

Isoflavone 강화 기능성 계란 생산 : 난황내 Genistein 전이 효율 개선

황보 중¹ · 이병석¹ · 이현정¹ · 정완태¹ · 조성백¹ · 홍의철¹ · 배해득¹ · 장종수^{2,*}

¹농촌진흥청 축산연구소, ²한국방송통신대학교

Production of the Functional Egg to Strengthen Isoflavone : Improvement of Transfer Efficiency of Genistein into the Egg Yolk

J. Hwangbo¹, B. S. Lee¹, H. J. Lee¹, W. T. Chung¹, S. B. Cho¹, E. C. Hong¹, H. D. Bae¹ and J. S. Chang^{2,*}

¹National Livestock Research Institute, RDA, ²Department of Agricultural Science, Korean National Open University

ABSTRACT This study was carried out to determine whether genistein implants in laying hens could be transferred into their eggs. 250 mg genistein pellet was implanted two or four subcutaneously in the neck of laying hens. The contents of genistein in egg yolk transferred were analyzed with HPLC-MS. In 500 mg genistein pellets, it was detected as 395 ng/egg yolk on the day 18 after implanting and maintained as 546 ng/egg yolk after the day 59. In 1,000 mg, genistein was detected as 240 ng/egg yolk on the day 13, as 514 ng/egg yolk on the day 30 and maintained over 59 days. In conclusion, the direct genistein implants could be more twenty times efficiently transferred to egg yolks than dietary supplement.

(Key words: genistein, implant, egg yolk, laying hens)

서 론

건강에 대한 관심이 증가되면서 국내외적으로 건강 기능성 식품 혹은 건강 기능성 식품 첨가제에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. Isoflavone은 polyphenolic 복합물로서 항암(Singleton 등, 2000), 항산화(Vedavanam 등, 1999), 콜레스테롤 감소(Anderson 등, 1995; Elizabeth 등, 1998), 항박테리아(Wells 등, 1999) 등에 효과가 있다는 보고가 많다. 특히, genistein은 isoflavone 물질 중 하나로서 90년대 이후부터 활발한 연구가 진행되어 지난 10년간 활발하게 보고되어 왔다.

Genistein은 대두에서 추출되는 생합성 물질로서, 대두 분말 1 g에는 대략 500 μ g의 genistein이 함유되어 있다(Dixon과 Ferreria, 2002). Genistein은 생체에서 분비되는 성호르몬인 estrogen과 화학 구조가 유사하며(Fig. 1), 체내에서 estrogen과 같은 물질로서 작용하여(Saitoh 등, 2001), estrogen의 기능을 생체 내에서 수행할 수 있다. 이러한 구조들은 estrogen 수용체와 단백질 결합 작용을 하는 성호르몬을 결합시키는 능력을 제공함으로써 genistein은 estrogen의 작용과 anti-estrogen의 작용을 동시에 발휘한다. 즉, genistein은 estrogen에 결합할 수 있는 estrogen 수용체에 대한 결합력이 estrogen 호르몬의 1/100로 혈중내 estrogen 농도 저하에 따른 문제점을 보완할 수 있는 물질로 간주되었다(Dixon과 Ferreria, 2002). 그러므로 genistein은 phytoestrogen의 일종으로서 androgen과 estrogen의 비율을 조정하여 세포를 겨냥한 호르몬의 이용성에 영향을 미친다.

폐경기 이후의 여성에게서 혈중내 estrogen 농도의 저하로 발생하는 갱년기 장애, 골다공증, 안면 홍조 등의 문제점 치료에 호르몬 요법으로 합성 호르몬을 사용하여 왔으나, 유방암을 포함한 호르몬성 암의 발생 위험때문에 사용에 주의가 요구되고 있다(Lee 등, 1991). 이러한 호르몬 요법의 문제점을 해결하기 위하여 phytoestrogen의 일종인 genistein을 급여함으로써 문제점을 해결하고자 하는 시도가 연구되고 있다. Estrogen이 부족한 갱년기에는 isoflavone의 섭취로서 골다공증과 갱년기 장애를 예방하게 된다(Alekel 등, 2000). 특히, genistein은 합성 호르몬의 급여시 발생하는 호르몬성 암의 위험 효과가 없을 뿐 아니라 유방암이나 전립선암과 같은 호르몬성 암의 치료 효과가 있음이 많은 논문에서 보고되고 있다(Yanagihara

