

청국장의 항산화 및 혈압강하 효과

황재성 · 김성조 · 김한복*

호서대 자연과학대 생명공학과 및 기초과학연구소

대두발효식품인 청국장에는 다양한 항산화물질, peptide 등의 생리활성물질이 존재한다. 청국장 ethanol 추출물은 285 nm에서 0.55의 흡광도 값을 보여 주었다. 이 영역에는 phenol을 포함한 아미노산 및 peptide류가 포함되어 있다고 알려져 있다. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 방법으로 청국장의 항산화도를 측정했을 때, ethanol 추출물의 농도가 증가할수록 항산화도는 증가하였다. 무염 생청국장 30 g을 복용하고 2시간 마다 혈압을 측정하였다. 수축기혈압은 복용 후 6시간 지난 후, 평균혈압이 14 mmHg 떨어졌고, 이완기혈압은 8 mmHg 떨어지는 등 혈압강하 효과가 뚜렷하였다. 청국장에 존재하는 daidzein, 항산화물질, Lys-Pro과 같은 angiotensin I-converting enzyme (ACE) 억제제 등이 복합적으로 작용하면서 혈압강하에 기여할 수 있을 것이다.

Key words □ angiotensin I-converting enzyme inhibitor, antioxidant, bioactive compounds, blood pressure, Chungkookjang

청국장은 대두발효식품으로 미생물, 효소, 다양한 생리활성물질 등이 풍부하며(13), 인체의 균형을 잡아주어 건강을 유지, 증진시켜준다. 또한 청국장은 정장, 혈행 개선 등의 기능성 식품으로서도 각광받고 있으며, 생, 분말 청국장의 형태로 개발되고 있다. 다른 장류식품이나 김치에는 높은 농도의 소금이 들어간다. 이는 한국인에게 많이 발생하는 위암, 고혈압과 관련이 있을 수 있다. 반면에 청국장은 소금을 전혀 이용하지 않고 제조할 수 있어 이들 질환의 예방에 도움이 된다. 된장의 경우 제조기간이 수개월 걸리나, 청국장의 경우 2~3일의 짧은 기간에 제조할 수 있는 장점도 있다.

대두식품은 암예방 식품으로 특히 유방암, 전립선암의 발생률을 감소시켜 준다(17). 청국장의 단백질분해효소에 의한 혈전용해 효과(13), daidzein에 의한 면역조절효과 등도 알려져 있다(7). 청국장의 daidzein은 estrogen receptor β (ER β)를 자극하는 효과도 있다(17). ER β 를 매개로 한 세포신호전달은 항산화 유전자 발현조절, 면역반응조절, 유방, 전립선, 대장암 세포의 증식억제, 세포사멸 조절, 혈압조절과 관련이 있다(10, 19). 그 밖에 청국장에 존재하는 β -glucanase에 의해 만들어진 oligosaccharide도 당뇨병 예방 등 다양한 생리활성을 지니고 있다(3).

현대인들에게는 과음, 흡연, 과식, 정신적인 스트레스 등으로 인해 체내에 과도한 활성산소가 생성되며, 이는 암, 동맥경화, 노화촉진, 염증발생 등과 연결될 수 있다. 청국장에는 genistein, daidzein과 같은 isoflavone류, 아미노산, chlorogenic acid, caffeic acid, 갈변물질 등의 항산화물질이 존재한다(13, 15, 17). 대두에 비해 청국장에서는 항산화도가 증가되는 것으로 보고되어 있다

(18). 청국장 발효가 진행되면서 *Bacillus protease*에 의해 대두단백질이 분해되어 아미노산이나 peptide류가 생성된다(13, 14). Angiotensin I-converting enzyme (ACE)는 angiotensin I을 II로 전환시키며, angiotensin II는 생체 내에서 혈압을 높하게 된다(14). 청국장에 존재하는 peptide류는 ACE 억제제로 작용하여 혈압을 떨어뜨릴 수 있다(14).

이와 같이 청국장의 대표적인 생리활성물질로서 항산화, 혈압강하 물질을 들 수 있다. 본 연구에서는 시험관에서의 청국장의 항산화능력과 인체에서 생청국장의 실제 혈압강하효과를 알아보았다.

재료 및 방법

청국장 발효

대두를 18시간 물에 담근 후, 120°C에서 30분간 autoclave한 후, *B. licheniformis* B1 배양액을 1%되도록 접종하였다. 그 후 40°C incubator에서 3일간 발효시켰다(13).

