

된장 숙성기간중의 항산화 및 암세포 생육 억제효과

권선희 · 손미예[†]
한국전통발효식품연구소

Antioxidant and Anticarcinogenic Effects of Traditional Doenjang during Maturation Periods

Sun-Hwa Kwon and Mi-Yae Shon[†]

Korea Fermented Food Research Institute, Jinju 660-844, Korea

Abstract

Antioxidant effect of traditional doenjang(TD) was reduced by increasing of maturation period. Methanol fractionate of TD matured for 1 year showed strong antioxidant effect against linoleic acid, following the order of hexane and water layer. Antioxidant effect in lipophilic and hydrophilic extracts of TD were gradually increased according to increasing maturation period, whereas their values of two extracts were lower than those of fractionates from TD. Hydrogen-scavenging effect in hydrophobic extract, methanol and butanol fractionates of TD were much higher than those of the other samples. Chloroform and ethylacetate fractionates were markedly lower in the range of 10.57~22.84% and 7.82~22.58%, respectively. Anticarcinogenic effect of extracts and fractionates from TD were higher in water fractionates for A549 cell (human lung carcinoma) and methanol fractionates for MCF-7 cell (human breast adenocarcinoma). Especially, inhibitory effect for growth of cancer cell was increased by the increasing maturation period of TD.

Key words : traditional doenjang, antioxidant effect, hydrogen-scavenging, anticarcinogenic effect

서 론

우리의 전통된장은 청국장과 간장과 같이 대두를 이용하여 발효한 식품으로 고유한 풍미를 지니고 있으며, 영양적으로 우수한 단백질 공급원으로서 저장성이 우수하다. 전통된장은 간장을 분리하고 남은 고형물을 이용하고, 메주의 발효도와 담금비율 및 숙성기간 등이 가정의 제조자에 따라 달라서, 주로 공장에서 제조되는 종국된장에 비하여 제품에 따라 품질 차이가 많이 나타난다.

최근 전통된장에 관한 연구로는 항돌연변이(1,2), 항암(1-5) 및 혈전용해능(6,7)이 있는 것으로 보고되고 있으며, 또한 면역증진(8,9)이나 혈압강하 (10,11), 고지혈증과 당뇨 개선(12,13), 아질산염 소거능(14) 및 항산화능(14-17)을 가지는 생체조절 기능의 식품성분 등이 일부 밝혀지고 있다. 그 중에 된장의 갈변색소인 melanoidin의 기능성은 주로 항산화능(15,17)이 가장 많고, 다음으로 활성산소소거작용, 변이원성 억제작용 및 항암작용 등이 보고되고 있다(18,19).

전통된장의 갈변은 자연의 노출상태에서 지방을 제거하지 않은 원료콩으로 장기간 발효시킨 메주를 사용하고, 간장과 달리 가열 살균처리를 하지 않기 때문에 저장·유통 중에 된장의 표면과 용기에 접촉된 부분은 수분감소, 광선과 산소접촉, 미생물 및 그 효소 작용에 의하여 일어난다(20). 이와 같은 전통된장의 갈변원인을 크게 나누어 보면, 비효소적 갈변과 효소적 갈변으로 구분하는데, 전자는 된장 숙성 중에 원료 자체에 함유된 단백질, 아미노산, 펩티드, 당류, 각종 카르보닐화합물 성분들의 amino-carbonyl반응(Maillard반응)에 의한 것(21,22)과 발효 세균들이 분비하는 전구물질에 의한 melanine과 같은 흑색소를 비효소적으로 생성하는 것인데(23,24), 이를 반응들에 의한 갈변을 된장의 “착색현상”이라고 한다. 후자는 발효미생물이 생성하는 효소와 공기 중의 산소 접촉에 의한 효소적 혹은 산화적 갈변되는 것으로 된장의 “변색현상”이라고 말하는데, 주로 *Bacillus subtilis*, *B. niger*를 포함한 *Bacillus*속 세균들이 생성하는 tyrosinase의 촉매작용에 의한 tyrosine 산화작용에 의한 것(16,17,25,26)과 국균이 생성하는 효소와 금속이온 및 산소에 의한 적갈색 ferrychrichin 결정체의 생성에 의한 것(27)이 있다.

