



저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

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

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

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

[Disclaimer](#) 

2012年 2月

碩士學位 論文

천일염으로 제조한 김치와 된장의
암세포 성장억제 효과

朝鮮大學校 大學院

食品營養學科

尹海熏

천일염으로 제조한 김치와 된장의
암세포 성장억제 효과

Growth Inhibitory Effects of Kimchi and Doenjang
Prepared with Solar Salt on Cancer Cells

2012年 2月 24日

朝鮮大學校 大學院

食品營養學科

尹海熏

천일염으로 제조한 김치와 된장의
암세포 성장억제 효과

指導教授 張 海 春

이 論文을 理學碩士學位申請 論文으로 提出함.

2011年 10月

朝 鮮 大 學 校 大 學 院

食 品 營 養 學 科

尹 海 熏

尹 海 熏의 碩士學位論文을 認准함

委員長 조선대학교 교수 이명렬 印

委 員 조선대학교 교수 박윤경 印

委 員 조선대학교 교수 장해춘 印

2011 年 11 月

朝鮮大學校 大學院

목 차

ABSTRACT	VI
LIST OF TABLES	III
LIST OF FIGURES	IV
제 1 장 서 론	1
제 2 장 실험재료 및 방법	7
제1절 천일염으로 제조한 김치의 암세포 성장 억제효과	
1. 소금의 성분 분석	7
2. 김치 제조	7
1) 배추절임	7
2) 김치담금	8
3. pH, 산도, 염도 측정	8
4. 시료의 추출물 제조	9
5. 김치의 <i>in vitro</i> 암세포 억제효과	9
1) 시료의 준비	9
2) 세포 배양	9
3) MTT assay에 의한 세포 생존율 측정	10
4) 세포의 형태적 변화 관찰	14
6. 통계처리	14
제2절 천일염으로 제조한 된장의 암세포 성장 억제효과	
1. 소금의 성분 분석	15
2. Bacterial-koji 이용 된장 제조	15
1) Bacterial-koji 제조	15
2) 된장 제조	16
3. 된장의 일반성분 분석	18

4. 시료의 추출물 제조	18
5. 된장의 <i>in vitro</i> 암세포 억제효과	20
1) 시료의 준비	20
2) 세포 배양	20
3) MTT assay에 의한 세포 생존율 측정	20
4) 세포의 형태적 변화 관찰	21
6. 통계처리	21
제 3 장 결과 및 고찰	22
제1절 천일염으로 제조한 김치의 암세포 성장 억제효과	
1. 소금의 성분 분석	22
2. 발효 김치의 특성	24
3. 김치의 암세포 성장 억제효과	26
1) 물 추출물	26
2) 메탄올 추출물	30
4. 세포의 형태적 변화 관찰	35
제2절 천일염으로 제조한 된장의 암세포 성장 억제효과	
1. 소금의 성분 분석	38
2. 된장의 일반성분 분석	41
3. 된장의 암세포 성장 억제효과	44
1) 물 추출물	44
2) 메탄올 추출물	49
4. 세포의 형태적 변화 관찰	54
제 4 장 결 론	56
제 5 장 참고문헌	59

LIST OF TABLES

Table 1. Classification of salts	2
Table 2. Composition of the 3 kinds of used salts	23
Table 3. pH, acidity and microbial populations properties of Kimchi during fermentation at 10°C	25
Table 4. Composition of the 6 kinds of used salts	39
Table 5 General components of Doenjang prepared with various salts	43

LIST OF FIGURES

Figure 1. Flow sheet for the preparation of Kimchi extract	11
Figure 2. Schema of the MTT assay	12
Figure 3. A procedure of cytotoxicity assay using by MTT assay method	13
Figure 4. Manufacturing process of bacterial-koji and Doenjang	17
Figure 5. Flow sheet for the preparation of Doenjang extract	19
Figure 6. Effects of water extracts from Kimchi prepared with various salts on human gastric adenocarcinoma cell viability	27
Figure 7. Effects of water extracts from Kimchi prepared with various salts on human colon cell viability	28
Figure 8. Effects of water extracts from Kimchi prepared with various salts on human foreskin normal cell viability	29
Figure 9. Effects of methanol extracts from Kimchi prepared with various salts on human gastric adenocarcinoma cell viability	32
Figure 10. Effects of methanol extracts from Kimchi prepared with various salts on human colon cell viability	33
Figure 11. Effects of methanol extracts from Kimchi prepared with various salts on human foreskin normal cell viability	34

Figure 12. Photomicrographs (x100) of AGS, HT-29, and BJ cells treated with methanol extract from four-years aged solar salt Kimchi 37

Figure 13. Effects of water extracts from Doenjang prepared with various salts on human gastric adenocarcinoma cell viability 46

Figure 14. Effects of water extracts from Doenjang prepared with various salts on human colon cell viability 47

Figure 15. Effects of water extracts from Doenjang prepared with various salts on human foreskin normal cell viability 48

Figure 16. Effects of methanol extracts from Doenjang prepared with various salts on human gastric adenocarcinoma cell viability 51

Figure 17. Effects of methanol extracts from Doenjang prepared with various salts on human colon cell viability 52

Figure 18. Effects of methanol extracts from Doenjang prepared with various salts on human foreskin normal cell viability 53

Figure 19. Photomicrographs (x100) of AGS, HT-29, and BJ cells treated with methanol extract from four-years aged solar salt Doenjang 55

ABSTRACT

Growth Inhibitory Effects of Kimchi and Doenjang Prepared with Solar Salt on Cancer Cells

Yoon, Hae Hoon

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

Department of Food and Nutrition,

Graduate School of Chosun University

To investigate the growth inhibitory effect of Kimchi and Doenjang prepared with various solar salt, water extracts and methanol extracts the Kimchi and Doenjang were measured on AGS human gastric adenocarcinoma cells, HT-29 colon carcinoma cells and BJ human foreskin normal cells using MTT assay. Kimchi was prepared, chinese cabbages were brined with addition of purified salt, four years aged solar salt, and topan solar salt and mixed with other ingredients. The final salt concentration was adjusted into 2.2~2.4% (w/v) with each salt and the Kimchi was fermented at 7°C. When acidity of the Kimchi reached around 0.5~0.6%. The water extracts of all Kimchi samples showed growth-inhibitory effect on cancer cells, however the difference among the used salts did not observed. The methanol extracts of all Kimchi samples showed higher growth-inhibitory effect than the water extracts. The methanol extract of four years aged solar salt Kimchi(AGS: 73%, HT-29: 48%) showed higher growth-inhibitory effect than the purified salt Kimchi(AGS: 52%, HT-29: 39%). In addition, morphological changes of cancer cells(AGS, HT-29) and decreased their cell numbers were observed, when the methanol extract of four years aged solar salt Kimchi was treated into AGS and HT-29 cells. However all Kimchi extracts little cell toxicity for BJ normal cells. Doenjang prepared with various kinds of solar salt. Doenjang was prepared using the bacterial koji and six kinds of salt(purified salt, one year aged solar salt,

four years aged solar salt, topan solar salt, boiled solar salt and gojil solar salt) with 12%(w/w) of NaCl concentration. The Doenjangs were fermented and aged for 18 months. The water and methanol extracts of the Doenjang samples showed growth-inhibitory effects on cancer cells. The methanol extracts of Doenjang prepared with four-years aged solar salt(AGS: 55%, HT-29: 48%) stronger growth-inhibitory effect than Doenjang with purified salt(AGS: 42%, HT-29: 38%). In addition, decreased cancer cell numbers and morphological changes of cancer cells were observed when methanol extract of Doenjang prepared with four years aged solar salt was treated to cancer cells(AGS, HT-29). However, all extracts of Doenjangs did not showed any growth inhibitory effect on BJ normal cells.

제 1 장 서 론

소금은 인체의 혈액이나 세포에 약 0.9% 들어있는 생명 유지를 위해 절대적으로 필요한 요소 중 하나이다. 식생활에서는 음식의 맛과 질을 높이고 식품의 적당한 조직감을 유지하기 위해 사용하는 등 많은 유용한 역할을 하고 있다. 소금의 가장 큰 특징인 짠맛을 내는 조미 효과와 침투작용과 수분 활성을 이용한 미생물의 증식 방지와 분해요소의 조절 효과를 이용하여 식품의 가공 및 저장 등에 이용되는데 거의 모든 식품, 특히 우리나라의 발효식품인 김치, 된장, 간장, 젓갈 등의 제조에 매우 중요한 역할을 하였다(84). 또한 생체 내에서는 체액의 삼투압 조절, 세포막의 전압 조절, 산과 알칼리의 균형, 신경 전달 및 근육의 자극 반응 조절 등의 생리적 기능을 지닌 물질로서(67,96,93,88,80,2) 소금의 주성분인 NaCl 외에 포함되어 있는 Mg와 Ca는 혈압의 항상성을 유지시키며 K는 혈관 확장 효과가 있다고 알려져 있다(48,97,63). 그리하여 소금 그 자체의 항암 활성에 관한 연구로 암세포 성장 억제 및 면역 활성 증가(26,40) 또는 고농도 소금 섭취는 고혈압의 원인이 되며 심혈과 질환과 관련되어 있을 뿐만 아니라, 암을 유발할 가능성이 있다는 연구가 보고되고 있다(40,106,104,56,4). 국내에 유통되고 있는 식탁용 소금은 여러 종류가 있는데 KS 규격에 따라 천일염과 정제염으로 나누어지고 정제염은 기계염과 가공염으로 분류되고 있다(107). 2008년 3월 28일 시행된 식품의약품안전청 개정 고시에 의하면 식염이란 해수(해양심층수 포함)나 암염, 호수염 등으로부터 얻은 NaCl이 주성분인 결정체를 재처리하거나 가공한 것 또는 해수를 결정화하면 정제·결정화 한 것이고 식품의 유형을 천일염, 재제소금(재제조소금) 태움·용융 소금, 정제 소금, 가공소금으로 Table 1과 같이 분류되고 있다(46).

천일염을 생산하는 방식에 따라 장판염과 토판염으로 구별할 수 있는데 이는 천일염을 생산하는 결정지 바닥의 재질의 차이로 현재 생산되는 천일염의 대부분을 차지하는 장판염은 갯벌 바닥에 PVC 장판을 깔아 채렵하는 방식으로 이는 소금의 결정을 끌어모으기 쉬우며 검정색 장판이므로 햇볕을 잘 흡수해 온도가 쉽게 상승되어 소금의 생산 효율이 높아진다. 반면 토판염은 갯벌인 흩판에서 바로 채렵하는 전통방식으로 다양한 무기질 성분을 함유하여 장판염에 비해 어두운 빛깔을 띠며 맛도 훨씬 깊다(39).

Table 1. Classification of salts(39).

종 류	설 명
천일염	염전에서 해수를 자연 증발시켜 얻은 염화나트륨이 주성분인 결정체와 이를 분쇄, 세척, 탈수과정을 거친 염
재제소금 (재제조소금)	원료 소금(100%)을 정제수, 해수 또는 해수 농축액 등으로 용해, 여과, 침전, 재결정, 탈수, 염도 조정 등의 과정을 거쳐 제조한 소금
태움·용융소금	원료 소금(100%)을 태움·용융 등의 방법으로 그 원형을 변형한 소금을 말한다. 다만, 원료 소금을 세척, 분쇄, 압축의 방법으로 가공한 것은 제외
정제소금	해수(해양심층수 포함)를 이온교환막 등의 방법으로 정제한 농축함수 또는 원료 소금(100%)을 용해한 물을 진공증발관 등에 넣어 제조한 소금
가공소금	천일염, 재제소금, 태움·용융 소금, 정제소금, 기타 소금을 50% 이상 사용하여 식품 또는 식품첨가물을 가하여 가공한 소금

육염 즉 자염은 근대 천일염전이 만들어지기 전에 행해지던 소금 생산 방식으로 바닷물을 갯벌에 판 웅덩이에 끌어들여 소금이 농축된 합수를 얻은 다음 가마솥에 합수를 넣고 끓여 만든 우리의 전래소금이다. 자염은 일제시대에 천일염이 만들어지면서 사라졌으나 2002년 5월에 충남 태안 문화원에서 옛 자염 생산터를 발굴하고 고증을 통해 자염 생산을 재연하여 소규모로 생산되고 있다(49). 가을에 생산되는 고질염은 강한 대륙풍의 영향으로 4~5일 걸려 생산되는 소금으로 다른 정상적인 소금(천일염)처럼 정육면체의 모양이 아닌 불규칙적인 결정 모양을 하고 있으며 색깔도 천일염처럼 흰색이 아니라 얼음과 같이 투명한 색을 가지는 소금이다. 고질염은 물에 잘 녹지도 않을 뿐더러 고질염을 사용해 음식을 하면 쓴맛이 나며 발효도 제대로 되지 않는다고 한다(31).

다른 소금에 비해 소금의 주성분인 NaCl의 함량이 낮고 K, Mg, Ca 및 S 등 미네랄을 다량 함유하고 있는 천일염이 지니고 있는 미네랄은 인체 내에 있는 미네랄 성분과 비슷하다고 보고되고 있으며, 이의 연구의 보고로 현대인의 미네랄 결핍증을 해결하고자 하는 방안 중 하나로 모색되고 있다(40,25,77). 이와 같은 이유에서 소금의 종류에 따른 특성에 대한 연구가 보고되고 있으며 대부분 천일염과 정제염을 비교한 논문이 많다. 일부 연구에 의하면 소금의 종류에 따라 과산화물 생성촉진능이 다르며 보돌염변이 유발성은 죽염이 가장 낮았으며 가공염, 천일염, 기계염(정제염) 순으로 높아졌다고 보고하였다(26). 또한 *in vivo*에서 천일염과 KCl 혼합 죽염의 고형암 성장 저지효과와 면역 활성의 증강 효과 등을 나타내었다(41).

또한 사용 소금에 따른 발효 식품의 기능성에 관한 연구로는 된장에서는 소금의 종류를 달리하여 제조한 된장의 항돌연변이 및 염색체 상해 방지효과(33), 천일염 함유 청국장 항산화 효과(70), 천일염 된장의 암세포 성장 억제 효과(75) 등이 보고된 바 있으며, 김치에서는 제간수 천일염 및 구운 소금으로 절인 배추김치의 *in vitro* 항암 기능성 증진 효과(27) 등이 보고되었다.

우리나라를 대표하는 식품인 김치와 된장은 한국인의 식생활에서 가장 기본이 되는 전통발효식품이다. 김치는 배추나 무 또는 오이, 열무 등을 주원료로 하여 이를 소금에 절인 후 마늘, 생강, 파, 고춧가루, 젓갈 등 다양한 향신료를 첨가하여 발효시킨 채소 발효식품이며 이들 원료와 미생물의 적당한 발효에 유래되는 성분이 잘 조화되어 독특하고 고유한 풍미를 가진다. 김치의 영양학적인 의의는 열량이 낮고 식이섬유소, 비타민, 무기질 등이 풍부하다는데 있으며(85,112) 김치 재료의 영양생리학적 특성에 대한 연구 결과가 많이 보고되고 있다(71,11).

십자화과 채소인 배추에는 glucosinolate, flavonoid, phenol 등의 생리활성물질들이 들어있으며, 그 중 포함되어있는 인돌화합물은 항암성이 있다고 Watterbeg는 보고하였고(108), 배추에 상당량 포함되어 있는 S-methylcysteinsulfoxide는 in vivo 실험에서 콜레스테롤을 낮추는 작용을 나타내는 것으로 보고되었다(24). 김치의 주요 양념으로 사용되는 고춧가루의 capsaicin은 위산 분비 촉진효과, 미생물 사멸효과(103) 및 혈관을 확장시키는 효과를 지니며(22), 고춧가루의 메탄올 추출물을 이용해 실험한 결과 돌연변이를 유발하지 않고 오히려 항돌연변이 효과를 보임을 알 수 있었다(36). 또한 김치의 부재료로 사용하는 마늘과 양파 모두 생리활성 물질인 thioester를 함유하고 있고(5) 혈중 콜레스테롤 및 중성지방의 저하효과, 저혈당 효과 등을 가지고 있다(36,65).

2007년 통계청의 한국인 주요 사망원인 보고에 따르면 암, 뇌혈관 질환, 심장 질환 등으로 나타나 있다. 암은 92년 이래 한국인 주요 사망률 1위의 질병이며 그 중 위암에 의한 사인이 가장 높게 나타났다(113). 이것은 우리의 맵고 짠 음식을 선호하는 식습관에 의한 것으로 여겨져 김치의 소금 첨가와 이의 다량 섭취가 위암 발생의 원인이 될 수 있다고 의심받았지만 다량의 소금을 첨가한 김치를 섭취하지 않는 한 발효 과정에서 생성되는 젖산균 및 김치의 재료로 사용되는 채소의 여러 기능성 물질로 인해 암을 예방하는 효과와 오히려 항암효과를 지니는 것으로 보고되고 있다(85,56).

원부재료 자체의 뛰어난 영양생리화학적 특성을 지니는 김치는 세계적인 식품으로 각광받고 있으며 그리하여 김치의 항산화성, 항비만, 암 예방과 항암효과 등에 관한 연구도 활발히 이루어졌다. 김치의 용매 추출물의 항산화성을 살펴보고(76), 김치를 토끼에게 급여했을 때 혈장 콜레스테롤 및 중성지방 함량이 저하되었다고 보고하면서 김치의 동맥경화 예방 효과에 대한 연구가 이루어졌다(65). Lee 등(72)은 사람에게 김치를 섭취시켰을 때 발암성분을 나타내며 장내유효효소인 β -glucosidase와 β -glucuronidase의 활성이 감소하였다고 하였으며, Park(85)은 AFB1(aflatoxin B1)에 대해 3주 동안 발효시킨 김치의 추출물 처리 시 항돌연변이 효과가 나타남을 보고하였고 in vitro 에서 HT-29 인체 결장암세포, human leukemia K-562 및 human osteosarcoma MG-63 세포를 이용하여 암세포 성장저해 효과를 확인하였다.

또한 Jo 등(13)은 김치의 활성물질에 관한 연구를 수행하였는데 잘 숙성된 배추 김치의 용매 분획물을 얻어 실험한 결과 dichloromethane fraction이 항돌연변이, 항발암 효과, 항암효과가 가장 뛰어남을 관찰하였다. 배추김치의 dichloromethane fraction의 항암활성에 대한 연구 또한 이루어졌는데 DNA fragmentation assay를 실시하여 암세포의 DNA 단편화 현상을 관찰하였고 이 fraction에 의한 암세포 성장 저해효과는

‘programmed cell death’인 apoptosis를 유도하여 나타난 것으로 보고되었다(15).

우리나라 전통 장류 중 하나인 된장은 대두로부터 미생물 발효를 통하여 만들어진 식품으로 뛰어난 저장성과 특유의 향미를 지니고 있어 조미료로 사용되어져 온 한국인의 식생활에 매우 중요한 역할을 해왔다. 단백질, 탄수화물, 지방 등의 영양소를 골고루 포함하고 있어 쌀을 주식으로 해 온 우리의 식생활에서 부족할 수 있는 필수 아미노산인 lysine을 공급받을 수 있었다. 또한 육류 섭취량이 적었던 과거 식생활에서 주요한 단백질 공급원 역할을 한 된장은 우수한 영양원일 뿐만 아니라 여러 가지 생리활성을 나타내는 것으로 알려져 있다(80,50,96). 된장 제조 시 사용되는 콩에 isoflavone, saponin, lecithin, phytic acid, trypsin inhibitor, 식이섬유소 등 여러 생리활성 성분이 함유되어 있다고 밝혀지면서 이러한 콩의 대표적인 발효식품인 된장의 기능성에 관한 연구가 활발히 진행되어져 왔다(60).

된장의 기능성의 첫 번째는 혈전용해능이다. 일본 전통 음식인 natto에서 분리된 ‘nattokinase’ 라는 혈전용해효소를 섭취하였을 때 혈전 용해능이 높아진다는 보고가 있다(28). 우리나라에서도 토양 또는 장류에서 혈전용해균주를 분리하는 연구가 진행되고 있는데(18,19,29,37,63) Bacillus 속이면서 혈전용해능을 가진 균주를 선별해 동정한 결과 natto 보다 더 높은 혈전용해 활성을 나타냈으며 더 많은 양의 혈전용해효소를 생산하였다고 하였다(55). 이렇게 균주로부터 생산되는 혈전용해 효소의 특성을 조사하였으며(17,57,74) 더 나아가 효소 생산을 위한 최적 조건을 조사하기도 하였다(35,16).

