

## 대두식품 지질추출물의 세포독성 및 지질성분분석

송성광 · 김광혁\* · 김희숙†

경성대학교 식품공학과

\*고신대학교 의과대학 미생물학교실

### Cytotoxic Effects and Components of Lipid Fractions from Soybean Products on Cancer Cell Lines

Sung-Kwang Song, Kwang-Hyuk Kim\* and Hee-Sook Kim†

Dept. of Food Science and Technology, Kyungsoong University, Busan 608-736, Korea

\*Dept. of Microbiology, Kosin Medical College, Kosin University, Busan 602-030, Korea

#### Abstract

The cytotoxic effects of lipid extracts from soybean products were studied using K562 human leukemia cell, Yac1 mouse leukemia cell and S180 mouse sarcoma cell. Total lipids from soybean powder, soybean curd residue and *doenjang* were extracted with chloroform/methanol (2:1) and water saturated butanol, consecutively, and fractionated into acetone supernatants (AS fraction) and acetone precipitates (AP fraction) by adding excess acetone. AS fraction of *doenjang* lipids showed the strongest cytotoxic effects on K562, Yac1 and S180 cancer cells, whereas each lipid fraction of soybean curd residue also showed relatively weak cytotoxic effects on cancer cells but soybean powder did not. AS and AP fractions of *doenjang* contained more free fatty acids than those of soybean curd residue and soybean. And when lipid fractions were digested with 0.4 N KOH/methanol, *doenjang* lipid fractions showed to contain some alkali-stable substances which showed positive reaction with ninhydrin solution on silica TLC separation.

**Key words:** cytotoxic effect, alkali stable lipid, free sphingoid base

#### 서 론

콩은 아시아 지역에서 널리 이용되어 왔으며, 최근 콩이 그 가치를 인정받는 식품으로 급부상하면서 차세대의 먹거리로 대두되고 있다. '밭에서 나는 쇠고기'라는 콩은 단백질과 지방의 함량이 각각 40% 및 20% 정도 함유되어 있어 우리 국민들에게는 저렴하면서도 질 좋은 단백질 급원일 뿐만 아니라 콩이 각종 성인병의 원인이 되는 혈중 콜레스테롤치를 낮추고 동맥경화, 심근경색, 뇌졸중 및 고혈압 등의 예방과 당뇨병, 간장병에 탁월한 효과와 항암작용을 한다는 것이 보고되면서 콩은 영양학적 가치뿐만 아니라 생리활성물질로서의 중요성도 인정되고 있다(1,2). 주로 콩 단백질의 가수분해물인 콩 peptide들이 콜레스테롤 저하효과, 항암활성, 항산화성, 항동맥경화성 등에 관여한다고 한다(3,4). 콩성분 가운데 항암효과가 있는 것으로 보고된 성분들 가운데 genestine, Bowman-Birk 트립신 저해제, 사포닌, phytate, linoleic acid 등이 있으나(5,6) 그들에 대한 항암기작에 대하여는 아직 명확하게 규명되어 있지 않다.

한편, 대두에는 복합지질인 sphingolipid가 다른 식품들에

비하여 많은 양 함유되어 있다고 보고된 바 있다(대두 2410  $\mu\text{mole/kg}$ , 우유 160  $\mu\text{mole/kg}$ , 치즈 1326  $\mu\text{mole/kg}$ , 달걀 2250  $\mu\text{mole/kg}$  등)(7). 최근의 연구들은 sphingolipid들의 구성 sphingoid base들은 아주 강한 생리활성을 가진 물질들이고 세포성장조절에 있어 중요한 역할을 하며 ceramide, sphingosine, sphingosine 1-phosphate, sphingosine phosphorylcholine 및 di-와 trimethylsphingosine들이 여기에 속한다고 밝히고 있다(8,9). Sphingolipid의 일반적인 구조는 sphingosine, N-acyl-sphingosine(ceramide) 및 sphingosine 1-phosphate와 같은 긴 사슬(sphingoid)염기의 유도체들이며, glycosphingolipid는 ceramide 골격의 1번 탄소위치에 glucose, galactose, sialic acid 등 탄수화물을 가지고 있다(10). 또한 sphingolipid는 혈중 lipoprotein의 구성물로 LDL에 가장 많고 VLDL, HDL의 순이며 LDL이나 VLDL에는 sphingomyelin의 형태로, HDL에는 ceramide형태로 존재한다고 하였다(11). 이러한 sphingolipid들은 여러 생리활성을 갖는다. 즉, 우유 또는 버터에서 정제된 sphingomyelin이 1,2-dimethylhydrazine(DMH)으로 대장암을 유발시킨 흰쥐의 암발생 및 종양의 악성화를 저해하였다고 하였으며 sphin-

