

고함량 폴리감마글루탐산(PGA) 청국장에 대한 칼슘 생체이용률 및 골다공증에 미치는 영향

이무진^{1,2} · 정호경^{1,2} · 심미옥¹ · 장지훈¹ · 김태묵¹ · 이현주¹ · 이기호¹
안병관¹ · 조정희¹ · 장민철³ · 용주현³ · 김종춘² · 조현우¹

¹한약진흥재단 한약자원본부
²전남대학교 수의과대학 BK21
³해남자연농업영농조합법인

Calcium Bioavailability and Antiosteoporotic Effects of *Cheonggukjang* Containing High Poly- γ Glutamate Contents

Mu-Jin Lee^{1,2}, Ho-Kyung Jung^{1,2}, Mi-Ok Sim¹, Ji-Hun Jang¹, Tae-Mook Kim¹, Hyun-Joo Lee¹,
Ki-Ho Lee¹, Byeong-Kwan An¹, Jung-Hee Cho¹, Min-Cheol Jang³,
Ju-Hyun Yong³, Jong-Choon Kim², and Hyun-Woo Cho¹

¹Division of Tradition Korean Medicine Research, National Development Institute of Korean Medicine

²College of Veterinary Medicine BK21 Plus Project Team, Chonnam National University

³Heanam Natural Farming Association Corporation

ABSTRACT Various types of fermented soybean foods are consumed in various Asian countries, including China, Indonesia, Japan, Korea, and Vietnam. *Cheonggukjang* is a Korean whole soybean paste fermented by *Bacillus subtilis* and regarded as a healthy food. The objective of this study was to investigate the Ca-bioavailability and anti-osteoporotic effects of *cheonggukjang* (CGJ) containing high poly- γ glutamate (PGA) contents in an animal model. Blood samples were collected from the jugular vein at 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, and 5 h after a single oral dose in male rats. Ca-bioavailability in CGJ containing high PGA contents was approximately 3~5 times higher than that of natural CGJ. Female rats were either sham-operated (sham; n=5) or surgically ovariectomized (OVX; five animals per group) and then administered to OVX control, raloxifene hydrochloride (RLX) 1 mg/kg/d, or CGJ containing high contents of PGA (20 and 200 mg/kg/d) for 12 weeks. Serum osteocalcin concentration was significantly lower in the CGJ 200 mg/kg/d group compared with the OVX control group. Serum progesterone concentration was significantly higher in the CGJ 200 mg/kg/d group compared with the OVX control group. Reduction grade of the trabecular bone decreased in the RLX 1 and CGJ 200 mg/kg/d group compared with that of the OVX control group. In conclusion, CGJ 200 mg/kg/d may have inhibitory effects on osteoporosis in OVX rats, and Ca-bioavailability was improved in CGJ containing high PGA contents.

Key words: *cheonggukjang*, calcium bioavailability, ovariectomized, osteocalcin, progesterone

서론

골다공증(osteoporosis)은 유전적 또는 후천적 요인인 폐경, 노화, 영양 불균형, 골다공증을 유발하는 질환과 약물 등 여러 원인에 의해서 뼈를 구성하는 무기질(특히 칼슘)과 기질이 감소하여 뼈가 약해져서 부러지기 쉬운 전신적인 골격계 질환이다(1-3). 최근 국민건강영양조사의 50대 이상 남성과 여성의 골다공증 유병률이 남성은 7%에 비해 여성

은 40%로 여성이 약 6배 높게 나타났다(4). 이처럼 남성보다 여성에서 발병률이 높는데 이는 여성이 남성보다 최대 골 질량이 낮고, 골 손실이 빨리 시작되기 때문이다(5). 특히 폐경기 후 에스트로겐(estrogen) 생성 감소는 조골세포(osteoblast) 및 파골세포(osteoclast)에 영향을 미쳐 골 교체율이 빨라지고 골 흡수가 골 형성보다 높아 골 손실률이 가속화된다(3,6). 폐경기 여성은 호르몬 불균형과 칼슘 결핍 및 체내 산화적 스트레스 증가로 여러 질병의 위험에 처해 있으며, 에스트로겐 및 비스포스포네이트(bisphosphonate) 등의 투여는 골다공증을 감소시키는 것으로 알려져 있으나 치료요법에 따른 유방암, 자궁암 및 위장관 장애 등 부작용의 발생위험도는 높아지는 것으로 보고되고 있다(7,8). 현재 임상에서 사용하고 있는 골다공증 치료제의 한계점이 드러

Received 6 July 2016; Accepted 11 August 2016

Corresponding author: Hyun-Woo Cho, Division of Tradition Korean Medicine Research, National Development Institute of Korean Medicine, Jeonnam 59338, Korea

E-mail: johw7@nikom.or.kr, Phone: +82-61-860-2801

나기 시작하면서 새로운 치료제를 개발하기 위한 필요성이 제기되었고, 특히 생체이용률이 높고 부작용이 적은 천연물을 이용하여 치료제를 개발하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다(9).

콩을 이용하여 만든 한국의 전통 발효식품인 청국장은 발효과정 중에 건조한 벧짚이나 콩의 종피에 많이 서식하고 있는 *Bacillus subtilis*나 *Bacillus natto* 등이 만드는 효소에 의해 원료 단백질과 당질이 발효되면서 점질물인 poly-gamma-glutamic acid(γ -PGA)를 형성하는 과정에서 비배당체(glycosides)가 배당체(aglycone) 형태로 바뀌어 콩 자체보다 높은 생리활성을 나타내고(10,11), γ -PGA는 장내에서 칼슘 흡수를 촉진하는 기능이 있음이 연구되어 신기능성 소재로 주목받고 있다(12,13). 골다공증을 예방하기 위해서는 충분한 양의 칼슘 섭취가 중요하지만, 성인의 칼슘 흡수율은 30% 이하로 낮은 흡수를 보인다(14). 따라서 칼슘 흡수율을 높이는 물질에 대한 구체적인 추가연구가 필요하다고 판단되어 칼슘 생체이용률 시험에 수컷 Sprague-Dawley 랫드를 이용하여 고함량 폴리감마글루탐산 청국장이 기존 청국장보다 칼슘의 생체이용률을 증가시키는지 알아보고자 실시하였다.

