

폴리감마글루탐산(PGA) 함유량이 증가된 청국장이 조골세포 분화에 미치는 영향

이기호¹ · 심미옥¹ · 송용수² · 정호경¹ · 장지훈¹ · 김민석^{1,3} · 김태묵¹ · 이효은¹ · 안병관¹ · 정원석¹

¹한약진흥재단 한약자원본부

²해남자연농업영농조합법인

³원광대학교 한의학과

Effects of Poly-Gamma Glutamate Contents Cheonggukjang on Osteoblast Differentiation

Ki Ho Lee¹, Mi-Ok Sim¹, Yong Su Song², Ho Kyung Jung¹, Ji-Hun Jang¹, Min-Suk Kim^{1,3},
Tae Mook Kim¹, Hyo Eun Lee¹, Byeong-Kwan An¹, and Won Seok Jung¹

¹Traditional Korean Medicine Research Team, National Development Institute of Korean Medicine

²Heanam Natural Farming Association Cooperation

³Department of Pathology, College of Korean Medicine, Wonkwang University

ABSTRACT Cheonggukjang (CKJ) is a Korean traditional food made of fermented soybeans. In comparison to normal intake of soybeans, Cheonggukjang has high digestibility with bioactive, antioxidant substances, and thrombolytic enzymes. Recent studies have reported anti-oxidant, anti-cancer, anti-inflammatory, anti-obesity activities as well as inhibitory activities against osteoporosis for CKJ. In this study, we identified the effects of CKJ on osteoblast differentiation by increasing the polyglutamic acid (PGA) content of CKJ. Alkaline phosphatase (ALP) activity and mineralization significantly increased in response to treatment with both natural CKJ (CKJ A) and PGA-increased CKJ (CKJ B). However, CKJ B exhibited higher ALP activity and mineralization than CKJ A. Real-time reverse transcription PCR demonstrated that mRNA expression of osteoblastic-associated genes such as type I collagen, alkaline phosphatase, osteocalcin, and osteopontin in C2C12 cells was significantly up-regulated by CKJ A or B treatment. These results indicate that treatment with CKJ has an anabolic effect on bone by increasing osteoblastic differentiation and ALP activity. Increasing PGA content in CKJ had a greater effect than CKJ A on up-regulation of osteoblastic gene expression in osteoblast cells.

Key words: ALP, Cheonggukjang, osteoblast, osteocalcin, osteopontin

서론

현대에는 평균 수명의 연장으로 노인질환의 관리가 중요 문제로 대두하고 있으며, 그중 골다공증은 유전적 요인이나 식이, 생활 방식과 같은 환경적 요인에 의해 영향을 받는 복합적인 질환이다(1,2). 골다공증은 단위 용적 내의 골량이 골의 화학적 조성의 큰 변화 없이 감소하는 질환으로 이로 인해 쉽게 골절을 일으킬 수 있으며 폐경 후 여성들에게 가장 그 발생 빈도가 높게 나타나는 질환이다(3).

뼈는 체내 구조를 이루고 골격계를 구성하는 역할을 함으로써 파골세포에 의한 골 흡수와 새로운 골기질을 형성하는 조골세포가 서로 균형을 이루면서 무기질화 과정이 끊임없이 일어나는 동적인 조직이다(4). 정상 성인에서는 골 흡수

량과 골 형성량이 항상성을 유지하고 있고, 뼈는 일정한 주기로 재형성을 이루게 된다(5). 이러한 골격계의 구조와 기능은 호르몬과 국소적 인자의 상호작용에 의해 조절되며, 조골세포와 파골세포 활성 간의 불균형은 전체적인 뼈의 감소나 증가로 인한 골격계의 이상을 나타낸다(3).

골 손실이 일어나게 되면 뼈를 원상태로 복구하는 것은 어려우며, 보통 뼈의 소실이 더는 진행되지 않게 치료하는 방법을 사용하고 있다(2,6). 대표적인 방법으로 에스트로겐, 칼시토닌, 비스포스테이트 제제가 이용되고 있으며(7,8), 그 중 에스트로겐 투여가 기본적으로 사용되고 있으나 장기적인 사용은 오심, 두통, 체중 증가, 유방암 발생을 초래하여 장기적인 사용은 기피하는 실정이다(9-11). 이러한 이유로 비교적 부작용이 적은 장점으로 인해 천연물질을 이용한 신약 개발과 질병의 치료가 보편화되면서 골다공증의 치료에 이를 응용하려는 연구 또한 많이 보고되고 있다.

