J. Fd Hyg. Safety
Vol. 24, No. 2, pp. 124~127 (2009)

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

재조합 효모를 이용한 호박씨 추출물의 에스트로겐 활성 평가

탁홍민[1] · 이복희[1] · 노숙령[1] · 김천수[2] · 정지윤[3] · 최창순[1]*
[1]중앙대학교 생활과학대학 식품영양학과, [2](주)맥코이교역, [3]공주대학교 산업과학대학 특수동물학과

Evaluation of Estrogenic Activity of Pumpkin Seed Extract using Recombinant Yeast Assay

Hongmin Tahk[1], Bog-Hieu Lee[1], Sooknyung Rho[1], Chun-Soo Kim[2], Ji-Youn Jung[3], and Changsun Choi[1]*
[1]*Department of Food and Nutrition, College of Human Ecology, Chung-Ang University,* [2]*McCoy Corporation,*
[3]*Department of Companion and Laboratory Animal Science, Kongju National University*
(Received March 25, 2009/Revised April 13, 2009/Accepted April 17, 2009)

ABSTRACT - The aim of this study is to evaluate the estrogenic activity of *Cucurbita pepo* seed extract which includes β-sitosterol and other phytosterols. Sample was extracted from *Cucurbita pepo* seed by supercritical carbon-dioxide method and resuspended with ethanol. Estrogenic activity was measured by recombinant yeast assay which detects estrogenic activity using recombinant yeast with high level of estrogenic receptor. However, estrogenic activity of pumpkin seed extract was not found in this study. Based on this data, pumpkin seed extract will not cause estrogenic disturbance.

Key words: Cucurbita pepo, β-sitosterol, Phytoestrogen, Recombinant yeast assay

식품의약품안전청에서 발간된 자료에 따르면 2006년 건강기능식품, 인삼제품류, 특수용도식품 생산액은 각각 약 5,000억, 2590억, 1800억 원으로 집계되었으며, 매년 꾸준한 성장세를 보이고 있다. 기존의 건강기능식품은 기존에는 37개 품목군으로 관리되어 왔으나, 최근 개정작업을 거친 건강기능식품 공전은 영양소(비타민 및 무기질, 식이섬유, 단백질, 필수지방산), 기능성원료(터핀류, 페놀류, 지방산 및 지질류, 당 및 탄수화물류, 발효미생물류, 아미노산 및 단백질류, 일반원료)와 같이 11개 원료군으로 개편하였다. 이 중에서 건강기능식품 시장의 상당부분을 차지하고 있는 지방산 및 지질류에는 오메가-3 지방산, 감마리놀렌산, 스쿠알렌을 포함하여 다양한 종류의 식물스테롤(Phytosterol)이 포함되며, 다양한 식물에서 얻어지는 추출물이 새로운 소재로 탐색 및 제품화되고 있다[1].

옥수수, 해바라기, 콩, 올리브, 참깨, 야자 등과 같은 식물 또는 종자로부터 얻어진 식물유에는 brassicasterol, campesterol, stigmasterol, β-sitosterol, γ-sitosterol 등을 포함한 phytosterol(또는 plant sterol)을 다량 포함하고 있는 것으로 알려지고 있다[2-3]. 식물유에 다량 함유된 β-sitosterol은 혈중 콜레스테롤 저하작용 나타낼 뿐만 아니라[2], HT-29, LNCaP 등과 같은 암세포주 성장을 저해하는 항암활성이 보고되어 중요한 기능식품소재로 주목을 받고 있다[4]. 특히 Pepo계 호박(*Cucurbita pepo*) 종자와 톱야자열매(Saw Palmetto Seed)는 β-sitosterol 함량이 높아 건강기능식품 소재로 연구되고 있다[5]. 호박은 한방 또는 민간요법에서 부종을 치료하는 이뇨제, 구충제, 전립선 질환 개선 등의 목적으로 오래 전부터 이용되어 왔으나 그 치료 효능 및 기능성이 과학적 규명이 되지 못하였다. 따라서 호박 과육을 활용한 죽, 가공식품 등과 같은 일반적인 식품개발 연구가 많았으나, 최근에는 호박 종자 추출물의 β-sitosterol을 주성분으로 한 양성전립선비대증(Benign Prostate Hyperplasia; BPH) 증상 개선 식품 개발이 시도되고 있다[5,6].

