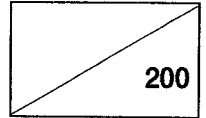


664.726
L2932

GA0042-0983



19916630

최 종
연구보고서

전통 간·된장의 기능성물질 탐색·동정 및 기능성 강화 제조 공정 설정

간장제조
된장제조

A study on the physiological function of traditional
Kanjang and *Doenjang*, and the development of
process for functional food

연구기관

한국식품개발연구원

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “전통 간·된장의 기능성물질 탐색·동정 및 기능성강화 제조공정 설정”과제의 최종보고서로 제출합니다.

1998. 12. 20.

주관연구기관명 : 한국식품개발연구원

총괄연구책임자 : 최 신 양

연 구 원 : 김 승 호

연 구 원 : 홍 석 산

연 구 원 : 김 혜 영

협동연구기관명 : 연세대학교 의과대학

협동연구책임자 : 이 봉 기

연 구 원 : 장 윤 수

여 백

요 약 문

I. 제 목

전통 간·된장의 기능성물질 탐색·동정 및 기능성강화 제조공정 설정

II. 연구개발의 목적 및 중요성

1. 연구개발의 목적

본 연구는 전통 간장, 된장의 항암, 혈압강하 및 면역조절 물질에 대한 기능성을 탐색, 동정하여 주요 생리활성을 규명하므로서 전통 장류의 우수성을 입증하고 연구결과를 바탕으로 기능성이 강화된 장류 제조공정(안)을 제시하는 데 목적이 있음.

2. 연구개발의 중요성

장류는 원료에서 유래하는 단백질, 탄수화물, 지방 등의 영양소가 골고루 갖추어진 우수한 조미식품으로 육류 섭취량이 많지 않은 우리민족의 중요한 단백질 공급원으로서 식생활에 없어서는 안될 중요한 식품으로 자리잡고 있다.

이러한 장류는 주원료인 대두의 단백질, 지방, 탄수화물 등이 미생물의 작용으로 분해되어 생성된 분해산물과 발효과정 중에 미생물의 작용에 의해 새로이 생성되는 물질들로 구성되어 있으므로 다양한 생리활성을 나타낼 것

으로 여겨지며 그 영양적 우수성에 대해서는 이미 널리 알려져 있으나 생체 조절기능에 대한 연구는 아직 미미한 실정이다.

우리 전통장류의 생체기능성에 대하여는 허준이 동의보감에서 “장류가 해독작용을 한다” 라고 기록한 것을 찾아 볼 수 있으나 우리 장류의 기능성에 대한 과학적인 연구로는 1980년대에 들어 항산화성, 항돌연변이성, 고혈압방지, 혈전용해 등에 대한 효과를 초보적 단계에서 일부 보고하고 있으나, 장류의 기능성에 대한 체계적이며 집중적인 연구가 되고 있지 않은 상태이다. 이러한 시점에서 우리나라 전통 대두 발효식품인 장류의 특성과 우수한 생리활성에 대한 체계적인 연구가 절실히 필요한 것으로 사료된다.

일찌기 장류에 대한 체계적인 연구를 추진해 온 일본은 일본 장류의 생체기능성(항암, 고혈압 방지, 혈중 콜레스테롤 저하 등)에 대한 연구를 진행하여 항암활성물질을 일부 분리하여 그 특성을 규명하는 등의 연구를 활발히 진행하고 있으며, 이외에도 혈중콜레스테롤 억제, 방사능에 대한 보호효과 등의 생리활성에 대한 연구를 수행하고 있다.

전통장류의 영양적 우수성 뿐만 아니라 항암성, 면역조절기능, 장내세균에 대한 영향 등의 우수한 기능성을 발굴, 홍보하여 장류의 소비를 유도하고 기능성이 강화된 장류제품을 개발할 경우, 건강식품에 대한 선호도가 높은 소비자의 욕구를 충족시키므로 판매량을 증대시키고, 부가가치를 높일수 있으나 아직 업계에서는 이를 충족시킬 만한 기술을 보유하지 못하고 있어 기술개발이 필요한 실정이다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 연구개발 내용

- 전통 간장, 된장의 기능성 물질의 탐색
- 기능성(항암효과, 혈압강하효과, 면역조절효과) 물질의 분리, 정제
- 면역조절물질의 생물학적 특성 및 효과
- 기능성 강화 제조공정(안) 제시

2. 연구개발 범위

- 전통 간장, 된장의 항암, 혈압강하, 면역조절효과 *in vitro* 측정
- 된장의 기능성(항암효과, 혈압강하효과, 면역조절효과)물질 분획
- 된장분획물의 기능성(항암효과, 혈압강하효과, 면역조절효과) 확인
- 기능성(항암효과, 혈압강하효과, 면역조절효과)물질의 정제
- 면역조절물질의 작용기전 규명
- 면역조절물질의 세포성 면역반응 및 알레르기 면역억제효과
- 기능성 강화 장류 제조공정(안) 설정

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

순천 재래식 된장의 암세포 성장 저해효과에 대하여 검토하였고, HPLC 및 GC 분석을 통하여 암세포 억제 활성물질을 동정하였다. 순천 재래식 된장의 에틸아세테이트 분획물과 헥산 분획물이 암세포 성장 저해효과 실험 및 MTT assay 결과, 사람의 HepG2 간암세포, WiDr 대장암 세포, SNU-1 위암세포 및 마우스의 L1210, P338D1 암세포에서 높은 성장 저해효과를 나타내었다. 효과가 높았던 에틸아세테이트 분획물을 HPLC로 분석하여 각 각의 peak를 분취해 암

세포 성장 저해효과 실험 및 MTT assay를 한 결과 genistein으로 확인된 peak에서의 효과가 가장 높았고, 그 함량은 된장 100g당 0.060mg이었다. 핵산 분획물을 GC 분석하여 표준물질의 GC 분석과 비교해 본 결과 oleic acid의 함량이 된장 100g 당 5.934g으로 가장 많았고 여러 연구를 통해 암세포 성장 억제효과가 있다고 밝혀진 바 있는 linoleic acid의 함량은 0.189g이었다.

농림수산부 품질인증 전통식품 장류 수종을 수집하여 된장 또는 청국장 여액의 ACE inhibitory activity를 측정된 결과, 시료간 활성의 차이는 최대가 최저의 무게로 비교했을 때 14배 컸으며, 간장의 활성이 가장 높았으나, 비슷한 수준의 된장 B를 탐색 대상원료로 된장이 간장보다 단백질원인 점을 고려하여 선정하였다. 된장에서 추출한 시료를 gel permeation chromatography에서 분리한 후, ACE 저해 활성이 높은 분획을 두 부분에서 얻을 수 있었다. 뚜렷하게 활성이 높은 획분은 90% 이상의 저해 활성을 나타냈으며 바로 뒤에 약간 겹쳐 활성이 낮은 획분은 70% 정도의 저해 활성을 나타내었다. Gel permeation chromatography에서 나온 획분을 reverse phase HPLC에 의해 분리한 결과, 거의 retain되지 않은 부분에 대부분의 활성이 있었다. 활성 획분을 8번 분취하여 동결 건조하였으며 이의 아미노산 함량은 $80\mu\text{g}$ 이었다. 0.02% ninhydrin in acetone로 발색시켜 얻은 각 spot를 끓어 $100\mu\text{l}$ 50 mM ammonia로 두번 추출, 원심 분리하여 동결 건조한 후 $400\mu\text{l}$ 증류수에 녹여 ACE저해 활성을 측정한 결과, 한 시료만이 활성을 보였으며 85%의 저해율을 보였다. 이 물질은 LC-MS 결과, 분자량 759.63의 거의 순수한 물질로 밝혀졌으나 peptide가 아닌 것으로 판명되었다. Scale up하기 위하여 gel permeation chromatography한 후 활성 성분을 Flash chromatography한 결과, TLC에 의해 확인한 활성 획분의 약 17% (건물량기준)를 얻어 상당한 순도 향상을 이룰 수 있었다. 된장 추출물을 gel permeation chromatography(G-25)했을 때 두 번째로 높은 혈압강화 활성을 보이는 획분에 대한 분리를 reverse phase HPLC로 시도하였다. 각 분획물의 AC

E 저해 활성을 측정한 결과 50%의 활성을 보이는 분획과 47%의 저해 활성을 보이는 분획을 얻을 수 있었다. Chromatogram상에서 이 두 분획이 순수해 보이지 않았으므로 NH₂ column으로 acetonitrile 농도를 변화시켜 분리한 결과, 70% acetonitrile에서 가장 잘 분리되었다. LC-Mass로 분자량 측정과 순수성을 분석한 결과, 이 분획물은 50%의 저해활성을 나타내는 IC₅₀이 92 μM로서, 거의 순수한 물질로서 분자량은 272.34dalton으로 분석되었다. LC-Mass에 의해 확인된 활성 물질의 sequencing은 Edman degradation method를 이용하여 분석한 결과, Arg-Pro의 아미노산 서열을 갖는 dipeptide로 밝혀졌다.

한국의 전통 발효식품인 된장에서 마우스 비장 림프구의 증식을 크게 증가시키는 물질이 발견되었으나 삶은 대두에서는 관찰되지 않았다. 이 물질은 ammonium sulfate에 의해 침전되고 열에 안정한 점으로 보아 선형의 단백질 내지는 glycoprotein일 것으로 추정되며, 대두의 lectin과는 달리 적혈구 및 림프구를 응집시키지 않았다. 이 물질은 복강 대식세포의 IL-6 및 TNF- α 생성과 비장 림프구의 IL-6 및 IFN- γ 생성을 크게 증가시켰으나 대식세포의 IL-12 생성은 크게 증가시키지 못하였다. 이 물질에 의한 림프구 증식반응은 T 림프구에서 일어나지 않고 B 림프구에서만 일어나는 점으로 미루어 비장 림프구의 IL-6 및 IFN- γ 생성은 B 림프구에서 일어났음을 추정할 수 있다.

이상의 결과에서 된장의 추출물이 특이적으로 B 림프구의 증식을 증가시키고 대식세포 및 B 림프구의 싸이토카인 생성을 증가시킨다는 것은 이 물질이 B 세포 mitogen으로서 면역조절제임을 의미한다. 더구나 현재까지 알려진 lectins과는 달리 림프구 및 적혈구를 응집시키지 않는다는 사실은 이 면역조절제의 가치성을 높이고 있다. 이러한 면역조절제가 삶은 대두에서 발견되지 않고 된장에서 발견되는 것은 자연계에 존재하는 다양한 미생물의 발효에 기인된 것으로 사료된다.

지금까지의 연구결과를 토대로 기능성 강화 제조공정(안)을 설정하였다. 전통 채래식 된장이 원료대두, 간장, 일본식된장 및 시판된장보다 기능성물질의 효과가 우수하였으므로 메주제조는 개량식보다 채래식으로 만들어 자연적인 미생물균총을 이루게 하여야 하며 이렇게 제조한 자연메주를 사용하여 된장을 담고 충분한 발효기간을 주게 되면 지금까지의 연구결과에 따른 효과를 갖게 된다.

2. 활용에 대한 건의

가. 활용실적

본 연구결과 일부를 전통된장의 우수성과 관련하여 언론매체홍보에 활용하여 된장소비를 촉진시켰다. 즉, 1996년 5월 10~11일에 MBC 9시 저녁뉴스, SBS 8시 저녁뉴스, KBS 1라디오, 기독교방송, 동아일보, 중앙일보, 경향신문, 세계일보, 문화일보, 매일경제신문, Korea Times, Korea Herald 등의 언론매체에 “된장의 항암효과”와 관련하여 출연 및 홍보를 하였으며 1998년 1월 14일에는 중앙일보, 한겨레신문, 서울신문, 한국경제신문 등의 언론에 “채래식된장의 인체 면역증강물질”과 관련하여 홍보한 바 있다.

또한 전통된장의 우수성을 관련학회를 통한 발표 및 게재함으로써 국내외 학자들의 관심을 유도하였다. 즉, 산업미생물학회, 식품과학회, 대한면역학회지에 일부 연구결과 4편을 게재하였으며 산업미생물학회, 식품영양과학회 등의 학술발표회에서 일부 연구결과 3편을 발표하였다. 1998년에는 산업미생물학회 및 건국대 식품개발연구소 공동주최 국제심포지움과 한국식품과학회, 식품영양과학회 등의 학술발표회에서 일부 연구결과를 발표하였으며 현재 이들 학회지에 논문을 투고중에 있다.

나. 건의

본 연구의 결과를 전통 된장의 우수성과 관련하여 지속적인 홍보를 통하여 전통식품에 대한 관심과 소비촉진을 유도함과 동시에 탐색된 기능성 물질의 식품 및 의약품업계에의 이전가능성을 타진 요망.

여 백

SUMMARY

Methanol extract and its fraction of traditional fermented soybean paste(*Doenjang*) from Soonchang area were studied for growth suppression on the various tumor cells and analysed suppression material by using HPLC and GC. Hexane fraction of methanol extract was indicated 79%, 76%, 67%, 66%, 78% of growth suppression on L1210, P338D1, HepG2, WiDr and SNU-1 tumor cells, respectively. Ethylacetate fraction of methanol extract also was showed 81%, 75%, 75%, 76% and 82% of growth suppression on the same tumor cells, respectively. Peak 8 obtained from HPLC of ethylacetate fraction was indicated 81%, 77%, 77%, 75% and 79% of growth suppression on the same tumor cells and identified as a genistein compare with standard one by HPLC analysis. Hexane fraction of methanol extract was contained oleic acid, linoleic acid and palmitic acid by using GC analysis. Linoleic acid was interpreted as one of growth suppression materials on the above tumor cells.

Angiotensin converting enzyme(ACE) acts in blood pressure regulation, converting angiotensin I to the potent vasoconstrictor angiotensin II and inactivating the vasodilator bradykinin to raise blood pressure. Some inhibitors of ACE show antihypertensive effects and are used as pharmaceuticals. The ACE inhibitory activity of foods has been studied, and some ACE inhibitory peptides were produced by the enzymatic hydrolysis of casein. The inhibitory activity of ACE in commercial traditional fermented soy bean products was screened. ACE inhibitory substance was extracted from *Doenjang*. The extracted substance was isolated by gel permeation chromatography.

ACE inhibitory activity was 90% and 70%. When the activity fraction of 90% was isolated by reverse phase prep-HPLC, initial fraction showed the highest ACE inhibitory activity. Using 2-dimensional electrophoresis/TLC detected with 0.02% ninhydrin, one out of four spots had activity. To scale up active fraction from gel permeation chromatography, flash chromatography was employed. The active fraction from flash chromatography was further rechromatographed for three times by reverse phase prep-HPLC on the same column. However, the purified active substance was not isolated. The active fraction of 70% from gel permeation chromatography was isolated by reverse phase prep-HPLC. The result of ACE inhibitory showed to be 50% and 47%. Subsequently, the second fraction was divided into another three fractions by NH_2 prep-HPLC, all of which appeared to be ACE inhibitory activity. Among them, the third fraction was purified. Molecular weight of this fraction was calculated to be 272.34 dalton by LC-Mass. The active fraction was identified as Arg-Pro. This fraction ACE IC_{50} was $92 \mu\text{M}$.

Responses of mouse lymphocytes to the soybean paste fermented by Korean traditional fashion was examined to clarify its effects in cytokine production *in vitro*. It was found that the proliferation of mouse splenic lymphocytes is significantly increased by fraction extracted from soybean paste fermented by Korean style(KFSP100), but not non-fermented soybean paste. The fact that the fraction is precipitated by ammonium sulfate and its activity is heat stable suggests that the fraction is the linear protein or glycoprotein, and unlike other lectins, does not induce agglutination of erythrocytes and/or lymphocytes. The fraction increases the production of IL-6 and TNF- α by macrophages, and IL-6 and IFN- γ by lymphocytes, but increa-

ses slightly that of IL-12 by macrophages. Increased proliferation of lymphocytes by the fraction is shown in B lymphocytes only but not T lymphocytes, suggesting that the production of IL-6 and IFN- γ by whole splenic lymphocytes may be due to B lymphocytes. These observations suggest that KFSP100 may be a novel mitogen for B lymphocytes. The component(s) responsible for the B cell proliferation in KFSP100 might be a factor gained by natural fermentation.

Conclusion, the fact that the fraction increases specifically the proliferation of B lymphocytes and the production of cytokines by macrophages and B lymphocytes may indicate that the fraction is the B cell mitogen and immunomodulator. Furthermore the fraction does not agglutinate erythrocytes and lymphocytes, meaning that it is of value as immunomodulator. That the fraction is found from soybean paste fermented by Korean style but not non-fermented one may be due to fermentation by the wide spectrum of microorganisms existing in nature.

여 백

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	23
1. Objectives and importance of the research	23
1) Background of the research	23
2) Necessity of the research	35
3) Objectives and contents of the research	38
Chapter 2. Anticarcinogenic compound	39
1. Introduction	39
2. Materials and Methods	44
1) Materials	44
2) Tumor cells and breeding materials	44
3) Extraction and preperation of anticarcinogenic substance from soy bean fermented products	46
4) Tumor cells cultivation	46
5) MTT assay for measurement of inhibitory effect	48
6) Growth inhibition test of tumor cells	48
7) Growth inhibition test of normal cell	50
8) Isolation and identification of the active fraction by HPLC	50
9) Fatty acids analysis by GC	52
3. Results	54
1) Extraction of anticarcinogenic substance from <i>Doenjang</i>	54
2) Anticarcinogenic effect of methanol extract and it's fraction of <i>Doenjang</i>	55

3) Isolation and identification of anticarcinogenic substance by HPLC	65
4) Analysis of anticarcinogenic substance by GC	76
4. Reference	83
 Chapter 3. Antihypertensive substance	88
1. Introduction	88
2. Materials and Methods	91
1) Materials	91
2) Extraction antihypertensive substance from soy bean fermented products	91
3) Assay of ACE inhibitory activity	91
4) Isolation of ACE inhibitor substance by gel permeation chromatography	92
5) Isolation of front fraction from gel permeation chromatography	92
6) Isolation of back fraction from gel permeation chromatography	94
7) Identification of the purified inhibitory	95
3. Results	95
1) Screening of ACE inhibitory activity from soy bean fermented products	95
2) Isolation of ACE inhibitor substance by gel permeation chromatography	96
3) Isolation of front fraction from gel permeation chromatography	96
4) Purification of ACE inhibitory substance by reverse phase prep-HPLC	99

5) Repurification of ACE inhibitory substance by reverse phase prep-HPLC	104
6) Isolation of back fraction from gel permeation chromatography	110
4. Referance	115
Chapter 4. Immunomodulator	118
1. Introduction	118
2. Materials and Methods	119
1) Materials	119
2) Experimental animals	119
3) Extraction and isolation of immunomodulators from <i>Doenjang</i>	119
4) Isolation of mouse lymphocytes and macrophages	123
5) Measurement of the proliferation of lymphocytes	123
6) Measurement of cytokine production	124
7) Antibody production against the fraction of <i>Doenjang</i> and lectin of soybean	124
8) Allergy induction of mouse	125
9) Measurement of antibody	125
10) Antibody production against the lipopolysaccharide(LPS)	127
11) Antibody production against the <i>Doenjang</i> (KFSP)	127
3. Results	128
1) Investigation and properties of immunomodulator	128
2) Isolation and purification of immunomodulator	139
3) Mechanisms of immunomodulator and therapeutical effects	142
4) Physiochemical properties of <i>Doenjang</i> (KFSP)	148

4. Reference	151
Chapter 5. Establishment of developed process for functional food	154
Chapter 6. References	155

목 차

제 1장 서 론	23
제 1절 연구개발의 목적과 범위	23
1. 연구배경	23
2. 연구의 필요성	35
3. 연구개발 목표 및 내용	38
제 2장 항암성 물질 분야	39
제 1절 서 설	39
제 2절 재료 및 방법	44
1. 재료	44
2. 암세포주 및 세포배양 재료	44
3. 시료의 추출 및 조제	46
4. 세포배양	46
5. MTT assay에 의한 저해효과	48
6. 암세포 증식억제 시험	48
7. 정상세포 성장억제 시험	50
8. HPLC에 의한 활성성분 분리 및 동정	50
9. GC에 의한 지방산 함량의 측정	52
제 3절 결과 및 고찰	54
1. 시료의 추출	54
2. 된장 메탄올 추출물 및 분획물의 항암효과	55
3. HPLC분석에 의한 암세포성장억제물질의 분리 및 동정	65
4. GC에 의한 암세포성장억제물질의 분석	76

제 4절	참고문헌	83
제 3장	혈압강하 물질 분야	88
제 1절	서 설	88
제 2절	재료 및 방법	91
1.	재료	91
2.	장류에서의 혈압강하물질 추출	91
3.	ACE 저해활성 측정	91
4.	Gel permeation chromatography에 의한 활성물질 분리	92
5.	Gel permeation chromatography에 의한 앞 분획의 분리	92
6.	Gel permeation chromatography에 의한 뒷 분획의 분리	94
7.	분자량 측정 및 동정	95
제 3절	결과 및 고찰	95
1.	ACE 저해활성이 높은 장류의 선택	95
2.	Gel permeation chromatography에 의한 활성물질 분리	96
3.	Gel permeation chromatography에 의한 앞 분획의 분리	96
4.	Reverse phase HPLC에 의한 분리	99
5.	Reverse phase HPLC에 의한 rechromatography	104
6.	Gel permeation chromatography에 의한 뒷 분획의 분리	110
제 4절	참고문헌	115
제 4장	면역조절 물질 분야	118
제 1절	서 설	118
제 2절	재료 및 방법	119
1.	재료	119

2. 실험동물	119
3. 면역증진물질의 추출 및 분리	119
4. 마우스 림프구 및 대식세포의 분리	123
5. 림프구의 증식반응 측정	123
6. 싸이토카인 생산과 측정	124
7. 된장분획물 및 대두 lectin에 대한 항체생산	124
8. 마우스의 알레르기 유발	125
9. 항체측정	125
10. Lipopolysaccharide(LPS)에 대한 항체생성	127
11. KFSP에 대한 항체생성	127
제 3절 결과 및 고찰	128
1. 면역조절물질 탐색 및 특성	128
2. 면역조절물질의 분리 및 정제	139
3. 면역조절물질의 작용기전 및 치료적 효과	142
4. KFSP의 물리화학적 성질	148
제 4절 참고문헌	151
제 5장 기능성 강화 제조공정 설정	154
제 6장 참고문헌	155

여 백

제 1 장 서 론

제 1절 연구개발의 목적과 범위

1. 연구 배경

된장, 간장, 고추장, 청국장 등은 조미식품으로 원료에서 유래하는 단백질, 탄수화물, 지방 등의 영양소가 갖추어진 우수한 영양원이다. 우리나라 장류의 역사는 삼국시대로 거슬러 올라가며, 육류 섭취량이 많지 않은 우리 민족의 식생활에 중요한 단백질 공급원으로서 그 역할을 담당해 왔다. 이러한 장류는 오늘날 우리들의 식생활에도 없어서는 안될 중요한 식품으로 자리잡고 있다. 또한, 장류는 영양원으로서만 아니라 생체기능성도 보유하고 있는 것으로 알려져 있다. 예를 들면 대두의 protease inhibitor, phytic acid 와 isoflavone 등이 항암효과를 나타내며, 청국장에 혈전 용해효소가 함유되어 있는 것 등이다.

일찌기 장류에 대한 체계적인 연구를 추진해 온 일본은 일본 장류의 생체기능성(항암, 고혈압 방지, 혈중 콜레스테롤 저하 등)을 연구하여 그 특성을 과학적으로 입증하고 있다. 우리 전통장류의 생체기능성에 대하여는 허준이 동의보감에서 “장류가 해독작용을 한다”라고 기록한 것을 찾아 볼 수 있다. 우리 장류의 기능성에 대한 과학적인 연구로는 1980년대에 들어 항산화성, 항돌연변이성, 고혈압방지 등에 대하여 시도된 바 있으나 아직 많은 연구는 진행되어 있지 않다.

오늘날 미국에서는 성인병 예방의 차원에서 식물성 단백질 섭취를 권장하고 있으며, 학교급식과 군용식품에 식물성 단백질 중 대표적인 대두 단백질

질을 첨가하고 있다. 또한 대두 가공제품 및 대두 발효제품에 대한 관심도 점차 증가하고 있는 추세이다. 이러한 시점에서 우리 전통의 대두 발효식품인 장류의 특성과 생리활성에 대한 체계적인 연구가 절실히 필요하다고 할 수 있다.

장류제품의 기능성에 대한 연구는 일본에서 활발하게 연구해왔으며, 현재 혈압강하효과, 살균효과, 항산화효과, 항암효과, 혈중콜레스테롤 저하효과, 방사능 물질 배제효과, 방사선 유발이상 방제효과 등이 보고되어 있다.

가. 항돌연변이성

Asahara 등(1)은 일본 된장에 있는 미생물이 돌연변이원과 결합하여 항돌연변이성을 나타낸다고 보고하였다. 동결건조된 세균과 효모는 돌연변이성을 지닌 3-amino-1-methyl-[5H] pyrido [4,3-b] indole (Trp-P-2)에 대하여 높은 항돌연변이성을 나타내었다. 곰팡이는 Trp-P-2에 대하여 세균과 효모보다 낮은 항돌연변이성을 보였다. 그러나, 대부분의 된장 미생물은 2-amino-3-methyl imidazole [4,5-f] quinoline(IQ)에 대해서는 항돌연변이성을 보이지 않는 것으로 나타나, 미생물에 의한 항돌연변이성은 돌연변이원에 특이적으로 반응하는 것으로 나타났다. 미생물의 돌연변이원과의 결합능은 세포벽 성분에 의한 것으로 추정되고 있으며, 결합능과 항돌연변이성은 121℃에서 15분간 가열처리한 후에 7~28% 감소하는 것으로 나타났다.

박 등(27)은 재래식 간장의 갈색물질이 aflatoxin B₁(AFB₁)을 파괴하는데 관여한다고 밝혔다. AFB₁은 *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*가 식품에 오염되어 생성하는 2차 대사산물로, 자연에서 발견되는 화합물중 발암성과 독성이 가장 강한 물질 중의 하나로 알려져 있다. 간장의 갈색물질(0.05%)과 AFB₁을 pH 7의 완충용액속에서 2일동안 30℃에서 반응시킨

결과 60% 이상의 AFB₁이 파괴되었으며, 이 반응물질을 *Salmonella typhimurium* TA 98과 TA 100으로 mutagenicity test(Ames test)를 하였을 때 돌연변이성이 각각 50%, 70%로 감소되었다고 보고하였다(p<0.05). 이 연구에서는 간장 갈색물질의 항돌연변이 활성은 밝혔지만 그 물질을 분리하여 동정하지는 못하였다.

박 등(28)은 재래식 된장에 AFB₁에 의해 유도되는 돌연변이유발성을 억제하는 효과가 있음을 밝혔다. 된장의 methanol추출물이 AFB₁에 대한 강력한 항돌연변이성을 나타내었으며, 된장 추출물 50% 농도에서 AFB₁에 의한 돌연변이 유발성은 *Salmonella typhimurium* TA 98과 TA 100으로 mutagenicity test(Ames test)한 결과 완전히 저해된다고 밝혔다. 또한, 재래식 된장이 일본 된장보다 항돌연변이성이 더 뛰어난 것으로 보고하였다.

김 등(29)은 전통장류에서 분리한 *Bacillus licheniformis* SSA3이 tyrosine을 전구체로하여 생산하는 암갈색의 색소가 항돌연변이활성을 가지고 있으며, 이 색소는 melanoidin 및 melanin과는 상이한 물질인 것으로 추정하였다. 홍 등(30)은 된장, 간장, 고추장, 청국장 항돌연변이성을 Ames test로 조사하였다. 돌연변이원으로는 *Salmonella typhimurium* TA 98의 diagnostic mutagen인 2-aminofluorene(2-AF), 식품이 곰팡이에 오염될 때 생성될 수 있는 mycotoxin으로 발암성을 지니는 aflatoxin B₁(AFB₁), 식품의 요리과정에서 생성되는 aminopyridine이나 amino-N-methyl imidazole 같은 아미노산 열분해물이 함유되어 있는 태운 삼치의 methanol 추출물을 사용하였다. 된장은 세가지 돌연변이원에 대하여 각각 79, 65, 68%의 항돌연변이성을 보여 돌연변이 억제효과가 가장 컸으며, 고추장, 간장 순으로 돌연변이 억제효과가 있다고 밝혔다.

나. 항산화 효과

Polyphenol성 화합물인 대두 isoflavones의 항산화 특성에 대한 연구는 1960년대 이후 여러 연구팀에 의해 진행되어져 왔다. Hammerschmidt와 Pratt(2)는 건조한 대두로부터 β -carotene/ linoleic acid coupled oxidation 시스템을 이용하여 항산화 물질을 추적하였다. 그 결과, 대두의 메탄올 추출물이 높은 항산화 효과를 보이는 것을 확인하였고, 이를 TLC, paper chromatography, Sephadex column chromatography등으로 분리하여 isoflavone pentoside임을 밝혔다. 이후 Pratt과 Birac(3)은 대두 및 대두 가공 식품의 항산화 특성은 일차적으로 isoflavone, chlorogenic acid isomers, caffeic acid, ferulic acid 등으로 구성된 polyphenol 화합물에서 기인한다고 밝혔다.

또한, Pratt 등(4)은 대두단백 가수분해물에서 항산화 효과를 나타내는 genistein, daidzein, glycitein 등의 isoflavone과 caffeic, ferulic, *p*-coumaric, syringic, vanillic, gentistic, *p*-hydroxybenzoic acid 등의 phenol성 화합물을 TLC, GLC, UV spectra, MS로 분리 확인하였다.

대두, 탈지대두분말, 농축대두단백 등에서 분리된 isoflavone이 대부분 배당체를 형성하고 있는 반면, 대두단백 가수분해물은 aglycone 형태의 isoflavone이 주류를 이루었다. 이는 대두단백 가수분해물 제조 공정에서 glucose가 배당체에서부터 분해되기 때문이라고 추측된다.

Murakami 등(5)은 대두 발효식품인 Temph의 높은 산화안정성에 대해 연구하여 대두 발효과정에서 β -glucosidase의 작용으로 isoflavone이 유리됨을 HPLC, GC/MS 를 통하여 확인하였고, 이들이 항산화 효과를 나타내는 주요한 물질이라고 발표하였다. Esaki 등(6)은 일본 대두 발효식품인 Natto의 항산화 특성을 증자한 대두와 비교 연구하였다. 천연 항산화제인 tocopherols과 isoflavone을 HPLC로 분석해본 결과 Natto와 증자한 대두 사이에는 그 함량의 차이가 나타나지 않았지만, natto의 경우 발효과정을 통하

여 항산화 물질로 추정되는 분획을 얻어 성분을 확인하는 연구를 진행하고 있다고 한다.

일반적으로 항산화 물질들은 radical scavenger, peroxide decomposer, singlet oxygen quencher, enzyme inhibitor, synergist(metal chelating, reducing agent)등의 기능적 특성을 지닌 것으로 알려져 있다. 또한, 항산화 물질들은 free radical을 제거하므로, 이들에 의한 지질, 단백질, 세포막 및 DNA의 손상을 방지하여 발암성을 억제할 것으로 추정되고 있다.

최 등(25, 26)은 양조간장 농축액에서 갈색도가 높은 melanoidin related products(MRPs)를 분획하여 그 항산화 작용특성을 밝혔다. MRPs는 첨가농도의 증가(갈색도의 증가)에 따라 과산화물의 생성 억제능이 높았고, free radical scavenger로서의 능력을 가지고 있어 리놀레산 화합물의 산화를 지연시켰으며, 염화제일철에 의하여 촉매된 산화반응에서 synergistic antioxidative effect를 가지는 것으로 나타났다.

다. 항암성

일본 된장(Miso)의 섭취빈도와 위암에 의한 사망률에 대한 역학적 조사가 일본에서 실시되었다(7). 전국을 대상으로 6개현 29개 보건소 관내의 40세 이상 성인 남녀 265,119명(남 122,262명, 여 142,857명)을 대상으로 1966년부터 13년간 관찰하여 일본 된장국의 섭취빈도별 위암에 의한 연령 표준화 사망률을 계산하였다. 남자의 경우 10만명당 매일 일본된장국을 먹은 사람은 171.9명, 가끔 먹은 사람은 210.2명, 드물게 먹은 사람은 240.0명, 전혀 먹지 않은 사람은 255.9명으로 0.001%이하의 위험률에서 일본된장국의 섭취빈도가 높을수록 위암에 의한 사망률이 저하되었다. 여자의 경우 매일 먹은 사람은 77.8명, 가끔 먹은 사람은 85.3명, 드물게 먹은 사람은 97.5명, 전혀 먹

지 않은 사람은 113.6명으로 1% 이하의 위험률에서 일본된장국 섭취빈도가 높을수록 위암에 의한 사망률이 저하되었다. 이러한 경향은 연령별, 사회계층별, 지역별로 검토하여도 차이가 없었다. 또한, 일본 된장국을 매일 먹은 사람은 모든 종류의 암, 동맥경화성 심장질환, 고혈압, 위십이지장 궤양, 간경변 등에 의한 사망률 모두가 낮은 것으로 나타났다.

