



저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#) 

2008年 2月

碩士學位 論文

Porphyran 첨가 청국장 추출물의
암세포 성장 억제효과

朝鮮大學校 大學院

食品營養學科

閔鉉京

Porphyran 첨가 청국장 추출물의
암세포 성장 억제효과

*Growth-inhibitory Effects of the Porphyran-contained
Chungkookjang Extracts on Cancer cells*

2008年 2月 25日

朝鮮大學校 大學院

食品營養學科

閔鉉京

Porphyran 첨가 청국장 추출물의
암세포 성장 억제효과

指導教授 張 海 春

이 論文을 理學碩士學位申請 論文으로 提出함.

2007年 10月

朝 鮮 大 學 校 大 學 院

食 品 營 養 學 科

閔 鉉 京

閔 鉉 京의 碩士學位論文을 認准함

委員長 조선대학교 교수 _____ 印

委 員 조선대학교 교수 _____ 印

委 員 조선대학교 교수 _____ 印

2007 年 11 月

朝鮮大學校 大學院

목 차

<i>ABSTRACT</i>	VI
<i>LIST OF TABLES</i>	III
<i>LIST OF FIGURES</i>	IV
제 1 장 서 론	1
제 2 장 실험재료 및 방법	6
1. 실험재료 및 일반성분분석	6
1) 재료	6
2) 김의 일반성분 및 총당 분석	6
2. 김으로부터 crude porphyran의 추출	11
3. Crude porphyran의 화학성분 분석	13
1) 총당	13
2) 총 단백질	13
3) 황산기	13
4) 3,6-anhydrogalactose	14
4. <i>Bacillus subtilis</i> 종균을 이용한 청국장 제조	15
1) 원료	15
2) 청국장 제조용 종균 및 배양	15
3) 청국장의 제조	15
4) 청국장의 발효조건 조사	15
5. 청국장의 물리화학적 특성	17
1) 청국장의 아미노산 정량	17
2) 청국장의 평균소수도	19
3) 청국장의 물성분석	21
6. Porphyran첨가 청국장의 제조	21
7. Porphyran 첨가 청국장의 <i>in vitro</i> 암세포 억제효과	22

1) 시료의 준비	22
2) 세포배양	22
3) MTT assay에 의한 세포 생존율 측정	24
4) 통계처리	24
제 3 장 결과 및 고찰	26
1. 김의 일반성분 및 총당 분석	26
2. Crude porphyran의 수율과 화학성분 분석	28
3. 청국장 제조시 발효온도의 변화	31
4. 청국장의 물리화학적 특성	33
1) 청국장의 아미노산 정량	33
(1) 구성아미노산	33
(2) 유리아미노산	35
2) 청국장의 평균소수도	38
3) 청국장의 물성분석	40
5. Porphyran 첨가 청국장의 <i>in vitro</i> 항암실험	43
1) Crude porphyran의 암세포에 대한 성장 억제효과	43
2) 청국장의 암세포에 대한 성장 억제효과	46
3) Porphyran 첨가 청국장의 암세포에 대한 성장 억제효과	51
제 4 장 결 론	57
제 5 장 참고문헌	60

LIST OF TABLES

Table 1. Range of standard concentration solutions for Ca, Cu, Fe, K, Mg and Zn and their correlation coefficient	9
Table 2. Operation conditions for analysis of amino acids by HPLC	18
Table 3. Hydrophobicity indices of amino acids in four different methods	20
Table 4. The conditions of texture measurement of <i>Chungkookjang</i>	22
Table 5. Proximate composition of laver(<i>porphyra yezoensis</i>) product	27
Table 6. Identification of chemical properties of porphyran from laver(<i>Porphyra yezoensis</i>) waste	30
Table 7. Composition of total amino acid in <i>Chungkookjang</i>	34
Table 8. Composition of free amino acid in <i>Chungkookjang</i>	37
Table 9. Average hydrophobicity of <i>Chungkookjang</i>	39
Table 10. Hardness of <i>Chungkookjang</i> snack	42

LIST OF FIGURES

Figure 1. Flow chart for the preparation of crude porphyran from <i>Porphyra yezoensis</i>	12
Figure 2. Making process for <i>Chungkookjang</i>	16
Figure 3. A procedure of cytotoxicity assay using by MTT assay method	25
Figure 4. Crude porphyran	29
Figure 5. Changes in the temperature of <i>Chungkookjang</i> during fermentation time	32
Figure 6. <i>Chungkookjang</i> snack	41
Figure 7. Dose-dependent effect of porphyran on cancer cells viability	44
Figure 8. Analysis of photomicrographic morphological changes by 1 mg/ml porphyran in BJ, HT-29 and AGS cells	45
Figure 9. Effects of water extract and methanol extract from <i>Chungkookjang</i> on human gastric cancer cell viability	48
Figure 10. Effects of water extract and methanol extract from <i>Chungkookjang</i> on human colon cancer cell viability	49
Figure 11. Effects of water extract and methanol extract from <i>Chungkookjang</i> on human foreskin normal cell viability	50

Figure 12. Effects of water extract and methanol extract from <i>Chungkookjang</i> with 5% porphyran on human gastric cancer cell viability	53
Figure 13. Effects of water extract and methanol extract from <i>Chungkookjang</i> with 5% porphyran on human colon cancer cell viability	54
Figure 14. Effects of water extract and methanol extract from <i>Chungkookjang</i> with 5% porphyran on human foreskin normal cell viability	55
Figure 15. Morphological observations of BJ normal cell, HT-29 colon carcinoma cells and AGS gastric carcinoma cells after treated with methanol extracts 1.0 mg/ml from porphyran-contained <i>Chungkookjang</i>	56

ABSTRACT

Growth-inhibitory Effects of the Porphyran-contained Chungkookjang Extracts on Cancer cells

Min, Hyun Kyeng

Adviser : Prof. Chang, Hae Choon, Ph. D.

Department of Food and Nutrition,

Graduate School of Chosun University

This study was performed to determine the anti-cancer effects of porphyran-contained *Chungkookjang*, because *Chungkookjang* has been reported to stimulate cancer cell death. Porphyran is a major component of the red algae of the genera, *Porphyra tenera* and *P. yezoensis* from the *Porphyra* species. Porphyran is one of the sulfated polygalactans composed of galactose and 3,6-anhydrogalactose unit. Crude porphyran was efficiently extracted with 50 vol.(w/v) of 0.1 N HCl at 60°C for 3 hours. The chemical properties of porphyran from waste laver (*Porphyra yezoensis*) were measured. The yields of crude porphyran was 13.9%. Contents of total sugar, sulfate/total sugar, protein and 3,6-anhydrogalactose in the crude porphyran were 66.6%, 16.9%, 8.6%, and 16.1% respectively. The effects of porphyran on cytotoxicity to human normal cell line (BJ) and human cancer cell lines (AGS and HT-29) were examined. Porphyran caused a significant decrease in viability in both gastric cancer cells and colon cancer cells, however, did not affect the viability of normal cells. *Chungkookjang* a kind of fermented soybean pastes representing Korea's fermented food using soybeans has been known to be abundant source of proteins and lipids with digestability as fermented seasoning food and to have strong antimutagenic and cytotoxic effect on cancer cells. *Chungkookjang* was prepared by inoculating *Bacillus subtilis* into steamed soybeans

at 1%(v/w) concentration and fermenting at 37°C. Physio-chemical properties and in vitro anticancer effects of *Chungkookjang* which has porphyrin or not were investigated. The changes in temperature, total amino acid and free amino acid compositions, and average hydrophobicity during fermentation of the *Chungkookjang* were measured. The cytotoxicity effects of methanol extracts and water extracts from *Chungkookjang* or *Chungkookjang* combined with porphyrin were evaluated with MTT assay using human foreskin normal cell(BJ) and human cancer cells (AGS, HT-29). The anticancer effect of methanol extracts from both *Chungkookjang* and porphyrin containing *Chungkookjang* was more stronger than that of water extracts from same sources. All extracts did not affect the growth of normal cells. However, the methanol extract of *Chungkookjang* combined with porphyrin showed higher anticancer effects than that of *Chungkookjang* in both AGS and HT-29 cells.

제 1 장 서 론

해조류 양식 산업 가운데 김(*Porphyra spp.*)양식 산업은 2005년 수산통계연보에 의하면 연간 생산량 약 20만톤(습중량), 생산 금액 약 200백만 달러 이상으로 전 세계 김양식 생산량의 30%를 차지하는 규모로서 해조류 중 미역과 더불어 생산금액 및 생산량 측면에서 가장 중요한 해조류 중 하나이다(94). 그러나 최근 양식 및 가공 기술 발달로 김의 생산량은 많아지고 있으나 그에 비하여 소비는 증가되지 않으므로 공급과 소비의 불균형이 심화되어 김양식산업의 걸림돌이 되고 있다(22). 따라서 김 소비를 위해 다양한 신제품의 개발과 생리활성물질의 이용을 위한 기술연구가 요구되어지고 있다.

김은 홍조류의 김 과(species) 김 속(genus)으로 25종(74)이 알려지고 있으며, 우리나라 전 연안에는 11종 2아종의 서식 분포가 보고되고 있다(17). 김의 종류로는 참김(*Porphyra tenera*), 방사무늬 돌김(*P. yezoensis*), 둥근 돌김(*P. suborbiculata*) 등이 있으며, 그 중 우리나라에서 양식하는 김의 주종을 이루는 것은 방사무늬 돌김이다.

김은 해조류 중 독특한 맛과 냄새, 특유한 빛깔을 내며, 풍부한 영양가 때문에 애용되어 온 기호식품이다. 또한 김에는 당질, 각종 무기질과 비타민이 골고루 함유되어 있으며 단백질과 비타민 A가 특히 많이 함유되어 있고 특수성분으로는 비타민 B군, EPA(eicosapentaenoic acid), taurine등이 함유되어 있다(54).

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. 골격 다당은 다른 해조류와 달리 cellulose는 없고 β -1,4 mannan과 β -1,3 xylan으로 구성된 hemicellulose로 이루어져 있다(37,63).

Porphyran은 황산기를 함유하는 수용성 산성다당의 고분자물질로서 3,6-anhydrogalactose, 6-methylgalactose, D,L-galactose 및 ester sulfate로 구성되어 있어서 agarose의 조성과 매우 유사하나 황산기와 $-OCH_3$ 기의 함량의 차이가 있어 한천과 같은 겔화능을 나타내지는 않는다(3,58,71). 구조는 1,3결합한 β -galactose나 6-methylgalactose와 1,4 결합한 α -3,6-anhydro-L-galactose나 α -L-galactose-6-sulfate가 서로 교대로 이어져 있다. 홍조류에서 추출되는 다당으로서 agar나 carrageenan과는 3,6-anhydrogalactose와

6-methylgalactose, D,L-galactose를 기본 성분으로 하고 있는 점에서는 동일하나 구성 성분의 조성비 및 구조에서 차이가 있어 각기 서로 다른 독특한 이화학적 및 생리적 특성을 나타낸다(52,59).

Porphyran 등의 해조다당류는 식이 섬유 (dietary fiber)로서 역할을 하므로 이를 섭취할 경우 체내에서 식품의 에너지 밀도를 낮출 뿐 아니라 소화기관 내에 음식물이 머무는 시간을 줄이고, 대변을 부드럽게 하여 변비와 계실염(憩室炎)을 완화시키는데 도움을 주며(69), 비만과 대장암의 예방은 물론 혈중 콜레스테롤과 혈당을 낮추어 당뇨(21)나 관상심장질환(44)의 위험을 줄인다고 알려져 왔다. 또한 혈당의 급상승을 억제하며, 유용장내세균이 잘 번식할 수 있도록 하고 vitamin이 활발하게 합성되도록 한다는 사실이 밝혀지고 있다.

Porphyran의 생리활성에 관한 연구로는 1,4 위치에 결합하는 α -L-galactose-황산잔기가 면역부활 물질로서의 생물학적 활성기능을 갖는다는 보고가 있고, Yoshizawa(81,82)등에 의하면 *in vivo* 및 *in vitro*에서 porphyran이 macrophage를 활성화시키며, 이는 porphyran에 3,6-anhydrogalactose와 sulfate가 함유되어 있기 때문이고 porphyran의 조성에 따라 그 활성도 달라진다고 보고되었다. 조(8) 등은 김으로부터 열수 또는 묽은 염산에서 추출되어지는 porphyran을 많이 함유한 분획물이 쥐의 macrophage를 활성화하는 작용을 갖는다고 보고하였다.

또한 porphyran은 항산화 활성(36,86), 콜레스테롤 저하작용, 항균효과 및 항암효과(16,32,76,77)등의 생리효과를 가진다. 고지혈증을 유발한 흰쥐의 식이에 porphyran 용액을 1 ml씩 1일 1회 총 20일간 복강내에 투여한 경우에 혈청 중의 ALT(alanine aminotransferase), AST(aspartate aminotransferase), ALP(alkaline phosphatase) 및 LDH(lactate dehydrogenase)의 활성은 비 투여군보다 투여군이 낮았다. 10% porphyran 용액을 투여한 경우 간장의 superoxide dismutase 와 catalase 활성은 정상 수준으로 유의하게 감소하여 항산화효소활성을 낮추는 작용을 한다고 보고하였다(36). 항암 활성에 관한 연구에서는 Yamamoto 등(76,77)이 유방암과 장암을 인공적으로 유발시킨 쥐에게 *P. tenera*의 분말을 급여하여 종양 발생율이 현저히 줄었음을 보고했고, Noda 등(55,56)은 porphyran을 경구투여 하였을 때 높은 항종양효과를 나타냈다고 보고하였다. Osumi 등(84)도 porphyran 올리고당의 경우는 항종양활성을 가지는 것으로 보고하였다. 남(51)등은 porphyran이 정상세포의 성장에는 거의 영향을 미치지 않으나 AGS 위암세포에는 porphyran 농도가 증가할수록 암세포 사멸을 유도함을 보고하

였다. 또한 박(60)등은 인체 암세포주에 대한 cytotoxicity작용, macrophage의 활성증가 작용, 항보체의 활성증가를 나타내며 고지혈증을 유발한 흰쥐에서는 porphyrin의 급이량이 증가할수록 지방개선 효과의 효과가 있음을 나타냈다.

이와 같이 porphyrin은 혈당상승억제, 장내 유용세균의 증식 촉진, 혈중 콜레스테롤 농도 저하, 면역 증진, 항암 기능 등의 우수한 생리활성이 밝혀짐에 따라 기능성 식이 섬유 소재로서의 이용 가능성이 매우 높다. 최근에는 porphyrin을 이용한 기능성 식품 소재를 개발하기 위한 기초자료를 얻기 위해 구 등(33)은 단백 분해효소를 이용하여 효율적으로 단백질을 제거한 porphyrin을 제조하고 제단백된 포피란의 화학적 및 물성적 특성을 조사하기도 하였다.

콩을 원료로 한 우리나라의 대표적인 발효식품중의 하나인 청국장(*Chungkuk-jang*, korean traditional fermented soy food)은 다른 콩 발효식품인 된장이나 간장과는 달리 발효기간이 매우 짧고 단백질과 지방함량이 높은 식물성 고 영양식품이다(31,53).

청국장은 삶은 콩에 고초균(*Bacillus subtilis*)을 이용하여 이들이 생산하는 여러 효소의 작용으로 콩 단백질을 분해시키고 파, 마늘, 고춧가루, 소금 등을 가미하여 저장성을 부여한다(1). 또한 숙성 과정 중 단백질은 protease에 의해 peptone, polypeptide, dipeptide, amino acid가 되고, 탄수화물은 β -amylase에 의해 당으로 분해되어 소화되기 쉽게 하며 청국장 특유의 맛을 내는 동시에 levan form fructan과 polyglutamate의 중합물질인 끈적끈적한 점질물이 생성되면서 독특한 향미를 내게된다(23,27,43,87).

청국장 제조에 이용되는 고초균(*B. subtilis*)은 호기성이며 내열성과 내건성이 강한 포자 상태로 남기 때문에 삶은 콩에 섞게 되면 포자가 발아하고 번식하면서 생육한다. 최적 발아온도는 40°C 전후이며 여러 가지 효소를 분비하여 콩 성분을 분해한다. 영양 성분 중에서 glutamic acid는 점질물을 구성하는 polypeptide를 형성하는 중요한 기질이며 aspartic acid, alanine, arginine, proline, asparagine, glutamine등이 전구체로써 이용된다(91). 또한 고초균은 장내에서 부패균의 활동을 억제하여 부패균이 만드는 암모니아, 인돌, 아민 등 발암 촉진물질을 감소시키는 효과가 있는 동시에 유기산도 생성하므로 장을 자극해 소화활동을 활발하게 해주며 변비개선과 다이어트에도 탁월한 효과가 있다(90).

일본에서는 우리나라의 청국장과 유사한 납두균(*Bacillus natto*, *B. subtilis*)을 접종시켜 만든 전통 발효식품인 natto가 있는데 소화 정장작용이 우수할 뿐만 아니라 발효 과정 중 분비되는 nattokinase는 fibrin을 강력하게 분해하는 효소로 밝혀지면서 혈전용

해제로서의 이용도 기대되고 있다(2,70).

우리나라의 청국장 역시 이와 동일한 혈전 용해능과 면역기능강화 및 항산화 효과의 특성을 모두 가지고 있는데(7,30,38), 김 등(88)에 의하면 청국장과 natto로부터 혈전용해 균주를 분리하여 혈전용해능을 조사한 결과 청국장에서 분리된 균주가 가장 우수한 혈전용해능을 나타내어 일본의 natto보다 우수한 것으로 보고되었다.

