

청국장에 존재하는 Isoflavone의 Mass 분석

유형재 · 황재성 · 김한복*

호서대 자연과학대 생명공학과

청국장은 미생물, 효소, 다양한 생리활성물질을 포함하는 대두발효식품으로 정장, 혈액순환개선 효과 등이 알려져 있다. 청국장에 존재하는 isoflavone이 유방암, 전립선암의 억제와 관련이 있을 수 있다. 본 연구에서는 HPLC와 Mass 분석을 통해 분말청국장 100% ethanol 추출물에 aglycone 형태의 genistein, daidzein, glycitein이 존재함을 확인했다. 당이 붙어 있는 genistin, daidzin, OH기가 추가적으로 붙어 있는 8-OH-genistein, 8-OH-daidzein은 존재하지 않았다. Estrogen 수용체에는 ER α , ER β 가 있다. ER α 는 유방암, 전립선암의 촉진에, ER β 는 이들 암의 억제와 관련이 있을 것으로 추정한다. 인간의 estrogen 수용체가 cloning되어 있는 효모의 전사촉진 assay를 이용하여, 청국장에 있는 isoflavone이 ER β 를 선택적으로 자극할 수 있음을 확인했다.

Key words □ Chungkookjang, daidzein, ER α , ER β , genistein, mass

요즘 청국장은 정장효과, 혈액순환 개선 효과 등으로 크게 각광을 받고 있다. 청국장은 빠른 시간에 제조할 수 있으며, 다른 식품과 달리 소금을 사용하지 않고 제조할 수 있다. 한국 사람이 많이 섭취하는 소금은 위암, 고혈압의 주요 원인이 된다. 청국장은 대두 발효식품으로 발효가 되면서 대두에 없었던 미생물, 효소, 다양한 생리활성물질이 만들어진다(11). 대두식품은 유방암, 전립선암 발생을 감소시킨다(4, 15, 18). 역학연구는 서양과 동양의 유방암, 전립선암 발생률의 커다란 차이가 대두 섭취량 때문인 것으로 보고 있다(4). 미국에 있는 동아시아인 교포 2세들의 상기 암 발생률이 현지인과 같아지는 것으로 보아, 음식 특히 대두의 섭취와 상기 암 발생률 간 상관관계가 있음을 암시해 준다. 그밖에 청국장의 항산화효과(17), 혈압강화효과(12) 등도 보고되어 있다.

대두, 청국장 등에는 genistein, daidzein, glycitein과 같은 isoflavone이 존재하며(16), 이들이 항산화효과, tyrosine 인산화효과(15) 등을 통해, 세포신호전달의 다양한 경로에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(1, 8, 13). Genistein이나 daidzein은 특이하게 여성 호르몬의 하나인 estrogen과 구조적으로 많이 닮아있다(3). Estrogen 수용체에는 ER α , ER β 가 있다(5). 이들 수용체는 전통적으로 세포의 핵(genomic)에서 작용하기도 하지만, 근래에는 세포막(non genomic)에 존재하면서 세포의 빠른 신호전달에 관여하는 것도 알려져 있다(9). ER α 는 유방암, 전립선암 세포의 증식을 촉진하나, ER β 는 이들 세포의 증식을 억제할 수 있다는 가능성도 제시되고 있다(10). 따라서 ER β 를 선택적으로 자극할 수 있는 물질을 찾는 것이 바람직하다.

본 연구에서는 청국장에 어떤 유형의 isoflavone이 존재하는지,

Mass를 이용하여 분석하였다. 또한 이들 isoflavone 중, ER β 를 선택적으로 자극할 수 있는 물질이 있는지 여부를, 인간의 estrogen 수용체가 cloning되어 있는 효모의 전사촉진 assay를 이용하여 밝혀냈다.

재료 및 방법

청국장 발효

Bacillus licheniformis B1을 이용하여 청국장을 제조하였다(11). 발효대두를 동결건조하고 분말을 제조한 후, 이를 100% ethanol에 10%(w/v)되게끔 넣어주고 실온에서 하루 두었다. 이를 10,000×g에서 원심분리하여 상층액을 얻었다.

