

죽염 된장의 발효 특성 및 기능성 증진 효과

정민우 · 정지강 · 김신정 · 박건영[†]

부산대학교 식품영양학과

Fermentation Characteristics and Increased Functionality of Doenjang Prepared with Bamboo Salt

Min-Woo Jeong, Ji-Kang Jeong, Sin-Jeong Kim, and Kun-Young Park[†]

Dept. of Food Science and Nutrition, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

ABSTRACT The aim of this study is carried out to evaluate the fermentation characteristics and increased functionality when doenjang was prepared with bamboo salts. Grain type mejus were fermented with mixed starter cultures of *Aspergillus oryzae*, *Bacillus subtilis*, and *Lactococcus lactis*. These mejus were mixed with different kinds of salts – purified salt (PD), sea salt (SD), one-time baked bamboo salt (1×BD), three-time baked bamboo salt (3×BD), and nine-time baked bamboo salt (9×BD) – when doenjangs were prepared. For doenjang fermentation period of 8 weeks at 37°C, the fermentation characteristics of all the groups were compared. The amino type nitrogen content and enzyme activities (protease and α -amylase) in the samples were significantly increased. In DPPH radical scavenging activities and hydroxyl radical scavenging activities, 9×BD (47% and 69%) showed the highest scavenging activities compared to PD (40% and 49%), SD (42% and 57%), 1×BD (42% and 64%) and 3×BD (45% and 65%) ($P<0.05$). The anticancer effects of doenjang in HT-29 cancer cells indicated all the groups, especially doenjang prepared with bamboo salts were higher than the others ($P<0.05$). Apoptosis related genes of Bax and Bcl-2, as well as inflammation related genes of iNOS and COX-2 were regulated by the treatment of doenjangs in HT-29 cancer cells. SD, 1×BD, 3×BD, and 9×BD increased the expression level of Bax and decreased the expression level of Bcl-2, iNOS, and COX-2. These results suggest that sea salt and bamboo salt especially bamboo salt could improve fermentation characteristics and functionality of doenjang and play an important role in regulating apoptosis and inflammation related genes in cancer cells.

Key words: bamboo salt, sea salt, mixed starter doenjang, anticancer effect, apoptosis

서 론

된장은 우리나라의 대표 전통식품으로 대두를 주원료로 하여 발효된 조미 및 단백질 공급 식품이다. 이러한 된장은 발효 시에는 독특한 맛과 냄새 등이 생성되며, 발효 후 완성된 된장은 아미노산, 유기산, 미네랄 및 비타민류 등을 풍부히 함유하고 있어 영양원으로서 매우 중요하다(1). 된장에 대해서 여러 선행연구가 이루어져 왔으며, 특히 기능성에 대한 연구로는 된장에서 분리한 펩타이드의 항혈전 및 항동맥경화활성(2), 콜레스테롤 및 혈압강하(3,4), 항돌연변이 및 항암작용(5,6), 항산화 작용(7,8) 등의 다양한 연구가 보고되어 있다. 또한 전통 된장의 발효는 주로 자연 발효이므로 된장의 품질을 조절하기에 어려움이 있다. 따라서 이에 대한 단점을 보완하고자 개량식 된장 제조법에 대한 연구도 보고되고 있다(9). 본 연구실에서는 전통 된장 제조법과 개

량식 된장 제조법을 보완 개선하고자 *Aspergillus oryzae*, *Bacillus subtilis*-SKm, *Lactococcus lactis*-GAm을 이용한 starter 된장(10)을 개발하였다.

소금은 발효 식품에서 부패 미생물을 억제하고 내염성의 발효 미생물이 선택적으로 성장할 수 있도록 조절해 주는 역할을 하고 있다(11,12). 소금은 CaSO₄, MgSO₄, MgCl₂, KCl 등의 많은 무기물이 혼입되어 있어 소금을 첨가한 김치, 장유, 젓갈 등 발효식품의 미생물 생육과 발효과정에서 무기물의 공급원으로도 중요하다(13,14).

죽염은 천일염을 대나무통에 넣고 진흙으로 봉하여 800~1,200°C 이상에서 구워서 구운 횟수에 따라서 1, 3, 9회 씩 구운 죽염이 상품화 되어서 판매되고 있다(15). 죽염은 제조과정에서 대나무 성분 등 많은 성분들을 함유하게 되며, 구운 횟수가 증가할수록 소금의 색은 어두운 회색을 띠고 유황냄새가 난다. 9회 구운 죽염은 자색을 띠며, 민간 약재로도 사용되고 있다(16). 죽염을 사용한 김치는 다른 소금을 이용한 김치보다 *E. coli*의 성장 억제의 효과가 높았다(17). 죽염으로 제조한 된장에서 돌연변이 억제작용 및 *in vitro*

Received 7 June 2013; Accepted 22 November 2013

[†]Corresponding author.

E-mail: kunypark@pusan.ac.kr, Phone: 82-51-510-2839

항암 기능이 증진되었고(18), 인체 위암세포와 결장암 세포에 대한 항암효과가 증가되었으며, 마우스를 이용한 종양전이 억제실험에서도 죽염된장의 매우 높은 전이억제효과를 보였다(19).

발효 식품에서 소금은 아주 중요한 역할을 담당하며, 특히 우리나라 전통 식품인 된장은 맛, 향, 색 등의 발효 특성에 의해 된장의 품질이 좌우되는데, 이때 소금이 된장의 발효에 영향을 미친다. 본 연구에서는 Jeong(10)이 개발한 방법으로 혼합 스타터(*Aspergillus oryzae*, *Bacillus subtilis*-SKm, *Lactococcus lactis*-GAm)를 이용하여 메주를 만들었고, 정제염과 천일염 및 1, 3, 9회씩 구운 죽염으로 된장을 제조하였다. 소금의 종류와 죽염의 구운 회수의 정도에 따른 된장의 발효 특성과 항산화 효과, 암 세포 성장 억제 효과, 암 세포의 apoptosis 유도 활성 및 염증 관련 유전자 발현을 연구하였고, 이에 기능성이 향상된 된장의 제조에 대한 기초를 마련하고자 하였다.

