

In vitro system에서 청국장 메탄올 추출물의 신경세포 보호효과

정창호 · 광지현¹ · 김지혜¹ · 최귀남¹ · 정희록¹ · 허호진^{1*}

경희대학교 생명과학대학 식품공학과, ¹경상대학교 농업생명과학대학 식품공학과 · 농업생명과학연구원

Neuronal Cell Protective Effects of Methanol Extract from *Cheonggukjang* Using *in vitro* System

Chang-Ho Jeong, Ji Hyun Kwak¹, Ji Hye Kim¹, Gwi Nam Choi¹, Hee Rok Jeong¹, and Ho Jin Heo^{1*}

Department of Food Science and Biotechnology, Institute of Life Science and Resources, Kyung Hee University

¹Department of Food Science and Technology, Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University

Abstract In this study, the neuronal cell protective effects of methanol extract from *cheonggukjang* were evaluated. The proximate composition and total phenolics of the methanol extract were 40.95% crude protein, 22.49% crude fat, 15.99% nitrogen free extract, 7.91% moisture, 6.74% crude ash, 5.92% crude fiber, and 28.43 mg/g of total phenolics. Intracellular ROS accumulation resulting from H₂O₂ treatment of PC12 cells was significantly reduced when methanol extract was present in the media compared to PC12 cells treated with H₂O₂ only. In a cell viability assay using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromide (MTT), the methanol extract showed protective effects against H₂O₂-induced neurotoxicity, and lactate dehydrogenase (LDH) release into the medium was also inhibited. Furthermore, the inhibitory effect of the methanol extract against acetylcholinesterase was dose-dependent.

Key words: neuronal cell protection, *cheonggukjang*, acetylcholinesterase

서 론

현대 사회의 눈부신 발달과 더불어 생체조직의 노화를 비롯한 퇴행성 신경질환이 사회적인 문제로까지 크게 대두되고 있다. 특히 이러한 질환의 주된 원인이 활성산소(free radical, oxygen radical)에 기인한다는 것이 인정됨(1,2)에 따라 활성산소를 조절할 수 있는 천연 항산화제에 대한 연구와 개발이 활발히 진행되고 있다(3,4). Superoxide anion radical, hydroxy radical, singlet oxygen 및 H₂O₂ 등과 같은 활성산소들은 산화력이 매우 강하기 때문에 인체 내에서 제거되지 못하면 산화적 스트레스를 유발하게 되며(5), 이러한 산화적 스트레스는 지질과산화물을 유도하고 단백질, 세포막 및 DNA 등을 손상시켜 암을 비롯한 다양한 성인병을 유발하는 것으로 알려져 있다(6). 퇴행성 신경질환의 대부분을 차지하는 노인성 치매(Alzheimer's disease; AD)는 기억과 인지 장애를 주는 특징을 가지고 있으며, AD환자의 뇌에서 free radical과 같은 산화적 스트레스로 인한 뇌신경세포들의 기능장애가 AD와 같은 퇴행성 신경질환의 원인으로 알려져 있다(7). 퇴행성 신경 질환의 대표적인 치료방법으로는 항산화제 처리, 세포 이식 및 외과적 수술 등 다양한 치료법이 제시되고 있지만, 대부분의 치료법이 여러 가지 위험요소, 부작용 및 손상 기전의 복잡

성 등으로 인하여 신경세포의 손상 보호에 적합한 치료제는 아직까지 개발되지 못하고 있는 실정이다. 따라서 안전성이 입증된 다양한 식품과 천연자원에서부터 보다 안전하고 신경세포 보호 효과가 뛰어난 치료 및 예방 효과를 나타낼 수 있는 화합물들의 개발이 절실히 요구되고 있다(8).

청국장은 된장이나 고추장보다 단백질과 지방 함량이 높고 발효기간이 짧은 고영양 식품(9)으로, 발효숙성 중에 *Bacillus subtilis*가 생산하는 효소에 의해서 증가된 대두가 분해되면서 생성된 glutamic acid의 polypeptide와 fructose로 구성된 fructan이 혼합되어 생성되는 끈적끈적한 점질물이 식품학적 가치를 향상시킨다(10). 청국장 발효과정 중 콩 속에 함유된 isoflavone, phytic acid, saponin, trypsin inhibitor, tocopherol, 불포화지방산, 식이섬유 및 올리고당 등의 각종 생리활성물질과 항산화물질 및 혈전용해 효소를 다량 함유하고 있기 때문에 기능성 식품으로 그 중요성이 재조명되고 있다(11,12). 또한 최근에는 *Bacillus subtilis*의 생합성으로 Vitamin B2와 K2 등의 함량이 증가되어 영양적, 경제적으로도 가장 효과적인 대두 단백질 섭취 방법으로 인정되고 있다(13,14).

