



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0087852
(43) 공개일자 2014년07월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 1/237 (2006.01) *A23L 1/30* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0158579
(22) 출원일자 2012년12월31일
심사청구일자 2012년12월31일

(71) 출원인
부산대학교 산학협력단
부산광역시 금정구 부산대학교63번길 2 (장전동,
부산대학교)
(72) 발명자
박건영
부산광역시 해운대구 대천로 187, 105동 402호 (좌동,
해운대화목타운)
조훈
부산광역시 금정구 부산대학교62길 2 부산대학교
생활환경관 421호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이덕록

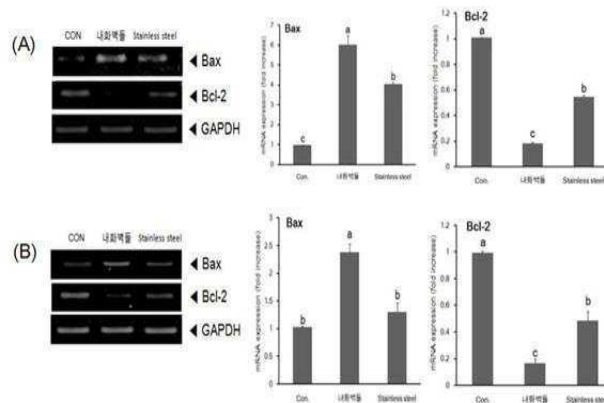
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 항산화 또는 항암 활성이 증대된 기능성 죽염 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 기능성 죽염 및 이의 제조방법을 제공함으로써 항산화 또는 항암 활성이 증대된 기능성 죽염을 제공하는 뛰어난 효과가 있다.

대표도 - 도11



(72) 발명자

송가락

부산광역시 금정구 부산대로62길 2 부산대학교
생활환경관 421호

주재현

서울특별시 강남구 삼성로 120길 6(삼성동 66-1 심
포니하우스)501호

김인석

전라북도 부안군 부안읍 오리정로 172 (봉덕리 하
이안아파트)101-1101

이정희

부산 사하구 다대로 109, 3동 1405호 (신평동, 한
성임호아파트)

길정하

부산 서구 구덕로 347, (서대신동3가)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 911004021HD110

부처명 농림수산식품부

연구사업명 한식세계화융역연구사업

연구과제명 죽염의 기능 및 안전성 규명

기 여 율 1/1

주관기관 부산대학교 산학협력단

연구기간 2012.07.01 ~ 2013.06.30

특허청구의 범위

청구항 1

소금에 지장수를 골고루 살포하여 죽통에 채워 넣은 다음 내화벽돌과 황토로 제조된 가마에서 850℃에서 12시간 동안 1회 가공하는 단계와; 상기 단계에서 수득한 죽염에 지장수를 살포한 다음 죽통에 채워넣은 다음 내화벽돌과 황토로 제조된 가마에서 850℃에서 8시간씩 가공하는 단계를 7회 반복 가공하여 죽염을 수득하는 단계와; 상기 단계에서 수득한 죽염을 1500℃에서 용융가공 하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 향산화 또는 향암활성이 증대된 기능성 죽염 제조방법.

청구항 2

제 1항 기재의 방법에 따라 제조된 향산화 또는 향암활성이 증대된 것이 특징인 기능성 죽염.

청구항 3

제 2항 기재의 기능성 죽염을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 향산화 기능성 건강식품 조성물.

청구항 4

제 2항 기재의 기능성 죽염을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 암 예방 및 치료용 약학적 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 향산화 또는 향암 활성이 증대된 기능성 죽염 및 그의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 소금은 인체 내에서 체액의 삼투압을 조절하는 성분으로써 생명유지에 필수적인 성분이고, 식품학적으로는 음식의 맛을 내고 저장성을 증대시키는 기본적인 조미료이다. 이러한 소금의 종류는 크게 천일염과 정제염으로 나뉜다.

[0003] 정제염은 제조방법에 따라 다시 제제염과 가공염으로 나뉘게 되는데, 제제염은 원료 소금을 용해, 탈수, 건조 등 재결정화 과정을 통하여 제조되고 가공염은 원료소금을 800℃ 이상의 고온에서 굽는 과정을 통하여 원료소금에 포함돼 있는 유해성분을 제거하는 과정을 통하여 제조된다.

[0004] 천일염에는 칼슘 마그네슘, 철, 망간, 인, 유황 등의 미네랄뿐만 아니라 여러가지 불순물이 포함되어 있기 때문에 이러한 불순물을 제거하기 위한 제조과정을 거치게 된다. 천일염의 불순물을 제거한 대표적인 가공소금으로는 죽염이 있는데 이는 천일염을 대나무 통에 넣어서 고온으로 구워낸 소금을 일컫는다. 죽염의 유효성분은 천일염을 대나무 통에 넣어서 고온으로 가열하는 가공과정에서 대나무에 함유된 유용한 성분들과 가열되는 대나무에서 발생하는 수기가 천일염에 영향을 미쳐 천일염과는 차이가 나타나는데 특히, 나트륨, 칼륨, 염소, 칼슘, 마그네슘, 철, 망간, 인, 실리콘, 유화, 아연의 함량이 증가한다. 이 밖에도 죽염에서는 천일염에 함유된 비소와 같은 독성물질이 죽염에서는 검출되지 않을 뿐만 아니라, 갈륨, 스트론튬, 규소 등 천일염에는 함유되어 있지 않은 유용성분들도 검출된다.

[0005] 종래 알려진 죽염제조방법으로는 특허등록 특01-85017호에는 천일염을 대나무통에 넣은 후 대나무통에 간접적으로 고온이 가해지게 하여 대나무가 손상되지 않은 상태로 죽염을 수득하는 방법에 대하여 공지하고 있고, 공개특허 특2002-0088302호에는 소금과 대나무 조각을 대나무통에 함께 채워넣은 대나무통을 황토로 에워싼 후 소성로에서 가열하여 대나무가 방법이 공지되어 있다 상기와 같은 방법으로 죽염을 제조하게 되면 소금과 함께 넣은 대나무조각에서 대나무의 유용한 성분이 효과적으로 소금에 전달될 뿐만 아니라 황토로 에워싼 죽통을 사용하여 대나무가 직접적으로 불에 닿지 않아 대나무재가 소금에 섞이는 것을 방지하였다.

