

대두발효식품 Cerebroside의 구성성분 분석 및 비교

이은열 · 김희숙*

경성대학교 응용공학부 식품공학전공

Analysis and Comparison of Cerebroside Components from Soybean Fermented Foods

Eun Yeul Lee and Hee Sook Kim*

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

Abstract

Cerebroside fatty acids, sugars and long-chain sphingoid bases in raw soybean and soybean fermented foods (*chongkukjang* and *deunjang*) were analyzed using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and high-pH anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD). Fatty acids of acid-hydrolyzed cerebroside were derivatized to O-TMS methylester and analyzed. The major fatty acids in raw soybean and *chongkukjang* cerebroside were identified as 2-hydroxyhexadecanoic acid (16:0h), 2-hydroxydocosanoic acid (22:0h) and 2-hydroxytetracosanoic acid (24:0h). In the case of *deunjang* cerebroside, 24:0h (40.9%) and 22:0h (23.4%) were major fatty acids, but 16:0h, 23:0h, 25:0h and 26:0h were also detected. Long-chain sphingoid bases of acid-hydrolyzed cerebroside from raw soybean, *chongkukjang* and *deunjang* consisted primarily of 4-trans, 8-trans-sphingadienine (dihydroxy base, d18:2 $\Delta^{4\text{trans}, 8\text{trans}}$) and cis-trans isomers of 4-hydroxy-sphingene (trihydroxy base, t18:1 $\Delta^{4\text{trans or cis}}$) with much less amounts of phytosphingosine (t18:0) and isomers of sphingene (d18:1). Although *deunjang* is a soybean food fermented by fungi and microorganisms for a long period, 2-hydroxyoctadec-3-enoic acid (18:1h) and branched 9-methyl-4,8-sphingadienine known as compositional cerebroside fatty acids in *Aspergillus* species were not detected. Mass spectrum for sugar derivatives in cerebroside of soybean foods including raw soybean and fermented soybean showed that C-1 of glucose moiety was linked to ceramide backbone as like a monoglucosylceramide.

Key words: cerebroside, ceramide, sphingoid base, 2-hydroxy fatty acid

서론

Cerebroside란 ceramide에 당이 결합된 당지질로 glycosylsphingolipid 또는 glycosylceramide라고도 부른다. 사람의 경우, cerebroside와 sphingolipid의 대사에 관여하는 유전자의 결손 때문에 lysosome 내의 cerebroside 축적증이 많이 알려져 있다(1,2). 동물세포의 cerebroside는 주로 탄소 18개를 가진 shingosine(d18:1 $\Delta^{4\text{trans}}$) 및 sphinganine(d18:0)과 같이 장쇄염기인 sphingoid base와 탄소 16~26개의 장쇄지방산들이 amide 결합을 하고 있는 ceramide backbone에 galactose, glucose, mannose 및 sialic acid 등이 결합함으로써 cerebroside를 구성하고 있다(3,4). 반면에 식물에서 유래된 cerebroside의 경우 sphingosine이나 sphinganine은 아주 미량이며 4-hydroxysphingene(t18:1 Δ^8), phytosphinganine(t18:0), sphingadienine(d18:2 $\Delta^{4, 8}$) 및 sphingene(d18:1 Δ^8) 등이 장쇄지방산들과 amide결합을 하고 있는 ceramide backbone을 가진다고 하였다(5,6). 또한 ceramide와 cere-

broside의 지방산 조성을 보면 ceramide의 경우 2-hydroxyl기를 함유한 지방산이 70% 정도인 반면 cerebroside에는 90%이상이 2-hydroxyl기를 함유한 지방산으로 되어 있다고 하였으며, 식물의 종류 또는 부위에 따라서도 ceramide 및 cerebroside의 구성 sphingoid base, 지방산 및 당 등이 다른 것으로 분석되어 있다(7,8).

Ceramide, cerebroside 및 sphingomyelin 등 복합 sphingolipid들은 진핵세포의 조직에서 일반적으로 관찰되며 막구조, 세포-세포, 세포-matrix 상호관계, 성장과 분화에서의 역할, 그리고 항체, 세균들과 virus에 대한 수용체로서의 역할을 한다고 연구되었다(9,10). 최근의 연구들을 보면 sphingoid base들은 아주 강한 생리활성물질이고 배양된 세포에서 세포성장을 촉진시키거나 저해하기도 하고, 세포분화를 촉진시키거나 저해하기도 하며, apoptosis를 경유하여 죽게 하기도 한다는 연구들이 많이 보고되어 있다(11,12). 우유 또는 버터에서 정제한 sphingomyelin이 1,2-dimethylhydrazine (DMH)으로 대장암을 유발시킨 흰쥐의 암발생 및 종양의 악