지금까지 청국장의 생리활성에 대한 연구로는 항암성 및 면역 기능개선(15,16), 지질대사 개선(17), 고혈압 예방(18), 심장병 및 콜레스테롤 저감 효과(19,20), 골다공증 예방 또는 치료(21,22), 항산화 및 tyrosinase 저해(23) 등의 효과가 있는 것으로 알려져 있으나 청국장 추출물의 산화적 스트레스에 대한 신경세포 보호효과와 같은 퇴행성 뇌신경질환에 관한 연구는 미비한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 산화적 스트레스로부터 유도되는 신경세포의 사멸을 보호할 수 있는 생리활성물질을 탐색하기 위한 목적으로, 청국장 메탄올 추출물을 이용하여 H₂O₂와 같은 산화적 스트레스에 의해 손상된 PC12 신경세포에 대한 보호효과를 조사하고자 하였다.

*Corresponding author: Ho Jin Heo, Department of Food Science and Technology, Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, Jinju, Gyeongnam 660-701, Korea
TEL: 82-55-751-5476
FAX: 82-55-753-4630
E-mail: hjher@gnu.ac.kr

Received June 8, 2010; revised September 6, 2010;
accepted September 8, 2010

재료 및 방법

실험재료 및 추출액의 제조

본 실험에 사용된 청국장 분말은 진주시에 위치한 대형마트에서 구입하여 냉장보관(4)하면서 실험에 사용하였다. 신경세포 보호효과 실험에 사용된 시약으로 hydrogen peroxide(H₂O₂) solution, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT) assay kit, lactate dehydrogenase(LDH) assay kit, penicillin, streptomycin, sodium bicarbonate, HEPES, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(DCF-DA) 및 나머지 시약은 Sigma사(St. Louis, MO, USA)제품을 구입하였다. 세포주 배양을 위해 필요한 RPMI 1640 medium과 fetal bovine serum은 Gibco BRL Co.(Grand Island, NY, USA)에서 구입하였으며, 그 외 사용된 용매 및 시약은 모두 일급 이상의 등급을 사용하였다. 청국장 메탄올 추출물은 분말 청국장 10 g에 메탄올 100 mL를 첨가하여 70°C에서 2시간 동안 추출 후 No. 2 여과지(Whatman plc., Kent, UK)로 여과하였다. 그 후 진공농축기(N-N series, EYELA Co., Tokyo, Japan)로 농축하고 동결건조(IIShin Lab Co., Ltd., Yangju, Korea)하여 사용하였고, 동결 건조된 추출물은 -20°C 냉동고에서 보관하면서 본 실험에 사용하였다.

세포 및 배양방법

본 실험에서 사용한 PC12 세포는 흰쥐 부신의 갈색세포종(pheochromocytoma)에서 분리하여 신경세포주로 확립된 것으로 Korean cell line bank(KCLB 21721, Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다. PC12 세포를 25 mM HEPES, 25 mM sodium bicarbonate, 10% fetal bovine serum, 50 units/mL penicillin 및 100 µg/mL streptomycin이 포함된 RPMI 1640배지에 접종하여 37°C, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 배양하였다.

일반성분 및 총 페놀성 화합물 분석

청국장의 일반성분은 AOAC 방법으로 측정하였고(24), 메탄올 추출물에 함유되어 있는 총 페놀화합물 함량을 측정하기 위하여 Folin-Ciocalteu's 방법을 이용하였다(25).

DCF-DA assay

청국장 메탄올 추출물이 H₂O₂에 의한 PC12 세포의 산화적 스트레스 손상을 보호하는 효과를 측정하기 위하여 DCF-DA 방법으로 실시하였다. 먼저 세포를 96 well plate에 2×10⁶ cells/well로 분주하고, 청국장 메탄올 추출물을 농도별로 처리한 후 37°C, 5% CO₂의 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 배지를 제거한 다음, phosphate buffered saline(PBS) buffer로 세척한 다음 200 µM H₂O₂를 가하고, 3시간 배양한 후 50 µM DCFH-DA를 가하고, fluorescence microplate reader(Infinite 200, Tecan Co., San Jose, CA, USA)를 사용하여 excitation 파장 485 nm와 emission 파장 535 nm에서 형광강도를 측정하였다(26).

세포 생존율 측정

H₂O₂에 의해 유도된 PC12 세포에 대한 보호효과는 MTT 방법으로 측정하였다(27). 청국장 메탄올 추출물을 PC12 세포에 처리하여 48시간동안 전 배양시킨 후, 200 µM H₂O₂를 각각 3시간 동안 처리하였다. 이 상태의 PC12 세포에 MTT stock solution을 처리하여 37°C에서 3시간 배양시킨 후, MTT solubilization solution 150 µL를 첨가하여 반응을 종결시켰다. 마지막으로 흡광도는 microplate reader(680, Bio-rad, Tokyo, Japan)에서 570 nm(deter-

mination)와 690 nm(reference wave length)에서 측정하였다. 양성 대조군은 vitamin C(200 µM)를 사용하였고, 세포생존율은 대조군에 대한 %concentration으로 나타났다.