건강기능식품 소재로 활용되는 일부 식물의 추출물 중에는 여성호르몬인 에스트로겐(Estrogen)과 화학적 구조와 활성이 유사한 phytoestrogen을 포함하고 있다. Phytoestrogen은 각종 두류, 소맥, 보리, 땅콩, 올리브에 포함된 isoflavone, lignin, courmestan등을 지칭하며, 합성 estrogen과 달리 부작용이 적은 것으로 알려져 있다. Phytoestrogen을 섭취한 여성의 경우 폐경후 증후군(post-menopausal syndrome) 증

*Correspondence to: Changsun Choi, D.V.M., Ph.D. Department of Food and Nutrition, College of Human Ecology, Chung-Ang University 72-1 Naeri, Daeduck-myun, Ansung-si, Kyounggi-do, Korea
Tel: 82-31-670-4589 Fax: 82-31-676-8741
E-mail: cchoi@cau.ac.kr

상 완화, 심혈관계 질환, 치매, 에스트로겐 관련 질병, 골다공증을 예방 및 완화시키고 진행중인 골다공증의 치료에도 효과가 있다고 알려져 있어 건강기능식품/대체요법 제제로 개발되고 있다[7-8]. 그러나, Kim 등의 연구에 따르면 비정상적인 에스트로겐의 노출은 실험동물에서 이상을 유발하는 것으로 밝혀졌다[9]. 특히 비정상적으로 에스트로겐에 노출된 수컷 실험동물은 내재성 에스트로겐 생합성, 아로마타제의 활성, 에스트로겐 수용체 기전에 손상을 일으키며, 정소 세포의 퇴화, 세포의 자연사(apoptosis) 증가, 정자형성과정의 이상, 정자수의 감소, 수컷의 암컷화 행동, 생식 이상, 불임 등이 유발된다고 보고되었다[9].

Phytoestrogen은 의, 약학 분야의 호르몬 대체 요법에서부터 기능성 식품 개발 분야에 이르기까지 광범위하게 이용되고 있다. 그러나 이러한 식물 소재에 포함될 수 있는 phytoestrogen의 과다한 섭취는 남성에게 부작용을 유발할 수 있어 기능성 소재로서 활용에 앞서 식품안전성 확보가 요구된다. 따라서 기능성 원료로 새롭게 주목 받고 있는 호박종자추출물의 에스트로겐 활성의 존재여부를 측정하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

연구에 사용된 호박종자추출물은 이산화탄소를 이용한 초임계 추출법으로 분리하고 maltodextrin으로 분말화 가공한 제품을 RIA INTERNATIONAL LLC(NJ, USA)에서 구입한 후 4°C에서 보관하며 실험에 사용하였다. 호르몬 활성 측정을 위한 양성대조 시료는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MI, USA)에서 17β-Estradiol(E2)을 구입하였다. Park의 연구에서 phytosterol의 추출온도에 따른 추출량은 유의적 차이가 없었고[10] 일반적으로 호박씨를 생으로 섭취하고 분말형태의 시료임을 감안하여 각 재료는 100% Ethanol을 이용하여 40°C에서 15분간 추출하여 각각의 농도로 희석하였다.

재조합 효모 분석

재조합 효모 균주

에스트로젠 활성 측정에 사용한 재조합 효모 균주 *Saccharomyces cerevisiae* ER+LYS 8127(YER)은 서울대학교 수의과대학 수의공중보건학 연구실에서 분양 받아 사용하였다. 균주의 배양은 Yeast Nitrogen Base(without amino acid, 67 g/ml, YNB: Invitrogen, USA), 1% dextrose, L-lysine (36 μg/ml), 그리고 L-histidine (24 μg/ml)이 혼합된 선택 증균 배양액을 이용하여 30°C 배양기(EYELA, LTI-600 SD, Japan)에서 150 rpm으로 진탕 배양(OPTIMA, orbital shaker, os-752, Japan)하였다. 재조합 효모는 분광광도계(Spectronic 20 Genesys, Spectronic instruments, USA)로 측정한 600 nm O.D.값이 1.0에서 2.0사이에 도달할 때까지 배양한 후 본 실험에 사용하였다.

