

된장의 *in vitro* Sulforhodamine B(SRB) Assay에 의한 암세포 증식 억제 효과

임선영 · 박건영 · 이숙희[†]

부산대학교 식품영양학과

Anticancer Effect of *Doenjang* in *in vitro* Sulforhodamine B(SRB) Assay

Sun-Young Lim, Kun-Young Park and Sook-Hee Rhee[†]

Dept. of Food Science and Nutrition, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

Abstract

Growth inhibitory effect of doenjang(Korean soypaste) methanol extracts in SRB assay using AGS human gastric adenocarcinoma cell, Hep 3B human hepatocellular carcinoma cell and HT-29 human colon cancer cell was studied. The treatment of *doenjang* methanol extracts(2mg/assay) to the AGS, Hep 3B and HT-29 cancer cells inhibited the growth of the cancer cells by 55%, 60%, and 71%, respectively. *Doenjang* methanol extracts exhibited the highest inhibitory effect among other soybean fermented foods and original materials in the SRB assay. In addition, to separate active compounds of *doenjang* methanol extracts, we fractionated the *doenjang* with hexane, methanol, dichloromethane, ethylacetate and butanol. Growth inhibitory effect on the AGS, Hep 3B, HT-29 and MG-63 cancer cells was the highest in the fractions of dichloromethane and ethylacetate among other solvent fractions of the *doenjang*. These results showed that some compounds contained in the fractions of dichloromethane and ethylacetate might play a role on the anticanceric effect of *doenjang*.

Key words: doenjang, SRB assay, human cancer cells

서 론

한국인의 식생활에서 주식인 쌀밥과 함께 빼놓을 수 없는 식품 중의 하나가 된장이다. 된장은 그의 제조법에 따라 재래식 된장과 개량식 된장으로 구분된다(1). 재래식 된장에는 간장을 얻고 난 부산물로 만든 전통된장이 있고, 된장만을 목적으로 담근 청국장, 막장 등의 숙성된장이 있다. 재래식 간장과 마찬가지로 재래식 된장은 콩만으로 메주를 꾸고 이것을 띄워 소금물에 담근다. 어느 정도 발효되면 간장은 걸러내 달이고 메주덩어리는 으갠 후에 소금을 더 넣어 항아리에 담아 두는데 이것이 된장이 된다. 재래식 메주를 띄울 때 자연 번식하는 세균인 *Bacillus subtilis*는 재래식 메주의 겉과 속에서 광범위하게 번식하면서 장이 숙성되는 동안 강력한 단백질과 탄수화물 분해 효소를 분비하여 원료 중의 탄수화물이나 단백질을 분해시키는 작용을 한다(2).

개량식 된장의 제법을 보면 쌀이나 보리쌀과 같은 전분질 원료에 단백질과 전분질을 잘 분해시키는 미생물로 알려진 황곡균 *Aspergillus oryzae*를 인공적으로 접종, 배양하여 고지를 만든다. 여기에 삶은 콩과 소금을 혼합하여 숙성시킨 다음 마쇄하여 제품을 만든다.

된장에는 아미노산 조성이 우수한 질 좋은 단백질이 많이 포함되어 있을 뿐만 아니라 지방 성분으로는 대부분 불포화 지방산 형태로 콜레스테롤 함유량이 낮으므로 동물성 지방질과는 달리 동맥경화나 심장질환 등을 유발할 염려가 없다. 오히려 linolenic acid 등은 콜레스테롤이 체내에 쌓이는 것을 방지하고 혈액의 흐름을 원활히 하는 역할을 한다(3-5). 재래식 된장은 자연 발효에 의해 제조되기 때문에 곰팡이 속의 오염 특히 강력한 발암물질인 aflatoxin B₁(AFB₁) 오염에 대한 우려가 있었으나, AFB₁ 생성균은 중온성균으로 여러 혼합균 주계에서는 경쟁력이 약하며, 콩단백질의 발효생산물