세포막 손상 억제효과

청국장 메탄올 추출물을 48시간동안 전 배양시킨 후, 200 µM H₂O₂를 처리하여 3시간 배양한 후, 5분간 원심분리(250×g)하여 100 µL의 상등액을 새로운 well로 옮긴 후 LDH assay kit(Sigma Chemical Co.)를 사용하여 측정하였다.

Acetylcholinesterase저해 활성

Acetylcholinesterase저해 활성 측정은 acetylcholine iodide를 기질로 사용하는 Ellman법으로 측정하였다(28). 효소는 PC12 세포 배양액 1 mL에 균질화를 위한 buffer(1 M NaCl, 50 mM MgCl₂, 1% Triton X-100 혼합액에 10 mM Tris-HCl로 pH 7.2로 조정) 5 mL를 첨가하여 Glass-Col homogenizer로 균질화한 후 균질화된 세포배양액을 15,000 g에서 30분 동안 원심 분리하였으며, 그 상등액을 효소실험을 위하여 사용하였다. 모든 추출공정은 4°C에서 수행하였으며, 추출한 효소액의 단백질함량을 측정하기 위하여 Quant-iT™ protein assay kit(Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)를 이용하였고, bovine serum albumin으로 작성한 검량곡선에 준하여 함량을 환산하였다. 정제효소(단백질 함량: 2.38 mg/mL) 10 µL에 추출물 10 µL를 넣어 37°C에서 15분간 반응시켰으며, 반응 혼합물에 50 mM sodium phosphate buffer(pH 8.0)에 용해시킨 Ellman's reaction mixture[0.5 mM acetylthiocholine, 1 mM 5,5'-dithio-bis(2-nitro benzoic acid)] 70 µL를 첨가한 후 405 nm에서 10분 동안 2분 간격으로 흡광도를 측정하였다.

통계처리

모든 실험은 3회 반복 실시하여 mean±SD로 나타내었으며, 각 평균값에 대한 검증은 SAS(Statistical Analysis System, ver. 6.12)를 이용하여 평균과 표준오차, Newman-Keul's multiple range tests로 평균값들에 대해 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

청국장 분말의 일반성분 및 메탄올 추출물의 총 페놀성 화합물 함량

청국장 분말의 일반성분을 분석한 결과는 Table 1에서 보는 바와 같이 조단백질 40.95%, 조지방 22.49%, 가용성 무질소물 15.99%, 수분 7.91%, 조회분 6.74% 및 조섬유 5.92% 순으로 나타났다. Song과 Jung은(29) 분말청국장의 일반성분을 분석한 결과 단백질이 43.61%로 가장 많았고, 조지방(22.75%), 탄수화물(14.81%) 및 조섬유(7.21%) 순으로 높게 나타났으며, 수분과 회분은 각각 6.14%와 5.48%의 함량이었다고 보고하여 본 실험의 결과와 유사한 결과를 보였다. 따라서 콩 발효식품의 청국장은 우수한 식물성 단백질 공급원과 양질의 불포화지방산을 공급하는 대표적인 식품이라 하겠다. 청국장 메탄올 추출물의 총 페놀성 화합물 함량을 측정한 결과 28.43 mg/g의 함량을 나타냈다. 페놀성 화합물은 천연물에 많이 함유되어 있는 성분으로 이들의 주요 생리적 역할은 자유 라디칼을 소거하는 것이라는 연구가 많이 보고되고 있으며, 또한 이러한 페놀성 화합물인 플라보노이드나 페놀산 및 안토시아닌 등의 총량인 총 페놀화합물은 DPPH 라디칼 소거활성과 같은 항산화 활성에 매우 중요한 인자로 작용을 한다(30). 또한 Lee 등(31)은 대두와 청국장에 존재하는 대

Table 1. Proximate compositions and total phenolics of *cheonggukjang*

	Moisture (%)	Crude protein (%)	Crude fat (%)	Nitrogen free extract (%)	Crude fiber (%)	Crude ash (%)	Total phenolics [mg/g GAE (gallic acid equivalent)]
<i>Cheonggukjang</i>	7.91±0.10	40.95±0.27	22.49±0.76	15.99±0.86	5.92±0.39	6.74±0.27	28.43±0.21

Results shown are means±SD (n=3).