[0006] 그러나 향산화 또는 향암활성을 증대시키기 위한 기능성 죽염제조방법은 개시된바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 따라서 본 발명의 목적은 항산화 또는 항암 활성이 증대된 기능성 죽염 및 이의 제조방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명의 상기 목적은, 한주소금, 간수를 뺀 천일염, 간수를 빼지 않은 천일염, 지중해 천일염, 계랑드 소금 등 5종의 소금원료를 수집하는 단계와; 상기 단계에서 수집한 5종의 소금의 무기질 함량을 측정하여 미네랄 함량이 우수한 소금원료를 선택하는 단계와; 상기 단계에서 선택된 소금을 원료로 하여 본 발명에 따른 죽염제조 방법으로 9종의 죽염을 제조하는 단계와; 상기 죽염제조단계에서 수득한 9종의 죽염의 항산화 및 항암 활성을 검정하는 단계와; 상기 활성검정단계를 통하여 항산화 또는 항암 활성이 증대되는 죽염제조방법을 확인하는 단계를 통하여 달성하였다.

발명의 효과

[0009] 본 발명은 항산화 또는 항암 활성이 증대된 기능성 죽염 및 이의 제조방법을 제공하는 뛰어난 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1은 소금 종류에 따른 항산화활성을 측정한 결과 그래프이다.
 도 2는 천일염 제조방법에 따라 수득한 각 죽염의 항산화활성을 측정한 결과 그래프이다.
 도 3은 천일염 가공용기에 따른 항산화활성을 측정한 결과 그래프이다.
 도 4는 천일염 제조방법에 따라 수득한 각 죽염의 결장암세포 HT-29에서의 항암효과를 측정한 결과 그래프이다.
 도 5는 천일염 제조방법에 따라 수득한 각 죽염의 결장암세포 HCT-116에서의 항암효과를 측정한 결과 그래프이다.
 도 6은 천일염 가공용기에 따른 항암효과를 결장암 세포 HT-29 및 HCT-116에서 측정한 결과 그래프이다.
 도 7은 소금의 종류가 결장암세포 HT-29의 Bax 및 Bcl-2 유전자 발현에 미치는 영향을 PCR을 통해 확인한 전기영동 사진도와 발현량 분석그래프이다.
 도 8은 소금의 종류가 결장암세포 HCT-116의 Bax 및 Bcl-2 유전자 발현에 미치는 영향을 PCR을 통해 확인한 전기영동 사진도와 발현량 분석그래프이다.
 도 9는 본 발명에 따라 제조된 죽염이 결장암세포 HT-29의 Bax 및 Bcl-2 유전자 발현에 미치는 영향을 PCR을 통해 확인한 전기영동 사진도와 발현량 분석 그래프이다.
 도 10은 본 발명에 따라 제조된 죽염이 결장암세포 HCT-116의 Bax 및 Bcl-2 유전자 발현에 미치는 영향을 PCR을 통해 확인한 전기영동 사진도와 발현량 분석그래프이다.
 도 11은 본 발명에 따라 제조용기별로 제조된 죽염이 결장암세포 HT-29(A)와 HCT-116(B)의 Bax 및 Bcl-2 유전자 발현에 미치는 영향을 PCR을 통해 확인한 전기영동 사진도와 발현량 분석그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의해 더욱 구체적으로 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명에 대한 이해를 돕기 위한 목적일 뿐이므로, 어떤 의미로든 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0012] <실시예 1> 본 발명 죽염 제조

[0013] 한주소금(정제염), 간수를 뺀 천일염, 간수를 빼지 않은 천일염, 지중해 천일염, 계랑드 소금, 태평양은 주식회사 삼보를 통하여 제공받았으며, 상기 6종의 소금을 하기 표 1에 정리한 바와 같이 본 발명의 비교예로 하였다.

- [0014] 제조예 1: 1회 죽염
- [0015] 태평염을 죽통에 1,000g 채워 넣은 후 850℃에서 12시간동안 1회 가공하여 수득한 죽염을 제조예 1로 하여 공시 재료로 사용하였다.
- [0016] 제조예 2: 2회 죽염
- [0017] 태평염을 죽통에 1,000g 채워 넣은 후 850℃에서 12시간동안 1회 가공하여 수득한 죽염을 다시 죽통에 700g 채워 넣은 후 850℃에서 8시간동안 가공하여 수득한 죽염을 제조예 2로 하여 공시재료로 사용하였다.
- [0018] 제조예 3: 2회 황토죽염
- [0019] 태평염을 죽통에 1,000g 채워 넣은 후 뚫려있는 한쪽 입구를 황토 400g을 사용하여막은 후 850℃에서 12시간동안 1회 가공하여 수득한 죽염을 다시 죽통에 700g 채워넣은 후 850℃에서 8시간동안 가공하여 수득한 죽염을 제조예 3으로 하여 공시재료로 사용하였다.
- [0020] 제조예 4: 2회 지장수 죽염
- [0021] 태평염 1,000g에 지장수 14mL를 골고루 살포한 다음 죽통에 채워 넣은후 850℃에서 12시간동안 1회 가공한 후 수득한 죽염을 700g에 지장수 10mL를 골고루 살포한 다음 죽통에 채워넣은 후 850℃에서 8시간 가공하여 수득한 죽염을 제조예 4로 하여 공시재료로 사용하였다.
- [0022] 제조예 5: 3회 죽염
- [0023] 태평염을 죽통에 1,000g 채워 넣은 후 850℃에서 12시간동안 1회 가공하여 수득한 죽염을 다시 죽통에 700g 채워 넣은 후 850℃에서 8시간동안 2회 더 가공하여 수득한 죽염을 제조예 5로 하여 공시재료로 사용하였다.
- [0024] 제조예 6: 3회 황토죽염
- [0025] 태평염을 죽통에 1,000g 채워 넣은 후 뚫려있는 한쪽 입구를 황토 400g을 사용하여막은 후 850℃에서 12시간동안 1회 가공하여 수득한 죽염을 다시 죽통에 700g 채워넣은 후 850℃에서 8시간 동안 2회 더 가공하여 수득한 죽염을 제조예 3으로 하여 공시재료로 사용하였다.
- [0026] 제조예 7: 3회 지장수 죽염
- [0027] 태평염 1,000g에 지장수 14mL를 골고루 살포한 다음 죽통에 채워 넣은후 850℃에서 12시간동안 1회 가공한 후 수득한 죽염을 700g에 지장수 10mL를 골고루 살포한 다음 죽통에 채워넣은 후 850℃에서 8시간 2회 더 가공하여 수득한 죽염을 제조예 7로 하여 공시재료로 사용하였다. 지장수는 황토 4kg과 물 18L를 섞이는 항아리에 담아 놓고 24시간 후에 부유물이 남지 않게 최대한 윗물을 떠서 제조한다.
- [0028] 제조예 8: 9회 지장수 죽염
- [0029] 태평염 1,000g에 지장수 14mL를 골고루 살포한 다음 죽통에 채워 넣은후 850℃에서 12시간 동안 1회 가공한 후 수득한 죽염을 700g에 지장수 10mL를 골고루 살포한 다음 죽통에 채워넣은 후 850℃에서 8시간씩 7회 더 가공한 다음 1500℃에서 용융가공을 하여 수득한 죽염을 제조예 8로 하여 공시재료로 사용하였다.
- [0030] 지장수는 황토 4kg과 물 18L를 섞이는 항아리에 담아 놓고 24시간 후에 부유물이 남지 않게 최대한 윗물을 떠서 제조한다.

