27±0.12	0.005±0.05**	2.25	-54.00

---

<sup>a</sup> NCBI database accession number.

<sup>b</sup> Theoretical molecular weight of the matching protein in kDa.

<sup>c</sup> Theoretical isoelectric point of the matching protein.

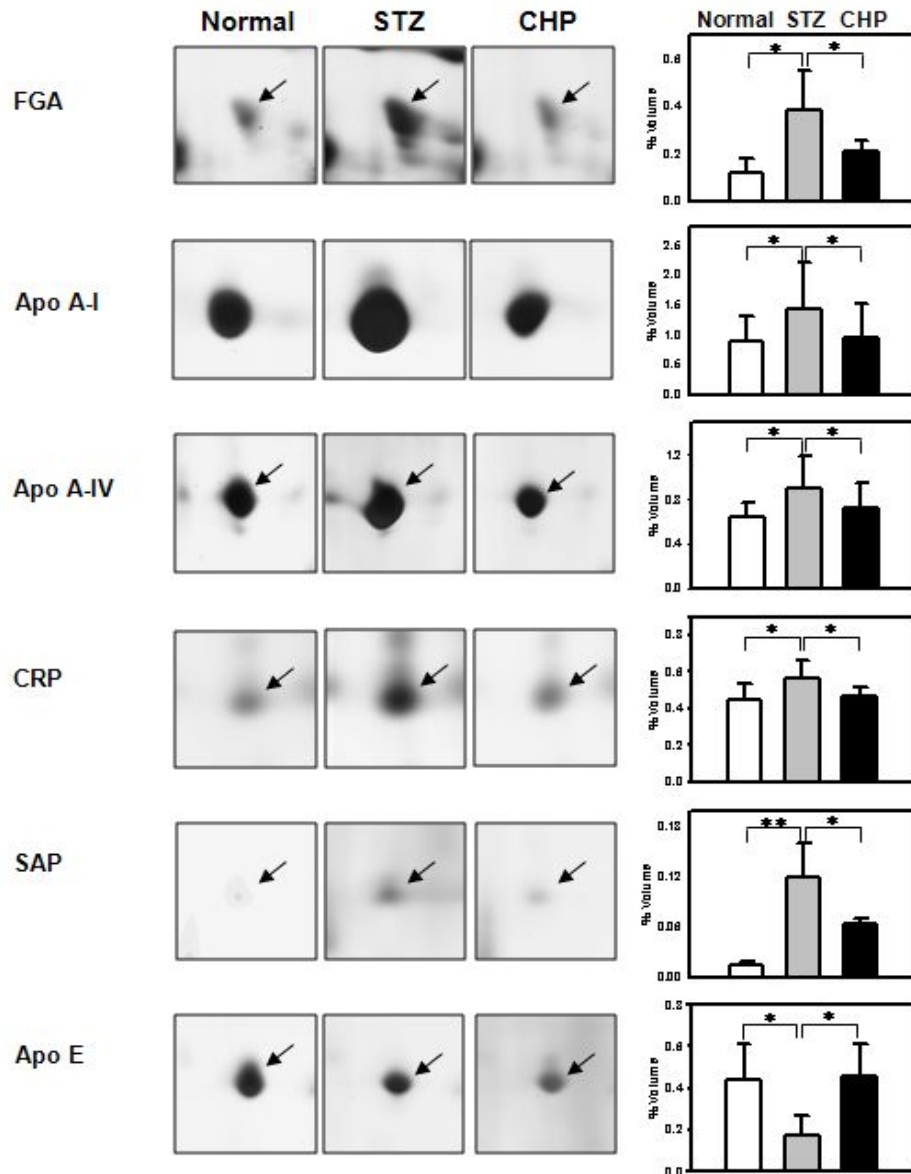
<sup>d</sup> Percent of identified sequence to the complete sequence of the known protein.

<sup>e</sup> Peptides are number of m/z values matched from an in silico digest versus number of m/z values unmatched.

<sup>f</sup> MASCOT probability-based molecular weight search score calculated for PMF. Protein score is  $-10 \cdot \log(P)$ , where  $P$  is the probability that the observed match is a random event and greater than 61 are significant ( $p < 0.05$ ).

<sup>g</sup> Notations for experimental group division: Normal, normal healthy group; STZ, STZ-induced diabetic group; CHP, CHP-treated group.

<sup>h</sup> Statistical significance between each group was determined by an ANOVA test, where p value was \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ .



**Fig. 81. Differentially-regulated plasma proteins among controls (white bars), STZ-induced diabetic rats (STZ, gray bars), and CHP-treated diabetic rats (STZ-CHP, black bars).** Five selected proteins of physiological significance in relation to diabetes are presented. Data are presented as mean values  $\pm$  SD of volume density (%) of changed spots in 3 gels from 6 individual rats per group. Statistical significance between each group was determined by an ANOVA test, where  $p$  value is \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ . For abbreviation of each protein name, see abbreviations.

## (2) 제 2형 mouse 혈액에서 당뇨관련 단백질 특성 분석

유전적인 제 2형 당뇨 쥐 6마리를 CHP 처리 후 분석하였을 때 약 500개의 단백질 spot중에서 20개의 단백질이 다른 형태로 조절되는 것을 확인하였다. Table 46에서 보는 것처럼 control 그룹인 *ob/ob* mouse와 비교할 때 CHP-처리 *ob/ob* mouse에서 12개 혈액 단백질들의 발현 수준은 감소하였지만 8개 단백질 수준은 증가하였다. 중요한 조절 단백질들의 자세한 결과는 Fig. 82에 보여진다.

유전적 제 2형 당뇨 쥐에서 CHP 처리 시 serine protease 저해제 A3K (SPA3K) 단백질의 혈액 내 수준은 감소하였다 (Fig. 82). 이 단백질은 발열, 혈압조절, 통증유발, 및 알러지 반응에 중요한 작용을 하는 것으로 보고되었다 [95]. 그러나 이전 연구들에 의해 당뇨와의 연관성은 밝혀지지 않았지만 당뇨 쥐의 망막에서 단백질 수준이 감소하였고 당뇨 망막증에 관여할 것이라고 보고되었다 (Zhang and Ma, 2008). 그러나 당뇨 개체에서 혈액 및 망막에서 SPA3K 단백질 변화에 대하여 좀 더 연구가 필요한 것으로 판단된다.

유전적 제 2형 당뇨 쥐에서 CHP 처리 전후에 transthyretin (TTR)의 발현 변화는 본 연구에 있어서 중요한 결과라 판단된다. 선행연구에 의하면 [96], STZ-처리 당뇨 쥐에서 TTR의 혈액 내 단백질 수준은 감소하였다. 현재 실험 결과 TTR의 농도는 유전적 제 2형 당뇨 쥐에서 약 2배 정도 감소하였지만 CHP 처리에 의해 현저하게 그 수준이 증가하였다. 선행연구들 [86, 97]과 본 연구 결과를 같이 종합해 볼 때, TTR은 제 1형 및 제 2형 당뇨의 biomarker로서 사용할 수 있을 것이다.

Alpha-macroglobulin (AM)은 혈액에서 만들어 지는 가장 풍부한 단백질로서 여러 질병 상황에서 그 역할이 보고되었다 [98-100]. 본 연구에서는 A1M과 A2M 단백질 모두 control 쥐 (*ob/ob*)보다 CHP 처리 유전적 제 2형 당뇨 쥐 혈액에서 높게 발현되었다. 쥐에서는 양성의 급성 단계의 단백질이지만, 대조적으로 사람에게서는 발열 조건하에서 A2M의 혈액 내 수준은 낮으며 따라서 이 단백질은 질병의 진단 마커로서 사용되지는 않았다 [101, 102]. 본 연구에서는 처음으로 CHP-처리 유전적 제 2형 당뇨 쥐의 (CHP 그룹) 혈액에서 발현 수준이 증가하였고, 이는 제 2형 당뇨 진행에 있어서 중요한 역할을 할 것이라 판단된다. 대조적으로 선행연구에서 A1M의 혈액 내 수준은 건강한 쥐와 STZ 유도 당뇨 쥐간에 별 차이가 없었다. 따라서 당뇨 진단을 위한 마커 단백질로 사용하기에는 무리가 있는 것으로 사료된다.

제 1형 및 제 2형 당뇨 쥐 혈액에서 다르게 발현되는 단백질들에 대하여 PMF로 분석하였을 때 매치되는 아미노산 서열은 Table 47에 보는 바와 같다.

**Table 46.** Identification of plasma proteins by PMF in *ob/ob* mice in response to CHP treatment.

Protein	Acc. No. <sup>a</sup>	Mw <sup>b</sup>	pI <sup>c</sup>	Seq cov.(%) <sup>d</sup>	Peptides	Score <sup>f</sup>	Normal (% vol) <sup>g</sup>	CHP (% Vol) <sup>g</sup>	Fold Change
									CHP/Control
unnamed protein product	Gi:74198755	80.71	5.47	18	8/10	104	0.41±0.02	0.26±0.04	-1.58
Coagulation factor XII (F12)	Gi:171906584	67.94	6.39	10	5/5	75	0.11±0.005	0.06±0.02 <sup>*h</sup>	-1.83
Serine protease inhibitor A3K precursor (SPA3K)	Gi:148747546	46.87	5.04	23	7/7	122	0.24±0.006	0.12±0.01 <sup>*</sup>	-2.00
Fibrinogen, B beta polypeptide (FGB)	Gi:33859809	55.40	6.68	44	19/33	182	1.26±0.31	0.88±0.32	-1.43
Fibrinogen, B beta polypeptide (FGB)	Gi:33859809	55.40	6.68	45	21/31	238	2.37±0.32	1.91±0.66 <sup>*</sup>	-1.24
Fibrinogen, B beta polypeptide (FGB)	Gi:33859809	55.40	6.68	50	25/41	240	0.99±0.13	0.71±0.21 <sup>*</sup>	-1.39
Fibrinogen gamma chain precursor (FGC)	Gi:19527078	55.04	5.54	48	17/21	236	3.01±0.11	2.24±0.06 <sup>*</sup>	-1.34
Alpha-1 protease inhibitor 2 (alpha-1-PI)	Gi:191844	44.91	5.33	23	9/13	112	0.36±0.05	0.16±0.03 <sup>*</sup>	-2.25
Apolipoprotein A-IV (Apo A-IV)	Gi:14789706	45.00	5.34	41	13/24	133	0.52±0.18	0.83±0.05 <sup>*</sup>	1.60
Chain A, crystal Structure of mouse transthyretin (TTR)	Gi:161172183	13.77	5.76	69	6/10	114	1.28±0.40	1.69±0.38 <sup>*</sup>	1.32
Alpha2 macroglobulin (A2M)	Gi:134035924	167.14	6.24	7	10/14	84	1.70±0.07	2.10±0.52 <sup>*</sup>	1.24
Alpha2 macroglobulin (A2M)	Gi:134035924	167.14	6.24	8	14/23	88	0.25±0.04	0.81±0.09 <sup>**</sup>	3.24
Alpha1 macroglobulin (A1M)	Gi:148667474	167.03	6.24	8	11/13	108	0.84±0.07	1.16±0.11 <sup>*</sup>	1.38
Alpha-2-macroglobulin (A2M)	Gi:134035924	167.14	6.24	10	15/20	131	0.60±0.13	0.80±0.20	1.33
Apolipoprotein E (Apo E)	Gi:1703338	35.88	5.54	50	21/35	208	0.69±0.15	1.01±0.09 <sup>*</sup>	1.46
Chain A, the crystal structure of A complment-1q family protein suggests an	Gi:6137745	15.66	5.88	37	6/8	112	0.40±0.12	0.30±0.05 <sup>*</sup>	-1.33

evolutionary link to tumor necrosis factor  
(C1QTNF5)

Apolipoprotein A-I (Apo A-I)	Gi:6753096	30.36	5.52	44	16/24	208	3.46±0.47	2.82±0.14*	-1.23
Apolipoprotein A-I preproprotein	Gi:160333304	30.60	5.51	49	18/34	198	0.55±0.18	0.39±0.18**	-1.41
Ig kappa-chain V-J-region	Gi:194755	11.62	7.96	40	4/6	58	0.03±0.05	0.19±0.10	6.33
Hemoglobin beta (HBB)	Gi:229255	15.63	7.26	69	8/13	121	3.25±0.98	1.11±0.58*	-2.93

<sup>a</sup> NCBI database accession number.

<sup>b</sup> Theoretical molecular weight of the matching protein in kDa.

<sup>c</sup> Theoretical isoelectric point of the matching protein.

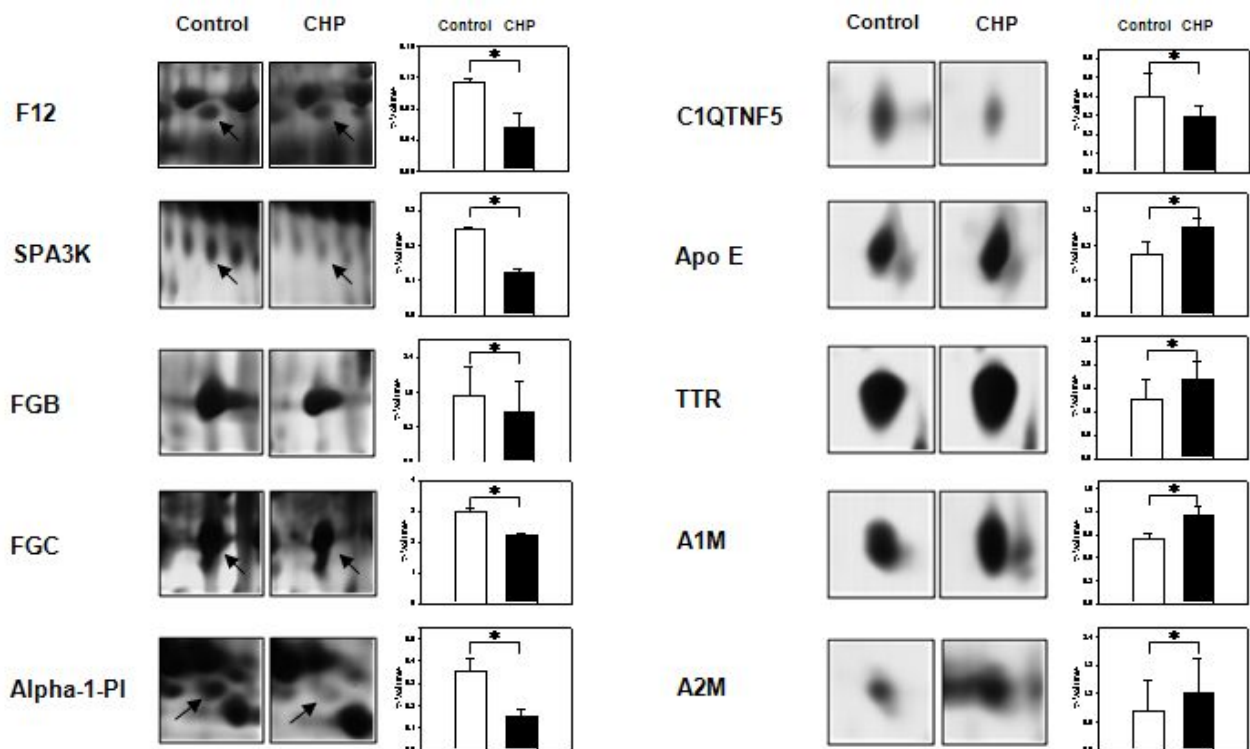
<sup>d</sup> Percent of identified sequence to the complete sequence of the known protein.

<sup>e</sup> Peptides are number of m/z values matched from an in silico digest versus number of m/z values unmatched.

<sup>f</sup> MASCOT probability-based molecular weight search score calculated for PMF. Protein score is  $-10 \cdot \log(P)$ , where  $P$  is the probability that the observed match is a random event and greater than 61 are significant ( $p < 0.05$ ).

<sup>g</sup> Notations for experimental group division: Normal, normal healthy group; STZ, STZ-induced diabetic group; CHP, CHP-treated group.

<sup>h</sup> Statistical significance between each group was determined by an ANOVA test, where p value was \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ .



**Fig. 82. Differentially-regulated plasma proteins between genetically diabetic mice (*ob/ob*, white bars) and CHP-treated diabetic mice (*ob/ob*-CHP, black bars).** Ten selected proteins of physiological significance in relation to diabetes are presented. Data are presented as mean values  $\pm$  SD of volume density (%) of changed spots in each group ( $n=3$ ). Statistical significance between each group was determined using Student's *t*-test, where the *p* value was  $*p<0.05$ . For the abbreviation of each protein name, see abbreviations.

**Table 47.** Sequences of the identified peptides of differentially expressed plasma proteins in each group by PMF

Protein	Seq cov.(%) <sup>a</sup>	Peptides <sup>b</sup>	Score <sup>c</sup>	Matched peptide Sequences
Group1: STZ-induced rats in response to CHP treatment.				
Albumin, isoform CRA_a	31	14/15	196	(R)MPKTVTSPFYLHEVAR(R) (R)AFKAWAVAR(M) (R)MSQRFNPNAEFAEITK(L) (R)MSQRFNPNAEFAEIT(L) (R)FPNAEFAEITK(L) (K)DVFLGTFLYEYSR(R) (R)RHPDYVSLLLLR(L) (R)HPDYVSLLLLR(L) (K)LGEYGFQNAILVR(Y) (R)YTQKAPQVSTPTLVEAAR(N) (K)APQVSTPTLVEAAR(N) (R)RPCFSALTVDETYVPK(E) (K)TVMGDFAQFVDK(C) (K)AADKDNCFATEGPNLVAR(S)
Apolipoprotein A-I (Apo A-I)	47	8/21	98	(R)VKDFATVYVDAVK(D) (K)DSGRDYVSQFESSTLGK(Q) (K)QLNLNLLDNWDTLGSTVGR(L) (R)LQEQLGPVTQEFWANLEKETDWLR(N) (K)QKMQLPHLDEFQEK(W) (K)MQPHLDEFQEKWNEEVEAYR(Q) (K)FGLYSDQMR(E) (K)AKPALDDLQGLMPVLEAWK(A)
Apolipoprotein A-I preproprotein (Apo A-I)	56	14/17	220	(R)VKDFATVYVDAVK(D) (K)DSGRDYVSQFESSTLGK(Q) (R)DYVSQFESSTLGK(Q) (K)QLNLNLLDNWDTLGSTVGR(L) (R)LQEQLGPVTQEFWANLEKETDWLR(N) (K)MQPHLDEFQEK(W) (K)MQPHLDEFQEKWNEEVEAYR(Q) (K)WNEEVEAYR(Q) (R)AKFGLYSDQMR(E) (K)FGLYSDQMR(E) (K)FGLYSDQMRENLAQR(L) (R)LTEIKNHPTLIEYHTK(A) (K)NHPTLIEYHTK(A) (K)AKPALDDLQGLMPVLEAWK(A)
Apolipoprotein A-IV (Apo A-IV)	62	26/36	323	(K)TDVTQQLNTLFQDK(L) (K)TDVTQQLNTLFQDKLGNINTYADDLQNK(L) (K)LGNINTYADDLQNK(L) (K)LQEHLRPYATDLQAQINAQTQDMK(R) (K)LQEHLRPYATDLQAQINAQTQDMK(Q) (R)QLTPYIQR(M) (R)MQTTIQDNVENLQSSMVPFANELK(E) (R)MQTTIQDNVENLQSSMVPFANELKEK(F)

				(K)FNQNMEGLKGQLTPR(A) (R)ANELKATIDQNLEDLR(S) (K)ATIDQNLEDLR(S) (R)LAPLAEGVQEKLNHQMEGLAFQMK(K) (K)LNHQMEGLAFQMK(K) (K)SLEDLNKQLDQQVEVFR(R) (K)QLDQQVEVFR(R) (K)QLDQQVEVFR(A) (R)AVEPLGDKFNMALVQQMEK(F) (K)FRQQLGSDSGDVESHLSFLEK(N) (R)QQLGSDSGDVESHLSFLEK(N) (R)EKVSSFMSTLQK(K) (K)VSSFMSTLQK(K) (K)KGSPDQPLALPLPEQVQEQQVQEQVQPKPLES(-) (K)GSPDQPLALPLPEQVQEQQVQEQVQPKPLES(-)
Apolipoprotein E (Apo E)	34	13/20	134	(R)FWDYLR(W) (K)ELEEQLGPVAEETR(A) (R)LGADMEDLRNR(L) (R)LGQYRNEVNTMLGQSTEELR(S) (R)NEVNTMLGQSTEELR(S) (R)LGPLVEQGR(Q) (R)TANLGAGAAQPLR(D) (R)TANLGAGAAQPLRDR(A) (R)GRLEEVEGNQAR(D) (R)LQAEIFQAR(I) (R)IKGWFEPLVEDMQR(Q)
C-reactive protein precursor (CRP)	13	3/3	56	((R)SFSIFSATK(T) (K)TSFNEILLFWTR(G) (R)VFSPNVLNWR(A)  (R)IVERQPSQCK(E) (R)MKGLIDEANQDFTNR(I) (K)GLIDEANQDFTNR(I) (K)GLIDEANQDFTNRINK(L) (K)LKNSLDFDFQK(N) (K)NSLDFDFQK(N) (R)NIMEYLR(G) (R)GDFANANNFDNTFGQVSEDLR(R) (R)GDFANANNFDNTFGQVSEDLRR(R)
Fibrinogen alpha subunit (FGA)	28	18/23	191	(K)AQQIQVLQK(D) (K)DLLPAKDR(Q) (K)MSPVPDLVPGSFK(S) (K)MSPVPDLVPGSFK(S) (K)SQLQEGPPEWK(A) (R)MHPELGSFYDSR(F) (R)MHPELGSFYDSR(F) (R)FGSLTSNFKEFGSK(T) (K)TSDSDIFTDIENPSSHVPEFSSSSK(T)
	33	22/27	222	(R)IVERQPSQCK(E) (R)MKGLIDEANQDFTNR(I) (K)GLIDEANQDFTNR(I) (K)GLIDEANQDFTNRINK(L) (K)LKNSLDFDFQK(N) (K)NSLDFDFQK(N) (R)NIMEYLR(G) (R)NIMEYLR(G) (R)GDFANANNFDNTFGQVSEDLR(R) (R)GDFANANNFDNTFGQVSEDLRR(R) (K)AQQIQVLQK(D) (K)DVRDQLIDMK(R)



				(K)RLEVDIDIK(I) (K)DLLPAKDR(Q) (R)QYLPAIK(M) (K)MSPVPDLVPGSFK(S) (K)MSPVPDLVPGSFK(S) (K)SQLQEGPPEWK(A) (R)MHPELGSFYDSR(F) (R)MHPELGSFYDSR(F) (R)FGSLTSNFKEFGSK(T) (K)TSDSDIFTDIENPSSHVPEFSSSSK(T)
	25	18/24	175	(R)IVERQPSQCK(E) (R)MKGLIDEANQDFTNR(I) (K)GLIDEANQDFTNR(I) (K)GLIDEANQDFTNRINK(L) (K)LKNSLFDQK(N) (K)NSLFDQK(N) (R)NIMEYLR(G) (R)NIMEYLR(G) (R)GDFANANNFDNTFGQVSEDLR(R) (R)GDFANANNFDNTFGQVSEDLRR(R) (R)EINLKDYEGQQK(Q) (K)MSPVPDLVPGSFK(S) (K)MSPVPDLVPGSFK(S) (K)SQLQEGPPEWK(A) (R)MELERPGKDGASR(G) (K)TVLGNDGHREVVK(E) (R)MHPELGSFYDSR(F) (R)MHPELGSFYDSR(F)
Plasma glutathione peroxidase precursor (GPX3)	28	9/11	122	(K)QEPGENSEILPSLK(Y) (K)EQKFYTFLK(N) (K)FYTFLK(N) (K)NSCPPTAELGSPGR(L) (R)LFWPEMK(I) (K)FLVGPDGIPIMR(W) (K)FLVGPDGIPIMR(W) (K)MDILSYMR(R) (K)MDILSYMR(R)
Serum amyloid P-component precursor (SAP)	33	6/10	92	(K)VFVFPR(E) (R)SQLFSYSVNSR(D) (K)VGQYSLYIGNSK(V) (K)SSPSIVLGQEQDTYGGGFDK(T) (R)GFPPNPILDWR(A) (R)ALNYEINGYVVIKPR(M)
<hr/> <b>Group2: <i>ob/ob</i> mice in response to CHP treatment.</b> <hr/>				
Alpha-1 protease inhibitor 2 (alpha-1-PI)	23	9/13	112	(K)DQSPASHEIATNLGDFAIPLYR(E) (K)NHYQAEVFSVNFAESEAAKK(V) (K)VINDFVEKGTQGK(I) (R)RLVQIHIPR(L) (R)LVQIHIPR(L) (K)TLMSPLGITR(I) (K)TLMSPLGITR(I) (R)IFNNGADLSGITEENAPLK(L) (R)IFNNGADLSGITEENAPLKLSK(A)
Alpha1 macroglobulin (A1M)	8	11/13	108	(K)QQNSHGGFSSTQDVTVALQALSK(Y) (K)YGAATFTR(S) (R)SQKEVLVTIESSGTFSK(T) (K)TFHVNSGMR(L) (R)LLLQEVRL(L)

				(R)LLLQEVRLPDLPGNYVTK(G) (R)LPDLPGNYVTK(G) (K)APFALQVNTLPLNFDK(A) (K)APFALQVNTLPLNFDKAGDHR(T) (K)KLQDQPNIQR(T) (R)TEVNTNHVLIYIEK(L)
				(K)QQNSHGGFSSTQDTVVALQALS(Y) (K)YGAATFTR(S) (R)SQKEVLVTIESSGTFSK(T) (K)EVLVTIESSGTFSK(T) (K)TFHVNSG(NR)(L) (R)LLLQEV(L) (R)LPDLPGNYVTK(G) (K)APFALQVNTLPLNFDK(A) (K)KLQDQPNIQR(T) (R)TEVNTNHVLIYIEK(L)
Alpha2 macroglobulin (A2M)	8	14/23	88	(K)QQNSHGGFSSTQDTVVALQALS(Y) (K)YGAATFTR(S) (R)SQKEVLVTIESSGTFSK(T) (K)EVLVTIESSGTFSK(T) (R)LLLQEV(L) (R)LLLQEVRLPDLPGNYVTK(G) (R)LPDLPGNYVTK(G) (K)GSGSGCVYLQTS(L)(Y) (K)APFALQVNTLPLNFDK(A) (K)APFALQVNTLPLNFDKAGDHR(T) (K)MVSGFIPMKPSVK(K) (K)MVSGFIPMKPSVK(K) (K)MVSGFIPMKPSVK(K) (R)TEVNTNHVLIYIEK(L)
				(K)QQNSHGGFSSTQDTVVALQALS(Y) (K)YGAATFTR(S) (R)SQKEVLVTIESSGTFSK(T) (K)EVLVTIESSGTFSK(T) (K)TFHVNSG(NR)(L) (R)LLLQEV(L) (R)LLLQEVRLPDLPGNYVTK(G) (R)LPDLPGNYVTK(G) (K)GSGSGCVYLQTS(L)(Y) (K)YNILPVADGK(A) (K)APFALQVNTLPLNFDK(A) (K)APFALQVNTLPLNFDKAGDHR(T) (K)MVSGFIPMKPSVK(K) (K)KLQDQPNIQR(T) (R)TEVNTNHVLIYIEK(L)
Apolipoprotein A-I (Apo A-I)	44	16/24	208	(K)VKDFANVYVDAVK(D) (R)LGPLTRDFWDNLEK(E) (R)DFWDNLEK(E) (R)DFWDNLEKETDWVR(Q) (K)VQPYLDEFQK(K) (K)VQPYLDEFQKK(W) (K)WKEDVELYR(Q) (K)VAPLGAELQESAR(Q) (K)VAPLGAELQESARQK(L) (R)QKLQELQGR(L) (K)LQELQGR(L) (R)LSPVAEEFR(D) (R)LSPVAEEFRDR(M) (R)TQLAPHSEQMR(E) (K)ARPALEDLR(H) (R)HSLMPMLETLK(T)
Apolipoprotein A-I	49	18/34	198	

preproprotein				(K)VKDFANVYVDAVK(D) (K)DFANVYVDAVK(D) (R)DFWDNLEK(E) (R)DFWDNLEKETDWVR(Q) (K)QKVQPYLDEFQK(K) (K)VQPYLDEFQK(K) (K)VQPYLDEFQKK(W) (K)WKEDVELYR(Q) (K)VAPLGAELQESAR(Q) (K)VAPLGAELQESARQK(L) (R)QKLQELQGR(L) (R)LSPVAEEFR(D) (R)LSPVAEEFRDR(M) (R)TQLAPHSEQMR(E) (K)ARPALEDLR(H) (R)HSLMPMLETLK(T) (K)TQVQSVIDKASETLTAQ(-)
Apolipoprotein A-IV (Apo A-IV)	41	13/24	133	(K)TDVTQQLSTLFQDK(L) (K)LVPFVVQLSGHLAQETER(V) (K)LQEHLKPYAVDLQDQINTQTQEMK(L) (K)LQLTPYIQR(M) (R)NMEELKGHLTPR(A) (K)ATIDQNLEDLRR(S) (R)SLAPLTVGVQEK(L) (K)LNHQMEGLAFQMK(K) (R)QLEQQVEEFR(T) (R)TVEPMGEMFNK(A) (K)ALVQQLEQFR(Q) (R)QQLGPNSGEVESHSFLEK(S)
Apolipoprotein E (Apo E)	50	21/35	208	(R)FWDYLR(W) (K)ELEEQLGPVAEETR(A) (K)ELEEQLGPVAEETRAR(L) (R)LGKEVQAAQAR(L) (R)LGADMEDLRNR(L) (R)LGQYRNEVHTMLGQSTEEIR(A) (R)NEVHTMLGQSTEEIR(A) (R)LGPLVEQGR(Q) (R)TANLGAGAAQPLR(D) (R)TANLGAGAAQPLRDR(A) (R)AQAFGDR(I) (R)AQAFGDRIR(G) (R)GRLEEVGNQAR(D) (R)EHMEEVR(S) (R)SKMEEQTQQIR(L) (R)LQAEIFQAR(L) (R)LKGFEPIVEDMHR(Q) (K)GWFEPIVEDMHR(Q) (R)QWANLMEK(I)
Chain A, crystal Structure of mouse transthyretin (TTR)	69	6/10	114	(K)KTSEGSWEPFASGK(T) (K)TSEGSWEPFASGK(T) (K)TAESGELHGLTTDEKFVEGVYR(V) (K)FVEGVYRVELDTK(S) (K)TLGISPFHEFADVFTANDSGHR(H) (R)HYTIAALLSPYSYSTTAVVSNPQN(-)
Chain A, the crystal structure of A complment-1q family	37	6/8	112	(R)SAFSVGLETR(V) (R)VTVPNVPIR(F) (R)VTVPNVPIRFTK(I) (K)IFYNQNHYDYGSTGK(F) (K)DKAVLFTYDQYQEK(N) (K)AVLFTYDQYQEK(N)

protein suggests an evolutionary link to tumor necrosis factor (C1QTNF5)

