

죽염된장의 항산화 및 HT-29 암세포에서 *in vitro* 항암 효과

심정하¹ · 박의성¹ · 김인석² · 박건영¹

¹부산대학교 식품영양학과
²삼보죽염

Antioxidative and Anticancer Effects of Doenjang Prepared with Bamboo Salt in HT-29 Human Colon Cancer Cells

Jung-Ha Shim¹, Eui Seong Park¹, In-Suk Kim², and Kun-Young Park¹

¹Department of Food Science and Nutrition, Pusan National University

²Sambo Food Corporation

ABSTRACT Antioxidant activities and *in vitro* anticancer effects of bamboo salt doenjang on HT-29 human colon cancer cells were studied. 3Y3B-D (three-year fermentation using three-time baked bamboo salt doenjang), 3Y9B-D (three-year fermentation using nine-time baked bamboo salt doenjang), 6Y3B-D (six-year fermentation using three-time baked bamboo salt doenjang), and 6Y9B-D (six-year fermentation using nine-time baked bamboo salt doenjang) were compared to C-D (commercial doenjang) and 3B-S (cooked soy beans prepared using three-time baked bamboo salt). There were no differences between experimental groups in pH, amino-type nitrogen, or ammonia-type nitrogen levels. 6Y9B-D showed the highest antioxidative effect, followed by 6Y3B-D, 3Y9B-D, and 3Y3B-D, in order. 6Y9B-D showed the highest total polyphenol concentration. 6Y9B-D showed the highest anticancer effect, as determined by MTT assay, as well as levels of the pro-inflammatory cytokines including TNF- α , IL-6, iNOS, and COX-2, followed by 6Y3B-D, 3Y9B-D, and 3Y3B-D, in order. From the results above, 6Y9B-D showed the highest antioxidative and anticancer effects, followed by 6Y3B-D, 3Y9B-D, 3Y3B-D, C-D, and 3B-S.

Key words: antioxidative, anticancer, fermentation, bamboo salt, doenjang

서 론

된장은 우리나라의 대표적인 전통 장류로써 우수한 영양소와 각종 생리활성 물질이 풍부한 항암식품 중 하나이며, 콩의 저장성뿐만 아니라 인체의 흡수율을 높일 수 있는 유익한 발효 가공식품이다(1). 된장은 발효와 숙성 과정 중 효소와 여러 미생물들에 의해 된장 고유의 구수한 맛과 향이 생성되고 유기산, 미네랄 및 비타민류가 풍부하게 된다(2). 특히 재래식 된장은 숙성기간이 오래될수록 맛과 풍미가 증가되고 콩의 이로운 성분들에 대한 생체 이용도와 흡수율이 증가된다고 알려져 있다. 콩의 이로운 성분 중 하나는 isoflavone이며 숙성이 진행됨에 따라 glucoside 형태인 genistin, daidzin, glycitin이 여러 미생물의 대사산물로 인해 생체 흡수율이 증가되는 각각의 aglycone 형태의 genistein, daidzein, glycitein으로 전환된다(3,4). 또한 Kwon과 Shon(5)의 연구에서도 된장의 발효기간이 오래될수록 높은 암세포 성장 억제 효과가 보고된 바 있다.

소금은 된장 제조에 있어 없어서는 안 될 재료이지만 된장에 들어 있는 약 13%의 소금은 특히 Na에 민감한 사람이 계속해서 많은 양의 소금을 섭취하면 나이가 들면서 고혈압이 발생할 가능성이 높아진다(6). 그러나 죽염은 제조과정 중 대나무의 여러 성분들이 소금의 성분에 변화를 주어 K, Mg, Fe 등의 무기질의 함량이 높아지고, 특히 K의 함량은 천일염에 비해 3배나 높아지게 된다. K와 Na의 길항작용으로 혈압조절에 용이하게 되고(7), Mg은 근육과 혈관을 이완시켜 연조직의 석회화를 막고 심혈관계 질환을 예방하는 효능을 가지고 있다(8). 또한 이러한 죽염을 된장에 첨가했을 때 인체 위암세포와 결장암세포에 항암 효과를 나타내었고, 마우스를 이용한 종양 전이 억제 실험에서도 죽염된장을 투여하였을 때 매우 높은 암 전이 억제 효과를 나타내었다(9).

그러나 이러한 죽염된장을 이용해 그 우수성은 많이 알려져 왔지만 6년까지 장기간 숙성된 죽염된장의 발효 특성과 항산화 및 항암 효과에 대한 연구는 거의 없다. 그래서 본 연구에서는 구운 횡수를 달리한 죽염(3회 및 9회)을 첨가하여 제조한 된장의 발효기간에 따른 발효 특성과 항산화 및 항암 기능성을 알아보고자 하였다. 이에 따라 된장 발효 전의 삶은 콩에 3회 죽염을 첨가한 시료와 시판된장을 대조군으로 하여 3회 구운 죽염을 첨가한 3년 발효된장, 9회 구운

Received 24 December 2014; Accepted 11 March 2015

Corresponding author: Kun-Young Park, Department of Food Science and Nutrition, Pusan National University, Busan 609-735, Korea
E-mail: kunypark@pusan.ac.kr, Phone: +82-51-510-2839

죽염을 첨가한 3년 발효된장, 3회 구운 죽염을 이용한 6년 발효된장, 9회 구운 죽염을 이용한 6년 발효된장을 이용하여 이들 시료의 pH, 암모니아태 질소 및 아미노태 질소 함량 등의 발효 특성 및 항산화 효과, HT-29 인체 암세포를 이용하여 암세포 성장 억제 효과 그리고 pro-inflammatory cytokines(TNF- α , IL-6) 및 염증관련 유전자(iNOS, COX-2) 발현을 살펴보았다.

