Collection @ chosun

creative commons
COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 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

Collection

[UCI]I804:24011-200000238478

Collection @ chosun

2009年 8月

碩士學位 論文

천일염된장 및 된장종균 *Bacillus subtilis* DJI의 암세포 성장 억제효과

朝 鮮 大 學 校 大 學 院

食 品 營 養 學 科

李 善 美

Collection @ chosun

천일염된장 및 된장종균 *Bacillus subtilis* DJI의 암세포 성장 억제효과

Growth-inhibitory Effects of the Solar salt-*Doenjang* and *Doenjang* starter *Bacillus subtilis* DJI on Cancer cells

2009年 8月 25日

朝 鮮 大 學 校 大 學 院

食 品 營 養 學 科

李 善 美

Collection @ chosun

천일염된장 및 된장종균 *Bacillus subtilis* DJI의 암세포 성장 억제효과

指導敎授 張 海 春

이 論文을 理學碩士學位申請 論文으로 提出함.

2009年 4月

朝 鮮 大 學 校 大 學 院

食 品 營 養 學 科

李 善 美

dCollection @ chosun

李 善 美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

2009年 5月

朝鮮大學校 大學院

Collection @ chosun

목 차

ABSTRACT ····· Ⅵ
LIST OF TABLES ····· Ⅲ
LIST OF FIGURES ····· Ⅳ

제 1 장 서 론 ····· 1

제 2 장 실험재료 및 방법 ····· 8
제 1절. *Bacillus subtilis* DJI 균주의 암세포 성장 억제효과 ····· 8
1. 사용균주 ····· 8
2. *B. subtilis* DJI 균주의 생육도 ····· 8
3. *B. subtilis* DJI의 세포벽성분 추출 ····· 11
4. *In vitro* 항암실험 ····· 14
1) 암세포 성장 억제효과 균주 선별 ····· 14
(1) 시료의 준비 ····· 14
(2) 세포배양 ····· 14
(3) MTT assay에 의한 세포 생존율 측정 ····· 15
2) *B. subtilis* DJI의 배양단계별 상징액의 암세포 성장 억제효과 ····· 16
(1) 시료의 준비 ····· 16
(2) 세포배양 ····· 16
(3) MTT assay에 의한 세포 생존율 측정 ····· 16
3) *B. subtilis* DJI 세포벽성분의 암세포 성장 억제효과 ····· 17
(1) 시료의 준비 ····· 17
(2) 세포배양 ····· 17
(3) MTT assay에 의한 세포 생존율 측정 ····· 17
4) 세포의 형태적 변화 관찰 ····· 19
제 2절. Bacterial-koji(*B. subtilis* DJI)를 이용하여 제조한 천일염 된장의 암세포 성장 억제효과 ····· 20
1. 소금의 종류를 달리한 bacterial-koji 이용 된장 제조 ····· 20

Collection @ chosun

1) Bacterial-koji 제조 ····· 20
2) 된장의 제조 ····· 20
2. 된장의 구성아미노산 분석 ····· 22
3. 된장의 유리아미노산 분석 ····· 22
4. 된장의 추출 ····· 23
5. *In vitro* 항암실험 ····· 25
1) 소금의 종류 및 발효기간을 달리한 된장의 암세포 성장 억제효과 ·····25
(1) 시료의 준비 ····· 25
(2) 세포배양 ····· 25
(3) MTT assay에 의한 세포 생존율 측정 ····· 25
2) 세포의 형태적 변화 관찰 ····· 26
3) Apoptosis의 관찰 ····· 26
6. 통계처리 ····· 28

제 3 장 결과 및 고찰 ····· 29
1. 암세포 성장 억제효과 균주 선별 ····· 29
2. *B. subtilis* DJI의 배양단계별 상징액의 암세포 성장 억제효과 ····· 36
3. *B. subtilis* DJI 세포벽성분의 추출 수율 및 암세포 성장 억제효과 ····· 42
4. 된장의 구성아미노산, 유리아미노산 분석 ····· 46
5. 소금의 종류 및 발효기간을 달리한 된장의 암세포 성장 억제효과 ····· 51
1) 소금의 종류를 달리한 2개월 숙성 된장 ····· 51
2) 소금의 종류를 달리한 16개월 숙성 된장 ····· 61
6. Apoptosis의 관찰 ····· 72

제 4 장 결 론 ····· 74

제 5 장 참고문헌 ····· 77

Collection @ chosun

LIST OF TABLES

Table 1. List of bacteria used in the experiment ····· 9

Table 2. Changes of total amino acids in refined salt *B. subtilis* DJI ····· 47

Table 3. Changes of total amino acids in solar salt *B. subtilis* DJI ····· 48

Table 4. Changes of free amino acids in refined salt *B. subtilis* DJI ····· 49

Table 5. Changes of free amino acids in solar salt *B. subtilis* DJI ····· 50

Collection @ chosun

LIST OF FIGURES

Figure 1. Growth from *B. subtilis* DJI in LB broth at 37℃ ····· 10
Figure 2. Flow chart for the preparation of cell wall extract ····· 13
Figure 3. A procedure of cytotoxicity assay using MTT assay ····· 18
Figure 4. Manufacturing process of bacterial-koji and *Doenjang* ····· 21
Figure 5. Flow sheet for the preparation of *doenjang* extract ····· 24
Figure 6. A procedure of Apoptosis detection using a fluorescence ····· 27
Figure 7. Cytotoxicity of the culture supernatants from *B. subtilis* MJP1 on cell viability ····· 32
Figure 8. Cytotoxicity of the culture supernatants from *B. polyfermenticus* CJ6 on cell viability ····· 33
Figure 9. Cytotoxicity of the culture supernatants from *Lb. plantarum* AF1 on cell viability ····· 34
Figure 10. Cytotoxicity of the culture supernatants from *B. subtilis* DJI on cell viability ····· 35
Figure 11. Cytotoxicity of the culture supernatants from *B. subtilis* DJI cultivation phases on human gastric adenocarcinoma cell ····· 38
Figure 12. Cytotoxicity of the culture supernatants from *B. subtilis* DJI cultivation phases on human colon cancer cell ··· ····· 39
Figure 13. Cytotoxicity of the culture supernatants from *B. subtilis* DJI cultivation phases on human foreskin normal cell ····· 40
Figure 14. Photomicrographs(x100) of BJ, HT-29 and AGS cells treated with culture supernatants at 10% from *B. subtilis* DJI ····· 41
Figure 15. Cytotoxicity of the cell wall extract isolated from *B. subtilis* DJI on human foreskin normal cell and human colon cancer cell ····· 44
Figure 16. Photomicrographs(x100) of BJ and HT-29 cells treated with cell wall extract isolated from *B. subtilis* DJI whole cell ····· 45
Figure 17. Effects of the water extracts from 2MO ripened *doenjang* with solar salt

Collection @ chosun

and refined salt on human gastric adenocarcinoma cell viability ····· 55
Figure 18. Effects of the methanol extracts from 2MO ripened *doenjang* with solar salt and refined salt on human gastric adenocarcinoma cell ····· 56
Figure 19. Effects of the water extracts from 2MO ripened *doenjang* with solar salt and refined salt on human colon cancer cell viability ····· 57
Figure 20. Effects of the methanol extracts from 2MO ripened *doenjang* with solar salt and refined salt on human colon cancer cell viability ····· 58
Figure 21. Effects of the water extracts from 2MO ripened *doenjang* with solar salt and refined salt on human foreskin normal cell viability ····· 59
Figure 22. Effects of the methanol extracts from 2MO ripened *doenjang* with solar salt and refined salt on human foreskin normal cell viability ····· 60
Figure 23. Effects of the water extracts from 16MO ripened *doenjang* with solar salt and refined salt on human gastric adenocarcinoma ····· 65
Figure 24. Effects of the methanol extracts from 16MO ripened *doenjang* with solar salt and refined salt on human ····· 66
Figure 25. Effects of the water extracts from 16MO ripened *doenjang* with solar salt and refined salt on human colon cancer cell viability ····· 67
Figure 26. Effects of the methanol extracts from 16MO ripened *doenjang* with solar salt and refined salt on human colon cancer cell viability ····· 68
Figure 27. Effects of the water extracts from 16MO ripened *doenjang* with solar salt and refined salt on human foreskin normal ····· 69
Figure 28. Effects of the methanol extracts from 16MO ripened *doenjang* with solar salt and refined salt on human foreskin normal ····· 70
Figure 29. Photomicrographs(x100) of BJ, HT-29 and AGS cells treated with water extract from 16MO ripened *doenjang* with solar salt ····· 71
Figure 30. Apoptosis induced in AGS cells treated by 1 mg/mL of the water extract from 16months ripened *doenjang* after 48hrs ····· 73

Collection @ chosun

ABSTRACT

Growth-inhibitory Effects of the Solar salt-*Doenjang* and *Doenjang* starter *Bacillus subtilis* DJI on Cancer cells

Lee, Sun Mi
Adviser : Prof. Chang, Hae Choon, Ph. D.
Department of Food and Nutrition,
Graduate School of Chosun University

This study extracted anticancer *Bacillus subtilis* DJI from 4 types of strains separated from traditional fermented foods. The results of measuring the anticancer effect of *B. subtilis* DJI supernatant by cultivation phase according to the MTT assay method showed a high concentration-dependent cancer cell restraint effect for HT-29(human colon cancer cell) and AGS(human gastric adenocarcinoma cell), but, uniquely, showed a concentration-dependent cell growth effect for BJ(human foreskin normal cell). The anticancer effect of supernatant on cancer cells by cultivation phase was high in the order of the death phase, stationary phase and logarithmic phase, which confirmed that the closer to the death phase, the bigger anticancer effect was. The extraction of cell wall content from *B. subtilis* DJI showed a yield of 59%, and the measurement of the anticancer effect of *B. subtilis* DJI cell wall showed a high restraint rate for HT-29, but little cell toxicity for BJ. DJI *doenjang* was prepared by using *B. subtilis* DJI starter and the refined salt or solar salt with 12%(w/v) concentration. The prepared *doenjangs* were fermented and aged for 2 month and 16 month respectively. MTT assay was used to measure the growth-inhibitory effect of DJI *doenjang* extracts(water, methanol) on BJ, HT-29

Collection @ chosun

and AGS. The anticancer effect increased in both refined salt-*doenjang* and solar salt-*doenjang* as fermentation period increased. In particular, in the case of water extracts, solar salt-*doenjang* showed much better anticancer effect than refined salt-*doenjang*. In addition, apoptosis were observed when the water extracts of the *doenjangs* were treated into AGS. In particular, it was observed that more apoptosis occured in solar salt-*doenjang* treats than refined salt-*doenjang* treats.

Collection @ chosun

제 1 장 서 론

우리나라는 생활양식과 식습관의 많은 변화로 인하여 주요 질병 발생 유형이 과거의 전염성 질환에서 각종 성인병과 만성 질환으로 이행되고 있으며, 특히 암(악성신생물)의 발생과 이로 인한 사망률이 계속 증가하는 추세이다(90). 현대 의학에 있어 인체에 무해하면서 동시에 효과적인 치료가 가능한 항암제 개발은 매우 중요한 과제이다. 현재 암 치료에 이용되는 여러 치료 요법은 그 치료 효능에 있어 한계성이 있으므로 식이를 이용한 암 예방법이 중요하다.

Bacillus sutilis(이하 *B. sutilis*)는 자연계에 널리 분포하는 비병원성 세균으로 호기성의 내열성 아포 형성균이다. 예전부터 식품과 함께 이용되어 오면서 안전성이 입증된 GRAS(generally recognized as safe)미생물로 최적 발아온도는 40℃정도이며 장내에서 부패균의 활동을 억제하고 유기산을 생성하여 장을 자극함으로써 변비개선 및 다이어트에도 효과가 있다(86). 또한 강력한 protease 및 amylase를 분비하여 식품의 발효산업 및 효소산업 분야의 활발한 연구와 산업적 이용이 이루어지고 있다. 그러나 *B. subtilis*의 항암활성 관련 연구는 유산균에 비교해 부족한 실정이다. *Bacillus*속 배양상징액의 항암활성 관련 보고로 장 (4)등은 장암세포 DLD-1에 *B. polyfermenticus* SCD 배양상징액을 10 mg/mL의 농도처리시 약 65%의 억제율을 보였으며, *B. polyfermenticus* SCD 배양상징액을 Diaion HP-20 column을 이용하여 정제한 부분정제물의 항암활성을 연구한 결과 인체 폐암세포주 A549, 인체 위암세포주 AGS, 인체 장암세포주 DLD-1, 인체 자궁암세포주 HEC-1-B, 인체 신장암세포주 SW-156에 부분정제물을 10 mg/mL로 처리했을 때 각각 97, 98.1, 81.6, 83.5, 92.7%의 높은 억제율을 보였음을 보고하였다.

세포벽은 세포막을 둘러싸고 있는 다소 단단한 물질층으로 세포 고유의 특징적인 모양을 유지하고 삼투압 분해와 기계적 피해로부터 구조체들을 보호하는 역할을 한다. 그람 양성균의 세포벽은 90% 이상이 peptidoglycan으로 구성되어 있으며, 이외 teichonic acid라는 기질이 존재한다. Teichonic acid는 그람 양성균의 세포벽에만 존재하는 것으로 세포벽을 강화시키는 역할을 한다. Peptidoglycan은 *N*-acethylglucosamine과 *N*-acetylmuramic acid의 2종류의 당 유도체와 L-alanine, D-alanine, D-glutamic acid, lysine 등의 아미노산으로 구성되어 있으며, 2종류의 당 유도체는 아미노산에 의

Collection @ chosun

해 사슬을 형성하여 peptidoglycan이라고 하는 3차 구조를 형성하게 된다(87, 30). 유산균으로부터 분리한 세포벽성분의 항암 및 면역활성에 관한 연구는 보고(30, 42)된 바 있으나 *Bacillus*로부터 분리한 세포벽성분의 항암활성에 관한 연구는 부족한 실정이다.

소금은 어전(漁箭)과 함께 국가의 주요 재정 수입원이자 수요 품목이었고, 민초들의 생활필수품이었다. 소금(salt)을 어원적으로 살펴보면 로마시대 용병들이 봉급(salaries) 일부를 소금막대로 지불 받았던 것에서 비롯된 것으로 화폐의 역할을 하기도 하였다. 문화적으로는 악이나 액운을 쫓는 등 다양한 습속을 가지고 있으며 민속의례에서도 빠져서는 안 될 중요한 재료이기도 하였다. 그러나 소금을 언급함에 있어 빼놓을 수 없는 것은 음식문화이다. 서남해안의 갯벌·조류·어류 등 해양생태와 소금은 젓갈문화를 가능케 했으며 다양한 음식 문화를 만들어 냈다(85).

소금의 종류는 다양하며 KS규격에 따라 크게 천일염과 정제염으로 나뉜다(88). 천일염은 해수를 저류지로 유입해 태양열과 바람 등 자연을 이용하여 농축시켜서 얻은 소금을 말하며(22), 정제염은 해수를 이온교환막에 전기투석시켜 정제한 농축함수를 증발관에 넣어 제조한 소금을 말한다(39).

소금은 풍미를 내는 조미료이며 식품의 방부력을 부여하는 보존제로 사용 되어왔다. 또한 생리적으로 발한 작용을 통해서 체온을 조절하고 체내 신경이나 근육의 흥분성 유지 및 신진대사를 왕성하게 하며, 체액과 세포의 삼투압을 일정하게 조절해 정상적인 생리기능을 유지하는 생체조절 물질로서도 중요하다(68, 61, 69, 51, 67, 1).

인체구성의 3.5%를 차지하는 미네랄의 역할은 광범위하며 생명력에 있어 중요한 위치를 차지한다. 현대사회에서는 화학농법과 가공기술이 발달하고, 저장과 유통기간 또한 연장되고 있는 실정이기에 식품 고유의 미량 영양소는 대부분 잃어버리고 있다. 따라서 현대인의 대부분은 미네랄의 만성 결핍에 시달려 돌연사, 암 등의 위험에 무방비로 노출되어 있다(89). 정제염과 천일염의 무기질 조성 연구결과 정제염은 99.8%의 NaCl을 함유하고 있으나 천일염은 92.4~94.4%의 NaCl과 K, Ca, Mg, S와 같은 다른 무기질을 함유하고 있음을 보였다(15). K, Ca, Mg은 혈압을 낮추는 효과가 있고(70) 특히 K은 혈관확장효과와 aldosterone 및 rennin 분비저해 작용을 억제하며(67), Ca과 Mg은 혈압의 항상성 유지를 위한 대사에 중요성이 보고된 바 있다(22). 즉, 천일염은 정제염에 비교해 K, Ca, Mg, S과 같은 무기질을 많이 함유하고 있으므로 천일염의 섭취는 현대인들의 큰 문제점으로 대두되고 있는 미네랄결핍의 예방 및 해결방안이 될 것으로 예상된다.

Collection @ chosun

박 (57)등은 천일염의 중금속(Pb, Cd, As, Hg) 함량을 조사해 본 결과 식품위생법 규정의 기준치 이하였으며, 신 (70)등은 저장기간에 따른 천일염의 구성 성분 변화를 조사한 결과 저장기간이 증가할수록 NaCl 함량이 증가하고 무기질의 함량은 낮은값을 나타내었으며, 천일염의 색도는 밝은 백색을 띠었다고 보고하였다. 소금의 외형구조를 SEM으로 관찰한 결과 정제염은 전형적인 소금의 결정구조를 보였지만 천일염은 결정구조에 핵이 중복되며 겹을 이루고 있다고 보고하였다(15).

김 (36)등은 된장제조시 여러 종류의 소금을 사용하여 된장의 발효시 성분의 변화를 측정해 본 결과 된장의 맛과 영양을 좌우하는 유리아미노산의 함량이 천일염을 사용한 된장에서 가장 우수하게 나타났다고 보고하였다. 최근 황(21)등의 보고에 의하면 소금의 종류를 달리하여 제조한 된장의 항돌연변이 및 염색체상해방지 효과를 측정한 결과 그 효과는 9번 구운 죽염, 1번 구운 죽염, 천일염, 정제염으로 제조한 된장 순으로 높게 나타났음을 보고하였다. 이밖에 김 (38)등은 천일염, 세척탈수염, 기계염, 환원염을 사용하여 제조한 김치의 숙성 중 산도변화 및 총균수에 대한 생육양상의 결과로 볼 때 기계염 보다는 천일염의 경우가 김치발효에 더욱 효과적이라고 보고하였다. 이 밖에 천일염으로 만든 된장분말을 첨가하여 제조한 쿠키와 머핀의 특성에 관한 연구 등 이 보고되었다(24).

정 (28)등은 소금이 sarcoma-180 세포를 이식한 마우스에서 고형암의 성장과 면역활성에 미치는 영향을 연구한 결과 천일염이 정제염보다 고형암의 성장을 억제하고, 면역활성을 증가시킴을 나타내었다. 하 (16)등은 소금의 종류에 따른 과산화효과와 항돌연변이성 비교 연구에서 그 효능은 죽염이 가장 좋았고 가공염, 천일염, 기계염 순으로 효과가 높았으며, 소금은 가공처리에 따라 생리적으로 다르게 작용할 수 있음을 보고하였다.

된장은 한국의 대표적인 대두 발효식품 중의 하나로 단백질과 아미노산 함량이 높아 영양적 가치가 우수하고 저장성이 뛰어나며 독특한 향미를 지니고 있어 조미식품으로써 우리 조상들의 식생활에 널리 애용되어져 왔다(68, 61). 이러한 된장은 제조방법에 따라 재래식 된장과 개량식 된장으로 구분되어진다. 재래식 된장은 대두를 100% 사용하며 메주를 자연발효하고 건조 된 메주를 소금물에 침지하여 일정기간 숙성시켜 여액을 분리하거나 그대로 소금을 넣어 5~6개월 숙성시키면 재래식 된장이 된다. 개량식 된장은 국(麴, koji)제조법을 도입한 것으로서 주원료로 대두와 전분질을 섞어 *Aspergillus oryzae*를 의도적으로 접종하여 된장 코지를 만든 후 이를 메주대신 사용

Collection @ chosun

하며, 코지에 삶은 콩과 소금을 혼합하여 1~2개월 정도 숙성시켜 제조한다(5). 최근장 (3)의 연구결과에서는 재래식 된장과 개량식 된장의 단점을 보완한 DJI 된장제조법을 개발하였다. 이는 대두를 100% 사용하였으며, 제조된 bacterial-koji(*B. subtilis* DJI)에 삶은 콩과 소금(12%)을 첨가하여 2개월 숙성시 된장이 제조된다. 제조된 DJI된장은 제조기간 단축과 더불어 위생상 안전하고 고유한 재래된장의 맛과 향을 재현할 수 있으며, 된장제조시 stater 도입으로 biogenic amine의 저감화 효과를 지닌다고 보고하였다.

된장 제조에 이용되는 콩에는 생리활성 물질로 알려진 isoflavone, trypsin inhibitor, phytic acid, saponin, vitamin E, 불포화지방산 등 의 성분을 포함하여 항암효과 및 항돌연변이 효과를 지닌다(84). 또한 많은 연구결과 콩을 많이 섭취하는 동양인의 경우 상대적으로 콩의 섭취가 낮은 서양인에 비해 유방암, 결장암, 전립선암 등 의 발병률이 훨씬 낮다고 증명하였다(17, 65, 73).

콩에 isoflavone은 주로 genistein, daidzein, glycitein 등이 당과 결합한 genistin, daidzein 형태로 들어있다. 식품에서 genistein은 aglycon(genistein), β-glycoside(genistin), acetylglucose(6″-*O*-acetylgenistin), malonylglucoside(6″-*O*-malonylgenistin)의 네 가지 화학구조로 존재하며(40), aglycon의 형태인 genistein은 생리활성 물질로 알려져 있다(55). 박 (59)등의 보고에 의하면 콩, 된장의 genistein의 함량은 각각 0.06 mg/kg, 5.29 mg/kg이고, genistin의 함량은 각각 5.28 mg/kg, 0.99 mg/kg 임을 알 수 있었다. 또한 최근 박 (26)등의 연구결과 된장은 발효기간이 길어질수록 콩의 isoflavone이 aglycone인 genistein, dadzein으로 전환되고 함량도 증가되어 항암활성이 증가한다고 보고하였다. 콩 비발효식품 보다 콩 발효식품에서 genistein의 함량이 높은 것은 발효동안에 여러 미생물의 가수분해 작용에 의해 genistin의 β-glycosyl bond 끊어짐에 의한 것으로 여겨진다(13).

된장의 기능성관련 보고에는 된장의 항산화성 물질에 관한 연구(44, 32, 45)와 된장에서 분리한 펩타이드의 혈압강하작용(37, 71), 항혈전(72) 및 항동맥경화활성(8)에 대한 연구 결과가 보고되었으며, *in vitro* 상에서 된장 추출물의 암세포 증식 억제효과(20, 48, 49), sarcoma-180 세포이식 마우스에서 항암활성(26, 35) 및 aflatoxin을 포함한 다양한 돌연변이 유도물에 대한 강한 항돌연변이 활성(26, 60, 50, 18)이 보고되었다. 이러한 된장의 항돌연변이 활성물질 연구결과 genistein과 linoleic acid는 *S. typhimurium* TA100균주에서 aflatoxin B_1과 MNNG에 대해 강한 항돌연변이 효과를

Collection @ chosun

보였고(59), 최근에 임 (47)등의 보고에 의하면 된장 분획물이 림프종 세포와 복수암 세포의 증식 억제나 생존력을 감소시키는데 작용할 뿐만 아니라 면역세포에서 IL-2 cytokine의 생성을 증가시켜 면역활성 증진 효과를 나타낸다고 보고하였다.

권 (41)등의 연구에 의하면 고지방식이에 의한 항비만효과는 된장, 쌈장, 고추장, 청국장 순으로 된장이 가장 높은 체중감소 효과가 있음을 보고하였다. 또한 이 등(43)의 보고에서 된장은 흰쥐에서 고지방 또는 고콜레스테롤 식이에 의하여 유발된 고지혈증을 개선하는 효과가 있음이 보고되었다.

Glutathione은 주요 세포의 protective system으로 sulfhydryl radical을 가지고 있으며, 친전자성 물질과 활성산소 및 과산화지질의 최종 무독화 과정에서 필연적으로 요구된다. 이 물질의 세포내 합성유지에는 합성계 효소와 해독반응 후 생성되는 산화형 glutathione의 재환원 효소가 관여하고 있다(27). 김 (35)등의 보고에 의하면 sarcoma-180 세포이식 마우스에서 된장, miso, 콩의 메탄올 추출물을 처리한 모든 실험군은 대조군에 비교해 lipid peroxide와 xanthine oxidase가 감소하였고, glutathione reductase와 glutathione은 증가함을 보였다. 이는 된장, miso, 콩 메탄올 추출물이 detoxification mechanism과 관련해서 간 효소의 활성을 조절하며 특히 된장의 메탄올 추출물이 가장 높은 활성을 나타냄을 보고하였다. 또한 sarcoma-180 세포이식 마우스에 된장, miso, 콩의 메탄올 추출물을 투여하고 이들 시료로 인한 수명연장 효과를 살펴본 결과 대조군에 비해 된장 메탄올 추출물을 처리한 구간은 68%의 수명연장 효과를 보이며, miso 및 콩은 각각 41%, 11%의 수명연장효과가 있다고 하였다. 이뿐만 아니라 박 (59)등의 연구에서도 전통된장이 miso 및 다른 콩 발효식품인 청국장보다 더 높은 항돌연변이 효과를 보임을 증명하였다.

된장의 발효숙성 중 성분변화에 관한 연구결과 숙성기간에 따른 된장의 총지질 함량은 점차 증가하였고 특히 지질 중의 중성지방은 감소하였으나 유리지방산은 증가함을 알 수 있었다(29). 정미 성분의 변화로는 숙성이 진행됨에 따라 된장의 지미성분인 glutamic acid는 30일까지 서서히 증가하여 그 이후 일정한 수치를 보였으며, aspartic acid는 계속 증가하여 된장의 지미는 숙성에 따라 더 깊어짐을 알 수 있었다(33). 또한 된장의 맛 성분에 기여하는 펩타이드의 변화 및 특성 연구(34)와 된장의 향기특성 변화(7) 등 에 관한 연구가 보고되었다.

된장 발효 미생물 및 원료배합에 의한 된장의 품질 변화 연구는 메주균을 달리한 된장의 유리아미노산, 유리당 및 유기산 조성의 비교(2)와 된장 koji 및 그 혼합에 따른

Collection @ chosun

된장 숙성 과정중의 화학성분 변화(23), 곰팡이 및 세균으로 제조한 콩알메주의 배합 비율을 달리하여 제조한 된장의 품질 변화(66), 원료배합을 달리한 된장의 특징(6) 등의 활발한 연구가 이루어졌으며 또한 된장의 담금 용기에 따른 숙성 중 품질변화(82), 된장 제조공정의 표준화(58) 등 된장 품질관련 연구가 보고 되었다.