HPLC 분석

분말청국장 ethanol 추출 상층액에 존재하는 isoflavone류를 분석하기 위해, Waters HPLC Pump Model 510 (Milford, USA), Waters Automated Gradient Controller, Water486, tunable absorbance detector를 이용하였다. Column은 C18 reversed-phase column (J.T. Baker Res., Phillipsburg, USA) (4.6×250 mm, 5 micron, pore size 120 Å)을 이용하였다. 분말청국장 ethanol 추출물 20 µl을 주입하였다. 용매 A (5% acetonitrile, 95% H₂O, 0.1% TFA)와 용매 B (95% acetonitrile, 5% H₂O, 0.1% TFA)를 제조하였다. 용출은 acetonitrile용액의 농도를 gradient program을 이용하여 2에서 30%로 증가시키면서 수행하였다. 유속은 0.8 ml/min으로 조절하였다. 용출된 시료는 260 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Mass spectrometry

Model, Thermo Finnigan LCQ (San Jose, USA)와 Column

*To whom correspondence should be addressed.

Tel: 82-41-540-5624, Fax: 82-41-548-6231

E-mail: hbkim@hoseo.edu

LCQ (Thermo Finnigan, San Jose, USA, 3 μm, 120 Å Keystone ODS-Hypersil, 1 mm×100 mm, 1344-1351 psi)을 이용하였다. 용매로는 30% acetonitrile과 0.1% formic acid 혼합액을 사용하였다. Collision energy는 40%로 조절하였다.

효모 전사 assay

ERα의 자극효과를 알아보기 위해 *Saccharomyces cerevisiae*에 수용체 발현용 YEpERα과 reporter용 YEp-vERE의 plasmid (LifeSensor, Inc., Malvern, USA)를 transformation한 것을 이용하였다. 선택배지로는 효모용 dropout 합성배지 (-Trp -Ura) (Clontech, Takara Bio, Palo Alto, USA)를 이용하였다. ERβ의 자극효과를 알아 보기 위해서는 *S. cerevisiae* (YEpERβ₁, YEp-vERE)를 이용했고, 이의 선택배지는 위의 효모용 dropout 합성배지(-Leu -Ura)를 이용하였다. Cytoplasm에 존재하던 ER이 ligand와 binding하면 핵내로 이동한다. ER이 estrogen response element (ERE)에 부착하고 transactivation이 진행되면, reporter유전자가 발현된다(5). Plasmid를 지닌 효모세포는 적절한 농도의 분말청국장 추출물과 함께 혹은 없이(control) 96-well plate에서 30°C에서 하룻밤 배양하였다. Ligand 의존적인 transactivation assay는 Beta-Glo assay (Promega, Madison, USA)를 이용하였다. Reporter유전자의 발현물인 luciferase 활성은 Victor 2 system (Perkin Elmer, Wellesley, USA)을 이용해 측정했다.

결과 및 고찰

HPLC, Mass 분석

분말청국장 ethanol 추출물을 HPLC 분석을 해서, 8개의 fraction을 얻었다(Fig. 1). 각 fraction별로 Mass를 수행하였다(Fig. 2.1-2.5). Mass의 정확도를 검증하기 위해, 순수분리된 genistein을 사용하여 Mass 분석을 했을 때 genistein에 해당되는 분자량의 값, 271을 보였다. Fraction 1에서는 genistein, glycitein, daidzein 3 중 어느 것도 발견되지 않았다. Fraction 4

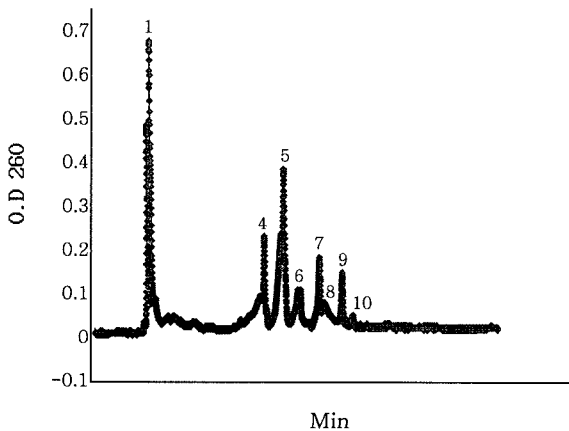


Fig. 1. HPLC analysis. To purify isoflavones in 100% ethanol extract of Chungkookjang powder, HPLC was performed, using acetonitrile solvent gradient. Elution was monitored at 260 nm.