Coagulation factor XII (FI2)	10	5/5	75	(R)LCHFPPQYHR(Q) (K)CFEPQLLK(F) (K)FFHENELWFR(T) (K)QALSWGLGHHAFRCR(N) (R)LHEGFSSITYQHDLALLR(L)
	45	21/31	238	(R)KEEPPSLRPAPPPISGGGYR(A) (K)EEPPSLRPAPPPISGGGYR(A) (K)ENENVINEYSSILEDQR(L) (R)LYIDETVNDNIPLNLR(V) (K)IQKLESDISAQMEYCR(T) (R)TPCTVSCNIPVVSGKECEEIIR(K) (R)KGGGETSEMYLIQPDTSIKPYR(V) (K)GGETSEMYLIQPDTSIKPYR(V) (R)VYCDMKTENGGWTVIQNR(Q) (K)KYCGLPGEYWLGNNDK(I) (K)AHYGGFTVQNEASK(Y) (K)QCSKEDGGGWYNR(C) (K)EDGGGWYNR(C) (R)YYWGGLYSWDMASK(H) (K)HGTDDGVVWMNWK(G) (K)GSWYSMR(R) (K)IRPFFPQQ(-)
Fibrinogen, B beta polypeptide (FGB)	50	25/41	240	(R)KEEPPSLRPAPPPISGGGYR(A) (K)EEPPSLRPAPPPISGGGYR(A) (K)ENENVINEYSSILEDQR(L) (R)LYIDETVNDNIPLNLR(V) (R)SILEDLR(S) (K)IQKLESDISAQMEYCR(T) (K)LESDISAQMEYCR(T) (R)TPCTVSCNIPVVSGKECEEIIR(K) (R)KGGGETSEMYLIQPDTSIKPYR(V) (K)GGETSEMYLIQPDTSIKPYR(V) (K)TENGGWTVIQNR(Q) (K)KYCGLPGEYWLGNNDK(I) (K)YCGLPGEYWLGNNDKISQLTR(M) (R)MGPTELLIEMEDWK(G) (R)MGPTELLIEMEDWKGDK(V) (K)AHYGGFTVQNEASK(Y) (K)QCSKEDGGGWYNR(C) (K)EDGGGWYNR(C) (R)YYWGGLYSWDMASK(H) (K)IRPFFPQQ(-)
	48	17/21	236	(R)KEEPPSLRPAPPPISGGGYR(A) (K)EEPPSLRPAPPPISGGGYR(A) (K)QAQVKENENVINEYSSILEDQR(L) (K)ENENVINEYSSILEDQR(L) (R)LYIDETVNDNIPLNLR(V) (R)SILEDLR(S) (K)QKLESDISAQMEYCR(T)

				(K)LESDISAQMEYCR(T) (R)TPCTVSCNIPVVSGKECEEIIR(K) (R)KGGTSEMYLIQPDTSIKPYR(V) (K)GGTSEMYLIQPDTSIKPYR(V) (R)VYCDMKTENGGWTVIQNR(Q) (K)TENGGWTVIQNR(Q) (K)KYCGLPGEYWLGNK(I) (R)MGPTELLIEMEDWKGDK(V) (K)AHYGGFTVQNEASK(Y) (K)QCSKEDGGGWYNR(C) (K)EDGGGWYNR(C) (R)YYWGGLYSWDMK(H) (K)HGTDDGVVWMNWK(G) (K)GSWYSMR(R) (K)IRPFFPQQ(-)
Fibrinogen gamma chain precursor (FGC)	48	17/21	236	(R)FGSFCPTTCGIADFLSSYQTDVDNDLR(T) (R)TLEDILFR(A) (K)AIQVYYNPDQPPKPGMIDSATQK(S) (K)MVEEIVKYEALLLTHETSIR(Y) (K)YEALLLTHETSIR(Y) (R)YLQEIYNSNNQK(I) (K)ESGLYFIRPLK(A) (K)QQFLVYCEIDGSGNGWTVLQK(R) (K)QQFLVYCEIDGSGNGWTVLQKR(I) (K)EGFGHLSPTGTTEFWLGNEK(I) (K)IHLISMQSTIPYALR(I) (K)IHLISMQSTIPYALR(I) (R)IQLKDWNDR(T) (R)TSTADYAMFR(V) (K)SSTTNGFDDGIIWATWK(S) (R)WYSMKETTMK(I) (K)IIPFNR(L)
Hemoglobin beta (HBB)	69	8/13	121	(-)VHLTDAEKAAVSCLWGK(V) (K)VNSDGVGGEALGR(L) (R)LLVVYPWTQR(Y) (R)YFDSFGDLSSASAIMGNAK(V) (R)YFDSFGDLSSASAIMGNAK(V) (K)VITAFSDGLNHLNLK(G) (K)DFTPAAQAAFQK(V) (K)VVAGVAAALAHKYH(-)
Ig kappa-chain V-J-region	40	4/6	58	(-)DIVMTQSPSSLAMSVGQK(V) (K)NYLAWYQKPGQSPK(L) (K)LLVYFASTR(E)  (R)ALYQTEAFTADFQQPTEAK(N) (K)ISFDPQDTFESEFYLDK(R)(S) (R)KTLFSSQIEELNLPK(F) (K)TLFSSQIEELNLPK(F) (K)FSIASDYRLEEDVLPK(G)(E) (K)AVLDVAETGTEAAAATGVIGGIR(K) (K)AVLDVAETGTEAAAATGVIGGIR(K)(A)
Serine protease inhibitor A3K precursor (SPA3K)	23	7/7	122	(K)AGQEPGLQIWR(V) (R)EVQGFESSTFSGYFK(S) (K)HVPNEVVQR(L) (K)VSNGAGSMSVSLVADENPFAQALR(S) (R)QTQVSVLPEGGETPLFK(Q)
unnamed protein product	18	8/10	104	

(K)SGALNSNDAFVLK(T) (K)TPSAAYLWVGAGASEAEK(T)

(R)SQHVQVEEGSEPDAFWEALGGK(T)

---

<sup>a</sup> Percent of identified sequence to the complete sequence of the known protein.

<sup>b</sup> Peptides are number of m/z values matched from an in silico digest versus number of m/z values unmatched.

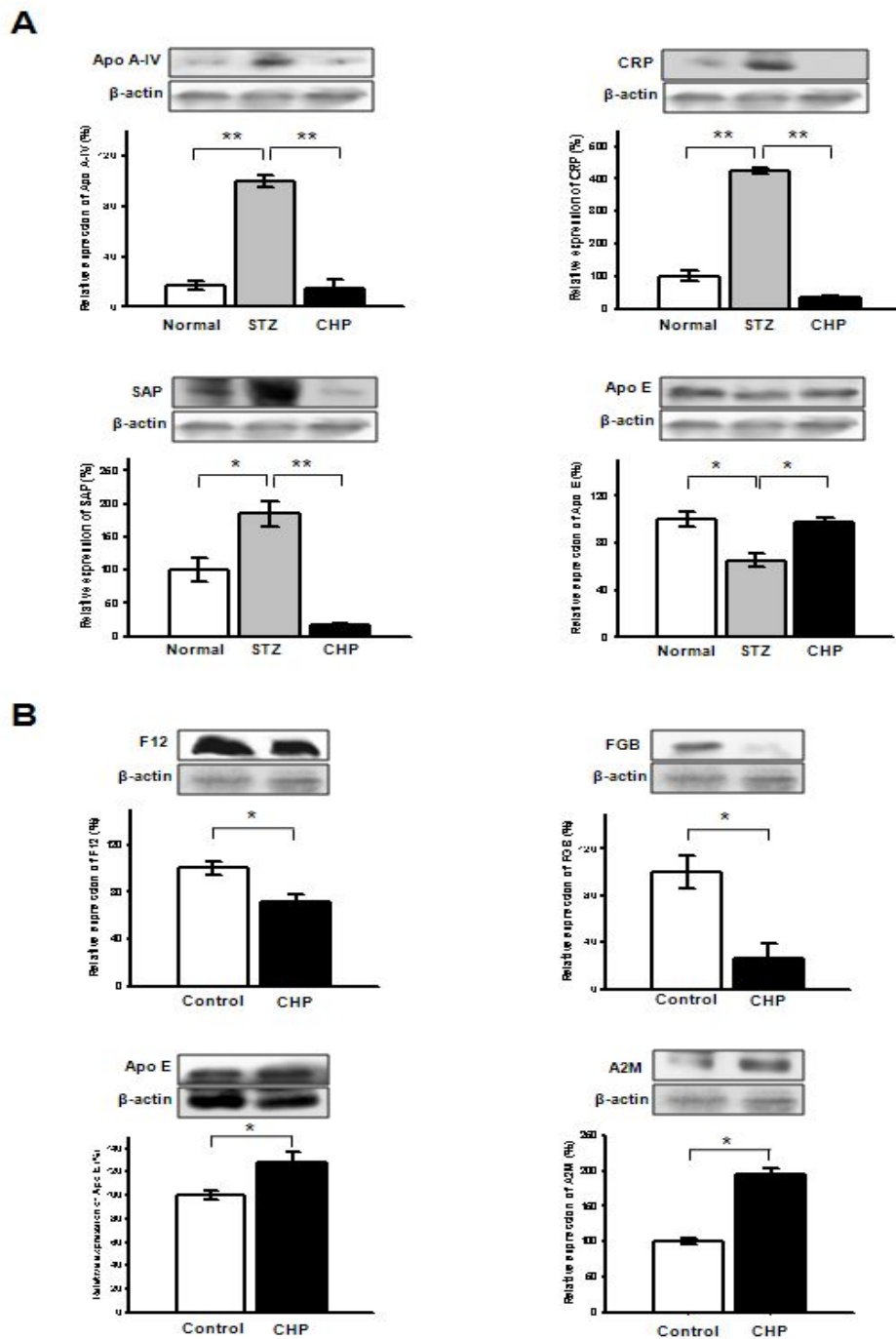
<sup>c</sup> MASCOT probability-based molecular weight search score calculated for PMF. Protein score is  $-10 * \log(P)$ , where  $P$  is the probability that the observed match is a random event and greater than 61 are significant ( $p < 0.05$ ).

### (3) Western blot 분석에 의한 프로테옴 결과 확인 및 adiponectin 및 resistin 단백질 분석

프로테옴 분석에서 기술적 에러 및 인위적인 실수 등을 제거하기 위하여 프로테옴 실험에서 확인된 단백질 중 8개의 단백질에 대하여 면역학적 분석을 통해 단백질 수준을 재확인하였다. 제 1형 당뇨병에서 4 단백질 (Apo A-IV, SAP, CRP, Apo E) 과 제 2형 당뇨병에서 4개의 단백질 (F12, FGB, Apo E, A2M)dp 대한 면역학적 분석 결과 두 방법 간에 거의 차이가 없이 동일한 결과를 보여 주었다 (Fig. 83)

당뇨 및 비만을 포함한 대사장애군의 진단자로서 잘 알려진 adiponectin과 resistin에 대하여 2-DE 젤에서는 검출이 어려우므로 면역학적 방법에 의해 두 단백질의 발현 수준을 조사하였다 (Fig. 84). Adiponectin은 지방세포에서 분비되는 인슐린-감지 호르몬으로서 지방대사 및 혈관생물학에서 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다 [103, 104]. 또한 그 단백질의 혈액 내 수준은 당뇨 및 비만의 경우에 감소한다고 알려져 있다 [105, 106]. 예상했던 대로 유전적 제 2형 당뇨 쥐에서는 adiponectin의 혈액 내 수준은 감소하였지만, CHP 처리에 의해 정상적인 수준으로 복구되었다. 또한 쥐에서 지방세포에 의해 유도되는 resistin은 비만과 제 2형 당뇨 간에 연결자로서 알려져 있다 [107, 108]. 제 2형 당뇨와 비당뇨 개체 간에 혈액 내 resistin 수준을 비교할 때 제 2형 당뇨 환자가 비당뇨 개체보다 더 높은 수준으로 존재한다고 보고되었다 [109]. 본 결과에서도 보듯이, 유전적 제 2형 당뇨 쥐에서는 혈액 내 높은 수준으로 유지하다가 CHP 처리에 의해 정상적인 수준으로 복구되는 것을 확인하였다. 따라서 CHP를 처리한 당뇨 쥐는 증가된 adiponectin 수준을 보이고 또한 감소된 resistin 수준을 보이므로 CHP는 *ob/ob* mouse에서 당뇨 상태를 완화시키는 것으로 판단된다.

결론적으로 정상쥐, 당뇨쥐 CHP-처리 당뇨쥐 등에서 프로테옴의 비교 분석 결과 분자적 기작은 아직 불명확하지만 CHP는 질병 상태에서 변화된 단백질들의 수준을 정상화 시키는 것으로 보여진다. 본 연구에서 도출된 프로테옴 결과들은 당뇨병의 치유 및 예방에 중요한 기초 자료를 제공할 것이다.



**Fig. 84. Validation of differentially-regulated plasma proteins in STZ-induced diabetic rats (A) and genetically-diabetic mice (B).** Levels of 8 identified proteins from 2-DE analysis were investigated using individual rats or mice ( $n=3$ ). Band density was calculated by ImageMaster 2D software V4.95 and relative intensity (%) refers to relative value of target proteins to that of  $\beta$ -actin. Statistical significance between each group was determined by an ANOVA test (for panel A) and Student's  $t$ -test (for panel B), respectively, where  $p$  value is \* $p<0.05$  and \*\* $p<0.01$ . For the full protein names, see the abbreviations section.



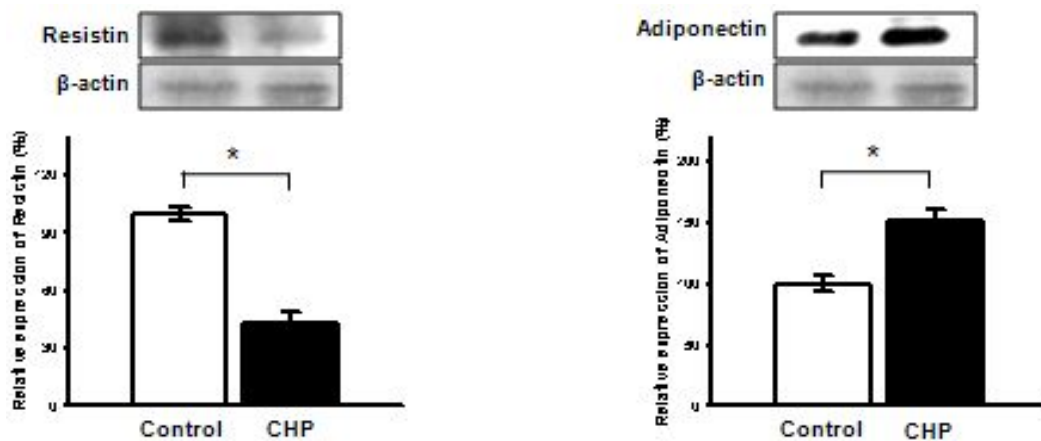


Fig. 85. Comparison of the levels of plasma adiponectin and resistin in genetically-diabetic mice before (*ob/ob*) and after CHP treatment (*ob/ob*-CHP). Data are exhibited as mean values  $\pm$  SD of volume density (%) of changed spots in 3 gels from individual 6 mice. Band density was calculated by ImageMaster 2D software V4.95 and relative intensity (%) refers to the relative value of target protein to that of  $\beta$ -actin. The statistical significance between each group was determined by Student's *t*-test, where the *p* value is  $*p < 0.05$ .

마. CHP 함유 대두가수분해물의 혈당강하 효과

(1) 피험자 선정 및 투약

피험자는 남자 4명, 여자 6명으로 전체 10명이었다. 환자들의 평균 나이는 43.5세로 20세부터 65세까지의 환자들이 포함되었다. 평균 당뇨병 유병기간은 4.82 년으로 적게는 4개월 많게는 9년까지의 유병기간이 있었으며 (Table 48), CHP 함유 알약(소환)을 하루에 3회, 총 12.0 g/일 섭취케 하였다.

**Table 48. Clinical characteristics**

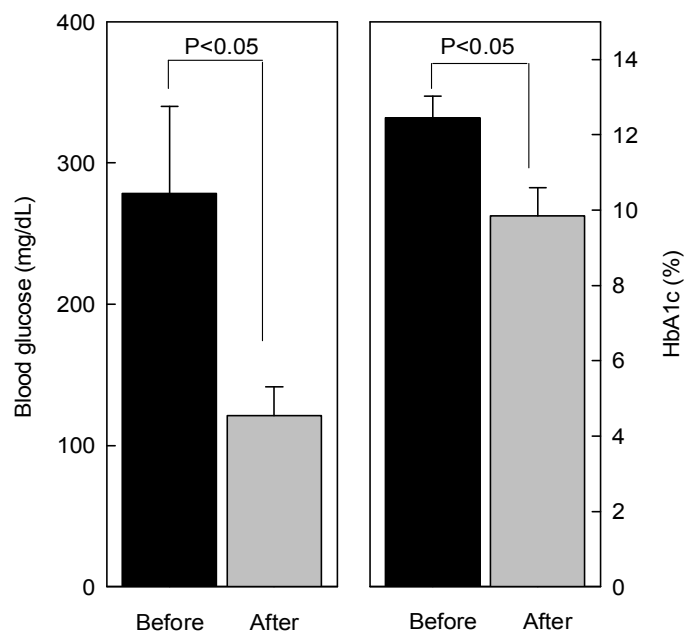
	Number	Mean±SD
Number	10	
Age (year)		43.5±15.7
Sex (male/female)	4/6	
DM duration (year)		4.82±3.72

(2) 공복 시의 혈당 및 지질 측정

대상자들이 대두가수분해물 복용하기 전과 15일간의 복용이 끝난 후 공복상태에서 말초 정맥혈을 채혈하여 혈중 포도당 농도와 당화혈색소를 측정하였다. 또한, 지질성분 중에서는 총 콜레스테롤 및 중성 지방, 그리고 HDL, LDL의 양을 측정하여 비교하였다.

대두가수분해물 복용 전과 후의 공복 시 혈당의 변화와 당화혈색소(HbA1c)의 변화를 측정한 결과 (Fig. 86), 복용 전 혈당이 278.25 mg/dL이었으나 15일 복용 후의 혈당은 121.25 mg/dL로 유의적으로 감소하였다. 또한 당화혈색소 당뇨조절이 좋은 상태에서 4~8%, 중등도의 조절인 경우 8~10%, 그리고 당뇨조절이 좋지 못한 상태에서는 10% 이상으로 나타난다. 실험 전 당화혈색소는 평균 12.45%에서 대두가수분해물 복용 후 9.85%로 유의적으로 감소하는 경향을 보였다.

또한 실험 전 후의 혈액 내의 지질 성분의 변화를 측정한 결과 (Table 49), 실험 전과 후의 유의적인 차이는 없었으며, 간의 손상여부를 판단할 수 있는 GOT와 GPT 수치도 유의적인 변화가 없었다. 이는 대두가수분해물이 당질 대사에 긍정적인 효과를 미치는 것으로 관찰되었으므로 당뇨병의 치료 및 예방에서 유용한 것으로 판단된다.



**Fig. 86.** Level of blood glucose and HbA1c before or after administration of soybean hydrolysate.

**Table 49.** Biochemical changes before and after administration of soybean hydrolysate containing CHP

	Pre-treatment	Post-treatment	P value
Weight (kg)	58.3±9.4	57.9±8.9	NS
BMI (kg/cm <sup>2</sup> )	25.8±4.5	24.9±4.1	NS
Total cholesterol (mmol/L)	5.1±0.8	5.0±0.8	NS
Triglyceride (mmol/L)	4.7±3.3	4.7±3.4	NS
HDL-chol (mmol/L)	1.4±0.5	1.5±0.3	NS
LDL-chol (mmol/L)	3.5±1.1	3.3±0.9	NS
GOT (IU/L)	26.3±16.7	25.8±17.2	NS
GPT (IU/L)	33.2±15.7	31.4±18.5	NS

바. CHP 함유 대두가수분해물을 이용한 제품 개발

(1) CHP 함유 대두가수분해물의 대량생산

Pilot plant에서의 생산 공정 및 표준화 조건 확립의 결과에 따라 CHP를 함유하는 대두가수분해물의 대량 생산공정은 Fig. 87과 같이 물 2,000 L에 탈지대두분 100 kg을 넣어 혼합하면서 pH를 7.0으로 조정하고 효소를 첨가하여 반응조에서 50℃로 12시간 반응시켰다. 반응 후 30분간 80℃로 가열하여 효소를 불활성시켰으며 여과 후 농축기에서 농축하고 분무건조를 통하여 대두가수분해물을 제조하였다.

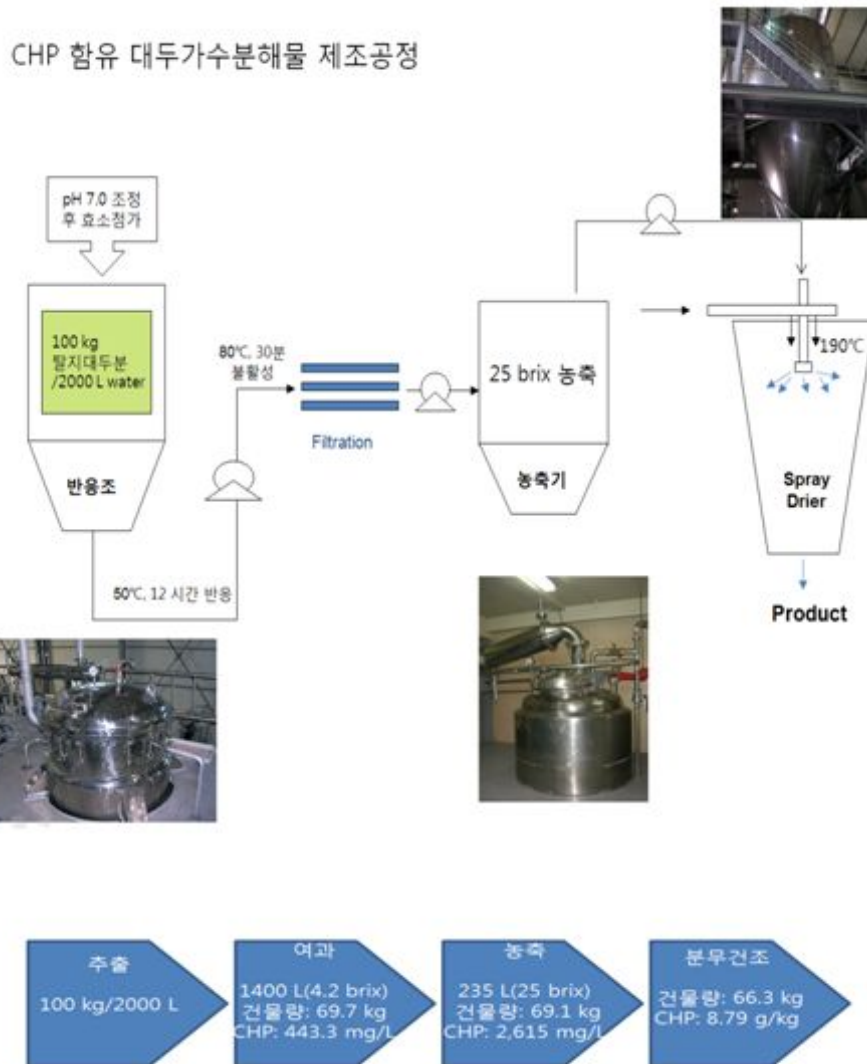


Fig. 87. Manufacturing process of soybean hydrolysate containing CHP

(2) 대두가수분해물의 제형화

항당뇨 효과가 있는 대두가수분해물을 이용하기 위하여 캡슐, 타블렛 및 환 형태로 제조하였다.

(가) 캡슐



효소를 처리하여 제조한 대두가수분해물을 25 brix로 농축하고 분무건조를 통해 얻은 대두가수분해 분말을 캡슐에 넣어 대두가수분해물을 500 mg 함유한 캡슐 제품을 제조하였다.

(나) 타정



(다) 환제조

대두가수분해물, 발효솔잎분말, 효모추출물, 옥수수전분, 바나바추출분말, 단백아연, 크롬효모, 비타민 혼합제제, 히드록시프로필렌 메틸셀룰로오스의 배합비로 환을 제조하였으며 원료계량 → 반죽 → 제환 → 열풍건조 → 코팅 → 포장 공정을 통하여 환을 제조하였다.

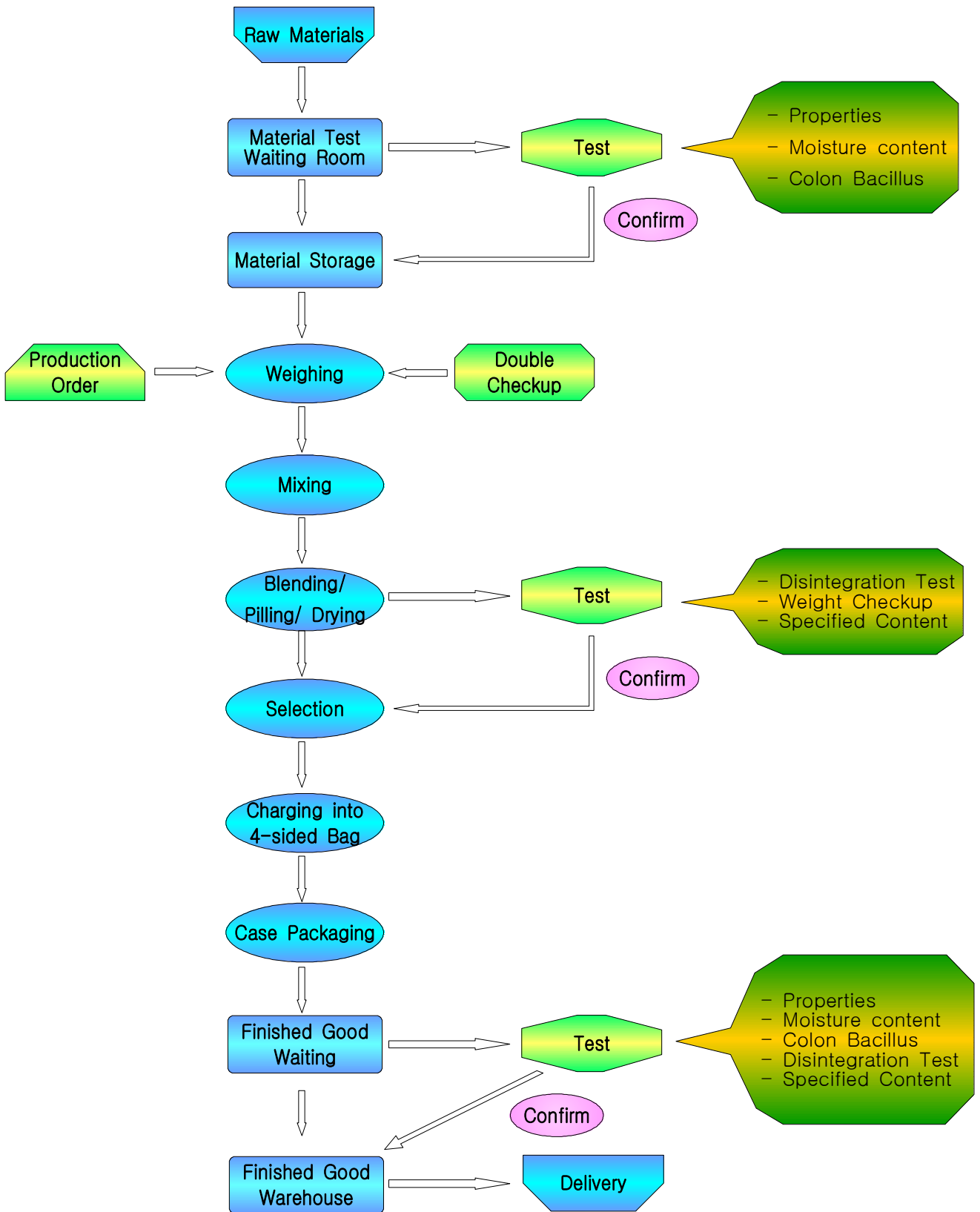


(3) CHP 함유 대두가수분해물의 상품화

혈당강화작용을 가진 CHP를 함유한 대두가수분해물에 대한 연구결과를 특허출원(2건)하였고, 이를 참여업체인 (주)새롭바이오에 기술이전함으로써 최종적으로 상품화하여 시판하게 되었다.

