The Korean Journal of Culinary Research
Vol. 17, No. 5, pp. 241~252 (2011)

소금 종류를 달리하여 제조한 된장에서의 항암효과

이 경 임[1)] · 박 건 영[2)] · 안 형 기[3)¶]
양산대학교 호텔외식조리과[2)] · 부산대학교 식품영양학과 및 김치 연구소[1)] ·
인천 재능대학교 호텔외식조리과[3)¶]

The Anticancer Effects of Doenjang Made with Various Kinds of Salt

Kyeoung-Im Lee[1)] · Kun-Young Park[2)] · Hyung-Ki Ahn[3)¶]
Dept. of Hotel Culinary Arts, Yangsan University[1)]
Dept. of Food Science and Nutrition, and Kimchi Research Institute Pusan National University[2)]
Dept. of Hotel Culinary Arts, Incheon JEI University[3)¶]

Abstract

The study was carried out to evaluate the anticancer effects in Korean soybean paste(*doenjang*) added with sun-dried salt(S-D), roasted salt(R-D), bamboo salt roasted once(B1-D) or bamboo salt roasted nine times(B9-D). In MTT assay, S-D, R-D, B1-D and B9-D exhibited a significant inhibitory activity(64-87% and 68-92%) against the proliferation of AGS human gastric adenocarcinoma cells by adding 0.05% and 0.1% of methanol extract. Among Balb/c mice injected with sarcoma-180 cells, the bodies, livers, spleens, kidneys and heart weight of the mice administered with 4 kinds of *doenjang* extracts were heavier than the non-administered ones of the group. However, no difference was found between the control and *doenjang* administered groups. Four kinds of *doenjang* inhibited significantly the tumor growth, especially R-D and B1-D showing an inhibition of tumor cell growth up to 97% by the administration of 1.0 mg/kg methanol extracts of *doenjang*. The activity of natural killer(NK) cells was relatively high in mice administered with four kinds of *doenjang*. Particularly, mice administered with R-D methanol extract showed a stronger activity of 88.2%. The activity of glutathione S-transferase(GST) in mice administered with four kinds of *doenjang* was higher than that of the non-administered group. In particular, the GST activity was the strongest in the group with B1-D. As these results indicate the various kinds of salt have different effects on the anticancer activity of *doenjang*.

Key words: anticancer effects, *doenjang*, salt, MTT assay, sarcoma-180, natural killer(NK) cells, glutathione S-transferase(GST)

Ⅰ. 서 론

우리나라의 전통식품인 된장은 우수한 영양소와 각종 생리활성 작용을 가지고 있는 훌륭한 식품이다. 항암작용이 있는 것으로 알려진 이후 된장은 항산화작용, 혈관질환예방, 항비만 및 항균작용 등을 나타내는 것으로 잘 알려져 있다(Park KY · Jung KO 2005). 지금까지 우리 전통된장의

¶ : 안형기, 011-552-1832, chef56@hanmail.net, 인천광역시 동구 송림동 122번지, 인천 재능대학교 호텔외식조리과

가치를 높이고 기능성을 증대시키기 위한 연구가 꾸준히 이루어져 왔다. 특히 된장에 각종 버섯류, 매실, 마늘, 생강 등을 첨가하였을 때 된장의 항돌연변이 및 항암효과는 더욱 높게 나타났다(Lee SJ et al 2004: Park KY et al. 2005).

된장을 제조할 때 소금은 물과 메주와 함께 필수적인 재료가 되며 최근 천일염 및 죽염과 같은 소금의 생리기능이 인정되면서 소금에 대한 연구도 활발하게 이루어지고 있다. 소금은 짠맛을 내는 인류에게 가장 오래된 조미료이며 호렴, 재제염, 정제염이 있다. 소금은 음식에서 맛을 내는 이외에 방부 및 탈수, 조직의 단단한 정도의 유지, 점성의 조절, 갈변 방지, 색의 보존, 단백질의 응고성 증진 및 다른 맛의 강화 등의 여러 가지 역할을 나타낸다(한국식품조리과학회 2007).

호렴 또는 굵은 소금이라고도 하는 천일염은 색이 검고 입자가 굵으며 반투명하고 각이 일정하다. 천일염은 정제염보다 칼슘, 마그네슘 및 황 등이 많이 함유되어 있으나 불순물과 간수를 제거한 생소금에는 이러한 무기질이 절반 정도 감소한다(한국식품조리과학회 2007; Ha JO · Park KY 1998). 국내산 천일염은 중국산에 비하여 구리, 칼륨, 마그네슘 함량이 높으며, 망간과 나트륨은 중국산이 더 높은 것으로 보고되고 있다(Heo OS et al. 2005). 구운 소금에는 칼슘, 칼륨, 마그네슘이 많으며 가열온도가 높아짐에 따라 농도가 증가된다. 특히 죽염에는 칼륨의 함량이 천일염 또는 다른 가공염보다 월등히 높으며 다량의 게르마늄도 함유되어 있다(Ha JO · Park KY 1998).

식품의 제조과정에 소금의 종류는 많은 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다. 참외피클을 제조할 때 해양심층수염과 천일염으로 절인 참외는 정제염을 사용하였을 때 보다 칼슘 함량이 증가되었으며, 색, 향, 맛, 물성 및 전반적인 기호도도 해양심층수염으로 절였을 때 더 우수하였다(Lee GD et al. 2003). 고추장 제조시 소금은 숙성과정의 미생물상과 효소 활성도에 영향을 미치며, 특히 죽염은 고추장의 맛과 색을 좋게 하고 산성 protease 활성도 및 총당의 함량을 높여준다(Kim DH et al. 2003). 또한 김치를 발효할 때 죽염은 다른 소금에 비하여 *E. coli*의 성장을 상당히 저해한다고 한다(Park SJ et al. 2001). 된장제조에 죽염을 사용하면 돌연변이 억제작용 및 *in vitro* 항암기능이 증진되며(Hwang KM et al. 2007), 죽염으로 만든 된장추출물은 인체 위암세포와 결장암세포에 항암효과를 나타내었고 마우스를 이용한 종양전이 억제실험에서도 죽염된장을 투여했을 경우 매우 높은 전이억제효과가 나타난다고 보고되고 있다(Hwang KM 2004).