본 연구에서는 전통된장의 장기간 실외 자연숙성과정을

[†]Corresponding author. E-mail : nuruksmy@hanmail.net,
Phone : 82-55-761-1930, Fax : 82-55-761-1930

통하여 식품성분간 화학반응 및 효소적 갈변현상으로 생성되는 멜라닌류 색소의 기능성을 탐색함으로써 전통된장의 색깔과 기능적 품질평가를 위한 기초 자료로 활용하고자 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

지용성 색소 및 수용성 색소의 용매별 추출

지용성 색소는 동결건조시킨 전통된장 10 g에 지용성 색소의 추출용매(chloroform : methanol = 2 : 1, v/v)를 10배(w/w) 첨가하여 3회 추출하였고, 수용성 색소는 지용성 색소를 추출하고 남은 잔사에 수용성 추출용매(methanol : D.W. = 1 : 1, v/v)를 10배(w/w) 첨가하여 지용성 색소와 동일 방법으로 추출하였다. 지용성 및 수용성 추출액은 rotary evaporator에서 각각 40°C, 80°C에서 농축하면서 용매를 휘발시킨 다음, 동결건조하여 사용 직전에 3차 중류수에 다시 재용해하여 항산화 효과, 수소공여능 및 항암 실험의 시료로 사용하였다(15).

분획 용매별 추출

전통된장의 기능성이 가장 높은 추출용매를 확인하기 위하여 된장 800 g에 10배(w/w)의 hexane을 혼합하여 환류냉각이 부착된 환저 플라스크에 넣고, 70°C 수육상에서 12시간 가열하여 추출한 다음, 그 여과액을 rotary evaporator로 감압 농축시킨 후, 동결건조하여 hexane 조추출물을 얻었다. Hexane 분획물은 용매의 극성을 증가시키는 계통 분획법에 따라 다시 chloroform, ethylacetate, butanol, methanol, water의 순으로 각각 분획하여 농축한 후, 동결건조하여 항산화 효과, 수소공여능 및 항암 실험을 하기 위하여 3차 중류수에 재용해하여 사용하였다(28).

수소공여능 측정

수소공여능의 측정은 α,α' -diphenyl- β -picrylhydrazine (DPPH)의 환원성을 이용하여 516 nm에서 UV/Vis-spectrophotometer로 실시하였다. 즉 각 추출물 0.1 mL와 대조구로 사용한 0.1% BHT 1 mL에 4×10^{-4} M DPPH 용액 3 mL를 각각 첨가한 후 5초 동안 vortex mixer로 혼합하여 중류수에 대한 흡광도를 측정하고, 대조구는 시료대신에 에탄올 1 mL를 첨가하여 대조구에 대한 흡광도의 감소비율로 나타내었다(29).

$$\text{수소공여능} = [1 - (\text{시료의 흡광도} / \text{무첨가구 흡광도})] \times 100$$

Linoleic acid 항산화 효과

전통된장 추출물 및 분획물의 항산화 효과를 linoleic acid의 과산화물가로 환산하여 in vitro로 조사하였다. 즉 삼각플라스크에 linoleic acid 1 mL, carbonyl을 제거한 ethanol 20 mL 및 전통된장 추출물 혹은 분획물 0.1 mL를 첨가한 후 0.2M phosphate buffer 25 mL를 가하여 50°C에서 3일간 저장한 다음 반응용액을 분액깔대기에 옮겨 chloroform 25 mL를 가하여 추출하였다. 다음에 chloroform 추출액에 acetic acid 25 mL와 포화 KI 용액 1 mL를 가하여 암소에서 5분간 방치한 다음, 중류수 50 mL를 가하여 soluble starch 지시약과 5/100 N Na₂S₂O₃용액으로 적정하여 meq/kg으로 환산하였다(30).

암세포 배양

한국생명공학연구원 생물자원센터로부터 분양받은 인체 폐암 세포주(A549)와 인체 유방암 세포주(MCF-7)들은 10%의 송아지 혈청(fetal bovine serum)이 포함된 RPMI 1640 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 1주일에 1~2회 계대배양하면서 실험에 사용하였다. 플라스크의 바닥에 부착되어 있는 세포를 떼어내는 데는 0.25% trypsin - 3 mM EDTA 용액을 PBS로 10배 희석한 용액을 사용하였다. 암세포주 배지로써 Rosewell Park Memorial Institute(RPMI) media 1640에 10% FBS (fetal bovine serum PAA 제품)와 penicillin-streptomycin 혼합용액을 첨가하여 사용하였으며, penicillin- streptomycin 혼합용액은 penicillin(10,000 units/mL)과 streptomycin(10 mg/mL)의 혼합액(SIGMA, P-0781)을 RPMI 1640 배지에 100배 희석하여 사용하였다. trypsin-EDTA 용액은 10배 농축용액(SIGMA)을 PBS(phosphate buffered saline)로 10배 희석한 후 사용직전까지 냉동보관하였으며, SRB (sulforhodamine B) 염색용액은 1% 빙초산에 0.4%농도로 녹여 사용하였다. TCA(trichloroacetic acid) 고정액은 100%(6.1 N)용액을 중류수로 희석하여 50%와 80% 용액을 사용하였다.