두 번째는 된장의 항산화 작용이다. 된장과 간장은 발효 및 숙성 중에 원료에 함유되어 있는 아미노 화합물과 당의 작용에 의해 쉽게 mailard 반응이 일어나고 그 결과 생성된 melanoidin의 지질산화에 대한 항산화효과가 보고된 바 있다(12,109,30). 이로 인해 항산화효과, 활성 산소 제거, 항돌연변이 및 항암효과를 보임을 알 수 있다(91,20,42,87). 지질의 함량이 높은 메주 및 된장이지만 지질이 자동산화에서 높은 안정성을 보이는 것은 페놀화합물과 갈변물질의 항산화작용에 의한 것으로 밝혀졌다(69). 이에 Lee(48) 등은 재래식 방법으로 메주와 된장을 제조한 후 발효 및 숙성시켜 수용성 및 지용성 갈변물질을 분리하여 항산화력을 측정하였다.

세 번째로는 가장 활발하게 연구되어진 항돌연변이 효과 및 항암효과이다. 대두에서 유래하는 항암 활성 물질은 protease inhibitor(43,110,101), phytic acid(95), isoflavone(105,82,90) 및 genistein(81) 등으로 이 성분의 항암효과에 대한 연구가 보고되어지고 있다. 된장이 aflatoxin B1에 의해 유도되어지는 돌연변이를 억제하는 효과가 보고되었고(44), Lim 등(77)은 된장을 극성이 다른 유기용매로 분획하여 항돌연변

이 효과를 관찰한 결과, 디클로로메탄 분획물이 Yac-1과 sarcoma-180 암세포들의 증식에 대해 80%의 저해효과를 나타내었고 동시에 면역과정의 생물학적 작용과 대사적 변화를 유도하는 interleukin-2 (IL-2)의 생성 활성 증진에 효과가 있었다. 된장의 원료로 사용되는 콩의 색소 성분 일종으로 isoflavone인 genistin은 콩 안에서 당과 결합한 배당체 상태로 존재하다가 발효 중 미생물에 의해 β -glycosyl 결합이 깨져 그 결과 genistein 양이 증가한다. 이 genistein은 생리활성 물질로서 된장의 항돌연변이 유발성은 genistein과 같은 물질이 증가했기 때문이라 하였으며(87) in vitro 실험에서는 종양의 생성과 발암을 감소시킴을 확인할 수 있었다(23,92). 또한 in vivo 실험에서는 다양한 질환의 원인인 혈관신생과 이의 전이를 억제함을 확인하여(102,6) genistein이 질병 치료를 위해 중요하게 이용될 수 있을 것이라 여겨졌다.

최근에는 된장의 기능성을 증대시키기 위한 연구가 더욱이 진행되고 있다. 물과 소금의 종류를 달리하여 된장을 제조한 후 된장의 항암효과를 측정하였으며(73) 여러 가지 부재료를 첨가하여 된장의 항암효과를 증대시키려 많은 연구가 이루어졌다. 그 예로는 녹차추출물을 첨가한 된장의 항돌연변이 및 in vitro 항암활성(34), 초피를 첨가한 장류의 항균 및 항암활성(53), 된장 제조 시 다시마를 농도별로 첨가하여 항암활성 및 항돌연변이 및 항암효과 활성이 높음을 나타내었으며(21) 또한 매실, 마늘 및 생강을 첨가한 된장을 투여한 쥐의 sarcoma-180 종양세포에서의 항암효과(89) 등이 보고되고 있다.

본 논문은 우리나라의 전통식품인 김치와 된장을 소금의 종류를 달리하여 이에 따른 암세포 성장 억제효과를 알아보고자 하였다. 즉 자연발효식품인 김치에 특정 김치 유산균(*Leuconostoc citreum* GJ7)을 적용하여 종균 발효시켰다. 그리하여 김치의 항암효과를 나타낼 수 있는 원·부재료, 김치유산균, 발효정도 등 모든 요인을 동일하게 적용시키고 이에 소금만을 정제염, 4년 숙성 천일염, 토판염으로 다르게 하여 사용소금에 따른 김치의 암세포 증식 억제효과를 조사하고자 하였다. 또한 된장은 고유한 재래 된장의 맛과 향을 재현할 수 있는 Bacterial-koji를 사용하여 된장을 제조하였다. 된장의 모든 제조 조건(원료, 제조방법, 발효 미생물, 발효 조건 등)을 동일하게 하고 이에 사용되는 소금의 종류(정제염, 1년 숙성 천일염, 4년 숙성 천일염, 토판염, 육염, 고질염)만을 각각 달리하여 발효된 된장이 인간 정상세포(BJ)에 미치는 세포독성 및 인체 위 암세포(AGS) 및 결장암세포(HT-29)의 성장 억제효과를 조사함으로써 소금이 김치의 암세포 증식 억제효과(in vitro)에 미치는 영향을 규명하고자 하였다.

제 2 장 실험 재료 및 방법

제 1 절. 다양한 소금으로 제조한 김치의 암세포 성장 억제효과

1. 소금의 성분 분석

김치제조 시 사용된 소금에 존재하는 무기질을 분석하기 위하여 정제염과 천일염 2 종(1년 숙성 토판염, 4년 숙성 장판염)을 증류수에 0.1%(w/v)가 되도록 녹인 다음 0.45 μm syringe filter(Advantec, Tokyo, Japan)로 여과한 후 분석 시료로 사용하였다. 음이온은 이온크로마토그래피(Compact IC 790, Metrohm, Herisau, Switzerland)를 이용하여 분석하였고, 무기질 분석은 유도결합 플라즈마 원자방출 분광계(Agilent 7500 Series, Agilent, Palo Alto, CA, USA)를 이용하여 분석하였다. 이 중 Ca, K, Mg, Na는 원자 흡광광도계(Hitachi Z-2300, Hitachi, Tokyo, Japan)를 이용하였다. 소금의 수분은 105°C 상압건조법으로 분석하였다.

2. 김치제조

1) 배추절임

김치 제조 시 배추절임에 사용된 소금은 정제염(Purified salt; H사, Ulsan, Korea)과 천일염으로 4년 동안 숙성하여 간수를 제거한 천일염인 4년 숙성 장판염(Four years aged solar salt; C사, Shinan, Korea)과 1년 숙성된 토판염(Topan solar salt; S사, Haenam, Korea)을 사용하였다. 배추는 4등분하여 16.6%(w/v)의 천일염 용액과 10%(w/v) 정제염 용액에 각각 5~6시간 절이고, 흐르는 물에 3회 세척한 후 4°C에서 5시간 탈수하였다.

2) 김치담금

김치 양념은 고춧가루, 무, 파, 마늘, 생강, 젓갈, 찹쌀풀(2.7 g: 1.22 g: 1.33 g: 1.33 g: 0.5 g: 4.06 g: 6.1 g) 등의 부재료를 혼합하여 제조하였으며, 절임배추 100 g 당 21 g의 김치 양념을 혼합하여 김치를 제조하였으며, 제조된 김치의 염도는 최종 염도 2.2~2.4%(w/v)가 되도록 하였다. 김치 종균의 배양 및 김치에 대한 종균의 사용은 Chang(7) 등의 방법에 따라 감수성균주 *Lb. plantarum* KFRI 464의 세포내 분획으로 박테리오신 생성능을 강화시켜 배양된 *Leuc. citreum* GJ7을 사용하였다. 김치 유산균 *Leuc. citreum* GJ7 배양액은 원심분리 (9,950×g, 15 min, 4°C) 후 멸균수로 2회 세척하여 김치 양념에 혼합하였으며, 종균 접종량은 김치 1 g당 약 10^7 CFU가 되도록 첨가하였다. 김치는 7°C에서 발효시켜 김치의 산도가 0.5~0.6%에 이르면 이를 -1°C인 김치냉장고에서 보관하여 (Dimchae DD-1827DFB, Winiamando, Asan, Korea) 시료로 사용하였다. 사용 소금별 김치 제조는 3회 반복 수행하였다.

3. pH, 산도, 염도 측정

김치는 hand blender(HHM-620, Hanil, Seoul, Korea)로 2분간 마쇄하여, 3겹의 멸균거즈를 사용하여 여과한 김치액을 실험에 사용하였다. 김치액의 pH는 pH meter(545 pH meter, Denver, Arvada, CO, USA)를 사용하여 실온에서 측정하였고, 산도는 AOAC법에 의해 김치액 10 mL를 0.1 N NaOH 용액으로 pH 8.3이 될 때까지 적정하여 소비된 0.1 N NaOH의 소비량을 아래의 식에 의해 lactic acid(% w/w)로 환산하여 표시하였다.

$$\text{산도(lactic acid, \%)} = \frac{0.1\text{N NaOH 사용량} \times 0.009(\text{젓산계수}) \times F}{\text{sample (mL)}} \times 100$$

4. 시료의 추출물 제조

시료로 사용된 김치는 동결건조(SFDSM12, Samwon, Pusan, Korea) 후 마쇄하고 시료의 20배(w/v) 물과 메탄올을 각각 첨가하여 12시간 동안 교반하고 이를 2회 반복한 후 여과(Whatman Paper No. 2)한 후 rotary vacuum evaporator(N-1000SW, Eyela, Tokyo, Japan)로 감압 농축하여 각각의 물 추출물, 메탄올 추출물을 얻었다. 준비된 각각의 물과 메탄올 추출물은 최종 농도가 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mg/mL가 되도록 각각 첨가하여 세포 실험에 사용하였다.

5. In vitro 항암실험

1) 시료의 준비

상기의 방법(Fig. 1)에 따라 추출한 각각의 김치 추출물은 cell culture media에 희석하여 실험에 사용하였다. 각 세포에 culture media를 첨가한 구간을 100% (대조구)로 하였으며, 실험구는 각각의 김치 추출물을 48시간 동안 농도별로 처리한 각 배양세포의 생존율을 대조구에 대한 상대적 생존율(%)로 표시하였다.

2) 세포 배양

실험에 사용되어진 암세포주는 AGS(human gastric adenocarcinoma cell), HT-29(human colon cancer cell)과 정상세포주 BJ(human foreskin normal cell)를 사용하였다. 인체 위암세포(AGS)와 인체 결장암세포(HT-29)는 한국 세포주은행(Korea cell line bank, KCLB)으로부터 분양 받아 Roswell Park Memorial Institute medium(RPMI 1640; HyClone, Logan, UT, USA)으로 배양하고, 대조군으로 사용한 인체 포낭 정상세포주 BJ(American Type Culture Collection, ATCC, VA, USA)는 Dulbecco/Vogt Modified Eagle's Minimal Essential Medium(DMEM; HyClone, Logan, UT, USA)으로 배양하였다. 각각의 배지에는 10% fetal bovine serum(FBS; HyClone, Logan, UT, USA)과 100 µg/mL

penicillin(Gibco BRL, Rockville, MD, USA) 그리고 100 µg/mL streptomycin(Gibco BRL, Rockville, MD, 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 계대 배양하면서 실험에 사용하였다. 계대 배양 시 각각의 passage number를 기록하였고 passage number가 10회 이상 일 때는 새로운 세포를 액체질소 탱크로부터 꺼내어 다시 배양하여 실험하였다.

3) MTT assay에 의한 세포 생존율 측정

세포 증식 정도를 MTT assay법에 따라 측정하였다(99). MTT assay는 살아있는 세포의 미토콘드리아에 있는 환원효소(reductase)에 의하여 노란색의 수용성 기질인 MTT(3-(4,5-dimethylethiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)를 자주색을 띠는 비수용성의 formazan crystal(dark blue formazan)로 환원시키는 미토콘드리아의 능력을 이용하는 검사법으로써 신속하고 정확하게 침전되는 정도를 흡광도로 측정하여 이로부터 암세포가 사멸 또는 증식이 억제되는 정도를 측정하는 방법이다(Fig. 2). Dark blue formazan의 생산량은 대사적으로 활성이 있는 살아있는 세포수와 거의 비례하는 것으로 알려져 세포의 생육과 분화를 측정하는데 아주 효과적으로 사용되고 있다.

배양된 각각의 세포주는 96 well plate에 well 당 1×10^4 cells/mL이 되도록 180 µL씩 seeding 하고 37°C, 5% CO₂배양기(Astec sci 165D, Astec, Tokyo, Japan)에서 24시간 동안 세포를 부착시킨 후 시료를 농도별로 20 µL씩 첨가하여 48시간 배양하였다. 여기에 인산생리식염수(PBS)에 5 mg/mL의 농도로 제조한 MTT(thiazolyl blue tetrazolium bromide, SIGMA, Louis, MO, USA)용액 20 µL를 첨가하고 4시간 더 배양한 후 생성된 formazan 결정을 dimethyl sulfoxide(DMSO, SIGMA, Louis, MO, USA)에 녹여 plate reader(UV scanning ELISA reader, BioTek, Winooski, VT, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정 값은 시료를 처리하지 않은 대조군과 비교하여 cell viability(%)를 계산하였다.

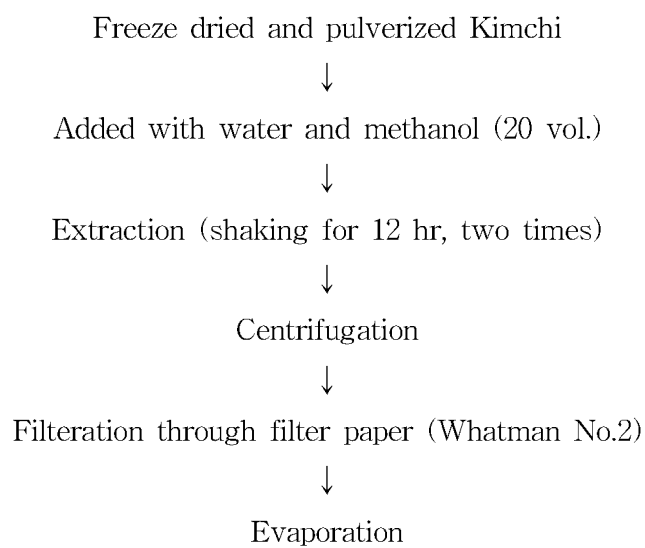


Figure 1. Flow sheet for the preparation of Kimchi extract.

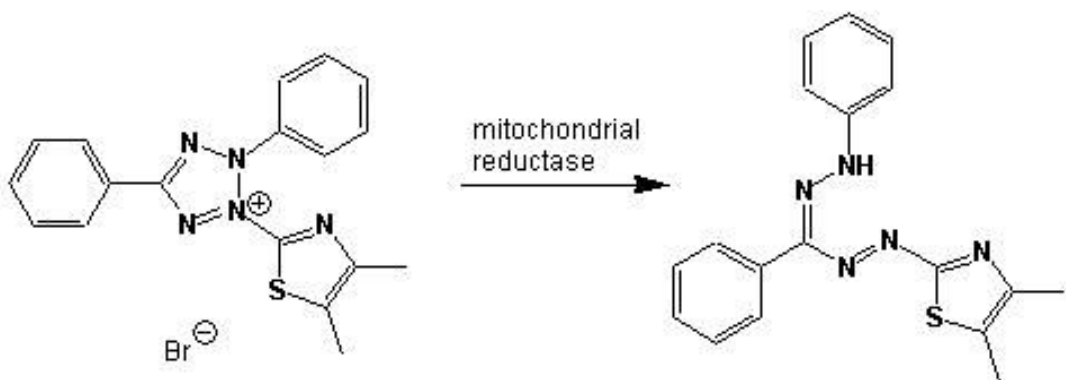


Figure 2. Schema of the MTT assay(99).

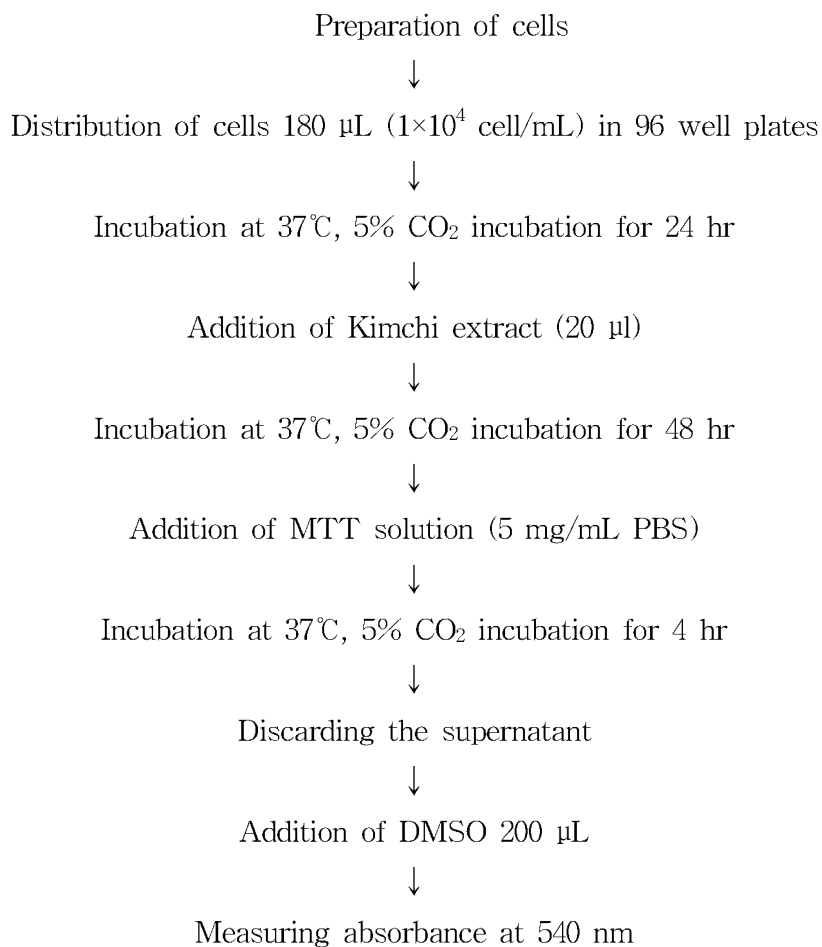


Figure 3. A procedure of cytotoxicity assay using by MTT assay method.

4) 세포의 형태적 변화 관찰

배양된 각각의 세포를 culture dish(100×20mm, Falcon Co, Franklin Lakes, NJ, USA) 에 1×10^5 cells/mL이 되도록 seeding하고 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 세포를 부착시킨 후 시료를 첨가(5 mg/mL)하여 48시간 배양하였다. 배양 후 세포의 형태적 변화는 현미경(ECLIPSE TS100, Nikon, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

6. 통계처리

자료 분석은 SPSS 18.0.1(statistical package for the social science) P/C package 를 이용하여 평균과 표준편차를 구하였다. 결과는 평균(mean)±표준편차(standard deviation)로 나타냈으며, 각 변수에 대해 일원배치분산분석(one-way ANOVA)을 실시하였다. 사후검정으로는 Duncan's multiple range test를 적용하였으며 통계적 유의성은 $P < 0.05$ 를 기준으로 하였다.

제 2 절. 다양한 소금으로 제조한 된장의 세포 성장 억제효과

1. 소금의 성분 분석

된장 제조에 사용된 소금은 1년 숙성 천일염(One-year aged solar salt, S사, Muan, Korea), 4년 숙성 천일염(four-years aged solar salt; C사, shinan, Korea), 토판염(Topan solar salt; S사, Haenam, Korea), 육염(Boiled solar salt; W사, Buan, Korea), 고질염(Gojil solar salt; T사, shinan, Korea) 5종의 천일염과 정제염(Purified salt; H사, Ulsan, Korea) 1종을 사용하였다. 5종의 천일염 중 3종의 숙성되지 않은 천일염은 모두 당해년도 생산 천일염이었다. 소금의 성분 분석을 위해 천일염 5 종과 정제염 1종을 증류수에 0.1%(w/v) 되도록 녹인 다음 0.45 μm syringe filter(Advantec, Bunkyo, Japan)로 여과한 후 분석시료로 사용하였다. 음이온 분석은 이온크로마토그래피(Compact IC 790, Metrohm, Herisau, Switzerland)를 이용하였고, 무기질 분석은 유도결합 플라즈마 원자방출 분광계(Agilent 7500 Series, Agilent, Palo Alto, USA)로 분석하였다. 이 중 Ca, K, Mg, Na는 원자 흡광광도계(Hitachi Z-2300, Hitachi, Tokyo, Japan)를 이용하였다. 소금의 수분은 105°C 상압 건조법으로 분석하였다(3).