이러한 기존의 연구 결과들을 볼 때 소금은 그 종류에 따라 영양성분과 인체에 미치는 영향이 큰 차이가 있음을 알 수 있다. 따라서 본 연구에서는 천일염, 구운 소금, 1회 구운 죽염 및 9회 구운 죽염을 사용하여 각각의 된장을 제조하여 MTT assay에 의한 된장의 암세포의 성장억제 작용과 sarcoma-180 종양세포를 이식한 쥐에 된장을 투여하여 종양세포의 형성 억제작용을 살펴봄으로써 소금의 종류에 따른 항암 효과의 차이를 관찰하였으므로 그 결과를 보고하고자 한다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 된장 시료의 제조

남천태콩을 원료로 하여 재래식 방법으로 만들어진 메주를 울산 농협에서 구입하여 된장을 제조하였다. 된장을 담글 때 물과 메주의 비율을 4:1로 하였으며 식염농도는 Be' 18로 맞추었다. 소금은 천일염(주, 삼양사), 구운 소금(주, 산내들), 1회 구운 죽염(주, 삼양사) 및 9회 구운 죽염(주, 삼양사)을 사용하여 소금 종류가 다른 된장을 제조하였다. 이렇게 담근 된장을 2월말에서 5월말까지 3개월간 항아리에 넣어 상온에서 숙성시켰다. 제조된 된장은 동결 건조(SFDSM06, SAMWON, Korea)한 후 분말화하여 냉동고에 보관하였으며 된장의 극성 및 비극성 성분의 대부분을 추출하기 위하여 시료 분량의 10배의 메탄올로 3회 추출

하였고 이를 여과한 후 농축시켜 실험에 사용하였다(Lee KI et al. 2001).

2. MTT assay를 이용한 항암실험

1) 암세포의 배양

실험에 사용된 사람의 위암세포는 AGS로 한국세포주은행(서울대학교 의과대학)으로부터 분양받았다. 암세포 배양에 사용된 배지는 100 units/mL의 penicillin-K-streptomycin과 fetal bovine serum(FBS) 10%가 함유된 Dulbeco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco Co., USA)이었으며 5% CO_2가 공급되는 37℃ humidified incubator(Mco96, San-yo, Japan)에서 배양하였다. 일주일에 2~3회 feeding하고 6~7일 만에 PBS로 세척한 후 0.05% trypsin-EDTA로 부착된 세포를 분리하여 계대 배양하였다(Goldin A et al. 1979; Park JG et al. 1990; Hwang WI et al. 1980; Franceschi RT et al. 1985).

2) MTT assay

암세포를 96 well plate에 1×10^4 cells/well되게 180 μL씩 분주한 뒤 시료 20 μL를 첨가하여 37℃, 5% CO_2 배양기에서 72시간 동안 배양하였다. 인산생리식염수에 5 mg/mL의 농도로 제조한 3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) 용액 20 μL를 첨가하여 37℃에서 4시간 더 배양하였다. 이것을 2000 rpm에서 10분간 원심 분리(Combi 514R, Hanil Science Industrial, Korea)하여 상층액을 제거하고, DMSO를 150 μL 가하여 30분간 교반한 후 ELISA reader(ELx800, Bio-Tex Instrument, Inc. USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하여 세포독성을 조사하였다(Park JG et al. 1987; Skehan P et al. 1990).

$$\text{Cytotoxicity(\%)} = \frac{\text{대조구의 흡광도} - \text{시료처리구의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}} \times 100$$

3. Sarcoma-180 종양세포를 이용한 항암실험

1) 실험동물

실험에 사용한 동물은 25 g 전후의 웅성 Balb/c mouse(한국화학연구소, 대전)이었으며 표준사료(삼양주식회사, 서울)로 사육하였다. 동물실험실의 온도는 22±1℃, 습도는 55±5%이었고 12시간 간격으로 light-dark cycle을 유지하였으며 물과 사료를 충분히 공급하였다.

2) Sarcoma-180 종양세포

실험용 종양세포인 sarcoma-180 세포(한국세포주은행, 서울)를 Balb/c mouse의 복강에 1주일 간격으로 계대 배양하여 보존하면서 사용하였다. 즉, 실험동물의 복강 내에서 1주일간 배양된 sarcoma-180 세포를 복수와 함께 취하여 phosphate buffered saline(PBS, Gibco, USA)을 첨가하여 원심분리(1,200 rpm, 10 min)하여 종양세포를 분리하였다. 분리된 세포를 다시 PBS에 부유시켜 원심 분리하여 상등액을 제거한 후 1×10^6 cells/mL가 되도록 종양세포 부유액을 만들어 1 mL씩 쥐의 복강에 주사하여 이식 보존하면서 실험에 사용하였다.

3) 시료의 조제

시료는 멸균된 PBS를 사용하여 조제하였고 투여량은 마우스 체중 kg당 1 mg으로 하였으며, 대조군에는 멸균 PBS만 투여하였다.

4) 세포독성실험

시료의 직접적인 세포 독성작용의 유무를 조사하기 위하여 dye exclusion method(Priest JH 1977; Jakoby WB · Pastan IH 1979)를 이용하여 *in vitro*에서 viability test를 행하였다. 조제한 종양세포 부유액 1 mL(2×10^5 cells)와 최종농도 10% HFBS (heat inactivated fetal bovine serum: Gibco, USA)의 RPMI 1640 배지(Gibco, USA) 1 mL를 24 well

plate에 가하였다. 여기에 100 μL의 시료를 넣어서 37℃, 5% CO_2 incubator에서 24시간 배양하였다. 배양 후 세포 50 μL를 0.2% trypan blue 용액 50 μL와 잘 섞어 hemocytometer를 사용하여 전체 세포수와 염색된 세포수를 측정하여 생존율을 계산하였다.

$$\text{Viability (\%)} = \frac{\text{The number of viable cells per mL of aliquot}}{\text{The number of total cells per mL of aliquot}} \times 100$$