재료 및 방법

실험 재료

본 연구에서 사용된 죽염된장은 (주)삼보죽염(Jeonbuk, Korea)에서 제공받아 사용하였다. 즉 3년 발효하였고 3회 죽염을 넣은 된장(3 year-3×bamboo salt-doenjang, 3Y3B-D), 3년 발효 9회 죽염된장(3 year-9×bamboo salt-doenjang, 3Y9B-D), 6년 발효 3회 죽염된장(6 years-3×bamboo salt-doenjang, 6Y3B-D), 6년 발효 9회 죽염된장(6 years-9×bamboo salt-doenjang, 6Y9B-D)의 4가지 된장이 사용되었으며, 비교를 위해 3회 구운 죽염을 첨가한 삶은 콩(3B-S, 된장의 염도 13%와 동일), 타사된장(C-D, 정제염과 천일염 혼합사용, 1년 발효된 된장; Nonghyup, Jeonbuk, Korea)을 사용하였다.

pH, 아미노태 질소 및 암모니아태 질소 측정

pH는 SevenEasy pH(8603, Mettler-Toledo AG, Schwerzenbach, Switzerland)를 이용하여 측정하였으며, 증류수로 10배 희석한 된장 시료를 이용해 실온에서 측정하였다.

아미노태 질소 함량 측정을 위해 10배 희석한 된장 시료 5 mL에 중성 formalin 용액 5 mL를 가한 후, 0.1 N NaOH를 이용하여 pH 8.4가 될 때까지 적정하였다. 이때 소비된 0.1 N NaOH 용액의 mL 수를 formol법으로 계산하여 아미노태 질소 함량을 나타내었다(10).

암모니아태 질소 함량은 10배 희석한 된장 시료를 이용하여 AM-505-K(Asan Pharmaceuticals, Hwaseong, Korea)에 의한 Indophenol법으로 측정하였다(11).

총 폴리페놀 측정

각각 된장의 총 폴리페놀 함량은 Dewanto 등(12)의 방법에 따라 Folin-Ciocalteu reagent가 시료의 폴리페놀성 화합물에 의해 환원된 결과 몰리브덴 청색으로 발색하는 것을 원리로 측정하였다. 동결 건조된 각각의 된장을 1.0 mg/mL 농도로 희석한 시료를 2 mL에 2% Na₂CO₃ 용액 2 mL를 첨가한 후 2분간 실온에 방치하였다. 그리고 50% Folin-Ciocalteu reagent 2 mL를 가한 후 30분 동안 실온(20~25 °C)에서 방치하여 반응을 시켰다. 반응 후 UV-VIS spectrophotometer(Jasco, Tokyo, Japan)를 이용하여 750 nm에서 흡광도 값을 측정하였으며, 표준물질로 gallic acid를

사용하여 표준곡선을 작성하였다. 총 폴리페놀 함량은 시료 1당 mg gallic acid equivalent(GAE)로 나타내었다.

된장 추출물의 제조

된장을 동결 건조시킨 후 건조된 된장 시료를 마쇄하고 시료에 20배(w/v)의 메탄올을 혼합하여 24시간 교반을 두 번 실행한 뒤 여과하였다. 추출액을 회전식 진공농축기(EYELA, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)로 농축해 추출물을 얻었으며, 이들을 dimethyl sulfoxide(DMSO, Kanto Chemical Co., Tokyo, Japan)에 용해하여 적당한 농도로 희석한 후 각 실험에 사용하였다(13).

In vitro 항산화 효과 측정

DPPH radical 소거 효과: 메탄올로 용해 희석한 150 μ m DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 용액 100 μ L를 농도별로 준비된 시료 100 μ L에 가하여 96-well plate에 혼합해 30분간 실온에서 반응시킨 뒤, UV-VIS spectrophotometer(Jasco)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 메탄올 200 μ L를 대조군으로 하여 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다(14).

Hydroxyl radical 소거 효과: Chung 등(15)의 방법으로 400 μ m FeSO₄·7H₂O-ethylenediaminetetra acetic acid disodium salt(EDTA)에 6 mM의 2-deoxyribose와 농도별로 시료액 200 μ L를 혼합한 후 400 μ m ascorbic acid와 3 mM의 H₂O₂를 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 이 혼합액에 2.8% trichloroacetic acid(TCA) 1.0 mL와 1.0% thiobarbituric acid(TBA) 1.0 mL를 첨가하여 100°C에서 25분간 반응시킨 후 얼음으로 냉각시킨 다음 UV-VIS spectrophotometer(Shimadzu UV-2401PC, Kyoto, Japan)를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다.

HT-29 인체 대장암세포에서의 in vitro 항암 효과 측정

MTT assay: 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 HT-29 인체 대장암세포를 분양받아 실험에 사용하였다. 암세포 배양을 위해 RPMI 1640 medium(GIBCO, Grand Island, NY, USA)에 100 unit/mL의 penicillin-streptomycin, 10%의 FBS가 함유된 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator(Model 3154, Forma Scientific Inc., Marietta, OH, USA)에서 배양했다. 배지는 24시간마다 교환해주면서 일주일마다 계대 배양을 실시하며 실험에 사용하였다. 암세포 배양을 위해 96 well plate에 well당 1.5×10⁴ cells/mL로 분주하고, 24시간 후 배지를 버리고 sample을 일정 농도 희석하여 48시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 48시간 후 배지로 MTT 용액을 5 mg/mL의 농도로 희석한 후 well당 100 μ L를 첨가하여 동일한 조건에서 4시간 동안 더 incubator에 배양한 다음, DMSO에 생성된 formazan을 녹여서 ELISA reader(model 680, Bio-Rad, Tokyo, Japan)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다(16).