이밖에도 황기 추출액을 첨가하여 항산화 활성이 높은 된장의 개발(53) 및 초임계 기술로 처리된 목초액을 첨가함으로서 된장의 저장성 향상과 갈변을 늦추는 연구(83)에 대한 다양한 연구가 이루어졌다.

세포사는 necrosis와 apoptosis라는 두 가지의 다른 mechanism에 의해 일어난다. Necrosis는 외부 환경의 변화에 의해 급격히 일어나는 수동적인 세포사멸이고, apoptosis는 program cell death로 여러 유전자들이 발현됨으로써 일어나는 능동적인 세포사멸이다. Apoptosis는 많은 병리학적 요인에 의해서도 생기지만 발생, 면역, 호르몬작용과 같은 정상적인 생리현상과 발현에 필수적인 physiological cell death로서 정상적인 생명유지와 발생과정 중에 중요한 역할을 한다(27). Apoptosis와 necrosis의 형태적, 생리적 특성을 보면 apoptosis는 세포의 수축(shrinkage of the cytoplasma), DNA의 분절(DNA fragmentation), caspase의 활성화, 세포막을 이루는 지질인 phosphatidylserine의 세포 외부로의 노출 등 이 있다. 그에 반해 necrosis는 세포질의 팽창(swelling of cytoplasm), 세포파편(cell debris), 염증(inflammation)유발 등 이 있다(78, 79, 9, 52, 54).

Apoptosis와 관련된 질환을 살펴보면 비정상적인 apoptosis의 발생은 심혈관계 질환(cardiovascular disease), 퇴행성뇌신경질환(neurogenerative disorder), 면역계 이상(immune disorder), 암(cancer)과 같은 질병의 발생과 높은 상관관계를 보인다(10). 이와 같이 apoptosis는 생명체의 정상적인 생리작용 유지에 중요한 역할을 할 뿐만 아니라 여러 질병들의 발병과정에도 밀접한 관련이 있다.

Apoptosis에 의한 세포의 죽음과정 중 가장 중요한 실행자는 cystein계의 단백분해효소인 caspase이며, 지금까지 알려진 caspase는 14종류가 있다(11, 74). Caspase는 세포내에서 비활성 효소(zymogen)로 존재하지만 protease와 다른 caspase 및 다양한 자극에 의해 DNA가 손상되어 종양억제 유전자인 p53이 발현되고 그에 따라 caspase-3가 활성화된다(77, 76, 12, 75, 56). 결과적으로 caspase-3의 활성화는 주요 기질인 PARP(poly ADP-ribose polymerase)의 분절을 일으킨다. PARP는 DNA 복구에 관련된 중요한 효소로서, PARP의 분해는 결국 염색체를 파괴한다(14). 즉 caspase-3의 활

Collection @ chosun

성화는 세포사멸 신호전달에 중요한 조절인자로 작용한다.

세계적으로 유명한 프랑스의 게랑드 천일염에 비해 국내산 천일염은 연간 생산량이 15배 정도 많으며, 가격 면에서도 저렴하여 높은 경쟁력을 지니고 있다. 뿐만 아니라 청정해역의 비옥한 갯벌에서 생산되는 국내산 천일염은 미네랄 함량이 높아 세계적으로 우수한 품질의 저렴한 천일염을 손쉽게 생산할 수 있는 좋은 조건을 지니고 있다.

*B. subtilis*는 예전부터 식품과 함께 이용되어 오면서 안전성이 입증된 GRAS (generally recognized as safe)미생물로 *B. subtilis* 관련 연구에는 효소생산 및 항생제 관련 분야 등의 많은 연구가 이루어지고 있는 반면에 *B. subtilis*로부터 분리한 세포벽 성분 및 대사산물의 항암활성 관련 연구는 부족한 실정이다.

따라서 본 논문은 항암활성을 지닌 *B. subtilis* DJI 균주를 선별하여 *B. subtilis* DJI의 배양단계별 상징액 및 세포벽성분이 정상세포에 미치는 세포독성을 조사하였고 암세포에 대한 성장억제효과를 측정하였다. 또한 항암활성을 지닌 *B. subtilis* DJI을 이용하여 bacterial-koji를 제조하였으며 이를 된장제조에 사용하였다. 된장제조시 사용되는 소금의 종류를 달리하여 천일염된장과 정제염된장을 제조하였고, 제조된 각 된장의 발효기간을 달리하였다. 소금의 종류 및 발효기간을 달리한 각각의 된장추출물이 정상세포(BJ)에 미치는 세포독성 및 인체 위암세포(AGS)와 인체 결장암세포(HT-29)의 성장억제효과를 조사하여 소금의 종류 및 발효기간에 따른 된장추출물의 항암효과를 알아보고, apoptosis 유발여부를 측정해 보고자 한다.

Collection @ chosun

제 2 장 실험 재료 및 방법

제 1 절. *Bacillus subtilis* DJI 균주의 암세포 성장 억제효과

1. 사용 균주

본 실험에 사용한 균주들은 본 실험실에서 개발된 균주로 Table 1과 같다.

2. *B. subtilis* DJI 균주의 생육도

B. subtilis DJI의 배양시간에 따른 생육을 측정하기 위하여 37℃에서 24시간 전배양한 균주를 40 mL LB broth(Duchefa biochemie, nutrient broth : bacto-tryptone 10%, yeast-extract 5%, sodium chloride 10%)에 1%(v/v) 접종한 후, 24시간 동안 배양하면서 3시간 간격으로 600 nm에서 흡광도를 측정하였다(5). (Fig. 1) 본 실험에 사용된 *B. subtilis* DJI 배양상징액은 logarithmic phase(Fig. 1 A지점), stationary phase(Fig. 1 B지점), death phase(Fig. 1 C지점)로 나누어 사용하였다.

Collection @ chosun

Table 1. List of bacteria used in the experiment

Strains	Medium	Incubation temperature(℃)	Reference
B. subtilis DJI	LB	37℃	(5)
B. subtilis MJP1	LB	37℃	(80)
B. polyfermenticus CJ6	TSB	37℃	(25)
Lb. plantarum AF1	MRS	30℃	(81)

Collection @ chosun

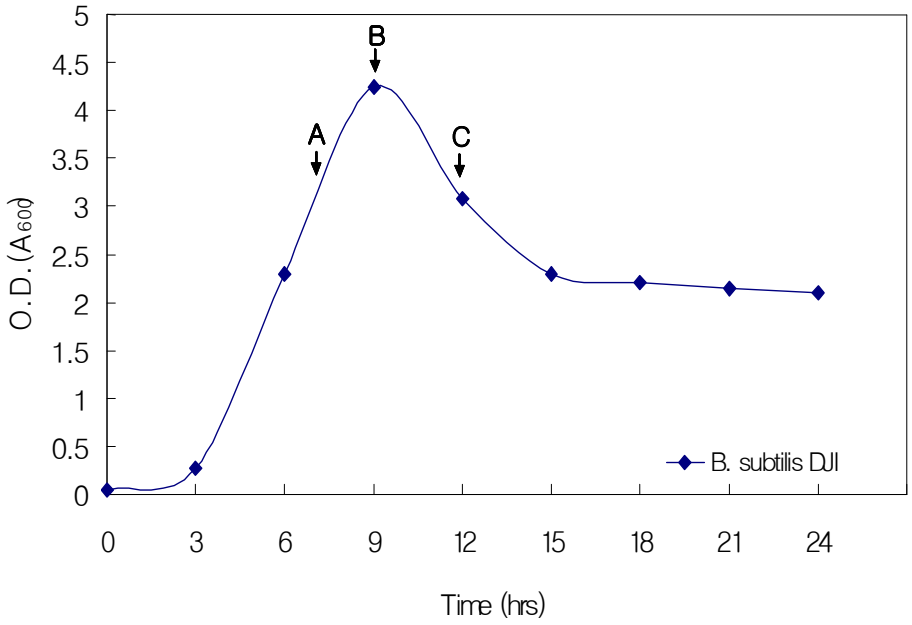

Figure 1. Growth from *B. subtilis* DJI in LB broth at 37℃(5).

A: logarithmic phase, B: stationary phase, C: death phase

Collection @ chosun

3. *B. subtilis* DJI의 세포벽성분 추출

B. subtilis DJI의 cell wall extract는 Lehman 등(46)의 방법에 따라 분리하였다. 먼저 *B. subtilis* DJI을 LB broth에서 death phase에 도달할 때까지 배양한 후 9,950 × g에서 15분간 원심분리하여 균체만 회수하였다. 회수된 균체는 PBS로 3회 세척한 후 PBS에 현탁하여 5분간 초음파 파쇄한 다음 원심분리하였다. 회수된 pellet은 PBS로 세척하여 4% sodium dodecyl sulfate (SDS)에 현탁시킨 후 30℃에서 2시간 용해하였다. 용해 후 원심분리하여 얻어진 pellet은 SDS를 제거하기 위하여 PBS로 다시 세척하였다. Ribonuclease A를 250 μg/mL의 농도로 37℃에서 4시간동안 처리한 후 앞서 수행한 방법으로 세척하였다. 세척 후 deoxyribonuclease I과 trypsin을 120 μg/mL의 농도로 첨가한 후 37℃에서 하룻밤동안 처리한 다음 PBS로 세척 후 9,950 × g에서 원심분리하여 상징액을 제거하고 pellet을 회수하였다. 회수된 pellet은 무게를 측정하여 그 수율을 구하고, 동결 건조하여 실험에 사용하였다(Fig. 2).

Collection @ chosun

Cultivation (15 hrs, 37℃)

↓

Centrifugation (9,950 × g, 15 min)

↓

Washed with PBS

↓

Sonication for 5 min

↓

Centrifugation (9,950 × g, 25 min)

↓

Washed with PBS

↓

Addition of 4% SDS (2 hrs, 30℃)

↓

Centrifugation (9,950 × g, 30 min)

↓

Washed with PBS

↓

Collection @ chosun

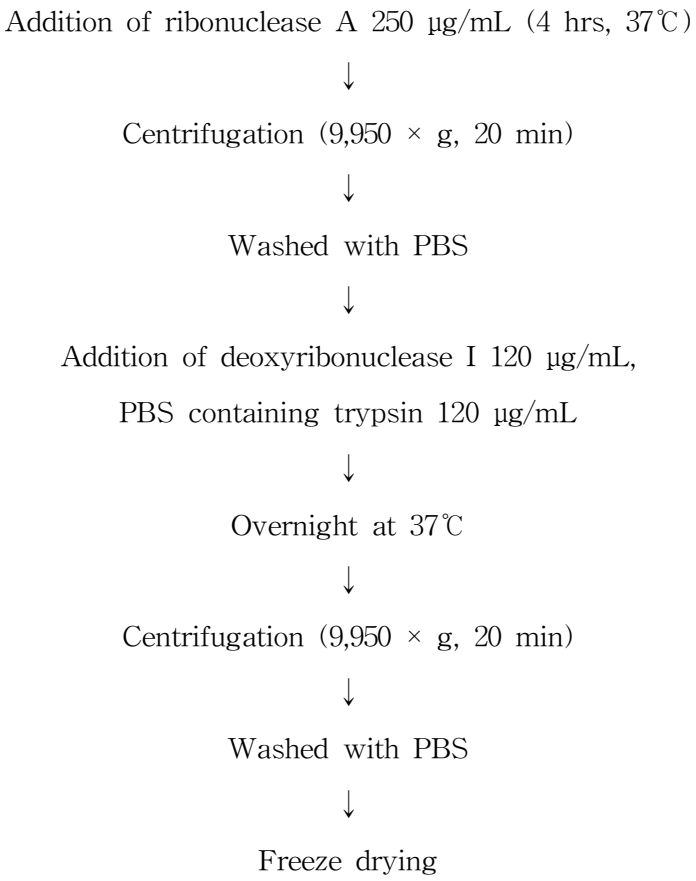

Figure 2. Flow chart for the preparation of cell wall extract isolated from *B. subtilis* DJI whole cell.

Collection @ chosun

4. *In vitro* 항암실험

1) 암세포 성장 억제효과 균주 선별

(1) 시료의 준비

준비된 각각의 균주 배양액을 원심분리(9,950 × g, 15 min, 4℃)하여 상징액을 회수한 후 각 상징액의 pH를 측정하고 0.45 μm syringe filter로 제균하여 실험에 사용하였다. 각 균주의 culture broth와 각 배양상징액 pH로 보정한 culture broth, cell culture media 모두 0.45 μm syringe filter로 제균한 후 각 농도별로 처리하였다. 각 세포의 무첨가구를 100%(대조구)로 하여 상대적인 세포 생존율(%)을 구하였다.

(2) 세포배양

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-4001를 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 배양 시 각각의 passage number를 기록하였고 passage number가 10회 이상일 때는 새로운 세포를 액체질소 탱크로부터 꺼내어 다시 배양하여 실험하였다.

Collection @ chosun

(3) MTT assay에 의한 세포 생존율 측정

세포 증식 정도를 MTT assay법(64)에 따라 측정하였다. MTT assay는 살아있는 세포의 미토콘드리아 내막에 존재하는 oxide-reductase작용을 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 2×10^4 cells/mL가 되도록 100 μL씩 seeding 하고 37℃, 5% CO_2배양기에서 24시간 동안 세포를 부착시킨 후 시료를 농도별로 첨가하여 48시간 배양하였다. 여기에 인산생리식염수 5 mg/mL의 농도로 제조한 MTT{3-(4,5-dimethylehiazol-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 scanning ELISA reader, BioTek, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Collection @ chosun

2) *B. subtilis* DJI의 배양단계별 상징액의 암세포 성장 억제효과

(1) 시료의 준비

B. subtilis DJI을 37℃에서 24시간 전 배양하여 LB broth에 1%(v/v) 접종한 후 logarithmic phase, stationary phase, death phase 각각의 지점까지 배양한 것을 사용하였다. 준비된 각각의 배양단계별 *B. subtilis* DJI 배양액을 원심분리(9,950 × g, 15 min, 4℃)하여 상징액을 회수한 후 0.45 μm syringe filter로 제균하였다. 제균한 각각의 배양단계별 상징액을 실험에 사용하였다. 각 세포의 배양상징액 무첨가구를 100%(대조구)로 하였고, 각 시료를 농도별로 처리하여 48시간 동안 배양한 세포의 생존율을 대조구에 대한 상대적 세포 생존율(%)로 표기하였다.

(2) 세포배양

실험에 사용되어진 암세포주는 AGS (human gastric adenocarcinoma cell), HT-29 (human colon cancer cell)과 정상세포주 BJ (human foreskin normal cell)를 사용하였으며, 배양방법은 상기의 방법대로 배양하여 실험에 사용하였다.

(3) MTT assay에 의한 세포 생존율 측정

B. subtilis DJI의 배양단계별 상징액의 세포 증식 정도를 측정하기 위하여 MTT assay를 시행하였다. 배양된 각각의 세포주는 96 well plate에 well 당 2×10^4 cells/mL가 되도록 100 μL씩 seeding 하고 37℃, 5% CO_2배양기에서 24시간 동안 세포를 부착시킨 후 시료를 농도별로 첨가하여 48시간 배양하였다. 여기에 인산생리식염수 5 mg/mL의 농도로 제조한 MTT{3-(4,5-dimethylethiazol-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 scanning ELISA reader, BioTek, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Collection @ chosun

3) *B. subtilis* DJI 세포벽성분의 암세포 성장 억제효과

(1) 시료의 준비

B. subtilis DJI으로부터 추출된 세포벽성분(Fig. 2)을 PBS에 녹여 실험에 사용하였다. 세포벽성분은 각 well 당 첨가되는 최종 농도가 45, 450 μg/mL가 되도록 조정하여 세포실험에 사용하였다. 각 세포에 PBS를 첨가한 구간을 100%(대조구)로 하였고, 시료를 농도별로 처리하여 48시간 동안 배양한 세포의 생존율을 대조구에 대한 상대적 세포 생존율(%)로 표기하였다.

(2) 세포배양

실험에 사용된 암세포주는 인체 결장암세포(HT-29: human colon cancer cell)와 대조군으로 인체 포낭 정상세포주 (BJ: human foreskin normal cell)를 사용하였다. 배양방법은 상기의 방법대로 배양하여 실험에 사용하였다.

(3) MTT assay에 의한 세포 생존율 측정

배양된 각각의 세포주는 96 well plate에 well 당 2×10^4 cells/mL가 되도록 100 μL씩 seeding 하고 24시간 동안 37℃, 5% CO_2배양기에서 세포를 부착시킨 후 시료를 농도별로 첨가하여 48시간 배양하였다. 여기에 인산생리식염수에 5 mg/mL의 농도로 제조한 MTT{3-(4,5-dimethylehiazol-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 scanning ELISA reader, BioTek, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

dCollection @ chosun

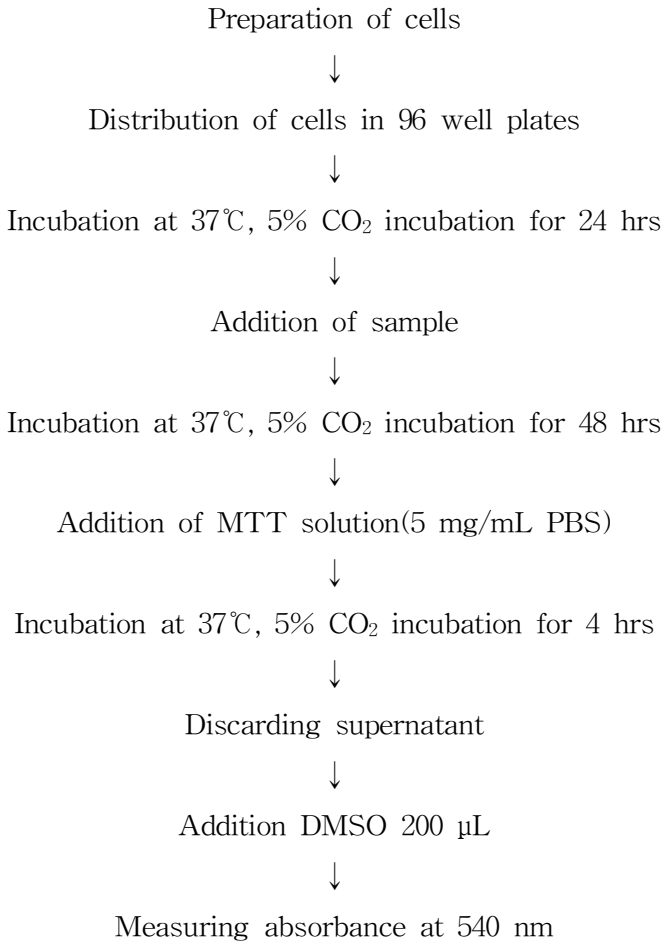

Figure 3. A procedure of cytotoxicity assay using MTT assay.

Collection @ chosun

4) 세포의 형태적 변화 관찰

세포배양은 상기의 방법대로 배양하였으며, 준비된 세포를 culture dish에 2×10^4 cells/mL이 되도록 분주하여 24시간 동안 37℃, 5% CO_2배양기에서 세포를 부착시켰다. 부착 후 각 시료를 첨가하여 48시간 배양한 후 세포의 형태적 변화를 현미경(Nikon ECLIPSE TS100)으로 관찰하였다.

Collection @ chosun

제 2 절. Bacterial-koji(*B. subtilis* DJI)를 이용하여 제조한 천일염 된장의 암세포 성장 억제효과

1. 소금의 종류를 달리한 bacterial-koji 이용 된장 제조

1) Bacterial-koji 제조

본 실험에 이용된 bacterial-koji 제조방법은 장 (3)의 방법에 따라 제조하였다. *B. subtilis* DJI은 37℃에서 24시간 전 배양하여 LB broth에 1% 접종한 후 9시간 배양한 것을 사용하였다. 균체를 회수하여 3차 멸균증류수로 2회 수세한 후 코지 제조에 사용하였다. 코지제조에 사용된 콩은 국내산 소립종을 사용하였으며, 정선된 원료콩 1 kg을 20℃에서 15시간 침지 후 121℃에서 40분간 증자하였다. 삶은 콩은 40℃로 냉각시킨 후 준비된 *B. subtilis* DJI 균체를 원료콩의 1%(w/w) 비율로 접종하였다. 접종 후 39~50℃ 온도에서 12~14시간 배양하였다. 배양 종료 후 항온항습장치(Han Baek Scientific Co. Korea)를 이용해서 24시간동안 20℃, 30% 습도를 유지하면서 풍건시켜 이를 bacterial-koji로 사용하였다.

2) 된장의 제조

본 실험에 이용된 된장제조의 방법은 장 (3)의 방법에 따라 제조하였다. 본 연구에서는 된장제조시 사용되는 소금의 종류를 달리하여 소금의 종류에 따른 된장추출물의 암세포 성장 억제효과를 비교해 보고자 하였다. 따라서 천일염(Shinan-docho, Korea)과 정제염(chunilsalt, Korea)을 사용하여 두 가지 종류의 된장을 제조하였으며, 사용된 소금은 목포대학교 천일염 및 염생식물 산업화 사업단에서 제공받아 사용하였다. 제조된 bacterial-koji에 삶은 콩(원료콩을 기준으로 코지와 같은 양)을 가하고 최종 소금의 농도가 12%(w/v)가 되도록 각각의 소금을 종수에 녹여 함께 섞었다. 이와 같이 제조된 된장을 20℃에서 2개월, 16개월 동안 숙성시켜 실험에 사용하였다(Fig. 4).

Collection @ chosun

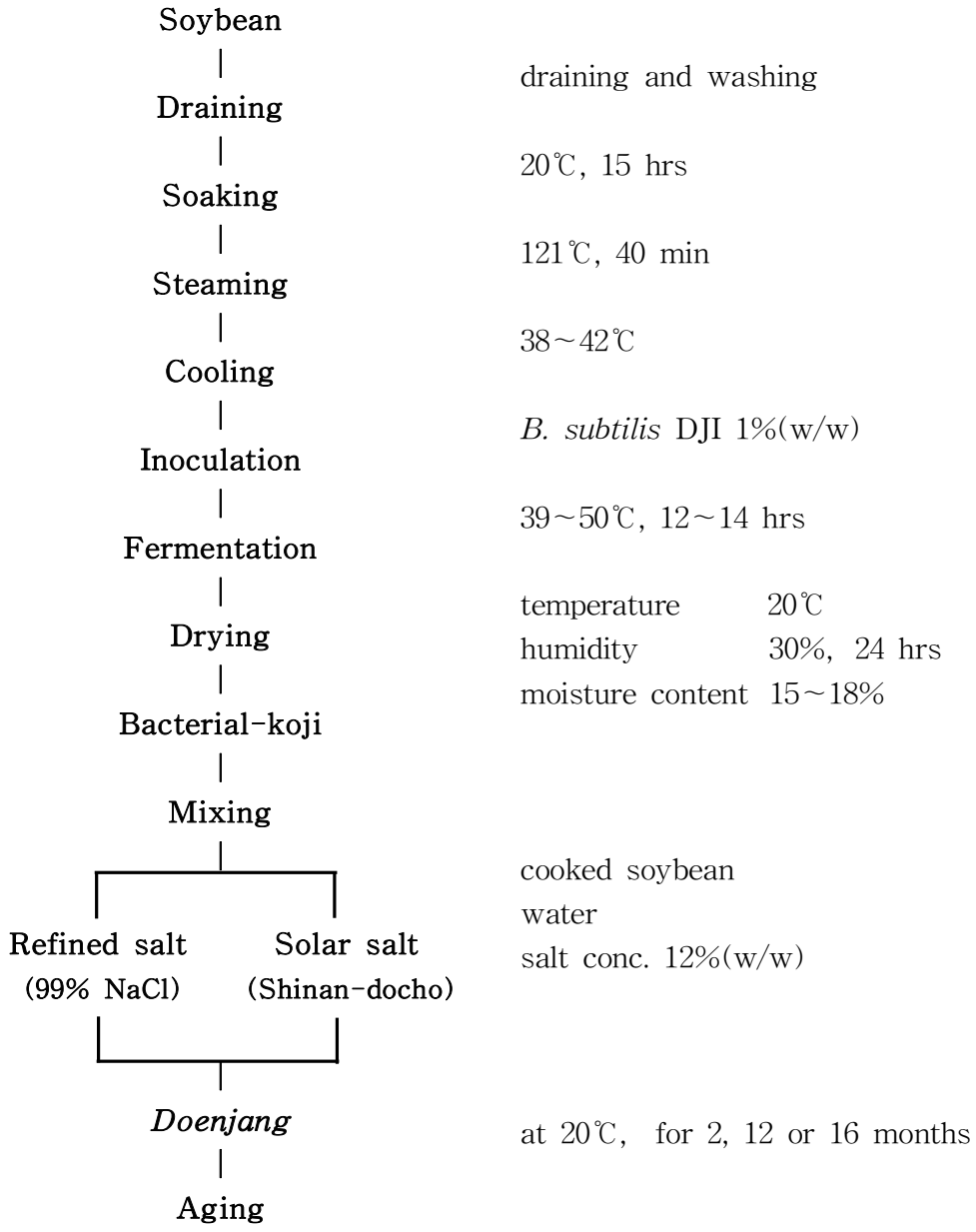

Figure 4. Manufacturing process of bacterial-koji and *doenjang*(3).

Collection @ chosun

2. 된장의 구성아미노산 분석

단백질 구성아미노산은 식품공전에 준하여 측정하였다(39). 시료 약 80~85 mg을 취하여 6 N HCl 7 mL를 가한 후 110℃에서 22시간동안 가수분해 시켰다. 이를 여과하고 rotary vacuum evaporator(Eyela N-1000SW, Japan)로 55℃에서 감압 농축하여 염산을 제거하였다. 이를 증류수 30 mL에 녹인 다음 0.45 μm syringe filter로 여과 후 아미노산 자동분석기(Hitach L-8800 Amino acid analyzer, Japan)에 주입하여 분석하였다.

3. 된장의 유리아미노산 분석

유리아미노산은 식품공전에 준하여 측정하였다(39). 시료 2 g을 취하여 70% ethanol 35 mL를 가하고 1시간동안 균질화 한 후 10분간 방치하였다. 원심분리(21,000 × g, 15 min) 후 상징액을 농축플라스크로 옮겨 70% ethanol 25 mL로 2회 반복 추출하고, 침전물에 다시 70% ethanol 25 mL를 넣고 2회 추출한 후 추출액을 합하여 rotary vacuum evaporator로 감압농축 하였다. 이를 증류수 35 mL에 녹여 0.45 μm syringe filter로 여과한 후 아미노산 자동분석기에 주입하여 분석하였다.

