

Porphyran-청국장 추출물의 암세포 성장 억제효과

민현경 · 김효주 · 장해춘[†]

조선대학교 식품영양학과

Growth-inhibitory Effect of the Extract of Porphyran- *Chungkookjang* on Cancer Cell

Hyun-Kyeng Min, Hyo-Ju Kim, and Hae Choon Chang[†]

Dept. of Food and Nutrition, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea

Abstract

The effects of porphyran-*chungkookjang* on cytotoxicity of human normal cell line (BJ) and human cancer cell lines (AGS and HT-29) were examined. Porphyran, which was prepared from laver (*Porphyra yezoensis*), decreased the viability of the cancer cells, however, it did not affect the viability of normal cells. Porphyran-*chungkookjang* was prepared by the addition of 5% (w/w) porphyran into *chungkookjang* which was fermented by starter, *Bacillus subtilis* DJI. The cytotoxicity effects of the *chungkookjang* and porphyran-*chungkookjang* were evaluated with MTT assay. The methanol and the water extract of porphyran-*chungkookjang* at 1.0 mg/mL showed 23~38% decreases in proliferation of cancer cells (AGS and HT-29). However, the methanol and the water extracts of porphyran-*chungkookjang* did not inhibit the growth of normal cell. Moreover, the methanol extract of porphyran-*chungkookjang* at 1.0 mg/mL showed 1.2~1.5 fold higher anticancer effects than that of the *chungkookjang*.

Key words: laver, porphyran, *chungkookjang*, anticancer effect

서 론

해조류 양식 산업 가운데 김(*Porphyra* spp.) 양식 산업은 2005년 수산통계연보에 의하면 연간 생산량 약 20만톤(습중량), 생산 금액 약 200백만 달러 이상으로서 전 세계 김 양식 생산량의 30%를 차지하는 규모이며 해조류 중 미역과 더불어 생산금액 및 생산량 측면에서 가장 중요한 해조류 중 하나이다(1). 그러나 최근 양식 및 가공 기술 발달로 김의 생산량은 많아지고 있지만 그에 비하여 소비는 증가되지 않으므로 공급과 소비의 불균형이 심화되어 김양식산업의 걸림돌이 되고 있다(2). 따라서 김 소비를 위해 다양한 신제품의 개발과 고부가가치 제품 개발을 위한 기술연구가 요구되어지고 있다.

홍조류인 김에는 전체 건물량의 35~50%를 차지하는 다량의 당이 함유되어 있는데 주요 당은 isofloridoside, floridoside 등의 유리당과 세포벽을 이루고 있는 골격 다당, 그리고 세포간 충전물질로써 수용성 산성다당인 porphyran으로 이루어져 있다(3). Porphyran은 황산기를 함유하는 수용성 산성다당의 고분자물질로서 3,6-anhydrogalactose, 6-methylgalactose, D,L-galactose 및 ester sulfate로 구성되어 있어 agarose의 조성파 매우 유사하나 황산기와 -

OCH₃기의 함량의 차이가 있어 한천과 같은 겔화능을 나타내지는 않는다(4). 구조는 1,3 결합한 β-galactose나 6-methylgalactose와 1,4 결합한 α-3,6-anhydro-L-galactose나 α-L-galactose-6-sulfate가 서로 교대로 이어져있다(5). 해조다당류인 porphyran은 식이섬유로서 역할을 할 뿐 아니라 면역기능 강화(6,7), 항산화 활성(8), 콜레스테롤 저하작용(7), 항균효과 및 항암효과(9-16) 등의 생리효과를 가진다고 알려지고 있다. 이와 같이 porphyran은 우수한 생리활성 기능이 밝혀짐에 따라 기능성 식이섬유 소재로서의 이용 가능성이 매우 높다.

콩을 원료로 한 우리나라 대표적 발효식품중의 하나인 청국장의 생리활성은 혈전 용해능, 혈압 및 지질대사 개선효과(17), 항산화 효과(18), 면역기능 강화(19), 항미생물효과(20), 노인성치매 예방 효과, 골다공증 억제 등의 성인병 예방 효과 등이 있음이 보고되었다(21). 또, 청국장 제조에 이용되는 콩에는 생리활성 물질로 알려진 trypsin inhibitor, isoflavones, phytic acid, saponins, lignin, vitamin E와 불포화지방산 등의 성분이 포함되어 항 돌연변이효과 및 항암효과를 나타내는 것으로 알려져 있다(21).

본 논문에서는 김 가공 중 발생하는 미이용 김으로부터 porphyran을 추출하고 이를 청국장에 첨가하여 porphyran-

[†]Corresponding author. E-mail: hcchang@mail.chosun.ac.kr
Phone: 82-62-230-7345, Fax: 82-62-234-7452

청국장을 개발하였다. 본 연구에서는 김으로부터 추출된 porphyran의 항암활성과 porphyran-청국장의 추출물이 정상세포(BJ)에 미치는 세포독성, 위암세포(AGS)와 대장암세포(HT-29)의 성장억제효과 등을 실험하여 porphyran-청국장의 항암활성효과 규명과 함께 미이용 김의 새로운 활용방안을 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 김(*Porphyra yezoensis*)은 전남 완도산으로 김 가공후 남은 자투리 가루 김을 사용하였다. 건조된 김은 miller(DA282-2, Arlon, Korea)로 분쇄한 후 20 mesh 체(Chunggye industrial Co., Korea)에 걸러 통과한 분말을 실험재료로 하여 4°C 냉장실에서 밀봉 보관하면서 실험에 사용하였다. 청국장 제조에 사용된 콩은 국내에서 생산되는 콩나물 콩을 이용하였다.

김의 일반성분 및 총당 분석

김의 일반성분 분석은 다음과 같은 방법으로 시행하였다. 수분함량은 Karl-Fischer법(22), 무기질은 건식분해법(23)으로 정량하였으며, AOAC법(24)에 따라 조지방은 Soxhlet 추출법, 조단백질은 Kjeldahl법, 조회분은 550°C 건식회화법으로 정량하였다. 탄수화물은 100-(수분+조지방+조단백질+조회분)의 식으로 계산하여 그 값을 표시하였다. 총당 함량은 glucose를 표준물질로 하여 Dubois 등(25)의 phenol-sulfuric acid법으로 측정하였다.

