

# 청국장의 암세포성장억제효과 및 흰쥐에서 DMBA 투여에 의한 유방종양발생 억제효과\*

곽충실\*\*§ · 김미연\*\* · 김성애\*\*\* · 이미숙\*\*\*

서울대학교 의학연구원 체력과학노화연구소,\*\* 한남대학교 식품영양학과\*\*\*

## Cytotoxicity on Human Cancer Cells and Antitumorigenesis of Chungkookjang, a Fermented Soybean Product, in DMBA-Treated Rats

Kwak, Chung-Shil\*\*§ · Kim, Mee-Yeon\*\* · Kim, Sung-Ae\*\*\* · Lee, Mee-Sook\*\*\*

Aging and Physical Culture Research Institute,\*\* Seoul National University, Seoul 110-810, Korea

Department of Food and Nutrition,\*\*\* Hannam University, Daejeon 306-791, Korea

### ABSTRACT

It is reported that a fermented soybean food, Doenjang, has strong antimutagenic and cytotoxic effect on cancer cells. This study investigated the effect of Chungkookjang, another traditional popular Korean soybean fermented food, on growth of cancer cells: HL-60, SNU-638 and MCF-7, and also its in vivo antitumorigenic effect in DMBA-induced mammary tumor rat model. For the in vitro study, Chungkookjang and steamed soybeans were extracted with ethanol and sequentially fractioned with 5 kinds of solvents differing in grades of polarity such as hexane, dichloromethane, ethylacetate, butanol and water. Almost all Chungkookjang extracts significantly inhibited the growth of HL-60 (human leukemic cancer cell), SNU-638 (human gastric cancer cell) and MCF-7 (human breast cancer cell) when compared to steamed soybean extracts. Butanol fraction of Chungkookjang extract especially showed a remarkable inhibitory effect in all the three kinds of cancer cells. To induce a mammary gland tumor, DMBA (50 mg/BW) was administered to 50 day-old female rats and followed by Chungkookjang or steamed soybean supplemented diets. Freeze-dried Chungkookjang powder (20% of diet in wet weight) was added to AIN-93G based diet for the Chungkookjang group of rats. Likewise, steamed soybean powder containing equal protein content to that of Chungkookjang powder was supplemented to soybean group of rats. At 13 weeks later, the mammary tumor incidence, average tumor number and tumor weight a rat were lower in Chungkookjang group compared to the control or soybean group. In conclusion, Chungkookjang showed a strong inhibitory effect on cancer cell growth in vitro, as well as a more preventive effect against chemically induced mammary tumorigenesis in vivo, while steamed soybeans did not. Therefore, these results suggest that Chungkookjang acquire its anticancer activity through the fermentation process. (*Korean J Nutrition* 39(4): 347 ~ 356, 2006)

**KEY WORDS** : chungkookjang, fermented soybeans, cancer cell growth inhibition, DMBA (7,12-dimethylbenz [a] anthracene), mammary tumor.

### 서론

예로부터 청국장은 된장과 함께 한국인들에게 값싸면서도 매우 질 좋고 소화가 잘 되는 단백질 급원식품으로 애용되어

접수일 : 2006년 4월 24일

채택일 : 2006년 6월 10일

\*This work was supported by the grants from Sunchang County and Korea Science and Engineering Foundation (RII-2002-097-05001-0) through the Aging and Apoptosis Research Center at Seoul National University.

§To whom correspondence should be addressed.

E-mail : kwacks@snu.ac.kr

왔다. 된장과 청국장은 우리나라의 대표적인 대두발효식품으로 원재료는 동일하나 제조방법이 서로 달라 작용하는 미생물들이 다소 다르고, 결과적으로 맛도 다르다. 된장은 증숙한 대두로 메주를 만들어 띄우는 동안 *Aspergillus Oryzae* 가 주로 작용하여 발효가 일어나며, 발효된 메주를 소금물에 담가 간장을 뺀 다음 다시 장기간 숙성시키는 반면, 청국장은 대두를 충분히 쪄 다음 40℃정도에서 2~3일간의 단기간 발효하여 매우 쉽게 만들 수 있고 주로 고초균 (*Bacillus subtilis*)이 작용하는 것으로 알려져 있다.<sup>1,2)</sup>

청국장의 역사는 고구려 시대까지 올라가 약 1,400년 정도가 된다. 만주지역에서 우리의 선조들이 콩을 삶아 말안

장 밑에 넣고 다니며 수시로 먹었는데 말의 체온에 의하여 자연 발효된 것이 청국장의 원조라고 한다. 이러한 청국장은 일본 중국 뿐 아니라 실크로드를 따라 동남아시아, 인도 심지어는 유럽과 아프리카에까지 전파되면서, 각 지역에 따라 조금씩 변형되어 오늘날 일본의 natto, 중국의 douchi, 인도네시아의 tempeh 등으로 발전되었다.<sup>3-6)</sup>

그러나 우리나라에서는 근대화 과정에서 도시화가 진행되면서 청국장은 발효과정에서 발생하는 강한 냄새로 인하여 기피 식품이 되기도 하였지만, 최근 청국장과 natto의 항미생물효과,<sup>7)</sup> 항혈전효과,<sup>8,9)</sup> 체중감소 및 혈압저하효과<sup>10)</sup> 등이 알려지면서 웰빙 식품의 하나로 다시 인기가 오르고 있다. 이와 함께 식품관련 연구자들에 의하여 과학적인 연구 실험을 통한 청국장의 다양한 생리활성효과를 새롭게 발견하고 그 기전을 밝히는 동시에 현대인의 욕구에 부응하는 기능성 식품을 개발하려는 시도가 활발하게 진행되고 있다. 그러나 한국의 청국장은 일본의 natto나 동남아의 tempeh에 비하면 아직 양적으로나 질적으로 연구 자료가 크게 부족하여 국제적으로 거의 알려져 있지 못한 실정이다.

역학조사 결과 아시아인이 서구인에 비하여 유방암 발생률이 크게 낮은 이유의 하나로 대두의 섭취량이 많은 것을 들고 있다.<sup>11)</sup> 여러 연구에서 대두 및 대두제품은 항암효과가 있는 것으로 보고 되었는데 이들의 항암성은 대두가 갖고 있는 genistein, daidzein과 같은 isoflavone과 phytic acid, protease inhibitor 등에 의한다고 알려져 있다.<sup>12,13)</sup> Genistein은 많은 역학연구와 동물실험 및 in vitro 실험에서 항암효과를 보였으며, 특히 전립선과 유방암의 예방효과가 뛰어나다고 보고 되었다.<sup>14,15)</sup> 그런데, 최근에는 대표적인 대두발효식품인 된장이 대두에 비하여 보다 강한 항돌연변이효과를 갖고 있으며,<sup>16)</sup> 발효 후의 청국장이 발효 전보다 AGS 위암세포에 대한 증식억제효과가 더 컸다는 보고가 있었고,<sup>17)</sup> 된장의 메탄올 추출물이 대두보다 암세포 성장을 억제시키는 효과가 더 우수하였다는 결과가 발표되어<sup>18)</sup> 대두가 발효되는 과정 중에 일어나는 일련의 변화가 항암효과를 추가적으로 더 강하게 부여해 줄 가능성을 제시하였다.