청국장의 생리활성은 혈전용해능 이외에도 혈압 및 지질대사 개선효과(92,67,72), 항산화 효과(93), 면역기능 강화(38), 항 미생물효과(83), 노인성치매 예방 효과, 골다공증 억제 등의 성인병 예방 효과 등이 있음이 보고되었다. 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 알려져있다(89).

청국장의 항 돌연변이 효과 및 항암활성에 관한 보고는 이미 활발하게 연구되어 있다(5,11,15,75). 최근에 박 등(61)의 보고에 의하면 청국장이 인간 위암세포(AGS)의 증식을 억제하는 효과를 나타내며, 임(46)등은 대두, 된장, 청국장, 미소(일본된장)로부터의 메탄올 추출물을 인간 위암세포(AGS), 인간 간암세포(Hep3B), 인간 대장암세포(HT-29)에 처리하였을 때 모두 암세포의 증식을 억제함을 밝혔다. 또한 곽 등(35)은 5 종류의 용매별 청국장 추출물을 사용해서 인간 유방암세포(MCF-7), 인간 위암세포(SNU-638), 백혈구 혈액암 세포(HL-60)에 대한 성장억제효과를 검토한 결과 모두 암세포를 억제하는 효과가 크게 나타남을 보고하였고, 임(45)등은 검정콩 청국장의 암 예방효과를 밝혀냄으로서 청국장의 항암효과를 입증하였다.

청국장은 식품 자체가 가지고 있는 수많은 장점들에도 불구하고 쿼퀴한 냄새 등 관능성이 낮고 조미하지 않은 상태의 생청국장은 보관성이 떨어지는 등의 이유로 다른 부재료나 첨가물을 사용함으로써 영양성과 관능성을 높이려는 연구가 이루어져 왔다.

황기, 키토산, 감초, Yucca 추출물, 다시마, 홍삼, 키위와 무를 첨가한 청국장 등 다양한 기능성 청국장을 제조함으로써 불쾌취를 감소시키며, 영양성분을 증가시키고, 관능검사시 맛과 향이 더 좋은 경우가 보고되었고, 청국장의 품질개선에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다(10,18,19,29,79,80,85).

우리나라의 김 생산량은 양식기술의 발달로 꾸준히 증가하고 있지만 가격하락, 소비둔화로 인해 해조산업의 걸림돌이 되고 있다. 김 등의 해조가공산업의 낙후성 및 취약성을 극복할 수 있는 발전방안이 요구되고 있으며, 보다 구체적으로는 김 가공 중 발

생하는 미이용 김, 폐김 그리고 장기보존된 김 제품 등의 재활용 기술이 필요한 실정이다. 그러므로 김 또는 폐김으로부터 고부가가치 기능성물질의 개발과 그 활용을 통하여 새로운 소비시장 창출과 해조가공산업의 고부가가치화가 절실히 필요한 실정이다.

따라서 본 논문은 폐기용 김으로부터 여러 생리효능을 가지고 있는 porphyran을 추출하고, 이의 활용도를 높이기 위하여 종균을 이용하여 제조한 청국장에 porphyran을 첨가하여 porphyran첨가 청국장을 개발하였다. Porphyran의 일반적인 생리활성기능은 알려져 있으나 본 연구에서 폐기용 김으로부터 추출된 porphyran의 항암활성과 porphyran첨가 청국장의 추출물이 정상세포에 미치는 세포독성, 위암세포(AGS)와 대장암세포(HT-29)의 성장억제효과 등을 실험하여 porphyran 첨가 청국장의 항암활성효과 규명과 함께 김의 새로운 활용방안을 제시하고자 하였다.

제 2 장 실험 재료 및 방법

1. 실험재료 및 일반성분 분석

1) 재료

본 실험에 사용한 김(*Porphyra yezoensis*)은 전남 완도산으로 김 가공후 남은 자투리 가루 김을 사용하였다. 건조된 김은 miller (DA282-2, Artlon, Korea)로 분쇄한 후 20 mesh 체(Chung gye industrial MFG. Co., Korea)에 걸러 통과한 분말을 실험재료로 하여 4℃ 냉장실에서 밀봉 보관하면서 실험에 사용하였다.

2) 김의 일반성분 및 총당 분석

김의 일반성분은 AOAC법(4)에 따라 수분함량은 Karl-Fischer법, 조지방은 Soxhlet 추출법, 조단백질은 Kjeldahl법, 조회분은 550℃ 건식회화법, 무기질은 건식분해법으로 정량하였다. 탄수화물은 100-(수분 + 조지방 + 조단백질 + 조회분)의 식으로 계산하여 그 값을 표시하였다. 실험 결과에 오차를 줄이기 위해 각 3회 반복하여 평균을 내어 측정하였다.

(1) 수분

수분 함량은 Karl Fischer Moisture Titrator MKS-520(K.E.M, Japan)을 사용하여 측정하였다. 각 시료는 3회 반복하여 측정하였다.

(2) 조지방

시료 2~10 g을 달아 원통여과지에 넣고 검체 위에 탈지면을 가볍게 충전하여 이를 적당한 용기에 담아 100~105℃의 건조기에서 2~3시간 건조한 후, 데시케이터에서 식히고 soxhlet추출기의 추출관에 넣었다. Receiving flask에 무수에테르 약 1/2 용량을 넣어 장치하고 8시간 추출하였다. 추출이 끝난 후 냉각기를 떼고 추출관 속의 원통여

과지를 핀셋으로 꺼낸 후, 다시 냉각기를 모두 추출관에 연결하고 수욕상에서 가온하여 receiving flask 중의 에테르가 전부 추출관에 옮겨지면 flask를 떼어 수욕 중에서도 에테르를 완전히 증발시켰다. Receiving flask의 바깥을 거즈로 깨끗이 닦은 후, 98~100℃의 건조기에 넣어 약 1시간 향량이 될 때까지 건조한 다음 desiccator에서 식히고 칭량하였다.

조지방의 양은 다음 식에 따라 산출하였다.

$$\text{조지방 (\%)} = \frac{W_1 - W_0}{S} \times 100$$

W_0 : 받는 그릇의 무게 (g)

W_1 : 조지방을 추출하여 건조시킨 receiving flask (g)

S: 검체의 채취량 (g)

(3) 조단백질

Kjeldahl법으로 총질소 함량을 측정하였으며, 시료 0.5 g을 취하여 Kjeldahl flask에 분해촉진제($K_2SO_4 : CuSO_4 = 9 : 1$)를 시료 당 6 g과 진한 황산(98%) 15 ml을 가하여 가열 분해한 후 실온에서 방냉하고 Kjeldahl 분석기기(BuchiB-324/K-424/ 702 system, Buchi, Switzerland)를 사용하여 증류·중화시켰다. 이때 분리되어 나오는 암모니아를 3% 붕산용액에 포집한 후 0.1 N HCl로 적정하여 질소량을 구한 후 단백질 함량을 계산하였다. 각 시료는 3회 반복하여 측정하였으며, 대조구는 시료 없이 모든 과정을 동일하게 처리하여 실험하였다.

조단백질의 양은 다음 식에 따라 산출하였다.

$$\text{조단백질 (\%)} = \frac{1.4 \times (b-a) \times F \times N}{S \times 1000} \times 100$$

a: 바탕 시험에 소비된 0.1 N HCl 적정값(ml)

b: 시료 분해액에 대한 0.1 N HCl 적정값(ml)

F: 0.1 N HCl의 농도계수

N: 질소계수

S: 시료량(g)

(4) 조회분

회분의 함량을 분석하기 위해 회화로(furnace, Thermolyne F6010, Barnstead, Co., USA)의 온도를 550℃로 조절하여 세척된 회화용기를 회화로(550℃)에서 여러 시간 가열하고 desiccator에서 실온으로 냉각하여 항량이 될 때까지 이 조작을 반복하여 칭량하였다. 항량이 된 도가니에 준비된 시료를 정밀히 칭량하여 약 10분 정도 연기가 더 이상 발생하지 않을 때까지 탄화시켰다. 탄화시킨 도가니를 회화로로 옮겨 백색 또는 회백색의 회분이 얻어질 때 까지 가열하고 desiccator에서 실온으로 냉각시킨 후 항량이 될 때까지 칭량하였다. 각 시료는 3회 반복하여 측정하였으며, 회분의 함량은 다음 식에 의해 계산하였다.

$$\text{회분}(\%) = \frac{\text{회화 후 (회화용기 + 회분)의 항량 (g)} - \text{회화용기의 항량 (g)}}{\text{시료의 채취량 (g)}}$$

(5) 무기성분

김의 무기질 함량은 건식 분해법에 따랐다. 즉 시료 김을 회화용기에 취하여 버너에서 약 10분 정도 연기가 나지 않을 때까지 탄화시킨 후 550℃에서 회화시켰다. 회화시킨 회분을 방냉 후 소량의 물로 재를 적신 다음 10 ml의 염산용액(염산:증류수 = 1 : 1)을 가하여 수욕상에서 증발건고 시켰다. 건고시킨 시료에 용액(염산 : 증류수 = 1 : 3) 10 ml를 첨가하여 수분 동안 가열 후 100 ml mass flask에 여과(Advantec 여과지 No. 6)시켰다. 불용물은 여지와 같이 사용했던 회화용기에 옮겨 다시 탄화시킨 후에 다시 회화시켜 얻어진 회분을 물로 적셔서 염산용액(염산 : 증류수 = 1 : 3) 2 ml를 첨가하고 증류수 5 ml로 희석 후 수욕상에서 가온시켜 앞의 100 ml mass flask에 여과시켰다. 각 무기질에 따른 사용용매는 Ca은 1 N HCl에 LaCl₃가 1,000 ppm이 되도록 첨가하여 시험용액으로 사용하였고, Fe은 1 N HCl을, Zn, Mg, Cu는 0.5 N HNO₃을, K는 물로 희석하여 사용하였다. 이를 각 무기질에 따라 100 ml로 정용하여 시험용액으로 하였다. 각 무기질의 분석은 원자흡광광도계(atomic absorption spectrometer, AA-6300F, Shimadzu Co., Japan)를 이용하여 각 표준물질로서 검량선을 작성한 후 분석 정량하였으며 각 시료는 3회 반복하여 측정하였다(Table 1).

Table 1. Range of standard concentration of the solutions for Ca, Cu, Fe, K, Mg and Zn and their correlation coefficient

<i>Element</i>	<i>Concentration</i>			<i>Unit</i>	<i>Correlation coefficient</i>
	<i>std 1</i>	<i>std 2</i>	<i>std 3</i>		
<i>Ca</i>	0.5	1.0	2.0	ppm	0.9990
<i>Cu</i>	0.5	1.0	2.0	ppm	0.9993
<i>Fe</i>	0.5	1.0	2.0	ppm	0.9998
<i>K</i>	0.2	0.4	0.8	ppm	0.9997
<i>Mg</i>	0.1	0.2	0.4	ppm	0.9996
<i>Zn</i>	0.1	0.2	0.4	ppm	0.9995

(6) 총당

김의 총당은 Dubois 등의(50) phenol-sulfuric acid법으로 측정하였다. 시료는 건조 김 1 g에 0.1 N HCl 50 ml를 넣고 60℃에서 3시간 추출하여 여과하고 6 N NaOH로 중화하여 준비하였다. 즉 시료용액 200 µl에 5%(w/v) phenol (Fluka Co., USA) 200 µl를 넣은 후 농축 H₂SO₄ 750 µl를 넣고 10분 방치 후 25℃ water bath에서 10분 반응시킨 후 spectrophotometer (Ultrospec 2100 pro, Amersham Bioscience Co., England)를 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도는 실험에서의 오차를 줄이기 위해 각각 3번씩 반응시켜 측정하였다. 표준물질로는 glucose (GR, Junsei, Japan)를 사용하였다.

2. 김으로부터 crude porphyran의 추출

Crude porphyran의 추출은 Fig. 1에 나타난 것처럼 Kim 등(64)의 방법에 준하여 제조하였다. 건조된 김을 분쇄한 후 50배(w/v)의 0.1 N HCl를 가하여 60℃의 수욕조상에서 3시간 동안 교반하여 추출하였다. 추출액을 농축(Rotary vacuum evaporator, Tokyo Rikakikar Co., Japan)한 후 감압여과하여 얻어진 여액을 6 N NaOH를 이용하여 pH 7.0으로 조정 한 다음 중화된 여액에 3배(v/v)량의 에탄올을 가해 하룻밤 정치한 후 원심분리기를 사용하여 1,520 xg에서 15분간 원심분리 하였다. 침전된 다당을 소량의 증류수에 용해시키고 진공 동결건조(Samwon freezing engineering Co., Korea) 한 다음, 분쇄하여 crude porphyran 분말을 얻었다.

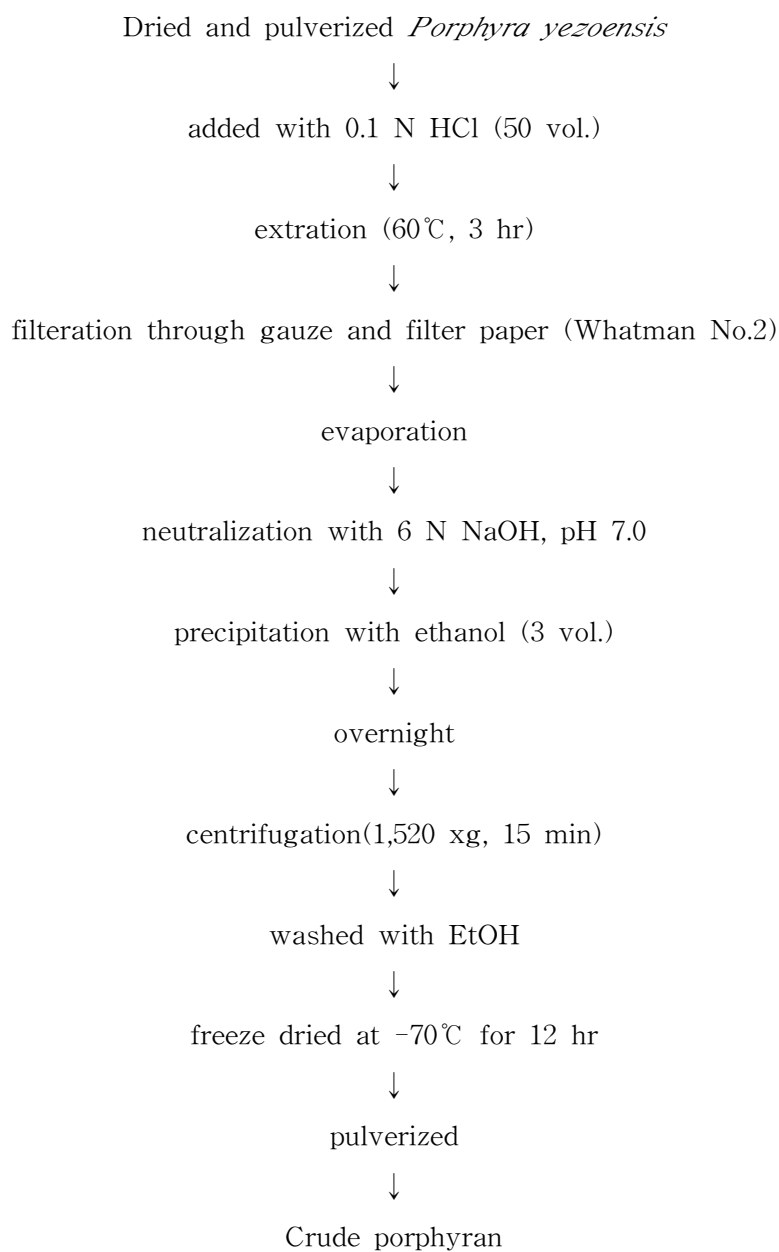


Figure 1. Flow chart for the preparation of crude porphyran from Porphyra yezoensis.

3. Crude porphyran의 화학성분 분석

1) 총당

추출한 crude porphyran의 총당 확인은 Dubois 등의(50) phenol-sulfuric acid법으로 측정하였다. 증류수에 용해시킨 porphyran용액 1 ml에 동량의 5%(w/v) phenol (Fluka Co., USA)을 가한 후 즉시 진한 황산 5 ml를 넣고 10분 방치 후 25°C water bath에서 10분 반응시킨 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도는 실험에서의 오차를 줄이기 위해 각각 3번씩 반응시켜 측정하였다. 표준물질로는 galactose (Acros, USA)를 사용하였다.

2) 총 단백질

Crude porphyran의 총 단백질은 Schacterle 및 Pollack(13)방법을 이용하여 측정하였다. 물에 용해시킨 porphyran용액 1 ml에 동량의 alkaline copper용액을 넣고 10분간 정치한 후 phenol working solution 4 ml를 즉시 가하여 55°C water bath에서 5분 처리한 후 즉시 식혀서 650 nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도는 실험에서의 오차를 줄이기 위해 각각 3번씩 반응시켜 측정하였다. 표준물질로는 bovine albumin (Fraction V, Sigma)을 사용하였다.

3) 황산기

황산기의 함량은 Dodgon 등(12)의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 시료 5 mg에 0.1 N HCl 2 ml를 가하여 100°C에서 6시간 가수분해한 시료 0.2 ml에 4% TCA 용액 3.8 ml와 BaCl₂-gelatin 용액 (젤라틴 1 g을 60~70°C의 증류수 200 ml에 녹여 12시간 보존한 젤라틴용액에 다시 BaCl₂ 1 g을 녹여 2~3시간 방치 후 사용) 1 ml를 첨가하여 교반하고 실온에서 20분간 방치한 후 360 nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도는 실험에서의 오차를 줄이기 위해 각각 3번씩 반응시켜 측정하였다. 표준 검량선은 K₂SO₄ (Extra pure, Junsei, Japan)를 사용하여 작성하였다.