청국장은 우리나라를 대표하는 전통적인 발효 식품으로써 일반 콩 섭취 시보다 소화 흡수율이 높은 이점을 가지고

Received 21 December 2015; Accepted 28 March 2016

Corresponding author: Won Seok Jung, Traditional Korean Medicine Research Team, National Development Institute of Korean Medicine, Jeonnam 59338, Korea

E-mail: i0823@nate.com, Phone: +82-61-860-2812

있으며, 이소플라본, 피틴산, 사포닌, 토코페롤, 불포화지방산, 식이섬유, 올리고당 등의 각종 생리활성 물질과 항산화 물질 및 혈전 용해 효소가 다량 함유된 것으로 밝혀져 있다(12-15). 또한 청국장은 항산화, 항암, 항염증, 항비만, 골다공증 개선 효과 등의 다양한 생리활성이 보고돼 있으며, 이러한 이유로 건강기능 식품으로서 청국장 관련 제품의 소비가 더욱 증가하고 있다(16-18). 특히 발효한 청국장에서 나타나는 끈끈한 실 형태의 물질을 γ -polyglutamic acid(γ -PGA)라 하는데 D,L-glutamic acid의 중합체로 청국장과 Natto의 주성분으로 알려졌다(19). γ -PGA는 수용성, 음이온성, 무독성, 생분해성, 생체적합성, 식용 등의 다양한 특성이 있으며, 침전제, 동결방지제, 쓴맛 감소제, 동물사료첨가제 등으로 이용되고 있다. 또한 의료분야에서는 약물 전달체, 의료용 생물접착제, 골다공증 예방 등에 이용되고 있는 것으로 알려졌다(20). 따라서 본 연구에서는 청국장의 유효 성분으로 보고되어 있는 γ -PGA에 대한 함량을 증대시키고 이를 HPLC를 이용하여 기존 청국장(청국장 A)과 γ -PGA가 증대된 청국장(청국장 B)의 γ -PGA 함량을 비교 탐색하였다. 또한 유효성분을 증대시킨 청국장이 기존 청국장보다 조골세포 분화에 어떠한 효과를 미치는지 검색하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

γ -PGA의 함유량이 증대되도록 시료를 준비하기 위하여 청국장 발효에 사용된 동일 균주를 사용하여 Bang 등(21)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%, NH_4Cl 0.2%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 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. 본 실험에 사용된 시료 청국장 B는 발효 후 55°C에서 48시간 건조해 분쇄한 가루 100 g과 액체 배양물 100 mL를 1:1 (v:v)의 비율로 균일하게 혼합한 다음 50°C에서 48시간 건조한 후 사용하였다.

표준 및 시험용액 조제

표준물질인 글루탐산 10 mg을 정밀히 칭량하여 100 mL 부피플라스크에 넣어 증류수에 용해하여 표준원액으로 이용하였으며, 이를 2배씩 희석하여 사용하였다. 또한 두 종류의 청국장 시료 2 g을 정밀히 칭량하여 50 mL 부피플라스크에 넣고, 증류수에 녹인 후 30분간 초음파로 추출하였다. 추출한 용액을 원심분리기를 이용해 15,000 rpm에서 25분간 4°C로 처리하였고, 그 상등액을 1 mL 취하여 내열성 플라스크에 담고 6 N 염산 10 mL를 가하여 오븐에 넣어 110°C에서 24시간 동안 가수분해하였다. 이를 50 mL 부피플라스크

에 옮겨 증류수로 정용하여 희석한 후, 그중 1 mL를 취하여 50 mL 부피플라스크에 넣은 다음 증류수로 정용하여 0.02 N에 가까운 농도로 희석하였다. 이렇게 희석한 시료는 필터하여 총 glutamic acid의 시험용액으로 하였다. 또한 가수분해하지 않은 용액을 사용해 유리글루탐산의 시험용액으로 하였다.

폴리감마글루탐산의 HPLC 분석

PGA의 함량분석에 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 μm , 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. 이동상의 기울기 조건은 Table 1에 표기하였다. 분석 시약으로는 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.

분석 및 계산

PGA는 글루탐산의 펩티드 결합으로 이루어진 중합체로 LC 분석을 통한 함량분석 시 글루탐산의 총합량이 필요하다. 따라서 PGA의 함량은 가수분해한 총글루탐산의 함량에서 유리글루탐산의 함량을 뺀 값이라 할 수 있다. 따라서 PGA의 LC를 이용한 함량 계산은 다음 식을 이용해 계산하였다.

$$\text{PGA 함량(mg/g)} = (\text{총 glutamic acid} \times 0.88) - \text{free glutamic acid 함량}$$

$$0.88 = 129(\text{PGA의 glutamic acid 잔기의 분자량}) / 147(\text{glutamic acid 분자량})$$

Table 1. Gradient condition of solvent A and B for PGA quantitative analysis

Time	Mobile phase	
	A% (40 mM Na_2HPO_4 , 0.1% phosphoric acid)	B% (acetonitrile : methanol : Dw=45:45:10)
0	100	0
3	100	0
10	70	30
12	70	30
13	100	0

Cell culture

마우스 C2C12 각 40,000 cell/22 mm well로 분주하고 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA)에 10% FBS(fetal bovine serum, Gibco Laboratories)와 항생제(1% anti-biotic antimycotic solution, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 처리한 후 37°C, 5% CO₂ 하에서 배양하였다. C2C12가 80% 자랐을 때 분화유도를 위해 5% FBS, 100 ng/mL의 rhBMP-2를 포함하는 DMEM으로 교체하였다.

조골세포의 alkaline phosphatase(ALP) 활성

분화된 조골세포를 PBS로 세척한 다음 0.1% Triton X-100을 20 µL씩 첨가하여 37°C에서 30분간 lysis 하였다. Lysis 된 cell의 상층액 5 µL는 단백질 정량에 사용하였고, 나머지 상층액에 20 µL의 0.1 N glycine과 10 µL의 100 mM p-nitrophenylphosphate(p-NPP)를 첨가한 후 다시 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 200 µL의 0.1 N NaOH로 반응을 중지하고, 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. ALP 활성은 p-NPP로부터 생성된 p-nitrophenol(p-NP)을 측정하여 p-NP에 대한 표준그래프를 작성한 후 활성도를 대조군과의 상대비교를 통해 도출하였다.