* To whom correspondence should be addressed : jschang@knou.ac.kr

등, 1993; Uckun 등, 1995; Fritz 등, 1998; Lamartiniere, 2000; Seichiro 등, 2003). 또한, genistein 급여시에는 혈중 콜레스테롤의 농도가 감소하여 심장 질환의 예방 효과가 있음도 보고되고 있다(Crouse 등, 1999; Greaves 등, 2000). 그럼에도 불구하고, isoflavone 강화 식이 보충제가 유방암 처방에 쓰이는 tamoxifen의 항종양 효과를 무효화한다는 연구 결과도 보고되었다(Mary 등, 2004).

Saitoh 등(2001)은 급여 방식을 통한 genistein의 난황내 전이를 처음으로 보고하였다.

따라서 본 연구는 계란내 난황에 전이되는 대두 isoflavone의 일종인 genistein을 산란계에 비급여 방식인 피하 이식을 통하여 기존의 급여 방식보다 난황내 전이 효율을 개선하고자 실행하였다.

재료 및 방법

1. 공시 동물 및 공시 재료

본 시험에서는 62주령 White Leghorn 산란계 30수를 공시하였으며, 공시재료는 순도 97% 이상의 genistein 250 mg을 직경 0.5 cm×높이 0.2 cm 정도의 펠렛으로 성형하여 이용하였다.

2. 시험 방법

1) 시험 설계

사료는 한국사양표준(가급, 2002)이 제시한 옥수수-대두 박 위주의 기초 사료를 이용하였으며(Table 1), 처리구는 대조구(무처리구)와 genistein 500 mg과 1,000 mg을 이식한 3개 처리구로 나누어 총 3처리구, 처리구당 10수씩 완전임의 배치하였다.

2) Genistein 피하 이식

순도 97% 이상의 genistein 250 mg을 펠렛으로 성형한 후 500 mg 및 1,000 mg의 용량으로 각각 2개, 4개씩 산란계의 어깨 부위 피하에 이식하였다.

3) 사양 관리

사양 관리는 3단 직립 철제 케이지(25×37×37 cm)에 케이지당 1수씩 시험에 공시하였다. 사료는 자유 급여하였으며, 급수는 니플을 통하여 자유 음수시켰다. 점등 관리는 17L/7D 방법으로 하였고 시험기간 중 계사내 평균 온도는 23±2℃로

조정하였으며, 습도는 62±8%를 유지하였고, 기타 사양 관리는 농촌진흥청 축산연구소의 사육 관행에 따라서 수행하였다.

3. 난황내 이식된 Genistein 분석

난황내 genistein 검출을 위하여 Saitoh 등(2001)의 방법을 이용하였다. 난황 5 g을 test tube(50 mL)에 넣고, 0.1 M Sodium acetate buffer(pH 5.0)로 녹인 후, β -glucuronidase를 넣은 혼합물을 37℃에서 밤새 배양하여 효소를 활성화시켰다. 활성된 효소는 29.2 mL의 에탄올과 혼합하여 2,000×g으로 10분간 원심분리 하였다. 상층액을 취한 후, 침전물은 10 mL 70% 에탄올로 녹인 후 다시 2,000×g으로 10분간 원심분리 하였다. 두 번째 상층액을 첫 번째 상층액과 섞은 후 증류수로 1:1 희석하여 2×15 mL hexane으로 추출하였다. 에탄올/증

Table 1. Feed formula and chemical composition of experimental diet

Ingredients	%
Corn	54.00
Wheat bran	9.70
Soybean meal	18.00
Corn gluten meal	5.00
Salt	0.30
Vit.-mineral premix ¹	0.50
L-lysine	0.50
DL-methionine	0.50
Limestone	7.50
Tricalcium phosphate	1.00
Chemical composition ²	
ME(kcal/kg)	2,650
Crude protein(%)	15.00
Lysine(%)	0.70
Methionine(%)	0.30
Calcium(%)	3.28
Phosphorus(%)	0.63

¹ Provided following nutrients per kg of diet : vitamin A, 12,300 IU; vitamin D₃, 2,500 IU; vitamin E, 20 IU; riboflavin, 5.6 mg; pyridoxine, 1.6 mg; vitamin B₁₂, 14 mg; niacin, 30 mg; pantothenic acid, 12 mg; folic acid, 1.0 mg; biotin, 0.12 mg.

