

된장, 청국장 및 미소추출물의 Hyaluronidase 저해활성

안선경 · 홍광원[†]

동국대학교 식품공학과

Hyaluronidase Inhibitory Activity of Extracts from Doenjang, Chungkookjang and Miso

Sun Kyung Ahn and Kwang Won Hong[†]

Dept. of Food Science and Technology, University of Dongguk, Seoul 100-715, Korea

Abstract

The inhibitory effects of water and methanol extracts of Doenjang, Chungkookjang and Miso on bovine hyaluronidase were examined. The extracts were vacuum-dried and the resulting pellets were dissolved with 0.1 M acetate buffer with 1% DMSO to a final concentration of 50 mg/mL. The water extracts of Doenjang, Chungkookjang and Miso inhibited 62%, 70%, 56% of hyaluronidase activity, respectively, while the extract of crushed soybean inhibited 24% of the activity. Under the same condition, disodiumcromoglycate known as an anti-allergic drug inhibited 46% of hyaluronidase activity at the concentration of 0.35 mg/mL as a positive control. Also the methanol extracts of Doenjang, Chungkookjang and Miso inhibited 48%, 52%, 70% of hyaluronidase activity, respectively, while the extract of crushed soybean inhibited 46% of the activity. After heat treatment of the water extracts of Doenjang, Chungkookjang and Miso at 100°C for 10 min, hyaluronidase inhibitory effects of them were reduced approximately to half. However, hyaluronidase inhibitory effects of methanol extracts were maintained well even after heat treatment.

Key words: Doenjang, Chungkookjang, Miso, hyaluronidase

서 론

식품 중에는 생체의 대사조절 기능에 관여하는 여러 가지 물질들이 존재하며 최근 이러한 생리활성을 가진 물질을 식품의 원료 또는 식품으로부터 탐색하거나 분리하여 그 기능을 해석하고 기능성 소재로 활용하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 대표적인 식물자원인 대두는 항암작용, 항고혈압 활성, 혈중콜레스테롤 저하, 항산화작용 등 여러 생리활성을 갖는 성분들을 다양하게 함유하여 기능성 식품의 좋은 소재로 활용될 수 있다(1-3). 이러한 대두를 발효시켜 만든 된장의 경우 알려진 다양한 생리활성기능 이외에도 민간요법으로 벌레에 물리거나 쏘여서 생긴 독을 풀어주는 것으로 전해져 왔다.

염증은 몸의 어떤 부분이 붉어지면서 붓고, 열이나 통증, 기능 장애 등을 일으키는 것을 말하며 염증을 유발하는 요인은 여러 가지 요인이 있으나 미생물 감염에 의한 유발 및 자가 면역 질환에 의한 염증 유발이 주원인으로 알려져 있다(4,5). 체내에서 염증반응이나 혈관 투과성에 관여하는 hyaluronidase는 선형의 glycosaminoglycan 중합체인 hyaluronic acid의 glucuronic acid와 N-acetylglucosamine의 β -

1,4 결합을 절단한다(6). Hyaluronic acid는 extracellular matrix의 주요 구성분 중의 하나로서 주로 뇌, 근육, 연결조직, 탯줄, synovial fluid, 연골 등에서 흔히 존재하고, 신체에 있는 hyaluronic acid의 50% 이상은 피부에서 발견된다(7). 고분자의 hyaluronic acid는 염증 형성의 중요 요인인 macrophage의 phagocytic ability를 저해하고 hyaluronic acid의 분해산물 혹은 저분자의 hyaluronic acid는 상처 치유 과정에서 inflammation, fibrosis, collagen deposition을 증가시킨다. 또한 hyaluronidase는 disodiumcromoglycate(DSCG)를 비롯한 여러 항알레르기 또는 항염증 약물에 의해 그 활성이 억제되는 것으로 알려져 있다(8). 그러므로 hyaluronidase의 활성저해는 hyaluronic acid의 분해를 억제시켜 항염증 및 항알레르기 효과를 기대할 수 있으며(9,10), hyaluronidase 저해활성 검색은 현재 항알레르기 활성의 *in vitro* 검색법 중의 하나로 이용되어 지고 있다(8). Hyaluronidase의 inhibitor는 동물의 serum에 존재하는 plasma protein인 inter- α -inhibitor complex(11)와 urine에 존재하는 kallikrein(12) 그리고 heparin(13) 등이 알려져 있다. 또한 식물에서는 flavonoids(14), tannins(15), hydragenols(16), glycyrrhizin(17) 등이 hyaluronidase 저해효과를 나타내는 것

