

해양심층수염 및 다시마분말을 첨가한 개량식 된장의 항돌연변이원성 및 암세포성장억제에 미치는 영향

함승시[†] · 김수현 · 유수정 · 오현택 · 최현진 · 정미자
강원대학교 생명공학과

Antimutagenicity and Cytotoxic Effects of Methanol Extract from Deep Sea Water Salt and Sea Tangle Added Soybean Paste (*Doenjang*)

Seung-Shi Ham[†], Soo-Hyun Kim, Su-Jong Yoo, Hyun-Taek Oh, Hyun-Jin Choi, and Mi-Ja Chung

Dept. of Biotechnology and Engineering, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

Abstract

This study was performed to determine the antimutagenic and anticytotoxic effects of soybean paste (*doenjang*) added deep sea water salt and sea tangle in *Salmonella* Typhimurium TA98, TA100 and human cancer cell lines. In the Ames test, methanol extract of *doenjang* did not exhibit any mutagenicity but showed substantial inhibitory effects against mutation induced by *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG) and 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO). The methanol extracts of *doenjang* (200 µg/plate) added deep sea salt and sea tangle (*doenjang* C) showed approximately 89.1% and 70% inhibitory effect on the mutagenesis induced by MNNG and 4NQO against TA100 strain, whereas 84.4% inhibitions were observed on the mutagenesis induced by 4NQO against TA98 strain. The cytotoxic effects of *doenjang* methanol extracts against the cell lines with human cervical adenocarcinoma (HeLa), human hepatocellular carcinoma (Hep3B), human gastric carcinoma (AGS), human lung carcinoma (A549) and human breast adenocarcinoma (MCF-7) were inhibited with the increase of the extract concentration. The treatment of 1.0 mg/mL *doenjang* C of methanol extracts showed strong cytotoxicities of 71%, 74.4%, 66.2%, 77.3%, and 71.2% against HeLa, Hep3B, AGS, A549, and MCF-7, respectively. In contrast 1 mg/mL treatment of *doenjang* C methanol extracts had only 10~40% cytotoxicity on normal human embryonal kidney cell (293). *Doenjang* methanol extract inhibited significantly the tumor growth in mice injected sarcoma-180 cells. Especially, *doenjang* C methanol extract showed an inhibition of tumor cell activity of 33% by the administration of 25 mg/kg methanol extracts.

Key words: deep sea water, Ames test, antimutagenic effect, cytotoxicity

서 론

최근의 식품개발은 식품의 3차 기능을 중심으로 이루어지고 있으며 우수한 기능성을 가진 식품소재를 규명하는 연구와 이를 식품에 이용하려는 시도가 활발히 진행 중이며, 콩을 비롯한 장류, 두부 및 두유 등 콩 관련 식품이 건강 증진 및 질병 예방과 연관되어 세계적인 관심을 모으고 있다. 장류는 예로부터 우리들의 식생활에서 없어서는 안 될 중요한 조미식품으로 최근에는 각종 기능성이 밝혀지고 있다. 항돌연변이원성 및 항산화 효과를 비롯한 암을 예방하는 건강식으로 알려져 있어 장류에 대한 많은 연구가 이루어지고 있는 실정이다.

지금까지 선행된 된장에 관한 연구결과를 살펴보면 콩을 원료로 하여 제조된 된장은 항산화효과, 항암효과, 항돌연변이효과, 항종양효과, angiotensin 전환효소 저해능 및 KB 세

포 증식억제효과가 있는 것으로 알려져 있다(1-6). Lim 등(7)의 연구에서는 된장이 다른 콩 발효식품 및 원재료 콩보다 높은 암세포 성장억제효과와 DNA 합성 저해효과를 나타낸다고 보고하였고, Rhee 등(8)은 tyrosinase의 저해활성, ACE 저해활성 및 항돌연변이원 활성은 된장의 숙성기간이 길어질수록 증가하는 경향을 나타낸다고 보고하였다. Lee 등(9)은 영지버섯된장이 표고버섯된장 및 상황버섯된장에 비해서 DPPH 라디칼 소거능이 높았으며, 항돌연변이 활성은 상황버섯된장에서 가장 높았고 암세포 성장 억제율은 상황버섯된장 및 영지버섯된장에서 91~92%의 억제율을 나타내어 표고, 상황 및 영지버섯을 첨가하여 제조한 재래식 된장은 항산화, 돌연변이유발 억제 작용 및 암세포 성장억제 작용을 가진다고 평가하였다. 또한 Cui 등(10)은 다시마분말을 10% 및 15% 첨가한 된장보다 다시마분말 5% 첨가하여 제조한 된장이 4-nitroquinoline-1-oxide(4NQO), *N*-methyl-*N'*-

