

발 간 등 록 번 호

11-1543000-002898-01

두과작물을 활용한 대사질환 및 갱년기질환 개선 기능성 제품 개발

최종보고서

2019. 11. 15.

주관연구기관 / 경상대학교 산학협력단
세부연구기관 / 경상대학교 산학협력단
협동연구기관 / 코스맥스엔비티(주)

농 립 축 산 식 품 부
(전문기관) 농림식품기술기획평가원

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “두과작물을 활용한 대사질환 및 갱년기질환 개선 기능성 제품 개발”(개발기간 : 2015. 08. 14. ~ 2019. 08. 13.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019. 11. .

주관연구기관명 : 경상대학교 산학협력단 (대표자) 정 종 일 (인)



협동연구기관명 : 코스맥스엔비티(주) (대표자) 이 윤 종 (인)



참여기관명 : (주)제이씨엔팜 (대표자) 최 홍 록 (인)



참여기관명 : (주,농)성마리오농장 (대표자) 김바오로 (인)



주관연구책임자 : 박 기 훈

세부연구책임자 : 이 동 훈

협동연구책임자 : 임 재 연

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	315032-4	해 당 단 계 연 구 기 간	2018.06.14.~ 2019.08.13	단 계 구 분	4차년도/ 4차년도
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	농생명산업기술개발			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	두과작물을 활용한 대사질환 및 갱년기질환 개선 기능성 제품 개발			
연구책임자	박기훈	해당단계 참여연구원 수	총: 33명 내부: 16명 외부: 17명	해당단계 연구개발비	정부:400,000천원 민간:140,000천원 계:540,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 56명 내부: 21명 외부: 35명	총 연구개발 비	정부:1,600,000천원 민간:560,000천원 계:2,160,000천원
연구기관명 및 소속부서명	경상대학교 산학협력단			참여기업명 코스맥스엔비티(주), (주)제이씨엔팜, 성마리오농장	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	일반과제
-------------------------	------

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품중	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호											

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)

- 대사체 생산농업 (Metabolite Farming)은 농산물의 주요활성물질 함량을 획기적으로 높여 농산물의 부가가치를 높이는 재배기술로 농생명산업의 경쟁력을 높이는 가장 도전적인 분야임. 식물성 에스트로겐이 고함유된 기능성 콩잎을 생산하는 대사체 생산농업기술 개발에 성공
- 개발된 식물성 에스트로겐 고함유 콩잎(파바톤콩잎)은 지방분해, 골밀도 증가, 피부콜라겐 생성, 갱년기 전반 개선에 탁월함을 동물 실험에서 확인하여 갱년기용 식의약 원천소재로 발전시킴
- 안전성이 확보된 Non-GMO 방법으로 식물성에스트로겐 고함유콩잎(파바톤콩잎) 실용화 기술을 완료하고 본 기술을 갱년기 용도 및 피부미용 용도 2개 기술로 분할하여 각각 기술이전을 완료함
*기술이전: (주)롯데정밀화학 (선급금 1.5억, 기술료 6억, 경상실시 1%)
제이씨엔팜 (선급금 2억, 기술료 10억, 경상실시 3%)
- 식물호르몬인 에틸렌이 식물성 에스트로겐(이소플라본) 생합성 전사인자 발현에 미치는 영향과 생합성 메카니즘 규명

보고서 면수

324면

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>연구의 목적: 대사체 생산농업(Metabolite Farming) 기술을 적용하여 식물성 에스트로겐이 고함유된 파바톤콩잎을 개발하고 개발된 원천생물소재의 생물학적 기능을 규명하여 갱년기 질환 및 피부미용 등 용도로 산업화함, 또한 대사체 농업의 효용성을 입증하여 우리나라 생물소재 생산의 혁신기술로 발전시킨다.</p> <p>1. 최종연구목표: 두과작물을 이용한 대사성질환 및 갱년기질환개선 기능성 제품개발</p> <p>2. 핵심연구목표</p> <p>첫째. 식물성 에스트로겐 고함유된 파바톤콩잎 생산기술 개발 둘째. 갱년기를 포함한 대사성질환용 식의약소재로 응용 셋째. 파바톤콩잎을 In & Out Beauty용 소재로 개발 넷째. 파바톤콩잎을 원천생물소재로 기술이전 및 산업화</p> <p>3. 연구 내용</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 식물성 에스트로겐이 고함유된 파바톤콩잎 생산기술 개발(제1세부) <ul style="list-style-type: none"> - 에테폰이용 식물성 에스트로겐 파바톤콩잎 생산기술 개발 - 에틸렌이용 식물성 에스트로겐 파바톤콩잎 생산기술 개발 - 개별인증 시험을 위한 파바톤 소재의 표준화 연구 - 에틸렌에 의한 식물성 에스트로겐 합성 메카니즘 규명 - 파바톤콩잎 대량생산을 위한 필드시험 및 대농민 기술전수 - 생산된 파바톤콩잎의 농약 잔류 평가 ○ 콩 및 파바톤콩잎의 생물전환을 통한 고부가 생물소재 개발(제1세부) <ul style="list-style-type: none"> - 파바톤콩잎의 일반성분 분석 및 평가 - 유산균을 이용한 콩의 생물전환 연구 - 송이버섯균사체를 이용한 파바톤콩잎의 생물전환 연구 ○ 파바톤콩잎의 활성을 강화할 수 있는 새로운 생물소재 개발(제1세부) <ul style="list-style-type: none"> - 콩과작물인 천근발(<i>Flemingia philippinensis</i>)의 대사체 연구 - 콩과작물인 천근발(<i>Flemingia philippinensis</i>)의 활성평가 연구 ○ 식물성 에스트로겐 고함유된 파바톤 콩잎의 전임상 활성평가(제2세부) <ul style="list-style-type: none"> - 파바톤콩잎 추출물의 뼈건강 및 갱년기 관련 효능 평가 - 파바톤콩잎 추출물의 내장지방을 포함한 지방감소 효과 평가 - 파바톤콩잎 추출물의 피부미용 관련 효능 평가 - 파바톤콩잎 추출물의 in vitro 활성 평가 ○ 식물성 에스트로겐 고함유된 파바톤콩잎의 갱년기용 개별인정시험(임상,제2세부) <ul style="list-style-type: none"> - 부산대학교 한방병원 및 (주)네오뉴트라 등과의 임상시험 ○ 식물성 에스트로겐 고함유된 파바톤콩잎의 독성평가(제2세부) <ul style="list-style-type: none"> - 콩 전초 추출물의 랫드를 이용한 4주간 반복 경구투여 독성시험 - 콩 전초 추출물의 랫드를 이용한 급성경구독성시험 ○ 식물성 에스트로겐 고함유된 파바톤콩잎의 제품화 연구(제1협동) <ul style="list-style-type: none"> - 콩잎 추출물의 기능/지표 성분 기준 시험법 개발 - 유효활성성분의 추출방법의 최적화 - 파바톤콩잎을 이용한 제품화 연구 ○ 식물성 에스트로겐 고함유된 파바톤콩잎의 기술이전 및 산업화(세부과제협업) <ul style="list-style-type: none"> - 목표점1: 갱년기 개선에 도움을 주는 식의약 소재 - 목표점2: 피부미용관련 In & Out Beauty
------------------------	--

<p>연구개발성과</p>	<p>4. 연구개발 성과</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 식물성 에스트로젠이 고함유된 파바톤콩잎 생산기술 개발(제1세부) <ul style="list-style-type: none"> - 에테폰이용 파바톤콩잎 생산기술 완료 - 에테폰이용 파바톤콩잎 생산기술의 스마트팜으로 응용기술 65% 완료 <ul style="list-style-type: none"> * 재배기술 국내 2건, 미국 1건, 일본 1건 특허 등록, 유럽 1건, 중국 1건 진행 - 콩잎에서 식물성 에스트로젠 생산 방법 및 합성기작 규명 및 객관화 완료 <ul style="list-style-type: none"> * 상위 5% <i>J. Agr. Food Chem</i>, 2016에 출판 완료 - 파바톤콩잎 생산을 위한 현장적용시험 수행 및 기술의 한계인지 <ul style="list-style-type: none"> * 2016년 3천평, 2017 4천평, 2018 3천평 재배 및 평가완료 * 현장적용시험 15,000평 수행(제이씨엔팜, 참여기업) - 생산된 파바톤콩잎에 에테폰 무검출(0.1ppm<)로 평가완료 ○ 콩 및 파바톤콩잎의 생물전환을 통한 고부가 생물소재 개발(제1세부) <ul style="list-style-type: none"> - 송이버섯 균사체가 콩 및 파바톤콩잎 전환용 생물 소재로 선정하고 최적 기술 개발완료 (Bioconversion 및 Story 면에서 경쟁력 확보) <ul style="list-style-type: none"> * 관련기술은 상위 5% <i>Food Chemistry</i>에 출판 완료하고 특허출원 중 - 파바톤콩잎에서 유리아미노산 함량이 2배 이상 증가하고 아스파라진은 100배 이상 함량증가 평가 완료, 새로운 가치 창출 ○ 파바톤콩잎의 활성을 강화할 수 있는 새로운 생물소재 개발(제1세부) <ul style="list-style-type: none"> - 천근발(<i>Flemingia philippinensis</i>)을 목표소재로 선정, 활성 대사체 평가 완료, Human neutrophil elastase(HNE) 저해활성 등 기초활성 규명완료 <ul style="list-style-type: none"> * 상위 20% <i>Bioorg. Chem</i> 및 상위 30% <i>Molecules</i>에 출판완료하고 객관성 입증 ○ 식물성 에스트로젠 고함유된 파바톤 콩잎의 전임상 활성평가(제2세부) <ul style="list-style-type: none"> - 뼈건강 및 장간막 등 내장지방세포 감소 등 갱년기 완화 효능 입증 <ul style="list-style-type: none"> * 상위 15% <i>J. Funct. Food</i>에 출판완료 및 임상진행 - 콜라겐 합성을 탁월하게 증진시키고 콜라겐 분해 억제 기능의 규명 완료 ○ 식물성 에스트로젠 고함유된 파바톤콩잎의 갱년기용 개별인정시험(임상,제2세부) <ul style="list-style-type: none"> - 표준화 완료된 생물소재로 부산대학교 한방 병원에서 임상시험 진행 중 ○ 식물성 에스트로젠 고함유된 파바톤콩잎의 독성평가(제2세부) <ul style="list-style-type: none"> - 파바톤콩잎의 전초 독성 시험 완료, 안전성 확보 ○ 식물성 에스트로젠 고함유된 파바톤콩잎의 제품화 연구(제1협동) <ul style="list-style-type: none"> - 추출 공정의 최적화, 파바톤 콩잎 이용한 xx종의 제품개발 완료 ○ 식물성 에스트로젠 고함유된 파바톤콩잎의 기술이전 및 산업화(세부과제협업) <ul style="list-style-type: none"> - 기술이전1: (주)제이씨엔팜(갱년기제품, 파바톤콩잎생산), 기술료10억(선급금2억) - 기술이전2: (주)롯데정밀화학(피부미용화장품, 이너뷰티), 기술료6억(선급금1.5억)
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 파바톤콩잎을 식의약소재 시장의 혁신소재로 농생명산업 활성화 및 농민소득 창출 - 독점권이 확보되고 기술 이전 완료된 파바톤콩잎의 산업화 및 매출 확대가 빠른 시간 내에 달성될 수 있도록 적극적 지원 및 노력 - 파바톤콩잎의 생산기술은 재배, 세척, 건조, 포장 등 투자가 요구되는 영역이므로 지자체, 업체 등과 협력하여 효과적인 생산체제 구축 - 파바톤콩잎의 노지 재배는 안정성 및 생산효율에 있어 한계 있음. 극복할 수 있는 스마트팜 기반 생산 방법 확보 및 보급
<p>국문핵심어</p>	<p>파바톤콩잎 갱년기 피부미용 식물성 에스트로젠 대사체 생산농업</p>

<SUMMARY>

<p>Project Purposes and Contents</p>	<p>General project objective: is to develop the cultivation techniques to produce phytoestrogen enriched soybean leaves(Fabaton Soybean Leaves) by applying a metabolite farming technology, to examine the biological functions focusing on menopause disease and skin beauty, to do licensing out of FSL to company for industrialization in nutraceutical market.</p> <p>1. The final goal of the project: Development of functional products with prevent metabolic syndrome and menopause diseases using legume crops</p> <p>2. The key research targets</p> <ul style="list-style-type: none"> - Development of cultivation techniques Fabaton Soybean Leaves(FSL) - Application FSL to metabolic syndrome including menopause disease - Application FSL to biosubstances for In & Out beauty materials - Licensing out of FSL as original biomaterial and industrialization. <p>3. Research contents</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Development of cultivation technique for phytoestrogen enrich FSL(Team1) <ul style="list-style-type: none"> - Cultivation technique of FSL from soybean by ethephone chemical - Cultivation technique of FSL from soybean by ethylene hormone - Standardization of FSL production for individual certification from KFDA - Examination of biosynthetic mechanism of phytoestrogen in soybean leaves - Field study for mass production of FSL and transfer technique to farmer - Evaluation of pesticide(ethephone) in FSL ○ Bioconversion of soybean and FSL to improve their values(Team1) <ul style="list-style-type: none"> - Examination and estimation of general biological components of FSL - Bioconversion study of soybean seed by <i>Lactobacillus plantarum</i> - Bioconversion study of FSL by <i>Tricholoma matsutake</i> ○ New biosubstance which makes a synergy effect with FSL(Team1) <ul style="list-style-type: none"> - Bioactive metabolites in <i>Flemingia philippinensis</i> belonging to legume family - Estimation of biological functions of <i>Flemingia philippinensis</i> ○ Preclinical study of phytoestrogen enriched FSL(Team2) <ul style="list-style-type: none"> - Effectiveness of FSL extract toward menopause disease including osteoporosis - Effectiveness of FSL extract toward fat reduction including visceral fat - Effectiveness of FSL extract toward In & Out beauty - In vitro biological function of FSL extract toward skin ○ Clinical demonstration of FSL for individual certification from KFDA(Team2) <ul style="list-style-type: none"> - Collaboration with PNU oriental hospital and Neonutra ○ Toxicological evaluation for a whole plant extract of FSL(Team2) <ul style="list-style-type: none"> - Oral administration of FSL extract to rat for 4 weeks - Acute oral toxicity test of FSL extract ○ Development of formulation process for productization of FSL(Team3) <ul style="list-style-type: none"> - Optimization of extraction process based on phytoestrogen content - Productization of some products with FSL extract ○ Transfer of the developed technology to company and its industrialisation <ul style="list-style-type: none"> - First target: Nutraceuticals for menopause disease - Second target: Skin cares for In & Out beauty
--	--

Research Results	<p>4. Research results</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Development of cultivation technique for phytoestrogen enrich FSL(Team1) <ul style="list-style-type: none"> - The cultivation technique of FSL by ethephone was almost optimized - The cultivation technique of FSL by ethephone was optimized up to 60% <ul style="list-style-type: none"> *Patent: 4 registers(Korea 2, USA 1, Japan 1), 2 applications(China 1, Europe 1) - The elucidation of phytoestrogen synthetic mechanism has done completely <ul style="list-style-type: none"> *Published on <i>J. Agr. Food Chem.</i>, 2016(JCR 5%) - The limit of our cultivation method in field was recognized for competitiveness <ul style="list-style-type: none"> *Cultivation cases: 2016(10,000 m²), 2017(12,000 m²), 2018(10,000 m²) *Finished a cultivation test with huge area(45,000 m²) with company(JC&Farm) - Evaluation of pesticide(ethephone) was completed to have (>0.1 ppm) ○ Bioconversion of soybean and FSL to improve their values(Team1) <ul style="list-style-type: none"> - The mycelium of matsutake was selected as best bioconversion source for soybean and FSL in view of efficacy and an emotional story to consumer <ul style="list-style-type: none"> *Published on <i>Food Chemistry</i> 2019(JCR 5%), patent application - FSL was proved to have a massive amount of free amino acids than control soybean leaves, especially asparagines (100 times increase) ○ New biosubstance which makes a synergy effect with FSL(Team1) <ul style="list-style-type: none"> - Isolated and identified bioactive metabolites in target plant completely - Evaluated biological functions including HNE inhibition <ul style="list-style-type: none"> *Published on <i>Bioorg. Chem.</i>, 2018(JCR 20%), <i>Molecules</i>, 2018(JCR 30%) ○ Preclinical study of phytoestrogen enriched FSL(Team2) <ul style="list-style-type: none"> - Proved the biological function of FSL toward menopause disease - Proved the biological function of FSL toward collagen synthesis <ul style="list-style-type: none"> *Published on <i>J. Funt. Food</i>, 2018(JCR 15%), moved to clinical experiments ○ Clinical demonstration of FSL for individual certification from KFDA(Team2) <ul style="list-style-type: none"> - Carrying out clinical demonstration by PNU oriental hospital ○ Toxicological evaluation for a whole plant extract of FSL(Team2) <ul style="list-style-type: none"> - Any toxicity was not observed on 4 weeks oral administration - Acute oral toxicity test showed that FSL has no matter with toxicity ○ Development of formulation process for productization of FSL(Team3) <ul style="list-style-type: none"> - The extraction process was optimized for industrialisation - Established best formulation method, for commercial product ○ Transfer of the developed technology to company and its industrialisation <ul style="list-style-type: none"> - Transferred FSL to JC&Farm Ltd. for nutraceutic product - Transferred FSL to Lotte Fine Chemical Ltd. for skin care product 				
Application and Expectation	<ul style="list-style-type: none"> - FSL technology would contribute to agrobio industry and farmers' income - The transferred FSL technology to companies would make a rapid sales and industrialisation in nutraceutic market as a creative biosubstance - We should lead a government assistance to establish an efficient system to do cultivation, cleaning, and drying of FSL simultaneously - The cultivation method of FSL in field by ethephone has a limit obviously, which should shift to smart farm system to maintain a higher quality 				
Keywords	Fabaton Soyleaves	Menopause	Skin beauty	Phytoestrogen	Metabolite Farming

<본문목차>

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	10
1-1. 연구개발 목적	10
1-2. 연구개발의 필요성	14
1-3. 연구개발 범위	26
2. 연구수행 내용 및 결과	29
2-1. 총괄추진체계	29
2-2. 제1세부과제 수행내용 및 결과	50
2-2-1. 연구 수행내용 및 결과 요약	50
2-2-2. 일반콩잎 및 파바톤콩잎의 페놀성 화합물 분석 및 동정(결과-1)	53
2-2-3. 파바톤콩잎 생산기초연구(결과-2)	72
2-2-4. 파바톤콩잎의 식물성에스트로겐 포함한 페놀성 대사체 분석(결과-3)	84
2-2-5. 파바톤콩잎의 식물성에스트로겐 생합성 기작규명(결과-4)	92
2-2-6. 파바톤콩잎의 유리아미노산을 포함한 저분자화합물 분석(결과-5)	95
2-2-7. 파바톤콩잎 생산 현장적용시험(결과-6)	102
2-2-8. 에테폰처리에 따른 잔류검사 및 안전성 평가(결과-7)	122
2-2-9. 개별인정형 제품개발을 위한 파바톤콩잎 표준화(결과-8)	125
2-2-10. 토양조건 및 품종이 식물성에스트로겐 생성에 미치는 영향(결과-9)	134
2-2-11. 미생물이용 생물전환연구-I(결과-10)	138
2-2-12. 미생물이용 생물전환연구-II(결과-11)	180
2-2-13. 스마트챔버에서 콩잎생산기술 개발(결과-12)	190
2-2-14. 콩과작물인 천근발 대사체 분리 및 구조분석(결과-13)	195
2-2-15. 천근발에서 분리된 이소플라본 유도체 생리활성 검정(결과-14)	209
2-2-16. 연구개발성과(결과-15)	217
2-3. 제2세부과제 수행내용 및 결과	230
2-3-1. 연구 수행내용 및 결과 요약	230
2-3-2. 동물모델을 이용한 파바톤콩잎 추출물의 안전성 검사(결과-1)	231
2-3-3. 동물모델을 이용한 파바톤콩잎 추출물의 항비만효과 검사(결과-2)	241
2-3-4. 동물모델을 이용한 파바톤콩잎 추출물의 간세포보호효과 검사(결과-3)	244
2-3-5. 동물모델을 이용한 파바톤콩잎 추출물의 골다공증 예방효과 검사(결과-4)	249

2-4. 제1협동과제 수행내용 및 결과	266
2-4-1. 연구 수행내용 및 결과 요약	266
2-4-2. 콩잎 추출물 지표설정을 위한 기초연구(결과-1)	267
2-4-3. 콩잎 추출물의 일반식품 제형개발(결과-2)	274
2-4-4. 과바톤콩잎 추출물의 건강기능식품 제형개발(결과-3)	284
2-4-5. 과바톤콩잎 추출물의 건강기능식품 제품개발(결과-4)	302
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	319
3-1. 목표	319
3-2. 목표 달성여부	319
3-3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등) ·	319
4. 연구결과의 활용 계획 등	320
붙임. 참고 문헌	321

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

가. 대사체 생산농업(Metabolite Farming)을 이용한 원천생물소재 개발의 목적(수준)

현재 유통되는 식약처 인증 생물소재는 소재의 다양성도 부족하지만 우리나라 농민들의 소득 창출에 기여할 수 있는 원천생물소재는 거의 없다. 대부분의 소재들을 생산단가가 낮은 제3국에서 공급되고 또한 핵심소재들은 우리나라에서 재배되지 않는 외국산이다. 따라서 우리나라 농민들의 소득 증대에 이바지하는 생물소재 발굴이 대단히 시급하고 경쟁력있는 생물소재는 아래 4가지의 조건을 만족해야 될 것이다.

첫째: 개발된 생물 소재가 우수한 활성을 갖고 있는가

개발된 활성지표물질의 유효 활성, 안전성, 약동력학(Pharmacokinetics), 생리활성 메카니즘 규명 등을 충분히 만족할 때 식약처 인증물질로 발전할 수 있다. 활성물질 도출도 어렵지만 10년 이상의 많은 시간이 소요되기 때문에 약학연구가 아닌 농생명연구에서 관련연구를 수행하겠다는 접근은 큰 위험성이 있다. 특히 식약처 고시 1등급 기능성 물질이 8종에 불과하다는 것을 고려하면 더욱 그렇다.

둘째: 생물 소재가 식약처 기준으로 식용 가능한가

높은 활성이 있는 지표 물질을 가진 생물 소재라도 먹을 수 없는 생물소재는 독성평가 등에 고비용이 소요될 뿐 아니라 인·허가를 획득하는데 긴 시간이 소요되어 식의약 소재로서 활용되기가 어렵다.

셋째: 생물소재의 바이오매스 확보가 용이한가

생물소재 대부분은 바이오매스가 많이 요구되는 식의약소재로 활용되기 때문에 재배기술이 확립되어 바이오매스 창출이 용이한 작물이 아니면 원료생산에 고비용이 발생해 발전하기가 힘들다.

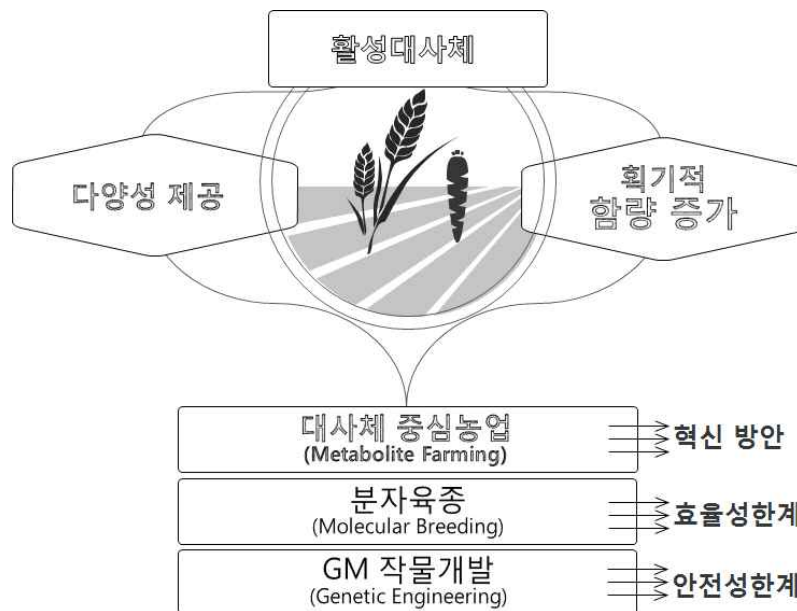
넷째: 생물소재의 독점권이 확보 되었는가

독점권이 없는 생물소재는 높은 부가가치 창출이 어렵다. 예로서, 녹차는 카테킨 고기능성 활성 지표물질을 갖고 있지만 하동, 보성, 중국산 등 소재가 너무 많기 때문에 고부가 소재로 발전하지 못한다.

- 상기 4가지 조건을 만족하는 “원천생물소재”는 재래식 농법으로는 사실상 불가능하다. 따라서 생물소재개발이라는 목표점으로 지원되는 R&D는 생리활성물질 발굴 및 제품개발에 매몰되어 있기때문에 연구시작단계에서 제시한 비전만큼 성과는 달성하지 못한 한계를 극복한다.
- 따라서 가장 현실적인 해답은 작물에서 이미 알려진 고기능 활성물질의 확량을 획기적으로 높일 수 있는 재배방법을 개발하고, 이에 대한 지적 재산을 확보하는 것이다. 상기의 목적을 달성할 수 있는 “대사체 생산 농업”의 원천기술을 창출한다.

나. 본 연구에 적용할 대사체 생산농업의 방향성 및 목적

- 전 세계적으로 생물 다양성 협약과 같은 국제 협약에 따라 생명자원의 중요성을 강조하고 있으며 생물자원에 대한 가치가 증가됨에 따라 자원 보유국과 자원가치 개발국 간의 지식 재산권, 출처 공제 등 이익 공유에 대한 대립이 첨예 되고 있다. GM 작물 개발 및 분자유종종을 통해 진화된 생물자원 확보는 물론이고 자원 보유국으로의 역량을 강화하고 있다.
- 각국마다 고유 GM 기술개발을 다국적 기술재배에서 탈피하려는 노력을 하고 있다. 옥수수, 콩, 면화뿐만 아니라 벼, 밀, 사탕수수 등으로 GM 작물의 재배가 확대 되고 있다. 그러나 GM 작물 개발의 목표점이 학명지표물질이 아닐 뿐만 아니라 GM 작물에 대한 국민적인 거부감, 개발될 식의약 제품의 안전성 등을 고려할 때 GM기술 생물소재개발에 이용하기에는 한계가 있다.
- 분자유종(전통육종)은 교배, 돌연변이유발 및 원형질체 세포융합을 통해 목표한 우수품종으로 개량한다. 중요 목표점의 대부분은 생산성 확보, 병 저항성, 열매크기조절, 열매 색조절 등이다.
- 재배방법을 달리하였을 때 활성대사체의 변화 및 함량증과 등은 다양한 과학 자료들이 축적되어 있다. 현재까지의 연구결과들은 “Better than nothing”으로 작은 변화들이기 때문에 산업적으로 활용하는데 한계가 있다. 그러나 이러한 변화들을 식물체의 전사인자등과 연관 지을 때 혁신적인 함량변화를 가져올 수 있고, 관련결과들이 보고되고 있다. 이러한 재배방법을 대사체 중심농업으로 정의할 수 있을 것이다.



- 농생명 미래융합 원천기술로써 대사체 중심 농업 기술 개발은 농생명 산업가치를 획기적으로 증가 시킬 수 있다. 특히 생육 조건을 정밀하게 조절 할 수 있는 스마트 팜 기술과 융합하면 농생명 산업을 주도 할 수 있는 신기술로 성장 할 수 있다.

다. 설계한 원천생물소재의 식의약적 목적(방향성)

★ 대사증후군



★ 발병원인

- 일반적으로 인슐린 저항성이 근본적인 원인으로 추정하고 있지만 대사증후군의 발병원인은 복합요인으로 알려져 있다.
- 생활식 습관
- 유전적인 요인
- **호르몬 불균형**

★ 본 연구의 목표점

• 40대 이후 여성에게 발병하는 대사성 질환에 적합한 기능성 식품 개발

비만, 간기능 **갱년기**
 (등 개선 + 식물성)
 기능성소재 **에스트로젠**

신개념의 기능성 식품

★ 호르몬 불균형

• 폐경기가 되면 대사증후군 발병율이 60% 이상증가

여성호르몬 저하
 ↓
상대적 남성호르몬 작용 강해짐
 ↓
복부비만, 지질대사장애
 ↓
대사성 질환으로 발전

신개념의 기능성식품(식의약)소재를 콩재배 대사체 생산 농업에 적용하여 식물성 에스트로겐이 고 함유된 파바톤콩잎 생산 기술을 최적화 시키고 이를 이용한 식의약 제품을 개발한다.

라. 본 연구의 최종 목적

구 분	핵 심 내 용	비 고
목적1	Non-GMO 방법으로 일반콩잎을 식물성 에스트로겐이 고함유된 기능성콩잎(파바톤콩잎)으로 전환하는 대사체 중심농업(Metabolite Farming) 기술을 개발한다.	원천생물 소재생산
목적2	외국에서 생물소재 수입이 원천적으로 불가능한 특허로 독점권이 보장된 기술로 진보시켜 우리나라 농민들에 의해 생산 가공되어 농민소득에 크게 이바지하는 기술로 성장시킨다.	범용기술로 발전
목적3	생산된 파바톤콩잎 전초의 독성평가를 실시하고 대사체 중심농업에 이용된 에테폰의 잔류 및 반감기를 평가하여 생산된 소재의 안전성을 확보한다.	안전성 확보
목적4	생산된 파바톤콩잎의 에스트로겐 대체제로서의 예상가능한 생리활성기능(갱년기, 피부콜라겐합성, 뼈건강, 지방축적)을 과학적으로 규명하고 파바톤콩잎의 새로운 생리활성을 발굴하여 소재의 용도개발 및 부가가치를 높인다.	제품개발위한 생리활성규명
목적5	식물성에스트로겐 고함유콩잎(파바톤콩잎)의 전임상시험(동물시험)결과를 검토하고 핵심 생리활성을 목표점으로 개별인정형 제품개발을 위한 임상시험을 수행한다.	기능성 제품개발
목적6	본 연구에서 설계한 대사체 생산농업의 핵심인자인 식물호르몬인 에틸렌과 식물성 에스트로겐 생합성 관계를 전사인자 및 단백체를 근간으로 생합성경로를 규명한다.	과학적 근거확립
목적7	생산된 파바톤콩잎에 미생물을 이용한 생물전환기술을 적용하여 소재의 가공적성 및 생물학적 활성을 증대시켜 생물소재로서 부가가치를 높인다.	소재이용률 확대
목적8	개발된 대사체 중심농업 기술을 관련업체에 기술이전하고 기술이전된 기술의 산업화를 위한 기반연구를 지원한다.	기술이전 산업화

1-2. 연구개발의 필요성

가. 연구개발의 필요성 및 중요성

(1) 국산 농산물 활용 대사질환 및 갱년기질환 개선 기능성 식·의약 소재 개발이 필요

- 농산물은 기능성 물질을 다량 함유하고 있으나 가공 방법의 제한성 및 활성지표물질의 관계 명확하지 않아 건강기능식품 및 의약품 소재 개발에 한계
 - 기능성 식·의약 소재의 대부분은 해외에서 수입하고 있어 해외 의존도가 심화 우려 제기
 - 관련업계에서는 상품화가 쉽거나, 기반 연구가 다수 진행되어온 일부의 농산물만 이용 또는 상품화 되고있는 실정으로 다양한 농산물로부터 고부가가치 창출이 가능한 연구필요
- 비만은 흔히 만병의 근원이라 표현하는데 지난해 우리 국민 4명 가운데 약 1명은 비만인 것으로 조사되어 심각한 사회문제로 대두
 - 최근 국민건강영양조사에 따르면 20~29세의 초고도 비만율이 1998년도 0.17%에서 2010년 1.63%로 늘어 10배 이상 증가
 - 2011년 우리나라 15~18세 청소년 비만율이 세계 1위를 기록하고 10~14세 소아비만아이들 또한 질병에 시달릴 확률이 미국보다 더 높다는 발표
 - 건강보험공단 건강보험정책연구원은 ‘건강위험요인으로 인한 건강보험 진료비 지출 분석’ 보고서에 흡연·음주·비만에 따른 진료비가 2007년 4조 6,540억원에서 2011년 6조 6,888억원으로 44%가량 급등했다고 했고 과체중 때문에 2011년에 발생한 진료비도 고혈압(36.17%), 당뇨(20.07%), 뇌졸중(12.03%), 허혈성 심장질환(9.22%) 등을 중심으로 2조 6,919억원에 달하며, 이는 2007년 1조 8,971억원보다 41.89% 늘어난 규모라고 보고
- 전 세계적으로 비만 인구가 늘고 있으며 미국과 유럽에서는 비만 인구가 전 국민의 절반을 넘어서며, 중국 및 인도 등에서도 비만 인구가 지속적으로 증가하고 있는 실정
 - 이에 따라 비만치료제 시장도 확장세이며 2011년 약 10억 달러(약 1조 1,180억원) 규모였던 비만치료제 시장이 2018년에는 10배 이상 커진 105억 달러(약 11조 7,000억원)대로 성장할 것이라고 보고
- 만성적인 대사 장애로 인하여 내당능장애(당뇨의 전 단계, 공복 혈당이 100 mg/dL보다 높은 상태), 고혈압, 고지혈증, 비만, 심혈관계 죽상동맥 경화증 등의 여러 가지 질환이 한 개인에게서 한꺼번에 나타나는 것을 ‘대사증후군(metabolic syndrome)’ 이라고 정의

- 대사증후군의 임상적인 중요성은 그 관련인들이 죽상경화증에 의한 문제인 뇌졸중, 심장질환 등, 우리나라의 사망 원인 2,3,4,7,9위를 차지하는 질환들 (2006년 통계청 자료 74,165명)이 포진하고 있다는 점이며 이들을 종합하면 사망 원인 1위인 암(65,909명)을 능가하는 상황임.



[그림] 대사증후군 관련 의료 지출비 및 보도자료

- 제2형 당뇨, 심혈관 질환, 고혈압, 비알콜성지방간, 관절염, 천식과 여러 형태의 암 발병율이 비만 증가율과 유사하게 같이 증가하고 있음은 우려할 만한 사항임.
- 최근 비만 관련 연구에서 비만이 염증유전자 네트워크를 활성화시켜 그 위험성을 증가시키고 있으며 염증이 대사성증후군을 유발하는 원인인자로 지목되고 있음.
- 국민건강보험공단이 30세이상 건강검진 수검자 대상 대사증후군 위험요인 보유자를 분석한 결과 연령이 높아질수록 위험요인을 많이 갖는다고 보고
- 고혈압은 30대가 30.2%였으며 50대 51.7%, 70대 77.9%, 80대는 81.5%가 앓았다고 함.
- 당뇨는 60대 46%, 70대 49%, 80대 50% 위험요인 안고 있음.
- 복부둘레는 50대 39%, 60대 45%, 70대 44% 순



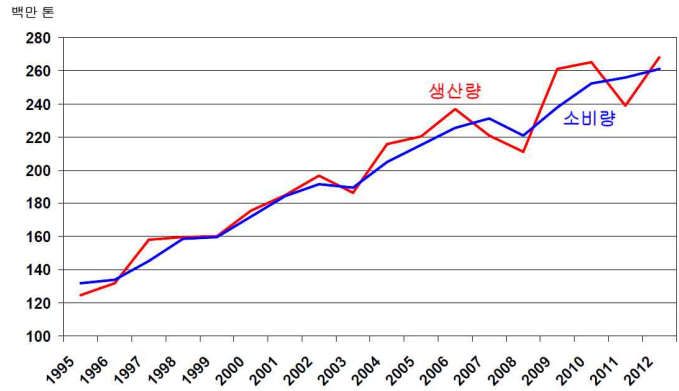
[그림] 연령별 대사증후군 위험요인 보유자 비율
(보건복지부,2010)

- 대사증후군, ‘복부비만’ 이 원인일 것으로 추정하고 있음.
- 우리나라 30세 이상 성인의 30% 이상이 각종 심혈관 질환의 원인이 되는 대사증후군에 걸린 것으로 보고
- 미국의 경우 현재 4,000만명 이상의 성인이 대사증후군에 해당되는 것으로 보고
- 갱년기 증상의 하나로 알려진 ‘대사증후군’ 은 섭취한 영양을 몸에 순환시키는 대사과정에 문제가 생겨 고혈압, 비만, 고지혈증 등의 원인이 되는 상태로 중년 여성들의 20~30%가 영향을 받으며, 심혈관질환과 당뇨병으로의 성장과 관련
- 갱년기 증상 가운데 안면홍조 및 발한 등의 신체증상이 대사증후군과 고중성지방 혈증과 연관성이 있으며 폐경기 여성에서 대사증후군의 발병율이 급증하는 것은 폐경기 전후 호르몬의 급격한 변화가 대사에 문제를 발생시켜 대사증후군 발병율을 높이는 것으로 보고

(2) 두과작물 활용성 증대를 위한 기능성 식의약 소재 및 제품 개발이 필요

- 두과작물 중 콩은 우리가 먹는 곡식 중 유일하게 만주와 한반도 북부 일대를 고향으로 하며 우리 민족의 문화와 밀접한 관계
 - 현재 콩의 가치가 강조되면서 전 세계의 생산과 소비가 모두 지속적으로 증가(그림 1-5)
 - 우리나라에서 콩은 쌀, 밀 다음으로 소비가 많은 곡물이나 75년도에 98%에 이르던 콩 자급률이 지속적으로 떨어져 현재 8.7%에 불과한 실정
 - 세계로 퍼진 콩은 각국 문화에 맞춰 다양한 요리로 변하면서 세계인의 필수 식품으로 정착하고 동양의 된장과 두부뿐 아니라 대두유, 두유 등 건강을 지키는 가공식품으로 사용
- 국내 콩 재배면적은 2012년 81천ha이며 생산량은 약 102천ton임.
 - 국내 콩의 연간 소비량은 약 140만 톤으로 사료용이 96만 톤, 식용은 44만 톤 내외 임 콩 자급률은 1975년도 98% 수준에서 2004년 25% 수준까지 지속적으로 하락
 - 1인당 연간 콩 소비량은 8.0 kg(2009년)으로 쌀과 밀 다음으로 많고 국내생산액은 4,358억원, 2010년 소비형태는 두부용 62.6%, 장류용 21.1%, 두유용 14.4%, 메주용 2.1% 등

- 한편 기존의 치료제(증상완화요법으로는 호르몬 대체요법Hormone replacement therapy)을 꼽을 수 있는데 부작용으로 유방암이 대표적임
 - 콩과 유래 isoflavone은 estrogen receptor에 경쟁적으로 결합하는 특징이 있어서 estrogen이 다할 때에는 이를 막아주고, 모자랄 때에는 비슷한 신호물질로 작용해주는 특징이 있어서, estrogen으로 인한 유방암의 발병을 예방(Stocco et al., 2015, Seidlova-Wuttke et al., 2013, Husain et al., 2015) 세계적으로도 부작용이 있는 HRT 보다도 자연물로 증상완화를 연구하는 추세
- 콩은 이소플라본, 사포닌, 레시틴 등 다양한 기능성 화합물을 지녀 이를 활용한 식·의약 소재로 개발이 활발히 진행중이며, 최근 콩 및 콩성분 기능성연구는 아래와 같음



[그림] 세계 콩 생산 및 소비량 (USDA, 2012)

[표] 최근 콩 및 콩 성분의 기능성 연구 결과

(식품과학회 대두가공이용분과 자료, 2015년)

분 류	성 분	기능성 연구 결과
여성 건강	이소플라본	▶난소암의 발병 위험을 감소
	제니스테인	▶자궁경부암에서 면역 유도효과 ▶폐경 여성의 생활(건강 상태, 삶의 만족도, 우울증) 품질을 향상
뼈 건강	단백질	▶조골세포에서 인슐린 신호 정상화를 통하여 조골세포의 활성 및 분화를 감소시키는 고지방 식이로부터 뼈 손실을 예방 ▶뼈의 회분 및 칼슘 함량에 긍정적 영향을 미쳐 뼈 건강에 유용
	이소플라본	▶골조직 형태학적 매개 변수인 GAGs(뮤코다당류)와 콜라겐 섬유의 함량 증가를 통해 대퇴골의 품질 향상
비만 예방	식이섬유소	▶체중을 줄이고 혈중 콜레스테롤 수준을 낮추는데 도움
	이소플라본	▶체중 및 혈당 조절에 유일한 효과
간 건강	단백질	▶비알콜성 지방간 환자들에게 효과적인 치료식 역할 ▶C형 간염 환자의 건강 관련 삶의 질을 향상
	이소플라본	▶지방간 예방
신장 건강	다이드제인	▶고혈압 전단계 폐경기 여성의 신장 기능 개선
	제니스테인	▶산화 스트레스와 염증 조절을 통해 당뇨병 신장손상 보호
	단백질	▶대두단백질은 유청단백질보다 신장건강에 이로운 단백질 공급원
전립선 건강	이소플라본	▶전립선암 위험의 감소 효과
	배아 분말	▶전립선상피세포의 세포사멸지수 증가, 증식지수 감소
위/장 건강	제니스테인	▶위암 예방
	사포닌	▶대장암 억제
	수용성 다당류	▶인간의 대장암 세포의 사멸 유도
뇌 건강	제니스테인	▶ α -, β -secretase, Protein Kinase C(PKC)의 함량과 활성화에 작용함으로 신경독성에 의한 해마 신경세포를 보호 효과
	사포닌	▶아세틸콜린가수분해효소를 억제하지 않고 스코폴라민에 의한 기억장애 개선
	펩타이드	▶신경 영양인자의 유도에 의한 인지 기능 저하 예방
호흡기·폐 건강	제니스테인	▶소세포폐암에 대한 항암 효과
	루나신(펩타이드)	▶비소세포성 폐암 확산 억제
	청국장	▶천식 억제

- 고도의 경제성장과 의학의 발달에 따른 고령화 및 식생활 패턴의 변화에 의한 성인병(동맥경화, 암, 당뇨병, 치매, 대사증후군) 환자가 증가함에 따라 세계적으로 건강기능성 제품에 대한 관심이 급격히 증가
 - 2011년 세계 건강기능식품 시장규모는 89십억 달러이며, 향후 2016년에는 120십억 달러를 상회할 것으로 예상
 - 미국의 식품분야 동향 조사 전문회사인 Sloan Trends & Solutions에서 세계 400대 식품업체를 대상으로 기능성식품 연구개발 동향을 조사한 결과, 항고혈압, 항비만, 혈당조절, 정신건강, 노인성 질환(치매 등) 예방 및 미용분야의 기능성식품 비중이 높은 것으로 조사
 - 국내의 경우 2013년 건강기능식품 생산실적을 분석한 결과, 총 생산액은 1조 4,820억원으로 2012년(1조 4,091억원)에 비해 5% 증가(식품의약품안전처, 2013년)
 - 개별인정형 건강기능식품의 생산은 2,324억원으로 2012년 1,807억원에 비해 29% 증가
 - 제품별로는 백수오등복합추출물(갱년기 여성 건강)이 전체의 30%(704억원)를 차지하여 가장 많았으며, 헛개나무과병추출분말(간 건강) 23%(541억원), 당귀혼합추출물(면역기능) 14%(314억원), 마태열수추출물(체지방 감소) 10%(229억원) 등의 순
 - 그러나 올해 4월 백수오복합추출물의 이엽우피소 혼입 파동으로 백수오복합추출물 대체 여성 갱년기질환 개선 소재의 필요성이 대두
- ⇒ 콩의 이소플라본은 세계 7대 식·의약소재 중 하나이며, 본 연구진의 분자농법을 통한 개발된 신소재인 Fabaton 콩잎(Non-GMO)은 유효 이소플라본을 함유하고 있으며(그림 1-6 참조), 일반 콩잎은 항비만, 항당뇨 효능을 가지는 cumestan 계열 화합물을 포함하고 있어 본 연구에서는 4년 이내에 이를 베이스로 한 생물전환콩, 돌팔 소재와 혼합하여 대사질환 혹은 갱년기질환 개선 기능성 식·의약 소재 제품화를 통한 사업화가 가능

7대 식의약소재

- Fatty acids
- Polyphenols
- Saponins
- Probiotics/Prebiotics
- Carotenoids
- Dietaryfiber
- **Phytoestrogen**

Soybean



대사질환

심혈관

여성의 난소에서 분비

골격

자궁과 유선의 발육,
여성의 2차 성징 발현,
생리상태,
성주기의 조절,
임신유지에 작용

지방분배

황반(눈)퇴화

피부 및 콜라겐
조직생성

▶ 식의약 소재로 isoflavone 가치

글로벌 식의약소재



이소플라본 고함유 슈퍼콩잎

바이오테크 확보
고시형 활성물질
독점권 확보

Isoflavone

미국 FDA 고시형
한국 KFDA 고시형

- 원재시장: 0.5조
- 제품시장: 2.4조
- 원재: 콩



제품 기능
bone, heart and urinary tract health



1



2



3



4

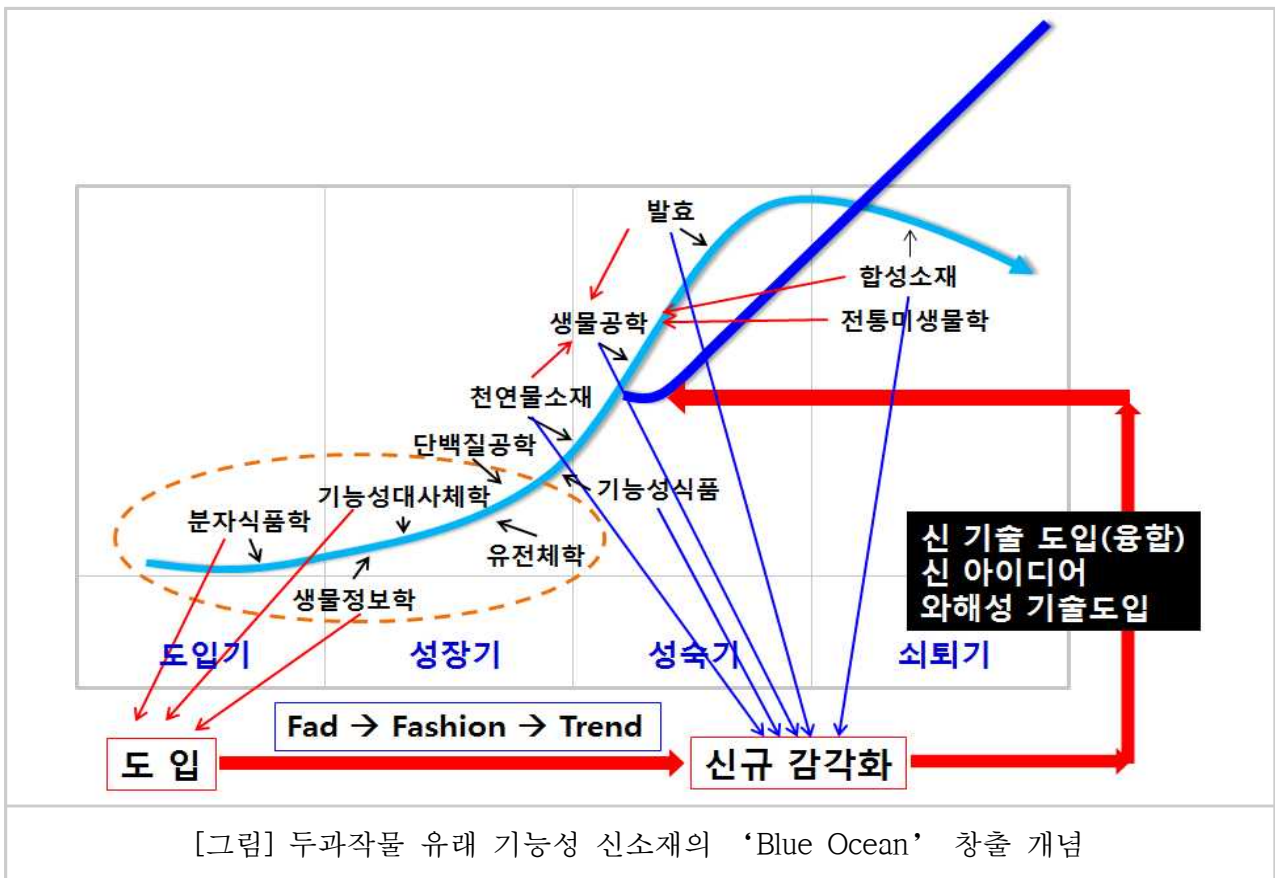
콩(잎)에 존재하는 Dietary Isoflavone

[그림] 이소플라본 고함유 Fabaton 콩잎

(3) 기술융합을 통한 두과작물의 'Blue Ocean' 창출이 필요

- 현재와 같이 먹거리 중심의 농생명산업으로 낮은 성장세(0.5%)가 지속될 경우 2020년에는 국내 총생산(GDP)이 1.2% 수준으로 위축될 전망, 전통산업에서 농생물체로부터 건강기능식품 소재 생산 등 고부가 생물소재산업으로 영역확대가 불가피
- 농생명공학기술은 다양한 농생물소재와 기능성 성분의 다양성, 기술의 복잡성, 투자소요액이 큰 관계로 선진국들이 선점하고 있어 이에 대응할 수 있는 기술개발과 투자가 필요. 특히 기능성물질탐색, 구조 해석, 대량생산기술개발은 고부가가치의 농생물소재 개발에 필수적이며, 최근 들어 신기능 생물활성원천소재에 대한 선진국의 관심도가 급증하고 있으므로 이에 대응한 원천기술개발이 요구
- 세계적으로 생물자원에 대한 관심이 증대되고 자국의 생물자원에 대한 가치를 인식하고 이를 자원화
 - 건강장수 및 웰빙(well-being)과 관련된 천연물 소재 시장의 요구 증가와 더불어 기존 소재(화합물)의 단점을 극복할 수 있을 것으로 기대되는 생물자원 소재에 대한 기대감이 급부상
 - 2010년 10월 일본 나고야에서 열린 제10차 생물다양성협약 당사국총회에서 유전자원 접근 및 이익 공유에 관한 나고야 의정서가 채택되었고 나고야 의정서가 발효되면 협약을 거쳐 원료 원산지 국가에 로열티를 지불
 - 나고야의정서에서 부각된 생물주권경쟁에 대처하고 국내식·의약산업의 글로벌 시장의 독점가치향상을 통한 시장경쟁력 제고를 위해 기능성 소재의 산업화 전략은 필수이며, 이에 독점적 원천 소재 및 기술력 확보가 필요
- 농산물의 부가가치 창출관계를 보게 되면 1세대(원물), 2세대(가공), 3세대(기술융합)으로 갈수록 부가가치를 증대로 인한 국부증대와 농산물소비의 증대를 일으킬 수 있음.
 - 최근 웰빙 열풍으로 미국, 유럽의 경우 지속적인 농산물 소비가 증가 되고 있으며, 특히 항노화 관련 갱년기와 대사증후군이 증가
 - 원물의 경우 해외시장의 경쟁력이 낮지만 3세대인 기술융합형 건강기능식품으로 갈수록 높은 부가가치로 해외 경쟁력이 높다는 점에서 농산부산물 유래 건강기능식품의 해외 수출 가능성은 매우 높다고 판단
- 생물전환기술(bioconversion 또는 biotransformation)이란 생체의 기능, 또는 생체가 가지고 있는 생촉매의 기능을 이용하여 새로운 신생물 제품을 생산하거나, 기존 화학합성 공정에 의해 합성 및 생산되고 있는 기존 화학제품을 신생물 제품으로 대체하고자 하는 기술
 - 이 기술은 인간과 환경을 고려한 신기술, 대체기술 및 청정기술을 의미
 - 생물전환기술은 여러 분야에서 폭넓게 이용되고 있는데, 유해한 물질을 비독성 물질로 바꾸는 생물학적 교정(bioremediation), 정밀 화학품 제조, 식품가공 및 의약품 생산 등이 주요 응용분야
 - 현재 제1세부에서 확보한 이소플라본 10배 강화 슈퍼콩잎과 탈지대두에는 비배당체 형태로 isoflavone이 약 95% 차지, 현재 식품의약품처 기능성원료 등록에는 빠 건강 도움 원료로 비배당체 이소플라본(daidzein, glycitein, genistein 합) 함량 일일 섭취량 24~27 mg으로 설정하고 있어 생물전환 이용 비배당체 이소플라본 강화 연구가 필요

- 갱년기와 대사증후군에 대한 관심증가는 농산물에 대한 관심증가로 이루어 지고 있으며, 소비 역시 지속적인 증가 상태
 - 외식문화의 발달로 인하여 농산물의 섭취에는 한계가 있으며, 특히 농산부산물에 대한 소비 형태는 사료 이외에는 거의 전무하여 새로운 부가가치 창출이 미흡
 - 한국과 유럽의 식습관 차이는 한국의 경우 영양성분의 대부분을 식재료에서 얻다 보니 영양 균형적 식단 구성이 우선이며, 유럽의 경우 식재료는 칼로리 보충 수단으로 인식하고 생활에 필요한 영양성분을 별도의 영양제로 섭취하는 것으로 생각
 - 특히 육류 위주의 고단백, 고지방식단으로 인하여 대사증후군(비만)이 급속도로 증가되고 있는 시점에서, 누구나 쉽게 접할 수 있는 원료 단가가 저렴한 농산부산물 활용 갱년기 및 대사증후군 개선 건강기능식품 및 이너뷰티(먹는 화장품)의 개발이 필요하며 이를 통해 소비자의 접근성을 높일 필요가 있음.
- ⇒ 분자식품학, 유전체학, 단백질공학 및 기능성 대사체학 등의 신기술과 천연물화학, 전통미생물학, 발효학 및 생물공정학 등의 전통기술을 접목하여 대사질환 및 갱년기질환 개선 두과작물 유래 기능성 소재(건강기능식품 및 의약품)의 제품화 기술 개발과 상품화를 통하여 두과작물 활용성 증대를 통해 식품산업의 새로운 ‘Blue Ocean’ 을 창출할 수 있음



나. 국내외 연구동향

(1) 두과작물 기능성 연구 동향

- 국가과학기술지식정보서비스(NITS)와 농림수산식품 연구개발사업 통합정보서비스(FRIS)에서 최근 10년간 두(콩)과 작물 key-words로 검색한 결과 두(콩)과작물 이용 다양한 연구들이 수행
 - 전통적으로 콩의 이소플라본은 식물성에스트로젠으로 알려져 있어 갱년기질환 개선 건강기능식품으로 인정
 - 최근 콩, 콩발효물, 돌팔 등 이용 혈전용해, 체지방 감소, 대사질환 개선 및 인지능 개선 연구가 진행
 - 그러나 대부분 콩 종자에 초점이 맞추어져 연구가 진행되고 있으며, 콩잎에 대한 연구는 본 연구팀과 일부 연구자들에 의해서만 진행되고 있으며, 생물전환의 경우에는 나토균을 이용한 콩발효물(혈전용해)에 국한되어 있는 실정
 - 돌팔의 경우 혈당 개선, 체지방 개선에 대한 연구가 진행
- 두과작물을 활용한 제품은 대부분 장류 제품이며, 일부 필수아미노산 제제, 콩 유래 이소플라본 함유 건강기능식품이 제조·판매
 - 필수아미노산 제품 : 대두추출물+효모추출물 등의 복합물
 - 갱년기개선(뼈 건강) 제품 : 이소플라본 함유 대두추출물 혹은 발효물
 - 혈행개선 제품 : 대두 레시틴 함유물 혹은 *Bacillus natto* 콩발효추출물



[그림] 콩 유래 건강기능식품 제품 현황

(2) 국내 건강기능식품 동향

○ 국내 제품생산 및 시장 현황

- 식품의약품안전처는 2013년 건강기능식품 생산실적을 분석한 결과, 총 생산액은 1조 4,820억원으로 2012년(1조 4,091억원)에 비해 5% 증가로 나타났다고 발표
- 지난해 성장은 새로운 기능성 원료를 사용한 ‘개별인정형 제품’ (전년대비 29% 증가)과 프로바이오틱스 제품(전년대비 55% 증가)이 주도
 - ※ 개별인정형: 고시된 품목 이외에 안전성, 기능성을 개별로 인정받은 원료로 제조한 건강기능식품(백수오등복합추출물, 당귀혼합추출물 등)
 - ※ 프로바이오틱스: 유산균을 주원료로 사용하여 배변활동에 도움을 주는 기능성을 가진 건강기능식품
- 또한 2013년 국내 건강기능식품 시장규모는 1조 7,920억원으로 조사되어 2009년 이후 지속적인 성장세를 유지
 - ※ 국내 시장규모(억원): 11,600(2009) → 12,804(2010) → 16,855(2011) → 17,039(2012) → 17,920(2013)
 - ※ 수출: 754억원으로 2012년(584억원)보다 29% 증가했으며, 수입도 3,854억원으로 2012년(3,532억원)보다 9% 증가
- ⇒ 2013년 건강기능식품 생산은 국내외 경기침체에도 건강에 대한 관심이 높아지면서 새로운 기능성을 찾는 다양한 계층의 소비자 욕구가 반영되어 성장세가 지속되는 것으로 분석

[표] 건강기능식품 생산실적 현황(2009~2013)

(13.12.31.기준, 출처: 식약처)

구분	총 생산액 (억원)	총 생산량 (톤)	내수용		수출용	
			생산액(억원)	생산량(톤)	생산액(억원)*	생산량(톤)
‘09년	9,598	19,885	9,184	19,293	415	592
‘10년	10,671	25,361	10,211	24,994	460	367
‘11년	13,682	40,258	13,126	39,611	556	647
‘12년	14,091	34,599	13,507	33,735	584	864
‘13년	14,820	31,446	14,066	30,490	754	956
증감률 (‘13/‘12, %)	△5.2	△9.1	△4.1	△9.6	△29.1	△10.6

* 1\$ = 1,095원(‘13년)

○ 개별인정형 건강기능식품 지속 성장

- 지난해 개별인정형 건강기능식품의 생산은 2,324억원으로 2012년 1,807억원에 비해 29% 증가
 - ※ 개별인정형 생산액(%는 전년대비 증가율): (2011) 1,435억원(27%) → (2012) 1,807억원(26%) → (2013) 2,324억원(29%)
- 기능성별로는 면역기능 개선 관련 제품의 점유율이 25%로 가장 높았고, 혈행개선(22%), 항산화(21%), 영양소 보충(7%), 장 건강(5%) 제품 순
- 제품별로는 백수오등복합추출물(갱년기 여성 건강)이 전체의 30%(704억원)를 차지하여 가장 많았으며, 헛개나무과병추출분말(간 건강) 23%(541억원), 당귀혼합추출물(면역기능) 14%(314억원), 마태열수추출물(체지방 감소) 10%(229억원) 등의 순

- 또한, 지난해 가장 높은 성장세를 보인 제품은 백수오등복합추출물 제품으로 604%(100억원→704억원)였으며, 마테열수추출물 56%(147억원→229억원), 초록입홍합추출오일 29%(28억원→36억원) 등의 순

※ 특히 백수오등복합추출물 제품은 중년 여성의 자기 건강관리에 대한 관심과 중요성이 크게 부각되어 관련제품의 생산이 급증한 것으로 풀이

○ 건강기능식품 수입 현황

- 지난 해 건강기능식품 수입액은 3,854억원으로 전년(3,532억원) 대비 9% 증가

※ 수입액(%는 전년대비 증가율): (2011) 3,729억원(44%) → (2012) 3,532억원(△5%) → (2013) 3,854억원(9%)

- 비타민·무기질 제품이 1,640억원으로 전체 수입액의 43%로 점유율이 가장 높았으며, 오메가-3지방산함유유지 제품 15%(586억원), 개별인정형 제품 6%(213억원) 순

- 나라별로는 미국이 2,624억원으로 전체의 68%로 점유율이 가장 높았으며, 미국, 캐나다, 호주, 독일, 중국 등 수입 상위 5개국 이 전체 수입액의 85%를 차지하는 것으로 분석

⇒ 식약처는 고령화와 소득수준 향상으로 건강기능식품의 꾸준한 성장세가 이어질 것이라며, 신규 기능성 평가 체계 마련 및 기능성 원료 개발 기술지원 등을 통해 건강기능식품의 안전성과 기능성 관리 강화에 주력해 나갈 방침이라고 설명

[표] 개별인정형 원료별 건강기능식품 생산실적

('13.12.31.기준, 출처: 식약처)

순위	구분	총 생산액(억원)						증감률 ('13/ 12, %)
		'11년	점유율(%)	'12년	점유율(%)	'13년	점유율(%)	
	계	1,435	100	1,807	100	2,324	100	28.6
1	백수오등복합추출물	40	2.8	100	5.5	704	30.3	604.0
2	헛개나무과병추출분말	349	24.3	502	27.8	541	23.3	7.8
3	당귀혼합추출물	140	9.8	245	13.6	314	13.5	28.2
4	마테열수추출물	4	0.3	147	8.1	229	9.9	55.8
5	돌외잎추출분말	-	-	-	-	63	2.7	-
6	히알uron산나트륨	71	4.9	41	2.3	48	2.1	17.1
7	초록입홍합추출오일	29	2.0	28	1.5	36	1.5	28.6
8	대두배아열수추출물등 복합물	-	-	61	3.4	27	1.2	△55.7
9	사탕수수왁스알코올	23	1.6	19	1.1	23	1.0	21.1
10	알로에추출물	29	2.0	21	1.2	22	0.9	4.8
	소계	685	47.7	1,164	64.5	2,007	86.4	72.4
11	기타	750	52.3	643	35.5	317	13.6	△50.7

[표] 품목별 생산실적 현황

('13.12.31.기준, 출처: 식약처)

순위	구분	총 생산액(억원)						증감률 (2013/ 2012, %)
		2011년	점유율(%)	2012년	점유율(%)	2013년	점유율(%)	
	계	13,682	100	14,091	100	14,820	100	5.2
1	홍삼	7,191	52.6	6,484	46.0	5,869	39.6	△9.5
2	개별인정형	1,435	10.5	1,807	12.8	2,324	15.7	28.6
3	비타민·무기질	1,561	11.4	1,646	11.7	1,747	11.8	6.1
4	프로바이오틱스	405	3.0	518	3.7	804	5.4	55.2
5	알로에	692	5.1	687	4.9	628	4.2	△8.6
	누계(5품목)	11,284	82.5	11,142	79.1	11,372	76.7	2.1
6	가르시니아캄보지아 추출물	207	1.5	440	3.1	541	3.7	23.0
7	오메가-3지방산 함유유지	509	3.7	497	3.5	490	3.3	△1.4
8	인삼	381	2.8	450	3.2	466	3.1	3.6
9	밀크씨슬(카르두스 마리아누스)추출물	138	1.0	135	1.0	308	2.1	128.1
10	감마-리놀렌산 함유유지	224	1.6	152	1.1	186	1.3	22.4
	누계(10품목)	12,743	93.1	12,816	91.0	13,363	90.2	4.3
11	기타 품목	939	6.9	1,275	9.0	1,457	9.8	14.3

[표] 품목별 건강기능식품 수입현황

('13.12.31.기준, 출처: 식약처)

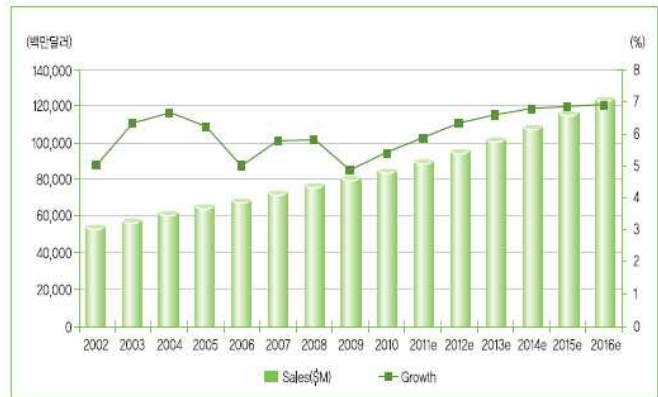
순위	품목유형	수입액(억원)		수입량(톤)	
			점유율(%)		점유율(%)
	계	3,854	100	9,377	100
1	비타민·무기질	1,640	42.5	3,401	36.2
2	오메가-3지방산함유유지	586	15.2	1,423	15.2
3	개별인정형	213	5.5	237	2.5
4	단백질	202	5.2	1,462	15.6
5	프로바이오틱스	187	4.9	74	0.8
	누계(5품목)	2,828	73.3	6,597	70.3
6	알로에	143	3.7	212	2.3
7	감마-리놀렌산함유유지	97	2.5	240	2.6
8	식이섬유	85	2.2	329	3.5
9	공액리놀레산	73	1.9	172	1.8
10	가르시니아캄보지아추출물	71	1.8	262	2.8
	누계(10품목)	3,298	85.3	7,812	83.3
11	기타	556	14.7	1,565	16.7

(3) 국외 건강기능식품 동향

- 세계적인 웰빙 트렌드의 확산과 고령화의 영향으로 건강기능식품이 포함된 Nutrition Industry의 시장규모는 최근 5년간 연평균 6% 수준의 고성장세를 지속
 - DataMonitor의 자료(2011)에서 글로벌 식품산업의 최근 5년간 연평균 성장률이 3.7%임을 감안할 때, 건강기능식품 시장의 성장세는 상당히 높음
 - 또한 최근 중국, 인도, 라틴아메리카 등 신흥개발국의 경제성장과 함께 수요가 크게 증가하는 추세이기 때문에 높은 잠재력을 지닌 시장으로 평가
- 건기식시장의 성장세는 ‘건강지향적소비자’의 증가에 따라 지속·확대될 것으로 예상
 - Datamonitor(2011)의 조사에 의하면, 소비자의 약 60%는 평소에 건강에 대한 관심이 매우 높았으며, 미국의 Food Marketing Institute의 조사에서는 소비자의 65%가 음식 섭취를 통해 건강 상태를 조절하는 특성
 - 또한 국내 소비자들도 건강관리의 수단으로 식사 조절이나 영양제의 섭취 등 식품에 관련된 응답이 높게 나타나고 있어, 개인의 건강관리 방법으로 건강기능식품이 중요한 역할을 담당하고 있는 것으로 파악

○ 2011 세계건강기능식품 시장규모는 89십억달러, 향후 2016년 120십억달러를 상회할 것

- 특히 개발도상국에서의 성장률이 향후 2016년까지 약 12%의 수준을 유지할 것으로 예상된 반면 선진국들은 약 3%의 낮은 성장률을 유지할 것으로, 향후 세계 건강기능식품 시장은 이들 개도국에 의해 주도될 것
- 이러한 개도국과 선진국간의 성장률 차이는 건강기능식품의 수요가 인구구조나 소득의 요인에 많은 영향을 받는 특성에 기인한 것이며, GDP 성장률이 상대적으로 높고 고령화가 진행되고 있는 개도국 추세 반영



[그림] 건강기능식품 세계시장 규모 및 성장률
(자료 : Nutrition Business Journal Estimates, 2011년)

- 국가지역별 2011년 매출액을 살펴보면 미국이 29,242백만달러로 가장 높으며, 2위는 서유럽이 15,657백만달러로 나타남
 - 미국은 2010년(28,066백만달러)대비 4.2% 성장한 29,242백만달러로 세계시장에서 가장 큰 건강기능식품 시장을 차지
 - 아시아 시장을 살펴보면 중국이 10,639백만달러로 가장 큰 시장을 나타내고 있으며, 전년대비(2010년, 9,540백만달러) 성장률은 11.5%로 급속한 성장세를 나타내고 있음
- Vitamins & Minerals의 시장규모가 가장 크며, 최근Sports nutrition이 시장성장을 주도
 - 건강기능식품의 대표상품으로 이미 소비자들에게 깊게 인식된 Vitamins & Mineral의 2011년 시장규모는 36십억달러이며 전년대비 5.3%의 성장률을 기록
 - 또한 최근 건강에 대한 소비자들의 관심이 체중 조절과 체력 향상을 돕는 Performance enhancers, Muscle builders, Weight gainers 등 건강 증진용 제품의 판매확대로 연결되면서 Sports nutrition 시장의 최근 5년간 연평균 성장률이 가장 높은 6.2%를 기록

(4) 천연물의약품 및 대사성 질환 관련 기술 및 시장동향

- 전 세계적으로 천연물의약품을 신약개발의 새로운 파이프라인으로 추진하는 전략을 세움
 - 실제로 2006년 미국 FDA에서는 녹차추출물인 Veregen이라는 천연물신약(Botanical Drug)을 치료제로써 승인을 하게 되었고, 이를 시작으로 본격적인 천연물의약품시대를 열어가고 있는 상황
 - 특히 발병 후의 치료보다는 예방, 장기간 투여에 따른 안전성 확보, 삶의 질 향상에 대한 기대치가 높아진 점도 천연물신약을 선택하게 하는 중요한 요인
 - 각국의 기술동향
 - 미국: 3,390종의 식물로부터 114,000개 추출물을 대상으로 항암제 개발 등
 - 유럽(EU): 은행잎의 ginkgo-flavonoid 성분을 혈액순환장애 치료제 개발 등
 - ※ 독일: 위장질환 치료제 Iberogast는 이베리스, 당귀, 백굴채, 감초 등 9가지 생약으로 이루어진 복합 천연제제
 - 중국: 심뇌혈관질환 치료제인 복방단삼적환(复方丹参滴丸)과 행령과립(杏靈顆粒) 개발 등
 - 일본: 고품질 한약제제(kampo) 129종의 전문의약품을 생산
 - 인도: 약초약물을 대상으로 골관절염, 당뇨 치료제 등 개발에서 임상 3단계 진입
 - 한국: 2010년까지 총 11종의 천연물의약품이 승인, 그 중에서 2종은 천연물신약
2011년 3건의 천연물신약(신바로캡슐, 시네츄라, 모리리톤정)이 식약청의 승인
- 한국 국적의 특허출원인은 천연물신약 분야에서 중국, 일본에 이어 3위를 차지
 - 국적별 출원건수('06~'10)는 중국 7,223건, 일본 1,033건, 한국 338건 순이다. 특허의 분포를 보면 식물 유래의 소화기 및 내분비/대사질환을 타겟으로 많은 특허가 출원
 - 천연물 유래별 분석: 식물(97%), 동물(2%), 미생물(1%)
 - 타겟 질환별 분석: 소화기(19%), 내분비/대사(12%), 심혈관(9%)
- 논문의 경우, 식물 기원의 천연물 연구 및 천연물의 생리활성 연구가 전 세계적으로 가장 활발한 가운데 한국은 세계에서 4번째로 많은 논문을 발표
 - 국가별 천연물 관련 국제저널 논문건수('06~'10): 중국(2,495편), 일본(1,575편), 미국(1,107편), 한국(698편)
 - 국제저널 분석: 천연물 생리활성 관련(49.6%), 신규물질 발굴(27.8%), 천연물에 대한 정량, 정성 분석(23.2%)
- 대사성 질환 기술 동향
 - 국외 기술 동향
 - 당뇨병 치료제 분야의 동향: Novo Nordisk가 2010년 79억달러의 매출로 전세계 항당뇨 시장을 주도하고 있으며, 주요 5개사가 전세계 시장의 77.8%를 장악
 - 비만 치료제 분야의 동향: 비만 치료제는 높은 성장 잠재력에도 불구하고 신약 승인의 어려움으로 최근 R&D의 어려움을 겪고 있는 분야
 - 국내 기술 동향
 - 당뇨병 치료제 분야의 동향: TARGET VALIDATION 경험부족 등으로 새로운 표적유래 약물 개발성공사례가 없는 실정
 - 비만 치료제 분야의 동향: LG생명과학 등과 국외 대학과 비만 치료제 공동개발 체결하여 현재 일부 임상실험 진행 중

1-3. 연구개발 범위

가. 1차년도 (2015.7~2016.6)

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1 차 년 도	2015.7 ~ 2016.6	○ 제1세부과제 : 두과작물에서 기능성 생물소재 생산 및 표준화 기술	
		기능성 Fabaton 콩잎 소재의 산업화 기반 연구*	<ul style="list-style-type: none"> - 식물성 에스트로젠 고함유 콩잎생산 기술 확보 (Phenomix-α의 최적화: 분자농법) - 재배환경별 최적 Fabaton 콩잎 생산 기술 확립 (토양조건별, 광도 및 일조시간, 처리시기별) - Fabaton 콩잎의 Biomass 최적화 확립 - 품종별 활성지표물질 평가 - Cumestan 고함유 콩잎 생산을 위한 생육시기별 대사체 분석
		생물전환공정 기반 기능성 콩 소재의 산업화 기반 연구	<ul style="list-style-type: none"> - 생물전환용 미생물(기 확보 포함) 선발 및 동정 - 생물전환용 미생물로부터 효소자원 확보 - 미생물 처리별 발효양상 확인: 이화학적 특성 등 - 발효물의 유효성분 변화 양상 확인 - 콩잎복합추출물의 비율별 제조: <i>In vitro</i> 생리활성 확인
		돌팔 생물소재의 산업화 기반 연구*	<ul style="list-style-type: none"> - 돌팔 분획물의 활성탐색 연구 - 간기능 개선 활성물질의 분리 연구 - 간기능 개선 활성물질의 구조분석 연구 - 돌팔에서 간기능 개선 활성물질 최적 가공조건 확립 - 제1협동 대량추출물의 활성물질 조사
		○ 제2세부과제 : 두과작물 유래 기능성 소재의 전임상 및 임상 효능평가	
		Fabaton 콩잎 유래 기능소재의 전임상시험 효능평가	<ul style="list-style-type: none"> • Fabaton 콩잎의 세포주 및 동물모델에서 안전성 평가 및 전임상 효능시험 <ul style="list-style-type: none"> - HepG2 간세포주 처리에 따른 세포독성 평가 및 동물투여량 결정 - 3T3L1세포주 mRNA, 단백질 발현분석을 통해 항비만작용기전 규명 - 섬유모세포주 및 동물세포 이용 콜라겐 합성량 측정 • 동물모델에서 Fabaton 콩잎의 효능 평가 <ul style="list-style-type: none"> - AOF, OVX 동물모델에서 Fabaton 콩잎소재의 투여에 따른 혈행지표(LH, FSH, TG, LDL 지질대사 관련 지표) 개선효능 평가 - AOF, OVX 동물조직을 추출하여 ACC(Acetyl CoA Carboxylase), Aconitase, UCP, acyl-CoA dehydrogenase, adiponectin, Leptin, AMPK 등을 조사하여 어느 단계에서 지방대사를 조절하는지 효과입증 - Fabaton 콩잎의 투여에 따른 골흡수 및 골형성 지표, 칼슘대사 및 호르몬 분비 등의 바이오마커 측정 • HepG2 간세포주 이용 콩잎복합추출물(돌팔/생물전환 콩+α)의 지방간 개선 최적 조건 탐색
○ 제1협동과제 : 두과작물 이용 건강기능식품 제조공정 확립 및 제품화 기술			
콩잎 추출물 원료 제조공정 표준화	<ul style="list-style-type: none"> - 콩잎으로부터 기능/지표성분 고효율 pilot 및 대량추출 조건 확립(1세부와 공조) - 콩잎 추출물의 분말화 조건 확립 - 콩잎의 기능/지표성분 설정(1세부와 공조) - 콩잎 추출물의 기능/지표성분 기준시험법 확립 (1세부와 공조) 		

*1년차 - 2년차 동일

1. 콩은 재배기간이 파종 후 90~100일 소요되므로 Field(노지) 실험은 년 1회 가능하고, 하우스 실험의 경우 2회 가능하므로 1년차, 2년차에 유사한 분자농법을 위한 재배실험을 수행함
2. 돌팔은 선행연구에서 활성은 검증되었지만 활성지표물질 규명 연구는 1년차 및 2년차에 수행함

나. 2차년도 (2016.7~2017.6)

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
2 차 년 도	2016.7 ~ 2017.6	○ 제1세부과제 : Fabaton 콩잎에서 기능성 생물소재 생산 및 표준화 기술	
		Fabaton 콩잎 생물소재 표준화 연구	- 식물성 에스트로젠 고함유 Fabaton 콩잎 생산 (4000평(12560m ²) 재배, 건조중량으로 500kg 이상 확보) - 준비된 Fabaton 콩잎을 이용한 표준화 (GLP 규격을 갖춘 식약처 인정업체 선발 및 표준화)
		Fabaton 콩잎 생물소재 생산 관련 대농민 기술 이전	- 대량생산을 위한 Phenomix- α (유도제) 최적화 - 경제성 있는 콩잎 수리 및 건조 방법 최적화 (콩잎을 먼저 따서 건조하는 방법은 생산비 너무 높음)
		Fabaton 콩잎의 대사체 연구 (새로운 가치 창출)	- 1년차 확보된 대사체를 기반으로 대사체 분석 - Fabaton 콩잎의 또다른 활성대사체인 아미노산 분석 - 생육후기에 만들어지는 cumestan 생산 연구
		생물전환공정을 이용한 Fabaton 콩잎 및 콩의 기능성 연구	- 유산균으로부터 생물전환효소 확인 - 유산균 단독 혹은 복합종균(2-3종)에 따른 콩(잎)의 최적조건 확인 - 발효 중 유효성분 분석 및 <i>in vitro</i> 생리활성 확인
		○ 제2세부과제 : Fabaton 콩잎 생물소재의 전임상 및 임상효능평가	
		Fabaton 콩잎 기능성 소재의 임상시험 준비	- 임상시험 설계 및 승인 획득 - 갱년기 장애 증상이 시작되어 병원을 방문하였으나, 호르몬대체요법을 받기를 원하지 않는 환자를 대상으로, Fabaton 콩잎추출물을 투여하여 효능 평가 - 대조군, 투약군, 위약-투약군 - 분석항목의 설정과 설계 - Fabaton 콩잎소재 시제품에 대한 임상연계 유효성평가
		○ 제1협동과제 : Fabaton 콩잎 생물소재의 일반식품 제품개발 및 건강기능식품 제형연구	
		콩잎추출물의 기준규격 및 유통기한 설정	- 성상, 기능/지표성분 함량, 유해물질(납, 카드뮴, 총비소, 총수은, 대장균군, 세균군), 잔류용매, 잔류농약 등 기준 설정 - 콩잎추출물 원료의 유통기한 설정을 위한 가속 및 장기 보존시험 진행
		콩잎추출물의 제형화 연구	- 콩잎 추출물의 제형화를 위한 formulation 결정 - 시제품 제조 및 제품 유통기한 설정
콩잎/복합추출물의 제조공정표준화	- 콩잎 복합 비율별 기능/지표성분 고효율 pilot 및 대량 추출조건 확립(1세부와 공조) - 콩잎 복합추출물의 분말화 조건 확립 - 콩잎 복합추출물의 기능/지표성분 설정(1세부와 공조)		

* 세부연구목표 변경사항

변경항목	변경이유
• 돌팔 생물소재 관련 연구	- 1년차 동물실험(제2세부과제 결과 참조)에서 Fabaton 콩잎 추출물이 여성호르몬 불균형에서 오는 지방간, 복부비만, 체중감소효과가 돌팔 추출물 결과 보다 탁월함이 관찰됨. - 계획시 지방간, 복부비만, 체중감소를 위한 부재료로 돌팔을 연구 생물소재로 생각했으나 역할의 중요도가 낮아짐. - 또한, 새롭게 발표된 갱년기용 식의약 소재 가이드라인에 보다 많은 항목의 동물실험을 요구함으로 Fabaton 콩잎에 집중하는 것이 수월성이 있다고 판단. - 보다 중요하게는 Fabaton 콩잎 추출물 단독으로 개별신청예정

다. 3차년도 (2017.8~2018.8)

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
3 차 년 도	2017.8 ~ 2018.8	○ 제1세부과제 : Fabaton 콩잎에서 기능성 생물소재 생산 및 표준화 기술	
		Fabaton 콩잎 생물소재 표준화 연구	- Fabaton 콩잎을 이용한 표준화 (GLP규격) 및 자료 확보 - 개발된 개별제품의 활성지표평가 (기술이전업체요구)
		Fabaton 콩잎 생물소재 생산	- 대량생산을 위한 최적화연구 (계속) - Fabaton 콩잎 생물소재 확보
		Fabaton 콩잎의 기능보강제 발굴 및 활성연구	- 선발된 천근발 (<i>Flemingia philippinensis</i>) 성분 연구 - 천근발 활성대사체의 활성평가
		Fabaton 콩잎 기반 기호성 개선 가공기술을 통한 제품화 기술 개발 (I)	- 기호성 개선을 위한 Fabaton 콩잎에 적합 부재료 선정을 통한 제형과 제품 개발 : → 부재료 혼합과 발효공정 기반을 통한 분말제, 과립제 혹은 캡슐제 제조 기술 - 선발 유산균 이용 기호성 개선 액상차 혹은 음료 가공 기술 개발 : → 부재료 혼합과 발효공정 기반 액상차 혹은 음료류 제품 제조 기술 - 참여기업체 및 타 기업체 기술이전 모색 : 1건 이상
		○ 제2세부과제 : Fabaton 콩잎 생물소재의 전임상 및 임상효능평가	
		Fabaton 콩잎 임상시험	- 국립한의학임상연구센터에 의뢰하여 그룹당 n수 50으로 3개월간 임상실험
		Fabaton 콩잎 추출물의 표준화 시료에 대한 in vitro test 보강	- 신경세포에서 에스트로겐 수용체 발현변화 조사 - 지방세포에서 에스트로겐 수용체 발현변화 조사 - 혈관내피세포 NO(nitric oxide) synthase 발현변화조사
		Fabaton 콩잎 추출물의 in vivo test 보강	- mouse에서 임상실험농도인 배당체 30 mg/day이 동일한 효과를 발휘하는지 검사 - 1년차 실험과는 다른 종으로 간세포에서 에스트로겐 수용체의 발현변화 조사
		○ 제1협동과제 : Fabaton 콩잎 이용 건강기능식품 제조공정 확립 및 제품화	
		콩잎 추출물 일반제품 시제품 개발 및 안정성 시험	- 제형 연구를 통해 적용된 콩잎 추출물의 일반식품 시제품 생산 - 콩잎 추출물 시제품의 안정성 시험 수행 (6개월 이상의 안정성 시험 수행)
		콩잎 추출물 일반제품 품질 관리(QC)시험법 확립	- 콩잎 추출물 시제품의 영양 성분 분석, 유해물질(납, 카드뮴, 총비소, 총수은, 대장균군 등)등의 분석 시스템 확립
		콩잎 추출물의 건강기능식품 제형 연구	- 콩잎 추출물의 섭취가 쉽고 안정성이 뛰어난 제형 연구 - 분말, 경질 캡셀, 연질 캡셀, 정제 등 다양한 제형 적용 연구
		콩잎 추출물의 건강기능식품 시제품 생산	- 콩잎 추출물의 섭취가 쉽고 안정성이 뛰어난 제형 연구 - 분말, 정제, 경질 및 연질 캡셀 등 다양한 제형 검토 - 콩잎 추출물 시제품의 안정성 시험 (6개월 이상의 안정성 시험 수행)

2. 연구수행 내용 및 결과

2-1. 총괄추진체계

가. 연구개발의 추진전략

- FTA, 나고야 의정서 체결 등으로 국내제품 원가상승 요인 발생이 되고 있음.
 - 한-미, 한-중 FTA 체결, 생물다양성협약 제10차 ‘유전자원 접근 및 이익분배(ABS)에 관한 나고야 의정서’ 채택 등으로 국내 농·식품산업은 아주 큰 피해산업으로 분류
 - 이에 대한 국가 차원의 대응방안이 필요한 시점에 창조경제 실현을 위한 항노화산업 및 농업6차산업화와 ‘Golden seed project’ 를 국가 정책으로 진행하고 있음.
 - 본 주관책임자가 확보한 Fabaton 콩잎의 경우 국제적 경쟁력이 있는 독점적 원천 두과 작물 기능성 소재로서 자리매김 할 수 있으며, 이를 기반으로 다양한 두과 작물 활용 건강기능성 제품화가 가능함.
- 두과작물은 다양한 생리활성을 지닌 이소플라본, 사포닌 등의 기능성 화합물들이 풍부함
 - 특히 Fabaton 콩잎은 식물체 중 이소플라본 함량은 최고이며, 콩잎은 cumestan 계열의 polyphenol성 화합물이 풍부함.
 - 생물전환기술 이용 두과작물의 전구체를 활용하여 기능성고시원료 물질 개발이 가능함
- 본 연구 전략은 대학, 건강기능식품 전문제조기업, 농가 계약재배 기업 및 연구소 산·학·연 구성으로 이들 기관의 긴밀한 협조관계를 통해 연구를 추진하고자 함.



[그림] 본 연구의 추진전략

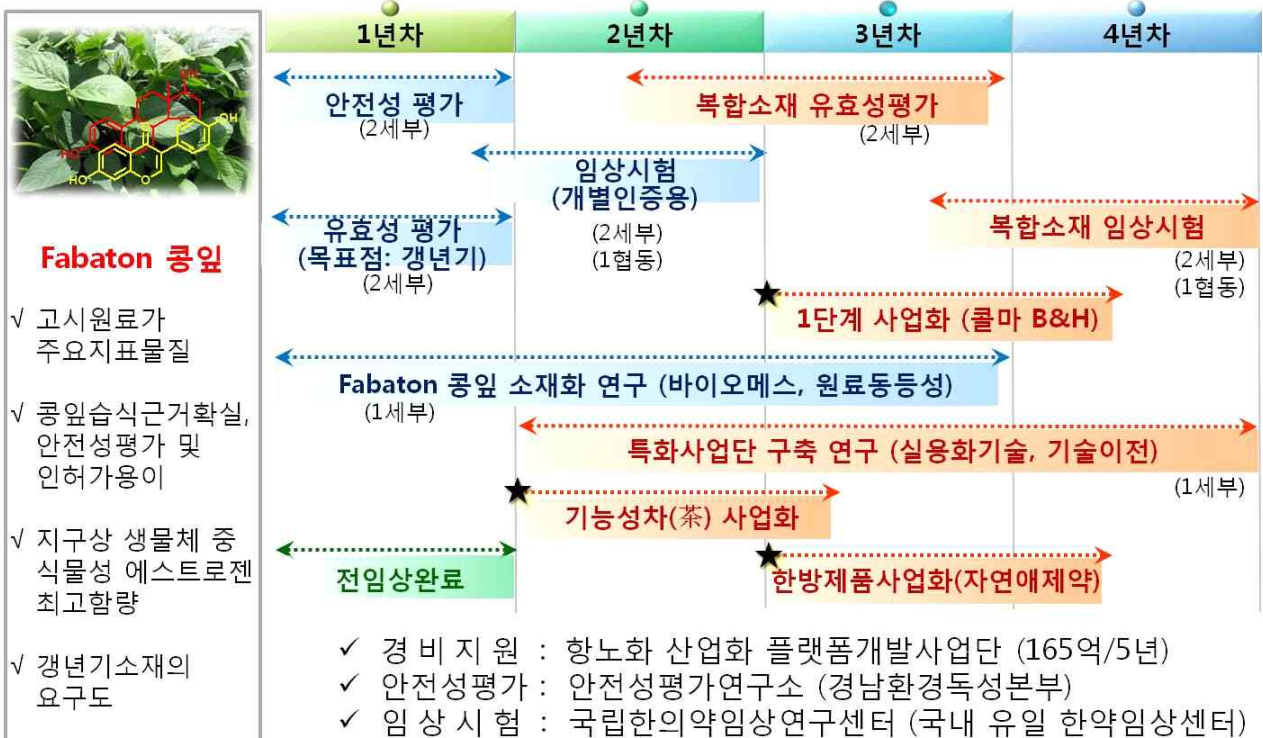
- 주관기관(대학+기업) :

- 제1세부과제 : 주관책임자가 보유하고 있는 독점적 원천생물소재(가치기술 약 15억원)인 Fabaton 콩잎의 대량 확보 기술과 두과 작물(생물전환 콩, 돌팔)의 기능성 탐색을 진행하고 최종 혹은 대사성질환 및 갱년기질환 개선 제품화 제조기술 개발을 목표로 진행
- 제1세부참여과제 : 생물전환공정 기능성 소재 강화의 원천 핵심기술을 보유하고 있어 본 핵심기술 이용 Fabaton 콩잎, 생물전환 콩, 돌팔 및 복합물의 활성강화와 이를 토대로

기능성 발효식품 제조기술 개발을 목표로 진행

- 제1세부참여기업 : 참여기업 두 곳은 건강기능식품 및 곡물관련 가공식품 전문제조업체이며, 특히 농가 직접 계약재배를 통한 원료 수급이 가능한 기업임.
- 제2세부과제 : 지난 10년간 구축한 뇌·심혈관질환, 대사성질환 및 갱년기질환 관련 안전성과 효능 평가 시스템 및 임상시험기관(대학병원)을 활용하여 Fabaton 콩잎, 생물전환콩, 돌팔 및 복합추출물의 안전성과 갱년기, 비만, 간기능 개선 등의 전임상시험과 임상시험으로 진행
- 협동기관(기업) : 협동기관이자 참여기업은 다양한 건강기능식품 제조 전문업체로서 생산뿐만 아니라 국내 3대 유통·판매업체와 연결되어 있어 기능성 소재의 제품화를 통한 사업화를 바로 창출할 수 있고, 현재에도 개별인정형 건강기능식품 지속적으로 발굴 및 개발하고 있어 주관기관이 Fabaton 콩잎, 생물전환 콩, 돌팔의 대량생산공정 확립, 제품화 및 제품 양산을 통한 본 과제제안서(RFP)에서 제시한 종료 4년 내 개별인정형 건강기능식품 최소 2건 이상은 신청·등록할 수 있음.

○ 목표달성을 위한 로드맵



(1) 두과작물 기능성 소재의 산업화 추진전략

① 두과작물 기능성 소재의 전반적인 산업화 추진전략

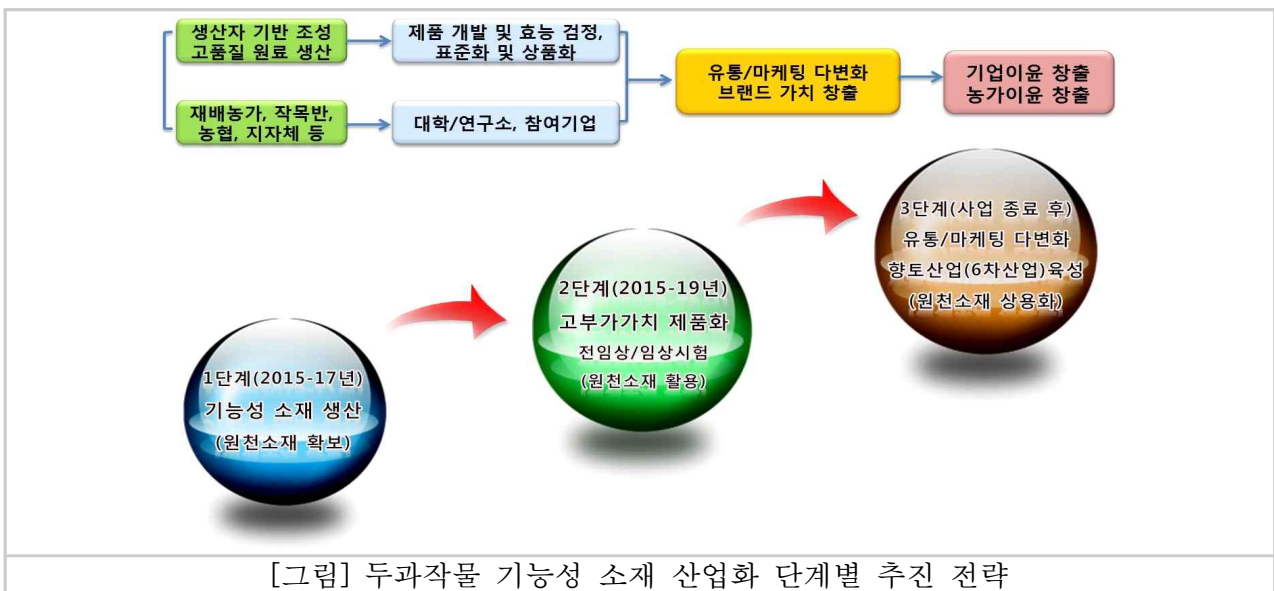
- 두과작물 기능성 소재 산업화 전략은 아래와 같음.
- Fabaton 콩잎의 재배단지 조성을 통한 농가수 육성을 통해 농가의 새로운 잉여 소득 창출을 유도하고 두과작물(콩, 팥 등)의 수매 계약과 수거 시스템을 구축할 것임.
- 참여기업은 기존 판로 및 신규 판로를 이용하여 판로를 지속적으로 모색할 것이며, 홍보·마케팅·광고를 지원할 것임.



② 두과 작물 기능성 소재 산업화 단계별 추진 전략(그림 4-3)

- 기존 이소플라본 제품과 차별화 계획
- 기존 이소플라본은 콩에서 추출한 활성물질 형태의 소재이므로 제품유형이 정 (tablet) 형태로 국한 되어 있음.
- 본 연구에서 이용될 소재는 이소플라본이 고함유된 생물소재 이므로 다양한 형태의 제품으로 발전시킴. 특히 대두이소플라본은 접근하기 어려운 액상 복합체, 음료, 차 등의 제품으로 개발함.
- 1단계(생산·수매) : Fabaton 콩잎 재배단지 조성 및 두과작물 수거 시스템 구축
 - 각 지자체(남해, 산청, 함양 등)와 협의하여 Fabaton 콩잎 재배단지 조성
 - Fabaton 콩잎의 재배단지 확대 및 재배기술 보급
 - 두과작물 수거 시스템 구축과 수매 계약(참여기업 주도)
- 2단계(추출·가공) : 두과작물 기능성 소재 활용 제품화 및 효능 검증, 제품 양산 계획
 - 두과작물의 활용성 증대를 위한 대량생산(추출) 기술 확립
 - Fabaton 콩잎 및 두과작물 기능성 소재 활용 제품의 공정 최적화 및 시제품 제조
 - Fabaton 콩잎 및 두과작물 기능성 소재의 안전성 및 효능 평가
 - 시제품의 소비자 반응 테스트
 - 대량생산 체계 확립

- 지식재산권 확보, 상표 디자인 및 등록
- 생산라인을 이용한 제품 생산
- 3단계(홍보·마케팅, 유통·판매, 문화·관광) : Fabaton 콩잎 기반 향토산업(6차산업) 육성
 - 제품의 마케팅, 홍보, 광고, 판매 전략 수립 및 지원
 - 오프라인 및 온라인 마켓 확대
 - 국내외 식품박람회 참가를 통한 제품 홍보, 광고, 마케팅 및 판매
 - 기존 판매점 및 대리점을 이용한 제품 판매, 신규 판매라인 개척
 - Fabaton 콩잎 기반 6차산업 혹은 향토산업 육성을 위한 비즈니스 모델 개발
 - 기존 Fabaton 콩잎과 두과작물 기반을 이용한 농촌체험, 관광 등의 상품 개발과 확장



③ 기술개발 전략 및 비즈니스/수익모델

- 지식재산권 확보 방안
 - Fabaton 콩잎에 대한 독점적 원천 특허권을 주관책임자가 보유하고 있어 Fabaton 콩잎 기반 제품 등에 대한 지식재산권 확보가 가능
 - 또한 생균제제능이 우수한 젓산균(이소플라본 비배당체와 가바 동시 증진 균주)을 이용한 Fabaton 콩잎을 기초로 두과작물(생물전환 콩, 들팥) 혼합에 따른 활성 강화 원천 지식재산권 확보 가능하고 이로부터 파생되는 제품 역시 산업재산권 확보가 가능
 - Fabaton 콩잎을 기초로 두과 작물의 갱년기 및 대사증후군 개선 효과 규명을 통한 지식재산권을 확보도 가능할 것으로 판단
- 선행특허 회피 전략
 - Fabaton 콩잎에 대한 독점적 원천 특허권을 주관책임자가 보유하고 있어 Fabaton 콩잎 기반 제품 및 효능에 대한 지식재산권은 전무한 상황
 - Fabaton 콩잎 기반 제품 및 효능의 지식재산권 및 산업재산권은 확보 다양할 것으로 판단되며, 이들의 기술이전을 통한 산업화가 바로 가능할 것으로 판단
- 핵심기술
 - 농산물 이용 건강기능식품의 산업화에서 중요한 것은 효능이 탁월한 원천 기능성 소재

와 관련 기술력 및 기업의 잠재적인 역량(제품 생산능, 홍보·마케팅, 유통·판매망)이 뒷받침 되어야 산업화로 직결될 수 있음.

- 예로서 녹차, 마늘, 도라지, 인삼 등은 칩체기의 소재이며, 오메가-3, 루테인 및 생균제 등등은 기업의 브랜드 가치에 의해 결정이 됨.
- 본 주관책임자가 확보 두과 작물의 일종인 Fabaton 콩잎의 경우 여성 갱년기와 갱년기 유래 대사질환에 탁월한 이소플라본 함량이 콩의 5-10배 함유되어 있고 이소플라본 시장은 세계적으로 약 2.9조원 형성되어 있음.

○ 비즈니스/수익창출 모델

- 기존 참여기업에서 성공적으로 시장에 진입한 제품 모델을 기초로 하여 비즈니스/수익창출 모델을 개발하고자 함.

④ 두과 작물 기능성 소재 활용 제품 양산 계획

○ 두과작물 원료 확보 및 추출물 원료 확보 방안

- Fabaton 콩잎의 지속적인 원료 확보를 위한 생산계획을 결정함으로써 원천소재 확보
- 두과작물(생물전환 콩, 돌팔)로부터 대량추출물 확보를 위한 1차 원료가공업체와 계약체결

○ 제품은 참여기업 공장의 생산라인 및 제조 노하우를 바탕으로 상품화할 계획

- 제품 대량생산체계 구축과 품질관리
- 제품의 디자인 및 상품 등록을 수행

○ 개발된 공정을 기존 생산라인에 적용할 수 있는 대량공정화 확립

- Pilot 규모의 시 생산을 통해 공정이 대량화되면서 발생하는 문제점 파악
- 생산량의 대형화에 따라 품질안전성 확인

○ 완제품의 시 생산

- 농산물 원료를 이용한 완제품의 생산은 제품의 마케팅과도 밀접한 관계
- (주)천호식품은 건강기능식품 전문업체로 건강기능식품을 제품화
- 특히 (주)천호식품은 공동으로 다양한 농산물 활용 제형화 기술 노하우를 보유

○ 제품 품질관리 시스템 구축

- 참여기업 부설연구소에서 농산부산물 기능성 소재 제품의 품질관리 실시

○ 유통기한 설정시험 : 제품의 생물학적, 이화학적 유통기한 설정시험

- 자체품질검사 및 필요 시 공인분석기관에 의뢰하여 유통기한 설정

○ 제품 디자인 및 상품 등록

- 마케팅 전략 수립을 통해 소비자에게 쉽게 다가갈 수 있도록 상품 디자인을 설계하고 다른 제품과 차별화함으로써 소비자의 감성과 신뢰성을 확보할 수 있는 상품을 등록

⑤ 판로 확보, 마케팅 및 상품화 계획

○ 국내 판로 및 마케팅

- 기존 참여기업의 국내 3대 유통·판매업체와 1,000여점의 한의원, 자사 쇼핑몰의 기존 유통, 판매망을 활용함.
- 현재 전국의 대형할인마트, 편의점 및 백화점 등에 이미 입점 되어 있고 건강식품 전문업체 인지도를 이미 확보하고 있으므로 추후 본 과제를 통해 얻어진 제품들을 대형할

인마트, 편의점 및 백화점 등에서 판매할 계획임.

- 인터넷, TV 광고, 홈쇼핑 등과 같은 새로운 채널화를 통해 농산물 건강제품의 우수성을 홍보하여 판매할 계획이며, 특히 TV 광고를 통해 초기 제품에 대한 홍보를 통해 판매할 계획임.

○ 국외 판로 및 마케팅

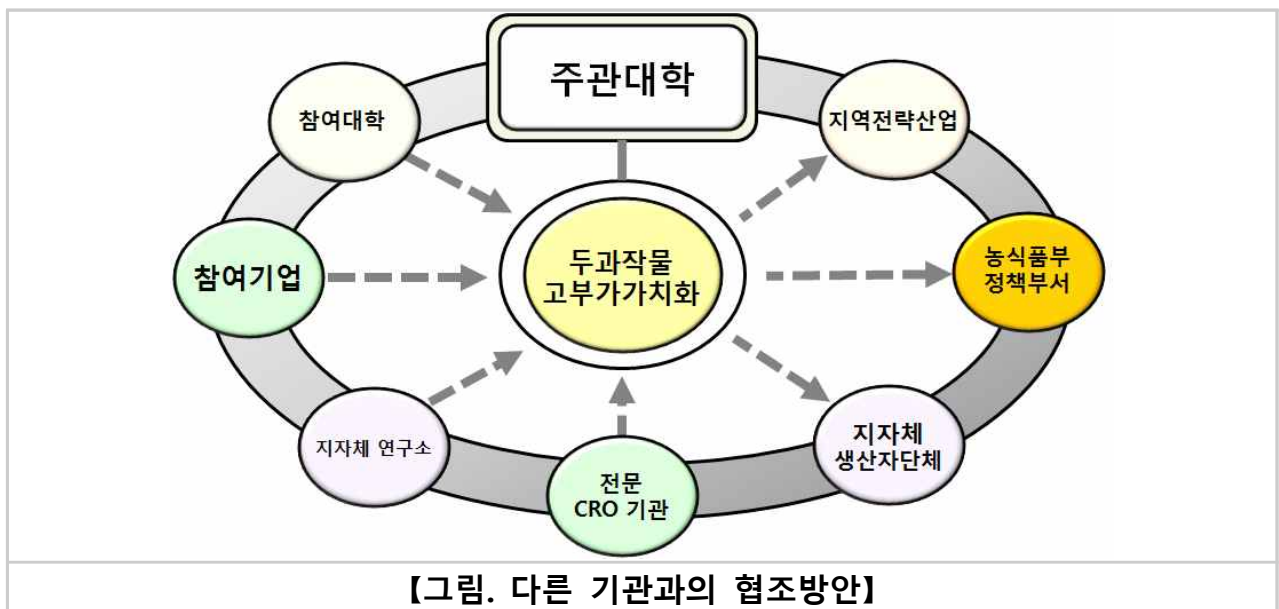
- 미국, 중국, 일본 등의 지사 등을 활용하여 수출을 본격화할 것임.

(2) 기술정보수집 및 전문가 확보 방안

- **On-line 상 기술정보수집** : 연구를 위한 논문, 특허 등의 기존 연구자료 수집은 Pub-med, Science-direct, springer, kiss, NCBI 및 kripp 등에서 연구관련 자료들을 수집할 예정임.
- **Off-line 상 기술정보수집** : 농림축산식품부, 농림수산식품기술기획평가원, 농촌진흥청, 중소기업청, 한국식품개발원, 한국식품공업협회, 한국농어촌공사, NTIS 등을 통해 지속적인 정보를 수집하여 연구동향에 파악하고 연구개발에 반영함.
- **전문가 확보 방안** : 본 연구팀은 산·학·연의 분야별 전문가로 구성되어 있어 특별한 자문은 필요하지 않음. 그러나 워크샵 등을 통해 각 분야의 다양한 전문가를 초청하여 전략을 수립하고자 함.

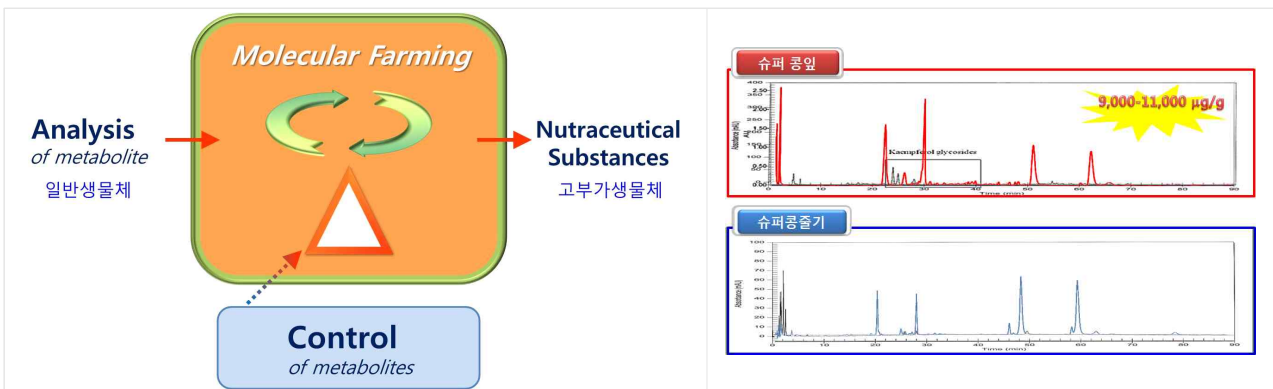
(3) 다른 기관과의 협조방안

- 본 연구팀은 두과작물의 독점적인 원천소재를 확보하고 있으며, 또한 선행연구 및 연구실적을 확보하고 있으며, 본 지역의 미래주력산업으로 항노화산업 벨트를 조성으로 본 연구지원 이외에 향후 산업화를 위한 다양한 지원을 받을 수 있는 장점을 보유
- 한편 참여기업은 건강식품 전문업체로서 두과작물의 기능성 소재 활용 제품의 산업화로 직결시킬 수 있는 장점을 보유
- 본 연구팀과 다른 기관과의 협조 방안 아래 그림과 같음.



나. 제1세부과제 추진방법

- 분자농법(Molecular Farming) 이용 Fabaton 콩잎 대량 확보
 - 식물의 2차대사체는 개체의 생존을 위해 또는 표현기능(색, 질소고정 등)을 위해 만들어지고 소멸된다. 생식성장과 영양성장시기를 조절함으로써 새로운 2차 대사체 생성 또는 활성성분의 대량발현을 유도
 - 식물호르몬(옥신, 에틸렌가스, 아브시스산, 지베렐린, 씨토키닌)을 elicitor로 사용하여 원하는 대사체를 대량 생산하는 기술 개발
 - 확립된 기술을 실제 농가에서 대량 재배하여 고부가식물체 확보
 - 건조된 콩잎과 줄기에서 HPLC 이용 이소플라본 함량 및 활성 대사체 분석

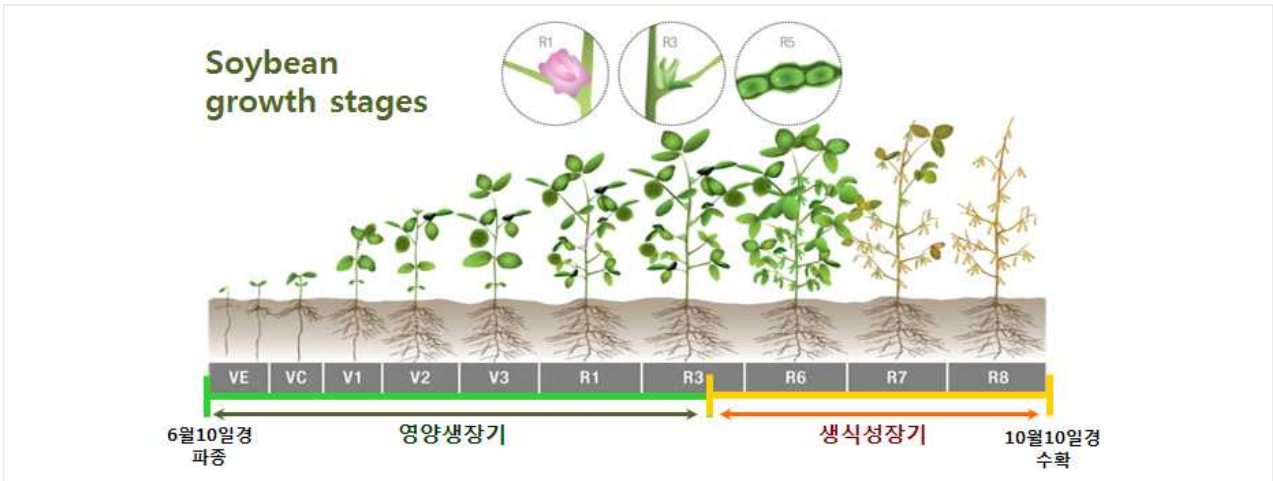


- Fabaton 콩잎의 원료보급을 위한 재배 단지 조성
 - Fabaton 콩잎의 원료보급을 위한 재배단지 조성 : 서부경남(남해, 산청, 하동, 함양 등) 친환경 재배단지를 물색하고 재배계약에 대한 협정서 체결, 재배기술이전을 통한 시범 재배단지 등 육성하여 고부가식물체(Fabaton 콩잎)의 보급과 대량생산시스템 확립
 - 토양, 기후 등 환경요건을 바탕으로 최적의 재배기술 확립
 - 동절기 잉여 하우스 활용 Fabaton 콩잎 생산 매뉴얼 제공하고 이를 통해 작목반을 결정하여 Fabaton 콩잎의 보급과 대량 생산 시스템 확립
- 원료 표준화 최적화 방안 구축
 - Fabaton 콩잎의 활성 지표물인 식물성 에스트로겐의 함량은 재배시기 (R1-R7) 및 광도와 밀접한 관계가 있음
 - 따라서, 본 연구의 핵심 내용이 원료의 표준화 및 재배방법의 표준화에 성공하고 이 기술을 기반으로 대농민 기술이전을 실시함
 - 기 확보한 활성 지표 물질의 최적화 결과를 바탕으로 현재 구축된 4동의 하우스에서 ① 생육 시기별, ② 일조량 및 광도별, ③ 토양의 영양상태 (특히 질소), ④ 품종별 활성 지표 물질 연구를 단계적으로 실시함



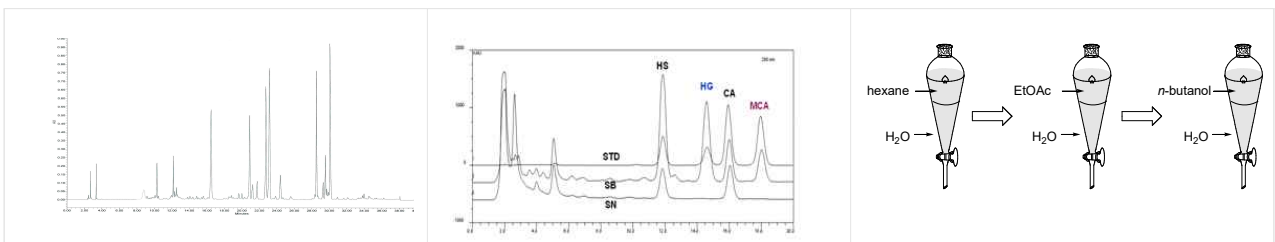
○ Cumesten 콩잎의 재배시기별 분석을 수확시기 결정

- 콩잎 증식 후 R1-R7 stage 통한 콩잎을 채취하여 cumesten 화합물 분석
- 토양, 기후, 수확시기 등의 환경요건을 바탕으로 최적의 수확시기 결정
- 원료 대량 확보를 위한 원료 전처리(건조 등), 수거 시스템 확립(농가 수매 방안)
- 지역의 단위농협과 협의 후 콩잎 대량수매 계약 체결 유도



○ 두과작물(돌팔, 생물전환 콩 등) 기능성 소재의 chemical library 및 profile 정보 구축

- 두과 작물 개별 및 복합 추출물의 지표 혹은 유효물질 탐색
- 추출물 고효율 추출조건 확립 : 추출용매 종류, 추출용매와 원료의 혼합 비율, 추출온도, 추출시간, 추출장치, 추출회수, 복합추출물의 배합비 등 다양한 조건으로 추출
- 추출물 기반 HPLC profile 정보구축
 - 분석기기: Waters e2695 HPLC system
 - 분석과장: 254, 290, 530 nm
 - 컬럼: XBridge™ C18 (4.6*250 mm, 5 μm)

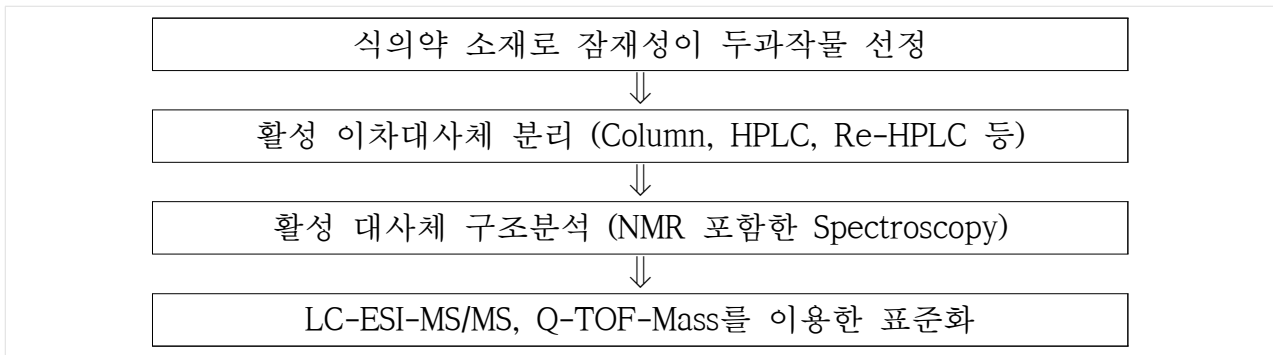


○ 두과작물 기능성 소재의 활성 대사체 중심 표준화 연구

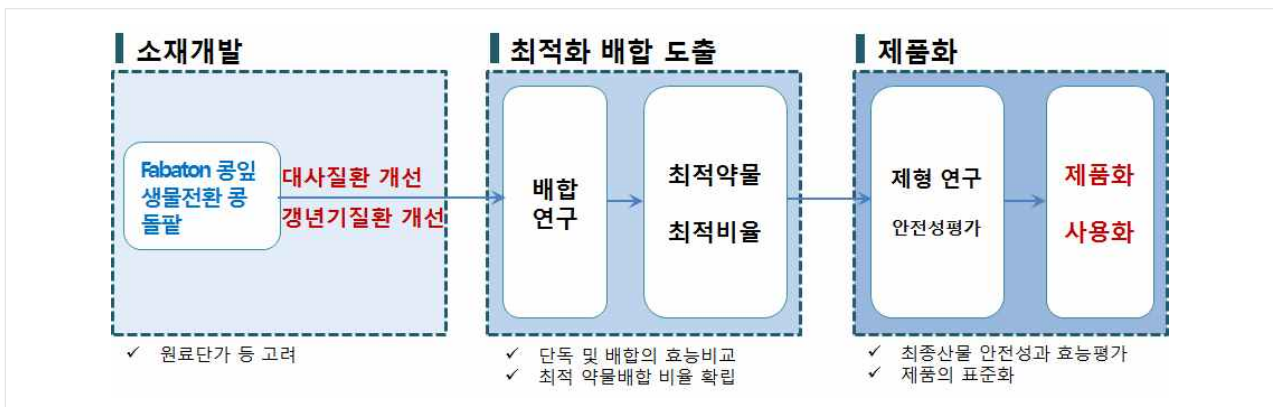
- 시험재료의 기능성 지표 화합물의 분리, 정제 및 화학구조 동정
 - 유기용매 추출 및 컬럼 크로마토그래피 분리 : 두과 작물 시료로부터 bioassay-guided fractionation, normal silica chromatography, sephadex LH-20 chromatography, reverse phased silica chromatography, prep-HPLC 등을 사용하여 유효물질을 분석
 - IR, NMR, MS, Q-TOF-Mass를 이용한 표준화 등의 기기분석데이터 수집 및 해석을 통하여 구조규명을 실시하여 표준물질을 확보
- 분석 장비를 활용한 단일구조 기반 chemical marker 탐색
 - 확보한 표준물질을 사용하여 해당소재의 추출물을 대상으로 HPLC-DAD, HPLC-DAD-MS/NMR과 같은 기기분석학적 방법을 사용하여 크로마토그램과 같은

profile을 얻은 다음 각 피크에 대한 정성 및 정량학적 데이터 수집

- 순수분리된 화합물의 분광학적 기기를 이용한 화학구조동정
- 효소기반(α -glucosidase 등) 기능성 소재(활성 대사체)의 유효성 평가

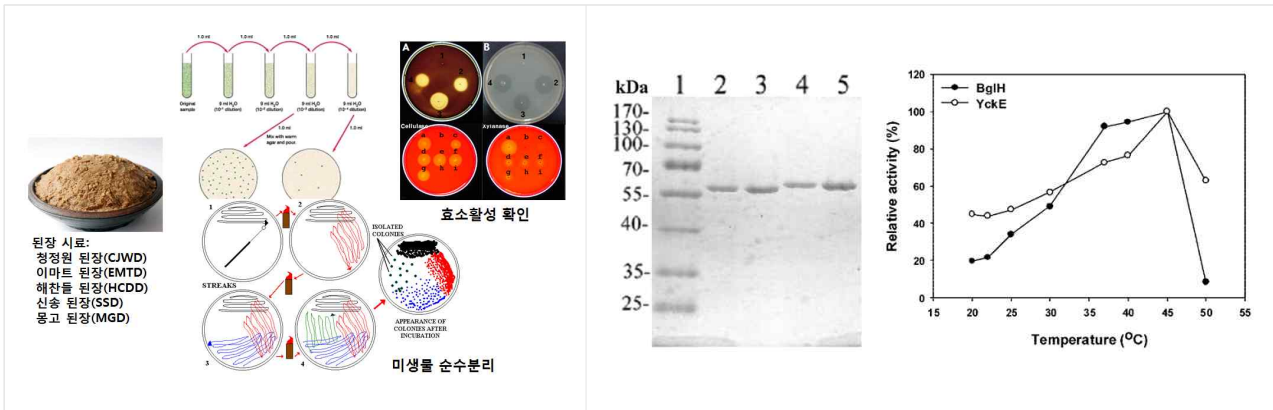


- 두과작물 기능성 소재 기반 대량 추출물 및 제품의 표준화
 - 활성 대사체 중심으로 분석하여 지표물질 선정
 - 각 대량 추출물 혹은 제품의 활성 대사체 분석을 통한 표준화
- 한방제 기반 Fabaton 콩잎 이용 갱년기 장애 개선 가공기술 개발
 - 한방제 기반 Fabaton 콩잎 이용 관련 제품 가공기술은 아래와 같이 수행



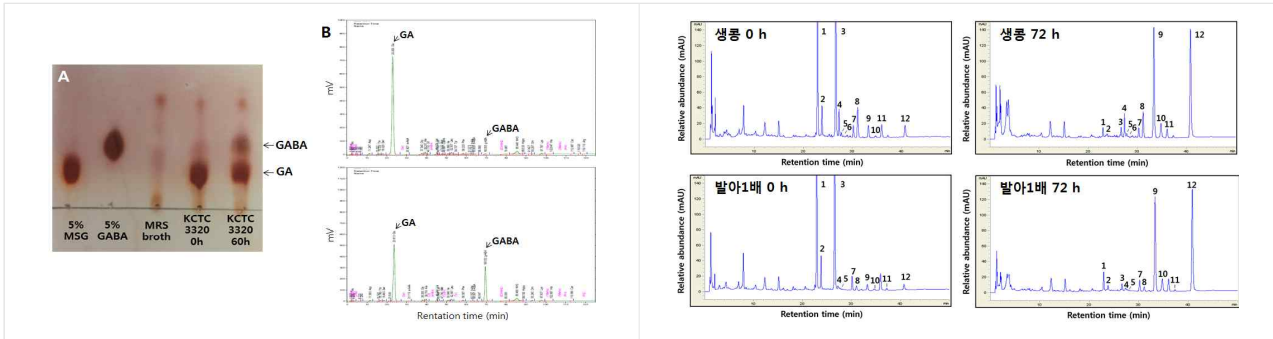
- 일반 두과 작물 연구 및 제품과의 차별화 전략
 - 대두 유래 이소플라본과 Fabaton 콩잎 유래 이소플라본의 차별화는 본 연구의 성공과 밀접한 관계가 있는 핵심 요소임
 - Fabaton 콩잎은 대두에 비해 월등히 높은 유리 아미노산을 함유 (약 2.5 g/100 g)하고 있으므로 이들 유리 아미노산 특히 다량함유하고 있는 필수 아미노산 및 가바의 장점을 극대화하는 유효성 평가 시도 및 마케팅에서 차별화 시도
- Fabaton 콩잎 혹은 두과 작물 복합물의 효소처리 조건 확립
 - Fabaton 콩잎 혹은 두과 작물복합물에 일정량 물을 가한 후 믹서기 분쇄하여 액상을 제조하고 여기에 상업적으로 사용하는 rapidase를 우선 처리하여 추출수율, 유효성분 함량 등을 분석
 - 2차적으로 rapidase에 단백질분해효소, 섬유질분해소 등을 혼합하여 처리하여 추출수율, 유효성분 함량 등을 분석
 - 최종 반응시간, 반응온도 등의 최적 효소처리 확인
- GRAS용 생물전환 우수 미생물 확보 및 생물전환효소 확인

- 기존 구축하고 GRAS용 미생물(고초균, 젖산균, 초산균 및 버섯균사체)과 신규미생물 자원 확보
- 유전체 정보 data-base(NCBI)와 라이브러리 구축을 통하여 생물전환효소(β -glucosidase, esterase, glutamate decarboxylase 등) 유전자 클로닝, 염기서열 결정 및 효소의 생화학적 특성(pH, 온도, 금속이온, 내열성 등) 규명



- GRAS용 생물전환미생물 처리에 따른 비배당체 이소플라본 증진 기술
 - GRAS용 미생물(고초균, 젖산균, 초산균 및 버섯균사체) 처리에 의한 Fabaton 콩잎, 두과 작물에서 비배당체 이소플라본 함량 변화 양상 확인
 - Fabaton 콩잎 및 탈지대두에 3-12일 동안 처리 후 0일, 2(3)일, 4(6)일, 6(9)일, 8(12)일째 시료를 채취 및 동결 건조하여 추출물 제조
 - 추출물의 이소플라본은 HPLC 이용해 1차적으로 분석하고 배양중 β -glucosidase 활성 등 분석.
 - 발효단계 추출물을 제조하고 추출물의 HPLC를 이용하여 이소플라본 분석
 - 추출물의 *in vitro*상 라디칼 소거활성과 비만(당뇨) 관련 효소 저해효과 확인
 - *In vitro*상에서 유의적 활성 검정 시 안전성과 전문적 효능은 제2세부와 공조
- 탈지대두에서 GA(glutamic acid) 최적 생성 조건 확립
 - 탈지대두 이용 GA(glutamic acid) 및 GABA 생성 최적 조건 확립
 - 물리적 처리에 따른 GA와 GABA 함량 검토 : 증자(80°C, 90°C, 100°C, 110°C, 120°C 및 15 min, 30 min, 45 min, 60 min) 처리 후 아미노산 자동분석기로 분석
 - 단백질 분해효소 처리에 따른 GA와 GABA 함량 검토 : 일차적으로 상용화 되어 있는 단백질효소를 처리(온도, 반응시간, 처리량 등)하여 검정
 - 단백질 분해효소가 풍부한 두과 작물 처리에 따른 GA와 GABA 함량 검토 : 키위즙, 무즙 및 유자즙 등을 처리(온도, 반응시간, 처리량 등)하여 검정
 - 처리별 추출물을 제조하고 추출물의 HPLC를 이용하여 이소플라본 분석
 - 추출물의 라디칼 소거활성과 비만(당뇨) 관련 효소 저해효과 확인
- GABA 및 비배당체 이소플라본 동시 증진 기술
 - 발효물 제조 : 최적 전처리 조건(GA 최대생성 조건)에 Fabaton 콩잎 분말 2.5 g, 설탕 1.25 g (5%) 및 증류수 50 mL를 첨가하여 발효물을 제조한 후 미리 배양한 균주를 5% 접종하여 72 시간 배양하고 12 hr 단위로 시료 채취하여 일부는 동결보관
 - 발효 중 pH, 산도, 효소활성 등의 이화학적 특성과 생균수 측정
 - 동결보관한 시료는 동결건조 후 추출한 후 GABA 및 이소플라본을 분석

- 추출물의 *in vitro*상 라디칼 소거활성과 비만(당뇨) 관련 효소 저해효과 확인
- *In vitro*상에서 유의적 활성 검정 시 안전성과 전문적 효능은 제2세부와 공조



- 두과작물에 생물전환공정 이용 활성강화 소재 개발
 - 두과작물 복합물 혹은 복합추출물에 선발한 GRAS 미생물 혹은 효소 처리 후 일정 간격으로 시료를 채취하여 동결건조하여 보관
 - 동결보관한 시료는 동결건조 후 추출하여 대사체 분석(제1세부와 공조)
 - 추출물의 라디칼 소거활성과 비만(당뇨) 관련 효소 저해효과 확인
 - *In vitro*상에서 유의적 활성 검정 시 안전성과 전문적 효능은 제2세부와 공조
- 활성강화 소재(효소처리 산물 및 발효산물)의 가공제조 기술
 - 시제품 제조 : 남해마늘연구소 및 기업의 생산라인을 이용한 활성강화 시제품을 제작한 후 관능평가 등을 통하여 개선점을 보완하고 제조공정 확립, 특허출원
 - 제품의 이화학적 분석(분석 공인인증기관에 의뢰)
 - 소비자 반응 테스트, 상표명 및 카다로그 구상
 - 참여기업 혹은 관련 기업에 기술이전 방안 모색
- 유효성(항균력, 항산화, 항염증) 평가
 - 항균력 확인 : 식품위해 혹은 피부질환 미생물에 대한 추출물의 항균력 평가
 - 항산화 확인 : 라디칼 소거활성 및 DNA base 산화적 스트레스 개선 효과 확인
 - 항염증 확인 : RAW 264.7 대식세포 이용 항염증 효과 측정

다. 제2세부과제 추진방법

- Fabaton 콩잎 혹은 콩(잎)/콩잎복합물 안전성 평가 : 전문 GLP 기관 의뢰
- 세포모델 및 동물모델에서 안전성 평가
 - 세포모델 : 동물실험 용량 결정 및 세포독성 확인
 - 세포주 : HepG2 간세포주
 - 세포배양 : 배양은 1% 항생제와 10% BCS가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 CO₂ incubator(5% CO₂, 95% air)에서 37°C 조건으로 배양
 - 추출물을 단계별로 희석하여 배지에 투여하고 MTT assay와의 비교·분석하여 독성을 나타내기 시작하는 농도 측정
 - 동물모델 : 식이 용량 결정에 따른 독성 평가
 - 동물모델 : C57BL/6 혹은 ICR mouse의 12주 식이
 - 평가항목 : 개체 생존률 및 12주 후 해부를 통한 장기 상태, 간, 췌장, 신장의 탄수화

물, 지질 및 단백질 대사 관련 바이오마커 분석을 통하여 안전성 평가

○ 세포모델 및 동물모델에서 갱년기 개선 효능 평가

- 세포모델에서 갱년기 개선 효과 검증

세포주: 유방암세포(BT-474, MCF-7, T-47D), 난소암세포(OVCAR-3, 상피세포; ES-2, 섬유아세포), 골모세포(hFOB 1.19)

• 평가항목 : 선택적 에스트로겐 수용체 조절제(SERM)를 이용한 천연물 식의약 소재의 효능 검증: Raloxifene(뼈세포에서는 항진, 유방과 자궁에서는 길항), tamoxifen(뼈와 자궁에서는 항진, 유방에서는 길항), Ospemifene(뼈세포에서는 항진, 유방과 자궁에서는 길항) 등과 같은 SERM을 뼈 혹은 골모세포에 Estrogen responsive element (ERE) reporter vector와 함께 처리하여 promoter 활성 측정 및 유전자발현 분석

• 동물실험에 사용할 기능성 소재의 용량 결정

- 동물모델에서 갱년기 개선 효과 검증

• Accelerated Ovarian Failure(AOF) 모델 : 4-vinylcyclohexene diepoxide(VCD, 3주간 15회) 복강투여 후 각각 9일(전폐경기, premenopause), 37일(폐경전기, Early perimenopause), 58일(폐경후기, Late perimenopause), 114일(후폐경기, Postmenopause)에 LH, FSH, Estrogen 측정

• Ovariectomy(OVX) 모델 : 암컷 생쥐의 양쪽 ovary를 제거하고 4주-8주 후에 LH, FSH, Estrogen 측정 등의 바이오마커 측정

• OVX 모델을 이용한 폐경기 골다공증 모델 : OVX 모델에서 안드로스테네디온 (androstenedione) 농도 및 대퇴골 바깥쪽 무게로 골감소증 또는 골다공증 관찰

○ 세포모델 및 동물모델에서 체지방 개선 효능 평가

- 세포모델에서 항비만 효과 확인

• 세포주 : 3T3-L1 지방전구세포주

• 세포배양 : 배양은 1% 항생제와 10% BCS가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 CO₂ incubator(5% CO₂, 95% air)에서 37°C 조건으로 배양

• 추출물을 단계별로 희석하여 배지에 투여하고 MTT assay와의 비교·분석

• 세포 생존율과 지질 과산화 측정은 MTT assay 이용

• Oil Red O 염색 : 세포에 Oil Red O 염색 후 건조 well에 100% iso-propyl alcohol을 용출시켜 490 nm에서 측정

- 동물모델에서 지방간, 체지방 및 혈중 지질대사 지표 개선 효과 확인

• C57BL/6 mouse의 High Fat Diet 동물모델 이용 체지방 감소 효과 확인

▶ 동물모델 : C57BL/6 mouse의 High Fat Diet(HFD, 제공되는 칼로리의 45%가 지방으로 구성된 먹이)

▶ 실험구성 : 일반식이(LFD), 고지방식이(HFD) 및 고지방식이+HFD에 추출물을 sonde로 하루 한 번, 12주 동안 먹인 다음 sacrifice하고 체중의 변화를 매주 측정

▶ 간 조직 및 췌장 조직의 정상 관찰

▶ 간 조직 및 췌장 조직의 NO 라디칼 함량 측정과 지질과산화 정도 측정

▶ 생체 내 바이오마커 분석

• 간의 무게와 내장지방(Epididymal fat)의 무게를 측정

- 지방조직과 간조직을 sample로 하여 western blot을 시행하여 Acetyl CoA Carboxylase(ACC), PPAR γ , SREBP, ACL, CPT 등의 발현 변화를 조사
- 혈중 대사지표(TG, HDL, LDL, total cholesterol, Leptin, Adiponectin)를 측정
- 내장지방의 지질지표(Lipoprotein Lipase, Acetyl CoA Carboxylase(ACC))를 측정
- 근육세포에서 에너지소비에 관계되는 Uncoupling protein을 Western blot으로 발현 변화를 조사
- 소제가 지방간 변성으로부터 얼마나 간세포를 보호하는지 알아보기 위해 Hematoxylin & Eosin염색법이나 Oil Red O법으로 염색하여 관찰
- 체지방 감소 및 혈당 개선 바이오마커 측정
- ob/ob mouse 비만 유도 동물모델 이용 체지방 감소 효과 확인
 - 동물모델 : Leptin을 만들어내지 못하는 비만모델인 *ob/ob* mouse
 - 실험구성 : ob/ob mouse에 추출물을 sonde로 하루 한 번, 12주 동안 먹인 다음 sacrifice하고 일주일에 한번 체중을 측정
 - 이하 실험은 상기와 동일하며, 체지방 감소 바이오 마커 측정
- 세포모델 및 동물모델에서 지방간 개선 효능 평가
 - 세포모델에서 항비만 효과 확인
 - 세포주 : HepG2 간세포주
 - 세포배양 : 배양은 1% 항생제와 10% BCS가 첨가된 DMEM 배지를 이용하여 CO₂ incubator(5% CO₂, 95% air)에서 37°C 조건으로 배양
 - 추출물을 단계별로 희석하여 배지에 투여하고 MTT assay와의 비교·분석
 - 세포 생존율과 지질 과산화 측정은 MTT assay 이용
 - Oil Red O 염색 : 세포에 Oil Red O 염색 후 건조 well에 100% iso-propyl alcohol을 용출시켜 490 nm에서 측정
 - 동물모델에서 지방간, 체지방 및 혈중 지질대사 지표 개선 효과 확인
 - C57BL/6 mouse의 High Fat Diet 동물모델 이용 지방간 감소 효과 확인
 - ▶ 동물모델 : C57BL/6 mouse의 High Fat Diet(HFD, 제공되는 칼로리의 45%가 지방으로 구성된 먹이)
 - ▶ 실험구성 : 일반식이(LFD), 고지방식이(HFD) 및 고지방식이+HFD에 추출물을 sonde로 하루 한 번, 12주 동안 먹인 다음 sacrifice하고 체중의 변화를 매주 측정
 - ▶ 간 조직 및 췌장 조직의 정상 관찰
 - ▶ 간 조직 및 췌장 조직의 NO 라디칼 함량 측정과 지질과산화 정도 측정
 - ▶ 생체 내 바이오마커 분석
 - 간의 무게와 내장지방(Epididymal fat)의 무게를 측정
 - 지방조직과 간조직을 sample로 하여 western blot을 시행하여 Acetyl CoA Carboxylase(ACC), PPAR γ , SREBP, ACL, CPT 등의 발현 변화를 조사
 - 혈중 대사지표(TG, HDL, LDL, total cholesterol, Leptin, Adiponectin)를 측정
 - 내장지방의 지질지표(Lipoprotein Lipase, Acetyl CoA Carboxylase(ACC))를 측정
 - 근육세포에서 에너지소비에 관계되는 Uncoupling protein을 Western blot 발현변화조사
 - 소제가 지방간 변성으로부터 얼마나 간세포를 보호하는지 알아보기 위해 Hematoxylin

& Eosin염색법이나 Oil Red O법으로 염색하여 관찰

- 체지방 감소 및 혈당 개선 바이오마커 측정
- Ethionine 지방간 동물모델 이용 지방간 감소 효과 확인
- 동물모델 : 체중 200g 내외의 SD계 흰쥐 암컷에 D,L-ethionine을 생리식염수(2 w/v %)에 녹여 200 mg/kg 씩 피하주사
- 실험구성 : 약물은 ethionine 투여 4시간전, 투여 6시간 후 2회 경구투여
- Ethionine 투여 24시간 경과 후 ether로 마취시켜 간을 떼어내어 간중량, 총지질량, 중성지질량 및 총 cholesterol치 측정
- Ethanol 지방간 동물모델 이용 지방간 감소 효과 확인
- 20 w/v % ethyl alcohol을 5g/kg씩 매일 오전 10시와 오후 6시 2회로 나누어서 9일간 경구 투여, 16시간 절식시킨 후 간중량 총지질량, 중성지질량 및 총 cholesterol치 측정
- 총 지질량 측정 : 채취한 간조직을 1.15 % KCl 용액으로 균질화하여 얻은 sample을 원심분리원심분리시켜 얻은 상정액에 Frings법에 따라 농황산을 가한 후 10분 동안 열탕 가열하고 흐르는 물로 냉각, 이 용액에 농황산과 phospho-vanillin 시액을 반응시켜 잘 혼화하고 37°C에서 15분간 incubation 한 후 540nm에서 흡광도를 측정
- 중성지질 측정 : 채취한 간조직을 균질화하여 얻은 sample을 원심분리, 원심분리시켜 얻은 상정액에 triglyceride GPO reagent를 사용하여 550nm에서 흡광도를 측정
- 총 cholesterol 측정 : 1.15 % KCl 용액으로 균질화하여 얻은 sample을 원심분리, 원심분리 시켜 얻은 상정액을 Libermann-Burchard 반응을 이용하여 ethylacetate-ethanol 혼합용액(1:1)과 잘 섞은 후 원심분리, 이 상정액 0.5 mL을 취해 0.07 % FeCl₃ 1 mL을 가하고 잘 섞은 다음 농황산 1 mL을 가하고 상온에서 냉각시킨 후 550 nm에서 흡광도를 측정

○ 건강기능식품 임상시험 (인체적용시험)

- 제목: Fabaton 콩잎소재의 갱년기 증상 개선: 무작위배정 이중눈가림 평행설계 임상시험
- IRB 승인
- 목적과 가설 선정 → 평가지표 선정 → 대상 집단 선정(선정/제외 기준)
→ 디자인 최종 확정 → 순응도 측정법 설정 → 식이중재 방법 개발
→ 피험자 수 및 연구비 계산 → 임상시험 기관심의위원회(IRB) 승인
→ 연구 개시
- 평가분석 : 확립된 Fabaton 콩잎소재 추출법과 분석법의 재현성 검증
- 인체적용시험 synopsis(안)
- 제목: Fabaton 콩잎소재의 갱년기 증상 개선: 무작위배정 위약 대조군 이중눈가림 평행설계 임상시험 (Leaf extract of Fabaton Bean for Peri-menopause Symptoms: a Randomized Paralleled, Placebo-controlled, Double Blind Trial)
- 목적: 갱년기증상을 호소하는 여성에 대해 Fabaton콩잎의 갱년기증상 개선효과 검증
- 투여방법: Fabaton 콩잎소재 추출물을 식후 30분 하루 3회 12주간 복용
- 시험설계: 무작위배정 위약 대조군 이중눈가림 평행설계 임상시험
- 시험방법: 본 연구는 Fabaton 콩잎소재 추출물을 갱년기 여성에게 투여하는 무작위 배정 위약 대조군 평행 설계 비교 연구로 광고를 통해 환자를 모집하여 screening하여 선

정/제외 기준을 통과한 참가자들에게 Fabaton 콩잎소재 추출물을 지급하여 식후 30분 하루 3회 12주 투여하게 된다.