2. Bacterial-koji 이용 된장 제조

1) Bacterial-koji 제조

본 실험에 이용된 Bacterial-koji 제조방법은 Chang(9)의 방법에 따라 제조하였다. *Bacillus subtilis* DJ1은 37°C에서 24시간 전 배양하여 LB broth(Duchefa biochemie, bacto-trypton 10%, yeast-extract 5%, sodium chloride 10%)에 1%(v/v) 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°C에서 15시간 침지 후 121°C에서 40분간 증자하였다. 삶은 콩은 40°C로 냉각시킨 후 준비된 *Bacillus subtilis*

DJ1 균체를 원료콩의 1%(w/w) 비율로 접종하였으며, 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 된장 제조의 방법은 Chang(9)의 방법에 따라 제조하였다. 본 연구에서는 된장 제조 시 사용되는 소금의 종류를 달리하여 소금의 종류에 따른 된장추출물의 암세포 성장 억제효과를 비교해 보고자 하였다. 따라서 1년 숙성 천일염, 4년 숙성 천일염, 육염, 고질염 그리고 정제염을 사용하여 총 여섯 가지 종류의 된장을 제조하였다. 제조된 Bacterial-koji에 삶은 콩(원료콩)을 기준으로 코지와 같은 양을 가하고 최종 소금의 농도가 12%(w/w)가 되도록 각각의 소금을 종수에 녹여 함께 섞었다. 이와 같이 제조된 된장을 20℃에서 18개월 숙성시켜 실험에 사용하였다.

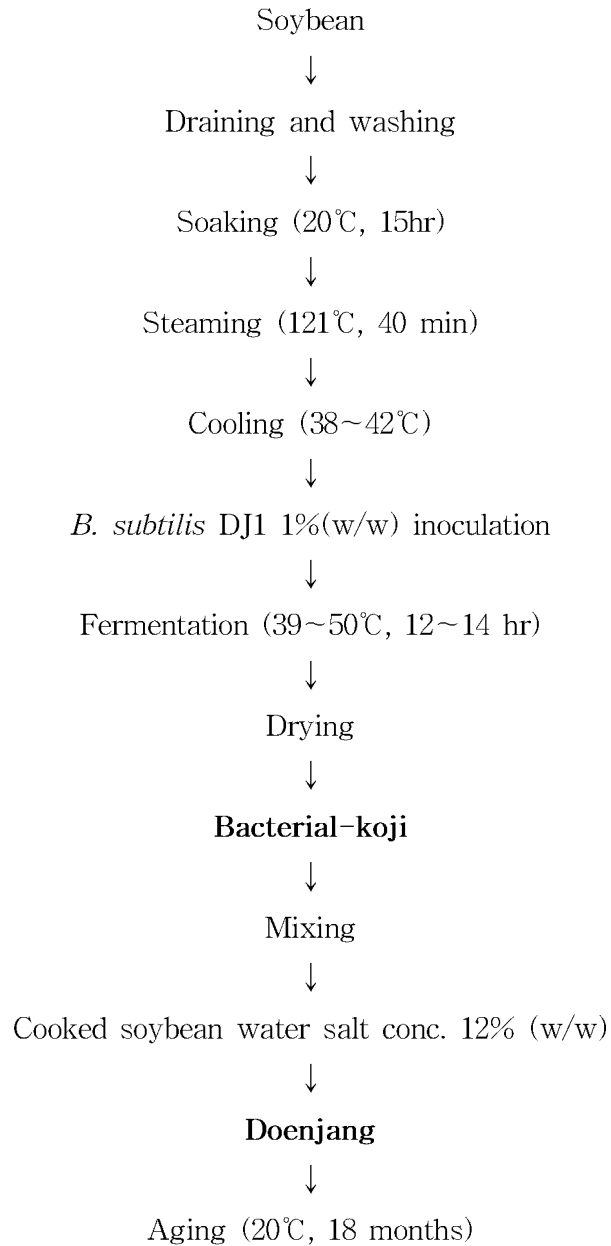


Figure 4. Manufacturing process of bacterial-koji and Doenjang(9).

3. 된장의 일반성분 분석

된장의 수분함량은 105°C 상압가열건조법으로 분석하였으며, 염도는 시료 3 g에 증류수 27 mL을 가하여 mixer로 30분 동안 균질화 한 후 Whatman paper No. 1(Schleicher & Schuell, Christchurch, England)로 여과한 염도계(ES-421, Atago, Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였다. 유리아미노산은 식품공전의 분석방법에 준하여 측정하였다(93). 시료 3 g을 취하여 70% ethanol 30 mL를 가하여 1시간 동안 균질화한 후 원심분리 하였다. 상정액을 70% ethanol 25 mL로 2회 반복 추출하고 추출액을 합하여 rotary vacuum evaporator(N-1000SW, Eyela, Nasa, Japan)로 감압농축 하였다. 이 농축물을 증류수 30mL에 녹여 0.45 μ m syringe filter(Minisart, Sartorius, Goettingen, Germany)로 여과한 후 아미노산 자동분석기(L-8800, Hitach, Tokyo, Japan)에 주입하여 분석하였다. 조단백은 Kjeldahl 법으로, 조회분은 550°C 건식회화법으로 측정하였다(3).

4. 된장의 추출물 제조

Bacterial-koji를 이용하여 제조한 총 6종의 된장을 동결건조(SFDSM12, Samwon, Pusan, Korea) 후 마쇄하고 시료의 20배(w/v) 물과 메탄올을 각각 첨가하여 12시간 동안 교반하고 이를 3회 반복하였다. 추출물은 여과(Whatman Paper No. 2)한 후 rotary vacuum evaporator(N-1000SW, Eyela, Tokyo, Japan)로 감압 농축하여 각각의 물 추출물, 메탄올 추출물을 얻었다. 준비된 각각의 물과 메탄올 추출물은 최종 농도가 0.005, 0.050, 0.500, 1.000 mg/mL가 되도록 각각 첨가하여 세포 실험에 사용하였다.

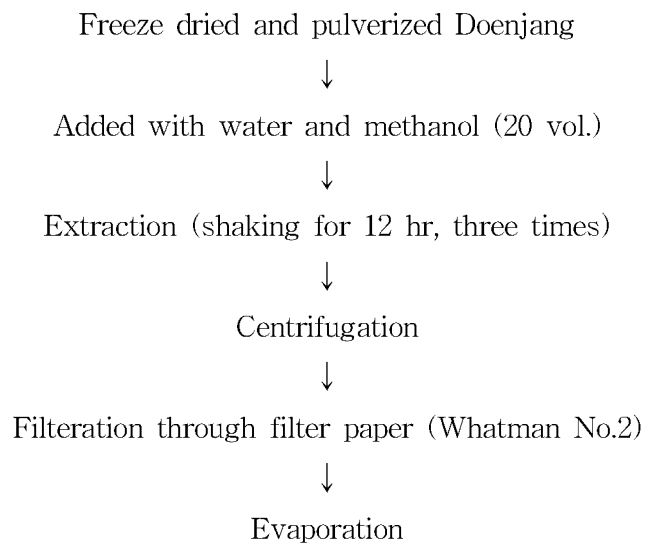


Figure 5. Flow sheet for the preparation of Doenjang extract.

5. In vitro 항암실험

1) 시료의 준비

추출한 각각의 된장 추출물은 cell culture media에 희석하여 실험에 사용하였다. 각 세포에 culture media를 첨가한 구간을 100%(대조구)로 하였으며, 실험구는 각각의 된장 추출물을 48시간 동안 농도별로 처리한 배양세포의 생존율을 대조구에 대한 상대적 생존율(%)로 표시하였다.

2) 세포 배양

실험에 사용되어진 암세포주는 AGS(human gastric adenocarcinoma cell) CRL-1739, HT-29(human colon cancer cell) HTB-38 2종의 암세포와 정상세포주 BJ(human foreskin normal cell) CRL-2522를 사용하였다. 배양 방법은 상기의 방법대로 배양하여 실험에 사용하였다.

3) MTT assay에 의한 세포 생존율 측정

배양된 각각의 세포주는 96 well plate에 well 당 1×10^4 cells/mL이 되도록 180 μ L씩 seeding 하고 37°C, 5% CO₂배양기(Astec sci 165D, Astec, Japan)에서 24시간 동안 세포를 부착시켰다. 그 후에 시료를 농도별로 20 μ L씩 첨가하여 48시간 동안 배양하였다. 여기에 인산생리식염수를 사용하여 5 mg/mL의 농도로 제조한 MTT{3-(4,5-dimethylethiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide}용액을 20 μ L를 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.

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{\text{sample O.D} - \text{blank O.D}}{\text{control O.D}} \times 100$$

4) 세포의 형태적 변화 관찰

배양된 각각의 세포를 culture dish(100×20mm, Falcon Co, Franklin Lakes, NJ, USA) 에 1×10^5 cells/mL이 되도록 seeding하고 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 세포를 부착시킨 후 시료를 첨가(5 mg/mL)하여 48시간 배양하였다. 배양 후 세포의 형태적 변화는 현미경(ECLIPSE TS100, Nikon, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

6. 통계처리

자료 분석은 SPSS 18.0.1(statistical package for the social science)P/C package 를 이용하여 평균과 표준편차를 구하였다. 결과는 평균(mean)±표준편차(standard deviation)로 나타냈으며, 각 변수에 대해 일원배치분산분석(one-way ANOVA)을 실시하였다. 사후검정으로는 Duncan's multiple range test를 적용하였으며 통계적 유의성은 $P < 0.05$ 를 기준으로 하였다.

제 3 장 결과 및 고찰

제 1 절. 다양한 소금으로 제조한 김치의 암세포 성장 억제효과

1. 소금의 성분 분석

105℃ 상압건조법으로 실험에 사용된 3종 소금의 수분함량을 분석하였다(Table 2). 정제염은 $0.01\pm 0.00\%$ 로 거의 수분이 존재하지 않았으며, 4년 숙성 천일염은 $10.76\pm 0.36\%$, 토판염의 수분 함량은 $11.34\pm 0.18\%$ 로 토판염의 수분함량이 가장 높았다. 그리고 NaCl의 함량은 정제염 98.60%, 4년 숙성 천일염 85.79%, 토판염 94.53%로 나타났다. 정제염은 해수를 이온교환막을 통해 NaCl을 추출하여 95% 이상의 NaCl 함량을 지닌다는 보고(46)와 일치하며, 본 실험에 사용된 토판염이 1년 숙성된 것임을 고려할 때 1년 숙성 토판염의 NaCl 및 수분함량이 4년 숙성된 천일염(장판염)의 조성에 오히려 더 근접함을 알 수 있었다. 이온크로마토그래피에 의한 소금 내 무기질을 분석한 결과 Table 2에 보여진 바와 같이 소금의 음이온 중 가장 많은 양을 차지하는 Cl은 4년 숙성 천일염에서 가장 높게 나타났으며 SO₄은 정제염에서는 전혀 검출되지 않았으며 천일염 중에서도 토판염에서 $18,672.50\pm 118.09$ mg/kg으로 가장 많이 검출되었다. 천일염은 해수의 수분을 증발시켜 염의 결정을 얻은 것으로 NaCl이 주성분이나 Ca, Mg, K 등의 많은 무기질이 함유되어 있다는 보고(84)와 같이 Table 2의 결과에서도 천일염에서는 정제염에 비해 높은 Ca, Mg, K 등의 양이온이 검출됨을 알 수 있었다. 이러한 무기질은 혈압을 낮추는 효과가 있다고 알려져 있다(26). Na 다음으로 정제염의 양이온은 K이 386.50 ± 13.15 mg/kg, Ca 26.47 ± 11.47 mg/kg, Mg 17.60 ± 0.15 mg/kg 포함되어 있었다. 정제염과 다르게 4년 숙성 천일염과 토판염에서 Mg이 $3,895.55\pm 141.35$ mg/kg, $9,560.75\pm 51.97$ mg/kg, K은 $1,511.45\pm 91.57$ mg/kg, $2,491.45\pm 18.31$ mg/kg 그리고 Ca은 $1,724.65\pm 240.48$ mg/kg, 168.45 ± 7.00 mg/kg 으로 나타났다.

Table 2. Composition of the used salts.

Element	Purified salt		Four years aged solar salt		Topan solar salt		
	Content (mg/kg)	Ratio(%)	Content (mg/kg)	Ratio(%)	Content (mg/kg)	Ratio(%)	
Anion	Cl	566,720.00± 6,561.95	59.32	575,171.00± 1,794.63	56.96	485,966.00± 312.54	52.52
	Br	145.00±0.00	0.02	421.50±7.78	0.04	541.00±22.63	0.06
	SO ₄	0.00±0.00	0.00	13,814.50± 218.50	1.37	18,672.50± 118.09	2.02
Cation	Na	388,050.00± 10,394.47	40.62	413,190.00± 16,772.57	40.91	407,895.00± 2877.92	44.08
	Mg	17.60±0.15	0.00	3,895.55±141.35	0.39	9,560.75±51.97	1.03
	K	386.50±13.15	0.04	1,511.45±91.57	0.15	2,491.45±18.31	0.27
	Ca	26.47±11.47	0.00	1,724.65±240.48	0.17	168.45±7.00	0.02
	Li	0.02±0.01	0.00	0.35±0.03	0.00	0.34±0.12	0.00
	Al	0.32±0.16	0.00	0.56±0.02	0.00	0.11±0.03	0.00
	Cr	0.00±0.00	0.00	0.01±0.00	0.00	0.01±0.01	0.00
	Mn	0.18±0.01	0.00	3.67±0.11	0.00	4.20±0.83	0.00
	Fe	0.00±0.00	0.00	0.01±0.00	0.00	0.63±0.26	0.00
	Ni	0.00±0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.09±0.01	0.00
	Cu	7.19±0.17	0.00	0.87±0.13	0.00	0.04±0.00	0.00
	Zn	5.46±0.46	0.00	0.00±0.00	0.00	0.52±0.09	0.00
	As	0.41±0.01	0.00	0.06±0.04	0.00	0.02±0.00	0.00
	Se	0.36±0.07	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00±0.00	0.00
	Sr	0.38±0.00	0.00	56.87±10.98	0.01	6.12±1.05	0.00
	Ag	0.01±0.00	0.00	0.01±0.00	0.00	0.96±0.20	0.00
	Cd	0.01±0.01	0.00	0.01±0.00	0.00	0.01±0.00	0.00
	Hg	0.00±0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00±0.00	0.00
	Pb	0.04±0.00	0.00	0.07±0.03	0.00	0.06±0.01	0.00
Total	955,596.01± 3,834.42	100.00	1,009,791.14± 19,278.22	100.00	925,308.26± 3,414.07	100.00	
NaCl(%)	98.6±0.17		85.79±0.25		84.53±0.36		
Moisture(%)	0.01±0.00		10.76±0.36		11.34±0.18		

Values are means±SD from duplicate determinations.

2. 발효 김치의 특성

정제염, 4년 숙성 천일염, 토판염을 이용하여 각각 배추를 절인 후 *Leuc. citreum* GJ7을 사용하여 김치를 제조하여 pH, 산도 및 염도를 측정하였다. 김치를 처음 제조할 때의 염도는 2.2~2.4%가 되도록 하였고 7°C에서 발효시켜 산도가 0.5~0.6%에 도달하면 김치 발효를 종료하여 김치를 보관하였다. 산도 0.5~0.6%는 알맞게 익은 발효 정도라 할 수 있는데 정제염 김치, 4년 숙성 천일염 김치, 토판염 김치가 산도 0.5~0.6%에 도달하는데 각각 19일, 12일, 15일이 소요되어, 정제염 김치가 천일염 김치보다 산도 0.5~0.6%에 도달하는데 더 오래 걸림을 알 수 있었다. 이 때의 pH는 정제염, 4년 숙성 천일염, 토판염 순으로 4.69 ± 0.12 , 4.75 ± 0.13 , 4.68 ± 0.08 이었다(Table 3). Table 2에서 보여지는 바와 같이 모든 김치 시료의 염도는 처음 김치 제조 시 맞추어진 염도인 2.2~2.4% 범위 이내로 발효에 따른 염도 변화는 관찰되지 않았다.

Chang(8) 등은 천일염 김치에서 보다 정제염 김치에서 발효 초기에는 김치의 산도 저하가 천천히 일어나지만 일단 산도 0.5~0.6% 부근에 도달하면 이후 정제염 김치에서 더 빨리 김치 시어짐 현상이 일어나며 이와 같은 현상은 김치 내 유산균의 우점율과 상관있다고 보고한 바 있다. 또한 김치 담금 시 국내산 천일염, 세척 탈수염, 기계염, 환원염을 사용하여 제조하고 숙성시킨 결과 이화학적, 물리적, 미생물학적으로 뚜렷한 차이는 없었지만, 김치의 숙성 중의 산도의 변화나 총균수의 생육을 살펴본 결과 기계염보다 천일염을 사용하여 제조하는 것이 김치의 발효에 더욱 효과적으로 판단된다고 하였다(59).

Table 3. pH, acidity properties of Kimchi during fermentation at 10°C

Characteristics	Purified salt Kimchi	Four years aged solar salt Kimchi	Topan solar salt Kimchi
pH	4.69±0.12 ^a	4.75±0.13 ^a	4.68±0.08 ^a
Acidity(%)	0.57±0.07 ^a	0.55±0.05 ^a	0.58±0.04 ^a
Salinity	2.36±0.16 ^a	2.35±0.10 ^a	2.32±0.04 ^a

Values are means ± SD from more than triple determinations.

^aMeans with the same letters in the same row(different salts) are significantly different($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

3. 김치의 암세포 성장 억제효과

1) 물 추출물의 세포 성장 억제효과

정제염 김치, 4년 숙성 천일염 김치, 토판염 김치를 추출한 시료를 이용하여 정상세포 BJ에 대한 세포독성과 AGS, HT-29의 암세포주에 대한 증식 억제효과를 알아보기 위하여 MTT assay를 실시하였다. 대조구는 정상세포 BJ를 DMEM 배지에서 배양하고 위암세포 AGS와 대장암세포 HT-29는 RPMI 1640 배지에서 48시간 동안 생육시킨 후 이때의 생존율을 100%로 표시하였다. 실험구는 정제염 김치, 4년 숙성 천일염 김치, 토판염 김치를 물로 추출한 시료를 48시간 동안 농도별로 처리한 후 배양세포의 생존율을 대조구에 대한 상대적 생존율(%)로 표시하였다.

소금 종류별 김치의 물 추출물을 1.0 mg/mL의 농도로 처리하였을 때 AGS에 대한 성장 억제 효과는 정제염 김치, 4년 숙성 천일염 김치, 토판염 김치 순으로 2%, 5%, 3%의 억제율을 나타내어 뚜렷한 암세포 성장 억제효과를 보이지 않았으나 물 추출물의 농도를 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mg/mL로 높여 실험한 결과 농도의존적으로 억제율이 증가하였다. 가장 고농도인 5.0 mg/mL 농도에서의 암세포 억제율은 정제염 김치 43%, 4년 숙성 천일염 김치 49%, 토판염 김치는 47%로 나타났다(Fig. 6). HT-29에 대한 성장 억제효과는 1.0~5.0 mg/mL 농도에서 정제염 김치 10~40%, 4년 숙성 천일염 김치 14~46%, 토판염 김치는 11~45%의 억제율을 나타냄을 보였다(Fig. 7). 이상의 결과로부터 김치 물 추출물이 암세포(AGS, HT-29) 성장 억제효과는 있지만, 소금에 따른 확연한 세포 성장 억제효과 차이는 관찰되지 않음을 알 수 있었다. 그러나 정상세포 BJ에 대한 소금 종류별 김치의 물 추출물의 경우 1.0 mg/mL 첨가 농도에서 정제염, 4년 숙성 천일염, 토판염 김치는 각각 109%, 117%, 119%의 생존율을 나타내었고, 5.0 mg/mL 농도 처리 시에도 약 100%의 생존율을 나타내어 정상세포 BJ에 대해서는 세포독성이 없고 오히려 세포 성장 효과를 나타냄을 알 수 있었다(Fig. 8).

