C57BL/6 마우스에서 세척·탈수 천일염으로 제조된 간장의 대장암 억제 효과 - 연구노트 -

이소영¹ · 박의성² · 홍근혜¹ · 김종희³ · 박건영¹

¹차의과학대학교 식품생명공학과

²연세대학교 식품영양학과

³서일대학교 식품영양학과

Anti-colorectal Cancer Effect of Ganjang Prepared with Washed-Dehydrated Solar Salt on C57BL/6 Mice

So-Young Lee¹, Eui-Seong Park², Geun-Hye Hong¹, Jong-Hee Kim³, and Kun-Young Park¹

¹Department of Food Science and Biotechnology, Cha University

²Department of Food and Nutrition, Yonsei University

³Department of Food and Nutrition, Seoil University

ABSTRACT This study evaluated the anticancer effects of Ganjang (Korean soysauce) prepared with Korean solar salt without bitter (washed-dehydrated solar salt), on the azoxymethane (AOM)/dextran sodium sulfate (DSS)-induced colon cancer in C57BL/6 mice. Ganjang samples were prepared using different salts, including purified salt (PSG), generally prepared solar salt (GSG), washed and dehydrated solar salt (WDG), and washed, dehydrated, and dried solar salt (WDDG). Compared to other samples, the physico-chemical characteristics of WDG showed lower pH, higher acidity and better amino and ammonia type nitrogen content. WDG and GSG resulted in increased mouse body weight as compared to Con 1 (AOM/DSS), Con 2 (AOM/DSS+18% purified salt water) and aPSG (AOM/DSS+purified salt Ganjang) after 7 weeks. aWDG (AOM/DSS+washed-dehydrated solar salt Ganjang) and aWDDG (AOM/DSS+washed-dehydrated-dried solar salt Ganjang) treatment significantly suppress colon length shortening and tumor counts in mouse colon, as compared to Con 1, Con 2, and aPSG ($P<0.05$). mRNA expressions of apoptosis related factors (Bax, Bcl-2, and Bcl-xL) in colon tissues of mice were also regulated after aWDG and aWDDG exposure. These results indicate that solar salts and different processing methods of the solar salts induces increased anti-cancer effects of Ganjang.

Key words: Ganjang, solar salts, washed-dehydrated solar salt, colon cancer

서 론

콩으로 메주를 제조하여 발효 숙성시킨 간장은 한국의 주요 전통 식품으로 음식의 맛과 풍미를 부여하고 건강에 좋은 식품이다(Choi 등, 2016). 간장은 향암(Song 등, 2018), 항고혈압(Mun 등, 2017), 면역 증진 효과(Lee와 Shin, 2014), 항산화 효과(Lee 등, 2003) 등이 있는 것으로 알려져 있다. Park 등(2007)의 연구에 따르면 발효 및 숙성 과정 동안 생성된 아미노산, 펩타이드, 페놀 화합물 등 간장 발효 산물들의 다양한 생리활성 물질이 여러 만성질환 예방하는 역할을 한다.

간장은 제조 방법에 따라 한식(전통)간장, 양조간장, 화학간장 등이 있으며, 전통간장은 콩으로 메주를 제조하고 이에 염수를 부어 발효숙성 과정을 거쳐 제조한 것으로 *Aspergillus oryzae* 등의 곰팡이와 *Bacillus* 속과 내염성 젖산균, 내염성 효모류 등이 간장의 발효숙성 과정에 관여한다(Choi 등, 2016). 이러한 미생물에 의해 대두의 단백질 성분이 아미노산으로 분해되어 간장의 맛, 품질 등에 영향을 줄 뿐만 아니라 숙성 기간, 간장의 재료, 특히 소금의 종류와 여러 조건 등이 간장의 맛과 특성, 발효에 영향을 주는 것으로 알려져 있다(Park과 Park, 2018).

소금은 일반적으로 식품의 맛을 내는 조미료 역할과 보존

Received 3 February 2021; Revised 21 May 2021; Accepted 21 May 2021

Corresponding author: Kun-Young Park, Department of Food Science and Biotechnology, CHA University, 335, Pangyo-ro, Bundang-gu, Seongnam-si, Gyeonggi 13488, Korea, E-mail: kunypark@cha.ac.kr

Author information: So-Young Lee (Graduate student), Eui-Seong Park (Graduate student), Geun-Hye Hong (Graduate student), Jong-Hee Kim (Professor), Kun-Young Park (Professor)

Copyright © 2021 by The Korean Society of Food Science and Nutrition. All rights Reserved.