재료 및 방법

사용된 미생물 균주 및 배양

사용된 미생물은 본 연구실에서 이미 연구 개발하여 보고한 *Aspergillus oryzae*, *Bacillus subtilis*-SKm(KFCC 11520P), *Lactococcus lactis*-GAm(KFCC11510P)으로서, *Aspergillus oryzae*는 ㈜충무발효(Ulsan, Korea)에서 구입하였으며 *Bacillus subtilis*-SKm, *Lactococcus lactis*-GAm은 전통메주로부터 분리, 동정한 균이다(10). *Bacillus subtilis*-SKm은 Nutrient Broth(Difco Co., Sparks, MI, USA)에 접종하여 40°C에서 24~48시간 배양하고 *Lactococcus lactis*-GAm은 MRS broth(Difco Co.)를 사용하여 37°C에서 24~48시간 배양하였다(10).

스타터 첨가 콩알 메주 및 된장 제조

메주의 제조는 콩을 12시간 침지한 후 121°C에서 30분간 증자하였다. 증자한 콩을 40~50°C가 될 때까지 식힌 후 *Aspergillus oryzae*를 콩 무게의 0.2% 함량과 *Bacillus subtilis*-SKm을 10⁶ cfu/g되게 접종시킨 후, 30°C에서 48시간 1차 발효를 시켰다. *Lactococcus lactis*-GAm을 10⁶ cfu/g되게 접종시킨 후, 37°C 24시간 발효를 시켜서 콩알 메주를 제조하였다(10). 제조된 콩알 메주에 소금과 물을 1:0.46:1.7(w:w:w) 비율로 첨가하고 37°C에서 8주간 발효시켜서 된장을 제조하였다. 본 연구에 사용된 소금은 정제염((주)한주, Ulsan, Korea)과 천일염 및 각각 1, 3, 9회씩 구운 죽염((주)삼보식품, Buan, Korea)이었다.

된장 추출물 제조

동결 건조한 된장 시료를 마쇄하고 시료에 20배(w/v)의 메탄올을 첨가하여 24시간 교반을 2회 반복한 후 여과하였다. 그리고 회전식 진공농축기(EYELA, Tokyo Rikakikai

Co., Tokyo, Japan)로 농축하여 메탄올 추출물을 얻었다. 이들 추출물들은 dimethyl sulfoxide(DMSO, Kanto chemical Co., Tokyo, Japan)에 희석하여 실험에 사용하였다(20).

pH 및 아미노태 질소

pH 측정은 된장을 증류수로 10배 희석하여 pH meter (TP-93, Toko Chemical Laboratories, Tokyo, Japan)로 실온에서 측정하였다. 아미노태 질소는 시료액 20 mL에 중성 formalin 용액 20 mL를 가한 다음 pH 8.4가 될 때까지 0.1 N NaOH로 적정하여 소비된 0.1 N NaOH 용액의 mL 수를 측정하여 formol법으로 아미노태 질소의 함량을 계산하였다(21).

효소 활성의 측정

Protease 활성은 0.6% casein을 기질로 하여 생성된 tyrosine을 Folin's법으로 측정하였으며, 효소의 활성은 30°C에서 1분간 생성되는 tyrosine의 μg 수로 표시하였다. α -amylase 활성은 1% soluble starch를 기질로 하여 반응액을 요오드 용액으로 발색시키고 700 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 효소의 활성은 40°C에서 분해된 soluble starch의 mL 수로 표시하였다(22).

관능평가

반복된 랜덤화 완전 블록 계획에 따라서 훈련된 12명의 관능요원이 공시 된장으로 만든 된장찌개(물 550 mL, 된장 7.5 g, 두부 15 g, 무 15 g, 파 2.5 g, 다시마 2 g, 멸치 2 g)를 이용하여 평가하게 하였다. 평가 항목은 색(color), 짠맛(salty), 쓴맛(bitter), 단맛(sweet), 전체적인 향(flavor) 및 종합 평가(overall acceptability)로 6가지 항목에 대해서 9점 척도법으로(9: 아주 좋음, 5: 보통, 1: 아주 나쁨) 평가하였다. 이때 시료에 대한 편견을 없애기 위하여 시료는 난수표에서 추출한 세자리 숫자로 표시하였다(23).

In vitro 항산화 효과 측정

DPPH radical 소거 효과 측정: 농도별로 에탄올에 용해시킨 시료 100 μL 와 150 μM DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 용액 100 μL 를 96-well plate에 혼합하여 30분간 실온에 방치시킨 후, 540 nm에서 분광광도계(UV/VIS Spectrophotometer, Jasco, Tokyo, Japan)로 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다(24).

DPPH radical scavenging effect (%)

$$= \left(1 - \frac{\text{Sample absorbance}}{\text{Control absorbance}}\right) \times 100$$

Hydroxyl radical 소거 효과 측정: Chung 등(25)의 방법에 따라 10 mM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt(EDTA)에 10 mM의 2-deoxyribose와 농도별 시료용액을 혼합한 다음, 10 mM의 H_2O_2

를 첨가하여 Fenton 반응에 따라 37°C에서 4시간 동안 배양하였다. 이 혼합액에 2.8% trichloroacetic acid(TCA) 1.0 mL와 1.0% thiobarbituric acid(TBA) 1.0 mL를 첨가하여 끓는 물에서 10분간 반응시킨 다음 냉각시킨 후 520 nm에서 UV-VIS spectrophotometer를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

HT-29 대장암 세포에서의 *in vitro* 항암 효과 측정

MTT assay: 실험에 사용된 HT-29 인체 대장암 세포는 한국세포주은행(Seoul, Korea)으로부터 분양 받아 배양하면서 실험에 사용하였다. 암세포를 100 unit/mL의 penicillin-streptomycin과 10%의 FBS가 함유된 RPMI 1640 medium(GIBCO, Grand Island, NY, USA)을 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하고, 배양된 각각의 암세포는 일주일에 2~3회 refeeding하면서 6~7일마다 계대배양하여 실험에 사용하였다. 배양된 암세포는 96 well plate에 well당 2×10⁴ cells/mL가 되도록 180 μL씩 분주하고, 일정 농도로 제조한 시료 20 μL를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 72시간 배양하였다. 여기에 PBS를 이용하여 5 mg/mL의 농도로 제조한 MTT 용액 20 μL를 첨가하여 동일한 배양 조건에서 4시간 동안 더 배양한 후, 생성된 formazan 결정을 DMSO에 녹여서 ELISA reader(model 680, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다(26).