Benjamin 등(8, 9)은 일본 간장을 생쥐에 투여할 경우 benzo(a) pyrene에 의해 유도되는 생쥐의 전위 종양을 억제한다고 보고하였다. 그 후, Nagahara 등(10)은 일본간장의 주요 향미 성분인 4-hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone(HEMF)이 benzo(a) pyrene에 의해 유도되는 생쥐의 전위 종양을 억제한다고 보고하였다. HEMF는 4mg/kg체중으로 생쥐에 투여할 경우 종양을 유효하게 억제하는 것으로 나타났다. HEMF는 일본 간장에 230 ppm으로 존재하며(11), 생쥐에게 25 ppm 수준으로 투여할 경우 전위종양 발생수를 충분히 감소시킨다고 한다. 한편 일본된장은 방사선에 의해 유발되는 위암과 간암의 발생을 억제한다고 보고된 바 있다(12).

대두 isoflavone, 특히 genistein의 항암작용에 대한 연구는 매우 활발하게 진행되고 있다. 대두 genistin, daidzin과 그들의 aglucone, coumestrol 등은 estrogen 활성이 있어 phytoestrogen이라고 불려진다(13).

Tyrosine-specific protein kinase활성은 retroviral src 유전자에 의한 oncogene생산물과 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다. 이 kinase 활성은 retrovirus가 세포를 형질전환 시킬 수 있는 능력과 강한 상관관계를 가지고 있다. 또한 kinase 활성은 EGF(epidermal growth factor), platelet-derived growth factor, insulin, insulin-like growth factor I과 관련되어 있으므로 tyrosin phosphorylation이 세포분화와 세포형질변환에 중요한 역할을 하고 있는 것으로 추정되고 있다. Akiyama 등(14)은 genistein이 EGF 수용체인 pp69^{v-src}, pp110^{gag-fes}의 tyrosine-specific protein kinase를 선택적으로

저해한다고 발표하였다. Genistein은 ATP와는 competitive하고, phosphate 수용체인 H2B와는 noncompetitive한 저해관계를 가지는 것으로 밝혀졌다. 그러나, genistein은 cAMP-dependent protein kinase, phosphorylase kinase, Ca⁺⁺/phospholipid-dependent enzyme kinase C와 같이 serine이나 threonine에 특이적인 protein kinase는 저해하지 않는 것으로 밝혀졌다. A431 배양세포를 대상으로 genistein을 처리하였을 때 EGF-수용체의 phosphorylation이 영향을 받아 EGF에 의해 촉진되는 serine, threonine, tyrosine phosphorylation이 감소된 것으로 나타났으며, 이 세포 단백질의 총 phosphoamino산을 분석한 결과 phosphotyrosine농도가 낮은 것으로 밝혀졌다.

Okura 등(15)은 genistein이 topoisomerase I, II를 저해하고, *ras*-transformed NIH 3T3(EJ)세포의 성장을 억제하지만 정상적인 NIH 3T3세포에 대해서는 억제효과를 나타내지 않는다고 밝혔다. Genistein은 10 µg/ml의 농도에서 *ras* 유전자에 의한 NIH 3T3 세포의 형질전환을 완전히 억제하였으나, genistein과 같이 tyrosine-specific protein kinase활성을 가지고 있는 TLCK(N-α-tosyl-L-lysyl-chloromethyl-ketone)는 동일한 농도에서 전혀 억제효과를 보이지 않았다. Genistein은 10µg/ml의 농도에서 형질변환된 EJ세포 성장을 억제하였지만 정상세포인 NIH 3T3세포의 성장에는 영향을 미치지 않았다. 그러나, TLPK는 이와 반대로 30µg/ml의 농도에서 정상세포인 NIH 3T3의 성장을 억제한 반면, 형질변환 세포인 EJ의 성장에는 영향을 미치지 않았다. Anthracycline계 항생물질, etoposide, 4'-(9-acridinyl-amino)-methanesulfon-m-aniside 등의 많은 암 치료제들은 topoisomerase II-DNA 복합체를 고정하는 기능을 가지고 있는 것으로 알려져 있는데 genistein의 경우도 이 복합체의 양을 증가시키는 것으로 나타났다. 또한, genistein은 다른 항암제에 비하여 세포독성이 매우 약하며, topoisomerase II뿐만 아니라 topoisomerase I에도 영향을 미치는 것으로 밝혀졌다. 이러한

결과로 볼 때 genistein은 다른 topoisomerase 저해제와는 다른 작용기작을 가지는 것으로 여겨지는데, 이에 대한 연구는 앞으로 더 진행되어야 할 필요가 있다.

쥐를 대상으로 한 유방암 발생률 비교실험에서 대두를 섭취한 쥐가 대두와 총질소함량과 칼로리량이 같은 사료를 섭취한 쥐에 비하여 N-methyl-nitrosourea와 7,12-dimethylbenz [a]anthracene에 의하여 유발되는 유방암 발생비율이 더 낮다는 결과가 발표되었다(16). 이는 대두 성분중에 tamoxifen과 같이 estrogen수용체(ER)에 경쟁적으로 결합함으로써 antiestrogen활성을 나타내어 유방암 세포의 성장을 억제하는 genistein, daidzein등의 isoflavone이 존재하기 때문으로 여겨진다. 유방암은 재발될 경우 대부분 ER과 독립적으로 암세포가 성장하기 때문에 유방암을 억제하는 물질은 ER과 관계없이 암세포를 억제하여야 한다. 또한, 암세포에서 multi-drug resistance (MDR)유전자에 의해 생성되어 약제를 세포외로 방출시키는 P-glycoprotein (gp 170; Mw=170 kDa)에 의해서도 영향을 받지 않는것이 바람직하다. Peterson과 Barnes(17)는 genistein, daidzein, biochanin A등의 isoflavone이 유방암 세포주인 MDA-468(ER negative), MCF-7과 MCF-7-D-40(ER positive)의 성장억제효과를 조사한 결과 genistein이 세포주를 강력하게 억제할 때 비하여(IC₅₀=6.5~12.0 µg/ml), biochanin A와 daidzein은 보다 약한 억제효과(IC₅₀=20~34 µg/ml)를 보인다고 보고하였다. 그리고, 이 isoflavone 배당체의 유방암세포 성장억제효과는 거의 없는 것으로 나타났으며(IC₅₀>100 µg/ml), isoflavone이 유방암세포 성장을 억제하는데 ER의 존재유무는 영향을 미치지 않는 것으로 밝혀졌다. 또한, genistein과 biochanin A의 유방암세포 성장억제효과는 MDR 유전자 발현에 의한 gp 170에 의해 감소되지 않는 것으로 나타났다.

Isoflavone의 대두 및 대두가공식품중의 분포를 알기 위해서는 정확한

추출방법과 정량방법이 확립되어야 한다. Coward 등(18)은 미국과 아시아 지역에서 판매되고 있는 대두이용식품중의 isoflavone 배당체와 isoflavone aglycone을 정량하여 비교하였다. 정제 순수도는 melting point를 측정하여 확인하였는데, daidzein 325°C, daidzin 223°C, genistein 297~299°C, genistin 257~258°C로 각각 측정되었다. Mass spectrum에서 이들의 분자량은 genistein 270, genistin 432, daidzein 254, daidzin 416 dalton으로 나타났다. Isoflavone의 최적추출조건을 찾기 위하여 *p*-nitrophenol, estradiol, fluorescein 등을 internal standard로 사용한 결과 fluorescein이 대두가공식품 추출 성분과 HPLC 상 retention index가 확연히 구분되어 가장 적합한 것으로 나타났다. Isoflavone의 대두가공식품중의 함량은 수 mg/g으로 비교적 다량 존재하는 것으로 나타났으며, 이는 Wang 과 Murphy(19, 20)의 연구와 유사한 결과를 보여 주었다.

장류에 항암성에 대한 연구논문은 아직 보고된 바 없으나, 방송매체를 통하여 일부 대학 연구팀에서 장류 추출물의 암세포억제 및 mouse를 이용한 *in vivo* 실험에서 장류의 항암특성에 대하여 알려진 바 있지만, 장류의 매탄을 추출물에 대해서만 그 효과를 확인 하였을 뿐 항암활성 물질을 분리, 동정하는 연구는 시행되지 않았다.

라. 혈압강하 효과

Angiotensin converting enzyme(ACE)는 angiotensin I의 C-말단 dipeptide(His-Leu)를 절단하여 활성형인 angiotensin II로 전환시켜 혈압을 상승시킴과 동시에 생체내에서 혈압 강하 작용을 갖는 bradykinin을 분해한다. 고혈압은 이 분해물을 불활성화시킴으로서 원인이 된다고 하며(42) 이러한 ACE의 작용을 저해함으로써 고혈압의 치료가 가능한 것이다.

ACE의 작용을 저해함으로써 혈압 강하 활성을 갖는 물질로는 단백질 효소 분해물 유래의 peptide가 40여 종이 있다고 보고 되어 있다(43). 특히, 젤라틴을 미생물에서 분비된 효소로 분해한 물질로부터 식품 단백질 유래의 ACE 저해 peptide가 발견된(44) 이후, 다른 식품 단백질에서 ACE 저해 peptide를 찾으려는 연구가 지속적으로 진행되어 왔다(45,46).

1979년 Oshima 등(44)은 collagenase로 젤라틴을 효소 분해하여 아미노산 3개~12개로 이루어진 9종의 peptide를 분리하였다. 우유 casein을 이용한 ACE 저해 peptide도 발견되었다. *Lactobacillus helveticus* 유래 효소로 분해한 α_{s1} -casein과 β -casein은 spontaneously hypertensive rat(SHR)에 경구 투여하였을 때 혈압 강하 활성을 확인하였다(47). *Lactobacillus helveticus* 유래 효소는 C-말단에 대한 어떤 특이성도 없기 때문에 생성된 peptide 역시 C-말단에 다양한 아미노산들이 위치할 수 있으며 따라서 ACE 저해 peptide들이 C-말단에 주로 proline을 가지고 있다는 또다른 가능성을 제시하였다. Nakamura 등은 *Lactobacillus helveticus*와 *Saccharomyces cerevisiae*로 발효시킨 sour milk로부터 Val-Pro-Pro과 Ile-Pro-Pro의 2종의 ACE 저해 peptide를 분리하여 milk 발효조건의 조절을 통하여 ACE 저해 peptide가 풍부한 새로운 기능성 식품의 제조 가능성이 있다는 것을 보고하기도 하였다(48).

이러한 ACE 저해 작용을 갖는 peptide은 어류 단백질에서도 연구된 바 있다. Kohama 등은 참치 근육의 acid extract를 고압 멸균한 후 몇단계의 chromatography를 통하여 Pro-Thr-His-Lys-Trp-Gly-Asp의 peptide를 동정하였다(49). 또한, 젓갈 및 자건품으로서 널리 이용하고 있는 멸치육 단백질을 소화효소인 pepsin으로 가수분해하여 gel chromatography에 의하여 분리하였다. ACE 저해활성이 있는 두 개의 아미노산 조성은 다소 차이가 있었으며, 각각의 분획은 glutamic acid, leucine, lysine과 aspartic acid, th-

reonune의 함량이 많은 것으로 나타났다(46).

ACE 저해 peptide의 경우 분리 및 정제 방법은 일반적인 peptide의 정제 방법과 동일하나 그 원료에 따라 전처리 방법에서 약간의 차이를 보인다. 기존에 보고된 peptide는 대체적인 극성도나 ionic strength 정도를 고려하여 peptide 분리, 정제 조건을 선정하게 되므로 유사한 조건으로 실험들이 진행되어 왔다.

지금까지 ACE 저해 peptide에 대한 연구는 주로 식품에서 직접 용매추출 및 column chromatography에 의한 정제를 하거나(45,50), pepsin, trypsin 등의 단백질 분해 효소로 분해한 후 추출, 정제하여 특성을 파악하는 연구가 있었다(46). 그리고 활성 peptide의 합성에 관한 연구도 일부 수행되었다(43).

마. 기타 생리활성

Naim등(23)은 탈지대두유로부터 isoflavone glycosides를 aluminium oxide chelation, polyamide column chromatography로 분리하여 이들이 전체의 0.25%를 차지하며 이중 99% 이상이 배당체로 존재함을 밝혔다(64% genistin, 23% daidzin, 13% glycitein 7-O- β -glycoside). 또한 isoflavone은 *Trichoderma lignorum*, *Rhizotonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium* spp, *Rhizopus* spp, *Sclerotium rolfsii* 등의 성장을 억제하는 활성을 보유하고 있음을 보고하였다.

Naim등(24)은 대두 isoflavones이 lipoxygenase를 저해하며 항산화 작용을 할 뿐만 아니라 antihemolytic활성도 보유하고 있음을 밝혔다. 양, rat, 토끼의 적혈구를 이용하여 antihemolytic활성을 측정된 결과 isoflavones 중 daidzein이 양의 적혈구에 대하여 가장 높은 억제활성을 보였고, genistein이

rat 적혈구에 대하여 일부 억제활성을 나타내었지만, 토끼 적혈구에 대해서는 어떤 isoflavone도 antihemolytic활성을 보이지 않았다. 이들 isoflavones의 antihemolytic 활성은 isoflavones의 구조에 의해 크게 영향을 받는 것으로 추정된다.

방사능물질(NaI^{131} , Cs^{134})을 $5\mu\text{Ci/g}$ 체중 및 $3.5\mu\text{Ci/g}$ 체중 단위로 마우스 복강에 주입하고 Miso를 사료중 10% 건조중량으로 투여하여 방사능 물질의 체내이동 및 잔존량을 측정한 결과 대조구에 비하여 낮은 것으로 나타났으며, 중성자선에 노출된 마우스의 혈액순환기능저하를 방지함으로써 1차 방사능에 대한 보호효과를 가지는 것으로 보고되었다(21).

위 내시경 피검자를 대상으로 위십이지장궤양 발생빈도를 비교해본 결과 매일 아침 Miso를 섭취하는 사람이 그렇지 않은 사람에 비해서 위십이지장궤양 발생빈도가 낮은 것으로 나타나, 이는 일상적인 미소섭취가 소화기계통 질병예방에 도움이 될 수 있음을 입증하는 자료로 제시되었다(22).

김 등(32)은 우리나라 전통식품인 청국장과 일본의 전통 발효 식품인 Natto로부터 혈전용해 균주를 분리하여 혈전용해능을 조사한 결과를 보고하였다. 청국장에서 분리된 균주중에는 혈전용해능을 나타내지 않는 균주가 다수 포함되어 있으나, Natto로부터 분리한 균주들은 대부분 혈전용해능을 나타내었다. 그러나, 가장 우수한 혈전용해능을 나타내는 균주는 청국장에서 발견되었으며, 그 활성은 1.84 plasmin unit였다고 한다. 이 균주를 형태학적, 생화학적 특성을 조사한 결과 분리균주는 간균으로 운동성이 있고, 호기성(catalase 함유)으로 그람양성의 세균이었으며 포자를 형성하는 것으로 관찰되어 *Bacillus*속에 속하는 미생물로 동정되었다고 밝혔다.

구 등(31)은 된장을 동결건조하여 물과 methanol로 추출하여 장내 주요균의 생육에 미치는 영향을 조사하였다. 된장의 메탄올 추출물에는 *B. bifidum*과 *L. acidophilus* KCTC 3145를 제외한 bifidobacteria와 *lactobacillus*의

생육은 저해하지 않고 *C.perfringens*와 β -glucuronidase를 강력하게 분비하고 있는 *Clostridium sp.*의 생육을 비교적 강력하게 억제하고 있는 것으로 보고되었다. 또한, *C. perfringens*의 생육에 영향을 미치는 인자원을 찾아보고자 된장, 메주 및 대두를 사용하여 균주에 미치는 영향을 조사한 결과 그 인자는 된장, 메주, 콩에 다같이 존재하며 열처리를 하여도 활성을 유지하는 것으로 나타났다. 된장에 존재하고 있는 *C. perfringens* 생육억제인자는 콩 자체에서 유래하는 것으로 추측되었으며, 극성이 다른 여러가지 용매로 분획하였을 때 에틸아세테이트 분획이 활성을 가지는 것으로 보고되었다.

본 연구는 우리 장류의 기능성중 항암특성, 혈압강하, 면역조절작용 등의 주요 생리활성을 규명하여 전통장류의 우수성을 입증하고, 기타 기능성 연구를 위한 기초자료를 마련하며 기능성이 강화된 장류 생산공정을 개발하는데 그 취지가 있다.

2. 연구의 필요성

가. 기술적 측면

■ 장류는 옛부터 우리 식생활에서 주로 조미를 목적으로 널리 애용되어 저온 전통 대두발효식품으로 그 영양적 우수성에 대해서는 이미 널리 알려져 있으나 생체조절기능에 대한 연구는 아직 미미한 실정임.

■ 장류는 주원료인 대두의 단백질, 지방, 탄수화물등이 미생물의 작용으로 분해되어 생성된 분해산물과 발효과정 중에 미생물의 작용이나 갈변반응 등에 의해서 새로이 생성되는 물질들로 구성되어 있으므로 다양한 생리활성을 나타낼 것으로 여겨짐.

■ 국내에서는 장류의 항고혈압, 혈전용해, 항돌연변이 등에 대한 효과를

초보적 단계에서 일부 보고하고 있으나, 장류의 기능성에 대한 체계적이며 집중적인 연구가 되고 있지않은 상태임.

■ 일본의 경우 장류의 항암성에 대한 연구를 진행하여 항암활성물질을 일부 분리하여 그 특성을 규명하는등의 연구를 활발히 진행하고 있으며, 이외에도 혈중콜레스테롤 억제, 방사능에 대한 보호효과등의 생리활성에 대한 연구를 수행하고 있음.

■ 따라서 우리 전통장류에 대한 우수한 생리활성에 대한 연구가 시급한 실정임.

나. 경제·산업적 측면

■ 대두발효식품은 한국, 일본, 중국을 비롯한 동남아시아에서 주로 먹어 왔으나, 최근에는 미국을 비롯한 서구권 국가에서도 영양학적 우수성을 인정하고 소비가 점차 증가하고 있는 추세임.

■ 장류는 조미식품으로 오랜 기간동안 우리 식탁에서 중요한 위치를 차지해 왔으나 최근 젊은층을 중심으로 식생활 패턴이 서구화 되어 국내에서 장류의 소비가 점차 줄어들고 있는 형편임.

■ 전통장류의 영양적 우수성 뿐만 아니라 항암성, 면역조절기능, 장내세균에 대한 영향 등의 우수한 기능성을 발굴, 홍보하여 장류의 소비를 유도할 수 있음.

■ 기능성이 강화된 장류제품을 개발할 경우 건강식품에 대한 선호도가 높은 소비자의 욕구를 충족시키므로 판매량을 증대시키고, 부가가치를 높일 수 있음.

■ 전통장류의 우수한 기능성을 발굴함으로써 일본장류제품의 수입을 대체할 수 있음.

■ 전통장류의 우수성을 홍보하여 대두발효식품에 대한 소비가 점차 증가하고 있는 서구권 국가에 대한 장류수출을 증대시킬 수 있음.

다. 사회·문화적 측면

■ 장류는 우리나라의 대표적인 전통식품의 하나로 전통식품의 계승발전 차원에서 과학적이고 체계적인 연구가 필요함.

■ 전통장류의 기능성을 조사하여 우리 식문화의 우수성을 입증함.

■ 현대인이 안고있는 성인병 등 각종 질병을 예방하는 차원에서 장류의 기능성 연구 및 기능성 장류의 개발이 필요함.

■ 민간요법차원이 아닌 과학적이고 합리적인 연구를 바탕으로 기능성 장류를 개발함으로써 앞으로 건강보조식품의 개발 방향을 제시함.

국내에서 장류에 대한 연구는 영양과 품질에 관한 내용을 중심으로 진행되어 왔으며, 최근에 들어서 일부 연구자들에 의해 장류의 기능성에 대한 연구가 수행되고 있다. 장류에서 항돌연변이성을 가진 색소물질을 생산하는 *Bacillus* 속 미생물을 동정하고, 청국장에서 혈전용해능을 지닌 미생물을 분리하는 등의 연구는 아주 흥미가 있다. 장류의 항암성에 대한 연구는 암세포와 mouse를 이용한 *in vivo* 실험으로 조사되고 있지만, 장류의 메탄올 추출물에 대해서만 그 효과를 볼 뿐이고 항암활성물질에 대한 분리, 동정은 이루어져 있지 않아 장류의 항암성 구명에는 아직 미흡하다고 할 수 있으며, 아울러 이를 활용하여 기능성이 강화된 장류제품을 개발하기가 불가능한 상태이다. 전통장류의 기능성에 대한 연구가 시작단계에 있는 점을 미루어 볼 때 지금까지의 연구결과가 부족하다고 할 수 만은 없고 앞으로 더욱 구체적인 연구의 진행이 필요하리라고 본다.

3. 연구개발 목표 및 내용

가. 연구개발의 목표

본 연구의 목표는 전통 간장, 된장의 항암, 혈압강하 및 면역조절 물질에 대한 기능성을 탐색하여 기능성 물질을 분리, 정제하여 주요 생리활성을 규명하므로서 전통 장류의 우수성을 입증하고 연구결과를 바탕으로 기능이 강화된 장류 제조공정(안)을 제시하고자 한다.

나. 연구개발의 내용

- 전통 간장, 된장의 기능성 물질의 탐색
- 기능성(항암효과, 혈압강하효과, 면역조절효과) 물질의 분리, 정제
- 면역조절물질의 생물학적 특성 및 효과
- 기능성 강화 제조공정(안) 제시

다. 연구개발의 범위

- 전통 간장, 된장의 항암, 혈압강하, 면역조절효과 *in vitro* 측정
- 된장의 기능성(항암효과, 혈압강하효과, 면역조절효과)물질 분획
- 된장분획물의 기능성(항암효과, 혈압강하효과, 면역조절효과) 확인
- 기능성(항암효과, 혈압강하효과, 면역조절효과)물질의 정제
- 면역조절물질의 작용기전 규명
- 면역조절물질의 세포성 면역반응 및 알레르기 면역억제효과
- 기능성 강화 장류 제조공정(안) 설정

제 2 장 항암성 물질 분야

제 1절 서 설

된장, 간장, 고추장, 청국장 등은 조미식품으로 원료에서 유래하는 단백질, 탄수화물, 지방 등의 영양소가 갖추어진 우수한 영양원으로서 오늘날 우리들의 식생활에 없어서는 안될 중요한 식품으로 자리잡고 있다. 또한, 장류는 영양원으로서만 아니라 생체기능성도 보유하고 있는 것으로 알려져 있다. 예를 들면 대두의 protease inhibitor, phytic acid와 isoflavone 등이 항암효과를 나타내며, 청국장에는 혈전 용해효소가 함유되어 있다는 연구결과가 보고되고 있다.

일찌기 장류에 대한 체계적인 연구를 추진해 온 일본은 일본 장류의 생체기능성(항암, 고혈압 방지, 혈중 콜레스테롤 저하 등)을 연구하여 그 특성을 과학적으로 입증하고 있다. 우리 전통장류의 생체기능성에 대하여는 허준이 동의보감에서 “장류가 해독작용을 한다”라고 기록한 것을 찾아 볼 수 있다. 우리 장류의 기능성에 대한 과학적인 연구로는 1980년대에 들어 항산화성, 항돌연변이성, 고혈압방지 등에 대하여 시도된 바 있으나 아직 많은 연구는 진행되어 있지 않다.

오늘날 미국에서는 성인병 예방의 차원에서 식물성 단백질 섭취를 권장하고 있으며, 학교급식과 군용식품에 식물성 단백질 중 대표적인 대두 단백질을 첨가하고 있다. 또한 대두 가공제품 및 대두 발효제품에 대한 관심도 점차 증가하고 있는 추세이다. 이러한 시점에서 우리 전통의 대두 발효식품인 장류의 특성과 생리활성에 대한 체계적인 연구가 절실히 필요하다고 할 수 있다.

장류제품의 기능성에 대한 연구는 일본에서 활발하게 연구해왔으며, 현재 혈압강하효과, 살균효과, 항산화효과, 항암효과, 혈중콜레스테롤 저하효과, 방사능 물질 배제효과, 방사선 유발이상 방제효과 등이 보고되어 있다.

일본 된장(Miso)의 섭취빈도와 위암에 의한 사망률에 대한 역학적 조사가 일본에서 실시되었다(7). 전국을 대상으로 6개현 29개 보건소 관내의 40세 이상 성인 남녀 265,119명(남 122,262명, 여 142,857명)을 대상으로 1966년부터 13년간 관찰하여 일본 된장국의 섭취빈도별 위암에 의한 연령 표준화 사망률을 계산하였다. 남자의 경우 10만명당 매일 일본된장국을 먹은 사람은 171.9명, 가끔 먹은 사람은 210.2명, 드물게 먹은 사람은 240.0명, 전혀 먹지 않은 사람은 255.9명으로 0.001%이하의 위험률에서 일본된장국의 섭취빈도가 높을수록 위암에 의한 사망률이 저하되었다. 여자의 경우 매일 먹은 사람은 77.8명, 가끔 먹은 사람은 85.3명, 드물게 먹은 사람은 97.5명, 전혀 먹지 않은 사람은 113.6명으로 1% 이하의 위험률에서 일본된장국 섭취빈도가 높을수록 위암에 의한 사망률이 저하되었다. 이러한 경향은 연령별, 사회적 층별, 지역별로 검토하여도 차이가 없었다. 또한, 일본 된장국을 매일 먹은 사람은 모든 종류의 암, 동맥경화성 심장질환, 고혈압, 위십이지장 궤양, 간경변 등에 의한 사망률 모두가 낮은 것으로 나타났다.

Benjamin 등(8, 9)은 일본 간장을 생쥐에 투여할 경우 benzo(a) pyrene에 의해 유도되는 생쥐의 전위 종양을 억제한다고 보고하였다. 그 후, Nagahara 등(10)은 일본간장의 주요 향미 성분인 4-hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone(HEMF)이 benzo(a) pyrene에 의해 유도되는 생쥐의 전위 종양을 억제한다고 보고하였다. HEMF는 4mg/kg체중으로 생쥐에 투여할 경우 종양을 유효하게 억제하는 것으로 나타났다. HEMF는 일본 간장에 230 ppm으로 존재하며(11), 생쥐에게 25 ppm 수준으로 투여할 경우 전위종양 발생수를 충분히 감소시킨다고 한다. 한편 일본된장은 방사

선에 의해 유발되는 위암과 간암의 발생을 억제한다고 보고된 바 있다(12).

대두 isoflavone, 특히 genistein의 항암작용에 대한 연구는 매우 활발하게 진행되고 있다. 대두 genistin, daidzin과 그들의 aglucone, coumestrol 등은 estrogen 활성이 있어 phytoestrogen이라고 불려진다(13).

Tyrosine-specific protein kinase활성은 retroviral *src* 유전자에 의한 oncogene생산물과 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다. 이 kinase 활성은 retrovirus가 세포를 형질전환 시킬 수 있는 능력과 강한 상관관계를 가지고 있다. 또한 kinase 활성은 EGF(epidermal growth factor), platelet-derived growth factor, insulin, insulin-like growth factor I과 관련되어 있으므로 tyrosin phosphorylation이 세포분화와 세포형질변환에 중요한 역할을 하고 있는 것으로 추정되고 있다. Akiyama 등(14)은 genistein이 EGF수용체인 pp69^{v-src}, pp110^{gag-fes}의 tyrosine-specific protein kinase를 선택적으로 저해한다고 발표하였다. Genistein은 ATP와는 competitive하고, phosphate수용체인 H2B와는 noncompetitive한 저해관계를 가지는 것으로 밝혀졌다. 그러나, genistein은 cAMP-dependent protein kinase, phosphorylase kinase, Ca⁺⁺/phospholipid-dependent enzyme kinase C와 같이 serine이나 threonine에 특이적인 protein kinase는 저해하지 않는 것으로 밝혀졌다. A431 배양세포를 대상으로 genistein을 처리하였을 때 EGF-수용체의 phosphorylation이 영향을 받아 EGF에 의해 촉진되는 serine, threonine, tyrosine phosphorylation이 감소된 것으로 나타났으며, 이 세포 단백질의 총 phosphoamino산을 분석한 결과 phosphotyrosine농도가 낮은 것으로 밝혀졌다.

Okura 등(15)은 genistein이 topoisomerase I, II를 저해하고, *ras*-transformed NIH 3T3(EJ)세포의 성장을 억제하지만 정상적인 NIH 3T3세포에 대해서는 억제효과를 나타내지 않는다고 밝혔다. Genistein은 10 µg/ml의 농도에서 *ras* 유전자에 의한 NIH 3T3 세포의 형질전환을 완전히 억제하였으

나, genistein과 같이 tyrosine-specific protein kinase활성을 가지고 있는 TLCK(N-a-tosyl-L-lysyl-chloromethyl-ketone)는 동일한 농도에서 전혀 억제효과를 보이지 않았다. Genistein은 10 μ g/ml의 농도에서 형질변환된 EJ세포 성장을 억제하였지만 정상세포인 NIH 3T3세포의 성장에는 영향을 미치지 않았다. 그러나, TLPK는 이와 반대로 30 μ g/ml의 농도에서 정상세포인 NIH 3T3의 성장을 억제한 반면, 형질변환 세포인 EJ의 성장에는 영향을 미치지 않았다. Anthracycline계 항생물질, etoposide, 4'-(9-acridinyl-amino)-methanesulfon-m-aniside 등의 많은 암 치료제들은 topoisomerase II-DNA 복합체를 고정하는 기능을 가지고 있는 것으로 알려져 있는데 genistein의 경우도 이 복합체의 양을 증가시키는 것으로 나타났다. 또한, genistein은 다른 항암제에 비하여 세포독성이 매우 약하며, topoisomerase II뿐만 아니라 topoisomerase I에도 영향을 미치는 것으로 밝혀졌다. 이러한 결과로 볼 때 genistein은 다른 topoisomerase 저해제와는 다른 작용기작을 가지는 것으로 여겨지는데, 이에 대한 연구는 앞으로 더 진행되어야 할 필요가 있다.

쥐를 대상으로 한 유방암 발생률 비교실험에서 대두를 섭취한 쥐가 대두와 총질소함량과 칼로리량이 같은 사료를 섭취한 쥐에 비하여 N-methylnitrosourea와 7,12-dimethylbenz [a]anthracene에 의하여 유발되는 유방암 발생비율이 더 낮다는 결과가 발표되었다(16). 이는 대두 성분중에 tamoxifen과 같이 estrogen수용체(ER)에 경쟁적으로 결합함으로써 antiestrogen활성을 나타내어 유방암 세포의 성장을 억제하는 genistein, daidzein등의 isoflavone이 존재하기 때문으로 여겨진다. 유방암은 재발될 경우 대부분 ER과 독립적으로 암세포가 성장하기 때문에 유방암을 억제하는 물질은 ER과 관계없이 암세포를 억제하여야 한다. 또한, 암세포에서 multi-drug resistance (MDR)유전자에 의해 생성되어 약제를 세포외로 방출시키는 P-glycoprotein

(gp 170; Mw=170 kDa)에 의해서도 영향을 받지 않는것이 바람직하다. Peterson과 Barnes(17)는 genistein, daidzein, biochanin A 등의 isoflavone이 유방암 세포주인 MDA-468(ER negative), MCF-7과 MCF-7-D-40(ER positive)의 성장억제효과를 조사한 결과 genistein이 세포주를 강력하게 억제하는데 비하여(IC₅₀=6.5~12.0 µg/ml), biochanin A와 daidzein은 보다 약한 억제효과(IC₅₀=20~34 µg/ml)를 보인다고 보고하였다. 그리고, 이 isoflavone 배당체의 유방암세포 성장억제효과는 거의 없는 것으로 나타났으며(IC₅₀>100 µg/ml), isoflavone이 유방암세포 성장을 억제하는데 ER의 존재유무는 영향을 미치지 않는 것으로 밝혀졌다. 또한, genistein과 biochanin A의 유방암세포 성장억제효과는 MDR 유전자 발현에 의한 gp 170에 의해 감소되지 않는 것으로 나타났다.