[†]Corresponding author. E-mail: hamss@kangwon.ac.kr
Phone: 82-33-250-6453, Fax: 82-33-250-6453

nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG), benzo(a)pyrene(B(a)P), 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido-(4,3-b)indol(Trp-P-1)에 대한 돌연변이원성 억제효과가 가장 높았으며 암세포 성장억제 실험에서도 A549, Hep3B 및 KATOIII 세포에서 다시마분말 5% 첨가 된장이 가장 높게 나타났다고 보고하였다. 그리고 Park 등(11)은 고지방식이에 녹차된장을 섭취한 쥐들의 경우 혈중 GOT, GPT 및 BUN의 농도가 일반 된장군에 비해 낮았으며 또한 혈중 콜레스테롤의 농도가 고지방식이군보다 낮았다고 보고하였다.

실험에 사용된 다시마(*Laminaria longissima*)는 갈조류에 속하는 다시마과의 한 속으로 2~3년생인 해조로서 비타민 및 미네랄, 특히 마그네슘, 칼슘, 요오드 및 철 등의 함량이 높고 해조류를 구성하고 있는 fucoidan 및 alginate 등의 생리활성이 강한 다당류를 많이 포함하고 있어 기능성 소재나 건강식품으로 많이 이용되고 있다. 그리고 함황산성 다당인 fucoidan은 heparin과 같은 혈액응고활성 이외에 항암 및 항 AIDS 등의 활성이 있다는 보고가 있다(12).

해양심층수란 “태양광이 도달하지 않는 수심 200 m 이상의 깊은 바다에 존재하여 수온이 연중 2°C 이하로 안정되어 있는 청정한 해수”로서 미국 및 일본 등 주요 선진국에서는 일찍부터 해양심층수의 자원적 특성에 주목하여 기초연구를 실시하고 있다. Moon 등(13)은 청정한 해양심층수와 현대적인 건조기법을 이용한 고품질 소금의 제조를 모색하고, 수평식 분무 소금의 미네랄 함량을 비교한 결과 Ca, K 및 Mg 등 무기질 함량이 많았을 뿐 아니라 Na와 S 함량이 천일염, 죽염 및 자염에 비하여 함량이 낮았다고 보고하였다.

전보에서 본 연구진은 다시마 5% 첨가 된장, 다시마 10% 첨가 된장, 다시마 15% 첨가 된장에 대해서 항돌연변이원성 및 항암효과를 실험한 결과 다시마 5% 첨가 된장이 다른 장류에 비해서 우수한 생리활성을 나타내었다. 따라서 다시마분말을 5% 첨가하고 일반소금 대신 해양심층수 염을 이용하여 된장을 제조한 후 이들의 항돌연변이원성, 항암효과 및 sarcoma-180 종양세포에서의 항암효과를 규명하여 보고한다.

재료 및 방법

된장의 재료 및 제조

실험에 사용된 다시마 분말, 콩 및 해양심층수는 강원도 고성군 농업기술센터에서 제공받아 사용하였다. 된장의 원료배합비율은 콩, 쌀코오지, 심층수소금을 2.5:2.5:1의 비율(Table 1)로 하였으며 다시마를 5% 첨가하여 3개월 동안의 항온항습실(20°C, 습도 60%)에서 숙성시켰다. 발효가 끝난 된장은 동결건조 후 믹서기로 잘 마쇄한 후 시료에 20배(w/v)의 메탄올을 첨가하여 12시간 교반을 3회 반복한 후 여과하여 회전식 진공농축기(EYELA evaporator NE-series, Tokyo Rikakikai Co., Japan)로 감압 농축하여 동결건조

Table 1. Mixing ratio of koji, see tangle, salt and soybean (unit: g)

Sample code	Doenjang A	Doenjang B	Doenjang C
Koji	2,375	2,500	2,375
Salt	1,000	1,000	1,000 ¹⁾
See tangle	125	-	125
Soybean	2,500	2,500	2,500

¹⁾Deep sea water salt.

후 실험에 사용하였다.