Bcl-2, Bax, iNOS, COX-2 유전자 발현 분석: HT-29 인체 대장암 세포를 배양하여 된장 메탄올 추출물을 암 세포에 처리한 후 PBS로 세척하여 trizol(Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 total RNA를 분리하였다. Oligo dT primer(Invitrogen Co.)를 사용하면 분리된 RNA 중 mRNA가 모두 cDNA로 만들어지기 때문에 분리된 RNA를 정량한 후, oligo dT primer와 AMV reverse transcriptase를 이용하여 2 μg의 RNA에서 mRNA에 상보적인 ss cDNA로 역전사 시켰다. 이 cDNA를 template로 사용하여 Bax, Bcl-2, iNOS, COX-2 유전자를 polymerase chain reaction(PCR) 방법으로 특정 유전자 부위를 증폭하였다 (Table 1). 이때 internal control로 housekeeping 유전자

인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)를 사용하였다. 각 PCR(Bioneer, Daejeon, Korea) 산물들을 1% agarose gel을 이용하여 전기영동하고 ethidium bromide(EtBr, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 이용하여 염색한 후 UV light에서 확인하였다(27).

통계분석

모든 실험 결과들은 평균±표준편차로 표시하였으며, 실험 결과들의 유의성을 검정하기 위하여 분산분석(ANOVA)을 행한 후 *P*<0.05 수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하였다. 모든 통계 분석은 SPSS(v18.0 SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 통계 프로그램을 이용하여 처리하였다.

결과 및 고찰

된장의 발효 특성

pH 및 아미노태 질소: pH의 측정 결과 된장의 발효가 진행될수록 pH가 감소하였다(Fig. 1). 정체염 된장은 발효 0주차에 pH 6.9에서 발효 8주차에 pH 6.2로 감소하였으며, 천일염 된장은 pH 7.0에서 6.2로 감소하였다. 그리고 죽염으로 된장을 제조한 군들에서는 1회 구운 죽염 된장은 pH 7.0에서 6.2, 3회 구운 죽염 된장은 pH 7.6에서 6.3, 그리고 9회 구운 죽염 된장은 pH 7.8에서 6.1로 감소하였다. 죽염을 사용한 된장에서 초기 pH가 높은 이유는 죽염의 pH가 천일염, 정체염보다 높기 때문인 것으로 사료된다(16). 또한 발효기간이 지남에 따라 된장의 pH가 감소하는 이유는 발효가 진행되면서 콩 속의 당류 성분들이 lactic acid 및 acetic acid 등의 유기산으로 변화하기 때문인 것으로 생각되어진다(28,29). 발효 8주차에 모든 된장의 pH는 6.1~6.3 정도의 범위를 나타냈으며 군간의 유의적인 차이는 없었다. 따라서 초기 pH가 높았던 죽염 된장군에서 pH 감소에 영향을 주는 유기산들이 많이 생성되어 결국 나중에는 pH가 비슷해지는 것으로 보이며, 이것은 유기산뿐 아니라 맛에도 영향을 미치는 glutamic acid, aspartic acid 등과 같은 유리아미노산의 생산과도 관련되는 것으로 보인다. 이는 소금 종류가 된장의 유리 아미노산 함량의 차이에 영향을 미친다는 Kim 등(13)

Table 1. Sequences of primer used for RT-PCR

Gene name		Sequence
Bax	Sense	5'-ATG GAC GGG TCC GGG GAG-3'
	Antisense	5'-TGG AAG AAG ATG GGC TGA-3'
Bcl-2	Sense	5'-CAG CTG CAC CTG ACG-3'
	Antisense	5'-GCT GGG TAG GTG CAT-3'
iNOS	Sense	5'-GCA GCT GGG CGT TAC AAA-3'
	Antisense	5'-AGC GTT CGG GAT CTC AAT-3'
COX-2	Sense	5'-TGA GCA ACT ATT CCA AAC CAG C-3'
	Antisense	5'-GCA CGT AGT CTT CGA TCA CTA TC-3'
GAPDH	Sense	5'-GGG AGT CAA ATT TGG TCG TAT-3'
	Antisense	5'-AGC CTT CTC CAT GGT GAA GAC-3'

의 연구 결과와도 일치한다.

된장의 발효가 진행될수록 아미노태 질소의 함량이 증가하였으며(Fig. 1), 발효 8주차에 아미노태 질소 함량은 9회 죽염 된장이 752 mg%로 가장 많았고, 3회 죽염, 1회 죽염, 천일염, 정제염을 첨가한 된장 순으로 729 mg%, 719 mg%, 687 mg%, 626 mg% 함량을 나타내었다. 또한 죽염을 첨가한 된장군이 천일염, 정제염을 첨가한 된장에 비해 유의적으로 높은 함량을 보였다($P<0.05$). 일반적으로 된장의 발효가 진행되면서 단백질이 아미노산으로 변화되기 때문에 아미노태 질소의 함량의 변화가 나타나는데, 본 실험에서 아미노태 질소 함량의 차이는 각 소금의 미네랄 함량 및 조성의 차이(16)가 아미노태 질소의 생성에 관여하는 protease의 활성에 영향을 미쳐 이러한 차이를 가져오는 것으로 생각되며, 이는 이미 보고된 연구 결과(13)에서 언급한 것과 일치한다.

효소 활성: Protease의 활성을 측정한 결과는 Fig. 2에 나타난 바와 같다. 모든 시료 된장들의 protease 활성은 발효가 진행됨에 따라 증가하였으며, 발효 8주차에 9회 죽염 된장의 protease 활성은 292 unit/g으로 실험군들 중 가장 높은 결과를 나타내었다. 또한 죽염 된장군은 천일염, 정제

염 된장보다 유의적으로 높은 protease 활성을 나타내었다($P<0.05$). 일반적으로 된장의 구수한 맛에 관련하는 유리 아미노산의 함량은 protease 활성에 영향을 받는데, 본 실험 결과 protease 활성의 결과는 아미노태 함량 측정 결과와도 동일한 경향을 나타내었다. 이는 *Aspergillus spp.*를 단일 접종한 된장이 발효 시 protease 활성도가 감소한다는 연구 결과(9)와는 달리, *Aspergillus oryzae*와 *Bacillus natto* 혼합 균주를 접종한 된장에서 *Bacillus*에 의하여 발효가 진행되면서 protease 활성도가 증가한다는 Lee와 Cho (30)의 연구와 동일한 결과라 할 수 있다. 또한 protease 활성은 Ca, K, Cu 등과 같은 무기질에 의해 상승된다고 알려져 있으므로(31), 죽염에 함유된 풍부한 미네랄 및 생리활성 물질의 영향으로 인해 죽염 된장에서의 protease 활성이 높게 나타나는 것으로 생각되어진다(16).