5) 고형암 성장저지 실험

실험동물은 각 군당 6마리씩 사용하였다. 실험실에서 1주일 간격으로 계대 보관 중인 종양세포 부유액 0.2 mL(6×10^6 cells/mouse)를 쥐의 왼쪽 서혜부(left groin)에 피하 이식하여 24시간 후부터 20일간 매일 1회씩 시료 용액을 복강에 주사하였다. 종양세포를 이식한 후 26일째 되는 날 치사하여 생성된 고형암을 적출하여 무게를 측정한 후 다음의 공식에 의하여 종양성장저지백분율(tumor growth inhibition ratio, IR; %)을 계산하였다(Son MH 1995; Ryu BH et al. 1989; Lee YS et al. 1992).

$$\text{I.R. (\%)} = \frac{Cw - Tw}{Cw} \times 100$$

Cw : 대조군의 평균 종양무게
Tw : 처리군의 평균 종양무게

4. 비장의 자연살해세포의 활성 측정

1) Mouse 비장 림프구의 분리

Balb/c mouse의 비장을 clean bench 내에서 무균적으로 적출하여 penicillin(100 U/mL)과 streptomycin(100 μg/mL)을 함유한 5 mL의 RPMI 1640 배지로 3회 세척한 후 곱게 마쇄하였다. 이 세포 부유액을 70 μm nylon mesh로 여과하고 원심 분리하여 림프구를 모아서 배지에 부유시켰다. 이것을 histopaque-1077(Sigma, USA)을 이용하여 원심분리(500 × g, 30 min, 18℃)하여 림프구를 분리하였다.

2) Effector cell의 준비

위의 방법으로 준비된 세포를 10% FBS, 2 mM L-glutamine, penicillin(100 U/mL), streptomycin(100 μg/mL)을 함유한 RPMI 1640 배지에 재현탁시키고, 37℃, CO_2 incubator에서 1~2시간 배양시켜서 세포가 배양 플라스크(60 mm dish)에 부착되도록 하였다. 비부착성 자연살해세포를 원심분리를 통하여 수집하여 배양배지에 재현탁시킨 다음 적정 세포수를 계수하여 사용하였다.

3) 자연살해세포의 활성 측정

자연살해(Natural killer, NK)세포의 활성 측정은 MTT 방법을 이용하였으며(Park JG et al. 1989; Skehan P et al. 1990). Yac-1 mouse의 lymphoma cell을 target cell로 사용하였다. Yac-1 세포를 10% FBS, 2 mM L-glutamine, penicillin(100 U/mL), streptomycin(100 μg/mL)을 함유한 RPMI 1640 배지에 5×10^4 cells/mL의 밀도가 되도록 희석한 후, 각 well에 50 μL씩 첨가하였다. 자연살해세포는 1×10^7 cells/mL의 밀도로 현탁시켜 50 μL씩 96 well flat-bottomed microtire plate에 첨가하였다. 이것을 37℃, CO_2 incubator에서 3일간 배양시킨 후 5 mg/mL의 농도로 제조한 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H tetrazolium bromide(MTT) 용액을 10 μL씩 각 well에 가한 다음 37℃에서 4시간 배양하였다. 여기에 SDS(10% in 0.02 N HCl)를 25 μL 첨가하여 실온에서 30분간 발색시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Cell cytolysis의 백분율을 아래 공식에 의해서 계산하였다.

$$\text{Cell cytolysis(\%)} = \frac{\text{OD of non-lysed target cells} - \text{OD of effector cell}}{\text{OD of target cell alone}} \times 100$$

5. 효소 활성 측정

1) 효소원의 조제

Mouse를 치사시킨 후 4℃ 이하의 생리식염수로 간을 관류하여 간장 내에 남아있는 혈액을 제거한 후 간을 적출하였다. 간조직 1 g당 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.4)를 가하여 빙냉하에서 glass teflon homogenizer(PT 3100 Polytron, Kinematica AG, Switzerland)로 마쇄하였다. 이 마쇄액을 homogenate 분획으로 하였으며, 이것을 13,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 핵 및 미마쇄세포 부분을 제거하고 다시 105,000 × g에서 1시간 동안 초원심분리(Ultra 4.0, Hanil Science Industrial, Korea)하여 얻은 상등액을 cytosol 분획으로 하였다. 이렇게 얻은 cytosol 분획물을 glutathione *S*-transferase 활성 측정에 이용하였다(Kim SH et al. 1994).

2) Glutathione *S*-transferase의 활성 측정

0.1 M potassium phosphate buffer(pH 6.5)에 0.04 M reduced glutathione 75 μL와 효소액 0.1 mL를 넣고 blank에는 20% trichloroacetic acid 0.5 mL를 가하여 효소를 실활시킨 다음 25℃에서 5분간 반응시켰다. Blank와 시료에 0.12 M 1-chloro-2,4-dinitrobenzene 25 μL를 가하여 25℃에서 2분간 반응시켰다. 여기에 20% trichloroacetic acid를 넣어 반응을 완결시킨 후 원심 분리하여 얻은 상등액을 340 nm에서 흡광도를 측정하여 1-chloro-2,4 -dinitrobenzene의 mole 흡광계수 9.6 $mM^{-1}cm^{-1}$을 이용하여 활성도를 산정하였다. 효소 활성의 단위는 1분간 mg protein이 생성한 2,4-dinitrobenzene-glutathione의 nmole 수로 표시하였다(Habig WH et al. 1974).

3) 단백질의 정량

단백질의 함량은 Lowry OH 등(Lowry OH et al. 1951)의 방법에 준하여 bovine serum albumin(Sigma, USA)을 표준품으로 하여 측정하였다.

6. 통계 분석

각 시료로부터 얻은 실험 자료로부터 ANOVA를 구한 후 Duncan's multiple range test를 이용하여 통계 분석하였다(Steel RG · Torrie JH 1980).