[†] To whom all correspondence should be addressed

인 암모니아, 아미노산 그리고 갈색색소, pH의 증가, 햇빛, 습의 첨가 등에 의해 파괴, 제거됨이 확인되었다(6-8). 반면, 된장은 그 원료가 콩이므로 콩으로부터 유래되어질 수 있는 물질들인 trypsin inhibitor(9-11), iso-flavone(12,13), phytic acid(14), saponin(15), lignan(16) 과 불포화 지방산(17)에 의해 항발암성 및 항암성을 가질 가능성이 있다. Lim 등(18)은 *in vitro* Ames 실험계 및 SOS 실험계에서 된장 메탄올 추출물은 다른 콩 관련 발효식품에 비해 항돌연변이 효과가 현저하게 높았음을 보고하였다. 된장의 암예방 효과는 된장을 끓인 후에도 있었으며, 여러 종류의 발암원에 대해 항돌연변이 활성이 확인되었다(19).

한편 항암성 물질을 검색하는 방법으로 암세포 억제 능력을 측정하는 *in vitro* 검색 방법인 sulforhodamine (SRB) assay가 있다. SRB assay의 장점으로는 단기간 내에 1,000개 이상의 항암제를 가지고 60종류의 인체 암세포에 대한 효과를 알아보는데 사용될 수 있으므로 기존의 MTT assay와 XTT assay에 비해 더 쉽고 더 빠르다. 또한 세포 수와 직선관계이며, 주위 환경의 변경에 덜 민감하고 중간 대사물에 영향을 받지 않는 안정한 end point를 제공해 준다(20-23).

본 연구에서는 *in vitro* 항암 실험으로 SRB assay에 의한 암세포 성장 억제 실험을 이용하여 된장의 항암효과를 콩 관련 발효식품 및 원료(콩, 밀가루)들과 비교하였으며 또한 된장을 극성이 다른 용매로 더욱 분획하여 각각 분획물들의 여러 인체 암세포 증식 억제 효과를 검토하였다.

재료 및 방법

시료

된장(콩 : 밀=7:3), 콩된장(100% 콩된장) 및 콩(US number 1 soybean)은 화영식품((주)대상)으로부터, 청국장(콩 : 대팥)은 한국청국장협회로부터 구입하였고, 미소(light yellow miso, 콩 : 쌀 : 소금=100 : 60 : 45)는 일반시장에서 Maruseng사의 제품을 구입하여 실험에 사용하였다. 된장과 콩된장은 3개월동안 숙성시킨 된장이었다.

시료의 조제

된장, 콩 된장, 미소 및 청국장은 동결 건조한 다음 분말화하였고, 콩 및 콩/밀가루는 건조상태에서 분말화하고 각각 5배의 메탄올을 넣고 3회 추출하였다. 회전식 진공 농축기(Buchi 011 & 461, Switzerland)를 이용하여 농축한 후 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹여 실험

함에 사용하였다.

된장의 용매 추출 및 분획

된장의 암세포 증식 억제 물질을 추출하기 위해 극성이 다른 용매로 더욱 분획하였다. 된장을 동결 건조한 후 분말(4,080g)로 만들었고, 헥산으로 3회 추출하고 얻어진 잔사물(3,975g)을 2배 메탄올로 95°C에서 환류 냉각기를 사용하여 3회 추출(836g)하였다(methanol soluble fraction). 회전식 진공 농축기를 이용하여 농축한 후, 다시 dichloromethane(디클로로메탄), ethylacetate(에틸아세테이트) 및 butanol(부탄올)로 분획하여 용매를 제거하고 각각 dichloromethane fr.(104g), ethylacetate fr.(27g), butanol fr.(91g) 및 aqueous fr.(614g)을 얻었다. 각각의 분획물들은 DMSO에 녹여 SRB assay에 의한 저해 실험을 행하였다.

사용 시약 및 기구

세포배양을 위해 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM), fetal calf serum(FCS), 0.05% trypsin-0.02% EDTA 그리고 100units/ml penicillin-streptomycin을 GIBCO사(USA)로부터 구입하여 사용하였다. 세포배양은 CO₂ incubator(Sanyo, model MCO96, Japan)을 사용하였다.

