(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2013 년 6 월 20 일 (20.06.2013)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2013/089346 A1

(51) 국제특허분류:
A23L 1/29 (2006.01) *A61K 31/785* (2006.01)
A61K 31/765 (2006.01) *A61K 31/352* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2012/008990

(22) 국제출원일: 2012 년 10 월 30 일 (30.10.2012)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2011-0136064 2011 년 12 월 16 일 (16.12.2011) KR

(71) 출원인: **계명대학교 산학협력단 (INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION KEIMYUNG UNIVERSITY)** [KR/KR]; 704-701 대구광역시 달서구 달구벌대로 1095 계명대학교 성서캠퍼스 대학원 300 호, Daegu (KR).

(72) 발명자: **김배환 (KIM, Bae Hwan)**; 706-040 대구광역시 수성구 청수로 213, 캐슬골드파크 1116 동 503 호, Daegu (KR). **이은희 (LEE, Eun Hei)**; 642-915 경상남도 창원시 성산구 동산로 48 번길 79, 성원아파트 504 동 503 호, Gyeongsangnam-do (KR). **이삼빈 (LEE, Sam Pin)**; 704-140 대구광역시 달서구 선원로 171, 성서무지개타운 102 동 306 호, Daegu (KR).

(74) 대리인: **양부현 (YANG, Boo-Hyun)**; 151-832 서울특별시 관악구 인헌동 1659-2 청동빌딩 301 호, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

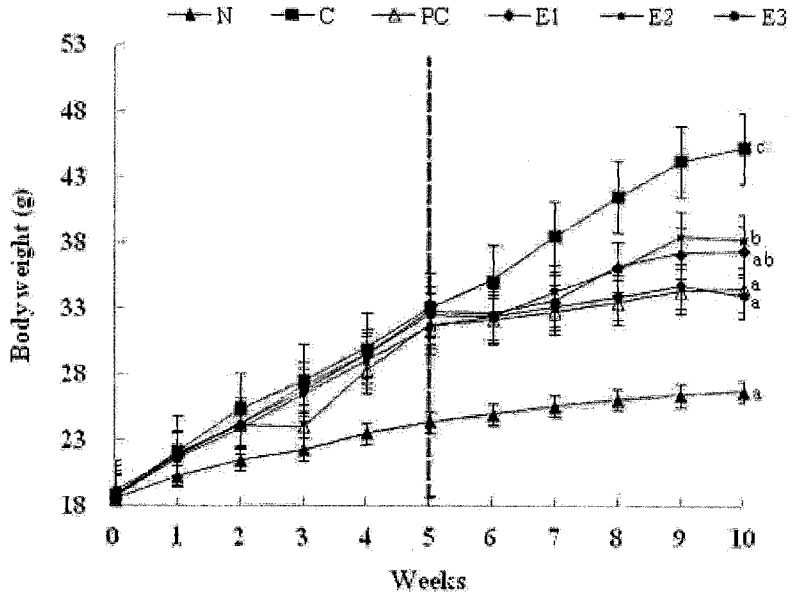
공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

[다음 쪽 계속]

(54) **Title**: COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING OBESITY, DYSLIPIDEMIA, FATTY LIVER OR DIABETES CONTAINING POLY-Γ-GLUTAMIC ACID AND ISOFLAVONE AS ACTIVE INGREDIENTS

(54) **발명의 명칭** : γ-폴리글루탐산 및 아이소플라본을 유효성분으로 포함하는 비만, 이상지방혈증, 지방간 또는 당뇨의 예방 또는 치료용 조성물



(57) **Abstract**: The present invention relates to a composition for preventing, alleviating or treating obesity, dyslipidemia, fatty liver or diabetes containing poly-γ-glutamic acid (γ-PGA) and isoflavone as active ingredients. The present invention provides a novel use of γ-PGA and isoflavone for preventing or treating obesity, dyslipidemia, fatty liver or diabetes. The composition of the present invention is highly effective in preventing, alleviating or treating obesity, hyperlipidemia or fatty liver by improving lipid metabolism and sugar metabolism. The γ-PGA and isoflavone as active ingredients in the composition of the present invention are natural compounds, and thus the composition is safe for the human body.

(57) **요약서**: 본 발명은 γ-PGA(Poly-γ-glutamic acid) 및 아이소플라본을 유효성분으로 포함하는 비만, 이상지방혈증, 지방간 또는 당뇨의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 비만, 이상지방혈증, 지방간 또는

[다음 쪽 계속]

WO 2013/089346 A1

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

당뇨의 예방 또는 치료에 대한 γ-PGA(Poly-γ-glutamic acid) 및 아이소플라본의 신규한 용도를 제시한다. 본 발명의 조성물은 지질대사와 당대사를 개선시킴으로써 비만, 고지혈 또는 지방간의 예방, 개선 또는 치료에 매우 유효하다. 본 발명 조성물에서의 유효성분으로서의 γ-PGA(Poly-γ-glutamic acid) 및 아이소플라본은 천연물이기 때문에 인체에 대하여 안전하다.

【명세서】

【발명의 명칭】

γ-폴리글루탐산 및 아이소플라본을 유효성분으로 포함하는 비만, 이상지방혈증, 지방간 또는 당뇨의 예방 또는 치료용 조성물

【기술분야】

본 발명은 γ-폴리글루탐산 및 아이소플라본을 유효성분으로 포함하는 비만, 이상지방혈증, 지방간 또는 당뇨의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

【배경기술】

2009년 기준으로 우리나라의 비만 환자는 31.9%에 도달했고 전 세계적으로도 증가하고 있는 추세이다(통계청. 2009). 비만은 생활방식의 서구화와 식습관의 변화로 인해 점차 증가하고 있으며 관상 동맥성 심장 질환, 2형 당뇨병, 비알콜성 지방간 및 암과 같은 여러 가지 질병의 발병률을 높이고 있다(Shinji et al. 2007). 또한 비만은 인슐린 저항성, 과 인슐린 혈증, 이상 지혈증, 과 렙틴혈증 및 지방간을 포함하여 여러 대사 변화 동반하는 대사 증후군으로 알려져 있어(Reaven. 2003) 비만의 방지와 치료는 건강 상태의 증진과 관련된다. 식이와 유전적 영향 사이의 상호작용은 대사 장애의 발생에 중요한 역할을 하기 때문에 비만과 결합된 인슐린 저항성과 당뇨병의 예방과 치료를 위해 식이성 접근법에서 최근 몇 년 동안 관심의 대상이 되었다. 비만은 에너지 섭취와 소비 사이의 불균형으로 발생되며 지방분해와 지방산 산화는 체지방 감소의 중요한 기전이다.

고지방이나 고 탄수화물의 장기 섭취는 지방세포 비대와 FFA(Free Fatty Acid)의 과도한 방출을 특징으로 하는 순환 기능 장애를 유도하므로(DeFronzo RA. 2004), 고지방 식이의 장기간 섭취는 비만의 발생을 가속화하게 된다(Buettner et al. 2007). 비만은 지방세포가 기능장애 되면서 간뿐만 아니라 지방조직의 변화를 동반하게 된다.(Unger & Orci. 2001).

지방조직에서 분비되는 사이토카인인 렙틴과 아디포넥틴 지방산 산화를 활성화하여 비만을 예방할 수 있는 잠재적인 메커니즘이다. 비만(ob) 유전자와 그것을 발생시키는 렙틴 발견이후, 지방 조직은 에너지 저장 기관이 뿐만 아니라 다양한 호르몬을 분비하는 내분비 기관으로 알려져 있으며(Yukihiro et al. 2002), 렙틴은 비 지방 조직에서 지질의 축적을 방지하기 뇌하수체에서 음식물 섭취를 조절하고, 지질 침착을 방지하기 위해 말초 조직의 지방산(FA)7 산화를 자극한다(Unger & Orci. 2001). 그러나 고에너지 식이의 만성적 섭취는 렙틴 분비를 증가시키며 렙틴 저항성으로 인한 과렙틴혈증로 인해 간 중성지방(TG)에 대한 FFA의 간 에스테르화(esterification)는 지방간을 형성시키고 과 인슐린혈증과 FA 산화 감소로 인해 증가된 지방합성을 가속화하게 된다. 렙틴은 근육 글루코스 흡수와 지방산 산화를 증가시킴으로써, 지방 위축성 환자와 지방위축 설치류 모델에서 인슐린 민감성을 향상 시킨다고 보고되고 있다(Petersen et al. 2002; Minokoshi et al. 2002).

아디포넥틴은 세포내 지방산의 농도나 지방 acyl-CoA 감소, 인슐린 자극 포도당 유용성을 증가시키며(Pascal Ferre. 2004) 근육에서 포도당 수송을 활성화하기 때문에 대사 작용에서 중요한 amp-activated protein kinase (AMPK)를 활성화 한다(Yamauchi et al. 2002; Tomas et al. 2002). Yamauchi와 Berg은 에디포넥틴이 비만과 당뇨병의 다양한 마우스 모델에서 인슐린 저항성을 개선시킨다고 보고했다(Yamauchi et al.2001; Berg et al. 2001). 또한 AMPK 인산화와 말로닐-CoA 농도를 감소시키는데 말로닐-CoA가 카르나틴 팔미토일트랜스퍼라아제 1(carnitine palmitoyltransferase 1)의 억제하기 때문에, β 산화 지방 아실-CoA 조절하는 효소인 AMPK 활성화는 미토콘드리아에서 지방산의 산화를 증가시킨다(Pascal Ferre. 2004). 간에서 AMPK의 과 발현은 글루코스 합성 저하 때문에 경미한 저혈당증을 유발하고(Foretz et al. 2005), 또한 간에서 AMPK를 과 발현된 마우스는 지방간이 발생되지 않았으며(Ueki et al. 2004 : Foretz M et al. 2005) 지방조직을 감소시켰다(Franckhauser et al. 2008). AMP-액티베이티드 프로테인 키나아제(AMP-activated protein kinase, AMPK)는 세린/트레오닌 키나아제의 일종으로 세포내 에너지 상태를 감지하는 효소로서(Hardie and Hawley. 2001 : Hardie and Carling. 1997), 에너지가 부족한 상황에서

활성화되어 정상 에너지 균형을 회복시키기 위해 ATP를 소비하는 과정(예: 지방산, 콜레스테롤 합성)을 억제하고 ATP를 생산하는 과정(예: 지방산 산화, 해당과정)을 활성화시킨다. 간에서 AMPK의 활성화는 콜레스테롤과 중성지방의 합성, 지질생성이 감소되고 지방산 산화와 케톤생산이 증가되며(Kurth-Kraczk et al. 1999 : Russell et al. 1999) 지방조직에서는 지방분해와 지방생성을 감소시키며 췌장 β세포에서 인슐린 분비를 증가시킨다(Sullivan et al. 1994: Malaisse et al. 1994). 따라서 아데노신 모노포스페이트-액티베이티드 프로테인 키나아제(AMPK)는 세포내 에너지 센서로서 글루코오스와 지질 대사의 조절에서 중심적인 역할을 한다.

지방산 산화의 속도조절 효소인 카르니틴 팔미토일트랜스퍼라아제 1(CPT 1)은 미토콘드리아 안으로 지방산을 이동하기 위해 L-카르니틴에 장쇄 아실-CoA 에스테르화에 촉매 작용을 하며(Shinji et al. 2007) 활성시 식이 유도 비만 마우스의 에너지 소비와 지방산 산화를 증가시킨다는 것을 보여줬다(Thupari et al. 2002).

2형 당뇨병(T2DM)은 간, 지방 조직과 골격근과 같은 말초 조직에서 췌장 베타 세포와 인슐린 저항성으로부터 인슐린 분비 작용의 감손을 특징으로 한 이질적 대사 장애이다(Ward et al. 1984). 2형 당뇨병 환자는 골격근에서 인슐린-스티뮬레이티드 글루코오스-업테이크의 감소가 나타나며 메트포민과 같은 항 당뇨 약품은 일반적으로 글루코오즈-로워링을 이용했고, 로시글리타존과 피오글리타존은 근육에서 글루코오스-업테이크를 증가시켰다. 따라서 근육의 포도당 흡수의 증가는 2형 당뇨병 치료의 중요한 방법이다(LEE et al. 2009). 지방산 (FA)은 또한 높은 ATP/adp 비율로 이어지는 FA β-산화를 증가시키거나 약간의 단백질 키나아제를 활성화함으로써 인슐린 분비를 증가시킨다(Lilia Noriega et al. 2007). 비만 기간 동안, 췌장 β 셀 글루코오스 대사증진, FFA 흡수와 과다생성은 인슐린을 과분비시켰다(Hull et al. 2005 : Shimabukuro et al. 1998 : Zhou et al. 1998).

많은 연구는 비만과 인슐린 저항성이 지방산 산화와 미토콘드리아 기능 장애와 일반적으로 관련된다는 것을 보여줬다(Koves et al. 2008 : Cunningham et al. 2007 : Schieke et al. 2006). 식후 인슐린 분비의 상승과 간 인슐린 민감성의 개선은 leucinetreated RCS10 마우스에서

당뇨병의 혈당 조절과 방지에 기여했다(Kaiying et al. 2010). 따라서 에너지 대사와 미토콘드리아 산화 기능의 개선은 HFD 마우스에서 글루코스-인슐린 항상성의 증진을 위한 중요한 기전일 수 있다.

글루코오스는 중개 수송에 의해서(Elbrink J & Bihler I. 1975) 글루코오스 트랜스포터 분자를 통해 셀에 들어간다(Scheepers A & Joost HG & Schurmann A. 2004). 인슐린-디펜던트 포도당 트랜스포터 GLUT 4는 포도당로부터 지방산 합성을 증가시킨다(Wu et al. 1998). GLUT4의 발현 증가는 혈액의 글루코오스를 낮추고 골격근의 글루코오스 트랜스포트와 글루코오스 유틸리제이션을 증가시켰다(Gibbs et al. 1995). 글루코오스 수송은 골격근에서 인슐린 작용으로 인한 글루코스 유용성의 속도 조절단계로서 이 수송은 스트렙토조토신으로 유도된 당뇨 랫트의 골격근에서 글루코스 수송체인 Glut- 4 과 1에 의해 조정된다(Ziel et al., 1988). 따라서 감소된 Glut-4로 인한 글루코스 수송 장애와 인슐린 스그널링 방해 현상은 인슐린 저항성과 2형 당뇨병의 원인이다.

2형 당뇨병의 40%가 지방간이나 간지방증을 발생시킨다(Browning et al. 2004; Marchesini et al. 2001). PPARγ는 핵 호르몬 수용체 슈퍼패밀리로 보통 지방 세포 분화 인자이고 SREBP-1은 지방합성 인자이며 각각 지방조직에서 인슐린 저항성의 발생과 관련된다(Armando et al. 2005). 식이에서 단백질 타입은 췌장의 인슐린의 분비와 SREBP-1(sterol regulatory element binding protein-1)에 의해 간의 지방합성을 조절할 수 있다(Noriega-Lopez et al. 2007). 또한 SREBP-1c는 지방산 합성에 관련된 유전자의 트랜스크립션을 활성화하며 상승발현은 간에서 지방합성의 비율을 증가시킨다(Armando et al. 2005). 인슐린 저항성 상태에서 SREBP-1c(sterolregulatory element binding protein-1c)의 활성화에 의해 지방간이 발생되며, 저항성 상태에서 높은 인슐린 수치에 반응하여 증가된다(Browning et al. 2004).

설치류에서 PPAR-γ의 특이적 활성화는 단시간에 지방전구세포에서 지방세포로의 분화를 유발한다(Hallakou et al. 1997). 더구나 지방 전구세포 분화는 지방 세포 수를 증가시키므로 PPAR-γ의 활성화는 여러 단계에 작용함으로써 성숙 지방 세포의 지방산 저장을 자극한다(Rosen. et al. 2001).

PPARα는 주로 간에서 지방산 산화 효소를 상승 조절하는 전사 인자이고(Gulick et al. 1994), 간에서 PPAR-α의 활성화는 지방산의 수송과 장쇄 아실-CoA 합성을 유도하며(Motojima et al. 1998.), PPAR-α자극은 인슐린 민감성을 향상시키고 지방과다증과(Guerre et al. 2000) 골격근의 지질 축적을 감소시킨다(Ye et al. 2001).

피토에스트로겐은 에스트라디올(Kuiper et 1997년, 1998년)의 배좌 구조와 유사하기 때문에 양쪽 ER-α와 ER-β을 결합할 수 있고, 표적 조직(Barnes 1998)에서 에스트로겐의 작용과 유사한 비-스테로이드성 화합물이다(Cederroth et al. 2007). 에스트로겐은 직접적으로 지방합성, 지방분해와 지방 세포 발생을 조절하고 간접적으로 식욕이나 에너지 소비를 조절함으로써 지방 조직에 영향을 미친다(Cooke & Naaz 2004). 설치류에 공급된 피토에스트로겐은 피토에스트로겐 제거 식이한 동물과 비교해서 지방 조직을 현저하게 감소시켰고(Lephart et al. 2004), 인간에서 isoflavones 식이는 체중감소와 인슐린 수치감소를 감소시켰다(Goodman-Gruen & Kritz-Silverstein 2001). 또한 마우스 연구에서 아이소플라본류를 포함하는 대두 단백질이 혈장농도와 지방조직의 아디포넥틴 mRNA 발현을 증가시켰으며(Nagasawa et al. 2003), 폐경전 원숭이에 대두를 공급했을 때 혈장 리포프로테인 프로필과 인슐린 민감성을 개선시켰다(Wagner et al. 2002). 이러한 모델들은 지방 조직 생리학에서 에스트로겐 시그널링의 중요성과 식이단백질의 타입이 대사 증후군의 개발을 방지하는데 중요한 역할을 할 수 있다고 제안한다.

γ-PGA는 대두를 원료로 바실러스 서브틸리스의 γ-글루타믹 에시드 합성계에 의해 발효되어 생성되는 점액질 성분인 γ-글루타믹 에시드이다. γ-PGA 수율은 발효방법에 따라 약간의 차이가 있으나 13-17%이며 제조방법이 비슷한 일본 낫토의 수율 0.1-0.8%(Tanimoto et al. 2001)보다 높다. 고콜레스테롤로 유도된 비만마우스에 청국장을 급여했을 때 체중감소 및 혈중 지질개선 효과를 보였으며(Lee et al. 2010; Park & Lee & Yoon. 2006), Kim 등은 청국장을 당뇨쥐에게 급여했을 때 혈당 및 인슐린 농도가 대조군에 비해 유의적으로 낮게 나타나 인슐린 민감도를 개선하고 그 결과 혈중 중성지방과 콜레스테롤 농도를 유의적으로 감소시켰다.

이와 같이 대두를 발효시킨 청국장과 그 원료인 대두나

아이소플라본류에 대한 항 비만효과는 연구되었으나 발효 시 새로이 생성된 생리활성 물질인 γ-PGA에 대한 비만 연구는 거의 전무한 실정이다.

본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

【발명의 내용】

【해결하려는 과제】

본 발명자들은 지질 대사 관련 질환, 특히 비만, 이상지방혈증, 지방간 및 당뇨를 예방 또는 치료할 수 있는 천연물질을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 γ-PGA(Poly-γ-glutamic acid) 및 아이소플라본이 지질의 축적을 감소시키고, 혈액 내 총 콜레스테롤의 함량을 감소시키며, 지방조직의 세포크기를 감소하여 지방중량 및 체중을 감소시키고, 인슐린 민감도 개선을 통해 인슐린 분비를 조절 및 감소시켜 비만, 이상지방혈증, 지방간 및 당뇨의 예방 또는 치료에 매우 유효하다는 것을 규명함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

따라서, 본 발명의 목적은 비만, 이상지방혈증, 지방간 또는 당뇨의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 비만, 이상지방혈증, 지방간 또는 당뇨의 개선용 식품 조성물을 제공하는 데 있다.

본 발명의 또 다른 목적은 비만, 이상지방혈증, 지방간 또는 당뇨의 예방, 치료 또는 개선 방법을 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명 및 청구범위에 의해 보다 명확하게 된다.

【과제의 해결 수단】

본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 γ-PGA(Poly-γ-glutamic acid) 및 아이소플라본을 유효성분으로 포함하는 비만, 이상지방혈증,

지방간 및 당뇨의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 γ-PGA(Poly-γ-glutamic acid) 및 아이소플라본을 유효성분으로 포함하는 비만, 이상지방혈증, 지방간 및 당뇨의 개선용 식품 조성물을 제공한다.

본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 γ-PGA(Poly-γ-glutamic acid) 및 아이소플라본을 유효성분으로 포함하는 조성물의 약제학적 유효량을 객체(subject)에게 투여하는 단계를 포함하는 비만, 이상지방혈증, 지방간 또는 당뇨의 예방, 치료 또는 개선 방법을 제공한다.

본 발명자들은 지질 대사 관련 질환, 특히 비만, 이상지방혈증, 지방간 및 당뇨를 예방 또는 치료할 수 있는 천연물질을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 γ-PGA(Poly-γ-glutamic acid) 및 아이소플라본의 조합이 지질의 축적을 감소시키고, 혈액 내 총 콜레스테롤의 함량을 감소시키며, 지방조직의 세포크기를 감소하여 지방중량 및 체중을 감소시키고, 인슐린 민감도 개선을 통해 인슐린 분비를 조절 및 감소시켜 비만, 이상지방혈증, 지방간 및 당뇨의 예방 또는 치료에 매우 유효하다는 것을 규명하였다.

본 발명의 조성물은 γ-PGA(Poly-γ-glutamic acid) 및 아이소플라본을 유효성분으로 포함한다.

본 명세서에서 사용되는 용어 "γ-PGA(Poly-γ-glutamic acid)"은 아미노산의 일종인 글루탐산의 중합체로써, 글루탐산의 아미노기와 글루탐산의 측쇄의 말단에 있는 카르복실기 사이에 펩타이드 결합이 형성된 글루탐산의 중합체를 의미한다. γ-PGA는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 수득할 수 있으며, 예를 들어 대두를 원료로 하여 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)의 γ-PGA 합성계에 의해 발효되어 생성되는 점액질 성분으로 얻을 수 있다.

본 명세서에서 사용되는 용어 "아이소플라본(Isoflavone)"은 아이소프라바논(isoflavanone), 아이소플라반(isoflavan)과 동시에 이소플라보노이드(isoflavonoids)에 속하는 배당체로써, 콩과, 장미과, 붓꽃과 등의 식물에 널리 분포되어 있다. 특히 본 발명의 원료인 대두 및 청국장에는 게니스테인(genistein). 다이드제인(daidzein),

아세틸게니스테인, 아세틸다이제인 및 글리시테인 (glycitein)등의 아이소플라본을 아글리콘으로 하는 배당체가 포함되어 있다.

본 발명의 γ-PGA 및 아이소플라본의 조합은 인체 내에서 지질 대사를 개선한다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 혈액 내 총 콜레스테롤의 함량을 감소시킨다. 또한, 본 발명의 γ-PGA 및 아이소플라본의 조합은 지방조직의 세포크기를 감소시킨다.

본 발명의 γ-PGA 및 아이소플라본의 조합은 지질 합성에 관여하는 생체분자의 레벨을 감소시킨다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 렙틴(렙틴), 아디포넥틴(adiponectin) 등의 사이토카인의 분비를 조절함으로써 지질대사와 당대사를 개선시킨다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 인슐린 민감도를 개선시켜, 인슐린 저항성을 예방 또는 치료할 수 있다.

본 발명은 대사질환, 특히 비만, 이상지방혈증, 지방간 및 당뇨의 예방 또는 치료에 매우 유효하다.

본 명세서에서 사용되는 용어 "비만(obesity)"은 체내에 지방조직이 과다한 상태를 의미한다. 진단 시 신체비만지수(체질량지수, Body mass index: 체중(kg)을 신장(m)의 제곱으로 나눈 값)가 25 이상이면 비만으로 정의한다. 혈장으로부터 지방세포로 유입된 지방산과 포도당이 에스테르화하여 주로 중성지방의 형태로 축적된다. 이러한 비만으로 인해 당뇨병 및 고지혈증이 생길 가능성이 높아지고, 성기능 장애, 관절염, 담석증 및 심혈관계 질환의 발병 위험이 커진다.