이에 본 연구에서는 청국장의 항암효과에 있어서 발효 과정이 얼마나 중요한 역할을 하는지를 확인하고자 증숙 대두와 전통식 청국장으로부터 5종류의 용매별 추출물을 획득하여 인간 유방암세포 (MCF-7)를 비롯한 3종의 암세포 성장에 미치는 영향을 비교하였고, 아울러 흰 쥐에게 먹여 유방종양 발생을 억제하는 효과에 대하여 비교 실험하였다.

## 연구 방법

### 1. 시료의 구입 및 분획추출과정

전라북도 순창군 민속장류마을에서 한국산 대두를 원료로 전통식으로 제조한 청국장과 함께 발효시키기 전의 증숙된 대두를 대조군으로 이용하기 위하여 공급 받았다. 전통식 청국장은 불린 대두를 120℃에서 쪄 다음 꺼내어 식힌 뒤 벗짚으로 싸서 38℃에서 72시간 동안 발효시켜 제조되었다.

### 2. 용매 추출

세포실험을 위한 추출물을 얻기 위하여 증숙 대두 또는 청국장을 각각 300 g씩 정량 한 다음 300 ml의 95% 에탄올을 가하여 실온에서 교반하면서 24시간 동안 2회 반복 추출한 후 Whatman 여과지 No. 6으로 여과하여 얻은 여과액을 40℃에서 농축하였다. 농축한 추출물을 100 ml의 물에 분산시킨 후 극성에 따라 hexan, 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 부탄올순으로 첨가하여(100 ml × 3회) 각각의 분획추출물을 분리하였으며, 최종적으로 남은 물 분획물을 얻었다 (Fig. 1). 각각의 용매추출 분획물은 rotary eva-

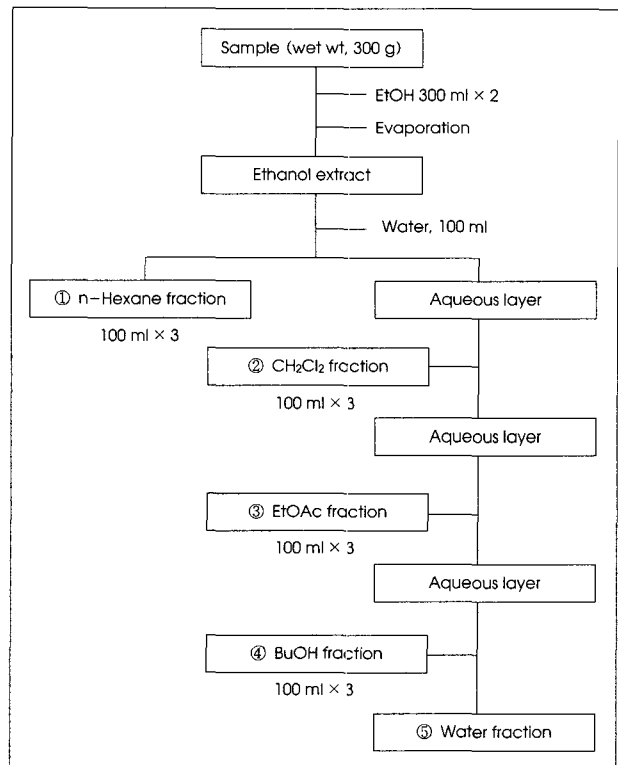


Fig. 1. Scheme of ethanol extract and sequential fractionation of food samples.

porator (EYELA, Japan)로 농축한 후 70% ethanol에 녹여 냉동 보관하였다가 세포실험에 사용하였다.

**3. 시료의 동결건조 및 열량 영양소 함량 분석**

동물 실험 시 동물의 식이에 시료를 건조분말상태로 첨가하기 위하여 증숙 대두와 청국장을 한국생물산업진흥원에 의뢰해서 동결 건조시킨 후 분말화하여 동결건조 전후의 무게로부터 수율을 계산하였고, 동결 건조된 분말의 수분, 단백질, 지방, 식이섬유의 함량을 한국보건산업연구원에 의뢰하여 분석하였다.

**4. 암세포 성장억제효과 검색**

인간 위암 세포주 (SNU-638), 유방암 세포주 (MCF-7), 백혈구 혈액암 세포주 (HL-60)에 대한 청국장의 분획 추출시료들의 성장억제효과를 검색하였다. 세포를 배양하기 위하여 SNU-638과 HL-60는 RPMI 배양액, MCF-7는 DMEM 배양액에 5% FBS (fetal bovine serum)와 1%의 penicillin-streptomycin을 첨가하여 사용하였다. 세포의 성장 정도를 알아보기 위하여 96 well plate의 각 well에 180  $\mu$ l의 배양액과 함께 각 세포들이 2,000~3,000개 들어가도록 심고, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 조건의 배양기에서 4시간 이상 안정화시켰다. 70% ethanol에 녹여 놓은 분획 추출 시료는 0.22  $\mu$ m pore size의 멸균필터 (Millipore, USA)로 여과한 후 다시 배양액으로 희석하여 최종농도가 100, 200, 400, 800, 1,600  $\mu$ g/ml 가 되도록 20  $\mu$ l의 배양액에 녹여 각 well에 처리하였으며, 대조군에는 동량의 70% ethanol을 처리하였다. 처리 후 48시간 경과했을 때 cell counting kit-8 (Dongindo Laboratories, Japan)을 각 well에 5  $\mu$ l 씩 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 4시간 더 배양한 다음 ELISA reader (Molecular Devices, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군의 흡광도에 대한 실험군의 흡광도 비율 (%)을 구한 후, 세포 성장을 50% 억제하는 시료의 농도 (IC<sub>50</sub>)를 계산하였다.

**5. 항종양효과 동물실험**

**1) 동물 및 식이**

6주령의 암컷 흰 쥐 Sprague-Dawley 36 마리를 샘타코 (주)으로부터 구입한 후 서울대 노화 및 세포사멸연구센터 동물사육실의 표준 환경 (23  $\pm$  1 $^{\circ}$ C, 50  $\pm$  10% 습도, 07 : 00~19 : 00 light cycle)에서 일반 고형사료를 주어 사육하였다. 생후 50일이 되었을 때 대조군 (Control), 대두군 (SOY), 청국장군 (CKJ)으로 각 군당 12마리씩 나누었으며, 유방종양 발생을 유도하기 위하여 7,12-Dimethylbenz [a] anthracene (DMBA, 50 mg/kg BW)를 옥수수

**Table 1.** Diet composition for rats (g/kg)

	Control	SOY	CKJ
Casein	200	155	155
Corn starch	400	373	380
Sugar	200	200	200
Lard	50	50	50
Soybean oil	50	26	27
Cellulose	50	41	42
Mineral mix	35	35	35
Vitamin mix	10	10	10
DL-methionine	3	3	3
Choline chloride	2	2	2
Steamed soybean powder	-	105	-
Chungkookjang powder	-	-	96
Dietary fiber	50.0	50.3	50.1
Protein	175.6	175.2	175.7
Carbohydrate	606.8	609.0	608.3
Lipid	100.0	101.7	102.0
Energy (kcal/kg)	4029.6	4052.3	4053.8

SOY: steamed soybean diet, CKJ: chungkookjang diet

유에 녹여 존대를 이용하여 1회 경구 투여하였다.