- ▶ 제품명 : 뉴엔술라 (New Ensular)
- ▶ 제조회사 : (주) 새롭바이오
- ▶ 제품성분: 대두발효추출물, 발효솔잎분말, 효모추출물, 옥수수전분, 바나바추출분말, 단백아연, 크롬효모, 비타민 혼합제제, 히드록프로필메틸셀룰로오스

▶ 제조공정



<b>(주)새롬바이오</b>	본사 및 공장 : 경기도 군포시 금정동 689-6 한림벤처타운201-1호 Tel:031-458-3541~2 Fax:031-458-3549		
<b>상 품 제 안 서</b>			
제품명	뉴엔술라(New Ensular)		
제품의 유형	기타가공식품	제형	환/4mm
섭취방법	<b>1일 3회, 1회 1포(6.0g)씩을 식사후에 충분한 물과 함께 섭취</b>		
제품의 구성	6.0g × 90포(540g)/1개월분		
제품의 성분	대두발효추출물-SR101, 발효솔잎분말, 효모추출물-SR101, 옥수수전분, 바나바추출분말, 단백질아연, 크롬효모, 비타민혼합제제, 히드록시프로필메틸셀룰로오스		
기능성	<b>식후 혈당조절</b>		
주요원료 참고사항	<p><b>1) 대두발효추출물-SR101</b>  <b>제조방법</b> : 대두에 바실러스 속 세균으로 발효  <b>제품의 특징</b> : 대두에 존재하는 Cyclos Histidine Proline(CHP)를 발효에 의한 생산 및 추출  대한민국 특허출원번호 : 10-2011-0001900  발명의 명칭 "바실러스 속 KH-15의 콩 발효물을 유효성분으로 포함하는 당뇨병 예방 및 치료용 조성물"  "Composition for prevention and treatment of diabetes which includes soybean fermentation product of <i>Bacillus</i> sp. KH-15"</p> <p><b>2) 대두추출물</b>  <b>제조방법</b> : 대두에 존재하는 Cyclo Histidine Proline(CHP)을 효소를 사용하여 생산  <b>제품의 특징</b> : 대두에 존재하는 Cyclos Histidine Proline(CHP)을 추출  대한민국 특허출원번호 : 10-2011-0068055  발명의 명칭: CHP(cyclo his-pro)를 고농도로 함유한 대두 가수분해물을 포함하는 혈당 조절용 조성물  "Composition for blood sugar regulation comprising soybean hydrolysate with CHP"</p> <p><b>3) 단백질아연</b>  단백질에 아연을 결합시킨 유기미네랄로서 인슐린 분비 및 작용에 관여함</p> <p><b>4) 크롬효모</b>  효모에 크롬을 결합시킨 유기미네랄로서 당내성인자라고하는 유기복합체의 필수성분으로 인슐린의 작용을 강화</p>		





(4) 대두가수분해물의 곡물 강정바 적용

대두가수분해물을 가공식품에 이용하기 위하여 곡물강정바에 대두가수분해물을 첨가한 대두 곡물강정바를 제조하여 곡물강정바와의 특성을 비교하였다.

(가) 배합비

곡물강정바와 대두가수분해물을 함유한 곡물강정바를 제조하는데 필요한 조성과 배합비는 Table 50에 나타내었다.

**Table 50.** Composition of cereal bar and soybean hydrolysate bar

재료명	곡물강정바		대두 곡물강정바	
	배합비(g)	백분율(%)	배합비(g)	백분율(%)
쌀엿조청	440.0	19.8	440.0	19.8
정백당	230.0	10.4	230.0	10.4
계성크리스피	600.0	27.0	600.0	27.0
아몬드슬라이스	350.0	15.8	350.0	15.8
땅콩분태	250.0	11.3	250.0	11.3
건포도	250.0	11.3	250.0	11.3
현미가루	100.0	4.5		0.0
대두가수분해물			100.0	4.5
합계	2220.0	100.0	2220.0	100.0

(나) 제조공정

쌀엿을 설탕(정백당)과 함께 끓인 후 원료를 혼합한 후 제품 중량 28 g 크기로 절단하여 제조하였다.

(다) 제품성상

곡물강정바



대두강정바



(라) 제품 평가 결과

① 색도

강정바의 색도는 Hunter L(lightness), a(redness), b(yellowness) color system을 색차계(Minolta CR-300, Japan)를 사용하여 측정하였으며, 색도의 색좌표 값은 L: 97.06, a: 0.06, b: 1.84인 백색판을 표준판으로 사용하였다. 강정바의 L, a, b를 측정하여 표준 백색판을 기준으로 다음과 같이 total color difference( $\Delta E$ , 총색차)를 계산하였다.

$$\sqrt{(L_{sample} - L_{standard})^2 + (a_{sample} - a_{standard})^2 + (b_{sample} - b_{standard})^2}$$

그 결과 대두강정바의 명도를 나타내는 L값은 곡물강정바에 비해 다소 높았으며, a와 b값은 곡물강정바와 대두가수분해물 강정바 사이에 차이가 없었다. 백색판과의 색도의 차이를 나타내는  $\Delta E$  값은 대두가수분해물 강정바가 곡물강정바에 비하여 낮은

수치인 42.94를 보임에 따라 다소 밝은 느낌을 주는 것을 확인하였다 (Table 51). 따라서 곡물강정바에 대두가수분해물을 첨가하여도 색도에는 큰 영향을 주지 않는 것으로 판단되었다.

**Table 51. Color value of cereal bar and soybean hydrolysate cereal bar**

	대두강정바	곡물강정바	<i>P</i> value
L	61.94 ± 3.84	52.39 ± 1.91	0.001
a	4.81 ± 1.88	4.28 ± 1.02	0.598
b	25.94 ± 1.72	24.76 ± 1.55	0.288
ΔE	42.94 ± 3.46	50.41 ± 1.50	0.002

표준편: L(97.06), a(0.06), b(1.84)

## ② 기계적 물성 평가

강정바를 높이 20 mm, 30×30 mm인 정육면체로 절단한 후에 Rheometer (Compac-100, Sun Scientific Co., Japan)를 이용하여 5회 압착시험을 통해서 기계적 물성을 측정하였다. 경도를 비롯한 물성인자 값은 지름이 10 mm인 adaptor를 부착하여 table speed 60 mm/min, compression ratio를 40%로 주어 측정하여 평균값으로 나타내었다. 경도를 의미하는 hardness는 곡물강정바가 454,740.0 dyne/cm<sup>2</sup>로 대두강정바에 비하여 높은 값을 보였다 (Table 52). 이는 대두 강정바가 상대적으로 경도가 낮음을 의미한다. 탄력성의 의미를 지닌 springiness값은 곡물강정바와 대두가수분해물 강정바가 각각 82.8과 85.9%로 유의적인 차이를 보이지 않았다. 반면 깨짐성을 나타내는 brittleness는 대두가수분해물 강정바가 곡물강정바에 비하여 낮은 힘에서 깨짐성을 보였다. 전체적으로 곡물강정바에 비하여 대두가수분해물 강정바가 좀 더 부드러운 기계적 물성을 보였다.

**Table 52.** Values of rheological parameters of cereal bars

	Hardenss (dyne/cm <sup>2</sup> )	Springiness (%)	Cohesiveness (%)	Brittleness (g)	Chewiness (g)
곡물강정바	454,740.0± 138,540.7	82.8±13.5	79.7±11.4	321,699.5± 175,748.8	3731.7±1427.3
대두강정바	222,240.0± 114,161.0	85.9±2.5	66.1±8.8	121,533.8±66,84 9.9	1419.2±794.7
P value	0.028	0.614	0.131	0.029	0.06

### ③ 관능평가

관능적 품질평가는 호텔조리과 학생 20명을 선정하여 본 관능평가에 대한 충분한 지식과 용어, 평가기준 등을 숙지시킨 후 강정바를 무작위로 제시하여 3번 반복 평가하도록 하였다. 시료는 각각 흰 접시에 담아 물과 함께 동시에 제시하였으며 한 개의 시료를 먹고 나면 반드시 생수로 입안을 헹군 후 다른 시료를 평가하도록 하였다. 평가방법은 강정바의 색, 향, 단맛, 전체적인 기호도 대하여 5점 평점법 (1 : 아주 나쁘다, 2 : 나쁘다, 3 : 보통이다, 4 : 좋다, 5 : 아주 좋다)로 평가하였다. 결과를 살펴보면 Table 53과 같이 관능검사 결과 색, 향 및 단맛의 정도에서 곡물강정바와 대두가수분해물 강정바의 유의적인 차이는 없었으며, 전체 기호도 역시 차이가 없었다. 강정바 제조 시 대두가수분해물의 첨가는 관능적인 면에서 차이를 보이지 않았으며, 기계적인 물성측정 시 다소 부드러운 물성을 보임에 따라 CHP 함유 대두가수분해물을 응용한 강정바 제조는 건강 및 관능적 면에서 우수한 제품으로 생각된다.

**Table 53.** Sensory characteristics of cereal bars

Characteristics	곡물강정바	대두강정바
Color	4.0±0.1	4.1±0.5
Flavor	3.9±0.4	3.4±0.4
Sweetness	4.1±0.2	4.2±0.3
Overall acceptability	3.9±0.5	4.0±0.4

#### (5) 대두가수분해물 첨가 두부 제조

혈당강화 효과를 가진 대두가수분해물의 이용도를 다양한 식품에 적용하기 위한 하나의 방법으로 대두가수분해물이 첨가된 두부를 제조하여 물리적 특성 등을 조사하였다.

##### (가) 두부의 제조

콩 200 g을 수세하고 증류수 600 ml에 넣어 12시간 동안 실온에서 수침시켰다. 수침된 콩과 증류수 900 ml 푸드 프로세서(Kitchen Aid, USA)에 넣고 3분간 같은 콩액을 준비한 후, 거즈 2장을 덮은 체에 콩액을 여과시켜 두유와 비지를 얻었고, 두유를 100℃에서 10분간 가열하면서 고형분이 8°Bx가 되도록 조정하였다. 두유량의 1.5%의 응고제와 소금 0.5% 조정하여 20분간 응고시켰다. 응고물을 성형(20×100×75 mm) 틀에 넣어 20분간 1 kg 추로 눌러 성형하였다. 성형된 두부는 증류수에 30분간 수침하였다가 건져서 경사진 쟁반에 15분간 방치하여 두부 표면의 수분을 제거하였다. 대두가수분해물 함유 두부는 두유량의 10% 첨가하여 대두 가수분해물 첨가 두부(SH-tofu)를 제조하였다.



##### (나) 색도

두부의 색도는 Hunter L(lightness), a(redness), b(yellowness) color system을 가지고 있는 색차계(Minolta CR-300, Japan)를 사용하였으며, 색도의 색좌표 값은 L: 97.06, a: 0.06, b: 1.84인 백색판을 표준판으로 사용하였다.

그 결과 대두를 함유한 두부와 대두가수분해물 첨가 두부의 b값은 각각 16.18과 15.15로 차이를 보였으며, 작은 두부 조각의 색차는 무첨가군이 다소 명도가 높고, 갈색도가 낮은 특성을 보였다 (Table 54).

**Table 54. Color value of tofu and SH-tofu**

	무첨가군(Tofu)		대두가수분해물 첨가군 (SH-tofu)		P value	
	Crust	Crumb	Crust	Crumb	Crust	Crumb
L	83.00 ± 2.57	85.58 ± 0.67	81.00 ± 2.48	82.92 ± 0.23	0.247	0.000
a	0.69 ± 0.11	-0.04 ± 0.03	0.89 ± 0.22	0.79 ± 0.10	0.115	0.000
b	16.18 ± 0.27	14.88 ± 0.33	15.15 ± 0.31	15.71 ± 0.24	0.001	0.002

(다) 두부의 조직감 측정

성형된 두부의 텍스처는 두부를 일정한 크기(5×5×2.5 cm)의 크기로 절단하여 Rheometer(Compac-100, Sun Scientific Co., Japan)를 이용하여 hardness(경도), springiness(탄성), cohesiveness(응집성), chewiness(씹음성), brittleness(깨짐성)을 측정하였다. 측정조건으로 20 mm aluminum probe를 사용하여 test speed 5.0 mm/sec. distance 5 mm의 조건에서 사용하였다.

그 결과 대두가수분해물이 10% 첨가된 두부와 일반 두부와 조직감을 측정한 결과, hardness, springiness, cohesiveness, brittleness와 chewiness에서의 유의적인 차이가 없었다 (Table 55).

**Table 55. Textures of tofu and SH-tofu**

	Hardness (dyne/cm <sup>2</sup> )	Springiness (%)	Cohesiveness (%)	Brittleness (g)	Chewiness (g)
Tofu	744.3±164.5	101.2±1.4	95.0±2.3	6133.7±1946.1	60.5±19.0
SH-tofu	746.0±151.7	101.4±1.6	96.7±0.6	5947.1±1240.4	58.8±12.8
P value	0.964	0.899	0.206	0.772	0.789

(라) 관능검사

CHP 함유 대두가수분해물을 이용하여 제조한 두부의 관능검사를 실시하였다. 관능 검사에 참여한 패널은 20명(남자 10명, 여자 10명)의 대학생을 대상으로 검사방법과 평가특성을 교육시킨 후 검사를 실시하였다. 두부는 일정한 크기(2.5×2.5×1 cm)로 하여 흰색 접시에 담아 제공하였으며, 한 개의 시료를 평가한 후 반드시 생수로 입안을 헹구고 다른 시료를 평가하도록 하였다.

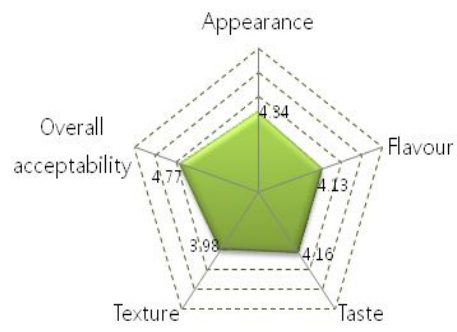
기호도 평점법을 사용하여 각 요리별 향(flavor), 맛(taste), 조직감(texture), 외관(appearance), 전체적인 기호도(overall acceptability)를 5점 척도 방법으로 평가하였다.

그 결과 외형, 향, 맛 및 조직감에서 일반 콩을 함유하여 제조한 두부가 다소 관능적으로 우수하였으나 대두가수분해물 첨가 두부와 유의적인 차이가 없었다. 또한 전체 기호도에서도 일반 두부는 4.77인 반면 대두가수분해물 첨가 두부에서는 4.56으로 다소 차이를 보였으나 유의적인 차이는 없었다 (Table 56, Fig. 88). 대두가수분해물 첨가 두부가 관능적으로 다소 떨어졌으나 유의적인 차이가 없었으므로 CHP 함유 대두가수분해물을 첨가한 두부 제조 가능성을 제시하였다.

**Table 56. Sensory characteristics of tofu and SH-tofu**

Characteristics	Tofu	SH-tofu
Appearance	4.34±0.21	4.12±0.27
Flavor	4.13±0.41	3.89±0.34
Taste	4.16±0.20	4.08±0.31
Texture	3.98±0.22	3.77±0.32
Overall acceptability	4.77±0.45	4.56±0.35





**<Tofu>**



**<SH-tofu>**

**Fig. 88. Sensory characteristics of tofu and SH-tofu**

(6) 대두가수분해물 강화 코팅 쌀의 제조

(가) 재료

본 연구에 사용한 쌀은 2011 년산의 해남쌀 (한눈에 반한쌀, 해남, 한국)로 시중에서 구입하여 냉장보관 (4°C)하면서 사용하였다. 한편, 코팅 재료로는 문헌조사를 통해 셀룰로오스 유도체인 methylcellulose (Sigma Co, USA)를 사용하였다 [110].

(나) 대두가수분해물의 수화 및 흡수 측정

CHP 함유 대두가수분해물의 정미 속으로의 최대 흡수 조건을 조사하기 위해 수용액 중 CHP 함유 대두가수분해물의 농도 (1, 3, 5, 10%, w/v) 및 담금시간 (20, 40, 60, 80 120 180 min)을 달리하여 김과 서 [111]의 방법에 따라 쌀 약 5 g을 수용액 40 mL에 넣어 상온에서 일정 시간 (3시간) 동안 흡수시킨 다음 여과지로 표면수를 제거하고 무게 증가량을 측정하였다. 무게의 증가량으로부터 시료 1 g (건량 기준) 당 수분함량을 계산하여 수화속도를 구하였다.

수화속도는 Becker [112]의 확산 방정식을 이용하여 다음 식에 따라 계산하였다.

$$m-m_0 = k_0$$

여기서  $m_0$ 는 시료의 초기 수분함량 (g water /g dry matter),  $m$ 은 일정시간 침지시킨 후의 수분함량 (g water / g dry matter)이다.

(다) 쌀입자의 코팅

CHP 함유 대두가수분해물의 코팅은 methylcellulose (1%, w/v)를 이용하고, 원료쌀을 CHP 함유 대두가수분해물 (5%, w/v) 용액으로 코팅하여 실시하였다. 쌀 30 g당 6 mL의 용액을 매회 증가시키면서 첨가하였으며, 이 때 코팅쌀은 유리병으로 저어 용액에 균일하게 분배되도록 하고 덩어리를 부숴주었다. 이를 열풍으로 10~15분간 건조하여 코팅쌀로 하였다.

(라) 대두가수분해물 코팅쌀의 수화 및 흡수 측정

코팅쌀의 온도에 따른 흡수 조건을 조사하기 위해 코팅쌀에 반응 온도 (30~50 °C) 및 담금시간 (20, 40, 60, 80 120 180 min)을 달리하여 코팅쌀 약 5 g을 40 mL의 증류수에 넣어 일정온도에서 일정 시간 (3시간) 동안 흡수시킨 다음 여과지로 표면수를 제거하고 무게 증가량을 측정하였다. 무게의 증가량으로부터 시료 1 g (건량 기준)당 수분함량을 계산하여 수화속도를 구하였다.

수화속도는 다음의 Becker [112]의 확산 방정식을 이용하여 다음 식에 따라 계산하였다.

$$m-m_0 = k_0 \quad (1)$$

여기서  $m_0$ 는 시료의 초기 수분함량 (g water /g dry matter),  $m$ 은 일정시간 침지시

킨 후의 수분함량 (g water / g dry matter)이다.

(마) 쌀입자의 형태분석

쌀알의 형태는 Supereyes microscope camera 및 PC에 연결한 image analysis system (Shenzhen Tak and assistive Technology Co., Supereyes B003+, ShenZhen, China)으로 분석하였으며, 면적, 길이, 직경 등 각종 형태변수를 구하였고, fractal 차원 D는 면적 및 길이 둘레값으로부터 다음 식을 이용하여 계산하였다 [113]. 즉,  $\log S_n$  과  $\log X_n$ 을 도시하여 얻어지는 직선의 기울기 (2/D)로부터 D값을 구하였다.

$$S_n^{1/2} \propto X_n^{1/D} \quad (2)$$

여기서  $S_n$ 은 면적 ( $\text{mm}^2$ ),  $X_n$ 은 둘레 (mm), D는 fractal 차원(-)이다. 한편, 쌀의 표면적과 부피는 쌀 입자를 타원체로 가정하고 다음 식에 의하여 계산하였다.

$$S=2\pi b^2 + 2\pi(ab/e) \sin^{-1} e \quad (3)$$

$$V= (4/3)\pi ab^2 \quad (4)$$

여기서 a는 시료의 장반경 (cm), b는 시료의 단반경 (cm), e는  $\sqrt{a^2 - b^2}/a - b^2$  이다.

(바) 쌀입자의 표면분석

코팅쌀의 표면 구조 변화를 주사전자현미경 (Scanning electron microscopes, SEM, JSM-6701E, JEOL, Tokyo, Japan)을 사용하여 관찰하였다. 건조시료를 ion coater에서 금으로 진공증착 (100 Å)시킨 다음, 전압 10 kV로 쌀의 종실 표면, 종실의 종단표면을 각각 250 배, 1000 배로 확대 촬영하였다.

(사) 색도 측정

코팅쌀의 표면 및 쌀가루의 색도는 hunter scale L (명도, Lightness), a (적색도, Redness), b (황색도, Yellowness) color system을 가지고 있는 색채 색차계 (Minolta CR-300, Minolta Camera Co., Tokyo, Japan)를 사용하였는데, 색도의 색좌표 값은 L=97.06, a=0.06, b=1.84인 표준 백색판 위에 놓고 측정하였다. 측정값을 통해  $\Delta E$  (total color difference; 총 색차)를 다음과 같이 계산하였다.

$$\sqrt{(L_{\text{sample}} - L_{\text{standard}})^2 + (a_{\text{sample}} - a_{\text{standard}})^2 + (b_{\text{sample}} - b_{\text{standard}})^2}$$

(아) 통계 처리

실험 결과는 SPSS 12.0 (SPSS Inc., IL, USA)을 이용하여 통계 처리하였으며 모든 측정 항목에 대한 평균(mean)과 표준편차(standard deviation, SD)를 산출하였다. 원료

쌀과 코팅쌀 간의 유의성은 독립표본 t-test를 이용하여  $p < 0.05$  수준에서 유의성으로 나타내었다.

(자) 결과

① 쌀의 대두가수분해물의 수화 및 흡수 코팅

원료쌀을 시료로 CHP 함유 대두가수분해물의 흡수실험을 실시하여 흡수 코팅 (dip coating)의 가능성을 조사하였으며, 그 결과는 Fig. 89와 같다. CHP 함유 대두가수분해물은 전형적인 hyperbolic한 수화양상을 보였고, 수화정도 (흡수 속도)는 1~10% 농도범위에서 무첨가구와 비교하여 큰 차이를 보이지 않았다. 한편, 흡수속도를 구한 결과, Table 57에서와 같이 원료쌀을 증류수에 넣은 것의 흡수속도는  $0.150 \text{ mm}^{-1/2}$ 의 수치를 나타내었는데, 이는 김 등 [114]과 허 등 [115]의 연구결과의 결과와 유사하다. 또한 결과에 따르면 흡수속도의 농도 의존성이 나타났는데 CHP 함유 대두가수분해물의 농도 증가에 따라 흡수저해를 나타내었다. 이러한 결과를 토대로 흡수 코팅만으로는 CHP 함유 대두가수분해물의 흡수가 어렵고 따라서 효능 및 경제성이 없는 것으로 판단하였다. 아울러 세척이나 조리 중의 손실도 예측되므로 이하에서는 methylcellulose 폴리머 분무코팅 (spray coating)을 검토하였다.

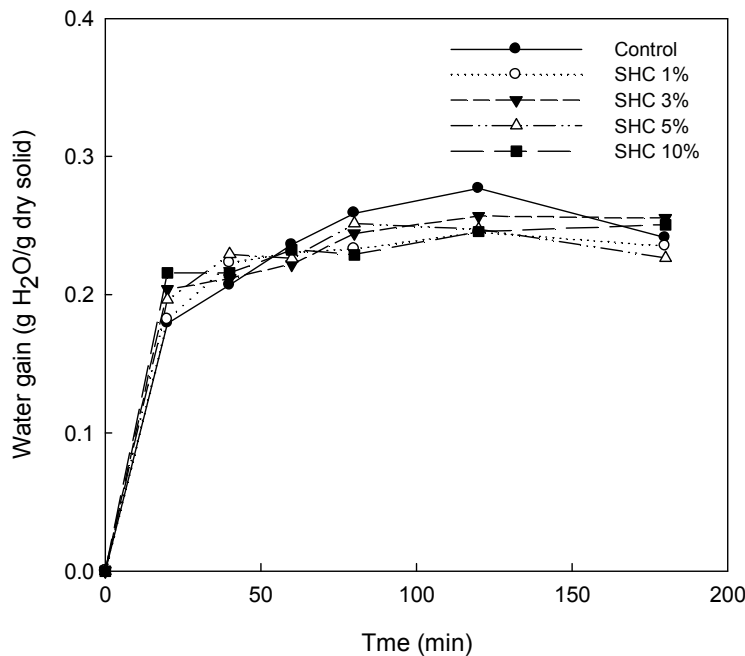


Fig. 89. Hydration patterns of rices under the solution containing different concentration of CHP enriched soybean hydrolysate.

**Table 57. Absorption rates of rices under the solution containing different concentration of CHP enriched soybean hydrolysate.**

Concentration	Hydration rate constant (k, min <sup>-1</sup> )
Control	0.150
SHC (1%)	0.089
SHC (3%)	0.087
SHC (5%)	0.079
SHC (10%)	0.047

② 코팅쌀의 외형적 특성

CHP 함유 대두가수분해물의 흡수 극대화 및 세척이나 조리 중 흡수 성분의 유리 및 손실 방지를 위해 methylcellulose polymer 분무코팅을 시도하여 코팅쌀을 제조하였으며, 이의 특성을 다음과 같이 조사, 분석하였다.

원료쌀 및 CHP 함유 대두가수분해물 코팅쌀 입자의 형태를 살펴본 결과는 다음과 같다. Fig. 90의 결과를 보면 원료쌀의 윤기가 나며 색깔은 투명하고 열은 담황색을 나타내었다. 반면에 코팅쌀은 CHP 함유 대두가수분해물의 코팅에 의하여 불투명하며 유백색을 띄는 것으로 관찰되었으며, 원료쌀에서 관찰되지 않았던 cracking 현상이 나타난 것을 관찰할 수 있었다.

코팅쌀의 표면과 쌀가루의 색도 측정 결과는 Table 58에 나타내었다. 먼저 코팅쌀의 표면의 색도 측정 결과를 보면, 밝은 정도를 나타내는 L값에서 원료쌀과 코팅쌀의 값은 각각 72.52과 77.96으로 유의적인 차이를 나타내었다 ( $p < 0.05$ ). 적색도를 나타내는 a값에서도 원료쌀에서 -0.90였음에 비해 코팅쌀에서는 -0.79으로 통계적으로 유의적으로 높아진 것을 관찰할 수 있었다 ( $p < 0.05$ ). 반면에 황색도를 나타내는 b값은 원료쌀과 코팅쌀에서 각각 9.67과 10.69으로 약간 증가하는 경향으로 나타났으나 유의적이지는 않았다. 총 색차 (total color difference,  $\Delta E$ )에서는 원료쌀에 비하여 코팅쌀에서 유의적으로 감소하는 경향으로 나타났다 ( $p < 0.05$ ).

코팅쌀가루의 색도 측정 결과에 따르면 L값은 원료쌀가루와 코팅쌀가루에서 각각 91.76과 91.43으로 유의적인 차이가 나타나지 않았다. a값에서는 원료쌀가루에서 -0.43였음에 비해 코팅쌀가루에서는 -0.59으로 통계적으로 유의적으로 높아졌다 ( $p < 0.05$ ). 반면에 b값은 원료쌀가루와 코팅쌀가루에서 각각 4.86과 4.91로 유의적인 차이가 나타

나지 않았으며,  $\Delta E$ 에서도 원료쌀가루에 비하여 코팅쌀가루에서 약간 증가되는 것으로 나타났으나 유의하지는 않았다.

또 길이, 폭 등 형태적 특성을 Supereyes microscope camera로 분석한 결과는 Table 59와 같다. 원료쌀의 길이와 폭은 각각 5.37 및 2.94 mm이었으나 코팅쌀은 각각 6.02 및 3.31 mm으로 원료쌀보다 통계적으로 높은 수치로 나타났다. 원료쌀 및 코팅쌀의 길이와 두께 비 (a/b)는 1.83과 1.82로 백미에 대해 보고된 값과 비슷하였으며, 일반적으로 백미의 길이와 두께비는 1.62~1.91 (평균 1.73) 범위라고 하였다 [114]). 원료쌀의 넓이는 42.71 mm<sup>2</sup>으로 나타났으며, 코팅쌀의 경우에는 55.21 mm<sup>2</sup>으로 통계적으로 유의하게 높은 수치를 나타내었다. 아울러 원료쌀의 부피는 23.12 mm<sup>3</sup>로 일반적인 백미 17.4 mm<sup>3</sup>의 보고된 값보다는 다소 높았으며, 코팅쌀은 35.23 mm<sup>3</sup>으로 원료쌀보다 유의적으로 높은 수치를 나타내었다. 부피에 대한 면적의 비 (S/V)는 원료쌀 및 코팅쌀에서 각각 1.78와 1.57로 나타나 통계적으로 유의한 차이를 나타내었다. 원료쌀에서의 S/V 수치는 허 등 [115]의 결과와 유사하게 나타났다.

한편, Fig. 91에서와 같이, 일반적으로 부정형 형태의 정량화 지표 차원으로 사용되는 fractal dimension을 계산한 결과, 원료쌀 및 코팅쌀 시료의 값은 각각 1.03과 1.23으로 코팅쌀에서 약간 높은 수치를 나타내었다. 해석기하학의 일종인 fractal은 자연계의 무질서한 혼돈현상을 해석하기 위해 사용되며 [116], 자연현상이나 형태의 복잡성을 규명하는데 적용되었는데, 곰팡이 균사의 경우 1.2 정도의 낮은 fractal 차원은 균사의 형태가 단순하고 가지의 수가 적은 길쭉한 형태의 균사를 의미한다 [117]. 따라서 각 시료들의 낮은 fractal dimension은 그 형태가 단순한 타원형임을 나타내며, 특히 시료들간의 차이가 없어 코팅에 의해 형태의 변화를 동반하지 않음을 정량적으로 확인할 수 있었다.