RT-PCR을 이용한 TNF- α , IL-6과 iNOS, COX-2 유전자 발현 분석: HT-29 인체 대장암세포를 위와 동일한 방법으로 배양하여 6 well plate에 well당 2×10^6 cells/mL로 분주하고 된장 추출물을 배지에 일정 농도를 희석하여 암세포에 처리한 후 상층액을 모아 원심분리기(1,200 rpm, 3 min, 4°C)로 세포와 배지를 분리하였다. 6 well plate에 부착된 세포는 trizol(Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 원심분리기로 모아 둔 세포와 함께 total RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 정량한 후 Oligo dT primer(Invitrogen Co.)와 AMV reverse transcriptase를 이용하여 2 μ g의 RNA를 reverse transcription(역전사) 하여 ss cDNA로 만들었다. 만들어진 cDNA를 주형으로 이용하여 TNF- α , IL-6, iNOS, COX-2 유전자를 polymerase chain reaction(PCR) 방법으로 특정 유전자 부위를 증폭하였다. 이때 internal control로 housekeeping 유전자는 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)를 사용하였다. 각 유전자의 primer sequence는 TNF- α 의 증폭을 위해 5'-CGGAGTCCGTCGGGCAGGT-3'(forward), 5'-GCTGGGTAGAGAATGGATGAACA-3'(reverse), IL-6의 증폭을 위해 5'-CTGCAAGAGACTTCCATCCAGTT-3'(forward), 5'-AGGGAAGGCCGCTGGTTGT-3'(reverse)를 사용하고, iNOS의 증폭을 위해 5'-GCAGCTGGGCTGTACAAA-3'(forward), 5'-AGCGTTTCGGGATCTGAAT-3'(reverse), COX-2 증폭을 위하여 5'-GAATCATTCACCAGGCCAAATTG-3'(forward), 5'-TCGTGTACTGCGGGTGAACA-3'(reverse), GAPDH 증폭을 위해 5'-TGACGCTGGACCAATCAG-3'(forward), 5'-ACCTCATTGGACTGCATAGC-3'(reverse)를 사용하였다.

PCR(Bioneer, Daejeon, Korea) 후 각 유전자들은 2% agarose gel을 이용하여 전기 영동하고 ethidium bromide(EtBr, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 이용하여 염색한 후 UV light 하에서 확인하였다(17).

통계분석

실험 결과의 유의성을 검증하기 위해 분산분석(ANOVA)을 시행하였고 그 후 $P < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하였다. 모든 실험 결과들은 평균 \pm 표준편차로 표시하였으며, 통계분석은 SPSS(v18.0, SPSS Inc.,

Chicago, IL, USA) 통계 프로그램을 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

된장의 발효 특성

pH, 아미노태 질소 및 암모니아태 질소: 된장은 콩을 삶아서 메주를 만들고 빻짚으로 찐 뒤 일정기간의 건조와 온도에서 띄운다. 된장이 숙성됨에 따라 된장의 당, 단백질이 미생물의 작용을 받아 여러 가지 휘발성, 비휘발성 유기산으로 대사되어 산도를 증가시키는 원인이 되었을 것이라고 사료되며 숙성기간이 오래될수록 pH는 낮아진다는 보고와 같은 경향을 보인다(18). 이 과정 중 빻짚에서 *Bacillus subtilis*, *Bacillus natto* 등의 세균이 분비하는 protease가 메주의 단백질을 가수분해 시켜 아미노산이 유리되고, 특히 글루탐산이 생성되어 된장 특유의 구수한 맛이 생성되게 된다(18). 그러나 일정시간이 지나게 되면 세균의 시스템인 분해효소가 황화수소를 발생시키고, deaminase가 아미노산을 탈아미노 시켜 아미노기가 암모니아로 전환된다(19). 따라서 pH와 아미노태, 암모니아태를 측정하여 된장의 숙성 정도와 품질 변화를 관찰한다. 죽염 첨가 된장의 발효기간에 따른 pH는 오랜 기간 발효가 진행된 군에서 pH가 감소하는 경향을 나타냈다(Table 1). 발효가 되지 않은 3 \times 죽염 첨가 삶은콩(3B-S)을 제외한 모든 군에서 pH 7.0 이하의 결과를 살펴볼 수 있었으며, 오랜 기간 발효가 진행된 군인 6Y3B-D, 6Y9B-D의 pH는 4.7 ± 0.1 과 5.2 ± 0.1 로 현저히 감소하였다($P < 0.05$).

아미노태 질소는 C-D를 비롯해 시료들 간에 큰 차이는 없었다(Table 1). 발효되지 않은 3B-S(삶은 콩)는 145.6 ± 7.6 mg/%로 나타났지만, 이를 제외한 모든 군에서 $1,058.5 \pm 26.1 \sim 1,173.5 \pm 17$ mg%의 아미노태 질소의 함량을 측정할 수 있었다.

암모니아태 질소 역시 된장의 발효기간이 오래된 것일수록 암모니아태 질소 함량이 증가하는 경향을 나타냈고, 특히 C-D에서 제일 높은 암모니아태 질소(97.0 ± 3.5 mg%)를 측정할 수 있었으며, 죽염된장 3Y3B-D에서는 83.8 ± 1.9 mg%, 3Y9B-D에서 94.6 ± 3.6 mg%, 6Y3B-D에서 89.2 ± 2.5 mg%, 6Y9B-D에서 96.3 ± 1.1 mg%로 측정되었다(Table 1). 암모니아태 질소 함량이 높은 시료는 좋지 않은

Table 1. pH, amino-type nitrogen and ammonium nitrogen contents in doenjangs prepared with different baked bamboo salts and fermentation period

	3B-S ¹⁾	C-D	3Y3B-D	3Y9B-D	6Y3B-D	6Y9B-D
pH	8.9 ± 0.2^a	5.6 ± 0.1^b	5.5 ± 0.1^b	5.6 ± 0.1^b	4.7 ± 0.1^d	5.2 ± 0.1^c
Amino type nitrogen (mg%)	145.6 ± 7.6^d	$1,128.4 \pm 7.3^{ab}$	$1,058.5 \pm 26.1^c$	$1,173.5 \pm 17^a$	$1,060.7 \pm 61.9^c$	$1,087.7 \pm 45.8^{bc}$
Ammonium nitrogen (mg%)	8.1 ± 1.9^d	97.0 ± 3.5^a	83.8 ± 1.9^c	94.6 ± 3.6^a	89.2 ± 2.5^b	96.3 ± 1.1^a