This is Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

할 수 있는 방부제 역할로 사용되어 왔다(Chang 등, 2010). 소금은 제조 방법에 따라 미네랄 조성에 차이가 있으며 정제염, 천일염, 가공염 등으로 구분된다(Chang 등, 2011). 정제염은 이온막 투과법을 이용해 고순도의 염화나트륨을 생산하는 소금으로 NaCl이 99% 이상 함유되어 있다(Kim 등, 2016). 반면, 천일염은 태양과 바람을 이용해 자연적으로 소금을 결정·석출시킨 것으로 정제염과는 달리 나트륨(Na) 뿐만 아니라 철(Fe), 마그네슘(Mg), 칼슘(Ca), 칼륨(K) 등 다양한 무기질이 함유되어 있다고 알려져 있다(Cho 등, 2018). 가공염은 소금을 볶음, 태움 등의 다양한 방법을 사용하여 가공한 소금으로 죽염, 구운 소금 등이 있다(Jung 등, 2002). 소금은 간장, 된장, 김치 등과 같은 발효식품에 필수적인 절임 재료로 사용되어 왔다. 발효식품 제조 시 전통적으로 3년 이상의 숙성 과정을 거쳐 쓴맛을 내는 간수가 제거된 제간수 천일염을 사용하였으나, 현재는 세척·탈수·건조 과정을 통해 제간수 천일염을 제조해 사용하고 있다(Park 등, 2020). 세척·탈수 과정을 거치면 특히 간수의 주성분인 마그네슘의 함량이 감소하는데, Yu 등(2020)의 연구에 따르면 일반적으로 제조한 천일염의 마그네슘 함량은 17.8 ± 0.1 g/kg이었으나 세척·탈수 과정을 거친 천일염은 5.8 ± 0.0 g/kg으로 마그네슘 함량이 절반 이상 낮아진다고 보고하였다. 같은 천일염이라도 숙성, 가공방법에 따라 전통 발효식품에서 기능성이 달라져 전통 발효식품 제조 시 어떠한 소금을 사용하는지가 중요하다. 간장에 대해서는 일반적으로 제조, 발효, 기능성 등에 대한 연구가 많았다. 그러나 제조 과정 중 어떤 종류의 소금을 사용해야 *in vivo*에서 대장암 억제 효과가 좋은가에 대한 연구는 거의 없다.

따라서 본 연구는 정제염 및 가공 과정을 거친 여러 종류의 천일염을 사용하여 간장을 제조했을 때 발효 지표인 pH와 산도, 아미노태 질소, 암모니아태 질소의 변화와 마우스에 azoxymethane/dextran sulfate sodium salt(AOM/DSS)로 대장암을 유도한 실험을 통하여 소금의 종류에 따른 간장의 품질 변화와 항암 기능성 증진에 대해 연구하였다.

재료 및 방법

간장 제조 및 이화학적 실험

간장 제조: 간장은 Park 등(2002)의 표준화 연구에 따라 메주:소금:물의 비율을 1:1:4(wt:wt:wt)로 하여 제조하였다. 메주는 알알이 식품(경상북도 고령군)의 국산 콩알 메주를 사용하였고, 소금은 울산광역시 소재 H사의 정제염(purified salt, PS)과 전라남도 신안군 T염전에서 일반천일염(generally manufactured solar salt, GS), 세척·탈수 천일염(washed and dehydrated solar salt, WD), 세척·탈수·건조 천일염(washed, dehydrated and dried solar salt, WDD)을 제공받아 사용하였다. 채취한 천일염을 포화함수로 순환 세척하고 450 rpm으로 탈수하여 세척·탈수 천일염을 제조하였으며, 이를 100~150°C 터널건조기에 통과시켜 5~10

분간 건조하여 세척·탈수·건조 천일염을 제조하였다. 메주는 대두를 증자한 후 *Aspergillus oryzae*(0.02% w/w)를 첨가하고 이를 37°C에서 48시간 발효시켜 제조하였다. 이후 물 12 kg에 소금 3 kg을 섞어 염수를 만든 뒤 메주 3 kg을 망사에 담아 넣고 34°C에서 2개월 발효시켰다. 발효 완료 후 장 가르기를 하여 간장과 된장을 분리하였고, 정제염으로 담근 간장(purified salt Ganjang, PSG), 일반천일염으로 담근 간장(generally manufactured solar salt Ganjang, GSG), 세척·탈수(제간수) 천일염으로 담근 간장(washed and dehydrated solar salt Ganjang, WDG), 세척·탈수·건조 천일염으로 담근 간장(washed, dehydrated, and dried solar salt Ganjang, WDDG)을 실험에 이용하였다.

pH 및 산도 측정: pH는 간장 시료를 증류수로 10배 희석하여 pH meter(Orion Star A211, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하여 실온에서 측정하였다. 산도는 Association of Official Analytical Chemists(1990) 표준화 시험법에 따라 시료를 20배 희석하여 0.1 N NaOH를 가해 pH 8.4가 될 때까지 적정하여 소비된 0.1 N NaOH의 양(mL)으로 나타내었다.