석회화 결절 형성 측정

배양 후 배지를 제거하고 PBS로 가볍게 세척한 후 70% ethanol을 가하고 4°C에서 1시간 동안 고정하였다. 세포를 증류수로 세척하고 2% alizarin red solution(pH 4.2)으로 실온에서 10분간 염색하였다. 비특이적인 염색을 줄이기 위해 증류수로 5번 세척한 후 PBS를 가하고 15분 방치하였다. PBS를 제거한 후 10%(w/v) cetylpyridinium chloride를 첨가한 10 mM sodium phosphate(pH 7.0) 용액을 각 well에 첨가하고 실온에서 15분간 반응시켜서 얻은 alizarin red 추출액을 96-well plate로 옮기고 562 nm에서 흡광도를 측정하였다.

유전자 발현 real-time PCR

수확한 세포는 TriPure Isolation Reagent(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)를 이용하여 RNA를 분리하였다. 5 µg의 mRNA를 High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit(Applied Biosystem, Foster City, CA, USA)을 이용하여 cDNA로 합성하였다. 실험은 제조사 매뉴얼에 따라 수행하였다. 합성된 cDNA 1 µL, TaqMan primer 1 µL, TaqMan Universal Master Mix II(Applied Biosystem) 10 µL, 3차 증류수 8 µL를 넣고 real-time PCR 기기(ABI7500, Applied Biosystem)를 이용하여 PCR을 수행하였다. 정량 증합 효소 반응에 쓰인 gene의 정보는 Table 2에서 나타내었다. 또한 real-time PCR 반응 조건은 50°C에서 2분, 95°C에서 10분 동안 1회 수행하고, 변성 온도 95°C에서 15초 어닐링, 온도 60°C에서 15초인 사이클을

Table 2. Real-time PCR primers used in this study

Gene		Primer sequence 5'-3'
OPN	Forward	GTAGGGACGATTGGAGTGAAAG
	Reverse	GGAAACCAGCCAAGGACTAA
COL1A	Forward	CTCCCAGAACATCACCTATCAC
	Reverse	GGTGGAGAAAGGAGCAGAAA
ALP	Forward	GCCATGACATCCCAGAAAGA
	Reverse	CAGATACAGGCAAGGCAGATAG
OCN	Forward	ACACCATGAGGACCATCTTTC
	Reverse	AGCTGCTGTGACATCCATAC

40회 반복 수행하였다.

통계분석

실험의 정량적인 결과는 평균값과 표준편차로 표시하였다. 통계적인 차이는 Student's t-test를 이용하여 분석하였고 P 값이 0.05 이하인 경우 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

결과 및 고찰

글루탐산의 분석조건 선정 및 직선성

시약을 통해 유도체화한 글루탐산의 detector별 chromatogram의 peak를 비교해 분석에 적당한 detector를 선정하였다. 그 결과 UV 254 nm에서는 peak를 확인할 수 없었으며, 338 nm에서 약간의 peak가 나타나는 것을 확인하였다. 그리고 FLD(Ex 230 nm, Em 450 nm)에서 UV보다 뚜렷한 peak가 나타나는 것을 확인하였다. 글루탐산의 표준 용액을 0.1~12.5 µg/mL의 범위로 용해시켜 HPLC를 이용해 분석하였으며, 각각의 농도에 따른 검량선 상관계수가 0.999 이상의 직선성을 보이는 것을 확인하였다. 또한 청국장 총 glutamic acid 및 free glutamic acid의 함량이 글루탐산 표준용액의 회귀곡선 범위 안에 포함되는 것을 확인하였다(Table 3, Fig. 1).

청국장 시료의 PGA 함량 분석

HPLC-FLD를 이용해 균주별 청국장 함유량을 확인하기 위해 기존의 일반적인 방법으로 발효시킨 청국장 A와 PGA의 증대를 위한 공정기술개발로 발효시킨 청국장 B의 시료

Table 3. Area values of the respective concentrations (n=3)

Level	Amount	Area (mean)	SD	RSD
2	12.500	256.597	2.406	0.938
3	6.250	127.477	1.096	0.860
4	3.125	64.058	0.470	0.733
5	1.562	32.253	0.412	1.275
6	0.781	16.367	0.241	1.473
7	0.391	8.196	0.082	1.002
8	0.195	4.484	0.037	0.830
9	0.098	2.518	0.034	1.353

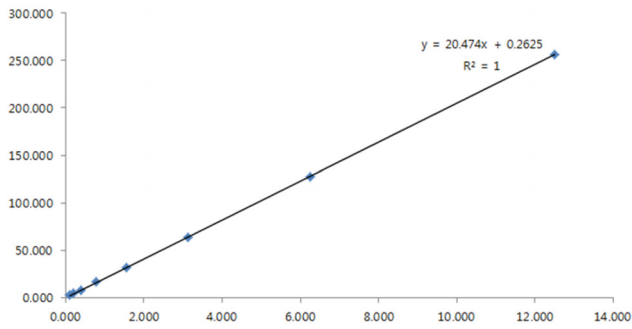


Fig. 1. The calibration curve of glutamic acid.