4) 3,6-anhydrogalactose

3,6-anhydrogalactose의 함량은 Yaphe등(78)의 방법에 따라 측정하였다. 즉, ice bath 상에서 0.02% 시료용액 2 ml와 resorcinol reagent(0.15% resorcinol 용액 9 ml에 진한 염산 100 ml를 가하고, 여기에 1 ml의 1,1-diethoxyethane을 가하여 혼합한 후 3시간 이내 사용) 10 ml를 시험관에 가하여 교반하고 5분간 냉각시킨 후 20℃의 수욕조 상에서 4분간 정치하고 80℃ water bath에서 10분간 가열하였다. 다시 ice-bath에 넣어 냉각시킨 후 15분 이내에 555 nm에서 흡광도를 측정하였다. 3,6-anhydrogalactose의 함량은 fructose (Ultra, Fluka, USA)로 검량선을 작성한 후 구하였다.

4. *Bacillus subtilis* 종균을 이용한 청국장 제조

1) 원료

콩은 국내에서 생산되는 콩나물 콩을 사용하였다.

2) 청국장 제조용의 종균 및 배양

된장에서 분리한 *Bacillus subtilis* DJI(6)은 본 실험실에서 제공받아 사용하였다. 균은 LB배지(Duchefa biochemie, nutrient broth: bacto-tryptone 10%, yeast-extract 5%, sodium chloride 10%)에 균을 접종하여 37℃에서 배양한 후 종균액으로 사용하였다.

3) 청국장의 제조

청국장 제조과정은 Fig 2와 같다. 먼저 콩을 정선 및 수세하여 3배의 물에 20시간 침지하였다. 이를 고압 멸균기(1.0~1.5 kg/cm²)에서 50분 동안 증자한 후 40℃로 냉각하였다. 전배양한 종균액을 원료의 1%(v/w) 접종하고 37℃ incubator에서 발효시켰다.

4) 청국장의 발효조건 조사

청국장의 최적 발효조건을 조사하기 위하여 시간에 따른 발효온도를 SATO digital sensor (Datalogger, SATO keiryorki MFG. Co., LTD, Japan)를 이용하여 발효하는 동안에 10분 간격으로 온도를 기록하였다.

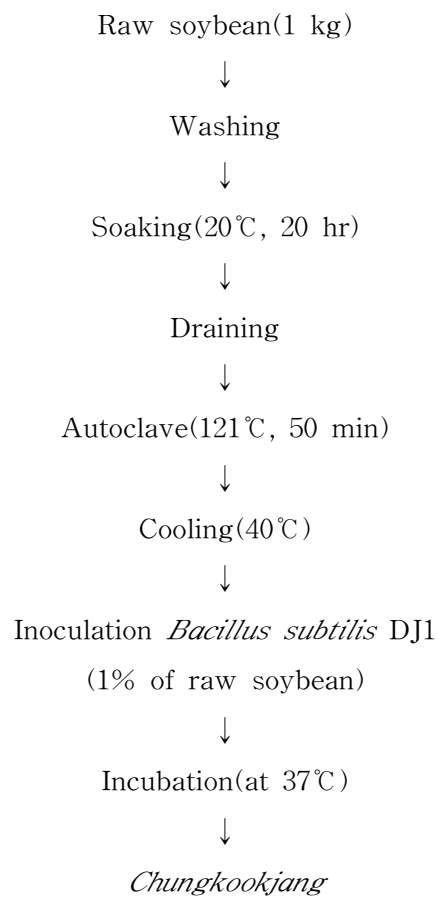


Figure 2. Making process for Chungkookjang.

5. 청국장지의 물리화학적 특성

1) 청국장지의 아미노산 정량

아미노산 분석은 분쇄한 건조시료를 끓인 6 N HCl로 가수분해 한 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(73), tryptophan 함량을 알기 위하여 시료를 4 N methanesulfonic acid 20 μ l 로 직접 분해시켰다(47).

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 유도화 한 후 유도화된 시료 800 μ l 중에서 10 μ l을 취하여 Table 2와 같은 조건하에서 HPLC로 분석하였고 유리아미노산은 6 N HCl로 가수분해를 행하지 않고 구성아미노산과 같은 방법으로 행하였다.

Table 2. Operation conditions for analysis of amino acids by HPLC

<i>Apparatus</i>	Waters System(510 HPLC pump with auto sampler)
<i>Column</i>	Waters Pico-tag column (3.9 × 300 mm, 4 μm)
<i>Mobile phase</i>	Buffer A : 140 mM sodium acetate(acetonitrile) Buffer B : 60% acetonitrile
<i>Detector</i>	Waters 996 photodiode array detector(PDA), 254 nm
<i>Gradient table</i>	A linear gradient : Elution of 0, 14, 20, 46, 100% Buffer B
<i>Flow rate</i>	1 ml/min at 40°C

2) 청국장의 평균소수도

평균소수는 각 청국장의 아미노산 몰수에 Nozaki와 Tanford (57), Manavalan 등 (48), Meirovitch 등(49) 및 Krigbaum 등(34)이 제시한 각 아미노산의 소수도지수를 곱해서 얻은 합을 각 펩타이드의 구성 아미노산 총 몰수로 나누어서 구하였다.

$$\text{평균소수도} = \frac{\sum A_i \times I_i}{\sum A_i}$$

다만 여기서 사용한 소수도 지수 중 Meirovitch(49)와 Krigbaum(34)이 제시한 값들은 각각의 역수를 취하여 숫자가 클수록 소수도 지수가 크게 나타나도록 표시하였다 (Table 3).

Table 3. Hydrophobicity indices of amino acids in four different methods

<i>Tanford</i> ¹⁾		<i>Manavalan</i> ²⁾		<i>Krigbaum</i> ³⁾		<i>Meirovitch</i> ⁴⁾	
<i>(Kcal/mol)</i>		<i>(Kcal/mol)</i>					
Trp	3.77	Val	4.86	Cys	4.52	Phe	3.30
Ile	3.15	Ile	4.82	Ile	3.07	Ile	3.14
Phe	2.87	Leu	4.05	Met	2.83	Val	2.83
Pro	2.77	Cys	4.05	Phe	2.60	Trp	2.53
Tyr	2.67	Met	3.54	Trp	2.33	Met	2.38
Leu	2.17	Phe	3.15	Val	1.76	Leu	2.24
Val	1.87	Trp	3.08	Tyr	1.53	Cys	1.84
Met	1.67	Tyr	2.57	Leu	1.28	His	1.72
Lys	1.64	Ala	2.12	Ala	1.05	Tyr	1.23
Cys	1.52	Gly	1.58	Thr	0.67	Ala	1.23
Ala	0.87	His	1.31	Ser	0.60	Gly	0.84
His	0.87	Glu	1.04	His	0.50	Arg	0.68
Arg	0.85	Arg	0.87	Asp	0.39	Thr	0.58
Glu	0.67	Thr	0.84	Gly	0.38	Pro	0.48
Asp	0.66	Pro	0.52	Glu	0.36	Asp	0.38
Gly	0.10	Lys	0.51	Arg	0.26	Glu	0.28
Ser	0.07	Ser	0.38	Pro	0.13	Ser	0.28
Thr	0.07	Asp	0.00	Lys	0.00	Lys	0.00

^{1)~4)} Each hydrophobicity index is referred to the references respectively, and the hydrophobicity indices by Krigbaum(34) and Meirovitch(49) were reciprocated.

3) 청국장의 물성분석

청국장을 제조한 후 생청국장 콩과 이를 건조한 건조청국콩의 물성을 texture analyzer(TA-XT Plus, Stable Micro Systems Ltd, England)를 사용하여 측정하였다. 제조된 청국콩의 물성측정시 탐침은 P2 탐침(2 mm cylinder stainless)을 장착하였으며, one bite 측정에 의한 경도(hardness)를 측정하였고, 분석조건은 Table 4와 같다.

6. Porphyran 첨가 청국장의 제조

상기의 방법대로 제조된 청국장에 crude porphyran 5%(w/w)을 첨가하여 porphyran 첨가 청국장을 제조하였으며 제조된 porphyran 청국장은 deep freezer(-70℃)에서 하룻 동안 보관 후 freeze dryer (Samwon freezing engineering Co., Korea)를 이용하여 건조시켜 진공포장 후 냉동실에 보관하면서 이후 실험에 사용하였다.

Table 4. The conditions for texture measurement of Chungkookjang

<i>Items</i>	<i>Conditions</i>
Instrument	Texture analyser
Sample size	wet : 5.18 mm × 10.31 mm dry : 4.97 mm × 9.79 mm
Probe	2 mm cyl. stainless
Pre test speed	2.0 mm/sec
Speed	1.0 mm/sec
Post test speed	10.00 mm/sec
Trigger type	Auto 5 g
Strain	80%

7. Porphyrin 첨가 청국장의 *in vitro* 항암실험

1) 시료의 준비

종균을 이용하여 제조된 청국장과 porphyrin 첨가 청국장은 동결건조된 시료를 마쇄한 다음 시료에 20배(w/v)의 메탄올, 물을 첨가하고 12시간 교반을 3회 반복한 후 여과(Whatman No. 2)하여 회전식 진공농축기로 농축하여 각각의 메탄올, 물 추출물을 얻었다.

위의 추출물과 김(*Porphyra yezoensis*)에서 추출한 crude porphyrin은 각 well 당 첨가되는 최종 농도가 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1 mg/ml가 되도록 조정하여 세포실험에 사용하였다.

2) 세포 배양

실험에 사용되어진 암세포주 AGS(human gastric adenocarcinoma cell), HT-29(human colon cancer cell)와 정상세포주 BJ(human foreskin normal cell)는 미국 세포주 은행(American Type Culture Collection, USA)에서 분양받아 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 6~7일 마다 계대배양하면서 실험에 사용하였다. 계대 배양시 각각의 passage number를 기록하였고 passage number가 10회 이상일 때는 새로운 세포를 액체질소 탱크로부터 꺼내어 다시 배양하여 실험하였다.

3) MTT assay에 의한 세포 생존율 측정

MTT assay는 살아있는 세포의 미토콘드리아 내막에 존재하는 *oxide-reductase* 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(62).

배양된 각각의 세포주는 96 well plate에 well 당 1×10^4 cells/ml가 되도록 180 μ l씩 seeding 하고 24시간 동안 37°C, 5% CO₂배양기에서 세포를 부착시킨 후 시료를 농도 별로 20 μ l씩 첨가하여 48시간 배양하였다. 여기에 인산생리식염수에 5 mg/ml의 농도로 제조한 MTT{3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide}용액 20 μ l를 첨가하고 4시간 더 배양한 후 생성된 formazan 결정을 DMSO에 녹여 Plate reader(UV scanning ELISA reader, BioTek, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다(68).

4) 통계처리

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

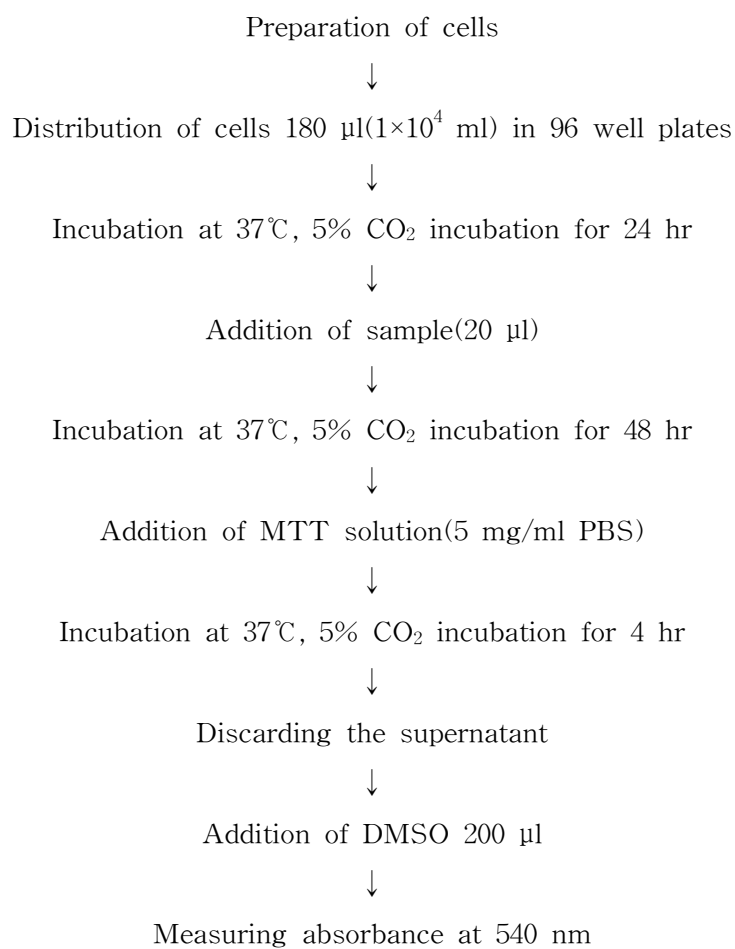


Figure 3. A procedure of cytotoxicity assay using by MTT assay method.

제 3 장 결과 및 고찰

1. 김의 일반성분 및 총당 분석

본 실험에 사용한 폐김의 일반성분 조성은 Table 5와 같다. 수분은 11.45%, 탄수화물은 47.26%, 단백질은 32.25%, 지방은 0.40%, 회분은 8.65%의 함량을 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.

총당의 함량은 15.2%로 김 등(65)이 보고한 폐김의 총당 함량(15.7%)과 유사하다. 또한 폐김의 총당 함량이 시판 김과 거의 동일 하게 함유되어 있다는 보고를 고려할 때 실험에 사용한 폐김으로부터 porphyran의 추출이 충분히 가능한 것임을 알 수 있었다.

*Table 5. Proximate composition of laver(*porphyra yezoensis*) product*

<i>Component</i>	<i>Content(%)</i>	<i>Component</i>	<i>Content(mg/100 g)</i>	
Moisture	11.45±0.20	Mineral	Ca	542.00±92.52
Carbohydrate	47.26		Fe	35.43±4.82
Crude Protein	32.25±0.22		Zn	2.19±0.11
Crude Fat	0.40		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

(dry weight basis)

2. Crude porphyran의 수율과 화학성분 분석

폐김으로부터 porphyran의 추출은 열수 또는 묽은 산을 이용하여 추출한 바가 있으나 본 실험에서는 0.1 N HCl를 사용하여 추출하였다(Fig. 4). 본 폐김으로부터 얻은 crude porphyran의 함량은 13.9%를 나타내어 김 등(64)의 보고 보다 조금 더 높은 함량(12.3%)을 나타내었다. Crude porphyran의 총당, 황산기, 3,6-anhydrogalactose의 함량은 Table 6과 같다. 총당은 66.6%, 황산기는 16.9%, 3,6-anhydrogalactose는 16.1% 및 단백질은 8.6%를 나타냈다. 이는 기존에 김 등(64)이 보고한 총당 63.7%, 황산기 16.9%, 3,6-anhydrogalactose 18.1%와 유사한 함량을 나타냈다.

Yoshizawa등(81)의 보고에 따르면, 쥐 식세포계의 *in vivo* 활성평가법(carbon clearance test)에 의해 활성을 연구한 결과 김의 porphyran을 주성분으로 하는 분획에 carbon clearance 향진활성이 있었고, 뿐만 아니라 묽은 염산 추출분획의 활성이 열수 추출 분획 보다 높은 수치를 나타냈었으며, 묽은 염산 추출 분획이 polystyrene latex beads를 이용한 평가법에서도 phagocytosis를 향진시켰다고 보고하였다. 또한 염산용액은 김의 엽체 조직을 파괴하여 porphyran의 추출이 용이해지도록 하며 점도를 떨어뜨려 여과가 잘되게 하는 효과(24) 등 추출의 수율과 생리기능성을 높이기 위해 염산용액을 이용하여 김으로부터 porphyran을 추출하였다.

Park 등(59)은 porphyran의 추출은 온도와 pH에 따라서 porphyran의 화학조성이 달라진다고 보고하였는데, 산성용액에서 추출하면 중성용액에 비하여 수율 및 황산기 함량은 더 높고 단백질 함량은 낮았으나 3,6-anhydrogalactose의 파괴에 의한 저분화가 일어난다고 보고하였다. 또한, 알칼리 용액에서 추출하는 경우는 황산기 함량이 줄어들고 단백질의 함량이 많아진다고 보고하였다. 그리하여 본 연구에서는 김 내에 존재하는 porphyran을 분자량의 변화 없이 추출하기 위해 60°C, pH 7.0의 조건으로 crude porphyran을 추출하였다(Fig. 4).

Dried and pulverized *Porphyra yezoensis*
Added with 0.1N HCl (50vol.)
Extracted (60°C, 3h)



Yield of crude porphyran: 13.9%



Figure 4. Crude porphyran.

Table 6. Identification of chemical properties of porphyran from laver(Porphyra yezoensis) waste

<i>Component</i>	<i>Content(%)</i>
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

3. 청국장 제조시 발효온도의 변화

본 실험실에서 분리한 *Bacillus subtilis* DJI을 가지고 청국장을 제조한 결과 청국장의 대두 발효과정 중 품온의 온도변화는 Fig. 5와 같다. 청국장의 제조시 50℃이상으로 올라갈 경우 암모니아취가 증가함을 선행연구를 통해 관찰하여 50℃를 넘지 않는 범위에서 발효하여 청국장을 제조하였다.