아미노태 질소(NH₂-N), 암모니아태 질소(NH₃-N) 측정: 아미노태 질소는 formal법으로 측정하였으며 시료를 10배 희석한 시료액 20 mL에 중성 포르말린 용액 20 mL를 가한 다음, pH 8.4가 될 때까지 0.1 N NaOH로 적정하여 소비된 mL 수를 측정하여 아미노태 질소의 함량을 측정하였다. 암모니아태 질소는 시료에 증류수를 가하여 10배 희석한 후 kit(AM505-K, Asan Pharmaceutical Co., Dongdaemoon, Korea)을 이용하여 Indophenol법으로 측정하였다(Park 등, 2015).

In vivo 대장암 실험

실험동물: 6주령 C57BL/6 수컷 마우스(Orient Bio, Seongnam, Korea)를 구입하여 사용하였다. 마우스는 온도 22±2°C, 습도 55±5%, 12시간 단위 dark-light cycle로 조정되는 시설에서 사육하였으며 식이 및 음수는 자유롭게 섭취하게 하였다. 마우스는 Normal(Nor, n=7)군과 대장암만을 유도한 Control 1(Con 1, AOM/DSS, n=7), 대장암을 유도한 뒤 정제염으로 제조한 18% 소금물(NaCl)을 섭취한 Control 2(Con 2, AOM/DSS+18% purified salt water, n=12), 대장암을 유도한 뒤 4종류의 간장 6 mL/kg을 각각 섭취한 aPSG(AOM/DSS+PSG, n=12), aGSG(AOM/DSS+GSG, n=12), aWDG(AOM/DSS+WDG, n=12), aWDDG(AOM/DSS+WDDG, n=12)군으로 구성하여 실험을 진행하였다. 본 실험은 차의과학대학교 동물윤리위원회의 허가를 받은 후 진행하였다(승인번호: IACUC-190065).

시료 투여 및 대장암 유발: 모든 마우스는 8주간의 실험기간에 AIN-93G(Dooyeol Biotech Co., Seoul, Korea)를 공급하였고, Normal군을 제외한 나머지 군은 azoxymethane(AOM, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)을 10

mg/kg 농도로 복강 내 투여하여 암을 유도하였다. AOM 투여 2주 후부터 2% dextran sulfate sodium salt(DSS, reagent grade, M.W. 8,000, MP Biomedicals, LLC, Ill-kirch, France)를 음수에 희석하여 자유롭게 섭취하도록 하였다. 실험 시작일로부터 3주 후, 4주간 Control 1의 경우 PBS, Control 2의 경우 간장과 같은 염도의 일반 소금물을 섭취시키기 위해 염도 18% 소금물을 경구 투여하였다. Song 등(2018)의 선행 연구에 따르면 고농도(8 mL/kg) 간장을 섭취한 군이 저농도(4 mL/kg) 간장을 섭취한 군에 비해 대장암 억제 효과가 다소 감소한 것으로 나타났다. 이를 근거로 각 간장 샘플은 중간 농도인 6 mL/kg b.w.를 선택하여 실험을 진행하였으며, 모든 경구투여는 존대를 사용하여 0.1 mL씩 공급하였다. 마우스의 체중은 순화기간 중 1회, 군 분리 시 및 실험기간 중 1주일에 한 번씩 개체별 체중을 측정하였다. 특히 실험기간 중 체중 측정은 매 측정 시 오차를 최소화하기 위해 동일한 요일과 동일한 시간대(오후 1시 전후)에 동일한 저울을 사용하여 측정하였다. 실험 종료 후 대장을 적출하고 길이와 무게를 측정하였다. 대장의 길이가 짧고 무게는 염증 및 종양으로 인해 무거워질수록 대장암이 유발된 것으로 보았다. 대장 외부에 존재하는 종양의 수를 측정하여 대장암 발생 정도를 비교하였다.