를 같은 실험방법을 이용해 분석을 진행하였으며, 그 결과 시료 각각 3.060±0.086%, 5.231±0.193%의 함량이 측정되었으며, 청국장 B가 A보다 약 1.7배의 PGA 함량을 증가시켰다(Table 4, Fig. 2).

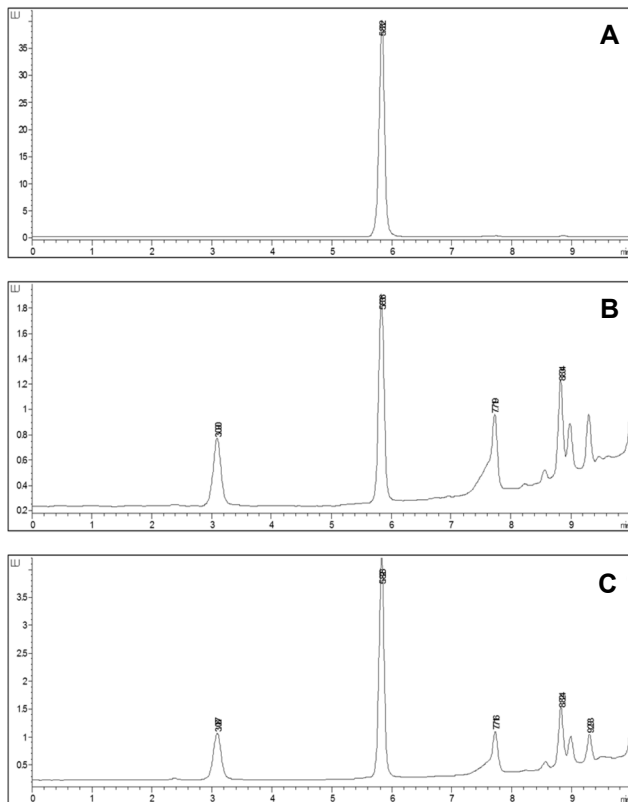


Fig. 2. LC chromatogram of glutamic acid (A), CKJ A (B), and CKJ B (C). CKJ A: natural Cheonggukjang, CKJ B: PGA-increased Cheonggukjang.

Table 4. PGA contents of the CKJ A and CKJ B prepared with various microorganisms

Sample	PGA contents (%)			Mean	SD	RSD
	1 time	2 time	3 time			
CKJ A	2.987	3.013	3.181	3.060	0.086	2.801
CKJ B	5.500	5.056	5.137	5.231	0.193	3.689

CKJ A: natural Cheonggukjang, CKJ B: PGA-increased Cheonggukjang.

청국장 시료의 세포독성 평가

C2C12 세포주에서 청국장 시료의 독성을 각각 조사하기 위해 MTS 실험을 수행하였다. 각각 C2C12 세포에 농도별 (62.5, 125, 250, 500 µg/mL)로 각각의 청국장 시료를 처리하고 72시간 후에 MTS를 처리한 결과 모든 농도에서 독성이 나타나지 않았다(Fig. 3).

청국장 시료의 골 석회화 형성에 미치는 영향

골 석회화 형성능은 조골세포의 분화에 중요한 표식인자로서 칼슘에 특이적으로 흡착력이 높은 식물성 염료인 alizarin을 이용해 염색하였다(22,23). 이것은 세포의 기질이 무기질화된 부분에 염색되어 석회화된 양과 염색 정도가 상호 비례하기 때문에 여러 논문에서 이를 이용하여 골 석회화 형성도를 확인하였다(24-27).

청국장 A와 B 시료의 농도에 따른 석회화 형성도를 확인하기 위해 염색된 석회화물을 10% cetylpyridinium chloride로 녹여 흡광도 값을 측정하여 상대 활성을 Fig. 4에 나타내었다. 청국장을 처리한 모든 군에서 시료를 처리하지 않은 군보다 농도 의존적으로 높은 골 석회화 형성능을 보였으며, 청국장 A보다 청국장 B가 더 높은 골 석회화 형성능을 보였다. 최근 Choi 등(28)의 연구에서도 대두 에탄올 추출물을 조골세포에 처리하였을 때 대조군보다 골 석회화 형성이 유의적으로 증가하였다. 이를 바탕으로 대두를 기반으로 한 청국장이 조골세포의 분화를 촉진시키며, 특히 PGA 함유량이 증가한 청국장(CKJ B)이 일반 청국장(CKJ A)보다 더

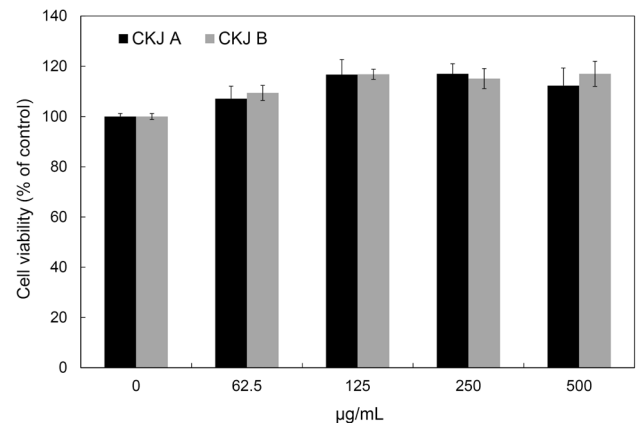


Fig. 3. Effect of CKJ on cell viability in C2C12 cells. Cell viability was evaluated with the MTS assay. Data represent the mean±SD of triplicate determinations from three separate experiments. CKJ A: natural Cheonggukjang, CKJ B: PGA-increased Cheonggukjang.