암세포 성장 억제효과

세포증식 정도를 SRB assay법(31,32)과 Cell titer 96[®] aqueous one solution cell proliferation assay(33)에 따라 측정하였다. Monolayer로 배양중인 암세포주를 0.25% trypsin-EDTA 용액으로 처리하여 single cell로 만든 후 배양액으로 최종농도가 5×10^4 cells/mL개가 되도록 희석하여 48 well plate에 각 well 당 450 μ L씩 접종한 다음 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 전배양하였다. 각 well의 배지를 흡입하여 제거한 후, 서로 다른 농도로 준비한 시료가 포함된 배지를 50 μ L 씩 각 well에 가하여 48시간 더 반응시켰다. 배양이 종료된 후, 50 μ L의 차가운 50% trichloroacetic acid(TCA)를 위에서

부터 천천히 가해주고 TCA가 바닥에 가라앉도록 잠시 기다린 후 조심스럽게 냉장고로 옮겨 1시간동안 충분히 고정시키고 고정이 끝난 후에는 중류수로 5회 이상 세척하여 잘 건조시키고 나서 각 well에 1% 빙초산에 녹인 0.4% SRB용액 100 mL를 가하여 상온에 30분 이상 염색하였다. 염색이 끝난 후, 1% 빙초산으로 5회 세척하여 잘 건조시키고, 150 μL의 10 mM 비완충성 Tris 용액으로 SRB염색액을 잘 녹여내어 96-well plate용 microplate reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

색차계 색도의 변화

장기 숙성시킨 전통된장의 색차계 색도의 L, a, b값을 측정한 결과는 Table 1과 같다. L값(명도)은 숙성시간이 경과함에 따라 1년 된장(밝은 적갈색) 35.65에서 2년 된장(짙은 적갈색) 27.03이었으며, 3년 된장(흑갈색)은 22.0으로 크게 감소하는 경향으로서 2년 된장까지는 명도에서 기호적으로 큰 문제가 없었다. a값(적색도)은 오히려 발효시간이 경과함에 따라 증가하였는데, 숙성 1년(+4.46)과 2년 된장(+4.84)은 큰 차이가 없었으나, 3년 된장은 +6.18로서 상당히 높게 나타났다. b값(황색도)은 명도와 마찬가지로 숙성기간이 경과함에 따라 비슷한 경향으로 감소하였는데, 숙성 1년(6.27)과 2년 된장(5.08)은 큰 차이가 없었으나, 3년 된장은 4.08로서 비교적 감소 폭이 크게 나타났다. 이상의 결과를 보면, 전통된장의 숙성기간은 기호적 평가에서 1년~2년 기간까지는 적절한 것으로 생각된다. 그러나 메주콩의 종류와 침지와 증자조건, 메주 크기와 발효조건, 염장조건(염수농도, 메주와 염수비율, 기간) 등에 따라서 최종 전통된장의 숙성 중 색도변화는 다르게 나타날 수가 있다.

Table 1. Changes in Hunter color values of traditional doenjang at room temperature during maturation period.

Color	Maturation period (year)		
	1	2	3
L	35.65	27.03	22.00
a	4.46	4.84	6.18
b	6.27	5.08	4.06
ΔE	36.47	27.93	23.87

Linoleic acid에 대한 항산화 효과

장기 숙성시킨 전통된장의 지용성 색소와 수용성 색소의 linoleic acid에 대한 항산화력을 측정한 결과는 Fig. 1과 같다. 전통된장의 색소 추출물의 linoleic acid에 대한 항산화력