Real time-quantitative polymerase chain reaction(RT-qPCR)을 이용한 apoptosis 관련 유전자 mRNA 발현 측정: Trizol reagent(Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 각 군의 대장 조직에서 RNA를 분리하였으며, 분리한 RNA를 정량하기 위해 NanoDrop ND-1000(Nano Drop Technologies Inc., Wilmington, DE, USA)을 사용하였다. 이후 정량한 RNA는 Superscript II reverse transcriptase(Invitrogen Co.)를 이용하여 역전사 하였으며, cDNA로 합성하여 실험에 이용하였다(Park 등, 2018). 이 cDNA를 apoptosis 관련 primer(Bioneer, Daejeon, Korea), SYBR green(Solis BioDyne, Tartu, Estonia)과 혼합하여 thermal cycler BioRad CFX-96 real time system(BioRad, Hercules, CA, USA)을 사용하여 유전자 발현을 분석하였다.

각 군 마우스의 대장 조직에서 apoptosis 관련 유전자인 B-cell lymphoma 2(Bcl-2), B-cell lymphoma-extra large(Bcl-xL), Bcl-2-associated X protein(Bax) 유전자의 발현을 측정하였으며, housekeeping 유전자는 18S rRNA를 사용하였다. 각 유전자의 sequence는 18S: Forward: 5'-TCG AGG CCC TGT AAT TGG AA-3', Reverse: 5'-CCC TCC AAT GGA TCC TCG TT-3', Bax: Forward: 5'-AGG CCT CCT CTC CTA CTT CG-3', Reverse: 5'-CTC AGC CCA TCT TCT TCC AG-3', Bcl-2: Forward: 5'-GAT GCT GGA GCT GCG GA-3', Reverse: 5'-AGA CGT CCT GGC AGC CA-3', Bcl-xL: Forward: 5'-GCT GGG ACA CTT TTG TGG AT-3', Reverse: 5'-TGT CTG GTC ACT TCC GAC TG-3'이다.

통계분석

대조군과 각 시료로부터 얻은 실험 결과는 평균(mean)±표준편차(SD)로 나타내었으며, 일원배치 분산분석(analysis of variance, ANOVA)을 수행한 후 $P<0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하여 유의성을 검정하였다. 모든 통계분석은 SPSS(ver. 18.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 통계프로그램을 이용하여 처리하였다.

결과 및 고찰

간장의 이화학적 특성

2개월 발효 후 PSG, GSG, WDDG의 pH는 각각 5.28 ± 0.08 , 5.24 ± 0.08 , 5.22 ± 0.02 로 비슷하게 나타났으나 WDG는 pH가 5.14 ± 0.08 로 낮게 나타났다($P<0.05$)(Fig. 1A). 이와 반대로 PSG, GSG, WDDG의 산도는 각각 $3.78\pm 0.00\%$, $3.82\pm 0.19\%$, $3.98\pm 0.18\%$ 로 낮게 나타났지만, WDG는 $4.10\pm 0.05\%$ 로 높게 나타났다($P<0.05$)(Fig. 1B). 이는 천일염의 미네랄 성분이 미생물의 활성에 영향을 끼쳐 발효 과정에서 젖산 생산으로 인한 산성도를 증가시키고 다양한 유기산을 증가시킨 것으로 보인다(Park 등, 2020).

아미노태 질소 함량은 품질 평가의 지표로 사용되는 것 중 하나로 함량이 높을수록 성분 면에서도 우수하다고 할 수 있다(Park과 Park, 2018). 발효를 마친 간장의 아미노태 질소 함량은 천일염으로 제조한 간장인 GSG $1,449.00\pm 6.10$ mg%, WDG $1,518.53\pm 37.18$ mg%, WDDG $1,446.67\pm 25.41$ mg%로 정제염으로 제조한 간장인 PSG $1,429.87\pm 3.23$ mg%에 비해 높게 나타났는데, 특히 WDG군이 유의적으로 높게 나타났다($P<0.05$)(Fig. 1C). 이러한 결과는 각 소금이 가지는 Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^{+} 등과 같은 무기금속 이온의 조성 차이가 아미노태 질소의 함량 변화에 영향을 미친 것으로 보인다(Yu 등, 2020). 반대로 암모니아태는 장류의 이상 발효 및 부패의 지표로 사용되는데, PSG가 408.05 ± 6.21 mg%로 GSG 325.32 ± 4.72 mg%, WDG 370.37 ± 5.99 mg%에 비해 유의적으로 높게 나타났다($P<0.05$)(Fig. 1D). 따라서 간장 제조 시 정제염보다 천일염을 사용한다면 우수한 품질의 간장을 제조할 수 있을 것으로 사료된다.

마우스의 체중

Fig. 2A에서 마우스 체중은 AOM/DSS를 투여한 그룹(Con 1, 26.8 ± 1.6 g)에 비해 소금물을 함께 섭취한 그룹(Con 2, 25.9 ± 0.8 g)이 낮은 체중 감소를 보였다. 따라서 보통 물을 섭취할 때보다 소금물을 섭취할 경우 암에 의한 체중 감소가 촉진되는 것으로 생각된다.