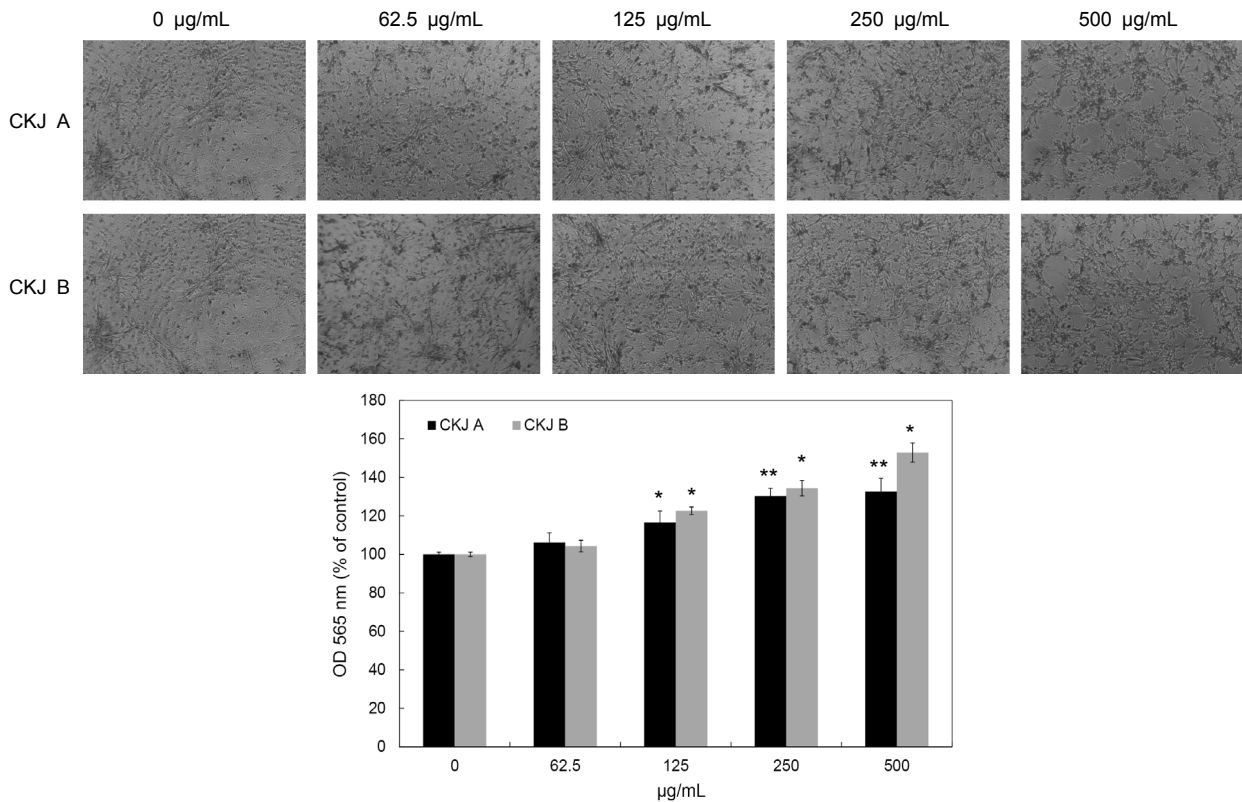


Fig. 4. Effect of CKJ on mineralization in C2C12 cell by alizarin Red S Staining. Data represent the mean±SD of triplicate determinations from three separate experiments. * $P < 0.05$ versus non treated group, ** $P < 0.01$ versus non treated group. CKJ A: natural Cheonggukjang, CKJ B: PGA-increased Cheonggukjang.

높은 골 석회화 형성능을 가지는 것으로 생각한다.

청국장 시료의 ALP 활성에 미치는 영향

염기성 인산분해효소(ALP)는 대부분의 조직에 존재하며, 특히 골조직에 존재하는 ALP는 골 성장이 활발히 일어날 때 그 활성이 증가하게 된다(29). Jeon과 Kim(30)이 보고한 연구 결과에서는 톳 분획물이 ALP의 발현을 증가시키므로 조골세포의 분화에 영향을 준다고 제시하였으며, 또한 황금 추출물, 아보카도 과피 및 씨 추출물에서 조골세포의 ALP 활성을 증가시킴에 따라 조골세포의 분화가 증대된 것으로 보고하였다(2,3). 따라서 조골세포의 활성을 알아보는 생화학적 지표로써 ALP 활성을 측정하는 방법이 일반화되어 있으므로 청국장이 ALP 활성에 미치는 영향을 검토하였다.