또한, 콩이 청국장균에 의해 발효되면서 비타민 B₂가 대두보다 약 10배 증가하고, 뼈의 형성에 관여하는 비타민 K₂ (menaquinone 2)도 다른 채소류보다 약 10배 증가하는 것으로 나타났다(15,16). 청국장은 발효식품 중 이소플라본(isoflavone) 함량이 가장 높은 것으로 보고된 바 있으며(17), 이 중 많은 양의 이소플라본이 아글리콘(aglycone) 형태로 존재한다고 하였다(18). 이 아글리콘으로 인하여 청국장이 콩 자체보다 높은 생리활성을 갖는 것으로 밝혀진 바 있다(19). 이소플라본은 여성 호르몬인 에스트로겐과 유사한 기능을 하는 식물성 에스트로겐으로 폐경기에 유발되는 골다공증 예방 효과(20,21)와 심혈관계 질환(22) 등과 같은 질환의 예방에 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 그래서 골다공증 시험에서는 여성의 폐경 후 에스트로겐 분비 감소로 인한 제1형 골다공증(23) 모델을 위하여 랫드의 난소를 적출하여 폐경을 유도하고 성호르몬 결핍 상태인 랫드에 골 대사 약화 상태를 확인한 후 고함량 폴리감마글루탐산 청국장을 투여하여 골다공증에 미치는 효과를 연구하고자 하였다.

재료 및 방법

시험물질 조제

청국장 발효에 사용된 대두는 전남 해남군 재배농가에서 직접 구입한 백태(*Glycine max* L. Merr)를 사용하였다. 선별된 백태 1 kg을 수세하고, 상온의 물에 7~8시간 동안 침지시켜 불린 후 고압멸균기에 넣어 121°C의 온도로 30분 동안 삶아서 증숙시켰다. 증숙된 백태를 60~70°C까지 식힌 후 청국장 PGA 수율이 우수한 균주인 *Bacillus subtilis* MJ

를 동정하고 분리한 바실러스균을 1%(v/w) 접종하여 온도 37°C, 습도 95% 조건으로 24시간 동안 발효시켰다. γ -PGA의 함유량이 증대되도록 시료를 준비하기 위하여 청국장 발효에 사용된 동일균주를 사용하여 Bang 등(24)의 방법을 변형하여 액체 배양물 3 L를 준비하였다. 그중 일부를 사용하고 나머지는 냉동 보관하였다. 액체 배양물 제조의 영양원으로 soybean 1%, glutamic acid 1%, sucrose 1%, NH₄Cl 0.2%, KH₂PO₄ 0.1%, MgSO₄·7H₂O 0.01%의 조성이 되도록 준비하여 사용하였으며, Jar Fermentor(LiFlus GX, Hanil Science Industrial, Incheon, Korea)에 37°C, 150 rpm, 1.0 L/air min 조건으로 36시간 동안 배양하였다. *Bacillus subtilis* MJ 균주로 발효한 청국장을 55°C에서 48시간 건조해 분쇄한 가루 100 g과 동일균주를 사용하여 배양한 액체배양물 100 mL를 1:1(v:v)의 비율로 균일하게 혼합한 다음 50°C에서 48시간 건조한 후 사용하였다.

폴리감마글루탐산의 HPLC 분석

PGA의 함량 분석에 사용한 고성능 액체크로마토그래피(HPLC)는 Agilent 1200 series(Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA)를 사용하였으며, 검출기는 FLD(fluorescence detector)와 DAD(diode array detector)를 사용하였다. 샘플의 주입은 Agilent auto-sampler(Agilent Technologies Inc.)의 injection program을 사용해 주입하였다. Column은 Agilent ZORBAX Eclipse AAA(4.6×150 mm, 5 μ m, Agilent Technologies Inc.)를 사용하였으며, 이동상(mobile phase)으로는 solvent A[40 mM sodium phosphate(dibasic), 0.1% phosphoric acid in water], solvent B(acetonitrile : methanol : DW=45:45 :10)를 사용하여 gradient 조건에서 1.5 mL/min의 유속으로 분석하였다. 분석시약으로는 유도체화 시약인 OPA와 Borate buffer를 사용하였으며, Agilent auto-sampler의 injection program을 통해 기기 내에서의 시약 반응을 통한 주입을 진행하였다. 주입한 표준 및 시험용액은 이용해 DAD(254, 338 nm)와 FLD(Ex 230 nm, Em 450 nm)를 통해 chromatogram으로 기록되었으며, peak의 적분 값을 이용해 총글루탐산 함량(%) 및 유리 글루탐산 함량(%)을 계산하였다.

실험동물 및 사육환경

본 시험에서는 (주)샘타코바이오코리아(Osan, Korea)로부터 입수한 7주령 수컷(칼슘 생체이용률 시험용) 및 6주령 암컷(골다공증 시험용) 특정병원체 부재(specific-pathogen free) Sprague-Dawley 랫드를 사용하였다. 1주일간의 검역 및 순화를 거친 후 건강하다고 판정된 것을 선발하여 시험에 제공하였다. 동물실의 사육환경은 온도 22±3°C, 상대습도 50±15%, 환기횟수 10~15회/시간, 조명시간 12시간(07:00 점등~19:00 소등) 및 조도 150~300 Lux로 설정된 사육환경에서 폴리카보네이트 사육상자(260W×420L

×180H mm)에 수용하였으며, 실험동물용 고품사료(Altromin 1314 feed, Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Germany)와 상수도수를 자유 급식시켰다. 본 실험에 사용된 모든 동물은 미국 National Research Council(1996)의 “실험동물의 관리와 사용에 관한 지침”에 따라 유지하였으며, 동물실험은 한약진흥재단 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee)의 승인(골다공증 시험 승인번호: 2015-1-01, 칼슘 생체이용률 시험 승인번호: 2015-1-02)하에 수행되었다. 골다공증 시험에 암컷을 사용하였으나 칼슘 생체이용률 시험에 수컷을 사용한 이유는 암컷의 성주기 등 호르몬 변화에 의하여 칼슘 흡수율에 대한 오차범위가 크다고 생각되어서 수컷동물을 이용하여 수행하였다.