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

성화를 저해하였다는 보고와 sphingomyelin이 소장에서 ceramide로 분해되어 대장세포에 흡수되며 흡수된 ceramide가 대장암세포의 증식을 저해할 것이라는 가설과 함께 sphingolipid가 세포내에서 강한 생리활성을 가지며 세포신호전달에서 중요한 역할을 할 것이라는 기대로 많은 연구들이 진행되고 있다(13,14). Dillehay 등(15)에 의하면 DMH로 대장암을 유도한 흰쥐에서 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 Sullards 등(16)은 밀이나 대두 cerebroside의 ceramide backbone이 동물뇌 sphingomyelin의 ceramide backbone보다 대장암세포에 높은 독성을 보였으며 식물 cerebroside 역시 우유, 버터 등과 같은 동물유래의 sphingolipid와 같이 생리활성이 높을 것이라고 주장하였다. 대두에는 sphingolipid가 2410 $\mu\text{mole/kg}$ 정도 있으며 주로 cerebroside 형태로 존재한다고 하였고 동물성식품인 우유(100 $\mu\text{mole/kg}$), 치즈(1320 $\mu\text{mole/kg}$), 달걀(2250 $\mu\text{mole/kg}$), 버터(460 $\mu\text{mole/kg}$) 등은 sphingomyelin이나 cerebroside의 형태로 함유하고 있어 세포의 생리활성에 관여한다고 하였다(17). 이상과 같이 식물 유래 cerebroside를 구성하는 sphingoid base, 지방산 및 당의 조성 및 그들의 비가 동물유래 cerebroside의 구성성분들과는 현저히 다르며 생체에 미치는 생리활성 역시 큰 차이를 보인다. 그러므로 본 연구에서는 대두와 우리나라 전통 대두 발효식품인 청국장 및 된장의 cerebroside를 확인하고자, 이를 분리정제하고 cerebroside를 구성하는 sphingoid base, 지방산 및 당을 분석, 비교하였다.

재료 및 방법

재료

실험에 사용한 대두, 청국장 및 된장 시료는 전보(18)에 사용한 시료와 같았다. 즉, 대두는 농협에서 구입한 국산 대두 2 kg을 잘 닦은 다음 분쇄기로 갈아 가루를 만들었으며 된장은 국산 대두로 제조한 메주로 담아 1년간 숙성시킨 시료를 동결건조한 후 분말화하였다. 청국장은 대두를 잘 세척한 다음 불려서 잘 무르게 고압솥으로 30분간 증자하였고 일반 가정집에서 띄우는 방법으로 짚을 군데군데 꽂은 다음 젖은 천을 씌운 후 항온기를 이용하여 40°C에서 3일간 발효시키고 동결건조하여 분말화하였다. 모든 시료들은 지질을 추출하기 전 autoclave에서 15분간 멸균함으로써 lipase 또는 protease 등의 효소를 불활성화시킨 다음 실험에 사용하였다.

지질추출 및 분획

효소를 불활성화시킨 대두, 청국장 및 된장시료 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(19)으로 정제하였다. 총지질에 약알카리인 0.4 N KOH/methanol용액을 가하여 37°C에서 glycerolipid를 가수분해한 다음 알카리성 증류수로 여러 번 세척하였다. 중성지질과 당지질을 분리하기 위하여 silica seppak cartridge(millipore, USA)를 이용한 Cahoon과 Lynch(20)의 방법을 약간 변형하여 사용하였다. 즉, 약알카리로 가수분해한 지질혼합물을 소량의 chloroform : acetic acid(99 : 1) 혼합용액으로 녹여 silica seppak cartridge에 가한 후 용출용매는 chloroform : acetic acid(99 : 1), chloroform : acetone(80 : 20), chloroform : acetone(60 : 40), acetone : acetic acid(100 : 1) 및 methanol 등을 사용하였으며 각각 16 mL, 14 mL, 36 mL, 6 mL 및 6 mL씩 순차적으로 지질을 용출하였다. 각각을 약 3 mL씩 tube에 받아 silica gel TLC로 cerebroside 분획을 확인하였다. 먼저 chloroform : methanol : water(60 : 35 : 8) 혼합용매로 원점에서 약 3.5 cm까지 전개한 다음 잘 건조하고 chloroform : methanol : acetic acid(90 : 2 : 8) 혼합용매로 TLC판의 끝에서 1 cm까지 전개하여 건조하였다. 건조된 TLC plate에 황산 및 orcinol-ferric chloride-황산시약을 분무하여 120°C에서 건조하여 cerebroside를 확인하였으며 cerebroside에 다른 물질이 혼합되어 있는 분획은 합하여 다시 한번 silica seppak cartridge를 이용하여 cerebroside를 정제하였다.

Cerebroside 구성지방산 분석

Cerebroside의 구성지방산을 분석하기 위하여 cerebroside 용액을 cap tube(13×100 mm)에 넣고 speed vac(Coldvac-80, Hanil, Korea)으로 완전 건조한 다음 5% HCl/anhydrous methanol을 가하고 80°C heat block에서 20시간 동안 가수분해하였다. Hexane 3 mL씩으로 구성지방산 methyl ester를 3회 추출한 다음 hexane층을 합하여 speed vac으로 완전 건조시켰다. α -hydroxyl기를 함유한 지방산 methyl ester를 분석하기 위하여 TMS시약(Sylon HTP, Supelco)으로 O-trimethylsilyl(TMS)유도체를 제조하였다. 생성된 지방산 methyl ester(FAME) 및 O-TMS 2-hydroxy FAME 유도체를 분리 동정하기 위하여 GC(GC-17A, Shimadzu, Japan)에 mass selective detector(MSD, QP-5000, Shimadzu, Japan)가 연결된 GC-MS를 사용하였다. 지방산 methyl ester 또는 O-TMS 유도체의 분리는 (50%-cyanopropyl)-methylpolysiloxane이 융합된 DB-WAX계인 DB23 capillary column(30 m×0.25 mm, ID 0.25 μm)을 이용하였고 carrier gas는 Ar gas, column 온도는 160°C에서 2분 유지한 후 205°C까지 1.5°C/min속도로 승온하고 10분 동안 유지하였으며 injector와 MSD inlet 온도는 240°C이었다. 검출 mass 영역은 40~600 mass unit이었으며 mass spectrum 동정은 내장된 Wiley 229 library와 Cahoon과 Lynch(20)의 보고를 참조하였다. 지방산의 조성비를 알기 위해서는 위와 같은 capillary column을 장착시킨 GC(GC-17AAFV3, Shimadzu, Japan)로 분석하고 area %로 계산하였다.