[0031] 상기 제조예 1 내지 8의 모든 제조는 내화벽돌과 황토로 제조된 가마에서 제조되었다.

[0032] 제조예 9: stainless steel

[0033] 태평염 1,000g에 지장수 14mL를 골고루 살포한 다음 죽통에 채워 넣은후 850℃에서 12시간 동안 1회 가공한 후 수득한 죽염을 700g에 지장수 10mL를 골고루 살포한 다음 죽통에 채워넣은 후 850℃에서 8시간씩 7회 더 가공한 다음 1500℃에서 용융가공을 하여 수득한 죽염을 제조예 8로 하여 공시재료로 사용하였다. 지장수는 황토 4kg과 물 18L를 섞어는 항아리에 담아 놓고 24시간 후에 부유물이 남지 않게 최대한 윗물을 떠서 제조한다.

[0034] 소금을 굽는 가마를 스테인리스 스틸로 사용하여 제조하였다.

표 1

[0035] 본 발명에 따른 비교예 및 제조예

	시료
비교예 1	한주소금
비교예 2	간수를 뺀 천일염
비교예 3	간수를 빼지 않은 천일염
비교예 4	지중해 천일염
비교예 5	계랑드 소금
비교예 6	태평염진
제조예 1	1회 죽염
제조예 2	2회 죽염
제조예 3	2회 황토 죽염
제조예 4	2회 지장수 죽염
제조예 5	3회 죽염
제조예 6	3회 황토 죽염
제조예 7	3회 지장수 죽염
제조예 8	9회 지장수 죽염/내화벽돌과 황토로 제조된 가마 사용
제조예 9	9회 지장수 죽염/stainless steel 용기사용

[0036] 실험예 1: 본 발명 죽염의 무기질 함량 측정

[0037] 시료 소금 비교예 1 내지 비교예 5의 무기질은 유도결합플라스마 분광분석법(inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry, ICP-AES)에 의해 분석하였다. 본 실험에 사용된 ICP-AES는 한국기초과학지원연구원(부산센터)에서 Perkin Elmer의 Optima 4300DV ICP-OES(Shelton, CT, USA)를 사용하였으며, 실험조건은 주파수 40 MHz(free-running), power 1300 W, plasma gas flows 20 L/min, auxiliary gas flows 1.0 L/min, nebulizer gas flows 0.5 L/min, sample uptake rate 2 mL/min이었다. 소금은 20 mesh의 sieve로 입자를 고르게 하여준 다음 무기질 분석 시료로 사용하였다.

[0038] 본 발명 죽염의 원료가 되었던 다섯 가지 종류의 소금 속에 존재하는 생리 활성을 가지는 미네랄의 상대적인 함량을 ICP-MS를 이용하여 측정한 결과는 하기 표 2에 나타낸 바와 같다.

[0039] 분석결과, 정제염인 비교예 1의 NaCl 함량은 99.8%이었으나 Ca, K, Mg 등의 무기질 함량은 비교예 2 내지 비교예 5의 천일염보다 낮게 나타났다. Ca의 함량은 계랑드 소금이 1326 ppm으로 가장 높았고, 간수 안 뺀 천일염은 1115 ppm으로 계랑드 소금보다 낮았다. K의 함량은 계랑드 소금과 간수 안 뺀 천일염이 각각 2905와 2391 ppm으로 다른 소금보다 높은 함유량을 나타냈고 Mg의 함량은 간수 안 뺀 천일염이 8789 ppm으로 가장 높았고, 계랑드 소금과 지중해 천일염은 6000~7000 ppm으로 높은 함량을 함유하고 있었다. 간수 뺀 천일염과 비교예 1의 Mg 함량은 낮게 나타났다. 비교예 1 내지 5 소금의 Mn과 P의 함량은 모두 낮게 나타났다.

표 2

[0040]

죽염 원료소금의 무기질 함량

Test item	Ca	Fe	K	Mg	Mn	P
한주소금 (비교예 1)	281.6	ND	677.3	110.3	ND	2.9
간수 뺀 천일염 (비교예 2)	604.0	0.7	1292.7	1372.6	ND	3.7
간수 안 뺀 천일염 (비교예 3)	1115.1	ND	2391.1	8788.7	ND	5.5
지중해 천일염 (비교예 4)	751.2	ND	1544.3	6293.8	1.1	3.8
계랑드 소금 (비교예 5)	1326.1	ND	2905.0	7741.3	2.2	3.0

[0041]

<실시예 2> 본 발명 죽염의 항산화 효과 검증

[0042]

항산화 효과(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl; DPPH 소거 효과) 농도별로 소금 시료 비교예 1 내지 비교예 5와 제조예 6 내지 제조예 9 각 시료를 DPPH 용액 100 μ L와 96-well plate에 분주 한 다음 혼합하여 30분간 실온에 방치시킨 후, 540 nm에서 microplate reader (Bio-Rad 680, Carlsbad, CA, USA)로 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 활성산소 소거효과를 백분율 (%)로 나타내었다.