칼슘 생체이용률

8주령 수컷 랫드에 대하여 투여 전(0시간) 측정된 칼슘 측정치 및 평균체중에 가까운 수컷 35마리를 선발하였다. 선발한 동물을 각 군에 칼슘 함량 및 평균체중이 균등하도록 무작위로 각 군당 7마리씩 군 분리하였다. 칼슘 생체이용률 예비시험 결과 청국장 250 mg/kg에서 뚜렷한 변화가 관찰되지 않아서 공비 2를 적용하여 500 mg/kg을 투여용량으로 설정하였다. 군 구성은 정상군(증류수), 대조군 칼슘단독 [calcium lactate(CaLa); Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA] 50 mg/kg, 칼슘+ raloxifene hydrochloride (RLX; Tokyo Chemical Industry, Tokyo, Japan) 2 mg/kg 투여군, 칼슘+ 기존 청국장 500 mg/kg 투여군 및 칼슘+ 고품량 PGA 청국장 500 mg/kg 투여군으로 하였다. 투여액은 10 mL/kg으로 하였고, 경구투여용 존데를 부착한 주사기(5 mL)를 이용하여 위 내에 단회 강제 투여하였다. 채혈은 투여개시일에 투여 전(0, blank), 투여 후 0.5, 1, 2, 3, 4, 5시간에 경정맥으로부터 1 mL 주사기로 약 0.5 mL의 혈액을 채취하여 3,000 rpm으로 10분간 원심분리 후 혈청을 취하여 이용하였다. 분석은 혈액생화학 분석기 FUJI DRI-CHEM 4000i(Fujifilm, Tokyo, Japan)로 Ca 항목을 mg/dL 단위로 측정하였다.

난소적출 및 투여

7주령 암컷 랫드를 2,2,2-tribromoethanol(Sigma-Aldrich Co.)과 2-methyl-2-butanol(Sigma-Aldrich Co.)을 혼합한 avertin stock solution을 PBS로 125 mg/kg이 되게 희석한 주사액을 복강 주사하여 전신마취 후 등 부위의 털을 제거하고 좌우 난소 위치의 피부, 근육, 복막을 절개한 다음 5호 실크 봉합사로 난소를 절찰한 후 난소를 적출(ovariectomized; OVX)하고 복막과 근육, 피부를 각각 5호 실크 봉합사로 봉합한 다음 5주간 골다공증을 유발시켰다. 수술 후 1주간 매일 diclofenac sodium(Sigma-Aldrich Co.) 5 mg/kg/d를 경구투여 하고 포비돈을 이용하여 수술 부위를 소독하였다. 군 분리는 일반증상 및 체중증가에 이상이 없는 동

물 중에서 난소적출 후 5주간의 회복기간 종료일에 실시하였다. 5주째 1주간의 성주기검사 결과 Sham(복막만 절개)군은 정상적인 발정주기(estrous cyclicity)를 보이는 동물을 선발하였으며, OVX군은 정상적인 발정주기를 보이지 않는 동물을 선발하였다. 또한, 군 분리 전에 측정된 오스테오칼신(osteocalcin), 에스라디올(estradiol), 알칼라인 포스파타제(alkaline phosphatase), 칼슘 측정치 및 군분리일의 평균체중에 가까운 암컷 각 25마리를 선발하였다(data not shown). 선발한 동물을 각 군에 효소면역 측정, 혈액생화학 측정치 및 평균체중이 균등하도록 무작위로 군 분리하였다. RLX 투여용량은 Black 등(25)의 결과에 근거하여 1 mg/kg/d로 설정하였으며, 청국장은 칼슘 생체이용률 시험, 12주 반복투여 및 임상 사용량을 고려하여 200 mg/kg/d 상용량으로 설정하고 최저 효과를 확인하기 위하여 공비 10을 적용하여 20 mg/kg/d를 저용량으로 설정하였다. 군 구성은 Sham+ 칼슘(20 mg/kg/d), OVX+ 칼슘, OVX+ 칼슘+RLX 1 mg/kg/d, OVX+ 칼슘+ 고품량 PGA 청국장 20 및 200 mg/kg/d 투여군으로 하였다. 투여액은 5 mL/kg으로 하고, 개체별 투여액은 최근의 측정체중을 기준으로 산출하였다. 매일 오전에 경구투여용 존데를 부착한 일회용 주사기를 이용하여 12주간 1일 1회 위 내에 강제 투여하였다.

체중 및 사료섭취량 측정

모든 동물에 대하여 난소적출 후 5주째에 투여 전, 투여 후 주 1회 체중을 12주간 측정하였다. 단 부검일의 체중은 절식을 시행하였으므로 체중평가에서 제외하였다. 또한, 사료섭취량은 1주일간의 섭취량을 측정하여 1일의 평균섭취량을 산출하였으며, 주 1회 12주간 측정하였다.

효소면역 측정

모든 동물에 대하여 약 18시간 이상 절식시킨 후 마취하여 복대정맥으로부터 채취한 혈액을 혈청분리 튜브(BD, Franklin Lakes, NJ, USA)에 넣고 3,000 rpm으로 10분간 원심분리 후 혈청을 취하여 이용하였다. 혈청에 대한 효소면역 측정은 오스테오칼신(Shanghai Yehua Biological Technology, Shanghai, China) 및 progesterone(Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA)에 대하여 각 회사에서 제공한 측정방법에 따라서 ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay) kit을 이용하여 측정하였다. 또한, 간 조직을 취하여 각 조직 100 mg당 1 mL의 PBS buffer를 가하여 4°C 온도 이하에서 homogenizer로 분쇄하고, 이때 얻은 균질액을 600×g에서 10분간 원심분리 한 후 상층액을 취하여 이용하였다. 조직액에 대한 효소면역 측정은 malondialdehyde(Shanghai Yehua Biological Technology) 및 superoxide dismutase(Cusabio Life Sciences, Hubei, China)에 대하여 각 회사에서 제공한 측정방법에 따라서 ELISA kit을 이용하여 측정하였다. 측정기기는 ELISA microplate reader(Infinite 200 pro, TECAN, Grödig, Aus-

tria)를 이용하여 각 회사에서 제공한 조건의 파장에서 측정하였다.

장기중량 측정

모든 동물에 대하여 자궁(uterus) 및 대퇴골(femur, Lt)에 대한 습증량을 측정하고, 절식체중에 대한 상대장기중량비를 산출하였다.