Collection @ chosun

4. 된장의 추출

Bacterial-koji를 이용하여 제조한 천일염, 정제염 된장을 동결 건조시킨 후 시료를 마쇄하였다. 시료에 20배(w/v)의 물, 메탄올을 각각 첨가하여 12시간 교반 추출을 3회 반복하였다. 추출물을 여과(Whatman No. 2)한 후 rotary vacuum evaporator로 농축하여 각각의 물, 메탄올 추출물을 얻었다(Fig. 4).

Collection @ chosun

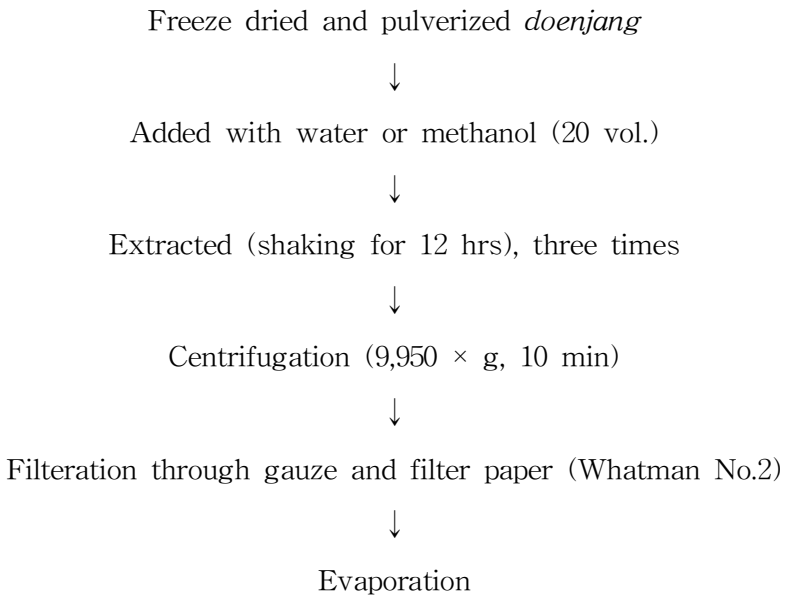

Figure 5. Flow sheet for the preparation of *doenjang* extract.

Collection @ chosun

5. *In vitro* 항암실험

1) 소금의 종류 및 발효기간을 달리한 된장의 암세포 성장 억제효과

(1) 시료의 준비

상기의 방법(Fig. 5)에 따라 추출한 각각의 된장추출물은 cell culture media에 희석하여 실험에 사용하였다. 각 세포에 culture media를 첨가한 구간을 100% (대조구)로 하였으며, 실험구는 각각의 된장추출물을 48시간 동안 농도별로 처리한 각 배양세포의 생존율을 대조구에 대한 상대적 생존율(%)로 표시하였다.

(2) 세포배양

실험에 사용된 세포주는 인체 위암세포(AGS: human gastric adenocarcinoma cell)와 인체 결장암세포(HT-29: human colon cancer cell) 두 종의 종양세포와 대조군으로 인체 포낭 정상세포주 (BJ: human foreskin normal cell)를 사용하였다. 배양방법은 상기의 방법대로 배양하여 실험에 사용하였다.

(3) MTT assay에 의한 세포 생존율 측정

배양된 각각의 세포주는 96 well plate에 well 당 1×10^4 cells/mL가 되도록 180 μL씩 seeding 하고 24시간 동안 37℃, 5% CO_2배양기에서 세포를 부착시킨 후 각 시료를 농도별로 20 μL 첨가하여 48시간 배양하였다. 여기에 인산생리식염수에 5 mg/mL의 농도로 제조한 MTT{3-(4,5-dimethylehiazol-2-yl)-2,5-dipheny ltetrazoliumbromide}용액 20 μL를 첨가하고 4시간 더 배양한 후 생성된 formazan 결정을 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹여 plate reader (UV scanning ELISA reader, BioTek, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Collection @ chosun

2) 세포의 형태적 변화 관찰

세포배양은 상기의 방법대로 배양하였으며, 준비된 세포를 culture dish에 1×10^4 cells/mL가 되도록 분주하여 24시간 동안 37℃, 5% CO_2배양기에서 세포를 부착시켰다. 부착 후 시료가 함유된 배지를 첨가하여 48시간 배양한 후 세포의 형태적 변화를 현미경(Nikon ECLIPSE TS100)으로 관찰하였다.

3) Apoptosis 관찰

배양된 인체 위암세포 AGS를 8 well chamber slide에 well 당 1×10^4 cells/mL가 되도록 seeding 하고 24시간 동안 37℃, 5% CO_2배양기에서 세포를 부착시킨 후 시료를 첨가하여 48시간 배양하였다. Apoptosis 유발 여부를 확인하기 위해 세포에 CaspACE FITC-VAD-FMK Kit(Promega, USA)을 최종 10 μm 농도로 첨가하여 37℃, 5% CO_2배양기에서 30분간 염색하였다. 염색 후 세포를 PBS로 3회 수세한 후 caspase-3 activation을 fluorescence microscope(×200)을 이용하여 관찰하였다(Fig. 6).

Collection @ chosun

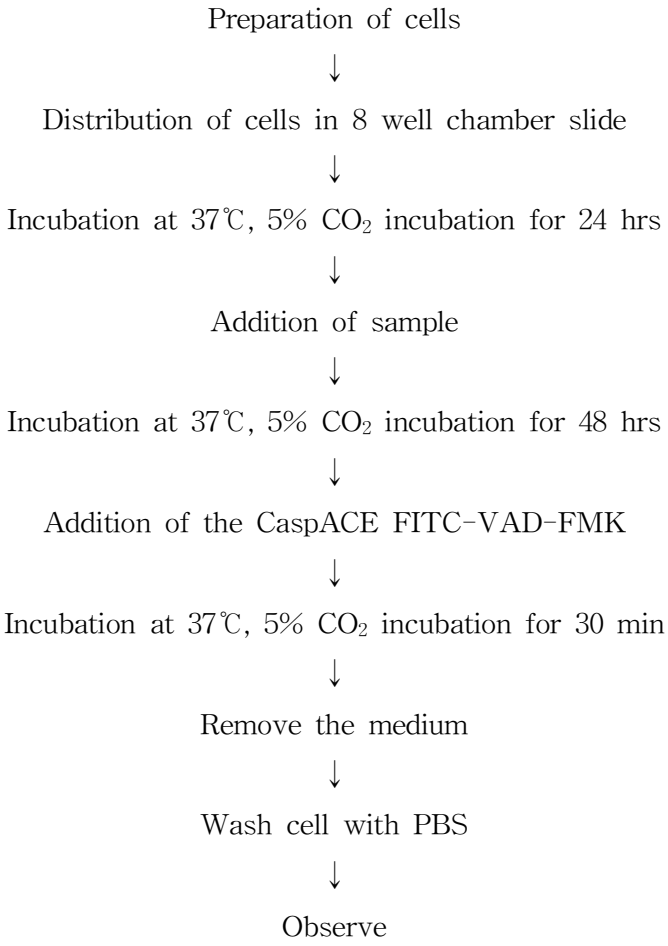

Figure 6. A procedure of apoptosis detection using a fluorescence microscope.

Collection @ chosun

5. 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 T-test에 의하여 실행하였다. 통계적 유의성은 $P < 0.05$를 기준으로 하였다.

Collection @ chosun

제 3 장 결과 및 고찰

1. 암세포 성장 억제효과 균주 선별

본 연구에서는 전통발효식품으로부터 분리된 4종의 균주로부터 항암효과를 지닌 균주를 선별하기 위하여 배양된 각각의 균주 배양액에서 상징액을 분리하였다. 각 균주의 배양상징액의 항암효과를 측정하기 위하여 MTT assay를 실시하였으며, 인체 정상세포주 BJ(human foreskin normal cell), 인체 위암세포주 AGS(human gastric adenocarcinoma cell), 인체 결장암세포주 HT-29(human colon cancer cell)에 시료를 처리한 후 그 생존율을 측정하였다. 각 세포의 배양상징액을 첨가하지 않은 구간을 100%(대조구)로 하였고 실험구는 각 균주의 culture broth 및 배양상징액의 pH로 보정된 culture broth, cell culture media, 배양상징액을 48시간 동안 농도별로 처리한 각 배양세포의 생존율을 대조구에 대한 상대적 생존율(%)로 표시하였다. 각 세포에 대한 각각의 균주 상징액의 세포독성 결과는 Fig. 7~10과 같다.

B. subtilis MJP1 배양액으로부터 분리한 상징액을 정상세포 BJ, 위암세포 AGS, 장암세포 HT-29에 각각 처리하였을 때 각 세포에 대한 세포독성 결과는 Fig. 7과 같다. AGS, HT-29에 cell culture media(RPMI 1640)를 농도별로 첨가하였을시 각 세포의 생육에 영향을 미치지 않는 것으로 관찰되었다. LB broth, pH보정 LB broth를 2.5%~7.5%로 첨가하였을시 AGS의 경우는 각각 93%~87%, 89%~86%로 LB broth 자체만으로도 AGS의 생육을 저해하는 경향을 보였고, pH에 의한 영향은 거의 없는 것으로 관찰되었다. HT-29의 경우는 각각 100%~101%, 100%~104%로 생육에 큰 영향을 미치지 않음을 확인하였다. 반면에 *B. subtilis* MJP1 배양상징액을 AGS, HT-29에 2.5%~7.5%로 농도 처리하였을시 각각 31%~41%, 9%~23%로 농도의존적으로 높은 억제율을 보여 2종의 암세포에 성장 억제효과를 나타냄을 관찰하였다. 정상세포 BJ의 경우는 cell culture media(DMEM)를 처리한 결과 대조구에 비교해 세포 생육에 영향을 미치지 않는 것으로 관찰되었고, LB broth, pH보정 LB broth 처리시 농도의존적으로 세포성장효과를 보여 최고 7.5% 농도에서 LB broth의 경우는 121% 생존율을 보였으며, pH보정 LB broth의 경우는 122%의 높은 세포생존율을 나타내어 정상세포에 대해 LB broth와 *B. subtilis* MJP1 배양상징액의 pH는 독성을 나타내지 않으며

Collection @ chosun

오히려 세포 성장효과를 보임을 확인하였다. 반면에 *B. subtilis* MJP1 배양상징액을 2.5%~7.5% 농도로 처리한 경우 102%~73%의 생존율을 보여 정상세포에 독성을 나타내는 것으로 관찰되었다.

B. polyfermenticus CJ6의 배양상징액을 각각의 세포에 처리하였을 때 각 세포에 대한 세포독성효과는 Fig. 8과 같다. AGS, HT-29에 cell culture media(RPMI 1640)를 첨가한 구간은 대조구에 비교해 세포 성장에 큰 영향을 미치지 않았으나 *B. polyfermenticus* CJ6 배양배지 TSB broth와 pH보정 TSB broth를 처리한 구간의 경우 HT-29는 영향을 받지 않았으나 AGS는 최고 7.5% 농도처리시 각각 74%, 71%의 생존율을 보였다. 위암세포 AGS에 대해 TSB broth 자체만으로도 세포성장을 억제하는 경향을 보이는 것으로 관찰되었다. 그러나 AGS에 *B. polyfermenticus* CJ6 배양상징액을 2.5%~7.5% 농도처리시 50%~59%의 매우 높은 억제율을 보여 위암세포에 대해 TSB broth 자체만으로도 세포 성장저해 경향을 보였으나 배양상징액 처리시 위암세포 억제효과가 더 높은 것으로 관찰되었다. HT-29의 경우도 32%~67%의 매우 높은 억제율을 보여 장암세포 억제효과가 매우 뛰어남을 관찰하였다. 정상세포 BJ에 대해서는 cell culture media(DMEM)를 첨가한 구간은 세포성장에 거의 영향을 미치지 않았으며, TSB broth, pH보정 TSB broth를 처리한 구간에서는 농도의존적으로 세포성장효과를 보였다. 반면에 *B. polyfermenticus* CJ6 배양상징액을 2.5%, 5%, 7.5% 첨가시 각각 73%, 55%, 11%의 생존율을 나타내어 정상세포에 독성을 보임을 관찰하였다.

Lb. plantarum AF1의 배양상징액을 정상세포 BJ, 위암세포 AGS, 대장암세포 HT-29에 각각 처리하여 각 세포에 세포독성을 측정한 결과는 Fig. 9과 같다. Cell culture media(RPMI 1640)를 농도별로 첨가시 AGS와 HT-29의 생육에 거의 영향을 미치지 않는 것으로 관찰되었으나 유산균 배양배지 MRS broth를 최고 7.5% 첨가했을 경우 AGS는 90% 생존율을 나타내어 다소 세포성장을 저해하는 것으로 보였으며, HT-29는 109%의 생존율을 보여 독성을 나타내지 않음을 관찰하였다. 그러나 pH보정 MRS broth를 첨가하였을시 AGS, HT-29의 세포생존율을 농도의존적으로 감소시켜 최고 7.5% 농도에서 각각 15%, 72%의 생존율을 나타내어 pH에 의한 영향으로 세포생존율이 감소함을 확인하였다. *Lb. plantarum* AF1 배양상징액을 2.5%~7.5% 농도로 처리하였을시 AGS의 억제율은 43%~97%, HT-29의 경우는 41%~94%로 매우 높은 억제율을 보임을 관찰하였다. 위 결과로 볼 때 암세포에 대한 *Lb. plantarum* AF1 배양상징액의 높은 억제율은 배양상징액의 효과만이 아니라 pH에 의한 영향이 큰 것으

Collection @ chosun

로 사료되어진다. 정상세포에 cell culture media(DMEM)를 2.5%~7.5%의 농도로 첨가하였을 경우 세포에 큰 영향을 미치지 않았으나 MRS broth 첨가시 농도의존적으로 122%~125%의 높은 생존율을 보였고 pH 보정 MRS broth 첨가시 114%~75%의 생존율을 나타내어 pH에 의해 세포성장 저해효과를 보임을 관찰하였다. *Lb. plantarum* AF1의 배양상징액 2.5% 농도첨가시 98%의 생존율을 보였으며, 5%, 7.5% 농도첨가시 각각 46%, 16%의 생존율 보여 농도의존적으로 세포독성이 증가함을 관찰하였다.

B. subtilis DJI의 배양상징액을 각각의 세포에 처리했을 때 각 세포에 대한 세포독성효과는 Fig. 10과 같다. 각 세포의 cell culture media(RPMI 1640, DMEM)를 농도별로 첨가시 AGS와 HT-29, BJ의 세포 생육에는 거의 영향을 미치지 않음을 관찰하였다. AGS에 *B. subtilis* DJI의 배양배지 LB broth와 pH보정 LB broth를 2.5%~7.5%의 농도로 첨가하였을 시 각각 95%~87%로 같은 생존율을 나타내어 pH에 의한 영향은 보이지 않았으나 LB broth가 위암세포의 성장을 다소 저해시키는 것으로 관찰되었다. HT-29에 대해서 모든 구간에서 세포생육에 영향을 미치지 않는 것으로 관찰되었다. 정상세포 BJ의 경우 LB broth와 pH보정 LB broth를 첨가한 구간에서 농도의존적으로 세포성장효과를 보여 최고 7.5% 처리농도에서 각각 125%, 124%의 높은 생존율을 나타내었다. *B. subtilis* DJI의 배양상징액을 각 세포에 2.5%~7.5%의 농도로 처리했을 때 위암세포 AGS, 대장암세포 HT-29에 대한 각각의 억제효과는 11%~21%, 13%~32%의 억제율을 나타내었으며, 정상세포 BJ의 경우 105%~120%의 생존율을 보임을 관찰하였다. *B. subtilis* DJI의 배양상징액은 정상세포 BJ에 독성을 나타내지 않으면서 위암세포 AGS, 대장암세포 HT-29에 대해 특이적으로 세포독성을 나타냄을 확인하였다.

따라서 본 연구에서는 전통발효식품으로부터 분리된 4종의 각 균주에서 배양상징액을 분리하여 항암효과를 조사한 결과 *B. subtilis* MJP1, *B. polyfermenticus* CJ6, *Lb. plantarum* AF1은 2종의 암세포에 대해 매우 높은 억제효과를 보였으나 정상세포에 대해서도 독성을 나타냄을 확인하였다. 그러나 *B. subtilis* DJI의 경우는 정상세포 BJ에 대해 독성을 나타내지 않았으며 오히려 농도의존적으로 세포성장효과를 보임을 관찰하였고, 특이적으로 2종의 암세포에 대해서는 성장억제효과를 보여 함암활성이 뛰어남을 확인하였다.

Collection @ chosun

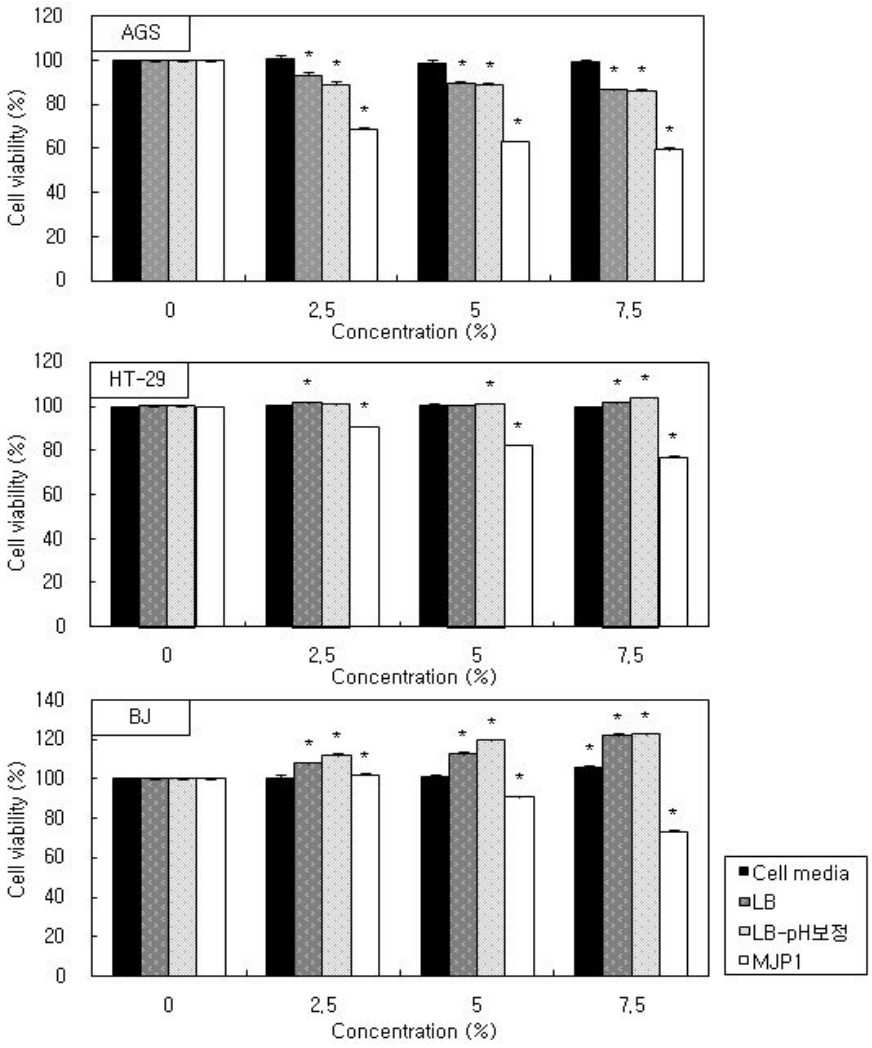

Figure 7. Cytotoxicity of the culture supernatants from *B. subtilis* MJP1 on cell viability.

Cells were exposed to different concentrations of culture supernatants from *B. subtilis* MJP1 for 48 hrs and then cell viability was assessed by MTT assay.

All values represent ± S.D of three independent experiments.

*Significant differences were compared with controls(0% concentration of the culture supernatants) of $p < 0.05$ by T-test.

Collection @ chosun

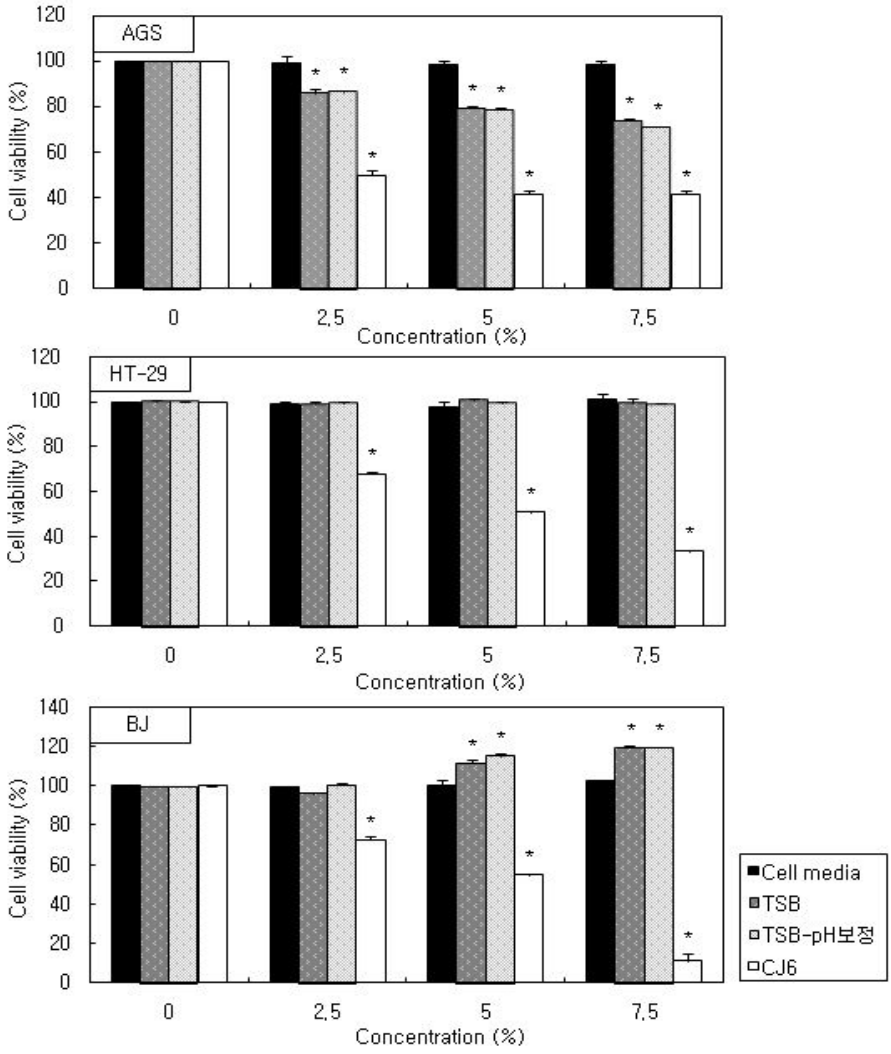

Figure 8. Cytotoxicity of the culture supernatants from *B. polyfermenticus* CJ6 on cell viability.

Cells were exposed to different concentrations of culture supernatants from *B. polyfermenticus* CJ6 for 48 hrs and then cell viability was assessed by MTT assay. All values represent ± S.D of three independent experiments.

*Significant differences were compared with controls(0% concentration of the culture supernatants) of $p < 0.05$ by T-test.

Collection @ chosun

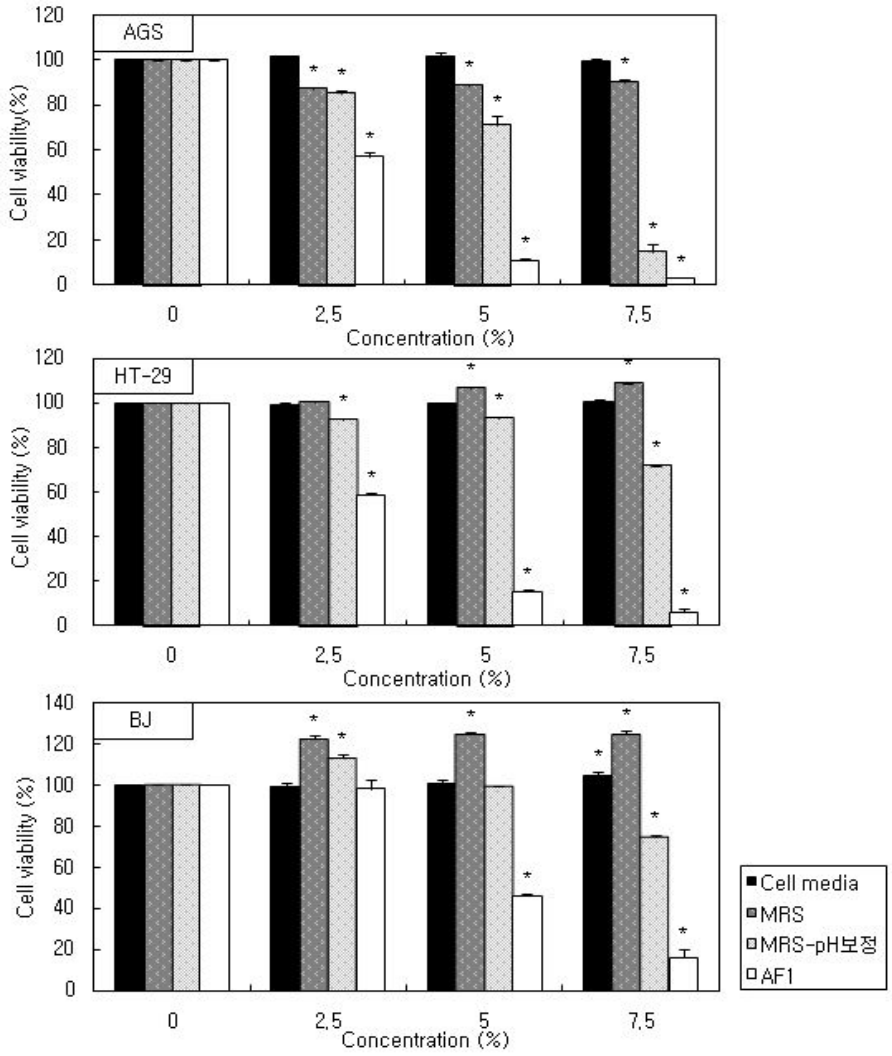

Figure 9. Cytotoxicity of the culture supernatants from *Lb. plantarum* AF1 on cell viability.

Cells were exposed to different concentrations of culture supernatants from *Lb. plantarum* AF1 for 48 hrs and then cell viability was assessed by MTT assay.

All values represent ± S.D of three independent experiments.

*Significant differences were compared with controls(0% concentration of the culture supernatants) of $p < 0.05$ by T-test.