시료준비

Freeze-drying방법에 의해 얻어진 분말청국장을 80% ethanol (10 g/100 ml)에 섞은 후, 25°C에서 24시간 두었다. 이 시료를 4°C, 15,000×g에서 30분간 원심분리하여 그 상층액을 진공 상태에서 evaporation하였다. 플라스크에 남은 시료를 다시 Freeze-drying 방법에 의해 분말형태로 제조하였다(7).

흡수스펙트럼 결정

Spectrophotometer (Optizen 2120, Mecasys, Korea)를 이용하여 200~700 nm에 걸쳐 분말청국장의 ethanol 추출물의 흡수스펙트

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-41-540-5624, Fax: 82-41-548-6231
E-mail: hbkim@hoseo.edu

렴을 결정하였다.

항산화도 결정

분말청국장의 ethanol 추출물을 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, Sigma, USA)와 섞어준 후, 517 nm에서 흡광도 감소를 spectrophotometer로 측정하였다(12).

단백질 농도 결정

Bovine serum albumin을 표준시료로 하고 Bradford 방법을 이용하여 시료의 단백질 농도를 결정하였다(16).

혈압측정

고혈압 약을 복용하지 않는 사람에게 생청국장 30 g을 복용하게 한 후, 자동혈압계(Omron model HEM-7051, Omron, Japan)를 이용하여 매 2시간마다 혈압을 측정하였다. 통계처리는 엑셀의 t검정 기능을 이용하였고, 유의도 기준은 0.05로 하였다.

결과 및 고찰

청국장의 항산화효과

청국장 ethanol 추출물은 285 nm에서 0.55의 흡광도 값을 보여 주었다(Fig. 1). 이 영역에는 phenol류를 포함한 아미노산류가 포함되어 있다고 알려져 있다(18). 한편 320 nm에서 높은 농도로 존재하는 peak가 존재하는데(흡광도 2.80), 이는 전의 청국장 ethanol 추출물에서는 발견되지 않았던 양상이다(18). 전의 추출 조건과 달리 본 연구에서 evaporation 과정이 추가되는 등, 추출 조건이 바뀌면서 생긴 결과로 사료된다. 새로 발견된 peak가 어떤 물질인지 규명하는 작업이 필요할 것이다. 또한 390 nm에서 0.51의 흡광도 값이 관찰되었는데, 이 영역에는 갈변물질이 존재할 것으로 추정된다(Fig. 1). 갈변물질도 항산화효과를 갖고 있다고 알려져 있다(12).

현대인에게서는 과음, 흡연, 과도한 스트레스로 인해 체내에 과량의 활성산소가 생성되며 이는 암, 염증, 동맥경화 등의 발생과 밀접한 관련이 있다. 다양한 곡물, 채소, 과일 등은 강한 자외선에 의해 발생하는 활성산소로부터 자신을 보호하기 위해 자신의 껍질 등에 항산화물질을 다량 갖고 있다. 대두에 존재하는

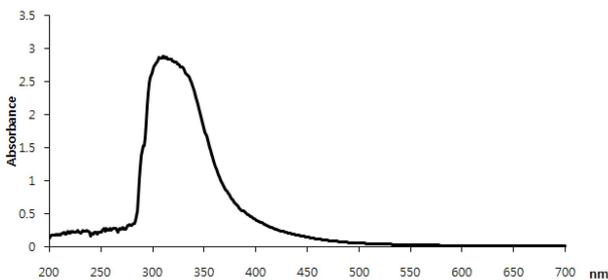


Fig. 1. UV-VIS spectrum of Chungkookjang extract. Substances extracted with 80% ethanol from Chungkookjang were scanned at the range between 200 and 700 nm.

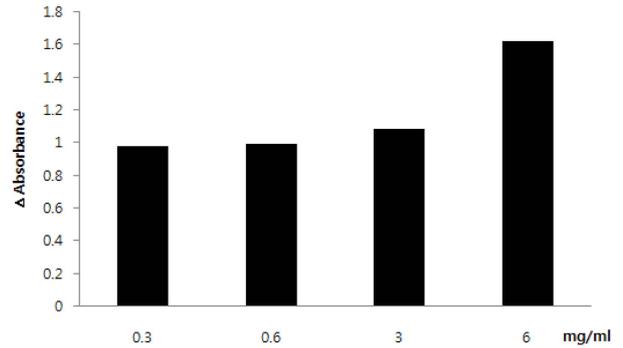


Fig. 2. Antioxidant activity. Increasing amounts of Chungkookjang-ethanol-extracts were mixed with the DPPH solution. Decreases of absorbance were determined at 517 nm, and used as their antioxidant activities.