조직병리학적 검사

부검을 실시한 모든 동물에 대하여 대퇴골을 적출하여 10% 중성완충 포르말린용액(Sigma-Aldrich Co.)에 2주간 고정하고, 골조직을 calci-clear-rapidTM액(National Diagnostics, Hackensack, NJ, USA)을 사용하여 탈회하였다. 탈회한 골조직은 삭정, 탈수 및 파라핀 포매 등의 일반적인 조직처리과정을 거쳐 조직절편을 제작하여 박절한 후, hematoxylin-eosin(Sigma-Aldrich Co.) 염색을 실시하였다. 잔여 골조직은 10% 중성완충포르말린용액에 보존하였다. 조직병리학적 검사는 검체 제작된 모든 동물의 대퇴골조직에 대하여 검정하였다.

통계분석

실험의 정량적인 결과는 평균값과 표준편차로 표시하였다. 통계분석은 PASW Statistics 18(IBM Co., Armonk, NY, USA)을 이용하였다. 통계적 유의성은 분산분석(ANOVA)을 행한 후 $P < 0.05$ 수준에서 Scheffe's test를 이용하여 검정하였다.

결 과

청국장 시료의 PGA 함량 분석

HPLC-FLD를 이용해 균주별 청국장 함유량을 확인하기 위해 기존의 일반적인 방법으로 발효시킨 청국장과 PGA의 증대를 위한 공정기술개발로 발효시킨 청국장의 시료를 같은 실험방법을 이용해 분석을 진행하였으며, 그 결과 시료 각각 $3.060 \pm 0.086\%$, $5.231 \pm 0.193\%$ 의 함량이 측정되었으며, 고함량 PGA 청국장이 기존 청국장보다 약 1.7배의 PGA 함량 증가를 확인하였다(26).

칼슘 생체이용률

칼슘의 혈청 중 함량은 증류수 투여군보다 칼슘 50 mg/kg 투여군에서 칼슘 흡수율 증가가 관찰되었다. 골다공증 치료제인 RLX 투여군은 0.5시간에 높은 칼슘 흡수율이 관찰되었으며 칼슘 단독 투여군보다 칼슘 흡수율 증가가 인정되었다. 칼슘 단독 투여군보다 칼슘+청국장 500 mg/kg 투여군에서 칼슘 흡수율 증가가 관찰되었으며, 칼슘+기존 청국장 500 mg/kg 투여군보다 칼슘+고함량 PGA 청국장 500 mg/kg 투여군에서 3~5시간에 칼슘 흡수율의 증가가 관찰되었다(Fig. 1).

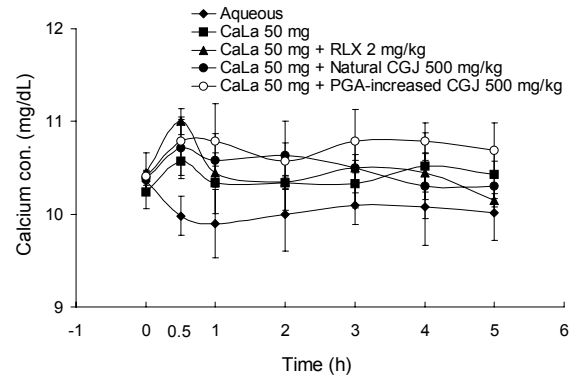


Fig. 1. Serum calcium concentration-time profiles following oral administration of CGJ in male rats. Values are expressed as mean±SD of seven rats. CaLa: calcium lactate, RLX: raloxifene, CGJ: *cheonggukjang*, PGA: poly-glutamic acid, test material.

체중 및 사료섭취량 측정

랫드 암컷의 난소를 적출한(OVX)군에서 투여 0주부터 12주까지 Sham군보다 유의성($P < 0.05$) 있는 체중 증가가 관찰되었으나, 대조약(RLX) 1 mg/kg 투여군에서는 투여 3주부터 12주까지 유의성이 있는 차이가 관찰되지 않았다. 이러한 체중 변화는 여성 호르몬 대체제인 RLX 투여를 통해 체중 증가가 억제되었으나 청국장 투여군에서 OVX 대조군보다 체중 증가 억제가 관찰되지 않았다(Fig. 2). 사료섭취량에서 난소를 적출한 군에서 투여 0주부터 12주까지 Sham군보다 섭취량 증가가 관찰되었으나 OVX 대조군보다 대조약 및 청국장 투여군에서는 차이가 관찰되지 않았다.

효소면역 측정

혈청 중 효소면역 측정에서 오스테오칼신은 Sham군보다 OVX 대조군에서 유의성($P < 0.05$) 있는 증가가 관찰되었으나, 청국장 200 mg/kg 투여군에서는 OVX 대조군보다 유의성($P < 0.05$) 있는 감소가 관찰되었다. 프로게스테론은 Sham군보다 OVX 대조군 및 RLX 1 mg/kg 투여군에서 유의성($P < 0.05$) 있는 감소가 관찰되었으나, 청국장 200 mg/kg

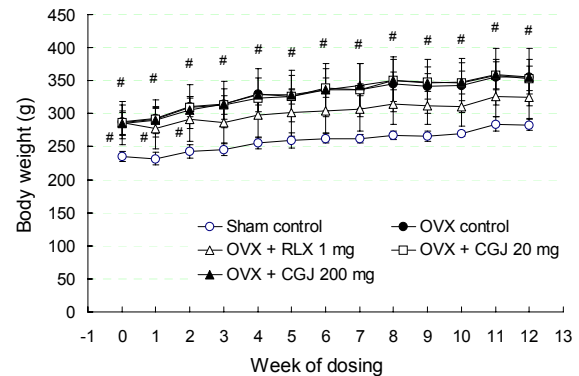


Fig. 2. Body weights in ovariectomized rats. Values are expressed as mean±SD of five ovariectomized (OVX) rats. RLX: raloxifene, CGJ: *cheonggukjang*, test material (mg/kg/d). Significantly different from sham control at # $P < 0.05$.

투여군에서는 OVX 대조군보다 유의성($P<0.05$) 있는 증가가 관찰되었다.

조직액 중 효소면역 측정 검사에서 간장 조직의 지질과산화물(malondialdehyde)은 Sham군보다 OVX 대조군에서 증가가 관찰되었으나, OVX 대조군보다 RLX 1 mg/kg, 청국장 20 및 200 mg/kg 투여군에서 모두 감소 경향이 관찰되었다. 간장 조직의 과산화물제거효소(superoxide dismutase)는 Sham군보다 OVX 대조군에서 유의성($P<0.05$) 있는 감소가 관찰되었으나, OVX 대조군보다 대조약 및 청국장 투여군에서 유의성이 있는 차이가 관찰되지 않았다(Fig. 3).