[†]Corresponding author. E-mail: hkwon@dongguk.edu
Phone: 82-2-2260-3369, Fax: 82-2-2285-3988

으로 보고되었다.

본 연구에서는 우리나라의 대두발효식품인 된장과 청국장 그리고 일본의 대두발효식품인 미소로부터 물 및 MeOH 추출물을 구한 후 hyaluronidase 저해활성을 조사함으로써 대두발효식품의 hyaluronidase 저해활성 존재여부를 확인하고 항염증효과 가능성을 탐색하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

대두와 청국장, 된장 그리고 미소는 시중에서 판매되고 있는 제품 중 각각 3가지를 구입하여 실험에 사용하였다. Hyaluronidase(EC 3.2.1.35, Type I-S from Bovine testes), hyaluronic acid sodium salt(from rooster comb) 및 disodiumchromoglycate(DSCG)는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, USA)사의 제품을 사용하였다.

시료 추출물의 제조

된장, 청국장 및 미소 시료는 시료무게의 5배의 물 또는 MeOH을 가하여 2시간 동안 추출하였다. 비교실험을 위해 대두는 12시간 동안 물에 불려 파쇄한 후에 발효식품시료와 동일한 조건으로 추출하였다. 추출액은 4°C에서 13,000 rpm으로 20분간 원심분리한 후, 상등액을 Whatman NO.41을 사용하여 여과한 후 여과액 1 mL을 취하여 감압건조를 하였다. 건조된 추출잔사는 1% dimethyl sulfoxide(DMSO)가 첨가된 0.1 M acetate buffer(pH 7.4)에 최종농도가 50 mg/mL가 되도록 녹여 시료액으로 사용하였다.

Hyaluronidase 저해활성 측정

Hyaluronidase의 저해활성은 Morgan-Elson assay 방법을 사용하였다(10). 각 시료의 물과 MeOH 추출물의 저해활성은 hyaluronic acid가 hyaluronidase에 의해 분해되어 생성되는 *N*-acetylglucosamine을 *p*-dimethylaminobenzaldehyde(DMAB)를 이용하여 585 nm에서 비색 정량하였다.

Hyaluronidase powder를 0.1 M acetate buffer(pH 3.5)에 녹인 효소용액(7,900 units/mL) 50 μ L를 시료용액(50 mg/mL) 50 μ L와 함께 혼합하여 37°C 수조에서 20분간 반응시켰다. 음성대조군으로 시료용액 대신 물을 넣고 동일한 조건에서 반응시켰다. 그 후 12.5 mM의 CaCl₂ 100 μ L를 가하여, 다시 37°C 수조에서 20분간 반응시켰다. 불활성 상태의 hyaluronidase는 Ca²⁺에 의해 활성화된다. 활성화된 hyaluronidase 용액에 0.1 M acetate buffer(pH 3.5)에 녹인 hyaluronic acid(2.4 mg/mL) 250 μ L를 첨가하여 다시 수조에서 40분간 반응시켰다. 그 후 0.4 N-NaOH 10 μ L와 0.4 M potassium tetraborate 용액 100 μ L를 반응액에 가하여 끓는 물에서 3분간 가열처리한 후, 상온에서 냉각시켰다. 냉각된 반응액에 DMAB 시약(*p*-dimethylaminobenzaldehyde 4 g, 100% acetic acid 350 mL, 10 N-NaOH 50 mL) 3 mL을 가한 후, 이 반응액을 37°C 수조에서 20분간 반응시켰다. 그 후 분광광도계를 이용하여 585 nm에서 흡광도를 측정하고 저해활성은 다음의 식을 통해 구하였다.