Cerebroside 구성당 분석

GC-MS로 cerebroside의 구성당을 분석하기 위한 시료를 제조하는데 있어 가수분해 조건은 구성지방산 분석하는 조건과 같았다. Hexane으로 지방산 methyl ester를 추출하고 남은 methanol층에 탄산은 가루를 가하여 중화시키고 무수 초산을 가하여 30°C에서 10시간 동안 놓아둔 다음 상층액을 완전히 건조시키고 TMS 시약을 넣어 N-acetyl-O-TMS 당 유도체를 만들었다. DB-23 capillary column을 연결한 GC-MS로 당유도체를 분리 동정하였으며 column 온도는 120°C에서 1분 유지, 120°C에서 240°C까지 2°C/min씩 승온하는 조건이었다. Injector와 MSD 온도는 240°C이었다. 유도체를 만들지 않고 분석한 경우 Bio-LC system을 사용하였다. 즉, TLC로 분리정제한 cerebroside에 2 M trifluoroacetic acid (TFA)를 가한 다음 100°C에서 4시간 동안 가수분해하고 speed vac에서 완전히 건조한 후 증류수로 녹여서 당 시료로 사용하였다. 당분석은 guard column(4×50 mm), CarboPax PA1 column(4.6×250 mm, Dionex, USA)과 pulsed amperometric detector(PAD)가 연결된 Bio-LC(DX-300, Dionex, USA)를 사용하였으며 16 mM NaOH 용액을 용출용매로 하여 1 mL/min 유속으로 20분 동안 분석하였다.

Cerebroside 구성 sphingoid base 분석

TLC로 정제한 cerebroside를 1 N HCl/aqueous methanol 용액으로 70°C에서 16시간 가수분해한 다음, 생성된 구성지방산 methyl ester를 hexane으로 제거하고 1 N KOH/methanol 용액으로 중화하였다(18). Speed vac으로 건조한 다음 acetic anhydride : methanol(1 : 4) 용액을 가하여 10시간 동안 실온에서 N-acetyl화하고 chloroform : methanol : H₂O(1 : 1 : 0.8, v/v/v)용액으로 녹인 다음 chloroform 층만을 완전 건조시켰다. N-acetyl sphingoid base 유도체에 TMS시약을 가하여 N-acetyl-O-trimethylsilyl sphingoid base유도체를 제조하였으며 GC-MS를 이용하여 분리 동정하였다. Column 온도는 180°C에서 2분 동안 유지한 다음 180°C에서 235°C까지 3°C/min로 승온시켰으며 235°C에서 15분간 유지하였다.

결과 및 고찰

대두, 청국장 및 된장으로부터 분리한 cerebroside의 silica gel TLC chromatogram은 Fig. 1과 같았다. 대두 cerebroside는 아래 band가 위 band보다 좀더 진하였으나 청국장 및 된장은 발효 중에 각각 아래 band 및 위 band가 사라지는 것을 알 수 있었다. 또한 된장의 경우에는 청국장에 비하여 cerebroside의 절대량이 많이 감소하였다. 대두의 cerebroside가 전개용매에 따라 silica gel TLC로 분리하면 Fig. 1과 같이 두 band가 나오는 것은 구성 지방산, sphingoid base 및 구성당의 조성 때문이다(4,21,22). 된장의 경우 오랜 기간 발효하는 중에 cerebroside가 많이 감소하였으므로 silica seppak cartridge로 분리하고 silica gel TLC로 정제하여 얻은 cere-

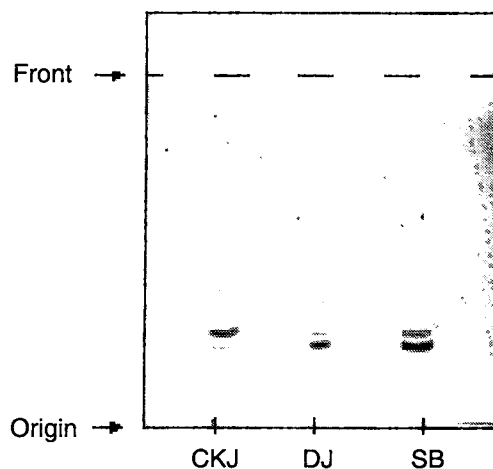


Fig. 1. TLC chromatogram for cerebroside fractions separated from raw soybean (SB), *chongkukjang* (CKJ) and *deunjang* (DJ) using silica seppak cartridge. Developed on silica gel G with solvent system I and II as mentioned on materials and methods and detected with orcinol-ferric chloride-sulfuric acid solution.

broside는 양이 적어 구성당 및 구성 sphingoid base의 분석 시 소량의 구성성분은 정확한 조성을 알 수 없었고 그 경향만을 관찰할 수 있었다.