[0043]

DPPH radical 소거 활성법은 소금 시료의 활성산소 소거 능력이나 수소 공여능력을 평가하는 방법으로써 안정적이고 간단하며, 재현성이 높아 널리 사용된다. 죽염 20%의 농도에서 계랑드 소금으로 제조한 죽염이 67%의 가장 높은 소거 효과를 나타내었다. 간수 안 뺀 천일염도 38%의 높은 효과를 나타냈고 지중해 천일염은 42%의 효과를 나타내었다. 간수를 뺀 천일염(10%)과 한주소금(1.4%)은 그 효과가 낮게 나타났다(도 1). 10%의 농도에서도 비슷한 경향을 나타냈고 계랑드 소금, 간수 안 뺀 천일염, 지중해 천일염, 간수 뺀 천일염과 한주소금의 항산화 효과가 각각 49%, 22%, 28%, 6%와 0.8%로 나타났다($p < 0.05$). 미네랄 성분이 적은 정제염인 한주소금이 가장 활성이 낮았고 간수를 뺀 것은 빼지 않은 것보다 효과가 낮게 나타났다. 계랑드 소금이 가장 효과가 높았으며 지중해 천일염도 항산화 효과가 우수하게 나타났다.

[0044]

도 2에 나타난 바와 같이 태평양전 소금으로 만든 다양한 죽염의 DPPH 소거능 결과, 10% 농도에서 태평양전 소금으로 만든 3회 지장수 죽염(제조예 7)이 31.2%로 가장 높은 활성산소 소거율을 보였고, 3회 황토 죽염(제조예 6)과 3회 죽염(제조예 5)이 각각 26.6%와 23.3%의 소거능을 보였고 2회 지장수 죽염(제조예 4), 2회 황토 죽염(제조예 3)과 2회 죽염(제조예 2)이 각각 17.9%, 13.9%와 12.0%의 소거능을 보였다. 반면에 1회 죽염(제조예 1) 10.2%, 태평양전 소금(비교예 6)은 6.5%의 낮은 활성산소 소거능을 나타냈다.

[0045]

본 발명에 따르면, 항산화활성이 최대치를 나타내는 죽염제조방법은 상기 제조예 4 또는 제조예 7에 나타난 바와 같이 지장수를 사용하여 죽염을 제조했을 때가 가장 항산화력이 증진되고 그 다음으로 황토를 죽통 양 입구를 막은 후 제조한 죽염에서 높은 활성을 확인할 수 있었다. 이에 따른 결과는 2회와 3회 죽염에서 비슷한 경향을 보이므로 지장수 또는 황토의 사용도 중요한 가공 인자라고 할 수 있다. 20% 농도에서도 비슷한 경향을 볼 수 있었으며, 태평양전 소금으로 만든 3회 지장수 죽염이 49.0%로 가장 높은 소거능을 보였고, 3회 황토 죽염과 3회 죽염이 각각 42.2%와 39.0%이었다. 2회 지장수 죽염, 2회 황토 죽염과 2회 죽염이 각각 36.3%, 29.0%와 22.2%의 소거능을 보였으며, 1회죽염 20.0%, 태평양전 소금은 14.0%의 소거능을 나타내었다.

[0046]

도 3 나타난 바와 같이 제조 용기를 달리하여 만든 9회죽염의 DPPH 소거능 결과, 10% 농도에서 내화벽돌과 황토로 제조된 가마에서 제조된 9회 죽염이 37.6%, stainless steel로 만든 9회 죽염이 34.4%의 DPPH 소거능을 보였다. 20% 농도에서도 비슷한 경향을 볼 수 있었으며, 내화벽돌과 황토로 제조된 가마에서 제조된 9회 죽염(제조예 8)이 55.1%, stainless steel으로 만든 9회 죽염이 52.8%의 DPPH 소거능을 보여 죽염 제조시 사용하는 용기는 내화벽돌과 황토로 제조된 가마가 우수한 것으로 나타났다.

[0047]

<실시예 3> 본 발명 죽염의 항암 효과 검증

[0048]

실험예 2: 암세포 배양 및 MTT assay

[0049]

세포배양을 위해 RPMI 1640, fetal bovine serum(FBS), 0.05% trypsin-0.02% EDTA 그리고 100 units/mL

penicillin-streptomycin을 GIBCO(Grand Island, NY, USA)로부터 구입하여 사용하였고 세포배양은 5% CO₂ incubator (model 311S/N29035, Forma, Marietta, GA, USA)를 사용하였다. HCT-116과 HT-29 인체 결장암세포는 미국 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)으로부터 분양받아 배양하면서 실험에 사용하였다. HCT-116과 HT-29 인체결장암세포는 100 units/mL penicillin-streptomycin과 10%의 FBS가 함유된 RPMI 1640을 사용하여 37℃, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양된 각각의 암세포는 일주일에 2~3회 refeeding하고 6~7일만에 PBS로 세척한 후 0.05% trypsin-0.02% EDTA로 부착된 세포를 분리하여 원심분리한 후 계대 배양하면서 실험에 사용하였다. 배양된 암세포는 96 well plate에 well당 1×10⁴ cells/mL가 되도록 180 μL씩 분주하고 24시간 부착시킨 후 소금시료 20 μL 첨가하여 37℃, 5% CO₂배양기에서 48시간 배양하였다. 여기에 인산 생리식염수에 5 mg/mL의 농도로 제조한 3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT) 용액 20 μL를 첨가하여 동일한 배양 조건에서 4시간 동안 더 배양하였다. 이때 생성된 formazan 결정을 DMSO에 녹여서 microplate reader (Bio-Rad 680, Carlsbad, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0050] 실험결과, 소금은 항염증 및 암세포의 성장을 억제하는 효과가 있다. 소금 중에서도 특히 죽염은 항암 효과가 있는데 하기 표 3은 HT-29 인체 결장암 세포에서의 비교예 1 내지 비교예 5의 항암 효과를 나타낸 결과이다. 소금 시료를 0.5%의 농도로 처리한 결과, 계랑드 소금이 20%로 가장 높은 암세포 성장 저해율을 보였고 간수 안 뺨 천일염과 지중해 천일염이 각각 16%와 13%의 저해율을 보였으며 간수 뺨 천일염과 한주소금은 11%와 5%의 저해율을 나타내었다(p<0.05). 1% 농도에서도 비슷한 경향을 볼 수 있었으며, 간수 안 뺨 천일염이 27%의 저해율이 나타났고 지중해 천일염과 계랑드 소금이 각각 17%와 39%의 저해율을 나타내며, 간수 뺨 천일염과 한주소금은 17%와 9%의 암세포 성장 억제율을 보였다(p<0.05). 이상의 결과에서도 계랑드 소금(프랑스 천일염)과 간수 안 뺨 천일염의 암세포 성장 저해 효과가 가장 큰 것으로 나타났다.