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 위암세포의 생존억제작용

소금 종류를 달리한 된장추출물을 첨가하여 MTT 실험계에서 AGS 인체 위암세포의 암예방 효과를 알아보기 위한 실험 결과는 <Table 1>과 같다. 된장의 메탄올 추출물의 농도를 0.05%와 0.1%로 하였을 때 천일염을 사용한 된장은 된장

<Table 1> The effect of methanol extracts from traditional *doenjang* added with various kinds of salt on growth inhibition by MTT assay in AGS human gastric adenocarcinoma cells

Treatment	OD_{540}	
	0.05(%)	0.1(%)
Control(PBS)	0.618±0.013[a]	0.619±0.003[a]
S-D	0.222±0.017[b](64)[1)]	0.195±0.007[b](68)
R-D	0.122±0.008[c](80)	0.109±0.006[c](82)
B1-D	0.088±0.005[d](86)	0.056±0.003[d](91)
B9-D	0.083±0.004[d](87)	0.047±0.003[e](92)

Control: Group added PBS without *doenjang* extracts. S-D: *Doenjang* used sun-dried salt. R-D: *Doenjang* used roasted salt. B1-D: *Doenjang* used bamboo salt roasted once. B9-D: *Doenjang* used bamboo salt roasted nine times.

[1)]Inhibition rate(%) = $\frac{OD_{540} \text{ of control} - OD_{540} \text{ of sample}}{OD_{540} \text{ of control}} \times 100$

[a-e]Means with the different letters in the same column are significantly different($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test(n=3).

추출물을 넣지 않은 대조군에 비하여 각각 64%와 68%의 암세포 생존을 억제하였으며 구운 소금된장은 각각 80%와 82%의 억제 효과를 나타내었다. 또한 같은 농도에서 1번 구운 죽염된장추출물은 각각 86%와 91%, 9번 구운 죽염된장 추출물은 87%와 92%의 암세포의 생존을 억제하여 두 종류의 죽염된장은 거의 비슷한 효과를 나타내면서 천일염된장과 구운 소금된장과 비교하여 유의적인 차이($p<0.05$)를 가지고 AGS 인체위암세포의 증식을 억제하였다.

민간에서 죽염은 암을 치료한다고 주장되고 있으며, 이수민(1993)은 죽염이 랫드의 미란성 위염에 대해 예방 및 개선효과가 있다고 발표한 결과는 본 실험의 결과와 잘 일치하였고, 이러한 결과는 죽염의 항암효과를 입증해 주는 것이라 생각된다. 또한 Hwang KM 등(2007)의 연구에서 녹차와 죽염을 함께 사용한 된장의 항돌연변이 활성은 죽염을 첨가하지 않은 된장보다 높았으며, 전립선암세포의 성장억제효과도 높게 나타났다고 보고하였다.

2. 마우스를 이용한 *in vivo*에서의 항암효과

1) 암세포에 대한 시료의 독성

천일염, 구운 소금, 1회 구운 죽염 및 9회 구운 죽염으로 담근 된장이 종양세포에 직접적인 독성을 나타내는지 살펴보기 위하여 sarcoma-180 종양세포에 여러 농도의 된장추출물을 첨가한 후 세포의 생존율을 관찰하였다(Table 2). 실험에 사용된 된장추출물의 농도는 0.1, 0.5, 1.0 및 2.0 mg/mL이었으며, 0.1~1.0 mg/mL 농도에서 종양세포의 생존율이 84~100%를 나타내었고 시료의 농도가 2.0 mg/mL일 때 천일염된장의 생존율이 74%로 낮아졌다. 기존의 연구에 근거하여(Park KY et al. 2005) 시료의 농도를 1.0 mg/mL 투여하였을 때 독성이 거의 없는 것으로 사료되어 이 농도의 시료를 쥐의 복강에 투여하여 고형암 성장저지 효과를 살펴보았다.

<Table 2> Viability of sarcoma-180 cells in a culture medium containing the methanol extracts from traditional *doenjang* added with various kinds of salt

Samples	Final conc. (mg/mL)	Total cell numbers ($\times 10^4$)	Viability of cells (%)
Control	-	30.0 ± 0.0^{a}	98
S-D	0.1	29.1 ± 0.0^{ab}	95
	0.5	28.2 ± 0.7^{b}	92
	1.0	25.7 ± 0.7^{c}	84
	2.0	22.7 ± 0.2^{d}	74
R-D	0.1	30.6 ± 0.8^{a}	100
	0.5	29.7 ± 0.0^{ab}	97
	1.0	28.5 ± 0.7^{b}	93
	2.0	27.5 ± 0.5^{b}	90
B1-D	0.1	30.0 ± 0.7^{a}	98
	0.5	28.5 ± 0.7^{b}	93
	1.0	28.5 ± 0.5^{b}	93
	2.0	27.2 ± 0.7^{b}	89
B9-D	0.1	29.7 ± 0.0^{ab}	97
	0.5	27.2 ± 0.9^{b}	89
	1.0	26.6 ± 0.7^{b}	87
	2.0	25.7 ± 0.8^{c}	84

Control: Group without *doenjang* extracts. S-D: *Doenjang* used sun-dried salt. R-D: *Doenjang* used roasted salt. B1-D: *Doenjang* used bamboo salt roasted once. B9-D: *Doenjang* used bamboo salt roasted nine times.
[a-d]Means with the different letters in the groups are significantly different($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test(n=3).

<Table 3> The effects of methanol extracts from traditional *doenjang* added with various kinds of salt on the spleen, liver, heart, kidney and heart weight of a Balb/c mouse

Samples	Dose (mg/kg)	Body weight (BW)(g)	Liver/BW (%)	Spleen/BW (%)	Kidney/BW (%)	Heart/BW (%)
Normal	-	27.1±0.74[ns]	6.58±0.60[ab]	0.37±0.01[ns]	1.60±0.18[ns]	0.37±0.01[ns]
Control	-	26.4±1.04	5.90±0.26[b]	0.37±0.02	1.51±0.07	0.37±0.02
S-180 + S-D	1.0	26.4±1.31	6.81±0.59[ab]	0.38±0.01	1.73±0.21	0.38±0.02
S-180 + R-D	1.0	27.0±1.64	7.28±0.30[a]	0.38±0.02	1.75±0.18	0.43±0.13
S-180 + B1-D	1.0	26.9±1.33	7.37±0.51[a]	0.38±0.02	1.74±0.21	0.38±0.02
S-180 + B9-D	1.0	26.6±1.03	6.89±0.76[ab]	0.38±0.01	1.72±0.22	0.43±0.13

BW: Body weight. Normal: Group without S-180 and *doenjang* extracts. Control: Group added S-180 and PBS without *doenjang* extracts. S-D: *Doenjang* used sun-dried salt. R-D: *Doenjang* used roasted salt. B1-D: *Doenjang* used bamboo salt roasted once. B9-D: *Doenjang* used bamboo salt roasted nine times.
[a-b]Means with the different letters in the groups are significantly different($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test(n=6).