본 명세서에서 사용되는 용어 "이상지방혈증(dyslipidemia)"은 고지혈증을 포함하는 개념으로, 혈액내의 지방수치 증가로 나타나는 고콜레스테롤혈증, 고중성지방혈증, 낮은 HDL-콜레스테롤혈증 외에도 지단백의 대사이상 등의 문제로 나타나는 비정상적 지질 상태를 의미한다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 이상지방혈증 중에서, 고지혈증의 예방 또는 치료에 매우 유효하다.

본 명세서에서 사용되는 용어 "지방간"은 간의 지방대사 장애로 지방이 간세포에 과도한 양으로 축적된 상태를 말하며, 이는 협심증, 심근경색, 뇌졸중, 동맥경화, 지방간 및 췌장염 등과 같은 다양한 질병의 원인이 된다.

본 명세서에서 사용되는 용어 "당뇨"는 포도당-비관용(intolerance)을 초래하는 인슐린의 상대적 또는 절대적 부족으로 특징되는 만성질환을 의미한다. 본 발명에 의해 예방 또는 치료되는 당뇨는 모든 종류의 당뇨병을 포함하며, 예를 들어, 제1형 당뇨, 제2형 당뇨 및 유전성 당뇨를 포함한다. 제1형 당뇨는 인슐린 의존성 당뇨병으로서, β-세포의 파괴에 의해 주로 초래된다. 제2형 당뇨는 인슐린 비의존성 당뇨병으로서, 식사 후 불충분한 인슐린 분비에 의해 초래되거나 또는 인슐린 저항성에 의해 초래된다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 제2형 당뇨 즉 인슐린 저항성의 예방 또는 치료에 매우 유효하다.

본 발명의 조성물은 약제학적 조성물로 제조될 수 있다.

본 발명의 조성물은 (a) 상술한 본 발명의 γ-PGA(Poly-γ-glutamic acid) 및 아이소플라본의 약제학적 유효량; 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물이다. 본 명세서에서 용어 "약제학적 유효량"은 상술한 γ-PGA(Poly-γ-glutamic acid) 및 아이소플라본의 효능 또는 활성을 달성하는 데 충분한 양을 의미한다.

본 발명의 조성물이 약제학적 조성물로 제조되는 경우, 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 *Remington's Pharmaceutical Sciences* (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 바람직하게는 경구 투여 방식으로 적용된다.

본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로,

배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 일반적인 투여량은 성인 기준으로 0.001-1000 mg/kg 범위 내이다.

본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캅셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

본 발명의 조성물은 식품 조성물로 제공될 수 있다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 (a) 상술한 본 γ-PGA(Poly-γ-glutamic acid) 및 아이소플라본의 식품학적 유효량; 및 (b) 식품학적으로 허용되는 담체를 포함하는 식품학적 조성물이다.

본 발명의 조성물이 식품 조성물로 제조되는 경우, 유효성분으로서 γ-PGA(Poly-γ-glutamic acid) 및 아이소플라본뿐만 아니라, 식품 제조시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함하며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제 및 향미제를 포함한다. 상술한 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스, 올리고당 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 사이클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 향미제로서 천연 향미제 [타우마틴, 스테비아 추출물 (예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등]) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 사용할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 식품 조성물이 드링크제로 제조되는 경우에는 본 발명의 γ-PGA(Poly-γ-glutamic acid) 및 아이소플라본 이외에 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙, 두충 추출액, 대추 추출액, 감초 추출액 등을 추가로 포함시킬 수 있다.

본 발명은 γ-PGA(Poly-γ-glutamic acid) 및 아이소플라본을 유효성분으로 포함하는 조성물의 약제학적 유효량을 객체(subject)에게

투여하는 단계를 포함하는 비만, 이상지방혈증, 지방간 또는 당뇨의 예방, 치료 또는 개선 방법을 제공한다.

【발명의 효과】

본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

(a) 본 발명은 비만, 이상지방혈증, 지방간 또는 당뇨의 예방, 개선 또는 치료에 대한 γ-PGA(Poly-γ-glutamic acid) 및 아이소플라본의 신규한 용도를 제시한다.

(b) 본 발명의 조성물은 비만, 이상지방혈증, 지방간 또는 당뇨의 예방, 개선 또는 치료에 매우 유효하다.

(c) 본 발명 조성물에서의 유효성분으로서의 γ-PGA(Poly-γ-glutamic acid) 및 아이소플라본은 천연물이기 때문에 인체에 대하여 안전하다.

【도면의 간단한 설명】

도 1은 전체 실험기간 동안 주수별 체중 변화를 보여주는 그래프이다.

도 2는 고지방식이 유도 비만 쥐의 γ-PGA와 아이소플라본 섭취시 간 조직에서의 조직학적 관찰 결과를 보여주고 있다.

도 3은 고지방식이 유도 비만 쥐의 γ-PGA와 아이소플라본 섭취시 부고환 지방 조직에서의 조직학적 관찰 결과를 보여주고 있다.

도 4는 고지방식이 유도 비만 쥐의 γ-PGA와 아이소플라본 섭취시 부고환조직의 지방세포의 크기를 확인하여 γ-PGA와 아이소플라본의 효과를 보여주는 그래프이다.

도 5는 고지방식이 유도 비만 쥐의 γ-PGA와 아이소플라본 섭취시 부고환조직의 지방세포의 개수를 확인하여 γ-PGA와 아이소플라본의 효과를 보여주는 그래프이다.

도 6은 고지방식이 유도 비만 쥐의 γ-PGA와 아이소플라본 섭취시 간에서의 아디포넥틴의 mRNA 발현 수준을 확인하여 γ-PGA와 아이소플라본의 효과를 보여주는 그래프이다.

도 7은 고지방식이 유도 비만 쥐의 γ-PGA와 아이소플라본 섭취시 간에서의 렙틴의 mRNA 발현 수준을 확인하여 γ-PGA와 아이소플라본의

효과를 보여주는 그래프이다.

도 8은 고지방식이 유도 비만 쥐의 γ-PGA와 아이소플라본 섭취시 간에서의 CPT-1의 mRNA 발현 수준을 확인하여 γ-PGA와 아이소플라본의 효과를 보여주는 그래프이다.

도 9는 고지방식이 유도 비만 쥐의 γ-PGA와 아이소플라본 섭취시 간에서의 AMPK의 mRNA 발현 수준을 확인하여 γ-PGA와 아이소플라본의 효과를 보여주는 그래프이다.

도 10은 고지방식이 유도 비만 쥐의 γ-PGA와 아이소플라본 섭취시 간에서의 GLUT-4의 mRNA 발현 수준을 확인하여 γ-PGA와 아이소플라본의 효과를 보여주는 그래프이다.

도 11은 고지방식이 유도 비만 쥐의 γ-PGA와 아이소플라본 섭취시 간에서의 SREBP-1c의 mRNA 발현 수준을 확인하여 γ-PGA와 아이소플라본의 효과를 보여주는 그래프이다.

도 12는 고지방식이 유도 비만 쥐의 γ-PGA와 아이소플라본 섭취시 백색 지방 조직에서 PPARγ mRNA 발현 수준을 확인하여 γ-PGA와 아이소플라본의 효과를 보여주는 그래프이다.

도 13은 고지방식이 유도 비만 쥐의 γ-PGA와 아이소플라본 섭취시 갈색 지방 조직에서 PPARα mRNA 발현 수준을 확인하여 γ-PGA와 아이소플라본의 효과를 보여주는 그래프이다.

도 14는 고지방식이 유도 비만 쥐의 γ-PGA와 아이소플라본 섭취시 지방질 조직에서 UCP-3 mRNA 발현 수준을 확인하여 γ-PGA와 아이소플라본의 효과를 보여주는 그래프이다.

【발명을 실시하기 위한 구체적인 내용】

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

실시예

실험재료 및 실험방법

시약 및 기기

헤마톡실린(Hematoxylin) 및 카페인(caffeine)은 Sigma 사(USA)의 제품을, cDNA 합성 및 실시간 RT-PCR 키트와 GAPDH 및 AMPK, PPARγ, adiponectin, PPARα, uncoupling protein-3 (UCP-3), GLUT-4, leptin, SREBP-1c, CPT-1 프라이머는 BioNEER 사(Korea)제품을 사용하였으며, 그 외 일반 시약들은 특급품을 사용하였다.

실험기기는 자동 혈액분석기(Hemavet, HV-950FS, USA), 자동 생화학 분석기(Thermo, Konelab 20XT, Finland), 냉동원심분리기(Beckman Coulter Inc., AVANTI J-E, USA), 균질기(IKA, T25 basic, Malaysia), PCR 기계(Bio-RAD, Mycycler™ thermal cycler, USA), 소형 원심기(Hitachi, MIKRO 200R, Japan), 분광 광도계 (Shimadzu, UV-1601, Japan), 절편기(Leica, RM2235, Germany), 광학 현미경(Olympus, BX51, Japan) 및 실험실에서 사용하는 일반기기를 사용하였다.

시료

카페인(Caffein)은 Sigma-Aldrich Co(USA)에서 아이소플라본은 Bioland(다이드제인 15.6%, 글리시테인 12.3%, 게니스테인 5.2% / 안산, Korea)에서 구입하여 사용하였으며, γ-PGA 는 계명대학교 식품가공학과에서 공급받아 사용하였으며 수율은 1.8%이다.

γ-Polyglutamic acid(γ-PGA) 생산

스타터 배양은 121℃에서 15 분간 멸균한 영양 배지(nutrient broth) 400 mL 가 들어있는 1 L 삼각플라스크에 MRS 아가 플레이트에서 배양(42℃, 24 hr)한 *B. subtilis* HA 균주를 접종한 뒤 진탕배양기(SI-900R, JEIO TECH CO., Ltd., Korea)에서 37 ℃, 24 시간 동안 진탕 배양(180 rpm)하였다. γ-PGA 배양은 70 L 발효조에 γ-PGA 생산용 배지 {0.1% Na_2HPO_4, 0.1% KH_2PO_4, 0.5%$(NH_4)_2SO_4$, 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.002% $MnSO_4 \cdot 5H_2O$, 0.02% $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 3% 글루타메이트(glutamate), 3% 글루코오스 솔루션(glucose

solution), 500 μg/L 비오틴(biotin)} 40 L 에 스타터 배양액을 1%(v/v) 접종하여 37 ℃에서 72 시간 배양하였다.

γ-PGA 의 분리 및 정제

배양액을 24,9000 xg 에서 10 분간 원심 분리하여 얻은 상층액에 3 배의 에탄올을 첨가하여 혼합한 후 침전물을 회수하였다. 회수한 침전물에 증류수 가하여 녹인 후 이를 동결 건조하여 γ-PGA 의 무게를 측정하였다.

γ-PGA 분자량 및 함량 측정

건조한 점질물을 0.1 M Na_2SO_4/0.05 % NaN_3(글래이셜 아세틱 에시드(glacial acetic acid)로 pH 4 로 조정) 용액에 1% 되게 녹인 다음, 원심분리 후 상층액 만을 0.45 μm 실린지 필터(syringe filter)로 여과하여 GPC(Gel Permeation Chromatography)로 분석하였다. 분석조건(표 1)은 검출기로 RI(Knauer K-2310, Berlin, Germany)를 이용하였으며, GPC 컬럼(column)은 Shodex SB 805 HQ(Japan)를 이용하여 이동상을 0.1 M Na_2SO_4/0.05 % NaN_3(글래이셜 아세틱 에시드(glacial acetic acid)로 pH 4 로 조정)로 유속은 1.0 mL/min 의 속도로 흘려주었다. 표준곡선은 각기 다른 분자량을 가진 덱스트란(dextran)(American Polymer Corporation, USA)을 이용하여 작성하였으며, 굴절지수 측정기를 이용하여 γ-PGA 의 분자량을 측정하였다. γ-PGA 의 함량은 정제한 γ-PGA 를 표준물질로 사용하였으며 GPC 분석을 실시하고 생성된 절정 면적(peak area)을 이용하여 계산하였다.

【표 1】

γ-PGA 의 분자량 측정을 위한 HPLC 분석

항목	Determination of Molecular weight
HPLC system	Knauer K-501 system
Column	OHpak SB 805 HQ (Shodex, Japan)
Mobile phase	0.1 M Na_2SO_4/0.05% NaN_3/pH4
Flow rate	0.1 M Na_2SO_4/0.05% NaN_3/pH4
Detector	RI (Knauer K-2310)

실험동물 및 처치

본 연구에 사용된 6 주령 C57BL/6 쥐는 Samtako Bio Korea 에서 48 마리를 분양받아 사용하였다. 실험시작 1 주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 난괴법(ramdomized block design)에 의해 8 마리씩 6 개 군으로 구분하여 5 주 동안 비만을 유도하였다. 비만이 유도된 실험군은 일반 식이를 섭취한 정상군, 고지방식이를 섭취한 대조군, 고지방 식이에 카페인 0.3%를 첨가하여 섭취한 양성대조군, 고지방 식이에 γ-PGA 3%, 아이소플라본 0.1%, γ-PGA 3% + 아이소플라본 0.1% 첨가하여 식이한 군으로 구분하여 6 주간 사육하였다. 물과 사료는 자유식이 하였으며 사육실 온도는 22± 1℃, 습도 50± 5%, 12 시간씩 명암주기를 유지하였다. 마우스는 희생되기 6 시간 전부터 절식한 후 에테르로 마취하여 후대정맥에서 채혈하였고, 3000 rpm 에서 15 분간 원심 분리한 후 혈청을 분리하여 분석에 사용하였다. 심장, 간장, 신장, 비장, 부고환지방조직(WAT), 견갑골지방(BAT)을 적출하여 생리식염수로 세척하고 여과지로 수분을 완전히 제거한 다음 무게를 측정하고 10% 포르말린 용액에 고정하여 조직학적 관찰에 사용하였으며 간장과 부고환 지방, 견갑골지방은 일정량을 절취하여 유전자 발현량을 보기 위해 급속 냉동하여 분석 전까지 -80℃ 에 보관하였다.

<물질 처치군 분류>

정상군(N): 정상 식이

대조군(C): 고지방 식이

양성대조군(PC): 고지방 식이 + 0.3% 카페인

실험군 1(E1): 고지방 식이 + 3% γ-PGA

실험군 2(E2): 고지방 식이 + 0.1% 아이소플라본

실험군 3(E3): 고지방 식이 + 3% γ-PGA + 0.1% 아이소플라본

실험식이

본 연구에 사용된 일반 식이는 지방의 에너지 비율이 10%인 AIN 76A(Purina Korea)을 사용하였으며 고지방식이는 지방의 에너지 비율이 60%인 D12492(Research Diets, USA)를 사용하였다. 카페인은 Sigma

Chemical (St. Louis, MO, USA)에서 공급받았고 아이소플라본은 Biorand Co(daidzein 15.6%, glycitein 12.3, ginistein 5.2%)에서 공급받아 사용하였다. 실험군은 고지방식이 AIN 76A 에 분말화된 카페인 0.3%, γ-PGA 0.3%, 아이소플라본 0.1%, γ-PGA 0.3% + 아이소플라본 0.1% 첨가하여 침전물 형태로 제조하였다. 고지방식이의 구성은 표 2과 같다.

【표 2】

실험 식이의 조성

항목	고지방식이	
	D12492	
	gm%	kcal%
단백질	26.2	20
탄수화물	26.3	20
지방	34.9	60
카세인, 80 메쉬(Mesh)	200	800
L-시스틴	3	12
말토덱스트린 10	125	500
자당	6808	275.2
셀룰로스	50	0
대두유	25	225
돼지기름(Lard)	245	2205
미네랄 혼합물(S10026)	10	0
인산 이칼슘	13	0
탄산칼슘	5.5	0
구연산칼륨, 1 H2O	16.5	0
비타민 혼합 V10001	10	40
콜린 바이타트레이트	2	0

자료출처: Research diets Inc. (USA)

음수량, 사료섭취량, 체중 및 사료효율 측정

음수량, 식이섭취량, 체중은 매주 1 회 오전 10-11 시에 측정하였으며 체중증가량은 실험식이 공급 마지막 날 체중에서 실험식이 공급 첫째 날 체중을 빼서 산출하였다. 식이효율은 실험식이 공급 시작일부터 희생 일까지를 총 실험 기간으로 하여 실험기간동안의 체중 증가량을 실험기간 동안의 식이 섭취량으로 나누어 산출하였다.

FER = 증가된 체중(weight gain) (g/6 주) / 사료섭취량(food intake) (g/6 주)

장기 및 지방조직 무게 측정

심장, 간장, 신장, 비장, 부고환지방조직(WAT), 견갑골지방(BAT)을 적출하여 0.9% 생리식염수로 세척하고 여과지로 수분을 완전히 제거한 다음 전자저울을 이용하여 무게를 측정하였다.

혈액학적 분석

채취한 혈액을 혈액 응고 방지제인 K_2-EDTA 가 포함된 혈액검사(cell blood count) 튜브에 담아, 콜터 혼합기(coulter mixer) 위에서 10 분 이상 혼합한 뒤 자동혈액분석기(Sysmex VE-2100, Japan)를 이용하여 백혈구 수, 호중구 수, 림프구 수, 단핵구 수, 호산구 수, 호염기구 수, 적혈구 수, 혈색소 농도, 적혈구 용적, 혈소판 수를 측정하였다.

혈청의 생화학적 분석

채혈된 혈액을 진공관(Greiner, Austria)에 담아 실온에서 1 시간 방치한 후 3,000 rpm 으로 10 분간 원심 분리하여 얻은 혈청을 자동생화학분석기(Konelab 20XT, Finland)를 이용하여 AST, ALT, ALP, LDH, 인슐린(insulin), 글루코오스(glucose), 중성지방(triglyceride), HDL-C, LDL-C 를 분석하였다.

인슐린저항성의 항상성 모델평가(Homeostasis model assessment of insulin resistance)

HOMA-IR 은 공복 인슐린과 공복 혈당을 곱한 값을 22.5 로 나누어 구하였으며, 인슐린 저항성의 평가지표로 사용했다(Hosker et al. 1985).

HOMA-IR = < 공복 인슐린 (μU/mL) × 공복 혈당 (mM)/22.5

간조직의 지질함량 측정

간조직의 인지질(Phospholipid)

간조직의 인지질 함량은 fisk-subarrow 방법(King 1936)에 따라 간 파쇄액에서 측정하였다. 간 파쇄액을 블러 추출물(에탄올:에테르=3:1)로 혼합하고 검출시약인 H_2SO_4 와 암모늄 몰리브데이트로 분리하여 자동생화학 분석기(Konelab 20XT, Finland)로 분석하였다.

간조직의 중성지방(triglyceredes)

간 조직의 중성지방(triglyceredes) 함량(Meded et al.1975)은 총 지질 중 일부를 아이소프로판올(isopropanol) 2.0 ㎖ 잘 섞은 후 혼합액을 시료로 측정하였다. 시료 0.5 ㎖에 햅탄(heptane) 2.0 ㎖, 아이소프로판올(isopropanol) 3.5 ㎖, 0.04 M 황산(sulfuric acid) 1.0 ㎖를 차례대로 첨가하고 30 초간 충분히 혼합하였다. 혼합 후 상층액 0.2 ㎖를 시험관에 취하고 아이소프로판올 2.0 ㎖, 감화(saponification)용액 0.6 ㎖를 첨가하여 30 초간 혼합하였다. 이것을 실온에서 5 분간 방치한 후 메타과요오드산염(metaperiodate) 용액 1.5 ㎖를 넣고 10 초간 섞은 다음, 아세틸 아세톤 1.5 ㎖를 첨가하여 10 초간 혼합한 후 항온 수조 65± 5℃에서 15 분간 방치하였다가 415 nm 흡광도를 측정(U-2000, Japan)하였다. 이때 표준용액으로는 트리올레인(triolein, Sigma, USA)을 사용하였다.

간조직의 총 콜레스테롤(total cholesterol)

간조직의 총 콜레스테롤 함량(Zlatkis et al. 1969)은 총지질 중 일부를 빙초산(glacial acetic acid) 3.0 ㎖로 잘 섞은 혼합액을 시료로 사용하였다. 시료 0.1 ㎖에 OPA(o-phthalaldehyde) 2.0 ㎖를 첨가하고 C-설포닌 산(C-sulfonic acid) 1.0 ㎖를 첨가하여 상온에서 10 분간

방치하였다가 550 nm 에서 흡광도(U-2000, Japan)를 측정하였다. 이때 표준용액으로는 콜레스테롤(Sigma, USA)을 사용하였다.

간조직의 총지질(total lipid)

간조직의 총지질 함량(Folch et al. 1956)은 간 조직 1 g 을 클로로포름-메탄올(chloroform-methanol)(2:1)의 혼합용액 15.0 ㎖과 증류수 3.0 ㎖를 몇 회로 난어 첨가하면서 마쇄하였다. 마쇄한 혼합물을 3.000 rpm 에서 20 분간 원심분리(SUPRA 25K, Korea)하여 얻은 지질층을 두 개의 시험관에 나눈 후 농축시켜 총 지질 함량을 정량하였다.

변 중 지질함량과 담즙산 측정

희생되기 1 주일 전부터 7 일간 대사케이지를 이용하여 변을 채취하였으며 동물 사육실 온도가 낮아 10-18 시 까지 채취한 변을 분석에 사용하였다.

변 중의 총 콜레스테롤(total cholesterol) 측정

변 중의 총 콜레스테롤 함량은 효소법을 응용한 것으로 총 지질에 메탄올 1 ㎖을 넣어 잘 섞은 혼합액을 시료로 사용하였다. 혼합액 0.02 ㎖에 효소시액 3.0 ㎖을 넣어 잘 혼합한 후 37℃에서 5 분간 방치하고 500 nm 에서 흡광도(U-2000, Japan)를 측정하였다. 시약은 총콜레스테롤 측정용 키트(ASAN, Korea)를 사용하였다.

변 중의 총 지질(total lipid) 측정

변 중의 총 지질 함량(Folch et al. 1956)은 먼저 변을 동결건조한 후, 마쇄하여 0.5 g 을 취한 다음 클로로포름-메탄올(2:1)의 혼합용액 15.0 ㎖와 증류수 3.0 ㎖를 첨가하였다. 마쇄한 혼합물을 3,000 rpm 에서 20 분간 원심 분리(SUPRA 25K, Korea)하여 얻은 지질층을 농축시켜 총 지질 함량을 정량 하였다.

변 중의 중성지방(triglyceredes) 측정

변 중의 중성지방 함량은 총 지질을 메탄올 1 ㎖을 넣어 잘 섞은 혼합액을 시료로 사용하였다. 혼합액 0.02 ㎖에 효소시액 3.0 ㎖을 넣어 잘 혼합한 후 37℃에서 10 분간 방치하고 560 nm 에서 흡광도(U-2000, Japan)를 측정하였다. 시약은 TG 측정용 키트(ASAN, Korea)를 사용하였다.

변 중의 담즙산 측정

변 중 담즙산 함량(Crowell & Macdoald. 1980)은 동결 건조한 변을 마쇄하여 0.3 g 을 취한 후 글리세롤 100 ㎖에 KOH 4 g 을 녹인 용액 1 ㎖를 첨가하여 잘 혼합한 후 3 시간 동안 멸균하였다. NaCl 용액 1 ㎖을 넣고 에틸 에테르(ethyl ether) 20 ㎖씩을 넣은 후 2 회 반복하여 추출한다. 반복 추출한 상층액을 빼내고 남은 층에 HCl 0.2 ㎖을 첨가한 후 잘 혼합하여 산성화 한 다음 에틸 에테르 20 ㎖씩을 사용하여 반복추출 하였다. 추출한 시료는 회전증발기(rotary evaporator)용 플라스크에 옮겨 감압 건조(Rotabapor R-124, Switzerland)하고 질소(N_2) 가스로 최종적으로 건조시킨 다음 메탄올과 물(H_2O) 혼합액(5;1) 1 ㎖를 넣은 후 분석 시료로 사용하였다. 시료 20 ㎛를 취하여 효소시약 150 ㎛를 잘 혼합하여 37℃에서 5 분간 방치하고 트리톤 X-100(triton X-100) 20 ㎛를 혼합한 후 즉시 530 nm 에서 흡광도를(U-2000, Japan) 측정하였다.