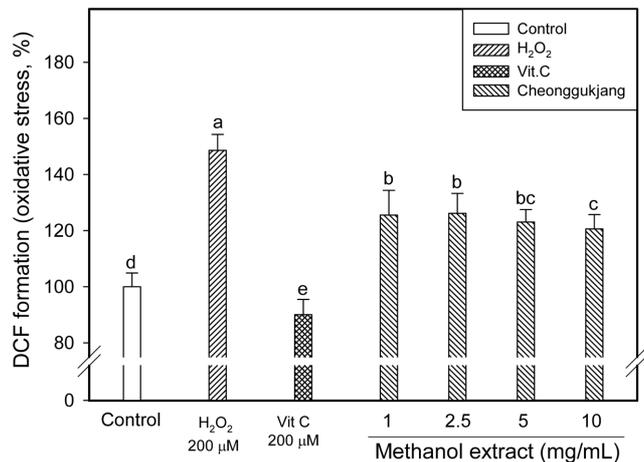


Fig. 1. Effect of methanol extract from *cheonggukjang* on ROS production determined in the presence and absence of H₂O₂ in PC12 cell. DCF value was not changed by vitamin C or methanol extract from *cheonggukjang* (data not shown). Results shown are means±SD (n=3). Statistical analysis indicated that the influence of the compounds used had significant effect on the H₂O₂-induced oxidative stress ($p < 0.05$ vs. vitamin C).

표적인 항산화효과의 원인물질로는 chlorogenic acid, isochlorogenic acid, caffeic acid, isoflavones, phenolic acids, tocopherol, amino acids와 peptides, aromatic amines 같은 합질소 화합물, 인지질, saponin 등이므로 보고하여 본 실험의 결과에서도 항산화 활성성분들이 많이 존재함에 따라 높은 신경세포 보호효과가 기대된다.

PC12 세포의 산화적 손상에 대한 보호효과

H₂O₂에 의한 PC12 세포의 산화적 손상을 보호하는 효과를 DCF-DA assay를 통하여 검토하였다. 먼저 PC12 세포에 농도별 청국장 메탄올 추출물을 전처리한 다음, H₂O₂로 세포의 산화적 손상을 유도하여 DCF 형광강도를 관찰한 결과는 Fig. 1과 같다. 그 결과 H₂O₂를 단독 처리한 군에서는 148.65%로 대조군 100% 대비 약 50%의 형광강도 증가를 보인 반면, 청국장 메탄올 추출물 1 mg/mL를 처리한 시료에서는 125.53%, 10 mg/mL를 처리한 시료에서는 120.59%로 농도 의존적인 산화적 손상 보호 효과를 보였다. Choi 등(28)은 가시오가피 80% 메탄올 추출물을 이용하여 PC12 세포에 H₂O₂로 산화적 스트레스를 유발한 후 DCF-DA 방법으로 산화적 손상 보호효과를 측정된 결과 H₂O₂ 단독 처리구에서는 407.85%의 ROS 증가량을 보인 반면 가시오가피 추출물 처리구에서는 농도 의존적인 산화적 손상 보호 효과를 보였으며, 특히 모든 농도에서 양성대조군으로 사용한 vitamin C보다 더 높은 산화적 손상 보호 효과를 나타내었는데 이는 가시오가피 추출물에 함유되어 있는 폴리페놀성 화합물에 의한 것으로 보고하였다. 따라서 청국장 메탄올 추출물에서도 Table 1의 결과에서와 같이 폴리페놀성 화합물들이 다량 존재하고 있어 이에 의한 보호효과인 것으로 판단된다.

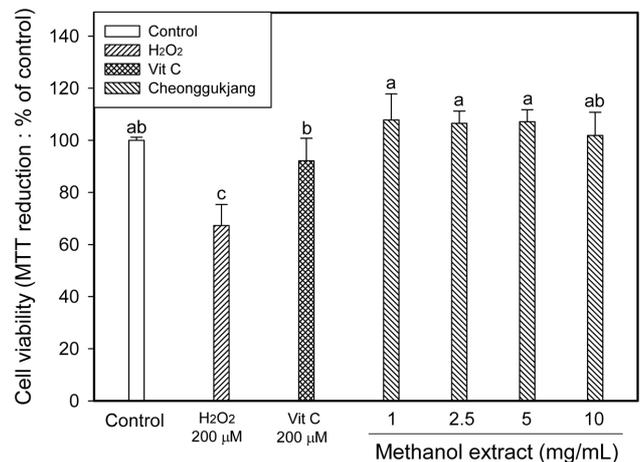


Fig. 2. Protective effect of methanol extracts from *cheonggukjang* against H₂O₂-induced cell death in PC12 cell system. PC12 cells were pretreated for 48 h with various concentrations. The cells were then treated with 200 μM H₂O₂ for 3 h. Levels of cell viability were measured using the MTT assay as described under materials and methods. Vitamin C (200 μM) was applied as positive control. Results shown are means±SD (n=3). Significant difference ($p < 0.05$) was observed on the H₂O₂-induced apoptosis.