은 linoleic acid에 지용성과 수용성 추출물을 첨가한 후 50°C에서 3일간 저장하면서 과산화물가를 측정하였는데, 수용성 색소가 지용성 색소보다 약간 낮은 과산화물가를 나타내므로 항산화능이 우수하였다. 순수한 콩만으로 만든 전통된장은 실외 자연조건에서 저장기간이 길어지면서 항산화능이 증가되는 경향이었는데, 특히 전통된장의 수용성 색소는 1년 된장(과산화물가 360 meq/kg)에서 3년 된장(300 meq/kg)으로 숙성기간이 경과되면서 과산화물의 생성을 낮추므로 항산화능은 오히려 증가되었다. 그러나 이들 전통된장의 색소류는 합성 항산화제인 BHT(butylated hydroxy toluene) 130 meq/kg보다는 linoleic acid로부터 과산화물 생성량이 높아 항산화력이 낮았으나, 물 추출물의 과산화물가 290 meq/kg보다는 비슷하거나 약간 높은 값을 나타내었다.

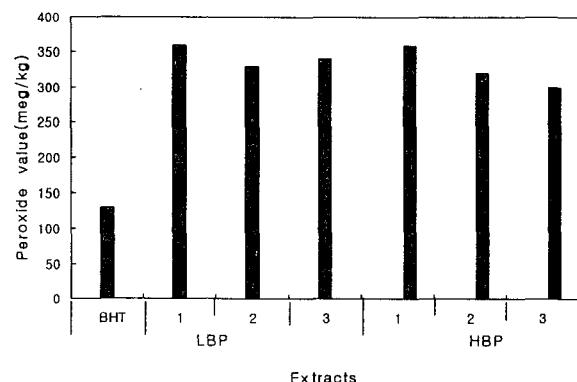


Fig. 1. Changes in antioxidant activity of extracts of traditional doenjang at room temperature during maturation period.

BHT : Butylated hydroxy toluene, LBP : Lipophilic brown pigment, HBP : Hydrophilic brown pigment.

전통된장의 추출물과 용매의 극성이 높은 순으로 계통 분획물을 조제하여 linoleic acid에 대한 항산화력은 linoleic acid에 대한 각 분획물을 첨가한 후 50°C에서 3일간 저장하면서 과산화물가를 측정한 결과는 Fig. 2와 같다. 이들 분획물의 과산화물가는 색소류와는 다르게 숙성기간이 짧을수록 낮은 경향으로 나타나서 1년 된장 > 2년 된장 > 3년 된장 순으로 항산화력이 높았으며, 그 중에서 methanol 분획물의 1년 된장(과산화물가 160 meq/kg)과 2년 된장(220 meq/kg)은 BHT보다는 항산화력이 약간 낮았지만, 다른 분획물에 비하여 높은 항산화 효과를 나타내었다.

Bae 등(34)은 linoleic acid에 전통된장의 hexane, methanol 및 물 분획물을 첨가한 후 50°C에서 25시간 저장하면서 과산화물가를 측정한 결과, 분획물 모두에서 추출물을 첨가하지 않은 대조구에 비하여 과산화물가가 크게 감소하여 강한 항산화 효과가 있는 것으로 보고하였다. Lee 등(35)은 linoleic acid에 된장 methanol 분획물을 농도별로 첨가한 후

50°C에서 48시간 저장하면서 과산화물가를 측정한 결과 된장 methanol 분획물을 첨가하지 않은 대조구에 비하여 과산화물가가 크게 감소하여 항산화효과가 우수한 것으로 나타났으며, 첨가 추출물 농도가 높을수록 그 효과는 더 크다고 보고하였다. Rhee 등(36)은 탈지 대두, 맥주 및 된장 phenol 물질의 항산화력을 측정한 결과 이들 모두 대조구에 비하여 항산화력이 뛰어났으며, 그 순서는 된장, 맥주 및 탈지대두 순으로 항산화력이 크게 나타났다고 보고하였다.

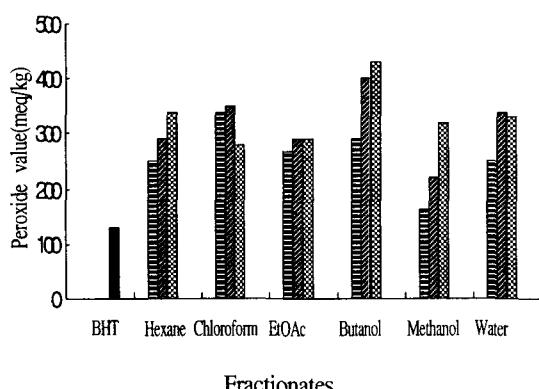


Fig. 2. Changes in antioxidant activity of fractionates of traditional doenjang at room temperature during maturation period.