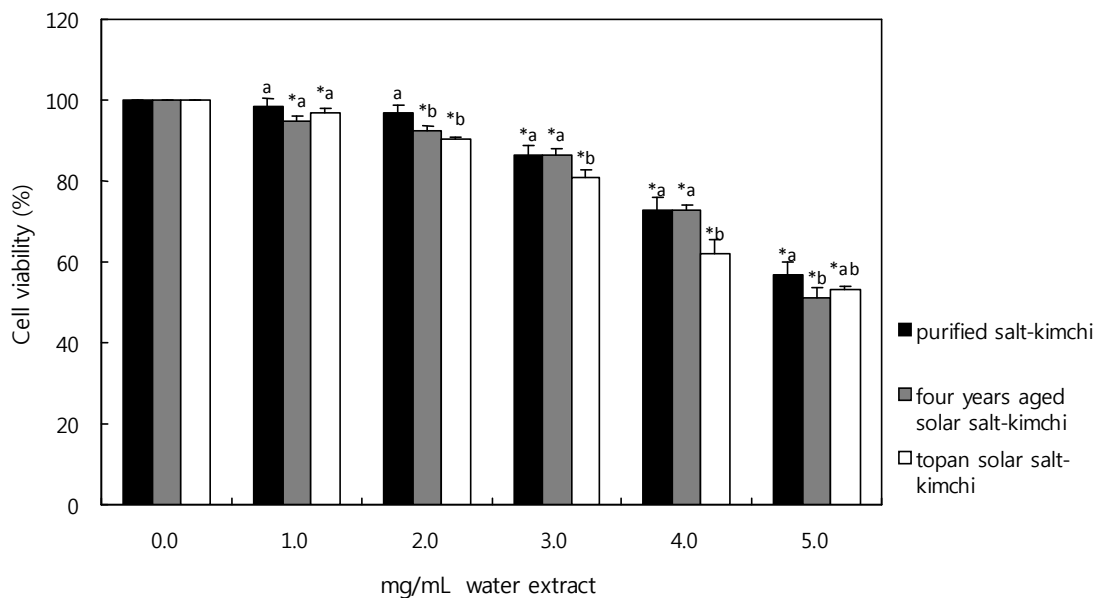


Figure 6. Effects of water extracts from Kimchi prepared with various salts on human gastric adenocarcinoma cell viability.

Cells were exposed to different concentrations of extracts for 48 hr and then cell viability was assessed by MTT assay.

*Significant differences were compared with controls. (0.0 mg/mL concentration of the extract)

^{a-b}Means with the same letters in the same row(different salts) are significantly different($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

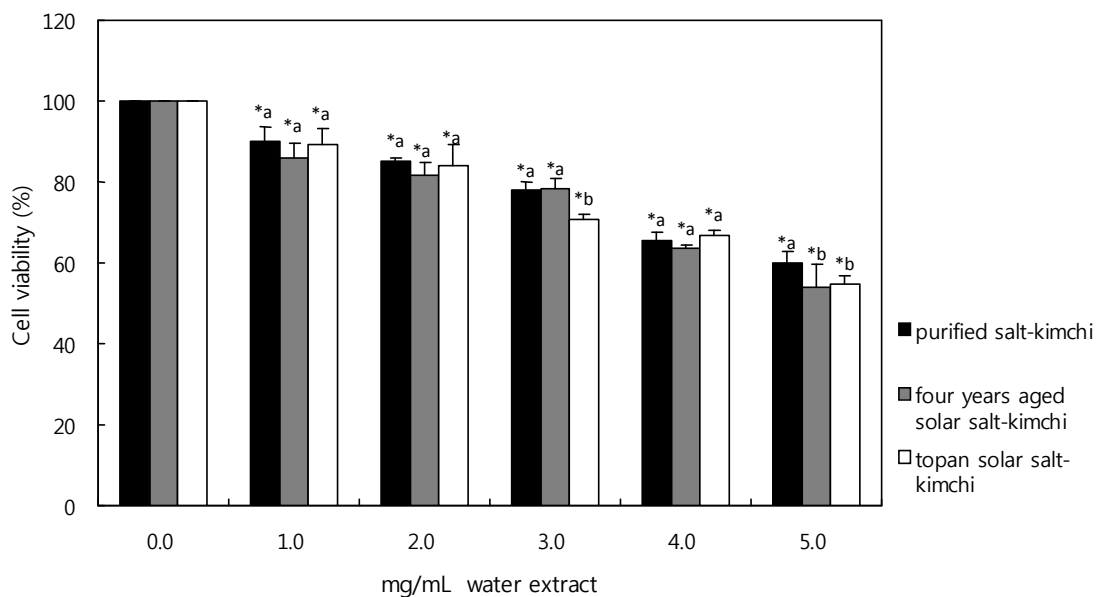


Figure 7. Effects of water extracts from Kimchi prepared with various salts on human colon cell viability.

Cells were exposed to different concentrations of extracts for 48 hr and then cell viability was assessed by MTT assay.

*Significant differences were compared with controls. (0.0 mg/mL concentration of the extract)

^{a-b}Means with the same letters in the same row(different salts) are significantly different($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

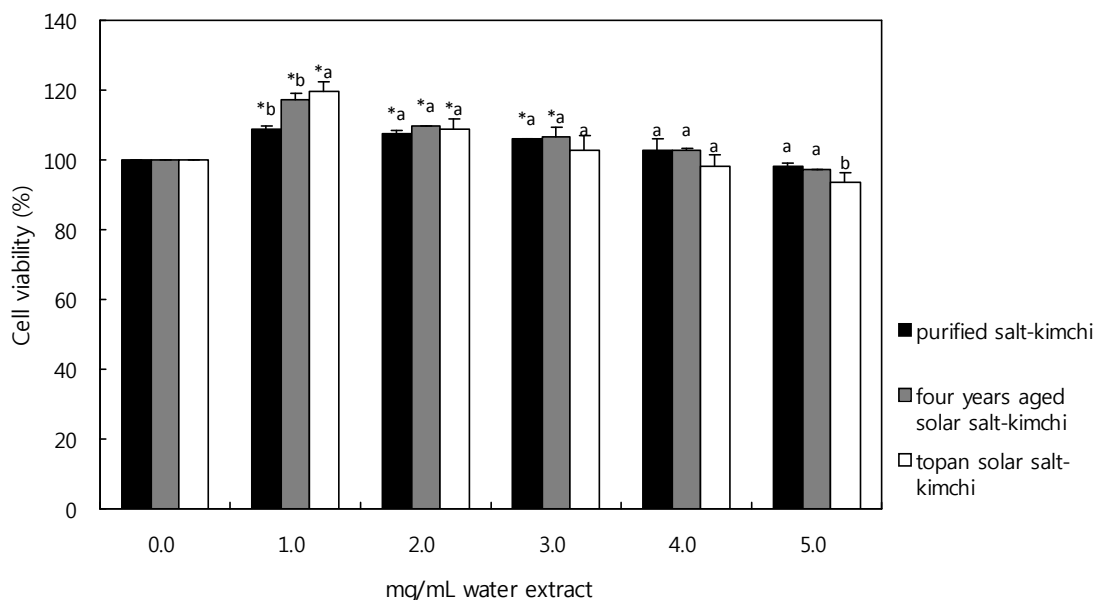


Figure 8. Effects of water extracts from Kimchi prepared with various salts on human foreskin normal cell viability.

Cells were exposed to different concentrations of extracts for 48 hr and then cell viability was assessed by MTT assay.

*Significant differences were compared with controls. (0.0 mg/mL concentration of the extract)

^{a-b} Means with the same letters in the same row (different salts) are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

2) 메탄올 추출물의 세포 성장 억제효과

정제염과 천일염(4년 숙성 천일염, 토판염)을 사용하여 제조한 김치의 메탄올 추출물을 이용하여 정상세포와 암세포주에 대한 증식 억제효과를 관찰하였다(Fig. 2).

메탄올 추출물의 AGS에 대한 성장 억제 효과는 4년 숙성 천일염 김치에서 가장 높게 나타났다. 1.0~4.0 mg/mL 농도 처리 시 18~56%를 보였으며, 가장 높은 농도인 5.0 mg/mL에서 73%의 높은 암세포 성장 억제 효과를 보였다. 정제염과 토판염 김치의 경우에는 1.0~5.0 mg/mL 농도 처리 시 각각 14~52%, 13~62%의 억제율을 보여 농도 의존적으로 억제 효과가 증가함을 나타내었다(Fig. 9). AGS에 대한 세포 성장 억제효과는 물 추출물 보다 메탄올 추출물에서 더 우수하며 메탄올 추출물 처리 시 4년 숙성 천일염으로 제조한 김치가 가장 높고 그 다음 토판염 김치, 정제염 김치 순으로 암세포 성장 억제효과가 뛰어난 것을 관찰하였다. 본 논문의 연구 결과에 비교해 Han 등(27)의 보고에서 본 실험의 김치 메탄올 추출물 처리 농도(5.0 mg/mL)보다 낮은 농도인 2.0 mg/mL에서도 높은 항암 효과를 보이는 이유는 MTT assay 시행 시 세포를 부착시키지 않고 바로 시료를 첨가하였고 시료 처리 시간이 72시간으로 본 실험의 처리 시간인 48시간보다 길게 실험한 것에 따른 차이로 생각되어진다.

소금의 종류를 달리하여 제조한 김치와 관련된 연구로 Kil 등(48)은 구운소금이 김치의 발효 특성 및 항암기능성에서 효과를 보인 것으로 나타났으며 Han 등(27)은 정제염, 일반 천일염, 제간수 천일염, 구운소금을 사용하여 제조한 김치의 메탄올 추출물을 2 mg/mL의 첨가 농도에서 구운 소금, 제간수 천일염, 일반 천일염, 정제염 순서로 각각 66%, 61%, 55%, 49%의 AGS 위암세포 성장 저해율을 나타냈으며 본 실험 결과와 유사하게 정제염 김치보다 제간수 천일염 김치의 항암 기능성이 증가되는 효과가 있음을 보고한 바 있다.

HT-29에 대한 성장 억제효과는 정제염, 토판염, 4년 숙성 천일염 김치 순서대로 1.0 mg/mL의 농도부터 각각 13%, 17%, 18%의 억제율을 보이고 최고 5.0 mg/mL 농도에서 각각 39%, 46%, 48%의 억제율을 보여 암세포 성장 억제효과가 증가함을 알 수 있었다(Fig. 10). HT-29 인체 결장암세포에 대한 성장 저해 효과를 살펴 본 결과 AGS 인체 위암세포에 비해서는 다소 낮은 성장 저해 효

과를 보였으나, 농도의존적으로 성장을 저해하였으며 4년 숙성 천일염과 토판염으로 제조한 김치의 메탄올 추출물이 높은 성장 저해효과를 나타내었다.

본 연구에서 사용 소금을 달리하여 제조한 김치의 항암 효과는 소금에 따라 다소 차이는 있으나 모든 김치 시료의 물 추출물 보다 메탄올 추출물이 AGS 또는 HT-29에 대한 생육 저해 작용이 더 크게 나타났다. Cho 등(14)의 연구에서도 배추김치의 메탄올 분획물이 AGS 인체 위암세포와 HT-29 인체 결장암세포의 성장을 크게 억제한다는 결과를 보고한 바 있다. 즉 유기용매이면서 극성용매인 메탄올을 사용하여 추출했을 때 김치에 있는 대부분의 물질이 추출되고 그리하여 김치의 유효 활성물질들이 복합적으로 작용하여 암세포 성장 억제 효과가 상승된 것이라 추측되어진다. 본 결과도 이와 같은 이유로 메탄올 추출물에서 보다 더 높은 암세포 성장 억제효과를 나타내는 것으로 생각되어진다. 그러나 김치의 메탄올 추출물도 물 추출물과 마찬가지로 정상세포인 BJ에 대해 세포독성을 거의 나타내지 않았으며 1.0 mg/mL 첨가 시에 정제염, 4년 숙성 천일염, 토판염 김치 순서대로 각각 112%, 123%, 122%의 높은 생존율을 보였으며 4년 숙성 천일염과 토판염 김치의 메탄올 추출물에서 보다 높은 생존율을 보였다. 또한 메탄올 추출물 처리가 물 추출물 처리 보다 다소 높은 세포 성장 효과를 나타냄을 관찰하였다(Fig. 11).

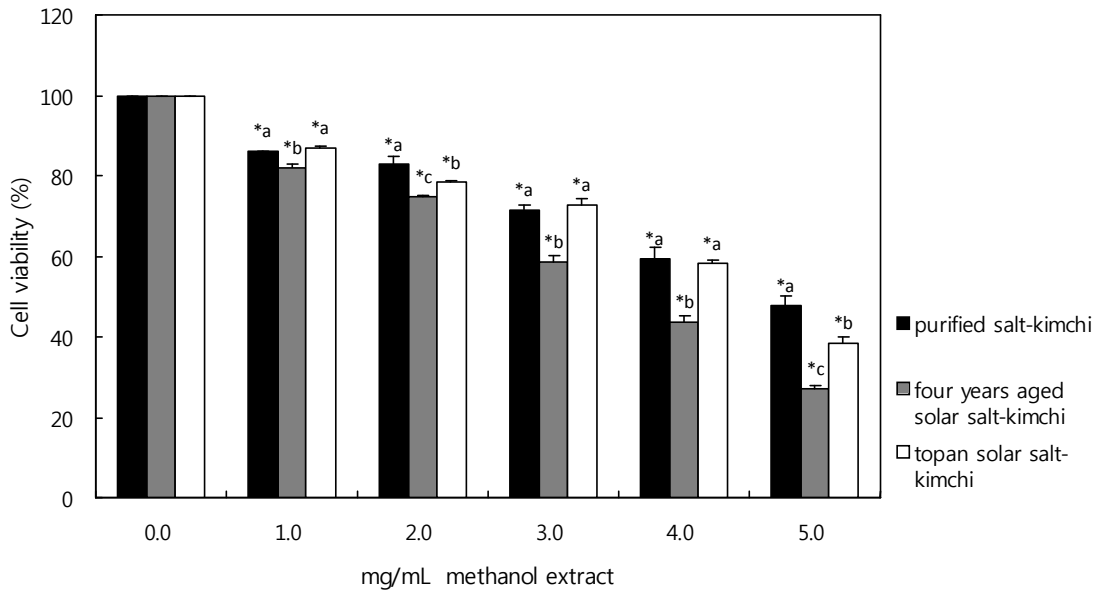


Figure 9. Effects of methanol extracts from Kimchi prepared with various salts on human gastric adenocarcinoma cell viability.

Cells were exposed to different concentrations of extracts for 48 hr and then cell viability was assessed by MTT assay.

*Significant differences were compared with controls. (0.0 mg/mL concentration of the extract)

^{a-c}Means with the same letters in the same row(different salts) are significantly different($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

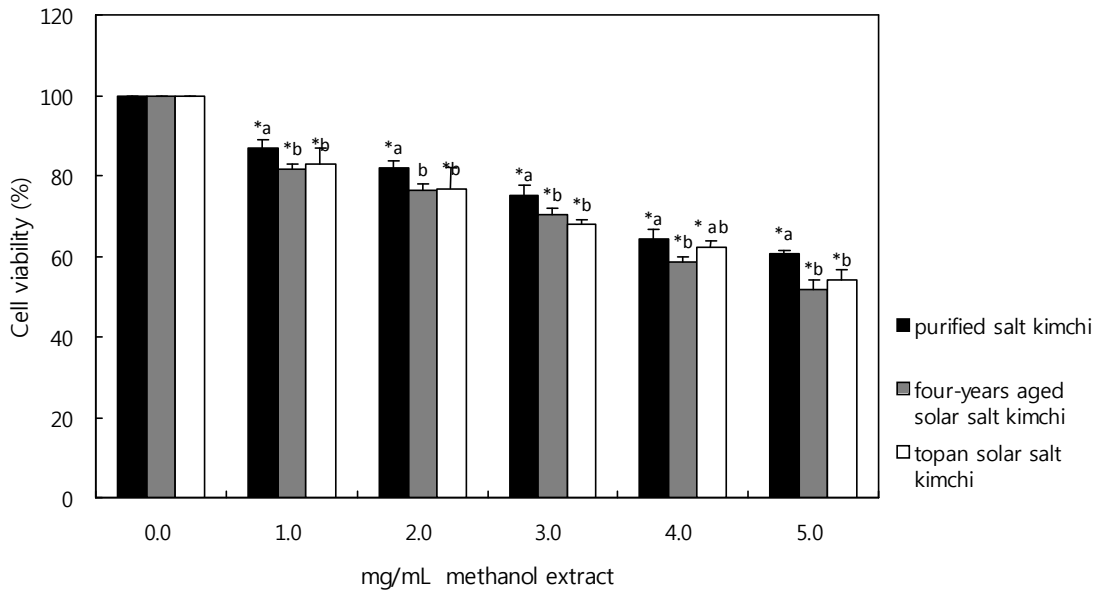


Figure 10. Effects of methanol extracts from Kimchi prepared with various salts on human colon cell viability.

Cells were exposed to different concentrations of extracts for 48 hr and then cell viability was assessed by MTT assay.

*Significant differences were compared with controls. (0.0 mg/mL concentration of the extract)

^{a-b}Means with the same letters in the same row(different salts) are significantly different($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

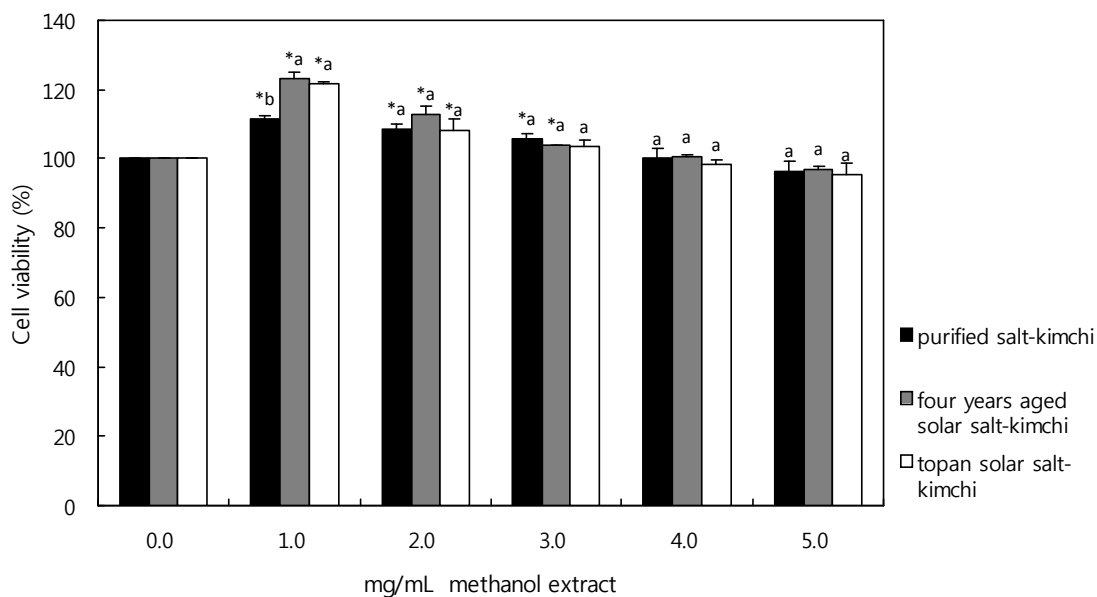


Figure 11. Effects of methanol extracts from Kimchi prepared with various salts on human foreskin normal cell viability.