신경세포 보호효과

AD와 PD(Parkinson's disease)와 같은 신경계 질환은 산화적 스트레스에 의한 신경세포의 사멸에 의해 발생되며, 천연 항산화제인 flavonoids, polyphenols 등은 산화적 스트레스로부터 신경세포 보호효과가 뛰어난 것으로 보고되고 있다(32). 청국장 메탄올 추출물의 H₂O₂에 의해 유도된 산화적 스트레스 상태에서 PC12 세포에 대한 보호 효과를 측정된 결과는 Fig. 2와 같다. 세포 생존율은 H₂O₂를 처리한 처리구에서는 대조군 100% 대비 67%의 생존율을 나타냈고 H₂O₂와 vitamin C를 동시에 처리한 처리구에서는 92%의 생존율로 약 25%정도의 신경세포 보호효과를 보였다. 청국장 메탄올 추출물 1 mg/mL를 처리한 시료에서는 107%의 생존율을 보였으며, 2.5와 5 mg/mL 처리구에서는 각각 106%와 107%로 청국장 메탄올 추출물의 농도에 따른 신경세포 보호효과의 유의적인 차이는 보이지 않았고, 오히려 10 mg/mL를 처리한 시료에서는 신경세포 보호효과가 상대적으로 감소하는 경향을 보였다. 위와 같은 청국장 메탄올 추출물의 신경세포 보호효과는 Table 1에서 나타난 청국장 메탄올 추출물에 함유되어 있는 폴리페놀성 화합물 등으로부터 기인한 것으로 생각된다. 청국장에 함유되어 있는 대표적인 폴리페놀성 성분들은 항산화 및 tyrosinase 저해활성 등의 다양한 생리활성을 가지는 것으로 보고하여(20-23), 본 실험의 결과로 미루어 보아 청국장 메탄올 추출물에 함유되어 있는 신경세포 보호효과를 나타내는 특정 화합물을 찾기 위한 추가적인 연구가 필요하다고 생각된다.

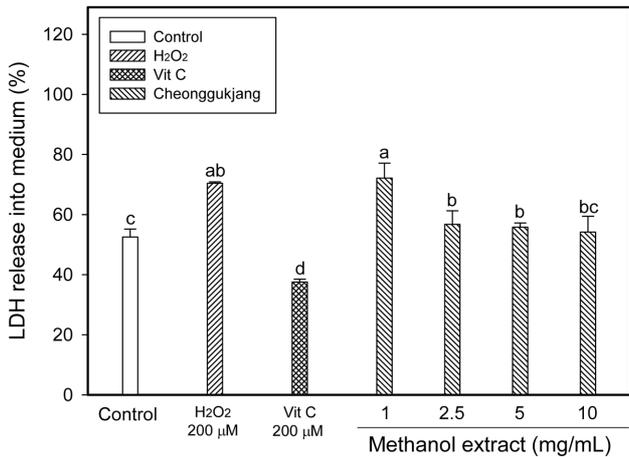


Fig. 3. Protective effect of methanol extracts from *cheonggukjang* against H₂O₂-induced cell death by neutral red uptake assay. The cells were then treated with 200 μM H₂O₂ for 3 h. Levels of cell viability were measured using the LDH assay as described under materials and methods. Vitamin C (200 μM) was applied as positive control. Results shown are means±SD (n=3). Significant difference (p<0.05) was observed on the H₂O₂-induced apoptosis.

세포막 손상 보호효과

신경세포의 경우 상대적으로 많은 지방성분을 함유하고 있고 이는 산화적인 스트레스에 매우 취약하기 때문에 이러한 구조적 특성을 이용하여 상기의 신경세포 보호효과와 신경세포막 손상과의 관계를 알아보고자 다음의 연구를 진행하였다. H₂O₂로 유도된 신경세포막 손상에 대한 청국장 메탄올 추출물의 보호효과를 확인하기 위하여 신경세포 중에 함유되어 있는 세포질 성분의 LDH 방출량을 측정 한 결과는 Fig. 3과 같다. 대조군의 방출량은 52% 정도인데 반해 H₂O₂ 처리한 구에서는 70%의 방출량을 보여 H₂O₂로 인해 LDH 방출량이 18%정도 증가하였다. Vitamin C 200 μM 처리군은 37%의 LDH 방출량을 보였고, 청국장 메탄올 추출물 1 mg/mL의 농도로 처리했을 때는 72%의 LDH 방출량을 나타내어 H₂O₂ 단독 처리구와 비교하였을 때 큰 차이를 보이지 않았으나 2.5, 5 및 10 mg/mL의 농도로 처리하였을 때는 56, 55 및 54%의 LDH 방출량을 나타내어 농도 의존적으로 신경세포막의 손상 정도가 점차적으로 감소하는 경향을 볼 수 있었다. 청국장 메탄올 추출물 1 mg/mL의 농도 처리구에서는 H₂O₂ 단독 처리구와 비교하였을 때 큰 차이를 보이지 않았으나 2.5 mg/mL 이상의 농도에서는 LDH 방출량이 감소하는 경향을 보였는데, 이는 청국장 메탄올 추출물에는 H₂O₂에 의해 유발된 신경세포손상 보호효과를 보이는 활성물질이 다량 함유되어 있을 것으로 생각된다. 따라서 청국장 메탄올 추출물에 함유되어 있는 특정 페놀성 화합물들의 분리, 동정에 대한 연구가 뒤따라야 할 것이며, 또한 분리된 페놀성 화합물들을 이용한 *in vivo* 실험을 비롯한 분자생물학적 등의 구체적인 연구도 병행되어야 할 것으로 판단된다.

