

초피첨가 전통장류의 항균 및 항암활성

김근기 · 박현철 · 손홍주 · 김용균 · 이상몽 · 최인수¹ · 최영환¹ · 신택순^{1*}

부산대학교 생명자원과학대학 생명응용과학부, ¹부산대학교 생명자원과학대학 생명자원과학부

Received June 4, 2007 / Accepted July 18, 2007

Antimicrobial and Anticancer Activity of Korean Traditional Soy Sauce and Paste with Chopi. Keun Ki Kim, Hyeon Cheal Park, Hong Joo Son, Yong Gyun Kim, Sang Mong Lee, In soo Choi¹, Young whan Choi¹ and Teak Soon Shin¹. *School of Applied Life Science, Pusan National University, Miryang 627-702, Korea, ¹School of Resources and Life Science, Pusan National University, Miryang 627-702, Korea* – The fruits of *Zanthoxylum piperitum* are known as having various physiology vitality, and the abstraction ingredient of the pericarp is also known as having strong antibiotic activities against various bacteria. Therefore, this study was carried out to estimate the effect of physiology vitality when the abstraction ingredient of *Z. piperitum* was added in soy sauce(Chopi-kanjang) and soybean paste(Chopi-doenjang). For the antibiotic activity against the pathogens of sitotoxism such as *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio parahemolyticus*, *Escherichia coli* 0157:H7, the extracts of the Chopi-kanjang was added 1%, 2%, 4% pericarp of *Z. piperitum* in the manufacturing process of soy source. According to the results, the growth of *E. coli* 0157:H7 and *V. parahemolyticus* were respectively inhibited as 70% and 50% by the Chopi-kanjang added 2% of the ingredient. For the antibiotic effects of the aforementioned Chopi-kanjang against *Sal. typhimurium* and *Sta. aureus*, the growth of those pathogens was also inhibited between 40% and 60% according to the manufacturing period of Chopi-kanjang. It was confirmed that the antibiotic activity using the mixture of the abstraction ingredient and Chopi-doenjang was lower than those of Chopi-kanjang. In order to estimate the anticancer activity using by caspase-3 activity, the mixture of the abstraction ingredient of the pericarp of *Z. piperitum* and Chopi-kanjang was treated to leukemia cells. According to the results, the activities of caspase-3 using the mixture added 1%, 2% and 4% of the abstraction ingredient were respectively increased as much as 4, 12, 15 times comparing with the control which was treated with the soy source only. It could be that the mixture of the abstraction ingredient of the pericarp of *Z. piperitum* and soy source induced apoptosis, and the mixture of the abstraction ingredient and soybean paste had no effect on the activity of caspase-3. In order to find out the death of the aforementioned cells caused by necrosis or apoptosis, DNA fragmentation in the cell was examined. U-937 cells showed apoptotic DNA fragmentation in the incubation with Chopi-kanjang extract.

Key words – *Z. piperitum*, antimicrobial activity, apoptosis, caspase, chopi-kanjang

서 론

식생활의 변화와 환경오염 등의 원인으로 생활습관병 발병율과 신종 병의 발생률이 증가하여 사회적인 문제로 대두되어지고 있다. 식생활의 변화에 따라 초래되어진 결과로서 우리의 전통적인 식습관과 전통식품에 대한 관심을 갖게 되는 계기가 되었다. 전통 발효식품인 김치[4,15,18,28], 간장[2,3,21], 된장[1,5,22,25,35]에 대한 생리활성효과가 입증됨으로써 전통발효식품의 시장도 점차 증가하고 있으며, 그에 따른 연구와 개발이 활발히 이루어지고 있다. 간장과 된장은 우리의 음식 맛을 결정하는 중요한 조미료로서, 고구려시대부터 우리 식생활에 이용되어진 가장 대표적인 발효식품이다.

전통발효식품들의 제조방법에 따른 맛과 향을 결정하는

성분조사[20,26]와 발효식품의 위생화 및 품질향상과 품질관리를 위한 표준화연구[27] 뿐만 아니라, 된장과 콩 관련발효식품과의 비교실험[7] 및 기호개선과 기능성구명 및 새로운 소재의 첨가로 기능성개발과 향상에 대한 연구가 활발히 전개되고 있다. 다시마분말을 첨가한 된장에 항돌연변이와 항암효과 부여[23], 더덕 및 산채를 혼합하여 만든 양조간장에서의 무기물성분상승과 항돌연변이 효과가 높게 나타났다[10]. 그 외에도 고로쇠와 대나무 수액을 이용한 간장개발[6], 식용식물인 고려영경귀와 컴프리를 이용[11], 정어리 잔사[19], 다시마분말[7] 첨가물을 이용하여 기능성 간장과 된장의 개발과 연구가 이루어지고 있다[8-11,16].

단체급식의 증가로 식중독, 콜레라 및 이질 등의 질환으로 인한 피해가 최근에 동반상승하고 있는 실정이며, 이들 원인균으로부터 식자재와 식품오염 방지를 위한 항균성식자재와 식품개발과 위생 등 다방면에 걸쳐 연구가 수행되어지고 있다.