Cells were exposed to different concentrations of extracts for 48 hr and then cell viability was assessed by MTT assay.

*Significant differences were compared with controls. (0.0 mg/mL concentration of the extract)

^{a-b} Means with the same letters in the same row (different salts) are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

4. 세포의 형태적 변화 관찰

Fig. 6~11의 결과로부터 모든 김치 추출물이 암세포 생육 억제 효과가 있음을 알 수 있었고 특히 4년 숙성 천일염 김치의 메탄올 추출물이 AGS 및 HT-29 암세포에 대한 생육 억제효과가 가장 뚜렷함을 알 수 있었다. 이에 김치 추출물의 첨가에 따른 위암세포 AGS, 인체 결장암세포 HT-29와 정상세포주인 BJ의 세포 조직의 형태 변화를 위상차 현미경을 통해 관찰하였다. 4년 숙성 천일염으로 제조한 김치의 메탄올 추출물 처리 시 정상세포 BJ에 대해서는 처리 전후 별 다른 차이가 관찰되지 않았으나 AGS 위암세포와 HT-29 결장암 세포에서 모두 세포 밀도의 감소와 함께 일부 세포에서 세포 수축 현상을 관찰할 수 있었다(Fig. 12).

김치의 원·부재료 및 김치 유산균의 항암 활성 등이 뛰어나다고 이미 보고된 바 있다(85,86,6). 그러나 우리나라 전통 발효식품의 형태 자체가 멸균이 제대로 이루어지지 않고 모두 개방형 발효이므로 발효식품 내의 토착 미생물외에도 제조 시 초기 오염균과 발효 과정중의 오염균에 의해 인위적 발효 조절이 어려우며 균일하고 표준화된 식품을 제조하기 어렵다. 김치 또한 대부분 자연발효로 이루어져 매년 담금시마다 품질 차이가 발생하며 소금의 농도와 발효 온도의 변화 등 환경 변화에 따라 발효 주체인 미생물의 천이가 일어나므로 소금이 김치에 미치는 직접적인 영향을 알 수 없었으며 이에 대한 연구 또한 미미한 실정이다. 본 실험에서는 천일염이 김치의 품질에 미치는 영향과 *in vitro* 항암효과를 알아보기 위해서 종균(*Leuc. citreum* GJ7)을 사용하여 김치를 제조하였으며 소금을 제외한 모든 발효 요건들을 일정한 조건으로 적용시켰다. 이와 같이 발효 요건들을 모두 동일하게 하여 진행한 실험 결과를 토대로 김치 제조 시 다르게 적용시켜준 소금의 종류에 따라 암세포 성장 억제에 영향이 있음을 알 수 있었고 4년 숙성 천일염 김치에서 암세포 성장 억제효과가 보다 더 크게 나타났는데 이는 김치에 사용된 천일염의 미네랄 함량과 그 조성이 김치 발효를 보다 우월하게 진행시켜 이때 생성된 발효대사 산물이 암세포 생육 억제효과(*in vitro*)에서 보다 우수하게 나타난 것으로 생각되어진다. 장판 천일염에 비해 토판 천일염은 갯벌에 함유된 다양한 유기물과 천연 미네랄이 소금에 스며들어 있어 가격도 10배 정도 비싸고 소금 생산량이 5배 가량 낮지만 맛이 더 좋다고 알려져 있다(39). 본 실험 결과에서 4년 숙성 천일염 김치의 암세포 증식 억제 효과가 가장 크게 나타났지만, 1년 숙성 토판염 김치도 4년 숙성 장판 천일염

김치와 비슷한 정도의 암세포 생육 저해 효과를 나타낸 흥미로운 결과이다. 결론적으로 김치 발효 및 암세포 생육 억제효과에서 가장 좋은 소금은 4년 숙성 천일염이며, 소금의 숙성이 김치 발효에 매우 중요함을 알 수 있다.

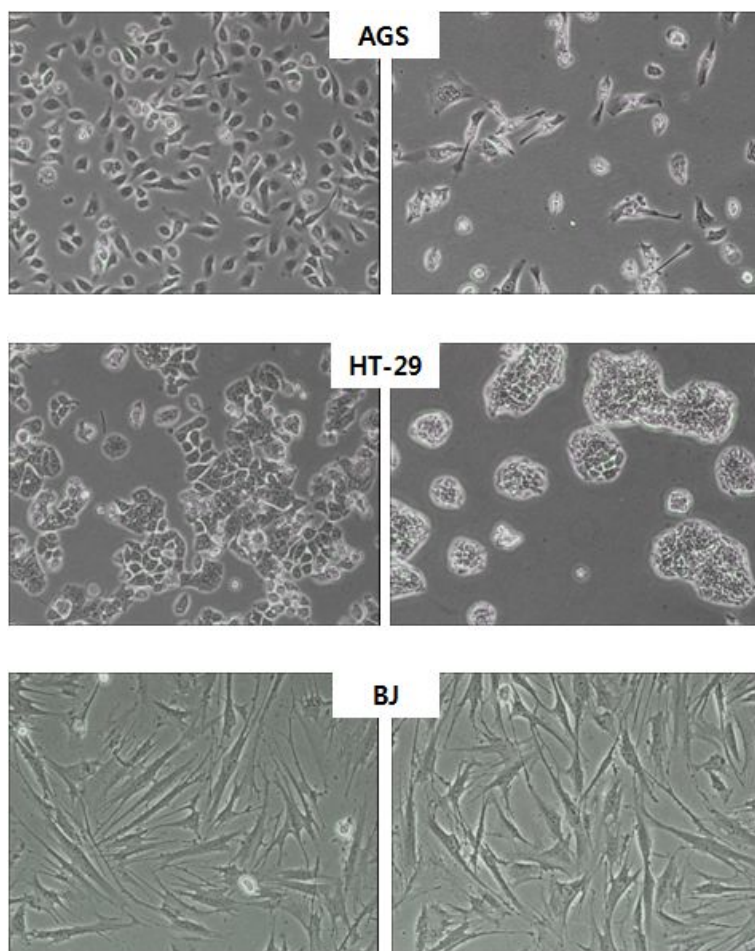


Figure 12. Photomicrographs (x100) of AGS, HT-29, and BJ cells treated with methanol extract from Four years aged solar salt **Kimchi**. The cells were treated for 48 hr by 5.0 mg/mL of the methanol extract of four years aged solar salt Kimchi.

제 2 절. 다양한 소금으로 제조한 된장의 암세포 성장 억제효과

1. 소금의 성분 분석

된장 제조 시 사용한 6종의 소금에 존재하는 NaCl 함량 및 무기질 함량을 분석한 결과를 Table 4에 나타내었다. 정제염, 4년 숙성 천일염, 토판염의 분석 결과는 김치 제조 시 사용한 소금의 성분 분석 결과와 동일하다. 총 6종의 소금의 NaCl 함량을 비교해 보았을 때 정제염의 NaCl 함량이 98.6%로 가장 높게 나타났으며 그 다음 고질염, 육염, 4년 숙성 천일염, 토판염, 1년 숙성 천일염 순으로 나타났다. 천일염의 경우 약 85%의 NaCl 함량을 지녔으며 고질염의 경우에는 약 92%의 NaCl 함량과 수분 5.5%로 천일염 중 가장 높은 NaCl 함량과 함께 가장 낮은 수분 함량으로 단단한 소금임을 알 수 있었다. 천일염의 주성분은 NaCl 이지만 CaSO_4 , MgSO_4 , MgCl_2 등 많은 무기질이 혼입되어 있으며(85) 이와 같은 무기질은 체내에서 생화학적 작용을 나타낸다고 알려져 있다(26). Table 4에 보여진 바와 같이 천일염은 정제염에 비해 많은 무기질이 검출되었다. 천일염의 미네랄 원소로 가장 많은 함유량을 나타낸 Mg의 함량은 토판염과 1년 숙성 천일염이 9,560 mg/kg, 8,247 mg/kg으로 높았으며, 4년 숙성 천일염의 Mg 함량이 3,895 mg/kg으로 감소한 것으로 보아 소금의 숙성 시간에 따라 Mg의 감소량이 컸음을 관찰할 수 있었다. 소금의 Ca 함량은 육염이 5,821 mg/kg으로 가장 높은 함량을 나타냈으며 1년 숙성 천일염, 4년 숙성 천일염 및 고질염은 각각 1,659 mg/kg, 1,724 mg/kg, 2,001 mg/kg을 함유하고 있다. 반면에 정제염 및 토판염은 현저하게 낮은 Ca를 함유하고 있음을 관찰할 수 있었다. 육염은 채소 염절임시 질감을 단단하게 해주고 물러지지 않게 해주는 Ca 함량이 다른 소금에 비해 높아 배추김치의 정도와 파쇄성이 오랫동안 유지된다고 Kim(49)은 보고하였다.

Table 4. Composition of the used salts.

Element	Purified salt		One year aged solar salt		Four years aged solar salt		
	Content (mg/kg)	Ratio(%)	Content (mg/kg)	Ratio(%)	Content (mg/kg)	Ratio(%)	
Anion	Cl	566,720.00± 6,561.95	59.32	469,336.00± 1,652.51	56.23	575,171.00± 1,794.63	56.96
	Br	145.00±0.00	0.02	472.04±1.51	0.06	421.50±7.78	0.04
	SO ₄	0.00±0.00	0.00	21,961.60± 203.72	2.63	13,814.50± 218.50	1.37
Cation	Na	388,050.00± 10,394.47	40.62	330,235.00± 12,042.03	39.56	413,190.00± 16,772.57	40.91
	Mg	17.60±0.15	0.00	8,247.70±401.50	0.99	3,895.55± 141.35	0.39
	K	386.50±13.15	0.04	2,554.2±160.94	0.31	1,511.45±91.57	0.15
	Ca	26.47±11.47	0.00	1,659.60±45.04	0.19	1,724.65± 240.48	0.17
	Li	0.02±0.01	0.00	0.97±0.27	0.00	0.35±0.03	0.00
	Al	0.32±0.16	0.00	18.55±7.62	0.00	0.56±0.02	0.00
	Cr	0.00±0.00	0.00	1.77±0.69	0.00	0.01±0.00	0.00
	Mn	0.18±0.01	0.00	2.99±0.45	0.00	3.67±0.11	0.00
	Fe	0.00±0.00	0.00	54.83±42.79	0.01	0.01±0.00	0.00
	Ni	0.00±0.00	0.00	1.16±0.28	0.00	0.00±0.00	0.00
	Cu	7.19±0.17	0.00	2.32±1.47	0.00	0.87±0.13	0.00
	Zn	5.46±0.46	0.00	50.23±14.32	0.01	0.00±0.00	0.00
	As	0.41±0.01	0.00	0.25±0.14	0.00	0.06±0.04	0.00
	Se	0.36±0.07	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00±0.00	0.00
	Sr	0.38±0.00	0.00	70.87±0.13	0.01	56.87±10.98	0.01
	Ag	0.01±0.00	0.00	0.08±0.00	0.00	0.01±0.00	0.00
	Cd	0.01±0.01	0.00	0.03±0.00	0.00	0.01±0.00	0.00
	Hg	0.00±0.00	0.00	0.04±0.01	0.00	0.00±0.00	0.00
	Pb	0.04±0.00	0.00	0.58±0.16	0.00	0.07±0.03	0.00
	Total	955,596.01± 3,834.42	100.00	834,670.81± 14,575.58	100.00	1,009,791.14± 19,278.22	100.00
NaCl(%)	98.6±0.17		82.29±0.32		85.79±0.25		
Moisture(%)	0.01±0.00		12.51±0.07		10.76±0.36		

Element	Topan solar salt		Boiled solar salt		Gojil solar salt		
	Content (mg/kg)	Ratio(%)	Content (mg/kg)	Ratio(%)	Content (mg/kg)	Ratio(%)	
Anion	Cl	485,966.00± 312.54	52.52	533,019.00± 6,403.56	55.66	523,166.50± 7,841.11	54.73
	Br	541.00±22.63	0.06	459.00±39.59	0.05	492.00±7.07	0.05
	SO ₄	18,672.50±11 8.09	2.02	26,999.45±60.60	2.82	15,990.50±702. 16	1.67
Cation	Na	407,895.00± 2877.92	44.08	384,300.00± 2,602.15	40.13	406,640.00± 1,951.61	42.54
	Mg	9,560.75± 51.97	1.03	4,998.85±37.41	0.52	5,620.75±56.78	0.59
	K	2,491.45± 18.31	0.27	1,882.75±18.31	0.20	1,994.95±12.23	0.21
	Ca	168.45±7.00	0.02	5,821.60±45.25	0.61	2,001.85±10.54	0.21
	Li	0.34±0.12	0.00	0.42±0.12	0.00	0.08±0.02	0.00
	Al	0.11±0.03	0.00	0.14±0.03	0.00	0.05±0.03	0.00
	Al	0.01±0.01	0.00	0.03±0.02	0.00	0.03±0.01	0.00
	Cr	4.20±0.83	0.00	17.14±1.11	0.00	0.85±0.01	0.00
	Mn	0.63±0.26	0.00	0.05±0.01	0.00	0.14±0.06	0.00
	Fe	0.09±0.01	0.00	0.22±0.08	0.00	0.02±0.00	0.00
	Ni	0.04±0.00	0.00	0.97±0.80	0.00	0.02±0.01	0.00
	Cu	0.52±0.09	0.00	2.12±0.14	0.00	0.19±0.01	0.00
	Zn	0.02±0.00	0.00	0.02±0.01	0.00	0.00±0.00	0.00
	As	0.00±0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00±0.00	0.00
	Se	0.00±0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00±0.00	0.00
	Sr	6.12±1.05	0.00	77.37±2.81	0.01	23.80±1.00	0.01
	Ag	0.96±0.20	0.00	0.10±0.11	0.00	3.43±0.02	0.00
	Cd	0.01±0.00	0.00	0.22±0.09	0.00	0.00±0.00	0.00
	Hg	0.00±0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00±0.00	0.00
	Pb	0.06±0.01	0.00	0.04±0.04	0.00	0.01±0.01	0.00
Total	925,308.26± 3,414.07	100.00	957,579.49± 9,212.25	100.00	955,935.17± 10,582.68	100.00	
NaCl(%)	84.53±0.36		89.44±0.59		91.68±0.30		
Moisture(%)	11.34±0.18		8.67±0.19		5.50±0.23		

Values are means±SD from duplicate determinations.

2. 된장의 일반성분 분석

소금의 종류를 다르게 하여 제조한 총 6종의 된장의 일반성분을 분석하였다(Table 5). 된장의 수분함량은 정제염 된장이 $50.40 \pm 0.13\%$ 로 가장 낮게 나타났으며 5종의 천일염으로 제조한 된장은 모두 52% 이상의 수분함량으로 그 중 토판염 된장이 $53.04 \pm 0.06\%$ 로 가장 높은 수분함량을 나타내었다. 6종의 된장 모두 전통식품인증규격인 수분함량 55% 이하로 규격에 적합하며(84) 천일염으로 제조한 된장의 수분함량이 정제염으로 제조한 된장보다 더 높게 나타났다는 보고와 유사한 결과였다(75). 제조 된장의 최종 농도를 12%(w/w)가 되도록 하였으나 18개월 숙성 후 염도를 측정된 결과 전체적으로 제조시보다 염도가 증가하였으며, 정제염 된장이 천일염 된장보다 높은 염도를 보였다. 이는 염도계를 이용한 염도 측정은 시료내의 NaCl 농도를 측정하는 것이므로 정제염 소금 자체의 NaCl 함량이 95% 이상으로 높기 때문에(46) 이와 같은 결과를 나타낸 것으로 보인다.

된장 숙성 과정 중 원료 단백질로부터 효소작용으로 인해 생성되는 아미노산은 된장의 맛을 좌우하는 성분 중 하나로 중요시 여겨진다(9). 6종의 소금으로 제조된 된장의 유리아미노산 함량 측정 결과 천일염으로 제조한 된장은 $2474.80 \pm 0.93 \sim 3010.92 \pm 0.89$ mg%를 포함하고 있었고 정제염 첨가 된장 2272.29 ± 1.01 mg% 에 비해 유리아미노산 함량이 높게 검출됨을 확인할 수 있었으며, 특히 천일염 가운데 4년숙성염을 첨가한 된장이 높은 함량의 유리아미노산이 검출되었다. Chang(9)숙성 기간이 콩 단백질의 가수분해가 진행되어 60일 이후에 유리 아미노산 함량이 증가하였다고 하였으며, 구성아미노산 성분으로는 된장에서 많이 검출되는 아미노산이며 된장의 맛에 크게 관여하는 지미성분인 glutamic acid 외에 aspartic acid, leucine, alanine 함량이 비교적 높았다는 결과가 보고되어져 있다(51,100,98). 된장은 발효 숙성 과정 중 효소 작용으로 인해 단백질에서 생성되는 펩타이드, 아미노산 등의 다양한 발효 생성물에 의해 영양학적 가치 및 풍미의 상승이 일어난다. 단백질 분해 효소 활성화는 Ca, K, Mg 등과 같은 무기질에 의해 활성이 상승 된다는 보고(111,52,32,1)와 함께 오히려 Mg, Mn 등과 같은 무기질에 의해 활성이 저해된다는 보고가 있다(111,52,38). 이는 된장 제조 시 사용되는 소금의 무기질 조성 및 함량과 된장의 숙성에 관련하는 단백질 분해 효소 활성이 밀접한 관련성이 있음을 시사한다.

조단백질 함량은 토판염 된장 $32.13 \pm 0.01\%$, 고질염 된장이 $31.08 \pm 0.02\%$ 를 나타냈으

며 정제염을 포함한 나머지 4종의 된장은 비슷한 수치를 보였다. 조회분은 소금에 따른 된장마다 $18.54\pm 0.08\sim 18.85\pm 0.02\%$ 함량을 나타냈는데 이는 된장 제조 시 첨가되는 소금에 함유되어 있는 NaCl, CaSO₄, MgSO₄ 등의 무기질의 함량에 기인하는 것으로 사료된다(58).

Table 5. General components of Doenjang prepared with various salts.

Component	Purified salt Doenjang	One year aged solar salt Doenjang	Four years aged solar salt Doenjang	Topan solar salt Doenjang	Boiled solar salt Doenjang	Gojil solar salt Doenjang
Moisture (%)	50.40±0.13 ^a	52.67±0.07 ^c	52.84±0.01 ^{cd}	53.04±0.06 ^d	52.03±0.12 ^b	52.19±0.05 ^b
Salt (%)	16.83±0.03 ^f	15.56±0.02 ^d	15.64±0.02 ^e	14.81±0.02 ^a	15.10±0.01 ^b	15.27±0.01 ^c
Free amino acid (mg%)	2272.29±1.01 ^a	2474.80±0.93 ^b	3010.92±0.89 ^e	2501.41±0.90 ^d	2502.83±1.26 ^d	2490.36±0.91 ^c
Crude protein (%)	30.37±0.02 ^b	30.30±0.01 ^{ab}	30.26±0.04 ^a	31.13±0.01 ^d	30.79±0.01 ^c	31.08±0.02 ^d
Crude Ash (%)	18.54±0.08 ^a	18.82±0.03 ^c	18.70±0.01 ^b	18.85±0.02 ^{bc}	18.85±0.02 ^c	18.76±0.00 ^{bc}

Values are means ± SD from more than triple determinations.

^{a-f}Means with the same letters in the same row(different salts) are significantly different($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

3. 소금의 종류를 달리한 된장의 암세포 성장 억제효과

1) 물 추출물의 세포 성장 억제효과

정제염과 천일염(1년 숙성 천일염, 4년 숙성 천일염, 토판염, 육염, 고질염)을 사용하여 제조한 된장의 세포 성장 억제효과를 MTT assay를 실시해 알아보았다. 대조구는 정상세포 BJ로 이는 DMEM medium에서 배양하고 위암세포 AGS와 대장암세포 HT-29는 RPMI 1640 medium에서 48시간 동안 생육시킨 후 이때의 생존율을 100%로 표시하였다. 실험구는 위의 여섯 종류의 소금으로 제조한 된장을 물로 추출한 시료를 24시간 동안 부착된 세포에 농도 별로 48시간 동안 처리한 후 배양세포의 생존율을 대조구에 대한 상대적 생존율(%)로 표시하였다.