Collection @ chosun

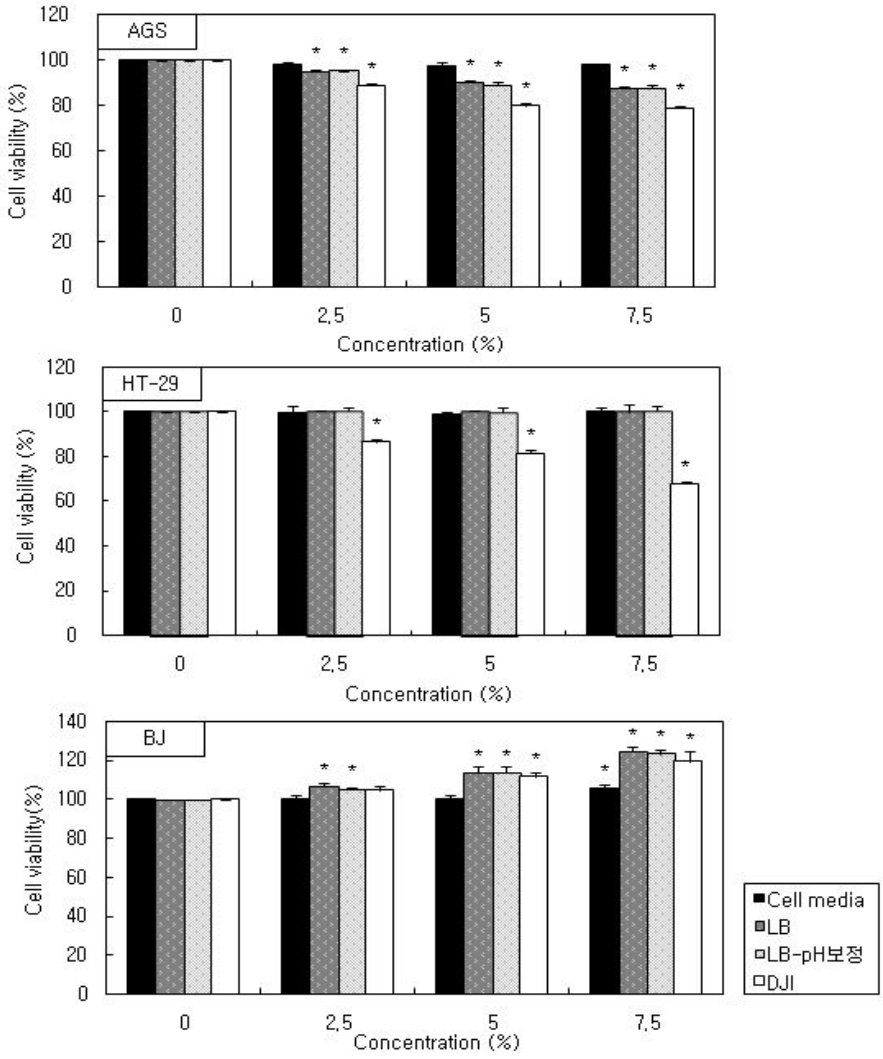

Figure 10. Cytotoxicity of the culture supernatants from *B. subtilis* DJI on cell viability.

Cells were exposed to different concentrations of culture supernatants from *B. subtilis* DJI for 48 hrs and then cell viability was assessed by MTT assay.

All values represent ± S.D of three independent experiments.

*Significant differences were compared with controls(0% concentration of the culture supernatants) of $p < 0.05$ by T-test.

Collection @ chosun

2. *B. subtilis* DJI 배양단계별 상징액의 암세포 성장 억제효과

B. subtilis DJI의 배양단계별 상징액의 암세포 성장 억제효과를 알아보기 위하여 MTT assay를 실시하였으며 인체 정상세포주 BJ(human foreskin normal cell)에 대한 세포독성과 인체 위암세포주 AGS(human gastric adenocarcinoma cell), 인체 결장암세포주 HT-29(human colon cancer cell)에 대한 세포독성을 알아보았다. 각 세포의 배양상징액 무첨가구를 100%(대조구)로 하여 배양세포의 생존율을 대조구에 대한 상대적 생존율(%)로 구하였다.

위암세포 AGS에 대한 *B. subtilis* DJI의 배양단계별 상징액의 세포 성장억제효과는 Fig. 11과 같다. 각각의 배양단계의 상징액을 처리한 모든 구간에서는 대조구에 비교해 유의적인($p < 0.05$) 차이를 보였으며, death phase에 도달 할수록 세포 성장억제효과가 증가하였다. Logarithmic phase의 경우 농도의존적으로 세포 성장을 억제 하였으며, 2.5~10%의 농도처리시 12~27%의 억제율을 보였다. Stationary phase의 경우는 2.5%의 농도에서부터 20% 억제율을 보였으며, 농도의존적으로 억제율이 증가하여 최고 10%의 농도에서 33%의 높은 억제율을 보였다. Death phase의 경우 2.5%, 5%, 7.5%의 농도에서 각각 22%, 29%, 31%의 억제율을 보였으며 최고 10%의 농도에서 44%의 높은 억제율을 보여 death phase의 상징액이 위암세포 성장억제효과가 가장 뛰어난 것으로 관찰되었다.

대장암세포 HT-29에 대한 *B. subtilis* DJI의 배양단계별 상징액의 성장억제효과는 Fig. 12와 같이 logarithmic phase의 경우 2.5% 농도에서 15%의 억제율을 보였고 이후의 농도인 5%, 7.5%, 10%에서는 농도의존적으로 각각 19%, 26%, 37%의 높은 억제율을 보였다. Stationary phase의 경우는 2.5%, 5%의 농도에서 19%, 22%의 비슷한 억제율을 보였으나 이후 7.5%, 10%의 농도처리시 31%, 39%의 높은 억제율을 나타냈다. Death phase의 경우도 2.5%, 5%의 농도에서는 20%, 23%의 비슷한 억제율을 보였지만 7.5%의 농도에서 35%, 10%의 농도에서 41%의 높은 억제율을 보임을 관찰하였다. HT-29에 *B. subtilis* DJI의 각 배양단계별 상징액을 처리한 구간은 대조구에 비교해 유의적인($p < 0.05$) 차이를 나타내었다.

BJ 정상세포에 대한 *B. subtilis* DJI의 배양단계별 상징액의 세포독성은 Fig. 13 과 같다. BJ에 대한 logarithmic phase의 경우 모든 농도에서 세포독성을 보이지 않았으며, 2.5%의 농도에서 103%의 생존율을 보였고 5%, 7.5%, 10%의 농도에서는 농도의

Collection @ chosun

존적으로 106%, 109%, 115%의 유의적인($p < 0.05$) 차이를 나타내어 오히려 세포성장 효과를 보임을 관찰하였다. Stationary phase의 경우 2.5%의 농도에서 96%의 생존율을 보여 세포독성을 나타내는 것처럼 보였으나 이후의 농도인 5%~10%의 농도에서는 101~114%의 세포성장효과를 보여 세포독성을 나타내지 않음을 알 수 있었다. Death phase의 경우도 2.5%의 농도에서 98%의 생존율을 나타내어 정상세포에 대해 독성을 나타내는 것처럼 보였으나 5%의 처리 농도에서 101%의 생존율을 나타내었고 7.5%, 10%의 농도에서 각각 103%, 114%의 유의적인($p < 0.05$) 차이를 나타내어 정상세포에 대한 세포독성이 없고 오히려 세포성장효과를 나타냄을 관찰하였다.

B. subtilis DJI의 배양단계별 상징액의 암세포 억제효과를 비교해 보기위해 각 배양단계 상징액의 동일 최대 농도인 10% 처리 구간을 비교해 보았다. 위암세포 AGS에 대한 logarithmic phase의 경우 27%의 억제율을 보였고, stationary phase는 33%, death phase는 44%의 억제율을 보여 AGS에 대한 *B. subtilis* DJI의 각 배양단계별 상징액의 세포 성장억제효과는 death phase에 도달할수록 증가됨을 확인하였다. HT-29의 경우 logarithmic phase에서 37%, stationary phase의 경우 39%, death phase에는 41%의 억제율을 보여 각 배양단계의 상징액이 모두 비교적 높은 억제율을 보였으며 death phase에 상징액이 가장 높은 세포 성장억제효과를 보임을 확인하였다. 위 결과로 볼 때 *B. subtilis* DJI의 각 배양단계별 상징액은 정상세포 BJ에 독성을 보이지 않고 오히려 세포성장효과를 지니는 반면에 위암세포 AGS와 대장암세포 HT-29에 대해서는 암세포 성장 억제효과가 높은 것으로 관찰되었다. 2종의 암세포에 대한 성장 억제효과는 death phase, stationary phase, logarithmic phase 순으로 높아 death phase의 암세포 성장 억제효과가 우수함을 확인하였다.

Fig. 14는 위상차 현미경을 이용하여 *B. subtilis* DJI의 death phase 상징액을 각 세포에 10%의 농도로 처리하였을 때 세포의 형태적 변화를 나타낸 사진이다. 대조구는 *B. subtilis* DJI의 death phase 상징액을 처리하지 않은 구간으로 정상세포 BJ, 위암세포 AGS, 대장암세포 HT-29의 정상적인 세포의 모습을 보였다. *B. subtilis* DJI의 death phase 상징액을 처리한 구간에서 정상세포 BJ는 성장에 영향을 받지 않으며 대조구와 비슷한 모습을 보였으나 2종의 암세포는 정상적으로 성장하지 못하고 세포밀도가 감소하는 현상을 관찰하였다. AGS의 경우 세포의 형태적 변화 및 잔유물이 발견되었고, HT-29의 경우도 세포밀도 감소 및 형태적 변화가 뚜렷이 관찰되었다.

Collection @ chosun

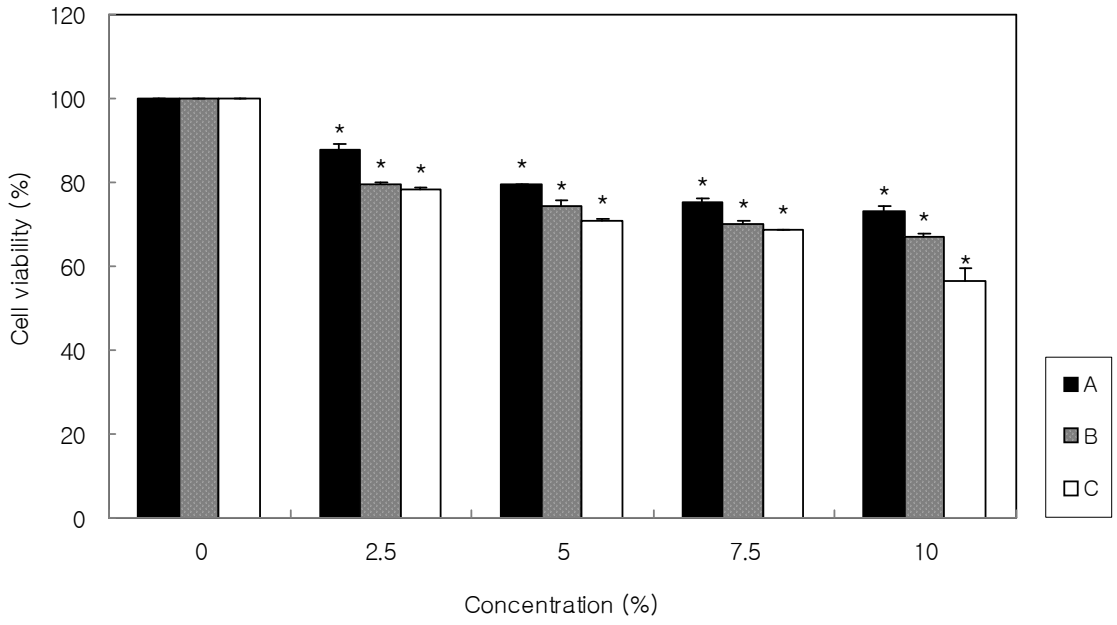

Figure 11. Cytotoxicity of the culture supernatants from *B. subtilis* DJI cultivation phases on human gastric adenocarcinoma cell.

AGS cells were exposed to different concentrations of culture supernatants from *B. subtilis* DJI cultivation phases for 48 hrs and then cell viability was assessed by MTT assay.

All values represent ± S.D of three independent experiments.

*Significant differences were compared with controls (0% concentration of the culture supernatants) of $p < 0.05$ by T-test.

B. subtilis DJI culture supernatant from logarithmic phase: A, stationary phase: B, or death phase: C.

Collection @ chosun

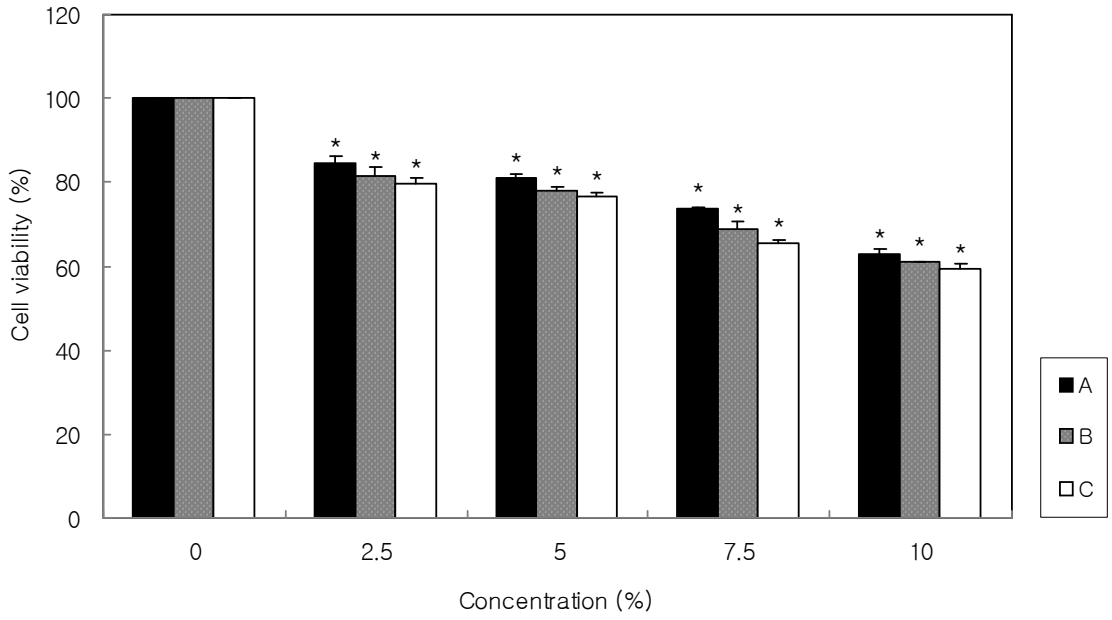

Figure 12. Cytotoxicity of the culture supernatants from *B. subtilis* DJI cultivation phases on human colon cancer cell.

HT-29 cells were exposed to different concentrations of culture supernatants from *B. subtilis* DJI cultivation phases for 48 hrs and then cell viability was assessed by MTT assay.

All values represent ± S.D of three independent experiments.

*Significant differences were compared with controls (0% concentration of the culture supernatants) of $p < 0.05$ by T-test.

B. subtilis DJI culture supernatant from logarithmic phase: A, stationary phase: B, or death phase: C.

Collection @ chosun

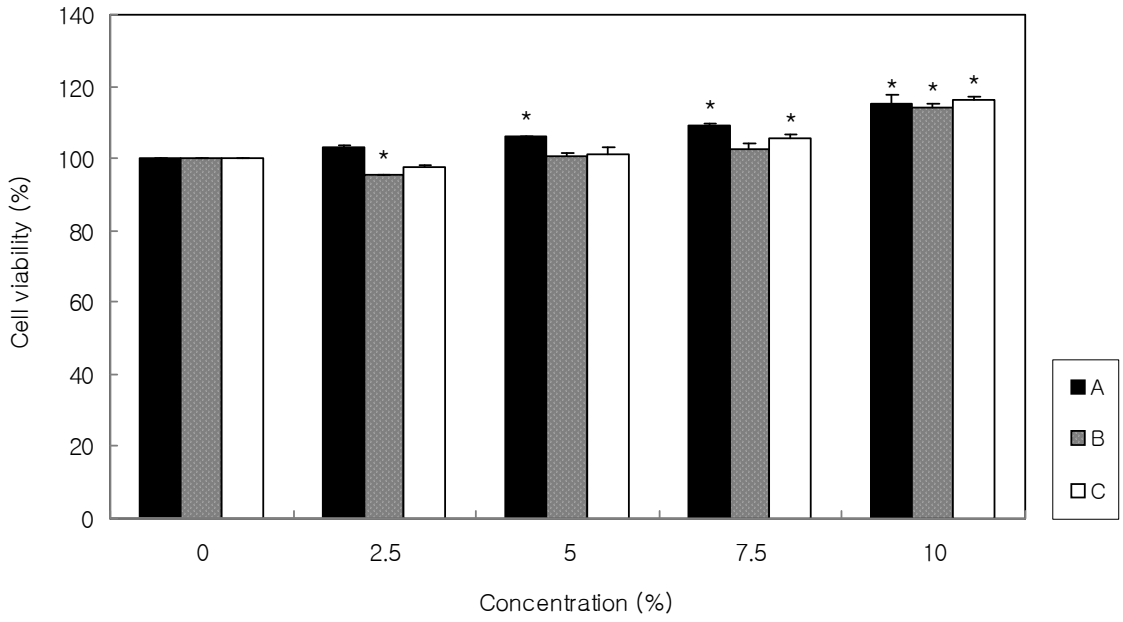

Figure 13. Cytotoxicity of the culture supernatants from *B. subtilis* DJI cultivation phases on human foreskin normal cell.

BJ cells were exposed to different concentrations of culture supernatants from *B. subtilis* DJI cultivation phases for 48 hrs and then cell viability was assessed by MTT assay.

All values represent ± S.D of three independent experiments.

*Significant differences were compared with controls (0% concentration of the culture supernatants) of $p < 0.05$ by T-test.

B. subtilis DJI culture supernatant from logarithmic phase: A, stationary phase: B, or death phase: C.

Collection @ chosun

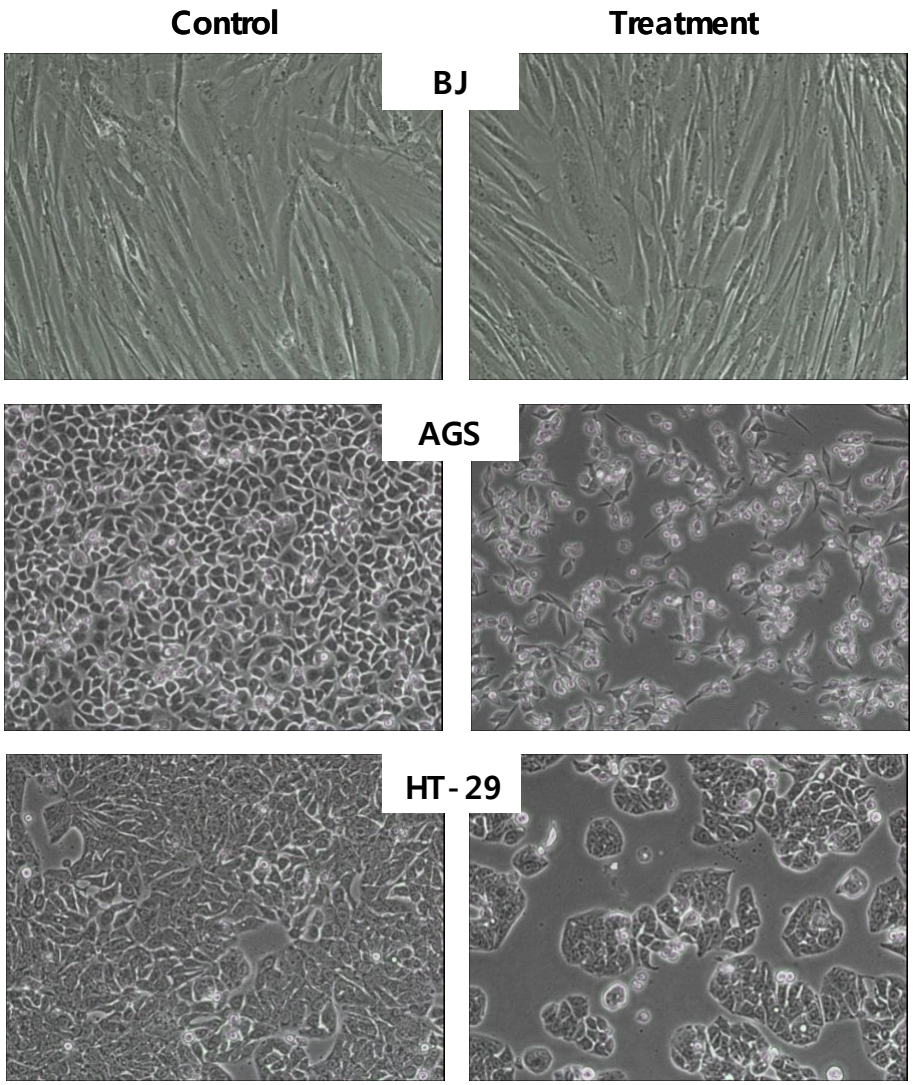

Figure 14. Photomicrographs(x100) of BJ, HT-29 and AGS cells treated with culture supernatants at 10% from *B. subtilis* DJI cultivation death phases.

The cells were treated by 10% of culture supernatants from *B. subtilis* DJI cultivation death phases.

Collection @ chosun

3. *B. subtilis* DJI 세포벽성분의 수율과 암세포 성장 억제효과

본 연구결과 *B. subtilis* DJI의 whole cell로부터 추출한 세포벽성분의 수율은 59%를 나타내었다. 세포벽성분의 암세포 성장 억제효과를 알아보기 위하여 정상세포 BJ(human foreskin normal cell)에 대한 세포독성과 2종의 종양세포 AGS(human gastric adenocarcinoma cell), HT-29(human colon cancer cell)에 대한 세포독성을 알아보았다. 시료대신 각 세포에 PBS를 첨가한 구간을 100%(대조구)로 하여 세포벽성분을 처리한 각 세포의 생존율을 대조구에 대한 상대적 생존율(%)로 구하였다.

정상세포 BJ와 대장암세포 HT-29에 대한 *B. subtilis* DJI 세포벽성분의 세포독성 효과는 Fig. 15와 같다. 정상세포 BJ에 대하여 *B. subtilis* DJI 세포벽성분을 45 μg/mL로 처리하였을시 100%의 생존율을 보여 세포독성을 나타내지 않았으나 450 μg/mL의 농도에서는 96%의 생존율을 보여 약간의 독성을 나타내었다. 반면에 *B. subtilis* DJI 세포벽성분의 대장암세포 HT-29에 대한 세포 성장억제효과는 뚜렷히 관찰되었다. 즉 45 μg/mL와 450 μg/mL의 농도에서 86%, 52%의 생존율을 가짐으로써 각각 14%, 48%의 높은 세포성장 억제율을($p < 0.05$) 나타내어, *B. subtilis* DJI으로 제조된 된장뿐만아니라 *B. subtilis* DJI 세포벽 자체도 강력한 항암활성이 있음을 나타내었다.

이 (42)등은 ICR mouse에서 고형암 및 복수암에 대하여 유산균 세포벽성분 분획물의 암세포 억제능력을 측정한 결과 시료 투여 농도가 높을수록 항암효과가 증가하였으며, 복수암의 경우 muramic acid와 polysaccaride 분획물을 각각 처리한 경우보다 결합된 상태일 때 암세포 억제능력이 더 높음을 보고하였다. 김 (30)은 유산균 *Lactobacillus pentosus* SGU 0010과 *Streptococcus thermophilus* SGU 0021로부터 분리한 세포벽성분을 결장암세포 WiDr에 5 mg/ml의 농도로 처리했을 때 각각 20.3%, 37.9%의 억제율을 보였다고 보고하였다. 본 연구결과에서는 *B. subtilis* DJI으로부터 분리된 세포벽성분을 450 μg/mL 농도처리시 인체 결장암세포 HT-29에 대해 48%의 높은 억제율을 보임으로 장암세포에 대한 *B. subtilis* DJI의 세포벽성분은 유산균으로부터 분리된 세포벽성분 보다 항암효과가 매우 우수함을 확인하였다.

B. subtilis DJI의 세포벽성분 450 μg/mL 첨가에 의한 세포형태 변화를 위상차 현미경을 이용하여 관찰한 결과는 Fig. 16과 같다. 정상세포 BJ의 생육에는 거의 영향을 미치지 않지만 대장암세포 HT-29에 대해서는 특이적으로 세포사멸을 유발함을 알 수 있었다. 대장암 세포의 밀도감소 뿐만 아니라 뚜렷한 세포의 형태적 변화를 관

Collection @ chosun

찰함으로써 항암효과가 있는 것으로 확인되었다. 따라서 본 연구결과는 *Bacillus*로부터 세포벽성분을 추출하였고, *Bacillus*로부터 추출된 세포벽성분의 항암활성 관련 보고로는 최초의 보고이다.

Collection @ chosun

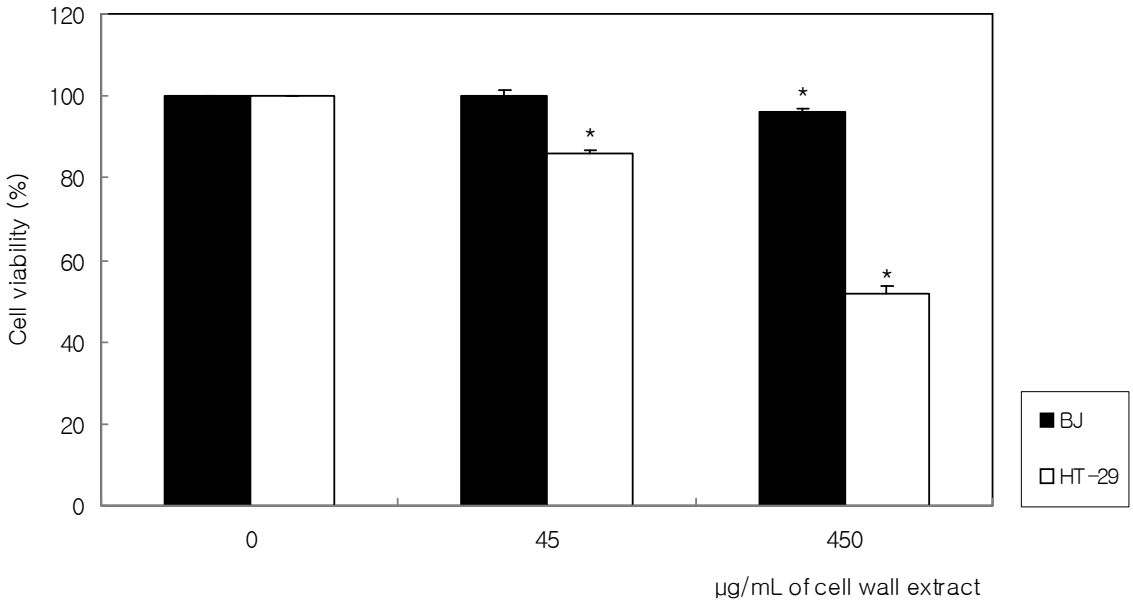

Figure 15. Cytotoxicity of the cell wall extract isolated from *B. subtilis* DJI whole cell on human foreskin normal cell and human colon cancer cell.