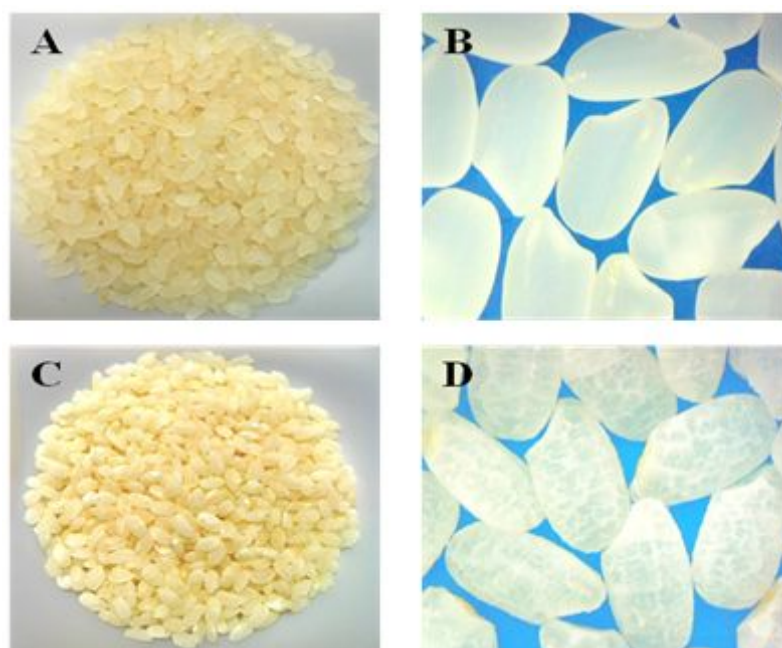


Fig. 90. Grain morphologies of raw (A, B) and coated rices (C, D).

Table 58. Color value of raw and coated rices.

	Surface		Flour	
	Raw Rice	Coated Rice	Raw Rice	Coated Rice
L <sup>1)</sup>	72.52 ± 2.44 <sup>5)</sup>	77.96 ± 0.90* <sup>6)</sup>	91.76 ± 0.52	91.43 ± 0.54
a <sup>2)</sup>	-0.90 ± 0.08	-0.79 ± 0.04*	-0.43 ± 0.05	-0.59 ± 0.07*
b <sup>3)</sup>	9.67 ± 0.82	10.69 ± 0.56	4.86 ± 0.47	4.91 ± 0.33
ΔE <sup>4)</sup>	25.77 ± 2.52	21.06 ± 0.87*	6.13 ± 0.36	6.45 ± 0.41

<sup>1)</sup> Degree of whiteness (white + 100 ↔ 0 black)

<sup>2)</sup> Degree of redness (red + 100 ↔ -80 green)

<sup>3)</sup> Degree of yellowness (yellow + 70 ↔ -80blue)

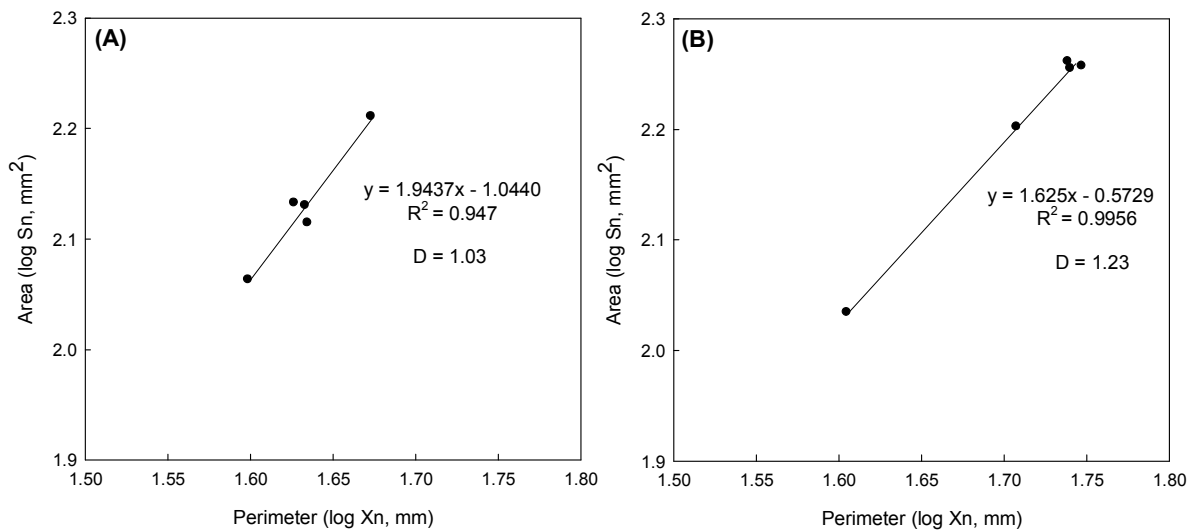
<sup>4)</sup>  $\Delta E$  (total color difference) =  $\sqrt{(L_{sample} - L_{standard})^2 + (a_{sample} - a_{standard})^2 + (b_{sample} - b_{standard})^2}$  ,

<sup>5)</sup> Each values are mean ± S.D,

<sup>6)</sup> Means with symbolare significantly different withdraw rice by Independent *t*-test at  $p < 0.05$ .

**Table 59. Geometric characteristics of raw and coated rices.**

	Raw Rice	Coated Rice
Major axis length (mm), 2a	5.37 ± 0.11	6.02 ± 0.29*
Minor axis length (mm), 2b	2.94 ± 0.17	3.31 ± 0.01*
a/b	1.83 ± 0.10	1.82 ± 0.09
Surface area (mm <sup>2</sup> ), S	42.71 ± 0.57	55.21 ± 0.57*
Volume (mm <sup>3</sup> ), V	23.12 ± 1.60	35.23 ± 0.41*
S/V	1.78 ± 0.01	1.57 ± 0.00*



**Fig. 91. Fractal dimensions of (A) raw and (B) coated rices.**



### ③ 코팅쌀의 수화 양상 및 수화 속도

상온에서의 원료쌀과 코팅쌀의 수화양상을 조사한 결과는 Fig. 92와 같다. Fig. 92 (A)의 결과를 보면, 원료쌀의 경우 침지 시간의 증가에 따라 수화의 폭이 커지는 hyperbolic한 수화 양상을 보였으나, 코팅쌀의 경우에는 침지시간 5 min (data not shown)에서부터 saturation되는 양상을 보였다. 또 코팅쌀은 원료쌀보다 다소 높은 수분흡수를 보여 methylcellulose polymer 코팅에 의한 수화 양상의 변화인 것으로 추측된다.

한편, 쌀을 물에 침지한 경우 내부로의 수분이동이 Becker [112]의 확산 법칙에 따르면 현미의 수분증가는  $m-m_0 = k_0$ 에서와 같이 침지 시간의 평방근에 비례하게 된다. 이를 알아보기 위해 침지 시간의 평방근에 대한 각 시료의 수분 흡수량을 조사하였다. Fig. 92 (B)에서와 같이, 원료쌀의 경우 침지 시간이 짧은 범위에서의 흡수량과 침지시간의 평방근은 직선관계를 보여 정비례 관계를 나타내었다. 따라서 직선의 기울기로부터 초기 흡수 단계에서의 수화속도상수  $k_0$ 를 구하였으며, 원료쌀의  $k_0$ 는  $0.15 \text{ min}^{-1/2}$ 을 나타내었다. 반면에 코팅쌀의 경우 흡수량과 침지시간의 평방근은 직선관계를 보였으나 매우 낮은 수화속도를 보였다. 아울러 두 시료 모두에서 침지 시간 0 일 때의 초기 수분 증가가 이론 값 0과 일치하지 않는 것을 보였다. 송 등 [118]도 이러한 현상을 보고한 바 있는데, 이와 같이 수분 증가와 침지 시간의 평방근의 관계로부터 절편 값이 0이 아닌 결과를 나타내는 현상은 다른 곡류에서도 알려져 있다. 이것은 외부층이 다공 조직을 이루고 있어 초기에 모세관 흡수로 쉽게 포화되는 것에 기인한다 [112, 119]. 따라서 침지 시간 0에서의 절편 값은 과피를 포화시키는데 필요한 수분 함량의 척도로서 초기 수분 흡수가 빨리 일어나는 사실을 의미한다. 하지만 코팅쌀은 침지 시간 0에서의 절편값은 이론값 0에서보다 매우 높은 값을 나타냄으로써 코팅에 의하여 쌀 외부층의 다공성이 매우 높아진 것을 알 수 있었다.

그리고 서로 다른 온도 ( $30 \sim 50^\circ\text{C}$ ) 범위에서 코팅쌀의 수화양상을 조사한 결과는 Fig. 93과 같다. 원료쌀의 경우 수화온도의 증가에 따라 수화의 증가폭이 커져서 일반적 경향과 잘 일치하였다. 코팅쌀은 원료쌀과는 다르게 매우 빠른 시간 내에 saturation되는 수분 흡수양상을 보였으며, 침지 온도  $50^\circ\text{C}$ 에서는 수화의 폭이 낮아지는 것을 관찰할 수 있었다.

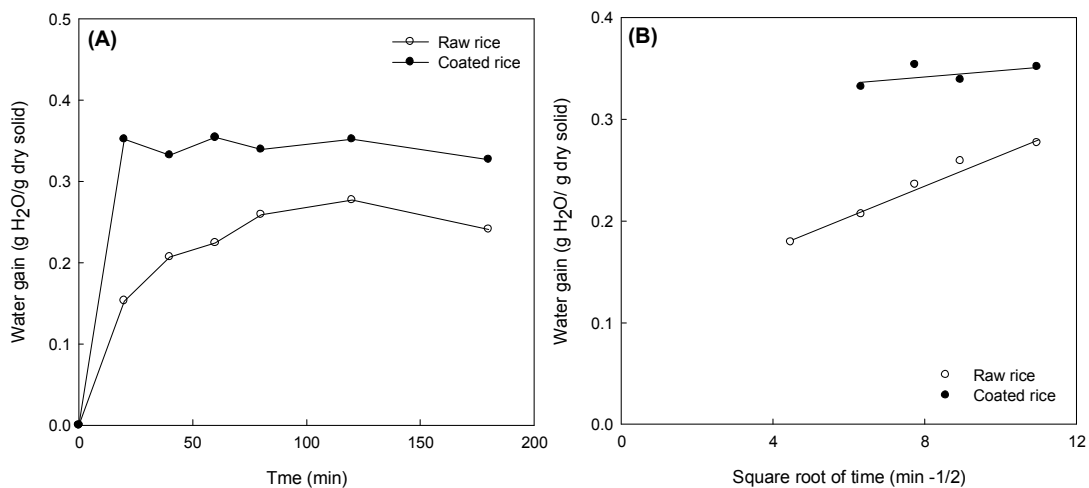


Fig. 92. (A) Hydration patterns and (B) relationship between water absorption and square root of absorption time of raw and coated rices.

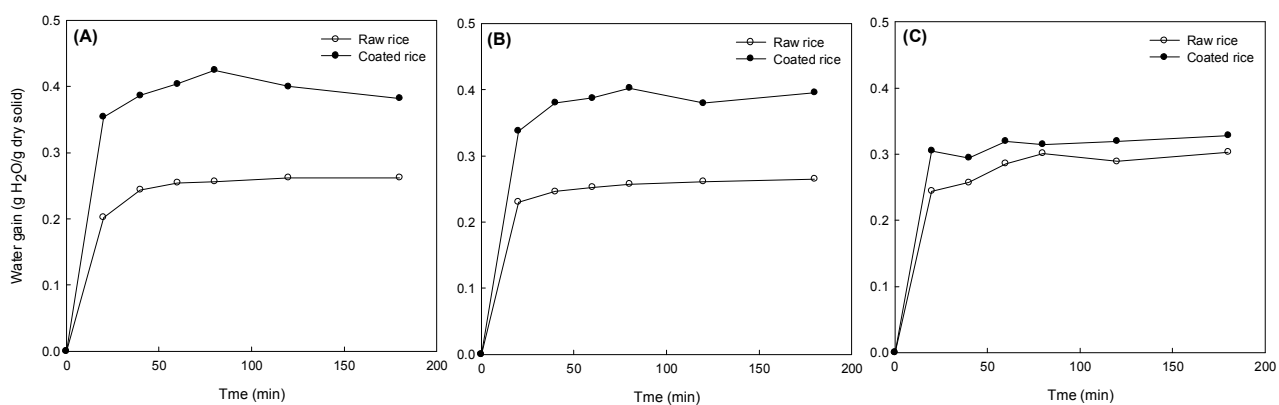
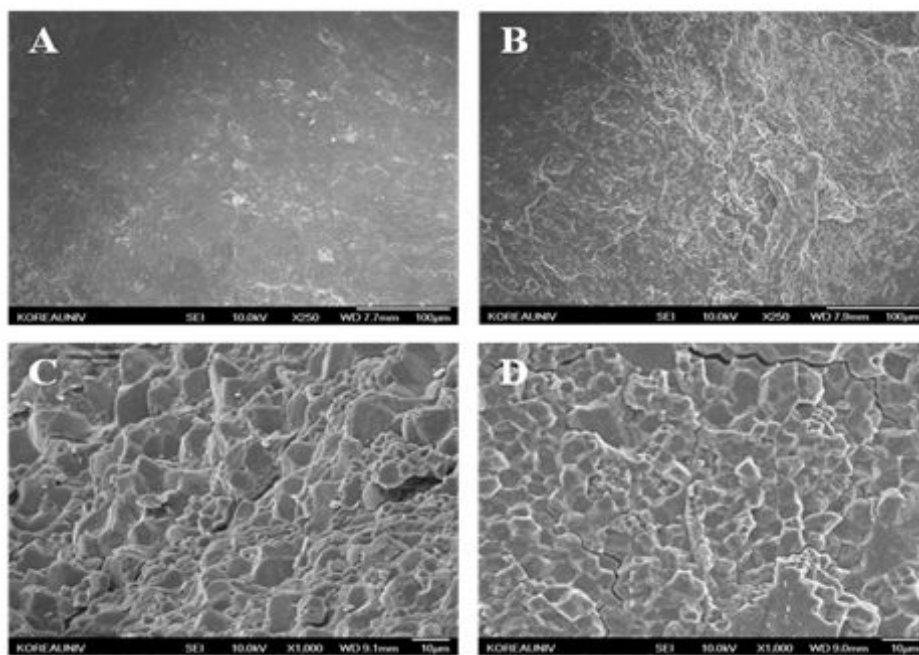


Fig. 93. Effect of temperature ((A) 30°C, (B) 40°C, (C) 50°C) on hydration patterns of raw and coated rices.

#### ④ 코팅쌀의 표면 및 내부구조 관찰

CHP 함유 대두가수분해물을 코팅한 쌀의 표면과 종단면을 전자현미경으로 각각 250배, 1000 배로 확대하였을 때의 모습을 Fig. 94에 나타내었다. 원료쌀의 종실 표면에서는 cracking 현상이 관찰되지 않았으나, 종단면으로 절단하여 표면을 확대한 결과, 종실표면에서는 보이지 않았던 미세한 cracking 현상이 관찰되었다. 원료쌀의 이러한 cracking 현상은 벼의 건조과정과 도정 시에 생긴 것으로 여겨진다. 코팅쌀의 종실 표면은 코팅과정에 의한 cracking 현상이 발생한 것으로 관찰되었으며, CHP 함유 대두가수분해물의 methylcellulose polymer 분무코팅이 비교적 고르게 된 것으로 관찰되었다. 코팅쌀을 종단면으로 절단하여 표면을 확대한 결과에서도 cracking 현상이 선명히 관찰되었다. 이는 코팅과정 중의 마찰과 건조과정에 의하여 발생된 것으로 여겨진다.

코팅과정 중의 코팅쌀의 전분입자가 호화의 영향을 받을 수 있을 가능성을 고려하여 코팅쌀을 종단면으로 절단하여 그 내부구조를 현미경으로 확대하여 관찰하였다. 원료쌀의 종단면의 경우 다각형 형태의 전분들의 모습을 관찰할 수 있으며, 전분 입자의 표면은 매우 매끄러우며 각면이 들어간 형태를 보였다. 쌀의 전분은 일반적으로 배유 세포 안에 복합 전분립으로 존재하며, 크기가 2~9  $\mu\text{m}$ 의 범위이고, 모양은 다각형을 가진다고 알려져 있다 [120]. 코팅쌀은 작은 입자들이 서로 뭉쳐서 나열되어 있는 것으로 보이나, 전분입자들의 큰 변화는 관찰되지 않았다. 본 실험의 결과로 보아, 종단면의 뚜렷한 형태상의 차이는 관찰되지 않았으며, 이에 따라 코팅과정에서의 코팅쌀의 전분입자 배열에는 큰 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다.



**Fig. 94. Scanning electron microscopy.** Whole kernel images of (A) raw and (B) coated rices, longitudinal section images of (C) raw and (D) coated rices.

(7) 대두가수분해물을 이용한 두유 제조

(가) 원료 및 레시피

두유액 : 86%(대두 고형분 7%이상), 감미료 : 4%, 칼슘원 : 0.25%, 향료 : 0.05%, 대두펩타이드 0.65%, 정제수 : 9.1%

(나) 공정

두유액 제조 (두유분말 + 정제수) → 1차 mixing (80°C/15 min, 감미료, 칼슘원, 대두 펩타이드, 정제수 첨가) → 2차 mixing (80°C/5 min, 향료투입) → 균질(3000 psi) → 냉각(25°C) → seaming → 멸균(121°C/20 min)

(다) 대두가수분해물 함유 두유의 색차값

시판 두유와 대두가수분해물을 함유한 두유의 색도값을 측정한 결과 Table 60과 Fig. 95와 같이 시판두유와 대두가수분해물 함유 두유의 L, a, b값의 차이가 크게 나타나지 않아 대두가수분해물을 두유에 적용하여 기능이 강화된 두유 제조 가능성을 제시할 수 있었다.

Table 60. Color value of soy milk containing soybean hydrolysates

	L	a	b
Standard	97.05	+0.08	+1.84
CHP두유	72.68±0.73	-0.61±0.16	10.14±0.35
시판두유	72.39±1.16	-1.85±0.25	9.06±0.66



Fig. 95. <CHP함유 두유> <시판용 두유>

(라) 총당 및 단백질 함량

시판두유와 대두가수분해물 두유의 총당 및 단백질 함량을 측정한 결과 (Table 61), 총당 및 단백질 함량의 큰 차이점을 나타내지 않았으며 맛과 향에 있어서도 시판 두유와 큰 차이를 나타내지 않아 대두가수분해물을 두유 제품 곡류 음료 제품에 적용할 수 있을 것으로 사료된다.

Table 61. Sugar and protein content of soy milk containing soybean hydrolysates

Component	CHP 두유	시판두유
Total sugar (mg/ml)	49.53±0.87	29.18±0.42
Protein (mg/ml)	45.80±1.87	28.87±0.28

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 총괄 연구개발 목표 달성도

#### 1. 총괄연구목표 및 달성도

##### 가. 연구성과 목표

(단위 : 건수)

구분	특허				신품종				유전자원등록	달성도	논문				기타
	출원	달성도	등록	달성도	품명등록	중생입수	품종보호				SCI	SCI 달성도	비SCI	비SCI 달성도	
							출원	등록							
1차년도												1	1		
2차년도	1	1	1	공고중							1	2			
3차년도	1	1	1	공고중					3	0 <sup>1)</sup>	2	3(+2) <sup>2)</sup>	1	1	
4차년도															
5차년도															
계	2	2	2						3	0	3	5(+2) <sup>2)</sup>	2	2	

<sup>1)</sup> 유전자원 등록의 경우 microarray 결과 당뇨관련 발굴된 신규 유전자가 없음.

<sup>2)</sup> (+2) : 현재 final minor revision 중 (Proteomics & Molecular Biology Report)

##### 나. 연구성과 활용 목표

(단위 : 건수)

구분	기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타 (학술대회 발표)
활용건수	2	2 (소재화포함)			1	
달성도	특허 2건 (이전 1건)	1 (시제품 4건)			예정 (과제 종료후)	3

## 제 2 절 연도별 연구개발 목표 달성 및 관련분야 기여도

### 1. 1차년도 연구개발 목표 달성 및 관련 분야 기여도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용	기여도
1차 연도 (2009)	제1세부	o Insulinoma 세포에서 CHP 항당뇨 활성 분석	100	o Insulinoma 세포에서 STZ 처리 농도에 따른 사멸 효과 분석 o CHP 처리에 의한 항당뇨 복구 및 예방 효과 측정 o CHP 처리에 의한 인슐린 생성 복구능 및 항당뇨 활성 측정. o CHP 처리 세포의 항당뇨 관련 특이 유전자(단백질) 발굴, 특성 분석	“논문 투고” “인력 양성”
		o 제1형 당뇨 모델동물에 의한 항당뇨 활성 분석	100	o STZ처리에 의한 제1형 당뇨모델 유발 o CHP 경구 투여에 의한 혈당강화 효과 및 인슐린 생성능 분석(4-6 주) o Histochemical분석에 의한 조직 복구능 측정 및 glucose tolerance test o 혈액 및 주요 조직에서 DEGs 및 프로테옴 분석에 의한 항당뇨 관련 특이 유전자(단백질) 발굴, 특성 분석	“논문 투고” “인력 양성”
		o CHP에 의한 제1형 당뇨 모델의 항당뇨 기작 규명	90	o diabetes RT-PCR array profiler를 이용한 항당뇨 관련유전자 발현 분포 분석 o CHP에 의한 antidiabetic pathway 및 기작 규명	방대한 유전자 정보이용신호진달 기작규명은 IPA분석 불가 “논문 투고” “인력 양성”
	제1협동	o 콩 가수분해물의 제조 및 분해 조건 확립	100	o 대두, 쥐눈이콩, 대두박 등 국내에서 생산 및 유통되고 있는 콩을 산업용 단백질 분해효소를 이용한 가수분해물 제조 o CHP 함량이 높은 가수분해물 및 단백질 분해효소 선정 o 가수분해물 제조 조건의 최적화 (온도, pH, 효소첨가량, 효소비율, 분해시간)	“식품산업기여” “제품개발” “특허출원”
		o Cyclization에 의한 CHP 함량 증진(효소적, 물리적)	100	o 각 공정에서 histidine, proline 함량 및 CHP 함량 분석 o Cyclization 조건 확립에 의한 최적화	“논문투고” “인력 양성”
		o 생화학적 정제 방법을 통한 CHP 함량 증진	100	o 크로마토그래피에 사용되는 resin을 이용한 함량 증진 o UF 및 펩타이드 특성 (pI)을 이용한 정제 방법에 의한 함량 증진	“인력 양성”



## 2. 2차년도 연구개발 목표 달성 및 관련 분야 기여도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용	기여도
2차 연도 (2010)	제1세부	○ 제2형 당뇨병 모델동물에 의한 항당뇨 활성 분석	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 유전적으로 제2형 당뇨병이 유발된 실험 동물 확보</li> <li>○ CHP 경구 투여에 의한 혈당강하 효과 및 인슐린 생성능 분석</li> <li>○ Histochemical 분석에 의한 조직 복구능 측정 및 glucose tolerance test</li> <li>○ CHP처리 조직의 proteome분석</li> <li>○ 혈액 및 주요 조직에서 DEGs 발굴 및 특성 분석</li> <li>○ 혈액 및 주요 조직에서 항당뇨 관련 proteome 발굴에 의한 특성 분석</li> </ul>	“논문투고” “인력양성” “분자의학 후보물질개발기초자료 제공” “연구성과공유” “당뇨 관련 타연구에 반영”
		○ CHP에 의한 제2형 당뇨병 모델의 항당뇨 기작 규명	90	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 항당뇨 관련 특이 유전자 (단백질) 발현에 의한 특성 분석</li> <li>○ Diabetes RT-PCR array profiler를 이용한 당뇨 관련 유전자들의 발현 분포 분석</li> <li>○ 제2형 당뇨병에서 CHP에 의한 anti-diabetic pathway 및 기작 규명</li> </ul>	“유전자 특성 분석에 의한 학계 기초자료 제공” “제 1형/2형에 대한 췌장조직에서 췌장항당뇨 기작규명”
	제1협동	○ Pilot plant에서 생산공정 및 표준화 공정 조건 확립	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Scalup에 따른 여러 인자 조사 및 적용</li> <li>○ 각 공정에서 CHP 함량 비교</li> <li>○ 각 공정에서 품질관리 지표선정</li> <li>○ 표준화 및 대량생산 공정 조건 확립</li> </ul>	“제품생산 및 개발” “기술이전” “기능성식품 산업기여”
		○ 콩 가수분해물의 안정성 평가	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 가공조건 (온도, pH, 건조)에 따른 안정성 평가</li> <li>○ 동물실험을 통한 안정성 평가</li> <li>○ 급성 및 아급성 독성 평가</li> </ul>	“제품개발” “기능성식품 산업기여”
		○ 소재의 일반적 특성 평가 및 CHP 생리활성 측정	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 소재의 일반적 (유화성, 기포성 등) 특성 평가</li> <li>○ 항당뇨 활성 이외의 생리활성 측정 (면역활성, 항산화 활성)</li> </ul>	“제품개발” “기능성식품 산업기여” “논문투고”

### 3. 3차년도 연구개발 목표 달성 및 관련 분야 기여도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용	기여도
3차년도 (2011)	제1세부	o 실험동물의 주요 조직세포 프로테오믹스/유전자분석자료해석	100	o 기존의 당뇨관련 특이 단백질 (유전자)과 비교분석(software 자료)	당뇨관련산업기초자료공유
		o 제1형 및 2형 당뇨 관련 단백질들의 기능 및 특성 분석연구(SAP, PRDX4, APEH, MDHC,... 등)	100	o 프로테오믹스에 의해 확보한 단백질들의 당뇨 연관성 및 작용 기전분석 (혈액 및 체장) o 당뇨병 진행 및 억제 기작과 관련된 새로운 단백질 마커 검색 o 당뇨병 관련 주요 미량 단백질 정밀 분석 및 주요 표적단백질의 기능분석 o 당뇨 특이 단백질 발굴에 의한 실용성 연구(biomarker, inhibitor 관련) o 진단 및 치료를 위한 표지 및 표적 단백질 분석 및 발굴	“논문투고” “인력양성” “당뇨관련 산업에 기초 자료 공유” “연구성과 공유” “국내 바이오 산업기술력향상”
		o 제1형 및 2형 당뇨 관련 유전자들의 기능 및 특성 분석 (Cysltr2, Mtus1, Wdr68, Sass6...등)	100	o 유전체 변화를 정량적 real time PCR 방법에 의해 유전자 검증 o 당뇨병 진행 및 억제 기작과 관련된 새로운 유전자 마커 검색 o CHP에 의해 특이 발현되는 유전자들 확인 및 분석(잠정적 바이오마커 후보군 선정) o 당뇨모델의 유전자 발현 프로파일 분석에 의한 CHP의 추가적 기능성 평가 (염증, 당수송, 인슐린 분비 조절 등의 기능)	“논문투고” “인력양성” “당뇨관련 산업 기초 자료공유” “연구성과 공유” “국내 바이오 산업기술력향상”
		o CHP 처리에 의한 항당뇨 메카니즘 규명	80	o 각각의 항당뇨 관련 특이 유전자 및 단백질 기능 분석에 의한 작용 메카니즘 규명 o 인체 상동성 유전자 및 단백질 비교 연구 (optional)	“당뇨기작 규명에 기초자료 제공” “국내 바이오 산업기술력향상”
		o 간이 임상 test에 의한 CHP 혈당 강하효과 규명	100	o 간이 임상 test용 시제품 제조 o 당뇨 및 내당성 환자 선별에 의한 CHP 투여 실험 (복용량, 복용기간, 혈당 및 인슐린변화 등) o 인체 관련 의약 후보물질 개발 가능성 타진	“제품개발” “당뇨관련 산업기여”
	제1협동	o 대량생산 공정의 최적화 및 표준화	100	o 실험실 수준을 벗어난 단백질 가수분해물 대량생산 공정 확립(100 L ~ 500 L 반응조 조건 등 생산공정 확립, 공정 중의 CHP 함량 변화 측정) o 대량생산 시 온도, 효소첨가량 pH, 염 등의 공정조건 확립에 따른 대량생산 표준화 확립	“제품개발” “수익창출” “국내 바이오 산업기술력향상”
		o 최적의 공정 선정 및 평가	100	o 대량생산 최적화와 표준화된 공정 적용에 따른 원가, 폐수발생 등을 파악하여 최적의 공정을 선정 (경제공정	“제품개발” “수익창출” “국내 바이오

			의 단순성, 수율, CHP 함량 및 단가 평가)	오산업기술 력향상”
	o 기능성 소재화 및 다양한 형태의 제품 개발	100	o CHP 제형화 조건 확립 (건조, 과립화, 분말화): 기능성 소재화 (시약, bulk 원료형태: 액상, 분말, 과립화) o 식품소재 가공 적성, 일반적 특성 안정성, 기능성 분석에 의한 가공 식품 소재로 활용 o 다양한 형태의 제품 개발 (과립포, 드링크 음료, 건강보조식품 등) o 관능 검사 및 시장성 조사 o 상품화를 위한 포장 및 용기 개발	“제품개발” “수익창출” “국내 바이오산업기술력향상” “기술이전”
	o 상품화	100	o 간이 임상 test 결과를 토대로 최종적으로 안전하고 효과적 제품개발 o 기술이전과 산학협동을 통한 최종 상품화	“제품개발” “수익창출” “국내 바이오산업기술력향상”
	o 홍보	100	o 인터넷 및 홈쇼핑 market 홍보 (업체와 협동)	“업체 주관 홍보/판매”
	o 보고서 및 논문, 특허 작성	100	o 결과보고서 작성 o 논문 작성 및 발간, 특허출원/등록	

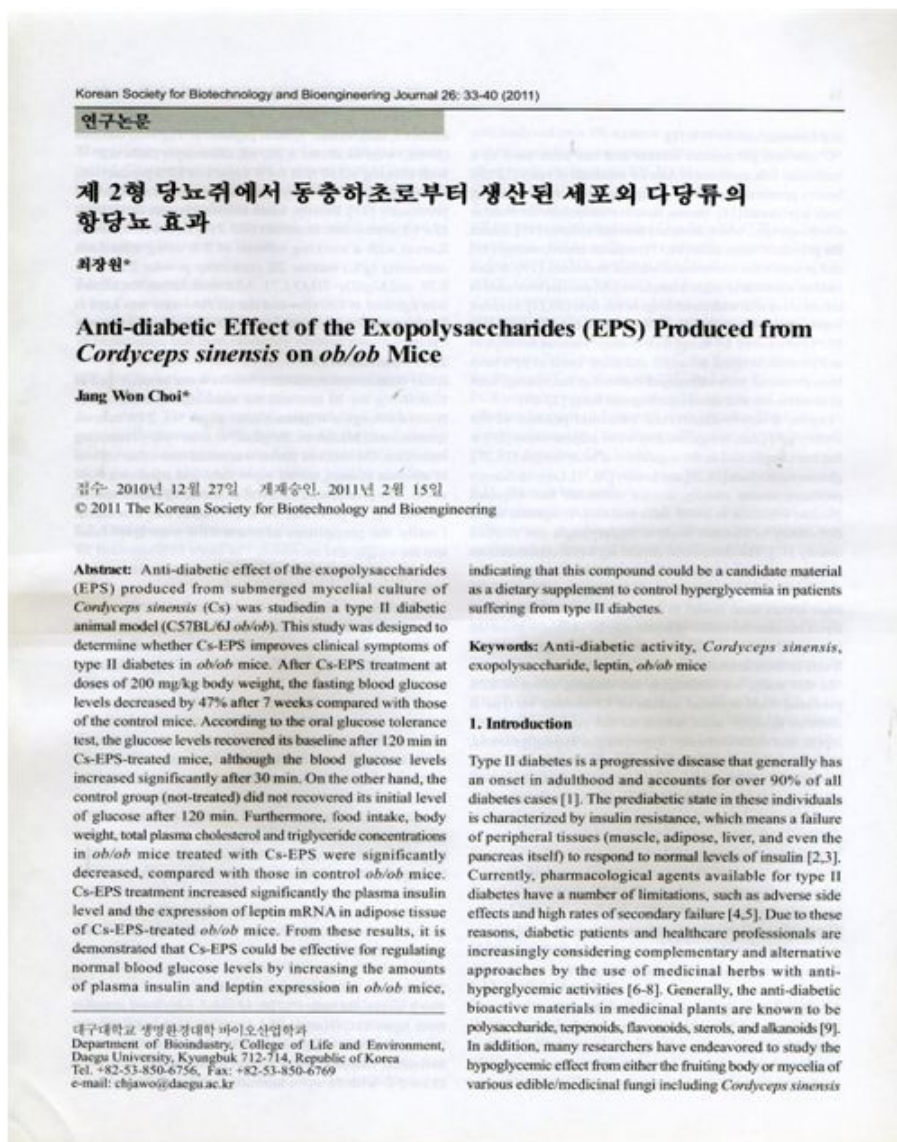
# 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

## 제 1 절 연구개발 성과

### 1. 연구논문 및 학술대회 발표

#### 가. 국내 연구논문

- (1) **Choi, J. W.** 2011. Anti-diabetic effect of the exopolysaccharide (EPS) produced from *Cordyceps sinensis* on *ob/ob* mice. *Korean Society for Biotechnology & Bioengineering Journal*. 26: 33-40.