김으로부터 crude porphyran의 추출

Crude porphyran의 추출은 Kim 등(26)의 방법에 준하여 시행하였다. 건조된 김을 분쇄한 후 김 중량의 50배(w/v)의 0.1 N HCl을 가하여 60°C의 수욕조상에서 3시간 동안 교반 추출 하였다. 추출액을 회전식 진공농축기(N-1000SW, Tokyo Rikakikai Co., Japan)로 농축한 후 감압여과 하여 얻어진 여액을 6 N NaOH를 이용하여 pH 7.0으로 조정된 다음 중화된 여액에 3배(v/v)량의 에탄올을 가해 하룻밤 정치한 후 원심분리기를 사용하여 1,520×g에서 15분간 원심분리 하였다. 침전된 다당을 소량의 증류수에 용해시키고 진공 동결건조(Samwon freezing engineering Co., Korea)한 다음, 분쇄하여 crude porphyran 분말을 얻었다.

Crude porphyran의 화학조성 분석

김으로부터 추출된 crude porphyran의 총당 함량은 glucose를 표준물질로 하여 Dubois 등(25)의 phenol-sulfuric acid법으로 측정하였고, 총 단백질량은 bovine albumin (Sigma Co., USA)을 표준물질로 하여 Schacterle와 Pollack 방법(27)을 이용하여 측정하였다. 황산기의 함량은 Dodgson과 Price의 방법(28)에 따라 K₂SO₄로 표준검량선을 작성하

여 측정하였으며, 3,6-anhydrogalactose의 함량은 Yaphe와 Arsenault의 방법(29)에 따라 측정하였다.

청국장 제조

청국장 제조에 이용된 균은 본 실험실에서 된장에서 분리하여 보유하고 있던 *Bacillus subtilis* DJI 균주를 균주로 사용하였다. 균은 37°C에서 24시간 전배양하여 LB 액체배지(Duchefa biochemie, bacto-tryptone 10%, yeast-extract 5%, sodium chloride 10%)에 1% 접종한 후 9시간 배양한 것으로 준비하였다. 배양된 *B. subtilis* DJI은 원심분리(9,950×g, 15 min, 4°C)하여 균체를 회수하고 회수된 균체를 멸균된 3차 증류수로 2회 수세하여 사용하였다.

콩은 정선 및 수세하여 3배의 물에 20시간 침지하였다. 이를 고압 멸균기(1.0~1.5 kg/cm²)에서 50분 동안 증자한 후 40°C로 냉각하였다. 배양된 균액을 원료의 1%(v/w) 접종하고 37°C incubator(SW-90S, Sangwoo Scientific Co., Korea)에서 11시간 동안 발효시켰다.

청국장의 아미노산 정량

아미노산 분석은 분쇄한 건조시료를 끓인 6 N HCl로 가수분해한 후 Pico-Tag 방법(Waters, Milford, USA)을 이용하여 아미노산을 분석하였다. Formic acid/hydrogen peroxide (19/1, v/v) 혼합용액으로 시료에 들어있는 cysteine의 잔기를 cysteic acid로 산화시켰고(30), tryptophan 함량을 알기 위하여 시료를 4 N methanesulfonic acid 20 μL로 직접 분해시켰다(31).

가수분해된 시료는 건조한 후 ethanol/DW/triethylamine (2/2/1, v/v) 용액으로 다시 건조시켰다. 가수분해된 시료와 유리아미노산 표준품은 ethanol/DW/trimethylamine/phenylisothiocyanate(7/1/1/1, v/v) 용액으로 15분 동안 유도화한 후 유도화된 시료 800 μL 중에서 10 μL를 취하여 HPLC (Waters Breeze HPLC system, Water Co., USA)로 분석하였고 유리아미노산은 6 N HCl로 가수분해를 행하지 않고 구성아미노산과 같은 방법으로 행하였다.

Porphyran-청국장의 제조

상기의 방법대로 제조된 청국장에 crude porphyran 5% (w/w)을 첨가하여 porphyran 첨가 청국장을 제조하였으며 제조된 porphyran-청국장은 동결건조 한 후 진공포장하여 -18°C에서 보관하면서 이후 실험에 사용하였다.

시료의 추출물 제조

시료인 청국장과 porphyran-청국장은 동결건조 후 마쇄하고 시료의 20배(w/v) 메탄올과 물을 각각 첨가하여 12시간 동안 교반하고 이를 3회 반복한 후 여과(Whatman No. 2)한 후 회전식 진공농축기로 농축하여 각각의 메탄올 추출물, 물 추출물을 얻었다. 준비된 각각의 메탄올과 물 추출물 그리고 crude porphyran은 최종 농도가 0.01, 0.05, 0.25, 0.5 및 1.00 mg/mL가 되도록 각각 첨가하여 세포실험에 사용하

Table 1. Proximate composition of the laver (*Porphyra yezoensis*)

Component	Content (%) ¹⁾	Component	Content (mg/100 g)
Moisture	11.45±0.20	Ca	542.00±92.52
Carbohydrate	47.26±0.14	Fe	35.43±4.82
Crude protein	32.25±0.22	Zn	2.19±0.11
Crude fat	0.40±0.01	Mg	331.25±2.32
Ash	8.65±0.04	Cu	0.98±0.14
Total sugar	15.23±0.18	K	1277.50±24.62

¹⁾Content: dry weight basis.

였다.

세포 배양

실험에 사용되어진 암세포주는 AGS(human gastric adenocarcinoma cell) CRL-1739, HT-29(human colon cancer cell) HTB-38과 정상세포주 BJ(human foreskin normal cell) CRL-2522를 사용하였다.

인체 위암세포(AGS)와 인체 결장암세포(HT-29)는 RPMI 1640(Gibco BRL, USA) 배지로 배양하고, 종양세포와 대조군으로 사용한 인체 포낭 정상세포주(BJ)는 Dulbecco's modification of eagles medium(DMEM; Gibco BRL, USA)으로 배양하였다. 각각의 배지에는 10% fetal bovine serum(FBS; Gibco, BRL, USA), 100 µg/mL penicillin(Gibco BRL, USA) 그리고 100 µg/mL streptomycin(Gibco BRL, USA)을 첨가하였다. 배양된 각각의 세포는 일주일에 2~3회 신선한 새 배지로 갈아주고 6~7일 만에 phosphate buffered saline(PBS)로 세척한 후 0.05% trypsin-0.02% EDTA로 부착된 세포를 분리하여 원심분리한 후 집적된 세포에 배지를 넣고 피펫으로 세포가 골고루 분산되도록 잘 혼합한 다음 6~7일마다 계대배양하면서 실험에 사용하였다. 계대배양 시 각각의 passage number를 기록하였고 passage number가 10회 이상일 때는 새로운 세포를 액체질소 탱크로부터 꺼내어 다시 배양하여 실험하였다.