DMBA 투여 다음 날부터 각 군에 해당되는 실험 식이를 Table 1과 같은 조성으로 제조하여 주었고, 식이와 물은 마음대로 섭취하도록 하였다. 대조군을 위한 기본식은 AIN-93G를 바탕으로 하여 카제인 20%, 라이드 5%와 대두유 5%가 함유된 분말사료로 제조되었고, 청국장 식이는 기본식에 젖은 청국장 무게로 20%에 해당하는 건조무게를 첨가하였으며, 대두 식이는 청국장군 식이에 첨가된 청국장 단백질의 양과 동일한 단백질을 함유하는 증숙 대두 분말을 첨가하였다. 건조시료의 기본 성분 분석자료를 기초로 하여 3군 식이의 열량영양소 및 섬유소의 함량이 동일하도록 카제인, 옥수수 전분, 대두유 및 셀룰로오스의 양을 조정하였다. 카제인은 Scerma (France), 옥수수제품은 대정화학, 라이드는 롯데삼강, 대두유와 설탕은 제일제당, 셀룰로오즈, dl-methionine, choline chloride, DMBA는 Sigma (USA), vitamin mix 와 mineral mix는 Dyet (Bethlehem, USA) 제품을 구입하여 사용하였다. DMBA 투여 13주 후에 overnight fasting하여 희생시켰다. 희생 시에 테트로 마취한 다음 헤파린이 들어 있는 주사기로 복대정맥으로부터 혈액을 채취한 후 혈장을 분리하여 냉동하였다가 자동분석기 (Technicon Inc, USA)를 이용하여 albumin, lactate dehydrogenase (LDH), blood urea nitrogen (BUN), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) 농도를 측정하였다.

2) 유방 종양 보유율과 종양개수 및 종양무게 측정

DMBA 투여 후 13주까지 매주 체중을 측정하였으며, 주 2회 동물들을 한 마리씩 눈으로 잘 살펴 보고 또 손으로 만져 보아 종양 발생 여부 및 종양 개수를 기록하였고, 이로부터 군별 종양보유율 (12마리 중 종양을 가진 쥐의 비율, %)과 마리 당 평균종양수를 계산하여 그 추이를 비교하였다. 또한, 희생시키자마자 heparin이 들어 있는 주사기로 복대정맥에서 혈액을 채혈한 후 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 혈장을 얻었고, 종양을 모두 떼어내어 털과 피부를 제거한 후 마리당 총 종양무게를 측정하였다.

6. 통계처리

모든 분석치는 3~4회 측정한 값으로부터 평균값 ± SD로 나타내었으며, 각 군 사이에 통계적으로 유의한 차이가 있는

Table 2. The yields of solvent fractions from steamed soybean and Chungkookjang by sequential extraction (%)

	Steamed soybean	Chungkookjang
Hexane	0.44	2.56
Dichloromethane	0.10	0.22
Ethylacetate	0.08	0.21
Butanol	0.53	0.79
Water	3.98	0.72

지는 SAS 프로그램을 이용하여 t-test 또는 ANOVA/duncan's multiple range test에 의하여 검증하였다.

결 과

1. 용매별 추출 수율

중숙 대두와 청국장 300 g으로부터 획득된 용매별 추출 고형성분의 무게로부터 계산한 수율은 Table 2와 같다. 가장 눈에 띄는 것은 중숙 대두는 물 분획의 수율이 3.98%로 상대적으로 가장 높은 반면 청국장은 핵산분획의 수율이 2.56%로 가장 높았다.

2. 암세포 생장억제효과

청국장으로부터 얻은 분획별 추출물에 의한 암세포 생장억제효과를 검색하기 위하여 백혈구 혈액암세포 (HL-60), 인간 위암세포 (SNU-638), 유방암세포 (MCF-7)를 이용하여 측정하였으며, 중숙 대두군의 동일한 분획과 비교한 결과는 Fig. 2, 3, 4와 같고, 각각의 IC<sub>50</sub>값은 Table 3과 같다.

세포별로 자세히 보면, HL-60에서는 청국장의 핵산 분획 추출물을 800 µg/ml 이상 처리하였을 때 중숙 대두에 비하여 유의하게 세포의 생장을 억제하였으나 (p < 0.05), 디