Yeast를 통한 에스트로겐 활성 분석

재조합 효모 배양액은 600 nm O.D.값이 0.03에 되도록 희석한 후 10 mM $CuSO_4$(5 μl/ml)를 넣어 receptor를 발현을 개시하였다. 50 ml conical tube에 분주된 재조합 효모 배양액에 호박종자추출물, 양성대조군 및 음성대조군을 각각 5 μl씩 처치하고, 배양기에서 30°C, 150 rpm으로 18시간 배양하였다. 호박종자추출물은 에탄올에 희석하여 250 mg/ml의 농도가 되도록 준비하고 10배 단계 희석하여 샘플을 준비하였다. 양성대조군으로 사용되는 estradiol은 10배 단계 희석하여 10^{-1} M~10^{-12} M 농도를 준비하였으며, Vehicle control은 추출물 용해시 사용한 100% ethanol이 사용되었다. 배양 후 배양액에 희석하며 600 nm에서 OD 값이 0.25이 되면 이를 96well-plate에 각각 100 ul씩 3개 well에 분주하였다. Microplate reader(Spectramax190, Molecular Device, USA)를 이용하여 590 nm에서 OD를 측정한 후 o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside(ONPG, 2 mg/ml), 0.1% sodium dodecyl sulfate(SDS), 50 mM β-mercaptoethanol 그리고 1.163 mg/ml(25 U/g/ml)의 Zymolyase 20T(MP biomedicals, USA)가 첨가된 Z buffer(60 mM Na_2HPO_4, 40 mM NaH_2PO_4, 10 mM KCl, 1 mM $MgSO_4$, pH7.0)를 각 well에 100 ul씩 처리하여 β-Galactosidase 활성을 유도하고 20분이 지난 뒤 420nm에서 OD를 측정하였다. 측정된 각각의 3개 well의 값을 평균 낸 후 420 nm에서 측정한 값에서 590 nm에서 측정한 값을 뺀 후 반응정도를 살펴보았다.

통계처리

모든 실험은 3반복으로 수행되었으며 관찰된 실험결과는 SAS 통계 프로그램(version 9.1, SAS Institute, Cary, NC, USA)의 ANOVA procedure을 이용하여 분석되었다. 각각의 처리군이 통계적으로 유의적으로 나타나는 경우에 ($P \leq 0.05$)각각의 3반복 실험에 의한 평균값은 Duncan's multiple range test를 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

재조합 효모는 양성대조 시약인 17β-Estradiol(E2) 처치에 강한 에스트로겐 활성을 나타내었다. 처치된 17β-Estradiol의 농도 희석에 따라 에스트로겐 활성이 일부 감소하는 경향이 있었으며, 10^{-10} M 이하의 농도에서는 호르몬 활성이 현저히 감소되었다(Data not shown). 따라서 양성대조군은 10^{-9} M estradiol을 처치하였다. 최종농도 250 ug/ml~2.5 pg/ml 호박종자추출물을 처치한 모든 실험군에서

뚜렷한 에스트로겐 활성이 관찰되지 않았다. 또한 양성대조군과 실험군과의 통계학적 유의성 검정에서도 모든 실험군의 에스트로겐 활성값이 유의하게(P≤0.05) 낮게 관찰되었다(Fig. 1).

사람을 대상으로 한 선행연구들은 호박종자추출물 1일 160 mg~320 mg 용량을 급여하고 생체 반응을 관찰하였는데, 대부분의 경우에서 이상반응이나 독성작용이 관찰되지 않았다고 보고하였다[11-12]. 본 연구에서 사용한 호박종자추출물의 최고 농도는 250 ug/ml로 선행 임상연구에 사용된 용량, 인체 흡수율, 생체외 실험(In vitro) 조건 등을 고려한다면 충분히 높은 용량으로 사려된다. 따라서 호박종자추출물은 생체내에서 에스트로겐 활성을 나타내지 않을 것으로 기대된다.