[0051] 본 발명에 따르면, 죽염을 제조하는 소금은 미네랄이 많고, 품질이 좋은 천일염이 우수함을 확인할 수 있었으며, 미네랄이 적은 비교예 1은 그 효과가 매우 낮았다.

표 3

[0052] 원료소금의 HT-29 세포에서의 항암효과

Treatment	OD ₅₄₀ (concentration of sample, %)	
	0.5	1.0
Control (untreated)	0.623 0.011 ^{a,A}	
한주소금	0.585 ± 0.009 ^b (5) ¹⁾	0.560 ± 0.008 ^B (9)
간수 뺨 천일염	0.549 ± 0.003 ^c (11)	0.511 ± 0.024 ^C (17)
간수 안 뺨 천일염	0.518 ± 0.020 ^d (16)	0.451 ± 0.014 ^D (27)
지중해 천일염	0.536 ± 0.027 ^{cd} (13)	0.509 ± 0.007 ^C (17)
계랑드 소금	0.492 ± 0.006 ^e (20)	0.375 ± 0.032 ^E (39)

[0053] 하기 표 4에는 HCT-116 인체 결장암세포에서의 항암 효과를 나타냈다. 소금 시료를 0.5%의 농도로 처리한 결과, 계랑드 소금이 23%로 가장 높은 저해율을 보였고 간수 안 뺨 천일염과 지중해 천일염이 각각 11%와 9%의 저해율을 보였으며 간수 뺨 천일염과 한주소금은 7%와 3%의 저해율을 나타내었다(p<0.05). 1% 농도에서도 비슷한 경향을 볼 수 있었으며, 간수 안 뺨 천일염이 36%의 저해율이 나타났고 지중해 천일염과 계랑드 소금이 각각 28%와 41%의 저해율을 나타내며, 간수 뺨 천일염과 한주소금은 21%와 14%의 암세포 성장 억제율을 보였다(p<0.05). 이상의 결과에서도 계랑드 소금(프랑스 천일염)과 간수 안 뺨 천일염의 암세포 성장 저해 효과가 가장 큰 것으로 나타났다. 역시 비슷한 효과로 죽염 제조에 사용된 재료 소금을 어떤 것을 사용하느냐에 따라 죽염의 기능성이 영향을 받는 것으로 나타났다.

표 4

[0054]

원료소금의 HCT-116 세포에서의 항암효과

Treatment	OD ₅₄₀ (concentration of sample, %)	
	0.5	1.0
Control (untreated)	0.596 0.005 ^{a,A}	
한주소금	0.578 ± 0.004 ^b (3) ¹⁾	0.513 ± 0.008 ^B (14)
간수 뺀 천일염	0.554 ± 0.010 ^c (7)	0.471 ± 0.012 ^C (21)
간수 안 뺀 천일염	0.483 ± 0.006 ^e (19)	0.381 ± 0.010 ^E (36)
지중해 천일염	0.530 ± 0.011 ^d (11)	0.429 ± 0.008 ^D (28)
계랑드 소금	0.458 ± 0.008 ^f (23)	0.352 ± 0.009 ^F (41)

[0055]

도 4에 나타난 바와 같이 태평양전 소금 및 이를 소금원료로 하여 제조한 다양한 종류의 죽염을 HT-29 인체 결장암세포에서 0.5%의 농도로 처리한 결과, 상기 제조예 7에 따라 태평양전 천일염 소금으로 제조된 3회 지장수 죽염이 38%로 가장 높은 저해율을 보였고, 상기 제조예 6에 따라 제조된 3회 황토 죽염과 상기 제조예 5에 따라 제조된 3회 죽염이 각각 31%와 25%의 저해율을 보였다. 2회 지장수 죽염(제조예 4), 2회 황토 죽염(제조예 3)과 2회 죽염(제조예 2)이 각각 21%, 16%와 14%의 저해율을 보였고 1회죽염(제조예 1) 12%, 태평양전 소금(비교예 6)이 7%의 저해율을 나타내었다. 1% 농도에서도 비슷한 경향을 볼 수 있었으며, 태평양전 소금으로 만든 3회 지장수 죽염(제조예 7)이 45%로 가장 높은 저해율을 보였고, 3회 황토 죽염(제조예 6)과 3회 죽염(제조예 3)이 각각 39%와 33%의 저해율을 보였다. 2회 지장수 죽염(제조예 4), 2회 황토 죽염(제조예 3)과 2회 죽염(제조예 2)이 각각 29%, 25%와 23%의 저해율을 보였으며 1회죽염(제조예 1) 20%, 태평양전 소금이 10%의 저해율을 나타내었다. 이는 앞의 항산화 효과와 비슷한 결과로 죽염을 제조할 경우 소금의 종류도 중요하고 죽통에 넣은 다음 지장수를 뿌리는 것이 황토로 막는 것보다 좋으며 황토를 사용하는 것이 사용하지 않은 것보다 우수함을 알 수 있다. 그리고 이 효과는 죽염의 굵는 횟수의 증가에 따라 증가됨을 알 수 있다.

[0056]

도 5에 나타난 바와 같이 태평양전 소금 및 이를 소금원료로 하여 제조한 다양한 종류의 죽염을 HCT-116 인체 결장암세포에서도 HT-29 암세포에서와 비슷한 경향을 보였다. 0.5%의 농도로 처리한 결과, 태평양전 천일염 소금으로 만든 3회 지장수 죽염이 41%로 가장 높은 저해율을 보였고, 3회 황토 죽염과 3회 죽염이 각각 35%와 29%의 저해율을 보였다. 2회 지장수 죽염, 2회 황토 죽염과 2회 죽염이 각각 26%, 21%와 19%의 저해율을 보였고 1회죽염은 17%, 태평양전 소금은 10%의 저해율을 나타내었다. 1% 농도에서도 비슷한 경향을 볼 수 있었으며, 태평양전 소금으로 만든 3회 지장수 죽염이 47%로 가장 높은 저해율을 보였고, 3회 황토 죽염과 3회 죽염이 각각 41%와 35%의 저해율을 보였다. 2회 지장수 죽염, 2회 황토 죽염과 2회 죽염이 각각 30%, 26%와 24%의 저해율을 보였고 1회죽염은 22%, 태평양전 소금은 16%의 저해율을 나타내었다. 이상의 결과에서 지장수를 이용하여 3회 굵는 방법으로 만든 죽염이 다른 죽염에 비하여 암세포의 성장 저해 효과를 증진 시키는 작용을 나타냈다.