돌연변이원성 실험

돌연변이원성 실험은 *Salmonella Typhimurium*의 변이주인 TA98과 TA100을 이용하여 Ames test를 개량한 pre-incubation(14)법으로 실시하였다. 각각의 된장 메탄올 추출물을 미리 건열 멸균시킨 glass cap tube에 1, 2, 3 및 4 mg/mL의 농도로 50 µL씩을 가하고 여기에 전배양시킨 *S. Typhimurium* 배양균액을 100 µL씩 가한 다음 0.2 M sodium phosphate buffer(pH 7.4)로 전체량이 700 µL가 되도록 하였다. 이것을 37°C에서 20분간 진탕배양을 한 다음 histidine/biotin이 첨가된 top agar(45°C)를 2 mL씩 가하여 잘 혼합한 후에 미리 조제해 놓은 minimal glucose agar plate 상에 도말하고 평판 고화시켜 37°C 배양기에서 48시간 배양하여 생긴 복귀돌연변이(his⁺ revertant colony) 수를 측정하여 각 된장 메탄올 추출물들의 돌연변이원성의 유무를 판정하였다.

항돌연변이성 실험

항돌연변이원성 실험에 사용한 변이원은 직접 돌연변이원으로서 4NQO와 MNNG(Sigma, USA)를 사용하였다. 건열 멸균시킨 glass cap tube에 시료 추출물들을 DMSO(dimethyl sulfoxide)에 녹여 1, 2, 3 및 4 mg/mL의 농도로 50 µL씩 첨가하고 변이원 물질을 각각 50 µL씩 첨가하였다. 여기에 전배양시킨 *S. Typhimurium* 균액을 100 µL씩 주입한 후에 0.2 M sodium phosphate buffer를 가하여 최종부피가 700 µL가 되도록 하였다. 이것을 37°C에서 20분간 진탕배양을 한 다음 상기의 돌연변이원성 실험과 같은 방법으로 생성된 복귀돌연변이 colony수를 측정하여 항돌연변이원성 유무를 판정하였다. 된장 메탄올 추출물과 변이원 물질의 농도는 예비실험을 통하여 결정하였으며 항돌연변이 억제효과는 변이원 물질의 활성에 대한 시료의 억제율(inhibition, %)로 나타내었다. 즉 돌연변이 물질의 존재하의 복귀 돌연변이수에 대한 자연 복귀 돌연변이와 시료 존재하의 복귀 돌연변이에 대한 비율로 나타내었다.

세포독성 실험

본 실험에 이용된 세포주는 암세포로 인간 위암세포 AGS (human stomach adenocarcinoma, KCLB 21739), 인간 폐암세포 A549(human lung carcinoma, KCLB 10184), 인간 유방암세포 MCF-7(human breast adenocarcinoma, KCLB,

30022), 인간 간암세포 Hep3B(human hepatocellular carcinoma, KCLB, 88064), 인간 자궁암세포 HeLa(human cervical adenocarcinoma, KCLB, 10002) 그리고 정상세포로 293(transformed human kidney, KCLB, 21573)을 Korea Cell Line Bank(KCLB)로부터 구입하여 실험에 사용하였다.

세포독성 측정 시 이용하는 SRB(sulforhodamine B)분석은 세포 단백질 염색을 이용하여 세포생육정도를 측정하는 방법(15)으로 10% fetal bovine serum 및 각각의 암세포(A549, Hep3B, MCF-7, AGS, HeLa)와 293을 함유하는 RPMI-1640과 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM)배지를 5×10^4 cells/mL 농도로 100 μ L씩 각각 96-well에 첨가하여 하루 동안 배양(37°C, 5% CO₂)시킨 후 배지에 녹인 시료를 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 mg/mL의 농도로 100 μ L씩 첨가하여 48시간 동안 다시 배양하였다. 그 후 상등액을 aspirator로 조심스럽게 제거하고 냉장 보관한 10% TCA를 100 μ L씩 첨가한 후 1시간 동안 4°C에서 방치한 후 증류수로 다섯 번 정도 행구었다. 열풍건조기에서 건조시킨 후 1% acetic acid에 녹인 0.4% SRB용액 100 μ L를 첨가해 30분 동안 염색시켰다. 결합되지 않은 SRB 염색액은 1% acetic acid 용액으로 네 번 정도 행구어, 다시 건조시킨 후 10 mM Tris buffer 100 μ L로 염색제를 충분히 녹인 후 540 nm에서 microplate reader로 흡광도를 측정하였다.

Sarcoma-180을 이용한 *in vivo*에서의 항암효과

실험동물: 본 실험에 사용한 실험동물은 웅성 Balb/c 마우스로 체중이 25 g 전후의 것을 오리엔트(주)에서 분양받아 강원대학교 생명공학부 동물사육실에서 일주일간 적응시켜 사용하였으며, 각각의 실험군 당 5마리를 사용하였다. 동물 사육실 실험조건은 온도 21~26°C, 습도 45~55%로 유지시켰으며, 조명은 오전 9시에 자동 점등, 오후 9시에 자동 소등하여 12시간 간격으로 조명을 조절하였다. 사료는 삼양유지 사료(주)의 마우스용 배합사료(조단백질 22.1%, 조지방 3.5%, 조섬유 5.0%, 회분 8.0%, 칼슘 0.6%, 인 0.4%)를 사용하였고, 물은 증류수를 공급하였으며 사료와 물을 자유롭게 먹도록 하였다.