초피(*Zanthoxylum piperitum*)나무는 우리나라 중부이남과

*Corresponding author

Tel : +82-55-350-5514, Fax : +82-55-350-5519

E-mail : shints@pusan.ac.kr

일본의 산야에 자생하는 낙엽관목으로 과실과 잎에 함유되어있는 정유물질은 강한 방향성과 청량한 매운맛을 나타낸다. 우리나라나 일본에서는 어린잎과 미숙과실을 예부터 첨가물, 구이, 절임류의 풍미개선이나 어취의 억제 등에 넓게 사용되어지고 있으며, 성숙한 과실은 건조 후 분말로 향신료나 약용으로서 이용되고 있다. 초피의 정유성분연구는 Sakai [29]등이 terpene화합물을 중심으로 성숙한 과실로부터 다양한 성분 연구가 되어졌고 Wu Yin[33]은 위의 각 성분들의 함량에 대해 조사를 하였다. 초피나무의 과피, 종자, 잎, 목피, 목질부 그리고 뿌리를 순차적 용매추출법으로 추출한 추출물을 이용하여 식중독 유발균(*E. coli* O157:H7, *Sta. aureus*, *Sal. typhimurium*, *V. parahemolyticus*)에 대한 항균효과를 조사한 결과, 과피추출물에서 그람 양성균과 음성균에 뛰어난 항균효과를 보였다[13]. 과피의 메탄올추출물이 항돌연변이와 MG-63 암세포증식억제 효과가 있는 것이 보고되어져 있다[17].

따라서 본 연구는 된장과 간장제조시 초피 과피를 첨가하여, 식중독 유발균이나 기타 세균성질병 병원성 균에 대한 항균활성을 확인하고, 식중독사고의 예방을 위한 식품개발의 가능성을 살펴보는데 그 목적이 있다.

재료 및 방법

초피

본 실험에 사용한 초피(*Z. piperitum*)는 경남 거창의 산지 개발연구소 재배단지에서 생산된 것을 이용하였다. 봄에 담근 간장과 된장에 사용한 것은 전년도 8월에 수확한 것으로 음건한 후 70% 탈립 시킨 과피를 사용했고, 가을에 담근 간장과 된장에 사용한 것은 8월에 수확하여 생초피를 그대로 사용하였다.

사용균주 및 세포

실험에 사용한 균주는 경상대학교 환경생명화학에서 분양받아 사용했으며, 그람양성균으로는 *Sta. aureus* ATCC 13301과 *B. subtilis* ATCC 9372를 사용하였고, 그람음성균으로는 *Sal. typhimurium*, *E. coli* O157:H7 KSC 059 및 *V. parahemolyticus* ATCC 33844를 사용하였다. 균 생육배지는 nutrient agar를 사용하였으나, *V. parahemolyticus*의 경우에는 nutrient agar배지에 3% NaCl을 첨가하여 사용하였다.

항암활성에 사용한 세포는 사람의 백혈병세포주 U-937을 10% FBS를 첨가한 RPMI-1640에 5% CO₂, 37°C에서 세포를 계대배양하며 실험에 사용하였다.

초피간장과 된장 제조

초피간장의 제조는 봄철과 가을철에 각각 제조를 하였다. 봄철 초피간장은 4월달에 제조를 하였으며, 60 l 간장독에 물

50 l, 소금 17 kg, 메주 6 kg을 넣고, 70% 종자를 제거한 과피를 4%(w/w) 첨가한 것을 2독, 2%(w/w) 첨가한 것을 2독, 1%(w/w)첨가한 것을 2독해서 총 6독을 담갔다. 그리고 가을철의 초피간장은 10월달에 제조를 하였으며 메주와 소금의 첨가량은 봄철과 동일하게 했고, 생초피를 각각 16%(w/w) 첨가한 것을 2독, 8%(w/w) 첨가한 것을 2독, 4%(w/w) 첨가한 것을 2독해서 6독을 제조하였다. 충분히 발효를 시킨 다음, 메주를 건져내어 새로운 항아리에 넣고, 위에 소금을 뿌리고 발효를 시켰다.

물질추출

초피간장 6종을 각각 200 ml씩 취해 Hexane 1 l로서 1차 추출을 하고, 남은 여액은 Ethylacetate 1 l로서 2차 추출을 실시했다. 추출용매는 진공회전 농축기로 농축을 한 다음 실험에 이용했다. 초피된장으로부터 물질추출은, 초피 된장 6종을 각각 200 g 씩 취해 Hexane 1 l를 가해 180 rpm으로 24시간 진탕추출 하고, 잔존물은 Ethylacetate 1 l를 가해 Hexane과 동일한 방법으로 추출을 실시했다. 추출용매는 진공회전 농축기로 농축을 한 다음 실험에 이용했다.

항균력 측정

과피의 용매추출물을 이용한 항균성 검정에 사용한 균주는 Slant에 배양한 균주 1백급이를 취해 3 ml nutrient broth 배지에 접종하고 30°C에서 18~24시간씩 3회 계대배양하여 사용하였다. 항균성 시험용 평판배지의 조제는 생육배지로 멸균된 기층용 배지(agar 1.5%)를 petri dish에 15 ml 씩 분주하여 응고시키고, 중층용배지(agar 0.75%)를 각각 2.5 ml 씩 시험관에 분주하여 멸균한 후 45°C의 수욕상에 보관하면서 각종 시험균액 0.1 ml 를 무균적으로 첨가하여 잘 혼합한 후 기층용 배지위에 고르게 퍼지도록 도포한 뒤 응고시켜 2종의 균 접종 평판배지를 만들어 사용하였다. 시료의 항균력 측정은 한천배지확산법(disk plate method)으로 측정하였다. 시료처리량은 초피 0.08 g, 0.16 g, 0.4 g 해당량 추출물을 0.45µm membrane filter 로 여과하여 paper disk 에 20 µl을 흡수시켰다. 용매를 완전히 휘산시키고 평판배지위에 밀착시켜 4°C 냉장고에서 1시간 방치한 후, 30°C의 incubator에서 24~48시간 배양한 다음 paper disk 주변의 clear zone 직경을 측정하여 항균력을 측정하였다.