발효초기 온도는 38.8℃로 시작하여 발효 시작 2시간이 지나서 품온이 37.4℃까지 떨어진 후 다시 비교적 빠른 속도로 상승하기 시작하여 8시간만에 최고 온도(51.3℃)에 도달했는데 이 때 균의 증식이 활발하여 품온이 상승되는 것으로 간주되어진다.

이(40)의 보고에 따르면 볏짚을 사용한 재래식 방법으로 청국장을 제조하였을 때 50℃에서 시작하여 발효 시작 12시간에 품온이 40℃까지 떨어진 후 다시 상승하기 시작하여 발효 24간에 최고 품온 53.5℃까지 상승하였으며 이후 비교적 완만한 감소 추세를 보여 72시간(3일) 발효시 최종 품온이 48℃로 나타났다고 보고하였다.

본 실험실에서 제조한 종균을 이용하여 제조된 청국장은 기존의 재래식 청국장(2~3일)보다는 빠른 품온 상승이 이루어지는데 이것은 단일 발효 미생물이 초기부터 활발히 성장이 이루어지고 또 이들이 성장하면서 효소작용으로 콩 단백질, 탄수화물 등을 빠르게 분해하기 때문으로 생각된다.

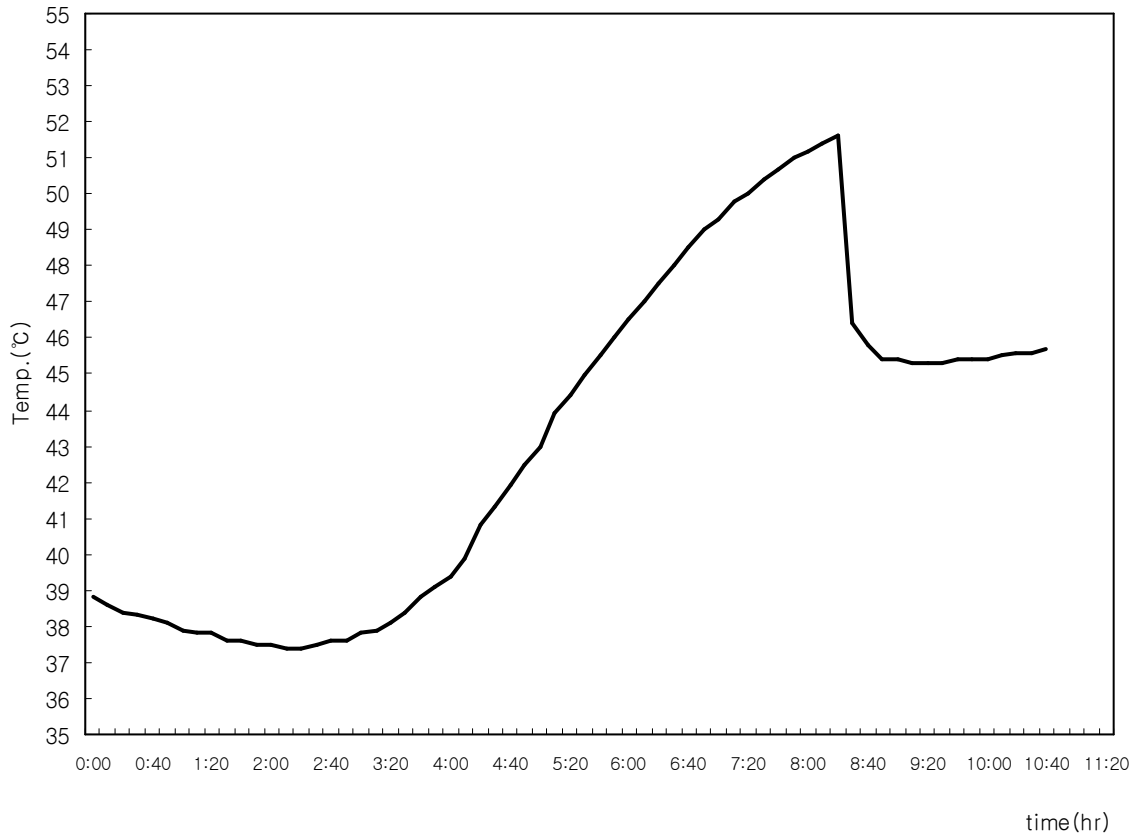


Figure 5. Changes in the temperature of Chungkukjang during fermentation time.

4. 청국장의 물리화학적 특성

1) 청국장의 아미노산 정량

(1) 구성 아미노산

Bacillus subtilis DJI을 이용하여 11시간 발효시킨 청국장의 구성 아미노산 함량을 측정 한 결과는 Table 7에 나타냈다. 청국장은 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 구성 아미노산 함량은 6,619.2 mg%로 나타났고, 총 필수 아미노산의 함량은 2,159.4 mg%로 나타났다.

Bacillus subtilis 균주로 제조한 청국장의 구성 아미노산에 관한 보고에서 정 등(25)은 균을 접종하여 5일간 발효시켰을 때 glutamic acid(4,440 mg%), leucine(3,164 mg%), aspartic acid(2,706 mg%), phenylalanine(2,640 mg%)의 순으로 함량이 높았다고 보고하였다. 본 실험의 결과와 비교할 때 청국장 전반의 맛을 좌우하는 glutamic acid의 함량이 가장 많은 것은 동일한 결과이나 각 아미노산의 함량이 상이하게 다른 것은 발효에 관여하는 균주와 발효시간 차이에 따른 결과로 생각된다.

Table 7. Composition of total amino acid in Chungkookjang

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

(2) 유리 아미노산

콩을 원료로 하여 제조한 청국장 발효과정에서 대두 중의 단백질들은 *Bacillus subtilis*가 분비하는 10여종의 protease작용으로 polypeptide → peptide → amino acid로 분해되어 소화흡수가 되기 쉬운 상태로 유리되고, 끈적한 점질물이 생성되어 청국장 고유의 독특한 맛과 향을 내게 된다(95). 이러한 유리 아미노산들은 청국장의 맛에 많은 영향을 미치는 성분들로 알려져 있다.

Bacillus subtilis DJ1을 이용하여 11시간 발효시킨 청국장의 유리 아미노산 함량은 Table 8과 같다. 청국장의 유리 아미노산 함량은 총 3,131.4 mg%로 나타났다. 또한 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 높은 함량을 나타냈다.

청국장에 함유된 필수 아미노산 중 threonine, isoleucine, leucine, methionine, phenylalanine, valine, histidine, lysine의 총 함량은 1,328.8 mg%로 조사되었다.

김 등(26)이 *Bacillus subtilis*을 이용, 24시간 동안 발효시켜 청국장을 제조하여 조사한 유리 아미노산의 함량이 glutamic acid(119.58 mg%), phenylalanine(112.34 mg%)의 순으로 많이 함유되었다는 결과와 비교해볼 때 본 실험에서 제조된 청국장에서도 유사한 유리 아미노산 함량이 검출되었다. 최 등(9)은 *Bacillus subtilis* DC-2를 이용하여 24시간 발효시켜 청국장을 제조한 결과 glutamic acid가 가장 높은 함량(184.24 mg%)을 가지고 있었고, 그 다음이 leucine(92.16 mg%), phenylalanine(84.50 mg%)순으로 나타났다고 보고하였다.

이(39)는 *B. subtilis* CH4-4, *B. subtilis* CH4-5 및 *B. subtilis* CH7-1로 48시간 발효시켜 제조한 청국장의 유리 아미노산 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 이(42)의 보고에 의하면 삶은 콩에 *Bacillus subtilis*를 2%(v/w)접종하여 48시간 발효시켜 제조한 청국장의 유리 아미노산은 총 8,725.4 mg%로 나타났으며, leucine, phenylalanine, isoleucine, serine, glutamic acid의 순으로 높은 함량을 가진 것으로 보고되어 본 실험결과와는 상이하게 달랐다. 이(42)의 보고를 제외하고 위의 연구된 *B. subtilis*의 균주로 제조된 청국장은 본 실험에서 제조한 청국

장과 비교했을 때 12~24시간 더 발효시켰음에도 불구하고 발효시간에 비해 유리 아미노산의 함량이 훨씬 적게 나타났다. 이는 본 청국장제조에 이용된 *B. subtilis* DJI이 위의 다른 종균에 비해 기질 이용능이 뛰어나 콩 단백질의 분해가 잘 일어나 유리아미노산의 함량이 높은 것으로 간주된다. 또한 이(42)의 청국장은 다른 청국장이 균을 1%(v/w)접종한 것에 반해 2%(v/w)를 접종하여 48시간 발효시켜 다량의 균이 충분한 발효시간을 거쳐 분해능이 더 좋아 아미노산의 함량이 많아진 것으로 사료된다.

청국장의 맛 성분들은 감미(sweet taste), 지미(savory taste or umami), 고미(bitter taste)등으로 나눌 수 있는데 유리 아미노산의 각 성분을 맛 종류별로 분류하여 알아본 결과 총 유리 아미노산 함량에 대한 유리 아미노산 각각의 비율은 단맛을 내는 아미노산이 10.96%, 지미성분이 19.94%, 고미성분은 17.71%를 나타냈다.

Table 8. Composition of free amino acid in Chungkookjang

<i>Taste</i>	<i>Amino acid</i>	<i>mg %</i>
Sweet	Threonine*	73.1
	Serine	41.2
	Glycine	38.5
	Alanine	105.4
	Lysine*	85.1
	Sub Total	343.3
Savory	Aspartic acid	28.4
	Glutamic acid	510.6
	Cysteine	85.6
	Sub Total	624.6
Bitter	Methionine*	187.8
	Isoleucine*	125.4
	Leucine*	241.4
	Sub Total	554.6
Other	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
	Sub Total	1,608.9
Total amino acid		3,131.4

* : Essential amino acid

2) 청국장장의 평균소수도

대두 단백질과 같은 몇 가지 단백질들은 가수분해에 의하여 강한 쓴맛을 형성하는데 이들 가수분해물의 쓴맛 물질은 올리고 펩타이드로 알려져 있으며, 펩타이드 분자를 구성하는 소수성 아미노산의 존재와 밀접한 관계가 있는 것으로 보고되고 있다.(28)

Nozaki와 Tanford, Manavalan 등, Meirovitch 등 및 Krigbaum 등이 제시한 각 아미노산의 소수도지수를 근거로하여 각 청국장장의 평균소수도를 구한 결과 Table 9와 같다. 상기 방법 중 Tanford법은 유리 아미노산을 대상으로 측정하였기 때문에 Tanford의 소수도지수로 구한 평균소수도는 유리 아미노산으로 그 함량을 측정하였다.

4가지 소수도지수를 근거로 하여 평균소수도를 구한 결과 유리 아미노산으로 측정한 Tanford법이 1,855.68 cal/mole으로 가장 높았고, Manavalan법이 1,652.82 cal/mole, Merovitch가 1,052.99 cal/mole 및 Krigbaum이 818.32 cal/mole를 나타냈다. 각 방법에 따라 평균소수도가 다르게 측정되어 그 유효성은 입증하기 어려우나 평균소수도를 이용하여 펩타이드의 쓴맛에 관해 연구하기 위해서는 펩타이드의 아미노산 서열분석이 필요할 것으로 사료된다.

Table 9. Average hydrophobicity of Chungkookjang

<i>amino acid</i>	<i>Tanford</i>	<i>Manavalan</i>	<i>krigbaum</i>	<i>Merovitch</i>
Cys	0.026512	0.059182	0.06605	0.026887
Asp	0.006695	0.000000	0.02023	0.019713
Glu	0.110475	0.200397	0.06937	0.053953
Ser	0.001304	0.020347	0.03213	0.014993
Gly	0.002437	0.180116	0.04332	0.095758
His	0.017474	0.036155	0.01380	0.04747
Arg	0.019026	0.027493	0.00822	0.021488
Thr	0.002042	0.047863	0.03818	0.033048
Ala	0.048897	0.104376	0.05170	0.060558
Pro	0.303255	0.097346	0.02434	0.089858
Tyr	0.185204	0.004678	0.00278	0.002239
Val	0.146220	0.266568	0.09654	0.155224
Met	0.099866	0.051958	0.04154	0.034932
Ile	0.143102	0.185354	0.11806	0.12075
Leu	0.189784	0.214716	0.06786	0.118757
Phe	0.295196	0.148500	0.12257	0.155572
Trp	0.212831	0.002677	0.00165	0.001796
Lys	0.045363	0.005096	0.00000	0.000000
<i>SUM(kcal/mole)</i>	<i>1.855684</i>	<i>1.652821</i>	<i>0.81832</i>	<i>1.052995</i>
<i>(cal/mole)</i>	<i>1855.684</i>	<i>1652.821</i>	<i>818.320</i>	<i>1052.995</i>

3) 청국장의 물성분석

청국장은 일반적으로 생청국장으로 섭취하였을 경우 심한 불쾌취와 점질물 식감의 거부감으로 인해 생 natto를 그대로 식용하는 일본의 natto와는 달리 찌개형태로 끓여 먹는 것이 일반적으로 이용되고 있다(66). 그러나 청국장을 가열조리 할 경우 생리활성 물질의 파괴가 일어나는데 생청국장을 5분 정도 끓이면 청국장의 발효균과 분해효소와 면역증강 효과가 있다고 알려져 있는 핵산(DNA)이 완전히 파괴된다고 한다(91). 그러므로 최근에는 생청국환 또는 생청국분말 형태로 판매되고 있기도 하지만 이들은 맛으로 먹는 기호성은 거의 없어 건강기능성식품 차원에서 약처럼 물과 함께 섭취하고 있다. 본 실험에서는 청국장이 가지고 있는 여러 영양 및 생리학적 특성을 이용하고, 생청국장의 식용방법 개선을 위해 청국장을 동결건조하여 스낵형태로 제조하였다(Fig. 6).

청국장 상태의 콩과 건조시킨 콩 스낵 형태로 제조한 청국장의 물성을 분석한 결과는 Table 10과 같다. 콩 스낵 형태의 청국장은 두 개의 peak이 생성되었는데 두 peak 모두 높은 경도를 지니고 있다. 이것은 입안에 씹었을 때 바스락거리며 부서지지 않고 약간의 탄성을 가지는 chewing의 질감을 지녀 새로운 형태의 스낵이 되므로 더 좋은 기호도를 가질 것으로 사료된다.

콩스낵의 물성을 비교해보기 위해 현재 시판되고 있는 청국콩스낵을 구매하여 그 물성을 비교해보았다(Table 10). 물성을 비교한 결과 시판 청국콩스낵 B의 경우 A청국스낵과 본 실험의 청국스낵 보다 경도의 값이 더 낮게 측정되었으며 관능시에도 바삭한 물성이 더 적게 나타남을 관찰할 수 있었다. A의 경우 두 개의 peak을 형성하는 경도가 본 실험의 경도와 유사한 값이 나왔으며 관능시에도 탄성을 지니는 비슷한 물성을 지녔다. 그러나 시판되는 청국콩스낵은 모두 바스락 부서지는 물성과 두 peak을 형성하며 탄성을 가지는 두 가지 형태의 물성을 가지고 있어, 균일하지 못한 물성을 가지는 것으로 보여진다. 이는 본 실험에서 제조된 청국스낵이 동일한 하나의 물성을 가지는 것과는 상이한 결과를 나타내어 본 실험의 청국콩스낵이 더 우수함을 알 수 있었다.



Figure 6. Chungkookang snack.

Table 10. Hardness of *Chungkookjang* snack

Sample	Sample size(mm) (depth, height)	Hardness	Force (g)
	Wet (5.18, 10.31)		61.13±5.319
B. DJI	Dry (4.97, 9.79)	First peak	1,710.35±78.20
		Second peak	1,250.10±161.07
A ¹⁾	6.37, 11.66	First peak	1,566.27±370.57
		Second peak	1,125.22±899.93
	6.42, 11.64	One peak	1,632.77±737.88
B ²⁾	6.61, 11.89	First peak	1,079.80±465.22
		Second peak	1,794.70±840.68
	6.73 , 12.55	One peak	1,286.00±329.83

¹⁾ Commercial *Chungkookjang* snack A

²⁾ Commercial *Chungkookjang* snack B

5. Porphyrin 첨가 청국장의 *in vitro* 항암실험

1) Crude porphyrin의 각 세포에 대한 성장 억제효과

Crude porphyrin의 정상세포 BJ(human foreskin normal cell)에 대한 세포독성과 AGS(human gastric cancer cell), HT-29(human colon carcinoma cell)에 대한 세포독성을 알아보기 위해 MTT assay를 실시하였다. 시료 대신 정상세포 BJ에는 DMEM을, 나머지 두 암세포에는 RPMI의 media로 처리하여 그 구간의 생존율을 100%(대조구)로 하여 배양세포의 생존율을 대조구에 대한 상대적 생존율로 구하였다.

BJ에 대한 porphyrin의 세포독성은 Fig. 7에서와 같이 0.25 mg/ml의 농도까지는 오히려 세포의 성장효과를 보여 0.05 mg/ml의 농도에서는 112.9%의 높은 생존율을 보였으며, 1 mg/ml의 농도에서도 73%의 생존율을 보였다.

Crude porphyrin은 상대적으로 0.005 mg/ml의 농도를 제외하고는 장암세포 HT-29보다 위암세포 AGS의 생육을 더 저해시키는 것으로 나타났고, 두 암세포 모두 porphyrin의 농도가 증가할수록 세포 성장 억제 효과가 뚜렷하게 나타났다. 특히 1 mg/ml의 농도에서는 HT-29와 AGS는 각각 56.22, 54.9%의 생존율을 가짐으로써 각각 43.78%, 45.1%의 높은 억제율을 나타냈다.