Cerebroside 구성지방산 분석

대두, 청국장 및 된장 cerebroside의 구성지방산 methyl ester(FAME) 및 2-O-TMS FAME의 GC chromatogram은 Fig. 2와 같았으며 제일 많은 양을 차지하는 2-O-TMS

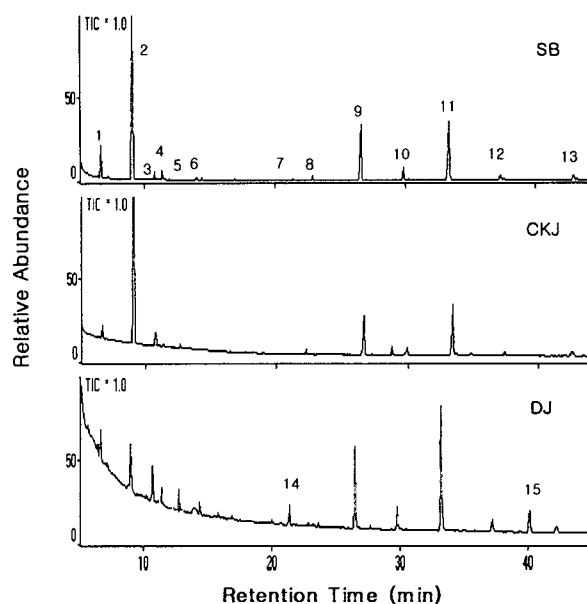


Fig. 2. Total ion chromatogram for fatty acid methyl ester and 2-hydroxy-O-TMS fatty acid methyl ester from cerebroside of soybean fermented food by GC-MS. Symbols SB, CKJ and DJ represents raw soybean, *chongkukjang* and *deunjang*. Peak numbers correspond to the fatty acids provided in Table 1.

hexadecanoic acid(16:0h, 2-hydroxy hexadecanoic acid methyl ester)의 mass spectrum은 Fig. 3과 같았다. 가수분해된 cerebroside의 지방산을 동정할 때 Fig. 3에서와 같이 정상 fatty acid에서는 M⁺ fragment로 동정하였지만 2-hydroxy fatty acid에서는 M⁺-59, M⁺-15 및 M⁺ fragment의 m/z로 동정하였다. 또한 대두 및 청국장 cerebroside의 지방산 조성비는 Table 1과 같았다. 청국장 발효 중 지방산 조성에는 약간의 변화가 있었는데 2-hydroxy hexadecanoic acid(16:0h)가 52.2%에서 62.0%로, 2-hydroxydocosanoic acid(22:0h) 및 hydroxytetracosanoic acid(24:0h)는 각각 17.2%에서 15.0%, 17.6%에서 16.2%로 조성비가 변화하였다. 그러나 된장의 경우 cerebroside의 절대량은 대두 및 청국장에 비하여 많은 감소를 보였으며 지방산의 조성에도 많은 변화가 있었다. 된장 cerebroside의 지방산 조성을 보면 대두 및 청국장 cerebroside에서 가장 많았던 16:0h는 10.2%로 많은 감소를 보였으나 오히려 22:0h 및 24:0h는 23.4% 및 40.9%를 차지하였는데 이는 오랜 기간의 된장발효 중 일어난 변화라 생각된다. 또한 대두와 청국장의 경우와는 달리 된장의 지방산 methyl ester chromatogram에서 분리된 14번과 15번

peak는 1,2-dibutylphthalate와 1,2-dioctylphthalate들로 pre-coated silica gel TLC를 이용한 물질분리에서 항상 나타나는 peak들이다. 된장에서만 나타난 이유는 정제된 된장 cerebroside의 시료가 적은 양이었으므로 농축된 시료를 GC-MS에서 분리한 경우 TL plate로부터 오염된 peak 14와 peak 15가 나타난 것으로 보인다. Toledo 등(23)은 *Paracoccidioides brasiliensis*, *Aspergillus fumigatus* 및 *Aspergillus versicolor* 등 fungi의 cerebroside에서는 2-hydroxyoctadecanoic acid(18:1h Δ^{3trans})가 주요 구성지방산(20~90%)이라고 하였으며, Fujino와 Ohnishi(24)는 *Aspergillus oryzae*의 cerebroside에서도 2-hydroxyoctadecanoic acid(18:0h) 및 18:1h Δ^{3trans} 가 주요 지방산이며 사람들에게 일으키는 곰팡이 유래 질병을 진단하는 지표로 쓰인다고 하였다(23,25). 그러나 이 실험에서 사용한 된장의 cerebroside에서는 18:0h 및 18:1h Δ^{3trans} 는 발견되지 않았다. Ohnishi 및 Fujino(5)는 잘 익은 대두의 cerebroside에는 16:0h가 전체의 79%, 22:0h 및 24:0h가 5% 및 9%, 16:0 및 18:0은 4% 및 2%가 함유되어 있다고 하였다. 그러나 호밀잎의 cerebroside에는 2-hydroxynervonic acid(24:1h) 및 2-hydrolylignoceric acid(24:0h)가 52.5% 및 12.4%가 함유되어 있었으며(20), 밀의 cerebroside에는 20:0h가 42.4%, 16:0h가 37.9% 존재한다고 하였다(26). 또한 일본현미 cerebroside의 구성지방산은 20:0h가 45% 이상이고 24:0h가 25% 이상인 반면 16:0h는 거의 존재하지 않았다고 하였다(8). 이와 같이 식물세포의 cerebroside에는 2-hydroxy 지방산이 정상지방산에 비하여 많은 양 존재하지만 지방산의 조성비는 아주 다른 것을 알 수 있다.