MTT assay

세포 증식 정도를 MTT assay법(32)에 따라 측정하였다. MTT assay는 살아있는 세포의 미토콘드리아 내막에 존재하는 oxidoreductase 작용을 받아 MTT에 의하여 생성되는 dark blue formazan의 양을 측정하는 방법이다. Dark blue formazan의 생산량은 대사적으로 활성이 있는 살아있는 세포수와 거의 비례하는 것으로 알려져 세포의 생육과 분화를 측정하는데 아주 효과적으로 사용되고 있다.

배양된 각각의 세포주는 96 well plate에 well 당 1×10^4 cells/mL가 되도록 180 µL씩 seeding 하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 세포를 부착시킨 후 시료를 농도별로 20 µL씩 첨가하여 48시간 배양하였다. 여기에 인산생리식염수에 5 mg/mL의 농도로 제조한 MTT{3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide}용액 20 µL를 첨가하고 4시간 더 배양한 후 생성된 formazan 결정을 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹여 plate reader(UV scan-

ning ELISA reader, BioTek, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계처리

모든 실험은 3회씩 수행하였으며, SPSS 12.0.1(Statistical package for the social science)P/C package를 이용하여 평균값과 표준편차범위로 나타내었다. 결과는 일원배치분산 분석(one-way ANOVA)을 실시하였으며, 사후검정은 T-test에 의하여 실행하였다. 통계적 유의성은 p<0.05를 기준으로 하였다.

결과 및 고찰

김의 일반성분 및 총당 분석

본 실험에 사용한 김의 일반성분 조성은 Table 1과 같다. 수분은 11.45%, 탄수화물은 47.26%, 단백질은 32.25%, 지방은 0.40%, 회분은 8.65%, 총당은 15.2%의 함량을 나타냈다. 이는 Kim 등(33)이 보고한 김의 수분 12.3%, 단백질 32.5%, 총당 15.7%의 함량과 유사한 결과를 나타냈으며, 탄수화물 35.2%, 지방 4%, 회분 15%는 다소 상이한 결과를 나타냈다. 무기질 함량은 100.0 g당 Ca 542.0 mg, Fe 35.0 mg, Zn 2.1 mg, Mg 331.2 mg, Cu 0.9 mg, K 1277.5 mg으로 나타났다.

Crude porphyran 함량 및 화학조성 분석

김으로부터 얻은 crude porphyran의 함량은 13.9%를 나타내어 Kim 등(26)의 보고(12.3%)보다 조금 더 높은 함량을 나타내었다. Table 2에서와 같이 crude porphyran의 총당은 66.6%, 황산기는 16.9%, 3,6-anhydrogalactose는 16.1% 및 단백질은 8.6%를 나타냈다. 이는 기존에 Kim 등(26)이 보고한 총당 63.7%, 황산기 16.9%, 3,6-anhydrogalactose 18.1%와 유사한 함량을 나타냈다.

청국장의 구성아미노산 및 유리아미노산

Bacillus subtilis DJI를 이용하여 11시간 발효시킨 청국장의 구성 아미노산 함량(Table 3)과 유리아미노산 함량(Ta-

Table 2. Chemical composition of porphyran from the laver

Component	Content (%)
Protein	8.60±2.89
Total sugar	66.60±1.26
Sulfate/total sugar	16.92±0.09
3,6-anhydrogalactose/total sugar	16.18±0.36

Table 3. Total amino acid of chungkookjang

	Amino acid	mg %
Essential	Valine	330.9
	Leucine	365.1
	Isoleucine	264.8
	Threonine	350.6
	Lysine	78.0
	Methionine	117.3
	Phenylalanine	422.3
None essential	Aspartic acid	363.3
	Serine	283.7
	Glutamic acid	1514.0
	Proline	1106.3
	Glycine	395.8
	Alanine	213.0
	Cysteine	92.0
	Tyrosine	181.4
	Histidine	230.4
	Arginine	300.4
	Cystine	2.0
Tryptophan	7.9	
	Total amino acid	6,619.2

ble 4)을 측정하였다. 구성아미노산 중 구수한 맛을 내는 glutamic acid가 1,514.0 mg%로 그 함량이 가장 많았고, proline이 1,106.3 mg%, phenylalanine이 422.3 mg%의 순으로 많이 함유되어 있었다. 청국장의 총 구성아미노산 함량은 6,619.2 mg%로 나타났고, 총 필수아미노산의 함량은 2,159.4 mg%로 나타났고, 청국장의 유리아미노산 함량은 총 3,131.4 mg%로 나타났으며, 구수한 맛을 내는 glutamic acid의 함량이 510.6 mg%로 가장 높게 나타났고, phenylalanine(357.6 mg%), proline(265.3 mg%), tyrosine(264.5 mg%)의 순으로

Table 4. Free amino acid of chungkookjang

Amino acid	mg %
Threonine*	73.1
Serine	41.2
Glycine	38.5
Alanine	105.4
Lysine*	85.1
Aspartic acid	28.4
Glutamic acid	510.6
Cysteine	85.6
Methionine*	187.8
Isoleucine*	125.4
Leucine*	241.4
Valine*	192.8
Tyrosine	264.5
Phenylalanine*	357.6
Histidine*	65.6
Arginine	82.1
Proline	265.3
Tryptophan*	242.7
Cystine	44.5
Asparagine	52.8
Glutamine	41.0
Total amino acid	3,131.4

*Essential amino acid.

높은 함량을 나타내었다.