생육저해효과 측정

초피열매를 말려 종자를 제거한 과피와 생초피를 이용하여 첨가량과 시기를 달리하여 조제한 간장과 된장의 추출물을 이용하여 각종 식중독 유발균에 대한 생육저해효과를 조사하였다. 초피간장과 된장추출물의 생육저해효과는 보관 중인 각 균을 3 ml nutrient broth 배지에 접종하고 30°C에서 18~24시간씩 3회 계대배양하여, 0.1 ml 를 취해 각 시료추출

물이 0.4 g 함유된 10 ml TSB 에 접종하여 30℃에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 배양액을 620 nm 에서 흡광도 측정으로 생육정도를 측정하였다.

Caspase-3 assay

Caspase-3 활성측정은 Yamazaki 등이 발표한 방법을 이용하였다[14,34]. 배양한 U-937세포를 원심분리하여 배지를 제거한 다음 1% Triton X-100를 첨가한 10 mM Tris/HCl buffer(pH 7.5); 10 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, 10 mM Na pyrophosphate, 130 mM NaCl, 3 ml를 넣고 상온에서 10분간 lysis를 시키고, 3,000rpm으로 3분간 원심분리하여 상등액을 취했다. 상등액 50 µl, Ac-DEVD-amc(1 mg/ml) 10 µl, 10% glycerol과 2 mM dithiothreitol 을 함유한 20 mM HEPES buffer(pH 7.5) 1 ml 를 혼합하여 37℃에서 1시간 반응을 시켰으며, 0.1 mg/ml Ac-DEVD-al 5 µl를 첨가하여 반응을 정지시키고 440 nm에서 흡광도를 측정하였다.

DNA fragmentation assay

세포사멸의 기전 중 apoptosis의 지표가 되는 DNA fragmentation 실험을 실시하였다. U-937 human leukemia 세포를 10% FBS가 포함된 RPMI 1640배지에 2x10⁵cells/ml 농도로 9.62cm² dish에 시료와 함께 8시간 배양한 후, cell을 회수하였다. 회수한 cell에 lysis buffer(20 mM EDTA, 100 mM Tris, pH 7.4, 0.5% Triton X-100)를 넣고 ice 위에서 10분간 정치를 시킨 다음 centrifuge를 하여 침전물을 제거하고 RNase를 처리하여 37℃에서 1시간 배양을 하고, Proteinase를 처리하여 37℃에서 1시간 배양을 한 다음 2% agarose gel 에 전기영동을 실시하여 DNA fragmentation을 확인하였다.

결과 및 고찰

과피의 항균활성

초피나무 과피는 향긋한 방향성분 때문에 생선이나 육류 요리에 첨가제로 이용하여 어취나 육취제거용으로 활용하고 있다. 초피종자를 건조시켜 탈립시키고 얻은 과피를 4종류의 용매로 순차적 추출로 얻은 추출물을 이용하여 주요 식중독 유발균인 *Sta. aureus*, *Sal. typhimurium*, *V. parahemolyticus*와 *E. coli* 0157:H7에 대해 항균활성을 조사했다. 무처리와 용매만 처리한 것에서는 clean zone이 형성되지 않았고, *V. parahemolyticus*에 대해서는 Methanol추출물이 넓은 clear zone이 형성되어져 강력한 항균활성을 보였고(Fig. 1), *E. coli* 0157:H7에는 Hexane, Chloroform, Ethylacetate추출물이 좋은 항균활성을 보였다. 초피종자도 Hexane, Chloroform, Ethylacetate 및 Methanol로 추출하여 *V. parahemolyticus*에 항균활성을 조사했지만 항균활성은 나타나지 않았다(Fig. 1). *Sta. aureus*에 대해서는 사용한 전 용매에서 항균활성이 강하

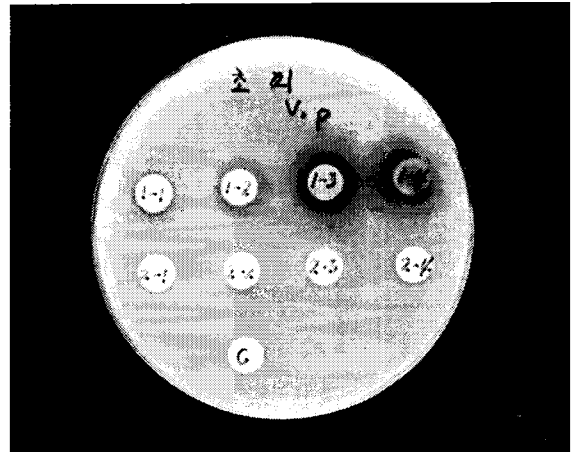


Fig. 1. Antibacterial activities of the pericarp and seed extracts on the growth of *V. parahemolyticus*. 1-1: Hexane extract of pericarp, 1-2: Chloroform extract of pericarp, 1-3: Ethylacetate extract of pericarp, 1-4: Methanol extract of pericarp, 2-1: Hexane extract of seed, 2-2: Chloroform extract of seed, 2-3: Ethylacetate extract of seed, 2-4: Methanol extract of seed.

게 나타났지만, *Sal. typhimurium*에 대해서는 항균활성이 없었다. 서 등은 과피의 휘발성분을 추출하여 *E. coli*, *Sta. aureus*, *S. enteritidis*에 대한 항균활성을 조사한 결과에서 150~200 ppm 휘발성분을 첨가한 곳에서 균의 생육을 완전히 억제하는 것으로 보고하고 있다[31]. 김 등은 산초와 초피의 잎을 Methanol, Ethanol, Hexane, Chloroform 및 물로서 추출하여 그람양성균 10종과 그람음성균 4종에 대한 항균력을 조사하여 보고한 결과를 보면 초피 잎의 Ethanol 추출물에서 우수한 항균력을 보이는 것을 확인할 수 있었다[12]. 잎의 Ethanol 추출물은 *Sal. typhimurium*에 항균활성을 보였지만, 본 실험에서 사용한 과피의 용매추출물은 *Sal. typhimurium*에 항균활성을 볼 수 없었다. 이는 초피 과피와 잎의 용매 추출물의 성분의 차이에 의한 항균활성으로 보여진다.