² Calculated values.

류수액을 취한 후 diethyl ester로 3번(69 mL, 20 mL, 15mL) 추출하였다.

계란의 난황에서 추출한 genistein은 Pico-Tag 4.5 μ m column (3.9 \times 150 mm, Waters-Millipore, USA)를 장착한 HPLC(Waters-Millipore, USA) 및 LC-MS(Waters-Micromass ZQ, USA)를 이용하여 분석하였다.

4. 통계 처리

모든 자료는 SAS의 ANOVA(SAS Institute, 1990)를 이용하여 분석하였다. 각 처리구간의 통계적 유의성은 Duncan's multiple range test(Duncan, 1955)로 처리하여 평균간의 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

가축에 급여된 isoflavone은 소장에서 흡수되고, 간에서 glucuronide 혹은 sulfide conjugate로 구조가 바뀌고, 혈류를 따라 주변 조직이나 난황으로 전이되거나, 분과 노로 배설된다(Saitoh 등, 2001). Isoflavone은 수용성인 aglycon이나 conjugate로 바뀌면서 난황으로의 전이가 쉽게 이루어지며, 그 전이율은 70% 정도이다(Saitoh 등, 2001).

본 연구에서 genistein 500 mg 혹은 1,000 mg을 어깨 부위 피하에 이식 후 난황에 전이된 genistein 함량을 Table 2에 나

타내었다. Genistein 500 mg과 1,000 mg 처리구는 이식 13일째에 각각 218 ng/g과 240 ng/g의 genistein이 전이되어 대조구 72.2 ng/g과 유의적인 차이를 보였다($p<0.01$). 이식 18일째 각각 395 ng/g과 406.5 ng/g으로 13일째보다 높았다($p<0.01$). 또한 이식 후 30일째에 각각 500 ng/g과 514 ng/g의 genistein이 난황으로 전이되어 18일째 전이된 양보다 높았으며($p<0.01$), 각각 546 ng/g과 580 ng/g의 농도가 59일 이상 지속되었다. Genistein 500 mg과 1,000 mg 이식 후 난황으로 전이된 양은 차이가 없었다.

Saitoh 등(2001)이 급이 genistein의 난황으로의 전이를 처음으로 보고하고, 이번 연구에서 얻어진 결과를 Table 3에서 비교하였다. Saitoh 등(2001)의 급이 방식은 50일 동안 매일 수당 35 mg 혹은 100 mg의 genistein을 사료에 첨가하여 급여하였을 때 136 ng/g 혹은 272 ng/g이 난황에서 검출되었다. 그러나 비급여방식인 피하 이식으로 genistein 500 mg을 이식한 59일 후에는 546 ng/g이 난황에서 검출되었다.

이상의 결과를 비교하여 보면, 272 ng/g의 genistein이 함유된 계란을 50일 동안 생산하기 위해서 기존의 방식은 100 mg의 genistein을 사료를 통해 지속적으로 공급하여 주어야 한다. 그러나 본 기법에서는 500 mg의 genistein을 이식하였을 경우, 500 ng/g의 genistein이 함유된 계란을 50일 이상 지속적으로 생산할 수 있기에 기존의 방법에 비교하여 20배 이상의 효과적인 방법이라 할 수 있다. 이러한 피하 이식 방법을 통해서 phytoestrogen 계열의 생리 활성 물질의 난황내

Table 2. Genistein contents in egg yolk after subcutaneous implanting in the neck of laying hens (units : ng/g/yolk)

Treatments	5 day	13 day	18 day	30 day	59 day	SEM ¹
Control	77.9	72.2 ^B	71.6 ^B	75.0 ^B	74.5 ^B	3.50
Implanted (500 mg)	75.1 ^d	218.0 ^{Ac}	395.0 ^{Ab}	500.0 ^{Aa}	546.0 ^{Aa}	36.40
Implanted (1,000 mg)	76.5 ^d	240.0 ^{Ac}	406.5 ^{Ab}	514.0 ^{Aa}	580.0 ^{Aa}	43.10
SEM ¹	4.24	24.52	17.90	35.12	23.00	-

¹ Pooled standard error of the mean for 30 laying hens per treatment.