7주차에 마우스의 체중은 소금물을 함께 섭취한 그룹(Con 2, 25.8 ± 1.0 g)에 비해 간장을 섭취한 aGSG군(28.0 ± 1.4 g), aWDG군(27.9 ± 1.7 g)의 체중은 유의적으로 높게 나타났다($P<0.05$), aPSG군(26.1 ± 1.0 g)보다 높았다.

8주차에 희생 전 절식 후 측정한 체중은 Normal군을 제

Fig. 1. (A) pH, (B) acidity, (C) amino-type nitrogen, and (D) ammonia-type nitrogen contents in Ganjang fermented at 37°C for 2 month. PSG: purified salt Ganjang, GSG: generally manufactured solar salt Ganjang, WDG: washed-dehydrate solar salt Ganjang, WDDG: washed-dehydrated-dried solar salt Ganjang. Means with the different letters (a-c) are significantly different ($P<0.05$) by Duncan's multiple range test.

Fig. 2. Effects of Ganjang on the change of body weight in C57BL/6 mice with AOM/DSS induced colitis associated colorectal cancer. Nor: AIN 93G, Con 1: AOM/DSS, Con 2: AOM/DSS + 18% purified salt water, aPSG: AOM/DSS + purified salt Ganjang, aGSG: AOM/DSS + generally manufactured solar salt Ganjang, aWDG: AOM/DSS + washed-dehydrated solar salt Ganjang, aWDDG: AOM/DSS + washed-dehydrated-dried solar salt Ganjang. Means with the different letters (a-c) are significantly different ($P<0.05$) by Duncan's multiple range test. NS: not significant.

외하고 차이를 보이지 않았다(Fig. 2). AOM/DSS 모델에서 체중의 감소는 DSS로 인한 염증에 의해 발생하는데(Thaker 등, 2012), aGSG와 aWDG를 섭취한 그룹에서 DSS로 유도된 대장염을 억제하여 체중이 Con 1, 2, aPSG군에 비해 적게 감소한 것으로 판단된다. 이는 간장을 담글 때 사용된 천일염에 포함된 다양한 미네랄로 인해 단순 소금물이나 정제염(NaCl, purified salt)으로 담근 간장을 섭취한 것에 비해 AOM/DSS에 의한 대장 손상을 억제한 것으로 판단된다.

대장의 길이 및 종양 수

대장 길이: 대장에 염증이 발생하게 되면 상피 조직이 손상되고 점막이 얇아지며 수축되어 대장의 길이가 짧아지게 된다(Thaker 등, 2012). AOM/DSS를 처리한 Con 1군(7.3±0.6 cm) 마우스의 대장 길이는 정상 마우스 대장 길이(8.1±0.2 cm)에 비해 유의적으로 감소하여($P<0.05$) AOM/DSS에 의한 대장 길이의 감소를 확인하였다(Fig. 3A). 하지만, Con 2군(7.1±0.1cm)이 유의적으로 더 짧은 대장 길이를 보여($P<0.05$) 단순 소금물 섭취는 AOM/DSS에 의한 암 발생을 더 많이 유도하는 것으로 판단된다. 간장을 경구 투여한 군(aPSG 7.7±0.3 cm, aGSG 7.9±0.1 cm, aWDG 8.0±0.1 cm, aWDDG 7.9±0.0 cm)은 Con 2군(7.1±0.1 cm) 대장 길이에 비해 유의적으로 높았다($P<0.05$). 특히 천일염으로 제조한 간장을 투여한 군(aGSG, aWDG, aWDDG)이 Normal군과 비슷한 대장 길이를 보여 같은 염분 농도라도 소금물 대신 간장을 섭취하는 것이 대장암 억제 효과가 큰 것으로 사료되며, 정제염보다 천일염으로 간장을 제조하면 우수한 기능성을 가진 간장을 제조할 수 있을 것으로 보인다.