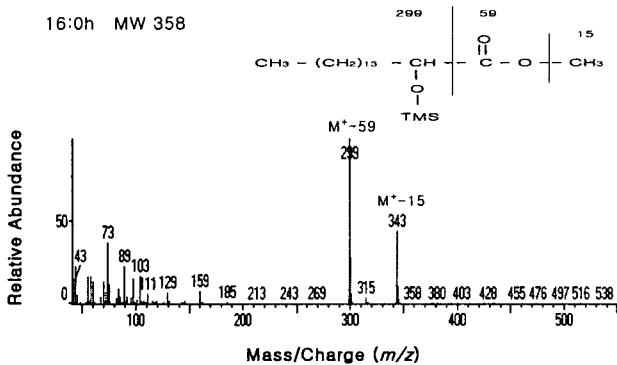


Fig. 3. Mass spectral fragmentation pattern for a cerebroside 2-hydroxy fatty acid O-TMS methyl ester derivatives, 2-hydroxyhexadecanoic acid (16:0h).

Table 1. Fatty acid composition of cerebrosides from fermented soybean foods (area %)

Fatty acid	Peak No.	Raw soybean	Chongkukjang	Deunjang
16:0	1	6.9	1.2	2.2
18:0	3	1.5	1.5	4.3
18:1	4	0.3	0.5	1.2
18:2	5	ND	ND	1.6
16:0h	2	52.2	62.0	10.2
18:0h	6	0.2	ND	0.6
20:0h	7	0.2	0.2	0.2
21:0h	8	0.8	ND	0.2
22:0h	9	17.2	15.0	23.4
23:0h	10	1.5	0.9	7.1
24:0h	11	17.6	16.2	40.9
25:0h	12	1.1	1.2	5.0
26:0h	13	1.2	1.3	3.1
normal/ α -hydroxy		8.0/92.0	3.2/96.8	9.3/90.7

Cerebroside 구성당 분석

Silica gel TLC로 정제한 cerebroside의 구성당을 acetylation 및 TMS화하여 GC로 분리한 chromatogram은 Fig. 4와

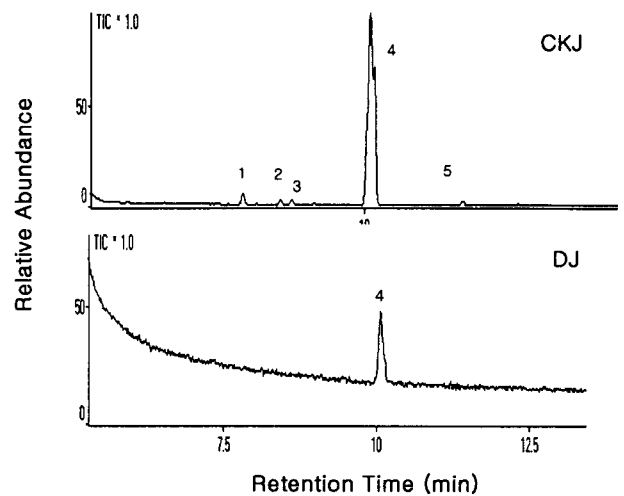


Fig. 4. Total ion chromatogram for N-acetyl-O-TMS-sugar derivatives from soybean fermented foods by GC-MS. Symbol CKJ and DJ are same as Fig. 1.

같았으며 peak 4의 mass spectrum pattern은 Fig. 5와 같았다. 또한 TLC로 분리하기 전 silica seppak cartridge로 분리한 cerebroside 분획을 가수분해하여 당유도체를 GC-MS로 분석한 경우에도 Fig. 5와 같은 methyl 2,3,4,6-tetra-O-TMS- α -D-glucopyranoside(peak 4)가 94~97% 들어있는 것으로 나타났으므로 대두, 청국장 및 된장 cerebroside들의 당은 주로 1번 탄소가 ceramide backbone에 결합되어 있는 monoglucosylceramide일 것으로 추정할 수 있었다. 또한 Fig. 4의 작은 peak들(peak 1, 2, 3, 5 등)도 MSD로 분석한 결과 mass spectrum pattern이 galactopyranoside, glucofuranoside 및 mannofuranoside 등으로 동정되었으며 N-acetylation된 아미노당의 peak는 동정되지 않았으므로 정확한 조성비를 알기 위하여 LC분석을 하였다. 중성당 분석조건인 TFA로 청국장 cerebroside를 가수분해하였으며 HPAEC-PAD로 분석한 결과는 Fig. 6와 같았다. 대두 및 청국장 cerebroside의 당 조성비는 glucose는 99.6~99.8%, galactose는 0.2~0.4%로 나타났으며 된장 cerebroside의 경우에도 GC-MS로 분석한 경우 2,3,4,6-tetramethylsilylglucose peak만 나타났(Fig. 4 DJ). 밀(26), 쌀(7) 및 호밀(20) 등 대부분 식물들 cerebroside들은 당이 여러 개 결합하여 mono-, di-, tri- 및 tetraglycosylceramide 등으로 되어 있다고 하였는데 당이 하나인 경우 glucose 또는 mannose가 결합되어 있으며 2번째 당부터는 mannose들이 결합되어 있는 반면 동물 cerebroside에는 glucose, galactose, mannose 및 sialic acid 등이 결합

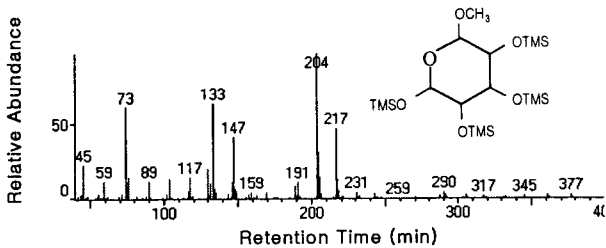


Fig. 5. Mass spectral fragmentation pattern for a cerebroside O-TMS sugar derivative from *chongkukjang*. Shown is the mass spectrum of methyl-2,3,4,6-tetra-O-TMS-glucopyranoside.