α -Amylase 활성 역시 된장의 발효기간 동안 점차 증가하는 경향을 나타냈다(Fig. 2). 8주간의 발효기간 동안 α -amylase 활성은 죽염된장에서 정제염, 천일염 된장보다 높게 나타났으며, 발효 8주차에 9회 죽염 된장의 α -amylase 활성은 381 unit/100 mL로 유의적으로 가장 높은 값을 나타내었다($P<0.05$). Joo 등(9)은 amylase 활성의 차이를 미

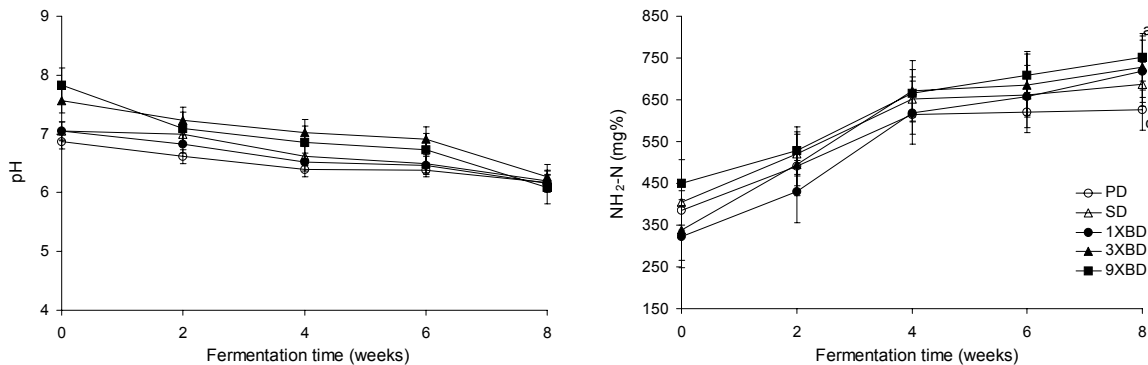


Fig. 1. Changes of pH and amino-type nitrogen contents of doenjang at 37°C during fermentation. PD, doenjang prepared with mixed starter cultures and purified salt; SD, doenjang prepared with mixed starter cultures and sea salt; 1×BD, doenjang prepared with mixed starter cultures and one-time baked bamboo salt; 3×BD, doenjang prepared with mixed starter cultures and three-time baked bamboo salt; 9×BD, doenjang prepared with mixed starter cultures and nine-time baked bamboo salt; *Aspergillus oryzae*, *B. subtilis*-SKm and *Lac. lactis*-GAm were used as mixed starter cultures. ^{a-c}Means with the different letters are significantly different ($P<0.05$) by Duncan's multiple range test.

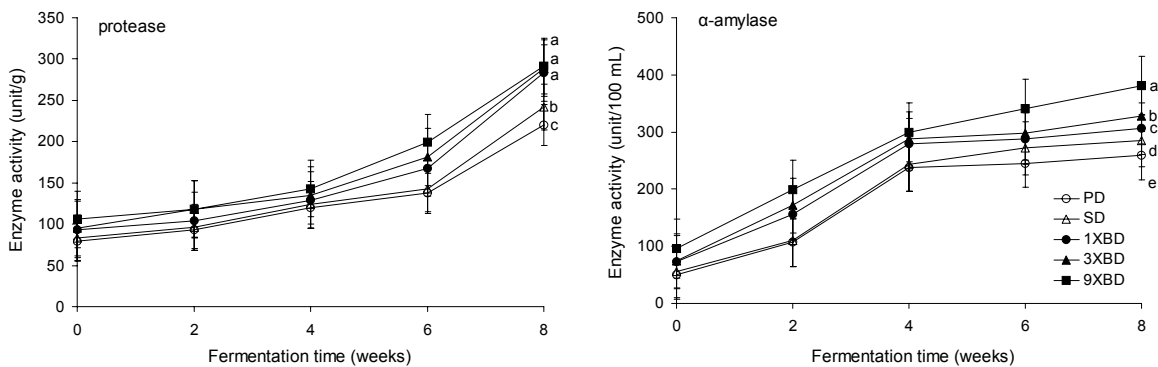


Fig. 2. Changes of protease and α -amylase activity of doenjang at 37°C during fermentation. Abbreviations are specified in Fig. 1. ^{a-c}Means with the different letters are significantly different ($P<0.05$) by Duncan's multiple range test.

Table 2. Sensory evaluation of doenjang stew

Attributes	PS ¹⁾	SD	1×BD	3×BD	9×BD
Color	4.9±0.9 ^a	5.1±0.9 ^{ab}	6.3±0.7 ^{bc}	6.5±1.4 ^c	6.6±1.6 ^c
Salty	6.1±1.1 ^a	5.6±1.3 ^a	5.5±1.4 ^a	5.9±0.8 ^a	6.3±0.7 ^a
Bitter	4.9±1.4 ^b	4.0±1.5 ^{ab}	3.6±1.6 ^{ab}	3.0±1.7 ^a	2.4±1.3 ^a
Sweet	3.6±0.9 ^a	4.1±1.1 ^{ab}	4.9±0.8 ^{bc}	5.0±0.8 ^{bc}	5.5±0.9 ^c
Flavor	4.6±0.7 ^a	5.0±0.8 ^a	5.4±0.7 ^{ab}	6.1±1.1 ^{bc}	6.6±1.2 ^c
Overall acceptability	4.6±0.5 ^a	5.0±0.8 ^{ab}	5.6±0.8 ^{bc}	6.0±1.0 ^{cd}	6.7±0.9 ^d

¹⁾ Abbreviations are specified in Fig. 1.

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

생물의 차이에 의한 것으로 간주하였으며, 발효가 진행될수록 단일균종의 접종에 의해 제조된 된장보다 자연 발효균에 의한 된장에서 amylase 활성이 유지되는 경향이 우수하다고 보고하였다. 따라서 본 연구에서 사용된 혼합 스타터 된장이 발효기간 중 계속적으로 높은 α-amylase 활성을 유지하는 것으로 생각되어진다. 또한 α-amylase의 경우 Na⁺, Ca²⁺ 등의 금속 이온이 효소의 안정화에 크게 기여한다고 알려져 있는데(32,33), 이에 따라 각 소금별 미네랄 성분 및 함량의 차이가 된장의 α-amylase 활성 차이에 영향을 미치는 것으로 사료되며, 미네랄 성분이 풍부한 죽염으로 제조한 된장, 특히 9회 죽염 된장의 α-amylase 활성이 유의적으로 높게 나타나는 것으로 생각되어진다(16,34).