(2) Ra, K. S. and J. W. Choi. 2011. Enhancement of cyclo (His-Pro) content from soybean fermented with *Bacillus amyloliquefaciens* CHP-12 and Its anti-diabetic effect. *Korean Society for Biotechnology & Bioengineering Journal*. 26:41-48.

## *Bacillus amyloliquefaciens* CHP-12에 의한 대두 발효물의 Cyclo-His-Pro (CHP) 함량 증진 및 항당뇨 효과

나경수<sup>2</sup>, 최장원<sup>1\*</sup>

### Enhancement of Cyclo-His-Pro (CHP) Content from Soybean Fermented with *Bacillus amyloliquefaciens* CHP-12 and Its Anti-diabetic Effect

Kyung Soo Ra<sup>2</sup> and Jang Won Choi<sup>1\*</sup>

접수: 2010년 12월 27일 / 게재승인: 2011년 2월 23일  
© 2011 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

**Abstract:** To enhance cyclo-His-Pro (CHP) content, soybean hydrolysate was obtained using the strains isolated from Chungkukjang and further purified by various purification steps. First, twenty two strains were screened from Chungkukjang containing high level of CHP. Among them, the strain No. 12, which showed higher productivity of CHP from soybean ferment and have homologous sequence with 16S rDNA of *Bacillus amyloliquefaciens*, was named *B. amyloliquefaciens* CHP-12. Through various purification processes, CHP was concentrated from soybean ferment using ultrafiltration, which showed the best efficiency of CHP production, with the yield (71.3%) and CHP content (2.14 mg/g). Moreover, when glucose tolerance test was performed in Type I Sprague-Dawley rat induced by streptozotocin using the soybean ferments [0.5 g soybean ferment/kg body weight (CHP-0.5 group)] and 1.0 g soybean ferment/kg body weight (CHP-1.0 group), there were significant differences in glucose levels between diabetes-control group (265.3 mg/dL) and soybean ferment-treated groups (CHP-0.5 group: 84.3 mg/dL and CHP-1.0 group: 85.3 mg/dL) 120 min after glucose

injection (2 g/kg body weight) ( $p < 0.05$ ). Accordingly, it is suggested that the soybean ferment containing high level of CHP might be a candidate material as an anti-diabetic supplement for manufacturing functional healthy foods.

**Keywords:** Cyclo-His-Pro (CHP), chungkukjang, soybean ferment, *Bacillus amyloliquefaciens*

#### 1. 서론

현대인은 가공식품과 동물성 식품의 섭취 증가에 따른 식물성 식품의 섭취 감소로 인해 동맥경화, 고혈압, 비만 및 당뇨병 등의 성인병 문제에 심각하게 직면하고 있으며 그 중 당뇨병 유행률은 세계적으로 급속히 증가하는 추세를 보여 중대한 문제로 대두되고 있다 [1,2]. 또한 당뇨병은 전 단계인 pre-diabetes 상태에 있는 사람이 상당수에 이르므로 이를 근거로 향후 당뇨병 환자의 급격한 증가가 경고되고 있다 [2,4]. Pre-diabetes는 아직 당뇨병은 아니지만 혈당치가 정상보다 높은 상태를 의미하며 이들은 운동이나 식이조절 없이 방치하였을 경우 10년 이내에 당뇨병으로 진행한다고 보고되고 있다 [3,4]. 당뇨병은 혈당을 조절하는 호르몬인 인슐린의 체내 생성 및 조절 능력에 이상이 온 것으로 심각한 자가 증상이 있기까지 당뇨병인 것을 인식 못하는 경우가 많다. 당뇨병의 치료는 대부분 약물치료와 식이요법에 의존하고 있으나 약물복용에 따른 독성 및 내성 문제가 심각하게 대두되고 있어 근래에 와서는 인슐린 등의 약물치료 이외에 민간요법이나 자연식품도 각광받고 있다. 이에 국민들에게 더

<sup>1</sup>대구대학교 바이오산업학과

<sup>2</sup>Department of Bioindustry, Daegu University, 15 Naeri-Ri, Jinyang-Up, Kyungsan, Kyungbuk 712-714, Korea  
Tel: +82-53-850-6756, Fax: +82-53-850-6769  
e-mail: chjawo@daegu.ac.kr

<sup>\*</sup>대구공업대학 식품영양과

<sup>2</sup>Department of Food and Nutrition, Daegu Technical College, Daegu 704-721 Korea



나. 국제 연구논문

- (1) Choi, J. W., K. S. Ra, S. Y. Kim, T. J. Yoon, K. W. Yu, K. S. Shin, S. P. Lee, and H. J. Suh. 2010. Enhancement of anti-complementary and radical scavenging activities in the submerged culture of *Cordyceps sinensis* by addition of citrus peel. *Bioresource Technology*. 101(15): 6028-6034. (SCI, Impact factor = 4.365)

Bioresource Technology 101 (2010) 6028–6034

Contents lists available at ScienceDirect

**Bioresource Technology**

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/biortech](http://www.elsevier.com/locate/biortech)

---

**Enhancement of anti-complementary and radical scavenging activities in the submerged culture of *Cordyceps sinensis* by addition of citrus peel**

Jang Won Choi<sup>a</sup>, Kyung Soo Ra<sup>b</sup>, Seong Yeong Kim<sup>c</sup>, Taek Joon Yoon<sup>d</sup>, Kwang-Won Yu<sup>e</sup>, Kwang-Soon Shin<sup>f</sup>, Sam Pin Lee<sup>g</sup>, Hyung Joo Suh<sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Bioindustry, Daegu University, Kyungbuk 712-714, Republic of Korea  
<sup>b</sup> Department of Food and Nutrition, Daegu Technical College, Daegu 704-721, Republic of Korea  
<sup>c</sup> Department of Food and Nutrition, Korea University, 1 Jeongneung-dong, Sungbuk-ku, Seoul 136-703, Republic of Korea  
<sup>d</sup> Department of Food and Nutrition, Yuhan College, Bucheon 422-749, Republic of Korea  
<sup>e</sup> Division of Food and Biotechnology, Chungju National University, Jeungpyeong-gun, Chungju, Chungbuk 368-701, Republic of Korea  
<sup>f</sup> Department of Food Science and Biotechnology, Kyonggi University, Suwon 443-760, Republic of Korea  
<sup>g</sup> Department of Food Science and Technology, Keimyung University, Daegu 704-710, Republic of Korea

---

**ARTICLE INFO**

**Article history:**  
Received 3 August 2009  
Received in revised form 27 October 2009  
Accepted 22 February 2010  
Available online 17 March 2010

**Keywords:**  
*Cordyceps sinensis*  
Exopolysaccharide  
Citrus peel  
Antioxidant activity  
Anti-complementary activity

**ABSTRACT**

To investigate the optimal conditions for the production of *Cordyceps sinensis* by the submerged culture method, glucosamine and exopolysaccharide (EPS) productivities were determined in culture broth containing different carbon sources, principally rice bran and citrus peel. An optimal medium composition (1.5% rice bran, 0.5% molasses, 3% CSL, 0.1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 0.05% MgSO<sub>4</sub>) and the optimal condition (25 °C and 5–6 d culture time) for high EPS productivity with potent immune-stimulating activities were obtained. The addition of citrus peel to the culture of *C. sinensis* under the optimized conditions improved EPS productivity and glucosamine content. Furthermore, anti-complementary activity was higher (58.0–80.8%) using citrus peel as compared to no addition of citrus peel (48.2–68.7%). Antioxidant activity (AEAC value) of the citrus peel culture was high (284.3–384.6 mg/100 g) compared to that of the culture without citrus peel (142.8–219.5 mg/100 g), indicating that the citrus peel helped enhance the anti-complementary and antioxidant activities of *C. sinensis*.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

---

**1. Introduction**

Today, medical mushrooms are becoming increasingly popular as foods and supplements with special health properties. Of all the medicinal mushrooms in China, *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc., an ascomycete, is unique and the most prized. *Cordyceps* is officially recognized in China as a national medicinal treasure, a tonic-food that has been used as a powerful restorative for at least the last one thousand years. Recently, research on *Cordyceps* has greatly increased in both China and Korea (Zhu et al., 1998).

Much interest has been generated in the subject of exopolysaccharides (EPS) produced by fungi, due to their various biological and anti-tumor activities (Lee et al., 2002). Biopolymers extracted from fruiting bodies, mycelium and culture precipitates of various mushrooms can have anti-complementary activities (Shin et al., 2007) and therefore can influence humoral immunity involved in host defense. In our previous research of *C. sinensis*, we found that the hot water extract of the mycelia had immunomodulatory effects such as macrophage stimulating activity (Koh et al., 2002).

The extract also stimulated the proliferation of bone marrow cells through Peyer's patch cells, and it inhibited tumor metastasis (Yoon et al., 2008), and lowered cholesterol (Koh et al., 2003).

These properties of *C. sinensis*-derived compounds make commercial production desirable; however, medium cost is a critical factor in determining the economics of fermentation processes. In most industrial processes, complex mixtures of cheap natural products are usually used. Generally, molasses from sucrose, ground nuts, and vitamin B complex have been regarded as more efficient medium ingredients than sucrose, beef extract, and yeast extract in the fermentation process (Dong and Yao, 2005).

Rice bran and citrus peel can potentially also serve as media components. These ingredients are likely relatively cheap since they are the principal solid by-products of the rice milling and citrus processing industries. For example, the orange juice industry yields about 1.8–2.3 million metric tons of orange peel as by-products in the United States (Li et al., 2006; Manthey et al., 2001). Citrus pectin and its derivatives have several biological and physiological functions, such as reduction of serum cholesterol (Brown et al., 1999), stimulation of phagocytes and macrophages (Iacomini et al., 2005; Popov et al., 1999), and anti-complementary activity (Samuelsen et al., 1995). Rice bran polysaccharides have

\* Corresponding author. Tel.: +82 2 940 2853; fax: +82 2 940 2850.  
E-mail address: [suh1960@korea.ac.kr](mailto:suh1960@korea.ac.kr) (H.J. Suh).

0960-8524/\$ - see front matter © 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.  
doi:10.1016/j.biortech.2010.02.083

(2) Jung, E. Y., H. S. Lee, J. W. Choi, K. S. Ra, M. R. Kim, and H. J. Suh. 2011. Glucose tolerance and antioxidant activity of spent brewer's yeast hydrolysate with a high content of cyclo-His-Pro (CHP). *J. Food Science*. 76(2): C272-C278. (SCI, IF = 1.733)

C Food Chemistry

## Glucose Tolerance and Antioxidant Activity of Spent Brewer's Yeast Hydrolysate with a High Content of Cyclo-His-Pro (CHP)

Eun Young Jung, Hyun-Sun Lee, Jang Won Choi, Kyung Soo Ra, Mi-Ryung Kim, and Hyung Joo Suh

**Abstract:** To elevate the Cyclo-His-Pro (CHP) content in yeast, the yeast hydrolysate that was obtained from enzymatic hydrolysis was subjected to various treatments. Flavourzyme-treated hydrolysate showed the highest CHP content (674.0  $\mu\text{g/g}$ ) among the various proteases treatments. Ultrafiltration was selected as the best method for concentrating CHP in yeast hydrolysate, based on the yields and CHP contents. In addition, we evaluated the radical scavenge and glucose tolerance of yeast hydrolysate with a high content of CHP. Yeast hydrolysate showed intense scavenging abilities of both 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) radicals. The  $\text{IC}_{50}$  values of yeast hydrolysate on DPPH and ABTS radicals were 1.9 and 0.9 mg/mL, respectively. There were significant differences in glucose level between the diabetes-control and yeast hydrolysate group at 30, 60, 90, and 120 min after injection in a type 1 diabetes model ( $P < 0.01$ ). Also, there were significant differences in blood glucose levels between the 2 groups at 30, 60, and 100 min after injection in the type 2 diabetes group ( $P < 0.05$ ). Therefore, it is possible to use the yeast hydrolysate with high levels of CHP as an antioxidative and/or antidiabetic material for the preparation of functional foods.

**Keywords:** antioxidant, Cyclo-His-Pro, diabetes, Flavourzyme, yeast hydrolysate

**Practical Application:** This study tried to develop a material containing a high content of CHP using yeast for possible applications of this cyclic dipeptide in the therapy of metabolic disorders. The yeast hydrolysate prepared with Flavourzyme showed a high level of CHP. The hydrolysate with a high content of CHP showed high levels of radical scavenging activities and oral glucose tolerance activity. Therefore, it is possible to use the yeast hydrolysate with high levels of CHP as an antioxidative and/or antidiabetic material for the preparation of functional foods.

### Introduction

Spent brewer's yeast, a by-product from the brewing industry, is produced in large amounts annually by main beer manufacturers due to an increase in beer production. Generally, it is sold primarily as inexpensive animal feed after inactivation by heat, and much of this by-product is considered industrial organic waste, which causes a great deal of concern. Yeast cells contain substantial proteins, lipids, RNA, vitamins, and minerals. The brewer's yeast is an inexpensive nitrogen source and generally recognized as safe, and it has good nutritional characteristics (Lamoolphak and others 2006).

Yeast extracts (yeast hydrolysate) are commercially marketed in liquid, paste, or powder forms (Rey and others 2007). They are usually produced from baker's or spent brewer's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) by autolysis, but other yeasts, (for example, *Candida utilis*, *Kluyveromyces marxianus*) also are used occasionally (Rey and others 2007). In general, since spent yeast in the brewing industry is relatively inexpensive, it is used largely in the production of extracts to meet the needs of the food and fermentation industries (Lodolo and others 2008; Wang and others 2010).

Peptides in foods play an important role in affecting the nutritional, organoleptic, and functional properties of the foods. Many types of peptides present in living organisms exhibit various biochemical activities.

Cyclo-His-Pro (CHP) is an endogenous cyclic dipeptide structurally related to hypothalamic tyrosin-releasing hormone (TRH) (Prasad 1995). CHP is ubiquitous in the central nervous system (CNS), and it has been found in blood and in the gastrointestinal tract, as well as in several body fluids, such as semen, cerebrospinal fluid, prostate, and urine. In the CNS, it seems to be related to a presynaptic dopaminergic mechanism and a leptin-like function (Hwang and others 2003; Song and others 2005). Since plasma levels of CHP in human are increased after glucose ingestion, CHP activity has been suggested to relate glycemic control in diabetes.

The dietary feeding of CHP plus zinc significantly improved insulin sensitivity and glucose clearance in diabetic and overweight animals (Song and others 2001; Hwang and others 2003; Song and others 2005). CHP also decreases food intake, consequently, mimicking the action of leptin, which controls appetite (Morley and others 1981; Steiner and others 1989). This suggests that CHP

MS 20100912 Submitted 8/11/2010, Accepted 11/10/2010. Authors Jung, Lee, and Suh are with Dept. of Food and Nutrition, Korea Univ., Seoul 136-703, Republic of Korea. Author Choi is with Dept. of Bioindustry, Daegu Univ., Kyungsan 712-714, Republic of Korea. Author Ra is with Dept. of Food and Nutrition, Daegu Technical College, Daegu 704-721, Republic of Korea. Author Kim is with Dept. of Food and Nutrition, Silla Univ., Busan 617-736, Republic of Korea. Direct inquiries to author Suh (E-mail: suh1960@korea.ac.kr).

A Publication of  
the Institute of Food Technologists  
**Journal of Food Science**

© 2011 Institute of Food Technologists  
doi: 10.1111/j.1750-3841.2010.01997.x  
Further reproduction without permission is prohibited.

C272 Journal of Food Science • Vol. 76, No. 2, 2011



(3) Koo, K. B., H. J. Suh, K. S. Ra, and J. W. Choi. 2011. Protective effect of cyclo(His-Pro) on streptozotocin-induced cytotoxicity and apoptosis *in vitro*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 21: 218-227. (SCIE, IF = 1.224)

*J. Microbiol. Biotechnol.* (2011), 21(2), 218–227  
doi: 10.4014/jmb.1012.12003  
First published online 16 January 2011



## Protective Effect of Cyclo(His-Pro) on Streptozotocin-Induced Cytotoxicity and Apoptosis *In Vitro*

Koo, Kwang Bon<sup>1</sup>, Hyung Joo Suh<sup>2</sup>, Kyung Soo Ra<sup>3</sup>, and Jang Won Choi<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biotechnology, College of Life and Environment, Daegu University, Kyungbuk 712-714, Korea

<sup>2</sup>Department of Food and Nutrition, Korea University, Seoul 136-703, Korea

<sup>3</sup>Department of Food and Nutrition, Daegu Technical College, Daegu 704-721, Korea

Received: December 6, 2010 Revised: January 5, 2011 / Accepted: January 6, 2011

Cyclo(His-Pro) (CHP) is a naturally occurring, cyclic dipeptide structurally related to thyrotropin-releasing hormone (TRH). CHP was efficiently obtained from soybean meal by hydrolysis with flavourzyme and alcalase. In this study, the effects of CHP on streptozotocin (STZ)-induced  $\beta$ -cell dysfunction and apoptosis were investigated in rat insulinoma cells (RINm5F) secreting insulin. When the RINm5F cells were treated with 2 mM STZ, insulin secretion decreased to approximately 54% that of control cells. However, CHP treatment restored the insulin-secreting activity of RINm5F cells to approximately 71% that of the untreated control cells. Moreover, CHP significantly protected the cells from STZ-mediated cytotoxicity *via* reduction of nitric oxide (NO) production (2.3-fold) and lipid peroxidation (1.9-fold), which were induced by STZ. Moreover, CHP treatment also attenuated STZ-induced apoptotic events, such as activation of caspase-3, poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage, and DNA fragmentation in RINm5F cells, indicating that CHP could protect the cells from apoptotic cell death induced by oxidative stress of STZ by increasing the expression of an anti-apoptotic protein, Bcl-2. These results suggest that CHP could be a candidate material for a protective and therapeutic agent against STZ-mediated cytotoxicity and apoptosis.

**Keywords:** Apoptotic events, cyclo(His-Pro), nitric oxide, RINm5F, streptozotocin

Diabetes mellitus is a group of metabolic diseases characterized by high blood sugar levels resulting from defects in insulin

secretion or action. More than 90% of diabetic patients suffer from Type II diabetes, which is a progressive disease with adult onset [67]. Type II diabetes, non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM), is characterized by insulin resistance, in which the primary insulin target organs (adipose, muscle, and liver tissues) are poorly responsive to insulin action [48] and which may combine with reduced insulin secretion caused by a progressive loss of  $\beta$ -cell function. Type I diabetes, insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM), which represents a majority of the diabetes cases in children, is distinguishable by selective destruction *via* an autoimmune process of the insulin-secreting  $\beta$ -cell in the pancreatic islets of Langerhans, and pancreatic  $\beta$ -cells are thought to be destroyed by apoptotic death [62]. Thus, activation of the pancreatic  $\beta$ -cell survival program might be an important factor in a therapy for Type I and Type II diabetes.

The pancreatic  $\beta$ -cells are vulnerable to oxidative stress, such as reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO), which may be involved in  $\beta$ -cell death by apoptosis, possibly due to low level expression of antioxidant enzymes. Antioxidant defense systems to increase production of free radicals are remarkably disordered in the pancreas of diabetic animals [8, 64]. It is well known that superoxide anion ( $O_2^{\cdot-}$ ) is the primary radical formed by the reduction of molecular oxygen, and it may lead to secondary radicals or ROS, such as  $H_2O_2$  and hydroxyl radical ( $\cdot OH$ ) [1, 15]. Moreover, in diabetic models induced by streptozotocin (STZ), an activated oxygen species, it was proposed that superoxide radical is formed and involved in the death of  $\beta$ -cells [41, 51].

STZ is a  $\beta$ -cell-specific toxin and can be used to chemically induce diabetes in insulinoma cells (RINm5F), rats, and mice to study the effects of antidiabetic agents.

\*Corresponding author  
Phone: +82-53-850-6756; Fax: +82-53-850-6769;  
E-mail: chjowo@daegu.ac.kr



(4) Ra, K. S., H. J. Suh, and J. W. Choi. 2012. Hypoglycemic effects of cyclo (His-Pro) in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 17:176-184. (SCIE, IF = 1.004)

Biotechnology and Bioprocess Engineering 17: 176-184 (2012)  
DOI 10.1007/s12257-011-0618-1

RESEARCH PAPER

## Hypoglycemic Effects of Cyclo (His-Pro) in Streptozotocin-induced Diabetic Rats

Kyung Soo Ra, Hyung Joo Suh, and Jang Won Choi

Received: 29 November 2011 / Revised: 6 December 2011 / Accepted: 8 December 2011  
© The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering and Springer 2012

**Abstract** The effects of Cyclo (His-Pro) (CHP), a cyclic dipeptide structurally related to thyrotropin-releasing hormone (TRH), on glucose metabolism, blood insulin level, lipid profile, and the viability of pancreatic cells were investigated in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats. The rats (Sprague-Dawley) with a blood glucose level above 300 mg/dL after induction with STZ (50 mg/kg of body weight) were considered to be diabetic and used for the treatment with CHP (4 mg/day/kg of body weight). The blood glucose level in the CHP-fed rats was reduced remarkably by approximately 56% as compared to the untreated diabetic group at 21 days of feeding. In an oral glucose tolerance test, blood glucose levels were restored to baseline at 120 min after CHP treatment, although the levels increased significantly after 30 min. Plasma insulin levels in the CHP-treated group were also enhanced by 2-fold compared to the untreated group. Triglyceride and total cholesterol levels in CHP-treated rats almost returned to normal levels. Moreover, histological examination showed that CHP treatment restored impaired  $\beta$ -cells in the pancreas up to two-thirds of the normal level. The transcriptional level of C-reactive protein (CRP), used mainly as a marker of inflammation, was also restored mimicking normal level in the CHP-treated-group, suggesting that the

$\beta$ -cells destroyed by STZ were, at least in part, recovered. Accordingly, CHP was concluded to have an excellent hypoglycemic effect by lowering average plasma glucose levels, increasing insulin secretion, and restoring the viability of pancreatic  $\beta$ -cells in diabetic rats. We suggest that CHP might be a potential candidate to control Type 1 diabetes mellitus.

**Keywords:** cyclo (His-Pro), diabetes, streptozotocin, pancreatic  $\beta$ -cell, hypoglycemic effect

### 1. Introduction

Diabetes mellitus is a major endocrine disorder that has become a growing health problem in most countries. Type 1 diabetes is estimated to constitute 5–10% of all diabetes mellitus, and its incidence has been increasing by approximately 3% per year, although the rates vary widely by country [1–3]. Type 1 diabetes mellitus (T1DM), insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM or formerly, juvenile diabetes), which represents the majority of diabetes cases in children, is distinguishable by selective destruction (apoptotic death) *via* an autoimmune process of the insulin secreting  $\beta$ -cells in the pancreatic islets of Langerhans [4]. Although the cause of T1DM is still not completely understood, it is believed to be of immunological origin. Eventually, T1DM is fatal unless treated with insulin.

Despite the usage of many hypoglycemic agents, diabetes and its related complications still constitute a major medical problem. Though different types of oral hypoglycemic agents are available along with insulin for the treatment of diabetes mellitus, there is increasing demand by patients to use natural products with anti-diabetic activity. Insulin cannot be used orally, and continuous use of synthetic anti-

Jang Won Choi\*  
Department of Bioindustry, College of Life and Environment, Daegu University, Gyeongsan 712-714, Korea  
Tel: +82-53-850-6736; Fax: +82-53-850-6769  
E-mail: chjawn@daegu.ac.kr

Kyung Soo Ra  
Department of Food and Nutrition, Daegu Technical College, Daegu 704-721, Korea

Hyung Joo Suh  
Department of Food and Nutrition, Korea University, Seoul 130-701, Korea

Springer

(5) Park, S. W., S. A. Choi, J. W. Yun, and J. W. Choi. 2012. Alterations in pancreatic protein expression in STZ-induced diabetic rats and genetically diabetic mice in response to treatment with hypoglycemic dipeptide cyclo (His-Pro). *Cellular Physiology and Biochemistry*. 29: 603-616. (SCI, IF = 3.585)

Original Paper

Cellular Physiology  
and Biochemistry

Cell Physiol Biochem 2012;29:603-616 Accepted: January 12, 2012

---

## Alterations in Pancreatic Protein Expression in STZ-Induced Diabetic Rats and Genetically Diabetic Mice in Response to Treatment with Hypoglycemic Dipeptide Cyclo (His-Pro)

Seung-Won Park<sup>1\*</sup>, Song Ah Choi<sup>2\*</sup>, Jong Won Yun<sup>3</sup> and Jang Won Choi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Agricultural Biology, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Suwon, <sup>2</sup>Department of Bioindustry and <sup>3</sup>Department of Biotechnology, Daegu University, Kyongsan, Kyungbuk, Republic of Korea, \*Two authors contributed equally for the manuscript

**Key Words**  
Cyclo (His-Pro) • Diabetes • *ob/ob* mice • Pancreatic proteome • STZ-induced diabetic rats

**Abstract**  
To provide insights into the molecular mechanisms underlying diabetes mellitus, we performed a proteomic study on two diabetic animal models, streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats (T1DM) and genetically diabetic (C57BL/6J *ob/ob*) mice (T2DM). To better understand the recovery process of those diabetic rodents, we examined the effect of hypoglycemic dipeptide Cyclo (His-Pro) (CHP) treatment on the differential expression of pancreatic proteins in both animal models. Oral administration of CHP had an excellent hypoglycemic effect in both animal models, lowering the average plasma glucose level by over 50%. Pancreatic proteins were separated by two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) and identified by MALDI-TOF mass spectrometry. This study allowed, for the first time, the identification of 34 proteins that are related to diabetes and potential targets of CHP, a potent anti-diabetic agent for both T1DM and T2DM. The alterations in the expression of these proteins could indicate a tendency for diabetic animals to overcome their diabetic state. These proteins are involved in cellular functions such as metabolism, cellular structure, oxidative stress, as well as signal and energy transduction. Some have already been linked to diabetes, suggesting that the newly identified proteins might also be significant in the etiology of this pathology and should be further investigated. Furthermore, CHP has emerged as a potent tool for both the treatment and study of the molecular mechanisms underlying diabetes. Thus, the findings presented here provide new insights into the study and potential treatment of this pathology.