장기중량 측정

절대 장기중량에서 대퇴골 중량은 Sham군보다 OVX 대

조군에서 유의성이 있는 차이가 관찰되지 않았다. 자궁 중량은 Sham군보다 OVX 대조군에서 유의성($P<0.05$) 있는 감소가 관찰되었으나, OVX 대조군보다 대조약 및 청국장 투여군에서 유의성이 있는 차이가 관찰되지 않았다.

상대 장기중량에서 대퇴골 중량은 Sham군보다 OVX 대조군에서 유의성이 있는 차이가 관찰되지 않았다. 자궁 중량은 Sham군보다 OVX 대조군에서 유의성($P<0.05$) 있는 감소가 관찰되었으나, OVX 대조군보다 RLX 1 mg/kg 투여군에서 증가가 관찰되었다(Table 1).

조직병리학적 검사

대퇴골에 대한 조직병리학적 검사에서 대퇴골 원위부 골간단의 관찰된 해면골 감소(reduction of trabecular bone)

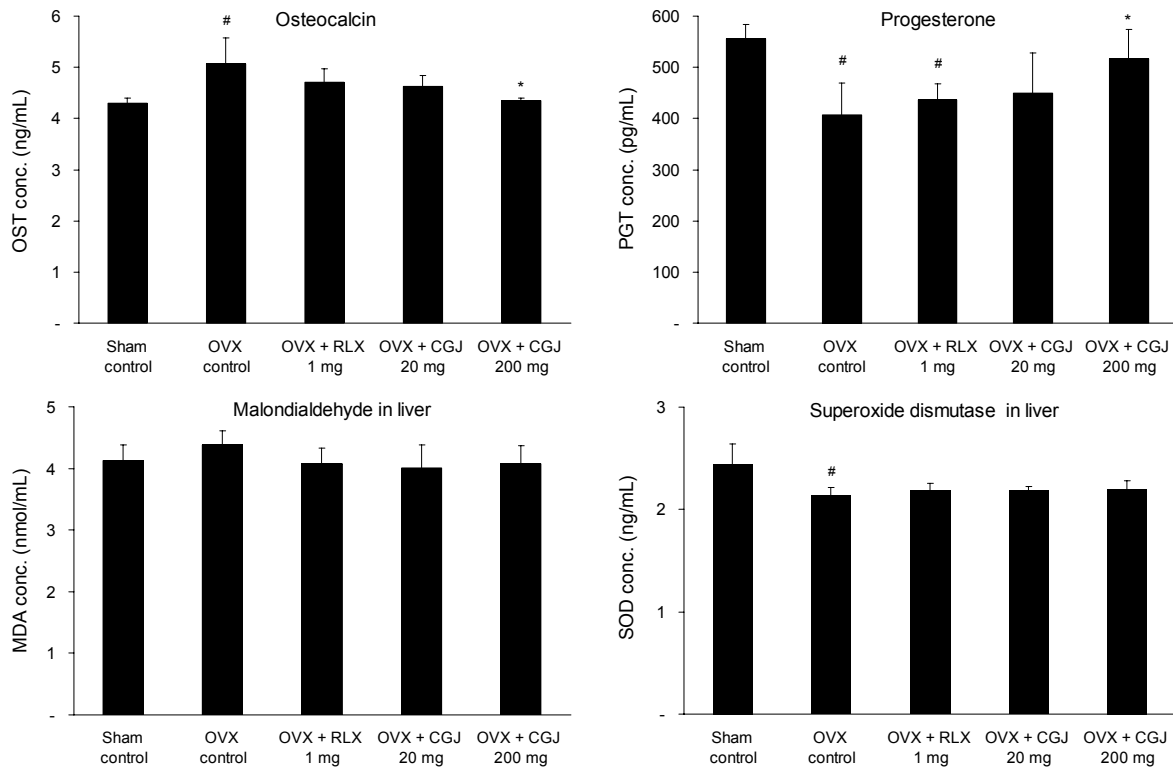


Fig. 3. Enzyme immunoassay in ovariectomized rats. Values are expressed as mean±SD of five ovariectomized (OVX) rats. RLX: raloxifene, CGJ: *cheonggukjang*, test material (mg/kg/d). Significantly different from sham control at [#] $P<0.05$. Significantly different from OVX control at ^{*} $P<0.05$.

Table 1. Absolute and relative organ weights in ovariectomized rats

Parameter	Sham control	OVX control	OVX+RLX 1 mg	OVX+CGJ 20 mg	OVX+CGJ 200 mg
Organ weights (g)					
Body weight (g)	259.8±5.3	337.0±41.9	303.4±29.8	338.6±26.4	339.2±13.6
Femur (Lt.)	0.73±0.09	0.76±0.06	0.81±0.19	0.79±0.05	0.85±0.06
Uterus	0.60±0.18	0.11±0.06 [#]	0.18±0.06 [#]	0.12±0.03 [#]	0.12±0.04 [#]
Organ weights (% of body weight)					
Femur (Lt.)	0.28±0.03	0.23±0.03	0.26±0.05	0.24±0.03	0.25±0.02
Uterus	0.23±0.07	0.03±0.03 [#]	0.06±0.02 [#]	0.03±0.01 [#]	0.03±0.01 [#]

Values are expressed as mean±SD of five ovariectomized (OVX) rats. RLX: raloxifene, CGJ: *cheonggukjang*, test material (mg/kg/d). Significantly different from sham control at [#] $P<0.05$.

Table 2. Histopathological findings of femur in ovariectomized rats

Parameter	Sham control	OVX control	OVX+RLX 1 mg	OVX+CGJ 20 mg	OVX+CGJ 200 mg
Reduction grade of trabecular bone	0.0±0.0	3.2±0.4 ^{##}	2.2±0.4 ^{##*}	3.0±0.7 ^{##}	2.8±0.4 ^{##}

Values are expressed as mean±SD of five ovariectomized (OVX) rats. RLX: raloxifene, CGJ: *cheonggukjang*, test material (mg/kg/d). Grade 0: no abnormalities detected, Grade 1: minimal, Grade 2: mild, Grade 3: moderate, Grade 4: severe. Significantly different from sham control at ^{##}*P*<0.01. Significantly different from OVX control at ^{*}*P*<0.05.