Isoflavone의 대두 및 대두가공식품중의 분포를 알기 위해서는 정확한 추출방법과 정량방법이 확립되어야 한다. Coward 등(18)은 미국과 아시아 지역에서 판매되고 있는 대두이용식품중의 isoflavone 배당체와 isoflavone aglycone을 정량하여 비교하였다. 정제 순수도는 melting point를 측정하여 확인하였는데, daidzein 325°C, daidzin 223°C, genistein 297~299°C, genistin 257~258°C로 각각 측정되었다. Mass spectrum에서 이들의 분자량은 genistein 270, genistin 432, daidzein 254, daidzin 416 dalton으로 나타났다. Isoflavone의 최적추출조건을 찾기 위하여 *p*-nitrophenol, estradiol, fluorescein 등을 internal standard로 사용한 결과 fluorescein이 대두가공식품 추출 성분과 HPLC 상 retention index가 확연히 구분되어 가장 적합한 것으로 나타났다. Isoflavone의 대두가공식품중의 함량은 수 mg/g으로 비교적 다량 존재하는 것으로 나타났으며, 이는 Wang 과 Murphy(19, 20)의 연구와 유사한 결과를 보여 주었다.

우리나라 전통장류의 항암성에 대한 연구논문은 아직 보고된 바 없으

나, 방송매체를 통하여 일부 대학 연구팀에서 장류 추출물의 암세포억제 및 mouse를 이용한 *in vivo* 실험에서 장류의 항암특성에 대하여 알려진 바 있지만, 장류의 메탄올 추출물에 대해서만 그 효과를 확인 하였을 뿐 항암활성 물질을 분리, 동정하는 연구는 시행되지 않았다.

제 2절 재료 및 방법

1. 재료

가. 시료

된장은 전라북도 순창에 소재한 농림수산부 지정 전통식품업체인 [순창술 전통식품]에서 제조한 것을 구입하여 -20℃에서 보관하면서 사용하였다.

나. 시약

시료의 추출에 이용한 유기용매로는 메탄올, 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 등으로서 특급이상을 사용하였다. HPLC 분석에 이용되는 아세트나이트릴과 물은 HPLC용으로 제조된 것을 사용하였고, Genistein, Daidzein, Glystein 등은 미국의 Sigma회사로부터 구입하여 사용하였다.

2. 암세포주 및 세포배양 재료

가. 사용시약 및 기기

세포배양을 위해 RPMI 1640 medium, fetal bovine serum(FBS)등은 Life Technologies Inc.(U.S.A)에서 구입하였다. 그리고 0.05% trypsin - 0.02% EDTA, 100units/ml penicillin streptomycin, 20 mM Hepes buffer는 GIBCO(U.S.A)사로 부터 구입하여 사용하였다. 세포배양은 CO₂ incubator를 이용하여 실험하였다. Cytotoxicity측정을 위한 3-(4,5-dimethylthiazol-2-y1)2,5-diphenyl tetra zolium bromide(MTT)는 Aldrich Chem. Co.(U.S.A)에서 구입하였다.

나. 실험에 사용된 세포

In vitro 항암실험을 위해 사용된 세포주는 한국세포주은행에서 구입하였으며 그 특성은 Table 1과 같다. 암세포주로는 마우스에서 유래한 L1210, P338D1을 사용하였고, 인체에서 유래한 HepG2, WiDr, SNU-1을 실험에 이용하였다. 그리고 정상세포로는 마우스의 정상세포인 NIH/3T3를 분양받아 사용하였다.

Table 1. Charateristics of cell lines used experiment

Name	ATTC NO.	KCLB No.
HepG2(hepatocellular carcinoma, human)	ATCC HB-8065	
L1210(lympocitic leukemia, mouse)	ATCC CCL-219	
P338D1(lympoid neoplasm, mouse)	ATCC CCL-21	
WiDr(colon adenocarcinoma, human)	ATCC CCL-218	
SNU-1(stomach carcinoma, human)		KCLB 0001
NIH/3T3(embryo, swiss mouse)	ATCC CCL-1658	

3. 시료의 추출 및 조제

시료의 추출은 물 또는 메탄올을 사용하여 1차 추출을 실시하였다. 시료에 물 또는 메탄올을 10배(v/w) 첨가하여 믹서기로 잘 마쇄하고 7시간씩 3번 추출하였고, 메탄올 추출후 잔유물을 유기용매 헥산, 클로로포름, 에틸 아세테이트, 부탄올 등을 사용하여 메탄올과 마찬가지로 방법으로 3회씩 추출하였다(Fig. 1). 추출액들은 회전식 진공 농축기 (Buchi 4161, Switzerland)를 이용하여 감압농축한 후 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹여서 암세포 증식 억제 실험 및 High Performance Liquid Chromatography(HPLC), Gas Chromatography(GC) 실험에 이용하였다.

4. 세포배양

암세포 HepG2, WiDr과 정상세포 NIH/3T3 등 부착형 세포의 배양은 100 units/ml의 penicillin-streptomycin과 10%의 FBS가 함유된 RPMI 1640을 사용하여 37°C, 5%CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양된 각 각의 암세포는 일주일에 2~3회 refeeding하고 6~7일 만에 PBS로 세척한 후 0.05% trypsin-0.02% EDTA로 부착된 세포를 분리하여 원심분리한 후 집적된 암세포에 배지를 넣고 피펫으로 암세포가 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 75 ml cell culture flask에 5ml씩 일정수 분할하여 주입하고 계속 6~7일 마다 계대 배양하면서 실험에 사용하였다. L1210, P338D1, SNU-1등의 부유형 세포는 위와 같은 과정으로 배양하며 단 0.05% trypsin-0.02% EDTA로 분리하는 과정은 거치지 않았다.

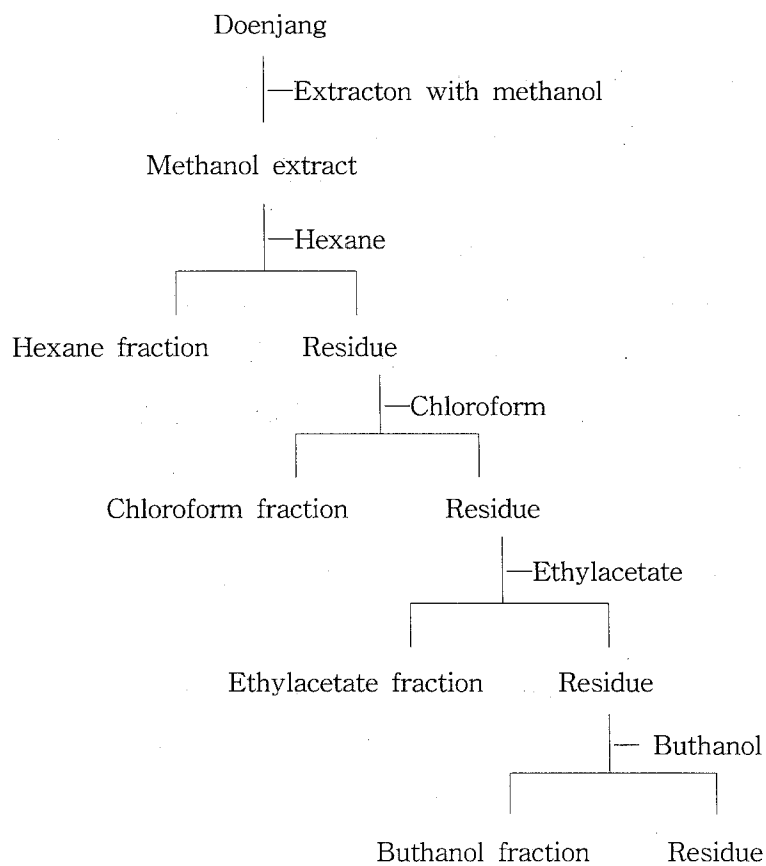


Fig. 1. The procedure for the solvent fractionation of *Doenjang*

5. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT)

Assay에 의한 저해효과

동물세포에 대한 시료의 암세포 성장저해효과를 측정하기 위하여 Carmichael 등의 방법에 따라 MTT Assay를 실시하였다. 동물세포를 96 well plate에 1×10^4 cell/well이 되게 $180 \mu\text{l}$ 분주하고 시료를 일정농도로 제조하여 $20 \mu\text{l}$ 를 첨가하여 37°C , 5% CO_2 incubator에서 96시간 배양하였다(L1210, P338D1 cell은 48시간 배양). 여기에 인산생리 식염수 5mg/ml로 제조한 MTT 용액 $20 \mu\text{l}$ 를 첨가하고 다시 위와 같은 배양조건에서 4시간 더 배양하였다. 이것을 2000rpm에서 10분간 원심분리하여 상정액을 제거하고 각 well 당 DMSO $150 \mu\text{l}$ 를 가하여 30분간 교반한 후 ELISA reader(Molecular Device. Co.)로 550nm에서 흡광도를 측정하여 다음과 같이 Cytotoxicity를 구하여 세포성장 억제효과의 지표로 하였다(Fig. 2)

대조구의 흡광도 - 시료처리구의 흡광도

$$\text{Cytotoxicity} = \frac{\text{대조구의 흡광도} - \text{시료처리구의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}} \times 100$$

6. 암세포 증식억제 실험

암세포 배양과 동일한 방법으로 배양하되 부착세포인 HepG2, WiDr 암세포를 원심 분리한 후 집적된 암세포를 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 24 well plate에 20,000 cells/ml의 농도로 seeding하여 하룻밤 배양하고 암세포가 plate에 부착되었음을 확인한 후, 10% FBS가 있는 배지에 시료를 첨가

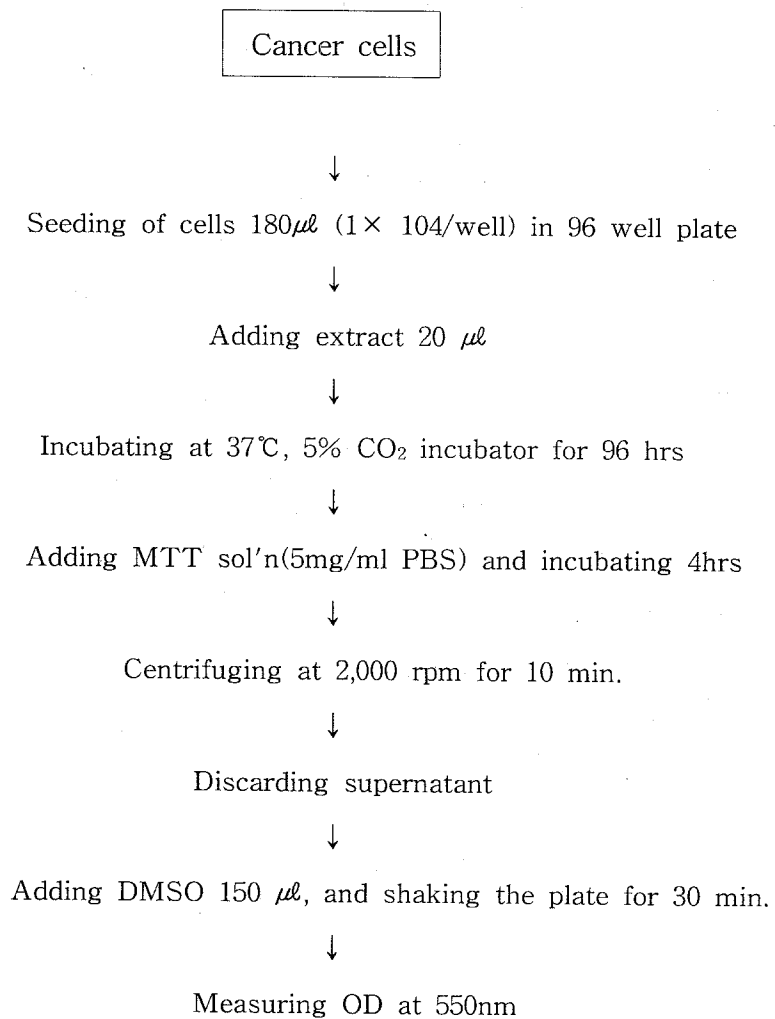


Fig.2. A schematic diagram for the test of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2, 5-diphenyl tetra zolium bromide(MTT)

하여 이틀에 한번씩 배양을 교체하면서 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 시료는 2일마다 10 μ l/ml medium씩 농도별로 첨가한 새로운 배지로 교체하여 배양 6일 후에 증식된 세포를 0.05% trypsin-0.02% EDTA 효소로 분리하여 각 세포수를 hemacytometer로 측정하여 대조군과 비교하여 암세포 증식억제효과를 관찰하였다(Fig. 3)

7. 정상세포 성장 억제 실험

암세포 배양과 동일한 방법으로 정상세포를 원심 분리한 후 집적된 세포를 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 24 well plate에 20,000 cells/ml의 농도로 seeding하여 하룻밤 배양하였다. 정상세포가 plate에 부착되었음을 확인한 후, 10% FBS가 있는 배지에 시료를 첨가하여 이틀에 한번씩 배양을 교체하면서 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 2일마다 한번씩 시료가 들어있는 배지로 교체하여 8~9일 후에 증식된 세포를 0.05% trypsin-0.02% EDTA 효소로 분리하여 각 세포수를 hemacytometer로 계수하였다.

8. High Performance Liquid Chromatograph (HPLC)에 의한 활성성분 분리 및 동정

앞에서 추출 분리한 획분들을 Table 2와 같은 조건에서 HPLC를 이용하여 분석하였고, genistein, glystein, daidzein등 함량을 측정하였다. 함량 측정은 각각의 표준물질을 사용하였고, HPLC 분석을 실시하여 peak 면적을 환산하여 함량을 계산하였다.

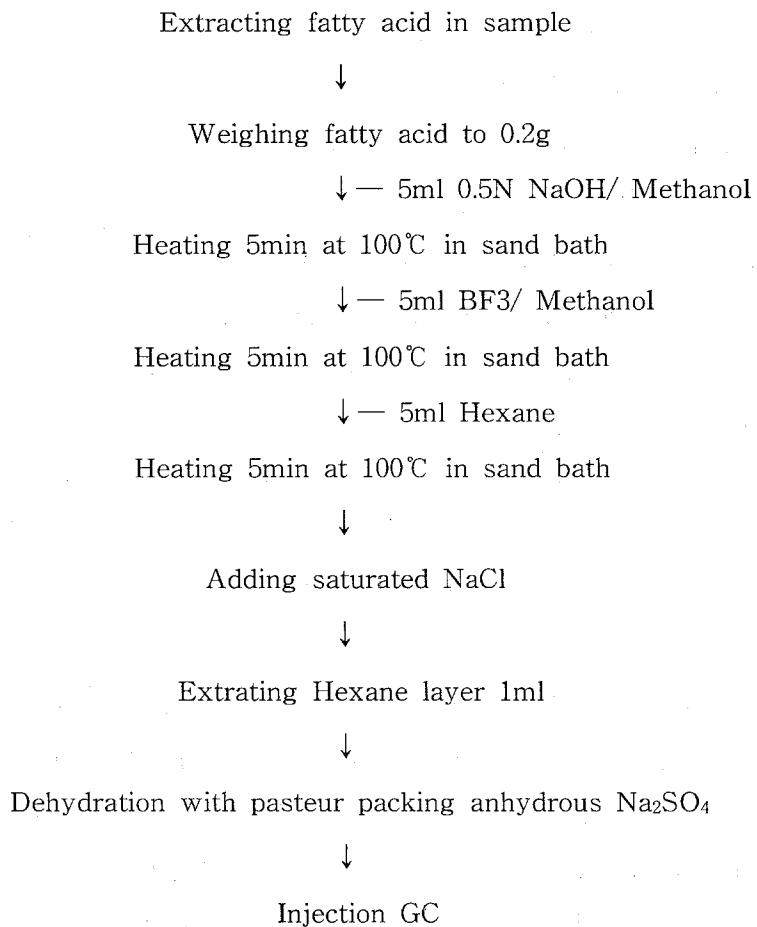


Fig. 3. A shematic diagram for the GC.

Table 2. The operation condition of HPLC for the analysis of ethylacetate fraction.

Instrument	: Pu-987 dual pump system
Column	: 3.9×300 mm μ Bondapak C18 colmn
Detector	: UV-975 detector (254nm)
Mobile phase	: A [95:5 (v/v) water : acetic acid] B [95:5 (v/v) metanol : acetic acid]
Flow rate	: 1.0ml/min

9. GC 에 의한 지방산 함량의 측정

된장에서 추출한 지방을 일정량을 취해서 0.5N NaOH/MeOH, BF₃ 등을 차례로 가해 모래상자에서 반응시켰다. 여기에 Hexane을 가하여 진탕, 방치한 후 헥산층을 취하여 무수 Na₂SO₄로 탈수처리 하였다. 이렇게 준비된 시료를 사용하여 GC 분석을 하였으며 분석조건을 Table 3과 같다. 분석된 결과는 면적 백분비법(Area %)를 이용하여 그 함량을 계산하였다.

Table 3. The operation condition of GC for the analysis of non-volatile fatty acids

Instrument	: Hewlett packard GC Model 5890
Column	: Supelcowax 10, 0.33mm x 30m
Oven Temp.	: 160°C (hold, 1min), 3°C/min, 220°C (hold, 10min)
Carrier gas	: Helium, 12psi
Make-up gas	: N ₂ gas
Detector	: Flame Ionization Detector
Injector Temp.	: 230°C
Detector Temp.	: 250°C

제 3절 결과 및 고찰

1. 시료의 추출

된장의 항암성 물질을 탐색하기 위하여 시료 된장을 먼저 물, 메탄올과 헥산으로 추출한 결과 Table 4와 같이 된장 물추출물은 14.9%의 추출율을 보였으며 메탄올추출물은 10%의 비교적 높은 추출율을 보였으나 헥산추출물은 1.2%의 낮은 추출율을 나타내었다. 된장의 메탄올추출물을 극성

Table 4. Recovery of water, methanol, hexane extracts from *Doenjang*

	Recovery (%)
Water	14.9
Methanol	10.0
Hexane	1.2

이 다른 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 등의 용매로 추출, 분획한 결과는 Table 5와 같았다. 메탄올의 경우 시료 된장 400g중 40g이 회수되어 10%의 회수율을 보였고, 나머지 분획물은 메탄올 추출물 40g에서 얻은 것으로서 이중 에틸아세테이트 분획물은 그 회수율이 0.21g으로 가장 적은 양이 분획되었다.

Table 5. Recovery of methanol, hexane, chloroform, ethylacetate, buthanol from *Doenjang*

Solvent	Recovery (g)
Methanol	40*
Hexane	5.05**
Chloroform	0.60
Ethylacetate	0.21
Buthanol	3.85

* from *Doenjang* 400g

** from *Doenjang* methanol extract 40g

2. 된장 메탄올 추출물 및 분획물의 항암효과

된장 메탄올 추출물 및 분획물이 암세포 성장에 미치는 효과를 시험하기 위하여 항암성 *in vitro*검색에 필요한 세포주, P338D1(lympoid neoplasm, mouse), L1210(lympocytic leukemia, mouse), HepG2(hepatocellular carcinoma, human), WiDr(colon adenocarcinoma, human), SNU-1(stomach carcinoma, human)를 한국세포주은행에서 구입하여 MTT assay에 의한 억제 효과와 암세포 증식억제효과를 측정하였다.

가. MTT assay에 의한 억제효과

Mouse lymphoid neoplasm인 P338D1 세포를 이용하여 실험한 결과, 처리농도 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 메탄올 추출물은 75%의 암세포 억제효과를 보였고, 헥산 분획물 역시 76%의 암세포 억제효과를 나타냈다. 클로로포름 분획물의 경우는 36%의 억제효과를 가졌고, 에틸아세테이트 분획물의 경우는 75%의 저해효과를 나타냈으며 부탄올 분획물의 경우 29%로 가장 낮은 저해효과를 보였다(Table 6). 된장을 여러 가지 용매를 사용하여 추출했을 때 디클로로메탄 분획물에서 가장 높은 암세포 저해효과를 얻을 수 있었다는 임(38)의 결과와는 다소 차이가 있으나, 이것은 시료처리 초기단계에서 헥산 처리를 먼저 실시한 후 분획과 추출의 과정을 거쳤다는 점이 본 실험과 달라서 나온 결과로 생각되었다. 된장 메탄올추출물을 농도별로 P338D1 세포에 처리하였을 때 세포의 형태변화를 관찰한 결과, Fig. 4에 나타난 바와 같이 처리농도가 증가할수록 P338D1의 세포형태가 점차 변형되는 것을 확인하였다.

Table 6. Inhibitory effect of the solvent fractionated samples(500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) from methanol extracts of *Doenjang* on the growth of P338D1 cells in MTT assay

Sample	OD ₅₅₀	Inhibition rate (%)
Control	1.153 \pm 0.05	
Methanol extract	0.260 \pm 0.01	75
Hexane fraction	0.251 \pm 0.01	76
Chloroform fraction	0.657 \pm 0.009	40
Ethylacetate fraction	0.255 \pm 0.035	75
Buthanol fraction	0.729 \pm 0.019	29

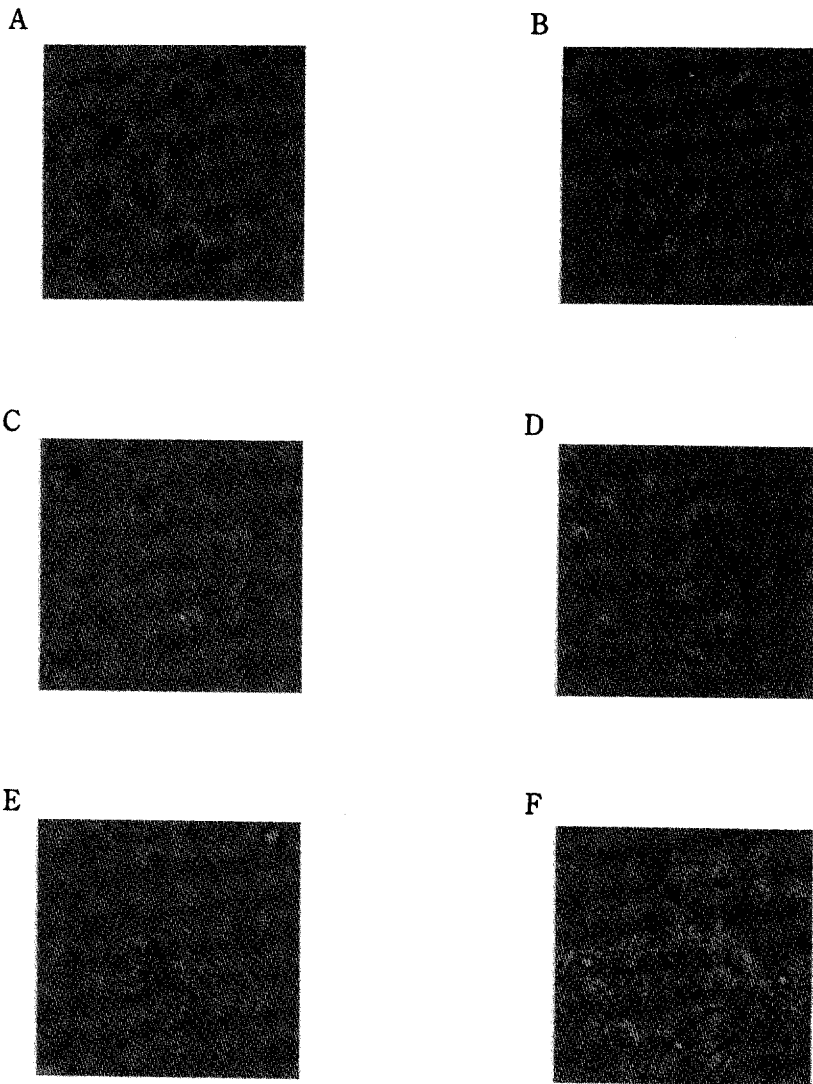


Fig. 4. Morphology of P338D1 cells treated with *Doenjang* methanol extract.

A: Control, B: 125µg/ml *Doenjang* methanol extract, C: 250µg/ml *Doenjang* methanol extract, D: 500µg/ml *Doenjang* methanol extract, E: 1mg/ml *Doenjang* methanol extract, F: 2mg/ml *Doenjang* methanol extract

Mouse leukemia인 L1210 세포를 이용하여 실험한 결과, 처리농도 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 메탄올 추출물은 79%의 암세포 억제효과를 보였고, 헥산 분획물 역시 79%의 암세포 억제효과를 나타냈다. 클로로포름 분획물의 경우는 47%의 억제효과를 가졌고, 에틸아세테이트 분획물의 경우는 81%의 저해효과를 나타냈으며 부탄올 분획물의 경우 39%로 가장 낮은 저해효과를 보였다 (Table 7).

Table 7. Inhibitory effect of the solvent fractionated samples(500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) from methanol extracts of *Doenjang* on the growth of L1210 cells in MTT assay

Sample	OD ₅₅₀	Inhibition rate (%)
Control	1.153 \pm 0.05	
Methanol extract	0.260 \pm 0.01	75
Hexane fraction	0.251 \pm 0.01	76
Chloroform fraction	0.657 \pm 0.009	40
Ethylacetate fraction	0.255 \pm 0.035	75
Buthanol fraction	0.729 \pm 0.019	29

Human hepatocellular carcinoma인 HepG2 세포를 이용하여 실험한 결과 처리농도 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 메탄올 추출물은 73%의 암세포 억제효과를 보였고, 헥산 분획물 역시 75%의 암세포 억제효과를 나타냈다. 클로로포름 분획물의 경우는 41%의 억제효과를 가졌고, 에틸아세테이트 분획물의 경우는

77%의 저해효과를 나타냈으며 부탄올 분획물의 경우 28%로 가장 낮은 저해효과를 보였다(Table 8).

Table 8. Inhibitory effect of the solvent fractionated samples(500 μ g/ml) from methanol extracts of *Doenjang* on the growth of HepG2 cells in MTT assay

Sample	OD ₅₅₀	Inhibition rate (%)
Control	1.153 \pm 0.05	
Methanol extract	0.240 \pm 0.01	79
Hexane fraction	0.237 \pm 0.013	79
Chloroform fraction	0.601 \pm 0.004	47
Ethylacetate fraction	0.220 \pm 0.019	81
Buthanol fraction	0.709 \pm 0.018	39

Human colon adenocarcinoma인 WiDr 세포를 이용하여 실험한 결과 처리농도 500 μ g/ml에서 메탄올 추출물은 76%의 암세포 억제효과를 보였고, 헥산 분획물 역시 80%의 암세포 억제효과를 나타냈다. 클로로포름 분획물의 경우는 46%의 억제효과를 가졌고, 에틸아세테이트 분획물의 경우는 82%의 저해효과를 나타냈으며 부탄올 분획물의 경우 39%로 가장 낮은 저해효과를 보였다(Table 9).

Table 9. Inhibitory effect of the solvent fractionated samples(500 μ g/ml) from methanol extracts of *Doenjang* on the growth of WiDr cells in MTT assay

Sample	OD ₅₅₀	Inhibition rate (%)
Control	1.025 \pm 0.075	
Methanol extract	0.278 \pm 0.003	73
Hexane fraction	0.242 \pm 0.008	76
Chloroform fraction	0.607 \pm 0.008	41
Ethylacetate fraction	0.215 \pm 0.010	79
Buthanol fraction	0.729 \pm 0.019	29

Human stomach carcinoma인 SNU-1 세포를 이용하여 실험한 결과, 처리농도 500 μ g/ml에서 메탄올 추출물은 73%의 암세포 억제효과를 보였고, 헥산 분획물 역시 76%의 암세포 억제효과를 나타냈다. 클로로포름 분획물의 경우는 41%의 억제효과를 가졌고, 에틸아세테이트 분획물의 경우는 79%의 저해효과를 나타냈으며 부탄올 분획물의 경우 29%로 가장 낮은 저해효과를 보였다(Table 10).

이와 같이 5종의 암세포주를 대상으로 MTT assay를 행한 결과, 메탄올 추출물인 헥산 분획물과 에틸아세테이트 분획물에서 비교적 높은 억제효과를 나타내는 것으로 보아 이들 분획물에 암세포 성장을 억제시키는 저해물질이 있음을 알 수 있었다.

Table 10. Inhibitory effect of the solvent fractionated samples(500 μ g/ml) from methanol extracts of *Doenjang* on the growth of SNU-1 cells in MTT assay

Sample	OD ₅₅₀	Inhibition rate (%)
Control	1.090 \pm 0.016	
Methanol extract	0.260 \pm 0.010	76
Hexane fraction	0.240 \pm 0.010	78
Chloroform fraction	0.587 \pm 0.007	46
Ethylacetate fraction	0.200 \pm 0.010	82
Buthanol fraction	0.670 \pm 0.030	39

나. 암세포 증식 억제효과

배양후 생존 암세포를 염색하여 그 저해효과를 알 수 있는 MTT assay와는 달리 배양후에 생존세포를 계수하여 암세포 성장 억제효과를 검토할 수 있는 실험으로 부착형 세포인 HepG2, WiDr 등의 암세포를 이용하여 된장 메탄올 추출물 및 분획물이 암세포 성장에 미치는 효과를 실험하였다. Human hepatocellular carcinoma인 HepG2 세포를 이용하여 실험한 결과 처리농도 500 μ g/ml에서 메탄올 추출물은 65%의 암세포 억제효과를 보였고, 헥산 분획물은 67%의 암세포 억제효과를 나타냈다. 클로로포름 분획물의 경우는 43%의 억제효과를 가졌고, 에틸아세테이트 분획물의 경우는 76%의 저해효과를 나타냈으며 부탄올 분획물의 경우 13%로 가장 낮은 저해효과를 보였다(Fig. 5). 또 다른 부착세포인 Human colon adenocarcinoma

WiDr 세포를 이용하여 실험한 결과 처리농도 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 메탄올 추출물은 61%의 암세포 억제효과를 보였고, 헥산 분획물은 66%의 암세포 억제효과를 나타냈다. 클로로포름 분획물의 경우는 43%의 억제효과를 가졌고, 에틸아세테이트 분획물의 경우는 76%의 저해효과를 나타냈으며 부탄올 분획물의 경우 16%로 가장 낮은 저해효과를 보였다(Fig. 6). 위의 결과는 앞의 MTT assay와도 유사하며 저해 효과가 높은 헥산 분획물과 에틸아세테이트 분획물에 저해 활성물질이 있음을 알 수 있는 결과이다.

다. 정상세포에 대한 효과

앞에 실험한 메탄올 추출물 및 각 분획물이 암세포에만 선택적으로 효과를 지니는지를 알아보기 위해 NIH/3T3 정상세포를 이용하여 정상세포계에서 세포독성효과를 검토하였다. 결과는 Table 11과 같으며 시료농도 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 아무런 독성을 나타내지 않았고 오히려 부탄올 분획물을 제외한 나머지 분획물에서는 대조군에 비해 세포 성장이 증식되었다.

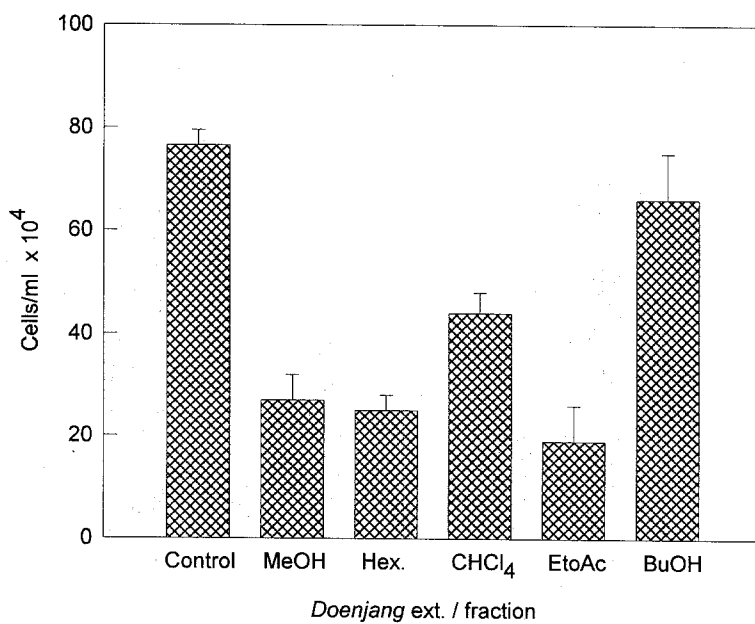


Fig. 5. Inhibitory effect of the solvent fractionated samples from methanol extract of *Doenjang* on the growth of HepG2 human hepatocellular carcinoma cells.