- 피험자수: 60명(시험군 30명, 대조군 30명)
- 유효성 평가:
 - ▶ 1차 평가변수
 - * 쿠퍼만 지수 : 11개 항목(안면홍조, 발한, 불면증, 신경질, 우울증, 어지럼증, 피로감, 관절통/근육통, 머리아픔, 가슴두근거림, 질 건조감)으로 구성된 갱년기 여성의 증상 개선을 평가하는 가장 보편적 방법
 - ▶ 2 차 평가변수
 - * E2, FSH 변화,
- 안전성 평가
 - 이상반응의 확인
이상반응에 대한 정보는 수시로 피험자에게 자발적인 보고를 하도록 교육하며, 시험자는 정기 또는 추가 방문에 면담 및 문진 등 진료를 통하여 이상반응을 확인함. 이상반응 조사에는 발현일 및 소실일, 이상반응의 정도 및 결과, 임상약과 관련하여 취해진 조치 및 임상약과의 인과관계, 임상약 이외 의심되는 약제명, 이상반응에 대한 치료여부 및 내용 등이 포함
 - 혈청생화학 검사, 일반혈액검사, 요검사
- 선정기준
 - 만 40세 이상의 여성
 - 최근 1년간 자발적 무월경이 있거나 혈중 FSH (follicle stimulating hormone) 농도가 40 mIU/mL을 초과하면서 6개월간 자발적인 무월경이 있는 경우,
 - 양측 난소절제술 6주 이상 경과자, 또는 자궁절제술을 받고 최소 6주 경과하고 혈중 FSH 농도가 40 mIU/mL을 초과하는 경우
 - 최근 2주 이내에 1일 최소 7회의 중등도 이상의 안면 홍조가 있었던 자
 - Kupperman Index Score 15점 이상인 자
 - 시험자와 원활한 의사소통이 가능하며, 시험 준수 사항을 잘 따를 수 있는 환자,
 - 임상시험의목적, 방법, 효과 등에 대한 설명을 듣고 본 임상시험에 참여할 것을 자발적으로 서면 동의한 자
- 제외기준 :
 - 심인성 갱년기 장애를 동반한 경우, 간종양 등 악성종양 환자
 - 조절되지 않는 고혈압 (170/110 mmHg 이상), 합병증을 동반한 당뇨, 심부전, 신부전, 췌장염, 급만성 간염/간경변, 갑상선기능 항진, 중증고지혈증, 신경·정신계 질환, 결핵을 포함한 전신감염성 질환 등으로 본 연구에 참여가 어렵다고 연구자가 판단한 경우
 - 간장 기능 이상자: AST and/or ALT 가 정상 상한치 2배 이상
 - 신장 기능 이상자: BUN and/or Creatinine 이 정상 상한치 2배 이상
 - 과거 1개월 이내에 에스트로겐 및 프로게스틴 제제 이외의 호르몬 제제 및 유사제제 등을 투여받은 경우
 - 갱년기증상 개선목적으로 한약 및 기타건강기능식품을 3개월 이내 복용한 적 있는 자
 - 과거 3개월 이내에 다른 임상시험용 의약품을 투여받은 적이 있는 자

- 연구참여 동의서 작성이 곤란한 자
- 임신 중이거나 수유 중 혹은 치료기간에 임신을 계획한 자
- 연구방문 및 검사 일정
 - Visit 1(Screening) : 동의서 획득, 개인신상 조사, 과거병력, 약물 복용력 조사, 병력 청취 신체검진, 실험실적 검사
 - Visit2(week0): 외래방문, 시험원료/대조원료(위약) 지급
 - Visit3(week6): 외래방문, 쿠퍼만 지수측정, 실험실적검사, 시험원료/대조원료(위약)지급
 - Visit 4(week 12) : 외래방문, 쿠퍼만 지수 측정, 실험실적 검사
 - 임신 중이거나 수유 중 혹은 치료기간에 임신을 계획한 자
- 이상반응의 확인 : 이상반응에 대한 정보는 수시로 피험자에게 자발적인 보고를 하도록 교육하며, 시험자는 정기 또는 추가 방문에 면담 및 문진 등 진료를 통하여 이상반응을 확인함. 이상반응 조사에는 발현일 및 소실일, 이상반응의 정도 및 결과, 임상약과 관련하여 취해진 조치 및 임상약과의 인과관계, 임상약 이외 의심되는 약제명, 이상반응에 대한 치료여부 및 내용 등이 포함
- 추진전략
 - 시간절약을 위한 효율적인 인체적용시험 참여자 모집
 - 임상시험 실시기관 주위의 관공서와 협력하여 홍보물 게재
 - 임상시험 실시기관 주변의 주거인구 성별, 연령 파악을 통해 갱년기 여성이 많은 지역에 집중적으로 광고 진행
 - 엄격한 임상시험 질관리
 - 천연물 전문 임상시험 실시기관 협력
 - 갱년기 분야의 전문의료진이 연구책임자 담당
 - 평가자, 통계분석자 맹검을 통해 임상시험 평가 및 분석의 객관성 확보
 - CRO와 협력하여 식약처 인체적용시험 계획 승인 및 임상시험 모니터링 지속적 수행
 - 평가자 맹검을 통해 임상시험 평가의 객관성 확보
 - 비용효과적인 인체적용시험 비용 산정
 - MOU기반 임상시험 실시기관 계약통해 필수비용 산정, 과도한 임상시험 비용책정지양
- 인체적용시험에 CRO 기관
 - 임상시험실시에 대한 이론적 근거확보를 위한 제반사항 검토
 - 치료를 위한 목표 적응증 및 증상
 - 특정 대상군에서의 사용여부
 - 임상적 유효성 확보를 위한 피험자 수 산출
 - 임상시험 평가 방법, 대상 적응증, biomarker, 예상되는 위험성 조사/연구
 - 임상 개발 전략에 따라 전 연구개발 과정에 대한 모니터링
 - Protocol에 적합하게 진행되는지 확인 및 검토
 - 임상시험 계획 초안 검토
 - 프로토콜 및 CRF 개발을 위한 전문가 회의 개최
 - 협력병원 간 임상연구자 연락 및 정보교류
 - 식품의약품안전처와의 상담 및 협의 진행

○ 임상연구 추진전략

- 임상연구 I (진행 이전 - 사전 점검 및 준비)

순번	사전점검		관련업무
	항목	내용	
1	Project team 구성	① Project Manager ② CRA	- 수행업무 분담 - 임상 Protocol, KGCP, CTC, Sponsor 등 관련자료 숙지
2	Regulatory requirements	① Community Authorization (Centralized Procedure) ② 임상시험관리기준(KGCP) 등의 규제요구사항 점검 ③ 구비서류점검	- 국내 (KFDA) 국외 (USA, EU 등) 규정 및 지침 검토 - 구비서류 확인
3	Consultation & Communication	① 규제당국(식약처)과 대상 제품 임상시험 관련 사전상담 ② CTC, Investigator 자문 求 ③ CTC와 대상 제품의 임상연구 적합성, 비용, 기간 등 예비조사	- 규제당국(식약처)과 사전미팅 및 Communication, 연구자, CRC에 임상 수행관련 자문 求 - 연구비, 인건비, 임상검사비용 등 예비조사

- 임상연구진행 II (연구개발)

순번	연구개발		관련업무
	항목	내용	
1	임상연구설계	① 국내학회지, 선행기술 등 문헌정보 검색 ② 해외 학술논문지 탐색 ③ 적응증, 피험자기준 등 검색	- 임상사례검색, 선행기술 탐구 - 적응증별 사이트 검색
2	임상연구계획서 초안 개발	① Protocol 초안 작성 ② e-CRF(Paper-CRF) 개발, ③ 적응증에 대한 안정성, 유효성 Endpoint 설정 ④ 피험자수 산정	- 설계자료 항목별 대입 - 피험자 동의서, 피험자 정보지, - 무작위배정표 초안 작성 - 맹검코드, 맹검봉투 준비 - 통계분석방법(피험자수) 결정
3	임상시험기관 선정 및 조율	① 연구자, 임상시설, 임상기술비용, 소요기간고려, CTC 선정 ② Investigator, IRB와수행협의 ③ Protocol 초안 IRB Review ④ Protocol 초안 보완	- 임상실시기관 및 기관수 결정 - 연구자와 연구비 협상 및 계약 - CRC, 임상검사비 등 협의 - IRB에 Protocol 검토 의뢰
4	임상프로토콜 식약처 사전 검토	① 모듬토의 및 방문상담	- 임상시험계획서 - 관련서류 준비

- 임상연구진행 III (임상연구수행)

순번	임상연구수행		관련업무
	항목	내용	
1	피험자모집	① 피험자 모집 수 결정 ② 피험자 선정, 제외기준 설정 ③ 피험자 보상기준 설정 ④ 피험자 모집 및기본경비책정	- 중도탈락 및 제외기준 등 고려 - 피험자 수 결정 - 피험자 보상비, 기본경비 등 책정 - 모집 광고비, 모집기간 고려
2	연구자 모임	① 연구자 예비미팅 ② 연구자 임상시험 개시 미팅	- 예비모임 준비 - 개시모임 준비
3	임상시험 수행	① 임상연구책임자 / 일반연구자 업무수행 ② 기본 임상검사 실시 ③ e-CRF(PaperCRF) 기록	- Protocol에 의한 임상수행 - 피험자 Screening - CRF 기록 및 보관 - Visit별 임상시험 수행 - (PI, CRC 등) 관리
4	임상시험 모니터링	① 모니터링 계획 수립 ② 모니터링(On-site) ③ Monitoring Report 작성	- Interim Monitoring - 임상시험모니터링 방문계획 - SAE(중대이상반응)관리 및 Reporting - 모니터링일지 및 보고서 작성 - 종료방문(Site, IRB)

- 임상연구진행 IV (통계분석/자료관리/결과보고서/기타)

순번	통계분석/자료관리/결과보고서/기타		관련업무
	항목	내용	
1	Statistical Analysis	① 통계검정 계획 수립 ② 통계 검정 및 추정	- 통계분석 계획 수립 - 통계검정 프로그램 적용 여부 - 통계분석보고서 작성
2	Data Management	① 임상시험 자료작성 및 정리 ② Database 개발 ③ Data Entry	- DM 위탁수행여부 결정 - Data 관리계획 작성 - Database 개발 - Data validation
3	결과보고서	① 임상시험 결과보고서 작성 ② 임상시험 종료보고서 작성	- 임상시험결과보고서(PI) - 임상시험종료보고(Sponsor)
4	기타	① Amendment(프로토콜 등) ② Safety 관리	- 임상프로토콜 변경시 변경계획서작성 - 안전성 관리

라. 제1협동과제 추진방법

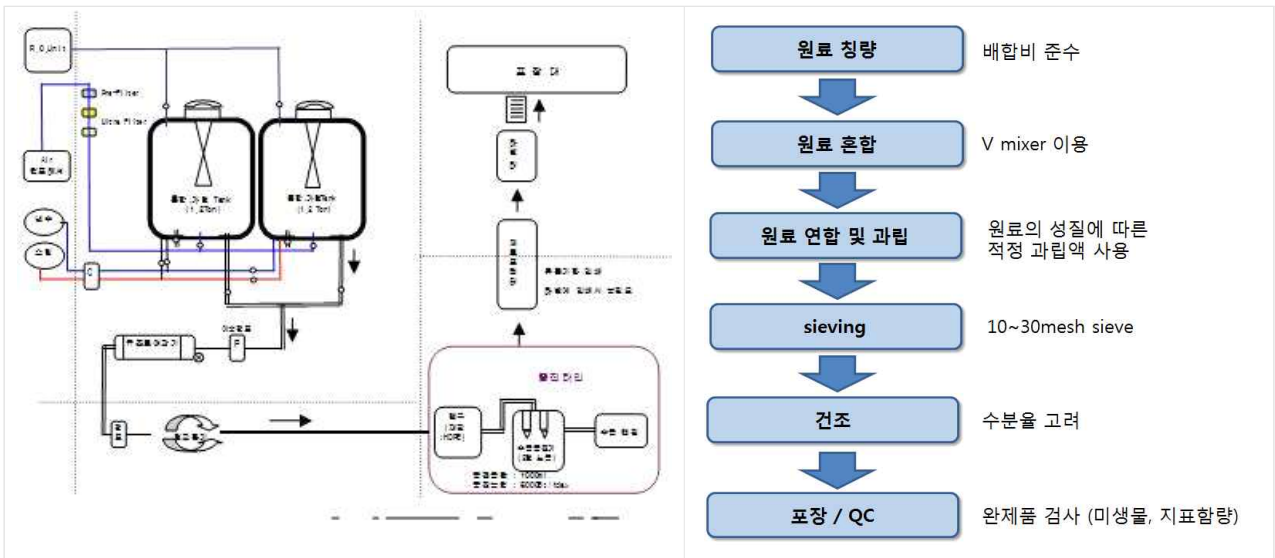
- 콩잎/복합추출물 제조과정 표준화 : 제1세부와 공조
 - 추출물 제조를 위한 전처리 방법 확립
 - 원료 확보 후 세척방법, 절단크기, 건조방법 등을 고려하여 추출수율 및 유효성분의 손실을 최소화할 수 있는 전처리 조건 확립
 - 원료 전처리 방법 : 원료 수확(Harvesting) → 원료 정선>Selecting) → 원료 세척(Washing) → 원료 절단(Slicing) → 건조(Drying)
- 콩잎/복합추출물의 기능/지표성분 고효율 추출조건 확립
 - 추출용매 종류, 추출용매와 원료의 혼합 비율, 추출온도, 추출시간, 추출횟수 등 다양한 조건으로 추출
 - 물 추출 : 온도 조건별(70, 100℃)로 열수 추출
 - 주정 추출 : 주정용 에탄올(ethanol) 비율을 달리 혼합(30, 50, 70, 95%)하여 추출
- 콩잎/복합추출물의 분말화 조건 확립
 - 추출물 제조 후 분무건조를 수행하여 기능/지표성분 및 효능의 안정성 검증
- 콩잎/복합추출물의 유효성분 함량 분석
 - 총 폴리페놀 분석 : Folin-Ciocalteu 시약을 이용하여 비색법으로 측정
 - 총 플라보노이드 분석 : Diethyleneglycol과 1N-NaOH 시약을 이용하여 비색법으로 측정
- 콩잎/복합추출물의 항산화 활성 검증
 - 1,1-dipicryl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical 소거능 측정 : 안정한 free radical인 DPPH를 이용하여 radical 소거활성을 측정
 - 2,2-azinobis (3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid) radical 소거능 측정 : 안정한 free radical인 ABTS를 이용하여 radical 소거활성을 측정
 - NO 소거 효과 : 각 농도별 시료를 5 mM sodium nitroprusside와 혼합하여 25℃에서 150분간 배양. 반응 혼합액을 96-well plate에 주입하여 1% sulphanilamide (in 5% phosphoric acid)와 0.1% naphthylethylene diamine dihydrochloride을 넣어 실온에서 10분간 배양한 후 540nm에서 흡광도를 측정
 - Superoxide dismutase(SOD) 유사활성 : SOD 유사활성 측정은 Bradford(18)의 방법에 따라 각 시료 0.2 ml에 pH 8.5로 보정한 tris-HCl buffer[50 mM tris(hydroxymethyl)aminomethane+10 mM EDTA] 3 ml와 7.2 mM pyrogallol 0.2 ml를 가하고 25℃에서 10분간 방치 후 1 N HCl 0.1 ml로 반응을 정지시킨 다음 420nm에서 흡광도를 측정. SOD 유사활성(%)은 시료용액의 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도 감소율로 나타냄.
 - Hydroxyl radical 측정 : H₂O₂와 FeSO₄ 시료를 혼합하여 37℃에서 5분간 incubation시킨 후 DCFH를 첨가하여 fluorescence(Ex. 485nm, Em 530nm)를 측정
- 콩잎/복합추출물의 세포모델에서 항염증 활성 검증
 - Raw 264.7 대식세포를 1% penicillin-streptomycin와 10% heat-inactivated FBS(fetal bovine serum)를 첨가한 DMEM(Dulbecco' Modified Eagle' Medium)에 배양하여 내독소인 LPS(Lipopolysaccharide)를 대식세포에 처리하고 구절초 추출물을 첨가하여 생성되는 염증 유발물질인 nitric oxide(NO)량 측정

- 콩잎/복합추출물의 기준, 규격 설정
 - 추출물 및 제품의 기준규격 설정을 위해 제조공정 표준화 과정의 결과를 토대로 성상, 기능/지표성분 함량, 유해물질(납, 카드뮴, 총비소, 카드뮴, 총수은, 대장균군, 세균군), 잔류용매, 잔류농약 등을 설정
- 콩잎/복합추출물의 유통기한 설정
 - 추출물 및 제품의 유통기한 설정 실험은 국내 식품의약품안전처 식품, 식품첨가물 및 건강기능식품의 유통기한 설정 기준 등 가이드라인, 관련 법규 등을 참고하여 저장조건을 고려하면서 가속실험, 장기보존 실험 진행
- Fabaton 콩잎 및 두과작물 기능성 소재 이용 건강식품의 시제품화
 - 기능별 시제품 제조 방안
 - 갱년기 장애 개선 : Fabaton 콩잎추출물 이용 갱년기 장애 개선 시제품 제조 후 시제품에 대한 기호적 측면, 효능적 측면 등에서 문제점을 분석하여 최종 제품화에 반응
 - 체지방 감소 및 혈당 개선 : 콩잎 복합추출물 이용 체지방 감소 시제품 제조 후 시제품에 대한 기호적 측면, 효능적 측면 등에서 문제점을 분석하여 최종 제품화에 반응
 - 제품 제형 개발 계획 : 연령대별 맞춤형 제형
 - 건강식품 선호계층 : 중장년층, 노년층
 - 중장년층(프리 실버세대) : 환제, 정제, 하드캡셀, 액상 스파우트파우치, 분말 스틱포, 젤리스티크, 씹어먹는 정제, 카라멜 제형, 빨아먹는 트로키정, 감성을 자극하는 병모양의 액상, 삼키는 정제 등
 - 노년층(실버세대) : 섭취가 용이한 양갱형태, 젤리스티크, 캔디류, 한약재와 같은 액상 사면포 포장
 - 젊은 여성층 : 다이어트 관련 음료 혹은 휴대용 과립 제품
 - 제형의 안전성 및 적합성을 확인하고 제형과 각 기능성 소재를 혼합한 시제품을 제조한 후 이를 바탕으로 하여 제품 대량생산체계 구축과 품질관리 시스템을 확립
- Fabaton 콩잎 및 두과작물 기능성 소재 이용 제품 양산 계획
 - Fabaton 콩잎을 포함한 두과 작물 기능성 원료 확보 방안
 - 제품생산을 위한 생산자 단체 혹은 1차 원료가공업체로부터 안정된 공급을 위한 계약 재배 및 계약서 체결
 - Fabaton 콩잎 생산을 위한 년도별 생산계획 수립, 재배농가의 생산량을 결정함으로써 생물소재 확보
 - 기타 기능성 원료 확보는 건강기능성 원료 판매업체나 재배농가로부터 확보
 - 원료 확보 후 제품 양산
 - 제품은 1협동기관 생산라인 및 제조 노하우를 바탕으로 상품화할 계획
 - 연령별로 기호에 맞고 쉽게 섭취할 수 있도록 스틱젤리, 액상파우치와 같은 다양한 제형별 제조, 제형의 안전성 및 적합성 확인, 제형의 효능 검증, 제형과 각 기능성소재를 혼합한 시제품 제조
 - 시제품을 바탕으로 제품 대량생산체계 구축과 품질관리, 제품의 디자인 및 상품 등록을 수행
 - 대량 생산의 공정의 확립화
 - Pilot 규모의 시생산을 여러 차례 진행함으로써 공정이 대량화되면서 발생하는 문제점에 대하여 정확하게 파악하고 정확한 추출수율을 계산하여 생산 loss 결정
 - 생산량의 대형화에 따라 지표성분 추출 수율 및 유효성분의 기능성을 지속적으로 확

인하면서 lab 규모에서의 생산성을 확인할 계획

- 완제품의 시생산

- 기능성 원료를 이용한 완제품의 생산은 제품의 마케팅과도 밀접한 관계를 가지는 매우 중요한 부분
- 1협동기관은 건강기능식품 전문제조업체로 음료, 정제, 분말, 젤리, 경질 캡셀, 연질 캡셀 등의 다양한 제형화를 통해 대량 생산이 가능
- 액제 생산공정(좌) : 아래 그림과 같은 생산 공정을 통하여 원료의 칭량 → 혼합 → 가열 → 살균 → 파우치포장 → 후살균 → 박스포장의 단계를 거침으로서 완제품 생산
- 고형제 생산공정(우) : 아래 생산 공정을 통하여 원료의 칭량 → 혼합 → 연합 및 과립 → 체과 → 건조 → 포장의 단계를 거침으로서 완제품 생산이 가능



- 이외에 위의 공정을 응용하여 정제제품 등의 생산이 가능하여 소비자의 트렌드를 파악하여 소비자에게 가장 가깝게 다가갈 수 있는 제형을 지속적으로 연구함으로써 시제품을 제조하고 대량생산에 적용시킬 수 있도록 연구개발에 박차를 가할 계획

- 제품 품질관리 시스템 구축

- 추출물을 다양한 신제형에 적용하여 제형이 및 추출물의 기능성 및 효능에 대한 영향 조사
- 시제품의 *in vitro* 소화모델 시험에 적용하여 건강기능성 제품 이용 가능성 확인
- 시제품 중 생리활성 유효성분은 크로마토그래피 분석을 통해 반제품, 완제품 내 유효 성분 함량, 기능성, 회수율 등을 측정함으로써 제품의 표준화 설정
- 제품 안전성 시험법 확립
 - 원료 : 이화학, 미생물, 함량 분석
 - 반제품 : 이화학, 미생물, 공정검사
 - 완제품 : 미생물, 포장검사, 안전성 테스트
 - 이화학시험 : 일반성분, 유해성 금속성분, 봉해시험, 미량성분 시험, 원료함량 시험 등
 - 미생물시험 : 일반세균수, 대장균 등 병원성 미생물 관리
- 유통기한 설정시험 : 제품의 생물학적, 이화학적 유통기한 설정시험

-제품 디자인 및 상품 등록 : 마케팅 전략 수립 후 상품 디자인을 설계하고 다른 제품과 차별화함으로써 소비자의 감성과 신뢰성을 확보할 수 있는 상품을 등록

2-2. 제1세부과제 수행내용 및 결과

2-2-1. 연구 수행내용 및 결과 요약

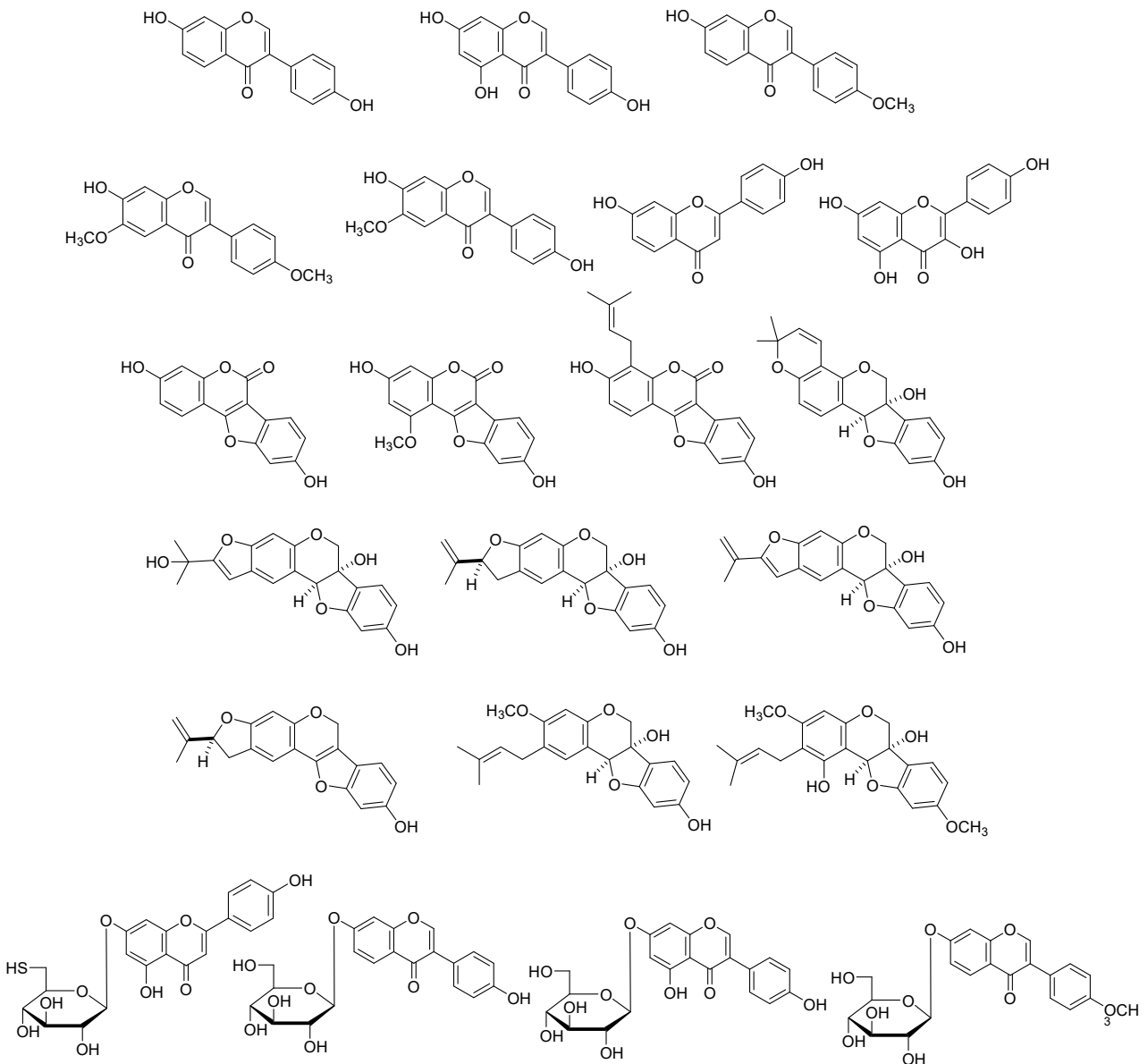
구분	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
1	일반콩잎 및 파바톤콩잎의 페놀성화합물 분석 및 동정	<ul style="list-style-type: none"> - 비교적 극성이 낮고 안정성이 높은 페놀성 대사체 22종을 분리 및 구조동정 - 극성이 높은 배당체들의 구조는 LC-ESI-TOF/MS 기기를 이용하고 화합물의 구조는 질량분석 데이터뱅크자료와 분석 후 검정함 - 콩잎 생육시기와 품종에 따라 대사체 차이 있음. 참고문헌 리뷰데이터 기반 방향설정 	<ul style="list-style-type: none"> - LC-ESI-TOF/MS로 13종의 화합물 분석 완료 - 22종의 화합물 칼럼 분리 후 구조동정 <p>[결과-1]</p>
2	파바톤콩잎 생산기초연구	<ul style="list-style-type: none"> - 가스상태인 에틸렌과 액상화합물질인 에테폰은 적용대상에 따라 장단점이 있음 - 에틸렌 단독처리에서 생산되는 콩잎의 식물성에스트로겐 변화양상 분석 - 에테폰 단독처리에서 생산되는 콩잎의 식물성에스트로겐 변화양상 분석 - 처리농도, 처리시간 등에 따른 함량변화분석 - 생육시기에 따른 식물성에스트로겐양상평가 	<ul style="list-style-type: none"> - 에테폰, 에틸렌 처리에 의한 콩잎 내 식물성에스트로겐 축적 방향성 확보 - 지적재산권 확보 및 학술논문발표로 결과의 객관화 <p>[결과-2]</p>
3	파바톤콩잎의 식물성에스트로겐 포함한 페놀성 대사체분석	<ul style="list-style-type: none"> - 일반콩잎(무처리)와 파바톤콩잎(에틸렌 또는 에테폰 처리콩잎)을 각각 7반복으로 LC-ESI-TOF/MS로 분석 - 무처리 및 처리구의 대사체변화를 통계분석하여 PLS-DA, S-plot, Heatmap, Boxplot 실시 - 에틸렌 및 에테폰 처리에 의해 큰 변화가 일어난 대사체의 정량 및 정성분석 	<ul style="list-style-type: none"> - PLS-DA분석, Heat map 분석, S-plot분석 등으로 에틸렌이 페놀성 화합물 생성에 미치는 영향 평가 - 에틸렌에 의해 큰 변화가 일어난 페놀성 화합물의 정량/정성 분석 <p>[결과-3]</p>
4	파바톤콩잎의 식물성에스트로겐 생합성 기작규명	<ul style="list-style-type: none"> - 일반콩잎과 파바톤콩잎의 식물성에스트로겐 생합성관련 전사인자 분석 - 일반콩잎 대비 파바톤콩잎에서 발현이 증가된 유전자동정 및 발현량 분석 - 발현이 증가된 유전자와 이소플라본 생합성 유전자와의 비교분석 - 발현이 증가된 유전자 기반 식물성 에스트로겐 생합성관련 기작규명 및 가설제시 	<ul style="list-style-type: none"> - 에틸렌에 의해 발현되는 전사인자 규명 - 에틸렌에 의한 이소플라본 생합성 경로 제시 <p>[결과-4]</p>

5	파바톤콩잎의 유리아미노산을 포함한 저분자 화합물 분석	<ul style="list-style-type: none"> - 일반콩잎(무처리) 및 파바톤콩잎(에틸렌 처리) 각각 7반복으로 GC-MS분석 - 콩잎의 유리아미노산, 당, 지방산 등 분석 - 분석된 GC-MS 자료를 바탕으로 통계처리하여 PLS-DA, Heatmap, Boxplot 분석 - 증가된 대사체 및 감소된 대사체 분석 - 아미노산분석기(A.A)를 이용하여 큰 변화가 나타난 아미노산의 정량분석 수행 	<ul style="list-style-type: none"> - PLS-DA, Heatmap, Box plot으로 에틸렌 처리와 저분자화합물의 생산규명 - 큰 변화가 나타난 각 대사체를 annotation함 - 가장 큰 변화가 나타난 유리아미노산의 정량분석 <p>[결과-5]</p>
6	파바톤콩잎 생산 현장적용시험	<ul style="list-style-type: none"> - 현장적용시험을 위한 케이스 연구 - 3년(1년차, 2년차, 3년차) 간 매년 12,000 m² 수준의 면적에서 현장적용시험 수행 - 2년차에는 기술이전 업체에서 50,000 m² 수준의 면적에서 현장적용시험 수행 - 생산된 파바톤콩잎의 세척, 건조, 보관 등에 대한 현장적용시험 수행하여 산업화 준비 	<ul style="list-style-type: none"> - 처리구에 따른 식물성 에스트로겐 함량±50% 편차 - 파바톤콩잎 수확이 7/20~8/10 집중되어 처리한계 - 세척, 건조에 대한 시설투자 새로운 문제로 대두 <p>[결과-6]</p>
7	에테폰 처리에 따른 잔류검사 및 안전성 평가	<ul style="list-style-type: none"> - GC-MS를 이용한 에테폰 분석방법 정립 - 에테폰 회수율 시험 - 에테폰 처리에 따른 잔류 농도, 반감기, 회귀식 및 수확 후 잔류 농도 평가 	<ul style="list-style-type: none"> - 반감기 19.8~23.2(1일)평가 - 1,000ppm 2회 약제 처리, 3일 후 수확한 콩잎에서 에테폰 불검출 <p>[결과-7]</p>
8	개별인정형 제품 개발 위한 파바톤콩잎 표준화	<ul style="list-style-type: none"> - 파바톤콩잎의 표준화를 위한 기초물성 연구 - 파바톤콩잎 추출물의 분말화 조건 - 기준규격 설정을 위한 파바톤콩잎 생물소재 공정 단계별 표준화 연구 - 표준화를 위한 파바톤추출액 제조기준 설정 - 중금속, 미생물, 잔류농약(58종) 등 분석 	<ul style="list-style-type: none"> - 파바톤콩잎 추출물의 개별인정용 규격 확립 - 임상시험을 위한 기준규격에 맞는 분말 확보 <p>[결과-8]</p>
9	토양조건 및 품종이 식물성 에스트로겐 생성에 미치는 영향	<ul style="list-style-type: none"> - 토양조건에 따른 콩잎에 축적된 식물성 에스트로겐 함량 비교 분석 - 21개의 품종을 대상으로 식물성 에스트로겐 함량 비교 분석 	<ul style="list-style-type: none"> - 토양조건 및 콩 품종에 따라 식물성 에스트로겐의 유의있는 변화 관찰 안됨 <p>[결과-9]</p>
10	미생물이용 생물전환 I	<ul style="list-style-type: none"> - 일반콩잎과 파바톤콩잎 영양성분분석 - 유산균이용 파바톤콩잎 발효물 특성 분석 - 유산균처리에 따른 파바톤콩잎 이소플라본 함량 및 일반성분 변화분석 - 유산균단독 및 혼합종균에 의한 발효최적화 - 오미자와 파바톤콩잎혼합소재의 발효최적화 <p>*오미자: 갱년기개선에 도움주는 생물소재</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 유산균 발효 최적화 및 대사체 변화양상 확보 - 혼합균주에 의한 발효특성 및 대사체 변화양상 확보 <p>[결과-10]</p>

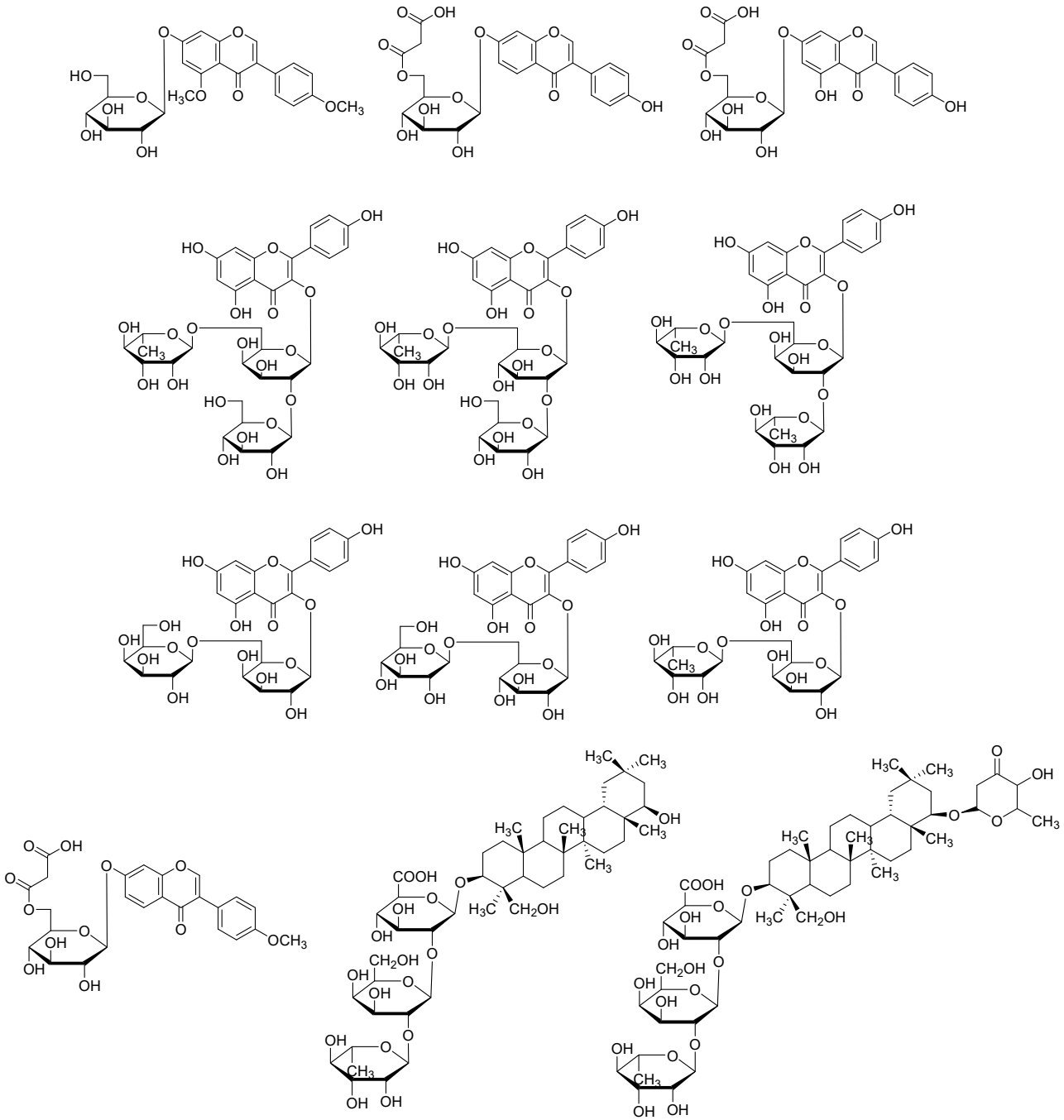
11	미생물이용 생물전환 II	<ul style="list-style-type: none"> - 비배당체 이소플라본의 효율적인 전환을 위한 진균(송이버섯 균사체) 발효기술 확립 - 기존의 액체발효 방식이 아닌 반고체 발효 (semi-solid fermentation) 기술 확립 - 콩 종자에 송이버섯 균사체 발효 중 이소플라본 함량 및 일반성분 변화 분석 - 파바톤 콩잎의 송이버섯 균사체 발효에 따른 이소플라본 함량 변화 	<ul style="list-style-type: none"> - 진균(송이버섯 균사체) 발효 최적화 및 대사체 변화양상 확보 - 비배당체 이소플라본 전환율 95-100% 기술력 확보 <p style="text-align: center;">[결과-11]</p>
12	스마트팜기반 파바톤콩잎 생산연구	<ul style="list-style-type: none"> - 노지(필드)에서 대량재배 시스템에서 파바톤콩잎을 생산할 때 수확, 세척, 건조에 극복해야 될 많은 문제 발생 - 노지재배를 실내재배로 옮겨 안정적 생산, 일정 수준의 식물성 에스트로겐 함량, 수확, 세척, 건조 등에 대한 문제해결 절실함 	<ul style="list-style-type: none"> - 스마트팜에 적용한 기초자료 확보 - 스마트팜으로 응용기술 65% 달성 <p style="text-align: center;">[결과-12]</p>
13	콩과작물인 천근발 대사체 분리 및 구조분석	<ul style="list-style-type: none"> - 파바톤콩잎 활성증가시킬 수 있는 새로운 생물활성소재 탐색 중 천근발 선정 - 천근발(<i>Flemingia philippinensis</i>) 뿌리에서 21종의 대사체 분리 및 구조분석 - 분리된 천근발 활성지표물질에서 이소플라본 유도체 중심으로 후속연구 진행 	<ul style="list-style-type: none"> - 천근발에서 식물성 에스트로겐 유도체 9종 분리 - 분리한 21종의 2차대사체 구조분석 완료 <p style="text-align: center;">[결과-13]</p>
14	천근발에서 분리된 이소플라본 유도체 생리활성 검증	<ul style="list-style-type: none"> - 천근발에서 분리된 식물성에스트로겐 유도체를 Human neutrophil elastase에 적용 - 천근발에서 분리된 식물성에스트로겐 유도체를 Protein Tyrosine Phosphatase 1B에 적용 	<ul style="list-style-type: none"> - HNE 저해제 16종 발굴 - PTP1B 저해제 8종 발굴 <p style="text-align: center;">[결과-14]</p>
15	연구결과의 홍보 및 성과	<ul style="list-style-type: none"> - 파바톤콩잎 pre-marketing을 위한 언론홍보 - 본 기술 2017국가연구개발우수성과 100선 지원 - 본 기술 2017 농림축산식품과학기술 대상 지원 - 지속적인 언론홍보 	<ul style="list-style-type: none"> - KBS, MBC, SBS 등 주요매체 포함 100여회 이상 - 2017 국가연구개발 우수성과 100선 선정 - 2017 농림축산식품과학기술대상 수상(근정포장) - 2019 MBC 다큐멘터리에 주요주제로 방송예정 <p style="text-align: center;">[결과-15]</p>

2-2-2. 일반콩잎 및 파바톤 콩잎의 페놀성화합물 분석 및 동정 (결과-1)

콩잎은 품종 및 재배시기(growth stage)에 따라 다양한 화합물을 활성대사체로 함유하고 있다. 본 대사체 생산농업(Metabolite Farming)연구에는 *Glycine max* 종(species)인 대원콩을 사용하였다. 대사체 분석은 콩잎에서 분리 및 구조분석하여 보고된 33종의 폴리페놀성 및 소이사포닌을 주요 참고문헌에서 리뷰하여 본 연구에서 추적할 목표 활성 대사체로 설정하였다. 아래 그림은 콩잎에서 분리 보고된 활성대사체 이다.



계속

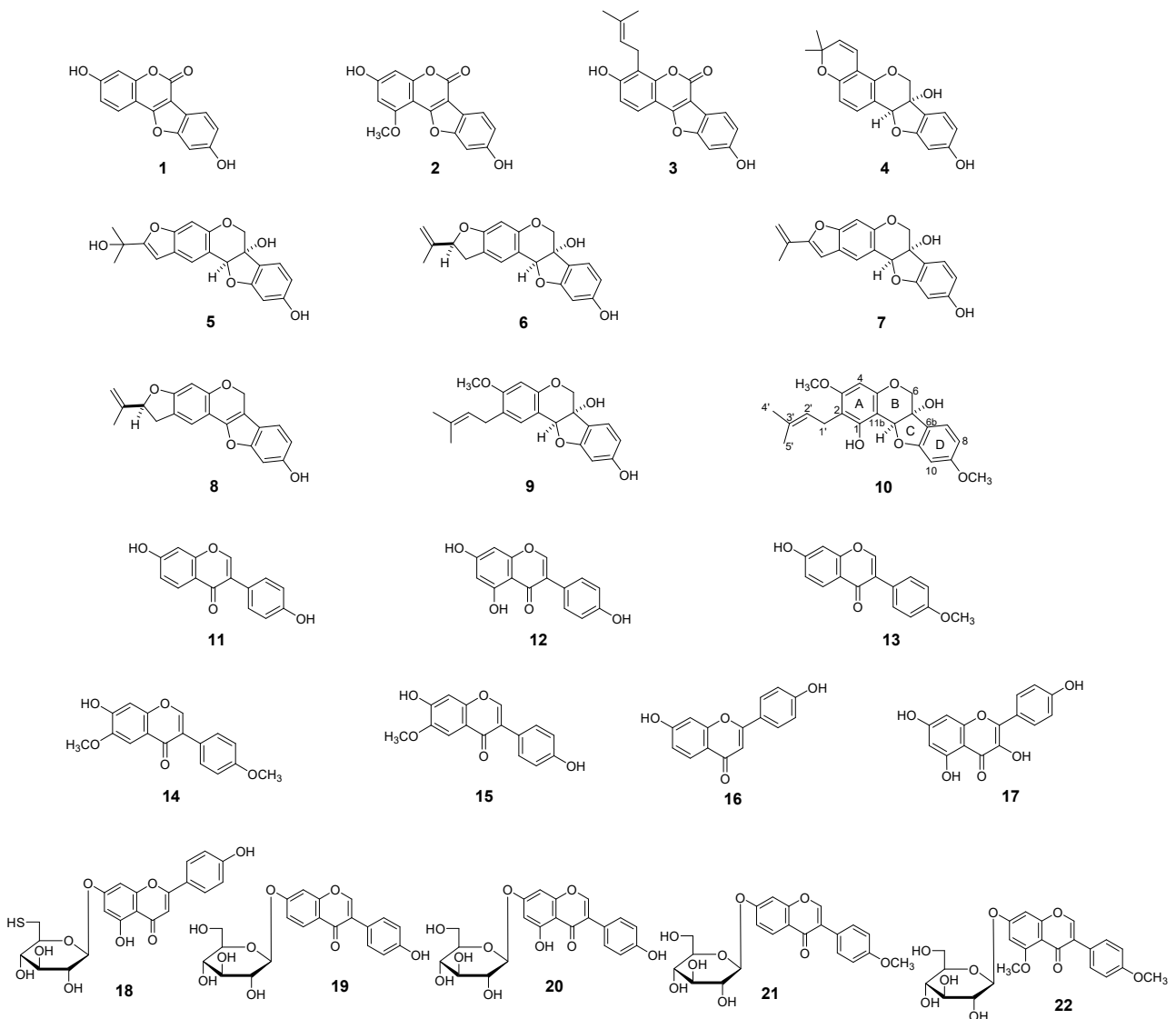


[그림] 콩잎에서 분리 및 확인된 페놀성 대사체 및 소이사포닌 유도체

- 본 연구에서는 극성이 비교적 낮고 구조적으로 안정성이 높은 비배당체 및 당이 1개 붙어있는 배당체는 크로마토그래피법으로 분리하고 NMR, HREIMS, HRESIMS 등 다양한 분광학적 자료를 이용하여 구조 동정하였다.
- 또한 극성이 대단히 높아 분리과정에 안정성이 약한 당이 2개 이상 붙어있는 배당체들은 적합한 용매로 추출하고 전처리하여 LC-ESI-TOF/MS기기를 이용하여 분석하였다. 이들의 구조 분석은 질량분석 데이터뱅크 자료 및 이온조각(Fragment ion)들을 이용하여 동정하였다.

2-2-2-1. 크로마토그래피법으로 분리 및 구조동정하여 획득한 화합물

콩잎의 생육시기 R1~R7에 있는 콩잎에서 아래 그림에 있는 22종의 화합물을 open column, MPLC, HPLC 및 Recycle-HPLC를 이용하여 순수분리하고 이들의 구조를 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT, COSY, HMQC 및 HMBC를 이용하여 동정하였고, 분자식 및 분자식에 해당하는 원소분석은 HREIMS를 이용하여 진행하였다. 분리한 화합물은 coumesterol (1), isotrifoliol (2), phaseol (3), glyceollin I (4), glyceofuran (5), glyceollin III (6), glyceollin VII (7), glyceollin VI (8), glyceollin IV (9), glyceollin VIII (10), daidzein (11), genistein (12), formononetin (13), afromosin (14), glycitein (15), 4',7-dihydroxyflavone (16), kampferol (17), apigenin-7-O- β -glucoside (18), daidzin (19), genistin (20), ononin (21), 및 genistin-5,4'-methyl ether (22)로 확인되었다.



[그림] 크로마토그래피법으로 분리한 22종의 폴리페놀성 화합물

앞에서 기술한 화합물 22종의 mp, 질량, 고분해능질량분석, $^1\text{H-NMR}$, 및 $^{13}\text{C-NMR}$ 등의 분광학적 자료와 화합물을 구성하는 각 탄소 및 수소를 동정(annotation)한 자료는 아래와 같다.

화합물 1 (Coumestrol): yellow needles; mp $>300\text{ }^\circ\text{C}$; EIMS, m/z 268 $[\text{M}]^+$; HREIMS, m/z 268.0373 (calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_8\text{O}_5$ 268.0372); $^1\text{H NMR}$ (500MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 6.91 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-4), 6.93 (1H, dd, $J = 8.5, 2.1$ Hz, H-2), 6.95 (1H, dd, $J = 8.3, 2.1$ Hz, H-8), 7.17 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-10), 7.69 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-7), 7.85 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-1); $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 99.1 (C-10), 102.5 (C-6a), 103.5 (C-4), 104.6 (C-11b), 114.2 (C-2), 114.4 (C8), 115.0 (C-6b), 121.1 (C-7), 123.2 (C-1), 155.1 (C-4a), 156.4 (C-9), 157.5 (C-10a), 158.0 (C-6), 160.0 (C-11a), 161.7 (C-3).

화합물 2 (Isotrifoliol): pale-yellow needles; mp $>300\text{ }^\circ\text{C}$; EIMS, m/z 298 $[\text{M}]^+$; HREIMS, m/z 298.0476 (calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{O}_6$ 298.0477); $^1\text{H NMR}$ (500MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 3.98 (1-OCH₃), 6.51 (1H, s, H-2), 6.52 (1H, s, H-4), 6.94 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-8), 7.13 (1H, s, H-10), 7.68 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-7); $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 56.7 (C-1), 96.2 (C-4), 96.5 (C-2), 98.8 (C-10), 101.7 (C-6a), 114.2 (C-8), 114.6 (C-6b), 114.6 (C-11b), 120.6 (C-7), 155.7 (C-6), 156.2 (C-4a), 157.0 (C-9), 157.1 (C-10a), 159.6 (C-3), 162.1 (C-11a).

화합물 3 (Phaseol): white needles; mp $248\text{--}250\text{ }^\circ\text{C}$; EIMS, m/z 336 $[\text{M}]^+$; HREIMS, m/z 336.1004 (calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{O}_5$ 336.0998); $^1\text{H NMR}$ (500MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 1.63 (3H, s, H-5'), 1.82 (3H, s, H-4'), 3.46 (2H, d, $J = 7.1$ Hz, H-1'), 5.22 (1H, t, $J = 7.2, 6.3$ Hz, H-2'), 6.94 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-8), 6.98 (1H, d, $J = 8.6$ Hz, H-2), 7.15 (1H, s, H-10), 7.68 (1H, s, H-7), 7.70 (1H, s, H-1); $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 18.2 (C-5'), 25.9 (C-4'), 99.0 (C-10), 102.1 (C-6a), 104.6 (C-11b), 113.2 (C-2), 114.3 (C-8), 114.9 (C-6b), 116.0 (C-4), 119.9 (C-7), 120.9 (C-1), 121.8 (C-1'), 132.0 (C-3'), 152.6 (C-4a), 156.4 (C-10a), 157.3 (C-9), 157.9 (C-6), 159.0 (C-3), 160.2 (C-11a).

화합물 4 (Glyceollin I): amorphous yellow powder; mp $154\text{--}158\text{ }^\circ\text{C}$; EIMS, m/z 338 $[\text{M}]^+$; HREIMS, m/z 338.1161 (calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_5$ 338.1154); $^1\text{H NMR}$ (500MHz, CH_3OH) δ 1.39 (3H, s, H-15), 1.40 (3H, s, H-16), 3.92 (1H, d, $J = 11.4$ Hz, H-6 α), 4.13 (1H, d, $J = 11.4$ Hz, H-6 β), 5.18 (1H, s, H-11a), 5.63 (1H, d, $J = 9.8$ Hz, H-13), 6.24 (1H, s, H-10), 6.26 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-8), 6.40 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2), 6.43 (1H, d, $J = 9.8$ Hz, H-12), 7.11 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-7), 7.17 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-1); $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CH_3OH) δ 26.9 (C-15, 16), 69.5 (C-6), 75.7 (C-14), 76.2 (C-6a), 84.3 (C-11a), 97.6 (C-10), 103.8 (C-8), 107.9 (C-4), 112.9 (C-2), 116.4 (C-11b), 119.7 (C-12), 121.2 (C-6b), 123.8 (C-7), 128.5 (C-13), 128.9 (C-1), 154.3 (C-4a), 155.6 (C-3), 159.8 (C-10a), 160.7 (C-9).

화합물 5 (Glyceofuran): colorless needles; mp $181\text{--}183\text{ }^\circ\text{C}$; EIMS, m/z 354 $[\text{M}]^+$; HREIMS, m/z 354.1127 (calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_6$ 354.1103); $^1\text{H NMR}$ (500MHz, CH_3OH) δ 1.62 (6H, s, H-15, 16), 3.98 (1H, d, $J = 11.4$ Hz, H-6 α), 4.18 (1H, d, $J = 11.4$ Hz, H-6 β), 5.39 (1H, s, H-11a), 6.25 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-10), 6.43 (1H, dd, $J = 8.2, 2.1$ Hz, H-8), 6.62 (1H, d, $J = 0.7$ Hz, H-12), 6.99 (1H, s, H-4), 7.20 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-7), 7.65 (1H, s, H-1); $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CH_3OH) δ 29.4 (C-15, 16), 68.2 (C-14), 70.3 (C-6), 76.1 (C-6a), 85.3 (C-11a), 97.4 (C-10), 98.7 (C-4), 99.6 (C-12), 108.0 (C-8), 117.0 (C-11b), 119.7 (C-6b), 122.7 (C-1), 123.6 (C-2), 123.8 (C-7), 152.7 (C-4a), 155.4 (C-3), 160.0 (C-9), 160.8 (C-10a), 163.8 (C-13).

화합물 6 (Glyceollin III): colorless needles; mp $148\text{--}152\text{ }^\circ\text{C}$; EIMS, m/z 338 $[\text{M}]^+$; HREIMS, m/z 338.1158 (calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_5$ 338.1154); $^1\text{H NMR}$ (500MHz, CD_3OD) δ 1.75 (3H, s, H-16), 3.00 (1H, m, H-12 α), 3.37 (1H, m, H-12 β), 3.90 (1H, d, $J = 11.3$ Hz, H-6 α), 4.12 (1H, d, $J = 11.3$ Hz, H-6 β), 4.89 (1H, m, H-15a), 4.91 (1H, s, H-11a), 5.20 (1H, m, H-15b), 5.21 (1H, t, $J = 8.1$ Hz, H-13), 6.24 (1H, s, H-10), 6.28 (1H, s, H-4), 6.41 (1H, dd, $J = 8.1, 2.1$ Hz, H-8), 7.17 (1H,

d, $J = 8.1$ Hz, H-7), 7.25 (1H, s, H-1); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ 15.8 (C-16), 33.5 (C-12), 69.7 (C-6), 75.8 (C-6a), 84.9 (C-11a), 86.6 (C-13), 97.2 (C-4), 97.5 (C-10), 107.9 (C-8), 110.8 (C-11b), 112.4 (C-15), 119.8 (C-6b), 120.9 (C-2), 123.8 (C-7), 126.5 (C-1), 144.3 (C-3), 155.4 (C-4a), 159.7 (C-10a), 160.7 (C-9), 161.1 (C-14).

화합물 7 (Glyceollin VII): yellowish powder; mp 149–151 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ -142 (c 0.26, CH_3OH); EIMS, m/z 336 $[\text{M}]^+$; HREIMS, m/z 336.1007 (calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{O}_5$ 336.0998); CD (DMSO) λ_{max} $\Delta\epsilon$ nm \odot +166.7 (289), -57.6 (235); ^1H NMR (500MHz, CD_3OD) δ 2.00 (3H, s, H-16), 3.90 (1H, d, $J = 11.4$ Hz, H-6 α), 4.07 (1H, d, $J = 11.4$ Hz, H-6 β), 5.04 (1H, s, H-15b), 5.27(1H, s, H-11a), 5.58 (1H, s, H-15a), 6.14 (1H, s, H-10), 6.31 (1H, dd, $J = 8.1, 1.5$ Hz, H-8), 6.61 (1H, s, H-12), 6.86 (1H, s, H-4), 7.09 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-7), 7.55(1H, s, H-1); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ 19.8 (C-16), 72.0 (C-6), 77.9 (C-6a), 87.1 (C-11a), 99.3 (C-10), 100.3 (C-4), 104.1 (C-12), 109.9 (C-8), 113.5 (C-15), 118.9 (C-11b), 121.5 (C- 6b), 124.8 (C-1), 125.7 (C-7), 125.9 (C-2), 134.6 (C-14), 155.2 (C-4a), 157.3 (C-3), 158.9 (C-13), 161.6 (C-9), 162.7 (C-10a).

화합물 8 (Glyceollin VI): yellow solid; mp 147–150 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{23}$ +42.8 (c 0.24, CH_3OH); EIMS, m/z 320 $[\text{M}]^+$; HREIMS, m/z 320.1050 (calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{O}_4$ 320.1049); ^1H NMR (500MHz, CD_3OD) δ 1.73 (3H, s, H-16), 2.97 (1H, m, H-12 α), 3.33 (1H, m, H-12 β), 4.89 (1H, s, H-15a), 5.06 (1H, s, H-15b), 5.19 (1H, t, $J = 8.6$ Hz, H-13), 5.45 (1H, s, H-6 α), 5.47 (1H, s, H-6 β), 6.34 (1H, s, H-4), 6.74 (1H, dd, $J = 8.4, 2.1$ Hz H-8), 6.92 (1H, s, H-10), 7.06 (1H, dd, $J = 8.4, 2.1$ Hz, H-7), 7.23 (1H, s, H-1); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ 17.7 (C-16), 35.4 (C-12), 66.7 (C-6), 88.3 (C-13), 99.6 (C-10), 99.7 (C-4), 107.1 (C-6a), 111.3 (C-11b), 112.6 (C-15), 113.6 (C-8), 117.5 (C-1), 120.0 (C- 6b), 120.1 (C-7), 121.3 (C-2), 146.1 (C-14), 148.8 (C-11a), 156.3 (C-4a), 156.9 (C-9), 158.2 (C-10a), 162.5 (C-3).

화합물 9 (Glyceollin IV): yellowish powder; mp 149–151 °C; EIMS, m/z 354 $[\text{M}]^+$; HREIMS, m/z 354.1467 (calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_5$ 354.1467); CD (CH_3OH) λ_{max} $\Delta\epsilon$ nm \odot +61.7 (290), -157.6 (240); ^1H NMR (500MHz, CD_3OD) δ 1.70 (3H, s, H-5'), 1.74 (3H, s, H-4'), 3.23 (2H, m, H-1'), 3.76 (3-OCH $_3$), 3.90 (1H, d, $J = 11.4$ Hz, H-6 α), 4.10 (1H, d, $J = 11.4$ Hz, H-6 β), 5.16 (1H, s, H-11a), 5.26(1H, m, H-2'), 6.23 (1H, s, H-10), 6.39 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-8), 6.42 (1H, s, H-4), 7.13 (1H, s, H-1), 7.15 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-7); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ 18.2 (C-5'), 26.4 (C-4'), 29.2 (C-1'), 56.3 (3-OCH $_3$), 71.4 (C-6), 77.7 (C-6a), 86.3 (C-11a), 99.4 (C-10), 100.5 (C-4), 109.8 (C-8), 113.5 (C-11b), 121.7 (C-6b), 124.3 (C-2'), 125.6 (C-7), 125.7 (C-2), 132.6 (C-1), 133.5 (C-3'), 155.9 (C-4a), 160.3 (C-3), 161.5 (C-9), 162.6 (C-10a).

화합물 10 (Glyceollin VIII): yellowish powder; mp 151–154 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ -162 (c 0.26, CH_3OH); EIMS, m/z 384 $[\text{M}]^+$; HREIMS, m/z 384.1572 (calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{O}_6$ 384.1573); CD (CH_3OH) λ_{max} $\Delta\epsilon$ nm \odot +54.3 (295), -156.5 (251); ^1H NMR (500MHz, CD_3OD) δ 1.67 (3H, s, H-5'), 1.75 (3H, s, H-4'), 3.27 (2H, m, H-1'), 3.75 (9-OCH $_3$), 3.86 (1H, d, $J = 11.3$ Hz, H-6 α), 3.90 (3-OCH $_3$), 4.05 (1H, d, $J = 11.3$ Hz, H-6 β), 5.15 (1H, m, H-2'), 5.33 (1H, s, H-11a), 6.25 (1H, s, H-10), 6.30 (1H, s, H-4), 6.40 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-8), 7.15 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-7); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ 18.4 (C-4'), 24.1 (C-1'), 26.3 (C-5'), 56.5 (9-OCH $_3$), 63.8 (3-OCH $_3$), 71.4 (C-6), 77.3 (C-6a), 83.3 (C-11a), 97.3 (C-4), 99.4 (C-10), 108.5 (C-11b), 109.7 (C-8), 118.8 (C-2), 121.7 (C-6b), 125.2 (C-2'), 125.4 (C-7), 132.1 (C-3'), 156.6 (C-4a), 161.3 (C-1), 161.5 (C-3), 161.7 (C-9), 162.5 (C-10a).

화합물 11 (Daidzein): white powder; mp 317–320 °C; EIMS, m/z 254 $[\text{M}]^+$; HREIMS, m/z 254.0573 (calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_4$ 254.0579); ^1H NMR (500MHz, DMSO- d_6) δ 6.85 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.93 (1H, dd, $J = 2.1, 8.6$ Hz, H-6), 6.96 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-3', 5'), 7.38 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-2', 6'), 8.07 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, H-5), 8.15 (1H, s, H-2); ^{13}C NMR (125 MHz,

DMSO-*d*₆) δ 102.5 (C-8), 115.4 (C-4'), 115.6 (C-6), 117.0 (C-4a), 123.0 (C-1'), 123.9 (C-3), 127.7 (C-5), 130.5 (C-2', 6'), 153.2 (C-2), 157.6 (C-3',5'), 157.9 (C-8a), 163.1 (C-7), 175.1 (C-4).

화합물 12 (Genistein): amorphous yellow powder; mp 297–299 °C; EIMS, *m/z* 270 [M]⁺; HREIMS, *m/z* 270.0521 (calcd for C₁₅H₁₀O₅ 270.0528); ¹H NMR (500MHz, DMSO-*d*₆) δ 6.21 (1H, d, *J* = 1.6 Hz, H-6), 6.33 (1H, d, *J* = 1.6 Hz, H-8), 6.86 (2H, dd, *J* = 6.7, 1.8 Hz, H-3', 5'), 7.38 (2H, dd, *J* = 6.7, 1.8 Hz, H-2', 6'), 8.06 (1H, s, H-2); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 94.0 (C-8), 99.3 (C-6), 104.8 (C-4a), 115.4 (C-3', 5'), 121.6 (C-3), 122.7 (C-1'), 130.5 (C-2', 6'), 154.3 (C-2), 157.8 (C-4'), 158.0 (C-8a), 162.4 (C-5), 164.7 (C-7), 180.6 (C-4).

화합물 13 (Formononetin): Needles; mp 261–263 °C; EIMS, *m/z* 268 [M]⁺; HREIMS, *m/z* 268.0737 (calcd for C₁₆H₁₂O₄ 268.0736); ¹H NMR (500MHz, DMSO-*d*₆) δ 3.79 (3H, s, OCH₃), 6.87 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-8), 6.96 (1H, d, *J* = 8.8 Hz, H-6), 6.99 (2H, d, *J* = 8.9 Hz, H-3', 5'), 7.51 (2H, d, *J* = 8.9 Hz, H-2', 6'), 7.97 (1H, d, *J* = 8.8 Hz, H-5), 8.35 (1H, s, H-2); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 55.5 (OCH₃), 102.5 (C-8), 114.0 (C-3', 5'), 115.6 (C-6), 117.0 (C-4a), 123.5 (C-3), 124.6 (C-1'), 127.7 (C-5), 130.4 (C-2', 6'), 153.5 (C-2), 157.8 (C-8a), 159.3 (C-4'), 163.0 (C-7), 175.0 (C-4).

화합물 14 (Afromosin): Needles; mp 228–230 °C; EIMS, *m/z* 298 [M]⁺; HREIMS, *m/z* 298.0846 (calcd for C₁₇H₁₄O₅ 298.0841); ¹H NMR (500MHz, DMSO-*d*₆) δ 3.79 (OCH₃), 3.89 (OCH₃), 6.96 (1H, s, H-8), 6.99 (2H, d, *J* = 8.7 Hz, H-3', 5'), 7.44 (1H, s, H-5), 7.52 (2H, d, *J* = 8.7 Hz, H-2', 6'), 8.33 (1H, s, H-2); ¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ 55.5 (OCH₃), 56.2 (OCH₃), 103.2 (C-8), 105.1 (C-5), 114.0 (C-3', 5'), 116.5 (C-4a), 123.0 (C-3), 124.9 (C-1'), 130.4 (C-2', 6'), 147.4 (C-6), 152.1 (C-8a), 153.1 (C-2), 153.4 (C-7), 159.3 (C-4'), 174.6 (C-4).

화합물 15 (Glycitein): white powder; mp 268–271 °C; EIMS, *m/z* 298 [M]⁺; HREIMS, *m/z* 298.0846 (calcd for C₁₇H₁₄O₅ 298.0841); ¹H NMR (500MHz, DMSO-*d*₆) δ 3.84 (3H, s, 6-OCH₃), 6.81 (2H, d, *J* = 8.6 Hz, H-3', 5'), 6.94 (1H, s, H-8), 7.39 (2H, d, *J* = 8.6 Hz, H-2', 6'), 7.43 (1H, s, H-5), and 8.28 (1H, s, H-2); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ 57.9 (OCH₃), 102.5 (C-8), 115.4 (C-3', 5'), 115.6 (C-6), 116.9 (C-4a), 123.0 (C-1), 123.9 (C-3), 127.7 (C-5), 130.5 (C-2', 6'), 141.1 (C-6), 153.3 (C-2), 157.6 (C-4), 163.1 (C-7), 175.1 (C-4).

화합물 16 (4',7-Dihydroxyflavone): yellow needles; mp 317–320 °C; EIMS, *m/z* 254 [M]⁺; HREIMS, *m/z* 254.0578 (calcd for C₁₅H₁₀O₄ 254.0579); ¹H NMR (500MHz, DMSO-*d*₆) δ 6.57 (1H, s, H-3), 6.82 (1H, d, *J* = 8.7 Hz, H-6), 6.84 (2H, d, *J* = 8.8 Hz, H-3', 5'), 6.87 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-8), 7.77 (2H, d, *J* = 8.8 Hz, H-2', 6'), 7.87 (1H, d, *J* = 8.7 Hz, H-5); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ 103.9 (C-8), 105.6 (C-3), 116.7 (C-6), 117.4 (C-3', 5'), 117.7 (C-4a), 124.0 (C-1'), 128.2 (C-5), 129.8 (C-2', 6'), 160.1 (C-8a), 163.0 (C-4'), 165.3 (C-7), 166.4 (C-2), 180.7 (C-4).

화합물 17 (Kaempferol): yellow power; mp 228–230 °C; EIMS, *m/z* 286 [M]⁺; HREIMS, *m/z* 286.0478 (calcd for C₁₅H₁₀O₆ 286.0477); ¹H NMR (500MHz, DMSO-*d*₆) δ 6.19 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-6), 6.44 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H-8), 6.92 (2H, dd, *J* = 6.9, 2.0 Hz, H-3', 5'), 8.05 (2H, dd, *J* = 6.9, 2.0 Hz, H-2', 6'), 9.35 (3-OH), 10.08 (4'-OH), 10.76 (7-OH), 12.47 (5-OH); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ 93.9 (C-8), 98.6 (C-6), 103.4 (C-10), 115.8 (C-3', 5'), 121.1 (C-1'), 129.9 (C-2', 6'), 136.0 (C-3), 147.2 (C-2), 156.6 (C-9), 159.6 (C-4'), 161.1 (C-5), 164.3 (C-7), 176.3 (C-4).

화합물 18 (Apigenin-7-O- β -glucoside): yellow power; ESI-MS(Q-TOF) [M+H]⁺ 433.1139 (calc. 433.1135, C₂₁H₂₁O₁₀, 0.9 ppm); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 3.19 (1H, dd *J* = 9.7, 4.6 Hz, H-4"), 3.30 (1H, dd, *m*, *J* = 13.2, 7.0 Hz, H-2"), 3.32 (1H, dd, *J* = 13.2, 4.6 Hz, H-3"), 3.44 (1H,

m, H-5''), 3.49 (1H, dd, $J = 11.2, 4.8$ Hz, H-6''b), 3.73 (1H, dd, $J = 11.2, 4.6$ Hz, H-6''a), 5.08 (1H, d, $J = 7.4$ Hz, H-1''), 6.45 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 6.83 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.87 (1H, s, H-3), 6.94 (2H, d, $J = 8.73$ Hz, H-3', 5'), 7.96 (2H, d, $J = 8.73$ Hz, H-2', 6'). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-*d*6) δ 60.9 (C-6''), 69.2 (C-4''), 73.5 (C-2''), 76.8 (C-3''), 77.5 (C-5''), 95.2 (C-8), 99.9 (C-6), 100.3 (C-1''), 103.4 (C-3), 105.7 (C-4a), 116.4 (C-3', 5'), 121.3 (C-1'), 128.9 (C-2', 6'), 157.3 (C-8a), 161.5 (C-5), 161.8 (C-4'), 163.2 (C-7), 164.6 (C-2''), 182.4 (C-4).

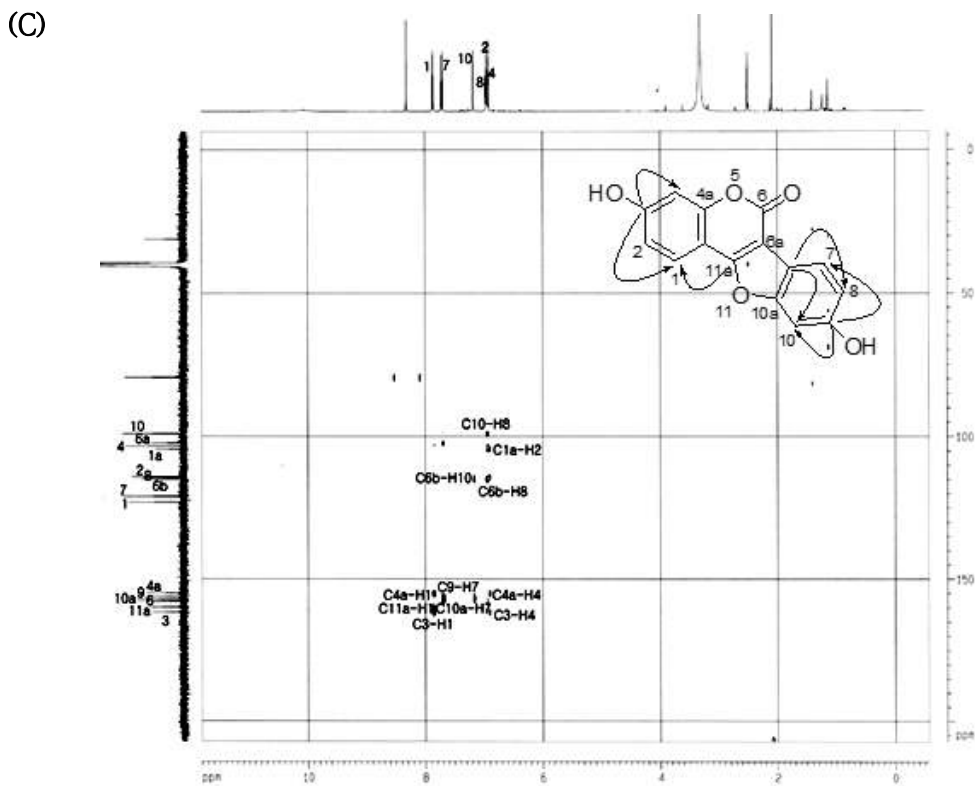
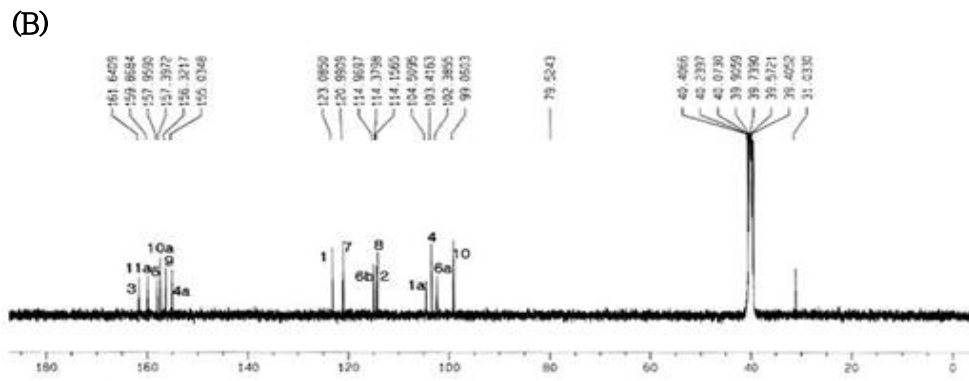
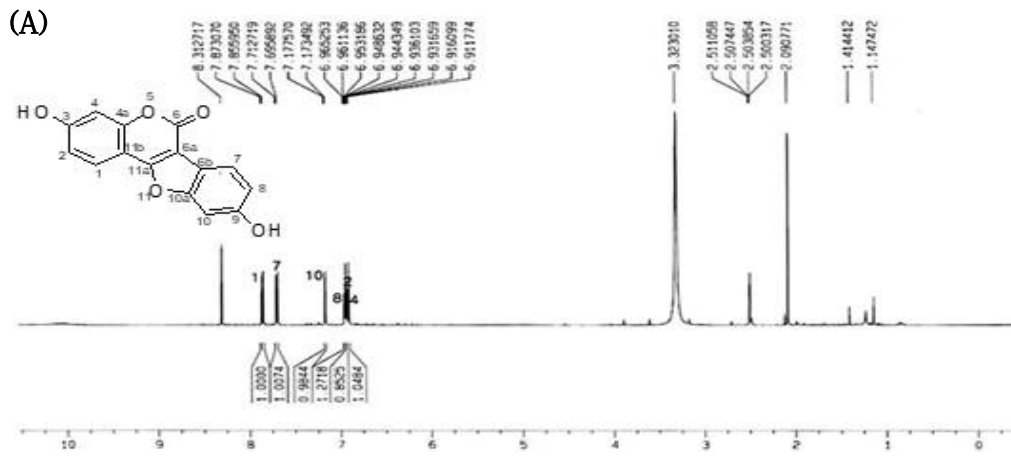
화합물 **19** (Daidzin): yellow power; ESI-MS(Q-TOF) [M+H]⁺ 417.1186 (calc. 417.1186, C₂₁H₂₁O₉, 0.0 ppm); ^1H NMR (500MHz, DMSO-*d*6) δ 3.30 (2H, m, H-4'',2''), 3.47 (3H, m, H-3'', H-5'',6''b), 3.73 (1H, dd, $J = 14.2, 7.4$ Hz, H-6''a), 5.12 (1H, m, H-1''), 6.82 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-3', 5'), 7.15 (1H, dd, $J = 8.6, 2.1$ Hz, H-6), 7.24 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 7.41 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-2', 6'), 8.04 (1H, d, $J = 8.9$ Hz, H-5), 8.39 (1H, s, H-2), and 9.56 (1H, s, 4'-OH); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-*d*6) δ 61.1 (C-6''), 70.1 (C-4''), 73.6 (C-2''), 76.9 (C-3''), 77.7 (C-5''), 100.5 (C-8), 104.5 (C-1''), 115.6 (C-3', 5'), 116.0 (C-6), 118.9 (C-4a), 122.8 (C-3), 124.2 (C-1'), 127.4 (C-5), 130.6 (C-2', 6'), 153.8 (C-2), 157.5 (C-4'), 157.7 (C-8a), 161.9 (C-7), 175.2 (C-4).

화합물 **20** (Genistin): yellow power; ESI-MS(Q-TOF) [M+H]⁺ 433.1139 (calc. 433.1135, C₂₁H₂₁O₁₀, 0.9 ppm); ^1H NMR (500 MHz, DMSO-*d*6) δ 3.19 (1H, dd $J = 9.9, 4.8$ Hz, H-4''), 3.29 (1H, dd, $J = 13.4, 7.4$ Hz, H-2''), 3.32 (1H, dd, $J = 13.4, 4.8$ Hz, H-3''), 3.45 (1H, m, H-5''), 3.48 (1H, dd, $J = 11.4, 5.5$ Hz, H-6''b), 3.73 (1H, dd, $J = 11.4, 4.8$ Hz, H-6''a), 5.06 (1H, d, $J = 7.4$ Hz, H-1''), 6.49 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-6), 6.72 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 6.84 (2H, d, $J = 6.6$ Hz, H-3', 5'), 7.41 (2H, d, $J = 6.6$ Hz, H-2', 6'), 8.41 (1H, s, H-2), 9.53 (1H, s, 4'-OH), and 12.9 (1H, s, 5-OH). ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-*d*6) δ 61.1 (C-6''), 70.1 (C-4''), 73.6 (C-2''), 76.9 (C-3''), 77.6 (C-5''), 95.0 (C-8), 100.0 (C-6), 100.4 (C-1''), 106.5 (C-4a), 115.5 (C-3', 5'), 121.4 (C-3), 123.0 (C-1'), 130.5 (C-2', 6'), 154.9 (C-2), 157.6 (C-4'), 157.9 (C-8a), 162.0 (C-5), 163.4 (C-7), 180.9 (C-4).

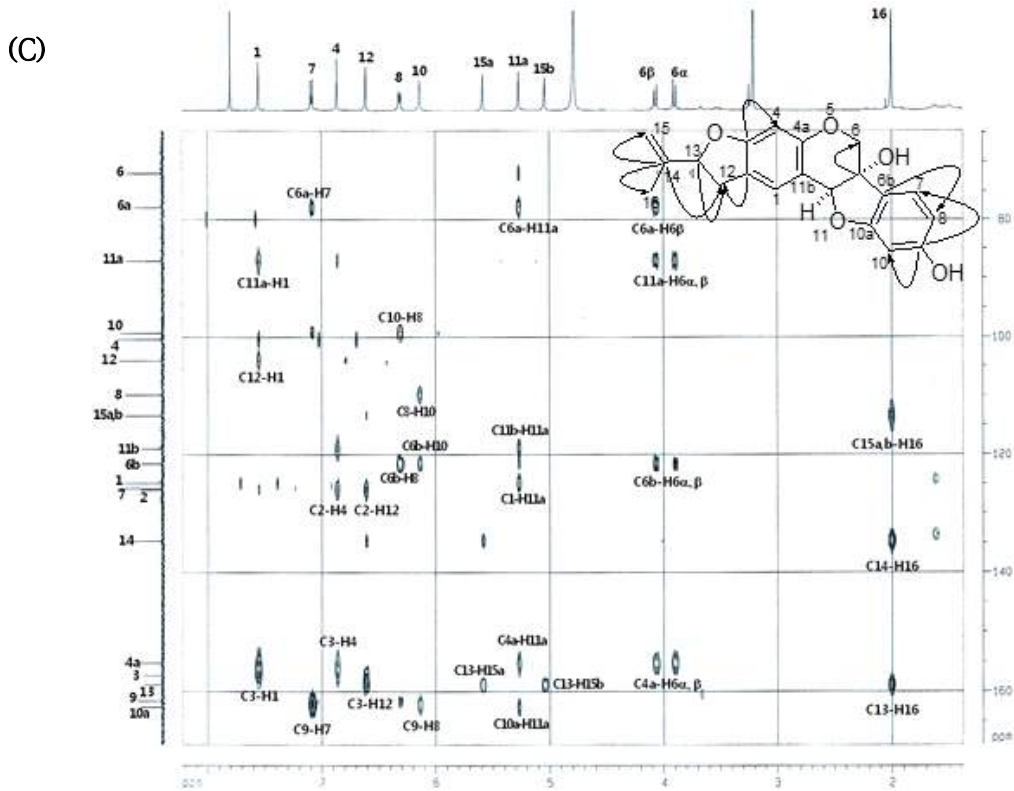
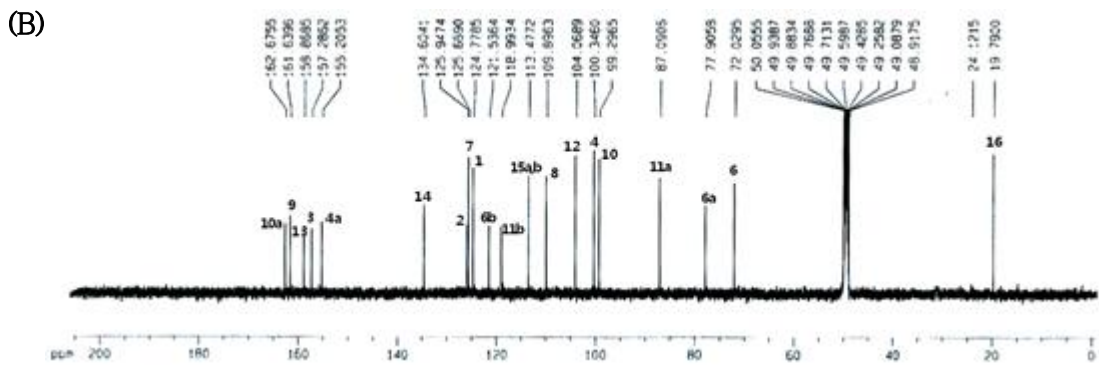
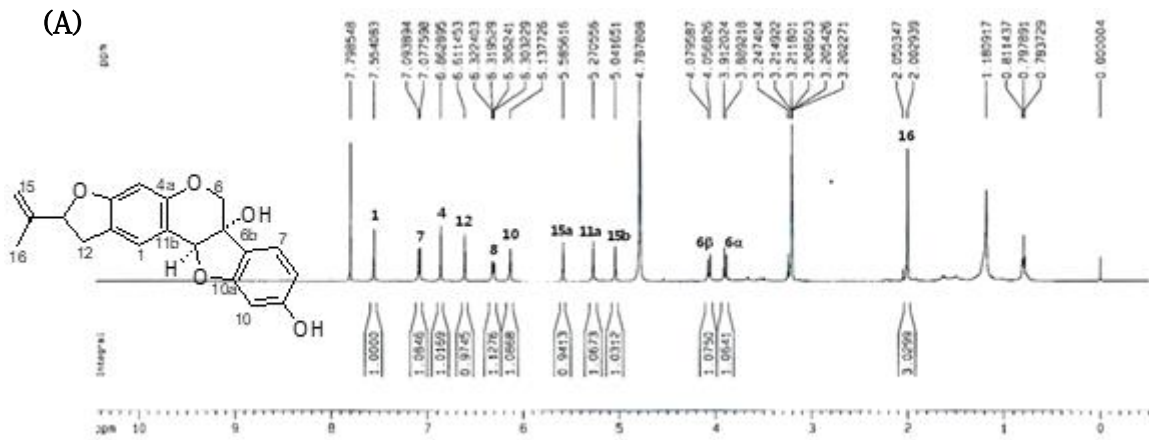
화합물 **21** (Ononin): white power; ESIMS, m/z 431 [M]⁺; ^1H NMR (500 MHz, DMSO-*d*6) δ 3.18 (1H, d, $J = 9.4$ Hz, H-4''), 3.31 (3H, m, H-6''b, H-3'', H-2''), 3.47 (2H, br.d, $J = 7.9$ Hz, H-6''a, 5''), 3.79 (4'-OCH₃), 5.12 (1H, d, $J = 7.1$ Hz, H-1''), 7.00 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, H-5', 3'), 7.16 (1H, dd, $J = 8.9, 2.1$ Hz, H-6), 7.25 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 7.54 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-2', 6'), 8.06 (1H, d, $J = 8.9$ Hz, H-5), 8.44 (1H, s, H-2); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-*d*6) δ 55.5 (4'-OCH₃), 61.0 (C-6''), 70.0 (C-4''), 73.5 (C-2''), 76.9 (C-3''), 77.6 (C-5''), 100.4 (C-1''), 103.8 (C-8), 114.0 (C-3', 5'), 116.0 (C-6), 118.8 (C-4a), 123.8 (C-3), 124.4 (C-1'), 127.3 (C-5), 130.5 (C-2', 6'), 154.0 (C-2), 157.4 (C-8a), 159.4 (C-4'), 161.8 (C-7), 175.0 (C-4).

화합물 **22** (Genistin-5,4'-methyl ether): white power; ESIMS, m/z 461 [M]⁺; ^1H NMR (500MHz, DMSO-*d*6) δ 3.17 (1H, d, $J = 5.1$ Hz, H-4''), 3.34 (2H, m, H-2'', 3''), 3.47 (2H, m, H-5'', 6''b), 3.71 (1H, m, $J = 15.3$ Hz, H-6''a), 3.79 (5-OCH₃), 3.89 (4'-OCH₃), 4.61 (6''-OH), 5.09 (4''-OH), 5.15 (3''-OH), 5.18 (1''-OH), 5.42 (2''-OH), 7.00 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, H-3', 5'), 7.34 (1H, s, H-6), 7.49 (1H, s, H-8), 7.54 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-2', 6'), 8.43 (1H, s, H-2); ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-*d*6) δ 55.5 (4'-OCH₃), 56.2 (5-OCH₃), 61.0 (C-6''a,b), 70.0 (C-4''), 77.1 (C-3''), 77.6 (C-5''), 100.0 (C-1''), 103.8 (C-6), 105.1 (C-8), 114.0 (C-3', 5'), 118.2 (C-4a), 123.2 (C-3), 124.7 (C-1'), 130.4 (C-2', 6'), 147.9 (C-5), 151.6 (C-8a), 152.0 (C-7), 153.7 (C-2), 159.3 (C-4'), 174.7 (C-4).

22종의 화합물 중 주요화합물인 coumesterol (**1**), glyceollin I (**6**), glyceollin IV(**9**), daidzin (**19**), genistin (**20**), ononin (**21**), 및 genistin-5,4' -methyl ether (**22**)의 분광학적 자료는 다음과 같다.

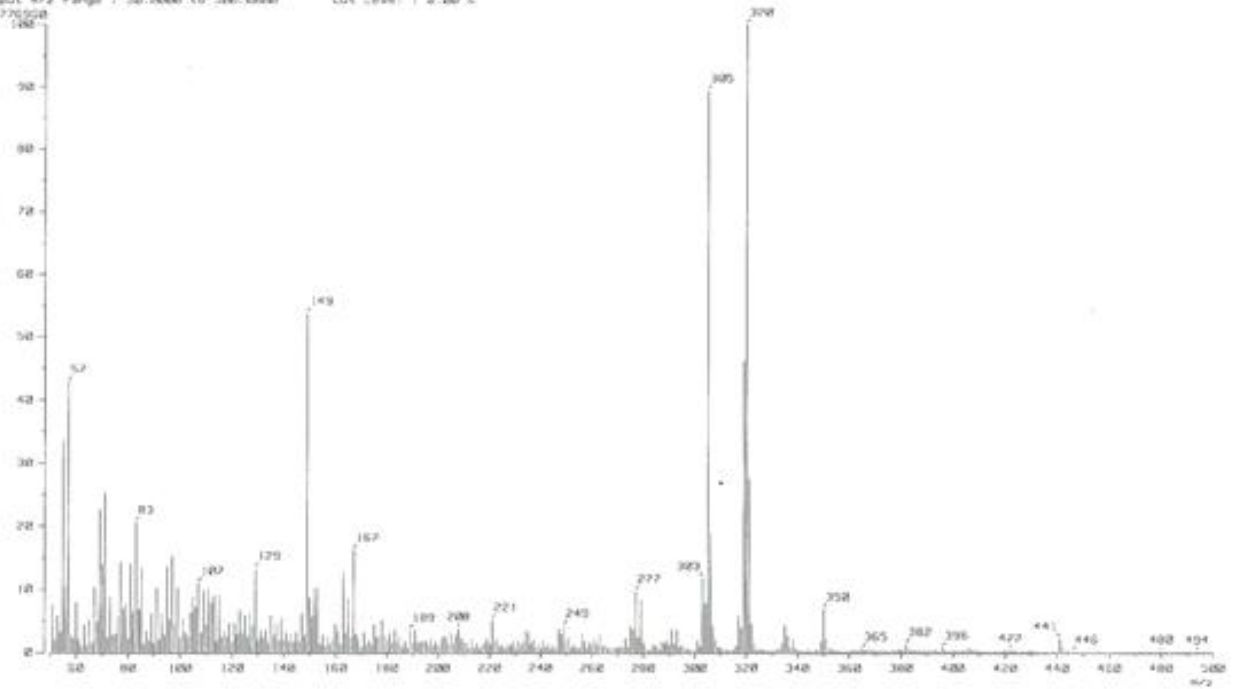


[그림] 화합물 1의 NMR 자료 (A) $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼, (B) $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼, (C) HMBC스펙트럼



[그림] 화합물 **6**의 NMR 자료 (A) $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼, (B) $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼, (C) HMBC스펙트럼

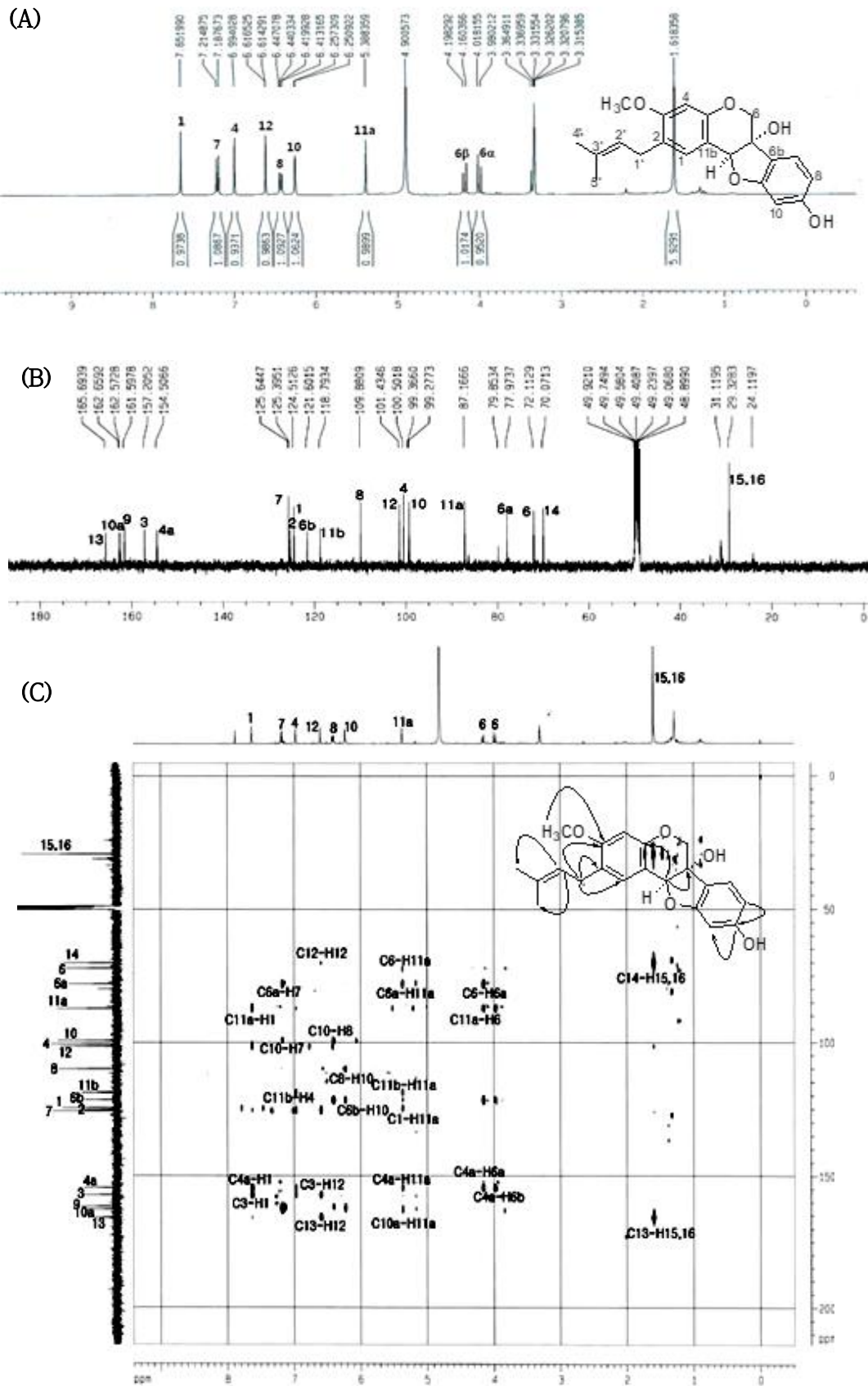
[Mass Spectrum]
 Date : 25-Aug-2012 15:26
 Sample : -
 Note : -
 Inlet : Direct Ion Mode : EI+
 Spectrum Type : Normal Ion (CHN) (near)
 RT : 1.55 min Scan# : 32
 BP : m/z 320.0000 Int. : 1555.00
 Output m/z range : 50.0000 to 500.0000 Cut Level : 0.00 %
 10770228



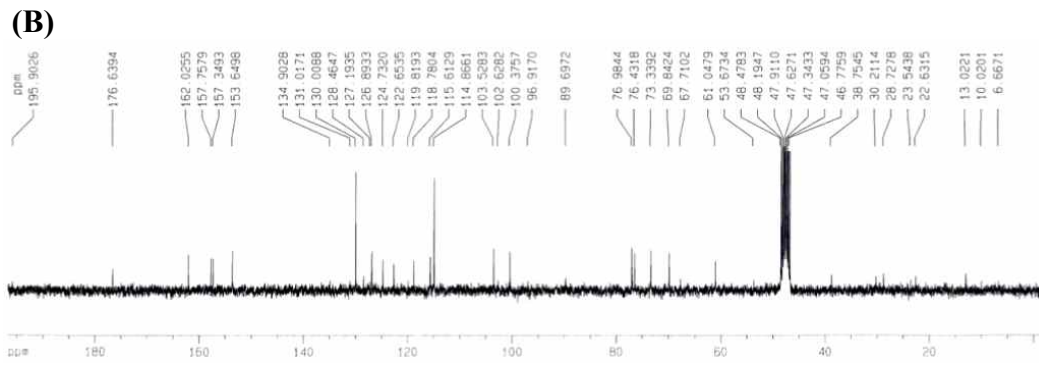
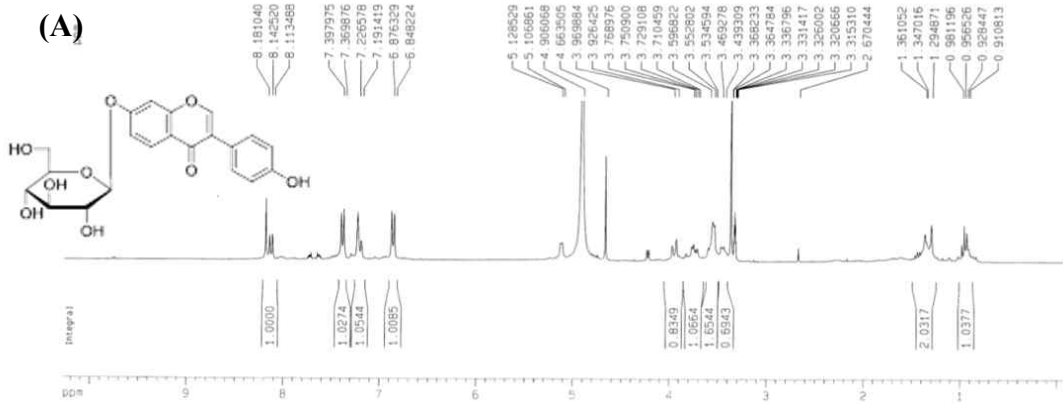
Sample: -
 Note: -
 Inlet: Direct Ion Mode: EI+
 RT: 1.55 min Scan#: 32
 Elements: C 100/1, H 100/1, O 20/1
 Mass Tolerance: 1000ppm, 1mmu if $m/z < 1$, 10mmu if $m/z > 10$
 Unsaturation (U.S.): 1.0 - 30.0

Observed m/z	Int%	Err[ppm / mmu]	U.S.	Composition
338.1158	32.1	+1.2 / +0.4	12.0	C 20 H 18 O 5
		-16.2 / -5.5	3.0	C 13 H 22 O 10

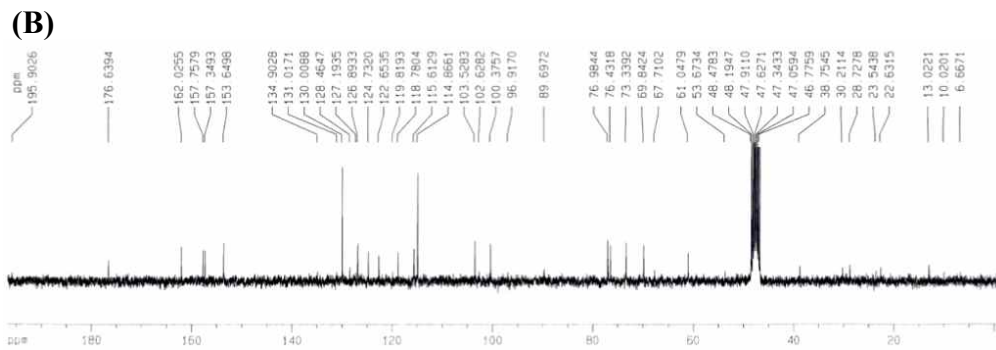
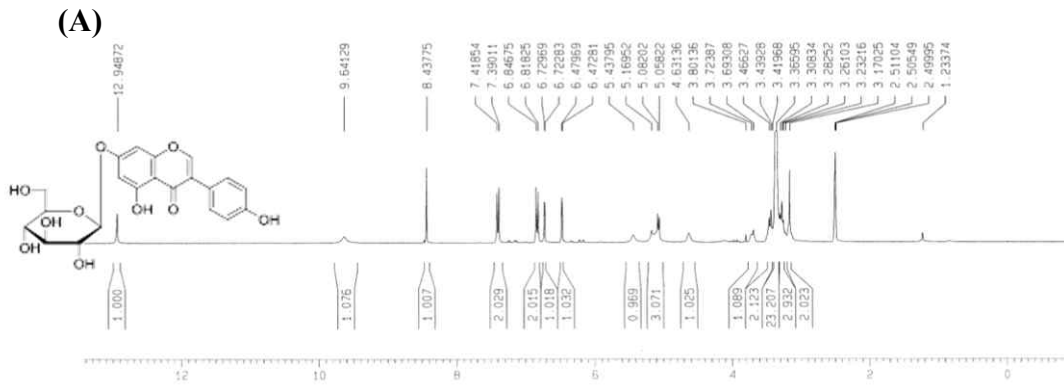
[그림] 화합물 6의 HREIMS 및 원소분석



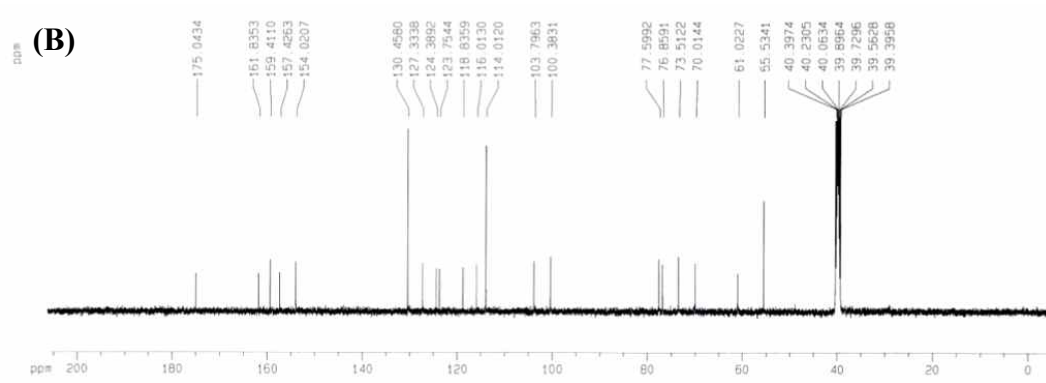
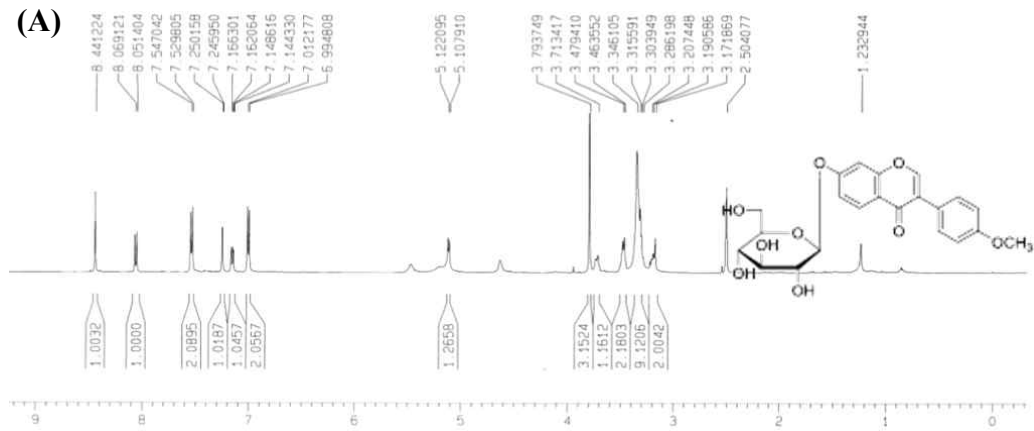
[그림] 화합물 9의 NMR 자료 (A) ^1H -NMR 스펙트럼, (B) ^{13}C -NMR 스펙트럼, (C) HMBC스펙트럼



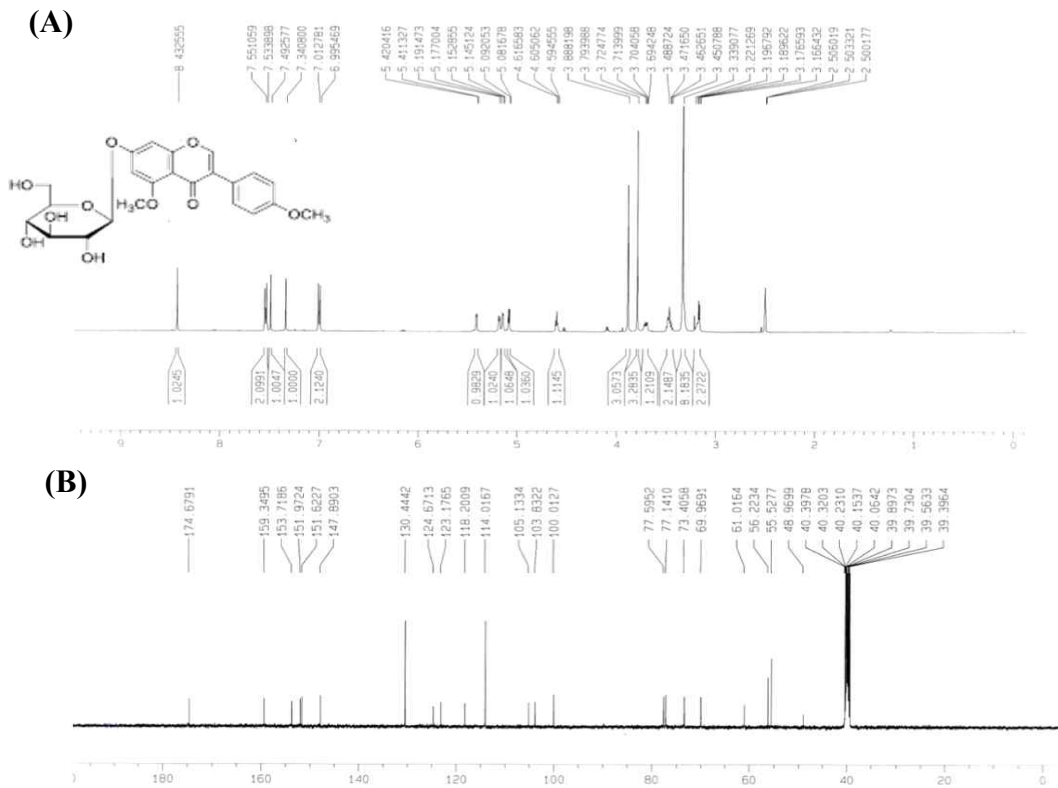
[그림] 화합물 19의 NMR 자료 (A) ^1H -NMR 스펙트럼, (B) ^{13}C -NMR 스펙트럼



[그림] 화합물 20의 NMR 자료 (A) ^1H -NMR 스펙트럼, (B) ^{13}C -NMR 스펙트럼



[그림] 화합물 21의 NMR 자료 (A) ^1H -NMR 스펙트럼, (B) ^{13}C -NMR 스펙트럼



[그림] 화합물 22의 NMR 자료 (A) ^1H -NMR 스펙트럼, (B) ^{13}C -NMR 스펙트럼

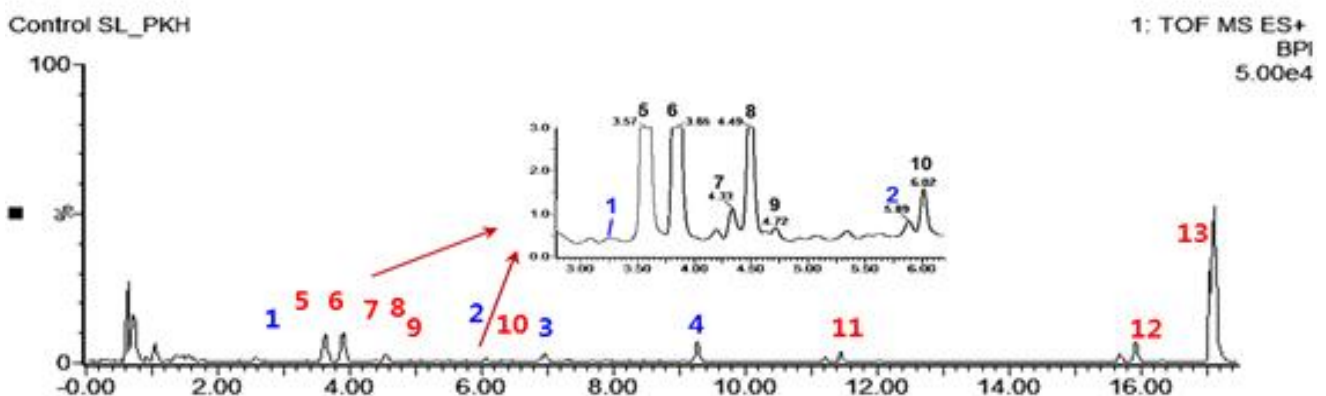
2-2-2-2. UPLC-ESI-Q-TOF-MS를 이용한 화합물 구조동정

극성이 높고 당(glucose)이 2개 이상 붙어있어 적당한 조건(온도, 산도) 가수분해가 일어나는 구조로 실리카겔 등에 안정성이 낮은 화합물은 UPLC-ESI-Q-TOF-MS 질량분석기를 이용하여 분석하였다. 추출조건은 80% EtOH용액으로 추출하여 여과 후 분석에 이용하였다. 질량분석기의 조건은 아래와 같다.

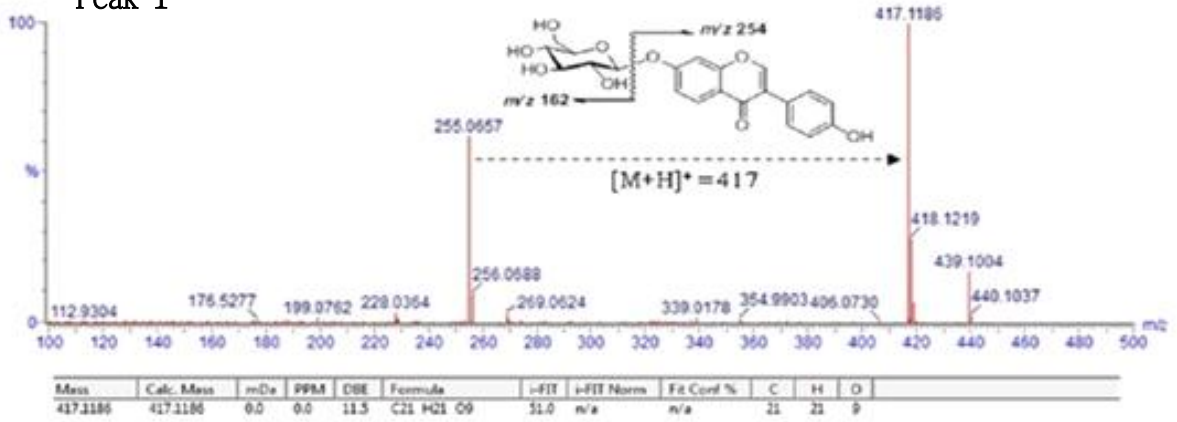
Q-TOF 질량분석기의 이온화는 ESI-positive mode로 수행하였다. 이온화 조건 등은 영문으로 기술하는 것이 보다 명확하여 다음과 같이 기술하였다.

『The ionization source conditions were as follows: capillary voltage of 2.5 kV, source temperature of 100 °C, and desolvation temperature of 300 °C. The sampling cone voltage was set at 40 V, extraction cone 0.8 V, trap collision energy 6.0, transfer collision energy 4.0; the trap gas flow was 1.50 mL/min, ion energy 1.0 V, collision energy 4.0 V. Mass spectrometric data were collected in the range of 50–1200 m/z with a scan time of 0.2 s and interscan delay time of 0.02 s. The MS/MS experiments were performed at variable collision energies (15–40 eV), which were optimized for each individual compound. The accurate mass and composition of the precursor and fragment ions were calculated and sequenced using the MassLynx software (Waters Corp.), which was incorporated into the instrument.』

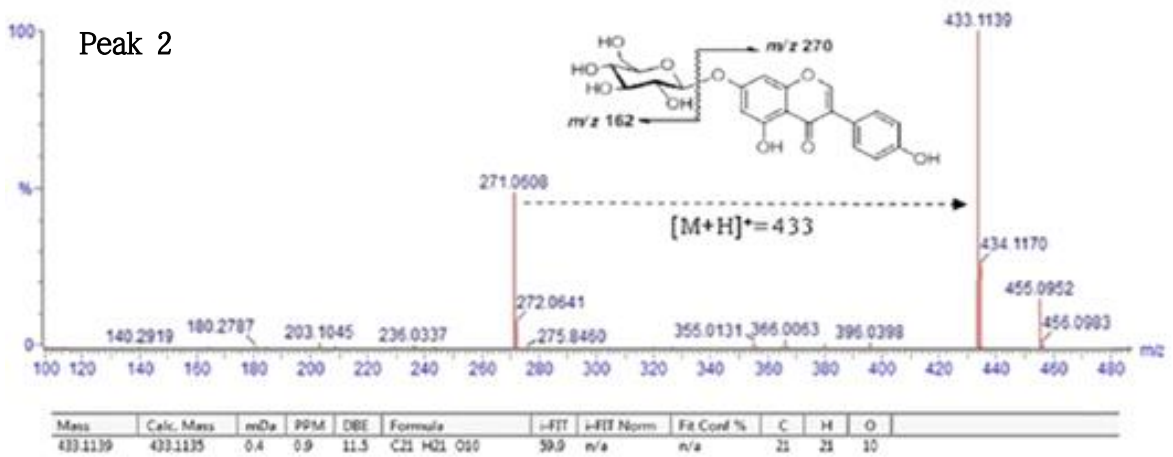
아래 그림은 생육시기 R3 건조 콩잎의 80% 에탄올 추출물의 Q-TOF 질량분석기 BPI(Base Peak Intensity) 그래프이다. 그림에 나타난 바와 같이 10종의 화합물이 분석 가능함을 알 수 있다. 본 실험에서는 13종의 화합물의 각 피크에서 나타난 HRESIMS 값을 가지고 분석한 결과 신뢰도 99%에서 화합물 13종을 분석(annotation)할 수 있었다.



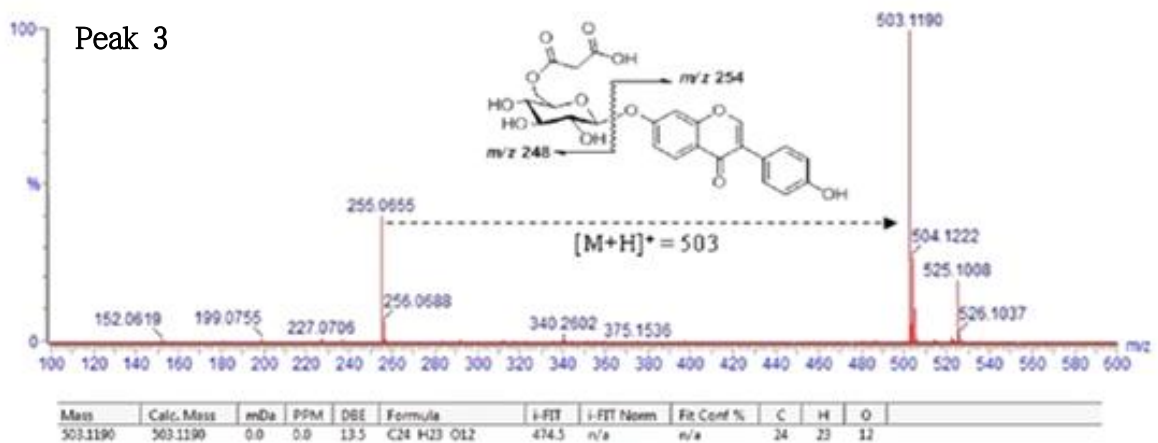
(A) Peak 1



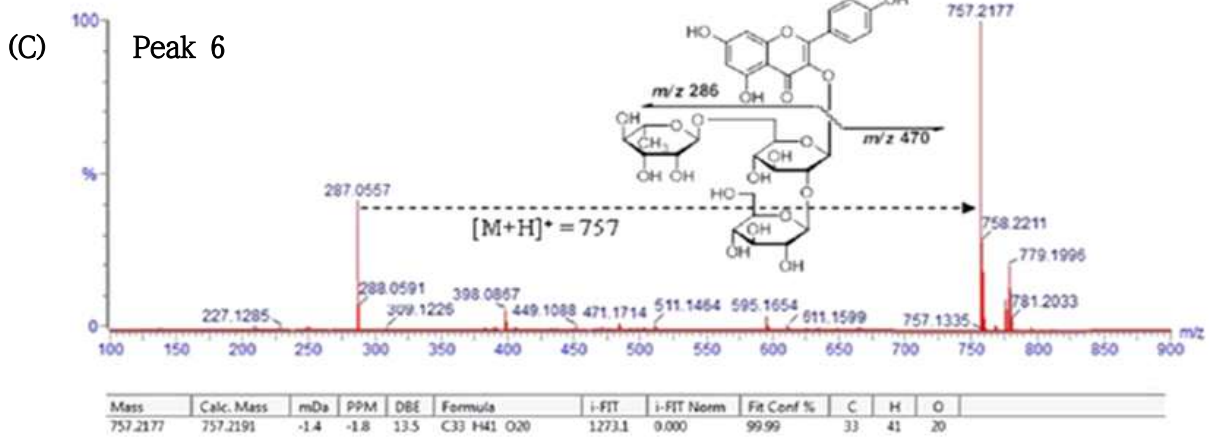
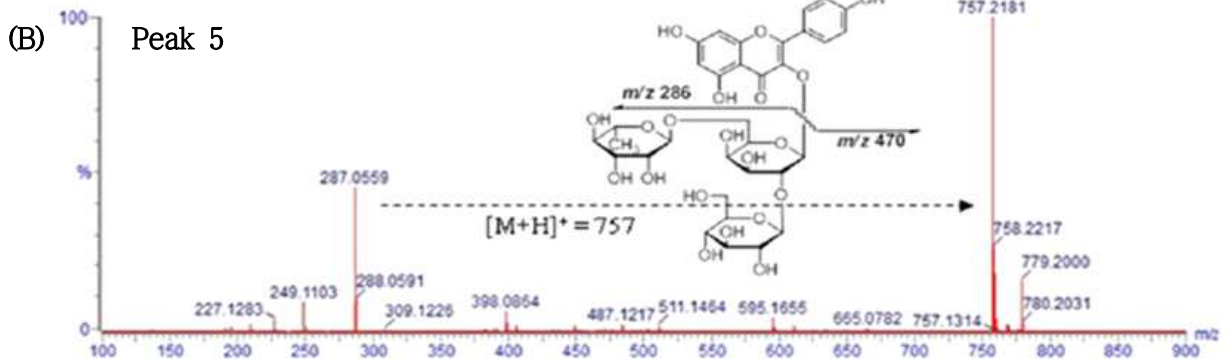
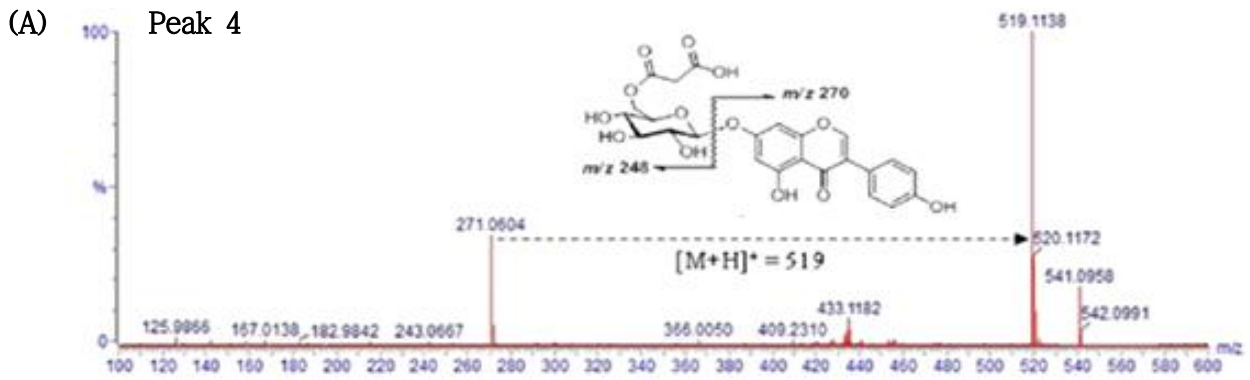
(B) Peak 2



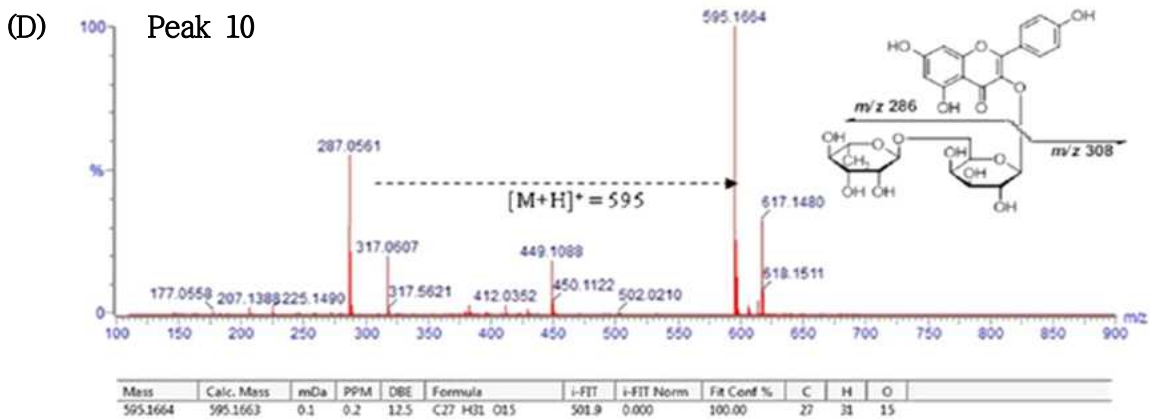
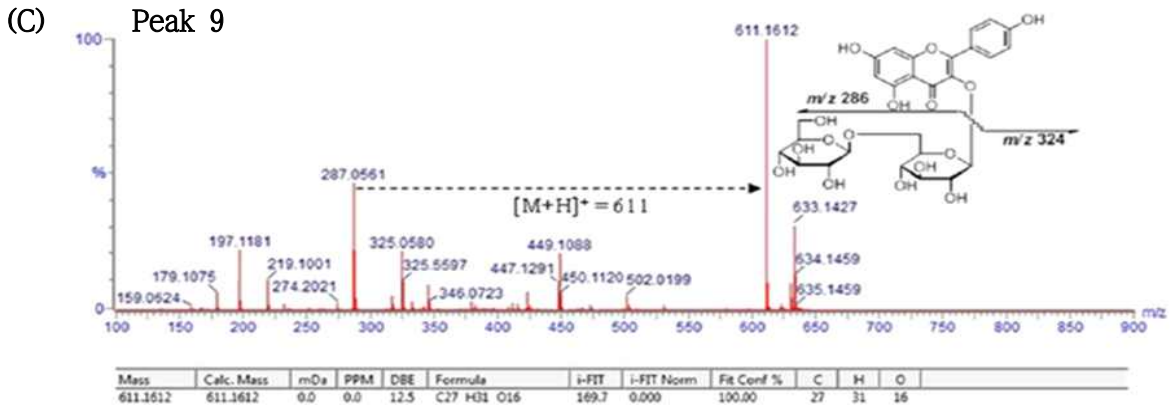
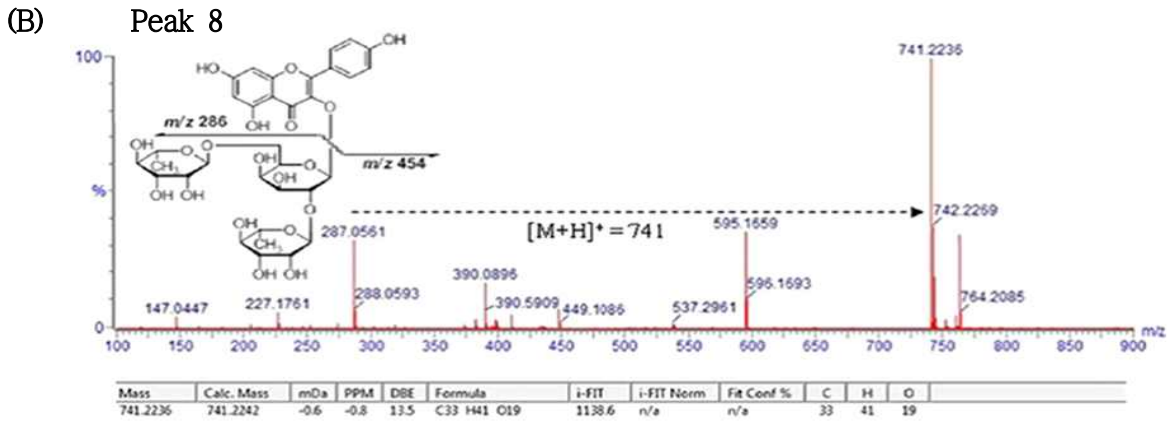
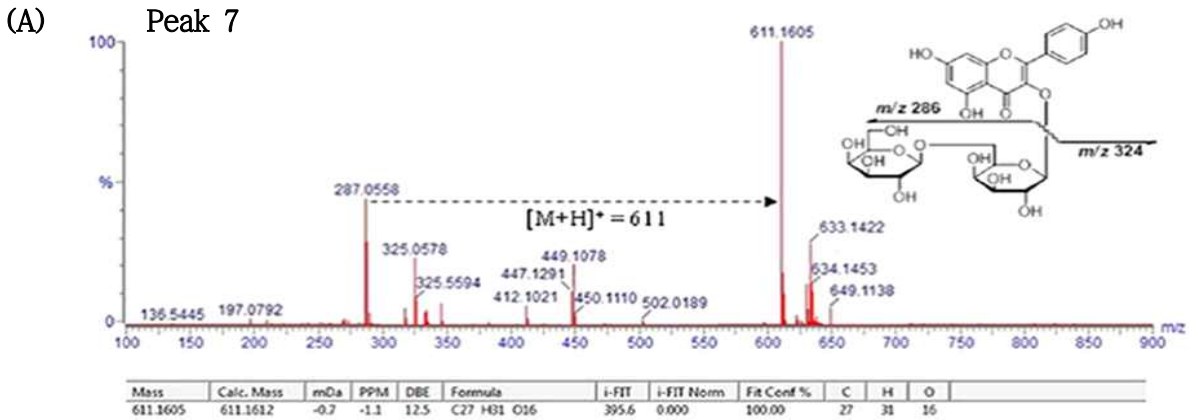
(C) Peak 3



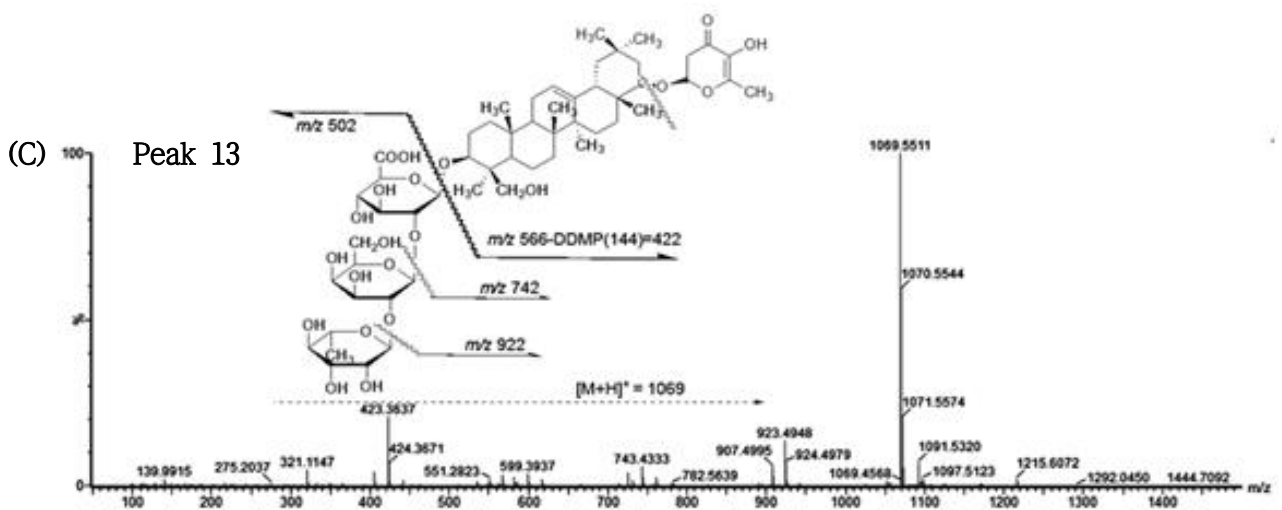
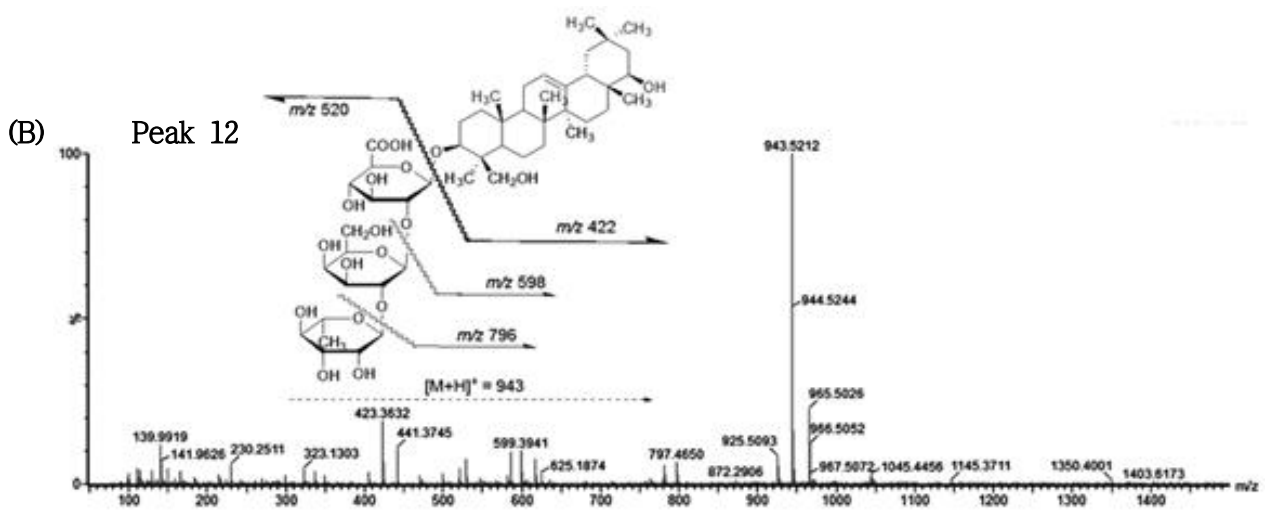
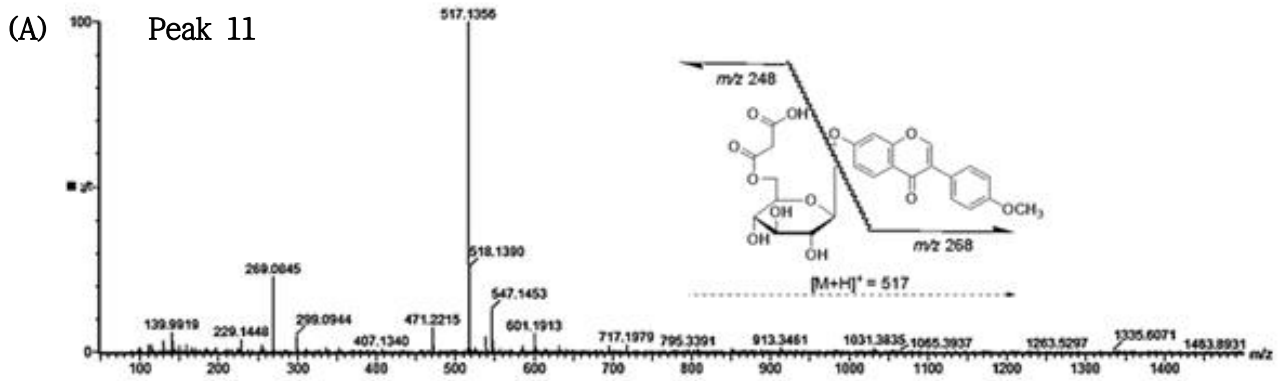
[그림] (A) 피이크 1의 질량분석 스펙트럼 및 원소분석 결과, (B) 피이크 2의 질량분석 스펙트럼 및 원소분석 결과, (C) 피이크 3의 질량분석 스펙트럼 및 원소분석 결과



[그림] (A) 피이크 4의 질량분석 스펙트럼 및 원소분석 결과, (B) 피이크 5의 질량분석 스펙트럼 및 원소분석 결과, (C) 피이크 6의 질량분석 스펙트럼 및 원소분석 결과



[그림] (A) 피이크 7의 질량분석 스펙트럼 및 원소분석 결과, (B) 피이크 8의 질량분석 스펙트럼 및 원소분석 결과, (C) 피이크 9의 질량분석 스펙트럼 및 원소분석 결과, (D) 피이크 10의 질량분석 스펙트럼 및 원소분석 결과



[그림] (A) 피이크 11의 질량분석 스펙트럼, (B) 피이크 12의 질량분석 스펙트럼, (C) 피이크 13의 질량분석 스펙트럼 및 원소분석 결과

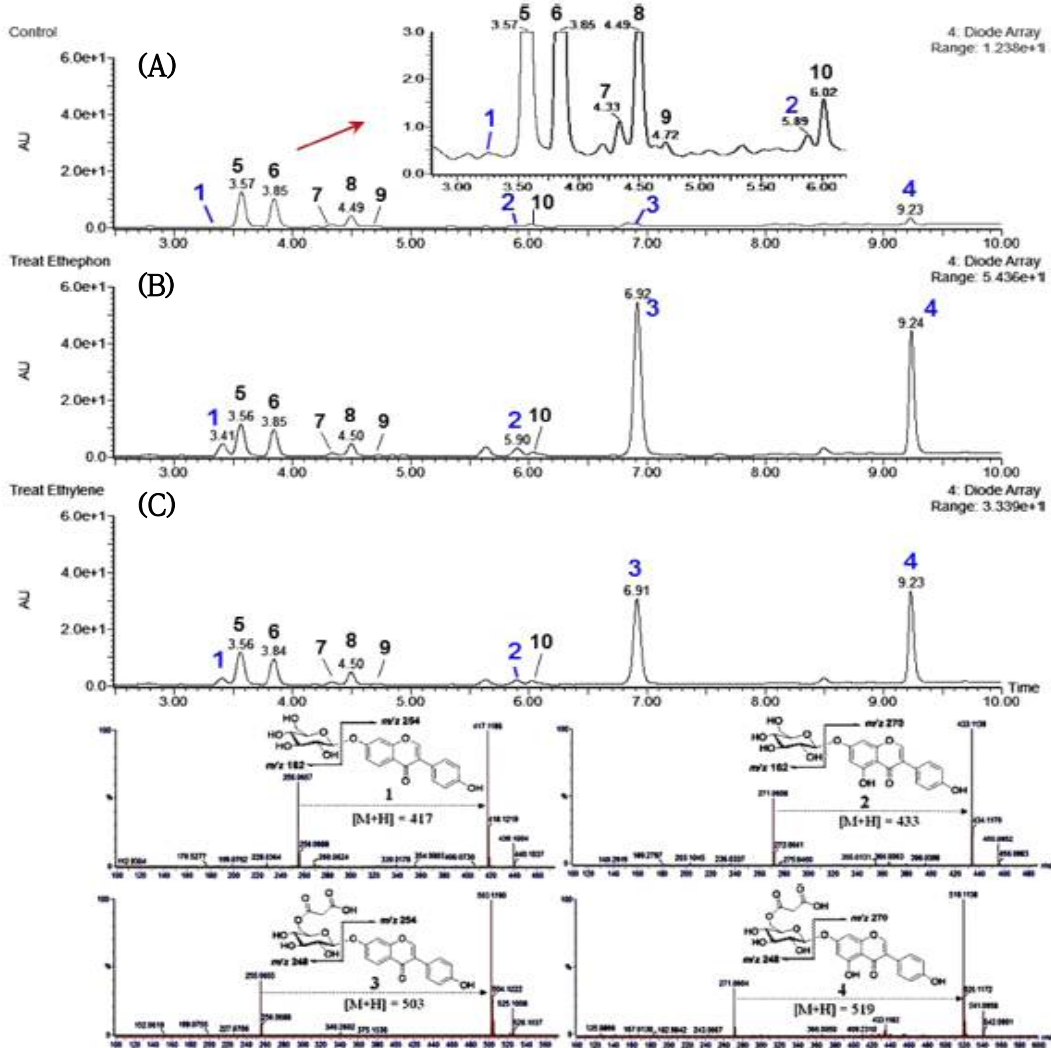
[표] UPLC-ESI-Q-TOF-MS에서 구조동정된 피이크 1-13의 분석표 요약

Peak no.	RT (min)	UV	[M+H] ⁺ (MF)	Other fragmental ion [M+H] ⁺ (MF)	Identification
1	3.41	259.7	417.1186 calc. 417.1186 (C ₂₁ H ₂₁ O ₉)	269.0624 (C ₁₂ H ₁₃ O ₇), 256.0688 (C ₁₅ H ₁₂ O ₄), 255.0657 (C ₁₅ H ₁₁ O ₄), 228.0364 (C ₁₃ H ₈ O ₄), 199.0762 (C ₁₃ H ₁₁ O ₂)	daidzin
2	5.89	259.8	433.1139 calc. 433.1135 (C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀)	271.0608 (C ₁₅ H ₁₁ O ₅), 236.0337 (C ₁₁ H ₈ O ₆)	genistin
3	6.92	257.4	503.1190 calc. 503.1190 (C ₂₄ H ₂₃ O ₁₂)	255.0655 (C ₁₅ H ₁₁ O ₄), 227.0706 (C ₁₄ H ₁₁ O ₃), 199.0755 (C ₁₃ H ₁₁ O ₂), 152.0619 (C ₅ H ₁₂ O ₅)	malonyldaidzin
4	9.23	259.8	519.1138 calc. 519.1139 (C ₂₄ H ₂₃ O ₁₃)	433.1182 (C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀), 271.0604 (C ₁₅ H ₁₁ O ₅), 243.0667 (C ₁₄ H ₁₁ O ₄)	malonylgenistin
5	3.57	264.7 344.8	757.2181 calc. 757.2191 (C ₃₃ H ₄₁ O ₂₀)	595.1655 (C ₂₇ H ₃₁ O ₁₅), 511.1464 (C ₂₃ H ₂₇ O ₁₃), 487.1217 (C ₂₄ H ₂₃ O ₁₁), 398.0864 (C ₁₇ H ₁₈ O ₁₁), 287.0559 (C ₁₅ H ₁₁ O ₆)	kaempferol-3-O- β -D-glucopyranosyl(1→2)- α -L-rhamnopyranosyl(1→6)- β -D-galactopyranoside
6	3.85	264.5 342.7	757.2177 calc. 757.2191 (C ₃₃ H ₄₁ O ₂₀)	611.1599 (C ₂₇ H ₃₁ O ₁₆), 595.1654 (C ₂₇ H ₃₁ O ₁₅), 471.1714 (C ₁₈ H ₃₁ O ₁₄), 449.1088 (C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁), 398.0867 (C ₁₇ H ₁₈ O ₁₁), 287.0557 (C ₁₅ H ₁₁ O ₆)	kaempferol-3-O- β -D-galactopyranosyl(1→2)- α -L-rhamnopyranosyl(1→6)- β -D-glucopyranoside
7	4.49	264.7 346.8	611.1605 calc. 611.1612 (C ₂₇ H ₃₁ O ₁₆)	449.1078 (C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁), 447.1291 (C ₂₂ H ₂₃ O ₁₀), 325.0578 (C ₁₄ H ₁₃ O ₉), 287.0558 (C ₁₅ H ₁₁ O ₆)	kaempferol-3-O- β -digalactopyranoside
8	4.33	264.8 346.7	741.2236 calc. 741.2242 (C ₃₃ H ₄₁ O ₁₉)	595.1659 (C ₂₇ H ₃₁ O ₁₅), 449.1086 (C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁), 380.0896 (C ₁₉ H ₁₈ O ₉), 287.0561 (C ₁₅ H ₁₁ O ₆)	kaempferol-3-O-(2,6-di-O- α -L-rhamnopyranosyl)- β -D-galactopyranoside
9	4.72	264.8 346.8	611.1612 calc. 611.1612 (C ₂₇ H ₃₁ O ₁₆)	449.1088 (C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁), 447.1291 (C ₂₂ H ₂₃ O ₁₀), 325.0580 (C ₁₄ H ₁₃ O ₉), 287.0561 (C ₁₅ H ₁₁ O ₆)	kaempferol-3-O- β -diglucopyranoside
10	6.02	264.7 346.8	595.1664 calc. 595.1663 (C ₂₇ H ₃₁ O ₁₅)	450.1122 (C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁), 449.1088 (C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁), 412.0352 (C ₂₀ H ₁₂ O ₁₀), 317.0607 (C ₁₆ H ₁₃ O ₇), 287.0561 (C ₁₅ H ₁₁ O ₆), 177.0558 (C ₁₀ H ₉ O ₃)	kaempferol-3-O- α -L-rhamnopyranosyl(1→6)- β -D-galactopyranoside
11	11.41	264.8 346.7	517.1355 calc. 517.1346 (C ₂₅ H ₂₅ O ₁₂)	517.1346 (C ₂₅ H ₂₅ O ₁₂), 269.0850 (C ₁₂ H ₁₃ O ₇)	Formononetin7-(6''-malonylglucoside)
12	15.92	204.2 288.6	943.5265 calc. 943.5266 (C ₄₈ H ₇₉ O ₁₈)	735.4501 (C ₄₁ H ₆₇ O ₁₁), 459.3667 (C ₃₀ H ₂₅ O ₃)	SoyasaponinI
13	17.12	211.1 292.3	1069.5581 calc. 1069.5583 (C ₅₄ H ₈₅ O ₂₁)	725.2011 (C ₄₀ H ₆₅ O ₉), 423.0993 (C ₂₈ H ₂₁ O ₂)	Soyasaponinbg

2-2-3. 파바톤콩잎 생산기초연구 (결과-2)

콩잎에서 식물성에스트로겐의 함량을 획기적으로 높일 수 있는 대사체 생산농업(Metabolite Farming) 기술개발 중 에틸렌 또는 에틸렌 공여체에 에테폰(ethephon)이 식물성에스트로겐 생합성을 증진시킨다는 사실을 발견하고 아래와 같은 실험을 실시하여 식물성에스트로겐 생합성을 최적화시키는 조건을 확보하고자 하였다.

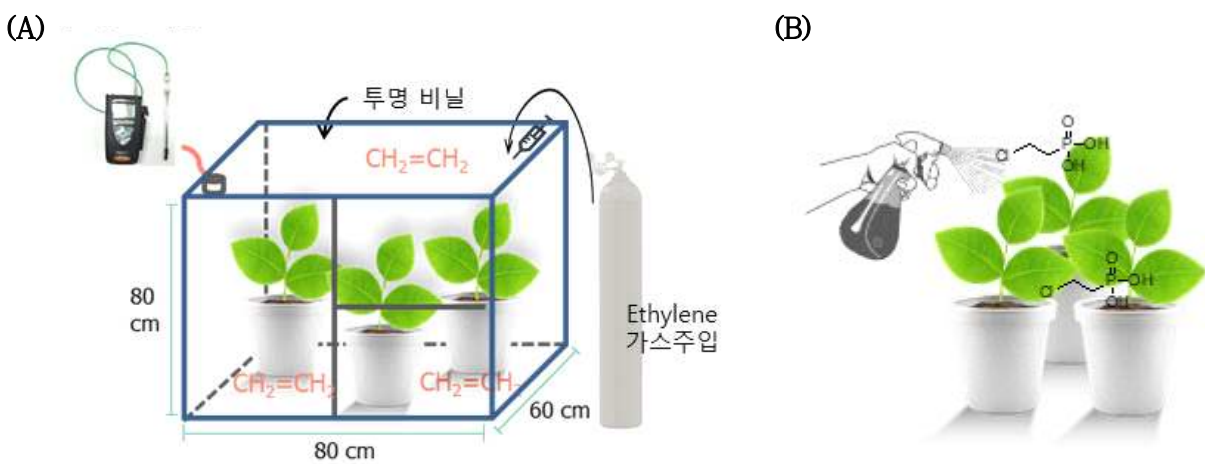
본 실험에 사용한 콩 종자는 경남 밀양시 소재 농촌진흥청 남부작물연구소에서 분양받은 *Glycine max* (L) Merrill의 대원콩을 사용하였다. 콩은 비닐하우스에서 생육시기가 R4가 될 때까지 80일간 재배하였으며, 각 생육시기별 R1, R2, R3 및 R4 식물체를 필요에 따라 사용하였다. 콩 재배는 4월에서 7월까지 하였고 온도는 15~35°C였다. 각 실험은 5 반복하여 통계처리하는 표준편차 분석법으로 하였다. 식물성에스트로겐 생산을 위해 에틸렌 및 에테폰을 각각 처리하였다. 에틸렌 및 에테폰을 처리했을 때 식물성 에스트로겐인 daidzin, genistin, malonyl daidzin, malonyl genistin이 아래 그림과 같이 다량 생산됨을 확인하였다.