간과 지방조직의 조직학적 분석

적출한 간과 부고환 지방조직은 조직학적 관찰을 위해 10% 중성 포르말린 용액에 12 시간 고정하고 흐르는 물에 수세한 후 조직처리 과정을 거쳐 4 ㎛ 두께의 박절편을 제작하여 탈 파라핀 함수 후 헤마톡실린-에오진(hematoxylin and eosin)으로 염색하고 광학현미경을 통해 조직학적 변화를 관찰하였다.

헤마톡실린-에오진(H&E) 염색

두께 4 ㎛의 박절편을 제작하여 자일렌(xylene)에 탈 파라핀한 후 함수 과정을 거쳐, 흐르는 물에 수세하였다. 해리스 헤마톡실린(Harris hematoxylin) 용액에 옮겨 5 분간 핵을 염색한 후 흐르는 물에 수세하고 1% HCl-알코올 용액으로 3 회 침적 후 수세하여 1% 암모니아 용액으로 청색화

하고 에오진 용액에 3 분간 세포질을 염색한 후 80%, 95%, 100% 에탄올로 점차 이동하여 탈수시켰다. 청명 과정을 거친 후 캐나다 발삼(Canada balsam)으로 봉입 후 100 배율 광학현미경으로 검경하였다.

간 조직 지질침착 및 지방세포 크기와 수 측정

H&E 염색한 간 조직은 100 배율 광학 현미경 아래에서 중심정맥 주변으로 침착된 지질의 분포 양상을 관찰하였고, 부고환 지방조직은 스케일 바(scale bar) 프로그램을 이용하여 지방세포 크기와 수를 측정하였다.

유해산소 대사 효소 활성 및 지질 과산화 함량 측정

효소시료의 조제

적출한 간 조직을 빙냉 하에서 절취하여 일정량을 칭량한 후 4 배량의 0.25 M 수크로즈(pH 7.4) 완충액을 가하여 균질기(glass teflon homogenizer)를 이용하여 20 %(w/v) 마쇄균질액을 만든다. 이 균질액을 600 Xg 에서 10 분간 원심 분리하여 핵 및 미 마쇄 부분을 제거한 상층액을 10,000 Xg 에서 20 분간 원심분리한 후 그 상층액을 얻어 효소활성도 측정에 사용하였다.

크산틴 산화효소(Xanthine oxidase, XO)

간 조직 중 XO 의 활성도는 Stripe 와 Della(1969)의 방법에 준하여 측정하였다. 활성도 단위는 효소액 중에 함유된 단백질 1 mg이 1 분 간 반응하여 기질인 크산틴으로부터 생성된 요산(uric acid)의 양을 nmole 로 표시하였다.

항산화 효소(Superoxide dismutase, SOD)

간 조직 중 SOD 의 활성도는 헤마톡실린 자동산화의 억제 정도를 관찰하는 Martin 등(1987)의 방법에 따라 0.1 mM EDTA 가 함유된 50 mM 인산 완충액(pH 7.5)에 10 ㎛ 헤마톡실린 및 효소액을 가해 25℃에서 반응시켜 생성된 헤마테인(hematein)을 560 nm 에서 측정하여 효소의 활성도를 산정하였다. 활성도 단위는 효소액을 넣지 않은 반응액 중의 헤마톡실린

자동산화를 50% 억제하는 정도를 1 유닛(unit)으로 하여 단백질 1 mg이 1 분 동안 반응한 유닛으로 표시하였다.

카탈라아제(Catalase, CAT)

간 조직 중 CAT 의 활성도는 과산화 수소(hydrogen peroxide)를 기질로 하여 환원되는 정도를 흡광분광광도계(spectrophotometer)를 이용하여 파장 240 nm 에서 흡광도를 읽고 분자흡광계수($E=0.04\ mM^{-1}cm^{-1}$)를 이용하여 활성을 산출하는 Aebi (1984)의 방법에 준하였다. 활성도 단위는 간 조직 중에 함유된 단백질 1 mg이 1 분 동안 반응하여 감소되는 과산화수소 양을 nmole 로 표시하였다.

티오바르비툴산 반응물질(Thiobarbituric acid reactive substance, TBARS)

간 조직 중 지질과산화 TBARS 시험은 Ohkawa 등(1979)의 방법에 따라 측정하였다. 효소 시료 속의 과산화지질을 산성조건 하에서 티오바르비툴산(thiobarbituric acid) 용액과 가열 반응시켜 생성된 TBARS 의 흡광도를 500 nm 에서 측정하였다. TBARS 함량은 단백질 g 당 nmole 로 표시하였다.

간과 지방조직의 분자생물학적 관찰

RNA 추출

냉동(-80℃) 보관하였던 간과 부고환지방 조직을 액화질소에 담아 이송한 후 얼음으로 저온을 유지시키며 조직 50 mg당 1 mℓ의 트리졸(Invitrogen, New Zealand)을 첨가하여 조직을 마쇄하고 실온에서 5 분간 배양시킨 후 클로로포름(chloroform) 200 μℓ를 첨가하여 실온에서 3 분간 방치 후 15,000 rpm, 4℃, 10 분간 원심분리 하였다. 상층액을 취한 후 아이소프로필 알코올(isopropyl alcohol)을 500 μℓ 첨가한 다음 15,000 rpm, 4℃, 15 분간 원심분리 후 상층액은 제거하고 70% 에탄올 1 mℓ을 첨가하여 RNA 침전물(pellet)을 수세하고 15,000 rpm, 4℃, 2 분간 원심분리 하여 나온 상층액은 제거하고 남은 RNA 침전물을 실온에서 건조 후 디에틸피로카르본산(diethylpyrocarbonate, DEPC)으로 희석하여 260 nm에서

흡광도(OD) 값을 측정하여 RNA 를 정량하였다. 280 ㎚에서 흡광도 값을 측정하고 흡광도 비율(A260/A280)이 1.8~2.0 사이인지 확인하였다.

cDNA 합성

BioNEER 사의 역전사반응용 효소 키트(CycleScript RT PreMix, dT20)에서 제공하는 절차에 따라 총 RNA 양이 0.1~1 ㎍/㎕가 되도록 RNA 시료를 넣고 DEPC 를 20 ㎕까지 채운 후 30 ℃에서 1 분간, 50℃에서 4 분간 12 주기(cycle) 반응시키고 95 ℃에서 5 분간 가열하여 반응을 종결시켰다.

실시간 RT-PCR(Real-time RT-PCR)

BioNEER 사의 실시간 RT-PCR 용 효소 키트(*AccuPower*™ PCR PreMix kit)를 구입하여 사용하였다. 템플레이트(Template) 2 ㎕, 정방향(forward) 프라이머와 역방향(reverse) 프라이머(10 pmole/ℓ, BioNEER, Korea)를 각각 1.4 ㎕, 멸균된 증류수 15.2 ㎕를 섞고 PCR 반응(Bio-RAD, Mycycler™ thermal cycler, USA)을 실시하였다. 프라이머는 대조군으로 GAPDH(57℃, 35 cycle), 실험군으로 AMPK (57° C, 35), PPARγ (60° C, 35 cycles), adiponectin (58° C 35 cycles), PPARα (58° C, 35 cycles), UCP-3 (57° C, 35cycles), GLUT-4 (58° C, 35 cycles), leptin (60° C, 35 cycles), SREBP-1c (59° C, 35 cycles), and CTP-1 (57° C, 35 cycles) 를 사용하였으며 사용된 프라이머들의 염기서열은 표 3 와 같다.

【표 3】

프라이머의 염기배열순서

항목	프라이머		예상크기 (bp)[9]	온도[10] (℃)
GAPDH[1]	정방향(5'→3')	ATTCCATGGCACCGTCAAGGC	571	55-59
	역방향(5'→3')	TCAGGTCCACCACTGACACGT		
AMPK[2]	정방향(5'→3')	GGATGTAGTTGCAGAACTTCCTGC	283	57
	역방향(5'→3')	ACGCAGGGTGCAACCGATGCGGCC		

PPAR γ [3]	정방향(5'→3')	GTGGAACGGAACGGCCATGTC	571	58
	역방향(5'→3')	ACACTGCTGCTGCTTAGACGC		
아디포넥틴	정방향(5'→3')	GATAGGTGCAACTGTCCTGAC	362	58
	역방향(5'→3')	GCACATGTACTACTGGGACAT		
PPAR α [4]	정방향(5'→3')	AATAGGTGCAGCTGTCCAGAG	362	58
	역방향(5'→3')	GCACCTGTATTACGGGGTCAC		
UCP-3[5]	정방향(5'→3')	GGATGCAGTTGCAGCAACTCATCC	283	57
	역방향(5'→3')	ACGTAAGATGCTACTGATGCTGAA		
GLUT-4[6]	정방향(5'→3')	TTGGAACGCTACGGTCAAGTG	571	58
	역방향(5'→3')	CCACTGCCGATGCTAAGCCGA		
렙틴	정방향(5'→3')	GAATGCAGCAGGCGTGCACAG	381	60
	역방향(5'→3')	GGATCTCTAGTACAGCGTAGC		
SREBP-1c[7]	정방향(5'→3')	GACCGATTCAGCCGTTCAGAC	372	59
	역방향(5'→3')	ACAGCTATACTACAGCGTAAC		
CPT-1[8]	정방향(5'→3')	AGGAGTAGTTGCAGGAATTCCTGT	283	57
	역방향(5'→3')	GCGTAGGGAGCTACTGATGCGGAT		

[1]GAPDH: 글리세르알데히드-3-포스페이트 디히드로게나아제

[2]AMPK: 아데노신 모노포스페이트-액티베이티드 프로테인 키나아제

[3]PPAR γ : 퍼옥시좀 프로리퍼레이터-액티베이티드 리셉터-γ

[4]PPAR α : 퍼옥시좀 프로리퍼레이터-액티베이티드 리셉터-α

[5]UCP-3: 언커플링 프로테인 3

[6]GLUT-4: GLUT-4: 글루코오스 트랜스포터

[7]SREBP-1c: 스테롤 레귤라토리 엘리먼트 바인딩 프로테인-1

[8]CPT-1: 카르니틴 팔미토일트랜스퍼아제- I

[9]bp: 염기쌍

[10]TM: 적정 어닐링 온도

자료분석

통계 프로그램(SPSS 18.0 for windows, SPSS Inc., USA)를 이용하여 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)을 실시하였으며, 각 그룹 간의 차이를 검정하기 위해 던컨의 다중검정(Duncan's multiple range test)을 이용하여 사후분석을 하였다. 통계학적 유의 수준은 $p<0.05$로 하였다.

실험 결과

음수량, 식이섭취량, 체중증가 및 식이효율 측정

실험 식이 공급 6 주 동안의 음수량, 식이섭취량, 체중 및 식이효율을 측정한 결과는 표 4 과 같다. 음수량은 정상군, 고지방식이한 대조군, 카테킨 식이한 양성대조군에서 유의한 차이가 없었으며, 실험군은 대조군에 비해 γ-PGA 식이군 80.1%, 아이소플라본 식이군 25.4% 유의적으로 높았고 γ-PGA 와 아이소플라본 공동식이군은 통계적 유의성이 없었다($p<0.05$). 식이량은 정상군에 비해 대조군과 실험군 모두 유의적으로 감소했으나 대조군과 실험군간 유의성은 없었다($p<0.05$). 고지방식이 기간 동안 체중증가량은 대조군이 정상군에 비해 425.4% 증가했고, 양성대조군은 대조군에 비해 77% 유의적으로 감소했다($p<0.05$). 실험군은 대조군에 비해 γ-PGA 식이군 62%, 아이소플라본 식이군 46%, γ-PGA 와 아이소플라본 공동식이군 88% 유의적으로 감소했다($p<0.05$). 식이효율은 정상군에 비해 대조군이 677. 7% 증가했으며 양성대조군은 대조군에 비해 70.5% 감소했다($p<0.05$). 실험군은 대조군에 비해 γ-PGA 식이군 85.1%, 아이소플라본 식이군 47.6%, γ-PGA 와 아이소플라본 공동식이군 85.8% 유의적으로 감소했다($p<0.05$). 실험 총 기간 동안 체중 변화는 도 1 과 같다.

【표 4】

고지방식이 유도 비만 쥐의 γ-PGA 와 아이소플라본 섭취시 음수량, 사료섭취량, 체중 및 사료 효율

항목	정상군	대조군		실험군		
	N	C	PC	E1	E2	E3
음수량 (ml/day)	2.28± 0.18[a]	2.52± 0.29[a]	2.65± 0.17[a]	4.53± 0.53[c]	3.16± 0.19[b]	2.43± 0.20[a]
사료섭취 (g/day)	3.23± 0.19[b]	2.15± 0.38[a]	1.71± 0.66[a]	2.29± 0.47[a]	1.96± 0.54[a]	2.17± 0.56[a]
실험전 체중(g)	24.37± 2.58[a]	33.02± 2.59[b]	32.75± 1.68[b]	31.75± 3.24[b]	31.57± 3.50[b]	32.53± 2.45[b]
실험후 체중(g)	26.70± 2.98[a]	45.21± 5.19[e]	34.51± 0.90[bc]	37.37± 4.70[bcd]	38.43± 3.97[cd]	34.01± 3.14[b]
증가된 (g/day)	2.32± 0.55[a]	12.19± 3.17[d]	2.76± 0.70[a]	4.62± 2.16[b]	6.59± 1.65[c]	1.47± 1.31[a]
사료효율 [1)] (%)	2.36± 0.27[a]	18.33± 3.74[c]	5.41± 4.56[a]	2.73± 3.78[a]	9.60± 0.41[b]	2.61± 0.53[a]

값은 8 마리에 대한 실험의 평균± SD 이다.

N: 정상식이

C: 고지방식이

PC: 고지방식이 + 0.3% 카페인

E1: 고지방식이 + 3% γ-PGA

E2: 고지방식이 + 0.1% 아이소플라본

E3: 고지방식이 t + 3% γ-PGA + 0.1% 아이소플라본

1) 사료효율(feed efficiency ratio)(%) = (늘은 체중 / 사료섭취량) × 100

같은 행에 있는 서로 다른 윗 첨자들의 값은 ANOVA 와 Duncan 의 다중검정(Duncan's multiple range test)을 이용하여 분석을 하였으며 그 값들이 확연히 다르다. 통계학적 유의 수준은 $p<0.05$ 로 하였다.

장기의 무게 변동

실험동물의 간, 신장, 비장, 부고환지방의 장기무게와 체중 당 장기 무게 측정 결과는 표 5 와 같다. 간은 정상군에 비해 대조군 14.9% 유의하게

낮았고(p<0.05), 대조군에 비해 양성대조군인 카페인 식이군은 1.8% 높았다(p<0.05). 실험군은 대조군에 비해 γ-PGA 식이군 6.1%, 아이소플라본 식이군 13.2%, γ-PGA 와 아이소플라본 공동식이군이 5.3% 유의하게 높았다(p<0.05). 왼쪽 부고환지방은 대조군이 정상군에 비해 533.3% 높았으며 양성대조군인 카페인 식이군은 대조군에 비해 54.9% 유의하게 낮았다(p<0.05). 실험군인 γ-PGA 식이군 25.6%, 아이소플라본 식이군 10.5%, γ-PGA 와 아이소플라본 공동식이군이 39.1% 유의하게 높았다(p<0.05). 오른쪽 부고환 지방은 대조군이 정상군에 비해 731.1% 높았으며 양성대조군인 카페인 식이군은 대조군에 비해 53.4% 유의하게 낮았다(p<0.05). 실험군인 γ-PGA 식이군 24.1%, 아이소플라본 식이군 13.%, γ-PGA 와 아이소플라본 공동식이군이 32.3% 유의하게 높았다(p<0.05). 비장은 정상군에 비해 대조군이 50% 유의하게 낮았으며 고지방식이군은 비장무게의 유의한 차이를 보이지 않았다 p<0.05). 심장과 신장은 모든 군에서 통계적 유의성이 없었다(p<0.05).

【표 5】

고지방식이 비만 유도 쥐의 γ-PGA 와 아이소플라본 섭취시 장기 무게 측정 결과

항목	정상군	대조군		실험군		
	N	C	PC	E1	E2	E3
심장	1)0.13±0.01[a]	0.14±0.02[a]	0.12±0.01[a]	0.13±0.02[a]	0.12±0.00[a]	0.23±0.31[a]
	2)0.51±0.03[a]	0.33±0.03[a]	0.36±0.04[a]	0.37±0.07[a]	0.33±0.03[a]	0.68±0.90[a]
간	1.09±0.96[a]	1.35±0.11[c]	1.14±0.17[a]	1.21±0.17[ab]	1.29±0.16[bc]	1.17±0.11[ab]
	4.13±0.74[a]	3.03±0.54[b]	3.02±0.28[b]	3.29±0.65[b]	3.39±0.39[b]	3.45±0.46[b]
신장(좌)	0.17±0.02[a]	0.16±0.01[a]	0.16±0.02[a]	0.16±0.02[a]	0.16±0.01[a]	0.14±0.01[a]

	0.64±0.07[d]	0.37±0.01[a]	0.48±0.08[bc]	0.45±0.06[b]	0.60±0.07[d]	0.52±0.05[c]
신장(우)	0.16±0.02[a]	0.16±0.02[a]	0.15±0.02[a]	0.15±0.02[a]	0.15±0.02[a]	0.14±0.01[a]
	0.62±0.05[b]	0.38±0.02[a]	0.45±0.07[b]	0.42±0.09[a]	0.41±0.09[a]	0.43±0.06[a]
부고환(좌)	0.21±0.06[c]	1.33±0.12[a]	0.60±0.20[b]	0.99±0.23[a]	1.19±0.15[a]	0.81±0.17[bc]
지방조직 3)	0.80±0.20[a]	3.05±0.42[de]	1.76±0.57[b]	2.66±0.48[cd]	3.15±0.26[de]	2.35±0.47[c]
부고환(우)	0.16±0.05[a]	1.33±0.14[d]	0.62±0.17[b]	1.01±0.18[cd]	1.15±0.24[de]	0.90±0.20[c]
지방조직 3)	0.60±0.18[a]	3.00±0.58[c]	1.82±0.49[b]	2.73±0.51[c]	3.01±0.52[c]	2.67±0.49[c]
비장	0.16±0.18[b]	0.08±0.00[ab]	0.07±0.00[a]	0.07±0.01[a]	0.07±0.01[ab]	0.07±0.00[a]
	0.34±0.03[b]	0.18±0.02[a]	0.22±0.03[a]	0.21±0.04[a]	0.21±0.02[a]	0.22±0.03[a]

값은 8 마리에 대한 실험의 평균± SD 이다.

N: 정상식이

C: 고지방식이

PC: 고지방식이 + 0.3% 카페인

E1: 고지방식이 + 3% γ-PGA

E2: 고지방식이 + 0.1% 아이소플라본

E3: 고지방식이 t + 3% γ-PGA + 0.1% 아이소플라본

1)장기 무게 절대값: g

2)장기 무게 상대값: g/100g 몸무게

3)AT: 지방 조직

같은 행에 있는 서로 다른 윗 첨자들의 값은 ANOVA 와 Duncan 의 다중검정(Duncan's multiple range test)을 이용하여 분석을 하였으며 그 값들이 확연히 다르다. 통계학적 유의 수준은 $p<0.05$ 로 하였다.

혈액학적 분석

혈액학적 분석결과는 표 6 과 같다. 정상군에 비해 대조군이 백혈구 50.9%, 호중구 36.7%, 림프구 65%, 혈색소 24.6%, 적혈구 24.2%, 적혈구용적 17.8%, 혈소판 27.3% 모두 유의하게 증가하였다($p<0.05$). 단핵구, 호염기구, 호산구는 유의한 차이가 없었다. 특히 백혈구 중 염증관련 세포인 호중구와 림프구가 유의하게 증가 하였다. 양성대조군인 카페인 식이군이 대조군에 비해 백혈구 21%, 호중구 15.2%, 림프구 26.2%, 혈색소 11.1%, 적혈구 14.9%, 적혈구용적 9.5%, 혈소판 17.4% 유의하게 감소했다($p<0.05$). 특히 백혈구, 림프구가 유의하게 감소하였으며 단핵구, 호염기구, 호산구는 유의성이 없었다. 실험군간 비교에서 백혈구는 대조군에 비해 아이소플라본 식이군 13.9%, γ-PGA 식이군 23.2%, 아이소플라본과 γ-PGA 공동식이군 25.8% 순으로 유의하게 감소하였다($p<0.05$). 호중구는 대조군에 비해 아이소플라본과 γ-PGA 공동식이군 14.8%, 아이소플라본 식이군 15%, γ-PGA 식이군 18.1% 순으로 유의하게 감소하였다($p<0.05$). 림프구는 아이소플라본 식이군 25.2%, γ-PGA 식이군 27.2%, 아이소플라본과 γ-PGA 공동식이군 36.4% 순으로 유의하게 감소했다($p<0.05$). 혈색소는 아이소플라본과 γ-PGA 공동식이군 9.5%, γ-PGA 식이군 12%, 아이소플라본 식이군 13.8% 유의하게 감소하였다($p<0.05$). 적혈구용적은 대조군에 비해 아이소플라본 식이군 9%, γ-PGA 식이군 10.3%, 아이소플라본과 γ-PGA 공동식이군 11.8% 순으로 유의하게 감소하였다($p<0.05$). 적혈구는 γ-PGA 식이군 12%, 아이소플라본 식이군 13%, 아이소플라본과 γ-PGA 공동식이군 15% 순으로 유의하게 감소하였다($p<0.05$). 혈소판은 대조군에 비해 아이소플라본 식이군 17.4%, γ-PGA 식이군 18%, 아이소플라본과 γ-PGA 공동식이군 21.9% 순으로 유의하게 감소하였다($p<0.05$). 단핵구, 호산구, 호염기구 수치는 유의성이 없었다.

【표 6】

고지방식이 비만 유도 쥐의 γ-PGA 와 아이소플라본 섭취시 혈액학적 분석 결과

항목	정상군	대조군		실험군		
	N	C	PC	E1	E2	E3
백혈구 ($\times 10^3/m\ell$)	9.90±0.30[a]	14.94±0.58[c]	11.81±0.19[b]	11.47±0.21[b]	12.87±0.19[b]	11.88±0.29[b]
적혈구 ($M/\mu\ell$)	677.33±7.5[a]	841.33±14.16[d]	716.00±11.74[b]	740.00±6.63[c]	729.00±16.29[bc]	729.17±16.15[bc]
혈색소 (g/L)	17.381±0.55[a]	21.66±0.81[d]	19.26±0.82[bc]	19.07±0.53[bc]	18.68±0.48[b]	19.78±1.00[c]
적혈구 용적(%)	48.83±1.17[a]	57.53±1.20[c]	52.08±0.93[b]	51.60±1.02[b]	52.40±1.16[b]	51.45±1.43[b]
혈소판 ($\times 10^3/m\ell$)	690.50±15.11[a]	879.00±9.96[c]	725.83±12.48[b]	720.50±16.27[b]	725.83±9.94[b]	721.17±17.92[b]
호염구 ($\times 10^3/m\ell$)	0.00±0.00[a]	0.01±0.00[a]	0.01±0.00[a]	0.01±0.00[a]	0.01±0.00[a]	0.01±0.00[a]
호중구 ($\times 10^3/m\ell$)	4.55±0.14[a]	6.22±0.28[d]	5.27±0.22[bc]	5.09±0.13[b]	5.29±0.12[bc]	5.42±0.24[c]
호산구 ($\times 10^3/m\ell$)	0.01±0.00[a]	0.01±0.00[a]	0.00±0.00[a]	0.00±0.00[a]	0.00±0.00[a]	0.00±0.00[a]
단핵구 ($\times 10^3/m\ell$)	0.18±0.07[a]	0.11±0.07[a]	0.19±0.04[a]	0.12±0.05[a]	0.15±0.05[a]	0.15±0.05[a]
림프구 ($\times 10^3/m\ell$)	5.20±0.93[a]	8.58±0.34[c]	6.33±0.16[b]	6.25±0.14[b]	6.42±0.07[b]	6.29±0.11[b]

값은 8 마리에 대한 실험의 평균± SD 이다.