Cells were exposed to different concentrations of the cell wall extract isolated from *B. subtilis* DJI whole cell for 48 hrs and then cell viability was assessed by MTT assay.

All values represent ± S.D of three independent experiments.

*Significant differences were compared with controls (0 μg/mL concentration of the extract) of $p < 0.05$ by T-test.

Collection @ chosun

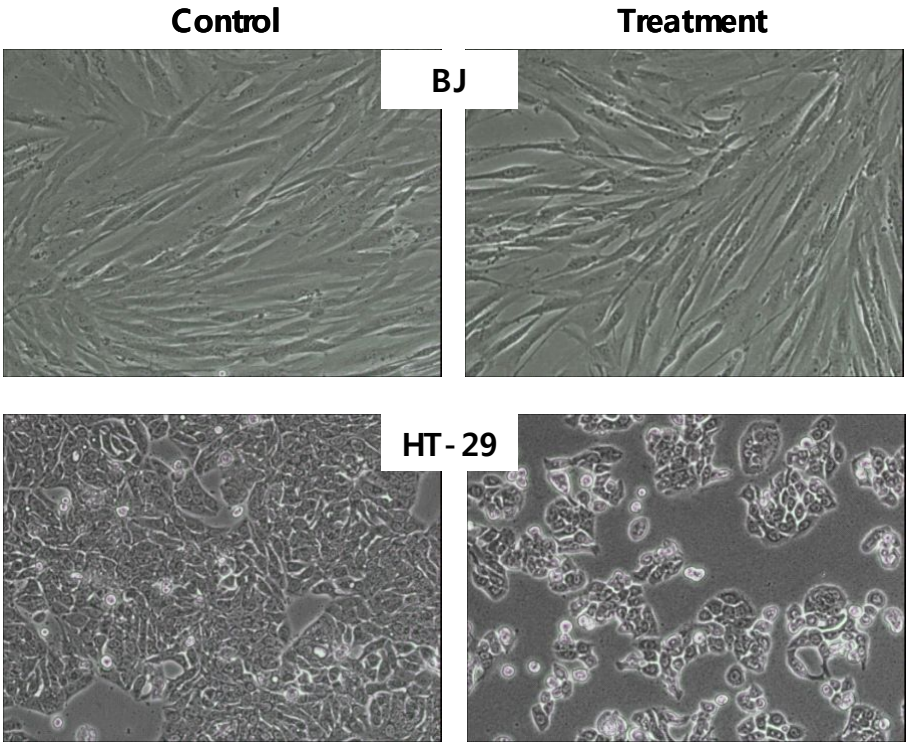

Figure 16. Photomicrographs(x100) of BJ and HT-29 cells treated with cell wall extract isolated from *B. subtilis* DJI whole cell.

The cells were treated by 450 μg/mL of cell wall extract isolated from *B. subtilis* DJI whole cell.

Collection @ chosun

4. 된장의 구성아미노산, 유리아미노산 분석

본 실험은 소금의 종류를 달리하여 제조한 된장(정제염된장, 천일염된장)의 숙성 중 원료 단백질의 가수분해작용에 의해 생성되는 구성아미노산과 유리아미노산의 함량을 측정하여 소금의 종류에 따른 아미노산의 함량을 비교해 보고자 하였다. 소금의 종류를 달리한 된장의 숙성 중 구성아미노산과 유리아미노산의 함량을 측정한 결과는 Table 2~5와 같다.

구성아미노산의 함량은 정제염된장의 경우(Table 2) 제조직후 총 함량이 277661.01 mg%였으나 숙성 2개월과 12개월에서 각각 12182.93 mg%와 12696.03 mg%로 감소하였고, 천일염된장의 경우는(Table 3) 제조직후 총 함량이 29906.27 mg%였고 숙성 2개월과 12개월의 경우 각각 10084.68 mg%와 13716.77 mg%로 숙성이 경과함에 따라 구성아미노산의 총 함량이 감소하는 것으로 나타났다. 정제염과 천일염된장 모두 된장의 감칠맛과 관련된 glutamic acid와 aspartic acid가 가장 높은 함량을 나타냈으며, 그 다음으로 leucine, lysine, arginie, valine 등이 높은 함량을 차지하여 본 연구결과는 앞서 수행되어진 보고(62, 31)들과 유사한 결과를 나타내었다.

유리아미노산의 함량은 된장의 맛을 좌우하는 중요한 요인 중에 하나로 소금의 종류를 달리한 된장의 유리아미노산 함량을 비교해 보면 정제염된장의 경우(Table 4) 제조직후 1181.62 mg%를 나타냈고 숙성 2개월에는 1716.86 mg%, 숙성 12개월은 1892.98 mg%로 나타내어 숙성이 진행될수록 유리아미노산의 함량이 증가함을 확인하였다. 천일염된장의 경우(Table 4) 제조직후 1254.37 mg%를 나타냈고 숙성 2개월과 12개월에서 각각 1953.10 mg%와 2001.31 mg%로 숙성과정이 경과함에 따라 유리아미노산의 함량이 증가하였다.

본 연구결과 소금의 종류를 달리한 된장 간의 유리아미노산 함량 증가율을 비교해 보면 정제염된장의 경우 제조직후를 100%(1181.62 mg%)로 하여 숙성 2개월에는 145%(1716.86 mg%), 숙성 12개월에는 160%(1892.98 mg%)로 나타났다. 천일염된장의 경우도 제조직후를 100%(1254.37 mg%)로 하여 숙성 2개월은 156%(1716.86 mg%), 숙성 12개월은 160%(2001.31 mg%)를 나타내어 2개월 숙성시 천일염된장이 11% 더 높은 증가율을 나타내었고, 12개월 숙성시에는 각각 160%로 증가율이 같음을 확인하였다. 따라서 정제염 및 천일염된장 모두 숙성이 경과함에 따라 유리아미노산의 함량이 증가함을 알 수 있었다. 위 결과로 된장의 숙성이 경과함에 따라 원료 단백질의 가수분해작용이 활발히 일어나지만 일정기간 이후에는 이러한 작용이 거의 마무리 되는 것으로 추측되어진다.

Collection @ chosun

Table 2. Changes of total amino acids in refined salt *B. subtilis* DJI *doenjang*

(unit : mg%)

Amino acid	Ripended period		
	Initial	2 months	12 months
Aspartic acid	3608.96	1519.11	1581.74
Threonine	1194.26	553.59	574.04
Serine	1280.28	698.40	712.80
Glutamic acid	6230.05	2338.82	2541.62
Glycine	1401.32	604.59	621.83
Alanine	1443.05	602.99	626.53
Valine	1784.03	679.66	715.27
Cystathionine	67.78	6.57	6.91
Isoleucine	1525.62	626.86	643.63
Leucine	2485.20	1087.20	1122.53
Tyrosine	189.08	487.43	504.42
Phenylalanine	1572.21	719.05	737.67
γ-Amino-n-butyric acid	30.38	12.37	11.41
Ornithine	134.86	43.77	37.56
Lysine	1996.61	895.27	914.74
Histidine	839.24	359.63	364.33
Arginie	1878.08	947.63	979.00
Total	27661.01	12182.93	12696.03

Collection @ chosun

Table 3. Changes of total amino acids in solar salt *B. subtilis* DJI *doenjang*

(unit : mg%)

Amino acid	Ripended period		
	Initial	2 months	12 months
Aspartic acid	3819.11	1617.79	1716.51
Threonine	1275.74	584.09	632.29
Serine	1325.37	729.76	766.86
Glutamic acid	6580.17	2674.14	2791.28
Glycine	1489.26	637.52	676.32
Alanine	1577.33	638.57	680.94
Valine	2155.87	714.71	768.34
Cystathionine	80.66	7.41	6.93
Isoleucine	1684.26	656.62	692.88
Leucine	2657.99	1139.63	1214.39
Tyrosine	453.91	512.99	495.22
Phenylalanine	1669.83	756.61	807.43
ɣ-Amino-n-butyric acid	34.78	10.84	11.11
Ornithine	152.70	29.55	33.03
Lysine	2073.87	939.57	993.04
Histidine	864.63	375.49	395.93
Arginie	2010.83	991.04	1034.27
Total	29906.27	10084.68	13716.77

Collection @ chosun

Table 4. Changes of free amino acids in refined salt *B. subtilis* DJI *doenjang*

(unit : mg%)

Amino acids	Ripended period		
	Initial	2 months	12 months
Aspartic acid	12.75	22.91	27.39
Threonine	18.18	43.55	54.99
Serine	22.76	55.20	66.70
Glutamic acid	186.06	234.40	255.88
Sarcosine	30.32	36.86	43.06
Glycine	22.14	43.94	52.20
Alanine	53.35	108.02	123.52
Citrulline	19.78	11.77	14.74
Valine	98.60	140.65	154.45
Methionine	25.95	45.16	45.17
Cystathionine	10.28	18.04	23.08
Isoleucine	89.26	135.04	146.90
Leucine	89.69	141.09	158.41
Tyrosine	105.76	153.17	164.46
Phenylalanine	114.03	159.26	175.38
ɣ-Amino-n-butyric acid	33.51	30.60	32.71
Tryptophan	40.18	39.31	33.87
Ornithine	6.65	1.65	1.73
Lysine	61.63	98.79	107.15
Histidine	46.64	64.56	68.87
Carnosine	47.40	44.65	43.78
Arginie	46.69	88.24	98.52
Total	1181.62	1716.86	1892.98

Collection @ chosun

Table 5. Changes of free amino acids in solar salt *B. subtilis* DJI *doenjang*

(unit : mg%)

Amino acids	Ripended period		
	Initial	2 months	12 months
Aspartic acid	13.24	24.84	27.68
Threonine	18.71	60.26	67.00
Serine	24.68	71.44	78.74
Glutamic acid	193.86	260.52	261.24
Sarcosine	33.24	41.95	43.96
Glycine	23.18	50.24	55.51
Alanine	57.50	120.73	127.92
Citrulline	22.05	12.38	15.28
Valine	103.86	155.48	158.84
Methionine	27.72	51.71	49.78
Cystathionine	12.10	19.73	23.11
Isoleucine	96.10	150.45	153.31
Leucine	94.26	162.07	169.20
Tyrosine	113.43	175.14	175.32
Phenylalanine	123.15	186.99	192.64
ɣ-Amino-n-butyric acid	36.44	32.59	32.73
Tryptophan	38.96	41.05	35.45
Ornithine	6.63	1.82	1.81
Lysine	64.20	111.18	112.18
Histidine	49.26	70.40	69.29
Carnosine	53.67	50.27	44.83
Arginie	48.15	101.86	105.50
Total	1254.37	1953.10	2001.31

Collection @ chosun

5. 소금의 종류 및 발효기간을 달리한 된장의 암세포 성장 억제효과

1) 소금의 종류를 달리한 2개월 숙성 된장의 암세포 성장 억제효과

소금의 종류를 달리한 2개월 숙성 된장의 세포독성을 알아보기 위해 MTT assay를 실시하였다. 대조구로 정상세포 BJ는 DMEM에서, 나머지 두 종의 암세포는 RPMI 1640 배지를 처리하여 이때의 생존율을 100%로 표시하고, 실험구는 소금의 종류를 달리하여 제조한 2개월 숙성 된장을 물과 메탄올로 추출한 각각의 시료를 48시간 동안 농도별로 처리한 각 배양세포의 생존율을 대조구에 대한 상대적 생존율(%)로 표시하였다.

소금의 종류를 달리한 2개월 숙성 된장의 물 추출물과 메탄올 추출물은 위암세포 AGS에 대해 성장 억제효과를 나타냈으며, AGS에 대한 2개월 숙성 된장의 물 추출물의 세포 성장억제효과는 Fig. 17과 같다. 천일염된장의 경우 0.005 mg/mL의 농도에서 97%의 생존율을 보여 억제효과가 거의 없는 것으로 보였으나 0.05 mg/mL~1 mg/mL의 농도 처리 시 16~41%의 높은 억제율을 보였다. 정제염된장의 경우 0.005 mg/mL와 0.05 mg/mL의 농도에서 96%, 94%의 생존율을 보여 억제효과가 거의 없는 것으로 나타났으나 0.5 mg/mL, 1 mg/mL의 농도에서는 각각 26%, 29%의 억제율을 나타냄을 관찰하였고 대조구에 비교해 실험구 모든 구간에서 유의적인($p < 0.05$) 차이를 나타내었다. 각 농도에서 천일염, 정제염된장간의 유의적인($p < 0.05$) 차이를 보이는 구간은 0.05 mg/mL~1 mg/mL로 물 추출물에서 천일염된장이 정제염된장보다 우수함을 입증하였다. AGS에 대한 2개월 숙성 된장의 메탄올 추출물의 세포 성장억제효과는 Fig. 18과 같다. 천일염된장의 경우 0.005 mg/mL~0.5 mg/mL의 농도처리시 7~27%의 억제율을 보였으며, 최대 1 mg/mL의 농도에서 29%의 억제율을 보였다. 정제염된장의 경우 0.005 mg/mL에서부터 15%의 억제율을 보였으며, 0.05 mg/mL~1 mg/mL의 농도에서는 23~32%의 높은 억제율을 나타내었다. 메탄올 추출물의 경우 천일염, 정제염된장은 모든 농도에서 대조구에 비교해 유의적인($p < 0.05$) 차이를 보였으며, 각각의 농도에서 소금의 종류를 달리한 두 종류의 된장은 0.005 mg/mL~1 mg/mL의 농도에서 서로 유의적인($p < 0.05$) 차이를 보여 2개월 숙성 된장의 메탄올 추출물의 경우 정제염된장이 더 우수함을 알 수 있었다.

HT-29에 대한 소금의 종류를 달리한 2개월 숙성 된장의 각각의 추출물은 세포

Collection @ chosun

성장억제효과를 나타내었다. 2개월 숙성 된장의 물 추출물의 세포 성장억제효과는 Fig. 19과 같다. 천일염된장의 경우 0.005 mg/mL, 0.05 mg/mL의 저 농도에서는 세포 성장억제효과가 없는 것으로 보였으나 0.5 mg/mL과 1 mg/mL 고 농도에서는 25%, 40%의 높은 억제율을 보였다. 정제염된장의 경우 0.005 mg/mL의 농도에서 생존율이 106%로 증가하여 억제효과가 없는 것으로 관찰되었으나 0.05 mg/mL에서부터 6%의 억제율을 나타내었고, 0.5 mg/mL에서 13%, 1 mg/mL의 농도에서 24%의 억제율을 보여 농도의존적으로 억제효과가 증가하여 유의적인($p < 0.05$) 차이를 나타냈다. 2개월 숙성 된장의 물 추출물의 경우 0.5 mg/mL와 1 mg/mL의 각각의 농도에서 천일염된장과 정제염된장이 서로 유의적인($p < 0.05$) 차이를 보여 물 추출물에서 천일염된장이 HT-29에 대한 세포 성장억제효과가 더 뛰어남을 확인하였다. HT-29에 대한 2개월 숙성 된장의 메탄올 추출물의 세포증식억제효과는 Fig. 20과 같다. 천일염된장의 경우 0.005 mg/mL의 농도에서 106%로 오히려 세포성장효과를 보였으나 이후 0.05 mg/mL에서부터 6%의 억제율을 나타내었고 0.5 mg/mL에서 17%, 1 mg/mL에서 26%의 억제율을 보여 농도의존적으로 억제효과가 증가함을 알 수 있었다. 정제염된장은 0.005 mg/mL의 농도에서는 생존율이 증가하여 105%를 나타냈으나 0.05 mg/mL~1 mg/mL의 농도에서는 7%~27%의 억제율을 보임을 관찰하였다. 메탄올 추출물의 경우 대조구에 비교해 실험구 모든 구간에서 유의적인($p < 0.05$) 차이를 보였으며, 각각의 농도에서 천일염된장과 정제염된장간의 유의적인($p < 0.05$) 차이는 보이지 않았다.

정상세포 BJ에 대한 소금의 종류를 달리한 2개월 숙성 된장의 물 추출물과 메탄올 추출물은 세포독성이 거의 없는 것으로 관찰되었으며, BJ에 대한 2개월 숙성 된장의 물 추출물의 세포독성효과는 Fig. 21과 같다. 천일염된장은 0.005 mg/mL의 농도에서 98%의 생존율을 보여 약간의 독성을 보이는 듯 했으나 0.05 mg/mL에서 103%, 0.5 mg/mL에서 최대 111%의 높은 생존율을 보였고, 1 mg/mL의 농도에서는 106%의 생존율을 보여 세포독성을 나타내지 않았고 오히려 세포 성장효과가 있음을 확인하였다. 정제염된장의 경우는 0.005 mg/mL의 농도에서 생존율 97%로 정상세포에 독성을 보이는 것으로 관찰되었으나 0.05 mg/mL~1 mg/mL의 구간에서는 농도의존적으로 100~114%의 높은 생존율을 보여 세포독성을 보이지 않으며 세포 성장효과가 있음을 관찰하였다. BJ에 대한 2개월 숙성 된장의 메탄올 추출물의 세포독성효과는 Fig. 22과 같다. 천일염된장의 경우 0.005 mg/mL의 농도처리시 101%

Collection @ chosun

의 생존율을 보였으며, 0.05 mg/mL에서 100%, 0.5 mg/mL에서 117%, 1 mg/mL에서 118%의 높은 세포성장효과를 보였다. 정제염된장의 경우 0.005 mg/mL와 0.05 mg/mL에서 103%의 생존율을 보였고 0.5 mg/mL에서 최고 108%의 생존율을 나타냈으며, 1 mg/mL에서 104%의 생존율을 나타내어 세포독성을 나타내지 않음을 알 수 있었다. 서로 같은 농도에서 천일염, 정제염된장을 비교했을 때 물 추출물의 경우 1 mg/mL에서 유의적인($p < 0.05$) 차이를 보였으며, 메탄올 추출물의 경우 0.05 mg/mL~1 mg/mL에서 유의적인($p < 0.05$) 차이를 보여 천일염된장의 메탄올 추출물이 정제염된장보다 정상세포에 대해 더 높은 세포성장효과를 지님을 확인하였다.

이와 같이 천일염과 정제염을 이용하여 제조한 2개월 숙성 된장의 각각의 추출물은 정상세포 BJ에 대해 세포독성을 보이지 않고 오히려 세포성장효과를 지니는 반면 2종의 암세포 AGS와 HT-29에 대해서는 암세포 성장억제효과가 높은 것으로 관찰되었다. 소금의 종류를 달리한 각각의 된장추출물의 암세포 성장억제효과를 비교해 보기 위해 최대 처리 농도인 1 mg/mL로 비교해 보았다. 위암세포 AGS에 대한 천일염된장의 물 추출물의 경우 41%, 메탄올 추출물의 경우 29%의 억제율을 보였고, 정제염된장의 물 추출물의 경우 29%, 메탄올 추출물의 경우 32%의 억제율을 보여 천일염된장이 정제염된장보다 위암세포 성장 억제효과가 매우 뛰어남을 알 수 있었다. HT-29에 대한 천일염된장의 물 추출물은 40%, 메탄올 추출물의 경우는 26%의 억제율을 보였고, 정제염된장의 물 추출물은 24%, 메탄올 추출물에서는 27%의 억제율을 보여 정제염된장보다 천일염된장이 대장암세포 HT-29에 대한 성장억제효과가 우수함을 확인하였다.

황(19)의 연구보고에 의하면 AGS와 HT-29에 대한 천일염과 정제염을 이용하여 제조한 된장추출물의 *in vitro* 항암 활성을 검토한 결과 100 μg의 농도처리시 AGS의 경우 천일염된장은 39%, 정제염된장은 36%를 보였고, HT-29의 경우 천일염된장은 40%, 정제염된장은 28%의 억제율을 보여 천일염된장이 정제염된장보다 암세포 억제효과가 뛰어난 것으로 관찰되었다. 한편 억제효과가 본 실험에 비교해 매우 높은 이유는 MTT assay 시행 시 세포를 부착시키지 않고 바로 시료를 첨가하여 실험한 것에 따른 차이로 여겨진다.

이 밖에도 소금의 종류를 달리하여 제조한 된장의 관한 연구로 황(21) 등은 천일염, 정제염, 1번 구운죽염, 9번 구운죽염을 이용하여 제조한 된장추출물의 항돌연변이 효과를 본 결과 9번 구운죽염, 1번 구운죽염, 천일염, 정제염 순으로 항돌연변이

Collection @ chosun

효과가 높았으며 정제염된장보다 천일염된장이 항돌연변이 효과가 더 뛰어남을 보고하였다.

Collection @ chosun

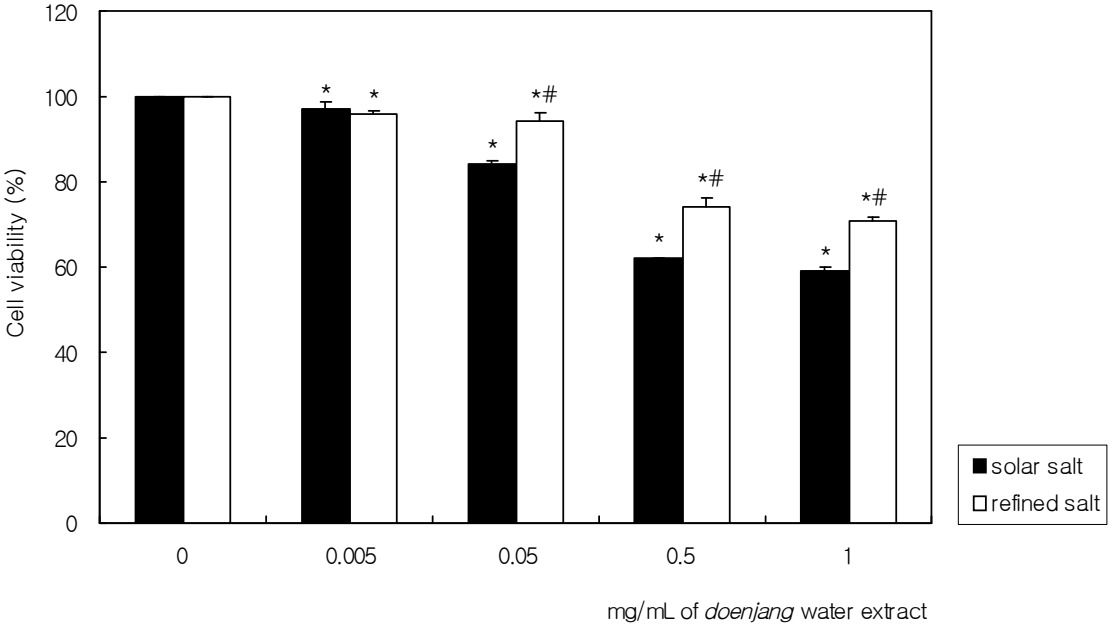

Figure 17. Effects of the water extracts from 2MO ripened *doenjang* with solar salt and refined salt on human gastric adenocarcinoma cell viability.

AGS cells were exposed to different concentrations of 2MO ripened *doenjang* with solar salt and refine salt water extracts for 48 hrs and then cell viability was assessed by MTT assay.

All values represent ± S.D of three independent experiments.

*Significant differences were compared with controls (0 mg/mL concentration of the extract, #*doenjang* with each concentration) of $p < 0.05$ by T-test.

2MO, 2-months ripened *doenjang*.

dCollection @ chosun

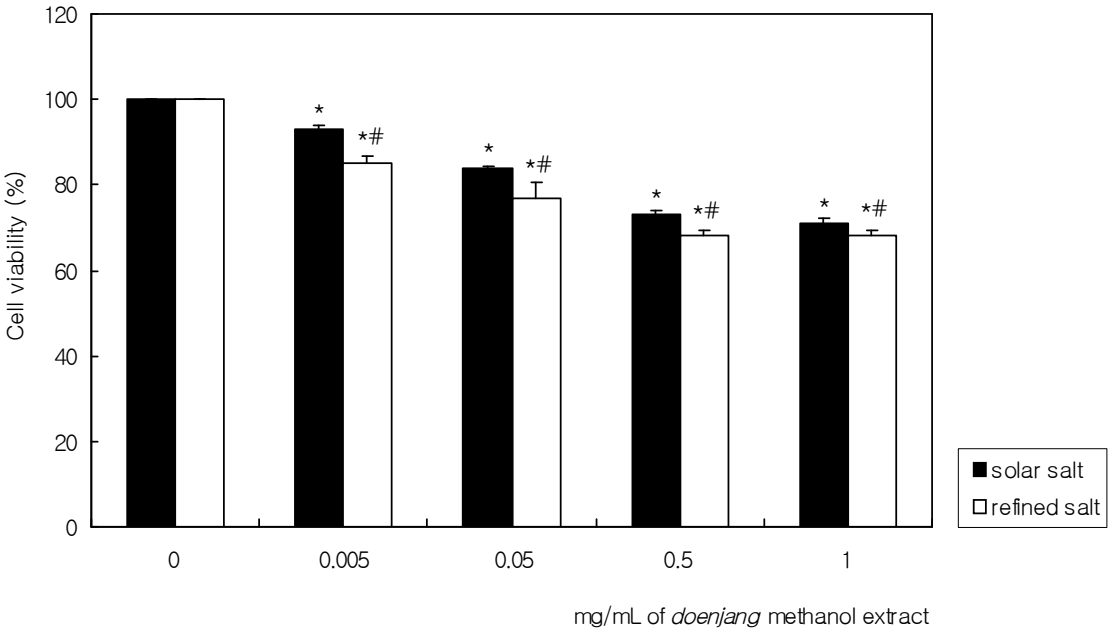

Figure 18. Effects of the methanol extracts from 2MO ripened *doenjang* with solar salt and refined salt on human gastric adenocarcinoma cell viability.

AGS cells were exposed to different concentrations of 2MO ripened *doenjang* with solar salt and refine salt methanol extracts for 48 hrs and then cell viability was assessed by MTT assay.

All values represent ± S.D of three independent experiments.

*Significant differences were compared with controls (0 mg/mL concentration of the extract, #*doenjang* with each concentration) of $p < 0.05$ by T-test.

2MO, 2-months ripened *doenjang*.

