Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal 26: 41-48 (2011)

연구논문

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

나경수[2], 최장원[1]*

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

Kyung Soo Ra[2] and Jang Won Choi[1]*

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

Abstract: To enhance cyclo-His-Pro (CHP) content, soybean hydrolysate was obtained using the strains isolated from Chungkukjang and further purified by various purification steps. First, twenty two strains were screened from Chungkukjang containing high level of CHP. Among them, the strain No. 12, which showed higher productivity of CHP from soybean ferment and have homologous sequence with 16S rDNA of *Bacillus amyloliquefaciens*, was named *B. amyloliquefaciens* CHP-12. Through various purification processes, CHP was concentrated from soybean ferment using ultrafiltration, which showed the best efficiency of CHP production, with the yield (71.3%) and CHP content (2.14 mg/g). Moreover, when glucose tolerance test was performed in Type I Sprague-Dawley rat induced by streptozotocin using the soybean ferments [0.5 g soybean ferment/kg body weight (CHP-0.5 group)] and 1.0 g soybean ferment/kg body weight (CHP-1.0 group), there were significant differences in glucose levels between diabetes-control group (265.3 mg/dL) and soybean ferment-treated groups (CHP-0.5 group: 84.3 mg/dL and CHP-1.0 group: 85.3 mg/dL) 120 min after glucose injection (2 g/kg body weight) ($p < 0.05$). Accordingly, it is suggested that the soybean ferment containing high level of CHP might be a candidate material as an anti-diabetic supplement for manufacturing functional healthy foods.

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

[1]대구대학교 바이오산업학과
[1]Department of Bioindustry, Daegu University, 15 Naeri-Ri, Jinryang-Up, Kyungsan, Kyungbuk 712-714, Korea
Tel: +82-53-850-6756, Fax: +82-53-850-6769
e-mail: chjawo@daegu.ac.kr

[2]대구공업대학 식품영양과
[2]Department of Food and Nutrition, Daegu Technical College, Daegu 704-721, Korea

1. 서론

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

많은 곡류, 시리얼 등의 탄수화물 식품, 과일, 채소 등을 섭취하고 지방 및 당류의 섭취를 줄일 것을 권고하고 있으며 당뇨병 환자 또는 pre-diabetes를 대상으로 다양한 건강 기능성 식품이 개발되고 있다 [5-7].

Cyclo-His-Pro (CHP)는 갑상선 자극호르몬 방출호르몬 (thyrotropin-releasing hormone, TRH)의 대사과정과 de novo로 체내에서 합성되기도 하는 bioactive dipeptide로써 뇌 전반과 척수 및 위장관 등에 널리 분포하며, 간과 부신에 CHP receptor가 존재함이 보고되고 있다. CHP와 TRH는 유사한 구조 및 생물학적 활성을 지니며 TRH의 투여 시 CHP가 증가하므로 TRH 투여에 의한 몇 가지 생물학적 효과가 CHP를 통해서 일어남을 알 수 있다. TRH로부터 분해 생성된 CHP는 인간의 중추신경 [8]과 소화기관 [9]에 고루 분포되어 있으며, 간과 부신에 수용체가 존재하고 있음이 보고되고 있다 [10]. 또한 CHP는 뇌하수체로부터 prolactin의 분비를 저해하며 [11], 알콜에 의한 부작용을 완화하고 [12], 또한 식사욕구를 완화하여 비만을 예방할 수 있는 효과를 지니고 있다. 동물과 사람의 당뇨 유발 시 혈청 내의 TRH 수준이 감소되어지는 것을 확인하였으며, TRH는 인슐린 분비를 촉진하며, 조직 내에서는 뇌와 전립선에서 가장 높은 함량을 보이고 있다 [13].

CHP는 당뇨 환자의 혈당을 조절할 수 있는 인슐린 기능 개선 소재로 사람의 소화기관, 혈액, 뇌척수액, 척수, 정액 등에서 발견되며, CHP는 endogenous cyclic dipeptide로 tyrotropin-releasing hormone (TRH)의 대사산물로서 생성된다 [14]. 포도당 주입 후 혈중 CHP가 증가하는 것으로 보아 CHP가 당뇨에서 혈당과 관련된 작용이 제안되어 있고, 아연과 함께 투여 시 당뇨 모델 쥐에서 인슐린 민감성 (insulin sensitivity) 및 포도당 제거율 (glucose clearance)을 유의하게 향상시킨다고 보고되었고, 또한 CHP는 중추신경에서 도파민 기전과 관련되어 있으며 렙틴과 유사한 작용을 한다 [15,16]. 이러한 보고들로부터 CHP는 당뇨병과 관련하여 인슐린과 렙틴의 작용에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 생각되고 있다.

현재 CHP가 함유된 소재로는 소의 전립선 분말 (약 1% 함유)이 있으며 그 외에 새우, 젓갈, 참치, 흰빵, 국수 등에서 CHP 함량이 보고되고 있으나 그 양이 매우 적어 ppm 수준으로 보고되고 있다 [17]. 그리고 식품에 존재하는 CHP를 활용할 경우 인체에 부작용을 야기하지 않을 것으로 생각되고 있으며, 실제로 현재 미국에서는 CHP가 함유된 카제인 또는 대두를 활용한 제품들이 개발되어 판매되고 있다 [17,18]. 이에 CHP를 함유한 단백질 가수분해물의 생산을 통해 안전하면서 효능있는 소재 개발이 가능하며 아울러 이를 활용한 액상, 분말, 과립형의 소재 개발과 CHP 함량에 따른 소재화의 가능성이 두각되고 있다.