Yang 등은 한국산 약용식물 9종의 추출물을 대상으로 에스트로겐과 안드로겐 활성을 측정한 바 있다. 약용식물 9종의 추출물 중에서 7종의 추출물은 에스트로겐 활성을 나타내었으며, 4종의 추출물은 안드로겐 활성을 나타내는 것으로 조사되어 식물 추출물 중에서 phytoestrogen이 상당히 포함되어 있음을 제시하였다. 한편 에스트로겐 양성 세포주 MCF-7의 증식능 실험에서는 한국산 약용식물 추출물 9종 중에서 8종의 추출물이 유방암 세포주의 증식을 유의적으로 억제하였다고 보고하였다. 이는 약용식물 추출물에 에스트로겐 활성이 있음에도 불구하고 MCF-7의 증식을 유의적으로 억제하는 항암 인자 활용될 수 있을 것으로 보고하였다[9].

Lee 등은 콩과 식물의 하나인 *Pueraria mirifica* 추출물의 에스트로겐 활성을 보고하였다. 흥미롭게도 재조합 효모를 이용한 에스트로겐 활성 측정에서는 활성이 관찰되지 않았으나 MCF-7 세포주 증식능 측정법에서는 에스트로겐 활성이 관찰되었다고 보고하였다. Lee 등은 추출물의 직접적인 에스트로겐 활성을 측정하는 재조합 효모법과 달리 세포 내에서 대사된 추출물이 MCF-7 세포주를 증식시키는 에스트로겐 활성을 가졌을 것으로 보고하였다[13].

재조합 효모를 이용한 에스트로겐 활성 측정 실험에 사용된 호박종자추출물은 Phytoestrogen을포함하는 다른 식물성 추출물들과 달리 에스트로겐 활성을 갖지 않는 것으로 조사되었다. 다만 Lee 등의 연구와 같이 호박종자추출물의 대사산물이 에스트로겐 활성을 갖는지 여부는 조사되지 못 하였다[13]. 그러나 최근 실험동물에서 수행된 호박종자추출물 실험에서 에스트로겐 활성에 따른 부작용 보고가 없는 것을 근거로 대사산물의 에스트로겐 활성과 상관성이 없을 것으로 추정할 수 있다. 따라서 향후 수행될 연구에서는 호박종자추출물의 대사산물의 에스트로겐 활성 측정 또는 MCF-7 세포주 등을 이용한 추가적인 연구가 수행될 필요가 있다고 하겠다. 한편 본 연구결과와 같이 호박종차추출물의 에스트로겐 활성 부재는 식품 안전성 확보 측면에서 중요한 의미로 해석될 수 있다. 또한 호박종자추출물은 건강기능식품의 안전한 식품소재로 활용될 수 있을 것이다.

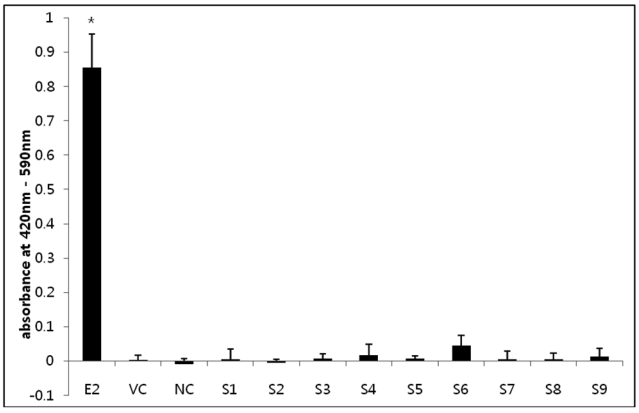

Fig. 1. Effect of Pumpkin seed extract powder on the yeast expressing human estrogen receptor. E2, 10^{-9}M 17β-Estradiol; VC, vehicle(0.1% EtOH) control; NC, negative (untreated) control; S1, 250 ug/ml; S2, 25 ug/ml; S3, 2.5 ug/ml; S4, 250 ng/ml; S5, 25 ng/ml; S6, 2.5 ng/ml; S7, 250 pg/ml; S8, 25 pg/ml; S9, 2.5 pg/ml.
*Significantly different from control (P≤0.05).