†Corresponding author. E-mail: hskim@star.kyungsoong.ac.kr  
Phone: 82-51-620-4713, Fax: 82-51-622-4986

gomyelin이 소장에서 ceramide로 분해되어 대장세포에 의하여 흡수되며 흡수된 ceramide가 대장암세포의 증식을 저해할 것이라는 가설과 함께 sphingolipid가 세포내에서 강한 생리활성을 가지며 세포신호전달에서 중요한 역할을 할 것이라는 기대로 많은 연구들이 진행되고 있다(12-14). Dillehay 등(15)은 DMH로 대장암을 유도시킨 흰쥐에서 glycosphingolipid의 일종인 ganglioside  $G_{M1}$ 이 sphingomyelin보다 4~8배 이상 강하게 암의 진행을 저해하였으며 milk에서 추출한 glucosylceramide, lactosylceramide 및 ganglioside  $G_{M3}$  등은 sphingomyelin과 비슷한 활성을 가진다고 하였다. 또한, Schmelz 등은 대두에서 분리한 glycosylceramide가 사람의 가계성 대장암(FAP; familial adenomatous polyposis)에서 발견된 것과 같은 유전자 결손을 갖는 Min mice의 종양수를 감소시켜 주었으며 생명을 연장시켰고 milk의 glycosylceramide나 sphingomyelin보다 활성이 강하였다고 하였다(7).

이렇게 영양적인 면이나 생리활성면에서 우수한 대두를 우리 나라에서는 콩나물, 두부를 제조하여 먹기도 하지만 된장, 고추장 또는 청국장 등 미생물을 이용하여 발효시킨 제품을 주로 섭취하는데 이러한 전통 대두발효식품들이 혈전 용해능, 항동맥경화증, 항발암원 등 대두자체가 가지는 것보다 더 우수한 생리활성 기능들을 가진다는 많은 보고들이 있다(16-18). 따라서 본 연구에서는 대두와 두부제조 부산물인 비지 및 한국의 전통발효식품인 된장의 지질획분의 생리활성 기능을 시험하기 위하여 우선 지질을 추출한 다음 acetone으로 부분분획하고 여러 종류의 암세포들에 대한 세포독성시험을 하였으며 silicic acid column chromatography, silica gel TLC 및 densitometer 등을 이용하여 지질획분의 조성을 비교하고 sphingolipid에 대한 연구를 위한 기초실험을 하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

대두는 농협에서 구입한 국산 대두콩 2 kg을 잘 닦은 다음 분쇄기로 갈아 가루를 만들었으며 비지는 부산시에 소재하는 동아식품에서 두부제조시 부산물인 생비지를 얻어 동결 건조하였고, 된장은 국산 대두콩으로 제조한 메주로 담아 1년간 숙성시킨 시료를 동결건조한 후 분말화하였다. 모든 시료들은 지질을 추출하기 전 autoclave에서 15분간 멸균하여 lipase 또는 protease 등의 효소를 불활성화 시킨 다음 실험에 사용하였다.

### 세포배양 및 세포독성시험

3종류의 암세포, 즉 사람의 K562 leukemia cell, mouse의 Yac1 leukemia cell 및 Sarcoma 180 cell을 10% fetal bovine serum 및 streptomycin, penicillin 등이 함유된 RPMI 1640 media에서 배양하였다. 세포독성시험을 위하여 배양한 세포들을 phosphate buffered saline(PBS)로 세척한 다음 trypan blue액에 현탁하여 세포수를 센 다음 배양액으로 희석하였

다. 대두 및 대두발효식품의 총지질을 아세톤으로 분획한 아세톤침전물(AP 분획) 및 아세톤상층액(AS 분획)을 농축하여 용매를 제거한 후 소량의 chloroform 및 methanol을 이용하여 녹이고 DMEM 배양액으로 희석하여 1 mg/mL 농도로 시료를 조제하였다. 96 well microplate에서 1 mg/mL 농도의 시료를 단계적 2배 희석법으로 희석하고 시료가 있는 microplate well 당 암세포를 4000 cell 되게 넣은 다음 72시간동안 배양하였다. 세포독성을 관찰하기 위하여 PBS에 5 mg/mL 되게 녹인 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyl tetrazolium bromide] 용액 20  $\mu$ L씩을 첨가하고 다시 4시간 동안 37°C에서 배양한 후 각 well당 10% SDS용액을 가하고 빛을 차광한 상태에서 하룻밤 실온에서 방치한 다음 흡광도는 microplate reader(model 550 microplate reader, Bio-Rad, Richmond, USA)로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다(19).

### 지질추출 및 분획

Steam으로 효소들을 불활성화 시킨 대두, 비지 및 된장 500 g씩을 각각 삼각플라스크에 넣고 chloroform/methanol (2:1)로 5번 추출한 후 물로 포화시킨 butanol로 3번 반복 추출한 다음 여과액들을 합하여 농축하였다. 농축된 지질로부터 오염된 비지질획분을 제거하기 위하여 Folch법(20)으로 정제하였다. 총지질의 일부는 silicic acid column chromatography 방법으로 분획하였으며 각 분획들을 지질표준품과 함께 TLC로 전개하였고 발색시약을 분무하여 지질을 확인하였다. 당지질을 검출하기 위하여는 orcinol-ferric chloride-황산 시약 및  $\alpha$ -naphthol 시약을, 아미노지질은 1% ninhydrin/acetone 시약을, 아미드지질은 차이염소산-benzidin 시약을, 인지질은 molybden trioxide 및 molybden이 함유된 Dittmer 시약을, sterol 지질 및 일반지질은 50% 황산을 분무하여 100~120°C에서 가열한 다음 지질성분들을 확인하였다(21).