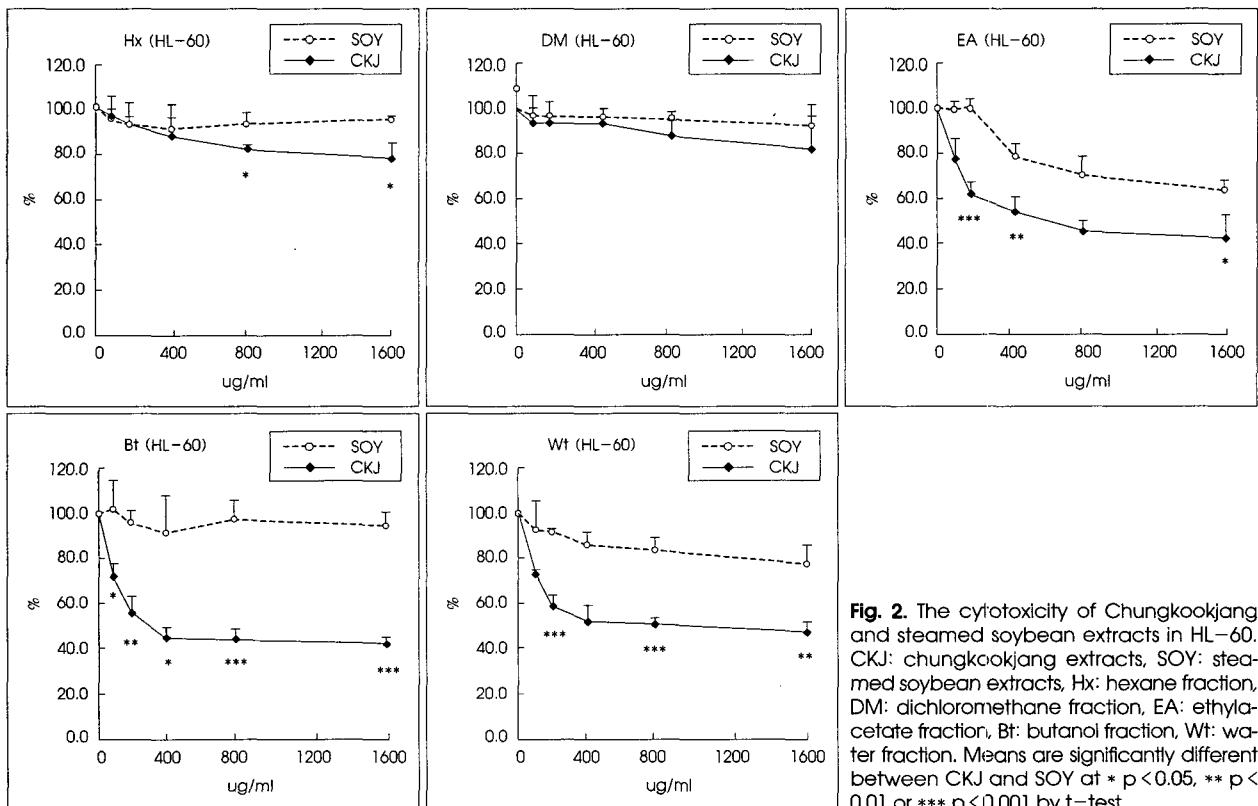
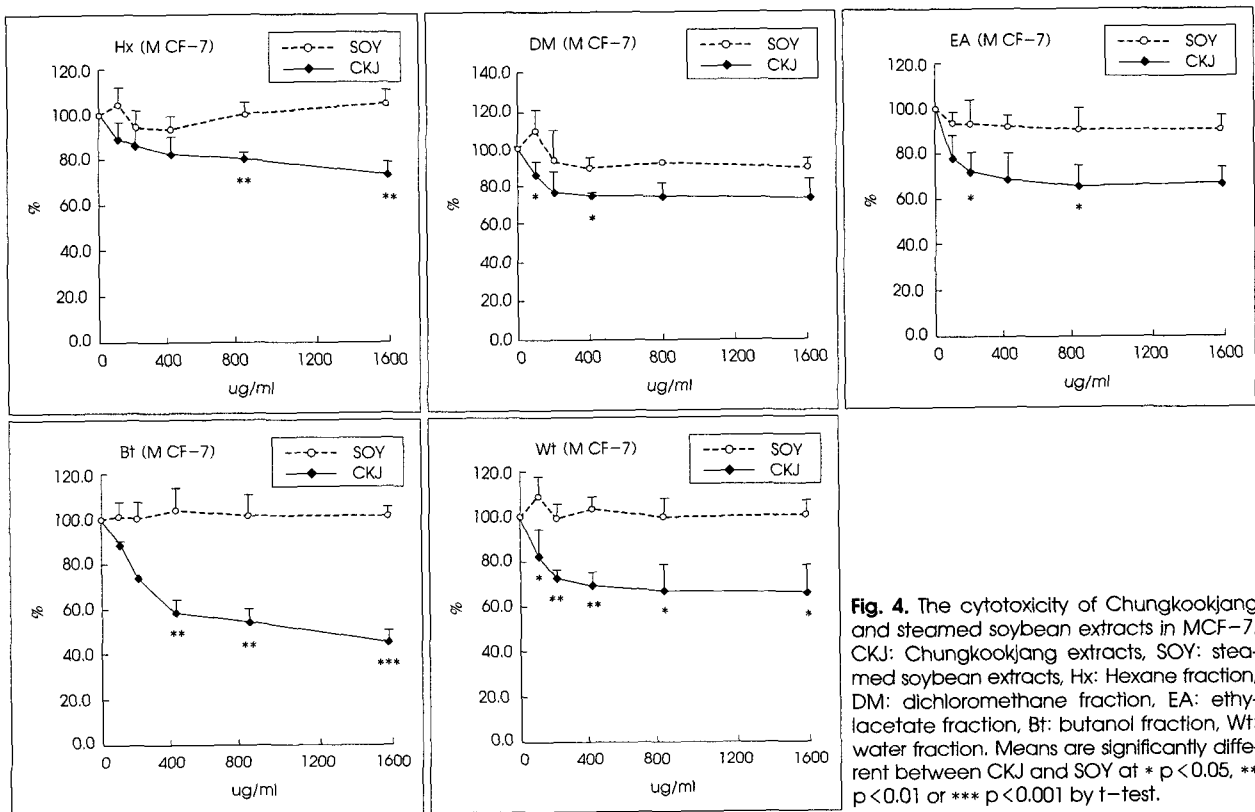
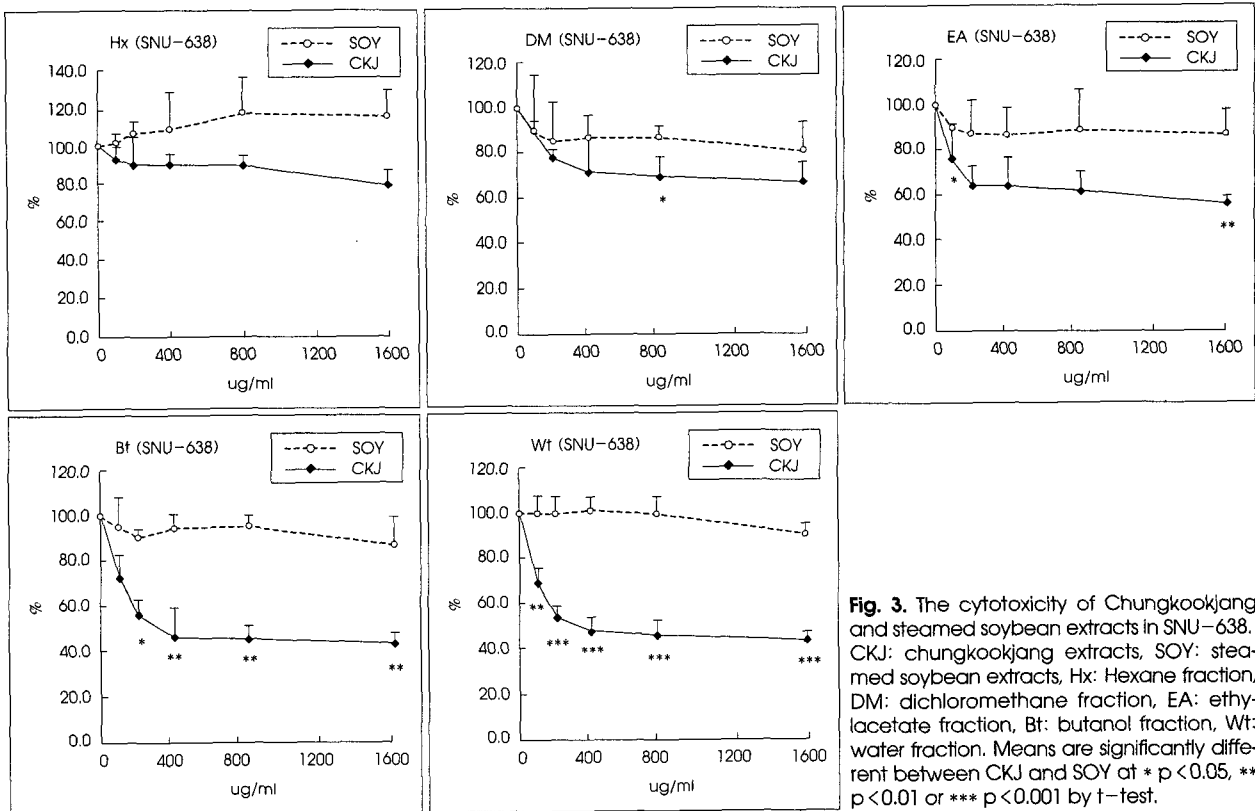


Fig. 2. The cytotoxicity of Chungkookjang and steamed soybean extracts in HL-60. CKJ: chungkookjang extracts, SOY: steamed soybean extracts, Hx: hexane fraction, DM: dichloromethane fraction, EA: ethylacetate fraction, Bt: butanol fraction, Wt: water fraction. Means are significantly different between CKJ and SOY at \* p < 0.05, \*\* p < 0.01 or \*\*\* p < 0.001 by t-test.



클로로메탄 분획 추출물은 차이가 없었다. 에틸아세테이트 분획 추출물은 200, 400, 1600  $\mu\text{g/ml}$  처리시 증숙 대두에 비하여 유의한 억제효과를 보였고, 부탄올 분획 추출물은 100  $\mu\text{g/ml}$  이상의 농도에서, 그리고 물 분획 추출물은 200  $\mu\text{g/ml}$  이상의 농도에서 모두 유의한 성장억제효과를 보였다 (Fig. 2).