^{a-d} Means with different superscripts in the same row differ significantly ($p<0.01$).

^{A,B} Means with different superscripts in the same column differ significantly ($p<0.01$).

Table 3. Comparison between feeding and subcutaneous implanting methods for the transfer of genistein

Supply methods	Supply quantity	Supply quantity(50 days)	Transfer
Feeding (Saitoh et al., 2001)	35 mg/day/bird	1,750 mg	136 ng/g/yolk
	100 mg/day/bird	5,000 mg	272 ng/g/yolk
Implanting	500 mg/day/bird	500 mg	≥ 500 ng/g/yolk

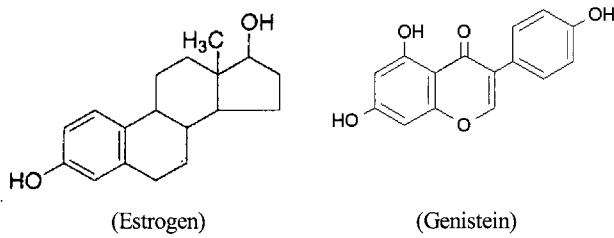


Fig. 1. Structures of estrogen and genistein.

전이가 기존의 급이 방식보다 더욱 용이할 것으로 사료된다.

기능성 물질이 난황으로 전이되는 기전에 대해서 최근까지 많은 연구가 계속되어 왔다. 2004년 4월 캐나다 밴프에서 계란 분야 학술단체 및 산업체 공동으로 ‘건강 증진을 위한 제3회 국제 계란 심포지엄’이 개최되어, 건강을 위한 계란성분의 탐색, 건강 기능성 식품으로서 계란에 대한 소비자들의 인식 제고, 과학적 마케팅 전략개발 등을 중심으로 그동안의 최신 연구동향들이 발표되었다. 그 내용들을 간략히 정리하면, 저콜레스테롤 계란 생산 기법, 사료를 통한 건강 기능성 물질 강화 계란(CLA, n-3 지방산, 엽산, 루테인, 이소플라본, 셀레늄, 항산화제, 지용성 비타민 등), 면역 및 치료제로서의 IgY 전이기술(*P. aeruginosa* 및 *Helicobacter* 감염 치료, 알레르기 치료 등), 가공 기술 및 마케팅 전략(건강 과학 및 과학과 공학을 기초로 한 시장의 전략) 등이다. 기능성 물질이 난황으로 전이되어 기능성 계란 생산 연구에 대한 관심이 모아지고 있으며, 앞으로도 지속적인 연구가 필요한 과제라 하겠다.

적 요

Genistein의 전이율을 조사하기 위하여 순도 97% 이상의 genistein 250 mg을 펠렛으로 성형한 후 500 mg 및 1 g의 용량으로 각각 2, 4개씩 산란계의 어깨 부위 피하에 이식하여 계란의 난황 내에서 검출되는 genistein의 함량을 HPLC 및 HPLC-MS를 이용하여 분석하였다. Genistein 500 mg 처리구에서, 12, 18, 30일에 각각 218, 395 ng/g, 500 ng/g의 genistein이 전이되어 59일까지 계속적으로 유지되었다. 또한 genistein 1,000 mg 처리구에서는 12일 후에는 240 ng/g, 18일 후에는 406.5 ng/g, 30일 후에는 514 ng/g의 genistein이 전이되어 59일까지 계속적으로 유지되었다. 본 연구를 통하여, 500 ng/g 이상의 genistein이 함유된 계란을 59일 이상 지속적으로 생산할 수 있어 피하이식을 통한 비급이 방식은 기존의 급이 방식에 비해 20배 이상 효과적이었다.