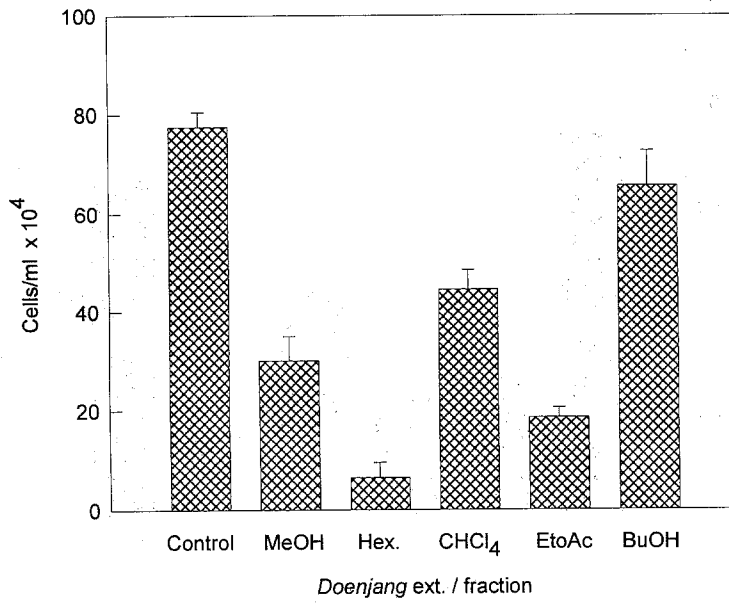


Fig. 6. Inhibitory effect of the solvent fractionated samples from methanol extract of *Doenjang* on the growth of WiDr human colon adenocarcinoma cells.

Table 11. Effect of the solvent fractionated samples(500 μ g/ml) from methanol extracts of *Doenjang* on the growth of NIH/3T3 cells

Sample	Cell number ($\times 10^4$ /ml)
Control	81.5 \pm 2
Methanol extract	83.0 \pm 3
Hexane fraction	85.0 \pm 3
Chloroform fraction	85.0 \pm 4
Ethylacetate fraction	82.5 \pm 5
Buthanol fraction	73.5 \pm 6

3. HPLC 분석에 의한 암세포 증식억제물질의 분리 및 동정

가. HPLC 분석

Table 2와 같은 조건으로 genistein, diadzein, glystein 각 표준품을 HPLC 분석을 실시하여 Fig. 7과 같은 peak를 확인하였으며, 된장의 에틸아세테이트 분획물을 이와 동일한 조건으로 분석하였다(Fig. 8). HPLC 분석결과 Fig. 8에서 보는 바와 같이 에틸아세테이트 분획물에서 앞의 세가지 화합물의 존재를 peak로 확인할 수 있었다.

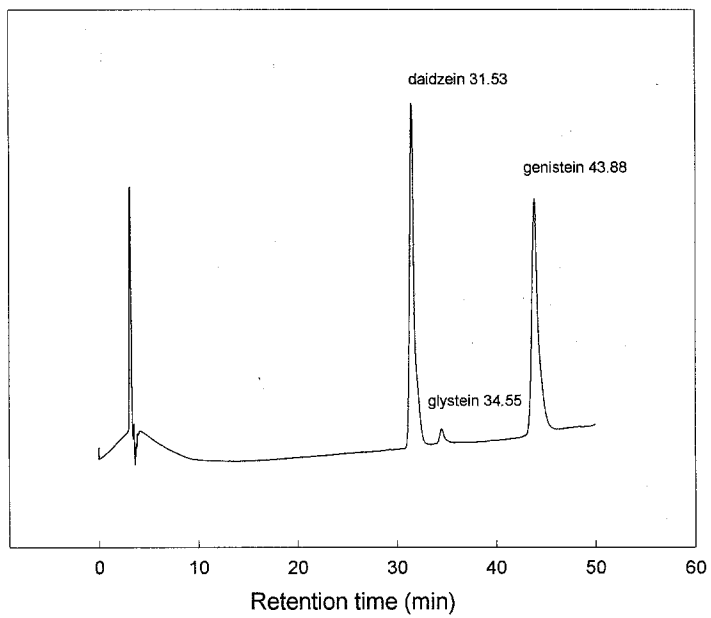


Fig. 7. HPLC analysis for daidzein, glystein, genistein standard

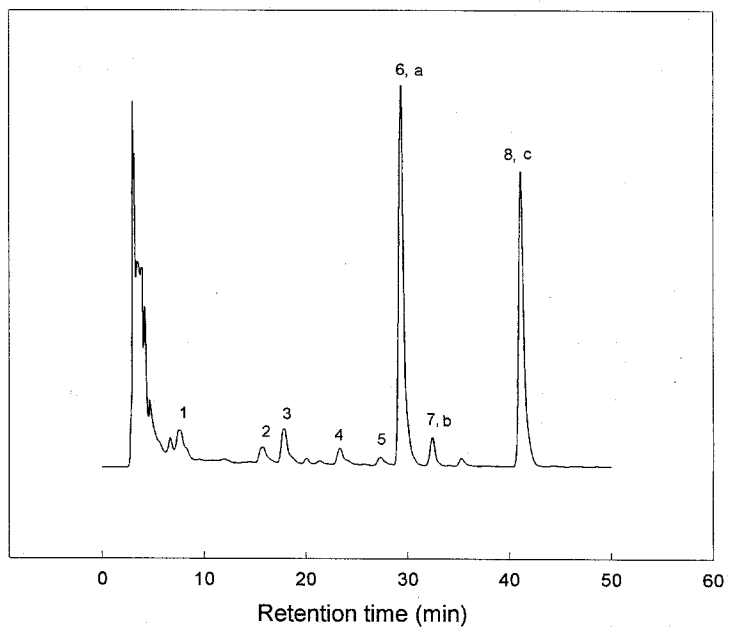


Fig. 8. HPLC analysis for ethylacetate fraction of methanol extract from *Deonjang*

- a. Daidzein 30.05
- b. Glystein 33.47
- c. Genistein 42.17

나. 각 peak의 암세포 성장 억제효과

암세포 성장 억제효과가 있는 활성물질을 찾기 위하여 HPLC 분석 결과 얻어진 각 peak를 분취하여 암세포 성장 억제효과 실험을 실시하였다.

1) MTT assay

L1210, P338D1, HepG2, WiDr, SNU-1등의 세포를 이용하여 실험한 결과는 각각 Table 12, 13, 14, 15, 16과 같았으며 각 암세포 모두에서 peak 8에서의 저해효과가 가장 높았는데 이는 Fig. 7의 화합물 분석을 통해서 genistein임을 확인할 수 있었다.

Table 12. Inhibitory effect of the peaks according to HPLC of ethylacetate fraction from *Doenjang* on the growth of L1210 cells in MTT assay.

Sample	OD ₅₅₀	Inhibition rate (%)
Control	1.153 ± 0.05	
Peak 1	0.802 ± 0.002	30
Peak 2	0.912 ± 0.002	21
Peak 3	0.716 ± 0.008	38
Peak 4	0.778 ± 0.005	32
Peak 5	0.917 ± 0.009	21
Peak 6	0.718 ± 0.008	38
Peak 7	0.906 ± 0.035	21
Peak 8	0.255 ± 0.003	81

Table 13. Inhibitory effect of the peaks according to HPLC of ethylacetate fraction from *Doenjang* on the growth of P338D1 cells in MTT assay.

Sample	OD ₅₅₀	Inhibition rate (%)
Control	1.033 ± 0.075	
Peak 1	0.797 ± 0.007	23
Peak 2	0.927 ± 0.007	10
Peak 3	0.707 ± 0.008	32
Peak 4	0.787 ± 0.005	24
Peak 5	0.901 ± 0.004	12
Peak 6	0.736 ± 0.006	29
Peak 7	0.918 ± 0.032	11
Peak 8	0.234 ± 0.017	77

Table 14. Inhibitory effect of the peaks according to HPLC of ethylacetate fraction from *Doenjang* on the growth of HepG2 cells in MTT assay.

Sample	OD ₅₅₀	Inhibition rate (%)
Control	0.980 ± 0.026	
Peak 1	0.740 ± 0.040	24
Peak 2	0.890 ± 0.010	9
Peak 3	0.662 ± 0.018	32
Peak 4	0.761 ± 0.015	22
Peak 5	0.910 ± 0.070	7
Peak 6	0.675 ± 0.008	31
Peak 7	0.879 ± 0.035	10
Peak 8	0.255 ± 0.003	77

Table 15. Inhibitory effect of the peaks according to HPLC of ethylacetate fraction from *Doenjang* on the growth of WiDr cells in MTT assay.

Sample	OD ₅₅₀	Inhibition rate (%)
Control	1.089 ± 0.016	
Peak 1	0.745 ± 0.004	31
Peak 2	0.896 ± 0.008	17
Peak 3	0.665 ± 0.015	38
Peak 4	0.715 ± 0.015	34
Peak 5	0.890 ± 0.010	18
Peak 6	0.840 ± 0.012	22
Peak 7	0.865 ± 0.015	20
Peak 8	0.215 ± 0.010	80

Table 16. Inhibitory effect of the peaks according to HPLC of ethylacetate fraction from *Doenjang* on the growth of SNU-1 cells in MTT assay.

Sample	OD ₅₅₀	Inhibition rate (%)
Control	1.025 ± 0.075	
Peak 1	0.801 ± 0.001	21
Peak 2	0.908 ± 0.004	11
Peak 3	0.710 ± 0.010	30
Peak 4	0.788 ± 0.008	23
Peak 5	0.916 ± 0.009	10
Peak 6	0.735 ± 0.015	28
Peak 7	0.915 ± 0.009	11
Peak 8	0.219 ± 0.005	79

2) 암세포 증식 저해효과

부착형 세포인 HepG2, WiDr 등의 암세포를 이용하여 앞의 MTT assay 와 마찬가지로 HPLC 분석에서 얻은 peak들을 시료로하여 암세포 성장에 미치는 효과를 실험하였다. Human hepatocellular carcinoma인 HepG2 세포를 이용하여 실험한 결과, 처리농도 500 μ g/ml에서 peak 8에서 78%의 가장 높은 저해효과를 보였다(Fig. 9). 또 다른 부착세포인 human colon adenocarcinoma WiDr 세포를 이용하여 실험한 결과 처리농도 500 μ g/ml에서 앞의

결과와 같은 peak 8에서 76%로 가장 높은 저해효과를 보였다(Fig. 10). 이 결과는 MTT assay를 통해 얻은 결과와 같으며, 이것을 통해 된장에서 암세포 성장을 억제하는 활성물질이 genistein임을 확인할 수 있었고 이 결과는 임 등(39)의 실험 결과와도 일치하였다.

3) 정상세포에 대한 효과

앞에 실험한 각 peak들이 암세포에만 선택적으로 효과를 지니는지를 알아보기 위해 NIH/3T3 정상세포를 이용하여 정상세포계에서의 세포독성효과를 검토하였다. 결과는 Table 17과 같으며 peak 8을 포함한 모든 peak에서 아무런 독성을 나타내지 않았다.

Table 17. Effect of the solvent fractionated samples(500 μ g/ml) from methanol extracts of *Doenjang* on the growth of NIH/3T3 cells

Sample	Cell number ($\times 10^4$ /ml)
Control	81.5 \pm 2
Peak 1	83.5 \pm 4
Peak 2	81.0 \pm 3
Peak 3	81.0 \pm 10
Peak 4	83.0 \pm 5
Peak 5	80.1 \pm 5
Peak 6	83.0 \pm 5
Peak 7	85.0 \pm 8
Peak 8	83.0 \pm 3

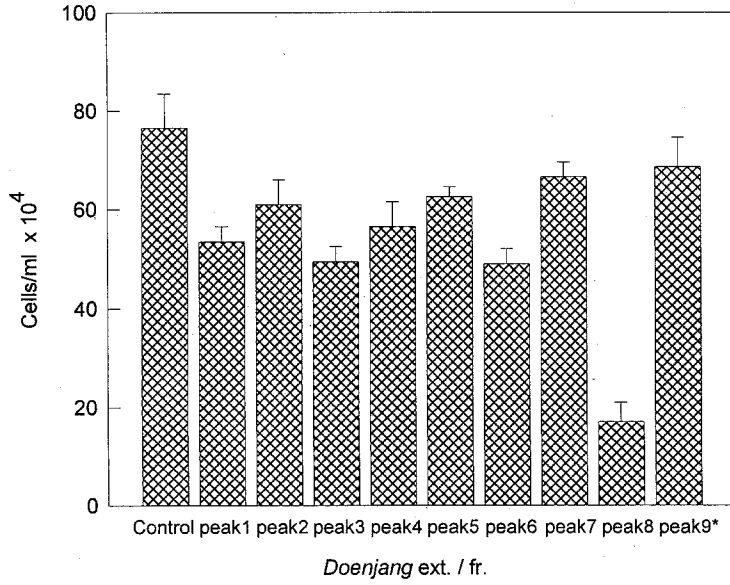


Fig. 9. Inhibitory effect of peaks according to retention time of HPLC of ethylacetate fraction from *Doenjang* on the growth of HepG2 human hepatocellular carcinoma cells.

*See the Fig. 8

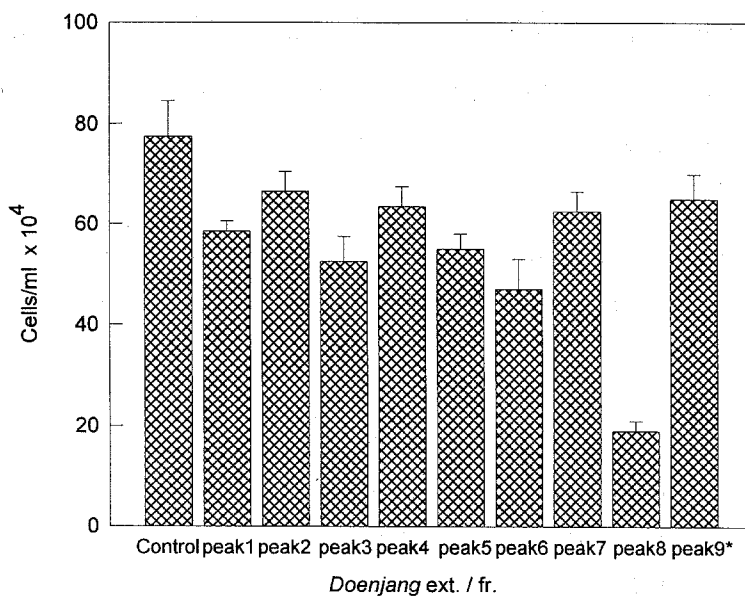


Fig. 10. Inhibitory effect of peaks according to retention time of HPLC of ethylacetate fraction from *Doenjang* on the growth of WiDr human colon adenocarcinoma cells.

*See the Fig. 8.

다. 화합물의 함량 측정

각 화합물의 양과 HPLC peak 면적과의 상관관계를 구하여 genistein, daidzein, glystein의 검량곡선을 작성하였다(Fig. 11, 12, 13). 세 성분의 함량은 Table 18과 같으며 ethylacetate fraction의 암세포 성장 억제 활성성분인 genistein은 *Doenjang* 100g당 0.060mg이 함유되어 있었다.

Table 18. Contents of genistein, daidzein, glystein from ethylacetate fraction of *Doenjang*

Sample	Contents(mg)*
Gennistein	0.075
Daidzein	0.060
Glystein	0.002

**Doenjang* 100g

4. GC에 의한 암세포 증식억제물질의 분석

메탄을 추출물의 분획물중 암세포 성장 저해효과가 있는 분획물인 헥산분획물의 물질을 동정하기 위해 Table 3의 조건으로 GC 분석을 실시하였다. 헥산 분획물의 GC분석을 통해서 함유된 지방산을 분석할 수 있었다. Fig. 14는 지방산 표준물질의 혼합물을 분석한 것이며 이것을 토대로 면적 백분비법(area%)을 이용하여 시료에 포함된 지방산의 함량을 구할 수 있었다.

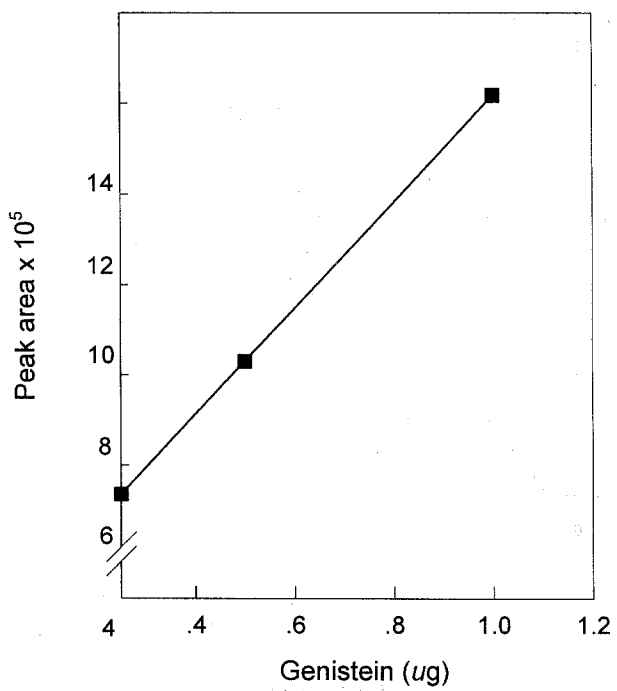


Fig. 11. Calibration curve of genistein standard.

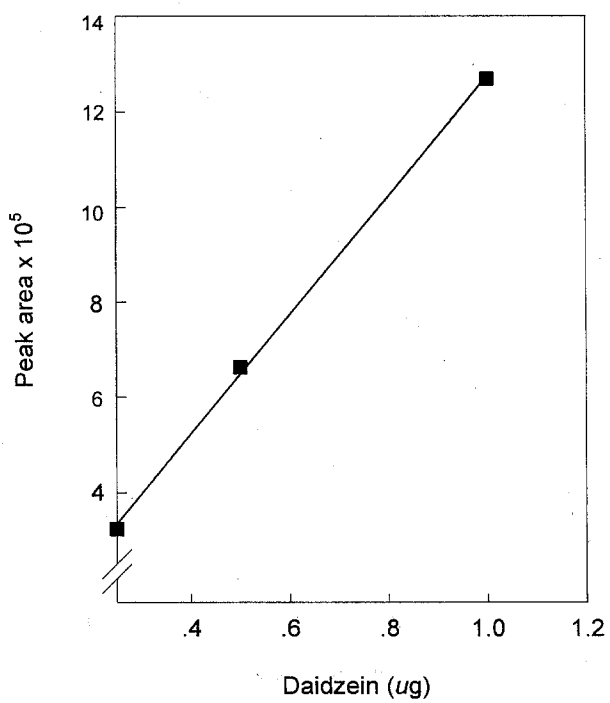


Fig. 12. Calibration curve of daidzein standard.

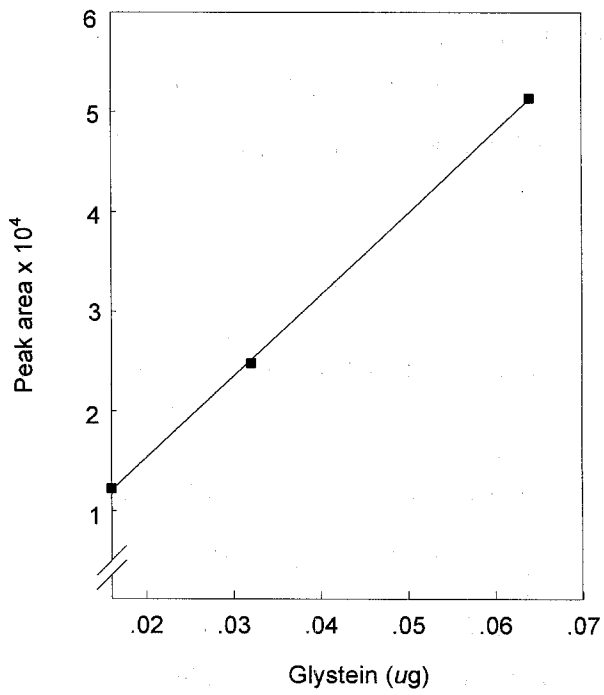


Fig. 13. Calibration curve of glystein standard.

Hexane fraction의 GC분석 결과는 Fig. 15와 같다. 분석된 주된 지방산으로는 palmitic acid, stearic acid, oleic acid, linoleic acid, linolenic acid, arachidic acid, erucic acid 등이다. 그 함량은 Table 19와 같다. 이중 oleic acid의 함량이 된장 100g당 5.934g으로 가장 높았으며 linoleic acid의 함량은 0.189g이다. Linoleic acid가 암세포 성장을 저해하는 효과가 있다는 사실은 이미 여러 실험들을 통해 밝혀진 바가 있으며, 이번 실험을 통하여 된장에 함유된 지방산 중에 암세포의 성장을 억제하는 활성물질이 있으며, 그 물질이 linoleic acid임을 알 수 있었다.

Table 19. Contents of fatty acids from hexane fraction of *Doenjang*.

Fatty acid	Contents(mg)*
Palmitic acid	0.053
Stearic acid	0.039
Oleic acid	5.934
Linoleic acid	0.189
Linolenic acid	0.039
Arachidic acid	0.038
Erucic acid	0.265

**Doenjang* 100g

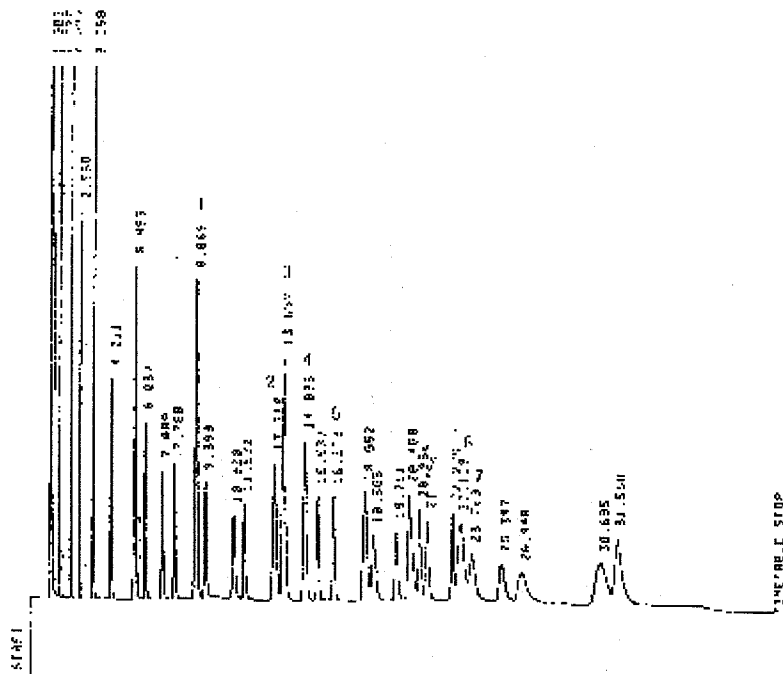


Fig. 14. GC analysis of the fatty acids standard mixture.

1. palmitic acid, 2. stearic acid, 3. oleic acid, 4. linoleic acid
5. linolenic acid, 6. arachidic acid, 7. erucic acid

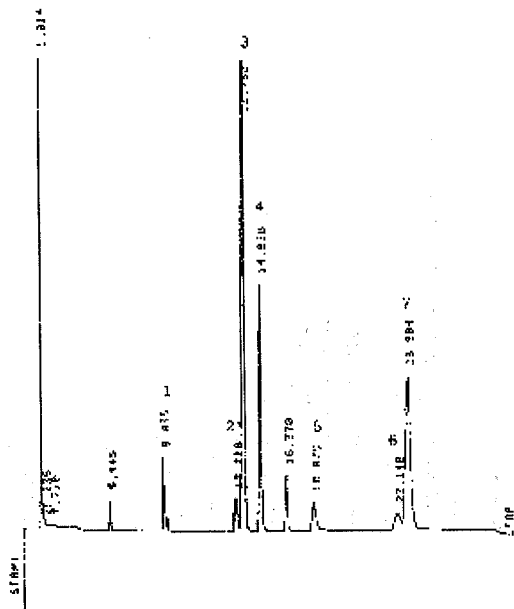


Fig. 15. GC analysis for hexane fraction of methanol extract from *Doenjang*.

1. palmitic acid, 2. stearic acid, 3. oleic acid, 4. linoleic acid
5. linolenic acid, 6. arachidic acid, 7. erucic acid

제 4절 참고문헌

1. Asahara, N., Zhang, X.B. and Ohta, Y. : Antimutagenicity and Mutagen-binding activation of mutagenic pyrolyzates by microorganisms isolated from Japanese Miso. *J. Sci. Food Agric.*, 58, 395~401(1992)
2. Hammerschmidt, P.A. and Pratt, D.E. : Phenolic antioxidants of dried soybeans. *J. Food Sci.*, 43, 556(1978)
3. Pratt, D.E. and Birac, P.M. : Source of antioxidant of soybeans and soy products. *J. Food Sci.*, 44, 1720~1722(1979)
4. Pratt, D.E., Pietro, C.D., Porter, W.L. and Giffie, J.W. : *J. Food Sci.*, 47, 24~25(1981)
5. Murakami, H., Asakawa, T., Terao, J. and Matwsushita, S. : *Agric. Biol. Chem.*, 48, 2971~2975(1984)
6. Esaki, H., Nohara, Y., Onozaki, H. and Osawa, T. : *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 37, 474~477(1990)
7. 平山雄, “豫防ガン學”, 中外製藥株式會社(1994)
8. Benjamin, H., Storkson, J., Tallas, P.G. and Pariza, M.W. : Reduction of benzo(a)pyrene-induced forestomach neoplasms in mice given nitrite and dietary soy sauce. *Food Chem. Toxic.*, 26, 671~678(1988)
9. Benjamin, H., Storkson, J., Nagahara, A. and Pariza, M.W. : Inhibition of benzo(a)pyrene-induced mouse forestomach neoplasia by dietary soy sauce. *Cancer Res.*, 51, 2940~2942(1991)
10. Nagahara, A., Benjamin, H., Storkson, J., Krewson, J., Sheng, K., Liu, W. and Pariza, M.W. : Inhibition of benzo(a)pyrene-induced mouse forestomach neoplasia by a principal flavor component of Japanese-

- style fermented soy sauce. *Cancer Res.*, 52, 1754~1756(1992)
11. Nunomura, N., Sasaki, M., Asao, Y. and Yokotsuka, T. : Isolation and identification of 4-hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone, as a flavour component in shoyu(soy sauce). *Agric. Biol. Chem.*, 40, 491~495(1976)
 12. Watanabe, H., Takahashi, T., Ishimoto, T. and Ito, A. : *Science and Technology of Miso*, 39, 29(1991)
 13. Murphy, P.A. : Phytoestrogen content of processed soybean products. *Food Technol.*, 36, 60~64(1982)
 14. Akiyama, T., Kadooka, T., Ogawara, H., and Sakakibara, S. : Characterization of the epidermal growth factor receptor and the erbB oncogene product by site-specific antibodies. *Arch. Biochem. Biophys.*, 245, 531~536(1986)
 15. Okura, A., Arakawa, H., Oka, H., Yoshinari, T. and Tonden, Y. : Effect of genistein on topoisomerase activity and on the growth of [Val12] Ha-ras-transformed NIH 3T3 cells. *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 157, 183~189(1988)
 16. Barnes, S., Grubbs, C., Setchell, K.D. and Carlson, J. : Soybeans inhibit mammary tumors in models of breast cancer. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 347, 239~253(1990)
 17. Peterson, G. and Barnes, S. : Genistein inhibition of the growth of human breast cancer cells: independence from estrogen receptors and multidrug resistance gene. *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 179, 661~667(1991)
 18. Coward, L., Barnes, N.C., Setchell, K.D. and Barnes, S. : Genistein,

- daidzein, and their beta-glycoside conjugates: antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets. *J. Agric. Food Chem.*, 41, 1961~1967(1993)
19. Wang, H. and Murphy, P.A. : Isoflavone content in commercial soybean foods. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 1666~1673(1994a)
 20. Wang, H. and Murphy, P.A. : Isoflavone composition of American and Japanese soybeans in Iowa: effects of variety, crop year, and location. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 1674~1677(1994b)
 21. 伊藤明弘, 渡刀郭光, 青山秀行, 藤本成明, Roy Bidiut, 森 雅弘 : 中央味曾研究所 研究報告, 17, 49(1989)
 22. 海老根英雄 : みその 機能性, 醸協, 85(2), 70~75(1990)
 23. Naim, M., Gestetner, B., Ziikah, S., Birk, Y. and Bondi, A : Soybean isoflavones. Characterization, determination and antifungal activity. *J. Agric. Food Chem.*, 22, 806(1974)
 24. Naim, M., Gestetner, B., Bondi, A. and Birk, Y. : Antioxiditive and antihemolytic activities of soybean isoflavones. *J. Agric. Food Chem.*, 24, 1174~1177(1976)
 25. 최홍식, 이정수, 문갑순, 박건영 : 양조간장에서 분리한 갈색물질의 항산화성. 한국영양식량학회지, 22, 565~569(1993)
 26. 최홍식, 이정수, 문갑순, 박건영 : 양조간장에서 분리한 멜라노이딘 관련 물질의 항산화작용 특성. 한국영양식량학회지, 22, 570~575(1993)
 27. 박건영, 이은숙, 문숙희, 최홍식 : 간장 및 모델시스템에서 간장 갈색물질과 슛이 Aflatoxin B₁ 의 파괴에 미치는 영향. 한국식품과학회지, 21, 419~424(1989)
 28. 박건영, 문숙희, 백형석, 최홍식 : 된장의 Aflatoxin B₁에 대한 항돌연변

- 이 효과. 한국영양식량학회지, 19, 156~162(1990)
29. Kim, J-K., Park, S-M. and Lee, S-J. : Novel antimutagenic pigment produced by *Bacillus licheniformis* SSA3. *J. Microbiol. Biotech.*, 5, 48~50(1995)
 30. 홍석산, 권동진 : 전통장류 중의 돌연변이 억제물질 탐색. 한국식품개발연구원 연구보고서(1994)
 31. 구영조, 유진영, 박종현, 권동진, 권민, 김성권, 여인옥, 김은영, 이선화, 한복진, 김창곤 : 국산식품소재의 장내미생물에 대한 영양분석 및 이를 이용한 기능성 식품개발. 한국식품개발연구원 연구보고서(1993)
 32. 김용택, 김원극, 오훈일 : 청국장으로부터 혈전용해균주의 분리 및 동정. 한국산업미생물학회지, 23, 1~5(1995)
 33. Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J.T., Bokesch, H., Kenney, S. and Boyd, M.R. : New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.*, 82, 1107~1112(1990)
 34. 이정옥 : 신규항암제의 약효평가. "신물질 창출을 위한 생물활성 시험법", 한국생화학회, pp. 19~33(1990)
 35. 김길현 : 면역반응의 측정-면역조절물질 탐색 기술. "신물질 창출을 위한 생물활성 시험법", 한국생화학회, pp. 393~406(1990)
 36. Kinoshita, E., Yamakoshi, J. and Kikuchi, M. : Purification and identification of an angiotensin I-converting enzyme inhibitor from soy souce. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 57, 1107~1110(1993)
 37. 千葉英雄, 吉川正明 : 化學と生物, 25, 396(1987)
 38. 신재익, 안창원, 남희섭, 이형재, 이형주, 문태화 : 된장으로 부터 angiotensin converting enzyme(ACE)저해 peptide의 분획, 한국식품과학

회지, 27, 230~234(1995)

39. 임선영 : 된장의 항돌연변이 및 항암효과, 부산대학교 대학원 박사학위
논문(1997)

제 3 장 혈압강하 물질 분야

제 1 절 서 설

최근들어 식품 성분이 갖는 각종 생체 조절 기능을 해명함으로써 식품의 기능을 새롭게 인식하려는 연구들이 활발히 진행되고 있다. 생체 조절 기능을 갖는 식품 성분으로는 단백질, peptide, 지질 및 당 등이 있다. 이 중에서 생리 활성 peptide는 구조 및 활성이 다양하고 protease류에 의해 분해되며, 생물공학 기술에 의한 생산 및 개조가 가능하다. 이것은 활성은 낮을지 모르나 안전성은 기대할 수 있다는 특성으로 인하여 주목되고 있다(1).

생리 활성 peptide를 소재로한 식품의 개발을 위하여는 여러 단계의 고려 사항들이 있다. 목적에 따른 생리활성 peptide의 선택, 구조 및 작용기작의 해명, peptide 생성 조건의 최적화, 섭취 후의 효과 확인 등이 그것이다.

생리 활성 peptide의 경구 섭취시 흡수의 문제에 있어서, 종래의 단백질 섭취시 소화관내에서 아미노산으로 분해되어 흡수된다고 생각하였다. 최근 동물 실험 결과 상당히 많은 peptide가 소화관내에서 분해나 장관 흡수에서의 어려움 없이 쉽게 흡수됨이 밝혀졌다. 또한 유리 아미노산보다 대두 peptide의 흡수가 훨씬 효과적임을 증명하는 자료가 보고되기도 하였다(2). 그러나 아직까지 구체적인 운반체의 구조나 작용기작이 밝혀지지 못하였으며 이러한 수송계상의 연구가 진행되고 있다.