Kim 등(34)이 *Bacillus subtilis*를 이용, 24시간 동안 발효시켜 청국장을 제조하여 조사한 유리아미노산의 함량을 glutamic acid(119.58 mg%), phenylalanine(112.34 mg%)으로 보고하였다. Choi 등(35)은 *Bacillus subtilis* DC-2를 이용하여 24시간 발효시켜 청국장을 제조한 결과 glutamic acid(184.24 mg%), leucine(92.16 mg%), phenylalanine(84.50 mg%)으로 보고하였다. Lee(36)는 *B. subtilis* CH4-4, *B. subtilis* CH4-5 및 *B. subtilis* CH7-1로 48시간 발효시켜 제조한 청국장의 유리아미노산 함량을 측정한 결과 CH4-4로 제조한 청국장이 2,254.90 mg%, CH7-1로 제조한 청국장이 2,208.18 mg%, CH4-5로 제조한 청국장이 1,973.57 mg%로 나타났다고 보고하였으며, glutamic acid, leucine, phenylalanine의 순으로 함량이 높게 나타났다. 또한 Lee(37)의 보고에서 삶은 콩에 *Bacillus subtilis*를 2%(v/w) 접종하여 48시간 발효시켜 제조한 청국장의 유리아미노산은 총 8,725.4 mg%로 나타났으며, leucine, phenylalanine, isoleucine, serine, glutamic acid의 순으로 높은 함량을 가진 것으로 보고하였다.

Lee(37)의 보고를 제외하고 위의 연구된 *B. subtilis*의 균주들로 제조된 청국장들은 본 실험에서 제조한 청국장과 비교했을 때 12~24시간 더 발효시켰음에도 불구하고 발효시간에 비해 유리아미노산의 함량이 훨씬 적게 나타났다. 이는 본 청국장 제조에 이용된 종균 *B. subtilis* DJI이 위의 다른 종균들에 비하여 기질 이용능이 뛰어나 콩 단백질의 분해가 잘 일어나 유리아미노산의 함량이 높은 것으로 추정된다. 또한 다른 연구보고들에서 제조된 청국장은 균을 1%(v/w) 접종한 것에 비하여 Lee(37)의 청국장은 2%(v/w)를 접종하여 48시간 발효시키므로 다량의 균이 충분한 발효시간을 거치므로 분해능이 더 좋아 타 연구에서보다 더 높은 아미노산의 함량을 나타낸 것으로 사료된다.

Crude porphyran의 각 세포에 대한 성장억제효과

Crude porphyran의 세포독성을 알아보기 위해 MTT assay를 실시하였다. 대조구로 정상세포 BJ는 DMEM에서, 나머지 두 암세포는 RPMI배지에서 배양하여 이때의 생존율을 100%로 표시하고, 실험구는 porphyran을 48시간 동안 농도 별로 처리한 각 배양세포의 생존율을 대조구에 대한 상대적 생존율(%)로 표시하였다.

정상세포인 BJ에 대한 porphyran의 세포독성은 Fig. 1에서와 같이 porphyran 0.25 mg/mL의 농도까지는 오히려 세포의 성장효과를 나타내었다. 0.05 mg/mL의 농도에서는 113%의 생존율로 가장 높은 생존율을 나타내었고, 0.5 mg/mL 이상의 농도(94% 생존율)부터는 다소 감소하여 1.0 mg/mL의 농도에서는 약 73%의 생존율을 보였다.

Crude porphyran을 0.05 mg/mL 농도로 처리 시 HT-29와 AGS의 생존율은 각각 95%, 89%, 1.0 mg/mL로 처리 시 HT-29와 AGS의 생존율은 56%, 55%의 생존율을 나타내어,

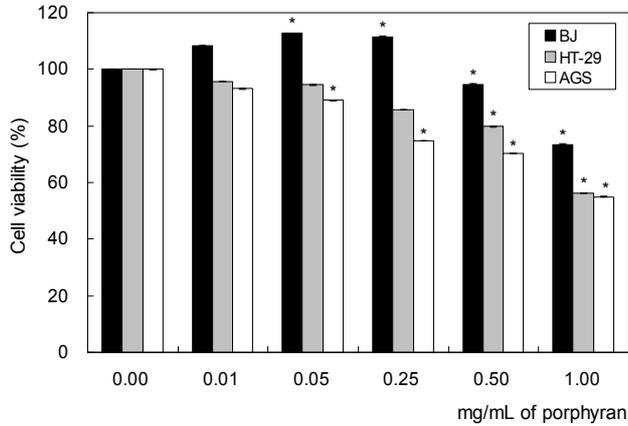


Fig. 1. Dose-dependent effect of porphyran on cell viability. BJ as a normal control cell, HT-29 (human colon cancer cell) and AGS (human gastric cancer cell) cells were treated with various concentrations (0.005~1.00 mg/mL) of porphyran for 48 hrs. After MTT assay, the MTT reduction rate was calculated as percentage. All values represent mean value±SD of three independent experiments. *Significant differences were compared with control (0.00 mg/mL) of $p < 0.05$ by T-test.

porphyran(0.05~1.0 mg/mL)의 처리가 농도 의존적으로 HT-29와 AGS 등의 암세포 성장을 억제시키는 결과를 나타냄을 알 수 있었다. 또한 porphyran은 장암세포 HT-29보다 위암세포 AGS의 생육을 더 효과적으로 저해시키는 것으로 나타났다.

Park(38)은 대장암세포인 WiDr에 porphyran을 처리하여 4일 동안 배양하였을 때 0.5 mg/mL 처리 시 43%의 생존율

을, 1.0 mg/mL 처리 시 33%의 생존율을 보임으로 porphyran이 대장암세포의 성장을 억제시킴을 보고한 바 있다.

Porphyran-청국장의 세포 성장억제효과

청국장과 porphyran-청국장을 물(Fig. 2)과 메탄올(Fig. 3)로 추출한 시료는 농도를 달리하여 정상세포 BJ에 대한 세포독성과 AGS, HT-29의 2종의 암세포에 투여하여 각각의 암세포주의 증식억제 효과를 관찰하였다.

AGS에 대한 성장억제효과는 청국장 물 추출물 0.01~1.0 mg/mL의 농도구간에서 6~17%의 억제율을 나타내었다. Porphyran-청국장의 AGS에 대한 세포증식억제효과는 물 추출물의 경우 0.01~0.25 mg/mL의 농도까지 14~18%의 억제율을 나타냈으며, 1.0 mg/mL의 농도에서 23%의 억제율을 나타내었다. 청국장 메탄올 추출물의 AGS에 대한 성장억제효과는 0.05~1.0 mg/mL의 농도 처리 시 15~24%의 억제율을 보였다 Porphyran-청국장의 메탄올 추출물은 같은 농도에서 12~38%의 높은 억제율을 나타내었다.