여섯 가지 종류의 소금으로 제조한 된장의 물 추출물을 0.005~1.000 mg/mL 처리 시 AGS에 대한 성장 억제 효과는 Fig. 13과 같다. 정제염 된장이 10~41%, 1년 숙성 천일염 된장 13~43%, 4년 숙성 천일염 된장 14~53%, 토판염 된장 15~50%, 육염 된장 12~43% 그리고 고질염 된장은 4~35%의 매우 낮은 억제율로 다른 된장에 비해 현저하게 낮은 암세포 성장 억제효과를 보였다. HT-29에 대한 성장 억제효과는 저농도인 0.005 mg/mL로 처리하였을 때 4년 숙성 천일염 된장 13% 토판염 된장 11%, 육염 된장 10%의 높은 억제율을 나타냈고 이는 유의적 차이를 보이지 않았으며($P < 0.05$) 정제염 된장 6%, 1년 숙성 천일염 된장 7%, 고질염은 5%의 억제율을 보였다. 물 추출물을 1.000 mg/mL 농도 처리 하였을 때 4년 숙성 천일염이 44%의 억제율로 가장 높은 암세포 성장 억제효과를 보였고, 정제염 된장은 38%, 1년 숙성 천일염 된장 37%, 토판염 된장 39%, 육염 된장 37%, 고질염 된장 35%의 억제율을 나타냄을 보였다(Fig. 14). 이상의 결과로부터 된장 추출물을 처리하지 않은 대조구와 비교해 모든 농도 구간에서 유의적인 차이를 나타냈으며 이는 된장 물 추출물이 암세포(AGS, HT-29) 성장 억제효과가 있음을 뜻하며 4년 숙성 천일염으로 제조한 된장의 물 추출물이 암세포 억제효과가 높았고, 상대적으로 정제염과 고질염으로 제조한 된장이 억제효과가 낮음을 알 수 있었다. Lee 등(75)도 된장의 물 추출물을 암세포(AGS, HT-29)에 처리 시 천일염 된장에서 정제염 된장보다 높은 암세포 성장 억제효과를 나타냄을 보고한 바 있다. 그러나 정상세포 BJ에 대한 소금 종류별 된장의 물 추출물의 경우 0.005 mg/mL 첨가 농도에서 정제염, 1년 숙성 천일염, 4년 숙성 천

일엽, 토판엽, 육엽, 고질엽 된장은 각각 99%, 101%, 105%, 103%, 101%, 98%의 생존율을 나타내었고, 최고 1.000 mg/mL 농도 처리 시에도 약 100%의 생존율을 나타내어 정상세포 BJ에 대해서는 세포독성이 없고 오히려 세포 성장 효과를 나타냄을 알 수 있었다((Fig. 15).

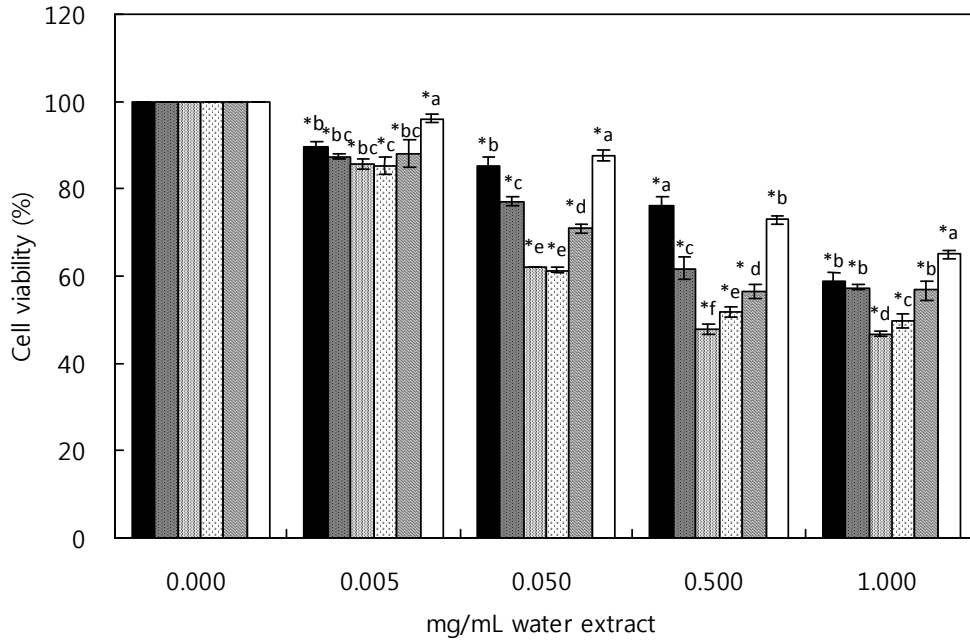








Figure 13. Effects of water extracts from Doenjang prepared with various salts on human gastric adenocarcinoma cell viability.

Cells were exposed to different concentrations of extracts for 48 hr and then cell viability was assessed by MTT assay.

Purified salt Doenjang: , One year aged salt Doenjang: , Four years aged salt Doenjang: , Topan solar salt Doenjang: , Boiled solar salt Doenjang: , Gojil solar salt Doenjang: .

*Significant differences were compared with controls. (0.000 mg/mL concentration of the extract)

^{a-e}Means with the same letters in the same row(different salts) are significantly different($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

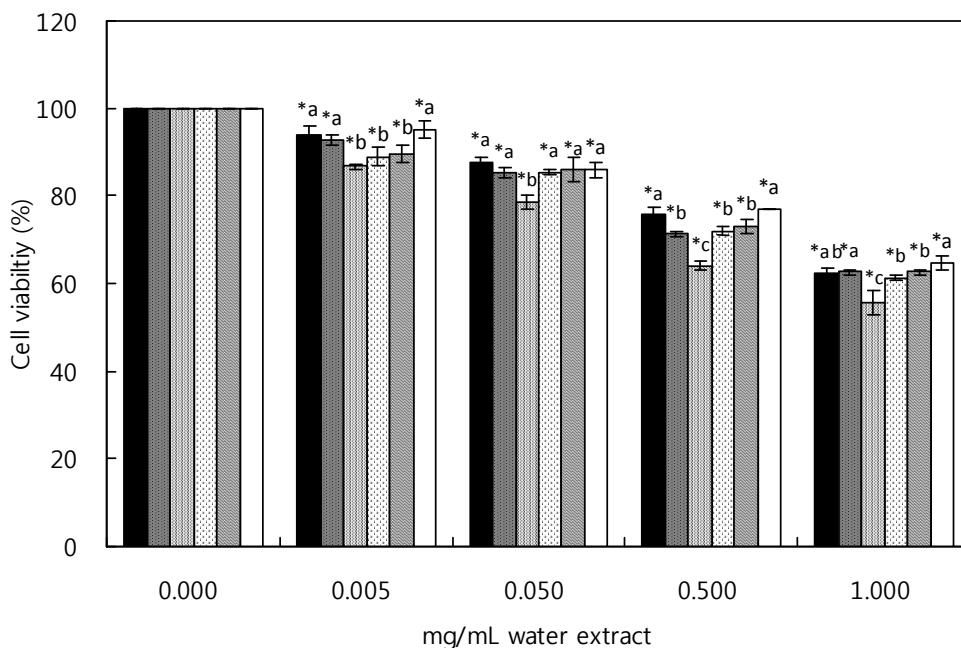








Figure 14. Effects of water extracts from Doenjang prepared with various salts on human colon cell viability.

Cells were exposed to different concentrations of extracts for 48 hr and then cell viability was assessed by MTT assay.

Purified salt Doenjang: , One year aged salt Doenjang: , Four years aged salt Doenjang: , Topan solar salt Doenjang: , Boiled solar salt Doenjang: , Gojil solar salt Doenjang: .

*Significant differences were compared with controls. (0.000 mg/mL concentration of the extract)

^{a-b}Means with the same letters in the same row(different salts) are significantly different($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

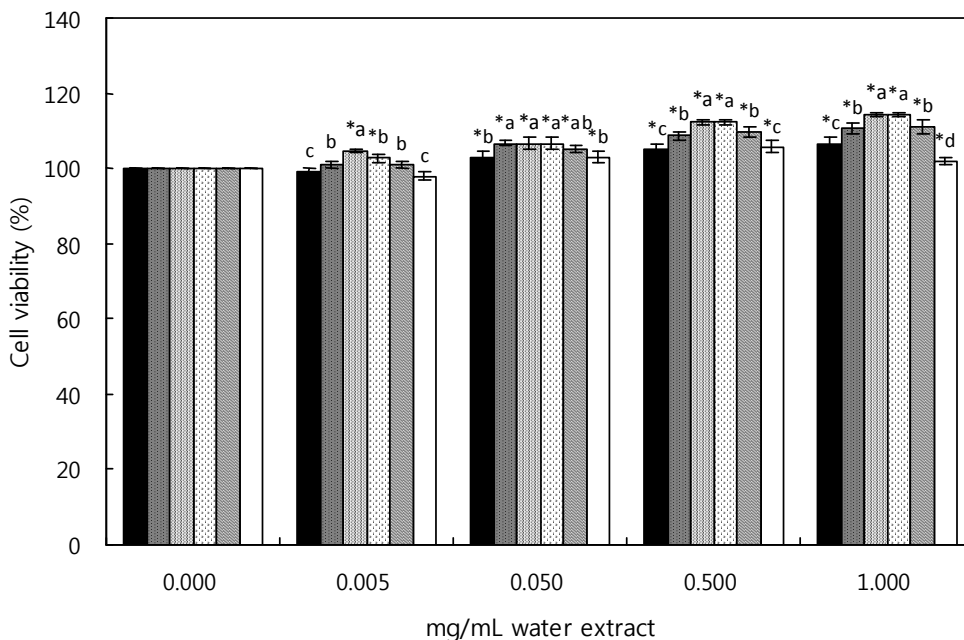








Figure 15. Effects of water extracts from Doenjang prepared with various salts on human foreskin normal cell viability.

Cells were exposed to different concentrations of extracts for 48 hr and then cell viability was assessed by MTT assay.

Purified salt Doenjang: , One year aged salt Doenjang: , Four years aged salt Doenjang: , Topan solar salt Doenjang: , Boiled solar salt Doenjang: , Gojil solar salt Doenjang: .

*Significant differences were compared with controls. (0.000 mg/mL concentration of the extract)

^{a-d}Means with the same letters in the same row(different salts) are significantly different($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

2) 메탄올 추출물의 세포 성장 억제효과

정제염 및 5종의 천일염을 사용하여 제조한 된장을 메탄올로 추출한 시료를 처리하여 AGS 위암세포와 HT-29 결장암세포에 대한 증식 억제효과 정상세포 BJ에 대한 세포독성을 관찰하였다.

소금 종류별 된장의 메탄올 추출물의 AGS에 대한 성장 억제 효과는 물 추출물을 처리했을 때와 비슷하게 4년 숙성 천일염과 토판염 된장에서 가장 높게 나타났다. 0.005~1.000 mg/mL 농도 처리 시 정제염 된장은 10~42%, 1년 숙성 천일염 된장 10~44%, 4년 숙성 천일염 된장 14~55%, 토판염 된장 17~51%, 육염 된장 11~49%, 고질염 된장은 3~38%의 억제율을 보여 농도 의존적으로 억제 효과가 증가함을 나타내었다(Fig. 16).

또한 HT-29 인체 결장암세포에 대한 성장 저해효과를 살펴 본 결과(Fig. 17) AGS 인체 위암세포에 비해서는 다소 낮은 성장 저해 효과를 보였으나, 가장 높은 농도인 1.000 mg/mL에서 1년 숙성 천일염과 4년 숙성 천일염, 토판염으로 제조한 된장의 메탄올 추출물은 각각 44%, 48%, 44%의 높은 성장 저해효과를 나타내었으며 모든 시료에서 농도 의존적으로 성장을 저해하였다. 그러나 정상세포 BJ에 대해서는 된장의 메탄올 추출물도 물추출물과 같이 세포독성을 나타내지 않았으며, 오히려 약간의 세포 성장 효과를 나타냄을 알 수 있었다(Fig. 18).

된장 제조 과정 중 중간단계인 메주를 추출 및 분획하여 SOS chromotest를 통해 항돌연변이 효과가 있음을 확인하고 암세포 성장 억제 효과를 확인한 결과 된장의 추출물과 그 분획물을 처리한 결과와 유사한 경향을 보여 높은 억제 효과가 있음을 알 수 있었다(78). 된장의 암세포 증식 억제 효과를 *in vitro* Sulforhodamine B (SRB) assay를 통하여 알아보기도 하였으며(80), Lim(11) 등은 된장의 메탄올 추출물과 그 분획들을 AGS 인체 위암세포와 HT-29 인체 결장암 세포 등에 처리하여 암세포 성장 억제효과를 관찰하였고 암세포 내의 DNA 합성도 90% 이상 저해하여 *in vitro* 상에서 된장의 암 예방 효과 및 항암 효과가 있음을 보고하였다. Lee 등(108)의 연구에서 물 및 소금의 종류를 달리한 된장의 메탄올 추출물의 항돌연변이 효과를 비교 검토한 결과 게르마늄수와 고로쇠나무 수액으로 담근 된장이 일반 수돗물로 담근 된장보다 효과를 돌연변이 억제 효과가 높았으며, 구운 소금과 죽염을 첨가한 된장 추출물이 천일염을 사용한

된장보다 항돌연변이 효과가 높음을 보고하였다. 위의 보고들처럼 된장은 여러 실험을 통해 돌연변이를 억제하며 그로 인해 암을 예방하는 식품이라고 할 수 있다.

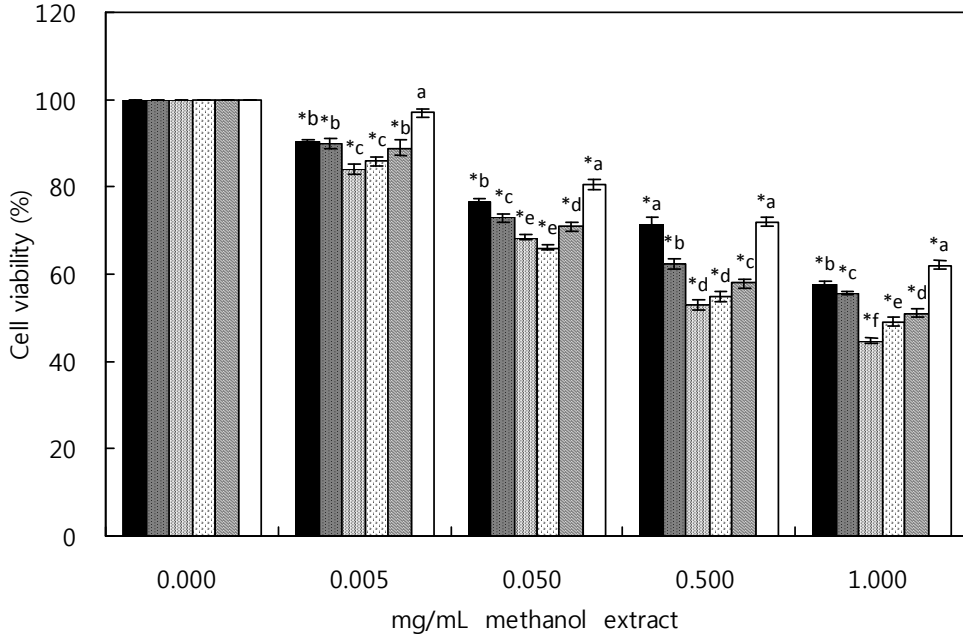








Figure 16. Effects of methanol extracts from Doenjang prepared with various salts on human gastric adenocarcinoma cell viability.

Cells were exposed to different concentrations of extracts for 48 hr and then cell viability was assessed by MTT assay.

Purified salt Doenjang: , One year aged salt Doenjang: , Four years aged salt Doenjang: , Topan solar salt Doenjang: , Boiled solar salt Doenjang: , Gojil solar salt Doenjang: .

*Significant differences were compared with controls. (0.000 mg/mL concentration of the extract)

^{a-f}Means with the same letters in the same row(different salts) are significantly different($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

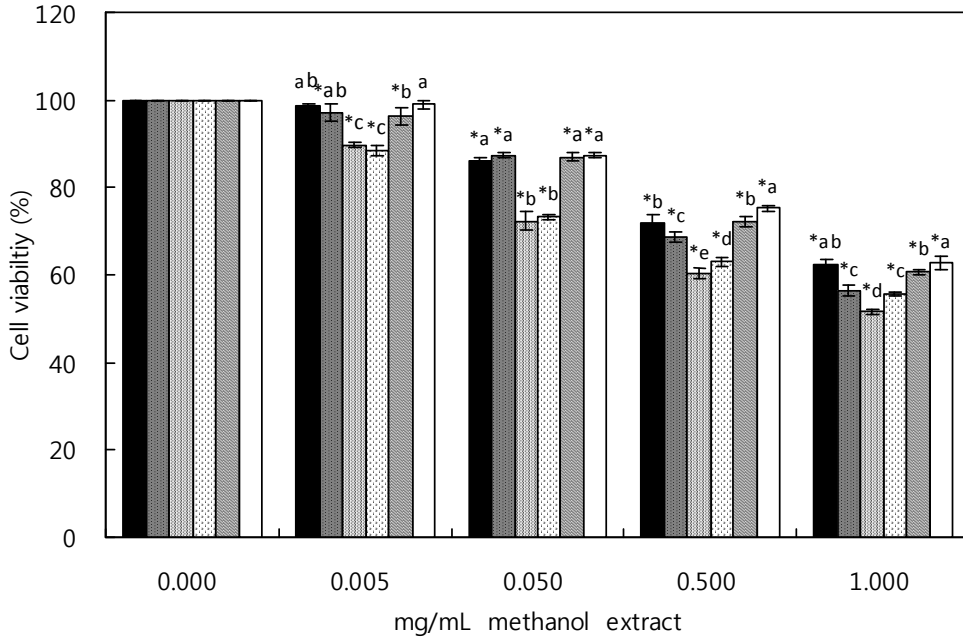








Figure 17. Effects of methanol extracts from Doenjang prepared with various salts on human colon cell viability.

Cells were exposed to different concentrations of extracts for 48 hr and then cell viability was assessed by MTT assay.

Purified salt Doenjang: , One year aged salt Doenjang: , Four years aged salt Doenjang: , Topan solar salt Doenjang: , Boiled solar salt Doenjang: , Gojil solar salt Doenjang: . *Significant differences were compared with controls. (0.000 mg/mL concentration of the extract)

^{a-e}Means with the same letters in the same row (different salts) are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

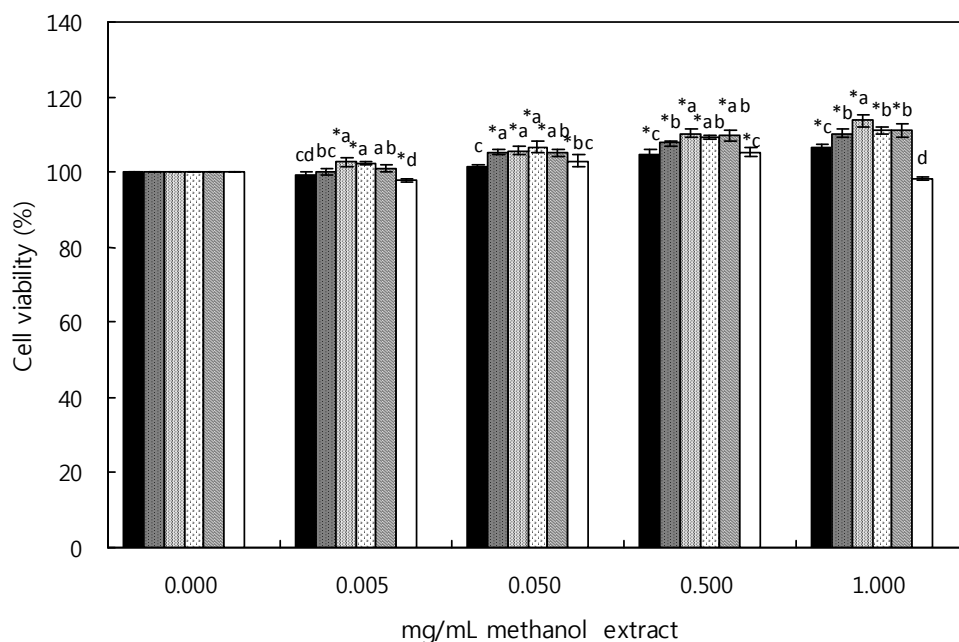








Figure 18. Effects of methanol extracts from Doenjang prepared with various salts on human foreskin normal cell viability.