관능평가: 정제염, 천일염, 죽염을 사용하여 제조한 된장을 된장찌개로 제조하여 관능평가를 실시하였으며 그 결과는 Table 2에 나타내었다. 관능평가 척도는 9점 척도를 이용하여 실시하였으며, 색에 있어서는 6.6으로 9회 죽염 된장이 높은 점수를 받았으며 단맛, 향과 전체적인 선호도에서도 9회 죽염 된장으로 만든 된장찌개에 대한 선호도가 각각 5.5, 6.6, 6.7로 가장 높은 점수를 받았다. 다음으로는 3회 죽염 된장과 1회 죽염 된장 순으로 선호도가 높았다. 반면 쓴맛에서는 정제염으로 만든 된장이 4.9로써 가장 쓴맛이 많이 났으며, 천일염 된장은 4.0의 점수를 받아서 정제염 된장보다는 쓴맛이 약하게 나타났다. 짠맛에서는 모든 군에서 수치적 차이는 발생하였으나, 통계적인 유의성은 없었다. 앞선 연구 결과에서 아미노태 질소, 효소활성이 9회 죽염 된장에서 가장 높았으며, 관능평가에서도 전체적 기호도와

선호도가 높았다. 하지만 실제로 9회 죽염을 된장 제조 시 사용하기 위하여 경제적인 부분을 고려하여야 한다. 따라서 실제 된장 제조 시에는 3회 죽염이나 1회 죽염을 활용한다면, 가격은 지나치게 높지 않으면서 된장의 기능성 면과 선호도에서 우수한 된장 제조가 가능할 것으로 사료된다.

된장의 in vitro 항산화 효과

DPPH radical 소거효과: 각 된장들의 DPPH radical 소거효과를 분석한 결과는 Fig. 3과 같다. 1.0 mg/mL의 농도에서 각 시료 된장은 약 40~47%의 소거효과를 나타내었으며, 9회 죽염 된장이 47%로 유의적으로 가장 높은 소거효과를 나타내었다($P < 0.05$). 된장과 같은 콩발효식품의 항산화 효과는 콩속에 함유된 항산화물질인 tocopherol, isoflavones 및 phenolic acids 등에 의해 비롯되며, 이는 발효과정으로 통해서 더욱 활성화된 형태로 변화하는 것으로 알려져 있다. 그밖에도 원료의 분해에 의하여 생성된 아미노산, 펩티드 성분들, 페놀화합물들 및 melanoidin 성분들에 의해 이러한 항산화 효과가 나타나는 것으로 보고되고 있다(35). 앞선 실험 결과로 볼 때 소금의 종류는 된장의 발효양상에 큰 영향을 미치는 것으로 보이며, 정제염, 천일염에 비해 미네랄 및 기타 생리활성 성분이 풍부한 죽염을 첨가한 된장의 발효가 보다 잘 진행되는 것으로 나타났다. 따라서 이러한 활발한 발효로 인해 된장 속에 항산화물질의 종류와 함량의 차이가 생기며, 이로부터 라디칼 소거효과의 차이가 나타나는 것으로 사료된다.

Hydroxyl radical 소거효과: Hydroxyl radical은 활성

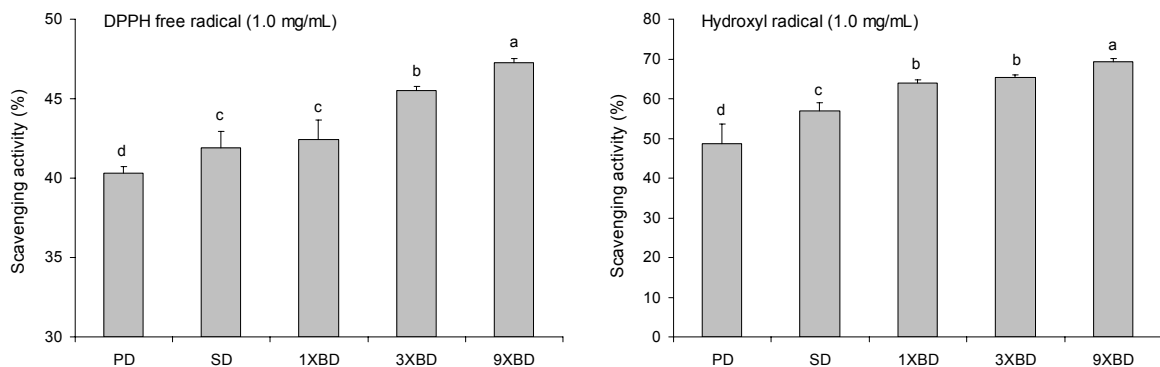


Fig. 3. DPPH and hydroxyl radical scavenging activities of doenjang prepared with different kinds of salts. Abbreviations are specified in Fig. 1. ^{a-d} Means with the different letters on the bars are significantly different ($P < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

산소 중에서 화학적으로 반응성이 가장 크고 생체 및 세포 내의 산화의 원인으로 DNA 손상을 주거나 돌연변이를 유발하는 물질로 알려져 있으며, membrane으로부터 수소 원자를 추출해낼 수 있는 능력과 지질의 과산화물 반응을 가져오는 것으로 알려져 있다(36). Hydroxyl radical에 의하여 세포의 손상을 예방하기 위해서 안토시아닌과 같은 플라보노이드를 이용하여 예방하는 것으로 알려져 있다(37). 천일염과 죽염을 첨가한 된장의 hydroxyl radical 소거효과를 분석한 결과는 Fig. 3과 같다. 1.0 mg/mL에서 정제염 된장 49%, 천일염 된장 57%, 1회 죽염 된장 64%, 3회 죽염 된장 65%의 hydroxyl radical 소거효과를 나타내었으며, 9회 죽염 된장이 69%로 가장 높은 소거효과를 나타내었다. 따라서 각각의 된장은 peroxy radicals 생산 및 종결 단계에서 지질과산화에 대하여 항산화 효과가 있으며, 세포 손상을 예방할 수 있는 것으로 사료된다. 이러한 결과로부터 된장 발효 시 사용되는 소금이 된장의 항산화 효과에도 영향을 미치는 것으로 보인다.