따라서 본 연구는 이러한 CHP 소재를 활용하여 CHP가 지니는 생리활성을 이용한 기능성 식품의 제조를 위해 단백질과 아미노산 함량이 높은 건강 기능성 소재인 대두를 청국장에서 분리한 다양한 균주를 통해 CHP 함량이 높은 발효물을 생산하고, 분리 균주를 규명하며, 적합한 정제 과정을 적용하여 CHP 함량을 높인 최종 대두 발효물을 제조하고자 하였다. 또한 생체 내에서의 당뇨 개선 효과의 검증을 위해 당뇨를 유발시킨 동물 모델을 대상으로 대두 발효물의 당부하 검사를 실시하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 재료

CHP는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 CHP 분석 시 표준물질로 사용하였다. 탈지 대두는 새롬바이오 (Kyonggi-do, Korea)로부터 제공받아 실험에 사용하였다. 그 외에 분석에 필요한 시약은 일급 이상의 시약을 사용하였다.

2.2. CHP 분석

CHP는 high performance liquid chromatography (HPLC, Varian 230, Varian Inc., Palo Alto, CA, USA)를 이용하여 다음과 같은 조건에서 분석하였다. Hamilton PRP-1 RP 10 μM (250 mm × 4.1 mm ID, Hamilton Co. NV, USA) column과 pre-column Hamilton PRP 10 μM (25 mm × 1.3 mm ID)에 시료를 20 μL 주입하여 유속 0.5 mL/min으로 eluent (acetonitrile: 0.75 g/L 1-heptanesulfonic acid in 0.004 M aqueous trifluoroacetic acid=1:9 v/v)로 용출하고 시료 내 CHP 함량은 UV Spectrophotometer (Beckman Du® 650, CA, USA)를 이용하여 206 nm에서 측정하였다.

2.3. 청국장으로부터 균주 분리

청국장은 *Bacillus* sp.에 의해서 발효되는 식품으로 이 균주들은 내생 포자를 생성한다. 따라서 수집된 시료를 5 g씩 시험관에 넣고 멸균수 10 mL을 가한 후 80℃에서 15분간 물중탕하였다. 이 상등액을 Luria-Bertani (LB) agar 배지에 희석하여 도말하고 호기적 조건하 30℃에서 2-3일간 배양한 후 colony 색상과 형태 등을 기준으로 균주를 분리하였다.

2.4. 분리 균주들의 특성 및 동정

분리한 균주들은 Bergey's manual [19]에 따라 형태학적, 생리학적 특성을 검토하기 위해 세포형태, 운동성, 그람 염색, 포자 염색과 catalase 활성을 분석하였다. 분리 균주들의 생육곡선 측정은 LB 액체배지 50 mL에 균을 접종하고 37℃에서 58시간 동안 배양하면서 600 nm에서 흡광도를 측정하였다.

분리한 균주의 chromosomal DNA를 Wizard genomic DNA purification kit (Promega, WI, USA)를 이용하여 분리한 후 16S rDNA sequencing에 사용하는 universal primer인 27F (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3')와 1492R (5'-GGATACCTTGTTACGACTT-3') primer를 사용하여 PCR로 증폭한 다음 증폭된 PCR 산물을 Wizard SV Gel and PCR clean-up system (Promega)을 이용하여 정제하였다 [20]. 정제한 PCR 산물은 ABI PRISM 3700 DNA Analyzer를 이용하여 염기 서열을 분석하였다. 그 결과를 BLASTEN 프로그램을 이용하여 GENBANK의 ribosomal DNA sequence와 비교하였으며 sequence의 상동성은 Clustal X와 Mega 3

program을 이용하여 비교 분석하였다 [21].

2.5. 발효 중 성분 변화

발효 과정 중의 성분 변화량을 측정하기 위해 단백질 및 아미노태 질소 (amino nitrogen, A-N)함량을 측정하였다. 단백질 함량은 BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific Inc. IL, USA)를 이용하여 측정하였으며 아미노태 질소는 trinitrobenzensulfonate (TNBS)를 사용하여 다음과 같이 측정하였다 [22]. 적당량 희석한 시료 0.125 mL를 취하고 1 mL phosphate buffer (pH 8.2, 0.212 M)와 1 mL 0.1% TNBS를 가하여 50℃에서 1시간 반응시킨 후 2 mL 100 mM HCl로 반응을 정지시켰다. 20분 후 반응액에 4 mL 증류수를 가한 후 10분간 방치하고 340 nm에서 흡광도를 측정하였으며 표준물질로는 leucine을 이용하였다.

2.6. 대두 발효물 제조 및 CHP 함량 증가

대두 발효물은 대두분 (새롬바이오, 산본) 10% 현탁액을 121℃에서 15분간 가압멸균한 후 30℃로 냉각한 다음 청국장 분리 균주 *Bacillus amyloliquefaciens* CHP-12 전배양액을 4% 접종하여 30℃에서 4일간 발효시켰다. 이때 *B. amyloliquefaciens* CHP-12 전배양을 위해 LB (Luria-Bertani, Difco, Franklin Lakes, NJ) 배지를 사용하였다.

대두 발효물에 함유된 CHP의 함량을 높이기 위해 산처리, 활성탄 처리 및 한외여과를 실시하였다. 산 처리는 5% 발효물 용액에 구연산을 가하여 pH 3.5로 조정한 후 30분간 방치하여 생긴 침전을 여과하여 제거한 다음 NaOH로 pH 7.0으로 중화 처리하여 건조하였다. 활성탄 처리는 5% 발효물 100 mL에 활성탄 1 g을 가하여 30분간 진탕한 후 여과하여 여액을 제거하여 얻은 활성탄에 0.3% 암모니아수를 70 mL 가하여 다시 30분간 진탕시킨 후 여과하여 얻은 여액을 pH 7.0으로 조정하여 건조하였다. 한외여과는 5% 발효물을 한외여과막을 이용하여 5 kDa 이하의 여과액을 건조하였다.