고형암 성장저지 실험: 실험에 사용한 sarcoma-180 종양세포는 Balb/c 마우스의 복강 내에 7~10일 간격으로 계대 배양하여 보존하면서 사용하였다. 즉 실험동물의 복강 내에서 7~10일간 배양된 sarcoma-180세포를 복수와 함께 취하고 phosphate buffered saline(PBS)과 함께 원심분리(1,200 rpm, 10 min)하여 종양세포를 분리하였다. 분리된 세포를 다시 PBS에 부유시켜 재차 원심분리를 하여 상등액을 제거한 후 1.0×10^6 cells/mL가 되도록 종양세포 부유액을 만들어 1 mL씩 복강 주사하여 이식 보존하면서 실험에 사용하였다.

고형암 성장저지 실험은 각 군당 5 마리의 마우스의 왼쪽 서혜부에 sarcoma-180 종양세포 부유액 0.2 mL(6.0×10^6

cells/mouse)씩을 피하 이식하고, 24시간 후부터 20일간 매일 1회씩 PBS에 녹인 시료 용액을 복강으로 투여하여 식이를 섭취시켰다. 종양세포 이식 26~30일째 되는 날 치사시켜 생성된 고형암을 적출하고 그 무게를 적출한 후 대조군의 종양무게와 처리군의 종양무게의 차이에서 대조군 종양무게의 비로 종양 성장 저지 백분율(tumor growth ratio, I.R.: %)을 계산하였다.

통계처리

본 실험에서의 모든 실험결과는 SPSS(statistical package for social sciences) package program을 이용하였으며, 각 실험군당 평균±표준편차로 표시하였고, 각 군의 평균치의 통계적 유의성은 one way ANOVA의 Duncan's multiple range test에 의해 $p < 0.05$ 수준에서 검정하였다.

결과 및 고찰

Ames test를 이용한 돌연변이원성 및 항돌연변이원성

S. Typhimurium TA98과 TA100을 이용한 Ames test를 행한 결과 음성대조군의 복귀돌연변이 집락수는 TA98이 20 ± 4 그리고 TA100은 161 ± 14.7 이었다. 각각의 된장메탄을 추출물을 50, 100, 150 및 200 μ g/plate의 여러 농도를 첨가하여 실험한 결과, 집락수가 음성대조군에 비하여 농도 변화에 따른 집락수의 큰 변화를 나타내지 않으므로 된장A, 된장B 및 된장C의 추출물은 돌연변이원성을 나타내지 않는 것으로 판단되었다(데이터 생략). 된장메탄을 추출물의 돌연변이원성 억제작용을 검토하기 위하여 Ames test에서 양성 반응을 나타내며, 물질 그 자체로서 돌연변이를 유발하는 직접 변이원물질로 MNNG와 4NQO를 사용하여 각각의 농도에 따른 돌연변이원성 억제효과를 검토하였다. MNNG (0.4 μ g/plate)의 경우 S. Typhimurium TA100 균주에서 농도 증가에 따라 농도 의존적으로 변이원성 억제효과를 나타내었으며 시료 농도 200 μ g/plate에서 다시마분말을 첨가한 해양심층수 된장인 된장C의 메탄을 추출물의 경우 89.1%의 억제효과를 나타내었다. 그리고 다시마분말을 첨가한 일반 된장인 된장A 메탄을 추출물의 경우는 그보다 낮은 63.1%의 억제효과를 나타내었으나 다시마분말 무첨가 일반된장인 된장B 메탄을 추출물은 55.2%의 억제효과를 나타냄으로써 다시마분말과 해양심층수를 첨가하여 제조한 된장에서 높은 돌연변이 억제효과를 나타내었다(Fig. 1).