박(59)은 대장암세포인 WiDr에 porphyrin을 처리하여 4일 동안 배양하였을 때 0.5 mg/ml 처리시 43.2%의 생존율을, 1 mg/ml 처리시 32.6%의 생존율을 보임으로 porphyrin이 대장암세포의 성장을 억제시킴을 보고하였다.

위상차 현미경을 이용하여 김에서 추출한 porphyrin 1 mg/ml 첨가에 의한 세포형태 변화의 결과는 Fig. 8과 같으며, 특히 종양 세포주 HT-29와 AGS 세포의 경우 세포사멸 정도가 분명하게 나타난 것을 알 수 있었다. 따라서 porphyrin 농도가 1 mg/ml 이하에서는 정상세포인 BJ 세포의 생육에 다소 영향을 미치지만, 위암세포와 대장암 세포에는 특이적으로 세포 생육을 크게 저해시킴으로써 항암작용이 있는 것으로 확인되었다.

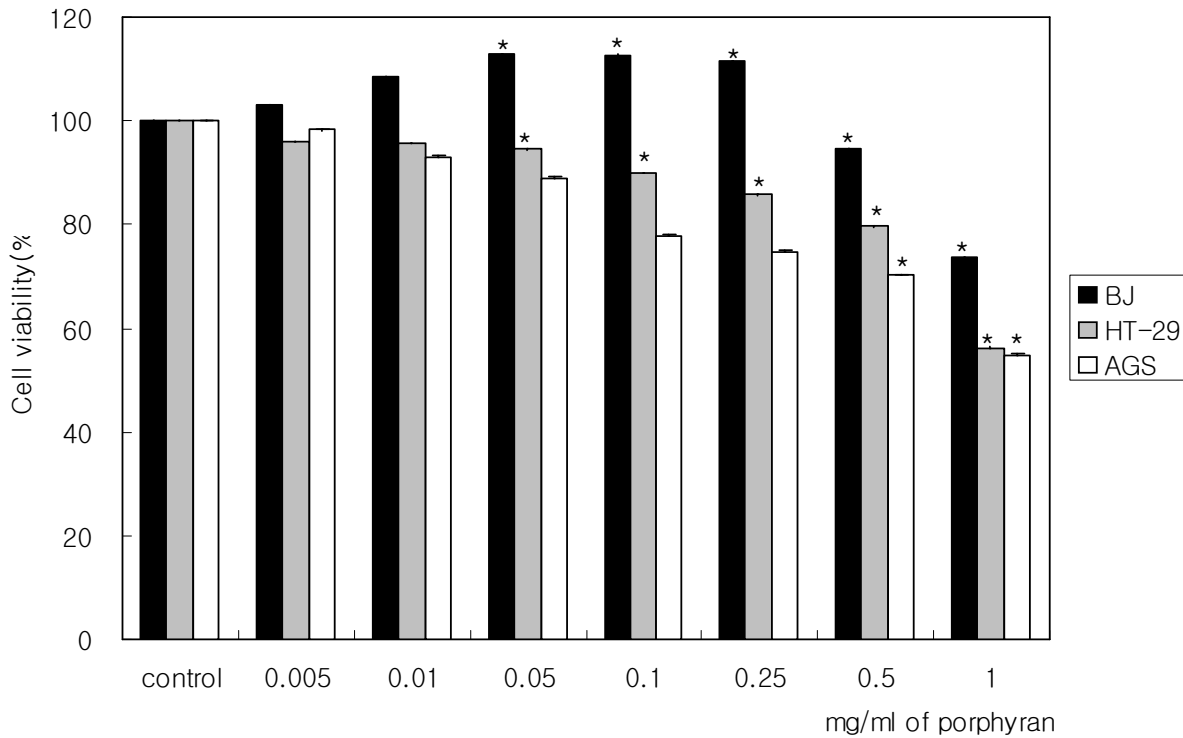


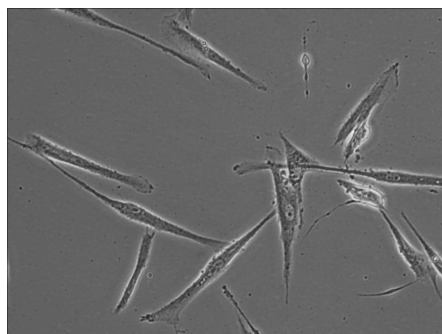
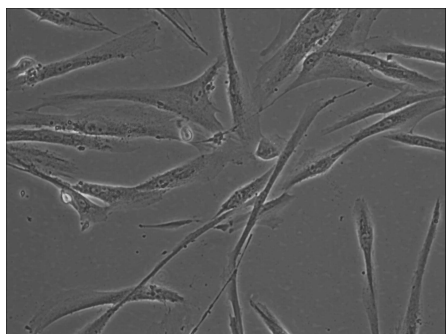
Figure 7. Dose-dependent effect of porphyran on cancer cells viability.

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, 0.01, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0 mg/ml) of porphyran for 48 hrs. After MTT assay, the MTT reduction rate was calculated as percentage.

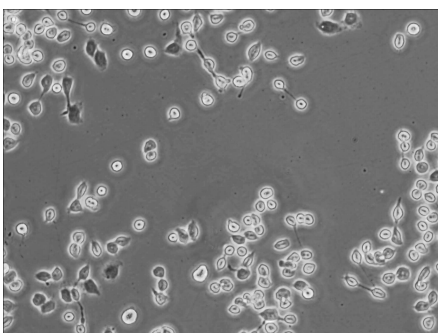
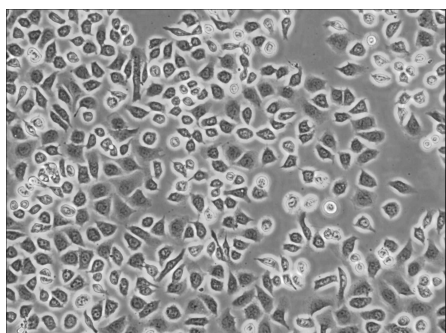
All values represent \pm S.D of three independent experiments. * $P < 0.05$

[control]

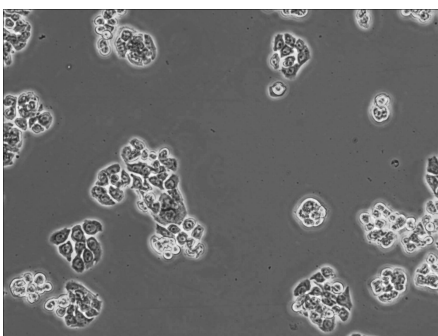
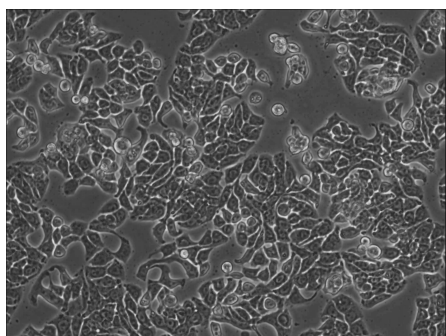
[treatment]



[BJ]



[AGS]



[HT-29]

Figure 8. Analysis of photomicrographic morphological changes by 1 mg/ml porphyran in BJ, HT-29 and AGS cells.

Photographs were taken with a phase-contrast microscope.

2) 청국장의 각 세포에 대한 성장 억제효과

소금을 첨가하지 않은 청국장을 물과 메탄올로 추출하여 제조한 시료를 농도를 달리 하여 정상세포 BJ에 대한 세포독성과 AGS(human gastric cancer cell), HT-29(human colon cancer cell)의 2종의 암세포에 투여하여 각각의 암세포주의 증식억제 효과를 관찰한 결과는 Fig. 9~11와 같다.

청국장의 각 추출물은 2종의 암세포에 대해 성장저해효과를 나타냈는데, AGS에 대한 청국장 추출물의 억제효과는 Fig. 9와 같다. 청국장 물 추출물의 AGS에 대한 성장 억제효과는 0.01 mg/ml의 농도까지는 94.20%의 생존율을 보여 억제율을 보이지 않았으나 0.05 mg/ml의 농도부터 1 mg/ml의 농도까지 대조구에 비해 10.25~16.79%의 억제율을 보였다. 청국장 메탄올 추출물의 AGS에 대한 성장억제효과는 0.005 mg/ml의 저 농도에서도 대조구에 비해 13.75%의 높은 억제율을 보여 0.05 mg/ml까지 14.95%의 비슷한 억제율을 보였으며 0.1 mg/ml의 농도부터 1 mg/ml의 농도까지 22.5~23.81%의 억제율을 보였다. AGS에 대한 청국장의 억제효과는 메탄올 추출물이 물 추출물보다 더 우수함을 관찰할 수 있었다. 특히 메탄올 추출물의 경우 저 농도인 0.005 mg/ml에서 물 추출물의 0.5 mg/ml의 농도와 비슷한 억제율을 보여 메탄올 추출물의 위암세포 억제효과가 뛰어난 것을 관찰할 수 있었다(Fig 9).

HT-29에 대한 억제효과는 Fig. 10과 같다. 청국장 물 추출물의 HT-29에 대한 성장억제효과는 0.1 mg/ml의 농도까지 92.75%의 생존율을 보여 억제율을 거의 나타내지 않았고, 0.25 mg/ml에서는 11.97%, 0.5 mg/ml에서는 19.11%, 1.0 mg/ml에서는 19.36%의 억제율을 보였다. 메탄올 추출물의 경우 0.01 mg/ml의 농도까지는 물 추출물과 거의 유사하게 억제효과를 나타내지 않았으나, 0.05 mg/ml의 농도부터 16.63%의 억제율을 보이고, 0.1 mg/ml에서 20.44%의 억제율을 보여 저 농도에서도 뛰어난 세포증식 억제효과를 나타냈다. 메탄올 추출물은 최고 1 mg/ml의 농도에서는 26.99%의 억제율을 나타내 HT-29에 대한 억제효과는 청국장의 물 추출물보다 메탄올 추출물에서 더 우수한 것으로 관찰되었다(Fig. 10).

청국장 물 및 메탄올 추출물의 BJ에 대한 세포독성은 Fig. 11에서와 같이 독성이 거의 없는 것으로 나타났다. 청국장의 물 추출물의 경우 0.005 mg/ml농도에서 103.75%의 생존율을 보였고, 농도가 0.01, 0.05, 0.1 mg/ml로 증가할수록 104.68%, 118.07%, 131.96%의 세포성장효과를 나타냈으며, 0.5 mg/ml의 농도에서는 153%의 높은 세포성

장효과를 보였다. 청국장의 메탄올 추출물도 정상세포 BJ에 대해 세포성장효과를 보였다. 0.005 mg/ml의 농도에서 103.22%의 생존율을 보여 물 추출물과 비슷한 생존율을 보였으며, 0.5 mg/ml까지의 범위 내에서는 농도 의존적으로 세포성장효과를 나타냈다. 메탄올 추출물의 경우 0.5 mg/ml의 농도에서 140.31%의 높은 생존율을 보였고 1.0 mg/ml의 농도에서는 물 추출물에 비해 생존율이 감소하지만 106.54%의 생존율을 나타냄으로 porphyran이 정상세포에 대해 세포독성이 없는 것으로 확인되었다(Fig. 11).

이와 같이 청국장은 정상세포에는 안전하나 두 종류의 암세포에는 증식억제효과를 나타냈다. 메탄올 추출물 중에서 저 농도(0.005~0.05 mg/ml)에서는 HT-29보다 AGS에서 더 증식억제효과가 뛰어났으나 농도가 증가할수록 HT-29 암세포 증식억제효과가 더 뛰어난 것으로 관찰되었다. 이는 고(14)의 연구에서 밝힌 청국장이 AGS 인체 위암세포가 HT-29 인체 결장암세포에서 보다 저해효과가 높다는 결과와는 상이함을 보였다.

청국장의 항암활성에 관한 연구보고로는 박 등(61)이 *B. subtilis*로 제조한 청국장의 메탄올 추출물이 AGS 암세포주에서 0.05 mg/ml의 농도에서 51%의 억제율을, 0.1 mg/ml의 농도에서는 64%의 억제율을 보고한 바 있다. 이는 본 실험 결과에 비해 상당히 높은 억제율을 보이는데 그 이유는 세포 실험에 사용된 청국장 시료로 제조된 청국장에 7%의 소금을 첨가하여 제조한 청국장을 시료로 사용하였고, MTT assay 시행시 세포를 부착시키지 않고 바로 시료를 첨가하여 실험한 것에 따른 차이로 여겨진다.

소금을 첨가하지 않은 생청국장을 이용하여 HT-29와 AGS에 대해 항암활성 실험에서 이(41)는 청국장의 메탄올 추출물을 0.25 mg/plate처리시 HT-29, AGS 각각 25%와 11%의 억제율을 보인다고 보고하였다. 또한 장(20)은 *B. licheniformis*를 이용하여 제조한 생청국장의 유선암세포(MDA-MB-231)와 악성피부암세포(SK-MEL 31)에 대한 항암효과를 보고하였는데, 유선암세포에서 0.5 mg/ml과 1 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 연구는 세포를 well당 1×10^4 cells/ml가 되도록 180 μ l 씩 seeding 하고 안정화시키지 않고 바로 시료를 처리한 것에 반해 본 실험에서는 세포를 안정화시키고 실험을 했음에도 불구하고 청국장 메탄올 추출물 0.25 mg/ml의 농도처리시 HT-29와 AGS에 대해 각각 24.21%, 20.30%의 억제율을 보여 그 억제효과가 뛰어난 것으로 관찰되어 본 청국장의 항암활성이 우수한 것으로 보여진다.

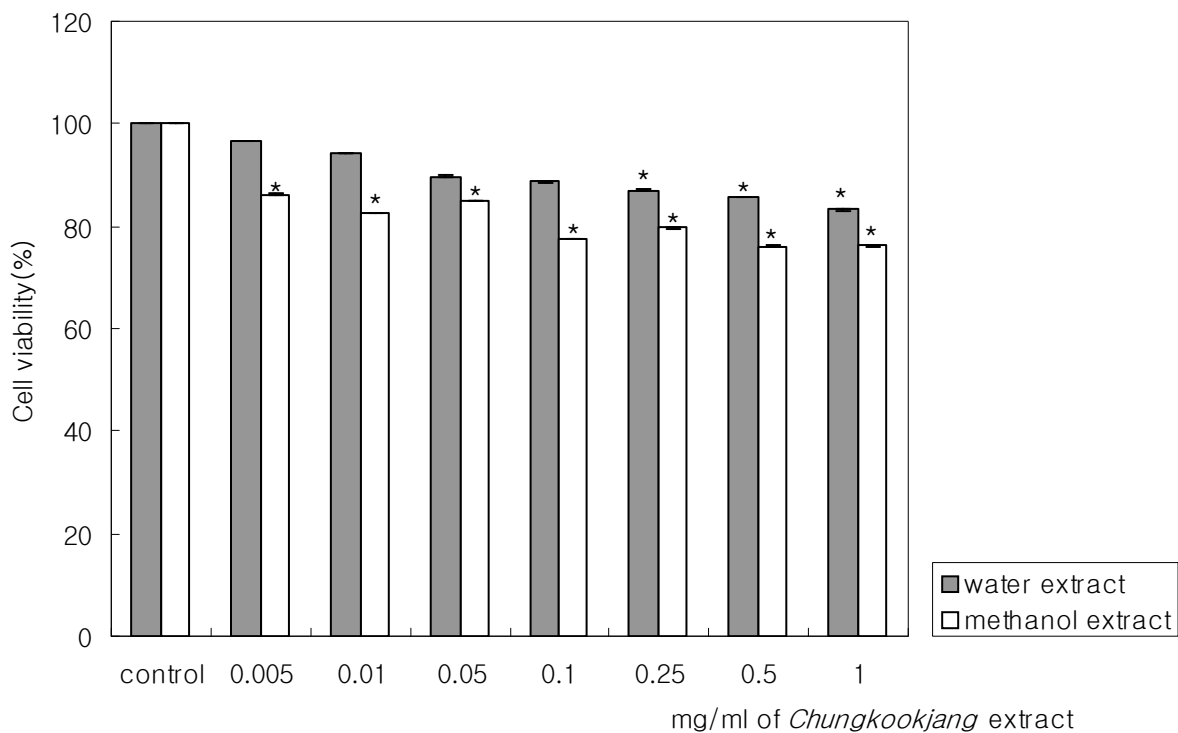


Figure 9. Effects of water extract and methanol extract from *Chungkookjang* on human gastric cancer cell viability.

AGS cells were exposed to different concentrations of *Chungkookjang* extracts for 48 hrs and then cell viability was assessed by MTT assay.