식중독에 의한 식품 안전사고가 세계적으로 증가하고 있으며, 사상자도 늘어나고 있는 실정이다. 우리나라에도 단체급식 등을 통해 식중독의 피해가 증가하고 있어 사회적으로 심각한 문제가 되고 있다. 초피의 과피추출물이 일부 그람양성균과 그람음성균에 모두 항균활성을 나타내므로 현재 주로 이용하는 주어탕이나 생선요리 외에도 초피의 사용범위를 확대하고, 과피추출물을 이용한 살균제개발과 이용으로 식중독에 대한 예방효과를 얻을 수 있을 것으로 여겨지며, 과피의 방향성과 매운맛을 활용하여 새로운 요리와 안전한 요리의 개발도 가능할 것이다.

초피간장의 항균활성

초피과피와 생초피를 이용하여 봄과 가을에 간장과 된장을 담구었으며, 생초피는 종자에서 과피를 제거하지 않고 수

확 후 곧바로 사용한 것이다. 과피량과 시기를 달리하여 조제한 간장을 Hexane과 Ethylacetate를 이용하여 추출하고, 얻은 추출물을 그람양성균인 *Sta. aureus*, *B. subtilis*와 그람음성균인 *Sal. typhimurium*, *E. coli* O157:H7, *V. parahemolyticus*에 대한 항균활성을 조사했으며, 생육저해활성은 무치리의 균 생육을 평균하여 100으로 하고, 일반간장과 초피처리간장의 생육을 비교하여 측정했다.

E. coli O157:H7에 대한 간장의 생육저해효과를 Fig. 2에 나타냈다. S-kanjang은 봄에 제조한 간장이고, A-kanjang은 가을에 제조한 간장의 추출물을 처리한 결과이다. 봄 간장에서는 초피를 2% 첨가한 간장이 *E. coli* O157:H7생육을 70% 이상 생육을 저해하는 것을 확인할 수 있었고, 4% 처리한 곳에서는 50% 생육을 저해했다. 가을간장 추출물의 처리에서는 30~40% 정도로 균의 생육을 저해했으나, 봄간장 추출물에 비해서는 초피처리량에 관계없이 모두 활성이 낮았다. *Sal. typhimurium*에 대한 초피간장 추출물의 생육저해효과는 Fig. 3에 나타냈다. 봄간장에서는 초피 1% 첨가한 간장추출물이 40%의 균생육을 억제했고, 가을간장은 2% 처리한 간장추출물이 35% 생육을 억제했다. *V. parahemolyticus*에 대한 간장의 생육저해효과를 Fig. 4에 나타냈다. 봄 간장에서는 과피 2% 첨가한 간장의 추출물이 약 50%의 균생육을 억제했고, 가을간장은 4% 처리한 간장추출물이 38% 생육을 억제했다. 가을에 담은 간장은 봄 간장에 비해서는 활성이 매우 낮았다. *Sta. aureus*에 대한 초피간장의 생육저해효과는 Fig. 5에 나타냈다. 봄 간장에서 초피의 첨가량이 많은 것일수록 생육저해효과가 뛰어나고, 초피 4% 처리한 간장의 추출물은 58%의 생육을 저해했으며, 2%의 초피첨가에도 55% 생육을 억제하는

효과가 나타났다. 가을 간장에서는 커다란 차이를 보이지 않았다. 전체적인 결과를 살펴보면 Hexane추출물에서는 커다란 항균효과를 볼 수 없었고, 건조한 과피를 사용한 봄 간장이 생과피를 사용한 가을 간장보다 균의 생육을 억제하는 효과가 뛰어나고, 4% 첨가한 간장보다 2% 첨가한 간장도 크게 활성에서 차이가 나지 않으므로 초피간장의 제조에는 2% 정도의 초피 첨가가 가장바람직한 것으로 여겨진다.

다양한 소재를 이용한 양조간장제조[6,10]와 기능성에 대

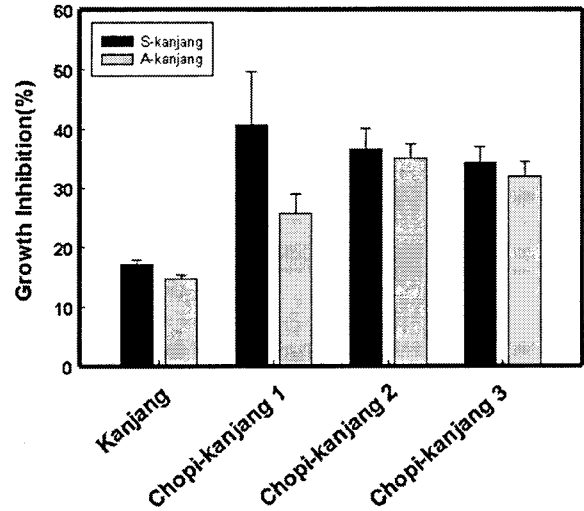


Fig. 3. Growth inhibition activity of the Chopi-kanjang extracts on the growth of *Sal. typhimurium*. S-kanjang: manufactured at spring, A-kanjang: manufactured at autumn. Chopi-kanjang 1, 2, 3 were added 1%, 2% and 4% Chopi pericarp in the manufacturing process of soy sauce.