Copyright © 2012 S. Karger AG, Basel

**Introduction**

Diabetes mellitus is a multifactorial disease characterized by the destruction of the insulin-secreting  $\beta$ -cells of the islets of Langerhans in the pancreas (type 1 diabetes mellitus, T1DM) or by insulin resistance, whereby the primary insulin target organs are unresponsive to insulin action (type 2 diabetes mellitus, T2DM) [1]. To date, numerous treatments based on medicinal plants for the management of diabetes have

**KARGER**  
Fax +41 61 306 12 34  
E-Mail karger@karger.ch  
www.karger.com

© 2012 S. Karger AG, Basel  
1015-8987/12/0294-0603\$38.00/0  
Accessible online at:  
www.karger.com/cpb

Dr. Jang Won Choi  
Department of Bioindustry, Daegu University  
Kyongsan, Kyungbuk 712-714 (Republic of Korea)  
Tel. +82-53-850-6756, Fax +82-53-850-6769, E-Mail chjowo@daegu.ac.kr

(6) Choi, S. A., H. J. Suh, J. W. Yun, and **J. W. Choi**. 2012. Differential gene expression in pancreatic tissues of streptozocin-induced diabetic rats and genetically-diabetic mice in response to hypoglycemic dipeptide cyclo (His-Pro) treatment. *Molecular Biology Reports* "under final revision". (SCI, IF = 1.875)

**Molecular Biology Reports**  
**Differential gene expression in pancreatic tissues of streptozocin-induced diabetic rats and genetically-diabetic mice in response to hypoglycemic dipeptide cyclo (His-Pro) treatment**  
 --Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	MOLE-4239R3
<b>Full Title:</b>	Differential gene expression in pancreatic tissues of streptozocin-induced diabetic rats and genetically-diabetic mice in response to hypoglycemic dipeptide cyclo (His-Pro) treatment
<b>Article Type:</b>	Manuscript
<b>Keywords:</b>	Cyclo (His-Pro); diabetes; DNA microarray; ob/ob mice; pancreatic gene expression; STZ-induced diabetic rats
<b>Corresponding Author:</b>	Jang Won Choi KOREA, REPUBLIC OF
<b>Corresponding Author Secondary Information:</b>	
<b>Corresponding Author's Institution:</b>	
<b>Corresponding Author's Secondary Institution:</b>	
<b>First Author:</b>	Song Ah Choi
<b>First Author Secondary Information:</b>	
<b>Order of Authors:</b>	Song Ah Choi Hyung Joo Suh Jong Won Yun Jang Won Choi
<b>Order of Authors Secondary Information:</b>	

Powered by Editorial Manager® and Preprint Manager® from Aries Systems Corporation

Research article for submission to *Molecular Biology Reports*

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

**Differential gene expression in pancreatic tissues of streptozocin-induced diabetic rats and genetically-diabetic mice in response to hypoglycemic dipeptide cyclo (His-Pro) treatment**

Song Ah Choi<sup>1</sup>, Hyung Joo Suh<sup>2</sup>, Jong Won Yun<sup>3</sup>, and Jang Won Choi<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>*Department of Bioindustry and* <sup>3</sup>*Department of Biotechnology, Daegu University, Kyungsan, Kyungbuk 712-714, Republic of Korea*

<sup>2</sup>*Department of Food and Nutrition, Korea University, Seoul 130-701, Republic of Korea*

**Running title:** Differential gene expression in diabetic animals by cyclo (His-Pro)

**\*Correspondence:** Dr. Jang Won Choi, Department of Bioindustry,  
Daegu University, Kyungsan, Kyungbuk 712-714, Republic of Korea

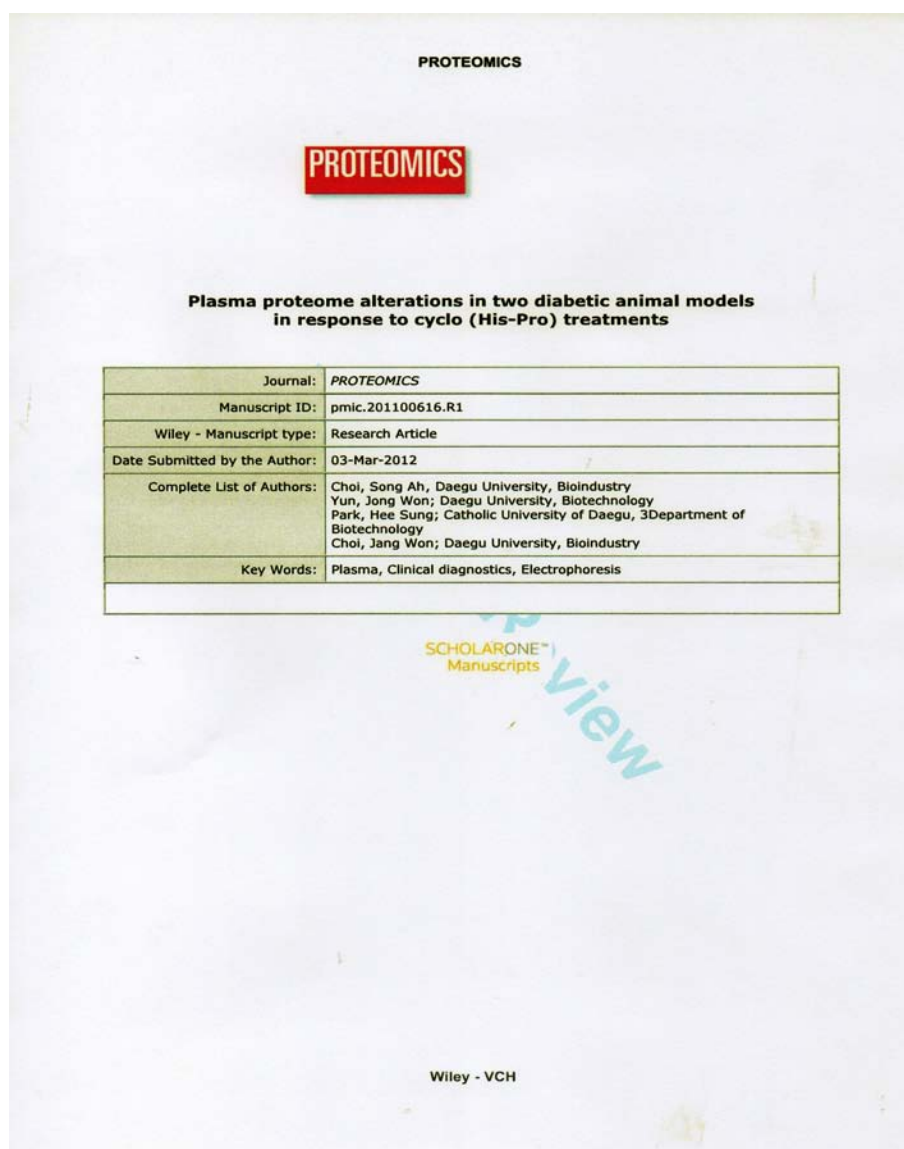
**Tel:** +82-53-850-6756, **Fax:** +82-53-850-6769, **E-mail:** chjawo@daegu.ac.kr



(7) Choi, S. A., J. W. Yun, H. S. Park, and J. W. Choi. 2012. Plasma proteome alterations in two diabetic animal models in response to cyclo (His-Pro) treatments. *Proteomics*. "under final revision". (SCI, IF = 4.815)

**Manuscripts with Decisions**

Manuscript ID	Manuscript Title	Date Submitted	Date Decided	Status	Actions
pmic.201100616.R1	Plasma proteome alterations in two diabetic animal models in response to cyclo (His-Pro) treatments [ <a href="#">View Submission</a> ]	03-Mar-2012	26-Mar-2012	ME: <a href="#">Kraus, Hans-Joachim</a> • Minor Revision (26-Mar-2012) • Due on: 25-May-2012 <a href="#">view decision letter</a>	<a href="#">create a revision</a>



Research article for submission to *Proteomics*

**Plasma proteome alterations in two diabetic animal models in response to cyclo (His-Pro) treatments**

Song Ah Choi<sup>1</sup>, Jong Won Yun<sup>2</sup>, Hee Sung Park<sup>3</sup> and Jang Won Choi<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>*Department of Bioindustry and* <sup>2</sup>*Department of Biotechnology, Daegu University, Kyungsan, Kyungbuk 712-714, Republic of Korea*

<sup>3</sup>*Department of Biotechnology, Catholic University of Daegu, Kyungsan, Kyungbuk 712-702, Republic of Korea*

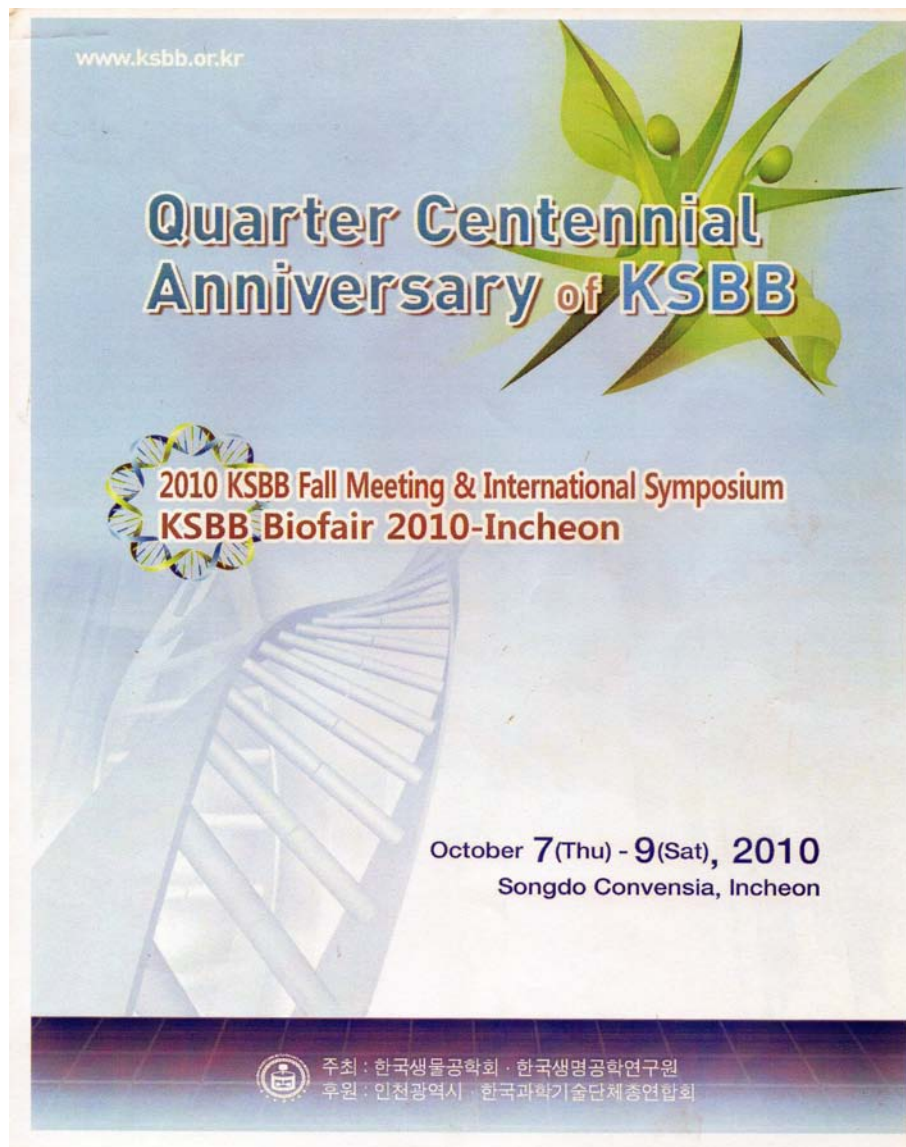
**Running title:** Plasma proteome alterations in diabetic animals by cyclo (His-Pro)

**\*Correspondence:** Dr. Jang Won Choi, Department of Bioindustry,  
Daegu University, Kyungsan, Kyungbuk 712-714, Republic of Korea

**Tel:** +82-53-850-6756, **Fax:** +82-53-850-6769, **E-mail:** [chjawo@daegu.ac.kr](mailto:chjawo@daegu.ac.kr)

다. 학술대회 발표

(1) Koo, K. B. and JANG WON CHOI. 2010. Protective effect of cyclo-His-Pro on streptozotocin-induced apoptosis of pancreatic  $\beta$ -cells. P108 (PMP02). "2010 KSBB Fall Meeting & International Symposium (KSBB Biofair 2010-Incheon)"





**PMP02**    **Protective Effect of Cyclo-His-Pro on Streptozotocin-Induced Apoptosis of Pancreatic  $\beta$ -Cells**

Kwang Bon KOO and Jang Won CHOI

*Dept. of Bioindustry, Daegu University, Kyungbuk, 712-714.*

Cyclo-His-Pro (CHP) is a cyclic dipeptide with numerous biological activities, and structurally related to thyrotropin-releasing hormone that was originally discovered in brain. This study was designed to determine the protective effect and its action mechanism of CHP on the apoptosis of pancreatic  $\beta$ -cells. The RINm5F cell line is a well-established and commonly used in vitro model for the study of the biology of pancreatic islet cells. Hence, the effect of CHP was tested on streptozotocin (STZ)-treated RINm5F cells and their stimulatory effects on RINm5F cells proliferation and apoptosis were investigated. CHP was produced from defatted soybean meal by hydrolysis with commercial proteases. In RINm5F cells, CHP markedly protected against STZ-mediated cytotoxicity (76%). Moreover, RINm5F cells incubated with CHP showed a significant reductions of STZ-induced nitric oxide (NO) production and lipidperoxidation. It also reduced the STZ-induced apoptotic events such as the activation of caspase-3, poly (ADP-ribose) polymerase cleavage, and DNA fragmentation in RINm5F cells showing the mode of protection of CHP on RINm5F cells. In addition, RINm5F cells treated with CHP increased the insulin-secretion capacity. These results suggest that CHP may be a candidate for the therapeutic agent against STZ-mediated cytotoxicity and apoptosis.

Keywords Cyclo (His-Pro) Apoptosis RINm5F

---



(2) Koo, K. B., H. S. Joo, and JANG WON CHOI. 2011. Anti-hyperglycemic activity of cyclo (His-Pro) produced from soybean meal in genetically diabetic ob/ob mice. P113(PMP06). "2011 KSBB Spring Meeting" at Jeju Phoenix Island.

2011년도 한국생물공학회  
춘계학술발표대회  
2011 KSBB SPRING MEETING  
2011. 4. 14(목) ~ 16(토)  
제주 휘닉스아일랜드  
April 14~16, 2011  
JEJU PHOENIX ISLAND



**2011. 4. 14(목)~16(토)**  
제주, 휘닉스아일랜드

**PMP06**    **Anti-hyperglycemic Activity of Cyclo (His-Pro)  
Produced from Soybean Meal in Genetically Diabetic ob/ob Mice**

Kwang Bon KOO, Han Seung JOO<sup>1</sup> and Jang Won CHOI

*Dept. of Bioindustry, Daegu University, Kyungbuk, 712-714.*

<sup>1</sup>*C&J Biotech, Jinju, Gyeongsangnam-do, 660-844.*

Cyclo (His-Pro) (CHP) is a naturally occurring cyclic dipeptide structurally related to thyrotropin-releasing hormone (TRH). CHP was efficiently obtained from soybean meal by hydrolysis using flavourzyme and alcalase. In this study, anti-diabetic effects of CHP were investigated in a Type II diabetic animal model (C57BL/6J ob/ob). When the ob/ob mice were administrated with CHP (2 mg/kg BW, 24 days), blood glucose levels decreased to approximately 57% that of the control mice. In the oral glucose tolerance test, blood glucose levels were restored to its baseline after 120 min by CHP treatment, although blood glucose levels increased significantly after 30 min. Total plasma cholesterol and triglyceride concentrations in ob/ob mice treated with CHP were significantly decreased (2-fold), compared with those in control ob/ob mice. In contrast, insulin levels in plasma were significantly increased (2-fold) in CHP-treated ob/ob mice. Moreover, a histopathological examination showed that CHP administration could restore the impaired  $\beta$ -cells of pancreas to the normal level. In addition, pancreatic  $\beta$ -cells (in CHP-treated and stopped groups) were strikingly restored on 72nd and 130th day, respectively. From these results, it is demonstrated that CHP could be effective for regulating blood glucose to normal level by increasing plasma insulin level in ob/ob mice. Conclusively, we suggest that this compound could be a candidate material as a dietary supplement to control hyperglycemia in patients suffering from type II diabetes.

**Keywords** Cyclo (His-Pro) , Diabetes , ob/ob mice

---



# Anti-hyperglycemic Activity of Cyclo (His-Pro) Produced from Soybean Meal in Genetically Diabetic *ob/ob* Mice

Kwang Bon Koo<sup>1</sup>, Han Seung Joo<sup>2</sup> and Jang Won Choi<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Bioindustry, College of Life and Environment, Daegu University, Kyungbuk 712-714, Korea.

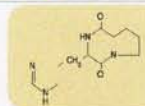
<sup>2</sup>C&J Biotech., Munsan-eup, Jinju, Gyeongsangnam-do 660-844, Korea.

## Abstract

Cyclo (His-Pro) (CHP) is a naturally occurring cyclic dipeptide structurally related to thyrotropin-releasing hormone (TRH). CHP was efficiently obtained from soybean meal by hydrolysis using flavourzyme and alcalase. In this study, anti-diabetic effects of CHP were investigated in a Type II diabetic animal model (C57BL/6J *ob/ob*). When the *ob/ob* mice were administrated with CHP (2 mg/kg BW, 24 days), blood glucose levels decreased to approximately 57% that of the control mice. In the oral glucose tolerance test, blood glucose levels were restored to its baseline after 120 min by CHP treatment, although blood glucose levels increased significantly after 30 min. Total plasma cholesterol and triglyceride concentrations in *ob/ob* mice treated with CHP were significantly decreased (2-fold), compared with those in control *ob/ob* mice. In contrast, insulin levels in plasma were significantly increased (2-fold) in CHP-treated *ob/ob* mice. Moreover, a histopathological examination showed that CHP administration could restore the impaired  $\beta$ -cells of pancreas to the normal level. In addition, pancreatic  $\beta$ -cells (in CHP-treated and stopped groups) were strikingly restored on 72nd and 130th day, respectively. From these results, it is demonstrated that CHP could be effective for regulating blood glucose to normal level by increasing plasma insulin level in *ob/ob* mice. Conclusively, we suggest that this compound could be a candidate material as a dietary supplement to control hyperglycemia in patients suffering from type II diabetes.

## Introduction

- Cyclo-His-Pro
  - \* Cyclic dipeptide
  - \* Controlled-energy diet
  - \* Soybean protein hydrolysate
- Medicinal activity
  - \* Improvement of blood glucose control and insulin sensitivity
  - \* Regulation of Zn absorption
  - \* Body weight (BW) control
- Purpose
  - \* Study of the anti-hyperglycemic effect of the Cyclo-His-Pro (CHP) on Type II diabetes in *ob/ob* mice



## Materials and Methods

### Preparation of Cyclo (His-Pro)

- \* Defatted soybean meal (substrate)
- \* Proteases: Flavourzyme, Alcalase
- \* Hydrolysis
- Animal
  - \* *ob/ob* mice
  - \* Animal model of Type II diabetes
  - \* *ob* gene mutation
- Anti-diabetic activity of the CHP
  - \* Hypoglycemic effect of the CHP
  - \* Oral glucose tolerance
  - \* Plasma insulin level
  - \* H&E Staining
  - \* ImmunoHistoChemistry staining

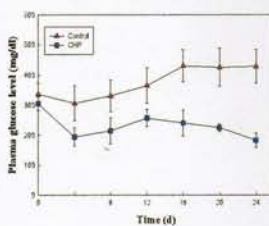


### - In vivo study

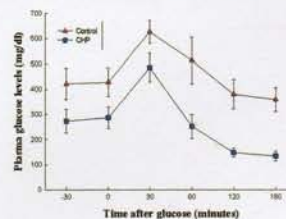


## Results

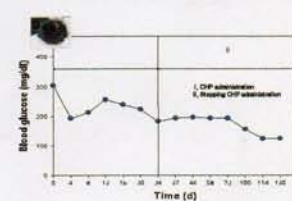
### 1. Effect of CHP on blood glucose levels in *ob/ob* mice



### 2. Effect of CHP on the glucose tolerance test



### 3. Long-term anti-diabetic effect of CHP



### 4. Anti-diabetic activity of the CHP



### 5. Effect of CHP

**A. Body weight gain and food intake**

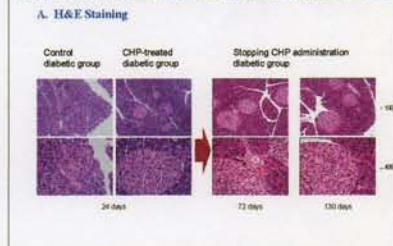
Group	Body weight gain (g/day)	Food intake (g/day)	Food efficiency ratio <sup>a</sup>
Control	0.27±0.02	4.84±0.07	0.06±0.01
CHP	0.32±0.03	5.11±0.37	0.06±0.02

<sup>a</sup> Food efficiency ratio (FER) = (Body weight gain / Food intake) × 100

**B. Total cholesterol and triglyceride**

Group	Total cholesterol (mg/dl)	Triglyceride (mg/dl)
Control	95.81±3.41	92.99±3.13
CHP	43.97±2.23*	53.13±4.70*

### 6. Histopathological results in diabetic mice pancreas

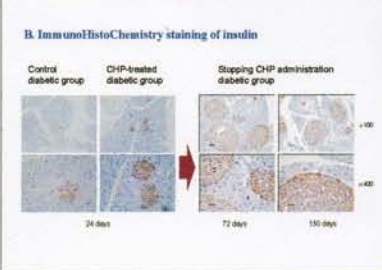


## Conclusion

- Soybean hydrolysate
  - CHP assay by HPLC
  - Cyclo (His-Pro): Approx. 11.00±2.08 mg/g of dry weight
  - Blood glucose levels decreased by 57% after 24 days compared to the control *ob/ob* mice.
  - Treated with CHP at 2 mg/kg body weight
  - Importantly, blood glucose levels were maintained at normal state after stopping CHP treatment during approx. 3 months.
  - Insulin levels were considerably enhanced in CHP-treated and stopped group.
  - Analytical measurements
    - \* Oral glucose tolerance test: Decreased significantly at 60min (CHP-treated mice)
    - \* Plasma insulin levels: up-regulated, >2.0-fold (CHP-treated mice)
    - \* Total Triglyceride: Decreased by approx. 54%
    - \* Triglyceride: Decreased by approx. 43%
  - Histopathological results in diabetic mice pancreas (H&E and ImmunoHistochemistry staining)
    - \* Pancreatic  $\beta$ -cells (in CHP-treated and stopped group) were strikingly restored at 24, 72, and 130 days, respectively.
- The orally administrated CHP exhibited an excellent hypoglycemic effect, lowering the average plasma glucose level and increasing insulin secretion in diabetic mice. We suggested that CHP would be an excellent candidate to develop as functional food additives or therapeutic agents to anti-obesity and anti-diabetic through improvement in glucose homeostasis and preservation of insulin reserves.

## References

1. Cho, E.J., Hwang, H.J., Kim, S.W., Oh, J.Y., Back, Y.M., Choi, J.W., Bae, S.H., and Yun, J.W. Hypoglycemic effects of exopolysaccharides produced by mycelia cultures of two different mushrooms *Tremella fuciformis* and *Phellinus baumii* in *ob/ob* mice (2007). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75, 1257-1265.
2. Xie, J.T., Aung, H.H., Wu, J.A., Athle, A.S., and Yuan, C.S. Effects of American ginseng berry extract on blood glucose levels in *ob/ob* mice (2002). *Am. J. Clin. Med.* 30, 187-194.
3. Lindström, P. The physiology of obese-hyperglycemic mice (*ob/ob* mice) (2007). *Scientific World Journal* 7, 666-685.
4. Xie, J. T., Aung, H. H., Wu, J. A., Athle, A. S., and Yuan, C. S. Effects of American ginseng berry extract on blood glucose levels in *ob/ob* mice (2002). *Am. J. Clin. Med.* 30, 187-194.
5. Chae, M. H., No, J. G., and Jhon, D. Y. Hangsinban, Sulfur-based Oriental Medicine, Lowers the Blood Cholesterol Level of *ob/ob* Obese Mice (2007). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 36, 27-31.



(3) Koo, K. B., H. S. Joo, and JANG WON CHOI. 2011. Anti-hyperglycemic activity of cyclo (His-Pro) produced from soybean meal in streptozotocin-induced diabetic rats. P113(PMP07). "2011 KSBB Spring Meeting" at Jeju Phoenix Island.

2011년도 한국생물공학회  
춘계학술발표대회  
2011 KSBB SPRING MEETING  
2011. 4. 14(목) ~ 16(토)  
제주 휘닉스아일랜드  
April 14~16, 2011  
JEJU PHOENIX ISLAND



**2011. 4. 14(목)~16(토)**  
제주, 휘닉스아일랜드



**PMP07**    **Anti-hyperglycemic Activity of Cyclo (His-Pro)  
Produced from Soybean Meal in Streptozotocin-Induced Diabetic  
Rats**

Kwang Bon KOO, Han Seung JOO<sup>1</sup> and Jang Won CHOI  
*Dept. of Bioindustry, Daegu University, Kyungbuk, 712-714.*  
<sup>1</sup>*C&J Biotech, Jinju, Gyeongsangnam-do, 660-844.*

Cyclo (His-Pro) (CHP) is a naturally occurring cyclic dipeptide structurally related to thyrotropin-releasing hormone (TRH). The major goal of the current study was to determine whether the CHP plays important role in Type I diabetes. The experiment was designed to investigate the effect of CHP on glucose metabolism in vivo (Type I diabetes model). CHP (approx. 11 mg/g of dry weight) was efficiently obtained from soybean meal by proteolytic hydrolysis using the mixture of Flavourzyme and Alcalase. When Type I rats (Sprague-Dawley) induced with streptozotocin (50 mg/kg BW) were administrated by CHP (4 mg/kg BW), blood glucose level in the CHP-fed rats was remarkably decreased by approximately 56% as compared to the diabetes group. In the oral glucose tolerance test, blood glucose levels were restored to its baseline after 120 min by CHP treatment, although blood glucose levels increased significantly after 30 min. Insulin level in plasma was also restored by 29%, compared to the STZ-treated rat and triglyceride levels were normalized in CHP-treated rats, whereas no effects of CHP treatment on cholesterol level were observed. Moreover, a histopathological examination showed that CHP administration could restore the impaired  $\beta$ -cells of pancreas to the normal level. Accordingly, the CHP exhibited an excellent hypoglycemic effect by lowering average plasma glucose levels, increasing insulin secretion, and restoring viability of pancreatic  $\beta$ -cells in diabetic rats. Considering these results, we suggest that the CHP might be a candidate material to control Type I diabetes mellitus.

**Keywords** Cyclo (His-Pro) , Diabetes , Streptozotocin



# Anti-hyperglycemic Activity of Cyclo (His-Pro) Produced from Soybean Meal in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats

Kwang Bon Koo<sup>1</sup>, Han Seung Joo<sup>2</sup> and Jang Won Choi<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Bioindustry, College of Life and Environment, Daegu University, Kyungbuk 712-714, Korea.

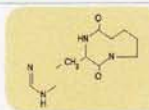
<sup>2</sup>C&J Biotech., Munsan-eup, Jinju, Gyeongsangnam-do 660-844, Korea.

## Abstract

Cyclo (His-Pro) (CHP) is a naturally occurring cyclic dipeptide structurally related to thyrotropin-releasing hormone (TRH). The major goal of the current study was to determine whether the CHP plays important role in Type I diabetes. The experiment was designed to investigate the effect of CHP on glucose metabolism *in vivo* (Type I diabetes model). CHP (approx. 11 mg/g of dry weight) was efficiently obtained from soybean meal by proteolytic hydrolysis using the mixture of Flavourzyme and Alcalase. When Type I rats (Sprague-Dawley) induced with streptozotocin (50 mg/kg BW) were administered by CHP (4 mg/kg BW), blood glucose level in the CHP-fed rats was remarkably decreased by approximately 56% as compared to the diabetes group. In the oral glucose tolerance test, blood glucose levels were restored to its baseline after 120 min by CHP treatment, although blood glucose levels increased significantly after 30 min. Insulin level in plasma was also restored by 29%, compared to the STZ-treated rat and triglyceride levels were normalized in CHP-treated rats, whereas no effects of CHP treatment on cholesterol level were observed. Moreover, a histopathological examination showed that CHP administration could restore the impaired  $\beta$ -cells of pancreas to the normal level. Accordingly, the CHP exhibited an excellent hypoglycemic effect by lowering average plasma glucose levels, increasing insulin secretion, and restoring viability of pancreatic  $\beta$ -cells in diabetic rats. Considering these results, we suggest that the CHP might be a candidate material to control Type I diabetes mellitus.