에서는 daidzein (분자량 255), glycitein (285)이, fraction 5에서는 daidzein (255), genistein (271), glycitein (285)이, fraction 6에서는 genistein (271)이 (자료 미제시), fraction 7에서는

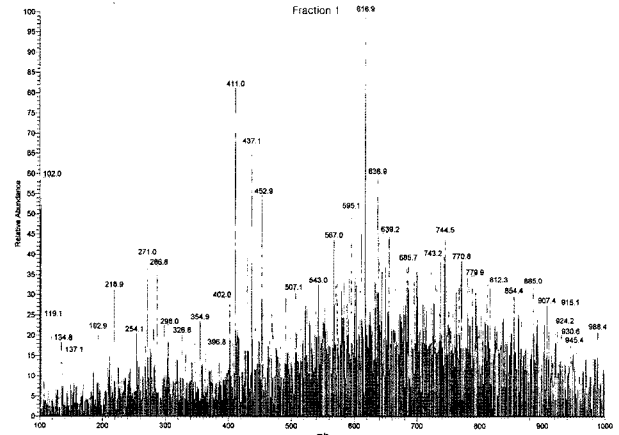


Fig. 2.1. Mass analysis of fraction 1.

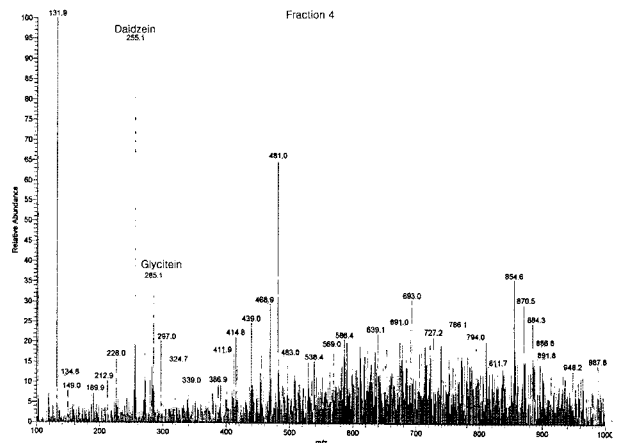


Fig. 2.2. Mass analysis of fraction 4. Daidzein and glycitein peaks are shown.

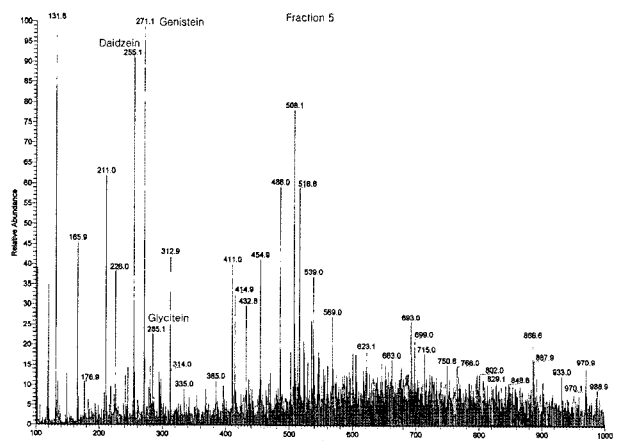


Fig. 2.3. Mass analysis of fraction 5. Daidzein, genistein, and glycitein peaks are shown.

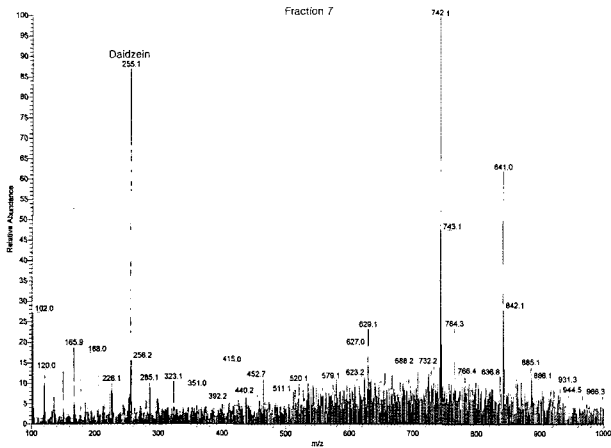


Fig. 2.4. Mass analysis of fraction 7. Daidzein peak is shown.