$$\text{Hyaluronidase inhibition (\%)} = \frac{(\text{OD}_c - \text{OD}_s)}{\text{OD}_c} \times 100$$

OD_c(optical density)는 585 nm에서 시료액을 첨가하지 않은 대조군의 흡광도이고, OD_s는 시료액을 첨가하여 측정된 흡광도이다. 양성대조군으로는 항알레르기 약물로 이용되는 DSCG를 이용하였으며, 각 실험은 3회 반복하여 평균치를 구하였다.

결과 및 고찰

사용량에 따른 hyaluronidase 저해활성

시료 추출물의 사용량이 hyaluronidase 저해활성에 미치는 영향을 조사하기 위해 대두와 된장의 물 추출물을 각각 20, 40, 60 및 80 μ L 사용하여 hyaluronidase 저해활성을 측정하였다. Fig. 1의(A)에서 보는 바와 같이 물에 불린 대두의

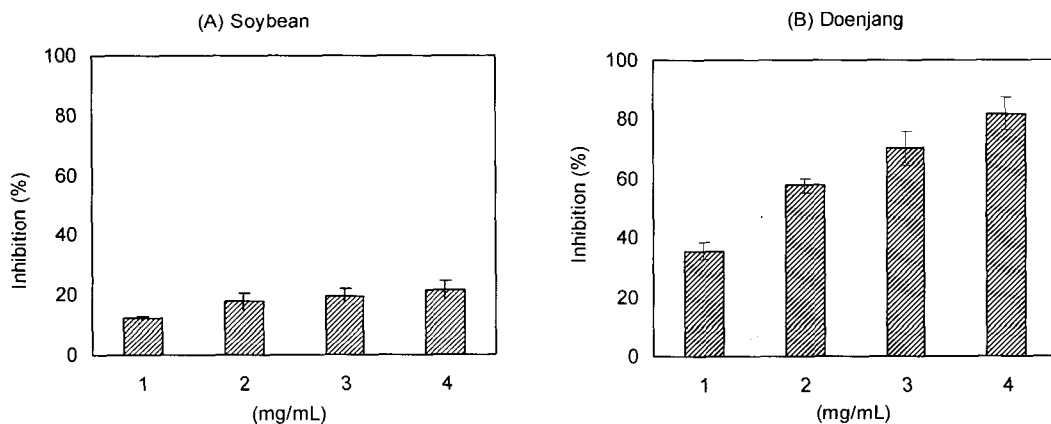


Fig. 1. Dose-dependent inhibition on hyaluronidase activity by the water extract of soybean (A) and Doenjang (B).

물 추출액은 사용량의 증가에 비례하여 hyaluronidase의 활성을 저해하지 못하였다. 또한 물에 불린 대두에서 효소와 같은 단백질에 의한 저해효과를 최소화하기 위해 대두를 삶은 후 동일한 조건하에서 추출한 시료액도 유사한 결과를 나타냈다(data not shown). 식물 중 박하의 열수 추출물에서 얻어진 당단백질이 hyaluronidase 저해효과를 가지며 이 당단백질을 단백질 가수분해효소로 분해하면 그 hyaluronidase 저해활성이 소실된다는 보고가 있으나(18), 대두의 경우 수용성 물질이 hyaluronidase를 저해한다는 보고는 잘 알려져 있지 않다.

그러나 된장의 물 추출액은 사용량을 최대 4배까지 증가 시킴에 따라 hyaluronidase 저해활성이 35%에서 82%까지 비례적으로 증가함으로서(Fig. 1B), 물 추출물의 경우 대두의 원료성분 자체보다는 된장의 제조과정 중에 생성되는 물질에 의한 저해효과가 더 큰 것으로 나타났다.