종양 수: Con 2군의 대장 종양의 수(5.2±1.6)는 Con 1군(4.2±1.0)에 비해서도 높게 나타났다. 그러나 간장을 먹은 aPSG(3.5±0.55), aGSG(2.8±0.75), aWDG(2.6±1.4),

aWDDG(2.5±1.1)군들은 Con 1 및 Con 2군보다 종양 수가 유의적으로 적게 나타났다($P<0.05$)(Fig. 3B). 그중 aWDG 및 aWDDG군의 종양 수가 가장 유의적으로 낮게 나타났다($P<0.05$). 따라서 간장과 같은 염도의 소금물을 섭취한 군(Con 2)은 AOM/DSS로 유도한 대장암을 억제시키지 못하지만, 소금으로 간장을 발효시켜 섭취하면 대장암을 억제하는 것으로 나타났다. 그리고 같은 간장이라 하더라도 정제염에 비해 천일염으로 제조한 간장, 특히 세척·탈수(제간수) 천일염으로 제조한 간장을 섭취하였을 때 대장암 억제 효과가 우수한 것으로 사료된다. 또한 HT-29 인체 대장암세포에서 4 mg/mL의 농도로 간장 샘플을 처리하였을 때 WDG군의 억제율이 61.1±2.6%로 PSG(54.2±4.2%), GSG(55.0±3.1%)보다 높은 암세포 성장 억제 효과를 나타내었고(data not shown), 세척·탈수 과정을 거쳐 간수를 제거한 천일염으로 담근 김치의 경우 다른 천일염으로 담근 김치에 비해 항암(Yu 등, 2020)과 항비만(Park 등, 2018) 효과가 뛰어난 것으로 확인되어 본 연구에서도 세척·탈수 천일염으로 담근 간장(WDG)이 더 높은 대장암 억제 효과를 나타내는 것으로 판단된다. 따라서 간장과 같은 발효식품을 제조할 때 정제염이나 일반천일염으로 제조하는 것에 비해 세척·탈수를 거친 천일염으로 간장을 제조할 때 더 높은 암 발생 억제 효과를 나타내는 것으로 판단된다.

Bax, Bcl-2 및 Bcl-xL 유전자 mRNA 발현

Bax: Bcl-2 family는 apoptosis 유발에 관여하는 가장 대표적인 유전자로 Bax는 apoptosis를 유발하여 암 발생을 억제시킨다(Lauria 등, 1997). Bax의 mRNA 발현은 Con 1군(1.00±0.08)과 Con 2군(1.01±0.10)에서 차이는 없었지만, 간장을 섭취한 군은 Con 1, 2군보다 더 높은 유전자 발현을 보였다($P<0.05$)(Fig. 4A). 특히, aWDG군은 5.23±0.55로 Con 2군에 비해 5.2배 높은 발현 수준을 보였고, aPSG(1.73±0.31), aGSG(2.77±0.12), aWDDG(4.19±

Fig. 3. Effects of Ganjang on the change of (A) colon length and (B) tumor number in C57BL/6 mice with AOM/DSS induced colitis associated colorectal cancer. Nor: AIN 93G, Con 1: AOM/DSS, Con 2: AOM/DSS+18% purified salt water, aPSG: AOM/DSS+purified salt Ganjang, aGSG: AOM/DSS+generally manufactured solar salt Ganjang, aWDG: AOM/DSS+washed-dehydrated solar salt Ganjang, aWDDG: AOM/DSS+washed-dehydrated-dried solar salt Ganjang. Means with the different letters (a-d) are significantly different ($P<0.05$) by Duncan's multiple range test.

Fig. 4. Effects of Ganjang on colon mRNA expression levels of apoptosis related genes in C57BL/6 mice with AOM/DSS induced colitis associated colorectal cancer. Nor: AIN 93G, Con 1: AOM/DSS, Con 2: AOM/DSS + 18% purified salt water, aPSG: AOM/DSS + purified salt Ganjang, aGSG: AOM/DSS + generally manufactured solar salt Ganjang, aWDG: AOM/DSS + washed-dehydrated solar salt Ganjang, aWDDG: AOM/DSS + washed-dehydrated-dried solar salt Ganjang. Means with the different letters (a-f) are significantly different ($P < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

0.26)군들보다도 유의적으로 높게 나타났다($P < 0.05$). Bax 유전자의 발현 정도에 따라 대장 종양의 발생에 연관성이 있다는 Pryczynicz 등(2014)의 연구 내용에 따라 한국산 천일염, 특히 세척·탈수 천일염으로 간장을 제조하였을 때, Bax의 mRNA 발현을 더 많이 촉진하여 대장 종양 발생을 억제할 수 있다고 사료된다.