Cells were exposed to different concentrations of extracts for 48 hr and then cell viability was assessed by MTT assay.

Purified salt Doenjang: , One year aged salt Doenjang: , Four years aged salt Doenjang: , Topan solar salt Doenjang: , Boiled solar salt Doenjang: , Gojil solar salt Doenjang: .

*Significant differences were compared with controls. (0.000 mg/mL concentration of the extract)

^{a-d}Means with the same letters in the same row(different salts) are significantly different($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

4. 세포의 형태적 변화 관찰

Fig. 16~18에 보여진 결과로부터 모든 된장 추출물이 암세포의 성장을 억제하는 효과가 있음을 알 수 있었고, 정제염에 비해 천일염의 효과가 좋았으며, 특히 4년 숙성 천일염과 토판염 된장이 AGS 및 HT-29 암세포에 대한 생육 억제효과가 가장 뚜렷함을 알 수 있었다. 이에 AGS 인체 위암세포, HT-29 인체 결장암세포와 정상세포주인 BJ에 4년 숙성 천일염으로 제조한 된장의 메탄올 추출물을 처리하여 위상차 현미경을 통해 세포의 형태 변화를 관찰하였다. 추출물을 처리한 정상세포 BJ에 대해서는 처리 전후 별다른 차이가 관찰되지 않았으나, 위암세포 AGS와 결장암세포 HT-29에서 MTT assay를 통한 생육 억제 결과와 비슷하게 모두 추출물 처리 전보다 현저하게 세포 밀도의 감소하였으며 세포 수축 현상 또한 관찰할 수 있었다(Fig. 19).

된장의 항돌연변이 활성 및 암세포 증식 억제 효과에 관한 많은 보고로(75,40,33) 된장은 암을 예방하는 식품으로 알려지고 있다. 된장의 이와 같은 암세포 증식 억제 효과는 된장이 발효 과정을 거치는 동안 생성되는 peptide류 또는 genistein 등의 원료 콩의 발효 대사 산물에 의한 것이라고 알려지고 있다(66,41).

본 연구에서 모든 된장 제조 조건이 동일하고 사용 소금만을 달리 하였을 때 된장의 암세포 성장 억제 효과가 천일염에서 보다 뚜렷하고 그 중 4년 숙성 천일염 된장에서 보다 높은 암세포 생육 억제 효과(in vitro)를 나타내었다. 이와 같은 결과는 4년 숙성 천일염과 같은 조성의 미네랄 함량과 조성이 된장 발효에 보다 더 적합하며 이렇게 생성된 된장의 콩 단백질 분해 발효 산물이 암세포 생육 억제효과에서 보다 우수하게 나타난 것으로 보여진다.

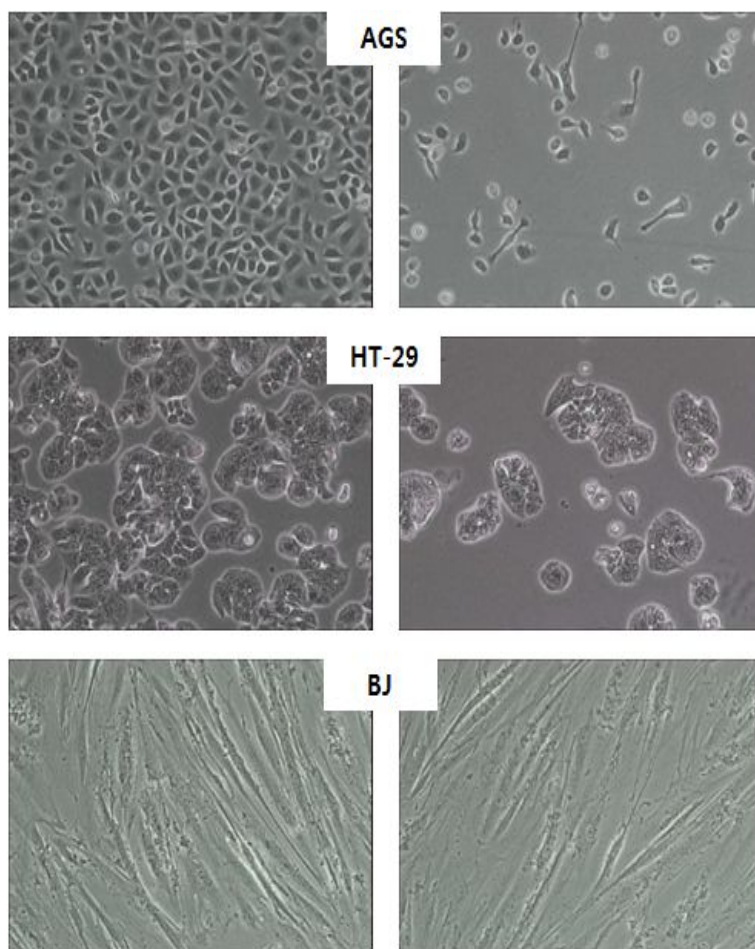


Figure 19. Photomicrographs (x100) of AGS, HT-29, and BJ cells treated with methanol extract from four years aged solar salt Doenjang. The cells were treated for 48 hr by 1.000 mg/mL of the methanol extract of Four years aged solar salt Doenjang.

제 4 장 결 론

본 연구에서는 천일염으로 제조한 김치와 된장의 항암효과를 알아보기 위하여 김치 제조 시에는 종균인 *Leuc. citreum* GJ7을 이용하였으며 된장을 제조할 때에는 bacterial-koji를 사용하여 김치와 된장의 모든 제조 조건, 즉 원료, 제조방법, 발효 미생물, 발효 조건 등을 동일하게 하여주고 소금만을 달리하여 발효된 김치와 된장이 인체 위암세포(AGS)와 대장암세포(HT-29)의 성장 억제효과와 인간 정상세포(BJ)에 미치는 세포 독성을 조사하였다. 숙성된 김치와 된장을 물과 메탄올을 이용해 추출하여 사용 소금에 따른 된장의 암세포 성장억제효과를 MTT assay를 사용해 살펴보았다.

정제염, 4년 숙성 천일염, 토판염의 성분을 분석하고 3종의 소금으로 각각 제조한 김치를 발효시켜 산도 0.5~0.6%에 도달했을 때 김치의 pH, 산도 및 염도를 측정하여 발효 특성을 확인하였으며 이를 물과 메탄올로 추출하여 사용 소금에 따른 김치의 암세포 생육 억제효과를 조사하였다. 정제염은 98.6% NaCl 함량을 지니며 천일염은 NaCl이 주성분이지만 많은 무기질을 함유하고 있음을 알 수 있었다. 소금의 종류를 달리한 김치의 물 추출물과 메탄올 추출물은 AGS 위암세포, HT-29 장암세포 2종의 암세포에 대해서 모두 농도가 증가할수록 농도의존적으로 높은 세포 생육 억제율을 나타내었다. 최대 처리 농도인 5.0 mg/mL에서 AGS의 경우 정제염 김치의 물 추출물은 44%, 메탄올 추출물은 52%의 억제율을 보였고 천일염 김치의 물 추출물은 40%, 메탄올 추출물은 73%의 억제율을 보였으며, 토판염 김치의 물 추출물은 49%, 메탄올 추출물은 62%의 억제율을 나타냄을 보여 천일염 김치 메탄올 추출물의 AGS 암세포 생육 억제효과가 매우 뛰어남을 확인하였다. 동일 농도에서 HT-29의 경우 정제염 김치의 물 추출물은 43%, 메탄올 추출물은 39%의 억제율을 보였고, 천일염 김치의 물 추출물은 37%, 메탄올 추출물은 48%의 억제율을 보였으며, 토판염 김치의 물 추출물은 42%, 메탄올 추출물은 46%의 억제효과를 나타냄을 보여 AGS에 대한 암세포 성장 억제효과 보다는 다소 낮지만 4년 숙성 천일염과 토판염으로 제조한 김치의 메탄올 추출물이 HT-29 암세포의 높은 성장 억제 효과를 보임을 확인하였다. 반면에 소금의 종류를 달리한 김치의 물 추출물과 메탄올 추출물은 모두 정상세포 BJ에 대해 세포독성을 거의 보이지 않으며 오히려 세포 성장 촉진효과를 보였다. 더 나아가 최대 암세포 생육 억제현상을 나타낸 4년 숙성 천일염 김치의 메탄올 추출물을 AGS, HT-29, BJ 세포에 처리하였을 때 정상세포 BJ에 대해서는 처리 후 별 다른 차이가 관찰되지는 않았으나

AGS 위암세포와 HT-29 장암세포에서는 모두 세포 밀도의 감소와 함께 일부 세포 수축 현상을 관찰할 수 있었다. 이상의 결과로부터 기능적 측면(암세포 생육억제)에서 김치 발효에는 가장 좋은 소금은 4년 숙성 천일염이며, 소금의 숙성이 김치 발효에 매우 중요함을 알 수 있다.

사용 소금을 달리한 된장 또한 된장 제조 시에 사용된 정제염 및 5종의 천일염(1년 숙성 천일염, 4년 숙성 천일염, 토판염, 육염, 고질염)의 소금의 성분을 분석하였으며 수분함량, 염도, 유리아미노산, 조단백, 조회분 등 일반성분을 분석하였다. 그리고 제조된 된장을 물과 메탄올을 이용해 추출하여 암세포 성장 억제효과를 조사하였다. 된장의 일반성분 중 된장에서 감칠맛을 내는데 가장 중요한 유리아미노산 함량 측정 결과 천일염으로 제조한 된장($2474.80 \pm 0.93 \sim 3010.92 \pm 0.89\text{mg}\%$)이 정제염 첨가 된장($2272.29 \pm 1.01\text{mg}\%$)에 비해 유리아미노산 함량이 높게 검출됨을 확인할 수 있었으며, 특히 천일염 중에서도 4년 숙성 천일염으로 제조한 된장이 높은 유리아미노산 함량을 보였다. 소금의 종류를 달리한 된장의 물 추출물과 메탄올 추출물은 AGS 위암세포, HT-29 결장암세포 대해서 모두 농도 의존적으로 높은 세포 생육 억제율을 나타내었다. AGS의 경우 4년 숙성 천일염과 토판염 된장이 높은 암세포 생육 억제효과를 나타내었다. 추출물 최대 처리 농도인 1.000 mg/mL 에서 4년 숙성 천일염 된장의 물 추출물과 메탄올 추출물은 53%, 55%의 억제율을 보였으며, 토판염 된장의 물 추출물과 메탄올 추출물은 각각 50%, 51%의 억제율을 나타냄을 보여 다른 종류의 소금에 비해 암세포 생육 억제효과가 매우 뛰어남을 확인하였다. 이어 육염, 1년 숙성 천일염, 정제염, 고질염 순으로 암세포 성장 억제효과를 나타내었다. HT-29의 경우 AGS에 대한 암세포 성장 억제효과보다는 다소 낮지만 물 추출물의 최대 처리 농도 시 4년 숙성 천일염이 44%의 억제율을 보여 가장 높았으며 나머지 5종의 소금으로 제조한 된장들은 30~40% 정도의 억제 효과가 관찰되었으며 고질염이 가장 낮은 억제효과를 보였다. 또한 메탄올 추출물에서는 1년 숙성 천일염, 4년 숙성 천일염, 토판염 된장이 정제염, 육염, 고질염 된장보다 암세포의 높은 성장 억제 효과를 보임을 확인하였다. 반면에 소금의 종류를 달리한 된장의 물 추출물과 메탄올 추출물은 모두 정상세포 BJ에 대해 세포독성을 거의 보이지 않으며 오히려 세포 성장 촉진효과를 보였다. 모든 추출물에서 최대 암세포 생육 억제현상을 나타낸 4년 숙성 천일염 된장의 메탄올 추출물을 AGS, HT-29, BJ 세포에 처리하였을 때 정상세포 BJ에 대해서는 처리 후 큰 차이가 관찰되지는 않았으나 AGS 위암세포와 HT-29 결장암세포에서는 모두 세포 밀도의 감소와 함께 일부 세포 수축 현상을 관찰할 수 있었다. 위의 결과로부터 천일염 된장이

암세포 생육억제에 좋으며 그 중에서도 4년 숙성 천일염 된장이 매우 뛰어난 항암효과를 지님을 알 수 있었다.

본 연구의 결과로부터 다양한 천일염을 사용한 김치와 된장을 제조하였으며 소금을 제외한 모든 김치와 된장 제조 과정을 동일한 조건에서 이루어지게 하였다. 소금의 종류를 달리한 김치 및 된장의 항암효과를 측정한 결과 천일염을 사용한 김치와 된장이 정제염을 사용한 것보다 항암효과가 더욱 우수함을 알 수 있었고 천일염 중에서도 4년 숙성 천일염이 뛰어난 항암효과를 나타내었다. 이 결과는 천일염의 우수성을 입증하는 연구 결과이며 이로써 천일염의 이용성을 향상시키며 천일염 산업이 더욱 발전할 수 있을 거라 기대된다.

제 5 장 참고문헌

1. Abdel-Fattah, Y. R., H. A. El-Enshasy, N. A. Soliman, H. El-Gendi. 2009. Bioprocess development for production of alkaline protease by *Bacillus pseudofirmus* Mn6 through statistical experimental designs. *J Microbiol Biotechnol.* **19**: 378-386
2. Ackley, S., E. Barret-Conner, L. Saurez. 1985. Daily products calcium supplementation of women. *Am J Clinic Nutr.* **42**: 12-17
3. AOAC. 1990. Official methods of analysis. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA
4. Bea, D. H. 2009. Hazardous contaminants in commercial salt. *Safe Food.* **4**: 14-24
5. Block, E., S. Naganathan, D. Putman. 1993. Garlic and onion chemistry. *Chem Int.* **65**: 625
6. Cai, Q. and H. Wei. 1996. Effect of dietary genistein on antioxidant enzyme activities in Sencar mice. *Nutr Cancer.* **25**: 1 - 7
7. Chang, J. Y. and H. C. Chang. 2010. Improvements in the quality and shelf life of kimchi by fermentation with the induced bacteriocin-producing strain, *Leuconostoc citreum* GJ7 as a starter. *J Food Sci* **75**: 103-110
8. Chang, J. Y., I. C. Kim, H. C. Chang. 2011. Effect of solar salt on the fermentation characteristics of kimchi. *J Food Preservation.* **18**: 256-265
9. Chang, M. and H. C. Chang. 2007. Characteristics of bacterial-koji and doenjang(soybean paste) made by using bacillus subtilis DJ1. *Kor J Microbiol Biotechnol.* **35**: 325-333
10. Chang, M., I. C. Kim, H. C. Chang. 2010. Effect of solar salt on the quality characteristics of Doenjang. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* **39**: 116-124
11. Cheigh, H. S. and J. H. Hwang. 2000. Antioxidative Characteristics of Kimchi. *Food Industry and Nutrition.* **5**: 52-56
12. Cheigh, H. S., K. S. Park, G. S. Moon, K. Y. Park. 1990. Antioxidative characteristics of fermented soybean paste and its extracts on the lipid oxidation. *J Korean Soc Food Nutr.* **19**: 163-167
13. Cho, E. J., J. S. Choi, S. H. Kim, K. Y. Park, S. H. Rhee. 2004. In vitro anticancer effect of active compounds from chinese cabbage kimchi. *J Kor Assoc Cancer Prevention.* **9**: 98-103

14. Cho, E. J., S. H. Rhee, K. S. Kang, K. Y. Park. 1999. In vitro Anticancer Effect of Chinese Cabbage Kimchi Fractions. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* **28**: 1326-1331
15. Cho, E. J., S. H. Rhee, S. M. Lee, K. Y. Park. 1997. In vitro antimutagenic and anticancer effects of kimchi fractions. *J Kor Assoc Cancer Prevention.* **2**: 113-121
16. Choi, M. Y. 2003. Screening of fibrinolytic enzyme producing from microorganisms and optimum conditions of enzyme production. *J Kor Soc Food Nutr.* **32**: 976-980
17. Choi, N. S., K. H. Yoo, J. H. Hahm, K. S. Yoon, K. T. Chang, B. H. Hyun, P. J. Maeng, S. H. Kim. 2005. Purification and characterization of a new peptidase, Bacillopeptidase DJ-2 having fibrinolytic activity: Produced by *Bacillus* sp. DJ-2 from Doenjang. *J Microbiol Biotechnol.* **15**: 72-79
18. Choi, W. A., J. O. Lee, K. H. Lee, S. H. Park. 1998. Effects of environmental and nutritional conditions on fibrinolytic enzyme production from *Bacillus subtilis* BK-17 in flask culture. Korean. *J Biotechnol Bioeng.* **13**: 491-196
19. Chung, Y. J. 1999. Isolation and characterization of bacterium with fibrinolytic activity. *Korean J Biotechnol Bioeng.* **14**: 103-108
20. Chuyen, N. V., K. Ijichi, H. Umetsu, K. Moteki. 1998. Antioxidative properties of products from amino acids and peptides in the reaction with glucose. *Adv Exp Med Biol.* **434**: 201 - 212
21. Cui, C. B., E. Y. Lee, D. S. Lee, S. S. Ham. 2002. Antimutagenic and anticancer effects of ethanol extract from korean traditional Doenjang added sea tangle. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* **31**: 322-328
22. Elmadfa, I., C. Leitsmann. 1990. Ernährung des menschen. Eugen. Ulmer. Verlag. Stuttgart. 449-455
23. Fotsis, T., M. Pepper, H. Adlercreutz, G. Fleishmann, T. Hase, R. Montesano, L. Schweigerer. 1993. Genistein, a dietary-derived inhibitor of in vitro angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* **90**: 2690 - 2694
24. Fujiwara, M. 1972. Antihypercholesterolemic effect of sulfur containing amino acid, s-methyl-L-cysteinsulfoxide isolated from cabbage. *Experimenta.* **28**: 254-255
25. Ha, J. O. 1997. Studies on the development of functional and low sodium kimchi and physiological activity of salts. Thesis, Pusan university, Pusan, Korea

26. Ha, J. O. and K. Y. Park. 1999. Comparison of autooxidation rate and comutagenic effect of different kinds of salt. *J Kor Assoc Cancer Prevention*. **4**: 44-51
27. Han, G. J., A. Y. Son, S. M. Lee, J. K. Jung, S. H. Kim, K. Y. Park. 2009. Improved quality and increased in vitro anticancer effect of kimchi by using natural sea salt without bittern and baked(guwun) salt. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. **38**: 1996-1002
28. Harlan, J. M. and L. A. Harker. 1981. Haemostasis, thrombosis and thromboembolic disorder. *Med Clin North Am*. **65**: 855-857
29. Heo, S., S. K. Lee, H. K. Joo. 1998. Isolation and identification of fibrionlytic enzyme producing strain from traditional food. *Agricultural Chemistry and Biotechnology*. **41**: 119-124
30. Hondo, S.F 1989. Saccharides of miso during manufacturing(part 2). *J Brew Soc J Japan*. **84**: 594 - 599
31. <http://www.foodnews.co.kr/news/board.php?board=news&command=body&no=245>
32. Hwang, J. Y., S. H. Choi, S. K. Lee, S. M. Kim. 2009. Optimal conditions for the production of salt-tolerant protease from *Aspergillus* sp. 101 and its characteristics. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. **38**: 1612-1617
33. Hwang, K. M., K. O. Jung, C. K. Song, K. Y. Park. 2008. Increased antimutagenic and anticlastogenic effects of doenjang(Korea fermented soybean paste) prepared with bamboo salt. *J Med Food*. **11**: 717-722
34. Hwang, K. M., S. H. Oh, K. Y. Park. 2007. Increased antimutagenic and in vitro anticancer effects by adding green tea extract and bamboo salt during Doenjang fermentation. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. **36**: 1-7
35. Hyun, K. W., J. S. Lee, J. H. Ham, S. Y. Choi. 2005. Isolation and identification of microorganism with potent fibrinolttic activity from korean traditional doenjang. *Kor J Microbiol Biotechnol*. **33**: 24-28
36. Jain, R. C., C. R. Vyas, O. P. Mahatama. 1973. Hypoglycemic action of onion and garlic. *Lancet*. **2**: 149
37. Jang, S. A., M. H. Kim, M. S. Lee, M. J. Lee, O. H. Ji, T. K. Oh, C. B. Sohn. 1999. Isolation and identification of fibrinolytic enzyme producing strains from shrimp Jeot-Gal, a tiny salted shrimps and medium optimization for enzyme production. *Korean J Food Sci Technol*. **131**: 1648-1653