청국장을 농도별로 처리한 결과 모든 시료를 처리한 군에서 시료를 처리하지 않은 대조군보다 높은 ALP 활성을 나타내었다. 특히 청국장 B는 대조군보다 약 2배의 높은 활성을 나타내었으며, 청국장 B가 청국장 A보다 더 높은 ALP 활성을 나타내었다. 따라서 청국장이 조골세포의 ALP 활성을 증가시켜 조골세포의 분화에 영향을 미칠 것으로 생각하며, 청국장 B가 청국장 A보다 골 석회화 형성을 촉진시킬 것으로 생각한다(Fig. 5).

청국장이 조골세포 분화 유전자 발현에 미치는 영향

골의 형성과정에 조골세포의 분화는 유전형질의 발현에 의해 조절되며, 배양방법에 따라 고유의 특성이 있다. 즉 증식과 분화 석회화 과정을 거치며 type I collagen(Coll1), ALP, osteocalcin(OCN), osteopontin(OPN) 등의 골 관련 형질표현 유전자가 발현된다(31). OCN은 성숙한 조골세포

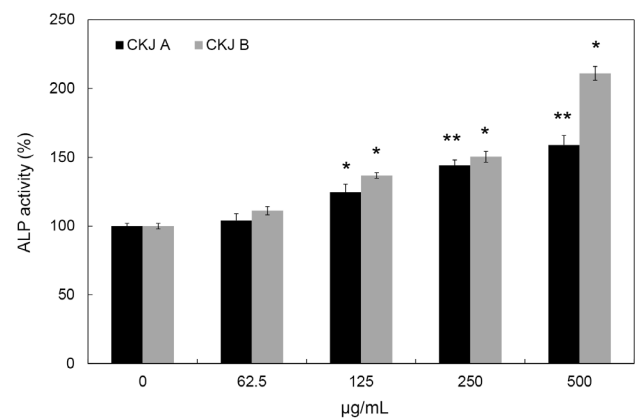


Fig. 5. Effect of CKJ on the alkaline phosphatase activities of the C2C12 osteoblastic cell during differentiation. Data represent the mean±SD of triplicate determinations from three separate experiments. * $P < 0.05$ versus non treated group, ** $P < 0.01$ versus non treated group. CKJ A: natural Cheonggukjang, CKJ B: PGA-increased Cheonggukjang.