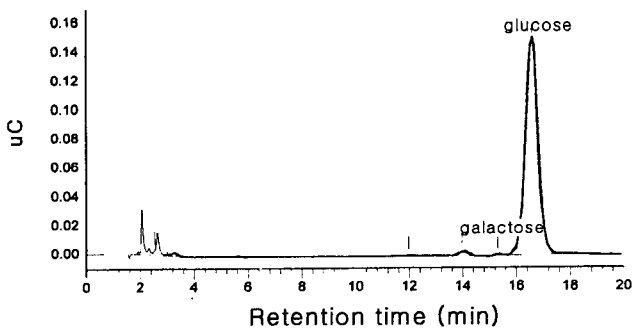


Fig. 6. Isocratic separation of neutral sugars derived from *chongkukjang* cerebroside on the CarboPac Pal column. Eluent was 16 mM NaOH and flow rate was 1 mL/min.

되어 있는 것으로 보고되었다(4). 또한 *Aspergillus* 속의 monoglycocerebroside들은 glucose로만 되어 있는지 glucose와 mannose가 1:1로 혼합되어 있다고 하였다(25).

Cerebroside sphingoid base 분석

대두, 청국장 및 된장 cerebroside를 구성하고 있는 sphingoid base들의 N-acetyl-O-TMS 유도체를 제조하여 GC로 분석한 chromatogram은 Fig. 7과 같았으며, 그 조성은 Table 2와 같았고 그 중 4-hydroxy-8-sphingenine(t18:1 Δ ^{8trans or cis}, peak 4) 및 trans-4, trans-8-sphinga dienine(d18:2 Δ ^{4trans, 8trans}, peak 6)의 mass spectrum은 Fig. 8과 같았다. 대두 cerebroside의 sphingoid 조성을 보면 d18:2 중에서도 d18:2 Δ ^{4trans, 8trans}가 59.9%로 가장 많았으며 다음은 t18:1 Δ ^{8trans or cis}가 20.9%이었는데 청국장 cerebroside의 경우 t18:1 Δ ^{8trans or cis}와 d18:2 Δ ^{4trans, 8trans}이 각각 44.5% 및 35.9%이었다. 된장 cerebroside의 경우에도 시료양이 적어 소량의 sphingoid는 검출되지 않았으나 t18:1 Δ ^{8trans or cis}와 d18:2 Δ ^{4trans, 8trans}의 함량이 비슷하다는 것은 알 수 있었다. 또한 이 실험에서는 t18:1 Δ ^{8trans} 및 t18:1 Δ ^{8cis}의 peak를 분리할

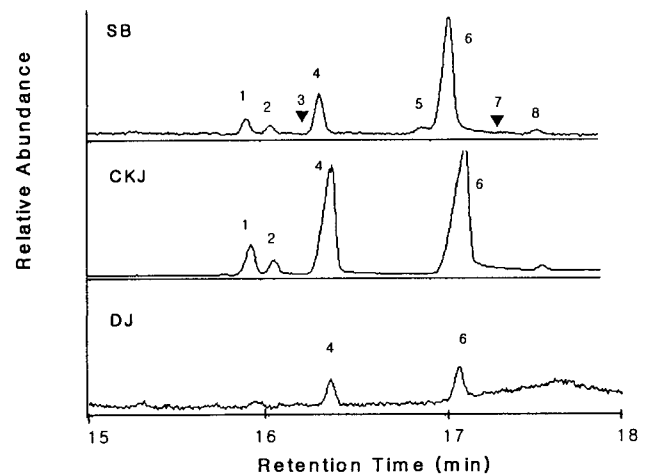


Fig. 7. Total ion chromatogram for N-acetyl-O-TMS long-chain sphingoid base derivatives obtained from acid hydrolysis of purified cerebroside on TLC.

Symbols SB, CKJ and DJ are the same as Fig. 1. Peak numbers correspond to the sphingoid base identification provided in Table 2.

Table 2. Long-chain sphingoid base composition of cerebroside from fermented soybean foods (area %)

Sphingoid base	Peak No.	Raw soybean	<i>Chongkukjang</i>
d18:0	7	ND	ND
d18:1 Δ ^{4trans}	5	4.7	ND
d18:1 Δ ^{8trans or cis}	8	2.3	4.6
d18:2 Δ ^{4trans, 8cis}	1	7.3	9.0
d18:2 Δ ^{4cis, 8trans}	2	4.9	6.0
d18:2 Δ ^{4trans, 8trans}	6	59.9	44.5
t18:0	3	ND	ND
t18:1 Δ ^{8trans or cis}	4	20.9	35.9
dihydroxy/trihydroxy		79.1/20.9	64.2/35.9