2) 장기의 중량 변화

Sarcoma-180 종양세포를 이식한 쥐에 된장추출물을 투여한 후 체중, 간, 비장, 신장 및 심장의 중량을 측정하여 비교한 결과는 <Table 3>과 같다. 종양세포를 이식한 쥐에 비하여 종양세포를 이식하지 않은 쥐의 체중이 약간 높게 나타났으나 유의적인 차이는 없었다($p<0.05$). 된장추출물을 투여한 경우 구운 소금된장추출물 투여군의 체중은 증가되었으나 나머지 군은 체중의 변화가 거의 없었다. 체중에 대한 간의 중량비는 PBS를 투여한 쥐와 비교하였을 때 4가지 소금을 넣어 만든 된장추출물 투여군 모두에서 높게 나타났으며 특히 구운 소금과 1회 구운 죽염을 넣어 만든 된장추출물을 투여한 쥐에서 유의적으로 높게 나타났다($p<0.05$). 또한 비장, 신장 및 심장의 중량비도 대조군에 비하여 약간 높게 나타났으나 유의적인 차이는 보이지 않았으므로($p<0.05$) 4가지 소금을 넣어 제조한 된장추출물이 장기의 크기 변화에는 영향을 미치지 않는 것으로 보여진다.

3) 고형암 성장저지 효과

Sarcoma-180 종양세포를 마우스의 서혜부에 이식하고 소금 종류를 달리한 된장의 메탄올추출물을 매일 1회씩 20일간 복강에 투여하여 종양의 무게를 측정한 결과는 <Table 4>와 같다. 된장추출물을 첨가하지 않은 대조군의 종양 무게는 4.6 g이었으나 된장을 투여한 군들의 종양 크기는 크게 줄어든 것으로 나타났다. 천일염된장 투여군은 종양의 크기가 0.5 g으로 대조군보다 90% 작았으며, 구운 소금된장, 1회 구운 죽염된장 및 9회 구운 죽염된장 추출물을 투여하였을 때 마우스의 종양 크기가 각각 0.1 g, 0.1 g 및 0.3 g으로 대조군보다 각각 97%, 97% 및 94%씩 유의적으로 감소되었다($p<0.05$).

<Table 4> Antitumor activities of methanol extracts from traditional *doenjang* added with various kinds of salt in a tumor bearing Balb/c mouse with sarcoma-180 cell

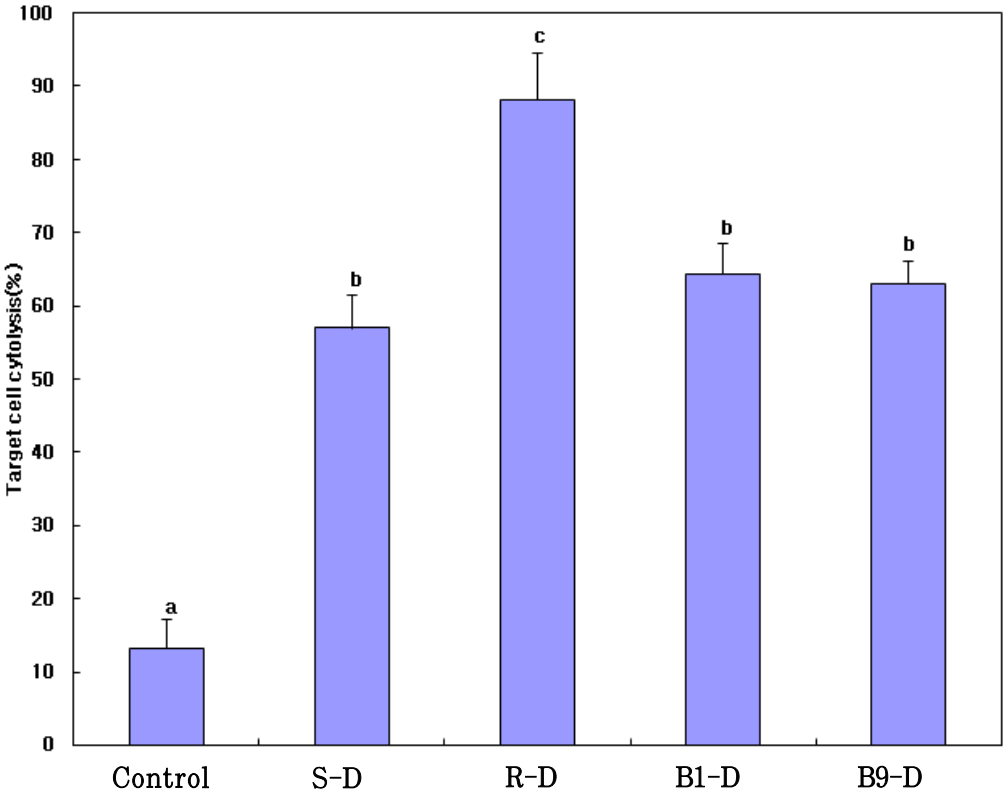
Samples	Tumor weight(g)	Inhibition rate(%)
S180 + PBS (Control)	4.6±0.3[a]	-
S180 + S-D	0.5±0.1[bc]	90
S180 + R-D	0.1±0.1[c]	97
S180 + B1-D	0.1±0.1[c]	97
S180 + B9-D	0.3±0.1[bc]	94

Control: Group added PBS without *doenjang* extracts. S-D: *Doenjang* used sun-dried salt. R-D: *Doenjang* used roasted salt. B1-D: *Doenjang* used bamboo salt roasted once. B9-D: *Doenjang* used bamboo salt roasted nine times.
[a-c]Means with the different letters are significantly different($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test(n=6).