항산화물질로는 chlorogenic acid, caffeic acid, genistein, daidzein과 같은 isoflavone류, 아미노산 등이 알려져 있다(18).

대두 발효식품인 청국장은 항산화도가 원재료 대두에 비해 2.6배 증가한다(18). 이는 발효가 되면서 고분자 물질이 분해되면서, 항산화물질이 증가되기 때문으로 사료된다. DPPH 방법으로 청국장의 항산화도를 측정했을 때, ethanol 추출물의 농도가 증가할수록 항산화도는 증가하였다(Fig. 2). 또한 저분자로 분해된 청국장 추출물은 *E. coli* 내부로 흡수되어 paraquat 독성을 제거할 수 있는 것으로 보아(18), 인간 세포에서도 흡수되어 항산화효과를 나타낼 수 있을 것이다. 분자량이 작은 항산화물질이 세포 내로 흡수가 쉬울 것으로 보인다. 이런 점에서 청국장 발효에 의해 생성된 항산화물질의 섭취가 인체에 실질적인 도움이 될 수 있을 것이다. 청국장에서는 daidzein 함량이 대두에 비해 44배 증가하였다(7). 이 daidzein과 함께 peptide류도 청국장의 항산화효과에 기여할 수 있을 것이며, 이들 peptide류를 분리하는 작업도 필요할 것이다.

청국장의 혈압강하효과

청국장에서는 *Bacillus protease*에 의해 대두 단백질이 분해되어 아미노산, peptide류가 생성된다(14). 이들 중에는 다양한 peptide가 존재할 것으로 추정된다. Angiotensin I-converting enzyme (ACE)는 angiotensin II를 형성하여 혈압을 높인다(14). 발효대두에서는 Trp-Leu, Ile-Phe-Leu, His-His-Leu, Ser-Tyr, Ala-Phe, Ile-Phe, nicotianamine 등도 ACE 억제제로 알려져 있으며(5, 8, 11, 20), nattokinase에 의한 혈압강하효과 등도 보고되어 있다(2, 6). 청국장에서는 Lys-Pro이 ACE 저해제로 보고되어 있다(4, 14). ACE의 억제제로는 C-terminal에 Leu, Tyr, Phe, Trp가 자주 발견되나, Ile-Pro-Pro, Val-Pro-Pro와 같이 Pro를 갖고 있는 것도 흔히 발견된다(14).

무염 생청국장 30 g을 복용하고 2시간 마다 혈압을 측정하였다. 수축기혈압은 복용 후 6시간 지난 후, 초기에 비해 평균혈압이 14 mmHg ($P=0.03$) 떨어졌고, 이완기혈압은 역시 복용 후 6시간 지나 8 mmHg 떨어지는 등($P=0.006$), 혈압강하 효과가 뚜

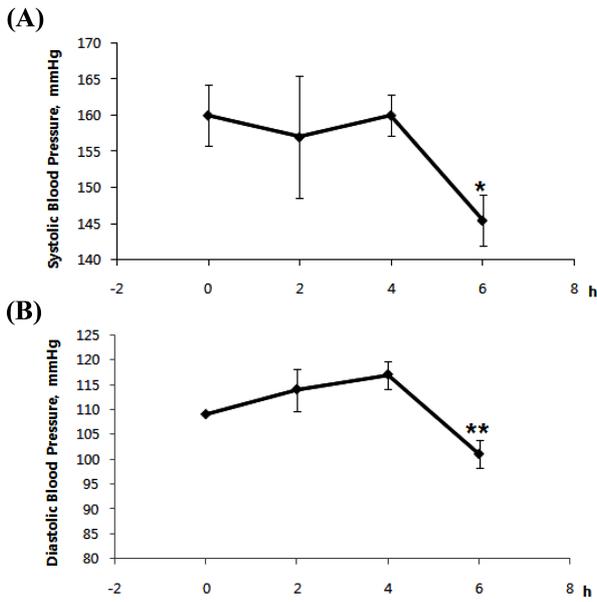


Fig. 3. Change of blood pressure. Changes of systolic blood pressure (A) and those of diastolic blood pressure (B) were determined after taking Chungkookjang, every two h. Data are the Mean±SEM. *P=0.03, **P=0.006, compared with 0 h.