HT-29에 대한 성장억제효과는 청국장 물 추출물의 0.25 mg/mL에서는 12%, 0.5~1.0 mg/mL에서는 약 19%의 억제율을 나타내었다. 메탄올 추출물의 경우 0.05 mg/mL의 농도부터 17%의 억제율을 보이고, 0.1 mg/mL에서 20%의 억제율을 보여 저 농도에서도 뛰어난 세포증식 억제효과를 나타내었다. Porphyran-청국장의 물 추출물의 경우 0.05 mg/mL의 농도부터 14%의 억제율을 나타내었으며 1.0 mg/mL에서는 27%의 억제율을 보였다. 메탄올 추출물은 0.05 mg/mL의

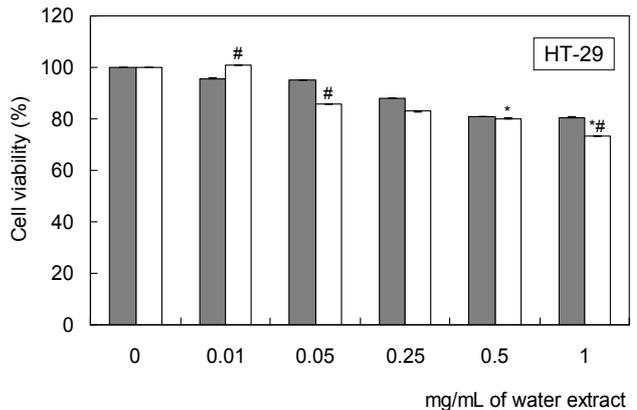
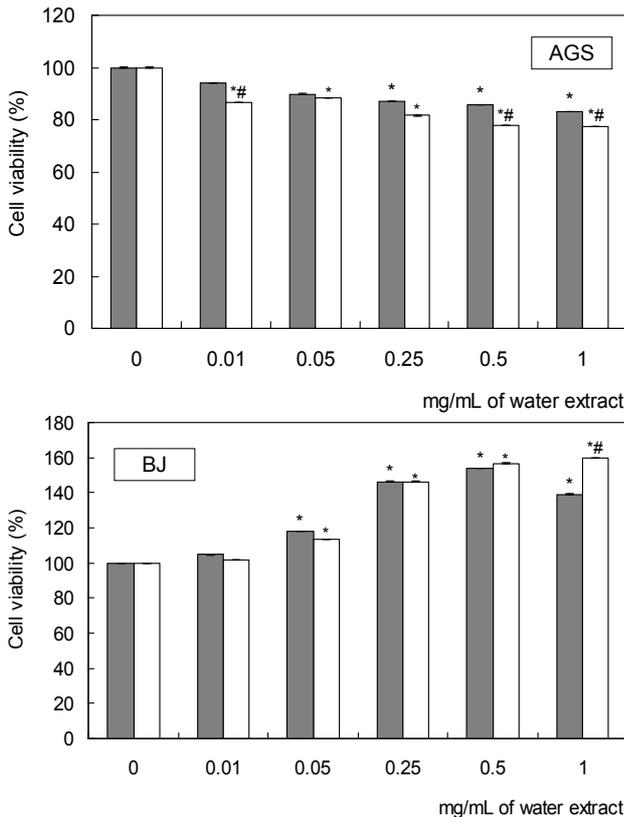


Fig. 2. Effects of the water extracts from chungkookjang and porphyran-chungkookjang on cell viability.

Cells were exposed to different concentrations of water extract for 48 hrs and then cell viability was assessed by MTT assay. All values represent mean value±SD of three independent experiments. *Significant differences were compared with controls (0.00 mg/mL concentration of the extract, #chungkookjang with each concentration) of $p < 0.05$ by T-test.

■ Chungkookjang, □ Porphyran-chungkookjang.