한편, Park KY 등(2005)은 본 연구와 동일한 조건으로 매실, 마늘 및 생강을 첨가한 된장으로 고형암 성장억제실험을 행한 결과 일반된장은 88%, 매실된장은 92%, 마늘된장은 96%, 생강된장이 97%의 암세포 형성을 저지하였다고 보고하였다. 따라서 본 연구와 비교할 때 된장에 다양한 암예방 식품을 첨가하지 않고 된장 제조에 필수 재료인 소금을 천일염, 구운 소금 및 죽염으로 변화시킴으로써 암세포 성장억제 효과가 달라지는 것으로 보여진다.

4) 자연살해세포의 면역활성 증강효과

Sarcoma-180 종양세포를 이식한 쥐에 20일 동안 소금 종류를 달리한 전통된장의 메탄올추출물을 투여하였으며, 사육 후 쥐의 비장을 무균적으로 적출하여 비장의 NK 세포를 분리한 후 이들의 Yac-1 cell에 대한 세포파괴 활성을 살펴본 결과는 <Fig. 1>과 같다. S-180 종양세포를 처리한 후 PBS만 투여한 군에서는 비장 내 NK 세포의 Yac-1 cell에 대한 세포파괴 활성이 낮았으나, 된장의 메탄올추출물을 투여한 군에서는 모두 유의적인 차이를 가지며($p<0.05$) 활성이 크게 증가되었다. 또한 구운 소금으로 담근 된장추출물을 투여한 군은 된장추출물을 투여하지 않은 군에 비하여 활성이 88.2% 더 높았으며 천일염된장, 1번 구운 죽염된장 및 9번 구운 죽염된장의 메탄올추



<Fig. 1> The effects of methanol extracts from traditional *doenjang* added with various kinds of salt on natural killer(NK) cell activity of mouse splenetic lymphocytes.

S-D: *Doenjang* used sun-dried salt. R-D: *Doenjang* used roasted salt. B1-D: *Doenjang* used bamboo salt roasted once. B9-D: *Doenjang* used bamboo salt roasted nine times.

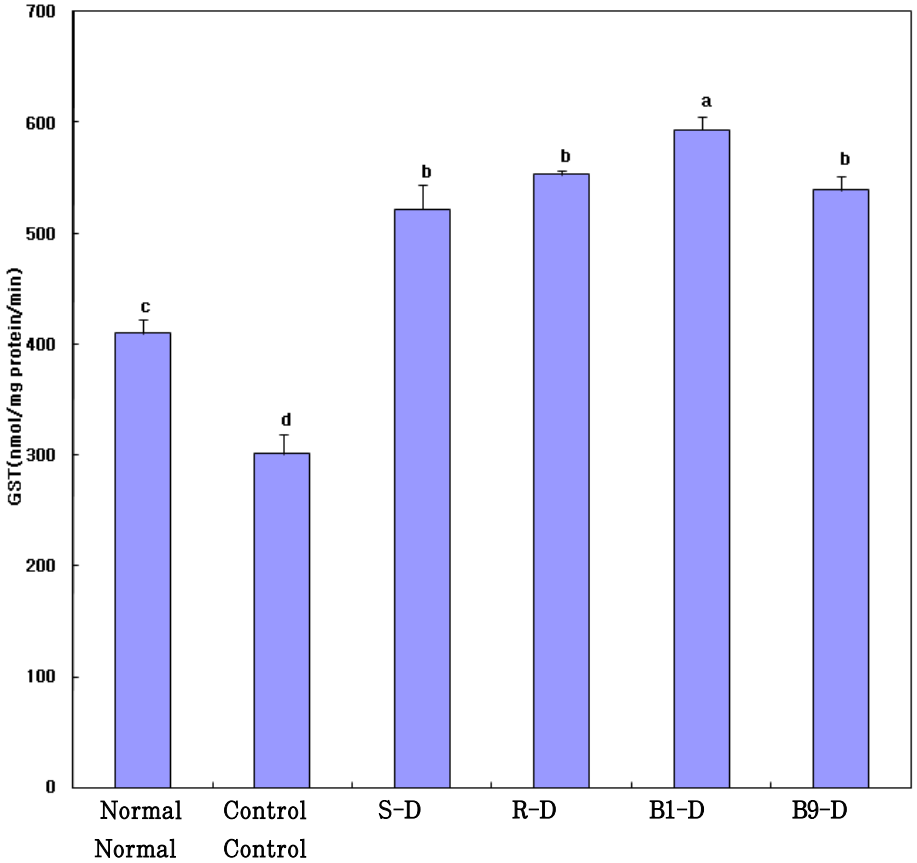
[a-c]Means with the different letters are significantly different($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test(n=6).

출물 투여군보다도 유의적으로 높게 나타났다 ($p<0.05$). 따라서 된장은 NK세포의 면역활성 증강에 의해 종양세포 형성을 억제하며 된장 제조 시 사용되는 소금의 종류에 따라 활성의 차이가 있는 것으로 보여진다.

전보(Lee SJ et al. 2008)에서 천일염된장, 구운 소금된장, 1번 구운 죽염된장 및 9번 구운 죽염된장의 항돌연변이 효과를 보고하였다. 즉 4종류의 소금 첨가된장은 *Salmonella typhimurium* TA100 균주를 이용한 Ames test와 SOS chromotest에서 MNNG의 돌연변이유발 억제작용을 강하게 나타내었으며 특히 1번 구운 죽염첨가된장이 가장 항돌연변이 효과가 높은 것으로 보고되었다.

5) 마우스 간 내의 gultathione *S*-transferase 활성 변화

간에서의 독성물질 배설에 관여하는 효소인 glutathione *S*-transferase(GST) 활성은 종양세포를 이식하지 않은 정상군에서 409.7 nmol/mg protein/min를 나타내었고, 종양세포를 이식한 대조군은 301.3 nmol/mg protein/min으로 가장 낮게 나타났다. 그러나 4가지 소금으로 만든 된장을 투여한 쥐의 간에서 효소의 활성이 대조군과 비교하여 모두 높게 나타났는데 천일염된장, 구운 소금된장, 1



<Fig. 2> The effects of traditional *doenjang* added with various kinds of salt on hepatic glutathione *S*-transferase activity.