38. Jin, Y. G., H. L. Li, M. H. Ma, J. Wang, H. N. Kim, D. H. Oh. 2011. Purification and characterization of an extracellular protease from *Bacilluspumilus* CN8. *J Fd Hyg Safety*. **26**: 76-81
39. Joo, M. B., J. H. Kang, H. S. Chang, H. D. Lee. 2009. Strategy study for high-valued food industrialization of solar salt. *Korea Maritime Institute*. 25-27
40. Jung, K. O., K. Y. Lee, S. K. Rhee, K. Y. Park. 2002. Effect of various kinds of salt on the tumor formation, NK cell activity and lipid peroxidation in sarcoma-180 cell transplanted mice. *J Kor Assoc Cancer Prevention*. **7**: 134-142
41. Jung, K. O., S. Y. Park, K. Y. Park. 2006. Longer aging time increase the anticancer and antimetastatic properties of doenjang. *Nutrition*. **22**: 539-545
42. Kamei, H., Y. Hashimoto, T. Koide, T. Kojima, M. Hasegawa, T. Umeda. 1997. Direct tumor growth suppressive effect of melanoidin extracted from immunomodulator-PSK. *Cancer Biother Radiopharm*. **12**: 341 - 344
43. Kennedy, A. R. and J. B. Little. 1981. Effects of protease inhibitors on radiation transformation in vitro. *Cancer Res*. **41**: 2103-2108
44. Keurechi, T., Kikugawa, S. Fufuda, M. Okuzumi. 1981. Inhibition of N-nitrosamine formation by soya products. *Food Cosmetics Toxicol*. **19**: 425-428
45. KFDA. 2004. Food Standards Codex. Korean Foods Industry Association, Seoul, Korea
46. KFDA. 2011. Food code. Korean Food & Drug Administration, Seoul, Korea
47. Kil, J. H. 2004. Studies on development of cancer preventive and anticancer kimchi and its anticancer mechanism. PhD Dissertation. Pusan National University, Busan.
48. Kim, D. H., S. B. Lee, J. W. Rhim. 2004. Characteristics of seaweed salts prepared with seaweeds. *Korean J Food Sci Technol*. **36**: 937-942
49. Kim, H. R. and M. R. Kim. 2010. Effects of traditional salt on the quality characteristics and growth of microorganisms from kimchi. *Korean J Food Culture*. **25**: 61-69
50. Kim, J. H., J. S. Yoo, C. H. Lee, S. Y. Kim, S. K. Lee. 2006. Quality properties of soybean pastes made meju with mold producing protease isolated from traditional meju. *J Kor Soc Appl Biol Chem*. **49**: 7-14

51. Kim, J. K. 2004. Changes of components affecting organoleptic quality during the ripening of traditional Korean soybean paste. *J Fd Hyg Safety*. **19**: 31-37
52. Kim, J. Y. 2007. Isolation and characterization of analkaline proteasep produced by *Bacillus subtilis* JK-1. *Kor J of Microbiology*. **43**: 331-336
53. Kim, K., H. C. Park, H. J. Son, Y. G. Kim, S. M. Lee, I. S. Choi, Y. W. Choi, T. S. Shin. 2007. Antimicrobial and anticancer activity of korean traditional soy sauce and paste with chopi. *J of Life Science*. **17**: 1121-1128
54. Kim, S. H, K. Y. Park, M. J. Suh. 1991. Inhibitory effect of aflatoxin B1 mediated mutagenicity by red pepper powder in the Salmonella assay system. *J Korean Soc Food Nutr*. **20**: 156-161
55. Kim, S. H. 1998. New trends of studying on potential activities of Doenjang. *Kor Soybean Digest*. **15**: 8-15
56. Kim, S. H., K. Y. Park, M. H. Suh. 1995. Comutagenic effect of sodium chloride in the salmonella/mammalian microsome assay. *Foods Biotech*. **4**: 264-267
57. Kim, S. H. and N. S. Choi. 2000. Purification and characterization of subtilisin DJ-4 secreted by Bacillus sp. Strain DJ-4 screened from Doenjang. *Biosci Biotechnol Biochem*. **64**: 1722-1725
58. Kim, S. H., S. J. Kim, B. H. Kim, S. K. Kang, S. T. Jung. 2000. Fermentation of Doenjang prepared with sea salts. *J Food Sci Technol*. **32**: 1365-1370
59. Kim, S. J., H. L. Kim, K. S. Ham. 2005. Characterization of kimchi fermentation prepared with various salts. *Korean J Food Preserv*. **12**: 395-401
60. Kim, Y. H. 2003. Biological activities of soysaponins and their genetic and environmental variations in soybean. *Kor J Crop Sci*. **48**: 49-57
61. Kim, Y. J. 1999. Physiological properties of kimchi. *Food Industry Nutrition*. **4**: 59-65
62. Kim, Y. M., J. Y. Byun, B. Namgung, J. H. Jo J. R. Do, J. P. In. 2007. Studies on functional salt fortified with seaweed components. *Korean J Food Sci Technol*. **39**: 152-157
63. Kim, Y. T., O. K. Kim, H. I. Oh. 1995. Screening and identification of the fibrinolytic bacterial strain from chungkook-jang. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol*. **23**: 1-5
64. Klender, B. S. 1987. Garlic(*Allium sativum*) and onion(*Allium cepa*): A review of their relationship to cardiovascular disease. *Prev Med*. **16**: 670

65. Kwon, M. J., Y. S. Song, Y. O. Song. 1998. Antioxidative effect of kimchi ingredients in rabbits fed cholesterol diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* **27**: 1189-1196
66. Lee, D. H., J. H. Kim, B. H. Yoon, G. S. Lee, S. Y. Choi, J. S. Lee. 2003. Changes of physiological functionalities during the fermentation of medicinal herbs doenjang. *Kor J Food Preserv.* **10**: 213-218
67. Lee, J. E. 1999. Salt and hypertension. *Korean J Nephrology suppl.* **6**: 56-60
68. Lee, J. H., M. H. Kim, S. S. Im, S. H. Kim, G. E. Kim. 1994. Antioxidative materials in domestic meju and doenjang 3. Separation of hydrophilic brown pigment and their antioxidative activity. *J Korean Soc Food Nutr.* **23**: 604-613
69. Lee, J. H., M. H. Kim, S. S. Im, S. H. Kim. 1991. Antioxidative Materials in Domestic Meju and Doenjang 1. Lipid Oxidation and Browning during Fermentation of Meju and Doenjang. *J Korean Soc Food Nutr.* **20**: 148-155
70. Lee, J. J., A. R. Kim, H. C. Chang, M. Y. Lee. 2009. Antioxidative effects of chungkukjang preparation by adding solar salt. *Korean J Food Preserv.* **16**: 238-245
71. Lee, J. J. and Y. K. Jeong. 1999. Cholesterol-lowering effect and anticancer activity of kimchi and kimchi ingredients. *Korean J Life Science.* **9**: 743-752
72. Lee, K. E., U. H. Choi, G. E. Ji. 1996. Effect of kimchi intake on the composition of human large intestinal bacteria. *Korean J Food Sci Technol.* **28**: 981-986
73. Lee, S. J., K. I. Lee, S. H. Moon, K. Y. Park. 2008. Antimutagenic effects on methanol extracts of Doenjang made with various kinds of water or salt. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* **37**: 691-695
74. Lee, S. K., D. H. Bae, T. J. Kwon, S. B. Lee, H. H. Lee, J. H. Park, S. Heo, M. G. Sohnson. 2001. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme from *Bacillus* sp. KDO-10 isolated from soybean paste. *J Microbiol Biotechnol.* **11**: 845-852
75. Lee, S. M., H. C. Chang. 2009. Growth-inhibitory effect of the solar salt doenjang on cancer cells, AGS and HT-29. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* **38**: 1664-1671
76. Lee, Y. O. and H. S. Cheigh. 1996. Antioxidant activity of various solvent extracts from freeze dried kimchi. *Korean J Life Science.* **6**: 66-71

77. Lim, S. Y., K. H. Kim, K. Y. Park. 2007, Effect of solvent fractions from Doenjang on antimutagenicity growth of tumor cells and production of interleukin-2. *J of Life Sci.* **17**: 791-797
78. Lim, S. Y., K. Y. Park, S. H. Lee, J. S. Choi. 2007. Inhibitory effect of methanol extracts and solvents fractions from meju on mutagenicity and growth of human cancer cells. *J of Life Science.* **17**: 76-81
79. 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
80. Maurice, E. S. and R. Y. Veron. 1988. Nutrition and diet in hypertension in modern nutrition in health and disease 7th ed. Lea&Febiger, Philadelphia. **2**: 1272
81. Messina, M. and V. Messina. 1991. Increasing use of soyfoods and their potential in cancer prevention. *J Am Diet Assoc.* **91**: 836-840
82. Okura, A., H. Arakawa, H. Oka, T. Yoshinari, Y. Monden. 1988. Effect of genistein on topoisomerase activity and on the growth of [Val 12] haras-transformed NIH 3T3 cells. *Biochim Biophys Res Commun.* **157**: 183-189
83. Park, I. B., J. W. Park, J. M. Kim, S. T. Jung, S. G. Kang. 2005. Quality of soybean paste(Doenjang) prepared with Lotus root powder. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* **34**: 519-532
84. Park, J. W., S. J. Kim, S. H. Kim, B. H. Kim, S. G. Kang, S. H. Nam, S. T. Jung. 2000. Determination of mineral and heavy metal contents of various salts. *Korean J Food Sci Technol.* **32**: 1442-1445
85. Park, K. Y. 1995. The nutritional evaluation, and antimutagenic and anticancer effects of kimchi. *J Korean Soc Food Nutr.* **24**: 169-182
86. Park, K. Y., E. J. Cho, S. H. Rhee. 1998. Increased antimutagenic and anticancer activities of chinese cabbage kimchi by changing kinds and levels of sub-ingredient. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* **27**: 625-623
87. Park, K. Y., K. O. Jung, S. H. Rhee, Y. H. Choi. 2003. Antimutagenic effects of doenjang(Korean fermented soypaste) and its active compounds. *Mutat Res.* **4**: 43 - 53
88. Park, M. W. and K. Y. Park. 1998. Changes of physicochemical and sensory characteristics of Oiji(Korean pickled cucumbers) prepared with different salts. *Korean J Food Sci Nutr.* **27**: 417-424

89. Park, K. Y., S. J. Lee, K. I. Lee, S. H. Rhee. 2005. The antitumor effect in sarcoma-180 tumor cell of mice administered with japanese, apricot, garlic or ginger Doenjang. *Korean J Food Cookery Sci.* **21**: 599-606
90. Peterson, G. and S. Barnes. 1991. Genistein inhibition of the human breast cancer cells; independence from estrogen receptors and the multi-drugresistance gene. *Biochim Biophys Res Commun.* **179**: 661-667
91. Powrie, W. D., C. H. Wu, V. P. Molund. 1986. Browning reaction systems as sources of mutagens and antimutagens. *Environ Health Perspect.* **67**: 47 - 54
92. Rauth, S., J. Kichina, A. Green. 1997. Inhibition of growth and induction of differentiation of metastatic melanoma cells in vitro by genistein: chemosensitivity is regulated by cellular. *Br J Cancer.* **75**: 1559 - 1566
93. Schroeder, H. A. 1960. Relation between mortality form cardiovascular disease and treated water supplies. *J Am Med Assoc.* **172**: 1902-1905
94. Shamsuddin, A. M., A. M. Elsayed, A. Ullah. 1988. Supression of large intestinal cancer in F344 rats by inositol hexaphosphate. *Carcinogenesis.* **9**: 577-580
95. Shamsuddin, A. M., A. Ullah, A. K. Chakravarthy. 1989. Inositol and inositol hexaphosphate supress cell proliferation and tumor formation in CD-1 mice. *Carcinogenesis.* **10**: 1461-1463
96. 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
97. Shin, T. S., C. K. Park, S. H. Lee, K. H. Han. 2005. Effects of age on chemical composition in sun-dried salts. *Korean J Food Sci Technol.* **37**: 312-317
98. Shin, Z. I., C. W. Ahn, H. S. Nam, H. J. Lee, T. H. Moon. 1995. Fractionation of angiotensin converting enzyme(ACE) inhibitory peptides from soybean paste. *Kor J Food Sci Technol.* **27**: 230-234
99. Skehan, P., R. Storeng, D. Scudiero, A. Monks, J. McMahon, D. Vistica, J. T. Warren, H. Bokesch, S. Kenney, M. R. Boyd. 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening. *J Natl Cancer Inst.* **82**: 1107-1112
100. Song, J. Y., C. W. Ahn, J. K. Kim. 1984. Flavor components produced by microorganism during fermentation of Korean ordinary soybean paste. *Kor J Appl Microbiol Bioeng.* **12**: 147-152

101. St Clair, W. H., P. C. Billings, J. A. Carew, C. K. McGandy, P. Newberne, A. R. Kennedy. 1990. Suppression of dimethylhydrazin induced carcinogenesis in mice by dietary addition of the Bowman-Birk protease inhibitor. *Cancer Res.* **50**: 580-586
102. Steele, V. E., M. A. Pereira, C. C. Sigman, G. J. Kelloff. 1995. Cancer chemoprevention agent development strategies for genistein. *J Nutr.* **125**: 713-716
103. Surh, Y. H., S. S. Lee. 1995. Capsaicin a double-edged sword: toxicity, metabolism and chemopreventive potential. *Life Sci.* **56**: 1845
104. Takahashi, M., T. Kokubo, F. Furukawa, Y. Kurokawa, M. Tatematsu, Y. Hayashi. 1983. Effect of high salt diet on rat gastric carcinogenesis induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Gann.* **74**: 28-34
105. Tiisala, S., M. L. Majuri, O. Carpen, R. Renkonen. 1994. Genistein enhances the ICAM-1 and its counter-receptors. *Biochim Biophys Res Commun* **203**: 443-449
106. Tobian, L. 1979. The relationship of salt to hypertension. *Am J Clin Nutr.* **32**: 2739-2748
107. Vilac institute. Vilac Co., Ltd. 1995. The report of salt
108. Wattenberg, L. W. and W. D. Loub. 1978. Inhibition of polycyclic aromatic hydrocarbon-inhibited neoplasia naturally occurring indols. *Cancer Res.* **38**: 1410-1413
109. Whitaker, J. R. 1978. Biochemical changes occurring during the fermentation of high-protein foods. *Food Technol.* **5**: 175 - 180
110. Yavelow, J., T. H. Finlay, A. R. Kennedy, W. Troll. 1983. Bowman-Birk soybean protease inhibitor as an anticarcinogen. *Cancer Res.* **43**: 2454-2459
111. Yoon, K. H. and H. Y. Shin. 2010. Medium optimization for the protease production by *Bacillus licheniformis* isolated from cheongkookjang. *Kor J Microbiol Biotechnol.* **38**: 385-390
112. 오영주, 황인주, C. Leitzman. 1994. 김치의 영양생리학적 평가, 김치의 과학. 한국식품과학회. 226
113. 통계청. 1992. 사망원인 통계 연보

감사의 글

2년이라는 대학원 생활은 일생을 보냄에 있어 좋은 경험을 할 수 있었고 많은 분들의 따뜻한 관심과 애정 어린 질책 속에 또 다시 한층 성숙해져 더 높은 곳으로 발돋움 할 수 있는 시간이었습니다. 항상 저를 응원해주시고 격려해주신 모든 분들께 이 자리를 빌어 감사의 말씀을 드립니다.

먼저, 늘 저에게 아낌없는 관심과 지도로 이끌어주시며 학문의 길과 방향에 대하여 넓은 안목으로 키워주신 장해춘 지도교수님께 진심으로 감사드립니다. 또한 바쁘신 와중에도 귀중한 시간을 내주시어 논문에 대한 충고를 해 주신 이명렬 교수님, 박윤경 교수님께 깊은 감사를 드리며 학부와 대학원 과정 동안 학문적으로 큰 가르침을 주신 노희경 교수님, 김경수 교수님, 김복희 교수님, 이재준 교수님께도 감사의 말씀 전합니다.

대학원 생활의 전부라고 해도 과언이 아닐 만큼 소중한 식품미생물 실험실은 정말 잊지 못할겁니다. 많은 조언과 가르침을 주시는 양은주 박사님, 엄마처럼 챙겨주시고 가르쳐주시는 장지윤 박사님, 언제나 따뜻한 말로 신경써주시는 장미 박사님, 공부방 방장으로 항상 먼저 우리들을 위해주시고 꼼꼼하게 챙겨주시는 지혜언니, 모든 일에 솔선수범하며 우리들에게 웃음을 주었던 송희언니, 똑부러지고 귀여움이 매력인 유리언니, 비슷한 성격에 공감대가 많았던 정선언니, 막내들답게 귀엽고 언니들 잘 따라주었던 송이, 세연이, 슬기, 은아, 그리고 기쁘고 슬픈 일 함께하며 서로 많이 의지하고 없었더라면 매우 힘들었을텐데 내 곁에 함께해준 동기 은혜에게 고마운 마음을 전합니다. 마지막으로 밝고 따뜻하게 웃어주시는 효주언니, 율언니, 지용언니, 현경언니, 선미언니, 은정언니께도 감사드립니다.

늘 힘이 되어주고 곁에 있어준 그 누구보다도 소중한 친구들 다운이, 지연이, 성희, 스런이, 먼 곳에 있어서 자주 만나지 못하지만 항상 응원해주는 지윤이, 진아, 민경이, 언제나 유쾌하고 즐거운 급모임의 주향이, 보균이, 유록이에게 모두 고맙다고 전하고 싶습니다. 그리고 대학원 동기인 주희, 영수언니도 힘이 되어주어서 고맙고 수고와 감사의 박수를 보내고 싶습니다.

마지막으로 늘 저를 믿어주시고 변함없는 사랑으로 응원해주시는 사랑하는 엄마, 아빠께 마음 깊이 감사드리고 대학원 생활의 마지막 결실인 이 논문을 바치고 싶습니다. 항상 격려해주신 친지 분들과 주위의 모든 분들께도 감사드리며 항상 건강하시길 기도합니다.

지금까지 해왔던 것처럼 주위에 모든 분들 실망시키지 않고 후회 없는 삶을 살도록 하루하루 노력하는 사람이 되겠습니다. 감사합니다.

저작물 이용 허락서

학 과	식품영양학과	학 번	20107045	과 정	석사
성 명	한글 윤해훈	한문 尹海熏	영문 Yoon Hae Hoon		
주 소	광주 광역시 남구 봉선2동 쌍용아파트 107동 802호				
연락처	e-mail : sun_mark@hanmail.net				
논문제목	한글: 천일염으로 제조한 김치와 된장의 암세포 성장억제 효과				
	영문: Growth Inhibitory Effects of Kimchi and Doenjang Prepared with Solar Salt on Cancer Cells				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건 아래 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 편집과 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 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함
6. 조선대학교는 저작물 이용의 허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속 대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함

동의여부 : 동의(○) 반대()

2011 년 11 월

저작자 : 윤해훈 (인)

조선대학교 총장 귀하