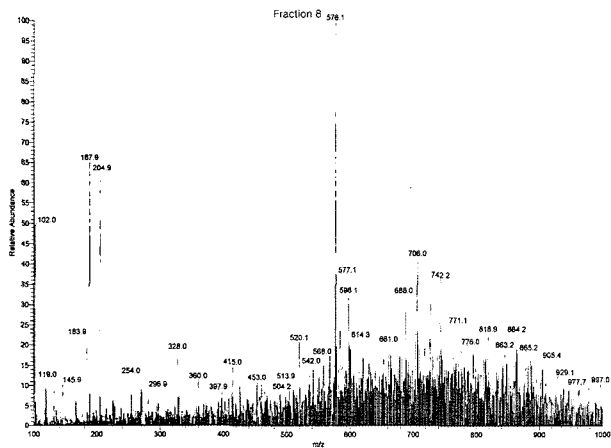


Fig. 2.5. Mass analysis of fraction 8.

daidzein (255)이 발견되었다. Fraction 8, 9, 10 (fraction 9,10 자료 미세시)에서는 isoflavone 중 어느 것도 발견되지 않았다. 대두의 isoflavone류는 당, malonate, acetate 등이 붙어있다. 당이 결합되어 있는 daidzin (417), genistin (433)은 어느 fraction에서도 발견되지 않았다. 대두를 물에 불리고 삶는 과정에서 isoflavone으로부터 당이 떨어질 수 있다(14). 또한 발효 중에 균주의 β -glucosidase가 작용하면서 genistin으로부터 당이 떨어지면서 genistein이 만들어질 수 있다(14). 청국장의 100% ethanol 추출물에는 aglycone 형태의 genistein, daidzein, glycitein만이 존재함을, 본 Mass분석을 통해 확인할 수 있었다. Aglycone형태의 isoflavone류는 인체의 장에서 흡수율이 높다는 장점이 있다(4).

이상과 같이, 특정물질이 완전 순수분리 되지 않은 혼합물의 상태에서도 특정물질의 분자량을 알아낼 수 있는 점은 Mass분석의 큰 장점이라 할 수 있다. 최종적인 isoflavone의 정확한 구조분석을 위해서는 추가적인 MS-MS나 NMR 분석이 필요할 것이다. 하지만, 본 연구 정도의 Mass 분석수준에서도, 청국장에 존재하는 isoflavone류의 전반적인 양상을 알아낼 수 있었다.

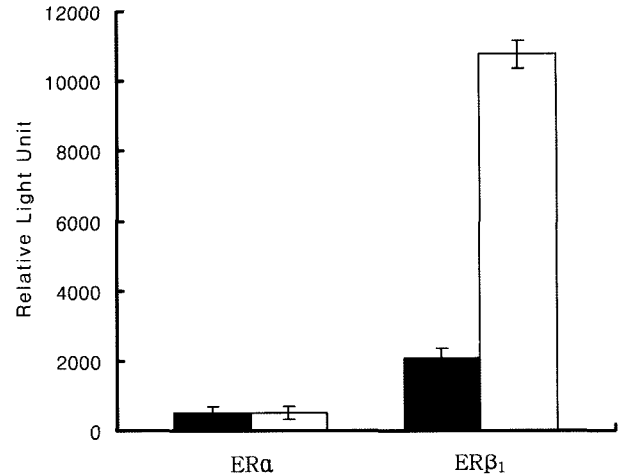


Fig. 3. Yeast transactivation assay. *Saccharomyces cerevisiae* containing YEpER α and YEp-vERE, or YEpER β_1 and YEp-vERE was treated without (control) (black bar) or with 100% ethanol extract of Chungkookjang (grey bar). Transactivated luciferase activity by ER α or ER β_1 was measured. Data represent triplicates with standard deviations.

된장에서는 OH기가 추가적으로 부착된 변형된 genistein, daidzein이 발견된다는 보고가 있다(7). 변형된 genistein, daidzein은 보통의 genistein, daidzein과 비교하여 항산화효과, 항암효과가 더 뛰어나다(7). 그러나 본 청국장에서는 변형된 isoflavone류 8-OH-daidzein (분자량 272), 6-OH-daidzein (272), 8-OH-genistein (288), equol (239) 등이 발견되지 않았다(2, 7). 이는 이들 장에 존재하는 균주의 차이점 때문으로 보인다. 일본의 미소나 템페에 존재할 수 있는 *Aspergillus oryzae*가 OH기가 추가적으로 붙어있는 genistein이나 daidzein을 만들어내는 것으로 보이며(7), 청국장에는 이런 균주가 없어 이들 변형된 형태의 것을 만들지 못하는 것으로 보인다.