인용문헌

- Alekel D, Germain A, Peterson C, Hanson K, Stewart J, Toda T 2000 Isoflavone-rich soy protein isolate attenuates bone loss in the lumbar spine of perimenopausal women. *Am J Clin Nutr* 72:844-852.
- Anderson J, Johnston B, Cook-Newell M 1995 Meta-analysis of the effects of soy protein intake serum lipids. *N Engl J Med* 333:276-282.
- BBC 1999 Soya beans linked to developmental damage.
- Cancer Research 2002 Isoflavone Genistein May Negate Effect of Common Breast Cancer Drug.
- Crouse J, Morgan T, Terry J, Ellis J, Vitolins M, Burke G 1999 A randomized trial comparing the effect of casein with that of soy protein containing varying amounts of isoflavones on plasma concentrations of lipids and lipoproteins. *Arch Intern Med* 159:2070-2076.
- Dixon RA, Ferreria D 2002 Genistein. *Phytochemistry*. 60:205-211.
- Duncan DB 1955 Multiple range and multiple F tests. *Biometrics* 11:1-42.
- Egg Nutrition for Health 2004 The 3rd international symposium. Banff Centre, Banff, Alberta.
- Elizabeth A, Phuong S, Shari A, Alan C, Renee C 1998 Dietary isoflavones reduce plasma cholesterol and atherosclerosis in C57BL/6 mice but not LDL receptor-deficient mice. *J Nutr* 128:954-959.
- Fritz WA, Coward L, Wang J, Lamartiniere CA 1998 Dietary genistein: perinatal mammary cancer prevention, bioavailability and toxicity testing in the rat. *Carcinogenesis* 19:2151-2158.
- Greaves K, Wilson M, Rudel L, Williams L, Wagner J 2000 Consumption of soy protein reduces cholesterol absorption compared to casein protein alone or supplemented with anisoflavone extract or conjugated equine estrogen in ovariectomized cynomolgus monkeys. *J Nutr* 130:820-826.
- Lamartiniere CA 2000 Protection gainst breast cancer with genistein: a component of soy. *Am J Clin Nutr* 71:1705. S-1707S.
- Lee HP, Gourley L, Duffy SW, Esteve J, Lee J Day NE 1991 Dietary effects on breast-cancer risk in Singapore. *Lancet* 337:1197-1200.

- Mary C, Lewis HK, Ross R, Rebecca JR, Bruce MP, Randall SS, Steven S, Fritz RR 2004 Estrogen plus progestin and risk of venous thrombosis. *J Ameri Med Assoc* 292:1573-1580.
- Saitoh S, Sato T, Harada H, Takita T 2001 Transfer of soy isoflavone into the egg yolk of chickens. *Biosci Biotechnol Biochem* 65(10):2220-2225.
- SAS Institute Inc 1990 SAS STAT User's Guide Release 6.08. SAS Institute Inc Cary NC.
- Seiichiro Y, Tomotaka S, Minatsu K, Satoshi S, Shoichiro T 2003 Soy, isoflavones, and breast cancer risk in Japan. For the Japan health center-based prospective study on center cardiovascular disease (JPHC Study) Group. *Journal of National Center Institute* 95(12):906-913.
- Singleton K, Faller J, Li J, Mahungu S 2000 Effect of extrusion on isoflavone content and antiproliferative bioactivity of soy/corn mixtures. *J Agric Food Chem* 48:3566-3571.
- Uckun FM, Evans WE, Forsyth CJ, Waddick KG, Ahlgren LT, Chelstrom LM, Burkhardt A, Bolen J, Myers DE 1995 Biotherapy of B-cell precursor leukemia by targeting genistein to CD19-associated tyrosine kinase. *Science* 267:886-891.
- Vedavanam K, Sriyayanta S, O'reilly J, Raman A, Wiseman H 1999 Antioxidant action and potential antidiabetic properties of an isoflavonoid-containing soybean phytochemical extract (SPE). *Phytother RES* 13:601-608.
- Wells C, Jechorek R, Kinneberg K, Debol S, Erlandsen S 1999 The isoflavone genistein inhibits internalization of enteric bacteria by cultured Caco-2 and HT-29 enterocytes. *J Nutr* 129:634-640.
- Yanagihara K, Ito A, Toge T, Numoto M 1993 Anti-proliferative effects of isoflavones on human cancer cell lines established from the gastrointestinal tract. *Cancer Res* 53:5815-5821.
- 농림부 2002 한국사양표준(가금).