Angiotensin converting enzyme(ACE)는 angiotensin I의 C-말단 di-peptide(His-Leu)를 절단하여 활성형인 angiotensin II로 전환시켜 혈압을 상승시킴과 동시에 생체내에서 혈압 강하 작용을 갖는 bradykinin을 분해한

다. 고혈압은 이 분해물을 불활성화시킴으로서 원인이 된다고 하며(3) 이러한 ACE의 작용을 저해함으로써 고혈압의 치료가 가능한 것이다.

ACE의 작용을 저해함으로써 혈압 강하 활성을 갖는 물질로는 단백질 효소 분해물 유래의 peptide가 40여 종이 있다고 보고 되어 있다(4). 특히, 젤라틴을 미생물에서 분비된 효소로 분해한 물질로부터 식품 단백질 유래의 ACE저해 peptide가 발견된(5) 이후, 다른 식품 단백질에서 ACE 저해 peptide를 찾으려는 연구가 지속적으로 진행되어 왔다(6,7).

1979년 Oshima 등(5)은 collagenase로 젤라틴을 효소 분해하여 아미노산 3개에서 많게는 12개로 이루어진 9종의 peptide를 분리하였다. 우유 casein을 이용한 ACE 저해 peptide도 발견되었다. *Lactobacillus helveticus* 유래 효소로 분해한 α_{s1} -casein과 β -casein은 spontaneously hypertensive rat(SHR)에 경구 투여하였을 때 혈압 강하 활성을 확인하였다(8). *Lactobacillus helveticus* 유래 효소는 C-말단에 대한 어떤 특이성도 없기 때문에 생성된 peptide 역시 C-말단에 다양한 아미노산들이 위치할 수 있으며 따라서 ACE 저해 peptide들이 C-말단에 주로 proline을 가지고 있다는 또다른 가능성을 제시하였다. Nakamura 등은 *Lactobacillus helveticus*와 *Saccharomyces cerevisiae*로 발효시킨 sour milk로부터 Val-Pro-Pro과 Ile-Pro-Pro의 2종의 ACE 저해 peptide를 분리하여 milk 발효조건의 조절을 통하여 ACE 저해 peptide가 풍부한 새로운 기능성 식품의 제조 가능성이 있다는 것을 보고 하기도 하였다(9).

이러한 ACE 저해 작용을 갖는 peptide은 어류 단백질에서도 연구된 바 있다. Kohama 등은 참치 근육의 acid extract를 고압 멸균한 후 몇단계의 chromatography를 통하여 Pro-Thr-His-Lys-Trp-Gly-Asp의 peptide를 동정하였다(10). 또한, 젓갈 및 자건품으로서 널리 이용하고 있는 멸치육 단백질을 소화효소인 pepsin으로 가수분해하여 gel chromatography에 의하여

분리하였다. ACE 저해활성이 있는 두 개의 아미노산 조성은 다소 차이가 있었으며, 각각의 분획은 glutamic acid, leucine, lysine과 aspartic acid, threonine의 함량이 많은 것으로 나타났다(7).

ACE 저해 peptide의 경우 분리 및 정제 방법은 일반적인 peptide의 정제 방법과 동일하나 그 원료에 따라 전처리 방법에서 약간의 차이를 보인다. 기존에 보고된 peptide는 대체적인 극성도나 ionic strength 정도를 고려하여 peptide 분리, 정제 조건을 선정하게 되므로 유사한 조건으로 실험들이 진행되어 왔다.

지금까지 ACE 저해 peptide에 대한 연구는 주로 식품에서 직접 용매추출 및 column chromatography에 의한 정제를 하거나(6,11), pepsin, trypsin 등의 단백질 분해 효소로 분해한 후 추출, 정제하여 특성을 파악하는 연구가 있었다(7). 그리고 활성 peptide의 합성에 관한 연구도 일부 수행되었다(4).

최근 우리 나라에서도 식품으로부터 영양소 또는 비영양소 성분의 항암, 항노화, 또는 혈압강하 등 다양한 생리 활성을 나타내는 기능성 성분들에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히 고혈압, 동맥경화 등 성인병의 경우 대부분이 식습관과 밀접한 관련을 가지는 점을 고려할 때 일상적으로 섭취 가능한 식품 성분들 가운데 혈압 강하 효과를 나타내는 물질을 검색하는 것은 질병의 예방차원에서 매우 의미가 있다.

그러므로 본 연구에서는 성인병의 하나인 고혈압의 예방과 식사 요법의 면에서 일상적으로 널리 식용되고 있는 전통발효 식품인 된장을 대상으로 ACE 저해 효과가 있는 물질을 얻고자 연구하였다. 분리능이 뛰어난 preparative HPLC를 이용하여 ACE 저해 활성이 높은 peptide를 순수 분리하여 정제된 peptide의 아미노산 서열을 검토했다.

제 2 절 재료 및 방법

1. 재료

된장은 순창 고은 식품에서 제조한 것을 구입하여 사용하였다. Preparative HPLC 및 LC-Mass에 사용한 용매는 HPLC 등급을 사용하였다. ACE 저해 활성 측정시 사용한 ACE와 기질(hippurylhistidine-leucine)은 Sigma사의 제품을 사용하였다.

2. 장류(된장)에서의 혈압강하 물질 추출

된장 500g을 열수 500ml에 녹인 후 95℃에서 20분간 끓였다. Blender로 상온에서 교반한 후 물 1L를 첨가하였다. pH 4.5로 조정한 후, 10000 xg에서 30분간 원심분리하여 상층액만 취하였다. Filter paper(watman No. 1)로 여과한 다음 다시 filter paper(watman No. 42)로 여과하였다. 이 여액을 냉동 건조하여 냉동 보관하였다.

3. ACE 저해 활성 측정

ACE 조해작용 측정은 Cushman과 Cheung(12)의 방법에 준하여 실시하였다. 0.3M NaCl을 함유한 0.1M sodium borate buffer(pH 8.3)에 녹인 기질 Hip-His-Leu(HHL)(2.14mg/ml) 200 μ l에 ACE 저해 용액 75 μ l을 첨가한 후, 37℃에서 5분간 preincubation시켰다. 여기에 증류수에 녹인 ACE 조효소액(0.2 U/ml) 20 μ l를 가하여 다시 37℃에서 30분간 반응시킨 후 1N HCl 250 μ l를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 여기에 ethyl acetate 2ml를 가

하여 15초간 교반한 후, 3000rpm에서 5분간 원심분리시켜 상층액 1ml를 취하였다. 이 상층액을 120℃에서 30분간 가열하여 완전히 건조시킨 뒤 증류수 1ml를 가하여 용해시킨 다음 228nm에서 흡광도를 측정하여 다음식에 의해서 ACE 저해율을 측정하였다.

$$\text{ACE 저해율} = (C-B) / (C-A) \times 100$$

A = 시료의 흡광도

B = 공실험의 흡광도

C = 시료의 대조구 흡광도

4. Gel permeation chromatography에 의한 활성물질 분리

8g의 냉동건조 분말을 20ml의 0.1M acetic acid buffer에 녹여 0.1M acetic acid buffer로 평형화된 Sephadex G-25(50 x 950mm)에 loading하였다. 0.1M acetic acid buffer를 90ml/hr 유속으로 용출하여 분리하였다. 254 nm에서 측정된 각 분획은 ACE 저해 작용의 활성을 측정하였다.

5. Gel permeation chromatography에서의 앞 분획 분리

가. Ion exchange chromatography에 의한 분리

Gel permeation chromatography에서 분리된 분획을 active carbon으로 탈색한 후, ion exchnage chromatography(Dowex X-2, 26 x 300mm)로 다

시 분리하였다. 용매는 0.1M acetic acid를 사용하였고, 0~1M NaCl로 용출하였다.

나. Reverse phase HPLC에 의한 분리

RP HPLC는 C₁₈(Vydac; 218TP510; 10 x 250mm, Hesperia, CA, USA) column을 사용하였다. 용매의 공급은 1.5 ml/min속도로 0.1% trifluoroacetic acid(TFA) in water를 5분간 흘려준 다음 40분동안 acetonitrile 농도를 60%까지 상승시켰다. 동결건조한 시료(5mg/ml) 500 μ l을 injection 하였으며 ACE 저해 성분의 검출은 UV detector를 사용하여 220nm에서 실시하였다.

다. Size exclusion column HPLC에 의한 분리

GS-320 HQ(Shodex Asahipak, 4.6 x 250mm) column을 사용하였다. 용매로는 0.1% TFA in water를 사용하였으며 0.6ml/min의 유속으로 분리하였다. 검출은 UV detector 220nm에서 하였다.

라. TLC plate을 이용한 2-dimensional electrophoresis/TLC에 의한 분리

RP HPLC에서 분리된 분획을 40 μ l 50mM ammonia에 녹여 3 μ l를 TLC plate(Silica gel 60, 10 x 10cm, Merck)의 하단에서 1cm되는 중앙에 spotting하였다. Plate의 좌우 양측에 platinum wire를 filter paper(Watman No. 1)로 감싸았다. 여기에 pH 6.5 buffer(10% pyridine 0.5% acetic acid)를 첨가하여 plate를 적신 후, 375V에서 10분 동안 전기영동하였다. Plate를 말린 후 TLC chamber에서 n-butanol : acetic acid : water(3 : 1 : 1)로 전개한

후 0.02% ninhydrin solution in acetone으로 발색시켰다.

마. Flash chromatography

C₁₈ column(Biotage, 40 x 70mm)을 사용하였으며 용매로는 0.1% TFA in water를 사용하였다. Gel permeation chromatography에서 얻은 동결 건조한 시료(10mg/ml) 5ml을 loading하였다. 20ml/min의 유속으로 용출하여 각 5ml씩 분취한 후 220nm에서 흡광도를 측정하였다.

6. Gel permeation chromatography에서의 뒷 분획의 분리

가. Reverse phase HPLC에 의한 분리

RP HPLC는 C₁₈(Vydac; 218TP510; 10 x 250mm, Hesperia, CA, USA) column을 사용하였다. 용매의 공급은 1.5 ml/min속도로 0.1% trifluoroacetic acid(TFA) water를 3분간 흘려준 다음 30분동안 acetonitrile의 농도를 7% 까지 상승시켰다. 다시 2분동안 60%까지 acetonitrile의 농도를 직선적으로 상승시켜준 후 5분간 유지하였다. 동결건조한 시료를 0.1% TFA in water에 용해하여(30mg/ml) 500 μ l을 injection 하였으며 ACE 저해 성분의 검출은 UV detector를 사용하여 220nm에서 실시하였다.

나. Amide column을 이용한 HPLC에 의한 분리

RP HPLC에서 얻은 ACE 저해 활성이 높은 분획을 NH₂ column(Cpacellpak, Shiseido, 10 x 250mm)상에서 재분획하였다. 용매는 70% acetoni-

trile을 사용하였으며 1.5ml/min의 유속으로 흘려 분리하였다. 검출은 UV detector를 사용하여 220nm에서 측정하였다.

7. 분자량 측정 및 동정

분자량의 측정은 LC-electrospray ionization mass spectrometer(Masslynx 2.1, Micromass platform II, manchester U.K)를 이용하였다. Peptide의 sequencing은 Procise TM(perkin Elmer, Protein sequencing system, USA)에 의하여 자동분석하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. ACE 저해활성이 높은 장류의 탐색

혈압강하 활성은 angiotensin I-converting enzyme억제활성으로 *in vitro*로 측정하였다. 농림수산부 품질인증 전통식품 장류 수종을 수집하여 된장 또는 청국장액의 여액을 ACE inhibitory activity와 고형분 함량을 측정하였다.

그 ACE inhibitory activity 를 측정한 결과 Table 20과 같은 결과를 얻었다. 시료간 활성의 차이는 최대가 최저의 무게로 비교했을 때 14배 컸으며, 간장의 활성이 가장 높았으나, 비슷한 수준의 된장 B를 탐색 대상원료로 된장이 간장보다 단백질원인 점을 고려하여 선정하였다.

Table 20. ACE inhibitory activities of various fermented foods.

Fermented foods	IC50% (ul/ml)	IC50% (mg/ml)
Soybean paste		
A	110	2.6
B	9.3	0.28
C	18	0.40
Soybean sauce	2.2	0.18
Chungkukjang	110	1.8

2. Gel permeation chromatography에 의한 활성물질 분리

된장에서 추출한 시료를 gel permeation chromatography에서 분리한 후, ACE 저해 활성을 측정한 결과를 Fig. 16에 나타내었다. ACE 저해 활성이 높은 분획을 두 부분에서 얻을 수 있었다. 뚜렷하게 활성이 높은 분획은 90% 이상의 저해 활성을 나타냈으며 바로 뒤에 약간 겹쳐 활성이 낮은 분획은 70% 정도의 저해 활성을 나타내었다.

3. Gel filtration chromatography의 앞 분획의 분리

가. Ion exchange chromatography에 의한 분리

Gel permeation chromatography에서 높은 활성을 보인 분획을 ion exchange chromatography에서 재분리하였다. 0.25M NaCl 근처에서 60%의

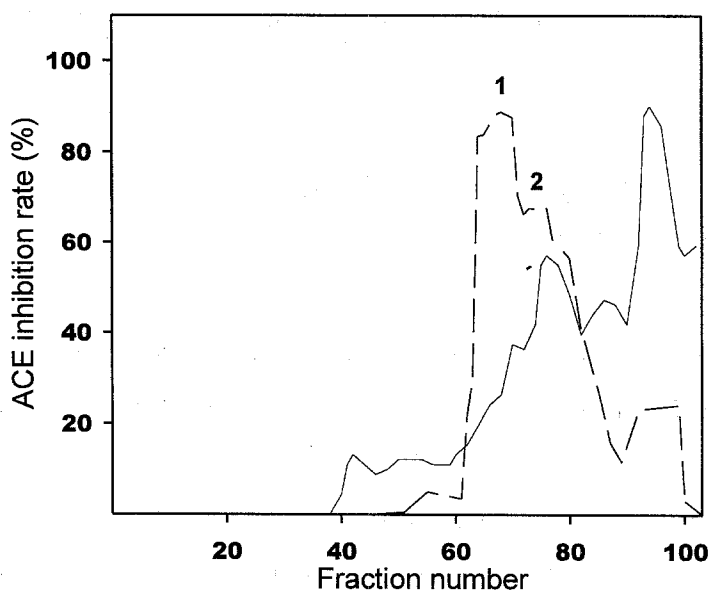


Fig. 16. Gel permeation column(GPC) chromatography of *Doenjang* extract on Sephadex G-25(95 x 5 cm). The active fractions collected are shown by ---.

수율로 단일 peak에 활성이 모였으며, open column chromatography인 점을 고려할 때 60%의 수율은 낮은 것이 아니며 실제로 전 획분의 활성을 측정할 결과 1M NaCl로 용출했을 때 극히 미미한 활성이 있었다(data는 제시하지 않았음). 활성 획분의 앞의 미미한 shoulder부분을 제외한 획분을 다음 정제 단계로 옮겼다

나. Reverse phase(C₁₈, Vydac 218TP, 10x250mm) HPLC에 의한 분리

활성은 C₁₈ column에 retain되지 않는 부분에서 NaCl salt(ion exchange chromatography에서 유래된)와 함께 용출되었다(data 제시 않음). 따라서 NaCl과의 분리가 우선 문제가 되었다.

다. YMC polyamine(4.6 x 250 mm), Shodex Asahipak size-exclusion column(GS-320 HQ, 4.6 x 250 mm)을 이용한 HPLC에 의한 분리

Ion exchange chromatography에서 얻은 분획을 상기 두 성질이 다른 column을 이용하여 분리한 결과, 앞 column의 경우에는 단일 peak(용매는 isocratic조건에서 100% water에서 30% acetonitrile까지 세밀한 간격으로 chromatography함)를 얻었고, 후의 column의 경우에는 6~7개의 peak를 얻었으나(용매는 water), 역시 salt와 함께 활성이 나타났다(data 제시하지 않음).

이상의 결과를 종합할 때, 활성 물질은 매우 분자량이 작고 친수성 물질인 것으로 사료되며, NaCl을 이용한 ion exchange chromatography를 한 후에 이 활성 물질을 우선 NaCl과 분리하는 것이 어렵다는 결론을 내렸다. 따라서 한 단계 전인 gel permeation chromatography(Sephadex G-25)에서 나

은 획분을 다시 재분리하는 것이 좋겠다고 생각되어 다음과 같이 분리하였다.

4. Reverse phase(C₁₈, Vydac 218TP, 10 x 250mm) HPLC에 의한 분리

Gel permeation chromatography(Sephadex G-25)에서 나온 획분을 ion exchange chromatography하지 않고 직접 상기 reverse phase(C₁₈, 10 x 250 mm) HPLC에 의해 분리한 결과(Fig. 17), 거의 retain되지 않은 부분에 대부분의 활성이 있었으며(후반의 활성은 활성의 logarism적 성질을 고려할 때 약한 활성임), 이는 여태까지의 경향과 일치한다.

가. YMC polyamine(4.6 x 250 mm), Shodex Asahipak size-exclusion column(GS-320 HQ, 4.6 x 250 mm)을 이용한 HPLC에 의한 분리

상기 reverse phase(C₁₈, Vydac 218TP, 10 x 250mm) HPLC에 의해 분리한 활성 분획을 YMC polyamine(4.6 x 250 mm), Shodex Asahipak size-exclusion column(GS-320 HQ, 46 x 250mm)에 의해 분리했을 때(두 경우 다 용매는 water를 사용하였다.), 단일 peak로 나왔다(data 제시하지 않음).

나. Reverse phase HPLC(C₁₈, Vydac 201HS, 4.6 x 250mm)에 의한 분리

보통 reverse phase(C₁₈)가 아닌 small peptides 분리에 효능이 있다는 reverse phase(C₁₈, Vydac 201HS, 46 x 250mm)을 이용하여 HPLC로 분리하였을 때 몇 개의 peak로 분리되었으나 그 분리능이 좋지 않았으며 또한 역시 거의 column에 retain되지 않은 상태였다(data 제시하지 않음).

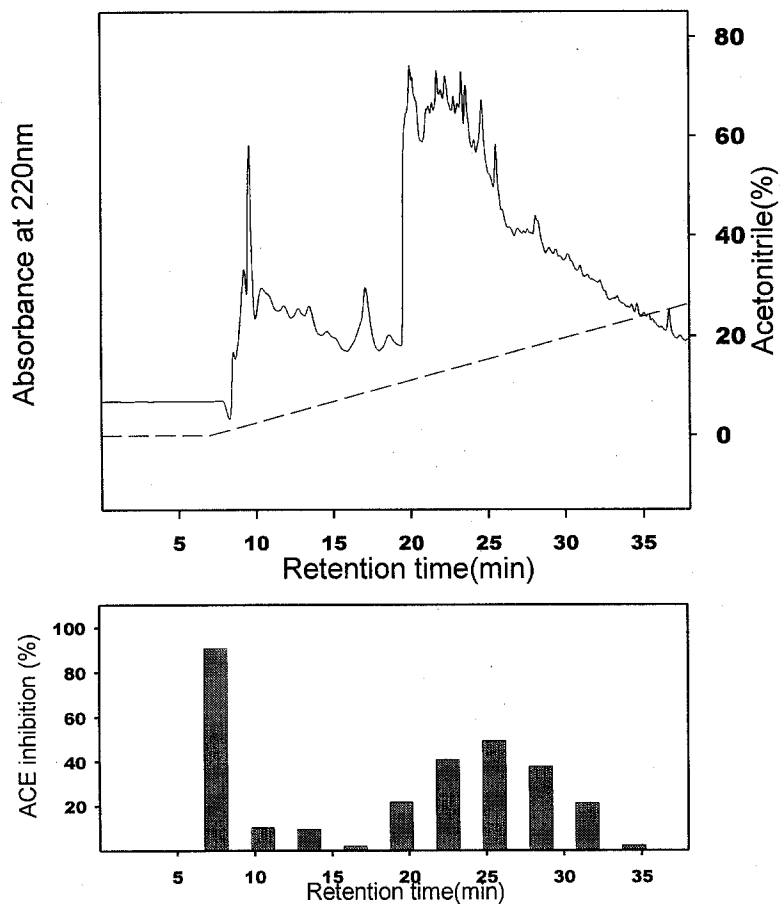


Fig. 17. HPLC purification of the inhibitors of angiotensin I converting enzyme(ACE) for the active fraction 1 from GPC in Fig. 16. Dotted line is the percentage of acetonitrile in the eluting solution containing 0.1% TFA.

다. Hydrophilic interaction HPLC(polyhydroxyethyl aspartamide column, PolyLC Inc., MD, USA, 4.6 x 200mm, 5 μ m, 200-Å)에 의한 분리

친수성 물질 분리에 효능이 있다고 알려진 상기 column을 이용, 용매는 10mM triethylamine phosphate(pH 2.8)을 포함한 85%~0% acetonitrile linear gradient를 사용하여 분리하였으나, 이 column에서는 분리가 되지 않았다. 그러나 여러개의 활성이 있는 peak가 나타났으며 그 분리 정도가 좋지 않아(data 제시하지 않음) 순수 분리에는 적합하지 않은 것으로 판단되었다.

라. TLC plate을 이용한 2-dimensional electrophoresis/TLC에 의한 분리

이상의 결과에서 본 혈압 강하 획득의 분리는 HPLC에 의해서 분리가 어렵다고 판단하여, 고전적인 방법인 TLC plate을 이용한 2-dimensional electrophoresis/TLC(1st dimension, electrophoresis; 2nd dimension, TLC)에 의해 분리하였다.

Gel permeation chromatography에 의해 분획한 활성 획득을 5 mg/ml (ninhydrin에 의한 아미노산 정량 결과 아미노산으로 1 mg/ml의 농도)의 농도로 500 μ l씩 reverse phase HPLC C₁₈ column에 의해 분리하였다. 활성 획득을 8번 분취하여 동결 건조하였으며 이의 아미노산 함량은 80 μ g이었다. 0.02% ninhydrin in acetone로 발색시킨 결과는 Fig. 18과 같다. 각 spot를 긁어 100 μ l 50 mM ammonia로 두번 추출, 원심분리하여 동결건조한후 400 μ l 증류수에 녹여 ACE 저해 활성을 측정한 결과, 화살표한 시료만이 활성을 보였으며 85%의 저해율을 보였다.

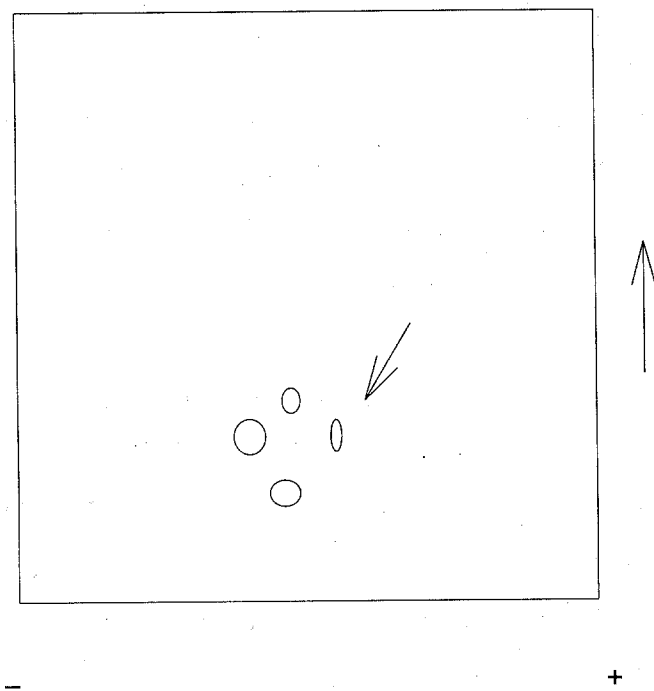


Fig. 18. Two-dimensional separation(1st, electrophoresis; 2nd, TLC) of the active fraction from reverse phase HPLC(Fig. 17). Arrowed spot is the active fraction.

마. 순수분리 물질의 순도확인, 분자량 측정, 아미노산 분석 및 peptide sequencing

TLC plate을 이용한 2-dimensional electrophoresis/TLC에 의해 분리한 물질의 순도를 확인하고, 동시에 그 분자량을 측정하기 위하여 500배로 희석한 후 LC-electrospray ionization mass spectrometer(MassLynx 2.1, Micromass, U.K)로 LC-MS한 결과, 분자량 759.63의 거의 순수한 물질로 밝혀졌다. 위에서 본 물질이 ninhydrin에 의해 발색한 점으로 미루어 α -amino기를 가진 물질이므로, peptide일 가능성이 높을 것으로 생각되어 아미노산 분석과 peptide sequencing을 수행했으나, peptide가 아닌 것으로 판명되었다.

바. Scale up의 필요성

본 분리물질이 peptide가 아닌 것으로 판명되어 두가지 문제점이 있다. 하나는 분리해야 할 순수물질의 양의 문제이다. 즉 peptide의 경우에는 동정을 위해서는 μg 수준의 양만이 필요하지만 그렇치 않은 경우 C^{13} -NMR 등을 위하여 5-10mg의 양이 필요하므로 scale up해야한다. 대략 계산해 본다면 된장 열수 추출물 400g에서 출발하여 지름 5cm의 gel permeation chromatography에서 열수 추출물 16g씩 40ml buffer에 녹여 분획하여(400g/16g=25번 분취) 분획물 15g을 얻고 이를 다시 C_{18} column으로 수십번 분취하여(15g/0.5g=30번) 15mg의 분획물을 얻고 이를 TLC plate로 전기영동/TLC를 2,500번 하여($15000\mu\text{g}/6\mu\text{g}=2500$) 6mg의 순수물질을 얻는다는 대략적인 계산이다.

또 다른 문제는 앞의 마지막 분리단계가 더 많은 양을 1회에 loading하

고 여러 apparatus를 사용한다 해도 너무 많은 노동력을 요구하므로 다른 방법을 강구해야 할 것으로 생각되어 아래와 같이 시도하였다.

그러나, 본 혈압강하 물질은 reverse phase HPLC에서 거의 retain되지 않는 분리에 어려움이 있어 좀더 많은 실험을 통해 scale up이 용이한 분리 방법을 강구할 예정이나 어려움이 예상된다. 따라서 원래 계획된 바를 미루어 혈압 강하물질 강화 공정 설정은 물질의 동정이 이루어진 후이나 과학적인 접근 방법이 가능하므로 본 과제에서 수행하지 않고 차후로 미루고자 한다.

5. Reverse phase HPLC(C₁₈, Vyac 218TP, 10x250mm)에 의한 rechromatogram

가. Flash chromatography에 의한 분리

Scale up하기 위하여 gel permeation chromatography(G-25) 한 후 활성 성분을 Flash chromatography한 결과(Fig. 19), TLC에 의해 확인한 활성 획분의 약 17%(건물량기준)를 얻어 상당한 순도 향상을 이룰 수 있었다. 만약 길이를 본 실험에서의 7.5 cm에서 15 cm(Biotage에서 구입할 수 있음)의 column으로 바꾸면 loading 량을 500 mg 정도까지 늘릴 수 있어 scale up에 적합하다고 판단되었다.

나. Reverse phase HPLC에 의한 3차에 걸친 rechromatography

Flash chromatography에서 얻은 활성 획분을 reverse phase HPLC에 의해 3차에 걸쳐 rechromatography한 결과를 Fig. 20, Fig. 21, Fig. 22에 나

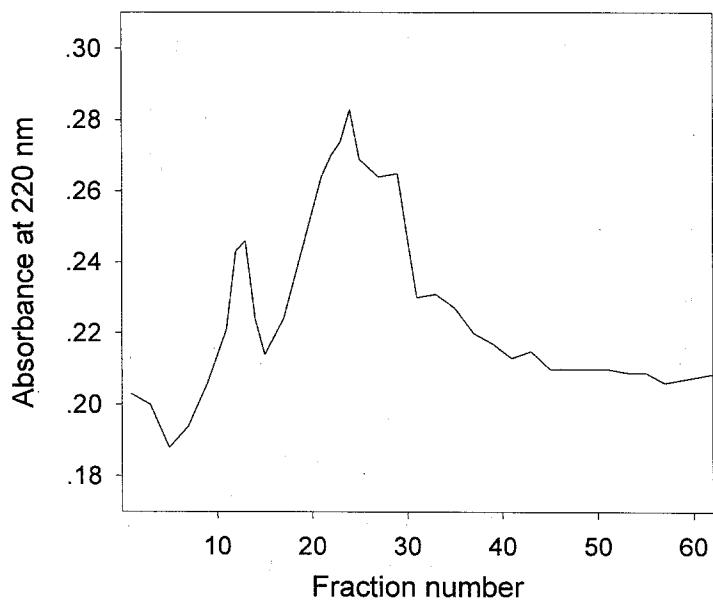


Fig. 19. Chromatography of the active fraction from gel permeation chromatography using a Biotage Flash 40S system with a KP-C18-HS column. The active fractions(11-15) were collected.

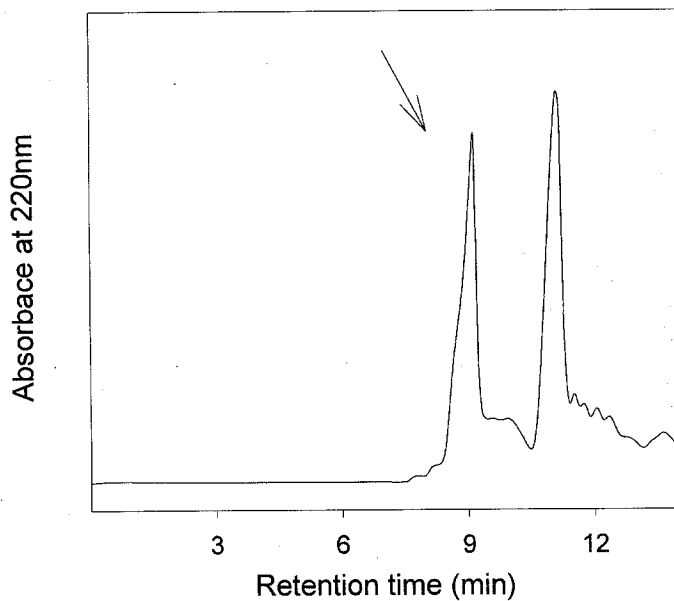


Fig. 20. Reverse-phase HPLC of the active fraction from the Flash chromatography (Eluent, 0.1%TFA; flow rate, 1.5 ml/min). The shoulder indicated by an arrow was the active fraction.

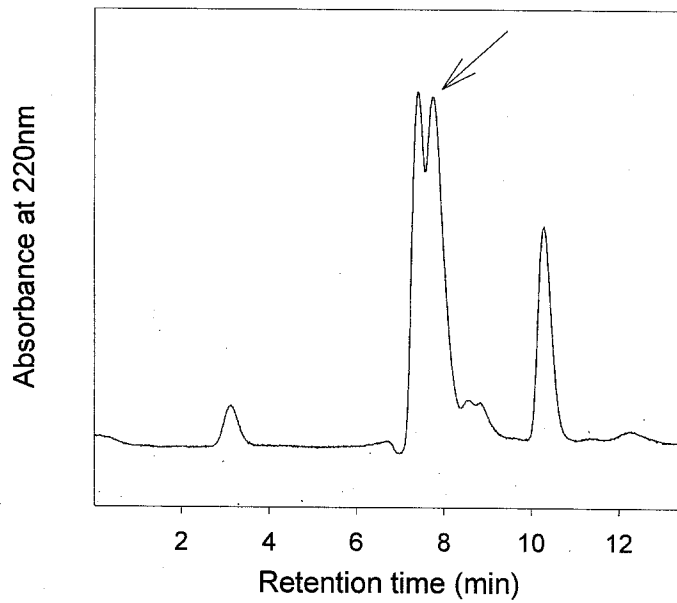


Fig. 21. Rechromatography of the active fraction from the previous Fig. 20. The chromatographic conditions are the same as in the Fig. 20. The arrowed peak was the active fraction.

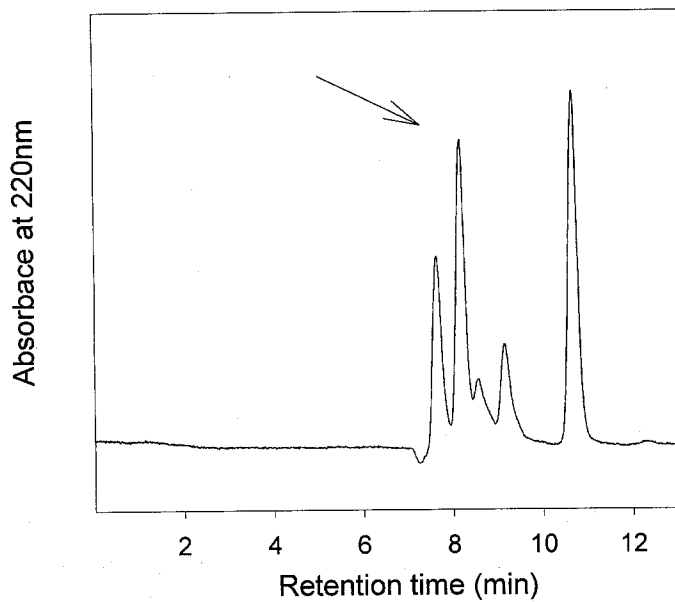


Fig. 22. Re-rechromatography of the active fraction from the previous Fig. 21. The chromatographic conditions are the same as in the previous Fig. 21. The arrowed peak was the active fraction.