ER β 특이성

분말청국장 ethanol 추출물 원액을 사용했을 때는 ER α 와 ER β 둘다 자극하였다 (자료 미세시). 반면에, 원액을 50배 희석시킨 추출물을 사용했을 때 ER α 는 자극하지 않고, ER β_1 만 자극하는 특이성이 있었다(Fig. 3). ER α 와 ER β 는 ligand binding domain에서 59% 유사성이 있으며, DNA binding domain에서는 96% 유사성이 있다(5). ER α 와 ER β 가 ligand binding domain에서 상당한 차이가 있다는 것은, ligand에 대해 상당한 특이성이 있다는 것을 의미한다. 본 연구에서는 genistein과 daidzein이 포함되어 있는 추출물을 사용하였다. 따라서 본 ER β 자극효과는 genistein과 daidzein 둘다 ligand로 작용한 복합효과로 보인다. 분말청국장의 ethanol 추출물이 효모에서 ER β 자극효과가 있음을 본 연구에서 밝혔으며, 이는 인간세포의 일종인 HEK293 세포에서도 적용됨을 확인할 수 있었다(자료 미세시).

ER α 는 자극하지 않고 ER β 만 자극하는 효과는 무엇에 좋은가? ER α 는 유전조직, 자궁에서 중요한 역할을 하는 수용체이다(5).

따라서 ER α 는 유방, 자궁암 촉진과 상당한 관련이 있다. ER β 는 뼈, 비뇨생식기, 심장혈관계, 중추신경계, 뇌발달 등에서 중요하다(5, 10). 그밖에도 ER β 는 유방, 전립선, 대장암 세포의 증식억제 작용, 세포사멸 조절, 항산화 유전자 발현조절, 면역반응조절에 관여한다(6, 10, 19). 따라서 청국장에 존재하는 genistein, daidzein의 ER β 자극효과는 유방, 전립선암의 억제에 기여할 수 있는 가능성이 있으며, 이에 대한 기작을 포함하여 보다 깊이 있는 연구가 앞으로 필요할 것이다.

감사의 말

본 연구는 2006년도 호서대학교 학술연구조성비의 지원에 의해 수행되었음.