4NQO(0.15 μ g/plate)에 대한 억제효과를 측정한 결과 농도 의존적으로 억제활성을 나타내었으며, S. Typhimurium TA98의 경우 된장C 메탄을 추출물의 농도 200 μ g/plate 첨가 시 84.4%의 높은 돌연변이 억제활성을 나타내었고 된장A 메탄을 추출물에서도 81.0%의 높은 억제활성을 보였다. S. Typhimurium TA100의 경우 된장C 메탄을 추출물의 농도 200 μ g/plate 첨가 시 70.0%의 억제활성을 나타내었으며

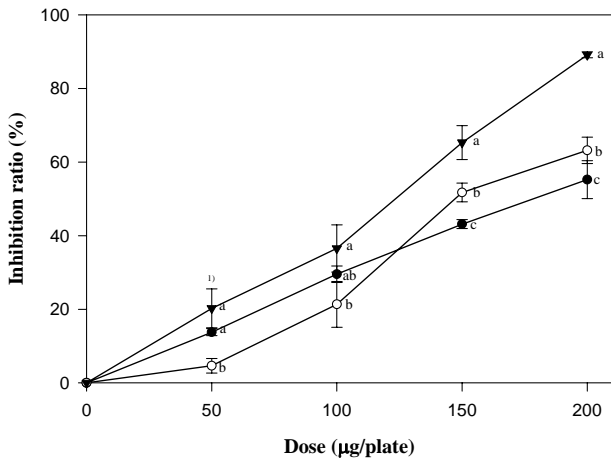


Fig. 1. Inhibitory effects of each samples of *doenjang* methanol extract on the mutagenicity by MNNG (0.4 µg/plate) in *Salmonella Typhimurium* TA 100.

● : *Doenjang* A, ○ : *Doenjang* B, ▼ : *Doenjang* C.
¹⁾Values are the mean ± SD. ^{a-c}Means with the different letters in the same concentration are significantly different by Duncan's multiple range test (p<0.05).

된장A 메탄올 추출물은 66.0%의 억제활성을 보였다(Fig. 2). 대두로 제조된 발효식품 중에서 된장에는 항돌연변이성 효과가 있음이 보고되었으며 이들 중에서 재래식 된장이 다른 된장(청국장, 일본된장 등)보다 항돌연변이성이 강하다고 보고되었는데 이는 주로 된장의 발효 및 숙성과정 중 콩으로부터 유래된 물질이라고 보고하였다(4).

인간암세포 성장억제효과

각각의 된장에 대한 인간 자궁암세포(HeLa), 인간 간암세포(Hep3B), 인간 위암세포(AGS), 인간 폐암세포(A549) 및 인간 유방암세포(MCF-7)에 대한 인간 암세포 성장억제효과를 검토하였다. Table 2에서 보는 바와 같이 인간 자궁암세포(HeLa)에 대해서 된장A, 된장B 및 된장C 메탄올 추출물의 암세포 성장억제효과를 검토한 결과, 시료 최고 농도 1 mg/mL의 경우 각각 70.5%, 63% 및 71%로 다시마분말을

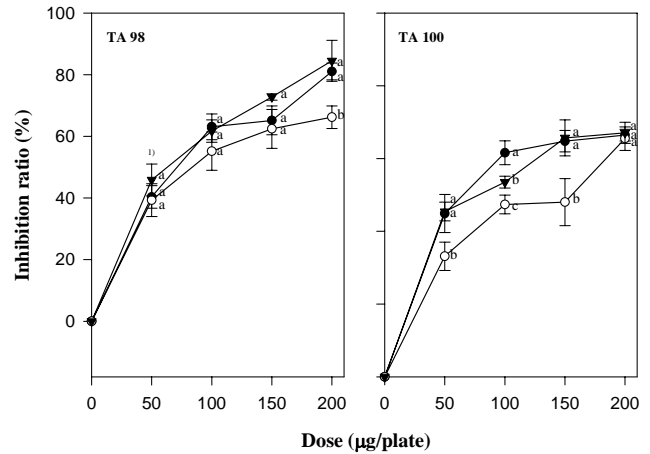


Fig. 2. Inhibitory effects of each samples of *doenjang* methanol extract on the mutagenicity by 4NQO (0.15 µg/plate) in *Salmonella Typhimurium* TA 98 and TA 100.

● : *Doenjang* A, ○ : *Doenjang* B, ▼ : *Doenjang* C.
¹⁾Values are the mean ± SD. ^{a-c}Means with the different letters in the same concentration are significantly different by Duncan's multiple range test (p<0.05).

첨가한 일반된장 및 해양심층수된장에서 비교적 높은 세포 독성을 나타냄을 알 수 있었다.