**Table 3.** IC<sub>50</sub> of extracts on cancer cell cytotoxicity ( $\mu\text{g/ml}$ )

		HL-60	SNU-638	MCF-7
Hexane fr.	SOY	-	-	-
	CKJ	-	5232	4348
Dichloromethane fr.	SOY	-	9185	-
	CKJ	4776	3919	-
Ethylacetate fr.	SOY	2672	-	-
	CKJ	636	2581	4861
Butanol fr.	SOY	-	6826	-
	CKJ	329	352	1252
Water fr.	SOY	5007	6022	-
	CKJ	1029	346	6233

Represents more than 10,000  $\mu\text{g/ml}$ . SOY: steamed soybean, CKJ: chungkookjang

**Table 4.** The yields from steamed soybean and Chungkookjang by freeze-drying

	Wet wt. (kg)	Dry wt. (kg)	Yield (%)
Steamed soybean	15.0	6.11	40.7
Chungkookjang	15.0	7.20	48.0

**Table 5.** Basic nutrients and dietary fiber contents of casein and dried steamed soybean and Chungkookjang (%)

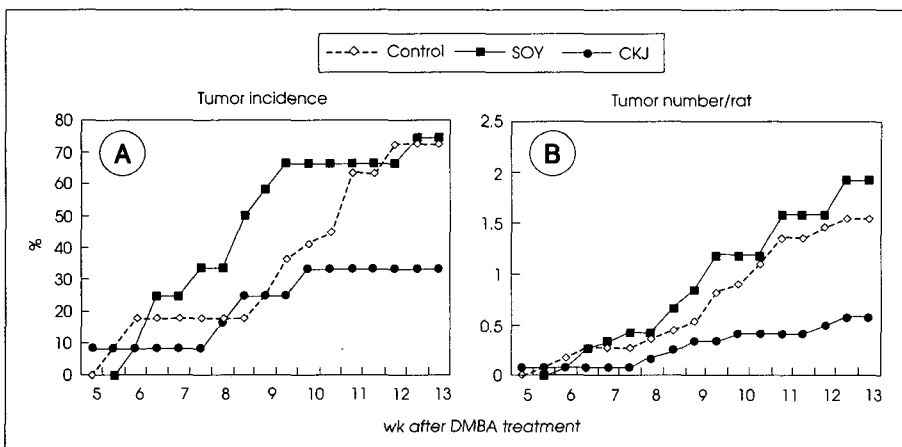
	Casein	Steamed soybean	Chungkookjang
Protein	87.8	37.2	41.3
Lipid	0.5	24.5	26.0
Carbohydrate	3.4	29.3	24.0
Dietary fiber	0.0	8.9	8.4

SNU-638에서는 청국장의 핵산 분획 추출물 처리에 의한 성장억제효과는 증숙대두와 비교하였을 때 유의한 차이가 없었고, 디클로로메탄 분획 추출물은 800  $\mu\text{g/ml}$  농도에서만 증숙대두보다 생장을 억제하였다 ( $p < 0.05$ ). 청국장의 에틸아세테이트 분획 추출물은 100, 1600  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 증숙 대두에 비하여 유의한 성장억제효과가 있었으며, 부탄올 분획 추출물은 200  $\mu\text{g/ml}$  이상에서, 그리고 물 분획 추출물은 100  $\mu\text{g/ml}$  이상에서 모두 유의한 효과를 보였다 (Fig. 3).

MCF-7에서는 청국장의 핵산 분획 추출물의 경우 800  $\mu\text{g/ml}$  이상에서 증숙 대두에 비하여 유의한 성장억제효과를 보였고 ( $p < 0.01$ ), 디클로로메탄 분획 추출물은 100, 400  $\mu\text{g/ml}$ 에서만 유의한 효과를 보였다 ( $p < 0.05$ ). 청국장의 에틸아세테이트 분획 추출물은 200, 800, 1600  $\mu\text{g/ml}$ 에서 증숙 대두에 비하여 유의한 성장억제 효과를 보인 반면 ( $p < 0.05$ ), 부탄올 분획 추출물은 200  $\mu\text{g/ml}$  이상에서, 그리고 물 분획 추출물은 100  $\mu\text{g/ml}$  이상에서 유의한 성장억제효과를 보였다 (Fig. 4).

이상의 혈액암, 위암, 유방암 세포 모두에서 청국장의 5 가지 분획 추출물들이 대부분 증숙 대두의 추출물들에 비하여 세포의 생장을 유의하게 억제하는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 부탄올과 물분획 추출물의 효과가 매우 우수하였다. 따라서, 증숙 대두가 발효되는 과정에서 생성된 어떤 극성의 물질들이 암세포의 생장을 효과적으로 억제하는 것으로 추정된다.

아울러, 이들 암세포의 생장을 50% 억제할 수 있는 청국장과 증숙 대두의 분획 추출물의 농도 (IC<sub>50</sub>)를 살펴보았을 때 역시 청국장의 농도가 증숙 대두에 비하여 크게 낮았다 (Table 3). HL-60에서는 특히 청국장의 에틸아세테이트 분획과 부탄올 분획 추출물의 IC<sub>50</sub>값이 각각 635.6  $\mu\text{g/ml}$



**Fig. 5.** The effects of Chungkookjang intake on tumor incidence (A) and average tumor number a rat (B) in DMBA-induced mammary gland tumor model using rat. Control: basal diet group, SOY: steamed soybean diet group, CKJ: Chungkookjang diet group.

과 328.8 µg/ml로 낮았고, SNU-638에서는 청국장 부탄을 분획과 물 분획 추출물의 IC<sub>50</sub> 값이 각각 352.3 µg/ml 과 346.1 µg/ml 로 나타났으며, MCF-7에 대해서는 청국장 부탄을 분획 추출물의 IC<sub>50</sub>값이 1,252.0 µg/ml으로 가장 낮았다.

**3. 시료의 동결건조 수율과 건조시료의 기본 성분 분석**

동물실험을 위하여 증숙 대두와 청국장을 동결 건조하였을 때 각각의 수율은 40.7%와 48.0%로 (Table 4), 청국장의 수율이 더 높았다. 이는 발효과정에서 증숙 대두의 수분이 일부 손실되었기 때문으로 여겨진다.

동결 건조한 시료의 단백질, 지방, 탄수화물, 식이섬유의 함량을 분석한 결과 증숙 대두와 청국장의 지방 및 식이섬유의 함량은 비슷하였으나, 단백질은 각각 37.2%와 41.3%로 청국장이 더 높았고, 탄수화물은 증숙 대두가 29.3%인데 반하여 청국장은 24.0%로 증숙 대두가 높았다 (Table 5).

**4. 유방종양 발생률, 종양수 및 종양 무게**

DMBA 투여 후 기간별 종양생성여부 및 종양수를 관찰한 결과 5주 후부터 종양이 생기기 시작하였고, 각 군 간에 실험기간에 따른 종양발생률의 추이는 Fig. 5A와 같다. 유방종양이 생기기 시작하여 희생 직전까지의 종양발생률의 양상을 보면 증숙 대두군은 그 발생률이 빠르게 증가한 반면, 대조군은 9주 이후 크게 증가하였고, 청국장군은 가장 서서히 증가함을 볼 수 있었다. DMBA 투여 5주 후부터 7.5주까지는 증숙 대두군이 33.3%, 대조군이 18.2%, 청국장군이 8.3%로 청국장군의 종양 발생률이 가장 낮았고 증숙 대두군이 가장 높았다. 그러나, 대조군의 종양 발생률은 9주 이후 빠르게 증가하여 희생직전인 13주에는 72.7%로 증숙 대두군의 75.0%에 접근한 반면, 청국장군은 여전히 33.3%로 가장 낮았다.