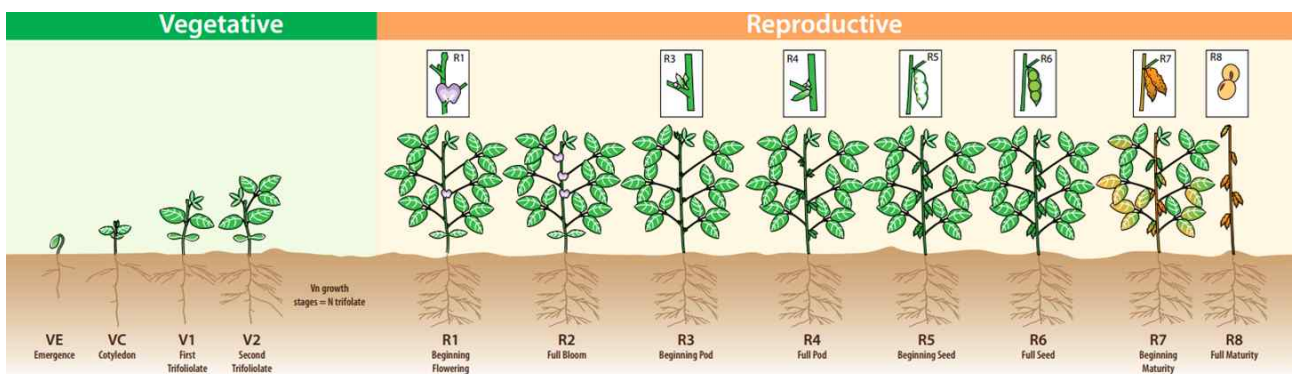
[그림] 에틸렌 또는 에테폰을 처리했을 때 콩잎에 식물성 에스트로겐인 daidzin, genistin, malonyl daidzin, malonyl genistin 생성양상 (A) 처리전 일반콩잎, (B) 에테폰 처리 콩잎, (C) 에틸렌 처리 콩잎

2-2-3-1. 에틸렌 및 에테폰 처리에 따른 식물성 에스트로겐 생산 실험설계개요

본 실험에 사용한 콩은 앞에서 기술한 대원콩을 사용하였고, 비닐하우스에 재배하는 콩 식물체를 필요에 따라 생육시기별로 사용하였다. 실험은 비닐로 밀폐된 챔버(80×60×80cm)를 사용하였고, 에틸렌은 에테폰 가스를 이용하여 농도 조절하였고, 이때 에틸렌 검출기는 XP-3160을 사용하였다. 포트에 재배된 식물체 5개를 각 챔버에 넣고 96시간 처리하였다. 24시간마다 챔버의 문을 열어 30분씩 환기시키고 다시 밀폐하였다. 생육시기(R1~R4)는 참고문헌에 제시한 아래 그림을 참고하여 구별하였다. 에틸렌 공여체인 에테폰은 시중에 유통되는 38% 에테폰 수용액을 희석하여 분무처리하는 방법으로 사용하였고, 아래 그림과 같이 열린 공간에서 하였다.



[그림] (A) 에틸렌 처리장치, (B) 에테폰 처리방법



[그림] 콩 식물체의 생육시기별 특징

2-2-3-2. 에틸렌 농도가 식물성 에스트로젠 생산에 미치는 영향

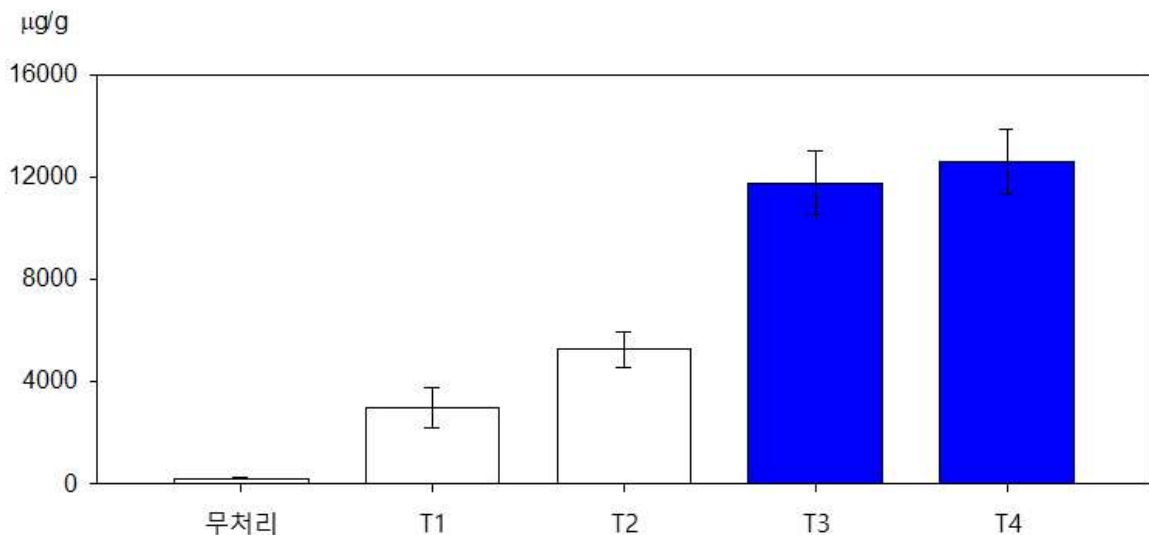
에틸렌 농도의 영향을 평가하기 위해 에틸렌 농도를 달리하는 4개의 실험구 T1 = 100 µg/g, T2 = 200 µg/g, T3 = 400 µg/g, 및 T4 = 800 µg/g에서 실험하였다. 온도는 25±10°C를 유지하였다. 24시간마다 문을 개방하였고 72시간 처리하였다.

아래 표에 나타난 바와 같이 100 µg/g 농도에서 800 µg/g까지 식물성 에스트로젠의 농도는 크게 증가하였으나 400 µg/g과 800 µg/g에서 함량에 대한 유의는 관찰되지 않았다. 오히려 800 µg/g에서는 콩잎이 노란색으로 변하고 낙화가 많이 일어나서 바이오매스가 줄어드는 것을 관찰하였다.

[표] 에틸렌 농도가 콩잎의 식물성 에스트로젠 생산에 미치는 영향

구분	처리된 에틸렌 농도 (µg/g)				
	무처리	T1	T2	T3	T4
		100	200	400	800
1	220	3,500	5,500	14,500	12,450
2	200	2,500	5,620	11,000	10,250
3	210	2,450	5,420	12,350	11,250
4	190	4,500	4,580	11,000	12,500
5	180	4,250	3,560	12,500	12,350
6	210	2,350	5,680	12,500	15,460
7	220	1,950	5,670	11,500	11,250
8	215	1,850	4,860	11,250	13,520
9	212	2,900	5,600	12,530	12,000
10	198	3,100	5,500	12,000	12,600
11	178	3,120	5,900	10,200	11,500
12	216	2,850	4,800	9,580	13,000
13	204	2,750	4,260	11,500	13,500
14	205	3,920	6,010	10,530	11,200
15	206	2,900	5,900	13,200	12,920

*HPLC를 이용한 정량분석을 실시하였고 malonyl dadizin 및 malonyl genistin 정량은 dadizin 및 genistin의 검량 곡선에서 분자량을 고려하여 계산하였다. 함량을 total isoflavone양으로 계산하였다.



[그림] 생육시기 R3 식물체의 에틸렌 농도별 식물성 에스트로젠 함량 변화 T1: 100 µg/g, T2: 200 µg/g, T3: 400 µg/g, 및 T4: 800 µg/g

2-2-3-3. 에틸렌 처리시간이 식물성 에스트로젠 생산에 미치는 영향

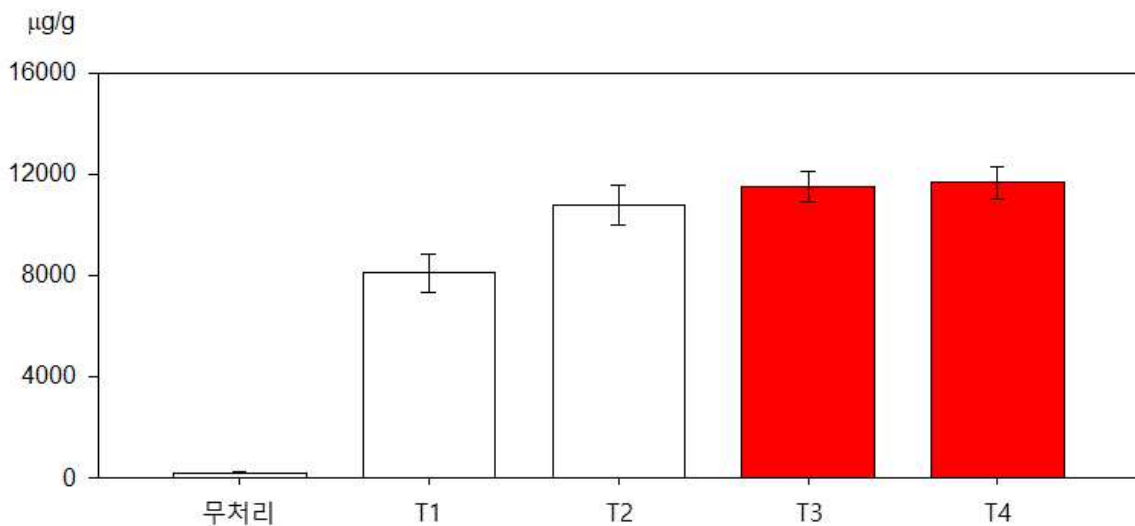
에틸렌 처리시간이 식물성 에스트로젠 생산에 미치는 영향을 규명하기 위해 T1 = 24 h, T2 = 48 h, T3 = 72 h, 및 T4 = 96 h에서 관찰하였다. 에틸렌 처리 농도는 400 µg/g에서 실시하였으며 식물체는 생육시기 R3를 사용하였다. 챔버의 조건은 앞에서 기술한 바와 같이 25±10°C 및 24시간 마다 문을 개방하였다.

24시간 처리와 48시간 처리에는 큰 차이가 관찰되었으나 48시간부터 96시간에서는 뚜렷한 유의는 관찰되지 않았다. 72시간부터는 낙화되는 잎의 양이 늘어 남으로 바이오매스 확보에는 부정적인 영향을 미쳤다.

[표] 에틸렌 처리시간이 콩잎의 식물성 에스트로젠 생산에 미치는 영향

구분	에틸렌 처리시간				
	무처리	T1 24h	T2 48h	T3 72h	T4 96h
1	210	8,560	12,000	11,560	11,520
2	200	9,500	10,020	12,560	13,000
3	210	8,150	10,500	12,300	11,450
4	190	7,950	10,050	11,600	12,000
5	185	7,850	10,020	11,200	11,200
6	198	7,250	10,302	11,000	12,020
7	210	8,020	10,600	11,500	11,700
8	215	8,200	12,100	11,000	11,900
9	213	8,400	9,800	12,000	11,500
10	214	7,850	10,900	12,500	11,800
11	200	7,900	9,900	13,000	12,000
12	200	7,800	10,700	9,900	13,000
13	250	7,600	11,200	10,900	11,000
14	220	7,500	12,500	10,800	10,500
15	189	9,110	11,200	10,880	10,600

*HPLC를 이용한 정량분석을 실시하였고 malonyl dadizin 및 malonyl genistin 정량은 dadizin 및 genistin의 검량 곡선에서 분자량을 고려하여 계산하였다. 함량을 total isoflavone양으로 계산하였다.



[그림] 생육시기 R3 식물체의 에틸렌 처리 시간별 식물성 에스트로젠 함량 변화 T1: 24h, T2: 48h, T3: 72h, 및 T4: 96h

2-2-3-4. 에틸렌 처리에서 생육시기가 식물성 에스트로겐 생산에 미치는 영향

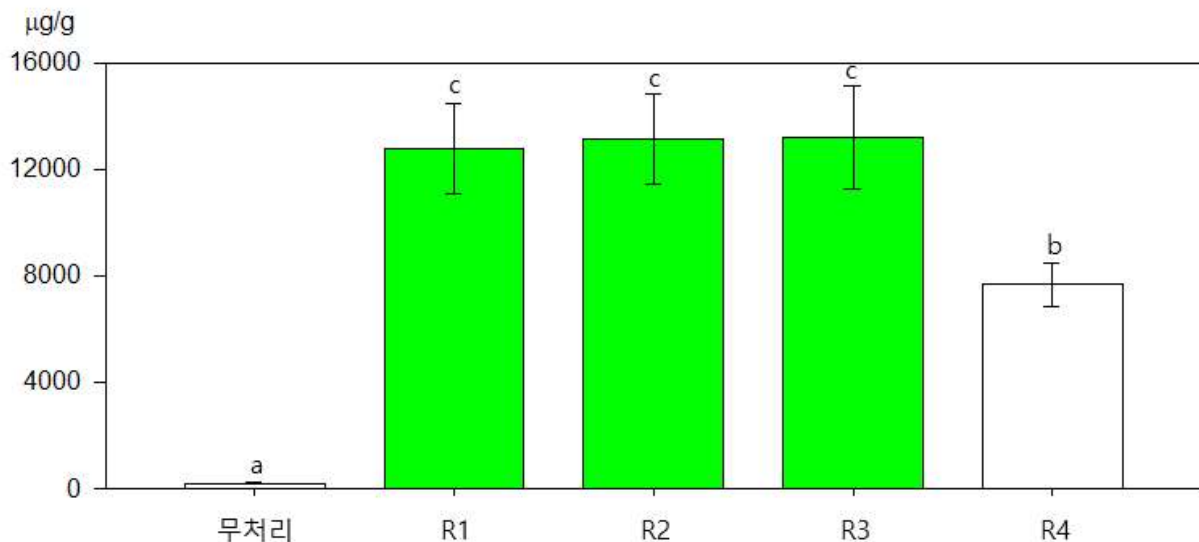
산업화가 목표인 본 연구에서는 바이오매스 확보가 대단히 중요한 요인이다. 특히 에틸렌을 밀폐된공간에서 처리해야되고, 특히 비닐하우스 내에서 처리할 경우 하우스 내의 온도가 40~55℃ 까지 올라가서 식물 생육이 어렵다. 따라서 대단위 면적의 필드에서 파바톤콩잎을 생산할 경우는 가스인 에틸렌 대신에 에틸렌을 제공할 수 있는 수화제인 에테폰을 사용하는 것 외에는 다른 대안이 없다. 본 연구에서는 시중에 유통되는 38% 에테폰을 구입하여 600 ppm 농도로 제조하여 생육시기별(무처리, R1, R2, R3 및 R4)에 처리하여 효능을 검증하였다.

예비 실험에서 영양생식기(vegetative)인 V1~V2 시기에도 에틸렌 처리시 식물성 에스트로겐이 고농도로 생산됨을 관찰하였으나 이때는 바이오매스가 R시기 보다는 낮았다. 일반적인 경향성은 에틸렌처리와 유사하였고 식물성 에스트로겐 함량은 15%정도 증가하였다.

[표] 에틸렌 처리에서 생육시기가 콩잎의 식물성 에스트로겐 생산에 미치는 영향

구분	콩 생육시기				
	무처리	R1	R2	R3	R4
1	220	11,250	15,940	12,000	6,520
2	210	13,500	14,890	12,560	8,560
3	212	12,560	16,830	11,250	7,580
4	190	11,250	12,650	14,560	6,520
5	198	15,684	12,300	12,850	7,865
6	190	12,560	12,400	13,650	8,500
7	210	14,560	12,600	11,000	8,600
8	215	11,520	11,500	15,890	6,872
9	200	12,360	12,500	18,500	7,860
10	220	12,500	12,650	13,000	8,500
11	202	12,000	12,360	12,500	7,850
12	210	11,200	12,500	12,000	7,800
13	200	11,560	11,500	11,500	6,145
14	190	12,340	11,560	13,456	8,010
15	180	16,840	15,296	13,450	7,800

*HPLC를 이용한 정량분석을 실시하였고 malonyl dadizin 및 malonyl genistin 정량은 dadizin 및 genistin의 검량 곡선에서 분자량을 고려하여 계산하였다. 함량을 total isoflavone양으로 계산하였다.



[그림] 에틸렌 처리에서 콩 생육시기별 식물성 에스트로겐 함량 변화

2-2-3-5. 에테폰 농도가 식물성 에스트로젠 생산에 미치는 영향

에테폰의 IUPAC명은 2-chloroethylphosphonic acid로 염기성 조건에서 에틸렌을 방출하는 에틸렌 공여체이다. 에테폰은 에틸렌 방출을 위해 제거반응(elimination reaction)이 일어나는데 부산물로 염소이온과 phosphate 염이 만들어지므로 특별한 잔류독성이 없는 화학물질이다. 본 실험에서는 시중에 유통되는 38% 에테폰 수용액을 사용하였다.

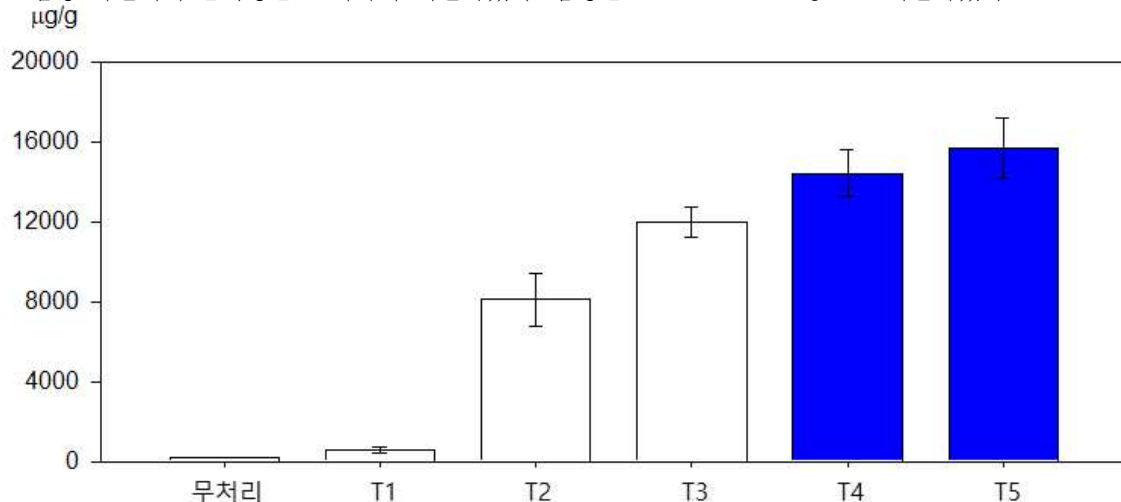
에테폰 농도의 영향을 평가하기 위해 에테폰 농도를 달리하는 5개의 실험구 T1 = 100 µg/g, T2 = 200 µg/g, T3 = 400 µg/g, T4 = 600 µg/g, 및 T5 = 800 µg/g에서 실시하였다. 온도는 실온 28±7°C에서, 각 농도별로 분무하여 시용하였다. 에테폰 처리는 2회(0 h, 24 h) 실시하였다.

아래 표에 나타난 바와 같이 100 µg/g (T1)에서는 낮은 농도의 식물성 에스트로젠이 발견되었고, 200 µg/g (T2)에서 800 µg/g (T5)는 처리농도에 따라 함량이 증가하였고 T4와 T5에서는 유의있는 차이는 관찰되지 않았다. T5에서 보다 많은 낙엽이 발생하였다.

[표] 에테폰 농도가 콩잎의 식물성 에스트로젠 생산에 미치는 영향

구분	처리된 에테폰 농도 (µg/g)					
	무처리	T1	T2	T3	T4	T5
		100	200	400	600	800
1	220	500	8,560	12,000	14,500	16,580
2	200	450	8,456	11,250	14,000	15,520
3	210	385	7,589	12,350	13,500	15,500
4	215	620	6,580	11,560	15,600	16,800
5	198	600	5,895	11,000	13,500	19,620
6	180	523	9,856	13,000	12,600	13,550
7	190	860	7,568	12,560	14,800	16,580
8	170	562	5,800	11,125	15,600	14,580
9	210	456	9,956	13,600	14,350	14,425
10	220	586	7,586	12,560	15,600	13,560
11	230	356	8,556	11,250	12,540	14,860
12	220	786	8,850	11,350	13,560	16,680
13	200	569	8,800	12,500	14,580	15,520
14	215	360	7,780	12,350	15,220	15,420
15	216	560	9,800	11,400	16,580	15,600

*HPLC를 이용한 정량분석을 실시하였고 malonyl dadizin 및 malonyl genistin 정량은 dadizin 및 genistin의 검량 곡선에서 분자량을 고려하여 계산하였다. 함량을 total isoflavone양으로 계산하였다.



[그림] 생육시기 R3 식물체의 에테폰 농도별 식물성 에스트로젠 함량변화 T1: 100 µg/g, T2: 200 µg/g, T3: 400 µg/g, T4: 600 µg/g, 및 T5: 800 µg/g

2-2-3-3. 에테폰 처리시간이 식물성 에스트로겐 생산에 미치는 영향

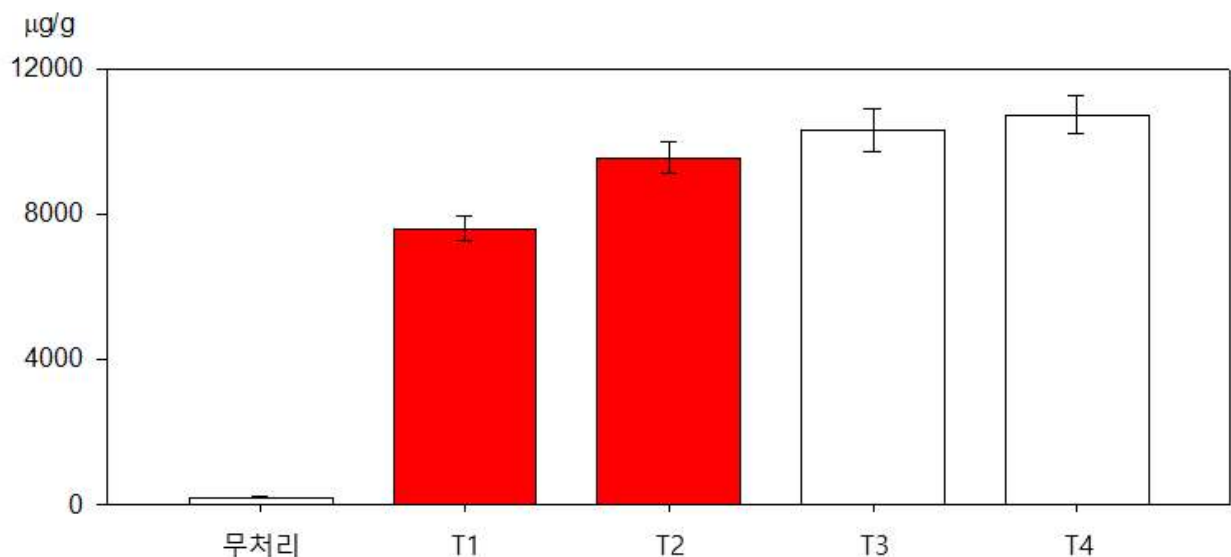
에테폰 처리시간이 식물성 에스트로겐 생산에 미치는 영향을 규명하기 위해 T1 = 24 h, T2 = 48 h, T3 = 72 h, 및 T4 = 96 h에서 관찰하였다. 에테폰 처리 농도는 600 µg/g으로, 분무처리는 2회(0 h, 24 h)하였다. 식물체의 생육시기는 R3를 사용하였다. 실험 온도는 실온 (28±7°C)에서 수행하였다.

에테폰 분무 처리 24 h 후 식물성 에스트로겐의 급격한 증가가 관찰되었고, T2(48 h)에 식물성 에스트로겐 함량이 최고수준이었다. 시간이 지남에 따라 T3(72 h) 및 T4(96 h)까지 지속적인 함량의 증가는 있었지만, T2와 유의있는 차이는 관찰되지 않았다. T4에서는 보다 많은 낙엽현상이 관찰되어 T2~T3가 적합한 처리시간으로 판단되었다.

[표] 에테폰 처리시간이 콩잎의 식물성 에스트로겐 생산에 미치는 영향

구분	에틸렌 처리시간				
	무처리	T1 24h	T2 48h	T3 72h	T4 96h
1	210	7,700	9,800	9,800	10,500
2	200	7,600	10,020	9,750	11,200
3	210	7,800	8,900	10,300	10,620
4	190	6,980	10,050	10,210	9,800
5	185	7,850	9,780	11,200	11,200
6	198	7,250	9,650	11,000	10,500
7	210	7,580	8,700	9,750	11,000
8	215	7,500	9,500	11,000	10,100
9	213	7,700	9,800	9,700	11,500
10	214	7,850	9,800	9,600	11,500
11	200	7,560	9,900	9,800	10,600
12	200	7,800	9,540	9,980	10,200
13	250	7,600	9,400	10,900	11,000
14	220	7,500	9,650	10,800	10,500
15	189	7,600	8,900	10,880	10,600

*HPLC를 이용한 정량분석을 실시하였고 malonyl dadizin 및 malonyl genistin 정량은 dadizin 및 genistin의 검량 곡선에서 분자량을 고려하여 계산하였다. 함량을 total isoflavone양으로 계산하였다.



[그림] 생육시기 R3 식물체의 에테폰 처리 시간별 식물성 에스트로겐 함량 변화 T1: 24h, T2: 48h, T3: 72h, 및 T4: 96h

2-2-3-4. 에테폰 처리에서 생육시기가 식물성 에스트로겐 생산에 미치는 영향

산업화가 목표인 본 연구에서는 바이오매스 확보가 대단히 중요한 요인이다. 바이오매스 최고에 이르는 R시기에서 생육시기별 식물성에스트로겐 함량을 비교평가하였다. 실험조건은 앞에서 기술한 동일한 조건(처리시간: 72h, 온도: 25±10℃)에서 수행하였다.

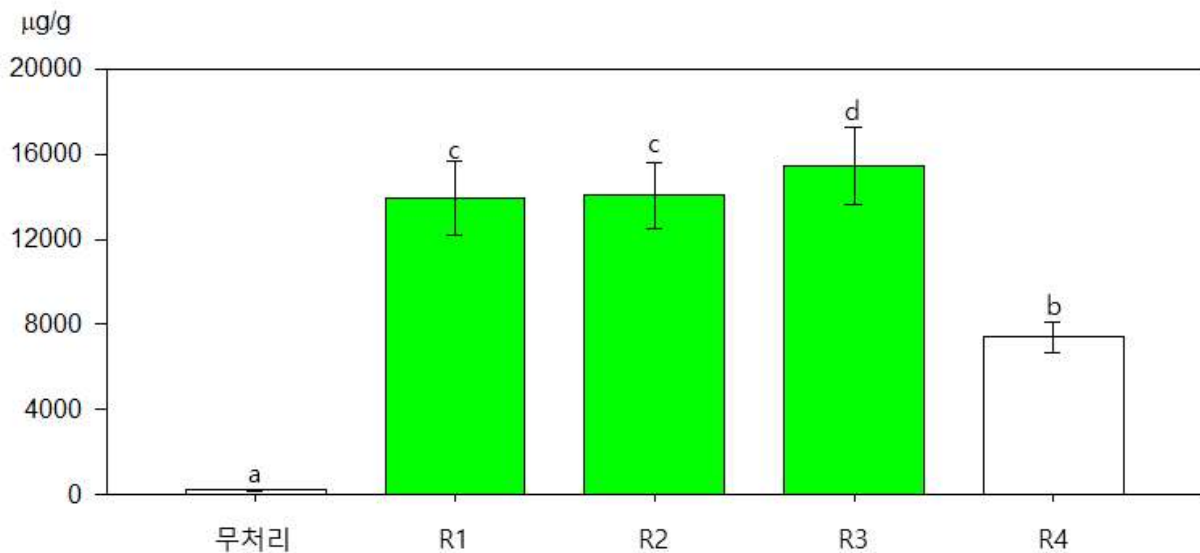
R1 = 꽃이 맺힐 시기, R2 = 꽃이 필 무렵, R3 = 까투리 맺힐 무렵, R4 = 까투리에서 콩이 생성되기 전. 4가지 생육시기에서 실시하였다.

예비 실험에서 영양생식기(vegetative)인 V1~V2 시기에 에틸렌 처리시 식물성 에스트로겐이 고농도로 생산됨을 관찰하였으나 이때는 바이오매스가 R시기 보다는 낮았다. 생육시기 R1~R3는 큰 유의는 관찰되지 않았으나 콩이 맺히는 R4에서는 식물성 에스트로겐 생산이 30% 이상 감소되었다.

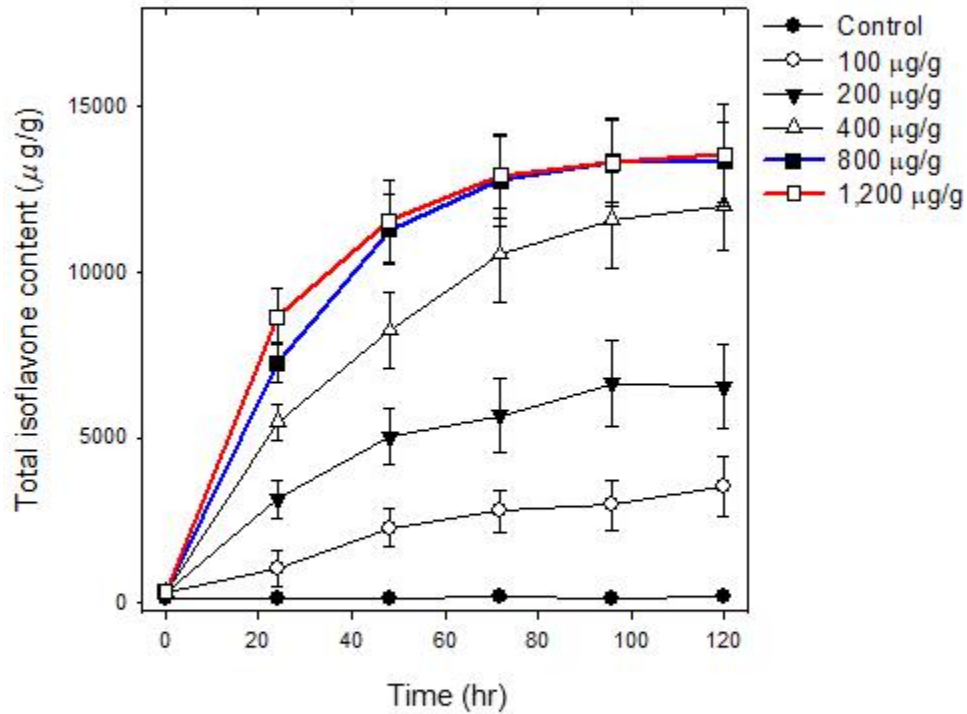
[표] 에테폰 처리에서 생육시기가 콩잎의 식물성 에스트로겐 생산에 미치는 영향

구분	콩 생육시기				
	무처리	R1	R2	R3	R4
1	181	14,021	16,626	17,125	6,660
2	210	12,600	13,183	12,707	7,366
3	211	12,234	15,736	14,624	8,279
4	211	13,742	15,693	17,451	7,701
5	186	16,011	14,953	13,339	7,304
6	192	13,188	12,635	17,326	6,922
7	206	16,388	15,679	17,736	7,635
8	204	16,610	13,667	15,114	6,370
9	219	16,477	13,707	15,218	8,082
10	218	13,874	14,661	15,565	8,459
11	208	14,562	12,029	15,271	6,524
12	198	12,142	11,633	13,566	7,978
13	193	11,457	12,019	17,166	8,308
14	195	13,461	14,649	12,544	7,121
15	212	12,203	14,022	16,961	6,232

*HPLC를 이용한 정량분석을 실시하였고 malonyl dadizin 및 malonyl genistin 정량은 dadizin 및 genistin의 검량 곡선에서 분자량을 고려하여 계산하였다. 함량을 total isoflavone양으로 계산하였다.

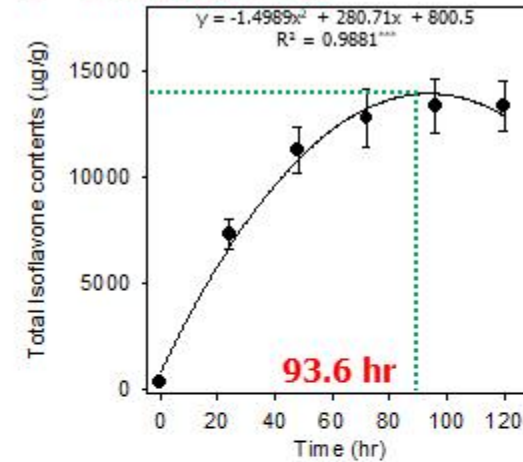


[그림] 에테폰 처리에서 콩 생육시기별 식물성 에스트로겐 함량 변화

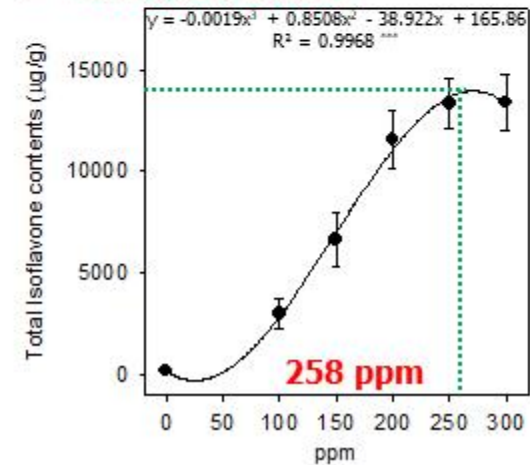


에틸렌 처리

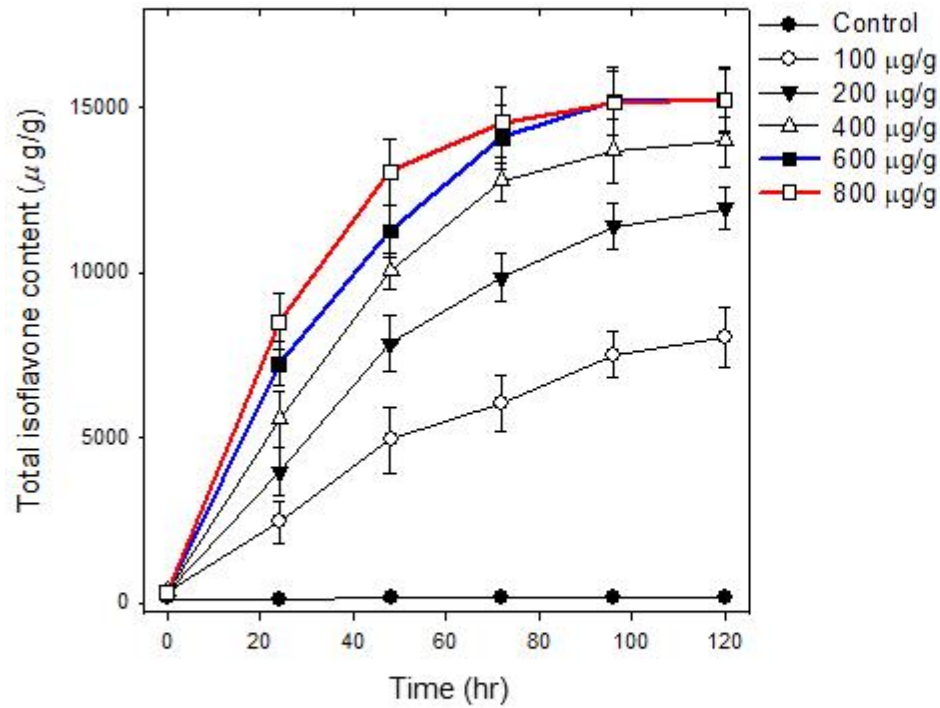
Harvest Time



Concentration

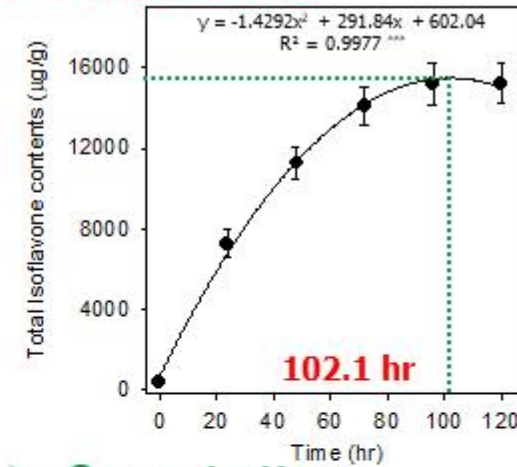


[그림] 에틸렌 처리구에서 콩잎에 축적되는 식물성 에스트로젠 함량의 처리농도, 처리시간에 따른 변화양상

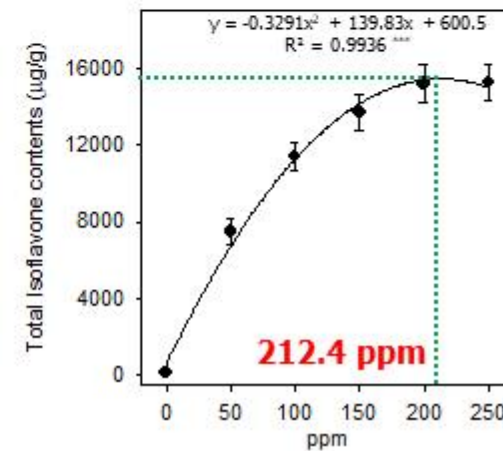


에테폰 처리

Harvest Time



Concentration



[그림] 에테폰 처리구에서 콩잎에 축적되는 식물성 에스트로겐 함량의 처리농도, 처리시간에 따른 변화양상

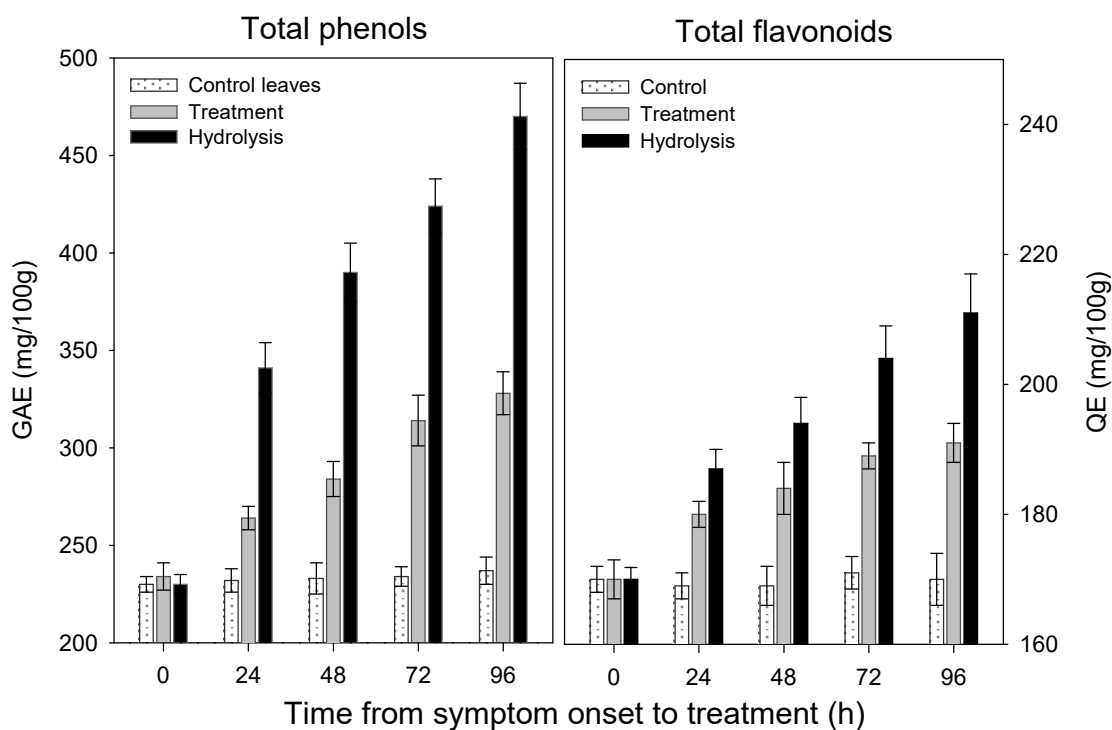
[표] 에틸렌 및 에테폰을 처리한 콩잎에 축적되는 식물성 에스트로겐 함량

처리제	식물성 에스트로겐 ($\mu\text{g/g}$)						
	Isoflavone	0 h (untreat)	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
Ethylene ^b	daidzin(1)	nd ^d	1649 \pm 119	1784 \pm 285	1996 \pm 266	2331 \pm 259	2395 \pm 183
	genistin(2)	nd	955 \pm 102	1280 \pm 204	1402 \pm 216	1452 \pm 172	1465 \pm 229
	malonyldaidzin(3)	<100	2706 \pm 153	5971 \pm 274	6158 \pm 484	6232 \pm 502	6461 \pm 419
	malonylgenistin(4)	<100	1969 \pm 178	3734 \pm 382	3279 \pm 384	3301 \pm 359	3533 \pm 346
	total	<200	7279 \pm 552	12769 \pm 1145	12835 \pm 1350	13316 \pm 1292	13854 \pm 1177
Ethephon ^c	daidzin(1)	nd	1311 \pm 87	1342 \pm 163	2585 \pm 104	2784 \pm 189	2863 \pm 196
	genistin(2)	nd	868 \pm 64	1035 \pm 178	1708 \pm 171	1797 \pm 116	1663 \pm 165
	malonyldaidzin(3)	<100	3133 \pm 103	5563 \pm 201	5756 \pm 318	6456 \pm 391	6430 \pm 389
	malonylgenistin(4)	<100	1980 \pm 121	3323 \pm 262	4056 \pm 375	4186 \pm 323	4295 \pm 324
	total	<200	7292 \pm 375	11265 \pm 804	14105 \pm 968	15223 \pm 1019	15251 \pm 1074

^aUntreated. ^bAll values are mean \pm SD of in five independent experiments. ^cEthylene treatments at 250 $\mu\text{g/mL}$. ^dEthephon treatments at 200 $\mu\text{g/mL}$. ^eNot detected.

- 콩(Soybean) 재배에서 생육시기 R1~R3(꽃 맺힐무렵부터 까투리 만들어지는 시기)의 식물체를 에틸렌 또는 에테폰을 처리했을 때 식물성 에스트로겐(다이드진, 제니스틴, 말로닐 다이드진, 및 말로닐 제니스틴)이 12,000 $\mu\text{g/g}$ 이상 축적됨을 실험실(이상적인 조건)에서 확인하였다. 수준은 먹을 수 있는 식물체에서 나오는 식물성 에스트로겐으로는 최고수준

- 앞에서 기술하였듯이 에틸렌 또는 에테폰을 처리한 콩잎에서는 다이드진, 말로닐 다이드진, 제니스틴, 말로닐 제니스틴의 함량이 급격히 관찰되었다. 총 함량기준으로는 건조콩잎 1 g 에 10,000 μg 이상의 식물성 에스트로젠이 축적됨이 관찰되었다. 여기서는 이소플라본 유도체가 현저히 증가되었으므로 Total phenol 함량 및 Total flavonoid 함량이 증가될 것을 예측하여 1) 무처리 콩잎 추출물, 2) 에테폰 처리 콩잎 추출물, 3) 에테폰처리 콩잎 추출물을 β -glucosidase로 가수분해시켜 비배당체로 전환된 추출물을 일반적으로 잘 알려진 분석법(참고문헌)으로 실시하여 아래 그림과 같은 결과를 얻었다. 에테폰 처리 추출물이 무처리 콩잎 추출물보다 월등히 높은 Total phenol(328 mg GAE/100 g, 96 h 시료) 및 Total flavonoid (191 mg QE/100 g, 96 h 시료) 나타내었다. 특히 β -glucosidase로 가수분해한 추출물은 Total phenol (470 mg GAE/100 g) 및 Total flavonoid (211 mg QE/100 g)으로 관찰되었다. 이는 배당체가 비배당체로 전환되므로 증가된 항산화력으로 판단된다.



[그림] 정상콩잎 추출물, 에테폰처리 콩잎 추출물 및 에테폰 처리콩잎 추출물의 β -glucosidase 가수분해물의 총 페놀 및 플라보노이드 함량

- 실험실의 이상적인 조건에서 에틸렌 또는 에테폰 처리가 콩잎의 식물성 에스트로젠 함량을 대단히 축적시키는 과학적 발견을 JAFc, 2016 (상위 5%) 출간함

Ethylene Induced a High Accumulation of Dietary Isoflavones and Expression of Isoflavonoid Biosynthetic Genes in Soybean (*Glycine max*) Leaves

Heung Joo Yuk,^{†,‡} Yeong Hun Song,^{†,‡} Marcus J. Curtis-Long,[§] Dae Wook Kim,[†] Su Gyeong Woo,^{||} Yong Bok Lee,[†] Zia Uddin,[†] Cha Young Kim,^{*,||} and Ki Hun Park^{*,†}

2-2-4. 파바톤콩잎의 식물성에스트로젠 포함한 페놀성 대사체 분석 (결과-3)

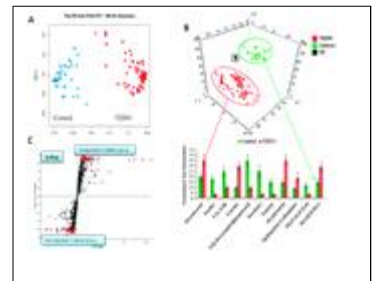
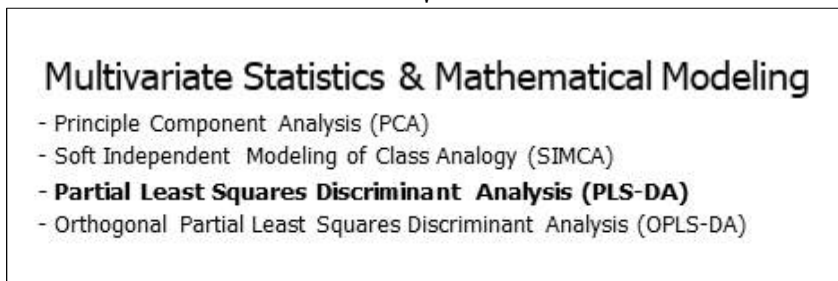
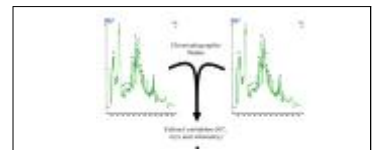
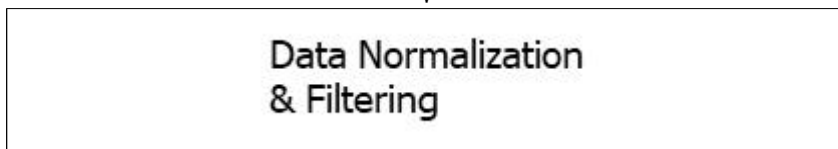
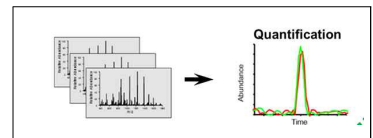
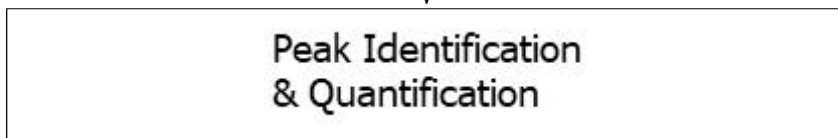
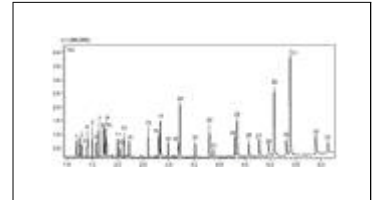
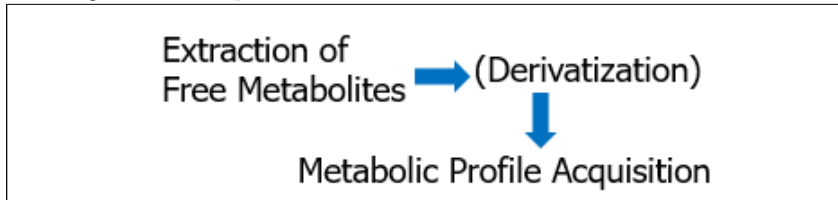
2-2-4-1. 대사체분석 프로토콜

대사체는 대사물질의 총합을 일컫는 개념으로 생명정보 빅데이터의 중요한 구성요소이다. 일반 콩잎과 파바톤 콩잎의 저분자화합물(metabolite)의 대사체 분석을 수행하였다. LC-ESI-TOF 질량분석기를 이용하여 데이터를 생성하였다. 생성된 데이터를 다양한 형태의 파일로 변환(input file conversion)한 후 기준보정, 신호왜곡, 강도필터 등의 자료형성(data cleaning) 초점 맞추기나 집합체 형성을 통한 특징추출(feature extraction), 크로마토그램을 이용한 시료정렬, 데이터베이스 검색(database search), 화합물 식별(compound identification), 통계분석(statistical analysis), 자료분석완성(integration)의 과정을 거쳐 구축하였다.

Pre-analytical steps



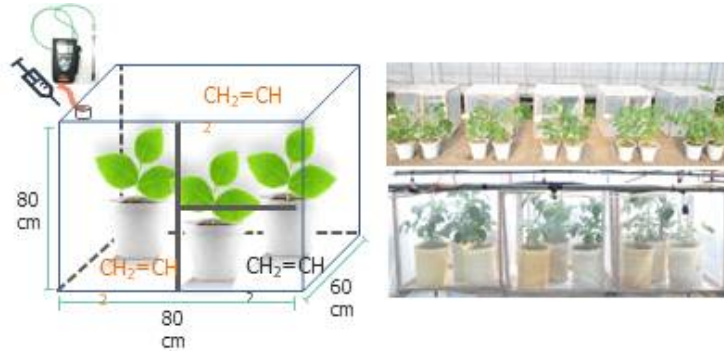
Analytical steps



2-2-4-2. 처리방법 및 샘플링

○ 에틸렌 처리

생육시기 R1의 콩식물체를 에틸렌의 농도가 일정하게 유지되는 폴리에틸렌 챔버에서 실험하였다. 에틸렌농도는 400 µg/ml로 유지하였고 24시간마다 문을 열어 O₂ 및 CO₂를 대기수준으로 공급하였다. 처리 후 72시간에 식물체를 수확하여 35°C에서 24시간 동안 열풍건조 하였다.



- Growth stage R3
- 9 replications
- 400 µg/ml
- Ethylene applied twice to the chamber
- Opened about every 24h to supply CO₂

그림. 에틸렌 처리 챔버

○ 에테폰 처리

생육시기 R1의 콩식물체에 에틸렌 공여체인 에테폰을 500 µg/ml 농도로 처리하였다. 이때 에테폰은 시중에 유통되는 39% 에테폰 수용액을 사용하였다. 에테폰은 0시간 및 24시간에 2회 분무 처리하였다. 처리 후 72시간에 식물체를 수확하여 35°C에서 열풍건조 하였다. 대사체 추출물은 건조콩잎 1g에 80% EtOH 50ml를 넣고 35°C에서 2시간 동안 소니케이션 하여 얻었다. 에테폰 처리의 개요도는 아래 그림과 같다.



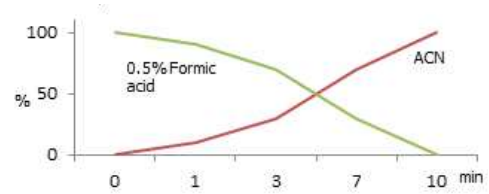
- Growth stage R3
- 9 replications
- 500 µg/ml
- Ethephon applied twice to the plants
- Sprayed to the plants until started dripping

그림. 에테폰 처리 개요도

2-2-4-3. UPIS-ESI-Q-TOF 질량분석 시험방법

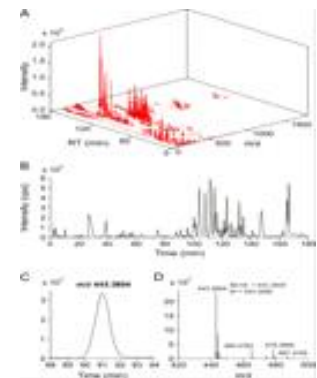
○ UPLC 분석 조건

- UPLC: Waters
(Binary pump, Auto sampler, Photo diode array)
- Column: AcquityUPLC BEH C18, 2.1x 100 mm, 1.7 μ m
- Injection volume : 2 μ l
- Column flow rate : 0.35 ml/min
- Mobile Phase: Formic acid (0.5 %), Acetonitrile
- Column temperature : 30 $^{\circ}$ C



○ Q-TOF/MS 분석 조건

- Q-TOF/MS
(MassLynxsoftware, ESI-Positive mode)
- MS operation conditions
- Capillary voltage of ionization source : 3 kV
- Desolvation/Ionization temperature : 300 $^{\circ}$ C/ 100 $^{\circ}$ C
- Sampling/extraction cone voltage : 30 V/ 0.8 V
- Trap/Transfer collision/Ion energy : 6.0 V/ 4.0 V/ 1.0 V
- Trap gas flow : 1.5 ml/min
- Scan of range : m/z 100~1200



○ Computational procedure (소프트웨어 및 데이터뱅크)

- MassLynxSoftware (Waters)
- MarkerLynxSoftware (Waters)
- Metlindatabase (metlin.scripps.edu)

○ Chemometric Approach (다변량분석)

- SIMCA-P⁺ 12.0.1 (Umetrics)
- SPSS 17.0 (SPSS Inc)

사용된 PLS-DA 모델의 fitting quality와 신뢰도를 quality parameter와 permutation test를 이용한 교차검증 (cross validation data)와 p -value를 확인한 결과 fitting goodness를 보여주는 R^2_X , R^2_Y 값이 0.4 이상으로 높고, 예측 가능한 값을 나타내는 Q^2 값이 0.7 이상을 보여 PLS-DA model의 fitting이 잘된 것으로 확인하였다. 그리고 이들 모델을 permutation 테스트로 교차검정한 결과, R^2 교점 값이 0.6보다 낮고 Q^2 교점 값이 -0.1보다 낮아 모든 비교군들이 다변량 통계분석을 진행하는데 문제 없는 것으로 확인되었다.

앞서 규명된 대사체를 기반으로 변화양상을 확인하기 위해 다변량통계분석법으로 분석하였다. PLS-DA score plot에서 주성분 t(1), t(2) 등의 축으로 하여 무처리구, 에틸렌처리구, 에테폰처리구 등이 명확히 그룹을 이루어 나뉘짐을 확인할 수가 있었으며 이의 결과는 처리에 따른 대사물질의 변화가 큰 것으로 판단할 수 있었다.

사용된 PLS-DA 모델의 fitting quality와 신뢰도를 quality parameter와 permutation test를 이용한 교차검증 (cross validation data)와 p -value를 확인한 결과 fitting goodness를 보여주는 R^2X , R^2Y 값이 0.4이상으로 높고, 예측가능한 값을 나타내는 Q^2 값이 0.7 이상을 보여 PLS-DA model의 fitting이 잘된 것으로 확인하였다. 그리고 이들 모델을 permutation 테스트로 교차검증한 결과, R^2 교점 값이 0.6 보다 낮고 Q^2 교점 값이 -0.1보다 낮아 모든 비교군들이 다변량통계분석을 진행하는데 문제 없는 것으로 확인되었다.

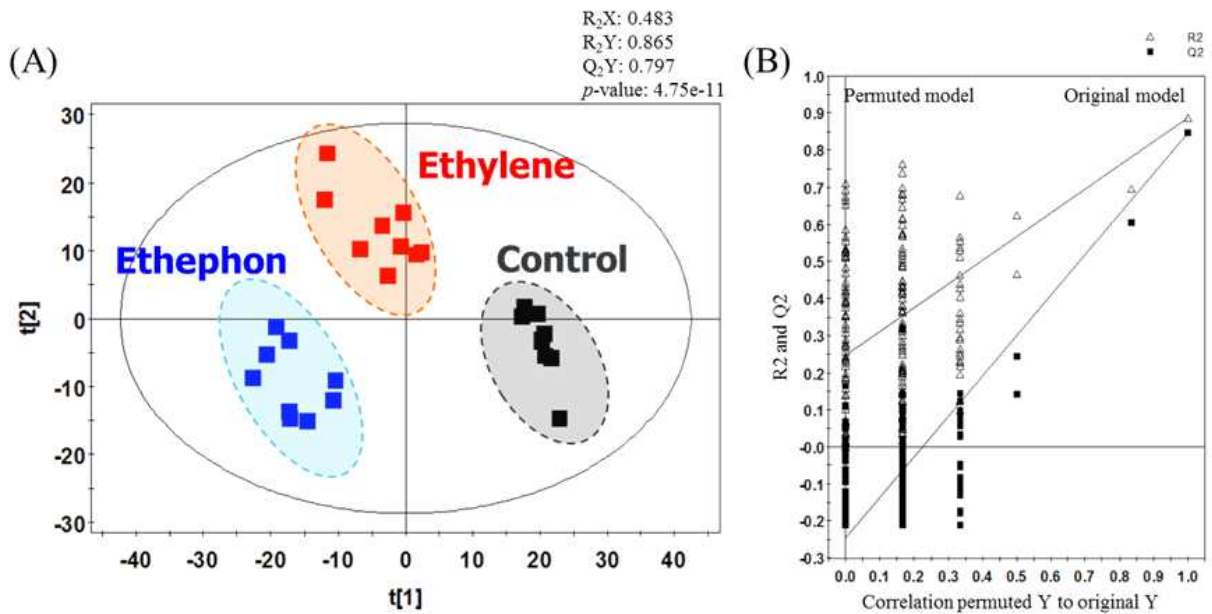


그림. 무처리구, 에틸렌처리구 및 에테폰처리구 대사체를 PLS-DA(Partial Least-Squares Discriminant Analysis) 분석결과 (A) from soybean leaves with different treatments and un-treatment. The quality of the PLS-DA scores plots was evaluated by R^2X , R^2Y , Q^2 and p -values (A) and validated by 200 permutation test (B) for UPLC-Q-TOF-MS, respectively.

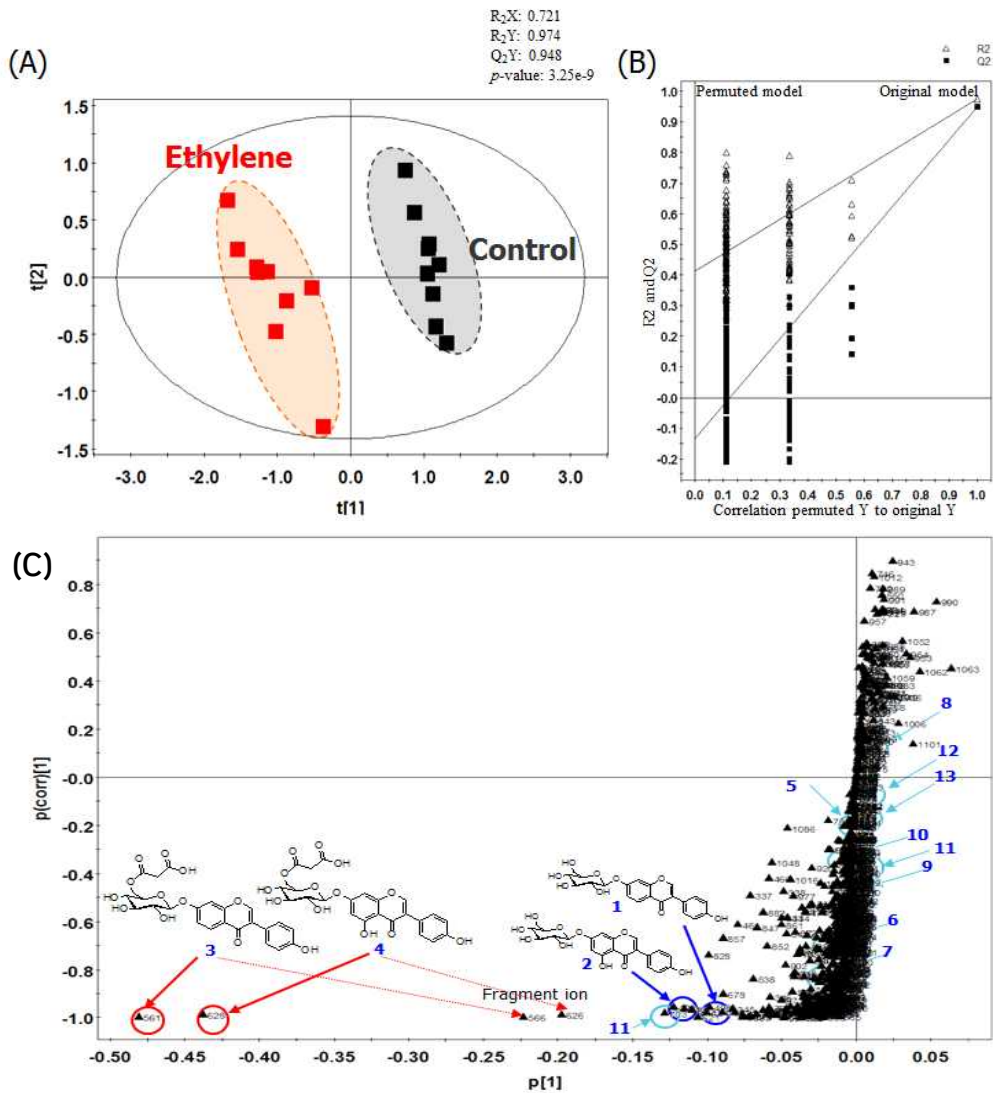


그림. 무처리구 및 에틸렌 처리구 대사체 PLS-DA 분석결과 (A) from soybean leaves with ethylene treatment and un-treatment. The quality of the PLS-DA scores plots was evaluated by R^2X , R^2Y , Q^2 and p -values (A) and validated by 200 permutation test (B) for UPLC-Q-TOF-MS, respectively. (C) PLS-DA S-plots derived from the UPLC-Q-TOF MS profiles of soybean leaves for ethylene treatment. After normalization, the data matrix processed by MarkerLynx was statistically analyzed with PLS-DA based on the UPLC-Q-TOF BPI chromatogram of soy leaves for ethylene treatment and plotted using Par scaling.

무처리구와 처리구간 비교분석을 수행하였다. PLS-DA score plot에서 주성분 t(2) 축으로 하여 무처리구와 에틸렌처리구 명확히 그룹을 이루어 나뉘짐을 확인할 수가 있었으며 이 결과는 처리에 따른 대사물질의 변화가 큰 것으로 판단할 수 있었다. 그리고 이 모델의 각종 파라미터 또한 앞선 결과와 유사하게 대사체 분석을 진행하는데 이상이 없음을 확인할 수 있었다.

PLS-DA Score plot에서 그룹을 결정짓는 변수가 무엇인지 확인하기 위해 S-plot을 이용하여 분석하였다. 무처리구와 에틸렌처리구간의 특정 대사체의 상대적인 함량의 차이 때문에 이와 같은 결과가 나타남을 확인하였으며 그 대사체는 daidzin (1), genistin (2), malonyl-daidzin (3), malonyl-genistin (4) 등 주요 식물성에스트로젠임을 확인 할 수 있었다.

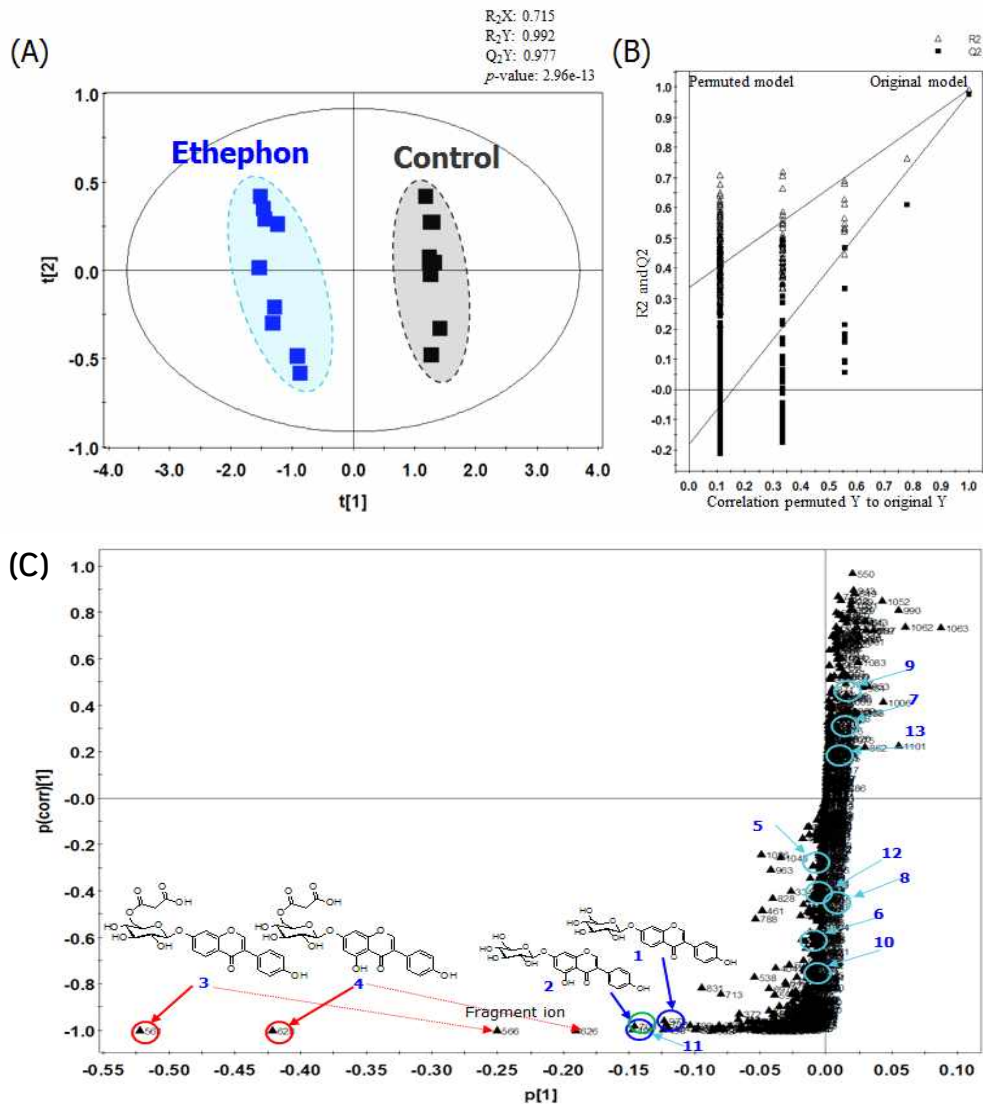


그림. 무처리구 및 에테폰 처리구 대사체 PLS-DA 분석결과 (A) from soybean leaves with ethephone treatment and un-treatment. The quality of the PLS-DA scores plots was evaluated by R^2X , R^2Y , Q^2 and p -values (A) and validated by 200 permutation test (B) for UPLC-Q-TOF-MS, respectively.(C) PLS-DA S-plots derived from the UPLC-Q-TOF MS profiles of soybean leaves for ethephone treatment. After normalization, the data matrix processed by MarkerLynx was statistically analyzed with PLS-DA based on the UPLC-Q-TOF BPI chromatogram of soy leaves for ethephone treatment and plotted using Par scaling.

무처리구와 에테폰처리구의 비교 분석을 수행한 결과, PLS-DA score plot에서 주성분 t(2) 축으로 하여 명확히 그룹을 이루어 나뉘짐을 확인할 수가 있었으며 이 결과는 앞선 결과와 동일하게 처리에 따른 대사물질의 변화가 큰 것으로 판단할 수 있었다. 그리고 이 모델의 각종 파라미터 또한 대사체 분석을 진행하는데 이상이 없음을 확인할 수 있었다.

PLS-DA Score plot에서 그룹을 결정짓는 변수가 무엇인지 확인하기 위해 S-plot을 이용하여 분석하였다. 앞의 분석결과와 동일하게 무처리구와 에틸렌처리구간의 특정 대사체의 상대적인 함량의 차이 때문에 이와 같은 결과가 나타남을 확인하였으며 그 대사체는 daidzin (1), genistin (2), malonyl-daidzin (3), malonyl-genistin (4) 등 주요 식물성에스트로젠임을 확인할 수 있었다.

○ 무처리구, 에틸렌처리구 및 에테폰 처리구의 식물성 에스트로젠(1-4)의 상대적 함량

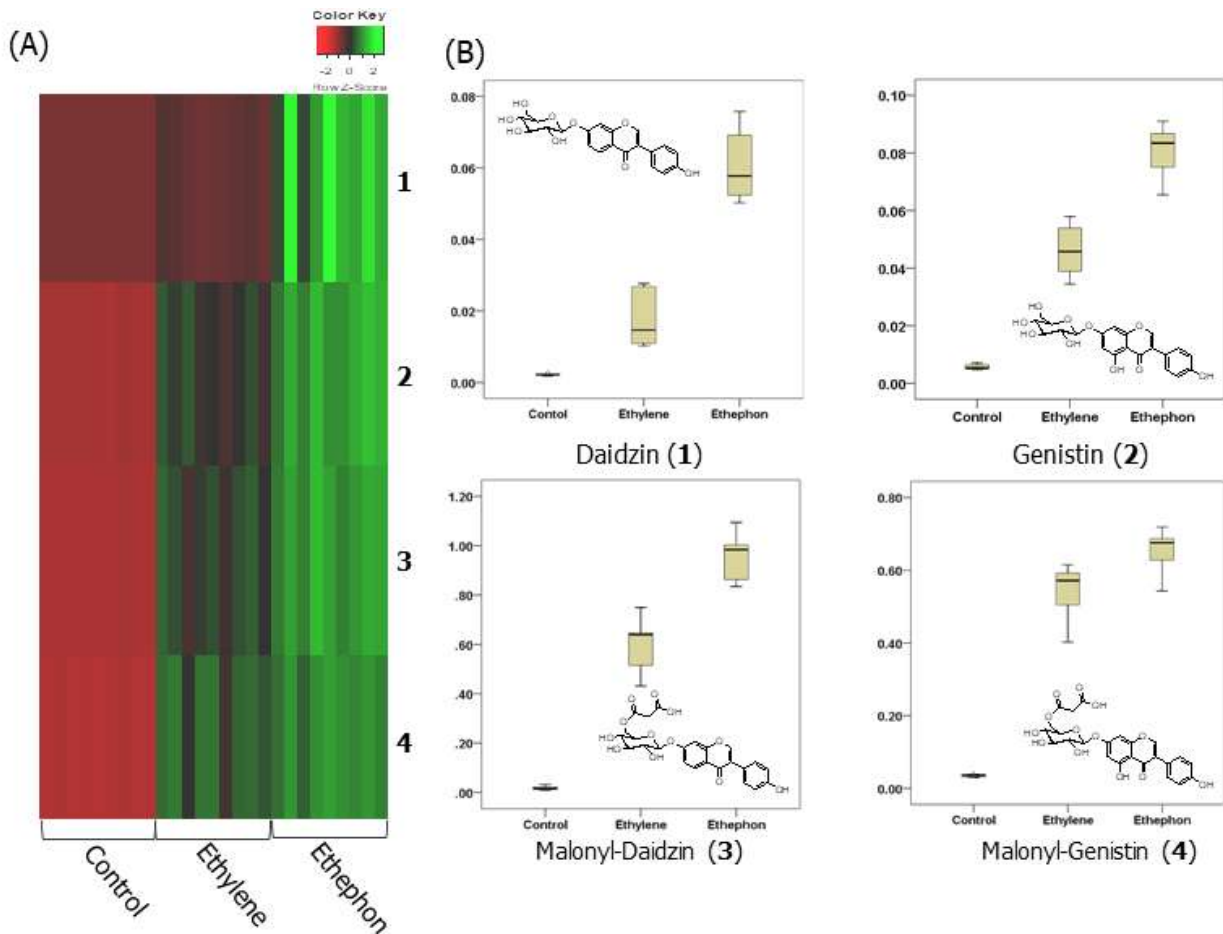
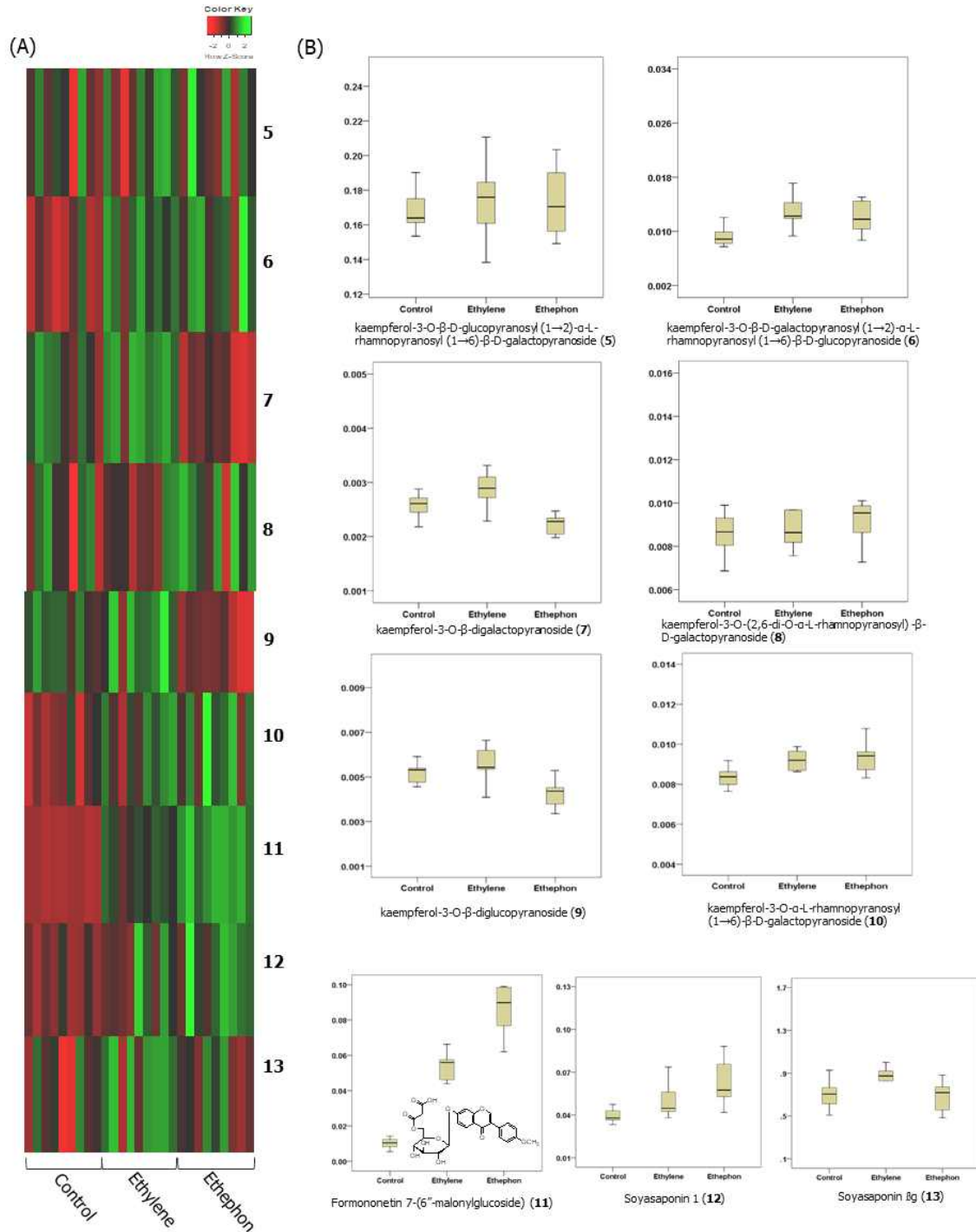


그림. (A) Heat map of identified different treatments of soybean leave samples analyzed using UPLC-Q-TOF-MS. The heat map was drawn by R with ggplot2 and the green-red color represents the z-score transformed raw data of soybean leaves metabolites with significant differences among sample group. Red and Green colors indicate an increase and a decrease of metabolite level, respectively. (B) Box and whisker plots of significantly different metabolites analyzed by UPLC-Q-TOF-MS in different treatments of soybean leave samples. These metabolites were responsible for the differentiation in the PLS-DA model, $VIP > 0.98$ And $p < 0.05$ (line, mean; box, standard error; whisker, standard deviation).

무처리구와 처리구간의 대사체들의 함량비교분석을 위해 Heat map을 작성하고 상대적 정량을 비교하기 위해 Box-whisker plot을 이용하여 분석하였다. 상대적으로 red 컬러는 감소한 패턴이고 green 컬러는 증가한 패턴이다. 처리구에서 식물성 에스트로젠(1-4) 등이 뚜렷하게 무처리구 대비 증가했다는 것을 확인할 수 있었다. Box-whisker plot에서도 식이이소플라본(1-4)이 무처리구 대비 에틸렌, 에테폰 처리구에서 아주 높은 수준으로 증가했다는 것을 확인할 수 있었다. 식이이소플라본 외의 동정된 대사체들은 거의 변화가 없거나 소폭 증감된 경향을 나타내었다.

○ 무처리구, 에틸렌처리구 및 에테폰 처리구의 일반 페놀성 화합물의 상대적 함량



일반 폴리페놀성 화합물 6종(화합물 5-10), 이소플라본 1종(화합물 11) 및 사포닌 2종(화합물 12, 13)은 에틸렌 또는 에테폰 처리구에서 무처리구와 비교해서 유의있는 변화는 관찰되지 않았다. 이소플라본인 화합물 Formononetin 7-(6''-malonylglucoside) (11)은 목표 에스트로젠(1-4)와 마찬가지로 처리구에서 급격한 함량변화가 관찰되었다.

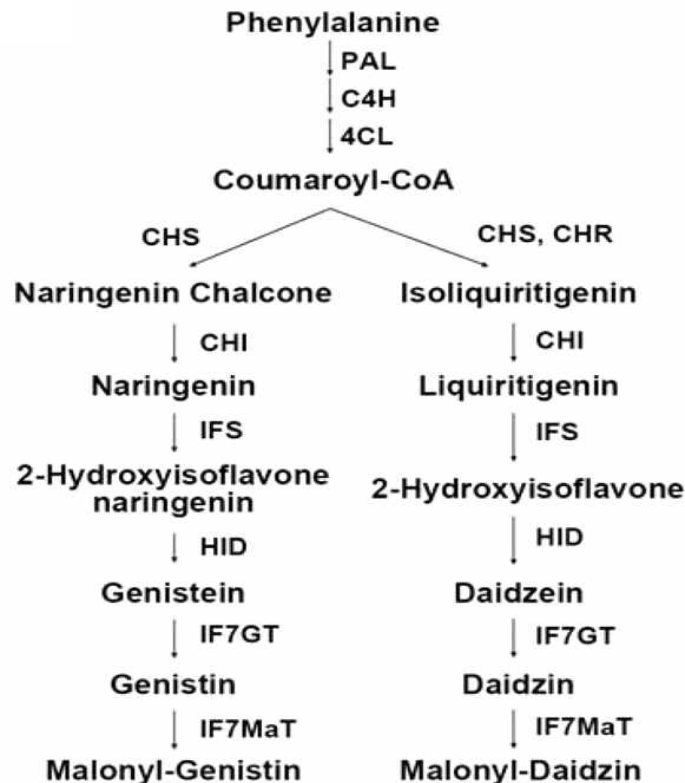
2-2-5. 파바튼콩잎의 식물성 에스트로겐 생합성 기작규명 (결과-4)

2-2-5-1. 이소플라본 생합성과 에틸렌처리 관계규명의 중요성

- 앞선 결과에서 보듯이 에틸렌 처리가 4종의 식물성 에스트로겐 (Daidzin, Genistin, Malonyl daidzin, Malonyl genistin)의 급격한 축적을 만들어 내었다. 본 연구에서는 에틸렌 처리가 식물성 에스트로겐 생합성을 촉진시키는 기작을 규명하였다. 에틸렌이 다양한 형태의 biotic stress에 대응하는 방어 기작들을 turn on 하는 결정적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이때 에틸렌은 신호전달체계에 관여하는 Jasmonic acid (JA), Salicylic acid (SA) 및 Abscisic acid (ABA) 등과 서로 교신하는 것으로 알려져 있다.
- 에틸렌은 이차대사산물의 생산을 유도하는 신호전달 체계에 많이 관여하지는 않지만, 몇 종의 대사체(anthoxyanin, flavonoid, stilbenoid)의 생산은 에틸렌 처리에 영향을 받는다고 보고되었다. 에틸렌이 이소플라본 생산에 영향을 준다는 보고는 아직 없다.

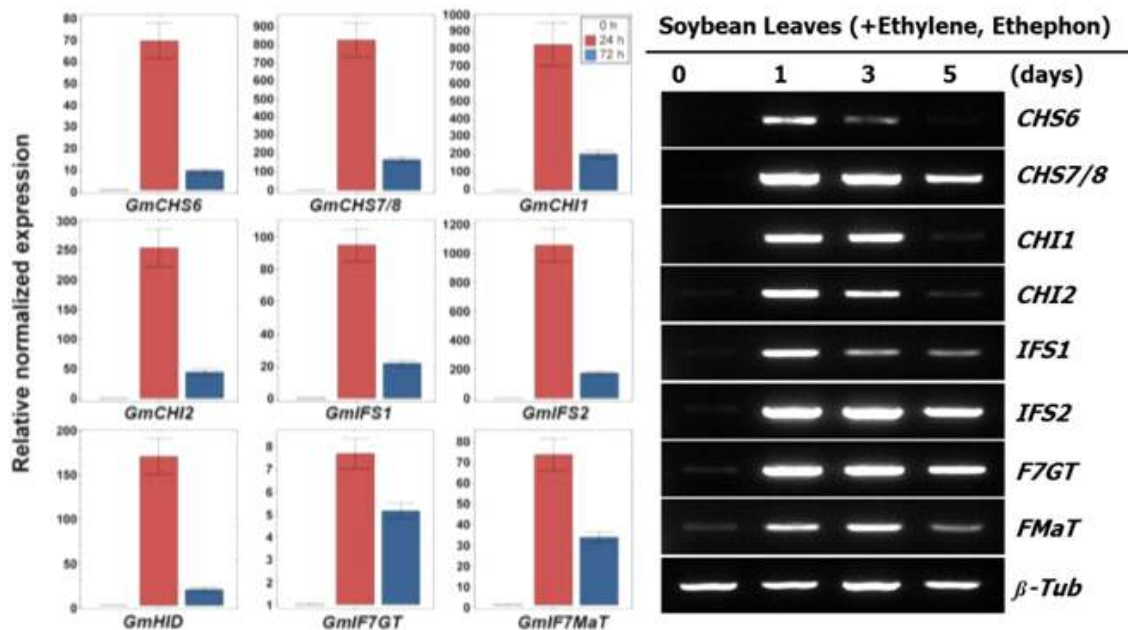
2-2-5-2. q-RT-PCR을 이용한 이소플라본 생합성 유전자의 발현분석

- 에테폰 처리구 및 무처리구에서 획득한 콩잎의 RNA 발현 양상은 real-time PCR을 이용하여 비교분석하였다. 생육시기 R3 식물체에 에테폰을 처리하고 24시간 마다 3차례 샘플링하였다. 여기서 콩과작물의 이소플라본은 아래 그림에 나타난 기작을 통해 일어난다.



[그림] Relative expression of isoflavonoid biosynthetic genes in soyleaves treated with ethephon. (A) The sequential actions of CHS, CHI, IFS, HID, IF7GT, and IF7MaT result in the conversion of phenylalanine to isoflavones: CHS, chalcone synthase; CHI, chalcone isomerase; IFS, isoflavone synthase; HID, 2-hydroxyisoflavanone dehydratase; IF7GT, UDP-glucose: isoflavone 7-O-glucosyltransferase; IF7MaT, malonyl-CoA: isoflavone 7-O-glucoside-6-O-malonyltransferase.

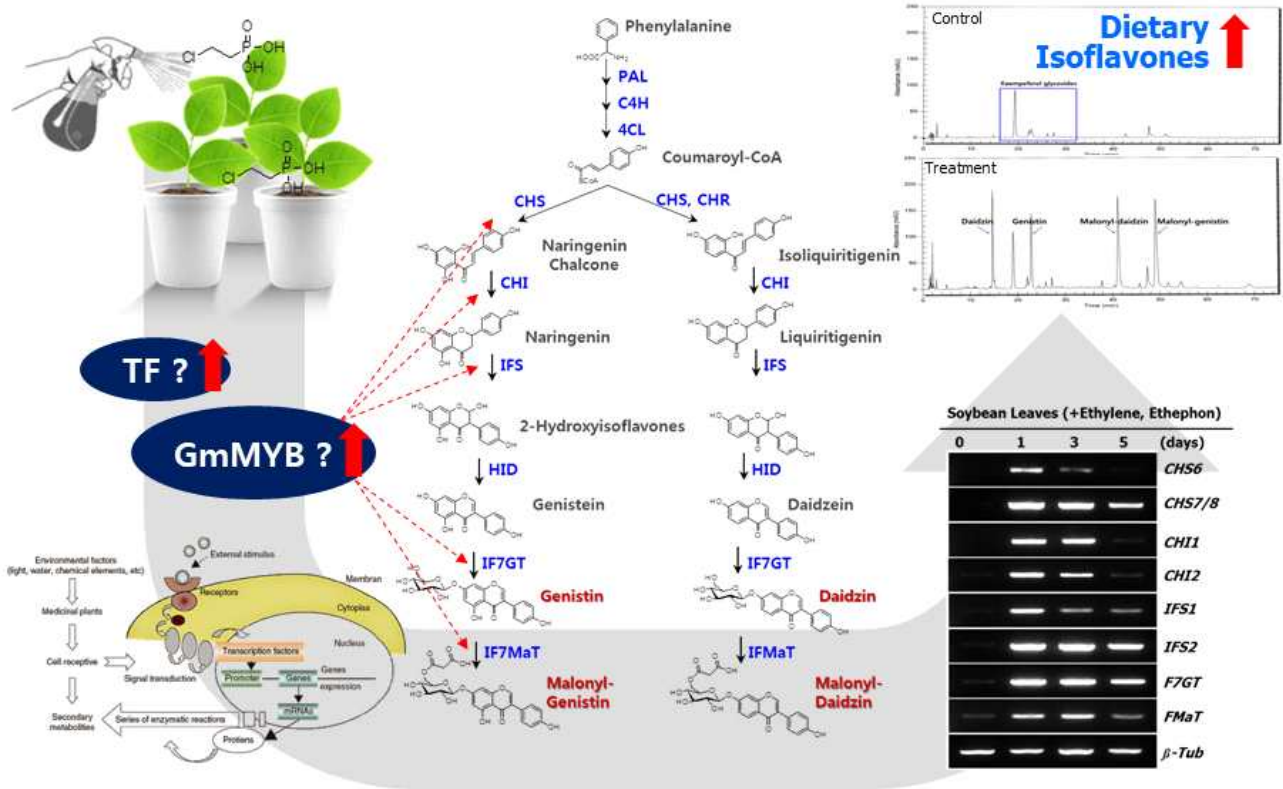
- 위 그림과 같이 prenylpropanoid 관련 유전자들 chalcone synthase(CHS); chalcone isomerase(CHI); isoflavone synthase(IFS); 2-hydroxyisoflavanone dehydratase(HID); UDP-glucose: isoflavone 7-O-glucosyltransferase(IF7GT); malonyl-CoA: isoflavone 7-O-glucoside-6-O-malonyltransferase(IF7MaT)이 이소플라본 생합성에 관여한다.
- 본 연구에서는 앞에서 기술된 생합성 gene들이 에틸렌 처리에 어떤 영향을 받는지를 관찰하였다. 이소플라본 생합성에 관여하는 모든 유전자들이 2~3배 (GmIF7GT)에서 1,000배 이상(GmIFS2) 무처리 콩잎에 비해 에테폰 처리콩잎에서 발현되었다. 전사인자들의 발현수준은 에테폰 처리 하고 3일 이후 부터는 감소되었다. 이것은 에틸렌이 이소플라본 생합성에 관여하는 전사인자들의 발현을 일으키는 것으로 판단할 수 있다.
- 요약하면 CHS 효소는 이소플라본 생합성의 첫 단계를 가능하게 하고, 9개의 CHS(CHS1~CHS9) 유전자 중에 CHS7과 CHS8이 이소플라본 생합성에 결정적인 역할을 하였다. Naringenin과 isoliquiritigenin chalcone은 CHI에 의해 각각 flavanone으로 전환되었다.



[그림] Relative expression of CHS, CHI, IFS, HID, IF7GT, and IF7MaT mRNAs were analyzed by real-time quantitative RT-PCR. Data were normalized against expression of the housekeeping gene beta-tubulin (β -TUB). All the values shown are mean \pm SE.

- qRT-PCR 분석시험에서 CHS7/8과 CHI1 유전자는 CHS6 및 CHI2 유전자보다 에테폰 처리에 대해 크게 반응 하였다.
- IFS효소 및 p450 monooxygenase 효소는 prenyl propanoid경로에서 이소플라보노이드로 전환시키는 중요한 효소이다. 예를 들면 IFS는 naringenin 및 liquiritigenin을 2-hydroxyisoflavone으로 전환시키는 효소이다. HID는 2-hydroxyisoflavanone을 탈수반응시켜 이소플라본으로 전환시킨다.
- 에테폰처리에서의 IFS2 유전자 발현은 IFS1 유전자 발현보다 강하게 나타났다. 이것은 IFS2 효소가 이소플라본 생합성에 더 많은 역할을 함을 알려준다.

- IF7GT 및 IF7MaT는 만들어진 이소플라본 화합물을 당화시키는 효소로, 비배당체인 genistein 및 daidzein을 배당체인 genistin, daidzin, malonyl genistin 및 malonyl daidzin으로 전환시켰다. 알려진 참고문헌의 가설과 잘 일치하였다.
- MYB계열 전사인자인 TFs 플라보노이드 생합성 유전자 발현에 관여하는 것으로 알려져있다. 예를 들면 AtMYB12는 CHS, CHI, F3H 및 FLS1 유전자의 전사(transcription)를 조절하여 flavonol 생성을 가능하게 한다. 또한 GmMYB176은 GmCHS8 유전자의 발현을 조절하여 콩 식물체에서 이소플라보노이드 생합성을 가능하게 한다.
- 결론적으로 본 연구에서는 MYB TFs는 GmCHS, GmCHI, GmIFS, GmHID, GmIF7GT, 및 GmIF7MaT 유전자의 발현을 upregulation시켜 콩잎 내에서 이소플라본 생합성을 촉진 시킴을 밝혔다. 특히 MYB TFs가 콩의 이소플라본 유도체 생합성에 관여한다는 사실은 관련 연구에 중요한 자료로 활용될 것이다.



[그림] 에틸렌 또는 에테폰 처리가 콩잎의 이소플라본 생합성을 촉진시킨다는 생합성 기작 요약

2-2-6. 파바톤콩잎의 유리아미노산을 포함한 저분자화합물 분석 (결과-5)

2-2-6-1. GC-MS를 이용한 대사체 분석

Gas chromatography-mass spectrometry(GC-MS)는 분자량 650Da 이하인 저분자 대사체 분석에 대단히 유용한 기법이다. 특히 저분자산(small acid), 알코올, hydroxyl acid, 아미노산, 당(sugar) 등을 빠른 시간내에 효과적으로 분석할 수 있다. 이유는 bp가 높은 유기산 및 아미노산을 유도체화 시켜 bp가 낮은 화합물로 전환할 수 있는 효과적인 시약인 methoxyamine 및 N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide 등이 잘 개발되어 있고, 이를 기반으로 개별 화합물들을 정성(identification) 및 정량(quantitative analysis)할 수 있는 Data Bank가 잘 구축되어 있다. 이런 이유로 본 연구에서 파바톤콩잎 및 일반콩잎(무처리)의 저분자 대사체를 분석하고, 특징적으로 많은 변화가 일어난 유기 아미노산들을 아미노산 분석기로 정량분석하였다.



2-2-6-2. GC-MS를 이용한 파바톤콩잎 및 일반콩잎의 저분자 대사체 분석방법

○ 파바톤콩잎 생산 및 시료확보

R1 콩잎을 에틸렌 농도를 조절할 수 있는 스마트챔버에 넣고 아래 조건에서 24시간 에틸렌을 처리하고 수확하여 파바톤 콩잎 샘플로 사용하였다. 분석에 이용한 샘플 수는 파바톤콩잎 및 일반콩잎(무처리) 각각 7개씩 하여 분석 및 통계처리 하였다.

- 스마트챔버 조건

에틸렌	3,000 ppm	상대습도	60%
챔버온도	35℃	광조건	암상태(Dark)
처리시간	24시간		

○ 추출 방법

콩잎시료 30 ul 건조 + internal standard (hydroxyphthalate) 후 유도체화 진행. 유도체화 과정은 건조된 시료에 hydroxymethoxyamine(20 mg/ml pyridine) 시약 80 ul를 넣은 후 37℃에서 90분 반응함. 90분 반응이 끝나면 BSTFA 시약을 80 ul 넣은 후 70℃에서 30분간 반응 후에 원심분리하여 상층액을 따낸 후 vial에 넣어 inject 시킴.

○ 분석장비

GC-2010 Plus, GCMS-TQ 8030 (Shimadzu, Tokyo, Japan)

○ GC 조건

- inject volume: 1 uL
- Column: *DB-5* column
(30m×0.25 mm id, 0.25 um film thickness; J & W scientific, Santa Clara, Calif., U.S.A)
- Column oven Temp: 70 °C
- Injection Temp: 200 °C
- Split ration: 40
- Column flow: 1 mL/min
- Carrier gas: Helium
- Analyzed method: 70 °C for 2 min, increased to 210 °C at 7 °C/min,
increased to 320 °C at 10 °C/min, and then held at 320 °C for 7 min.

○ MS 조건

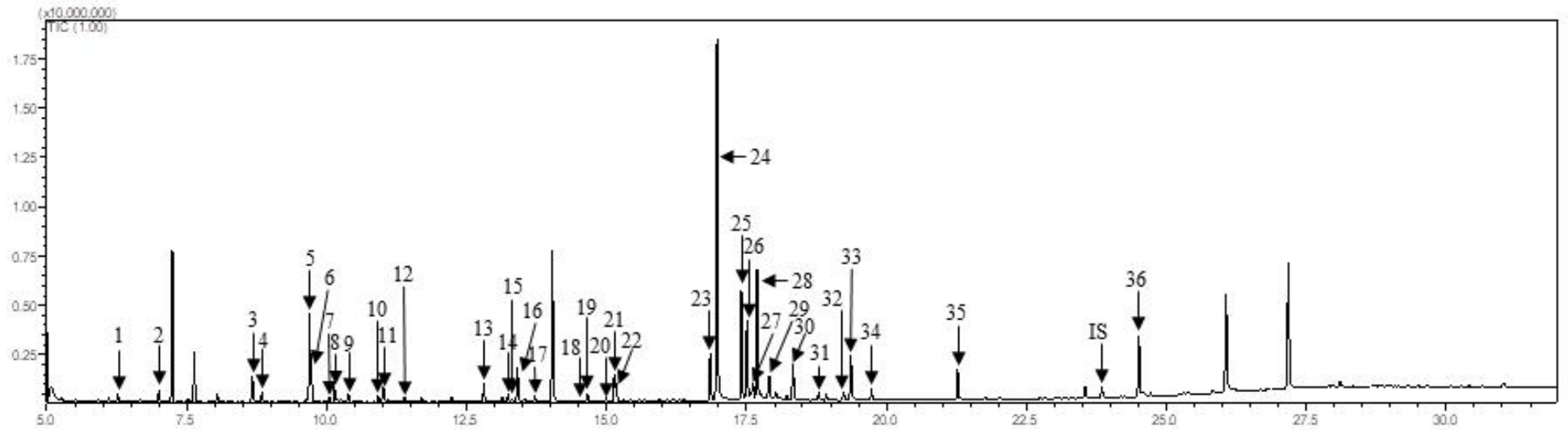
- Q3 scan mode
- Ion source Temp: 230 °C
- Interface Temp: 280°C
- Detector voltage: 0.1 kV
- Event time 0.03 s, 15 eV

○ Data process

- Data collection, normalization, alignment
- 물질동정: *NIST 11*, *Wiley 9* mass spectral libraries, retention indices (RIs),
calculated using *n*-alkanes

○ 통계분석 및 visualization

- SIMCA-P⁺ version 12.0.1 (Umetrics, Umeå, Sweden)
PCA, PLS-DA, VIP, permutation test, p-value
- One-way analysis of variance (ANOVA)
with Duncan's test ($p < 0.05$), using SPSS 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).
- R-project: heat map, box plot



1, lactic acid; 2, alanine; 3, malonic acid; 4, valine; 5, phosphoric acid; 6, glycerol; 7, isoleucine; 8, proline; 9, succinic acid; 10, fumaric acid; 11, serine; 12, threonine; 13, malic acid; 14, aspartic acid; 15, oxoproline; 16, 4-aminobutanoic acid; 17, threonic acid; 18, glutamic acid; 19, phenylalanine; 20, arabinose; 21, asparagine; 22, lyxose; 23, citric acid; 24, pinitol; 25, fructose; 26, fructose; 27, galactose; 28, mannose; 29, glucose; 30, inositol; 31, gluconic acid; 32, galactaric acid; 33, palmitic acid; 34, myo-inositol; 35, stearic acid; 36, sucrose

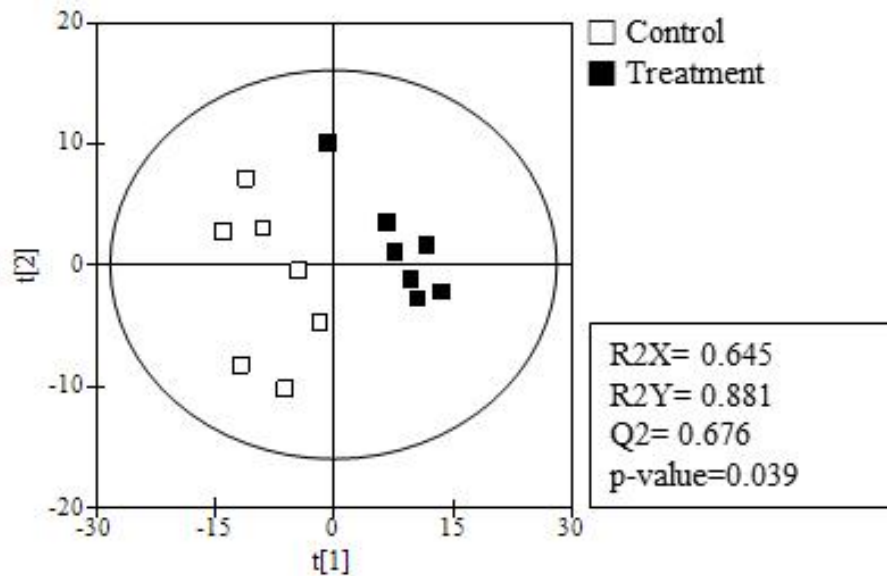
[그림] GC-MS 이용한 파바톤콩잎 및 일반콩잎(무처리) 분석에서 확인된 저분자 화합물 크로마토그램

[丑] Identification of major metabolites contributing the separation among sample groups

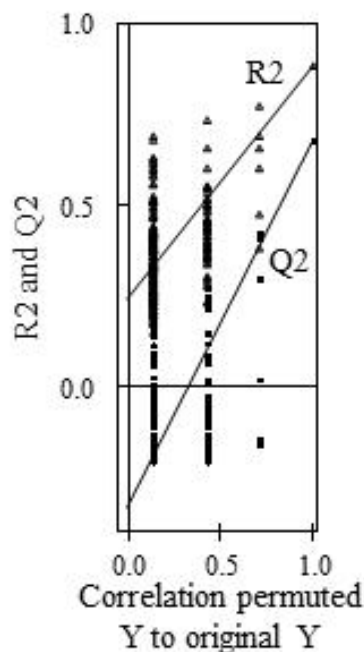
No.	RT (min)	Compound	RI ^(a)	VIP	<i>p</i> -value
1	6.27	lactic acid	1053	0.19	0.045
2	7.00	alanine	1097	0.20	6.74E-04
3	8.67	malonic acid	1198	0.25	0.253
4	8.85	valine	1209	0.33	6.98E-05
5	9.70	phosphoric acid	1264	1.66	6.72E-04
6	9.73	glycerol	1266	0.17	0.653
7	10.05	isoleucine	1286	0.14	0.006
8	10.14	proline	1292	0.13	0.589
9	10.39	succinic acid	1308	0.04	0.110
10	10.92	fumaric acid	1345	0.09	0.044
11	11.03	serine	1352	0.40	2.25E-04
12	11.39	threonine	1377	0.09	6.26E-04
13	12.81	malic acid	1479	0.29	0.310
14	13.25	aspartic acid	1512	0.22	4.00E-05
15	13.32	oxoproline	1517	0.03	9.74E-04
16	13.41	4-aminobutanoic acid	1525	0.80	0.002
17	13.72	threonicacid	1549	0.01	0.842
18	14.53	glutamic acid	1611	0.06	1.39E-05
19	14.66	phenylalanine	1622	0.23	0.001
20	14.99	arabinose	1649	0.03	0.511
21	15.14	asparagine	1661	1.39	0.002
22	15.18	lyxose	1664	0.06	0.865
23	16.86	citric acid	1807	1.33	0.002
24	16.98	pinitol	1818	3.11	0.122
25	17.41	fructose	1856	1.40	0.147
26	17.51	fructose	1866	1.07	0.123
27	17.62	galactose	1876	0.38	0.068
28	17.69	mannose	1882	2.81	0.012
29	17.91	glucose	1902	0.59	0.025
30	18.33	inositol	1942	0.18	0.472
31	18.80	gluconic acid	1987	0.48	0.010
32	19.24	galactaricacid	2030	0.08	3.75E-04
33	19.37	palmitic acid	2043	0.23	0.197
34	19.73	myo-inositol	2079	0.06	0.319
35	21.27	stearic acid	2239	0.12	0.276
36	24.51	sucrose	2593	3.36	0.002

2-2-6-3. PLS-DA분석을 이용한 파바톤콩잎 및 일반콩잎의 저분자 대사체 분석

파바톤콩잎(샘플 7종) 및 일반콩잎(샘플 7종)을 추출 후 유도체화 시켜 GC-MS를 이용하여 분석하였고, 파바톤콩잎과 일반콩잎의 대사체를 부분최소제곱회귀분석인 PLS(Partial Least Square) 분석하였다. Permutation test에서 Q2값이 -0.1이하, R2값이 0.1 이상으로 PLS-DA분석이 충분히 가능하게 했다. 또한 R2X = 0.645, R2Y = 0.881, Q2 = 0.676으로 무처리군(일반콩잎)과 에틸렌처리군(파바톤콩잎)에 충분히 대사체의 차이가 발견되었다. 특히 p-value가 0.039로 관찰되었다.

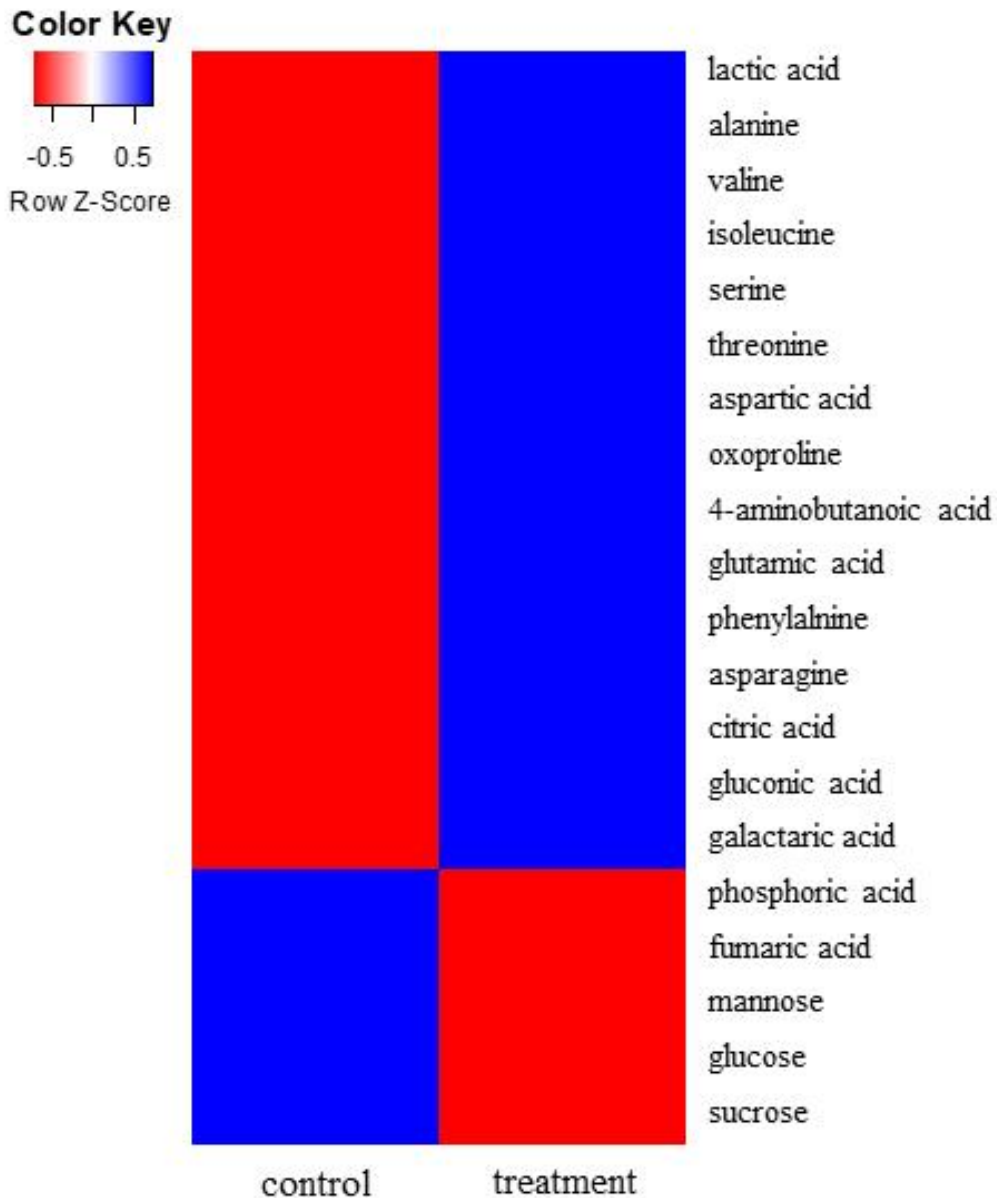


[그림] 일반콩잎(control)과 파바톤콩잎(treatment)의 PLS-DA scores scatter plot



[그림] 일반콩잎과 파바톤콩잎의 PLS-DA scores scatter plot에 대한 Permutation test

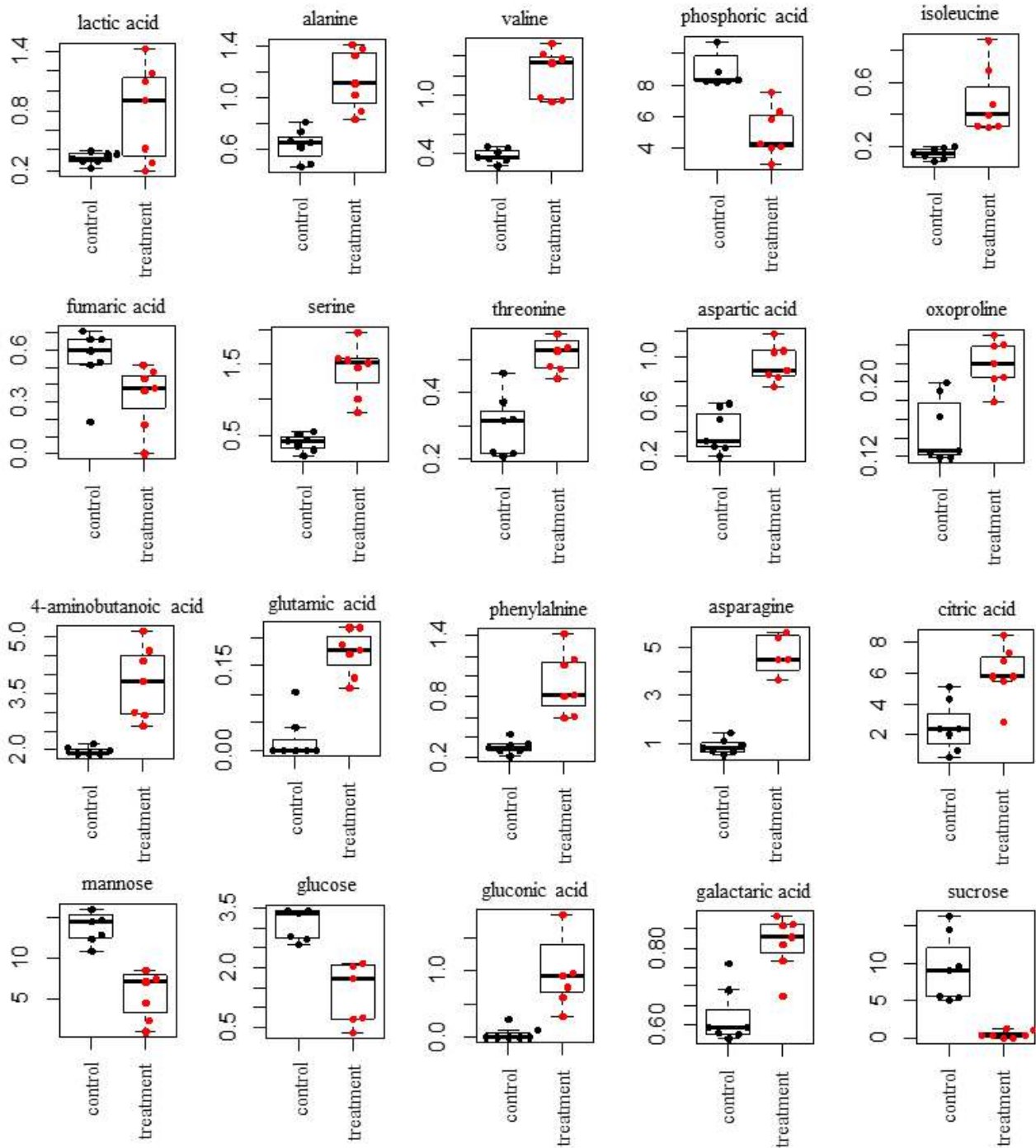
2-2-6-4. Heatmap분석을 이용한 파바톤콩잎 및 일반콩잎의 저분자 대사체 분석



[그림] 일반콩잎(무처리)과 파바톤콩잎의 대사체 분석에서 큰 변화가 관찰된 개별성분들의 Heatmap

GC-MS 분석에서 36종의 저분자화합물들이 확인되었고 그 중 위 그림에 나타난 바와같이 15종의 대사체(lactic acid, alanine, valine, isoleucine, serine, threonine, aspartic acid, oxoproline, 4-aminobutanoic acid, glutamic acid, phenylalanine, asparagine, citric acid, gluconicacid, galactaricacid)가 에틸렌을 처리함으로 인해 함량이 크게 증가 되었고, 5종의 대사체(phosphoric acid, fumaric acid, mannose, glucose, sucrose)는 오히려 감소됨을 관찰되었다.

2-2-6-5. Boxplot분석을 이용한 파바톤콩잎 및 일반콩잎의 저분자 대사체 분석



[그림] 일반콩잎(무처리)과 파바톤콩잎의 대사체 분석에서 큰 변화가 관찰된 개별성분들의 boxplot

분석된 개별대사체 중 Heat map 분석에서 큰 변화를 보여준 20종 대사체의 Box plot을 아래와 같이 나타내었다. 특히 Asparagine, citric acid 및 4-aminobutanoic acid(GABA)가 에틸렌 처리로 인해 크게 증가되었고, phosphoric acid는 크게 감소되었다.

2-2-7. 파바톤콩잎 생산 현장적용시험 (결과-6)

2-2-7-1. 현장적용실험설계를 위한 예비조사 실험

○ 에테폰 처리농도별 식물성에스트로젠 함량 변화

- 실험실 연구에서는 한 식물개체에 대해 최적화시켜 에테폰 처리 및 조건 유지가 가능하지만 필드(노지) 실험에서는 식물 개체별 일조량에 큰 차이가 있고 또한 에테폰 수용액을 분무처리할 때 일관성 있게 처리가 불가능함이 예측되어 예비조사 처리시험을 수행하였다.
- 실험실 연구에서는 100ppm 농도에서도 식물성 에스트로젠이 5,000 $\mu\text{g/g}$ 수준으로 축적되었으나 필드실험에서는 100ppm 처리에서는 낮은 농도 2,752 \pm 815 $\mu\text{g/g}$ 으로 축적되는 등 실험실 연구와 필드(노지) 실험과는 큰 차이가 발견되었다.
- 에테폰 200ppm 이상 농도에 식물성 에스트로젠이 유의 있게 축적됨을 관찰함.
- 실험실 연구보다 함량의 많은 편차가 있는 것은 에테폰 처리시 콩잎의 바이오메스가 뒤섞여 있어 개별 옆면에 골고루 처리하는데 한계가 있는 것으로 판단됨.

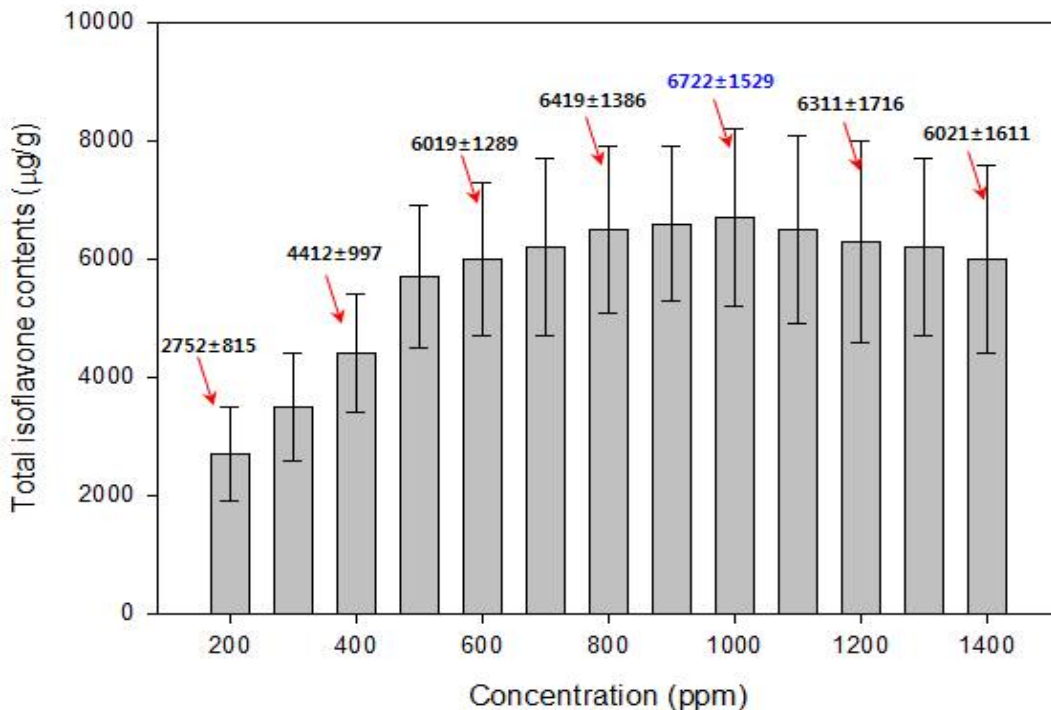


그림. 에테폰 처리농도에 따른 식물성에스트로젠 함량 변화 1) 처리시기: 23/07/2016 ~27/07/2016, 2) 반복수: 3반복, 3) 처리면적: 200m²/처리구, 4) 온도: 23 \pm 5~35 \pm 2 $^{\circ}\text{C}$

- 1000ppm 이상 처리했을 때 상대적으로 많은 낙엽이 생성되어 1000ppm 이상 처리하는 것은 바이오메스 효율 면에서 한계가 있음.
- 현장적용시험에서는 에테폰 수용액의 균일한 분무처리, 개별식물체의 일조량, 토양의 수분상태, 식물체의 생육시기 등에 따른 식물성 에스트로젠 함량 및 바이오메스에 큰 영향을 미침.

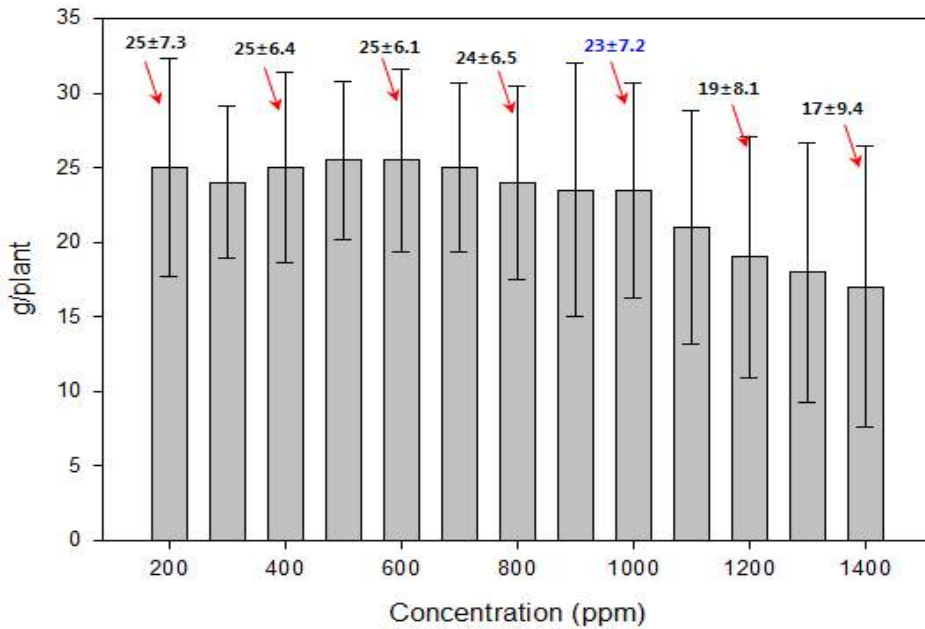


그림. 에테폰 처리농도에 따른 바이오메스 변화 양상 1) 처리시기: 23/07/2016 ~27/07/2016, 2) 반복수: 3반복, 3) 처리면적: 200m²/처리구, 4) 온도: 23±5~35±2℃

○ 수확시기에 따른 식물성 에스트로겐 함량

- 에테폰 처리후 식물성 에스트로겐 함량은 급격히 증가하여 48시간 후 일정수준을 유지하나 120시간 까지는 함량이 지속적으로 증가함이 관찰되었다. 한편 72시간 이후부터 낙엽의 양이 증가되어 바이오메스가 급격히 줄어들었다.

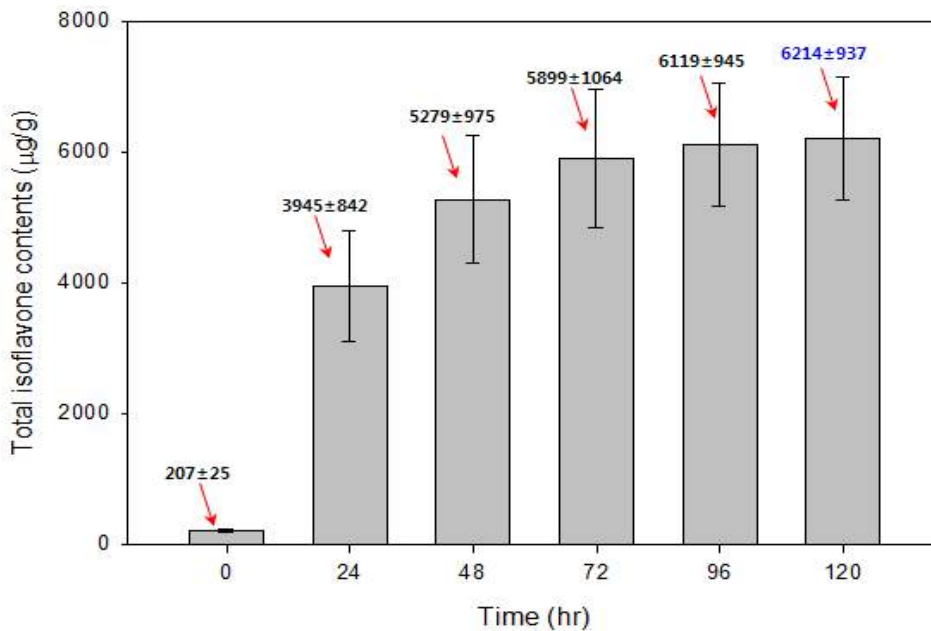


그림. 수확시기별 식물성 에스트로겐 함량 1) 처리농도: 800ppm 2) 반복수: 3반복, 3) 처리면적: 200m²/처리구, 4) 온도: 23±5~35±2℃

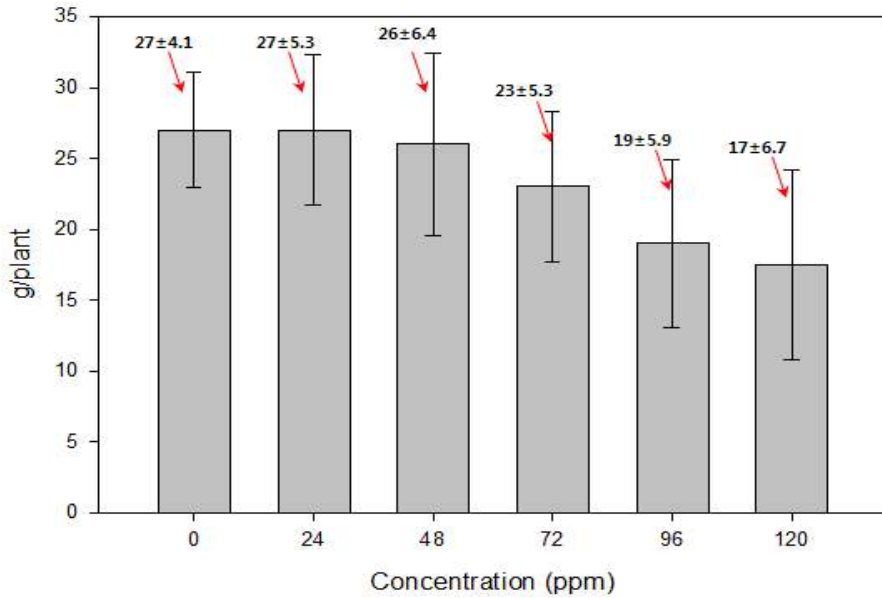


그림. 수확시기별 바이오메스 변화 양상 1) 처리농도: 800ppm 2) 반복수: 3반복, 3) 처리면적: 200m²/처리구, 4) 온도: 23±5~35±2℃

○ 생육시기에 따른 식물성에스트로젠 함량

- 잎의 발달상태가 다르고 R2부터는 영양성장기에서 생식성장기에 접어들므로 우리가 이해하지 못하는 다양한 생리적 변화가 예측, 확실한 것은 생육시기에 따라 처리되는 에테폰의 농도를 높여야 될 것으로 판단됨.

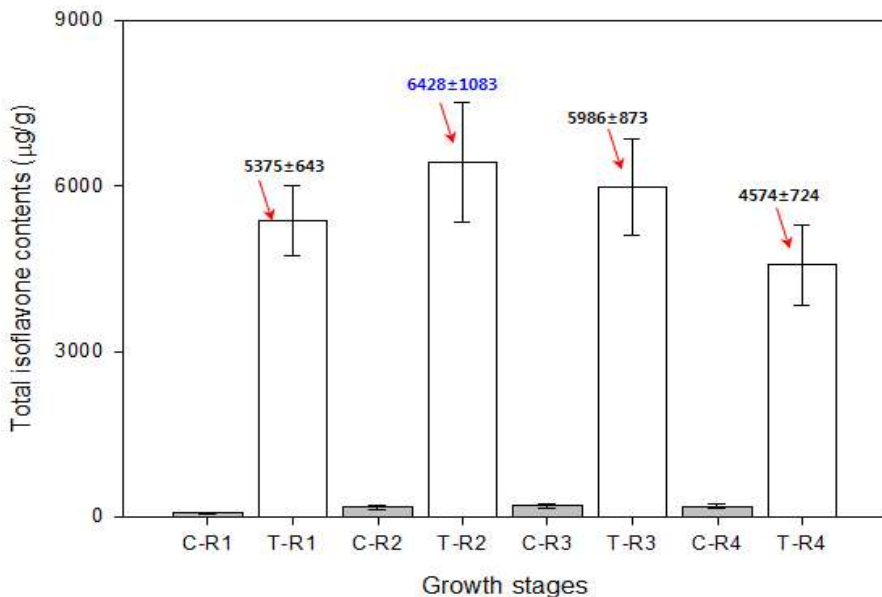


그림1-16. 생육시기에 따른 식물성에스트로젠 함량 1) 처리농도: 800ppm 2) 반복수: 3반복, 3) 처리면적: 200m²/처리구, 4) 온도: 23±5~35±2℃

2-2-7-2. 식물성에스트로젠 함량에 미치는 물리 화학적 요인 검정

- 최적화된 Fabaton 콩잎 소재 생산을 위해 1-2년차 때의 결과를 바탕으로 방법적인 측면에서 다소 명확하지 않은 부분과 개선된 방법을 찾고자 하우스 노지 및 포트 실험을 3회에 걸쳐 수행하였다.
- 시험일자는 2017년 6월 20일 부터 7월 20일까지 수행하였으며 공통적인 처리 및 수확조건은 1-2년차 최적화 조건에 따라 처리액은 아그로텍사의 에테폰(ethephon 39%) 50mL/20L (400배 희석), 수확시기는 2회 처리 후 72시간 쯤 수확을 하여 이소플라본 함량을 분석하였다.
- 1-2년차의 포트 및 필드생산실험에서 Fabaton 콩잎의 이소플라본 축적 함량에 다양한 변수들을 확인하였는데 그 중 대표적으로 ① 비닐피복효과 ② 처리용액pH효과 ③ 살리실산 효과 ④ 처리시점영향(온도) ⑤ 비료시비 영향 ⑥ 에테폰 및 기타 혼합제 처리에 따른 영향 등을 설정하여 최적조건을 얻으려는 노력을 계속하였다.

표. 파바톤콩잎 생물소재 생산 최적화 연구 실험 개요

구분	실험 일시	처리조건
	2017 년 06월 22일~ 26일	<ul style="list-style-type: none"> - 하우스 노지 구역 실험(1차) - 약 100m² 하우스 2동 - 비닐개폐, 처리용액 pH, 살리실산, 온도, 처리횟수에 따른 영향 평가
	2017 년 07월 13일~ 17일	<ul style="list-style-type: none"> - 하우스 포트 실험(2차) - 지름 20cm 포트 60개 - 비료시비, 기타 혼합제 처리에 따른 영향 평가
	2018 년 02월 09일~ 13일	<ul style="list-style-type: none"> - 하우스 포트 실험 (3차, 동계 실험) - 지름 20cm 포트 100개 - 살리실산, 온도, 비닐개폐에 따른 영향 평가

표. 하우스 노지 구역 실험 결과 (1차)

실험	구분	시료 코드	비고	이소플라본 함량(mg/g)
비닐피복 효과	오전6시처리 (2시간 덮기)	V1	처리 후 2시간 덮기	2.08 ± 0.14
	오후6시처리 (2시간 덮기)	V2	처리 후 2시간 덮기	4.33 ± 0.21
	오후6시처리 (12시간 덮기)	V3	처리 후 12시간 덮기(Over-night)	4.42 ± 0.25
용액pH 효과 (acetic acid, A.A)	A.A 100ppm	A1	-	N.D. ¹⁾
	A.A 200ppm	A2	-	N.D. ¹⁾
	A.A 100ppm 처리후 에테폰	A3	A.A 처리 다음날 에테폰 동일 처리	2.19 ± 0.12
	A.A 200ppm 처리후 에테폰	A4	A.A 처리 다음날 에테폰 동일 처리	3.60 ± 0.19
	A.A 100ppm+에테폰(혼합)	A5	A.A와 에테폰 혼합액 처리	1.32 ± 0.09
	A.A 200ppm+에테폰(혼합)	A6	A.A와 에테폰 혼합액 처리	2.83 ± 0.21
살리실산 효과 (salicylic acid, S.A)	S.A 100ppm	S1	-	N.D. ¹⁾
	S.A 200ppm	S2	-	N.D. ¹⁾
	S.A 100ppm 처리후 에테폰	S3	S.A 처리 다음날 에테폰 동일 처리	7.02 ± 0.32
	S.A 200ppm 처리후 에테폰	S4	S.A 처리 다음날 에테폰 동일 처리	7.43 ± 0.36
	S.A 100ppm+에테폰(혼합)	S5	S.A와 에테폰 혼합액 처리	8.39 ± 0.41
	S.A 200ppm+에테폰(혼합)	S6	S.A와 에테폰 혼합액 처리	7.38 ± 0.33
처리시기 영향 (온도)	오전6시처리	P1	-	5.03 ± 0.29
	오후6시처리	P2	-	7.32 ± 0.31
처리횟수	1회처리	T1	-	1.90 ± 0.11
	2회처리	T2	처리 control	4.35 ± 0.37

1) N.D. : Not detected

* 에테폰(ethephon 39%) 50mL/20L 농도로 2회 처리, 처리 후 72시간 췌 수확, 오전6시 처리, 날씨 맑음

- 비닐 피복 처리 효과에서는 처리 control 대비 효과가 거의 없었다고 확인 할 수 있었다. 다만 오전 6시경에 처리하여 2시간 비닐을 덮었을 경우에는 함량이 현저히 낮아졌는데 이는 여름에는 해가 떠오르면서 기온도 급격히 올라가고 또한 비닐에 의해 복사열이 생기므로 내부 온도가 너무 높아져서 에테폰의 작용이 낮아질 것이라고 판단되었다.

- 용액의 pH 효과에서 살펴보면 에테폰의 주요 성분은 클로로에틸포스폰산(2-chloroethyl phosphonic acid)이라고 불리는 물질인데 이는 pH 4.1 이상의 약산성, 중성, 염기성 환경에서 에틸렌을 발생시킨다. 그리고 30℃ 이상의 온도에서는 약효가 떨어진다고 알려져 있다. 여름철에 고온에서의 에테폰의 작용을 보다 용이하게 하기 위해 용액을 산성으로 유지하는 것이 낫다고 판단하여 pH 3.5 정도의 에테폰과 초산(acetic acid)을 혼합 및 개별 처리를 하였다. 하지만 이 효과는 미비하였고 오히려 이소플라본 함량이 감소하는 경향을 나타내었다.
- 살리실산(salicylic acid)의 효과에서는 에테폰과 혼합액 처리에서 처리 control 대비 약 2배의 이소플라본 함량 증가 현상을 나타내었다. 그리고 살리실산 처리 후 에테폰을 처리한 경우에도 함량이 증가하였다.
- 에테폰 처리 시기 영향(온도)에서는 오전6시 처리 보다는 오후6시 처리가 조금 더 함량이 높았고 이는 오전에는 온도가 급격히 올라가기 때문에 일정 시간이 지나면 약효가 떨어질 것으로 판단이 된다. 1-2차년도에 흐린날과 비가 내리는 날에 처리한 것의 샘플의 함량은 현저히 낮았다. 여름의 오후6시는 아직 해가 떠 있기 때문에 일몰 무렵까지의 약 2시간 정도의 광합성이 진행된다. 에테폰에 의한 콩잎의 이소플라본 축적에는 광합성과 온도가 주요 작용점이라고 판단된다.



그림. 하우스 노지 구역 실험 주요 모습 (1차)

표. 하우스 포트 실험 결과 (2차)

실험	구분	시료 코드	비고	이소플라본 함량(mg/g)
비료시비 효과	Control (비료무처리)	FC	콩 전용 비료 추비	7.25 ± 0.41
	표준시비량의 0.5배 처리	F05	콩 전용 비료 추비	8.12 ± 0.48
	표준시비량 처리	F1	콩 전용 비료 추비	9.27 ± 0.46
	표준시비량의 1.5배 처리	F15	콩 전용 비료 추비	9.14 ± 0.51
	표준시비량의 2배 처리	F2	콩 전용 비료 추비	7.84 ± 0.38
기타 혼합제 처리 효과	Control (에테폰 처리)	S19		8.02 ± 0.47
	IAA 처리 (인돌아세트산)	S17	생장조절제 옥신 계열 (100ppm)	N.D. ¹⁾
	에테폰 + IAA 혼합 처리	S16		5.34 ± 0.35

1) N.D. : Not detected

* 에테폰(ethephon 39%) 50mL/20L 농도로 2회 처리, 처리 후 72시간 쟈 수확, 오전6시 처리, 날씨 맑음



그림. 하우스 포트 실험 주요 모습 (2차)

표. 하우스 포트 실험 결과 (3차, 동계)

실험	구분	시료 코드	비고	이소플라본 함량(mg/g)
살리실산 영향	Control	SC	무처리	N.D. ¹⁾
	SA	SA	살리실산(100ppm) 처리	N.D. ¹⁾
	ET	ST	에테폰 동일 조건	4.19 ± 0.26
	SA+ET	SAT	살리실산(100ppm)+에테폰 혼합액 처리	5.28 ± 0.36
온도별 영향	ET (오전 9시 처리)	T9	에테폰 동일 조건	3.41 ± 0.21
	ET (정오 처리)	T12	에테폰 동일 조건	2.75 ± 0.11
	ET (저녁 5시 처리)	T17	에테폰 동일 조건	4.17 ± 0.34
비닐피복 영향	ET (아침 9시)	V9	에테폰 처리 후 2시간 덮기	2.18 ± 0.19
	ET (저녁 5시)	V17	에테폰 처리 후 Over night	5.26 ± 0.37

1) N.D. : Not detected

* 에테폰(ethephon 39%) 50mL/20L 농도로 2회 처리, 처리 후 72시간 쉼 수확, 오전9시 처리, 날씨 맑음

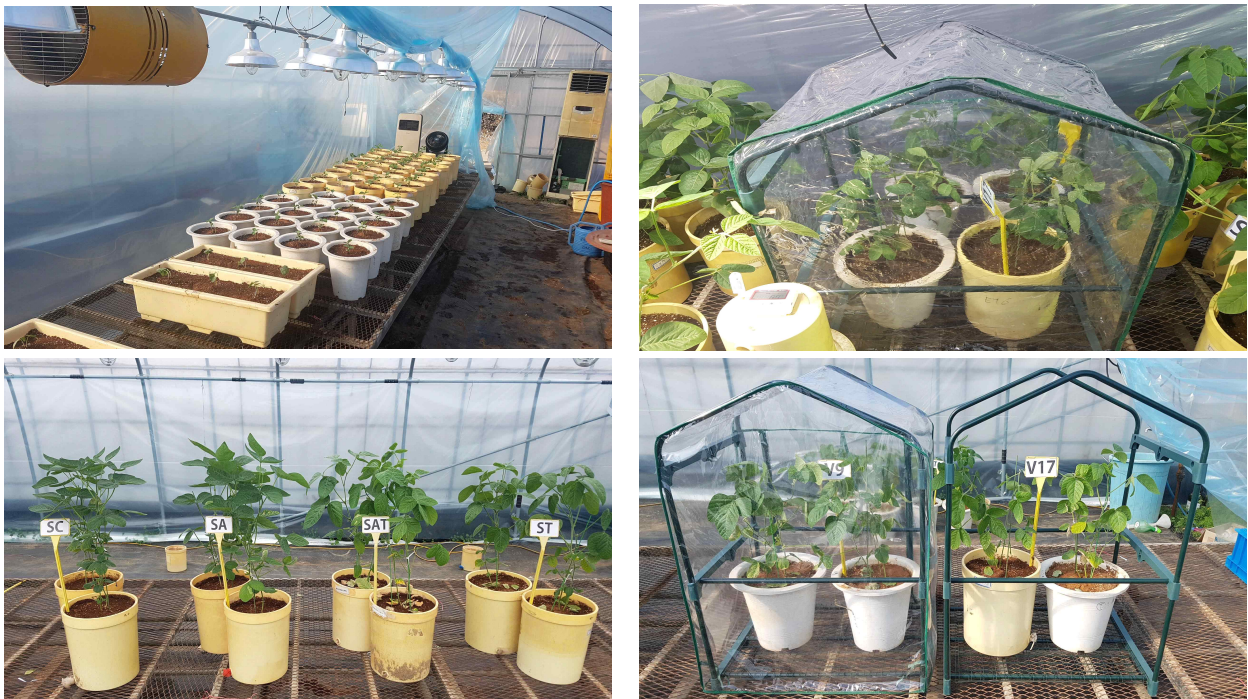


그림. 하우스 포트 실험 주요 모습 (3차, 동계)

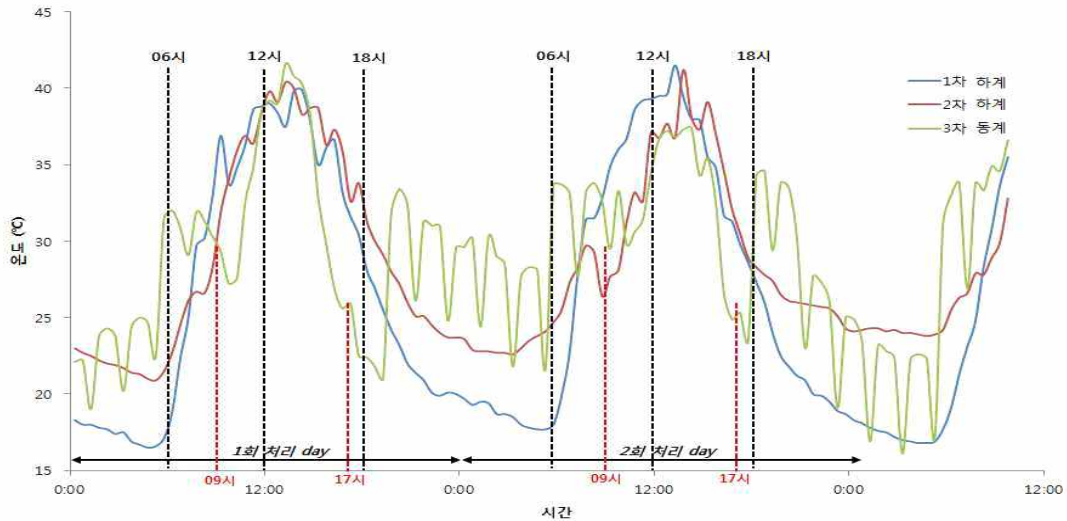


그림. 처리 시점의 하우스 내 온도 분포

- 하우스 포트 2차 실험에서는 비료시비효과와 기타혼합제효과를 확인하였다. 비료는 콩전용복합비료(9-9-9)를 사용하였으며 콩 재배시 표준시비량에 준하여 과중된 콩 모종을 이식 후 1주일 지나서 추비를 진행하였다. 에테폰은 동일조건으로 처리하였으며 비료무처리 대비 표준시비량 처리한 구에서 이소플라본 함량이 약 20% 증가하는 경향을 나타내었고 과다 시비한 구에서는 감소하는 경향을 나타내었다. 비료사용에 대한 정확한 검증은 필드에서 추후 진행되어야 할 것으로 판단된다.
- 인돌아세트산(IAA)는 옥신의 일종으로서 식물 내에서 합성되는 천연생장조절제이다. 에테폰 처리 시 일정 시기가 지나면 낙엽 되는 잎이 많아서 생산량 감소에 영향을 미치는데 이를 보완하고자 문헌을 참고하여 처리를 하였지만 효과가 미비하였다. 이소플라본 함량은 감소하는 패턴을 확인하였다.
- 하우스 포트 3차 실험에서는 앞선 1차 실험의 반복실험으로서 동계 재배 시 하계 재배 조건과 환경을 최대한 비슷하게 설정을 하여 재배 및 실험을 진행하였다. 동계 조건은 일장 문제와 온도 문제가 제일 큰 변수인데 일장은 메탈할라이드 등을 설치하여 보완시켰으며 온도는 온풍기 및 비닐을 통해서 유지시켰다. 하계 재배 때 보다는 동계 재배 시 온도 패턴이 다소 불특정한데 이는 온풍기 및 메탈할라이드 등의 열 때문일 것이라고 판단된다. 동계처리조건은 일장 및 기온 등을 고려하여 오전 9시, 정오, 저녁 5시에 설정하여 처리하였으며 이의 결과는 1차 하계 실험과 비슷한 양상으로 정오 무렵 처리한 구에서는 이소플라본 함량이 현저히 감소하였으며 저녁 5시 무렵 처리한 구에서 오전9시 처리한 구 대비 소폭 증가된 현상을 나타내었다. 살리실산 효과는 1차 하계 실험 대비 소폭 증가된 현상을 나타내었다. 이는 하계 대비 동계는 일조량이 현저히 부족하기 때문이라고 판단되며 이는 이소플라본 축적에 영향을 미친것이라고 판단된다. 비닐 피복 효과도 1차 하계 실험과 비슷한 양상으로 30°C 이하인 조건에서 비닐피복을 유지시켰을 때 소폭 증가된 현상을 보였다.
- 이소플라본 함량 증진을 위하여 에테폰 이용 시 온도 및 일조량은 중요한 인자임을 확인하였으며 에테폰 보강제로 살리실산을 혼합해서 이용하면 효과가 더 좋을 것으로 확인되었으며 추후 필드에서의 현장적용시험 및 살리실산에 대한 위해요소나 기준 등을 확인해야 할 것으로 판단된다.