된장의 HT-29 인체 대장암세포 생육 억제 효과

MTT assay: HT-29 인체 대장암세포를 이용하여 된장의 *in vitro* 항암 효과를 측정하였으며, 그 결과는 Fig. 4와 같다. 0.5 mg/mL 농도에서 암세포 성장억제 효과를 측정한 결과 모든 시료 처리군에서 암세포 성장억제 효과를 나타내었다. 정제염 된장 73%, 천일염 된장 77%, 1회 죽염 된장 78%, 3회 죽염 된장 81%, 9회 죽염 된장 84%의 암세포 성장 억제율을 나타내었으며 모두 유의적인 차이를 보였다 ($P < 0.05$). Lee와 Chang(38)은 HT-29세포에서 천일염으로 제조된 된장이 정제염으로 제조된 된장에 비해 유의적으로 우수한 성장 억제율을 나타낸다고 보고하였으며, Yoon 등(39)은 사용된 소금에 따라 된장의 암세포 성장억제 효과가 유의적으로 차이가 있음을 보고하였고, 4년 숙성 천일염 된장에서의 암세포 성장 억제율이 가장 우수하다고 보고하였다.

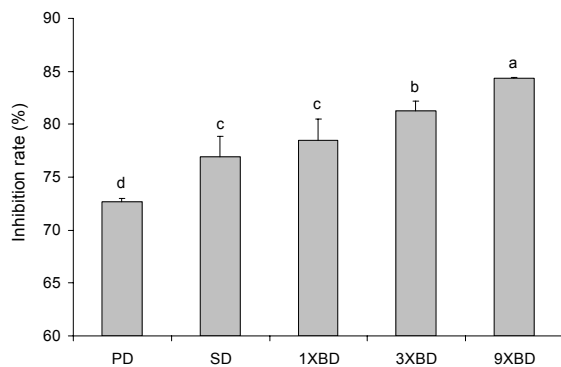


Fig. 4. Antiproliferative activities of doenjang prepared with different kinds of salts on HT-29 cancer cells (0.5 mg/mL). Abbreviations are specified in Fig. 1. ^{a-d}Means with the different letters on the bars are significantly different ($P < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

본 연구 결과 역시 소금의 종류에 따른 암세포 성장 억제율의 차이가 나타났으며, 정제염에 비해 상대적으로 미네랄 등의 함량이 높은 천일염을 사용한 된장에서 천일염을 사용한 된장보다는 죽염을 사용한 된장에서 암세포의 억제율이 높게 나타났다. 따라서 소금의 종류가 된장의 항암 효과 차이를 나타내는 데에 중요한 역할을 하는 것으로 사료되며, 이것은 소금 자체에서 기인하는 효과이기도 하고(34), 앞서 설명하였던 발효 양상의 차이에 따른 활성성분의 차이에 의한 것이기도 한 것으로 보인다.

Apoptosis 및 염증 관련 유전자 발현에의 영향: 암은 세포가 비정상적으로 증식되거나 apoptosis가 원활하게 이루어지지 않는 경우에 발생되고, 따라서 암세포의 증식을 억제하고 apoptosis를 활성화시키는 것은 암 발생 및 발달을 효과적으로 차단하는 방법이라 할 수 있다(40). 또한 apoptosis를 유도하는 과정은 복잡하고 많은 매개체들의 조절을 거쳐 이루어지는데, 현재 널리 알려져 있는 것은 ROS를 통한 pro-apoptosis를 유도하는 Bax 유전자의 활성화와 anti-apoptosis와 관련된 Bcl-2 유전자 억제가 널리 알려져 있다(40-42). 9회 죽염 된장에서 Bcl-2 유전자 발현이 현저히 감소되었으며, Bax 유전자 발현이 증가하여서 대장암 세포의 apoptosis를 가장 크게 유도한 것으로 나타났다(Fig. 5). 이것은 Zhao 등(34)의 연구에 의하면 천일염 자체는 Bcl-2, Bax 유전자의 발현을 조절하고 apoptosis를 조절하여 암세포 증식을 억제한다고 보고하였으며, Hwang 등(18)의 연구에 의하면 정제염 된장보다 미네랄 함량이 높은 천일염, 죽염을 사용하여 제조한 된장의 항돌연변이 억제 효과 측정에서도 훨씬 높은 항돌연변이 억제 효과가 나타났다고 보고하였다. 본 연구에서도 된장 제조 시 사용한 소금이 유전자 발현에 큰 영향을 미친 것으로 사료된다. 또한 천일염보다는 죽염, 특히 9회 죽염을 이용한 된장에서 이러한 효과가 더욱 우수하였다.

일반적으로 COX-2, iNOS는 암이나 염증 관련 질환에서 그 발현이 증가되어서 나타나는 것으로 연구되고 있으며, 따라서 COX-2와 iNOS의 발현을 낮추는 치료법을 암의 치료 방법으로 활용하도록 제안되고 있다(43,44). 또한 대장암 환자들의 용종에서의 COX-2 mRNA expression을 분석한 결과, 그 발현 정도가 현저하게 높게 나타난 연구(45)를 바탕으로 본 연구에서의 대장암 세포의 COX-2 mRNA expression의 감소는 된장이 대장암 발현 시 많이 생성되는 COX-2의 inhibitor의 역할로 생각된다. iNOS 또한 인체 대장암 세포에 있어서 그 발현이 높게 나타나고 대장암에서 COX-2의 조절과 관련이 있으며(46), 실제적으로 NO가 다양한 세포에서 COX-2의 활성화와 발현을 강화시키는 역할(47)을 한다고 보고하고 있다. 따라서 천일염과 죽염을 이용한 된장이 COX-2와 iNOS의 발현을 감소시킨 결과가 높은 것을 바탕으로 된장은, 특히 9회 죽염으로 제조된 된장은 이러한 염증 유전자 발현의 inhibitor로서 효과적이라고 할 수 있다.