암세포 및 암세포 배양

인체 위암세포(AGS human gastric adenocarcinoma cell), 인체 결장암세포(HT-29 human colon cancer cell), 인체 간암세포(Hep 3B human hepatocellular carcinoma cell) 그리고 인체 골육암세포(MG-63 human osteosarcoma cell)는 한국 세포주 은행(서울의대)으로부터 분양받아 배양하면서 실험에 사용하였다. AGS, Hep 3B, HT-29, MG-63는 100units/ml의 penicillin-streptomycin과 10%의 FCS가 함유된 DMEM을 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양된 각각의 암세포는 일주일에 2~3회 refeeding하고 6~7일만에 phosphate buffered saline(PBS)로 세척한 후 0.05% trypsin-0.02% EDTA로 부착된 세포를 분리하여 원심 분리한 후 집적된 암세포에 배지를 넣고 피펫으로 암세포가 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 75mm³ cell culture flask에 10ml씩 일정수 분할하여 주입하고 계속 6~7일마다 계대 배양하면서 실험에 사용하였다. 계대 배양시 각각의 passage number를 기록하였고 passage number가 10회 이상일 때는 새로운 암세포를 액체 질소 탱크로부터 꺼내어 다시 배양하여 실험하였다.

Sulforhodamine B(SRB) assay

암세포를 96 well plate에 well당 40,000 cells/ml가 되도록 seeding하고 24시간 배양한 후 세포가 plate에 부착되면 시료 추출물 100μl를 첨가한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 이때 blank에는 시료와 10% FCS를 함유한 배지만 넣고 대조군에는 세포와 시료 대신에 DMSO를 첨가하였다. 배양 48시간 후에 배지를 제거한 후 PBS로 한번 씻은 후 50% trichloroacetic acid (TCA)를 첨가하여 4°C에서 냉장 방치하였다. 1시간 후 TCA를 제거하고 증류수로 5번 씻은 후 실온에서 건조시킨 후 0.4% SRB 100μl를 첨가하여 30분 동안 염색시켰다. 다음 1% acetic acid로 5번 씻은 후 다시 실온에서 건조시킨 후 0.01M tris base를 150μl를 첨가한 후 510nm에서 흡광도를 측정하였다(24).

통계분석

대조군과 각 시료로부터 얻은 실험 자료로부터 ANOVA를 구한 후 Duncan's multiple range test를 이용하여 통계 분석하였다.

결과 및 고찰

된장, 콩 관련 발효식품 및 콩의 SRB assay에 의한 억제 효과

Sulforhodamine B(SRB)는 두 개의 sulfonic group을 가진 밝은 핑크의 aminoxanthene염색액으로 단백질 염색에 널리 사용되어지는 bromophenol blue와 naphthol yellows와 유사하다. 약산성일 때 SRB는 trichloroacetic acid(TCA)로 고정된 세포내의 단백질 염기 아미노산 잔기와 결합하므로 세포의 밀도와 직선 관계이다(24). 본 연구에서는 암세포로 AGS 인체 위암세포, Hep 3B 인체 간암세포와 HT-29 인체 결장암세포를 이용하여 된장, 콩관련 발효식품, 콩 및 콩/밀가루의 메탄을 추출물에 대하여 SRB assay를 행하였다. 이들 메탄을 추출물들의 암세포에 대한 성장 저해 효과를 검토하기 전에 정상세포에 대한 독성효과를 살펴보았다. 실험 결과는 본 논문에 나타내진 않았지만 2mg/assay의 첨가농도에서는 어떠한 독성을 찾아볼 수가 없었다. Table 1은 AGS 인체 위암세포에 대한 된장, 콩관련 발효식품, 콩 및 콩/밀가루 메탄을 추출물의 SRB assay에 의한 저해 효과를 나타낸 것이다. 콩된장과 70% 콩된장 메탄을 추출물의 경우 2mg/assay 두어시 각각 53%, 55%의 저해 효과를 나타내었고, 원재료인 콩과 콩/밀가루 메탄을 추출물은 각각 48%, 35%의 저해 효과를

Table 1. Inhibitory effect of methanol extracts(2mg/assay) of doenjang, other soybean products and soybean on the growth of AGS human gastric adenocarcinoma cells in sulforhodamine B (SRB) assay that determined after 2 days of incubation at 37°C

| Samples | OD ₅₁₀ | Survival rate ⁵⁾ (%) | Inhibition rate(%) |
|-----------------------------------|-------------------------|---------------------------------|--------------------|
| Control | 0.99±0.02 ⁴⁾ | | |
| Doenjang(SF) | 0.45±0.01 ^d | 45 | 55 |
| SF(Soybean + flour) ¹⁾ | 0.64±0.03 ^b | 65 | 35 |
| Doenjang(S) | 0.47±0.01 ^d | 47 | 53 |
| S(Soybean) ²⁾ | 0.51±0.00 ^f | 52 | 48 |
| Miso ³⁾ | 0.54±0.02 ^e | 55 | 45 |
| Chongkukjang | 0.51±0.01 ^e | 52 | 48 |