참고문헌

- Aggarwal, B.B. and S. Shishodia. 2006. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochem. Pharmacol.* 71, 1397-1421.
- Atkinson, C., C.L. Frankenfeld, and J.W. Lampe. 2005. Gut bacterial metabolism of the soy isoflavone daidzein: exploring the relevance to human health. *Exp. Bio. Med.* 230, 155-170.
- Beck, V., U. Rohr, and A. Jungbauer. 2005. Phytoestrogens derived from red clover: An alternative to estrogen replacement therapy? *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 94, 499-518.
- Bemis, D.L., J.L. Capodice, M. Desai, R. Buttyan, and A.E. Katz. 2004. A concentrated aglycone isoflavone preparation (GCP) that demonstrates potent anti-prostate cancer activity in vitro and in vivo. *Clin. Cancer Res.* 10, 5282-5292.
- Bovee, T.F.H., R.J.R. Helsdingen, I.M.C.M. Rietjens, J. Keijer, and R.L.A.P. Hoogenboom. 2004. Rapid yeast estrogen bioassays stably expressing human estrogen receptors α and β , and green fluorescent protein: a comparison of different compounds with both receptor types. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 91, 99-109.
- Harris, H.A., L.M. Albert, Y. Leathurby, M.S. Malamas, R.E. Mewshaw, C.P. Miller, Y.P. Kharode, J. Marzolf, B.S. Komm, R.C. Winneker, D.E. Frail, R.A. Henderson, Y. Zhu, and J.C. Keith, Jr. 2003. Evaluation of estrogen receptor- β , agonist in animal models of human disease. *Endocrinol.* 144, 4241-4249.
- Hirota, A., M. Inaba, Y. Chen, N. Abe, S. Taki, M. Yano, and S. Kawaii. 2004. Isolation of 8-hydroxyglycitein and 6-hydroxydaidzein from soybean miso. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 1372-1374.
- Ise, R., D. Han, Y. Takahashi, S. Terasaka, A. Inoue, M. Tanji, and R. Kiyama. 2005. Expression profiling of the estrogen responsive genes in response to phytoestrogens using a customized DNA microarray. *FEBS Lett.* 579, 1732-1740.
- Klinge, C.M., K.A. Blankenship, K.E. Risinger, S. Bhatnagar, E.L. Noisin, W.K. Sumanasekera, L. Zhao, D.M. Brey, and R.S. Keynton. 2005. Resveratrol and estradiol rapidly activate MAPK signaling through estrogen receptors α and β in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 280, 7460-7468.
- Kochler, K.F., L.A. Helguero, L.A. Haldosen, M. Warner, and J.A. Gustafsson. 2005. Reflections on the discovery and significance of estrogen receptor beta. *Endocr. Rev.* 26, 465-478.
- Lee, J.J., D.S. Lee, and H.B. Kim. 1999. Fermentation patterns of Chungkookjang and Kanjang by *Bacillus licheniformis* B1. *Kor. J. Microbiol.* 35, 296-301.
- Matsui, T., H.J. Yoo, J.S. Hwang, D.S. Lee, and H.B. Kim. 2004. Isolation of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from Chungkookjang. *Kor. J. Microbiol.* 40, 355-358.
- Moskaug, J.Ø., H. Carlsen, M. Myhrstad, and R. Blomhoff. 2004. Molecular imaging of the biological effects of quercetin and quercetin-rich foods. *Mech. Ageing Dev.* 125, 315-324.
- Sung, J.H., S.J. Choi, S.W. Lee, K.H. Park, and T.W. Moon. 2004. Isoflavones found in Korean soybean paste as 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 1051-1058.
- Takimoto, C.H., K. Glover, X. Huang, S.A. Hayes, L. Gallot, M. Quinn, B.D. Jovanovic, A. Shapiro, L. Hernandez, A. Goetz, V. Llorens, R. Lieberman, J.A. Crowell, B.A. Poisson, and R.C. Bergan. 2003. Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis of unconjugated soy isoflavones administered to individuals with cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers & Prev.* 12, 1213-1221.
- Wu, Q., M. Wang, W.J. Sciarappa, and J.E. Simon. 2004. LC/UV/ESI-MS analysis of isoflavones in Edamame and Tofu soybeans. *J. Agric. Food Chem.* 52, 2763-2769.
- Yoo, H.J., S.H. Lee, D.S. Lee, and H.B. Kim. 2002. Antioxidant activity of fermented barley, wormwood, sea tangle, and soybean. *Kor. J. Microbiol.* 38, 230-233.
- Zhou, J.R., L. Yu, Z. Mai, and G.L. Blackburn. 2004. Combined inhibition of estrogen-dependent human breast carcinoma by soy and bioactive components in mice. *Int. J. Cancer.* 108, 8-14.
- Zhu, Y., Z. Bian, P. Lu, R.H. Karas, L. Bao, D. Cox, J. Hodgins, P.W. Shaul, O. Thorn, O. Smithies, J.-Å. Gustafsson, and M.E. Mendelsohn. 2002. Abnormal vascular function and hypertension in mice deficient in estrogen receptor β . *Science* 295, 505-508.

(Received January 23, 2007/Accepted March 3, 2007)

ABSTRACT: Mass Analysis of Isoflavones in Chungkookjang

Hyung Jae Yoo, Jae Sung Hwang, and Han Bok Kim* (Department of Biotechnology, Hoseo University, Asan 336-795, Korea)

Fermented soybean, Chungkookjang contains microorganism, enzyme, and diverse bioactive compounds. Isoflavones in Chungkookjang might suppress breast and prostate cancers. Using HPLC and Mass analyses, it was found that 100% ethanol extract of Chungkookjang contains aglycone forms such as genistein, daidzein, and glycitein. 8-OH-genistein, 8-OH-daidzein were not found. There are two estrogen receptors, ER α , ER β . ER α might stimulate proliferation of breast and prostate cancer cells, and ER β might suppress their growth. Using yeast transactivation assay under the control of human ER expression, it was demonstrated that isoflavones in Chungkookjang can stimulate ER β_1 selectively.