렸하였다(Fig. 3). 무염 생청국장을 복용하지 않은 위 실험대상자에 대해, 혈압을 측정할 경우에는, 6시간이 지나도 유의성 있는 혈압강하를 보이지 않았다(자료 미제시). Bradford 방법을 이용해서, 청국장 ethanol 추출물에는 7.0 µg/ml의 protein이 존재함을 밝혔다. 이 추출물 속에 다양한 peptide가 포함되어 있을 것으로 추정한다. 이 추출물 속에 존재하는 Lys-Pro과 같은 peptide들이 ACE 억제제로 작용하여 혈압을 떨어뜨릴 수 있다(14). 본 실험에서는 청국장의 단기적인 혈압강하 효과의 가능성을 제시했으며, 다수를 대상으로 한 장기적인 효과를 규명하는 작업이 필요할 것이다.

산화적인 스트레스는 고혈압과 연결될 수 있다(1, 9). Angiotensin II의 증가가 직접 혈압상승으로 연결될 수도 있지만, 한편으로는 angiotensin II에 의해 생성된 superoxide에 의해 혈압이 상승할 수 있다(9). 청국장 속에 존재하는 다양한 항산화물질이 산화적

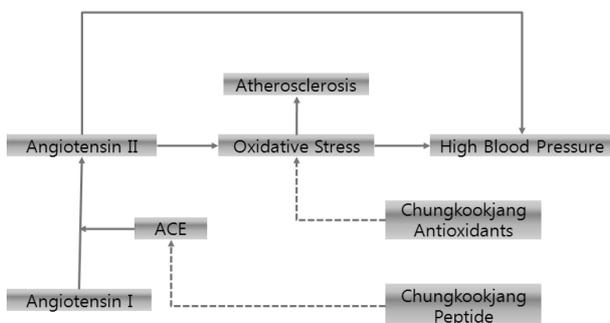


Fig. 4. Relation among antioxidants, peptides, and blood pressure. →, stimulation; ····, repression.

스트레스를 해소시켜 혈압을 떨어뜨릴 수 있다. 혹은 청국장 peptide가 ACE 억제제로 작용하여 angiotensin II가 줄어들면서 혈압강하로 이어질 수도 있다(Fig. 4). 청국장 속의 항산화물질과 ACE 억제 peptide들이 같이 작용하면서 synergy 효과를 발휘하여 인체 내에서 혈압강하에 효율적인 기여를 할 수 있을 것이다(Fig. 4).

Genistein, daidzein은 여성 호르몬 estrogen과 구조적으로 많이 닮아 있다(17). Estrogen 수용체에는 ERα와 ERβ가 있는데, 청국장의 isoflavone은 ERβ를 선택적으로 자극한다(17). ERβ는 또한 혈압조절에 관여한다(19). 이들 수용체는 세포의 핵에서 작용하나, 세포막에 존재하면서 세포의 빠른 신호전달에 관여하는 사실도 알려져 있다(17). 청국장에 존재하는 daidzein은 ERβ를 자극하는 효과가 있으며, 이는 혈압강하와 연결될 수도 있을 것으로 추정한다. 청국장에 존재하는 daidzein, 항산화물질, Lys-Pro ACE 억제제 등이 복합적으로 작용하면서 혈압강하에 기여할 수 있을 것이며, 이런 연구를 바탕으로 혈압조절용 건강기능식품의 개발도 가능할 것으로 기대해 본다.

감사의 말

본 연구는 2008년도 호서대학교 학술연구조성비의 지원에 의해 수행되었음(2008-0198).

참고문헌

- De Cavanagh, E.M., B. Piotrkowski, and C.G. Fraga. 2004. Concerted action of the rennin-angiotensin system, mitochondria, and antioxidant defenses in aging. *Mol. Aspects Med.* 25, 27-36.
- He, J., D. Gu, X. Wu, J. Chen, X. Duan, J. Chen, and P.K. Whelton. 2005. Effect of soybean protein on blood pressure: a randomized, controlled trial. *Ann. Intern. Med.* 143, 1-9.
- Hwang, J.S., H.J. Yoo, S.J. Kim, and H.B. Kim. 2008. Characterization of β-1,4-glucanase activity of *Bacillus licheniformis* B1 in Chungkookjang. *Kor. J. Microbiol.* 44, 69-73.
- Ichimura, T., J. Hu, D.Q. Aita, and S. Maruyama. 2003. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity and insulin secretion stimulative activity of fermented fish sauce. *J. Biosci. Bioeng.* 96, 496-499.
- Kataoka, S. 2005. Functional effects of Japanese style fermented soy sauce (Shoyu) and its components. *J. Biosci. Bioeng.* 100, 227-234.
- Kim, J.Y., S.N. Gum, J.K. Paik, H.H. Lim, K.C. Kim, K. Ogasawara, K. Inoue, S. Park, Y. Jang, and J.H. Lee. 2008. Effects of nattokinase on blood pressure: a randomized, controlled trial. *Hypertens. Res.* 31, 1583-1588.
- Kim, H.B., H.S. Lee, S.J. Kim, H.J. Yoo, J.S. Hwang, G. Chen, and H.J. Youn. 2007. Ethanol extract of fermented soybean, Chungkookjang, inhibits the apoptosis of mouse spleen, and thymus cells. *J. Microbiol.* 45, 256-261.
- Kinoshita, E., J. Yamakoshi, and M. Kikuchi. 1993. Purification and identification of an angiotensin I-converting enzyme inhibitor from soy sauce. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57, 1107-1110.
- Kishi, T., Y. Hirooka, Y. Kimura, K. Ito, H. Shimokawa, and A. Takeshita. 2000. Increase reactive oxygen species in rostral vent-