N: 정상식이

C: 고지방식이

PC: 고지방식이 + 0.3% 카페인

E1: 고지방식이 + 3% γ-PGA

E2: 고지방식이 + 0.1% 아이소플라본

E3: 고지방식이 t + 3% ɣ-PGA + 0.1% 아이소플라본

같은 행에 있는 서로 다른 윗 첨자들의 값은 ANOVA 와 Duncan 의 다중검정(Duncan's multiple range test)을 이용하여 분석을 하였으며 그 값들이 확연히 다르다. 통계학적 유의 수준은 $p<0.05$ 로 하였다.

혈청의 생화학적 분석

혈청 생화학적 분석 결과는 표 7-8 과 같다. 간세포 손상 지표인 효소 변화는 정상군에 비해 대조군이 AST 68.2%, ALT 91.5%, ALP 44.2%, LDH 62.5% 모두 유의하게 높았으나 실험군에서는 모두 유의하게 감소했다($p<0.05$). 양성대조군은 대조군에 비해 AST 38.9%, ALT 34.4%, ALP 26.8%, LDH 32.9% 유의하게 낮았다($p<0.05$). 실험군은 ɣ-PGA 식이군과 아이소플라본 식이군 모두 대조군에 비해 간세포 독성이 회복되었으나 특히 ɣ-PGA 와 아이소플라본 공동식이군이 대조군에 비해 AST 53.3%, ALT 44.8%, ALP 28.3%, LDH 32.9% 유의하게 감소하여($p<0.05$) 정상수준에 가깝게 회복되었다. 중성지방은 대조군이 정상군에 비해 263.9% 높았으며 양성대조군은 대조군에 비해 66.9% 감소했다($p<0.05$). 실험군에서는 ɣ-PGA 식이군 65.2%, 아이소플라본 식이군 72.6%로 대조군에 비해 유의하게 낮았으며 특히 ɣ-PGA 와 아이소플라본 공동식이군이 76.9%로 정상군 보다도 낮았다($p<0.05$). 총 콜레스테롤은 대조군이 정상군에 비해 122.8% 높았으나 양성대조군은 대조군에 비해 41.7% 유의하게 낮았다($p<0.05$). 실험군은 대조군에 비해 모두 유의하게 낮았으며 특히 ɣ-PGA 와 아이소플라본 공동식이군이 62.6% 감소하여 중성지방과 비슷한 경향을 보였다($p<0.05$).

LDL-콜레스테롤은 대조군이 정상군에 비해 187.7% 높았으며 양성대조군은 대조군에 비해 54.3% 유의하게 낮았다($p<0.05$). 실험군은 대조군에 비해 모두 유의하게 감소했으며 ɣ-PGA 와 아이소플라본 공동식이군이 59.8%로 가장 낮았다($p<0.05$). HDL-콜레스테롤은 대조군이 정상군에 비해 29% 낮았으며 양성대조군은 대조군에 비해 21.3% 높았다($p<0.05$). 실험군은 대조군에 비해 모두 유의하게 높았으나 ɣ-PGA 와 아이소플라본 공동식이군이 43%로 가장 높은 증가를 보여($p<0.05$) 지질저하 작용이 강한 것으로 보인다. 인슐린 함량은 대조군이 정상군에 비해 105%

유의하게 증가하였으며 양성대조군은 대조군에 비해 32.8% 감소했다($p<0.05$). 실험군은 대조군에 비해 γ-PGA 식이군 47.3%, 아이소플라본 식이군 47.3%, γ-PGA 와 아이소플라본 공동식이군 47.5%로 유의한 감소를 보였다($p<0.05$). 글루코오스 함량은 대조군이 정상군에 비해 56.5% 유의하게 증가하였고 양성대조군은 대조군에 비해 30.1% 감소했다($p<0.05$). 실험군은 모두 대조군에 비해 유의하게 감소하였으며 그 중 γ-PGA 와 아이소플라본 공동식이군이 42.7%로 가장 낮았다($p<0.05$).

HOMA-IR 은 정상군에 비해 대조군이 220%로 유의적으로 높았고 양성대조군인 카페인 식이군은 대조군에 비해 53.9% 감소하였으며 실험군인 γ-PGA 식이군 66.2%, 아이소플라본 식이군 66.5%, 아이소플라본과 γ-PGA 공동식이군 70%로 대조군에 비해 유의한 감소를 보였다($p<0.05$).

γ-PGA 와 아이소플라본 공동식이군이 인슐린 민감도 개선을 통한 글루코오스 유용성이 향상됨으로써 혈당저하와 인슐린저항성이 개선된 것으로 보인다.

【표 7】

고지방식이 비만 유도 쥐의 γ-PGA 와 아이소플라본 섭취시 혈청 생화학적 분석 1

항목	정상군	대조군		실험군		
	N	C	PC	E1	E2	E3
AST[1)]	76.80 ± 3.34^{bc}	129.20 ± 3.89^{d}	79.00 ± 3.16^{c}	75.00 ± 2.64^{bc}	73.50 ± 2.88^{b}	60.25 ± 3.59^{a}
ALT[2)]	49.20 ± 3.76^{a}	94.20 ± 1.92^{d}	61.75 ± 2.27^{c}	57.33 ± 2.08^{b}	56.67 ± 2.80^{b}	52.00 ± 2.94^{a}
ALP[3)]	188.60 ± 3.05^{a}	272.00 ± 43.4^{b}	199.00 ± 3.19^{a}	202.33 ± 7.50^{a}	189.17 ± 8.56^{a}	195.00 ± 3.16^{a}
LDH[4)]	345.60 ± 12.46^{a}	561.60 ± 15.69^{c}	381.75 ± 9.74^{b}	383.00 ± 23.06^{b}	350.83 ± 6.40^{a}	377.25 ± 3.59^{b}

값은 8 마리에 대한 실험의 평균± SD 이다. 단위는 U/L 이다.

N: 정상식이

C: 고지방식이

PC: 고지방식이 + 0.3% 카페인

E1: 고지방식이 + 3% γ-PGA

E2: 고지방식이 + 0.1% 아이소플라본

E3: 고지방식이 t + 3% γ-PGA + 0.1% 아이소플라본

1)AST (aspartate transaminase)

2)ALT (alanine transaminase)

3)ALP (alkaline phosphatase)

4)LDH (Lactate dehydrogenase)

같은 행에 있는 서로 다른 윗 첨자들의 값은 ANOVA 와 Duncan 의 다중검정(Duncan's multiple range test)을 이용하여 분석을 하였으며 그 값들이 확연히 다르다. 통계학적 유의 수준은 $p<0.05$ 로 하였다.

【표 8】

고지방식이 비만 유도 쥐의 γ-PGA 와 아이소플라본 섭취시 혈청 생화학적 분석 2

항목	정상군	대조군		실험군		
	N	C	PC	E1	E2	E3
중성지방	49.80±5.40^{b}	181.20±3.76^{d}	60.00±3.46^{c}	63.00±2.00^{c}	49.67±4.76^{b}	42.00±1.82^{a}
HDL-C	133.20±4.43^{d}	94.60±2.88^{a}	114.75±4.11^{b}	110.67±20.8^{b}	124.67±5.75^{c}	135.25±2.98^{d}
LDL-C	48.60±2.79^{a}	139.80±4.26^{d}	63.75±2.87^{c}	63.33±2.51^{c}	62.17±3.12^{c}	56.25±5.12^{b}
글루코오스	80.42±0.95^{b}	125.88±7.88^{d}	88.12±2.74^{c}	80.76±1.50^{b}	80.10±1.92^{b}	72.12±2.03^{a}
인슐린	20.64±0.51^{a}	42.32±1.40^{d}	28.47±3.99^{b}	22.30±1.01^{a}	22.31±0.67^{a}	22.20±0.80^{a}
HOMA-	73.77±1.7	236.50±19.	111.50±13.	80.04±5.1^{a}	79.42±2.61^{a}	71.16±4.56^{a}

IR	[a]	05[c]	08[b]			

값은 8 마리에 대한 실험의 평균± SD 이다. 단위는 mg/dl 이다.

HOMA-IR = < 공복 인슐린 (μU/mL) × 공복 혈당 (mM)/22.5

N: 정상식이

C: 고지방식이

PC: 고지방식이 + 0.3% 카페인

E1: 고지방식이 + 3% γ-PGA

E2: 고지방식이 + 0.1% 아이소플라본

E3: 고지방식이 t + 3% γ-PGA + 0.1% 아이소플라본

HDL-C: high density lipoprotein-cholesterol

LDL-C : low density lipoprotein-cholesterol

같은 행에 있는 서로 다른 윗 첨자들의 값은 ANOVA 와 Duncan 의 다중검정(Duncan's multiple range test)을 이용하여 분석을 하였으며 그 값들이 확연히 다르다. 통계학적 유의 수준은 $p<0.05$ 로 하였다.

간조직의 지질함량 분석

간조직의 지질함량 분석 결과는 표 9 와 같다. 인지질은 정상군에 비해 대조군이 91.9% 유의하게 증가하였으나 실험식이 후 감소했으며 γ-PGA 와 아이소플라본 공동식이군이 38.6%로 대조군에 비해 가장 유의한 감소를 보였다($p<0.05$). 중성지방과 총 지질은 정상군에 비해 대조군이 각각 270.2%와 153.2% 높았으나 실험식이 후 유의하게 감소했다($p<0.05$). 특히 γ-PGA 와 아이소플라본 공동식이군이 대조군에 비해 각각 73.5%와 56.7% 가장 유의하게 감소하여($p<0.05$) 고지방 식이후 증가된 간조직의 지질농도가 거의 정상군에 가깝게 회복된 것으로 보인다. 총 콜레스테롤 역시 정상군에 비해 대조군이 92.2% 유의하게 높았으나 실험식이후 대조군에 비해 유의하게 낮았다($p<0.05$). 특히 γ-PGA 와 아이소플라본

공동식이군이 대조군에 비해 41.8% 가장 뚜렷하게 감소하여($p<0.05$) 실험군 중 간조직의 지질저하 효과가 가장 높은 것으로 보인다.

【표 9】

고지방식이 비만 유도 쥐의 γ-PGA 와 아이소플라본 섭취시 간조직의 생화학적 분석

항목	정상군	대조군		실험군		
	N	C	PC	E1	E2	E3
인지질	1.23 ± 0.07^{a}	2.36 ± 0.06^{d}	1.62 ± 0.13^{c}	1.62 ± 0.10^{c}	1.66 ± 0.12^{c}	1.45 ± 0.04^{b}
중성지방	9.17 ± 1.00^{a}	33.95 ± 2.35^{c}	10.36 ± 1.22^{ab}	11.02 ± 1.42^{b}	11.32 ± 1.29^{b}	9.01 ± 0.60^{a}
총 콜레스테롤	34.38 ± 2.50^{a}	66.10 ± 4.49^{d}	44.72 ± 2.08^{c}	47.88 ± 4.01^{c}	46.73 ± 3.23^{c}	38.51 ± 2.65^{b}
총 지질	37.98 ± 2.39^{a}	96.18 ± 4.93^{c}	51.85 ± 4.41^{b}	54.80 ± 5.62^{b}	54.20 ± 3.06^{b}	41.71 ± 2.05^{a}

값은 8 마리에 대한 실험의 평균± SD 이다.

N: 정상식이

C: 고지방식이

PC: 고지방식이 + 0.3% 카페인

E1: 고지방식이 + 3% γ-PGA

E2: 고지방식이 + 0.1% 아이소플라본

E3: 고지방식이 t + 3% γ-PGA + 0.1% 아이소플라본

서로 다른 윗 첨자들의 값은 ANOVA 와 Duncan 의 다중검정(Duncan's multiple range test)을 이용하여 분석을 하였으며 그 값들이 확연히 다르다. 통계학적 유의 수준은 $p<0.05$ 로 하였다.

변 중 지질함량과 담즙산 분석

변으로 배출되는 지질함량 분석결과는 표 10 과 같다. 변중 총 콜레스테롤과 총 지질은 정상군에 비해 대조군이 각각 4.9%와 21.1% 유의하게 감소하였으나 실험식이 후 모두 증가했다($p<0.05$). 특히 γ-PGA 와 아이소플라본 공동식이군이 대조군에 비해 각각 39.9%, 44.2%로 가장 유의한 증가를 보였으며 정상군보다도 지질배출이 높았다($p<0.05$).

중성지방은 정상군에 비해 대조군이 5.6% 증가했으나 통계적 유의성은 없었으며 실험군간 비교에서 γ-PGA 와 아이소플라본 공동식이군이 대조군에 비해 42.4% 중성지방 배출량이 증가하여($p<0.05$) 총 콜레스테롤과 총 지질과 비슷한 경향을 보였다.

변중 담즙산 배출량은 대조군이 정상군에 비해 33.3% 낮았으나 실험식이후 높았으며 실험군간 비교에서 아이소플라본 식이군과 γ-PGA 와 아이소플라본 공동식이군이 250%로 담즙산 배출량이 증가했다($p<0.05$).

【표 10】

고지방식이 비만 유도 쥐의 γ-PGA 와 아이소플라본 섭취시 분변의 생화학적 분석

항목	정상	대조군		실험군		
	N	C	PC	E1	E2	E3
담즙산	0.03 ± 0.00^{b}	0.02 ± 0.00^{a}	0.03 ± 0.00^{a}	0.03 ± 0.00^{b}	0.07 ± 0.00^{c}	0.07 ± 0.00^{c}
중성지방	1.25 ± 0.02^{a}	1.32 ± 0.01^{ab}	1.35 ± 0.00^{c}	1.33 ± 0.01^{ab}	1.37 ± 0.01^{b}	1.88 ± 0.11^{a}
총 콜레스테롤	4.30 ± 0.66^{a}	4.09 ± 0.05^{ab}	4.37 ± 0.01^{b}	4.33 ± 0.01^{ab}	4.96 ± 0.13^{b}	5.72 ± 0.31^{c}
총 지질	6.73 ± 0.00^{b}	5.31 ± 0.06^{a}	6.69 ± 0.02^{b}	6.74 ± 0.02^{b}	5.25 ± 0.15^{a}	7.66 ± 0.02^{c}

값은 8 마리에 대한 실험의 평균± SD 이다.

N: 정상식이

C: 고지방식이

PC: 고지방식이 + 0.3% 카페인

E1: 고지방식이 + 3% γ-PGA

E2: 고지방식이 + 0.1% 아이소플라본

E3: 고지방식이 t + 3% γ-PGA + 0.1% 아이소플라본

서로 다른 윗 첨자들의 값은 ANOVA 와 Duncan 의 다중검정(Duncan's multiple range test)을 이용하여 분석을 하였으며 그 값들이 확연히 다르다. 통계학적 유의 수준은 $p<0.05$ 로 하였다.

ANOVA 와 Duncan 의 다중검정(Duncan's multiple range test)을 이용하여 분석을 하였으며 C 그룹에 비교한 값이다. 통계학적 유의 수준은 $^{**}p<0.001$ 로 하였다.

간과 부고환 지방조직의 조직학적 관찰

헤마톡실린-에오진(H&E) 염색

간조직의 조직학적 관찰 결과는 도 2 와 같다. 9 주 동안의 고지방식이에 의해 간조직에서 대조군이 정상군에 비해 지방구(lipid droplet)의 분포 형태가 조밀하게 분포되어 있어 지방 축적이 확인 된 반면 양성대조군, γ-PGA 식이군, 아이소플라본 식이군 및 γ-PGA 와 아이소플라본 공동식이군에서는 정상군과 유사한 형태의 지방구 분포를 보여 실험 물질 처치에 의해 지질축적이 개선됨을 확인할 수 있었다.

지방세포 크기와 수의 변화

부고환 지방조직을 H&E 염색(도 3)하여 스케일 바(scale bar)로 크기와 수를 측정한 결과는 도 4 및 5 와 같다. 고지방식이로 인한 대조군의 지방세포의 크기와 수는 증가했고 대조군에 비교했을 때 모든 그룹에서 감소되었다. 특히 γ-PGA 와 아이소플라본 공동식이군에서는 지방세포의 크기와 수는 정상군 수준까지 회복되었고 이는 실험 물질 처치에 의해 지질축적이 개선됨을 확인할 수 있었다.

유해산소 대사 효소 활성 및 지질과산화 함량

간 조직의 유해산소 대사 효소활성 및 지질과산화 함량 분석 결과는 표 11 과 같다. 유해산소 생성 효소인 XO 와 생체막 지질의 과산화물 생성지표인 TBARS 는 정상군에 비해 대조군이 각각 47.2%와 111.6% 유의하게 높았고 양성대조군인 카페인 식이군은 39.7%, 59.7% 감소했다($p<0.05$). 실험식이 후 대조군에 비해 모두 유의한 감소를 보였으며 실험군간 비교에서는 대조군에 비해 γ-PGA 식이군은 각각 35.4%, 59.9% 감소했고

아이소플라본 식이군은 35%, 59.4% 감소했으며 γ-PGA 와 아이소플라본 공동식이군이 44.9%, 68.4%로 가장 뚜렷한 감소를 보였다($p<0.05$). 유해산소 제거 효소인 SOD 와 CAT 는 정상군에 비해 대조군이 각각 41%, 38.1% 유의하게 낮았고 대조군에 비해 양성대조군인 카페인 식이군은 148%, 70.5% 유의하게 높았다($p<0.05$). 실험군은 대조군과 비교하여 γ-PGA 식이군이 각각 150.2%, 75.8% 높았고 아이소플라본 식이군은 157%, 59.5% 높았으며 γ-PGA 와 아이소플라본 공동식이군이 191.6%, 99.5%로 가장 뚜렷한 증가를 보여 항산화능이 우수한 것으로 나타났다($p<0.05$).

【표 11】

고지방식이 비만 유도 쥐의 γ-PGA 와 아이소플라본 섭취시 간조직의 유해산소 대사관련 생화학적 분석

항목	정상군	대조군		실험군		
	N	C	PC	E1	E2	E3
XO	1.59 ± 0.06^{d}	2.34 ± 0.05^{e}	1.41 ± 0.02^{b}	1.51 ± 0.04^{c}	1.52 ± 0.05^{c}	1.29 ± 0.03^{a}
SOD	23.43 ± 1.42^{a}	13.60 ± 0.95^{b}	33.73 ± 0.82^{c}	34.03 ± 0.84^{cd}	34.95 ± 0.98^{d}	39.65 ± 0.97^{e}
CAT	6.46 ± 0.39^{b}	4.00 ± 0.46^{a}	6.82 ± 0.18^{c}	6.98 ± 0.15^{c}	7.03 ± 0.20^{c}	7.98 ± 0.16^{d}
TBARS	2.17 ± 0.10^{c}	4.59 ± 0.23^{d}	1.85 ± 0.05^{b}	1.84 ± 0.04^{b}	1.86 ± 0.53^{b}	1.45 ± 0.07^{a}

값은 8 마리에 대한 실험의 평균± SD 이다.

단위는 nmole 2,4-디니트로벤젠-글루타티온 콘쥬게이트/mg 프로테인/min 이다.

N: 정상식이

C: 고지방식이

PC: 고지방식이 + 0.3% 카페인

E1: 고지방식이 + 3% γ-PGA

E2: 고지방식이 + 0.1% 아이소플라본

E3: 고지방식이 t + 3% γ-PGA + 0.1% 아이소플라본

XO: 잔틴 옥시데이즈

SOD: 수퍼옥사 디스무타제

CAT: 카탈라제

TBARS: 티오바르비투릭 에시드 리액티브 서브스탠스

서로 다른 윗 첨자들의 값은 ANOVA 와 Duncan 의 다중검정(Duncan's multiple range test)을 이용하여 분석을 하였으며 그 값들이 확연히 다르다. 통계학적 유의 수준은 $p<0.05$ 로 하였다.

ANOVA 와 Duncan 의 다중검정(Duncan's multiple range test)을 이용하여 분석을 하였으며 C 그룹에 비교한 값이다. 통계학적 유의 수준은 $*p<0.01$ 로 하였다.

간조직의 분자생물학적 변화

지방세포에서 분비되는 싸이토카인(cytokine)인 아디포넥틴과 렙틴의 간 조직에서 발현량은 각각 도 6 및 7 과 같다. 대조군은 정상군에 비해 62.6% 유의하게 낮았고, 양성대조군인 카페인 식이군은 대조군에 비해 261.2% 유의하게 높았다($p<0.05$). 실험군은 대조군에 비해 γ-PGA 식이군이 260%, 아이소플라본 식이군 266.2%, γ-PGA 와 아이소플라본 공동식이군이 400% 유의하게 높았다($p<0.05$). 지방산 산화의 속도조절 효소인 CPT-1 과 ATP 생성 조절을 통한 에너지 조절 인자인 AMPK 의 간 조직에서 유전자 발현량은 각각 도 8 및 9 와 같다. 대조군은 정상군에 비해 각각 44.1%, 402.5% 유의하게 낮았고 양성대조군인 카페인 식이군은 대조군에 비해 108%, 73.8% 유의하게 높았다($p<0.05$). 실험군은 γ-PGA 식이군이 109.4%, 73.4%, 아이소플라본 식이군 108.7%, 72.8%, γ-PGA 와 아이소플라본 공동식이군 72.4%, 60.3%로 유의하게 높았다($p<0.05$). 인슐린-의존형(insulin-dependent) 포도당 수송체(transporter) GLUT-4 의 간 조직에서 유전자 발현량은 도 10 과 같다. 대조군은 정상군에 비해 37.4% 유의하게 낮았고 양성대조군인 카페인 식이군은 대조군에 비해 87.4% 유의하게 높았다($p<0.05$). 실험군은 γ-PGA 와 아이소플라본 공동식이군이 대조군에 비해 111%로 가장 높았고 γ-PGA 식이군 89.1%, 아이소플라본 식이군 90.8%로 유의하게 높았다($p<0.05$). 지방산 합성에 관련된 유전자들의 전사에서 주요하게 작용하는 SREBP-1c 의 발현량은 도 11 과 같다. 양성대조군 40.6%, γ-PGA 식이군 36.8%, 아이소플라본 식이군 42.2%, γ-PGA 와 아이소플라본 공동식이군 60.3%로 대조군에 비하여 유의성있게($p<0.05$) 감소하였다. 따라서 실험 물질 처치에 의해 지질합성의

저해, 지방산 산화의 증가, 글루코오스의 조절이 개선되었으며 비만에 있어서 효과적임을 증명하였다.