¹⁾3B-S: boiled soy beans prepared with 3-time baked bamboo salt, C-D: commercial doenjang, 3Y3B-D: 3 years fermented doenjang prepared with 3 \times baked bamboo salt, 3Y9B-D: 3 years fermented doenjang prepared with 9 \times baked bamboo salt, 6Y3B-D: 6 years fermented doenjang prepared with 3 \times baked bamboo salt, 6Y9B-D: 6 years fermented doenjang prepared with 9 \times baked bamboo salt.

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

Table 2. Total polyphenol contents in doenjang with different baked bamboo salts and fermentation period (unit: mg/mL)

Groups	3B-S ¹⁾	C-D	3Y3B-D	3Y9B-D	6Y3B-D	6Y9B-D
Total polyphenol	6.8±0.2 ^e	22.8±0.5 ^d	26.9±0.6 ^c	27.7±1.9 ^c	42.9±1.9 ^b	47.2±0.6 ^a

¹⁾Abbreviations are same as shown in Table 1.

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

결과로 해석할 수도 있으나 식품공전 규격이 400 mg% 이하인 것을 바탕으로 본 연구에서의 암모니아태 질소 함량은 제품에 영향을 미치는 수준이 아닌 것으로 사료된다.

따라서 발효과정 중 성분 변화로 인해 장기 숙성된 6Y3B-D, 6Y9B-D에서 C-D와 3Y3B-D, 3Y9B-D에 비해 pH와 아미노태 그리고 암모니아태 질소가 특별히 높게 측정되었다고 볼 수 없고, 따라서 장기간 숙성으로 인한 된장의 품질 변화에는 이상이 없다고 할 수 있다.

총 폴리페놀 측정

된장의 총 폴리페놀 함량 측정 결과는 Table 2와 같다. 장기간 숙성된 9회 죽염으로 제조한 6년 발효된장(6Y9B-D)이 47.2±0.6 mg/mL로 가장 높았다($P<0.05$). 실험 결과 된장의 발효 진행과 함께 많은 페놀 화합물들이 분리되어 높은 항산화 활성을 나타내는 것으로 사료된다(19). Jo 등(20)의 연구에 의하면 발효되지 않은 된장 대조군보다 숙성 기간이 오래된 된장에서 isoflavone과 GABA의 함량이 각각 48.1 mg/kg에서 101.2 mg/kg, 24.9 mg/kg에서 1,938.7 mg/kg으로 증가되었다고 보고하였다. 또 된장이 발효됨에 따라 원재료 콩의 배당체 형태에서 생체 내 흡수율과 이용률 및 건강기능성이 높은 비배당체 형태인 daidzein과 genistein으로 전환된 것을 확인할 수 있었으며(3,4), 또한 본 연구를 통해 장기간 숙성된 된장에서 총 폴리페놀 함량이 높은 것과 일치한다.

In vitro 항산화 효과 측정

DPPH 소거 효과 측정: 죽염된장의 DPPH free radical 소거 효과는 Fig. 1과 같다. 0.5 mg/mL 농도인 된장 추출물의 free radical 소거 효과는 3B-S는 3.4±0.4%, C-D는

20.3±0.7%, 3Y3B-D는 24.8±1.5%, 3Y9B-D는 31.2±1.0%, 6Y3B-D는 34.1±0.4%, 6Y9B-D는 38.2±2.5%의 분포를 나타냈으며, 오랜 기간 발효된 죽염 된장군에서 소거 효과가 높았다($P<0.05$). 된장을 메탄올로 추출하였을 때 그 추출물에는 아이소플라본 종류의 항산화 물질이 나오는 것으로 알려져 있으며(21), 그 추출물은 항산화성을 가진다는 보고가 되어 있다(22). Lee 등(23)은 장기간 숙성된 된장에서 수용성 갈변 물질과 페놀 화합물이 점차 증가되는 것을 알 수 있었고, 6년 숙성 죽염된장에서는 C-D와 3년 숙성 된장보다 높은 수용성 갈변 물질과 페놀 화합물들이 많아 더 높은 DPPH free radical 소거 효과를 보인다고 할 수 있다. Jeong 등(2)은 소금의 종류를 달리한 된장의 기능성 차이에서 죽염을 첨가한 된장에서 가장 높은 free radical 소거능을 측정할 수 있었으며, 정제염에 비해 죽염은 Ca, Mg, K, Fe 등의 함량과 기타 생리활성 성분이 풍부해(7) 된장의 발효가 보다 잘 진행되는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과와 죽염된장과 장기간 숙성되어 만들어진 수용성 갈변 물질, 페놀 화합물의 함량 차이와 장기간 숙성된 된장, 그리고 9회 죽염 사용 등이 항산화 능력을 높이는 결과를 나타냈다고 생각된다. 9회 죽염의 경우 3회 죽염과 다른 미네랄 조성을 하고 있는데 이것으로 인해 항산화 활성이 달라졌다고 할 수 있다(24).