가 Sham군보다 OVX(중증이상 소견: 100%)군에서 유의성 (*P*<0.01) 있는 증가가 관찰되었으나, RLX 1 mg/kg(중증이상 소견: 20%)은 OVX 대조군보다 유의성(*P*<0.05) 있는 감소가 관찰되었으며, 청국장 200 mg/kg 투여군에서도 해면골 감소의 중증이상 소견이 60%로 OVX 대조군보다 40% 감소가 관찰되었다(Table 2).

고 찰

칼슘은 인체 내에서 가장 중요한 다량 무기질 중의 하나로 골격과 치아의 형성뿐만 아니라 근육 수축, 혈액 응고, 특정 효소의 활성화 및 세포막의 투과성 등 조직과 세포 수준에서 다양한 생리적인 반응을 조절한다(27). 장내 칼슘 흡수는 주로 pH가 낮은 산성 환경의 소장 상부에서 이루어지는 능동적 수송기전(active transport)과 pH가 알칼리성인 소장 하부에서 농도 차에 의해 일어나는 확산기전(passive diffusion)으로 이루어진다(28,29). 식물(콩)을 발효시켜 생성된 음이온성 고분자 아미노산인 폴리감마글루탐산(poly-γ-glutamic acid)이 장내에서 칼슘 흡수를 촉진하는 기능이 있다고 보고하였다(12,30).

고함량 PGA 청국장 및 기존 청국장을 투여하고 0(blank), 0.5, 1, 2, 3, 4, 5시간에 경정맥에서 채혈하여 혈청 중 칼슘 함량을 측정한 결과, 칼슘 단독 투여군보다 칼슘+청국장 500 mg/kg 투여군에서 칼슘 흡수율 증가가 관찰되었으며, 칼슘+기존 청국장 500 mg/kg 투여군보다 칼슘+고함량 청국장 500 mg/kg 투여군에서 3~5시간에 칼슘 흡수율의 증가가 관찰되었다. 따라서 PGA 함유량 증가한 청국장이 기존 청국장보다 투여 후 3~5시간에 흡수율이 증가할 것으로 생각한다.

골의 흡수량이 생성량보다 많아지면 골다공증이 발생하게 되며 이런 현상은 폐경기 이후의 여성 및 노인 환자에게 주로 발생(1,2)하는데, 특히 폐경 전 젊은 나이에 난소절제술을 받은 여성은 예외 없이 골다공증이 발생한다(31). 청국장이 발효되면서 청국장균에 의해 다량 생성되는 비타민 K₂는 직접 뼈의 형성에 관여하기 때문에 비타민 K 섭취가 부족할 경우 골절 등의 위험이 초래될 수 있다고 보고하였다(16). 또한, 청국장은 발효식품 중 이소플라본 함량이 가장 높은 것으로 보고된 바 있으며(17), 이소플라본은 여성 호르몬인 에스트로겐과 유사한 기능을 하는 식물성 에스트로겐으로 폐경기에 유발되는 골다공증의 예방 효과(20)가 보고되어 있고, 청국장의 제조과정에서 생성되는 물질인 PGA는

장내에서 칼슘 흡수를 촉진하는 기능이 있음이 연구되어 신기능성 소재로 주목받고 있다(13). 청국장은 이처럼 다양한 성분들이 골대사에 영향을 미치는 것으로 확인되었지만, 본 연구에서는 PGA 함유량만 측정하여 향후 추가로 비타민 K 및 이소플라본 등 다양한 청국장의 활성물질에 대하여 확인이 필요하다고 생각한다.

난소절제군은 Sham군보다 유의적으로 체중이 증가하였는데 이것은 선행연구에서 난소절제는 Sham 수술한 쥐와 비교해 체중이 유의적으로 증가하였다는 결과와 일치하였다. 난소절제 쥐가 체중이 증가하는 이유는 에스트로겐 결핍으로 인한 것을 보충하기 위하여 에스트로겐 생성이 가능한 체지방을 증가시켜 뼈에 가하는 힘을 부과시킴으로써 체중 지탱능력(weight bearing activity)을 키우기 위한 방어기전으로 보고하였다(32).

오스테오칼신은 뼈에 매우 특이한 단백질로써 조골세포의 활동성을 평가하는 골 형성 정도를 반영하는 가장 좋은 단일 지표로 보고되었다(33). 오스테오칼신은 칼슘과 결합하는 비타민 K 의존성 α-carboxylglutamic acid 단백질로서 혈중 농도는 골밀도와 관련이 있고 조골세포에서 분비되며 골형성에 관여하는 것으로 알려져 있고(34), 폐경기 여성은 골 교체율이 증가하여 혈청 오스테오칼신 농도가 증가하는 것으로 알려져 있다(35). 혈청 오스테오칼신 농도 증가는 젊은 연령층에서는 골 형성의 증가를 의미하는 긍정적인 면으로 해석되지만 폐경 후에는 골밀도와 음의 상관관계를 갖는 것으로 보고되어 골 교체율의 증가를 의미한다(36). 프로게스테론은 황체와 자궁에서 생산, 분비되는 임신지속 호르몬으로, 임신 지속을 위해서 필수적인 호르몬으로 알려져 있다(37). 난소절제에 의한 골다공증의 원인으로 프로게스테론도 중요한 역할을 하며, 프로게스테론 투여로 치료 효과가 볼 수 있다고 하였다(38). 혈청 검사에서 오스테오칼신은 Sham군보다 OVX 대조군에서 유의성 있는 증가가 관찰되었으나, 청국장 200 mg/kg 투여군에서는 OVX 대조군보다 유의성 있는 감소가 관찰되었고, 프로게스테론은 Sham군보다 OVX 대조군에서 유의성 있는 감소가 관찰되었으나, 청국장 200 mg/kg 투여군에서는 OVX 대조군보다 유의성 있는 증가가 관찰되어 청국장이 골다공증 개선에 효과가 있는 것으로 생각한다.

만성퇴행성 질환의 주요 원인 중 세포의 산화적 손상은 신체 내의 유산소적인 대사과정에서 생성된 자유라디칼(free radical)에 의해 발생한다(39). 지질과산화 반응은 생체 조직막의 다가불포화지방산 유리기에 의해 산화적 분해

를 일으키는 지표로 지질과산화물(malondialdehyde)을 확인하였으며 이의 증가는 산화적 스트레스의 증가를 나타낸다(40). 과산화물제거 효소(superoxide dismutase) 활성 증가는 자유라디칼 생성을 감소시켜 세포막의 다가불포화지방산으로부터 지질과산화물의 생성을 억제하는 것으로 보고되고 있다(41). 간장 조직액의 지질과산화물은 OVX 대조군보다 대조약 및 청국장 투여군에서 모두 감소 경향이 관찰되어 청국장 투여에 의하여 지질과산화물 생성을 감소시키는 것으로 기대된다.