한편, 마리당 평균 유방 종양 수의 변화 역시 종양발생률과 같이 대조군과 증숙 대두군은 시간이 감에 따라 빠르게 증가한 반면, 청국장군은 아주 서서히 증가함을 볼 수 있었다 (Fig. 5B). 이는 청국장군의 유방종양 발생률 자체가 다른 군에 비하여 현저히 낮았기 때문으로 설명될 수 있다. 최종적으로 희생 직전의 마리당 평균 유방종양 수는 대조군이 1.55 ± 1.6개, 증숙 대두군이 1.92 ± 1.70개인데 반해 청국장군은 0.58 ± 1.81개로 증숙 대두군과 비교시 유의하게 적었고(p < 0.05), 마리당 평균종양무게는 대조군이 4.44 ± 5.29 g, 증숙 대두군이 5.55 ± 6.26 g, 청국장군이 2.92 ± 6.09 g으로 청국장군이 가장 낮았으나 편차가 심하여 통계적으로 의미는 없었다 (Table 6).

**Table 6.** Tumor number and tumor weight a rat at termination of experiment

	Tumor number/rat	Tumor weight/rat (g)
Control	1.55 ± 1.6 <sup>ab</sup>	4.44 ± 5.29 <sup>NS</sup>
SOY	1.92 ± 1.70 <sup>a</sup>	5.55 ± 6.26
CKJ	0.58 ± 1.81 <sup>b</sup>	2.92 ± 6.09

Values are represented with mean ± SD (n = 12)  
 SOY: steamed soybean group, CKJ: chungkookjang group  
 a, b, ab: Means with a different alphabet superscript is not significantly different among groups determined by ANOVA/Duncan's multiple range test at p < 0.05  
 NS: not significantly different among groups at p < 0.05

**Table 7.** Serum analysis

	Control	SOY	CKJ
Albumin (g/dl)	3.13 ± 0.34 <sup>NS</sup>	3.02 ± 0.43	2.82 ± 0.19
AST (U/L)	136.6 ± 52.9 <sup>NS</sup>	136.0 ± 30.4	126.9 ± 37.9
ALT (U/L)	33.55 ± 6.77 <sup>NS</sup>	35.92 ± 8.07	37.92 ± 7.75
LDH (U/L)	1245.6 ± 775.9 <sup>NS</sup>	1228.0 ± 445.7	1050.2 ± 399.4
BUN (mg/dl)	14.36 ± 2.87 <sup>NS</sup>	12.83 ± 1.95	12.83 ± 1.59

Values are represented with mean ± SD (n = 12)  
 SOY: steamed soybean group, CKJ: chungkookjang group  
 AST: aspartate aminotransferase, ALT: alanine aminotransferase  
 LDH: lactate dehydrogenase, BUN: blood urea nitrogen  
 NS: not significantly different among groups at p < 0.05

**5. 혈액분석**

혈장에서 측정한 albumin, LDH, AST, ALT, BUN 농도는 3군 간에 유의한 차이가 없었다.

**고 찰**

Park 등<sup>16)</sup>은 벧짚을 이용하여 발효시킨 청국장이 공기 중에서 자연 발효시킨 청국장보다 인간 위암세포 (AGS)의 증식을 억제하는 효과가 더 컸으며, 전통식 청국장으로부터 얻은 메탄을 추출물을 AGS 세포에 100 µg/ml 농도로 70 시간 처리하였을 때 세포 수가 41% 감소한 반면, 된장과 natto의 메탄을 추출물은 각각 66%와 53%를 감소시켰다고 하였다. 임선영 등<sup>18)</sup> 역시 대두, 된장, 청국장, 미소 메탄을 추출물을 인간 위암세포 (AGS), 인간 간암세포 (Hep 3B), 인간 대장암세포 (HT29)에 처리하였을 때 이들 추출물이 모두 암세포의 증식을 억제하였으나, 상대적으로 된장의 효과가 가장 컸고, 대두, 청국장, 미소 추출물의 효과는 서로 비슷하였다고 하였다. 본 연구에서는 다른 장류와 비교하여 실험하지는 않았지만 청국장에서 얻은 5가지 용매의 추출물 대부분이 대두보다 암세포증식을 억제하는 효과가 크게 나타나는 결과를 보였다. 이는 시료와 세포 종류, 추출 용매 및 배양기간 등의 차이 때문이 아닌가 생각된다.

또, Choi 등<sup>19)</sup>은 재래식 된장의 메탄올 추출물을 여러 용매로 분획했을 때 에틸아세테이트 분획이 가장 높은 암세포 성장억제효과를 나타냈다고 하였으나, 본 연구에서는 청국장 부탄올 분획이 HL-60, SNU-638, MCF-7의 성장을 모두 억제하는 효과가 가장 컸고, 에틸아세테이트 분획은 HL-60 세포에서만 2번째로 좋은 효과를 보여, 암세포 성장억제효과를 보이는 유효성분에 있어서 청국장이 된장에 비하여 조금 더 극성인 경향의 물질을 함유하고 있을 것으로 추측된다.

청국장의 원료인 대두에는 genistein, daidzein과 같은 isoflavone이 많이 함유되어 있는데 이것은 체내에서 에스트로젠과 같은 역할을 하며, 특히 유방암을 억제시키는 효과가 있다고 널리 알려져 있으나,<sup>20,21)</sup> 그와 상반되는 보고들도 있어 아직 대두 isoflavone의 항암효과에 대해서는 단정적으로 말할 수 없다. 특히 가장 주목 받고 있는 genistein은 천연의 tyrosine kinase inhibitor로 잘 알려져 있으며, topoisomerase II의 활성을 저해하고 유방암세포의 apoptosis를 촉진하는 동시에 이동성을 억제함으로써 유방암의 발생과 전이를 억제할 수 있다고 보고 되었다.<sup>22)</sup> 그러나, 세포실험이나 동물실험 결과 세포의 종류나 투여용량, 투여시기 및 투여기간에 따라 상반된 결과들을 보이고 있다. Genistein을 10  $\mu$ M 이상의 농도로 유방암세포에 처리하였을 때 에스트로젠 의존적인 세포인 MCF-7과 비의존적인 세포인 MDA-468 모두에서 세포증식을 억제하였으나,<sup>13)</sup> 200 nM의 낮은 농도에서는 MCF-7 세포의 증식을 촉진하여 genistein의 유방암세포 증식에 대한 영향은 그 농도에 따라 이중적인 효과를 보였다. Giri 등<sup>23)</sup>은 DMBA를 투여하여 유방암을 유도한 생쥐에서 genistein과 daidzein을 먹인 결과 유선과 간에서 DNA adduct의 형성을 감소시키는 효과에 대하여 보고하였으며, 사춘기 이전에 genistein을 먹은 흰쥐가 성체가 되었을 때에는 발암물질 투여로 인한 유방암의 발생율이 대조군보다 낮았으나,<sup>24)</sup> 사춘기 이후에 섭취시켰을 때에는 효과가 없었다는 연구 결과도 있었다.<sup>25)</sup> 한편, Jin 과 MacDonald는 ErbB2/neu/HER2 oncogene이 과발현되어 자연적으로 유방종양이 생기는 MMTV-neu mouse에게 genistein이나 daidzein을 먹였을 때 투여군 모두에서 유방종양의 발생시기가 지연되는 효과를 보았으나, 장기적으로 관찰한 결과 계속해서 유방종양의 발생을 억제하지는 못하였다고 하였다.<sup>26)</sup> 그리고, Charland 등은 유방암 세포인 MAC-33을 피하에 이식한 흰 쥐에게 대두추출물 또는 가열 멸균한 대두추출물을 먹인 결과 두 군 모두 대조군에 비하여 종양의 성장과 폐로의 전이가 증가되는 의외의 결과를 관찰하였으며, 특히 열에