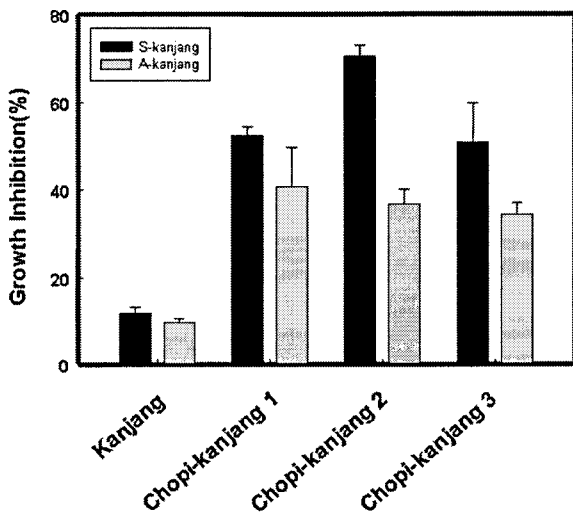


Fig. 2. Growth inhibition activity of the Chopi-kanjang extracts on the growth of *E. coli* O157:H7. S-kanjang: manufactured at spring, A-kanjang: manufactured at autumn. Chopi-kanjang 1, 2, 3 were added 1%, 2% and 4% Chopi pericarp in the manufacturing process of soy sauce.

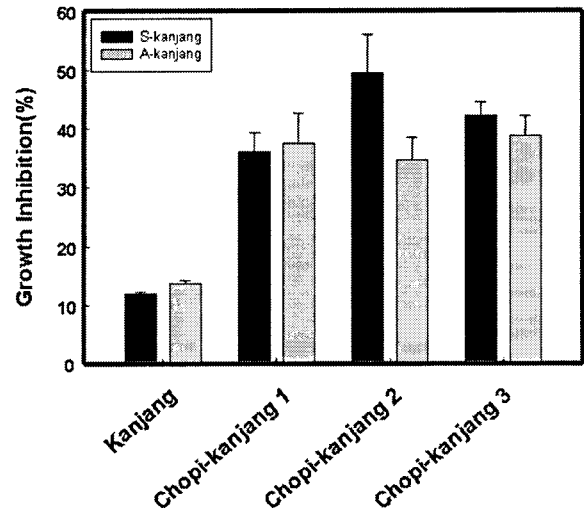


Fig. 4. Growth inhibition activity of the Chopi-kanjang extracts on the growth of *V. parahemolyticus*. S-kanjang: manufactured at spring, A-kanjang: manufactured at autumn. Chopi-kanjang 1, 2, 3 were added 1%, 2% and 4% Chopi pericarp in the manufacturing process of soy sauce.

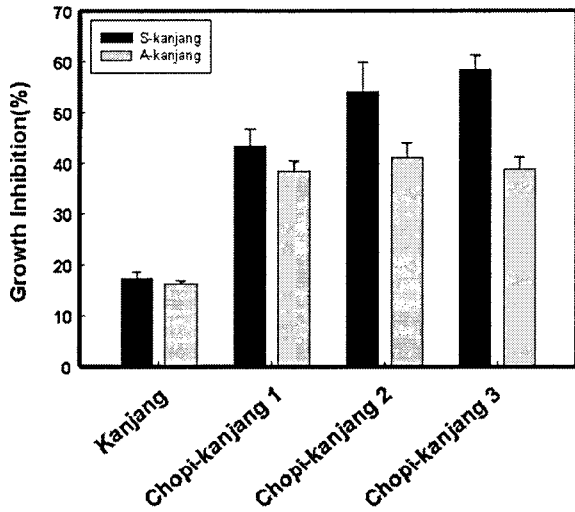


Fig. 5. Growth inhibition activity of the Chopi-kanjang extracts on the growth of *Sta. aureus*. S-kanjang: manufactured at spring, A-kanjang: manufactured at autumn. Chopi-kanjang 1, 2, 3 were added 1%, 2% and 4% Chopi pericarp in the manufacturing process of soy sauce.

한 연구가 보고되어져 있다. 대두와 소맥을 원료로 한 양조간장에서 멜라로이딘 관련물질과 갈색물질을 분리하여 항산화 활성을 조사한 연구결과가 보고되어져 있다[2,3]. 하지만 양조간장을 이용한 항균활성은 보고된 사례가 적다. 초피 과피는 많은 요리나 음식에 오랫동안 사용해오고 있으나 인체에 대한 해가 없기 때문에 이를 이용한 양조간장제조의 활용은 식중독 유발균의 오염방지 및 기능성의 효과를 얻을 수 있을 것이다.

초피 된장의 경우는 Hexane과 Ethylacetate 추출물에서 뚜렷한 항균효과를 볼 수 없었으며, 간장과 비교했을 때 약한 항균활성이 나타났다. 이 등은 된장 추출물의 항균활성에 대한 보고에서[35] 된장의 용매추출물이 *B. cereus*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Sta. aureus* 및 *S. faecalis*에는 항균활성을 확인할 수 있었으나, *E. coli* O157:H7, *Sal. typhimurium*에 대해서는 항균활성을 확인할 수 없었다. 된장의 추출물은 균에 따라 항균활성의 차이를 확인할 수 있었으며, 본 실험의 결과와도 유사한 점을 볼 수 있었다.

Caspase-3 assay

apoptosis는 세포의 분해를 위해 세포내의 효소들이 활발하게 관여하는 능동적인 죽음기작으로 세포의 비중이 감소하고, 세포막이 파괴되며 염색체의 응축현상이 일어난다. apoptosis가 일어나게 되면 caspase 들이 활성화되어지는데 apoptosis의 마지막단계에 작용하는 caspase-3은 cystein kinase의 일종으로 caspase 14종 중에[31] caspase-9과 함께 중요한 역할을 한다. caspase들의 활성화유무에 따라 신경계질환들이 발생할 수 있고, 암세포를 치사시키는 등의 생리작용

이 일어난다.