2-2-7-3. 현장적용실험설계

앞선 2-2-3절 실험실 규모의 실험에서 얻어진 최적화 된 생산조건을 근거로 현장적용실험을 3차(2016년, 2017년, 2018년)년에 걸쳐 실험함. 현장적용실험은 아래 그림과 같이 경남 진주시 미천면 안간리 일원에서 진행하였다. 현장실험은 농민 이진식씨가 주관이 되어 진행하였다.

현장 필드실험에서는 가스인 에틸렌 적용이 불가하여, 에테폰을 사용하였다. 에테폰 농도는 실험구에 따라 500~1,200 ppm($\mu\text{g/g}$) 범위로 실시하였다. 처리는 조제된 에테폰 용액을 분무 살포하였다. 식물체에 24시간 간격으로 2회 처리하였다.

파바톤콩잎 식물성 에스트로겐 함량 평가는 서로 다른 30개 지점에서 채취하여 분석하였다. 추출 및 분석 조건은 실험실 연구에 사용방법을 적용하였다. 콩 재배는 보리 수확 후 5월 말에 파종하여 당해연도 장마가 끝나는 7월 20일 ~ 8월 10일에 에테폰을 처리하였다.



<p>지점 A</p> 	<p>지점 B</p> 
<p>경상남도 진주시 미천면 안간리 529-1 GPS좌표:35.319862, 128.090636, 면적:1,986 m², 600평</p>	<p>경상남도 진주시 미천면 안간리 600 GPS좌표:35.314585, 128.0088290, 면적:4,905 m², 1,483평</p>
<p>지점 C</p> 	
<p>경상남도 진주시 미천면 안간리 644-2 GPS좌표:35.309294, 128.088967, 면적:5,383 m², 1,628평</p>	<p>현장적용실험을 수행한 농민</p>

2-2-7-4. 1차 현장적용시험 (2015.06~2016.05)

- 앞에서 기술한 실험포 A 및 B에 2015년 6월 15일경 콩을 파종하여 7월 20일경에 에테폰을 처리하는 현장적용실험을 하였다. 온도 및 강우가 적합하여 콩 생육은 양호하였다.
- 에테폰 처리기간 2015년 7월 20일~8월 10일에는 평균기온 24~28℃, 최저기온 22~25℃, 및 최고기온 26~35℃를 유지하였다. 강우가 있는 날은 6일이었고, 강수량은 10 mm 미만이었다.
- 39% 에테폰 수용액을 물에 희석하여 통상의 방법으로 분무살포 2회 하였다. 분무살포 후 3 일째에 수확하였다. 분석을 위한 샘플은 포장 A, B, C에서 30곳을 선발하여 채취하였다.
- 콩잎은 식약처 인정 식용가능하고 콩줄기는 식용한 보고가 없어 콩잎과 콩줄기의 분리를 현장에서 수작업으로 수행했다. 수확된 콩잎은 산청군 산청읍 소재 생약농업협동조합에 설치되어있는 세척기 및 건조기를 사용하였다.



A지점에서 파종한 에테폰 살포 전 콩의 생육상태 생육상태는 대단히 좋은 것으로 판단



에테폰 처리는 수확, 세척 및 건조를 고려하여 1일 300~400평 수행하였다. 생산된 파바톤콩잎을 줄기와 분리하는 작업. 수작업으로 진행



시험포 중 일부에서 처리 조건을 달리하여 식물성 에스트로겐 최적화 시키는 시험 시행



생약농업협동조합에서 콩잎을 세척하는 과정



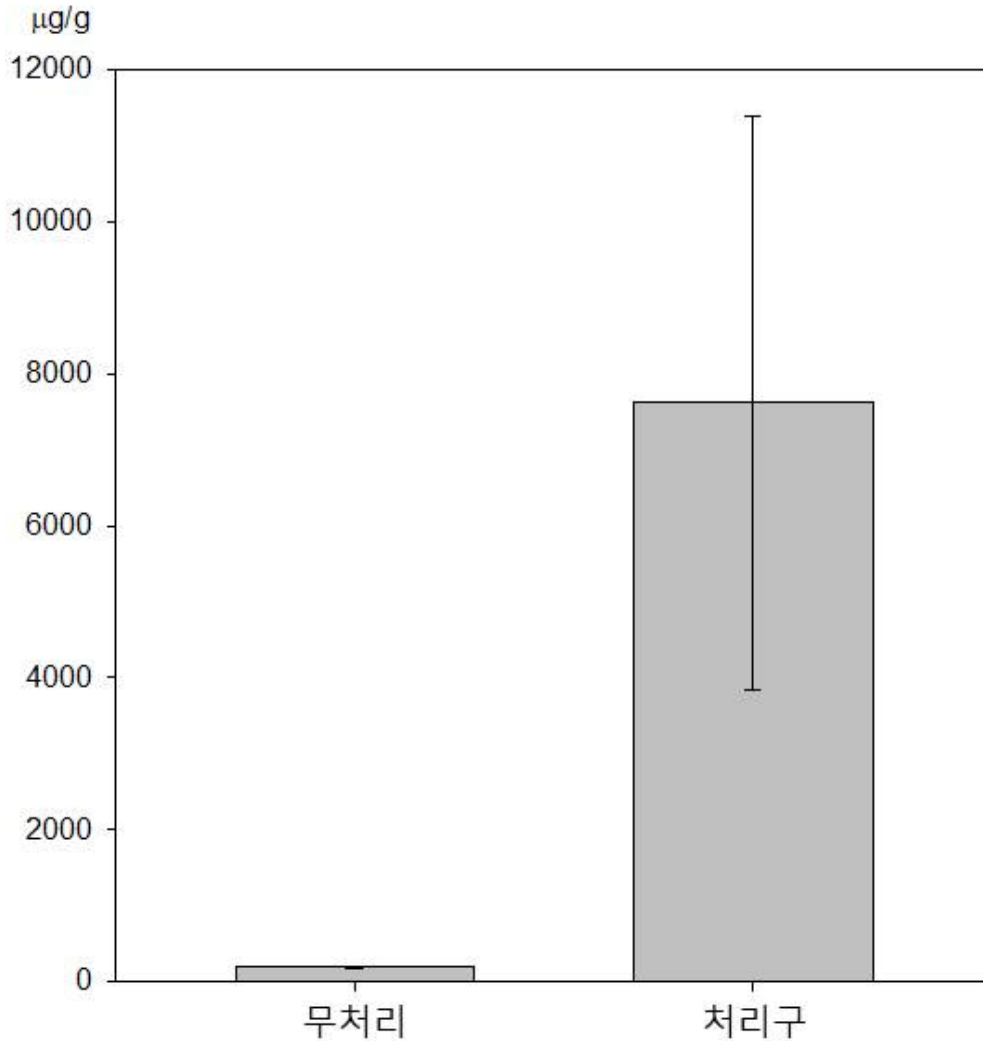
세척된 콩잎을 건조시키는 과정. 선반형 건조기로 콩잎이 겹겹이 쌓이는 등 건조에 한계 있었음.



건조된 콩잎을 진공포장하는 과정

[표] 1차 현장적용시험에서 생산한 파바톤 콩잎에 함유된 식물성 에스트로겐 함량

시료 채취지점	식물성 에스트로겐 함량				총합량 (μg)
	Daidzin	Genistin	Malonyl daidzin	Malonyl genistin	
1	162	116	504	474	1,255
2	410	144	1,272	599	2,425
3	481	140	1,554	688	2,862
4	767	244	2,578	1,062	4,651
5	755	255	2,461	1,069	4,539
6	621	184	1,781	815	3,401
7	940	302	2,962	1,153	5,357
8	905	283	3,210	1,211	5,608
9	962	354	3,108	1,359	5,783
10	895	312	2,770	1,244	5,221
11	517	252	1,488	881	3,139
12	1,391	444	3,899	1,658	7,393
13	1,683	632	5,419	2,193	9,927
14	1,610	691	5,288	2,307	9,895
15	1,644	688	4,809	2,289	9,430
16	1,516	494	4,334	1,755	8,100
17	2,054	818	6,953	2,833	12,658
18	2,152	964	6,739	2,948	12,803
19	2,179	1,059	6,851	3,387	13,476
20	2,233	1,067	5,906	2,965	12,171
21	369	172	1,069	705	2,315
22	1,155	376	3,280	1,289	6,101
23	1,600	609	4,522	1,907	8,638
24	1,424	568	4,117	1,740	7,849
25	1,908	754	5,142	2,243	10,047
26	1,109	387	3,252	1,312	6,060
27	1,748	732	5,965	2,541	10,986
28	1,524	673	4,709	2,085	8,991
29	2,258	1,165	6,503	3,408	13,334
30	2,456	1,168	7,032	3,456	14,113
평균	1,314	535	3,983	1,786	7,618
표준편차	650	323	1,937	898	3,777



[그림] 1차 현장적용시험(2015.06~2016.06)

○ 개선점

- 실험실(대학내 포장)에서 수행한 포트실험보다 각 구별 함량의 차이가 큼
- 콩잎과 콩줄기를 분리했을 경우 콩잎의 급격한 호흡으로 콩잎이 자체 산화가 일어남. 양파망 같은 공기 통기가 잘 되는 용기를 사용해도 유사한 현상 발생하여 해결해야 될 문제로 대두
- 세척기의 효율이 낮고 선반형 건조기는 콩잎이 겹겹이 쌓여 건조가 균일하지 못하고, 콩잎 뒤집기 작업을 하면 건조 콩잎의 건조 정도가 균일하지 않고, 수작업이 많이 요구되는 과정을 거쳐야 함, 따라서 해결해야 될 큰 문제로 대두

2-2-7-5. 2차 현장적용시험 (2016.06~2017.05)

- 앞에서 기술한 실험포 A 및 B에 2016년 5월 25일경 콩을 파종하여 7월 20일경에 에테폰을 처리하는 현장적용실험을 하였다. 온도 및 강우가 적합하여 콩 생육은 양호하였다.
(1차는 과제선정 일정 관계로 농민과의 계약이 늦어 약간 늦게 파종함. 2차년도 1차 때보다 파종시기를 2주간 당겨서 함)
- 에테폰 처리기간 2016년 7월 20일~8월 10일에는 평균기온 24~29℃, 최저기온 20~24℃, 및 최고기온 30~35℃를 유지하였다. 강우가 있는 날은 25일이었고, 강수량은 28.0 mm 이었다.
- 39% 에테폰 수용액을 물에 희석하여 통상의 방법으로 분무살포 2회 하였다. 분무살포 후 3 일째에 수확하였다. 분석을 위한 샘플은 포장 A, B, C에서 30곳을 선발하여 채취하였다.
- 1차년도 콩잎 및 콩줄기 분리과정에서 노동력 투입이 많고, 줄기에서 분리된 콩잎의 호흡량이 많아 콩잎의 변질이 많고, 또한 선반형 건조장치의 한계점을 극복하고자 새로운 방법장구
- 진주시 미천면 인근에 예전에 담배를 재배하여 담배건조장이 있음. 담배건조장 구조가 아래 그림과 같이 콩잎과 콩줄기를 분리하지 않고 세척 후 뒤집어 건조하는 것을 시도함.



7월 20일경 에테폰 수용액을 생육시기 R1~R3 콩 식물체에 분무하는 작업



담배건조기에 적합하도록 콩잎 콩줄기 분리없이 수확하는 과정



적합한 세척기를 구하지 못해 농민들이 수작업으로 대형 고무용기에서 세척(3회반복) 하는 과정



콩잎이 붙어있는 콩줄기를 뒤집어서 고정틀에 넣고 건조장에 설치하는 전경, 건조는 40℃



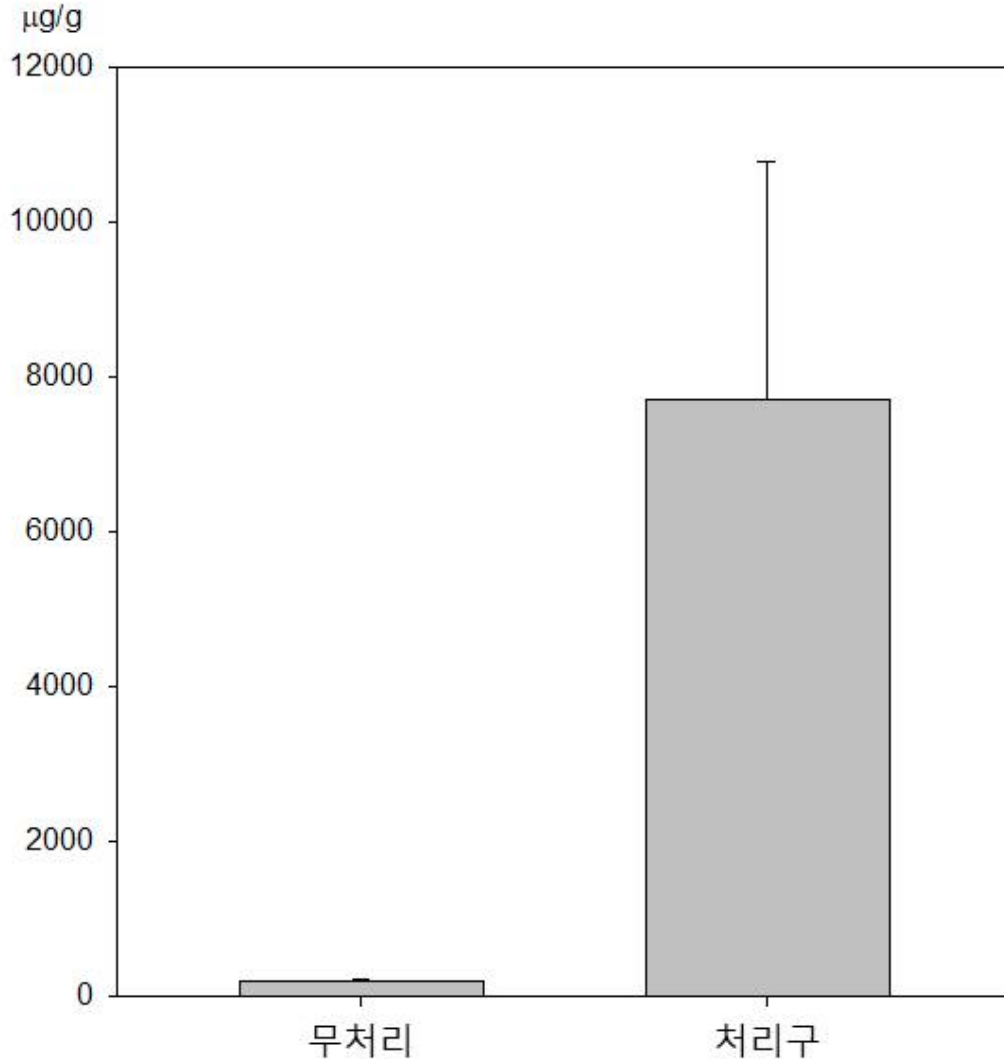
건조된 콩 식물체에서 콩잎과 콩줄기를 분리하는 작업



파바톤콩잎 생산품이 포장된 전경. 미건조 콩잎이 포함되면 포장된 전체가 오염됨

[표] 2차 현장적용시험에서 생산한 파바톤 콩잎에 함유된 식물성 에스트로겐 함량

시료 채취지점	식물성 에스트로겐 함량				총합량 (μg)
	Daidzin	Genistin	Malonyl daidzin	Malonyl genistin	
1	456	327	1,422	1,337	3,542
2	792	278	2,460	1,158	4,689
3	511	149	1,651	730	3,041
4	1074	342	3,611	1,488	6,516
5	507	171	1,652	718	3,048
6	2,406	713	6,906	3,161	13,186
7	1,335	429	4,206	1,636	7,606
8	1,592	497	5,646	2,129	9,864
9	1,676	616	5,412	2,366	10,070
10	1,597	557	4,941	2,220	9,315
11	862	421	2,483	1,470	5,237
12	1,023	326	2,866	1,218	5,434
13	1,035	389	3,334	1,349	6,108
14	1,310	562	4,301	1,876	8,050
15	897	376	2,623	1,249	5,144
16	2,021	658	5,777	2,340	10,795
17	1,588	632	5,376	2,190	9,786
18	1,015	455	3,178	1,391	6,039
19	837	407	2,633	1,301	5,178
20	1,526	729	4,037	2,027	8,319
21	1,438	671	4,169	2,751	9,030
22	2,384	776	6,767	2,659	12,586
23	936	356	2,645	1,116	5,053
24	1,119	447	3,236	1,368	6,170
25	2,048	809	5,518	2,408	10,783
26	1,574	549	4,616	1,862	8,601
27	567	237	1,935	824	3,564
28	1,645	727	5,085	2,252	9,709
29	2,340	1,208	6,741	3,532	13,821
30	1,927	917	5,518	2,711	11,073
평균	1,335	524	4,025	1,828	7,712
표준편차	568	233	1,617	720	3,069



[그림] 2차 현장적용시험(2016.06~2017.05)

○ 개선점

- 전체적인 경향성은 1차년도 유사하게 콩잎의 식물성에스트로젠 함량 (평균값 7,712 μg) 평균값에서 표준편차 양의 값과 음의 값이 크게 나타남
실험실에서 수행한 실험은 소형분무기라 잎에 골고루 살포가 가능하고 대형 필드에서는 대형 분무기로 살포하니 밑부분의 콩잎에 살포되지 않는 등 살포방법에 한계 노출
- 또한 일조량이 식물성 에스트로젠 함량 축적에 중요한 요소인데 식물체의 재배 장소에 그늘 등의 이유로 받아들이는 일조량 차이가 난 것으로 판단됨
- 생산된 콩잎의 세척은 수작업으로 했지만 건조장은 1년차 선반형에서 2년차 담배건조장으로 전환하므로 효율성을 대단히 높일 수 있었다

○ 2년차 참여기업에서의 현장적용시험(2017.07~2018.03)

- 참여기업 및 기술이전 업체인 제이씨엔팜에서 현장적용시험을 남해군 및 진주시 미천면에서 계약재배 형식으로 현장적용시험을 함.
 - 남해군: 34,000 m² (10,000평) 규모
 - 진주시: 40,800 m² (100,000평) 규모
- 계약재배 농가의 처리방법, 처리시기, 처리농도 등에 대해 사전교육 및 점검이 있었으나 낮은 이해도 때문에 처리과정에 많은 문제 노출. 처리시기를 놓쳐서 R3이상으로 진행시킴
- 수확 후 세척시설이 갖추어지지 않아 생산물량을 처리하지 못함. 또한 건조시설이 부족하여 생산된 콩잎에서 많은 손실 발생



대규모 재배시험에서 효용물질(에테폰) 처리과정



생산된 콩잎을 수확하여 트랙터로 옮기는 과정. 나타낸 사진과 같이 대용량으로 수확되는 콩잎을 세척 및 건조하는 시설이 부족하여 파바톤콩잎 수확에 큰 어려움을 겪음



60대 이상 농민 어른들이 수작업으로 콩잎을 세척하는 과정



건조장에 들어가기 전 콩 식물체를 건조고정틀에 묶는 과정



건조실에서 콩잎을 건조하는 과정



제이씨엔팜에서 제작한 박스에 파바톤 콩잎을 담아 창고에 입고하는 과정

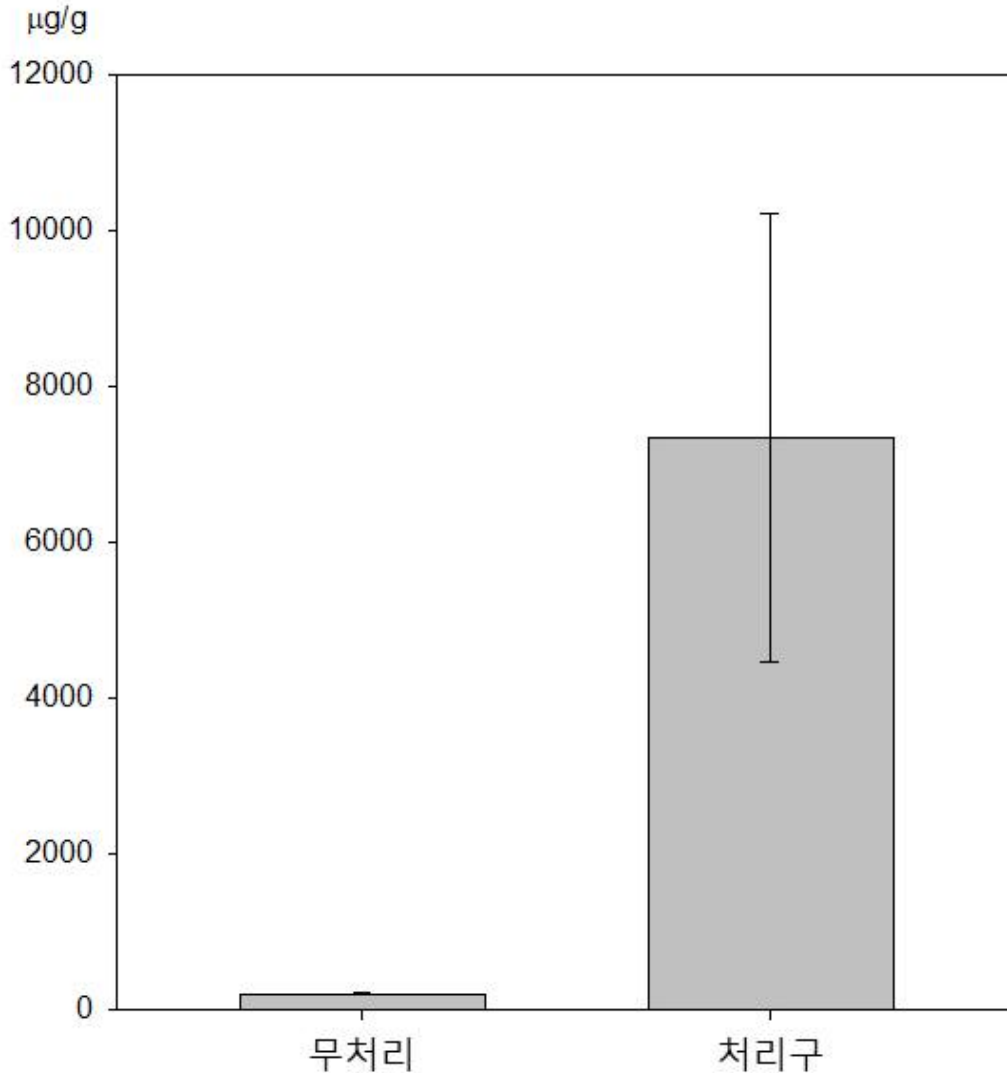
2-2-7-6. 3차 현장적용시험 (2018.05~2019.05)

- 앞에서 기술한 A, B, C 실험포에서 5월 20일경에 파종하고 6월 중순부터 가뭄이 찾아와 콩 식물체 생육에 많은 어려움 발생. 특히 7월 9일 23 mm 강우 이후 8월말까지 거의 비가오지 않아 식물체의 생육이 중지되어있는 상태로 바이오매스가 적었음
- 7월 20일 경부터 살리실산 혼합시용 등 새로운 방법으로 에테폰 처리를 했으나, 선행연구에서 확보한 결과에 미치지 못함. 가뭄때문인지 인과는 명확하지 않음.
- 35°C 고온에서 에테폰 처리는 에틸렌이 콩잎에 침투하기 전 말라버려 상대적으로 낮은 식물성 에스트로젠 수율을 보임. 처리를 오후 5시경에 하고, 시험구에 따라서는 비닐로 처리구를 차단시켜 수율향상 실험을 시도함.

<p>가뭄의 기억 ... 2018년 여름</p> <p>52일간 비가 내리지 않아 극심한 가뭄 게다가 기온은 거의 한 달간 35도에서...2달정도 가운 적은 몇 번 있었지만 여름철에 이리 가물기는 ...</p> <p>블로그 2018.10.6. 술광의 소나무와 황금소나무</p> 	
<p>2018년 여름 심각한 가뭄으로 콩 식물체 생육 및 에테폰 처리 시용에 어려움 발생</p>	<p>고온에서 에테폰 증발을 차단하여 식물성 에스트로젠 축적향상을 기대하고 시도했으나, 유의있는 향상은 없었음.</p>
	
<p>세척장으로 옮기기 전 시료 수확 과정</p>	<p>세척된 콩 식물체를 건조장으로 옮기는 과정</p>
	
<p>담배 건조기에 세척된 콩 식물체를 넣은 건조장 모습</p>	<p>건조된 파바톤 콩잎을 수확하는 과정</p>

[표] 3차 현장적용시험에서 생산한 파바톤 콩잎에 함유된 식물성 에스트로겐 함량

시료 채취지점	식물성 에스트로겐 함량				총합량 (μg)
	Daidzin	Genistin	Malonyl daidzin	Malonyl genistin	
1	854	613	2,663	2,505	6,634
2	2,139	752	6,646	3,129	12,666
3	590	172	1,907	844	3,513
4	1,659	529	5,575	2,298	10,060
5	1,864	629	6,079	2,642	11,214
6	1,537	456	4,413	2,020	8,425
7	812	261	2,558	995	4,627
8	1,638	512	5,812	2,192	10,154
9	1,911	702	6,172	2,699	11,483
10	1,250	436	3,868	1,738	7,291
11	1,220	596	3,513	2,080	7,409
12	1,324	423	3,711	1,578	7,036
13	647	243	2,085	844	3,819
14	494	212	1,623	708	3,038
15	1,887	790	5,520	2,627	10,825
16	2,006	653	5,734	2,322	10,715
17	1,329	529	4,500	1,833	8,192
18	1,021	458	3,197	1,399	6,075
19	549	267	1,727	853	3,396
20	1,466	700	3,877	1,947	7,990
21	1,523	711	4,414	2,912	9,560
22	1,188	387	3,372	1,325	6,271
23	1,228	467	3,470	1,464	6,629
24	948	379	2,742	1,159	5,227
25	718	284	1,935	844	3,780
26	1,327	463	3,891	1,570	7,251
27	1,870	782	6,378	2,717	11,747
28	1,320	583	4,078	1,806	7,787
29	690	356	1,987	1,041	4,074
30	597	284	1,709	840	3,430
평균	1,254	488	3,839	1,764	7,344
표준편차	487	180	1,577	726	2,886



[그림] 3차 현장적용시험(2018.05~2019.05)



○ 개선점

- 에테폰처리 및 수확시기가 20일 이내에 짧은시간이 주어지므로 효과적으로 세척, 건조 및 포장할 수 있는 장비 절실히 요구됨. 기술이전 업체에서 적당한 규모의 세척 및 건조시설을 설치 운영하고, 이를 기반으로 농민들이 운영할 수 있는 시설모델을 반드시 제시함. 또한 지자체 및 정부에 운영할 수 있는 시설모델을 반드시 제시함. 관련 시설의 지원을 요청하는 일련의 노력들이 요구됨.
- 일조량, 강우, 재배지, 재배시기 등 인위적으로 통제가 어려운 요소가 매년 발생하여 예상했던 성과에는 미치지 못함. 특히 평균값에 대한 표준편차 양의값 및 음의값 범위가 커서 파바톤 콩잎의 시료 표준화에 어려움 예상
- 4차례(기업주관 확대재배실험 포함)의 노지 필드실험을 종합하면 파바톤 콩잎 사업의 큰 성공을 위해서는 인위적으로 통제가 가능한 실내로 옮겨오는 기술개발이 절실히 요구됨

2-2-8. 에테폰 처리에 따른 잔류검사 및 안전성 평가 (결과-7)

- 주로 농가에서 착색이나 후숙 등과 같은 목적으로 사용하는 에테폰은 중성이나 알칼리조건에서 쉽게 분해되어 에틸렌을 발생시키는 기작을 가지고 있다. 일반콩잎에 에테폰 처리 후 잔류 특성과 생물학적 반감기를 평가하였다.
- 시험일자는 2016년 7월 11일부터 8월 16일 까지 수행하였으며 사용약제는 아그로텍사의 에세폰(ethephon 39%)을 50mL/20L (400배 희석), 20mL/20L (1000배 희석), 10mL/20L (2000배 희석)액을 각각 제조하여 1회 처리와 1일 간격 2회 처리 후 잔류농도를 평가하였다.
- 시료수확은 약제 살포 후 2, 12, 24, 48, 72 시간 후 콩잎을 수확하여 즉시 냉장하여 드라이아이스와 함께 분쇄기로 갈아 분쇄한 후 -20℃에서 보관하였다.

표1-1. Fabaton 콩잎 안전성 평가 포장 장소

구분	면적	주소
	330 m ² (100 평)	경남 진주시 미천면 안간리 644-2 GPS좌표: 35.309294, 128.088967
	330 m ² (100 평)	경남 진주시 미천면 안간리 70-1 GPS좌표: 35.319862, 128.090636

○ Ethephon(에테폰) 잔류 분석

■ 시료 전처리

- 분쇄 시료 5.0 g을 conical tube에 칭량하고 0.1M HCl Acetonitrile 용액 15 mL 를 첨가하여 30분 동안 shaking 하였다. 이 후 4000 rpm에서 10분 동안 4 °C에서 원심분리하고, 상등액 1 mL를 취하여 유도체화 하였다. 시료용액 1 mL를 15 mL conical tube에 분취하고, (Trimethylsilyl)diazomethane solution (2.0 M in diethyl ether) 1 mL을 첨가하여 5분마다 vortex mixer하며 상온에서 30분간 유도체화 하였다. 이후 30 °C에서 질소농축하고 acetone 1 mL로 재용해하고 0.45 μm syringe filter로 여과 후 기기분석에 사용하였다.

■ 기기분석조건

- Instrument : 7890A GC/MSD
- Column : Agilent DB-35 Capillary Column (30m × 250μm, 0.25μm)
- Detector : 5975C mass spectrometry, temperature 270 °C
- Inlet : temperature 180 °C
- Source temperature : 200 °C
- Oven : 100 °C (2 min hold) → 5 °C/min → 130 °C (2 min hold) → 1 °C/min → 150 °C → 30 °C/min → 290 °C (3 min hold); Run time: 37.667 min
- Injection volume : 1 μl (Split 10 : 1)
- Selected ions : 110(quantitative), 109 (qualitative)

■ 분석법 검증

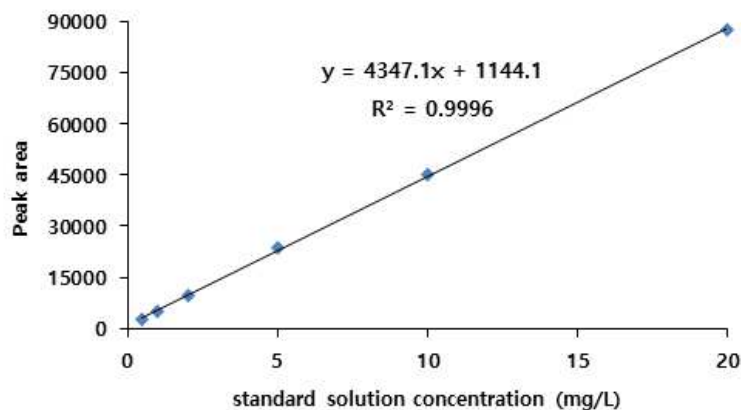


그림. 에테폰 표준검량곡선

표. 에테폰 회수율 시험

Fortification level (mg/kg)	Recovery (%)				LODa (mg/kg)
	1	2	3	Average ± CV	
5.0	84.9	90.7	87.2	87.6 ± 3.3	0.25

표. Ethephon 처리에 따른 초기 잔류농도, 반감기, 회귀식 및 수확 후 잔류 농도

처리 농도 및 횟수		초기 잔류농도 (mg/kg)	반감기	회귀식	건조 후*
10ml/20L (2000배)	1회 처리	139.28	NT***	NT	불검출**
	2회 처리	204.27	NT	NT	불검출**
20ml/20L (1000배)	1회 처리	133.42	NT	NT	불검출**
	2회 처리	171.55	NT	NT	불검출**
50ml/20L (400배)	1회 처리	293.06	19.8 시간	$y=680.96e^{-0.035x}$	불검출**
	2회 처리	479.52	26.6 시간	$y=395.85e^{-0.026x}$	불검출**

* 최종 약제처리 후 3일 후 수확 후 48시간 건조
 ** 불검출기준 : 0.25 mg/kg
 *** Not tested

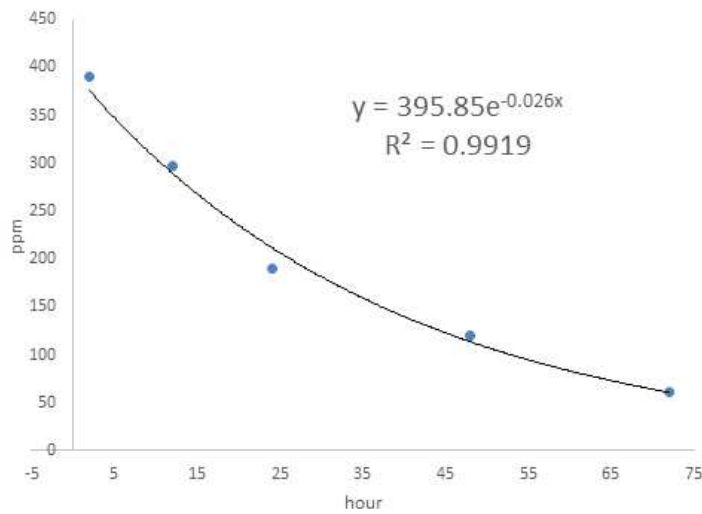


그림1-10. ethephon 400배 희석액 2회 처리 후 잔류 감소식

■ 시험 결과

- 희석 농도별 약제처리 후 초기 잔류 농도는 최대 379 mg/kg, 최저 133 mg/kg 이었다. 또한, 400배 희석액을 사용한 생물학적 잔류 반감기 평가결과 처리 회수별 약간의 차이는 있었으나 19.8-23.2시간으로 1일 정도로 확인되었다.
- 콩잎에 대한 Ethephon의 처리 횟수와 농도를 각각 달리한 시험에서 약제 처리 3일 후 수확하고 음건한 콩잎의 ethephon 잔류농도는 불검출이었다.

2-2-9. 개별인정형 제품개발을 위한 파바톤콩잎 표준화 (결과-8)

- Fabaton 콩잎 추출 분말의 원료 표준화를 위하여 기능/지표성분 시험법 설정 연구 및 검증 단계(밸리데이션)를 거쳐 기준규격설정을 완료하였다.
- Fabaton 콩잎 추출 분말 제조공정에 따른 지표성분함량을 확인하여 제조 기준을 설정하였으며 중금속, 잔류농약, 영양성분, 미생물 (대장균군) 등의 검사를 완료하여 원료표준화 및 임상 IRB 신청, 건기식 기능성 원료 신청을 위한 자료를 확보하였다.

2-2-9-1. Fabaton 콩잎 생물소재 표준화 연구 (기준규격설정)

① 시험법

i. 성상

- 식품공전 제 9. 일반시험법 9.1 성상시험법 (관능시험법), 한국표준색이름 (산업자원부 기술 표준원) 참조

ii. 지표물질 Daidzin, Genistin 시험법 (고속액체크로마토그래피법)

- 분석기기

HPLC System	Agilent 1260 Infinity,USA G1311B 1260 Dual Pump, G1329B 1260 ALS G1316A 1260 TCC, G1315D 1260 DAD
Analytical Column	Supelco C18 (250mm × 4.6 mm, 5 μm)

- 시약

표준품: Daidzin, Sigma, Cat# 42926, Lot# WXBC4295V, 98.2%

Genistin, Sigma, Cat# 73822, Lot# BCBT6600, 98.4%

Methanol: Duksan, HPLC grade

Acetonitrile: J.T Baker, HPLC Grade

Acetic acid: J.T Baker

3차 증류수 (DW)

- 표준용액 조제

Daidzin 표준물질 약 5mg을 정밀하게 달아 10mL 정용플라스크에, Genistin 표준물질 약 5mg 을 정밀하게 달아 20mL 정용플라스크에 70% Methanol을 넣어 용해 후 적정농도로 희석하여 표준용액으로 사용한다.

- 시험용액 조제

시료를 50ml 부피플라스크에 정밀히 달아 70% Methanol을 가하고 60분 동안 초음파 추출한다. 정용 후 PTFE syringe filter (0.45 um)를 사용하여 여과한 것을 최종 시험용액으로 사용한다.

- 분석 조건

Instrument	Agilent 1260 Infinity,USA		
Detector	UV (DAD)		
Wavelength	260 nm		
Column	Supelco C18 (250mm x 4.6 mm, 5 μm)		
	A: 0.1% Acetic acid in DW		
	B: Methanol : Acetonitrile = 7:3		
Mobile phase	Time	A(%)	B(%)
	0	87	13
	21	65	35
	32	60	40
	35	10	90
	36	87	13
	45	87	13
Flow rate	1.0 ml/min		
Injection volume	5 μl		
Oven Temperature	35 °C		

- 계산

$$\text{Daidzin, Genistin (mg/g)} = [\text{검량선 농도(ug/ml)} \times \text{시험용액전량(ml)} \times \text{표준품 순도} \times \text{희석배수}] / \text{시료채취량(mg)}$$

iii. 총비소, 카드뮴, 납

- 식품공전 제 9. 일반시험법 7. 식품 중 유해물질 시험법 7.1.2 금속별시험 7.1.2.1 납 (Pb)

1) 시험용액의 조제 가) 습식분해법 (2) 마이크로웨이브법

iv. 총수은

- 식품공전 제 9. 일반시험법 7. 식품 중 유해물질 시험법 7.1 중금속 시험 7.1.2.4. 수은(Hg)

v. 대장균군

- 식품공전 제 9. 일반시험법 3. 미생물 시험법 3.7. 대장균군 3.1.1 정성시험 가. 유당배지법

② 기준 · 규격 설정근거

i. 기능/지표성분 규격 설정에 관한 자료

- 기능/지표성분의 규격은 분석오차를 고려하여 표시하고자 하는 값에 대한 하한치와 상한치를 백분율로 설정한다. 일반적으로 추출물의 경우는 표시량의 80~120%를 원칙으로 하나 천연물의 경우 원료 Lot 별 기능/지표성분의 함량 편차가 커서 여러 Lot의 분석 데이터를 근거로 규격 함량을 달리 설정할 수 있다. Fabaton 콩잎추출분말 중 Daidzin, Genistin 함량은 설정한 시험방법으로 분석하여 측정하였으며, 분석 결과는 SPSS(Statistical Package for Social Science 250) One-way ANOVA을 이용하여 각 Lot 간의 평균값(mean), 표준편차(SD, standard deviation), 표준오차(SE, standard Error), 최소값, 최대값, 95% 신뢰구간에서의 상한치(Upper Bound)와 하한치(Lower Bound)를 구하여 모두 포함할 수 있는 규격을 설정하였다.

ii. Fabaton 콩잎추출분말 중 Daidzin 함량

- Fabaton 콩잎추출분말의 기준규격을 설정하기 위하여 3 Lot를 각각 3반복 분석한 결과를 토대로 Daidzin의 함량 범위(Table 1-2, 1-3)를 구하였다. 전체 평균±SD, 평균의 80~120%, 각 Lot별 하한치~상한치, 각 Lot 별 95% 신뢰구간에서의 하한치~상한치를 분석하여 분석 오차 및 Lot 별 함량을 모두 포함할 수 있는 기준규격으로 10.7 mg/g의 80%~120%인 8.56 ~ 12.84mg/g 으로 설정하였다. 그러나 천연물의 경우 원재료 채취 시기, 재배지 등에 따라 편차가 있을 것으로 사료되므로 Lot를 추가적으로 생산하여 좀 더 검토할 필요가 있다고 사료된다.

표. Lot 별 Daidzin의 함량 분석 결과

	반복수	Lot 1.	Lot 2.	Lot 3.	평균
	Lot No.				
Daidzin 함량 (mg/g)	1	10.79	10.84	10.39	10.6656
	2	10.78	10.73	10.52	
	3	10.76	10.68	10.50	
	평균	10.7767	10.7500	10.4700	

표. Lot 별 Daidzin의 함량 범위 결과

Lot No.	표준편차 (SD)	표준오차 (SE)	최소값	최대값	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
Lot 1.	0.01528	0.00882	10.76	10.79	10.7387	10.8146
Lot 2.	0.08185	0.04726	10.68	10.84	10.5467	10.9533
Lot 3.	0.07000	0.04041	10.39	10.52	10.2961	10.6439
전체	0.15685	0.05228	10.39	10.84	10.5450	10.7861

표. Daidzin 함량 범위 (요약)

	Daidzin (mg/g) 함량 범위
전체 평균±SD	10.7 ± 0.15685
평균의 80~120%	8.56 ~ 12.84
각 Lot별 최소값~최대값	10.39 ~ 10.84

iii. Fabaton 콩잎추출분말 중 Genistin 함량

- Fabaton 콩잎추출분말의 기준규격을 설정하기 위하여 3 Lot를 각각 3반복 분석한 결과를 토대로 Genistin의 함량 범위를 구하였다. 전체 평균±SD, 평균의 80~120%, 각 Lot별 하한치~상한치, 각 Lot 별 95% 신뢰구간에서의 하한치~상한치를 분석하여 분석오차 및 Lot 별 함량을 모두 포함할 수 있는 기준규격으로 4.8 mg/g의 80%~120%인 3.84 ~ 5.76mg/g으로 설정하였다. 그러나 천연물의 경우 원재료 채취 시기, 재배지 등에 따라 편차가 있을 것으로 사료되므로 Lot를 추가적으로 생산하여 좀 더 검토할 필요가 있다고 사료된다.

표. Lot 별 Genistin의 함량 분석 결과

	Lot No.	Lot 1.	Lot 2.	Lot 3.	평균
	반복수				
Genistin 함량 (mg/g)	1	4.87	4.92	4.64	4.8156
	2	4.88	4.88	4.71	
	3	4.88	4.86	4.70	
	평균	4.8767	4.8867	4.6833	

표. Lot 별 Genistin의 함량 범위 결과

Lot No.	표준편차 (SD)	표준오차 (SE)	최소값	최대값	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
Lot 1.	0.00577	0.00333	4.87	4.88	4.8623	4.8910
Lot 2.	0.03055	0.01764	4.86	4.92	4.8108	4.9626
Lot 3.	0.03786	0.02186	4.64	4.71	4.5893	4.7774
전체	0.10224	0.03408	4.64	4.92	4.7370	4.8941

표. Genistin 함량 범위 (요약)

	Genistin (mg/g) 함량 범위
전체 평균±SD	4.8 ± 0.10224
평균의 80~120%	3.84 ~ 5.76
각 Lot별 최소값~최대값	4.64 ~ 4.92

③ 제조기준

제조공정	세 부 내 역	수율 (kg)	기능/지표성분 함량변화 Daidzin (mg/g)	기능/지표성분 함량변화 Genistin (mg/g)
원료	파바톤 콩잎 (Soybean leave, <i>Glycine max</i> (L.) Merr.)	40	2.29	1.29
↓				
물 추출	정제수 18배수, 720L, 100°C, 6시간 (게이지압력 : 1.1kgf/cm ²)		0.21	0.09
↓				
여과	0.5마이크로필터로 여과		0.22	0.10
↓				
진공농축	65~75°C 20~25brix 저온감압농축 (400mmHg ~ 500mmHg)	12.42	1.92	0.88
↓				
살균	5% 텍스트린 투입, 80°C 40분 살균 (배합액 80°C 도달 후 40분간유지)			
↓				
분무건조	Inlet: 175°C Outlet: 85°C	13.07		
↓				
선별	60mesh 여과	11.08		
↓				
포장		11.06	10.78	4.88

④ 유해물질 규격 설정에 관한 자료

- Fabaton 콩잎추출분말의 유해물질 규격은 원재료 또는 제조과정 중 유해물질의 오염 또는 잔류가능성을 막고 안전성을 확보할 수 있도록 건강기능식품 기능성 원료 인정에 관한 규정 중 유해물질규격설정항목 (식약처 고시 제2016-141호 제14조 제6호 가목 관련)에 준하여 설정하였다. Fabaton 콩잎추출분말의 경우 콩잎을 정제수로 추출하여 분말화 하였으므로 중금속 4종(납, 총비소, 카드뮴, 총수은)과 미생물 중 대장균군만 유해물질규격으로 설정하였다.

i. 중금속

- Fabaton 콩잎추출분말의 중금속 실험을 진행한 결과, 납 최대 0.0666mg/kg, 카드뮴 최대 0.0142mg/kg, 총비소 최대 0.1306 mg/kg로 검출되었고 총수은은 0.0134 mg/kg 검출되었다. 원료에서 발생할 수 있는 오차, 원료의 1일 최대섭취량, 건강기능식품 기능성 원료 인정에 관한 규정에서 제안하고 있는 중금속 기준(상한값)을 고려하여 안전성에 문제가 없도록 설정하고자 하였으며, 그 결과 납, 카드뮴, 총수은, 총비소 모두 1.0 mg/kg 이하로 설정하였다.

표. 중금속 분석결과

시험항목		Lot1.	Lot2.	Lot3.
중금속	납 (mg/kg)	0.0468	0.0666	0.0457
	카드뮴 (mg/kg)	0.0082	0.0142	0.0082
	총비소 (mg/kg)	0.1191	0.1129	0.1306
	총수은 (mg/kg)	0.0025	0.0134	0.0020

표. Fabaton 콩잎추출분말 중금속 규격 상한값

시험항목		규격	상한값 (이하)*
중금속	납 (mg/kg)	< 10.8 μ g/일	10.8 μ g/g
	카드뮴 (mg/kg)	< 3.0 μ g/일	3.0 μ g/g
	총비소 (mg/kg)	< 150 μ g/일	150 μ g/g
	총수은 (mg/kg)	< 2.1 μ g/일	2.1 μ g/g

* Fabaton 콩잎추출분말의 최대섭취량을 1g/일로 계산. 단, 섭취량 변경 시 검토 필요

Table 1-9. 중금속 제안규격

시험항목		제안규격 (mg/kg)
중금속	납 (mg/kg)	1.0 a)
	카드뮴 (mg/kg)	1.0 b)
	총비소 (mg/kg)	1.0 c)
	총수은 (mg/kg)	1.0 d)

a) 납: Fabaton 콩잎추출분말의 최대섭취량은 1g/일로 제안된 규격(1.0mg/kg) 범위에서 1.0 μg/일의 납을 섭취할 수 있음. 이는 식약청의 가이드라인 범위인 10.8 μg/일 보다 낮은 섭취 기준임.

b) 카드뮴: 최대섭취량은 1g/일로 제안된 규격(1.0mg/kg) 범위에서 1.0 μg/일의 카드뮴을 섭취할 수 있음. 이는 식약청의 가이드라인 범위인 3.0 μg/일 보다 낮은 섭취 기준임.

c) 총비소: 최대섭취량은 1g/일로 제안된 규격(1.0mg/kg) 범위에서 1.0 μg/일의 총비소를 섭취할 수 있음. 이는 식약청의 가이드라인 범위인 150 μg/일 보다 낮은 섭취 기준임.

d) 총수은: 최대섭취량은 1g/일로 제안된 규격(1.0mg/kg) 범위에서 1.0 μg/일의 총수은을 섭취할 수 있음. 이는 식약청의 가이드라인 범위인 2.1 μg/일 보다 낮은 섭취 기준임.

ii. 대장균군

- 대장균군은 실험결과 원료에서 음성임이 확인되었고, 건강기능식품 기능성 원료 인정에 관한 규정에 따라 대장균군의 규격을 음성으로 설정하였다.

표. 대장균군 분석결과

시험항목	Lot1	Lot2	Lot3
미생물 대장균군	음성	음성	음성

iii. 유해물질 규격 미설정에 관한 자료 (잔류농약)

- 잔류농약은 건강기능식품 기능성 원료 인정에 관한 규정에 의거하여 규격으로 설정하지는 않지만 시험결과를 제출하여야 하는 항목으로 「식품의 기준 및 규격」에 원재료에 대한 농약의 잔류허용기준이 있는 경우에는 「수입식품등검사지침」(제 2016-11호) 별표 3.1. 동시다분석 검사대상: 58종에 대하여 분석하여야 한다. 또한 식품으로 섭취 이력이 있거나 잔류농약이 오염될 수 있다고 판단되면 원재료에 대한 잔류허용기준이 없다 하여도 정밀 검사항목 58종을 분석하여야 한다. 콩잎의 경우 원재료에 대한 기준이 있어 정밀검사 항목 58종에 대하여 분석하였다. 분석결과 정밀검사항목(58종) 중 Azoxystrobin이 0.0004mg/kg 검출되었고 나머지는 모두 불검출로 확인되었다. 검출된 농약성분 Azyxostrobin은 국내 농약잔류허용기준 중 풋콩이 0.5mg/kg 이내로 설정되어 있는데 검출된 양은 극히 미량이므로 안전성에는 문제가 되지 않는다고 사료된다.

표.. 잔류농약(58종) 분석 결과

시험항목	Fabaton 농도추출분말
Diazinon	불검출
DDT	불검출
Dicofol	불검출
Dichlorvos	불검출
Malathion	불검출
Methomyl	불검출
Methoxyfenozide	불검출
Methidathion	불검출
Boscalid	불검출
BHC	불검출
Bifenthrin	불검출
Cypermethrin	불검출
Cyprodinil	불검출
Cyhalothrin	불검출
Acetamiprid	불검출
Azoxystrobin	0.00004mg/kg
Atrazine	불검출
Ethion	불검출
Endosulfan	불검출
Imazalil	불검출
Isoprothiolane	불검출
Iprodione	불검출
Carbaryl	불검출
Carbofuran	불검출
Captan	불검출
Quintozene	불검출
Chlorothalonil	불검출
Chlorpyrifos	불검출
Chlorpyrifos-methyl	불검출
Chlorfenapyr	불검출
Tolclofos-methyl	불검출
Triadimefon	불검출
Triazophos	불검출
Triflumizole	불검출
Triflumuron	불검출
Thiamethoxam	불검출
Parathion	불검출
Parathion-methyl	불검출
Padobutrazol	불검출
Permethrin	불검출
Fenarimol	불검출
Fenitrothion	불검출
Fenvalerate	불검출
Phenthoate	불검출
Fenpropathrin	불검출
Fenhexamid	불검출
Phosmet	불검출
Procymidone	불검출
Prochloraz	불검출
Profenofos	불검출
Flufenoxuron	불검출
Pyradostrobin	불검출
Pyrimethnail	불검출
Pirimicarb	불검출
Pirimiphos-methyl	불검출
Fludioxonil	불검출
Dimethoate	불검출

⑤ 영양성분분석

- Fabaton 콩잎추출분말에 대한 영양성분분석은 아래와 같다.

표. 영양성분 시험방법 및 결과

시험항목	시험방법	결과
열량 (Kcal/100g)	식품공전 제9.일반시험법 1.일반성분시험법 6) 열량의 계산	323.30
탄수화물(%)	식품공전 제9.일반시험법 1.일반성분시험법 5)탄수화물	60.51
조단백질(%)	식품공전 제9.일반시험법 1.일반성분시험법 3)질소화합물 (1) 총질소 및 조단백질	16.40
조지방(%)	식품공전 제9.일반시험법 1.일반성분시험법 5)지질 (1)조지방	1.74
수분(%)	식품공전 제9.일반시험법 1.일반성분시험법 1) 수분	7.30
회분(%)	식품공전 제9.일반시험법 1.일반성분시험법 2) 회분	14.05
나트륨 (mg/100g)	식품공전 제9.일반시험법 1.일반성분시험법 1.2.미량영양성분시험법 1)무기성분	80.88

⑥ Fabaton 콩잎추출분말 기준규격(안)

- 위의 분석 자료들을 정리하여 나타낸 Fabaton 콩잎추출분말 기준규격(안)은 아래와 같다.

표. Fabaton 콩잎추출분말 기준규격(안)

시험항목		시험방법
성상		이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 황갈색의 분말
지표성분	Daidzin 함량	10.7 mg/g 의 80~120%
	Genistin 함량	4.8 mg/g 의 80~120%
중금속	납	1.0 mg/kg 이하
	카드뮴	1.0 mg/kg 이하
	총비소	1.0 mg/kg 이하
	총수은	1.0 mg/kg 이하
미생물	대장균군	음성

2-2-9-2. 파바톤콩잎 추출물의 표준화 요약

- 개별인정 관련 CRO 업체등과 토론에서 아래와 같은 이유에서 단일추출물로 표준화 및 개별인정 과정을 진행하는 것이 유리하다는 결론을 얻음.
 - ① 첫째: 단일추출물 이용한 OVX 동물실험에서 갱년기 질환을 개선한 분명한 결과를 확보함.
 - 1) 체지방 감소 (간, 복부, 자궁 및 신장 주변), 2) 골밀도 증가 효과
 - ② 둘째: Fabaton 추출물에는 다이드진, 제니스틴, 소이사포닌 등 일반콩잎과 구별 될 수 있는 지표물질을 함유하고 있음.
- Fabaton 콩잎 추출물의 액상형태의 표준화 및 분말 형태의 표준화에 대한 적합성을 검토하여 분말형태의 표준화로 진행하기로 결정하고 현재 경기도 화성 소재 (주)대호양행 (GMP업체)에서 진행함.

표. 액상형태 및 분말형태의 장단점

구분	장점	단점	비고
액상형태	- 추출 및 제조공정이 상대적으로 수월함 - 상대적으로 낮은 비용	- 보관, 미생물관리 및 표준화 등이 어려움 - 유효기간 설정에 어려움	- 유효성분 추출의 회수율 높음
분말형태	- 건조상태이므로 보관 및 미생물관리 등에 용이함 - 유효기간 설정에 용이함 - 표준화가 용이함	- 에너지가 요구되는 분말화 공정으로 상대적으로 고비용	- 소량의 덱스트린에도 분말화 잘됨

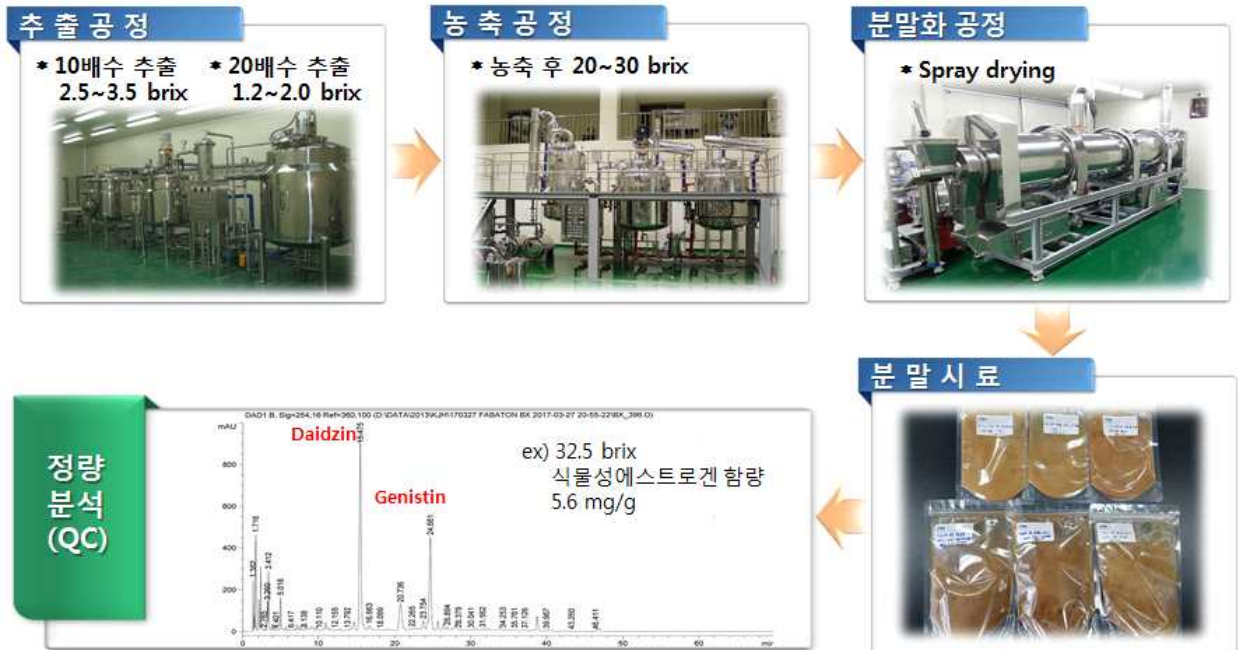


그림. Fabaton 콩잎 분말화 모식도

2-2-10. 토양조건 및 품종이 식물성에스트로젠 생성에 미치는 영향 (결과-9)

2-2-10-1. 토양 조건별 활성 지표물질 분석

- 본 연구실에서 콩 재배 실험을 수행한 5개 지점의 토양을 분석 (유기물, 질소, pH 등)하고 각 토양을 이용한 포트실험을 수행하여 각 시료별 바이오메스함량과 각 시료의 식물성 에스트로젠 함량을 평가하였다. 바이오메스 함량과 식물성 에스트로젠의 총 함량에서 유의가 있는 차이를 발견하지 못하였다. 차년도에 질소를 포함한 유기물 함량과 바이오메스 및 식물성 에스트로젠 함량 분석을 통해 최적화에 대한 결론을 확보 할 것이다.

구분	지역	pH	O.M. ^a (kg/g)	Total N (g/kg)	바이오메스 (건조잎) (g/주)	식물성 에스트로젠 함량(mg/g)
토양 시료 1	경상남도 진주시 미천면 안간리 644-3 (논 개량밭)	5.55±0.03	21.4±1.4	1.14±0.05	14.4±2.1	13.2±1.8
토양 시료 2	경상남도 진주시 미천면 안간리 623-1 (산 개량밭)	5.72±0.04	11.7±1.1	0.81±0.04	13.2±1.9	12.8±1.3
토양 시료 3	경상남도 사천시 사천읍 두량리 1510 (밭)	5.43±0.05	11.4±0.8	0.66±0.03	13.9±1.4	12.4±1.5
토양 시료 4	경상남도 사천시 용현면 통양리 117 (밭)	6.19±0.03	12.9±1.5	0.94±0.04	13.3±0.9	12.6±1.7
토양 시료 5	경상대학교 부속농장 비닐하우스	6.53±0.03	28.2±1.0	1.21±0.04	14.8±2.2	13.5±1.9

^a Organic matter (유기물 함량)

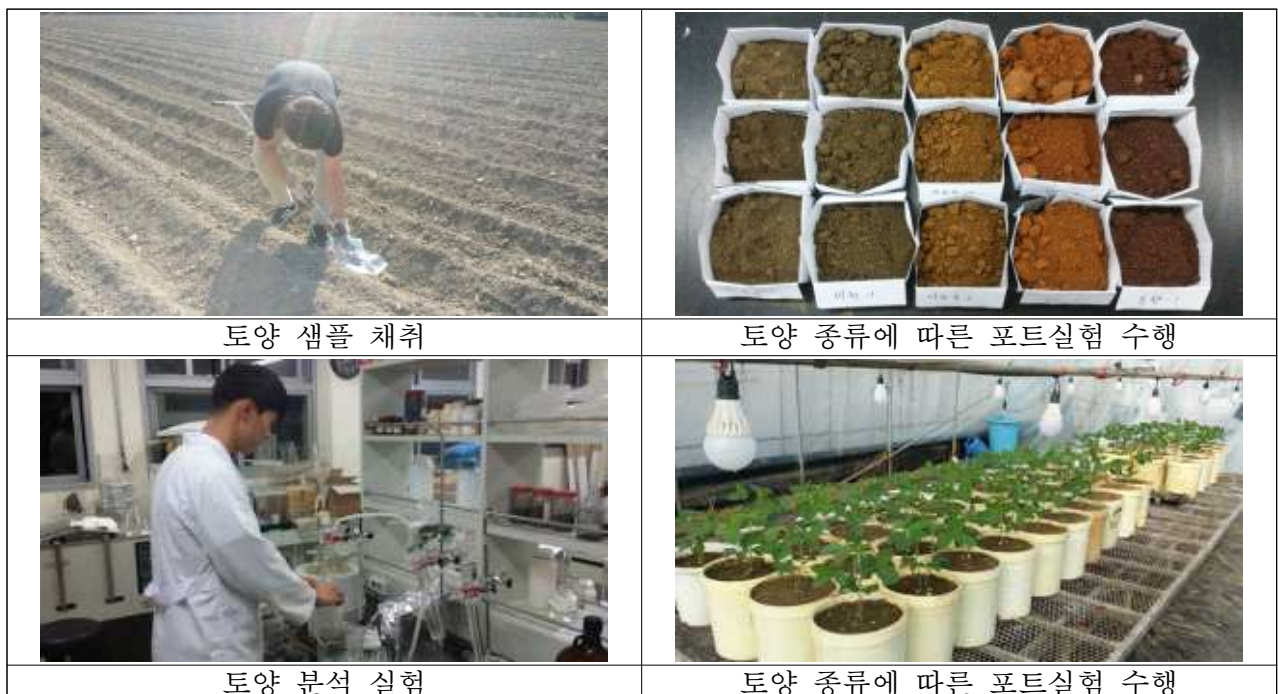




표. 공시토양의 이화학적 특성

	pH	EC	OM	T-N	Avail. P ₂ O ₅	Exch. Cation			CEC
						K	Ca	Mg	
	1:5 H ₂ O	dS m ⁻¹	g kg ⁻¹	g kg ⁻¹	mg kg ⁻¹	----- cmol _c kg ⁻¹ -----			cmol _c kg ⁻¹
1-1	5.60±0.02	0.30±0.03	21.7±1.4	1.16±0.05	57.52±2.65	0.18±0.01	4.29±0.13	0.77±0.02	10.2±0.06
1-2	5.47±0.03	0.19±0.01	22.4±1.6	1.18±0.05	89.32±5.30	0.26±0.01	3.13±0.07	0.53±0.01	9.12±0.16
1-3	5.58±0.04	0.23±0.01	20.0±1.1	1.09±0.04	72.53±4.40	0.22±0.01	4.55±0.19	0.71±0.03	10.0±0.27
2-1	5.83±0.05	0.40±0.01	14.5±1.1	0.59±0.05	121.13±5.30	0.31±0.02	6.21±0.36	2.00±0.11	11.5±0.60
2-2	5.62±0.04	0.42±0.01	13.6±1.1	0.73±0.04	152.05±4.05	0.50±0.05	6.37±0.67	2.04±0.20	13.2±1.23
2-3	5.72±0.03	0.37±0.01	6.90±3.3	0.59±0.04	122.01±5.52	0.31±0.01	7.11±0.46	2.27±0.14	14.2±0.29
3-1	5.48±0.06	0.17±0.02	7.90±1.3	0.64±0.02	379.99±13.60	0.38±0.01	4.99±0.06	1.62±0.06	12.0±0.12
3-2	5.40±0.03	0.15±0.01	13.8±0.3	0.65±0.04	362.32±7.95	0.36±0.01	4.58±0.12	1.50±0.04	11.8±0.06
3-3	5.42±0.04	0.17±0.01	12.4±0.9	0.68±0.02	334.93±12.53	0.51±0.01	4.77±0.01	1.61±0.01	12.5±0.14
4-1	6.18±0.03	0.24±0.01	12.1±2.4	0.94±0.04	59.28±1.53	0.36±0.03	6.12±0.54	2.48±0.21	13.4±1.10
4-2	6.17±0.01	0.26±0.02	13.1±1.3	0.99±0.03	68.12±2.65	0.39±0.01	7.78±0.10	2.62±0.11	14.7±0.20
4-3	6.22±0.04	0.18±0.02	13.6±0.8	0.90±0.04	54.86±2.65	0.27±0.01	5.20±0.16	2.24±0.06	11.1±0.10
5-1	6.49±0.04	1.06±0.03	29.1±0.8	1.22±0.03	932.17±7.95	0.56±0.03	9.29±0.41	1.85±0.08	14.4±0.62
5-2	6.53±0.02	1.09±0.01	28.1±1.1	1.21±0.04	914.50±4.05	0.44±0.01	8.52±0.10	1.69±0.02	13.7±0.21
5-3	6.57±0.04	1.01±0.01	27.4±1.1	1.20±0.06	893.29±10.03	0.51±0.04	10.6±1.11	1.86±0.20	15.9±1.55

2-2-10-2. 콩 품종별 활성지표물질 변화 양상 규명

- 경상남도 농업기술원에서 아래와 같은 20 품종을 확보하였다. 식물성 에스트로젠 함량은 온도, 광도, 습도, 일교차 등에 따라 큰 차이를 보이므로 최적시기인 7월 30일 경에 Phenomix- α 를 처리 할 수 있도록 5월 20일에 발아시켜 현재 각 품종별로 이식시켜 재배 중에 있다.

확보된 품종	비고
소진 (Sojin)	
진양 (Jinyang)	
보석 (Bosuk)	
원광 (Wongwang)	
대풍 (Daepung)	
태광 (Taekwang)	
신화 (Shinwha)	
조양 (Jayang)	
우람 (Uram)	
조남 (Jonam)	
원황 (Wonwhang)	
풍원 (Pungwon)	
대하 (Daeha)	
장기 (Janggi)	
천상 (Chunsang)	
송학 (Songhak)	
갈채 (Galchae)	
청자 (Chungja)	
대원 (Daewon)	
새단백 (Saedanback)	
청두1호 (Chengdu)	

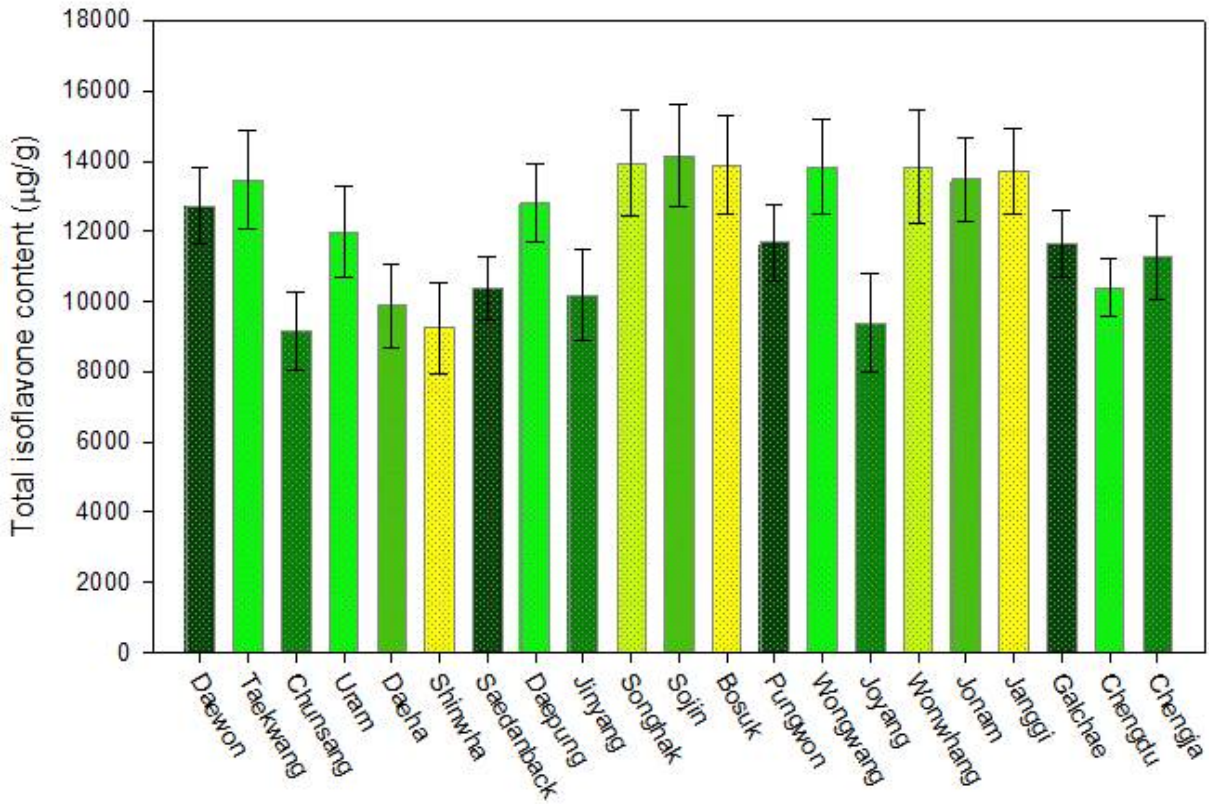


그림. Evolution of total isoflavone content of the leaves of soybean cultivars as affected by ethephon treatment at 200 $\mu\text{g/mL}$ treatment applied at harvest time (96 h). Data are the mean \pm SD of determinations performed in three replicate in 21 samples.

○ 토양 조건 및 콩 품종에 따른 에스트로겐 함량 축적 양상 요약

- 노지(필드) 시험을 실시한 5지점의 토양은 pH 5.5~6.5 및 총질소함량 0.66~1.21 g/kg으로 차이가 있었지만, 이들 토양을 이용한 포트 재배실험에서 에테폰 처리에 따른 식물성 에스트로겐 함량은 12.6 ~ 13.5 mg/g으로 차이는 있었지만 통계적으로 유의한 차이는 발견하지 못했다.
- 경상남도 농업기술원에서 제공받은 21종(대원콩 등)의 서로 다른 품종을 대상으로 에테폰 처리에 따른 식물성 에스트로겐 함량 관찰 시험에서 통계적으로 유의있는 차이는 발견하지 못하였고 특히 본 연구에서 사용하고 있는 대원콩이 평균 이상의 함량 축적을 보여주어 품종에 따른 함량변화 연구는 추가적으로 실시하지 않았다.

2-2-11. 미생물 이용 생물전환연구-I (결과-10)

2-2-11-1. 일반콩잎과 파바톤콩잎의 영양성분 분석

○ 이소플라본 함량별 콩잎의 영양성분 분석

- 시료 확보 : 생물전환공정 혹은 발효기술을 이용하여 Fabaton 콩잎의 기능성에 대한 연구를 위하여 2016년 화학적 처리(ethephon)하여 수확한 후 건조한 Fabaton 콩잎을 제공받아 사용하였고, 대조구는 무처리구인 일반 콩잎을 사용

- 영양성분 : 무처리구와 화학적 처리구(A와 B)인 일반 콩잎과 Fabaton 콩잎 A와 B의 5대 일반성분을 분석한 결과, 일반 콩잎보다 Fabaton 콩잎에서 단백질, 회분 함량이 증가하였고, 지방산과 탄수화물 함량은 감소

표. 일반 콩잎과 Fabaton 콩잎의 5대 영양성분

Contents ^{d)} (g/100 g)	무처리구 (일반 콩잎)	화학 처리구 (Fabaton 콩잎)	
		A	B
Moisture	9.0±0.54	8.9±0.53	8.6±0.52
Ash	9.9±0.59	8.8±0.53	10.0±0.61
Protein	20.6±1.24	20.9±1.25	25.0±1.50
Fat	3.3±0.20	5.3±0.32	3.4±0.19
Carbohydrate	57.2±3.43	56.1±3.37	53.0±3.18

^{d)}All values are presented as the mean±SD of triplicate determination.

- 지방산 조성 : 콩잎들의 주요 지방산은 α -linolenic acid로 각각 383.8 mg/100 g, 519.6 mg/100 g 및 447.1 mg/100 g 있었음

표. 일반 콩잎과 Fabaton 콩잎의 지방산 조성

Contents ^{d)} (mg/100 g)	무처리구 (일반 콩잎)	화학 처리구 (Fabaton 콩잎)	
		A	B
Saturated fatty acids			
Palmitic acid (C16:0)	212.3±10.62	334.8±16.74	191.2±9.56
Stearic acid (C18:0)	65.7±3.29	100.5±5.03	52.7±2.64
Arachidic acid (C20:0)	4.8±0.24	10.3±0.52	5.0±0.25
Behenic acid (C22:0)	6.5±0.33	15.5±0.78	7.3±0.37
Lignoceric acid (C24:0)	8.4±0.42	16.7±0.84	10.0±0.50
Total	297.7±14.89	477.8±23.89	266.2±13.31
Unsaturated fatty acids			
Palmitoleic acid (C16:1)	31.5±1.58	32.0±1.60	21.1±1.06
Oleic acid (C18:1n9c)	90.0±4.50	67.3±3.37	93.7±4.69
Linoleic acid (C18:2n6c)	163.5±8.18	267.4±13.37	161.5±8.08
γ -Linolenic acid (C18:3n6)	3.1±0.16	nd ²⁾	nd
α -Linolenic acid (C18:3n3)	383.8±19.19	819.6±40.98	447.1±22.36
Eicosenic acid (C20:1)	2.7±0.14	4.1±0.21	1.7±0.09
Eicosatrienoic acid (C20:3n3)	1.9±0.10	3.8±0.19	2.9±0.15
Nervonic acid (C24:1)	2.7±0.14	7.7±0.39	2.5±0.13
Total	679.2±33.96	1,201.9±60.10	730.5±36.53
Total fatty acids	976.9±48.85	1,679.7±83.99	996.7±49.84

^{d)}All values are presented as the mean±SD of triplicate determination.

²⁾nd: not detected.

- 아미노산 조성 : 콩잎들의 주요 아미노산은 aspartic acid로 각각 383.8 mg/100 g, 519.6 mg/100 g 및 189.6 mg/100 g 있었고, γ -aminobutyric acid(GABA)는 각각 141 mg/100 g, 182.2 mg/100 g 및 182.6 mg/100 g 있었음

표. 일반 콩잎과 Fabaton 콩잎의 유리아미노산 조성

Contents ¹⁾ (mg/100 g)	무처리구 (일반 콩잎)	화학 처리구 (Fabaton 콩잎)	
		A	B
Non-essential amino acids			
Taurine	7.2±0.36	8.4±0.42	9.2±0.46
Urea	79.4±3.97	158.0±7.90	304.4±15.22
Aspartic acid	174.2±8.71	179.8±8.99	189.6±9.48
Serine	69.2±3.46	79.2±3.96	132.8±6.64
Glutamic acid	65.8±3.29	88.0±4.40	132.8±6.64
Sarcosine	nd ²⁾	2.4±0.12	nd
Aminoadipic acid	32.8±1.64	42.8±2.14	57.2±2.86
Glycine	14.6±0.73	20.6±1.03	19.4±0.97
Alanine	116.8±5.84	90.6±4.53	108.6±5.43
Citrulline	3.6±0.18	6.2±0.31	6.2±0.31
α -aminobutyric acid	6.8±0.34	9.0±0.45	10.4±0.52
Cystathionine	4.4±0.22	6.6±0.33	5.0±0.25
Tyrosine	52.8±2.64	29.2±1.46	45.8±2.29
β -alanine	21.6±1.08	22.8±1.14	18.2±0.91
β -aminoisobutyric acid	18.0±0.90	23.4±1.17	nd
γ -aminobutyric acid	141.0±7.05	182.2±9.11	182.6±9.13
Aminoethanol	8.8±0.44	7.20±0.36	10.40±0.52
Hydroxyproline	0.8±0.04	1.4±0.07	1.0±0.05
Ornithine	1.4±0.07	1.6±0.08	2.6±0.13
1-Methylhistidine	3.2±0.16	5.2±0.26	3.4±0.17
3-Methylhistidine	nd	nd	nd
Anserine	nd	nd	nd
Carnosine	nd	nd	nd
Arginine	141.0±7.05	82.4±4.12	192.0±9.60
Totals	963.4±48.17	1047.0±52.35	1431.6±71.58
Essential amino acids			
Threonine	30.4±1.52	58.6±2.93	52.4±2.62
Valine	115.8±5.79	126.2±6.31	166.4±8.32
Methionine	11.2±0.56	12.4±0.62	11.0±0.55
Isoleucine	62.2±3.11	71.4±3.57	82.6±4.13
Leucine	61.4±3.07	93.0±4.65	95.6±4.78
Phenylalanine	84.0±4.20	108.6±5.43	157.0±7.85
Lysine	58.2±2.91	33.2±1.66	68.8±3.44
Histidine	26.4±1.32	19.4±0.97	35.0±1.75
Total	449.6±22.48	522.8±26.14	668.8±33.44
Total amino acids	1413.0±70.65	1569.8±78.49	2100.4±105.22
Ammonia	15.80±0.79	19.20±0.96	18.40±0.92

¹⁾All values are presented as the mean±SD of triplicate determination.

²⁾nd: not detected.

- 무기질 조성 : 일반 콩잎과 Fabaton 콩잎 A와 B의 무기질 분석 결과, 인, 칼륨은 일반 콩잎보다 Fabaton 콩잎 높았고, 게르마늄은 일반 콩잎에서는 검출되지 않았으나, Fabaton 콩잎에서 검출되었고 이외에는 일반 콩잎보다 함량이 낮거나 비슷한 수준

표. 일반 콩잎과 Fabaton 콩잎의 무기질 조성

Contents ¹⁾ (mg/100 g)	무처리구 (일반 콩잎)	화학 처리구 (Fabaton 콩잎)	
		A	B
Phosphorus (P)	253.0±12.65	321.94±16.10	308.11±15.41
Sulfur (S)	2,197.44±109.87	1,611.06±80.55	2,073.86±103.69
Kalium (K)	4,544.91±227.25	5,103.61±255.18	7,314.83±365.74
Magnesium (Mg)	658.84±32.94	423.8±21.19	518.15±25.91
Calcium (Ca)	19.74±0.99	10.54±0.53	21.15±1.06
Manganese (Mn)	26.74±1.34	2.89±0.14	16.14±0.81
Iron (Fe)	374.96±18.75	198.18±9.91	39.54±1.98
Germanium (Ge)	nd ²⁾	7.17±0.36	9.39±0.47
Total	8,075.63±403.78	7,679.19±383.96	10,301.17±515.06

¹⁾All values are presented as the mean±SD of triplicate determination.

²⁾nd: not detected.

- Isoflavone 조성 : 무처리구와 화학적 처리구(이소플라본 중과 고)인 일반 콩잎과 Fabaton 콩잎 A와 B의 HPLC 분석 결과, 배당체 4종(daidzin, genistin, malonyldaidzin, malonylgenistin)과 비배당체 2종(daidzein, genistein)이 검출되었고, 총 isoflavone 함량은 무처리구는 2,017.94 μ g/g, 화학적 처리구A는 7,806.42 μ g/g, 화학적 처리구B는 14,968 μ g/g으로 무처리구보다 각각 3.9배 및 7.4배가 증가하였다.

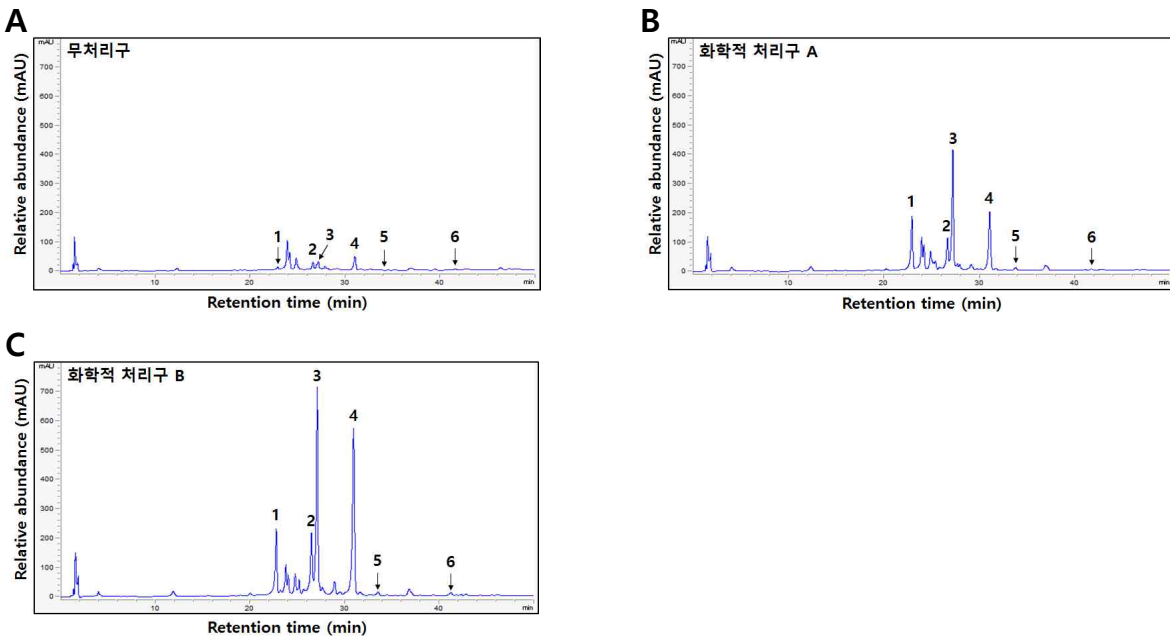


그림. HPLC chromatogram of six isoflavone derivatives in soy-leaves. A, 무처리구(일반 콩잎); B와 C, 화학적 처리구(Fabaton) A와 B. 1, Daidzin; 2, Genistin; 3, malonyldidzin; 4, malonylgenistin; 5, Dadzein; and 6, Genistein.

표. 일반 콩잎과 Fabaton 콩잎의 이소플라본 함량 조성

Contents ¹⁾ ($\mu\text{g/g}$)	무처리구 (일반 콩잎)	화학 처리구 (Fabaton 콩잎)	
		A	B
Glycosides			
Daidzin (1)	279.08 \pm 18.01	1,652.33 \pm 99.14	2,076.14 \pm 124.57
Genistin (2)	216.10 \pm 12.97	831.35 \pm 49.88	1,664.39 \pm 99.86
Total	495.18 \pm 28.31	2,483.67 \pm 149.02	3,740.54 \pm 224.43
Malonylglycosides			
Daidzin (3)	354.12 \pm 21.25	3,264.16 \pm 195.85	5,673.07 \pm 340.38
Genistin (4)	505.07 \pm 30.30	1,896.63 \pm 113.80	5,238.65 \pm 314.32
Total	859.20 \pm 51.55	5,160.79 \pm 309.65	10,911.73 \pm 654.70
Aglycones			
Daidzein (5)	33.58 \pm 2.01	117.23 \pm 7.03	208.62 \pm 12.52
Genistein (6)	42.15 \pm 2.53	44.73 \pm 2.68	107.11 \pm 6.43
Total	75.73 \pm 4.54	161.96 \pm 9.72	315.73 \pm 18.94
Total isoflavones	1,430.11 \pm 89.12	7,806.42 \pm 468.39	14,968.00 \pm 898.08

¹⁾All values are presented as the mean \pm SD of triplicate determination.

- Vitamin 조성 : 일반 콩잎과 Fabaton 콩잎(이소플라본 중과 고)의 비타민 분석 결과, vitamin B5(pantothenic acid), vitamin B9(folic acid), vitamin C(ascorbic acid) 및 vitamin E(tocopherols & tocotrienols)가 증가하였고, 무처리구에 비해 각각 2배, 1.8배, 102배 및 3.5배가 증가

표. 일반 콩잎과 Fabaton 콩잎의 비타민 조성

Contents ¹⁾	무처리구 (일반 콩잎)	화학 처리구 (Fabaton 콩잎)	
		A	B
Water-soluble vitamin (mg/100 g)			
Vitamin B2	0.1 \pm 0.01	nd ²⁾	0.1 \pm 0.01
Vitamin B3	21.9 \pm 1.31	8.8 \pm 0.53	14.3 \pm 0.86
Vitamin B5	215.7 \pm 12.94	206.0 \pm 12.36	431.0 \pm 25.86
Vitamin B9	8.8 \pm 0.53	12.3 \pm 0.74	15.4 \pm 0.92
Vitamin C	0.2 \pm 0.01	17.6 \pm 1.06	40.8 \pm 2.45
Fat-soluble vitamin (mg α-TE/100 g)			
Vitamin E	356.4 \pm 21.38	433.3 \pm 26.00	1,233.5 \pm 74.01

¹⁾All values are presented as the mean \pm SD of triplicate determination.

²⁾nd: not detected.

2-2-11-2. 유산균이용 파바톤 콩잎 발효물 특성

- 본 실험에서 사용한 유산균 총 28종이며, 공시균주는 한국유전자은행(KCTC)에서 8종을 분양 받아 사용하였고, 10종의 *Lactobacillus plantarum* 균주는 기존에 CLA 생성 균주로 보관하고 있던 것을 사용하였으며, 10종의 *Lactobacillus brevis*는 김치 등의 발효식품으로부터 분리하여 보관하고 있던 약 500여종의 유산균 pool에서 TLC를 통해 GABA 생성 유산균 10종을 확인한 후 16S rRNA 염기서열을 결정하였다

표. 본 실험에 사용한 8종의 공시균주와 10종의 *Lac. plantarum* 목록

No	Species	Strains / isolates	Index
Type strains			
1	<i>Lactobaillus brevis</i>	KCTC ¹⁾ 3320	
2	<i>Lactobaillus casei</i>	KCTC 3109	
3	<i>Lactobaillus fermentum</i>	KCTC 3112	
4	<i>Lactobaillus paracasei</i>	KCTC 3166	
5	<i>Lactobaillus amylovorus</i>	KCTC 3597	
6	<i>Lactobaillus delbrueckii</i>	KCTC 3635	
7	<i>Lactobaillus farciminis</i>	KCTC 3681	
8	<i>Lactobaillus plantarum</i>	KCTC 13093	
<i>Lac. plantarum</i>			
1	<i>Lactobaillus plantarum</i>	S48	물김치, <u>생균제제, CLA 생성균</u>
2	<i>Lactobaillus plantarum</i>	S52	물김치
3	<i>Lactobaillus plantarum</i>	S56	물김치
4	<i>Lactobaillus plantarum</i>	S64	물김치
5	<i>Lactobaillus plantarum</i>	S65	물김치
6	<i>Lactobaillus plantarum</i>	P1201	식물추출발효음료, <u>생균제제, CLA 생성균</u>
7	<i>Lactobaillus plantarum</i>	K24	배추김치
8	<i>Lactobaillus plantarum</i>	K28	배추김치
9	<i>Lactobaillus plantarum</i>	D56	동치미
10	<i>Lactobaillus plantarum</i>	D58	동치미

¹⁾KCTC: Korean Collection for Type Cultures

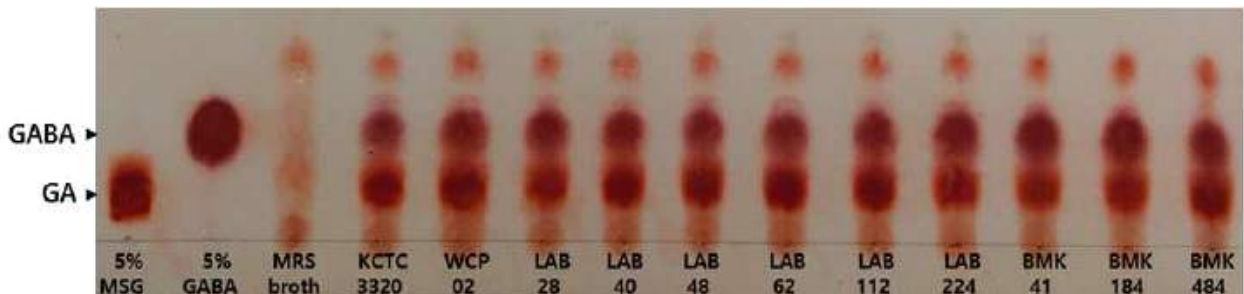


그림. 10종의 GABA 생성 유산균의 TLC 패턴 양상

표. 10종의 GABA 생성 유산균의 16S rRNA 염기서열 유사성

No	Isolates	Nearest relative ¹⁾	Accession No	Similarity (%)	Index
1	WCP02	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 14869	M58810	99	열무물김치, 생균제제, 유기인제농약 분해균
2	LAB28	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	NR_075024	99	배추김치
3	LAB40	<i>Lactobacillus brevis</i> BSO 464	JX398133	100	배추김치
4	LAB48	<i>Lactobacillus brevis</i> BSO 464	JX398133	99	배추김치
5	LAB62	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	NR_075024	99	배추김치
6	LAB112	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	NR_075024	96	배추김치
7	LAB224	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	NR_075024	100	배추김치
8	BMK41	<i>Lactobacillus brevis</i> BSO 464	JX398133	99	여주열무물김치
9	BMK184	<i>Lactobacillus brevis</i> BSO 464	JX398133	99	여주열무물김치
10	BMK484	<i>Lactobacillus brevis</i> BSO 464	JX398133	99	여주열무물김치

¹⁾Accession number of the nearest relative. When more than one sequence had the same similarity, only the accession number of the first sequence is given.

- 우선 공시균주 8종의 유산균를 이용하여 Fabaton 콩잎을 반고체 발효법을 이용하여 72시간 동안 발효시켜 이화학적 특성, 항산화 활성(DPPH, ABTS 및 •OH 라디칼 소거활성과 환원력), 소화효소 저해활성(α -glucosidase 및 췌장-lipase) 및 유리아미노산과 isoflavone 조성을 살펴보았다.
- 이화학적 특성 : 8종의 유산균를 이용하여 72시간 동안 발효시킨 Fabaton 콩잎 발효물의 pH, 산도, 생균수 및 β -glucosidase 활성을 살펴본 결과 균을 접종하지 않은 콩잎(NIM)은 pH 6.30, 산도는 0.36% 있었으며, *Lac. plantarum* KCTC 13093으로 발효한 콩잎 발효물이 pH는 4.07로 가장 낮았고, 이에 상응하여 산도 2.21%로 가장 높았다. 한편 *Lac. brevis* KCTC 3320의 콩잎 발효물 경우 pH는 5.06으로 가장 높았고, 산도는 가장 1.06%로 가장 낮았다. 생균수는 모두 9.80 log cfu/g 이상 있었다. 마지막으로 β -glucosidase 활성은 *Lac. fermentum* KCTC 3112 및 *Lac. delbrueckii* KCTC 3635는 효소활성을 나타내지 않았고, 그 외 균주에서는 약 1.60 이상의 효소활성을 나타내었다.

표. 8종의 유산균 이용 Fabaton 콩잎 발효물의 이화학적 특성 비교

Species	Contents			
	pH	Acidity (% as lactic acid)	Viable cell numbers (log cfu/g)	β -Glucosidase activity (unit/g)
NIM	6.30	0.36	-	-
<i>Lac. brevis</i> KCTC 3320	5.06	1.06	9.80	2.60
<i>Lac. casei</i> KCTC 3109	4.81	1.28	9.80	1.78
<i>Lac. fermentum</i> KCTC 3112	4.55	1.53	10.11	-
<i>Lac. paracasei</i> KCTC 3166	4.62	1.37	9.82	2.71
<i>Lac. amylovorus</i> KCTC 3597	4.31	1.75	10.32	2.73
<i>Lac. delbrueckii</i> KCTC 3635	4.28	1.71	10.69	-
<i>Lac. farciminis</i> KCTC 3681	4.51	1.64	10.34	1.55
<i>Lac. plantarum</i> KCTC 13093	4.07	2.21	9.99	1.86

¹⁾All values are presented as the mean \pm SD of triplicate determination.

- 항산화 활성 : 8종의 유산균를 이용하여 72시간 동안 발효시킨 Fabaton 콩잎 발효물의 DPPH, ABTS와 hydroxyl 라디칼 소거활성 및 환원력을 살펴본 결과 균을 접종하지 않은 콩잎(NIM)보다는 대부분 유산균 발효 콩잎이 활성이 증가하였으나, *Lac. fermentum* KCTC 3112 및 *Lac. delbrueckii* KCTC 3635는 거의 증가하지 않았다. 한편 NIM의 경우에 DPPH, ABTS와 hydroxyl 라디칼 소거활성 및 환원력은 각각 56.30%, 76.32%, 45.59% 및 1.576 있었 고, 콩잎 발효물 중 활성이 가장 높은 *Lac. amylovorus* KCTC 3597 발효물 경우 DPPH, ABTS와 hydroxyl 라디칼 소거활성 및 환원력은 각각 74.21%, 77.56%, 56.20% 및 2.250 있었 다. 일반적으로 유산발효가 진행됨에 따라 미생물이 생산하는 β -glucosidase 활성과 산에 의해 배당체 형태의 polyphenol성 화합물들이 비당체 형태로 전환됨으로써 항산화 활성 등 이 증가하는 것으로 보고되어 있다.

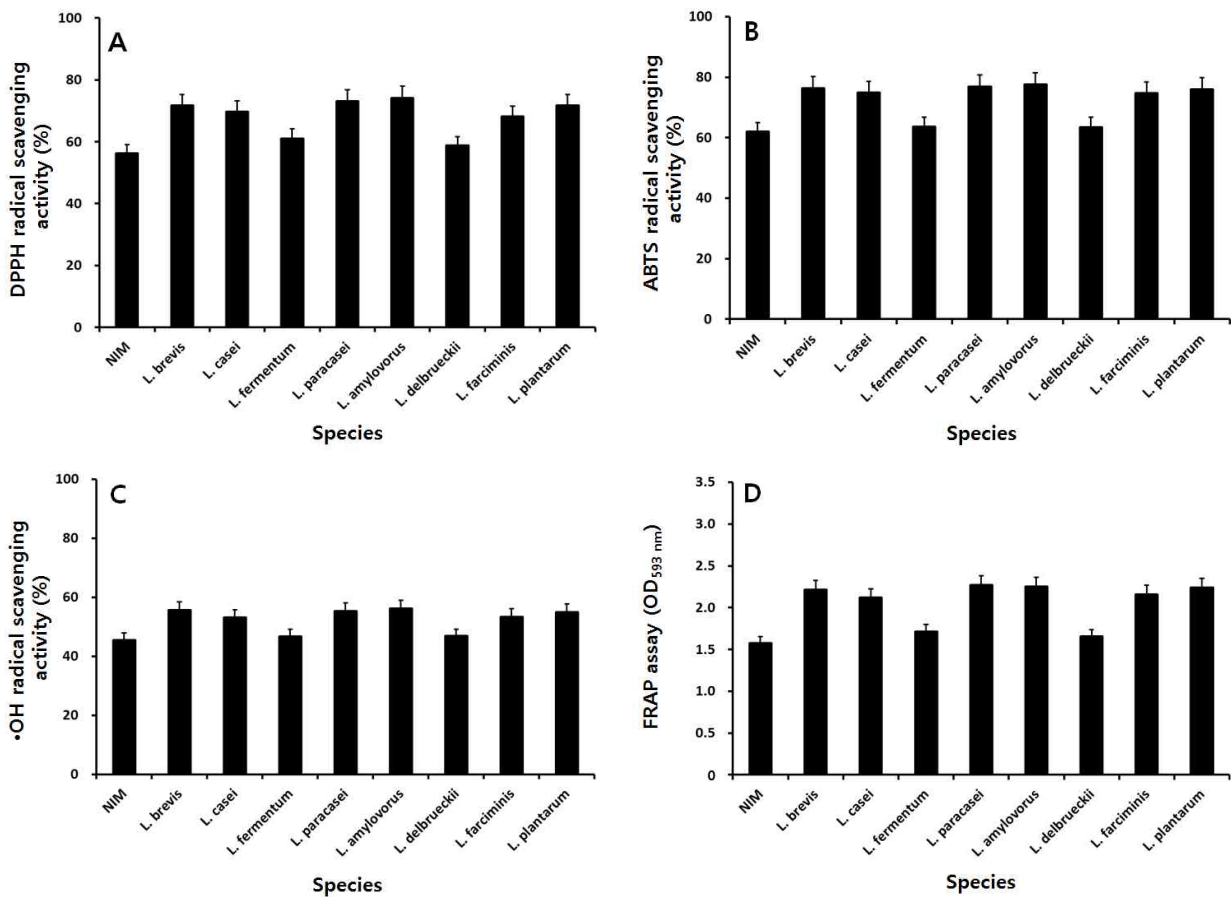


그림. 8종의 유산균 이용 Fabaton 콩잎 발효물의 항산화 활성

- 소화효소 저해활성 : 8종의 유산균를 이용하여 72시간 동안 발효시킨 Fabaton 콩잎 발효물의 α -glucosidase 및 췌장-lipase 저해활성을 살펴본 결과 항산화 활성과 동일하게 균을 접종하지 않은 콩잎(NIM)보다는 대부분 유산균 발효 콩잎이 활성이 증가하였으나, *Lac. fermentum* KCTC 3112 및 *Lac. delbrueckii* KCTC 3635는 거의 증가하지 않았다. Fabaton 콩잎 발효물 중 *Lac. brevis* KCTC 3320, *Lac. paracasei* KCTC 3166 및 *Lac. amylovorus* KCTC 3597로 발효시킨 발효물이 대체적으로 활성이 높았고, 이중에 가장 높은 *Lac. amylovorus* KCTC 3597의 경우 α -glucosidase 및 췌장-lipase 저해활성은 각각 39.15% 및 28.54% 있었고, NIM의 경우에는 각각 18.0% 및 12.02% 있었다.

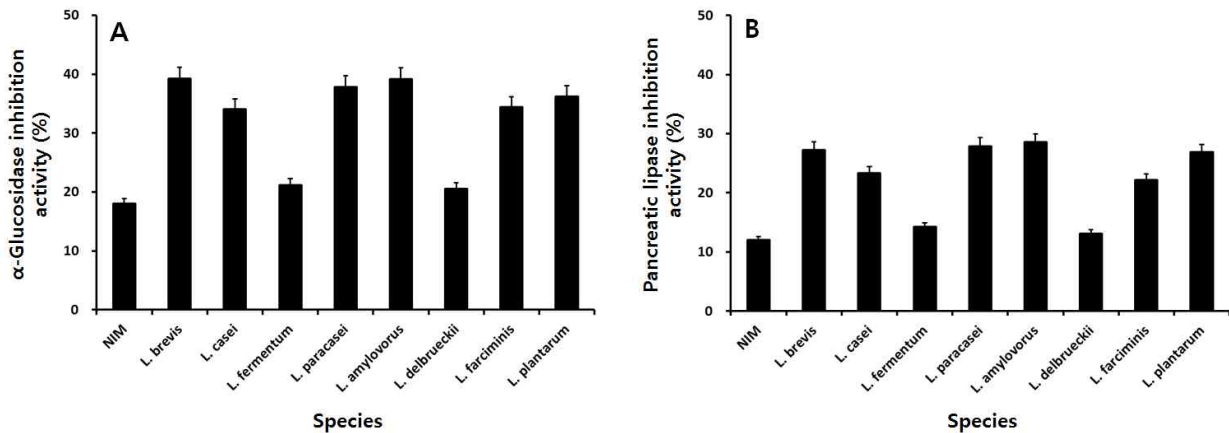


그림. 8종의 유산균 이용 Fabaton 콩잎 발효물의 소화효소 활성

- Isoflavone 조성 : 8종의 유산균을 이용하여 72시간 동안 발효시킨 Fabaton 콩잎 발효물의 isoflavone 조성을 살펴본 결과 daidzin, genistin, malonyldaidzin, malonylgensitin, daidzein 및 genistein 6종의 isoflavone 유도체가 검출되었다. 균을 접종하지 않은 콩잎(NIM)은 배당체인 daidzin과 genistin이 함량이 각각 4024.56 $\mu\text{g/g}$ 과 2256.53 $\mu\text{g/g}$ 으로 isoflavone의 약 70%를 차지하였으나, 생리활성이 대체적으로 높았던 *Lac. brevis* KCTC 3320, *Lac. paracasei* KCTC 3166, *Lac. amylovorus* KCTC 3597 및 *Lac. plantarum* KCTC 13093 콩잎 발효물의 경우 배당체인 dadzein과 genistein 함량이 높았고, dadzein은 각각 2510.55 $\mu\text{g/g}$, 3252.06 $\mu\text{g/g}$, 3464.46 $\mu\text{g/g}$, 3255.67 $\mu\text{g/g}$ 및 genistein은 각각 1078.28 $\mu\text{g/g}$, 1229.50 $\mu\text{g/g}$, 1307.62 $\mu\text{g/g}$, 829.15 $\mu\text{g/g}$ 으로 이들이 isoflavone의 약 50% 이상을 차지하였다. 일반적으로 유산발효가 진행됨에 따라 미생물이 생산하는 β -glucosidase 활성과 산에 의해 배당체 형태의 β -glycoside 화합물들이 배당체 형태인 aglycones로 전환됨으로 보고되어 있으며, 본 연구에서도 유산균의 생육에 따른 효소활성과 이들이 생산한 산에 의한 것으로 판단되었다. 한편 *Lac. fermentum* KCTC 3112과 *Lac. delbrueckii* KCTC 3635은 NIM가 유사한 isoflavone의 조성 나타내었다.
- 유리아미노산 조성 : 8종의 유산균을 이용하여 72시간 동안 발효시킨 Fabaton 콩잎 발효물의 유리아미노산 조성을 살펴본 결과 주요 아미노산은 aspartic acid, γ -aminobutyric acid (GABA) 및 valine으로 균을 접종하지 않은 콩잎(NIM)은 각각 179.66 mg/100 g 160.16 mg/100 g 및 107.27 mg/100 g 있었고, 생리활성이 대체적으로 높았던 *Lac. brevis* KCTC 3320, *Lac. paracasei* KCTC 3166 및 *Lac. amylovorus* KCTC 3597 콩잎 발효물의 경우 aspartic acid는 각각 309.22 mg/100 g, 228.95 mg/100 g, 250.96 mg/100 g, GABA는 각각 178.5 mg/100 g, 162.95 mg/100g, 160.89 mg/100 g 및 valine은 각각 108.54 mg/100 g, 111.09 mg/100 g, 112.65 mg/100 g으로 aspartic acid는 NIM보다 급격히 증가하였으나, GABA는 *Lac. brevis* KCTC 3320만이 증가하였고, 나머지 두 균주는 변화가 없었으며, valine 큰 변화가 없었다. 한편 GABA 함량이 증가한 *Lac. brevis* KCTC 3320의 콩잎 발효물의 경우 GABA의 전구물질인 glutamic acid 함량이 29.88 mg/100 g으로 가장 낮았다. 이는 *Lac. brevis*에 의해 생성된 GADase의 효소 작용으로 glutamic acid가 GABA로 전환된 것으로 추측된다.

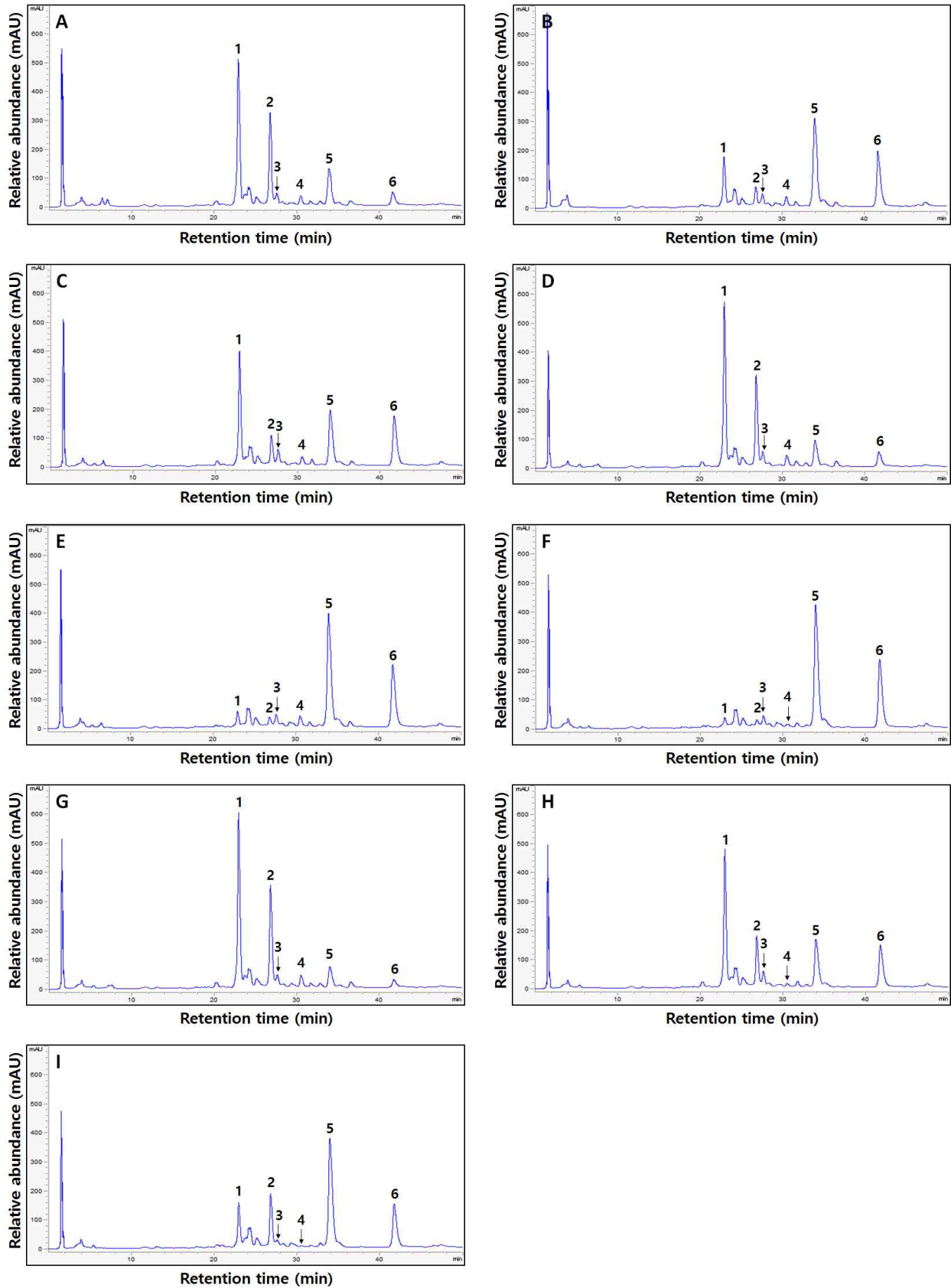


그림. 8종의 유산균 이용 Fabaton 콩잎 발효물의 isoflavone HPLC 크로마토그램.

1, daidzin; 2, genistin; 3, malonyldaidzin; 4, malonylgenistin; 5, daidzein; 6, genistein. A, non-incubation microorganism; B, *Lac. brevis* KCTC 3320; C, *Lac. casei* KCTC 3109; D, *Lac. fermentum* KCTC 3112; E, *Lac. paracasei* KCTC 3166; F, *Lac. amylovorus* KCTC 3597; G, *Lac. delbrueckii* KCTC 3635; H, *Lac. farciminis* KCTC 3681; I, *Lac. plantarum* KCTC 13093.

표. 8종의 유산균 이용 Fabaton 콩잎 발효물의 isoflavone 조성

Isoflavones	Contents ¹⁾ (μ g/g)								
	Species								
	NIM	3320	3109	3112	3166	3597	3635	3681	13093
<i>β</i> -Glycosides									
Daidzin (1)	4024.56	1468.66	3146.01	4424.15	585.69	473.46	4684.74	3762.25	1316.57
Genistin (2)	2256.53	540.23	779.70	2231.14	297.89	231.35	2547.31	1263.16	1315.72
Total	6281.09	2008.90	3925.71	6655.29	883.58	704.81	7232.05	5025.40	2632.29
Malonyl- <i>β</i> -glycosides									
Daidzin (3)	507.31	505.67	607.20	583.68	517.16	486.13	556.83	600.23	354.76
Genistin (4)	394.15	403.27	364.74	466.59	454.30	214.05	587.04	191.62	147.69
Total	901.46	908.94	971.94	1050.27	971.46	700.18	1143.86	791.85	502.45
Aglycones									
Daidzein (5)	1055.18	2510.55	1563.21	743.57	3252.06	3464.46	656.48	1357.95	3255.67
Genistein (6)	273.03	1078.28	970.44	264.73	1229.50	1307.62	240.03	783.62	829.15
Total	1328.21	3588.83	2533.65	1008.30	4481.55	4772.08	896.51	2141.57	4084.81
Total isoflavones	8510.75	6506.66	7431.30	8713.86	6336.59	6177.07	9272.42	7958.83	7219.55

¹⁾All values are presented as the mean \pm SD of triplicate determination. NIM, non-incubation microorganism; 3320, *Lac. brevis* KCTC 3320; 3019, *Lac. casei* KCTC 3109; 3112, *Lac. fermentum* KCTC 3112; 3116, *Lac. paracasei* KCTC 3166; 3597, *Lac. amylovorus* KCTC 3597; 3635, *Lac. delbrueckii* KCTC 3635; 3681, *Lac. farciminis* KCTC 3681; 13093, *Lac. plantarum* KCTC 13093.

표. 8종의 유산균 이용 Fabaton 콩잎 발효물의 유리아미노산 조성

Amino acids	Contents (mg/100 g)								
	Species								
	NIM	3320	3109	3112	3166	3597	3635	3681	13093
General amino acids									
Taurine	-	17.13	15.69	21.21	15.25	16.13	22.45	13.07	-
Aspartic acid	179.66	309.22	286.53	211.12	228.95	250.96	211.03	223.72	217.28
Serine	48.80	70.11	67.47	45.25	70.89	71.27	47.59	53.71	17.41
Glutamic acid	77.59	29.88	56.42	51.02	64.92	67.07	57.55	41.72	59.12
Aminoadipic acid	23.10	27.82	18.82	15.21	17.71	17.77	15.83	15.25	18.39
Glycine	18.09	28.02	22.25	22.95	29.51	30.55	21.73	29.85	18.80
Alanine	76.09	78.76	69.29	78.67	84.47	78.21	95.22	118.69	41.46
Citrulline	3.68	0.00	4.08	2.71	6.69	6.90	2.90	32.90	4.72
α -aminobutyric acid	3.39	3.57	4.38	7.01	4.14	4.41	8.12	4.37	5.85
Cystine	7.85	15.95	15.13	4.91	5.21	5.64	5.98	4.18	4.71
Cystathionine	-	6.98	4.76	36.03	4.07	5.83	38.18	31.58	7.16
Tyrosine	48.05	3.63	46.49	33.24	44.38	44.88	29.52	25.13	28.59
β -alanine	26.06	23.32	23.48	25.61	21.36	21.57	28.94	23.74	30.77
β -aminobutyric acid	16.71	12.82	10.34	14.16	5.88	14.09	17.57	5.90	19.59
γ-aminobutyric acid	160.16	178.35	162.00	164.51	162.95	160.89	157.67	165.54	155.26
Aminoethanol	25.25	15.60	24.92	10.93	16.09	14.20	11.50	24.72	40.94
Hydroxyproline	2.90	1.89	1.29	-	-	-	2.47	-	-
Ornithine	1.71	64.91	1.63	37.31	17.67	2.13	21.90	28.56	1.58
Anserine	5.93	-	-	-	-	-	-	-	-
Carnosine	5.07	-	-	-	-	-	-	-	-
Arginine	70.18	50.54	73.29	50.00	55.45	77.93	50.91	52.90	64.55
Total	800.27	921.37	892.57	810.64	840.34	874.30	824.61	882.46	737.54
Essential amino acids									
Threonine	32.38	38.98	34.26	11.47	35.48	38.97	10.14	5.25	16.37
Valine	107.27	108.54	104.44	90.75	111.09	112.65	81.34	78.68	86.93
Methionine	5.52	5.23	4.40	3.24	4.25	5.23	3.80	4.31	4.17
Isoleucine	69.63	74.99	69.32	44.70	75.56	75.34	38.43	18.74	55.28
Leucine	65.56	74.37	64.17	49.42	78.62	75.83	48.40	36.82	50.96
Phenylalanine	68.13	75.16	59.14	52.61	67.28	60.89	53.18	35.87	44.67
Lysine	22.57	15.54	11.41	16.41	17.83	19.06	10.80	1.93	23.56
Histidine	21.86	23.73	22.27	15.96	22.35	22.58	11.66	21.03	19.12
Total	392.92	416.54	369.41	284.56	412.46	410.55	257.75	202.63	301.06
Total amino acids	1193.19	1337.91	1261.98	1095.2	1252.8	1284.85	1082.36	1085.09	1038.6

¹⁾All values are presented as the mean \pm SD of triplicate determination. NIM, non-incubation microorganism; 3320, *Lac. brevis* KCTC 3320; 3019, *Lac. casei* KCTC 3109; 3112, *Lac. fermentum* KCTC 3112; 3116, *Lac. paracasei* KCTC 3166; 3597, *Lac. amylovorus* KCTC 3597; 3635, *Lac. delbrueckii* KCTC 3635; 3681, *Lac. farciminis* KCTC 3681; 13093, *Lac. plantarum* KCTC 13093.

- 분리균주 10종의 *Lac. plantarum*을 이용하여 Fabaton 콩잎을 반고체 발효법을 이용하여 발효시켜 발효 전·후(발효시간 0 hr과 72 hr) 이화학적 특성, 항산화 활성(DPPH, ABTS 및 •OH 라디칼 소거활성과 환원력), 소화효소 저해활성(α -glucosidase 및 췌장-lipase) 및 유리아미노산과 isoflavone 조성을 살펴보았다.
- 이화학적 특성 : 10종의 *Lac. plantarum*을 이용하여 72시간 동안 발효시킨 Fabaton 콩잎 발효물의 pH, 산도, 생균수 및 β -glucosidase 활성을 살펴본 결과 균을 접종하지 않은 콩잎(NIM)은 pH 6.38, 산도는 0.23% 있었으며, *Lac. plantarum* P1201로 발효한 콩잎 발효물이 pH는 3.98로 가장 낮았고, 이에 상응하여 산도 2.18%로 가장 높았다. 한편 *Lac. plantarum* K23의 콩잎 발효물 경우 pH는 4.23으로 가장 높았고, 산도는 가장 1.37% 있었다. 생균수는 모두 10.80 log cfu/g 이상 있었다. 마지막으로 β -glucosidase 활성은 1.85 이상의 효소활성을 나타내었다.

표. 10종의 *Lac. plantarum* 이용 Fabaton 콩잎 발효물의 이화학적 특성

Isolates	Contents			
	pH	Acidity (% as lactic acid)	Viable cell numbers (log cfu/g)	β -Glucosidase activity (unit/g)
NIM	6.38	0.23	-	-
S48	3.98	1.94	10.85	1.86
S52	3.96	2.11	10.91	1.87
S56	3.96	2.03	10.86	1.90
S64	3.98	1.85	10.93	1.87
S65	4.01	1.93	10.92	1.84
P1201	3.98	2.18	10.87	1.85
K23	4.23	1.37	10.93	1.82
K24	3.97	1.93	10.94	1.96
D56	4.21	1.64	10.96	1.81
D58	4.31	1.44	10.97	1.83

¹⁾All values are presented as the mean \pm SD of triplicate determination.

- 항산화 활성 : 10종의 *Lac. plantarum*을 이용하여 72시간 동안 발효시킨 Fabaton 콩잎 발효물의 DPPH, ABTS와 hydroxyl 라디칼 소거활성 및 환원력을 살펴본 결과 균을 접종하지 않은 콩잎(NIM)보다는 *Lac. plantarum*으로 발효시킨 Fabaton 콩잎이 활성이 증가하였다. NIM의 경우에 DPPH, ABTS와 hydroxyl 라디칼 소거활성 및 환원력은 각각 63.78%, 60.14%, 44.87% 및 1.610 있었고, 콩잎 발효물 중 활성이 가장 높은 *Lac. plantarum* K24 발효물 경우 DPPH, ABTS와 hydroxyl 라디칼 소거활성 및 환원력은 각각 90.41%, 79.57%, 58.25% 및 2.166 있었다. 한편 생균제제이자 CLA 생성 유산균인 *Lac. plantarum* S48과 P1201의 항산화 활성은 각각 84.98%와 83.61%(DPPH), 75.95%와 73.87%(ABTS), 56.26%와 55.55%(•OH) 및 2.022%와 2.086%(FRAP)으로 대체적으로 높은 활성을 나타내었다.

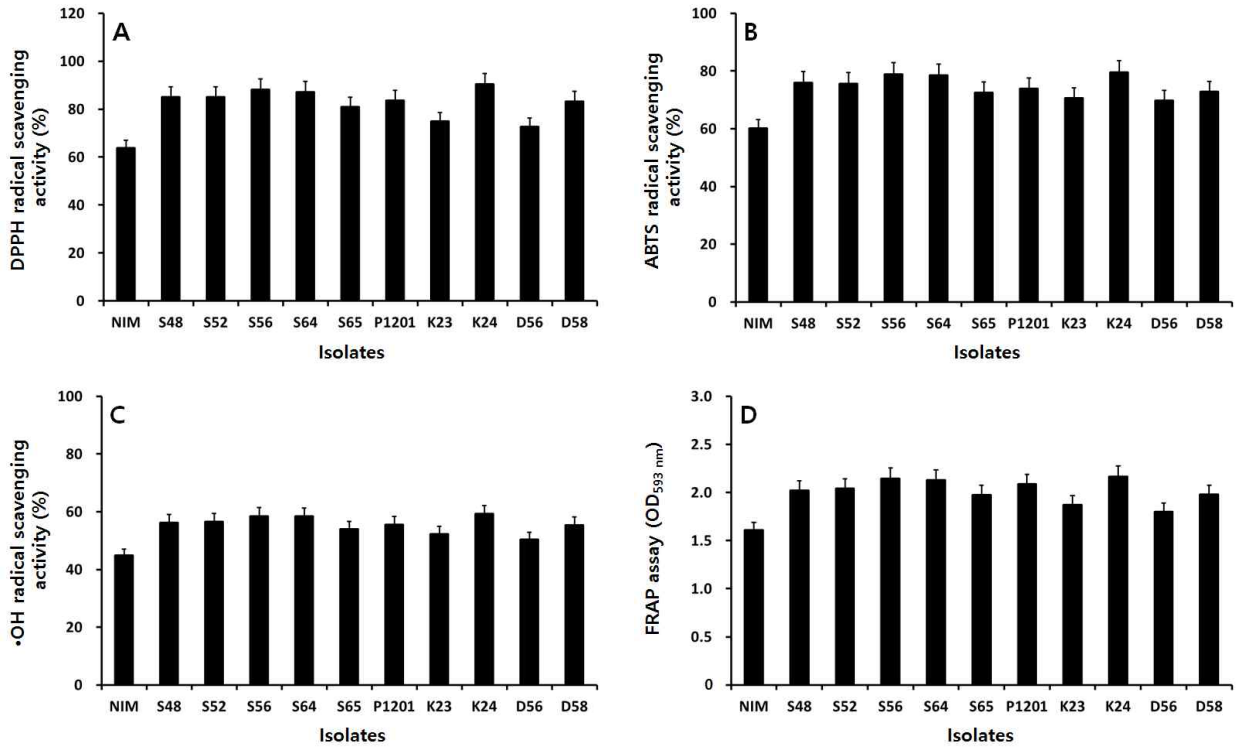


그림. 10종의 *Lac. plantarum* 이용 Fabaton 콩잎 발효물의 항산화 활성

- 소화효소 저해활성 : 10종의 *Lac. plantarum*을 이용하여 72시간 동안 발효시킨 Fabaton 콩잎 발효물의 α -glucosidase 및 췌장-lipase 저해활성을 살펴본 결과 항산화 활성과 동일하게 균을 접종하지 않은 콩잎(NIM)보다는 *Lac. plantarum*으로 발효시킨 Fabaton 콩잎이 활성이 증가하였다. Fabaton 콩잎 발효물 중 *Lac. plantarum* K24로 발효시킨 발효물이 활성이 가장 높아 α -glucosidase 및 췌장-lipase 저해활성은 각각 39.15% 및 28.54% 있었고, NIM의 경우에는 각각 12.96% 및 11.06% 있었다. 역시 생균제제이자 CLA 생성 유산균인 *Lac. plantarum* S48과 P1201의 항산화 활성은 각각 24.7%와 25.0%(α -glucosidase), 22.25%와 22.67%(췌장-lipase)으로 대체적으로 높은 활성을 나타내었다.

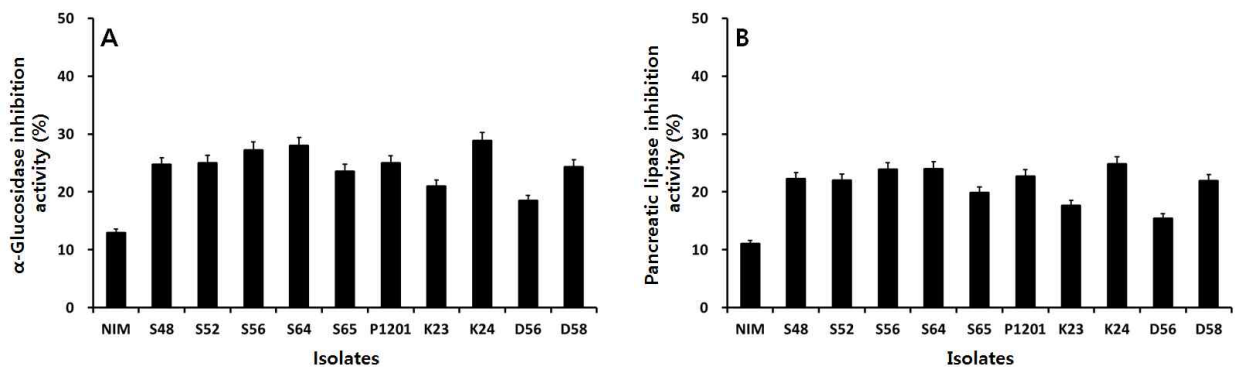


그림. 10종의 *Lac. plantarum* 이용 Fabaton 콩잎 발효물의 소화효소 활성

- Isoflavone 조성 : 10종의 *Lac. plantarum*을 이용하여 72시간 동안 발효시킨 Fabaton 콩잎 발효물의 isoflavone 조성을 살펴보았다. 그림에서 보는바와 같이 isoflavone은 daidzin, genistin, malonyldaidzin, malonylgenistin, daidzein 및 genistein 6종의 유도체가 검출되었다. 균을 접종하지 않은 콩잎(NIM)은 배당체인 daidzin과 genistin이 함량이 각각 4596.08 $\mu\text{g/g}$ 과 2471.70 $\mu\text{g/g}$ 으로 isoflavone의 약 80%를 차지하였으나, 생리활성이 가장 높은 *Lac. plantarum* K23 콩잎 발효물의 경우 비당체인 dadzein과 genistein 함량이 높았고, dadzein은 2389.73 $\mu\text{g/g}$ 및 genistein은 583.53 $\mu\text{g/g}$ 으로 이들이 isoflavone의 약 40% 이상을 차지하였다. 생균제제이자 CLA 생성 유산균인 *Lac. plantarum* S48과 P1201의 dadzein과 genistein은 각각 1592.60 $\mu\text{g/g}$ 과 1356.96 $\mu\text{g/g}$ (dadzein) 및 389.30과 343.31(genistein)으로 40% 이하의 비율을 차지하였다. 일반적으로 유산발효가 진행됨에 따라 미생물이 생산하는 β -glucosidase 활성과 산에 의해 배당체 형태의 β -glycoside 화합물들이 비당체 형태인 aglycones로 전환됨으로 보고되어 있으며, 본 연구에서 *Lac. plantarum* 균주별 이소플라본 조성의 차이는 각 균주들의 효소활성과 산 생성능이 다르기 때문인 것으로 판단되었다.

2-2-11-3. 유산균 단독 혹은 혼합 종균에 따른 파바톤 콩잎 발효

- 유산균 단독 혹은 혼합종균에 따른 콩잎의 발효 중 특성 변화
 - 반고체 발효(Semi-solid fermentation) : 1차년도에 선발한 5종의 균주 중 *Lactobacillus plantarum* P1201과 *Lactobacillus brevis* BMK184를 선택하여 semi-solid fermentation 방식으로 발효
 - 이화학적 특성 : 단독 혹은 혼합종균을 이용한 콩잎 발효 중 이화학적 특성 변화는 표와 같았다. 발효 초기 pH는 6.14 ~ 6.19로 큰 차이를 나타내지 않았으나 발효 시간이 경과함에 따라 pH는 서서히 감소하였고 *Lac. plantarum* P1201 단독 발효 시에는 발효 중기 3.97로 pH 감소가 가장 컸으며 *Lac. brevis* BMK184 단독 발효 시에는 5.39, 혼합 발효 시 4.19의 pH 감소가 일어났다. 산도는 pH 감소에 따라 서서히 증가하였고 생균수 역시 발효가 진행되는 동안 대부분 증가하는 경향을 나타내었다. β -glucosidase 활성은 공통적으로 발효 48시간까지는 증가하였으나 이후에는 약간 감소하는 경향을 나타내었다. *Lac. brevis* BMK184 단독 발효 시 발효 48시간째 2.47 unit/g의 효소활성을 나타내었고 *Lac. plantarum* P1201 단독 발효 시에는 1.88 unit/g, 혼합 발효 시에는 2.51 unit/g의 활성을 나타내었다. 한편 GADase 활성 역시 발효 48시간까지는 지속적으로 증가하였으나 발효 72시간째에는 약간 감소하는 경향을 나타내었다.

표. 유산균 단독/혼합종균에 따른 콩잎의 발효 중 이화학적 특성 변화

Starter / index	Fermentation time (hr)				
	0	12	24	48	72
<i>Lac. plantarum</i> P1201					
pH	6.19±0.31	6.14±0.31	6.05±0.30	4.07±0.20	3.97±0.20
Acidity (% as lactic acid)	0.32±0.02	0.36±0.02	0.41±0.02	1.05±0.05	1.89±0.09
Viable cell numbers (log cfu/g)	6.48±0.32	6.00±0.30	8.38±0.42	9.98±0.50	10.61±0.53
β -Glucosidase activity (unit/g)	0.05±0.00	0.87±0.04	1.56±0.08	1.88±0.09	1.87±0.09
GADase activity (unit/g)	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
<i>Lac. brevis</i> BMK184					
pH	6.19±0.31	5.47±0.27	5.41±0.27	5.40±0.27	5.39±0.27
Acidity (% as lactic acid)	0.32±0.02	0.58±0.03	0.61±0.03	0.73±0.04	0.93±0.05
Viable cell numbers (log cfu/g)	6.60±0.33	9.45±0.47	9.60±0.48	9.86±0.49	9.69±0.48
β -Glucosidase activity (unit/g)	0.07±0.00	1.11±0.06	1.90±0.10	2.47±0.12	2.42±0.12
GADase activity (unit/g)	0.32±0.02	1.54±0.08	2.99±0.15	3.66±0.18	3.58±0.18
<i>Lac. plantarum</i> P1201+<i>Lac. brevis</i> BMK184					
pH	6.14±0.31	5.49±0.27	5.22±0.26	4.47±0.22	4.19±0.21
Acidity (% as lactic acid)	0.33±0.02	0.61±0.03	0.91±0.05	1.35±0.07	1.80±0.09
Viable cell numbers (log cfu/g)	6.35±0.32	9.41±0.47	9.50±0.48	10.65±0.53	9.71±0.49
β -Glucosidase activity (unit/g)	0.04±0.00	0.88±0.04	1.84±0.09	2.51±0.13	2.34±0.12
GADase activity (unit/g)	0.33±0.02	1.36±0.07	2.54±0.13	3.52±0.18	3.45±0.17

¹⁾All values are presented as the mean±SD of triplicate determination.

- 아미노산 조성 : 콩잎 발효 중 유리아미노산 조성은 다음과 같았다. P1201 단독 균주 발효를 진행한 경우 총 유리아미노산 함량은 감소하는 결과를 나타내었다. 발효 초기 aspartic acid는 278.95 mg/100 g이 검출되었고 발효 12시간째에는 282.74 mg/100 g으로 약간 증가하였다. 24시간째에는 약간 감소하였고 48시간째에는 좀 더 증가하는 경향을 나타내었으나 72시간째 256.90 mg/100 g으로 약간 감소하는 경향을 나타내었다. GABA는 발효 초기 (131.69 mg/100 g)부터 발효 24시간(137.17 mg/100 g)까지 증가하였으나 이후에는 조금씩 감소하여 72시간째에는 131.83 mg/100 g으로 나타났다. 한편 필수 아미노산 중 valine은 발효 초기 가장 많은 함유량을 나타내었고 12시간째 약간 증가하였으나 발효 과정 중 서서히 감소하였으며 대부분의 유리아미노산 역시 감소하는 경향을 나타내었다. 이러한 결과는 발효 과정 중 P1201이 생성하는 젖산에 의해 아미노산들이 분해되는 것으로 추정하였다. BMK184 단독 발효 시에는 P1201 단독 발효 시와 다른 양상을 나타내었다. 발효 초기 주요 아미노산은 aspartic acid로 277.68 mg/100 g에서 287.30 mg/100 g(12시간), 316.65 mg/100 g (24시간), 319.98 mg/100 g (48시간), 371.76 mg/100 g (72시간)으로 발효가 진행됨에 따라 크게 증가하는 결과를 나타내었다. 이외에도 serine, alanine, citrulline, GABA와 같은 비필수 아미노산들이 발효 초기보다 발효 72시간째 증가하였다. 필수 아미노산 중에서는 valine이 가장 많은 양이 검출되었고 이 역시 발효 72시간째 97.06 mg/100 g으로 발

효 초기보다 약간 증가하는 경향을 나타내었다. 총 유리아미노산 역시 발효 초기 1185.61 mg/100 g에서 조금씩 증가하여 발효 72시간째에는 1255.34 mg/100 g으로 증가하였다. 한편 이들의 혼합 발효 시에는 P1201 단독 발효 시와 유사한 경향을 나타내었다. 즉, 발효 과정 중 대부분의 유리아미노산들이 감소되는 경향을 나타내었고 GABA는 발효 초기와 비교하였을 시 발효 72시간째 175.59 mg/100 g으로 약간 증가하는 경향을 나타내었다. 그러나 필수 아미노산인 valine은 발효 과정 중 서서히 감소하였고 총 유리아미노산 함량 역시 감소하는 결과를 나타내었다.

표. 유산균 단독/혼합종균에 따른 콩잎의 발효 중 아미노산 함량 변화

Amino acids	Fermentation time (hr) / Contents ¹⁾ (mg/100 g)				
	Starter (P1201)				
	0	12	24	48	72
General amino acids					
Taurine	19.79±0.99	20.41±1.02	19.50±0.98	20.92±1.05	15.27±0.76
Aspartic acid	278.95±13.95	282.74±14.14	257.88±12.89	278.15±13.91	256.90±12.85
Serine	54.99±2.75	59.49±2.97	57.71±2.89	57.32±2.87	35.00±1.75
Glutamic acid	52.25±2.61	55.13±2.76	56.22±2.81	55.72±2.79	11.37±0.57
Aminoadipic acid	14.83±0.74	16.01±0.80	16.47±0.82	16.35±0.82	15.04±0.75
Glycine	20.67±1.03	21.00±1.05	19.60±0.98	19.92±1.00	11.80±0.59
Alanine	58.05±2.90	61.45±3.07	61.42±3.07	60.68±3.03	26.89±1.34
Citrulline	5.84±0.29	4.73±0.24	3.65±0.18	4.80±0.24	3.54±0.18
α -aminobutyric acid	3.57±0.18	3.21±0.16	2.83±0.14	3.27±0.16	3.73±0.19
Cystine	6.91±0.35	5.64±0.26	5.61±0.28	6.10±0.31	4.09±0.20
Cystathionine	7.35±0.37	5.60±0.28	4.35±0.22	5.58±0.28	2.39±0.12
Tyrosine	43.44±2.17	42.40±2.12	37.84±1.89	40.38±2.02	11.98±0.60
β -alanine	25.93±1.30	21.87±1.09	18.84±0.94	21.95±1.10	24.44±1.22
β -aminoisobutyric acid	9.14±0.46	5.66±0.28	7.06±0.35	10.53±0.53	8.26±0.41
γ-aminobutyric acid	131.69±6.58	134.94±6.75	137.17±6.86	134.15±6.71	131.83±6.59
Aminoethanol	15.56±0.78	13.89±0.69	13.80±0.69	16.88±0.84	29.92±1.50
Hydroxylysine	0.76±0.04	nd	nd	nd	nd
Ornithine	0.93±0.05	0.97±0.05	1.14±0.06	1.31±0.07	1.00±0.05
Arginine	63.09±3.15	67.22±3.36	68.80±3.44	66.55±3.33	53.12±2.66
Total	813.74±40.69	822.36±41.12	789.89±39.49	820.56±41.03	646.57±32.33
Essential amino acids					
Threonine	28.98±1.45	31.02±1.55	30.26±1.51	29.77±1.49	16.59±0.83
Valine	90.92±4.55	96.66±4.83	94.76±4.74	94.50±4.73	67.63±3.38
Methionine	5.28±0.26	4.47±0.22	3.66±0.18	4.71±0.24	2.68±0.13
Isoleucine	62.49±3.12	65.49±3.27	61.11±3.06	62.02±3.10	38.95±1.95
Leucine	52.19±2.61	54.36±2.72	52.55±2.63	52.99±2.65	29.73±1.49
Phenylalanine	60.83±3.04	57.49±2.87	52.21±2.61	56.04±2.80	24.46±1.22
Lysine	17.27±0.86	18.11±0.91	17.63±0.88	17.32±0.87	20.62±1.03
Histidine	20.55±1.03	21.68±1.08	21.14±1.06	20.95±1.05	16.49±0.82
Total	338.51±16.93	349.28±17.46	333.32±16.67	338.3±16.92	217.15±10.86
Total amino acids	1152.25±57.61	1171.64±58.58	1123.21±56.16	1158.86±57.94	863.72±43.19

¹⁾All values are presented as the mean±SD of triplicate determination.

²⁾nd: not detected.

표. 계 속

Amino acids	Fermentation time (hr) / Contents ¹⁾ (mg/100 g)				
	Starter (BMK184)				
	0	12	24	48	72
General amino acids					
Taurine	16.27±0.81	16.94±0.85	16.74±0.84	15.44±0.77	19.46±0.97
Aspartic acid	277.68±13.88	287.30±14.37	316.65±15.83	319.98±16.00	371.76±18.59
Serine	57.09±2.85	58.93±2.95	60.73±3.04	59.25±2.96	64.98±3.25
Glutamic acid	44.51±2.23	44.52±2.23	32.35±1.62	16.85±0.84	18.26±0.91
Aminoadipic acid	15.96±0.80	16.78±0.84	17.65±0.88	17.46±0.87	17.79±0.89
Glycine	21.06±1.05	24.36±1.22	24.59±1.23	23.97±1.20	24.06±1.20
Alanine	63.18±3.16	68.16±3.41	69.37±3.47	67.49±3.37	66.87±3.34
Citrulline	12.81±0.64	23.84±1.19	28.62±1.43	38.78±1.94	41.72±2.09
α -aminobutyric acid	4.14±0.21	4.65±0.23	4.17±0.21	3.44±0.17	3.48±0.17
Cystine	7.30±0.37	6.69±0.33	6.59±0.33	6.08±0.30	6.51±0.33
Cystathionine	8.86±0.44	5.20±0.26	4.57±0.23	5.73±0.29	5.44±0.27
Tyrosine	47.48±2.37	49.13±2.46	44.86±2.24	39.22±1.96	42.00±2.10
β -alanine	26.93±1.35	26.62±1.33	23.07±1.15	10.47±0.52	10.92±0.55
β -aminoisobutyric acid	9.76±0.49	15.57±0.78	11.06±0.55	1.49±0.07	1.73±0.09
γ-aminobutyric acid	141.63±7.08	149.61±7.48	162.23±8.11	169.81±8.49	173.09±8.65
Aminoethanol	13.85±0.69	16.70±0.84	15.21±0.76	17.11±0.86	15.60±0.78
Hydroxylysine	0.62±0.03	nd	nd	nd	nd
Ornithine	0.29±0.01	0.21±0.01	0.31±0.02	0.40±0.02	0.65±0.03
Arginine	57.87±2.89	53.04±2.65	47.94±2.40	34.24±1.71	26.59±1.33
Total	827.29±41.36	868.25±43.41	886.71±44.34	847.21±42.36	910.91±45.55
Essential amino acids					
Threonine	29.96±1.50	30.79±1.54	30.72±1.54	29.04±1.45	30.93±1.55
Valine	94.82±4.74	95.17±4.76	94.33±4.72	90.97±4.55	97.06±4.85
Methionine	7.18±0.36	7.15±0.36	6.19±0.31	5.21±0.26	5.04±0.25
Isoleucine	65.93±3.30	66.41±3.32	64.58±3.23	61.00±3.05	66.28±3.31
Leucine	57.28±2.86	58.66±2.93	55.68±2.76	51.97±2.60	55.97±2.80
Phenylalanine	66.13±3.31	68.10±3.41	62.13±3.11	54.43±2.72	57.17±2.86
Lysine	15.62±0.78	12.68±0.63	10.62±0.53	8.32±0.42	8.59±0.43
Histidine	21.40±1.07	22.66±1.13	22.97±1.15	22.73±1.14	23.39±1.17
Total	358.32±17.92	361.62±18.08	347.22±17.36	323.67±16.18	344.43±17.22
Total amino acids	1185.61±59.28	1229.87±61.49	1233.93±61.70	1170.88±58.54	1255.34±62.77

¹⁾All values are presented as the mean±SD of triplicate determination.

²⁾nd: not detected.

표. 계 속

Amino acids	Fermentation time (hr) / Contents ¹⁾ (mg/100 g)				
	Starter (P1201+BMK184)				
	0	12	24	48	72
General amino acids					
Taurine	25.18±1.26	21.89±1.09	17.31±0.87	19.62±0.98	18.25±0.91
Aspartic acid	299.89±14.99	282.92±14.15	293.74±14.69	276.28±13.81	266.03±13.30
Serine	65.73±3.29	56.26±2.81	60.63±3.03	46.47±2.32	42.34±2.12
Glutamic acid	43.68±2.18	45.76±2.29	39.40±1.97	13.35±0.67	11.25±0.56
Aminoadipic acid	16.84±0.84	14.25±0.71	16.19±0.81	15.40±0.77	17.43±0.87
Glycine	22.79±1.14	21.53±1.08	24.09±1.20	20.20±1.01	23.04±1.15
Alanine	69.04±3.45	61.52±3.08	67.87±3.39	57.19±2.86	60.07±3.00
Citrulline	8.73±0.44	11.98±0.60	21.14±1.06	26.39±1.32	35.89±1.79
α -aminobutyric acid	3.60±0.18	2.97±0.15	3.88±0.19	4.19±0.21	4.42±0.22
Cystine	6.86±0.34	4.91±0.25	6.23±0.31	5.66±0.28	4.22±0.21
Cystathionine	6.30±0.32	3.33±0.17	4.31±0.22	3.88±0.19	3.04±0.15
Tyrosine	46.55±2.33	36.21±1.81	42.42±2.12	29.22±1.46	23.86±1.19
β -alanine	24.32±1.22	9.28±0.46	22.57±1.13	21.84±1.09	12.05±0.60
β -aminoisobutyric acid	6.06±0.30	0.83±0.04	9.80±0.49	10.21±0.51	1.76±0.09
γ-aminobutyric acid	144.24±7.21	134.43±6.72	153.44±7.67	165.48±8.27	175.59±8.78
Aminoethanol	14.33±0.72	15.63±0.78	16.83±0.84	13.75±0.69	13.71±0.69
Hydroxylysine	0.88±0.04	nd	nd	nd	nd
Ornithine	0.53±0.03	0.18±0.01	0.2±0.01	0.39±0.02	0.28±0.01
Arginine	67.29±3.36	53.87±2.69	54.77±2.74	36.84±1.84	36.17±1.81
Total	872.84±43.64	777.75±38.89	854.82±42.74	766.36±38.32	749.4±37.47
Essential amino acids					
Threonine	34.35±1.72	29.93±1.50	31.18±1.56	21.93±1.10	22.08±1.10
Valine	108.34±5.42	90.09±4.50	96.38±4.82	82.65±4.13	86.83±4.34
Methionine	6.31±0.32	4.21±0.21	4.92±0.25	4.45±0.22	3.60±0.18
Isoleucine	73.45±3.67	60.64±3.03	65.83±3.29	45.74±2.29	48.57±2.43
Leucine	63.15±3.16	51.07±2.55	55.05±2.75	45.59±2.28	48.08±2.40
Phenylalanine	65.07±3.25	49.65±2.48	61.54±3.08	50.00±2.50	42.59±2.13
Lysine	18.87±0.94	12.39±0.62	11.55±0.58	13.92±0.70	21.45±1.07
Histidine	23.47±1.17	20.92±1.05	22.91±1.15	20.29±1.01	2.39±0.12
Total	393.01±19.65	318.9±15.90	349.36±17.47	284.57±14.23	275.59±13.78
Total amino acids	1265.85±63.29	1096.65±54.83	1204.18±60.21	1050.93±52.55	1024.99±51.25

¹⁾All values are presented as the mean±SD of triplicate determination.