Hydroxyl radical 소거 효과 측정: 죽염을 첨가한 된장의 hydroxyl radical 소거 효과를 분석한 결과는 Fig. 1과 같다. 0.5 mg/mL 농도에서 3B-S는 33.0±2.6%, C-D는 64.9±2.1%, 3Y3B-D는 71.5±0.6%, 3Y9B-D는 76.9±0.5%, 6Y3B-D는 80.8±0.9%, 6Y9B-D는 86.2±2.0%의 소거 효과를 나타내었고, hydroxyl radical 소거 효과 측정에서도 6Y9B-D에서 radical 소거능이 유의적으로 가장 우

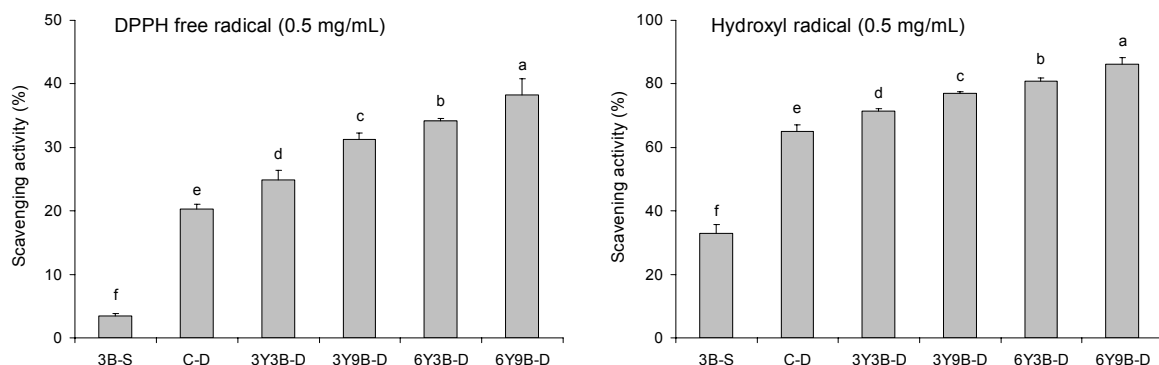


Fig. 1. DPPH and hydroxyl radical scavenging activities of doenjangs with different baked bamboo salts. Abbreviations are same as shown in Table 1. Means with the different letters (a-f) on bars are significantly different ($P<0.05$) by Duncan's multiple range test.

수하였다($P<0.05$). 죽염은 항암 및 항돌연변이 효과(25)를 가지며, 죽염은 일반 정제염이나 천일염보다 Ca, Fe, Mn, P, K 등의 무기물질의 함량이 높은 것으로 알려져 있다(7). 특히 Mn은 Mn-SOD의 구성성분으로 인체에 유해한 free radical을 제거하며, 결핍 시에는 세포 내의 지질과산화가 증가함이 보고되었다. 또한 죽염이 제조되면 OH기가 많이 생성되어 이들이 항산화 활성을 높인다고 하였다(26). 따라서 죽염 내에 무기물질은 항산화 효과 및 건강에 이롭게 작용할 것으로 추측되며(24), 죽염으로 제조한 된장의 과산화 지질 생성 억제 효과 역시 높게 나타난 것으로 생각된다.

HT-29 인체 대장암세포에서의 *in vitro* 항암 효과 측정

MTT assay: 발효기간을 달리한 죽염된장의 HT-29 대장암세포 억제 효과를 관찰한 결과는 Fig. 2와 같다. 0.1 mg/mL 농도로 된장의 암세포 성장 억제 효과를 측정된 결과 3B-S는 $10.9\pm 0.6\%$, C-D는 $12.6\pm 2.5\%$, 3Y3B-D는 $25.9\pm 1.4\%$, 3Y9B-D는 $28.8\pm 3.1\%$, 6Y3B-D는 $36.2\pm 3.4\%$, 6Y9B-D는 $58.7\pm 0.3\%$ 로 암세포 성장 억제율을 나타내었으며, 0.25 mg/mL 농도로 된장의 암세포 성장 억제 효과를 측정된 결과 3B-S는 $20.6\pm 2.2\%$, C-D는 $32.9\pm 0.6\%$, 3Y3B-D는 $42.7\pm 2.3\%$, 3Y9B-D는 $53.8\pm 1.3\%$, 6Y3B-D는 $65.9\pm 2.4\%$, 6Y9B-D는 $72.8\pm 1.7\%$ 로 더 높은 암세포 성장 억제율을 나타내었다. Kwon과 Shon(5)은 1, 2, 3년 된장의 메탄올 추출물과 물 분획물을 가지고 인체 폐암세포 주(A-549) 및 인체 유방암세포 주(MCF-7)에 농도별로 처리하여 살펴본 결과 농도별로 비례하게 3년 숙성 된장이 암세포 성장을 가장 많이 억제하는 것으로 보고하였다. Yoon(27)의 연구에서는 된장 제조 시 사용한 소금의 종류에 따라 암세포 성장 억제 효과를 관찰했을 때 죽염을 첨가한 된장에서 유의적인 차이로 가장 높게 암세포 성장을 억제하였다. 죽염의 경우는 굵은 핏수가 증가될수록 항암 가능성이 증가된다(7). 본 연구 결과에서도 6Y9B-D에서 유의적인 암세포 성장 억제 효과를 가져왔으며 천일염과 정제염을 혼합하여 제조된 C-D와 발효되지 않은 3B-S는 낮은

암세포 성장 억제 효과를 나타냈다. 따라서 앞서 말한 소금의 종류와 장기간의 숙성 과정 중 변화되는 생리활성 물질들이 6Y9B-D에서 유의적인 암세포 성장 억제를 가져왔을 것이라 사료되며 MTT assay에서도 6Y3B-D보다 6Y9B-D가 더 효과가 우수했다.

TNF- α , IL-6과 iNOS, COX-2 유전자 발현 분석: 염증성 장 질환 환자가 대장암에 이환될 가능성이 일반인보다 30배 높은 것으로 관찰되었다(28). 지속적인 염증은 혈중 대식세포가 분비하는 pro-inflammatory cytokine의 수준을 높이고, 장점막 세포의 염증은 더욱 악화되어 돌연변이를 초래하게 된다. 이때 생성된 돌연변이세포들은 apoptosis가 원활하게 이루어지지 않은 경우 대장암으로 발전되게 된다. 이런 염증반응이 일어날 때 측정되는 pro-inflammatory cytokine의 대표적인 인자들은 여러 연구들을 통해 많이 밝혀지고 있고 그중 가장 대표적인 인자인 TNF- α , IL-6이며(29), 이 인자들을 RT-PCR을 통해 측정했다.