된장, 청국장 및 미소의 추출물들에 의한 hyaluronidase 저해활성

대두 발효식품인 된장, 청국장 및 미소의 물 추출물에 의한 hyaluronidase 저해활성을 측정하기 위해 각각 50 μL의 시료액을 사용하였다(Fig. 2). 추출물에 의한 저해활성을 비교하기 위하여 물에 불린 대두의 시료액과 항알레르기 약물로 알려진 disodiumcromoglycate(0.35 mg/mL)를 대조군으로 각각 50 μL 사용하였다. 대두원료는 hyaluronidase의 활성을 24% 저해하였으며 양성 대조약물인 disodiumcromoglycate는 활성을 46% 저해하였다. 각기 다른 된장 시료액인 D1, D2 및 D3의 경우 hyaluronidase의 활성을 각각 62%, 56%와 48% 저해하였다. 청국장 시료액인 C1, C2 및 C3의 경우 hyaluronidase의 활성을 각각 70%, 44%와 38% 저해하였으나 제품간의 저해활성 편차가 심한 것을 볼 수 있다. 미소 시료액 M1, M2 및 M3의 경우 hyaluronidase의 활성을 각각 49%, 56%와 52% 저해하여 제품 간에 비교적 균일한 저해활

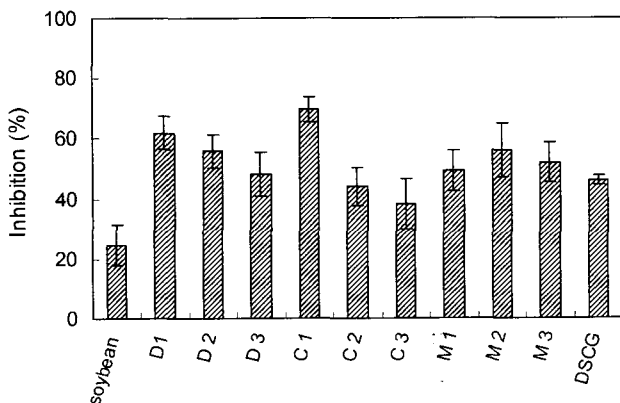


Fig. 2. Inhibitory effects of hyaluronidase by water extracts of soybean, Doenjang (D1, D2 and D3), Chungkookjang (C1, C2 and C3), Miso (M1, M2 and M3), and disodiumcromoglycate (DSCG).

성을 나타내었다. 된장, 청국장 및 미소의 물 추출물들은 원료인 대두의 물 추출물에 비하여 대략 2~3배의 hyaluronidase 저해활성을 나타냄으로서 이들 제품의 제조과정 중에 생성되거나 혼입되는 물질들의 수용성분획에 의한 저해효과로 보인다.

또한 지용성 분획에 의한 hyaluronidase 저해효과를 조사하기 위하여 동일한 조건하에서 대두, 된장, 청국장 및 미소의 MeOH 추출물에 의한 hyaluronidase 저해활성을 측정하였다(Fig. 3). 대두의 MeOH 추출물은 hyaluronidase의 활성을 46% 저해하였으며 물 추출물에 비해 약 2배의 저해활성을 나타냄으로서 대두 추출물의 경우, 수용성 분획보다는 지용성분획에 의한 저해효과가 우수한 것으로 보인다. 된장의 MeOH 추출물 D1, D2 및 D3의 경우 hyaluronidase의 활성을 각각 40%, 30%와 48% 저해하여 원료인 대두자체의 저해활성과 유사하였다. 청국장 추출물 C1, C2 및 C3의 경우 역시 대두 추출물과 유사하게 활성을 각각 49%, 52%와 46% 저해하였다. 미소 추출물 M1, M2 및 M3의 경우는 hyaluronidase의 활성을 각각 51%, 70%와 62% 저해하여 대두 추출물보다 약 20~40% 저해효과가 큰 것으로 나타났다. 식물에서 알려진 hyaluronidase의 활성을 저해하는 물질로는 앞서 언급한 flavonoids, glycyrrhizin, tannins 이외에도 iridoid glycosides(19) 또는 여러 종류의 불포화 지방산(20) 들이 hyaluronidase의 활성을 강력하게 저해하는 것으로 알려져 있다. 그러므로 flavonoids나 불포화 지방산 등이 풍부한 대두에서, MeOH 추출물에 의한 저해활성은 이러한 성분들에 의한 가능성이 있을 것으로 추정된다.