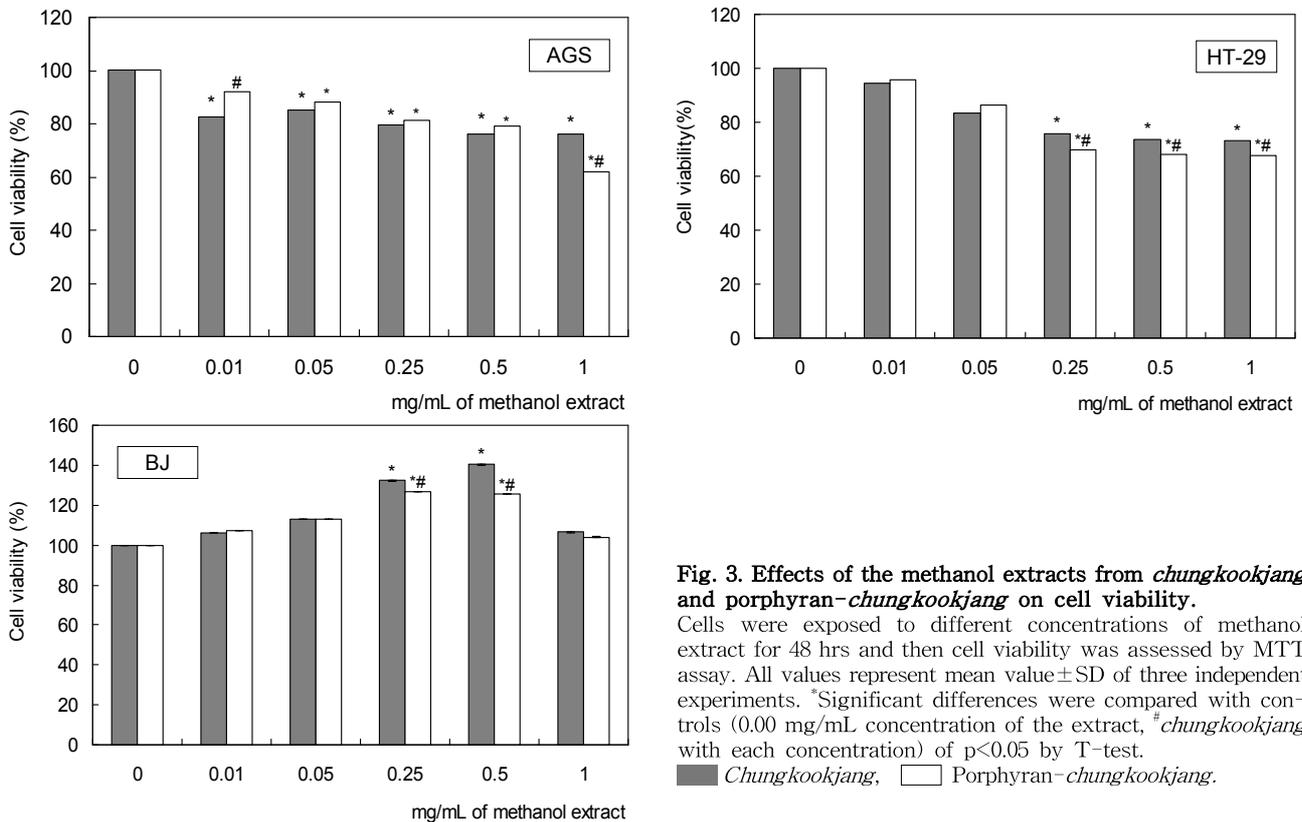


Fig. 3. Effects of the methanol extracts from chungkookjang and porphyran-chungkookjang on cell viability. Cells were exposed to different concentrations of methanol extract for 48 hrs and then cell viability was assessed by MTT assay. All values represent mean value±SD of three independent experiments. *Significant differences were compared with controls (0.00 mg/mL concentration of the extract), #chungkookjang with each concentration) of p<0.05 by T-test. ■ Chungkookjang, □ Porphyran-chungkookjang.

농도에서는 14%의 억제율을 보였으며, 0.25~1.0 mg/mL의 농도에서는 30~32%의 높은 억제율을 나타냈다.

청국장이나 porphyran-청국장의 AGS 또는 HT-29에 대한 세포증식억제효과는 물 추출물 보다 메탄올 추출물이 모든 농도에서 더 높은 억제효과를 보였다. 즉 암세포에 대한 청국장과 porphyran-청국장의 항암효과는 메탄올 추출물이 물 추출물보다 더 우수하여 암세포 성장억제효과를 보이는 유효성분은 더 소수성 경향의 물질을 함유하고 있을 것으로 추측되어진다.

정상세포 BJ에 대한 청국장의 물 추출물의 경우 0.005 mg/mL농도에서 104%의 생존율을 보였고, 농도가 증가할수록 세포성장효과를 나타냈으며, 0.5 mg/mL의 농도에서는 153%의 높은 세포성장효과를 보였다. 청국장의 메탄올 추출물도 청국장 물 추출물에서와 같이 정상세포 BJ에 대해 세포성장효과를 나타내어 0.01~0.5 mg/mL까지의 범위 내에서 농도 의존적으로 세포성장효과를 나타냈다. 메탄올 추출물의 경우 0.5 mg/mL의 농도에서 140%의 생존율로 가장 높은 생존율을 보였고 1.0 mg/mL의 농도에서는 같은 농도의 물 추출물에 비해 생존율(139%)이 다소 감소하지만 107%의 생존율을 나타냄으로 청국장이 정상세포에 대해 세포독성이 없으며 오히려 정상세포 성장효과가 있음을 확인하였다. Porphyran-청국장의 물 추출물의 경우 0.1~1.0 mg/mL의 농도 처리 시 124~160%의 높은 생존율을 보여 농도 의존적으로 세포성장효과를 나타내었다. Porphyran-

청국장의 메탄올 추출물도 0.25 mg/mL의 농도까지 농도 의존적으로 세포성장효과를 보였으며 0.25 mg/mL에서 최대 127%의 생존율을 보였다. 이후 0.5, 1.0 mg/mL의 농도에서 생존율이 약간 감소하는 것으로 보이나 1.0 mg/mL의 농도에서도 104%의 생존율을 나타내었다.

이상의 결과로부터(Fig. 2, 3) 청국장과 porphyran-청국장은 정상세포에는 안전하나 두 종류의 암세포에는 증식억제효과를 나타냄을 알 수 있었고, porphyran-청국장이 청국장 보다 두 종류의 암세포에 대해 보다 더 효과적으로 증식억제 작용을 함을 알 수 있었다. Fig. 4는 위상차 현미경을 이용하여 porphyran-청국장의 메탄올 추출물을 각 세포에 1.0 mg/mL의 농도로 처리하였을 때 세포형태 변화의 사진을 나타낸 것이다. 각 대조구에는 시료 추출물 무 처리구로 삼았다. Fig. 4를 보면 처리구의 정상세포 BJ의 생육에는 거의 영향을 미치지 않으며, 위암세포와 대장암세포는 정상적으로 성장하지 못하고, 세포밀도가 감소하는 현상을 관찰할 수 있었다.

청국장의 항암활성에 관한 기존의 연구보고로서 본 연구에서와 같이 소금을 첨가하지 않은 생청국장을 이용하여 HT-29와 AGS에 대해 항암활성 실험을 한 Lee(39)의 연구에서 청국장의 메탄올 추출물을 0.25 mg/mL 처리 시 HT-29, AGS 각각 25%와 11%의 억제율을 보인다고 보고하였다. 또한 Jang(40)은 *B. licheniformis*를 이용하여 제조한 생청국장의 유선암세포(MDA-MB-231)와 악성피부암세포