²⁾nd: not detected.

- Isoflavone 조성 : HPLC를 이용하여 isoflavone 분석 결과는 아래와 같았다. 발효 초기의 주요 isoflavone 유도체는 peak 1번(daidzin)과 2번(genistin)으로 나타났다. P1201 단독 발효의 경우에는 발효 초기에 비해 daidzin (3199.04 $\mu\text{g/g}$) 및 genistin (2189.00 $\mu\text{g/g}$)이 약간 감소하였고 peak 5번인 daidzein이 1460.02 $\mu\text{g/g}$ 으로 가장 크게 증가하였다. BMK184 단독 발효 시에는 발효 초기와 P1201 단독 발효보다 daidzin과 genistin 유도체가 각각 2717.60 및 910.85 $\mu\text{g/g}$ 으로 큰 감소폭을 나타내었고 이에 상응하여 daidzein과 genistein 유도체들은 각각 2008.11 및 1055.27 $\mu\text{g/g}$ 으로 아주 큰 상승폭을 나타내었다. 이들의 혼합 발효 시에도 BMK184 단독 발효와 유사한 결과로 나타났으며 즉, 발효 과정 중에 daidzin (3082.27 $\mu\text{g/g}$)과 genistin(1211.84 $\mu\text{g/g}$)은 크게 감소하고 daidzein (2265.57 $\mu\text{g/g}$)과 genistein (987.65 $\mu\text{g/g}$)이 크게 증가하였다. 한편 비배당체 형태인 daidzein과 genistein의 총 함량은 혼합 발효 시에 3253.22 $\mu\text{g/g}$ 으로 가장 많은 것으로 나타났으며 malonyl-glycoside 그룹들은 발효 전 과정 중 큰 변화가 없었다.

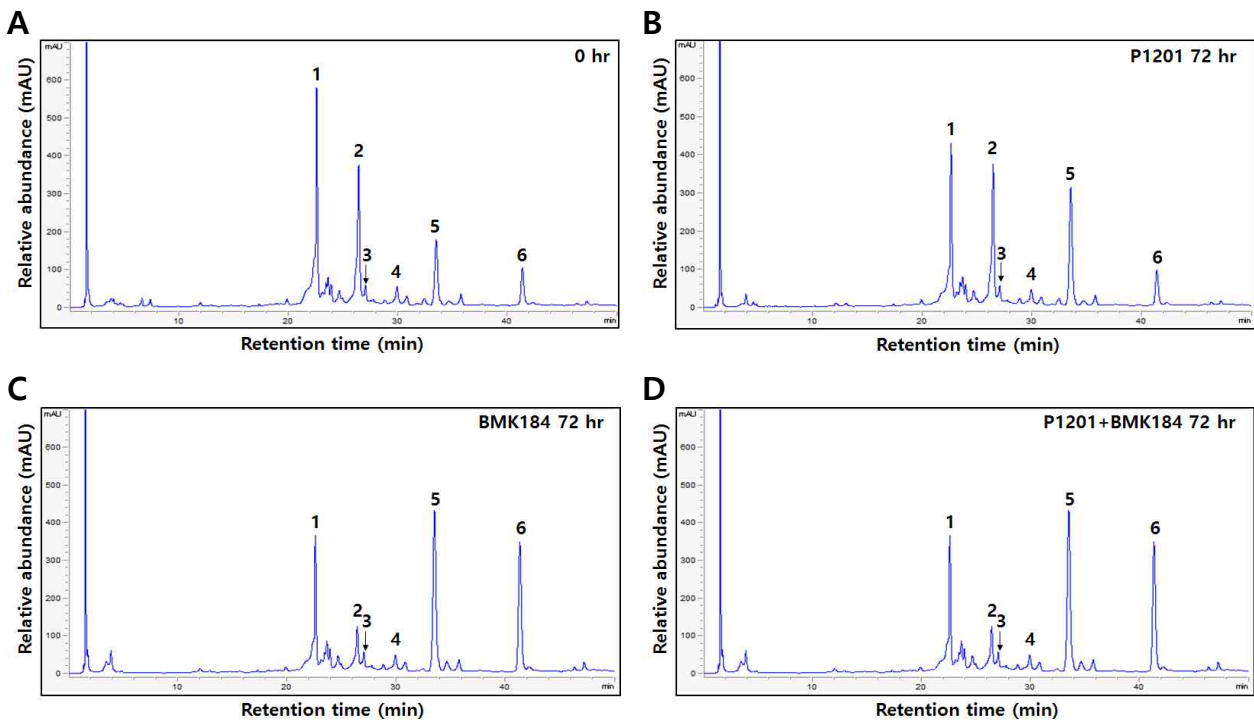


그림. HPLC chromatogram of six isoflavone derivatives in soy-leaves. A, 발효전; B, *Lac. plantarum* P1201 단독 발효 후; C, *Lac. brevis* BMK184 단독 발효 후; D, 혼합 발효 후. 1, Daidzin; 2, Genistin; 3, malonyldaidzin; 4, malonylgenistin; 5, Daidzein; and 6, Genistein.

표. 유산균 단독/혼합종균에 따른 콩잎의 발효 중 이소플라본 함량 변화

Isoflavones	Fermentation time (hr) / Contents ¹⁾ ($\mu\text{g/g}$)				
	0	12	24	48	72
<i>Lac. plantarum</i> P1201					
Glycosides					
Daidzin (1)	4276.31 \pm 213.82	4577.09 \pm 228.85	4434.50 \pm 221.73	4485.15 \pm 224.26	3199.04 \pm 159.95
Genistin (2)	2361.20 \pm 118.06	2515.72 \pm 125.79	2471.22 \pm 123.56	2505.79 \pm 125.29	2189.00 \pm 109.45
Total	6637.51 \pm 331.88	7092.81 \pm 354.64	6905.72 \pm 345.29	6990.94 \pm 349.55	5388.04 \pm 269.40
Malonylglycosides					
Daidzin (3)	395.13 \pm 19.76	420.12 \pm 21.01	390.55 \pm 19.53	400.64 \pm 20.03	379.87 \pm 18.99
Genistin (4)	606.37 \pm 30.32	625.37 \pm 31.27	599.57 \pm 29.98	602.91 \pm 30.15	440.54 \pm 22.03
Total	1001.49 \pm 50.07	1045.49 \pm 52.27	990.12 \pm 49.51	1003.55 \pm 50.18	820.41 \pm 41.02
Aglycones					
Daidzein (5)	754.11 \pm 37.71	649.97 \pm 32.50	616.03 \pm 30.80	617.49 \pm 30.87	1460.02 \pm 73.00
Genistein (6)	240.38 \pm 12.02	202.40 \pm 10.12	184.85 \pm 9.24	185.19 \pm 9.26	316.55 \pm 15.83
Total	994.49 \pm 49.72	852.37 \pm 42.62	800.88 \pm 40.04	802.68 \pm 40.13	1776.57 \pm 88.83
Total isoflavones	8633.49 \pm 431.67	8990.67 \pm 449.53	8696.72 \pm 434.84	8797.18 \pm 439.86	7985.02 \pm 399.25
<i>Lac. brevis</i> BMK184					
Glycosides					
Daidzin (1)	4225.26 \pm 211.26	3413.37 \pm 170.67	3519.23 \pm 175.96	2919.84 \pm 145.99	2717.60 \pm 135.88
Genistin (2)	2400.95 \pm 120.05	1926.56 \pm 96.33	1805.54 \pm 90.28	1338.08 \pm 66.90	910.85 \pm 45.54
Total	6626.21 \pm 331.31	5339.93 \pm 267.00	5324.77 \pm 266.24	4257.92 \pm 212.90	3628.46 \pm 181.42
Malonylglycosides					
Daidzin (3)	408.01 \pm 20.40	370.22 \pm 18.51	384.06 \pm 19.20	358.33 \pm 17.92	364.75 \pm 18.24
Genistin (4)	587.37 \pm 29.37	474.82 \pm 23.74	495.65 \pm 24.78	460.06 \pm 23.00	451.10 \pm 22.56
Total	995.38 \pm 49.77	845.05 \pm 42.25	879.71 \pm 43.99	818.39 \pm 40.92	815.84 \pm 40.79
Aglycones					
Daidzein (5)	747.54 \pm 37.38	1233.61 \pm 61.68	1312.07 \pm 65.60	1669.57 \pm 83.48	2008.11 \pm 100.41
Genistein (6)	236.93 \pm 11.85	471.29 \pm 23.56	619.11 \pm 30.96	826.72 \pm 41.34	1055.27 \pm 52.76
Total	984.48 \pm 49.22	1704.90 \pm 85.25	1931.17 \pm 96.56	2496.29 \pm 124.81	3063.38 \pm 153.17
Total isoflavones	8606.07 \pm 430.30	7889.87 \pm 394.49	8135.65 \pm 406.78	7572.61 \pm 378.63	7507.68 \pm 375.38
<i>Lac. plantarum</i> P1201+<i>Lac. brevis</i> BMK184					
Glycosides					
Daidzin (1)	4327.03 \pm 216.35	3931.18 \pm 196.56	3745.84 \pm 187.29	2535.66 \pm 126.78	3082.27 \pm 154.11
Genistin (2)	2459.23 \pm 122.96	2144.18 \pm 107.21	1925.64 \pm 96.28	1204.33 \pm 60.22	1211.84 \pm 60.59
Total	6786.26 \pm 339.31	6075.37 \pm 303.77	5671.49 \pm 283.57	3739.99 \pm 187.00	4294.11 \pm 214.71
Malonylglycosides					
Daidzin (3)	417.63 \pm 20.88	339.14 \pm 16.96	378.64 \pm 18.93	284.51 \pm 14.23	290.68 \pm 14.53
Genistin (4)	609.59 \pm 30.48	527.53 \pm 26.38	604.93 \pm 30.25	471.10 \pm 32.56	418.69 \pm 20.93
Total	1027.22 \pm 51.36	866.67 \pm 43.33	983.57 \pm 49.18	755.61 \pm 37.78	709.37 \pm 35.47
Aglycones					
Daidzein (5)	749.27 \pm 37.46	1035.28 \pm 51.76	1164.63 \pm 58.23	1939.64 \pm 96.98	2265.57 \pm 113.28
Genistein (6)	217.93 \pm 10.90	342.38 \pm 17.12	551.18 \pm 27.56	963.49 \pm 48.17	987.65 \pm 49.38
Total	967.20 \pm 48.36	1377.66 \pm 68.88	1715.82 \pm 85.79	2903.14 \pm 145.16	3253.22 \pm 162.66
Total isoflavones	8780.68 \pm 439.03	8319.70 \pm 415.99	8370.87 \pm 418.54	7906.62 \pm 395.33	7748.83 \pm 387.44

¹⁾All values are presented as the mean \pm SD of triplicate determination.

²⁾nd: not detected.

- 라디칼 소거활성 : 발효시간에 따른 항산화 활성 측정 결과 단독 및 혼합균주 사용에 따른 활성 차이는 있었으나 공통적으로 발효가 진행됨에 따라 그 활성은 점차 증가하였다. DPPH 라디칼 소거활성은 발효 12시간까지는 단독 및 혼합 발효 시 큰 차이는 나타나지 않았다. 발효 24시간째에는 BMK184 단독 발효 시 76.71%로 이들 중 가장 높게 나타났으나 발효 48시간과 72시간째에는 혼합 발효를 하였을 경우 88.02%에서 90.90로 가장 우수하였다. 한편 ABTS 및 $\cdot\text{OH}$ 라디칼 소거활성 역시 DPPH와 마찬가지로 발효 과정 중 점차 라디칼 소거활성이 증가하였고 혼합 발효 시 좀 더 우수한 것으로 나타났다.

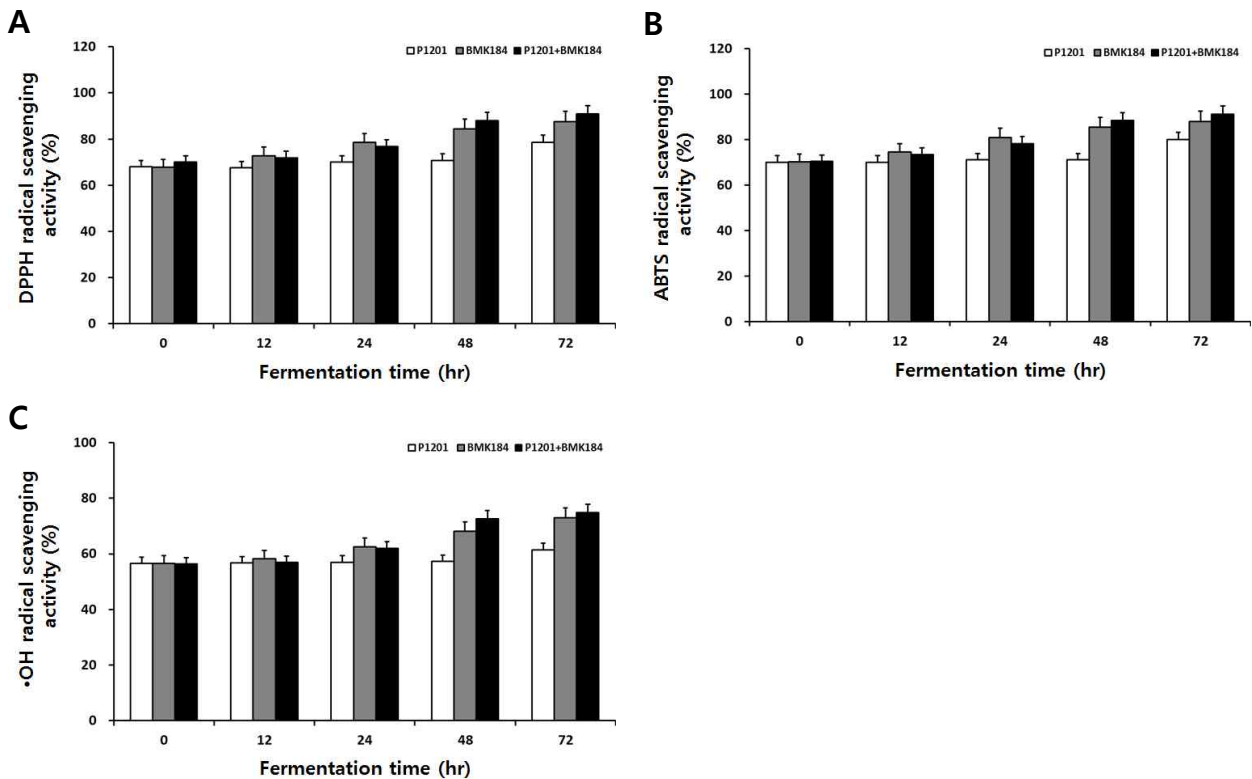


그림. 유산균 단독/혼합종균에 따른 콩잎의 발효 중 라디칼 소거활성 변화. A, DPPH; B, ABTS; C, Hydroxyl.

- 소화효소 저해활성 : 발효 중 탄수화물(α -glucosidase) 및 지방분해 효소(pancreatic lipase) 저해활성을 측정한 결과는 다음과 같았다. 발효 초기에는 단독 및 혼합 발효에 따른 차이 없이 31.16%(P1201), 31.20%(BMK184), 31.11%(P1201+BMK184)로 유사한 활성을 나타내었다. P1201 단독 발효 시 발효 48시간까지 큰 변화 없이 활성이 유사하였고 발효 72시간째 아주 약간 증가하여 38.87%의 α -glucosidase 저해활성을 보였다. BMK184 단독 발효 시에는 발효 과정 중 서서히 증가하는 경향을 나타내었고 발효 72시간째에는 48.74%를 나타내었고 혼합 발효 시에는 이보다 약간 더 증가하여 최종 49.86%의 저해활성을 나타내었다. 한편 지방분해 효소 저해활성을 측정한 결과 역시 α -glucosidase 저해활성과 유사한 것으로 나타났다. 발효 초기에는 활성이 거의 유사하였고 발효가 진행됨에 따라 서서히 증가하였으며 혼합 발효 시 37.30%의 저해활성을 나타내었다.

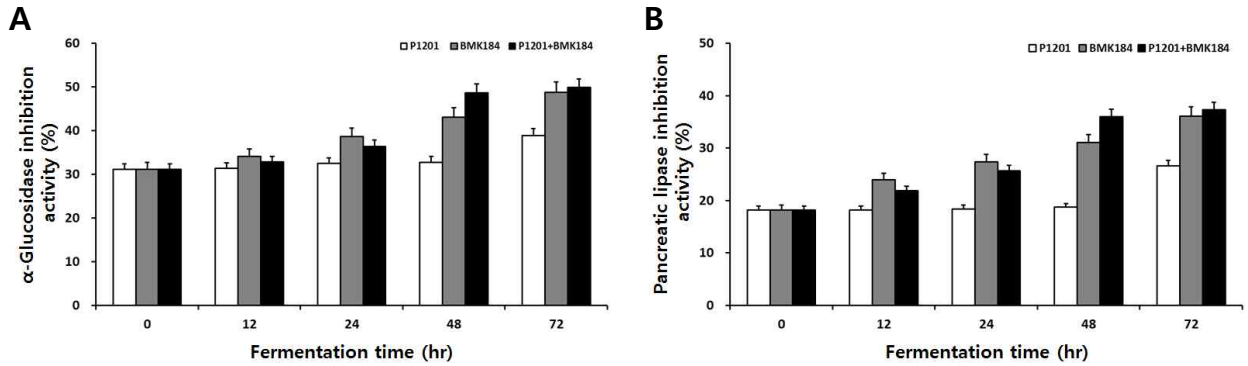


그림. 유산균 단독/혼합종균에 따른 콩잎의 발효 중 소화효소 저해활성 변화. A, α -Glucosidase; B, pancreatic lipase.

○ 콩잎 원료 및 혼합종균(P1201+BMK184) 콩잎 발효 전·후의 특성 확인

- 반고체 발효(Semi-solid fermentation) : *Lactobacillus plantarum* P1201과 *Lactobacillus brevis* BMK184 균주를 이용하여 scale-up하여 semi-solid fermentation 방식으로 발효를 진행한 후 콩잎 원료 및 혼합종균 콩잎 발효 전·후의 특성을 확인

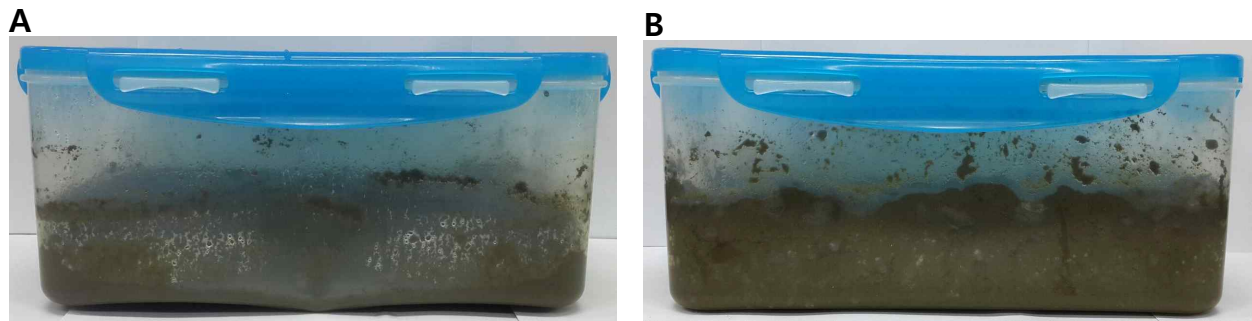


그림 1-24. 합종균(P1201+BMK184) 콩잎 발효 전·후 모습. A, 발효 전; B, 발효 후.

- 이화학적 특성 : 혼합종균을 이용한 콩잎 발효 전후 이화학적 특성은 다음과 같았다. 원료와 발효 전 콩잎의 pH는 6.22 및 6.18로 큰 차이는 없었으나 발효 후에는 4.89로 감소하였다. 콩잎의 산도는 pH 감소에 따라 증가하는 경향을 나타내었으며 생균수 역시 발효 전보다 발효 후에 증가하였다. β -glucosidase와 GADase 활성 측정 결과 원료의 경우 효소활성이 없었으나 발효 후에 각각 2.55 및 3.62 unit/g으로 효소활성을 나타내었다.

표. 콩잎 원료 및 혼합종균(P1201+BMK184) 콩잎 발효 전·후의 이화학적 특성

Contents ¹⁾	Samples			
	원료	발효 전 (0 h)	발효 후 (72 h)	발효 후 (72 h) + 동결건조 후
pH	6.22±0.31	6.18±0.31	4.89±0.24	4.68±0.23
Acidity (% as lactic acid)	0.3±0.02	0.4±0.02	1.1±0.06	1.1±0.06
Viable cell numbers (log cfu/g)	nm ²⁾	8.56±0.43	10.77±0.54	7.3±0.37
β -Glucosidase activity (unit/g)	nm	0.05±0.00	2.55±0.13	2.30±0.12
GADase activity (unit/g)	nm	0.29±0.01	3.62±0.18	3.39±0.17

¹⁾All values are presented as the mean±SD of triplicate determination.

²⁾nm : not measure

- 영양성분 : 영양성분 분석 결과 수분 함량은 원료 콩잎이 11.4 g/100 g으로 가장 많은 함유량을 나타내었다. 조회분 함량은 원료와 발효 전후에 따른 차이는 없었고 평균 7.13 g/100 g을 함유하고 있었다. 단백질은 원료 콩잎이 25.1 g/100 g이었고 발효 전 즉, 콩잎 증자 처리 후에는 약간 증가하여 28.8 g/100 g을 함유하였으며 발효 후에는 29.0 g/100 g으로 아주 약간 증가하였다. 지방 함량은 발효 후에 5.7 g/100 g으로 나타났으며 탄수화물은 51 ~ 56.9 g/100 g을 함유하고 있었다.

표. 콩잎 원료 및 혼합종균(P1201+BMK184) 콩잎 발효 전·후의 5대 영양성분 조성

Contents ¹⁾ (g/100 g)	Samples		
	원료	발효 전 (0 h)	발효 후 (72 h)
Moisture	11.4±0.57	2.2±0.11	1.9±0.10
Ash	7.3±0.37	6.9±0.35	7.2±0.36
Protein	25.1±1.26	28.8±1.44	29.0±1.45
Fat	5.2±0.26	4.9±0.25	5.7±0.29
Carbohydrate	51.0±2.55	56.9±2.85	56.0±2.80

¹⁾All values are means of determinations in three independent experiments.

- 지방산 조성 : 콩잎 원료와 혼합종균 이용 콩잎 발효물의 지방산 함량은 아래표에 나타내었다. 포화지방산은 palmitic acid가 가장 많았으며 콩잎 원료에서는 254.6 mg/100 g이었으며 발효 전에는 257.8 mg/100 g, 발효 후에는 337.3 mg/100 g으로 증가하였다. Stearic acid 또한 palmitic acid 다음으로 많은 함유량을 나타내었고 이 역시 발효 후에 90.2 mg/100 g으로 증가하였다. Arachidic acid와 behenic acid는 원료와 발효 전에는 검출되었으나 발효 후에는 검출되지 않았다. 불포화지방산은 linoleic acid가 주요 지방산으로 나타났고 원료 콩잎에서는 144.5 mg/100 g이 검출되었고 발효 전에는 112.9 mg/100 g으로 약간 감소하였으나 발효 후에 136.9 mg/100 g으로 약간 증가하였다. 한편 포화 및 불포화지방산 총 함량은 발효 후에 741.5 mg/100 g으로 가장 많은 것으로 나타났다.

표. 콩잎 원료 및 혼합종균(P1201+BMK184) 콩잎 발효 전·후의 지방산 조성

Contents ¹⁾ (mg/100 g)	Samples		
	원료	발효 전 (0 h)	발효 후 (72 h)
Saturated fatty acids			
Palmitic acid (C16:0)	254.6±12.73	257.8±12.89	337.3±16.87
Stearic acid (C18:0)	68.3±3.42	65.3±3.27	90.2±4.51
Arachidic acid (C20:0)	5.8±0.29	6.5±0.33	nd ²⁾
Behenic acid (C22:0)	11.1±0.56	9.8±0.49	nd
Lignoceric acid (C24:0)	14.2±0.71	11.8±0.59	12.4±0.62
Total	354.0±17.70	351.2±17.56	439.9±22.00
Unsaturated fatty acids			
Palmitoleic acid (C16:1)	30.9±1.55	36.0±1.80	36.5±1.83
Oleic acid (C18:1n9c)	53.4±2.67	66.3±3.32	113.1±5.66
Linoleic acid (C18:2n6c)	144.5±7.23	112.9±5.65	136.9±6.85
γ-Linolenic acid (C18:3n6)	nd	2.9±0.15	nd
α-Linolenic acid (C18:3n3)	4.2±0.21	3.7±0.19	8.8±0.44
Eicosenic acid (C20:1)	3.0±0.15	3.0±0.15	nd
Eicosatrienoic acid (C20:3n3)	4.5±0.23	4.7±0.24	6.3±0.32
Docosadienoic acid (C22:2)	3.3±0.17	3.1±0.16	nd
Nervonic acid (C24:1)	3.5±0.18	3.6±0.18	nd
Total	247.3±12.37	236.2±11.81	301.6±15.08
Total fatty acids	601.3±30.07	587.4±29.37	741.5±37.08

¹⁾All values are presented as the mean±SD of triplicate determination.

²⁾nd: not detected.

- 아미노산 조성 : 유리아미노산 분석 결과는 아래표에 나타내었다. 각각의 유리아미노산들은 전체적으로 발효가 됨에 따라 감소하는 것으로 나타났다. 특히 콩잎 원료의 glutamic acid는 286.74 mg/100 g이었고 증자 처리 후 151.77 mg/100 g으로 감소하였고 발효 후 역시 56.93 mg/100 g으로 크게 감소하였다. 그러나 γ -aminobutyric acid는 발효됨에 따라 435.48 mg/100 g에서 487.36 mg/100 g으로 증가하였다. 유리아미노산 총 함량은 발효 전 콩잎에서 4,784.24 mg/100 g으로 가장 많았고 발효 후에는 3,717.80 mg/100 g으로 가장 낮은 함유량을 나타내었다.

표. 콩잎 원료 및 혼합종균(P1201+BMK184) 콩잎 발효 전·후의 아미노산 조성

Contents ^{b)} (mg/100 g)	Samples		
	원료	발효 전 (0 h)	발효 후 (72 h)
Non-essential amino acids			
Taurine	36.32±1.82	37.27±1.86	32.78±1.64
Urea	1012.49±50.62	867.15±43.36	712.49±35.62
Aspartic acid	1169.37±58.47	1107.24±55.36	993.13±49.66
Serine	138.71±6.94	160.40±8.02	45.44±2.27
Glutamic acid	286.74±14.34	151.77±7.59	56.93±2.85
Aminoadipic acid	59.20±2.96	64.99±3.25	56.41±2.82
Glycine	42.74±2.14	45.30±2.27	44.78±2.24
Alanine	163.56±8.18	184.82±9.24	135.02±6.75
Citrulline	7.16±0.36	9.87±0.49	59.50±2.98
α -aminobutyric acid	15.31±0.77	17.29±0.86	14.12±0.71
Cystine	nd	10.34±0.52	15.06±0.75
Cystathionine	13.12±0.66	15.43±0.77	12.01±0.60
Tyrosine	105.39±5.27	129.47±6.47	75.74±3.79
β -alanine	47.86±2.39	54.62±2.73	70.39±3.52
β -aminoisobutyric acid	65.26±3.26	84.57±4.23	31.96±1.60
γ-aminobutyric acid	308.88±15.44	435.48±21.77	487.36±24.37
Aminoethanol	33.49±1.67	38.77±1.94	34.74±1.74
Hydroxyproline	13.96±0.70	13.71±0.69	2.68±0.13
Ornithine	3.68±0.18	3.83±0.19	0.42±0.02
1-Methylhistidine	5.08±0.25	3.53±0.18	1.50±0.08
Anserine	25.54±1.28	27.86±1.39	14.92±0.75
Carnosine	8.98±0.45	8.07±0.40	1.59±0.08
Arginine	246.64±12.33	254.6±12.73	177.0±8.85
Total	3,809.48±190.47	3,726.38±186.32	3,075.97±153.80
Essential amino acids			
Threonine	76.86±3.84	90.41±4.52	48.62±2.43
Valine	219.96±11.00	267.87±13.39	181.00±9.05
Methionine	22.37±1.12	18.34±0.92	7.77±0.39
Isoleucine	135.41±6.77	171.50±8.58	97.75±4.89
Leucine	133.71±6.69	157.86±7.89	91.13±4.56
Phenylalanine	178.52±8.93	199.59±9.98	124.34±6.22
Lysine	79.50±3.98	80.58±4.03	41.88±2.09
Histidine	61.23±3.06	71.71±3.59	49.34±2.47
Total	907.56±45.38	1,057.86±52.89	641.83±32.09
Total amino acids	4,717.04±235.85	4,784.24±239.21	3,717.8±185.89
Ammonia	118.50±5.93	113.08±5.65	124.10±6.21

¹⁾All values are presented as the mean±SD of triplicate determination.

²⁾nd: not detected.

- 무기질 조성 : 무기질 조성을 분석한 결과는 아래표에 나타내었다. 콩잎 원료는 kalium(5567.31 mg/100 g)을 가장 많이 함유하고 있었고 그 다음으로는 sulfur(2473.08 mg/100 g)을 많이 함유하고 있는 것으로 나타났다. 발효 전 역시 kalium(5109.14 mg/100 g)이 주요 무기질이었고 발효 후에는 5572.56 mg/100 g으로 증가하였다. 이 외에도 phosphorus, magnesium, calcium, iron, zinc, gallium, germanium들이 함유되어 있었고 무기질 총 함량은 원료가 9,118.58 mg/100 g으로 가장 높았고 발효됨에 따라 8,337.29 mg/100 g에서 9,027.69 mg/100 g을 함유하고 있었다.

표. 콩잎 원료 및 혼합중균(P1201+BMK184) 콩잎 발효 전·후의 무기질 조성

Contents ¹⁾ (mg/100 g)	Samples		
	원료	발효 전 (0 h)	발효 후 (72 h)
Phosphorus (P)	337.72±16.89	299.06±14.95	330.0±16.50
Sulfur (S)	2473.08±123.65	2261.63±113.08	2393.9±119.70
Kalium (K)	5567.31±278.37	5109.14±255.46	5572.56±278.63
Magnesium (Mg)	629.86±31.49	571.64±28.58	619.86±30.99
Calcium (Ca)	26.1±1.31	22.76±1.14	24.96±1.25
Manganese (Mn)	25.54±1.28	22.12±1.11	25.27±1.26
Iron (Fe)	35.57±1.78	31.54±1.58	36.06±1.80
Zinc (Zn)	12.17±0.61	11.49±0.57	11.38±0.57
Gallium (Ga)	6.32±0.32	5.61±0.28	6.02±0.30
Germanium (Ge)	4.91±0.25	2.3±0.12	7.68±0.38
Total	9,118.58±455.93	8,337.29±416.86	9,027.69±451.38

¹⁾All values are presented as the mean±SD of triplicate determination.

- Isoflavone 조성 : Isoflavone 분석 결과는 아래표에 나타내었다. 공통적으로 모두 6종류의 isoflavone 유도체가 검출되었다. 콩잎 원료의 isoflavone 조성은 peak 3번인 malonyl-daidzin이 3455.08 $\mu\text{g/g}$ 으로 가장 많은 것으로 나타났으며 peak 5번과 6번인 daidzein과 genistein은 각각 270.02 및 121.18 $\mu\text{g/g}$ 으로 가장 적은 것으로 나타났다. 발효 전 즉, 콩잎 증자 처리 후에는 peak 1번과 2번인 daidzin 및 genistin이 각각 3177.95 및 1849.19 $\mu\text{g/g}$ 으로 증가하는 결과를 나타내었다. 한편 발효 후에는 peak 1, 2, 3, 4번 유도체들이 대부분 감소하였으며 이에 따라 daidzein(3735.10 $\mu\text{g/g}$)과 genistein(1386.01 $\mu\text{g/g}$)이 아주 크게 증가하였다.

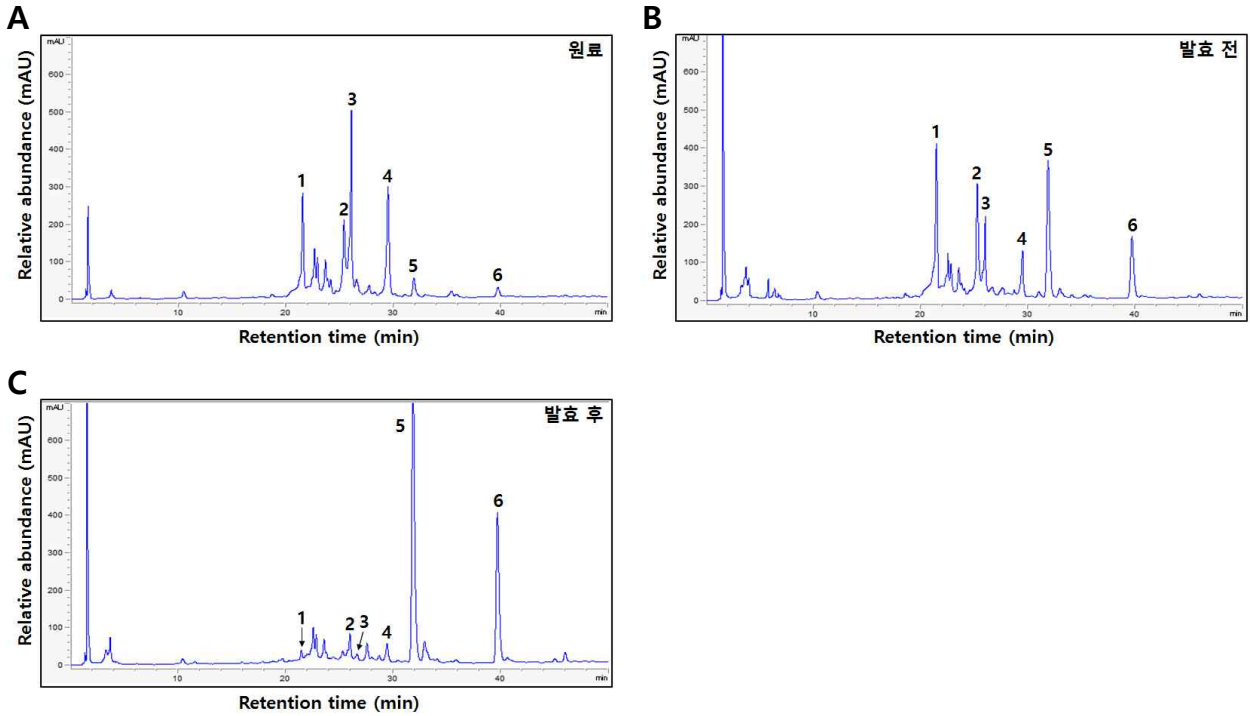


그림. HPLC chromatogram of six isoflavone derivatives in soy-leaves. A, 원료; B, 발효 전; C, 발효 후. 1, Daidzin; 2, Genistin; 3, malonyldaidzin; 4, malonylgenistin; 5, Daidzein; and 6, Genistein.

표. 콩잎 원료 및 혼합종균(P1201+BMK184) 콩잎 발효 전·후의 이소플라본 조성

Contents ($\mu\text{g/g}$) ¹⁾	Samples		
	원료	발효 전 (0 h)	발효 후 (72 h)
Glycosides			
Daidzin (1)	1944.92 \pm 97.25	3177.95 \pm 158.90	339.15 \pm 16.96
Genistin (2)	1108.92 \pm 55.45	1849.19 \pm 92.46	395.88 \pm 19.79
Total	3053.84 \pm 152.69	5027.14 \pm 251.36	735.03 \pm 36.75
Malonylglycosides			
Daidzin (3)	3455.08 \pm 172.75	1685.16 \pm 84.26	51.39 \pm 2.57
Genistin (4)	2022.98 \pm 101.15	993.63 \pm 49.68	510.08 \pm 25.50
Total	5478.05 \pm 273.90	2678.79 \pm 133.94	561.47 \pm 28.07
Aglycones			
Daidzein (5)	270.02 \pm 13.50	1705.71 \pm 85.29	3735.10 \pm 186.76
Genistein (6)	121.18 \pm 6.06	565.71 \pm 28.29	1386.01 \pm 69.30
Total	391.20 \pm 19.56	2271.41 \pm 113.57	5121.12 \pm 256.06
Total isoflavones	8923.09 \pm 446.15	9977.34 \pm 498.87	6417.62 \pm 320.88

¹⁾All values are presented as the mean \pm SD of triplicate determination.

- 비타민 조성 : 콩잎 원료와 콩잎 발효물의 비타민 함량을 분석한 결과는 아래표와 같았다. 비타민 B2는 공통적으로 0.1 mg/100 g으로 미량 존재하였다. B3는 원료에서 19.0 mg/100 g으로 가장 낮은 함량을 나타내었고 콩잎 발효물은 발효됨에 따라 70.1 mg/100 g에서 130.6 mg/100 g으로 크게 증가하였다. 비타민 B5는 발효 후에 131.2 mg/100 g으로 감소하는 경향을 나타내었으며 비타민 B9는 발효 과정 중 15.2 mg/100 g에서 25.5 mg/100 g으로 증가하였으며 비타민 C는 발효 과정 중 감소하였다. 한편 지용성 비타민 E는 콩잎 원료에서 859.0 mg/100 g이 검출되었고 발효 전에는 2,316.7 mg/100 g이 검출되었고 발효 후 2,492.6 mg/100 g으로 약간 증가하는 결과를 나타내었다.

표. 콩잎 원료 및 혼합종균(P1201+BMK184) 콩잎 발효 전·후의 비타민 조성

Contents ^b	Samples		
	원료	발효 전 (0 h)	발효 후 (72 h)
Water-soluble vitamin (mg/100 g)			
Vitamin B2	0.1±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01
Vitamin B3	19.0±0.95	70.1±3.51	130.6±6.53
Vitamin B5	175.9±8.80	226.4±11.32	131.2±6.56
Vitamin B9	9.7±0.49	15.2±0.76	25.5±1.28
Vitamin C	12.0±0.60	2.5±0.13	0.6±0.03
Fat-soluble vitamin (mg α-TE/100 g)			
Vitamin E	859.0±42.95	2,316.7±115.84	2,492.6±124.63

^bAll values are means of determinations in three independent experiments.

- 라디칼 소거활성 : DPPH, ABTS, 및 hydroxyl 라디칼 소거활성 측정 결과 모두 콩잎 발효물의 추출물 농도가 커질수록 활성은 증가하였고 콩잎 발효 후 1 mg/ml 농도 처리 시 DPPH-66.02%, ABTS-87.78%, hydroxyl-51.79%의 비교적 우수한 라디칼 소거활성을 나타내었다.

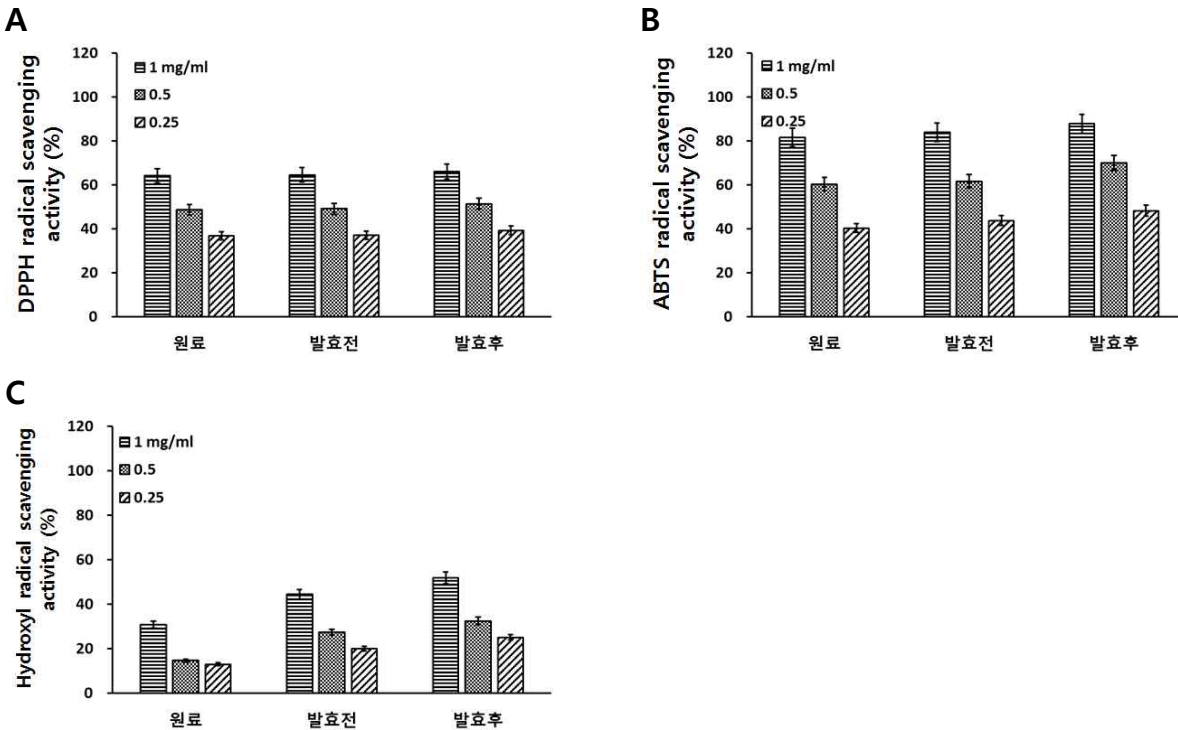


그림. 콩잎 원료 및 혼합종균(P1201+BMK184) 콩잎 발효 전·후의 라디칼 소거활성 비교. A, DPPH; B, ABTS; C, Hydroxyl.

- 소화효소 저해활성 : 소화효소 저해활성 역시 라디칼 소거활성과 경향이 일치하는 것으로 나타났다. α -glucosidase 저해활성은 원료보다는 발효 전에 활성이 좋았으며 발효 전보다는 발효 후에 1 mg/ml 농도 처리 시 51.79%의 저해활성을 나타내었다. 지방 분해효소 저해활성 역시 추출물의 처리 농도가 커질수록 활성이 증가하였고 1 mg/ml 농도 처리 시 원료는 35.13%를 나타내었고 발효 전에는 38.44%였으나 발효 후에 50.46%로 저해활성이 증가하였다.

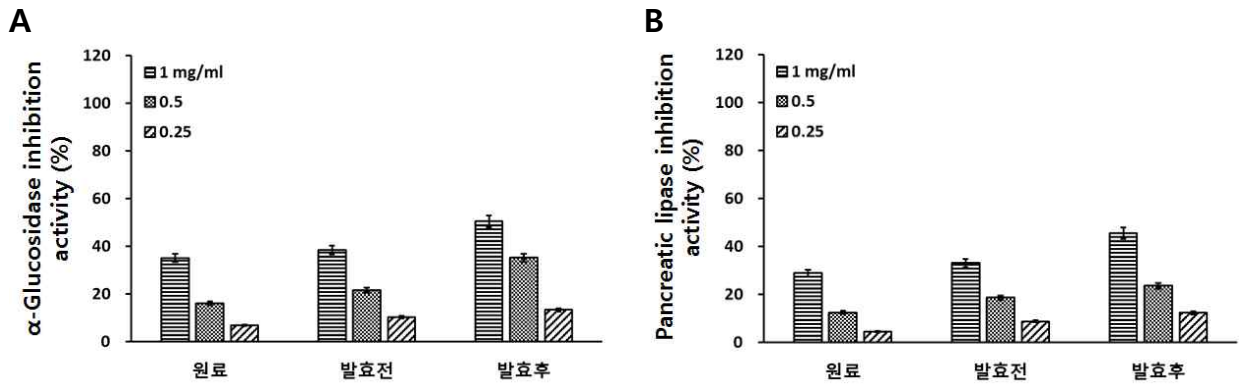


그림. 콩잎 원료 및 혼합종균(P1201+BMK184) 콩잎 발효 전·후의 소화효소 저해활성 비교. A, α -Glucosidase; B, pancreatic lipase.

2-2-11-4. 오미자와 파바톤 콩잎 혼합소재의 발효물 특성

- Fabaton 콩잎의 경우 액상차 혹은 음료 등 제조에서 가공적성은 우수하나, 콩잎 추출 시 특유의 풀 냄새로 인해 기호성이 나빠, 2016년 12월에 여성갱년기 건강기능식품 원료로 등록된 오미자를 혼합하는 방안을 연구하였음.
- 2017년 참여기업 (주)제이씨팜에서 2017년 8월에 재배하여 수확한 Fabaton 콩잎과 문경에서 구입한 오미자에 대해서 5대 영양성분, 유리아미노산 및 지방산을 분석하였고, Fabaton 콩잎에 대해서는 isoflavone 함량을 분석하였음.

○ Fabaton 콩잎과 오미자의 일반성분 분석

- 5대 영양성분: Fabaton 콩잎은 단백질을 15.7 g/100 g로 5대 영양소 중 가장 많은 양을 함유하고 있었고, 수분은 오미자가 9.3 g/100 g로 Fabaton 콩잎(6.9 g/100 g)보다 좀 더 많은 양을 함유하고 있었다. 회분은 Fabaton 콩잎이 10.2 g/100 g이었고 오미자의 회분 함량은 3.0 g/100 g을 보였음. 한편 지방산 12.6 g/100 g로 오미자가 높은 함유량을 나타냈음.

표. Fabaton 콩잎 및 오미자 원료의 5대 영양성분

Samples	Contents (g/100 g) ¹⁾				
	Moisture	Ash	Protein	Fat	Carbohydrate
Fabaton soy-leaf	6.9	10.2	15.7	4.6	62.6
<i>Schisandra chinensis</i>	9.3	3.0	7.9	12.6	67.2

¹⁾ All values are means of determinations in three independent experiments.

- 지방산: 지방산 함량은 Fabaton 콩잎보다 오미자 원료에서 함량이 높았음. 포화 지방산인 palmitic acid, stearic acid, arachidic acid, arachidonic acid, behenic acid, 및 lignoceric acid 함량은 서로 유사하였으나 불포화 지방산 중 linoleic acid는 8.98 mg/100 g로 오미자 원료에서 가장 높은 함량이 검출되었음. 지방산 총 함량 역시 Fabaton 콩잎은 1.55 mg/100 g에 불과하였으나 오미자 원료에서는 10.98 mg/100 g로 약 10배 정도 높은 함량을 보였음.

표. Fabaton 콩잎 및 오미자 원료의 지방산 함량

Contents ¹⁾ (mg/100 g)	Samples	
	Fabaton soy-leaf	<i>Schisandra chinensis</i>
Saturated fatty acids		
Palmitic acid (C16:0)	0.28	0.30
Stearic acid (C18:0)	0.08	0.06
Arachidic acid (C20:0)	0.01	nd
Arachidonic acid (C20:4n6)	0.01	nd
Behenic acid (C22:0)	0.01	nd
Lignoceric acid (C24:0)	0.01	nd
Total	0.40	0.36
Unsaturated fatty acids		
Palmitoleic acid (C16:1)	nd	0.01
Oleic acid (C18:1n9c)	0.20	1.51
Linoleic acid (C18:2n6c)	0.39	8.98
γ -Linolenic acid (C18:3n6)	0.01	nd
α -Linolenic acid (C18:3n3)	0.54	0.06
Eicosenic acid (C20:1)	nd	0.03
Eruic acid (C22:1n9)	0.01	0.01
Docosahexaenoic acid (C22:6n3)	nd	0.02
Total	1.15	10.62
Total fatty acids	1.55	10.98

¹⁾ All values are presented as the mean \pm SD of triplicate determination. ²⁾ nd: not detected.

- 유리아미노산: Fabaton 콩잎과 오미자 원료의 유리아미노산 함량은 전체적으로 오미자에 비해 Fabaton 콩잎에서 월등히 높은 양이 검출되었음. 주요 아미노산은 asparagine 유도체로 Fabaton 콩잎에서 403.65 mg/100 g으로 가장 많이 검출되었고 오미자에서는 2.0 mg/100 g이 검출되었고, 가바 역시 Fabatone 콩잎에서는 129.4 mg/100g 있었고, 오미자는 25.31 mg/100 g 있었음. 특히 유리아미노산 총 함량은 Fabaton 콩잎은 1,766.91 mg/100 g이었고, 오미자 원료는 171.97 mg/100 g로 약 10배 정도 높았음.

표. Fabaton 콩잎 및 오미자 원료의 유리아미노산 함량

Contents ¹⁾ (mg/100 g)	Samples	
	Fabaton soy-leaf	<i>Schisandra chinensis</i>
Essential amino acids		
Phosphoserine	25.18	nd
Taurine	11.00	5.72
Urea	215.96	nd
Proline	132.26	nd
Aspartic acid	148.66	14.39
Serine	44.68	4.18
Asparagine	403.65	2.00
Glutamic acid	68.53	34.75
Sarcosine	1.23	nd
Aminoadipic acid	14.72	1.20
Glycine	10.79	2.74
Alanine	76.78	6.84
Citrulline	2.42	nd
α -aminobutyric acid	15.78	5.49
Cystine	13.40	2.68
Tyrosine	28.05	3.27
β -alanine	14.36	1.95
β -aminoisobutyric acid	5.28	nd
γ -aminobutyric acid	129.40	25.31
Aminoethanol	6.92	2.21
Hydroxylysine	1.74	1.71
Ornithine	1.82	0.87
1-Methylhistidine	nd	1.43
Arginine	97.65	19.61
Totals	1,470.26	146.80
Essential amino acids		
Threonine	33.34	2.48
Valine	68.07	4.27
Methionine	5.89	1.86
Isoleucine	48.10	6.57
Leucine	44.41	3.21
Phenylalanine	47.78	2.27
Lysine	26.60	3.39
Histidine	22.46	1.12
Totals	296.65	25.17
Total amino acids	1,766.91	171.97
Ammonia	19.49	31.23

¹⁾All values are presented as the mean \pm SD of triplicate determination. ²⁾nd: not detected.

- 비타민: Fabaton 콩잎과 오미자 원료의 비타민 함량을 비교 분석한 결과는 표 1-22에 나타내었다. 오미자 원료의 경우 대부분의 비타민(B₂, B₅, B₉, C)이 검출되지 않았으며, 비타민 B₃의 경우 2.4 g/100 g이 검출되었고 토코페롤(비타민 E)은 0.7 g/100 g을 함유하고 있었음. Fabaton 콩잎은 비타민 B₃와 비타민 C가 각각 22.0, 21.9 g/100 g로 가장 많은 양을 함유하고 있었고 토코페롤은 0.5 g/100 g이 검출되었음.

표. Fabaton 콩잎 및 오미자 원료의 비타민 함량

Samples	Contents ¹ (g/100 g)					Vitamin E (mg α -TE/100 g)
	Vitamin B ₂	Vitamin B ₃	Vitamin B ₅	Vitamin B ₉	Vitamin C	
Fabaton soy-leaf	8.3	22.0	nd	0.1	21.9	0.5
<i>Schisandra chinensis</i>	nd	2.4	nd	nd	nd	0.7

¹All values are means of determinations in three independent experiments.

- 총 페놀릭스와 총 플라보노이드: Fabaton 콩잎의 총 페놀릭스 함량은 2.12 mg/mL이었고 오미자는 1.89 mg/mL를 함유하고 있었음. 총 플라보노이드 함량은 오미자의 경우 0.30 mg/mL로 아주 낮은 함유량을 나타내었으나 Fabaton 콩잎은 7.01 mg/mL로 오미자에 비해 월등히 높은 함량이 검출되었음.

표. Fabaton 콩잎 및 오미자 원료의 총 페놀릭스와 총 플라보노이드 함량

Contents ¹ (mg/mL)	Samples	
	Fabaton soy-leaf	<i>Schisandra chinensis</i>
Total phenolics	2.12	1.89
Total flavonoids	7.01	0.30

¹All values are presented as the mean \pm SD of triplicate determination

- Fabaton 콩잎 추출물을 이용하여 이소플라본을 분석한 결과를 토대로 Fabaton 콩잎에서는 daidzin(1번), genistin(2번), malonyldaidzin(3번), malonylgenistin(4번) 화합물의 함량이 비교적 높게 검출되었고, 3번인 malonylgenistin의 함량은 1471.41 μ g/g로 가장 많은 함량을 보였음. 총 isoflavone 함량은 4869.02 μ g/g 있었음.

표. Fabaton 콩잎의 이소플라본 함량

Isoflavone contents ¹ (μ g/mL)						
Glycosides		Malonylglycosides		Aglycones		Totals
Daidzin	Genistin	Daidzin	Genistin	Daidzein	Genistein	
636.42	895.16	1492.89	1471.41	280.07	93.06	4869.02

¹All values are presented as the mean \pm SD of triplicate determination.

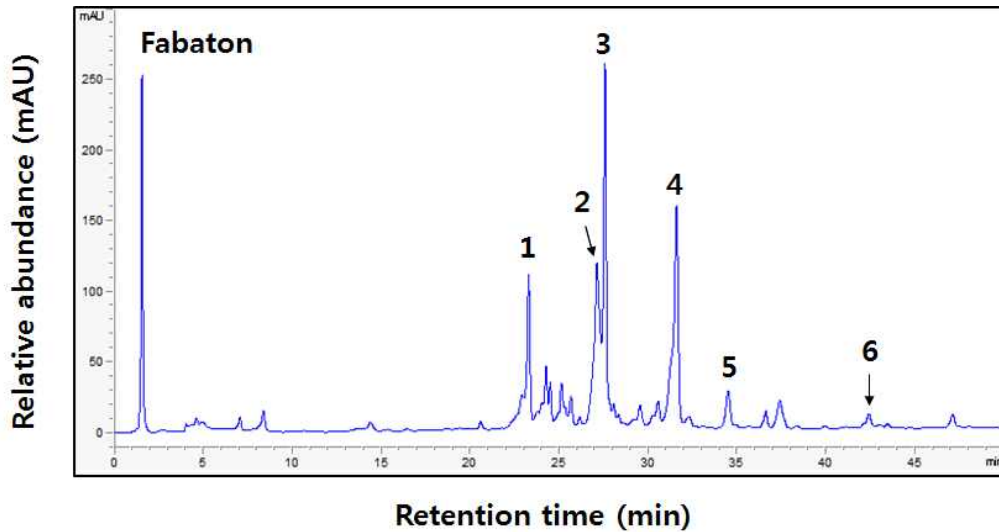


그림. Fabaton 콩잎 원료의 이소플라본 크로마토그램. 1; daidzin, 2; genistin, 3; malonyl-daidzin, 4; malonyl-genistin, 5; daidzein, 6; genistein.

○ Fabaton 콩잎 및 볶음 오미자 최적 혼합비율 선정

- 오미자 역시 한방 용어로 법제 처리하지 않을 시 신맛이 강하여, 법제 처리의 일종인 볶음처리를 150°C에서 10분간 처리한 후 Fabaton 콩잎과 볶음 오미자 분말을 각각 9:1, 8:2, 7:3, 및 6:4 비율로 혼합하고 이를 티백에 일정량 담아 아래의 그림과 같이 차 형태로 걸러낸 후 경남과학기술대학교 학부생 30명을 대상으로 각종 맛에 관한 관능평가를 실시하였고, 이 혼합물들을 사용하여 총 페놀릭스와 DPPH 라디칼 소거활성을 측정하였음.

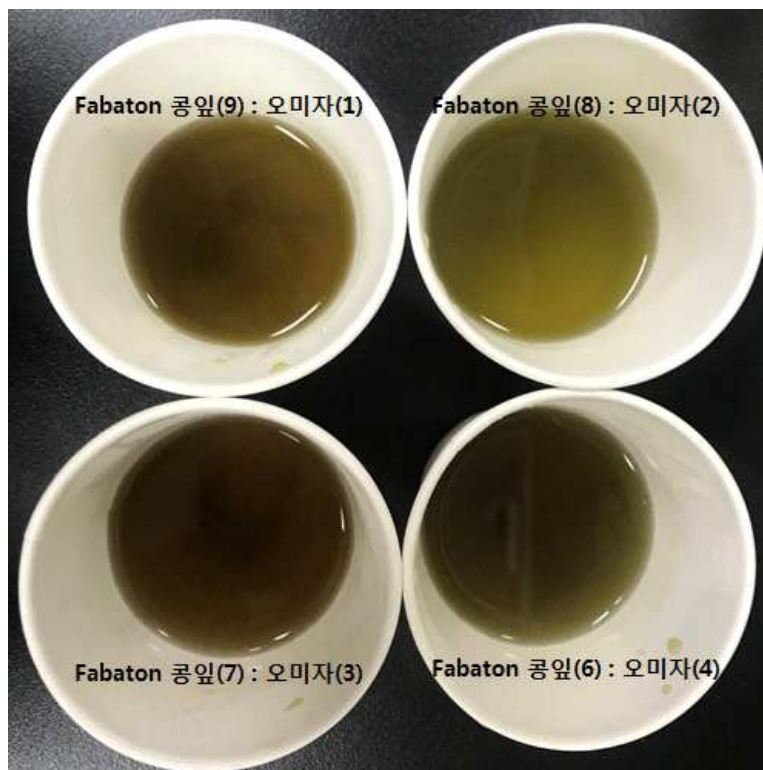


그림. Fabaton 콩잎 및 볶음 오미자 혼합 액상차.

- Fabaton 콩잎과 볶음 오미자 혼합비율에 따른 관능평가 결과는 떫은맛은 Fabaton 콩잎의 비율이 높은 9:1과 8:2 혼합비율에서 가장 많이 느껴졌으며, 7:3과 6:4 혼합비율에서는 오미자 비율이 높은 관계로 모두 떫은맛이 약하였으나, 신맛을 보였고 냄새 역시 오미자 비율 높을 수록 콩잎 특유의 냄새가 저감되어 높은 점수를 획득하였음.

표. Fabaton 콩잎과 볶음 오미자 혼합비율에 따른 차 형태의 관능평가

Index	Mixture ratio of soy-leaf and <i>S. chinensis</i>			
	9:1	8:2	7:3	6:4
Sourness	1.8	1.8	3.6	3.6
Bitterness	4.2	4.0	3.4	3.0
Color	3.4	3.6	2.8	2.7
Smell	2.0	2.4	3.5	3.6

- 총 페놀릭스와 총 플라보노이드: Fabaton 콩잎 함량이 높을수록 총 페놀릭스 함량에는 커다란 차이가 없었으나, 총 플라보노이드 함량은 높은 경향을 보였음.

표. Fabaton 콩잎과 볶음 오미자 혼합비율에 따른 총 페놀릭스와 총 플라보노이드 함량

Mixture ratio of soy-leaf and <i>S. chinensis</i>	Index	
	Total phenolics	Total flavonoids
9 : 1	2.15	6.61
8 : 2	2.14	5.65
7 : 3	2.13	4.26
6 : 4	2.12	3.69

- 이소플라본: HPLC를 이용하여 이소플라본을 분석한 결과는 아래표와 같았음. Fabaton 콩잎과 오미자 혼합물에서는 공통적으로 6종류의 이소플라본이 검출되었음. 특히 malonyl-daidzin과 malonyl-genistin의 함량이 가장 높았음. 한편 glycosides(daidzin 및 genistin) 함량은 9:1 비율에서 1,362.15 $\mu\text{g/mL}$ 로 가장 많았으며 오미자 비율이 증가함에 따라 조금씩 감소하는 추세를 나타내었고, 6:4 비율에서는 977.04 $\mu\text{g/mL}$ 가 검출되었다. 이소플라본 총 함량 역시 9:1 비율에서 4307.61 $\mu\text{g/mL}$ 로 가장 높았고 6:4 비율에서는 3387.05 $\mu\text{g/mL}$ 로 오미자 비율에 비례하여 조금 낮은 함량을 보였음.

표. Fabaton 콩잎과 볶음 오미자 혼합비율에 따른 이소플라본 함량

Mixture ratio (%)	Isoflavone contents ¹⁾ ($\mu\text{g/ml}$)						Totals
	Glycosides		Malonylglycosides		Aglycones		
	Daidzin	Genistin	Daidzin	Genistin	Daidzein	Genistein	
9:1	537.27	824.88	1330.31	1291.42	253.92	69.81	4307.61
8:2	512.98	762.16	1300.94	1247.50	256.36	84.11	4164.05
7:3	453.30	642.18	1153.38	1092.65	283.97	75.10	3700.59
6:4	415.56	561.48	1050.59	986.00	322.51	50.90	3387.05

¹⁾All values are presented as the mean \pm SD of triplicate determination.

- 생리활성: DPPH 라디칼 소거활성은 9:1 혼합비율에서 69%로 가장 우수하였으나 혼합비율에 따른 차이는 크게 없었음. ABTS 라디칼 소거활성은 Fabaton 콩잎의 비율이 적어질수록 활성이 낮아지는 경향을 나타내었으나 이 역시 큰 차이는 없었음. Hydroxyl 라디칼 소거활성 또한 9:1 혼합비율에서 39%로 가장 높았으나 조금씩 감소하여 6:4 비율에서는 30%로 약간 감소하였음. FRAP 환원력은 2.12에서 2.0 수준으로 모두 유사하였음. α -glucosidase 저해활성은 62.23%에서 58.58%로 대부분 유사하였고 pancreatic lipase는 9:1 혼합비율에서 43.28%로 가장 높았으며 Fabaton 콩잎 비율이 증가할수록 조금씩 감소하여 6:4 혼합비율에서는 26.33%로 약간 감소하는 경향을 보였음. 따라서 본 연구 결과를 토대로 관능평가와 생리활성이 전체적으로 우수한 Fabaton 콩잎과 오미자 7:3 혼합비율이 최적인 것으로 판단되었음.

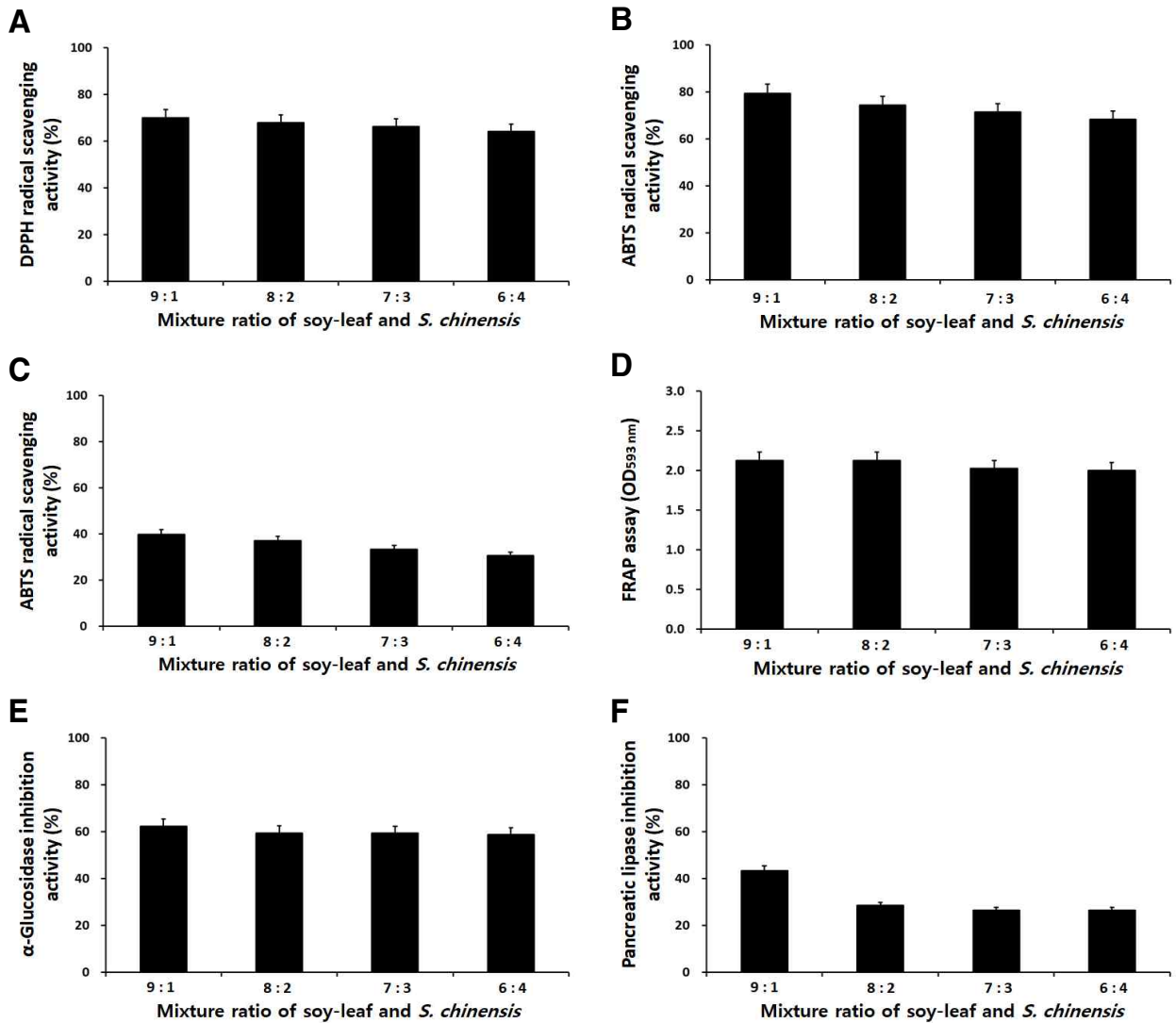


그림. Fabaton 콩잎과 볏짚 오미자 혼합비율에 따른 생리활성. A; DPPH, B; ABTS, C; hydroxyl, D; FRAP, E; α -glucosidase 및 F; pancreatic lipase.

○ Fabaton 콩잎과 볶음 오미자의 유산발효물 제조

- 단독 혹은 혼합종균 이용 유산발효물 제조: 1차와 2차 년도에 최종 선발된 생균제제 *Lactobacillus plantarum* P1201 균주와 *Lactobacillus brevis* WCP02 균주 단독 혹은 혼합 종균을 이용하여 Fabaton 콩잎과 볶음 오미자 분말(7:3)에 설탕 2.5%를 첨가한 뒤 121°C에서 15분간 살균하여 각각의 균주 배양액을 2.5%씩 접종하여 30°C에서 72시간 유산발효를 진행하였음.
- 이화학적 특성 비교: P1201 단독의 경우 pH는 4.53에서 발효 후 3.45로 감소하였고 산도는 0.16%에서 0.21%로 약간 증가하였다. WCP02 단독균주는 산 생성력이 P1201보다는 약하였음. 한편 혼합균주를 이용한 발효물 또한 pH는 4.54에서 3.97로 P1201 혹은 WCP02 단독균주의 산 생성력을 보완하는 것으로 판단됨.

표. 유산균 단독 혹은 혼합 종균에 의한 Fabaton 콩잎과 오미자 볶음 오미자 발효물의 이화학적 특성 Index¹⁾

Strain / Fermentation time (h)	pH	Acidity (% as lactic acid)	Viable cell numbers (log cfu/mL)		Enzymatic activities (U/mL)	
			<i>Lac. plantarum</i>	<i>Lac. brevis</i>	β -glucosidase	GADase
<i>Lac. plantarum</i> P1201						
0	4.53	0.18	7.74	-	3.2	>0.01
72	3.45	0.21	12.36	-	26.2	>0.01
<i>Lac. brevis</i> WCP02						
0	4.66	0.15	-	7.52	2.8	2.2
72	4.12	0.17	-	11.36	28.1	18.9
<i>Lac. plantarum</i> P1201+ <i>Lac. brevis</i> WCP02						
0	4.54	0.16	4.52	3.46	3.0	1.6
72	3.97	0.18	7.25	6.12	26.4	17.3

¹⁾All values are means of determinations in three independent experiments.

- 유리아미노산: Fabaton 콩잎과 볶음 오미자(7:3) 발효물의 유리 아미노산 함량을 분석한 결과 proline, aspartic acid, serine, glutamic acid, GABA 등의 대부분의 아미노산들은 발효 전보다는 발효 후에 조금씩 증가하는 것으로 나타났고, 또한 필수 아미노산 역시 발효 후 증가하였고 혼합균주를 이용한 콩잎 발효물의 경우 유리아미노산 총 함량이 1932.75 mg/100 g로 가장 크게 증가하였음.

표. 유산균 단독 혹은 혼합 종균에 의한 Fabaton 콩잎과 오미자 볶음 오미자 발효물의 유리 아미노산 함량

Contents ¹⁾ (mg/100 g)	Strain /Fermentation time (h)					
	P1201		WCP02		PW	
	0	72	0	72	0	72
Non-essential amino acids						
Proline	117.99	140.58	122.49	146.19	121.19	152.58
Aspartic acid	125.12	150.30	132.59	167.67	132.50	161.24
Asparagine	349.12	368.37	355.26	340.13	351.61	384.59
β -aminoisobutyric acid	9.73	9.17	10.23	7.32	9.48	8.39
γ -aminobutyric acid	104.44	104.60	107.59	111.96	105.43	120.49
Aminoethanol	4.90	6.19	5.12	6.13	4.79	6.87
Hydroxylysine	1.49	1.57	1.48	1.38	1.55	1.58
Ornithine	1.56	2.60	1.58	72.91	1.54	68.28
Arginine	80.33	91.54	81.57	0.72	81.55	2.05
Essential amino acids						
Threonine	28.83	31.54	29.77	36.58	29.73	32.93
Valine	60.79	71.92	62.63	79.00	62.07	74.96
Methionine	3.73	2.08	3.76	3.74	3.60	2.03
Isoleucine	44.34	49.55	45.89	59.92	45.07	49.79
Leucine	33.81	52.20	34.91	59.99	34.20	51.93
Phenylalanine	45.95	47.18	47.35	61.92	45.32	48.88
Lysine	19.11	31.17	19.52	17.76	19.40	22.95
Histidine	18.33	19.49	18.78	20.85	18.56	21.10

¹⁾All values are presented as the mean \pm SD of triplicate determination. ²⁾nd: not detected.

- 총 페놀릭스 및 총 플라보노이드 함량 비교: 단독 또는 혼합균주를 이용한 Fabaton 콩잎과 볶음 오미자(7:3) 발효물의 총 페놀릭스 함량은 발효 전보다는 발효 후에 조금씩 증가하는 경향을 나타내었다. 이는 단독 또는 혼합균주에 따른 차이는 크게 보이지 않았다. 그러나 총 플라보노이드 함량은 혼합균주를 이용한 콩 발효물에서 5.54 mg/g로 가장 높게 증가하였음.

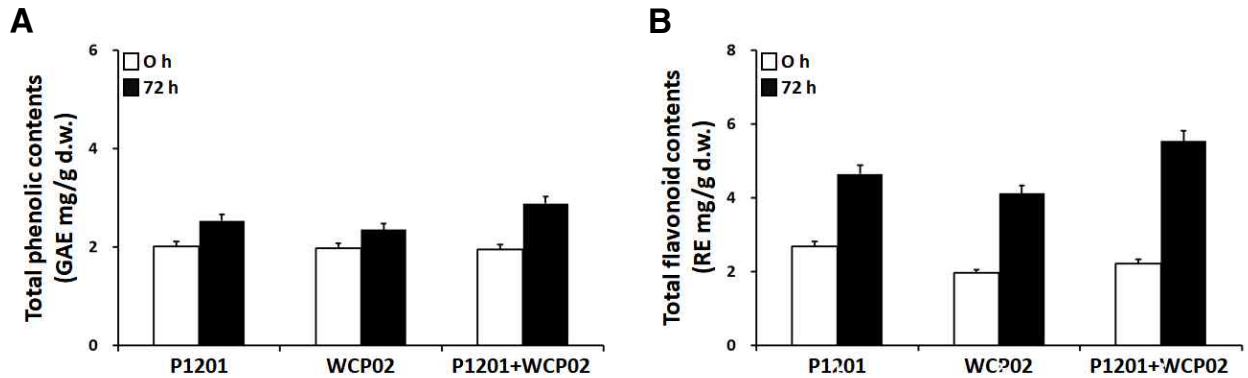


그림. 유산균 단독 혹은 혼합 종균에 의한 Fabaton 콩잎과 오미자 볶음 오미자 발효물의 총 페놀릭스 및 총 플라보노이드 함량. A; total phenolics 및 B; total flavonoids.

- 이소플라본 함량 비교: Fabaton 콩잎과 볶음 오미자(7:3) 발효물의 이소플라본 분석 결과는 아래에 나타내었다. 단독 혹은 혼합균주를 이용한 Fabaton 콩잎과 볶음 오미자(7:3) 발효물은 모두 공통적으로 glycosides(1-2번)와 malonyl-glycosides(3-4번) 함량이 발효 후 감소하고 이에 비례적으로 aglycones(5-6번) 함량이 증가하였다(그림1-18). 단독과 혼합균주에 대한 차이는 크게 없었으며, 발효 후 이소플라본 총 함량은 P1201 단독 균주 발효물에서 2131.77 $\mu\text{g/mL}$ 로 가장 많았으며 혼합균주를 이용한 콩잎 발효물의 경우 1856.69 $\mu\text{g/mL}$ 가 검출됨.

표. 유산균 단독 혹은 혼합 종균에 의한 Fabaton 콩잎과 오미자 볶음 오미자 발효물의 이소플라본 함량

Strain / Fermentation time (h)	Isoflavone contents ¹⁾ ($\mu\text{g/ml}$)						Totals
	Glycosides		Malonylglycosides		Aglycones		
	Daidzin	Genistin	Daidzin	Genistin	Daidzein	Genistein	
<i>L. plantarum</i> P1201							
0	683.97	661.05	261.96	197.41	240.76	58.36	2103.52
72	672.65	626.54	231.47	195.24	258.25	147.62	2131.77
<i>L. brevis</i> WCP02							
0	659.12	622.27	267.34	175.52	214.72	58.27	1997.23
72	598.36	383.89	193.63	164.39	293.09	165.22	1798.58
<i>L. plantarum</i> P1201+ <i>L. brevis</i> WCP02							
0	703.66	692.98	291.19	228.73	266.13	84.23	2266.93
72	613.00	468.90	207.33	157.53	280.52	129.42	1856.69

¹⁾All values are presented as the mean \pm SD of triplicate determination.

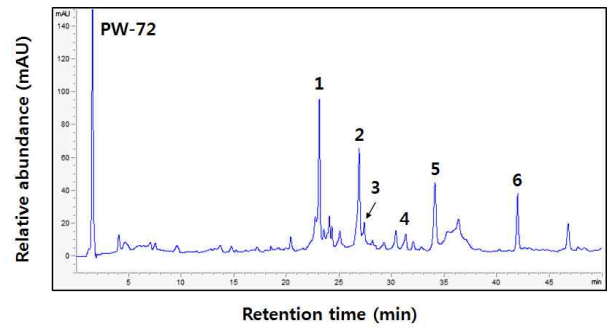
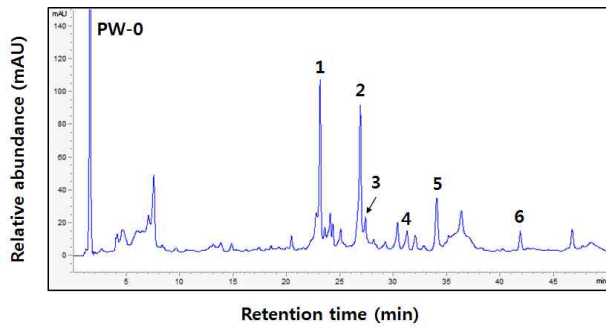
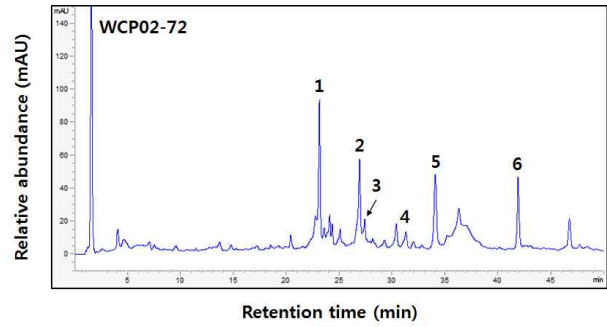
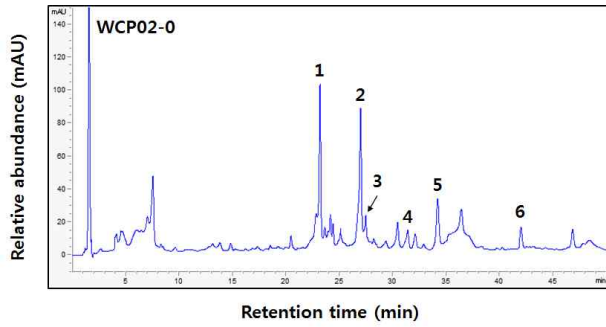
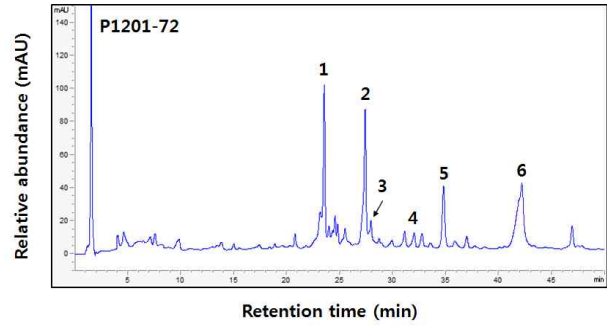
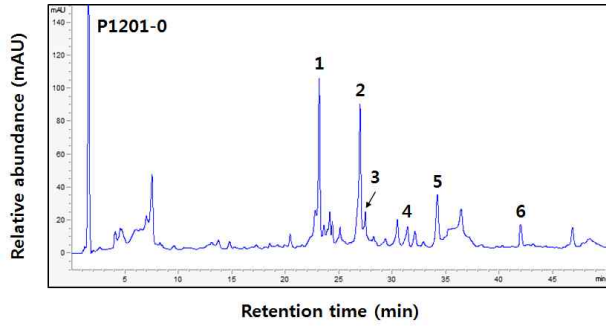


그림. 유산균 단독 혹은 혼합 종균에 의한 Fabaton 콩잎과 오미자 볶음 오미자 발효물의 이소플라본 크로마토그램. 1; daidzin, 2; genistin, 3; malonyl-daidzin, 4; malonyl-genistin, 5; daidzein, 6; genistein.

- 생리활성: 항산화 활성은 총 페놀릭스 및 총 플라보노이드 함량과 유사한 결과를 나타냄. 즉 발효 전보다 발효 후에 그 활성이 증가하였으며 특히 혼합균주를 이용하였을 시 DPPH(78%), ABTS(71%), hydroxyl(66%), 및 FRAP 환원력(2.77)이 가장 크게 증가하였음, 한편 항산화 활성과 마찬가지로 소화효소 저해활성 역시 발효 후 크게 증가하는 경향을 나타내었고 이는 혼합균주를 이용하였을 시 가장 우수한 저해활성을 나타내었다. 이러한 연구 결과를 바탕으로 전체적으로 생리활성물질 함량과 항산화 활성 및 소화효소 저해활성이 우수하였던 P1201+WCP02 혼합균주 발효 방식을 이용하여 이후 연구에서는 발효 시간에 따른 변화를 살펴보았음.

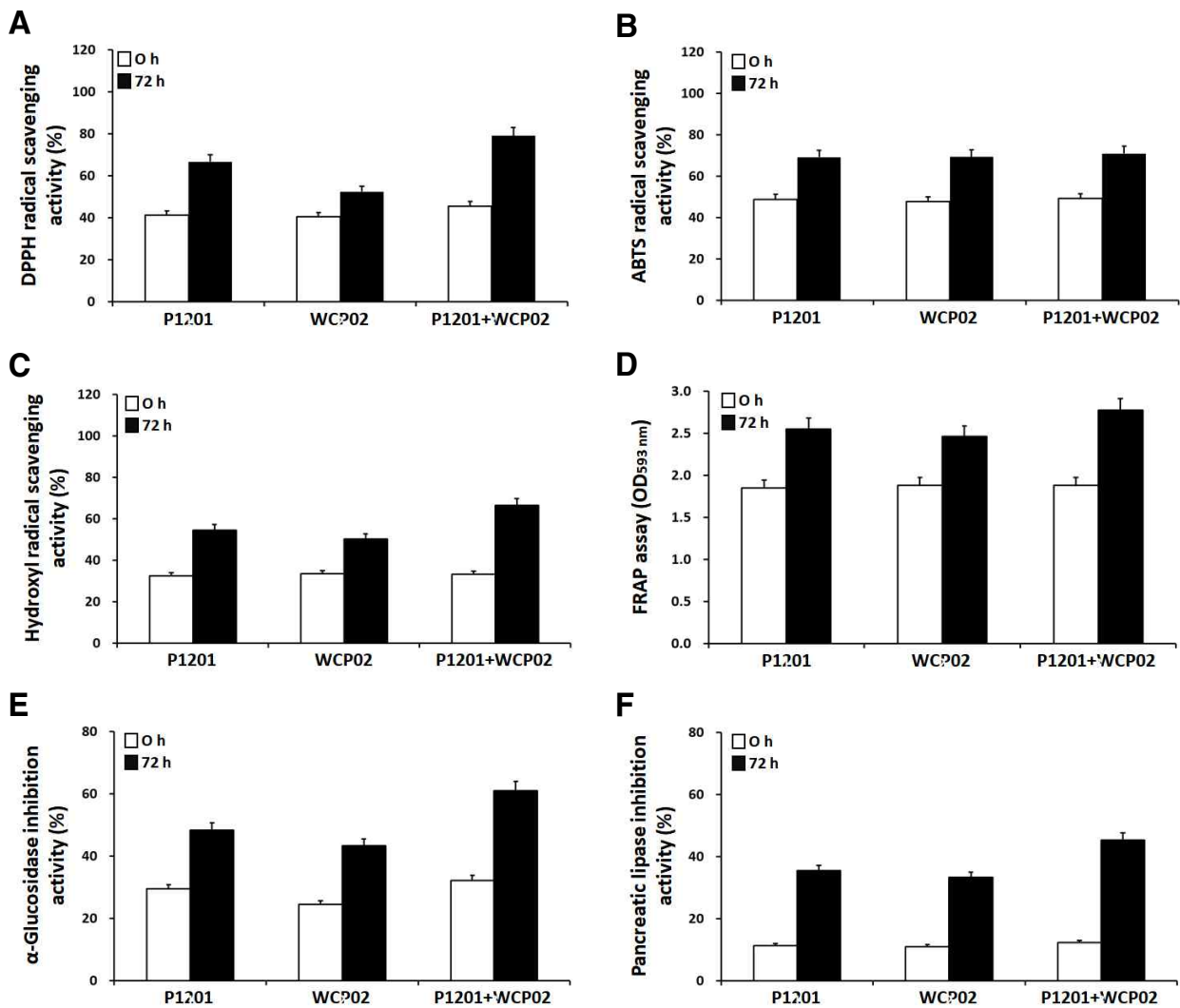


그림. Fabaton 콩잎 발효물의 항산화 활성. A; DPPH, B; ABTS, C; hydroxyl, D; FRAP, E; α -glucosidase 및 F; pancreatic lipase.

○ Fabaton 콩잎과 볶음 오미자의 유산발효 시간별 특성

- 이화학적 특성 변화: 발효 시간에 따른 이화학적 특성 분석 결과는 아래표와 같았음. pH는 발효 초기 4.39에서 발효 72시간 후 3.97로 감소하였으며, 이에 따라 산도는 0.16에서 0.19%로 약간 증가하였다. P1201 및 WCP02 균주의 생균수는 발효가 진행됨에 따라 증가한 후 발효 60시간째 최대 균수를 나타낸 후 약간 감소하였고, 효소 활성 역시 균주 변화와 동일한 경향을 나타냄

표. Fabaton 콩잎과 볶음 오미자 발효 시간에 따른 이화학적 특성

Strain/ Fermentation time (h)	Index ¹⁾					
	pH	Acidity (%, as lactic acid)	Viable cell numbers (log cfu/mL)		Enzymatic activities (U/mL)	
			<i>Lac.</i> <i>plantarum</i>	<i>Lac.</i> <i>brevis</i>	β -glucosidas e	GADase
0	4.39	0.16	4.53	3.53	2.2	1.3
12	4.48	0.16	6.92	5.92	10.1	8.3
24	4.34	0.17	7.18	6.18	15.6	12.9
48	4.21	0.18	7.86	6.86	22.4	17.7
60	4.16	0.19	7.88	6.78	26.8	20.6
72	3.97	0.19	7.09	6.09	24.4	15.3

¹⁾ All values are means of determinations in three independent experiments.

- 총 페놀릭스 및 총 플라보노이드 함량 변화: 발효 시간에 따른 총 페놀릭스와 총 플라보노이드 함량 변화는 증가하는 경향을 보였음. 총 페놀릭스 함량은 발효 초기 1.31 mg/g에서 발효 72시간째 까지 꾸준히 증가하여 2.26 mg/g 있었고, 총 플라보노이드 함량은 발효 초기 2.23 mg/g에서 발효 60시간째까지 급격히 증가하여 5.48 mg/g 있었고 이후 약간 감소하여 5.23 mg/g을 나타내었음.

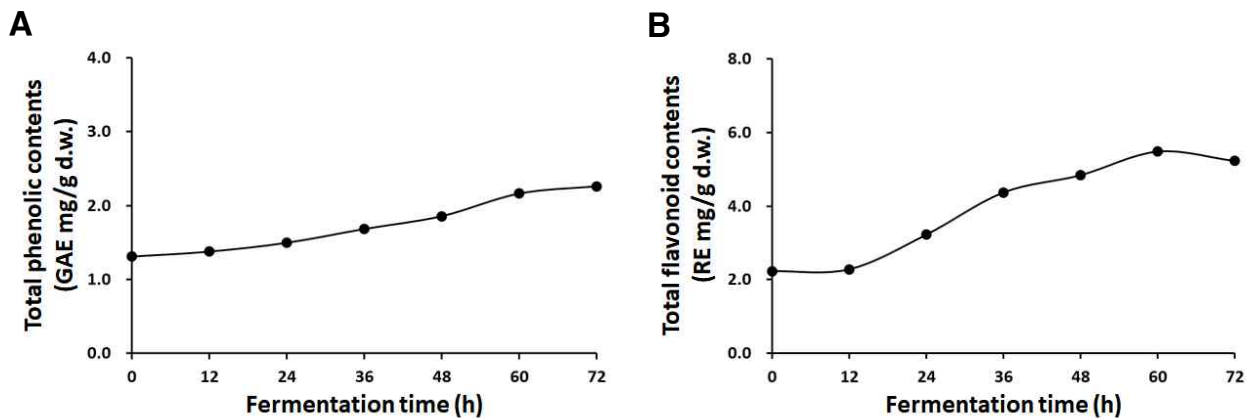


그림. Fabaton 콩잎과 볶음 오미자 발효 시간에 따른 총 페놀릭스 및 총 플라보노이드 함량. A; total phenolic 및 B; total flavonoid.

- 이소플라본 함량 변화: 발효 과정 중 이소플라본 함량을 분석한 결과 glycosides 함량은 발효가 진행됨에 따라 감소하는 경향을 보였고, 이에 상응하여 aglycone 형태는 증가하였다. 발효 초기 daidzin 873.64 μ g/g, genistin 520.4 μ g/g에서 발효 72시간째 766.51 g/g, genistin 459.21 μ g/g로 감소하였고, daidzein 92.66 μ g/g, gensitin 17.7 μ g/g에서 발효 72시간째 296.42 μ g/g, gensitein 115.51 μ g/g로 증가하였음.

표. Fabaton 콩잎과 볶음 오미자 발효 시간에 따른 이소플라본 함량

Strain / Fermentation time (h)	Isoflavone contents ¹⁾ ($\mu\text{g/ml}$)						Totals
	Glycosides		Malonylglycosides		Aglycones		
	Daidzin	Genistin	Daidzin	Genistin	Daidzein	Genistein	
0	873.64	520.40	309.25	239.93	92.66	17.70	2,053.58
12	858.54	498.43	335.45	186.83	134.08	70.98	2,084.31
24	853.83	479.86	360.89	205.59	148.65	79.80	2,128.62
36	814.02	508.89	386.99	224.23	164.25	93.64	2,192.02
48	810.04	503.51	324.69	241.53	373.20	129.16	2,382.13
60	808.37	506.08	357.08	283.88	383.86	180.26	2,519.53
72	766.51	459.21	342.73	207.47	296.42	115.51	2,187.85

¹⁾All values are presented as the mean \pm SD of triplicate determination.

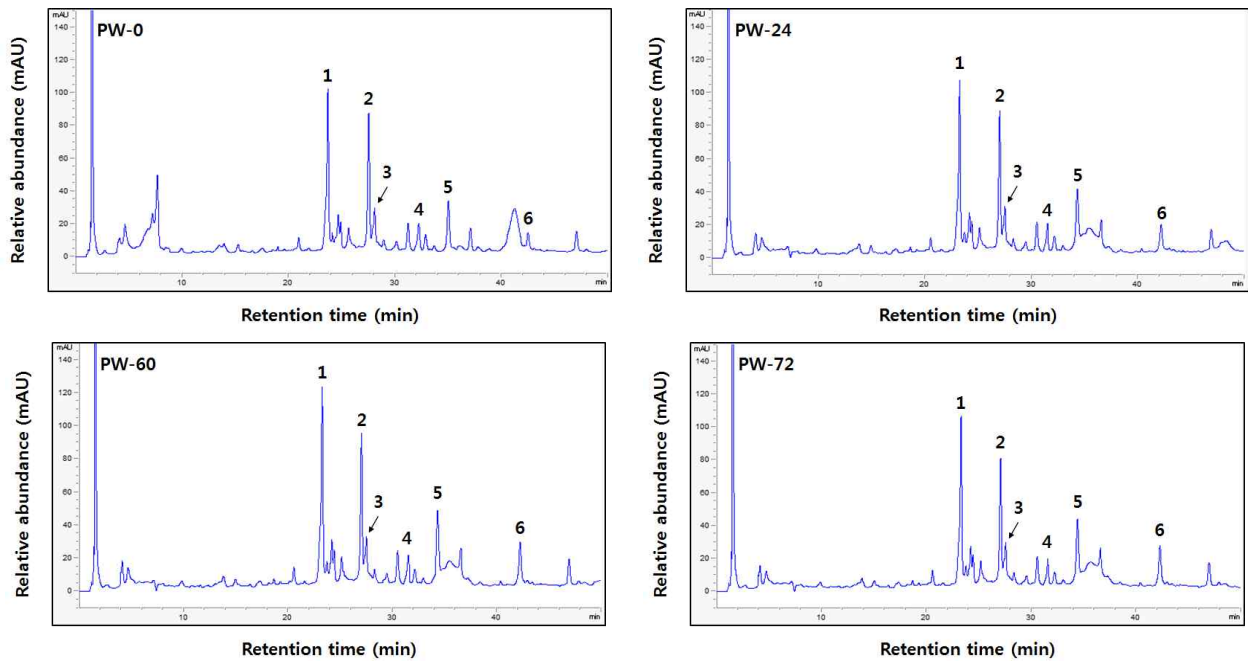


그림. Fabaton 콩잎과 볶음 오미자 발효 시간에 따른 이소플라본 크로마토그램.

1; daidzin, 2; genistin, 3; malonyl-daidzin, 4; malonyl-genistin, 5; daidzein, 6; genistein.

- 생리활성: 발효가 진행됨에 따라 항산화 활성과 소화효소 저해활성은 발효 60시간까지 서서히 증가하여 이후 약간 감소하는 경향을 보였음. DPPH 라디칼 소거활성은 36.73%에서 발효 60시간째 65.59%로 증가하였고, ABTS 라디칼 소거활성도 동일한 결과로서 발효 60시간 때 75.77%로 가장 우수한 소거활성을 나타내었고 이후 약간 감소하였음. Hydroxyl 라디칼 소거활성 역시 발효 초기 16.23%에서 발효 60시간째 42.39%로 증가하였고, FRAP 환원력 역시 발효 60시간째 최대 활성을 보였음. α -Glucosidase 저해활성은 21.25%에서 발효 60시간째 44.22%로 증가하였고, 췌장-lipase 저해활성은 발효 24시간까지 거의 변화가 없다가 발효 36시간째부터 증가하여 발효 60시간째 37.86%로 증가한 후 이후 약간 감소하였음

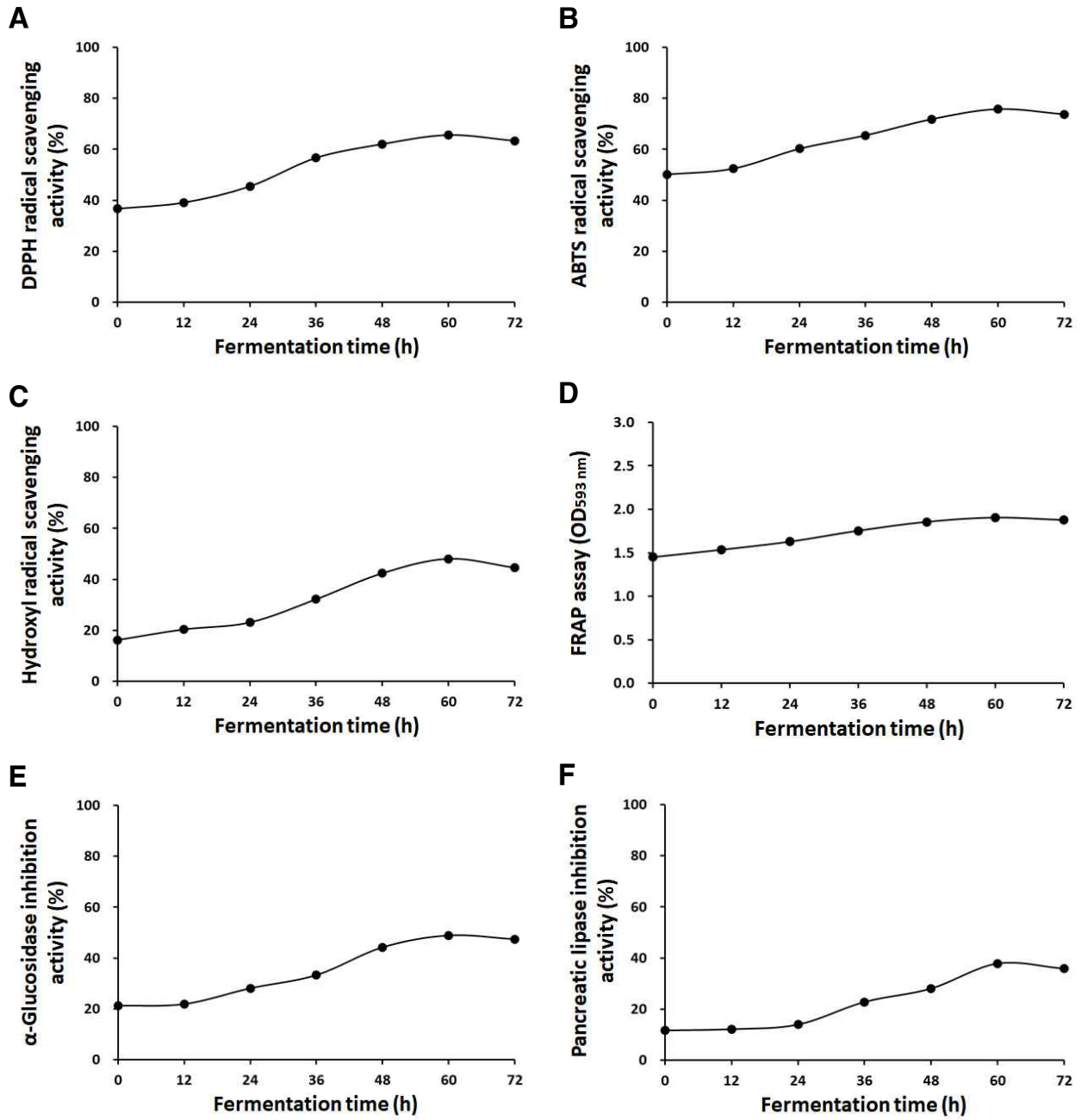


그림. Fabaton 콩잎과 볶음 오미자 발효 시간에 따른 생리활성. A; DPPH, B; ABTS, C; hydroxyl, D; FRAP, E; α -glucosidase 및 F; pancreatic lipase.

2-2-12. 미생물이용 생물전환 II (결과-11)

- 송이버섯 균사체를 이용한 콩의 비배당체 이소플라본 전환 연구
 - 송이버섯 균사체 12일 동안 발효시킨 결과 아래 그림에서 보는 바와 같이 콩 전체로 송이버섯 균사체가 확산된 것을 확인할 수 있었음

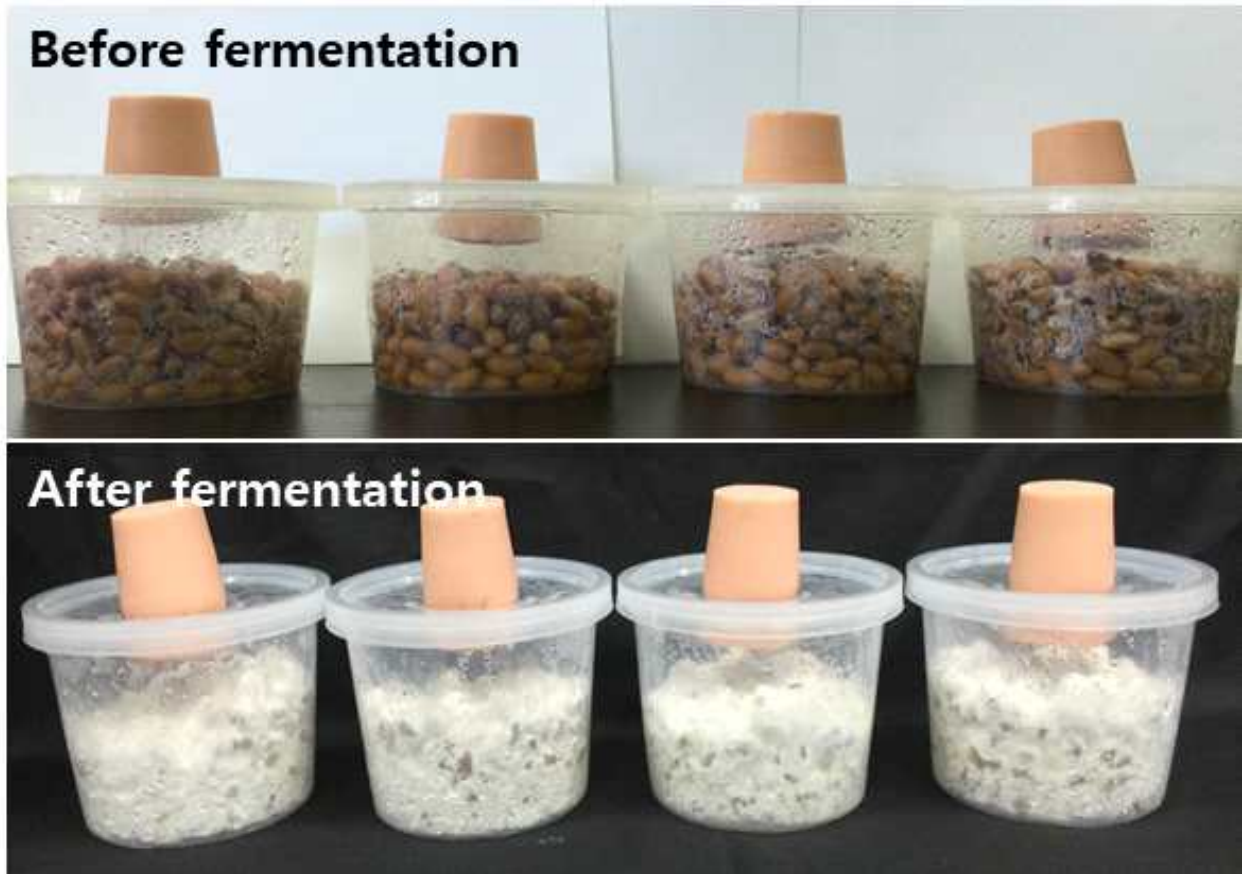


그림. 송이버섯 균사체 이용 콩발효물.

- 송이버섯 균사체를 이용한 콩 고체발효 중 isoflavone의 전형적인 HPLC 크로마토그램 변화는 아래와 같았음. 콩의 경우 genistin (peak 3) 및 malonylgenistin (peak 6)가 주요 피크였음. 한편 증자 처리에 의해 malonylglycosides 형태(malonyldaidzin, malonylglycitin 및 malonylgenistin)에서 glycosides 형태(daidzin, glycitin 및 genistin)로 전환되었으며, 증자 처리 및 발효에 의해 glycosides 형태는 비배당체인 aglycone 형태(daidzein, glycitein 및 genistein)로 변화됨. 송이버섯 균사체를 이용한 콩 고체발효 중 isoflavone 함량 변화는 표 1-23과 같았음. 콩의 총 isoflavone 함량은 2,661.54 $\mu\text{g/g}$ 이었으며, 주요 isoflavone은 daidzin 및 malonylgenistin으로 각각 746.80 $\mu\text{g/g}$ 및 1,402.74 $\mu\text{g/g}$ 이었고 aglycone인 daidzein은 43.21 $\mu\text{g/g}$, glycitein은 11.72 $\mu\text{g/g}$ 및 genistein은 52.68 $\mu\text{g/g}$ 이었으며, 증자 처리(발효 0일째) 총 isoflavone 함량은 증가하여 3,019.51 $\mu\text{g/g}$ 이었고 malonylglycosides 형태인 malonyldaidzin, malonylglycitin 및 malonylgenistin은 증자 처리(발효 시작 전) 감소하여 각각 92.63 $\mu\text{g/g}$, 18.94 $\mu\text{g/g}$ 및 136.11 $\mu\text{g/g}$ 에서 발효 12일째 70.77 $\mu\text{g/g}$, 13.12 $\mu\text{g/g}$ 및 32.24 $\mu\text{g/g}$ 이었음. 한편 증자 처리 후 glycosides 형태인 daidzin, glycitin 및 genistin은 증가하여 각각 993.24 $\mu\text{g/g}$, 460.98 $\mu\text{g/g}$ 및 1,120.89 $\mu\text{g/g}$ 이었으나, 발효 중 감소하여 최종 53.60 $\mu\text{g/g}$, 70.24 $\mu\text{g/g}$ 및 32.54 $\mu\text{g/g}$ 을 나타내었음. 이와 반대로 비배당체인 총

aglycone 형태는 증자 처리 후(발효 시작 전) 187.90 $\mu\text{g/g}$ 로 증가하였고 발효 9일째까지 큰 폭으로 증가하여 1,452.46 $\mu\text{g/g}$ 이었고 발효 12일째는 감소하여 1,285.66 $\mu\text{g/g}$ 이었다. 특히 발효 9일째 daidzein은 721.38 $\mu\text{g/g}$, glycitein은 184.44 $\mu\text{g/g}$ 및 genistein은 546.64 $\mu\text{g/g}$ 으로 본 시료 중에 가장 높은 함량을 나타내었음

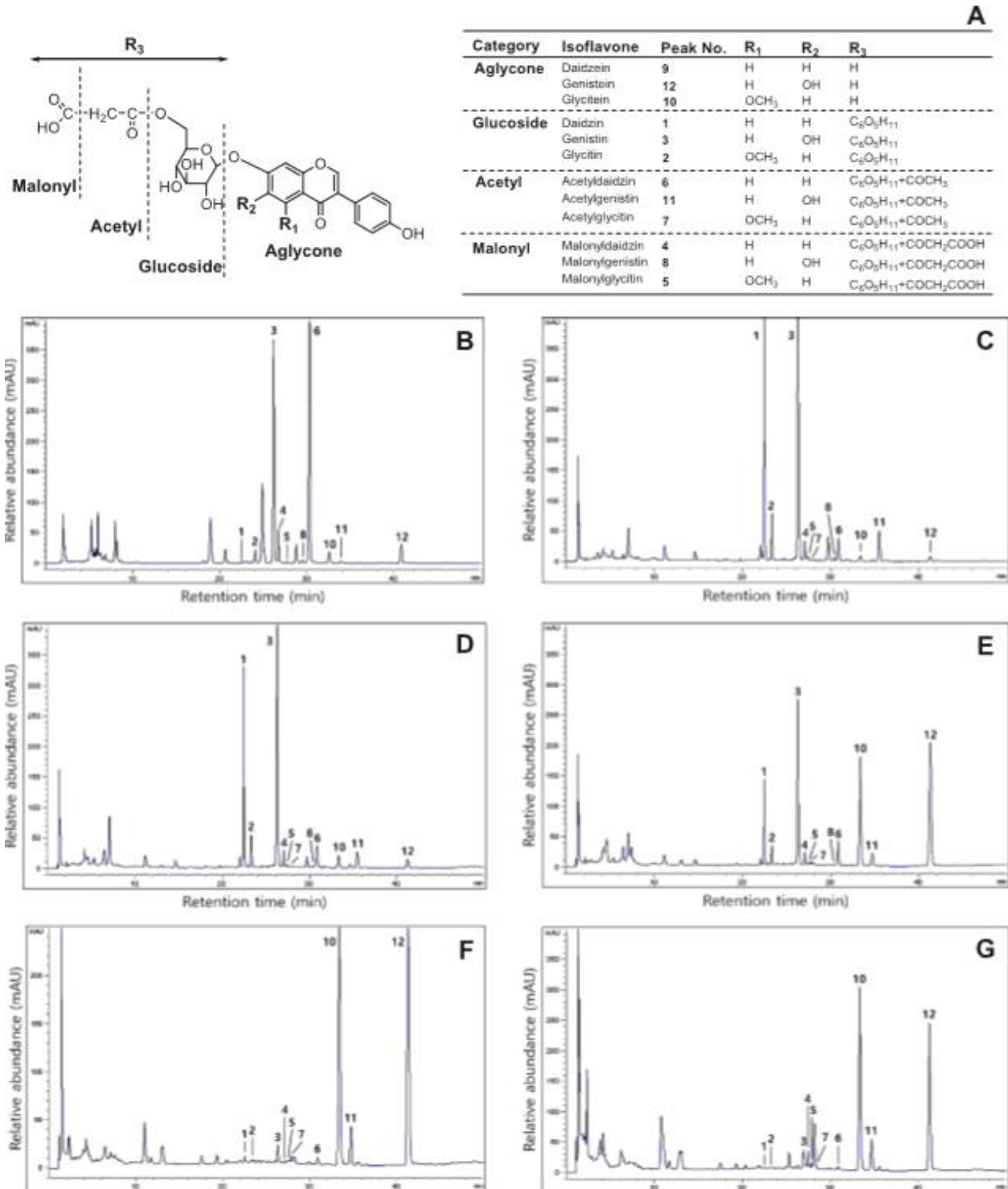


그림. 송이버섯 균사체 이용 콩발효물의 이소플라본 HPLC 크로마토그램. A. 이소플라본 화학구조, B. 수침, C. 증자(0 day), D. 3 day, E. 6 day, F. 9 day, G. 12 day.

표. 송이버섯 균사체 이용 콩발효물의 이소플라본 함량 변화

Contents ¹⁾ ($\mu\text{g/g}$)	Soaking	Fermentation time (day)				
		0	3	6	9	12
Glycosides						
Daidzin	41.62	993.24	758.79	356.09	51.89	43.60
Glycitin	178.68	460.98	320.89	216.69	73.47	70.24
Genistin	746.80	1,120.89	1,037.40	551.12	57.51	32.54
Total	220.30	1,454.22	1,079.68	572.780	125.36	113.84
Malonylglycosides						
Daidzin	156.05	92.63	76.88	38.61	31.10	70.77
Glycitin	20.43	18.94	12.01	10.44	11.16	13.12
Gensitin	1,402.74	136.11	131.28	120.38	63.36	32.24
Total	176.48	111.57	88.89	49.05	42.26	83.89
Acetylglycosides						
Daidzin	nd ²⁾	tr ³⁾	3.69	8.84	7.42	10.87
Glycitin	7.61	8.82	4.01	4.52	nd	nd
Gensitin	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Total	7.61	8.82	7.70	12.36	7.42	10.87
Aglycones						
Daidzein	43.21	20.30	43.55	421.85	721.38	633.98
Glycitein	11.72	155.43	80.88	74.87	184.44	138.85
Genistein	52.68	12.17	24.44	339.48	546.64	512.83
Total	54.93	175.73	124.43	496.720	905.82	772.83
Total isoflavones	2,661.54	3,019.51	2,493.82	2,141.89	1,748.37	1,559.04

¹⁾All values are presented as the mean \pm SD of triplicate determination.

²⁾nd: not detected.

³⁾tr: trace ($< 0.002 \mu\text{g/g}$).

- 송이버섯 균사체를 이용한 콩 발효 중 아미노산 함량 변화는 다음과 같다. 콩의 총 아미노산 함량은 각각 437.58 mg/g 이었으며, 주요 아미노산 역시 glutamic acid, aspartic acid, leucine 및 arginine로 각각 85.70 mg/g, 50.51 mg/g, 36.47 mg/g 및 33.79 mg/g 이었고, 비단백질 질소인 암모니아는 7.50 mg/g 이었다. 또한 발효가 진행됨에 따라 증가하여 발효 0일째 각각 95.19 mg/g, 55.99 mg/g, 41.56 mg/g 및 38.19 mg/g에서 발효 9일째 112.83 mg/g, 65.38 mg/g, 46.82 mg/g 및 37.68 mg/g 이었고 발효 12일째 약간 감소하여 각각 111.88 mg/g, 59.60 mg/g, 45.65 mg/g 및 35.87 mg/g 이었음. 암모니아는 발효 0일째 8.73 mg/g에서 발효 12일째까지 증가하여 최종 15.84 mg/g을 나타내었다. 필수 아미노산은 총 아미노산 중에 34.9 ~ 36.0% 차지하였다. 본 연구에서 발효 중 아미노산 함량이 증가한 것은 송이버섯 균사체의 증식과 더불어 이들이 분해하는 protease 때문인 것으로 판단됨
- 송이버섯 균사체를 이용한 콩발효물의 발효 중 지방산 함량 변화는 아래 표와 같다. 콩의 총 지방산 함량은 각각 86.23 mg/g 있었으며, 주요 지방산 역시 linoleic acid, oleic acid 및 palmitic acid로 각각 46.38 mg/g, 16.89 mg/g 및 11.62 mg/g 이었음. 또한 발효가 진행됨에 따라 증가하여 발효 0일째 각각 53.21 mg/g, 19.77 mg/g 및 13.74 mg/g에서 발효 12일째 63.23 mg/g, 23.42 mg/g 및 16.27 mg/g 이었음. 포화지방산보다는 불포화지방산이 약 4.4 - 4.5배 높았다. 본 연구에서 발효 중 지방산 함량이 증가한 것은 송이버섯 균사체의 증식과 더불어 이들이 분해하는 lipase 혹은 esterase 때문인 것으로 판단됨

표. 송이버섯 균사체 이용 콩발효물의 아미노산 함량 변화

Contents (mg/g)	Soaking	Fermentation time (day)				
		0	3	6	9	12
General amino acids						
Aspartic acid	50.51	55.99	60.02	59.63	65.38	59.60
Serine	20.87	21.49	22.52	23.33	25.55	23.01
Glutamic acid	85.70	95.19	101.33	101.05	112.83	111.88
Proline	22.44	25.10	26.76	27.19	30.33	28.94
Glycine	19.32	21.83	23.14	23.96	28.00	26.33
Alanine	21.37	23.25	24.50	24.71	28.79	30.35
Cystine	6.72	7.11	8.09	8.09	10.14	9.45
Tyrosine	12.50	14.38	15.83	16.16	18.65	18.33
Histidine	11.73	13.16	13.81	13.87	15.61	14.96
Arginine	33.79	38.19	41.18	39.74	37.68	35.87
Total	251.16	277.5	296	297.99	335.28	322.85
Essential amino acids						
Threonine	17.39	19.07	20.31	21.81	24.04	23.72
Valine	22.00	26.08	28.00	28.74	32.85	30.13
Methionine	5.79	6.22	6.35	7.41	6.40	5.72
Isoleucine	21.87	25.88	27.90	28.35	31.05	30.19
Leucine	36.47	41.56	44.46	44.89	46.82	45.65
Phenylalanine	24.04	27.62	29.62	29.71	31.58	29.00
Lysine	25.07	27.74	29.57	29.16	31.29	29.49
Total	127.56	146.43	156.64	160.91	172.74	164.410
Total amino acids	437.58	489.86	523.39	527.80	576.99	552.62
Ammonia	7.50	8.73	9.27	10.19	13.05	15.84

¹⁾All values are presented as the mean±SD of triplicate determination.

표. 송이버섯 균사체 이용 콩발효물의 지방산 함량 변화

Contents ¹⁾ (mg/g)	Soaking	Fermentation time (day)				
		0	3	6	9	12
Saturated fatty acids						
Myristic acid (C14:0)	0.09	0.11	0.13	0.13	0.13	0.12
Palmitic acid (C16:0)	11.62	13.74	15.59	15.81	15.89	16.27
Stearic acid (C18:0)	3.66	4.34	4.88	4.95	5.02	5.03
Arachidic acid (C20:0)	0.31	0.37	0.42	0.42	0.42	0.43
Total	15.37	18.19	20.6	20.89	21.04	21.42
Unsaturated fatty acids						
Palmitoleic acid (C16:1)	0.05	0.05	0.06	0.07	0.07	0.07
Oleic acid (C18:1n9c)	16.89	19.77	21.88	22.37	22.62	23.42
Linoleic acid (C18:2n6c)	46.38	53.21	60.82	61.39	62.80	63.23
γ -Linolenic acid (C18:3n6)	0.02	0.02	0.03	0.03	0.03	0.03
Gadoleic acid (C20:1)	0.17	0.20	0.23	0.23	0.22	0.24
α -Linolenic acid (C18:3n3)	6.91	7.76	8.84	8.87	8.85	8.83
Eicosadienoic acid (C20:2)	0.05	0.06	0.07	0.08	0.08	0.08
Eicosatrienoic acid (C20:3n3)	0.06	0.07	0.08	0.08	0.07	0.08
Nervonic acid (C24:1)	0.02	0.03	0.04	0.03	0.03	0.03
Total	70.53	81.14	92.01	93.12	94.74	95.98
Total fatty acids	86.23	99.73	113.07	114.46	116.23	117.86

¹⁾All values are presented as the mean±SD of triplicate determination.

- 송이버섯 균사체를 이용한 콩 고체발효 중 항산화 활성과 총 phenolics 함량 변화는 아래와 같다. 항산화 활성은 증자 처리 후(발효 0일째) 활성은 약간 증가하였고, 발효가 진행됨에 따라 활성은 급격히 증가하였음. 발효 12일째 DPPH 라디칼 소거활성은 87.0%, ABTS 라디칼 소거활성은 94.81% 및 hydroxyl 라디칼 소거활성은 42.11% 이었음. 총 phenolics 함량은 콩의 총 phenolics 함량은 3.74 GAE mg/g 이었으며, 증자처리 후(발효 0일째) 함량은 약 1.5 배 증가하였다. 발효가 진행됨에 따라 총 phenolics 함량은 급격히 증가하여 발효 0일째 5.58 GAE mg/g에서 발효 12일째 15.09 GAE mg/g을 나타내었으며, 약 4.0배 증가하였음

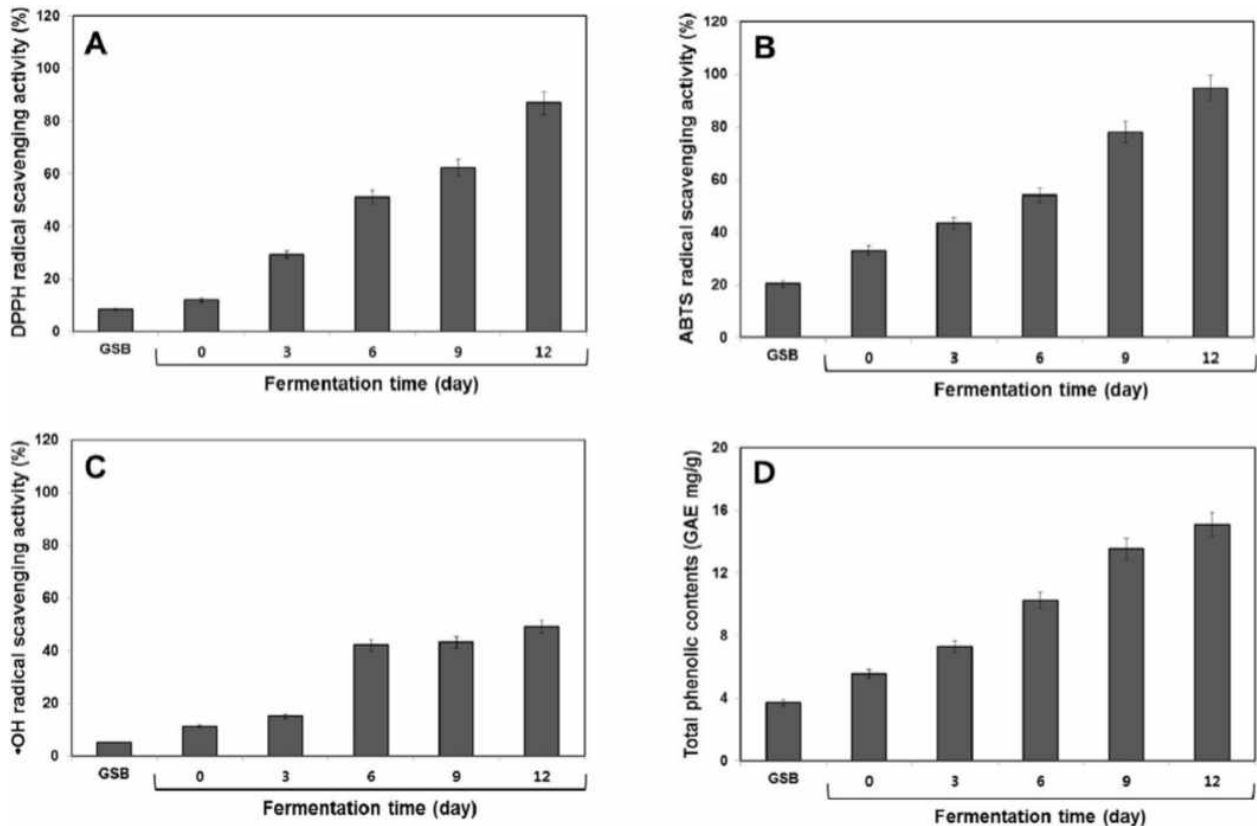


그림. 송이버섯 균사체 이용 콩발효물의 항산화 활성 및 총 phenolics 함량. A. DPPH 라디칼 소거활성, B. ABTS 라디칼 소거활성, C. hydroxyl 라디칼 소거활성 및 D. 총 phenolics 함량.

○ 송이버섯 균사체를 이용한 파바톤 콩잎의 비배당체 이소플라본 전환 연구

- 파바톤 콩잎의 송이버섯 균사체 발효 여부 확인을 위하여 파바톤 콩잎과 현미를 10:0, 9:1, 8:2 및 7:3로 설정하고 아래 그림과 같이 발효를 진행하였음. 즉, 수확된 파바톤 콩잎을 건조한 후 분쇄하고 파바톤 콩잎과 현미를 혼합한 분말에 정제수를 무게 비율 5배로 첨가하고 수화시키고 121°C에서 1시간 동안 증자 처리하고 송이버섯 균사체 액체 배양액을 접종하여 발효시키고 건조하였고, 혼합비율별 발효 양상은 아래 그림과 같으나, 파바톤 콩잎만 발효시킬 경우 균사체 완전히 생성되지 않을 것을 확인하였고 균사의 성장 정도는 8:2 비율이 가장 양호하였음

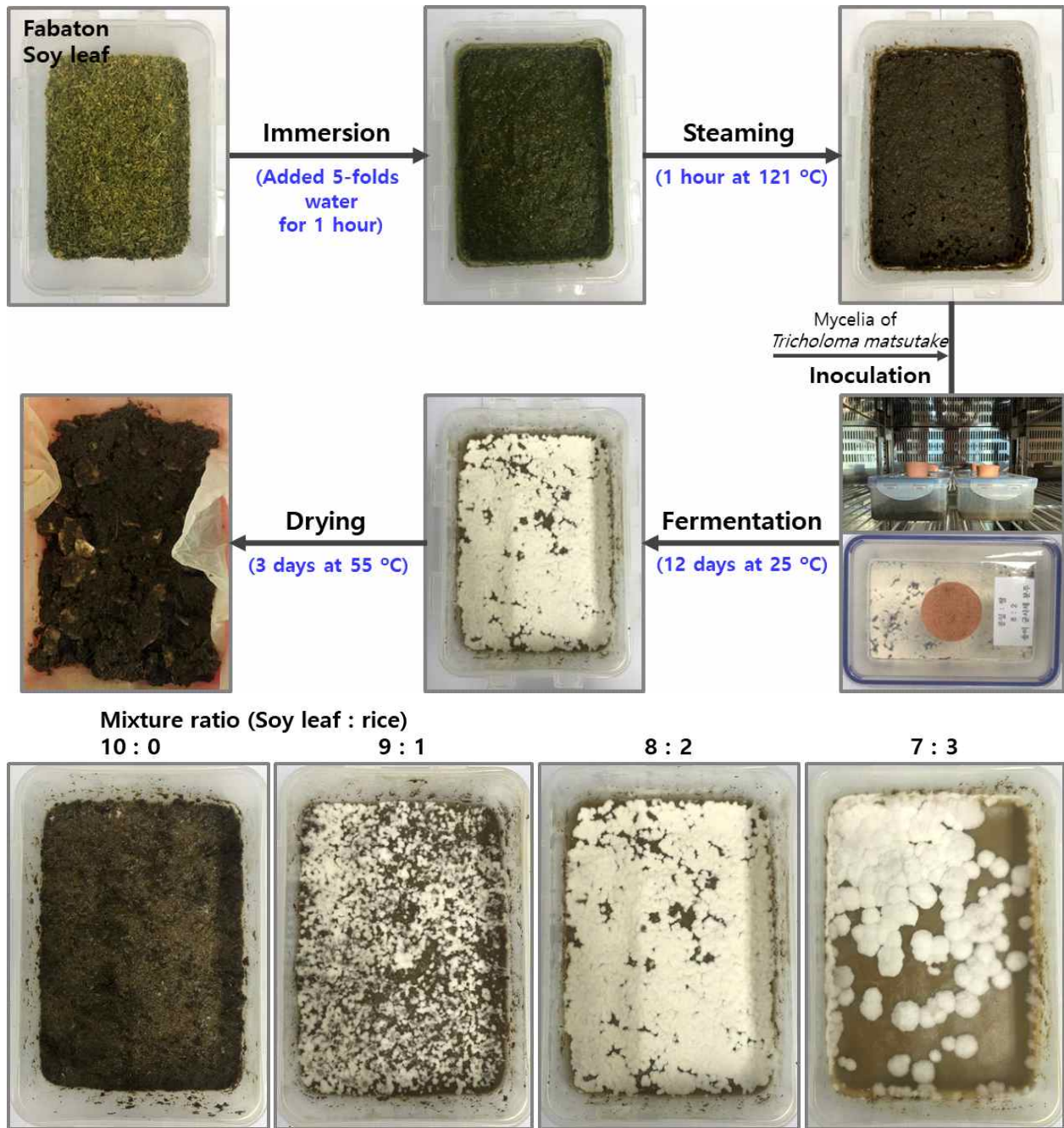


그림. 송이버섯 균사체 이용 파바톤 콩잎 발효물의 제조 과정.

- 파바톤 콩잎과 현미를 10:0, 9:1, 8:2 및 7:3로 설정하여 12일간 발효하여 이소플라본 변화 양상은 아래 크로마토그램과 같았음. 파바톤 콩잎만 발효시킨 결과 비배당체 이소플라본으로 전환은 완전히 이루어지지 않아 배당체인 daidzin과 genistin, malonyl- β -daidzin, malonyl- β -genistin 및 비배당체인 daidzein과 genistein 6종이 검출되었으나, 9:1, 8:2 및 7:3로 혼합하여 진행한 것은 비배당체인 daidzein과 genistein만이 검출되었음. 비배당체 이소플라본인 daidzein과 genistein의 함량은 각각 562.29과 130.0 $\mu\text{g/g}$ (10:0), 1636.6과 365.43 $\mu\text{g/g}$ (9:1), 1591.96과 281.61 $\mu\text{g/g}$ (8:2) 및 123.02과 407.17 $\mu\text{g/g}$ (7:3) 있었음.

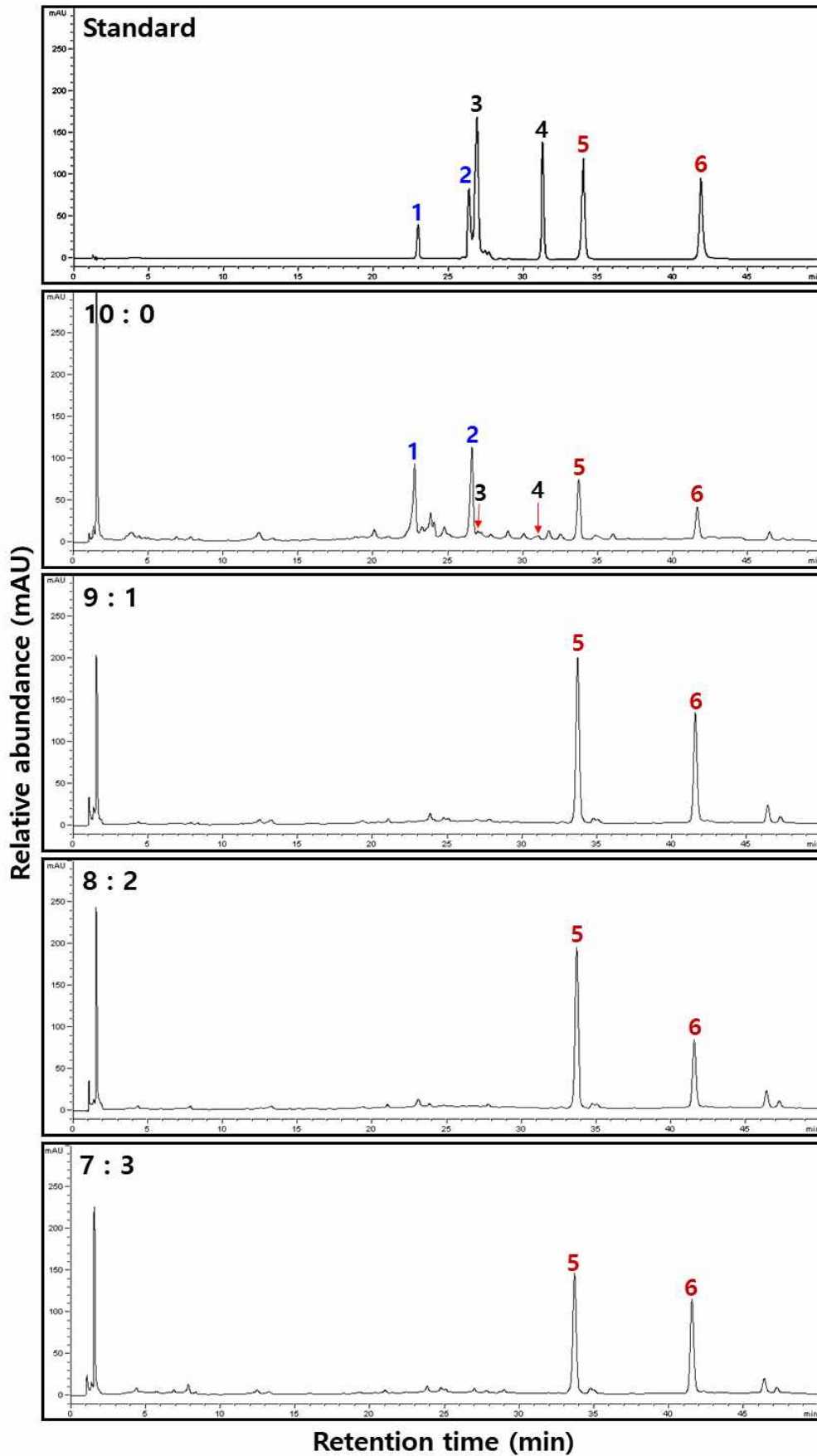


그림. 송이버섯 균사체 이용 콩발효물의 이소플라본 HPLC 크로마토그램.

표. 송이버섯 균사체 이용 파바톤 콩잎 콩발효물의 이소플라본 함량

Contents ¹⁾ ($\mu\text{g/g}$)	Mixture ratio (Soy leaf : rice)			
	10:0	9:1	8:2	7:3
Glycosides				
Daidzin (1)	678.17	nd	nd	nd
Genistin (2)	708.31	nd	nd	nd
Total	1386.49	nd	nd	nd
Aglycones				
Daidzein (5)	8.16	nd	nd	nd
Genistein (6)	15.87	nd	nd	nd
Total	24.03	nd	nd	nd
Aglycones				
Daidzein (5)	562.29	1636.6	1591.96	1238.02
Genistein (6)	130.0	365.43	281.61	407.17
Total	692.3	2002.03	1873.5	1645.19
Total isoflavones	2078.79	2002.03	1873.57	1645.19

¹⁾All values are presented as the mean \pm SD of triplicate determination.

²⁾nd: not detected.

- 균사 성장 정도와 이소플라본 함량을 고려하여 파바톤 콩잎과 현미 비율은 8:2로 설정하고 발효 시간에 따른 영향을 살펴본 결과 아래 그림과 같았음. 균사 정도는 4일째부터 균사가 생성되어 8일째 대부분 균사가 성장하였고, 12일째는 균사 성장이 완료되었음
- 파바톤 콩잎과 현미 혼합물의 원료는 6종의 이소플라본이 검출되었음. 즉, 배당체인 daidzin 과 genistin, malonyl- β -daidzin, malonyl- β -genistin 및 비배당체인 daidzein과 genistein이 검출되었음. 역시 살균 후 발효 0일째에는 주요 이소플라본은 배당체인 daidzin과 genistin 있었으나, malonyl- β -daidzin, malonyl- β -genistin 및 비배당체인 daidzein과 genistein이 검출되었고 발효 4일째부터는 배당체인 daidzin과 genistin 및 비배당체인 daidzein과 genistein 이 검출되었음. 발효가 진행됨에 따라 새로운 peak가 생성되었음

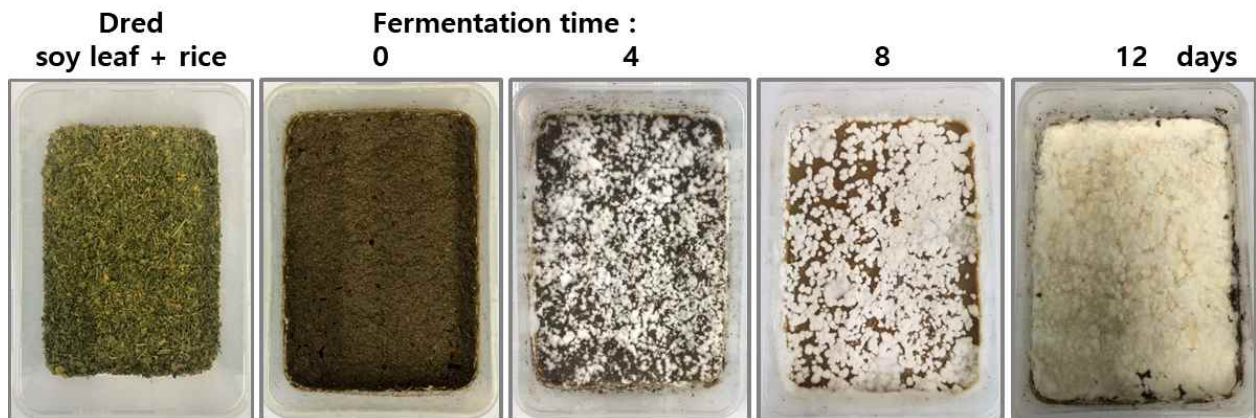


그림1-28. 송이버섯 균사체 이용 파바톤 콩잎과 현미 혼합발효물의 시간대별 사진.

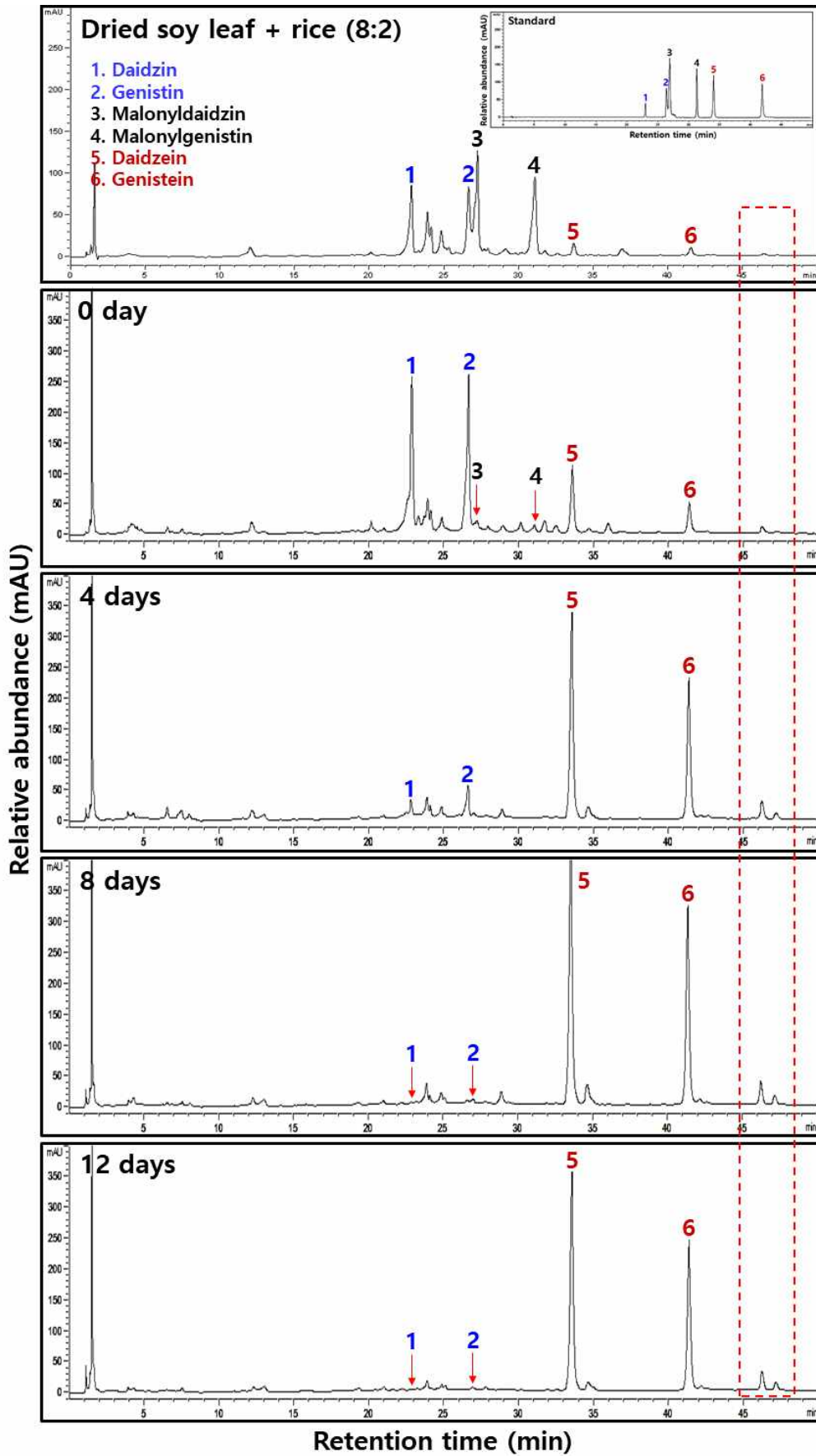


그림. 송이버섯 균사체 이용 콩발효물의 이소플라본 HPLC 크로마토그램.

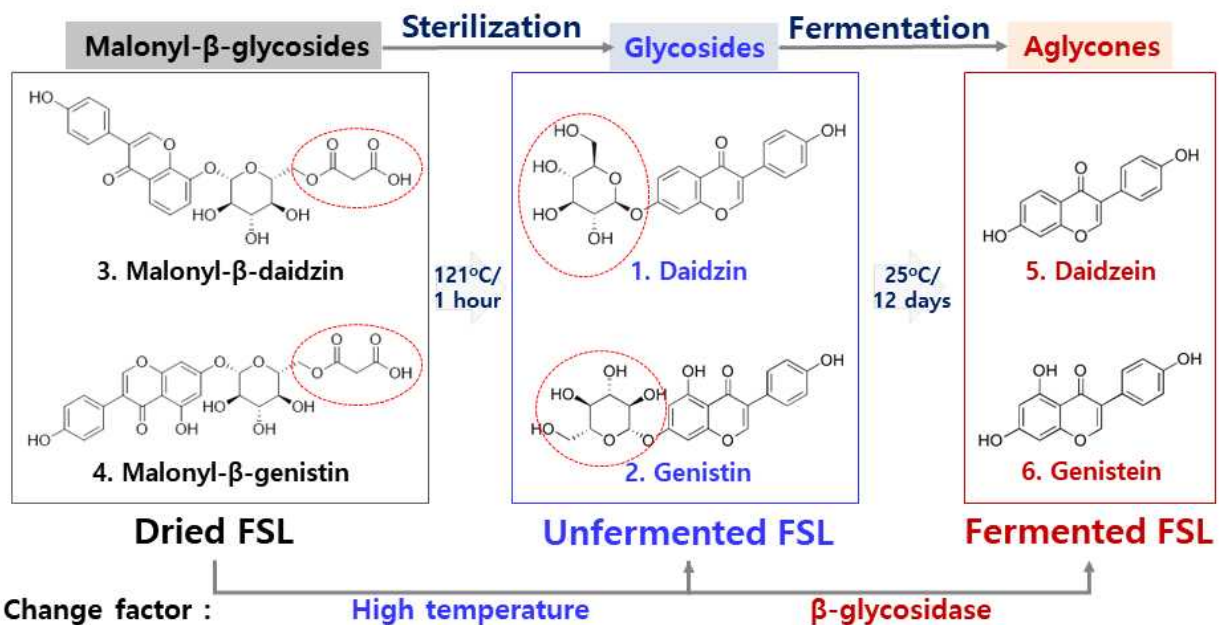
- 원료의 경우 daidzin과 genistin, malonyl- β -daidzin, malonyl- β -genistin, daidzein 및 genistein 함량은 715.11, 707.16, 1048.86, 953.02, 144.62 및 28.26 $\mu\text{g/g}$ 있었고, 살균 후 malonyl- β -glycosidase 함량은 감소하였고 glycosides 함량은 증가하였음. 발효가 진행됨에 따라 glycosides 함량은 감소하였고 8일째까지는 aglycones 함량은 증가하였으나, 12일째에는 감소하는 경향을 보였음. 발효 8일째 daidzin과 genistin, daidzein 및 genistein 함량은 267.14, 181.55, 2448.05 및 1175.53 $\mu\text{g/g}$ 있었고, malonyl- β -daidzin와 malonyl- β -genistin은 검출되지 않았음. 한편, 열처리에 의해서 malonyl- β -glycosidase의 malonyl기가 떨어져 나가 glycosides로 전환되고 송이버섯 균사체로부터 유래된 β -glycosidase에 의하여 glucose가 떨어져 나가 aglycone로 전환되는 것으로 추정되었음

표. 송이버섯 균사체 이용 파바톤 콩잎과 현미 혼합발효물의 시간대별 이소플라본 함량

Contents ¹⁾ ($\mu\text{g/g}$)	Dried soy leaf	Fermentation time (day)			
		0	4	8	12
Glycosides					
Daidzin (1)	715.11	2244.72	511.1	267.14	231.85
Genistin (2)	707.16	1711.83	384.23	181.55	43.99
Total	1422.27	3956.55	895.33	448.69	275.84
Malonyl-β-glycosides					
Daidzin (3)	1048.86	12.33	nd	nd	nd
Genistin (4)	953.02	28.42	nd	nd	nd
Total	2001.88	40.75	-	-	-
Aglycones					
Daidzein (5)	144.62	636.49	1874.29	2448.05	1919.83
Genistein (6)	28.26	206.76	865.44	1175.53	879.51
Total	172.88	843.25	2739.73	3623.58	2799.34
Total isoflavones	3597.03	4840.55	3635.06	4072.25	3075.18

¹⁾ All values are presented as the mean \pm SD of triplicate determination.