2.7. 경구 당부하 검사

제1형 당뇨 모델로는 중앙실험동물 (Central Lab Animal Inc., Seoul, Korea)에서 공급받은 10주령의 웅성 Sprague-Dawley rat (160 ± 10 g)를 이용하였다. 실험동물은 당뇨를 유발시키기 전 7일간 적응시키고 당뇨 유발 전 12시간 동안 절식시킨 후 0.1 M citrate buffer (pH 4.5)에 streptozotocin (Sigma Chemical Co.)을 녹여 55 mg/kg BW 농도로 복강 내에 주입하였다. 당뇨 유발 다음날은 24시간 동안 5% glucose 용액을 물 대신 주어 일시적인 저혈당 현상을 방지하도록 하였으며 당뇨 유발 72시간 후에 혈당을 측정하여 250 mg/dL 이상인 개체를 선별하고 이를 제1형 당뇨 모델로 이용하였다. 경구 당부하 검사는 사육 7주째에 실험동물을 12시간 절식시킨 후 공복 시 혈당을 측정하고 경구로 시료를 투여한 다음 30분 후에 glucose 2 g/kg BW을 경구로 투여하고 이후 30분 간격으로 혈당을 측정하였다. 혈당은 혈액을 꼬리 정맥으로부터 채혈하여 채혈 즉시 Superglucocard Ⅱ (ARKRAY Inc., Kyoto, Japan)로 혈당을 측정하였다. 실험군은 control 군 (정상 혈당 대조군), DM-control군 (당뇨 유발 대조군), CHP-0.5군 (당뇨 유발 모델에 0.5 g/kg BW 대두 발효물 경구 투여군), CHP-1.0군 (당뇨 유발 모델에 1.0 g/kg BW 대두 발효물 경구 투여군)으로 군당 8마리씩 4개군으로 구성하였다. 대두 발효물은 *Bacillus amyloliquefaciens* CHP-12에 의한 대두 발효물을 한외여과 처리한 시료를 이용하였다. 군간의 차이는 SPSS program (ver. 10.0)을 이용하여 $p = 0.05$ 수준에서 one-way ANOVA와 구체적인 사후 검정은 Duncan's multiple range test로 유의성을 검증하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 대두 발효물의 CHP 함량

대두는 건조 분말의 20-45%에 해당하는 조단백질을 함유하여 과거에는 주요 단백질 공급원으로서 연구되었으나 현재는 단백질 부족 현상이 감소하면서 대두의 다양한 유용 생리활성에 연구가 집중되고 있다 [23]. 또한 대두에는 lectin과 같은 phytohemagglutinin 및 Kunitz trypsin inhibitor, Bowman-Birk protease inhibitor 등의 소화효소 저해제를 포함하고 있어 생 대두의 섭취는 설사, 영양분의 흡수저해, 체중감소, 성장억제 등 동물에게 농도 의존적 독성을 나타내어 가열 처리 또는 발효 과정을 거쳐 유해 성분을 제거한 가공 식품으로 제조 유통되고 있다 [24,25]. 본 실험에서는 시중에서 유통되는 대두 관련 제품인 청국장과 된장을 구입하여 시료 40 g에 증류수 200 mL를 가하여 열수추출 후 여과하여 얻은 여액의 건물량과 CHP 함량을 측정한 결과 (Fig. 1), 청국장 열수추출물 시료는 3.94 g 이상의 건물량을 보인 반면 된장 열수추출물 D-1, D-2, D-3의 건물량은 각각 3.38, 3.21, 3.88 g으로 청국장 시료에 비해 건물량이 적었다. 또한 CHP의 함량을 측정한 결과, D-1과 D-3 된장에서는 CHP가 검출되지 않았으며 청국장 시료인 C-1, C-2, C-3에서는 각각 21.0, 28.5, 16.0 μg/g의 CHP가 검출되었다. 대두 발효물인 된장에서는 CHP 함량이 검출되지 않은 시료도 있는 반면 청국장 시료에서는 함량 차이는 있었으나 모두 CHP를 함유하는 것으로 나타났다. Hilton 등 [17]은 햄, 달걀, 참치, 새우 등 여러 식품에서 CHP의 양을 측정한 결과 건조된 새우에서 6576 pmol/g의 가장 높은 함량을 보고하였고, Choi 등 [26]은 다른 식품에 비해 청국장에서 26.5 mg/g (건물량)의 높은 함량을 보고하였다. 증자 대두에 *Bacillus* sp. 균주들을 이용, 발효 제조한 청국장은 전통 대두 발효 식품류 중 가장 단기간에 제조 가능하고 영양적, 경제적으로 가장 효과적인 콩의 섭취방법이며 [27], 청국장의 생리활성으로는 혈전 용해능, 면역기능 강화, 항산화 효과, phytoestrogen 효과가 잘 알려져 있고, 최근 정확한 생리활성 지표 물질과 작용 기전은 밝혀지지는 않았으나 청국장의 항당뇨 작용 가능성에 대한 연구 결과가 보고되었으며 [28], 청국장에 상대적으로 높은 함량의 CHP가 함유되어 있음이 보고된 바 있다 [26]. 대두 발효식품인 된장과 청국장의 경우 숙성에 사용되는 균주에 따라 유리 아미노산, 유리당 및 유기산의 차이가 숙성 균주의 종류에 따라 달라지므로 [29-31] CHP의 함량도 청국장 발효에 관여하는 균의 특성에 따라 차이가

나타나고 청국장에 비해 장기간 숙성이 필요한 된장은 숙성 과정 중에 생성되었던 CHP가 분해되어 적은 양을 함유하는 것으로 추정된다. 따라서 청국장에 함유된 균주를 분리하고 분리 균주를 이용한 대두 발효물을 제조하여 CHP 함량의 증진 여부를 확인하였다.