All values represent \pm S.D of three independent experiments. * $P < 0.05$

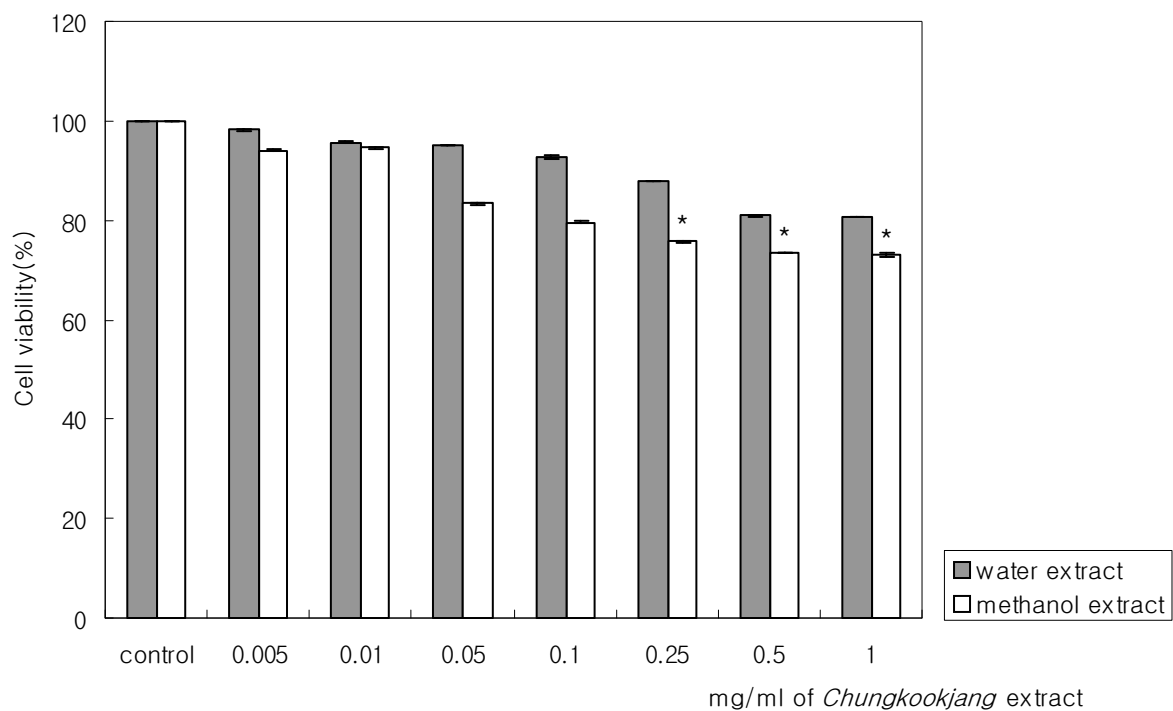


Figure 10. Effects of water extract and methanol extract from *Chungkookjang* on human colon cancer cell viability.

HT-29 cells were exposed to different concentrations of *Chungkookjang* extracts for 48 hrs and then cell viability was assessed by MTT assay.

All values represent \pm S.D of three independent experiments. * $P < 0.05$

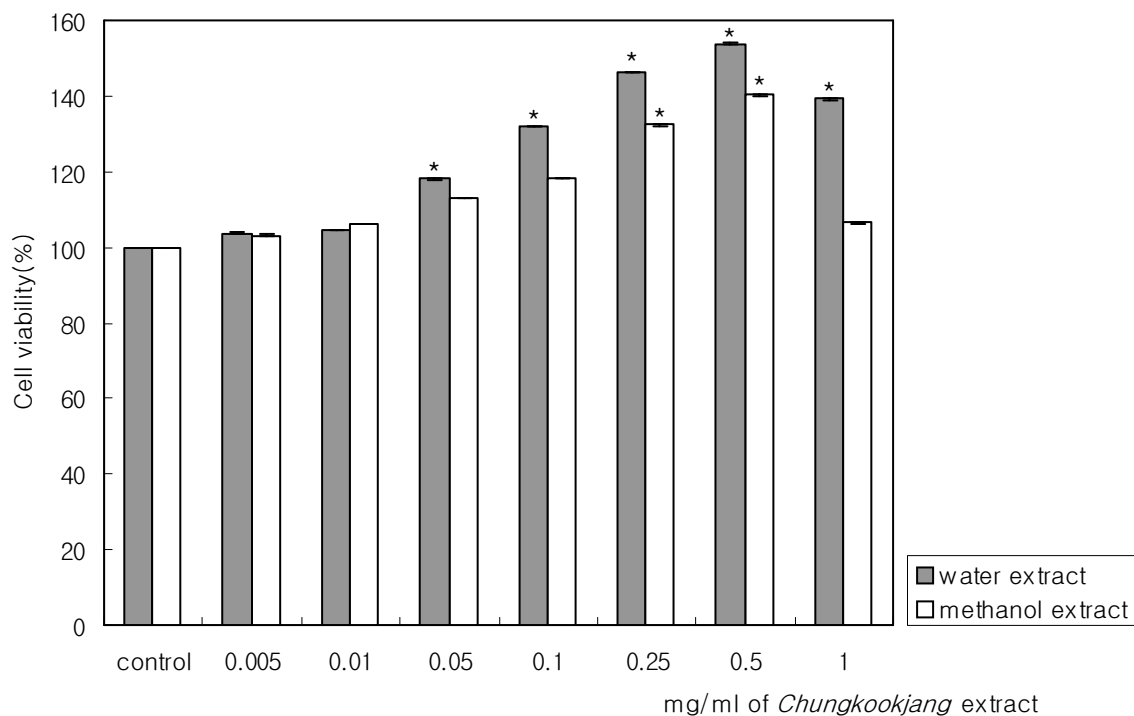


Figure 11. Effects of water extract and methanol extract from *Chungkookjang* on human foreskin normal cell viability.

BJ cells were exposed to different concentrations of *Chungkookjang* extracts for 48 hrs and then cell viability was assessed by MTT assay.

All values represent \pm S.D of three independent experiments. * $P < 0.05$

3) Porphyrin첨가 청국장의 각 세포에 대한 성장 억제효과

5%의 porphyrin을 첨가하여 제조된 청국장을 시료로 사용하여 농도별로 정상세포 BJ에 대한 세포독성과 AGS(gastric cancer cell), HT-29(colon cancer cell)의 2종의 암세포에 처리하여 각각의 암세포주에 대한 증식억제 효과를 관찰하였다.

Porphyrin 첨가 청국장을 메탄올과 물로 각각 추출하였을 경우 추출물 안에 함유되어있는 porphyrin의 함량은 1 mg/ml속에 메탄올에는 193 µg, 물 추출물에는 178 µg으로 측정되었다.

Porphyrin 첨가 청국장의 각 추출물은 2종의 암세포에 대해 성장저해효과를 나타냈으며, 위암세포 AGS에 대한 porphyrin 첨가 청국장의 증식억제효과는 Fig. 12과 같다. Porphyrin 첨가 청국장의 AGS에 대한 세포증식억제효과는 물 추출물의 경우 0.005 mg/ml~0.25 mg/ml의 농도까지 11.42~18.38%의 비슷한 억제율을 나타냈으며, 0.5 mg/ml와 1 mg/ml의 농도에서 각각 22.05%와 22.53%의 억제율을 나타냈다. 메탄올 추출물의 경우 0.01 mg/ml의 농도까지는 92.18%의 생존율을 나타내 물 추출물에 비해 억제율이 거의 없는 것으로 나타났지만 0.05 mg/ml~0.5 mg/ml의 농도부터는 11.92~21.03%의 억제율을 보이면서 물 추출물과 비슷한 억제율을 나타냈다. 그러나 1 mg/ml의 농도에서는 메탄올 추출물이 38.21%의 높은 억제율을 나타내 동일 농도의 물 추출물보다 성장저해효과가 더 뛰어남을 관찰했다(Fig. 12).

대장암 세포 HT-29에 대한 세포증식억제효과 Fig. 13과 같다. Porphyrin 첨가 청국장의 HT-29에 대한 세포증식억제효과는 물 추출물 보다 메탄올 추출물이 모든 농도에서 더 높은 억제효과를 보였다. 물 추출물의 경우 0.01 mg/ml의 농도까지는 생존율이 오히려 증가하는 100.85%로 억제효과가 없는 것으로 관찰되었으나 0.05 mg/ml의 농도부터 14.25%의 억제율을 보이면서 0.5 mg/ml에서는 19.89%, 1 mg/ml에서는 26.78%의 억제율을 보였다. Porphyrin 청국장의 메탄올 추출물에 대한 HT-29의 억제효과는 0.01 mg/ml의 농도까지는 95.73%의 생존율을 나타냄으로 거의 억제효과가 없었으나 이후 농도가 증가함에 따라 농도 의존적으로 억제효과를 보였다. 0.1 mg/ml의 농도에서는 18.57%의 억제율을 보였으며, 0.25~1.0 mg/ml의 농도에서는 30.41~32.27%의 높은 억제율을 나타냈다(Fig 13).

Porphyrin 첨가 청국장의 정상세포 BJ에 대한 세포독성은 Fig. 14와 같다. 정상세포 BJ에 대한 세포독성은 물, 메탄올 추출물 모두 독성이 없는 것으로 관찰되었다. 물 추

출물의 경우 0.01 mg/ml의 농도까지 101.93%의 생존율을 보여 약간 증가하는 경향을 보였으나 이후 농도가 증가하면서 0.1 mg/ml에서 1 mg/ml의 농도 처리시 123.94%, 146.39%, 156.72%, 159.99%의 아주 높은 생존율을 보여 농도 의존적으로 세포성장효과를 보였다. Porphyrin 첨가 청국장의 메탄올 추출물도 0.25 mg/ml의 농도까지 농도 의존적으로 세포성장효과를 보였으며 0.25 mg/ml에서 최대 126.89%의 생존율을 보였다. 이후 0.5, 1.0 mg/ml의 농도에서 생존율이 약간 감소하는 것으로 보이나 1 mg/ml의 농도에서 103.86%의 생존율을 보임으로 porphyrin 첨가 청국장의 메탄올 추출물도 정상 세포에 대해 독성이 없는 것으로 관찰되었다(Fig 14).

청국장 추출물과 Porphyrin 첨가 청국장 추출물의 암세포에 대한 억제효과를 비교해보기 위해 동일 최대 농도인 1 mg/ml로 비교해보았다. 위암세포인 AGS의 경우 물 추출물에서 청국장은 16.79%, porphyrin 첨가 청국장은 23.81%의 억제율을 보였고, 메탄올 추출물에서는 청국장은 23.81%, porphyrin 첨가 청국장은 38.21%의 억제율을 보였다. 장암세포 HT-29에 대해서는 물 추출물에서 청국장이 19.36%, porphyrin 첨가 청국장은 26.78%의 억제율을 보였고, 메탄올 추출물에서 청국장이 26.99%, porphyrin 첨가 청국장이 32.27%의 억제율을 보였다. 이와 같이 porphyrin 첨가 청국장은 청국장에 비해 AGS와 HT-29에 대해 세포성장억제효과가 더 뛰어난 것으로 관찰되었다. 또한 물 추출물에 비해 메탄올 추출물이 더 뛰어났고 가장 억제효과가 높게 나타난 처리구는 위암세포 AGS에 대해 porphyrin 첨가 청국장 메탄올 추출물 1 mg/ml 처리시 38.21%의 억제율을 보이므로 암세포에 대한 성장억제효과가 우수함을 관찰할 수 있었다.

Fig. 15는 위상차 현미경을 이용하여 porphyrin 첨가 청국장의 메탄올 추출물을 각 세포에 1 mg/ml의 농도로 처리하였을때 세포형태 변화의 사진을 나타낸 것이다. 각 대조구에는 시료를 처리하는 대신 세포에 해당되는 배지로 처리하였다. Fig. 15을 보면 처리구의 정상세포 BJ의 생육에는 거의 영향을 미치지 않으며, 위암세포와 대장암세포는 정상적으로 성장하지 못하고, 세포밀도가 감소하는 현상을 관찰할 수 있었다. AGS의 경우에는 세포의 형태적인 변화가 일어났으며 두 가지 암세포 모두 사멸된 세포의 잔유물이 발견되어 손상된 세포의 형태가 뚜렷이 관찰되었다.

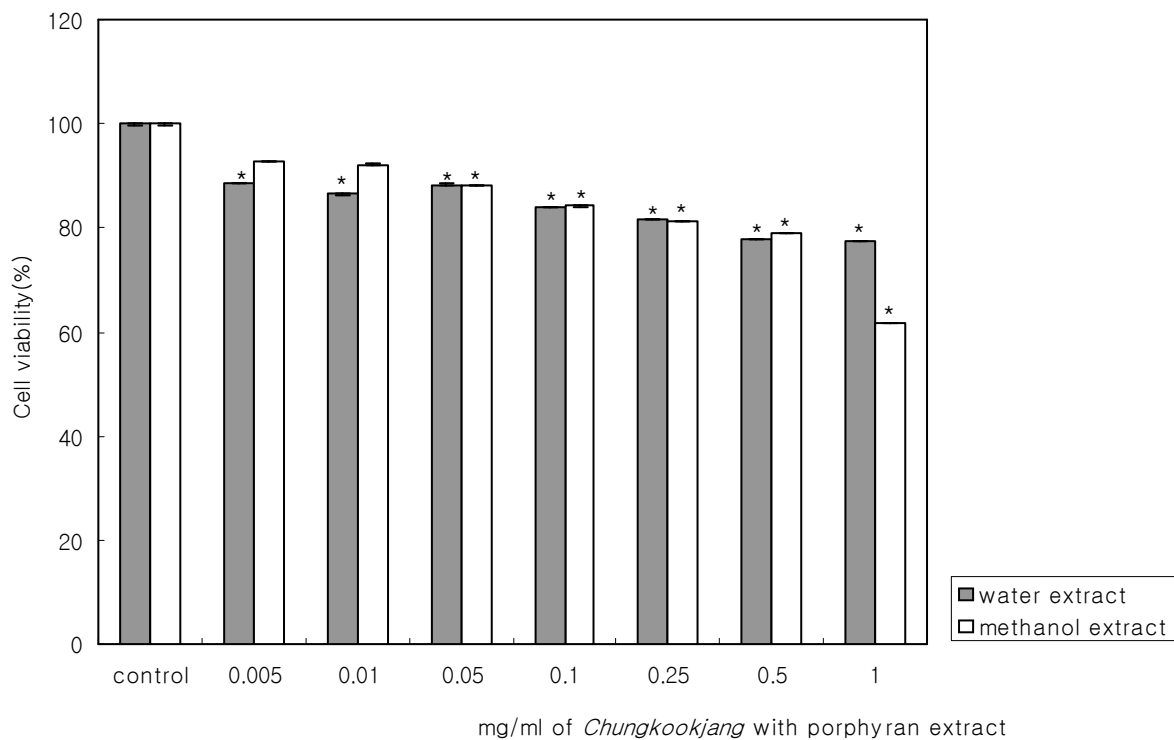


Figure 12. Effects of water extract and methanol extract from *Chungkookjang* with 5% porphyran on human gastric cancer cell viability.

AGS cells were exposed to different concentrations of *Chungkookjang* with 5% porphyran extracts for 48 hrs and then cell viability was assessed by MTT assay.

All values represent \pm S.D of three independent experiments. * $P < 0.05$

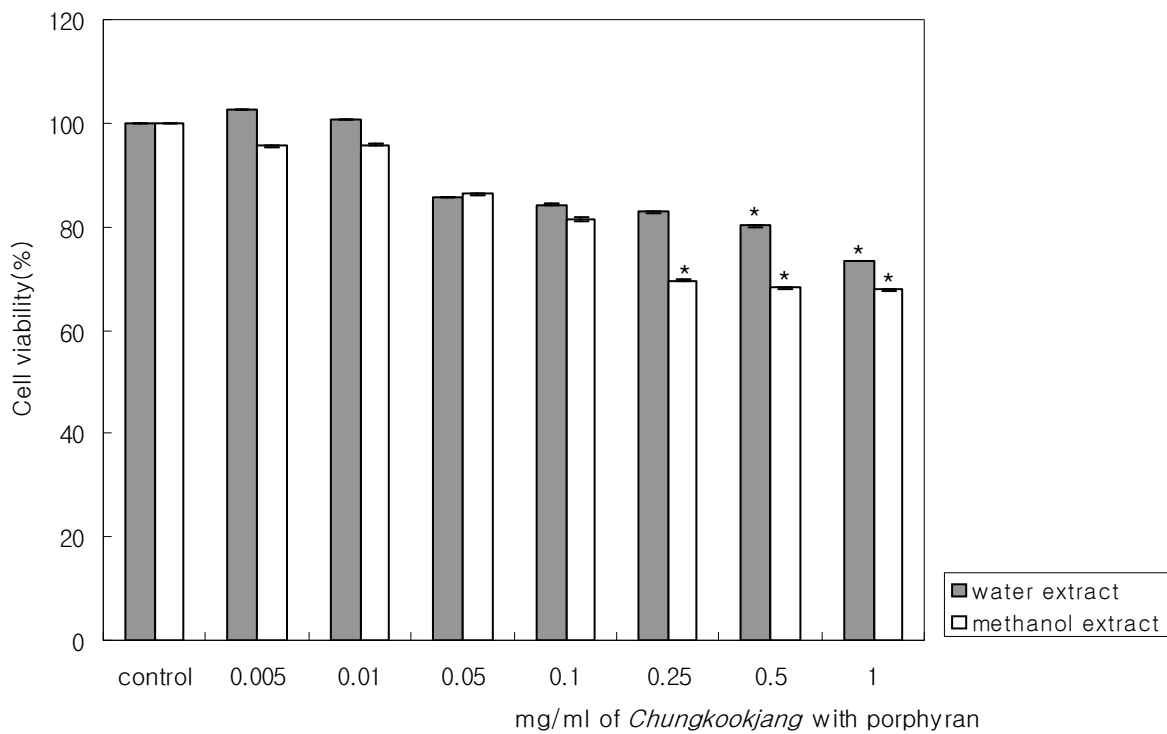


Figure 13. Effects of water extract and methanol extract from *Chungkookjang* with 5% porphyran on human colon cancer cell viability.