Collection @ chosun

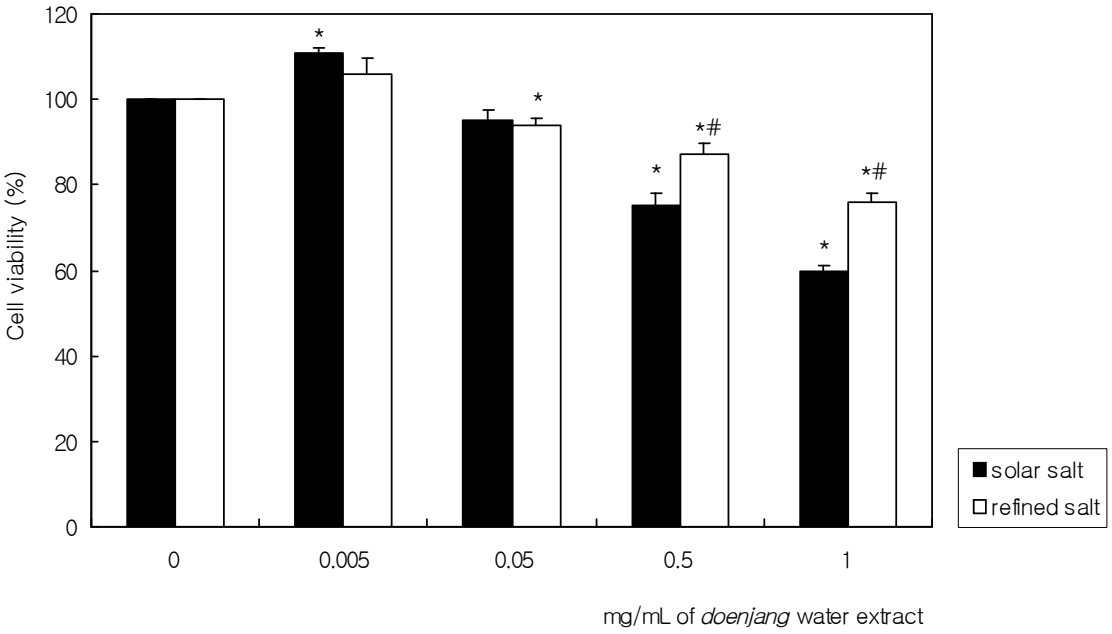

Figure 19. Effects of the water extracts from 2MO ripened *doenjang* with solar salt and refined salt on human colon cancer cell viability.

HT-29 cells were exposed to different concentrations of 2MO ripened *doenjang* with solar salt and refine salt water extracts for 48 hrs and then cell viability was assessed by MTT assay.

All values represent ± S.D of three independent experiments.

*Significant differences were compared with controls (0 mg/mL concentration of the extract, #*doenjang* with each concentration) of $p < 0.05$ by T-test.

2MO, 2-months ripened *doenjang*.

dCollection @ chosun

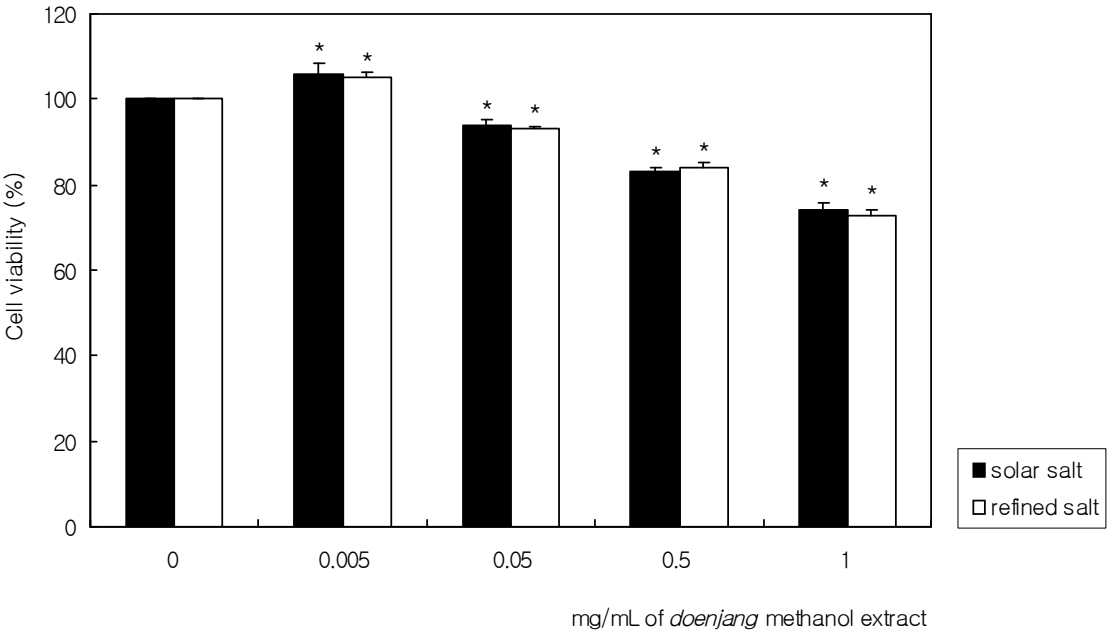

Figure 20. Effects of the methanol extracts from 2MO ripened *doenjang* with solar salt and refined salt on human colon cancer cell viability.

HT-29 cells were exposed to different concentrations of 2MO ripened *doenjang* with solar salt and refine salt methanol extracts for 48 hrs and then cell viability was assessed by MTT assay.

All values represent ± S.D of three independent experiments.

*Significant differences were compared with controls (0 mg/mL concentration of the extract, #*doenjang* with each concentration) of $p < 0.05$ by T-test.

2MO, 2-months ripened *doenjang*.

Collection @ chosun

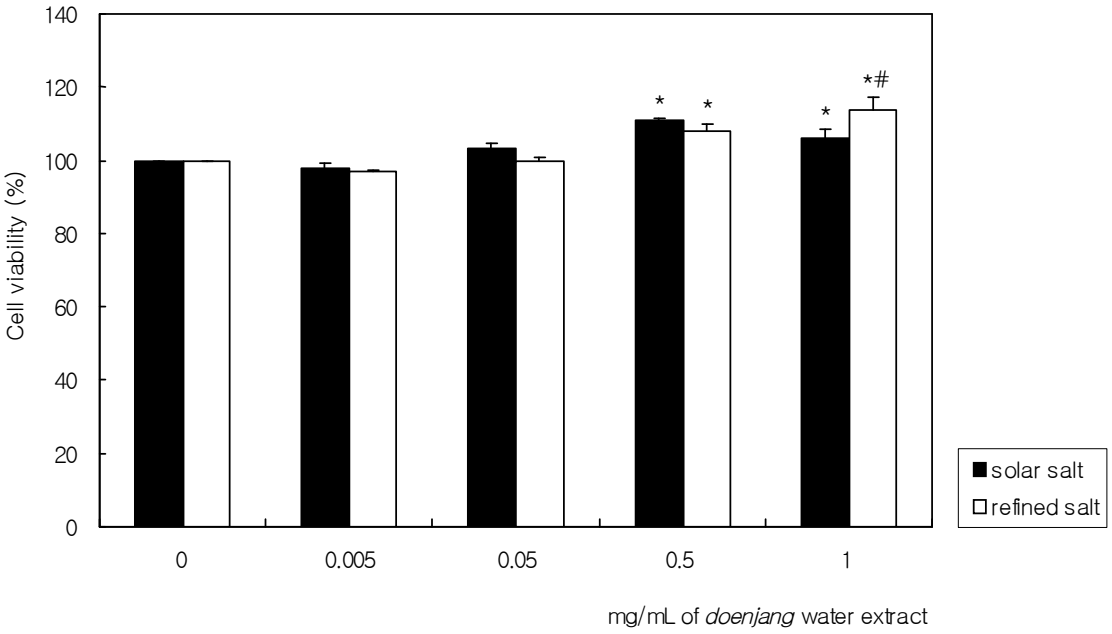

Figure 21. Effects of the water extracts from 2MO ripened *doenjang* with solar salt and refined salt on human foreskin normal cell viability.

BJ cells were exposed to different concentrations of 2MO ripened *doenjang* with solar salt and refine salt water extracts for 48 hrs and then cell viability was assessed by MTT assay.

All values represent ± S.D of three independent experiments.

*Significant differences were compared with controls (0 mg/mL concentration of the extract, #*doenjang* with each concentration) of $p < 0.05$ by T-test.

2MO, 2-months ripened *doenjang*.

dCollection @ chosun

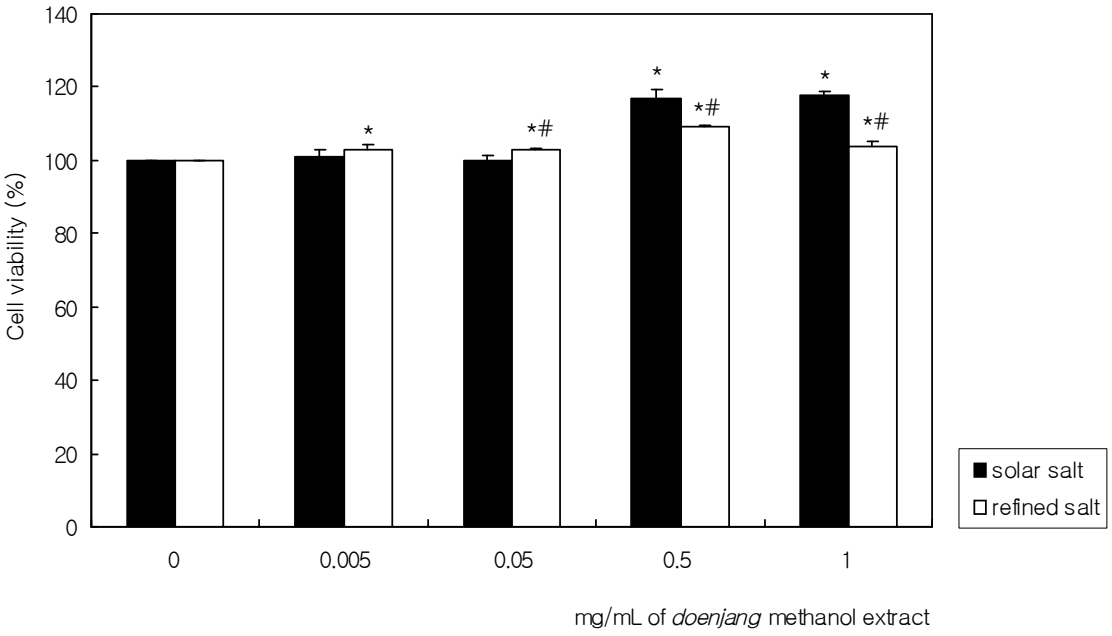

Figure 22. Effects of the methanol extracts from 2MO ripened *doenjang* with solar salt and refined salt on human foreskin normal cell viability.

BJ cells were exposed to different concentrations of 2MO ripened *doenjang* with solar salt and refine salt methanol extracts for 48 hrs and then cell viability was assessed by MTT assay.

All values represent ± S.D of three independent experiments.

*Significant differences were compared with controls (0 mg/mL concentration of the extract, #*doenjang* with each concentration) of $p < 0.05$ by T-test.

2MO, 2-months ripened *doenjang.*

Collection @ chosun

2) 소금의 종류를 달리한 16개월 숙성 된장의 암세포 성장 억제효과

발효기간 및 소금의 종류에 따른 된장의 항암효과를 알아보기 위해 천일염, 정제염을 첨가하여 제조한 각각의 된장을 16개월 동안 숙성시킨 후 물과 메탄올로 추출한 시료의 농도를 달리하여 인체 정상세포주 BJ(human foreskin normal cell)에 대한 세포독성과 인체 위암세포주 AGS(human gastric adenocarcinoma cell), 인체 결장암세포주 HT-29(human colon cancer cell) 두 종의 암세포에 투여하여 각각의 암세포주의 성장억제효과를 관찰하였다.

소금의 종류를 달리한 16개월 숙성 된장의 물 추출물과 메탄올 추출물은 위암세포 AGS에 대해 성장억제효과를 나타냈으며, AGS에 대한 16개월 숙성 된장의 물 추출물의 세포 성장억제효과는 Fig. 23과 같다. 천일염된장은 0.005 mg/mL의 농도에서 10%의 억제율을 나타냈으며 0.05 mg/mL에서 17%, 0.5 mg/mL와 1 mg/mL의 농도에서는 각각 38%, 50%로 유의적인($p < 0.05$) 차이를 나타내었으며, 농도의존적으로 높은 억제율을 보였다. 정제염된장의 경우 0.005 mg/mL의 농도처리시 9%의 억제율을 보였으며, 0.05 mg/mL~1 mg/mL의 농도에서 14~32%의 억제율을 나타내어 모든 농도에서 유의적인($p < 0.05$) 차이를 보였다. 16개월 숙성 된장의 물 추출물의 경우 0.05 mg/mL~1 mg/mL의 각각의 농도에서 천일염된장과 정제염된장간의 유의적인($p < 0.05$) 차이를 보여 물 추출물에서 천일염된장이 정제염된장 보다 위암세포 억제효과가 더 우수함을 알 수 있었다. AGS에 대한 16개월 숙성 된장의 메탄올 추출물의 세포 성장억제효과는 Fig. 24와 같다. 천일염된장의 경우 0.005 mg/mL~1 mg/mL의 농도처리시 억제율은 9~36%로 유의적인($p < 0.05$) 차이를 나타내었다. 정제염된장은 0.005 mg/mL에서 11%의 억제율을 보였고 0.05 mg/mL~1 mg/mL의 농도에서 20~42%의 높은 억제율을 나타내었으며 모든 구간에서 유의적인($p < 0.05$) 차이를 보였다. 또한 각각의 모든 농도에서 천일염된장과 정제염된장간의 유의적인($p < 0.05$) 차이를 보여 16개월 숙성 된장의 메탄올 추출물의 경우 정제염된장이 위암세포 억제효과가 더 뛰어남을 확인하였다.

HT-29에 대한 소금의 종류를 달리한 16개월 숙성 된장의 각각의 추출물은 세포성장억제효과를 나타내었고 HT-29에 대한 16개월 숙성 된장의 물 추출물의 세포성장억제효과는 Fig. 25와 같다. 천일염된장은 0.005 mg/mL와 0.05 mg/mL의 농도에서 각각 100%, 97%의 생존율을 나타내어 세포 성장억제효과가 없는 것으로 관찰

Collection @ chosun

되었으나 0.5 mg/mL에서 29%의 최고 1 mg/mL 농도처리시 44%의 높은 억제율을 보여 유의적인($p < 0.05$) 차이를 나타냈다. 정제염된장의 경우 0.005 mg/mL의 농도에서 102%의 생존율을 나타내어 오히려 세포 성장효과를 보였으나 0.05 mg/mL의 농도처리시 8%의 억제율을 보이면서 0.5 mg/mL와 1 mg/mL의 농도에서 각각 20%, 32%의 억제율을 보였다. 0.05 mg/mL~1 mg/mL의 각각의 농도에서 천일염된장과 정제염된장은 서로 유의적인($p < 0.05$) 차이를 보여 물 추출물의 경우는 정제염된장보다 천일염된장이 HT-29 세포의 성장억제효과가 더 우수한 것으로 관찰되었다. HT-29에 대한 16개월 숙성 된장의 메탄올 추출물의 세포증식억제효과는 Fig. 26과 같다. 천일염된장의 경우 0.005 mg/mL와 0.05 mg/mL의 저 농도에서 각각 99%와 98%의 생존율을 나타내어 유의적인($p < 0.05$) 차이를 보이지 않았으나 0.5 mg/mL의 농도에서 억제율 21%, 1 mg/mL의 농도에서 억제율은 30%로 유의적인($p < 0.05$) 차이를 보였다. 정제염된장의 경우 0.005 mg/mL에서 102%의 생존율을 보여 세포 성장억제효과가 없는 것으로 보였으나 0.05 mg/mL의 농도에서 억제율 9%를 보였고 0.5 mg/mL에서 26%, 1 mg/ml는 35%의 억제율을 보여 유의적인($p < 0.05$) 차이를 나타냈다. 0.05 mg/mL~1 mg/mL의 각각의 농도에서 소금의 종류를 달리한 두 종류의 된장간의 유의적인($p < 0.05$) 차이를 보였다. 메탄올 추출물의 경우 정제염된장이 HT-29에 대해 성장 억제효과가 더 높은 것으로 관찰되었다.

정상세포 BJ에 대한 소금의 종류를 달리한 16개월 숙성 된장의 물 추출물과 메탄올 추출물은 세포독성이 없는 것으로 관찰되었고 BJ에 대한 16개월 숙성 된장의 물 추출물의 세포독성효과는 Fig. 27과 같다. 천일염된장의 경우 0.005 mg/mL에서 105%의 생존율 보였고, 농도가 증가할수록 세포성장효과를 나타냈으며, 최대 1 mg/mL의 농도에서는 114%의 높은 세포성장효과를 보였다. 정제염된장의 경우도 천일염 된장에서와 같이 0.005 mg/mL에서 103%의 생존율 보였고, 농도가 증가할수록 세포성장효과를 나타내어 1 mg/mL의 농도에서는 112%의 세포성장효과를 나타냈다. 대조구에 비교해 천일염된장은 실험구 모든 구간에서 유의적인($p < 0.05$) 차이를 보였으며, 정제염된장의 경우 0.05 mg/mL~1 mg/mL의 농도에서 유의적인($p < 0.05$) 차이를 보였다. 0.005 mg/mL와 1 mg/mL의 농도에서는 천일염된장과 정제염된장간의 유의적($p < 0.05$) 차이를 보임을 확인되었다. BJ에 대한 16개월 숙성 된장의 메탄올 추출물의 세포독성효과는 Fig. 28과 같다. 천일염된장의 경우 0.005

Collection @ chosun

mg/mL의 농도처리시 103%의 생존율을 나타냈고, 0.05 mg/mL에서 105%, 0.5 mg/mL와 1 mg/mL의 농도에서는 각각 109%, 108%의 생존율을 보여 대조구에 비교해 모든 농도에서 유의적인($p < 0.05$) 차이를 나타내었다. 천일염된장은 BJ에 대해 세포독성을 보이지 않고 오히려 세포성장효과를 지님을 관찰하였다. 정제염된장의 경우도 0.005 mg/mL~0.5 mg/mL에서 103~107%의 생존율을 나타냈으며, 1 mg/mL의 농도처리시 106%의 생존율을 보여 정상세포에 독성을 보이지 않았으며 0.05 mg/mL~1 mg/mL의 구간에서 유의적인($p < 0.05$) 차이를 보여 오히려 세포성장효과가 있음을 관찰하였다.

이와 같이 천일염과 정제염을 이용하여 제조한 16개월 숙성 된장의 각각의 추출물은 정상세포 BJ에 대해 세포독성을 보이지 않고 오히려 세포성장효과를 지니며 특이적으로 2종의 암세포 AGS와 HT-29에 대해서는 성장 억제효과가 높은 것으로 확인되었다. 소금의 종류를 달리한 된장 추출물의 암세포 억제효과를 비교해 보기 위해 최대 처리 농도인 1 mg/mL로 비교해 보았다. 위암세포 AGS에 대한 천일염된장의 물 추출물의 경우 50%, 메탄올 추출물의 경우 36%의 억제율을 보였고, 정제염된장의 물 추출물의 경우 32%, 메탄올 추출물의 경우 42%의 억제율을 보여 천일염된장이 정제염된장보다 위암세포 성장억제효과가 매우 뛰어남을 알 수 있었다. HT-29에 대한 천일염된장의 물 추출물의 경우 44%, 메탄올 추출물의 경우 30%의 억제율을 보였고, 정제염된장은 물 추출물의 경우 32%, 메탄올 추출물은 35%의 억제율을 보여 물 추출물에서 천일염된장이 정제염된장보다 HT-29에 대한 성장억제효과가 우수함을 확인하였다. 2종의 암세포에 대한 소금의 종류를 달리한 된장의 물 추출물의 경우 천일염된장이 정제염된장보다 암세포 성장억제효과가 매우 뛰어났으며 메탄올 추출물의 경우 정제염된장이 천일염된장보다 암세포 성장억제효과가 더 우수함을 확인하였다.

된장의 발효기간에 따른 암세포 성장억제효과를 비교해 보기위해 각각 2개월, 16개월 숙성 된장의 추출물을 최대 처리 농도인 1 mg/mL로 비교해 보았다. AGS에 대한 2개월 숙성 된장의 경우 천일염된장의 물 추출물은 41%, 메탄올 추출물은 29%의 억제율을 보였으며, 정제염된장의 물 추출물에서 29%, 메탄올 추출물에서는 32%의 억제율을 보였다. 16개월 숙성 된장의 경우 천일염된장의 물과 메탄올 추출물은 각각 50%, 36%의 억제율을 보였고 정제염된장의 경우에는 물 추출물과 메탄올 추출물에서 각각 32%, 42%의 억제효과를 보여 천일염 및 정제염을 첨가하여 제

Collection @ chosun

조한 각각의 된장의 물 추출물과 메탄올 추출물 모두 발효기간이 경과함에 따라 위암세포 억제효과가 증가함을 확인하였다. HT-29에 대한 2개월 숙성 된장의 경우 천일염된장의 물과 메탄올 추출물은 각각 40%, 26%의 억제율을 보였고, 정제염된장의 물 추출물과 메탄올 추출물은 24%, 27%의 억제율을 나타내었다. 16개월 숙성 된장의 경우 천일염된장의 물과 메탄올 추출물은 각각 44%, 30%의 억제율을 보였고, 정제염된장의 물 추출물과 메탄올 추출물은 32%, 35%의 억제율을 보임으로서 된장의 발효기간이 경과함에 따라 HT-29의 성장억제효과가 증가함을 확인하였다.

된장의 발효기간에 관한 박(63)의 연구보고에서는 3개월, 6개월, 24개월 숙성 된장의 각각의 메탄올 추출물을 AGS, HT-29에 2.5 mg/mL 처리 시 3개월 숙성 된장은 각각 65%, 31%의 억제율을 보였으며 6개월 숙성 된장의 경우 각각 74%, 45%의 24개월 숙성 된장은 91%, 62%로 매우 높은 억제율을 보여 발효기간이 증가할수록 된장의 항암효과가 증가하였고, 된장추출물의 저해효과가 HT-29보다 AGS에서 더 높게 나타나 본 실험 결과와 유사함을 알 수 있었다. 된장의 발효기간의 연장에 의한 항암효과의 증가는 된장의 발효과정 동안에 발효 미생물 및 Maillard 반응에 의한 생리활성 물질의 생성 및 함량이 증가되어 항암효과가 증가하는 것으로 여겨진다. 한편 본 연구에 비해 매우 높은 항암효과를 보이는데 그 이유는 된장의 발효기간 및 된장추출물의 처리농도가 2.5 mg/mL로 본 실험(1 mg/mL)보다 높고, MTT assay 시행 시 세포를 부착시키지 않고 바로 시료를 첨가하여 실험한 것에 따른 차이로 보여진다.

Fig. 29는 위상차 현미경을 이용하여 천일염된장의 물 추출물을 각 세포에 1 mg/mL의 농도로 처리하였을 때 세포형태 변화의 사진을 나타낸 것이다. Fig. 29를 보면 정상세포 BJ는 시료를 처리한 구간에서도 생육에는 영향을 미치지 않으나 위암세포 AGS와 대장암세포 HT-29는 대조구에 비교해 정상적으로 성장하지 못하고 세포밀도가 감소하였으며, 세포의 형태적 변화가 일어났음을 관찰 할 수 있었다.

dCollection @ chosun

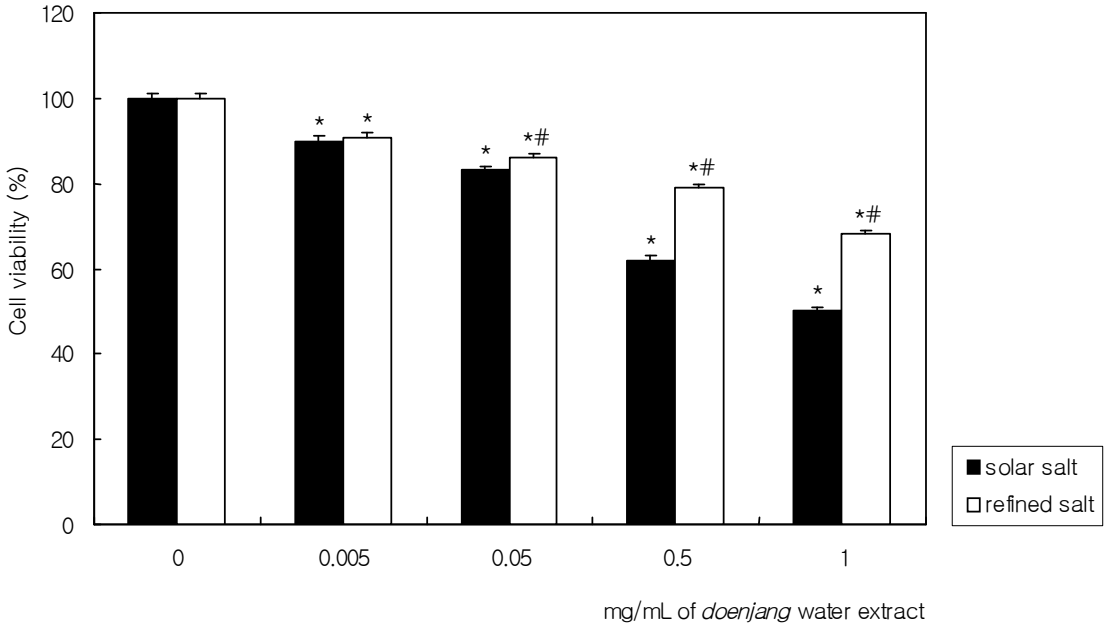

Figure 23. Effects of the water extracts from 16MO ripened *doenjang* with solar salt and refined salt on human gastric adenocarcinoma cell viability.

AGS cells were exposed to different concentrations of 16MO ripened *doenjang* with solar salt and refine salt water extracts for 48 hrs and then cell viability was assessed by MTT assay.

All values represent ± S.D of three independent experiments.

*Significant differences were compared with controls (0 mg/mL concentration of the extract, #*doenjang* with each concentration) of $p < 0.05$ by T-test.

16MO, 16-months ripened *doenjang*.