초피를 첨가한 간장추출물을 백혈병세포 U-937에 처리하여 caspase-3 활성을 조사한 것이 Fig. 6에 나타났다. U-937만 배양한 것에서는 caspase 활성을 확인할 수 없었고, 초피를 첨가하지 않은 간장의 처리구에서도 거의 caspase 활성을 볼 수 없었다. 반면 초피를 1% 처리한 간장에서는 대조구에 비해 170%의 활성을 보였고, 2% 초피를 첨가한 것은 510% 이상 높게 caspase 활성이 나타났으며, 4% 초피를 처리한 것은 630% 이상 caspase 활성을 증가시켰다. 양조간장의 추출물은 항산화활성이 확인 되어졌다[2,3]. 초피를 첨가한 간장에서도 caspase 활성이 뚜렷하게 증가한 현상은 항산화와 caspase 활성에 관련이 있는 것으로 추정이 되며, 항균과 항암활성 검정에 2% 초피를 처리한 간장과 4% 초피를 처리한 간장에서는 2배의 량을 증가하여 처리함에도 caspase 활성은 1.2 배밖에 상승되어지지 않기 때문에 초피간장 제조에는 과피를 2% 정도 첨가하는 것이 생리활성과 생산가격을 비교했을 때 가장 합리적으로 여겨진다. 그리고 초피간장의 Hexane 추출물과 된장의 용매추출물은 caspase-3 활성에 뚜렷한 영향이 없었다. 된장과 간장의 추출물을 이용한 caspase-3 활성을 조사해서 항암활성을 조사한 보고서는 없으나, 다시마분말을 첨가하여 제조한 된장의 ethanol 추출물[7]과 순창 재래식 된장의 methanol 추출물을 이용한 암세포의 성장억제활성은 확인한 보고가 있다[5]. 대나무나 천연물을 이용한 암세포의 apoptosis 유도실험 등의 몇몇 보고가 있다[14].

DNA fragmentation assay

세포사에는 apoptosis와 necrosis가 있다. necrosis와 apoptosis는 형태학적으로 큰 차이를 보이는데 apoptosis가 일어

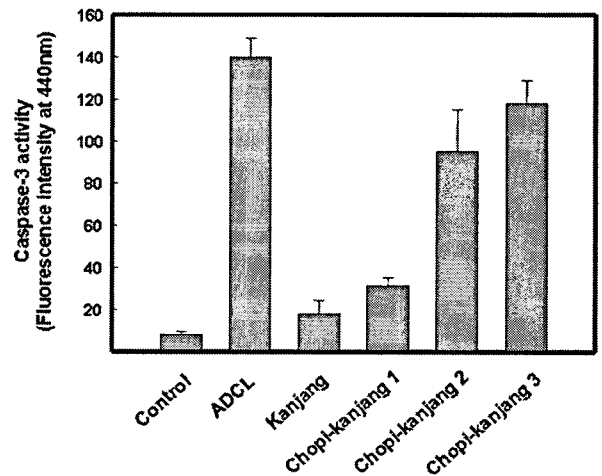


Fig. 6. Caspase-3 activation in U-937 cells. Cells were treated with Chopi-kanjang extracts and kanjang for 6 hr. Chopi-kanjang 1, 2, 3 were added 1%, 2% and 4% Chopi pericarp in the manufacturing process of soy sauce.

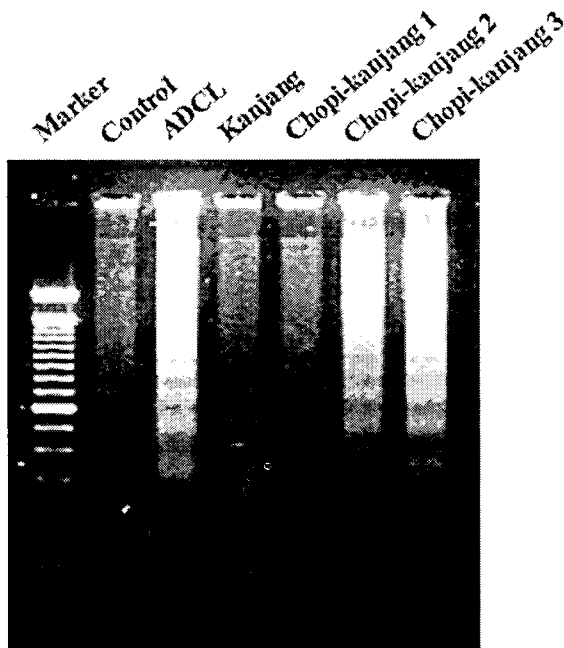


Fig. 7. Detection of DNA cleavage in U-937 cells. Cells were treated with kanjang and Chopi-kanjang extracts for 8 hr. DNA was extracted with 0.5% Triton X-100 in PBS, treated with 400 µg/ml RNase for 1 hr and then with 400 µg/ml proteinase K, for 1 hr and analyzed by agarose gel electrophoresis and EtBr staining.