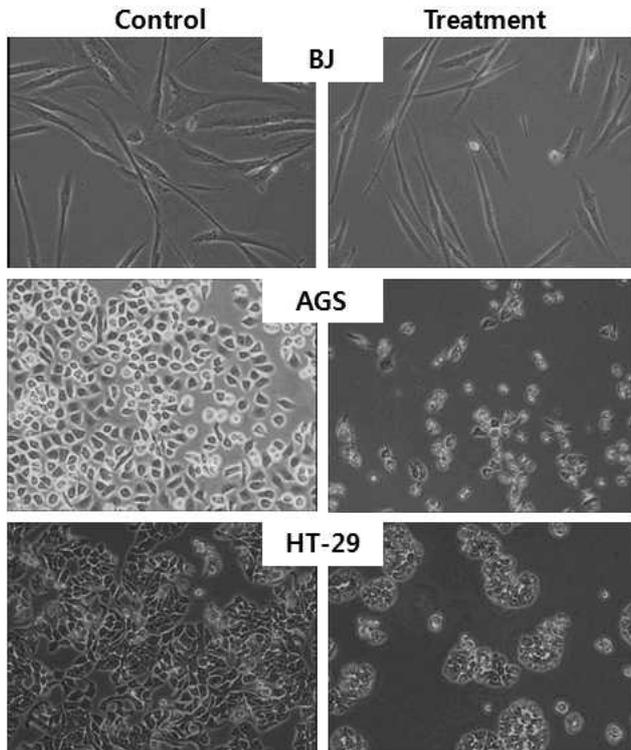


Fig. 4. Photomicrographs ($\times 100$) of BJ, HT-29, and AGS cells treated with methanol extract from porphyran-*chungkookjang*. The cells were treated by 1.0 mg/mL of the methanol extract from porphyran-*chungkookjang* for 48 hrs.

(SK-MEL 31)에 대한 항암효과를 보고하였는데, 유선암세포에서 0.5 mg/mL와 1.0 mg/mL의 농도에서 각각 15.68%와 17.20%의 억제율을 보이고, 악성피부암에서는 18.10%와 24.23%의 억제율을 보였다. 위 생청국장의 항암활성에 관한 연구(39,40)는 시료가 무염 청국장이라는 점에서는 같으나 세포를 dish에 안정화시키지 않고 바로 시료를 처리하여 실험하였다. 미부착세포는 정상상태가 아니므로 이 상태에서 세포생육저해 현상은 처리시료의 영향 이외에도 세포상태가 불안정하여 생길 수 있다. 이러한 점들을 고려할 때, 본 실험에서 세포 안정화 후 porphyran-청국장 메탄올 추출물 0.25 mg/mL의 농도처리 시 HT-29와 AGS에 대해 각각 30%, 19%의 억제율을 나타낸 것은 기존의 청국장에 의한 암세포 증식억제 효과의 연구결과와 비교 시 우수한 암세포 증식 억제 효과임을 알 수 있다.

요 약

김 가공 후 발생하는 자투리 김으로부터 porphyran을 추출(13.9% 수율)하고, 이를 청국장에 첨가하여 porphyran-청국장을 제조하고 이의 항암활성을 조사하였다. Crude porphyran의 암세포에 대한 증식억제효과는 AGS와 HT-29에서 모두 농도가 증가할수록 농도 의존적으로 높은 억제율을 나타내었다. Crude porphyran의 정상세포 BJ에 대한 세포

독성은 거의 없는 것으로 관찰되었으며 0.25 mg/mL의 농도까지는 농도 의존적으로 세포성장효과를 보였다. *Bacillus subtilis* DJI으로 제조한 청국장의 물 추출물과 메탄올 추출물의 세포증식에 미치는 효과를 살펴보았다. 정상세포 BJ에 대해 청국장 물 추출물의 경우 0.5 mg/mL의 농도에서는 최고 153%의 생존율을 나타냈으며, 메탄올 추출물의 경우 동일 농도에서 140%의 생존율을 보여 청국장이 정상세포에 대해 세포성장효과가 있는 것으로 관찰되었다. Porphyran-청국장의 정상세포 BJ에 대한 세포독성을 관찰한 결과 물, 메탄올 추출물 모두 독성이 없었으며, 물 추출물의 경우 1.0 mg/mL 농도 처리 시 160%, 메탄올 추출물의 경우 0.25 mg/mL에서 최대 127%의 생존율을 보이므로 porphyran-청국장이 정상세포에 대해 세포독성이 없는 것으로 관찰되었다. 청국장 추출물과 porphyran-청국장 추출물의 암세포 증식 억제효과를 농도 1.0 mg/mL 구간에서 비교해보았을 때 porphyran을 첨가하지 않은 청국장 물 추출물에서 최고 17%, 메탄올 추출물은 24%의 AGS 세포증식억제효과를 나타내는 것에 비해, porphyran-청국장의 물 추출물과 메탄올 추출물은 최고 23%와 38%의 세포증식 억제효과를 각각 나타내었다. 장암세포 HT-29에 대해서는 porphyran을 첨가하지 않은 청국장 물 추출물에서 19%, 메탄올 추출물은 27%의 세포증식억제효과를 나타내는 것에 비해 porphyran-청국장의 물 추출물과 메탄올 추출물은 최고 27%, 32%를 각각 나타내었다. 이로부터 청국장과 porphyran-청국장의 물 추출물보다 메탄올 추출물이 더 높은 항암활성을 나타내며, 청국장보다 porphyran-청국장이 1.2~1.5배 더 높은 암세포 성장 억제율을 나타낼 수 있었다. 본 실험에서 김으로부터 유용한 기능을 가지고 있는 porphyran을 추출하여 항암활성 기능을 가지는 porphyran-청국장을 제조하여 그 우수성을 확인하였다. 앞으로 이러한 기능성 식품을 널리 이용하여 해조가공산업에 기여하고 부가가치를 향상시켜 새로운 소비를 창출할 수 있을 것으로 기대된다.

문 헌

1. Korea Ministry of Maritime Affairs and Fisheries. 2005. <http://www.momaf.go.kr/>
2. Jo KS, Do JR, Koo JG. 1998. Pretreatment conditions of *Porphyra yezoensis*, *Undaria pinnatifida* for functional alginate-tea. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27: 275-280.
3. Lahaye M. 1991. Marine algae as sources of fibers. Determination of soluble and insoluble dietary fiber contents in some sea vegetables. *J Sci Food Agric* 54: 587-594.
4. Anderson NS, Dolan TCS, Rees DA. 1965. Evidence for a common structural pattern in the polysaccharide sulphate of the *Rhosophyceae*. *Nature* 13: 1060-1069.
5. Peat S, Turvey JR, Rees DA. 1961. Carbohydrates of the red alga, *Porphyra umbilicalis*. *J Chem Soc* 1590-1595.
6. Yoshizawa Y, Enomoto A, Todoh H, Ametani A, Kamino-gawa S. 1993. Activation of murine macrophages by polysaccharide from marine algae (*Porphyra yezoensis*). *Biosci Biotechnol Biochem* 57: 1862-1866.