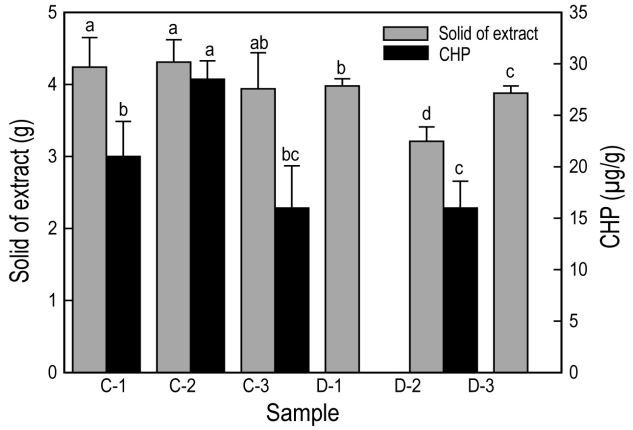

Fig. 1. Solid and Cyclo-His-Pro (CHP) contents of commercial soybean pastes, Chungkookjang (C 1-3) and Daenjang (D 1-3). Values are mean ± SD of triple determinations.

3.2. 청국장으로부터 분리한 미생물 특성

청국장으로부터 분리한 미생물을 배양하여 대두 가수분해 활성을 보일 수 있는 단백질 분해 활성을 측정한 결과, 단백 분해능을 가지는 12개의 균주를 분리하였으며 분리 균주의 유단백 분해능은 Fig. 2와 같다. 12개의 균주 중 10 unit 이상의 활성을 보이는 균주는 strain 1, 4, 5, 12번 균주로 각각 14.3, 10.8, 10.9, 12.4 unit의 활성을 보였다.

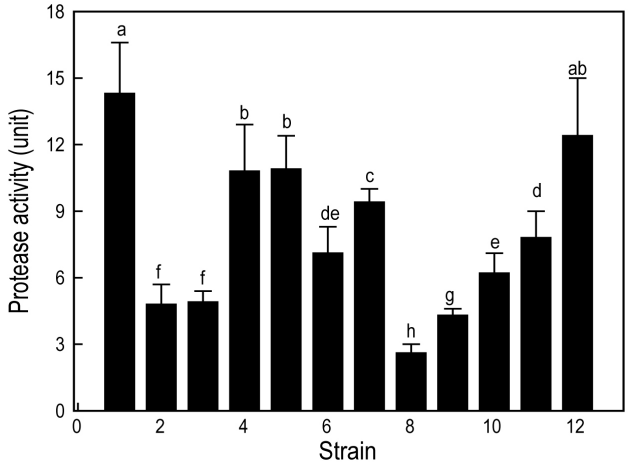

Fig. 2. Caseinolytic activity of isolated strains from Chungkukjang. Values are mean±SD of triple determinations.

비교적 우유단백 분해능이 높았던 분리 균주 strain 1, 4, 5, 12번 균주의 morphology는 Fig. 3과 같았다. 분리 균주의 생화학적 특성을 검토한 결과 (Table 1), 탄수화물의 이용성은 strain 4, 5번 균주 비교 시 xylose, trehalose, maltose, palatinose, salicin의 이용성에 차이를 보였으며 strain 1, 12번 균주도 inositol, arabinose, salicin, sorbitol의 이용성에 차이를 보임에 따라 각각 다른 균주로 추정되었다.

Table 1. Characteristics of carbohydrate utilization for the isolated strains (strain 1, 4, 5 and 12) from Chungkukjang

Carbohydrate	Strain			
	1	4	5	12
Sucrose	+	+	+	+
Tagatose	-	-	-	-
Glucose	+	+	+	+
Inositol	-	-	-	+
Galactose	-	-	-	-
Arabinose	+	-	-	-
Xylose	+	+	-	+
Mannitol	+	+	+	+
Raffinose	-	-	-	-
Salicin	-	+	-	+
Amygdalin	-	-	-	-
Inulin	+	+	-	+
Ribose	-	-	-	-
Maltose	+	+	-	+
Trehalose	+	+	-	+
Palatinose	+	+	-	+
Sorbitol	+	-	+	-
N-Acetyl-D-Glucosamine	+	+	+	+
Amylopectin	-	-	-	-
Arabitol	-	-	-	-

+, - means positive and negative, respectively.

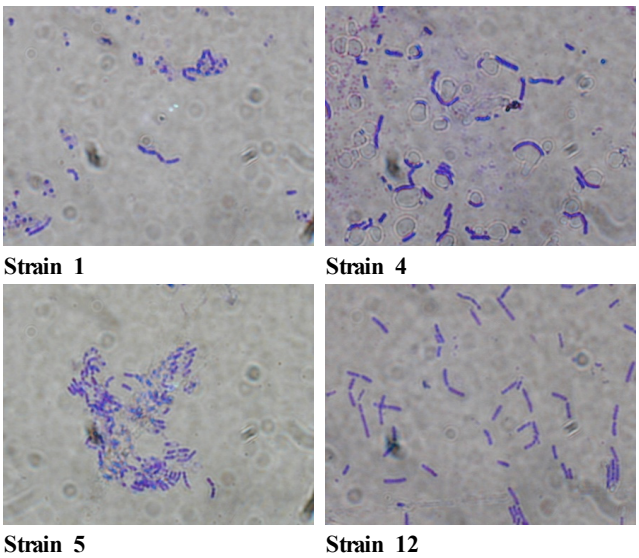

Fig. 3. Morphologies of the isolated strains (strain 1, 4, 5 and 12) from Chungkukjang. Morphologies of strains showed typical loosely aggregated cells and rod-shaped cell.

3.3. 분리 균주에 의한 대두 발효물의 성분 변화

대두 10% 용액에 분리 균주를 preculture하여 각각 2%씩 접종한 후에 30℃에서 6일간 배양하면서 단백질, 아미노태 질소 및 CHP의 성분 변화를 측정하였다. 단백질의 함량 변화는 Fig. 4에서와 같이 발효가 진행될수록 점차 감소하는 경향

을 보였으며 단백질 함량간의 다소 차이는 있었으나 뚜렷한 경향 차이는 없었다. 대두에 함유된 단백질은 발효가 진행될수록 가수분해 되어 free amino acid로 전환되어 아미노태 질소는 배양 시간이 증가할수록 점차 증가하는 경향을 보였다 (Fig. 4). 단백질이나 아미노태 질소의 함량 변화는 배양 3일 후에 점차 변화 폭이 줄어드는 경향으로 보아 청국장에서 분리한 균주는 3-4일 정도 발효가 적당한 것으로 생각된다.