²⁾ nd: not detected.



*FSL : Fabaton soy leaf

그림. 송이버섯 균사체 이용 파바톤 콩잎 발효물의 제조 과정.

2-2-13. 스마트챔버에서 콩잎생산기술 개발 (결과-12)

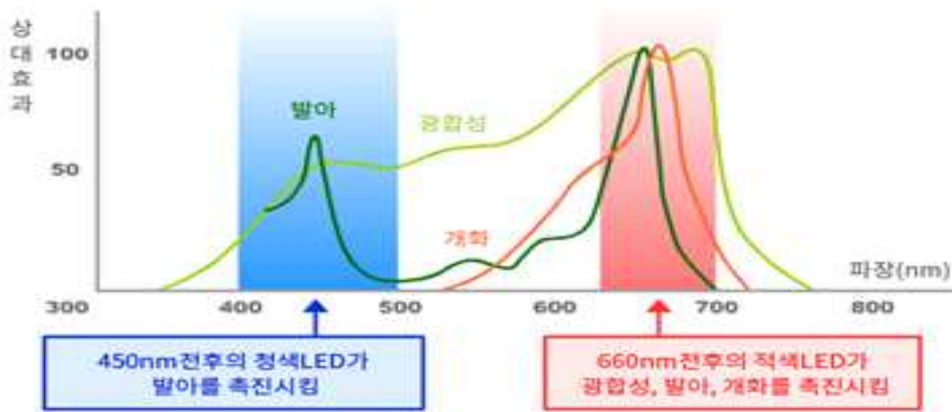
- 왜 스마트 챔버에서 파바톤콩잎을 생산해야 하는가
 - 에틸렌 및 에테폰(에틸렌공여체)를 이용한 실험실 규모에서 파바톤콩잎 생산연구는 특별한 문제 없이 8,000~17,000 mg/g 수준의 식물성 에스트로젠이 함유된 콩잎을 제공하였다.
 - 노지(필드)는 열려있는 공간이라 에틸렌을 처리할 수 없고 수화제인 에테폰을 적당한 농도(500~800 ppm) 처리하였다. 선행연구에 나타나 있듯이 물리적인 조건(광도 및 광량), 수분 상태(가뭄 등), 살포방법에 따른 유효성분 함량에 큰 차이가 있었다. (결과-xx, 결과-xx)
 - 특히 콩 생육기간인 장마철에는 수화제인 에테폰을 처리할 수 없는 구조적인 특성과 또한 넓은 면적의 필드에 수화제 살포를 식물체에 골고루 처리할 수 없는 한계 등으로 극복할 수 없는 문제가 대두되었다.
 - 밀폐된 공간에서 가스인 에틸렌을 처리하면 식물체에 골고루 살포되어 수화제인 에테폰 보다 큰 장점을 가지고 있으나 비닐하우스같이 밀폐된 공간은 실내온도가 50°C 까지 상승하여 정상적인 식물체를 얻을 수 없었다.
 - 이와 같은 난제를 해결하기 위해 스마트챔버에서 파바톤콩잎 생산기술을 개발하여 목표소재인 파바톤콩잎의 표준화 및 지속적인 생산을 가능하게 함.

- 스마트챔버를 이용한 파바톤콩잎 생산의 장점
 - 우리가 에틸렌농도, 광도, 습도, 온도 등을 통제할 수 있는 공간에서 파바톤콩잎 생산이 성공적으로 이루어진다면 통제할 수 없는 많은 변위가 있는 노지보다는 유효성분 함량 편차가 적은(표준편차가 용이함) 파바톤 콩잎을 생산할 수 있을 것이다.

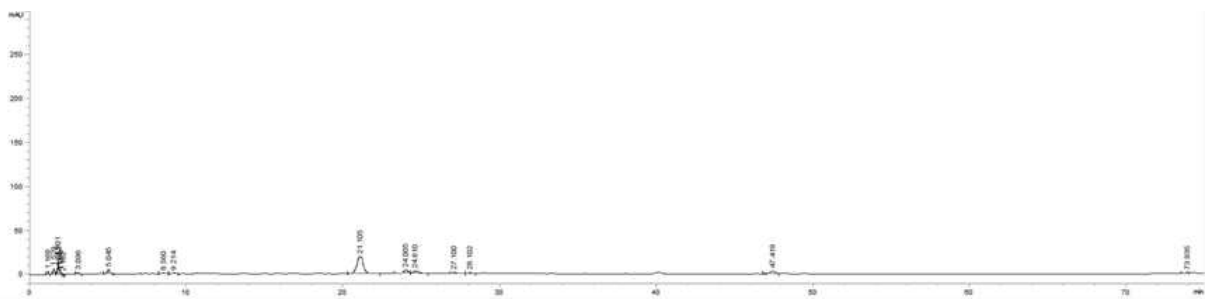
- 스마트챔버를 이용한 파바톤콩잎 생산에서 예상되는 문제점
 - 한여름 노지에서 광도(light intensity)가 10만룩스 이상이고, 인공광인 LED가 장착된 밀폐 공간에서 광도는 3만룩스 이하가 되어 낮은 광도 때문에 식물성에스트로젠 생산이 가능할까 하는 현실적 문제점이 있다.
 - LED기반 스마트챔버에서 광합성이 가능해서 식물성에스트로젠 합성이 가능한 경우에도 스마트챔버에 설치될 많은 LED 등으로 인한 전력(경비), 높은 광도를 얻기 위해서는 LED를 식물체 가까이 설치해야 하는데 이때 유발된 LED 등의 약해를 어떻게 극복할 것인가
 - LED가 없는 완전한 암조건에서 온도, 습도, 에틸렌농도의 조절만으로 식물성 에스트로젠이 콩잎에 축적될까하는 의문점. 광합성은 ATP 및 NADPH를 얻는 명반응과 얻어진 에너지인 ATP와 NADPH를 이용하여 CO₂로부터 당(C₆H₁₂O₆)을 얻을 수 있는 암반응(Kelvin 회로)으로 구성되어 있는데 암반응과 명반응은 동시에 일어나게 되고 명반응 없이 스마트챔버에 넣기 전에 식물체가 가지고 있는 ATP와 NADPH는 암반응을 움직여서 식물성 에스트로젠 생성이 가능할까 하는것과 이와 같은 논리적인 모순을 어떻게 극복할까하는 난제들이 예상됨

2-2-13-1. LED를 이용한 선행연구

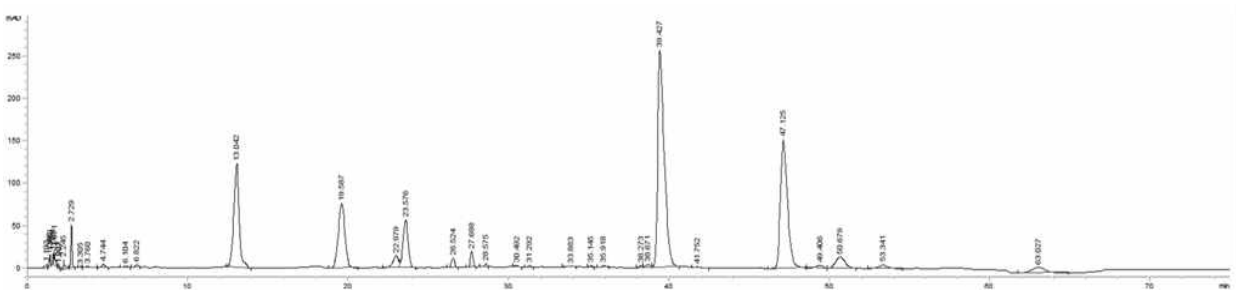
- 식물생장등으로 이용되는 LED 등을 90 x 80 x 80 cm³에 장착된 특수공간을 제작



- 식물성 에스트로젠 생산의 최적화를 위해 다양한 조건에서 실시



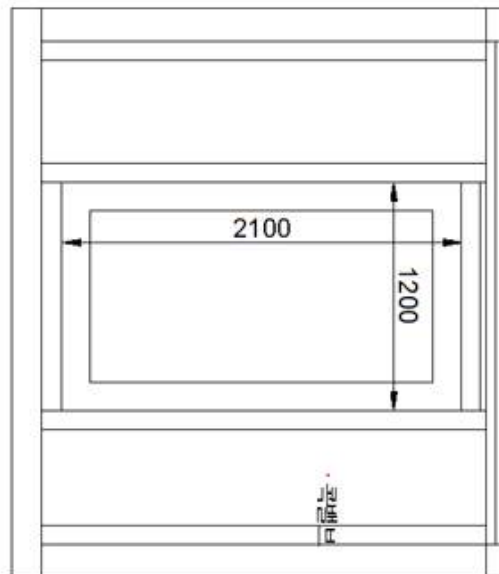
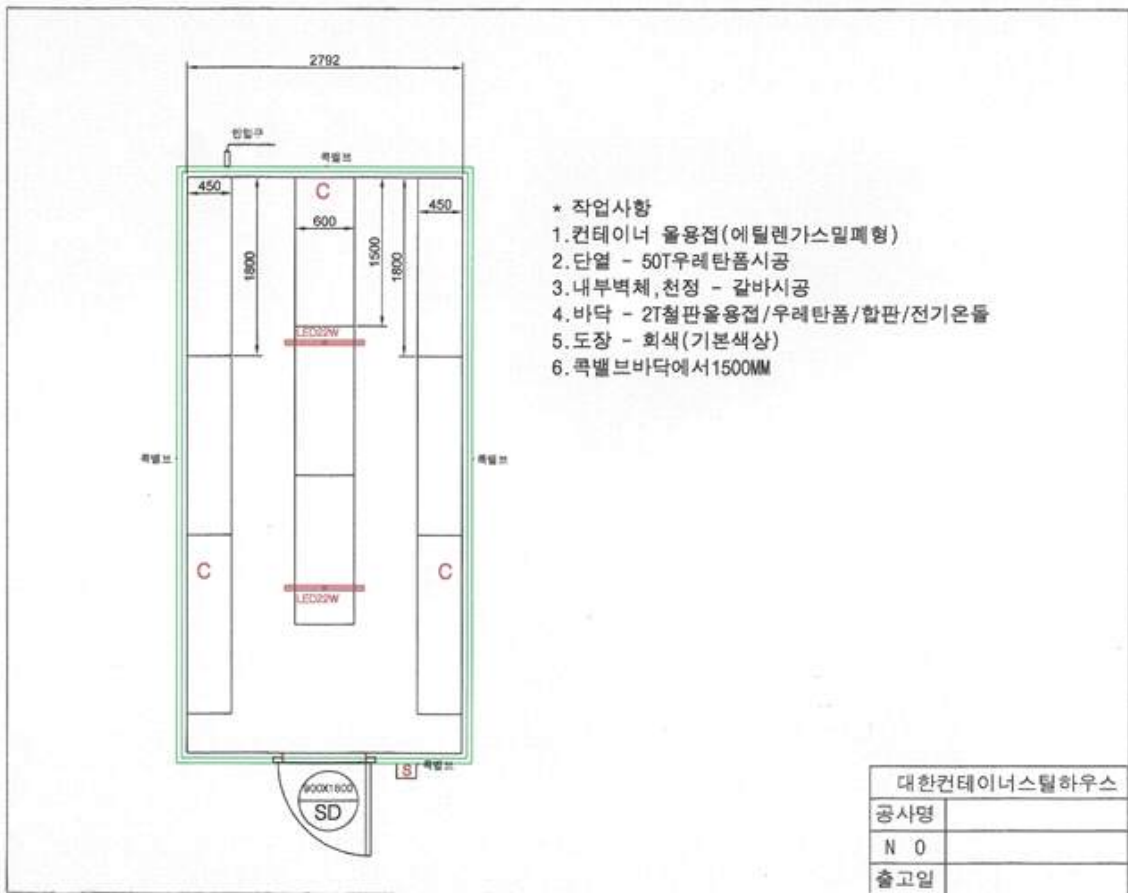
일반콩잎



암조건에서 생산된 파바튼콩잎

실험조건: 온도 30±5, 습도 60~80%, 에틸렌 2,500ppm, 처리시간 48시간

○ 이소플라본 고탐유 콩잎 생산을 위한 스마트챔버 설계도면



○ 온도, 습도, 에틸렌 농도를 조절가능한 암조건 스마트챔버에서 시험

<스마트챔버>



제원: 제습기, 냉방기, 유동팬, 온열기 장착



스마트챔버 내부

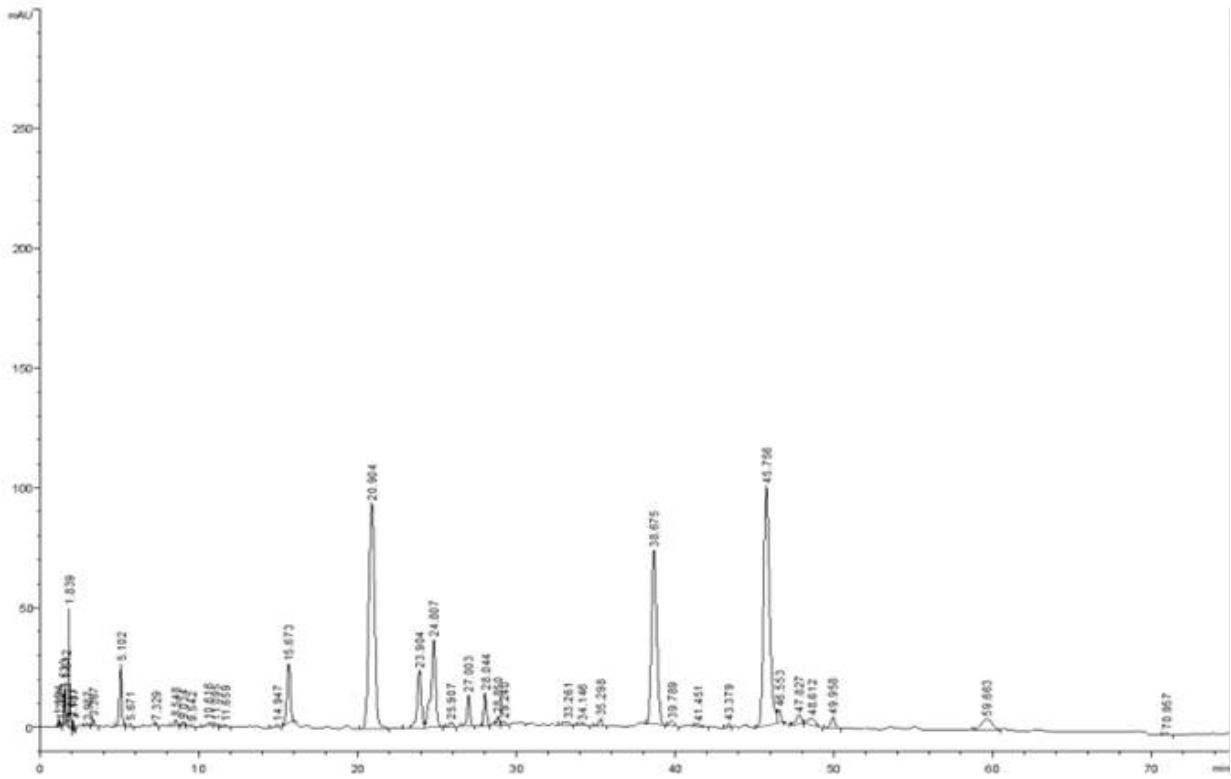


그림. 생육시기 R1식물체를 에틸렌 2,000ppm에서 24시간 처리한 파바톤콩잎의 크로마토그램

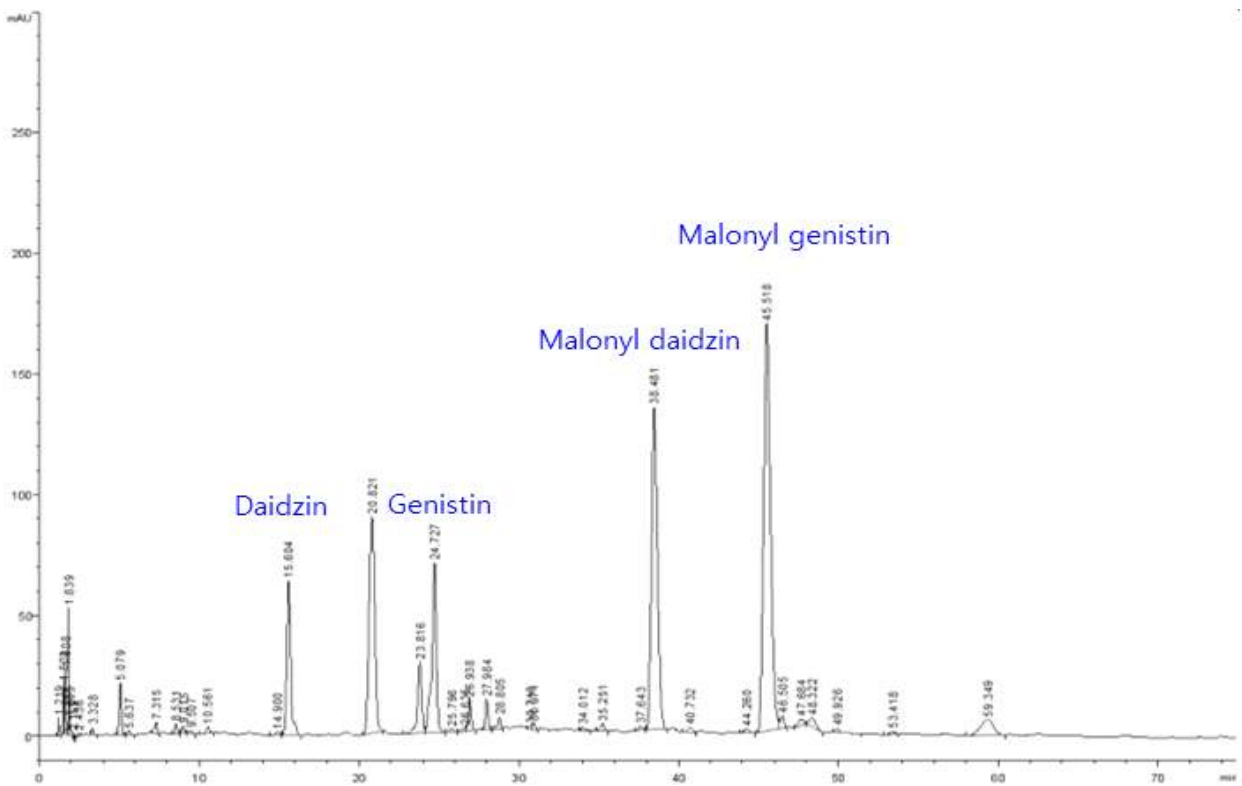
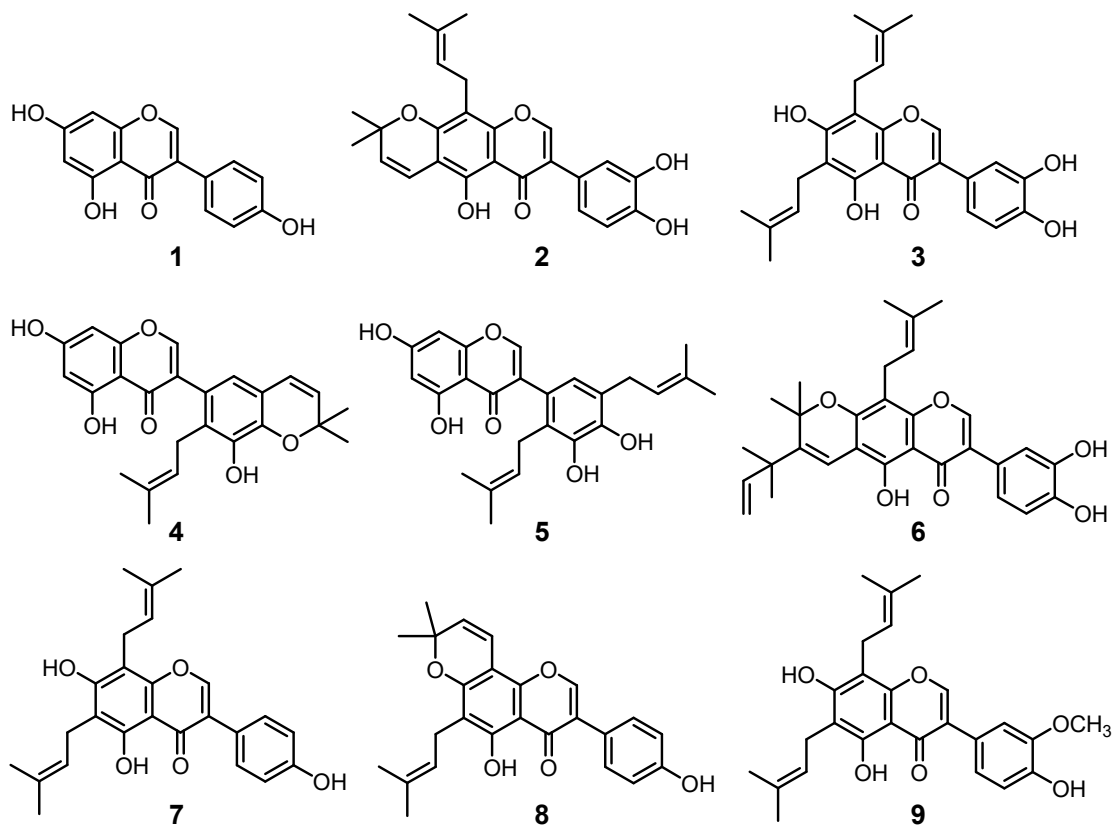


그림. 생육시기 R1식물체를 에틸렌 3,000ppm에서 24시간 처리한 파바톤콩잎의 크로마토그램

2-2-14. 콩과작물인 천근발 대사체 분리 및 구조분석 (결과-13)

천근발은 콩과식물로 예로부터 전통한약재로 쓰였으며 특히 류마티스 관절염에 효과가 있다고 알려져 왔다. 건조된 뿌리의 껍질을 잘라 0.5 kg을 메탄올로 7일간 상온 추출하였다. 메탄올 추출물은 medium-pressure liquid chromatography (MPLC, LC Forte/R 100, YMC Co., Ltd.)를 이용하여 총 80개의 fraction을 얻었고, 각 fraction들은 용매 극성을 이용한 컬럼크로마토 그래피를 반복적으로 실시하여 순수 화합물을 분리하였다. 분리한 화합물은 NMR과 Mass를 통하여 구조 동정을 실시하였으며 그 결과 9종의 isoflavone 계열, 3종의 flavanone 계열, 3종의 chalcone 계열, 1종의 flavonol 계열 화합물이었다.

2-2-14-1. 천근발(*Flemingia philippinensis*) 뿌리로부터 분리한 Prenylated isoflavone



[그림] 천근발로부터 분리한 9종의 이소플라본 화합물

화합물 1 (Genistein): UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 260 (4.52) nm; EIMS, m/z 270 [M]⁺; HREIMS m/z 270.0531 (calcd for C₁₅H₁₀O₅ 270.05); ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 6.22 (1H, d, J = 5.0 Hz, H-6), 6.33 (1H, d, J = 5.0 Hz, H-8), 6.86 (2H, d, J = 15.0 Hz, H-3' and H-5'), 7.38 (2H, d, J = 15.0 Hz, H-2' and 6'), 8.05 (1H, s, H-2); ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD): δ 93.38 (C-8), 98.70 (C-6), 104.88 (C-4a), 114.86 (C-3' and 5'), 121.91 (C-3), 123.33 (C-1'), 129.98 (C-2' and 6'), 153.39 (C-2), 157.41 (C-4'), 158.31 (C-8a), 162.46 (C-5), 164.55 (C-7), 180.85 (C-4).

화합물 2 (Auricularin): UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 272 (3.54) nm; EIMS, m/z 420 [M]⁺; HREIMS m/z 420.1572 (calcd for C₂₅H₂₄O₆ 420.1573); ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 1.49 (6H, s, H-4" and 5"), 1.69 (3H, s, 4'''), 1.82 (3H, s, 5'''), 3.35 (2H, d, J = 5.0 Hz, H-1'''), 5.24 (1H, t, J = 10.0 Hz, H-2'''), 5.60 (1H, d, J = 10.0 Hz, H-2''), 6.70 (1H, d, J = 10.0 Hz, H-1'), 6.78 (1H, d, J = 8.1 Hz, H-5'), 6.99 (1H, dd, J = 1.7, 8.1 Hz, H-6'), 7.29 (1H, s, H-2'), 7.86 (1H, s, H-2), 12.93 (1H, s, OH-5); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 18.3 (C-5'''), 26.16 (C-4'''), 28.55 (C-5" and C-6"), 30.09 (C-1'''), 78.41 (C-3"), 101.25 (C-6), 105.92 (C-4a), 113.44 (C-8), 115.30 (C-1'), 115.86 (C-6'), 116.61 (C-2'), 121.78 (C-5'), 122.29 (C-2''), 123.20 (C-3), 124.13 (C-1'), 127.61 (C-2'), 132.01 (C-3'''), 144.31 (C-4'), 145.06 (C-3'), 151.03 (C-8a), 153.25 (C-2), 157.93 (C-5), 159.52 (C-7), 181.80 (C-4).

화합물 3 (6,8-Diprenylorobol): UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 260 (4.21), 280 (3.38) nm; EIMS, m/z 422 [M]⁺; HREIMS m/z 422.1728 (calcd for C₂₅H₂₆O₆ 422.1729); ¹H-NMR (500 MHz, Acetone-*d*₆): δ 1.66 (3H, s, H-4"), 1.66 (3H, s, H-4'''), 1.78 (3H, s, H-5"), 1.81 (3H, s, H-5'''), 3.44 (2H, d, J = 6.9 Hz, H-1"), 3.52 (2H, d, J = 6.9 Hz, H-1'''), 5.21 (2H, dt, J = 15.8, 7.1 Hz, H-2" and H-2'''), 6.88 (1H, d, J = 8.1 Hz, H-5'), 6.95 (1H, dd, J = 1.5, 8.1 Hz, H-6'), 7.17 (1H, d, J = 1.5 Hz, H-2'), 8.22 (1H, s, H-2), 13.35 (1H, s, OH-5); ¹³C NMR (125 MHz, Acetone-*d*₆): δ 18.4 (C-5" and C-5'''), 23.0 (C-1" and C-1'''), 26.4 (C-4" and C-4'''), 106.9 (C-4a), 108.2 (C-8), 113.6 (C-6), 114.6 (C-5'), 116.4 (C-2'), 123.4 (C-6'), 123.6 (C-2'), 123.7 (C-2'''), 124.5 (C-3), 124.8 (C-1'), 133.2 (C-3'), 133.4 (C-3'''), 148.2 (C-4'), 148.3 (C-3'), 155.2 (C-8a), 155.3 (C-2), 158.8 (C-5), 161.1 (C-7), 184.1 (C-4).

화합물 4 (5,7,3',4'-Tetrahydroxy-2',5'-di(3-methylbut-2-enyl)isoflavone): UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 260 (4.50), 276 (2.96) nm; EIMS, m/z 422 [M]⁺; HREIMS m/z 422.1727 (calcd for C₂₅H₂₆O₆ 422.1729); ¹H-NMR (500 MHz, Acetone-*d*₆): δ 1.31 (3H, s, H-4"), 1.54 (3H, s, H-5"), 1.71 (6H, s, H-4''' and H-5'''), 3.30 (2H, s, H-1'), 3.36 (2H, d, J = 7.3 Hz, H-1'''), 5.08 (1H, t, J = 7.0 Hz, H-2'), 5.34 (1H, t, J = 7.0 Hz, H-2'''), 6.30 (1H, d, J = 2.0, H-6), 6.43 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-8), 6.54 (1H, s, 2'), 7.89 (1H, s, H-2), 13.01 (1H, s, OH-5); ¹³C NMR (125 MHz, Acetone-*d*₆): δ 18.0(C-4"), 18.3 (C-4'''), 26.1 (C-5"), 26.3 (C-5'''), 27.9 (C-1'), 29.3 (C-1'''), 94.9 (C-6), 100.2 (C-8), 106.5 (C-4a), 123.9 (C-2'''), 124.0 (C-3), 124.5 (C-2'), 124.9 (C-2'), 125.9 (C-1'), 127.1 (C-6'), 127.7 (C-3'), 131.5 (C-3"), 133.1 (C-3'''), 144.5 (C-5'), 144.6 (C-4'), 155.6 (C-2), 159.7 (C-8a), 164.2 (C-5), 165.4 (C-7), 182.4 (C-4).

화합물 5 (Flemphilippinin A): UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 270 (2.32) nm; EIMS, m/z 488 [M]⁺; HREIMS m/z 488.2199 (calcd for C₃₀H₃₂O₆ 488.2199); ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 1.31 (6H, s, H-4'''' and H-5'''), 1.45 (6H, s, H-4" and H-5"), 1.60 (3H, s, H-4'''), 1.72 (3H, s, H-5'''), 3.27 (2H, d, J = 7.0 Hz, H-1'''), 5.02 (2H, dd, J = 10.5, 17.5 Hz, H-3'''), 5.15 (1H, t, J = 7.0 Hz, H-2'''), 5.88 (1H, dd, J = 10.5, 17.5 Hz, H-2'''), 6.65 (1H, s, H-1'), 6.68 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-5'), 6.75 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-6'), 6.90 (1H, s, H-2'), 7.81 (1H, s, H-2), 12.82 (1H, s, OH-5); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 18.3 (C-5'''), 21.8 (C-1'''), 26.2 (C-4'''), 28.3 (C-4" and C-5"), 28.7 (C-4'''' and C-5'''), 42.1 (C-1'''), 82.3 (C-3"), 103.2 (C-4a), 106.1 (C-6), 112.1 (C-1'), 112.2 (C-3'''), 113.2 (C-8), 115.9 (C-5'), 116.8 (C-2'), 121.8 (C-6'), 122.4 (C-2''), 123.3 (C-1'), 124.2 (C-3), 132.0 (C-3'''), 144.1 (C-2'), 144.3 (C-3'), 145.0 (C-4'), 147.4 (C-2'''), 151.0 (C-5), 153.2(C-2), 157.3 (C-7), 159.2 (C-8a), 181.9 (C-4).

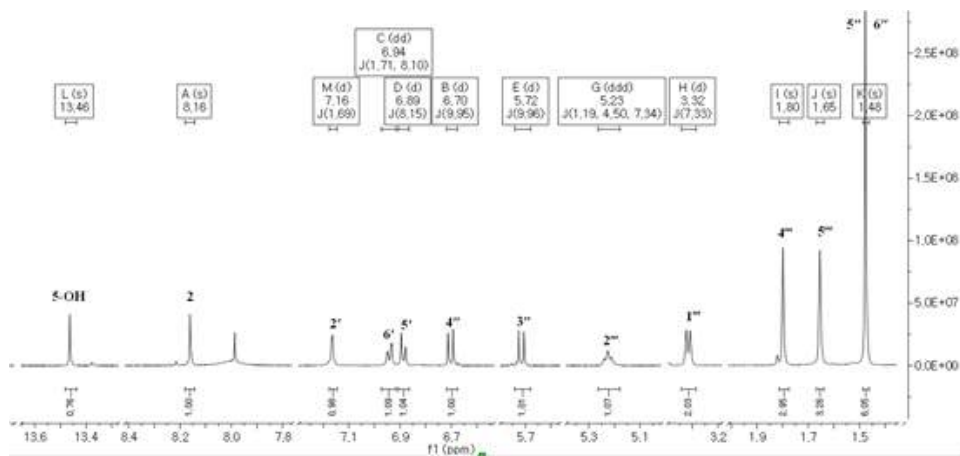
화합물 6 (5, 7, 3'-Trihydroxy-2'-(3-methylbut-2-enyl)-4',5'-(3,3-dimethylpyrano)isoflavone) : UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 260 (4.00), 278 (3.38) nm; EIMS m/z 420 [M]⁺; HREIMS m/z 420.1573 (calcd for C₂₅H₂₄O₆ 420.1573); ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 1.48 (6H, s, H-5'' and 6''), 1.52 (3H, s, H-5'''), 1.62 (3H, s, H-4'''), 3.30 (1H, s, H-1'''), 5.11 (1H, t, J = 10.0 Hz, H-2'''), 5.58 (1H, d, J = 10.0 Hz, 2''), 6.26 (1H, d, J = 10.0 Hz, H-1''), 6.28 (1H, s, H-6), 6.35 (1H, s, H-8), 6.45 (1H, s, H-2'), 7.71 (1H, s, H-2), 12.78 (1H, s, 5-OH); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 17.99 (C-5'''), 25.94 (C-4'''), 27.26 (C-1'''), 28.69 (C-5'' and C-6''), 78.00 (C-3''), 94.50 (C-8), 100.03 (C-6), 106.38 (C-4a), 119.18 (C-6'), 120.25 (C-2'), 122.09 (C-1''), 122.82 (C-3), 123.12 (C-2'''), 124.35 (C-1'), 128.45 (C-5), 130.42 (C-2''), 131.95 (C-3''), 140.06 (C-4'), 143.17 (C-3'), 154.49 (C-2), 158.58 (C-8a), 162.89 (C-5), 163.08 (C-7), 181.85 (C-4).

화합물 7 (8- γ,γ -Dimethyl-allylwighteone) : UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 270 (3.37) nm; EIMS, m/z 406 [M]⁺; HREIMS m/z 406.1780 (calcd for C₂₅H₂₆O₅ 406.1780); ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 1.77 (3H, s, H-4'''), 1.86 (3H, s, H-5'''), 1.80 (3H, s, H-4''), 1.87 (3H, s, H-5''), 3.50 (4H, t, J = 7.3 Hz, H-1'' and H-1'''), 5.28 (2H, dt, J = 10.0, 7.0 Hz, H-2'' and H-2'''), 6.81 (2H, d, J = 7.5 Hz, H-3' and H-5'), 7.33 (2H, d, J = 7.5 Hz, H-2' and H-6'), 7.91 (1H, s), 13.10 (1H, s, OH-5); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 18.3 (C-4'' and C-4'''), 22.1 (C-1'' and C-1'''), 26.2 (C-5'' and C-5'''), 105.9 (C-8), 106.2 (C-4a), 110.8 (C-6), 116.2 (C-3' and C-5'), 121.7 (C-2''), 121.9 (C-2'''), 123.2 (C-1'), 123.8 (C-3), 130.7 (C-2' and C-6'), 134.5 (C-3'''), 135.8 (C-3''), 153.2 (C-2), 153.9 (C-8a), 156.6 (C-4'), 157.9 (C-7), 160.1 (C-5), 182.0 (C-4).

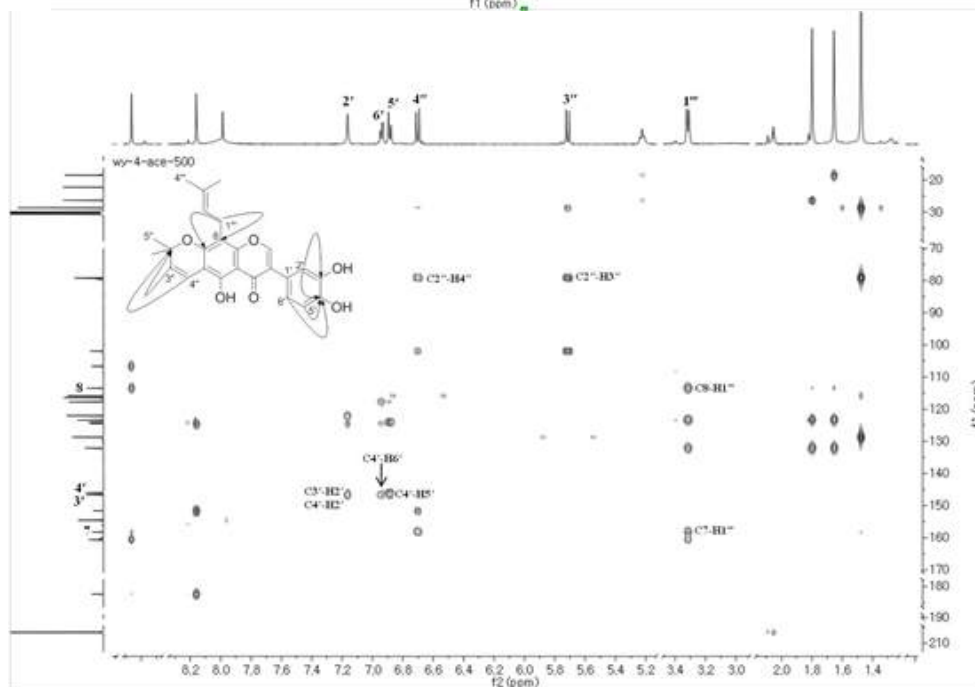
화합물 8 (Osajin) : UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 272 (4.74) nm; EIMS, m/z 404 [M]⁺; HREIMS m/z 404.1621 (calcd for C₂₅H₂₄O₅ 404.1624); ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 1.50 (6H, s, H-5'' and H-6''), 1.71 (3H, s, H-4'''), 1.84 (3H, s, H-5'''), 3.38 (2H, d, J = 7.3 Hz, H-1'''), 5.27 (1H, t, J = 7.3 Hz, H-2'''), 5.61 (1H, d, J = 10.0 Hz, H-3''), 6.73 (1H, d, J = 10.0 Hz, H-4''), 6.91 (2H, d, J = 8.1 Hz, H-3' and H-5'), 7.41 (2H, d, J = 8.1 Hz, H-2' and H-6'), 7.88 (1H, s, H-2); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 18.3 (C-4'''), 21.7 (C-1'''), 26.1 (C-5'''), 28.5 (C-5'' and C-6''), 78.3 (C-2''), 101.1 (C-8), 106.0 (C-4a), 113.3 (C-6), 115.4 (C-4'), 116.0 (C-3' and C-5'), 122.4 (C-2'''), 123.8 (C-3), 123.9 (C-1'), 127.5 (C-3''), 130.8 (C-2' and C-6'), 131.9 (C-3'''), 151.0 (C-8a), 152.6 (C-2), 156.2 (C-4'), 157.7 (C-7), 159.8 (C-5), 181.4 (C-4).

화합물 9 (Flemingsin) : UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 270 (4.45) nm; EIMS m/z 436 [M]⁺; HREIMS m/z 436.1888 (calcd for C₂₆H₂₈O₆, 436.1886); ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 1.84 (3H, s, H-4'''), 1.70 (3H, s, H-5'''), 1.81 (3H, s, H-4'), 1.67 (3H, s, H-5''), 3.40 (2H, t, J = 7.0 Hz, H-1''), 3.49 (2H, t, J = 7.0, H-1'''), 3.91 (3H, s, OCH₃), 5.21 (2H, dt, J = 10.0, 7.0 Hz, H-2'' and H-2'''), 6.87 (2H, d, J = 8.1 Hz, H-5'), 6.98 (1H, dd, J = 1.8, 8.1 Hz, H-6'), 7.18 (1H, d, J = 1.8 Hz, 2'); ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 18.1 (C-4''), 18.4 (C-4'''), 23.0 (C-1'') 23.1 (C-1'''), 26.3 (C-5''), 26.4 (C-5'''), 108.2 (C-8), 106.9 (C-4a), 113.6 (C-6), 114.6 (C-2'), 116.6 (C-5'), 123.6 (C-2'''), 123.7 (C-2''), 124.8 (C-1'), 124.5 (C-3), 123.4 (C-6'), 133.2 (C-3''), 133.4 (C-3'''), 146.2 (C-3'), 155.2 (C-8a), 155.3 (C-2), 148.3 (C-4'), 161.1 (C-7), 158.8 (C-5), 183.1 (C-4).

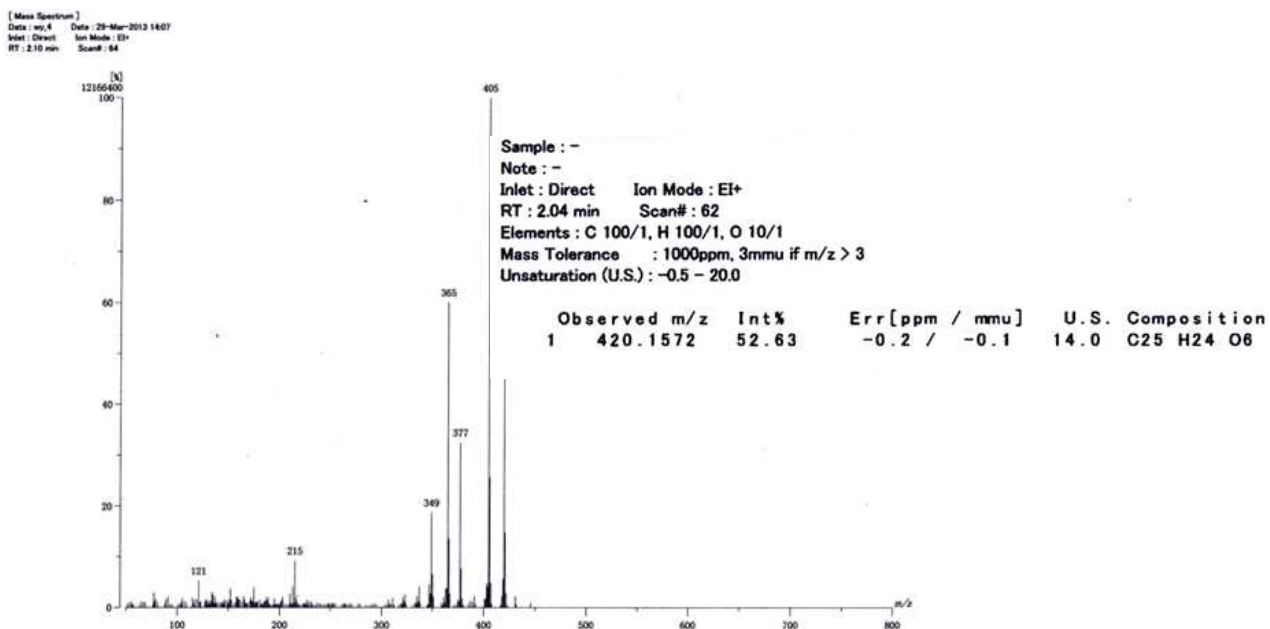
(A)



(B)

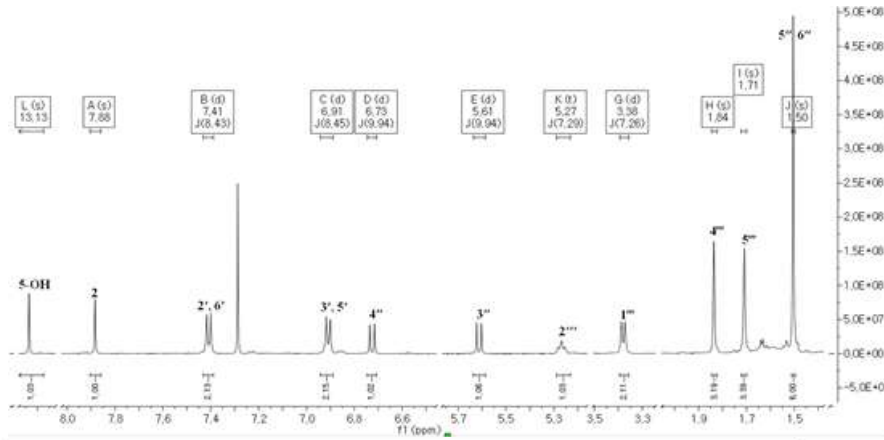


(C)

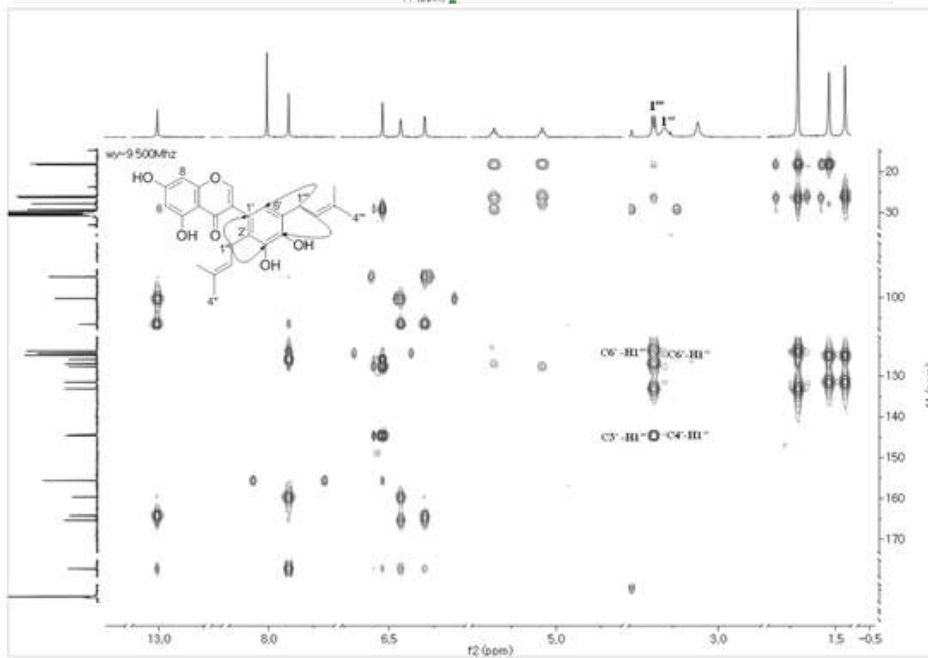


[그림] 화합물 2의 분광학 자료 (A) $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼, (B) HMBC 스펙트럼, (C) HREIMS 분석

(A)

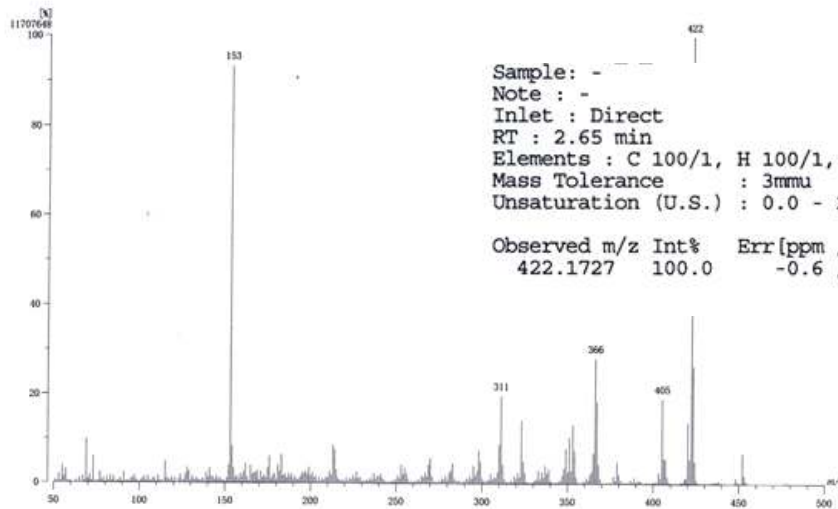


(B)



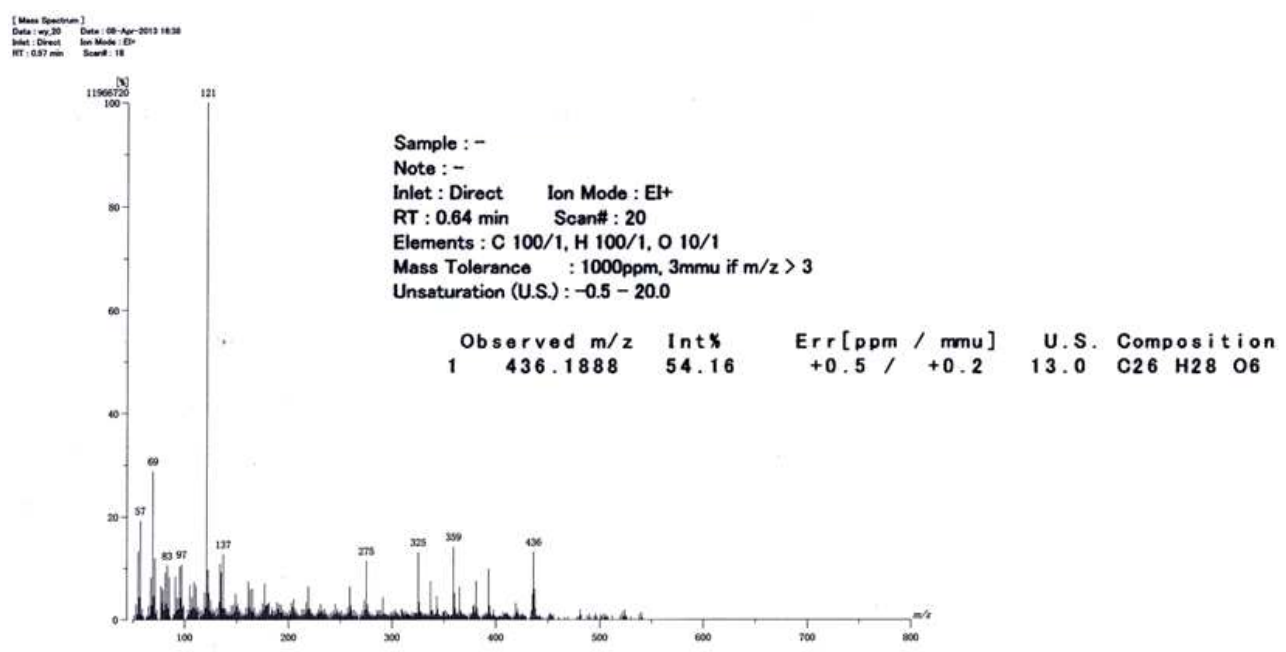
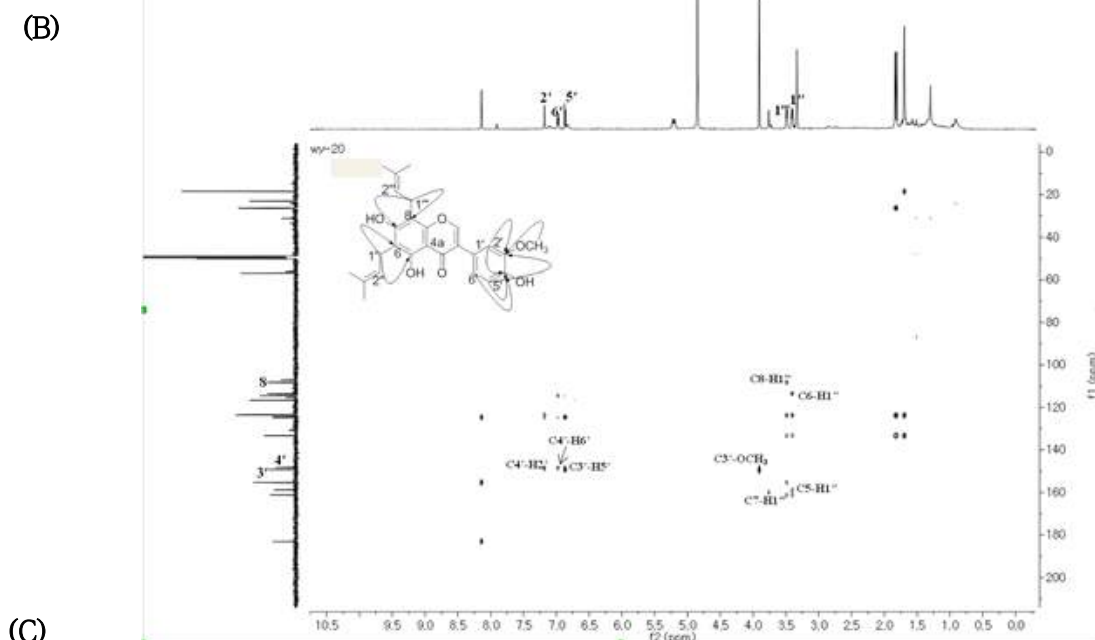
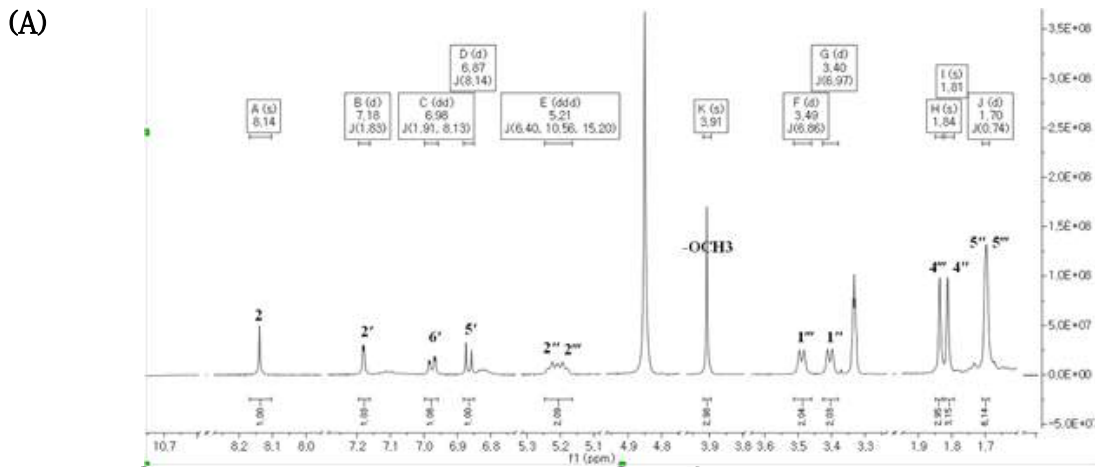
(C)

[Mass Spectrum]
Data : wj_8 Date : 05-Mar-2013 15:38
Instrument : MSStation
Sample : --
Note : --
Inlet : Direct Ion Mode : EI+
Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]
RT : 2.65 min Scan# : 135 Temp : 2278.7 deg.C
BP : m/z 422 Int. : 1116.53 (1170768)
Output m/z range : 50 to 500 Cut Level : 0.00 %



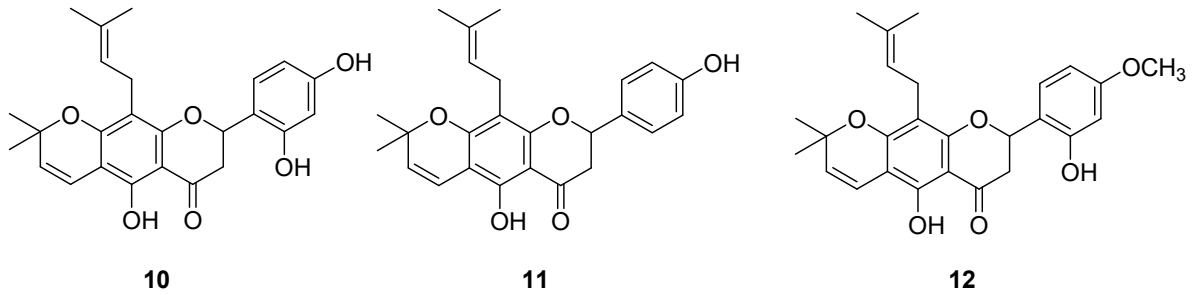
Sample: -
Note: -
Inlet: Direct
RT: 2.65 min
Elements: C 100/1, H 100/1, O 10/1
Mass Tolerance: 3mmu
Unsaturation (U.S.): 0.0 - 20.0
Observed m/z Int% Err [ppm / mmu] U.S. Composition
422.1727 100.0 -0.6 / -0.3 13.0 C 25 H 26 O 6
Ion Mode: EI+
Scan#: 54

[그림] 화합물 4의 분광학 자료 (A) ^1H -NMR 스펙트럼, (B) HMBC 스펙트럼, (C) HREIMS 분석



[그림] 화합물 9의 분광학 자료 (A) ¹H-NMR 스펙트럼, (B) HMBC 스펙트럼, (C) HREIMS 분석

2-2-14-2. 천근발(*Flemingia philippinensis*) 뿌리로부터 분리한 flavanone



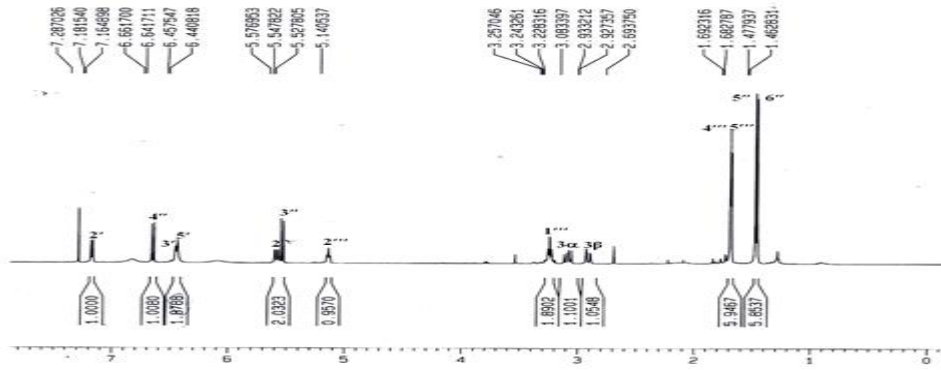
[그림] 천근발로부터 분리한 3종의 플라바논 화합물

화합물 **10** (Flemichin D): UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 272 (4.80), 314 (0.74) nm; EIMS m/z 422 [M^+]; HREIMS m/z 422.1727 (calcd 422.1729 for $C_{25}H_{26}O_6$); 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$), δ 1.46 (3H, s, 6''), 1.48 (3H, s, 5''), 1.68 (3H, s, 5'''), 1.69 (3H, s, 4'''), 2.93 (1H, dd, $J = 6.3, 1.1$ Hz, 3 α), 3.08 (1H, dd, $J = 6.3, 4.7$ Hz, 3 β), 3.24 (2H, d, $J = 7.6$ Hz, 1'''), 5.14 (1H, t, $J = 7.6$ Hz, 2'''), 5.55 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, 3''), 5.58 (1H, dd, $J = 4.7, 1.1$ Hz, 2), 6.44 (1H, s, 5'), 6.46 (1H, s, 3'), 6.65 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, 4'), 7.17 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, 2'), 12.21 (1H, s, 5-OH); ^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$): δ 18.2 (C-4'''), 21.9 (C-1'''), 26.1 (C-5'''), 28.7 (C-5''), 28.8 (C-4''), 42.2 (C-3), 77.1 (C-2), 78.8 (C-3''), 103.1 (C-4a), 103.96 (C-6), 104.4 (C-5'), 108.2 (C-3'), 109.3 (C-8), 115.9 (C-4'), 117.5 (C-1'), 122.7 (C-2'''), 126.6 (C-3''), 128.3 (C-2'), 132.1 (C-3'''), 155.4 (C-6'), 157.1 (C-5), 157.5 (C-4'), 159.5 (C-8a), 160.5 (C-7), 197.6 (C-4).

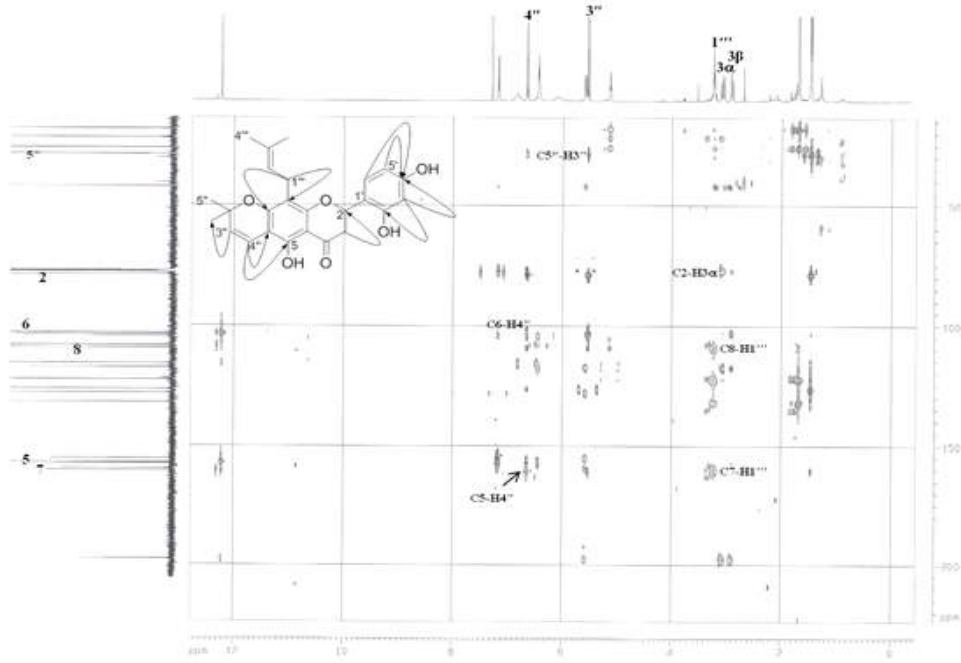
화합물 **11** (Lupinifolin): UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 272 (2.62), 314 (1.46) nm; EIMS m/z 406 [M^+]; HREIMS m/z 406.1778 (calcd 406.1780 for $C_{25}H_{26}O_5$). 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$), δ 1.46 (3H, s, 6''), 1.48 (3H, s, 5''), 1.68 (6H, s, 4''', 5'''), 2.82 (1H, dd, $J = 3.0, 17.2$ Hz, 3 β), 3.06 (1H, dd, $J = 12.9, 17.2$ Hz, 3 α), 3.24 (m, 2H, 1'''), 5.18 (1H, m, 2'''), 5.36 (1H, dd, $J = 3.0, 12.9$ Hz, 2), 5.53 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, 3''), 6.66 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, 4''), 6.90 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, 3', 5'), 7.35 (2H, d, $J = 10.0$ Hz, 2', 6'), 12.27 (1H, s, 5-OH); ^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$), δ 18.2 (C-4'''), 21.9 (C-1'''), 26.2 (C-5'''), 28.7 (C-5''), 28.8 (C-4''), 43.6 (C-3), 78.5 (C-3''), 78.9 (C-2), 103.1 (C-4a), 103.2 (C-6), 109.0 (C-8), 115.9 (C-3', 5'), 116.1 (C-4'), 123.0 (C-2'''), 126.3 (C-3''), 128.1 (C-2', 6'), 131.4 (C-1'), 131.5 (C-3'''), 156.3 (C-4'), 157.0 (C-5), 159.8 (C-8a), 160.3 (C-7), 196.8 (C-4).

화합물 **12** (Khonklonginol H): UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 272 (3.55), 314 (1.29) nm; EIMS m/z 436 [M^+]; HREIMS m/z 436.1882 (calcd 436.1886 for $C_{26}H_{28}O_6$). 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$), δ 1.47 (3H, s, 6''), 1.48 (3H, s, 5''), 1.70 (6H, s, 4''', 5'''), 2.87 (1H, dd, $J = 3.0, 17.2$ Hz, 3 β), 3.18 (1H, dd, $J = 13.1, 17.2$ Hz, 3 α), 3.25 (2H, t, $J = 7.7$ Hz, 1'''), 3.83 (3H, s, OCH_3), 5.13 (1H, m, 2'''), 5.55 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, 1H, 3''), 5.58 (1H, m, 2), 6.51 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, 5'), 6.54 (1H, dd, $J = 2.3, 8.4$ Hz, 3'), 6.67 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, 4'), 7.17 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, 2'), 12.29 (1H, s, 5-OH); ^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$): δ 18.2 (C-4'''), 21.9 (C-1'''), 26.1 (C-5'''), 28.8 (C-5'', 6''), 42.4 (C-3), 55.8 (C- OCH_3), 78.0 (C-2), 78.7 (C-2''), 103.1 (C-4a), 103.3 (C-5'), 103.7 (C-6), 106.9 (C-3'), 109.2 (C-8), 116.0 (C-4'), 117.1 (C-1'), 122.7 (C-2'''), 126.6 (C-3''), 128.2 (C-2'), 132.2 (C-3'''), 155.8 (C-6'), 157.2 (C-5), 159.1 (C-8a), 160.1 (C-7), 161.6 (C-4'), 196.9 (C-4).

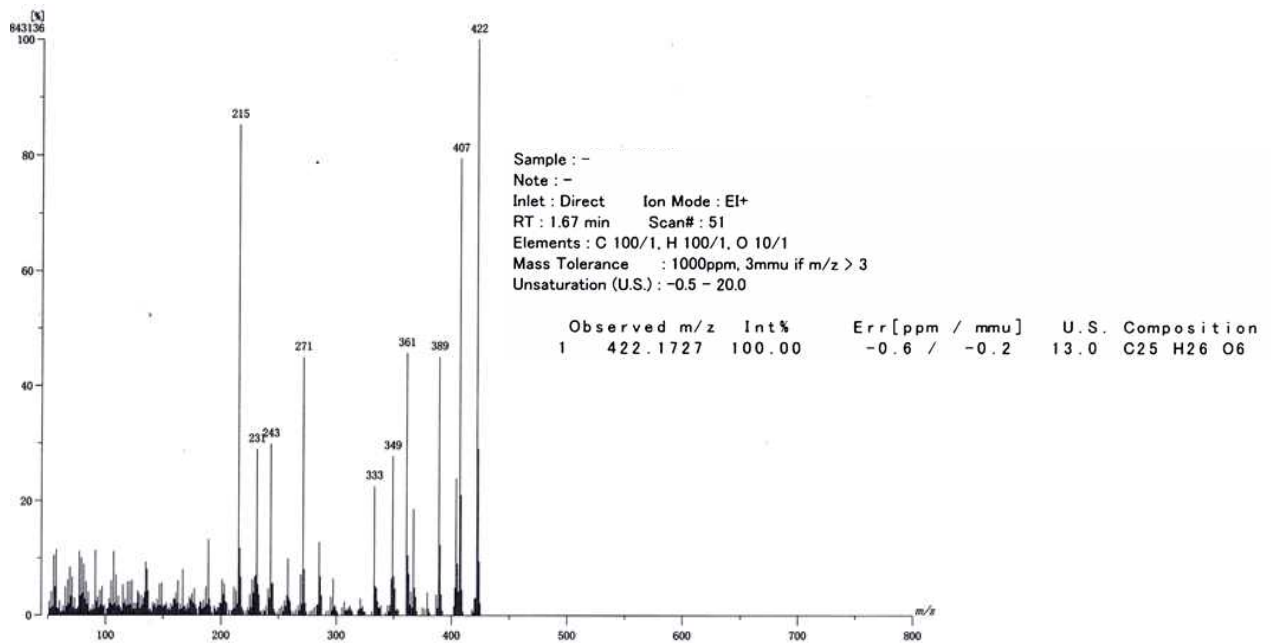
(A)



(B)

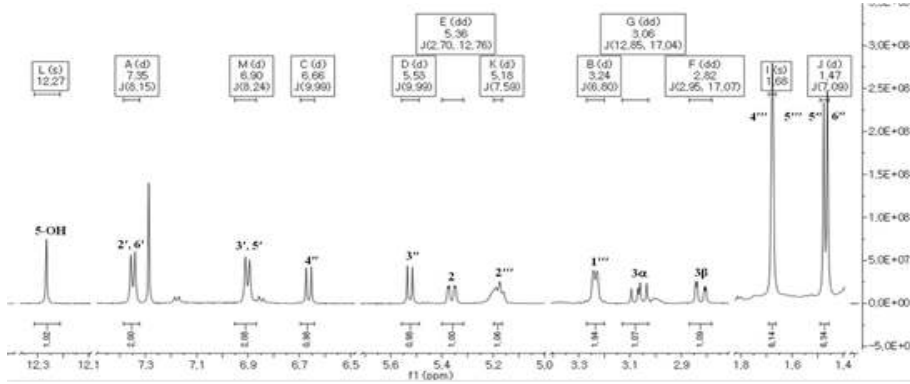


(C)

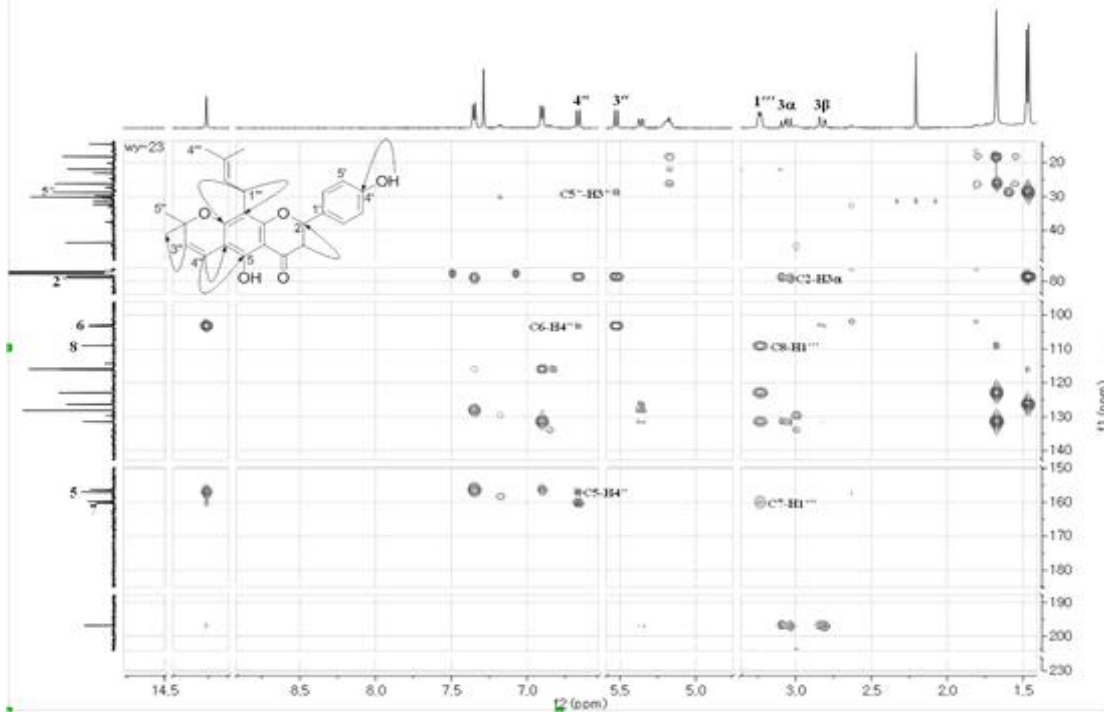


[그림] 화합물 10의 분광학 자료 (A) ^1H -NMR 스펙트럼, (B) HMBC 스펙트럼, (C) HREIMS 분석

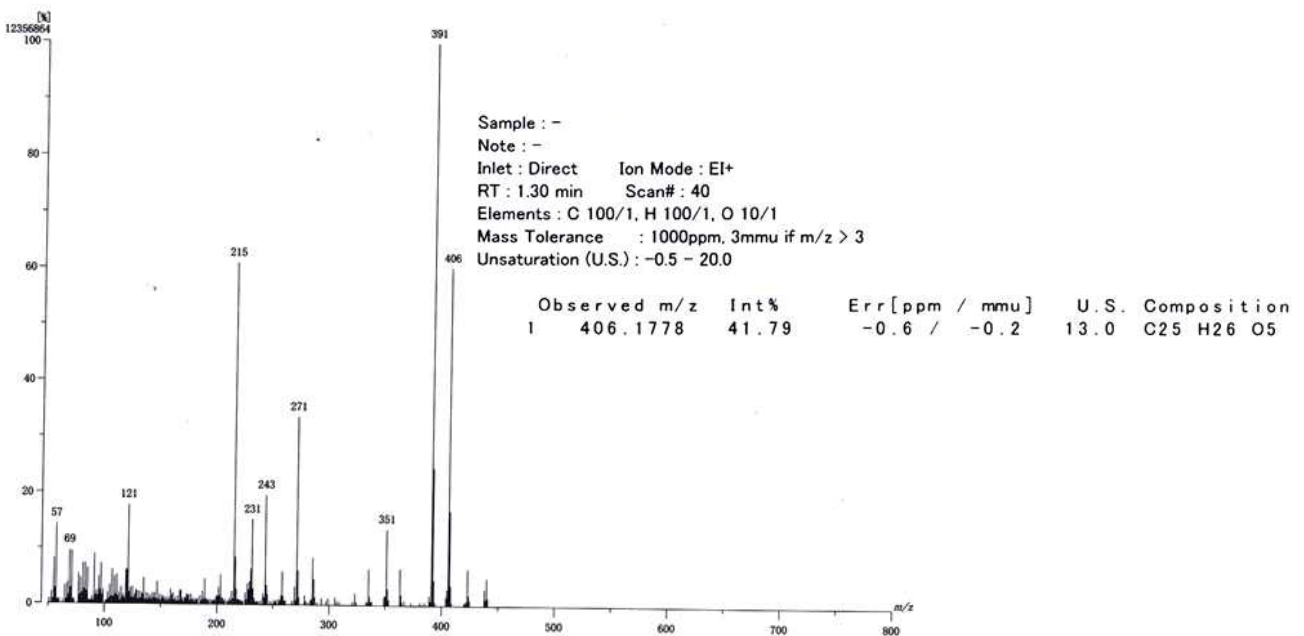
(A)



(B)

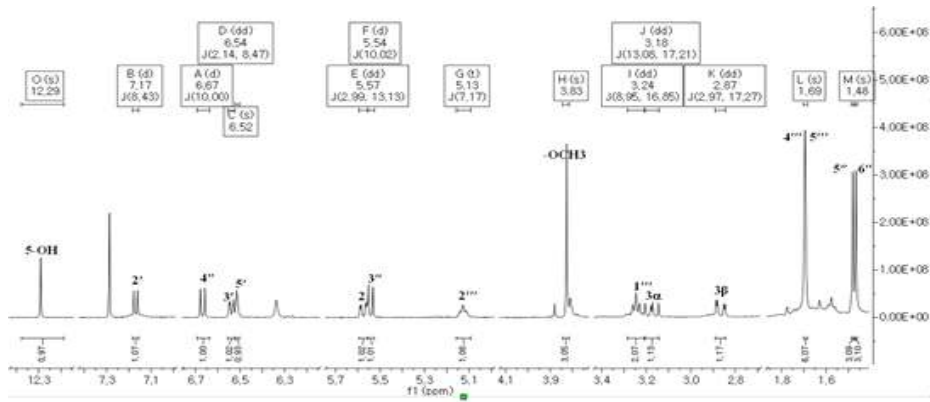


(C)

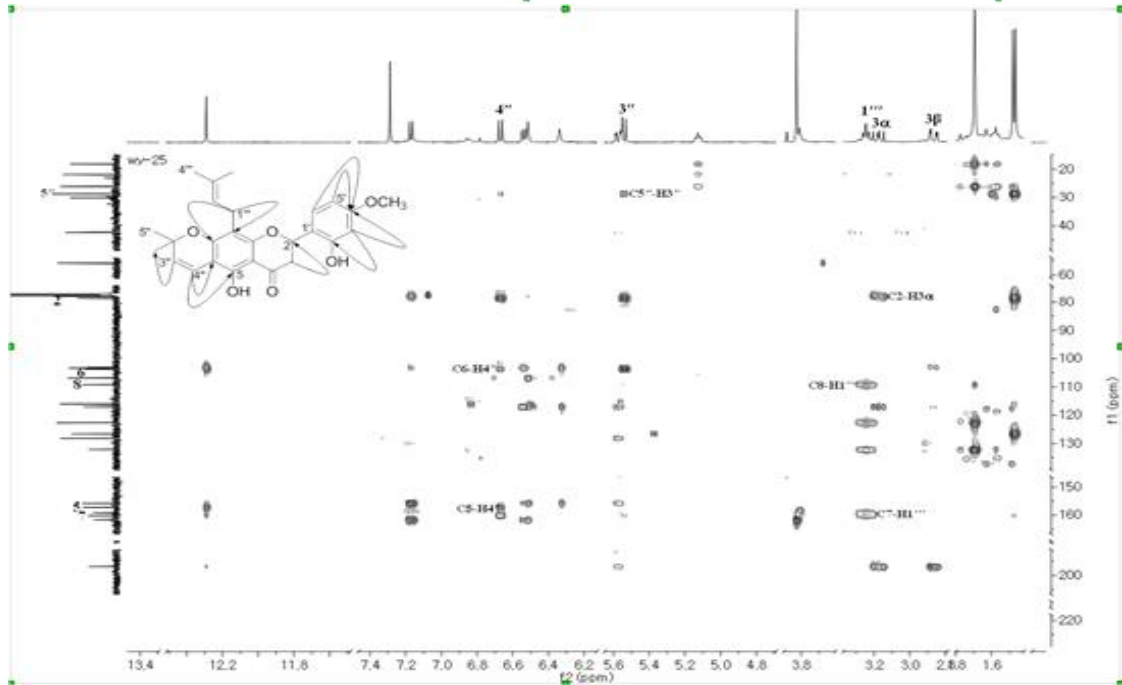


[그림] 화합물 11의 분광학 자료 (A) ^1H -NMR 스펙트럼, (B) HMBC 스펙트럼, (C) HREIMS 분석

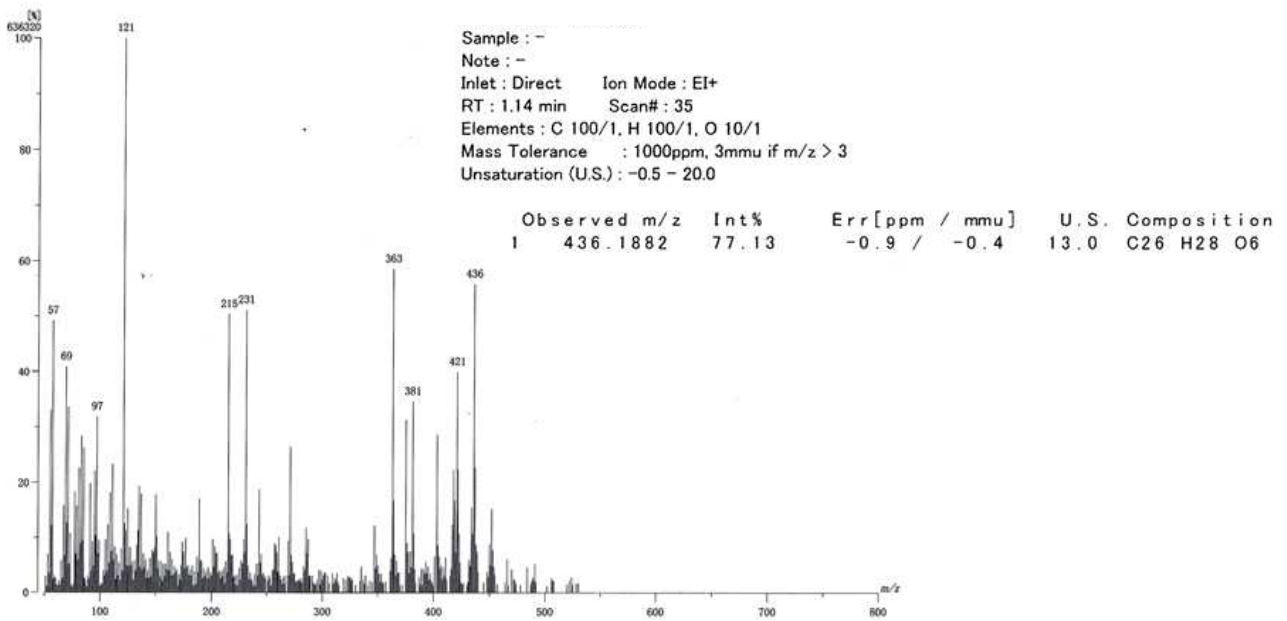
(A)



(B)

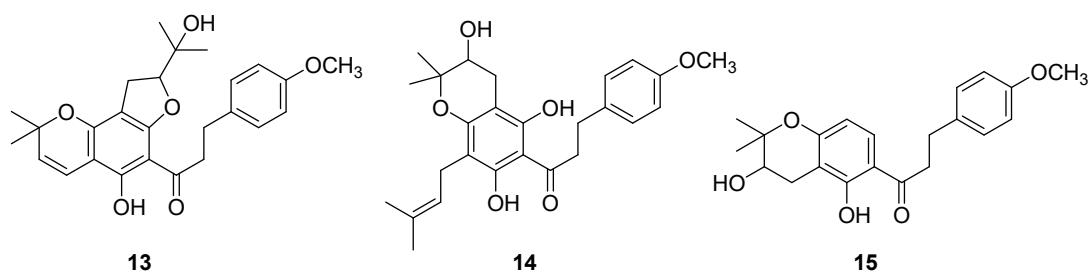


(C)



[그림] 화합물 12의 분광학 자료 (A) ^1H -NMR 스펙트럼, (B) HMBC 스펙트럼, (C) HREIMS 분석

2-2-14-3. 천근발(*Flemingia philippinensis*) 뿌리로부터 분리한 dihydrochalcone

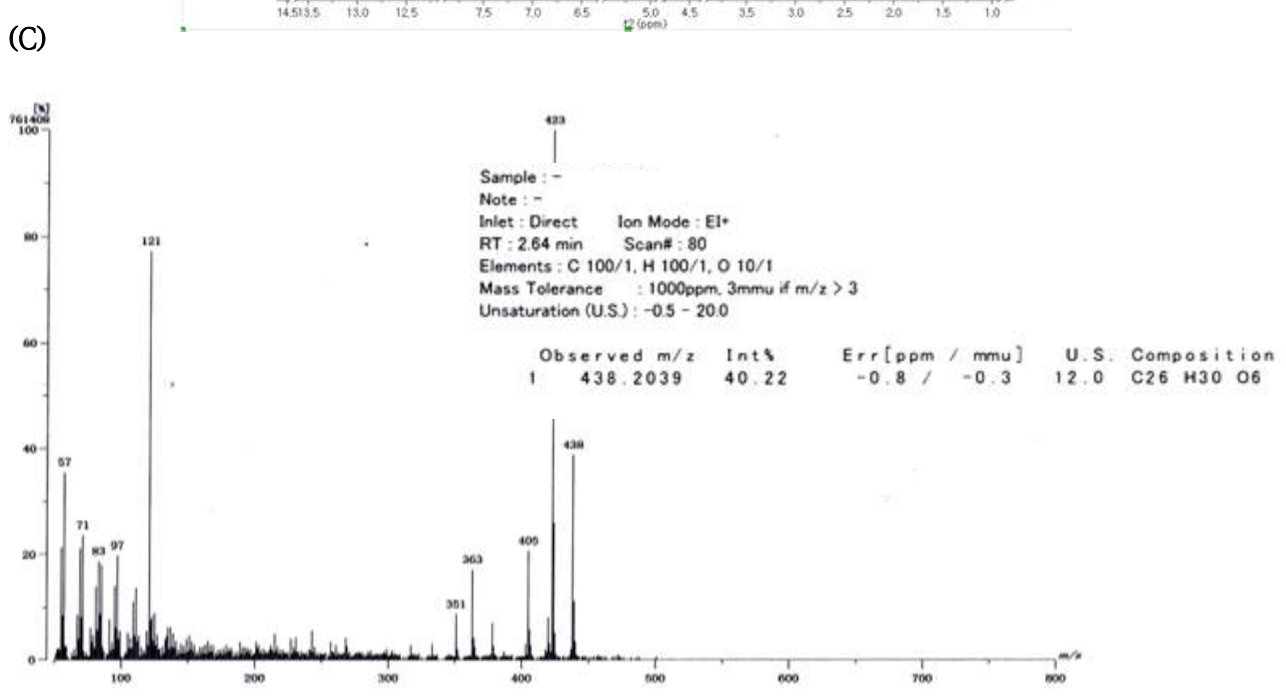
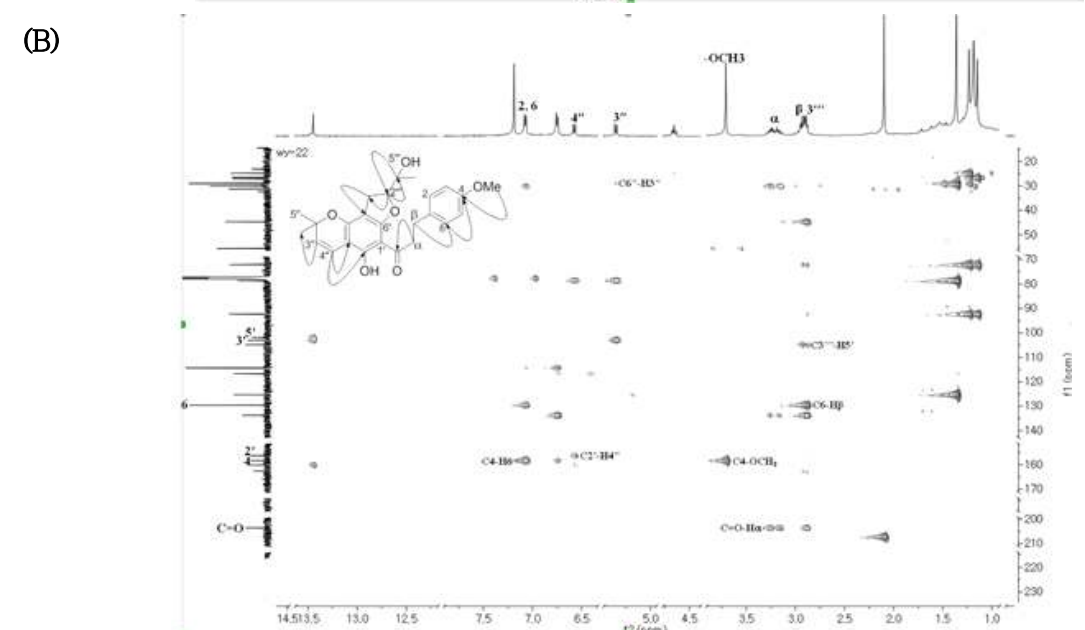
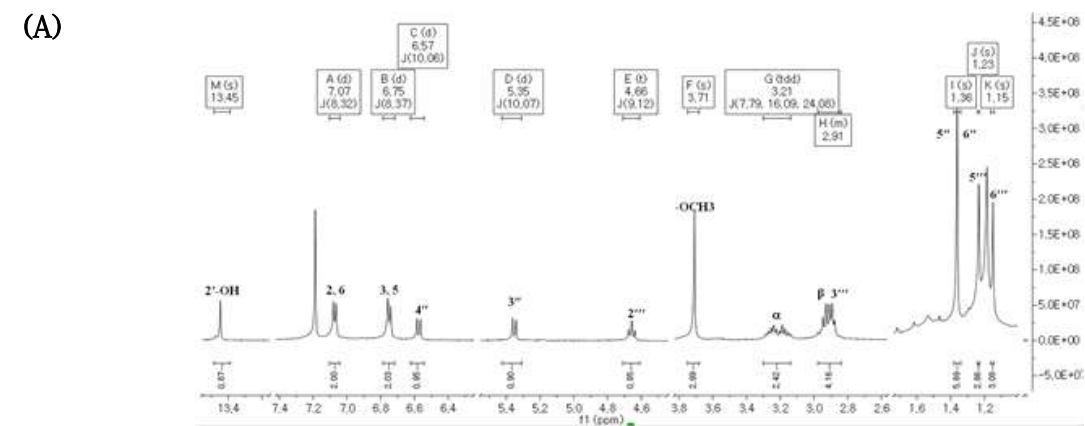


[그림] 천근발로부터 분리한 3종의 디하이드로 칼콘 화합물

화합물 **13** (Fleminchalcone C): UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 275 (4.56), 360 (3.41) nm; EIMS m/z 438 [M^+]; HREIMS m/z 438.2039 (calcd 438.2042 for $C_{26}H_{30}O_6$); 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$), δ 1.15 (3H, s, 6 $''$), 1.23 (3H, s, 5 $''$), 2.93 (4H, m, β , 3 $''$), 3.21 (2H, m, α), 4.66 (1H, t, $J = 9.1$ Hz, 2 $''$), 5.35 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, 3 $''$), 6.57 (1H, d, $J = 10.0$ Hz, 4 $''$), 6.75 (2H, d, $J = 8.3$ Hz, 3,5), 7.07 (2H, d, $J = 8.3$ Hz, 2,6), 13.45 (1H, s, 2' OH); ^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$), δ 24.8 (C-6 $''$), 26.5 (C-5 $''$), 27.0 (C-3 $''$), 29.1 (C-5 $''$, 6 $''$), 30.1 (C- β), 44.6 (C- α), 55.6 (C-OCH $_3$), 72.0 (C-4 $''$), 78.6 (C-2 $''$), 92.2 (C-2 $''$), 101.8 (C-1'), 103.0 (C-3'), 104.8 (C-5'), 114.3 (C-3, 5), 116.7 (C-4 $''$), 125.3 (C-3 $''$), 129.6 (C-2, 6), 133.7 (C-1), 156.3 (C-2'), 158.4 (C-4), 160.2 (C-4'), 162.7 (C-6'), 203.6 (C=O).

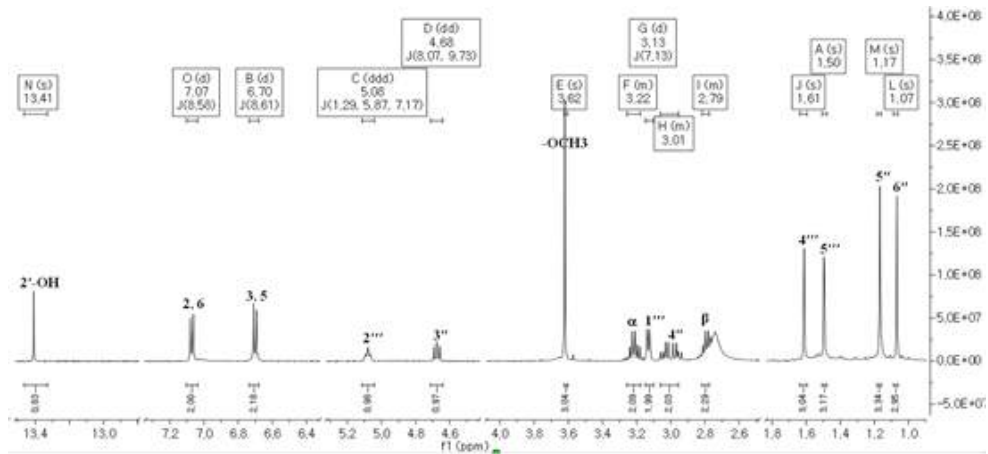
화합물 **14** (Fleminchalcone A): UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 286 (4.26) nm; EIMS m/z 440 [M^+]; HREIMS m/z 440.2199 (calcd 440.2199 for $C_{26}H_{32}O_6$); 1H -NMR (500 MHz, Acetone- d_6), δ 1.07 (3H, s, 6 $''$), 1.17 (3H, s, 5 $''$), 1.50 (3H, s, 4 $''$), 1.61 (3H, s, 5 $''$), 2.79 (2H, m, β), 3.01 (2H, m, 4 $''$), 3.13 (2H, d, $J = 7.1$ Hz, 1 $''$), 3.21 (2H, m, α), 4.68 (1H, m, 3 $''$), 5.08 (1H, t, $J = 7.1$ Hz, 2 $''$), 6.70 (2H, d, $J = 8.5$, 3,5), 7.08 (2H, d, $J = 8.5$, 2,6), 13.41 (1H, s, 2' OH); ^{13}C -NMR (125 MHz, Acetone- d_6): δ 18.3 (C-4 $''$), 22.5 (C-1 $''$), 26.3 (C-6 $''$), 26.4 (C-5 $''$), 26.6 (C-5 $''$), 28.1 (C-4 $''$), 30.6 (C- β), 45.4 (C-2), 79.6 (C-2 $''$), 92.6 (C-3 $''$), 102.4 (C-1'), 105.3 (C-5'), 108.7 (C-3'), 114.9 (C-3, 5), 124.6 (C-2 $''$), 130.6 (C-2, 6), 134.9 (C-1), 159.0 (C-4'), 159.4 (C-4), 162.4 (C-6'), 163.3 (C-2'), 204.7 (C=O).

화합물 **15** (Fleminchalcone B) : UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 272 (4.04), 359 (3.45) nm; EIMS m/z 356 [M^+]; HREIMS m/z 356.1625 (calcd 356.1624 for $C_{21}H_{24}O_5$); 1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$), δ 1.26 (3H, s, 6 $''$), 1.35 (3H, s, 5 $''$), 3.02 (2H, m, β), 3.13 (2H, m, 4 $''$), 3.40 (2H, m, α), 4.77 (1H, t, $J = 9.1$ Hz, 3 $''$), 6.47 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, 5'), 6.86 (2H, d, $J = 8.4$, 3,5), 7.18 (2H, d, $J = 8.4$, 2,6), 7.22 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, 6'), 12.67 (1H, 2' OH); ^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$), δ 25.0 (C-6 $''$, 5 $''$), 29.8 (C-4 $''$), 30.1 (C- β), 45.4 (C- α), 55.7 (C-OCH $_3$), 72.0 (C-2 $''$), 92.0 (C-3 $''$), 107.2 (C-1'), 109.9 (C-5'), 114.4 (C-3, 5), 117.9 (C-3'), 129.6 (C-2, 6), 131.9 (C-6'), 133.5 (C-1), 158.4 (C-4), 160.9 (C-2'), 163.1 (C-4'), 205.2 (C=O).

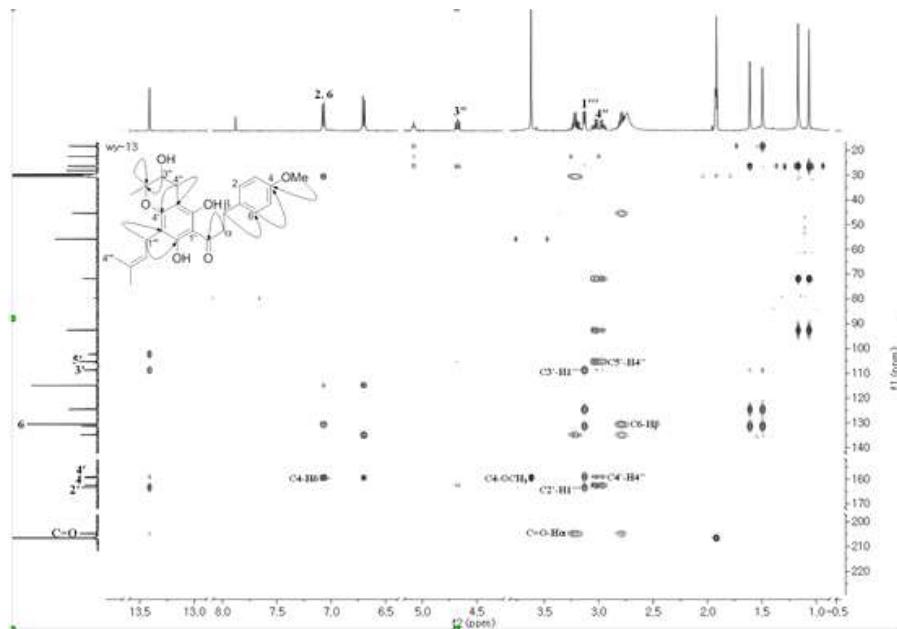


[그림] 화합물 13의 분광학 자료 (A) ^1H -NMR 스펙트럼, (B) HMBC 스펙트럼, (C) HREIMS 분석

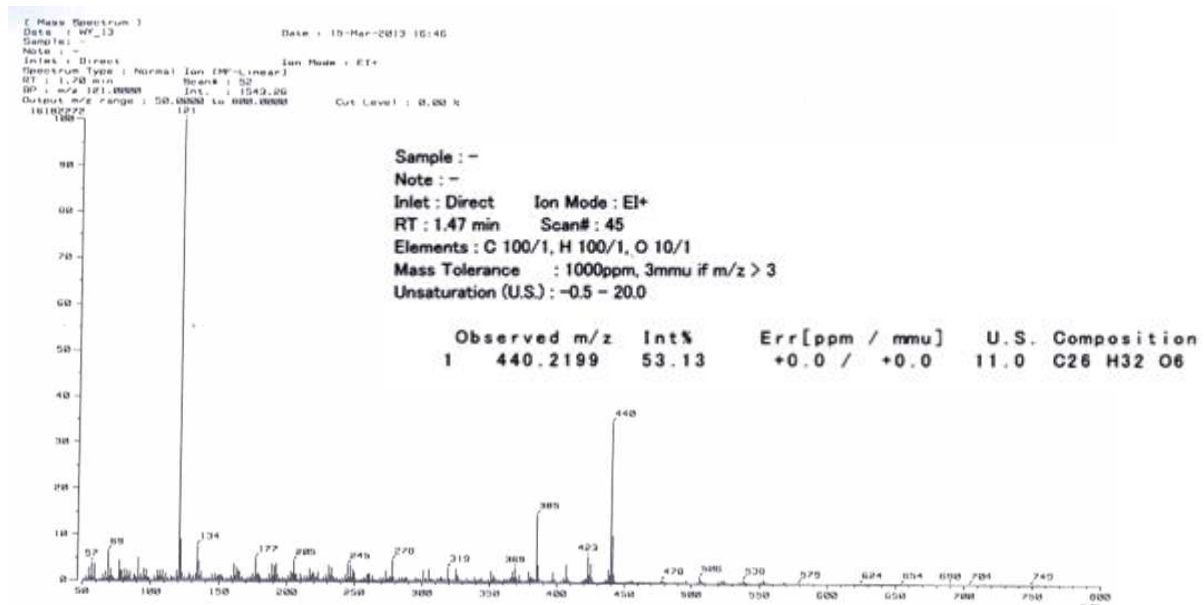
(A)



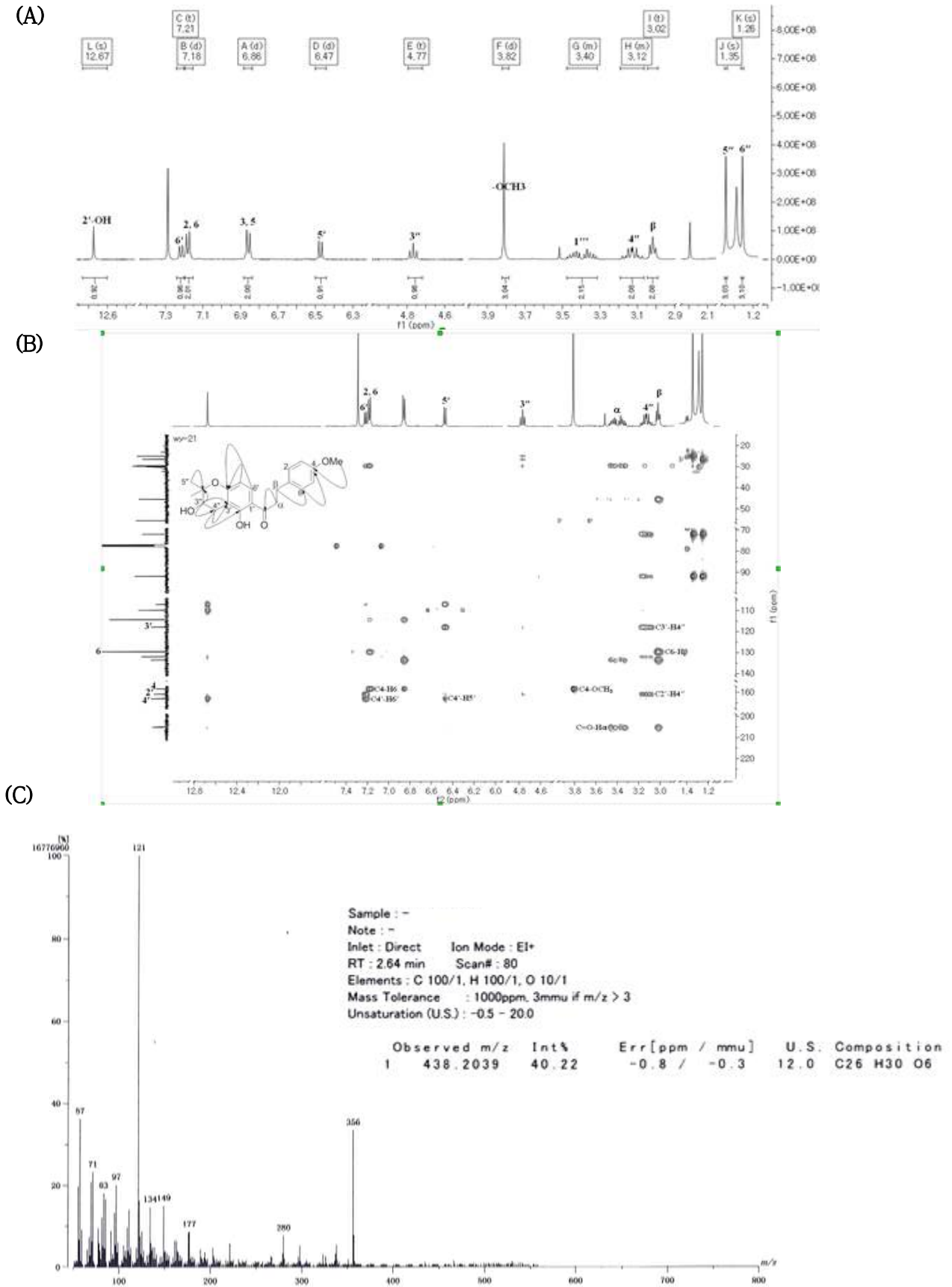
(B)



(C)



[그림] 화합물 14의 분광학 자료 (A) ^1H -NMR 스펙트럼, (B) HMBC 스펙트럼, (C) HREIMS 분석

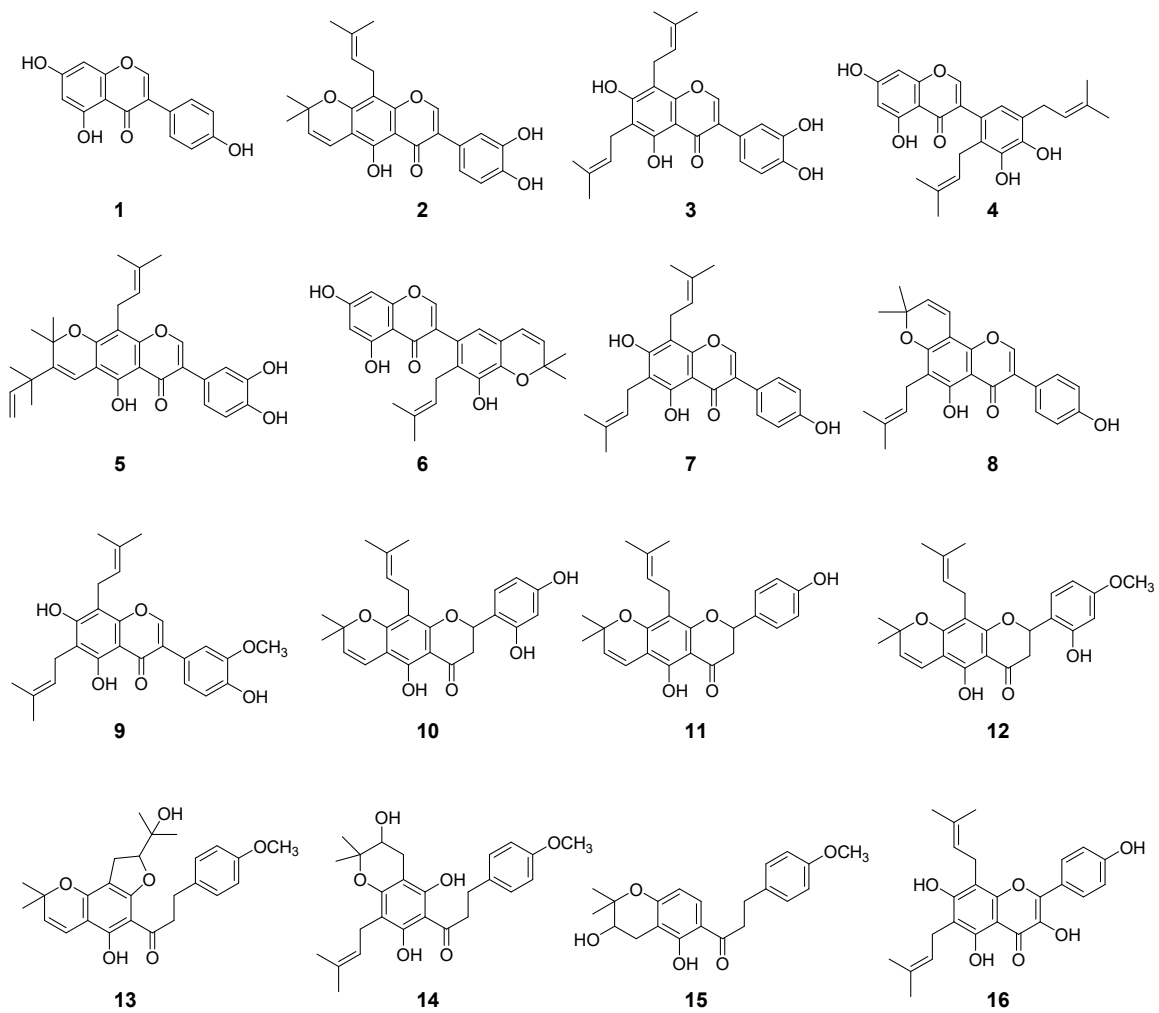


[그림] 화합물 15의 분광학 자료 (A) ^1H -NMR 스펙트럼, (B) HMBC 스펙트럼, (C) HREIMS 분석

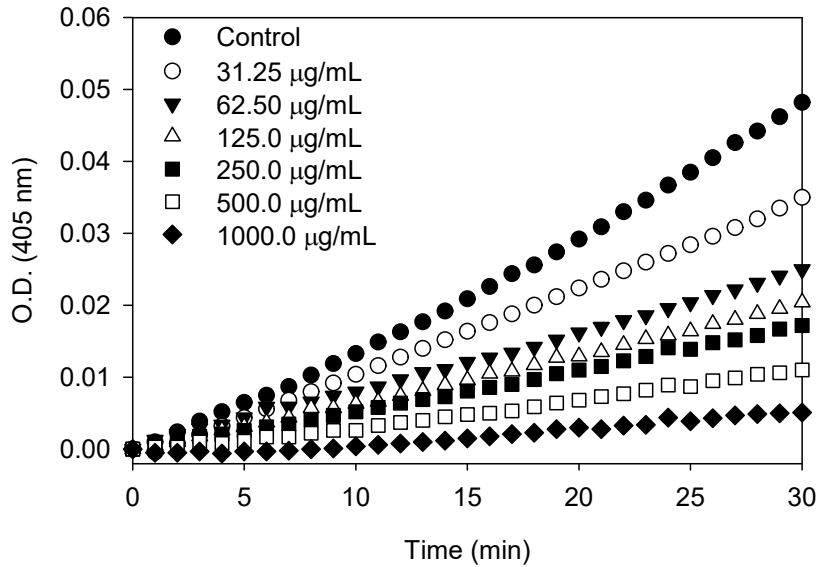
2-2-15. 천근밭에서 분리된 이소플라본 유도체 생리활성 검정 (결과-14)

2-2-15-1. Human neutrophil elastase (HNE) 저해활성

- Fabaton 콩잎을 사용하여 건기식이나 일반식품으로 가공시 보다 넓은 작용점에 대응할 수 있게 기능 보강제로 이용될 재료를 탐색함
- 분리한 유용대사체 중 아래 그림의 16종의 유용대사체는 항염에 관여하는 Human neutrophil elastase 효소의 저해제로서 작용하는 것을 확인하여, HNE 저해와 관련한 kinetic, slow-binding 및 binding affinity 등의 전반적인 연구를 수행함



[그림] 천근밭 뿌리껍질로부터 분리한 HNE 저해활성을 갖는 16종의 유용대사체



[그림] 천근발 뿌리 메탄올 추출물 농도에 따른 HNE 저해활성

- 천근발 뿌리껍질 메탄올추출물($IC_{50} = 87.0 \mu\text{g/mL}$)은 농도의존적으로 엘라스테이스를 저해함
- HNE 저해제로 선발된 16종의 화합물은 $1.3 \sim 213.1 \mu\text{M}$ 의 IC_{50} 값을 갖는 것을 확인

[표] 발굴된 유용대사체 (1-16)의 엘라스테이스에 대한 저해활성

Compounds	IC_{50}^a (μM)	Inhibition mode (K_i^b , μM)	K_i (μM)	K_S (μM)
1	51.4 ± 0.5	Noncompetitive (48.3 ± 0.7)	NT ^c	NT
2	3.1 ± 0.2	Competitive (1.8 ± 0.4)	NT	NT
3	1.3 ± 0.3	Competitive (0.9 ± 0.1)	NT	NT
4	213.1 ± 1.9	Competitive (131.1 ± 1.4)	NT	NT
5	8.3 ± 0.4	Competitive (5.2 ± 0.3)	NT	NT
6	22.4 ± 0.7	Noncompetitive (22.4 ± 0.9)	NT	NT
7	6.0 ± 0.3	Competitive (3.4 ± 0.2)	NT	NT
8	26.0 ± 0.6	Competitive (14.1 ± 0.6)	NT	NT
9	12.0 ± 0.4	Competitive (6.2 ± 0.5)	NT	NT
10	5.3 ± 0.5	Mixed type I (3.6 ± 0.3)	39.3 ± 0.3	9.1 ± 0.4
11	13.3 ± 0.1	Mixed type I (14.7 ± 0.5)	14.3 ± 0.2	39.6 ± 0.8
12	110.2 ± 0.8	Mixed type I (89.8 ± 0.5)	92.5 ± 1.1	232.3 ± 3.2
13	62.1 ± 0.5	Mixed type I (48.8 ± 0.7)	52.6 ± 1.8	167.8 ± 1.5
14	76.6 ± 0.9	Mixed type I (47.3 ± 0.2)	46.6 ± 0.8	92.4 ± 0.5
15	53.2 ± 0.2	Mixed type I (44.9 ± 0.6)	42.7 ± 0.4	158.0 ± 1.2
16	29.3 ± 0.3	Mixed type I (28.2 ± 0.1)	28.9 ± 0.7	106.9 ± 1.1
Oleanolic acid ^d	28.4 ± 0.5	NT	NT	NT

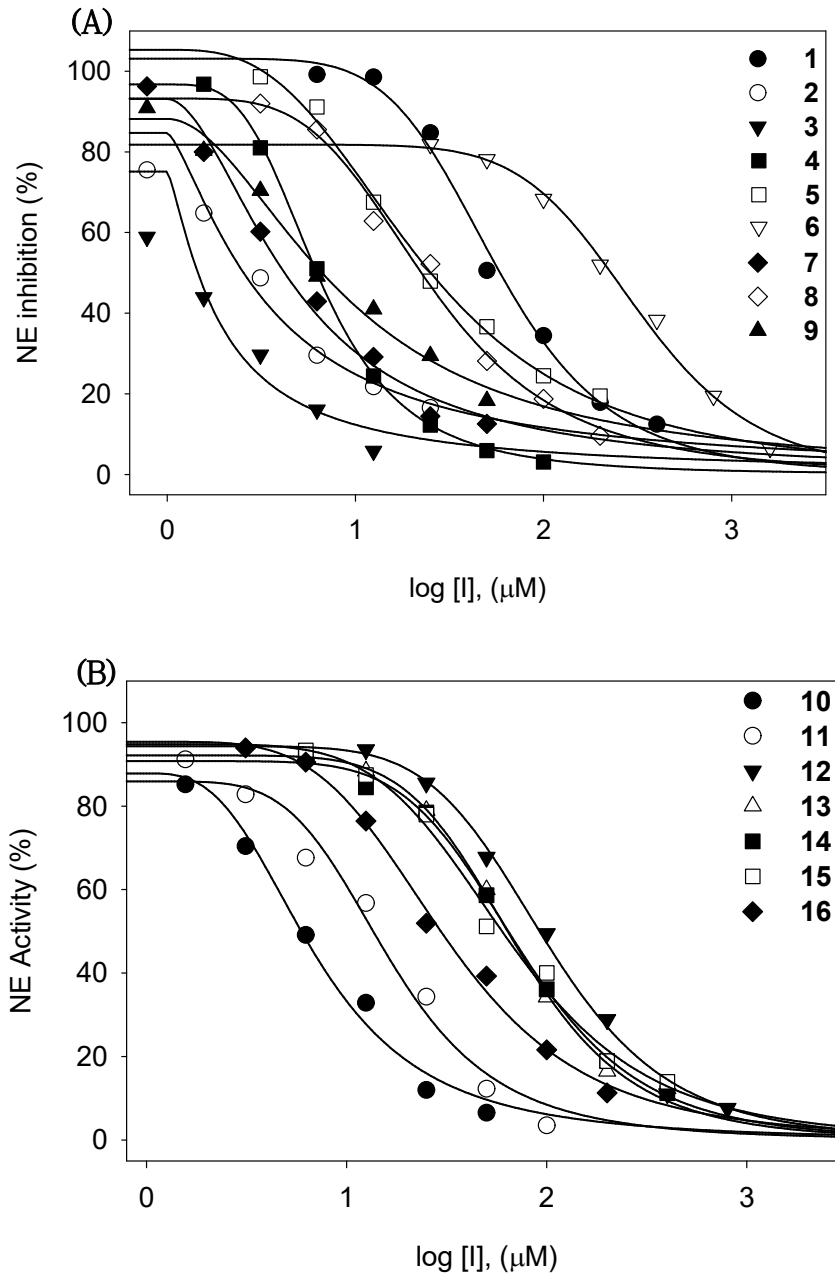
All compounds were examined in a set of experiments repeated three times.

a IC_{50} values of compounds represent the concentration that caused 50% enzyme activity loss.

b Values of inhibition constant.

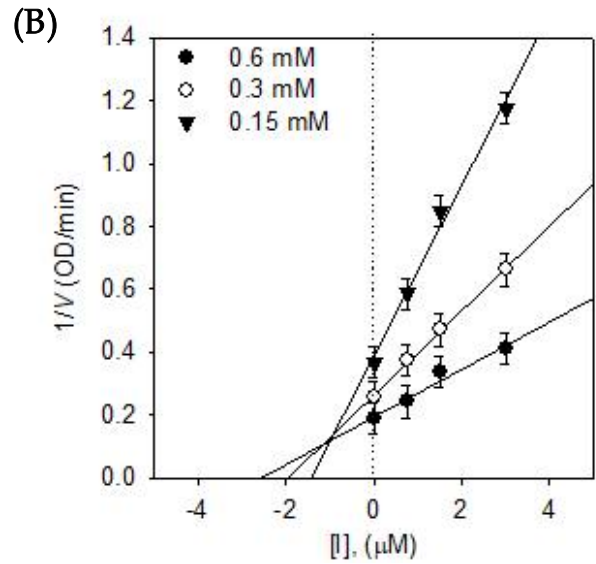
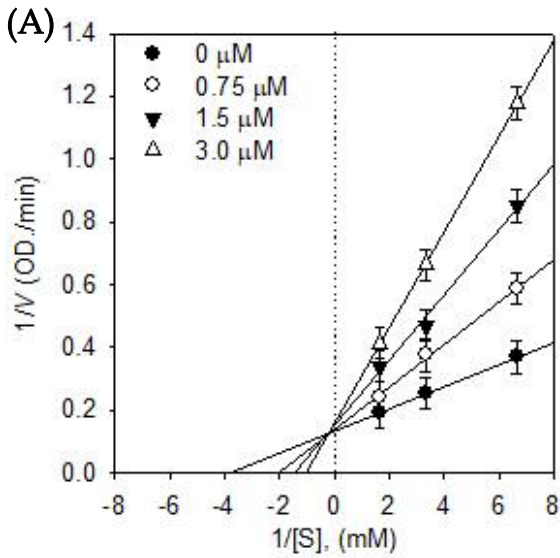
c NT is not tested.

d Oleanolic acid are positive control.



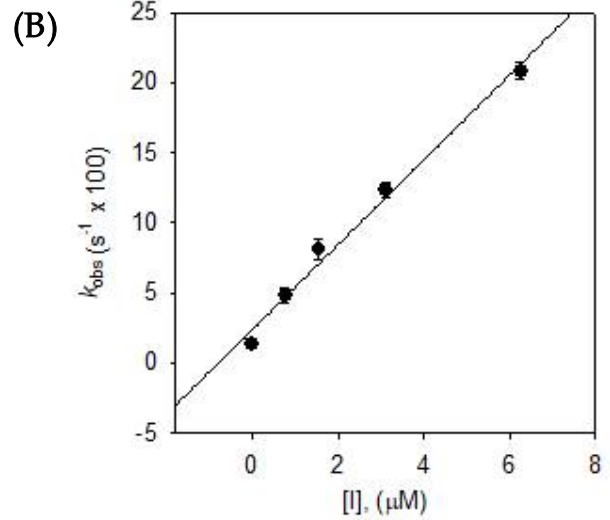
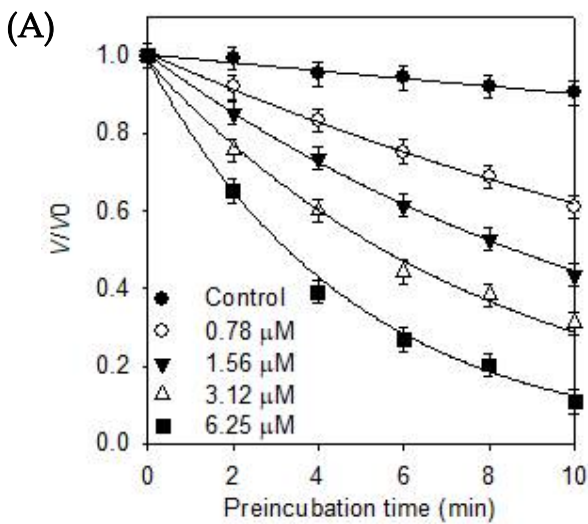
[그림] 천근밭의 엘라스테이즈 저해활성 (A) 발굴된 유용대사체 중 isoflavone (1-9)의 농도에 따른 엘라스테이즈 저해활성 (B) 발굴된 유용대사체 중 flavone (10-16)의 농도에 따른 엘라스테이즈 저해활성

- 활성이 가장 높은 화합물 3 ($IC_{50} = 1.3 \mu M$)은 positive control인 oleanolic acid ($IC_{50} = 28.4 \mu M$)보다 약 20배 이상의 높은 활성을 나타냄.
- 분리한 16종의 대사체 모두는 농도의존적으로 엘라스테이즈를 저해하였고, 높은 활성을 나타내어 엘라스테이즈 저해제로 큰 경쟁력이 있음.



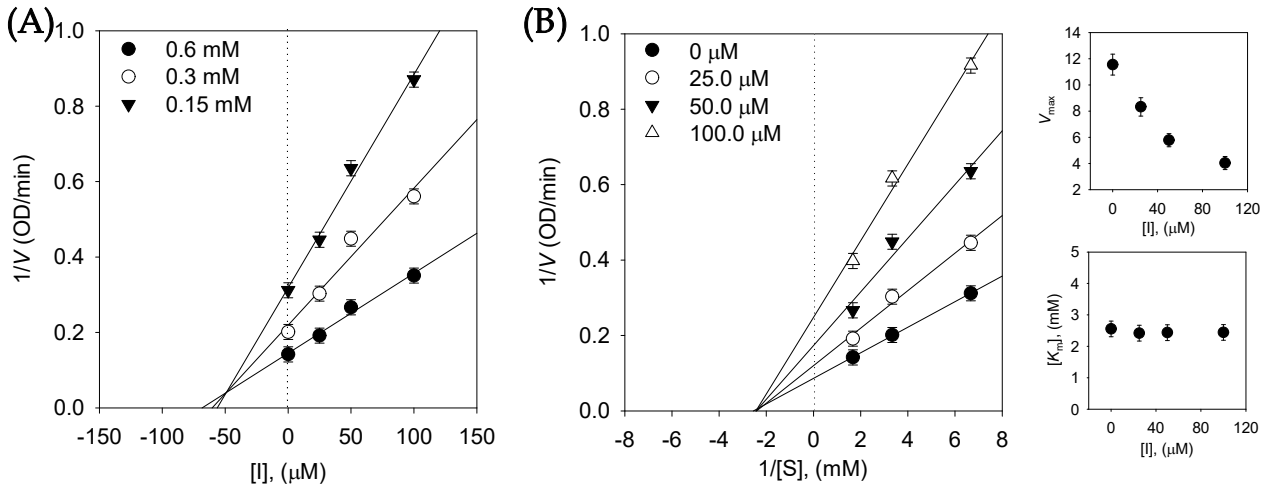
[그림] 화합물 3의 HNE 저해 활성 (A) Lineweaver-Burk plot, (B) Dixon plot

- Lineweaver-Burk plot을 통해 화합물 3이 경쟁적 저해양상을 보이는 것을 규명함.
- Dixon plot을 통해 화합물 3이 0.9 μM 의 저해상수 (K_i)을 가짐을 규명.



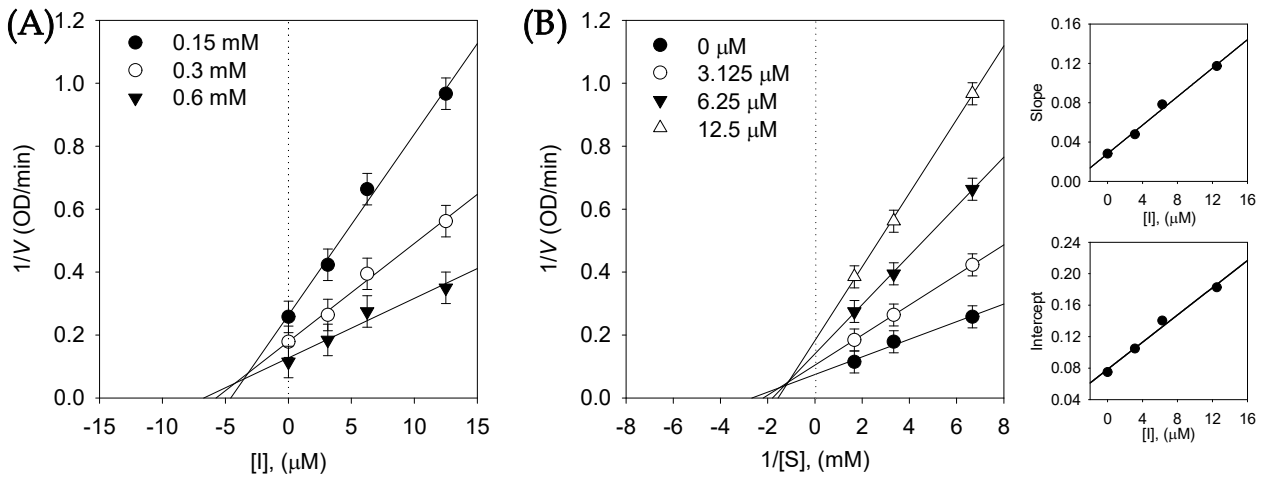
[그림] 화합물 3의 HNE 저해 활성 (A) 화합물 3의 농도 (0, 0.78, 1.56, 3.12, 6.25 μM)를 달리했을 때 preincubation time에 따른 엘라스테이스 저해양상, (B) 화합물 3의 농도와 각 농도에서의 K_{obs} 와의 관계.

- 화합물 3의 slow-binding 기능을 규명하였고, 화합물 3이 목표효소와 결합력이 상대적으로 높음을 확인
- 화합물 3은 HNE에 대해 reversible, simple, slow-binding 저해제임



[그림] 화합물 1의 엘라스테이즈 저해활성 검증. (A) 화합물 1의 엘라스테이즈 저해활성에 관한 Dixon plot, (B) 화합물 1의 엘라스테이즈 저해활성에 관한 Lineweaver-Burk plot, inset: 화합물 1의 농도 (0, 25, 50, 100 μM)에 따른 V_{max} 와 K_{m} 값

- Lineweaver-Burk plot을 통해 B-ring에 작용기가 없는 이소플라본 화합물 1은 엘라스테이즈에 대해 비경쟁적 저해양상을 보이는 것을 확인
- Dixon plot을 통해 화합물 1이 48.3 μM 의 저해상수 (K_i)을 가짐을 규명함

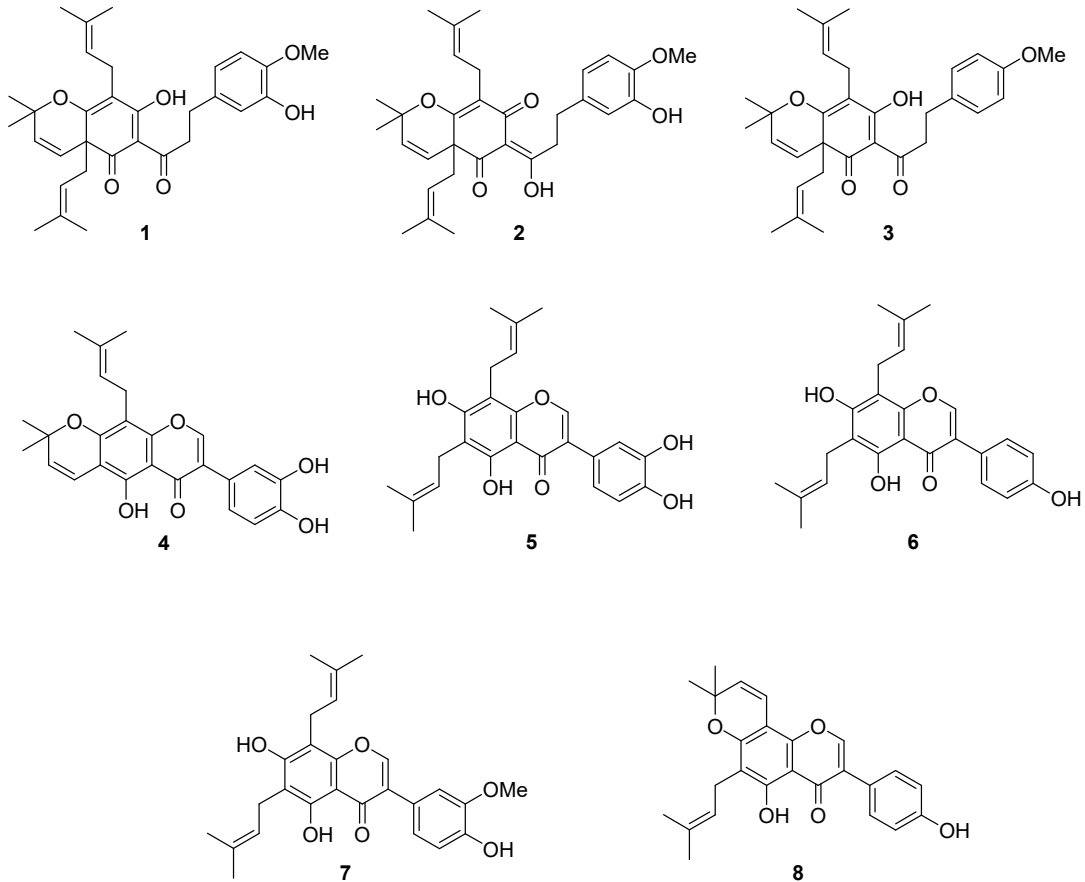


[그림] 10의 엘라스테이즈 저해활성 검증. (A) 화합물 10의 엘라스테이즈 저해활성에 관한 Dixon plot, (B) 화합물 10의 엘라스테이즈 저해활성에 관한 Lineweaver-Burk plot, inset: 화합물 10의 농도 (0, 3.125, 6.25, 12.5 μM)에 따른 Slope 값과 Intercept 값.

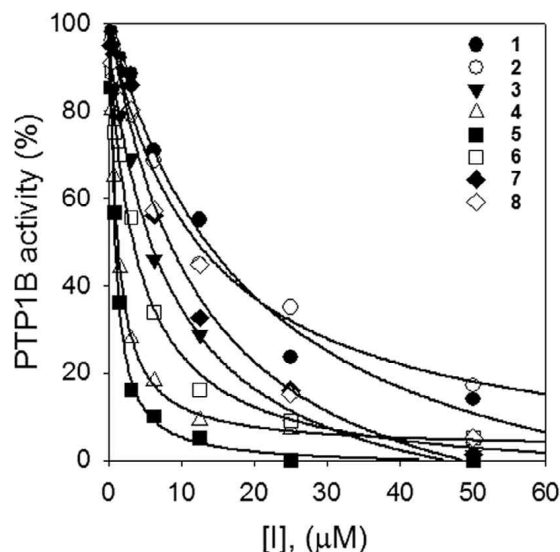
- Lineweaver-Burk plot을 통해 flavanone, dihydrochalcone, 및 flavonol 화합물(10-16)은 엘라스테이즈에 대해 K_i 값이 K_S 값보다 높은 제1형 혼합저해양상을 보이는 것을 확인
- Dixon plot을 통해 화합물 10이 3.6 μM 의 저해상수 (K_i)을 가짐을 규명함

2-2-15-2. Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B) 저해활성

- 분리한 유용대사체 중 아래 그림의 8종의 유용대사체는 당노 및 비만에 관여하는 Protein Tyrosine Phosphatase 1B 효소의 저해제로서 작용하는 것을 확인
- PTP1B에 활성을 가지는 물질은 3종의 chromenedione계열 및 5종의 isoflavone 계열이었으며, 이 중 philippin A (1), philippin B (2) 및 philippin C (3)는 신규물질로 규명



[그림] 천근발 뿌리껍질로부터 분리한 PTP1B 저해활성을 갖는 8종의 유용대사체



[그림] 천근발로부터 분리한 유용대사체 (1-8) 농도에 따른 PTP1B 저해활성

- 활성이 가장 높은 화합물 5 ($IC_{50} = 2.4 \mu M$)은 positive control인 ursolic acid ($IC_{50} = 15.5 \mu M$)보다 약 7배 이상의 높은 활성을 나타냄.
- 분리한 8종의 대사체 모두는 농도의존적으로 PTP1B를 저해하였고, 높은 활성을 나타냄

[표] 발굴된 유용대사체 (1-8)의 PTP1B 저해활성

Compounds	IC_{50}^a (μM)	Inhibition mode (K_i^b , μM)
1	29.4 ± 0.4	Competitive (17.6 ± 0.3)
2	20.2 ± 0.2	Competitive (12.3 ± 0.1)
3	6.5 ± 0.5	Competitive (3.4 ± 0.1)
4	3.6 ± 0.1	Noncompetitive (4.4 ± 0.3)
5	2.4 ± 0.3	Noncompetitive (2.5 ± 0.4)
6	9.3 ± 0.7	Noncompetitive (9.6 ± 0.2)
7	17.4 ± 0.2	Noncompetitive (19.2 ± 0.5)
8	23.6 ± 0.5	Noncompetitive (29.9 ± 0.4)
Ursolic acid ^d	15.5 ± 0.9	NT ^c

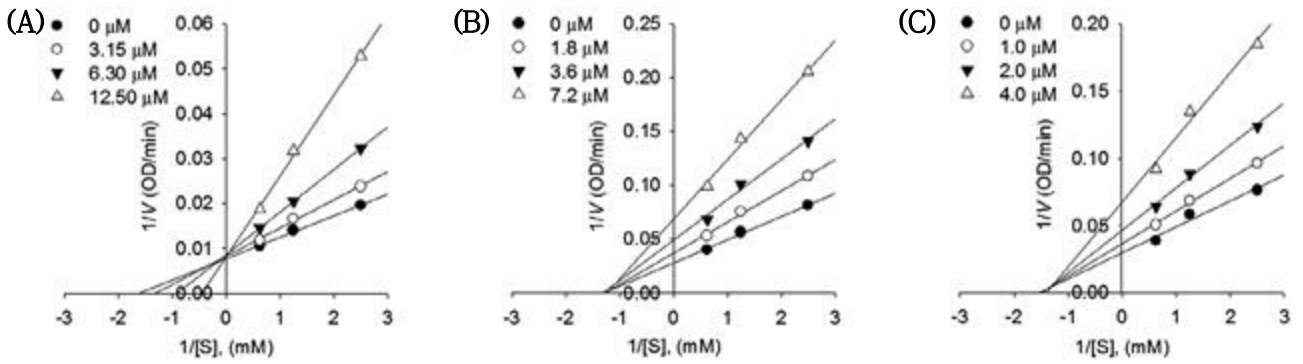
All compounds were examined in a set of experiments repeated three times.

a IC_{50} values of compounds represent the concentration that caused 50% enzyme activity loss.

b Values of inhibition constant.

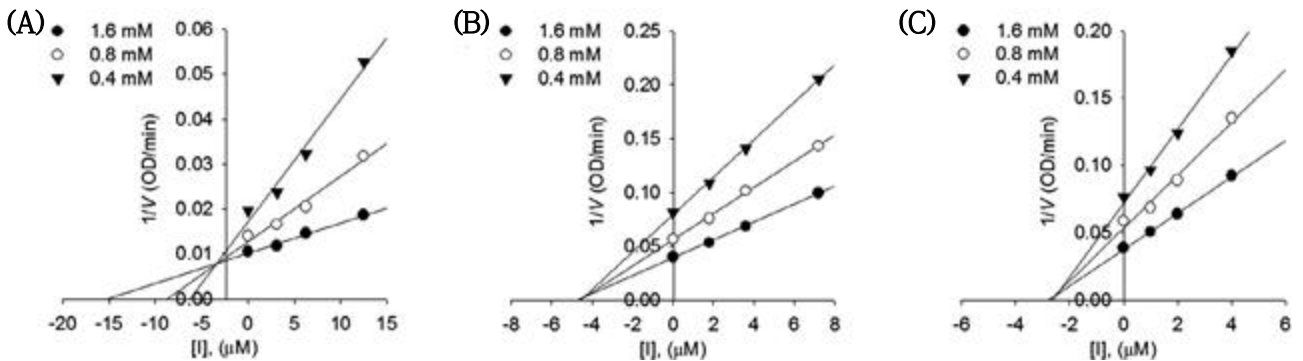
c NT is not tested.

d Ursolic acid are positive control.