타 내었다. TLC에 의해 분석하였을 때 활성 성분의 순도가 계속 증가하였으나 아직도 순수한 물질을 얻을 수 없었다(TLC에 의하면 약 80% 이상의 순도를 얻을 수 있었다). 여러번 더 rechromatography하면 동정에 필요한 순수 물질을 얻을 수 있겠으나, 비록 더 지름이 큰(본 실험은 지름 1 cm의 column을 썼으나 지름 4.7 cm의 column) column을 사용한다해도, 현실적으로 분리하기가 어려울 것으로 판단되어, 더 좋은 분리 방법이 필요할 것으로 사료된다.

본 실험에 의한 분리방법에 의한 분리가 지난할 것이라고 결론내린 근거에는 앞에서 밝힌 바와 같은 다단계의 분리와 목적하는 물질이 원료에서의 낮은 농도(추출물에 대해 6 ppm이하) 물질 수지를 고려하면, 16 g을 gel permeation chromatography(G-25) 했을 때, 약 500 mg의 활성 획분을 얻었으며, 100 mg을 Flash chromatography 했을 때, 활성 획분이 매우 hydroscopic하여 정확히 평량할 수 없었다. 그러나 chromatogram의 optical density에 의하면 약 17% 정도의 수율을 얻었으며, 다음의 경우들도 optical density에 의해 계산하고 전체를 계산해보면 추출물에 대해 약 6 ppm 정도의 활성획분을 얻을 수 있었다. 아직 순수하지 않으므로 6 ppm이하라고 결론지을 수 있다.

따라서 6 ppm이라고 가정한다 하고, 또한 100%의 수율을 가정해도, 이는 추출물 1 kg을 분리해야 동정에 필요한 최소한의 량에 가까운 6 mg을 얻을 수 있음을 의미하며, 이는 약 63회($1000\text{g}/16\text{g}=62.5$)의 각 분리단계의 분리를 의미하며 아직도 만족할 만한 순도가 아님을 감안할 때, 이는 현실적으로 어렵다.

여태까지는 된장 추출물을 gel permeation chromatography(G-25)했을 때 가장 높은 혈압강화 활성을 보이는 획분에 대한 분리를 시도한 결과, 소량의 순수 물질을 분리할 수 있었으며 759.63dalton의 amino기를 함유한 펩

타이드가 아닌 극히 친수성이 높은 물질로 밝혀졌다. 그러나, 이의 동정을 위한 대량 분리는 원료 중의 낮은 농도, 대량 분리 방법 개발의 어려움 등의 이유로 할 수 없었으며, 추후 이의 개발이 필요하며 현재로서는 어렵다고 판단된다. 따라서 본 연구의 남은 기간 동안에는 된장 추출물을 gel permeation chromatography(G-25)했을 때 다음으로 높은 혈압강화 활성을 보이는 획분에 대한 분리를 시도하였다.

6. Gel filtration chromatography의 뒷 분획의 분리

가. Reverse phase HPLC에 의한 분리

된장 추출물을 gel permeation chromatography(G-25)했을 때 두 번째로 높은 혈압강화 활성을 보이는 획분(2)(Fig. 16)에 대한 분리를 reverse phase HPLC(C₁₈, Vydac, 218TP, 10x250mm)로 시도하였다.

우선 보통 쓰이는 linear gradient로 분리하여 혈압강화 활성을 측정하여(자료 제시하지 않음) 높은 활성을 보이는 획분들이 자세히 분리되도록 shallow gradient를 사용하여 분리하였다(Fig. 23). 각 분획물의 ACE 저해 활성을 측정한 결과 50%의 활성을 보이는 분획과 47%의 저해 활성을 보이는 분획을 얻을 수 있었다. Chromatogram상에서 이 두 분획이 순수해 보이지 않았으므로 냉동 건조하여 다음 분리 단계를 이행하였다.

나. Amide column(Capcellpak, Shiseido, 10x250mm)을 이용한 HPLC에 의한 분리

상기 reverse phase HPLC에 의해 분리한 두 획분을 NH₂ column으로

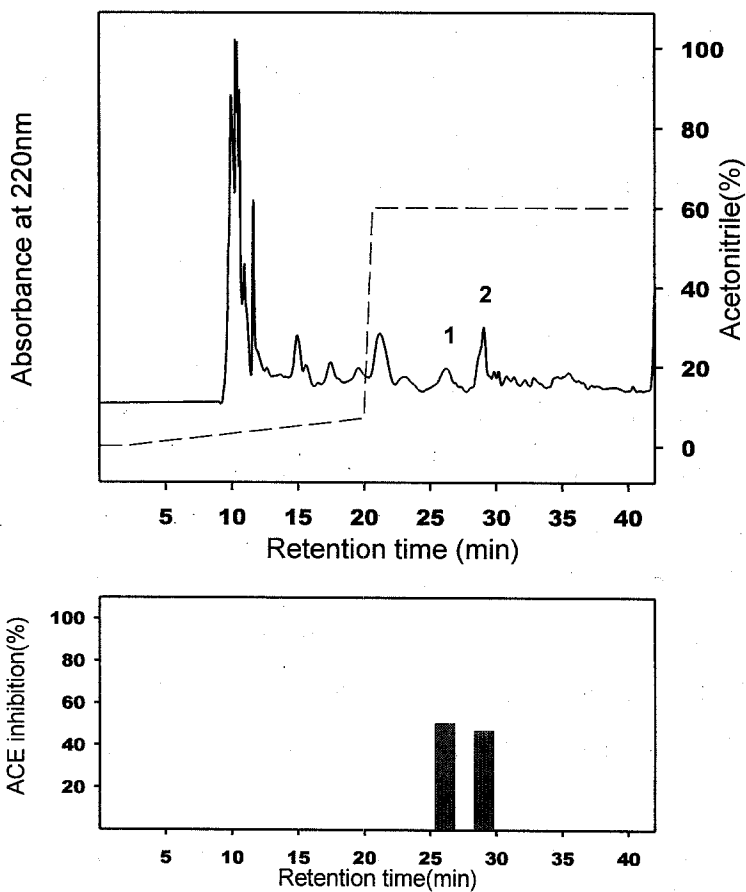


Fig. 23. HPLC purification of the inhibitors of ACE for the fraction 2 from the GPC in Fig. 16. Dotted line is the percentage of acetonitrile in the eluting solution containing 0.1% TFA.

acetonitrile 농도를 변화시켜 분리한 결과 70% acetonitrile에서 가장 잘 분리되었다. Reverse phase HPLC에 의해 분리한 첫 번째 획분은 아직도 활성이 있는 획분들이 분리가 잘 되지 않아(자료 제시하지 않았음), 두 번째 획분을 우선 대상으로 삼았으며 그 결과는 Fig. 24와 같다. 각각의 분획들은 비슷한 ACE 저해 활성(각각 60%, 58%, 70%)을 가지고 있었으나 NH₂ column chromatogram상에서 순수해 보이는 분획은 마지막 분획이었으므로(3번 peak), 이 분획을 LC-Mass로 분자량 측정과 순수성을 분석하였다. 이 분획물은 50%의 저해활성을 나타내는 IC₅₀이 92 μM로 나타났다.

다. 분리된 분획의 동정

NH₂ column HPLC에서 분리 정제된 분획을 LC-electrospray ionization mass spectrometer (MassLyns 2.1, Micromass platform II, manchester U. K)로 분석한 결과(Fig. 25), 거의 순수한 물질임을 확인하였다. 이 물질의 분자량은 272.34dalton으로 분석되었다. LC-Mass에 의해 확인된 활성 물질의 sequencing은 ProciseTM를 이용하여 bobrene으로 처리한 여지에 peptide를 담은 상태로 Edman degradation method를 이용하여 분석하였다(13). 분석한 결과는 dipeptide로 밝혀졌으며, Arg-Pro의 아미노산 서열을 가짐을 확인하였다.

Matsumura 등(14)은 가다랭이 내장으로부터 ACE 저해 작용을 나타내는 6종류의 peptide를 분리하여 이들의 아미노산 배열 순서를 밝혔다. 그 결과 이들중 특히 강한 ACE 저해작용을 나타내는 4종류의 tripeptide들은 공통적으로 N-말단 아미노산 잔기로서는 valine, isoleucine 및 leucine과 같은 소수성 아미노산을 가지고, 중앙에는 arginie, lysine과 같은 염기성 아미노산을, C-말단 아미노산 잔기로서는 proline을 함유하고 있다고 보고하고

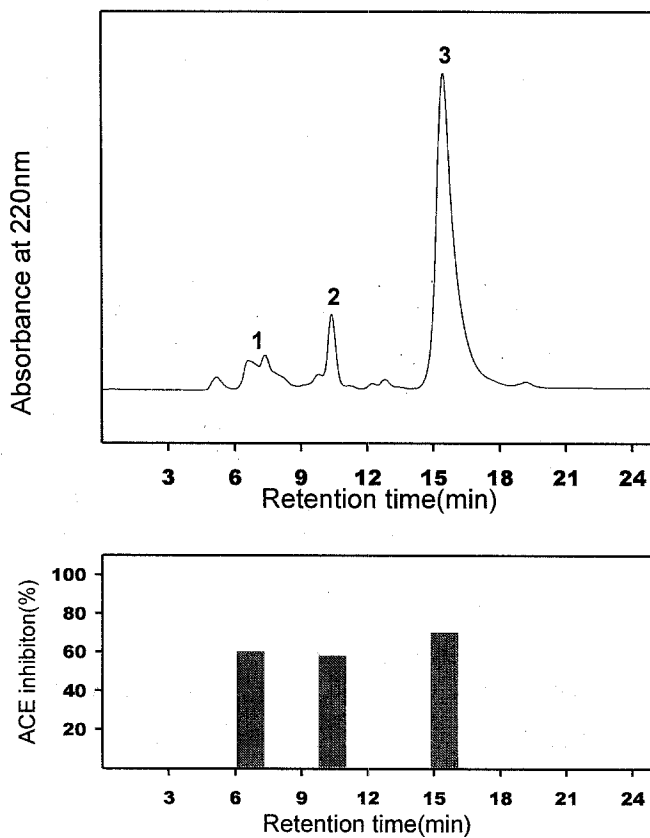


Fig. 24. Purification of fraction 2 from Fig. 18 by HPLC. 70% acetonitrile in water was loaded on a NH_2 column(Shiseido, 10 X 250mm) and eluted in the same solvent.

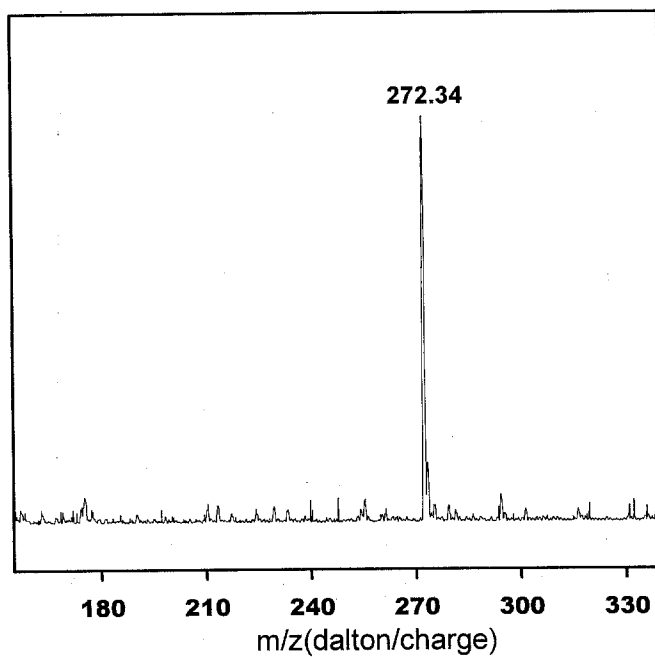


Fig. 25. Mass spectrum of the fraction 3 collected from the HPLC profile shown in NH₂ column(MassLynx 2.1, Micromass Patform II, Manchester, U. K)

있다.

여러 가지 dipeptide를 합성하여 ACE 저해 효과에 미치는 C-말단과 N-말단 아미노산 잔기의 영향에 대하여 검토한 결과(15), C-말단 아미노산 잔기로서는 tryptophan, phenylalanine, tyrosine, proline을, N-말단 아미노산 잔기로서는 방향족 및 염기성 아미노산을 가지는 peptide가 ACE에 대하여 경쟁적으로 저해함으로써 활성을 나타낼 것이라고 추정하고 있다.

이상의 결과를 종합하면 된장에서 분리한 물질의 저해 작용은 그 구성 아미노산의 조성이나 함량에도 영향을 받을 것으로 생각된다. 그러나 그 구성 peptide의 종류나 아미노산의 배열에 더 큰 영향을 받을 것으로 추정된다. 따라서 전통장류인 된장에서 분리한 물질이 나타내는 ACE 저해 작용은 저분자 peptide의 길이나 구조 및 아미노산의 종류, 배열순서 등의 복합적인 작용에 의하여 angiotensin I 전환효소에 대하여 저해작용이 있는 것으로 추정된다.

제 4 절 참고문헌

1. 손동화 : 식품단백질 유래의 생리활성 펩타이드. 식품기술, 7(3), 25(1994)
2. 木本實 : Function of soybean peptide and the present situation of application. 食品と開發, 29(7), 27(1994)
3. 신현경 : 기능성 식품의 개발 현황. 식품기술, 7, 3(1994)
4. Ariyosh, Y. : Angiotensin converting enzyme inhibitors derived from food proteins. *Trend in Food Science & Technol.* May, 139(1993)
5. Oshima, G., Shimabukuro, H. and Nagasawa, K. : Peptide inhibitors of angiotensin-I converting enzyme in digests of gelatin by bacterial

- collagenase. *Biochem. Biophys. Acta.*, 566, 128(1979)
6. Maruyama, S., Miyoshi, S. and Tanaka, H. : Angiotensin-I converting enzyme inhibitors derived from *Ficus Carica*. *Agric. Biol. Chem.*, 53, 2763(1989)
 7. 김선봉, 이태기, 박영범, 염동민, 김의경, 도정룡, 박영호 : 멸치육 단백질 효소분해물로부터 angiotensin-I 전환효소 저해제의 분리 및 그 특성. *한국수산학회지*, 27, 1(1994)
 8. Yamamoto, N., Akino, A. and Takano, T. : Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J. Dairy Sci.*, 77, 917(1994)
 9. Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K. Okubo, A., Yamasaki, S. and Takano, T. : Purification and characterization of angiotensin-I converting enzyme inhibitors from sour milk. *J. Dairy Sci.*, 78, 777(1995)
 10. Kohama, Y., Matsumoto, S., Oka, H., Teramoto, T., Okabe, M. and Mimura, T. : Isolation of angiotensin converting enzyme inhibitor from tuna muscle. *Bilchem. Biophys. Res. Commun.*, 155, 332(1988)
 11. Saito, Y., Nakamura, K., Kawato, A. and Imayasu, S. : Angiotensin converting enzyme inhibitors in Sake and its by-product. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 66, 1081(1992)
 12. Siuzdak, G. : Mass spectrometry for biotechnology. *Academic press, Inc.* (1996)
 13. Cushman, D. W. and Cheung, H. S. : Spectrometric assay and properties of angiotensin converting enzyme of rabbit lung. *Biochem. Parm.*, 20, 1637(1971)
 14. Matsumura, N., Fujii, M., Takeda, Y., Sugita, K. and Shimizu, T. :

Angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides derivde from bonito bowels autolysate. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57, 695(1993)

15. Cheung, H., Wang, F., Ondetti, M., Sabo, E. and Cushman, D. : Binding of peptide substracts and inhibitors of angiotensin converting enzyme. *J. Biol. Chem.*, 255, 401(1980)

제 4 장 면역조절 물질 분야

제 1절 서 설

한국의 전통 장류인 된장, 간장 및 고추장은 대두로부터 복잡한 미생물 발효를 통하여 만들어진 식품이다. 장류는 음식의 맛과 풍미를 부여하는 조미료의 기능과 대두로부터 영양성분의 공급 기능을 갖고 있으며, 특히 된장은 육류 섭취가 부족하였던 시대의 한국인에게 주된 단백질원 식품이었고 현재에도 채식을 선호하는 한국인에게는 매우 중요한 식품이다.

최근 국제적으로 식품의 기능성에 관한 연구가 활발히 전개되고 있다. 일본의 된장 (Miso) 및 간장(Shoyu)에서 항암성(1,2,3,4), 항돌연변이원성(5) 및 항산화성(5,6,7)의 물질이 발견되었고 한국 전통된장에서도 항돌연변이원성(7,8,9)의 효과가 밝혀져 있으나 된장에서의 생체 반응 조절물질(biological response modifier, BRM)에 관해서는 연구보고가 없다.

BRM(10,11)에는 진핵세포에서 생성되는 싸이토카인(cytokine) 및 흉선 호르몬 (thymic hormone)과 세균의 대사산물 및 균체성분 등이 포함된다. 이 물질들은 면역계 세포의 성장, 분화 및 활성을 증가 또는 억제함으로써 면역반응을 조절한다. 현재 여러종류의 BRM이 의학에 이용되고 있으나 미생물의 산물들이 BRM으로서 가장 많이 이용되고 있다.

한국의 전통 된장은 미확인된 많은 종류의 미생물들에 의해 자연적으로 발효된 식품이기 때문에 된장에는 다양한 미생물 효소에 의해 분해된 대두의 각종 성분들 이외에 미생물의 대사산물과 균체성분들이 포함되어 있음을 암시하고 있다. 따라서 한국 전통된장에는 많은 종류의 BRM들이 함유되어 있을 가능성을 제시하고 있다.

본 연구에서는 한국의 전통된장에서 BRM을 탐색하고, 그 작용을 알아보고자 된장으로부터 BRM의 추출 및 분획을 시도하고, 이 분획물이 면역계 세포인 림프구 및 대식세포의 기능에 미치는 효과를 조사하였다.

제 2절 재료 및 방법

1. 재 료

BRM을 추출하기 위한 된장은 전라남도 순천지방에서 한국 전통식으로 제조한 된장을 선정하였으며 -20℃에 보관하고 사용하였다. 실험의 대조군으로서는 동일종의 대두를 시장에서 구입하여 메주를 만들때와 같은 방법으로 가열하고 분쇄한 후 발효를 시키지 않고 사용하였다.

2. 실험동물

특수 무병원균(specific pathogen free) 환경에서 사육한 생후 5~6 주령의 암컷 C57BL/6 및 BALB/c 를 대한실험동물센터에서 구입하여 본 대학교 의과대학 실험동물실에서 7일간 적응시킨 후 사용하였다.

3. 된장으로부터 면역증진 물질의 추출 및 분리

발효시키지 않은 삶은 대두의 분쇄물과 발효시킨 된장으로부터 면역증진 물질(Immunomodulator extracted from Korean-style fermented soybean paste, KFSP)의 추출은 증류수를 사용하였고, 추출물은 ammonium sulfate로 침전분리, DIAFLO ultrafiltration membranes (Amicon, Inc. MA)에 의해 분자량에 따

라 부분 분리, Column chromatography에 의한 Gel filtration 및 Ion exchange 로 부분 분리, 그리고 Non-SDS 및 SDS acylamide gel electrophoresis로 부분 분리 하였다(Fig. 26).

가. Ammonium sulfate로 KFSP의 침전분리

된장 2 Kg에 증류수 5 L 비율로 넣어 mixer로 1분간 된장 부유액을 만들고 1000ml flask에 500 ml씩 담아 4°C 냉장고에서 20시간 교반기로 처리한 후 여과지(whatmann filter paper, No.2) 및 membrane filter (pore size, 0.4 및 0.2 μ m, Sierra Court-Dublin, CA)로 여과하였다. 증류수로 추출한 여과액에 ammonium sulfate를 85%되도록 용해시키고 4°C에서 24시간 방치한 후 원심분리(14,000 \times G/30 min)하여 침전물을 취하였다. 침전물은 PBS에 용해시키고, 다시 원심분리(14,000 \times G/30min)하여 불용성 물질을 제거한 후 투석 membrane tube에 넣어 동일한 PBS로 4°C 냉장고에서 48시간 투석시켜 ammonium sulfate를 제거하였다.

나. DIAFLO ultrafiltration membranes으로 KFSP의 부분분리

Ammonium sulfate를 제거한 용액은 membrane filter(pore size, 0.4 및 0.2 μ m)로 일차 여과하고, 여과액은 ultrafiltration membrane(Amicon Inc.)을 사용하여 분자량 10만 이상을 분획하였다. 용액내에 잔존하는 ammonium sulfate는 ultrafiltration membrane 최종 여과시 0.05M phosphate buffer saline (PBS)로 3회 여과 세척하였다. 분획한 시료는 0.2 μ m membrane filter로 다시 여과하여 4°C 또는 -70°C에서 보관하였으며 일부는 동결건조하여 -70°C에 보관하고 필요 시 사용하였다.

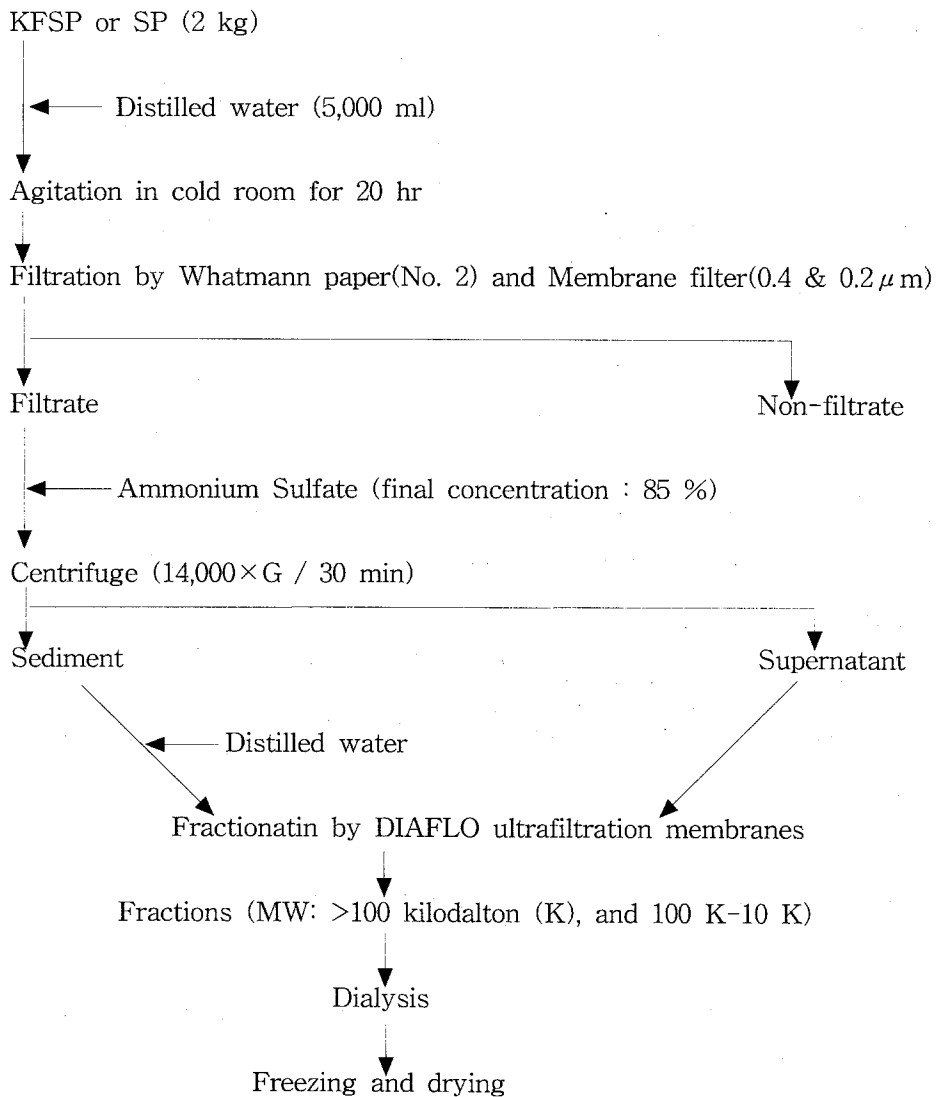


Fig. 26. Flow chart for the isolation of immunoenhancer from soybean paste fermented by Korean style (KFSP) or non-fermented soybean paste (SP)

다. Gel filtration에 의한 KFSP의 부분분리

DIAFLO ultrafiltration membranes으로 부분 분리한 KFSP를 Sephacryl S-300 HR(Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)로 충전시킨 column으로 1ml씩 분획한다. 이때 사용한 완충액은 0.05M Phosphate buffer(pH 7.4)를 사용하였다.

라. Ion exchange에 의한 KFSP의 부분분리

Gel filtration에 의해 분리하여 모은 KFSP는 분자량 10만 이상의 물질을 통과시키지 않는 Minisart SRP 15 membrane filter(Sartorius AG, Gotting, Germany)로 농축하고 20mM Tris 완충액(pH 8.0)으로 1회 세척하였다. 동일 완충액으로 충전시킨 Mono Q HR 5/5 Ion exchange(Amersham)에 농축시킨 KFSP를 runnig 시킨후 1M NaCl이 함유된 동일 완충액에 의해 gradient로 1 ml씩 분획하였다.

마. Acylamide gel electrophoresis에 의해 KFSP의 정제

Ion exchange에 의해 분리한 KFSP는 Minisart SRP 15 membrane filter로 다시 농축하고 이 농축액을 5% Non-SDS acylamide gel로 전기영동하였다. Stacking gel과 1cm 간격으로 절단한 Runing gel들을 electroextrusion하여 각각의 분획물을 채취하고 Minisart SRP 15 membrane filter로 농축 및 PBS 완충액으로 세척하였다. 각각의 분획물에 대한 림프구의 증식반응을 검사한 후 림프구 증식반응을 증가시키는 분획물 만을 취하여 0.2 μ m membrane filter로 여과한 후 4 $^{\circ}$ C 또는 -70 $^{\circ}$ C에서 보관하였으며 일부는 동결건조하여 -70 $^{\circ}$ C에 보관하고 필요시 사용하였다.

4. 마우스의 림프구 및 대식세포의 분리

정상의 C57BL/6 또는 BALB/C 마우스 (6-7 주령, 암컷)를 희생시켜 비장 및 복강으로부터 림프구 및 대식세포를 각각 분리하였다. 림프구의 분리 방법은 채취한 비장을 멸균된 slide glass 두장으로 가볍게 압착하여 림프구를 유리시켜 RPMI 1640 배지 (2 mM L-glutamine, 2.2 mg/ml sodium bicarbonate, 100 units/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 및 10 mM HEPES)로 3회 세척하였다. 림프구에 함유된 적혈구는 ACK lysing buffer (Coligan 등, 1992)를 사용하여 제거하였으며 림프구는 10 % 우태아 혈청이 함유된 RPMI 1640 배지(이후 완전배지로 칭함)에 2×10^6 세포/ml로 부유시켰다.

한편 대식세포의 분리는 마우스 복강으로 RPMI 1640 배지 6 ml를 주사하여 복강을 세척하고 복강세척액을 동일 주사기로 다시 채취하였다. 여러 마우스로부터 채취한 복강세포는 함께 혼합하여 완전배지에 부유시킨 후 2 시간 배양하여 대식세포가 배양용기에 부착하게 하였다. 배양용기로부터 비부착된 세포들은 세척하여 제거하고 부착된 세포들은 rubber policeman으로 용기 밑면을 부드럽게 문질러 떼어내어 대식세포로 사용하였다.

5. 림프구의 증식반응 측정

림프구 증식의 측정은 [3 H]-thymidine (3 H-TdR) incorporation (Coligan 등, 1992) 방법에 의해 시행하였다. 즉, 완전배지에 준비한 림프구 부유액 100 μ l (2×10^5 cells)을 96 well round-bottomed microplate(Corning, Rochester, NY)에 분주하고, 완전배지로 희석시킨 여러농도의 된장 분획물들을 각

각의 well에 100 μ l씩 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 항원항습기(이후 세포의 배양은 이에 준한다)에서 3일간 배양한다. 배양 후 10 μ l(1.0 μ Ci)의 ³H-TdR (New England Nuclear Boston, MA)을 각 well에 첨가하고 6 시간 연장 배양하였다. 각 well에 배양된 세포들은 glass fiber filter에 흡착시키고 beta counter로 ³H-TdR 의 방사선량을 측정하여 세포의 증식반응을 count per minute(CPM)로 나타내었다.

6. 싸이토카인 생산과 측정

림프구의 interferon gamma(IFN- γ) 및 interleukin-6(IL-6)생산과 대식세포의 IL-6, IL-12 및 tumor necrosis factor(TNF- α)생산은 다음과 같이 측정하였다. 준비한 림프구 부유액 1 ml씩을 24 well cul-ture plate에 분주하고 자극제로는 완전배지로 희석시킨 된장분획물들을 각각의 well에 여러 농도로 첨가하여 배양하였다. 배양 시간에 따라 각 well로 부터 상층액을 취하여 -70 °C에 보관하고 싸이토카인을 측정하였다. 각각의 싸이토카인 측정은 ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)을 이용한 Mouse IFN- γ , IL-6, IL-12 및 TNF- α Assay Kit (Endogen Inc. MA)을 사용하여 시행하였다.

7. 된장 분획물 및 대두 lectin에 대한 항체생산

분자량 100 kDa의 된장 분획물(KFSP-100)(1mg/ml) 또는 *Glycin max* 로 부터 분리한 lectin(Sigma)을 Herb needle를 이용하여 동량의 complete freund's adjuvant와 혼합하여 항원을 준비하였다. 준비한 항원 1 ml를 200 μ l씩 가토의 등 피하에 산발적으로 주사하였다. 일주일 후 동일한 된장 분

획물 또는 lectin을 동량의 incomplete freund's adjuvant에 상기와 같은 방법으로 혼합하고 매주 1회씩 3회 연속 가토에 주사하였다. 최종 주사 일주일 후 가토로부터 혈액을 채취하여 혈청을 분리하였다. 분리한 혈청은 -70℃에 보관하고 anti-KFSP antibody(항 KFSP-100항체) 또는 anti-soybean lectin antibody(항대두 lectin항체)로 사용하였다.

8. 마우스에 알레르기 유발

마우스에 알레르기 유발은 Ha등의 방법(17)을 응용하여 시행하였다. 즉, 생리식염수에 용해시킨 ovalbumin(OVA, 1 mg/ml)에 aluminium hydroxide(최종농도, 1 mg/ml)와 *Bordetella pertussis*사균 부유액(최종농도, 5×10^9 균수/ml)을 함께 혼합한 후 이 혼합액 0.2 ml를 마우스 복강내로 1회 주사 하였다. 알레르기 유발에 대한 판정은 OVA(100 μ l/mouse)를 꼬리 정맥내로 주사하고 Table 21에 제시한 anaphylactic shock score로 판정 하였다.