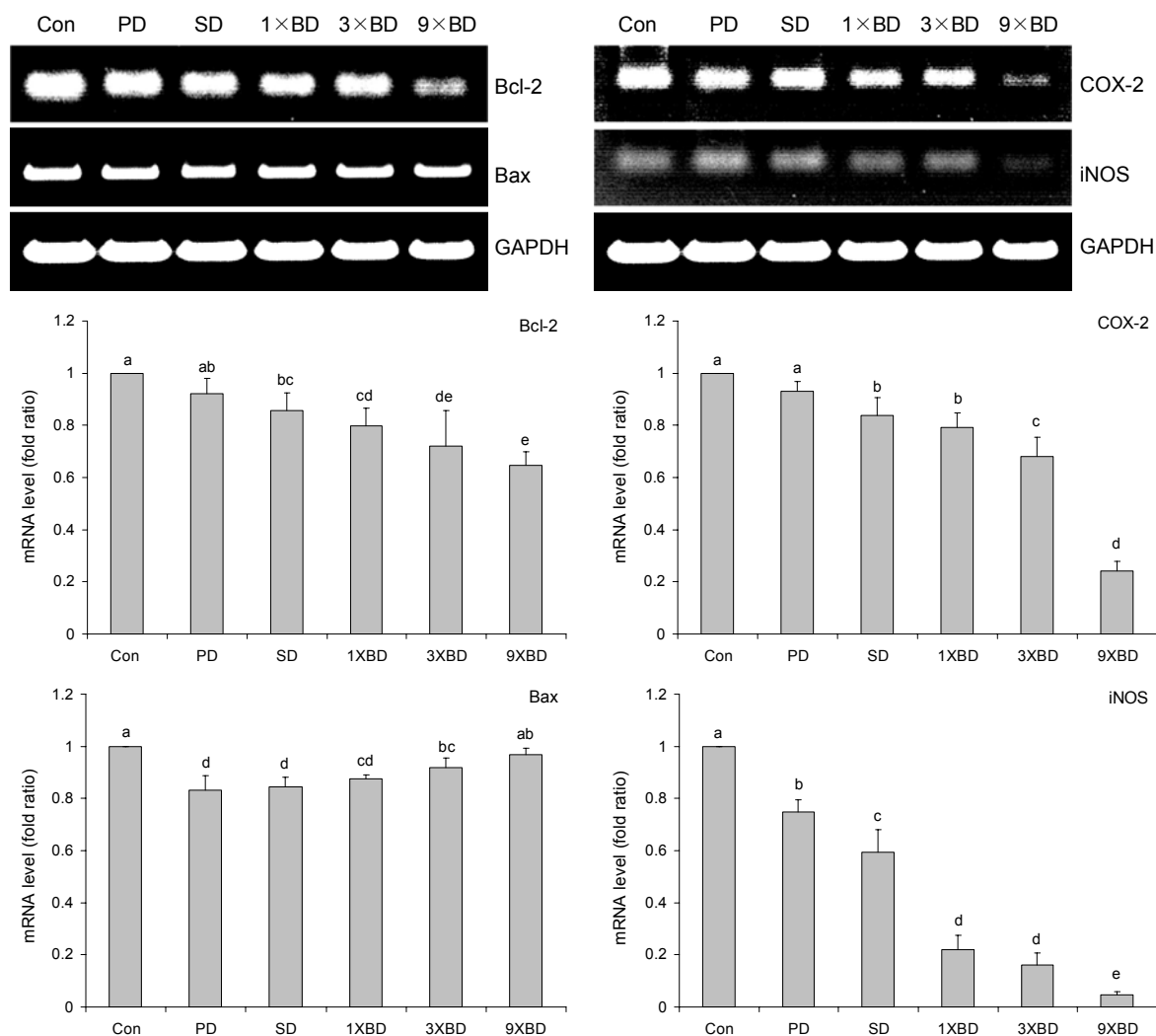


Fig. 5. Effects of doenjang on mRNA expression levels of COX-2, iNOS, Bcl-2 and Bax in HT-29 cancer cells (0.5 mg/mL). Abbreviations are specified in Fig. 1. ^{a-c}Means with the different letters on the bars are significantly different ($P < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

요 약

된장 발효 시에 정제염, 천일염 및 죽염을 사용하여 된장을 8주간 37°C에서 발효시키면서 발효의 특성 및 관능평가, 항산화, HT-29 암세포의 성장 억제효과와 apoptosis 및 염증관련 유전자 발현 정도를 측정하였다. 발효가 진행되면서 소금의 종류에 관계없이 pH는 전체적으로 감소하는 경향을 나타내었으며, 아미노태 질소는 증가하는 경향을 나타내었다. Protease와 α -amylase 활성은 발효의 진행에 따라 증가하였다. 정제염으로 사용한 된장에서는 천일염과 죽염으로 제조한 된장보다 아미노태 질소 함량과 효소 활성에서 낮은 결과를 나타내었다. 관능평가를 실시한 결과 정제염 된장이 맛, 기호도에서 그 선호도가 가장 낮았으며, 죽염 된장 중에서 9회 죽염 된장의 관능평가가 맛, 기호성 등에서 가장 높은 점수를 획득하였다. DPPH radical 소거효과와 hydroxy radical 소거효과는 1.0 mg/mL에서 정제염 된장

에서는 40%, 49%, 천일염 된장에서는 42%, 57%, 1회 죽염 된장은 42%, 64%, 3회 죽염 된장은 45%, 65%, 9회 죽염 된장이 47%, 69%의 소거효과를 나타내었다. HT-29 암세포 성장 억제효과는 모든 된장 처리군에서 암세포 성장 억제 효과가 나타났으며, apoptosis 및 염증 관련 유전자의 발현 정도를 분석 결과에서도 모든 된장군에서 iNOS, COX-2, Bcl-2 유전자 발현이 현저히 감소하고, Bax 유전자의 발현은 증가하여서 암 세포의 apoptosis 유도 활성 및 염증 억제를 시키는 것으로 나타났다. 정제염으로 제조한 된장, 천일염으로 제조한 된장, 죽염으로 제조한 된장의 순으로 apoptosis 유도 활성 및 염증 억제 효과가 높았다. 이상의 결과로 된장 제조 시에 정제염보다는 천일염이나 죽염을 이용하고, 특히 굵은 횡수가 증가한 죽염을 사용하여 된장을 발효시킨다면, 된장의 발효 우수성 및 기능성 증가를 갖는 된장 제조가 가능할 것으로 나타났다.

감사의 글

이 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원의 지원으로 이루어졌으며 이에 감사를 드립니다. 또한 소금을 제공해 주신 (주)삼보식품에 감사를 드립니다.