안정한 isoflavone인 genistein을 많이 함유하는 가열 멸균한 대두추출물을 먹은 군의 종양무게와 종양크기가 가장 컸다고 하였다.<sup>27)</sup> 일부 연구자는 nude mouse에게 MCF-7을 이식하거나<sup>28)</sup> DMBA를 투여하고<sup>29)</sup> genistein 함량을 달리한 식이를 먹인 경우 genistein 함량이 높을수록 종양의 성장 및 발생율이 더 증가하였다고 하였다. 이들의 보고는 충분하지는 않지만 본 실험에서 예상 외로 증속 대두군의 유방종양 발생율과 평균 종양수가 대조군보다 다소 높은 경향을 보인 결과를 부분적으로 설명할 수 있는 실마리를 제공하고 있다. 대두의 항암효과에 대한 상반된 결과들을 보다 잘 설명하기 위해서는 우선적으로 대두, 증속 대두 및 발효된 대두에서 isoflavone을 비롯하여 가능성 있는 여러 생리활성 물질들의 양적 및 질적인 변화를 측정 비교해야 할 것이며, 보다 세밀하고 다양한 조건의 실험연구들이 지속적으로 요구된다.

한편, 많은 실험들에서 사용된 대두 isoflavone은 모두 free form 이라는 점에 주목할 필요가 있다. 실제로 식품 속에 존재하는 isoflavone을 비롯한 flavonoid 들은 대부분 free form이 아닌 glucoside의 형태로 존재하며 체내에서 aglycone으로 분해되어야 흡수가 용이하기 때문에 일반적으로 isoflavone의 체내흡수율은 매우 낮다고 알려져 있다.<sup>30)</sup> 반면, 발효 과정을 거치면 미생물들에 의해 분비된  $\beta$ -glucosidase에 의하여 glucoside가 빠르게 분해되어 aglycone이 크게 증가하게 되어 결국 발효대두식품의 주된 isoflavone은 aglycone 형태가 된다.<sup>31-33)</sup> 청국장의 발효 과정에 따른 isoflavone의 구조적 변화에 대한 연구 자료는 찾을 수 없었으나 청국장과 유사한 tempeh의 경우 발효시킨 지 24시간이 지나면 발효 전과 비교하여 aglycone isoflavone의 함량이 2배로 증가하였다는 보고가 있었다.<sup>32)</sup> 또한, 최근에 Cassidy 등<sup>34)</sup>은 tempeh, 두유, 콩단백을 사람에게 먹여 aglycone과 glucoside isoflavone의 체내 이용율에 대한 비교연구를 수행한 결과 tempheh 섭취 시 혈청 내 genistein과 daidzein의 농도가 가장 높게 상승하였다고 하여 발효과정에서 isoflavone의 체내 이용율을 상승시키는 것을 확인할 수 있었다.

본 실험에서는 청국장의 발효 전후에 isoflavone 함량 및 그 구조적 변화에 대하여 측정하지는 않았지만 청국장은 증속 대두에 비하여 월등히 많은 aglycone isoflavone을 함유할 것으로 예상되며, 이로 인하여 *in vitro* 암세포의 성장을 억제하는 효과를 분명하게 보이는 동시에 동물실험에서도 청국장을 섭취시킨 경우에서만 유방종양의 발생을 효과적으로 감소시킨 결과를 초래했을 것으로 추측된다. 그 밖에 발효과정 중에 isoflavone이 아닌 다른 어떤 물질들의 양



적·질적인 변화가 청국장장의 항암효과에 기여했을 가능성도 배제할 수는 없으며 앞으로 이 부분에 대하여 많은 연구가 요구된다.

### 요약 및 결론

청국장장의 항암효과와 발효과정의 관련성을 확인하기 위하여 *in vivo* 유방종양 억제효과와 *in vitro* 암세포 성장억제 효과를 알아 보았다. 증숙 대두와 이를 3일간 발효시켜 만든 청국장을 동결 건조시켜 DMBA투여로 유방종양을 유도한 흰쥐에게 먹이면서 (젓은 무게로 환산 시 먹이의 20% 무게) 유방종양의 발생율과 종양수를 측정하였다. 또한, 청국장을 에탄올로 추출 농축한 후 다시 핵산, 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 부탄올, 물로 순차적 분획추출을 하여 각각을 인간 백혈구 혈액암세포 (HL-60), 인간 위암세포 (SNU-638), 인간 유방암세포 (MCF-7)에 농도별로 처리한 후 48시간 후 MTT 방법으로 흡광도를 측정하여 살아 있는 세포의 수를 비교하였다.

1) 청국장을 섭취한 군은 유방종양 발생율과 마리당 평균 종양수를 효과적으로 낮추었으나 증숙 대두를 섭취한 군은 대조군과 차이가 없었다.

2) 청국장 추출물의 HL-60 세포 성장에 대한 영향을 증숙 대두와 비교해 보면, 청국장 디클로로메탄 분획물만 증숙 대두와 차이가 없었을 뿐 나머지 분획들은 모두 증숙 대두군에 비하여 유의하게 세포 성장을 억제하는 효과가 있었는데, 특히 부탄올 분획물은 모든 투여 농도에서 확실하게 성장을 억제하는 효과가 더 컸다. IC<sub>50</sub> 값은 청국장 부탄올 분획이 328.8 µg/ml로 가장 낮았으며, 에틸아세테이트 분획 635.6 µg/ml, 물 분획 1029.4 µg/ml의 순이었다.

3) 청국장 추출물의 SNU-638 세포 성장에 대한 영향을 보면 핵산 분획물과 디클로로메탄 분획물은 증숙 대두와 별 차이가 없었으나, 부탄올 분획물과 물 분획물의 억제효과는 증숙대두에 비하여 매우 컸다. 청국장의 부탄올과 물 분획물의 IC<sub>50</sub>는 각각 352.3 µg/ml과 346.1 µg/ml로 매우 낮았다.

4) 청국장 추출물의 MCF-7 세포 성장에 대한 영향은 모든 분획물이 증숙 대두에 비하여 유의하게 억제하는 효과를 보였다. 특히 부탄올 분획물에서 발효의 효과가 가장 크게 나타났으며, IC<sub>50</sub> 값은 1252.0 µg/ml로 가장 낮았다.

이상의 결과를 종합해 보면, 청국장은 발효과정을 거치는 동안 항종양 및 암세포 성장억제효과를 갖는 물질이 증가하며, 그 물질은 부탄올 분획물에 가장 많은 것으로 판단된다.