된장 추출물을 HT-29 인체 대장암세포에 0.25 mg/mL의 농도로 처리했고, 유전자 발현 결과는 Fig. 3과 같다. TNF- α , IL-6 유전자 발현 모두에서 유의적인 차이로 6Y9B-D가 가장 낮았고, 장기간 숙성된 된장일수록 그리고 3회 죽염보다는 9회 죽염된장이 유의적인 차이를 나타내며 mRNA의 발현양이 감소하였다($P<0.05$). Hwang(9)은 죽염된장이 일반된장보다 높은 항돌연변이 억제 효과를 나타낸다 하였고, 죽염의 미네랄 함량의 차이로 인해 이런 cytokine 유전자의 발현에 영향을 준 것으로 생각된다고 하였다(24). 본 연구에서도 정제염과 천일염을 혼합 사용하여 제조한 된장 C-D와 발효가 되지 않은 3B-S보다 장기 숙성 죽염된장인 6Y9B-D, 6Y3B-D에서 훨씬 낮은 pro-inflammatory cytokines의 mRNA 발현 양을 살펴볼 수 있었다($P<0.05$).

암에 있어 COX-2의 과 발현 현상은 대장암, 식도암, 폐암 등에서 많이 관찰할 수 있으며, 이런 현상은 apoptosis를 억제하여 암세포의 증식 촉진 및 면역기능을 교란시키고 신생혈관 형성, 정상세포로 침윤 현상 증가, 암세포의 전이까지 연관된 것으로 보고되어 있다(30). NO의 합성효소인

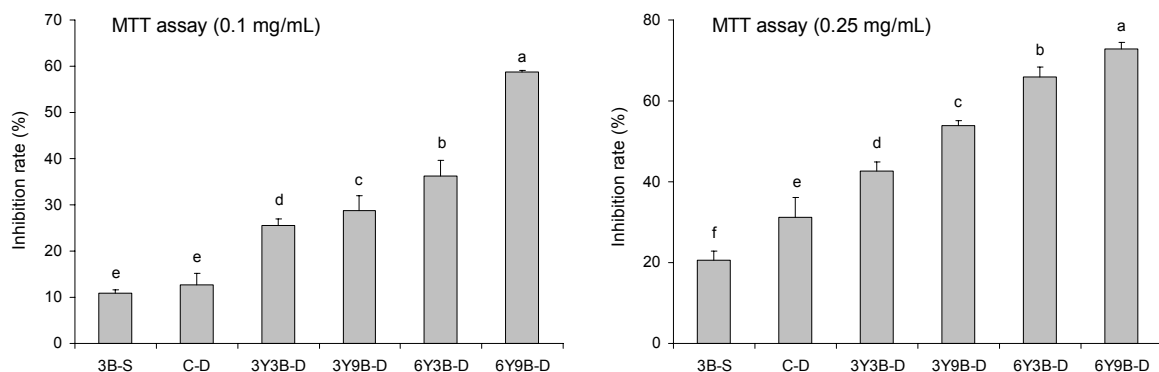


Fig. 2. Antiproliferative activities of doenjang prepared with different baked bamboo salts on HT-29 human cancer cells (0.5 mg/mL). Abbreviations are same as shown in Table 1. Means with the different letters (a-f) on bars are significantly different ($P<0.05$) by Duncan's multiple range test.