¹⁾Soybean : flour=7 : 3, ²⁾Soybean(100%), ³⁾Light yellow miso

⁴⁾Means with the different letters beside symbols are significantly different at the 0.01 level of significance as determined by Duncan's multiple range test.

⁵⁾Survival rate(%) = $\frac{OD_{510} \text{ of treated cells}}{OD_{510} \text{ of control cells}} \times 100$

나타냈으므로 원재료보다 된장의 경우가 암세포 증식을 더 많이 억제시켰음을 살펴볼 수가 있었다(p<0.01). 또한 Hep 3B 인체 간암세포와 HT-29 인체 결장암세포에서는 AGS 인체 위암세포의 경우보다 높은 암세포 증식 억제 효과를 나타내었는데 된장 메탄을 추출물은 2mg/assay 첨가시 각각 60%, 71%의 저해 효과를 나타낸 반면, 일본 미소 메탄을 추출물의 경우 같은 첨가농도에서 각각 52%, 58%의 저해 효과를 가졌고, 콩/밀가루 메탄을 추출물 2mg/assay 첨가시에는 각각 33%, 44%의 저해 효과를 관찰할 수 있어 된장 메탄을 추출물의 SRB assay에 의한 저해 효과가 가장 높았음을 확인할 수가 있었다(p<0.01)(Table 2, 3). 한국 성인 남자 중 간암에 의한 사망이 크게 차지하고 있다는 보고와 관련해서 된장이 인체 간암세포 Hep 3B에 대한 저해 효과를 가진다는 결과는 암예방 식품으로서의 된장의 가치를 시사해 준다고 하겠다.

이상의 결과로부터 된장이 여러 종류의 미생물, 곰팡이류와 세균류들에 의한 발효과정을 거치는 동안 원재료인 콩에서는 없었던 혹은 함량이 적은 성분들이 생성되거나 증가되어 항암효과를 나타내는 것으로 추정되어진다.

된장 분획물들의 SRB assay에 의한 저해 효과

된장의 활성물질을 얻고자 극성이 다른 용매로 더욱 분획하여 된장 핵산 추출물, 메탄올 분획물, 디클로로메탄 분획물, 에틸아세테이트 분획물, 부탄올 분획물 및 수층을 얻었다. Table 4는 인체 위암세포인 AGS를

Table 2. Inhibitory effect of methanol extracts(2mg/assay) of doenjang, other soybean products and soybean on the growth of Hep 3B human hepatocellular carcinoma cells in sulforhodamine B(SRB) assay that determined after 2 days of incubation at 37°C

| Samples | OD ₅₁₀ | Survival rate ⁵⁾ (%) | Inhibition rate(%) |
|-----------------------------------|--------------------------|---------------------------------|--------------------|
| Control | 0.42±0.01 ^{a4)} | | |
| Doenjang(SF) | 0.17±0.01 ^d | 40 | 60 |
| SF(Soybean + flour) ¹⁾ | 0.28±0.00 ^b | 67 | 33 |
| Doenjang(S) | 0.19±0.01 ^c | 45 | 55 |
| S(Soybean) ²⁾ | 0.20±0.01 ^c | 48 | 52 |
| Miso ³⁾ | 0.20±0.01 ^c | 48 | 52 |
| Chongkukjang | 0.19±0.04 ^c | 45 | 55 |

¹⁾Soybean : flour=7 : 3, ²⁾Soybean(100%), ³⁾Light yellow miso

⁴⁾Means with the different letters beside symbols are significantly different at the 0.01 level of significance as determined by Duncan's multiple range test.