가열 처리 후의 잔여 저해활성

Fig. 2와 3에서 본 바와 같이 된장, 청국장 및 미소의 물 추출물은 대두의 물 추출물에 비하여 모두 저해효과가 2~3 배 이상이었으나, 이들의 MeOH 추출물들은 대두의 MeOH 추출물과 유사한 정도의 hyaluronidase 저해효과를 나타냈

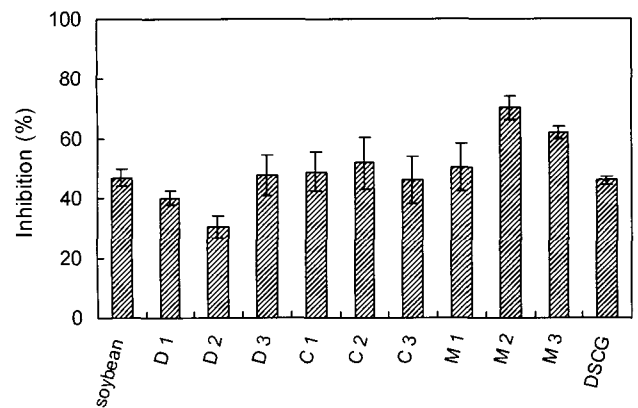


Fig. 3. Inhibitory effects of hyaluronidase by methanol extracts of soybean, Doenjang (D1, D2 and D3), Chungkookjang (C1, C2 and C3), Miso (M1, M2 and M3), and disodiumcromoglycate (DSCG).

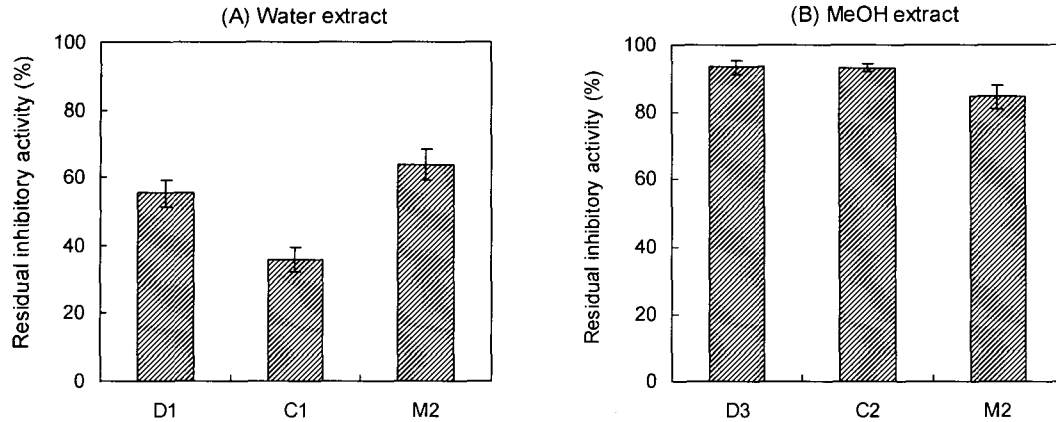


Fig. 4. Residual inhibitory activities of heat-treated water (A) and methanol (B) extracts of the samples.

다. 대두 발효식품들의 수용성 분획이 전반적으로 지용성 분획보다 우수한 저해활성을 나타냈으며, 일반적으로 대두 발효식품을 끓여서 섭취하므로 시료의 가열 처리 후에도 이러한 저해활성을 유지하는지 조사하였다.