7. Park JH, Koo JG, Do JR, Yang CB, Woo SK. 1998. Effect of extraction temperature and pH on the chemical properties of crude porphyrin extracted from *Porphyra yezoensis*. *J Korean Fish Soc* 32: 127-131.
8. Jung KJ, Jung BM, Kim SB. 2002. Effect of porphyrin isolated from laver, *Porphyra yezoensis*, on liver lipid peroxidation in hyperlipidemic rats and on immunological functions in mice. *Korean J Food Sci Technol* 34: 325-329.
9. Hong SP, Koo JK, Jo KS, Kim DS. 1997. Physicochemical characteristics of water of alcohol soluble extracts from laver, *Porphyra yezoensis*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 26: 10-16.
10. Koo JK, Jo KS, Do JR, Park JH, Yang CB. 1995. Chemical properties of fucoidans from *Hizikia fusiformis* and *Sargassum fulvellum*. *Bull Korean Fish Soc* 28: 659-666.
11. Yamamoto I, Maruyama H. 1985. Effect of dietary seaweed preparation on 1,2-dimethylhydrazine-induced intestinal carcinogenesis in rats. *Cancer Lett* 26: 241-249.
12. Yamamoto I, Maruyama H, Moriguchi M. 1987. The effect of dietary seaweeds on 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene-induced mammary tumorigenesis in rats. *Cancer Lett* 35: 109-115.
13. Noda H, Amano H, Arashima K. 1989. Studies on the anti-tumour activity of marine algae. *Nippon Suisan Gakkaishi* 55: 1259-1264(a).
14. Noda H, Amano H, Arashima K. 1989. Antitumour activity of polysaccharides and lipids from marine algae. *Nippon Suisan Gakkaishi* 55: 1265-1271(b).
15. Yukihiko O, Masanobu K, Hideomi A, Hiroyuki N. 1998. Antitumor activity of oligosaccharides derived from *Porphyra yezoensis* porphyrin. *Nippon Suisan Gakkaishi* 64: 847-853.
16. Kwon MJ, Nam TJ. 2006. Porphyrin induces apoptosis related signal pathway in AGS gastric cancer cell lines. *Life Sciences* 79: 1956-1962.
17. Tanimoto H, Mori M, Motoki M, Torii K, Kadowaki M, Noguchi T. 2001. Natto mucilage containing poly- γ -glutamic acid increases soluble calcium in the rat small intestine. *Biosci Biotechnol Biochem* 65: 516-521.
18. Cheigh HS, Lee JS, Lee CY. 1993. Antioxidative characteristics of melanoidin related products fractionated from fermented soybean sauce. *J Korean Soc Food Nutr* 22: 570-575.
19. Lee BK. 1999. Immunomodulation material of fermented soybean products. *MS Thesis*. Yeungnam University, Korea.
20. Youn HK, Choi HS, Hur SH, Hong JH. 2001. Antimicrobial activities of viscous substance from *chungkukjang* fermented with different *Bacillus spp.* *J Food Sci Technol* 32: 1266-1270.
21. Kim SH, Yang JL, Song YS. 1999. Physiological functions of *chungkukjang*. *Food Indus Nutr* 4: 40-46.
22. ASTM E1064-04. Standard Test Method for Water in Organic Liquids by Coulometric Karl Fischer Titration.
23. KFDA. 2008. Code of Korea Food Regulation. Seoul. p 701-708.
24. AOAC. 2005. *Official Method of Analysis*. 18th ed. Association of official analytical chemists, Washington DC. p 35.1.14, 35.1.15, 35.1.26.
25. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28: 350-356.
26. Kim SJ, Moon JK, Kang SG, Jung ST. 2003. Extraction of porphyrin from decolored laver. *Korean J Food Sci Technol* 35: 1017-1021.
27. Schacterle GR, Pollack RL. 1973. A simplified method for the quantitative assay of small amounts of protein in biologic material. *Anal Biochem* 51: 654-655.
28. Dodgson KS, Price RG. 1962. A note on the determination of the ester sulfate content of sulphated polysaccharides. *Biochem J* 84: 106-110.
29. Yaphe W, Arsenault GP. 1965. Improved resorcinol reagent for the determination of fructose, and of 3,6-anhydrogalactose in polysaccharides. *Anal Biochem* 13: 143-148.
30. Tarr GE. 1986. *Methods of protein microcharacterization*. Shively JE, ed. Humana Press Clifton, New Jersey. p 155-194.
31. Krigbaum WR, Komoriya A. 1979. Local interaction as a structure determinant for protein molecules. *Biochem Biophys Acta* 576: 204-248.
32. Philip S, Ritsa S. 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening. *J Natl Cancer Inst* 82: 1107-1112.
33. Kim SJ, Ma SJ, Jang YS. 2005. Extraction and quality characteristics of porphyrin from laver (*Porphyra yezoensis*) waste. *Korean J Food Culture* 20: 446-450.
34. Kim BR, Han YB, Park KH. 1987. Changes of free sugar and free amino acid during the natto fermentation used by *Bacillus sp.* S.N.V 816. *J Kor Agric Chem Soc* 30: 192-197.
35. Choi UK, Son DH, Ji WD, Im MH, Choi JD, Chung UG. 1998. Changes of taste components and palatability during *chungkukjang* fermentation by *Bacillus subtilis* DC-2. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27: 840-845.
36. Lee EJ. 2004. Isolation and selection of main strain for *chungkukjang* fermentation and characteristics of *chungkukjang* fermented with selected strains. *PhD Dissertation*. Yeungnam University, Korea.
37. Lee MY. 2005. Quality and functional characteristics of *chungkukjang* fermented by *Bacillus sp.* isolated from commercial products. *MS Thesis*. Catholic University, Korea.
38. Park JH. 1995. Studies on the isolation and characterization of porphyrin from *Porphyra yezoensis*. *PhD Dissertation*. Hanyang University, Korea.
39. Lee KB. 2005. Studies on the enhancement of cancer preventive effects and antiobestic activities of Korean soybean-fermented foods. *PhD Dissertation*. Pusan National University, Korea.
40. Jang Ym. 2004. Research on quality improvement of *chungkookjang* (fermented soybean pastes) by *Bacillus subtilis*. *PhD Dissertation*. Sungshin Women's University, Korea.

(2008년 4월 7일 접수; 2008년 6월 25일 채택)