나면 염색질의 응축, 핵의 응축, 세포의 축소, antibody의 출현, 대식세포에 의한 탐식작용과 같은 현상이 관찰되어진다 [32]. 또한 apoptosis의 결정적인 증거가 되는 것이 DNA의 fragmentation이다. 초피간장 추출물처리에 의한 세포사나 necrosis인지 apoptosis인지 알아보기 위하여 세포내의 DNA 구조적 변화를 관찰하였다. 그 결과 무처리와 일반간장을 처리한 대조구세포의 DNA는 fragmentation이 일어나지 않았으나, 초피간장의 추출물을 처리한 세포는 endonuclease가 활성화되어 DNA가 일정한 크기로 단편화되어 전형적인 DNA ladder가 형성되어졌다(Fig. 7). 초피를 1% 처리한 것에서는 ladder를 확인하기 힘들었고, 2%와 4% 초피를 첨가한 간장의 추출물을 처리한 세포에서는 ADCL을 처리한 세포의 DNA와 같이 DNA fragmentation이 강하게 일어났다. 따라서 초피간장의 추출물에 의한 세포사는 apoptosis에 의한 것임을 확인했다. 초피를 첨가한 간장이 caspase-3를 활성화시키고 DNA fragmentation을 일으키는 것으로서 초피간장의 항암효과가 있는 것으로 생각되어진다.

요 약

초피나무(*Z. piperitum*) 열매는 다양한 생리활성을 갖고 있으며, 과피 용매추출물은 세균에 대한 강한 항균활성을 갖고 있어, 간장과 된장제조에 초피를 첨가하여 생리활성효과를

조사하였다. 초피를 간장제조에 1%, 2%, 4% 첨가하여 제조하고, 간장추출물을 식중독균(*Sta. aureus*, *Sal. typhimurium*, *V. parahemolyticus*, *E. coli* O157:H7)에 대한 항균활성을 조사했다. 초피를 2% 첨가한 간장은 *E. coli* O157:H7과 *V. parahemolyticus*의 생육을 각각 70%와 50% 억제했으며, *Sal. typhimurium*과 *Sta. aureus*에 대한 항균효과는 농도와 간장제조시기에 따라 40% ~ 60%의 생육을 억제했다. 초피된장의 용매추출물에서는 약한 항균활성을 확인할 수 있었다.

초피간장의 추출물을 백혈병세포 U-937에 처리하여 caspase-3 활성으로 항암활성을 조사했다. 그 결과 초피의 량을 1%, 2%, 4% 첨가한 간장의 추출물은 초피를 첨가하지 않은 간장보다 caspase-3 활성이 각각 4배, 12배, 15배 활성이 증가하는 것이 확인되어졌다. 이는 초피간장의 추출물이 apoptosis를 유도하는 것을 의미하며, 된장의 용매추출물은 caspase-3 활성에 아무런 영향이 없었다.

초피간장 추출물을 처리한 세포의 죽음이 necrosis인지 apoptosis인지 알아보기 위하여 세포내의 DNA fragmentation을 확인한 결과, 초피간장 추출물을 처리한 세포는 DNA 단편화가 형성되어졌다. 초피를 1% 첨가한 것에서는 fragmentation을 확인하기 힘들었고, 2%와 4%초피를 첨가한 간장추출물은 DNA fragmentation을 강하게 일으켰다. 초피를 첨가한 간장추출물이 caspase를 활성화시키고, DNA fragmentation을 일으키는 apoptosis 기작에 의해 암세포를 죽음으로 유도하는 초피간장의 항암효과를 입증했다.

감사의 글

이 논문은 부산대학교 자유과제 학술연구비(2년)에 의하여 연구되었으며, 유정종묘 황조연사장님께 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

1. Ahn, S. K. and K. W. Hong. 2005. Hyaluronidase inhibitory activity of extracts from doenjang, chungkookjang and miso. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **34**(8), 1119-1123.
2. Cheigh, H. S., J. S. Lee and C. Y. Lee. 1993. Antioxidative characteristics of melanoidin related products fractionated from fermented soybean sauce. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **22**(5), 570-575.
3. Cheigh, H. S., J. S. Lee, G. S. Moon and K. Y. Park. 1993. Antioxidative activity of browning products fractionated from fermented soybean sauce. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **22**(5), 565-569.
4. Cho, E. J., S. H. Rhee, K. S. Kang and K. Y. Park. 1999. *In vitro* anticancer effect of chinese cabbage Kimchi fractions. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **28**(6), 1326-1331.
5. Choi, S. Y., M. J. Cheigh, J. J. Lee, H. J. Kim, S. S. Hong,