감사의 말씀

본 연구는 농림수산식품부 농림기술개발사업(과제번호: 108054-03-1-CG000)의 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사의 말씀을 드립니다.

요 약

기능성 식품 소재로 주목을 받고 있는 호박종자추출물의 에스트로겐 활성을 재조합 효모를 이용하여 측정하였다. 양성대조물질로 사용된 17β-Estradiol은 강력한 에스트로겐 활성을 나타내었으며, 농도의존적인 반응을 나타내었다. 초임계추출법에 의하여 얻어진 호박종자추출물 분말을 에탄올로 재추출하여 시험에 사용한 결과 에스트로겐 활성이 관찰되지 않았다. 따라서 호박종자추출물이 건강기능식품 제조에 사용될 때 에스트로겐 활성으로 인한 부작용은 없을 것으로 기대된다.

참고문헌

1. 김명철, 홍진환, 유순영, 외 18명: 건강기능식품 평가의 과거·현재·미래. 식품의약품안전청, 서울, pp. 1-84 (2008).
2. Choi, Y.J. and Choi, S.W.: Sterol Composition and Phytoestrogen Activity of Safflower(*Carthamus tinctorius* L.) Seed. *Journal of Life Science*, **13**, 529-534 (2003).
3. Itoh, T., Tamura, T. and Matsumoto, T.: Sterol Composition of 19 Vegetable Oils. *J Am Oil Chem Soc.* **50**, 122-125

(1973).
4. Awad, A.B. and Fink, C.S.: Phytosterols as Anticancer Dietary Components: Evidence and Mechanism of Action. *J. Nutr.* **130**, 2127-2130 (2000).
5. Sim, H-S., Jang, B-C., Park, H-M., Jeng, B-Y. and Oh, M-J.: Isolation of Cucurbitacin E from Sprouted Pumpkin Seed and Analysis of Its Anti-cancer and Anti-inflammatory Activities. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **37**, 834-840 (2008).
6. WILT, T.J., MACDONALD, R. and ISHANI, A.: β-sitosterol for the treatment of benign prostatic hyperplasia: a systematic review. *BJU International*. **83**, 976°©983 (1999).
7. Kim, D.J.: Hormone Therapy and Phytoestrogen. *Korean J. Community Nutrition*. **8**, 1030-1033 (2003).
8. Yang, S-R., Hong, H-D., Cho, S-D., Ahn, N-S., Jung, J-W., Park, J-S., Jo, E-H., Hwang, J-W., Sun-bo, Park, J-R., Lee, S-H., Jung, J-Y., Choi, C., Kang, K-S. and Lee, Y-S.: Screening of Korean Medicinal Herbs for Hormonal Activities using Recombinant Yeast Assay and MCF-7 Human Breast Cancer Cells. *J. Fd Hyg. Safety.* **20**, 1-6 (2005).
9. Kim, J.H., Kim, J.K. and Yoon, Y-D.: Estrogen Function in Male Rodents Fertility. *Dev. Reprod.* **9**, 85~93 (2005).
10. Park, R-K. and Lee, K-T.: Optimization for the Phytosterol Extraction and Production of Structured Lipids from Safflower seed. *Korean Journal of Food Preservation*. **10**, 219-223 (2003).
11. Lowe, F.C., and Fagelman E.: Phytotherapy in the treatment of benign prostatic hyperplasia: an update, *Urology.* **53**, 671-678 (1999).
12. Di Silverio F, Flammia GP, Sciarra A, Caponera M, Mauro M, Buscarini M, Tavani M, D'Eramo G.: Plant extract in BPH. *Minerva Urol Nefrol.* **45**, 143-149 (1993).
13. Lee, Y.S., Park, J.S., Choi, S.D., Son, J.K., Cherdshewasart, W. and Kang, K.S.: Requirement of metabolic activation for estrogenic activity of *Pueraria mirifica*. *J. Vet. Sci.* **3**, 273-277 (2003).