■ : BHT, ▨ : 1 year, ▨ : 2 year, ▨ : 3 year, BHT : butylated hydroxy toluene.

수소공여능 효과

장기 숙성된 전통된장의 수용성 색소와 지용성 색소 및 각 용매 분획물을 대한 수소공여능을 측정한 결과는 Fig. 3, 4와 같다.

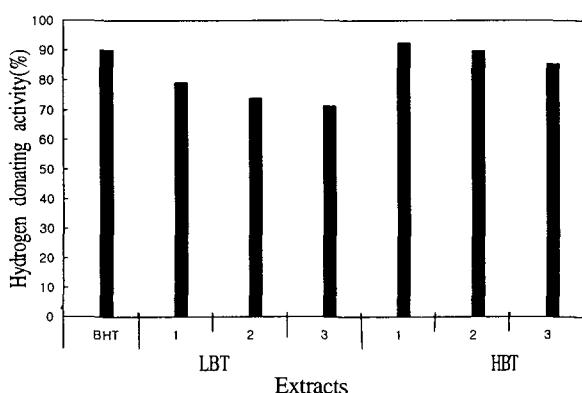


Fig. 3. Changes in hydrogen-donating activity of extracts and fractionates of traditional doenjang at room temperature during maturation period.

BHT : Butylated hydroxy toluene, LBP : Lipophilic brown pigment, HBP : Hydrophilic brown pigment.

수소공여능은 수용성 색소 추출물(92.4 ~ 85.2%)이 동일년도에 대하여 지용성 색소 추출물(78.8 ~ 71.5%)보다 10%이상 높았으며, 또한 저장기간이 길어짐에 따라 약간씩 감소하는 경향이었다(Fig. 3). 장기 숙성시킨 전통된장의 용매 분획물은 숙성기간(1년 ~ 3년)에 따라 증가하는 경향을 나타내었는데, methanol 분획물(79.7 ~ 84.3%)과 butanol 분획물(79.7 ~ 82.6%)은 매우 높았으며, 물 분획물(66.1 ~ 62.3%)과 hexane(50.6 ~ 54.9%)의 값도 비교적 높았으나, chloroform 분획물(10.6 ~ 22.8%)과 ethylacetate 분획물(7.8 ~ 22.6%)은 아주 낮은 값을 나타내었다(Fig. 4).

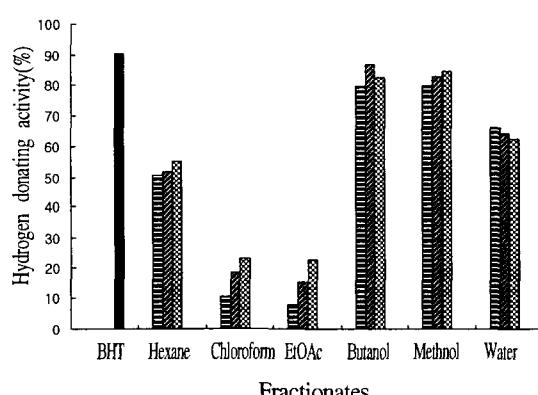


Fig. 4. Changes in hydrogen-donating activity of fractionates of traditional doenjang at room temperature during maturation period.

■ : BHT, ▨ : 1 year, ▨ : 2 year, ▨ : 3 year, BHT : Butylated hydroxy toluene.

암세포 성장억제 효과

장기 숙성시킨 전통장류의 수용성 색소의 추출물 및 methanol과 물 분획물의 암세포주 성장억제 효과를 인체 폐암 세포주(A-549) 및 인체 유방암 세포주(MCF-7)를 대상으로 조사한 결과는 Fig. 5, 6, 7과 같다. 수용성 색소 추출물(Fig. 5)은 인체 폐암세포주의 성장 억제효과에서 추출물의 농도에 비례하여 증가하였으며, 100 ppm 농도에서 2년 된장(35.1%)이 1년(10.4%)과 3년 된장(7.9%)보다 높게 나타났으나, 인체 유방암 세포주의 성장 억제 효과는 폐암 세포주와 마찬가지로 추출물의 농도에 비례하여 증가하였지만, 100 ppm 농도에서 오히려 1년 된장(32.0%)이 2년(11.6%)과 3년 된장(5.3%)보다 상당히 높게 나타났다.