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.
- Shon DH, Lee KA, Kim SH, Ahn CW, Nam HS, Lee HJ, Shin JI. 1996. Screening of antithrombotic peptides from soybean paste by the microplate method. *Korean J Food Sci Technol* 28: 684-688.
- Sohn HS, Lee YS, Shin HC, Chung HK. 2000. Recent research for physiological mechanism of soybean in preventing and treating chronic diseases. *Korea Soybean Digest* 17: 37-60.
- Kim YS, Rhee CH, Park HD. 2001. Isolation and characterization of a bacterium from Korean soy paste *Doenjang* producing inhibition of angiotensin converting enzyme. *Korean J Food Sci Technol* 33: 84-88.
- Choi SY, Cheigh MJ, Lee JJ, Kim HJ, Hong SS, Chung KS, Lee BK. 1999. Growth suppression effect of traditional fermented soybean paste (*doenjang*) on the various tumor cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 28: 458-463.
- Lim SY, Rhee SH, Park KY. 2004. Inhibitory effect of methanol extract of *doenjang* on growth and DNA synthesis of human cancer cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 936-940.
- Lee JH, Kim MH, Lim SS. 1991. Antioxidative materials in domestic Meju and *Doenjang*. 1. Lipid oxidation and browning during fermentation of Meju and *Doenjang*. *J Korean Soc Food Nutr* 20: 148-155.
- Lee MJ, Kim HD, Park JW, Kim DS. 1992. Comparison of the antioxidant activity of melanoidin with commercial antioxidants and their synergistic effects. *J Korean Soc Food Nutr* 21: 686-692.
- Joo HK, Kim ND, Yoon KS. 1989. Changes of enzymatic activities during the fermentation of soybean-soypaste by *Aspergillus* spp. *J Korean Agric Chem Soc* 32: 295-302.
- Jeong JK. 2012. Improvement of quality and probiotic effect of meju and *doenjang* prepared with mixed starter cultures. *PhD Dissertation*. Pusan National University, Busan, Korea. p 126-140.
- Heo OS, Oh SH, Shin HS, Kim MR. 2005. Mineral and heavy metal contents of salt and salted-fermented shrimp. *Korean J Food Sci Technol* 37: 519-524.
- Park BJ, Jang KS, Kim DH, Yook HS, Byun MW. 2002. Changes of microbiological and physicochemical characteristics of *Doenjang* prepared with low salt content and gamma irradiation. *Korean J Food Sci Technol* 34: 79-84.
- Kim SH, Kim SJ, Kim BH, Kang SG, Jung ST. 2000. Fermentation of *doenjang* prepared with sea salts. *Korean J Food Sci Technol* 32: 1365-1370.
- Ha JO, Park KY. 1998. Comparison of mineral contents and external structure of various salts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27: 413-418.
- Kim YH, Ryu HI. 2003. Elements in a bamboo salt and comparison of its elemental contents with those in other salts. *Yakhak Hoeji* 47: 135-141.
- Zhao X, Jung OS, Park KY. 2012. Alkaline and antioxidant effects of bamboo salt. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 1301-1304.
- Park SJ, Park KY, Jun HK. 2001. Effects of commercial salts on the growth of *kimchi*-related microorganisms. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30: 806-813.
- 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.
- Hwang KM. 2004. Studies on the enhancement of chemopreventive and anticancer effects of *doenjang*. *PhD Dissertation*. Pusan National University, Busan, Korea. p 199-202.
- 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 Prevention Res* 11: 218-224.
- 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.
- Lee JS, Kwon SJ, Chung SW, Choi YJ, Yoo JY, Chung DH. 1996. Changes of microorganisms, enzyme activities and major components during the fermentation of Korean traditional *Deonjang* and *Kochujang*. *Korean J Appl Microbiol Biotechnol* 24: 247-253.
- Kim HG. 2010. Sensory characteristics and consumer acceptability of fermented soybean paste (*Doenjang*) products. *MS Thesis*. Ewha Womans University, Seoul, Korea. p 21-22.
- 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 Culin 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.
- Kim EY, Rhyu MR. 2000. The chemical properties of *doenjang* prepared by *Monascus koji*. *Korean J Food Sci Technol* 32: 1114-1121.
- Rhee CH, Lee JB, Jang SM. 2000. Changes of microorganism, enzyme activity and physiological functionality in the traditional *deonjang* with various concentrations of *Lentinus edodes* during fermentation. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* 43: 277-284.
- Lee KY, Cho SH. 2003. Effect of the combined fermentation with *Aspergillus oryzae* and *Bacillus natto* on the quality improvement of *doenjang* meju. *J Agric & Life Sci* 37: 9-21.
- Kim JY. 2007. Isolation and characterization of an alkaline protease produced by *Bacillus subtilis* JK-1. *Korean J Microbiol* 43: 331-336.
- Vallee BL, Stein EA, Sumerwell WN, Fischer EH. 1959. Metal content of α -amylases of various origins. *J Biol Chem* 234: 2901-2905.
- Kim JM, Shin MK, Hwang HS, Kim HT. 1990. Effects of salting process on ascorbic acid contents, α -amylase activity, seasoning penetration and microbial counts of radish cubes for *Kakdugi*. *Korean J Food Sci Technol* 22: 492-495.

34. 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.
35. 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 antioxidative activity. *J Korean Soc Food Nutr* 23: 792-798.
36. Kitada M, Igarashi K, Hirose S, Kitagwa H. 1979. Inhibition by polyamines of lipid peroxide formation in rat liver microsomes. *Biochem Biophys Res Commun* 87: 388-394.
37. Shon MY, Lee J, Choi JH, Choi SY, Nam SH, Seo KI, Lee SW, Sung NJ, Park SK. 2007. Antioxidant and free radical scavenging activity of methanol extract of *chungkukjang*. *J Food Comps Anal* 20: 113-118.
38. Lee SM, Chang HC. 2009. Growth-inhibitory effect of the solar salt-*Doenjang* on cancer cells, AGS and HT-29. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 1664-1671.
39. 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.
40. Paoluzzi L, O'Connor OA. 2010. Targeting survival pathways in lymphoma. *Adv Exp Med Biol* 687: 79-96.
41. Korsmeyer SJ. 1995. Regulators of cell death. *Trends Genet* 11: 101-105.
42. Debatin KM. 2004. Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother* 53: 153-159.
43. Cianchi F, Perna F, Masini E. 2005. iNOS/COX-2 pathway interaction: a good molecular target for cancer treatment. *Current Enzyme Inhibition* 1: 97-105.
44. Kumar M, Kumar S, Kaur S. 2012. Role of ROS and COX-2/iNOS inhibition in cancer chemoprevention: a review. *Phytochem Rev* 11: 309-337.
45. Einspahr JG, Krouse RS, Yochim JM, Danenberg PV, Danenberg KD, Bhattacharyya AK, Martínez ME, Alberts DS. 2003. Association between cyclooxygenase expression and colorectal adenoma characteristics. *Cancer Res* 63: 3891-3893.
46. Watanabe K, Kawamori T, Nakatsugi S, Wakabayashi K. 2000. COX-2 and iNOS, good targets for chemoprevention of colon cancer. *Biofactors* 12: 129-133.
47. Salvemini D, Settle SL, Masferrer JL, Seibert K, Currie MG, Needleman P. 1995. Regulation of prostaglandin production by nitric oxide; an *in vivo* analysis. *Br J Pharmacol* 114: 1171-1178.