인간 간암세포(Hep3B)에 대해서 각각의 된장 메탄올 추출물에 대한 암세포 성장억제 효과를 검토한 결과 최고농도 1 mg/mL일 때 된장C 메탄올 추출물은 74.4%로 가장 높았으며, 그 다음으로 된장A가 72.2%로 나타났다. Lim 등(7)은 콩된장을 통해 간암세포에 대한 증식억제효과는 시료농도 200 µg/mL에서 73%가 나타났다고 보고하였다. Aflatoxin B₁(AFB₁)은 *Aspergillus flavus*와 *Aspergillus parasiticus*에 의해 생성되는 2차 대사산물로서 주로 식품이 곰팡이에 오염되었을 때 생성될 수 있는 잠재적 간 독성을 가지고 있는 돌연변이원이다. 이러한 된장에 AFB₁가 오염 가능성에 대한 우려가 보고된 바가 있었으나 Park 등(16)은 된장의 경우에 AFB₁에 의한 오염 가능성이 없음을 밝혔다. 이러한 측면에서 된장의 AFB₁에 의한 오염 가능성이 희박하지만

Table 2. Inhibitory effects of growth of human cancer cells and 293 cell in adding the *doenjang* methanol extract

	Dose (mg/mL)	293	HeLa	Hep3B	AGS	A549	MCF-7
<i>Doenjang</i> A	0.25	10.2±6.7 ^{1)a2)}	4.7±2.9 ^a	25.5±1.4 ^a	3.9±4.8 ^a	8.0±1.5 ^a	1.6±4.9 ^a
	0.5	21.3±1.5 ^a	32.7±2.1 ^a	44.1±10.2 ^a	22.3±4.1 ^b	40.9±2.9 ^a	15.3±7.7 ^b
	0.75	31.6±2.4 ^a	57.1±7.1 ^a	52.4±0.6 ^a	48.2±9.2 ^a	68.1±1.9 ^a	34.5±3.9 ^b
	1	37.4±1.5 ^a	70.5±2.1 ^a	72.2±1.9 ^a	65.3±9.0 ^a	74.2±0.8 ^a	68.7±6.7 ^a
<i>Doenjang</i> B	0.25	3.2±1.8 ^a	2.9±3.8 ^a	5.7±1.3 ^b	7.5±5.3 ^a	0.2±3.3 ^b	13.0±4.1 ^a
	0.5	10.6±3.4 ^a	24.1±2.2 ^a	20.6±1.3 ^b	34.2±7.2 ^a	17.8±5.3 ^c	23.3±6.5 ^a
	0.75	20.6±2.6 ^a	39.9±3.7 ^b	37.1±6.1 ^b	43.8±8.6 ^a	41.7±0.6 ^b	41.8±6.9 ^b
	1	32.7±2.3 ^b	63.0±2.8 ^a	58.2±0.8 ^b	58.1±2.3 ^a	67.3±0.6 ^b	62.8±5.5 ^a
<i>Doenjang</i> C	0.25	2.5±1.5 ^a	6.4±3.6 ^a	1.1±0.8 ^b	5.1±4.8 ^a	3.6±1.8 ^a	9.8±1.4 ^a
	0.5	12.0±2.8 ^a	32.6±5.6 ^a	20.3±7.6 ^b	22.7±2.4 ^b	30.8±1.3 ^b	40.2±6.2 ^a
	0.75	27.2±7.7 ^a	54.1±2.2 ^a	42.5±1.4 ^b	51.7±8.8 ^a	36.9±8.5 ^b	68.7±4.9 ^a
	1	36.5±1.9 ^{ab}	71.0±3.2 ^a	74.4±0.4 ^a	66.2±2.4 ^a	77.3±2.5 ^a	71.2±2.4 ^a

¹⁾Values are the mean ± SD.

²⁾Means with the different letters in the same concentration are significantly different by Duncan's multiple range test (p<0.05).

설령 약간 오염되어 간암 발생의 우려가 있었어도 이 추출물에 의한 인간 간암세포인 Hep3B의 성장억제효과는 된장이 효과적으로 간암 발생을 저해할 수가 있음을 시사해 준다. 본 실험에서도 해양심층수된장이 높은 암세포 성장억제효과를 보였으며, 시료 농도가 증가할수록 높은 암세포 성장억제효과를 보였다.

인간 위암세포인 AGS의 경우 시료 농도가 증가할수록 세포 증식억제효과를 보였고 최고 농도 1 mg/mL에서 된장 C 메탄을 추출물과 된장A 메탄을 추출물이 각각 66.2%와 65.3%의 암세포 성장억제효과를 보여주었다.

인간 폐암세포인 A549의 경우 된장C 메탄을 추출물이 시료 최고 농도인 1 mg/mL일 때 77.3%로 가장 높은 암세포 성장억제효과를 나타내었으며, 그 다음으로 된장A와 된장B 메탄을 추출물이 74.2%와 67.3%로 비교적 높은 억제활성을 나타내었다. Cui 등(10)이 인간 폐암세포인 A549에 대해서 시료의 최고 농도 1 mg/mL 농도에서 다시마분말을 5% 첨가한 된장이 56.4%의 억제효과를 나타낸다고 보고한 것에 비해 본 실험에서는 더 높은 억제효과를 보였다.