Bcl-2, Bcl-xL: Bcl-2와 Bcl-xL은 anti apoptosis 분자로 apoptosis 유발을 억제하여 암을 발생시킨다(Zamzami와 Kroemer, 2001). Bcl-2의 mRNA 발현은 Con 2군이 2.02 ± 0.13 으로 Con 1군 1.00 ± 0.02 에 비해 2배 높게 나타나 단순 소금물 섭취 자체는 암 유발을 촉진시켰지만, 천일염으로 제조한 aWDG군은 0.09 ± 0.01 , aWDDG군은 0.27 ± 0.03 으로 Con 2군에 비해 0.04배(96%), 0.13(87%)배 유의적으로 낮게 나타났다($P < 0.05$)(Fig. 4B). 특히 aWDG군은 Nor군(0.10 ± 0.01)과 유의적으로 유사한 값을 보였다($P < 0.05$). 또한 Bcl-xL의 mRNA 발현 역시 Con 2군(3.23 ± 0.08)이 Con 1군(1.00 ± 0.08)에 비해 3배 높게 나타났지만, aWDG, aWDDG군은 각각 0.48 ± 0.08 , 0.49 ± 0.42 로 Con 2군에 비해 0.14배, 0.15배 유의적으로 낮게 나타났다($P < 0.05$)(Fig. 4C). 세척·탈수 천일염과 세척·탈수·건조 천일염으로 제조한 간장이 비슷한 항암 효과를 보였는데, 이는 천일염 제조 시 건조 과정을 거치는 것이 기능성을 증진시키는 데 영향을 미치지 않는 것으로 생각된다. 그러므로 전통

적으로 사용했던 3년 숙성 천일염과 같은 세척·탈수 과정을 거쳐 간수를 제거한 천일염을 사용하는 것이 간장의 대장암 예방 효과에 더 중요한 영향을 미치는 것으로 사료된다. Han 등(2009)의 연구 결과에서도 제간수 천일염으로 제조한 김치의 암세포 성장 억제 실험에서 일반천일염과 정제염으로 제조한 김치에서 보다 높은 억제율을 보였다고 보고하였다.

본 연구에 따르면 세척·탈수 과정을 거친 천일염으로 담근 간장이 다양한 항암 기전 중 apoptosis를 활성화시킨 것으로 확인되나 간수를 제거한 천일염으로 담근 다른 종류의 발효식품에서도 어떠한 기전으로 항암효과를 나타내는지에 대한 추가적인 연구가 필요하다.

요 약

본 연구에서는 정제염 및 다른 종류의 천일염을 이용하여 간장을 제조하였을 때 품질 특성 및 항암 기능성의 차이를 확인하였다. WDG군에서 낮은 pH와 높은 산도값을 보였으며 아미노태 질소는 $1,518.50 \pm 37.18$ mg%로 높은 함량을 보였다. 반대로 암모니아태 질소의 함량에서는 370.4 ± 5.99 mg%로 낮게 나타나 세척·탈수 천일염으로 제조한 간장의 품질이 가장 좋았다. AOM/DSS로 대장암을 유도한 마우스 체중에서 암을 유도한 Con 1군과 단순 소금물을 섭취한

Con 2군이 더 유의적인 체중감량을 보였으나 천일염으로 제조한 간장 섭취 시 체중감량이 억제되었다. 암 유발에 의한 대장 길이의 변화에서 aWDG군과 aWDDG군은 다른 군에 비해 유의적으로 정상군과 비슷한 대장 길이를 보였으며 ($P<0.05$), 종양 수 역시 다른 간장에 비해 2.6 ± 1.4 , 2.5 ± 1.1 개로 적게 나타나 높은 대장암 억제 효과를 나타내었다. Bcl-2, Bcl-xL 유전자 발현은 Con 2에 비해 aWDG, aWDDG에서 유의적으로 낮은 수준을 보였다($P<0.05$). 특히 aWDG군의 Bax 유전자 발현은 aWDDG군에 비해서도 높게 발현되었고, Con 2군에 비해서는 5.2배 높은 수준을 보였다. 따라서 천일염으로 담근 간장을 섭취했을 때 정제염으로 담근 간장과 동일한 농도의 소금물을 섭취하는 것보다 apoptosis를 크게 증가시켜 대장암을 억제한 것으로 보인다. 이에 따라 정제염보다 천일염으로, 천일염 중 세척·탈수 천일염으로 간장을 제조한다면 품질과 항암 기능성이 증진될 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 경기도의 경기도 지역협력연구센터 사업[GRRC-CHA2017-B03, 기능성 김치 및 태명청 음료의 건강기능식품 개발]의 일환으로 수행하였으며 이에 감사를 드립니다.