지방조직의 분자생물학적 변화

지방합성과 지방산 산화, 인슐린 민감성 조절 인자들의 지방조직에서 발현량은 도 12-14 와 같다. 체중과 백색지방조직의 감소가 PPAR-γ 발현억제에 기인했을지의 여부를 확인하기 위해 PPAR-γ의 mRNA 수준을 측정했다(도 12). 그 결과 지방전구세포(preadipocyte)에서 지방세포(adipocyte)로 지방세포 분화를 촉진하는 인자인 PPAR-γ는 대조군이 정상군에 비해 64.7% 유의하게 낮았고, 양성대조군인 카페인 식이군은 대조군에 비해 52.8% 유의하게 높았다($p<0.05$). 실험군은 대조군에 비해 γ-PGA 식이군이 53.4%, 아이소플라본 식이군 54.1%, γ-PGA 와 아이소플라본 공동식이군이 67.9% 순으로 유의한 감소를 보여($p<0.05$) 지방합성 억제효과가 우수한 것으로 보인다. 지방 산화와 인슐린 감수성을 활성화하는 PPAR-α의 갈색지방조직에서 발현량은 도 13 와 같다. 대조군은 정상군에 비해 40.4% 유의하게 낮았고, 양성대조군인 카페인 식이군은 대조군에 비해 358.7% 유의하게 높았다($p<0.05$). 실험군은 대조군에 비해 γ-PGA 와 아이소플라본 공동식이군이 675.9%로 가장 높았고 γ-PGA 식이군이 344.8%, 아이소플라본 식이군 355.2%순으로 유의한 감소를 보였다($p<0.05$). 미토콘드리아 열생성을 통한 지방산화 인자인 UCP-3 의 발현량은 도 14 와 같다. 대조군이 정상군에 비해 63.2% 유의하게 낮았고, 양성대조군인 카페인 식이군은 대조군에 비해 224.6% 유의하게 높았다($p<0.05$). 실험군은 대조군에 비해 γ-PGA 식이군이 217.5%, 아이소플라본 식이군 226.3%, γ-PGA 와 아이소플라본 공동식이군이 24.6% 유의하게 감소했다($p<0.05$).

고 찰

비만의 발생은 지방세포 전구물질의 집합과 새로운 지방세포의 분화를 포함하는 일련의 과정에 의해 진행되며, 이러한 과정을 거쳐서 분화된 지방세포는 세포질내에 중성지방을 저장 하게 된다. 지방생성(Adipogenesis)은 지방전구세포(preadipocyte)가 증식 및 분화되는

과정을 거쳐 성숙한 지방세포(adipocyte)로 되는 과정을 의미하고, 이 과정에서 지질 축적, 호르몬에 대한 민감성 변화가 초래되며, 지질합성(lipogenesis) 및 지방분해(lipolysis)에 관여하는 일련의 유전자발현이 변화된다. 비만 해결을 위한 중요한 메커니즘은 지방합성 억제와 지방산의 산화이며, 실제로 항-비만제인 C75 는 비만 치료에서 2 개의 중요한 연결 통로인 지방산 합성과 지방산 산화를 목표로 한다고 알려져 있다(Kuhajda & Landree & Ronnett. 2005). γ-PGA 와 아이소플라본의 주원료인 대두는 고지방식이로 유도된 비만에서 총 콜레스테롤, LDL 콜레스테롤을 감소시키고 HDL 콜레스테롤을 증가시켜 지질개선과 고지혈증을 예방한다고 보고되고 있다(Anthony & Clarkson & Williams. 1998 : Anderson et al. 1995). 본 연구는 고지방식이로 유도된 c57BL/6 마우스가 지질대사와 당대사의 기능을 저하시키는 것을 확인하고, γ-PGA 와 아이소플라본을 처리함으로써 유전자 발현 및 렙틴(렙틴), 아디포넥틴(adiponectin) 등의 싸이토카인의 분비를 조절하여 지질대사와 당대사를 개선시킴을 연구하였다.

식이 섭취량은 정상군보다 고지방식이군이 감소했는데 고지방식이의 에너지 밀도가 높아 식이섭취량이 감소한 것으로 보여 진다. γ-PGA 와 아이소플라본이 고지방식이로 유도된 비만 마우스에서 체중을 감소시키는지를 조사하였다. 고지방식이 후 체중이 증가하는 선행연구는 보고되고 있는데(Unger. 2003), 60% 지방식이에 함유된 지방 함량의 차이 때문이라고 생각된다. 정상군에 비해 대조군이 425.4% 증가했으며 대조군에 비해 γ-PGA 식이군, 아이소플라본 식이군 및 γ-PGA 와 아이소플라본 공동식이군이 각각 62.10%, 45.94%, 87.94% 낮은 체중 증가량을 보여 체중을 감소시킴을 확인 하였다. 청국장 식이 후 고지방- 고콜레스테롤 식이를 급여한 흰쥐에서 체중감소를 보인 연구와(Kim et al. 2011), 카제인 식이군보다 대두 식이군과 청국장 식이군의 체중이 감소된 연구(Kwon et al. 2006 ; Lee et al. 2006)가 보고되고 있으며 본 연구 결과 실험군에서 모두 체중이 감소하여 선행연구와 일치하며 특히 청국장 성분 중 γ-PGA 및 아이소플라본 공동식이군의 체중 증가량은 정상군 수준으로 유의한 효과를 입증했다. 식이섭취에 대한 체중변화를 나타내는 식이효율은 정상군에 비해 대조군이 676.7% 증가했고, 대조군에 비해 γ-PGA 식이군, 아이소플라본

식이군 및 γ-PGA 와 아이소플라본 공동식이 후 각각 85.1%, 47.6%, 85.8% 낮아 음식물을 섭취량에 비례하여 실험군들의 체중이 감소한 것으로 나타났다. 비만연구에 있어 식이효율은 중요한 지표가 되며 특히 실험군 중에서 γ-PGA 및 아이소플라본 공동식이군의 식이효율이 가장 높게 나타나 비만에 효과적인 물질로 사료된다.

장기무게 변화는 간은 정상군에 비해 대조군이 증가하여 지방간의 양상을 보였고 γ-PGA 식이군, 아이소플라본 식이군 및 γ-PGA 와 아이소플라본 공동식이 후 대조군에 비해 감소했으며 부고환 지방은 대조군에 비해 γ-PGA 식이군, 아이소플라본 식이군 및 γ-PGA 와 아이소플라본 공동식이군 모두 유의한 감소를 보였다. 고지방식이는 간의 중성지방 합성을 증가시키고 인지질과 VLDL 의 합성은 억제된다고 보고하고 있다(Stein, Y. et al. 1990). 또한 부고환 지방과 복부지방 등 백색지방조직은 주로 혈청 트리글리세라이드에서 유래된다는 보고(Schreyer et al. 2002)가 있어 γ-PGA 와 아이소플라본은 중성지방 감소에 의한 체지방억제 효과가 있을 것으로 사료된다. 심장과 신장, 비장의 무게는 통계적 유의성을 보이지 않았다.

5 주간의 고지방식이한 C57BL6 마우스는 비만으로 인해 혈액의 지질 축적이 되었을 것으로 판단되어 지질을 분석하였다. 총 콜레스테롤은 정상군에 비해 대조군이 122.7% 높았으며 대조군에 비해 γ-PGA 식이군, 아이소플라본 식이군 및 γ-PGA 와 아이소플라본 공동식이 후 각각 42.2%, 51.2%, 62.5% 감소하였다. 혈액중 지질의 급원이 되는 총 콜레스테롤 증가는 지질대사 장애와 동맥경화 및 그에 따른 합병증을 발생시킨다(YANG. 2000). 식이성분 중 식이 단백질의 종류에 따라 혈중 지질농도에 영향을 미친다고 알려져 있으며 식물성 단백질인 대두 단백질의 저지혈 효과 보고되었다(Teixeira et al. 2000). 대두 단백질을 공급한 비만 SHR/N-cp 랫트(Rats)는 카제인 공급한 마우스와 비교하여 총콜레스테롤, LDL 콜레스테롤, 트리글리세라이드의 농도가 낮았으며(Sam et al. 2003), 대두 발효시 새로운 생리활성 물질인 γ-PGA(Kim et al. 2002) 역시 총콜레스테롤 저하 효과가 있다고 보고되고 있다.

대두 단백질의 혈중 콜레스테롤 저하시키는 메커니즘 중 하나는 대두 단백질 섭취에 의해 유발된 담즙산 배출의 증가가 LDL 의 제거를 개선하고,

유리 티록신 분비를 증가시키고 간세포에 의해 LDL 제거를 증가시킨 방법으로 간 대사를 변경하고, LDL 리셉터를 증가시킨다는 것이다(Potter. 1996).

일반적으로, 식물 단백질의 식이는 동물성 단백질보다 혈청 지질과 관련된 낮은 I/G 비율을 나타내고(Torres & Torre-Villalvazo & Tovar. 2006), 지질의 만성적 축적은 췌장의 인슐린의 분비를 증가시킨다는 것이 보고되었다(Kakuma et al. 2000). 대두단백질과 아이소플라본, 청국장은 인슐린 민감도 개선을 통해 인슐린 분비를 조절한다고 보고되고 있어 본 연구의 대조군보다 γ-PGA 식이군, 아이소플라본 식이군 및 γ-PGA 와 아이소플라본 공동식이군이 인슐린 분비를 감소시킨 내용과 일치한다. 따라서 실험군은 높은 지방함량 섭취에도 불구하고 과인슐린혈증과 인슐린 저항성을 개선했다.

비만일 때 지방세포의 형태론적인 변화는 지질 축적의 증가와 이미 존재하는 지방세포의 확대로 인해 지방조직 질량이 증가하는 것으로 보고되었다(Ogawa et al., 2004; Villena et al., 2004). 백색 지방 조직 지질이 순환성 트리글리세라이드에서 주로 파생되기 때문에, 지방 세포 크기는 혈청 트리글리세라이드의 영향을 받는다(Bourgeois et al. 1983). CD-1 마우스에 고 식물성 에스트로겐(high phytoestrogen) 식이를 공급했을 때 지방조직무게와 지방세포크기가 감소했음을 확인했고(Christopher et al. 2007), 지방 중량의 감소가 콩 유래 식물성에스트로겐(phytoestrogens)의 투여와 상호 관련되었다는 것을 보여줬다(Lephart et al. 2004). 본 연구에서 대조군에 비해 γ-PGA 식이군과 아이소플라본 식이군, γ-PGA 및 아이소플라본 공동식이군의 실험 후 지방조직의 세포크기가 감소하여 선행연구와 일치하며 백색지방 중량과 체중감소의 결과가 된 것으로 판단된다.

지방조직에서 분비된 호르몬인 렙틴은 비지방 조직에서 지질의 축적을 방지하기 뇌하수체에서 음식물 섭취를 조절하고, 지질 침착을 방지하기 위해 말초 조직의 지방산(FA) 산화를 자극한다(Unger & Orci. 2001). 본 연구결과에서는 대조군에 비해 γ-PGA 식이군과 아이소플라본 식이군, γ-PGA 및 아이소플라본 공동식이군이 대조군에 비해 렙틴 발현량이 높게 나타났다. 따라서 대두를 식이한 군의 렙틴 발현량이

고지방식이군보다 높게 나타난 연구와 대두나 아이소플라본을 식이한 군에서 카제인 식이군보다 렙틴 발현량이 높게 나타난 연구의 결과를 뒷받침해준다.

지방조직은 단순한 잉여 에너지의 저장소가 아니라, 지방세포 분비 물질들을 분비하여 인슐린 저항성과 지질/탄수화물 대사, 면역기능, 염증반응, 혈관벽 및 혈압 유지 및 생식기능 등에 중요한 역할을 하는 내분비기관이다(Ahima & Flier. 2000). 지방조직에서 분비된 아디포넥틴은 아디포넥틴 수용체 (adipoR1, adipoR2)와 결합하여 아데노신 모노포스페이트 키나제(adenosine monophosphate kinase, AMPK)를 활성화시켜 간의 포도당 생성을 억제하고, 근육의 지방산 산화를 촉진하여 인슐린감수성을 증가시킨다. 아디포넥틴 대응 마우스 Acrp30 연구에서 근육의 지방산 산화의 급성 증가를 통하여 트리글리세라이드 ,비에스테르 지방산, 혈장 글루코스를 현저하게 감소시켰고(Rudenski et al. 1991), 혈중 아디포넥틴 농도가 당뇨병 환자에서 비 당뇨병 대조군에 비해 낮고, 체질량지수 및 HOMA-IR 과 음의 상관관계가 있다고 보고했다(Youn et al. 2004). 혈장 아디포넥틴 레벨이 인슐린 민감성을 개선한다는 연구(Weyer et al. 2001)와 일본인을 대상으로 한 연구에서 높은 아디포넥틴 농도를 가진 사람은 혈청 LDL 콜레스테롤, 중성지방이 낮았고 HDL-콜레스테롤은 높았으며 HOMA-IR 와 음의 상관관계에 있었다(Yukihiro et al. 2002)고 보고하여 본 연구 결과 고지방식이 대조군에 비해 γ-PGA 식이군, 아이소플라본 식이군 및 γ-PGA 와 아이소플라본 공동식이군의 아디포넥틴 발현량이 각각 260% , 266.3%, 400% 높게 나타나 아디포넥틴이 인슐린 저항성과 혈중 지질을 개선시킨 선행 연구결과와 일치했다.

최근 맷포민(metformin)당뇨병 치료제와 아디포넥틴, 렙틴과 같은 아디포싸이토카인(adipocytokine)이 모두 AMPK 활성을 촉진시킴이 보고되고 있다(Yamauchi et al.2000: Fulgencio et al. 2001). 혈액 내 포도당은 간에서 당원분해(glycoge-nolysis)와 포도당 신합성(gluconeogenesis)의 과정에 의해 생성된다. 아디포넥틴과 2 형 당뇨병의 대표적인 치료제인 맷포민은 골격근에서와 마찬가지로 간에서 지방산 산화를 증가시키는 한편 포도당 합성을 감소시킴이 보고되고 있는데 이 효과는 AMPK 의 활성화를

통해 일어나는 것으로 설명된다(Minokoshi et al. 2002 : Musi et al. 2002 : Zhou et al. 2001).

Brown & Goldstein(1997)에 의하면, 간에서의 지방 및 콜레스테롤의 생성은 스테롤 레귤러리 엘리먼트 바인딩 프로테인(sterol regulatory element binding protein, SREBPs)의 발현정도에 따라 결정된다고 하였고, 인슐린저항으로 유도된 혈중 고 인슐린은 SREBP-1c 의 활동을 높여 간에서의 중성지방을 쌓이게 한다고 보고하고 있다(Fortez et al., 1999; Shimomura et al., 1999). SREBP 는 베이직 헬릭스-루프-헬릭스(basic helix-loop-helix) 전사인자로서 지방을 분화시키며 이중 SREBP-1c 는 소포체(endoplasmic reticulum)의 막에서 비 활성화되어 붙어 있다가 콜레스테롤이 부족하거나 인슐린에 의해 SREBP 클리어베이지-액티베이션 프로테인(cleavage-activation protein0 을 활성화시켜 SREBP-1c 를 골지(Golgi)체로 이동시킨다. 이후 몇 몇 효소들에 의해 분해되어 활성된 것들이 핵으로 들어가 SREBP-1c 의 표적유전자의 발현들을 유도시킨다(Horton et al., 2002).

즉, 간에서 중성지방합성과 관련된 ACC, FAS, 스테롤-CaP-디새츄라아제(sterol-CaP desaturase), ATP 시트레이트 리아제(ATP citrate lyase), 말릭 엔자임(malic enzyme)과 같은 유전자발현을 조절하기 때문에 SREBP-1c 의 발현증가는 간에서 지방산의 생합성과 조직 내 지방축적을 일으키는 것이다(Shimomura et al. 1999). AMPK 는 SREBP-1c 를 감소시켜 지방간 발생을 억제하고(Yang et al. 2008), 포스포에놀피루베이트 카르복시키나제(phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK)의 전사를 억제하여 포도당의 합성을 저해한다(Hubert et al. 2000). AMPK 가 인산화 되면 ACC 와 같은 효소들을 비활성화 시켜 간에서의 SREBP-1c 의 발현조절을 통해 이들 표적유전자들의 합성을 억제시키기 때문에 간에서 지방생성을 예방(Yang et al., 2008)할 수 있다고 제기되고 있다. 이전 연구는 대두 단백질 식품의 장기간 소비가 지방간을 감소시키면서, 차례로 간에서 지방합성과 관련된 단백질 SREBP2-1c 의 발현을 감소시켜 과인슐린혈증을 감소시킨다는 것을 보여줬다(Ascencio et. al. 2004). Lee(2005)에 의하면 pAMPK 가 SREBP-1c 의 발현을 막는다고 하였고, 비만과 관련된 대사증후군에서는 조직 내 AMPK 활성화를 억제시켰다는 연구결과와

일치한다(Lessard et al. 2006). 따라서 본 연구에서는 γ-PGA 식이군, 아이소플라본 식이군 및 γ-PGA 와 아이소플라본 공동식이군이 고지방식이로 비만이 유도된 마우스의 간 조직에서 AMPK 의 발현량은 대조군에 비해 각각 73.7%, 72.8%, 60.3% 높게 나타났고 SREBP-1c 의 발현량은 γ-PGA 식이군, 아이소플라본 식이군 및 γ-PGA 와 아이소플라본 공동식이군이 대부분 낮게 나타나 AMPK 활성화에 의한 SREBP-1c 와 ACC 의 발현이 감소됨으로써 지방합성을 저해하고 지질개선 효과를 보인 것으로 사료된다.

간에서 AMPK 는 세포의 에너지를 감지하여 지방을 대사시킨다(You et al. 2004). 간에서의 AMPK 활성은 ACC 를 불활성화 시키고(Davies et al. 1992), 말로닐 CoA 의 합성을 감소시켜 지방산 산화를 증가시킨다. 또한 말로닐 CoA 를 억제하여 미토콘드리아내로 장쇄 아실-CoA(long chain fatty acyl-CoA, LCAC)의 운반을 담당하는 카르니틴 팔미토일 트랜스퍼라제(carnitine palmitoyl transferase-1, CPT-1)을 활성화시켜 지방산의 미토콘드리아 수송을 높여 지방산 산화를 유도했다.

AMPK 작용을 이용하는 바이구아니드 맷포민(biguanide metformin)과 트로글리타존(troglitazone) 화합물을 이용하는 치아졸리딘다이온(thiazolidinedione, TZD)은 선택된 PPAR-α 타겟 유전자 발현을 증가시키고 포도당 생성을 증가시키며 AMPK 작용저하는 PPAR-α 발현과 PPAR-α 타겟 유전자로 알려진 ACO 와 CPT-1 의 발현을 억제했다(Kim et al. 2006). PPAR-α는 미토콘드리아 베타산화 속도조절 효소인 CPT-1 을 조절한다(Brady et al. 1989). 인슐린 분비의 또 다른 변조기가 PPAR-α라고 증명했다(Sugden & Holness. 2004). 세포내 지방산과 그들의 유도체는 예외적 단백질 키나제 C(kinase C)를 활성화함으로써 인슐린 자극 포도당 대사, 포도당/지방산 회로(glucose/fatty acid cycle), 인슐린 신호전달(insulin-signaling) 경로에 대한 효과를 저해하는 것으로 알려져 있으며 PPAR-α의 활성화는 지방산 산화를 증가시키므로(간에서 명백한 효과) 조직의 지질함량을 감소시키고 세포독성을 최소화시킨다(Pascal Ferre. 2004). 뉴트리셔널(nutritional, high-fat diet), 제네틱(genetic, Zucker obese fa/fa rat), (A-ZIP/F-1)에서 PPAR-α의 작용은 인슐린 저항성 모델에서 인슐린 민감성을 향상시키고 high-fat diet 와 Zucker obese fa/fa rat 모델에서 내장지방을 감소시킨다(Chou.et al. 2002 & Ye

et al. 2001 & Guerre-Millo et al. 2000). 본 연구에서는 AMPK 가 SREBP-1c 의 발현을 억제하여 지방합성을 저해한 기전과 또 하나는 AMPK 가 PPAR-α를 인산화하여 CPT-1 의 발현을 활성화함으로서 지방산 산화를 증가되는 기전으로 간의 지방합성 억제 및 지질개선과 체중감소로 이어지는 것으로 판단된다.

지방 조직과 지방 세포 크기의 감소가 PPAR-γ 활동의 조절과 관련될지 알아보기 위해 PPAR-γ mRNA 발현을 측정했다. C/EBP family 와 PPAR-γ는 호르몬에 의해 지질생성(adipogenesis)이 유도되는 과정에서 중요하게 작용하는 전사인자이다. Nuclear receptor superfamily 에 속하는 PPARγ는 지질생성(adipogenesis)를 총괄적으로 조절하는 역할을 하며, 아디포싸이트로 분화된 상태를 유지하는데 필수적인 인자이다. PPARγ는 지방 조직에서 지방산의 저장을 촉진시키는 기능을 담당하며 지방세포의 분화 과정 중 초기 단계에 그 발현이 증가된다. PPARγ의 표적 유전자로리포프로테인 리파아제(lipoprotein lipase)(Schoonjans et al. 1996), 아디포싸이트 팻티 에시드 바인딩 프로테인(adipocyte fatty acid binding protein, A-FABP 혹은 aP2)(Tontonoz et al 1996), PEPCK(Tontonoz et al. 1995), 아실-CoA 신타아제(acyl-CoA synthase)(Schoonjans et al. 1995), FATP(Fatty acid transport protein)(Martin et al)와 CD36(Sfeir et al. 1997)등이 있다. 이들 표적 유전자들은 PPAR-α의 표적 유전자가 대부분 지방산 분해를 관장하고 있는 것과는 달리 대부분 체내 지방대사물의 합성에 관여하는 리포제닉 엔자임(lipogenic enzyme)들이다. 또한 PPAR-γ는 렙틴의 발현을 억제하여 렙틴에 의해 유도되는 지방분해(lipolysis)와 지방산 분해를 저해한다(Wang & Lee & Unger. 1999).

17β-에스트라디올(17β-estradiol)이 암컷 OVX C57BL/6J 마우스의 지방 조직에서 PPAR-γ와 타겟 유전자인 aP2 발현을 감소시킴으로써 지방과다증과 지방 세포 크기를 감소시켰고(Yoon & Jeong), 또한 에스트로겐이 PPARγ의 전사 억제를 통해 중간엽(mesenchymal) 마우스 세포주 KS483 의 지방합성 조절할 수 있다고 보고하여(Dang et al., 2002) γ-PGA 및 아이소플라본 공동 식이는 고지방식이로 비만이 유발된 마우스에서 PPARγ mrna 발현을 억제함으로서 체중 감소와 백색 지방 조직 감소시킨 본 연구 결과와 일치한다.

본 연구에서 γ-PGA 및 아이소플라본 공동 식이군이 대조군에 비해 PPAR-γ mRNA 의 낮은 발현으로 인해 백색지방조직의 지방세포 크기를 감소시킨 것으로 판단된다.

인슐린 저항성이란 정상적인 인슐린이 분비되어 혈액을 통해 표적장기(간, 근육, 지방조직 등) 세포의 수용체에 잘 결합하였으나, 결합 후 인슐린의 역할, 즉 인슐린의 신호전달이 적절하게 이루어지지 않는(저항성이 있는)다는 의미를 가진다. 결국, 세포에 제대로 결합한 인슐린이 세포내에서 고유의 작용을 발휘하지 못하는 상태를 인슐린 저항성이 있다고 말한다. 인슐린저항성은 인슐린 수용체 키나제(kinase)의 결함, 인슐린 레셉터 서브스트레이트 패밀리(insulin receptor substrate family, IRS) 단백질발현 감소, GLUT4 베지클 트래픽킹-도킹-퓨전(vesicle trafficking-docking-fusion) 그리고 PI3-키나제(kinase) 또는 이와 연관된 신호전달 분자(signaling molecule)들의 변화를 포함한다. GLUT4 는 지방세포와 근육세포에서 주로 발현되는 포도당 수송체이며, 내장지방 축적에 의한 인슐린저항성이 생기면 세포질로부터 세포막으로의 GLUT4 전위(translocation)가 원활히 일어나지 않게 된다. 이전 연구는 AMPK 가 골격근의 GLUT4 전위를 활성화함으로서 글루코오스 흡수를 증가시킨다는 것을 보여줬다(Lemieux et al. 2003).

본 연구에서 γ-PGA 식이, 아이소플라본 식이, γ-PGA 및 아이소플라본 공동 식이군이후 대조군에 비해 GLUT4 mRNA 의 발현량이 각각 89.1%,90.8%, 110.9% 높게 나타나 인슐린 민감도와 인슐린 저항성 개선에 효과를 보인 것으로 판단된다.