### Literature cited

- 1) Sung JH, Choi SJ, Lee SW, Park KH, Moon TW. Isoflavones found in Korean soybean paste as 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Biosci Biotechnol Biochem* 68(5) : 1051-1058, 2004
- 2) Kim SH, Yang JL, Song YS. Physiological functions of Chungkuk-Jang. *Food Ind Nutr* 4: 40-46, 1999
- 3) Kim HB. Chungkook-jang diet and Health. Human & Books, Seoul, Korea, 2003
- 4) Nout MJR, Kiers JL. Tempe fermentation, innovation and functionality: update into the third millenium. *J Appl Microbiol* 98: 789-805, 2005
- 5) Chen YC, Sugiyama Y, Abe N, Kuruto-niwa R, Nozawa R, Hirota A. DPPH radical-scavenging compounds from dou-chi, a soybean fermented food. *Biosci Biotechnol Biochem* 69(5) : 999-1006, 2005
- 6) Dakwa S, Sakyi-Dawson E, Diako C, Annan NT, Amoa-Awua WK. Effect of boiling and roasting on the fermentation of soybeans into dawadawa (soy-dawadawa). *Inter J Food Microbiol* 104: 69-82, 2005
- 7) Youn HK, Choi HS, Hur SH, Hong JH. Antimicrobial activities of viscous substance from Chungkukjang fermented with different Bacillus spp. *J Food Sci Technol* 32: 1266-1270, 2001
- 8) Heo S, Lee SK, Joo HK. Isolation and identification of fibrinolytic bacteria from Korean traditional Chungkukjang. *Agric Chem Biotech* 41: 119-124, 1998
- 9) Omura K, Hitosugi M, Zhu X, Ikeda M, Maeda H, Tokudome S. A newly derived protein from Bacillus subtilis natto with both anti-thrombotic and fibrinolytic effects. *J Pharmacol Sci* 99: 247-251, 2005
- 10) Yang JL, Lee SH, Song YS. Improving effect of powders of cooked soybean and Chungkukjang on blood pressure and lipid metabolism in spontaneously hypertensive rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32(6) : 899-905, 2003
- 11) Lee HP, Gourley L, Duffey SW, Esteve J, Lee J, Day NE. Dietary effects on breast-cancer in Singapore. *Lancet* 337: 1197-1200, 1991
- 12) Coward L, Barnes NC, Setchell KDR, Barnes S. Genistein, daidzein and their glycoside conjugates: Antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets. *J Agric Food Chem* 41: 1961-1967, 1993
- 13) Peterson G, Barnes S. Genistein inhibition of the growth of human breast cancer cells: independence from the estrogen receptor and the multi-drug resistance gene. *Biochem Biophys Res Commun* 179: 661-667, 1991
- 14) Tiisala S, Majuri MI, Carpen O, Renkonen R. Genistein enhances the ICAM-1 and its counter-receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 203: 443, 1994
- 15) Wei H, Wei L, Frenkel F, Brown R, Barnes S. Inhibition of tumor promotor-induced hydrogen peroxide formation in vitro and in vivo by genistein. *Nutr Cancer* 20: 1-8, 1993
- 16) Park KY, Jung KO, Rhee SH, Choi YH. Antimutagenic effects of doenjang (Korean fermented soypaste) and its active com-

- pounds. *Mutation Research* 523-524: 43-53, 2003
- 17) Park KY, Jung KO, Kwon EY. Development of a Chungkookjang (soybean paste fermented for 2-4 days) with anti-AGS human gastric cancer cell properties. *Nutraceuticals Food* 8: 54-60, 2004
  - 18) Allred CD, Allred KF, Ju YH, virant SM, Helferich WG. Soy diets containing varying amounts of genistein stimulate growth of estrogen-dependent (MCF-7) tumors in a dose-dependent manner. *Cancer Res* 61: 5045-5050, 2001
  - 19) Lim SY, Rhee SH, Park KY. Inhibitory effect of methanol extract of doenjang on growth and DNA synthesis of human cancer cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33(6): 936-940, 2004
  - 20) Choi SY, Cheigh MJ, Lee JJ, Kim HJ, Hong SS, Chung KS, Lee BK. Growth suppression effect of traditional fermented soybean paste (Doenjang) on the various tumor cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 28: 458-463, 1999
  - 21) Record IR, Dreosti IE, McInerney JK. The antioxidant activity of genistein in vitro. *J Nutr Biochem* 6: 481-485, 1995
  - 22) Sugano M, Gatchalian-Yee M, Arimura Y, Ochiai E, Yamada K. Soybean protein lowers serum cholesterol levels in hamsters: effect of debittered undigested fraction. *Nutrition* 13: 633-639, 1997
  - 23) Valachovicova T, Slivova V, Bergman H, Shuherk J, Sliva D. Soy isoflavones suppress invasiveness of breast cancer cells by the inhibition of NF- $\kappa$ B/AP-1-dependent and -independent pathways. *Int J Oncol* 25: 1389-1395, 2004
  - 24) Giri AK, Lu LJ. Genetic damage and inhibition of 7,12-dimethylbenz [a] anthracene-induced genetic damage by the phytoestrogens, genistein and diazein, in female ICR mice. *Cancer Lett* 95: 125-133, 1995
  - 25) Murrill WB, Brown NM, Zhang JX, Manzollilo PA, Barnes S, Lamartiniere CA. Prepubertal genistein exposure suppresses mammary cancer and enhances gland differentiation in rats. *Carcinogenesis* 17: 1451-1457, 1996
  - 26) Cohen LA, Zhao Z, Pittman B, Scimeca JA. Effect of intact and isoflavone-depleted soy protein on NMU-induced rat mammary tumorigenesis. *Carcinogenesis (Lond)* 27: 929-935, 2000
  - 27) Jin Z, MacDonald RS. Soy isoflavones increase latency of spontaneous mammary tumors in mice. *J Nutr* 132: 3186-3190, 2002
  - 28) Charland SL, Hui JW, Torosian MH. The effects of a soybean extract on tumor growth and metastasis. *Int J Mol Med* 2(2): 225-228, 1998
  - 29) Day JK, Besch-Williford C, McMann TR, Hufford MG, Lubahn DB, MacDonald RS. Dietary genistein increased DMBA-induced mammary adenocarcinoma in wild-type, but not ER- $\alpha$  KP mice. *Nutr Cancer* 39: 226-232, 2001
  - 30) Hollman PCH, Katan MB. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomed Pharmacother* 51: 305-310, 1997
  - 31) Yin LJ, Li LT, Liu H, Satto M, Tatsumi E. Effects of fermentation temperature on the content and composition of isoflavones and  $\beta$ -glucosidase activity in Sufu. *Biosci Biotechnol Biochem* 69(2): 267-272 2005
  - 32) Nakajima N, Nozaki N, Ishihara K, Ishikawa A, Tsuji H. Analysis of isoflavone content in Tempeh, a fermented soybean, and preparation of a new isoflavone-enriched Tempeh. *J Biosci Bioengine* 100(6): 685-687, 2005
  - 33) Wang HJ, Murphy PA. Isoflavone content in commercial soybean foods. *J Agric Food Chem* 42: 1666-1673, 1994
  - 34) Cassidy A, Brown JE, Hawdon A, Faughnan MS, King LJ, Millward J, Zimmer-Nechemias L, Wolfe B, Setchell KDR. Factors affecting the bioavailability of soy isoflavones in humans after ingestion ph physiologically relevant levels from different soy foods. *J Nutr* 136: 45-51, 2006