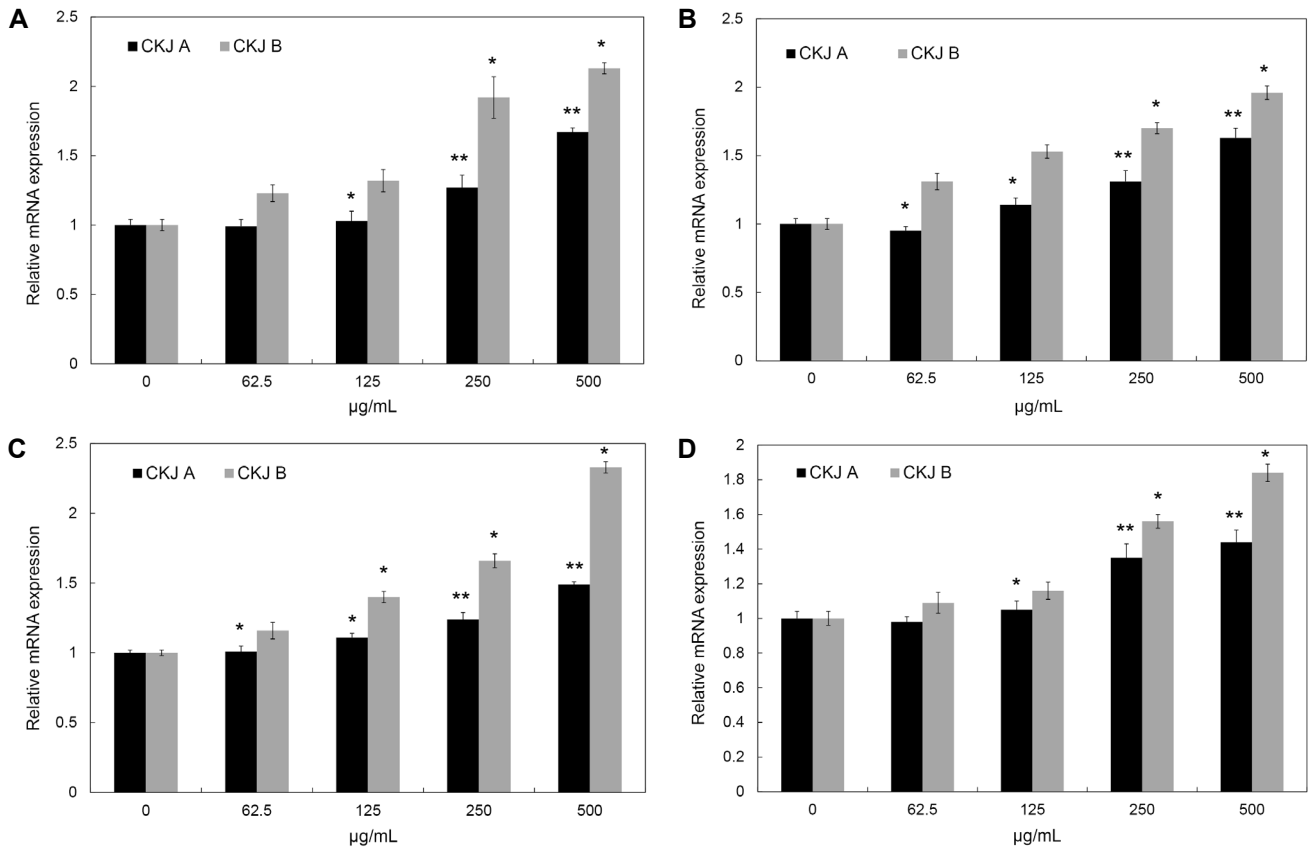


Fig. 6. Effect of CKJ on mRNA expression of osteoblast-related genes in of the C2C12 osteoblastic cell during differentiation. (A) osteocalcin (OCN), (B) type I collagen (Col1), (C) alkaline phosphatase (ALP), and (D) osteopontin (OPN). Data represent the mean±SD of triplicate determinations from three separate experiments **P*<0.05 versus non treated group, ***P*<0.01 versus non treated group. CKJ A: natural Cheonggukjang, CKJ B: PGA-increased Cheonggukjang.

에서 발현되는 유전자로서 일반적으로 골기질의 석회화를 촉진하는 요인으로 작용하는 것으로 알려졌다(32,33). 또한 OCN은 bone morphogenetic proteins(BMPs)에 의해 발현이 촉진되며, 특히 BMP-4에 의해 발현이 증가한다(33). OCN의 발현은 골이 석회화되어 결절을 형성하는 시기와 일치하는 반면, OPN은 OCN과 달리 조골세포 분화의 초기와 석회화기에 나타난다. Col1은 Runx2의 발현이 증가할 때 유도되며 이는 뼈의 무기질화를 촉진한다(32). ALP의 발현 역시 증대되면 조골세포의 분화를 촉진한다고 알려졌다. 이를 토대로 본 실험에서는 청국장이 조골세포 분화와 관련된 유전자 발현에 미치는 영향에 대해 알아보고자 하였다.

ALP의 발현은 모든 농도 및 청국장 처리군에서 증가하였으며 이는 ALP의 활성 정도와 같은 양상을 나타내었다. 또한 다른 유전자인 OCN, OPN, Col1의 유전자 발현 역시 모든 농도 및 시료처리군에서 대조군보다 높은 발현을 보였다. 또한 청국장 A보다 청국장 B가 더 높은 발현을 보였다. 이로 인하여 본 연구진은 청국장 B가 청국장 A보다 ALP, OCN, OPN, Col1 등의 유전자 발현을 증대시킴으로써 조골세포의 석회화 및 분화를 증대시켜 골다공증에 더 효과적일 것으로 생각한다(Fig. 6).

요 약

Polyglutamic acid(PGA) 함유량이 증대된 청국장이 조골세포에 미치는 영향을 세포 수준에서 관찰하고자 하였다. 조골세포에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 세포 생존율, 염기성 인산분해효소(alkaline phosphatase, ALP) 활성, 골 석회화 형성능, 조골세포 분화 관련 유전자 발현능을 측정하였다. 세포 독성이 없는 농도에서 염기성 인산분해효소 활성을 측정할 결과 농도에 의존적으로 ALP 활성이 증가하였으며, 일반 청국장 A보다 PGA 함유량이 증가한 청국장 B가 더 높은 ALP 활성 증가 효과를 나타내었다. 청국장의 골 석회화 형성능을 측정할 결과 역시 청국장 A보다 B가 더 높은 석회화 형성능을 나타내었다. 또한 분화 관련 유전자인 OCN, OPN, Col1, ALP 역시 청국장 B가 A보다 유전자 발현이 더 높게 나타났다. 이러한 실험 결과를 바탕으로 PGA가 증대된 청국장이 기존 청국장보다 조골세포의 활성화에 효과적일 것으로 생각한다.

감사의 글

본 연구는 산업통상자원부와 한국산업기술진흥원의 지역특

성화산업육성 기술개발사업(R&D)으로 수행된 연구 결과입니다.