또한 중성지방은 아포리포프로테인 B(apolipoprotein B, apoB)와 결합하여 성숙지질 단백을 형성한다. ApoB 는 유리지방산 및 중성지방의 증가, 마이크로조말 트랜스퍼 프로테인(microsomal transfer protein, MTP)에 의해 합성이 증가하며 반대로 인슐린에 의해 억제 된다. 그러므로 인슐린이 정상보다 낮거나 인슐린저항성이 있는 경우 많은 양의 유리지방산이 간 조직으로 유입되면 성숙한 apoB-VLDL (very low density lipoprotein)의 분비가 증가하게 된다. 인슐린 저항성이 수반된 경우 지방조직에서의 지질분해가 촉진되어 대량의 유리지방산이 간으로 유입되는 동시에, 인슐린저항성에 의해 유발된 고 인슐린혈증은 그 기전이

무엇인지는 분명치 않으나 DNL 유발전사인자인 SREBP-1c 의 유전자 발현을 증가시키고 유리 지방산의 β-산화(oxidation)를 감소시켜 결과적으로 간조직 내 지질축적이 증가하게 된다(Postic & Girard. 2008).

각 개체는 매일 불규칙한 양의 에너지를 섭취하지만 비교적 일정한 체중을 유지 하는 것은 우리 몸이 지방에 대한 설정지점(set point)이 정해져 있어서 체중을 유지하는 에너지 항상성이 존재하기 때문이다. 에너지 소모의 중요한 부분인 열 발생(thermogenesis)의 기전은 크게 두 가지로 구분되는데 추위에 대해 개체를 보호하거나 식이 변화에 의한 에너지 균형을 목적으로 일어난다. 식사 후 혹은 지방세포의 렙틴으로부터 신호를 받은 뇌는 뉴로펩타이드 Y(neuropeptide Y, NPY), 아구티 릴레이티드 프로테인(agouti related protein, AgRP), 멜라노코르틴 스티뮬레이팅 호르몬(melanocortin stimulating hormone, MSH), 멜라닌-콘센트레이팅 호르몬(melanin-concentrating hormone, MCH)을 경유해 교감신경계를 활성화하며, 갈색 지방조직이나 근육의 베타 3 아드레날린 시스템을 활성화시켜 에너지소모를 증가시켜 백색지방에서 체지방량 및 렙틴 분비를 조절하는 회로를 형성한다.

렙틴은 과식이 장기화될 경우 지방세포에서 분비가 촉진되어 뇌의 시상하부에 존재하는 신경 세포들을 자극함으로써 더 이상의 음식물 섭취를 억제하고 그 결과 체중 증가를 막도록 하는 기능을 수행한다. 백색지방조직은 중성 지방의 형태로 에너지를 저장하는 반면, 갈색지방조직은 열을 발생(thermogenesis)시킴으로써 에너지를 소비하는 기능을 담당한다.

미토콘드리아 내막에 존재하는 UCP 는 양성자 누출에 관여하며 동물에서 정량적 분석에 따르면 휴식 시 에너지 소비의 25%가 바로 양성자 누출에 의한 UCP 가 기여한다. UCP 가 일단 활성화되면 이는 미토콘드리아 기질로 양성자(proton)의 수동적 재유입을 유발하고 이는 산화적 인산화에 의한 ATP 합성을 감소시킴과 동시에 열을 발생시킨다. 비만 지표와의 관련성을 본 연구에서 UCP 3 를 코딩하는 유전자에 변이가 있을 경우 체질량지수, 체지방률 및 피하주름의 두께 등이 모두 높은 것으로 나타났다(Lanouette et al. 2001). UCP 3 를 골격근에 과 발현시킨 형질전환 생쥐에서 식이 섭취가 증가함에도 불구하고 체중이 감소했고, 지방 조직의

양이 적었으며 글루코스내성을 감소시켰고(Son et al. 2004 ; Clapham et al. 2000), 페노피브레이트(fenofibrate) 처리에 의한 UCP 3 의 발현이 고지방 식이로 비만이 유도된 쥐에서 직장온도 상승과 체중감소와 관련되었다고 증명했다(Park et al. 2009). 또한 미토콘드리아의 지방산 조절이 UCP 3 의 중요한 생리 작용이라고 보고했다(Bezaire et al. 2005). 따라서 UCP 3 가 지방대사 및 포도당 대사에서 중요한 역할을 하며 비만과 강한 상관관계가 있을 것이라는 가설 하에 갈색지방조직에서 UCP 3 의 발현량을 관찰하였다. 고지방식이로 유도된 대조군 마우스의 UCP3 mRNA 의 발현량은 정상군에 비해 224.6% 낮았으며 대조군에 비해 γ-PGA 식이군, 아이소플라본 식이군 및 γ-PGA 와 아이소플라본 공동식이군은 각각 217.5%, 226.3%, 375.4% 높은 것으로 나타나 열생성을 통한 에너지 소비를 증가시켜 체중감소로 이어진 것으로 사료된다.

따라서 본 발명자들은 γ-PGA 식이군과 아이소플라본식이군 각각 식이 했을 때도 대조군에 비해 효과를 보였으나 γ-PGA 과 아이소플라본의 결합은 지질 축적, 지방 분해와 지방산 산화에서 더 강한 효과를 나타냈고, 혈청과 간에서 지질을 개선했으며, 간의 지방합성을 억제하여 비만에 효과적인 물질임을 입증했다.

참고 문헌

Ascencio, C., Torres, N., Isoard-Acosta, F., Gomez-Perez, F. J., Hernandez-Pando, R., and Tovar, A. R. (2004) *J. Nutr.* 134, 522-29.

Bezaire V, Spriet LL, Campbell S, Sabet N, Gerrits M, Bonen A, Harper ME. Constitutive UCP3 overexpression at physiological levels increases mouse skeletal muscle capacity for fatty acid transport and oxidation. FASEB J. 2005 6;19:977.

Bourgeois E, Alexiu A, Lemonnier D. Dietary-induced obesity: effect of dietary fats on adipose tissue cellularity in mice. Br J Nutr. 1983. 49: 17-26.

Christopher R. Cederroth, Manlio Vinciguerra, Françoise Kühne, Rime Madani, Daniel R. Doerge, Theo J. Visser, Michelangelo Foti, Françoise Rohner-Jeanrenaud, Jean-Dominique Vassalli, and Serge Nef. 2007. A Phytoestrogen-Rich Diet Increases Energy Expenditure and Decreases Adiposity in Mice. *Environ Health Perspect 115:1467-473*

Clapham JC, Arch JR, Chapman H, Haynes A, Lister C, Moore GB, Piercy V, Carter SA, Lehner I, et al. Mice overexpressing human uncoupling protein-3 in skeletal muscle are hyperphagic and lean. Nature. 2000 Jul 27 ; 406(6794)-415.

Kakuma, T., Lee, Y., Higa, M., Wang, Z., Pan, W., Shimomura, I., and Unger, R. H. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 8536-541

Kim Aa-Ra, Lee Jae-Joon, Chang Hae-Choon, Lee Myung-Yul. 2010. Body weight loss and cholesterol lowering effects of cheonggukjang(a fermented soybean paste) given to rats fed a high fat/high cholesterol diet. The Korea of food preservation. Vol. 17, No. 5, 688-697

Kim SY, Son JH, Ha HC, Lee HW, Lee JS. 2002. Chemopreventive effects of extracts from soybean fermented with basidiomycetes. Korean J Mycol 0: 124-130.

Kuhajda FP, Landree LE, Ronnett GV. The connections between C75 and obesity drug-target pathways. Trends Pharmacol Sci. 2005;26: 541-544.

Kwon SH, Lee KB, Im KS, Kim SO, Park KY. 2006. Weight reduction and lipid lowering effects of korean traditional soybean fermented products. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 35.-, 1194-1199

Kwon SH, Lee KB, Im KS, Kim SO, Park KY. 2006. Weight reduction and lipid lowering effects of korean traditional soybean fermented products. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 35.-, 1194-1199

Lephart ED, Setchell KD, Handa RJ, Lund TD. 2004b. Behavioral effects of endocrine-disrupting substances: phytoestrogens. ILAR J 45(4):443-54.

Michung Yoon and Sunhyo Jeong. 2009. 17β-estradiol represses white adipose tissue metabolism by inhibiting PPARγ in high fat diet-induced obese female ovariectomized mice. J. Exp. Biomed. Sci. 15. 171-177

Ogawa R, Mizuno H, Waranabe A, Migita M, Hyakusoku H, Shimada T. Adipogenic differentiation by adipose-derived stem cells harvested from GFP transgenic mice-including relationship of sex difference. Biochem Biophys Res Commun. 2004. 319: 511-517

Park Mi-Kyoung , Ah-Young Kang, Eunhui Seo, Yeonsoo Joe, Soojeong Kang, Sook-Hee Hong, Duk Kyu Kim and Hye-Jeong Lee. 2009. De novo Expression of Hepatic UCP3 Is Time-Dependently Related with Metabolic Function in Fenofibrate-Treated High Fat Diet Rats. Journal of Life Science Vol. 19. No. 1. 15-20

Potter S. 1996 Overview of proposed mechanisms for the hypocholesterolemic effect of soy. J Nutr 125:606S-611S

Lee EH, Chyun JH. 2007. Effects of chongkukjang intake on lipid metabolism and liver function in ethanol consumed rats. Korean J. Nutr., 40, 684-692

Rudenski, A. S., Matthews, D. R., Levy, J. C. and Turner, R. C. (1991) Understanding "insulin resistance": both glucose resistance and insulin resistance are required to model human diabetes. Metab. Clin. Exp. 40, 908-917

Sam J. Bhathena, Ali, A. Ali, Christian Haudenschild, Patricia Latham, Tedine Ranich, Ali I. Mohamed, Carl T. Hasen, Manuel T. Velasquez. 2003. Dietary meal is more protective than soy protein conecentrate ahainst hpertriglyceridemia and steatosis of the liver in an animal model of obesity. Journal of the American college of Nutrition, Vol. 22. No. 2 157-164

Schreyer SA, Vick C, Lystig TC, Mystkowski P, and leBoeuf RC (2002). LDL receptor but not apolipoprotein E deficiency increases diet-induced obesity and diabetes in mice. Am J Phusiol Endocrinol Metab 282: E207-E214.

Son C, Hosoda K, Ishihara K, Bevilacqua L, Masuzaki H, Fushiki T, Harper ME, Nakao K. Reduction of diet-induced obesity in transgenic mice overexpressing uncoupling protein 3 in skeletal muscle. Diabetologia. 2004;47:47-4.

Stein, Y., Dabach, Y., Hollader, G. and stein, O. Cholesterol ester transfer protein activity in hamster plasma increase by fat and cholesterol rich diets. Biochem. Et. Biophys. Acta. 1990. 1042: 138-145.

Sugden, M. C., and Holness, M. J. (2004) *Diabetes* 53, Suppl. 1, S71-81.
Teixeira SR, Potter SM, Weigel R, Hannum S, Erdman Jr JW, Hasler CM: Effects of feeding 4 levels of soy protein for 3 and 6 wk on blood lipids and apolipoproteins in moderately hypercholesterolemic men. Am J Clin Nutr 71:1077-1084, 2000.

Torres, N., Torre-Villalvazo, I., and Tovar, A. R. (2006) *J. Nutr. Biochem.* 17, 365-73.

Unger, R. H. (2003) *Trends Endocrinol. Metab.* 14, 398-03.

Villena JA, Viollet B, Andreelli F, Kahn A, Vaulont S, Sul HS. Induced adiposity and adipocyte hypertrophy in mice lacking the AMP-activated protein kinase-alpha2 subunit. Diabetes 2004. 53: 2242-2249

Yang JL. 2000. Antiatherogenic effect of chongkukfang. Ph. D. Thesis, Pusan National University. Yukihiro YAMAMOTO, Hiroshi HIROSE, Ikuo SAITO, Motowo TOMITA Matsuo TANIYAMA Koichi MATSUBARA, Yasunori OKAZAKI, Tatsuya ISHII, Kanako NISHIKAI and Takao SARUTA. 2002. Correlation of the adipocyte-derived protein adiponectin with insulin resistance index and serum high-density lipoprotein-cholesterol, independent of body mass index, in the Japanese population. Clinical Science 103, 137-42 (Printed in Great Britain)

Weyer, C., Funahashi, T., Tanaka, S. et al. 2001. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. J. Clin. Endocrinol. Metab. 86, 1930-1935

이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

γ-PGA(γ-Polyglutamic acid) 및 아이소플라본을 유효성분으로 포함하는 비만, 이상지방혈증, 지방간 또는 당뇨의 개선용 식품 조성물.

【청구항 2】

제 1 항에 있어서, 상기 γ-PGA(Poly-γ-glutamic acid) 및 아이소플라본은 대두 또는 청국장에서 추출한 식물성 천연물인 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 3】

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 혈액 내 총 콜레스테롤의 함량을 감소시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 4】

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 지방조직의 세포크기를 감소시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 5】

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 인슐린 민감도를 개선시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 6】

γ-PGA(Poly-γ-glutamic acid) 및 아이소플라본을 유효성분으로 포함하는 비만, 이상지방혈증, 지방간 또는 당뇨의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

【청구항 7】

제 6 항에 있어서, 상기 γ-PGA(Poly-γ-glutamic acid) 및 아이소플라본은 대두 및 청국장에서 추출한 식물성 천연물인 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 8】

제 6 항에 있어서, 상기 조성물은 혈액 내 총 콜레스테롤의 함량을 감소시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 9】

제 6 항에 있어서, 상기 조성물은 지방조직의 세포크기를 감소하여 지방중량과 체중을 감소시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 10】

제 6 항에 있어서, 상기 조성물은 인슐린 민감도 개선을 통해 인슐린 분비를 조절 및 감소시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 11】

γ-PGA(γ-Polyglutamic acid) 및 아이소플라본을 유효성분으로 포함하는 조성물의 약제학적 유효량을 객체(subject)에게 투여하는 단계를 포함하는 비만, 이상지방혈증, 지방간 또는 당뇨의 예방, 치료 또는 개선 방법.

【청구항 12】

제 11 항에 있어서, 상기 γ-PGA(Poly-γ-glutamic acid) 및 아이소플라본은 대두 또는 청국장에서 추출한 식물성 천연물인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 13】

제 11 항에 있어서, 상기 조성물은 혈액 내 총 콜레스테롤의 함량을 감소시키는 것을 특징으로 하는 방법.

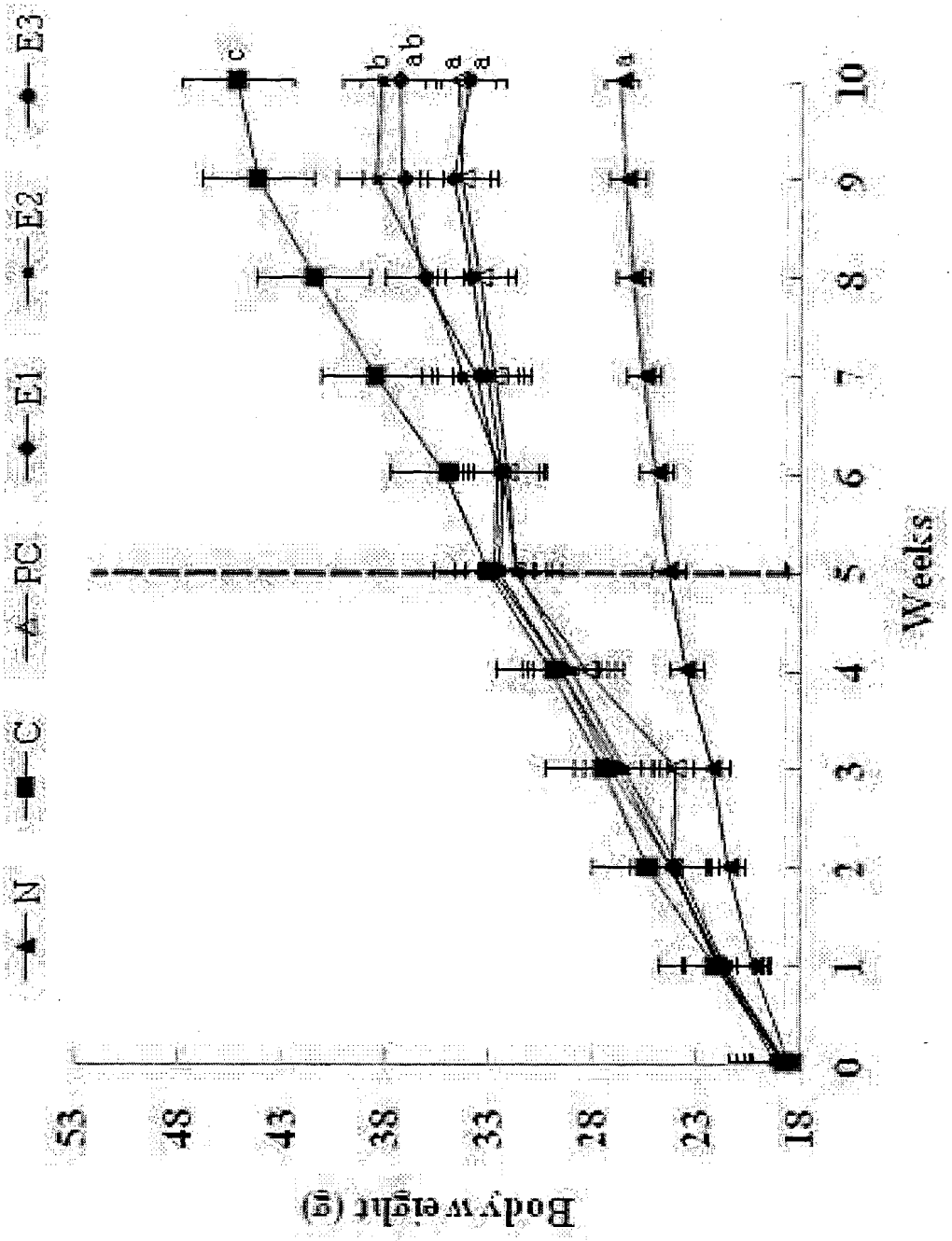
【청구항 14】

제 11 항에 있어서, 상기 조성물은 지방조직의 세포크기를 감소시키는 것을 특징으로 하는 방법.

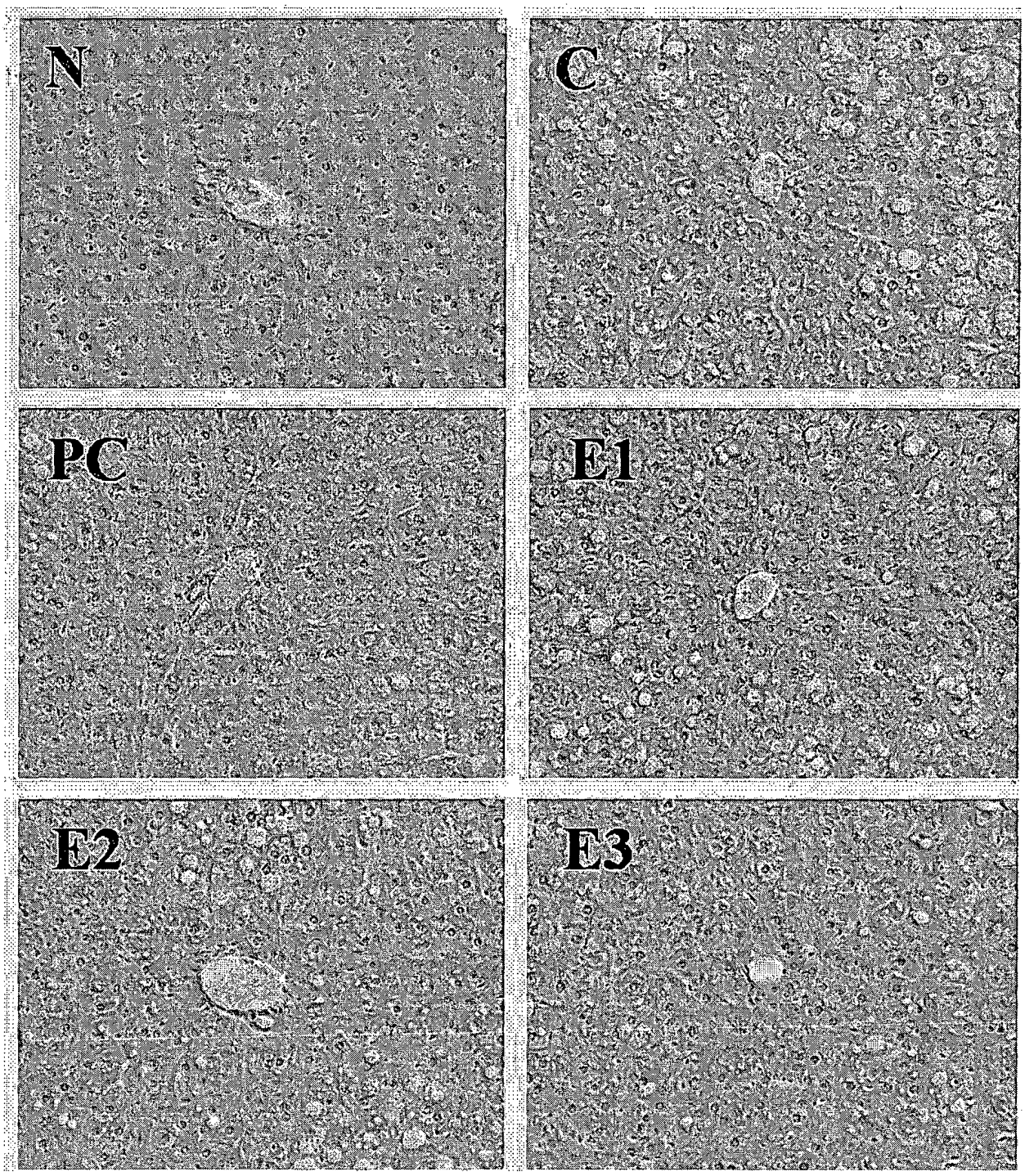
【청구항 15】

제 11 항에 있어서, 상기 조성물은 인슐린 민감도를 개선시키는 것을 특징으로 하는 방법.