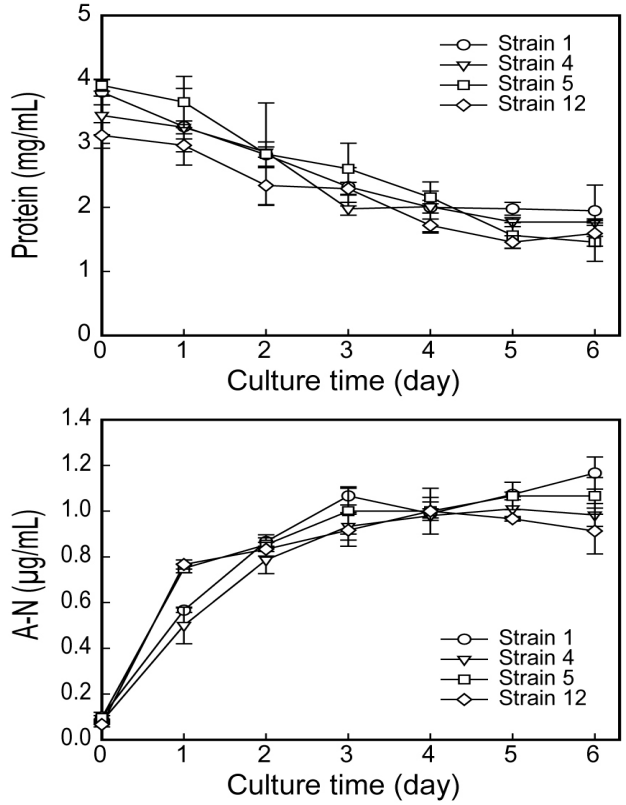

Fig. 4. Changes of protein and amino-nitrogen (A-N) content during fermentation of soybean by isolated strains (strain 1, 4, 5 and 12) from Chungkukjang. Values are mean ± SD of triple determinations.

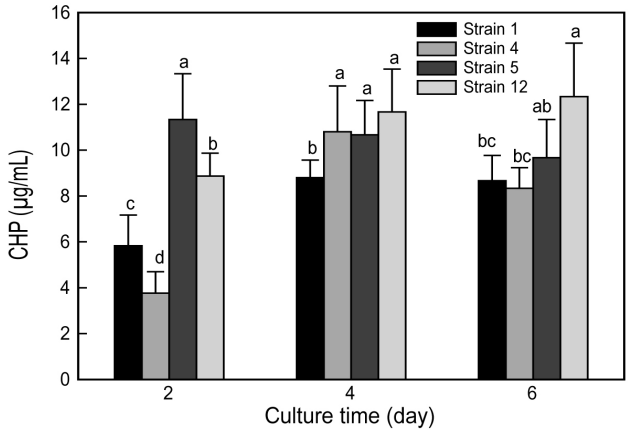

Fig. 5. Changes of Cyclo-His-Pro (CHP) content during fermentation of soybean by isolated strains (strain 1, 4, 5 and 12) from Chungkukjang.

발효 과정 중의 CHP 함량 변화를 측정한 결과 (Fig. 5), 발효 초기에 CHP는 검출되지 않았으나 발효가 진행될수록 함량에 변화를 보였다. Strain 5번 균주의 경우 발효 2일째에 CHP 함량이 가장 높았으며 발효가 진행될수록 약간 감소하는 경향을 보였고 strain 12번 균주는 발효 시간이 경과할수록 증가하는 경향을 보였다. 반면 strain 1, 4번 균주는 발효 시간이 증가할수록 약간 증가하다가 다시 감소하는 경향을 보였다. 따라서 발효 과정 중에 CHP 함량 변화가 나타났지만 분리 균주에 의한 CHP 생산을 확인할 수 있었다. 그러나 발효 과정은 적어도 3-4일 정도 시간이 소요될 뿐만 아니라 효모 가수분해물 [32]에 비해 CHP 함량이 상대적으로 낮은 수준이지만 4개의 균주 중 strain 12번 균주가 가장 높은 CHP 함유한 발효물을 생산하였다. 따라서 대두 발효물 제조에 적합한 균주 strain 12번 분리 균주를 CHP-12로 명명하였다.

분리 균주 strain 12번의 16S rDNA의 염기서열을 분석한 후 기존에 보고된 다른 균과의 상동성을 측정하여 계통수를 그린 결과 (Fig. 6), 분리 균주는 *Bacillus* sp. *Bacillus subtilis, Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus velezensis*와 상동성이 높았으며 상동성이 높은 균주와 일반적으로 알려진 *Bacillus cereus*와 *Bacillus pumilis*와 계통적 특성을 비교한 결과, 상동성이 높은 균주인 *Bacillus amyloliquefaciens*와 유사한 균주 특성을 가지고 있음을 확인하였다. 따라서 분리 균주를 *Bacillus amyloliquefaciens* CHP-12로 명명하였다.

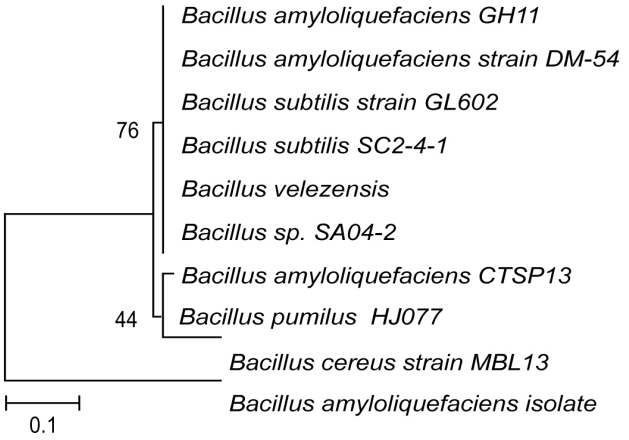

Fig. 6. Phylogenetic tree of *Bacillus amyloliquefaciens* CHP-12. Neighbour-joining tree presents the phylogenetic position of the isolated strain, some *Bacillus* sp. and representatives of some other taxa based on 16S rDNA sequences. Bootstrap values are expressed as percentage per 1,000 replicates.