### 총지질의 아세톤분획

암세포에 대한 세포독성시험을 위하여 acetone 침전법으로 조단순지질 및 조복합지질로 분획하였다. 즉, Folch 법으로 정제된 지질을 농축하여 소량의 chloroform : methanol(2:1)에 녹인 다음 20배 용량의 acetone을 가한 후 4°C에서 16시간동안 놓아두어 그 침전물을 여과하고 농축하여 용매를 제거한 다음 아세톤 비가용분획(AP : acetone precipitates) 및 아세톤 가용분획(AS : acetone supernatants)으로 나누어 실험에 사용하였다.

각 지질시료에 다량 존재하는 glycerolipid를 가수분해하고 N-acyl lipid인 sphingolipid를 얻기 위하여 약염기 용액으로 가수분해하였다. 즉, Folch 법으로 정제하고 acetone으로 분리한 분획들(AP분획 및 AS 분획)을 0.4 N KOH/methanol로 비누화하여 glycerol 함유 지질을 가수분해한 다음 alkali성 증류수로 세척하여 약 alkali에 안정한 지질을 얻었다. 각 지질분획들의 지방산조성을 측정하기 위하여 지질분획을 speed vac으로 건조한 다음 5%의 무수 methanol성 HCl로 80°C에서 18시간동안 가수분해하였다.

### Silica gel TLC chromatography

분리한 지질분획들을 silica gel TLC에 점적하고 표준품들도 점적하여 전개용매를 chloroform : methanol : formic acid : water(56 : 31 : 4 : 2), chloroform : methanol : 0.2 N NH<sub>4</sub>OH(40 : 10 : 1), chloroform : methanol : water(60 : 35 : 8), chloroform : methanol : water(65 : 12 : 2), chloroform : benzene : acetone(80 : 20 : 10), chloroform : methanol : water(65 : 25 : 4) 및 chloroform : methanol : acetic acid(90 : 2 : 8) 등으로 전개한 후 발색시약을 분무하고 densitometer(Model GS-670, Bio-Rad, USA)로 scanning하여 비교하였다.

## 결과 및 고찰

### 아세톤분획의 세포독성시험

Lipase, protease 등을 불활성화시킨 대두, 비지 및 된장으로부터 추출한 지질에 과량의 아세톤을 가하여 침전된 분획(AP 분획)과 비침전분획(AS 분획)을 농축 건조하고 용매 및 배양액을 이용하여 1 mg/mL 농도로 조제한 다음 96 well microplate에서 단계별 희석하고 사람의 백혈암 세포주인 K562 세포, mouse의 백혈암 세포주인 Yac1 세포 및 mouse의 고형암세포주인 sarcoma 180 세포에 대한 세포독성을 관찰한 결과는 Table 1, 2 및 3과 같았다. 대두의 지질획분은 아세톤상층액(AS 획분)과 아세톤침전물(AP 획분) 모두 1 mg/mL 농도에서 실험에 사용한 모든 암세포들에 대하여 세포독성을 나타내지 않았으나 비지의 경우 0.5 mg/mL 농도에서 사람이나 mouse의 백혈암세포주에 독성을 나타내었으며 mouse sar-

**Table 1. Cytotoxic effects of soybean foods on human leukemia cell line, K562 cells in MTT assay**

		OD <sub>550</sub>		
		1 mg/mL	0.5 mg/mL	0.25 mg/mL
Soybean	AS fr.	0.470±0.003	0.494±0.008	0.519±0.003
	AP fr.	0.472±0.011	0.493±0.008	0.486±0.010
Soybean curd residue	AS fr.	0.268±0.003	0.344±0.002	0.464±0.017
	AP fr.	0.299±0.070	0.406±0.003	0.472±0.017
Doenjang	AS fr.	0.246±0.010	0.216±0.002	0.213±0.003
	AP fr.	0.205±0.004	0.412±0.010	0.479±0.009

Control was 0.436±0.030.

Experiments were performed in triplicate.

**Table 2. Cytotoxic effects of soybean foods on mouse leukemia cell line, Yac1 cells in MTT assay**

		OD <sub>550</sub>		
		1 mg/mL	0.5 mg/mL	0.25 mg/mL
Soybean	AS fr.	0.662±0.013	0.647±0.015	0.626±0.012
	AP fr.	0.666±0.017	0.693±0.027	0.648±0.016
Soybean curd residue	AS fr.	0.233±0.007	0.262±0.004	0.645±0.024
	AP fr.	0.238±0.008	0.330±0.009	0.689±0.042
Doenjang	AS fr.	0.237±0.016	0.212±0.002	0.214±0.001
	AP fr.	0.218±0.008	0.282±0.025	0.519±0.012

Control was 0.632±0.043.

Experiments were performed in triplicate.