HT-29 cells were exposed to different concentrations of *Chungkookjang* with 5% porphyran extracts for 48 hrs and then cell viability was assessed by MTT assay.

All values represent \pm S.D of three independent experiments. * $P < 0.05$

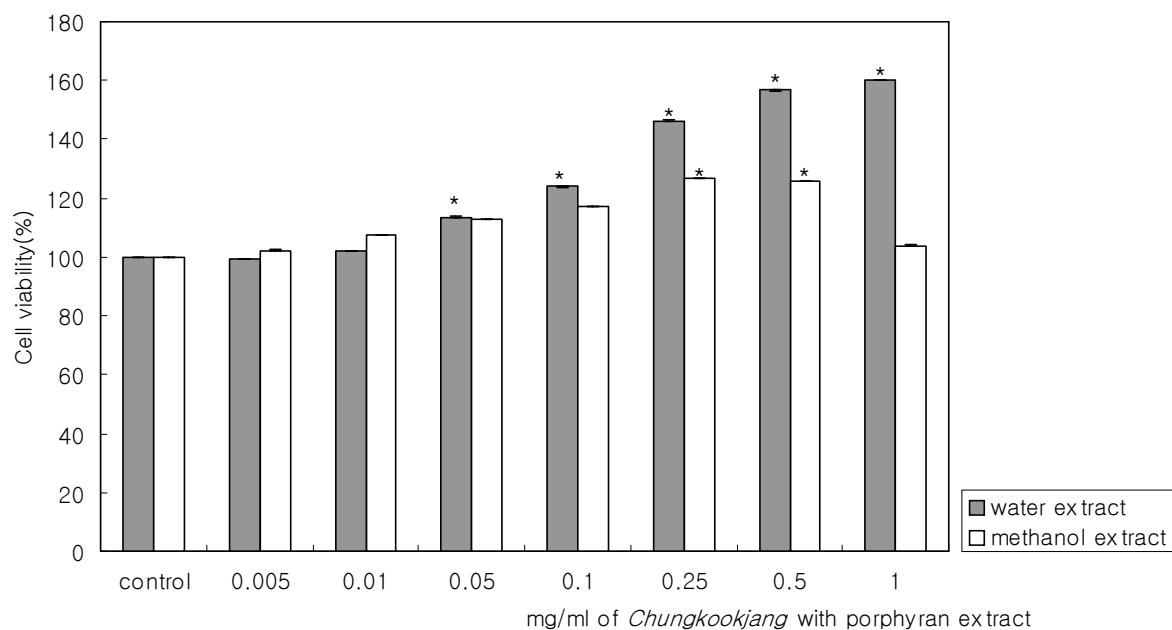


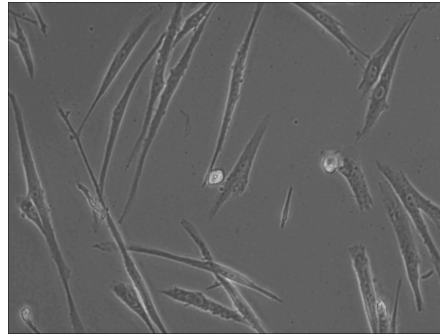
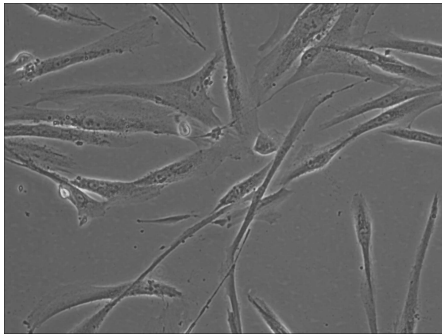
Figure 14. Effects of water extract and methanol extract from *Chungkookjang* with 5% porphyran on human foreskin normal cell viability.

BJ cells were exposed to different concentrations of *Chungkookjang* with 5% porphyran extracts for 48 hrs and then cell viability was assessed by MTT assay.

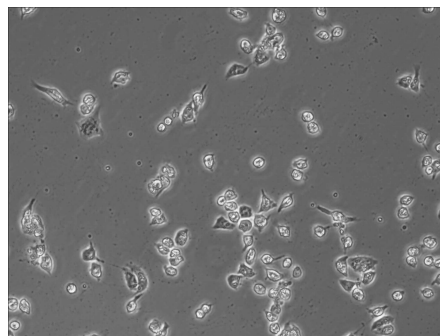
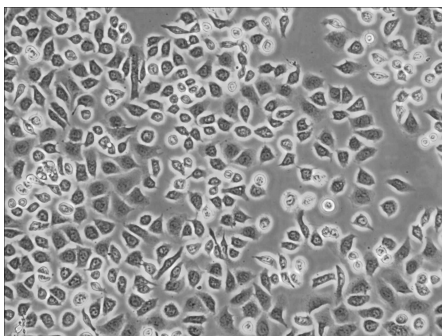
All values represent \pm S.D of three independent experiments. * $P < 0.05$

[control]

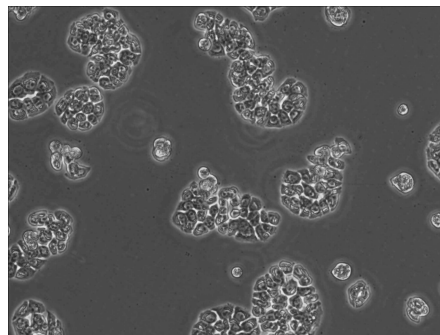
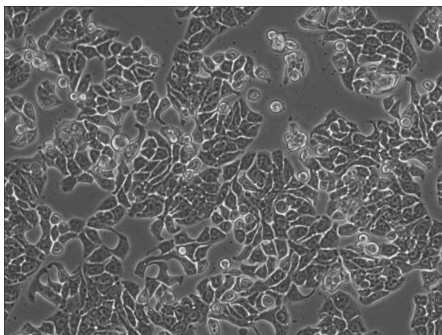
[treatment]



[BJ]



[AGS]



[HT-29]

Figure 15. Morphological observations of BJ normal cell, HT-29 colon carcinoma cells and AGS gastric carcinoma cells after treated with methanol extracts 1.0 mg/ml from porphyran-contained Chungkookjang.

Photographs were taken with a phase-contrast microscope.

제 4 장 결 론

현재 우리나라 해조가공산업의 낙후성 및 취약성으로 인해 폐기용과 장기보존 김 제품 등의 재활용 기술이 필요한 실정이다. 이로 인해 김의 생리활성기능을 가지는 물질을 분리하고 강화시켜 고부가가치를 지니는 기능성 물질을 만들어 김의 소비증대를 목적으로 하는 것이 시급한 문제이다. 또한 전통발효식품인 청국장은 소화흡수율이 매우 높으며 이미 여러 생리활성물질이 연구되어 그 우수성이 입증되어 있지만 콩 단백질이 분해되어 생기는 암모니아의 불쾌취 등과 생청국장의 점질물의 식감으로 인한 거부감 등으로 관능성이 낮아 그 이용의 증대를 위해 품질개선이 필요하다.

이에 본 연구에서는 폐기용 김으로부터 항암효과가 뛰어난 porphyran을 추출하고, 이의 활용도를 높이기 위해 종균을 이용하여 제조한 청국장에 porphyran을 첨가하여 porphyran 청국장을 제조하였다. 그리하여 이 청국장이 위암세포와 장암세포에 대한 암세포 증식억제 효과가 기존의 청국장보다 더 우수함을 관찰하였다.

Porphyran 분리를 위해 사용된 폐기용 김의 일반성분을 분석하고 이 김을 이용하여 crude porphyran을 추출한 결과 13.9%의 수율을 얻었다. Crude porphyran의 화학성분을 분석한 결과 총당은 66.6%, 황산기는 16.9%, 3,6-anhydrogalactose는 16.1%를 나타냈고, 단백질은 8.6%를 나타냈다.

Bacillus subtilis DJ1을 이용하여 제조한 청국장의 발효조건을 결정하기 위해 시간에 따른 발효온도를 측정하였으며, 그에 따라 제조된 청국장의 구성 아미노산, 유리 아미노산, 평균소수도, 물성분석을 통한 물리화학적 분석을 시행하였다. 청국장의 구성 아미노산 함량은 6619.2 mg%를 나타냈으며, 유리 아미노산의 함량은 3131.4 mg%를 나타냈다.

Crude porphyran의 암세포에 대한 증식억제효과는 AGS(human gastric cancer cell)와 HT-29(human colon cancer cell)에서 모두 농도가 증가할수록 농도 의존적으로 높은 억제율을 나타냈다. 특히 1 mg/ml의 농도에서는 HT-29와 AGS에 대해 각각 43.78%, 45.1%의 억제율을 보여 암세포에 대해 높은 증식억제효과를 보였다. 정상세포 BJ(human foreskin normal cell)에 대한 세포독성은 거의 없는 것으로 관찰되었으며 0.25 mg/ml의 농도까지는 농도 의존적으로 세포성장효과를 보였다.

Bacillus subtilis DJ1으로 제조한 청국장의 물 추출물과 메탄올 추출물은 정상세포에 대해 세포독성을 나타내지 않았으며, 농도 의존적으로 세포성장효과를 나타냈다. 물 추

출물의 경우 0.5 mg/ml의 농도에서는 최고 153%의 생존율을 나타냈으며, 메탄올 추출물의 경우 동일 농도에서 140.31%의 생존율을 보여 청국장이 정상세포에 대해 세포성장효과가 있는 것으로 관찰되었다.

청국장의 암세포 증식억제효과는 물 추출물과 메탄올 추출물 모두 위암, 대장암의 암세포주에서 농도증가에 따라 억제효과가 있었으며, 위암세포인 AGS에 비해 장암세포 HT-29에 대해서 높은 억제효과를 보였다. 최대 1 mg/ml의 농도에서 청국장 메탄올 추출물은 AGS에 대해 23.81%, HT-29에 대해 26.99%의 높은 억제율을 나타냈다.

Porphyran 첨가 청국장의 정상세포 BJ에 대한 세포독성을 관찰한 결과 물, 메탄올 추출물 모두 독성이 없었으며, 물 추출물의 경우 0.1 mg/ml에서 1 mg/ml로 처리농도가 증가할수록 123.94%, 146.39%, 156.72%, 159.99%의 매우 높은 생존율을 보여 농도 증가에 따라 세포성장효과를 나타냈다. 메탄올 추출물의 경우 물 추출물에 비해 세포성장효과의 수치는 낮았으나 농도의존적으로 세포성장효과를 보였으며 0.25 mg/ml에서는 최대 126.89%의 생존율을 보이므로 porphyran 청국장이 정상세포에 대해 세포독성이 없는 것으로 관찰되었다.

Porphyran 첨가 청국장의 암세포에 대한 성장억제효과는 AGS와 HT-29에 대해 모두 성장저해효과를 나타냈다. AGS의 경우 청국장의 물 추출물에서는 0.01 mg/ml의 농도까지 94.20%의 생존율을 보이는데 반해 porphyran 첨가 청국장의 물 추출물은 0.005 mg/ml의 저 농도에서도 11.42%의 억제율을 나타냈으며, 1 mg/ml의 농도에서는 22.53%의 높은 억제율을 보였다. AGS에 대해 porphyran 청국장의 메탄올 추출물은 0.5 mg/ml의 농도까지는 물 추출물과 비슷한 억제율을 보였지만 1 mg/ml의 농도에서는 38.21%의 높은 억제율을 나타냈다.

청국장 추출물과 Porphyran 첨가 청국장 추출물의 암세포에 대한 억제효과를 비교해보기 위해 최대 농도인 1 mg/ml로 비교해보면 위암세포인 AGS의 경우에는 물 추출물에서 청국장은 16.79%, porphyran 첨가 청국장은 23.81%의 억제율을 보였고, 메탄올 추출물에서는 청국장은 23.81%, porphyran 첨가 청국장은 38.21%의 억제율을 보였다. 장암세포 HT-29에 대해서는 물 추출물에서 청국장이 19.36%, porphyran 첨가 청국장은 26.78%의 억제율을 보였고, 메탄올 추출물에서 청국장이 26.99%, porphyran 첨가 청국장이 32.27%의 억제율을 보였다. 이로서 porphyran 첨가 청국장은 기존의 청국장에 비해 최대 1 mg/ml의 농도에서 메탄올 추출물을 처리했을 때 HT-29와 AGS에 대해 각각 5.28%, 14.4%의 억제효과가 상승되는 것으로 보아 항암활성이 더 뛰어난 것으

로 관찰되었다.

위 결과로 청국장과 porphyran 첨가 청국장의 물 추출물보다 메탄올 추출물이 AGS와 HT-29의 암세포 성장억제 효과가 있는 것으로 보아 암세포 성장억제효과를 보이는 유효성분은 더 소수성 경향의 물질을 함유하고 있을 것으로 추측되어진다.

본 실험에서 김으로부터 유용한 기능을 가지고 있는 porhyran을 추출하여 항암활성 기능을 가지는 porphyran 첨가 청국장을 제조하여 그 우수성이 확인되었다. 앞으로 이러한 기능성 식품을 널리 이용하여 해조가공산업에 기여하고, 해조류와 청국장의 이용성 및 부가가치를 향상시켜 새로운 소비를 창출할 수 있을것으로 기대된다.

제 5 장 참고문헌

1. Adlercreutz, H.A. Phytoestrogens and western diseases. *Ann. Med.* 29:95-120(1997)
2. Akimoto, T., Yamada, S. and Matsumo, I. : The relation between protease and γ -glutamyltranspeptidase activities and qualities of Natto. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaish*, 37:872(1990)
3. Anderson, N.S., Dolan, T.C.S. and Rees, D. A. Evidence for a common structural pattern in the polysaccharide sulphate of the *Rhosophyceae*. *Nature* 13: 1060-1069(1965)
4. AOAC. 1995. Official method of analysis of AOAC international. 16th. Ed.
5. Benjamin H. Storkson J. Nagahara A, Pariza MW. Inhibition of benzopyrene-induced mouse forestomach neoplasia by dietary soy sauce. *Cancer Res.* 51:2940-2942(1991)
6. Chang, H. C. Method for preparing reduced off-flavor Doenjang(soybean paste) composed of 100% soybean using *Bacillus subtilis* DJ1. Korean Patent 10-0661707(2006)
7. Cheigh, H. S., Lee, J.S., Lee, C.Y. Antioxidative characteristics of melanoidin related products fractionated from fermented soybean sauce. *J. Food Soc. Food Nutr.* 22: 570-575(1993)
8. Cho, K.J., Lee, Y.S. and Ryu, B.H. Antitumor effect and immunological activity of seaweeds toward sarcoma-180. *Bull. Korean Fish. Soc.* 23: 345-352(1990)

9. Choi UK, Son DH, Ji WD, Im MH, Choi JD, Chung UG. Changes of taste components and palatability during chungkukjang fermentation by *Bacillus subtilis* DC-2. J Korean Soc Food Sci Nutr 27:840-845(1998)
10. Choi HS, Joo SJ, Yoon HS, Kim KS, Song IG, Min KB. Quality Characteristic of Hwangki(*Astragalus membranaceus*) Chungkukjang during Fermentation. Korean J. Food Preserv. 14(4):358-363(2007)
11. Chung, K. S., Yoon, K. D., Hong, S. S. and Kwon, D. J. Antimutagenic and anticarcinogenic effect of korean fermented soybean products. J. Food Sci. Technol. 1:75-85(1996)
12. Dodgson, K.S. and Price, R.G. A note on the determination of the ester sulfate content of sulphated polysaccharides. Biochem. J. 84:106-110(1962)
13. George R. Schacterle and Robert L. Pollack. A Simplified Method for the Quantitative Assay of Small Amounts of Protein in Biologic Material. Anal Biochem. 51:654-655(1973)
14. Go, Hyun-Sook.. Characteristics, and antimutagenic and in vitro anticancer effects of chungkookjang manufactured by various variety of soybean. Kon-Kuk university(1998)
15. Hong SS, Chung KS, Yoom KD, Cho YJ. Antimutagenic Effect of Solvent Extracts of Korean Fermented Soybean Products. Foods and Biotechnology. 5(4):263-267(1996)
16. Hong, S. P., Koo, J. K., Jo, K. S., and kim, D. S. Physicochemical characteristics of water of alcohol soluble extracts from laver, *Porphyra yezoensis*. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 26:10-16(1997)

17. Hwang, M.S. A Taxonomic Study on the Genus *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta) in Korea. Seoul National Unvi. pp. 245(1994)
18. Hwang, S. H., Chung, H.S., Kim, S. D., and Youn, K. S. Effect of Glycyrrhizia uralensis extract addition on the quality of chungkukjang. J. East Asian Soc. Dietary Life.14:571-575(2004)
19. In, J. P., Lee, S. K., Ahn, B. K., Chung, I. M., and Jang, C. H. Flavor improvement of chungkukjang by addition of yucca(*Yucca chidigera*) extract. Korean J. Food Sci. Technol. 34:57-64(2002)
20. Jang Young-mi. Research on Quality Improvement of Chungkookjang(fermented soybean pastes) by *Bacillus subtilis*. Sungshin Women's University(2004)
21. Jenkins, D.J., C.W. Kendall, M. Axelsen, L.S. Augustin and V. Vuksan. Viscous and nonviscous fibres, nonabsorbable and low glycaemic index carbohydrates, blood lipids and coronary heart disease. Curr. Opin. Lipidol., 11:49-56(2000)
22. Jo KS, Do JR, Koo JG. Pretreatment Conditions of *Porphyra yezoensis*, *Undaria pinnatifida* and *Laminaria religiosa* for Functional Alage-Tea. J Korean Soc Food Sci Nutr, 27:275-280(1998)
23. Joo, H.K. Studies on the manufacturing of *chungkukjang*. Korean J. Food Sci. Technol., 3:64-67(1971)
24. Jung, K. J. A new method of extracting and refining a porphyran from laver for treating hyperlipemia 10-0381363-0000(2003)
25. Jung, Ji-Heun, Seoung-Guk Kang, Young-Soon Kim and Hee-Jong Chung.