난소적출 모델에서 골 감소는 대부분 해면골에서 일어나 골다공증이 발생한다고 하였다(42). 대퇴골에 대한 조직병리학적 검사에서 대퇴골 원위부 골간단의 해면골 감소가 Sham군보다 OVX군에서 유의성 있는 증가가 관찰되었으나, 대조약은 OVX 대조군보다 유의성 있는 감소가 관찰되었으며 청국장 200 mg/kg 투여군에서도 감소가 관찰되어 청국장이 해면골 감소를 억제시켜 골다공증을 어느 정도 개선 및 예방시키는 것으로 생각한다.

요 약

본 연구는 칼슘 생체이용률 시험에 수컷 랫드를 이용하여 고함량 폴리감마글루탐산 청국장이 기존 청국장보다 칼슘의 생체이용률을 증가시키는지 알아보려고 실시하였다. 고함량 폴리감마글루탐산(PGA) 청국장 및 기존 청국장을 투여하고 0.5, 1, 2, 3, 4, 5시간에 채혈하여 칼슘 함량을 측정 한 결과, 고함량 PGA 청국장이 기존 청국장보다 투여 후 3~5시간에 칼슘 흡수율이 증가할 것으로 생각한다. 골다공증 시험에 난소를 적출하여 폐경을 유도한 후 PGA 함유량이 증가한 청국장을 12주간 경구투여 하여 골다공증에 미치는 효과를 연구하고자 하였다. 혈청 검사에서 오스테오칼신은 청국장 200 mg/kg 투여군에서 OVX 대조군보다 유의성 있는 감소가 관찰되었고, 프로게스테론은 청국장 200 mg/kg 투여군에서는 OVX 대조군보다 유의성 있는 증가가 관찰되어 청국장이 골다공증 개선에 효과가 있는 것으로 생각한다. 간장 조직액의 지질과산화물은 OVX 대조군보다 대조약 및 청국장 투여군에서 모두 감소 경향이 관찰되어 청국장 투여로 지질과산화물 생성을 감소시키는 것으로 기대된다. 대퇴골에 대한 조직병리학적 검사에서 대퇴골 원위부 골간단의 해면골 감소가 대조약은 OVX 대조군보다 유의성 있는 감소가 관찰되었으며, 청국장 200 mg/kg 투여군에서도 감소가 관찰되어 청국장이 해면골 감소를 억제시키는 것으로 생각한다. 이상의 결과는 고함량 PGA 청국장이 기존 청국장보다 투여 후 3~5시간에 칼슘 흡수율을 증가시킬 것으로 생각하고, 난소적출 후에 일어나는 골격 대사의 이상에도 청국장이 골 교체를 억제, 호르몬 변화, 항산화 및 해면골 감소 억제 등 유익하게 나타남으로써 임상상 폐경기에 나타나는 골다공증을 어느 정도 예방시킬 수 있음을 시사하며, 폐경 후 여성의 골대사에 유익한 효과를 줄 것으로 생각한다.

감사의 글

본 연구는 산업통상자원부와 한국산업기술진흥원의 지역특화산업육성(R&D) 기술개발사업(과제번호: R0003434)으로 수행된 연구 결과입니다.

REFERENCES

- Walsh CA, Birch MA, Fraser WD, Ginty AF, Gallagher JA. 2000. Cytokine expression by cultured osteoblasts from patients with osteoporotic fractures. *Int J Exp Path* 81: 159-163.
- Park HM. 2010. Current use of drugs for osteoporosis in Korea. *Korean J Obstet Gynecol* 53: 152-159.
- Lee JW, Kim H, Jhee O, Won H, Yu Y, Lee M, Kim T, Om A, Kang J. 2005. Effects of alternative medicine extract on bone mineral density, bone strength and biochemical markers of bone metabolism in ovariectomized rats. *Korean J Food Nutr* 18: 72-80.
- Kim YM, Kim JH, Cho DS. 2015. Gender difference in osteoporosis prevalence, awareness and treatment: based on the Korea national health and nutrition examination survey 2008~2011. *J Korean Acad Nurs* 45: 293-305.
- Chung HY. 2008. Osteoporosis diagnosis and treatment 2007. *J Korean Endocr Soc* 23: 76-108.
- Kanis JA, Melton LJ, Christiansen C, Johnston CC, Khaltaev N. 1994. The diagnosis of osteoporosis. *J Bone Min Res* 9: 1137-1141.
- Grodstein F, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, Manson JE, Joffe M, Rosner B, Fuchs C, Hankinson SE, Hunter DJ, Hennekens CH, Speizer FE. 1997. Postmenopausal hormone therapy and mortality. *N Engl J Med* 336: 1769-1775.
- Choi HJ. 2013. Treatment for osteoporosis: focusing on bisphosphonate therapy. *Korean J Fam Pract* 3: 16-24.
- Kang MJ, Cho JY, Shim BH, Kim DK, Lee J. 2009. Bioavailability enhancing activities of natural compounds from medicinal plants. *J Med Plant Res* 13: 1204-1211.
- Lee JO, Ha SD, Kim AJ, Yuh CS, Bang IS, Park SH. 2005. Industrial application and physiological functions of *Chongkukjang*. *Food Science and Industry* 38(2): 69-78.
- Kang SA, Jang KH, Cho Y, Hong K, Suh JH, Choue R. 2003. Effects of artificial stomach fluid and digestive enzymes on the aglycone isoflavone contents of soybean and black bean (*Rhynchosia molubillis*: Yak-Kong). *Korean J Nutr* 36: 32-39.
- Tanimoto H, Mori M, Motoki M, Torii K, Kadowaki M, Noguchi T. 2001. Natto mucilage containing poly- γ -glutamic acid increases soluble calcium in the rat small intestine. *Biosci Biotechnol Biochem* 65: 516-521.
- Lee MS, Kang JI, Kim HS. 2006. Effect of γ -PGA(poly- γ -glutamic acid) supplement on calcium absorption and bone metabolism in rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 255-261.
- Louie DS. 1996. *Calcium and phosphorus in health and disease: Intestinal bioavailability and absorption of calcium*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. p 45.
- Booth SL, Suttie JW. 1998. Dietary intake and adequacy of vitamin K. *J Nutr* 128: 758-788.
- Akedo Y, Hosoi T, Inoue S, Ikegami A, Mizuno Y, Kaneki M, Nakamura T, Ouchi Y, Orimo H. 1992. Vitamin K₂ modulates proliferation and function of osteoblastic cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 187: 814-820.