Collection @ chosun

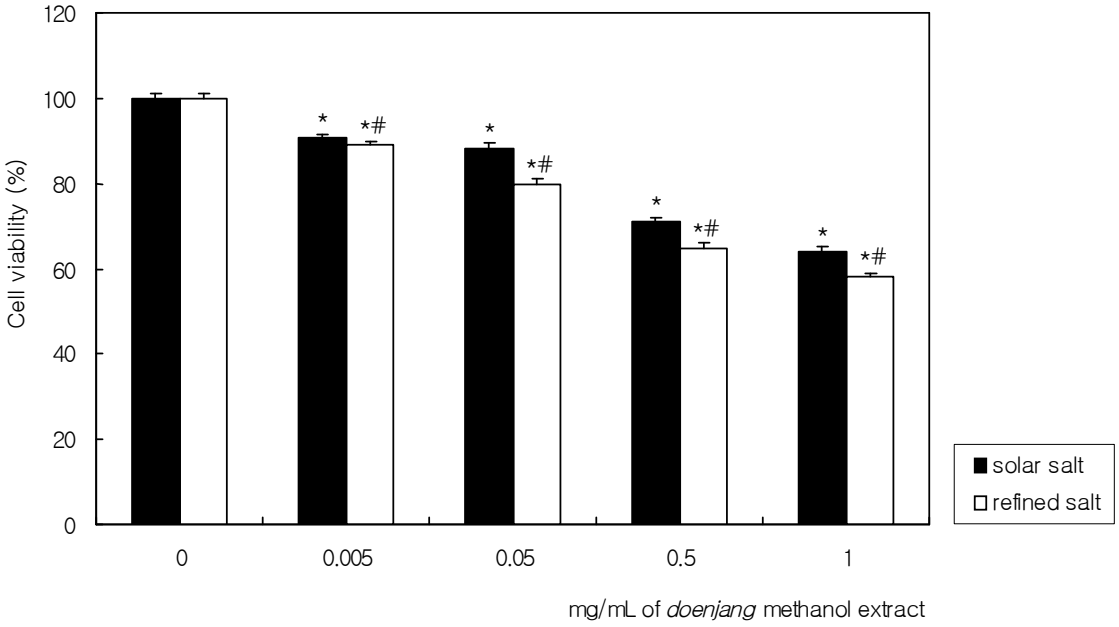

Figure 24. Effects of the methanol extracts from 16MO ripened *doenjang* with solar salt and refined salt on human gastric adenocarcinoma cell viability.

AGS cells were exposed to different concentrations of 16MO ripened *doenjang* with solar salt and refine salt methanol extracts for 48 hrs and then cell viability was assessed by MTT assay.

All values represent ± S.D of three independent experiments.

*Significant differences were compared with controls (0 mg/mL concentration of the extract, #*doenjang* with each concentration) of $p < 0.05$ by T-test.

16MO, 16-months ripened *doenjang*.

dCollection @ chosun

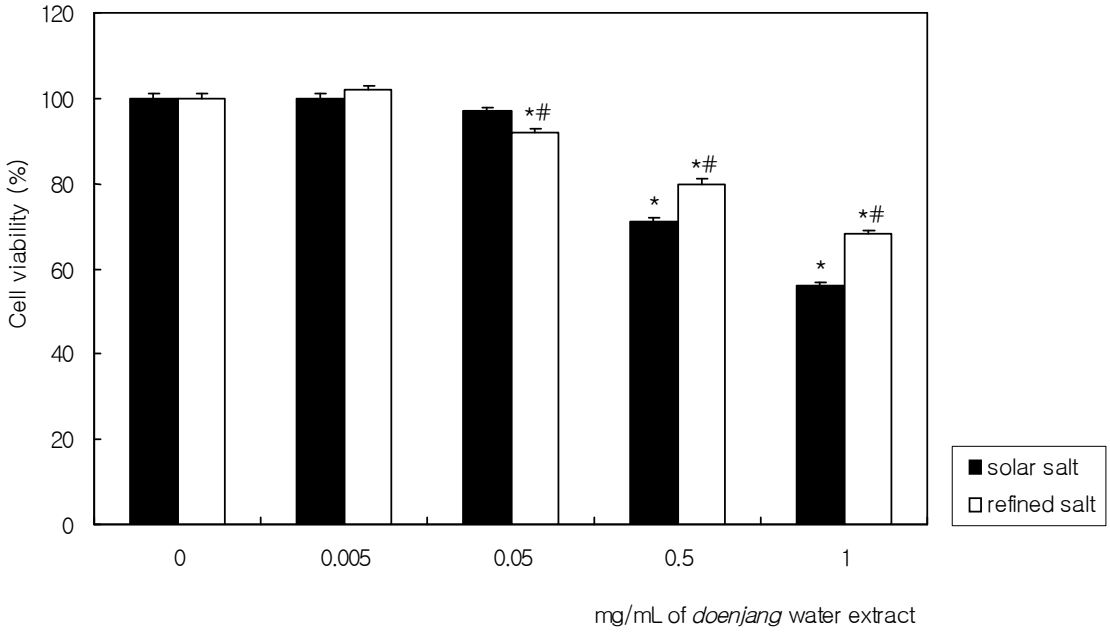

Figure 25. Effects of the water extracts from 16MO ripened *doenjang* with solar salt and refined salt on human colon cancer cell viability.

HT-29 cells were exposed to different concentrations of 16MO ripened *doenjang* with solar salt and refine salt water extracts for 48 hrs and then cell viability was assessed by MTT assay.

All values represent ± S.D of three independent experiments.

*Significant differences were compared with controls (0 mg/mL concentration of the extract, #*doenjang* with each concentration) of $p < 0.05$ by T-test.

16MO, 16-months ripened *doenjang*.

Collection @ chosun

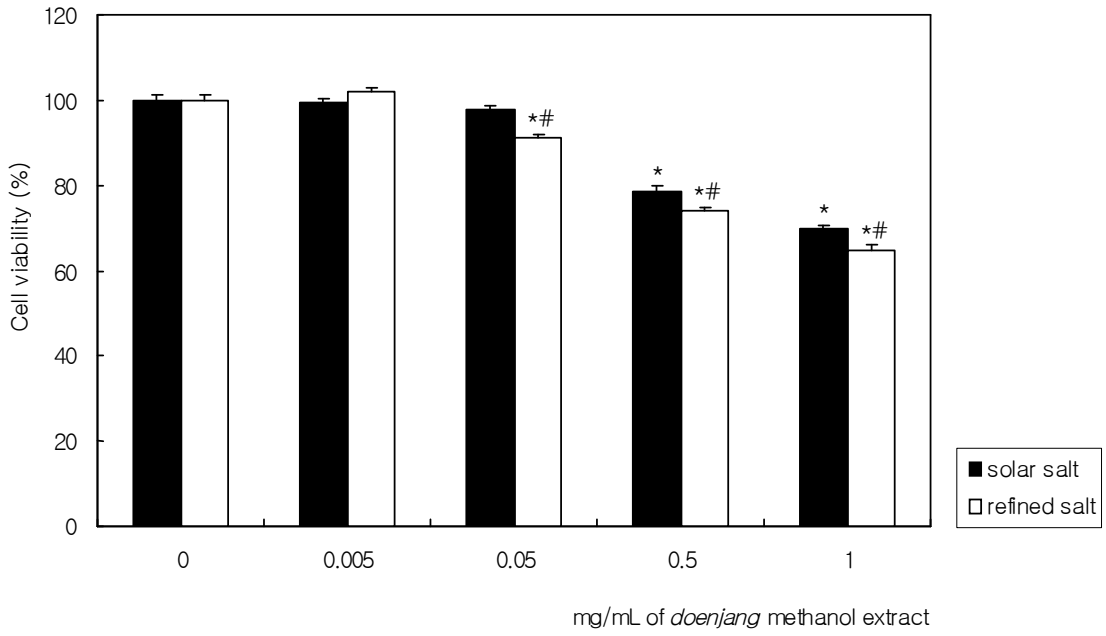

Figure 26. Effects of the methanol extracts from 16MO ripened *doenjang* with solar salt and refined salt on human colon cancer cell viability.

HT-29 cells were exposed to different concentrations of 16MO ripened *doenjang* with solar salt and refine salt methanol extracts for 48 hrs and then cell viability was assessed by MTT assay.

All values represent ± S.D of three independent experiments.

*Significant differences were compared with controls (0 mg/mL concentration of the extract, #*doenjang* with each concentration) of $p < 0.05$ by T-test.

16MO, 16-months ripened *doenjang*.

Collection @ chosun

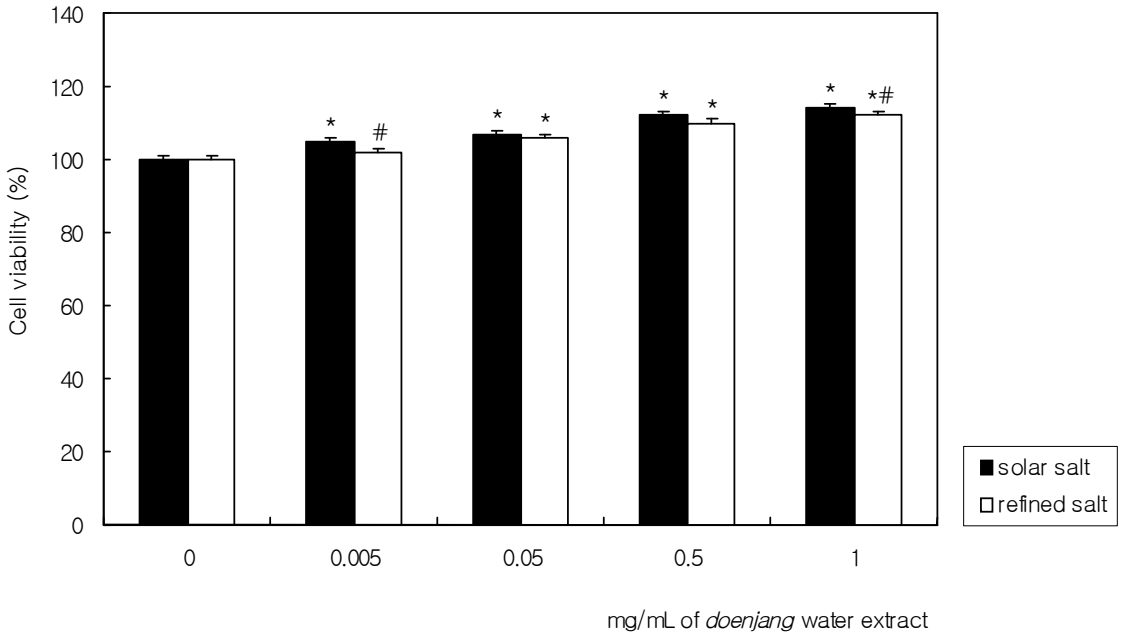

Figure 27. Effects of the water extracts from 16MO ripened *doenjang* with solar salt and refined salt on human foreskin normal cell viability.

BJ cells were exposed to different concentrations of 16MO ripened *doenjang* with solar salt and refine salt water extracts for 48 hrs and then cell viability was assessed by MTT assay.

All values represent ± S.D of three independent experiments.

*Significant differences were compared with controls (0 mg/mL concentration of the extract, #*doenjang* with each concentration) of $p < 0.05$ by T-test.

16MO, 16-months ripened *doenjang*.

Collection @ chosun

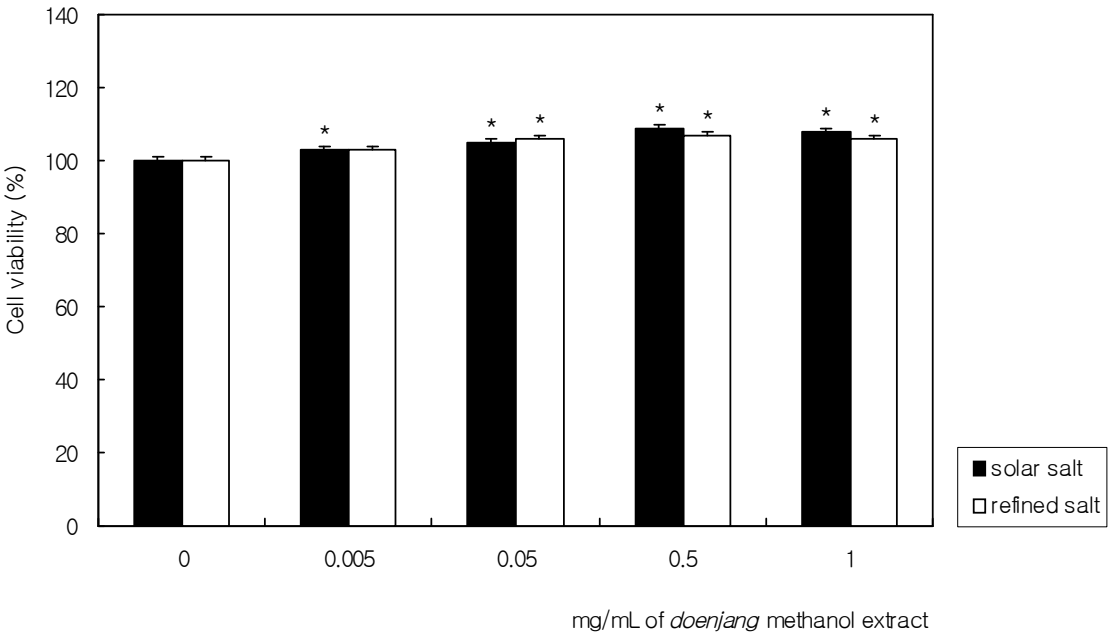

Figure 28. Effects of the methanol extracts from 16MO ripened *doenjang* with solar salt and refined salt on human foreskin normal cell viability.

BJ cells were exposed to different concentrations of 16MO ripened *doenjang* with solar salt and refine salt methanol extracts for 48 hrs and then cell viability was assessed by MTT assay.

All values represent ± S.D of three independent experiments.

*Significant differences were compared with controls (0 mg/mL concentration of the extract, #*doenjang* with each concentration) of $p < 0.05$ by T-test.

16MO, 16-months ripened *doenjang*.

Collection @ chosun

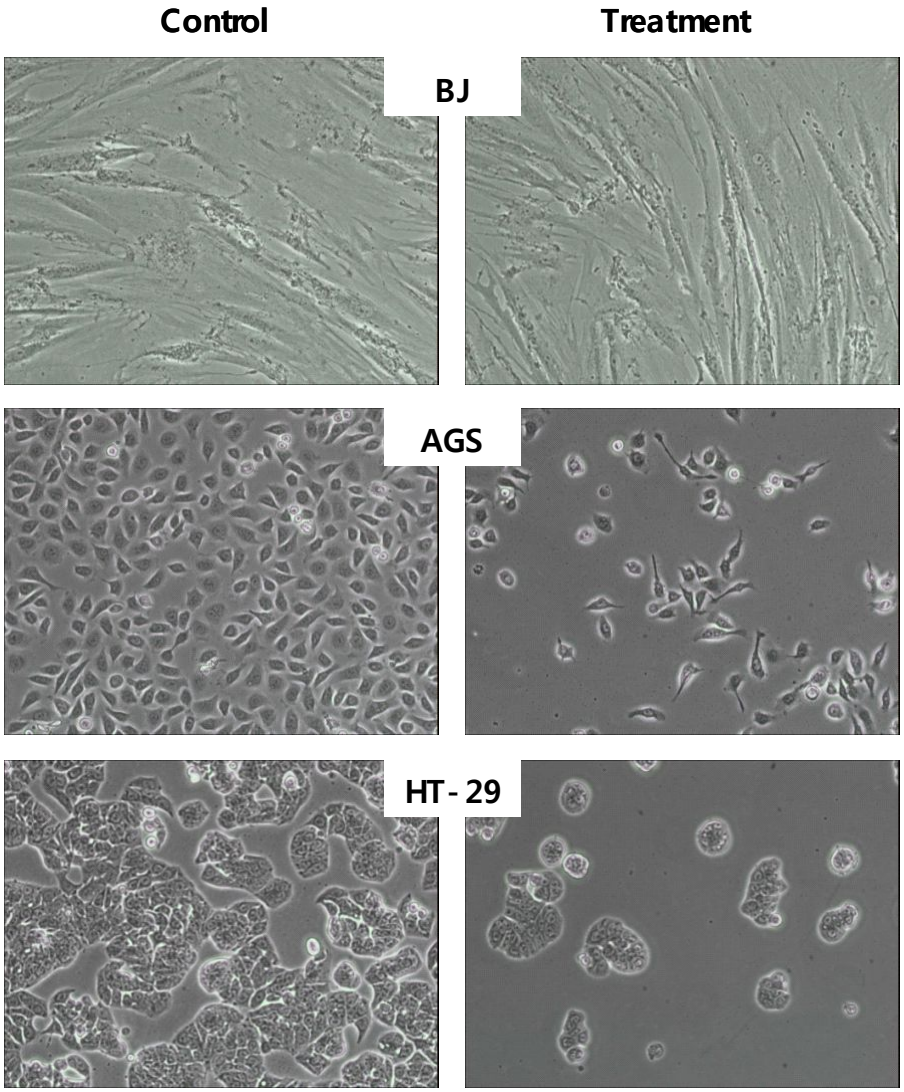

Figure 29. Photomicrographs(x100) of BJ, HT-29 and AGS cells treated with water extract from 16MO ripened *doenjang* with solar salt.

The cells were treated by 1 mg/mL of the water extract from 16MO ripened *doenjang* with solar salt for 48 hrs.

16MO, 16-months ripened *doenjang*.

Collection @ chosun

6. Apoptosis의 관찰

Apoptosis는 생체내에서 정상적이지 못한 세포와 불필요한 세포를 제거하는 필수적인 역할을 한다. 이전의 연구보고에 의하면 된장추출물 처리에 의한 암세포 성장 억제효과는 apoptosis유발에 의한 것임을 보고한 바 있다(20). 따라서 본 연구에서는 소금의 종류를 달리한 각 된장의 물 추출물의 apoptosis유발 가능성을 조사해 보고자 하였다. 각각 천일염, 정제염을 첨가하여 제조한 16개월 숙성 된장의 물 추출물의 apoptosis 유발여부를 측정하기 위하여 위암세포 AGS에 각 된장의 물 추출물을 1 mg/mL 농도로 처리하였으며 그 결과는 Fig. 30과 같다. AGS에 된장추출물 대신 cell culture media(RPMI 1640)를 첨가한 대조구(0±0.00)에서는 apoptosis가 관찰되지 않았으나 소금의 종류를 달리한 각 된장의 물 추출물을 처리한 경우에는 모두 apoptosis가 유발됨을 관찰하였다. 또한 정제염된장의 물 추출물(3±0.58)에 비교해 천일염된장의 물 추출물(7±1.15)이 apoptosis 유발을 더 많이 진행시킴을 확인하였다.

본 연구결과 천일염과 정제염으로 제조한 각 된장의 물 추출물은 인체 위암세포 AGS의 성장을 억제하였고 이는 apoptosis유발에 의한 것으로 사료되어진다. 특히 천일염된장의 물 추출물이 AGS에 대한 억제효과 및 apoptosis 유발이 더 높은 것으로 보아 정제염된장보다 천일염된장이 매우 뛰어난 항암효과를 지닌 것으로 생각되어진다.

Collection @ chosun

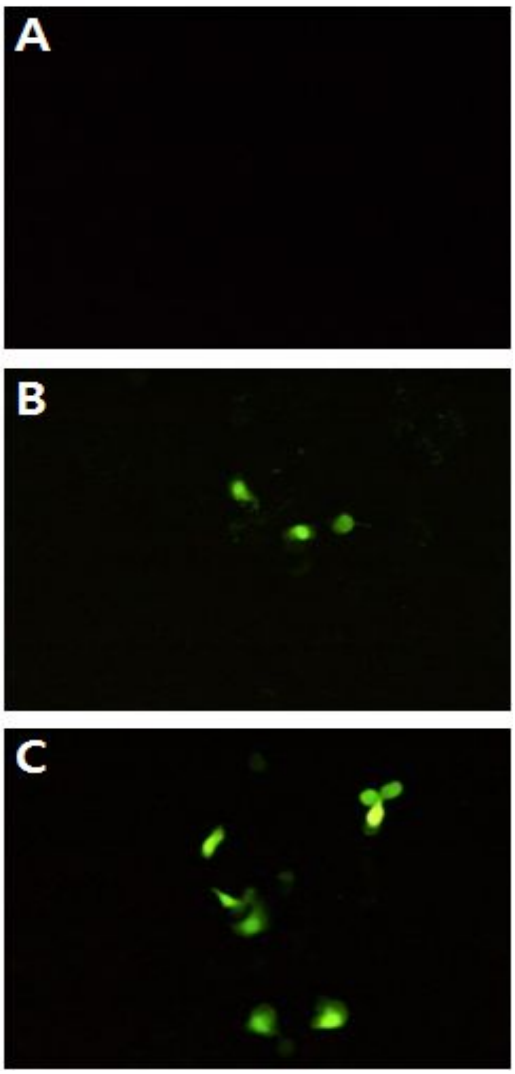

Figure 30. Apoptosis induced in AGS cells treated by 1 mg/mL of the water extract from 16 months ripened *doenjang* after 48 hrs.

A: control

B: refined salt-*doenjang*

C: solar salt-*doenjang*

Collection @ chosun

제 4 장 결 론

본 연구에서는 전통발효식품으로부터 분리된 4종의 균주로부터 항암효과를 지닌 균주를 선별하였고, 선별된 균주의 배양단계별 상징액 및 세포벽성분의 암세포 성장 억제효과를 관찰하였다. 항암효과를 지닌 균주를 된장제조시 bacterial-koji로 이용하여 된장제조에 사용되는 소금(천일염: Shinan-docho, Korea, 정제염: chunilsalt, Korea)을 달리하여 소금의 종류를 달리한 된장의 암세포 성장 억제효과를 비교해 보고자 하였다. 따라서 천일염과 정제염을 이용하여 두 종류의 된장을 제조하였고, 각각의 된장을 2개월, 16개월 동안 숙성시켜 소금의 종류와 발효기간에 따른 암세포 억제효과를 비교하고, apoptosis 유발여부를 측정하고자 하였다.

전통발효식품으로부터 분리된 *B. subtilis* MJP1, *B. polyfermenticus* CJ6, *Lb. plantarum* AF1, *B. subtilis* DJI 균주로부터 항암효과를 지닌 균주를 선별하기 위해 각 균주를 배양하여 분리한 배양상징액을 2종의 종양세포 AGS(human gastric adenocarcinoma cell), HT-29(human colon cancer cell)와 정상세포 BJ(human foreskin normal cell)에 처리하였을시 4종의 균주 모두 농도의존적으로 암세포 성장 억제효과를 보였으나 정상세포 BJ(human foreskin normal cell)에 대해서 *B. subtilis* DJI은 세포성장효과를 보였고, 나머지 3종의 균주는 세포독성을 나타내었다. 따라서 *B. subtilis* DJI은 정상세포 BJ에 대해 독성을 나타내지 않고 오히려 세포성장효과를 보이며, 특이적으로 2종의 암세포에 대해서는 성장 억제효과를 지님을 확인하였다.

B. subtilis DJI의 각 배양단계별 상징액은 암세포 성장 억제효과의 차이를 보였다. 각각의 배양단계별 상징액의 동일 최대 농도인 10%에서 암세포 성장 억제효과는 AGS의 경우 logarithmic phase에서 27%, stationary phase는 33%, death phase 44%의 억제율을 나타내었고, HT-29의 경우는 logarithmic phase에서 37%, stationary phase는 39%, death phase 41%의 억제율을 보여 death phase에 도달 할수록 암세포 성장 억제효과가 증가함을 확인하였다. 정상세포 BJ에 대해서는 세포독성을 나타내지 않았으며, 오히려 농도의존적으로 세포성장효과를 보여 최대 10%의 농도에서 logarithmic phase에서 115%, stationary phase는 114%, death phase 114%의 생존율을 나타내는 것으로 관찰되었다.

항암효과를 지닌 *B. subtilis* DJI의 whole cell로부터 세포벽성분을 추출한 결과 수율은 59%를 나타냈으며, *B. subtilis* DJI 세포벽성분의 암세포 성장 억제효과는 450 μ

Collection @ chosun

g/mL의 농도에서 대장암세포 HT-29에 대해 48%의 높은 억제율을 보였고 정상세포 BJ의 대해서는 96%의 생존율을 나타내었다. *B. subtilis* DJI 세포벽성분은 HT-29에 대해 높은 성장억제효과를 보이고 정상세포 BJ에 대한 세포독성은 거의 없는 것으로 관찰되었다.

소금의 종류를 달리하여 제조한 각각의 된장(천일염된장, 정제염된장)의 숙성 중 구성아미노산의 총 함량은 제조직후에 비교해 감소하였으며, 유리아미노산의 함량은 정제염된장의 경우 제조직후를 100%(1181.62 mg%)로 하여 숙성 2개월은 145%(1716.86 mg%), 숙성 12개월은 160%(1892.98 mg%)로 증가하였다. 천일염된장의 경우는 제조직후(1254.37 mg%)를 100%로 하였을 시에 숙성 2개월은 156%(1953.10 mg%), 숙성 12개월은 160%(2001.31 mg%)로 정제염, 천일염된장 모두 숙성이 경과함에 따라 유리아미노산의 함량이 증가함을 알 수 있었다.

소금의 종류를 달리한 2개월 숙성 된장의 물 추출물과 메탄올 추출물은 모두 정상세포 BJ에 대해 세포독성을 보이지 않고 오히려 세포성장효과를 지니는 반면 2종의 암세포에 대해서는 높은 성장억제효과를 나타냈다. 최대 처리 농도인 1 mg/mL에서 AGS의 경우 천일염된장의 물 추출물은 41%, 메탄올 추출물은 29%의 억제율을 보였고, 정제염된장에서 물 추출물은 29%, 메탄올 추출물은 32%의 억제율을 보였다. 동일 농도에서 HT-29의 경우 천일염된장의 물 추출물은 40%, 메탄올 추출물은 26%의 억제율을 보였고, 정제염된장의 물, 메탄올 추출물은 각각 24%, 27%의 억제율을 보여 AGS, HT-29에 대해 천일염된장의 물 추출물은 억제효과가 매우 뛰어남을 확인하였다.

천일염과 정제염을 첨가하여 제조한 16개월 숙성 된장의 각각의 추출물은 모두 정상세포 BJ에 대해 세포성장효과를 보였으며 특이적으로 암세포 AGS, HT-29에 대해서는 성장억제효과가 높음을 확인하였다. 소금의 종류에 따른 된장추출물의 암세포 성장억제효과를 비교해 보기 위하여 최대 처리 농도인 1 mg/mL로 비교해 보면 AGS의 경우 천일염된장의 물 추출물은 50%, 메탄올 추출물은 36%의 억제율을 보였고, 정제염된장의 물 추출물은 32%, 메탄올 추출물은 42%의 억제율을 보였다. 동일 농도에서 HT-29의 경우 천일염된장의 물, 메탄올 추출물은 각각 44%, 30%의 억제율을 보였고, 정제염된장의 물, 메탄올 추출물은 각각 32%, 35%의 억제율을 보여 16개월 숙성 된장의 경우 천일염된장의 물 추출물이 암세포 성장억제효과가 더 우수함을 확인하였다. 더 나아가 AGS에 각 된장의 물 추출물을 최대 1 mg/mL의 농도로 처리하여 apoptosis 유발 여부를 측정한 결과 대조구에 비교해 모든 실험구에서 apoptosis를 유

Collection @ chosun

발함을 확인하였다. 따라서 AGS에 대한 각 된장추출물의 억제효과는 apoptosis 유발에 의한 것으로 사료되어진다. 특히 천일염된장의 물 추출물이 정제염된장의 물 추출물보다 AGS에 대한 억제효과 및 apoptosis 유발이 더 높게 나타나 위 결과로 볼 때 천일염된장이 매우 뛰어난 항암효과를 지닌 것으로 생각된다.