- rolateral medulla contribute to neural mechanisms of hypertension in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Circulation* 109, 2357-2362.
10. Koehler, K.F., L.A. Haldosen, M. Warner, and J.A. Gustafsson. 2005. Reflections on the discovery and significance of estrogen receptor beta. *Endocr. Rev.* 26, 465-478.
 11. Kuba, M., K. Tanaka, S. Tawata, Y. Takeda, and M. Yasuda. 2003. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides isolated from Tofuyo fermented soybean food. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67, 1278-1283.
 12. Lee, J.J., C.H. Cho, J.Y. Kim, D.S. Lee, and H.B. Kim. 2001. Antioxidant activity of substances extracted by alcohol from Chungkookjang powder. *Kor. J. Microbiol.* 37, 177-181.
 13. Lee, J.J., D.S. Lee, and H.B. Kim. 1999. Fermentation patterns of Chungkookjang and Kanjang by *Bacillus licheniformis* B1. *Kor. J. Microbiol.* 35, 269-301.
 14. Matsui, T., H.J. Yoo, J.S. Hwang, D.S. Lee, and H.B. Kim. 2004. Isolation of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from Chungkookjang. *Kor. J. Microbiol.* 40, 355-358.
 15. Pratt, D.E. and P.M. Birac. 1979. Source of antioxidant activity of soybeans and soy products. *J. Food Sci.* 44, 1720-1722.
 16. Read, S.M. and D.H. Northcote. 1981. Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie blue G dye-binding assay for protein. *Anal. Biochem.* 116, 53-64.
 17. Yoo, H.J., J.S. Hwang, and H.B. Kim. 2007. Mass analysis of isoflavones in Chungkookjang. *Kor. J. Microbiol.* 43, 54-58.
 18. Yoo, H.J., S.H. Lee, D.S. Lee, and H.B. Kim. 2002. Antioxidant activity of fermented barley, wormwood, sea tangle, and soybean. *Kor. J. Microbiol.* 38, 230-233.
 19. Zhu, Y., Z. Bian, P. Lu, R.H. Karas, L. Bao, D. Cox, J. Hodgins, P.W. Shaul, O. Thorn, O. Smithies, J.A. Gustafsson, and M.E. Mendelsohn. 2002. Abnormal vascular function and hypertension in mice deficient in estrogen receptor β . *Science* 295, 505-508.
 20. Zhu, X.L., K. Watanabe, K. Shiraishi, T. Ueki, Y. Noda, T. Matsui, and K. Matsumoto. 2007. Identification of ACE-inhibitory peptides in salt-free soy sauce that are transportable across caco-2 cell monolayers. *Peptides* 29, 338-344.

(Received January 19, 2009/Accepted February 13, 2009)

ABSTRACT : Antioxidant and Blood-Pressure Reduction Effects of Fermented Soybean, Chungkookjang

Jae Sung Hwang, Sung Jo Kim, and Han Bok Kim* (Department of Biotechnology, The Research Institute for Basic Sciences, Hoseo University, Asan 336-795, Republic of Korea)

Fermented soybean, Chungkookjang has diverse bioactive compounds including antioxidants and peptides. Ethanol extract from Chungkookjang exhibited absorbance of 0.55 at 285 nm, where amino acids and peptides containing phenol are known to exist. Antioxidant activity of Chungkookjang was determined using the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) method. With increasing concentrations of ethanol extracts, their antioxidant activities increased. Blood pressure was determined every two hours after taking raw Chungkookjang which does not contain salts. In 6 h, systolic blood pressure dropped by 14 mmHg, and diastolic one dropped by 8 mmHg, which was statistically significant. Daidzein, antioxidants, angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitor such as Lys-Pro which are rich in Chungkookjang might contribute to the reduction of blood pressure.