## Introduction

- Cyclo-His-Pro
  - \* Cyclic dipeptide
  - \* Controlled-energy diet
  - \* Soybean protein hydrolysate
- Functions
  - \* Improvement of Zn absorption and transfer (from intestine to muscle and fat cells)
  - \* Regulation of glucose transport
  - \* Increment of glucose absorption
  - \* Promotion of insulin synthesis and secretion
  - \* Regulation of blood sugar level
- Purpose
  - \* Study of the anti-hyperglycemic effect of the Cyclo-His-Pro (CHP) on Type I diabetes in STZ-induced rats



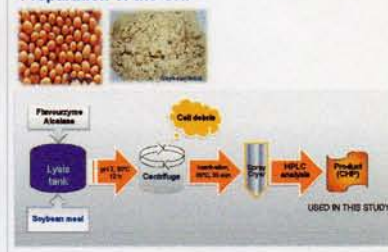
## Materials and Methods

### Preparation of Cyclo (His-Pro)

- \* Defatted soybean meal (withwater)
- \* Proteases: Flavourzyme, Alcalase
- \* Hydrolysis
- Animal
  - \* Rat: Sprague-Dawley rats (initial age: 5 weeks) STZ-induced Type I diabetes
- Anti-diabetic activity of the CHP
  - \* Hypoglycemic effect of the CHP
  - \* Oral glucose tolerance
  - \* Plasma insulin level
  - \* H&E Staining
  - \* Immunohistochemistry staining



### Preparation of the CHP

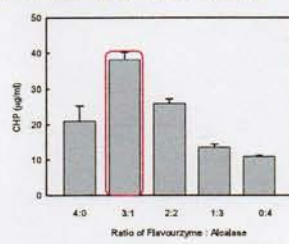


## Results

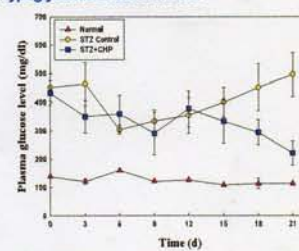
### In vivo study



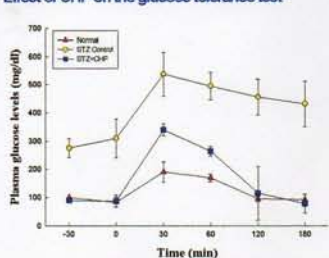
### 1. CHP content of soybean hydrolysate



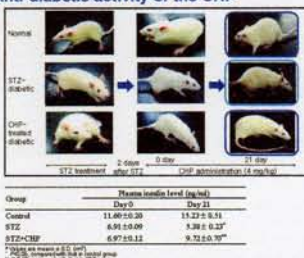
### 2. Hypoglycemic effect of the CHP



### 3. Effect of CHP on the glucose tolerance test



### 4. Anti-diabetic activity of the CHP



### 5. Effect of CHP

**A. Body weight gain and food intake**

Group	Body weight gain (g/day)	Food intake (g/day)	Food efficiency ratio <sup>a</sup>
Control	5.77±0.43	36.71±0.91	0.15±0.02
STZ	3.36±0.67	31.71±0.27	0.11±0.03*
CHP	5.04±0.89	31.41±0.68	0.16±0.02**

**B. Total cholesterol and triglyceride**

Group	Total cholesterol (mg/dl)	Triglyceride (mg/dl)
Control	127.92±1.21	132.59±4.11
STZ	136.29±6.77	287.42±13.61*
CHP	111.07±8.18	148.06±12.21**

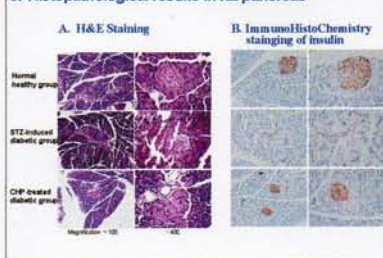
## Conclusion

- Soybean hydrolysate
    - \* Hydrolysis: Flavourzyme & Alcalase (3:1)
    - \* CHP assay by HPLC
    - \* Cyclo (His-Pro): Approx. 11.08±2.08 mg/g of dry weight
    - \* Blood glucose levels decreased by 50% after 21 days compared to the STZ-induced rat.
    - \* Treated with CHP at 4 mg/kg body weight
    - \* Insulin levels were considerably enhanced in CHP-treated group.
  - Analytical measurements
    - \* Oral glucose tolerance test: Decreased significantly at 120 min (CHP-treated mice)
    - \* Plasma insulin levels were restored by 29% in CHP-treated rat
    - \* Plasma levels of total cholesterol and triglyceride were normalized.
    - \* Histopathological results indicated mice pancreas (H&E and Immunohistochemistry staining)
    - \* Pancreatic  $\beta$ -cells were restored in CHP-treated rat (examined by Hematoxylin and eosin staining)
    - \* Insulin secretion was also improved in CHP-treated rat (by insulin immunohistochemical staining)
- The orally administered CHP inhibited an excellent hypoglycemic effect, lowering the average plasma glucose level and increasing insulin secretion, and restored viability of pancreatic cells in Type I diabetic rats. We suggested that CHP would be an excellent candidate to develop as functional food additives or therapeutic agents in anti-diabetic through improved in glucose homeostasis and preservation of insulin reserves.

## References

- Bolzarín, A.D. and Bianchi, M.S. Genotoxicity of streptozotocin (2002). *Mutat. Res.* 512, 121-134.
- Latha, M., Pari, L., Sitasawad, S., and Bhonde, R. Scoparia dulcis, a traditional antidiabetic plant, protects against streptozotocin induced oxidative stress and apoptosis in vitro and in vivo (2004). *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 18, 261-272.
- Furuse, M., Kimura, C., Mabayo, R. T., Takahashi, H., and Okumura, J. Dietary sorbose prevents and improves hyperglycemia in genetically diabetic mice (1993). *J. Nutr.* 123, 59-65.
- Li, W. L., Zheng, H. C., Bukuru, J., and De Kimpff, N. Natural medicines used in the traditional Chinese medical system for therapy of diabetes mellitus (2004). *J. Ethnopharmacol.* 92, 1-21.
- Godzukevi, N. H., and Abady, N. E. Antihyperglycemic effect of aqueous and ethanolic extracts of *Congronema latifolium* leaves on glucose and glycogen metabolism in livers of normal and streptozotocin-induced diabetic rats (2003). *Life Sci.* 73, 1925-1938.

### 6. Histopathological results in rat pancreas



## 2. 특허 출원

(1) COMPOSITION FOR PREVENTION AND TREATMENT OF DIABETES WHICH INCLUDES SOYBEAN FERMENTATION PRODUCT OF BACILLUS SP. KH-15 (Application date 2011.01.07; Application number 10-2011-0001900 )

**관인생략**  
**출원번호통지서**

출원일자 2011.01.07  
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)  
출원번호 10-2011-0001900 (접수번호 1-1-2011-0014924-17)  
출원인명칭 대구대학교 산학협력단(2-2006-016513-0)  
대리인성명 특허법인대아(9-2009-100101-8)  
발명자성명 최장원 나경수 서형주 배승환  
발명의명칭 바실러스 속 KH-15의 콩 발효물을 유효성분으로 포함하는 당뇨병 예방 및 치료용 조성물

**특 허 청 장**

<< 안내 >>

- 1 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다
- 2 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다  
\* 납부자번호 0131(기관코드) + 접수번호
- 3 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보 변경(경정), 정정신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다  
\* 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서식다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
- 4 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다
- 5 국내출원건을 외국에도 출원하고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정 받을 수 있습니다  
\* 우선권 인정기간 특허 실용신안은 12월 상표 디자인은 6월 이내  
\* 미국특허상표청의 선출원을 기초로 우리나라에 우선권주장출원 시 선출원이 0 공개상태이면, 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명서류를 제출하여야 합니다
- 6 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다  
\* 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
- 7 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다



(2) COMPOSITION FOR BLOOD SUGAR REGULATION COMPRISING SOYBEAN HYDROLYSATE WITH HIGH CHP(CYCLO(HIS-PRO)) (Application date 2011.07.08; Application number 10-2011-0068055)

관인생략  
출원번호통지서

출원 일자 2011 07 08  
특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)  
출원 번호 10-2011-0068055 (접수번호 1-1-2011-0525984-87)  
출원인 명칭 대구대학교 산학협력단(2-2006-016513-0)  
대리인 성명 특허법인대아(9-2009-100101-8)  
발명자 성명 최장원 서형주 나경수  
발명의 명칭 CHP(cyclo(His-Pro))를 고농도로 함유한 대두 가수분해물을 포함하는 혈당 조절용 조성물

특 허 청 장

<< 안내 >>

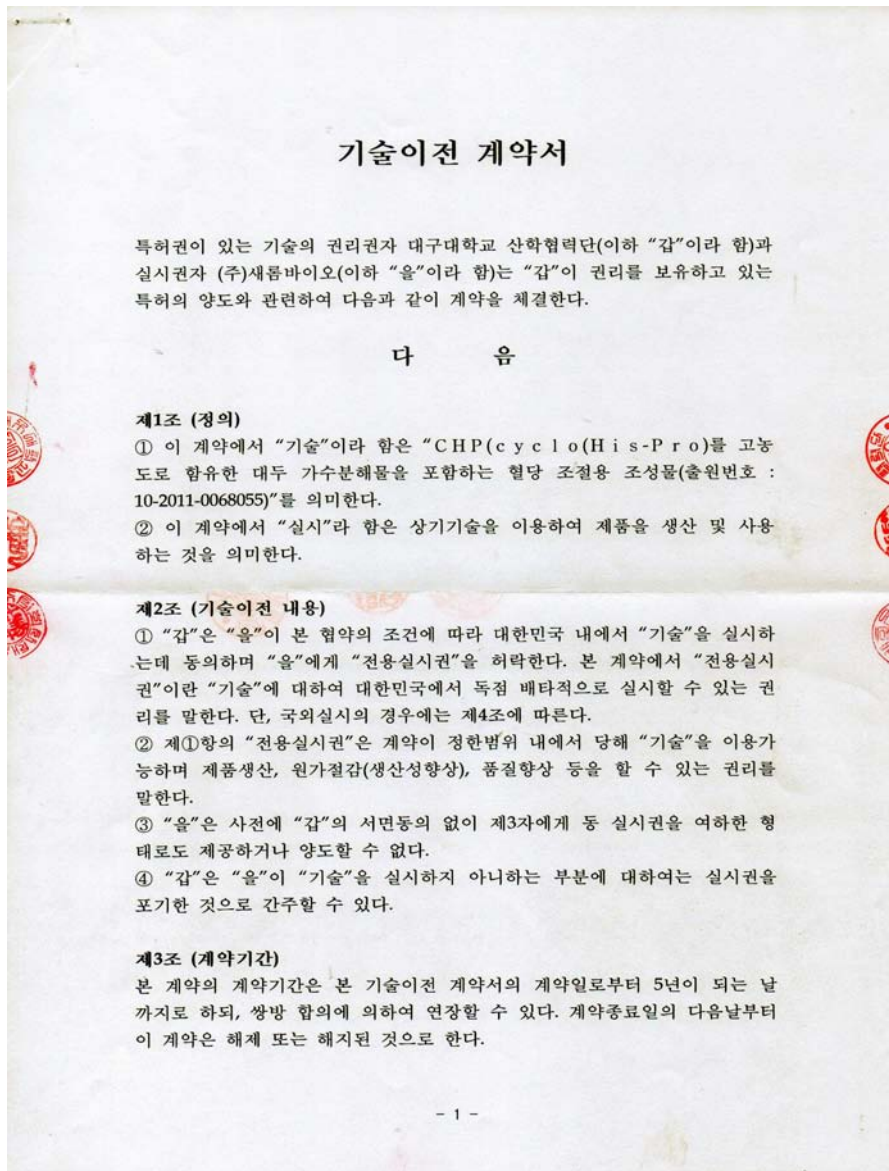
- 1 귀하의 출원은 위와 같이 정상적으로 접수되었으며, 이후의 심사 진행상황은 출원번호를 통해 확인하실 수 있습니다
- 2 출원에 따른 수수료는 접수일로부터 다음날까지 동봉된 납입영수증에 성명, 납부자번호 등을 기재하여 가까운 우체국 또는 은행에 납부하여야 합니다  
\* 납부자번호 0131(구 관코드) + 접수번호
- 3 귀하의 주소, 연락처 등의 변경사항이 있을 경우, 즉시 [출원인코드 정보변경(경정), 정정 신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다  
\* 특허로(patent.go.kr) 접속 > 민원서비스다운로드 > 특허법 시행규칙 별지 제5호 서식
4. 특허(실용신안등록)출원은 명세서 또는 도면의 보정이 필요한 경우, 등록결정 이전 또는 의견서 제출기간 이내에 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 보정할 수 있습니다
- 5 국내출원건을 외국에도 출원하고자 하는 경우에는 국내출원일로부터 일정한 기간 내에 외국에 출원하여야 우선권을 인정 받을 수 있습니다  
\* 우선권 인정기간 특허 실용신안은 12월 상표 디자인은 6월 이내  
\* 미국특허상표청의 선출원을 7 초로 우리나라에 우선권주장출원 시 선출원이 미공개상태이면 우선일로부터 16개월 이내에 미국특허상표청에 [전자적교환허가서(PTO/SB/39)]를 제출하거나 우리나라에 우선권 증명 서류를 제출하여야 합니다
- 6 본 출원사실을 외부에 표시하고자 하는 경우에는 아래와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련법령에 따라 처벌을 받을 수 있습니다  
\* 특허출원 10-2010-0000000, 상표등록출원 40-2010-0000000
- 7 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다



## 제 2 절 연구성과 활용 계획

### 1. 기술이전

- (1) 참여기업 : (주)새롬바이오
- (2) 이전기술 : COMPOSITION FOR BLOOD SUGAR REGULATION COMPRISING SOYBEAN HYDROLOLYSATE WITH HIGH CHP(CYCLO(HIS-PRO))  
(출원번호 10-2011-0068055)
- (3) 기술이전 형태 : 전용실시권 (5 년)
- (4) 기술료 : 선급기술료 (일천만원) + 경상기술료 (제품 판매액의 2%/년)
- (5) 기술이전계약서



#### 제4조 (국외실시)

“국외실시”는 대한민국 이외의 지역에 실시권을 허여하거나 기술을 수출하는 것(동 지역에서 제품을 생산, 판매하는 행위 포함)을 말하며, “을”이 “기술”을 “국외실시”하고자 하는 경우 사전에 “갑”과 협의하여 이 계약과 별도로 “국외실시”에 관한 실시계약을 체결하여야 한다.

#### 제5조 (기술료 및 특허유지비용의 지급)

① “을”은 본 “전용실시권”에 대한 대가로서 제②항의 기술료를 “갑”에게 납부한다. 이 조항은 제2조 제④항에 의거 “을”이 “기술”의 일부 또는 전부를 포기할 경우에도 계속 유효하다.

② “을”은 이 계약체결 시 선급기술료로 일천만원정(₩10,000,000; 부가세별도)을 계약 체결 후 15일 이내에 “갑”에게 현금으로 지급한다.

③ “을”은 경상기술료의 정산을 매년 1회하는 것을 원칙으로 하고, 매년 2월말까지 전년 1월1일부터 12월31일까지의 기간 동안 발생한 제품판매액의 2%를 “갑”에게 지급하여야 하며, 본 계약기간 만료년도에는 만료일부 60일 이내에 지불하여야 한다.

#### 제6조 (기술의 개량)

“을” 또는 “을”의 임원 및 피용자가 “기술의 개량, 확장, 대체 또는 추가 발명에 의한 기술(이하 “개량기술”이라 한다)을 적용하거나, 이를 근거로 새로운 산업재산권을 취득하고자 할 경우 “을”은 사전에 “갑”에게 통보하여 상호 협의하여 추진하여야 하며, 취득한 산업재산권은 쌍방의 공동소유로 한다. 특약이 없는 한, “개량기술”의 실시 역시 이 계약에 의하여 실시되는 것으로 보고 이 계약은 계속 유효하다.

#### 제7조 (신의성실의 의무와 자료협조)

이 계약이 목적하는 바를 상호 충족시키기에 필요한 제반사항에 대하여 “갑”은 신의, 성실을 다하여 “을”에게 적극 협조하여야 하고, “을”은 이 계약을 성실히 이행하여야 한다. 또한 “갑”은 필요시 “을”에게 연구개발성과의 활용 등 필요한 자료를 요구할 수 있으며 “을”은 이에 응하여야 한다.



**제8조 (비밀보장)**

“을”은 “기술”이 타인에게 제공되거나 누설되지 않도록 보안에 유의하여야 하며 이 의무에는 “을”의 임원 및 피용자나 그 승계인을 통하여 사실상 위반됨이 없도록 하는 의무도 포함한다. 또한 본 조항은 이 계약이 해제 또는 해지 되었을 경우에도 계속 유효하다

**제9조 (계약의 변경 등)**

① “을”의 생산능력이 제품수요를 충족하지 못하거나, “을”이 “기술”을 기술적으로 충분히 실현하지 못하고 이를 개선할 능력이 없다고 인정될 경우 이 계약의 내용은 “갑”과 “을”의 서면합의에 의하여 변경될 수 있다.

② “을”이 이 계약체결 후 법인의 주소 등 중요사항을 변경하였을 경우에는 이를 지체없이 “갑”에게 통보하여야 하며, 그 불이행으로 인한 “갑”의 착오는 “을”의 항변으로부터 면책된다.

**제10조 (계약의 해지)**

① “갑”과 “을”은 다음 각 호에 해당하는 경우 30일의 기한을 두고 “상대방”에게 그 이행을 서면으로 최고함으로써 이 계약을 취소할 권리를 가진다. 단, 이에 따라 계약이 해지되었을 경우 “갑”에 기인하지 않은 사유로 계약이 해지된 경우에는 “갑”은 기 지급 받은 금액을 환불하지 아니하며, “을”에 기인한 사유로 계약이 해지된 경우에는 “을”은 기술자료를 “갑”에게 반환하고 이 계약서 상의 모든 권리를 포기하여야 한다.

1. 계약일로부터 1년 이내에 기술을 실시하지 아니하는 경우.

2. “을”이 조업을 중단하여 더 이상의 기술 실시를 할 수 없다고 인정할 때.

3. “기술”이 특허등록 거절되었을 때

4. 매년 2월말까지 전년 1월1일부터 12월31일까지의 기간 동안 발생한 제품판매액의 2%를 “갑”에게 지급하지 아니하는 경우

5. 기타 이 계약서 상의 의무를 위반할 때

② 이 계약이 해지 또는 해제되었을 경우, “을”은 지체없이 기술의 실시를 중단해야 하며, 제3자로 하여금 “기술”을 실시하도록 할 수도 없다.

**제11조 (손해배상)**

“갑”과 “을”은 이 계약을 위반하여 상대방에게 손해를 끼쳤을 때에는 상대방에게 이를 배상하여야 한다.

**제12조 (권리양도의 제한)**

“갑”과 “을”은 이 계약상 특약이 있는 경우를 제외하고 상호 상대방의 동의 없이 본 계약의 이행과정에서 취득되는 제반 권리를 제3자에게 제공하거나 양도할 수 없다

**제13조 (해석 및 분쟁해결)**

이 계약에 명기되지 아니하거나 이 계약서의 해석상 이의가 있을 때, 또 쌍방의 의무이행과 관련하여 분쟁이나 이견이 발생하는 경우 “갑”과 “을”은 이를 상호 협의하여 원만히 해결토록 노력하여야 한다. 이러한 분쟁이나 이견이 해결되지 않은 경우에는 「사단법인 대한상사중재원」의 상사중재 규칙에 의해 해결하기로 하고, 최종적으로는 대한민국 법률의 해석에 따른다.

**제14조 (계약의 효력)**

이 계약의 효력은 쌍방이 서명 날인한 아래의 날부터 유효하다.

이 계약서는 3부를 작성하여 서명 날인하고, “갑”과 “을” 및 “기술이전책임자”가 각각 1부씩 보관한다.

2011년 12월 14일

“갑”

경북 경산시 진량읍 내리리 15번지

대구대학교 산학협력단장 최 병 재 (인)

“기술이전책임자”

대구대학교 생명환경학부 최 장 원 (인)

“을”

경기도 군포시 금정동 689-6 한림벤처타운 201-1호

(주)새롬바이오 대표이사 배 송 환 (인)

## 2. 기술이전에 의한 상품개발

### 가. 뉴엔술라 개발 및 출시

(주)새롬바이오	본사 및 공장 : 경기도 군포시 금정동 689-6 한림벤처타운201-1호 Tel:031-458-3541~2 Fax:031-458-3549		
<b>상 품 제 안 서</b>			
제품명	뉴엔술라(New Ensular)		
제품의 유형	기타가공식품	제형	환/4mm
섭취방법	<b>1일 3회, 1회 1포(6.0g)씩을 식사후에 충분한 물과 함께 섭취</b>		
제품의 구성	6.0g × 90포(540g)/1개월분		
제품의 성분	대두발효추출물-SR101, 발효솔잎분말, 효모추출물-SR101, 옥수수전분, 바나바추출분말, 단백아연, 크롬효모, 비타민혼합제제, 히드록시프로필메틸셀룰로오스		
기능성	<b>식후 혈당조절</b>		
주요원료 참고사항	<p><b>1) 대두발효추출물-SR101</b>  <b>제조방법</b> : 대두에 바실러스 속 세균으로 발효  <b>제품의 특징</b> : 대두에 존재하는 Cyclo Histidine Proline(CHP)를 발효에 의한 생산 및 추출          대한민국 특허출원번호 : 10-2011-0001900          발명의 명칭 "바실러스 속 KH-15의 콩 발효물을 유효성분으로 포함하는 당뇨병 예방 및 치료용 조성물"          "Composition for prevention and treatment of diabetes which includes soybean fermentation product of <i>Bacillus</i> sp. KH-15"</p> <p><b>2) 대두추출물</b>  <b>제조방법</b> : 대두에 존재하는 Cyclo Histidine Proline(CHP)을 효소를 사용하여 생산  <b>제품의 특징</b> : 대두에 존재하는 Cyclo Histidine Proline(CHP)을 추출          대한민국 특허출원번호 : 10-2011-0068055          발명의 명칭: CHP(cyclo his-pro)를 고농도로 함유한 대두 가수분해물을 포함하는 혈당 조절용 조성물          "Composition for blood sugar regulation comprising soybean hydrolysate with CHP"</p> <p><b>3) 단백아연</b>          단백질에 아연을 결합시킨 유기미네랄로서 인슐린 분비 및 작용에 관여함</p> <p><b>4) 크롬효모</b>          효모에 크롬을 결합시킨 유기미네랄로서 당내성인자라고하는 유기복합체의 필수성분으로 인슐린의 작용을 강화</p>		





나. 시제품 제조

(1) 대두강정바 (Cereal bar containing soybean hydrolysate)

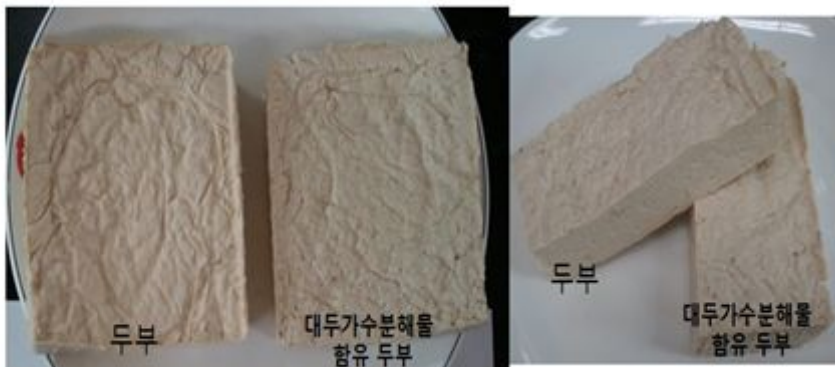
곡물강정바



대두강정바

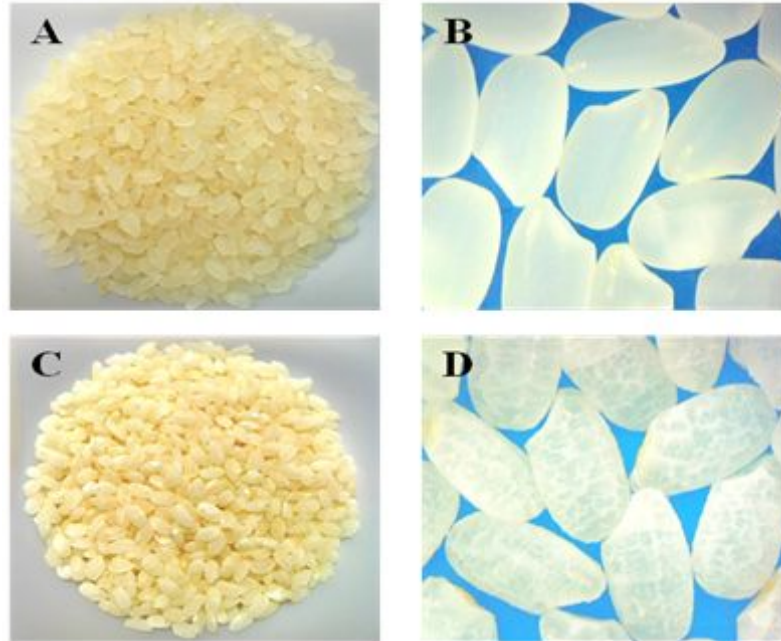


(2) 대두가수분해물 첨가 두부 (Tofu prepared with soybean hydrolysate)



(3) 대두가수분해물 강화 코팅 쌀 (Rice coated with soybean hydrolysate)

Raw Rice (A & B)



Coated Rice (C & D)

(4) 대두가수분해물 함유 기능성 두유 (Functional soybean milk with soybean hydrolysate)

<CHP함유 두유> <시판용 두유>





### 3. 개발기술 활용계획 및 판매 전략 (새롬바이오)

#### 가. 개발기술 활용계획

개발 기술 활용 계획
1. 기술개발 국내외 특허 확보
2. 민간 참여 가능 기업과 생산협약 체결 추진
3. 원료 소재의 국내 생산체계 구성
4. 원료 소재의 국내 및 해외 판매 확보
5. 원료 소재 함유 다양한 제품 또는 상품 개발

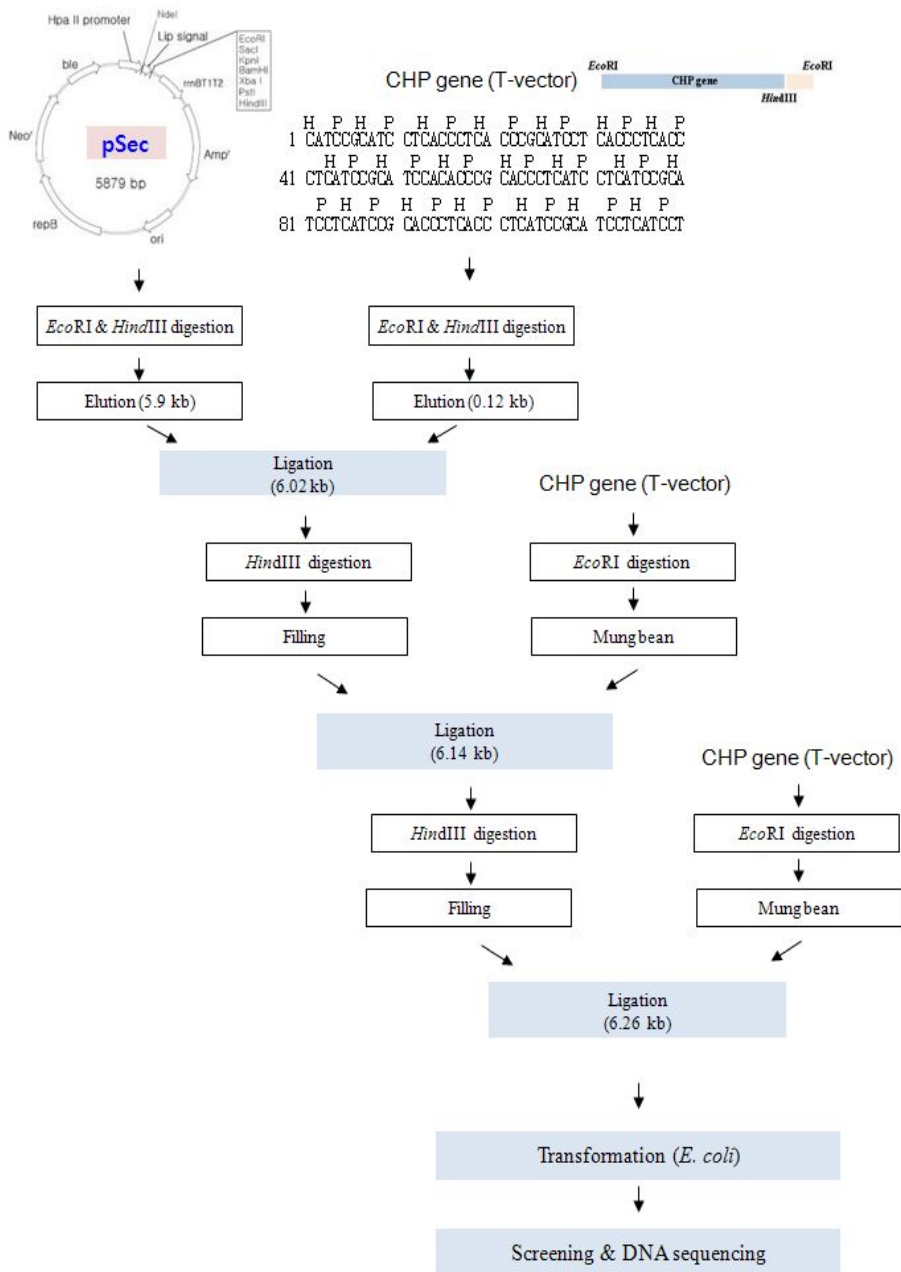
#### 나. 판매계획

판매 계획
1. 원료 상태로 공급하는 형태 : 네오클레마 (일본, 대만 등 해외 판매)
2. 완제품 OEM 형태 : 다단계 회사 (하이리빙, 웰빙테크, 투에버 등 다수) 방문판매 회사(엠엔씨코리아, 나일랜드 등) 홈쇼핑 판매회사 (새롬현대 등)
3. 완제품 수출 : 미국, 중국, 일본, 호주, 중남미, 중동 등에 수출 추진

#### 4. 타 연구 활용계획

기존 생산방법 외에 CHP를 구성하는 아미노산인 histidine과 proline의 유전자 암호를 여러 개가 반복되는 repeat 서열을 합성하여 concatamer를 구성한 다음, 개시코돈과 종결코돈을 도입하여 본 실험실에서 기 개발된 분비벡터에 도입하여 미생물 (고초균)에 형질전환 한 다음, 얻어진 형질전환체를 최적화 배지조건하에서 배양한 후, 배양액 내로 multimer 형태로 생산하여 대량생산 하려는 연구에 활용할 계획이다. 전략은 다음과 같다.