Methanol 분획물(Fig. 6)은 인체 폐암세포주의 성장 억제효과에서 추출물의 농도에 비례하여 증가하였으며, 100 ppm 농도에서 2년(17.4%)과 3년 된장(16.4%)이 1년 된장(7.4%)보다 높게 나타났으나, 인체 유방암 세포주는 추출물의 농도에 비례하여 증가하였지만, 100 ppm 농도에서 오히려 3년 된장(55.2%)이 2년(17.4%)과 1년 된장(7.6%)보다 3.2 ~ 7.3배

높게 나타났다.

물 분획물(Fig. 7)은 인체 폐암세포주의 성장 억제효과에서 추출물의 저농도(1 ~ 10 ppm)에서도 높은 효과를 나타내었으며, 100 ppm 농도에서 3년 된장(59.9%), 2년(51.6%)과 1년 된장(55.1%) 순으로 나타났다. 그러나 인체 유방암 세포주의 성장 억제 효과는 폐암 세포주와 다르게 상당히 낮게 나타났으며, 100 ppm 농도에서 3년 된장(26.4%)이 2년(18.9%)과 1년 된장(11.3%)순으로 나타났다.

결론적으로 인체 폐암과 유방암 세포주의 성장억제는 수용성색소 추출물과 각 분획물의 농도에 따라 비례적으로 증가하였고, 각각 3년 된장의 물 분획물과 methanol 분획물에서 가장 높게 나타났으며, 또한 전통된장의 숙성기간이 길어질수록 암세포 성장억제효과는 높게 나타났다.

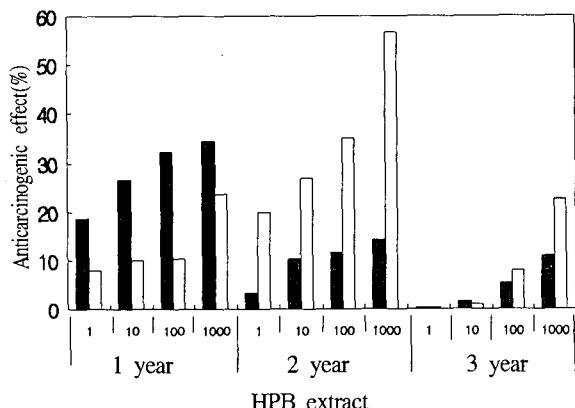


Fig. 5. Changes in anticarcinogenic effect of hydrophilic brown pigment of traditional doenjang at room temperature during maturation period.

□ : A549 (human lung cancer cell), ■ : MCF-7 (human breast cancer cell), HBP : Hydrophilic brown pigment.

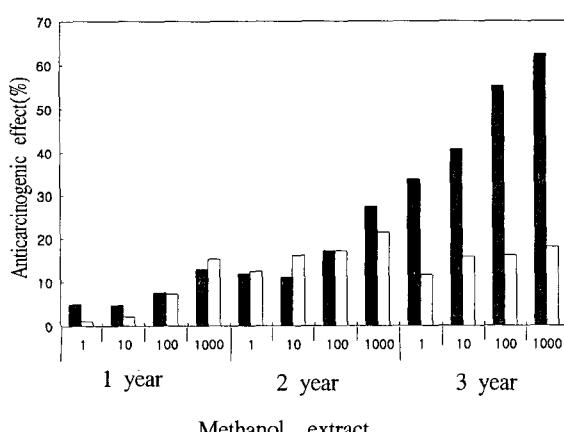


Fig. 6. Changes in anticarcinogenic effect of methanol of traditional doenjang at room temperature during maturation period.

□ : A549 (human lung cancer cell), ■ : MCF-7 (human breast cancer cell).

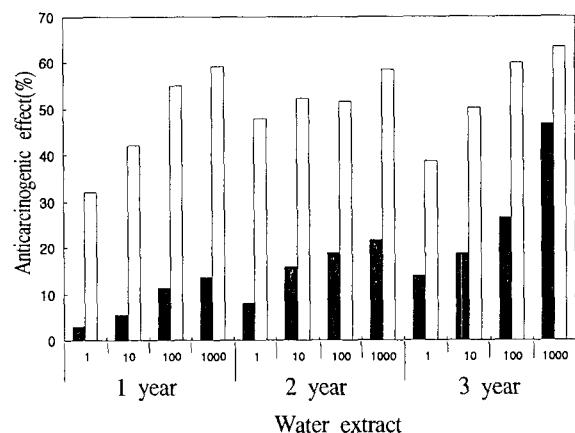


Fig. 7. Changes in anticarcinogenic effect of water of traditional doenjang at room temperature during maturation period.