⁵⁾Survival rate(%)= $\frac{OD_{510} \text{ of treated cells}}{OD_{510} \text{ of control cells}} \times 100$

Table 3. Inhibitory effect of methanol extracts(2mg/assay) of doenjang, other soybean products and soybean on the growth of HT-29 human colon cancer cells in sulforhodamine B(SRB) assay that determined after 2 days of incubation at 37°C

| Samples | OD ₅₁₀ | Survival rate ⁵⁾ (%) | Inhibition rate(%) |
|-----------------------------------|--------------------------|---------------------------------|--------------------|
| Control | 0.55±0.01 ^{a4)} | | |
| Doenjang(SF) | 0.16±0.00 ^d | 29 | 71 |
| SF(Soybean + flour) ¹⁾ | 0.31±0.04 ^b | 56 | 44 |
| Doenjang(S) | 0.17±0.00 ^d | 31 | 69 |
| S(Soybean) ²⁾ | 0.17±0.00 ^c | 31 | 69 |
| Miso ³⁾ | 0.23±0.00 ^c | 42 | 58 |
| Chongkukjang | 0.23±0.02 ^c | 42 | 58 |

¹⁾Soybean : flour=7 : 3, ²⁾Soybean(100%), ³⁾Light yellow miso

⁴⁾Means with the different letters beside symbols are significantly different at the 0.01 level of significance as determined by Duncan's multiple range test.

⁵⁾Survival rate(%)= $\frac{OD_{510} \text{ of treated cells}}{OD_{510} \text{ of control cells}} \times 100$

이용하여 된장의 핵산 추출물 및 분획물들의 SRB assay에 의한 저해 효과를 검토한 것이다. 첨가농도 2mg/assay에서 된장의 핵산 추출물과 메탄올 분획물은 각각 46%, 44%의 저해효과가 있었으나 용매 분획에 의해 얻어진 디클로로메탄 분획물, 에틸아세테이트 분획물은 각각 63%, 59%의 저해 효과를 나타내어 핵산 추출물과 메탄올 분획물보다 높은 활성을 가졌다. 부착세포인 Hep 3B 인체 간암세포를 이용하여 된장의 분획물들의 SRB에 의한 저해 효과를 살펴본 결과는 Table 5와 같다. 된장의 메탄올 분획물을 2mg/assay로 투여했을

Table 4. Inhibitory effect of the solvent fractionated samples(2mg/assay) from defatted doenjang on the growth of AGS human gastric adenocarcinoma cells in sulforhodamine B(SRB) assay that determined after 2 days of incubation at 37°C

| Samples | OD ₅₁₀ | Survival rate ¹⁾ (%) | Inhibition rate(%) |
|-------------------------------------|--------------------------|---------------------------------|--------------------|
| Control | 0.41±0.02 ^{a2)} | | |
| Hexane ext. | 0.22±0.03 ^{cd} | 54 | 46 |
| MeOH sol. fr. | 0.23±0.12 ^c | 56 | 44 |
| CH ₂ Cl ₂ fr. | 0.15±0.01 ^e | 37 | 63 |
| EtOAc fr. | 0.17±0.01 ^{de} | 41 | 59 |
| BuOH fr. | 0.24±0.03 ^c | 59 | 41 |
| H ₂ O fr. | 0.32±0.02 ^b | 73 | 27 |

¹⁾Survival rate(%)= $\frac{OD_{510} \text{ of treated cells}}{OD_{510} \text{ of control cells}} \times 100$

²⁾Means with the different letters beside symbols are significantly different at the 0.01 level of significance as determined by Duncan's multiple range test.

Table 5. Inhibitory effect of the solvent fractionated samples(2mg/assay) from defatted doenjang on the growth of Hep 3B human hepatocellular carcinoma cells in sulforhodamine B(SRB) assay that determined after 2 days of incubation at 37°C

| Samples | OD ₅₁₀ | Survival rate ¹⁾ (%) | Inhibition rate(%) |
|-------------------------------------|--------------------------|---------------------------------|--------------------|
| Control | 0.55±0.03 ^{a2)} | | |
| Hexane ext. | 0.29±0.07 ^{bc} | 53 | 47 |
| MeOH sol. fr. | 0.25±0.14 ^{cd} | 45 | 55 |
| CH ₂ Cl ₂ fr. | 0.17±0.04 ^e | 31 | 69 |
| EtOAc fr. | 0.15±0.04 ^{de} | 27 | 73 |
| BuOH fr. | 0.27±0.03 ^c | 49 | 51 |
| H ₂ O fr. | 0.35±0.03 ^b | 64 | 36 |

¹⁾Survival rate(%)= $\frac{OD_{510} \text{ of treated cells}}{OD_{510} \text{ of control cells}} \times 100$

²⁾Means with the different letters beside symbols are significantly different at the 0.01 level of significance as determined by Duncan's multiple range test.