인간 유방암세포인 MCF-7에 대하여 된장C 메탄을 추출물이 시료 농도 1 mg/mL에서 71.2%의 암세포 성장억제효과를 나타내었다. 된장A 메탄을 추출물은 68.7%의 저해효과를 보였으며, 된장B 메탄을 추출물은 62.8%의 저해효과를 나타내었다. Kwon과 Shon(3)은 인간 유방암세포주의 성장억제효과는 메탄을 추출물 농도에 비례하며 100 ppm 농도에서 52%의 억제율을 보인다고 보고하여 본 실험 결과보다 낮은 농도에서 암세포 성장억제효과를 보여주었다.

암세포에 대해서 대부분 높은 활성을 토대로 한 인간 신장 정상세포 293에 대한 시료농도에 따른 세포독성 실험 결과, 1 mg/mL의 시료 첨가 시 모든 시료농도에서 40% 이하의 낮은 생육 억제율을 보였다. 이러한 결과를 바탕으로 정상세포는 비교적 낮은 독성을 나타낸다는 사실을 알 수 있었다.

Sarcoma-180 cell을 이용한 *in vivo*계 항암실험

다시마분말을 첨가한 해양심층수된장 및 일반된장의 *in vivo*에서의 항암효과를 검토하기 위하여 육종암세포인 sarcoma-180을 실험에 이용하였다. 실험 결과(Table 3) 시료농도 25 mg/kg에서 된장A와 된장C 메탄을 추출물의 경우 고형암의 무게가 각각 3.2 ± 0.4 g과 3.3 ± 0.5 g으로 대조군의 고형암 무게인 4.94 ± 0.4 g과 비교하여 30% 이상의 고형암 성장억제효과를 나타내었다. 이는 앞서 실시한 인간 암세포에 대한 성장억제효과와 마찬가지로의 결과가 동물실험에서도 나타난 것이라고 보인다. 한편 이와 같은 결과는 Park 등(5)의 매실, 마늘 및 생강 첨가 된장이 1 mg/kg의 시료농도에서 90% 이상의 종양성장 억제효과를 나타내었으며 이번 결과와 비교해보면 다소 높은 고형암성장 억제효과를 보여주고 있다.

지금까지의 결과들을 유추해 보면 해양심층수된장은

Table 3. Antitumor activities of methanol extracts from various kinds of *doenjang* in tumor bearing Balb/c mouse with sarcoma-180 cell

Group	Dose (mg/kg body weight)	Tumor weight	Inhibition rate (%)
Control	-	$4.9 \pm 0.4^{1)a2)}$	-
<i>Doenjang</i> A	12.5	3.8 ± 0.6^b	21.3 ± 12.2
<i>Doenjang</i> B	12.5	4.5 ± 0.4^{ab}	8.1 ± 8.8
<i>Doenjang</i> C	12.5	3.8 ± 0.72^b	23.0 ± 14.6
<i>Doenjang</i> A	25	3.2 ± 0.4^b	33.3 ± 8.1
<i>Doenjang</i> B	25	4.2 ± 0.4^a	14.1 ± 8.1
<i>Doenjang</i> C	25	3.3 ± 0.5^b	32.5 ± 10.2

All groups were fed commercial chow diet, control group was injected with PBS (phosphate buffered solution) and other group were injected with methanol extract of each diet (12.5 mg/kg/day, 25 mg/kg/day) once a day for 20 day from 24 hr following transplantation.

¹⁾Values are mean \pm SD of 5 mice.

²⁾Means with the different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

돌연변이 억제효과, 암세포 성장억제 효과 및 고형암 성장억제효과를 확인할 수 있었다. 다시마와 해양심층수염의 시너지 효과를 기대할 수는 없었지만 해양심층수를 탈염하여 얻은 염을 사용하여 재래식으로 된장을 제조한다면 기능성과 부가가치를 높일 수 있는 장류가 될 수 있다고 사료된다.