- K. S. Chung and B. K. Lee. 1999. Growth suppression effect of traditional fermented soybean paste(Doenjang) on the various tumor cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **28(2)**, 458-463.
6. Chung, M. J., J. S. Jo, H. J. Kim and N. J. Sung. 2001. The component_L of the fermented soy sauce from Gorosoe and bamboo sap. *Korean J. Food & Nutr.* **14(2)**, 167-174.
 7. Cui, C. B., E. Y. Lee, D. S. Lee and S. S. Ham. 2002. Antimutagenic and anticancer effects of ethanol extract from korean traditional Doenjang added sea tangle, *J. Korean Soc. Sci. Nutr.* **31(2)**, 322-328.
 8. Hwang, K. M., S. H. Oh and K. Y. Park. 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.
 9. Jung, B. M. and S. B. Roh. 2004. Physicochemical quality comparison of commercial *Doenjang* and traditional green tea *Doenjang*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **33(1)**, 132-139.
 10. Kang, I. J., S. S. Ham, C. K. Chung, S. Y. Lee, D. H. Oh and J. J. Do. 1999. Production and characteristics of fermented soy sauce from mountain herbs. *Korean J. Food Sci. Technol.* **31(5)**, 1203-1210.
 11. Kang, I. J., S. S. Ham, C. K. Chung, S. Y. Lee, D. H. Oh, K. P. Choi and J. J. Do. 1997. Development of fermented soysauce using *Cirsium setidens Nakai* and comfrey. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **26(6)**, 1152-1158.
 12. Kim, J., Y. S. Cho, K. I. Seo, O. S. Joo and K. H. Shim. 2000. Antimicrobial activities of *Zanthoxylum schinifolium* and *Zanthoxylum piperitum* leaves. *Korean J. Postharvest Sci. Technol.* **7(2)**, 195-200.
 13. Kim, K. K., H. J. Son, H. S. Kim, Y. G. Kim, K. Y. Kang, B. G. Son and Y. W. Choi. 1998. Antimicrobial activity of the solvent extract from *Zanthoxylum piperitum*. *J. Agri. Tech. & Dev. Inst.* **2**, 58-64.
 14. Kim, K. K., Y. Kawano and Y. Yamazaki. 2003. A novel porphyrin photosensitizer from bamboo leaves that induces apoptosis in cancer cell lines. *Anticancer Research.* **23**, 2355-2362.
 15. Kim, M. J., Y. S. Song and Y. O. Song. 1998. The fibrinolytic activity of kimchi and its ingredients *in vivo* and *in vitro*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **27(4)**, 633-638.
 16. Kim, S. J., C. W. Park, S. J. Park, Y. S. Kim, H. J. Cho, D. K. Lim, J. O. Kim, J. H. Lee and Y. L. Ha. 2003. Enhanced antitumorogenicity and antimutagenicity of *Doenjang* prepared from mushroom mycelia-cultured traditional *Mejus*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **32(1)**, 143-148.
 17. Kim, S. H., and K. Y. Park. 1993. Inhibitory effects of chinese pepper on the mutagenicity and the growth of MG-63 human osteosarcoma cells. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21(6)**, 628-634.
 18. Kwon, M. J., J. H. Chun, Y. S. Song and Y. O. Song. 1999. Daily Kimchi consumption and its hypolipidemic effect in middle-aged men. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **28(5)**, 114-1150.
 19. Lee, E. H., Cho, S. Y., Ha, J. H., Oh, K. S., and Kim, C. Y., 1984, Processing of sardine sauce from sardine scrap, *Bull. Korean Fish. Soc.*, **17(2)**, 117-124.
 20. Lee, K. H., N. D. Kim and J. Y. Yoo. 1997. Survey on the manufacturing process of traditional *Meju* for and of *Kanjang*(Korean soy sauce). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **26(3)**, 390-396.
 21. Lee, S. J., S. H. Ryu, Y. S. Lee. Y. S. Song and G. S. Moon. 2003. Protective effect of soybean sauce and melanoidin on lipid oxidation in rats fed high PUFA oils. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **32(6)**, 913-920.
 22. Lee, S. L., J. G. Kim 2005 Inhibitory effects of doen-jang (Korean fermented soybean paste) and soyeon extracts on the growth of KB cells. *Kor. J. Hlth.* **31(5)**, 444-450.
 23. Lim, S. Y., K. Y. Park and S. H. Rhee. 1999. Anticancer effect of Doenjang in *in vitro* sulforhodamine B(SRB) assay, *J. Korean Soc. Sci. Nutr.* **28(1)**, 240-245.
 24. Lim, S. Y. S. H. Rhee and K. Y. Park. 2005. Effect of solvent fractions from methanol extract of doenjang on inhibition of growth and DNA synthesis of human cancer cells. *Journal of Life Science* **15(5)**, 685-691.
 25. Lim, S. Y., S. H. Rhee and K. Y. Park. 2005. 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.
 26. Oh, G. S., K, J. Kang, Y. P. Hong, Y. S. An and M. H. Lee. 2003. Distribution of organic acids in traditional and modified fermented foods. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **32(8)**, 1177-1185.
 27. Park, K. Y., K. M. Hwang, K. O. Jung and K. B. Lee. 2002. Studies on the standardization of Doenjang (Korean soybean paste) 1. Standardization of manufacturing method of Doenjang by literatures. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **32(2)**, 343-350.
 28. Ryu, S. H., Y. S. jeon, M. J. Kwon, J. W. Moon, Y. S. Lee and G. S. Moon. 1997. Effect of kimchi extracts to reactive oxygen species in skin cell cytotoxicity. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **26(5)**, 814-821.
 29. Sakai, T., K. Yoshihara and Y. Hirose. 1968. Constituents of fruit oil from Japanese pepper. *Bull. Chem. Soc. Jap.* **41**, 1945-1950.
 30. Seo, E. Y. and W. K. Kim. 2006. Effect of [6]-gingerol on Bcl-2 and Bax expression in MDA-MB-231 human breast cancer cell line. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **35(6)**, 671-676.
 31. Seo, K. L., H. J. Lee, and K. H. Koh. 1999. Antimicrobial activity of the volatile components from fruit peel of Chopi(*Zanthoxylum poperitum* DC). *Kor. J. Appl. Microbiol. biotechnol.* **27(3)**, 179-183.
 32. Shin, S. H., D. S. Kim, M. J. Kim, S. H. Kim, S. K. Jo, M. W. Byun and S. T. Yee. 2006. Protective effects of a herbal composition (HemoHIM) against apoptosis induced by oxidative stress of hydrogen peroxide. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **35(9)**, 1127-1132.
 33. Wu-Yin, M. Shimoda and Y. Osajima. 1996. Volatile aroma compounds in young leaves and green fruits of Japanese pepper. *Nippon-Nogeikagaku-Kaishi.* **70(9)**, 1001-1005.
 34. Yamazaki, Y., M. Tsuruga, D. Zhou, Y. Fujita, X. Shang, Y. Dang, K. Kawasaki and S. Oka. 2000. Cytoskeletal dis-

ruption accelerates caspase-3 activation and alters the intracellular membrane reorganization in DNA damage-induced apoptosis. *Exp. cell Res.* **259**, 64-78.

35. Yi, S. D., J. S. Yang, J. H. Jeong, C. K. Sung and M. J. Oh. 1999. Antimicrobial activities of soybean paste extracts. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **28(6)**, 1230-1238.