**Table 3. Cytotoxic effects of soybean foods on mouse sarcoma cell line, S180 cells in MTT assay**

		OD <sub>550</sub>		
		1 mg/mL	0.5 mg/mL	0.25 mg/mL
Soybean	AS fr.	0.528±0.002	0.501±0.002	0.529±0.017
	AP fr.	0.544±0.014	0.549±0.007	0.532±0.010
Soybean curd residue	AS fr.	0.311±0.004	0.534±0.012	0.528±0.014
	AP fr.	0.377±0.016	0.532±0.011	0.536±0.015
Doenjang	AS fr.	0.236±0.002	0.211±0.003	0.285±0.062
	AP fr.	0.213±0.007	0.505±0.016	0.563±0.010

Control was 0.542±0.020.

Experiments were performed in triplicate.

coma 세포에 대하여도 1 mg/mL 농도에서 독성을 나타내었다. 된장의 경우 AS 획분과 AP 획분 모두 대두 및 비지의 지질에 비하여 세포독성이 아주 강하였으며 0.5 mg/mL 농도에서는 두 획분 모두 90% 이상 세포가 사멸하는 것을 볼 수 있었다. 된장지질의 AS 획분은 특히 0.25 mg/mL 농도에서도 강한 세포독성을 나타내었다. Park 등(22)은 된장 발효시 생성된 유리지방산 중 linoleic acid가 *Aspergillus sp.* 들이 만들어내는 독소인 aflatoxin B<sub>1</sub>의 생성을 억제하고 암세포에 대한 항돌연변이원성 및 항암효과를 나타낸다고 주장하였으며, Choi 등(23)은 재래식 된장의 유기용매 추출액이 사람의 암세포에 대해 성장억제작용이 있었는데 이는 daidzein 및 genestein 등이 함유된 ethylacetate 획분(0.5 mg/mL 농도에서 75~81% 성장저해)과 유리지방산들이 함유된 hexane 획분(0.5 mg/mL 농도에서 75~82% 성장저해)들 때문일 것이라고 하였으며, 본 실험에서는 정제된 총지질로부터 분리한 지질획분들의 세포독성 결과이므로 유리지방산이 나타내는 세포독성일 가능성은 높지만 daidzein 및 genestein 등의 활성은 배제할 수 있었다.

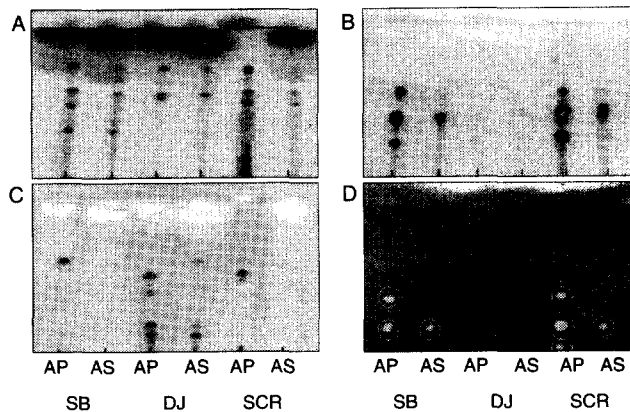
### 아세톤분획의 TLC 분석

대두, 비지 및 된장의 지질을 아세톤으로 분획한 AP분획과 AS분획의 지질조성을 비교하기 위하여 각 지질분획을 silica gel TLC plate 위에서 여러 혼합용매계로 분리하고 발색시약을 분무한 다음 105°C에서 건조하여 비교하였다. 단순 지질분리용 전개용매로 AS 및 AP 지질분획을 전개한 경우 Table 4에서와 같이 된장지질에는 대두 또는 비지에 비하여 triglyceride는 22.3%(AS 획분) 및 13.2%(AP 획분)으로 적고 유리지방산은 대두 6.8%와 4.2%, 비지 9.4%와 7.2%에 비하여 44.3%와 20.2%로 5~6배 이상 함유되어 있었으며 원점에 그대로 남아 있는 지질들은 중성지질 이외의 획분들로 복합 지질분리용 전개용매인 chloroform : methanol : water 혼합용매(65 : 25 : 4)로 분리할 수 있었으며 그 결과는 Fig. 1과 같았다. 본 실험에서는 총지질을 중성지질, 당지질 및 인지질로 분리하지 않은 혼합지질상태에서 복합지질 전개용매를 사용하여 TLC를 행하였으므로 농도%를 정확하게 계산할 수 없었으나 여러 종류의 발색시약을 분무하여 지질의 조성을 비교할 수 있었다. Fig. 1A에서와 같이  $\alpha$ -naphthol-황산용액에

**Table 4. Relative proportions of AS and AP lipid fraction from soybean, soybean curd residue and doenjang**

		Lipid components on TLC(%)				
		Origin <sup>1)</sup>	FS+DG	FFA	TG	ES
Soybean	AS fr.	5.5	8.9	6.8	71.8	7.0
	AP fr.	62.1	80.4	4.2	23.4	1.9
Soybean curd residue	AS fr.	17.5	13.8	9.4	58.5	0.8
	AP fr.	54.3	8.2	7.2	29.6	0.7
Doenjang	AS fr.	22.9	9.7	44.3	22.3	0.8
	AP fr.	60.3	6.2	20.2	13.2	0.1

<sup>1)</sup>Origin: Substances on starting point, FS: free sterol, DG: diglyceride, FFA: free fatty acids, TG: triglyceride, ES: esterified sterol.