[0057]

도 6은 죽염 제조 용기별로 제조된 9회 죽염을 HT-29 및 HCT-116 인체 결장암세포에서 0.5%의 농도로 처리한 결과, 내화벽돌과 황토로 제조된 가마에서 제조된 죽염이 44.3%와 47.4%, stainless steel으로 만든 9회 죽염이 39.1%와 42.5%의 암세포 성장 저해율(MTT assay)을 나타내었다. 1% 농도에서도 비슷한 경향을 볼 수 있었으며, 내화벽돌과 황토로 제조된 가마에서 제조된 죽염이 52.5%와 50.1%이었으나, stainless steel으로 제조된 죽염은 45.2%와 47.7%의 암세포 성장 저해율을 나타내어 통계적인 유의성이 있었다(p<0.05). 이상의 결과에서는 stainless steel에서 제조되는 것보다 내화벽돌과 황토로 제조된 가마에서 제조된 죽염(제조예 8)의 항암 효과가 더 높게 나타났다.

[0058]

실험예 3: 아폽토시스 관련 유전자 발현 분석

[0059]

Bax 및 Bcl-2의 reverse transcriptase-polymerase chain reaction(RT-

[0060]

PCR) 분석은 동일한 조건에서 준비된 암세포를 대상으로 RNAzol B (TEL-TEST, Inc., Friendswood TX, USA)을 이용하여 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 정량한 후, oligo dT primer와 AMV reverse transcriptase를 이용하여 2 µg의 RNA에서 ss cDNA를 합성하였다. 이 cDNA를 주형으로하고 하기 표 5에 나타난 Bax 및 Bcl-2 유

전자 증폭용 프라이머를 이용하여 polymerase chain reaction(PCR) 방법으로 유전자 발현분석을 수행하였다. 이때 내부 유전자 발현 보정은 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH) 유전자 발현량을 기준으로 하였다. 각 PCR 산물들을 1% agarose gel을 이용하여 전기영동하고 ethidium bromide(EtBr, Sigma, St. Louis, MO, USA)를 이용하여 염색한 후 UV 하에서 확인하였다.

표 5

[0061]

Bax 및 Bcl-2 유전자 증폭용 프라이머 염기서열

Genes		sequence of primers (5' 3')
Bax	Forward	AAG CTG AGC GAG TGT CTC CGG CG
	Reverse	CAG ATG CCG GTT CAG GTA CTC AGT C
Bcl-2	Forward	CTC GTC GCT ACC GTC GTG ACT TGG
	Reverse	CAG ATG CCG GTT CAG GTA CTC AGT C
GAPDH	Forward	CGG AGT CAA CGG ATT TGG TC
	Reverse	AGC CTT CTC CAT GGT CGT GA

[0062]

원료소금의 암세포들에 대한 세포사멸유도 영향을 측정하기 위해 RT-PCR 분석을 이용하여 Bax와 Bcl-2 유전자의 mRNA 발현 정도를 비교하였다. 1% 농도의 소금 처리에 의한 암세포의 세포사멸 유발이 Bcl-2의 발현 변화와 관련이 있는 것인지를 조사하기 위하여 Bcl-2에 속하는 주요 유전자들의 전사 수준에 미치는 영향을 조사하였다.

[0063]

실험결과, 도 7과 도 8에 나타난 바와 같이 비교예 1 내지 비교예 5의 소금을 처리한 HT-29 및 HCT-116인체 결장암세포에서 세포사멸 유도에 관련이 있는 Bax의 발현은 비교예 1내지 비교예 5 처리에 의해서 증가하였으며, 간주소금, 간수 뺀 천일염, 지중해 천일염, 간수 안 뺀 천일염과 계랑드 소금의 순으로 Bax 발현이 증가되었으며, 세포사멸을 저해하는 Bcl-2 발현은 반대 현상으로 나타났다. 이는 이들 소금의 상기 실험예 2에서 확인한 항암효과와 유사한 경향으로 암세포의 세포사멸을 유도하여 항암 효과를 높이는 것으로 나타났다.

[0064]

도 9와 도 10에서는 태평양전 천일염 소금을 소금원료로하여 본 발명 제조예 1 내지 제조예 7에 따라 제조된 죽염을 처리한 HT-29 및 HCT-116 인체 결장암세포에서의 세포사멸 유도에 관여하는 유전자 발현분석 결과를 나타냈다. Bax의 발현은 본 발명 제조예 1 내지 제조예 7에 따라 제조된 죽염 처리에 의하여 증가하였으며, Bax 발현량은 태평양전 소금 < 1회 죽염 < 2회 죽염 < 2회 황토죽염 < 2회 지장수 죽염 < 3회 죽염 < 3회 황토 죽염 < 3회 지장수 죽염 순서로 높게 나타났으며, Bcl-2 발현은 상기 Bax 유전자 발현분석 결과와는 반대로 태평양전 소금 > 1회 죽염 > 2회 죽염 > 2회 황토죽염 > 2회 지장수 죽염 > 3회 죽염 > 3회 황토 죽염 > 3회 지장수 순서로 발현량이 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 이는 항암 효과를 나타내는 세포사멸 유도를 MTT assay의 항암 효과에서 나타난 순서에 따라 관련 유전자의 mRNA 발현도 같은 경향으로 나타나, 이에 따른 항암 효과를 유전자 발현에서도 증명이 되었다고 할 수 있다.