Acetylcholinesterase저해 활성

뇌조직의 모든 신경세포에서 발견되는 신경전달물질로서 acetylcholine(ACh)은 시냅스(synapse)와 시냅스 사이의 신경전달에 관계하는 중요한 신경전달물질로 알려져 있다. 뇌신경계의 특정부위에서 ACh이 시냅스 전 말단에서 분비되면 그것이 시냅스 후 수용체와 결합하여 신경세포 사이의 자극을 전달한다. 그러나 제 2의 자극이 시냅스를 통해 전달하기 전에 제 1의 자극 시에 분

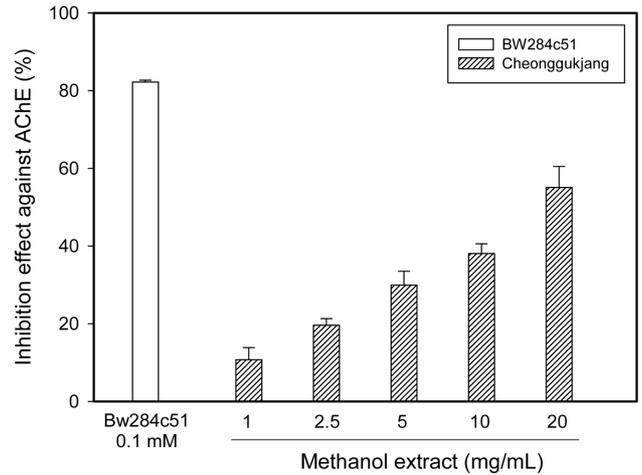


Fig. 4. Inhibitory effects against AChE of methanol extracts from *cheonggukjang*. Results shown are means±SD (n=3). Different superscripts indicate significant difference among groups at p<0.05.

비된 ACh은 acetylcholinesterase(AChE)에 의하여 가수분해 되어야 한다. 그런데 ACh의 함량과 합성효소로서 choline acetyltransferase(ChAT)의 활성이 대부분의 사람 및 설치동물에서 연령과 함께 감소하는 것으로 알려져 있다. 또한 AChE의 활성도 ACh와 마찬가지로 감소한다는 사실도 밝혀지고 있다(33). 청국장 메탄올 추출물을 이용하여 AChE의 저해 활성에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 4와 같다. 청국장 메탄올 추출물의 농도가 증가함에 따라 AChE에 대한 저해활성도 비례적으로 증가하는 경향을 보였으며, 특히 20 mg/mL의 농도에서 55.07%의 높은 저해활성을 보였으나 양성대조군으로 사용된 BW284c51의 82.22%보다는 낮은 효과를 보였다. Heo 등(34)은 쑥꽃에서 분리한 daidzein을 이용하여 *in vivo* 상에서의 choline acetyltransferase(ChAT) 활성을 측정 한 결과 scopolamine을 처리한 시료에서는 7.8%의 ChAT의 활성을 보였지만 daidzein을 1.5, 3.0 및 4.5 mg/kg의 농도로 첨가한 시료에서는 각각 19.6, 24.7 및 29.3%의 활성을 보여 scopolamine에 의해 유도한 기억력 감퇴 모델을 이용한 실험에서 기억력 개선 및 인지능력 향상 효과가 있다고 보고하였다. 따라서 본 연구에서 보여주는 AChE의 저해활성도 역시 청국장 추출물에 함유되어 있는 폴리페놀성 화합물과 그 연계성이 높을 것으로 판단된다. 다만 상대적으로 높은 농도에서 *in vitro* AChE 저해활성을 나타내고 있으므로, 향후 청국장 내에 함유되어 있는 개별 폴리페놀성 화합물에 의한 실험과 함께 Y-maze task 및 수동회피 실험과 같은 *in vivo* 실험의 병행으로 생리적인 효과의 직접적인 상관관계 정립이 필요할 것으로 판단된다. 위의 실험 결과를 종합하여 볼 때 청국장에서는 *in vitro* 실험을 통하여 나타난 신경세포 보호효과를 토대로 알츠하이머성 신경질환과 같은 퇴행성 뇌신경질환의 예방을 위한 식품으로서의 활용 가능성을 제시할 수 있을 것으로 판단된다.