□ : A549 (human lung cancer cell), ■ : MCF-7 (human breast cancer cell).

요약

장기간 자연숙성시킨 전통된장의 항산화 효과는 숙성기간이 길어질수록 대체로 감소되었으며, 숙성기간 1년 된장에서 methanol 분획물이 가장 우수하였으며, 다음으로 hexane과 물 분획물의 순이었다. 지용성 및 수용성 추출물은 숙성기간이 길어질수록 항산화 효과가 점진적으로 오히려 증가되었으나, 분획물에 비하여 낮은 수치를 나타내었다. 전통된장의 수소공여능은 수용성 색소 추출물과 methanol 및 butanol 분획물에서 대체적으로 높은 수치였으나, chloroform과 ethylacetate 분획물은 매우 낮았다. 전통된장의 항암효과에서 인체 폐암 세포주(A549)는 물 분획물에서 가장 높았고, 인체 유방암 세포주(MCF-7)는 methanol 분획물에서 가장 높은 수치를 나타내었으며, 특히 전통된장의 숙성기간이 길어질수록 암세포 성장억제효과는 높게 나타났다.

감사의 글

본 연구는 농림부 농림기술개발사업의 지원에 의해 이루어진 것으로 이에 감사를 드립니다.

참고문헌

- Park, K.Y., Moon, S.H., Baik, H.S. and Cheigh, H.S. (1990) Antimutagenic effect of doenjang (Korean fermented soy