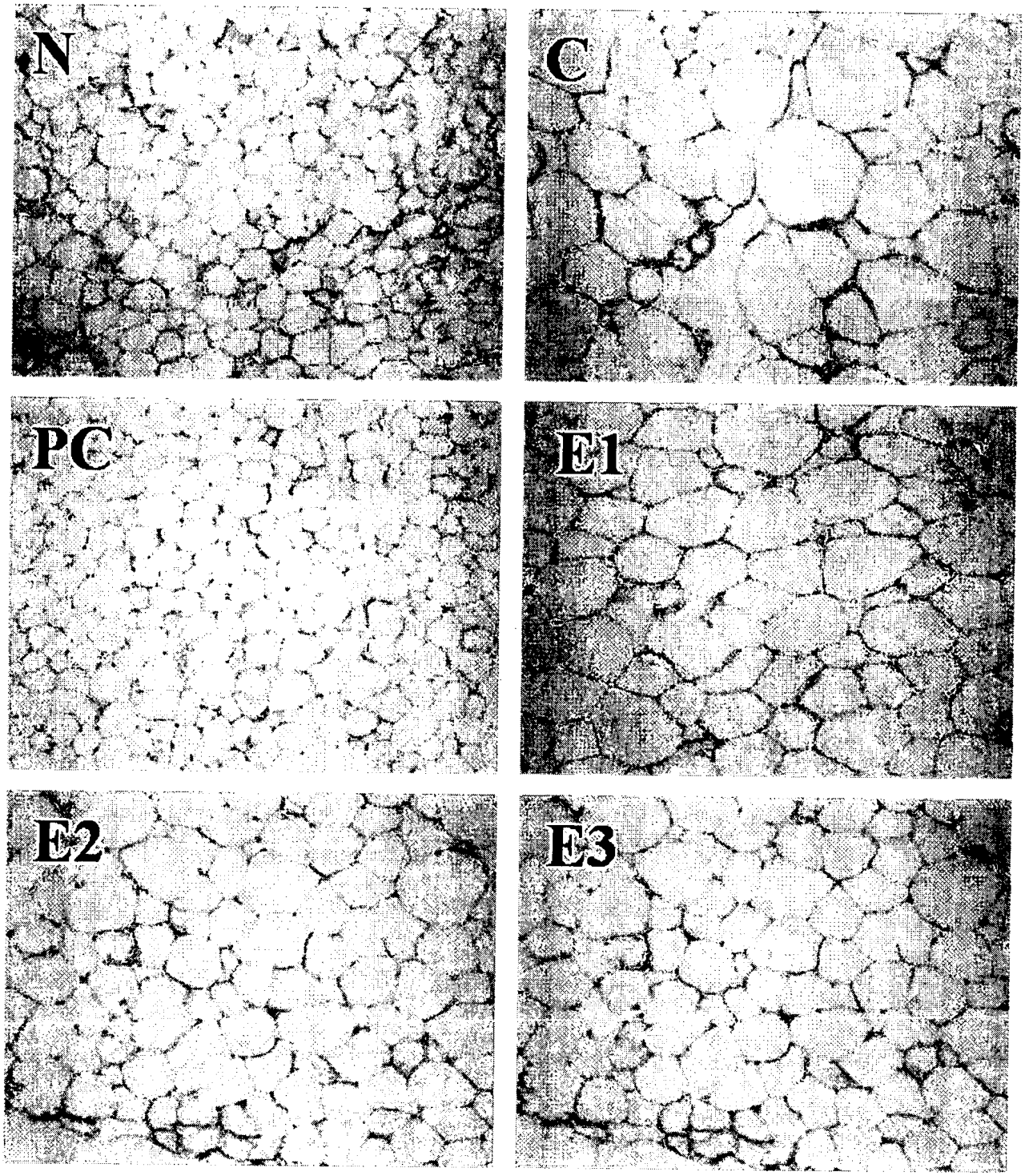
도 1


N
C
PC
E1
E2
E3
Body weight (g)
53
48
43
38
33
28
23
18
Weeks
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
c
b
ab
a
a
a

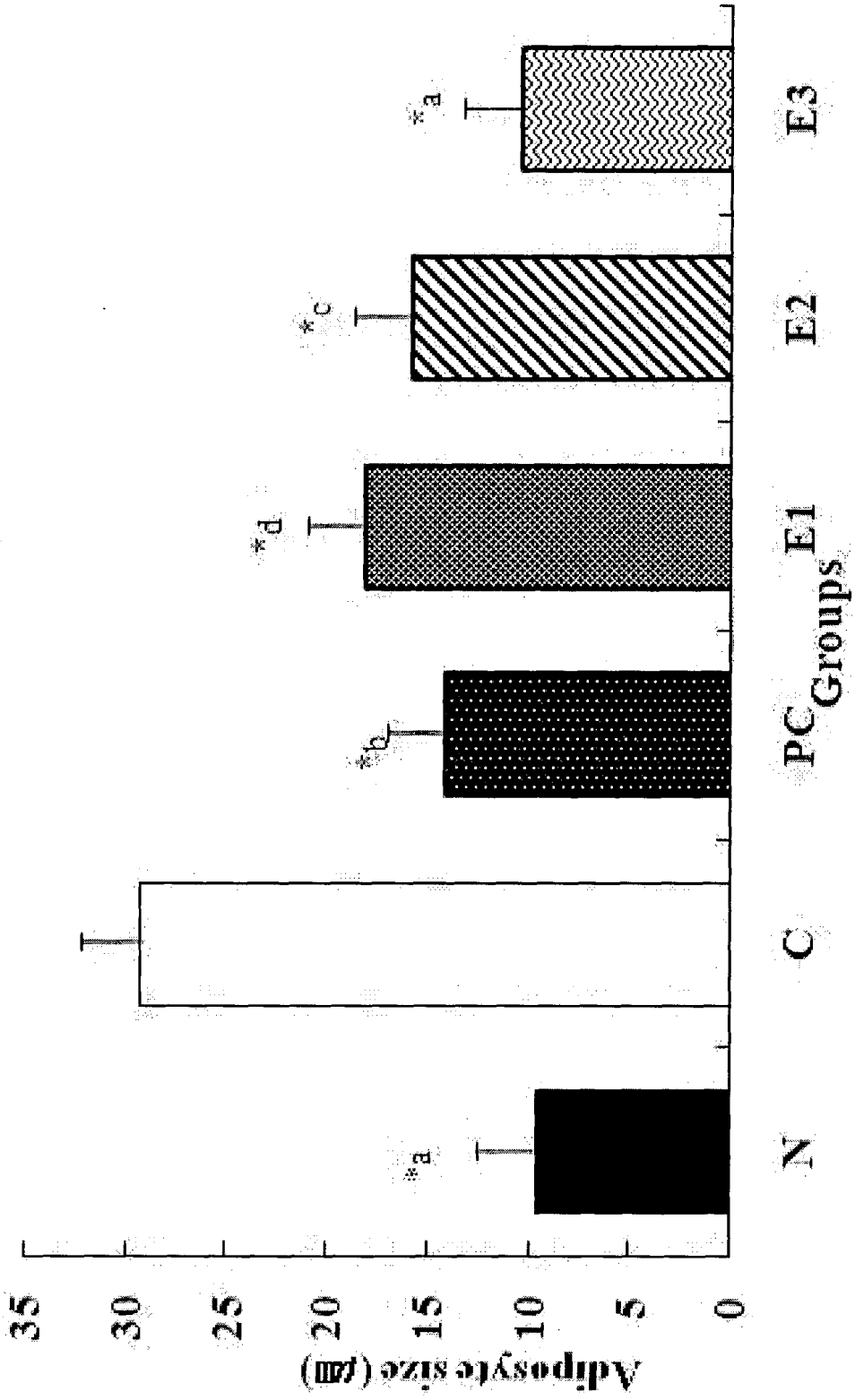
도 2



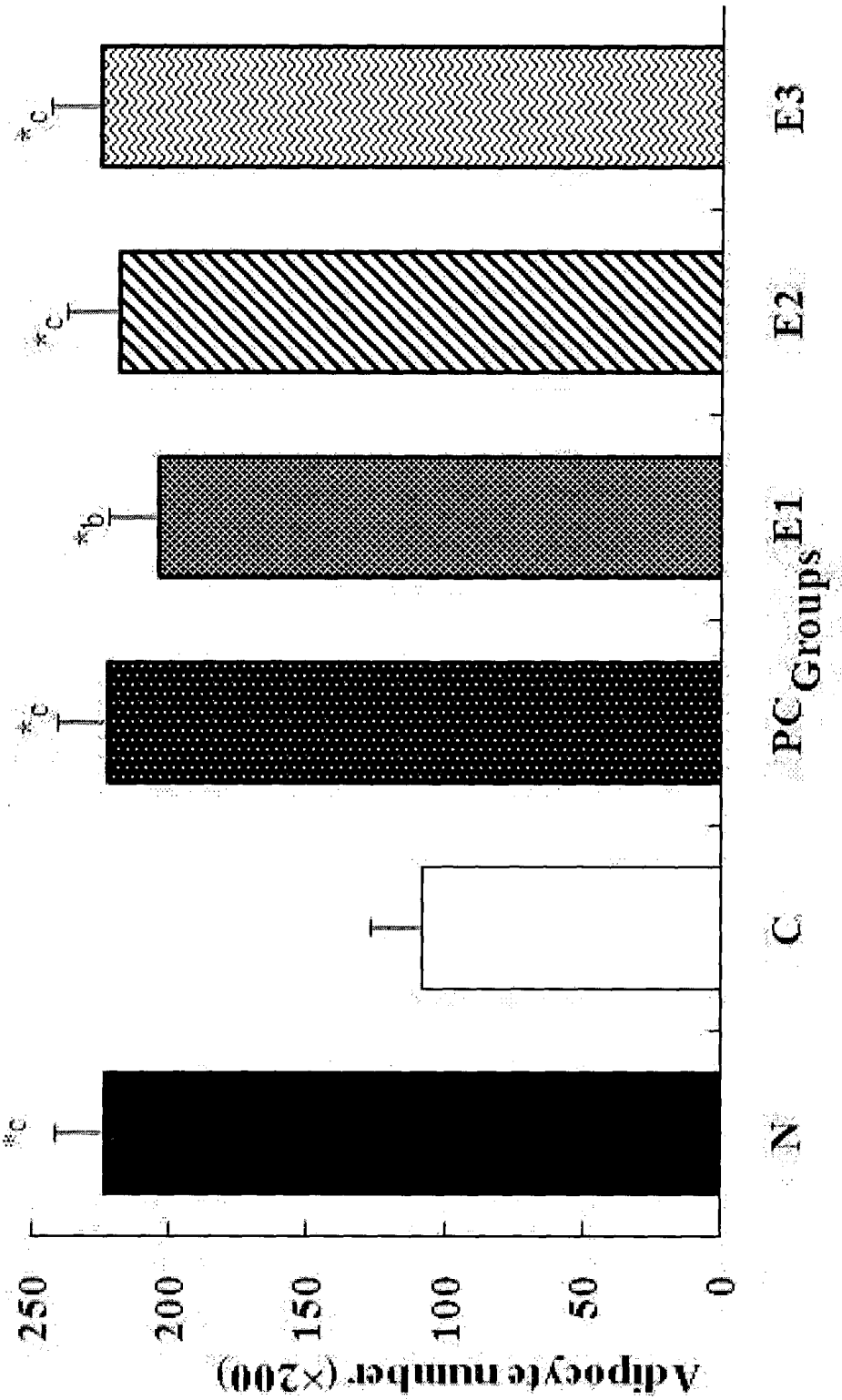
도 3



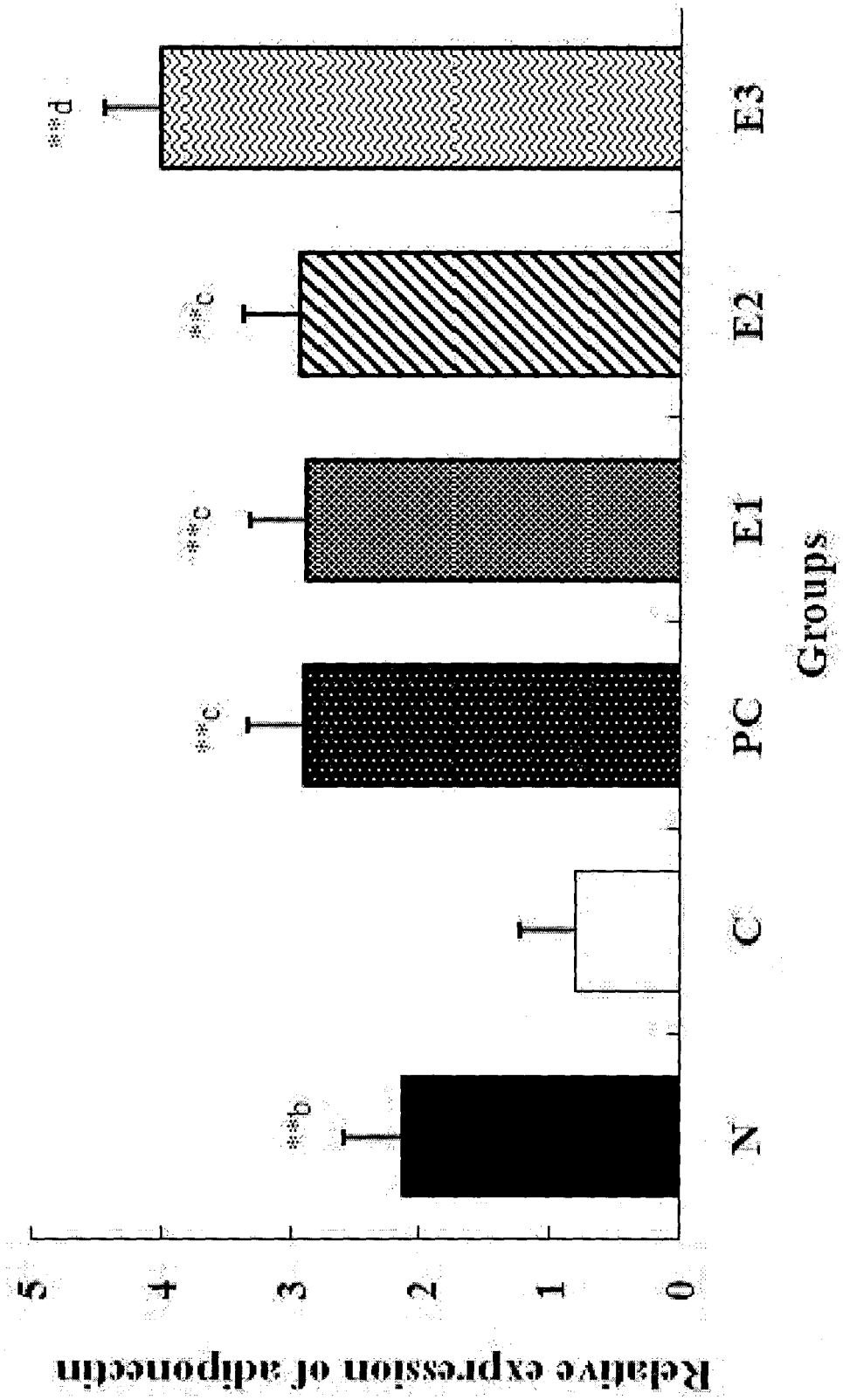
도 4



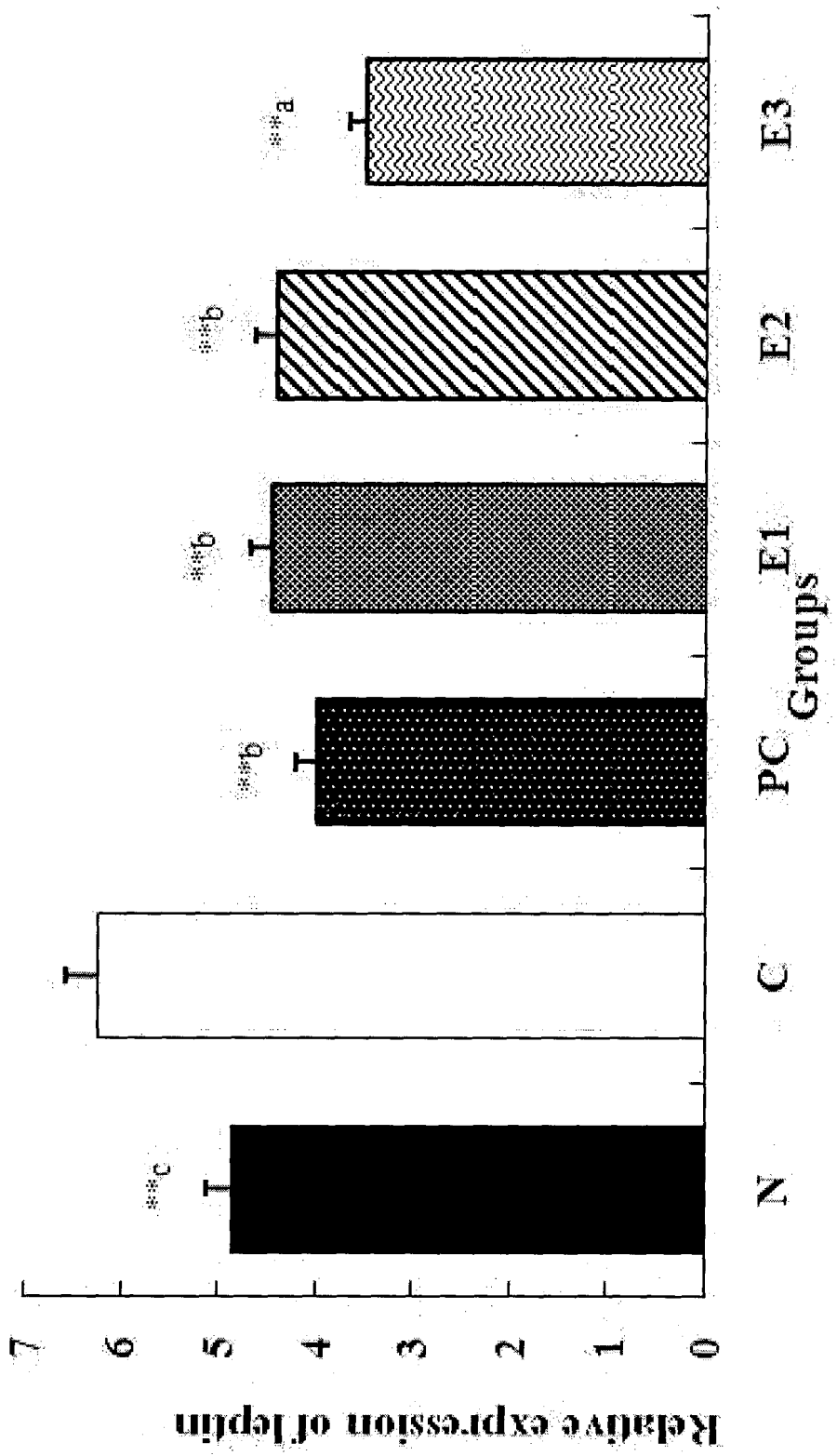
도 5


Adipocyte number (×200)
250
200
150
100
50
0
N
C
PC
E1
E2
E3
Groups
*c
*b
*c
*c
*c

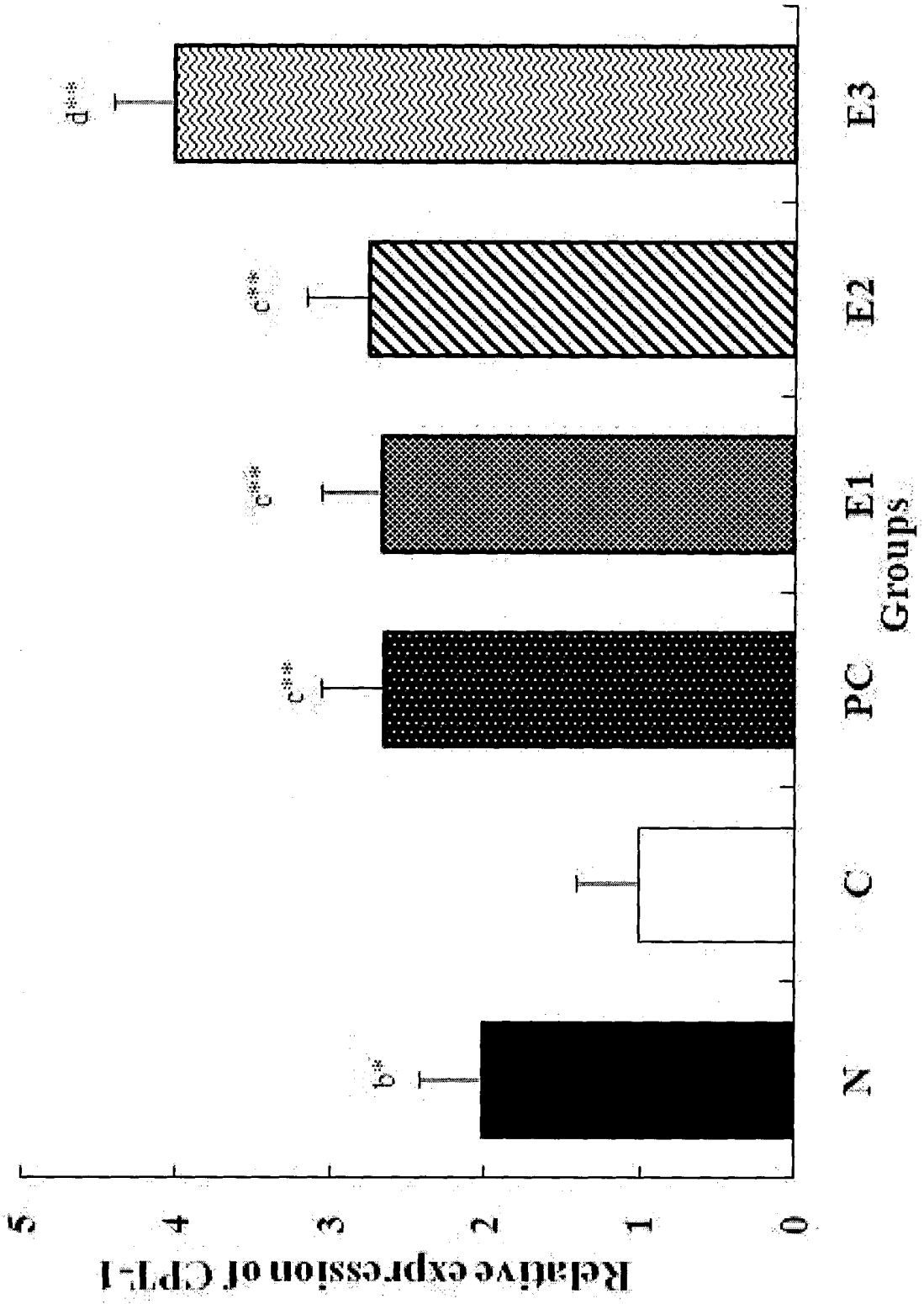
도 6


Relative expression of adiponectin
0
1
2
3
4
5
**b
**c
**c
**c
**d
N
C
PC
E1
E2
E3
Groups

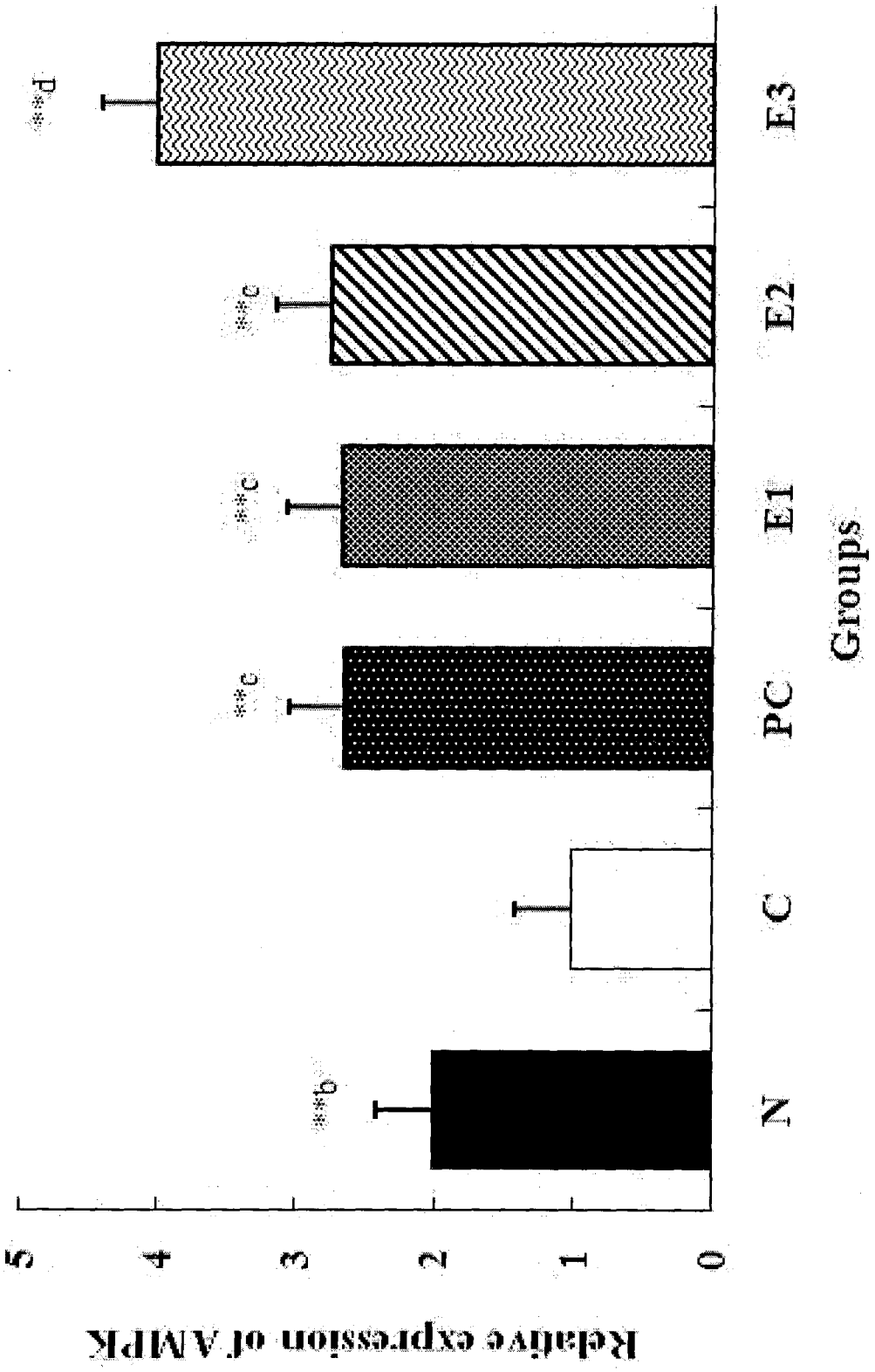
도 7


Relative expression of leptin
0
1
2
3
4
5
6
7
N
C
PC
E1
E2
E3
Groups
**c
**b
**b
**b
**a