요 약

다시마분말과 해양심층수염을 첨가하여 제조한 된장 메탄을 추출물의 항돌연변이원성과 세포독성을 측정하였다. *S. Typhimurium* TA98과 TA100 균주를 이용한 실험에서 모든 된장의 시료에서 돌연변이성이 없었으며, 항돌연변이원성 실험에서는 직접변이원인 MNNG(0.4 μ g/plate)의 경우 TA100 균주에서 다시마분말을 첨가한 해양심층수된장(된장C)의 시료농도 200 μ g/plate에서 89.1%의 억제효과를 나타내었으며 4NQO(0.15 μ g/plate)에 대해서는 같은 시료농도에서 70%의 억제효과를 나타내었다. 그리고 4NQO에서 TA98 균주에 대해서 다시마분말을 첨가한 해양심층수된장(된장C)은 84.4%의 높은 억제효과를 나타내었으며 모든 시료는 농도 의존적으로 억제하는 것으로 나타났다. 세포독성 효과를 알아보기 위해서 HeLa, Hep3B, AGS, A549와 MCF-7을 사용하였으며 다시마분말을 첨가한 해양심층수된장(된장C)이 1 mg/mL의 농도에서 위암세포를 제외한 자궁암세포, 간암세포, 폐암세포 및 유방암세포에서 모두 70% 이상의 높은 억제활성을 나타내었으며 그 중에서도 폐암세포에서 77.3%의 가장 높은 암세포 성장억제율을 나타내었다. 또한 다시마분말을 첨가한 해양심층수된장(된장C)은 고형암 성장억제실험에서 대조군에 비해서 32.5%의 고형암 성장억제효과를 나타내었다.

감사의 글

본 연구는 고성군 농업기술센터의 연구비 지원에 의해 이루어진 연구결과의 일부로 이에 감사드립니다.

문헌

1. Lee JS, Cheigh HS. 1997. Antioxidative characteristics of isolated crude phenolics from soybean fermented foods (*doenjang*). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 26: 376-382.
2. Cui CB, Cho MA, Jun YY, Lee DS, Ham SS. 2002. Antimutagenicity and cytotoxic effect of ethanol extract from Korean traditional *mackjang* added sea tangle. *J East Asian Soc Dietary Life* 12: 15-22.
3. Kwon SH, Shon MY. 2004. Antioxidant and anticarcinogenic effects of traditional *doenjang* during maturation periods. *Korean J Food Preserv* 11: 461-467.
4. Kim SJ, Park CW, Park SJ, Kim YS, Cho HJ, Lim DK, Kim JO, Lee JH, Ha YL. 2003. Enhanced antitumorogenicity and antimutagenicity of *doenjang* prepared from mushroom mycelia-cultured traditional *mejus*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 143-148.
5. 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*. *Korean J Food Cookery Sci* 21: 599-606.
6. Lee SL, Kim JG. 2005. Inhibitory effects of *doenjang* (Korean fermented soybean paste) and soybean extracts on the growth of KB cells. *Kor J Env Hlth* 31: 444-450.
7. Lim SY, Rhee SH, Park KY. 2004. Inhibitory effect of methanol extract of *doenjang* on growth and DNA synthesis of human cancer cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 936-940.
8. Rhee CH, Kim WC, Rhee IK, Lee OS, Park HD. 2006. Changes in the physicochemical property, angiotensin converting enzyme inhibitory effect and antimutagenicity during the fermentation of Korean traditional soy paste (*doenjang*). *Korean J Food Preserv* 13: 603-610.
9. Lee SJ, Lee KI, Rhee SH, Park KY. 2004. Physiological activity in *doenjang* added with various mushrooms. *Korean J Food Cookery Sci* 20: 365-370.
10. Cui CB, Lee EY, Lee DS, Ham SS. 2002. Antimutagenicity and cytotoxic effect of ethanol extract from Korean traditional *doenjang* added sea tangle. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31: 322-328.
11. Park JH, Ha AW, Cho JS. 2005. Effects of green tea soybean paste on weights and serum lipid profiles in rats fed high fat diet. *Korean J Food Sci Technol* 37: 806-811.
12. Collic S, Fischer AM, Tapon-Brethaudiere J, Boisson C, Durand P, Jozefonvicz J. 1991. Anticoagulant properties of a fucoidan fraction. *Thromb Res* 64: 143-154.
13. Moon DS, Kim HJ, Shin PK, Jung DH. 2005. Characteristics of chemical contents of horizontal spray salts from deep ocean water. *J Kor Fish Soc* 38: 65-69.
14. Maron DM, Ames BN. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res* 113: 173-215.
15. Scudiero DA, Shoemaker RH, Paul KD, Monks A, Tiemey S, Nofziger TH, Currens MJ, Seniff D, Boyd MR. 1988. Evaluation of a soluble tetrazolium formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res* 48: 4827-4836.
16. Park KY, Moon SH, Baik HS, Cheigh HS. 1990. Antimutagenic effect of *doenjang* (Korean fermented soy paste) toward aflatoxin. *J Korean Soc Food Nutr* 19: 156-162.

(2008년 1월 11일 접수; 2008년 4월 4일 채택)