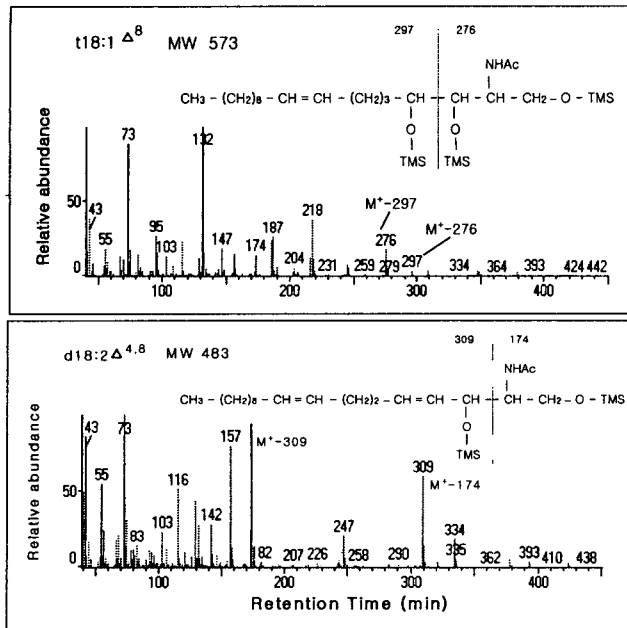


Fig. 8. Mass spectral fragmentation pattern for cerebroside N-acetyl-O-TMS sphingoid base derivatives, trihydroxy-sphinganine and dihydroxysphingadienine.

수 없었으므로 조성비를 계산할 때 그 함으로 하였다. 그리고 대두, 청국장 및 된장 cerebroside 모두에서 phytosphingosine (t18:0), sphingosine(d18:1 Δ^{4trans}) 및 sphinganine(d18:0)은 거의 검출되지 않았다. Fujino와 Ohnishi(24)는 *Aspergillus oryzae*의 cerebroside에 17-methyl sphingadienine이 주요 성분으로 들어있으며 Boas 등(25)은 *Aspergillus* 속의 cerebroside에 9-methyl-4,8-sphingadienine이 주요성분이라고 하였으나 대두발효식품인 청국장이나 된장에서는 가지달린 sphingoid base가 분리되지 않았다. Ohnishi와 Fujino(5)는 대두 cerebroside를 가수분해하여 얻은 sphingoid 혼합물을 sodium periodate로 지방산 aldehyde를 만들어 GC-MS로 분석하였으며 d18:2 $\Delta^{4trans, 8trans}$ 는 69%, t18:1 Δ^{8trans} 는 10%, t18:1 Δ^{8cis} 는 7%, d18:2 $\Delta^{4trans, 8cis}$ 는 9%가 함유되어 있다고 하였다. 그러나 밀 monoglycosylceramide의 경우(26), d18:1 Δ^{8cis} 가 47%, d18:1 Δ^{8trans} 가 24%, d18:2 $\Delta^{4trans, 8cis}$ 는 13%, d18:0은 9% 함유되어 있다고 하였으며 쌀 monoglycosylceramide의 경우(7) d18:2 $\Delta^{4trans, 8cis}$ 는 64.9%, d18:2 $\Delta^{4trans, 8trans}$ 는 18.3%, t18:1 Δ^{8trans} 는 11.0%의 sphingoid base들로 구성되어 있다고 보고한 바 있다.

Sullards 등(16)은 사람의 대장암세포를 배양한 실험에서 동물의 뇌 ceramide(sphingomyelin의 효소분해물로 주로 d18:4 Δ^4 를 함유함)에 비하여 대두나 밀 ceramide(cerebroside의 효소분해물)가 세포독성이 더 강하다고 하였으며 이는 d18:2 $\Delta^{4, 8}$ 또는 t18:1 Δ^8 등의 sphingoid가 d18:4 Δ^4 보다 독성이 더 강한 때문이라고 하였다. 이와 같이 식물 cerebroside들은 동물식품에서 얻은 sphingolipid들과 같거나 그 이상의 생리활성을 가질 것으로 기대할 수 있다.

요 약

대두 및 대두발효식품인 청국장과 된장의 cerebroside 구성성분인 지방산, 당 및 장쇄 sphingoid base들을 GC-MS로 분석하였다. Cerebroside 산-가수분해물의 지방산들을 O-TMS methylester 유도체로 만들어 분석하였으며 대두 및 청국장의 경우 2-hydroxyhexadecanoic acid(16:0h)가 각각 52.2% 및 62.0%로 가장 많았고 2-hydroxydocosanoic acid(22:0h) 및 2-hydroxytetracosanoic acid(24:0h)도 15.0~17.6%이었다. 그러나 된장의 경우 16:0h는 10.2%로 많은 감소를 보인 반면 24:0h는 40.9%, 22:0h는 23.4%이었으며 23:0h, 25:0h 및 26:0h도 대두 및 청국장에 비하여 많았다. Cerebroside 산-가수분해물의 장쇄 sphingoid base들은 N-acetyl-O-TMS 유도체로 분석하였으며 대두 및 청국장에서 4-trans, 8-trans-sphingadienine(d18:2 $\Delta^{4trans, 8trans}$)는 59.9% 및 44.5%이었으며 4-hydroxy-8-trans, cis-sphinganine (t18:1 Δ^{8trans} or cis)는 20.9% 및 35.9% 이었고 된장 cerebroside 역시 d18:2 $\Delta^{4trans, 8trans}$ 와 t18:1 Δ^{8trans} or cis가 가장 많았다. 그러나 phytosphingosine(t18:0) 및 sphingosine 이성질체(d18:1)들은 거의 보이지 않았다. 또한 된장의 경우 오랜 기간 미생물들에 의하여 발효되었지만 *Aspergillus* 속들의 cerebroside가 가지는 것으로 알려진 2-hydroxyoctadec-3-enoic acid(18:1h) 및 9-methyl-4,8-sphingadienine 등은 발견되지 않았다. 대두, 청국장 및 된장 cerebroside의 당유도체 mass spectrum 분석 결과 99%이상이 glucose 1번 탄소가 ceramide backbone에 결합된 monoglucocerebroside인 것으로 나타났다.