3.4. *Bacillus amyloliquefaciens* CHP-12에 의한 대두 발효물의 CHP 함량 증진

Bacillus amyloliquefaciens CHP-12에 의한 대두 발효물에 함유된 CHP는 펩타이드로 알콜에 의해 정제가 가능하므로 이를 확인하고자 알콜 분획을 실시한 결과 60-80% 분획에서 32.9 μg/g의 CHP가 함유되어 있었으며 상등액에는 1345.7 μg/g의 함량을 보였다 (데이터 미게재). 알콜 80% 첨가 시까지 침전으로 회수가 되지 않는 것으로 보아 상당히

작은 펩타이드로 구성되어 있는 것을 확인할 수 있었으며 알콜에 의해 분획되지 않는 것으로 확인되었다.

대두 발효물의 CHP 함량 증진을 위해 산 처리에 의한 침전 회수, 활성탄 처리 및 한외여과 처리를 실시하여 얻은 건조물의 CHP 함량을 측정한 결과 (Table 2), 수율은 한외여과 (5 kDa 이하 회수)가 71.3%, 산 처리가 13.5%의 수율을 각각 보였고, CHP 함량은 활성탄 처리 시 1.21 mg/g로 비교적 높았으며 한외여과는 2.15 mg/g로 가장 높은 함량을 보였다. 이상의 결과에 의하면 CHP의 함량과 수율이 가장 높은 한외여과가 가장 바람직한 정제 과정으로 사료되었다.

Table 2. Yield and Cyclo-His-Pro (CHP) content after purification treatment in soybean fermented by *Bacillus amyloliquefaciens* CHP-12

Treatment	Yield (%)	CHP (mg/g)
Non-treatment	100	0.6 ± 0.08
Acid precipitate	13.5	1.61 ± 0.05
Active carbon	4.3	1.21 ± 0.21
Ultrafiltration	71.3	2.15 ± 0.11

Values are mean ± SD of triple determinations.

CHP는 pyroglutamyl peptidase에 의해 시상하부 TRH의 대사산물로서 생성되며 [33] 비효소적으로 pH 6-7, 37℃ 조건에서 dipeptide His-Pro-NH_2의 연속적인 고리화 (cyclization)를 통해 형성된다 [34]. Diketopiperazines는 dipeptide esters나 dipeptides로부터 쉽게 형성되고 dipeptide esters와 amides 또한 화학적 열처리를 통해 diketopiperazine으로 쉽게 고리화된다 [14,35]. 식품 중의 CHP는 대부분 식품 가공 중에 단백질 가수분해의 열처리 과정에서 생성되는 것으로 생각되고 있으며 [13], 실제로 단백질 가수분해물의 제조 공정 동안의 열처리 정도에 따라 CHP 함유량이 달라진다 [14]. 본 연구에서 His-Pro 또는 Pro-His dipeptide를 다량 함유한 대두는 특정 균주에 의한 발효 과정에서 효소적 가수분해와 열처리를 통해 고용량의 CHP를 형성하는 것으로 추정된다.

3.5. *Bacillus amyloliquefaciens* CHP-12에 의한 대두 발효물의 당부하능

Bacillus amyloliquefaciens CHP-12로 제조한 대두 발효물의 CHP 함량 증진을 위해 한외여과 처리한 시료 0.5 g, 1.0 g을 각각 경구투여하여 당부하 검사를 실시하였다 (Fig. 7). 포도당을 투여하고 30분 후에 모든 실험군에서 최고 혈당치를 나타냈으며 투여 전 (0시간)에 비해 30분에서 혈당이 당뇨 대조군인 DM-control군은 247.6 mg/dL, CHP-0.5군은 157.3 mg/dL, CHP-1.0군은 117.7 mg/dL, 정상 혈당군인 control군은 173.3 mg/dL로 상승하였다. 또한 시간이 경과할수록 대두 발효물 경구 투여군인 CHP-0.5군과 CHP-1.0군은 혈당 상승폭이 점차 감소하여 2시간 경과 후 84.3, 85.3 mg/dL로 각각 상승 억제 효과를 보여 당뇨 대조군인 DM-control군에 비해 유의하게 낮은 수준을 나타냈으며 ($p < 0.05$) 3시간 이후에는 통계적으로 정상 혈당 대조군인 control군의 혈당 회복 수준과 같은 수준을 나타내었다. 따라서 한외여과 처리한 대두 발효물은 당부하 검사를 통해 항당뇨 활성을 가지고 있음을 알 수 있었다. Hilton 등 [17]의 연구에 의하면 고용량의 CHP를 섭취할 경우 혈액 내 CHP의 양이 증가된다고 한다. 식이로 섭취한 CHP는 소화관을 통해 흡수되며, 인체는 CHP 섭취 60분 후에 정상 수준에 비해 182%의 높은 혈중 CHP 수준을 나타낸다고 보고된 바 있다 [13]. CHP는 세포 내 아연 유입과 장내 아연 대사를 촉진하는데 [13,15,36] 당뇨 동물 모델에서 아연과 함께 CHP를 투여 할 경우 당뇨 개선 효과를 보인다 [13-16]. CHP의 정확한 항당뇨 기전이 밝혀지진 않았지만 CHP는 아연 대사를 자극하므로서 인슐린과 렙틴 작용의 조절에 관여하는 것으로 생각되고 있다. Wilber 등 [37]은 실제로 *in vitro* 실험 결과 고용량의 CHP는 직접적으로 췌장 세포에서 인슐린 및 글루카곤 분비에 관여함을 관찰하였다. 본 연구에서도 경구 당부하 검사 2시간 경과 후 당뇨 대조군에 비해 고용량의 CHP를 함유한 대두 발효물을 처치한 군은 유의하게 혈당 회복을 나타내어 CHP에 의한 당뇨 개선 효과를 확인할 수 있었다.