REFERENCES

- Seo J, Hwang ES, Kim GH. 2011. Antioxidative and differentiation effects of *Artemisia capillaris* T. extract on hydrogen peroxide-induced oxidative damage of MC3T3-E1 osteoblast cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 1532-1536.
- Kim MJ, Im NK, Yu MH, Kim HJ, Lee IS. 2011. Effects of extracts from sarcocarp, peels, and seeds of avocado on osteoblast differentiation and osteoclast formation. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 919-927.
- Shin JM, Park CK, Shin EJ, Jo TH, Hwang IK. 2008. Effects of *Scutellaria radix* extract on osteoblast differentiation and osteoclast formation. *Korean J Food Sci Technol* 40: 674-679.
- Canalis E. 1985. Effect of growth factors on bone cell replication and differentiation. *Clin Orthop Relat Res* 193: 246-263.
- Canalis E, McCarthy T, Centrella M. 1988. Growth factors and the regulation of bone remodeling. *J Clin Invest* 81: 277-281.
- Oh HJ. 2005. Therapy of osteoporosis in climacteric. *J Korean Acad Fam Med* 21: 20-27.
- Wu D, Malda J, Crawford RW, Xiao Y. 2007. Effects of hyperbaric oxygen on proliferation and differentiation of osteoblasts derived from human alveolar bone. *Connect Tissue Res* 48: 206-213.
- Dong GC, Chen HM, Yao CH. 2008. A novel bone substitute composite composed of tricalcium phosphate, gelatin and *Drynaria fortunei* herbal extract. *J Biomed Mater Res A* 84: 167-177.
- Aldercreutz H, Mazur W. 1996. Physiological effects of phyto-estrogens in relation to cancer and other human health risks. *Proc Nutr Soc* 55: 399-417.
- Baker VL, Leitman D, Jaffe RB. 2000. Selective estrogen receptor modulators in reproductive medicine and biology. *Obstet Gynecol Surv* 55: S21-S47.
- Gray TK, Flynn TC, Gray KM, Nabell LM. 1987. 17 β -Estradiol acts directly on the clonal osteoblastic cell line UMR106. *Proc Natl Acad Sci* 84: 6267-6271.
- Lee BK, Jang YS, Yi SY, Chung KS, Choi SY. 1997. Immunomodulators extracted from Korean-style fermented soybean paste and their function. 1. Isolation of B cell mitogen from Korean-style fermented soybean paste. *Korean J Immunol* 19: 559-569.
- Youn KC, Kim DH, Kim JO, Park BJ, Yook HS, Cho JM, Byun MW. 2002. Quality characteristics of the *chungkookjang* fermented by the mixed culture of *Bacillus natto* and *B. licheniformis*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31: 204-210.
- Kim JS, Yoo SM, Choe JS, Park HJ, Hong SP, Chang CM. 1998. Physicochemical properties of traditional *chonggugjang* produced in different regions. *Agric Chem Biotechnol* 41: 377-383.
- Joo EY, Park CS. 2011. Antioxidant and fibrinolytic activities of extracts from soybean and *Chungkukjang* (fermented soybean paste). *Korean J Food Preserv* 18: 930-937.
- Park H, Yoon L, Kim HS. 2013. Effects of fermented soybean paste *Chungkukjang* on the immunoreactivity in ovariectomized mice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42: 1930-1939.
- Harada S, Matsumoto T, Ogata E. 1991. Role of ascorbic acid in the regulation of proliferation in osteoblast-like MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res* 6: 903-908.
- Takamizawa S, Maehata Y, Imai K, Senoo H, Sato S, Hata R. 2004. Effects of ascorbic acid and ascorbic acid 2-phosphate, a long-acting vitamin C derivative, on the proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells. *Cell Biol Int* 28 255-265.
- Cheng C, Asada Y, Aida T. 1989. Production of γ -polyglutamic acid by *Bacillus licheniformis* A35 under denitrifying conditions. *Agric Biol Chem* 53: 2369-2375.
- Borbely M, Nagasaki Y, Borbely J, Fan K, Bhogle A, Sevoian M. 1994. Biosynthesis and chemical modification of poly (γ -glutamic acid). *Polymer Bull* 32: 127-132.
- 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.
- Maeda T, Matsunuma A, Kawane T, Horiuchi N. 2001. Simvastatin promotes osteoblast differentiation and mineralization in MC3T3-E1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 280: 874-877.
- Schiller PC, D'ippolito G, Balkan W, Roos BA, Howard GA. 2001. Gap-junctional communication is required for the maturation process of osteoblastic cells in culture. *Bone* 28: 362-369.
- Yun J, Hwang ES, Kim GH. 2011. Effects of *Chrysanthemum indicum* L. extract on the growth and differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 1384-1390.
- Lee YS. 2001. Effect of isoflavones on proliferation and oxidative stress of MC3T3-E1 osteoblast-like cells. *Korea Soybean Digest* 18: 35-42.
- Choi EM, Koo SJ. 2002. Effects of soybean ethanol extract on the prostaglandin E₂ and interleukin-6 production in osteoblastic cells. *Food Res Int* 35: 893-896.
- Stein GS, Lian JB, Owen TA. 1990. Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation. *FASEB J* 4: 3111-3123.
- Choi EM, Suh KS, Kim YS, Choue RW, Koo SJ. 2001. Soybean ethanol extract increases the function of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Phytochemistry* 56: 733-739.
- Newmark HL. 1996. Plant phenolics as potential cancer prevention agents. *Adv Exp Med Biol* 401: 25-34.
- Jeon MH, Kim M. 2011. Effect of *Hijikia fusiforme* fractions on proliferation and differentiation in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J Life Sci* 21: 300-308.
- Park MJ, Joo BS, Lee JE, Kim HJ, Moon SE, Moon HS. 2010. Alendronate enhances osteoblastic differentiation with increased expression of Id-1 and Id-2 in pre-osteoblast cell line, MC3T3-E1. *Korean J Obstet Gynecol* 53: 274-281.
- Yang HM, Seo HS. 2013. Effects of ascorbic acid on osteoblast differentiation in MC3T3-E1 cells. *Soonchunhyang Medical Science* 19: 93-98.
- Kozawa O, Hatakeyama D, Tokuda H, Oiso Y, Matsuno H, Uematsu T. 2002. Sphingomyelinase amplifies BMP-4-induced osteocalcin synthesis in osteoblasts: role of ceramide. *Cell Signal* 14: 999-1004.