된장, 청국장 및 미소의 물 추출물 및 MeOH 추출물 중 가장 저해효과가 우수한 추출물을 하나씩 선택하여 100°C에서 10분간 열처리한 후, 잔여 저해활성을 측정하였다. 열처리한 물 추출물의 경우 열처리 전에 비하여 된장 D1은 55%, 청국장 C1은 36% 그리고 미소 M2는 64%의 저해활성이 남아 있는 것으로 나타났다(Fig. 4A). 이와 같이 열처리 후, 물 추출물들에 의한 hyaluronidase 저해활성의 감소는 열에 민감한 수용성 저해 물질의 파괴에 기인하는 것으로 추정된다. 그러나 열처리한 MeOH 추출물의 경우, 된장 D3는 93%, 청국장 C2는 93%, 그리고 미소 M2는 85%의 저해활성이 남아있는 것으로 나타나 MeOH 추출물의 hyaluronidase 저해활성을 나타내는 물질은 열에 비교적 안정한 물질일 것으로 추정된다(Fig. 4B).

이상의 결과로부터 대두발효식품인 된장, 청국장 및 미소의 물 및 MeOH 추출물들은 항염증 및 항알레르기 활성검사 중의 하나로 이용되고 있는 hyaluronidase의 효소활성을 모두 효과적으로 저해하였음을 알 수 있었다. 또한 이들의 물 추출물들은 가열하더라도 대략 저해활성의 평균 50% 정도를 유지하였으며 MeOH 추출물들은 가열하여도 대부분의 저해활성을 유지하였다. 이러한 결과는 전통적인 대두발효식품의 새로운 생리활성을 보여주고 있으며 이들로부터 기능성을 갖는 물질을 규명하기 위한 연구가 추후 필요할 것으로 생각한다.

요 약

최근 여러 생리활성이 알려지면서 많은 연구가 진행되어 온 발효식품의 우수성을 확보하기 위하여 전통 발효식품인 된장, 청국장 그리고 미소의 hyaluronidase 저해활성을 조사

하였다. 저해활성 측정을 위하여 각 시료는 물과 MeOH로 추출하여 사용하였다. 각 추출물은 감압 건조하여 50 mg/mL의 농도로 0.1 M acetate buffer에 녹여 시료 액으로 사용하였다. 된장, 청국장 및 미소의 물 추출물은 hyaluronidase의 활성을 각각 62%, 70%, 56% 저해하였으며 원료성분인 대두의 물 추출물은 24% 저해하였다. 동일한 조건하에서 양성대조구로 항알레르기 약물인 disodiumcromoglycate (0.35 mg/mL)는 46%의 저해활성을 나타냈다. 한편 된장, 청국장 및 미소의 MeOH 추출물은 hyaluronidase의 활성을 각각 48%, 52%, 70% 저해함으로써, 46%를 저해한 대두의 MeOH 추출물과 유사한 저해활성을 보였다. 물과 MeOH 추출물 중 저해활성이 높게 나타난 각 시료에 대하여 100°C에서 10분간의 가열 후 잔여저해활성을 측정하여 열 안정성을 조사하였다. 평균적으로 각 시료의 물 추출물은 50% 정도, MeOH 추출물은 90% 정도의 저해활성을 유지하여 MeOH 추출물이 열에 대해 더 안정한 것으로 나타났다.

감사의 글

이 연구는 2004학년도 동국대학교 연구년 지원에 의하여 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Satchell KD, Brown NM, Lydeking-Olsen E. 2002. The clinical importance of the metabolite equol—a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. *J Nutr* 132: 3577-3584.
2. Messina M, Persky V, Satchell KDR, Barnes S. 1994. Soy intake and cancer risk: a review of the in vitro and in vivo data. *Nutr Cancer* 21: 113-131.
3. Ruiz-Larrea MB, Mohan AR, Paganga G, Miller NJ, Bolwell GP, Rice-Evans CA. 1997. Antioxidant activity of phytoestrogenic isoflavones. *Free Rad Res* 26: 63-70.
4. Park CS, Ryn IH, Lee KS. 2001. Enzymological evaluation of oral inflammation inhibitory activity by *Aloe vera* peel extract. *Kor J Food Sci Technol* 33: 753-759.