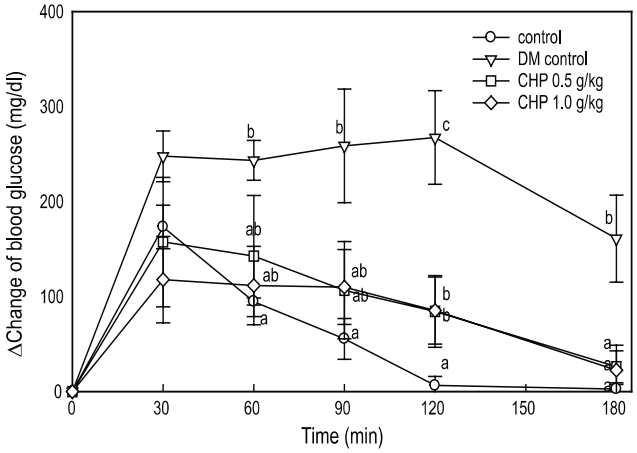

Fig. 7. Oral glucose tolerance test in streptozotocin-diabetic rats fed with soybean ferment containing a high content of Cyclo-His-Pro (CHP). Values are mean ± SD for 8 rats. Means with different superscript letters are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range tests. Control: normal blood glucose rats, DM control: streptozotocin-diabetic rats fed saline, CHP-0.5: streptozotocin-diabetic rats fed soybean ferment 0.5 g/kg BW, CHP-1.0: streptozotocin-diabetic rats fed soybean ferment 1.0 g/kg BW.

4. 결론

본 연구는 대두를 소재로 하여 청국장에서 분리한 다양한 균주를 통해 CHP 함량이 높은 발효물을 생성하고 적합한 정제 과정을 적용하여 CHP 함량을 높인 최종 대두 발효물을 제조하였으며 이에 대한 생체 내에서의 당뇨 개선 효과의 검증하고자 하였다. 그 결과 청국장으로부터 단백 분해능을 가지는 12개의 균주 중 strain 12번 균주에 의한 발효물이 가장 높은 CHP 함량을 보였으며 strain 12번 균주의 16S rDNA의 염기서열의 상동성 측정 결과 *Bacillus amyloliquefaciens*와 유사한 균주 특성을 가지는 것으로 나타나 이를 *Bacillus*

amyloliquefaciens CHP-12로 명명하였다. 다양한 정제 과정을 적용한 결과에서는 CHP의 함량과 수율이 가장 높은 한외여과가 가장 바람직한 정제 과정으로 판단되었다. 최종 대두 발효물에 대해 당뇨 유발 동물 모델을 대상으로 경구 당부하 검사를 실시한 결과, 대두 발효물은 당뇨 대조군에 비해 혈당 회복에 유의적인 영향을 미치는 것으로 나타나 항당뇨 효과가 있음을 알 수 있었다.

감사

본 연구는 농림수산식품부 식품기술개발사업의 지원에 의해 이루어진 것임 (Project No. 109144-03-2).