Degradation of Phytic acid in Chungkookjang Fermented with Phytase-producing Bacteria. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.* 18(4):423-428(1990)

26. Kim B. R., Han, Y. B. and Park, K. H. 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(1987)
27. Kim, K.J., Ryu, M.K. and Kim, S.S. *Chungkookjang koji* fermentation with rice straw. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 14:301-308(1982)
28. Kim MR. The isolation and structural characteristics of bitter peptides from soybean 11S clycinin. Korea university.(1999)
29. Kim M. H. Shon M. Y. Park S. K. Park J. R. Sung N. J. Taste Components and Palability of Black Bean Chungkukjang Added with Kiwi and Radish. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 31(1): 39-44(2002)
30. Kim SH. New trends of studying on potential activities of Doenjang fibrinolytic activity. *Korea Soybean Digest* 15:8-15(1998)
31. Kim SH. Yang JL. Song YS. Physiological functions of chongkukjang. *Food industry and Nutrition* 4(2):40-46(1999)
32. Koo, J. K., Jo, K. S., Do, J. R., Park, J. H., and Yang, C. B. Chemical properties of fucoidans from *Hizikia fusiformis* and *Sargassum Fulvellum*. *Bull. Korean Fish Soc.* 28, 659-666(1995)
33. Koo JG, Park BC, Kim BG, Kim HA, Ryu CH, Kim SY. Chemical Composition and Rheological Properties of Deproteinated Porphyran. *J. Kor. Fish. Soc.* 40(1):1-7(2007)

34. Krigbaum. W.R and Komoriya, A. Local interaction as a structure determinant for protein molecules. *Biochem. Biophys. Acta*, 576:204(1979)
35. Kwak CS, Kim MY, Kim SA, Lee MS. Cytotoxicity on Human Cancer Cells and Actitumorogenesis of Chungkookjang, a Fermented Soybean Product, in DMBA-Treated Rats. *The Korean Nutrition Society*. 39(4):347-356(2006)
36. Kyoo-Jin Jung, Bok-Mi Jung and Seon-Bong Kim. 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(2):325-329(2002)
37. Lahaye, M. 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(1991)
38. Lee, B. K. Immunomodulation material of fermented soybean products. The Reasearch Institute of Soybean Fermentation Foods. Yeungnam Univ., Korea. MS thesis.(1999)
39. Lee EJ. Isolation and selection of main strain for chongkukjang fermentation and characteristics of chongkukjang fermented with selected strains. YeungNam Univ.(2004)
40. Lee H. J. Suh J. S. Effect of Bacillus strains on the chungkook-jang Processing(1) Changes of the Components and Enzyme Activities During Chungkook-jang-Koji Preparation. *Korean J. Nutr.* 14(2):97-104(1981)
41. Lee KB. Studies on the Enhancement of Cancer Preventive Effects and

Antibiotic Activities of Korean Soybean-Fermented Foods. Pusan University.
(2005)

42. Lee MY. Quality and functional characteristics of chungkukjang fermented by *Bacillus* sp. isolated from commercial products. Catholic university of Taegu.
(2005)
43. Lee, Y. L., Kim, S. H., Choung, N. H. and Yim, M, H. A study on the production of viscous substance during chungkookjang fermentation. J. Korea Agric. Chem. Soc. 35:202-209(1992)
44. Leinonen, K.S., K.S. Poutanen and H.M. Mykken. Rye bread decrease serum total and LDL cholesterol in men with moderately elevated serum cholesterol. J. Nutr., 130:164-170(2000)
45. Lim, Chae Min. Studies on development of preparation method and increased antimutagenic and in vitro anticancer effects of black soybean Chungkukjang. Pusan Univ.(2006)
46. 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)
47. Lui, T.Y., Chan, Y.H. *J. Biol. Chem.* 246:2842-2848(1971)
48. Manavalan, P. and Ponnuswany. P.K. Hydrophobic character of amino acid residues in globular proteins. *Nature.* 275:19(1978)
49. Meirovitch, H. and Rackvosky, S. Empirical studies of hydrophobicity. 1. Effect of protein size in the hydrophobic behavior of amino acids, *Macromolecules,*

13:1398(1980)

50. Michel Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and Fred Smith. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chemistry*. 28:350-356(1956)
51. Mi-Jin Kwon, Taek-Jeong Nam. Porphyrin induces apoptosis related signal pathway in AGS gastric cancer cell lines. *Life Sciences*. 79(20):1956-1962(2006)
52. Morrice, L. M., MacLean, M. W., Long, W. F., and Williamson, F. B., Porphyrin primary structure. *Eur. J. Biochem.*, 133:673-684(1983)
53. National Rural Living Science Institute, R. D. A. Food composition table. Fifth revision, p.324.(1996)
54. Nishizawa, K and S. Murasugi. *The Sea vegetable Book*. Kensei Press, Tokyo, pp. 57-66(1988)
55. Noda, H., H. Amano and K. Arashima. Studies on the antitumour activity of marine algae. *Nippon Suisangakkaishi*, 55:1259-1264(1989a)
56. Noda, H., H. Amano and K. Arashima. Antitumour activity of polysaccharides and lipids from marine algae. *Nippon Suisangakkaishi*, 55:1265-1271(1989b)
57. Nozaki, Y. and Tanford, C. The solubility of amino acids and two glycine peptides in aqueous ethanol and dioxane solutions. *J. Biol. Chem.* 246:2211(1971)
58. Nunn, J.R. and von Holdt, M.M. Red-seaweed polysaccharides, part 2. *Porphyra capensis* and the separation of D- and L-galactose by crystallization. *J. Chem. Soc*, 1094(1957)

59. Park J.H. Studies on the isolation and characterization of porpyran from porphyra yezoensis. ph. D. Thesis, Hanyang university, Seoul, Korea.(1995)
60. Park JH, Koo JG, Do JR, Yang CB, Woo SK. Effect of extraction temperature and pH on the chemical properties of crude porphyran extracted from Porphyra yezoensis. J Korean Fish Soc, 32:127-131(1998)
61. Park KY, Jung KO, Kwon EY. Development of a Functional Chungkookjang(Soybean Paste Fermented for 2-4 Days) with Anti-AGS Human Gastric Cancer Cell Properties. Nutraceuticals and Food 8:54-60(2003)
62. Philip S, Ritsa S. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening. J. Natl. Cancer Inst. 82:1107-1112(1990)
63. Peat, S., Turvey, J.R and Rees, D.A. : Carbohydrates of the red alga, *Porphyra umbilicalis*. J. Chem. Soc., 1590(1961)
64. Seon-Jae Kim, Ji-Sook Moon, Seong-Gook Kang and Soon-Teck Jung. Extraction of Porphyran from Decolored Laver. Korean J. Food. Sci. Technol. 35(6):1017-1021(2003)
65. Seon-Jae Kim, Seung-Jin Ma and Yoon-Sen Jang. Extradtion and Quality Characteristics of Porphryan from Laver(*Porphyra yezoensis*) Waste. Korean J. Food culture. 20(4):446-450(2005)
66. Shin In Park. Preparation of Natto(Unripe *Chungkukjang*) Using Small soybeans and *Bacillus subtilis* KCCM 11315. The Korean Journal of Culinary Reaserch. 12(4):225-235(2006)

67. Singer JW, Vries R, Bhatt J, Tulinsky P, Klein C, Li L, Milas RA. Conjugation of camptothecins to poly-(L-glutamic acid). *Ann NY Acad Sci* 922:136-150(2000)
68. Skehan, P., Storeng. R. Monks, S.A., McMahon, J., Vsitica, D., Warren, J.T., Bokesch, J., Kenney, S. and Boyd, K.R : New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* 82:1107-1112(1990)
69. Southgate, D.A.T. Definitions and Terminology of Dietary Fiber in: *Dietary Fiber in Health and Disease*. Plenum Press, New York, pp. 1-7(1982)
70. Sumi H, Tsushima H, Muraki H. A novel fibrinolytic activity(nattokinase) in the vegetable cheese natto ; A typical and popular soybean food in the Japan diet. *Experientia* 43:1110-1118(1987)
71. Su, J.C. and W.Z. Hassid. Carbohydrates and nucleotides in the red alga *Porphyra perforata*. 1. Isolation and identification of carbohydrates. *Biochemistry*, 1, 468-474(1962)
72. Tanimoto HM, Mori M, Motoki K, Torii M, Kadowaki, T. Nattp mucilage containing poly- γ -glutamic acid increases double calcium in the rat small intestine. *Biosci Biotechnol Biochem* 65:516-521(2001)
73. Tarr, G. E. *Methods of Protein Microcharacterization*(Humana Press Clifton, NJ), *J. E. Shively*, ed, p.155-194(1986)
74. Tokida, J. Key to the species of porphyra in Japan and Vicinity. *Bull. Jap. Soc. Phycol.* 14:42-45(1996)
75. Wei, H., Wei, L., Frenkel, F., Brown, R. and Barnes, S. Inhibition of tumor promoter-induced hydrogen peroxide formation in vitro and in vivo by

genistein. Nutr. Cancer. 20:1-12(1993)

76. Yamamoto, I., and Maruyama, H. Effect of dietary seaweed preparation on 1,2-dimethylhydrazine-induced intestinal carcinogenesis in rats. Cancer Lett. 26:241-249(1985)
77. Yamamoto, I., Maruyama, H. and Moriguchi, M. The effect of dietary seaweeds on 7,12-dimethylbenz[a] anthracene-induced mammary tumorigenesis in rats. Cancer Lett. 35:109-115(1987)
78. Yaphe, W. and Arsenault, G.P. Improved resorcinol reagent for the determination of fructose, and of 3,6-anhydrogalactose in polysaccharides. Anal. biochem. 13:143-148(1965)
79. Yoo Kyung Jung, Ye Kyung Lee, Hong Kyoon No, Soon Dong Kim. Establishment of Optimal Conditions for Preparation of Chitosan Chungkukjang and its Quality Evaluation. J. chitin Chitosan 11(2):96-101(2006)
80. Yoo-Kyung Jung, Ye-Kyung Lee, Hong-Kyoon No and Soon-Dong Kim Effect of Sea Tangle on Fermentation and Quality Characteristics of Cheongkukjang. Korean J. Food Preserv. 13(1):95-101(2006)
81. Yoshizawa, Y., Enomoto, A., Todoh, H., Ametani, A., and Kaminogawa, S., Activation of murine macrophages by polysaccharide from marine algae(*Porphyra yezoensis*). Biosci. Biotechnol. Biochem., 57:1862-1866(1993)
82. Yoshizawa, Y., Ametani, A., Tsunehiro, J., Nomura, K., Itoh. Macrophage stimulation activity of the polysaccharide fraction from a marine alga (*Porphyra yezoensis*) : structure-function relationships and improved solubility. Biosci. Biotechnol. Biochem., 59:1933-1937(1995)

83. 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)
84. Yukihiro Osumi, Masanobu kawai, Hideomi Amano and Hiroyuki Noda. Antitumor activity of oligosaccharides derived from *porphyra yezoensis* porhyan. *Nippon suisan Gakkaishi*, 64:847-853(1998)(in Japanese)
85. Yun SH, Lee SS, Jang JE, Noh, GW. Sensory Evaluation of Chungkukjangs with Herbal Extracts and Clinical Evaluation in Atopy Dermatitis Patients. *The Korean Nutrition Society*. 37(8):669-674(2004)
86. Zhang, Q., L. Ning, X. Liu, Z. Zhao, Z. Li and Z. Xu. The structure of a sulfated glactan from *porphyra haitanensis* and its vivo antioxidant activity. *Carbohydr. Res.*, 339:105-111(2004)
87. 김기연, 함영태. 청국장의 생리활성에 관한 연구동향과 유전공학적 접근을 통한 기능성 강화. *유전공학연구논문집* 16:1-18(2004)
88. 김용택, 김원극, 오훈일. 청국장으로부터 혈전용해균주의 분리 및 동정, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol*, 23(1):1-5(1995)
89. 김소희, 양정혜, 소영선. 청국장의 생리활성. *식품산업과 영양* 4:40-46(1999)
90. 김한복. 미생물학 박사 김한복 교수의 청국장 다이어트 & 건강법, *Human & Book*, (2003)
91. 발효식품학. 효일. 95-102

92. 양정례, 이숙희, 송영선. 자발성 고혈압 흰쥐에서 찐콩과 청국장 분말의 혈압 및 지질대사 개선 효과. 한국식품영양과학회지 32: 899-905(2003)
93. 이재중, 조창훈, 김지연, 이동석, 김한복. 분말청국장에서 알코올로 추출한 물질의 항산화능. 한국미생물학회지 37:177-181(2001)
94. 주현규: 청국장 제조에 관한 연구. 한국식품과학회지, 3, 64-67(1971)
95. 해양수산부, 2005 해양수산통계연보 2005년

감사의 글

대학원 생활을 시작한지도 어느덧 2년이라는 시간이 지났습니다. 짧은 시간동안 배운것도 많았고 얻은 것도 많았지만 부족한 것도 많기에 열정을 가지고 노력할 수 있도록 많은 도움을 주신 분들께 감사의 마음을 전하고자 합니다.

학부 때부터 지금까지 한결 같은 마음으로 세심한 배려와 가르침을 주시고 격려해주신 장해춘 지도교수님께 진심으로 감사를 드립니다. 그리고 논문의 부족한 부분을 따뜻한 조언과 세심하게 체크하여 주신 이명렬 교수님, 전홍성 교수님께도 감사드립니다. 학부와 대학원 과정 동안에 많은 가르침을 주신 노희경 교수님, 김경수 교수님, 김복희 교수님, 이소정 교수님께도 감사드립니다.

대학교 4학년때부터 함께 했던 실험실 식구들... 정말 감사합니다. 투정부릴 때마다 따뜻하게 감싸주시고 실험의 조언도 아낌없이 해주시는 맏언니 은주언니, 작은 말 한마디로 감동주며 세심한 배려가 너무 감사한 지윤언니, 학부때부터 지금까지 아낌없이 사랑주시는 늘 고마운 정신적 지주 장미언니, 항상 따뜻하게 웃어주는 효주언니, 언제나 씩씩하게 힘내라 외쳐주며 응원해준 울언니, 많이 도와준 지용언니, 이제는 의젓한 사회인인 정길오빠, 실험실의 분위기 메이커 귀여운 은정이, 언니 아래서 실험 배우느라 고생한 선미에게 고마운 마음을 전합니다. 마지막으로 너무 고맙고 사랑하는 내 친구 지혜...옆에 있는 것만으로도 힘이 되는 소중한 친구에게 기도로 사랑으로 따뜻함으로 함께해주어 너무 감사하며 늘 행복하길 기도합니다.

바쁘다는 핑계로 자주 보진 못하지만 언제나 날 격려해주는 고마운 친구 효진, 혜선, 보화, 고운이 그리고 대학원 동기인 근영오빠, 형덕이에게도 감사드립니다.

변함없는 관심과 기도로 함께 동역해준 나의 사랑하는 친구 현모양처 민희, 함께 있으면 든든한 장군 하나, 많이 신경 못써서 미안한 친구같은 동생 애교만땅쟁이 수진, 언제나 기도해주며 섬겨주시는 은영언니에게 참으로 감사의 마음을 전합니다. 또한 사랑하는 02학번 친구들~지영, 재덕, 대영, 현국, 재신, 경훈이와 예쁜 대팔 지연언니, 능률한 민철오빠, 언제나 힘내라며 격려해준 고마운 건후, 기도해준 많은 언니, 오빠, 동생들에게 고마운 마음을 전합니다.

사랑하는 가족들에게 감사드립니다. 항상 저를 위해 희생하시는 사랑하는 아빠, 언제나 따뜻한 사랑을 느끼게 해주시는 엄마, 손녀딸 걱정해주시고 기도해주시는 할머니께 너무 감사드립니다. 모두 오래오래 건강하시길 기도합니다. 언니 투정 다 받아주고 기도해주는 동생 회경이에게도 감사의 말을 전하며 앞으로의 일들이 잘되길 기도합니다. 항상 도와주시고 이끌어주신 친척분들께도 감사드리며 미처 표현하지 못한 분들을 포함하여 많은 분들께 다시 한번 감사드립니다.

오늘의 제가 있기까지 많은 축복과 은혜로 채워주시고 인도해주신 하나님께 이 모든 감사와 영광을 드립니다. 사랑합니다.

저작물 이용 허락서

학 과	식품영양학과	학 번	20067032	과 정	석사
성 명	한글: 민현경 한문 : 閔鉉京 영문 : Min Hyun Kyeng				
주 소	광주 광역시 남구 주월1동 장미아파트 5동102호				
연락처	E-MAIL : tinyhand@hanmail.net				
논문제목	한글 : Porphyran 첨가 청국장 추출물의 암세포 성장억제 효과 영문 : Growth-inhibitory Effects of the Porphyran-contained <i>Chungkookjang</i> Extracts on Cancer cells				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집·형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

동의여부 : 동의(O) 조건부 동의() 반대()

2008년 2 월

저작자: 민현경 (서명 또는 인)

조선대학교 총장 귀하