9. 항체측정

마우스 혈청내 OVA 특이 항체의 측정은 ELISA방법으로 측정하였다. 즉, OVA를 coating buffer(100 mM carbonate buffer, pH 9.6)에 25 μ l/ml로 용해시킨 후 96-well ELISA microtiter plate(Corning)의 각 well에 100 μ l씩 넣고 4℃ 냉장고에서 24시간 부착시키고 0.05% Tween 20이 함유된 인산완충액(PBS : phosphate buffered saline, pH 7.4)(PBST)으로 3회 세척하였다. 각 well에 3% bovine serum albumin(BSA) 용액을 200 μ l씩 분주하여 실온에서 2시간 방치한 후 다시 plate를 PBST로 3회 세척하였다. 마우스 혈청을 1% BSA가 함유된 PBS로 10%(IgG 아군, IgM 및 IgA 항체측정) 또는 50%(IgE 항체측정)되게

Table 21. Scoring of active systemic anaphylaxis

Shock score	Sign
0	No sign of shock
1	Decreasing bouts of spontaneous activity and piloerection
2	Loss of coordination and dyspnea
3	No activity following whisker stimuli and slight activity after prodding with ball-point pen
4	No activity following whisker stimuli, progressive paresis beginning with the hind leg
5	No activity following Haffne's tail pinching stimuli by forcep
6	Brief but violent convulsion, prostration, coma or substantial recovery
7	Fatal shock (died within 30-60 min)
8	Fatal shock (died within 15 min)

희석하고 이중 100 μ l씩을 각 well에 넣어 실온에서 1시간 반응시킨 후 다시 PBST로 4회 세척하였다. Biotin이 결합된 rat anti-mouse IgE, -mouse IgM, -mouse IgA 또는 mouse IgG subclasses(IgG1, IgG2a 및 IgG3) 단순항체들을 1% BSA가 함유된 PBS로 2 μ g/ml되게 희석하여 각각 100 μ l씩을 각 well에 넣어 상온에서 1시간 반응시키고 PBST로 5회 세척하였다. Horseradish peroxidase가 결합된 goat anti-biotin 항체를 1% BSA가 함유된 PBS로 1 μ g/ml되게 희석하여 각 well에 100 μ l씩을 넣고 상온에서 1시간 반응시킨 후 PBST로 세척하였다. 기질용액인 OPD(citrate-phosphate buffer 25 ml에 10 mg의 O-phenylenediamine와 10 μ l의 2H₂O₂ 함유)를 각 well에 100 μ l씩 넣어 상온에서 발

색 반응을 유도하였다. 반응 15~30분 후 2.5 N H₂SO₄ 용액 50 μ l씩을 각 well에 넣어 반응을 중단시키고 ELISA reader를 이용하여 492nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정한 알레르겐 특이 항체의 흡광도 값은 표준 항체의 농도에 대한 흡광도 값에 비교하여 농도로 산정하였다. 이 실험에 사용된 모든 항체는 Pharmingen(San Diego, CA)에서 구입하였다. 세포배양액내의 IgM 측정은 상기의 방법과 동일하게 수행하되 단지 마우스 혈청대신 세포배양액을 첨가하는 내용만 차이가 있었다.

10. Lipopolysaccharide (LPS)에 대한 항체생성

Escherichia coli 세포벽에서 추출한 LPS (Sigma)를 생리식염수에 200 μ g/ml로 부유시키고 이 부유액 0.5 ml와 동량의 complete freund's adjuvant를 herb needle를 이용하여 혼합시켜 토끼의 등 피하에 0.2 ml씩 여러 부위에 1차 면역시켰다. 일주일 후 동일한 LPS 용액에 complete freund's adjuvant 대신 incomplete freund's adjuvant를 동일한 방법으로 혼합시킨 혼합액을 같은 방법으로 매주 1회씩 3회 주사하여 면역시켰다. 마지막 주사 일주일 후 토끼로부터 채혈하여 혈청을 분리하였다. 분리한 혈청은 4 $^{\circ}$ C 또는 -70 $^{\circ}$ C에서 보관하고 LPS에 대한 항체로 사용하였다.

11. KFSP에 대한 항체생성

Acylamide gel electrophoresis에 의해 부분분리한 KFSP를 생리식염수에 200 μ g/ml로 부유시키고 위에서와 같이 complete 및 incomplete freund's adjuvant와 혼합하여 토끼에 면역시켰으며 분리한 혈청은 4 $^{\circ}$ C 또는 -70 $^{\circ}$ C에서 보관하고 KFSP에 대한 항체로 사용하였다.

제 3절 결과 및 고찰

1. 면역조절물질 탐색 및 특성

가. 삶은 대두의 분쇄물과 된장의 추출물이 마우스 림프구의 증식에 미치는 효과

삶은 대두의 분쇄물 또는 된장으로부터 추출한 분획물에 대한 생체반응 조절물질(biological response modifier: BRM)의 검색을 위해 삶은 대두 및 된장의 추출물을 ammonium sulfate로 처리하고 원심하여 분리한 상층액과 침전물에서 분자량 100 kDa 이상과 10-100 kDa의 분획물을 분리하였다. 각각의 분획물(2 μ g 및 10 μ g)을 마우스 림프구 배양에 첨가하고 ^3H -TdR incorporation으로 증식반응을 비교하였다(Table 22). 된장의 추출물 중 ammonium sulfate에 침전되지 않는 상층액에서는 림프구의 증식이 관찰되지 않는데 비하여, ammonium sulfate 침전물에서는 림프구의 증식이 크게 증가되는 것으로 나타났다. Ammonium sulfate 침전물의 림프구 증식효과를 분자량에 따라 비교하여 보았을 때 분자량 10~100 kDa의 분획물 2 μ g 및 10 μ g에서는 림프구의 증식이 각각 879 ± 121 및 $1,212 \pm 328$ cpm인데 비하여 분자량 100 kDa 이상의 분획물 2 μ g 및 10 μ g에서는 각각 $29,648 \pm 954$ 및 $154,064 \pm 3,552$ cpm으로 현저히 높은 증식을 보였으며, 그 증식정도는 분획물의 농도에 비례하는 것으로 나타났다. 이에 반하여 삶은 대두의 ammonium sulfate 침전물과 상층액의 분획물에서는 모두 분자량 및 농도에 관계 없이 마우스 림프구의 증식이 관찰되지 않았다. 이상의 결과에 따라 이후의 실험에서는 ammonium sulfate로 침전시킨 분자량 100 kDa 이상의 된장 분획물(KFSP-100)을 선택하여 면역계 세포에 미치는 효과를 조사하였다.

Table 20. Effects of water soluble extracts of soybean paste fermented by Korean style (KFSP) or non-fermented soybean paste (SP) on the proliferation of spleen cells from BALB/c mouse.

Extract treated with ammonium sulfate	Molecular weight	Concn. of extract	³ H-TdR incorporation (cpm) by lymphocytes cultured with extract
Placebo			216 ± 32
SP			
Supernatants	> 100 K	2 μg	123 ± 25
		10 μg	132 ± 18
	10 K-100 K	2 μg	145 ± 12
		10 μg	105 ± 24
Precipitates	> 100 K	2 μg	176 ± 29
		10 μg	168 ± 23
	10 K-100 K	2 μg	151 ± 19
		10 μg	192 ± 17
KFSP			
Supernatants	> 100 K	2 μg	514 ± 68
		10 μg	718 ± 72
	10 K-100 K	2 μg	247 ± 26
		10 μg	318 ± 42
Precipitates	> 100 K	2 μg	29,648 ± 954
		10 μg	154,064 ± 3,552
	10 K-100 K	2 μg	879 ± 121
		10 μg	1,215 ± 328

The SP or KFSP was extracted with water and saturated with ammonium sulfate, and the supernatants and precipitates were separated into two fractions (molecular weight, >100 K, and 10 K-100 K) by DIAFLO ultrafiltration membranes, respectively. The splenic lymphocytes (2×10^5 cells/200 μl) from BALB/c mice were cultured at various concentration of SP or KFSP for 72 hrs, and their proliferations were measured by 6 hrs-³H-TdR incorporation.

나. KFSP-100의 열 안전성

KFSP-100의 열 안전성을 알아보기 위하여 일정량의 KFSP-100 용액을 60℃ 또는 100℃에서 각각 30분간 열 처리하고 림프구의 증식반응에 미치는 효과를 조사하여 Fig. 27에 나타내었다. Fig. 27에서 나타낸 바와 같이 KFSP-100를 60℃에서 열처리하고 림프구 배양에 첨가한 경우 림프구의 증식은 $24,002 \pm 950$ cpm으로 열처리 하지않은 KFSP-100를 첨가한 대조군의 $25,142 \pm 1,000$ cpm과 차이를 나타내지 않았다. 한편 KFSP-100을 100℃에서 열처리하고 림프구 배양에 첨가한 경우는 림프구의 증식이 $22,899 \pm 700$ cpm으로 대조군에 비해 약간 감소된 경향을 보이거나 큰 차이는 발견할 수 없었다.

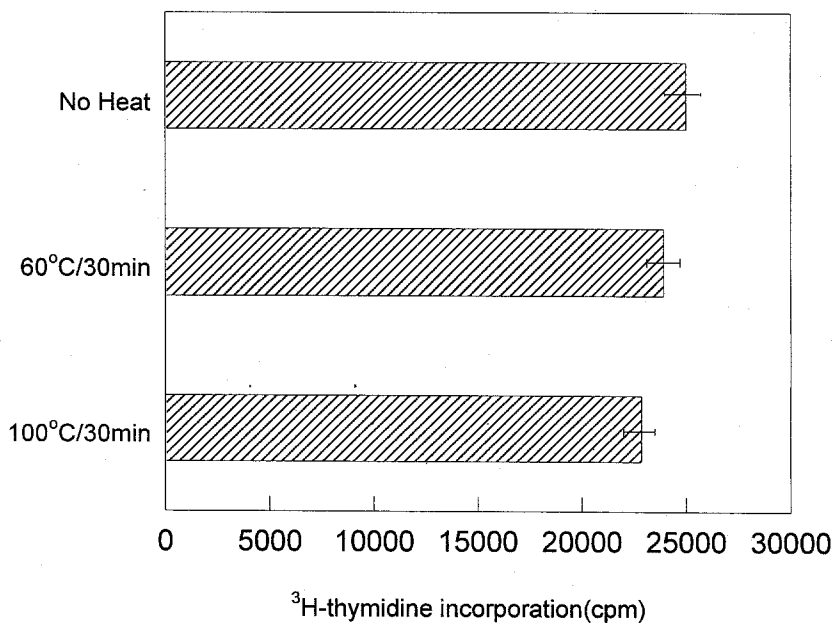


Fig. 27. Heat stability of KFSP-100. The splenic cells(2×10^5 cells/ $200 \mu\ell$) from BALB/c mice were cultured for 72hrs in medium contained with KFSP-100 heated at 60°C or 100°C for 30min and their proliferations were measured by 6 hrs- ^3H -TdR incorporation.

다. KFSP-100와 대두 lectin의 기능성 비교

KFSP-100와 대두 lectin이 동일 또는 다른 물질인지를 확인하기 위하여 항체에 의한 두 물질의 기능성 차단효과와 림프구에 대한 응집반응 효과를 비교하였다. 항체에 의한 두 물질의 기능성 차단효과를 조사하기 위하여 두 물질을 가토에 각각 접종하여 항 KFSP-100 항체와 항 대두 lectin 항체를 준비하였다. 이들 각각의 항체를 KFSP-100와 혼합하여 반응시킨 후 그 반응액을 림프구 배양에 첨가하여 림프구의 증식반응에 미치는 효과를 비교하였다. 이때 항체에 대한 대조군으로는 정상 가토의 혈청을 사용하였다(Fig. 28). KFSP-100만을 첨가한 림프구의 $^3\text{H-TdR}$ incorporation은 $25,142 \pm 2,152$ cpm인데 반하여 KFSP-100을 항 KFSP-100 항체와 반응시킨 경우 림프구 증식은 $3,974 \pm 305$ cpm으로 현저히 감소되었다. 한편 KFSP-100을 항 대두 lectin 항체와 반응시킨 경우 림프구 증식은 $16,914 \pm 2,580$ cpm으로 감소되지 않았으며 KFSP-100을 대조혈청과 반응시킨 림프구의 $17,234 \pm 2449$ cpm과 차이가 없었다. 림프구에 대한 두 물질의 응집반응 효과를 조사하기 위하여 마우스 림프구를 $50 \mu\text{g/ml}$ 의 KFSP-100 또는 대두 lectin이 함유된 완전배지에 1×10^6 세포/ml로 부유하여 24시간 배양하였다. Fig. 22에서 보는 바와 같이 KFSP-100이 함유된 배지에서 림프구는 응집현상을 나타내지 않으나(Fig. 29A) 대두 lectin이 함유된 배지의 림프구는 심한 응집반응을 나타내었다(Fig. 29B).

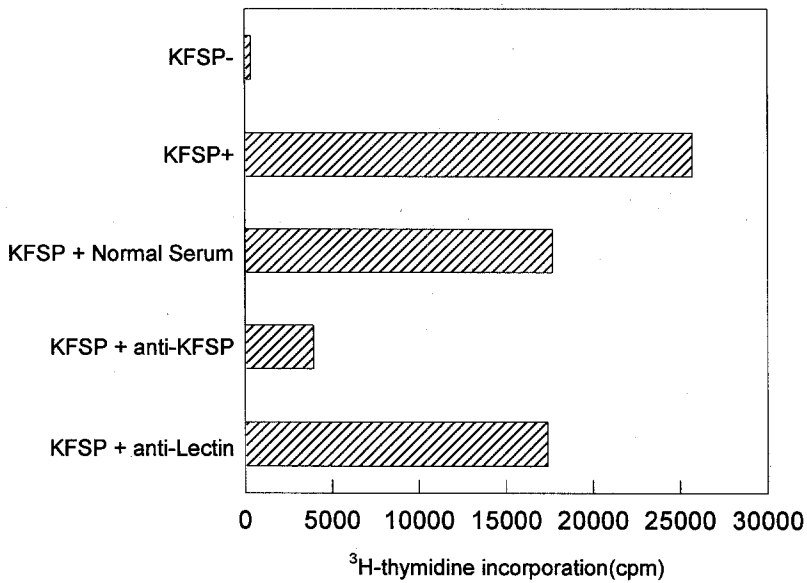
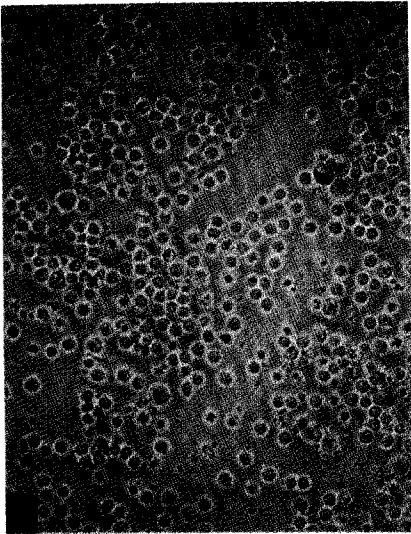


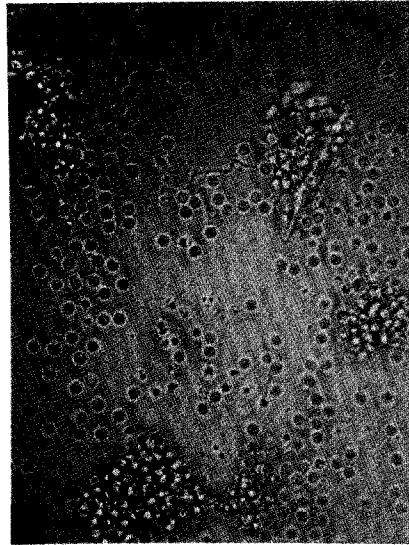
Fig. 28. Blocking effect of anti-KFSP-100 antibody or anti-soybean lectin antibody on the proliferation of mouse splenic lymphocytes stimulated with KFSP-100. The sera were obtained from rabbit immunized with KFSP-whole extract precipitated by ammonium sulfate or with lectin(Sigma) extracted from Glycine max. Each sera(100 μ l) were added to 100 μ l(10 μ g) of KFSP-100, and the mixtures were incubated at 37 $^{\circ}$ C for 30 min. The splenic lymphocytes(2×10^5 cells/100 μ l) from BALB/c mouse were cultured with 100 μ l of the mixtures for 72 hrs. Their proliferations were measured by 6 hrs-³H-TdR incorporation.

(A)



KFSP-100

(B)



Soybean lectin

Fig. 29. Effect of KFSP-100 and soybean lectin on the agglutination of mouse splenic lymphocytes. The splenic lymphocytes (1×10^6 cells/ml) from BALB/c mouse were suspended in medium contained KFSP-100 ($50 \mu\text{g/ml}$) or soybean lectin ($50 \mu\text{g/ml}$). The cell suspension ($200 \mu\text{l}$) were distributed in 96 well flat-bottomed microtiter plate and incubated for 24 hrs.

라. KFSP-100이 마우스 림프구 및 대식세포의 싸이토카인 생성에 미치는 효과

면역계 세포에 대한 KFSP-100의 BRM 효과는 림프구 및 대식세포의 싸이토카인 생성에 미치는 효과로 측정하였다. 싸이토카인 생성은 림프구 및 복강대식세포(1×10^6 cells/ml)를 KFSP-100($20 \mu\text{g/ml}$)이 함유된 완전배지에 배양하여 측정하였다. 림프구는 24, 48 및 72 시간 배양하고 대식세포는 6, 24 및 48 시간 배양하여 이들 배양액의 싸이토카인 함량을 ELISA assay kit로 측정하였다. Fig. 30에서 보는 바와 같이 KFSP-100가 대식세포에 의한 $\text{TNF-}\alpha$, IL-6 및 IL-12 생성과 림프구에 의한 IL-6 및 IFN- γ 생성을 모두 증가시키는 것으로 나타났다. 대식세포에 의한 $\text{TNF-}\alpha$ 의 생성은 KFSP-100이 함유되지 않은 배지(대조군)에서는 배양시간에 관계없이 $57 \pm 2 \sim 58 \pm 2$ pg/ml 범위인데 비해 KFSP-100이 함유된 배지에서는 배양 6시간에 $3,166 \pm 127$ pg/ml으로 크게 증가되었으며 배양 24 및 48 시간에는 급격히 감소되는 것으로 나타났다(Fig. 30A). 대식세포의 IL-6 생성도 KFSP-100이 함유된 배지에서 배양 6, 24 및 48 시간 모두 20,000 pg/ml 이상으로 대조군의 $1,359 \pm 28 \sim 1,516 \pm 42$ pg/ml 생성에 비해 크게 증가되었다(Fig. 30B). 그러나 대식세포의 IL-12 생성에서는 KFSP-100을 첨가한 경우 배양 6, 24 및 48 시간에 각각 100 ± 5 , 95 ± 9 및 176 ± 46 pg/ml으로 대조군의 53 ± 9 , 17 ± 5 및 121 ± 105 pg/ml에 비해 모두 증가된 경향을 보이나 그 효과는 높지 않았다(Fig. 30C). 한편 림프구에 의한 IL-6 생성 대조군에서는 배양 72 시간에 10 ± 8 pg/ml이나 KFSP-100가 함유된 배지에서는 배양 24, 48 및 72 시간에 각각 253 ± 20 , 297 ± 35 및 273 ± 40 pg/ml으로 증가되었으며 배양 시간에 따른 생성의 차이는 발견할 수 없었다 (Fig. 30D). 림프구에서의 IF

N- γ 생성은 대조군 및 20 μg 의 KFSP-100 첨가 군에서는 배양시간에 관계 없이 모두 발견되지 않으나 80 μg 의 KFSP-100 첨가 군에서는 24, 48 및 72 시간에 각각 98 ± 53 , $1,896 \pm 1245$ 및 $7,519 \pm 548$ pg/ml로서 증가되었으며 72 시간에 가장 생성이 높게 나타났다(Fig. 23E).

마. KFSP-100가 T 및 B 림프구의 증식반응에 미치는 효과

마우스 비장 림프구의 증식반응 증강에 대한 KFSP-100의 표적세포를 알아보기 위하여 immuno-magnetic beads인 Dynabeads mouse-pan B (B220) 또는 -pan T(Thy1.2) (Dyna AS, Oslo, Norway)를 사용하여 비장 림프구로부터 T 및 B 림프구를 분리하였다. 분리한 각각의 림프구에 KFSP-100를 첨가하고 3 일간 배양하여 ^3H -TdR incorporation으로 증식반응을 비교 조사하였다. Fig. 31에 제시한 결과와 같이 분리한 T 림프구에서는 증식반응이 거의 발견되지 않으나 분리하지 않은 비장 림프구 및 분리한 B 림프구에서는 각각 $161,791 \pm 11,724$ 및 $215,300 \pm 12,530$ cpm의 높은 증식반응 증가를 나타내었다.

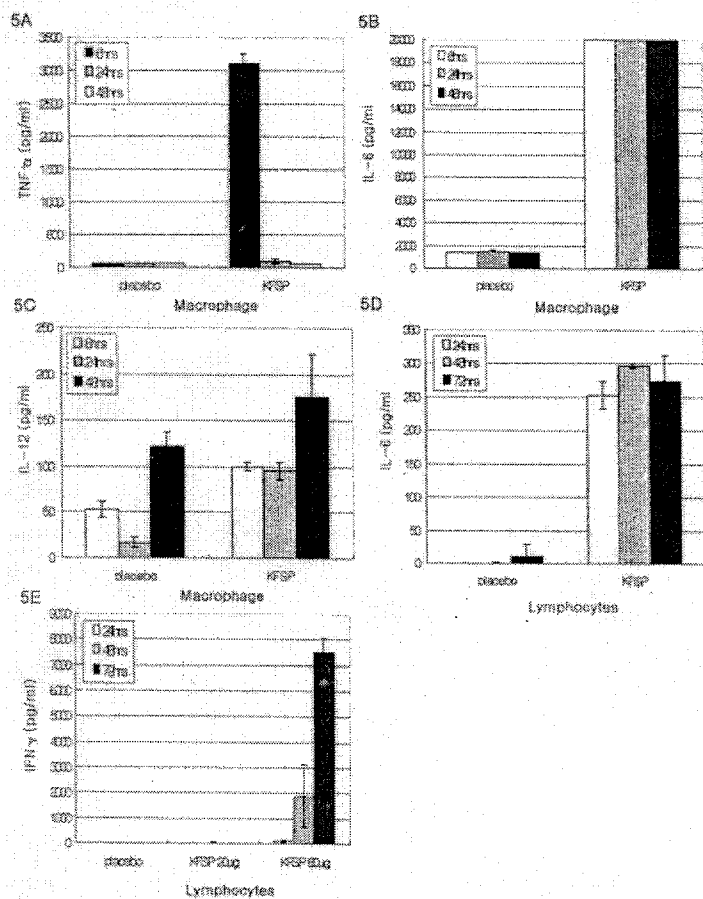


Fig. 30. The effect of KFSP-100 on the production of cytokine by macrophages and lymphocytes from mouse. The macrophages and lymphocytes were obtained from peritoneum and spleen of C57BL/6 mice respectively. The macrophages (1×10^6 cells/ml) were cultured for 6, 24 or 48hrs and the lymphocytes (2×10^6 cells/ml) were cultured for 24, 48 or 72 hrs in medium contained $20 \mu\text{g}$ of KFSP-100. The activities of cytokines were assayed by ELISA.

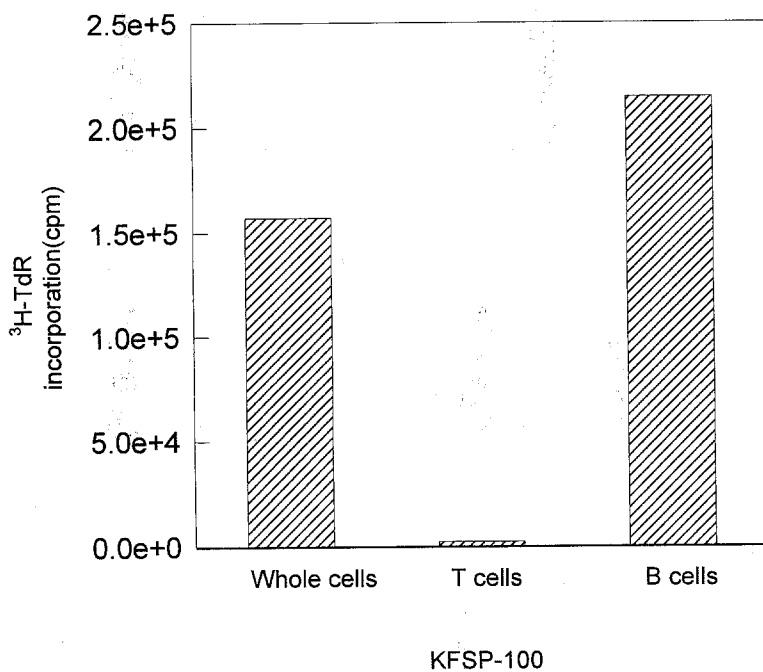


Fig. 31. The effect of KFSP-100 on the proliferation of T or B lymphocytes. The lymphocytes were obtained from BALB/c mouse spleen, and the isolation of T or B lymphocytes was carried out by using immuno-magnetic beads. The cells (2×10^5 cells/ $200 \mu\text{l}$) were cultured for 72 hrs in medium contained $2 \mu\text{g}$ of KFSP-100 and their proliferations were measured by 6 hrs- ^3H -TdR incorporation.

2. 면역조절물질의 분리 및 정제

된장으로부터 면역증진 물질(Immunomodulator extracted from Korean-style fermented soybean paste, KFSP)의 추출은 증류수를 사용하였고, 추출한 여과액에 ammonium sulfate를 85%되도록 처리한 후 침전물을 분리하여 투석하였으며, 투석액을 ultrafiltration membranes (Amicon, Inc. MA)에 의해 분자량에 따라 부분 분리하였다. DIAFLO ultrafiltration membranes으로 부분 분리한 KFSP를 Sephacryl S-300 HR(Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)로 충전시킨 column으로 gel filtration을 행하였으며 이때 사용한 완충액은 0.05M Phosphate buffer(pH 7.4)로서 각각의 분획물에 대한 림프구의 증식반응을 검사한 후 Fig. 32에 나타낸 바와 같이 림프구 증식반응을 증가시키는 22번 분획물부터 45번 까지의 분획물들을 모아 다음 실험에 사용하였다.

Gel filtration에 의해 분리하여 모은 KFSP는 분자량 10만 이상의 물질을 투과시키지 않는 Minisart SRP 15 membrane filter(Sartorius AG, Gotting, Germany)로 농축하고 20mM Tris 완충액(pH 8.0)으로 1회 세척하고 동일 완충액으로 충전시킨 Mono Q HR 5/5 Ion exchange(Amersham)에 농축시킨 KFSP를 runnig시킨 후 1M NaCl이 함유된 동일 완충액에 의해 gradient로 1ml씩 분획하였다. Gel filtration과 같이 각각의 분획물에 대한 림프구의 증식반응을 검사한 후 림프구 증식반응을 증가시키는 19번 분획물부터 22번 분획물까지 함께 모았다(Fig. 33).

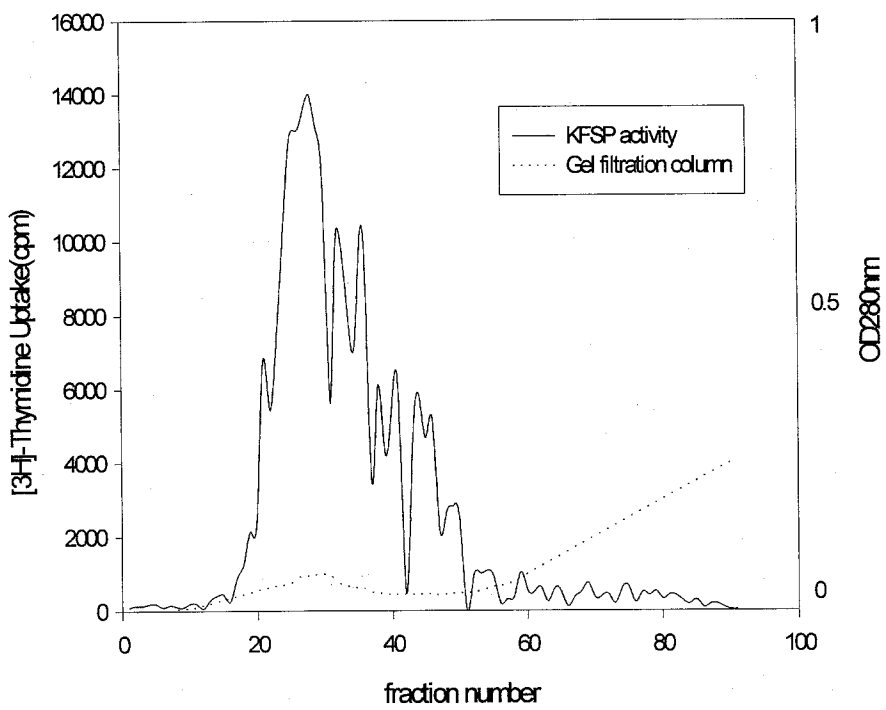


Fig. 32. Column chromatography of KFSP on Sephacryl S-300
 Elution : 0.05M phosphate buffer(pH 7.4)
 Eluted volume: 1ml

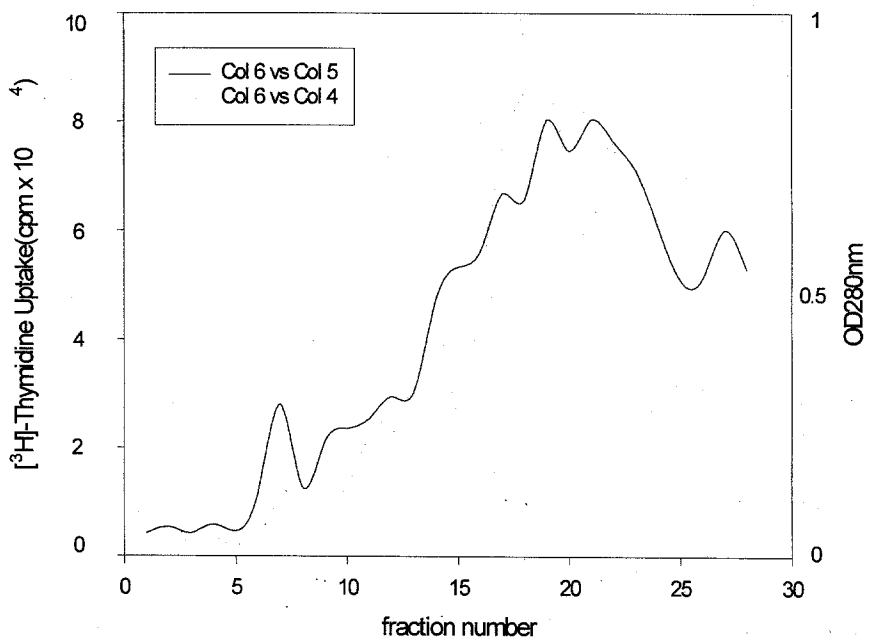


Fig. 33. Column chromatography of KFSP on Mono Q HR 5/5
 Buffer A: 20mM Tris buffer (pH 8.0)
 Buffer B: 20mM Tris buffer (pH 8.0) plus 1M NaCl

Gel filtration과 Ion exchange에 의해 분리한 KFSP를 5% Non-SDS acylamide gel로 전기영동하고 Stacking gel과 1cm 간격으로 절단한 Running gel들을 electroextrusion하여 림프구의 증식반응을 조사한 결과 Stacking gel에서 추출한 용액에서 90%이상의 림프구 증식반응의 증가를 나타내었다. 따라서 이후의 실험에서는 Stacking gel에서 추출한 용액을 KFSP로 사용하였으며 이 용액은 0.2 μ m membrane filter로 여과한 후 4 $^{\circ}$ C 또는 -70 $^{\circ}$ C에서 보관 또는 동결건조하여 -70 $^{\circ}$ C에 보관하고 필요시 사용하였다.

3. 면역조절물질의 작용기전 및 치료적 효과

가. 시험관내에서 KFSP가 B 림프구의 증식에 미치는 효과

특수 무 병원균(specific pathogen free) 환경에서 사육한 생후 5~6 주령의 암컷 마우스(BALB/c)를 대한실험동물센터에서 구입하여 본 의과대학 실험동물실에서 일주일간 적응시킨 후 사용하였다. 정상 마우스 비장에서 분리한 B 림프구 부유액에 KFSP를 첨가하여 배양한 결과 Fig. 34에 제시한 바와 같이 KFSP 비첨가군에서는 B 림프구의 증식이 2×10^6 세포수인데 반하여 KFSP 첨가군에서는 10×10^6 세포수로 KFSP가 B 림프구의 증식을 증가시키는 것으로 나타났다.