##### 가. 클로닝 전략 (Cloning strategy)

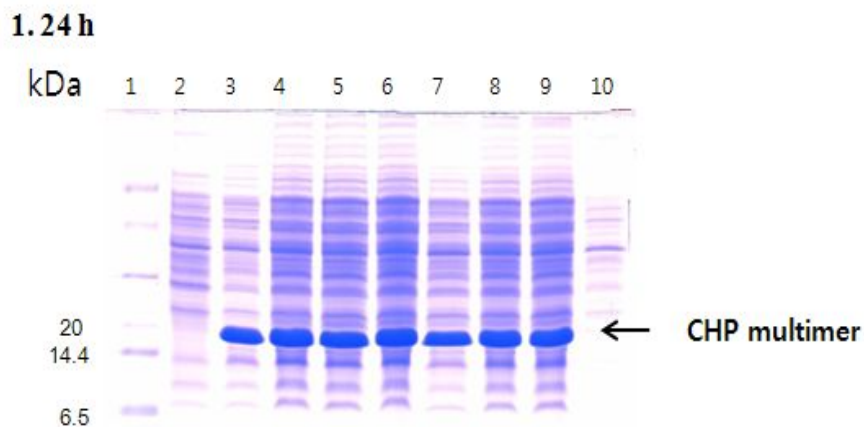


나. 서열분석 결과

```

→ pSec vector
1 TTTTGCTACC CGCTAGCCAT AGTGAGAGGG TACAATACAC TACATCCAGC CGTAAGTAGG
      → CHP1
61 CAAGCCGCCT GAGGAATTCC ATCCGCATCC TCACCCTCAC CCGCATCCTC ACCCTCACCC
      EcoRI
121 TCATCCGCAT CCACACCCGC ACCCTCATCC TCATCCGCAT CCTCATCCGC ACCCTCACCC
      → CHP2
181 TCATCCGCAT CCTCATCCTA AGCTCCATCC GCATCCTCAC CCTCACCCGC ATCCTCACCC
      HindIII filled & EcoRI mung bean
241 TCACCCTCAT CCGCATCCAC ACCCGCACCC TCATCCTCAT CCGCATCCTC ATCCGCACCC
301 TCACCCTCAT CCGCATCCTC ATCCTTAAAA GCTTGGCTGT TTTGGCGGAT GAGAGAAGAT
      HindIII
361 TTTCAGCCTG ATACAGATTA AATCAGAACG CAGAAGCGGT CTGATAAAAC AGAATTTGCC
421 TGGCGGCAGT AGCGCGGTGG TCCCACCTGA CCCCATGCCG AACTCAGAAG TGA AACGCCG
481 TAGCGCCGAT GGTAGTGTGG GGTCTCCCA TGCGAGAGTA GGGAACTGCC AGGCATCAAA
541 TAAAAACGAAA GGCTCAGTCG AAAGACTGGG CCTTTCGTTT TATCTGTTGT TTGTCGGTGA
601 ACGCTCTCCT GAGTAGGACA AATCCGCCGG GAGCGGATTT GAACGTTGCG AAGCAACGGC
    
```

다. 발현 및 분비



배지로 분리된 CHP multimer를 단백질분해효소로 분해하고 Bioconversion에 의해 cyclization 한 후에 생물학적 활성을 제 1형 및 제 2형 동물 모델을 이용하여 검정 하여 원래의 CHP와 비교 분석한다. 이 시스템이 성공할 경우 대량생산 (5 ton 발효)에 의해 CHP 수율을 최대한으로 높일 수 있을 것으로 사료된다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. Anne E. Osbourn., Virginia Lanzotti. Plant-derived Natural Products. Springer. 2008
2. A. H. Barnett., Obesity and Diabetes. Wiley. 2004
3. Butler, M., Animal Cell Culture and Technology. BIOS Scientific Publishers. 2004
4. Kayser, Oliver Quax, Wim J. Medicinal Plant Biotechnology. WILEY-VCH. 2007
5. Petit, William A., Adamec, Christine. The Encyclopedia of Diabetes, Second Edition. Facts on File. 2011
6. Reinhard Renneberg, Darja Subbier. Biotechnologie Fur Einsteiger. Spektrum. 2006.
7. Visockiene, Zydrune. Energy Metabolism in Obesity and Diabetes. Lap LAMBERT Academic Publishing. 2010

## 제 7 장   참고문헌

- [1] 2007 한국인 당뇨병 연구보고서. (2007) 대한당뇨학회, 건강보험심사평가원
- [2] IMS Health Report. (2000) IMS Health
- [3] Ugochukwu NH, Babady NE. Antihyperglycemic effect of aqueous and ethanolic extracts of *Gongronema latifolium* leaves on glucose and glycogen metabolism in livers of normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci.* (2003) 73:1925-38.
- [4] Hilton CW, Prasad C, Vo P, Mouton C. Food contains the bioactive peptide, cyclo(His-Pro). *J Clin Endocrinol Metab.* (1992) 75:375-8.
- [5] Yamada M, Shibusawa N, Hashida T, Satoh T, Monden T, Prasad C, Mori M. Abundance of cyclo (His-Pro)-like immunoreactivity in the brain of TRH-deficient mice. *Endocrinology.* (1999) 140:538-41.
- [6] Mizuma H, Legardeur BY, Prasad C, Hilton CW. The bioactive peptide cyclo (his-pro) may be absorbed following ingestion of nutritional supplements that contain it. *J Am Coll Nutr.* (1996) 15:175-9.
- [7] Ortiz-Caro J, González C, Jolin T. Diurnal variations of plasma growth hormone, thyrotropin, thyroxine, and triiodothyronine in streptozotocin-diabetic and food-restricted rats. *Endocrinology.* (1984) 115:2227-32.
- [8] Song MK, Rosenthal MJ, Naliboff BD, Phanumas L, Kang KW. Effects of bovine prostate powder on zinc, glucose, and insulin metabolism in old patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism.* (1998) 47:39-43.
- [9] Song MK, Hwang IK, Rosenthal MJ, Harris DM, Yamaguchi DT, Yip I, Go VL. Anti-hyperglycemic activity of zinc plus cyclo (his-pro) in genetically diabetic Goto-Kakizaki and aged rats. *Exp Biol Med (Maywood).* (2003) 228:1338-45.
- [10] Song MK, Rosenthal MJ, Hong S, Harris DM, Hwang I, Yip I, Golub MS, Ament ME, Go

VL. Synergistic antidiabetic activities of zinc, cyclo (his-pro), and arachidonic acid. *Metabolism*. (2001) 50:53-9.

[11] Kathleen Meisrer, M. A., 기능성 식품 보고서. (2002) ACSH(미국 과학건강협회)

[12] Hwang IK, Go VL, Harris DM, Yip I, Kang KW, Song MK. Effects of cyclo (his-pro) plus zinc on glucose metabolism in genetically diabetic obese mice. *Diabetes Obes Metab*. (2003) 5:317-24.

[13] Minelli A, Bellezza I, Grottelli S, Pinnen F, Brunetti L, Vacca M. Phosphoproteomic analysis of the effect of cyclo-[His-Pro] dipeptide on PC12 cells. *Peptides*. (2006) 27:105-13.

[14] Lenzen S, Tiedge M, Jorns A, Munday R. Alloxan derivatives as a tool for the elucidation of the mechanism of the diabetogenic action of alloxan. *Lessons from Animal Diabetes*. (1996)

[15] Adler-Nissen J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *J Agric Food Chem*. (1979) 27:1256-1262

[16] Claus D, Berkeley RCW. Genus *Bacillus* Cohn 1872. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2, pp. 1105-1140. Edited by P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe & J. G. Holt. Baltimore: *Williams & Wilkins*. (1986)

[17] Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol*. (1991) 173:697-703.

[18] Thomas HE, Kay TW. Beta cell destruction in the development of autoimmune diabetes in the non-obese diabetic (NOD) mouse. *Diabetes Metab Res Rev*. (2000) 16:251-61.

[19] Eizirik DL, Sandier S. Function and metabolism of pancreatic  $\beta$ -cells maintained in culture following experimentally induced damage. *Pharmacol Toxicol*. (1989) 65:163-168

[20] Eizirik DL, Strandell E, Sandler S. Culture of mouse pancreatic islets in different glucose concentrations modifies B cell sensitivity to streptozotocin. *Diabetologia*. (1988) 31:168-174.

[21] McCulloch DK, Raghu PK, Johnston C, Klaff LJ, Kahn SE, Beard JC, Ward WK, Benson

EA, Koerker DJ, Bergman RN, *et al.* Defects in beta-cell function and insulin sensitivity in normoglycemic streptozocin-treated baboons: a model of preclinical insulin-dependent diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* (1988) 67:785-92.

[22] Golden P, Baird L, Malaisse WJ, Diabetes. *Malaisse-Lague, F. & Walker, M. M.* (1971)

[23] Ullrich S, Wollheim CB. Expression of both alpha 1- and alpha 2-adrenoceptors in an insulin-secreting cell line. Parallel studies of cytosolic free Ca<sup>2+</sup> and insulin release. *Mol Pharmacol.* (1985) 28:100-6.

[24] Halban PA, Praz GA, Wollheim CB. Abnormal glucose metabolism accompanies failure of glucose to stimulate insulin release from a rat pancreatic cell line (RINm5F). *Biochem J.* (1983) 212:439-43.

[25] Sai P, Pogu S, Ouary M. Heparin attenuates low-dose streptozotocin-induced immune diabetes in mice and inhibits the beta-cell binding of T-splenocytes in vitro. *Diabetologia.* (1991) 34:212-7.

[26] Jung GD, Yang JY, Song ES, Par JW. Stimulation of melanogenesis by glycyrrhizin in B16 melanoma cells. *ExpMolMed.* (2001) 33:131-5.

[27] Delaney CA, Dunger A, Di Matteo M, Cunningham JM, Green MH, Green IC. Comparison of inhibition of glucose-stimulated insulin secretion in rat islets of Langerhans by streptozotocin and methyl and ethyl nitrosoureas and methanesulphonates. Lack of correlation with nitric oxide-releasing or O<sub>6</sub>-alkylating ability. *Biochem Pharmacol.* (1995) 50:2015-20.

[28] Gray AM, Abdel-Wahab YH, Flatt PR. The traditional plant treatment, *Sambucus nigra* (elder), exhibits insulin-like and insulin-releasing actions in vitro. *J Nutr.* (2000) 130:15-20.

[29] Green IC, Delaney CA, Cunningham JM, Karmiris V, Southern C. Interleukin-1 beta effects on cyclic GMP and cyclic AMP in cultured rat islets of Langerhans-arginine-dependence and relationship to insulin secretion. *Diabetologia.* (1993) 36:9-16.

[30] Xie QW, Cho HJ, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Ding A, Troso T, Nathan C. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science.* (1992) 256:225-8.

- [31] Marnett LJ. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *MutatRes.* (1999) 424:83-95.
- [32] Kwon KB, Yang JY, Ryu DG, Rho HW, Kim JS, Park JW, Kim HR, Park BH. *Vibrio vulnificus* cytolysin induces superoxide anion-initiated apoptotic signaling pathway in human ECV304 cells. *J Biol Chem.* (2001) 276:47518-23.
- [33] Kwon KB, Yoo SJ, Ryu DG, Yang JY, Rho HW, Kim JS, Park JW, Kim HR, Park BH. Induction of apoptosis by diallyl disulfide through activation of caspase-3 in human leukemia HL-60 cells. *Biochem Pharmacol.* (2002) 63:41-7.
- [34] Tejedo J, Bernabé JC, Ramírez R, Sobrino F, Bedoya FJ. NO induces a cGMP-independent release of cytochrome c from mitochondria which precedes caspase 3 activation in insulin producing RINm5F cells. *FEBS Lett.* (1999) 459:238-43.
- [35] Gazdar AF, Chick WL, Oie HK, Sims HL, King DL, Weir GC, Lauris V. Continuous, clonal, insulin- and somatostatin-secreting cell lines established from a transplantable rat islet cell tumor. *Proc Natl Acad Sci USA.* (1980) 77:3519-23.
- [36] Hwang HJ, Kim SW, Lim JM, Joo JH, Kim HO, Kim HM, Yun JW. Hypoglycemic effect of crude exopolysaccharides produced by a medicinal mushroom *Phellinus baumii* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci.* (2005) 76:3069-80.
- [37] Prasad SK, Kulshreshtha A, Qureshi TN. Antidiabetic activity of some herbal plants in streptozotocin induced diabetic albino rats. *J Nutr.* (2009) 8:551-557.
- [38] Van Horn LV. Lipid metabolism and choices for persons with diabetes. pp. 336-359. In: M. A. Powers (ed.), *Handbook of Diabetes Medical Nutrition Therapy*. Aspen Publishers Inc., Gaithersburg, MD. (1996)
- [39] Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA.* (2001) 286:327-34.
- [40] Dehghan A, Kardys I, de Maat MP, Uitterlinden AG, Sijbrands EJ, Bootsma AH, Stijnen T, Hofman A, Schram MT, Witteman JC. Genetic variation, C-reactive protein levels, and incidence of



diabetes. *Diabetes*. (2007) 56:872-8.

[41] Larsen CM, Faulenbach M, Vaag A, Vølund A, Ehres JA, Seifert B, Mandrup-Poulsen T, Donath MY. Interleukin-1-receptor antagonist in type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med*. (2007) 356:1517-26.

[42] Kaye WA, Adri MN, Soeldner JS, Rabinowe SL, Kaldany A, Kahn CR, Bistran B, Srikanta S, Ganda OP, Eisenbarth GS. Acquired defect in interleukin-2 production in patients with type I diabetes mellitus. *N Engl J Med*. (1986) 315:920-4.

[43] Chu SH, Geyer RP. Tissue content and metabolism of myo-inositol in normal and lipodystrophic gerbils. *J Nutr*. (1983) 113:293-303.

[44] Ostlund RE Jr, McGill JB, Herskowitz I, Kipnis DM, Santiago JV, Sherman WR. D-chiro-inositol metabolism in diabetes mellitus. *Proc Nat Acad Sci USA*. (1993) 90:9988-92.

[45] Kawa JM, Przybylski R, Taylor CG. Urinary chiro-inositol and myo-inositol excretion is elevated in the diabetic db/db mouse and streptozotocin diabetic rat. *Exp Biol Med*. (2003) 228:907-14.

[46] Breer H, Strotmann J. Olfactory receptor gene expression. *Semin Cell Dev Biol*. (1997) 8:189-95.

[47] Dang H, Franklin G, Darlak K, Spatola AF, Ellis SR. Discoordinate expression of the yeast mitochondrial ribosomal protein MRP1. *J Bio IChem*. (1990) 265:7449-54.

[48] Chen YC, Chang MY, Shiau AL, Yo YT, Wu CL. Mitochondrial ribosomal protein S36 delays cell cycle progression in association with p53 modification and p21(WAF1/CIP1) expression. *J Cell Biochem*. (2007) 100:981-90.

[49] Accardi R, Oxelmark E, Jauniaux N, de Pinto V, Marchini A, Tommasino M. High levels of the mitochondrial large ribosomal subunit protein 40 prevent loss of mitochondrial DNA in null *mmf1* *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Yeast*. (2004) 21:539-48.

[50] Adorini L. Interleukin 12 and autoimmune diabetes. *Nat Genet*. (2001) 27:131-2.

- [51] Dancygier H, Berg J, Classen M. Interleukin-2 production and type I diabetes. *N Engl J Med.* (1987) 316:949-50.
- [52] Duarte PM, de Oliveira MC, Tambeli CH, Parada CA, Casati MZ, Nociti FH Jr. Overexpression of interleukin-1beta and interleukin-6 may play an important role in periodontal breakdown in type 2 diabetic patients. *J Periodontal Res.* (2007) 42:377-81.
- [53] Andreelli F, Laville M, Ducluzeau PH, Vega N, Vallier P, Khalfallah Y, Riou JP, Vidal H. Defective regulation of phosphatidylinositol-3-kinase gene expression in skeletal muscle and adipose tissue of non-insulin-dependent diabetes mellitus patients. *Diabetologia.* (1999) 42:358-64.
- [54] Nikoulina SE, Ciaraldi TP, Carter L, Mudaliar S, Park KS, Henry RR. Impaired muscle glycogen synthase in type 2 diabetes is associated with diminished phosphatidylinositol 3-kinase activation. *J Clin Endocrinol Metab.* (2001) 86:4307-14.
- [55] Morioka T, Asilmaz E, Hu J, Dishinger JF, Kurpad AJ, Elias CF, Li H, Elmquist JK, Kennedy RT, Kulkarni RN. Disruption of leptin receptor expression in the pancreas directly affects beta cell growth and function in mice. *J Clin Invest.* (2007) 117:2860-8.
- [56] Zhong B, Strnad P, Toivola DM, Tao GZ, Ji X, Greenberg HB, Omary MB. Reg-II is an exocrine pancreas injury-response product that is up-regulated by keratin absence or mutation. *Mol Biol Cell.* (2007) 18:4969-78.
- [57] Caulin C, Ware CF, Magin TM, Oshima RG. Keratin-dependent, epithelial resistance to tumor necrosis factor-induced apoptosis. *J Cell Biol.* (2000) 149:17-22.
- [58] Granger J, Remick D. Acute pancreatitis: models, markers, and mediators. *Shock.* (2005) 24(Suppl1):45-51.
- [59] Koivunen P, Helaakoski T, Annunen P, Veijola J, Räsänen S, Pihlajaniemi T, Kivirikko KI. ERp60 does not substitute for protein disulphide isomerase as the beta-subunit of prolyl 4-hydroxylase. *Biochem J.* (1996) 316:599-605.
- [60] Garbi N, Tanaka S, Momburg F, Hämmerling GJ. Impaired assembly of the major

histocompatibility complex class I peptide-loading complex in mice deficient in the oxidoreductase ERp57. *Nat Immunol.* (2006) 7:93-102.

[61] Lan H, Rabaglia ME, Schueler KL, Mata C, Yandell BS, Attie AD. Distinguishing covariation from causation in diabetes: a lesson from the protein disulfide isomerase mRNA abundance trait. *Diabetes.* (2004) 53:240-4.

[62] Stöckler S, Isbrandt D, Hanefeld F, Schmidt B, von Figura K. Guanidinoacetate methyltransferase deficiency: the first inborn error of creatine metabolism in man. *Am J Hum Genet.* (1996) 58:914-22.

[63] Ding Y, Yamada S, Wang KY, Shimajiri S, Guo X, Tanimoto A, Murata Y, Kitajima S, Watanabe T, Izumi H, Kohno K, Sasaguri Y. Overexpression of peroxiredoxin 4 protects against high-dose streptozotocin-induced diabetes by suppressing oxidative stress and cytokines in transgenic mice. *Antioxid Redox Signal.* (2010) 13:1477-90.

[64] Jiang YL, Ning Y, Ma XL, Liu YY, Wang Y, Zhang Z, Shan CX, Xu YD, Yin LM, Yang YQ. Alteration of the proteome profile of the pancreas in diabetic rats induced by streptozotocin. *Int J Mol Med.* (2011)28:153-60.

[65] Bast A, Wolf G, Oberbäumer I, Walther R. Oxidative and nitrosative stress induces peroxiredoxins in pancreatic beta cells. *Diabetologia.* (2002) 45:867-76.

[66] Hamid AA, Aiyelaagbe OO, Usman LA, Ameen OM, Lawal A. Antioxidants: Its medicinal and pharmacological applications. *Afr J Pure Appl Chem.* (2010) 4:142-151.

[67] Xu X, Martin F, Friedman JS. The familial Parkinson's disease gene DJ-1 (PARK7) is expressed in red cells and plays a role in protection against oxidative damage. *Blood Cells Mol Dis.* (2010) 45:227-32.

[68] Joo JI, Oh TS, Kim DH, Choi DK, Wang X, Choi JW, Yun JW. Differential expression of adipose tissue proteins between obesity-susceptible and -resistant rats fed a high-fat diet. *Proteomics.* (2011) 11:1429-48.

[69] Yamin R, Bagchi S, Hildebrandt R, Scaloni A, Widom RL, Abraham CR. Acyl peptide

hydrolase, a serine proteinase isolated from conditioned medium of neuroblastoma cells, degrades the amyloid-beta peptide. *J Neurochem.* (2007) 100:458-67.

[70] Yamin R, Zhao C, O'Connor PB, McKee AC, Abraham CR. Acyl peptide hydrolase degrades monomeric and oligomeric amyloid-beta peptide. *Mol Neurodegener.* (2009) 4:33.

[71] Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science.* (2002) 297:353-6.

[72] Chen JZ, Yang QS, Wang S, Meng XF, Ying K, Xie Y, Ma YM. Cloning and expression of a novel retinoblastoma binding protein cDNA, RBBP10. *Biochem Genet.* (2002) 40:273-82.

[73] Shields DJ, Niessen S, Murphy EA, Mielgo A, Desgrosellier JS, Lau SK, Barnes LA, Lesperance J, Bouvet M, Tarin D, Cravatt BF, Cheresch DA. RBBP9: a tumor-associated serine hydrolase activity required for pancreatic neoplasia. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2010) 107:2189-94.

[74] Cassie S, Koturbash I, Hudson D, Baker M, Ilnytsky Y, Rodriguez-Juarez R, Weber E, Kovalchuk O. Novel retinoblastoma binding protein RBBP9 modulates sex-specific radiation responses in vivo. *Carcinogenesis.* (2006) 27:465-74.

[75] Fahien LA, Laboy JI, Din ZZ, Prabhakar P, Budker T, Chobanian M. Ability of cytosolic malate dehydrogenase and lactate dehydrogenase to increase the ratio of NADPH to NADH oxidation by cytosolic glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys.* (1999) 364:185-94.

[76] Gietl C : Malate dehydrogenase isoenzymes. cellular locations and role in the flow of metabolites between the cytoplasm and cell organelles. *Biochim Biophys Acta.* (1992) 1100:217-34.

[77] Arai T, Nakamura M, Magori E, Fukuda H, Sako T. Decrease in malate dehydrogenase activities in peripheral leucocytes of type 1 diabetic dogs. *Res Vet Sci.* (2003) 74:183-5.

[78] Wu KK, Huan Y. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Curr Protoc Pharmacol.* (2008) 40:1-14.

[79] Bair WB 3rd, Cabello CM, Uchida K, Bause AS, Wondrak GT. GLO1 overexpression in

human malignant melanoma. *Melanoma Res.* (2010) 20:85-96.

[80] Santarius T, Bignell GR, Greenman CD, Widaa S, Chen L, Mahoney CL, Butler A, Edkins S, Waris S, Thornalley PJ, Futreal PA, Stratton MR. GLO1-A novel amplified gene in human cancer. *Genes Chromosomes Cancer.* (2010) 49:711-25.

[81] Antognelli C, Del Buono C, Ludovini V, Gori S, Talesa VN, Crinò L, Barberini F, Rulli A. CYP17, GSTP1, PON1 and GLO1 gene polymorphisms as risk factors for breast cancer: an Italian case-control study. *BMC Cancer.* (2009) 9:115.

[82] Gurr W, Yavari R, Wen L, Shaw M, Mora C, Christa L, Sherwin RS. A Reg family protein is overexpressed in islets from a patient with new-onset type 1 diabetes and acts as T-cell autoantigen in NOD mice. *Diabetes.* (2002) 51:339-46.

[83] Sekikawa A, Fukui H, Fujii S, Ichikawa K, Tomita S, Imura J, Chiba T, Fujimori T. REG Ialpha protein mediates an anti-apoptotic effect of STAT3 signaling in gastric cancer cells. *Carcinogenesis.* (2008) 29:76-83.

[84] Yamada N, Murase T, Iwamoto Y, Mashiko S, Akanuma Y. Reciprocal changes of plasma apo AI and apo E levels in streptozotocin-induced diabetic rats. *Horm Metab Res.* (1984) 16:85-88.

[85] O'Looney P, Irwin D, Briscoe P, Vahouny G V. Lipoprotein composition as a component in the lipoprotein clearance defect in experimental diabetes. *J Biol Chem.* (1985) 260:428-432.

[86] Kim SW, Hwang HJ, Kim HM, Lee M C, Lee MS, Choi JW, et al. Effect of fungal polysaccharides on the modulation of plasma proteins in streptozotocin-induced diabetic rats. *Proteomics.* (2006a) 6:5291-5302

[87] Page RC, Schroeder HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *LabInvest.* (1976) 34:235-249.

[88] Proud D, Kaplan AP. Kinin formation: mechanisms and role in inflammatory disorders. *Annu Rev Immunol.* (1988) 6:49-83.

[89] Cathcart ES, Wollheim FA, Cohen AS. Plasma protein constituents of amyloid fibrils. *J*

*Immunol.* (1967) 99:376-385.

[90] Pepys MB, Booth DR, Hutchinson WL, Gallimore JR, Collins PM, Hohenester E. Amyloid P component. *A critical review. Amyloid: Int J Exp Clin Invest.* (1997) 4:274-295.

[91] Li XA, Hatanaka K, Ishibashi-Ueda H, Yutani C, Yamamoto A. Characterization of serum amyloid P component from human aortic atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (1995) 15:252-257.

[92] Young B, Gleeson M, Cripps AW. C-reactive protein: A critical review. *Pathology.* (1991) 23:118-124.

[93] Pepys MB. The acute phase response and C-reactive protein. *The Oxford Textbook of Medicine.* (1996) 2:1527-1533.

[94] Kyriakidis AV, Alexandris I, Papoulia E, Athanasiou K, Perysinakis I, Pyrgioti, M, et al. C-reactive protein: diagnostic aid in right lower quadrant abdominal pain. *Am J Gastroenterol.* (2010) 23:307-310.

[95] Bhoola KD, Figueroa CD, Worthy K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol Rev.* (1992) 44:1-480.

[96] Kim SW, Hwang HJ, Cho EJ, Oh JY, Baek YM, Choi JW, et al. Time-dependent plasma protein changes in streptozotocin-induced diabetic rats before and after fungal polysaccharide treatments. *J Proteome Res.* (2006b) 5:2966-2976.

[97] Refai E, Dekki N, Yang SN, Imreh G, Cabrera O, Yu L, et al. Transthyretin constitutes a functional component in pancreatic beta-cell stimulus-secretion coupling. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2005) 102:17020-17025.

[98] Umans L, Serneels L, Overbergh L, Lorent K, Van Leuven F, Van den Berghe H. Targeted inactivation of the mouse  $\alpha$ 2-macroglobulin gene. *J Biol Chem.* (1995) 270:19778-19785.

[99] Umans L, Serneels L, Overbergh L, Stas L, Van Leuven F.  $\alpha$ 2-macroglobulin- and murinoglobulin-1-deficient mice. A mouse model for acute pancreatitis. *Am J Pathol.* (1999) 155:983

-993.

[100] Gourine AV, Gourine VN, Tesfaigzi Y, Caluwaerts N, Van Leuven F, Kluger MJ. Role of alpha (2)-macroglobulin in fever and cytokine responses induced by lipopolysaccharide in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* (2002) 283:218-226.

[101] Banks RE, Evans SW, Alexander D, Van Leuven F, Whicher JT, McMahon MJ. Alpha 2 macroglobulin state in acute pancreatitis. Raised values of alpha 2 macroglobulin-protease complexes in severe and mild attacks. *Gut.* (1991) 32:430-434.

[102] Isaac L, Florido MP, Fecchio D, Singer LM. Murine alpha-2-macroglobulin increase during inflammatory responses and tumor growth. *Inflamm Res.* (1999) 48:446-52.

[103] Vergès B, Petit JM, Duvillard L, Dautin G, Florentin E, Galland F. Adiponectin is an important determinant of apoA-I catabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (2006) 26:1364-1369.

[104] Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Imai Y, Shimozawa N, Hioki K, et al. Globular adiponectin protected ob/ob mice from diabetes and Apo E deficient mice from atherosclerosis. *J Biol Chem.* (2003) 278:2461-468.

[105] Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun.* (1999) 257:79-83.

[106] Mather KJ, Funahashi T, Matsuzawa Y, Edelstein S, Bray GA, Kahn SE, Crandall J, Marcovina S, Goldstein B, and Goldberg R, Diabetes Prevention Program. Adiponectin, change in adiponectin, and progression to diabetes in the diabetes prevention program. *Diabetes.* (2008) 57:980-986.

[107] Stepan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature.* (2001a) 409:307-312.

[108] Stepan CM, Brown EJ, Wright CM, Bhat S, Banerjee RR, Dai CY, et al. A family of tissue-specific resistin-like molecules. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2001b) 98:502-6.

- [109] Chen BH, Song Y, Ding EL, Roberts CK, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Gaziano JM, and Liu S. Circulating levels of resistin and risk of type 2 diabetes in men and women: results from two prospective cohorts. *Diabetes Care*. (2009) 32:329-334.
- [110] Peil A, Barrett F, Rha C, Langer R. Retention of micronutrients by polymer coatings used to fortify rice. *Journal of Food Science*. (1982) 4:260-262.
- [111] Kim SK, Suh CS. Water uptake rate of brown rice at 100°C. *J. Korean Agric. Chem. Soc.* (1990) 33:261-263.
- [112] Becker HA. A study of diffusion in solids of arbitrary shape with application to the drying of the wheat kernel. *J. Appl. Polymer Sci.* (1959) 1:212-226.
- [113] Aratani T, Fujii T, Morigawa T, Miyanani T. Evaluation of floc fonn by fractal dimension. *J. Chem. Eng.* (1988) 14:395-400.
- [114] Kim S, Han K, Park H, Chae J, Rhee J. Hydration rate of milled rice. *Journal of The Korean Agricultural Chemical Society*. (1985) 28.
- [115] Her YM, Lee SY, Lee SY. Preparation of functional nutrient enriched rices by coating method. *Food Engineering Progress*. (2007) 11:185-194.
- [116] Vicsek T. *Fractal growth phenomena*. World Scientific Pub Co Inc. (1992)
- [117] Ryoo DH. Analysis of filamentous fungal growth and pellets formation by fractal geometry. *Korean J Biotechnol. Bioeng.* (1994) 9:512-517.
- [118] Song B, Kim D, Kim S. Comparison of hydration and cooking rates of brown and milled rices. *Journal of The Korean Agricultural Chemical Society*, (1988) 31.
- [119] Hsu K, Kim C, Wilson L. Factors affecting water uptake of soybeans during soaking. *Cereal Chemistry*. (1983) 60.
- [120] BeMiller JN, Whistler RL. *Starch:chemistry and technology*. Academic Press. (2009)



## 주 의

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