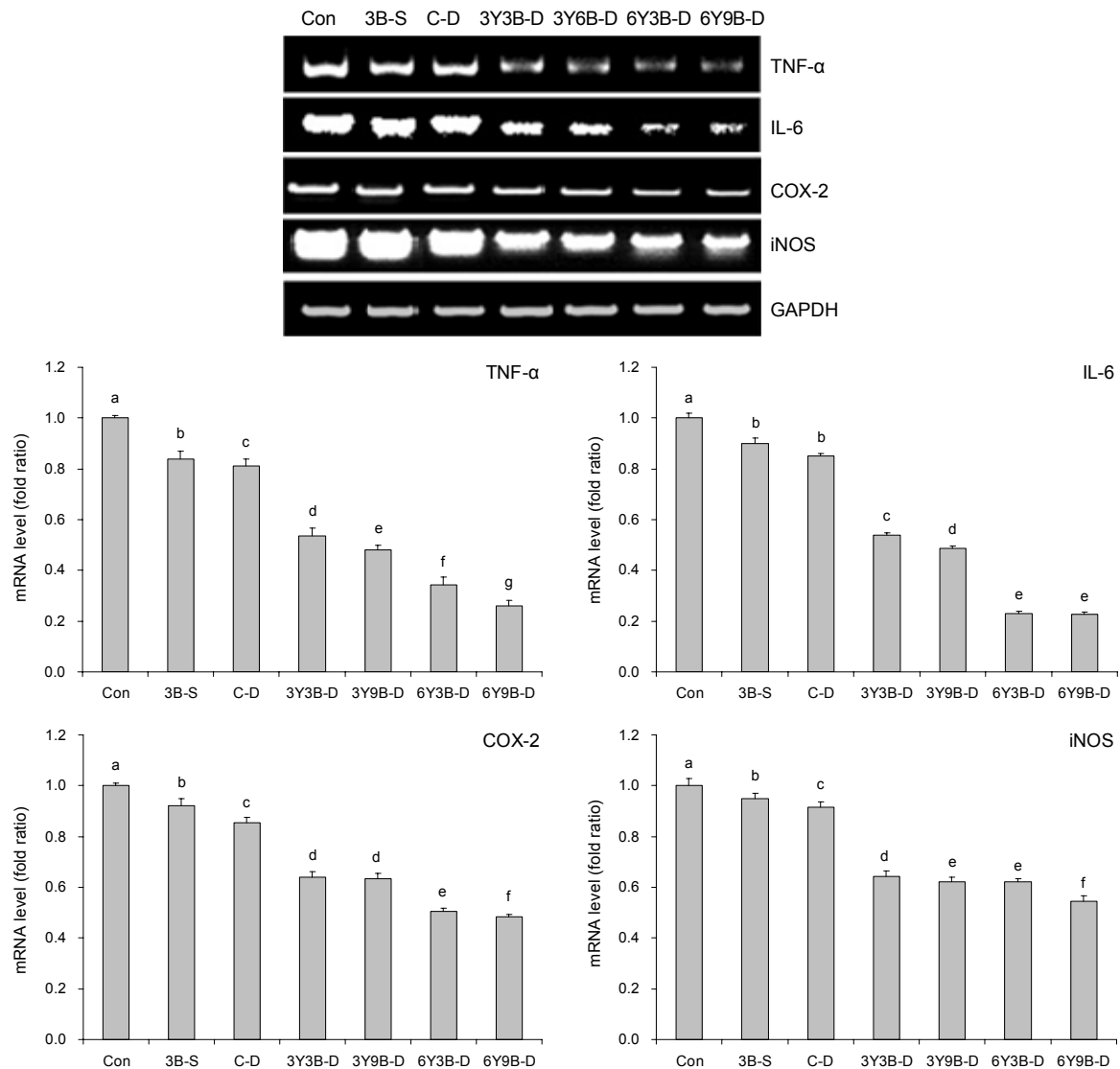


Fig. 3. mRNA expression levels of doenjang with bamboo salts on TNF- α , IL-6, COX-2, and iNOS, in HT-29 cancer cells (0.25 mg/mL) by the treatment of different kinds of doenjangs. Abbreviations are same as shown in Table 1. Means with the different letters (a-g) on bars are significantly different ($P<0.05$) by Duncan's multiple range test.

iNOS 또한 인체 대장암세포에서 mRNA의 발현이 높게 나타났고, COX-2의 signaling과 조절에 관련이 있다(31). 따라서 COX-2와 iNOS의 mRNA 발현을 HT-29 인체 대장암세포를 이용해 RT-PCR을 실시한 결과는 Fig. 3에 나타난 바와 같다. iNOS와 COX-2의 mRNA 발현 양은 모두 유의적인 차이를 보이며 3Y3B-D, 3Y9B-D의 순으로 그리고 6Y3B-D, 6Y9B-D에서 가장 낮은 발현 양을 측정할 수 있었고 ($P<0.05$), 대조군들보다 낮은 mRNA 발현 양을 나타내었다. Lee 등(32)은 소금을 달리하여 된장의 돌연변이 유발 억제 효과를 살펴보았을 때 천일염보다는 구운 소금에서, 구운 소금보다는 죽염에서 돌연변이 유발 억제 효과가 크게 나타났으며, Jo 등(20)의 연구에 의하면 1~10년 숙성 된장을 선정하여 isoflavone과 GABA 등의 성분을 분석해본 결과 10년 숙성된장에서 그 함량이 가장 높은 것으로 나타났

다. Isoflavone은 대두에 약 0.1~0.4% 함유되어 있으며 항암, 항심혈관 질환, 항골다공증 감소 등의 기능이 알려진 된장의 주요 활성 성분으로 알려져 있다(33).

본 연구에서도 3회, 9회 죽염을 이용한 장기 숙성된장인 6Y9B-D, 6Y3B-D에서 가장 효과적인 염증 유전자 발현 억제를 나타낸 것을 바탕으로 장기 숙성된 죽염된장은 3년 보다는 6년까지 그리고 3회 죽염보다는 9회 죽염을 된장 제조 시 사용하면 항암 효과는 증가될 수 있다고 하겠다.

요 약

죽염된장의 발효기간(3년, 6년)과 죽염의 구운 횟수(3×, 9×)에 따른 항산화 및 HT-29 암세포에서 *in vitro* 항암 효과를 측정하였다. 죽염된장의 발효 기간에 따른 pH 및 아

미노테 질소, 암모니아태 질소 함량은 3B-S(3×, 삶은 콩)를 제외하고는 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 총 폴리페놀 함량은 6Y9B-D(6년, 9×)가 유의적으로 가장 함량이 높았다($P<0.05$). DPPH free radical 소거 효과에서는 6Y3B-D(6년, 3×)는 $34.1\pm0.4\%$, 6Y9B-D는 $38.2\pm2.5\%$, hydroxyl radical 소거 효과 역시 6Y3B-D는 $80.8\pm0.9\%$, 6Y9B-D는 $86.2\pm2.0\%$ 로 높은 소거 효과를 나타내었다. HT-29 인체 대장암세포를 이용한 암세포 성장 억제 효과 역시 6Y3B-D는 $65.9\pm2.4\%$, 6Y9B-D는 $72.8\pm1.7\%$ 로 가장 높은 성장 억제율을 나타내었다. TNF- α , IL-6과 iNOS, COX-2 염증 유발 인자에서 6Y9B-D군이 유의적인 차이를 보이며 mRNA의 발현을 가장 많이 억제하는 것으로 나타났다. 장기간 숙성된 6년 숙염된장이 3년 숙염된장보다 항산화, 항암 효과가 뛰어났고, 3회 숙염보다 9회 숙염을 첨가한 된장이 천연염과 정제염을 혼합해 제조한 시판된장보다 항산화, 항암 효과가 더 우수했다.

감사의 글

이 연구는 NCEED(인하대학병원 국가지정 소화기질환 의료제품 유효성평가 서비스센터)의 지원으로 이루어졌으며, 또한 숙염된장을 제공해 주신 (주)삼보숙염에 감사드립니다.