S-D: *Doenjang* used sun-dried salt. R-D: *Doenjang* used roasted salt. B1-D: *Doenjang* used bamboo salt roasted once. B9-D: *Doenjang* used bamboo salt roasted nine times.

[a-d]Means with the different letters are significantly different($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test(n=6).

회 구운 죽염된장 및 9회 구운 죽염된장 투여군의 효소 활성은 각각 521.6, 552.6, 593.2 및 539.2 nmol/mg protein/min을 나타내었다. 특히 1회 구운 죽염된장 투여군의 glutathione *S*-transferase의 활성이 가장 높은 것으로 나타났다(Fig. 2).

간에서 일어나는 대사 효소계의 phaseⅡ 단계에서는 내인성 물질이나 외부에서 투여되는 독성물질을 포함하거나 수용성물질로 전환시켜 체외로 배출하여 이물질을 제거하는데glutathione *S*-transferase이 체내 독성물질을 전이하여 배설함으로써 무독화시키게 된다(Nair SC et al. 1992). 따라서 4가지 소금된장 추출물은 모두 종양세포를 이식한 쥐의 간에서 효소계를 자극시키며, 특히 glutathione *S*-transferase를 활성화시켜 독성물질을 제거함으로써 종양세포의 제거에 효과가 있을 것으로 사료된다.

Ⅳ. 요약 및 결론

본 연구는 기존의 연구(Lee SJ et al. 2008)에서 항돌연변이 효과가 인정된 천일염, 구운 소금, 1회 구운 죽염 및 9회 구운 죽염으로 제조된 된장으로 항암효과를 조사한 것으로 그 결과는 다음과 같다. 먼저 인체위암세포인 AGS에 대한 된장의 생존억제활성을 살펴보았는데 대조군과 비교하여 4가지 종류의 된장추출물을 0.05% 첨가하였을 때 64~87%, 0.1%의 첨가시에는 68~92%의 암세포 생존을 억제하였다. 특히 1회 구운 죽염된장 및 9회 구운 죽염된장은 천일염된장과 구운 소금된장에 비하여 암세포 생존억제효과가 더 강한 것으로 나타났다. 다음은 *in vivo*에서 항암효과를 살펴보기 위하여 sarcoma-180 종양세포를 이식한 쥐에 4종류의 된장추출물을 투여하여 암세포의 성장을 관찰하였다. 종양세포를 이식한 쥐에서 체중을 측정하고 간, 비장, 신장 및 심장의 중량을 측정한 결과 대조군과 비교하여 4종류의 된장추출물을 투여한 쥐에서 약간의 차이는 있었으나 유의적인 차이는 나타내지 않았다($p<0.05$). 그러나 쥐의 종양 무게는 큰 차이가 나타났는데 된장을 투여하지 않은 대조군에서 종양의 무게는 4.6 g이었고 천일염된장, 구운 소금된장, 1회 구운 죽염된장 및 9회 구운 죽염된장 추출물 투여군에서는 각각 0.5, 0.1, 0.1 및 0.3 g으로 나타나 종양의 무게가 상당히 낮았으므로 된장이 sarcoma-180 종양세포의 성장을 억제시킬 수 있는 것으로 여겨지며 4가지 소금된장 가운데 구운 소금된장과 1회 구운 죽염된장을 투여하였을 때 종양의 무게가 가장 적었다. 또한 쥐의 비장에서 자연살해(NK)세포의 활성도를 측정한 결과 4종류의 된장추출물 투여군에서 활성이 크게 증가되었으며 특히 구운 소금된장 투여군에서 가장 높은 활성을 나타내었다. 따라서 된장추출물은 자연살해세포의 활성을 증가시켜 종양세포의 형성을 억제하고 제거하는 효과가 큰 것으로 여겨진다. 된장추출물의 독성제거 능력을 살펴보기 위하여 종양세포를 이식한 쥐의 간에서 glutathione *S*-transferase 활성을 측정한 결과 된장추출물을 투여하지 않은 군은 효소의 활성이 낮았으나 4가지 종류의 된장추출물을 투여하였을 때 효소활성이 높아졌으며 1회 구운 죽염된장 추출물군에서 가장 높은 활성을 나타내었다. 이러한 연구 결과로 볼 때 된장은 인체위암세포인 AGS 및 sarcoma-180 종양세포의 형성을 억제하는 효과를 가지며 사용되는 소금의 종류에 따라서 약간의 차이가 있음을 알 수 있었다.

한글 초록

본 연구는 천일염, 구운 소금, 1회 구운 죽염과 9회 구운 죽염으로 만든 된장에서 항암효과를 평가하기 위하여 수행되었다. MTT 분석에서 천일염된장(S-D), 구운 소금된장(R-D), 1회 구운 죽염된장(B1-D) 및 9회 구운죽염 된장(B9-D)을 0.05%와 0.1%를 첨가하였을 때 인체위암세포인 AGS의 증식에 대하여 상당한 저해효과(64-87%)를 나타내었다. Sarcoma-180 세포를 주사한 Balb/c 마우스 가운데 4종류의 된장을 투여한 쥐

의 체중, 간장, 비장, 간장과 심장의 무게는 된장을 투여하지 않은 군보다 무거웠다. 또한 4가지 종류의 된장은 쥐의 종양 형성을 크게 저해하였으며, 특히 R-D와 B1-D는 1.0mg/kg 투여함으로써 97%의 종양세포의 성장억제를 나타내었다. 자연살해세포의 활성은 4종류의 된장을 투여한 쥐에서 상당히 높았으며 R-D를 투여한 쥐에서는 88.2%의 강한 활성을 나타내었다. 4종류의 된장을 투여한 쥐에서 glutathione S-transferase(GST)는 된장을 투여하지 않은 쥐보다 높았으며, 특히 GST 활성은 B1-D를 투여한 군에서 가장 높게 나타났다. 이러한 결과들은 여러 가지 종류의 소금이 된장의 항암활성에 미치는 영향에 차이가 있는 것으로 사료된다.