감사의 말

이 논문은 1999년도 한국학술진흥재단의 연구비(KRF-99-041-D00458)에 의하여 지원되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Kolter T, Doering T, Wilkening G, Werth N, Sandhoff K. 1999. Recent advances in the biochemistry of glycosphingolipid metabolism. *Biochem Soc Transact* 27: 409-415.
2. Kolter T, Sanhoff K. 1999. Sphingolipids-their metabolic pathways and the pathobiochemistry of neurodegenerative disease. *Angew Chem Int Ed* 38: 1532-1568.
3. Merrill AH Jr, Liotta DC, Ronald TR. 1996. Fumonisin : fungal toxins that shed light on sphingolipid function. *Trans in Cell Biology* 6: 218-223.
4. Karlsson KA, Samuelsson BE, Steen GO. 1973. Separation of monoglycosylceramides (cerebrosides) of bovine kidney into subgroups and characterization by mass spectrometry. *Biochim Biophys Acta* 306: 317-328.
5. Ohnishi M, Fujino Y. 1982. Sphingolipids in immature and mature soybeans. *Lipids* 17: 803-810.
6. Ohnishi M, Fujino Y, Ito S. 1980. Structure and composition of plant sphingosine. *Proc Jpn Con Biochem Lipids* 22:

- 379-382.
7. Fujino Y, Ohnishi M, Ito S. 1985. Molecular species of ceramide and mono-, di-, tri- and tetraglycosylceramide in bran and endosperm of rice grains. *Agric Biol Chem* 49: 2753-2762.
 8. Mano Y, Kawaminami K, Kojima M, Ohnishi M, Ito S. 1999. Comparative composition of brown rice lipids of Indica and Japonica rices. *Biosci Biotechnol Biochem* 63: 619-626.
 9. Merrill AH Jr, Schmelz EM, Dillehay DL, Sphiegel S, Shayman JA, Schroeder JJ, Riley RT, Voss KA, Wang E. 1997. Sphingolipids - the enigmatic lipid class. *Toxicol Appl Pharmacol* 142: 208-225.
 10. Hakomori S. 1981. Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation and oncogenesis. *Annu Rev Biochem* 50: 733-764.
 11. Hannun YA, Lincardic CM. 1993. Sphingolipid breakdown products: anti-proliferative and tumor-suppressor lipids. *Biochim Biophys Acta* 1154: 223-236.
 12. Bell RM, Hannun YA, Merrill AH Jr. 1993. Sphingolipids, Part A : Functions and breakdown products. In *Advances in lipid research*. Academic Press, San Diago, CA. Vol 25, p 336-365.
 13. Schmelz EM, Dillehay DL, Webb SK, Reiter A, Adams J, Merrill AH Jr. 1996. 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.
 14. Schmelz EM, Dombink-Kurtman MA, Roberts PC, Kozutsumi Y, Kawasaki T, Merrill AH Jr. 1998. Induction of apoptosis by fumonisin B1 in HT29 cells is mediated by the accumulation of endogenous free sphingoid bases. *Toxicol Appl Pharm* 148: 252-260.
 15. Dillehay DL, Webb SJ, Schmelz EM, Merrill AH Jr. 1994. Dietary sphingomyelin inhibits 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in CF1 mice. *J Nutr* 124: 615-620.
 16. Sullards MC, Lynch DV, Merrill AH Jr, Adams J. 2000. Structure determination of soybean and wheat glucosylceramides by tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 35: 347-353.
 17. Vesper H, Schmelz EM, Nikolova-Karakashian MN, Dillehay DL, Lynch DV, Merrill AH Jr. 1999. Sphingolipids in food and the emerging importance of sphingolipids to nutrition. *J Nutr* 129: 1239-1250.
 18. Song SK, Kim KH, Kim HS. 2001. Cytotoxic effects and components of lipid fractions from soybean products on cancer cell lines. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30: 1266-1271.
 19. Folch J, Lee M, Sloan-Stanly HS. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497-509.
 20. Cahoon EB, Lynch DV. 1991. Analysis of glucocerebrosides of Rye leaf and plasma membrane. *Plant Physiol* 95: 58-68.
 21. 藤野安彦. 1980. 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.
 22. Kean EL. 1996. Separation of gluco- and galactocerebrosides by means of borate thin-layer chromatography. *J Lipid Res* 7: 449-452.
 23. Toledo MS, Levery SB, Straus AH, Suzuki E, Momany M, Glushka J, Moulton JM, Takahashi HK. 1999. Characterization of sphingolipids from mycopathogens: factors correlating with expression of 2-hydroxy fatty acyl (E)-delta-3-unsaturation in cerebroside of *Paracoccidioides brasiliensis* and *Aspergillus fumigatus*. *Biochemistry* 38: 7294-7306.
 24. Fujino Y, Ohnishi M. 1976. Structure of cerebroside in *Aspergillus oryzae*. *Biochim Biophys Acta* 486: 161-171.
 25. Boas MH, Egge H, Pohlenta G, Hartmann R, Bergter EB. 1994. Structural determination of N-2'-hydroxyoctadecenoyl-1-O-beta-D-glucopyranosyl-9-methyl-4,8-sphingadienine from species of *Aspergillus*. *Chem Phys Lipids* 70: 11-19.
 26. Fujino Y, Ohnishi M. 1983. Sphingolipids in wheat grain. *J Cereal Sci* 1: 159-168.

(2002년 1월 22일 접수; 2002년 3월 28일 채택)