REFERENCES

- Kim MJ, Lee HS. 1990. Studies on the changes of taste compounds during soy paste fermentation. *Korean J Soc Food Sci* 6: 1-8.
- Jeong MW, Jeong JK, Kim SJ, Park KY. 2013. Fermentation characteristics and increased functionality of doenjang prepared with bamboo salt. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42: 1915-1923.
- Bowey E, Adlercreutz H, Rowland I. 2003. Metabolism of isoflavones and lignans by the gut microflora: a study in germ-free and human flora associated rats. *Food Chem Toxicol* 41: 631-636.
- Coward L, Barnes NC, Setchell KDR, Barnes S. 1993. Genistein, daidzein and their β -glycoside conjugates, antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets. *J Agric Food Chem* 41: 1961-1967.
- Kwon SH, Shon MY. 2004. Antioxidant and anticarcinogenic effects of traditional doenjang during maturation periods. *Korean J Food Preserv* 11: 461-467.
- Dahl LK. 2005. Possible role of salt intake in the development of essential hypertension. *Int J Epidemiol* 34: 967-972.
- Zhao X, Jung OS, Park KY. 2012. Alkaline and antioxidant effects of bamboo salt. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 1301-1304.
- Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafeman DG, Hoekstra WG. 1973. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 179: 588-590.
- Hwang KM. 2004. Studies on the enhancement of chemopreventive and anticancer effects of doenjang. *PhD Dissertation*. Pusan National University, Busan, Korea. p 199-202.
- Park SK, Seo KI, Shon MY, Moon JS, Lee YH. 2000. Quality characteristics of home-made doenjang, a traditional Korean soybean paste. *Korean J Soc Food Sci* 16: 121-127.
- AOAC. 1995. *Official methods of analysis*. 16th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA.
- Dewanto V, Wu X, Liu RH. 2002. Processed sweet corn has higher antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 50: 4959-4964.
- Im CM, Kwon SH, Bae MS, Jung KO, Moon SH, Park KY. 2006. Characteristics and increased antimutagenic effect of black soybean (var. seoritae) chungkukjang. *Cancer Prev Res* 11: 218-224.
- Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
- Chung SK, Osawa T, Kawakishi S. 1997. Hydroxyl radical scavenging effects of spices and scavengers from brown mustard (*Brassica nigra*). *Biosci Biotech Biochem* 61: 118-123.
- Park KT, Kim MY, Chun SS. 2009. Quality characteristics of Korean wheat wet noodles with pomegranate cortex powder. *Korean J Culinary Res* 15: 128-136.
- Bak SS, Kong CS, Rhee SH, Rho CW, Kim NK, Choi KL, Park KY. 2007. Effect of sulfur enriched young radish kimchi on the induction of apoptosis in AGS human gastric adenocarcinoma cells. *J Food Sci Nutr* 12: 79-83.
- Hong HJ, Rhee HS. 1994. Characteristics of bitter peptides from doenjang. *Korean J Food Cookery Sci* 10: 45-50.
- Kim MH, Im SS, Yoo YB, Kim GE, Lee JH. 1994. Antioxidative materials in domestic meju and doenjang 4. Separation of phenolic compounds and their antioxidant activity. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 23: 792-798.
- Jo SJ, Hong CO, Yang SY, Choi KK, Kim HK, Yang H, Lee KW. 2011. Changes in contents of γ -aminobutyric acid (GABA) and isoflavones in traditional Korean doenjang by ripening periods. *J Food Soc Food Sci Nutr* 40: 557-564.
- Hammerschmidt PA, Pratt DE. 1978. Phenolic antioxidants of dried soybeans. *J Food Sci* 43: 556-559.
- Lee JS, Choi HS. 1997. Antioxidative characteristics of isolated crude phenolics from soybean fermented foods (Doenjang). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 26: 376-382.
- Lee JH, Kim MH, Im SS, Kim SH, Kim GE. 1994. Antioxidative materials in domestic meju and doenjang 3. Separation of hydrophilic brown pigment and their antioxidant activity. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 23: 604-613.
- Zhao X, Kim SH, Qi Y, Kim SY, Park KY. 2012. Effects of different kinds of salt in the comutagenicity and growth of cancer cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 26-32.
- Hwang KM, Oh SH, Park KY. 2007. Increased antimutagenic and *in vitro* anticancer effects by adding green tea extract and bamboo salt during doenjang fermentation. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 1-7.
- Borrello S, De Leo ME, Galeotti T. 1992. Transcriptional regulation of MnSOD by manganese in the liver of manganese-deficient mice and during rat development. *Biochem Int* 28: 595-601.
- Yoon HH, Kim IC, Chang HC. 2012. Growth inhibitory effects of doenjang, prepared with various solar salts on cancer cells. *Korean J Food Preserv* 19: 278-286.
- Brooke BN. 1961. Malignant change in ulcerative colitis. *Diseases of the Colon & Rectum* 4: 393-398.
- Vane JR, Mitchell JA, Appleton I, Tomlinson A, Bishop-Bailey D, Croxtall J, Willoughby DA. 1994. Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 2046-2050.
- Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LB, Lipsky PE. 1998. Cyclooxygenase

- in biology and disease. *FASEB J* 12: 1063-1073.
31. Watanabe K, Kawamori T, Nakatsugi S, Wakabayashi K. 2000. COX-2 and iNOS, good targets for chemoprevention of colon cancer. *Biofactors* 12: 129-133.
32. Lee SJ, Lee KI, Moon SH, Park KY. 2008. Antimutagenic effects on methanol extracts of doenjang made with various kinds of water or salt. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 691-695.
33. Lee SW, Park YW, Chang PS, Lee JH. 2010. Isoflavone distribution and β -glucosidase activity in home-made and factory-produced doenjang. *Korean J Food Sci Technol* 42: 125-129.