17. Lee KH, Ryu SH, Lee YS, Kim YM, Moon GS. 2005. Changes of antioxidative activity and related compounds on the *Chungkukjang* preparation by adding drained boiling water. *Korean J Food Cook Sci* 21: 163-170.
18. Choi YB, Sohn HS. 1998. Isoflavone content in Korean fermented and unfermented soybean foods. *Korean J Food Sci Technol* 30: 745-750.
19. Chung WY, Kim SK, Son JY. 2008. Isoflavones contents and physiological activities of soybeans fermented with *Aspergillus oryzae* or *Bacillus natto*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 141-147.
20. Somekawa Y, Chiguchi M, Ishibashi T, Aso T. 2001. Soy intake related to menopausal symptoms, serum lipids, and bone mineral density in postmenopausal Japanese women. *Obstet Gynecol* 97: 109-115.
21. Morabito N, Crisafulli A, Vergara C, Gaudio A, Lasco A, Frisina N, D'Anna R, Corrado F, Pizzoleo MA, Cincotta M, Altavilla D, Ientile R, Squadrito F. 2002. Effects of genistein and hormone-replacement therapy on bone loss in early postmenopausal women: a randomized double-blind placebo-controlled study. *J Bone Miner Res* 17: 1904-1912.
22. Taku K, Umegaki K, Sato Y, Taki Y, Endoh K, Watanabe S. 2007. Soy isoflavones lower serum total and LDL cholesterol in humans: a meta-analysis of 11 randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr* 85: 1148-1156.
23. Akesson K, Lau KH, Baylink DJ. 1997. Rationale for active vitamin D analog therapy in senile osteoporosis. *Calcif Tissue Int* 60: 100-105.
24. Bang BH, Rhee MS, Kim KP, Yi DH. 2012. Influences of culture medium components on the production poly(γ -glutamic acid) by *Bacillus subtilis* GS-2 isolated *Chungkookjang*. *Korean J Food Nutr* 25: 677-684.
25. Black LJ, Sato M, Rowley ER, Magee DE, Bekele A, Williams DC, Cullinan GJ, Bendele R, Kauffman RF, Bensch WR, Frolik CA, Termine JD, Bryant HU. 1994. Raloxifene (LY139481 HCl) prevents bone loss and reduces serum cholesterol without causing uterine hypertrophy in ovariectomized rats. *J Clin Invest* 93: 63-69.
26. Lee KH, Sim MO, Song YS, Jung HK, Jang JH, Kim MS, Kim TM, Lee HE, An BK, Jung WS. 2016. Effects of poly-gamma glutamate contents Cheonggukjang on osteoblast differentiation. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 45: 664-670.
27. Allen LH. 1982. Calcium bioavailability and absorption: a review. *Am J Clin Nutr* 35: 783-808.
28. Pansu D, Bellaton C, Bronner F. 1981. Effect of Ca intake on saturable and nonsaturable components of duodenal Ca transport. *Am J Physiol* 240: G32-G37.
29. Bronner F. 1992. Current concepts of calcium absorption: an overview. *J Nutr* 122: 641-643.
30. Park C, Chol YH, Shin HJ, Poo HY, Song JJ, Kim CJ, Sung MH. 2005. Effect of high-molecular-weight poly- γ -glutamic acid from *Bacillus subtilis* (chungkookjang) on Ca solubility and intestinal absorption. *J Microbiol Biotechnol* 15: 855-858.
31. Han KO. 2005. Molecular pathophysiology of postmenopausal osteoporosis. *J Korean Soc Menopause* 11: 175-177.
32. Li M, Wronski TJ. 1995. Response of femoral neck to estrogen depletion and parathyroid hormone in aged rats. *J Bone Miner Res* 16: 551-557.
33. Johnell O, Oden A, De Laet C, Gamero P, Delmas PD, Kanis JA. 2002. Biochemical indices of bone turnover and the assessment of fracture probability. *Osteoporos Int* 13: 523-526.
34. Abadjieva DK, Kang SK. 1996. Effects of Cervi Cornu aqua-acupuncture on lipid metabolism and osteoporosis in ovariectomized rats. *J Korean Orient Med* 17: 168-177.
35. Kim SJ. 2003. Study on the relationship between osteoporosis-cause factor and bone mineral density, biochemical marker. *MS Thesis*. Pukyong National University, Busan, Korea. p 28-29.
36. Liu G, Peacock M. 1998. Age-related changes in serum undercarboxylated osteocalcin and its relationships with bone density, bone quality, and hip fracture. *Calcif Tissue Int* 62: 286-289.
37. McDonald LE, Pineda MH. 1989. *Veterinary endocrinology and reproduction*. 4th ed. Lea and Febiger Philadelphia, PA, USA. p 303-354.
38. Heersche JN, Bellows CG, Ishida Y. 1998. The decrease in bone mass associated with aging and menopause. *J Prosthet Dent* 79: 14-16.
39. Lee O. 2004. Effects of supplementation of *Puerariae radix* ethanol extract on the antioxidative defense system in rats. *Korean J Nutr* 37: 872-880.
40. Thurman RG, Bradford BU, Iimuro Y, Knecht KT, Connor HD, Adachi Y, Wall C, Arteel GE, Raleigh JA, Forman DT, Mason RP. 1977. Role of Kupffer cells, endotoxin and free radicals in hepatotoxicity due to prolonged alcohol consumption: studies in female and male rats. *J Nutr* 127: 903S-906S.
41. Morel DW, Chisolm GM. 1989. Antioxidant treatment of diabetic rats inhibits lipoprotein oxidation and cytotoxicity. *J Lipid Res* 30: 1827-1834.
42. Kimmel DB. 1996. *Animal models for in vivo experimentation in osteoporosis research*. Osteoporosis Academic Press, San Diego, CA, USA. p 671-690.