[0065]

도 11에서는 다른 본 발명에 따라 상기 제조예 8과 제조예 9의 방법으로 제조된 9회 죽염이 처리된 HT-29 및 HCT-116 인체 결장암세포에서 세포사멸 유도에 관련이 있는 유전자의 발현을 비교하였다. 두 암세포에서 비슷한 경향을 나타내었는데 세포사멸을 일으키는 Bax 유전자는 유의적으로 내화벽돌과 황토로 제조된 가마에서 제조된 죽염(제조예 8)에서 증가되었으며 세포사멸을 억제하는 Bcl-2 유전자는 유의적으로 감소 되는 것으로 나타났다(p<0.05).

[0066]

따라서 본 발명에 따르면 죽염을 제조할 때에는 내화벽돌과 황토로 제조된 가마를 제조용기로 사용하는 것이 stainless steel를 사용하는 것보다 항암효과가 우수한 것으로 확인되었다.

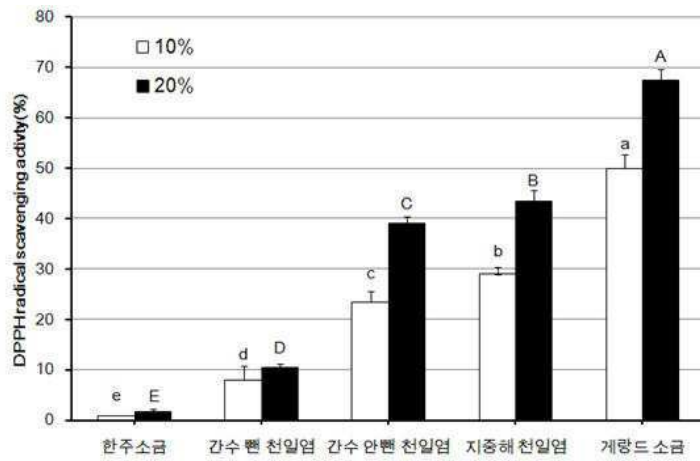
산업상 이용가능성

[0067]

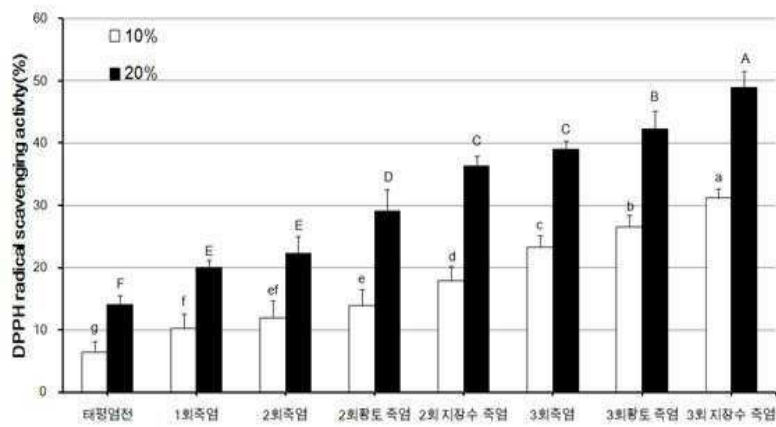
본 발명은 기능성 죽염 및 이의 제조방법을 제공함으로써 항산화 또는 항암 활성이 증대된 기능성 죽염을 제공하는 뛰어난 효과가 있으므로 식품산업상 매우 유용한 발명이다.