**Fig. 1. Separation and visualization of lipid fractions from soybean products on silica gel TLC.**

The lipids were developed in chloroform : methanol : water (65 : 25 : 4) solvent system. TLC plates were sprayed with (A)  $\alpha$ -naphthol-sulfuric acid for glycolipids, (B) Dittmer reagent for phospholipids, (C) ninhydrin reagent for aminolipids and (D) sodium hypochlorite-benzidine reagent for lipid with amide or secondary amine.

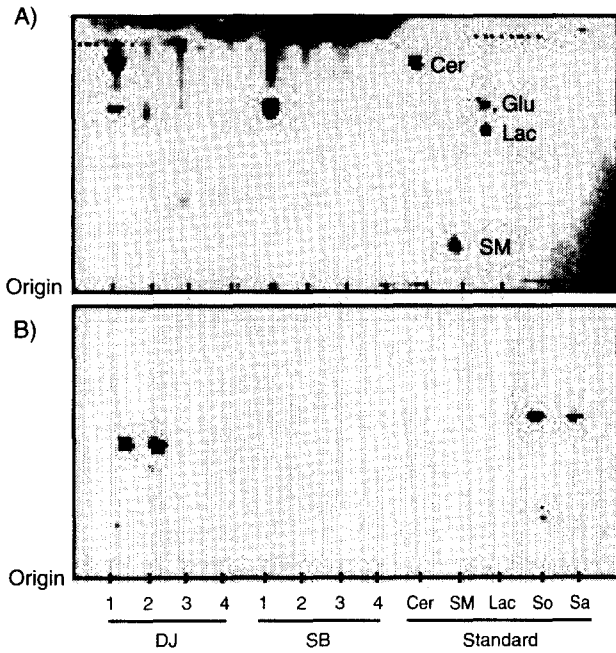
의하여 보라색으로 발색된 당지질을 비교해보면 대두 및 비지에서는 acylsterylglycoside(Rf=0.75), sterylglycoside(Rf=0.55), glycosylceramide(Rf=0.53, 0.48), sulfoglycosyl ceramide (sulfatides, Rf=0.30), unknown glycolipid(Rf=0.16) 등이 발견되었으나 된장의 경우 acylsterylglycoside 및 sterylglycoside는 사라지지 않았고 glycosylceramide는 많이 감소하였으며 낮은 위치의 당지질 spot들은 거의 보이지 않았다. Front line 및 그 위쪽에 나타난 커다란 반점은 혼합용매로 옮기기 전에 미리 ether로 끝까지 전개하여 나타난 중성지질들이다. Fig. 1B는 1A와 같은 용매로 전개한 후 Dittmer 시약을 분무한 것으로 푸른색으로 발색된 인지질들을 보여준다. 대두 및 비지의 지질획분에서는 표준물질 phosphatidyl ethanolamine (Rf=0.39) 및 phosphatidyl choline(Rf=0.33)의 높이와 비슷한 곳에서 인지질들이 많이 나타났으나 된장에서는 많이 감소된 것으로 나타났다. 그러나 Fig. 1C에서와 같이 ninhydrin을 분무한 경우에는 된장의 AP 및 AS 획분에서 콩과 비지에 보이지 않았던 보라색의 여러 spot들(Rf=0~0.18)을 발견할 수 있었다. Fig. 1D는 amide 또는 2급아민을 가진 지질을 나타

내는 녹색바탕에 노란 반점으로 대두와 비지의 AP 획분에서는 phosphatidylethanolamine(Rf=0.39), sulfphoglycosylceramide(Rf=3.0) 및 Rf=0.16인 미지의 물질이 풍부하였으나 된장의 경우 AP 및 AS획분에서는 많이 감소한 것으로 나타났다. 이와 같이 된장이 대두 및 비지와는 달리 phosphatidyl ethanolamine 또는 sulfphoglycosylceramide 등의 물질이 감소된 것은 오랜 기간 발효숙성되는 과정에서 자가효소 및 미생물에 의하여 발효되는 과정에서 복합지질들이 가수분해되어 지방산으로 분해되거나 인산, 콜린, 당 등이 제거된 지질들이 생성된 때문으로 생각된다. 위의 결과에서 된장지질의 AP분획 및 AS분획에 대두나 비지보다 유리지방산이 많이 함유되어 있어 일부 세포독성효과를 나타낸 것으로 추정할 수 있다. 그러나 대두의 지질추출물에도 비지의 지질추출물에서와 비슷한 양의 유리지방산이 함유되어 있는 것으로 분석결과 나타났으나 비지에 비하여 세포독성을 일으키지 않는 것으로 보아 유리지방산 이외의 지질성분들도 세포독성에 관여한다고 추정할 수 있다. 또한 본 실험에서 암세포에 대한 세포독성실험에서는 대두지질의 효과가 나타나지 않았으나 콩이나 비지를 음식물로 섭취하면 체장의 lipase 및 장내 미생물들에 의하여 콩이나 비지의 지질이 가수분해되어 유리지방산이 생성될 것이므로 생체에서는 된장보다는 약하지만 세포독성을 나타낼 것으로 예견할 수 있다.