REFERENCES

- AOAC. Official method of analysis. 15th ed. Association of Official Analytical Chemistry, Washington, DC, USA. 1990. p 79.
- Chang JY, Kim IC, Chang HC. Effect of solar salt on the fermentation characteristics of kimchi. *Korean J Food Preserv.* 2011. 18:256-265.
- Chang M, Kim IC, Chang HC. Effect of solar salt on the quality characteristics of *doenjang*. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2010. 39:116-124.
- Cho JY, Jaiswal L, Ham KS. Beneficial effects of Cheonilyeom (a mineral-rich solar sea salt produced in Korea) in health and fermentation. In: Park KY, Kwon DY, Lee KW, Park S, editors. *Korean Functional Foods—Composition, Processing and Health Benefits*. CRC Press, New York, NY, USA. 2018. p 345-346.
- Choi JM, Lee CB, Kim HS. Quality characteristics of soy sauce by various manufacturing methods. *Culi Sci & Hos Res.* 2016. 22(2):57-65.
- Han GJ, Son AR, Lee SM, Jung JK, Kim SH, Park KY. Improved quality and increased *in vitro* anticancer effect of kimchi by using natural sea salt without bitter and baked (Guwun) salt. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2009. 38:996-1002.
- Jung KO, Lee KY, Rhee SK, Park KY. Effects of various kinds of salt on the tumor formation, NK cell activity and lipid peroxidation in sarcoma-180 cell transplanted mice. *J Korean Assoc Cancer Prev.* 2002. 7:134-142.
- Kim HY, Ju J, Lee KH, Park KY. *In vitro* anticancer effect of salt on HepG2 human hepatocellular carcinoma cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2016. 45:137-142.
- Lauria F, Raspadori D, Rondelli D, Ventura MA, Fiacchini M, Visani G, et al. High Bcl-2 expression in acute myeloid leukemia cells correlates with CD34 positivity and complete remission rate. *Leukemia.* 1997. 11:2075-2078.
- Lee MS, Shin KS. Intestinal immune-modulating activities of polysaccharides isolated from commercial and traditional Korean soy sauces. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2014. 43:9-15.
- Lee SJ, Ryu SH, Lee YS, Song YS, Moon GS. Protective effect of soybean sauce and melanoidin on lipid oxidation in rats fed high PUFA oils. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2003. 32: 913-920.
- Mun EG, Sohn HS, Kim MS, Cha YS. Antihypertensive effect of Ganjang (traditional Korean soy sauce) on Sprague-Dawley rats. *Nutr Res Pract.* 2017. 11:388-395.
- Park ES, Lee JY, Park KY. Anticancer effects of black soybean doenjang in HT-29 human colon cancer cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2015. 44:1270-1278.
- Park ES, Lee SM, Park KY. *In vitro* anti-obesity effects of kimchi prepared with solar salts without bitter on 3T3-L1 adipocytes. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2018. 47:229-234.
- Park ES, Yu T, Yang K, Choi S, Lee SM, Park KY. Cube natural sea salt ameliorates obesity in high fat diet-induced obese mice and 3T3-L1 adipocytes. *Sci Rep.* 2020. 10:3407. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60462-z>
- Park JW, Lee YJ, Yoon S. Total flavonoids and phenolics in fermented soy products and their effects on antioxidant activities determined by different assays. *Korean J Food Cult.* 2007. 22:353-358.
- Park KY, Hwang KM, Jung KO, Lee KB. Studies on the standardization of *doenjang* (Korean soybean paste) 1. Standardization of manufacturing method of *doenjang* by literatures. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2002. 31:343-350.
- Park KY, Park ES. Health benefits of Doenjang (soybean paste) and Kanjang (soybean sauce). In: Park KY, Kwon DY, Lee KW, Park S, editors. *Korean Functional Foods—Composition, Processing and Health Benefits*. CRC Press, New York, NY, USA. 2018. p 101-144.
- Pryczynicz A, Gryko M, Niewiarowska K, Cepowicz D, Ustymowicz M, Kemon A, et al. Bax protein may influence the invasion of colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2014. 20:1305-1310.
- Song JL, Choi JH, Seo JH, Park KY. Fermented *ganjangs* (soy sauce and sesame sauce) attenuates colonic carcinogenesis in azoxymethane/dextran sodium sulfate-treated C57BL/6J mice. *J Med Food.* 2018. 21:905-914.
- Thaker AI, Shaker A, Rao MS, Ciorba MA. Modeling colitis-associated cancer with azoxymethane (AOM) and dextran sulfate sodium (DSS). *J Vis Exp.* 2012. 67:e4100. <https://doi.org/10.3791/4100>
- Yu T, Park ES, Zhao X, Yi RK, Park KY. Lower Mg and S contents in solar salt used in kimchi enhances the taste and anticancer effects on HT-29 colon carcinoma cells. *RSC Adv.* 2020. 10:5351-5360.
- Zamzami N, Kroemer G. The mitochondrion in apoptosis: how pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001. 2:67-71.