요 약

청국장 메탄올 추출물의 H₂O₂로 유도된 신경세포 독성에 대한 보호 효과를 조사하였다. 청국장 분말의 일반성분을 분석한 결과 조단백질 40.95%, 조지방 22.49%, 가용성 무질소물 15.99%, 수분 7.91%, 조회분 6.74% 및 조섬유 5.92% 순으로 나타났으며, 총 페놀성 화합물 함량은 28.43 mg/g이었다. H₂O₂로 유발된 산화

적 손상에 의한 ROS 축적량을 조사한 결과 H₂O₂ 단독 처리구보다 청국장 메탄올 추출물 처리구에서 낮은 ROS 축적량을 보였다. H₂O₂로 유도된 PC12 신경세포에 대한 보호효과를 MTT 방법을 이용하여 측정된 결과 모든 시료에서 40%정도의 신경세포 보호효과를 보였고, LDH release 실험 결과 5 mg/mL 농도에서 15%정도의 LDH 방출량 저해 효과를 나타내었다. 청국장 메탄올 추출물의 아세틸콜린에스테라이스 저해활성은 농도 의존적인 경향이었다. 본 연구 결과를 종합해 볼 때, 청국장 메탄올 추출물은 산화적 스트레스로부터 신경세포 보호효과 및 아세틸콜린에스테라이스 저해활성을 나타내어 알츠하이머성 신경질환의 예방을 위한 식품으로서의 활용 가능성이 높다고 판단된다.