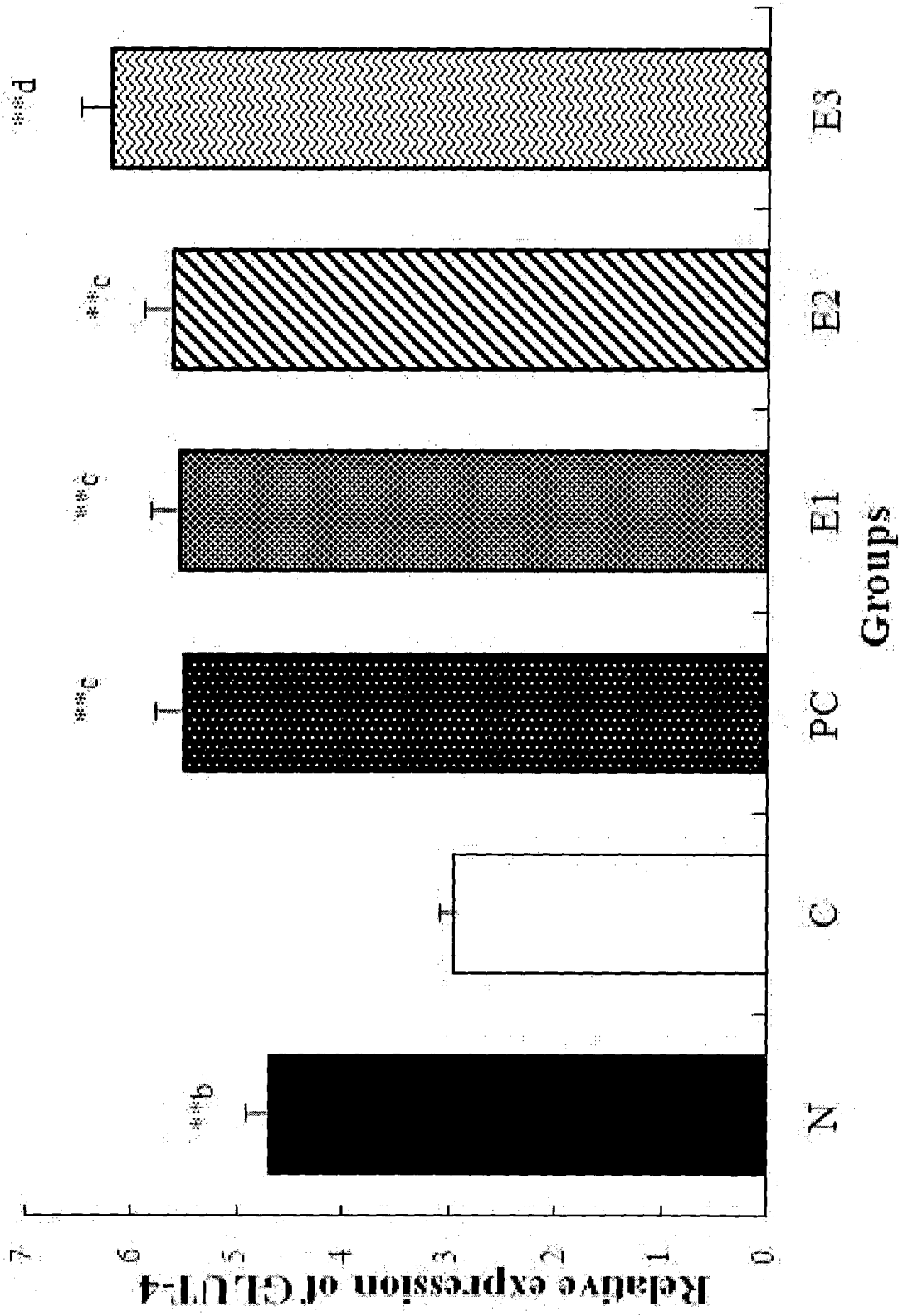
도 8


Relative expression of CPT-1
0
1
2
3
4
5
N
C
PC
E1
E2
E3
Groups
b*
c**
c**
c***
d***

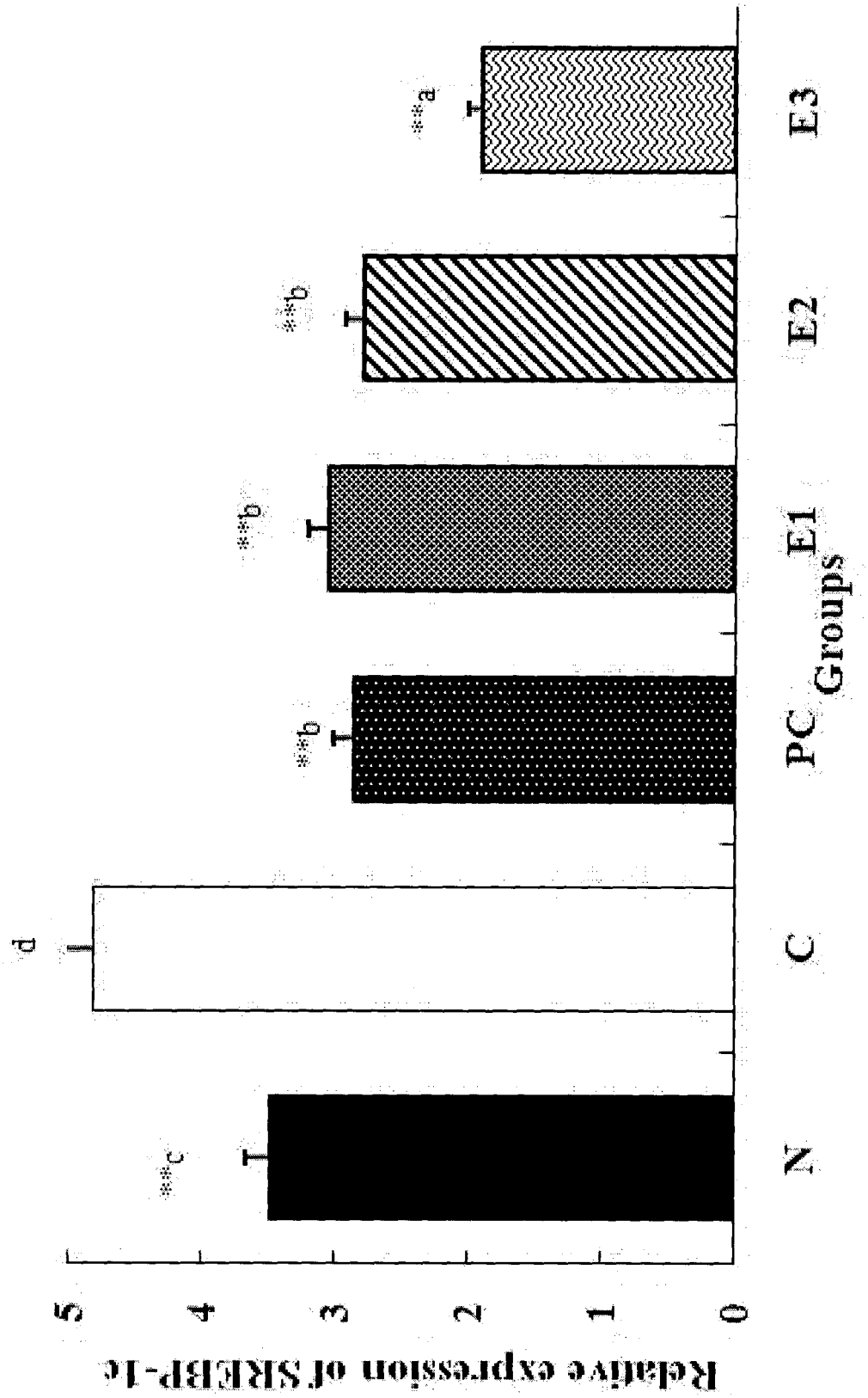
도 9


Relative expression of AMPK
0
1
2
3
4
5
**b
**c
**c
**c
**d
N
C
PC
E1
E2
E3
Groups

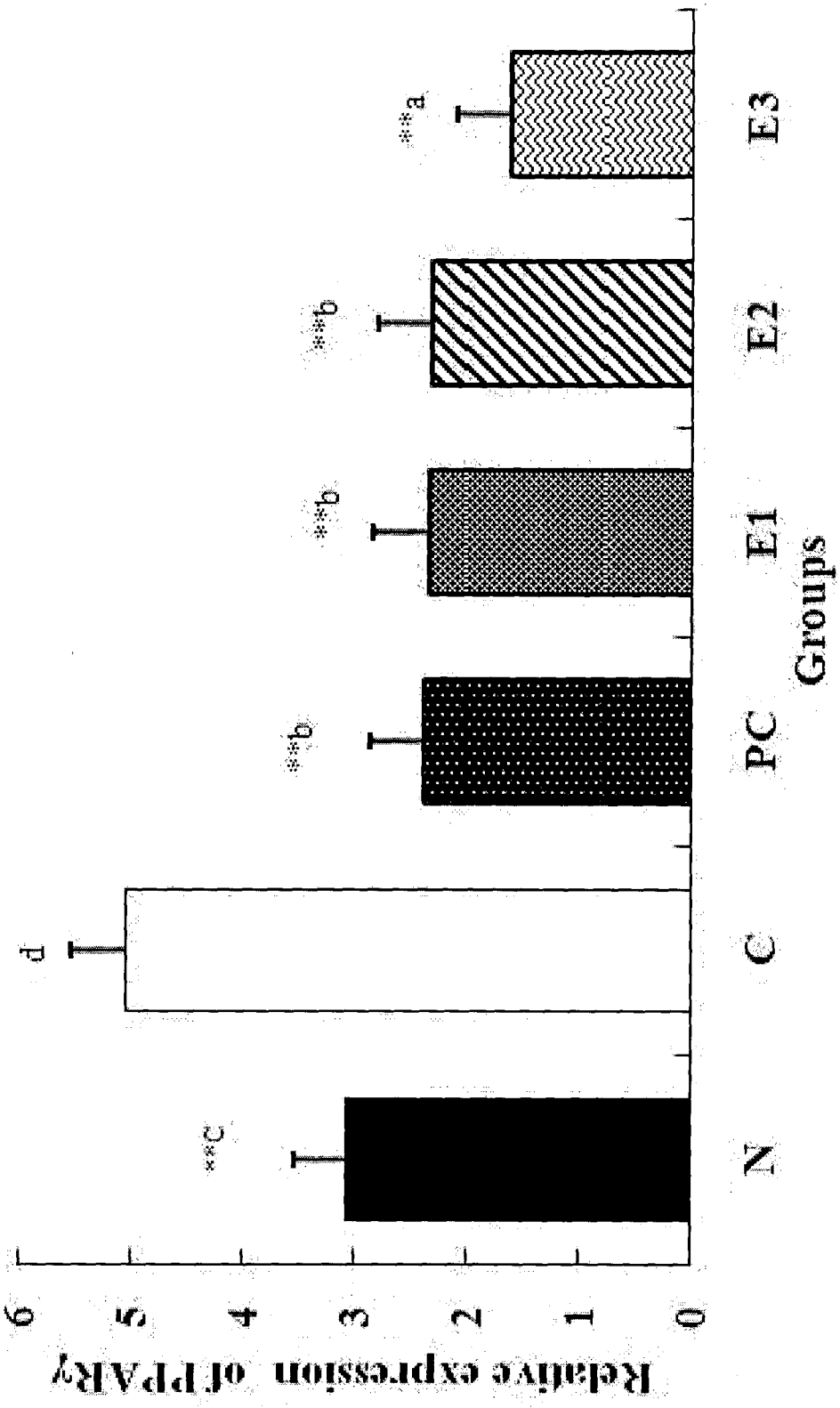
도 10


Relative expression of GLUT-4
0
1
2
3
4
5
6
7
N
C
PC
E1
E2
E3
Groups
**b
**c
**c
**c
**d

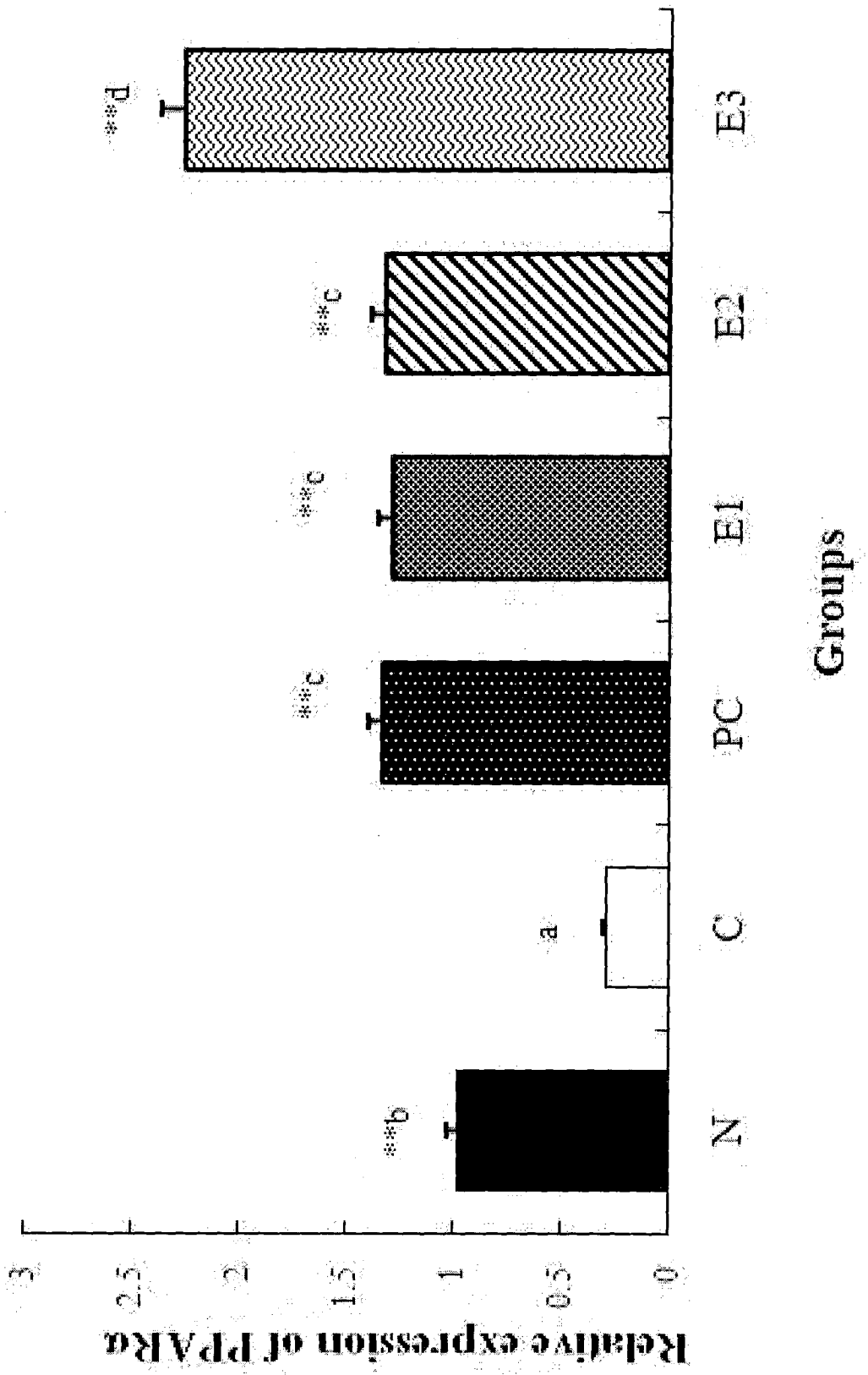
도 11


Relative expression of SREBP-1c
0
1
2
3
4
5
N
C
PC
E1
E2
E3
Groups
**c
d
**b
**b
**b
**a

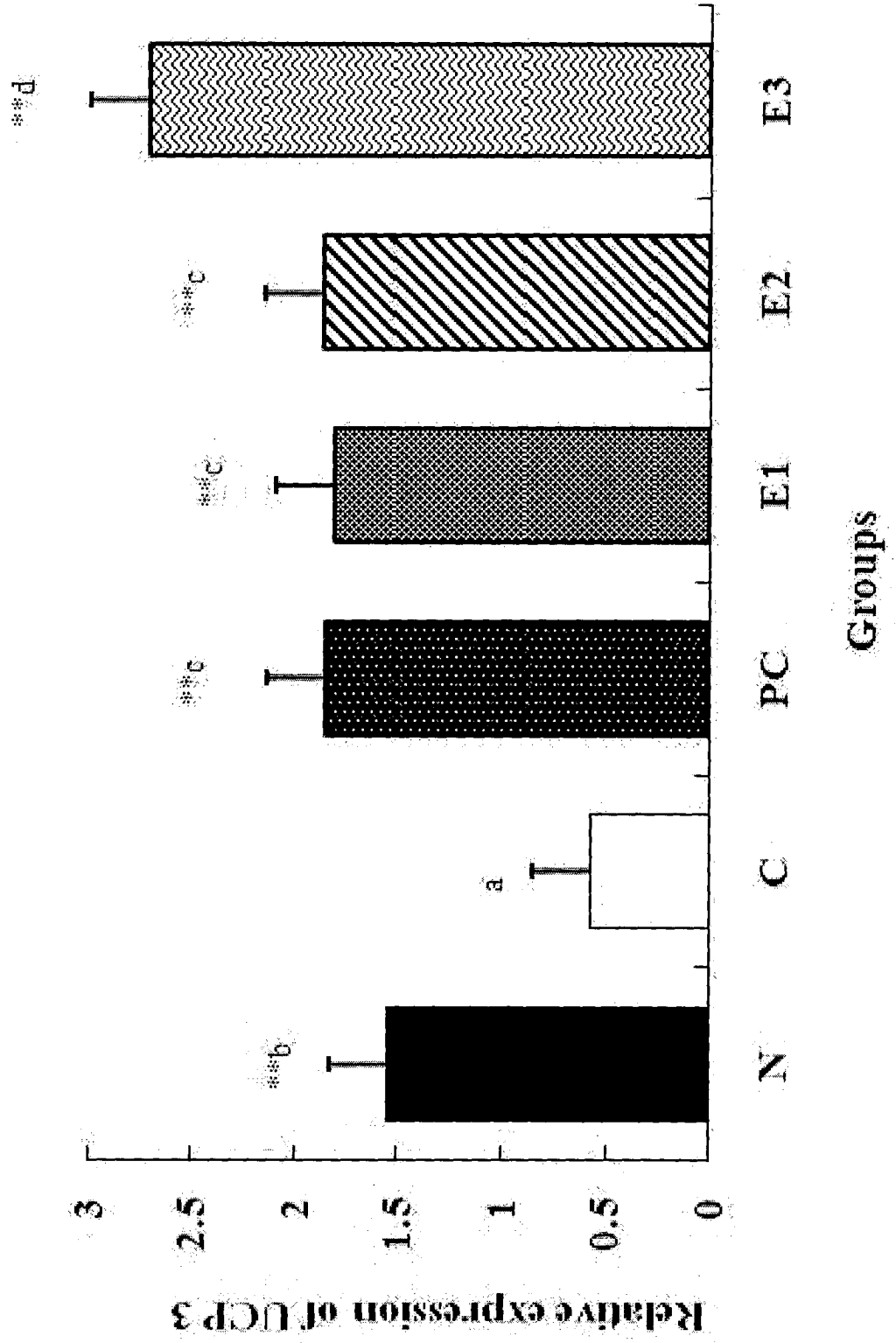
도 12


Relative expression of PPARγ
0
1
2
3
4
5
6
**c
d
**b
**b
**b
**a
N
C
PC
E1
E2
E3
Groups

도 13


Relative expression of PPARα
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
**b
a
**c
**c
**c
**d
N
C
PC
E1
E2
E3
Groups

도 14


Relative expression of UCP 3
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
N
C
PC
E1
E2
E3
Groups
a
**b
**c
**c
**c
**d

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2012/008990

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A23L 1/29(2006.01)i, A61K 31/765(2006.01)i, A61K 31/785(2006.01)i, A61K 31/352(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A23L 1/29; A61P 3/10; A61K 36/484; A61K 31/35; A61K 31/14

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above
Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: polyglutamic acid, isoflavone, obesity, diabetes, dyslipidemia

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Journal of Microbiology and Biotechnology, Vol. 21 No. 7, 766-775, 11 June 2011 See pages 766-775	1-10
A	KR 10-2006-0107183 A (YOUNGSANFOOD) 13 October 2006 See abstract, claims 1, 3	1-10
A	KR 10-2008-0038870 A (AMOREPACIFIC CORPORATION) 07 May 2008 See abstract	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
11 MARCH 2013 (11.03.2013)	**12 MARCH 2013 (12.03.2013)**
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2012/008990

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **11-15**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 11-15 pertain to a method for treatment of the human body, and thus pertain to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2012/008990

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2006-0107183 A	13.10.2006	NONE	
KR 10-2008-0038870 A	07.05.2008	CN 101534817 A	16.09.2009
		EP 2086532 A1	12.08.2009
		EP 2086532 B1	13.07.2011
		KR 10-2010-0028616 A	12.03.2010
		US 2010-0056560 A1	04.03.2010
		WO 2008-054059 A1	08.05.2008

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2012/008990

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A23L 1/29(2006.01)i, A61K 31/765(2006.01)i, A61K 31/785(2006.01)i, A61K 31/352(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
A23L 1/29; A61P 3/10; A61K 36/484; A61K 31/35; A61K 31/14

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 폴리글루탐산,이소플라본,비만, 당뇨, 이상지질혈증

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	Journal of Microbiology and Biotechnology, 21 권 7 호, 766-775, 2011.6.11 페이지 766-775 참조	1-10
A	KR 10-2006-0107183 A (영농조합법인 영산식품) 2006.10.13 요약, 청구항 1, 3 참조	1-10
A	KR 10-2008-0038870 A ((주)아모레퍼시픽) 2008.05.07 요약 참조	1-10

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2013년 03월 11일 (11.03.2013)	**2013년 03월 12일 (12.03.2013)**

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 82-42-472-7140

심사관
김재현
전화번호 82-42-481-5626

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2012/008990

제**2**기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견**(**첫 번째 용지의 **2**의 계속**)**

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: **11-15**
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
제11항 내지 제15항은 사람의 치료방법에 관한 것이므로 PCT조약 제17조(2)(a)(i) 및 조약규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.

2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,

3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제**3**기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견**(**첫 번째 용지의 **3**의 계속**)**

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.

2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.

3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.

4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에 관한 기재

☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.

☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.

☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2012/008990

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2006-0107183 A	2006.10.13	없음	
KR 10-2008-0038870 A	2008.05.07	CN 101534817 A	2009.09.16
		EP 2086532 A1	2009.08.12
		EP 2086532 B1	2011.07.13
		KR 10-2010-0028616 A	2010.03.12
		US 2010-0056560 A1	2010.03.04
		WO 2008-054059 A1	2008.05.08