참고문헌

이수민 (1993). 한국인산죽염에 의한 흰쥐 미란성 위염의 예방과 치료작용 관찰. 한국인산죽염 임상 및 기초실험 연구보고 논문집. 79. 함양.

한국식품조리과학회 (2007). 식품조리과학 용어사전. (주)교문사. 177, 286, 경기.

Franceschi RT · James WM · Zerlauth G (1985) 1 α, 25-dihydroxyvitamin D_3 specific regulation of growth, morphology and fibronectin in a human osteosarcoma cell line. *J. Cellular Physiol* 123:401-410.

Goldin A · Schepartz SA · Venditti JM · DeVita VT (1979). Historical development and current strategy of the National Cancer Institute drug development program. In *Methods in Cancer Research*, Vol. 16. Cancer Drug Development, Part A, DeVita VT and Busch H (eds.), Academic Press, 165, New York.

Habig WH · Pabst MJ · Jakoby WB (1974). Glutathione *S*-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249(22):7130-7139.

Ha JO · Park KY (1998). Comparison of mineral contents and external structure of various salts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27(3):413-418.

Heo OS · Oh SH · Shin HS · Kim MR (2005). Mineral and heavy metal contents of salt and salted-fermented shrimp. *Korean J Food Sci Technol* 37(4): 519-524.

Hwang KM (2004). Studies on the enhancement of chemopreventive and anticancer effects of *doenjang*. *Ph D Dissertation*. Pusan National University, 199-202, Busan.

Hwang KM · Oh SH · Park KY (2007). Increased antimutagenic and in vitro anticancer effects by adding green tea extract and bamboo salt during doenjang fermentation. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36(1):1-7.

Hwang WI · Cha S · Lee SY (1980). A study on the extraction of anticancer components from korean medicinal plants and the determination of their cytotoxic activities on the cancer cells. *Korean Biochem J* 13(1):25-39.

Jakoby WB · Pastan IH (1979). Methods in enzymology cell culture. Academic Press, vol. 56, 119, NY.

Kim DH · Yang SE · Rhim JW (2003). Fermentation characteristics of Kochujang prepared with various salts. *Korean J Food Sci Technol* 35(4):671-679.

Kim SH · Park KY · Suh MJ · Chung HY (1994). Effect of garlic on glutathione *S*-transferase activity and the level of glutathione in the mouse liver. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 23(3): 436-442.

Lee KI · Moon RJ · Lee SJ · Park KY (2001). The quality assessment of doenjang added with Japanese apricot, garlic and ginger, and samjang. *Korean J Soc Food Cookery Sci* 17(5):472-477.

Lee GD · Kim SK · Kim JO · Kim ML (2003).

Comparison of quality characteristics of salted muskmelon with deep seawater salt, sun-dried and purified salts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32(6):840-846.

Lee SJ · Lee KI · Moon SH · Park KY (2008). Antimutagenic effects on methanol extracts of doenjang made with various water or salt. *J Korean Soc Food Nutr* 37(6):691-695.

Lee SJ · Lee KI · Rhee SH · Park KY (2004). Physiological activity in doenjang added with various mushrooms. *Korean J Food & Cookery Sci* 20(4):365-370.

Lee YS · Kim DS · Ryu BH · Lee SH (1992). Antitumor and immunomodulating effects of seaweeds toward sarcoma-180 cell. *J Korean Soc Food Nutr* 21(5):544-550.

Lowry OH · Rosebrough NJ · Farr AL · Randall RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193(1):265-275.

Nair SC · Salomi MJ · Varghese CD · Panikkar B · Panikkar KR (1992). Effect of saffron on thymocyte proliferation intracellular glutathion levels and its antitumor activity. *Biofactors* 4(1):51-54.

Park KY · Lee SJ · Lee KI · Rhee SH (2005). The antitumor effect in sarcoma-180 tumor cell of mice administered with Japanese apricot, garlic or ginger *doenjang*. *Koran J or Food & cookery Sci* 21(5):599-606.

Park KY · Jung KO (2005). Fermented soybean products as functional foods: Functional properties of *doenjang*(fermented soybean paste). In Asian Functional food. Shi J · Ho CT · Shahidi F, eds. CRC Press, Boca Raton, 555-596, FL.

Park JG · Frucht H · LaRocca RV · Bliss DP · Kurita Y · Chen TR · Henslee JG · Trepel JB · Jensen RT · Johnson BE · Bang YJ · Kim JP · Gazdar AF (1990). Characterization of cell lines established from human gastric carcinoma. *Cancer Res* 50(9):2773-2781.

Park JG · Kramer BS · Steinber SM · Carnichael J · Collins JM · Minna JD · Gazdar AF (1987). Chemosensitivity testing of human colorectal carcinoma cell lines using a tetrazolium-based colorimetric assay. *Cancer Res* 47(22):5875-5879.

Park SJ · Park KY · Jun HK (2001). Effects of commercial salts on the growth of Kimchi-related microorganism. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30(5): 806-813.

Priest JH (1977). Medical cytogenetics and cell culture. Lea & febriger, 263. Pennsylvania.

Ryu BH · Kim DS · Cha KJ · Sin DB (1989). Antitumor activity of seaweeds toward sarcoma-180. *Korean J Food Sci Technol* 21(5): 595-600.

Skehan P · Storeng R · Scudiero D · Monks A · McMahon J · Vistica D · Warren JT · Bokesch H · Kenney S · Boyd MR (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* 82(13):1107-1112.

Son MH (1995). Anticancer effect of Doenjang and its mechanism in mice. MS Thesis, Pusan national university, 16-18, Busan.

Steel RG · Torrie JH (1980). Principles and procedure of statistics. McGraw-Hill kogakusha Ltd, 96, Tokyo.

2011년 10월 12일 접 수
2011년 11월 22일 1차 논문수정
2011년 12월 11일 2차 논문수정
2011년 12월 17일 게 재 확 정