때 56%의 저해 효과를 나타내었으며, 분획물 중에서 에틸아세테이트 분획물은 73%의 가장 높은 저해 효과를 보였고 그 다음으로 디클로로메탄 분획물이 69%의 저해 효과를 가졌다. 다음으로 인체 결장암세포인 HT-29를 이용하여 된장 추출물 및 분획물의 SRB assay에 의한 저해 효과를 검토한 결과는 Table 6과 같다. 50% 이상의 저해 효과를 나타낸 것은 된장 핵산 추출물(51%), 메탄올 분획물(56%), 디클로로메탄 분획물(65%) 및 에틸아세테이트 분획물(63%)이었다. HT-29 세포에 대해서도 분획물들 중 디클로로메탄 분획물과 에틸아세테이트 분획물의 암세포 증식 저해 효과가 가장 컸다. Table 7은 인체 골육암세포인 MG-63을 이용하여 SRB

Table 6. Inhibitory effect of the solvent fractionated samples(2mg/assay) from defatted doenjang on the growth of HT-29 human colon cancer cells in sulforhodamine B(SRB) assay that determined after 2 days of incubation at 37°C

| Samples | OD ₅₁₀ | Survival rate ¹⁾ (%) | Inhibition rate(%) |
|-------------------------------------|--------------------------|---------------------------------|--------------------|
| Control | 0.43±0.03 ^{a2)} | | |
| Hexane ext. | 0.21±0.07 ^b | 49 | 51 |
| MeOH sol. fr. | 0.19±0.14 ^b | 44 | 56 |
| CH ₂ Cl ₂ fr. | 0.15±0.04 ^b | 35 | 65 |
| EtOAc fr. | 0.16±0.04 ^b | 37 | 63 |
| BuOH fr. | 0.23±0.03 ^b | 53 | 47 |
| H ₂ O fr. | 0.25±0.03 ^b | 58 | 42 |

$$^1)\text{Survival rate(\%)} = \frac{\text{OD}_{510} \text{ of treated cells}}{\text{OD}_{510} \text{ of control cells}} \times 100$$

²⁾Means with the different letters beside symbols are significantly different at the 0.01 level of significance as determined by Duncan's multiple range test.

Table 7. Inhibitory effect of the solvent fractionated samples(2mg/assay) from defatted doenjang on the growth of MG-63 human osteosarcoma cells in sulforhodamine B(SRB) assay that determined after 2 days of incubation at 37°C

| Samples | OD ₅₁₀ | Survival rate ¹⁾ (%) | Inhibition rate(%) |
|-------------------------------------|--------------------------|---------------------------------|--------------------|
| Control | 0.41±0.02 ^{a2)} | | |
| Hexane ext. | 0.10±0.02 ^d | 24 | 76 |
| MeOH sol. fr. | 0.15±0.04 ^d | 37 | 63 |
| CH ₂ Cl ₂ fr. | 0.08±0.02 ^d | 20 | 80 |
| EtOAc fr. | 0.13±0.04 ^d | 32 | 68 |
| BuOH fr. | 0.21±0.02 ^{bc} | 51 | 49 |
| H ₂ O fr. | 0.27±0.04 ^b | 66 | 34 |

$$^1)\text{Survival rate(\%)} = \frac{\text{OD}_{510} \text{ of treated cells}}{\text{OD}_{510} \text{ of control cells}} \times 100$$

²⁾Means with the different letters beside symbols are significantly different at the 0.01 level of significance as determined by Duncan's multiple range test.

assay에 의한 된장의 핵산 추출물 및 분획물들의 저해 효과를 검토한 것이다. 첨가농도 2mg/assay에서 된장 메탄올 분획물은 63%의 저해 효과를 보였으며 분획물들 중에서 디클로로메탄 분획물이 80%로 가장 높은 저해 효과를 보였으며, 에틸아세테이트 분획물의 경우 68%의 저해 효과를 나타내었다.