**약알칼리에 안정한 lipid의 분리**

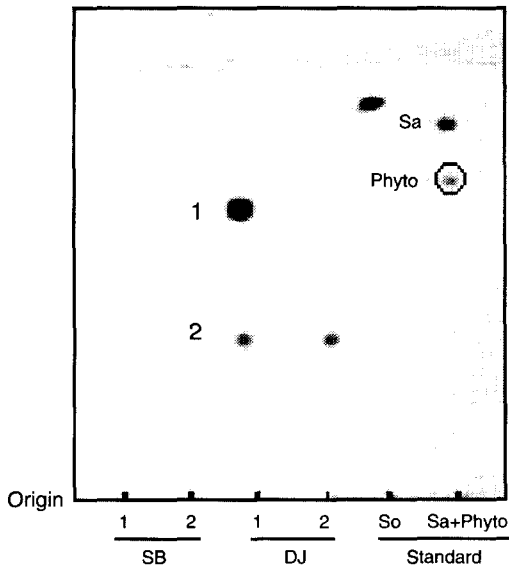
대두에는 sphingolipid인 glycosphingolipid가 다량 존재하며 항암효과가 있다고 하였다. Sphingolipid는 약알칼리에 가수분해되지 않으므로 약알칼리에 안정한 lipid를 분리하여 sphingolipid의 존재를 일부 확인하였다. 각 분획을 0.4 N KOH/methanol로 가수분해하여 glycerolipid를 제거하고 silicagel TLC로 분석한 결과는 Fig. 2와 같았다. Fig. 2A에서 나타난 바와 같이 fr. 1(chloroform : methanol=90 : 10)의 경우 5% 황산용액의 분무시 대두에서 monoglycosylceramide의 Rf치와 비슷한 Rf=0.74에서 진한 spot을 볼 수 있었으나 된장에서는 glycosylceramide는 감소한 반면 ceramide(Rf=0.88)가 증가한 것으로 나타났다. 같은 조건으로 전개한 TLC에 1%의 ninhydrin용액을 분무하였을 때 된장지질획분에서는 Rf=0.51과 0.49에서 보라색의 spot을 관찰할 수 있었으며 sphingosine 및 sphinganine의 Rf치와 비슷하였고 대두에서는 나타나지 않았다(Fig. 2B).

된장지질 중 약알칼리에 안정하고 ninhydrin에 양성인 지질이 free sphingolipid인 sphingosine이나 sphinganine 또는 phytosphingosine과 같은 물질인지 알아보기 위하여 free sphingoid base를 분리하는 전개용매인 chloroform : methanol : 2 N NH<sub>4</sub>OH 혼합액(40 : 10 : 1)으로 TLC를 행한 다음 1% ninhydrin용액을 분무하였을 때 Fig. 3에서와 같이 Rf치가 0.67 및 0.37에서 보라색 spot이 나타났으며 1번 spot은 phytosphingosine과 비슷하였으나 2번 spot은 glycosphingosine인 psycosin으로 추정되었다. 또한 대두, 비지 및 된장



**Fig. 2. Separation of alkali-stable lipid fractionated by silicic acid column on silica gel TLC.**

The lipids are visualized by spraying 5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution (A) or 1% ninhydrin solution (B). TLC was developed in chloroform : methanol : formic acid : H<sub>2</sub>O (56 : 30 : 4 : 2) solvent system. Cer, SM, Lac, Glu, So and Sa mean ceramide, sphingomyelin, lactosylceramide, glucosylceramide, sphingosine and sphinganine.



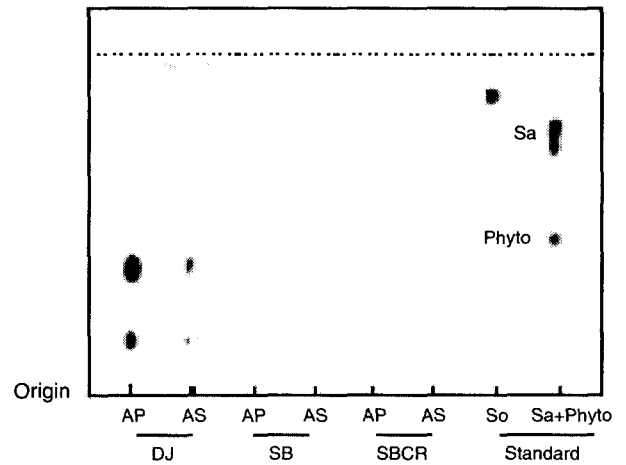
**Fig. 3. Difference of alkali-stable lipid fraction between soybean and doenjang on TLC.**

The lipids are visualized by spraying 1% ninhydrin solution. TLC was developed in chloroform : methanol : 2 N NH<sub>4</sub>OH (40 : 10 : 1) solvent system. So, Sa and Phyto mean sphingosine, sphinganine and phytosphingosine.