References

1. Wang, Y. and M. A. Beydoun (Youfa Wang and May A. Beydoun (2007) The obesity epidemic in the United States-gender, age, socioeconomic, racial/ethnic, and geographic characteristics: a systematic review and meta-regression analysis. *Epidemiol Rev.* 29: 6-28.
2. Porrini, E., P. Delgado, and A. Torres (2010) Metabolic syndrome, insulin resistance, and chronic allograft dysfunction. *Kidney Int.* 78: S42-S46.
3. Bacha, F., S. Lee, N. Gungor, and S. A. Arslanian (2010) From pre-diabetes to type 2 diabetes in obese youth: pathophysiological characteristics along the spectrum of glucose dysregulation. *Diabetes Care* 33: 2225-2231.
4. Nanda, N., S. K. Sen, M. C. Arokiaraj, R. Sripradha, R. Roma, and K. Pattegar (2009) Myocardial infarction in nondiabetic and prediabetic population: a retrospective analysis. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 53: 334-340.
5. Risérus, U. (2010) Right diet can prevent cardiometabolic diseases. *Lakartidningen* 107: 2077-2082.
6. Becker, W., A. Bruce, I. Mattisson, and A. Sohlström (2007) Dietary guidelines are the same in spite of different basis. *Lakartidningen* 104: 3786-3787.
7. Humphreys, M. M. (1997) Are the nutritional guidelines for diabetics achievable? *Proc. Nutr. Soc.* 56: 899-902.
8. Parker, Jr C. R., M. Mori, J. Pegues, C. Prasad, and J. F. Wilber (1983) Evidence for the presence of immunoreactive cyclo (His-Pro) in the adult human brain. *Peptides* 4: 879-881.
9. Kandarakis, F., T. Iriuchijima, C, Prasad, and J. F. Wilber (1985) Distribution and characterization of cyclo (His-Pro)-like immunoreactivity in the human gastrointestinal tract. *Neuropeptides* 6: 21-25.
10. Koch, Y., F. Battaini, and A. Peterkofsky (1982) [^{3}H]-Cyclo (His-Pro) in rat tissues: distributio, clearance and binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 104: 823-829.
11. Wilber, J., C. Prasad, and V. Richards (1980) Cyclo (His-Pro): a potent prolactin inhibiting metabolite of thyrotropin releasing hormone. *Abstracts Int. Congr. Endocrinology*. 6: 294-299.
12. Prasad, C., S. Kumar, W. Adkinson, and J. U. McGregor (1995) Hormones in foods: abundance of authentic cyclo(His-Pro)-like immunoreactivity in milk and yogurt. *Nutr. Res.* 15: 1623-1635.
13. Song, M. K., M. J. Rosenthal, S. Hong, D. M. Harris, I. Hwang, I. Yip, M. S. Golub, M. E. Ament, and V. L. Go (2001) Synergistic antidiabetic activities of zinc, cyclo (his-pro), and arachidonic acid. *Metabolism* 50: 53-59.
14. Prasad, C. (1995) Bioactive cyclic dipeptides. *Peptides* 16: 151-164.
15. Song, M. K., I. K. Hwang, M. J. Rosenthal, D. M. Harris, D. T. Yamaguchi, I. Yip, and V. L. Go (2003) Anti-hyperglycemic activity of zinc plus cyclo (his-pro) in genetically diabetic Goto-Kakizaki and aged rats. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 228: 1338-1345.
16. Hwang, I. K., V. L. Go, D. M. Harris, I. Yi, K. W. Kang, and M. K. Song (2003) Effects of cyclo (his-pro) plus zinc on glucose metabolism in genetically diabetic obese mice. *Diabetes Obes. Metab.* 5: 317-324.
17. Hilton, C. W., C. Prasad, P. Vo, and C. Mouton (1992) Food contains the bioactive peptide, cyclo (His-Pro). *J. Clin. Endocr. Metab.* 75: 375-378.
18. Prasad, C., C. W. Hilton, F. Svec, E. S. Onaivi, and P. Vo (1991) Could dietary proteins serve as cyclo (His-Pro) precursors? *Neuropeptides* 19: 17-21.
19. Claus, D. and R. C. W. Berkeley (1986) Genus Bacillus cohn. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Williams & Wilkins, Baltimore. p 1105-1139.
20. Yoon, J. H., S. T. Lee, and Y. H. Park (1996) Inter- and intraspecific phylogenetic analysis of genus nocardioides and related taxa based on 16S rDNA sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 187-194.
21. Thompson, J. D., D. G. Higgins, T. H. Gibson, and W. Clusta (1994) Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment though sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Res.* 22: 4673-4680.
22. Adler-Nissen, J. (1979) Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *J. Agric. Food. Chem.* 27: 1256-1262.
23. Lee, K. A. (2006) Quality characteristics of castella with chungkukjang. *Kor. J. Food Cookery Sci.* 22: 244-249.
24. Lafont, J., J. M. Rouanet, J. Gabrion, J. L. Assouad, J. L. Zambonino Infante, and P. Besançon (1988) Duodenal toxicity of dietary *Phaseolus vulgaris* lectins in the rat: an integrative assay. *Digestion* 41: 83-93.
25. Lyu, S. Y., J. Y. Rhim, Y. H. Park, K. B. Suh, and W. B. Park (2002) Changes of lectin activity of kidney beans by heating and fermentation. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 31: 1-6.
26. Choi, Y. M., D. O. Noh, K. W. Yu, J. H. Koh, and H. J. Suh (2007) Physiological activities of chungkookjang (Korean traditional soybean paste) pill as a functional food. *J. Food Biochem.* 31: 108-120.
27. Yoo, S. M. and C. M. Chang (1999) Study on the processing adaptability of soybean cultivars for Korean traditional chungkukjang preparation. *J. Kor. Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* 42: 91-98.
28. Kim, D. J., Y. J. Jeong, J. H. Kwon, K. D. Moon, H. J. Kim, S. M. Jeon, M. K. Lee, Y. B. Park, and M. S. Choi (2008) Beneficial effect of chungkukjang on regulating blood glucose and pancreatic beta-cell functions in C75BL/KsJ-db/db mice. *J. Med. Food* 11: 215-223.
29. Park, J. S. (1992) Histological changes of Doenjang during the fermentation with different strains. *Korean J. Food Sci. Technol.* 24: 477-481.
30. Yoo, S. K., S. M. Kang, and Y. S. Noh (2000) Quality properties on soybean pastes made with microorganism isolated from

traditional soybean pastes. *Korean J. Food Sci. Technol.* 32: 1266-1270.
31. Ahn, H. S., J. S. Bae, and T. S. Lee (1997) Comparison of free amino acids, sugars, and organic acids in soybean paste prepared with various organisms. *J. Korean Agric. Chem. Soc.* 30: 4-12.
32. Jung, E. Y., H. S. Lee, K. S. Ra, M. R. Kim, and H. J. Suh (2010) Glucose tolerance and anti-oxidant activity of spent brewer's yeast hydrolysate with a high content of Cyclo-His-Pro (CHP). *J. Food. Sci.* in press.
33. Prasad, C. and A. Peterkofsky (1976) Demonstration of pyroglutamylpeptidase and amidase activities toward thyrotropin-releasing hormone in hamster hypothalamus extracts. *J. Biol. Chem.* 251: 3229-3234.
34. Perry, T. L., K. S. Richardson, S. Hansen, and A. J. Friesen (1965) Identification of the diketopiperazine of histidylproline in human urine. *J. Biol. Chem.* 240: 4540-4542.
35. Goolcharran, C. and R. T. Borchardt (1998) Kinetics of diketopiperazine formation using model peptides. *J. Pharm. Sci.* 87: 283-288.
36. Rosenthal, M. J., I. K. Hwang, and M. K. Song (2001) Effects of arachidonic acid and cyclo (his-pro) on zinc transport across small intestine and muscle tissues. *Life Sci.* 70: 337-348.
37. Wilber, J. F., M. Mori, E. D. Kandarakis, T. Iriuchijima, H. Sacks, and A. E. Kitabchi (1984) Histidyl-proline diketopiperazine [cyclo(His-Pro)]: a new neuropeptide modulator of insulin and glucagon secretion. *Trans. Assoc. Am. Physicians* 97: 88-94.