[그림] PTP1B 저해활성에 관한 Lineweaver-Burk plot (A) 화합물 3, (B) 화합물 4, (C) 화합물 5

- Lineweaver-Burk plot을 통해 PTP1B에 대해 크로멘디온계열 화합물(1-3)은 경쟁적저해제, 이소플라본계열 화합물(4-8)은 비경쟁적 저해제임을 규명함



[그림] PTP1B 저해활성에 관한 Dixon plot (A) 화합물 3, (B) 화합물 4, (C) 화합물 5

- 크로멘디온 계열 화합물 중 PTP1B에 가장높은 저해활성을 갖는 8종의 화합물 중 활성이 좋은 화합물 3 ($IC_{50} = 6.5 \mu M$)의 저해상수(K_i)가 $3.4 \mu M$ 임을 Dixon plot을 통해 확인
- 이소플라본 계열 화합물 중 PTP1B에 가장높은 저해활성을 갖는 8종의 화합물 중 활성이 좋은 화합물 4 ($IC_{50} = 3.6 \mu M$) 및 화합물 5 ($IC_{50} = 2.4 \mu M$)의 저해상수(K_i)가 각각 $4.4 \mu M$ 및 $2.5 \mu M$ 임을 Dixon plot을 통해 확인

2-2-16. 연구개발성과 (결과-15)

2-2-16-1. 기술실시

번호	기술명	이전기업명	실시유형	기술실시일	기술료
1	이소플라본 유도체 고함량 콩잎 및 그 제조방법	롯데정밀화학 주식회사	특허등록	2016-10-31	150,000,000
2	이소플라본 유도체 고함량 콩잎 및 그 제조방법	(주)제이씨엔팜	특허등록	2017-01-26	200,000,000

2-2-16-2. 산업재산권

2-2-16-2-1. 특허출원

번호	출원등록명	출원자명	출원일	출원번호	비고
1	콩잎의 하이드록시프롤린 및 아르기닌 함량을 증가시키는 방법	경상대학교 산학협력단	2015-12-17	10-2015-0180827	대한민국
2	타이로시네이즈 및 멜라닌 생성 저해 활성을 갖는 캄필로트로피스 히르텔라 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 화장품 조성물	경상대학교 산학협력단	2016-05-11	10-2016-0057561	대한민국
3	이소플라본 유도체 고함량 콩잎 또는 콩줄기, 및 그 제조방법	경상대학교 산학협력단	2016-06-09	2016-539220	일본
4	다이드제인 및 제니스테인을 고함량으로 포함하는 파바톤 콩잎 조성물의 제조방법 및 이를 이용하여 제조된 갱년기 증후군 개선 유효성분 강화 콩잎 조성물	경남과학 기술대학교 산학협력단	2017-06-09	10-2017-0072798	대한민국
5	이소플라본 유도체 고함량 콩잎 또는 콩줄기, 및 그 제조 방법	경상대학교 산학협력단	2017-06-10	15/179,720	미국

6	이소플라본 유도체 고함량 콩잎 또는 콩줄기, 및 그 제조 방법	경상대학교 산학협력단	2017-06-29	14869566.1	유럽연합
7	이소플라본 유도체 고함량 콩잎 또는 콩줄기, 및 그 제조 방법	경상대학교 산학협력단	2017-08-15	201480075528.3	중국
8	암 조건에서 이소플라본 고 함유 콩잎 조제 방법	경상대학교 산학협력단	2019-07-25	10-2019-0090238	대한민국

2-2-16-2-2. 특허등록

번호	출원등록명	출원자명	등록일	등록번호	비고
1	이소플라본 유도체 고함량 콩줄기 및 그 제조 방법	경상대학교 산학협력단	2016-03-23	10-1607188	대한민국
2	콩잎의 하이드록시프롤린 및 아르기닌 함량을 증가시키는 방법	경상대학교 산학협력단	2018-03-08	10-1838619	대한민국
3	타이로시네이즈 및 멜라닌 생성 저해 활성을 갖는 캄필로트로피스 히르텔라 추출물을 유효성분으로 함유하는 피부 미백용 화장품 조성물	경상대학교 산학협력단	2018-06-01	10-1866022	대한민국
4	이소플라본 유도체 고함량 콩잎 또는 콩줄기, 및 그 제조방법	경상대학교 산학협력단	2018-07-06	6364085	일본
5	이소플라본 유도체 고함량 콩잎 또는 콩줄기, 및 그 제조방법	경상대학교 산학협력단	2019-01-22	10,183,050	미국
6	다이드제인 및 제니스테인을 고함량으로 포함하는 파바톤 콩잎 조성물의 제조방법 및 이를 이용하여 제조된 갱년기 증후군 개선 유효성분 강화 콩잎 조성물	경남과학기술대학교 산학협력단	2019-03-27	10-1965059	대한민국

2-2-16-3. 논문 게재

번호	논문명	학술지명	저자명	권(호)	게재 년도	구분	비고
1	Highly potent tyrosinase inhibitor, neorauflavane from <i>Campylotropis hirtella</i> and inhibitory mechanism with molecular docking	<i>Bioorganic & Medicinal Chemistry</i>	Xuefei Tan, Yeong Hun Song, Chanin Park, Ki-Won Lee, Jeong Yoon Kim, Dae Wook Kim, Kwang Dong Kim, Keun Woo Lee, Marcus J. Curtis-Long, Ki Hun Park	24(2)	2016	SCI	국외 IF2.802
2	Cinnamic acid amides from <i>Tribulus terrestris</i> displaying uncompetitive alpha;-glucosidase inhibition	<i>European Journal of Medicinal Chemistry</i>	Yeong Hun Song, Dae Wook Kim, Marcus J. Curtis -Long, Chanin Park, Minky Son, Jeong Yoon Kim, Heung Joo Yuk, Keun Woo Lee, Ki Hun park	114(0)	2016	SCI	국외 IF4.833 (JCR 10%)
3	Ethylene Induced a High Accumulation of Dietary Isoflavones and Expression of Isoflavonoid Biosynthetic Genes in Soybean (<i>Glycine max</i>) Leaves	<i>Journal of Agricultural and Food Chemistry</i>	Heong Joo Yuk, Yeong Hun Song, Marcus J. Curtis- Long, Dae Wook Kim, Su Gyeong Woo, Yong Bok Lee, Zia Uddin, Cha Young Kim, Ki Hun Park	64(39)	2016	SCI	국외 IF3.571 (JCR 10%)
4	Potent bacterial neuraminidase inhibitors, anthraquinone glucosides from <i>Polygonum cuspidatum</i> and their inhibitory mechanism	<i>Journal of Ethnopharmacology</i>	Zia Uddin, Yeong Hun Song, Marcus J. Curtis-Long, Jeong Yoon Kim, Heung Joo Yuk, Ki Hun Park	193(0)	2016	SCI	국외 IF3.414
5	Visconata: A rare flavonol having long chain fatty acid from <i>Dodonaea viscosa</i> which inhibits Human neutrophil elastase (HNE)	<i>Tetrahedron letters</i>	Zia Uddin, Zuopeng Li, Yeong Hun Song, Jeong Yoon Kim, Ki Hun Park	58(25)	2017	SCI	국외 IF2.259
6	Phytochemical profile and angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity of <i>Limonium michelsonii</i> Lincz	<i>Journal of Natural Medicines</i>	Janar Jenis, Jeong Yoon Kim, Zia Uddin, Yeong Hun Song, Hyeong-Hwan Lee, Ki Hun park	71(4)	2017	SCIE	국외 IF1.966
7	Inhibition of protein tyrosine phosphatase (PTP1B) and α -glucosidase by geranylated flavonoids from <i>Paulownia tomentosa</i>	<i>Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry</i>	Yeong Hun Song, Zia Uddin, Young Min Jin, Zuopeng Li, Marcus John Curtis-Long, Kwang Dong Kim, Jung Keun Cho, Ki Hun Park	32(1)	2017	SCI	국외 IF4.027

8	Inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) and alpha-glucosidase by xanthenes from <i>Cratoxylum cochinchinense</i> , and their kinetic characterization	<i>Bioorganic & Medicinal Chemistry</i>	Zuo Peng Li, Yeong Hun Song, Zia Uddin, Yan Wang, Ki Hun Park	26(3)	2018	SCI	국외 IF2.802
9	Isolation and Characterization of Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B) Inhibitory Polyphenolic Compounds From <i>Dodonaea viscosa</i> and Their Kinetic Analysis	<i>Frontiers in Chemistry</i>	Zia Uddin, Yeong Hun Song, Mahboob Ullah, Zuopeng Li, Jeong Yoon Kim, Ki Hun Park	6(0)	2018	SCIE	국외 IF3.782
10	Caged xanthenes displaying protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) inhibition from <i>Cratoxylum cochinchinense</i>	<i>Bioorganic Chemistry</i>	Zuo Peng Li, Hyeong-Hwang Lee, Zia Uddin, Yeong Hun Song, Ki Hun Park	78(0)	2018	SCI	국외 IF3.926
11	Isoflavone-enriched soybean (<i>Glycine max</i>) leaves prevents ovariectomy-induced obesity by enhancing fatty acid oxidation	<i>Journal of Functional Foods</i>	Cheng-liang Xie, Sang Soo Kang, Kye Man Cho, Ki Hun Park, Dong Hoon Lee	43(0)	2018	SCIE	국외 IF3.197
12	Antioxidant Activities of Phenolic Metabolites from <i>Flemingia philippinensis</i> Merr. et Rolfe and Their Application to DNA Damage Protection	<i>Molecules</i>	Jeong Yoon Kim, Yan Wang, Yeong Hun Song, Zia Uddin, Zuo Peng Li, Yeong Jun Ban, Ki Hun Park	23(4)	2018	SCIE	국외 IF3.060
13	Competitive neutrophil elastase inhibitory isoflavones from the roots of <i>Flemingia philippinensis</i>	<i>Bioorganic Chemistry</i>	Jeong Yoon Kim, Yan Wang, Zia Uddin, Yeong Hun Song, Zuo Peng Li, Janar Jenis, Ki Hun Park	78(0)	2018	SCI	국외 IF3.926
14	Comparisons of nutritional constituents in soybeans during solid state fermentation times and screening for their glucosidase enzymes and antioxidant properties	<i>Food chemistry</i>	Jin Hwang Lee, Chung Eun Hwang, Kwang Sik Son, Kye Man Cho	272(0)	2019	SCI	국외 IF5.399 (JCR 10%)

2-2-16-4. 학술회의 발표

번호	학술회의명	발표제목	발표일시	장소
1	The 6 th International Conference on Natural Products for Health and Beauty (NATPRO6)	Cinnamic amides from <i>Tribulus terrestris</i> displaying uncompetitive α -glucosidase inhibition	2016-01-21	Pullman Raja Orchid Hotel, Khon Kaen, Thailand
2	The 6 th International Conference on Natural Products for Health and Beauty (NATPRO6)	Competitive tyrosinase inhibitor, tetrahydroxy isoflavanone from <i>Campylotropis hirtella</i> and inhibitory characteristics	2016-01-22	Pullman Raja Orchid Hotel, Khon Kaen, Thailand
3	The 6 th International Conference on Natural Products for Health and Beauty (NATPRO6)	Alkylated xanthenes from <i>Cratoxylum cochinchinense</i> and their α -Glucosidase inhibition	2016-01-22	Pullman Raja Orchid Hotel, Khon Kaen, Thailand
4	2016 한국응용생명화학학회	α -Glucosidase inhibition of flavonoids from <i>Paulownia tomentosa</i> and their inhibitory mechanism	2016-06-17	제주ICC, 한국
5	2016 한국응용생명화학학회	α -Glucosidase inhibition of (E)-N-(4-fluorophenyl)-3-(4-hydroxyphenyl)acrylamide and its kinetic mechanism	2016-06-17	제주ICC, 한국
6	2016 한국응용생명화학학회 천연물 분과 및 충청지회 합동 심포지엄	Human neutrophil elastase inhibitory activity of polyphenols from <i>Epimedium koreanum</i> Nakai	2016-11-04	대전 한화리조트
7	2016 한국미생물연합 국제학술대회	Comparison of Physiochemical Properties, Isoflavone Contents and Biological Activities in Lactic Acid Fermentation with the Isoflavone-containing High	2016-11-03	일산킨텍스, 한국
8	27 th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis(PBA)	Anti-osteoporotic and anti-obesity activities of soybean leaf in ovariectomized rats	2016-11-14	광저우, 중국
9	2017 한국응용생명화학학회	Inhibition of angiotensin-I converting enzyme (ACE) by flavonoid glycosides of <i>Limonium michelsonii</i> Lincz.	2017-06-16	부산 해운대 그랜드호텔, 한국
10	2017 한국응용생명화학학회	Identification of phenolic metabolites of <i>Limonium michelsonii</i> Lincz	2017-06-16	부산 해운대 그랜드호텔, 한국

11	2017 한국응용생명화학학회	Inhibition of neutrophil elastase by phenolic metabolites from <i>Dodonaea viscosa</i>	2017-06-16	부산 해운대 그랜드호텔, 한국
12	2017 한국응용생명화학학회	Visconata: A rare flavonol having long chain fatty acid from <i>Dodonaea viscosa</i> which inhibits Human Neutrophil Elastase (HNE)	2017-06-16	부산 해운대 그랜드호텔, 한국
13	2017 농업기술박람회 심포지움	대사체 중심 농업을 이용한 식물성 에스트로젠 고함유 콩잎 개발	2017-08-14	서울코엑스, 한국
14	제67회 대한해부학회	Anti-inflammatory and antiosteoporotic effects of isoflavone enriched soybean (<i>Glycine max</i>) leaf extrats	2017-10-18	부산백스코, 한국
15	2017한국식품영양과학회 국제 심포지엄 및 정기 학술대회	comparison of fermentative characteristics, isoflavone contents~	2017-11-08	HICO, 경주
16	2017한국식품영양과학회 국제 심포지엄 및 정기 학술대회	Comparison of γ -Aminobutyric Acid (GABA) and Isoflavone~	2017-11-08	HICO,경주
17	2018 한국응용생명화학학회	Evaluation of antioxidant effects of phenolic metabolites from <i>Flemingia philippinensis</i> by using four different radical sources	2018-06-18	ICC JEJU, Korea
18	2018 한국응용생명화학학회	Inhibition of Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) by phenolic metabolites from <i>Dodonaea viscosa</i>	2018-06-18	ICC JEJU, Korea
19	2018 한국응용생명화학학회	Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) inhibitory potentials of the caged xanthenes from <i>Cratogeomys cochinchinense</i>	2018-06-18	ICC JEJU, Korea
20	2018 한국응용생명화학학회	Isoflavones from <i>Flemingia philippinensis</i> and their DNA damage protection effects	2018-06-18	ICC JEJU, Korea
21	2018 한국응용생명화학학회	X-ray crystallographic analysis of caged xanthenes from <i>Cratogeomys cochinchinense</i>	2018-06-18	ICC JEJU, Korea
22	2019 Annual Meeting of the Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry(JSBBA)	Tyrosinase inhibition and kinetics of silydianin that is the most abundant phenolic metabolite in milk thistle	2019-03-27	Tokyo University of Agriculture in Tokyo, Japan

2-2-16-5. 홍보 실적



농촌진흥청 브리핑



YTN Science



연합뉴스



KBS1 뉴스광장



KBS1 정오뉴스



KBS1 9시 뉴스



SBS 뉴스



OBS 뉴스



MBC 뉴스



SCS 뉴스IN타임



YTN 뉴스 Q



SBS 생활 경제



세계 일보



경남 일보



BRIC

번호	홍보유형	매체명	제목 산업재산권 종류	일시
1	중앙전문지	한국농어촌방송	여성갱년기 치유 탁월, 신비의 '파바톤 콩잎' 개발 성공	2016-11-03
2	중앙전문지	소믈리에타임즈	식물성 에스트로겐 고함유 콩잎 생산 기술개발...기능성 식의약 소재 및 실용화로 고부가가치 창출 기대	2016-11-04
3	지방일간지	수원시민신문	'식물성 에스트로겐' 고함유 콩잎 생산 기술개발	2016-11-02
4	중앙전문지	식약일보	'식물성 에스트로겐' 고함유 콩잎 생산 기술개발	2016-11-03
5	중앙전문지	식품음료신문	'식물성 에스트로겐' 고함유 파바톤 콩잎 생산 기술 개발	2016-11-02
6	Internet/PC 통신	식품음료신문_네이버블로그	'식물성 에스트로겐' 고함유 파바톤 콩잎 생산	2016-11-02
7	월간잡지	식품저널 인터넷 식품신문	식물성 에스트로겐 고함유 콩잎 재배 기술 개발	2016-11-02
8	중앙일간지	아시아뉴스통신	경상대 박기훈교수, 콩잎에서 식물성 에스트로겐 생산기술 개발 성공	2016-11-02
9	기타	아이틴뉴스	식물성 에스트로겐 고함유된 콩잎 생산 기술개발	2016-11-03
10	Internet/PC 통신	아이틴뉴스_네이버블로그	식물성 에스트로겐 고함유된 콩잎 생산 기술	2016-11-03
11	중앙전문지	아이팜뉴스	식물성 에스트로겐 고함유 콩잎 생산 기술개발	2016-11-02
12	중앙일간지	아주경제	농진청 콩잎으로 친환경 여성호르몬 보충	2016-11-02
13	중앙전문지	연합뉴스	콩잎으로 여성호르몬 보충...재배기술 개발	2016-11-02
14	중앙TV 방송	연합뉴스TV 대한 민국 뉴스의 시작_채널 23	에스트로겐 다량 함유 기능성 콩잎으로 갱년기 증상 완화	2016-11-03
15	중앙전문지	에코저널_신개념 환경신문	'식물성 에스트로겐' 고함유 콩잎 생산 기술개발	2016-11-03
16	지방일간지	용인신문	농촌진흥청, '식물성 에스트로겐' 고함유 콩잎 생산 기술개발	2016-11-03
17	월간잡지	월간인물	농진청, '식물성 에스트로겐' 고함유 콩잎 생산 기술 개발	2016-11-04
18	중앙전문지	의학신문	'식물성 에스트로겐' 고함유 콩잎 생산 기술개발	2016-11-03
19	Internet/PC 통신	인크루트 경제 뉴스	노화방지 '식물성 에스트로겐' 고함유 콩잎개발	2016-11-02
20	중앙전문지	일요신문	경상대 박기훈 교수, 콩잎에서 식물성 에스트로겐 생산 기술 성공	2016-11-02
21	Internet/PC 통신	이투데이	[농업이 미래다] 갱년기 증상 개선 콩잎, 노화 막는 국화... 밭에서 찾은 특효약	2016-11-10
22	Internet/PC 통신	한국국정일보	농촌진흥청, '식물성 에스트로겐' 고함유 콩잎 생산 기술 개발	2016-11-03
23	지방TV방송	OBS 뉴스	"기능성 콩잎으로 여성 갱년기 이긴다"	2016-11-07
24	중앙TV방송	YTN 사이언스	이소플라본 함량 높은 콩잎 재배기술 개발	2016-11-03
25	Internet/PC 통신	에코타임스	식물성 에스트로겐 고함유 '콩잎' 개발	2016-11-03
26	중앙전문지	닥터더블유	식의약 소재 '식물성 에스트로겐 고함유 콩잎' 개발	2016-11-02
27	Internet/PC 통신	KJT 뉴스	'식물성 에스트로겐' 콩잎 생산 기술 개발	2016-11-03
28	중앙전문지	대한식품의약신문	농진청, '식물성 에스트로겐' 고함유 콩잎 생산 기술 개발	2016-11-03

29	Internet/PC 통신	공정거래신문	농촌진흥청, '식물성 에스트로겐' 고함유 콩잎 생산 기술 개발	2016-11-03
30	중앙전문지	메디업 메디뉴스	식물성 에스트로겐 고함유 콩잎 생산 기술 개발	2016-11-02
31	중앙전문지	코리아비즈저널	농진청, '식물성 에스트로겐' 고함유 콩잎 생산 기술 개발	2016-11-04
32	Internet/PC 통신	디오데오	식물성 에스트로겐 고함유 콩잎 생산 기술 개발	2016-11-02
33	지방일간지	제주환경일보	농진청, '식물성 에스트로겐' 고함유 콩잎 생산 기술 개발	2016-11-03
34	지방일간지	제주환경일보	농진청, '식물성 에스트로겐' 고함유 콩잎 생산 기술 개발	2016-11-03
35	Internet/PC 통신	양심냉장고	[브리핑] 식물성 에스트로겐 고함유 콩잎 생산 기술 개발	2016-11-07
36	지방TV방송	MBC 경남 뉴스 데스크	기능성 콩잎 개발	2016-11-05
37	지방일간지	충청투데이	농진청, '식물성 에스트로겐' 고함유 콩잎 생산 기술 개발	2016-11-03
38	Internet/PC 통신	뉴스줌	박기훈 교수, 콩잎에서 식물성 에스트로겐 생산 기술 성공	2016-11-02
39	지방일간지	전북매일신문	“갱년기 완화 물질, 콩잎서 추출“	2016-11-02
40	Internet/PC 통신	정책브리핑_정책 뉴스	식물성 에스트로겐 고함유 콩잎 생산 기술개발	2016-11-03
41	지방일간지	제주뉴스	농진청, '식물성 에스트로겐' 고함유 콩잎 생산 기술 개발	2016-11-03
42	Internet/PC 통신	주간현대com	농진청, 갱년기 증상 완화해 줄 '콩잎 생산 기술' 개발	2016-11-03
43	지방일간지	중도일보	콩잎으로 여성 호르몬 보충...재배 기술 개발	2016-11-02
44	중앙일간지	중앙일보	경상대 연구팀, 콩잎서 식물성 에스트로겐 생산 기술 성공	2016-11-02
45	중앙일간지	중앙일보	노화방지'식물성 에스트로겐' 고함유 콩잎 개발	2016-11-02
46	지방TV방송	채널A(사회_뉴스)	경상대 연구진 '에스트로겐 콩잎' 생산 기술 개발	2016-11-03
47	Internet/PC 통신	쿠키뉴스	경상대 박기훈 교수, 식물성 에스트로겐 생산 기술 성공	2016-11-02
48	중앙전문지	푸드투데이_창간 14주년	'식물성 에스트로겐' 고함유 콩잎 생산 기술개발	2016-11-03
49	Internet/PC 통신	뉴스포털1_한국 시민기자협회	이소플라본(식물성 에스트로겐)다량함유콩잎 생산 기술개발	2016-11-03
50	중앙전문지	환경일보	고함유 콩잎 '식물성 에스트로겐' 생산 기술개발	2016-11-03
51	중앙일간지	스포츠조선	콩잎으로 여성호르몬 보충...재배기술 개발	2016-11-02
52	중앙일간지	농축유통신문	'식물성 에스트로겐' 고함유 콩잎 생산 기술개발	2016-11-04
53	중앙일간지	농업인신문	'여성 호르몬' 많은 콩잎 생산 기술 개발	2016-11-04
54	지방TV방송	지자체뉴스	농촌진흥청, 식물성 에스트로겐 고함유 콩잎 생산 기술 개발	2016-11-03
55	기타	한국유기농연구소	'식물성 에스트로겐' 고함유 콩잎 생산 기술 개발	2016-11-05
56	Internet/PC 통신	파워코리아데일리	농산청, 고함유 에스트로겐 콩잎 생산 기술 개발	2016-11-03
57	기타	전남농업정보 Vol.109	식물성 에스트로겐 고함유 콩잎 생산 기술 개발 (31~32페이지)	2016-11-06

58	중앙전문지	전업농신문	'식물성 에스트로겐' 고함유 콩잎 생산 기술 개발	2016-11-10
59	Internet/PC 통신	공감언론 뉴시스 통신사	노화방지'식물성 에스트로겐'고함유 콩잎개발	2016-11-02
60	Internet/PC 통신	국제신문_e	경상대박기훈교수팀,기능성콩잎 재배 기술 개발	2016-11-03
61	Internet/PC 통신	내외뉴스통신	'식물성 에스트로겐' 고함유 콩잎 생산 기술개발	2016-11-03
62	Internet/PC 통신	노컷뉴스	경상대 연구팀, 콩잎서 식물성 에스트로겐 생산 기술 성공	2016-11-02
63	Internet/PC 통신	농어촌경제신문	'식물성 에스트로겐' 고함유 콩잎 생산 기술 개발	2016-11-04
64	Internet/PC 통신	농촌여성신문	기능성콩잎으로 농가소득 여성건강 쑥쑥~	2016-11-02
65	Internet/PC 통신	뉴스와이어	농진청, '식물성 에스트로겐' 고함유 콩잎 생산 기술 제	2016-11-03
66	중앙일간지	전국매일신문	박기훈교수, 콩잎에서 식물성 에스트로겐 생산 기술 성공	2016-11-02
67	중앙TV방송	KBS1 뉴스12	수퍼 콩잎으로 '천연 항노화' ... "갱년기 증상 완 화"	2016-11-03
68	중앙TV방송	KBS1 뉴스광장	수퍼 콩잎으로 '천연 항노화' ... "갱년기 증상 완 화"	2016-11-03
69	Internet/PC 통신	KBS_NEWS(인터 넷뉴스)	콩잎으로 여성호르몬 보충...재배기술 개발	2016-11-02
70	Internet/PC 통신	KNS뉴스통신	농진청, 식물성 에스트로겐 고함유 콩잎 생산기술 개 발	2016-11-03
71	Internet/PC 통신	MBC NEWS	이소플라본 5배 많은 콩잎 생산기술 개발	2016-11-02
72	지방일간지	METRO	농진청, 식물성 에스트로겐 함유량 높은 '파마톤 콩 잎' 생산기술 개발	2016-11-02
73	Internet/PC 통신	이티뉴스(전자신 문)	박기훈교수, 콩잎에서 식물성 에스트로겐 생산 기술 성공	2016-11-02
74	Internet/PC 통신	대한민국정부포 털 국정소식	식물성 에스트로겐 고함유 콩잎 생산 기술개발	2016-11-03
75	Internet/PC 통신	데일리한국	경상대 박기훈교수, '식물성 에스트로겐' 함유콩잎재 배에 성공	2016-11-02
76	Internet/PC 통신	동아닷컴(뉴스)	경상대 연구진 '에스트로겐 콩잎' 생산 기술개발	2016-11-03
77	지방TV방송	OBS 경인	기능성 콩잎으로 여성 갱년기 이긴다	2016-11-05
78	Internet/PC 통신	동양뉴스통신	박기훈 경상대 교수, 에스트로겐 고함유 콩잎재배	2016-11-03
79	지방일간지	동양일보	"콩잎으로 친환경 여성호르몬 보충"	2016-11-02
80	중앙일간지	매일일보	경상대 박기훈 교수, 콩잎에서 식물성 에스트로겐 생 산 기술성공	2016-11-02
81	지방TV방송	부산경남대표방 송 KNN	여성갱년기 완화 물질 콩잎에서 대량 추출	2016-11-02
82	지방일간지	부산일보	에스트로겐 다량 함유한 기능성 콩잎 개발	2016-11-02
83	중앙일간지	서울일보	경상대 박기훈 교수팀, 기능성 콩잎 개발	2016-11-02
84	Internet/PC 통신	뉴스룩인터넷신 문	농진청, '식물성 에스트로겐' 고함유 콩잎 생산 기술 개발	2016-11-03

85	Internet/PC 통신	더피플	농진청, '식물성 에스트로겐' 고함유 콩잎 생산 기술 개발	2016-11-03
86	Internet/PC 통신	발효신문	농진청, '식물성 에스트로겐' 고함유 콩잎 생산 기술 개발	2016-11-03
87	지방TV방송	서경방송(뉴스in 타임)	'갱년기 치료' 기능성 콩잎 개발	2016-11-02
88	지방TV방송	서경방송 뉴스와 이드	'갱년기 치료' 기능성 콩잎 개발	2016-11-03
89	지방일간지	검찰투데이	농촌진흥청, '식물성 에스트로겐' 고함유 콩잎 생산기술 개발	2016-11-03
90	지방일간지	경남도민신문	경상대 농생명과학대학 박기훈 교수팀 콩잎서 '식물성 에스트로겐' 생산 성공	2016-11-02
91	지방일간지	경남도민일보	국내서 '이소플라본' 다량 함유된 콩잎 재배기술 개발	2016-11-07
92	지방일간지	경남신문	경상대 박기훈 교수팀, 갱년기 잡는 '기능성 콩잎' 개발	2016-11-04
93	지방일간지	경남연합일보	경상대 박기훈 교수, 콩잎에서 식물성 에스트로겐 생산기술 성공	2016-11-02
94	지방일간지	경남일보	식물성 에스트로겐 고함유 콩잎 개발	2016-11-03
95	기타	경상대학교 뉴스 홍보	박기훈 교수, 콩잎에서 식물성 에스트로겐 생산기술 성공	2016-11-02
96	지방전문지	농수축산신문	대사체 생산농업 기술로 농업과학 기술력 제고를	2017-12-20
97	중앙TV방송	YTN	버리던 콩잎을 기능성 식품 원료로	2017-12-14
98	지방TV방송	노컷뉴스	농진청, 여성호르몬 보충 콩잎 재배기술 개발	2017-12-15
99	중앙TV방송	연합뉴스TV	중년여성 갱년기 질환 "콩잎으로 해결한다"	2017-12-16
100	지방일간지	일요신문	경상대 박기훈 교수, 농림축산식품과학기술대상 수상 (식물성 에스트로겐 고함유된기능성콩잎 재배기술 개발 성공)	2017-12-07
101	지방일간지	경남도민신문	경상대 박기훈 교수 농림축산식품과학기술대상 수상 (식물성 에스트로겐 고함유 기능성콩잎 재배기술 개발 성공)	2017-12-06
102	지방일간지	일요서울	박기훈 교수, 농림축산식품과학기술대상(근정포장)수상 (식물성 에스트로겐 고함유 기능성콩잎 재배기술 개발 성공)	2017-12-06
103	지방전문지	대학저널	박기훈 교수, 농림축산식품과학기술대상(근정포장) 수상	2017-12-06
104	지방일간지	베리타스알파	경상대 박기훈 교수, 농림축산식품과학기술대상	2017-12-06
105	지방일간지	경남일보	경상대 박기훈 교수, 농림축산식품과학기술대상 수상	2017-12-06
106	지방일간지	뉴시스	박기훈 교수, 농림축산식품과학기술대상 수상	2017-12-06

2-2-16-6. 전시회 등 참여

번호	유형	행사명칭	전시품목	장소	활용년도
1	박람회	2017농업기술박람회	설명판넬, 파바톤추출분말, 원물, 시제품(차, 음료, 젤리, 화장품 등)	서울 코엑스	2017
2	박람회	2017 생명산업과학기술대전	수상판넬, 시제품(파바톤콩잎원물, 화장품, 환 등)	양재AT센터	2017

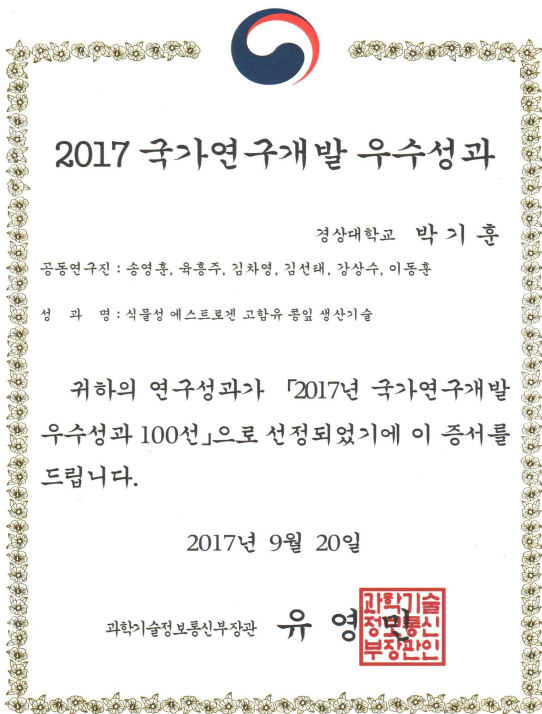
2-2-16-7. 기타 활용 및 홍보실적(단행본 발간, CD 제작 등)

번호	일자	활용명칭	활용내역 출원등록일
1	2017-05-30	식품품목제조보고서	식품품목제조보고서(Fabaton 추출분말)
2	2016-10-11	2016년 경남항노화 콘퍼런스 기획보고서	보고서 상에 Fabaton 콩잎의 갱년기 소재로서 우수성 소개
3	2017-10-02	2017국가연구개발 우수성과 100선 발간	2017국가연구개발 우수성과100선 발간 (생명해양분야_식물성 에스트로젠 고함유 콩잎 생산기술)
4	2017-12-05	농림식품기술기획평가원 홍보자료발간 (창)	2017년 겨울, Vol.69 창 (농림식품기술기획평가원 발간) page 12-15
5	2016-11-01	경상맨이야 (경상대학교 발간)	2016년 11-12월 경상맨이야 홍보자료(경상대학교 발간) page 12-13, 경상인연전 section
6	2017-09-22	식품품목제조보고서 (파바톤콩잎음료)	식품품목제조보고서(파바톤콩잎음료)
7	2017-09-22	식품품목제조보고서 (파바톤 콩잎 젤리)	식품품목제조보고서(파바톤 콩잎 젤리)
8	2018-05-02	식품품목제조보고서 (타블렛)	식품품목제조보고서(타블렛)
9	2018-05-02	식품품목제조보고서 (타블렛_플라시보)	식품품목제조보고서(타블렛_플라시보)

2-2-16-8. 기타 홍보실적(수상실적)

번호	일자	홍보명칭	주요내용
1	2017-09-20	2017 국가연구개발 우수성과	2017년 국가연구개발 우수성과 100선 선정 (성과명: 식물성 에스트로젠 고함유 콩잎 생산기술)
2	2017-12-05	제20회 농림축산식품과학기술대상 근정포장	제20회 농림축산식품과학기술대상 근정포장 (주제:식물성 에스트로젠 고함유 콩잎(파바톤콩잎) 재배 기술 및 산업화

※ 식물성 에스트로젠 고함유 콩잎 생산기술 우수 실적



2017 국가연구개발 우수성과 100선 선정



2017 농림축산식품 과학기술대상 근정포장

미국농화학회지(JAFC, JCR5%이내) 게재완료 및 메인페이지 소개
J. Agric. Food Chem., 2016, 64, 7315-7324

2-3. 제2세부과제 수행내용 및 결과

2-3-1. 연구 수행내용 및 결과 요약

구분	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
1	동물모델을 이용한 파바톤콩잎 추출물 안전성 검사	<ul style="list-style-type: none"> - 콩식물체 지상부 추출물의 암수랫드를 이용한 경구독성시험 - 콩식물체 지상부 추출물의 암수랫드를 이용한 4주간 반복 경구투여 독성시험 - 사망률, 일반증상, 체중, 부검소견 등 관찰 * 경남환경독성본부에 의뢰하여 수행 	<ul style="list-style-type: none"> - 2,000 mg/kg의 용량으로 경구투여 했을 때 사망률, 일반증상, 체중, 부검 소견에 문제 관찰안됨 - 0, 500, 1,000, 2,000 mg/kg 용량으로 4주간 반복 투여해서 문제 관찰 안됨 <p>[결과-1]</p>
2	난소제거동물모델을 이용한 파바톤콩잎 추출물의 항비만 및 간세포보호효과검사	<ul style="list-style-type: none"> - 6개월된 암컷 SD랫드 난소절제 후 3개월 경과한 갱년기 랫드 - 4개그룹(정상랫드, 갱년기랫드, 저농도처리, 고농도처리)에 6개월간 처리함 	<ul style="list-style-type: none"> - 처리군에서 유의미한 비만증세 완화효과 관찰 - 처리군에서 장간막지방 감소효과가 뚜렷하게 관찰됨 - 처리군에서 뚜렷한 총 콜레스테롤 및 LDL-콜레스테롤 감소효과 관찰 <p>[결과-2]</p>
3	난소제거동물모델을 이용한 파바톤콩잎 추출물의 골다공증 예방 및 피부개선 효과검사	<ul style="list-style-type: none"> - 6개월된 암컷 SD랫드 난소절제 후 3개월 경과한 갱년기 랫드 - 4개그룹(정상랫드, 갱년기랫드, 저농도처리, 고농도처리)에 6개월간 처리함 *피부건강: Masson's trichrome 염색법 *뼈건강: 마이크로 CT이용 대퇴골 해면골 부분의 미세구조 분석 및 파라핀 포매하여 조직학적 관찰, 또한 mRNA 변화관찰 	<ul style="list-style-type: none"> - 처리군에서 bone mineral density(BMD), percent bone volume(BT/TV) 및 trabecular number(Tb,N) 유의미하게 증가 - 처리군에서 콜라겐 농도 및 진피층 탄력도가 유의미하게 증가 <p>[결과-3]</p>
4	임상실험을 통한 파바톤콩잎 추출물의 갱년기증상 개선효과 검사	<ul style="list-style-type: none"> - 실시기관: 부산대학교 한방병원 - 시험책임자: 한방부인과 윤영진 - 시험종류: Fabaton콩잎추출물의 섭취에 대한 안정성 및 갱년기 여성의 건강개선 효과를 평가하기 위한 무작위배정, 이중눈가림, 대조군 비교 인체적용시험 - 의뢰자: 경상대학교 산학협력단 - 시험기간: IRB승인일로부터 2019년 8월 	<p><진행사항></p> <ul style="list-style-type: none"> - 총스크리닝: 108명 - 스크리닝탈락: 18명 - 동의철회: 11명 - 완료: 23명 - 8월 31일 임상시험 완료 <p>[결과-4]</p>

2-3-2. 동물모델을 이용한 파바톤콩잎 추출물의 안전성 검사 (결과-1)

향후 실험에 기본이 될 파바톤콩잎추출물의 안전성을 확인하기 위하여 쥐(Rat, Sprague-Dawley, 이하 쥐)를 이용하여

1. 콩 전초 추출물의 랫드를 이용한 급성경구독성시험
2. 콩 전초 추출물의 랫드를 이용한 4주간 반복 경구투여 독성시험

을 경남환경독성본부에 의뢰하였다. 이하의 내용은 경남환경독성본부로부터 받은 최종보고서 중 일부를 발췌한 것이다.

2-3-2-1. 콩 전초 추출물의 랫드를 이용한 급성경구독성시험

암수 각각 5마리의 SD 랫드에 2000mg/kg의 용량으로 경구 투여한 후 14일간의 사망률, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰하여 얻은 결과를 요약하면 다음과 같다.

최종보고서

콩 전초 추출물의 랫드를 이용한 급성경구독성 시험

KIT 시험번호 B15029

최종보고서 제출일 2015년 12월 07일

시험의뢰자 강상수
경상대학교 향노화산업화플랫폼개발사업단

시험기관 한국화학연구원 부설 안전성평가연구소
경남환경독성본부

Homepage <http://www.kitox.re.kr>

시험정보

시험제목	콩 전초 추출물의 랫드를 이용한 급성경구독성 시험	
KIT 시험번호	B15029	
시험의뢰자	강상수 경상대학교 항노화산업화플랫폼개발사업단	
의뢰자측 시험관리자	성명 박나은	
시험기관	한국화학연구원 부설 안전성평가연구소 경남환경독성본부	
시험책임자	황광현 한국화학연구원 부설 안전성평가연구소 경남환경독성본부	
부문책임자	동물사육관리	김제헌
	시험물질관리	문연규
	투여, 관찰	이주홍
시험일정	실험개시일(동물입수)	2015년 11월 03일
	투여개시일	2015년 11월 10일
	부검개시일(부검일)	2015년 11월 24일
	실험종료일	2015년 11월 24일
	시험종료일	2015년 12월 07일

요 약

본 시험은 콩 전초 추출물을 암수 랫드(Sprague Dawley)에 단회경구투여 후 발현되는 독성을 조사하기 위해 실시하였다. 암수 각각 5마리의 SD 랫드에 2000 mg/kg의 용량으로 경구투여한 후 14일간의 사망률, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰하여 시험한 결과를 요약하면 다음과 같다.

- (1) 시험물질의 투여로 인한 사망동물은 암수 모든 투여군에서 시험기간 동안 관찰되지 않았다.
- (2) 일반증상관찰에 있어 암수 모두 시험물질과 관련된 빈사, 외관 및 행동 변화 등의 변화는 없었다.
- (3) 체중변화의 경우 암수 모든 투여군에서 정상적인 체중증가를 나타내었다.
- (4) 부검결과 암수 모든 투여군에서 어떠한 육안적 이상소견도 관찰되지 않았다.

이상의 결과로부터 콩 전초 추출물을 SD 랫드에 2000 mg/kg의 용량으로 단회경구투여시 시험물질과 관련된 독성은 발현되지 않는 것으로 판단된다.

3. 결과

3.1. 사망률 (Table 1)

2000 mg/kg의 콩 전초 추출물을 투여군(T) 랫드에 단회경구투여한 결과, 시험과정 중 사망동물은 발생하지 않았다.

3.2. 일반증상 관찰 (Table 2, Appendix 1)

시험물질과 관련된 빈사, 외관 및 행동 변화 등의 변화는 없었다.

3.3. 체중 (Table 3, Appendix 2)

시험물질과 관련된 체중변화는 관찰되지 않았다.

3.4. 부검소견 (Table 4)

시험물질과 관련된 장기의 이상변화는 관찰되지 않았다.

4. 고찰 및 결론

콩 전초 추출물을 2000mg/kg로 단회 강제경구투여시, 계획도살 외에 투여후 사망한 동물은 발생하지 않았다. 투여군 암수 모두 시험기간중에 이상증상이 보이는 동물은 관찰되지 않았다. 체중변화에 있어서 시험물질과 관련된 영향은 암수 모두 관찰되지 않았다. 부검소견 결과 육안적 이상소견은 관찰되지 않았다.

이상의 결과로부터 SD계 랫드에 콩 전초 추출물의 2000mg/kg의 용량으로 단회경구 투여시 시험물질과 관련된 독성은 관찰되지 않은 것으로 판단된다.

제출받은 보고서를 바탕으로 파바톤콩잎추출물의 1회 2000mg/kg 경구투여는 독성이 없다는 결론을 얻었다. 1회 과량의 투여로 독성이 없다는 것이 밝혀졌지만 장기간의 투여에도 독성이 없는 지는 확실하지 않기 때문에 4주간 연속하여 투여하고 독성이 있는지 알아보기 위하여 다음 독성실험을 진행하였다.

2-3-2-2. 콩 전초 추출물의 랫드를 이용한 4주간 반복 경구투여 독성시험

콩 전초 추출물을 암수 쥐에 반복경구투여 후 발현되는 독성을 조사하기 위해 실시하였다. 암수 각각 5마리의 SD 쥐에 0, 500, 1000, 2000mg/kg의 용량으로 경구 투여한 후 4주간의 사망률, 일반증상, 체중변화, 부검소견, 사료섭취량측정, 혈액학적검사, 혈액생화학적검사 및 장기중량을 관찰하여 얻은 결과를 요약하면 다음과 같다.

최종보고서

콩 전초 추출물의 랫드를 이용한 4주간 반복 경구투여
독성시험 (DRF)

KIT 시험번호 B15020

최종보고서 제출일 2015년 12월 18일

시험의뢰자 강상수
경상대학교 향노화산업화플랫폼개발사업단

시험기관 한국화학연구원 부설 안전성평가연구소
경남환경독성본부

Homepage <http://www.kitox.re.kr>

대외비



시험정보

시험제목	공 전초 추출물의 렙트를 이용한 4주간 반복 정구투여 독성시험 (DRF)	
KIT 시험번호	B15020	
시험의뢰자	강상수 경상대학교 향노화산업화물렙트개발사업단	
의뢰자측 시험관리자	성명 박나은	
시험기관	한국화학연구원 부설 안전성평가연구소 경남환경독성본부	
시험책임자	황광현 한국화학연구원 부설 안전성평가연구소 경남환경독성본부	
부문책임자	동물사육관리 시험물질관리 투여, 관찰	탁배길 문연규 이주홍
시험일정	실험개시일(동물입수) 투여개시일 부검개시일(부검일) 실험종료일 시험종료일	2015년 10월 20일 2015년 10월 27일 2015년 11월 24일 2015년 12월 02일 2015년 12월 18일

3. 결과

3.1. 사망률 (Table 1)

시험과정 중 사망동물은 발생하지 않았다.

3.2. 일반증상 관찰 (Table 2, Appendix 1)

시험물질과 관련된 빈사, 외관 및 행동 변화 등의 변화는 없었다.

3.3. 체중 (Table 3, Appendix 2)

시험물질과 관련된 체중변화는 관찰되지 않았다.

3.4. 부검소견 (Table 4)

시험물질과 관련된 장기의 이상변화는 관찰되지 않았다.

3.5. 사료섭취량 (Table 5, Appendix 3)

시험물질과 관련된 사료섭취량 변화는 관찰되지 않았다.

3.6. 장기중량 (Table 6, Appendix 4)

시험물질과 관련된 장기중량 변화는 관찰되지 않았다.

3.7. 혈액학적 검사 (Table 7, Appendix 5, Appendix 6)

시험물질 투여와 관련한 변화는 관찰되지 않았다. MCH 수치는 수컷 T1군에서 Vehicle Control군에 비해 유의하게 낮았다. MCHC 수치는 암컷 콩 전초 추출물 투여군 모두 Vehicle Control군에 비해 유의하게 낮았다.

3.8. 혈액생화학적 검사 (Table 8, Appendix 7)

시험물질 투여와 관련한 변화는 관찰되지 않았다. Creatinine 수치는 수컷에서 T3군이 Vehicle Control군에 비해 유의하게 낮았다. Total bilirubin 수치는 수컷 T2이 Vehicle Control군에 비해 낮았으나 암컷 T1, T2군은 Vehicle Control군에 비해 높았다. Glucose 수치는 암컷 콩 전초 추출물 투여군 모두 Vehicle Control군에 비해 낮았다.

요 약

본 시험은 콩 전초 추출물을 암수 랫드(Sprague Dawley)에 반복경구투여 후 발현되는 독성을 조사하기 위해 실시하였다. 암수 각각 5마리의 SD 랫드에 0, 500, 1000, 2000 mg/kg의 용량으로 경구투여한 후 4주간의 사망률, 일반증상, 체중변화, 부검소견, 사료섭취량측정, 혈액학적검사, 혈액생화학적검사 및 장기중량을 관찰하여 시험한 결과를 요약하면 다음과 같다.

- (1) 시험물질의 투여로 인한 사망동물은 암수 모든 투여군에서 시험기간 동안 관찰되지 않았다.
- (2) 일반증상관찰에 있어 암수 모두 시험물질과 관련된 빈사, 외관 및 행동 변화 등의 변화는 없었다.
- (3) 체중변화의 경우 암수 모든 투여군에서 정상적인 체중증가를 나타내었다.
- (4) 부검결과 암수 모든 투여군에서 어떠한 육안적 이상소견도 관찰되지 않았다.
- (5) 사료섭취량 측정결과, 시험물질 투여와 관련된 변화는 암수 모두에서 관찰되지 않았다.
- (6) 혈액학적 검사 결과, 시험물질 투여와 관련된 변화는 암수 모두에서 관찰되지 않았다.
- (7) 혈액생화학적 검사 결과, 시험물질 투여와 관련된 변화는 암수 모두에서 관찰되지 않았다.
- (8) 장기중량 측정 결과, 시험물질투여와 관련된 변화는 암수 모두에서 관찰되지 않았다.

이상의 결과로부터 콩 전초 추출물을 SD 랫드에 0, 500, 1000, 2000 mg/kg의 용량으로 4주간 반복경구투여시 시험물질과 관련된 변화는 관찰되지 않았다. 따라서 본 시험에서의 무해용량 (NOAEL : No Observed Adverse Effect Level)은 암수 각각 2000 mg/kg 이상으로 사료된다.

4. 고찰 및 결론

콩 전초 추출물을 500, 1000, 2000mg/kg로 4주간 반복 강제경구투여시, 계획도살 외에 투여후 사망한 동물은 발생하지 않았다. 투여군 암수 모두 시험기간 중에 이상증상이 보이는 동물은 관찰되지 않았다. 체중변화에 있어서 시험물질과 관련된 영향은 암수 모두 관찰되지 않았다. 부검소견 결과 육안적 이상소견은 관찰되지 않았다. 시험물질과 관련된 사료섭취량 변화는 없었다. 장기중량 측정 결과 모든 군에서 유의한 차이가 발견되지 않았다.

응고계 검사에서는 모든 군에서 유의한 차이가 발견되지 않았다. 혈액학 및 혈액생화학 검사에서도 시험물질 투여와 관련된 변화는 관찰되지 않았다. MCH 수치는 수컷 500mg/kg투여군에서 비투여군에 비해 유의하게 낮았다. MCHC 수치의 경우 모든 암컷 투여군에서 비투여군에 비해 유의하게 낮았다. 그러나 모두 정상범위 내의 변화였으며 MCH 및 MCHC와 밀접한 연관이 있는 RBC, Hemoglobin, Hematocrit 수치가 모두 정상범위에서 군당 유의한 차이를 보이지 않아 임상적 의의는 없는 것으로 판단된다. Creatinine 수치는 수컷 2000mg/kg 투여군이 비투여군에 비해 유의하게 낮았으나 모두 정상범위이고 다른군에서는 관찰되지 않아 시험물질 투여와 관련된 변화로 보이지 않는다. Total bilirubin 수치는 수컷 1000mg/kg 투여군이 비투여군에 비해 낮았으나 암컷 500mg/kg, 2000mg/kg 투여군은 비투여군에 비해 높아 용량의존성이 나타나지 않으며 모두 정상범위로 시험물질과의 관련성은 없는 것으로 보인다. Glucose 수치는 암컷 500mg/kg, 1000mg/kg, 2000mg/kg 투여군 모두 각각 비투여군에 비해 낮았으나 역시 정상범위이며 우발적 변화로 판단된다.

이상의 결과로부터 본 시험에서의 무해용량 (NOAEL : No Observed Adverse Effect Level)은 암수 모두 2000 mg/kg/day 이상으로 사료된다.

이러한 독성연구로부터 파바톤콩잎추출물은 안전한 물질이며, 실험동물에게 60mg/kg/day는 다른 불안정성을 야기하지 않는 적합한 양이라는 결과를 얻어 다음 실험을 진행하였다.

2-3-3. 난소제거 동물모델을 이용한 파바톤콩잎 추출물의 항비만효과 검사(결과-2)

2-3-3-1. 실험방법

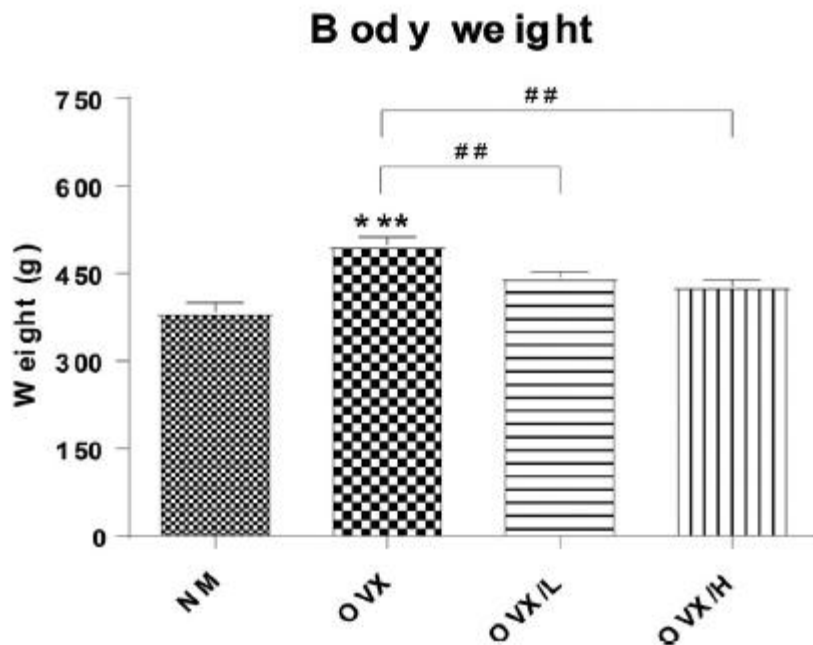
6개월 된 암컷 SD rat을 중앙실험동물(주)로 구입하여 1주간의 적응기간을 거친 다음, 양쪽의 난소를 절제하였다. 수술 후 3달의 기간을 두어 충분한 에스트로겐 결핍상황과 비만상태를 만들었고, 그 이후 실험군을 나누었다.

실험군은

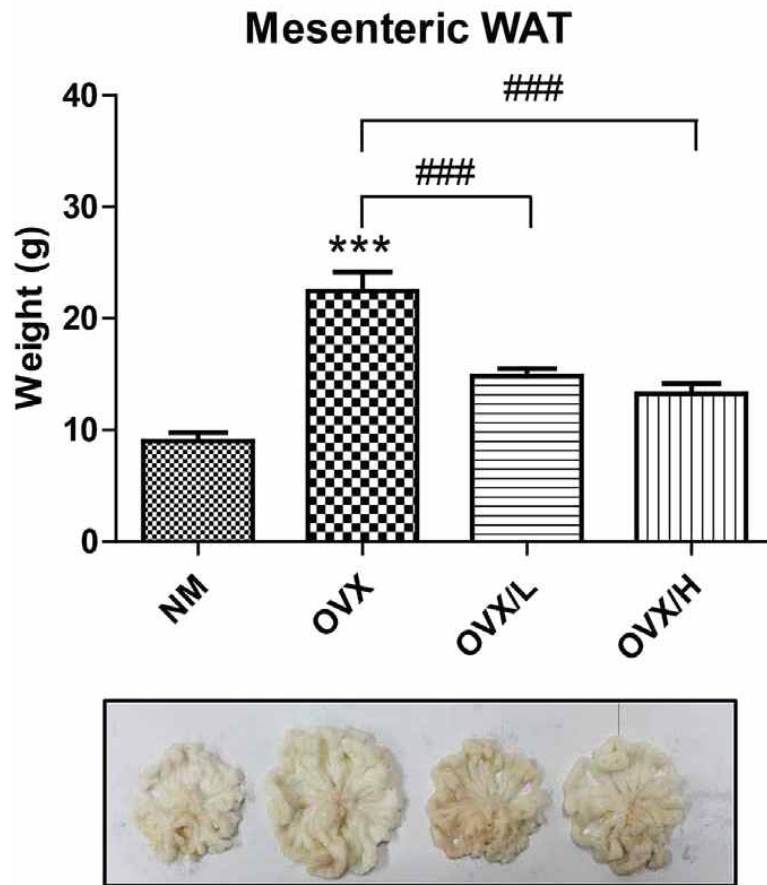
1. NM (난소절제를 받지 않은 그룹, n=5),
2. OVX (난소절제만 받은 그룹, n=6),
3. OVX/L (난소절제를 받고 저농도의 파바톤콩잎추출물을 투여한 그룹, n=9),
4. OVX/H (난소절제를 받고 고농도의 파바톤콩잎추출물을 투여한 그룹, n=9)

으로 나누었다. 모든 그룹은 골다공증증세를 더 잘 만들기 위해 칼슘제한 식이 (AIN-76A)를 제공하여 자유로이 섭취하도록 하였다. 실험동물은 한 마리씩 독립된 쥐장에 넣어서 사육하였으며, 12시간 주기의 light/dark cycle, 24도로 조절된 온도에서 사육하였다. 모든 실험계획은 경상대학교 실험동물윤리위원회에 의해 검토 받고 승인되었다.

2-3-3-1. 실험결과

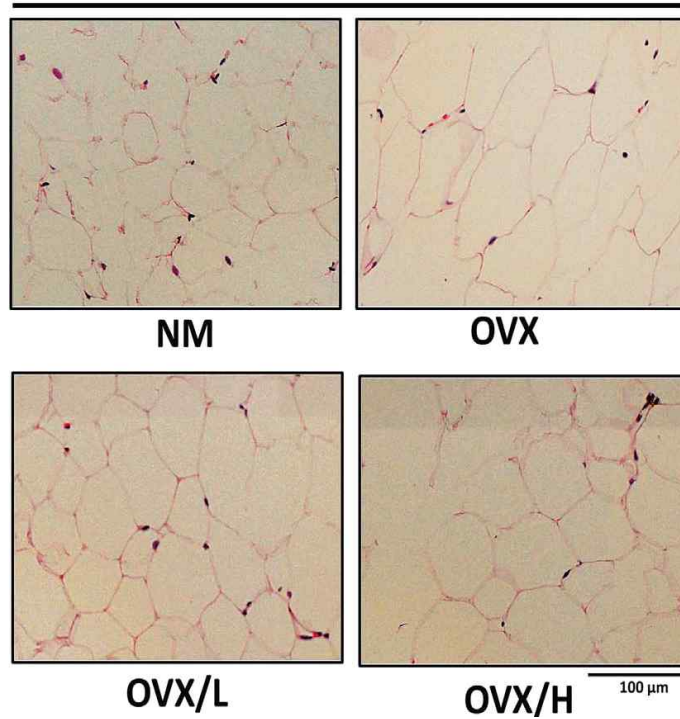


총 6개월간의 실험이 종료되었을 때의 각 그룹의 몸무게를 나타낸 그림이다. OVX 에서 유의미하게 비만이 나타났으며, OVX/L과 OVX/H군에서 이러한 증세가 완화되는 것이 관찰되었다.

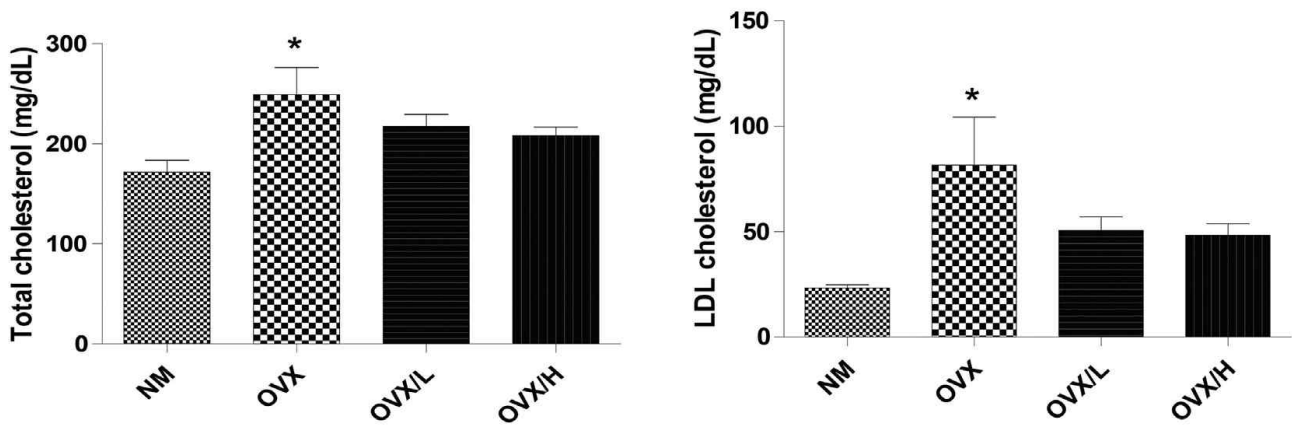


실험동물을 희생한 다음 장간막에 있는 지방을 분리하여 무게를 재고, 그룹의 평균값을 구하였다. 비만이 나타난 정도보다 더 심한 내장비만이 관찰되었고 파바톤콩잎추출물을 투여한 그룹에서 그 정도가 줄어드는 것을 관찰하였다.

H&E staining

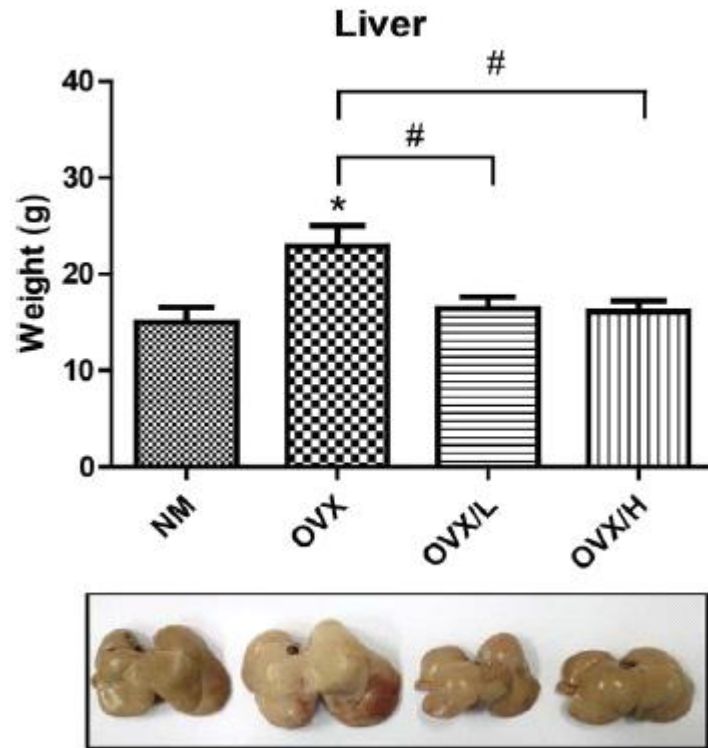


장간막에 있는 지방세포의 모양을 H&E법으로 염색하여 관찰한 결과이다. 지방세포가 커져있고, 지방을 많이 함유하고 있는 모습이 관찰되었다.



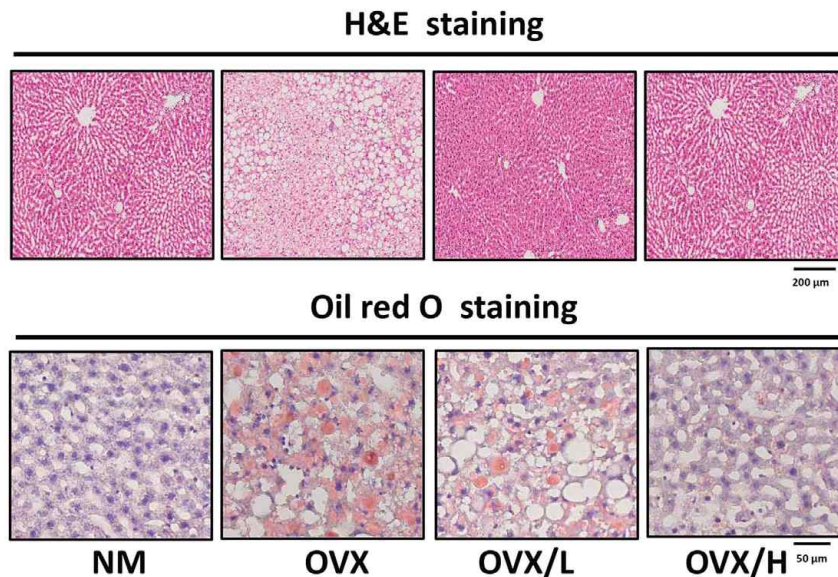
그리고 혈중지질 중 동맥경화와 밀접한 연관을 가지고 있는 대표적인 수치인 총콜레스테롤과 저밀도지단백이 OVX에서 나빠지는데 파바톤콩잎추출물을 투여한 그룹에서는 그 정도가 경감되는 것을 확인하였다. 이로서 파바톤콩잎추출물은 갱년기여성의 비만의 정도를 경감시켜줄 수 있는 가능성을 가지고 있는 것으로 관찰되었다.¹⁻⁵

2-3-4. 난소제거 동물모델을 이용한 파바톤콩잎 추출물의 간세포보호효과 검사(결과-3)



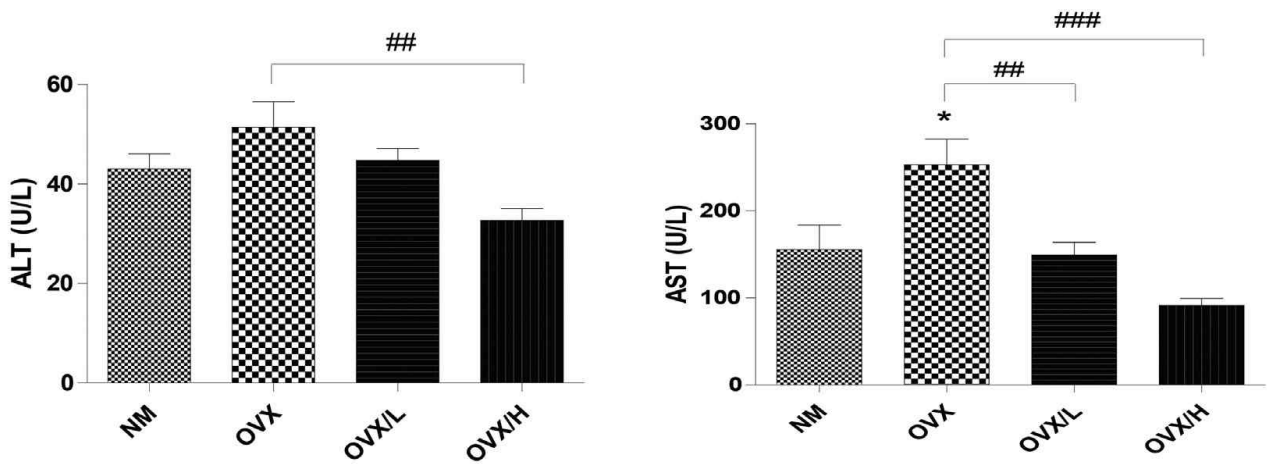
각 실험군의 간을 떼어내 육안으로 관찰한 결과이다. 난소적출군(OVX)에서 간은 지방의 함유량이 높아 밝은 색으로 관찰되며 크기도 다른 군에 비하여 큰 편이다. 그룹간의 평균값을 구해본 결과, OVX에서 유의미하게 증가해 있고, 이러한 변화는 파바톤콩잎추출물을 고농도 또는 저농도로 처리하였을 때(OVX/H & OVX/L), 정상화 된다는 결과를 얻었다.

각 실험군의 간조직을 Hematoxylin & Eosin 법과 Oil red O법으로 염색을 한 결과이다.



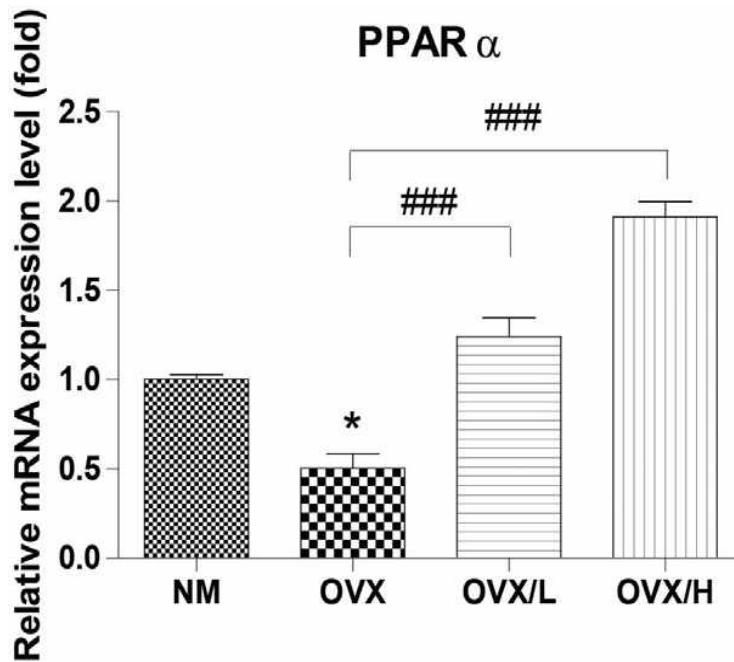
OVX에서 간은 지방함량이 높아 다른 군보다 밝은색으로 염색되는 것이 관찰되었다. 염색이 되지 않은 부분을 정확하게 알아보려고 Oil red O라고 하는 지방과 lipoprotein을 붉게 염색하는 염색약으로 염색한 결과, 희게 관찰되던 공간의 대부분이 지방세포라는 것을 알게 되었다. OVX에서 지방망울의 숫자와 크기가 커져서 많은 양의 지방을 저장하고 있는 양상으로 보이며, 또한 이는 간세포가 파괴되고 난 후 상처조직으로서 지방세포로 대체된 것이기 때문에 일정수준 이상의 간세포 파괴가 있었던 것으로 생각된다. 이러한 결과들은 OVX/H에서 회복되는 결과를 관찰하였다.

간세포파괴의 현미경적인 소견이 혈액생화학검사에서 일치하는 결과를 보여주는지 알아보기 위해 쥐들을 희생할 때 좌심실에서 혈액을 채취하여 (주)녹십자에 검사를 의뢰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

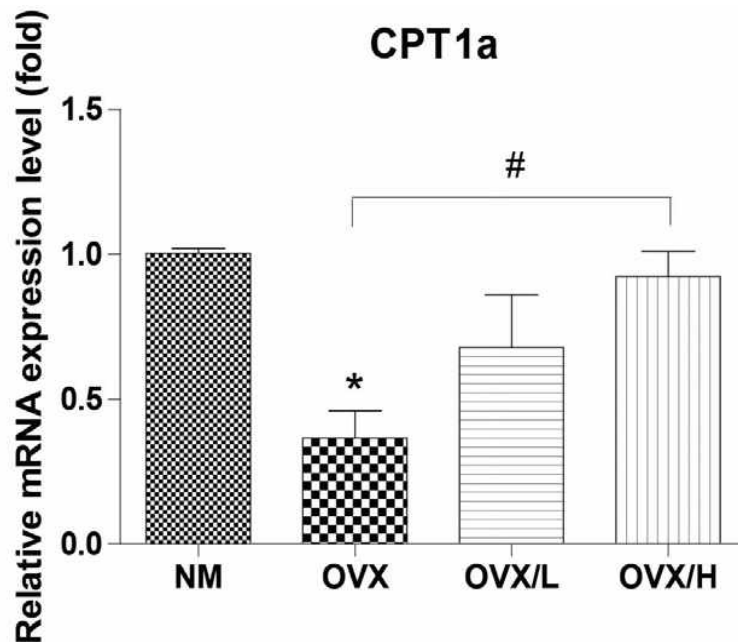


간세포가 파괴되어 혈액으로 흘러나오는 ALT, AST가 OVX에서 증가되어 있었고, 파바톤콩잎추출물을 고농도로 투여한 그룹에서 유의미하게 감소되는 것을 관찰할 수 있었다. 이로서 파바톤콩잎추출물은 갱년기 여성에서 일어나는 Non-alcoholic fatty liver disease의 증세를 완화시켜줄 수 있는 것으로 생각된다.

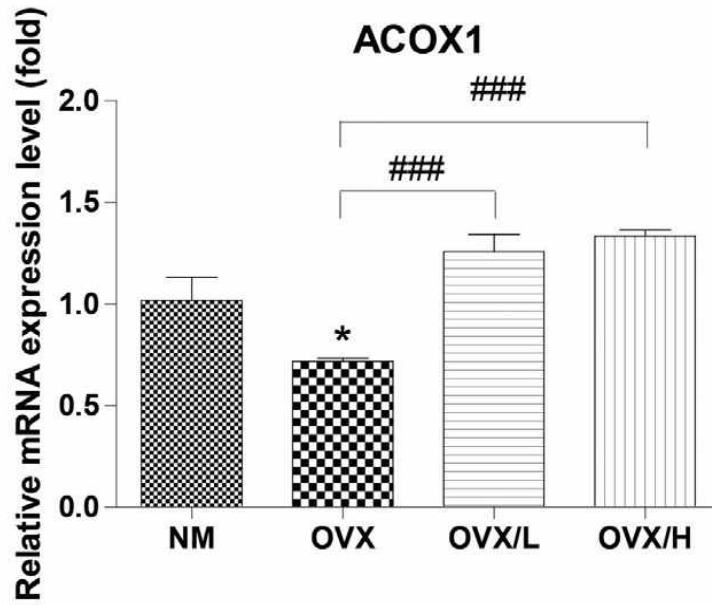
이러한 과바톤콩잎추출물이 어떠한 분자경로를 통한 것인지 알아보기 위해 지방세포의 분열과 에너지대사에 관계된 단백질들 중에서 몇 가지를 골라서 RT-PCR법으로 발현의 증감을 조사하였다.



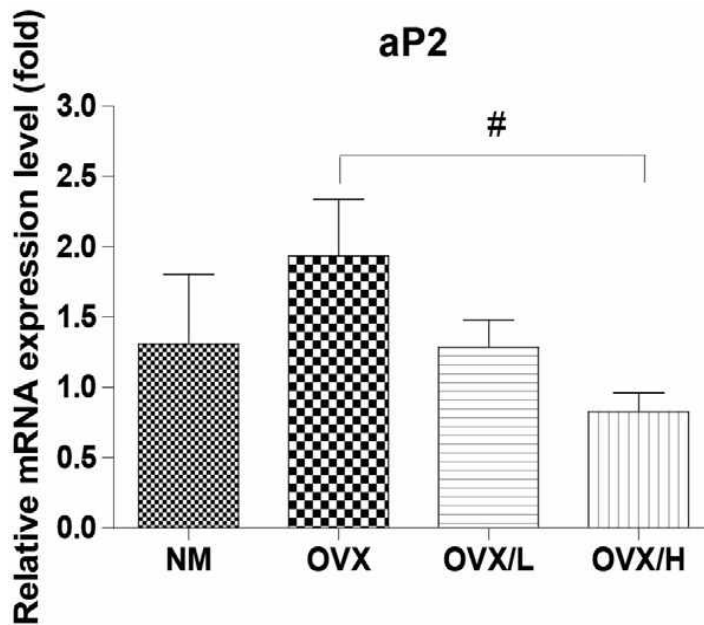
공복상태의 PPAR α -null mice에서 PPAR α 의 결핍이 hepatic steatosis에 영향을 준다는 연구가 있었다. 그리고 PPAR α 의 활성이 높아지면 ACOX1과 CPT-1a의 발현이 늘어나 지방의 분해를 촉진한다는 연구결과도 있었다. ⁶



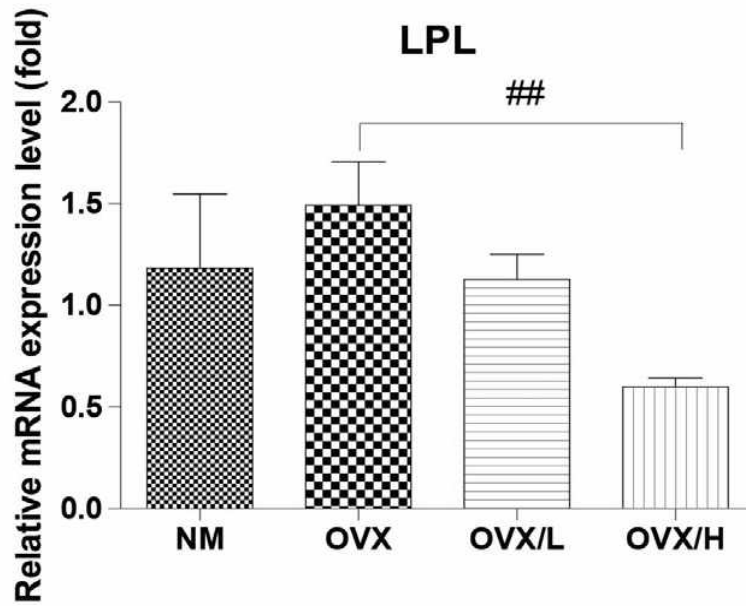
CPT-1a 효소는 지방산을 미토콘드리아 내로 이동시키는 제일 첫 번째 효소로서 이 효소를 활성화 시키면 미토콘드리아에서 지방산의 분해가 증가한다.



ACOX1은 지방산이 분해되는 과정 중 β -oxidation pathway에 관여하는 효소로, acyl-CoAs를 2-trans-enoyl-CoAs로 바꾸어주는 효소이다.



증가된 adipogenesis-related gene aP2는 지방간 형성에 중요한 역할을 한다는 연구가 있었는데 본 실험의 결과에서 파바톤콩잎추출물은 aP2의 발현을 낮추는 효과가 있었다.



비슷한 의견으로 LPL은 중성지방으로부터 지방산이 떨어져 나오는 것을 촉진하여 지방간형성을 촉진한다라는 연구도 있었다. 파바톤콩잎추출물은 LPL의 발현도 낮추어주는 효과가 관찰되었다.

이러한 결과를 종합해 볼 때 파바톤콩잎추출물은 갱년기 여성에서 비만에 의해 속발되거나, 비만과 관계없이 발생하는 지방간변성을 막을 수 있을 것이라 생각된다.

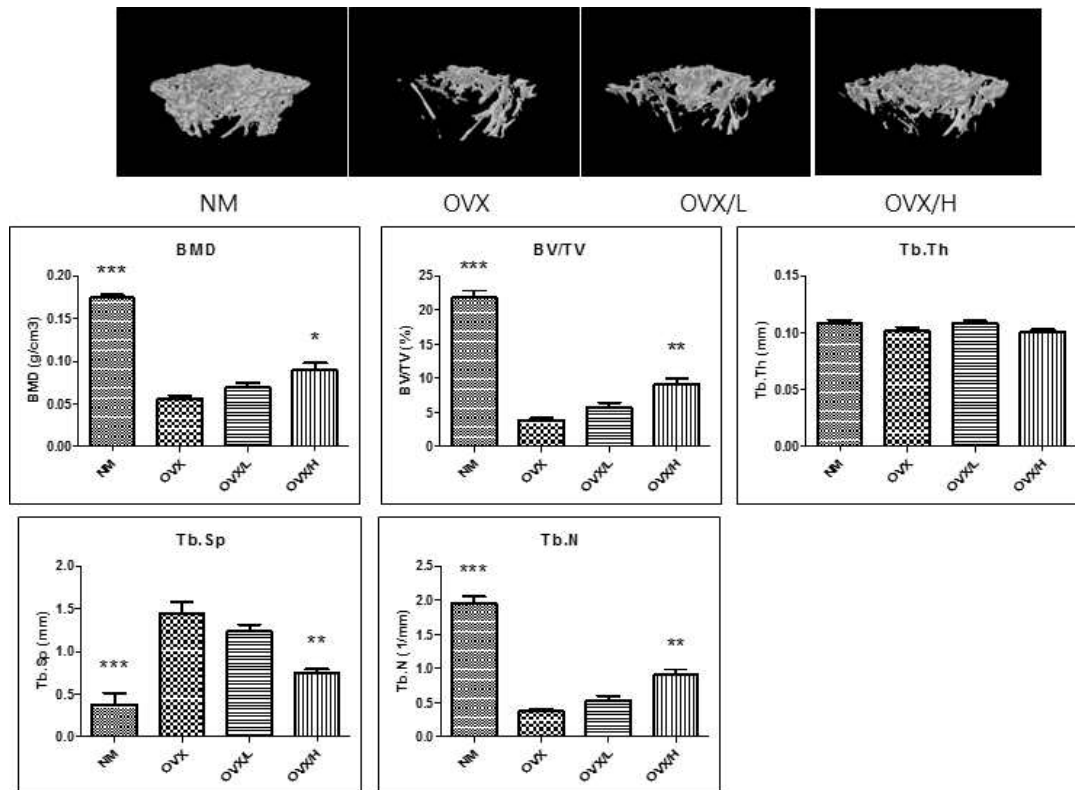
2-3-5. 난소제거 동물모델을 이용한 파바톤콩잎 추출물의 골다공증 예방효과 검사(결과-4)

2-3-5-1. 실험방법

쥐를 희생할 때 대퇴골을 분리해 내어 부피 대비 20배의 고정액에 넣어 24시간 동안 고정한 후 일부는 마이크로CT를 이용하여 대퇴골의 해면골부분의 미세구조를 분석하였고, 일부는 파라핀 포매하여 조직학적으로 관찰하였다.

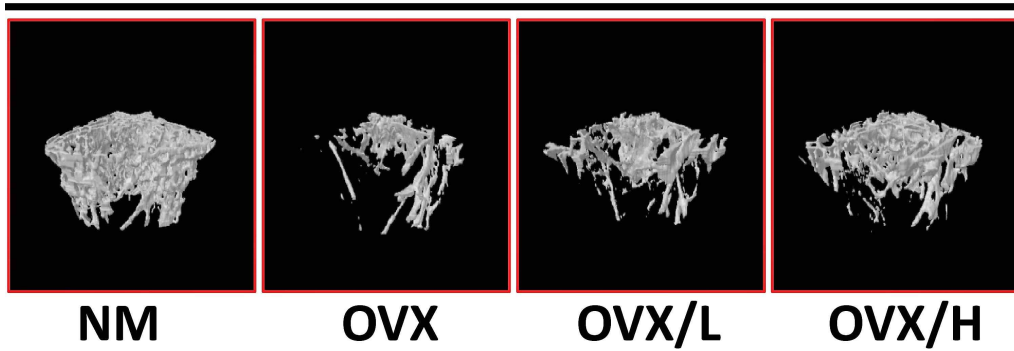
마이크로CT의 결과를 바탕으로 뼈에 얼마나 많은 미네랄 성분이 있는지를 나타내는 bone mineral density (BMD), 뼈 안에 얼마나 많은 잔기둥들이 남아있는지 나타내는 percent bone volume (BV/TV), 잔기둥의 두께 Trabecular thickness (Tb.Th), trabecular bone과 trabecular bone 사이의 거리를 나타내는 trabecular separation (Tb.Sp), 잔기둥의 수 trabecular number (Tb.N),의 값을 각각 구하였다.

2-3-5-2. 실험결과

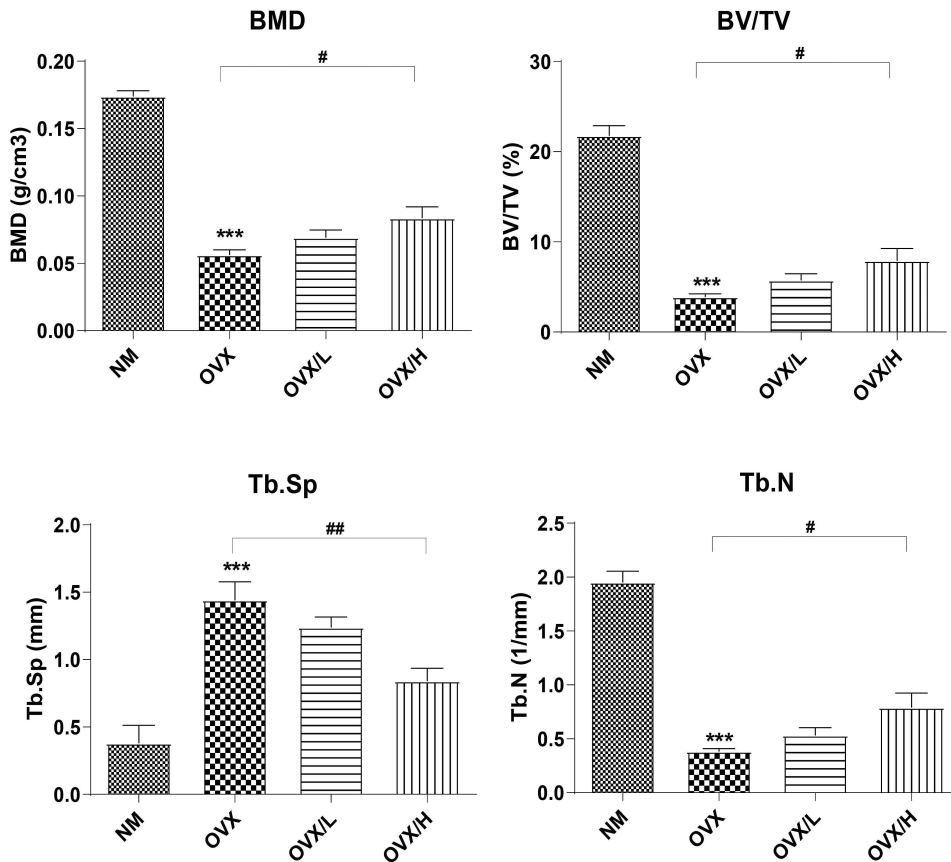


Trabecular bone parameters change of rat femurs after the whole experiment period. BMD: bone mineral density; BV/TV: percent bone volume; Tb.Th: trabecular thickness; Tb.Sp: trabecular separation; Tb.N: trabecular number; *, vs OVX, p<0.05; **, vs OVX, p<0.01

Micro CT

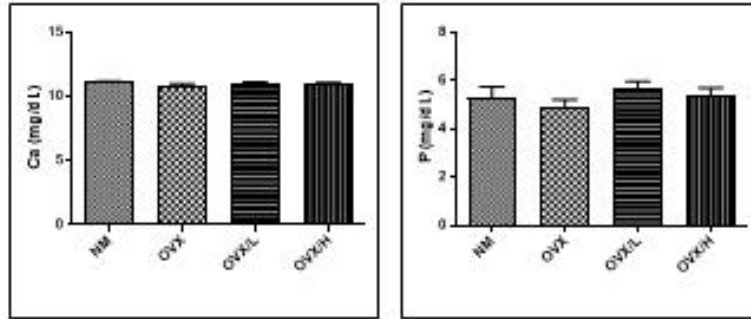


난소절제 및 Fabaton 콩잎 추출물의 투여에 따른 대퇴골 변화를 나타내는 마이크로CT결과이다. OVX에서 많은 양의 해면골이 파괴되어 있는 것을 관찰할 수 있고, 이는 OVX/H에서 회복되는 결과를 보였다.



OVX군은 NM군과 비교했을 때, bone mineral density (BMD), percent bone volume (BV/TV), trabecular number (Tb.N)가 감소하였고, trabecular bone과trabecular bone 사이의 거리를 반영하는 trabecular separation (Tb.Sp)이 증가하는 것이 보였다. 골다공증 모델이 매우 잘 만들어졌음을 나타내는 결과이다. 이러한 변화는 Fabaton 콩잎 추출물 투여에 의해서 회복된다. OVX/H군은 OVX군과 비교했을 때, trabecular thickness (Tb.Th)를 제외하고 bone mineral density (BMD), percent bone volume (BV/TV), trabecular number (Tb.N)가 증가하였다. 난소절제에 의한 골다공증은 Fabaton 콩잎 추출물 투여에 의하여 유의미하게 회복되었다.

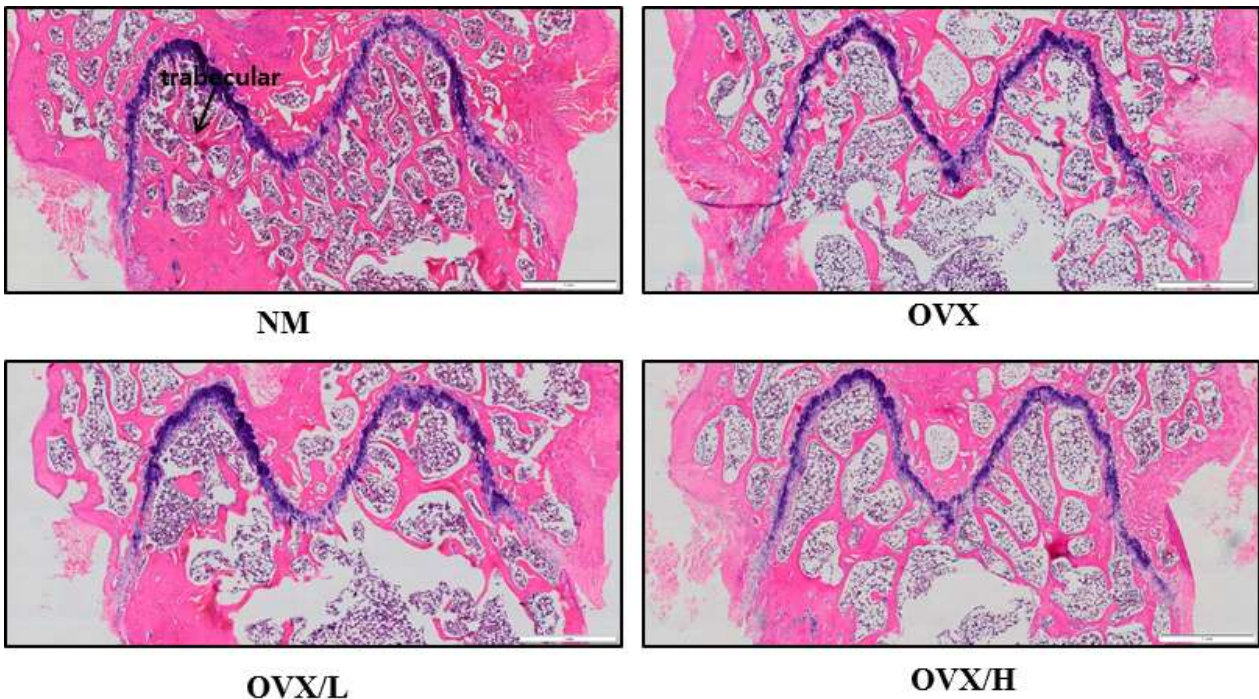
뼈대사관련 혈액지표, 칼슘과 인



There was no difference among the groups

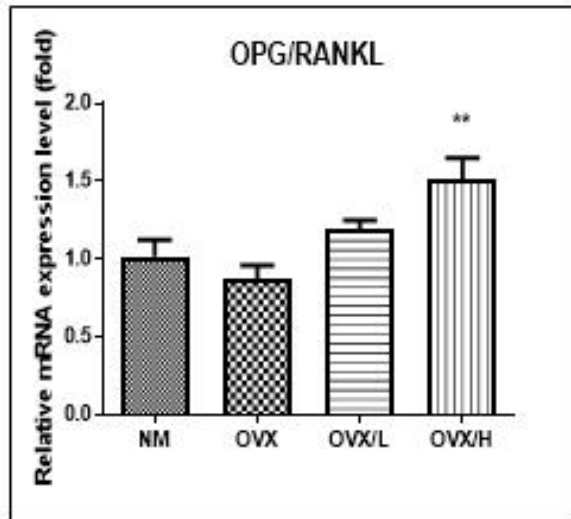
이러한 변화가 혹시 사료에 의한 무기질의 변화나 흡수의 변화에 기인하는지 알아보기 위하여 혈액 내의 칼슘과 인을 검사하여 보았지만, 혈액 내의 칼슘과 인의 농도에는 그룹 간의 차이가 없어서, 골다공증모델에서 각 그룹간의 차이는 식이나 식이의 흡수에 의한 것은 아니라는 것을 판단할 수 있었다.

마이크로CT에 나타난 부분과 동일한 부분을 적출해내어 고정하여 파라핀 포매 후 절단한 다음 H&E 염색을 이용하여 대퇴골의 미세구조를 분석하였다. 난소절제 및 Fabaton 콩잎 추출물의 투여에 따른 대퇴골 변화 결과는 다음과 같다. OVX군은 NM군과 비교했을 때, 잔기둥의 숫자가 감소하고 뼈가 재흡수된 공간이 증가하는 것으로 관찰이 되었다. 이는 갱년기 여성의 골다공증의 증상과 일치하는 결과이다. Fabaton 콩잎 추출물 투여에 의해서 OVX/H군은 OVX와 비교했을 때 trabecular number가 증가하고, 뼈재흡수공간이 줄어드는 것이 관찰된다. 이러한 결과는, 마이크로-CT 결과와 일치한다.



각 그룹에서 골다공증의 발현에 관계된 단백질의 발현변화를 RT-PCR법으로 분석하였다.

뼈대사관련 mRNA 변화 1



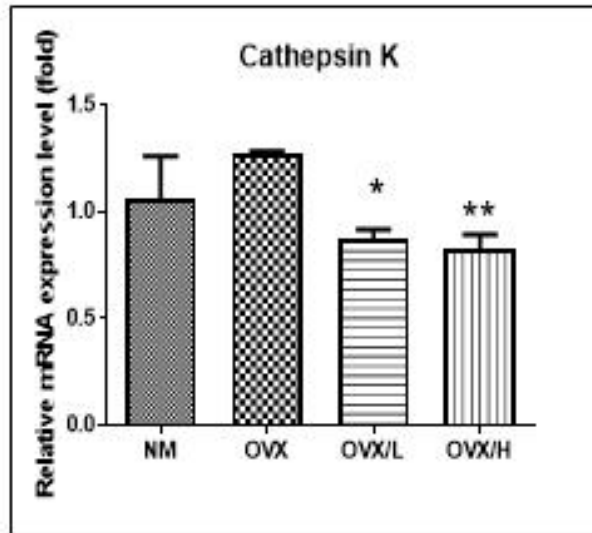
*, vs OVX, $p < 0.05$;

***, vs OVX, $p < 0.001$;

**, vs OVX, $p < 0.01$;

먼저 뼈파괴세포(osteoclast)로 분화를 증가시키는 RANKL과 뼈파괴세포의 활성을 감소시키는 osteoprotegrin을 분석하였다. 위의 그래프는 이 반대되는 두 물질의 비율을 한 번에 비교해 보기위해서 osteoprotegrin의 값을 RANKL의 값으로 나눈 수치를 비교한 것이다. 정상 그룹의 값을 1로 보정하였을 때, OVX 그룹에서는 이보다 낮은 수치를 보였는데 OVX/H에서는 1.5 정도의 값으로 높게 측정되었다. 이러한 결과로부터 유추해 보면 갱년기 여성에서 발생하는 뼈파괴세포의 활성화 증가를 Fabaton 콩잎 추출물이 막아 줄 수 있을 것이라 생각된다.

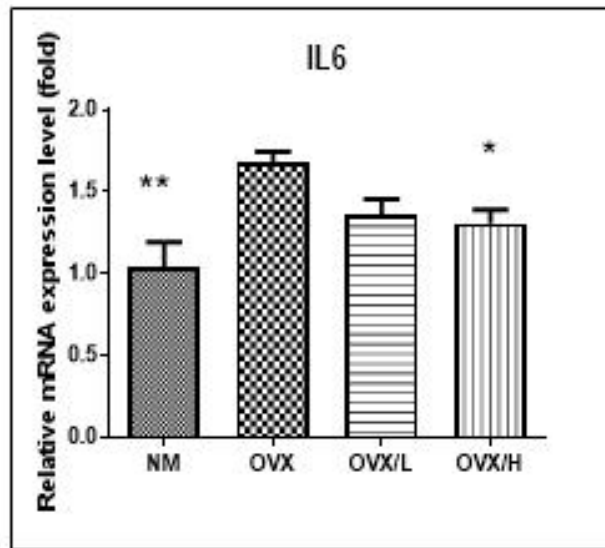
뼈대사관련 mRNA 변화 2



*, vs OVX, $p < 0.05$;
**, vs OVX, $p < 0.01$;
***, vs OVX, $p < 0.001$

cathepsin K는 cysteine protease 활성을 가지는 lysosomal enzyme인데, 뼈파괴세포에서 주로 분비되기 때문에 뼈재흡수의 지표로 사용된다. elastin, collagen, gelatin 등을 분해하는 기능이 있어 뼈와 연골을 파괴하는 기능을 가진 단백질이다. OVX 그룹에서 증가되었던 cathepsin K는 OVX/H에서 감소되는 것으로 관찰되었다. 이러한 결과를 보면 파바톤콩잎추출물은 갱년기 여성에서 뼈파괴세포가 분비하는 cathepsin K의 발현을 낮추어 골다공증 감소효과를 가져올 수 있을 것이라 생각된다.

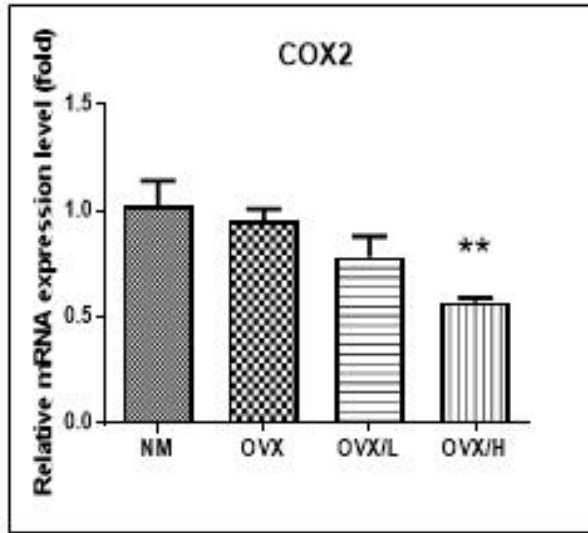
뼈대사관련 mRNA 변화 3



*, vs OVX, $p < 0.05$;
 **, vs OVX, $p < 0.01$;
 ***, vs OVX, $p < 0.001$

Interleukin 6(IL6)는 염증유발성 cytokine으로서 T cell이나 macrophage로부터 분비된 다음 염증반응을 더욱 격렬하게 만든다. 뼈파괴세포는 IL6에 의해 자극을 받은뒤 더욱 활성이 증가하는 것으로 알려져 있다. OVX군에서 증가한 IL6는 OVX/H에서 그 발현이 낮아지는 것을 확인하였다. 이로서 파바톤콩잎추출물은 갱년기 골다공증에 도움을 줄 수 있을 뿐 아니라, 갱년기에 유발되는 각종 염증성 질환에도 도움을 줄 수 있을 것으로 생각된다.

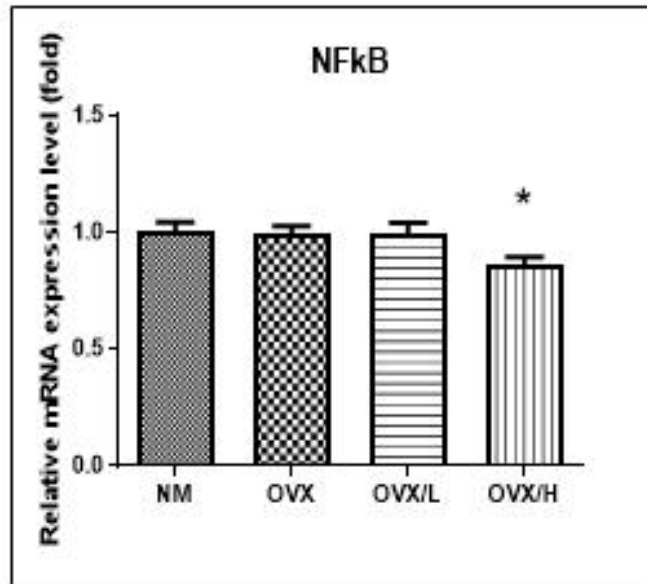
뼈대사관련 mRNA 변화 4



*, vs OVX, $p < 0.05$;
 **, vs OVX, $p < 0.01$;
 ***, vs OVX, $p < 0.001$

염증을 유발하는 물질을 만들어내는 효소인 COX2의 발현을 각 그룹에서 조사하였다. Fabaton 콩잎 추출물 고농도 투여 그룹에서 그 발현이 감소한 것을 관찰할 수 있었는데 NM과 OVX그룹의 발현이 비교하기 어려워 딱히 골다공증과 관련이 있다라고 말하기는 어렵다. 그렇지만 OVX그룹과 OVX/H그룹을 단순비교해보면 발현이 줄어들어 뼈 파괴세포의 활성을 줄이는데 도움을 줄 것이라고 생각된다. 좀 더 정확한 내용은 추가적인 실험에서 확인해야 할 내용이라고 생각된다.

뼈대사관련 mRNA 변화 5



*, vs OVX, $p < 0.05$;
 **, vs OVX, $p < 0.01$;
 ***, vs OVX, $p < 0.001$

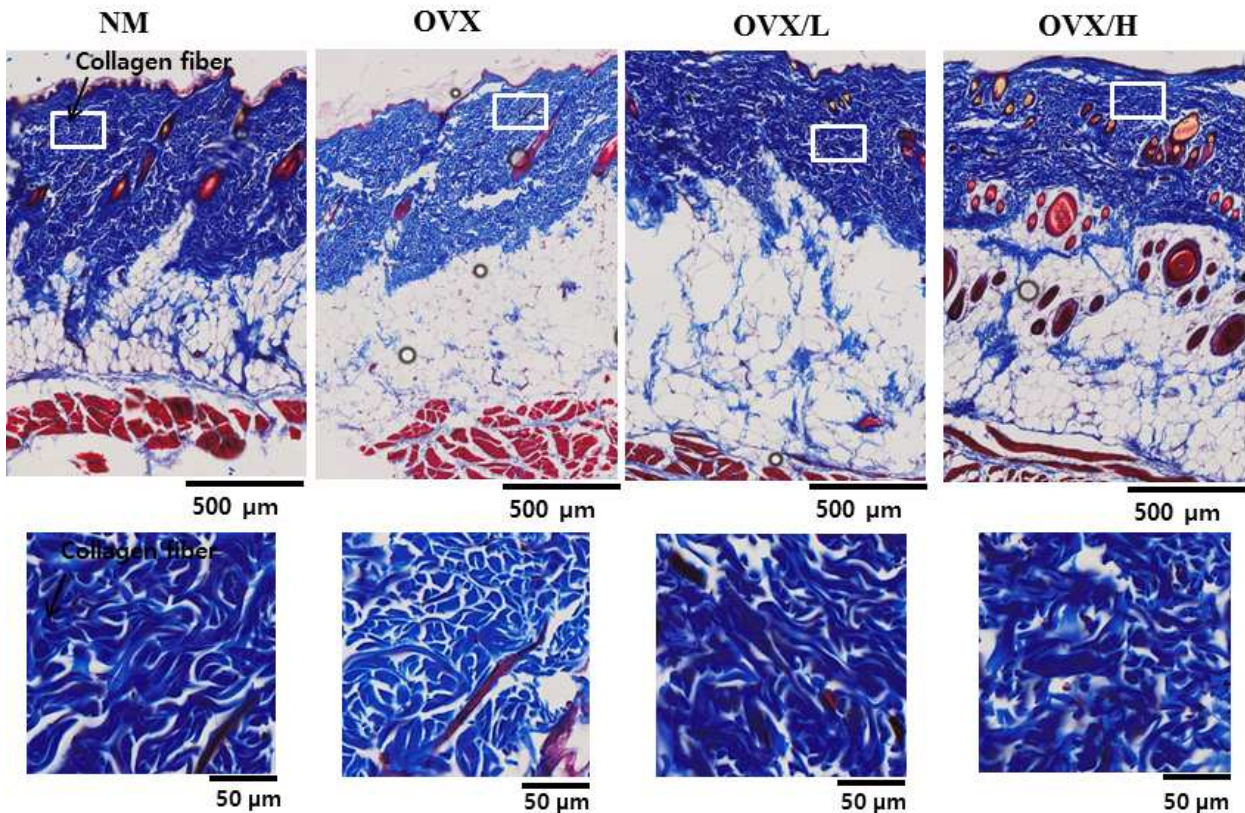
염증의 정도와 양의 상관관계에 있는 NFkB를 분석한 결과이다. 염증을 유발하고, 염증세포가 일정 기간 이상으로 생존하는데 필요한 물질로서 뼈파괴세포의 생존과 활성 획득에 필요한 물질이다. Fabaton 콩잎 추출물 고농도 투여 그룹에서 그 발현이 감소한 것을 관찰할 수 있었는데 정상군과 OVX그룹의 발현이 비교하기 어려워 딱히 골다공증을 개선해 줄 수 있다라고 말하기는 어렵다. 그렇지만 OVX그룹과의 단순비교를 해보면 발현이 줄어들어 뼈파괴세포의 활성화 숫자를 줄이는데 도움을 줄 것이라고 생각된다.

2-3-6. 난소제거 동물모델을 이용한 파바톤콩잎 추출물의 피부개선효과 검사

2-3-6-1. 실험방법

쥐의 등쪽 피부를 5mm X 15mm 면적으로, 피하지방이 충분히 포함되도록 절개하여 포르말린에 고정하였다. 24시간 동안 고정한 후, 파라핀 포매하여 절편을 만든 다음 콜라겐을 잘 염색할 수 있는 Masson's trichrome 염색법으로 염색한 다음 그 결과를 관찰하였다.

2-3-6-2. 실험결과



난소절제 그룹에서는 짙은 푸른색으로 염색되는 collagen의 색이 연해지고 그 양도 감소한 것을 볼 수 있다. 그리고 collagen의 완성도와 관련이 있는 collagen fiber의 크기도 잘게 변한 것을 관찰할 수가 있었다. 이러한 변화는 파바톤콩잎추출물 투여에 의하여 회복되는 것으로 관찰된다. 피부에서 콜라겐의 농도가 낮아지고, 그 완성도(콜라겐 사이의 결합)이 낮아진다는 것은 진피층의 탄력도와 갱년기 여성의 피부주름 개선에 파바톤콩잎추출물은 도움이 될 것으로 생각된다.

이 과제를 진행하면서 얻은 데이터로 Journal of Functional foods 에 2017년 2월에 투고하여, 2018년 2월에 accept 되었다. 그 이후에 뼈 건강에 관련된 데이터도 현재 Food and Function에 투고하여 결과를 기다리고 있다.



Isoflavone-enriched soybean (*Glycine max*) leaves prevents ovariectomy-induced obesity by enhancing fatty acid oxidation



Cheng-liang Xie^{a,b}, Sang Soo Kang^b, Kye Man Cho^c, Ki Hun Park^d, Dong Hoon Lee^{b,*}

^a Department of Medical Statistics and Epidemiology, School of Public Health, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510000, China

^b Department of Anatomy and Convergence Medical Science, Institute of Health Sciences, College of Medicine, Gyeongsang National University, Jinju 52727, Republic of Korea

^c Department of Food Science, Gyeongsang National University of Science and Technology, Jinju 52725, Republic of Korea

^d Division of Applied Life Science (BK21 plus), IALS, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Republic of Korea

ARTICLE INFO

Keywords:

Isoflavone-enriched soybean leaves (IESLs)

Glycine max

Ovariectomy

Anti-obesity

Fatty acid oxidation

ABSTRACT

Dietary isoflavones have been gaining increased interest in the field of functional foods due to their ability to ameliorate several postmenopausal symptoms. Using ovariectomized (OVX) rats supplemented with isoflavone-enriched soybean leaves (IESLs), we investigated the effect of dietary isoflavones on menopausal-associated obesity. Oral administration of IESLs significantly reduced OVX-induced weight gain and visceral fat mass. Additionally, IESLs significantly ameliorated OVX-induced hepatic steatosis as reflected by decreased triacylglycerol accumulation in the liver and decreased serum alanine transaminase and aspartate aminotransferase levels. These anti-obesity effects of IESLs were confirmed to be due to enhanced fatty acid oxidation via up-regulation of peroxisome proliferator activated receptor alpha, peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1, and carnitine palmitoyltransferase 1a mRNA expression. These results demonstrate that IESLs may be an effective functional food-based approach to protect against menopause-associated obesity.

2-3-7. 임상실험을 통한 파바톤콩잎 추출물의 갱년기증상 개선효과 검사

2-3-7-1. 연구수행내용

시험 명칭	'Fabaton 콩잎추출물'의 섭취에 대한 안전성 및 갱년기 여성의 건강개선 효과를 평가하기 위한 무작위배정, 이중 눈가림, 대조군 비교 인체적용시험					
생명윤리법에 따른 분류	<input checked="" type="checkbox"/> 인간대상연구 <input type="checkbox"/> 인체유래물연구					
단 계	<input checked="" type="checkbox"/> 1상, <input type="checkbox"/> 2상, <input type="checkbox"/> 3상, <input type="checkbox"/> 4상, <input type="checkbox"/> 기타					
기기등급	<input type="checkbox"/> 1등급 <input type="checkbox"/> 2등급 <input type="checkbox"/> 3등급 <input type="checkbox"/> 4등급					
구 분	<input checked="" type="checkbox"/> Local					
	<input type="checkbox"/> Multi(총기관수)	<input type="checkbox"/> 국내 (기관명, 기관수도 구체적으로 기술, 본원 포함 기관수기입) <input type="checkbox"/> 국외 (국가명, 국가수도 구체적으로 기술)				
시험 종류	<input type="checkbox"/> 약물 <input type="checkbox"/> 시약 <input type="checkbox"/> 의료기기 <input type="checkbox"/> 의료용구 <input type="checkbox"/> 진단 및 치료법 개발 <input checked="" type="checkbox"/> 식품 (건강기능식품) <input type="checkbox"/> 기타					
시험 목적	<input type="checkbox"/> 학술용 <input type="checkbox"/> 관찰조사연구 <input type="checkbox"/> 중개연구 <input type="checkbox"/> PMS <input type="checkbox"/> 가교시험 <input type="checkbox"/> 실험연구 <input checked="" type="checkbox"/> 국내허가용(KFDA) <input type="checkbox"/> 기타 <input type="checkbox"/> 국외/다국적 허가용					
의뢰자	경상대학교 산학협력단					
시험책임자	소속	부산대학교한방병원	직명	부교수	성명	윤영진
공동연구자	소속	부산대학교한방병원	직명	부교수	성명	최준용
	소속	부산대학교한방병원	직명	전임의	성명	배주은
	소속	부산대학교한방병원	직명	연구원(전문의)	성명	홍미나
	소속	부산대학교한방병원	직명	수련의	성명	박경덕
	소속	양산부산대학교병원	직명	교수	성명	나용진
연구담당자	소속	부산대학교한방병원	직명	CRC	성명	강미경
연구 예정기간	IRB승인일부부터 ~ 2019년 08월 31일까지					
포함 기준	1. 만 40세 이상 만 65세 미만의 여성 2. 스크리닝일 기준 마지막 월경 후 1년 이상 경과한 자 3. 스크리닝 시 쿠퍼만 갱년기 지수가 15 이상인 자 4. 스크리닝일 기준 자궁절제술을 받았거나 받지 않은 양측 난소 절제술 후 6주가 경과한 여성 5. 본 인체시험에 대한 자세한 설명을 듣고 완전히 이해한 후, 자의로 참여를 결정하고, 주의사항을 준수하기로 서면 동의한 자 6. 인체적용시험 기간 동안 추적관찰이 가능한 자 7. 제외기준에 포함되지 않는 자					
제외 기준	1. 유방촬영술(Mammography) 상 임상적으로 유의한 이상이 확인되는 경우					

	<p>(BI-RADS; Breast Imaging-Reporting and data system Category 0 또는 3 이상. 단, BI-RADS category 0인 경우 시험자 판단하에 등록가능)</p> <ol style="list-style-type: none"> 2. 질초음파상 자궁내막 두께가 5mm 초과인 여성 3. 스크리닝일 기준 3개월 이내 호르몬 대체요법을 받은 적이 있는 자 4. 스크리닝일 기준 3개월 이내에 갑상선 기능저하 또는 기능항진으로 약물복용력이 있는 자 5. 자궁내막증식증, 자궁암, 자궁내막암, 유방암 또는 유방질환의증, 성호르몬 관련 암 등의 과거력이 있는 자 6. 최근 1년 이내 심한 편두통이 있거나, 혈전색전증, 뇌혈관질환, 심근경색, 불안정형 협심증을 진단 받았거나 관상동맥 성형술을 시행한 과거력이 있는 자 7. 우울증, 불안장애 등의 심한 정신 질환이 있거나, 현재 항우울제 등 정신신경계 약물을 복용 중인 자 8. 폐경 1년 이후 부정형 자궁출혈이 있는 자 9. 조절되지 않는 고혈압 환자 (160/100mmHg 이상, 시험대상자 10분 안정 후 측정 기준) 10. 혈당이 조절되지 않는 당뇨병 환자 (공복혈당 180mg/dL 이상 또는 3개월 이내에 당뇨로 인해 약제를 새로 시작하는 경우) 11. 조절되지 않는 갑상선 질환이 있는 자 (시험자에 의해 본 시험에 참여가 가능하다고 판단되는 자는 참여 가능) 12. ALT(Alanine transaminase) 또는 AST(Aspartate transaminase)가 실시기관 정상 상한치의 3배를 초과하는 자 13. Creatinine이 실시기관 정상 상한치의 2배를 초과하는 자 14. 본 시험 시작 1개월 이내에 다른 임상시험에 참여했거나 시험 기간 중에 다른 임상시험에 참가할 계획이 있는 자 15. 3개월 이내에 갑상선 호르몬 제제, Clonidine, 항응고제 또는 항혈전제 (Warfarin, Clopidogrel등)를 사용한 자 16. 스크리닝일 기준 1개월 이내에 여성 갱년기 관련 의약품 또는 건강기능식품을 복용한 자 17. 약물이나 알코올 중독자 18. 임신부, 수유부, 임신 가능성이 있는 가임여성 19. 사회복지시설 등 집단시설에 수용 중인 자 20. 기타 시험자의 판단으로 부적합하다고 판단되는 자
중단 기준	<ol style="list-style-type: none"> 1. 선정/제외기준 위반 2. 시험대상자의 시험 중지 요구 3. 시험을 지속할 수 없는 이상반응 발생 (중대한 이상반응 포함) 4. 시험대상자의 불순응(순응도 80%미만) 5. 시험에 중대한 영향을 줄 수 있는 인체적용시험계획서의 위반

	6. 본 인체적용시험에 영향을 미칠 수 있는 의약품 또는 건강기능식품 등을 복용했거나 복용해야 하는 자 1. 시험용 식품을 연속 3일을 초과하여 복용하지 않은 경우 7. 기타 시험자의 판단																																																																																																								
시험 방법	대상 질환	갱년기 여성의 건강 개선 효과																																																																																																							
	대상	스크리닝일 기준 만 45세 이상 만 65세 미만의 여성으로서 선정기준에 적합하고, 제외기준에 해당되지 않는 자																																																																																																							
	대상 환자수	총 90명 (본원 90명)																																																																																																							
	적용 방법	<table border="1"> <thead> <tr> <th>항 목</th> <th>방문 1 (screening) (-21일 ~ 0일)</th> <th>방문 2 (기초방문) (0일)</th> <th>방문 3 (시험 중) (6주±3일)</th> <th>방문 4 (시험 종료) (12주±5일)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>대상자 서면동의서 취득</td> <td>✓</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>대상자 기초 정보</td> <td>✓</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>과거병력</td> <td>✓</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>신체검사¹</td> <td>✓</td> <td>✓</td> <td>✓</td> <td>✓</td> </tr> <tr> <td>생체징후²</td> <td>✓</td> <td>✓</td> <td>✓</td> <td>✓</td> </tr> <tr> <td>심전도 검사³</td> <td>✓</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>임상실험실 검사</td> <td>✓</td> <td></td> <td></td> <td>✓</td> </tr> <tr> <td>안전성 평가⁴</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td> 유 방 밀 도 (mammographic density)</td> <td></td> <td>✓</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td> 자궁내막 두께</td> <td></td> <td>✓</td> <td></td> <td>✓</td> </tr> <tr> <td> 이상반응 확인</td> <td></td> <td></td> <td>✓</td> <td>✓</td> </tr> <tr> <td>대상자 선정 / 제외기준 평가</td> <td>✓</td> <td>✓</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>시험용 식품 및 복용일지 배부</td> <td></td> <td>✓</td> <td>✓</td> <td></td> </tr> <tr> <td>기복용 식품용기 및 복용일지 회수</td> <td></td> <td></td> <td>✓</td> <td>✓</td> </tr> <tr> <td>유효성평가변수 측정⁵</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td> 1차</td> <td>✓</td> <td></td> <td>✓</td> <td>✓</td> </tr> <tr> <td> 2차</td> <td></td> <td>✓</td> <td>✓</td> <td>✓</td> </tr> <tr> <td>병용약물 체크</td> <td></td> <td>✓</td> <td>✓</td> <td>✓</td> </tr> <tr> <td>순응도 체크</td> <td></td> <td></td> <td>✓</td> <td>✓</td> </tr> </tbody> </table> <p># 방문 1과 방문 2를 같은 날에 수행할 수 있다. ## 상세 검사/측정 내역은 다음 페이지의 [검사항목] 참조</p>				항 목	방문 1 (screening) (-21일 ~ 0일)	방문 2 (기초방문) (0일)	방문 3 (시험 중) (6주±3일)	방문 4 (시험 종료) (12주±5일)	대상자 서면동의서 취득	✓				대상자 기초 정보	✓				과거병력	✓				신체검사 ¹	✓	✓	✓	✓	생체징후 ²	✓	✓	✓	✓	심전도 검사 ³	✓				임상실험실 검사	✓			✓	안전성 평가 ⁴					유 방 밀 도 (mammographic density)		✓			자궁내막 두께		✓		✓	이상반응 확인			✓	✓	대상자 선정 / 제외기준 평가	✓	✓			시험용 식품 및 복용일지 배부		✓	✓		기복용 식품용기 및 복용일지 회수			✓	✓	유효성평가변수 측정 ⁵					1차	✓		✓	✓	2차		✓	✓	✓	병용약물 체크		✓	✓	✓	순응도 체크			✓	✓
항 목	방문 1 (screening) (-21일 ~ 0일)	방문 2 (기초방문) (0일)	방문 3 (시험 중) (6주±3일)	방문 4 (시험 종료) (12주±5일)																																																																																																					
대상자 서면동의서 취득	✓																																																																																																								
대상자 기초 정보	✓																																																																																																								
과거병력	✓																																																																																																								
신체검사 ¹	✓	✓	✓	✓																																																																																																					
생체징후 ²	✓	✓	✓	✓																																																																																																					
심전도 검사 ³	✓																																																																																																								
임상실험실 검사	✓			✓																																																																																																					
안전성 평가 ⁴																																																																																																									
유 방 밀 도 (mammographic density)		✓																																																																																																							
자궁내막 두께		✓		✓																																																																																																					
이상반응 확인			✓	✓																																																																																																					
대상자 선정 / 제외기준 평가	✓	✓																																																																																																							
시험용 식품 및 복용일지 배부		✓	✓																																																																																																						
기복용 식품용기 및 복용일지 회수			✓	✓																																																																																																					
유효성평가변수 측정 ⁵																																																																																																									
1차	✓		✓	✓																																																																																																					
2차		✓	✓	✓																																																																																																					
병용약물 체크		✓	✓	✓																																																																																																					
순응도 체크			✓	✓																																																																																																					
	Monitoring	동의서, 기초정보, 과거병력, 신체검사, 생체징후, 임상실험실 검사, 심전도 검사, 유효성 평가 변수 측정, 이상반응, 병용약물, 순응도, 안전성 평가																																																																																																							
시험 방법	결과 판정	1. 유효성 : (1) 1차 유효성 변수 <ul style="list-style-type: none"> • 쿠퍼만 갱년기 지수 (Kupperman index, KI) 변화량 (2) 2차 유효성 변수																																																																																																							

		<ul style="list-style-type: none"> • 갱년기 삶의 질 평가 (Menopause-specific Quality of Life questionnaire, MENQOL) 점수 변화량 • 골 흡수 지표 변화량 <ul style="list-style-type: none"> - 요중 Deoxypyridinoline - 요중 NTx(N-terminal telopeptide) - 혈중 CTx(C-terminal telopeptide) • 골 생성 지표 변화량 <ul style="list-style-type: none"> - 혈중 Osteocalcin - 혈중 bone-specific alkaline phosphatase <p>2. 안전성 :</p> <ul style="list-style-type: none"> - 이상반응 여부 - 임상실험실 검사 결과의 이상 여부 - 생체징후 및 문진에 의한 이상소견 여부 - 유방 밀도 이상 소견 여부 - 자궁내막 두께 측정
	비용 요법	없음

2-3-7-2. 연구 진행상황 결과 요약

2-3-7-2-1. IRB 변경내역

심의종류	승인일	변경내역
초기심의	1. 2018.03.27. (시정승인) 2. 2018.04.11. (승인)	해당없음
변경심의	1. 2018.06.01	1. 동의서변경(V1.1) 2. 연구계획서변경 (제형변경 캡슐15mg -> 정제 700mg) 3. 증례기록서 4. 설문지 내용변경
	2. 2018.06.04	1. 동의서변경(V1.2) 1) 24시간 연락처 변경 2) 교통비 지급방식 변경
	3. 2018.09.19	1. 연구계획서변경 1) 자궁내막, 유방밀도검사추가 2) 선정제외기준 수정

		자궁적출술 및 난소절제대상자 추가 3) 공동연구자-산부인과교수 추가
4. 2018.10.31		1. 연구계획서 변경 1) 유방촬영술 스크리닝기간 조정 3개월->6개월 2) 자궁적출술대상자 자궁내막검사생략
5. 2019.01.22		1. 연구계획서 변경 연구담당자 변경
6. 2019.02.27		1. 동의서변경 대상자 방문비 변경(10만원->16만원)
7. 2019.04.03		1. 연구계획서변경 (공동연구자 퇴사)

2-3-7-2-1. IRB 대상자 등록 및 진행현황(2019.07.12.)

총 스크리닝	스크리닝탈락	등록	동의철회	완료	진행중
108명	18명	90명	11명 <동의철회 사유> - 추적 loss 1명 - 동의철회 4명 - 두통 1명 - 설사 1명 - 유방통증 2명 - 장기미복용 1명 - 홍조 및 심계항진 1명	23명	56명 (9월 전체 완료 예정)

“따뜻한 치유 · 나누는 사랑 · 더하는 행복”



부산대학교병원



수신자 수신자참조

(참조)

제목 부산대학교한방병원 연구윤리심의위원회 신속심의 결과 알림

부산대학교한방병원 연구윤리심의위원회 신속심의 결과를 다음과 같이 알립니다.

○ 부산대학교한방병원 연구윤리심의위원회 신속심의 결과

연번	구분	연구명	연구책임자	의뢰자	결과
1	계획서 위반 및 미준수 사례보고	'Fabaton 콩잎추출물'의 섭취에 대한 안전성 및 갱 년기 여성의 건강개선 효과를 평가하기 위한 무작위 배정, 이중 눈가림, 대조군 비교 인체적용시험	부산대학교한방병원 한방부인과 윤영진	경상대학교 산학협력단장 정종일	검토완료

붙임 통지서 1부. 끝.

연구윤리심의위원회장



수신자 부산대학교한방병원 한방부인과 윤영진, 경상대학교 산학협력단장 정종일

★직원 이선미 위원장 06/25 김기봉

협조자

시행 연구윤리심의위원회-119 (2019.06.25.) 접수 ()

우 49241 경상남도 양산시 물금읍 금오로20


/ www.pnukh.or.kr

통지서

IRB과제번호	2018004	심의내용	계획서 위반 및 미준수 사례보고	통지일자	2019. 6. 25.
수신	의뢰기관	경상대학교 산학협력단장 정종일			
	연구책임자	부산대학교한방병원 한방부인과 윤영진			
연구과제명	'Fabaton 콩잎추출물'의 섭취에 대한 안전성 및 갱년기 여성의 건강개선 효과를 평가하기 위한 무작위배정, 이중 눈가림, 대조군 비교 인체적용시험				
생명윤리법에 따른 분류	<input checked="" type="checkbox"/> 인간대상연구		<input type="checkbox"/> 인체유래물연구		
연구대상	<input type="checkbox"/> 의약품 <input type="checkbox"/> 의료기기 <input checked="" type="checkbox"/> 식품 <input type="checkbox"/> 기타				
	Phase	<input checked="" type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> II <input type="checkbox"/> III <input type="checkbox"/> IV <input type="checkbox"/> PMS <input type="checkbox"/> 기타			
	일반명	Fabaton 콩잎 추출물	상품명	Fabaton 콩잎 추출 분말	
전체 대상자 수	90명		(본 기관배정)	90명	
연구예정기간	IRB승인일(2018.4.11.) - 2019.8.31.		심의일 (승인일자)	2019. 6. 19.	
연구승인기간	IRB승인일(2018.4.11.) - 2019.8.31.				
제출서류	계획서 위반 및 미준수 사례보고서				
관련근거	회의록	중간보고시기	1년		
심의결과	<input type="checkbox"/> 승인 <input type="checkbox"/> 보완(재심의)		<input type="checkbox"/> 중지 <input checked="" type="checkbox"/> 검토완료		
	<input type="checkbox"/> 시정승인 (수정 후 신속심의)		<input type="checkbox"/> 반려 <input type="checkbox"/> 보류		
변경문서정보	-				
심의결과내용	-				

- ◆ 「시정승인」 시에는 시정서류를 2주일 이내에 제출하시기 바랍니다.
- ◆ 본 심의위원회는 생명윤리 및 안전에 관한 법률, 의약품·의료기기 임상시험 관리기준을 준수합니다.
- ◆ 이해갈등 관련 IRB 위원이 있는 경우, 토론 및 결정과정에 참여하지 못하도록 위원장이 조치하였습니다.
- ◆ 연구 중에 중대한 이상반응 발생 시 연구책임자는 본 위원회에 즉시 보고해야 합니다.
- ◆ 본 심의위원회에서 지정한 중간보고시기에 중간보고서를 연구종료 시에는 종료보고서를 제출해주시고 종료보고 승인 후 1년 안에 결과보고서를 제출해 주시기 바랍니다.
- ◆ 해당연구를 1년 이상 지속적으로 수행하는 연구책임자께서는 본 심의위원회로 지속심의의뢰서를 제출하여야 합니다.
- ◆ 본 임상연구 결과를 임상연구실시기관의 사전 서면동의 없이는 어떤 경우라도 학술목적 이외에 실시기관명을 사용할 수 없습니다.
- ◆ 심의위원회의 결정사항에 대해 이의가 있는 경우 이의신청 절차에 따라 2회까지 이의신청이 가능합니다.

부산대학교한방병원
연구윤리심의위원회



2-4. 제1협동과제 수행내용 및 결과

2-4-1. 연구 수행내용 및 결과 요약

구분	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
1	콩잎 추출물 지표설정을 위한 기초연구	<ul style="list-style-type: none"> - 콩잎의 기능/지표 성분설정 - 콩잎 추출물의 기능/지표 성분 기준 시험법 개발 - 고효율 pilot추출 및 대량추출 조건 확립 - 콩잎추출물의 기초생리활성 검증 	<ul style="list-style-type: none"> - 추출 용매별 활성지표 물질 확인 및 후속연구자료 확보 - 기초활성 검증 <p>[결과-1]</p>
2	콩잎추출물의 일반 식품 제형개발	<ul style="list-style-type: none"> - 주관기관 콩잎추출물의 분말원료확보 - 일반식품 시제품개발을 위한 제형연구 - 여러제형의 콩잎 추출물 시제품 개발 - 콩잎 추출물 시제품의 기호도 조사 	<ul style="list-style-type: none"> - 건강음료 및 젤리 시제품 개발 완료 - 건강음료 및 젤리 시제품의 기호도조사 평가 완료 <p>[결과-2]</p>
3	파바톤콩잎 추출물의 건강기능식품 제형개발	<ul style="list-style-type: none"> - 파바톤콩잎 추출물의 일반 식품 (음료, 젤리) 시제품 개발 - 안정성검사 (장기보존/가속실험) - 파바톤콩잎 추출물 및 일반 식품(음료, 젤리) 품질관리 (미생물, 중금속검사) - 파바톤콩잎 추출물의 건강기능식품 제형 연구 및 시제품 개발 	<ul style="list-style-type: none"> - 파바톤콩잎 분말원료, 음료 및 젤리 안정성검사 - 파바톤콩잎 분말원료, 음료 및 젤리 품질관리 - 파바톤콩잎 추출물의 임상 샘플제작 - 파바톤콩잎 추출물의 건강 기능식품 제형 연구 - 건강기능식품 1건 시제품 개발 진행중 <p>[결과-3]</p>
4	파바톤콩잎 추출물의 건강기능식품 제품개발	<ul style="list-style-type: none"> - 파바톤콩잎 추출물 건강기능식품 제품화 - 파바톤콩잎 추출물 건강기능식품(임상용 샘플, 타블렛) 품질관리(QC) 시험법 확립 (미생물, 중금속검사) - 파바톤콩잎 추출물 건강기능식품(임상용 샘플, 타블렛) 안정성시험(장기보존/가속 실험) 	<ul style="list-style-type: none"> - 건강기능식품 1건 시제품 개발/디자인연구/품목제조 보고서 1건 완료 - 파바톤콩잎 임상용 샘플, 건강기능식품 품질관리 - 파바톤콩잎 임상용 샘플 안정성 검사 - 파바톤콩잎 건강기능식품 포장 형태별 안정성 검사 <p>[결과-4]</p>

2-4-2. 콩잎 추출물 지표설정을 위한 기초연구(결과-1)

2-4-2-1. 콩잎의 기능/지표성분 설정

- 실험에 사용된 콩잎은 분자농법기술을 이용하여 일반콩잎을 식물성 에스트로겐이 고함유되도록 전환한 것이다.
- 이에 지표성분 설정을 위해 여러 식물성 에스트로겐(Daidzin, Glycitin, Genistin, Daidzein, Glycitein, Genistein, Malonyl Genistin)을 HPLC를 이용하여 분석을 진행하였다.
- 그 결과 콩잎추출물에서는 배당체인 Daidzin과 Genistin 성분만 검출이 되었고 그 외의 성분들은 검출되지 않음이 확인되었다.
- 따라서 약 7종의 성분 중 Daidzin과 Genistin을 콩잎추출물의 가장 적합한 지표성분으로 선정하였다.

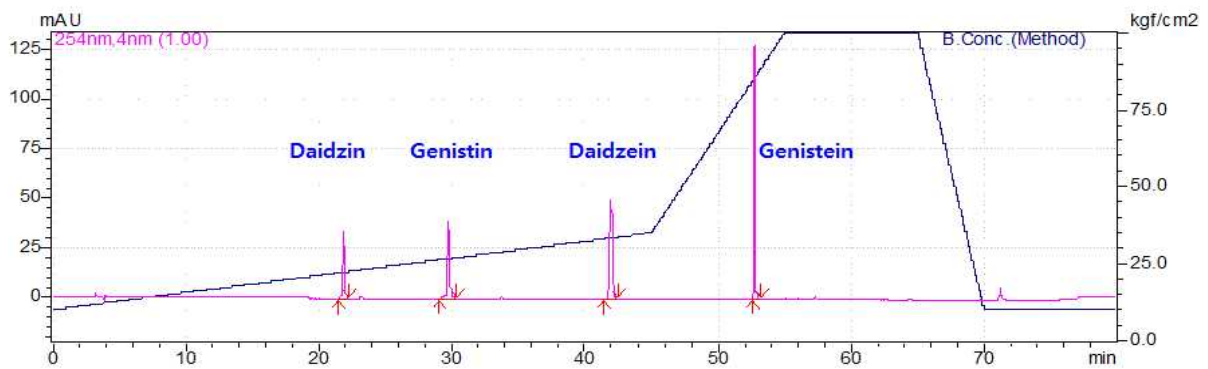


그림 3-1. 식물성 에스트로겐 분석 data

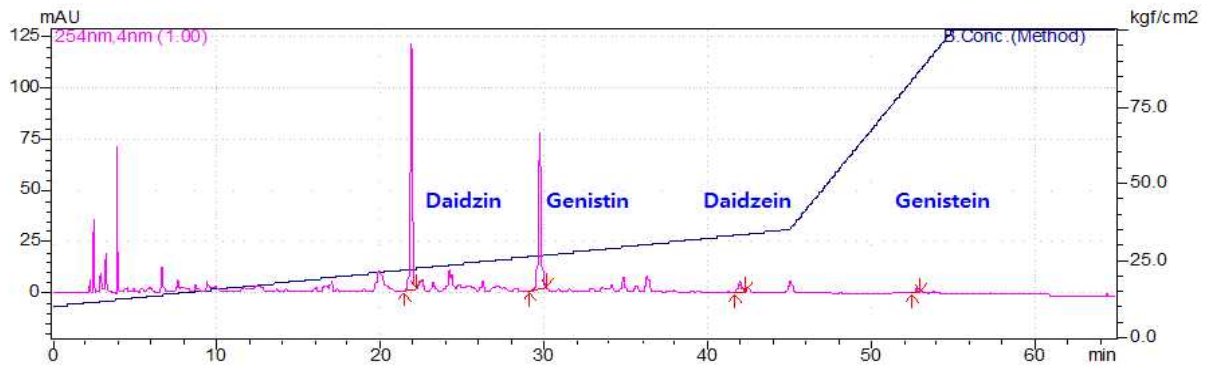


그림 3-2. 콩잎추출물 분석 data

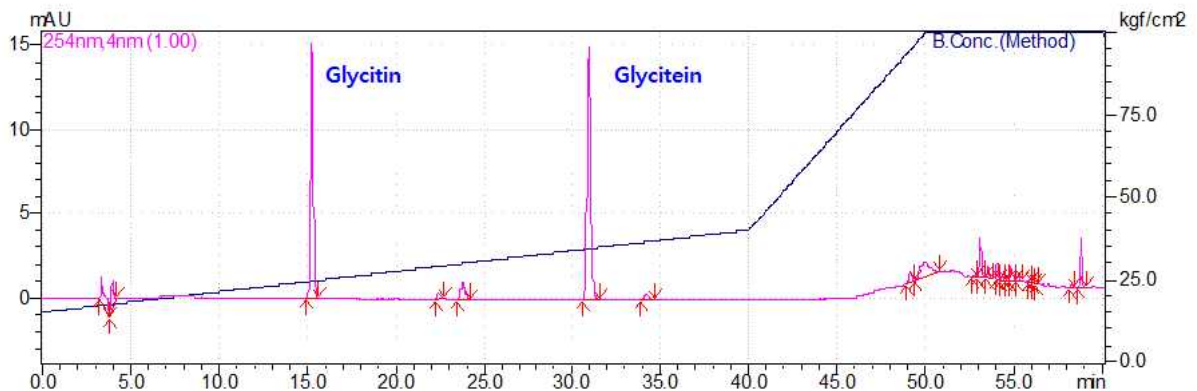


그림. 식물성 에스트로겐 분석 data

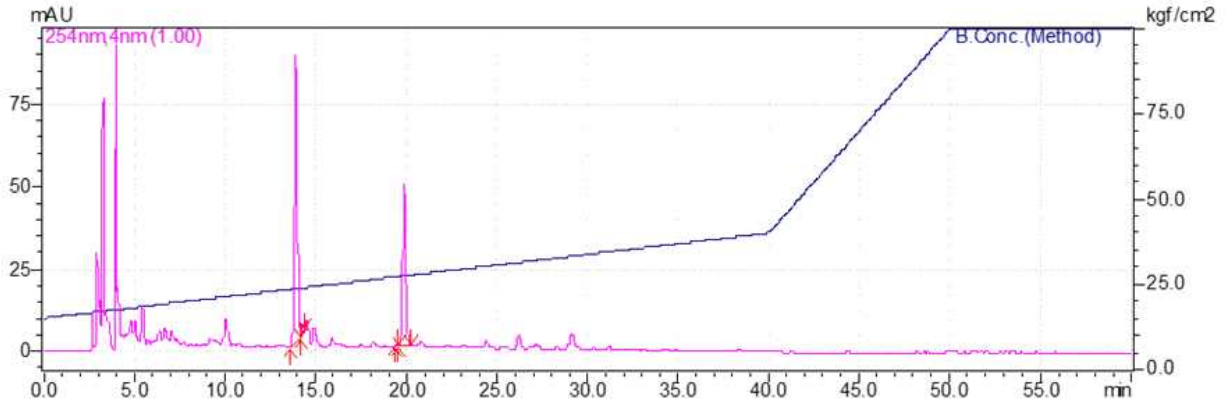


그림. 콩잎추출물 분석 data

2-4-2-2. 콩잎 추출물의 기능/지표성분 기준시험법 확립

- 지표성분으로 선정된 Daidzin과 Genistin의 시험법을 확립하기 위해 먼저 건강기능식품 공전상에 고시된 대두 이소플라본의 시험방법을 이용하여 지표성분 분석을 진행하였다.

표. 식품공전상의 HPLC 조건

항목	조건
주입량	10 μ L
칼럼온도	40 $^{\circ}$ C
이동상	A : 물/메탄올/초산(88:10:2) B: 메탄올/초산(98:2)
검출기 파장	260nm
유량	1.0ml/분

표. 식품공전상의 이동상 조건

시간	A용액 (%)	B용액 (%)
0	90	10
21	60	40
32	60	40
35	40	60
36	90	10

- 식품공전상에 고시된 시험법을 사용하였을 경우 분석시간을 단축시킬 수 있었지만 지표성분으로 설정한 Daidzin과 Genistin의 peak가 다른 성분과 겹쳐서 제대로 분리가 되지 않았다.
- Peak 분리를 위해 이동상의 조건을 변경하여 공전상에 고시된 시험법보다 더 나은 시험법을 설정할 수 있었다. 공전보다 분석시간은 더 길지만 겹친 peak를 분리하여 더 나은 지표성분 분석법을 설정하였다. 변경된 조건은 다음과 같다.

표. 변경한 HPLC 조건

항목	조건
주입량	10 μ L
칼럼온도	30 $^{\circ}$ C
이동상	A : 물(0.1% 초산) B: Acetonitrile
검출기 파장	254nm
유량	1.0ml/분

표. 변경한 이동상 조건

시간	A용액 (%)	B용액 (%)
0	85	15
40	60	40
50	0	100
60	0	100

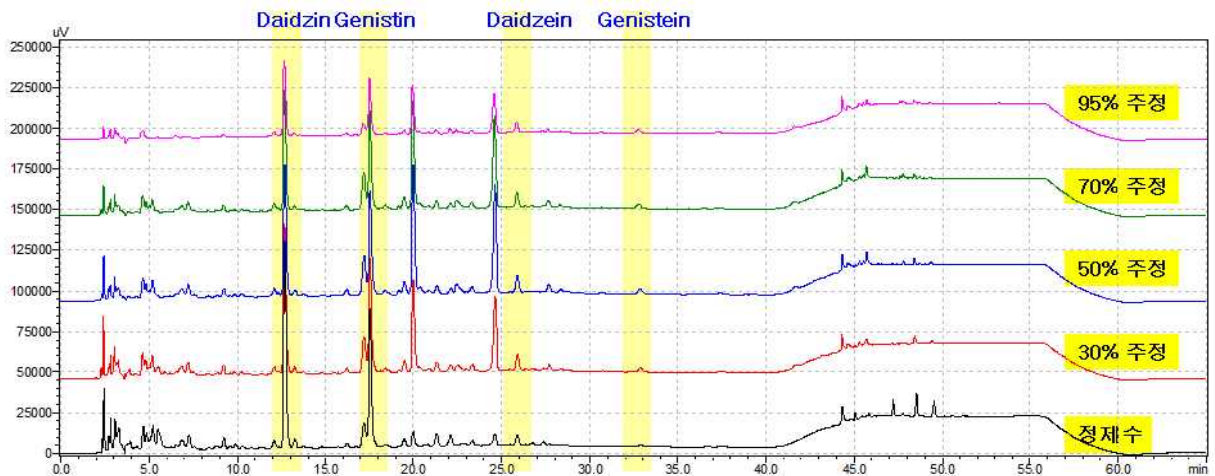


그림. 건강기능식품 공전에 기재된 분석법 사용 data

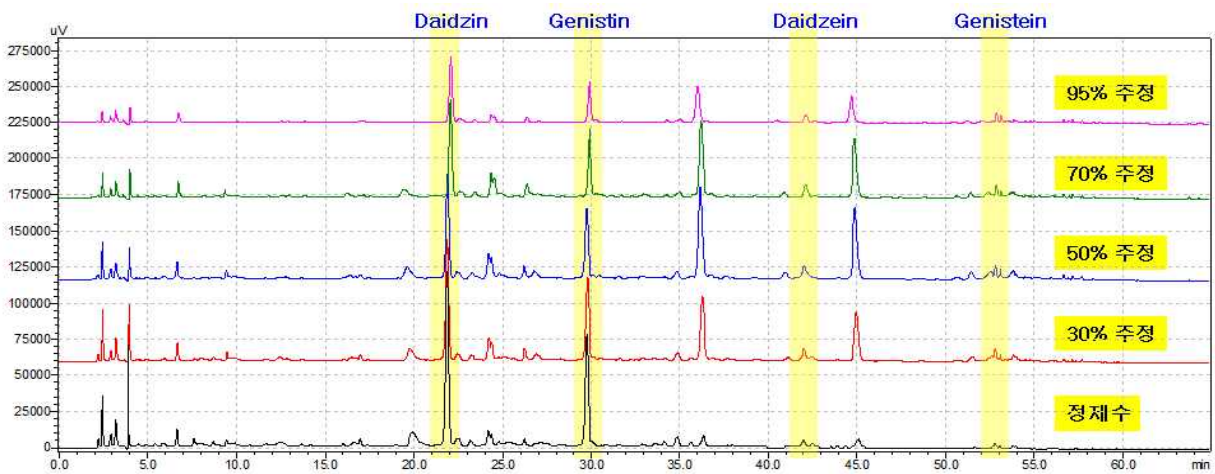


그림. 이동상 조건 변경을 통한 분석 결과

2-4-2-3. 콩잎으로부터 기능/지표성분 고효율 pilot 및 대량추출조건 확립

- 콩잎추출물로부터 지표성분의 함량을 최적화하기 위해 여러 가지 조건을 변경하여 수율을 측정하고 HPLC를 이용하여 정량분석을 진행하였다.
- 주관기관으로부터 제공받은 건조된 Fabaton 콩잎을 추출배수, 추출횟수, 온도, 용매 등에 변화를 주어 추출하여 추출물로부터 지표성분의 함량을 최적화할 수 있는 조건을 확립하였다.
- 먼저 정제수와 주정을 비율을 달리 한 용매를 원재료 대비 10배수로 하여 2차에 걸쳐(1차-4hr, 2차-2hr) 추출하였다. 그 결과 주정이 혼합된 용매보다 정제수 100%로 추출했을 때 수율과 지표성분인 Daidzin과 Genistin의 함량이 가장 높았다.

표. 정제수와 주정의 혼합비율별 수율 및 지표성분 함량

조건	추출수율(%)	Daidzin 함량(%)	Genistin 함량(%)
정제수	29.4	2.34	1.24
30% 주정	28.6	1.71	0.92
50% 주정	28.8	1.46	0.69
70% 주정	28.6	1.47	0.70
95% 주정	18.2	1.70	0.80

- 두 번째로 추출배수에 변화를 주고(원재료 대비 용매비율 15배수) 정제수와 다른 유기용매를 이용하여 지표성분의 함량을 분석하였다. 정제수보다 Methanol을 용매로 사용하였을 때 지표성분의 함량은 높았지만 수율이 정제수를 이용한 것보다 절반 이하로 떨어졌기 때문에 정제수를 지표성분 함량을 최적으로 할 수 있는 용매로 선정하였다. 추출배수는 10배수로 하는 것이 15배수로 하는 것이 더 효율적인 것으로 확인되었다.

표. 정제수와 주정비율별 수율 및 지표성분 함량

조건	추출수율(%)	Daidzin 함량(%)	Genistin 함량(%)
MeOH, 60℃	11.5	1.81	0.99
MeOH, 상온, 3일	7.8	1.30	1.00
EtOAc, 상온, 3일	2.4	0.08	0.03
정제수, 90℃	25.3	0.82	1.01

- 위의 두 결과를 바탕으로 정제수를 이용하여 추출횟수, 온도에 변화를 주어 지표성분 함량 변화를 분석한 결과 90℃ 이상의 온도에서 2차에 걸쳐 추출하는 것이 지표성분 함량을 최적화할 수 있는 조건임이 확인되었다.

표. 추출횟수 및 온도 변화에 따른 지표성분 함량

조건	추출수율(%)	Daidzin 함량(%)	Genistin 함량(%)
50℃, 1차(6hr)	17.3	0.04	0.00
70℃, 1차(6hr)	13.0	0.54	0.25
90℃, 1차(6hr)	19.5	0.87	0.41
70℃, 2차(4hr, 2hr)	16.6	0.61	0.25
70℃, 2차(6hr, 3hr)	25.3	0.46	0.19
90℃, 2차(6hr, 3hr)	25.9	1.14	0.57

- 위 모든 결과를 종합하였을 때 추출용매는 정제수로 하여 90℃ 이상의 온도에서 2회에 걸쳐 추출하는 것을 콩잎추출물에서 지표성분 수득율을 최대로 할 수 있는 조건으로 확립하였다.

2-4-2-4. 콩잎/복합추출물의 항산화 활성 검증

- 콩잎추출물의 항산화 활성을 검증하기 위해 안정한 free radical인 DPPH와 ABTS를 이용하여 radical 소거 활성을 측정하였다.
- DPPH로 산화를 개시시킨 후 콩잎추출물에 의해 radical이 소거되는 능력을 측정한다. 농도에 따라 보라색에서 노란색으로 바뀌며 이를 ELISA를 이용해 517nm에서 파장이 흡수되는 차이를 이용하여 항산화 측정이 가능하다.
- ABTS도 DPPH와 같은 원리이며 ABTS radical은 짙은 청녹색이며 항산화 물질과 반응하면 점점 투명해진다.
- 실험 결과 정제수와 주정의 혼합추출물에서는 항산화 활성을 나타내지 않는 것을 확인되었다.