이상의 결과로부터 된장의 디클로로메탄 분획물은 여러 암세포 중에서 특히 인체 골육암 세포인 MG-63의 증식을 가장 크게 억제시켰으며 에틸아세테이트 분획물은 인체 간암세포인 Hep 3B에 대한 증식 억제 효과가 가장 컸다. 전체적으로 된장의 분획물 중에서 디클로로메탄 분획물과 에틸아세테이트 분획물의 SRB

assay에 의한 저해 효과가 가장 컸음을 살펴볼 수 있으며 이 두 분획물 속에 주요 활성 물질이 존재할 것으로 추정되어지며 두 분획물들에 함유되어 있는 활성 물질은 암세포의 종류에 대해 특이적으로 활성을 가지고 있다고 사료되어진다.

된장은 우리가 일상생활에서 자주 섭취하고 있는 대표적인 발효식품이라고 할 수 있으며 본 연구의 결과는 주식인 쌀밥과 함께 자주 섭취하고 있는 된장이 암세포 증식을 억제시키며 암을 예방할 수 있다는 정보를 제시해 주고 있다고 여겨진다. 된장의 원료가 콩인 것을 고려해 볼 때 디클로로메탄 분획물에는 linoleic acid, linolenic acid 및 sitosterol이 활성물질로 그리고 에틸아세테이트 분획물에는 genistein, genistin 및 soyasaponin 등이 그 활성물질로서 가능성이 있으나 이것에 대해서는 silica gel 및 thin layer chromatography를 이용한 분리 정제가 요구되어진다.

요 약

된장의 항암효과를 알아보기 위하여 *in vitro* SRB assay에 의한 저해 실험을 이용하여 된장, 콩관련 발효 식품 및 원료인 콩과 콩/밀가루의 항암효과를 비교, 검토하였다. AGS 인체 위암세포, Hep 3B 인체 간암세포 그리고 HT-29 인체 결장암세포에서 첨가농도 2mg/assay의 된장 메탄올 추출물은 각각 55%, 60% 그리고 71%의 SRB assay에 의한 저해 효과를 나타내어 다른 콩관련 발효식품 및 원료에 비해 항암 활성 효과가 높았다. 또한 된장의 활성물질을 분리하기 위해 극성이 다른 용매로 더욱 분획하여 얻어진 각각 분획물들의 SRB assay에 의한 암세포 증식 억제 효과를 검토하였다. 된장의 분획물들 중에서 디클로로메탄 분획물과 에틸아세테이트 분획물이 이상의 여러 암세포들의 증식 억제 효과가 가장 큰 것으로 나타났으며 디클로로메탄 분획물의 경우 인체 골육암세포인 MG-63의 증식을 크게 억제시켰으며 에틸아세테이트 분획물의 경우는 인체 간암세포 Hep 3B의 증식 억제 효과가 높았다. 이상의 결과로부터 된장은 다른 발효식품과 원재료 콩보다 더 큰 암세포 증식 억제 효과를 가지는 것으로 확인되었으며 디클로로메탄 분획물과 에틸아세테이트 분획물이 가장 높은 *in vitro* 항암활성을 보임을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 부산대학교 기성희 재원 학술연구조성비에 의한 연구로 연구지원에 감사드립니다.