- paste) toward aflatoxin B1. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 19, 158-162
2. 박건영 (1997) 한국전통발효식품(된장, 김치)의 발암안전성, 항돌연변이 및 항암기능성. *식품과학과 산업*, 30, 89-102
3. Cui, C.B., Lee, E.Y., Lee, D.S. and Ham, S.S. (2002) Antimutagenic and anticancer effects of ethanol extract from Korean traditional doenjang added sea tangle. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 31, 322-328
4. Chung, N.H. (2001) Studies on inhibitory effect of human breast cancer cells and protection against endocrine disruptors of fermented soy extracts. M.S. Thesis, The Catholic University of Korea, Seoul
5. Lee, S.J. (2002) Studies on the enhancement of cancer preventive effects of doenjang. Pusan National University Ph.D. Thesis
6. Kim, S.H. (1998) New trends of studying on potential activities of doenjang - fibrinolytic activity. *Korea Soybean Digest*, 15, 8-15
7. Lee, S.K., Hur, S., Ju, H.K. and Song, K.B. (1999) The study on isolation of fibrinolytic bacteria from soybean paste. *J. Korean Agri. Chem. Soc.*, 42, 6-11
8. 이봉기, 장윤수, 이숙이, 정건섭, 최신양 (1997) 식품과 면역증진효과-된장의 면역조절 기능과 그 작용기전-. 한국식품영양과학회 추계학술대회, Poster Session SL 5,
9. Lee, B.K., Jang, Y.S., Yi, Y.S., Chung, K.S. and Choi, S.Y. (1997) Immunomodulators extracted from Korean-style fermented soybean paste and their function. 1. Isolation of B cell mitogen from Korean-style fermented soybean paste. *Korean J. Immunol.*, 19, 559-569
10. Suh, H.J., Suh, D.B., Chung, S.H., Whang, J.H., Sung, H.J. and Yang, H.C. (1994) Purification of ACE inhibitor from soybean paste. *J. Korean Agri. Chem. Soc.*, 37, 441-446
11. Hwang, J.H. (1997) Angiotensin I converting enzyme inhibitory effect of doenjang fermented by *B. subtilis* SCB-3 isolated from meju, Korean traditional food. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 26, 775-783
12. Yang, B.K., Jeong, S.C., Hur, N.J., Ha, S.O., Kim, K.Y., Kym, K.H., Yun, J.W. and Song, C.H. (2000) Hypoglycemic effects of extracts of soybean paste containing mycelia of mushrooms in streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J. Mycol.*, 28, 126-129
13. Yang, B.K., Park, J.B., Ha, S.O., Kim, K.Y., Kym, K.H., Park, K.Y., Yun, J.W. and Song, C.H. (2000) Hypolipidemic effect of extracts of soybean paste containing mycelia of mushrooms in hyperlipidemic rats. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 28, 228-232
14. Choe, G.S., Lim, S.Y. and Choi, J.S. (1998) Antioxidant and nitrite scavenging effect of soybean, meju and doenjang. *Korean J. Life Science*, 8, 473-478
15. Kim, M.H., Im, S.S., Kim S.S., Kim, G.E. and Lee, J.H. (1994) Antioxidative materials in domestic meju and doenjang. 2. Separation of lipophilic brown pigment and their antioxidative activity. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 23, 251-260
16. Choi, U.K., Ji, W.D., Chung, H.C., Choi, D.H. and Chung, Y.G. (1997) Optimum condition for pigment production and antioxidative activity of the products by *Bacillus subtilis* DC-2. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 26, 1039-1043
17. Choi, U.K., Ji, W.D., Chung, H.C., Choi, D.H. and Chung, Y.G. (1997) Optimum condition for pigment production and antioxidative activity of the products by *Bacillus subtilis* DC-2 with response surface methodology. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 26, 620-624
18. Hayase, H. (1987) Chemistry of melanoidins. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 61, 970-973
19. Gomyo, T. and Miura, M. (1983) Melanoidin in foods. Chemical and physiological aspects. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*, 36, 331-340
20. Kwon, D.J., Kom, Y.J., Kim, H.J., Hong, S.S. and Kim, H.K. (1998) Changes of color in doenjang by different browning factors. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 30, 1000-1005
21. Hondo, S. (1989) Saccharides of miso during manufacturing (Part 2). *J. Brew. Soc. Japan*, 84, 594-599
22. Hayashi, T. and Namiki, M. (1986) Role of sugar fragmentation in an early stage browning of amino-carbonyl reaction of sugar with amino acid. *Agric. Biol. Chem.*, 50, 1965-1970
23. Barnett, T.A., Valenzuela, D., Riner, S. and Hageman, J.H. (1982) Production by *Bacillus subtilis* of brown sporulation-associated pigments. *Can. J. Microbiol.*, 29, 96-102
24. Barnett, T.A. and Hageman, J.H. (1983) Characteristics of brown pigments from *Bacillus subtilis* cultural. *Can. J. Microbiol.*, 29, 309-315
25. Clark, F.E. and Smith, N.R. (1938) Cultural requirements for the production of black pigment by *Bacilli*. *J. Bacteriol.*, 37, 277
26. Park, S.K. and Kyung, K.H. (1986) Pigment-forming bacteria in the presence of L-tyrosine and their possible role in the browning of fermented soybean products. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 18, 376-381
27. Himenokunio, M., Kodegen, K. and Hubetadaba, L. (1973) Browning and reducing material of the grain for processing

- miso. The science and technique of miso, 277, 28-34
28. Kim, B.H. (2003) Anticancer activities of cytotoxic substances isolated from *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. Sunchon National University, MS. Thesis
29. Bois, M.S. (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*, 26, 1199-1204
30. AOAC (1980) Official Method of Analysis. 14th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C., p.233
31. Rubinstein L.V., Paull, K.D., Shoemaker, R.H., Simmon, R.M., Skehan, P. and Boyd, M.R. (1990) Correlation of screening data generated with a tetrazolium assay(MTT) versus a protein assay(SRB) against a broad panel of human tumor cell lines. Proceedings of the American Association for Cancer Research, 30, 2418-2423
32. Skennan, P., Storeng, S., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J.T., Bokesch, H., Keney, S. and Boyd, M.R. (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Institute*, 82, 1107-1112
33. Promega protocol (2001) Cell titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, USA
34. Bae, E.A. and Moon, G.S. (1997) A study on the antioxidative of Korean soybeans. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 26, 203-208
35. Lee, J.S. and Cheigh, H.S. (1997) Antioxidative characteristics of isolated crude phenolics from soybean fermented foods(doenjang). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 26, 374-382
36. Rhee, S.H., Kim, S.K. and Cheigh, H.S. (1983) Studies on the lipids in Korean soybean fermented foods. *Korean J. Food Sci. Tehnol.*, 15, 399-403

(접수 2004년 10월 8일, 채택 2004년 11월 25일)