나. 생체내에서 KFSP가 B 림프구의 증식에 미치는 효과

마우스 복강내로 KFSP 또는 Placebo를 투여하고 2일 및 3일째에 마우스를 희생시켜 비장으로부터 림프구를 분리하고 anti-mouse pan B(B220) conjugated magnetic beads로 B 림프구를 분리하여 haemocytometer cha-

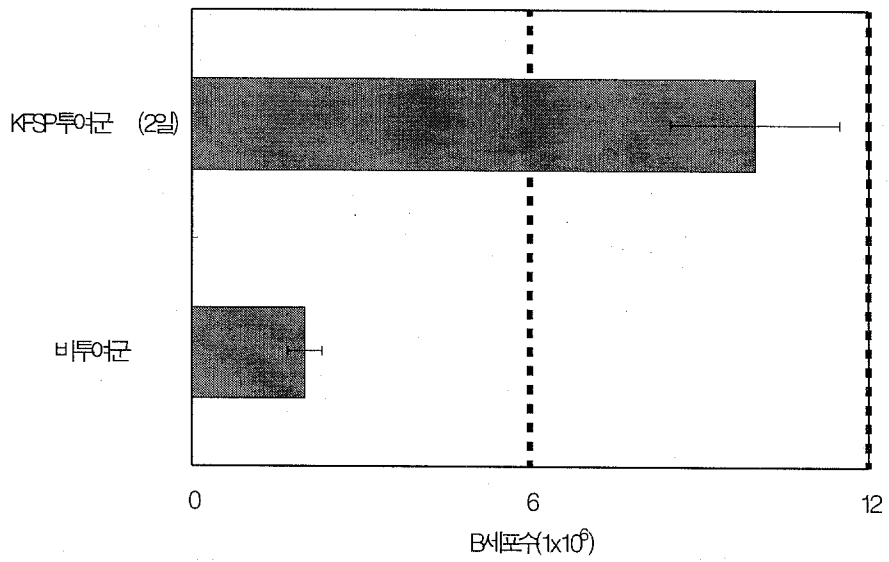


Fig. 34. Proliferation of B lymphocytes by KFSP *in vitro*

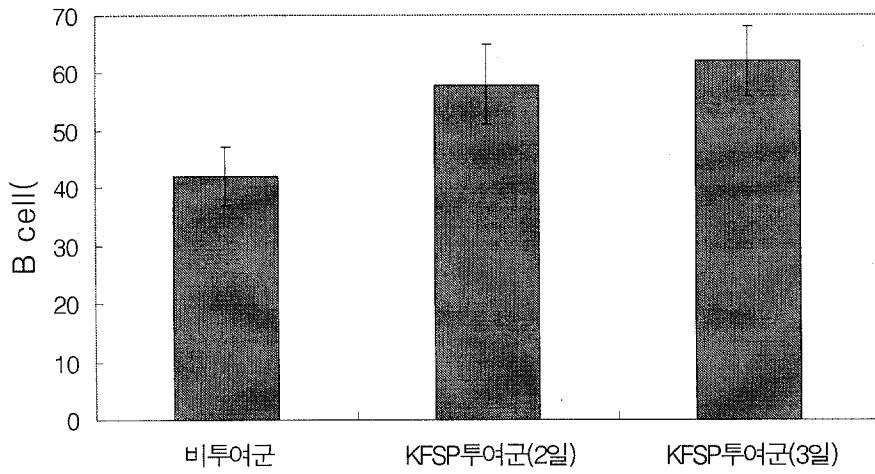


Fig. 35. *In vivo* effect of KFSP on the proliferation of splenic B lymphocytes

mber를 이용하여 세포수를 측정하고 전체 림프구에 대한 백분율로 산정하여 Fig. 35에 나타내었다. KFSP 투여 마우스에서 비장 림프구에 대한 B 림프구의 수가 KFSP 투여 2일 및 3일에 각각 58 ± 7 및 62 ± 6 %로 대조군 42 ± 5 %에 비해 생체내에서도 KFSP는 B 림프구의 증식을 증가시키는 것으로 나타났다.

다. 시험관내에서 KFSP가 B 림프구의 항체생성에 미치는 효과

정상 마우스에서 분리한 B 림프구에 KFSP를 첨가하여 2일 및 3일간 배양하고 배양 상층액을 채취하여 배양액내의 IgM를 측정하였다. Fig. 36에서 보는 바와 같이 KFSP 첨가군에서 B 림프구의 IgM생성은 2일 및 3일에 150 ± 24 및 415 ± 49 ng/ml으로 배양시간에 따라 증가됨을 나타내었고 이것은 대조군의 $23 \pm 7 \mu\text{g/ml}$ 에 비해 현저한 증가를 나타냈다.

라. KFSP가 알레르기 면역반응에 미치는 효과

KFSP의 알레르기 면역억제 효과를 관찰하기 위하여 마우스에 adjuvants와 혼합한 OVA를 복강으로 1회 주사하여 OVA에 대한 알레르기 면역반응을 유도하고 3일 간격으로 KFSP 또는 생리식염수를 4회 주사한 전신성 과민반응 shock를 유발시키기 위하여 OVA를 마우스 꼬리 정맥으로 주사하고 일어나는 반응을 Table 21에 제시한 전신성 과민반응 shock score로 판정하였다. Table 22에서 보는 바와 같이 알레르기를 유발하고 생리식염수를 투여한 대조군에서는 shock score가 7.3으로 8마리 마우스 전체가 알레르기 shock로 사망하는 데 반하여 알레르기 유발 후 KFSP를 투여한 군에서는 shock score가 0.9로 8마리 모두 미약한 과민반응을 나타내었을

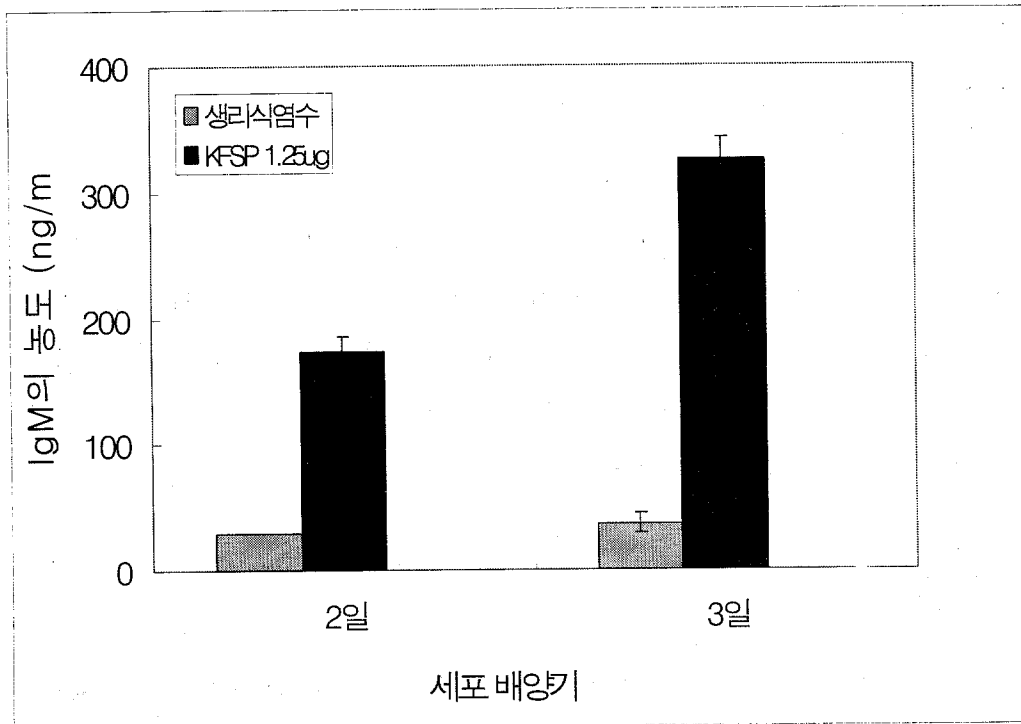


Fig. 36. *In vitro* effect of KFSP on the production of IgM by splenic B lymphocytes

Table 22. Immunotherapeutic effect of KFSP on the OVA-induced allergy in BALB/c mice.

*Group	No. of mouse	**No. of mice showing shock score										Mean of shock score
		0	1	2	3	4	5	6	7	8		
Placebo treatment	8									6	2	7.3
KFSP treatment	8					3	3	2				0.9

* The mice were sensitized by a single intraperitoneal injection of mixtures of OVA(10 μ g/mouse) plus aluminium hydroxide(20 μ g/mouse) and *B. pertussis*(2×10^9 /mouse), and three days later, treated intraperitoneally with saline or KFSP(20 μ g/mouse). The treatment of saline or KFSP was performed twice a week for 2 weeks. Inductions of anaphylaxis in these mice were performed by a single intravenous injection of OVA(100 μ g/mouse).

** Shock score was determined as described in materials and methods.

뿐 shock에 의한 사망은 관찰되지 않았다.

다. KFSP가 알레르기 유발 마우스의 항체 생성 변화에 미치는 효과

Acylamide gel electrophoresis에 의해 부분분리한 KFSP를 생리식염수에 200 μ g/ml로 부유시키고 complete 및 incomplete freund's adjuvant와 혼합하여 토끼에 면역시켰으며 분리한 혈청은 4 $^{\circ}$ C 또는 -70 $^{\circ}$ C에서 보관하고

KFSP에 대한 항체로 사용하였다.

KFSP가 알레르기 면역반응에 미치는 효과에서와 같이 동일하게 처리한 마우스를 희생시키고 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 후 OVA 특이 항체들을 측정하여 Fig. 37에 제시하였다. IgE는 다른 항체에 비하여 생성량이 약 1/1000 정도로 적기 때문에 그림에서 비교 구분하기는 어려우나 대조군의 IgE는 0.67 ± 0.15 ng/ml인데 반하여 KFSP를 5 및 20 μ g을 투여한 군에서는 모두 0.33 ± 0.58 ng/ml으로 대조군에 비해 감소되는 경향을 보이나 KFSP 투여량에 의한 차이는 관찰되지 않았다. 한편 interleukin-4(IL-4)에 의해 IgE와 함께 조절되는 IgG1은 대조군에서 268 ± 220 ng/ml이나 KFSP를 5 및 20 μ g을 투여한 군에서는 각각 106 ± 44 및 69 ± 11 ng/ml으로 대조군에 비해 감소되었고 KFSP 투여량 증가에 반비례하여 감소되는 것으로 나타났다. IFN- γ 의해 조절되는 IgG2는 대조군이나 KFSP를 5 및 20 μ g 투여군 모두 1.0 ng/ml으로 차이를 보이지 않는 반면에 IgG3는 대조군에서 51 ± 6 ng/ml, KFSP 5 및 20 μ g을 투여한 군에서는 각각 369 ± 320 및 727 ± 33 ng/ml으로 KFSP 투여량에 비례하여 증가됨을 나타내었다.

4. KFSP의 물리·화학적 성질

KFSP를 SDS Acrylamide gel로 전기영동할 때 활성이 변화되는지를 알아보기 위하여 SDS Acrylamide gel로 전기영동에 사용되는 시약들과 반응조건들이 KFSP의 활성에 미치는 효과를 관찰하였다. 50 μ l의 KFSP(500 μ g/ml)를 1ml씩의 생리식염수, 0.4% SDS, 2.88mM 2-Mercaptoethanol 또는 0.4% SDS에 2.88mM 2-Mercaptoethanol이 함유된 용액에 넣고 100 $^{\circ}$ C에서 30분 열처리 또는 비 열처리하고 Minisart SRP 15 membrane filter를 이용하여 생리식염수로 각각 3회 세척하고 최종 200 μ l로 농축하였다. 이 용액을

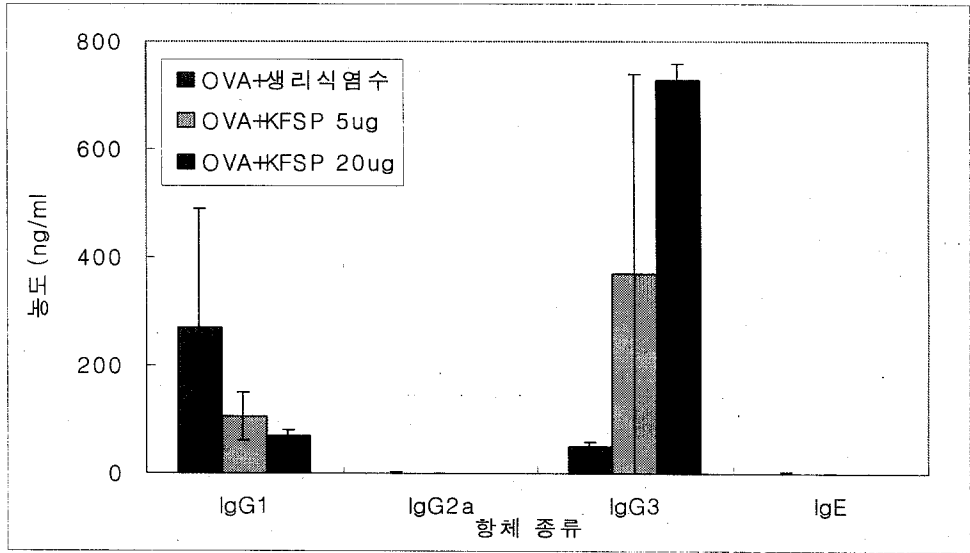


Fig. 37. The effect of KFSP on the production of OVA-specific immunoglobulin isotypes in sera of mice sensitized with OVA

림프구에 넣어 림프구 증식반응을 조사한 결과 Table 23에 나타낸 것과 같이 KFSP에 SDS를 처리한 경우 림프구의 증식반응은 74.0×10^3 cpm으로 PBS로 처리한 대조군의 73.5×10^3 cpm과 차이가 없었다. 이에 반하여 2-ME 또는 SDS 및 2-ME 함께 처리한 경우는 오히려 림프구의 증식이 각각 89.5×10^3 및 104.0×10^3 cpm으로 증가되는 양상을 보였다. 한편 이들 용액을 100°C 에서 30분간 열처리한 경우 KFSP의 활성화에는 별다른 영향이 없는 것으로 나타났다.

Table 23. The effect of SDS or/and 2-Mercaptoethanol on the biological activity of KFSP

Group	3H-thymidine incorporation by lymphocytes($\times 10^3$ cpm)	
	Not boiled	Boiled
KFSP+PBS	73.5	70.4
KFSP+SDS	74.0	109.7
KFSP+ 2-ME	89.5	100.0
KFSP+SDS+ 2-ME	104.0	133.5

제 4절 참고문헌

1. Benjamin, H., Storkson, J., Tallas, P.G., Pariza, M.W. : Reduction of benzo(a)pyren-induced mouse forestomach neoplasms in mice given nitrite and dietary soy sauce. *Food Chem. Toxic.*, 26, 671(1988)
2. Benjamin, H., Storkson, J., Nagahara, A., Pariza, M.W. : Inhibition of benzo(a)pyren-induced mouse forestomach neoplasia by dietary soy sauce. *Cancer Res.*, 51, 2940(1991)
3. Nagahara, A., Benjamin, H., Storkson, J., Krewson, J., Sheng, K., Liu, W., Pariza, M.W. : Inhibition of benzo(a)pyren-induced mouse forestomach neoplasia by a principal flavor component of japanese-style fermented soy sauce. *Cancer Res.*, 52, 1754(1992)
4. Asahara, N., Zhang, X.B., Ohta, Y. : Antimutagenicity and mutagen-binding activation of mutagenic pyrolyzates by microorganisms isolated from Japanese miso. *J. Sci. Food Agri.*, 58, 395(1992)
5. Cheigh H-S, Lee C-Y : Antioxidative and antimutagenic characteristics of melanoidin related products. *J. Kor. Soc. Food Nutr.*, 22, 246 (1993)
6. Cheigh H-S, Lee J-S, Moon G-S, Park K-Y : Antioxidative activity of browning products fractionated from fermented soybean sauce. *J. Kor. Soc. Food Nutr.*, 22, 565(1993)
7. Cheigh H-S, Lee J-S, Lee C-Y : Antioxidative characteristics of melanoidin related products fractionated from fermented soybean sauce. *J. Kor. Soc. Food Nutr.*, 22, 570(1993)
8. Park K-Y, Moon S-H, Baik H-S, Cheigh H-S : Antimutagenic effect

- of *Doenjang*(Korean fermented soy paste) toward aflatoxin. *J. Kor. Soc. Food Nutr.*, 19, 156(1990)
9. Park K-Y, Lin S-Y, Rhee S-H : Antimutagenic and anticarcinogenic effects of *Doenjang*. *J. Kor. Assoc.*, 1, 99(1997)
 10. Oldham, R.K. : Introduction, in "Biological response modifiers" ed. Torrence PF, Academic Press Inc., p1-18(1985)
 11. Gatenby, P.A. : Immunopotential, in "Encyclopedia of immunology" Vol. 2, eds. Roitt IM, Delves PJ, Academic Press Inc., p847-852(1992)
 12. Hennessey, L.R., Baker, Jr. J.R. : Immunomodulators, in "Medical immunology" eds. Stites DP, Ter AI, Parslow TG., p846-851(1997)
 13. Good, R.A., West, A., Fernandes, G. : Nutritional modulation of immune responses. *Fed. Proc.*, 39, 3098(1980)
 14. Good, R.A., Lorenz, E. : Nutritoin and cellular immunity. *Int. J. Immunopharmacol.*, 14, 361(1992)
 15. Chandra, R.K. : Nutrition and the immune system : an introduction. *Am. J. Clin. Nutr.*, 66, 460S-463S(1997)
 16. Scrimshaw, N.S., SanGiovanni, J.P. : Synergism of nutrition, infection, and immunity: an overview. *Am. J. Clin. Nutr.*, 66, 464S-477S(1997)
 17. Schiffrin, E.J., Brassart, D., Servin, A.L., Rochat, F., Donnet-Hughes, Al. : Immune modulation of blood leukocytes in humans by lactic acid bacteria: criteria for strain selection. *An. J. Clin. Nutr.*, 66, 515S-520S(1997)
 18. Solis-Pereyra, B., Aattouri, N., Lemonnier, D. : Role of food in the stimulation of cytokine production. *An. J. Clin. Nutr.*, 66, 521S-525S

(1997)

19. Vilcek, J., Le, J. : Immunology of cytokines: an introduction, *in* "The cytokine handbook" ed. Thomson A, Academic Press Inc., p1-19(1994)
20. Kuby, J. : Cytokines, *in* "Immunology" ed. Kuby J, Freeman, p313-343(1997)
21. Yoshimoto, T., Okamura, H., Tagawa, Y.I., Iwakura, Y., Nakanish, K. : Interleukin 18 together with interleukin 12 inhibits IgE production by induction of interferon- γ production from activated B cells. *Immunology*, 94, 3948(1997)

제 5 장 기능성 강화 제조공정 설정

지금까지의 연구결과를 토대로 기능성 강화 제조공정(안)을 Fig. 38에 나타내었다. 전통 재래식 된장이 원료대두, 간장, 일본식 된장 및 시판된장보다 기능성물질의 효과가 우수하였으므로 메주제조는 개량식보다 재래식으로 만들어 자연적인 미생물균총을 이루게 하여야 하며 이렇게 제조한 자연메주를 사용하여 된장을 담고 충분한 발효기간을 주게 되면 지금까지의 연구결과에 따른 효과를 갖게 된다.

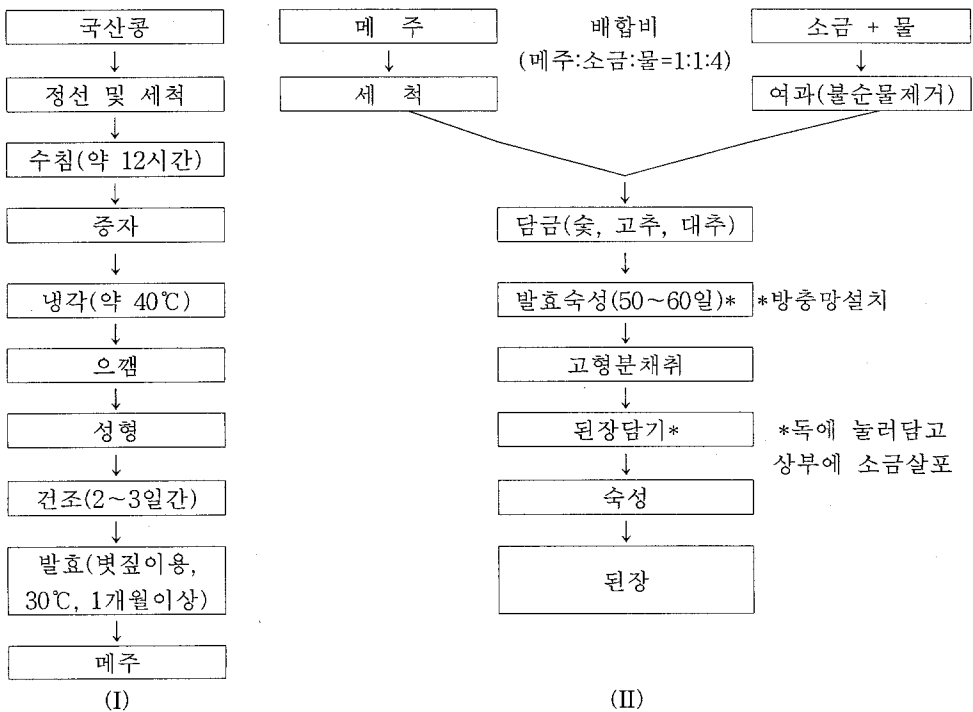


Fig. 38. 메주(I) 및 된장(II)제조 공정

제 6 장 참고문헌

1. Asahara, N., Zhang, X.B. and Ohta, Y. : Antimutagenicity and Mutagen-binding activation of mutagenic pyrolyzates by microorganisms isolated from Japanese Miso. *J. Sci. Food Agric.*, 58, 395~401(1992)
2. Hammerschmidt, P.A. and Pratt, D.E. : Phenolic antioxidants of dried soybeans. *J. Food Sci.*, 43, 556(1978)
3. Pratt, D.E. and Birac, P.M. : Source of antioxidant of soybeans and soy products. *J. Food Sci.*, 44, 1720~1722(1979)
4. Pratt, D.E., Pietro, C.D., Porter, W.L. and Giffie, J.W. : *J. Food Sci.*, 47, 24~25(1981)
5. Murakami, H., Asakawa, T., Terao, J. and Matwsushita, S. : *Agric. Biol. Chem.*, 48, 2971~2975(1984)
6. Esaki, H., Nohara, Y., Onozaki, H. and Osawa, T. : *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 37, 474~477(1990)
7. 平山雄, “豫防ガン學”, 中外製藥株式會社(1994)
8. Benjamin, H., Storkson, J., Tallas, P.G. and Pariza, M.W. : Reduction of benzo(a)pyrene-induced forestomach neoplasms in mice given nitrite and dietary soy sauce. *Food Chem. Toxic.*, 26, 671~678(1988)
9. Benjamin, H., Storkson, J., Nagahara, A. and Pariza, M.W. : Inhibition of benzo(a)pyrene-induced mouse forestomach neoplasia by dietary soy sauce. *Cancer Res.*, 51, 2940~2942(1991)
10. Nagahara, A., Benjamin, H., Storkson, J., Krewson, J., Sheng, K., Liu, W. and Pariza, M.W. : Inhibition of benzo(a)pyrene-induced mouse

- forestomach neoplasia by a principal flavor component of Japanese-style fermented soy sauce. *Cancer Res.*, 52, 1754~1756(1992)
11. Nunomura, N., Sasaki, M., Asao, Y. and Yokotsuka, T. : Isolation and identification of 4-hydroxy-2(or 5)-ethyl-5(or 2)-methyl-3(2H)-furanone, as a flavour component in shoyu(soy sauce). *Agric. Biol. Chem.*, 40, 491~495(1976)
 12. Watanabe, H., Takahashi, T., Ishimoto, T. and Ito, A. : *Science and Technology of Miso*, 39, 29(1991)
 13. Murphy, P.A. : Phytoestrogen content of processed soybean products. *Food Technol.*, 36, 60~64(1982)
 14. Akiyama, T., Kadooka, T., Ogawara, H., and Sakakibara, S. : Characterization of the epidermal growth factor receptor and the erbB oncogene product by site-specific antibodies. *Arch. Biochem. Biophys.*, 245, 531~536(1986)
 15. Okura, A., Arakawa, H., Oka, H., Yoshinari, T. and Tonden, Y. : Effect of genistein on topoisomerase activity and on the growth of [Val12] Ha-ras-transformed NIH 3T3 cells. *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 157, 183~189(1988)
 16. Barnes, S., Grubbs, C., Setchell, K.D. and Carlson, J. : Soybeans inhibit mammary tumors in models of breast cancer. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 347, 239~253(1990)
 17. Peterson, G. and Barnes, S. : Genistein inhibition of the growth of human breast cancer cells: independence from estrogen receptors and multidrug resistance gene. *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 179, 661~667(1991)

18. Coward, L., Barnes, N.C., Setchell, K.D. and Barnes, S. : Genistein, daidzein, and their beta-glycoside conjugates: antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets. *J. Agric. Food Chem.*, 41, 1961~1967(1993)
19. Wang, H. and Murphy, P.A. : Isoflavone content in commercial soybean foods. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 1666~1673(1994a)
20. Wang, H. and Murphy, P.A. : Isoflavone composition of American and Japanese soybeans in Iowa: effects of variety, crop year, and location. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 1674~1677(1994b)
21. 伊藤明弘, 渡刀郭光, 青山秀行, 藤本成明, Roy Bidiut, 森 雅弘 : 中央味曾研究所 研究報告, 17, 49(1989)
22. 海老根英雄 : みその 機能性, 醸協, 85(2), 70~75(1990)
23. Naim, M., Gestetner, B., Ziikah, S., Birk, Y. and Bondi, A : Soybean isoflavones. Characterization, determination and antifungal activity. *J. Agric. Food Chem.*, 22, 806(1974)
24. Naim, M., Gestetner, B., Bondi, A. and Birk, Y. : Antioxiditive and antihemolytic activities of soybean isoflavones. *J. Agric. Food Chem.*, 24, 1174~1177(1976)
25. 최홍식, 이정수, 문갑순, 박건영 : 양조간장에서 분리한 갈색물질의 항산화성. 한국영양식량학회지, 22, 565~569(1993)
26. 최홍식, 이정수, 문갑순, 박건영 : 양조간장에서 분리한 멜라노이딘 관련 물질의 항산화작용 특성. 한국영양식량학회지, 22, 570~575(1993)
27. 박건영, 이은숙, 문숙희, 최홍식 : 간장 및 모델시스템에서 간장 갈색물질과 슛이 Aflatoxin B₁ 의 파괴에 미치는 영향. 한국식품과학회지, 21, 419~424(1989)

28. 박건영, 문숙희, 백형석, 최홍식 : 된장의 Aflatoxin B₁에 대한 항돌연변이 효과. 한국영양식량학회지, 19, 156~162(1990)
29. Kim, J-K., Park, S-M. and Lee, S-J. : Novel antimutagenic pigment produced by *Bacillus licheniformis* SSA3. *J. Microbiol. Biotech.*, 5, 48~50(1995)
30. 홍석산, 권동진 : 전통장류 중의 돌연변이 억제물질 탐색. 한국식품개발연구원 연구보고서(1994)
31. 구영조, 유진영, 박종현, 권동진, 권민, 김성권, 여인옥, 김은영, 이선화, 한복진, 김창곤 : 국산식품소재의 장내미생물에 대한 영향분석 및 이를 이용한 기능성 식품개발. 한국식품개발연구원 연구보고서(1993)
32. 김용택, 김원극, 오훈일 : 청국장으로부터 혈전용해균주의 분리 및 동정. 한국산업미생물학회지, 23, 1~5(1995)
33. Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J.T., Bokesch, H., Kenney, S. and Boyd, M.R. : New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.*, 82, 1107~1112(1990)
34. 이정옥 : 신규항암제의 약효평가. "신물질 창출을 위한 생물활성 시험법", 한국생화학회, pp. 19~33(1990)
35. 김길현 : 면역반응의 측정-면역조절물질 탐색 기술. "신물질 창출을 위한 생물활성 시험법", 한국생화학회, pp. 393~406(1990)
36. Kinoshita, E., Yamakoshi, J. and Kikuchi, M. : Purification and identification of an angiotensin I-converting enzyme inhibitor from soy souce. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 57, 1107~1110(1993)
37. 千葉英雄, 吉川正明 : 化學と生物, 25, 396(1987)
38. 신재익, 안창원, 남희섭, 이형재, 이형주, 문태화 : 된장으로 부터 an-

- giotensin converting enzyme(ACE)저해 peptide의 분획, 한국식품과학회지, 27, 230~234(1995)
39. 임선영 : 된장의 항돌연변이 및 항암효과, 부산대학교 대학원 박사학위논문(1997)
 40. 손동화 : 식품단백질 유래의 생리활성 펩타이드. 식품기술, 7(3), 25(1994)
 41. 木本實 : Function of soybean peptide and the present situation of application. 食品と開發, 29(7), 27(1994)
 42. 신현경 : 기능성 식품의 개발 현황. 식품기술, 7, 3(1994)
 43. Ariyoshi, Y. : Angiotensin converting enzyme inhibitors derived from food proteins. *Trend in Food Science & Technol. May*, 139(1993)
 44. Oshima, G., Shimabukuro, H. and Nagasawa, K. : Peptide inhibitors of angiotensin-I converting enzyme in digests of gelatin by bacterial collagenase. *Biochem. Biophys. Acta.*, 566, 128(1979)
 45. Maruyama, S., Miyoshi, S. and Tanaka, H. : Angiotensin-I converting enzyme inhibitors derived from *Ficus Carica*. *Agric. Biol. Chem.*, 53, 2763(1989)
 46. 김선봉, 이태기, 박영범, 염동민, 김의경, 도정룡, 박영호 : 멸치육 단백질 효소분해물로부터 angiotensin-I 전환효소 저해제의 분리 및 그 특성. 한국수산학회지, 27, 1(1994)
 47. Yamamoto, N., Akino, A. and Takano, T. : Antihypertensive effect of the peptides derived from casein by an extracellular proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J. Dairy Sci.*, 77, 917(1994)
 48. Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K. Okubo, A., Yamasaki, S. and Takano, T. : Purification and characterization of angiotensin-I con-

- verting enzyme inhibitors from sour milk. *J. Dairy Sci.*, 78, 777(1995)
49. Kohama, Y., Matsumoto, S., Oka, H., Teramoto, T., Okabe, M. and Mimura, T. : Isolation of angiotensin converting enzyme inhibitor from tuna muscle. *Bilchem. Biophys. Res. Commun.*, 155, 332(1988)
 50. Saito, Y., Nakamura, K., Kawato, A. and Imayasu, S. : Angiotensin converting enzyme inhibitors in Sake and its by-product. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 66, 1081(1992)
 51. Siuzdak, G. : Mass spectrometry for biotechnology. *Academic press, Inc.* (1996)
 52. Cushman, D. W. and Cheung, H. S. : Spectrometric assay and properties of angiotensin converting enzyme of rabbit lung. *Biochem. Parm.*, 20, 1637(1971)
 53. Matsumura, N., Fujii, M., Takeda, Y., Sugita, K. and Shimizu, T. : Angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides derivde from bonito bowels autolysate. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57, 695(1993)
 54. Cheung, H., Wang, F., Ondetti, M., Sabo, E. and Cushman, D. : Binding of peptide substracts and inhibitors of angiotensin converting enzyme. *J. Biol. Chem.*, 255, 401(1980)
 55. Cheigh H-S, Lee C-Y : Antioxidative and antimutagenic characters-tics of melanoidin related products. *J. Kor. Soc. Food Nutr.*, 22, 246 (1993)
 56. Park K-Y, Lin S-Y, Rhee S-H : Antimutagenic and anticarcimogenic effects of *Doenjang*. *J. Kor. Assoc.*, 1, 99(1997)
 57. Oldham, R.K. : Introduction, in "Biological response modifiers" ed. Torrence PF, Academic Press Inc., p1-18(1985)

58. Gatenby, P.A. : Immunopotential, in "Encyclopedia of immunology" Vol. 2, eds. Roitt IM, Delves PJ, Academic Press Inc., p847-852(1992)
59. Hennessey, L.R., Baker, Jr. J.R. : Immunomodulators, in "Medical immunology" eds. Stites DP, Ter AI, Parslow TG., p846-851(1997)
60. Good, R.A., West, A., Fernandes, G. : Nutritional modulation of immune responses. *Fed. Proc.*, 39, 3098(1980)
61. Good, R.A., Lorenz, E. : Nutritoin and cellular immunity. *Int. J. Immunopharmacol.*, 14, 361(1992)
62. Chandra, R.K. : Nutrition and the immune system : an introduction. *Am. J. Clin. Nutr.*, 66, 460S-463S(1997)
63. Scrimshaw, N.S., SanGiovanni, J.P. : Synergism of nutrition, infection, and immunity: an overview. *Am. J. Clin. Nutr.*, 66, 464S-477S(1997)
64. Schiffrin, E.J., Brassart, D., Servin, A.L., Rochat, F., Donnet-Hughes, AI. : Immune modulation of blood leukocytes in humans by lactic acid bacteria: criteria for strain selection. *An. J. Clin. Nutr.*, 66, 515S-520S(1997)
65. Solis-Pereyra, B., Aattouri, N., Lemonnier, D. : Role of food in the stimulation of cytokine production. *An. J. Clin. Nutr.*, 66, 521S-525S (1997)
66. Vilcek, J., Le, J. : Immunology of cytokines: an introduction, in "The cytokine handbook" ed. Thomson A, Academic Press Inc., p1-19(1994)
67. Kuby, J. : Cytokines, in "Immunology" ed. Kuby J, Freeman, p313-343(1997)

68. Yoshimoto, T., Okamura, H., Tagawa, Y.I., Iwakura, Y., Nakanish, K.
: Interleukin 18 together with interleukin 12 inhibits IgE production
by induction of interferon- γ production from activated B cells. *Im-*
munology, 94, 3948(1997)