문헌

1. 이서래 : 한국의 발효식품. 이화여자대학교 출판부(1986)
2. Kwon, O. J., Kim, J. K. and Chung, Y. G. : The Characteristics of bacteria isolated from ordinary Korean soy sauce and soybean paste. *J. Kor. Agric. Chem. Soc.*, **29**, 422(1986)
3. Illingworth, D. R. and Ullmann, D. : Effects of omega-3 fatty acids on risk factors for cardiovascular disease. In "Omega-3 fatty acids in health and disease" Lees, R. S. and Karel, M.(eds.), Marcel Dekker Inc., New York. p.39(1990)
4. Phinney, S. D., Odin, R. S., Johnson, S. B. and Holman, R. T. : Reduced arachidonate in serum phospholipids and cholesteryl esters associated with vegetarian diets in humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, **51**, 385(1990)
5. Endres, S., De Caterina, R., Schmidt, E. B. and Kristensen, S. D. : n-3 polyunsaturated fatty acids : update 1995. *Eur. J. Clin. Invest.*, **25**, 629(1995)
6. Park, K. Y., Lee, K. B. and Bullerman, L. B. : Aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* and its stability during the manufacture of Korean soy paste(*Doenjang*) and soy sauce(*Kanjang*) by traditional method. *J. Food. Prot.*, **51**, 938(1988)
7. Park, K. Y. and Lee, K. B. : Degradation of aflatoxin during manufacturing of *doenjang* and *kanjang* by traditional method. *J. Colle. Home Eco., Pusan Nat'l Univ.*, **13**, 49(1987)
8. Park, K. Y. and Lee, E. S. : Effect of ammonia and pH on the degradation of aflatoxin B₁ during the storage of Korean soy sauce(*kanjang*). *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **18**, 115(1989)
9. Kennedy, A. R. : The evidence for soybean products as cancer preventive agents. *J. Nutr.*, **125**, 733s(1995)
10. Kennedy, A. R. and Little, J. B. : Effects of protease inhibitors on radiation transformation *in vitro*. *Cancer Res.*, **41**, 2103(1981)
11. Kuroki, T. and Drevon, C. : Inhibition of chemical transformation in C3H/10T1/2 cells by protease inhibitors. *Cancer Res.*, **39**, 2755(1979)
12. Adlercreutz, C. H. T., Goldin, B. R., Gorbach, S. L., Watanabe, S., Hähälä, K. T., Hase, T. A. and Fotsis, T. : Soybean phytoestrogen intake and cancer risk. *J. Nutr.*, **125**, 757s(1995)
13. Jing, Y. and Waxman, S. : Structural requirements for differentiation-induction and growth-inhibition of mouse erythroleukemia cells by isoflavones. *Anticancer Res.*, **15**, 1147(1995)
14. Shamsuddin, A. M. : Inositol phosphates have novel anti-cancer function. *J. Nutr.*, **125**, 725s(1995)
15. Rao, A. V. and Sung, M. K. : Saponins as anticarcinogens. *J. Nutr.*, **125**, 717s(1995)
16. Adlercreutz, H. : Lignans and phytoestrogens. Possible preventive role in cancer. *Progress in Diet and Nutrition*, **14**, 165(1988)
17. Nicholson, M. L., Neoptolemos, J. P., Clayton, H. A., Talbot, I. C. and Bell, P. R. F. : Inhibition of experimental colorectal carcinogenesis by dietary N-6-polyunsaturated fats. *Carcinogenesis*, **11**, 2191(1990)
18. Lim, S. Y., Rhee, S. H. and Park, K. Y. : Inhibitory effect of linolenic acid on the mutagens-induced mutagenicities in Ames assay system and SOS chromotest. *Korean J. Life Science*, **5**, 121(1995)
19. Park, K. Y., Moon, S. H. and Rhee, S. H. : Antimutagenic effect of *doenjong*(Korean soy paste)-Inhibitory effect of *doenjang* stew and soup on the mutagenicity induced by aflatoxin B₁. *Environ. Mut. Carcino.*, **14**, 145(1994)
20. Alley, M. C., Scudiero, D. A., Monks, A., Hursey, M. L., Czerwinski, M. J., Fine, D. L., Abbott, B. J., Mayo, J. G., Shoemaker, R. H. and Boyd, M. R. : Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.*, **48**, 589(1988)
21. Scudiero, D. A., Shoemaker, R., Paull, K., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T. H., Currens, M. J., Seniff, D. and Boyd, M. R. : 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(1988)
22. Venditti, J. M. : The national cancer institute antitumor drug discovery program, current and future perspectives : a commentary. *Cancer Treat. Rep.*, **67**, 767(1983)
23. Mosman, T. : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol. Meth.*, **65**, 55(1983)
24. Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, R., Paull, K., Vistica, D., Hose, C., Langley, J., Cronise, P., Vaigro-Wolff, A., Gray-Goodrich, M., Campbell, H., Mayo, J. and Boyr, M. : Feasibility of a high-flux anti-cancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.*, **83**, 757(1991)

(1998년 10월 24일 접수)