5. Jeong SJ, Kim NY, Ahn NH, Kim YC. 1997. Screening of hyaluronidase inhibition activity using a microplate assay. *Kor J Pharmacogn* 28: 131-137.
6. Sreer R. 2003. Devising a pathway for hyaluronan catabolism: are we there yet? *Glycobiology* 13: 105-115.
7. Hynes WL, Walton SL. 2000. Hyaluronidases of Gram-positive bacteria. *FEMES Microbiol Lett* 183: 201-207.
8. Jeong SJ, Ko YS, Ahn NH, Kim YC. 1998. Hyaluronidase inhibitor from *Uncariae Ramulus et Uncus*. *Kor J Pharmacogn* 29: 169-172.
9. Kim YS, Noh YK, Lee GI, Kim YK, Lee KS, Min KR. 1995. Inhibitory effects herbal medicines on hyaluronidase activity. *Kor J Pharmacogn* 26: 256-272.
10. Lee NH, Lee SJ, Jung DS, Bu HJ, Yang HC, Riu KZ. 2001. Screening of the tyrosinase inhibition and hyaluronidase inhibition activities, and radical scavenging effects using plants in Cheju. *Kor J Pharmacogn* 32: 175-180.
11. Mio K, Carrette O, Maibach HI, Stern R. 2000. Evidence that the serum inhibitor of hyaluronidase may be a member of the inter- α -inhibitor family. *J Biol Chem* 275: 32413-32421.
12. Warren GH, Seifter J, Glassman JM. 1962. Inhibition of hyaluronidase by urinary kallikrein. *Nature* 194: 770-771.
13. Wolf RA, Glogar D, Chaung LY, Garrett PE, Ertl G, Tumas J, Braunwald E, Kloner RA, Feldstein ML, Muller JE. 1984. Heparin inhibits bovine testicular hyaluronidase activity in myocardium of dogs with coronary artery occlusion. *Am J Cardiol* 53: 941-944.
14. Kuppasamy UR, Das NP. 1991. Inhibitory effects of flavonoids on several venom hyaluronidase. *Experientia* 47: 1196-2000.
15. Kakegawa H, Matsumoto H, Endo K, Satoh T, Nonaka G, Nishioka I. 1985. Inhibitory effects of tannins on hyaluronidase activation and on the degranulation from rat mesenteric mast cells. *Chem Pharm Bull Tokyo* 33: 5079-5082.
16. Kakegawa H, Matsumoto H, Satoh T. 1988. Inhibitory effects of hydragenol derivatives on the activation of hyaluronidase and their antiallergic activities. *Planta Med* 54: 385-389.
17. Furuya T, Yamagata S, Shimoyama Y, Fujihara M, Morishima N, Ohtsuki K. 1997. Biochemical characterization of glycyrrhizin as an effective inhibitor for hyaluronidases from bovine testis. *Biol Pharm Bull* 20: 973-977.
18. Asada M, Fukumori Y, Inoue M, Nakagomi K, Sugie M, Fujita Y, Tomizuka N, Yamazaki Y, Oka S. 1999. Glycoprotein derived from the hot water extract of mint plant, *Perilla frutescens* britton. *J Agric Food Chem* 47: 468-472.
19. Ling SK, Tanaka T, Kouno I. 2003. Effects of iridoids on lipoxygenase and hyaluronidase activities and their activation by β -glucosidase in the presence of amino acids. *Biol Pharm Bull* 26: 352-356.
20. Suzuki K, Terasaki Y, Uyeda M. 2002. Inhibition of hyaluronidase and chondroitinases by fatty acids. *J Enzyme Inhib Med Chem* 17: 183-186.

(2005년 7월 19일 접수; 2005년 8월 22일 채택)