된장의 발효기간에 따른 암세포 성장억제효과 비교를 위해 최대 처리 농도인 1 mg/mL로 비교해 보았다. AGS에 대한 천일염된장의 물 추출물과 메탄올 추출물의 억제율은 2개월 숙성시 각각 41%, 29%이고, 16개월 숙성시 각각 50%, 36%의 억제율을 보였다. 정제염된장은 2개월 숙성시 각각 29%, 32%이고, 16개월 숙성시 각각 32%, 42%의 억제율을 나타냈다. HT-29에 대한 천일염된장의 물 추출물과 메탄올 추출물의 억제율은 2개월 숙성시 각각 40%, 26%이고, 16개월 숙성시 각각 44%, 30%의 억제율을 보였다. 정제염된장의 경우는 2개월 숙성시 각각 24%, 27%이고, 16개월 숙성시 각각 32%, 35%의 억제율을 나타냈다. 이와같이 된장의 발효기간이 경과함에 따라 AGS, HT-29의 대한 항암활성이 더 증가함을 확인하였다.

위 결과로 정제염된장은 이전에 보고된 결과와 유사하게 메탄올 추출물이 물 추출물보다 암세포 성장억제효과가 높아 정제염된장의 암세포 성장억제효과를 보이는 유효성분은 더 소수성 물질을 함유하고 있을 것으로 추측되어진다. 한편 천일염 된장에서는 물 추출물이 메탄올 추출물보다 AGS와 HT-29의 성장억제효과가 높은 것으로 나타났다. 이와같이 물 추출물의 높은 암세포 성장억제효과를 보이는 이유는 정제염보다 천일염의 높은 무기질 함량과 천일염과 bacterial-koji로 제조된 된장의 품질특성의 결과로 추측되어진다.

본 연구에서는 전통발효식품으로부터 분리된 4종의 균주에서 항암효과를 지닌 균주를 선별하였고, 선별된 균주 *B. subtilis* DJI의 항암효과를 규명하였다. Bacterial-koji(*B. subtilis* DJI)를 이용하여 된장을 제조하였으며, 된장제조시 소금의 종류를 달리하여 두 종류의 된장(천일염된장, 정제염된장)을 제조하였다. 또한 소금의 종류를 달리한 된장의 항암효과를 측정한 결과 천일염된장이 정제염된장보다 항암효과가 뛰어나 천일염의 우수성을 입증하였다. 본 연구 결과는 된장의 부가가치 및 천일염의 이용성을 향상시켜 천일염산업에 기여할 수 있을 것으로 기대된다. 향후 연구에서는 천일염 첨가 된장의 뛰어난 항암효과가 첨가 소금에 의한 것인지에 대한 규명을 위해 소금의 암세포 억제효과 평가에 대한 연구가 이루어져야 할 것이다.

Collection @ chosun

제 5장 참 고 문 헌

1. Ackley, S., E. Barret-Conner, L. Saurez. 1985. Daily products calcium supplementation of women. Am. J. Clinic. Nutr. **42**: 12-17
2. An, H. S., J. S. Bae, and T. S. Lee. 1987. Comparison of free amino acids, sugars, and organic acids in soy bean paste prepared with various organisms. J. Korean Agricultural Chemical Society. **30**: 345-350
3. Chang M., 2009. *Doenjang* manufacture by using *Bacillus subtilis* starter and reducing process of biogenic amine(PhD dissertation).Gwang ju: Chosun University.
4. Chang, K. H., J. S. Park, J. H. Choi, C. J. Kim, and H. D. Paik. 2007. Cytotoxic effects of paritally purified substances from *Bacillus Polyfermenticus* SCD supernatant toward a variety of tumor cell lines. *Food Sci. Biotechnol.* **16**: 163-166
5. Chang, M., and H. C. Chang. 2007. Characteristics of bacterials-koji and doenjang(soybean paste) made by using *Bacillus subtilis* DJI. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **35**: 325-333.
6. Choi, K. S., and H. S. Rhee. 1994. Characteristics of Doenjang made from Different Material and Ratio of Koji. *KOREAN J. SOC. FOOD SCI.* **10**: 39-44
7. Choi, M. K., K. H. Shon, and H. J. Jeon. 1997. Changes in odor characteristics of doenjang with different preparing methods and ripening periods. *KOREAN J. DIETARY CULTURE.* **12**: 265-274
8. Chung, S. H., M. A. Choi, J. S. Park, K. S. Kim, D. K. Chung, H. S. Nam, Z. I. Shin, R. Yu. 1999. Effect of dietary soybean hydrolysate on plasma lipid profiles, select biochemical indexes, and histopathological changes in spontaneously hypertensive rats. *Korean J Food Sci Technol.* **31**: 1101-1108
9. Collins, M. K. L., and A. L. Rivas. 1993. The control of apoptosis in mammalian cells. *Trends Biochem. Sci.* **18**: 307-309
10. Craig, B. T. 1995. Apoptosis in the Pathogenesis and Treatment of disease. *Science.* **267**: 1456-1462

Collection @ chosun

11. Enari, M., R. V. Talanian, W. W. Wong, and S. Nagata. 1996. Sequential activation of ICE-like and CPP32-like proteases during Fas-mediated apoptosis. Nature. **380**: 723-726
12. Faraco, P. R., E. C. Ledgerwood, P. Vandenabeele, et al. 1999. Tumor necrosis factor induces distinct patterns of caspase activation in WEHI-164 cells associated with apoptosis or necrosis depending on cell cycle stage. Biochem Biophys Res Commun. **261**: 358-392
13. Fukutake, M., M. Takahashi, K. Ishida, H. Kawamura, T. Sugumura, and K. Wakabayashi. 1996. Quantification of genistein and genistin in soybeans and soybean products. Food Chem. Toxicol. **34**: 457-461
14. Gilliams-Francis, K. L., A. A. Quaye, and J. R. Naegele. 2003. PARP cleavage, DNA fragmentation, and pyknosis during excitotoxin-induced neuronal death. Exp Neurol. **184**: 359-372
15. Ha, J. O., and K. Y. Park. 1998. Comparison of mineral contents and external structure of various salts. Korean J. Food Sci. Nutr. **27**: 413-418
16. Ha, J. O., and K. Y. Park. 1999. Comparison of Autooxidation rate and comutagenic effect of different kinds of salt. Journal of Korean Association of Cancer Prevention. **4**: 44-51
17. Hong, S. J. November 17, 2000. Health potential of genistein against prostate diseases. Proceedings of International Symposium Soybean and Human Health. Korean Soc Food Sci Technol. 13-24
18. Hong, S. S., K. S. Chung, K. D. Yoon, and Y. J. Cho. 1996. Antimutagenic effect of solvent extracts of korean fermented soybean products. *FOOD AND BIOTECHNOLOGY.* **5**: 263-267
19. Hwang, K. M., 2004. Studies on the enhancement of chemopreventive and anticancer effects of *doenjang*(PhD dissertation). Busan: Pusan National University.
20. Hwang, K. M., J. M. Lee, and K. Y. Park. 2005. Doenjang extract has anticancer activity and induces apoptosis in AGS human gastric adenocarcinoma. *J Food Sci Nutr.* **10**: 167-171

Collection @ chosun

21. Hwang, K. M., K. O. Jung, C. H. Song, and K. Y. Park. 2008. Increased Antimutagenic and anticlastogenic effects of doenjang(korean fermented soybena paste) prepared with bamboo salt. J Med Food. **11**: 712-722

22. Hwang, S. H., 1988. A study on the heavy metal contents of common salts in Korean. Korean. J. Environ. Hlth. Soc. **14**; 73-86

22. Joffers, M. R., D. M. Reed, and K. Yano. 1986. Realtionship of magnesium intake and other dietary factor to blood pressure; the Honolulu heart study. J. Nutr. **116**: 1896-1901

23. Joo, H. K., D. H. Kim, and K. T. Oh. 1992. Chemical composition changes in fermented *doenjang* depend on *doenjang* koji and its mixture. J. Korean Agric. Chem. Soc. **35**: 351-360

24. Jung, H. O., J. J. Lee, and M. Y. Lee. The characteristics of cookie and muffin made with soybean paste powder and sun-dried salt. Korean J. Food Preserv. **15**: 505-511

25. Jung, J. H., and H. C. Chang. 2009. Antifungal activity of *Bacillus polyfermenticus* CJ6 isolated from meju. J Korean Soc Food Sci Nutr. **38**: 509-516

26. Jung, K. O. Ph.D., S. Y. Park, M. S., and K. Y. Park, Ph.D. 2006. Longer aging time increases the anticancer and antimetastatic properties of *doenjang*. Nutrition. **22**: 539-545

27. Jung, K. O., 2000. Studies on enhancing cancer chemopreventive(anticancer) effects of Kimchi and safety of salts and fermented anchovy(PhD dissertation). Busan: Pusan National University.

28. Jung, K. O., K. Y. Lee, S. K. Rhee, and K. Y. Park. 2002. Effects of various kinds of salt on the tumor formation, NK cell activity and lipid peroxidation in Sarcoma-180 cell transplanted mice. Journal of Korean Association of Cancer Prevention. **7**: 134-142

29. Kang, J. H, and H. S. Lee. 1994. Changes in lipid component and quantitative measurement of carbonyl compound during doenjang fermentation. *KOREAN J. SOC FOOD SCI.* **10**: 51-56

Collection @ chosun

30. Kim, H. J., 2004. Antitumor effects and immune activity by cell wall extract of lactic acid bacteria (MS thesis). Seoul: Sungkyunkwan University.
31. Kim, J. G., 2004. Changes of components affecting organoleptic quality during the ripening of traditional Korean soybean paste-Amino nitrogen, Amino acids, and color. J. Fd Hyg. Safety **19**: 31-37
32. Kim, M. H., S. S. Im, S. H. Kim, G. E. Kim, and J. H. Lee. 1994. Antioxidative materials in domestic meju and doenjang. 2. Separation of Lipophilic Brown Pigment and their antioxdative activity. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **23**: 251-260
33. Kim, M. J, and H. S. Rhee. 1990. Studies on the changes of taste compounds during soy paste fermentation. *KOREAN J. SOC. FOOD SCI.* **6**: 1-8
34. Kim, M. J, and H. S. Rhee. 1993. Studies on the changes of taste compounds during soy paste fermentation(Ⅲ). *KOREAN J. SOC. FOOD SCI.* **9**: 261-265
35. Kim, M. K., S. H. Moon, J. W. Choi, and K. Y. Park. 1999. The effect of *doenjang*(Korean soy paste) on the liver enzyme activities of the sarcoma-180 cell transplanted mice. *J. Food Sci. Nutr.* **4**: 260-264
36. Kim, S. H., S. J. Kim, B. H. Kim, S. G. Kang, and S. T. Jung. 2000. Fermentation of *doenjang* perpared with sea salts. *KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL.* **32**: 1365-1370
37. Kim, S. H., Y. J. Lee, D. Y. Kwon. 1999. Isolation of angiotensin converting enzyme inhibitor from doenjang. *Korean J Food Sci Technol*. **31**: 848-854
38. Kim, S. J., H. L. Kim, and K. S. Ham. 2005. Characterization of *kimchi* fermentation prepared with various salts. Korean J. Food Preserv. **12**: 395-401
39. Korea Food and Drug Administration. Food Standards Codex. Korean Foods Industry Association, Seoul, Korea(2004)
40. Kuzer, M. S., and X. Xu. 1997. Dietary phytoestrongens. Annu. Rev. Nutr. **17**: 353-381
41. Kwon, S. H., K. B. Lee, K. S. Im, S. O. Kim., and K. Y. Park. 2006. Weight reduction and lipid lowering effects of korean traditional soybean fermented products. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. **35**: 1194-1199

Collection @ chosun

42. Lee, H. S., S. H. Park, H. K. Chung, and T. B. Choe. 1993. Antitumor effect of cell wall component purified from *Lactobacillus plantarum*. *KK. J. Gen. Eng.* **5**: 22-28

43. Lee, I. K., J. G. Kim. 2002. Effect of dietary supplementation of Korean soybean paste (*Doenjang*) on the lipid metabolism in rats fed a hight fat and/or a high cholesterol diet. *J Korean Public Health Assoc* **28**: 282-305

44. Lee, J. H., M. H. Kim, and S. S. Im. 1991. Antioxidative materials in domestic meju and doenjang. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **20**: 148-155

45. Lee, J. H., M. H. Kim, S. S. Im, S. H. Kim, and G. E. Kim. 1994. Antioxidative materials in domestic meju and doenjang. 3. Separation of Hydrophlic Brown Pigment and their antioxidant activity. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **23**: 604-613

46. Lehaman, T. J., J. B. Allen, P. H. Plotz, and R. L. Wilder. 1983. Polyarthritis in rats following the systemic injection of *Lactobacillus casei* cell walls in aqueous suspension. *Arthritis and Rheumatism.* **26**: 1259-1265

47. Lim, S. Y., K. H. Kim, K. Y. Park and S. H. Lee. 2007. Effect of solvent fractions from doenjang on antimutagenicity, growth of tumor cells and production of interleukin-2. *Journal of Life Science*. **17**: 791-797

48. Lim, S. Y., K. Y. Park, S. H. Rhee. 1999 Anticancer effect of *Doenjang* in *in vitro* sulforhodamine B (SRB) assay. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. **28**: 240-245

49. Lim, S. Y., S. H. Lee, and K. Y. Park. 2005. effect of solvent fractions form methanol extract of doenjang on inhibition of growth and DNA synthesis of human cancer cells. *Journal of Life Science*. **15**: 685-691

50. Lim, S. Y., S. H. Rhee, K. Y. Park, H. S. Yun, W. H. Lee. 2004. Inhibitory effect of methanol extracts and solvent fractions form *Doenjang* on mutagenicity using *in vitro* SOS chromotest and *in vivo Drosophila* system. *Korean J Food Sci Technol*. **33**: 1432-1438

51. Maurice, E. S., and R. Y. Vernon. 1988. Nutrition and diet in hypertention in "modern nutrition in health and disease" 7th ed. Lea & Febiger, Philadephia. Ⅱ 1272

52. Merlo, G. R., N. Cella, and N. E. Hynes. 1997. Apoptosis is accompanied by

Collection @ chosun

changes in bcl-2 and bax expression, induced by loss of attachment, and inhibited by specific extracellular matrix proteins in mammary epithelial cells. *Cell Growth and Differentiation*. 8: 251-260

53. Min, S. H. 2006. Quality characteristics of doenjang containing astragalus membranaceus water extracts. *KOREAN J. FOOD COOKERY SCI*. 22: 514-520
54. Olle, S., E. Sven, C. Juan, H. Thomas, E. Stefan, and G. Dan. 1997. Induction of apoptosis responses to interferon$^{-\alpha}$ in hematopoietic cell lines. *Cell Growth and Differentiation*. 8: 343-352
55. Onozawa, M., K. Fukuda, M. Ohtani, H. Akaza, T. Sugimura, and K. Wakabayashi. 1998. Effects of soybean isofalvones on cell growth and apoptosis of the human prostatic cancer cell line LNCaP. Jpn. J. Clin. Oncol. 28: 360-363
56. Park, J. E., Studies on the biochemical changes and apoptosis induced by cellular heat shock responses(MS thesis). Seoul: Ewha University.
57. Park, J. W., S. J. Kim, S. H. Kim, B. H. Kim, S. G. Kang, S. H. Nam, and S. T. Jung. 2000. Determination of mineral and heavy metal contents of various salts. *KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL.* 32: 1442-1445
58. Park, K. Y., K. M. Hwang, K. O. Jung, and K. B. Lee. 2002. Studies on the standardization of doenjang (Korean soybean paste) 1. Standardization of manufacturing method of doenjang by literatures. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 31: 343-350
59. Park, K. Y., K. O. Jung, S. H. Rhee, and Y. H. Choi. 2003. Antimutagenic effects of *doenjang*(Korean fermented soypaste) and its active compounds. Mutation Research. 523-524: 43-53
60. Park, K. Y., S. H. Moon, H. S. Cheigh, and H. S. Baik. 1996. Antimutagenic effects of doenjang(Korean soy paste). *J. Food Sci. Nutr.* 1: 151-158
61. Park, M. W., and Y. K. Park. 1998. Changes of physicochemical and sensory characteristics of Oiji(Korean pickled cucumbers) prepared with different salts. *Korean J. Food Sic Nutr*. 27: 417-424
62. Park, S. K., K. I. Seo, M. Y. Shon, J. S. Moon., and Y. H. Lee. 2000. Quality

Collection @ chosun

characteristics of home-made doenjang, a traditional Korean soybean paste. KOREAN J. SOC. FOOD SCI. **16**: 121-127

63. Park, S. Y., 2003. The manufacture of cancer preventive *doenjang* and anticancer effects of *doenjang* (MS thesis). Busan: Pusan National University.
64. Philip S, Ritsa S. 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening. *J Natl Cancer Inst* **82**: 1107-1112.
65. Phillips, R. L. 1981. Role of life-style and dietary habits in risk of cancer among senventh day adventists. J. Cancer Res. **35**: 3515-3522
66. Rho, J. D., S. Y. Choi, and S. J. Lee. 2008. Quality characteristics of soybean pastes (*doenjang*) prepared using different types of microorganisms and mixing ratios. *Korean J. FOOF COOKERY SCI.* **24**: 243-250
67. Schroeder, H. A. 1960 Realtion between mortality form cardiovascular disease and treated water supplies. J. Am. Med. Assoc. **172**: 1902-1905
68. Shin, M. R. and K. J. Joo. 1999. Fractionated volatile flavor components of soybean paste by dynamic headspace method. *Korean J. Soc. Food Sci.* Nutr. **28**: 305-311
69. Shin, M. S., and H. I. Rhee. 1983. The properties of salts and their effects on salted vegetables. Korean home Econ. Assoc. **21**: 55-63
70. Shin, T. S., C. K. Park, S. H. Lee, and K. H. Han. 2005. Effects of age on chemical composition in sun-dried salts. *KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL.* **37**: 312-317
71. Shin, Z. I., C. W. Ahn, H. S. Nam, H. J. Lee, T. H. Moon. 1995. Fractionation of angiotensin converting enzyme(ACE) in inhibitory peptides from soybean paste. *Korean J Food Sci Technol.* **27**: 230-234
72. Shon, D. H., K. A. Lee, S. H. Kim, C. W. Ahn, H. S. Nam, H. J. Lee. 1996. Screening of antithrombotic peptides from soybean paste by the microplate method. *Korean J Food Sci Technol.* **28**: 684-688
73. Takahashi, M., K. Imaida, F. Furukawa, and Y. Hayashi. 1991. Inhibitory effecs of soybean trypsin inhibitor during initiation and promotion phases of N-nitrosobis (2-oxopropyl)amine-induced hamster pancratic carcinogenesis. In

Collection @ chosun

"Chemically induced cell profiration: Implications for risk as assessment" Wiley-Less. Inc. 145-154

74. Tewari, M., and V. M. Dixit. 1995. Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is inhibited by the poxvirus crmA gene product. J. Biol. Chem. **270**: 3255-3260
75. Tezel, G., and M. B. Wax. 1999. Inhibition of caspase activity in retinal cell apoptosis induced by various stimuli in vitro. Invest Ophthalmol Vis Sci. **40**: 2660-2667
76. Thornberry, N. A. 1997. The caspase family of cysteine proteases. Br Med Bull. **53**: 478-490
77. Thornberry, N. A. 1998. Caspases: key mediators of apoptosis. Chem Biol. **5**: 97-103
78. Vaux, D. L. 1993. Toward an understanding of the molecular mechanisms of physiological cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**: 786-789
79. Williams, G. T., and C. A. Smith. 1993. Molecular regulation of apoptosis : Genetic controls on cell death. *Cell.* **74**: 777-779
80. Yang, E. J., and H. C. Chang. 2007. Characterization of bacteriocin-like substances produced by *Bacillus subtilis* MJP1. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **35**: 339-346.
81. Yang, E. J., and H. C. Chang. 2008. Antifungal activity of *Lactobacillus plantarum* isolated from kimchi. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **36**: 276-284
82. Yoo, S. M., J. S. Kim, and D. H. Shin. 2001. Quality changes of traditional *doenjang* fermented in different vessels. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **44**: 230-234
83. Youn, S. K., S. J. Lee, S. O. Yoon, S. Y. Park, H. K. Kim, and B. S. Jun. 2003. Effect of quality improvement and the preservation on soybean sauce and paste by adding pyrollgneous liquor treated with supercritical carbon dioxide. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **18**: 117-121
84. 김소희, 양정혜, 소영선. 1999. 청국장의 생리활성. 식품산업과 영양 **4**: 40-46
85. 김준. 2002. 소금과 국가 그리고 어민. 島嶼文化 . p 118

Collection @ chosun

86. 김한복. 미생물학 박사 김한복 교수의 청국장 다이어트&건강법. Human&Book. 2003
87. 민경찬. 전정일. 박상기. 조남철. 정수현. 유현주 공역. 필수 식품미생물학. 광문각. p40
88. 비락연구실 가공 2팀. 1995. 소금에 관한 보고서. 주(비락) 비락연구실, 김해
89. 야마다 도요후미 지음. 김소운 옮김. 김수현 감수. 생명의 균형, 미네랄 3.5%. 북폴리오. p32-45
90. 통계청 : 2007년 사망원인통계결과 .2007

Collection @ chosun

감사의 글

짧고도 긴 지난 대학원 생활을 돌아보면 많은 아쉬움이 남지만 한층 더 성숙될 수 있는 밑거름이 되는 소중한 시간들이였습니다. 저를 위해 항상 사랑과 관심으로 희망과 격려를 아끼지 않으셨던 모든 분들께 이 자리를 빌어 감사의 말씀을 드립니다.

먼저 한결같은 마음으로 학문의 길과 방향에 대한 아낌없는 지도를 해주시고 연구에 대한 끝없는 열정과 자부심을 주신 장해춘 지도교수님께 진심으로 감사드립니다. 또한 바쁘신 가운데도 논문의 부족한 부분을 세심하고 따뜻한 조언으로 심사해 주신 이명렬 교수님과 전홍성 교수님께도 감사드립니다. 그리고 학부와 대학원 과정 동안에 학문적 성취를 위해 아낌없는 가르침을 주신 노희경 교수님, 김경수 교수님, 김복희 교수님, 이소정 교수님, 이재준 박사님께도 진심으로 감사드립니다.

오랜시간을 함께 보내면서 정이 많이 든 식품미생물 실험실 식구들...감사합니다. 실험실의 정신적 지주이면서 많은 조언을 해주신 장군이 엄마 양은주 박사님, 엄마같이 항상 세심하게 챙겨주시는 마음 따뜻한 장지윤 박사님, 늘 자신의 일처럼 걱정해주시는 장미 박사님, 어느덧 나의 눈빛만 봐도 생각을 읽어버리는 실험실의 든든한 버팀목 지혜언니, 항상 옆에서 내 투정 다 받아주고 말없이 챙겨주는 나의 영원한 귀염댕이 동기 은정이, 언니의 큰 웃음이 되어주는 선영이, 털털한 성격의 상냥소녀 유리, 힘이 되어주는 송희 그리고 너무나 의젓한 우리 막내 해훈, 지영, 은혜에게도 고마운 마음을 전합니다. 마지막으로 밝고 따뜻하게 웃어주시는 효주언니, 힘내라고 항상 파이팅을 외치며 에너지를 주시는 율언니, 웃는 모습이 너무 예쁜 지용언니, 실험과 함께 많은 것을 가르쳐 준 나의 정신적 지주 현경언니에게도 고마운 마음을 전합니다.

변함없는 믿음으로 지켜봐주는 내 친구들~ 희진이, 유진이, 보름이, 수진이, 복희, 미란이, 지현이, 민영이, 한아라, 현경이, 진아, 지선언니, 그리고 대학원 동기인 인민오빠와 김아라에게도 고마움을 전합니다. 항상 내 투정 다 받아주고 나를 웃게 만드는 우리 한오라기 동기 진민이, 승룡이, 상현이, 세윤이, 윤영언니 모두 고마워.

항상 따뜻한 마음으로 딸처럼 대해 주시는 여천 부영관광호텔 가족들...너무 감사합니다. 그리고 영원한 나의 반쪽 김상대씨... 많이 고맙고 사랑해요.

마지막으로 자랑스럽진 않아도 부끄러운 딸이 되지 않겠다고 항상 큰 소리 치는 부족한 딸을 이 세상에서 가장 최고로 아시는 우리 아빠, 엄마... 감사합니다. 힘든 생활에도 공부한다는 딸을 기특하게 여기고 항상 격려해주신 부모님이 없었다면 지금의 저는 없었겠지요... 아빠 · 엄마 사랑해요. 그리고 가까이 있지 못해 잘 챙겨주지 못한다고 늘 그리워하고 미안해하는 하나뿐인 우리 오빠, 좋은 가르침과 제 인생에 나침반이 되어주시는 우리 혜성스님 그리고 남희보살림 모두 감사하고 행복하시길 빌겠습니다. 항상 못난 조카딸이 가장 이쁘다고 하시는 우리 인천식구들과 친지분들께도 감사드리며 항상 건강하시길 두 손 모아 기도합니다. 저를 사랑하고 아껴주시는 모든 분들께 다시 한번 머리 숙여 감사의 말씀을 전합니다.

Collection @ chosun

저작물 이용 허락서

학 과	식품영양학과	학 번	20087057	과 정	석사
성 명	한글: 이선미 한문 : 李善美 영문 : Lee, Sun Mi				
주 소	전남 진도군 고군면 오류리 산 55-1번지				
연락처	E-MAIL : jindo-sm@hanmail.net				
논문제목	한글: 천일염된장 및 된장종균 *Bacillus subtilis* DJI의 암세포 성장 억제효과 영문: Growth-inhibitory Effects of the Solar salt-*Doenjang* and *Doenjang* starter *Bacillus subtilis* DJI 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(○) 조건부 동의( ) 반대( )

2009년 8월

저작자: 이선미 (서명 또는 인)

조선대학교 총장 귀하