의 총지질을 acetone으로 분획한 AP 및 AS획분을 약알칼리 로 가수분해하여 TLC로 비교한 경우에도 된장에서만 AP 및

AS 분획에서 Fig. 4에서와 같이 2개의 spot들이 나타났으며 대두 및 비지에서는 보이지 않았다.

동물조직의 ceramide, cerebroside 또는 sphingomyelin이 식물인 대두의 그들과 구성 sphingoid base 및 구성 지방산이 서로 다르며 생리활성도 서로 다르므로 대두에 풍부한 glycosylceramide가 된장의 발효시 가수분해되어 ceramide 및 phytosphingosine과 같은 free sphingoid base로 존재한다면 대두 자체를 섭취하는 것보다 항암효과가 훨씬 좋아질 수 있음을 추정할 수 있다. 본 연구에서는 여러 종류의 백혈암세포에 대한 *in vitro* 실험에서 콩의 지질획분은 1 mg/ml 농도에서 세포독성이 없는 것으로 나타났으나(Table 1, 2, 3), Schmelz 등의 mouse를 이용한 *in vivo* 실험에서는 대두의 glucosylceramide가 우유의 sphingomyelin보다 대장암의 악성화를 저해하는 효과가 높다고 하였는데 이는 소장 및 대장 내에서 일어나는 체장의 소화효소 및 미생물의 분해효소에 의한 sphingolipid의 가수분해 결과라고 볼 수 있다. 우유 및 버터 등 동물성 식품의 sphingolipid는 주로 sphingomyelin으로 존재하는 반면 대두는 glycosylceramide로 존재하며 동, 식물의 glycosylceramide와 sphingomyelin 및 ceramide의 구성 지방산 및 구성 sphingoid base의 조성이 세포에 미치는 생리활성은 다르다고 하였다. Sullards 등(24)은 대두의 glycosylceramide를 대장균의 glucoceramidase로 처리하여 얻은 ceramide가 우유의 sphingomyelin으로부터 얻은 ceramide보다 대장암세포인 HT29 cell의 apoptosis를 일으키는데 더 효과가 있었다고 하였다. 본 연구에서 된장의 발효과정에서 대두에 함유되어 있는 glycosylceramide는 분해되어 함량이 감소하였지만 그 대신 생성된 ceramide 또는 sphingosine, sphinganine, phytosphingosine 등이 세포에 직접적인 생리활성을 가지기 때문에 대두 및 비지보다도 *in vitro* 실험에서 암세포에 세포독성을 나타낼 수도 있었던 것으로 생각되며



**Fig. 4. Separation of alkali-stable lipid fraction on TLC.**

The lipids are visualized by spraying 1% ninhydrin solution. TLC was developed in chloroform : methanol : 2N NH<sub>4</sub>OH (40 : 10 : 1) solvent system. So, Sa and phyto mean sphingosine, sphinganine and phytosphingosine.

대두 및 대두발효식품의 sphingolipid 조성 및 항암효과에 대한 연구를 진행하고 있다.

요 약

대두식품들로부터 추출한 지질분획들이 사람의 K562 백혈구암세포, mouse의 Yac1 백혈구암세포 및 S180 고형암세포에 미치는 세포독성 효과를 MTT assay법으로 조사하였다. 대두, 비지 및 된장의 총지질을 chloroform/methanol(2:1) 및 물포화 butanol로 추출하고 20배 용량의 acetone을 가하여 아세톤상층액(AS 획분) 및 아세톤침전물(AP 획분)을 얻었다. 된장지질의 AS 획분 및 AP 획분이 실험에 사용한 K562, Yac1 및 S180 암세포에 가장 강한 세포독성을 일으켰으며 비지의 AS 및 AP 획분 역시 된장보다는 약하지만 세포독성을 나타냈으나 대두의 지질획분들은 세포독성효과를 나타내지 않았다. 된장지질의 AS 및 AP 분획의 지질조성을 보면 대두 및 비지에 비하여 많은 양의 유리지방산이 함유되어 있었다. 또한 지질획분들을 0.4 N KOH/methanol로 약알칼리 분해하고 silica gel TLC로 분석한 결과, 된장의 지질획분에서는 대두 및 비지에서 보이지 않았던 알칼리에 안정하고 ninhydrin에 양성인 물질들이 여러개 나타났으며 이들은 유리 sphingoid base 및 psycosin으로 추정되었다.