도면

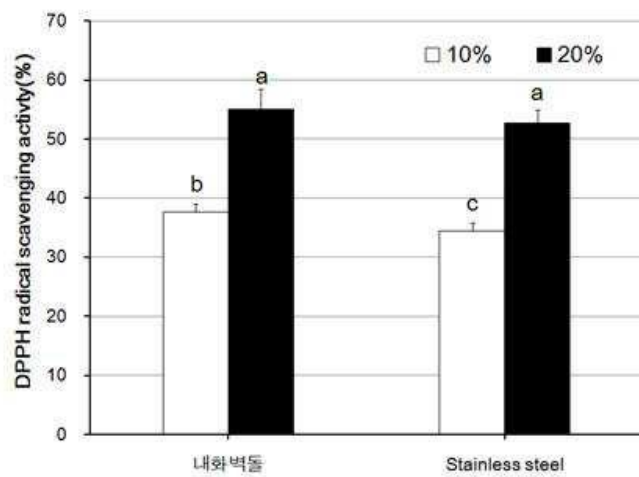
도면1



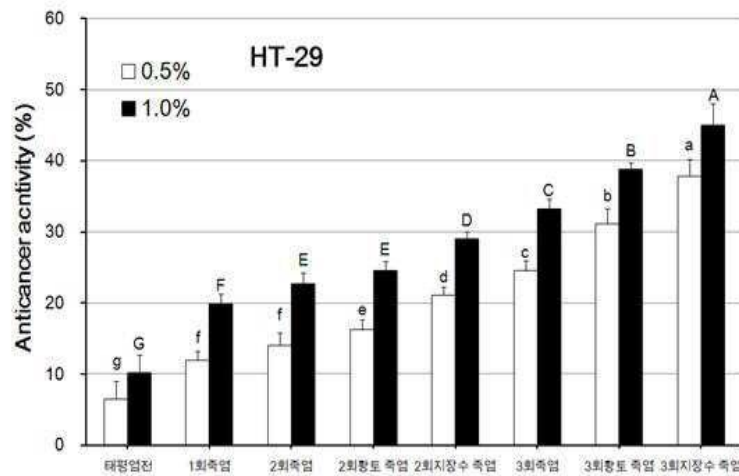
도면2



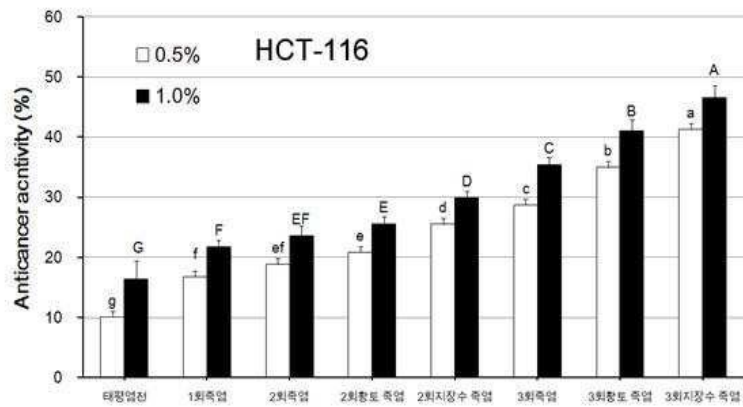
도면3



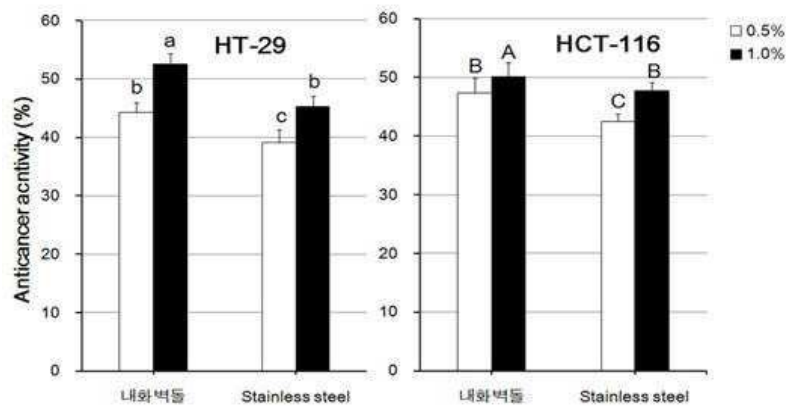
도면4



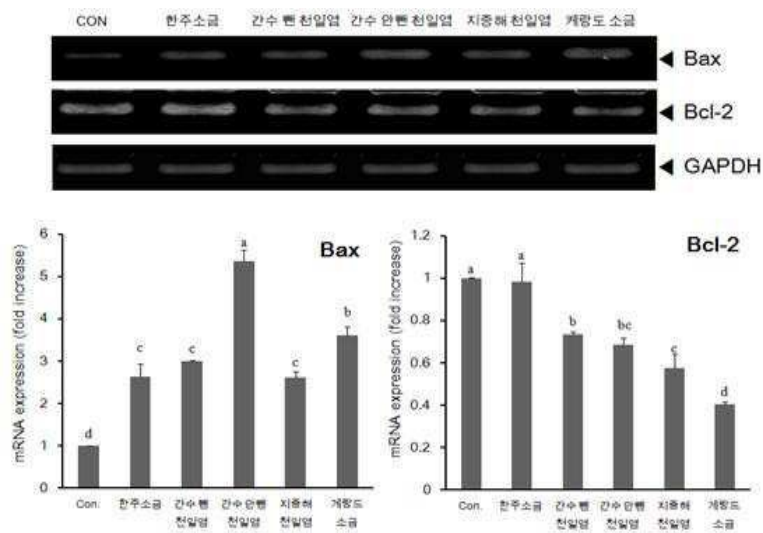
도면5



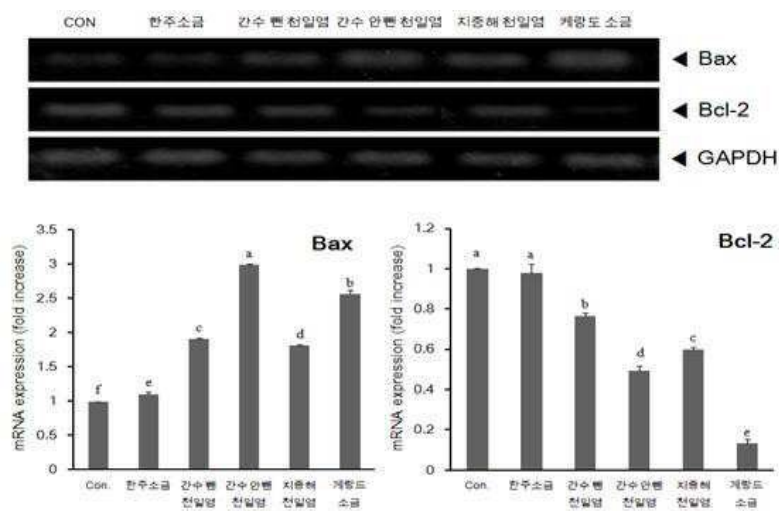
도면6



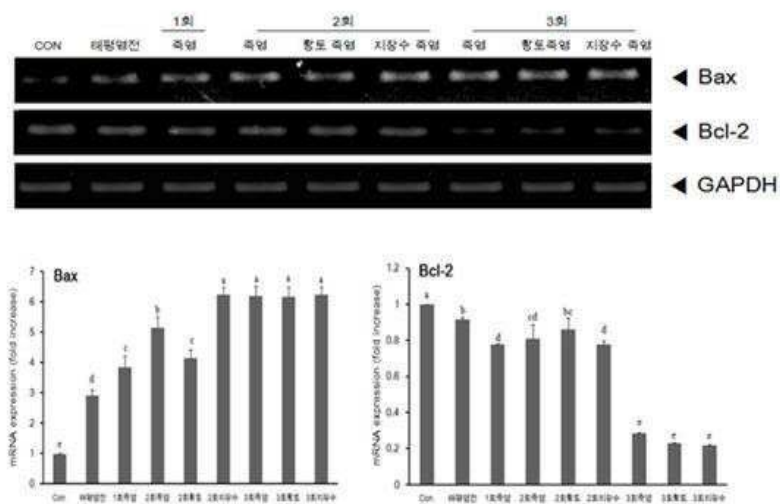
도면7



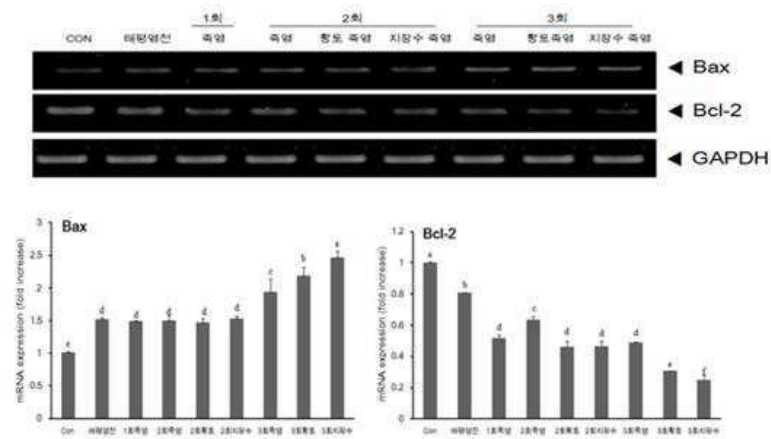
도면8



도면9



도면10



도면11