표. 주정 혼합 비율에 따른 DPPH radical 소거능

	100 ug/mL	50 ug/mL	25 ug/mL	12.5 ug/mL	6.25 ug/mL	3.13 ug/mL
정제수	8.1 %	6.3 %	3.1 %	1.3 %	3.3 %	-2.2 %
30%주정	8.6 %	4.7 %	3.5 %	2.0 %	3.2 %	2.1 %
50%주정	8.7 %	5.5 %	3.0 %	0.7 %	1.4 %	-1.0 %
70%주정	12.2 %	8.3 %	4.0 %	1.8 %	1.6 %	0.3 %
95%주정	12.2 %	6.8 %	1.7 %	-0.2 %	0.5 %	-2.3 %
Ascorbic acid	85.5 %	84.6 %	80.6 %	64.9 %	45.1 %	22.0 %

표. 주정 혼합 비율에 따른 ABTS radical 소거능

	200 ug/mL	100 ug/mL	50 ug/mL	25 ug/mL	12.5 ug/mL	6.25 ug/mL
정제수	27.4 %	21.8 %	13.8 %	8.1 %	6.0 %	1.9 %
30%주정	36.6 %	37.2 %	22.4 %	14.3 %	8.8 %	5.8 %
50%주정	29.8 %	38.5 %	23.8 %	14.6 %	9.5 %	4.6 %
70%주정	30.5 %	32.1 %	25.8 %	17.0 %	11.1 %	6.5 %
95%주정	25.3 %	23.6 %	17.6 %	12.9 %	10.4 %	5.4%
Ascorbic acid	88.7 %	88.4 %	88.6 %	87.9 %	88.3 %	87.9 %

- Raw 264.7 대식세포를 1% penicillin-streptomycin와 10% heat-inactivated FBS(fetal bovine serum)를 첨가한 DMEM(Dulbecco' Modified Eagle' Medium)에 배양하여 내독소인 LPS(Lipopolysaccharide)를 대식세포에 처리하고 콩잎추출물을 첨가하여 생성되는 nitric oxide(NO) 및 염증성 cytokine TNF- α , IL-6 생성 억제능을 확인하였다.
- 주정이 50% 이상 함유된 콩잎추출물에서 위 3가지 염증관련 인자에 대하여 억제능을 보임으로 항염증 효과를 확인하였다.

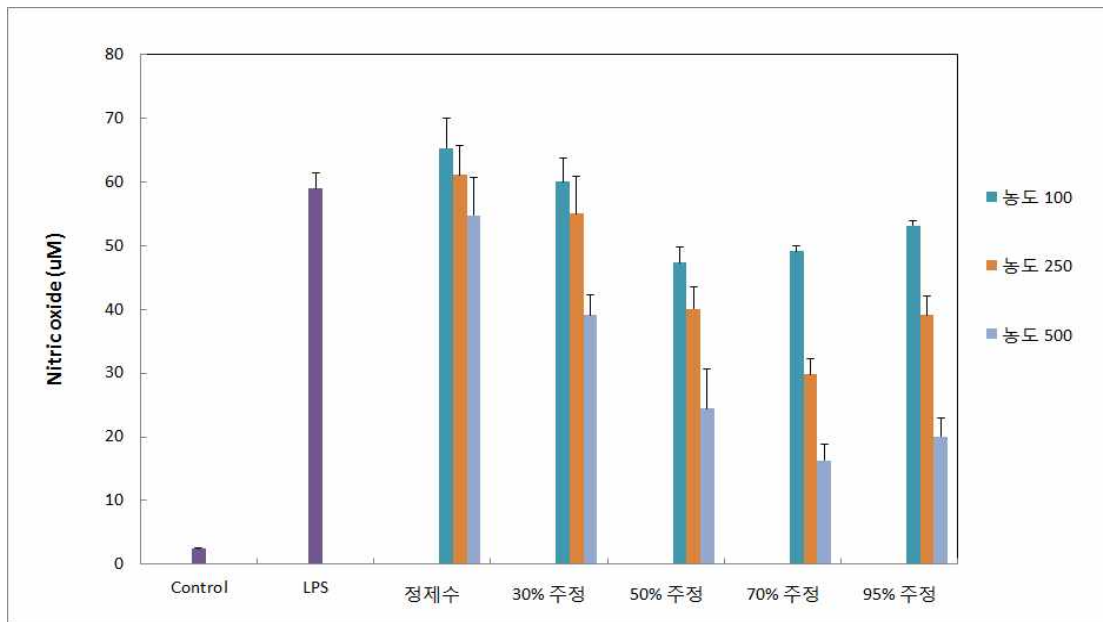


그림. 주정 농도별 콩잎추출물 처리에 따른 NO(nitric oxide) 농도

- NO 저해 활성은 정제수 추출조건에서는 거의 활성이 나타나지 않았고 주정 추출조건에서는 농도 의존적으로 활성이 높아짐을 보였다. 30% 주정 추출조건에서는 500 μ g/ml 농도에서 항염증 효과가 나타났고, 이외 50%, 70%, 95% 주정 추출조건에 대하여서도 저해활성을 보였으나 70% 주정추출물에서 가장 높은 저해활성을 나타냈다.

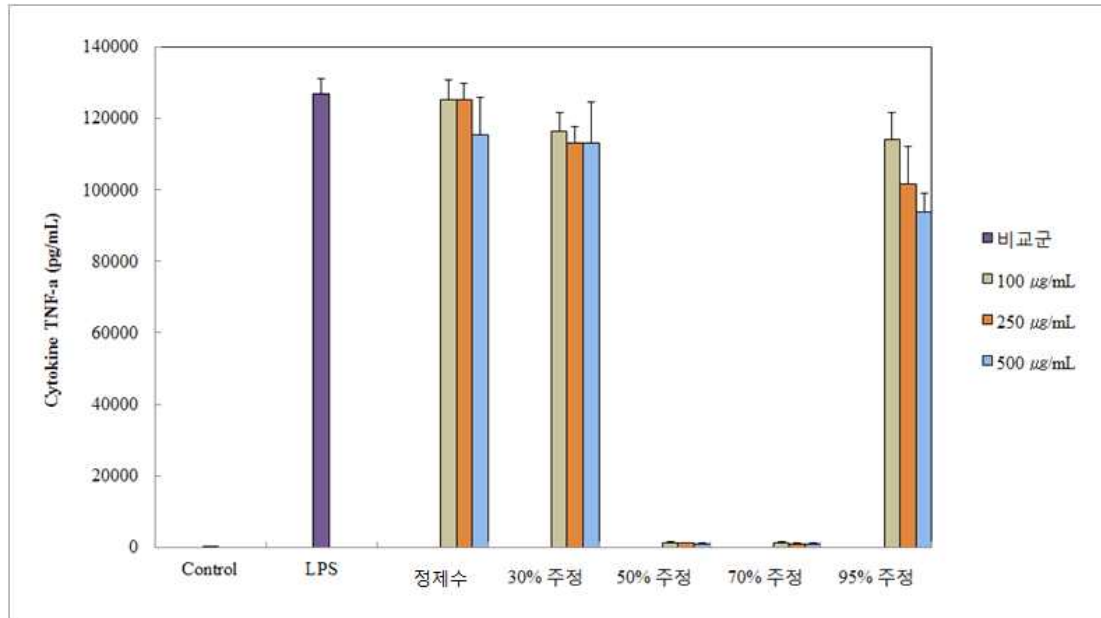


그림. 주정 농도별 콩잎추출물 처리에 따른 TNF- α 농도

- TNF- α 생성 억제능의 경우 정제수 및 30% 주정 추출조건에서는 유의적인 저해활성이 나타나지 않았고 50%, 70% 주정 추출조건인 경우 100, 250, 500 μ g/ml 모든 농도에서 항염증 효과를 나타내었다. 이외 95% 주정 추출조건에 대하여서도 미약한 저해활성을 보였으나 유의적인 값을 보이지는 않았다.

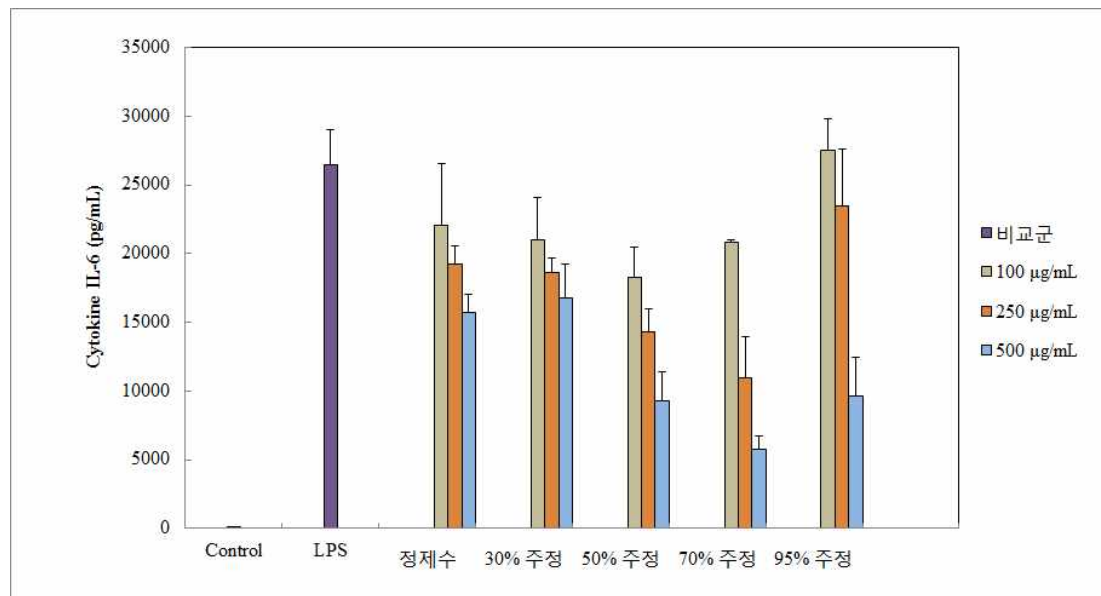


그림. 주정 농도별 콩잎추출물 처리에 따른 IL-6 농도

- IL-6 생성 억제능의 경우 정제수 및 30% 주정 추출조건에서는 유사한 정도의 저해활성을 보였고 50%, 70% 주정 추출조건인 경우 100, 250, 500 μ g/ml에서 농도 의존적으로 항염증 효과를 나타내었다. 이외 95% 주정 추출조건에서는 500 μ g/ml의 농도를 제외한 다른 농도에서는 유의적인 저해 활성을 보이지는 않았다.

2-4-3. 콩잎추출물의 일반식품 제형개발 (결과-2)

2-4-3-1. 파바톤 콩잎 추출물의 일반식품(음료/젤리) 제형연구

- Fabaton 콩잎 추출물의 원료는 2017년 3월 30일 주관기관인 경상대로부터 약 250g의 건조 분말원료를 확보하여 제형연구를 진행하였음.



그림. Fabaton 콩잎 분말원료

- 주관기관에서 보내준 Fabaton 콩잎 추출물의 분말원료는 건조된 고형분 형태이며, 고형분 1g은 식물성 에스트로젠 17mg 함유되어 있으며, 아래 그림은 고형분 0.5g을 물 30ml에 용해시킨 후의 LC그램 데이터로 나타난 그래프이며, 이는 주관기관에서 제공하였고 또한, 주관기관에서는 하루섭취량 근거를 1g(고형분)으로 제시하였음.

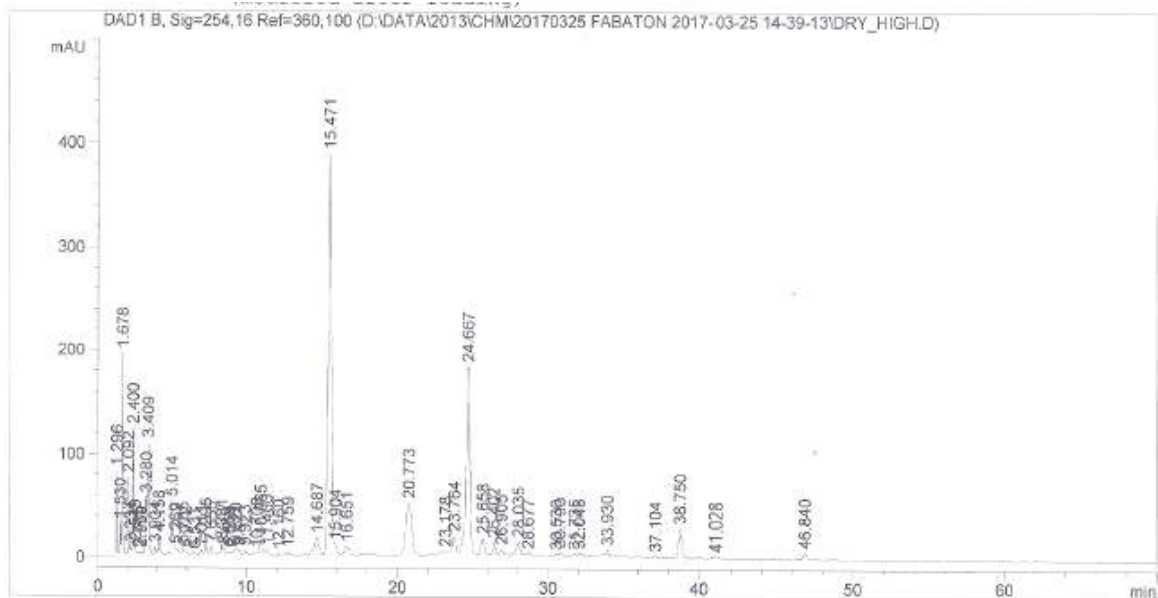


그림. Fabaton 콩잎 분말원료 LC그램 데이터(주관기관)

- 이를 바탕으로, 당사는 콩잎 추출물의 일반식품 제형연구를 진행하였으며, 주로 섭취가 쉽고 안정성이 뛰어나며, 적용 가능한 분말, 액상, 파우치 등 다양한 형태의 제형연구를 진행하였고, 갱년기관련 타사제품조사를 통해 일반식품 제형연구의 컨셉 및 배합비연구등을 진행함.

표. 당사 일반식품(건강음료 및 젤리) 배합비 설계

건강음료(100ml)			젤리(20g)		
원료명	배합비(%)	라벨표시	원료명	배합비(%)	라벨표시
콩잎추출분말	1.0	17mg	콩잎추출분말	5.0	17mg
석류농축액	4.0	-	난소화성말토텍스트린	8.0	-
블루베리농축액	2.4	-	프락토올리고당	7.0	-
라즈베리농축액	0.8	-	푸드겔	1.9	-
크랜베리농축액	0.8	-	결정과당, 이스라엘	6.5	-
복분자	0.8	-	젯산칼슘	0.4	-
프락토올리고당	12.0	-	염화칼륨	0.4	-
자일리톨 결정	5.0	-	구연산나트륨	0.3	-
정제수	73.2	-	석류농축액	3.0	-
합계	100.0	-	블루베리농축액	1.0	-
			라즈베리농축액	0.5	-
			크랜베리농축액	0.5	-
			수크랄로스	0.075	-
			N-아세틸 글루코사민	0.1	-
			구연산	0.7	-
			(합성)블루베리향	1.0	-
			정제수	63.625	-
			합계	100.0	-

* 일일섭취량 : 이소플라본 함유(1g=17mg)

- 파바톤 콩잎 건강음료 및 젤리의 제조공정은 아래 표에서 나타나듯이, 공정명, 사용설비, 공정 상세내용, 체크사항등은 아래와 같음. 건강음료의 제조공정은 원료검수-원료칭량-혼합-물성체크 및 살균-살균여과-충진-포장단계를 거쳐 각 단계별 온도, 시간, brix, pH등을 체크 후 음료제품을 생산하였음.
- 파바톤 콩잎 젤리의 제조공정은 원료검수-원료칭량-혼합-물성체크 및 살균-탈포-여과-충진-포장단계를 거쳐 각 단계별 온도, 시간, brix, pH등을 체크 후 젤리제품을 생산하였음.

표. 파바톤 콩잎 일반식품(건강음료 및 젤리) 제조공정

<파바톤 콩잎_건강음료>

공정명	사용설비	공정상세내용	체크사항 (생산 및 생산관리)
원료검수	-	- 각 원료의 규격 확인	- 원료시험의뢰
↓			
원료칭량	전자저울	- 각 원료의 규격 확인 - 원료 칭량	- 원료 규격 (코드번호, 제조사, 공급처) - 사용량
↓			
혼합	배합탱크	- 85±5℃의 온도를 유지, 모든 원료를 투입 후 15분간 교반 - 완전히 용해 확인	- 온도 : 각 단계참조 - 시간 : 각 단계참조
↓			
물성체크, 살균	배합탱크	- 물성 규격 확인 - 물보정 후 85±5℃에서 5분간 교반	- Brix : 24±3 - pH : 3.5±0.3 - 탱크유지온도: 85±5℃
↓			
여과	여과기	- 95±3℃를 30초간 통과하여 살균 - 100um의 여과기를 이용하여 여과 - 여과후 규격을 확인	- 온도 : 95±3℃ - 시간 : 30s - 여과망 : 100um
↓			
충진	로터리파우 치포장기	- 90±2℃의 온도를 유지하면서 충전 - 충전기준 : 100ml ± 3%	- 충전온도 : 90±2℃
↓			
포장	-	- 포장 규격에 맞추어 포장하고 완제품규격 확인	

<파바톤 콩잎_젤리>

표 3-3 계속

공정명	사용설비	공정상세내용	체크사항 (생산 및 생산관리)
원료검수	-	- 각 원료의 규격 확인	- 원료시험의뢰
↓			
원료칭량	전자저울	- 각 원료의 규격 확인 - 원료 칭량	- 원료 규격 (코드번호, 제조사, 공급처) - 사용량
↓			
혼합	젤리조제 탱크	- 액상과당과 검을 10분간 교반 후 정제수를 투입하여 85±5℃의 온도를 올려 15분간 용해하고 검이 완전히 용해되었는지 확인 - 구연산, 향을 제외한 나머지 원료를 순서대로 투입 - 구연산은 마지막에 정제수에 용해 및 투입하고 10~20분간 교반	- 온도 : 각 단계참조 - 시간 : 각 단계참조
↓			
물성체크, 살균	젤리조제 탱크	- 브릭스 및 pH 목표까지 보정 및 물성확인 - 85±5℃에서 향을 투입후 5분간 교반	- Brix : 24±3 - pH : 3.5±0.3 - 탱크유지온도: 85±5℃
↓			
탈포	탈포기	- 진공도 35cmHg 이상을 유지하며 탈포 한후 기포의 유무확인	- Brix : 33±3 - pH : 4.1±0.2 - 탱크유지온도: 80±5℃
↓			
살균, 여과	UHT 여과기	- 60mesh의 여과기를 이용하여 여과 - 여과후 규격을 확인	- 온도 : 80±5℃ - 여과망 : 60mesh
↓			
충진	로터리과 우치포장기	- 80±5℃의 온도를 유지하면서 충진 - 충전기준 : 20g ± 3% ± 3%	- 충전온도 :80±5℃
↓			
포장	-	- 포장 규격에 맞추어 포장하고 완제품규격을 확인	

- 위의 배합비 설계를 바탕으로 Fabaton 콩잎 추출물 액상형태(병 및 파우치) 및 젤리 2가지 형태로 최종 일반식품 제형개발을 하였으며, 이를 바탕으로 2017.05.25일에 당사 연구본부 내 임직원을 대상으로 관능테스트를 통한 기호도 조사를 실시하였음.
- Fabaton 콩잎 일반식품의 기호도 평가는 갱년기여성을 위한 제품이지만, 이는 일반식품 및 주변환경 여건상, 전연령층을 대상으로 9점척도법을 이용하여 기호도 관능검사를 진행하였고, 향후 마케팅자료로 삼고자 구입의향 및 가격부분도 함께 설문하였음.

< 기호도 평가 >

이름 _____ 날 2017년 월 일
연월일 / 날-여 _____

1. 방금 시식하신 **건강음료**는 **과바톤(고형분 이소플라본)용질**으로 만든 **액상/젤리**기 용제품입니다.
(참고로 과바톤(과바톤, 분말)은 1개(100g)에 약 2,800원에 판매되고 있습니다.)

이 **건강음료**를 구입하기 위해서 얼마를 지불하시겠습니까?
_____ 원/개

2. 방금 시식하신 **건강음료**에 대한 향, 외관, 맛, 조직감 및 전반적인 기호도는
과 별첨 1개의 표지(○, 혹은 X, 혹은 V)해 주십시오.

	향	외관	맛	전반적인
전달력 좋아한다(가)				
좋지 않다				
미용 좋아한다				
미용 좋아하지 않다				
조직감/기호도 좋아하기도 싫어하기도 않는다				
미용 좋아한다				
미용 좋아하지 않다				
전달력 좋아한다(가)				
전달력 좋아하지 않다				

5. 방금 맛보신 **건강음료**의 구입의향은?

꼭 구매할 것입니다. (5)	
아마도 구매할 것입니다.	
구매할지 안할지 모르겠다.	
아마도 구매 안할 것입니다.	
결정히 구매하지 않겠다. (1)	

4. 의견: _____
감사합니다!

< 기호도 평가 >

이름 _____ 날 2017년 월 일
연월일 / 날-여 _____

1. 방금 시식하신 **젤리**는 **과바톤(고형분 이소플라본)용질**으로 만든 **액상/젤리**기용 제품입니다.
(참고로 과바톤(과바톤, 분말)은 1개(100g)에 약 2,800원에 판매되고 있습니다.)

이 **젤리**를 구입하기 위해서 얼마를 지불하시겠습니까?
_____ 원/개

2. 방금 시식하신 **젤리**에 대한 향, 외관, 맛, 조직감 및 전반적인 기호도는
과 별첨 1개의 표지(○, 혹은 X, 혹은 V)해 주십시오.

	향	외관	맛	조직감	전반적인
전달력 좋아한다(가)					
좋지 않다					
미용 좋아한다					
미용 좋아하지 않다					
조직감/기호도 좋아하기도 싫어하기도 않는다					
미용 좋아한다					
미용 좋아하지 않다					
전달력 좋아한다(가)					
전달력 좋아하지 않다					

5. 방금 맛보신 **젤리**의 구입의향은?

꼭 구매할 것입니다. (5)	
아마도 구매할 것입니다.	
구매할지 안할지 모르겠다.	
아마도 구매 안할 것입니다.	
결정히 구매하지 않겠다. (1)	

4. 의견: _____
감사합니다!



<2017.05.25>

그림. Fabaton 콩잎 시제품 기호도 설문지 및 평가 장면(2017.05.25)

- Fabaton 콩잎 일반식품의 기호도 평가의 결과는 아래와 같으며, 건강음료의 경우, 향(6.1점), 외관(5.6점), **맛(7.3점) 및 종합(6.7점)**으로 각각 평가되었으며, 특히 맛과 종합적인 평가에서 높게 평가되었음. 과바톤콩잎 젤리의 경우, 향(5.6점), 외관(5.8점), **맛(6.4점), 조직감(6.9) 및 종합(6.4점)**으로 각각 평가되었으며, 두가지 형태 제품 모두 보통이상의 기호도를 나타내었음. 두 제품 모두 구입여부에서는 구입할지 안할지 모르겠다로 평가되었으며, 기타의견으로는 건강음료 및 젤리는 둘다 달다라는 의견이 있어, 최종제품 적용시 참조하면 더 나은 제품화가 될것으로 판단됨.

<p>- 패널요원 : 20~40대 남/여 총 20명</p> <p>- 9점척도법 이용</p> <p>9점 : 대단히 좋아한다.</p> <p>8점 : 많이 좋아한다.</p> <p>7점 : 보통 좋아한다.</p> <p>6점 : 약간 좋아한다.</p> <p>5점 ; 좋아하지도 싫어하지도 않는다.</p> <p>4점 : 약간 싫어한다.</p> <p>3점 : 보통 싫어한다.</p> <p>2점 : 많이 싫어한다.</p> <p>1점 : 대단히 싫어한다.</p> <p>- 향(6.1), 외관(5.6), 맛(7.3), 종합(6.7)</p> <p>- 구입가격 : 1822원(타사제품 보헤미 약 2,500원)</p> <p>- 구입의향(5점척도법) : 3.4점</p> <p>5점 : 확실히 구입하겠다.</p> <p>4점 : 아마도 구입할 것이다.</p> <p>3점 : 구입할지 안할지 모르겠다.</p> <p>2점 : 아마도 구입안할 것이다.</p> <p>1점 ; 확실히 구입하지 않겠다.</p>	<p>- 패널요원 : 20~40대 남/여 총 20명</p> <p>- 9점척도법 이용</p> <p>9점 : 대단히 좋아한다.</p> <p>8점 : 많이 좋아한다.</p> <p>7점 : 보통 좋아한다.</p> <p>6점 : 약간 좋아한다.</p> <p>5점 ; 좋아하지도 싫어하지도 않는다.</p> <p>4점 : 약간 싫어한다.</p> <p>3점 : 보통 싫어한다.</p> <p>2점 : 많이 싫어한다.</p> <p>1점 : 대단히 싫어한다.</p> <p>- 향(5.6), 외관(5.8), 맛(6.4), 조식감(6.9), 종합(6.4)</p> <p>- 구입가격 : 597원(타사제품 홍삼젤리 약 700원)</p> <p>- 구입의향(5점척도법) : 3.3점</p> <p>5점 : 확실히 구입하겠다.</p> <p>4점 : 아마도 구입할 것이다.</p> <p>3점 : 구입할지 안할지 모르겠다.</p> <p>2점 : 아마도 구입안할 것이다.</p> <p>1점 ; 확실히 구입하지 않겠다.</p>
<p>파바톤콩잎 건강음료</p>	<p>파바톤콩잎 젤리</p>
<p><주요기타의견></p> <ul style="list-style-type: none"> · 맛과 향이 강하지 않아 좋음 · 조금만 덜 달았으면 함. 	<p><주요기타의견></p> <ul style="list-style-type: none"> · 식감 좋음 · 향이 진하며, 덜 달았으면 함.

그림. Fabaton 콩잎 시제품 기호도 평가 결과

- 일반식품 시제품 개발의 안정성 시험 및 품질관리(QC)시험법 확립은 분말형태의 샘플을 주관기관으로부터 추가로 받은 후, 6월 중순이후부터, 6개월 기간동안의 안정성 실험 및 관련 영양성분 분석 및 유해물질등의 분석을 진행하였으며, 이를 바탕으로 품질관리(QC)시험법 분석시스템을 확립하였음.

2-4-3-2. 파바톤 콩잎 추출물의 일반식품(음료/젤리) 시제품 개발

- 2차년도에는 파바톤 콩잎 추출물을 이용하여 일반식품 제형연구를 통해 여성갱년기에 좋은 음료 및 젤리를 생산하여, 아래와 같이 시제품개발을 진행하였음.



< 파바톤 콩잎_음료 [100ml] >



< 파바톤 콩잎_젤리 [20g] >

그림. 파바톤 콩잎 일반식품(음료 및 젤리) 생산 (2017. 09. 19)

- 파바톤 콩잎을 이용한 갱년기 대상 일반식품의 제형연구를 통해 음료 및 젤리를 생산하였으며, 이에 파바톤 콩잎 음료 및 젤리제품에 대한 식품 및 식품첨가물 품목제조 보고서를 아래와 같이 각각 1건씩 등록하였음.

표. 파바톤 콩잎 일반식품(음료 및 젤리) 품목제조보고서 (제품정보)

구분	파바톤 콩잎 음료	파바톤 콩잎 젤리
식품의 유형	혼합음료	캔디류
제품명	파바톤 콩잎 음료	파바톤 콩잎 젤리
유통기한	18개월	18개월
포장방법	병포장(밀봉)	파우치포장(밀봉)
포장단위	50ml×1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,20,30,40,50,60,70,80,90,100,150,200/병	20g/젤리×10,20,30,40,50,60,70,80,90,100,150,200/포
성상	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 갈색의 액상	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 갈색-진갈색의 젤리

표. 파바톤 콩잎 일반식품(음료 및 젤리) 품목제조보고서 (원재료명 또는 성분명 및 배합비율)

[파바톤 콩잎 음료]

원재료명 또는 성분명	배합비율(%)	라벨표시
정제수	73.2	
프락토올리고당	12	
자일리톨	5	
석류과즙농축액	4	
블루베리농축액	2.4	
기타가공품[Fabaton추출분말]	1	이소플라본 17mg
덩굴월귤농축액[크랜베리농축액]	0.8	
라즈베리농축액	0.8	
복분자농축액	0.8	
* 용도용법 : 1일 1회, 1회 1병을 섭취하십시오. * 보관방법 : 1. 직사광선을 피해 서늘한 실온에서 보관하십시오. 2. 어린이의 손에 닿지 않는 곳에 보관하십시오. * 포장재질 : 1. 병:폴리에틸렌(PE), 고밀도폴리에틸렌(HDPE), 폴리에틸렌테레프탈레이트(PET), 폴리스틸렌(PS), 폴리프로필렌(PP) 2. 뚜껑 : 폴리에틸렌(PE), 저밀도폴리에틸렌(LDPE)		

[파바톤 콩잎 젤리]

원재료명 또는 성분명	배합비율(%)	라벨표시
정제수	63.625	
덱스트린	8	
프락토올리고당	7	
결정과당	6.5	
기타가공품[Fabaton추출분말]	5	이소플라본 17mg
대두잎[Fabaton콩잎추출물]	95	
덱스트린[말토덱스트린]	5	
석류농축액	3	
검 베이스 혼합제제	1.9	
블루베리농축액	1	
블루베리향	1	
무수구연산	0.7	
라즈베리농축액	0.5	
덩굴월귤농축액[크랜베리농축액]	0.5	
젖산칼슘	0.4	
염화칼륨	0.4	
구연산나트륨	0.3	
N-아세틸글루코사민분말	0.1	
수크랄로스	0.075	
* 용도용법 : 1일 1회, 1회 1포를 씹어서 섭취하십시오. * 보관방법 : 1. 직사광선을 피해 서늘한 실온에서 보관하십시오. * 포장재질 : 폴리에틸렌(PE, 내포장재질)		

발급번호 : 0102-6259-4595-9867-0617



식품(식품첨가물) 품목제조보고서

보고인	성명(법인명)	생년월일(법인번호)	
	권인혁	1967년 12월 30일	
	주소	전화번호	02 3474 852
경기도 이천시 마장면 덕평로663번길 127-16		휴대전화	010 4225394
영입소	영입(상호)	영입등록번호	
	(주)뉴트리바이오텍	20070358224	
소재지		경기도 이천시 마장면 덕평로663번길 127-16	
제품정보	식품의 유형	혼합음료	모형하는 품목제조 보고번호
	제품명	파바톤 과일 음료	20070358224728
	유통기한	18개월	
	유통유지기간	유통에 기재	
	원료명 또는 성분명, 첨가물	유통에 기재	
	제조 방법	유통에 기재	
	포장방법 및 포장재질	유통에 기재	
	포장방법 및 포장단위	포장방법 : 병포장(원액), 포장단위 : 50mL X 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200포	
	성상	이리, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 갈색~갈색의 액상	
	품목의 특성	<input checked="" type="checkbox"/> 고열량 · 지방질 식품 해당 여부 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 이소 <input type="checkbox"/> 해당 없음 <input checked="" type="checkbox"/> 알콜성 식품 해당 여부 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 이소	

「식품위생법」 제37조제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다. 2017년 09월 22일 보고한 권인혁

경기도 이천시장 귀하

품목보고번호	20070358224-728
처리부서	보건소 보건위생과
처리과장	김종훈
처리일자	2017년 09월 25일



본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며 식품안전정보포털(<http://www.foodsafe.go.kr/>) 홈페이지에서 확인할 수 있습니다.

발급번호 : 0102-6259-4595-9867-0617



원재료명 또는 성분명 및 배합비율		
No.	원재료명 또는 성분명	배합비율(%)
1	정제수	73.2%
2	프락토올리고당	12%
3	자일리톨	5%
4	석류과즙농축액	4%
5	블루베리농축액	2.4%
6	기타가공품 [Fabaton추출분말]	1%
7	당굴꿀농축액 [크랜베리농축액]	0.8%
8	라즈베리농축액	0.8%
9	복분자농축액	0.8%
제조방법	1일 1회, 1회 1병을 섭취하십시오.	
무관영양 및 포장재	1. 적사광선을 피해 서늘한 실온에서 보관하십시오. 2. 어린이의 손이 닿지 않는 곳에 보관하십시오. 1. 병 : 폴리에틸렌(PE), 고밀도폴리에틸렌(HDPE), 폴리에틸렌타이프탈레이트(PE), 폴리스틸렌(PS), 폴리에틸렌(PP) 2. 뚜껑 : 폴리에틸렌(PE), 저밀도폴리에틸렌(LDPE)	



본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며 식품안전정보포털(<http://www.foodsafe.go.kr/>) 홈페이지에서 확인할 수 있습니다.

<파바톤 콩잎 음료_혼합음료>

발급번호 : 0102-6259-4595-9867-7085



식품(식품첨가물) 품목제조보고서

보고인	성명(법인명)	생년월일(법인번호)	
	권인혁	1967년 12월 30일	
	주소	전화번호	02 3474 852
경기도 이천시 마장면 덕평로663번길 127-16		휴대전화	010 4225394
영입소	영입(상호)	영입등록번호	
	(주)뉴트리바이오텍	20070358224	
소재지		경기도 이천시 마장면 덕평로663번길 127-16	
제품정보	식품의 유형	캔디류	모형하는 품목제조 보고번호
	제품명	파바톤 과일 젤리	20070358224727
	유통기한	18개월	
	유통유지기간	유통에 기재	
	원료명 또는 성분명, 첨가물	유통에 기재	
	제조 방법	유통에 기재	
	포장방법 및 포장재질	유통에 기재	
	포장방법 및 포장단위	포장방법 : 용수치포장(원액), 포장단위 : 20g/롤리 X 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200포	
	성상	이리, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 갈색~갈색의 롤리	
	품목의 특성	<input checked="" type="checkbox"/> 고열량 · 지방질 식품 해당 여부 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 이소 <input type="checkbox"/> 해당 없음 <input checked="" type="checkbox"/> 알콜성 식품 해당 여부 <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 이소	

「식품위생법」 제37조제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다. 2017년 09월 22일 보고한 권인혁

경기도 이천시장 귀하

품목보고번호	20070358224-727
처리부서	보건소 보건위생과
처리과장	김종훈
처리일자	2017년 09월 29일



본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며 식품안전정보포털(<http://www.foodsafe.go.kr/>) 홈페이지에서 확인할 수 있습니다.

발급번호 : 0102-6259-4595-9867-7085



원재료명 또는 성분명 및 배합비율		
No.	원재료명 또는 성분명	배합비율(%)
1	정제수	63.625%
2	엑스틴	8%
3	프락토올리고당	7%
4	갈락토티드	6.5%
5	기타가공품 [Fabaton추출분말]	5%
6	L-대우일 [Fabaton 과일 추출물]	95%
7	L-엑스틴 [갈락토티드]	5%
8	석류농축액	3%
9	검 베이스 혼합제제	1.9%
10	블루베리농축액	1%
11	블루베리향	1%
12	우수구연산	0.7%
13	라즈베리농축액	0.5%
14	당굴꿀농축액 [크랜베리농축액]	0.5%
15	꽃산향료	0.4%
16	젤리분말	0.4%
17	구연산삼나트륨	0.3%
18	N-아세틸글루코사민분말	0.1%
19	수크랄로스	0.075%



본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며 식품안전정보포털(<http://www.foodsafe.go.kr/>) 홈페이지에서 확인할 수 있습니다.

<파바톤 콩잎 젤리_캔디류>

그림. 파바톤 콩잎 일반식품(음료 및 젤리) 식품품목제조보고서

2-4-4. 파바톤콩잎 추출물의 건강기능식품 제형개발(결과-3)

2-4-4-1. 파바톤콩잎 추출물의 일반식품(음료, 젤리) 품질관리

- 아래그림에서 나타나듯이 당사는 원료, 시제품 그리고 제품에 이르기까지 모든 제품에 대해 체계화된 품질관리 프로세스를 통하여 관리하며, 즉 개발부터 완제품까지의 품질관리 시스템, 개발단계에서의 품질보증부 참여로 규격설정, 품질의 기준규격에 대한 적합성 평가를 거쳐 ①원료입고검사, ②생산공정검사 및 ③완제품검사의 품질관리 시스템 구축되어 있음.



< 품질관리(QC) 시스템 >



- NSF : National Sanitation Foundation(미국위생협회)
- TGA : Therapeutic Goods Administration(호주식약청관리제도)
- GMP : Good Manufacturing Practice
- HACCP : Hazard Analysis Critical Control Point
- ISO 9001 : 국제표준화기구_국제규격
- HALAL : 한국이슬람중앙회
- HALAL M : 국제할랄인증기관

< 품질관리 국제인증 >

그림. 자사 품질관리(QC) 시스템 프로세스 및 국제인증현황

- 파바톤콩잎 추출물 분말원료, 일반식품(음료, 젤리)의 미생물, 중금속 검사 및 5대영양소 분석결과를 나타낸 것임.
- 아래 그림에서 나타나듯이 파바톤콩잎 음료 및 젤리의 5대 영양소 분석 및 미생물, 중금속 검사를 위해 2017. 09. 19일 제품생산을 통해 품질관리 시험용 샘플을 확보하였음. 5대 영양소 분석은 식품공전 고시 제2016-154호 일반성분시험법으로 각 샘플 50g을 취한 후 실험을 진행하였으며, 미생물 및 중금속검사는 안정성검사에서 진행된 동일한 방법으로 실험함
- 식품공전 1.1. 일반시험법 1.1.1. 건조감량법 가. 상압가열건조법, 식품공전 1.1. 일반시험법 1.1.2. 회분, 식품공전 1.1. 일반시험법 1.1.3. 질소화합물 1.1.3.1 총질소 및 조단백질 나. 단백질분석기를 이용하는 방법, 식품공전 1.1. 일반성분시험법 1.1.5 지질 1.1.5.1 조지방 1.1.5.1.1 에테르추출법, 식품공전 1.2. 미량영양성분시험법 1.2.1 무기성분 1.2.1.6 나트륨, 식품공전 1.1. 일반성분시험법 1.1.4 탄수화물 1.1.4.1 당질 1.1.4.1.4 기기분석법에 의한 당류의 정성 및 정량, 식품공전 1.1. 일반성분시험법 1.1.6 열량의 계산 방법을 이용하여 아래 결과값을 산출함.



< 파바톤 콩잎_분말원료 [20g_12개] >



< 파바톤 콩잎_음료 [50ml_20병] >



< 파바톤 콩잎_젤리 [20g_30개] >

그림. 파바톤 콩잎 5대영양소 및 QC관리(안정성 검사)용 샘플 시생산 (2017. 09. 19)

- 파바톤콩잎 분말원료, 음료 및 젤리 제품의 미생물 및 중금속 검사는 식품공전 규격 및 기준에 준하여 실험하였고, 그 결과는 모두 적합하게 측정되었음.

표. 파바톤 콩잎 분말원료, 일반식품(음료 및 젤리) 미생물 및 중금속 검사 (식품공전 규격 및 기준에 의함)

시험항목	규격 및 기준	분말원료	시험항목	규격 및 기준	음료	시험항목	규격 및 기준	젤리
성상	적합	적합	세균수	n=5, c=1, m=100, M=1000	M=35	성상	고유향미, 무이미, 무이취	적합
이물	적합	적합	대장균군	n=5, c=1, m=0, M=10	0	세균수	n=5, c=2, m=10000, M=50000	M=164
대장균군	n=5, c=1, m=0, M=10	0	납(mg/kg)	0.3이하	0.19	납(mg/kg)	1.0이하	0.28
납(mg/kg)	10이하	0.33	카드뮴(mg/kg)	0.1이하	0	-		
카드뮴(mg/kg)	10이하	0.01	-					
총비소(mg/kg)	10이하	0.06						
총수은(mg/kg)	10이하	0.00						
<p>* n : 검사하기 위한 시료의 수 * c : 허용기준치 보다 크고 최대허용한계치 보다 적거나 같은 최대 허용 시료수 결과가 m보다 크고 M보다 적거나 같은 (> m and ≤M) 경우 c에 따라 적합 또는 부적합으로 판정 * m : 허용기준치로서 시료가 "만족(satisfactory)"으로 간주되는 미생물 기준 수치로 결과가 m이하인 제품은 적합으로 판정 * M : 최대허용한계치(acceptability threshold)로서 시료가 "불만족 (unsatisfactory)"으로 간주되는 미생물기준 수치로 결과가 M초과인 제품은 부적합으로 판정</p>								

- 파바톤 콩잎 분말원료, 음료 및 젤리의 5대 영양소 결과는 아래표와 같으며, 파바톤 콩잎 분말원료는 전반적으로 일반제품보다 높게 측정되었고, 음료는 조단백질을 제외한 모든 항목에서 높게 측정되었으며, 젤리의 경우 조지방은 낮게 측정되었음.

표. 파바톤 콩잎 분말원료, 일반식품(음료 및 젤리) 5대영양소 함량 결과

구분	원료	일반식품	
	파바톤 콩잎_분말원료	파바톤 콩잎_음료	파바톤 콩잎_젤리
열량(kcal/100g)	310.63	81.34	112.74
탄수화물(g/100g)	59.30	19.04	26.59
당류(mg/100g)	2,212.19	10,452.41	14,923.39
조단백질(g/100g)	17.03	0.35	1.10
조지방(g/100g)	0.59	0.42	0.22
나트륨(mg/100g)	49.95	20.02	58.95

2-4-4-2. 파바톤콩잎 추출물의 일반식품(음료, 젤리) 안정성시험(가속/장기보존시험)

- 파바톤 콩잎 일반식품 음료 및 젤리의 안정성 검사를 위해 2017. 09. 19일 시험용 샘플을 확보하여 안정성 검사(가속시험 및 장기보존시험)를 진행하였으며, 시험방법은 식품의약품 안전처 고시 제 2016-154호에 따라 각 30g씩 취한 후 식품공전방법에 따라 해당되는 식품 유형의 규격 및 기준에 따라 실험을 진행하였음.
- 분말원료는 식품공전 23-2. 기타가공품에 해당되며, (1) 성상 제7. 일반시험법 1.1 성상 (2) 이물 제7. 일반시험법 1.2 이물 (5) 대장균군 제7. 일반시험법 4. 미생물시험법 4.7 대장균군, 음료는 9-8. 기타음료에 해당되며, (2) 납 및 카드뮴 9-1. 과일·채소류음료 6) 시험방법 (1) 납 및 카드뮴에 따른 시험법으로 실험하며, 당사에서 구비하고 있는 분석 장비를 이용하여 실험을 진행하였으며, 표준품 및 분석장비는 아래와 같음.
- 미생물관련실험은 (4) 세균수 제7. 일반시험법 4. 미생물시험법 4.5.1 일반세균수 (5) 대장균군 제7. 일반시험법 4. 미생물시험법 4.7 대장균군, 젤리는 과자류, 빵류 또는 떡류, 캔디류 로, (6) 세균수 제7. 일반시험법 4.미생물시험법 4.5.1 일반세균수에 따라 실험을 진행하였음.

표. 식품공전 식품유형

식품유형	정의
기타가공품	제4. 규격외 일반가공식품의 기준 및 규격_기타가공품 (1~7에 해당하지 않는 가공식품을 말한다.)
기타음료	먹는물에 식품 또는 식품첨가물 등을 가하여 제조하거나 또는 동·식물성원료를 이용하여 음용할 수 있도록 가공한 것으로 다른 식품유형이 정해지지 아니한 음료를 말한다.
과자류_캔디류	식물성원료, 당류, 당알코올, 양금 등을 주원료로 하여 이에 식품 또는 식품첨가물을 가하여 성형 등 가공한 것으로 사탕, 캐러멜, 양갱, 젤리 등을 말한다.

표. 납 및 카드뮴에 대한 분석장비 및 표준품 정보

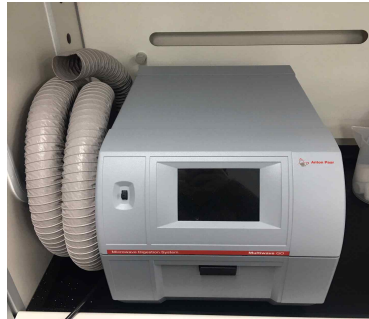
분석장비 정보			표준품 정보	
분석기기 명	ICP-MS	마이크로웨이브	표준품명	Quality Control Standard 21
제조처	Perkin Elmer	Anton paar	제조처	Perkin Elmer

표. 총수은에 대한 분석장비 및 표준품 정보

분석장비 정보		표준품 정보	
분석기기 명	수은분석기	표준품명	Mercury Standard Solution
제조처	Mile Stone	제조처	Kanto Chemical



[ICP-MS]



[마이크로웨이브]



[수은분석기DMA-80]

그림. 실험에 사용된 분석장비((주)코스맥스엔비티(주)_이천공장)

- 안정성 검사 중 장기보존 및 가속실험을 위해 온·습도 (장기보존 : $30\pm 2^{\circ}\text{C}$, $65\pm 5\%$ RH, 가속실험 : $40\pm 2^{\circ}\text{C}$, $75\pm 5\%$ RH)에 해당되는 항온·항습기에 각 샘플을 보관 후, 해당되는 실험기간에 따라 안정성 검사를 진행하였음.
- 식품공전에 명시된 각 해당되는 항목으로 분석을 진행하였으며, 시험항목 중 납, 카드뮴은 경시적으로 변화가 없는 것으로 판단되어, 초기에만 실험하였으며, 세균수 및 대장균군은 유의성을 고려하여 매 회 차 실험하였음.

표. 파바톤 콩잎 분말원료, 일반식품(음료 및 젤리) 안정성(장기보존, 가속실험) 검사 조건

구분	안정성 검사	
	장기보존	가속실험
시험보관조건	$30\pm 2^{\circ}\text{C}$, $65\pm 5\%$ RH	$40\pm 2^{\circ}\text{C}$, $75\pm 5\%$ RH
허가보관조건	항온항습 1호기	항온항습 2호기
시험기간	18개월	6개월
장기보존	Initial(0), 3, 6, 9, 12, 18개월	Initial(0), 2, 4, 6개월
실제분석기간	9, 12(2017년), 03, 06, 09, 03(2019년)	9, 11(2017년), 01, 03(2018년)

표. 파바톤 콩잎 분말원료, 일반식품(음료 및 젤리) 안정성(장기보존, 가속실험) 검사 시험항목

품명	파바톤콩잎_분말원료	파바톤콩잎_음료	파바톤콩잎_젤리
생산일자	2017.09.19	2017.09.19	2017.09.19
시험항목	성상, 이물, 대장균군, 납, 카드뮴, 총비소, 총수은	세균수, 대장균군, 납, 카드뮴	성상, 세균수, 납
식품공전	기타가공품 & 한국기능식품연구원 파바톤콩잎추출분말의 기준규격설정 (주관기관) 자료 참조(중금속)	기타음료_혼합음료	과자류_캔디류

표. 파바톤 콩잎 분말원료, 일반식품(음료 및 젤리) 안정성(장기보존, 가속실험) 검사 규격 및 기준

시험항목	파바톤콩잎_분말원료 ¹⁾	파바톤콩잎_음료	파바톤콩잎_젤리
성상	적합	-	고유의 향미를 가지고, 이미, 이취가 없어야 한다.
이물	적합	-	-
세균수	-	n=5, c=1, m=100, M=1000 (유산균함유제품 제외)	n=5, c=2, m=10,000, M=50,000
대장균군	n=5, c=1, m=0, M=10	n=5, c=1, m=0, M=10	-
납(mg/kg)	10이하	0.3이하	1.0이하
카드뮴(mg/kg)	10이하	0.1이하	-
총비소(mg/kg)	10이하	-	-
총수은(mg/kg)	10이하	-	-

* n : 검사하기 위한 시료의 수

* c : 허용기준치 보다 크고 최대허용한계치 보다 적거나 같은 최대 허용 시료수

결과가 m보다 크고 M보다 적거나 같은 (> m and ≤M) 경우 c에 따라 적합 또는 부적합으로 판정

* m : 허용기준치로서 시료가 "만족(satisfactory)"으로 간주되는 미생물 기준 수치로 결과가 m이하인 제품은 적합으로 판정

* M : 최대허용한계치(acceptability threshold)로서 시료가 "불만족 (unsatisfactory)"으로 간주되는 미생물 기준 수치로 결과가 M초과인 제품은 부적합으로 판정

* ¹⁾ : 중금속 규격 및 기준은 (사) 한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 파바톤 콩잎 추출분말의 기준 규격(안) 적용

- 아래표에서 나타나듯이, 파바톤 콩잎 분말원료, 음료 및 젤리 안정성 검사를 진행하였으며, 파바톤콩잎 일반식품 생산된 시점인 2017.09월달을 초기시점으로 실험을 진행하였고, 18개월간의 안정성 검사를 측정한 결과, 파바톤콩잎 분말원료, 음료 및 젤리의 검사결과는 기준 규격에 모두 적합하였음.

표. 파바톤 콩잎 분말원료, 일반식품(음료 및 젤리) 안정성(장기보존, 가속실험) 검사 결과

구분	시험항목	규격 및 기준	initial	장기보존(Month)					가속실험(Month)		
			0 (17.09)	3 (17.12)	6 (18.03)	9 (18.06)	12 (18.09)	18 (19.03)	2 (17.11)	4 (18.01)	6 (18.03)
분말 원료	성상	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합
	이물	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합
	대장균군	n=5, c=1, nF=0, M=10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	납(mg/kg)	10이하	0.33	-	-	-	-	-	-	-	-
	카드뮴(mg/kg)	10이하	0.01	-	-	-	-	-	-	-	-
	중비소(mg/kg)	10이하	0.06	-	-	-	-	-	-	-	-
	총수은(mg/kg)	10이하	0.00	-	-	-	-	-	-	-	-
음료	세균수	n=5, c=1, nF=100, M=1000	M=35	0	0	0	0	0	0	M=35	0
	대장균군	n=5, c=1, nF=0, M=10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	납(mg/kg)	0.3이하	0.19	-	-	-	-	-	-	-	-
	카드뮴(mg/kg)	0.1이하	0	-	-	-	-	-	-	-	-
젤리	성상	고유향미, 무이미, 무이취	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합
	세균수	n=5, c=2, nF=1000, M=10000	M=164	M=132	0	0	0	0	M=191	M=150	0
	납(mg/kg)	1.0이하	0.28	-	-	-	-	-	-	-	-

* () : 실제 실험 진행된 달
 * n : 검사하기 위한 시료의 수
 * c : 허용기준치 보다 크고 최대허용한계치 보다 적거나 같은 최대 허용 시료수
 결과가 m보다 크고 M보다 적거나 같은 (> m and ≤M) 경우 c에 따라 적합 또는 부적합으로 판정
 * m : 허용기준치로서 시료가 "만족(satisfactory)"으로 간주되는 미생물 기준 수치로 결과가 m이하인 제품은 적합으로 판정
 * M : 최대허용한계치(acceptability threshold)로서 시료가 "불만족 (unsatisfactory)"으로 간주되는 미생물기준 수치로 결과가 M초과인 제품은 부적합으로 판정

2-4-4-3. 파바톤콩잎 추출물의 임상용샘플(파바톤콩잎/플라시보) 제형연구

- 파바톤 콩잎 추출물에 대해 갱년기 여성용 임상시험을 위한 샘플제작은 협동기관인 당사에
서 임상용 및 플라시보 샘플을 진행하였으며, 배합비 및 관련 내용은 아래와 같음.
- 파바톤 콩잎의 임상형태는 700mg 장방형 중(파바톤 콩잎 추출물 500mg 포함), 타블렛형태의
병포장이며, 일일섭취량은 파바톤 콩잎 추출물 1.8~2g으로, 1일 1회 4정으로 물과 함께 섭
취를 권장하였음.
- 아래표와 같이 파바톤콩잎 및 플라시보 제품을 각각 제작하였으며, 플라시보제품은 파바톤
콩잎 제형과 비슷한 수준으로 제작하였음. 임상대상은 각 50명으로 3개월(90일)동안 진행예
정이며, 추가 임상대상을 위해 여유분으로 15명을 추가하여 총 65명의 임상샘플용으로 제
작하였음.
- 포장형태는 120정 한달분으로, 빛과 외부환경을 차단할 수 있는 불투명 플라스틱병, 흡습방
지용인 인습제 실리카겔을 포함하였고, 깨짐방지를 위한 완충비닐 포함 그리고, 고주파 실
링을 하여 임상용 샘플을 제작하여 주관기관인 경상대에 발송하였음.
- 임상용 샘플 배합비를 진행 중, 플라시보의 파바톤 콩잎 대체 부형제로 이소말토로 진행하
면서, 최대한 임상에 영향을 미치지 않는 범위내 및 일반적으로 사용하는 부형제인 결정셀
룰로오스, 유당혼합분말 및 말토덱스트린으로 대체하였으며, 아래와 같이 변경 배합비에 대
한 실험을 2차례이상 진행하였음
- 플라시보를 파바톤 콩잎 임상용샘플과 최대한 같은 수준을 유지하기 위해, 정제의 압, 흐름
성, 마손도, 부피 및 두께 등 관련실험을 통해 최종 배합비로 하였으며, 이를 바탕으로 임
상용 샘플(파바톤콩잎, 플라시보)를 생산하였음.

구분	변경 전	변경 후
결정셀룰로오스	95.357%	57.214%
유당혼합분말	-	19.071%
말토덱스트린	-	19.071%
파바톤 콩잎	플라시보	
5.93mm	5.62mm	



< 변경배합비, 정제두께 >

< 기존(왼), 변경(오) 변경 배합비 샘플 사이즈 비교 >

그림. 파바톤 콩잎 임상용 샘플 제작 (배합비 실험)

표. 파바톤 콩잎 추출물 임상용 샘플

	구분	1인기준	임상용(65명)
임상용	파바톤콩잎	3병	200병(195)
	placebo	3병	200병(195)

* 120정(4정×30일=1병_한달)×3개월=1인(3병)

표. 파바톤 콩잎 추출물 임상용 샘플 최종 배합비[최종본]

구분	임상용 배합비(%)	플라시보 배합비(%)	비고
파바톤 콩잎	71.430	-	-
결정셀룰로오스	23.927	57.214	-
유당혼합분말	-	19.071	-
말토덱스트린	-	19.071	-
스테아린산마그네슘	1.500	1.500	-
이산화규소	1.000	1.000	-
히드록시프로필메틸셀룰로오스	0.875	0.875	코팅
홍국적색소	0.656	0.656	
카라멜색소	0.262	0.262	
이산화티타늄	0.219	0.219	
글리세린	0.131	0.131	
합계	100	100	-

* 700mg 장방형 중 형태 (파바톤 콩잎 추출물 500mg 함유)
 * 1일 4회, 1회 1정을 물과 함께 섭취 (일일섭취량[1day] = 1.8 ~ 2g)
 * 1병(1달) = 1명 × 30일 × 4정 = 120정 지급
 * 1병(120정)×3달 ×65명 = 195병 (임상용 65명, 플라시보 65명)

- 아래 표에서 나타나듯이, 파바톤 콩잎의 임상 제조공정은 원료검수→원료칭량→혼합→물성체크→타정→코팅→포장 순으로 임상샘플을 생산하였으며, 물성체크는 이물, 수분함량, 안식각을 측정하여 적합여부 확인 후, 16mm 장방형 몰드를 이용하여 타정하였음.
- 타정 시 경도 및 마손도 체크 후 95%주정에 HPMC(HydroxyProphyl MethylCellulose)를 소량씩 넣어가면서 용해한 후 정제수를 넣어 혼합한 다음 글리세린에 추가 혼합 후 코팅하였음. 아래와 같이, 임상용 샘플(파바톤 콩잎 및 플라시보)를 각각 제작하였음.
- 3차년도 최종 배합비로 적용된 임상용 샘플의 품목제조보고서를 진행하였으며, 임상용 샘플 생산을 완료하여 주관기관에 임상용 샘플을 전달하였음.

표. 파바톤 콩잎 추출물 임상용 샘플 제조 공정도[최종본]

공정	사용설비	공정 상세 내용	체크사항 생산 및 생산관리
원료 검수	-	<ul style="list-style-type: none"> · 각 원료의 규격을 확인한다. 	· 원료 시험 의뢰
↓			
원료 칭량	전자저울	<ul style="list-style-type: none"> · 각 원료의 규격을 확인한다. · 원료를 칭량한다. 	· 원료규격 및 사용량 (코드번호, 제조사, 공급처)
↓			
혼합	체과망더블콘믹서 or 브이믹서	<ul style="list-style-type: none"> · 검수가 완료된 원료를(스테아린산마그네슘 제외)체를 통과한 후 혼합기에 투입한다. · 20~ 30분간 혼합한다. · 스테아린산마그네슘은 최종혼합시간 5분을 남겨놓은 시점에 투입한 후 혼합한다. 	· 체망사이즈 : 16~18 mesh
↓			
물성 체크	-	<ul style="list-style-type: none"> · 정상, 이물, 수분함량(%), 안식각이 적합한지 확인한다. 	<ul style="list-style-type: none"> · 이물 : 불검출 · 수분함량 : 7%이하 · 안식각 : 0.65±0.2 (파바톤) · 안식각 : 0.5±0.2 (플라시보)
↓			
타정	타정기	<ul style="list-style-type: none"> · 16mm 장방형 몰드를 이용하여 타정한다. · 최종 혼합된 내용물을 기준중량에 맞추어 정제기로 타정하고, 매1시간마다 10정을 중량 검사한다. · 두께, 경도 및 마손도를 확인한다. (정제 타정시 경도 / 마손도 중심) 	<ul style="list-style-type: none"> · 마손도 : 0.13%±0.2(파바톤) · 마손도 : 0.22%±0.2(플라시보) · 경도 : 16±0.2 · 두께 : 6.37mm±0.2
↓			
코팅	코팅기	<ul style="list-style-type: none"> · 정제에 색소(홍국적, 카라멜), 이산화티타늄을 소량씩 넣어가면서 혼합한다. · 용해된 위용액에 글리세린을 투입하고 교반한다. 	
↓			
포장	-	<ul style="list-style-type: none"> · 포장규격에 맞추어 포장하고 완제품 규격을 확인한다. 	· 병포장 (120정)



그림. 파바톤 콩잎 임상용 샘플 제작 (타정기)



< 코팅 전 > < 임상샘플_플라시보 & 파바톤콩잎 > < 임상샘플_플라시보 & 파바톤콩잎(절단) >

그림. 파바톤 콩잎 임상용 샘플 제작(위_플라시보 / 아래_파바톤콩잎)

표. 파바톤 콩잎 임상용샘플(플라시보, 파바톤콩잎) 품목제조보고서 (제품정보)

구분	플라시보	파바톤 콩잎 타블렛
식품의유형	캔디류	캔디류
제품명	플라시보	파바톤 콩잎 타블렛
유통기한	24개월	24개월
포장방법	병포장(밀봉)	병포장(밀봉)
포장단위	700mg×1,2,4,8,12,16,20,24,28,30,32,36,40,44,48,52,56,60,64,68,72,76,80,84,88,92,96,100,104,108,112,116,120,160,200,240,280	파우치포장, PTP포장, 병포장/700mg×1,2,4,8,12,16,20,24,28,30,32,36,40,44,48,52,56,60,64,68,72,76,80,84,88,92,96,100,104,108,112,116,120,160,200,240,280
성상	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 갈색의 제피정제	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 갈색-진갈색의 제피정제

표 파바톤 콩잎 임상용샘플(플라시보, 파바톤콩잎) 품목제조보고서 (원재료명 또는 성분명 및 배합비율)

[임상용]

원재료명 또는 성분명	플라시보	파바톤 콩잎 타블렛
	배합비율(%)	배합비율(%)
기타가공품	-	71.43
대두잎[fabaton 추출분말]	-	95
덱스트린[말토덱스트린]	-	5
결정셀룰로스	57.2142	23.927
유당	19.0714	-
덱스트린	19.0714	-
스테라인산마그네슘	1.5	1.5
이산화규소	1	1
히드록시프로필메틸셀룰로스	0.875	0.875
착색료 홍국적색	0.656	0.656
카라멜색소	0.262	0.262
이산화티타늄	0.219	0.219
글리세린	0.131	0.131

* 용도용법 : 1일 4회, 1회 1정을 물과 함께 섭취하십시오.

* 보관방법 : 1. 직사광선을 피해 서늘한 곳에 보관하시고, 어린이의 손이 닿지 않는 곳에 보관하십시오. 2. 제품 개봉 후에는 인습 될 수 있으니 반드시 밀봉하여 보관하십시오.

* 포장재질 : PVC(폴리염화비닐), Al-Foil(알루미늄호일), PE(폴리에틸렌), HDPE(고밀도폴리에틸렌), PET(폴리에틸렌테레프탈레이트), PP(폴리프로필렌), PS(폴리스틸렌)파우치포장, PTP포장, 병포장

신고번호 : HKA-E46-1840-0807-1878

식품(식품첨가물) 품목제조보고서

보고인	성명(법인명)	성남식품(법인번호)		
	과장직	1967년 12월 30일		
	주소	전화번호	02-3474-8502	
	경기도 이천시 마장면 덕평로663번길 127-16	휴대전화	010-42225394	
영업소	명칭(상호)	영양등록번호		
	(주)뉴트리네이오백	20070358224		
	소재지			
	경기도 이천시 마장면 덕평로663번길 127-16			
제품정보	식품의 유형	전대류	요청하는 품목제조 신고번호	20670358224790
	유형명	물리사탕		
	유통기한	24개월		
	품질관리기준			
	원재료 또는 성분명, 함유량	천황과 기차		
	용도 용법	복합아 기차		
	보관방법 및 포장재질	복합아 기차		
	포장방법 및 포장단위	복합아 기차		
	중량	100g		
	중요특성	■ 고열성, 차광용 비닐 포장 여부 [] 예 [] 아니오 [] 해당 없음 ■ 발효인공 식품 함유 여부 [] 예 [] 아니오		

기타

※ 식품의약품, 제37조제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조제1항에 따른 식품(식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다. 2018년 05월 02일 보고인 권진복

경기도 이천시장 귀하

품목제조번호	201870358224-790
처리부서	보건소 보건위생과
처리과정명	검정승
처리일자	2018년 05월 15일

본 증명서는 민원정보로 활용되므로 식품안전정보포털(http://www.foodsafetykorea.go.kr) 홈페이지에서 확인할 수 있습니다.

신고번호 : HKA-E46-1840-0807-1878

원재료명 또는 성분명 및 배합비율		
No.	원재료명 또는 성분명	배합비율(%)
1	꿀맛젤리모스	57.2142%
2	당알	19.0714%
3	액스프린	19.0714%
4	스테인리스강그네송	1.5%
5	이산화규소	1%
6	히드록시프로필베타셀룰로스	0.875%
7	착색료 홍곡역색	0.656%
8	카라멜색소	0.262%
9	이산화티타늄	0.210%
10	글리세린	0.131%

용도용법 : 1일 4회, 1회 1개를 섭취할게 섭취하십시오.

보관방법 및 포장재질 : 1. 직사광선을 피해 서늘한 곳에 보관하시고, 어린이의 손이 닿지 않는 곳에 보관하십시오. 2. 개봉 후 개봉 후에는 신속히 먹을 수 있으나 반드시 유통기한에 보관하십시오. PVC(폴리염화비닐), AL-Foil(알루미늄 호일), PE(폴리에틸렌), HDPE(고밀도폴리에틸렌), PET(폴리에틸렌 테레프탈레이트), PP(폴리프로필렌), PS(폴리스티렌) 포장재질, PVP포장, 연두장

본 증명서는 민원정보로 활용되므로 식품안전정보포털(http://www.foodsafetykorea.go.kr) 홈페이지에서 확인할 수 있습니다.

<플라시보>

신고번호 : HKA-E46-1840-0807-1878

식품(식품첨가물) 품목제조보고서

보고인	성명(법인명)	성남식품(법인번호)		
	과장직	1967년 12월 30일		
	주소	전화번호	02-3474-8502	
	경기도 이천시 마장면 덕평로663번길 127-16	휴대전화	010-42225394	
영업소	명칭(상호)	영양등록번호		
	(주)뉴트리네이오백	20070358224		
	소재지			
	경기도 이천시 마장면 덕평로663번길 127-16			
제품정보	식품의 유형	전대류	요청하는 품목제조 신고번호	20670358224777
	유형명	비누콘 포장 타블렛		
	유통기한	24개월		
	품질관리기준			
	원재료 또는 성분명, 함유량	복합아 기차		
	용도 용법	복합아 기차		
	보관방법 및 포장재질	복합아 기차		
	포장방법 및 포장단위	복합아 기차		
	중량	100g		
	중요특성	■ 고열성, 차광용 비닐 포장 여부 [] 예 [] 아니오 [] 해당 없음 ■ 발효인공 식품 함유 여부 [] 예 [] 아니오		

기타

※ 식품의약품, 제37조제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조제1항에 따른 식품(식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다. 2018년 05월 02일 보고인 권진복

경기도 이천시장 귀하

품목제조번호	201870358224-777
처리부서	보건소 보건위생과
처리과정명	검정승
처리일자	2018년 05월 16일

본 증명서는 민원정보로 활용되므로 식품안전정보포털(http://www.foodsafetykorea.go.kr) 홈페이지에서 확인할 수 있습니다.

신고번호 : HKA-E46-1840-0807-1878

원재료명 또는 성분명 및 배합비율		
No.	원재료명 또는 성분명	배합비율(%)
1	기타기공품	71.43%
2	타블렛 [Labaton 非염산성]	9%
3	락스프린 [알도덱스프린]	5%
4	꿀맛젤리모스	23.927%
5	스테인리스강그네송	1.5%
6	이산화규소	1%
7	히드록시프로필베타셀룰로스	0.875%
8	착색료 홍곡역색	0.656%
9	카라멜색소	0.262%
10	이산화티타늄	0.210%
11	글리세린	0.131%

용도용법 : 1일 4회, 1회 1개를 섭취할게 섭취하십시오.

보관방법 및 포장재질 : 1. 직사광선을 피해 서늘한 곳에 보관하시고, 어린이의 손이 닿지 않는 곳에 보관하십시오. 2. 개봉 후 개봉 후에는 신속히 먹을 수 있으나 반드시 유통기한에 보관하십시오. PVC(폴리염화비닐), AL-Foil(알루미늄 호일), PE(폴리에틸렌), HDPE(고밀도폴리에틸렌), PET(폴리에틸렌 테레프탈레이트), PP(폴리프로필렌), PS(폴리스티렌) 포장재질, PVP포장, 연두장

본 증명서는 민원정보로 활용되므로 식품안전정보포털(http://www.foodsafetykorea.go.kr) 홈페이지에서 확인할 수 있습니다.

<파바톤 콩잎>

그림. 파바톤 콩잎 임상용샘플(플라시보, 파바톤콩잎) 식품품목제조보고서

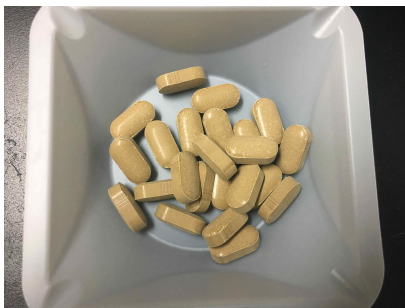
2-4-4-5. 파바톤콩잎 추출물의 건강기능식품 제형연구

- 파바톤 콩잎은 이소플라본 함유량이 높아 갱년기 증상 완화효과를 주관기관의 실험에서 확인하였으며, 이를 바탕으로 제형연구를 진행하였음. 갱년기는 폐경이 되기 전인 폐경 이행기, 폐경, 폐경 이후의 시기를 모두 포함하며, 이 시기에는 여성호르몬 변화, 즉 에스트로겐의 감소로 인해 안면홍조 및 질 건조증 등 갱년기 증상 등이 나타남.
- 아래 표에서 나타나듯이, 갱년기 여성건강 개별인정형 건강기능식품 현황표이며, 2016년 식약처에 등재된 갱년기여성 건강 기능성원료 인정 현황을 보면, 프랑스해안송겉질추출물, 백수오 등 복합추출물, 석류추출물, 홍삼(홍삼농축액), 석류농축액, 회화나무열매추출물, 오미자추출물 7건으로 확인되었음.

표. 갱년기 여성건강 개별인정형 건강기능식품 현황 (식품의약품안전처 홈페이지 재가공)

원료명	제조 기업	제품명
백수오 등 복합추출물	(주)네추럴엔도텍	백수오, 백수오 킴 프리미엄, 백수오 궁
	웅진식품(주)	발효홍삼, 백수오 수
	(주)동구바이오제약	레드우먼
	(주)비오팜	뉴백수오 프리미엄, 로제골드
	(주)서흥	백수오궁, 참 백수오, 동아 백수오 프리미엄
	(주)한국씨엔에스팜	레이디리본 백수오, 한미 진품 백수오, 한미 진품 센스미인, 백수오 미인
	천호식품(주)	황후 백수오 플러스, 황후 백수오정
	코스맥스바이오(주)	백수오진, 백수오 생 골드, 수오련
	콜마비엔에이치(주)푸드팜 사업부문	백세 백수오, 백수오 HCA
	풀무원건강생활(주)	로젠빈수 백수오, 퍼스트 백수오
석류 추출액/농축액	네이처퓨어코리아(주)	리플라워 킴
	대상(주)	발효식초석류복합물
	비엔지웰푸드	석류 추출물
	(주)더존피에이치씨	페미케어, 여다움
	(주)서흥	여왕의 석류, 닥터레드킴
	(주)에이치엘사이언스	닥터석류진, 닥터석류진 알파, 황실보감, 황후의 시크릿, 레드클레오
	(주)케이지엔에프	에스-T 석류추출물
	(주)한풍네이처팜	금단미인궁
	천호식품(주)	우먼솔루션
	코스맥스바이오(주)	에버플라본 석류, 가르시니아 맥스 석류맛, 미에 석류
콜마비엔에이치(주)푸드팜 사업부문	석류골드프리미엄	
회화나무 열매 추출물	극동에치팜(주)	우먼스립
	(주)노바렉스	텍스플라본, 보옴 씨클라 케어 감마리놀렌산 플러스 회화나무, 건미라 에스티골드, 디어우먼
	(주)알피바이오	회화 궁
	(주)유유헬스케어	회화 춘
	(주)한풍네이처팜	퀸즈 트리플케어
	콜마비엔에이치(주)푸드팜 사업부문	에터미소포라퀸
한국코러스(주)건강기능식품사업부	여자의 청춘 2	

- 이를 바탕으로, 파바톤 콩잎의 제형연구는 ①갱년기 증상 완화 ②뼈건강 및 혈행개선이며, 파바톤 콩잎(이소플라본 고함유), 뼈건강(비타민D), 갱년기증상완화(석류추출분말), 혈행개선(은행잎추출물) 등으로 타블렛 제형연구를 진행하였음.
- 파바톤 콩잎추출물의 건강기능식품 타블렛형태 제형연구 중에 아래 그림에서 나타나듯이, 코팅 전의 파바톤콩잎은 정제과정에서 끈적거림이 있어 코팅과정을 진행하였음.
- 그리고, 겉표면 및 외관이 불균일 혼합으로 인해 외관 및 겉표면이 점박이처럼 나타남. 이는 파바톤 원료가 가벼워, 타정시 부형제가 한쪽으로 쏠리는 현상이 발생되어 생기는 것으로 판단됨. 따라서 기존에 사용했던 결정타입의 이소말트를 고운 분말형 이소말트로 대체하여 과립공정 대신 최대한 직접 타정하는 공정으로 진행하였음.
- Alu-Alu포장형태 규격에 의해 기존사이즈인 700mg 장방형 몰드에서 350mg으로 제형연구하였음. 그러나, 제형의 크기는 상황에 따라 유동적이지만, 크기가 작을수록 일일섭취량은 늘어나므로, 적합한 섭취갯수는 1일 4회, 1회 1정을 물과 함께 섭취가 적정하다고 판단됨.



< 코팅 전 (타블렛)_700mg >



< 결정 타입_이소말트 >



< 분말 타입_이소말트 >



< HDPE병포장 >



< Alu-Alu 포장 >

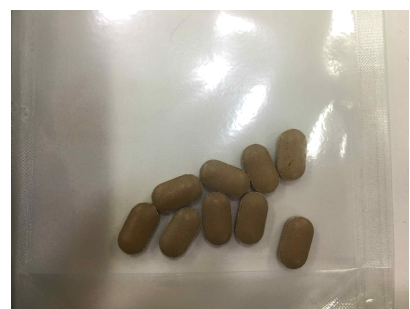


그림. 파바톤 콩잎 건강기능식품 제형연구 샘플 제작

- 포장형태는 HDPE 포장 및 alu-alu형태 2가지이며, 포장형태에 따른 사이즈가 서로 상이하
여 각각의 배합비로 구성하였으며 배합비는 아래와 같음.

표. 파바톤 콩잎 추출물 건강기능식품 배합비 [HDPE병 / alu-alu포장]

구분		HDPE+실리카겔 포장형태	Alu-Alu 포장형태	비고
원료명		배합비(%)	배합비(%)	
타블렛 제형	파바톤 콩잎	70.00	70.00	
	석류추출물	2.00	2.00	갱년기 증상완화
	비타민D3혼합제제	0.16	0.16	뼈건강 라벨표시 0.01mg
	은행잎추출물분말, 프랑스	4.170	-	지표물질 중복함유로 인해 품목보고용은 제외함.
	이소말트	21.17	24.79	
	스테아린산마그네슘	1.50	1.50	
	이산화규소	1.00	1.00	
	히드록시프로필메틸 셀룰로오즈	0.5	0.5	
	글리세린	0.05	0.05	
	합계	100	100	
	5% HPMC	히드록시프로필메틸 셀룰로오즈	5.0000	5.0000
글리세린		0.7500	0.7500	
정제수		94.2500	94.2500	
주정 정제수		84.8250 9.4250	84.8250 9.4250	
* 700mg, 장방형 몰드 * 1일 4회, 1회 1정을 물과 함께 섭취 *일일섭취량_1day=1.8~2g, 실제섭취량=(490mg×4)=1.9g		* 350mg, 장방형 몰드 * 1일 4회, 1회 2정을 물과 함께 섭취 *일일섭취량_1day=1.8~2g, 실제섭취량=(245mg×8)=1.9g		

- 아래 표에서 나타나듯이, 건강기능식품 파바톤 콩잎의 제조공정은 원료검수→원료칭량→혼합→물성체크→타정→코팅→포장 순으로 생산하며, 물성체크는 이물, 수분함량, 안식각을 측정하여 적합여부 확인 후, 21mm 장방형 몰드를 이용하여 타정을 한 후, 타정 시 경도 및 마손도 체크 후 95%주정에 HPMC(HydroxyPropyl MethylCellulose)를 소량씩 넣어가면서 용해한 후 정제수를 넣어 혼합한 다음 글리세린에 추가 혼합 후 코팅의 과정을 진행한다.

표. 파바톤 콩잎 추출물 타블렛 제조 공정도

공정	사용설비	공정 상세 내용	체크사항 생산 및 생산관리
원료 검수	-	<ul style="list-style-type: none"> · 각 원료의 규격을 확인한다. 	· 원료 시험의뢰
원료 칭량	전자저울	<ul style="list-style-type: none"> · 각 원료의 규격을 확인한다. · 원료를 칭량한다. 	· 원료규격 및 사용량 (코드번호, 제조사, 공급처)
혼합	체과망더블콘믹서 or 브이믹서	<ul style="list-style-type: none"> · 검수가 완료된 원료를(스테아린산마그네슘 제외) 체를 통과한 후 혼합기에 투입한다. · 20~ 30분간 혼합한다. · 스테아린산마그네슘은 최종혼합시간 5분을 남겨놓은 시점에 투입한 후 혼합한다. 	· 체망사이즈 : 16~18 mesh
물성 체크	-	<ul style="list-style-type: none"> · 정상, 이물, 수분함량(%), 안식각이 적합한지 확인한다. 	<ul style="list-style-type: none"> · 이물 : 불검출 · 수분함량 : 7%이하 · 안식각 : 0.65±0.2
타정	타정기	<ul style="list-style-type: none"> · 21mm 장방형 몰드를 이용하여 타정한다. · 최종 혼합된 내용물을 기준중량에 맞추어 정제기로 타정하고, 매1시간마다 10정을 중량 검사한다. · 두께, 경도 및 마손도를 확인한다. (정제 타정시 경도 / 마손도중심) 	<ul style="list-style-type: none"> · 마손도 : 0.13%±0.2 · 경도 : 16±0.2 · 두께 : 6.07mm±0.2
코팅	-	<ul style="list-style-type: none"> · 95%주정에 HPMC(Hydroxylpropyl Methylcellulose)를 소량씩 넣어가면서 용해한 후 정제수를 넣어 혼합한다. · 용해된 HPMC에 글리세린을 투입하고 교반한다. 	
포장	-	<ul style="list-style-type: none"> · 포장규격에 맞추어 포장하고 완제품 규격을 확인한다. 	<ul style="list-style-type: none"> · 병(HDPE병+ 실리카겔) · Alu-Alu 포장

- (포장연구) 파바톤 콩잎의 타블렛 제형연구 중, 포장은 아래 실험법에 따라 병(HDPE+실리카겔) 및 alu-alu포장형태로 진행하였으며, 표기사항에 상온/실온 및 서늘한 곳에 보관으로 표기하여 고온다습한 곳을 피해 제품의 변형 및 변색예방을 하고자 함.
- 포장관련 시료제조방법은 시제량 기준에 맞추어 칭량, 칭량된 원료로 내용물 조제 및 병안에 정제(HDPE병+실리카겔 포함)를 각 각 추가 후, 각 실온조건(30±5℃, 60%RH) 및 가혹조건(40±5℃, 75%RH)의 안정성 chamber에 보관 후 약 2주간 정상 비교 예비실험을 진행하였음.
- 2주간의 각 온도조건별 성상을 살펴보았을 때, 실온조건에서는 처음과 다른 색 및 모양 변형등을 관찰되지 않았으나, 가혹조건에서는 갈색이 진하게 변색 및 변형된 모양을 처음과 확연히 다른 형태를 나타내어 보관상태의 주의가 필요함을 시사하였음.
- 이를 보완하기 위한, 대안책으로는 상온 및 서늘한 곳에 보관 및 표기사항 필히 기입 또는 일반적으로 안정성이 우수한 포장형태인 alu-alu포장/유산균전용병포장등을 제시하였으며, 이 예비실험을 통해 파바톤콩잎은 고온다습 조건에서는 상당히 취약함을 확인하였음.
- 포장형태별 확인실험을 통해, 제형연구의 포장형태는 병포장(HDPE+실리카겔포함) 및 alu-alu포장으로 진행할 계획이며, 예비실험으로 진행된 포장형태에 따른 안정성 검사를 추가로 진행할 계획이며, 그 결과는 파바톤 콩잎 추출물의 건강기능식품 품질관리(가속 및 장 기보존실험)에서 그 결과를 기입할 것임.




구분		0 Day (2018.08.23)	14 Day (2018.09.06)
실온조건 30±5℃ 60%RH	성상		
	비고	이슈사항 없음	
가혹조건 40±5℃ 75%RH	성상		
	비고	갈색상의 정제가 심하게 진한 갈색으로 변색 및 모양 변형 됨.	
고찰		<ul style="list-style-type: none"> · Feasibility Test Summary : 고온다습한 조건에 취약한 파바톤 원료의 특성상 상온에서는 큰 변화가 없지만, 2주간의 가속조건(40±5℃, 75% RH)에서는 정제의 색상 및 형태가 변화하는 것을 확인함. · Way to solve problems : 위 원료를 함유하여 생산하는 경우, 성상이 변할 가능성이 매우 크기 때문에 상온유통 조건에서 반드시 유통 및 보관해야 하며, 인습에 강한 포장방법을 추천함 (Alu-Alu 포장, 유산균 전용병). 혹은 파바톤 원료 제조 시 텍스트린과 같은 케리어와 함께 혼합하여 함량을 낮추거나, 배합 시 낮은 배합으로 진행하는 것이 바람직하다고 사료됨. 	

그림. 파바톤 콩잎 건강기능식품 제형연구 포장(HDPE병+실리카겔포함)시 안정성실험(실온/가혹조건)결과

2-4-5. 파바톤콩잎 추출물의 건강기능식품 제품개발 (결과-4)





2-4-5-1. 파바톤콩잎 추출물의 디자인 연구

- 파바톤콩잎과 관련한 일반식품(건강음료/젤리)와 건강기능식품(타블렛형태인 HDPE병/PTP형태)의 포장디자인 연구를 당사 디자인팀에서 진행하였음.
- 주요컨셉은 콩잎을 강조한 이소플라본 고함유 슈퍼콩잎 파바톤콩잎 Fabaton®으로 아래의 내용을 바탕으로 주요컨셉+설명문구를 삽입하여 디자인 작업을 진행하였음.

		
<p>파바톤콩잎 Fabaton®</p>	<ul style="list-style-type: none"> · 갱년기여성건강(파바톤콩잎) · 식류 / 폴리페놀이 풍부한 베리3종(블루/크랜/라즈베리) · 뼈건강(칼슘)_젤리에 한함 · 액상(파우치, 병 (50mL), 젤리 (20g)) · 일일섭취량 : 이소플라본 함유(1g=17mg) : 50mL*2ea · 표시사항 : 상온 및 서늘한 곳에 보관 	<ul style="list-style-type: none"> · 갱년기여성건강(파바톤콩잎) · 식류 / 뼈건강(비타민D) · 타블렛, 700mg 장방형 · 일일섭취량 : 1.8~2g (1일 4회 1회 1정을 물과 함께 섭취) · 표시사항 : 상온 및 서늘한 곳에 보관

- 일반식품으로 제형연구된 병/젤리포장과 건강기능식품으로 제형연구된 HDPE병/alu-alu형태의 포장으로 각각 디자인팀에 의뢰하였으며, 다양한 색, 글씨체 등을 반영한 4가지 종류의 디자인으로 제시하였음.
- 주요컨셉은 주요원료인 파바톤콩잎과 갱년기여성건강이라는 점을 강조하였고, 부원료인 식류, 베리류 3종(블루베리/크랜베리/라즈베리)을 이미지로 삽입하여 한눈에 보기 쉽게 구성하였음. 제형형태별로, 음료(액상), 젤리, 타블렛형태, 타블렛 형태의 포장별 HDPE병/Alu-Alu 2가지 등 다양하게 개별포장과 전체포장도 함께 디자인하여 향후 제품화 적용시 응용할 수 있음.
- 각 제품의 표시사항과 제품명은 아래와 같으며, 참고용(예시용)이므로, 향후 본격적인 제품화 할 경우 수정, 삭제, 추가 등이 가능함.

표. 파바톤 콩잎 추출물 표시사항 (예시용)

구분	표시사항 (예시용)
	<ul style="list-style-type: none"> • 원료 및 함량 : 파바톤추출분말, 식류과즙, 블루베리농축액, 크랜베리농축액, 라즈베리농축액, 복분자농축액, 프락토올리고당, 자일리톨 • 섭취량 및 섭취방법 : 1일 1병/100ml • 주의사항 : 개봉 후 빨리 드시기 바랍니다. 영유아, 어린이, 임산부와 수유여성은 섭취에 주의해야 합니다. 대두에 알레르기를 나타내는 사람은 섭취에 주의해야 합니다. 에스트로겐 호르몬에 민감한 사람은 섭취에 주의해야 합니다. • 침전물이 생길수 있으나 품질에는 이상이 없으니 안심하고 흔들어 주세요. • 보관방법 ; 직사광선을 피해 서늘한 실온에서 보관하십시오. 어린이의 손에 닿지 않는 곳에 보관하십시오. • 포장재질 : 1.병:폴리에틸렌(PE), 고밀도폴리에틸렌(HDPE), 폴리에틸렌테레프탈레이트(PET), 폴리스틸렌(PS), 폴리프로필렌(PP) 2.뚜껑 : 폴리에틸렌(PE), 저밀도폴리에틸렌(LDPE) • 유통기한 및 제조번호 : 측면 표기일까지 • 본제품은 엄격한 품질관리를 통해 제조되었으며, 공정거래위원회 고시 소비자 분쟁해결기준에 의거 교환 또는 보상받을 수 있습니다. • 본 제품은 질병의 예방 또는 치료를 위한 의약품이 아닙니다.
	<ul style="list-style-type: none"> • 원료 및 함량 : 파바톤추출분말, 식류농축액, 블루베리농축액, 라즈베리농축액, 크랜베리농축액, 프락토올리고당, 결정과당, 텍스트린, 젖산칼슘, 염화칼륨, 구연산나트륨, N-아세틸글루코사민분말, 수크랄로스 • 섭취량 및 섭취방법 : 1일 1회 1포를 씹어서 섭취하십시오. • 주의사항 : 개봉 후 빨리 드시기 바랍니다. 영유아, 어린이, 임산부와 수유여성은 섭취에 주의해야 합니다. 대두에 알레르기를 나타내는 사람은 섭취에 주의해야 합니다. 에스트로겐 호르몬에 민감한 사람은 섭취에 주의해야 합니다. • 보관방법 ; 직사광선을 피해 서늘한 실온에서 보관하십시오. • 포장재질 : 폴리에틸렌(PE, 내포장재질) • 유통기한 및 제조번호 : 측면 표기일까지 • 본제품은 엄격한 품질관리를 통해 제조되었으며, 공정거래위원회 고시 소비자 분쟁해결기준에 의거 교환 또는 보상받을 수 있습니다. • 본 제품은 질병의 예방 또는 치료를 위한 의약품이 아닙니다.
 	<ul style="list-style-type: none"> • 원료 및 함량 : 파바톤콩잎, 식류추출물, 비타민D3혼합제제, 이소말트, 스테아린산마그네슘, 이산화규소, 히드록시프로필메틸셀룰로오스, 글리세린 • 섭취량 및 섭취방법 : 700mg 장방형 몰드, 1일 4회 1회 1정 물과 함께 섭취 • 일일섭취량_1day=1.8~2g, 실제섭취량=(490mg×4)=1.9g • 주의사항 : 영유아, 어린이, 임산부와 수유여성은 섭취에 주의해야 합니다. 대두에 알레르기를 나타내는 사람은 섭취에 주의해야 합니다. 에스트로겐 호르몬에 민감한 사람은 섭취에 주의해야 합니다. • 보관방법 ; 직사광선을 피해 서늘한 실온에서 보관하십시오. • 포장재질 : • 유통기한 및 제조번호 : 측면 표기일까지 • 본제품은 엄격한 품질관리를 통해 제조되었으며, 공정거래위원회 고시 소비자 분쟁해결기준에 의거 교환 또는 보상받을 수 있습니다. • 본 제품은 질병의 예방 또는 치료를 위한 의약품이 아닙니다.

파바톤콩잎 디자인연구 A



파바톤콩잎 디자인연구 B



파바톤콩잎 디자인연구 C



파바톤콩잎 디자인연구 D



그림. 파바톤 콩잎 관련 제품 당사 디자인 연구 목록 (제품명/가명_파바톤콩잎)

2-4-5-2. 파바톤콩잎 추출물의 건강기능식품(타블렛) 시제품 개발

- 파바톤 콩잎 추출물의 건강기능식품 타블렛 제형 연구로 진행된 HDPE병 및 alu-alu포장형 테별 시제품을 생산하였음. HDPE병의 형태는 2018.10.19일에 안정성검사용을 위해 아래와 같이 생산하였음.
- alu-alu 시생산은 품질관리 및 안정성 검사 샘플 부족으로 2차례에 걸쳐 생산을 진행하였으며, 시제품 생산은 2018.12.19일(첫번째), 및 2019.01.23(두번째)로 각각 진행 후 안정성 검사를 진행하였으며, 장기 및 가속조건에서의 안정성 실험을 진행하기 위해 아래와 같이 샘플을 생산하였음.



2018.10.19 시제품 생산

2019.01.23 시제품 생산



[HDPE 형태]



[alu-alu 형태]



그림.. 파바톤 콩잎 건강기능식품 타블렛 시제품 개발

- 건강기능식품 타블렛 형태로 품목제조보고를 등록하였으며, 건강기능식품으로 등록하기 위해 alu-alu포장형태의 배합비로 구성된 샘플로 위와 같이 생산 후, 외부기관업체((사)한국건강기능식품협회부설 한국기능식품연구원) 의뢰를 통해 지표물질인 Daidzin / Genistin와 식품제조 수입품목허가(신고)용검사를 위해 성상, 비타민D, 대장균군, 봉해시험을 의뢰하여 진행하였으며, 시험성적의 결과값은 아래와 같음.
- 건강기능식품 품목제조 보고를 진행하기 위해 당사는 공인인증된 검사기관에서 원료 지표물질과 식품공전 기준규격에 해당되는 분석항목을 검사한 후 품질본부인 QC팀에 유통기한 설정 신청을 진행한 후 건강기능식품 품목제조신고를 진행하였음.
- 파바톤콩잎은 아직 제품명으로 사용하기에 개별인정형원료로 등재되지 않아, 우선적으로 우먼스라이프(가칭)라는 제품명으로 건강기능식품 품목제조신고를 완료하였으며, 이는 향후 파바톤콩잎의 개별인정재료로 인정되면 이 과제의 제품명으로 검토후 사용할 계획임.

제 D2018110641 호
발사확인

시험·검사성적서

제품명	파바톤식용콩	제조일자 (유통기한)	2018-10-10
의뢰인	업체명 (주)뉴트리바이오텍 주소 경기 이천시 바강면 덕평로 663번길 127-16	성명	이승중
제조번호		접수년월일	2018-11-07
검사내역목적	검고용	접수번호	D2018110641

귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.
시험·검사 완료일: 2018-11-15
시험·검사 책임자: 이경구
검사관련 총 책임자: 김원희


시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원
Daidzin(mg/g)	5.30mg/g	조미주
Genistin(mg/g)	3.62mg/g	조미주

2018년 11월 15일

한국기능식품연구원

(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 http://www.kbsi.re.kr | 전화번호 031-628-2400 | 팩스번호 031-628-0400-1

문서확인번호 : PLKJ-0TPB-T2PT-MKAJ



시험·검사성적서

제038호

발행번호	R20190124-0083	접수번호	190101567-001
검사완료일	2019-01-24	접수완료일	2019-01-18
제품명	파바톤식용콩		
(품목)제조번호		품목제조신고번호	
유형·재질·품목명	비타민D		
제조(수입)일	2018-10-10	유통(품질유지)기한	
성명	이승중	업체명	(주)뉴트리바이오텍
의뢰자	(17389)경기 이천시 마장면 덕평로 663번길 127-16	전화번호	070-4077-0361
소재지		팩스번호	031-636-6447
제조사	업체명	전자우편	wonjinseong@nutrbiotech.co.kr
소재지		제조국	
시험·검사목적	식품 제조·수입품목허가(신고)용검사		

시험·검사 항목 및 결과

시험·검사 항목	시험·검사 기준	시험·검사 결과	판정	비고
성상	고유의 색택과 향미를 가지며, 이취가 없어야 함	이취, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 혼란 용 감색의 투영 코팅정제	적합	
비타민D(%)	표시량의 80% ~ 180%	120%(12μg/2800mg)	적합	10μg/2800mg
대장균군	음성	음성	적합	
봉해시험	적합	적합(제외정제 : 60분이 내 봉해)	적합	

중합판정 : 적합
시험검사원 : 윤효선, 한아름, 허준, 허태영 시험검사책임자 : 김천희, 이현영, 장정순

비고 :

* 위 판정은 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.
* 지면이 부족한 경우 시험·검사 항목 및 결과란은 별지로 작성 가능합니다.
* 검사결과를 공고하거나 용기·포장 등에 표시할 때에는 시험·검사성적서 전체 내용을 모두 표시하여야 합니다.

「식품·의약품분야 시험·검사 등에 관한 법률」 제11조제2항 및 같은 법 시행규칙 제12조제4항제1호에 따라 위와 같이 시험·검사성적서를 발급합니다. 2019년 01월 24일

(사)한국건강기능식품협회부설 한국기능식품연구원

13488 경기도 성남시 분당구 대행판교로 700 A동 102호(상명동, 코히어바이오파리) T:031-628-2400 F:031-628-0400-1

* 본 증명서는 전자서명용 발급되었으며, 발급번호를 통하여 위변조 여부를 확인할 수 있습니다.
또한, 문서하단의 QR코드를 통해 QR코드를 검사확인(스캐너를 검사확인프로그램)을 이용하실 수 있습니다. http://lims.mfds.go.kr Page 1 of 1

< 파바톤 콩잎_타블렛 제형 >

그림. 파바톤 콩잎 건강기능식품(타블렛제형) 지표물질 및 품목보고용 관련 시험성적서

발급번호 : 순190444444110-062-5924
제 200700170351270 호

건강기능식품 품목제조신고증

○ 영장허가(번호) : 제 20070017035 호

○ 접 소 명 : 파스텍스엔비티(주)

○ 소 재 지 : 경기도 이천시 미곡면 덕영로663번길 127-16


○ 영장의 종류 : 건강기능식품제조업

○ 재 품 명 : 우먼스라이프 (유형: 비타민D)

제조방법·원료나 성분의 명칭과 함량·제품의 형태·기준과 규격 (필수적 작성)
"건강기능식품에 관한 법률" 제7조의 같은 법 시행규칙 제8조에 따라 건강기능식품품목제조신고증 수리합니다.

2019년 05월 01일

경인지방식품의약품안전청장



발급번호 : 순190444444110-062-5924

제품명	우먼스라이프
유통일자	1월 4일 (토) 1월 10일 월화 목요일
제조 시 주의사항	1. 원료, 포장나 조차물을 보관하는 동안 분해 및 변질방지, 광택제인 구연산(포도산)을 사용하며, 포장나 조차물(포장, 운반)은 청결하게 유지하며, 수분과 열을 피해야 합니다. 2. 섭취할 때 섭취방법을 확인후 후 순환제인 마그네슘을 섭취하여 소화불량, 변비, 설사 등의 부작용을 예방하며, 산성식품(과일, 유제품)은 섭취하지 않습니다. 3. 수분 섭취가 충분하지 않을 경우 섭취를 중단하고, 산성식품(과일, 유제품)은 섭취하지 않습니다. 4. 5. 0.5g 통상이 성상 일부 섭취를 중단하고, 산성식품(과일, 유제품)은 섭취하지 않습니다.
포장방법	PPF포장, 방호막
포장단위	700mg × (1~1000) 봉
주요재료	PPF·PVC·PVDC·AL·Foil·Alu·Au·Au형 포장재, 폴리에틸렌, 폴리카보네이트
성상	고체, 약가가 없고 규격이 정해진 용출되는 투과성 포장재
기능성내용	비타민D 기능성: 인체 내에서 합성되고 인체내에서 부족하면 골밀도 유지에 관여 하는 호르몬을 생성하며, 뼈의 건강을 유지하는 데 도움을 준다.
제조방법	1. 원료: 건강기능식품용: 시판 원료 및 시판제조물과인 원료에서 제조 가능 규격에 적합한 비율의 원료가 투입됨. 그러나, 반드시 규격대로 사용한다. 2. 포장: 용출되는 성분: 용출되는 성분(PPF, PVC, PVDC, AL, Foil, Alu, Au, Au형 포장재)에 적합한 포장재 사용한다. 3. 포장: 용출되는 성분: 용출되는 성분(PPF, PVC, PVDC, AL, Foil, Alu, Au, Au형 포장재)에 적합한 포장재 사용한다. 4. 포장: 용출되는 성분: 용출되는 성분(PPF, PVC, PVDC, AL, Foil, Alu, Au, Au형 포장재)에 적합한 포장재 사용한다. 5. 포장: 용출되는 성분: 용출되는 성분(PPF, PVC, PVDC, AL, Foil, Alu, Au, Au형 포장재)에 적합한 포장재 사용한다. 6. 포장: 용출되는 성분: 용출되는 성분(PPF, PVC, PVDC, AL, Foil, Alu, Au, Au형 포장재)에 적합한 포장재 사용한다. 7. 포장: 용출되는 성분: 용출되는 성분(PPF, PVC, PVDC, AL, Foil, Alu, Au, Au형 포장재)에 적합한 포장재 사용한다. 8. 포장: 용출되는 성분: 용출되는 성분(PPF, PVC, PVDC, AL, Foil, Alu, Au, Au형 포장재)에 적합한 포장재 사용한다. 9. 포장: 용출되는 성분: 용출되는 성분(PPF, PVC, PVDC, AL, Foil, Alu, Au, Au형 포장재)에 적합한 포장재 사용한다.

발급번호 : 순190444444110-062-5924

제품의 형태	봉
기준과 규격	1. 원료: 인체 내에서 합성되고 인체내에서 부족하면 골밀도 유지에 관여 하는 호르몬을 생성하며, 뼈의 건강을 유지하는 데 도움을 준다. 2. 포장: 용출되는 성분: 용출되는 성분(PPF, PVC, PVDC, AL, Foil, Alu, Au, Au형 포장재)에 적합한 포장재 사용한다. 3. 포장: 용출되는 성분: 용출되는 성분(PPF, PVC, PVDC, AL, Foil, Alu, Au, Au형 포장재)에 적합한 포장재 사용한다. 4. 포장: 용출되는 성분: 용출되는 성분(PPF, PVC, PVDC, AL, Foil, Alu, Au, Au형 포장재)에 적합한 포장재 사용한다. 5. 포장: 용출되는 성분: 용출되는 성분(PPF, PVC, PVDC, AL, Foil, Alu, Au, Au형 포장재)에 적합한 포장재 사용한다. 6. 포장: 용출되는 성분: 용출되는 성분(PPF, PVC, PVDC, AL, Foil, Alu, Au, Au형 포장재)에 적합한 포장재 사용한다. 7. 포장: 용출되는 성분: 용출되는 성분(PPF, PVC, PVDC, AL, Foil, Alu, Au, Au형 포장재)에 적합한 포장재 사용한다. 8. 포장: 용출되는 성분: 용출되는 성분(PPF, PVC, PVDC, AL, Foil, Alu, Au, Au형 포장재)에 적합한 포장재 사용한다. 9. 포장: 용출되는 성분: 용출되는 성분(PPF, PVC, PVDC, AL, Foil, Alu, Au, Au형 포장재)에 적합한 포장재 사용한다.
보존 및 유통기준	단 저산소 상태를 유지하는 실온에 방치된 후 처음 개봉 후에는 인체에 유익한 조건의 보관을 한다.
유통기간	제조일로부터 24개월
기타	

발급번호 : 순190444444110-062-5924

원료나 성분의 명칭과 함량

기능성원료(기능성물 표시하고 있는 원료)				
No.	원료명 또는 성분명	배합비율(%)	기능(기능성명)	원료의 기원 표명
1	비타민 D25	0.16% (0.25%)		
2	비타민 D3	0.25%		비타민D3 결정
3	비타민E	38%		
4	비타민	38%		
5	비타민 복합	15.55%		
6	비타민 복합	7.5%		비타민 복합
7	비타민 복합	0.5%		
8	비타민 복합	0.2%		
기타원료				
No.	원료명 또는 성분명	배합비율(%)	기능(기능성명)	원료의 기원 표명
1	당도당	70%		Fabaron(당도당)

발급번호 : 순190444444110-062-5924

기타원료

No.	원료명 또는 성분명	배합비율(%)	기능(기능성명)	원료의 기원 표명
2	비타민	90%		Fabaron(당도당)
3	비타민	5%		
4	비타민	2%		
5	비타민	73.11%		
6	비타민	25.98%		
7	비타민	0.72%		
8	비타민	0.58%		
9	비타민	24.79%		
10	비타민	1.5%		
11	비타민	1%		
12	비타민	0.5%		당도당

발급번호 : 순190444444110-062-5924

기타원료

No.	원료명 또는 성분명	배합비율(%)	기능(기능성명)	원료의 기원 표명
12	당도당	0.95%		당도당

그림. 파바톤 콩잎 건강기능식품(타블렛제형_우먼스라이프) 품목제조신고증(2019. 05. 01)

제품명	우먼스라이프
섭취방법	1일 4회, 1회 1정 물과 함께 섭취하십시오.
섭취 시 주의사항	1. 임신, 수유부나 의약품을 섭취하시는 분은 섭취 전 전문가와 상담하여 주십시오. 2. 특이체질, 알레르기체질인 경우에는 의사와 상담후 섭취여부를 결정하십시오. 3. 섭취량 및 섭취방법을 확인한 후 섭취하십시오. 4. 섭취 전에 유통기한을 확인 후 섭취하십시오. 또한 유통기한이 경과한 제품은 섭취하지 마십시오. 5. 이상 증상이 생길 경우 섭취를 중단하고 전문의와 상담하시거나 소비자상담실로 문의하시기 바랍니다.
포장방법	PTP포장, 병포장
포장단위	700mg × (1~1000)정
포장재질	PTP : PVC,PVDS, AL-Foil, Alu-Alu 병포장: 폴리에틸렌, 폴리프로필렌
성상	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 흐린 황갈색의 투명 코팅정제
기능성내용	비타민D ① 칼슘과 인이 흡수되고 이용되는데 필요, ② 뼈의 형성과 유지에 필요, ③ 골다공증발생 위험 감소에 도움을 줌
제조방법	1. 원료 : 건강기능식품공전, 식품공전 및 식품첨가물공전 등에서 정한 기준 규격에 적합한 분말원료(상기원료)를 국내, 외에서 구입하여 사용한다. 2. 칭량 : 원료량에 따라 전자저울(1mg~100g, 1kg~150kg)을 이용하여 성분배합비율에 따라 정밀하게 각각 칭량한다. 3. 체과, 혼합 : 체과 후 원료를 혼합기에 배산, 혼합 후 균질성이 확보되도록 혼합한다. 4. 타정 : 최종 혼합된 내용물을 기준중량에 맞추어 정제기로 타정하고 매 1시간마다 10정을 중량검사한다. 5. 코팅 : 타정된 정제를 코팅기를 이용하여 코팅한다. 6. 선별 : 정제를 선별기를 이용하여 육안검사하여 적합한 제품을 선별한다. 7. 포장 : 선별한 반제품을 일정한 포장단위에 따라 포장한다. 8. 최종검사 : 포장된 제품에 대해 최종 자가 품질검사를 실시한다. 9. 보관 및 출하 : 검사 결과 적합한 제품에 한하여 보관 및 출하한다.
제품의형태	정
기준과규격	1) 성상 : 이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 흐린 황갈색의 투명 코팅정제 2) 대장균군 : 음성 3) 비타민D : 표시량(10ug/2800mg)의 80~180%이상 4) 붕해도 : 60분이내 붕해
보존및유통기준	① 직사광선을 받지 않는 실온에 보관 유통 ② 제품 개봉 후에는 인습에 주의하여 보관하세요.
유통기한	제조일로부터 24개월

원료나 성분의 명칭과 함량				
기능성원료(기능성을 표시하고자 하는 원료)				
No.	원재료명 또는 성분명	배합비율 (%)	기능(지표)성분함량	원재료 기타 설명
1	비타민D3혼합제제	0.16%	(0.25%)	-
2	^L 비타민D3	0.25%	-	비타민D3결정
3	^L 아라비아검	38%	-	-
4	^L 설탕	38%	-	-
5	^L 옥수수전분	15.55%	-	-
6	^L 가공유지	7.5%	-	중쇄중성지방
7	^L 이산화규소	0.5%	-	-
8	^L DL-알파-토코페롤	0.2%	-	-
기타원료				
No.	원재료명 또는 성분명	배합비율 (%)	기능(지표)성분함량	원재료 기타 설명
1	대두잎	70%	-	Fabaton콩잎추출물
2	^L 대두잎	95%	-	-
3	^L 텍스트린	5%	-	-
4	석류추출물	2%	-	-
5	^L 석류농축액	73.11%	-	-
6	^L 텍스트린	25.58%	-	-
7	^L 아라비아검	0.73%	-	-
8	^L 포도과피색소	0.58%	-	-
9	이소말트	24.79%	-	-
10	스테아린산마그네슘	1.5%	-	-
11	이산화규소	1%	-	-
12	히드록시프로필에틸셀룰로스	0.5%	-	코팅기제
13	글리세린	0.05%	-	코팅기제

2-4-5-3. 파바톤콩잎 추출물의 임상용샘플(파바톤콩잎/플라시보) 품질관리

- 파바톤 콩잎 추출물의 임상용 샘플 품질관리 및 안정성 검사를 위해 2018. 05. 04일 시험용 샘플을 확보하여 품질관리 및 안정성 검사(가속시험 및 장기보존시험)를 진행하였으며, 시험방법은 식품의약품안전처 고시 제 2016-154호에 따라 각 30g씩 취한 후 식품공전방법 및 건강기능식품공전에 해당되는 식품유형의 규격 및 기준에 따라 봉해도, 대장균군, 납, 카드뮴, 총비소, 총수은 실험을 진행하였음.
- 봉해도의 실험방법은 보조판을 넣어 시료의 잔류물이 유리관내 없어야 하며, 피막, 해면상의 물질, 연질의 물질 및 니상의 물질은 약간 있는 현상으로 60분 이내에 봉해되는 과정을 측정하였음.
- 납, 카드뮴, 총비소 관련 실험은 건강기능식품공전 방법에 따라, 표준품인 Quality Control Standard 21용액을 사용하며, 검액은 시료 일정량(0.1~0.5g)을 질산 10ml를 가하여 Microwave digestion system에 넣어 분해한 후 측정하고, 총수은은 수은분석기를 이용하여 표준검량 및 검액조제하여 실험하였음. 대장균군은 식품공전방법인 BGLB배지법으로 측정함.

표. 식품공전 식품유형

식품유형	정의
과자류_ 캔디류	식물성원료나, 당류, 당알코올, 앙금등을 주원료로 하여 이에 식품 또는 식품첨가물을 가하여 성형 등 가공한 것으로 사탕, 캐러멜, 양갱, 젤리 등을 말한다.

표. 납 및 카드뮴에 대한 분석장비 및 표준품 정보

분석장비 정보			표준품 정보	
분석기기명	ICP-MS	마이크로웨이브	표준품명	Quality Control Standard 21
제조처	Perkin Elmer	Anton paar	제조처	Perkin Elmer

표. 총수은에 대한 분석장비 및 표준품 정보

분석장비 정보		표준품 정보	
분석기기명	수은분석기	표준품명	Mercury Standard Solution
제조처	Mile Stone	제조처	Kanto Chemical



[ICP-MS]

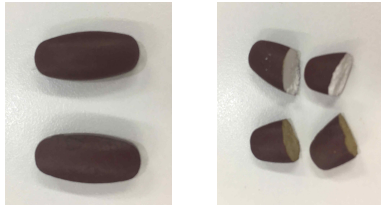
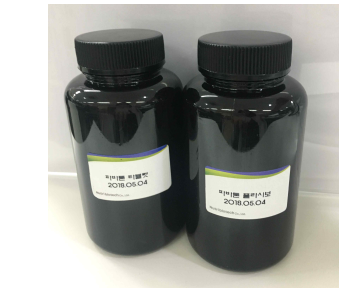


[마이크로웨이브]



[수은분석기DMA-80]

그림. 실험에 사용된 분석장비((주)코스맥스엔비티(주)_이천공장)



[임상용샘플(위_플라시보,아래_파바톤콩잎)]

[미생물 및 봉해도 실험]

그림. 미생물 및 봉해도 실험장면 (코스맥스엔비티(주)_이천공장)

- 파바톤콩잎 임상용샘플의 미생물 및 중금속 검사는 식품공전 규격 및 기준에 준하여 실험하였고, 그 결과는 아래표에서 나타나듯이, 모두 적합하게 측정되었음

표. 파바톤 콩잎 임상용샘플(플라시보, 파바톤콩잎) 품질관리 검사 규격 및 기준

시험항목	플라시보	파바톤 콩잎
성상	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 탁한 황갈색의 제피정제	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 탁한 황갈색의 제피정제
봉해도	60분 이내	60분 이내
대장균군	음성	음성
납(mg/kg)	1.0이하	1.0이하
카드뮴(mg/kg)	1.0이하	1.0이하
총비소(mg/kg)	1.0이하	1.0이하
총수은(mg/kg)	1.0이하	1.0이하

표. 파바톤 콩잎 임상용샘플(플라시보, 파바톤콩잎) 품질관리 검사 규격 및 기준

시험항목	규격 및 기준	플라시보	파바톤콩잎
성상	적합	적합	적합
봉해도	60분 이내	적합 (4'05")	적합 (10'13")
대장균군	음성	음성	음성
납(mg/kg)	1.0이하	0.20	0.28
카드뮴(mg/kg)	1.0이하	0.00	0.00
총비소(mg/kg)	1.0이하	0.08	0.02
총수은(mg/kg)	1.0이하	0.05	0.12

2-4-5-4. 파바톤콩잎 추출물의 임상용샘플(파바톤콩잎/플라시보) 안정성검사

- 안정성 검사 중 장기보존 및 가속실험을 위해 온·습도 (장기보존 : $30\pm 2^{\circ}\text{C}$, $65\pm 5\%$ RH, 가속실험 : $40\pm 2^{\circ}\text{C}$, $75\pm 5\%$ RH)에 해당되는 항온·항습기에 각 샘플을 보관 후, 해당되는 실험기간에 따라 안정성 검사를 진행하였음.
- 식품공전 및 기능성식품공전에 명시된 각 해당되는 항목으로 분석을 진행하였으며, 시험항목 중 납, 카드뮴은 경시적으로 변화가 없는 것으로 판단되어, 초기/말기에만 실험하였으며, 정상, 붕해도, 대장균군은 유의성을 고려하여 매 회 차 실험하였음.

표. 파바톤 콩잎 임상용샘플(플라시보, 파바톤콩잎) 안정성(장기보존, 가속실험) 검사 조건

구분	안정성 검사	
	장기보존	가속실험
시험보관조건	$30\pm 2^{\circ}\text{C}$, $65\pm 5\%$ RH	$40\pm 2^{\circ}\text{C}$, $75\pm 5\%$ RH
허가보관조건	항온항습 1호기	항온항습 2호기
시험기간	18개월	6개월
장기보존	Initial(0), 3, 6, 9, 12, 18개월	Initial(0), 2, 4, 6개월
실제분석기간	05(2018년), 08, 11, 02(2019년), 05, 11	05(2018년), 07, 09, 11
당사규격(타블렛)	정상, 붕해도, 대장균군, 납, 카드뮴, 총비소, 총수은	



< 안정성검사보관실_항온 항습기 >

표. 파바톤 콩잎 임상용샘플(플라시보, 파바톤콩잎) 안정성(장기보존, 가속실험) 검사 규격 및 기준

시험항목	플라시보	파바톤 콩잎
정상	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 탁한 황갈색의 제피정제	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 탁한 황갈색의 제피정제
붕해도	60분 이내	60분 이내
대장균군	음성	음성
납(mg/kg)	1.0이하	1.0이하
카드뮴(mg/kg)	1.0이하	1.0이하
총비소(mg/kg)	1.0이하	1.0이하
총수은(mg/kg)	1.0이하	1.0이하

- 아래표에서 나타나듯이, 파바톤 임상용(플라시보, 파바톤콩잎)의 안정성 검사를 진행하였으며, 기준 및 규격에 모두 적합하게 실험결과를 나타냈으며, 잔여기간동안 계속적으로 실험할 예정이다.

표. 파바톤 콩잎 임상용샘플(플라시보, 파바톤콩잎) 안정성(장기보존, 가속실험) 검사 결과

구분	시험항목	규격 및 기준	initial	장기보존(Month)					가속실험(Month)			
			0 (1805)	3 (1808)	6 (1811)	9 (1902)	12 (1905)	18 (1911)	2 (1807)	4 (1809)	6 (1811)	
플라시보	성상	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합		적합	적합	적합
	붕해도	60분 이내	적합 (4' 05")	적합 (5' 51")	적합 (8' 20")	적합 (7' 50")	적합 (9' 10")		적합 (5' 12")	적합 (8' 03")	적합 (8' 53")	
	대장균군	음성	음성	음성	음성	음성	음성		음성	음성	음성	
	납(mg/kg)	1.0이하	0.20	-	-	-	-		-	-	0.03	
	카드뮴(mg/kg)	1.0이하	0.00	-	-	-	-		-	-	0.00	
	총비소(mg/kg)	1.0이하	0.08	-	-	-	-		-	-	0.00	
	총수은(mg/kg)	1.0이하	0.05	-	-	-	-		-	-	0.00	
파바톤콩잎	성상	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합		적합	적합	적합
	붕해도	60분 이내	적합 (10' 13")	적합 (14' 07")	적합 (15' 22")	적합 (15' 50")	적합 (14' 38")		적합 (15' 03")	적합 (18' 36")	적합 (17' 30")	
	대장균군	음성	음성	음성	음성	음성	음성		음성	음성	음성	
	납(mg/kg)	1.0이하	0.28	-	-	-	-		-	-	0.02	
	카드뮴(mg/kg)	1.0이하	0.00	-	-	-	-		-	-	0.00	
	총비소(mg/kg)	1.0이하	0.02	-	-	-	-		-	-	0.03	
	총수은(mg/kg)	1.0이하	0.12	-	-	-	-		-	-	0.00	

2-4-5-4. 파바톤콩잎 추출물의 건강기능식품(제형_타블렛) 품질관리

- 파바톤콩잎 추출물 건강기능식품(타블렛)의 미생물, 중금속 검사, 5대영양소 및 표시사항 분석을 실시하였음. 건강기능식품용으로 품목제조보고를 등록하기 위해 규격 및 표시사항(비타민D) 및 지표물질인 Daidzin/Genistin은 외부기관 의뢰((사)한국건강기능식품협회부설 한국기능식품연구원)하였으며, 그 외 5대영양소, 품질관리 및 안정성 검사는 당사에서 진행함
- 아래 그림에서 나타나듯이, 파바톤 콩잎 건강기능식품 타블렛 제형의 5대 영양소 분석 및 미생물, 중금속검사를 위해 2019. 01. 23일 제품생산을 통해 품질관리 시험용 샘플 확보함
- 5대 영양소 분석은 식품공전 고시 제 2016-154호 일반성분시험법으로 각 샘플 50g을 취한 후 실험을 진행하였으며, 미생물 및 중금속검사는 임상용샘플의 품질관리에서 진행된 동일한 방법으로 실험함



2019.01.23 시제품 생산

그림. 파바톤 콩잎 추출물 건강기능식품(타블렛) 5대영양소 및 QC관리(안정성 검사)용 샘플 시생산 (2019. 01. 23)

- 파바톤콩잎 타블렛 제품의 미생물 및 중금속 검사는 식품공전 규격 및 기준에 준하여 실험하였고, 결과는 모두 적합하게 측정되었으며, 5대영양소 및 표시기준함량은 아래표와 같음.

표. 파바톤 콩잎추출물 건강기능식품(타블렛) 지표물질 측정 결과 (한국기능식품연구원에서 실험한 데이터)

시험항목	시험 검사 결과	비고
Daidzin (mg/g)	5.39	-
Genistin (mg/g)	3.62	-

* 외부기관((사)한국건강기능식품협회부설 한국기능식품연구원) 의뢰

표. 파바톤 콩잎추출물 건강기능식품(타블렛) 미생물 및 중금속 검사결과 (식품공전 규격 및 기준에 의함)

시험항목	규격 및 기준 (타블렛)	검사결과
성상	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 탁한 황갈색의 제피형태	적합
붕해도	60분 이내	적합
대장균군	음성	음성
납(mg/kg)	10이하	0.23
카드뮴(mg/kg)	10이하	0.01
총비소(mg/kg)	10이하	0.09
총수은(mg/kg)	10이하	0.00

표. 파바톤 콩잎 추출물 건강기능식품(타블렛) 5대영양소 및 표시 함량 결과

구분	파바톤 콩잎 추출물 건강기능식품(타블렛)
열량(kcal/100g)	325.66
탄수화물(g/100g)	70.01
조단백질(g/100g)	11.00
조지방(g/100g)	0.18
나트륨(mg/100g)	37.92
*비타민 D(표시량의 80~180%)	120%(12ug/2800mg)

2-4-5-6. 파바톤콩잎 추출물의 건강기능식품(타블렛) 포장형태별 안정성 검사

- 파바톤 콩잎 추출물의 건강기능식품(타블렛) 포장형태(HDPE+실리카겔 / Alu-Alu형태)에 따른 안정성 검사를 위해 2018. 08. 23일 예비실험을 위해 시험용 샘플을 확보하여 예비 안정성 검사를 진행하였음.
- 제형연구에서 예비실험을 통해 HDPE+실리카겔 포장에서는 가혹조건(40±5℃ 75%RH)에서 2주동안 색 및 모양형태 변형 등을 나타내어 외관/성상에서 색 및 모양이 변형되어, 포장의 중요성을 확인하였음.
- 따라서, HDPE+실리카겔 조건에서의 안정성 검사는 가속조건에서의 성상 및 외관에서 제형의 변형이 확인되어, 실온조건에서의 안정성 검사만 장기적으로 진행하였음. Alu-Alu 포장형태의 제품은 가속실험 및 장기보존실험 두 가지 조건에서 안정성 검사를 진행하였음.
- 포장형태별 안정성 검사는 HDPE+실리카겔 형태 병포장(2018.10.19.) 및 Alu-Alu 포장은 실험샘플량 부족으로 인해 두차례에 걸쳐(2018.12.26 / 2019.01.24) 각각 생산하여 아래와 같이 안정성 검사를 진행하였음.
- 시험방법은 식품의약품안전처 고시 제 2016-154호에 따라 각 30g씩 취한 후 식품공전방법 및 건강기능식품공전에 해당되는 식품유형의 규격 및 기준에 따라 봉해도, 대장균군, 납, 카드뮴, 총비소, 총수은 실험을 진행하였으며, 각각의 방법은 위에서 기술된 방법과 동일함.

표. 식품공전 식품유형

식품유형	정의
건강기능식품	식물성원료나, 당류, 당알코올, 양금등을 주원료로 하여 이에 식품 또는 식품첨가물을 가하여 성형 등 가공한 것으로 사탕, 캐러멜, 양갱, 젤리 등을 말한다.

표. 포장유형에 따른 안정성 검사

구분	HDPE 병+실리카겔	Alu-Alu (PTP)포장
특징	<p>고밀도 폴리에틸렌 (High-density polyethylene)</p> <ul style="list-style-type: none"> · 밀도에 따라 저밀도 폴리에틸렌과 고밀도 폴리에틸렌으로 구별 · 비중은 0.94~0.96으로 반투명 결정성 · 결정화도가 높기 때문에 강성이 있고 충격에 강하며 내한성도 양호해서 각종 용기, 플라스틱 상자 등에 많이 사용되며 상하수도 파이프, 쇼핑백 등에도 사용 · 전기 특성이 뛰어나고 내 부식성도 좋음 	<p>PIP(Press Through Pack or Push Through Pack)</p> <ul style="list-style-type: none"> · 알루미늄 포일(두께 15-20 마이크로미터) 만들어진 뚜껑 필름을 반대편의 용기 필름에서 눌러 내용물을 밀어내어 알루미늄 포일을 찢어서 사용하는 포장형태 · 높은 방습성, 습기, 산소 및 기타 가스와 자외선에 대한 높은 차단성



<HDPE+실리카겔 형태 병 포장_2018.10.19>



< Alu-Alu 포장_2018.12.26 / 2019.01.24 >

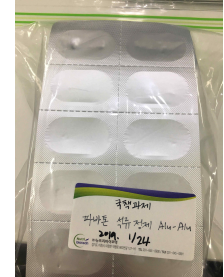


그림. 포장형태에 따른 안정성검사용 샘플

- 안정성 검사 중 장기보존 및 가속실험을 위해 온·습도 (장기보존 : $30\pm 2^{\circ}\text{C}$, $65\pm 5\%$ RH, 가속실험 : $40\pm 2^{\circ}\text{C}$, $75\pm 5\%$ RH)에 해당되는 항온·항습기에 각 샘플을 보관 후, 해당되는 실험기간에 따라 안정성 검사를 진행하였음.
- 식품공전 및 기능성식품공전에 명시된 각 해당되는 항목으로 분석을 진행하였으며, 시험항목 중 납, 카드뮴은 경시적으로 변화가 없는 것으로 판단되어, 초기/말기에만 실험하였으며, 성상, 붕해도, 대장균군은 유의성을 고려하여 매 회 차 실험하였음.

표. 파바톤 콩잎 추출물 건강기능식품 제형연구(타블렛) 안정성(장기보존, 가속실험) 검사 조건

구분	안정성 검사	
	장기보존	가속실험
시험보관조건	$30\pm 2^{\circ}\text{C}$, $65\pm 5\%$ RH	$40\pm 2^{\circ}\text{C}$, $75\pm 5\%$ RH
허가보관조건	항온항습 1호기	항온항습 2호기
시험기간	18개월	6개월
장기보존	Initial (0), 3, 6, 9, 12, 18개월	Initial (0), 2, 4, 6개월
실제 분석일	HDPE+실리카겔	10(18년), 01(19년), 04, 07, 10, 04(20년)
	Alu-Alu포장 (1,2차생산)	12_1차생산 (0M) 01_2차생산, 04, 07, 10, 01(20년), 07(20년) (0M, 3, 6, 9, 12, 18M)
당사규격(타블렛)	성상, 붕해도, 대장균군, 납, 카드뮴, 총비소, 총수은	

표. 파바톤 콩잎 추출물 건강기능식품 제형연구(타블렛) 안정성(장기보존, 가속실험) 검사 규격 및 기준

시험항목	파바톤 콩잎
성상	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 탁한 황갈색의 제피정제
붕해도	60분 이내
대장균군	음성
납(mg/kg)	1.0이하
카드뮴(mg/kg)	1.0이하
총비소(mg/kg)	1.0이하
총수은(mg/kg)	1.0이하

- 아래표에서 나타나듯이, 파바톤 콩잎 추출물 건강기능식품 제형연구(타블렛)의 안정성 검사를 진행하였으며, 계속적으로 실험할 예정입니다.

표. 파바톤 콩잎 추출물 건강기능식품 제형연구(타블렛) HDPE+실리카겔 포장형태에 따른 안정성(장기보존) 검사 결과

구분 (포장형태)	시험항목	규격 및 기준	initial	장기보존(Month)				
			0 (1810)	3 (1901)	6 (1904)	9 (1907)	12 (1910)	18 (2004)
파바톤콩잎_ 타블렛(HDPE+ 실리카겔)	성상	적합	적합	적합	적합	적합		
	붕해도	60분 이내	적합 (7'30")	적합 (7'28")	적합 (7'20")	적합 (7'24")		
	대장균군	음성	음성	음성	음성	음성		
	납(mg/kg)	1.0이하	0.23	-	-	-		
	카드뮴(mg/kg)	1.0이하	0.01	-	-	-		
	총비소(mg/kg)	1.0이하	0.09	-	-	-		
	총수은(mg/kg)	1.0이하	0.00	-	-	-		

* 포장형태에 따른 예비실험으로 인해 이미 HDPE+실리카겔의 가속조건외 예비실험을 통해 안정성을 확인하여 장기보존의 안정성 검사만 진행함.

표. 파바톤 콩잎 추출물 건강기능식품 제형연구(타블렛) Alu-Alu 포장형태에 따른 안정성(장기보존, 가속실험) 검사 결과

구분 (포장형태)	시험항목	규격 및 기준	장기보존(Month)					가속실험(Month)				
			0 (1901)	3 (1904)	6 (1907)	9 (1910)	12 (2001)	18 (2007)	0 (1812)	2 (1903)	4 (1905)	6 (1906)
파바톤 콩잎_ 타블렛 (Alu-Alu)	성상	적합	적합	적합	적합				적합	적합	적합	적합
	붕해도	60분 이내	적합 (5'21")	적합 (5'45")	적합 (5'22")				적합 (4'55")	적합 (5'45")	적합 (5'30")	적합 (5'20")
	대장균군	음성	음성	음성	음성				음성	음성	음성	음성
	납(mg/kg)	1.0이하	0.03	-	-				0.07	-	-	0.03
	카드뮴(mg/kg)	1.0이하	0.00	-	-				0.01	-	-	0.00
	총비소(mg/kg)	1.0이하	0.04	-	-				0.03	-	-	0.04
	총수은(mg/kg)	1.0이하	0.00	-	-				0.00	-	-	0.00

* 1차 생산(18.12) : 0M / 6M진행(가속실험) 샘플량 부족으로 인해 2단계만 우선 실험 적용

* 2차 생산(19.01) : 장기보존 / 가속실험 단계별 실험 적용

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

- 1) 일반콩잎을 식물성에스트로겐이 고함유된 파바톤콩잎으로 생산하는 대사체농업(Metabolite Farming) 기술을 완성하고, 2) 독점권이 확보된 원천생물소재인 파바톤콩잎을 이용하여 Inner & Outer Beauty 제품 및 여성 갱년기용 식의약 제품을 개발함. 3) 또한, 개발된 파바톤콩잎은 기술이전 및 산업화를 달성함. 4) 사업계획서 제출시 서약한 SCI 학술논문 10편 및 특허 7건 5) 여성 갱년기 완화용 개별인증형 제품개발

3-2. 목표 달성여부(98%)

○ 파바톤콩잎 생산기술 개발(100%)

- 생산관련 대사체 농업기술을 한국(3건), 미국(1건), 일본(1건)을 등록완료하고, 중국(1건) 및 유럽(1건)은 진행중으로 관련기술의 독점권 확보
- 생산관련기술을 *J. Agr. Food Chem.* 2016(상위 5%)에 출판함으로 접근방법의 과학성 입증

○ 파바톤콩잎의 생물학적 기능 검증(100%)

- 파바톤콩잎 추출물의 뼈건강활성, 복부지방감소, 간지방 축적완화 등 여성갱년기 관련 기능을 동물실험으로 검증완료함
- 파바톤콩잎 추출물의 갱년기 여성에서 주로 나타나는 콜라겐 분해로 인한 피부손상 개선 기능을 동물실험으로 검증완료함
- 생물학적 기능 결과는 *J. Funct. Food.* 2018(상위 12%) 출판함으로 접근방법의 과학성 입증

○ SCI논문 및 지적재산권 출원(100%)

- JCR 10%이내 논문 4편, 20%이내 논문 2편, 30%이내 논문 3편, 30~50% 논문 5편으로 총 14편을 출판 완료함
- 특허 출원 9건을 완료하였고, 이들 중 5건을 등록(국제 2건 포함) 완료함

○ 여성갱년기용 개별인증형 제품개발(85%)

- 파바톤콩잎의 추출 및 분말화 등 원료 표준화 완료
- 표준화된 원료를 이용한 제품개발 완료
- 부산대학교 한방병원에서 진행중

○ 파바톤콩잎의 기술이전 및 산업화(100%)

- 기술이전1: (주)제이씨엔팜(갱년기제품, 파바톤콩잎생산), 기술료 10억(선급금 2억)
- 기술이전2: (주)롯데정밀화학(피부미용화장품, 이너뷰티), 기술료 6억(선급금 1.5억)

3-3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

파바톤콩잎 추출물의 개별인증을 위한 인체시험을 2018년 5월경에 시작하여 2019년 8월에 완료예정으로 추진하였으나 갱년기 적용에 대한 식약처 가이드라인 강화 및 인체시험군의 모집 및 탈락 등으로 3개월 연장된 11월경에 완료될 것으로 예상됨

4. 연구결과의 활용 계획 등

- 기술이전 업체인 제이씨엔팜에서 금년말로 예상되는 개별인증을 위한 인체적용시험이 완료되면 본격적인 마케팅을 계획하고 있음
- 기술이전 업체인 롯데 파인케미컬에서는 파바톤이라는 브랜드명으로 화장품 개발을 완료하여 출시단계에 있으나 기업의 내부사정으로 잠정 중단된 상태
- 전체적으로는 2020년부터 사업화 및 고용인력 창출이 활성화 될 것으로 예상됨
- 4차년도 연구에서 파바톤콩잎에 에테폰 수용액 처리하여 노지(필드)에서 생산방법을 개선하고자 스마트챔버에서 에틸렌을 처리하는 공정에 부분적으로 성공하였다. 추가연구를 통해 본 기술의 완성도를 높여 케미컬 프리(chemical free) 파바톤을 생산하여 소재의 고급화를 달성할 것임
- 파바톤콩잎의 새로운기능을 규명하는 후속연구를 수행할 것이다. 특히 가능성이 높은 뇌기능 및 비만관련 연구를 수행하여 새로운 가치를 창출할 것임

<사업화의 애로사항>

파바톤콩잎 생산에 필연적으로 요구되는 재배, 처리, 세척, 건조 등을 효율적으로 진행하기 위해서는 기업에서 일정 수준의 관련 인프라 투자가 요구되는데 현재까지는 한계가 있음

붙임. 참고문헌

- 질병관리본부, 2010, 2010 국민건강통계 국민건강영양조사 제 5기 1차년도
- 보건복지부, 2010, 2010년 일반건강검진 및 생애전환기 건강검진 자료와 그 수검자의 진료자료
- 식품과학회 대두가공이용분과, 2015, 콩 성분의 여성건강에 관한 최신연구
- 식품의약품안전처, 2013, 2013년 건강기능식품 생산실적
- 이선미, 윤영덕, 현경래, 2012, 건강위험요인으로 인한 건강보험 진료비 지출분석
- 질병관리본부, 2010, 2010 국민건강통계 국민건강영양조사 제 5기 1차년도
- 한국건강기능식품협회, 2018, 2018 건강기능식품 시장현황 및 소비자 실태조사
- (재)춘천바이오산업진흥원, 2018, 2018 국내 건강기능식품 시장규모 및 동향
- Behloul, N., Wu, G., 2013. Genistein: A promising therapeutic agent for obesity and diabetes treatment. *Eur. J. Pharmacol.*
- Campbell, S.E., Mehan, K.A., Tunstall, R.J., Febbraio, M.A., Cameron-Smith, D., 2003. 17β -Estradiol upregulates the expression of peroxisome proliferator-activated receptor α and lipid oxidative genes in skeletal muscle. *J. Mol. Endocrinol.*
- Chang, W.C., Wu, J.S.B., Chen, C.W., Kuo, P.L., Chien, H.M., Wang, Y.T., Shen, S.C., 2015. Protective effect of vanillic acid against hyperinsulinemia, hyperglycemia and hyperlipidemia via alleviating hepatic insulin resistance and inflammation in High-Fat Diet (HFD)-fed rats. *Nutrients.*
- Cheng, L., Zhou, S., Zhao, Y., Sun, Y., Xu, Z., Yuan, B., Chen, X., 2018. Tanshinone IIA attenuates osteoclastogenesis in ovariectomized mice by inactivating NF- κ B and Akt signaling pathways. *Am. J. Transl. Res.*
- Fraga, C.G., 2009. Plant Phenolics and Human Health: Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology, *Plant Phenolics and Human Health: Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology.*
- Hashimoto, T., Cook, W.S., Qi, C., Yeldandi, A. V., Reddy, J.K., Rao, M.S., 2000. Defect in peroxisome proliferator-activated receptor α -inducible fatty acid oxidation determines the severity of hepatic steatosis in response to fasting. *J. Biol. Chem.*
- Hou, J.M., Xue, Y., Lin, Q.M., 2012. Bovine lactoferrin improves bone mass and microstructure in ovariectomized rats via OPG/RANKL/RANK pathway. *Acta Pharmacol. Sin.*
- Husain, D., Khanna, K., Puri, S., Haghizadeh, M., 2015. Supplementation of Soy Isoflavones

Improved Sex Hormones, Blood Pressure, and Postmenopausal Symptoms. *J. Am. Coll. Nutr.*

- Inoue, M., Ohtake, T., Motomura, W., Takahashi, N., Hosoki, Y., Miyoshi, S., Suzuki, Y., Saito, H., Kohgo, Y., Okumura, T., 2005. Increased expression of PPAR γ in high fat diet-induced liver steatosis in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*
- Jenis, J., Kim, J.Y., Uddin, Z., Song, Y.H., Lee, H.H., Park, K.H., 2017. Phytochemical profile and angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity of *Limonium michelsonii* Lincz. *J. Nat. Med.*
- Kim, J.Y., Wang, Y., Song, Y.H., Uddin, Z., Li, Z.P., Ban, Y.J., Park, K.H., 2018. Antioxidant activities of phenolic metabolites from *flemingia philippinensis* Merr. et rolfe and their application to DNA damage protection. *Molecules.*
- Kim, J.Y., Wang, Y., Uddin, Z., Song, Y.H., Li, Z.P., Jenis, J., Park, K.H., 2018. Competitive neutrophil elastase inhibitory isoflavones from the roots of *Flemingia philippinensis*. *Bioorg. Chem.*
- Lee, J.H., Hwang, C.E., Son, K.S., Cho, K.M., 2019. Comparisons of nutritional constituents in soybeans during solid state fermentation times and screening for their glucosidase enzymes and antioxidant properties. *Food Chem.*
- Lee, M.Y., Kim, H.Y., Singh, D., Yeo, S.H., Baek, S.Y., Park, Y.K., Lee, C.H., 2016. Metabolite profiling reveals the effect of dietary *Rubus coreanus* vinegar on ovariectomy-induced osteoporosis in a rat model. *Molecules.*
- Li, H., Kim, U.H., Yoon, J.H., Ji, H.S., Park, H.M., Park, H.Y., Jeong, T.S., 2019. Suppression of Hyperglycemia and Hepatic Steatosis by Black-Soybean-Leaf Extract via Enhanced Adiponectin-Receptor Signaling and AMPK Activation. *J. Agric. Food Chem.*
- Li, Z.P., Lee, H.H., Uddin, Z., Song, Y.H., Park, K.H., 2018. Caged xanthenes displaying protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) inhibition from *Cratoxylum cochinchinense*. *Bioorg. Chem.*
- Li, Z.P., Song, Y.H., Uddin, Z., Wang, Y., Park, K.H., 2018. Inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) and α -glucosidase by xanthenes from *Cratoxylum cochinchinense*, and their kinetic characterization. *Bioorganic Med. Chem.*
- Lu, Y., An, Y., Lv, C., Ma, W., Xi, Y., Xiao, R., 2018. Dietary soybean isoflavones in Alzheimer's disease prevention. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.*
- Moldes, C.A., Cantarelli, M.A., Camiña, J.M., Tsai, S.M., Azevedo, R.A., 2017. Changes in Amino Acid Profile in Roots of Glyphosate Resistant and Susceptible Soybean

(Glycine max) Induced by Foliar Glyphosate Application. *J. Agric. Food Chem.*

- Nazrun, A.S., Norazlina, M., Norliza, M., Nirwana, S.I., 2012. The anti-inflammatory role of vitamin e in prevention of osteoporosis. *Adv. Pharmacol. Sci.*
- Paquette, A., Chapados, N.A., Bergeron, R., Lavoie, J.M., 2009. Fatty acid oxidation is decreased in the liver of ovariectomized rats. *Horm. Metab. Res.*
- Paquette, A., Wang, D., Jankowski, M., Gutkowska, J., Lavoie, J.M., 2008. Effects of ovariectomy on PPAR α , SREBP-1c, and SCD-1 gene expression in the rat liver. *Menopause.*
- Qiao, Y., Sun, J., Xia, S., Li, L., Li, Y., Wang, P., Shi, Y., Le, G., 2015. Effects of different *Lactobacillus reuteri* on inflammatory and fat storage in high-fat diet-induced obesity mice model. *J. Funct. Foods.*
- Seidlova-Wuttke, D., Jarry, H., Wuttke, W., 2013. Plant derived alternatives for hormone replacement therapy (HRT). *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.*
- Stocco, B., Toledo, K.A., Fumagalli, H.F., Bianchini, F.J., Fortes, V.S., Fonseca, M.J. V., Tolo, M.R.T., 2015. Biotransformed soybean extract induces cell death of estrogen-dependent breast cancer cells by modulation of apoptotic proteins. *Nutr. Cancer.*
- Song, Y.H., Kim, D.W., Curtis-Long, M.J., Park, C., Son, M., Kim, J.Y., Yuk, H.J., Lee, K.W., Park, K.H., 2016. Cinnamic acid amides from *Tribulus terrestris* displaying uncompetitive α -glucosidase inhibition. *Eur. J. Med. Chem.*
- Song, Y.H., Uddin, Z., Jin, Y.M., Li, Z., Curtis-Long, M.J., Kim, K.D., Cho, J.K., Park, K.H., 2017. Inhibition of protein tyrosine phosphatase (PTP1B) and α -glucosidase by geranylated flavonoids from *Paulownia tomentosa*. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*
- Tan, X., Song, Y.H., Park, C., Lee, Ki Won, Kim, J.Y., Kim, D.W., Kim, K.D., Lee, Keun Woo, Curtis-Long, M.J., Park, K.H., 2016. Highly potent tyrosinase inhibitor, neorauflavane from *Campylotropis hirtella* and inhibitory mechanism with molecular docking. *Bioorganic Med.*
- Uddin, Z., Song, Y.H., Curtis-Long, M.J., Kim, J.Y., Yuk, H.J., Park, K.H., 2016. Potent bacterial neuraminidase inhibitors, anthraquinone glucosides from *Polygonum cuspidatum* and their inhibitory mechanism. *J. Ethnopharmacol.*
- Uddin, Z., Li, Z., Song, Y.H., Kim, J.Y., Park, K.H., 2017. Visconata: A rare flavonol having long chain fatty acid from *Dodonaea viscosa* which inhibits Human neutrophil elastase (HNE). *Tetrahedron Lett.*

- Uddin, Z., Song, Y.H., Ulla, M., Li, Z., Kim, J.Y., Park, K.H., 2018. Isolation and characterization of protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) inhibitory polyphenolic compounds from *Dodonaea viscosa* and their kinetic analysis. *Front. Chem.*
- Varanasi, U., Chu, R., Chu, S., Espinosa, R., Lebeau, M.M., Reddy, J.K., 1994. Isolation of the human peroxisomal acyl-CoA oxidase gene: Organization, promoter analysis, and chromosomal localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
- Wang, Y., Yuk, H.J., Kim, J.Y., Kim, D.W., Song, Y.H., Tan, X.F., Curtis-Long, M.J., Park, K.H., 2016. Novel chromenedione derivatives displaying inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) from *Flemingia philippinensis*. *Bioorganic Med. Chem. Lett.*
- Wu, T., Qi, X., Liu, Y., Guo, J., Zhu, R., Chen, W., Zheng, X., Yu, T., 2013. Dietary supplementation with purified mulberry (*Morus australis* Poir) anthocyanins suppresses body weight gain in high-fat diet fed C57BL/6 mice. *Food Chem.*
- Xie, C. liang, Kang, S.S., Cho, K.M., Park, K.H., Lee, D.H., 2018. Isoflavone-enriched soybean (*Glycine max*) leaves prevents ovariectomy-induced obesity by enhancing fatty acid oxidation. *J. Funct. Foods.*
- Yuk, H.J., Song, Y.H., Curtis-Long, M.J., Kim, D.W., Woo, S.G., Lee, Y.B., Uddin, Z., Kim, C.Y., Park, K.H., 2016. Ethylene Induced a High Accumulation of Dietary Isoflavones and Expression of Isoflavonoid Biosynthetic Genes in Soybean (*Glycine max*) Leaves. *J. Agric. Food Chem.*
- Yuk, H.J., Lee, J.H., Curtis-Long, M.J., Lee, J.W., Kim, Y.S., Ryu, H.W., Park, C.G., Jeong, T.S., Park, K.H., 2011. The most abundant polyphenol of soy leaves, coumestrol, displays potent α -glucosidase inhibitory activity. *Food Chem.*
- Zhang, Y., Li, Q., Wan, H.Y., Xiao, H.H., Lai, W.P., Yao, X.S., Wong, M.S., 2011. Study of the mechanisms by which *Sambucus williamsii* HANCE extract exert protective effects against ovariectomy-induced osteoporosis in vivo. *Osteoporos. Int.*

<뒷면지>

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.