감사의 글

이 논문은 1999년도 한국학술진흥재단의 연구비지원에 의하여 수행된 연구(KRF-99-041-D00458)의 일부로서 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Yang, J.L. : Antiatherogenic effect of *chongkukjang*. A Thesis for the Degree of Doctor of Philosophy, Pusan National University (2000)
2. Joo, H.K., Shin, Y.K. and Lee, M.S. : Effects of salt and alcohol on organic acids content during aging of *chongkukjang*. *J. Food Sci. Technol.*, **1**, 13-23 (1996)
3. Hawrylevicz, E.J., Zapata, J.J. and Blair, W.H. : Soy and experimental cancer: Animal studies. *J. Nutr.*, **125**, 698s-708s (1995)
4. Kennedy, A. : Cancer prevention by soy products. *J. Nutr.*, **125**, 733s-743s (1995)
5. Kennedy, A.R., Suzhaj, B.F., Newberne, P.M. and Billings, P.C. : Preparation and production of a cancer chemopreventive agent, Bowman-Birk inhibitor concentrate. *Nutr. Cancer*, **19**, 281-302 (1993)
6. Thiagarajan, D.G., Bennink, M.R., Bourquin, L.D. and Kavas, F.A. : Prevention of precancerous colonic lesions in rats by soy flakes, soy flour, genistein, and calcium. *Am. J. Clin. Nutr.*, **68**, 1394s-1399s (1998)
7. Vesper, H., Schmelz, E.M., Nikolova-Karakashian, M.N., Dillehay, D.L., Lynch, D.V. and Merrill, A.H., Jr. : Sphingolipids in food and the emerging importance of sphingolipids to nutrition. *J. Nutr.*, **129**, 1239-1250 (1999)

8. Schmelz, E.M., Crall, K.J., Larocque, R., Dillehay, D.L. and Merrill, A.H. Jr. : Uptake and metabolism of sphingolipids in isolated intestinal loops of mice. *J. Nutr.*, **124**, 702-712 (1994)
9. Hannun, Y.A. and Linardic, C.M. : Sphingolipid breakdown products: anti-proliferative and tumor-suppressor lipids. *Biochim. Biophys. Acta*, **1154**, 223-236 (1993)
10. Merrill, A.H. Jr., Liotta, D.C. and Ronald, T.R. : Fumonisin: Fungal toxins that shed light on sphingolipid function. *Trends in Cell Biology*, **6**, 218-223 (1996)
11. Merrill, A.H. Jr., Lingrell, S., Wang, E., Nikolova-Karakashian, M., Vales, T.R. and Vance, D.E. : Sphingolipid biosynthesis de novo by rat hepatocytes in culture. Ceramide and sphingomyelin are associated with, but not required, for very low density lipoprotein secretion. *J. Biol. Chem.*, **270**, 13834-13841 (1995)
12. Smith, E.R., Jones, P.L., Boss, J.M. and Merrill, A.H. Jr. : Changing J774A. 1 cells to new medium perturbs multiple signaling pathways, including the modulation of protein kinase C by endogenous sphingoid bases. *J. Biol. Chem.*, **272**, 5640-5646 (1997)
13. Schmelz, E.M., Bushnev, A.S., Dillehay, D.L., Liotta, D.C. and Merrill, A.H. Jr. : Suppression of aberrant colonic crypt foci by synthetic sphingomyelins with saturated or unsaturated sphingoid base backbones. *Nutr. Cancer*, **28**, 81-85 (1997)
14. Schmelz, E.M., Dillehay, D.L., Webb, S.K., Reiter, A., Adams, J. and Merrill, A.H. Jr. : Sphingomyelin consumption suppresses aberrant colonic crypt foci and increases the proportion of adenomas versus adenocarcinomas in CF1 mice treated with 1,2-dimethylhydrazine: implications for dietary sphingolipids and colon carcinogenesis. *Cancer Res.*, **56**, 4936-4941 (1996)
15. Dillehay, D.L., Webb, S.J., Schmelz, E.M. and Merrill, A.H., Jr. : Dietary sphingomyelin inhibits 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in CF1 mice. *J. Nutr.*, **124**, 615-620 (1994)
16. Lim, S.Y., Park, K.Y. and Rhee, S.H. : Anticancer effect of doenjang in *in vitro* sulforhodamine assay. *Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **28**, 240-245 (1999)
17. Nicholson, M.L., Neoptolemos, J.P., Clayton, H.A., Talbot, I.C. and Bell, P.R.F. : Inhibition of experimental colorectal carcinogenesis by dietary N-6-polyunsaturated fats. *Carcinogenesis*, **11**, 2191-2197 (1990)
18. Kim, S.H., Yang, J.L. and Song, Y.S. : Physiological functions of *chongkukjang*. *Food Ind. Nutr.*, **4**, 40-46 (1999)
19. Alley, M.C., Scudiero, D.A., Monks, A., Hursey, M.L., Czerwinsky, M.J., Fine, D.L. and Boyd, M.R. : Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.*, **48**, 589-601 (1988)
20. Folch, J., Lee, M. and Sloan-Stanly, H.S. : A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **226**, 497-509 (1957)
21. 勝野安彦 : 脂質分析法入門, 生物化學實驗法 9. 學會出版センター, 日本, p.91-98 (1980)
22. Park, K.Y., Moon, S.H., Baik, H.S. and Cheigh, H.S. : Antimutagenic effect of *doenjang* toward aflatoxin. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **19**, 156-162 (1990)
23. Choi, S.Y., Cheigh, M.J., Lee, J.J., Kim, H.J., Hong, S.S., Chung, K.S. and Lee, B.K. : Growth suppression effect of traditional fermented soybean paste on various tumor cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **28**, 458-463 (1999)
24. Sullards, M.S., Lynch, D.V., Merrill, A.H. Jr. and Adams, J. : Structure determination of soybean and wheat glucosylceramides by tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, **35**, 347-353 (2000)

(2001년 9월 17일 접수)