감사의 글

본 연구는 2008과 2009년 정부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구(KRF-2008-521-F00074, NRF-2009-351-F00028) 결과로 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Yoon MY, Kim JY, Hwang JH, Cha MR, Lee MR, Jo KJ, Park HR. Protective effect of methanolic extracts from *Dendrobium nobile* Lindl. on H₂O₂-induced neurotoxicity in PC12 cells. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 50: 63-67 (2007)
2. Sagara Y, Dargusch R, Chambers D, Davis J, Schubert D, Mater P. Cellular mechanisms of resistance to chronic oxidative stress. Free Radical Bio. Med. 24: 1375-1389 (1998)
3. Lee YS. Antioxidative and physiological activity of extracts of *Angelica dahurica* leaves. Korean J. Food Preserv. 14: 78-86 (2007)
4. Kim DJ, Seong KS, Kim DW, Ko SR, Chang CC. Antioxidative effects of red ginseng saponins on paraquat-induced oxidative stress. J. Ginseng Res. 28: 5-10 (2004)
5. Ames BN. Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. Science 221: 1256-1264 (1983)
6. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidant, antioxidants, and the degenerative disease of aging. P. Natl. Acad. Sci. USA 90: 7915-7922 (1993)
7. Heo HJ, Choi SJ, Choi SG, Shin DH, Lee JM, Lee CY. Effects of banana, orange, and apple on oxidative stress-induced neurotoxicity in PC12 cells. J. Food Sci. 73: 28-32 (2008)
8. Yoon MY, Lee BB, Kim JY, Kim YS, Park EJ, Lee SC, Park HR. Antioxidant activity and neuroprotective effect of *Psoralea corylifolia* Linne extracts. Korean J. Pharmacogn. 38: 84-89 (2007)
9. Kim SH, Yang JL, Song YS. Physiological functions of *cheonggukjang*. Food Indus. Nutr. 4: 40-46 (1999)
10. Lee BY, Kim DM, Kim KH. Physico-chemical properties of viscous substance extracted from *cheonggukjang*. Korean J. Food Sci. Technol. 23: 599-604 (1991)
11. Kim JS. Current research trends on bioactive function of soybean. Korea Soybean Digest 13: 17-24 (1996)
12. Kim WK, Choi KH, Kim YT, Park HH, Choi JY, Lee YS, Oh HI, Kwon IB, Lee SY. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strain CK 11-4 screened from *cheonggukjang*. Appl. Environ. Microbiol. 62: 2482-2488 (1996)
13. Sato T, Yamada Y, Ohtani Y, Mitsui N, Murasawa H, Araki S. Efficient production of menaquinone by minadione resistant mutant of *Bacillus subtilis*. J. Ind. Microbiol. Biot. 26: 115-120 (2001)
14. Kim KY, Hahm YT. Recent studies about physiological functions of *cheonggukjang* and functional enhancement with genetic engineering. J. Genetic Engineer. Res. 16: 1-18 (2003)
15. Hong SW, Kim JY, Lee BK, Chung KS. The bacterial biological response modifier enriched *cheonggukjang* fermentation. Korean J. Food Sci. Technol. 38: 548-553 (2006)
16. Kwak CS, Kim MY, Kim SA, Lee MS. Cytotoxicity on human cancer cells and antitumorigenesis of *cheonggukjang*, a fermented soybean product, in DMBA-treated rats. Korean J. Nutr. 39: 347-356 (2006)
17. Yang JL, Lee SH, Song YS. Improving effect of powders of cooked soybean and *cheonggukjang* on blood pressure and lipid metabolism in spontaneously hypertensive rats. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 32: 899-905 (2003)
18. Kim YT, Kim WK, Oh HI. General microbiology, physiology and metabolism; Screening and identification of the fibrinolytic bacterial strain from *cheonggukjang*. Korean J. Microbiol. Biotechnol. 23: 1-5 (1995)
19. Anthony MS, Clarkson TB, Hughes JrCL, Morgan TM, Burke GL. Soybean isoflavones improve cardiovascular risk factors without affecting the reproductive system of peripubertal rhesus monkeys. J. Nutr. 126: 43-50 (1996)
20. Merz-DeMlow BE, Duncan AM, Wangen KE, Xu X, Carr TP, Phipps WR, Kurzer MS. Soy isoflavones improve plasma lipids in normocholesterolemic, premenopausal women. Am. J. Clin. Nutr. 71: 1462-1469 (2000)
21. Potter SM, Baum JA, Teng H, Stillman RJ, Shay NF, Erdman JrJW. Soy protein and isoflavones; Their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. Am. J. Clin. Nutr. 68: 1375-1379 (1998)
22. Ishida H, Uesugi T, Hirai K, Toda T, Nukaya H, Yokotsuka K, Tsuji K. Preventive effects of the plant isoflavones, daidzin, and genistin, on bone loss in ovariectomized rats fed a calcium-deficient diet. Biol. Pharm. Bull. 21: 62-66 (1998)
23. Choi HK, Lim YS, Kim YS, Park SY, Lee CH, Hwang KW, Kwon DY. Free-radical-scavenging and tyrosinase-inhibition activities of *Cheonggukjang* samples fermented for various times. Food Chem. 106: 564-568 (2008)
24. AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC Intl. 13th ed. 920.39, 934.01, 942.05, 954.01 and 974.06, Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA (1990)
25. Kim DO, Jeong SW, Lee CY. Antioxidant capacity of phenolic phytochemical from various cultivars of plums. Food Chem. 81: 321-326 (2003)
26. Choi SJ, Yoon KY, Choi SG, Kim DO, Oh SJ, Jun WJ, Shin DH, Cho SH, Heo HJ. Protective effect of *Acanthopanax senticosus* on oxidative stress induced PC12 cell death. Food Sci. Biotechnol. 16: 1035-1040 (2007)
27. Heo HJ, Cho HY, Hong BS, Kim HK, Kim EK, Kim BK, Shin DH. Protective effect of 4',5'-dihydroxy-3',6,7-trimethoxyflavone from *Artemisia asiatica* against A β -induced oxidative stress in PC12 cells. Amyloid 8: 194-201 (2001)
28. Ellman GL, Doutney KD, Andres V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination acetylcholinesterase activity. Biochem. Pharmacol. 7: 88-95 (1961)
29. Song HN, Jung KS. Quality characteristics and physiological activities of fermented soybean by lactic acid bacteria. Korean J. Food Sci. Technol. 38: 475-482 (2006)
30. Jeong CH, Choi SG, Heo HJ. Analysis of nutritional components and evaluation of functional activities of *Sara borealis* leaf tea. Korean J. Food Sci. Technol. 40: 586-592 (2008)
31. Lee JJ, Cho CH, Kim JY, Lee DS, Kim HB. Antioxidant activity of substances extracted by alcohol from *cheonggukjang* powder. Korean J. Microbiol. 37: 177-181 (2001)
32. Zhao B. Natural antioxidants protect neurons in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. Neurochem. Res. 34: 630-638 (2009)
33. Choi JH, Kim DI, Park SH, Baek SJ, Kim NJ, Cho WK, Kim KJ, Kim HS. Effects of pine needle ethyl acetate fraction on acetylcholine (ACh) and its related enzymes in brain of rats. Korean J. Nutr. 37: 95-99 (2004)
34. Heo HJ, Kim MJ, Suh YM, Choi SJ, Mun NS, Kim HK, Kim EK, Shin DH. Protective effects of daidzein on oxidative stress-induced neurotoxicity and scopolamine-mediated cognitive defect. J. Food Sci. 70: S91-S94 (2005)